

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

YDIA MARIELE VALADARES

***Remijia ferruginea* D.C., *Jacaranda caroba* D.C. e
Solanum paniculatum L: fitoquímica, atividades
biológicas e síntese de derivados dos ácidos
ursólico e oleanólico.**

Belo Horizonte -MG

2009

YDIA MARIELE VALADARES

***Remijia ferruginea* D.C., *Jacaranda caroba* D.C. e
Solanum paniculatum L: fitoquímica, atividades
biológicas e síntese de derivados dos ácidos
ursólico e oleanólico.**

Tese, como requisito parcial, para obter o grau de doutor em Ciências Farmacêuticas, submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais.

Orientador: Prof. Dr. Fernão Castro Braga - UFMG

Co-orientadores: Profa. Dra. Alaíde Braga de Oliveira – UFMG

Prof. Dr. Jose Maria Miguel Santana Del Corral - USAL, ES.

Belo Horizonte - MG

2009

Dedico este trabalho às pessoas mais importantes e especiais da minha vida:

À minha mãe, Ana, meu exemplo de fortaleza, espiritualidade e bondade em uma só pessoa. Sem suas palavras de sabedoria eu não teria chegado até aqui. Por isso, o mérito de tudo que eu conquistei e vier a conquistar talvez seja muito mais dela do que meu, em função de tudo que passou e renunciou para oferecer às filhas algo essencial: a educação. Assim, serei eternamente grata pela sua existência.

Ao meu pai Walter, pela herança de disciplina e seriedade. Os valores e princípios transmitidos por ele proporcionaram não apenas minha formação como ser humano, mas também foram e serão essenciais para a minha conduta profissional.

Ao Leo, por acreditar em mim até nos momentos em que mais fraquejei. Sem dúvida, meu maior incentivo, meu companheiro incondicional, meu apoio. Com desprendimento e coragem “largou seus projetos” e embarcou nos meus. Estou certa que foram “os anjos que te colocaram no meu caminho”, TE AMO.

AGRADECIMENTOS

A DEUS, companhia e força constantes em todos os momentos.

Ao Prof. Fernão Castro Braga pela orientação lúcida e coerente. Pelo incentivo, críticas, puxões de orelha que colaboraram para o meu amadurecimento. Pelas inúmeras discussões, sempre valiosas. Pela confiança em mim depositada. Por mostrar-me a necessidade de paciência, e, ao mesmo tempo, a seriedade do que é fazer um doutorado. Pela amizade além dos limites do laboratório.

Ao Prof. José Maria Miguel Santana Del Corral pelo carinho, dedicação e incansável paciência. Com sua simpatia, seu jeitinho meigo e imensa sabedoria me estimulou e me guiou no mundo da química orgânica. Pelo aconchego e segurança encontrados em cada conversa e, sobretudo pela inestimável amizade.

Ao Prof. Pablo Anselmo Garcia, pelo carinho, atenção e disponibilidade. Pela amizade que foi muito além das fronteiras do laboratório de Química Farmacêutica da USAL. Mais do que me orientar no desenvolvimento das sínteses, me ha enseñado mucho sobre España y la tradición Salmantina.

Aos Profs. Maria Angeles Castro Gonzalez e Arturo San Feliciano, pela atenção e por me receberem com tanto carinho.

Ao “Peixe” ><> (Prof. José Dias de Sousa Filho) pela obtenção dos inúmeros espectros de ressonância magnética nuclear e pela paciência a mim sempre dedicada. Valeu!

À Profa. Leida Maria Botion pelo grande auxílio na execução dos experimentos biológicos.

A todos os professores, funcionários e alunos do laboratório de Química Farmacêutica da Universidade de Salamanca, pela amizade desenvolvida durante o estágio sanduíche e pelas conversas otimistas e revigorantes.

Às minhas irmãs Ywia e Anna Flávia pela torcida, incentivo, descontração, risos, conversas, choros. Ao Fernandóvisk pelo carinho e pelos inúmeros momentos de deleite e criatividade gastronômica.

Ao Padre Libério, tenho certeza que seu apoio foi essencial.

Às minhas chuchucas Pitty e Kika, pela companhia e amor incondicional de sempre. Por terem me esperado com paciência todo o tempo em que ficamos afastadas e principalmente por não terem se esquecido de mim.

A todos do laboratório de Química farmacêutica da FAFAR, principalmente Dani e Marilda, pelos inúmeros favores prestados.

Às minhas grandes amigas Raquel e Carla pela disponibilidade, bom humor, pelas inúmeras conversas recheadas de papos-cabeça ou sem nenhuma utilidade aparente, mas que desanuviam muitas vezes minhas angústias. Pessoas especiais, admiráveis e amigas que guardarei para sempre.

Aos meus queridos amigos Cris, Priscila, Keller, Jussara, Suzan, Patrícia, Francisca, Claiton, Denise, Gorette, Graça, Ana Bárbara, Célio, Eliana, pelo companheirismo, amizade, cumplicidade e alegria durante todo o nosso período de convivência diária. Às ex-alunas de iniciação científica que trabalharam comigo Luciana e Bruna, pela dedicação e seriedade com que executaram cada etapa do trabalho. Aos demais amigos que passaram pelo laboratório de Fitoquímica.

A todos os familiares que, sempre perguntavam: “já acabou os estudos?” mesmo sem saber ao certo o que é um doutorado, torceram e rezaram por mim.

A todos os funcionários da FAFAR, em especial Soninha, Rose e Batista, pelo carinho e atenção.

A cidade de *“Salamanca que enhechiza a voluntad de volver a ella todos los que de la apacibilidad de su vivienda han gustado”*.

A CAPES pela bolsa concedida e pela oportunidade de realizar o estágio de doutorado sanduíche em Salamanca, Espanha.

Eu vejo a vida melhor no futuro
Eu vejo isso por cima do muro
De hipocrisia que insiste em nos rodear
Eu vejo a vida mais farta e clara
Repleta de toda a satisfação
Que se tem direito
Do firmamento ao chão
Eu quero crer no amor numa boa
E que isso valha prá qualquer pessoa
Que realizar a força que tem uma paixão
Eu vejo um novo começo de era
De gente fina, elegante e sincera
Com habilidade pra dizer mais sim do que não
Hoje o tempo voa amor
Escorre pelas mãos
Mesmo sem se sentir
E não há tempo que volte amor
Vamos viver tudo o que há prá viver
Vamos nos permitir

(Tempos Modernos - Lulu Santos)

RESUMO

Jacaranda caroba D.C. (Bignoniaceae), *Remijia ferruginea* D.C. (Rubiaceae) e *Solanum paniculatum* L. (Solanaceae) são espécies vegetais empregadas popularmente como tônico e amargo, entre outros usos. Os objetivos do presente trabalho foram isolar e identificar os constituintes micromoleculares majoritários dessas espécies, avaliar suas atividades biológicas relacionadas ao uso tradicional e realizar transformações químicas em triterpenos obtidos das espécies. O triterpeno ácido ursólico foi isolado como constituinte comum aos extratos etanólicos de *J. caroba* (partes aéreas) e *R. ferruginea* (galhos), além de β -sitosterol. Ácido oleanólico foi obtido da primeira espécie e estigmasterol da segunda, sendo a ocorrência desses metabólitos inédita em ambas. O fracionamento do extrato etanólico de folhas de *S. paniculatum* resultou na obtenção da saponina espirostânica inédita 3-O- β -D-glicopiranosídeo $\Delta^{25(27)}$ -tigogenina (**1**), identificada por métodos espectroscópicos usuais como uma mistura epimérica em C-22, além da sapogenina neotigogenina, e de uma mistura de β -sitosterol e estigmasterol. A administração individual dos extratos vegetais na dose de 1,0 mg/Kg de peso corpóreo a ratos tratados com dieta hiperlipídica induziu aumento nos níveis de triglicérides plasmáticos, em comparação ao grupo controle ($p < 0,05$). Observou-se, também, incremento na atividade enzimática da lipase lipoprotéica quando da administração dos extratos na dose de 0,1 mg/Kg de peso corpóreo, em relação ao grupo controle ($p < 0,05$). Esses dados sugerem o potencial das espécies no tratamento de dispepsias. *S. paniculatum* é também utilizada tradicionalmente para tratar infecções virais, incluindo herpes. O extrato etanólico de folhas da espécie apresentou atividade antiviral *in vitro* frente aos vírus da herpes humana tipo 1 ($EC_{50} = 428,9 \pm 19,2 \mu\text{g/ml}$) e encefalomiocardite murina ($EC_{50} = 298,0 \pm 11,2 \mu\text{g/ml}$). A saponina (**1**) exibiu significativa atividade antiherpética ($EC_{50} = 170,8 \pm 1,7 \mu\text{g/ml}$) e anti-vaccinia linhagem Western Reserve ($EC_{50} = 177,0 \pm 3,3 \mu\text{g/ml}$), além de baixa citotoxicidade ($CC_{50} > 400 \mu\text{g/ml}$). Os ácidos ursólico e oleanólico, isolados em grandes quantidades de *J. caroba*, foram submetidos a transformações químicas nas posições C-3, C-11 e C-28. Foram obtidos 5 derivados do ácido oleanólico e 21 derivados do ácido ursólico, sendo 6 inéditos. A atividade citotóxica de alguns derivados do ácido ursólico foi avaliada *in vitro* frente às linhagens celulares tumorais de mama MDA-MB-231, cólon HT29 e pulmão A549. Um derivado hidroxilado em C-3 e C-28 foi cerca de nove vezes mais potente que o ácido ursólico. A atividade antiplasmódica de alguns dos produtos sintetizados a partir do ácido ursólico foi avaliada *in vitro* frente ao *Plasmodium falciparum*, e somente um derivado contendo grupo ceto em C-3 foi parcialmente ativo ($CI_{50} 42 \mu\text{g/mL}$).

Palavras-chave: *Jacaranda caroba*, *Remijia ferruginea*, *Solanum paniculatum*, ácido ursólico, ácido oleanólico, derivados sintéticos, atividade anti-tumoral, 3-O- β -D-glicopiranosídeo $\Delta^{25(27)}$ -tigogenina, atividade anti-viral.

ABSTRACT

Jacaranda caroba D.C. (Bignoniaceae), *Remijia ferruginea* D.C. (Rubiaceae) and *Solanum paniculatum* L. (Solanaceae) are plant species traditionally employed as tonic and bitter, among other uses. The main goals of the present study were to isolate and identify the major micromolecular compounds of these species, to evaluate their biological activities related to the traditional uses and to undertake chemical transformations on triterpenes obtained from the species. Ursolic acid was isolated from the ethanol extracts of *J. caroba* aerial parts and *R. ferruginea* stems, along with β -sitosterol, whereas oleanolic acid was obtained from the first and stigmasterol from the second species, being their occurrence in both here described for the first time. The fractionation of the ethanol from *S. paniculatum* leaves resulted in the new spirostanic saponin $\Delta^{25(27)}$ -tigogenin-3-O- β -D-glucopyranoside (**1**), identified by spectrometric data as an epimeric mixture at C-22, along with neotigogenin and a mixture of β -sitosterol and stigmasterol. The administration of each extract at the dose of 1.0 mg/kg body weight to rats fed with high-fat diet increased the plasmatic triglycerides in comparison to the control group ($p < 0.05$). Extracts administration at the doses of 0.1 mg/kg body weight increased the lipoprotein lipase activity, as compared to the control group ($p < 0.05$). These results suggest the potential of the species for treating dyspepsia. *S. paniculatum* is also traditionally used for treating viral infections, including herpes. The ethanol extract from its leaves exhibited *in vitro* antiviral activity against Human Herpes Virus type 1 ($EC_{50} = 428.9 \pm 19.2 \mu\text{g/mL}$) and murine *Encephalomyocarditis Virus* ($EC_{50} = 298.0 \pm 11.2 \mu\text{g/mL}$). The saponin **1** presented significant antiherpes ($EC_{50} = 170.8 \pm 1.7 \mu\text{g/mL}$) and anti-vaccinia virus effects ($EC_{50} = 177.0 \pm 3.3 \mu\text{g/mL}$), with low cytotoxicity ($CC_{50} > 400 \mu\text{g/mL}$). Ursolic and oleanolic acids, obtained in bulk amounts from *J. caroba* aerial parts, were submitted to chemical transformations at C-3, C-11 and C-28 positions, resulting in 5 oleanolic derivatives and 21 ursolic derivatives, among them 6 new compounds. The cytotoxic activity of some selected ursolic derivatives was evaluated *in vitro* against tumor cell lines of breast MDA-MB-231, colon HT29 and lung A549. A derivative containing hydroxyl groups at C-3 and C-28 was about nine-fold more potent than the parent compound ursolic acid. Some selected ursolic derivatives were assayed *in vitro* against *Plasmodium falciparum* and only a compound containing a keto group at C-3 was partially active ($IC_{50} 42 \mu\text{g/mL}$).

Key-words: *Jacaranda caroba*, *Remijia ferruginea*, *Solanum paniculatum*, ursolic acid, oleanolic acid, chemical transformations, anti-tumor activity, $\Delta^{25(27)}$ -tigogenin 3-O- β -D- glucopyranoside, antiviral activity.

LISTA DE FIGURAS

1	<i>Remijia ferruginea</i>	31
2	<i>Solanum paniculatum</i>	33
3	<i>Jacaranda caroba</i>	38
4	Fracionamento cromatográfico do extrato etanólico bruto de partes aéreas de <i>Jacaranda caroba</i>	51
5	Fracionamento cromatográfico do extrato etanólico bruto de caules e cascas de <i>Remijia ferruginea</i>	57
6	Fracionamento cromatográfico do extrato etanólico bruto de folhas de <i>Solanum paniculatum</i>	63
7	Fracionamento do extrato bruto de <i>Solanum paniculatum</i> visando a obtenção de fração alcaloídica.....	64
8	Perfis cromatográficos obtidos por RP-HPLC para o extrato (A) e frações FHX (B), FDCM/EtOAC (C) de <i>Jacaranda caroba</i> , bem como para os sólidos isolados Jc2 (D) e Jc3 (E).....	72
9	Perfis cromatográficos obtidos por RP-HPLC para o extrato (A) e frações FDCM (B) e FDCM/EtOAC (C) de <i>Remijia ferruginea</i> , bem como para os sólidos isolados Rf1 (D) e Rf2 (E).....	73
10	Perfis cromatográficos obtidos por RP-HPLC para o extrato (A) e frações FHX (B) e FDCM (C) de S, paniculatum, bem como para o sólido isolado Sp2 (D).....	74
11	Estruturas parciais de triterpenos das séries olean-12-enos (a) e urs-12-enos (b).....	78
12	Espectro de RMN de ¹³ C obtido para Jc2 (100 MHz, CDCl ₃ + CDOD ₃).....	79
13	Subespectro DEPT-135 obtido para Jc2 (100 MHz, CDCl ₃ + CDOD ₃).....	81
14	Espectro de RMN de ¹ H obtido para Jc2 (400 MHz, CDCl ₃).....	81
15	Seção expandida do mapa de contornos HMQC obtido para Jc2 (400 MHz, CDCl ₃ + CDOD ₃).....	83
16	Espectro de RMN de ¹³ C obtido para Jc3 (50 MHz, CDCl ₃).....	84
17	Subespectro DEPT-135 obtido para Jc3 (50 MHz, CDCl ₃).....	85
18	Espectro de RMN de ¹ H obtido para Jc3 (200 MHz, CDCl ₃).....	87
19	Espectro de RMN de ¹³ C obtido para Rf3 (100 MHz, CDCl ₃).....	91
20	Subespectro DEPT-135 obtido para Rf3 (100 MHz, CDCl ₃).....	91
21	Espectro de RMN de ¹ H obtido para Rf3 (400 MHz, CDCl ₃).....	93
22	Espectro de RMN de ¹³ C obtido para Sp2 (50 MHz, CDCl ₃).....	99
23	Subespectro DEPT-135 obtido para Sp2 (50 MHz, CDCl ₃).....	99
24	Espectro de RMN de ¹ H obtido para Sp2 (200 MHz, CDCl ₃).....	100
25	Seção expandida do mapa de contornos COSY obtido para Sp2 (200 MHz, CDCl ₃)...	101
26	Seção expandida do mapa de contornos HMQC obtido para Sp2 (200 MHz, CDCl ₃)..	103
27	Hidrólise ácida de $\Delta^{25(27)}$ -tigogenina 3-O- β -D-glicopiranosídeo e conseqüente formação da mistura de isômeros R e S.....	109
28	Espectro de RMN de ¹³ C e DEPT-135 obtidos para Sp3 (100 MHz, CDCl ₃).....	110
29	Espectro de RMN de ¹ H obtido para Sp3 (400 MHz, CDCl ₃).....	110
30	Mapa de contornos COSY obtido para Sp3 (400 MHz, CDCl ₃).....	111
31	Mapa de contornos NOESY obtido para Sp3 (400 MHz, CDCl ₃).....	111

32	Espectro de massas de alta resolução e seção expandida do mapa de contornos HSQC-TOCSY obtidos para Sp3 (100 MHz, CDCl ₃).....	112
33	Seções expandidas do espectro de HSQC obtido para Sp3 (100 MHz, CDCl ₃).....	113
34	Concentração de triglicérides (mmol/mL) determinada no experimento com alças intestinais evertidas para o grupo controle (G1) e grupos tratados com volumes crescentes do fitoterápico (G2, 1 µL; G3, 3 µL; G4, 10 µL; G5 30 µL; G6, 100 µL).....	118
35	Efeito dos extratos avaliados no nível de TAG plasmático e na atividade da LPL. Extratos: E1, <i>Remijia ferruginea</i> ; E2, <i>Solanum paniculatum</i> ; E3, <i>Jacaranda caroba</i> ; C, grupo controle.....	122
36	Esquema de síntese proposto para obtenção de derivados do ácido ursólico.....	135
37	Esquema de síntese proposto para obtenção de derivados do ácido ursólico.....	136
38	Esquema de síntese proposto para obtenção de derivados do ácido oleanólico.....	137
39	Esquema de síntese para a obtenção dos derivados do ácido ursólico.....	180
40	Mecanismo proposto para a formação de 79.....	183
41	Mapa de contornos HMQC obtido para 80 (100 MHz, CDCl ₃).....	185
42	Mapa de contorno HMBC obtido para 80 (100 MHz, CDCl ₃).....	186
43	Mecanismo proposto para a redução de 79 com LiAlH ₄ , segundo Carey e Sunberg...	188
44	Espectro de RMN de ¹ H obtido para o derivado 81 (200 MHz, CDCl ₃).....	189
45	Mecanismo proposto para a isomerização do álcool alílico 81.....	190
46	Espectro de RMN de ¹ H obtido para 102 (400 MHz, CDCl ₃).....	191
47	Espectro de RMN de ¹³ C obtido para 102 (100 MHz, CDCl ₃).....	191
48	Mapa de contorno COSY obtido para 102 (100 MHz, CDCl ₃).....	192
49	Mapa de contornos HMQC obtido para 102 (100 MHz, CDCl ₃).....	193
50	Proposta de mecanismo de formação de 85.....	194
51	Mapa de contornos HMQC obtido para 85 (100 MHz, CDCl ₃).....	196
52	Mapa de contorno COSY obtido para 85 (400 MHz, CDCl ₃).....	198
53	Mapa de contornos HMQC obtido para 85 (100 MHz, CDCl ₃).....	199
54	Mapa de contornos HMBC obtido para 85 (100 MHz, CDCl ₃).....	200
55	Proposta de mecanismo para a formação do produto de rearranjo 83.....	202
56	Seção expandida do mapa de contornos HMQC de 83 (400 MHz, CDCl ₃).....	207
57	Seção expandida do mapa de contornos HMBC de 83 (400 MHz, CDCl ₃).....	208
58	Seção expandida do mapa de contornos HMBC de 83 (400 MHz, CDCl ₃).....	209
59	Mapa de contorno COSY obtido para 83 (400 MHz, CDCl ₃).....	210
60	Proposta de mecanismo para a formação de 84.....	210
61	Mapa de contorno COSY obtido para 84 (400 MHz, CDCl ₃).....	214
62	Mapa de contornos HMQC obtido para 84 (400 MHz, CDCl ₃).....	215
63	Mapa de contornos HMBC obtido para 84 (400 MHz, CDCl ₃).....	216
64	Seção expandida do mapa de contornos HMBC de 84 (400 MHz, CDCl ₃).....	217
65	Esquema de síntese para a obtenção dos derivados 90, 91, 92, 93, 94, 95 e 96.....	219

66	Esquema de síntese para obtenção do derivado 89.....	221
67	Proposta de mecanismo para a formação de 90, segundo Carey e Sundberg	222
68	Proposta de mecanismo para a formação de 91 segundo Carey e Sundberg	223
69	Mapa de contorno COSY obtido para 94 (400 MHz, CDCl ₃).....	229
70	Mapa de contornos HMQC obtido para 94 (100 MHz, CDCl ₃).....	230
71	Mecanismo proposto para a formação da lactona 95, segundo Carey e Sundberg.....	231
72	Mapa de contornos HMQC obtido para 95 (100 MHz, CDCl ₃).....	232
73	Esquema de síntese de derivados do ácido oleanólico.....	236

LISTA DE TABELAS

1	Sistema de eluição empregado para obtenção de perfis cromatográficos por RP-HPLC.....	47
2	Fracionamento preliminar do extrato etanólico de <i>Jacaranda caroba</i> por filtração em sílica gel.....	48
3	Fracionamento de FHX (C1), em coluna de sílica gel.....	49
4	Fracionamento de FDCM:EtOAc (C2), em coluna de sílica gel.....	50
5	Fracionamento preliminar do extrato etanólico de <i>Remijia ferruginea</i> em coluna de sílica gel.....	52
6	Fracionamento de FDCM/EtOAc (C1), em coluna de sílica gel.....	53
7	Fracionamento de F 209-234 (C2), em coluna de sílica gel.....	54
8	Fracionamento de FDCM (C3), por cromatografia em coluna de sílica gel.....	54
9	Fracionamento de F 6-46 (C4), em coluna de sílica gel.....	55
10	Fracionamento de F 7-18 (C5), em coluna de sílica gel.....	56
11	Fracionamento preliminar do extrato etanólico bruto de folhas de <i>Solanum paniculatum</i> por filtração em sílica gel.....	58
12	Fracionamento de FHX (C1), em coluna de sílica gel.....	59
13	Fracionamento de F281-362 (C2), em coluna de sílica gel.....	59
14	Fracionamento de FDCM (C3), em coluna de sílica gel.....	60
15	Fracionamento de F42-102 (C4), em coluna de sílica gel.....	60
16	Fracionamento do resíduo da fase DCM (C6) em coluna de sílica gel.....	61
17	Fracionamento de F F182-194 (C7) em coluna de sílica gel.....	62
18	Atribuição dos sinais do espectro de RMN de ¹³ C obtido para Jc1 (50 MHz, CDCl ₃) e comparação com dados da literatura para o β-sitosterol.....	76
19	Deslocamentos químicos e constantes de acoplamento escalar (J) de alguns sinais do espectro de RMN de ¹ H obtido para Jc1.....	76
20	Atribuições dos sinais do espectro de RMN de ¹³ C obtido para Jc2 (100 MHz, CDCl ₃ + CDOD ₃) e comparação com dados da literatura para o ácido ursólico.....	80
21	Atribuição de alguns sinais do espectro de RMN de ¹ H para Jc2 (400 MHz, CDCl ₃ + CDOD ₃).....	82
22	Correlações heteronucleares (¹ H- ¹³ C) observadas no mapa de contorno HMQC obtido para Jc2.....	82
23	Atribuição dos sinais do espectro de RMN de ¹³ C obtido para Jc3 (100 MHz, CDCl ₃) e dados da literatura para o ácido ursólico.....	86
24	Atribuição dos sinais do espectro de RMN de ¹³ C obtido para Rf3 (100 MHz, CDCl ₃) e dados da literatura para β-sitosterol e estigmasterol.....	92
25	Atribuição dos sinais do espectro de RMN de ¹ H obtido para Rf1 (400 MHz, CDCl ₃) e dados da literatura para β-sitosterol e estigmasterol.....	94
26	Posições e vibrações das bandas de Sp2 no espectro no IV.....	95
27	Atribuição dos sinais do espectro de RMN de ¹³ C obtido para Sp2 (50 MHz, CDCl ₃) e dados da literatura para as sapogeninas das séries 25R (tigogenina) e 25S (neotigogenina).....	98
28	Atribuição de alguns sinais do espectro de RMN de ¹ H obtido para Sp2 (200 MHz, CDCl ₃) e dados da literatura para neotigogenina.....	101
29	Correlações heteronucleares (¹ H - ¹³ C) observadas no mapa de contorno HMQC obtido para Sp2.....	102
30	Posições e vibrações das bandas de Sp3 no espectro no IV.....	104
31	Atribuição dos sinais do espectro de RMN de ¹³ C obtido para Sp3 (100 MHz, CDCl ₃) e dados da literatura para a Δ ²⁵⁽²⁷⁾ -tigogenina.....	106
32	Correlações do espectro HSQC-TOCSY obtido para Sp3.....	107
33	Correlações heteronucleares (¹ H - ¹³ C) observadas no mapa de contorno HSQC obtido para Sp3.....	108
34	Citotoxicidade (CC ₅₀) e atividade antiviral (CI ₅₀) in vitro do extrato bruto e substâncias isoladas de <i>S. paniculatum</i>	116

35	Concentrações de triglicérides absorvidos (mmol/mL) em alças intestinais evertidas, determinadas para o grupo controle (G1) e para os grupos tratados com o fitoterápico (G2, G3, G4, G5 e G6).....	118
36	Condições avaliadas no tratamento de 81 com $\text{BF}_3\text{-Et}_2\text{O}$ (0,19 mmol).....	148
37	Condições avaliadas no tratamento de 81 (0,11 mmol) com HI 57%.....	151
38	Condições avaliadas na oxidação do produto 90 (42 mg; 0,09 mmol) com SeO_2	158
39	Condições avaliadas nas tentativas de oxidação de 90 com t-BuOOH/ SeO_2	159
40	Condições avaliadas na oxidação de 90 com NaClO_2 /t-BuOOH.....	160
41	Condições avaliadas na oxidação de 90 com MCPBA, catalisada por 5,10,15,20-tetrakis(pentafluorofenil) porfirina.....	168
42	Condições avaliadas no tratamento de 81 com $\text{BF}_3\text{-Et}_2\text{O}$ (0,19 mmol) visando obter o produto de rearranjo 83	203
43	Correlações de HMBC obtidas para 83 (400 MHz, CDCl_3).....	204
44	Atribuição dos sinais do espectro de RMN de ^1H obtidos para 83 (400 MHz, CDCl_3).....	205
45	Atribuição dos sinais do espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) obtidos para 83....	206
46	Atribuição do espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) obtido para 84.....	212
47	Atribuição do espectro de RMN de ^{13}C obtido para 84 (100 MHz, CDCl_3).....	213
48	Correlações observadas no mapa de contorno HMBC obtido para 84 (400 MHz, CDCl_3).....	213
49	Atividade citotóxica do ácido ursólico e derivados frente a linhagens tumorais humanas.....	242

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

$[\alpha]_D$	Poder rotatório específico
CCD	Cromatografia em camada delgada
CI ₅₀	Concentração inibitória 50%
COSY	<i>Correlation spectroscopy</i>
d	Dupleto
DAD	Detecção por arranjo de diodos
DCM	Diclorometano
dd	Dupleto duplo
DEPT	<i>Distortionless enhancement by polarization transfer</i>
DL ₅₀	Dose letal 50%
EtOAc	Acetato de etila
EtOH	Etanol
F.M	Fórmula molecular
GuHCl	Hidrocloreto de guanidina
HAc	Ácido acético
HMBC	<i>Heteronuclear multiple bond correlation</i>
HMQC	<i>Heteronuclear multiple quantum coherence</i>
HPLC	<i>High performance liquid chromatography</i>
HRMS	<i>High resolution mass spectrometry</i>
HSQC	<i>Heteronuclear single quantum coherence</i>
HX	<i>n</i> -hexano
I.V	Infravermelho
J	Constante de acoplamento escalar
LPL	Lipase lipoprotéica
m	Multiplete
M.M	Massa molecular
M	Molar (número de moles por litro)
MCPBA	Ácido meta-cloroperbenzóico
MHz	Megahertz
MeOH	Metanol
MTT	Brometo de 3-(4,5- dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio
NOESY	<i>Nuclear overhauser enhancement spectroscopy</i>

OMS	Organização mundial de saúde
PDC	Dicromato de piridínio
Rf	Fator de retenção
RMN	Ressonância magnética nuclear
RP-HPLC	<i>Reverse fase high performance liquid chromatography</i>
s	Simpleto
SRB	Sulforodamina B
t	Tripleto
TAG	Triglicérides
TGF- β	Fator de crescimento transformador-beta
THF	Tetraidrofurano
TOCSY	<i>Total Correlation Spectroscopy</i>
TMS	Tetrametilsilano
TR	Tempo de retenção
U.V	Ultravioleta

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE TABELAS

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

RESUMO

ABSTRACT

1 INTRODUÇÃO 19

PARTE 1

2 OBJETIVOS 22

2.1 Objetivo Geral 22

2.2 Objetivos Específicos 22

3 REVISÃO DA LITERATURA..... 23

3.1 Metabolismo lipídico 23

3.2 Produtos fitoterápicos empregados no tratamento de distúrbios digestivos 24

3.3 *Remijia ferruginea*: usos populares, composição química e atividades biológicas 29

3.4 *Solanum paniculatum*: usos populares, composição química e atividades biológicas 32

3.5 *Jacaranda caroba*: usos populares, composição química e atividades biológicas 37

4 MATERIAIS E MÉTODOS..... 43

4.1 Equipamentos 43

4.2 Reagentes e Materiais 44

4.3 Coleta e identificação do material vegetal 46

4.4 Preparo dos extratos 46

4.5 Análises por cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa (RP-HPLC) 47

4.5.1 Preparo das amostras 47

4.5.2 Condições Cromatográficas 47

4.6 Estudo fitoquímico 47

4.6.1 *Jacaranda caroba* 48

4.6.1.1	<i>Fracionamento preliminar do extrato bruto</i>	48
4.6.1.2	<i>Fracionamento de FHX (coluna 1 - C1)</i>	49
4.6.1.3	<i>Fracionamento de FDCM:EtOAc (coluna 2 – C2)</i>	49
4.6.2	<i>Remijia ferruginea</i>	52
4.6.2.1	<i>Fracionamento preliminar do extrato bruto</i>	52
4.6.2.2	<i>Fracionamento de FDCM/EtOAc (coluna 1 - C1)</i>	53
4.6.2.3	<i>Fracionamento de F209-324 (coluna 2 – C2)</i>	53
4.6.2.4	<i>Fracionamento de FDCM (coluna 3 – C3)</i>	54
4.6.2.5	<i>Fracionamento de F6-46 (coluna 4 – C4)</i>	55
4.6.2.6	<i>Fracionamento de F7-18 e precipitado de FDCM (coluna 5 - C5)</i>	55
4.6.3	<i>Solanum paniculatum</i>	58
4.6.3.1	<i>Fracionamento preliminar do extrato bruto</i>	58
4.6.3.2	<i>Fracionamento de FHX (coluna 1 – C1)</i>	58
4.6.3.3	<i>Fracionamento de F281-362 (coluna 2 – C2)</i>	59
4.6.3.4	<i>Fracionamento de FDCM (coluna 3 – C3)</i>	60
4.6.3.5	<i>Fracionamento de F42-102 (coluna 4 – C4)</i>	61
4.6.3.6	<i>Marcha para obtenção de alcalóides e fracionamento de FDCM</i>	61
4.6.3.7	<i>Fracionamento de F182-194 (coluna 6 – C6)</i>	62
4.7	Ensaio biológicos.....	65
4.7.1	Ensaio <i>in vitro</i> de atividade antiviral	65
4.7.1.1	<i>Avaliação da citotoxicidade</i>	65
4.7.1.2	<i>Avaliação da atividade antiviral</i>	65
4.7.1.3	<i>Análise dos dados</i>	66
4.7.2	Ensaio <i>ex vivo</i> de absorção de lipídeos	66
4.7.2.1	<i>Preparo das soluções</i>	66
4.7.2.2	<i>Protocolo experimental</i>	67
4.7.3	Análises estatísticas.....	69
4.7.4	Ensaio <i>in vivo</i> de absorção de lipídeos	69
4.7.4.1	<i>Protocolo experimental</i>	69
4.7.5	Medida da atividade da lipase lipoprotéica	70
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	71
5.1	Análises por cromatografia líquida de alta eficiência (RP-HPLC).....	71
5.1.1	<i>Jacaranda caroba</i>	71

5.1.2	<i>Remijia ferruginea</i>	72
5.1.3	<i>Solanum paniculatum</i>	73
5.2	Elucidação estrutural das substâncias isoladas	74
5.2.1	Elucidação estrutural das substâncias isoladas de <i>Jacaranda caroba</i>	74
5.2.1.1	<i>Jc1</i>	74
5.2.1.2	<i>Jc2</i>	77
5.2.2	<i>Jc3</i>	83
5.2.2.1	<i>Jc4</i>	87
5.2.3	Discussão sobre a composição micromolecular de <i>J. caroba</i>	88
5.2.4	Elucidação estrutural das substâncias isoladas de <i>Remijia ferruginea</i>	89
5.2.4.1	<i>Rf1</i>	89
5.2.4.2	<i>Rf2</i>	90
5.2.4.3	<i>Rf3</i>	90
5.2.5	Discussão sobre a composição química micromolecular de <i>Remijia ferruginea</i>	94
5.2.6	Elucidação estrutural das substâncias isoladas de <i>Solanum paniculatum</i>	94
5.2.6.1	<i>Sp1</i>	94
5.2.6.2	<i>Sp2</i>	95
5.2.6.3	<i>Sp3</i>	104
5.2.7	Discussão sobre a composição química de <i>S. paniculatum</i>	114
5.3	Ensaio biológicos.....	115
5.3.1	Ensaio <i>in vitro</i> de atividade antiviral	115
5.3.2	Ensaio <i>ex vivo</i> de absorção de lipídeos	117
5.3.3	Ensaio <i>in vivo</i> de absorção de lipídeos	119
6	CONCLUSÕES	123
 PARTE 2		
7	REVISÃO DA LITERATURA	125
7.1	Transformações químicas dos ácidos ursólico e oleanólico.....	127
8	OBJETIVOS	134
8.1	A proposta do trabalho	134

9	MATERIAIS E MÉTODOS.....	138
9.1	Procedimentos gerais.....	138
9.2	Transformações químicas do ácido ursólico	139
9.2.1	Síntese do 3 β -hidróxi-urs-12-en-28-oato de metila (77).....	139
9.2.2	Síntese do 3 β -acetóxi-urs-12-en-28-oato de metila (78).....	140
9.2.3	Síntese do 3 β -acetóxi-11-oxo-urs-12-en-28-oato de metila (79) e do 3 β -acetóxi-urs-9,12-dien-28-oato de metila (80)	141
9.2.4	Síntese do 3 β ,11,28-triidróxi-urs-12-eno (81)	143
9.2.5	Síntese do 3 β ,28-diacetóxi-urs-11,13(18)-dieno (85).....	144
9.2.6	Síntese do 3 β ,11,28 β -triacetoxi-urs-12-eno (82).....	145
9.2.7	Síntese do 3 β -hidróxi-urs-12-en-28-al (83) e do 3 β -hidróxi-urs-11-en-28,13 β -eter (84)	147
9.2.8	Tentativas de epoxidação de 81	149
9.2.9	Tentativas de isomerização de 57 com HI	150
9.2.10	Síntese do 3 β ,28-diidroxi-urs-12-eno (86).....	151
9.2.11	Síntese do ácido 3 β -acetóxi-urs-12-en-28-óico (87)	152
9.2.12	Tentativas de oxidação de 87 com MCPBA catalisada por 5,10,15,20-tetrakis(pentaflorofenil) porfirina.....	153
9.2.13	Síntese do ácido 3 β -acetóxi-11-oxo-urs-12-en-28-óico (88)	153
9.2.14	Síntese de 3 β -acetóxi-urs-12-en-28,13 β -lactona (89).....	154
9.2.15	Síntese do 3-oxo-urs-12-en-28-oato de metila (90)	155
9.2.16	Síntese do 3-hidroxi-oxima-urs-12-en-28-oato de metila (91) ..	156
9.2.17	Tratamento de 77 com HI 57%	157
9.2.18	Tentativa de oxidação de 90 com SeO ₂	158
9.2.19	Tentativa de oxidação de 90 com t-BuOOH/SeO ₂	158
9.2.20	Síntese do 3,11-dioxo-urs-12-en-28-oato de metila (92).....	159
9.2.21	Tentativa de oxidação de 78 com SeO ₂ /AcOH	160
9.2.22	Tentativa de oxidação de 90 com SeO ₂ /AcOH	161
9.2.23	Tentativa de rearranjo de 90 com BF ₃ -Et ₂ O.....	161
9.2.24	Tentativas de redução de 92.....	162
9.2.24.1	<i>Redução de 92 com NaBH₄/CeCl₃.7H₂O.....</i>	<i>162</i>
9.2.24.2	<i>Redução de 92 com NaBH₄/alumina</i>	<i>163</i>
9.2.24.3	<i>Tentativa de redução de 92 com NaBH₄/GuHCl.....</i>	<i>164</i>
9.2.24.4	<i>Tentativa de redução de 92 com InCl₃/NaBH₄.....</i>	<i>164</i>
9.2.24.5	<i>Tentativa de redução de 92 com NaBH₄</i>	<i>164</i>

9.2.25	Síntese de 3 β ,28-diidroxi-urs-9,12-dieno (94) e 3 β -hidroxi-urs-11-en-28,13 β -eter (84)	165
9.2.26	Síntese do 3,4-seco-11-oxo-urs-12-en-28-oato de metila (95).	166
9.2.27	Síntese do 3-oxo,11-hidroxi-urs-12-en-28-oato de metila (96).	167
9.2.28	Tentativa de oxidação de 31 com NaClO ₂ /t-BuOOH.....	169
9.2.29	Esterificação de 88 com CH ₃ I/K ₂ CO ₃	170
9.2.30	Tentativas de epoxidação de 79 com H ₂ O ₂ /NaOH.....	170
9.2.31	Tentativas de epoxidação de 79 com MCPBA	170
9.3	Transformações químicas do ácido oleanólico.....	171
9.3.1	Síntese do 3 β -hidróxi-olean-12-en-28-oato de metila (97).....	171
9.3.2	Síntese do 3-oxo-olean-12-en-28-oato de metila (98).....	172
9.3.3	Síntese do 3-hidroxi-oxima-olean-12-en-28-oato de metila (99)	173
9.3.4	Acetilação de 99.....	174
9.3.5	Síntese do 3-acetóxi-olean-12-en-28-oato de metila (101)	175
9.4	Ensaio Biológicos	176
9.4.1	Avaliação da atividade citotóxica das substâncias obtidas a partir do ácido ursólico	176
9.4.2	Linhagens celulares empregadas	176
9.4.3	Culturas celulares	176
9.4.4	Ensaio de Citotoxicidade.....	176
9.4.5	Avaliação da atividade antiplasmódica dos derivados obtidos...	177
10	RESULTADOS E DISCUSSÃO	178
10.1	Transformações químicas do ácido ursólico	180
10.1.1	Síntese do 3 β -hidróxi-urs-12-en-28-oato de metila (77).....	180
10.1.2	Síntese de 3 β -acetóxi-urs-12-en-28-oato de metila (78).....	180
10.1.3	Síntese de 3 β -acetóxi-11-oxo-urs-12-en-28-oato de metila (79) e 3 β -acetóxi-urs-9,12-dien-28-oato de metila (80)	181
10.1.4	Síntese de 3 β ,11,28-triidroxi-urs-12-eno (81)	185
10.1.5	Síntese de 3 β ,11,28-triacetóxi-urs-12-eno (82).....	197
10.1.6	Síntese de 3 β -hidróxi-urs-12-en-28-al (83) e 3 β -hidróxi-urs-11-en-28,13 β -éter (84)	200
10.1.7	Tentativas de epoxidação de 81	217
10.1.8	Tratamento de 81 com HI 57%	217
10.1.8.1	Síntese do 3 β ,28 β -diidroxi-urs-12-eno (86).....	217
10.1.9	Síntese de 87	218

10.1.10	Tentativas de oxidação de 87 com MCPBA catalisado por 5,10,15,20-tetrakis(pentaflorofenil) porfirina	220
10.1.11	Síntese do ácido 3 β -acetóxi-11-oxo-urs-12-en-28-óico (88) ..	220
10.1.12	Síntese de 3 β -acetóxi-urs-11-en-28,13 β -lactona (89).....	220
10.1.13	Síntese de 3-oxo-urs-12-en-28-oato de metila (90)	222
10.1.14	Síntese de 3-hidroxi-oxima-urs-12-en-28-oato de metila (91)	223
10.1.15	Tratamento de 77 com HI 57%	224
10.1.16	Tentativa de oxidação de 90 com SeO ₂	224
10.1.17	Tentativa de oxidação com <i>t</i> -BuOOH/SeO ₂	224
10.1.18	Síntese de 3,11-dioxo-urs-12-en-28-oato de metila (92).....	224
10.1.19	Tentativas de oxidação de 78 e 90 com SeO ₂ /AcOH.....	225
10.1.20	Tentativa de rearranjo de 92 com BF ₃ -Et ₂ O	225
10.1.21	Tentativas de redução de 92.....	226
10.1.21.1	<i>Redução de 92 com NaBH₄/CeCl₃.7H₂O.....</i>	<i>226</i>
10.1.21.2	<i>Redução de 92 com NaBH₄/alumina</i>	<i>227</i>
10.1.21.3	<i>Tentativa de redução de 92 com NaBH₄/GuHCl.....</i>	<i>227</i>
10.1.21.4	<i>Tentativa de redução de 92 com InCl₃/NaBH₄.....</i>	<i>227</i>
10.1.21.5	<i>Tentativa de redução de 92 com NaBH₄</i>	<i>227</i>
10.1.22	Síntese de 3 β ,28-diidroxi-urs-9,12-dieno (94) e 3 β -hiiróxi-urs-11-en-28,13 β -éter (84).....	228
10.1.23	Síntese de 3,4-seco-11-oxo-urs-12-en-28-oato de metila (95).....	230
10.1.24	Síntese de 3-oxo,11-hidróxi-urs-12-en-28-oato de metila (96).....	232
10.1.25	Tentativa de oxidação de 31 com NaClO ₂ / <i>t</i> -BuOOH.....	233
10.1.26	Esterificação de 88 com CH ₃ I/K ₂ CO ₃	234
10.1.27	Tentativas de epoxidação de 79 com H ₂ O ₂ /NaOH.....	234
10.2	Transformações químicas do ácido oleanólico.....	235
10.2.1	Síntese de 3 β -hidróxi-olean-12-en-28-oato de metila (97).....	236
10.2.2	Síntese de 3-oxo-olean-12-en-28-oato de metila (98).....	237
10.2.3	Síntese de 3-hidroxi-oxima-olean-12-en-28-oato de metila (99)	237
10.2.4	Acetilação de 99.....	238
10.2.5	Síntese de 3-acetóxi-olean-12-en-28-oato de metila (101)	238
10.3	Ensaio biológicos.....	239
10.3.1	Avaliação da atividade citotóxica dos produtos obtidos	239

10.3.2	Avaliação da atividade antiplasmódica	242
11	CONCLUSÕES	243
	APÊNDICE	244

1 INTRODUÇÃO

Desde os primórdios da civilização, os vegetais estão associados ao desenvolvimento humano, sendo utilizados como fonte de alimentos, de habitação, para a produção de meios de transporte e como meio restaurador da saúde. Com o passar do tempo, um número cada vez maior de produtos naturais de origem vegetal foi incorporado ao arsenal terapêutico humano, através de conhecimentos tradicionais de práticas de cura de enfermidades de diversas populações espalhadas pelo mundo (SCHENKEL et al., 2003).

Segundo dados da Organização Mundial de Saúde (OMS), atualmente cerca de 80% da população mundial utiliza a medicina tradicional para o tratamento de suas necessidades primárias de saúde e a maior parte da terapia tradicional envolve o uso de extratos de plantas ou de seus princípios ativos. As plantas medicinais constituem o único recurso terapêutico de parcela significativa da população brasileira, e de mais de dois terços da população do planeta (LUI; WANG, 2008). A OMS estima que aproximadamente 20.000 espécies de plantas superiores sejam empregadas como medicamento em todo o mundo (KHAN, 2006; SIMÕES; SCHENKEL, 2002). O mercado mundial de fitoterápicos movimenta cerca de US\$60 bilhões por ano e vem angariando, a cada ano, mais adeptos nos países desenvolvidos (LUI; WANG, 2008). No Brasil, esse mercado movimenta algo em torno de R\$ 400 milhões, com uma taxa de crescimento anual entre 5 e 15% (FREITAS, 2007; LUI, WANG, 2008).

Tradicionalmente, espécies vegetais desempenham um papel relevante na descoberta de substâncias bioativas. Estudos de diversas espécies resultaram na introdução de substâncias como atropina, digoxina, morfina, quinina, reserpina, taxol, vincristina e vimblastina, entre diversas outras, na terapêutica moderna (GILANI; RAHMAN, 2005).

Apesar da relevância do conhecimento popular, resultado de observações sistemáticas de práticas tradicionais, é imprescindível empregar métodos científicos para avaliar a eficácia das espécies vegetais. Neste sentido, é fundamental associar estudos químicos/farmacológicos com as informações obtidas junto às comunidades tradicionais, visando comprovar o efeito terapêutico das espécies.

O Brasil é um dos países com megadiversidade vegetal, contando com um total estimado de 55.000 espécies de plantas superiores. Essa riqueza vegetal, associada à ampla tradição no uso de plantas medicinais no país, representa uma oportunidade única para a pesquisa fitoquímica e de atividades biológicas, com vistas ao desenvolvimento futuro de fármacos e fitoterápicos. No entanto, a despeito das diversas espécies medicinais catalogadas no país, com usos etnofarmacológicos diversos, a grande maioria delas carece de estudos químicos e biológicos que comprovem as atividades alegadas.

Nesse contexto se insere o presente trabalho, cuja parte 1 visa fornecer dados sobre a composição fitoquímica e de atividades biológicas para três espécies medicinais brasileiras, amplamente utilizadas, *Jacaranda caroba*, *Remijia ferruginea* e *Solanum paniculatum*. A parte 2 foi realizada durante o período de estágio de doutorado sanduíche na Universidade de Salamanca, Espanha e relata as transformações químicas dos ácidos ursólico e oleanólico bem como a avaliação das atividades antitumoral e antiplasmódica de derivados obtidos.

PARTE 1

Estudo fitoquímico e de atividades biológicas de *Solanum paniculatum* L., *Remijia ferruginea* D.C. e *Jacaranda caroba* D.C.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Isolar constituintes micromoleculares majoritários de *Solanum paniculatum* L., *Remijia ferruginea* D. C. e *Jacaranda caroba* D. C., e avaliar as atividades biológicas das espécies relacionadas ao seu uso tradicional.

2.2 Objetivos Específicos

- ✓ Avaliar a atividade de extratos de *S. paniculatum*, *R. ferruginea* e *J. caroba* sobre a absorção de lipídeos, em ensaios *in vivo* com animais tratados com dieta hiperlipídica.
- ✓ Avaliar a atividade dos extratos supracitados sobre a absorção de lipídeos em modelo *ex vivo* (preparações isoladas de alça intestinal de ratos).
- ✓ Isolar constituintes micromoleculares abundantes dos extratos das três espécies.
- ✓ Avaliar a potencial atividade antiviral *in vitro* do extrato de *S. paniculatum* e substâncias isoladas deste.
- ✓ Elucidar a estrutura química das substâncias isoladas utilizando métodos espectrométricos usuais (U.V, I.V, RMN de ^1H e de ^{13}C , E.M).

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 Metabolismo lipídico

Os lipídeos constituem aproximadamente 40% da ingestão calórica da população ocidental, equivalendo a um consumo diário de 60-120g (adultos). Os componentes lipídicos quantitativamente mais importantes da dieta humana são os triglicérides ou triglicérides (TAG), seguidos de fosfolipídeos, colesterol e ésteres de colesterol (GEEVENBROEK; BRUIN, 1998). Em condições fisiológicas normais, o sistema digestivo pode digerir e absorver mais de 95% do total de triglicérides ingeridos (MU; HOY, 2004).

A digestão e absorção de triglicérides são processos dinâmicos e eficientes, mas compreendidos apenas parcialmente a nível molecular. As principais fases da absorção de triglicérides são: emulsificação, hidrólise, dispersão aquosa dos produtos lipolíticos e absorção, que ocorre principalmente no jejuno proximal (ROS, 2000, SINGH et al., 2009). Os lipídeos da dieta não são prontamente absorvidos, pois se apresentam como óleos na temperatura corporal; portanto, o processo de digestão consiste em transformá-los em moléculas mais polares que possam ser solubilizadas no meio aquoso intestinal e absorvidas. Assim, a primeira etapa na digestão das gorduras é a emulsificação, que ocorre no duodeno e jejuno, na qual o conteúdo lipídico é emulsionado em pequenas gotas por ação das lecitinas presentes nos sais biliares secretados na bile.

Os sais biliares atuam como detergentes, reduzindo a tensão superficial dos glóbulos de gordura. Sob a ação da lipase pancreática, cada molécula de triglicéride é hidrolisada originando uma molécula de 2-monoglicerídeo e duas de ácido graxo, parcialmente solúveis no meio aquoso intestinal. A dispersão destes produtos no meio aquoso requer sua incorporação em micelas, agregados polimoleculares de sais biliares, que transportam ácidos graxos e monoglicerídeos até as microvilosidades, onde difundem passivamente para os enterócitos. Posteriormente, as células intestinais reesterificam 2-monoglicerídeos e ácidos graxos para formarem novamente triglicérides e os incorporam em quilomícrons que são secretados para a linfa, atingem o ducto torácico e chegam até tecidos periféricos (GEEVENBROEK; BRUIN, 1998; MU; HOY, 2004; ROS, 2000).

A digestão e a absorção de lipídeos são fenômenos de maior complexidade do que para as outras classes de nutrientes, estando mais freqüentemente sujeitas a alguma disfunção. Por isto, o tratamento ideal para distúrbios digestivos é incerto, e terapias empíricas, sem diagnósticos prévios, vêm sendo empregadas, utilizando-se antiácidos (trissilicato de magnésio, bicarbonato de sódio, hidróxido de alumínio), antagonistas dos receptores histaminérgicos H₂ (cimetidina, ranitidina, nizatidina, famotidina) e, mais recentemente, inibidores da bomba de próton (omeprazol, lansoprazol, pantoprazol) e gastrocinéticos (metoclopramida, domperidona, cisaprida) (MILOSAVLJEVIC; JOVANOVIC, 2000). Por se tratar de uma terapia crônica, o custo do tratamento pode ser elevado. Estima-se que, somente nos EUA, sejam gastos US\$2 milhões por ano em medicações para o alívio dos sintomas (HOHENESTER et al., 2004).

3.2 Produtos fitoterápicos empregados no tratamento de distúrbios digestivos

Os distúrbios digestivos são clinicamente caracterizados por dor recorrente e/ou desconforto persistente ou episódico na parte superior do estômago, sem evidências de patologia que explique os sintomas, com exames clínicos normais (JAN TACK; LEE, 2005; OUDENHOVE; TACK, 2009; QUIGLEY, 2008). Podem ser ocasionados por alterações em um ou vários fatores fisiológicos, tais como tônus e motilidade intestinal, secreção enzimática e hormonal, reabsorção e digestão. Alterações neuronais e sensoriais na motilidade, além de fatores psicológicos como estresse ou depressão, também podem levar ao desencadeamento de distúrbios digestivos (SAAD; CHEY, 2006). Porém, ainda não é possível definir exatamente o mecanismo desencadeador dos sintomas (JAN TACK; LEE, 2005).

Os sintomas comumente relatados nos casos de distúrbios digestivos são: saciedade precoce, regurgitamento ácido, gases, distensão abdominal, náuseas e vômito (HOLTMANN et al., 2004; TALLEY, 2008). Cerca de 75% dos pacientes afirmam que os sintomas se agravam após a ingestão de dieta gordurosa (BISSCHOPS et al., 2008; MILOSAVLJEVIC; JOVANOVIC, 2000). Segundo Thompson et al. (2002), cerca de 40% da população adulta apresenta um ou dois episódios dispépticos no decorrer de um ano.

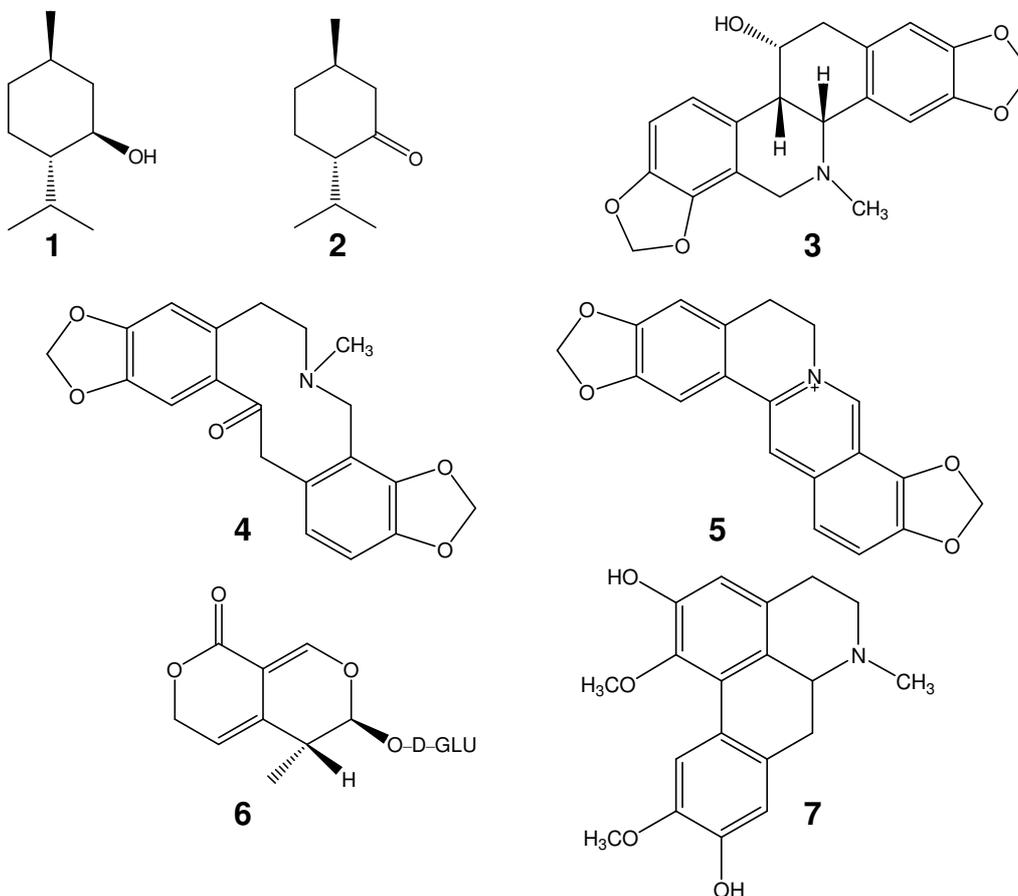
Além da terapia medicamentosa disponível, com resultados nem sempre satisfatórios e de custo elevado, espécies vegetais vêm sendo utilizadas como alternativa para o tratamento e alívio dos sintomas dispépticos, seja isoladamente ou em associação. Este é o caso de espécies ricas em óleos essenciais, tais como *Foeniculum vulgare* (funcho), *Pimpinella anisum* (erva-doce), *Matricaria chamomilla* (camomila), *Mentha piperita* (hortelã), com propriedades espasmolíticas, carminativas e ação anestésica, cujos mecanismos de ação podem estar relacionados com a modulação da atividade da musculatura lisa do trato gastrointestinal (MELZER et al., 2004).

Várias espécies vegetais usadas no tratamento de distúrbios digestivos foram estudadas e algumas tiveram seus possíveis mecanismos de ação e constituintes ativos identificados. Assim, a espécie *Mentha piperita* atua inibindo a contração da musculatura lisa através da interação do mentol (1) e da mentona (2) com os canais de cálcio (HILLS; AARONSON, 1991; MCKAY; BLUMBERG, 2006). Grigoleit e Grigoleit (2005) relataram o potencial efeito espasmolítico observado para o óleo de *Mentha piperita* em 9 estudos clínicos empregando pessoas saudáveis e pacientes com distúrbios digestivos, que fizeram uso do óleo em dose única por duas semanas.

Chelidonium majus possui em sua composição alcalóides, flavonóides e substâncias fenólicas, identificados como possíveis constituintes ativos, que atuam como antiespasmódicos, colagogos e coleréticos. Dois extratos etanólicos da espécie, com concentração definida dos principais alcalóides chelidonina (3), protopina (4) e coptisina (5), foram avaliados em modelos espasmolíticos de íleo isolado de ratos. Os extratos produziram 50% de relaxamento na dose de 5×10^{-4} g/mL (HILLER et al., 1998). Estudo duplo-cego com 60 pessoas, empregando a associação dos extratos de *Chelidonium majus* e *Peumus boldos* ou placebo, mostrou que a associação das espécies melhora os sintomas da indigestão após 14 dias de tratamento (KUPKE et al., 1991).

Gentiana lutea tem sua ação antidispéptica atribuída ao estímulo das secreções gástrica e salivar por compostos “amargos” como o secoiridóide gentioprlicosídeo (6) (BLUMENTHAL, 2002). Já a ação de *Peumus boldos* Mol.

(boldo) no alívio dos sintomas dispépticos pode ser explicada pela presença do alcalóide boldina (**7**), cuja ação relaxante da musculatura lisa foi identificada *in vitro* (THOMPSON; ERNST, 2002).



Formulações contendo individualmente caules de quassia (*Quassia amara*), folhas de trevo aquático (*Menyanthes trifoliata*), estróbilos de lúpulo (*Humulus lupulus*), partes aéreas de cardo-santo (*Carduus benedictus*), casca de condurango (*Marsdenia condurango*), casca de laranjeira amarga (*Citrus aurantium*), partes aéreas de centáurea menor (*Erythraea centaurium*), raízes de *Taraxacum officinale* Weber (Asteraceae), óleo essencial de *Marrubium vulgare* L. (Lamiaceae), raízes de *Zingiber officinale*, sumidades floridas de *Angelica archangelica*, cascas de *Cinchona pubecens* e frutos de *Embllica officinalis* também são comumente recomendados para o tratamento de distúrbios digestivos (THOMPSON; ERNST, 2002).

O fitoterápico Iberogast[®], produzido pelo laboratório Steigerwald Arzneimittelwerk GmbH, em Darmstadt, Alemanha, é constituído pela associação de extratos de nove espécies (*Mentha piperita*, *Carum carvi*, *Iberis amara*, *Glycyrrhiza glabra*, *Melissa officinalis*, *Angelica archangelica*, *Chelidonium majus*, *Silybum*

marianus, *Matricaria recutita*). O produto foi avaliado em estudos clínicos que comprovaram um efeito significativo no alívio e diminuição dos sintomas da má digestão, sem relato de efeitos adversos sérios ou alterações relevantes nos exames clínicos laboratoriais dos pacientes, bem como ausência de toxicidade aguda e crônica (MELZER, 2004; PILICHIEWICZ et al., 2007). O efeito superior do fitoterápico em relação à cisaprida, droga procinética empregada no alívio dos sintomas dispépticos, também foi constatado (RÖSCH et al., 2006), sugerindo ser vantajosa a combinação de extratos com vários componentes ativos para o tratamento de uma patologia multifatorial como a dispepsia.

O fitoterápico Iberogast® apresentou boa absorção em modelos *in vivo* (sacos intestinais evertidos) e *in vitro* (células Caco-2). Segundo os autores, a rápida absorção do medicamento poderia explicar seus efeitos farmacológicos e eficácia clínica (KELBER et al., 2006).

Schemann et al. (2006) sugeriram que o mecanismo de ação do fitoterápico Iberogast® no alívio dos sintomas da má digestão se dê através da alteração na motilidade gástrica, promovendo relaxamento do fundo e corpo do estômago, e contração do antro. A diminuição da sensibilidade aferente vagal e espinal no intestino delgado também foi observada por Liu et al. (2004). Schemann et al. (2006) também avaliaram a ação de cada extrato isoladamente concluindo que a alteração na motilidade do estômago é resultante da combinação de ações isoladas de cada extrato. Alguns são responsáveis pela ação no fundo e corpo, enquanto outros atuam no antro. O efeito espasmolítico e carminativo de alguns extratos como *Mentha piperita* e *Carum carvi* também são importantes para a ação do fitoterápico (TALLEY; VAKIL, 2005).

Michael et al. (2009) sugeriram que processos inflamatórios também podem desencadear eventos dispépticos, através de alterações sensoriais e motoras no trato gastrointestinal. Os autores demonstraram que o fitoterápico Iberogast® é capaz de reduzir a inflamação *in vitro*, avaliada em modelo de segmentos de jejuno e íleo. De acordo com Germann et al. (2006), a ação antioxidante dos constituintes da formulação também é responsável pelo efeito antiinflamatório. Muller et al. (2006) observaram a redução de sensibilidade intestinal aferente *in vivo*, frente a estímulos

mecânicos e químicos, após o tratamento com Iberogast[®], o que explicaria a ação do fitoterápico no alívio de sintomas dispépticos.

Estudo clínico com o fitoterápico chinês Shenxiahewining, composto da associação de *Ginseng radix*, *Pinelliae tuber*, *Coptidis rhizoma*, *Zingiberis rhizoma exsiccatum* e *Glycyrrhizae radix* na proporção de 3:9:3:3:3, demonstrou a diminuição dos sintomas dispépticos em 92% dos pacientes, em comparação com 20% no grupo tratado com o fármaco procinético cisaprida (CHEN, 2002).

Em outro estudo clínico com 96 pacientes, a associação dos óleos essenciais das espécies *Mentha piperita* (270 mg/dia) e *Carum carvi* (150 mg/dia) ou placebo foi administrada durante 4 semanas a pacientes com diagnóstico de dispepsia funcional. No grupo tratado com a associação das espécies, 94,7% dos pacientes apresentou melhora dos sintomas, comparado a 55% no grupo placebo (MAY et al., 1996).

Os sistemas tradicionais de medicina Ayurveda e Unani da Índia incluem o uso de várias espécies vegetais para o tratamento e alívio de sintomas dispépticos. A avaliação clínica de uma preparação contendo extratos dos frutos de *Aegle marmelos* e *Bacopa monniere*, utilizada nesses sistemas tradicionais, comprovou a eficácia *in vivo* na diminuição dos sintomas dispépticos, quando comparada ao grupo tratado com placebo (GHOSH; PLAYFORD, 2003).

Alguns fitoterápicos estão disponíveis no mercado brasileiro para o tratamento de distúrbios digestivos. Este é o caso do produto Ierobina (Laboratório Belfar, Belo Horizonte), constituído pelos extratos fluidos das espécies nativas *Jacaranda caroba*, *Remijia ferruginea* e *Solanum paniculatum*, além da espécie exótica *Erythraea centaurium*. O fitoterápico produziu um aumento significativo na concentração plasmática de triglicérides *in vivo* e provocou a ativação da lipase lipoprotéica, enzima localizada no endotélio dos capilares de vários tecidos, responsável pela hidrólise de triglicérides. Também foi demonstrada a atividade espasmolítica *in vitro* do produto sobre preparações isoladas de íleo. Em conjunto, estes resultados subsidiam a eficácia do fitoterápico no alívio dos sintomas causados por distúrbios digestivos (BOTION et al., 2005). O produto também foi avaliado em estudos de toxicidade aguda e crônica, que indicaram ausência de efeitos tóxicos (TAGLIATI et al., 2008).

As espécies nativas empregadas na composição do fitoterápico (*Jacaranda caroba*, *Remijia ferruginea* e *Solanum paniculatum*) são utilizadas popularmente como tônico e amargo, entre outros usos. Segundo Saller e Reichling (2001), drogas vegetais com constituintes amargos apresentam importância secular na terapia de distúrbios digestivos. O mecanismo de ação não está completamente entendido, mas há indicações de que substâncias amargas possam, em pequenas concentrações, estimular as secreções gástricas e a força de contração da musculatura lisa do trato gastrointestinal, *via* sistema gustatório, nervo vago e sistema nervoso entérico. É difícil estabelecer um modelo para avaliar o mecanismo de ação de extratos vegetais no alívio dos sintomas dispépticos, principalmente porque a fisiopatologia dos distúrbios não é bem definida (THOMPSON; ERNEST, 2002).

Nos últimos anos, estudos clínicos foram realizados com preparações fitoterápicas contendo drogas vegetais contendo compostos amargos, tais como os presentes em *Iberis amara*, *Mentha piperita*, *Zingiber officinalis* e *Carum carvi*. A associação das drogas mostrou ser mais eficaz que o grupo tratado com placebo e, tão efetiva quanto o grupo controle, que recebeu medicação gastrocinética (SALLER; REICHILING, 2001). Diversos outros resultados indicam que associações de extratos são mais eficazes que o uso de espécies isoladas (THOMPSON; ERNEST, 2002). O fato de pequenas doses de alguns extratos serem hábeis em produzir efeitos terapêuticos benéficos são indícios da ocorrência de interações sinérgicas entre os componentes de extratos vegetais usados em associações (SCHEMPP et al., 2004).

3.3 *Remijia ferruginea*: usos populares, composição química e atividades biológicas

Remijia ferruginea D.C. (Rubiaceae), sinonímia *Cinchona ferruginea* St.Hill, é uma espécie arbustiva de aproximadamente 2 metros de altura, denominada popularmente de quina da serra ou quina mineira (Figura 1, página 31). Ocorre em regiões de clima quente e úmido, sendo encontrada na Amazônia, e da Bahia até São Paulo (CORRÊA, 1974). As cascas da espécie são utilizadas tradicionalmente

como tônico, amargo, vermífugo e no tratamento de febres e malária (ANDRADE-NETO, 2003; HIRSCHMANN, 1990).

Caules de outras espécies de *Remijia* são fontes reconhecidas de alcalóides, como *R. pedunculata*, considerada pela Farmacopéia dos Estados Unidos (USP) fonte de quinidina (**8**). A espécie também contém cupreína (**9**). Nos caules de *Remijia purdiana* não se encontra a quinidina, mas os alcalóides cinchonina (**10**) e cinchonamina (**11**) (EVANS, 1989). A espécie *Remijia peruviana* é fonte dos alcalóides quinina (**12**) e também de cupreína e cinchonina, já descritos em *R. purdiana* (DIAZ et al., 2004; RUIZ-MESIA et al., 2005). A presença de saponinas triterpênicas também é freqüentemente relatada na família Rubiaceae (ITOH et al., 2003; SHI; MIN, 2003).

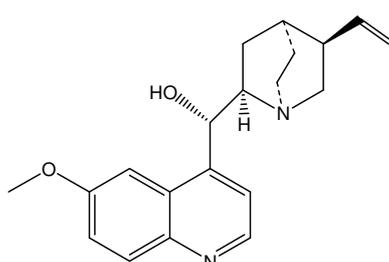
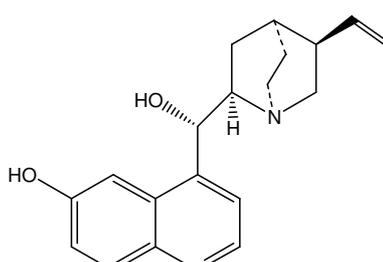
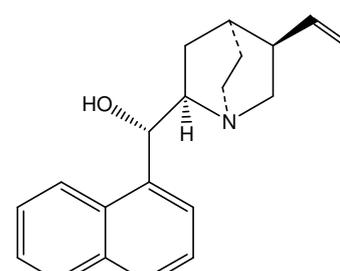
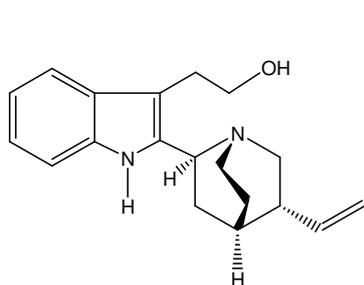
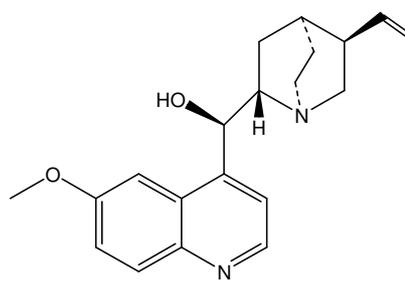
**8****9****10****11****12**



Figura 1 - *Remijia ferruginea*. Fonte: <http://www.flora.brasiliensis.cria.org.br>

Botsaris (2007), em seu estudo etnofarmacológico sobre espécies utilizadas tradicionalmente no tratamento de malária no Brasil, relatou o uso *R. ferruginea* como sucedâneo da “quina verdadeira” (*Cinchona calisaya*) no tratamento da malária. A atividade antimalárica do extrato etanólico das cascas de *R. ferruginea* foi avaliada *in vivo*. Doses de 500 e 1000 mg/kg reduziram a parasitemia em 34 e 48%, respectivamente (ANDRADE NETO et al., 2003).

As fontes tradicionais de alcalóides quinolínicos, como a quinidina (8) e a quinina (12), são as cascas de outras espécies de Rubiaceae. Preparações galênicas de cascas de *Remijia* são, há muito, utilizadas como tônico, amargo, estimulante digestivo e do apetite, febrífugo, em casos de anemia, distúrbios gastrointestinais, fadiga e malária (ANDRADE-NETO et al., 2003; EVANS, 1989).

Merschjohann et al. (2001) avaliaram a atividade antimalárica *in vitro* dos alcalóides quinina (12), cupreína (9) e cinchonamina (11), isolados de *R. peruviana*. Estes compostos possuem ainda atividade tripanossomicida frente às formas

sanguíneas de *T. brucei* e *T. congolensis*, enquanto somente a quinina foi ativa frente ao *T. cruzi*.

No levantamento bibliográfico realizado não foram encontradas referências sobre estudos fitoquímicos de *R. ferruginea*.

3.4 *Solanum paniculatum*: usos populares, composição química e atividades biológicas

Solanum paniculatum L. (sinónimas *Solanum belfort* Vand, *Solanum belfortianum* Dun e *Solanum Manoelii* Moric) é uma planta da família Solanaceae, conhecida popularmente como jurubeba verdadeira, jurupeba, juripiba, jurubebinha, jupeba, juvena e juuína (CORRÊA, 1974; MATOS FILHO, 1997; RODRIGUES; CARVALHO, 2001; SANTOS, 1996). O nome vulgar jurubeba não corresponde a uma única espécie, mas a diversas espécies de *Solanum*, utilizadas como medicinais: *S. paniculatum* L., *S. variable* Mart., *S. insidiosum* Mart., *S. juripeba* Rich. e *S. fastigatum* Wild. (FURLAN, 1999). A Farmacopéia Brasileira 2ª edição considera, entretanto, *Solanum paniculatum* L. como droga oficial, indicando o uso do caule e da raiz como tônico, amargo e hepatoprotetor. A droga vegetal é constituída por caule, folhas, frutos e flores (SIQUEIRA, 1981).

A espécie possui porte arbustivo, com até 3 metros de altura, apresentando acúleos no caule e nas folhas, de onde provavelmente veio o nome jurubeba, cuja etimologia da palavra seria *yu* = espinho e *peba* = chato (Figura 2) (SIQUEIRA, 1981). É encontrada na zona tropical do continente americano, ocorrendo das Guianas até Minas Gerais e São Paulo, principalmente em lavouras, pastagens, beiras de estradas, rios e terrenos baldios (COSTA, 1975).

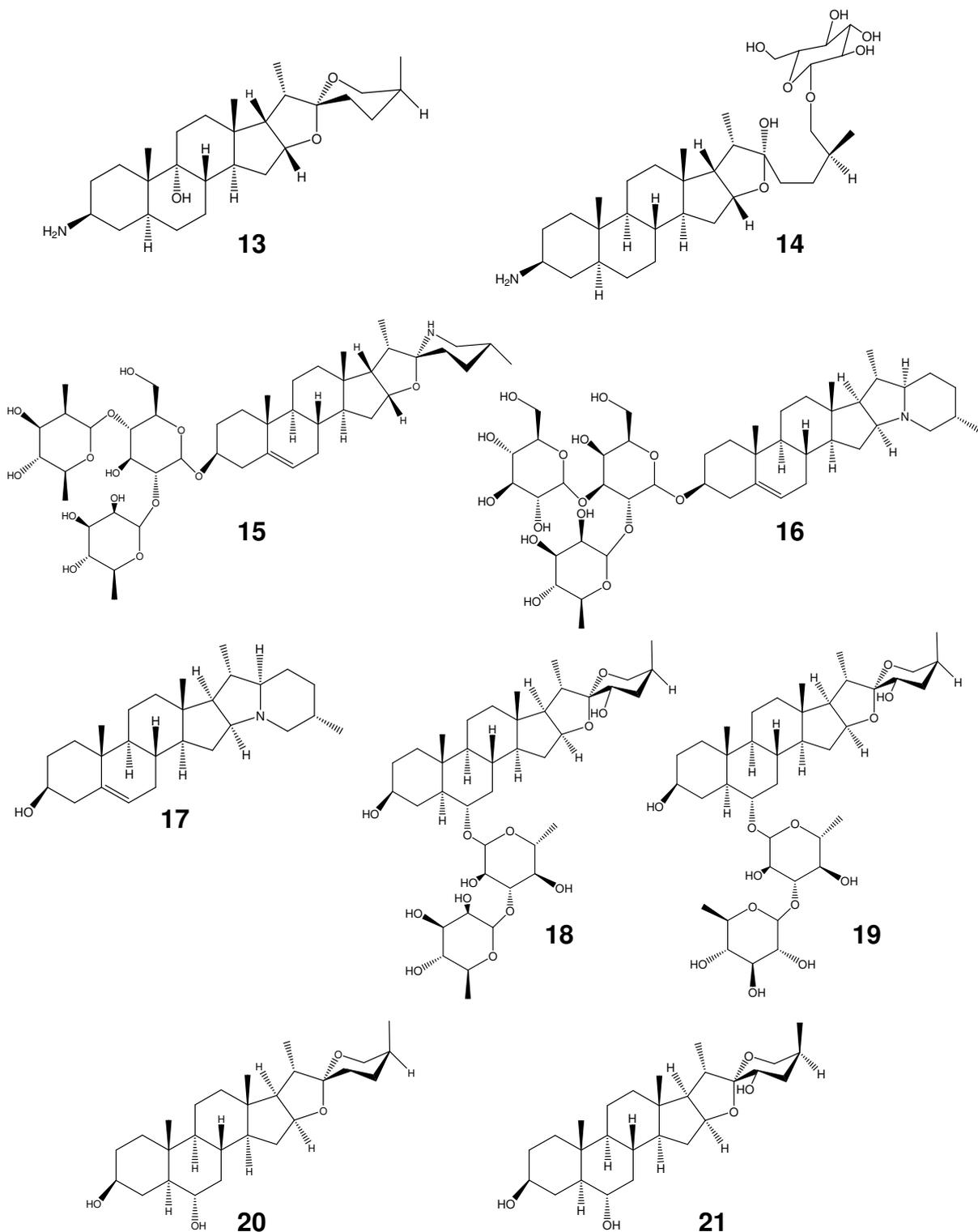


Figura 2 - *Solanum paniculatum*. Fonte: <http://www.geocites.com>

S. paniculatum possui vários usos populares, sendo empregada como estimulante do aparelho digestivo, ação atribuída aos seus princípios amargos (SIQUEIRA, 1981). Oliveira (1947), em ensaio com pacientes submetidos à intubação duodenal, demonstrou que a tintura e o extrato fluido de raízes de *S. paniculatum* possuem propriedades colagogas e coleréticas. Popularmente, a espécie é usada como chá, tintura ou vinho, para o tratamento de afecções do fígado, icterícia e hepatite crônica. É recomendada, também, como febrífugo, antianêmica, cicatrizante, ememagogo, colerético, protetor hepático, tônico, amargo, em casos de má digestão, falta de apetite, flatulência e azia (CORREA, 1974). A infusão das folhas é indicada em casos de bronquite e tosse; o macerado das raízes para o tratamento de artrite, e o dos frutos para anemia (CORREA, 1974; MATOS FILHO, 1997; RODRIGUES, 2001).

Estudos fitoquímicos das raízes de *S. paniculatum* revelaram a presença da sapogenina nitrogenada esteroideal paniculidina (13), da saponina jurubina (14) (SCHREIBER; RIPPERGER, 1966), e dos alcalóides solamargina (15), solanina (16) e solanidina (17) (RIPPERGER et al., 1967). Das folhas da espécie foram isolados dois glicosídeos espirostânicos denominados paniculonina A (18) e B (19) (RIPPERGER; SCHREIBER, 1968), e as geninas neoclorogenina (20) e

paniculogenina (**21**) (RIPPERGER et al., 1967). O alcalóide solanina (**16**), característico do gênero *Solanum*, foi encontrado nas folhas e flores (BLANKEMEYER, 1998).



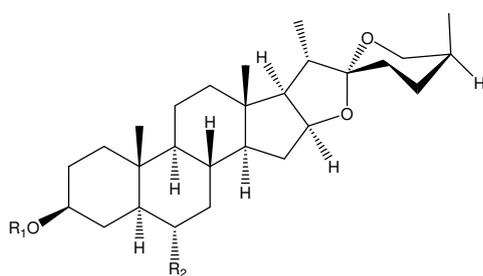
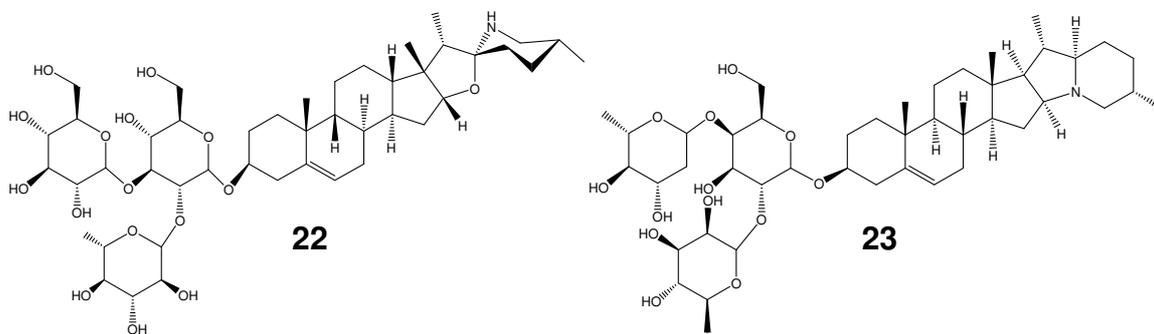
No que se refere às atividades biológicas de constituintes de *Solanum*, Michalska et al. (1985) relataram a ação inibitória do transporte de cálcio para o alcalóide α -solanina (**16**), em experimentos *in vitro* e *in vivo*, no duodeno de ratos. Outra atividade biológica relatada para diversos alcalóides de *Solanum* é sua ação anticolinesterásica. Faucher e Monnet citados por Santos (1996) demonstraram a importância do esqueleto esteroidal para esta atividade. Por sua vez, Patil et al. (1972) demonstraram a ação tóxica da α -solanina. A α -solanina (**16**) e outros alcalóides inibiram a biossíntese de colesterol em estudos *in vitro* e *in vivo* (DIXIT et al., 1992). Os efeitos tóxicos produzidos por **16** e outros alcalóides esteroidais podem ser explicados pela atividade anticolinesterásica e, também, por alterações na permeabilidade de membranas biológicas (KEUKENS et al., 1992; RODDICK, 1990).

Alguns trabalhos demonstraram a potencial atividade antitumoral dos glicoalcalóides solamargina (**15**) e solasonina (**22**), isolados de *S. sodomaeum*, *S. nigrum*, *S. incanum* e *S. crinitum*. Solamargina apresentou atividade frente a linhagens tumorais humanas de hepatoma (Hep3B) e solasonina (**22**) em células de leucemia humana (K562); α -chaconina (**23**) e α -solanina (**16**) apresentaram maior efeito inibitório de células de hepatoma humano (HepG2) do que doxorubicina e camptotecina, fármacos empregados no tratamento deste tipo de câncer. α -Solanina (**16**) também foi capaz de inibir células tumorais humanas de linfoma (U937) e estômago (AGS e KATO III) (DAUNTER et al., 1990; ESTEVES-SOUZA et al., 2002; FRIEDMAN et al., 2005; HU et al., 1999; KUO et al., 2000; LEE et al., 2004).

Dois novos glicosídeos espirostânicos denominados torvosídeo M (**24**) e N (**25**), isolados de *S. torvum*, mostraram significativa atividade citotóxica frente a linhagens tumorais gástrica (MGC-803), de fígado (HepG2), pulmão (A549) e mama (MCF-7) (LU et al., 2009).

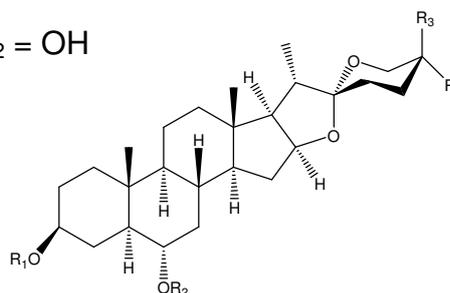
Algumas saponinas isoladas de *Solanum* apresentam potencial atividade antifúngica. Zamilpa et al. (2002) relataram a atividade da saponina **26**, isolada de *S. chrysotrichum*, frente a *Trichophyton mentagrophytes* (CIM = 12,5 μ g/mL), *Trichophyton rubrum* (CIM = 12,5 μ g/mL), *Aspergillus niger* (CIM = 100 μ g/mL) e *Candida albicans* (CIM = 200 μ g/mL). Gonzales et al. (2004) isolaram várias saponinas esteroidais de *S. hispidum*, todas com atividade antifúngica, dentre elas a

substância **27**, que foi a mais ativa (CIM = 25 $\mu\text{g/mL}$ para *T. mentagrophytes* e *T. rubrum*).



24 - Δ^5 ; $R_1 = \beta\text{-D-glu}(1\rightarrow6)\text{-O-}\beta\text{-D-glu}$; $R_2 = \text{H}$

25 - $5\alpha\text{-H}$; $R_1 = \beta\text{-D-glu}(1\rightarrow6)\text{-O-}\beta\text{-D-glu}$; $R_2 = \text{OH}$



26 - $R_1 = \text{H}$; $R_2 = \text{Xil}(1\rightarrow3)\text{Quinovopirano}$; $R_3 = \text{CH}_3$; $R_4 = \text{H}$

27 - $R_1 = \text{H}$; $R_2 = \text{Xil}(1\rightarrow3)\text{Quinovopirano}$; $R_3 = \text{H}$; $R_4 = \text{CH}_3$

Várias atividades biológicas já foram descritas para extratos de *S. paniculatum*. O extrato alcoólico de folhas da espécie promoveu depressão respiratória e redução da pressão arterial em gatos; já o extrato aquoso também produziu queda da pressão arterial, porém com estimulação respiratória. Ambos os extratos exerceram ação estimulante sobre preparações isoladas de coração de sapos e foram tóxicos para camundongos (BARROS et al., 1967 e 1970). Mesia-Vela et al. (2002) relataram atividade inibitória *in vivo* da secreção gástrica para o extrato aquoso de raízes, galhos e flores de *S. paniculatum*. Segundo os autores, este efeito fornece subsídios para comprovar o uso popular da planta no tratamento

de distúrbios digestivos, sugerindo potencial atividade antiúlcera. Extratos aquosos de caules e raízes da espécie inibiram a secreção ácida gástrica de roedores em estudos *in vivo* (SANTOS, 1996). A potencial atividade antiulcerogênica do extrato etanólico de partes aéreas de *Solanum variable* Mart. foi demonstrada em estudos *in vivo*, para úlceras duodenais agudas e crônicas (ANTÔNIO et al., 2004).

Em decorrência da grande utilização de *S. paniculatum* pela população com finalidades medicinais, as atividades mutagênica, antimutagênica e citotóxica foram avaliadas *in vivo* empregando-se extratos etanólicos de folhas e frutos. O extrato de folhas não apresentou ação mutagênica, no entanto, em doses elevadas (300 mg/kg), exibiu atividade citotóxica. Já o extrato de frutos apresentou atividade mutagênica na dose de 200 mg/kg e ação citotóxica na dose de 300 mg/kg (VIEIRA, 2007). O potencial citotóxico também foi avaliado *in vitro*, empregando células somáticas de *Drosophila melanogaster*, sendo a espécie classificada como de baixa citotoxicidade (taxa de sobrevivência de 84% para *S. paniculatum* e 87% para controle negativo) (RIBEIRO et al., 2008).

Ribeiro et al. (2007) relataram a atividade antioxidante *in vitro* para os extratos etanólico e aquoso de folhas de *S. paniculatum*.

Burger et al. (2008) descreveram a atividade coagulante *in vitro* para as frações em acetato de etila e metanólica dos frutos de *S. paniculatum*, empregando a peçonha da serpente *Bothrops pauloensis*. Segundo os autores, a atividade apresentada pelas frações está relacionada à presença dos alcalóides característicos da família Solanaceae.

3.5 *Jacaranda caroba*: usos populares, composição química e atividades biológicas

A espécie *Jacaranda caroba* D.C. (Bignoniaceae) é ocorrente no cerrado, denominada vulgarmente de caroba ou carobinha (Figura 3). Atinge 2,5 a 10 metros de altura, possui casca cinzenta e fina, flores arroxeadas e frutos elípticos (CESAR et al., 2004). O gênero possui 49 espécies nativas nas Américas do Sul, Central e Caribe, das quais 39 são endêmicas do Brasil (GACHET; SCHÜHLY, 2009). *J. caroba* é encontrada em São Paulo, Minas Gerais, Goiás e Mato Grosso (GACHET; SCHÜHLY, 2009).

Suas cascas são utilizadas popularmente como amargo, adstringente, depurativo, diurético e anti-sifilítico; já suas folhas são empregadas como tônico, anti-sifilítico e em banhos para o tratamento de infecções (CORRÊA, 1974; SIQUEIRA, 1981). O uso do macerado das folhas em cachaça é empregado como cicatrizante e internamente para o tratamento de úlceras (DI STASI; HIRUMA-LIMA, 2002).



Figura 3 - *Jacaranda caroba*. Fonte: <http://www.panoramio.com>

Bacchi et al. (1999; 1986) relataram a atividade antiulcerogênica *in vivo* para as folhas de *J. caroba*. O extrato hidroalcoólico e a fração diclorometânica oriunda deste, se mostraram ativos na redução de úlceras induzidas por etanol e ácido clorídrico (70% e 100% de redução, respectivamente).

Uma formulação fitoterápica contendo *J. caroba*, *Casearia sylvestris* Swartz. e *Peschiera fuchsiaefolia* Miers., comercializada no mercado nacional, e com uso indicado como “regulador da absorção de alimentos” e hipolipemiante, entre outros, teve sua toxicidade pré-clínica avaliada em ratos e coelhos. Os resultados indicaram ausência de efeitos tóxicos. Porém, foi observado um aumento no nível de colesterol sérico nos animais tratados com o produto, e os autores recomendaram estudos

farmacológicos adicionais para confirmar os resultados obtidos (GOMES et al., 2003; MANENTI et al., 2003).

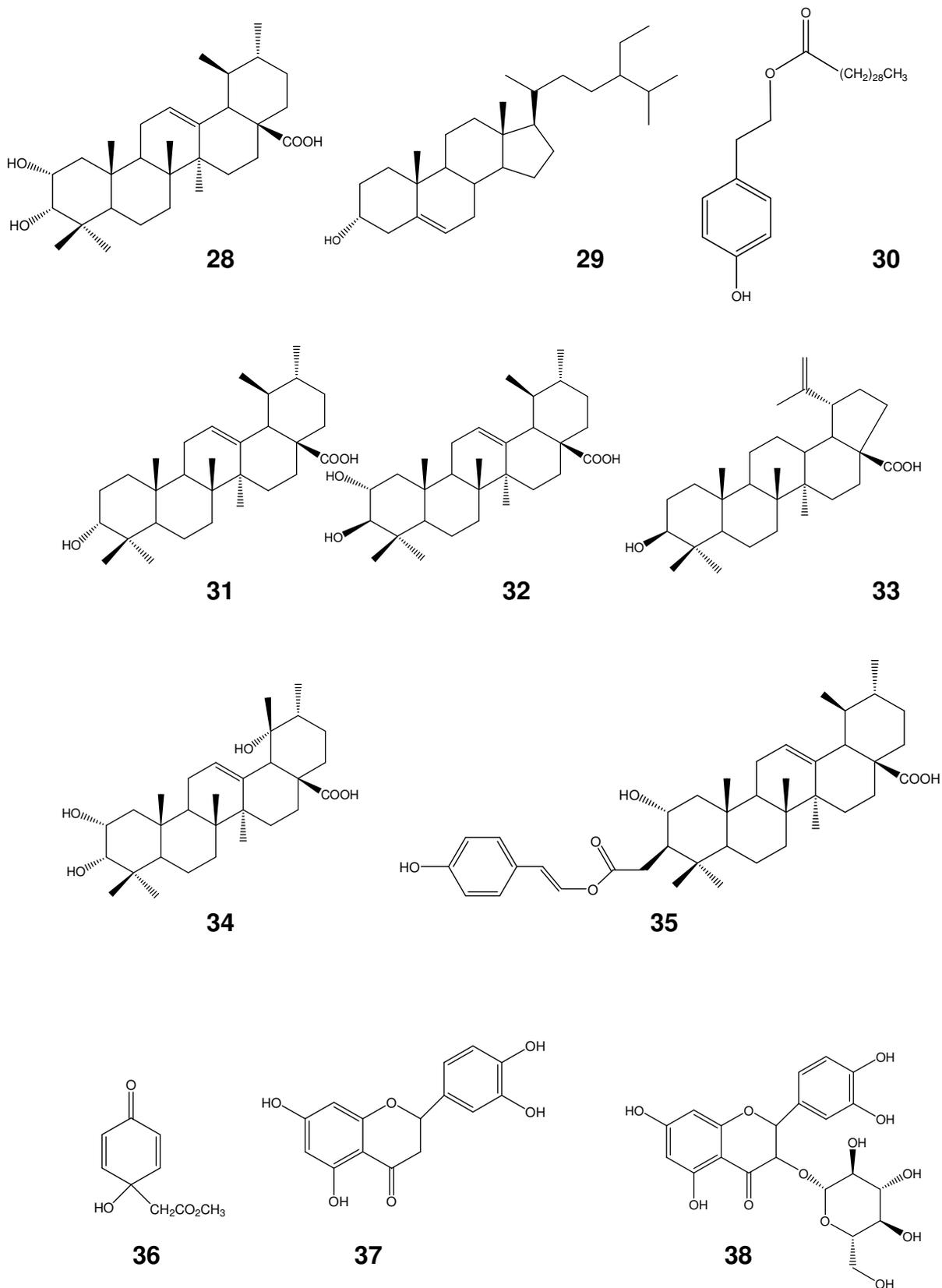
No levantamento bibliográfico realizado não foram encontrados relatos de estudos fitoquímicos para a espécie *J. caroba*. Outras espécies de *Jacaranda*, no entanto, foram objeto de estudos fitoquímicos e/ou de atividades biológicas, os quais fornecem indícios sobre a química e as atividades do gênero, descritos a seguir.

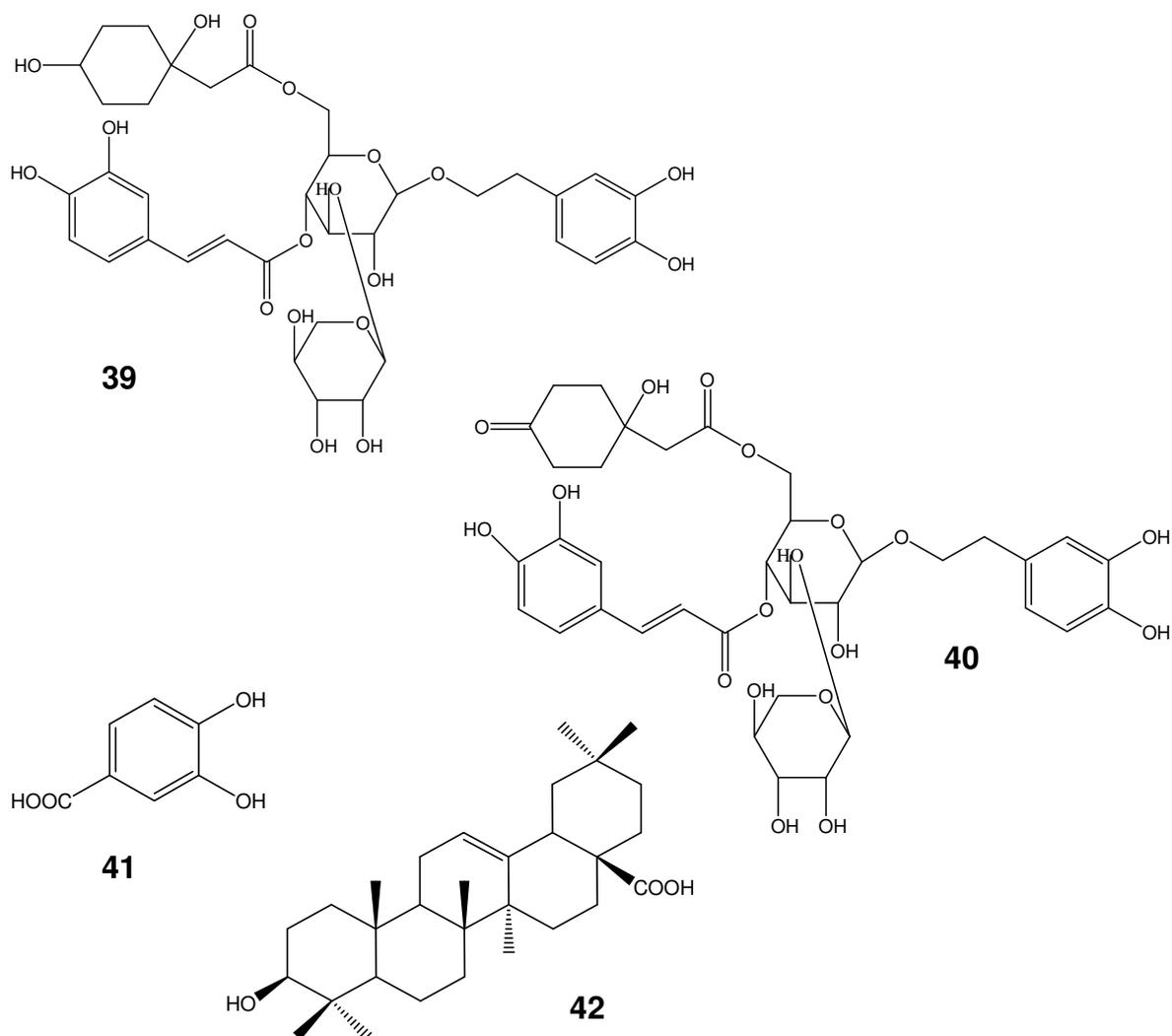
O extrato diclorometânico de galhos de *J. filicifolia* apresentou inibição *in vitro* da 5-lipoxigenase e seu fracionamento biomonitorado levou ao isolamento de três substâncias ativas: ácido 2 α ,3 α -diidrox Urs-12-en-28-óico (**28**), β -sitosterol (**29**) e 2-(4-hidroxifenil)etil-1-trioctanoato (**30**), um composto inédito (ALI; HOUGHTON, 1999).

Estudos fitoquímicos de *J. caucana* levaram ao isolamento dos ácidos ursólico (**31**), 2 α -hidrox Ursólico (**32**), betulínico (**33**), jacarândico (**34**) e jacumárico (**35**), sendo os dois últimos inéditos (LORENÇO et al., 2002; OGURA et al., 1976; OGURA et al., 1977; VARANDA et al., 1992). De *J. caucana* também foram isolados o derivado quinoídico jacaranona (**36**) (OGURA et al., 1976) e de *J. decurrens*, flavonóides como luteolina (**37**) e quercetina-3-O-glicosídeo (**38**) (BLATT et al., 1998).

O fracionamento do extrato metanólico dos caules de *J. mimosefolia* levou à obtenção de dois glicosídeos fenil etanóides (**39** e **40**) e do ácido procatecúnico (**41**), inédito na espécie (MARTIN et al., 2009).

A atividade antitumoral de jacaranona (**36**), isolada de *J. copaia* e *J. caucana* foi demonstrada frente à células P-388 de leucemia. O composto também mostrou atividade antimicrobiana e propriedades inseticidas; porém, estudos de toxicidade *in vivo* demonstraram moderada neurotoxicidade com DL₅₀ = 150-200 mg/kg (GACHET; SCHÜHLY 2009; TAYLOR et al., 2006; XU et al., 2003).





Com relação às atividades biológicas de espécies de *Jacaranda*, a atividade antitumoral do extrato hidroalcolico de *J. caucana* foi relatada em modelos *in vivo* e *in vitro* (OGURA et al, 1977). O extrato etanólico de *J. micrantha* apresentou atividade antioxidante em ensaios *in vitro* (MENEZES et al., 2002).

O extrato metanólico das folhas de *J. puberula* mostrou atividade frente a formas promastigotas de *Leishmania amazonensis*, com $CI_{50} = 88,0 \mu\text{g/mL}$. O fracionamento biomonitorado do extrato metanólico da espécie levou à obtenção de uma fração ativa frente às formas amastigotas, com $CI_{50} = 14,0 \mu\text{g/mL}$ (PASSERO et al., 2007).

O efeito hipotensor do extrato hidrometanólico de folhas de *J. mimosifolia* foi demonstrado *in vivo*. Observou-se uma redução dose dependente da pressão

arterial e da frequência cardíaca (doses de 100 a 400 mg/kg). Estudos *in vitro* sugeriram que a ação hipotensora esteja relacionada ao bloqueio de receptores α -adrenérgicos (NICASIO; MECKES, 2005).

Rojas et al. (2006) relataram a atividade antimicrobiana *in vitro* para o extrato de folhas de *J. mimosifolia* frente à *Bacillus cereus* (CIM = 2,9 μ g/mL), *Escherichia coli* (CIM = 2,3 μ g/mL) e *Staphylococcus aureus* (CIM = 2,8 μ g/mL).

Dentre os compostos isolados do gênero, jacaranona (**36**) é o que tem despertado maior interesse científico, devido seu potencial anticancerígeno. Porém, outros compostos também merecem atenção, como o ácido oleanólico (**42**) que apresentou atividade cicatrizante *in vivo* e moderada atividade antileishmania *in vitro* (MOURA-LETTTS et al., 2006; TORRES-SANTOS et al., 2004).

Segundo Gachet e Schühly (2009) existem relatos de estudos de atividade biológica para 12 das 49 espécies do gênero *Jacaranda*, mas apenas para 6 destas espécies (*J. caucana*, *J. acutifolia*, *J. copaia*, *J. decurrens*, *J. filicifolia*, *J. mimosifolia*) foram realizados estudos fitoquímicos.

Não foram encontrados relatos de ensaios biológicos dessas substâncias sobre o metabolismo de lipídeos.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Equipamentos

- Balança analítica Micronal, modelo AB 204.
- Balança eletrônica Micronal, modelo B 160.
- Balança eletrônica Helmac, modelo HM 10.
- Banho-maria Fanem, modelo 120/4.
- Banho de ultra-som Thornton, modelo T14.
- Chapas para aquecimento Fisatom, modelo 752 A e Corning, modelo V-092.
- Sistema de cromatografia líquida de alta eficiência Waters, modelo 2695, constituído de injetor automático AS-2000A, detector Photodiode Array 2996, bomba L-6200A, integrador modelo C-R4A e coluna Lichrosper 100RP-18 (5 μ m, 250x4mm d.i.).
- Evaporador rotatório Buchi, modelo B-480.
- Moinho de facas Marconi, modelo 6294.
- Estufa ventilada Fanem, modelo 315/9.
- Ultra-som Thornton, modelo T14.
- Micro centrífuga Cientec, modelo 14000D.
- Micropipetas Oxford, volume ajustável de 200 μ L – 1000mL.
- Micropipetas Transferpette-Brand, volume ajustável de 1-20 μ L, 5-50 μ L e 20-200 μ L.
- Soprador serigráfico Starnel, modelo HL 500.
- Centrífuga Fanem, modelo 205-N.
- Fonte de luz UV Spectroline, modelo 977 C.
- Sistema de purificação de água Millipore, Milli-Q plus.
- Espectrofotômetro de ultravioleta-visível Shimadzu, modelo UV-160A (Laboratório de Controle de Qualidade, FAFAR).

- Espectrofotômetro de infravermelho Perkin-Elmer, modelo Spectrum One (Laboratório de Química Farmacêutica, FAFAR), acoplado a acessório de refletância difusa.
- Espectrômetros de ressonância magnética nuclear Bruker Avance DPX200 e DRX400 (LAREMAR, Departamento de Química, ICEX, UFMG), Bruker WP 200SY e Bruker Advance DRX400 (Laboratório de Ressonância Magnética Nuclear da Universidade de Salamanca, USAL).
- Espectrômetro de massas Applied Biosystems, modelo QSTAR XL (Laboratório de Espectrometria de Massa da Universidade de Salamanca, USAL).
- Polarímetro Perkin-Elmer, modelo 241 (Laboratório de Química Farmacêutica da Universidade de Salamanca).

4.2 Reagentes e Materiais

- Etanol grau comercial.
- Acetonitrila e metanol grau HPLC, Merck.
- Solventes grau P.A: n-hexano, diclorometano, clorofórmio, acetato de etila, acetona, n-butanol, metanol, tetrahidrofurano (THF) (marcas Merck, Quimex e Grupo Química).
- Dimetilformamida, piridina, anidrido acético, benzeno (marcas Sigma e Merck).
- Reagentes: carbonato de potássio, iodeto de metila, clorito de sódio, ter-butil hidroperóxido, trifluoreto de boro em éter etílico, nitrato de prata, iodeto de hidrogênio, ácido meta-cloroperbenzóico (MCPBA), hidreto de lítio e alumínio, cloreto de hidroxilamina, dióxido de selênio, tricloreto de cério hepta hidratado, , 5,10,15,20-tetrakis(pentafluorofenil) porfirina [Fe(PFPP)Cl porfirina], hidreto de sódio, cloreto de guanidina, tricloreto de índio, água oxigenada, hidróxido de sódio, ácido deoxicólico, trioleína, albumina, cloreto de sódio, cloreto de potássio, fosfato de potássio diidratado, fosfato di-sódico mono-hidratado, sulfato de magnésio diidratado, glicose, triton (marcas Fluka, Sigma, Synth e Merck).

- Soluções reveladoras para cromatografia em camada delgada: preparadas segundo Morita & Assumpção (1981) e Wagner et al. (1984).
- Solução aquosa ácida de sulfato cérico;
- Solução metanólica a 5% de cloreto de alumínio;
- Solução de vanilina e ácido sulfúrico;
- Solução ácida de anisaldeído;
- Solução metanólica a 50% de ácido sulfúrico;
- Reagente de Liebermann-Burchard;
- Reativo de Dragendorff.
- Ácidos grau P.A: ácido fosfórico, ácido acético glacial, ácido fórmico e ácido sulfúrico, Merck.
- Sílica gel Merck, 70-230 mesh.
- Sílica gel 60G Merck.
- Cromatofolhas de sílica gel 60, 20 x 20cm, Merck.
- Coluna para HPLC ODS Lichropher (250 × 4,0 mm i.d., partículas de 5µm), Merck.
- Solução metanólica de hidróxido de sódio 2M.
- Solução aquosa de ácido clorídrico a 50%.
- Ácido bórico, P.A, Reagen.
- Acetato de sódio tri-hidratado, Merck.
- Frascos plásticos do tipo safe lock Netheler e Hinz, 3810.
- Frascos de vidro com tampa e septos de teflon para HPLC, Merck.
- Cubas de vidro Pirex.
- Vórtex Marconi, modelo MA162.
- Kit para dosagem de triglicérides, Analisa Diagnóstica.

4.3 Coleta e identificação do material vegetal

Jacaranda caroba D.C.

As partes aéreas de *J. caroba* foram coletadas em Belo Horizonte, em setembro de 2005. A identificação do material foi realizada pelo botânico Marco Antônio Sobral, ICB, UFMG. Uma exsicata da espécie foi depositada no herbário do ICB/UFMG, sob número 51460.

Remijia ferruginea D.C.

Galhos e cascas de *R. ferruginea* foram coletados no Parque Estadual do Rio Preto, São Gonçalo do Rio Preto, Minas Gerais, em abril de 2004. A coleta e identificação do material foram realizadas pelo Prof. Júlio Antônio Lombardi, na ocasião locado no ICB, UFMG. Uma exsicata da espécie foi depositada no herbário do ICB/UFMG, sob número 3833.

Solanum paniculatum L.

As folhas de *S. paniculatum* foram coletadas em Divinópolis, Minas Gerais, em agosto de 2005. A identificação da espécie foi realizada pelo Prof. José Renato Stehmann, ICB, UFMG. Uma exsicata da espécie foi depositada no herbário do ICB/UFMG, sob número 69902.

4.4 Preparo dos extratos

Os materiais vegetais foram lavados em água corrente e secos, separadamente, em estufa ventilada, à aproximadamente 40 °C. Após a secagem e moagem, em moinho de facas, foram obtidos 6800 g, 616 g e 1510,62 g de pó de *J. caroba*, *R. ferruginea* e *S. paniculatum*, respectivamente. O material vegetal pulverizado foi, então, submetido à extração por percolação exaustiva com etanol a 96°GL. Os extratos obtidos foram concentrados em evaporador rotatório a temperatura máxima de 70°C, sob pressão reduzida, fornecendo 1585,10 g, 131,77 g e 254,63 g de resíduos de *J. caroba*, *R. ferruginea* e *S. paniculatum*, respectivamente.

4.5 Análises por cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa (RP-HPLC)

4.5.1 Preparo das amostras

As amostras foram pesadas diretamente em frascos eppendorf e solubilizadas em metanol grau HPLC, na concentração de 10 mg/mL para extratos e frações oriundas dos fracionamentos preliminares e 1 mg/mL para substâncias isoladas. As amostras foram solubilizadas com auxílio de sonicação, durante 15 min, seguida de centrifugação a 10.000 giros por 10 min. Empregaram-se os sobrenadantes para análise por HPLC. Para tanto, foram injetadas alíquotas de 20 µL dos sobrenadantes, de modo automático, em sistema de HPLC. Obtiveram-se perfis por RP-HPLC para todas as frações resultantes dos fracionamentos dos extratos brutos e algumas frações resultantes dos demais fracionamentos em colunas de sílica gel.

4.5.2 Condições Cromatográficas

Para a obtenção dos perfis cromatográficos empregou-se coluna LiChrospher 100 RP-18 (5 µm, 250 × 4 mm d.i.), detecção no UV_{220nm}, fluxo de 1 mL/min e temperatura de 40 °C. Empregou-se eluição em gradiente de acetonitrila e água, conforme apresentado na Tabela 1. Foram empregados solventes grau HPLC e água destilada, filtrada em sistema Milli-Q.

Tabela 1 - Gradiente de eluição empregado para obtenção de perfis cromatográficos por RP-HPLC.

Tempo (min)	Água (%)	Acetonitrila (%)
0	95	5
60	10	90
65	95	5
70	95	5

4.6 Estudo fitoquímico

Os fracionamentos foram monitorados por CCD de sílica gel, observando-se os cromatogramas sob luz visível e ultravioleta, antes e após a revelação com solução de anisaldeído, Liebermann-Burchard e Dragendorf.

Foram obtidos perfis por RP-HPLC e por CCD de sílica gel para todas as frações resultantes do fracionamento preliminar dos três extratos. A seleção das frações para refracionamento foi realizada a partir dos perfis cromatográficos obtidos (menor complexidade e/ou predomínio de constituintes), bem como da massa da fração disponível, visando viabilizar o isolamento dos constituintes.

4.6.1 *Jacaranda caroba*

4.6.1.1 Fracionamento preliminar do extrato bruto

O extrato de partes aéreas de *Jacaranda caroba* foi submetido a fracionamento preliminar em sílica gel. Para tanto, foram utilizados 925 g de extrato etanólico seco para 1000 g de sílica gel.

Utilizou-se como série eluotrópica, *n*-hexano, DCM, DCM:EtOAc (1:1), EtOAc e MeOH. Foram coletadas frações de 1000 mL. As frações recolhidas foram concentradas em evaporador rotatório a 50 °C, sob pressão reduzida, até resíduo. Estes foram transferidos para frascos previamente tarados e mantidos em dessecador, sob vácuo, para completa eliminação do solvente por, no mínimo, 72 horas. Na Tabela 2, encontram-se listadas as frações cromatográficas obtidas, os respectivos eluentes e as massas obtidas. O fracionamento do extrato de *Jacaranda caroba* está representado no fluxograma da Figura 4 (pág 51).

Tabela 2 - Fracionamento preliminar do extrato etanólico de *Jacaranda caroba* por filtração em sílica gel.

Fração	Eluente	Volume (L)	Massa (g)
F HX	<i>n</i> -hexano	10	46,02
F DCM	DCM	25	202,85
F DCM/EtOAc	DCM:EtOAc	12	211,59
F EtOAc	EtOAc	10	85,17
F MeOH	MeOH	10	149,54
<i>Total</i>		67	695,17

4.6.1.2 Fracionamento de FHX (coluna 1 - C1)

Uma porção da fração FHX (45,0 g), obtida do fracionamento preliminar do extrato bruto, eluída com *n*-hexano, foi submetida à cromatografia em coluna aberta de sílica gel (mesh: 0,063-0,200 mm, 450 g, 35 × 7,2 cm). Empregou-se a série eluotrópica descrita na Tabela 3, sendo coletadas frações de 300 mL. O grupo de frações reunidas 117-138 (4,27 g) foi identificado como Jc1.

Tabela 3 - Fracionamento de FHX (C1) em coluna de sílica gel.

Fração	Eluente	Volume (L)	Frações reunidas	Massa (g)
F1-17	HX	5,1	1-2	0,05
F18-32	HX:DCM (95:5)	4,2	3	0,50
F33-51	HX:DCM (85:15)	5,4	4-9	0,15
F52-66	HX:DCM (75:25)	4,2	10-31	0,63
F67-80	HX:DCM (65:35)	3,9	32-36	0,59
F81-113	HX:DCM (50:50)	9,6	37-46	8,95
F114-125	HX:DCM (35:65)	3,3	47-54	1,48
F126-162	HX:DCM (75:25)	10,8	55-69	2,47
F163-178	HX:DCM (85:15)	4,5	70-79	0,66
F179-199	DCM	6,0	80-91	2,53
F200-240	DCM:EtOAc (95:5)	12,0	92-106	5,03
F241-255	DCM:EtOAc (85:15)	4,2	107-116	2,47
F256-266	DCM:EtOAc (25:75)	3,0	117-138	4,27
F267-281	DCM:EtOAc (35:65)	3,9	139-161	0,85
F282-294	DCM:EtOAc (50:50)	3,6	162-171	0,59
F295-304	DCM:EtOAc (65:35)	2,7	172-186	0,47
F305-311	DCM:EtOAc (80:20)	1,8	187-205	1,94
F312-321	EtOAc	2,7	206-209	0,62
F322-343	EtOAc:MeOH (90:10)	6,3	210-266	1,57
F344-354	EtOAc:MeOH (50:50)	3,0	267-336	0,89
F355-364	MeOH	2,7	337-360	0,32
			361-364	0,10
<i>Total</i>		<i>102,9</i>		<i>37,13</i>

4.6.1.3 Fracionamento de FDCM:EtOAc (coluna 2 – C2)

Uma porção da fração FDCM:EtOAc (70,0 g), obtida do fracionamento preliminar do extrato bruto, e eluída com DCM:EtOAc (1:1), foi cromatografada em coluna de sílica gel (mesh: 0,063-0,200 mm, 600 g, 47 × 6,5 cm). Empregou-se a série eluotrópica descrita na Tabela 4, sendo coletadas frações de 500 mL. Os grupos de frações reunidas 81-136 (9,58 g), 137-156 (0,56 g) e 177-264 (27,63 g) foram identificados como Jc2, Jc3 e Jc4, respectivamente.

Tabela 4 - Fracionamento de FDCM:EtOAc (C2) em coluna de sílica gel.

Fração	Eluente	Volume (L)	Frações reunidas	Massa (g)
F1-27	HX	13,5	1-12	0,67
F28-38	HX:DCM (80:20)	5	13-17	0,01
F39-57	HX:DCM (50:50)	9	18-80	0,10
F58-73	HX:DCM (35:65)	7,5	81-136	0,56
F74-102	HX:DCM (20:80)	14	137-156	9,58
F103-123	DCM	10	157-176	13,1
F124-507	DCM:EtOAc (97,5:2,5)	191	177-264	27,63
F508-516	DCM:EtOAc (90:10)	4	265-297	2,44
F517-534	DCM:EtOAc (82,5:17,5)	8,5	298-523	5,93
F535-564	DCM:EtOAc (70:30)	14,5	524-553	0,03
F565-584	DCM:EtOAc (50:50)	9,5	554-577	0,79
F585-605	DCM:EtOAc (25:75)	10	578-624	2,36
F606-614	EtOAc	4	625-686	0,82
F615-631	EtOAc:MeOH (95:5)	8	687-712	0,95
F632-652	EtOAc:MeOH (85:15)	10	713-719	0,476
F653-687	EtOAc:MeOH (70:30)	17	720-721	0,09
F688-701	EtOAc:MeOH (50:50)	6,5		
F702-721	MeOH	9,5		
<i>Total</i>		<i>351,5</i>		<i>65,55</i>

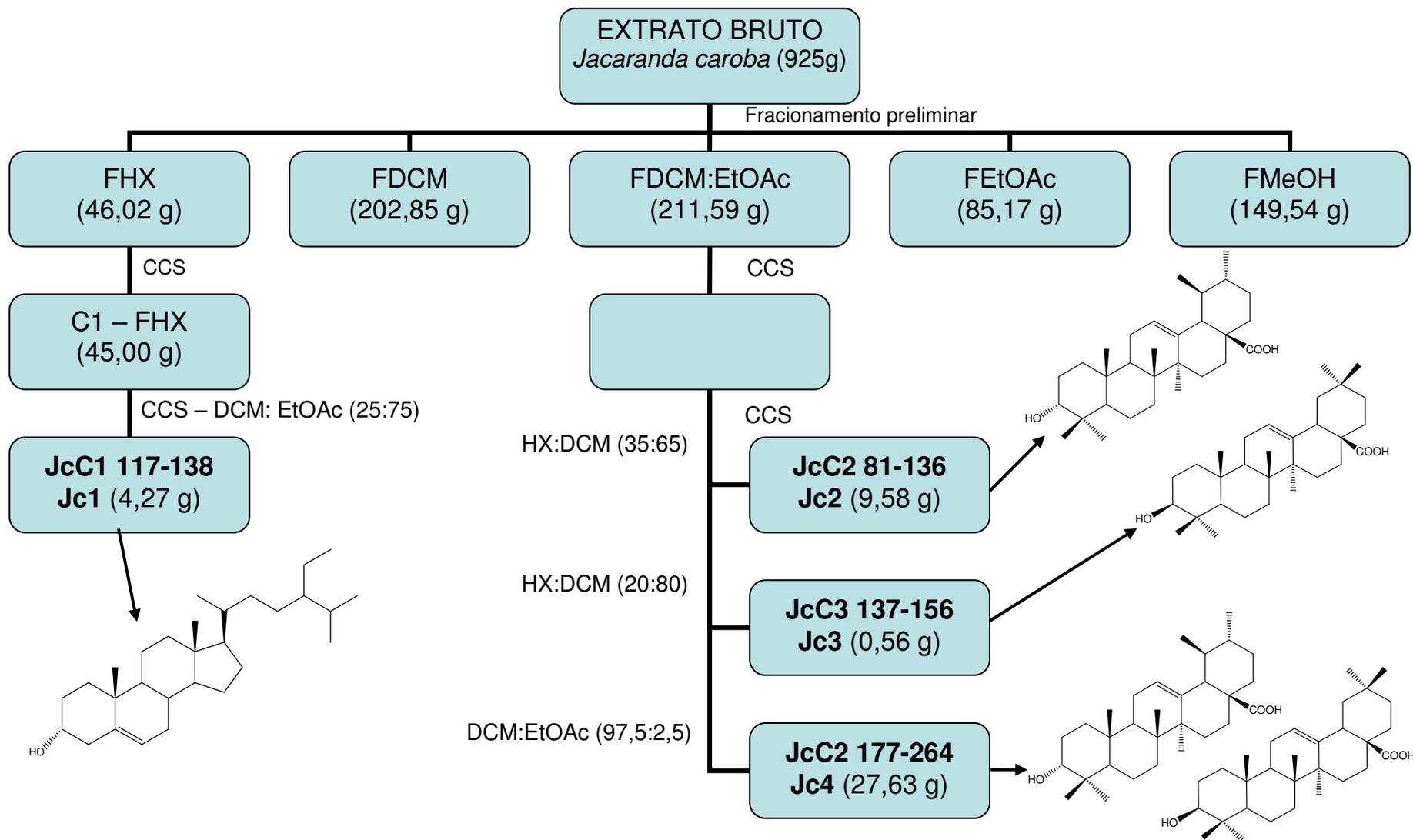


Figura 4 - Fracionamento cromatográfico do extrato etanólico bruto de partes aéreas de *Jacaranda caroba*.

4.6.2 *Remijia ferruginea*

4.6.2.1 Fracionamento preliminar do extrato bruto

O extrato de caules e cascas de *R. ferruginea* foi submetido a fracionamento preliminar em coluna aberta de sílica gel (mesh: 0,2-0,5 mm, 700 g, 51 × 6,5 cm). Para tanto, foram utilizados 131,77 g de extrato etanólico seco. Utilizou-se a série eluotrópica descrita na Tabela 5, sendo coletadas frações de 300 mL.

As frações recolhidas foram concentradas em evaporador rotatório a 50°C, sob pressão reduzida, até resíduo. Estes foram transferidos para frascos previamente tarados e mantidos em dessecador, sob vácuo, para a completa eliminação do solvente por, no mínimo, 72 horas. Na Tabela 5 encontram-se listadas as frações cromatográficas, os respectivos eluentes e massas obtidas. O fracionamento cromatográfico de *R. ferruginea* está representado no organograma da Figura 5 (pág. 57).

Tabela 5 - Fracionamento preliminar do extrato etanólico de *Remijia ferruginea* em coluna de sílica gel.

Fração	Eluente	Volume (L)	Massa (g)
F HX	<i>n</i> -hexano	2,1	0,08
F DCM	DCM	18,7	2,40
Pptado FDCM	DCM	2,0	1,51
F DCM/EtOAc	DCM:EtOAc	37,8	6,76
F EtOAc	EtOAc	5,7	4,67
F EtOAc:MeOH	EtOAc:MeOH	81,0	45,46
F MeOH	MeOH	43,5	23,70
F MeOH:HAc	MeOH:HAc (95:5)	25,5	4,00
<i>Total</i>		<i>216,3</i>	<i>88,58</i>

4.6.2.2 Fracionamento de FDCM/EtOAc (coluna 1 - C1)

Uma porção da fração FDCM/EtOAc (6,50 g), obtida do fracionamento preliminar do extrato bruto, foi submetida à cromatografia em coluna aberta de sílica gel (mesh: 0,063-0,200 mm, 200 g, 35 × 6,5 cm). Empregou-se a série eluotrópica descrita na Tabela 6, sendo coletadas frações de 300 mL.

Tabela 6 - Fracionamento de FDCM/EtOAc (C1), em coluna de sílica gel.

Fração	Eluente	Volume (L)	Frações reunidas	Massa (g)
F1-95	DCM	28,5	1-21	0,12
F96-170	DCM:EtOAc (90:10)	22,2	22-28	0,04
F171-208	DCM:EtOAc (75:25)	11,4	29-97	0,16
F209-234	DCM:EtOAc (60:40)	7,5	98-123	1,08
F235-245	DCM:EtOAc (35:65)	3,0	124-208	0,79
F246-257	DCM:EtOAc (20:80)	3,3	209-324	2,80
F258-264	DCM:EtOAc (10:90)	1,8	325-331	0,96
F265-274	EtOAc	2,7		
F275-279	EtOAc:MeOH (98:2)	1,2		
F280-283	EtOAc:MeOH (95:5)	0,9		
F284-288	EtOAc:MeOH (85:15)	1,2		
F289-301	EtOAc:MeOH (75:25)	2,4		
F302-306	EtOAc:MeOH (60:40)	0,9		
F307-311	EtOAc:MeOH (40:60)	1,2		
F312-315	EtOAc:MeOH (20:80)	1,2		
F316-324	EtOAc:MeOH (10:90)	0,9		
F325-328	MeOH	2,4		
F329-331	MeOH:HAc (95:5)	0,9		
<i>Total</i>		93,6		5,95

4.6.2.3 Fracionamento de F209-324 (coluna 2 – C2)

O grupo de frações reunidas F209-324 (2,8 g), resultante da coluna C1, foi submetido à cromatografia em coluna aberta de sílica gel (mesh: 0,063-0,200 mm, 200 g, 36 × 3,5 cm). Empregou-se a série eluotrópica descrita na Tabela 7, sendo coletadas frações de 200 mL. O grupo de frações reunidas 51-58 foi identificado como Rf1.

Tabela 7 - Fracionamento de F 209-324 (C2), em coluna de sílica gel.

Fração	Eluente	Volume (L)	Frações reunidas	Massa (g)
F1-16	DCM	3,2	1-10	0,02
F17-33	DCM:EtOAc (97,5:2,5)	3,2	11-34	0,01
F34-46	DCM:EtOAc (95:5)	2,4	35-36	0,01
F47-130	DCM:EtOAc (92,5:7,5)	16,6	37-48	0,02
F131-135	DCM:EtOAc (90:10)	0,8	49-50	0,08
F136-141	DCM:EtOAc (85:15)	1,0	51-58	0,11
F142-146	DCM:EtOAc (75:25)	0,8	59-70	0,93
F147-150	DCM:EtOAc (65:35)	0,6	71-122	0,41
F151-159	DCM:EtOAc (50:50)	1,6	123-162	0,73
F160-167	DCM:EtOAc (35:65)	1,4	163-176	0,06
F168-175	DCM:EtOAc (20:80)	1,4	177-199	0,01
F176-181	DCM:EtOAc (10:90)	1,0	200-202	0,03
F182-191	EtOAc	1,8	203-213	0,03
F192-195	EtOAc:MeOH (98:2)	0,6	214-222	0,10
F196-201	EtOAc:MeOH (90:10)	1,0		
F202-217	EtOAc:MeOH (75:25)	3,0		
F218-222	EtOAc:MeOH (50:50)	0,8		
<i>Total</i>		<i>41,2</i>		<i>2,55</i>

4.6.2.4 Fracionamento de FDCM (coluna 3 – C3)

Uma porção da fração FDCM (1,28 g), obtida do fracionamento preliminar do extrato bruto, foi submetida à cromatografia, sob pressão, em coluna de sílica gel (mesh: 0,040-0,063 mm, 150 g, 56 × 3,0 cm). Empregou-se a série eluotrópica descrita na Tabela 8, sendo coletadas frações de 15 mL.

Tabela 8 - Fracionamento de FDCM (C3), por cromatografia em coluna de sílica gel.

Fração	Eluente	Volume (mL)	Frações reunidas	Massa (mg)
F1-3	HX	45	1-5	62,0
F4-46	HX:DCM (50:50)	630	6-46	272,4
F47-62	HX:DCM (35:65)	225	47-53	14,2
F63-76	HX:DCM (25:75)	195	54-62	17,8
F77-84	HX:DCM (15:85)	105	63-71	24,6
F85-94	DCM	135	72-94	24,4
F95-113	DCM:EtOAc (97,5:2,5)	270	95-108	114,2
F114-117	DCM:EtOAc (90:10)	45	109-123	31,6
F118-122	DCM:EtOAc (80:20)	60	124-131	31,7
F123-127	DCM:EtOAc (70:30)	60	132-160	254,6
F128-134	DCM:EtOAc (50:50)	90	161-168	55,7
F135-139	DCM:EtOAc (30:70)	60		
F140-144	DCM:EtOAc (10:90)	60		
F145-151	EtOAc	90		
F152-156	EtOAc:MeOH (97,5:2,5)	60		
F157-163	EtOAc:MeOH (90:10)	60		
F164-168	EtOAc:MeOH (50:50)	60		
<i>Total</i>		<i>2250</i>		<i>903,2</i>

4.6.2.5 Fracionamento de F6-46 (coluna 4 – C4)

O grupo de frações reunidas F6-46 (272,4 mg), resultante da coluna C3 e eluído com HX:DCM (50:50), foi submetido à cromatografia, sob pressão positiva, em coluna de sílica gel (mesh: 0,040-0,063 mm, 30 g, 42 × 3,5 cm). Empregou-se a série eluotrópica descrita na Tabela 9, sendo coletadas frações de 50 mL. O grupo de frações reunidas 19-23 foi identificado como Rf2.

Tabela 9 - Fracionamento de F 6-46 (C4), em coluna de sílica gel.

Fração	Eluente	Volume (mL)	Frações reunidas	Massa (mg)
F1-2	HX	100	1-6	19,5
F3-17	HX:EtOAc (97:3)	700	7-18	28,8
F18-35	HX:EtOAc (94:6)	850	19-23	97,2
F36-44	HX:EtOAc (92:8)	400	24-48	43,9
F45-50	HX:EtOAc (90:10)	250	49-58	15,4
F51-67	HX:EtOAc (87:13)	800	59-60	17,4
F68-76	HX:EtOAc (83:17)	400	61	2,3
F77-93	HX:EtOAc (75:25)	800	62-63	2,0
F94-101	HX:EtOAc (60:40)	350	64-92	18,4
F102-115	HX:EtOAc (40:60)	650	93-104	7,8
F116-120	HX:EtOAc (10:90)	200	105-113	5,4
F121-125	EtOAc:MeOH (97,5:2,5)	200	114-127	7,8
F126-127	EtOAc:MeOH (80:20)	100		
<i>Total</i>		<i>5800</i>		<i>259,8</i>

4.6.2.6 Fracionamento de F7-18 e precipitado de FDCM (coluna 5 - C5)

O grupo de frações reunidas F7-18 (28,8 mg), obtido da eluição da coluna C4 com HX:EtOAc (97:3), e o precipitado FDCM (1516,6 mg), resultante do fracionamento preliminar do extrato bruto (Figura 5, página 57), foram reunidos devido à semelhança de seus perfis cromatográficos. A massa total reunida (1,54 g) foi submetida à cromatografia sob pressão positiva, em coluna de sílica gel (mesh: 0,040-0,063 mm, 130 g, 32 × 6,0 cm). Empregou-se a série eluotrópica descrita na Tabela 10, sendo coletadas frações de 50 mL. O grupo de frações 19-25 foi identificado como Rf3.

Tabela 10 - Fracionamento de F 7-18 (C5), em coluna de sílica gel.

Fração	Eluente	Volume (mL)	Frações reunidas	Massa (mg)
F1-5	HX	250	1-5	62,0
F6-14	HX:DCM(90:10)	400	6-18	121,7
F15-21	HX:DCM(85:15)	300	19-25	310,8
F22-55	HX:DCM(80:20)	1650	26-37	178,7
F56-62	HX:DCM(75:25)	300	38-52	67,9
F63-68	HX:DCM(65:35)	250	53-68	36,7
F69-130	HX:DCM(50:50)	3050	69-82	113,0
F131-138	HX:DCM(35:65)	350	83-111	177,9
F139-150	HX:DCM(25:75)	550	112-177	289,2
F151-155	HX:DCM(10:90)	200		
F156-160	DCM	200		
F161-171	DCM:EtOAc (95:5)	500		
F172-177	DCM:EtOAc (80:20)	250		
<i>Total</i>		<i>8250</i>		<i>1357,9</i>

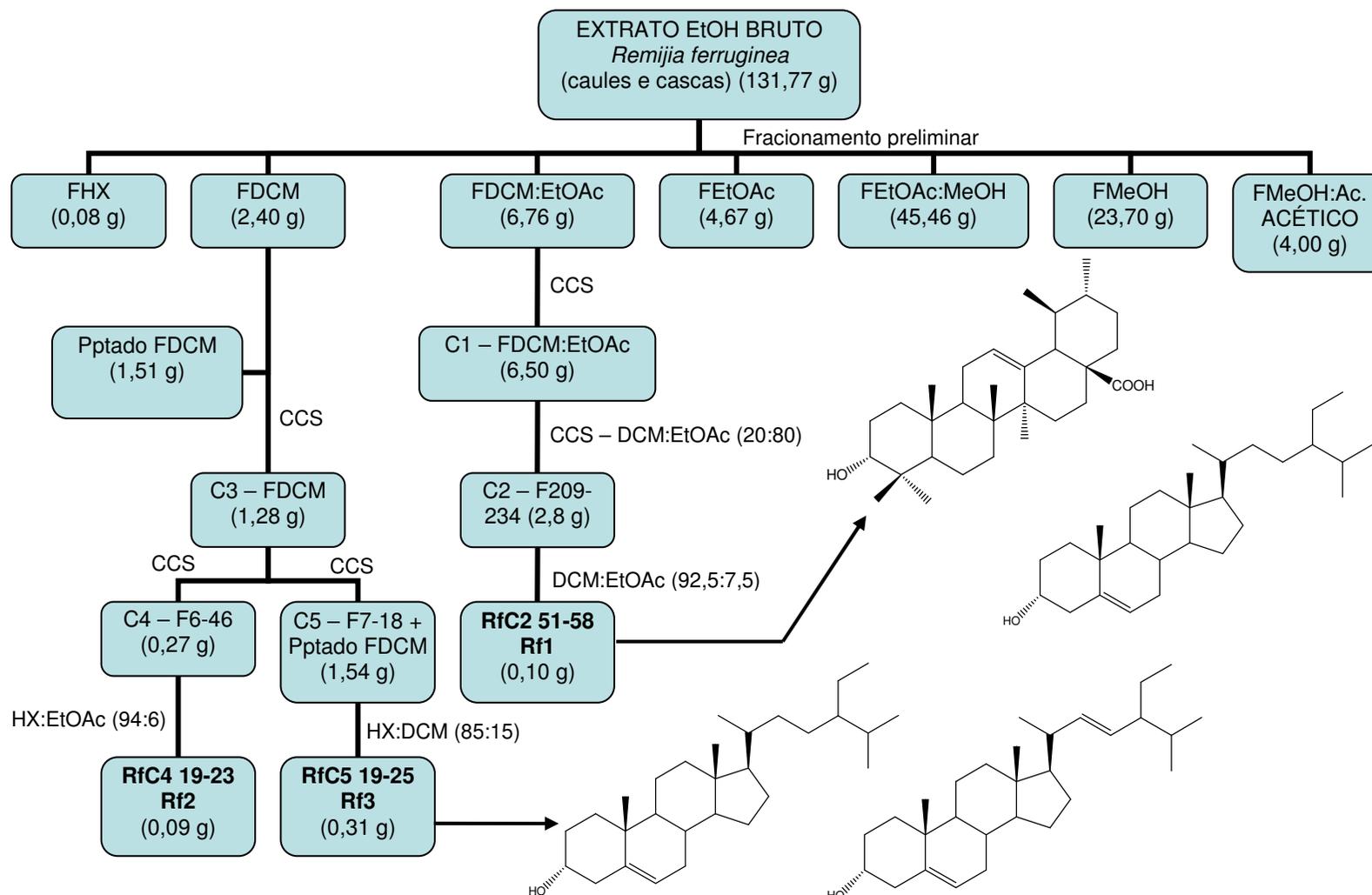


Figura 5 - Fracionamento cromatográfico do extrato etanólico bruto de caules e cascas de *Remijia ferruginea*.

4.6.3 *Solanum paniculatum*

4.6.3.1 Fracionamento preliminar do extrato bruto

O extrato das folhas de *Solanum paniculatum* foi submetido a fracionamento preliminar por filtração em sílica gel. Foram utilizados 231 g de extrato etanólico seco para 500 g de sílica gel, sendo a operação realizada em percolador. Utilizou-se a série eluotrópica descrita na Tabela 11, sendo coletadas frações de 1000mL.

As frações recolhidas foram concentradas em evaporador rotatório a 50°C, sob pressão reduzida, até resíduo. Estes foram transferidos para frascos previamente tarados e mantidos em dessecador, sob vácuo, para completa eliminação do solvente por, no mínimo, 72 horas. Na Tabela 11, encontram-se listadas as frações cromatográficas, os respectivos eluentes e as massas obtidas. O fracionamento cromatográfico de *S. paniculatum* está representado no fluxograma da Figura 6 (pág. 63).

Tabela 11 - Fracionamento preliminar do extrato etanólico bruto de folhas de *Solanum paniculatum* por filtração em sílica gel.

Fração	Eluente	Volume (L)	Massa (g)
F HX	<i>n</i> -hexano	6	20,15
F DCM	DCM	17	21,81
F EtOAc	EtOAc	12	26,44
F EtOAc/MeOH	EtOAc:MeOH	8	91,74
F MeOH	MeOH	10	4,15
<i>Total</i>		<i>53</i>	<i>164,30</i>

4.6.3.2 Fracionamento de FHX (coluna 1 – C1)

Uma porção da fração FHX (18 g), obtida do fracionamento preliminar do extrato bruto, foi submetida à cromatografia em coluna aberta de sílica gel (mesh: 0,063-0,200 mm, 360 g, 31 × 7,0 cm). Empregou-se a série eluotrópica descrita na Tabela 12, sendo coletadas frações de 500 mL.

Tabela 12: Fracionamento de FHX (C1) em coluna de sílica gel.

Fração	Eluente	Volume (L)	Frações reunidas	Massa (g)
1-91	HX	45,5	1-17	0,06
92-97	HX:DCM (95:5)	2,5	18-45	0,06
98-150	HX:DCM (90:10)	26	46-61	0,28
151-191	HX:DCM (85:15)	20	62-65	0,09
192-388	HX:DCM (80:20)	98	66-98	0,28
389-422	HX:DCM (65:35)	16,5	99-111	0,88
423-487	HX:DCM (45:55)	32	112-165	2,51
488-520	HX:DCM (30:70)	16	166-187	0,74
521-537	HX:DCM (15:85)	8	188-231	1,00
538-583	DCM	22,5	232-280	2,43
584-591	DCM:EtOAc (95:5)	3,5	281-362	1,35
592-615	DCM:EtOAc (90:10)	11,5	363-385	0,16
616-628	DCM:EtOAc (80:20)	6	386-432	0,66
629-640	DCM:EtOAc (50:50)	5,5	433-499	0,79
641-654	DCM:EtOAc (25:75)	6,5	500-538	0,36
655-663	EtOAc	4	539	0,27
664-671	EtOAc:MeOH (95:5)	3,5	540-548	0,90
672-683	EtOAc:MeOH (90:10)	5,5	549-555	0,34
684-689	EtOAc:MeOH (75:25)	2,5	556-559	0,08
690-694	EtOAc:MeOH (50:50)	2	560-610	0,71
695-696	MeOH	0,5	611-694	2,14
			695-696	1,25
<i>Total</i>		<i>338</i>		<i>16,64</i>

4.6.3.3 Fracionamento de F281-362 (coluna 2 – C2)

O grupo de frações reunidas F281-362 (1,35 g), resultante da coluna C1, eluído com HX:DCM (80:20), foi submetido à cromatografia em coluna aberta de sílica gel (mesh: 0,063-0,200 mm, 135 g, 31 × 4,0 cm). Empregou-se a série eluotrópica descrita na Tabela 13, sendo coletadas frações de 125 mL. O grupo de frações reunidas 84-120 foi identificado como Sp1.

Tabela 13 - Fracionamento de F281-362 (C2) em coluna de sílica gel.

Fração	Eluente	Volume (L)	Frações reunidas	Massa (mg)
1-10	HX:DCM (85:15)	1,25	1-12	141,3
11-17	HX:DCM (82:20)	0,75	13-24	40,8
18-25	HX:DCM (75:25)	0,87	25-42	39,8
26-37	HX:DCM (70:30)	1,37	43-48	90,9
38-62	HX:DCM (68:32)	3,00	49-70	74,4
63-77	HX:DCM (61:39)	1,75	71-80	27,4
78-143	HX:DCM (55:45)	8,12	81-83	24,5
144-149	HX:DCM (50:50)	0,62	84-120	453,4
150-153	HX:DCM (45:55)	0,37	121-136	11,6
154-163	HX:DCM (35:65)	1,12	137-165	25,6
164-172	HX:DCM (25:75)	1,00		
173-180	DCM	0,87		
<i>Total</i>		<i>21,12</i>		<i>929,7</i>

4.6.3.4 Fracionamento de FDCM (coluna 3 – C3)

Uma porção da fração FDCM (20 g), obtida do fracionamento preliminar do extrato bruto, foi cromatografada em coluna aberta de sílica gel (mesh: 0,063-0,200 mm, 200 g, 22,5 x 6,5 cm). Empregou-se a série eluotrópica descrita na Tabela 14, sendo coletadas frações de 300 mL.

Tabela 14 - Fracionamento de FDCM (C3) em coluna de sílica gel.

Fração	Eluente	Volume (L)	Frações reunidas	Massa (g)
1-15	HXDCM (50:50)	4,5	1-22	0,06
16-34	HX:DCM (25:75)	5,4	23-41	0,35
35-138	DCM	30,9	42-102	2,10
139-169	DCM:EtOAc (95:5)	9,0	103-146	0,76
170-189	DCM:EtOAc (85:15)	5,7	147-157	0,58
190-201	DCM:EtOAc (70:30)	3,3	158-171	0,38
202-213	DCM:EtOAc (50:50)	3,3	172-174	1,12
214-241	DCM:EtOAc (25:75)	8,1	175-182	1,18
242-255	EtOAc	3,9	183-217	4,27
256-283	EtOAc:MeOH (95:5)	8,1	218-228	1,77
284-296	EtOAc:MeOH (85:15)	3,6	229-237	1,47
297-308	EtOAc:MeOH (70:30)	3,3	238-250	0,35
309-315	EtOAc:MeOH (50:50)	1,8	251-265	1,28
316-319	EtOAc:MeOH (25:75)	0,9	266-273	0,44
320-324	MeOH	1,2	274-285	0,75
325-328	MeOH: HAc (90:10)	0,69	286-299	1,79
			300-328	1,09
<i>Total</i>		<i>93,6</i>		<i>17,94</i>

4.6.3.5 Fracionamento de F42-102 (coluna 4 – C4)

O grupo de frações reunidas F42-102 (2,1 g), resultante da coluna C3, eluído com DCM, foi cromatografado em coluna aberta de sílica gel (mesh: 0,063-0,200 mm, 50 g, 35 × 4,0 cm). Empregou-se a série eluotrópica descrita na Tabela 15, sendo coletadas frações de 200 mL.

Tabela 15 - Fracionamento de F42-102 (C4) em coluna de sílica gel.

Fração	Eluente	Volume (L)	Frações reunidas	Massa (mg)
1-8	HX:DCM (50:50)	1,6	1-32	0,01
9-19	HX:DCM (25:75)	2,0	33-61	0,20
20-83	HX:DCM (12,5:87,5)	12,6	62-105	0,12
84-104	DCM	4,0	106-111	1,36
105-108	DCM:EtOAc (95:5)	0,6		
109-111	EtOAc:MeOH (50:50)	0,4		
<i>Total</i>		<i>21,2</i>		<i>1,74</i>

4.6.3.6 Marcha para obtenção de alcalóides e fracionamento de FDCM

A 25,0 g do extrato etanólico de folhas de *S. paniculatum* foram adicionados 200 mL de solução aquosa de HCl 0,5 N, seguindo-se sonicação em banho de ultrassom por 15 min. A porção solúvel foi então transferida para um funil de separação, sendo alcalinizada com NH₄OH concentrado até pH 10-11, seguindo-se extração com DCM (3 × 200 mL). Na seqüência, a fase diclorometânica foi seca em sulfato de sódio anidro e o solvente eliminado em evaporador rotatório, obtendo-se 1,93 g de resíduo. A fase aquosa foi submetida à extração com EtOAc (3 × 200 mL). As fases EtOAc e aquosa foram concentradas até resíduo em evaporador rotatório, resultando em resíduos de 0,37 g e 18,7 g, respectivamente.

Na seqüência, uma porção do resíduo da fase diclorometânica (FDCM; 1,73 g) foi cromatografado em coluna aberta de sílica gel (C5) (mesh: 0,063-0,200 mm, 200 g, 55 × 4,0 cm), empregando-se a série eluotrópica descrita na Tabela 16. Recolheram-se frações de 100 mL. O grupo de frações reunidas 62-105 foi identificado como Sp2. O fracionamento do extrato bruto de *S. paniculatum*, visando obter frações enriquecidas em alcalóides, está representado no organograma da Figura 7 (pág. 64).

Tabela 16 - Fracionamento do resíduo da fase DCM (C5) em coluna de sílica gel.

Fração	Eluente	Volume (mL)	Frações reunidas	Massa (mg)
1-8	HX	0,80	1-45	16,3
9-17	HX:DCM (90:10)	0,80	46-59	34,9
18-43	HX:DCM (85:15)	2,50	60-69	103,7
44-89	HX:DCM (60:40)	4,50	70-92	14,1
90-108	HX:DCM (40:60)	1,80	93-114	389,7
109-111	HX:DCM (15:85)	0,20	115-123	53,4
112-123	DCM	1,10	124-167	164,2
124-138	DCM:EtOAc (90:10)	1,40	168-181	359,7
139-156	DCM:EtOAc (75:25)	1,70	182-194	264,9
157-167	EtOAc	1,00	195-202	170,8
168-189	EtOAc:MeOH (50:50)	2,10		
190-202	MeOH	1,20		
<i>Total</i>		<i>19,10</i>		<i>1571,7</i>

4.6.3.7 Fracionamento de F182-194 (coluna 6 – C6)

Uma porção da fração reunida F182-194 (109,6 mg), obtida da coluna C5, foi cromatografada em coluna de sílica gel (mesh: 0,063-0,200 mm, 30 g, 60 × 2,0 cm). Empregou-se a série eluotrópica descrita na Tabela 17, sendo coletadas frações de 5 mL. O grupo de frações reunidas 12-26 foi identificado como Sp3.

Tabela 17 - Fracionamento de F F182-194 (C6) em coluna de sílica gel.

Fração	Eluente	Volume (mL)	Frações reunidas	Massa (mg)
1-15	EtOAc	75	1-11	2,5
16-28	EtOAc:MeOH (97,5:2,5)	70	12-26	46,8
29-41	EtOAc:MeOH (95:5)	60	27-39	15,3
42-48	EtOAc:MeOH (90:10)	30	40-46	13,4
49-63	EtOAc:MeOH (80:20)	70	47-58	10,3
64-73	EtOAc:MeOH (65:35)	45	59-73	4,5
<i>Total</i>		<i>350</i>		<i>92,8</i>

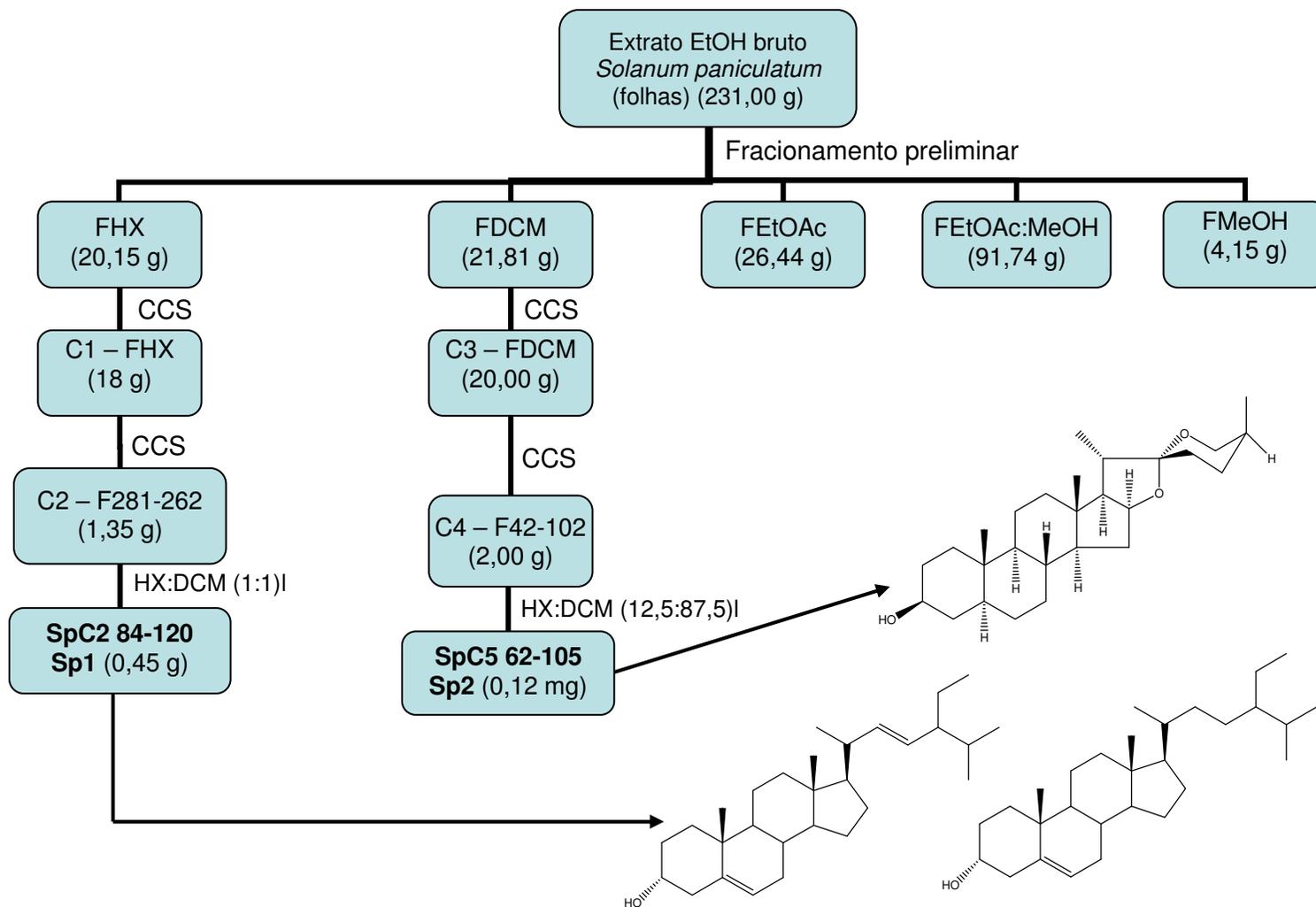


Figura 6 - Fracionamento cromatográfico do extrato etanólico bruto de folhas de *Solanum paniculatum*.

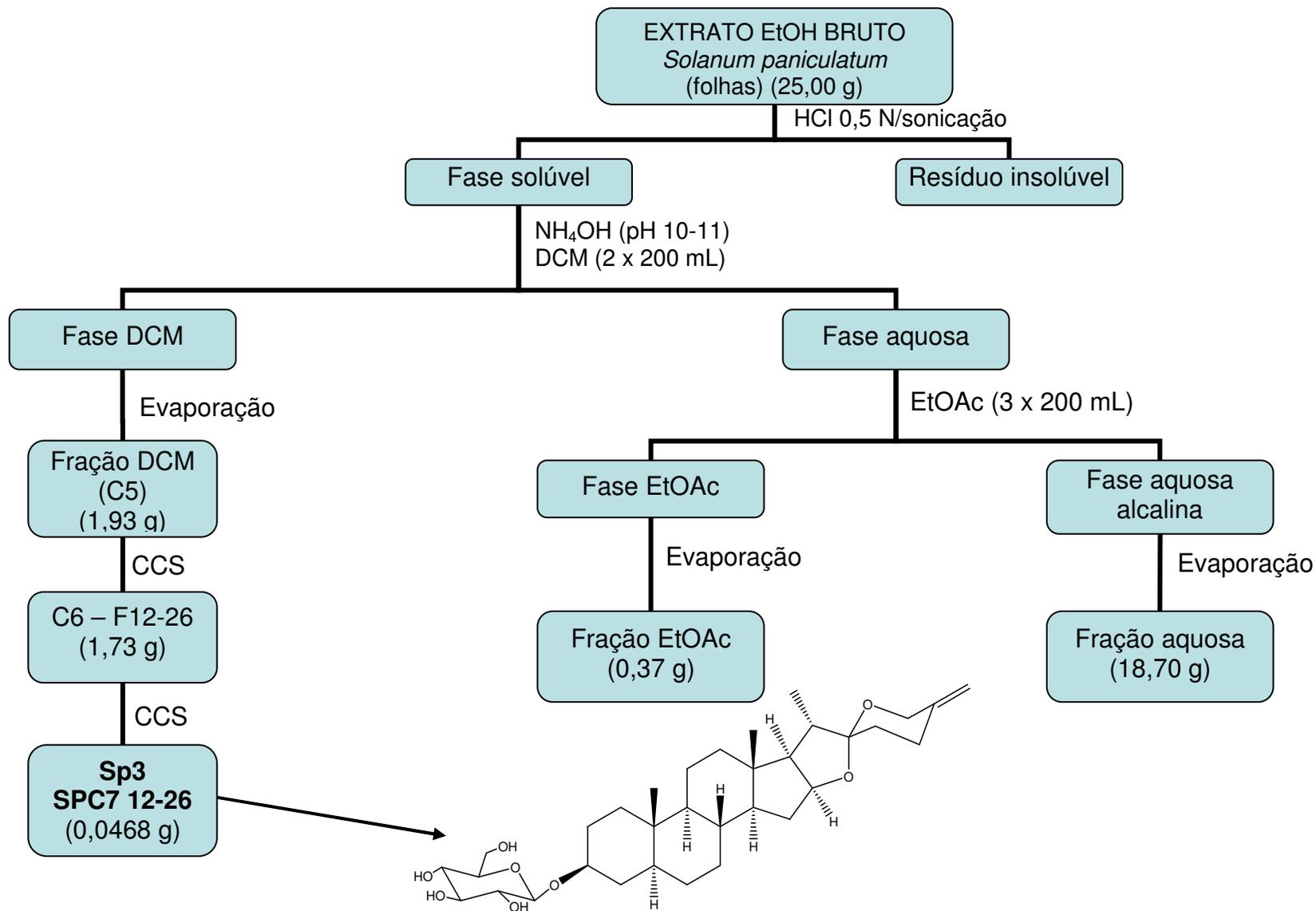


Figura 7 - Fracionamento do extrato bruto de *Solanum paniculatum* visando à obtenção de fração alcaloídica.

4.7 Ensaios biológicos

4.7.1 Ensaios *in vitro* de atividade antiviral

Os ensaios foram realizados pelo doutorando Geraldo Célio Bandrão, sob supervisão da Profa. Erna Geessien Kroon, no Laboratório de Vírus, ICB, UFMG.

4.7.1.1 Avaliação da citotoxicidade

Para avaliação da citotoxicidade celular, atividade antiviral e determinação dos títulos virais foram empregadas Células VERO, oriundas de rim de macaco verde (*Cercopithecus aethiops*), multiplicadas em meio MEM (meio mínimo essencial Eagle). A citotoxicidade celular foi avaliada segundo metodologia descrita por Kumar & Das (1996), Mosmann (1983) e Twentnan & Luscombe (1987). Foram realizadas 4 replicatas dos experimentos para todas as amostras testadas, sendo os resultados expressos como citotoxicidade a 50 % (CC₅₀).

4.7.1.2 Avaliação da atividade antiviral

4.7.1.2.1 Vírus

Cepas dos vírus HHV-1 (isolado clínico proveniente de herpes labial em adulto saudável), Encefalomiocardite murina (EMC; cedida pelo Dr. I. Kerr, Londres, Reino Unido) e Vaccinia vírus Western Reserve (VACV-WR; cedida pelo Dr. C. Jungwirth, Universidade de Würzburg, Alemanha) foram empregadas nos ensaios. Os estoques de vírus foram obtidos em cultivos de fibroblastos de camundongos (L-929).

4.7.1.2.2 Título viral

O título viral foi determinado pelo método TCID₅₀ (diluição de vírus exigida para infectar 50% de um determinado grupo de células inoculadas) segundo Reed & Muench (1938).

4.7.1.2.3 Avaliação da atividade antiviral

A atividade antiviral do extrato bruto de *S. paniculatum* e das substâncias **Sp2** e **Sp3** foi determinada pelo ensaio colorimétrico do MTT (BETANCUR-GALVIS et al., 1999; MOSMANN, 1983). Foram preparadas soluções estoque das amostras em DMSO, as quais foram ensaiadas em concentrações não citotóxicas. Aciclovir e interferon α foram empregados como controle positivo (BETANCUR-GALVIS et al., 2002; 1999). A concentração eficaz que representa 50% de efeito antiviral (CI_{50}) foi expressa como a concentração que promoveu a proteção de 50% das células tratadas da destruição causada pelo vírus.

4.7.1.3 Análise dos dados

Os valores de CC_{50} e CI_{50} para cada amostra foram obtidos de curvas concentração-resposta. Os valores obtidos correspondem à média de 4 ensaios realizados em 4 concentrações distintas. O índice terapêutico IT, foi definido como CC_{50}/CI_{50} .

4.7.2 Ensaio ex vivo de absorção de lipídeos

Os ensaios foram executados pela autora, sob orientação da Profa. Leida Maria Botion, Departamento de Fisiologia, ICB, UFMG.

4.7.2.1 Preparo das soluções

4.7.2.1.1 Tampão fosfato 0,1M

Tomou-se uma alíquota de 62,7 mL de uma solução de KH_2PO_4 a 13,55 g/L, transferiu-se para um béquer e adicionaram-se 37,3 mL de uma solução de $Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$ a 17,73 g/L. Ajustou-se o pH na faixa entre 6,6 e 6,8 com solução de KOH 0,1 M. A solução foi acondicionada em geladeira, até o momento do uso.

4.7.2.1.2 Tampão experimento

Tomaram-se 100 mL de solução salina (NaCl 0,9%) livre de Ca^{2+} , 4 mL de solução de KCl a 1,15%, 1 mL de solução de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ a 3,82%, 20 mL de tampão fosfato 0,1 M e acrescentou-se glicose (62,5 mg). Homogeneizou-se e gaseificou-se por uma hora com carbogênio (5% CO_2 e 95% O_2). A solução foi mantida em geladeira até o momento do uso.

4.7.2.1.3 Solução mucosa

Misturaram-se 100 mL da solução tampão experimento, 0,884 g de trioleína (triglicéride) e 0,52 g de ácido deoxicólico (ácido biliar). A suspensão foi sonicada por 5 min, com intervalos seriados de 30 s. A emulsão obtida foi mantida em geladeira, homogeneizada e gaseificada por uma hora antes do uso.

4.7.2.1.4 Solução serosa

Ao tampão experimento acrescentou-se 1% de albumina deslipidada. A solução foi mantida em geladeira até o momento do uso.

4.7.2.1.5 Triton

Preparou-se uma solução a 0,2% de triton em água destilada, seguindo-se homogeneização por 20 min. A solução foi mantida em geladeira.

4.7.2.2 Protocolo experimental

Ratos Wistar machos (180-200 g), em jejum alimentar de 24 h, foram sacrificados por decapitação em guilhotina, sendo o abdome imediatamente aberto por incisão na parte mediana. O intestino delgado foi, então, lavado *in situ* com solução isotônica gelada de NaCl. A porção do intestino imediatamente distal ao duodeno, logo após o ligamento de Treitz, foi retirada e evertida rapidamente, com o auxílio de um microbastão de vidro (BENNETT, 1971; WILSON; WISEMAN, 1954). Transferiu-se a alça intestinal de jejuno para uma placa de petri gelada, contendo o tampão experimento. Uma das porções terminais da alça intestinal foi amarrada com linha e a alça foi completamente preenchida com a solução serosa (0,2 mL/cm),

amarrando-se, na seqüência, a outra extremidade. Com o auxílio de pinça cirúrgica, foram amarrados intervalos regulares na alça, obtendo-se cerca de 18 sacos por alça, medindo entre 1,5 e 2 cm e com massa de 200 a 300 mg. Estes foram então divididos em seis grupos: grupo controle G1, e grupos experimento G2, G3, G4, G5 e G6, aos quais foi inoculada a solução fitoterápica [G2 (1 μ L), G3 (3 μ L), G4 (10 μ L), G5 (30 μ L) e G6 (100 μ L)]. Uma alíquota (3,0 mL) da solução mucosa foi transferida para frascos de penicilina aos quais se adicionou a solução fitoterápica no volume correspondente a cada grupo. Efetuou-se a pesagem dos frascos e na seqüência adicionou-se um saco intestinal a cada frasco, que foi novamente pesado. Os frascos foram incubados em banho-maria por 1 hora, a 37°C, sob agitação de 90 rpm. Após incubação, os sacos foram retirados dos frascos de penicilina, lavados com a solução de triton, seguida de solução salina e alíquotas das soluções serosas e mucosas foram retiradas para a dosagem de triglicérides.

A dosagem de triglicérides foi realizada com kits enzimáticos comerciais (Analisa Diagnóstica). Para os ensaios, as amostras foram preparadas em tubos de ensaio. Alíquotas de 10 μ L da solução mucosa de cada frasco de penicilina foram adicionadas aos tubos de ensaio correspondentes e, em seguida, diluiu-se com 90 μ L de solução salina. Das soluções serosas foram coletadas alíquotas de 50 μ L, que foram diluídas com 50 μ L de salina. Preparou-se, também, uma amostra da solução mucosa estoque (controle), adicionando 10 μ L da solução e 90 μ L de salina. O branco foi preparado adicionando-se 100 μ L de salina ao tubo de ensaio correspondente. Os padrões de triglicérides foram preparados em duplicata. Para o padrão 1, adicionou-se 10 μ L de solução comercial padrão de triglicérides a 90 μ L de solução salina, enquanto para o preparo do padrão 2 adicionaram-se 20 μ L de solução padrão de triglicérides a 80 μ L de solução salina. A todos os tubos foi adicionado 1,0 mL de solução enzimática. Os tubos foram agitados em vórtex e incubados em banho-maria por 10 min, a 37°C. Após incubação, efetuou-se a leitura das absorvâncias a 540 nm.

Para o cálculo da concentração de triglicérides em cada amostra utilizou-se a seguinte equação:

$$F_c = \frac{C_p}{A_p} \qquad C_t = F_c \times A_t \qquad C_t(\text{mg/dL}) = F_c \times A_t$$
$$C_t(\text{mmol/mL}) = F_c \times A_t \times 0,0113$$

Onde: F_c = fator de correção

C_p = concentração do padrão

A_p = absorvância do padrão

C_t = concentração do teste

A_t = Absorvância do teste

Os experimentos foram realizados em triplicata e os resultados foram expressos em mmol/mL. O procedimento foi aprovado pelo comitê de ética da Universidade Federal de Minas Gerais.

4.7.3 Análises estatísticas

Utilizou-se a estatística t de Student para se comparar a concentração média de triglicérides ($H_0: \mu_1 = \mu_n$; $H_1: \mu_1 \neq \mu_n$) do grupo controle (G1) com as médias de cada um dos grupos experimento, G2, G3, G4, G5, e G6, considerando um nível de significância de 95%.

4.7.4 Ensaios *in vivo* de absorção de lipídeos

Os ensaios foram realizados pelas doutorandas Érika Guilhen Mario e Laura Cristina Jardim Porto, sob orientação da Profa. Leida Maria Botion, Departamento de Fisiologia, ICB, UFMG.

4.7.4.1 Protocolo experimental

Utilizaram-se ratos Wistar machos provenientes do centro de bioterismo (CEBIO) do ICB, UFMG, pesando entre 250 e 300 g. Os animais foram divididos em 4 grupos: grupo controle e grupos experimento, nos quais foram administrados os extratos das três espécies estudadas (*R. ferruginea*, *S. paniculatum* e *J. caroba*). Os animais foram mantidos em gaiolas individuais, com temperatura ($\sim 25^\circ\text{C}$) e umidade controladas e ciclo claro/escuro de 14/10 horas.

Inicialmente, os animais foram tratados com dieta padrão constituída por ração peletizada (41% carboidratos, 4% gordura, 22% proteína). Três dias antes do experimento, a ração peletizada foi removida as 14:00 horas, sendo administrada dieta hiperlipídica (56% carboidratos, 25% gordura, 15% proteína) nas manhãs seguintes, no período entre 10:00 – 12:00 horas. Durante este período, água foi fornecida *ad libitum*. No dia do experimento e, imediatamente antes do fornecimento da dieta, administraram-se aos animais pertencentes aos grupos amostra, via gavagem, 20 µL dos extratos nas doses de 0,1, 1,0 e 5,0 mg/mL, diluídos em 500 µL de solução fisiológica. Ao grupo controle foi fornecido somente o veículo. Na seqüência, a dieta hiperlipídica foi fornecida *ad libitum* por 2 horas (BOTION et al., 2005). Após este período, foram realizadas coletas de sangue da veia caudal de todos os animais para determinar a concentração de triglicérides plasmáticos. A dosagem de triglicérides foi realizada com o emprego de kits enzimáticos comerciais (Analisa Diagnóstica) e a leitura das absorbâncias foi efetuada a 540 nm. Após o sacrifício dos animais, coletaram-se amostras do tecido adiposo epididimal para determinar a atividade da enzima lipase lipoprotéica. Os ensaios foram realizados com $n = 6$ animais. O procedimento foi aprovado pelo comitê de ética da Universidade Federal de Minas Gerais.

4.7.5 Medida da atividade da lipase lipoprotéica

As amostras de tecido adiposo epididimal (50 mg) foram homogeneizadas com 500 µL de tampão Tris, pH 8,5, contendo 0,05 mg/mL de heparina, 10,0 mg/mL de BSA e 2,0 mg/mL de deoxicolato de sódio. Centrifugou-se a 2500 rpm por 15 minutos e coletou-se a camada intermediária para a medida da atividade enzimática (IVERIUS; ÖSTLUND-LINDQVIST, 1986). O substrato foi preparado a partir da sonicação de 12-µCi [9,10-³H]-trioleína em tampão Tris, usando lecitina (3,6 mg) e glicerol (5 mL) como emulsionantes, sendo incubado a 37°C, por 45 min (NILSSON-EHLE; SCHOTZ, 1976). A reação foi interrompida pela adição de 3,25 mL de metanol:clorofórmio:heptana 1,41:1,25:1 (v/v/v), seguido de 1,05 mL de tampão potássio carbonato-borato 0,1 M (pH 10,5). Os [³H]-ácidos graxos livres, resultantes da hidrólise enzimática, foram quantificados por espectrometria de cintilação líquida ($n = 6$) e a atividade da LPL foi expressa em mU (1mU = 1 nmol de ácido oléico livre/min) (BELFRAGE; VAUGHAN, 1969).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Análises por cromatografia líquida de alta eficiência (RP-HPLC)

As análises por RP-HPLC objetivaram obter perfis cromatográficos exploratórios dos extratos vegetais (“impressão digital”), visando à avaliação preliminar de sua complexidade e a polaridade dos constituintes. Os cromatogramas obtidos por RP-HPLC também foram utilizados para monitorar os processos de fracionamento e para avaliar a pureza das substâncias isoladas.

Assim, foram obtidos perfis cromatográficos, por RP-HPLC, para os extratos etanólicos das três espécies vegetais, para as frações resultantes do fracionamento preliminar e para as substâncias isoladas, empregando as condições cromatográficas descritas no item 4.5.2.

5.1.1 *Jacaranda caroba*

O perfil cromatográfico obtido para o extrato bruto de *J. caroba* (Figura 8) mostrou-se complexo, com o predomínio de picos relativos a constituintes de elevada polaridade (Tr de 0 a 20 min). Observou-se, também, a presença de alguns picos referentes a substâncias de menor polaridade (Tr entre 38 e 61 min), com destaque para o pico intenso, com Tr = 48,06 min.

Este extrato foi submetido a fracionamento preliminar em coluna de sílica gel (item 4.6.1.1) resultando em cinco frações. Observou-se o predomínio da(s) substância(s) com Tr = 48,25 min na fração FDCM/EtOAc (Figura 8), sendo esta selecionada para fracionamento posterior, resultando no isolamento de Jc2 (Tr = 47,52 min), Jc3 (Tr = 47,59 min) e Jc4 (mistura, Tr = 47,62 min), todos de natureza triterpênica. A fração FHX também foi refracionada, obtendo-se Jc1 (Tr = 48,14 min).

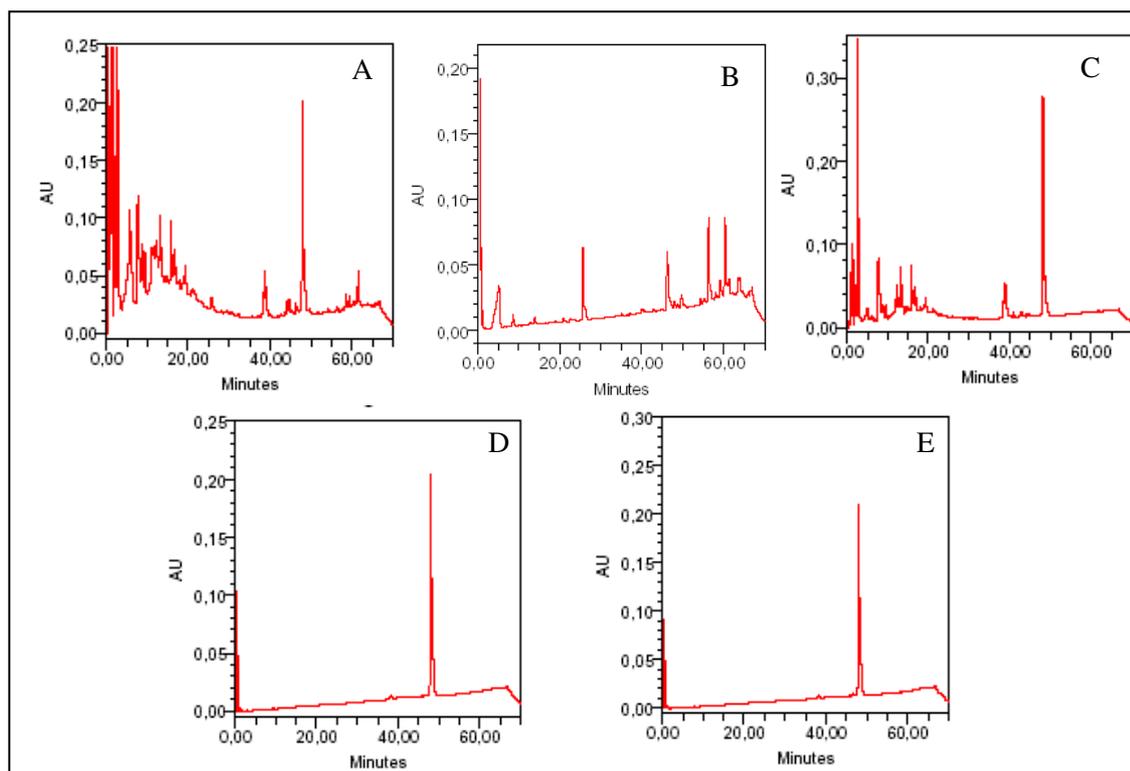


Figura 8 - Perfis cromatográficos obtidos por RP-HPLC para o extrato (A) e frações FHX (B), FDCM/EtOAc (C) de *J. caroba*, bem como para os sólidos isolados Jc2 (D) e Jc3 (E) (condições cromatográficas: vide item 4.5.2).

5.1.2 *Remijia ferruginea*

O perfil cromatográfico obtido para o extrato bruto de *R. ferruginea* (Figura 9), também revelou o predomínio de picos correspondentes a substâncias de elevada polaridade (Tr entre 0 e 20 min). Cabe ressaltar, ainda, a presença do pico com Tr = 48,24 min, tempo de retenção semelhante àquele detectado no extrato de *J. caroba*. O fracionamento preliminar do extrato resultou em cinco frações. Observou-se a concentração do pico com TR = 48,24 min nas frações FDCM e FDCM/EtOAc (Figura 9). O refracionamento de FDCM/EtOAc em coluna de sílica gel resultou no isolamento de Rf1 (Tr = 48,09 min), enquanto Rf2 (Tr = 48,18 min) e Rf3 (mistura) originaram-se do refracionamento de FHX.

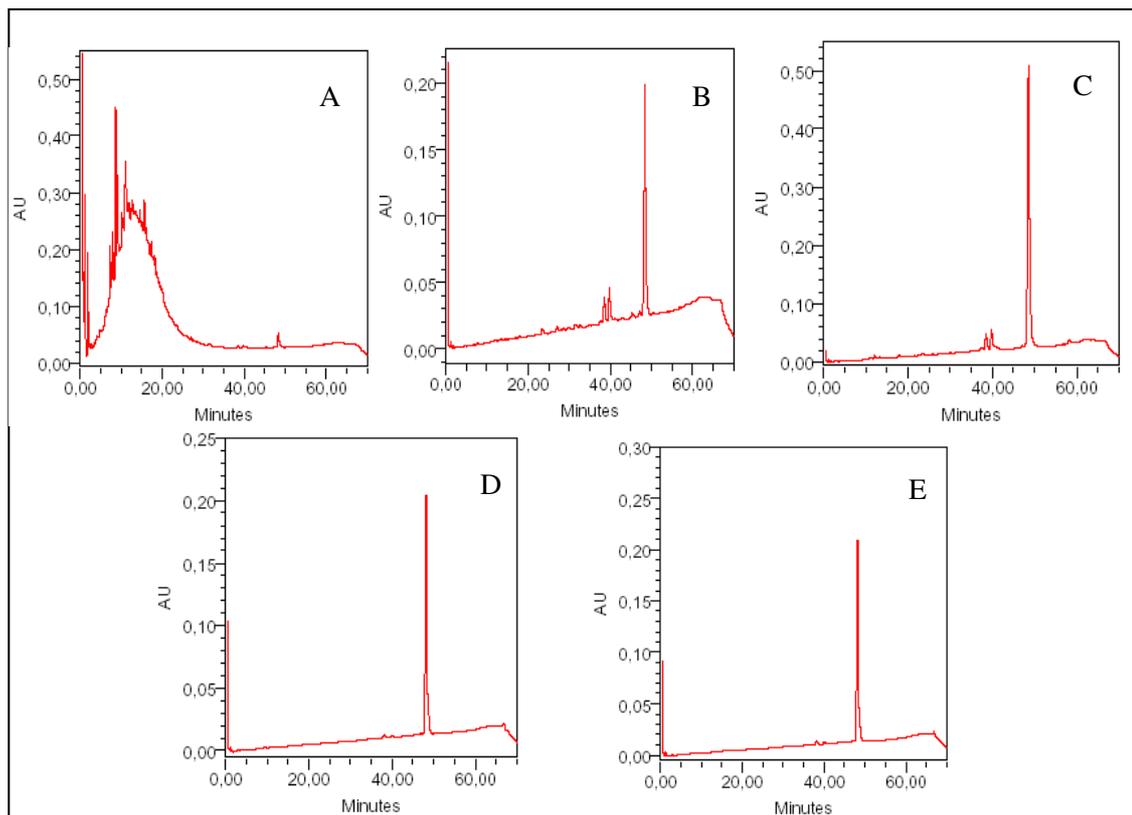


Figura 9 - Perfis cromatográficos obtidos por RP-HPLC para o extrato (A) e frações FDCM (B) e FDCM/EtOAC (C) de *R. ferruginea*, bem como para os sólidos isolados Rf1 (D) e Rf2 (E) (condições cromatográficas, item 4.5.2).

5.1.3 *Solanum paniculatum*

O perfil cromatográfico obtido para o extrato bruto de *S. paniculatum* apresentou predomínio de picos com Tr entre 0 e 13 min, correspondentes a substâncias de elevada polaridade, e menor complexidade em relação aos perfis obtidos para as demais espécies (Figura 10). Seu fracionamento preliminar (item 4.6.3) resultou em cinco frações, sendo FHX e FDCM posteriormente cromatografadas em coluna de sílica gel, levando ao isolamento de Sp1 (Tr = 48,14 min) da primeira e Sp2 (pico não detectado pelo DAD) da segunda. FDCM, obtida da partição do extrato bruto entre solventes imiscíveis (página 64), também foi cromatografada em coluna de sílica gel (item 4.6.3.4) e resultou no isolamento de Sp3 (pico não detectado pelo DAD).

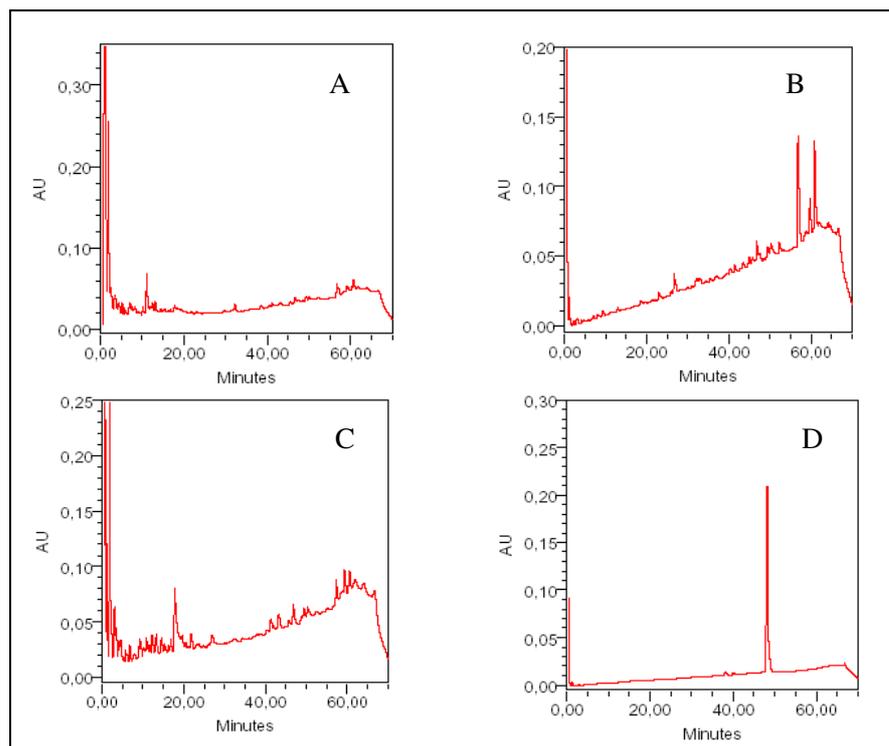


Figura 10 - Perfis cromatográficos obtidos por RP-HPLC para o extrato (A) e frações FHX (B) e FDCM (C) de *S. paniculatum*, bem como para o sólido isolado Sp1 (D) (condições cromatográficas, item 4.5.2).

5.2 Elucidação estrutural das substâncias isoladas

J. caroba, *R. ferruginea* e *S. paniculatum* foram submetidas a estudo fitoquímico preliminar, visando isolar os constituintes majoritários de cada espécie e avaliar a atividade biológica das substâncias isoladas.

5.2.1 Elucidação estrutural das substâncias isoladas de *Jacaranda caroba*

5.2.1.1 Jc1

Jc1 (4,27g), oriunda de FHX de *J. caroba*, apresentou-se como um sólido cristalino acicular branco, com temperatura de fusão na faixa entre 130,0 – 131,9 °C. Sua análise por CCD de sílica gel sugeriu uma substância esteroideal, após revelação com reagente de Liebermann-Burchard.

O espectro no IV de Jc1 evidenciou sua natureza alifática pela presença de absorções intensas em 2931 e 2850 cm^{-1} , atribuídas à deformação axial C-H, e ausência de absorções nas regiões características de aromáticos. A banda larga centrada em 3428 cm^{-1} foi atribuída à deformação axial de OH livre. A presença de hidroxila foi confirmada pela absorção em 1375 cm^{-1} , atribuída à deformação angular no plano de OH. A banda em 1463 cm^{-1} foi atribuída à deformação angular simétrica no plano de ligação CH (CH_2). A banda em 1053 cm^{-1} foi atribuída à deformação axial de CO de álcool secundário (SILVERSTEIN; WEBSTER, 2000).

O espectro de RMN de ^{13}C revelou a presença de 29 sinais de carbono. A análise dos espectros de IV, RMN de ^1H e de ^{13}C e do subespectro DEPT-135, e a comparação com dados da literatura (NES et al., 1992) possibilitaram identificar Jc1 como β -sitosterol (**29**). A atribuição dos sinais dos espectros de RMN de ^{13}C e ^1H obtidos para Jc1 e a comparação com dados da literatura encontram-se nas Tabelas 18 e 19.

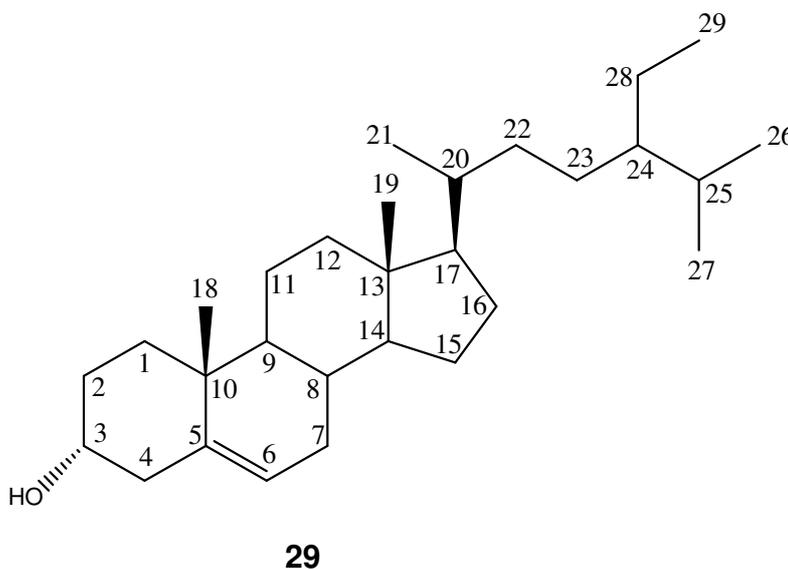


Tabela 18 - Atribuição dos sinais do espectro de RMN de ^{13}C obtido para Jc1 (50 MHz, CDCl_3) e comparação com dados da literatura para o β -sitosterol.

Carbono	β -sitosterol (δ , ppm)*	Jc1 (δ , ppm)	Tipo
1	37,2	37,4	CH_2
2	31,6	31,8	CH_2
3	71,8	72,0	CH
4	42,5	42,5	CH_2
5	140,7	140,9	C
6	121,7	121,9	CH
7	31,8	32,1	CH_2
8	31,9	31,8	C
9	50,1	50,3	CH
10	36,5	36,7	C
11	21,1	21,3	CH_2
12	39,7	40,0	CH_2
13	42,3	42,5	C
14	56,7	56,9	CH
15	24,3	24,5	CH_2
16	28,2	28,4	CH_2
17	56,0	56,2	CH
18	11,9	12,0	CH_3
19	19,4	19,5	CH_3
20	36,1	36,3	CH
21	18,8	18,9	CH_3
22	33,9	34,1	CH_2
23	26,0	26,3	CH_2
24	45,8	46,0	CH
25	29,2	29,3	CH
26	19,8	20,0	CH_3
27	19,1	19,2	CH_3
28	23,0	23,2	CH_2
29	12,0	12,1	CH_3

Nota: * Nes et al., 1992 (50 MHz, CDCl_3).

Tabela 19 - Deslocamentos químicos e constantes de acoplamento escalar (J) de alguns sinais do espectro de RMN de ^1H obtido para Jc1 CDCl_3 .

Hidrogênio	β -sitosterol (δ , ppm)*	Jc1 (δ , ppm)	Multiplicidade
H-18	0,68	0,67	s
H-21	0,92 ($J = 7$ Hz)	0,92 ($J = 6,3$ Hz)	d
H-19	1,01	1,00	s
H-4	2,28	2,31	m
H-3	3,52	3,52	m
H-6	5,36 ($J = 5$ Hz)	5,34 ($J = 4,5$ Hz)	dl

Nota: * Nes et al., 1992 (200 MHz, CDCl_3).

5.2.1.2 Jc2

Jc2 (9,58 g), isolado da fração FDCM/EtOAc de *J. caroba*, foi obtido como um sólido amorfo branco, com temperatura de fusão na faixa entre 250,4–252,2°C. Sua análise por CCD de sílica gel sugeriu um triterpeno, devido ao aparecimento de uma mancha violácea após revelação com reagente de Liebermann-Burchard.

O espectro no IV de Jc2 indicou sua natureza alifática com absorções intensas em 2900, 2860 cm^{-1} e ausência de absorções nas regiões características de aromáticos. As bandas em 3400 e 1689 cm^{-1} confirmaram a presença de hidroxila e carbonila de ácido carboxílico. A banda em 1029 cm^{-1} foi atribuída à deformação axial de CO de álcool secundário (SILVERSTEIN; WEBSTER, 2000).

No espectro de RMN de ^{13}C e subespectro DEPT-135 obtidos para Jc2 (Figuras 12 e 13) foram identificados sinais referentes a trinta átomos de carbono, sendo sete carbonos metílicos, nove metilênicos, sete metínicos e sete carbonos não hidrogenados (Tabela 20). Esses dados e os valores de deslocamentos químicos dos carbonos olefínicos C-12 (δ 125,8) e C-13 (δ 138,5) sugeriram que Jc2 é um triterpeno pentacíclico da série ursano (MAHATO; KUNDU, 1994). O espectro de RMN de ^{13}C também permitiu identificar o carbono carbinólico C-3 (δ 79,0) e um sinal de carbonila de ácido carboxílico (δ 181,0).

O espectro de RMN de ^{13}C é uma ferramenta bastante útil para distinguir triterpenos das séries oleanano e ursano (Figura 11). Um dos fatores a serem considerados é o número de carbonos não hidrogenados, seis nos ursanos e sete nos oleananos; nos urs-12-enos o valor do deslocamento químico de C-12 encontra-se geralmente 2 ppm mais afastado do TMS, e o de C-13 cerca de 5 ppm mais próximo do TMS, em comparação com os sinais correspondentes em olean-12-enos. Portanto, nos urs-12-enos os deslocamentos químicos de C-12 e C-13 encontram-se em torno de δ 125 e δ 140, enquanto nos olean-12-enos estes deslocamentos encontram-se em torno de δ 123 e δ 145, respectivamente (MAHATO; SEN, 1997). Esta diferença se deve ao fato de que, na série ursano, o grupo metila em C-19 está espacialmente próximo à dupla ligação, o que afeta os deslocamentos químicos dos carbonos olefínicos, em relação àqueles da série oleanano, que não apresentam o grupo metila em C-19 (Figura 11). Esta variação nos deslocamentos químicos

aparece como uma proteção γ em C-13 e uma desproteção δ em C-12 (DODRELL et al., 1974).

Observa-se, também, uma variação nos deslocamentos químicos de C-11 e C-27 entre as duas séries. Na série ursano, esses sinais são, respectivamente, cerca de 6,0 e 3,0 ppm mais próximos do TMS que aqueles da série oleanano e, portanto, mais protegidos. Estas diferenças também podem ser explicadas pela mudança conformacional no anel E, causada pela proximidade espacial do grupo metila C-29 com C-12, C-13 e C-27 na série dos ursanos (Figura 11). Outra diferença pode ser observada no deslocamento químico do sinal de C-18, na série oleanano, a metila axial em C-20 exerce efeito protetor sobre C-18 (interação γ gauche). Na série ursano, ocorre efeito de desproteção β do grupo metila equatorial do C-19 sobre C-18. Nos olean-12-enos, o sinal de C-18 encontra-se em torno de 11,5 ppm mais próximo do TMS (valores em torno de δ 41,3 nos oleananos e δ 52,8 nos ursanos) (MAHATO; KUNDU, 1994).

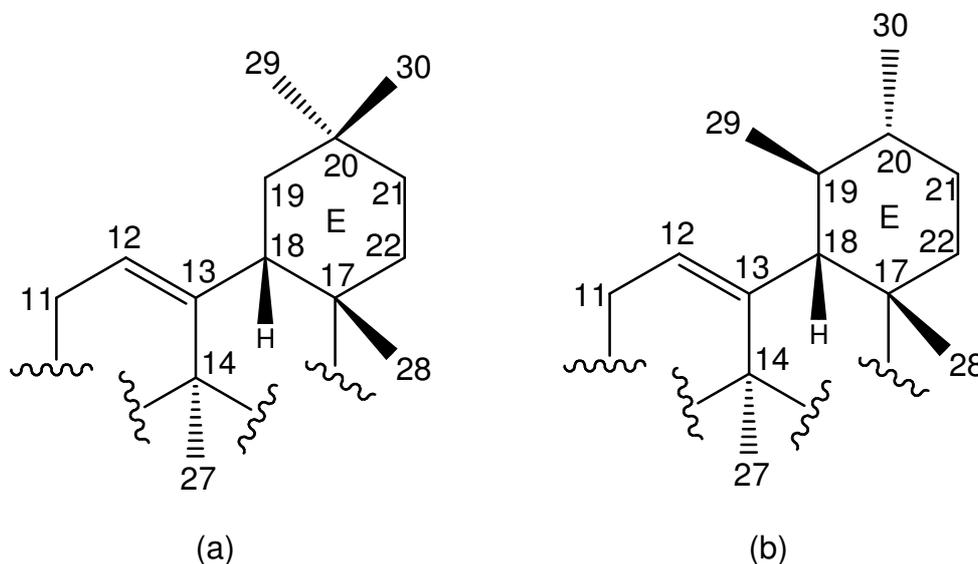


Figura 11 - Estruturas parciais de triterpenos das séries olean-12-enos (a) e urs-12-enos (b).

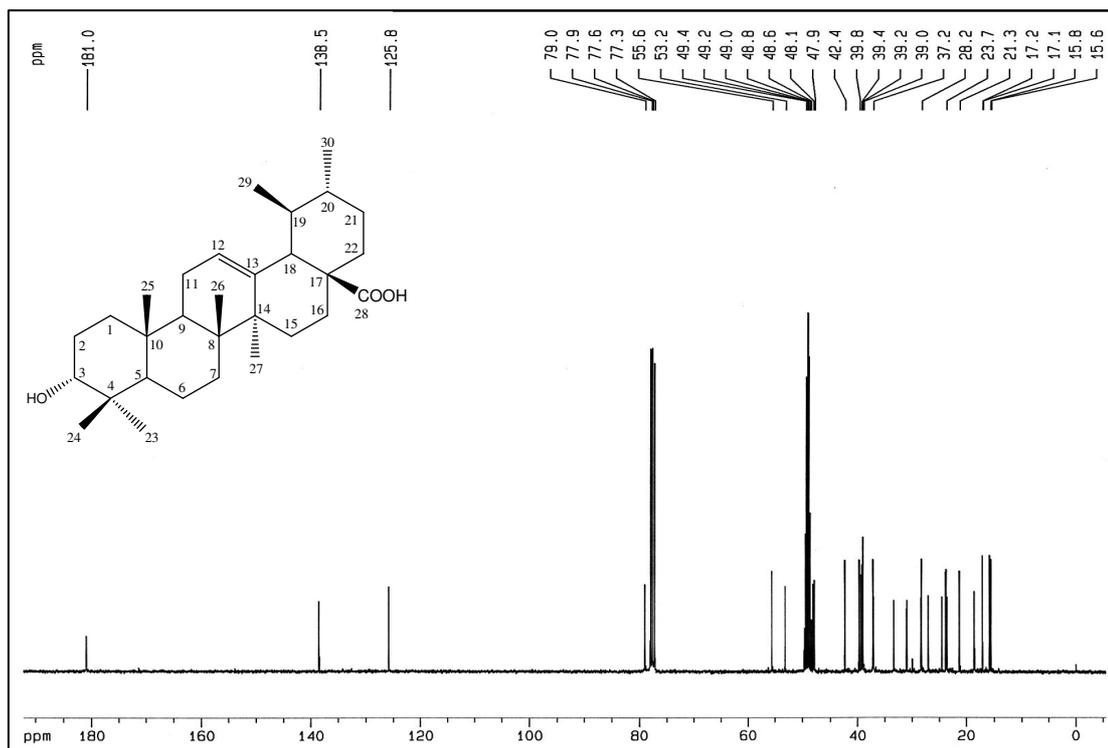
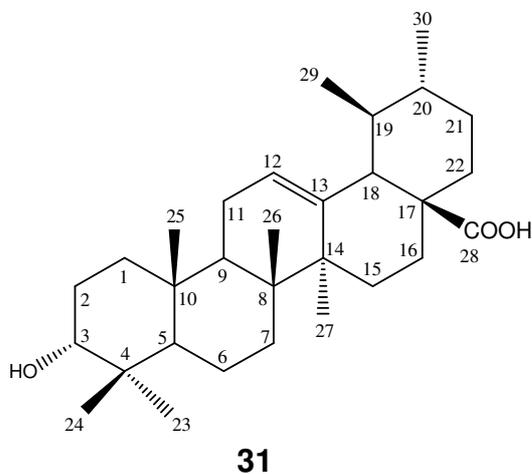


Figura 12 - Espectro de RMN de ¹³C obtido para Jc2 (100 MHz, CDCl₃ + CDOD₃).

Com base nas atribuições anteriormente discutidas, e comparação com dados da literatura, Jc2 foi identificado como sendo o ácido 3β-hidróxi-urs-12-en-28-óico (ácido ursólico) (**31**). A atribuição dos sinais do espectro de RMN de ¹H (Figura 14), e sua comparação com dados da literatura, encontra-se listada na Tabela 21.



31

Tabela 20 - Atribuições dos sinais do espectro de RMN de ^{13}C para Jc2 (100 MHz, $\text{CDCl}_3 + \text{CDOD}_3$) e dados da literatura para o ácido ursólico.

Carbono	Ácido ursólico (δ , ppm)*	Jc2 (δ , ppm)	Tipo
1	38,67	39,00	CH_2
2	27,26	27,02	CH_2
3	79,03	79,00	CH
4	38,77	38,96	C
5	52,27	53,30	CH
6	18,34	18,59	CH_2
7	33,01	33,35	CH_2
8	39,53	39,77	C
9	47,60	47,87	CH
10	37,00	37,21	C
11	23,32	23,54	CH_2
12	125,60	125,80	CH
13	138,17	138,50	C
14	42,02	42,35	C
15	28,06	28,20	CH_2
16	24,26	24,49	CH_2
17	48,12	48,10	C
18	52,92	53,10	CH
19	39,08	39,38	CH
20	38,90	39,22	CH
21	30,68	30,95	CH_2
22	36,66	37,11	CH_2
23	28,16	28,20	CH_3
24	15,45	15,61	CH_3
25	15,63	15,81	CH_3
26	16,93	17,11	CH_3
27	23,63	23,73	CH_3
28	180,96	181,00	C
29	16,93	17,20	CH_3
30	21,18	21,30	CH_3

Nota: * Takeoka et al., 2000 (50 MHz, CDCl_3).

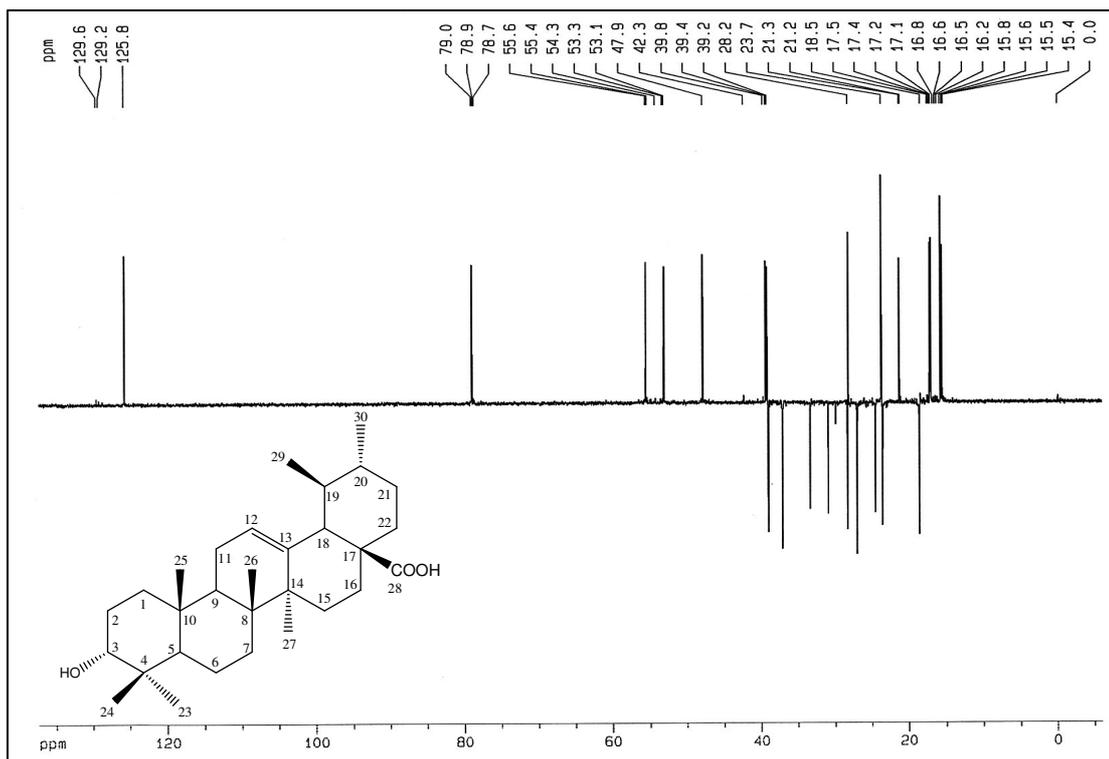


Figura 13 - Subespectro DEPT-135 obtido para Jc2 (100 MHz, $CDCl_3 + CDOD_3$).

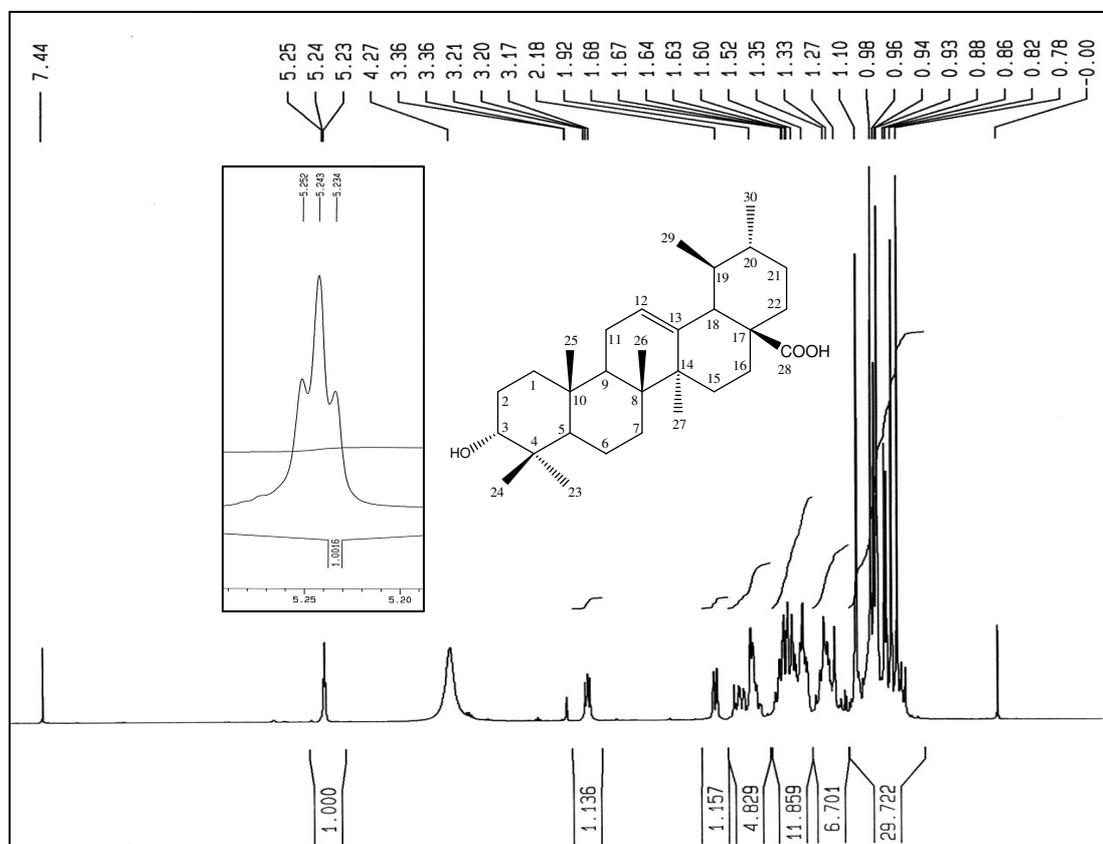


Figura 14 - Espectro de RMN de 1H obtido para Jc2 (400 MHz, $CDCl_3 + CDOD_3$).

Tabela 21 - Atribuição de sinais do espectro de RMN de ^1H para Jc2 (400 MHz, CDCl_3 + CDOD_3) e dados da literatura para o ácido ursólico.

Hidrogênio	Multiplicidade	Jc2		Ácido ursólico*	
		δ (ppm)	J (Hz)	δ (ppm)	J (Hz)
$\text{C}_2\text{-H}_2$	m	1,51		1,51	-
$\text{C}_3\text{-H}$	m	3,19	-	3,05	-
$\text{C}_3\text{-OH}$	s	4,27	-	-	-
$\text{C}_5\text{-H}$	m	0,71	11,2	0,70	10,0
$\text{C}_{12}\text{-H}$	t	5,24	3,4	5,17	3,5
$\text{C}_{16}\text{-H}_2$	m	1,60	-	1,55; 1,96	-
$\text{C}_{18}\text{-H}$	d	2,19	11,2	2,15	11,5
$\text{C}_{19}\text{-H}$	m	1,37	-	1,34	-
$\text{C}_{27}\text{-H}_3$	s	1,09	-	1,08	-
$\text{C}_{29}\text{-H}_3$	d	0,86	6,8	0,85	6,5
$\text{C}_{30}\text{-H}_3$	d	0,95	6,0	0,96	6,5

Nota: * Tkachev et al., 1994 (200 MHz, CDCl_3).

O mapa de contornos HMQC (Figura 15) possibilitou confirmar as atribuições dos sinais do espectro de RMN de ^1H e as principais correlações observadas estão listadas na Tabela 22.

Tabela 22 - Correlações heteronucleares (^1H - ^{13}C) observadas no mapa de contornos HMQC obtido para Jc2.

Carbono	^1H δ (ppm)	^{13}C δ (ppm)
C-2	1,51	27,02 (CH_2)
C-3	3,19	79,00 (CH)
C-5	0,71	53,30 (CH)
C-12	5,24	125,80 (CH)
C-16	1,60	24,49 (CH_2)
C-18	2,19	53,10 (CH)
C-19	1,37	39,38 (CH_2)
C-23	0,98	28,20 (CH_3)
C-24	0,77	15,81 (CH_3)
C-25	0,93	15,61 (CH_3)
C-26	0,86	17,11 (CH_3)
C-27	1,09	23,73 (CH_3)
C-29	0,86	17,20 (CH_3)
C-30	0,95	21,30 (CH_3)

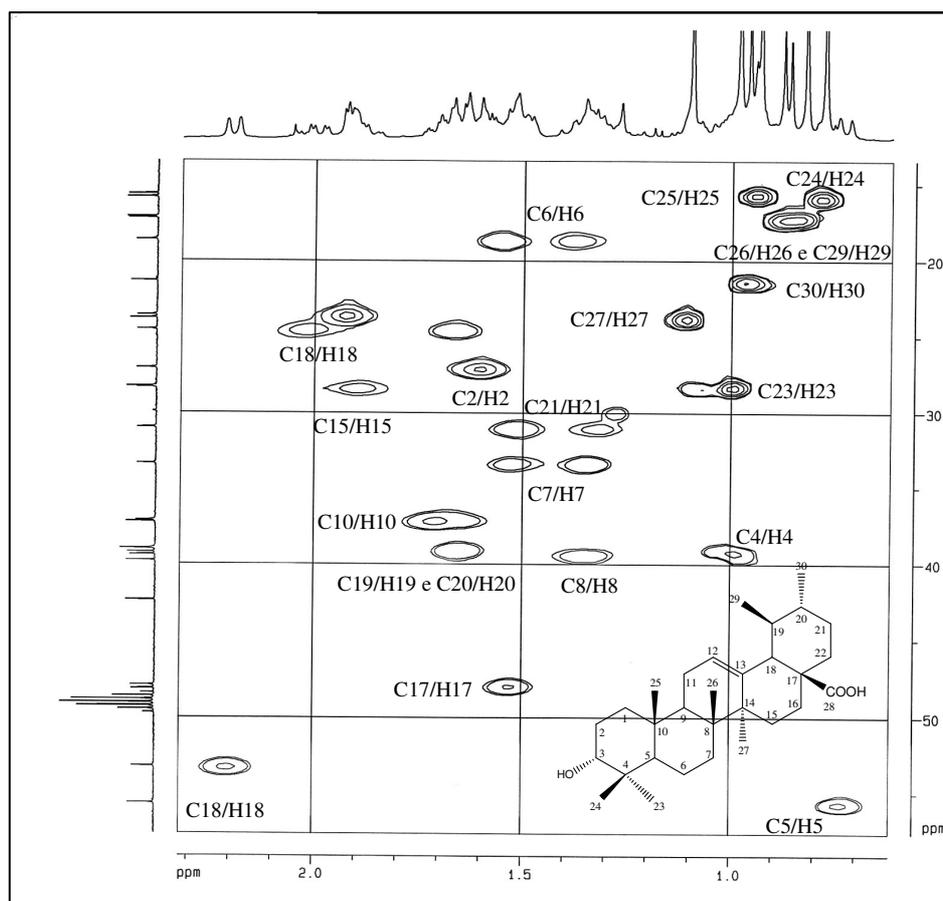


Figura 15: Seção expandida do mapa de contornos HMQC obtido para Jc2 (100 MHz, $\text{CDCl}_3 + \text{CDOD}_3$).

5.2.2 Jc3

Jc3 (560 mg), obtido do fracionamento de FDCM:EtOAc (item 4.6.1.3), apresentou-se como um sólido amorfo branco, com ponto de fusão na faixa entre 293-294,8 °C. Sua análise por CCD de sílica gel indicou tratar-se de um triterpeno, evidenciado pelo surgimento de mancha violácea, quando revelada com reagente de Liebermann-Burchard.

A análise do espectro de RMN de ^{13}C e do subespectro DEPT-135 (Figuras 16 e 17) indicou ser Jc3 um triterpeno da série olean-12-eno, pela presença de sete carbonos não hidrogenados (seis em urs-12-enos) e pelos deslocamentos químicos característicos dos carbonos olefínicos C-12 e C-13, (δ 122,3 e δ 143,8, respectivamente) (MAHATO; KUNDU, 1984). Os sinais em δ 78,7 e δ 180,9 são

característicos, respectivamente, dos carbonos carbinólico C-3 e carbonílico C-28. A comparação dos dados espectrais de RMN de ^{13}C (Tabela 23) com dados da literatura permitiram identificar Jc3 como sendo o ácido 3 β -hidróxi-olean-12-en-28-óico (ácido oleanólico) (**42**).

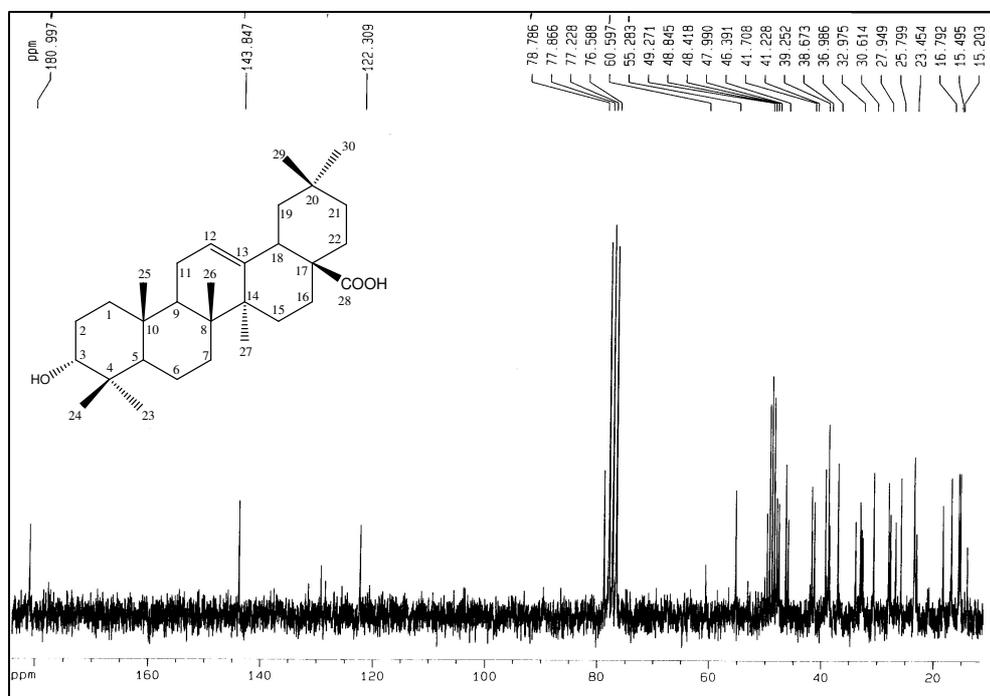
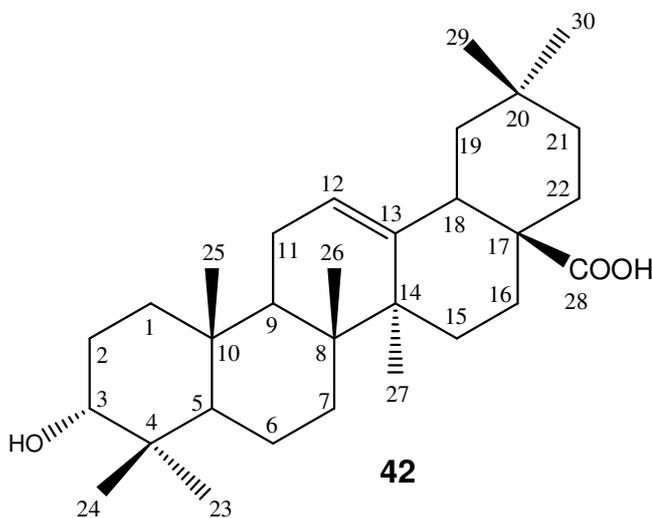


Figura 16 - Espectro de RMN de ^{13}C obtido para Jc3 (50 MHz, CDCl_3).

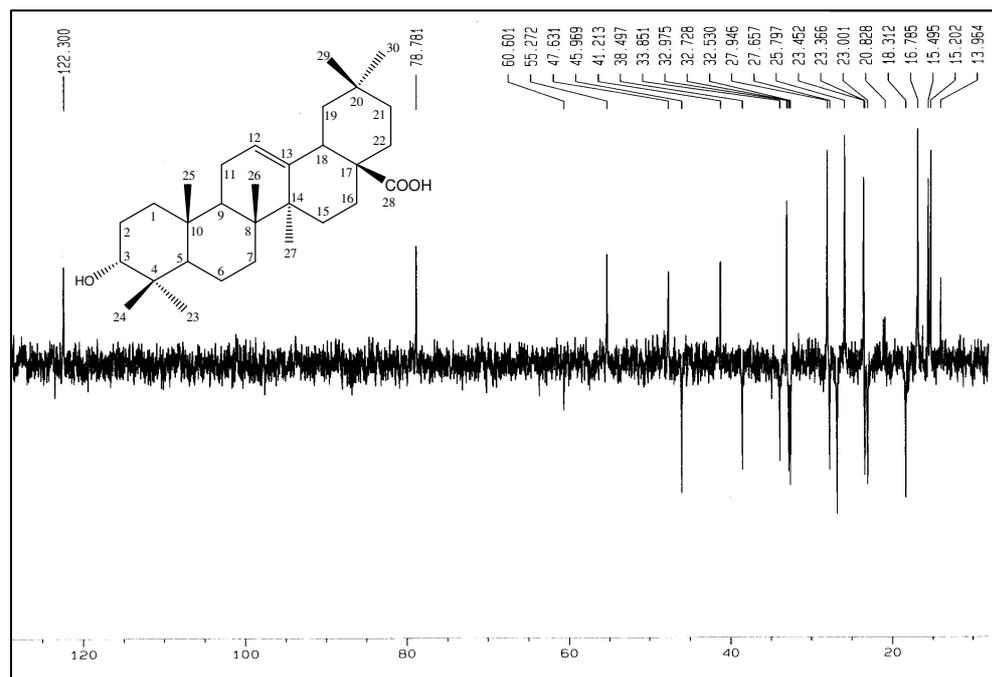


Figura 17 - Subespectro DEPT-135 obtido para Jc3 (50 MHz, CDCl_3).

O espectro de RMN de ^1H obtido para Jc3 (Figura 18) apresentou a maioria dos sinais com deslocamentos químicos entre δ 0,70 e δ 2,05, característicos de substância de natureza triterpênica. Observou-se, também, um sinal largo em δ 5,27, atribuído a H-12. O multiplete em δ 4,14 foi atribuído ao hidrogênio da hidroxila em C-3, acoplado com o H-3. Este sinal seria originalmente um duplete; porém, aparece no espectro como um sinal largo, resultado da sobreposição com o sinal de traços de metanol encontrados na amostra. O sinal em δ 3,19 foi atribuído a H-3. O duplete duplo em δ 2,80 foi atribuído a H-18 ($J = 14$ e 4 Hz) em acoplamento vicinal com os dois hidrogênios H-19a e H-19b. Os sete simpletos, correspondendo a 21 hidrogênios em δ 0,77; δ 0,84; δ 0,97; δ 1,14; δ 1,22; δ 1,26 e δ 1,30 foram atribuídos aos hidrogênios dos grupos metila ligados a C-24, C-26, C-29, C-30, C-23, C-25 e C-27, respectivamente (DAVID et al., 2001).

Tabela 23: Atribuições dos sinais do espectro de RMN de ^{13}C obtido para Jc3 (100 MHz, CDCl_3) e comparação com dados da literatura para o ácido ursólico.

Carbono	Ácido oleanólico (δ)*	Jc3 (δ)	Tipo
1	38,5	38,51	CH_2
2	27,4	26,74	CH_2
3	78,7	78,79	CH
4	38,7	38,67	C
5	55,2	55,22	CH
6	18,3	18,32	CH_2
7	32,6	32,74	CH_2
8	39,3	39,25	C
9	47,6	47,64	CH
10	37,0	36,98	C
11	23,1	23,01	CH_2
12	122,1	122,30	CH
13	143,4	143,84	C
14	41,6	41,70	C
15	27,7	27,67	CH_2
16	23,4	23,38	CH_2
17	46,6	46,31	C
18	41,3	41,22	CH
19	45,8	45,98	CH_2
20	30,6	30,61	C
21	33,8	33,86	CH_2
22	32,3	32,54	CH_2
23	28,1	27,96	CH_3
24	15,6	15,50	CH_3
25	15,3	15,21	CH_3
26	16,8	16,79	CH_3
27	26,0	25,81	CH_3
28	181,0	180,99	C
29	33,1	32,99	CH_3
30	23,6	23,46	CH_3

Nota: * David et al., 2001 (100 MHz, CDCl_3).

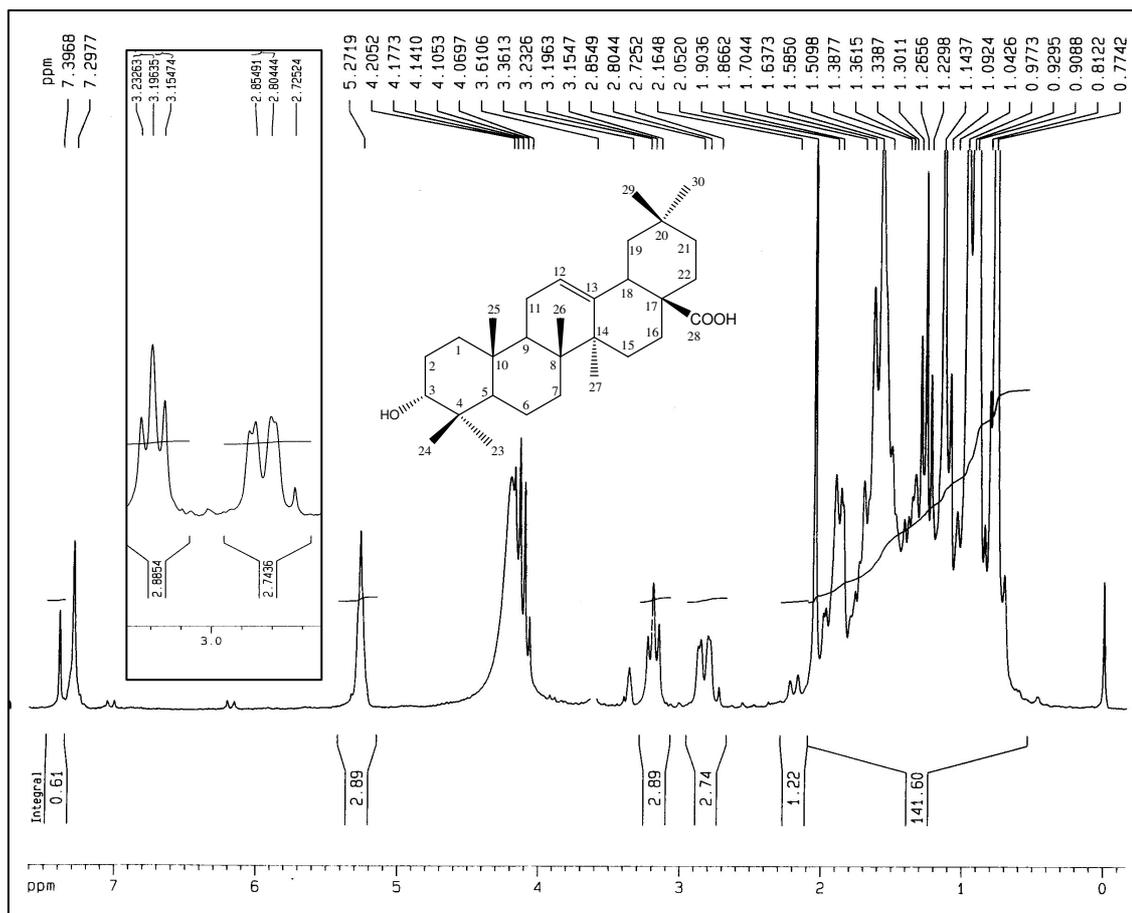


Figura 18 - Espectro de RMN de ^1H obtido para Jc3 (200 MHz, CDCl_3).

5.2.2.1 Jc4

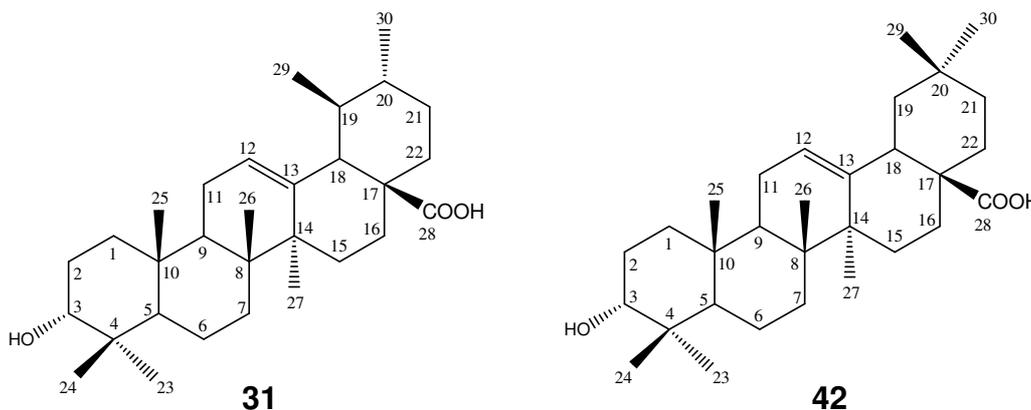
Jc4 foi obtido como um sólido branco (27,63g), com temperatura de fusão na faixa entre 248-251°C. Sua análise por CCD de sílica gel revelou mancha de coloração violácea após revelação com reagente de Liebermann-Burchard, característico de triterpenos (MATOS, 1997).

O espectro no IV de Jc4 indicou sua natureza alifática com absorções intensas em 2926, 2871 cm^{-1} e ausência de absorções nas regiões características de aromáticos. As bandas centradas em 3500 e 1698 cm^{-1} confirmaram a presença de hidroxila e carbonila de ácido carboxílico. A banda em 1029 cm^{-1} foi atribuída à deformação axial de CO de álcool secundário (SILVERSTEIN; WEBSTER, 2000).

Os espectros de RMN de ^{13}C obtidos para Jc4 permitiram identificar sinais correspondentes a quatro carbonos olefínicos em δ 144,10 (C), δ 122,50 (CH), δ 138,4 (C) e δ 125,80 (CH). Os valores de deslocamentos químicos são semelhantes

àqueles dos carbonos olefínicos dos ácidos oleanólico e ursólico, respectivamente (MAHATO; SEN, 1997). A comparação dos dados espectrométricos obtidos para Jc4 com dados da literatura possibilitou concluir que Jc4 corresponde a uma mistura dos ácidos ursólico (**31**) e oleanólico (**42**).

Segundo Maia (2000), triterpenos são facilmente encontrados na natureza e quando se utilizam técnicas cromatográficas usuais, raramente consegue-se o isolamento destas moléculas puras, sendo estes quase sempre obtidos em misturas de difícil separação.



5.2.3 Discussão sobre a composição micromolecular de *J. caroba*

No levantamento bibliográfico realizado não foram encontrados relatos de estudos fitoquímicos para a espécie *J. caroba*. O gênero *Jacaranda*, no entanto, já foi objeto de vários estudos fitoquímicos que resultaram no isolamento de alguns triterpenos como os ácidos 2 α ,3 α -dihidroxi-urs-12-en-28-óico (**28**), ursólico (**31**), 2 α -hidroxiursólico (**32**), betulínico (**33**), jacarândico (**34**), jacumárico (**35**), oleanólico (**42**), além do esteróide β -sitosterol (**29**) (Página 40).

No presente trabalho, os ácidos oleanólico (554,6 mg), ursólico (9,58 g) e uma mistura destes (27,63 g) foram obtidos em quantidades significativas de *J. caroba*. Os ácidos ursólico e oleanólico juntos representam aproximadamente 4% da composição total do extrato bruto de partes aéreas de *J. caroba*.

Algumas espécies vegetais que contém os ácidos oleanólico e ursólico em sua composição como *Sambucus incanum*, *Calendula officinalis*, *Rosmarinus officinalis*, *Ligustrum lucidum* e *Panax ginseng* são utilizadas popularmente como antiinflamatório, analgésico, cardiotônico, sedativo, hepatoprotetor e tônico

(DZUBAK, 2006; KOWALSKI, 2007; YIM et al., 2001). Os triterpenos isolados já foram avaliados em diversos modelos biológicos, sendo relatadas as atividades hepatoprotetora, antiinflamatória, hipolipidêmica, antiaterosclerótica, tripanossomicida, imunomodulatória, anti-HIV e antitumoral, revistas por Liu (2005). O ácido oleanólico é indicado na China no tratamento de distúrbios hepáticos, hepatites crônicas e outras hepatopatias, com resultados promissores (LIU; 1995). Sua extração de *Beta vulgaris* L. para o tratamento de hepatopatias foi patenteada por um grupo do Japão (YABUCHI et al., 1988). Os ácidos ursólico e oleanólico são empregados no Japão, sob a forma de preparações cosméticas, em terapias de câncer de pele (LIU, 1995).

β -sitosterol, um dos esteróides de distribuição mais ampla, anteriormente descrito no gênero, também foi obtido de *J. caroba*. Várias atividades biológicas já foram relatadas para este metabólito tais como antiinflamatória, hipocolesterelomiante, antimicrobiana, antibacteriana, antifúngica e anticarcinogênica (SOTIROUDIS; KYRTOPOULOS, 2008; WANG, 1999). Suas atividades antitumoral e quimiopreventiva também foram alvo de estudos (OVESNÁ et al., 2004). Além das diversas atividades biológicas relatadas, a ausência de toxicidade (LING; JONES, 1995; OVESNÁ et al., 2004) contribui para o interesse científico crescente nesta classe de metabólitos.

Os usos etnofarmacológicos relatos para *J. caroba* possuem relação com as atividades biológicas relatadas para os ácidos ursólico, oleanólico e β -sitosterol, isolados da espécie. Assim, pode-se supor que o uso da espécie como cicatrizante, no tratamento de infecções e úlceras estaria relacionado aos efeitos antiinflamatório e antimicrobiano relatados para os ácidos ursólico, oleanólico e β -sitosterol (IKEDA et al., 2008; LIU, 1995; MÁÑEZ et al., 1998), bem como à ação antiulcerogênica relatada para esses ácidos (FARINA et al., 1998).

5.2.4 Elucidação estrutural das substâncias isoladas de *Remijia ferruginea*

5.2.4.1 Rf1

Rf1 (101,8 mg) foi obtido como um sólido amorfo branco, com ponto de fusão na faixa entre 250,0 e 252°C. Sua análise por CCD de sílica gel revelou uma

mancha violácea após revelação com reagente de Liebermann-Burchard, característica de triterpenos (MATOS, 1997).

A análise dos dados espectrais de RMN de ^1H e de ^{13}C obtidos para Rf1, seu ponto de fusão e a comparação com dados da literatura, permitiram identificar Rf1 como sendo o ácido ursólico (**31**).

5.2.4.2 Rf2

Rf2 (97,3 mg) apresentou-se como um sólido cristalino branco, com temperatura de fusão na faixa de 129,5-130,8°C. Sua análise por CCD revelou uma mancha esverdeada, após revelação com reagente de Liebermann-Burchard, indicando a natureza esteroidal da substância.

A análise dos dados espectrais obtidos para Rf2 e a comparação com dados da literatura (GOULART et al., 1993) permitiram identificar Rf2 como sendo β -sitosterol (**32**), também isolado de *J. caroba* (item 5.2.1.1).

5.2.4.3 Rf3

Rf3 (310,8mg) apresentou-se como um sólido cristalino branco, com temperatura de fusão na faixa entre 129,5-131,8°C.

O espectro no IV obtido para Rf3 evidenciou a natureza alifática da substância (bandas em 2932, 2849 e 1463 cm^{-1}) e a presença de hidroxila de alcoóis (bandas em 3428 cm^{-1}). A banda de absorção fraca em 960 cm^{-1} e as bandas em 840 e 800 cm^{-1} , características de deformação angular de CH de alcenos sugeriram a presença de olefina dissubstituída *trans* e trissubstituída (SILVERSTEIN; WEBSTER, 2000).

A análise do espectro de RMN de ^{13}C (Figura 19) e do subespectro DEPT-135 (Figura 20) possibilitou identificar Rf3 como uma mistura de β -sitosterol e estigmasterol, evidenciada pelos deslocamentos químicos característicos dos carbonos olefínicos em δ 141,00, δ 121,70, δ 138,50 e δ 129,40 (GOULART et al., 1993). A identificação foi confirmada pela análise por CCD de sílica gel de Rf3 e comparação com substâncias de referência β -sitosterol e estigmasterol. As

atribuições dos dados espectrais de RMN de ^{13}C obtidos para Rf3 e valores relatados na literatura para a mistura de β -sitosterol e estigmasterol estão listadas na Tabela 24.

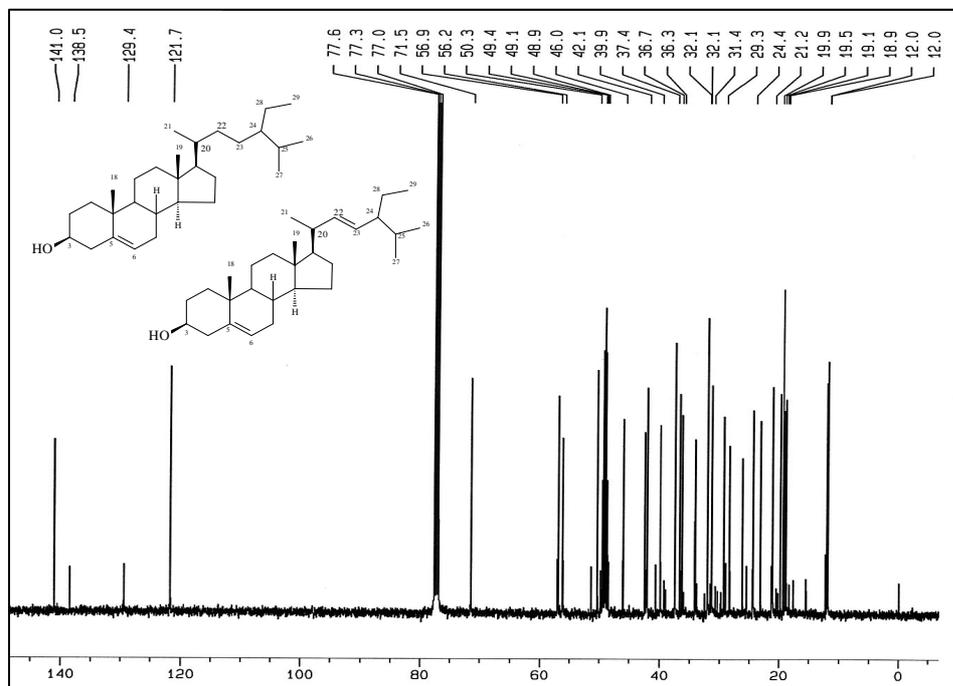


Figura 19 - Espectro de RMN de ^{13}C obtido para Rf3 (100 MHz, CDCl_3).

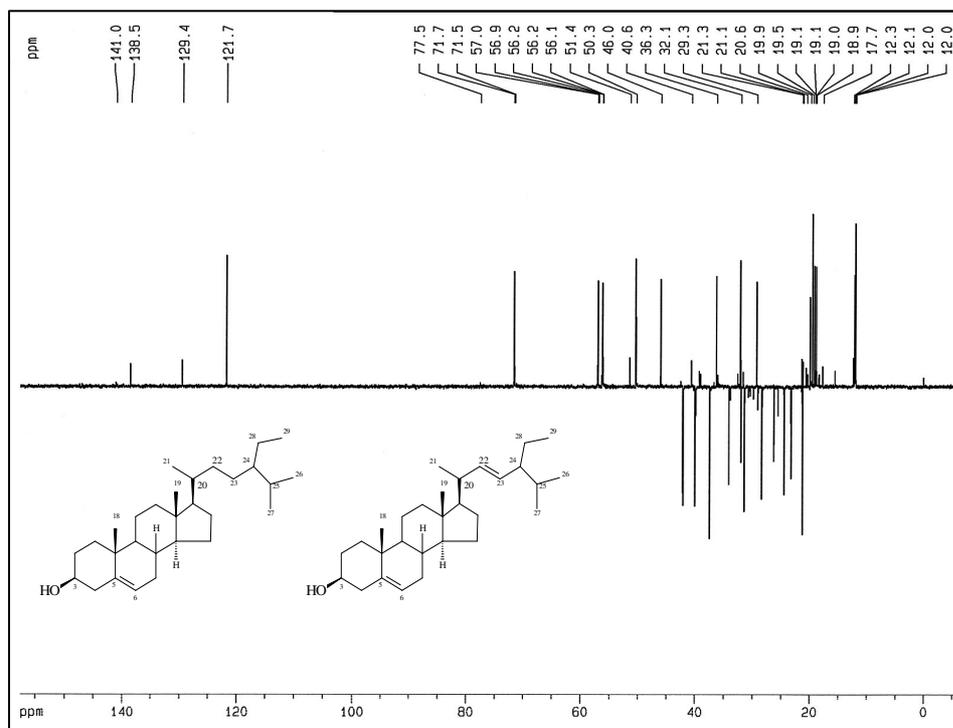


Figura 20 - Subespectro DEPT-135 obtido para Rf3 (100 MHz, CDCl_3).

Tabela 24 - Atribuição dos sinais do espectro de RMN de ^{13}C obtido para Rf3 (100 MHz, CDCl_3) e dados da literatura para β -sitosterol e estigmasterol.

Carbono	β -sitosterol (δ , ppm)*	Rf3 (δ , ppm)	Estigmasterol (δ , ppm)**	Rf3 (δ , ppm)
1	37,2	37,42	37,3	37,42
2	31,6	31,39	31,7	30,43
3	71,8	71,70	71,8	71,5
4	42,5	42,07	42,5	42,24
5	140,7	141,00	140,8	141,00
6	121,7	121,70	121,7	121,70
7	31,8	32,05	31,9	30,73
8	31,9	32,07	31,9	31,61
9	50,1	50,34	50,2	51,40
10	36,5	36,67	36,6	36,67
11	21,1	21,22	21,1	21,22
12	39,7	39,94	39,7	39,85
13	42,3	42,47	42,4	42,37
14	56,7	56,94	56,9	57,03
15	24,3	24,43	24,4	24,48
16	28,2	28,37	29,0	29,04
17	56,0	56,29	56,1	56,14
18	11,9	11,95	12,1	12,14
19	19,4	19,46	19,4	19,06
20	36,1	36,29	40,5	40,63
21	18,8	18,87	21,1	21,14
22	33,9	34,11	138,4	138,50
23	26,0	26,26	129,3	129,40
24	45,8	46,02	51,3	51,40
25	29,2	29,33	31,9	31,61
26	19,8	19,87	21,3	21,30
27	19,1	19,11	19,0	18,98
28	23,0	23,22	25,4	25,52
29	12,0	12,05	12,3	12,29

Nota: * Nes et al., 1992, (50 MHz, CDCl_3); ** Goulart et al., 1993, (50 MHz, CDCl_3).

O espectro de RMN de ^1H (Figura 21) obtido para Rf3 apresentou diversos sinais na região entre δ 0,68 e δ 2,25, característicos de hidrogênios metílicos, metilênicos e metínicos de esteróides. O sinal largo em δ 5,34 e o multipeto em δ 5,09 foram atribuídos aos hidrogênios olefínicos H-6, H-22 e H-23, respectivamente, enquanto o multipeto em δ 3,63 foi atribuído ao hidrogênio de OH, e aquele em δ 3,48 ao hidrogênio carbinólico (H-3). Os dados espectrais de RMN de ^1H obtidos para Rf3 e os valores relatados na literatura para a mistura de β -sitosterol e estigmasterol estão listados na Tabela 25.

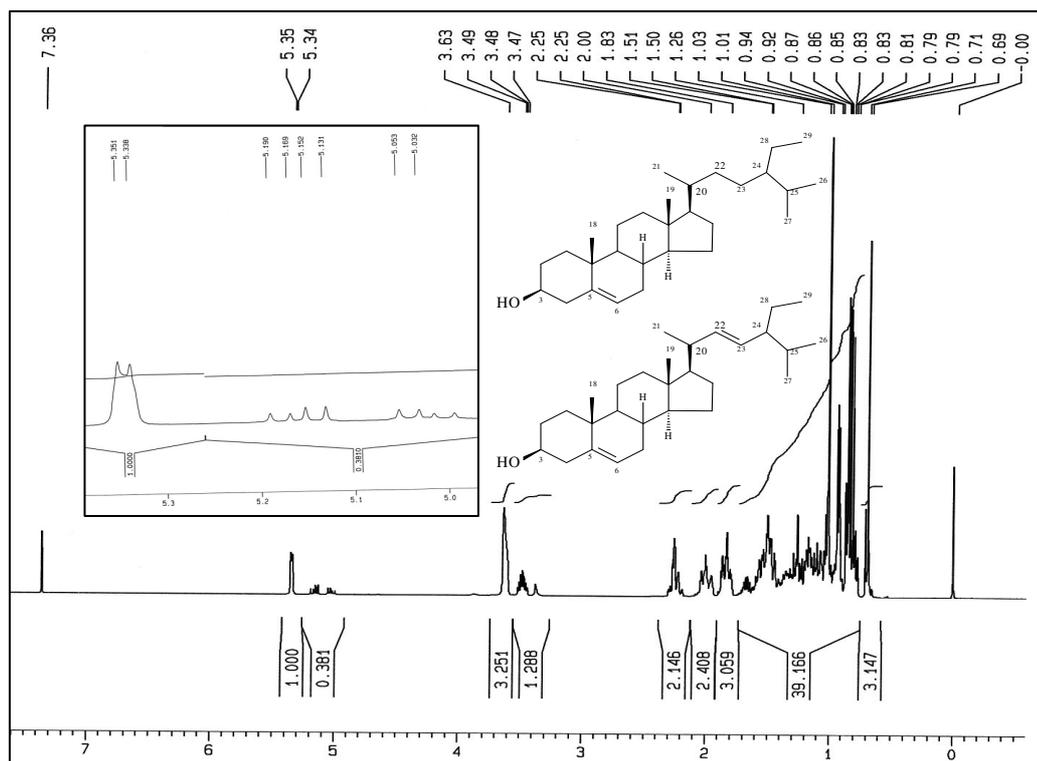
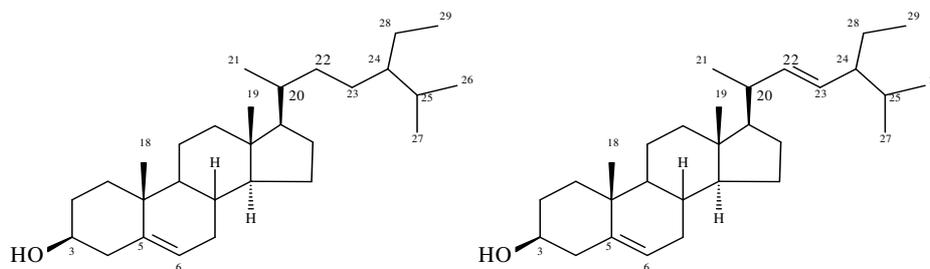


Figura 21 - Espectro de RMN de ¹H obtido para Rf3 (400 MHz, CDCl₃).

O isolamento de misturas de β-sitosterol e estigmasterol é comum para espécies vegetais de diferentes gêneros e famílias. A proporção de β-sitosterol e estigmasterol em Rf3 foi estimada a partir do espectro de RMN de ¹H. A porcentagem dos dois constituintes foi calculada com base na integração dos sinais correspondentes aos hidrogênios H-6 (β-sitosterol + estigmasterol, integral de 1,0) e H-22 e H-23 (estigmasterol, integral de 0,38), segundo proposto por Goulart et al. (1993). Com base nesses valores, pôde-se concluir que a mistura é composta por 81% de β-sitosterol (**29**) e 19% de estigmasterol (**43**).



32

43

Tabela 25 - Atribuição dos sinais do espectro de RMN de ^1H obtido para Rf3 (400 MHz, CDCl_3) e dados da literatura para β -sitosterol e estigmasterol.

H	β -sitosterol* δ (ppm)	Estigmasterol** δ (ppm)	Rf3 δ (ppm)
H-3	3,5 (m)	3,5 (m)	3,48 (m)
H-6	5,2 (m)	5,2 (m)	5,34 (sl)
H-22	-	5,18 (dd, $J = 14,8$ e $7,0$ Hz)	5,16 (dd, $J = 15,2$ e $8,4$ Hz)
H-23	-	5,03 (dd, $J = 14,8$ e $7,0$ Hz)	5,04 (d, $J = 8,4$ Hz)

Nota:* Macari et al., 1990, (200 MHz, CDCl_3); ** Bezerra et al., 1994, (200 MHz, CDCl_3).

5.2.5 Discussão sobre a composição química micromolecular de *Remijia ferruginea*

No levantamento bibliográfico realizado não foram encontradas referências sobre estudos fitoquímicos de *R. ferruginea*. O gênero *Remijia*, no entanto, é fonte reconhecida de alcalóides como quinidina (**8**), cupreína (**9**), cinchonina (**10**) e cinchonamina (**11**) (RUIZ-MESIA et al., 2005). A presença de saponinas triterpênicas, ácido ursólico (**31**) e β -sitosterol (**29**) também foi relatada na família Rubiaceae (ITOH et al., 2003; KANG et al., 2005; KANOKMEDHAKUL, 2005); porém, o isolamento de ácido ursólico (0,08% da composição do extrato bruto) e β -sitosterol (0,26% da composição do extrato bruto), descrito no presente trabalho, é inédito no gênero *Remijia*.

O uso popular de *R. ferruginea* como antimalárico pode estar relacionado à presença do ácido ursólico. Steele et al. (1999) relataram a atividade antiplasmódica do ácido ursólico *in vitro* frente ao *Plasmodium falciparum* resistente K1 ($\text{CI}_{50} = 36,5 \mu\text{g/mL}$) e sensível T9-96 ($\text{CI}_{50} = 28 \mu\text{g/mL}$) à cloroquina.

5.2.6 Elucidação estrutural das substâncias isoladas de *Solanum paniculatum*

5.2.6.1 Sp1

Sp1 (453,4 mg) foi obtido como um sólido branco cristalino, com temperatura de fusão na faixa entre 129,6-130,6 °C. Sua revelação com reagente de Liebermann-Burchard, em CCD de sílica gel, resultou em uma mancha esverdeada, característica de substâncias esteroidais.

Os sinais obtidos nos espectros de RMN de ^1H , ^{13}C e no IV para Sp1 indicaram tratar-se de uma mistura de β -sitosterol (**29**) e estigmasterol (**43**), confirmada a partir dos valores característicos de deslocamento químico dos carbonos olefínicos (δ 140,96, δ 121,98, δ 138,51 e δ 129,49), segundo relatado por Goulart et al. (1993).

A relação percentual entre o β -sitosterol e o estigmasterol em Sp1 foi obtida com base na integração dos sinais correspondentes aos hidrogênios H-6 (β -sitosterol + estigmasterol, integral de 0,946) e H-22/H-23 (estigmasterol, integral de 0,500), segundo proposto por Goulart et al., (1993). Essa análise possibilitou inferir que Sp1 é constituído por 74% de β -sitosterol e 26% de estigmasterol.

5.2.6.2 Sp2

Sp2 foi obtido como um sólido cristalino branco (121,3 mg), com temperatura de fusão na faixa entre 152,0 e 153,8°C. Sua análise por CCD de sílica gel e revelação com reagente de Liebermann-Burchard revelou uma mancha esverdeada, característica de substância esteroideal.

As posições e vibrações características das bandas de absorção observadas no espectro obtido para Sp2 na região do IV estão listadas na Tabela 26.

Tabela 26 - Posições e vibrações das bandas de Sp2 no espectro no IV.

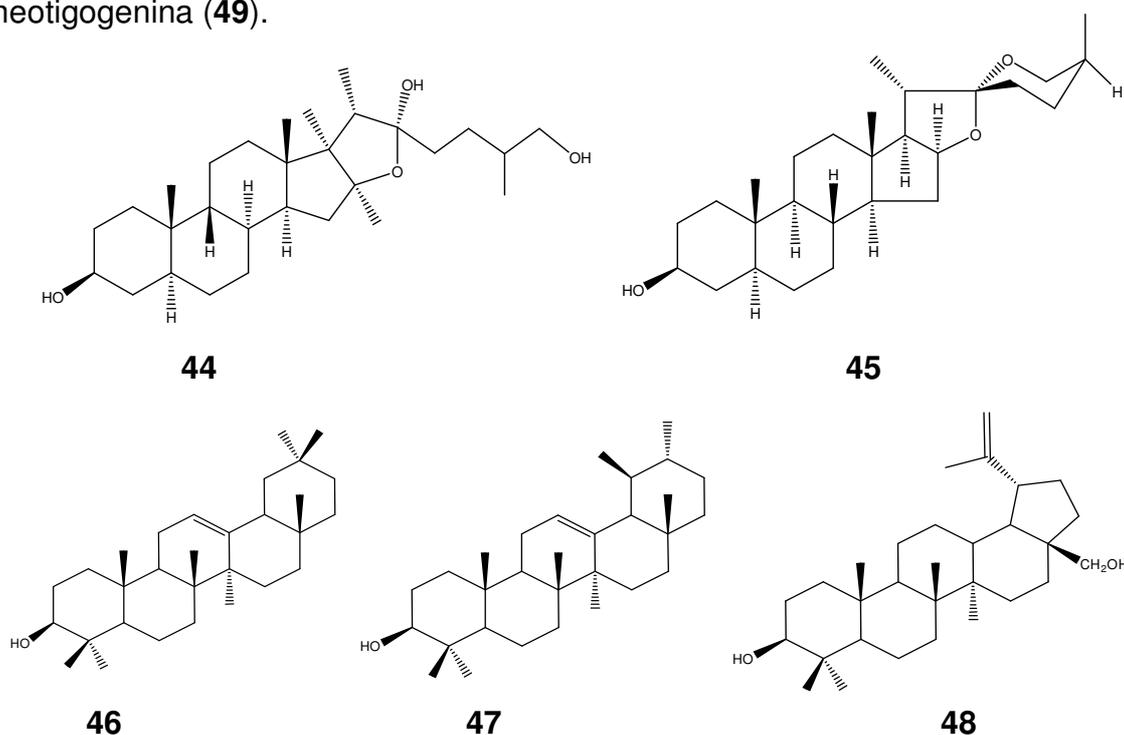
Posição (cm^{-1})	Vibração
3553	Estiramento O-H de alcoóis (OH livre)
3266	Estiramento O-H de alcoóis (ligação de H)
2949, 2918, 2848	Estiramento C-H simétrico e assimétrico de alcanos
1447	Deformação C-H de alcanos
1368	Deformação O-H de alcoóis
1054	Estiramento C-OH de alcoóis
1174-1055	Estiramento C-O-C simétrico de éter
952-849	Estiramento C-O-C assimétrico de éter

No espectro de RMN de ^{13}C desacoplado de Sp2 (Figura 22) foram identificados sinais referentes a 27 carbonos (Tabela 27). A natureza dos carbonos foi determinada pela análise do subespectro DEPT-135 (Figura 23), que indicou 4

carbonos metílicos, 11 metilênicos, 9 metínicos e 3 carbonos não hidrogenados. A natureza, os valores de deslocamento químico característicos encontrados para os carbonos do anel E [C-16 (δ 81,15); C-17 (δ 62,23); C-20 (δ 42,33); C-22 (δ 109,93)], para C-26 (65,33) e sua comparação com dados da literatura sugeriram que Sp2 é uma sapogenina espirostânica (AGRAWAL et al., 1985).

Sapogeninas podem ocorrer naturalmente ou como resultado de hidrólise ácida ou enzimática de saponinas. Sua classificação depende do esqueleto dos carbonos constituintes, podendo ser encontrados núcleos esteroidais furostânicos (**44**) e espirostânicos (**45**), além de triterpênicos (ex.: β -amirina **46**, α -amirina **47** e lupeol **48**). As sapogeninas esteroidais espirostânicas possuem um núcleo espirocetal em C-22 e são classificadas nas séries 25R (metila em C-25 em posição equatorial) e 25S (metila em C-25 em posição axial). Em relação ao esqueleto esteroidal, a fusão dos anéis A e B pode ser *cis* (H-5 em posição β) ou *trans* (H-5 em posição α). Já a fusão dos anéis B/C e C/D é *trans*, enquanto a junção dos anéis D/E é *cis* (AGRAWAL et al., 1985).

Segundo Bernardo et al. (1996), os valores de deslocamento químico encontrados para os carbonos C-5 (δ 45,05) e C-6 (δ 28,82) indicam a fusão *trans* dos anéis A/B, de acordo com a configuração espacial relatada para a sapogenina neotigogenina (**49**).



Nas sapogeninas espirostânicas da série 25R, os valores de deslocamento químico dos sinais de C-23, C-24, C-25 e C-26 normalmente aparecem em δ 31,3 \pm 0,3; δ 28,8 \pm 0,3; δ 30,3 \pm 0,3 e δ 66,9 \pm 0,2, respectivamente, enquanto o sinal de C-22 é observado em δ 109,5 \pm 0,1. Já para aquelas da série 25S, os valores característicos para os deslocamentos dos carbonos C-23, C-24, C-26 e C-27 são δ 27,3 \pm 0,3, δ 26,1 \pm 0,3, δ 65,1 \pm 0,1 e δ 16,2 \pm 0,2, respectivamente. O carbono C-23, em particular, encontra-se cerca de 5,4 ppm mais próximo do TMS, devido ao efeito γ -gauche (AGRAWAL et al., 1985). Wu et al. (1996) consideram os valores de deslocamento químico dos carbonos C-23 e C-27 particularmente importantes na determinação da estereoquímica das sapogeninas. Segundo os autores, na série 25R estes se encontram em δ 27,0 e δ 16,0, respectivamente, e na série 25S em δ 30,1 e δ 17,1.

A análise dos deslocamentos químicos dos sinais referentes aos carbonos supracitados e a comparação dos demais sinais com valores da literatura (AGRAWAL et al., 1985) sugeriu que Sp2 é a sapogenina espirostânica da série 25S neotigogenina (**49**). A Tabela 27 lista os deslocamentos químicos obtidos para Sp2 e a comparação com dados da literatura para as sapogeninas espirostânicas da série 25S (neotigogenina; **49**) e 25R (tigogenina; **50**).

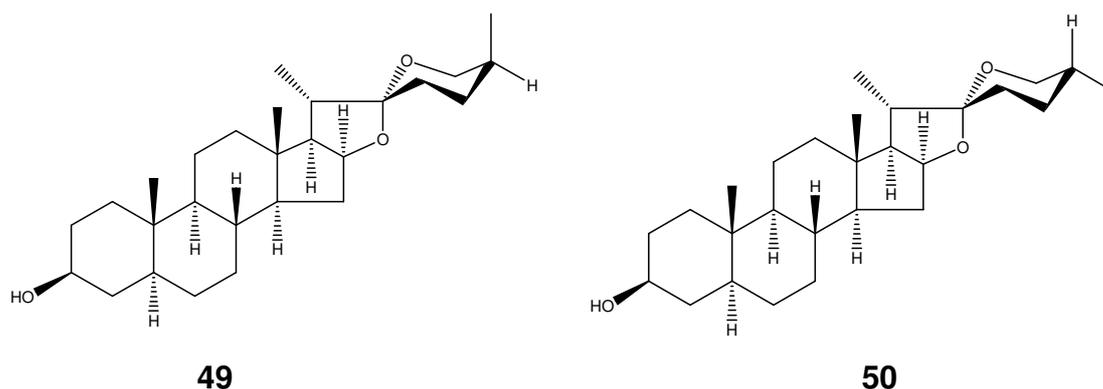


Tabela 27 - Atribuição dos sinais do espectro de RMN de ^{13}C obtido para Sp2 (50 MHz, CDCl_3) e dados da literatura para as sapogeninas das séries 25R (tigogenina) e 25S (neotigogenina).

Carbono	Tigogenina (δ , ppm)*	Neotigogenina (δ , ppm)*	Sp2 (δ , ppm)	Tipo
1	37,0	37,0	37,19	CH_2
2	31,4	31,4	31,68	CH_2
3	71,2	71,2	71,49	CH
4	38,2	38,2	38,37	CH_2
5	44,9	44,9	45,05	CH
6	28,6	28,6	28,82	CH_2
7	32,2	32,2	32,46	CH_2
8	35,1	35,1	35,32	CH
9	54,4	54,4	54,58	CH
10	35,6	35,6	35,78	C
11	21,1	21,1	21,27	CH_2
12	40,1	40,1	40,28	CH_2
13	40,6	40,6	40,75	C
14	56,3	56,3	56,51	CH
15	31,8	31,8	31,91	CH_2
16	80,8	80,8	81,15	CH
17	62,3	62,3	62,23	CH
18	16,5	16,5	16,70	CH_3
19	12,3	12,3	12,56	CH_3
20	41,6	42,2	42,33	CH
21	14,5	14,3	14,51	CH_3
22	109,6	109,7	109,93	C
23	31,4	27,1	26,15	CH_2
24	28,8	25,8	25,98	CH_2
25	30,3	26,0	27,28	CH
26	66,8	65,2	65,33	CH_2
27	17,1	16,1	16,25	CH_3

Nota: * Agrawal et al., 1985, (50 MHz, CDCl_3); Xu et al. 1998 (100 MHz, CDCl_3).

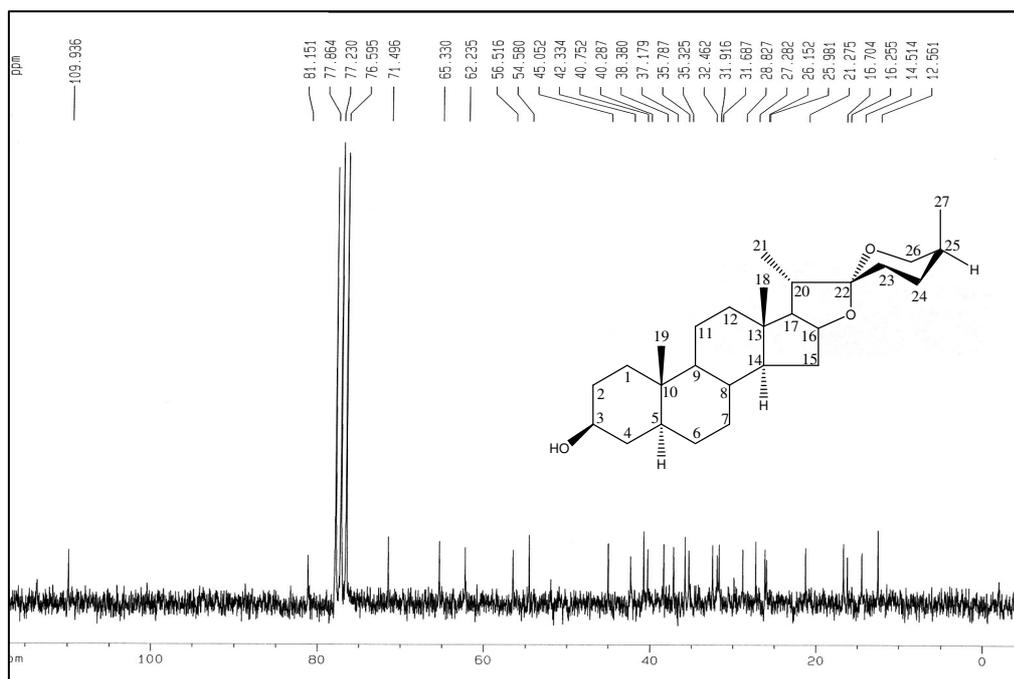


Figura 22 - Espectro de RMN de ^{13}C obtido para Sp2 (50 MHz, CDCl_3).

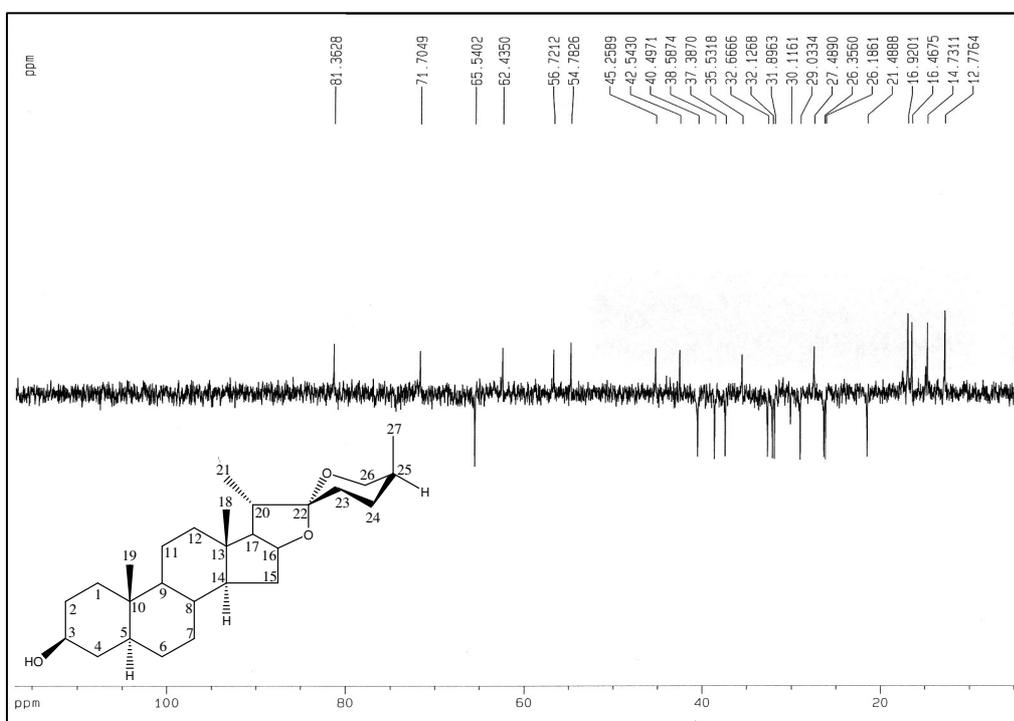


Figura 23 - Subespectro DEPT-135 obtido para Sp2 (50 MHz, CDCl_3).

O espectro de RMN de ^1H obtido para Sp2 (Figura 24) apresentou um padrão típico de esteróides, com a maioria dos sinais na região de δ 0,75 a δ 2,32 e nenhum sinal com deslocamento químico na região de hidrogênios aromáticos. Os simples em δ 0,75 e δ 0,81 foram atribuídos aos hidrogênios metílicos ligados a carbonos não hidrogenados (H-18 e H-19, respectivamente) e os dois dupletos em δ 0,98 (3H, $J = 6,4$ Hz) e δ 1,07 (3H, $J = 7,0$ Hz) foram atribuídos, respectivamente, aos grupos metila 21- CH_3 e 27- CH_3 , (Tabela 28). O duplete largo em δ 3,29 (1H, $J = 10,8$ Hz) foi atribuído a um dos hidrogênios H-26 e o duplete duplo em δ 3,94 ao outro ($J = 10,8$ e 2,4 Hz). Os valores das constantes de acoplamento escalar encontrados para os hidrogênios H-26 ($J_{\text{gem}}=10,9$ Hz e $J_{\text{ax/eq}}(\text{H}_{26\text{a}}/\text{H}_{25})=2,4$ Hz) permitiram confirmar a localização axial do grupo metila em C-25. O multiplete em δ 3,58 foi atribuído a H-3, ligado a carbono carbinólico e o multiplete em δ 4,39 corresponde a H-16.

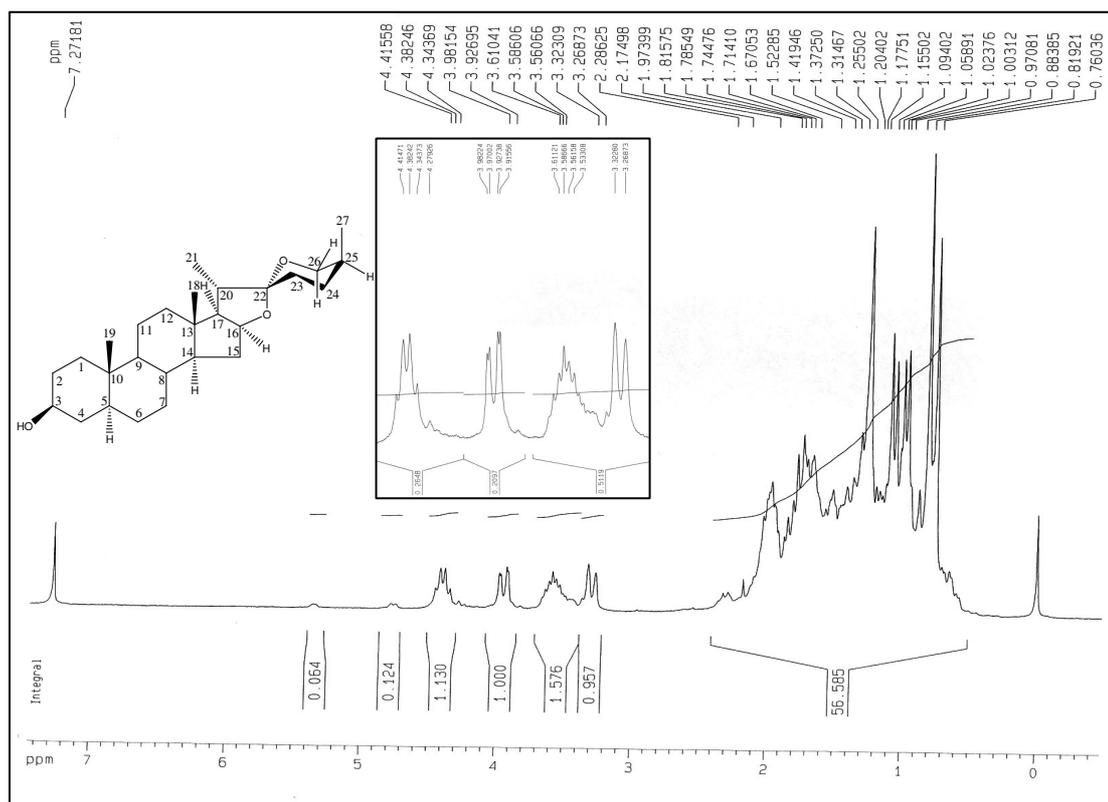


Figura 24 - Espectro de RMN de ^1H obtido para Sp2 (200 MHz, CDCl_3).

Tabela 28 - Atribuição de sinais do espectro de RMN de ^1H obtido para Sp2 (200 MHz, CDCl_3) e dados da literatura para neotigogenina.

H	Neotigogenina* (δ , ppm)	Sp2 (δ , ppm)
H-19	0,63 (s)	0,76 (s)
H-18	0,90 (s)	0,81 (s)
H-21	1,0 (d; $J=6,6$ Hz)	0,98(d; $J=6,4$ Hz)
H-27	1,0 (d; $J=6,6$ Hz)	1,07(d; $J=7,0$ Hz)
H-26'	3,23 (d; $J=11$ Hz)	3,29 (dl; $J=10,9$ Hz)
H-26''	3,91 (dd; $J=11,0$ e $3,0$ Hz)	3,94 (dd; $J=10,9$ e $2,4$ Hz)
H-3	3,5 (m)	3,58 (m)
H-16	4,38 (m)	4,39(m)

Nota: * Chakravarty et al., 1978; Wu et al., 1996; Xu et al., 1998.

A observação da conectividade entre alguns sinais dos hidrogênio H-16/H-17 (δ 4,39/ δ 1,81), H-16/H-15 (δ 4,39/ δ 1,25) e H-26'/H-26'' (δ 3,29/ δ 3,94) no mapa de contornos COSY (Figura 25) possibilitou confirmar as atribuições feitas a partir do espectro de RMN de ^1H monodimensional.

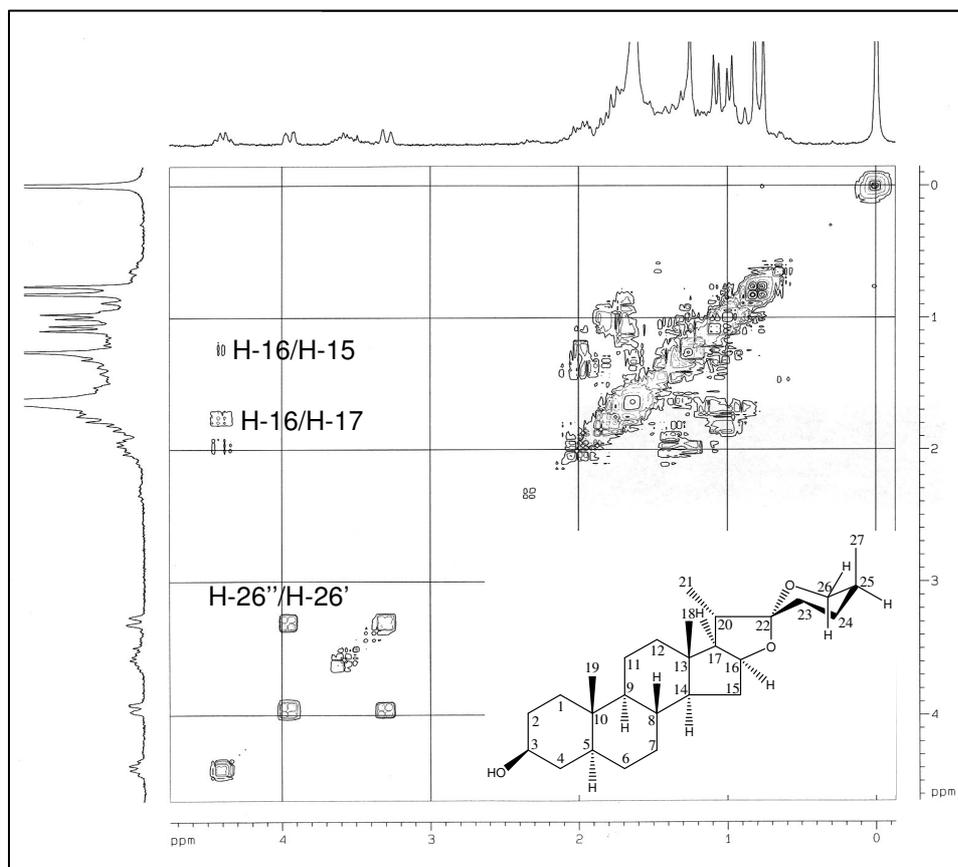


Figura 25 - Seção expandida do mapa de contornos COSY obtido para Sp2 (200 MHz, CDCl_3).

Por sua vez, o espectro bidimensional de correlação heteronuclear ^1H - ^{13}C obtido pelo experimento HMQC (Figura 26) foi utilizado para confirmar algumas atribuições dos espectros monodimensionais. Assim, evidenciou-se a conectividade do sinal do hidrogênio em δ 0,76 (H-19) com o sinal do carbono em δ 12,56 (C-19), do simpleto em δ 0,81 (H-18) com o sinal do carbono em δ 16,70 (C-18), dos dupletos centrados em δ 0,98 (H-21) e δ 1,07 (H-27) com os sinais de carbono em δ 14,51 (C-21) e δ 16,25 (C-27), respectivamente. O duplete centrado em δ 3,29 e o duplete duplo em δ 3,94 atribuídos aos hidrogênios metilênicos H-26 apresentaram manchas de correlação com o sinal de carbono em δ 65,33 (C-26). Observou-se, também, a correlação entre o sinal do carbono carbinólico C-3 (δ 71,49) e o multiplete em δ 3,58 (H-3), bem como do multiplete em δ 4,39 (H-16) ao carbono em 81,15 (C-16). Finalmente, os simpletos em δ 1,81 (H-17) e δ 1,25 (H-15) apresentaram conectividade com os sinais dos carbonos em 62,23 (C-17) e 31,91 (C-15). As correlações identificadas no experimento HMQC encontram-se listadas na Tabela 29.

Tabela 29 - Correlações heteronucleares (^1H - ^{13}C) observadas no mapa de contornos HMQC obtido para Sp2.

Correlações (^1H - ^{13}C)	Deslocamentos Químicos	
	^{13}C (δ , ppm)	^1H (δ , ppm)
C-19/H-19	12,56	0,76
C-21/H-21	14,51	0,98
C-27/H-27	16,25	1,07
C-18/H-18	16,70	0,81
C-15/H-15	31,91	1,25
C-17/H-17	62,23	1,81
C-26/H-26	65,33	3,94; 3,29
C-3/H-3	71,49	3,58
C-16/H-16	81,15	4,39

A análise dos dados espectrais obtidos possibilitou identificar Sp2 como a sapogenina esteroidal (25S)-5 α -espirostan-3 β -ol (neotigogenina) (**49**).

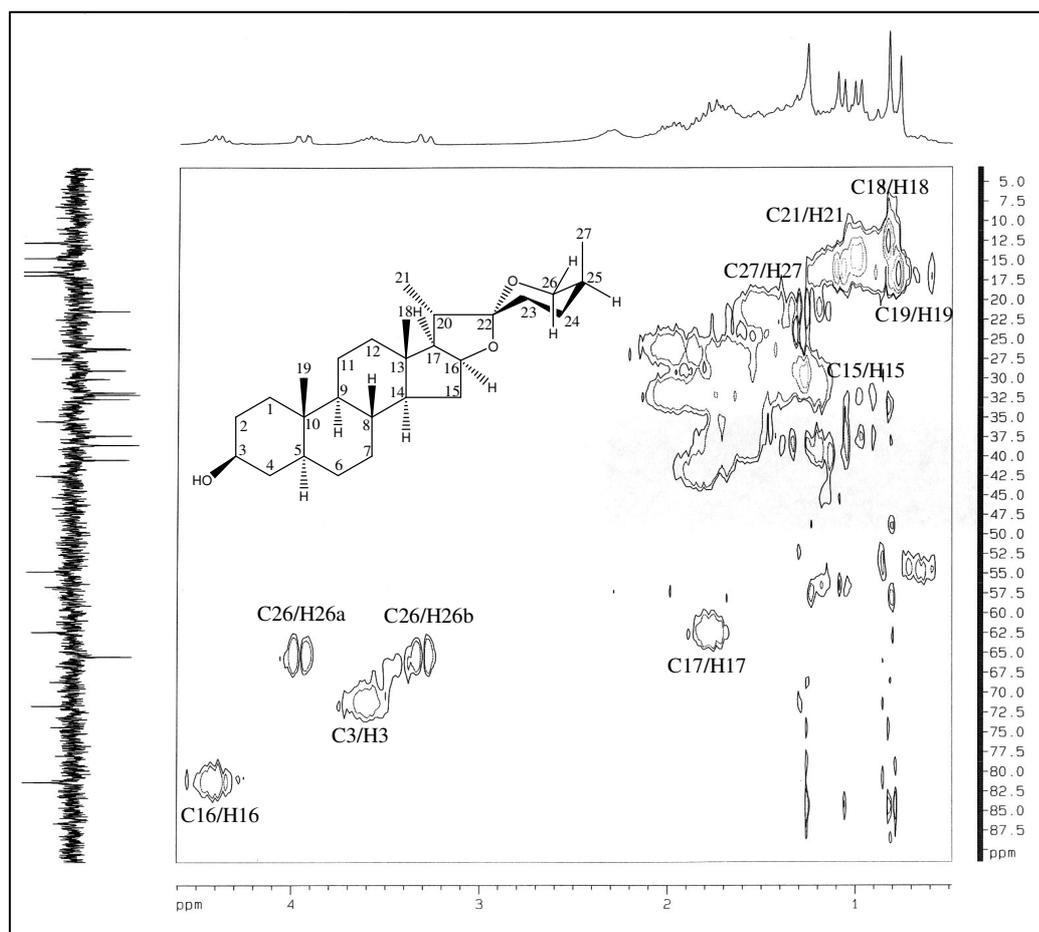


Figura 26 - Seção expandida do mapa de contornos HMQC obtido para Sp2 (200 MHz, CDCl₃).

5.2.6.3 Sp3

Sp3 foi obtido como um sólido cristalino branco (46,8 mg) com temperatura de fusão na faixa entre 246,5 e 248,5 °C. Sua reação com reagente de Liebermann-Burchard revelou uma mancha esverdeada, característica de compostos esteroidais.

As posições e vibrações características das bandas de absorção observadas no espectro obtido para Sp3 na região do IV estão listadas na Tabela 30.

Tabela 30 - Posições e vibrações das bandas de Sp3 no espectro no IV.

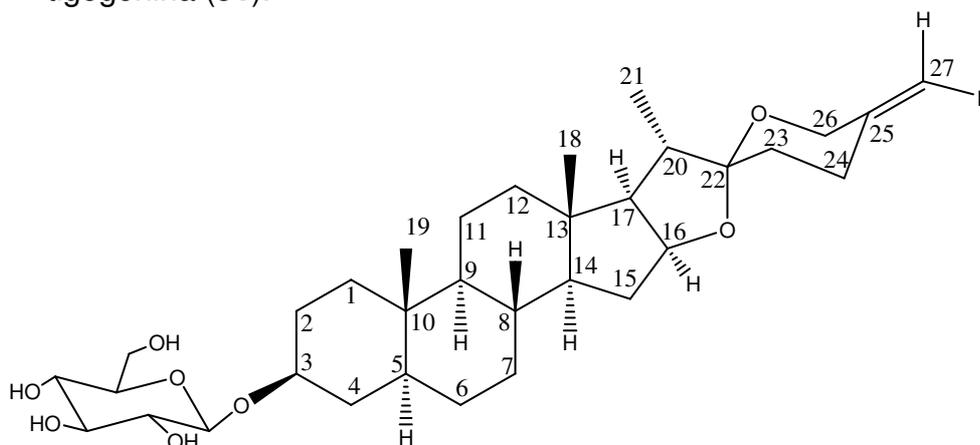
Posição (cm ⁻¹)	Vibração
3400	Estiramento O-H de alcoóis (OH livre)
2950	Estiramento C-H simétrico e assimétrico de alcanos
1445	Deformação C-H de alcanos
1380	Deformação O-H de alcoóis
1100-1000	Estiramento C-O-C simétrico de éter

No espectro de RMN de ¹³C de Sp3 (Figura 28, pag 110) foram identificados sinais referentes a 40 carbonos (Tabelas 31 e 33). A natureza dos carbonos foi determinada pela análise do subespectro DEPT-135 (Figura 28), que indicou 3 carbonos metílicos, 12 metilênicos, 14 metínicos e 4 carbonos não hidrogenados. A comparação dos dados espectrométricos de Sp3 com aqueles obtidos para a sapogenina Sp2 mostraram deslocamentos similares para a maioria dos sinais, exceto para os sinais do anel F. Segundo Agrawal et al. (1995), os sinais em δ 143,92 e δ 108,78 no anel F indicam a presença de uma ligação dupla exocíclica e foram atribuídos aos carbonos C-25 e C-27, respectivamente. A diferença de deslocamento químico encontrada para os demais carbonos do anel F (C-23, δ 32,65 e C-24, δ 29,01) em relação àqueles de Sp2 (C-23, δ 26,15 e C-24, δ 25,98) é devida à presença da ligação dupla. Os demais sinais (C-22 e C-26) encontram-se com valores de deslocamento químico semelhantes.

O deslocamento paramagnético do sinal correspondente a C-3 (δ 74,37) em relação ao sinal correspondente em sp2 (δ 71,49) sugeriu a presença de um açúcar ligado nesta posição. A presença dos sinais em δ 41,81, 54,27 e 11,54, referentes aos carbonos C-5, C-9 e C-19 no espectro de RMN de ¹³C, permitiu identificar a fusão *trans* entre os anéis A e B, indicando que Sp3 é um derivado esteroidal 5 α -

espirostânico. Valores de deslocamento químico de δ 36,5, δ 40,3 e δ 24,2 para os carbonos C-5, C-9 e C-19, respectivamente, indicam a fusão *cis* entre os anéis A e B e conseqüentemente, um núcleo 5 β -espirostânico (ACHARYA et al., 2009; BERNARDO et al., 1996; ZAMILPA et al., 2002). Outra evidência da estereoquímica *trans* entre os anéis A e B é a presença de manchas de correlação entre os hidrogênios H-3 (δ 3,96) e H-5 (δ 1,86) no mapa de contornos NOESY obtido para Sp3 (Figura 31). A genina de Sp3 foi então identificada como sendo a 5 α ,25(27)-en-espirostan-3 β -ol ($\Delta^{25(27)}$ -tigogenina) pela comparação de seus dados espectrométricos com aqueles relatados na literatura para uma saponina contendo a mesma aglicona (ACHARYA et al., 2009).

A existência de um glicosídeo foi confirmada pelo espectro de massas de alta resolução, a partir do pico da molécula cationizada com Na⁺ (Figura 32). Os valores de [M+Na]⁺ calculado em m/z 599,3559 e encontrado em m/z 599,3699, permitira deduzir a fórmula molecular C₃₃H₅₂O₈ para Sp3, compatível com um monoglicosídeo da $\Delta^{25(27)}$ -tigogenina (**51**).

**51**

A duplicidade dos sinais dos carbonos do anel espirostânico observada no espectro de RMN de ¹³C (Figura 28), a saber C-16 (δ 81,37/81,06), C-17 (δ 62,46/62,36), C-20 (δ 41,81/41,71), C-21 (14,47/17,36), C-22 (δ 109,43/109,53), C-23 (δ 32,65/32,41) e C-24 (δ 29,01/28,71), sugeriu que Sp3 foi obtido como uma mistura dos isômeros *R* e *S* em C-22. Além disso, os dois dupletos centrados em δ 0,94 e 0,74 ($J = 6,0$ Hz), atribuídos aos hidrogênios metílicos H-21 dos isômeros, no espectro de RMN de ¹H, apresentaram correlação com os sinais em δ 14,51 e δ 17,36 (C-21) no espectro HSQC (Figura 33), confirmando o isolamento da mistura epimérica.

Tabela 31 - Atribuição dos sinais do espectro de RMN de ^{13}C obtido para Sp3 (100 MHz, CDCl_3) e dados da literatura para a $\Delta^{25(27)}$ -tigogenina.

Carbono	$\Delta^{25(27)}$ -tigogenina* (δ) ppm	Sp3 (δ) ppm	Tipo
1	37,20	34,50	CH
2	30,00	25,47	CH ₂
3	77,00	74,37	CH
4	34,40	32,41	CH ₂
5	44,60	41,81	CH
6	28,90	28,71	CH ₂
7	32,20	31,58	CH ₂
8	35,30	35,31	CH
9	54,60	54,27	CH
10	35,50	40,77	C
11	21,40	20,84	CH ₂
12	40,20	40,29	CH ₂
13	40,90	40,77	C
14	56,50	56,75	CH
15	32,00	32,14	CH ₂
16	81,30	81,37/81,06	CH
17	63,20	62,46/62,36	CH
18	16,80	16,70	CH ₃
19	12,40	11,54	CH ₃
20	42,00	41,81/41,71	CH
21	15,00	14,47/17,36	CH ₃
22	109,20	109,53/109,46	C
23	32,00	32,65/32,41	CH ₂
24	29,00	29,01/28,71	CH ₂
25	144,00	143,92	C
26	65,00	65,11	CH ₂
27	108,80	108,78	CH ₂

Nota: * Acharya et al., 2009 (600 MHz, CDCl_3).

O espectro de RMN de ^1H (Figura 29) apresentou um padrão típico de esteróides com sinais entre δ 0,79 e 2,26. Os simpletos em δ 4,74 e 4,78 foram atribuídos aos hidrogênios olefínicos H-27a e H-27b. O multiplete em δ 4,42 foi atribuído à H-16, os dois dupletos em δ 4,30 e 3,87, com constante de acoplamento escalar de 12,0 Hz, foram atribuídos aos hidrogênios H-26a e H-26b, respectivamente. O simpleto largo em δ 3,96 foi atribuído ao hidrogênio H-3, os dupletos em δ 0,94 e 0,76, com constante de acoplamento escalar de 6,0 Hz, foram atribuídos aos hidrogênios epiméricos H-21 e o simpleto em δ 0,79 foi atribuído aos hidrogênios H-19.

Os sinais entre δ 3,28 e 4,41 foram atribuídos aos hidrogênios do açúcar; o duplete em δ 4,36 ($J = 8,0$ Hz) foi atribuído à H-1', os dupletos em δ 3,84 e 3,80 ($J = 12,0$ Hz) foram atribuídos à H-6'a e H-6'b, os tripletos em δ 3,64 e 3,56 foram atribuídos aos hidrogênios H-4' e H-3', o multiplete centrado em δ 3,41 foi atribuído à H-2' e o duplete em δ 3,29 ($J = 8,0$ Hz) foi atribuído à H-5'.

A conectividade entre os sinais de hidrogênio atribuídos ao açúcar no mapa de contornos COSY (Figura 30) possibilitou confirmar as atribuições efetuadas no espectro de RMN de ^1H . Assim, foram observadas correlações entre os hidrogênios H-2'/H-1' (δ 3,41/4,36); H-4'/H-3' (δ 3,64/3,56); H-2'/H-3' (δ 3,41/3,56) e H-5'/H-4' (δ 3,29/3,64). As atribuições dos sinais do resíduo de açúcar também foram confirmadas pelo mapa de contornos HSQC-TOCSY (Figura 32), que indicou a conectividade entre todos os hidrogênios do sistema de spins e cada átomo de carbono correspondente (Tabela 32).

A partir dos dados espectrométricos de RMN de ^1H e de ^{13}C e comparação com dados da literatura para glicosídeos (BERNARDO et al., 1996), bem como pela análise conjunta dos espectros obtidos pelos experimentos HSQC-TOCSY e COSY o açúcar constituinte de sp3 foi definido como glicose. Por sua vez, o duplete centrado em δ 4,36, ($J = 8,0$ Hz), correspondente ao hidrogênio anomérico, indicou a configuração β da unidade de glicose.

Tabela 32 - Correlações do mapa de contornos HSQC-TOCSY obtido para Sp3.

CARBONO (δ) ppm	HIDROGÊNIO (δ) ppm
C-6' (61,75)	H-3' (3,56); H-4' (3,64); H-5' (3,29); H-6' (3,84; 3,80)
C-4' (69,76)	H-1' (4,36); H-2' (3,41); H-3' (3,56); H-4' (3,64); H-5' (3,29); H-6' (3,84, 3,80)
C-2' (73,56)	H-1' (4,36); H-2' (3,41); H-3' (3,56); H-4' (3,64); H-5' (3,29)
C-5' (75,71)	H-2' (3,41); H-3' (3,56); H-4' (3,64); H-5' (3,29); H-6' (4,36)
C-3' (76,63)	H-1' (4,36); H-2' (3,41); H-3' (3,56); H-4' (3,64); H-5' (3,29)

O mapa de contornos HSQC (Figura 33) confirmou as atribuições dos espectros monodimensionais de RMN de ^1H e de ^{13}C . Assim, evidenciou-se a conectividade do sinal dos hidrogênios em δ 4,74 (H-27a) e δ 4,78 (H-27b) com o sinal do carbono em δ 108,78 (C-27), dos dupletos centrados em δ 4,30 (H-26a) e δ

3,87 (H-26b) com o sinal em δ 65,11 (C-26), do multiplete em δ 4,42 (H-16) com os sinais de carbono em δ 81,37 e δ 81,06, e dos dupletos em δ 0,94 (CH₃-21) e δ 0,76 (CH₃-21) com os sinais de carbono em δ 14,47 e 17,36. As correlações dos sinais atribuídos à glicose nos espectros monodimensionais, assim como demais correlações observadas no mapa de contornos HSQC estão listadas na Tabela 33.

A análise espectrométrica permitiu definir a estrutura de Sp3 como 3-O- β -D-glicopiranosídeo de $\Delta^{25(27)}$ -tigogenina (**51**).

Tabela 33 - Correlações heteronucleares (¹H – ¹³C) observadas no mapa de contornos HSQC obtido para Sp3.

Carbono	Deslocamentos Químicos	
	¹³ C (δ) ppm	¹ H (δ) ppm
C-27	108,78	4,74; 4,78
C-16	81,37; 81,06	4,42
C-26	65,11	4,30; 3,87
C-3	74,37	3,96
C-21	14,47; 17,36	0,94; 0,76
C-19	11,54	0,79
C-1'	101,04	4,36
C-6'	61,75	3,84
C-4'	69,76	3,64
C-3'	76,63	3,56
C-2'	73,56	3,41
C-5'	75,71	3,29

Sp3 foi isolado a partir do refractionamento da fração diclorometânica, resultante do procedimento clássico de extração de alcalóides (item 4.6.3.7). A análise da fração por CCD de sílica gel revelou várias manchas de coloração laranja em presença do reagente de Dragendorff porém, não foi possível isolar nenhum alcalóide dessa fração.

O isolamento de Sp3 como mistura epimérica pode ser explicado pela hidrólise do cetel correspondente ao produto natural 22R nas condições ácidas de extração, o que resultaria na δ -hidróxicetona de cadeia aberta e sua espontânea reciclagem originaria a mistura de diastereoisômeros R e S (Figura 27). A manutenção da estereoquímica *cis* entre os anéis D e E após a reciclagem foi

confirmada a partir do mapa de contornos NOESY (Figura 30), que indicou manchas de correlação entre os sinais correspondentes a H-16 (δ 4,42, m) e H-17 (δ 1,78, m).

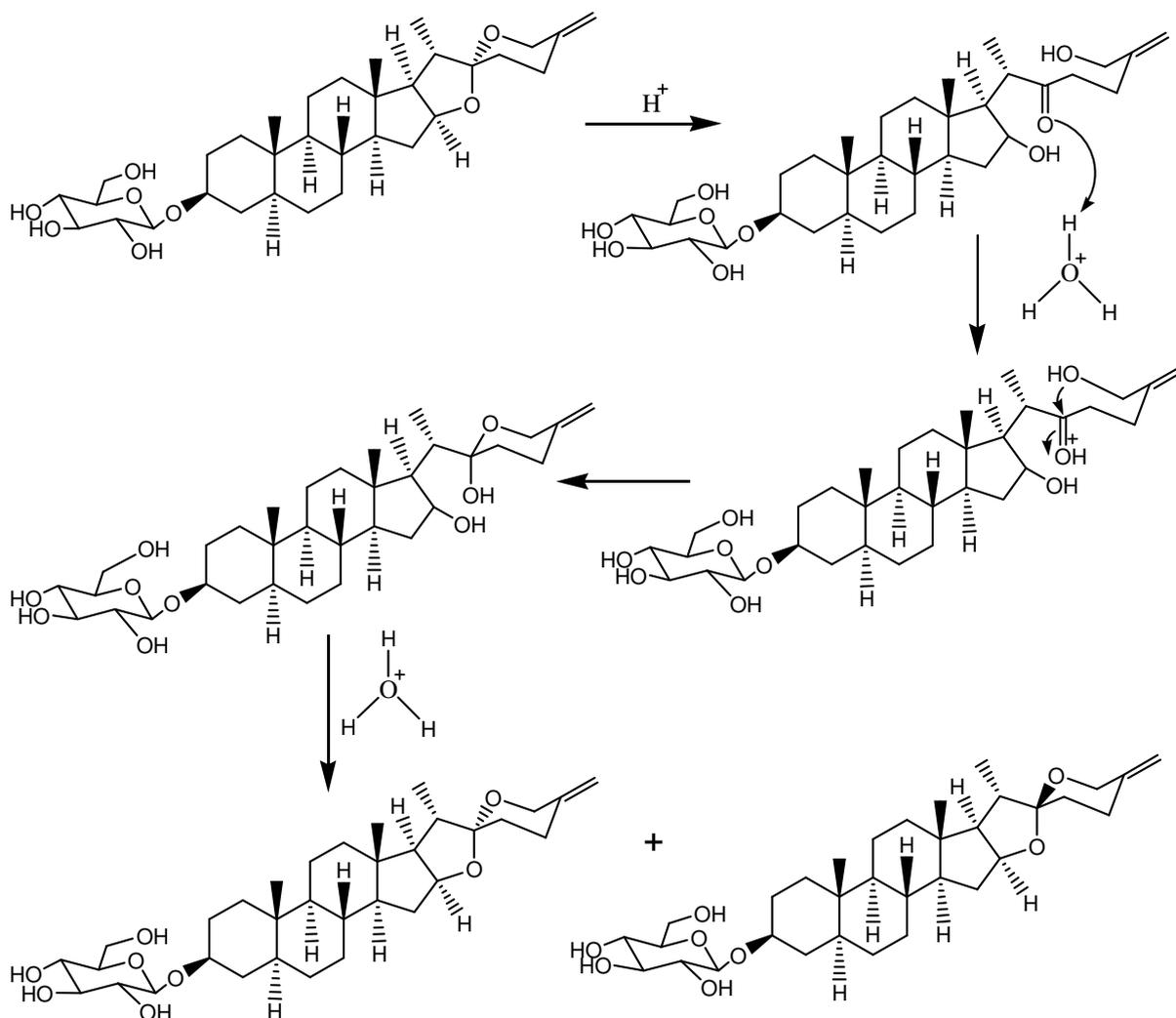


Figura 27 - Hidrólise ácida de 3-O-β-D-glicopiranosídeo Δ²⁵⁽²⁷⁾-tigogenina e conseqüente formação da mistura de diastereoisômeros R e S.

De acordo com a revisão bibliográfica realizada, sp3 3-O-β-D-glicopiranosídeo de Δ²⁵⁽²⁷⁾-tigogenina (**51**) é uma substância inédita.

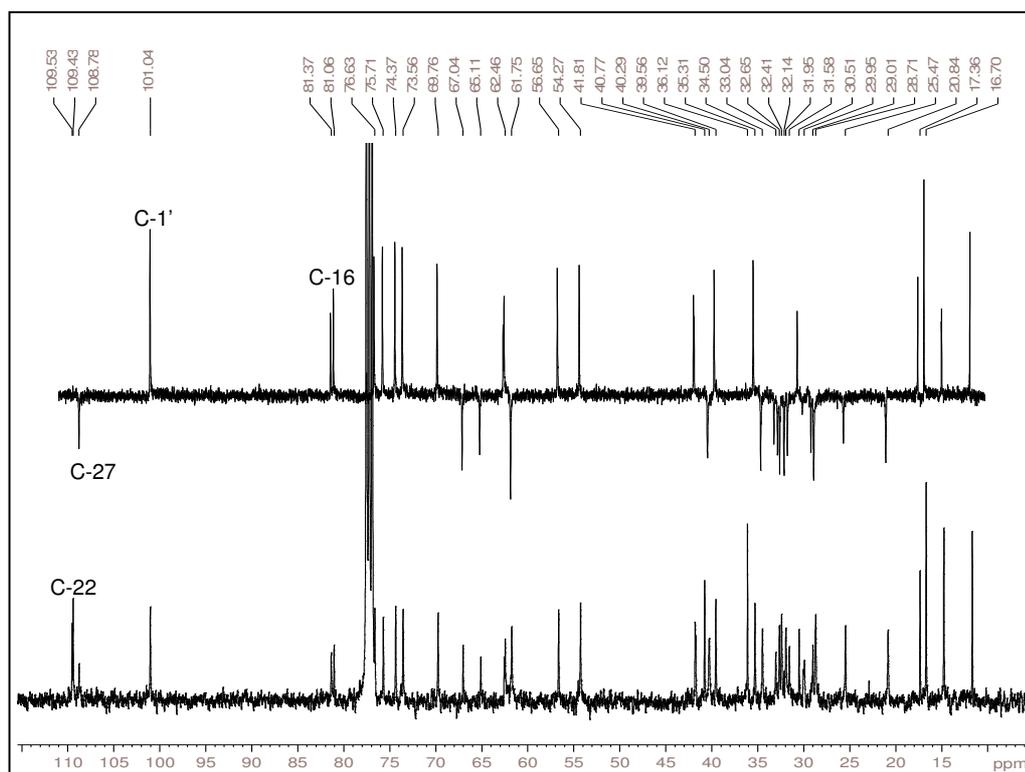


Figura 28 - Espectro de RMN de ^{13}C e DEPT-135 obtidos para Sp3 (100 MHz, CDCl_3).

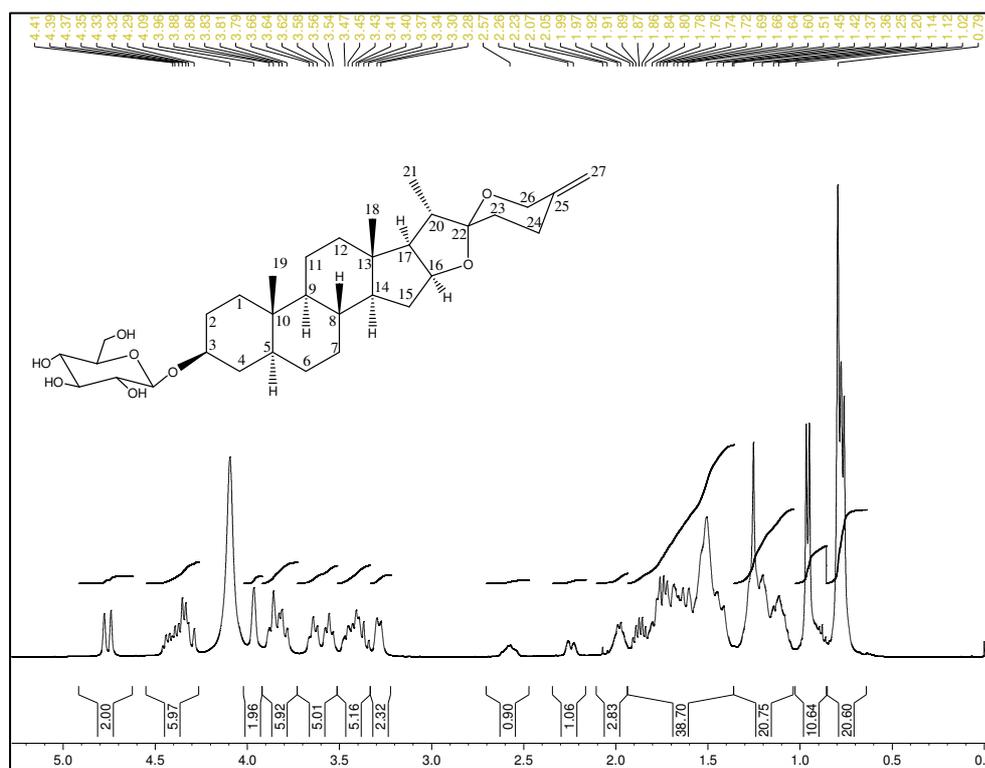


Figura 29 - Espectro de RMN de ^1H obtido para Sp3 (400 MHz, CDCl_3).

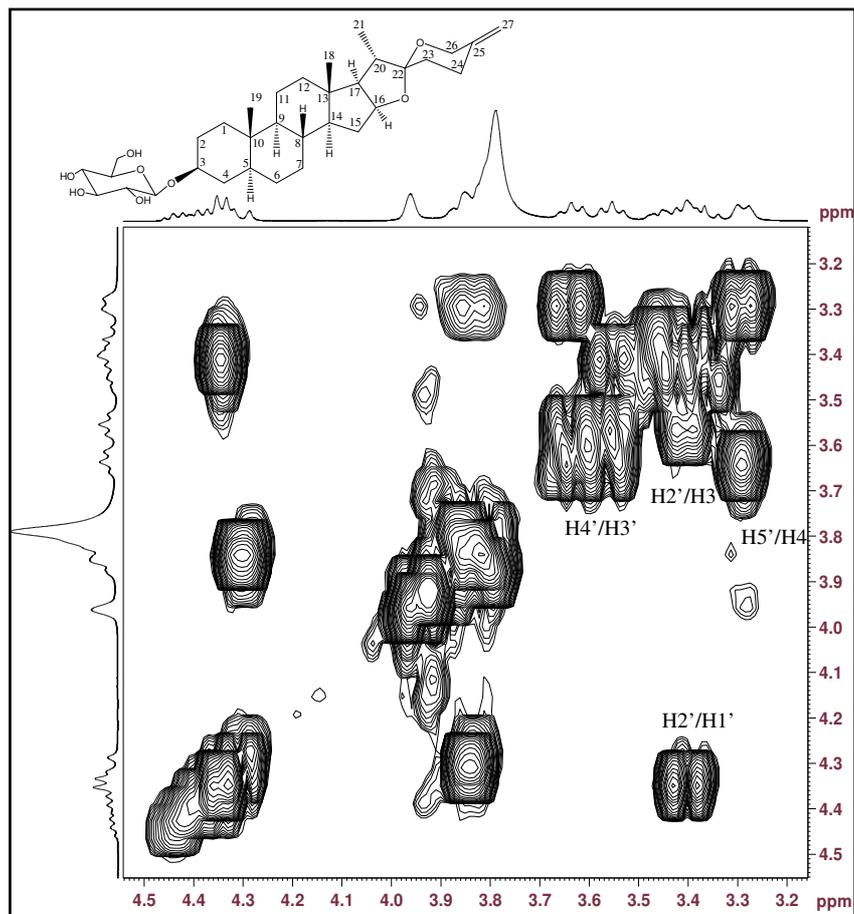


Figura 30 – Mapa de contornos COSY obtido para Sp3. (400 MHz, CDCl₃).

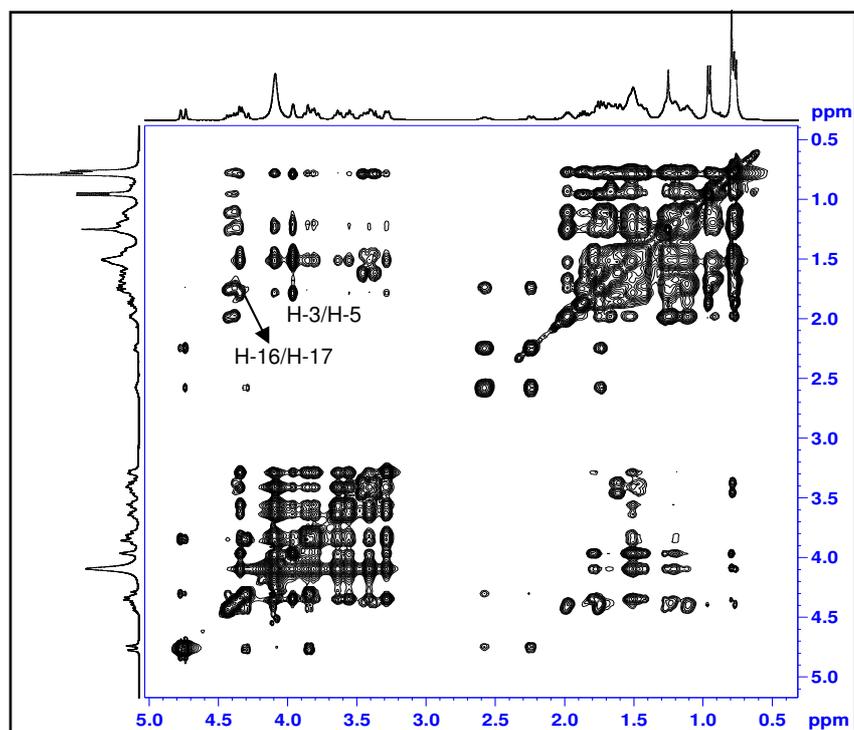


Figura 31 – Mapa de contornos NOESY obtido para Sp3 (400 MHz, CDCl₃).

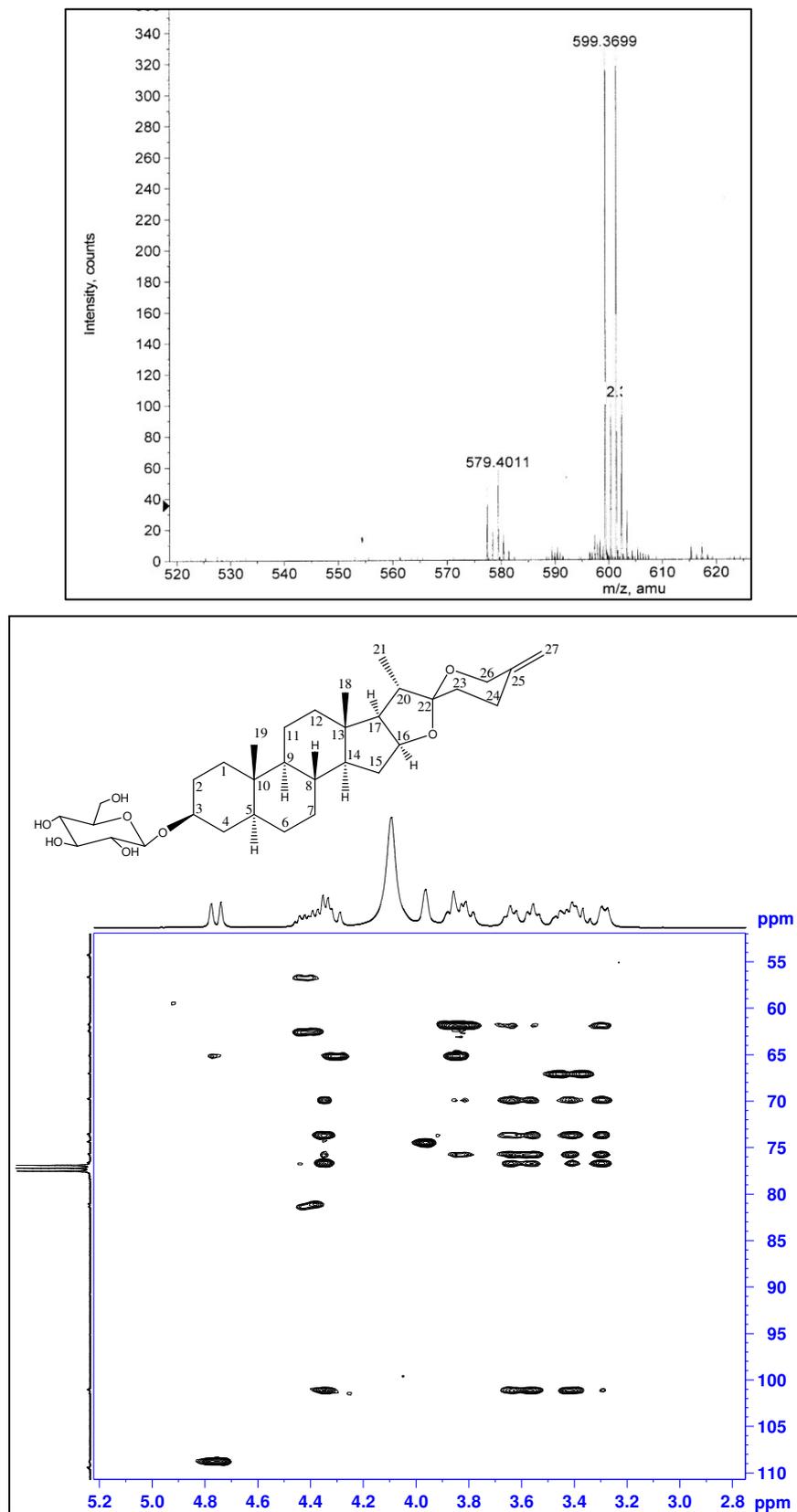


Figura 32 – Espectro de massas de alta resolução e seção expandida do mapa de contornos HSQC-TOCOSY obtidos para Sp3 (100 MHz, CDCl₃).

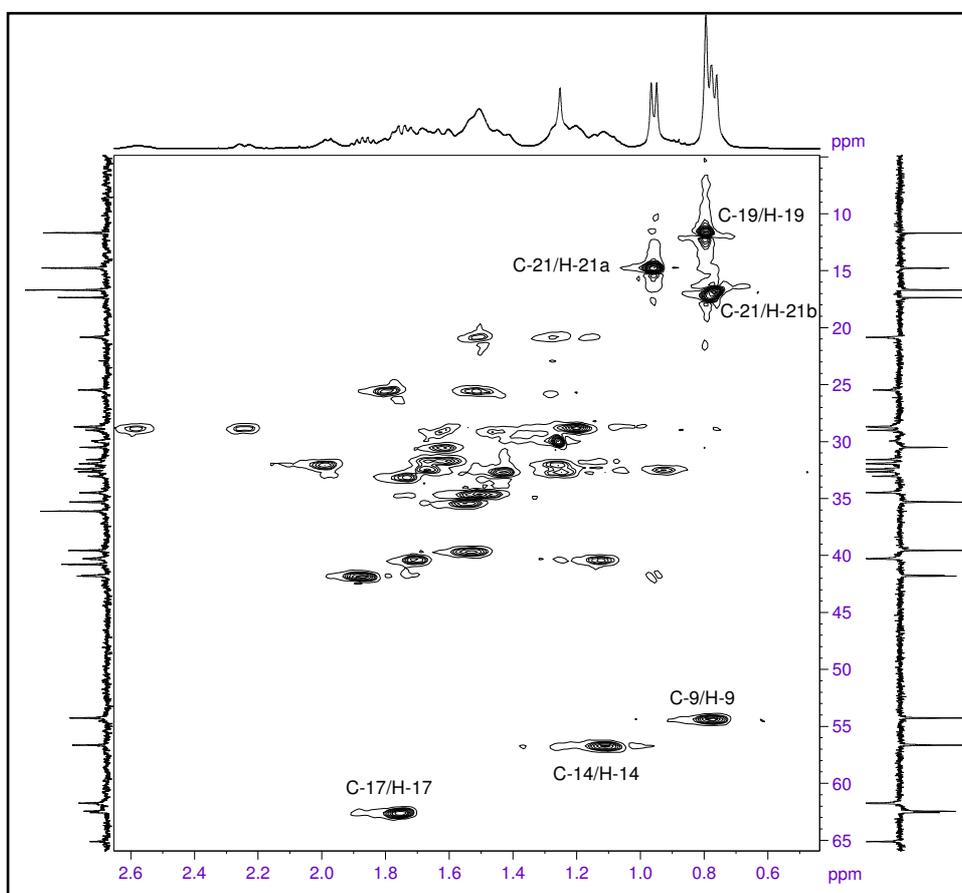
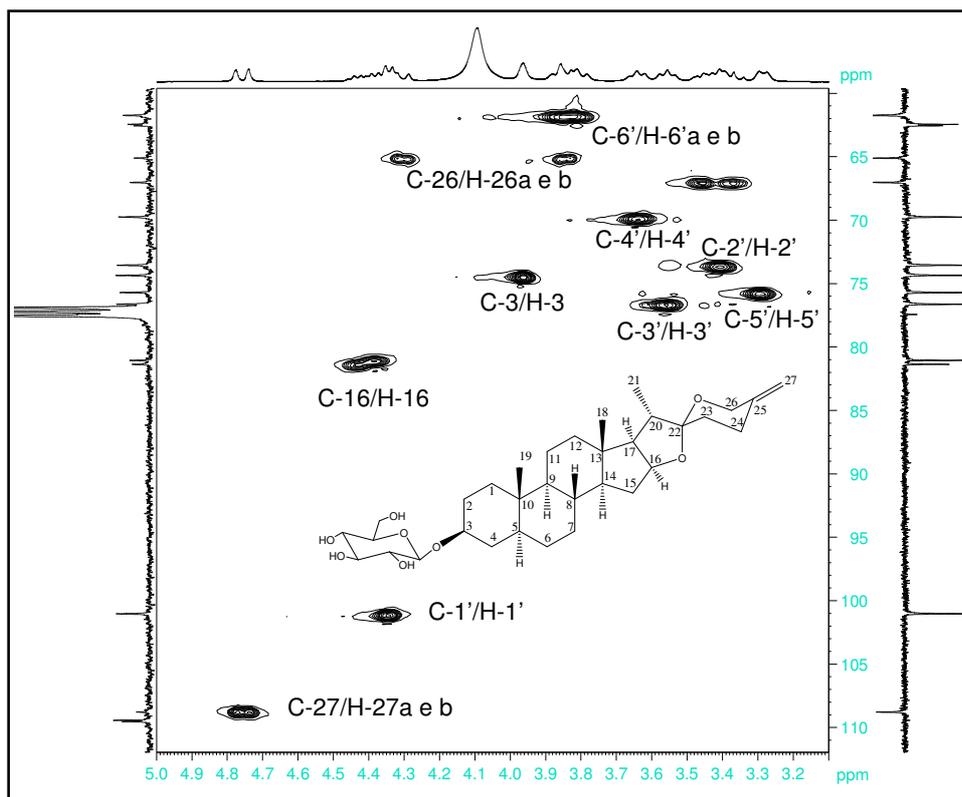


Figura 33 - Seções expandidas do mapa de contornos HSQC obtido para Sp3 (100 MHz, CDCl₃).

5.2.7 Discussão sobre a composição química de *S. paniculatum*

Não há relatos do isolamento da sapogenina esteroidal (25S)-5 α -espirostânica, neotigogenina (**49**) na família Solanaceae e a saponina 3-O- β -D-glicopiranosídeo $\Delta^{25(27)}$ -tigogenina (**51**) é uma substância inédita. Por outro lado, a presença de saponinas esteroidais nitrogenadas e alcalóides esteroidais já foi anteriormente descrita para a espécie *S. paniculatum*, incluindo a sapogenina paniculidina (**13**), a saponina jurubina (**14**) (RIPPERGER et al., 1967) e os alcalóides solamargina (**15**), solanina (**16**) e solanidina (**17**) (SCHREIBER; RIPPERGER, 1966). Das folhas da espécie foram isolados dois glicosídeos espirostânicos denominados paniculonina A e B (**18** e **19**) (RIPPERGER; SCHREIBER, 1968), e as geninas neoclorogenina (**20**) e paniculogenina (**21**) (RIPPERGER et al., 1967). O alcalóide solanina (**16**), característico do gênero *Solanum*, foi encontrado nas folhas e flores (BLANKEMEYER, 1998).

A presença de β -sitosterol (**29**) em *S. indicum* já foi relatada por Chiang et al., (1991).

Com relação à atividade biológica de substâncias dessa classe, saponinas esteroidais isoladas de *Paris polyphylla* mostraram potencial atividade gastroprotetora e foram capazes de inibir úlceras induzidas por etanol. Segundo os autores, a presença de anel espirostânico e a ligação do açúcar na posição 3 são essenciais para a atividade (MATSUDA et al., 2003). Yoshikawa et al. (2005) também relataram a atividade gastroprotetora de saponinas esteroidais isoladas de *Camela sinensis*.

Glicosídeos esteroidais isolados de espécies de *Solanum* apresentaram atividade antiviral frente à HHV-1 e atividade citotóxica frente a linhagens tumorais humanas de pulmão (PC-12) e cólon (HCT-116). Os autores sugerem que a potência da atividade está relacionada com a natureza do núcleo esteroidal, sendo os compostos de núcleo espirostânico os mais potentes. A natureza do açúcar ligado à aglicona também pode influenciar as atividades antiviral e citotóxica (IKEDA et al., 2003; 2000; NAKAMURA et al., 1996).

Esses dados sugerem que a saponina e a sapogenina esteroidais isoladas de *S. paniculatum* no presente trabalho podem estar relacionadas com seu uso popular como gastroprotetor, antiviral e em casos de distúrbios gastrointestinais.

5.3 Ensaios biológicos

5.3.1 Ensaios *in vitro* de atividade antiviral

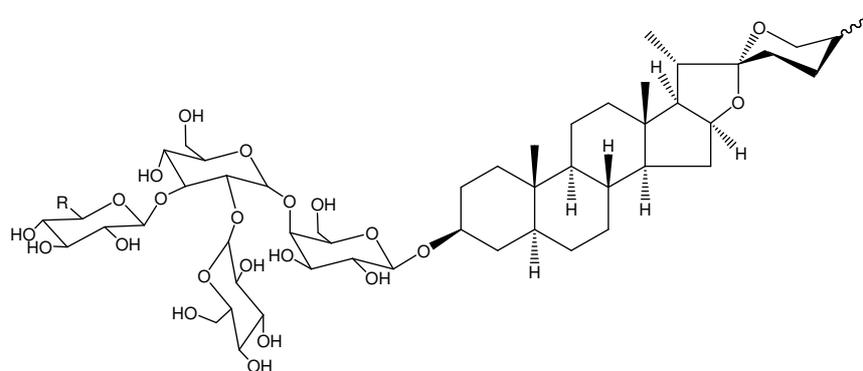
Espécies de *Solanum* são empregadas tradicionalmente para o tratamento de câncer e como antiherpética em diversos países (NAKAMURA et al., 1996). Neste contexto, o extrato bruto de *S. paniculatum* e as substâncias Sp2 (**49**) e Sp3 (**51**) isoladas deste, no presente trabalho, foram avaliados *in vitro* frente aos vírus HHV-1 (vírus da herpes humano tipo 1), EMC (vírus da encefalomiocardite murina) e VACV-WR (vírus da vaccinia), cujo título viral frente à células VERO foi HHV-1 = $2,5 \times 10^6$ TCID₁₀₀/ml em 48 horas, EMC = $1,0 \times 10^6$ TCID₁₀₀/ml em 48 horas e VACV-WR = $1,0 \times 10^6$ TCID₁₀₀/ml em 72 horas.

O extrato bruto de *S. paniculatum* mostrou atividade antiherpética (CI₅₀ = $298,0 \pm 11,2$ µg/ml) e citotóxica (CC₅₀ = $428,9 \pm 19,2$ µg/ml). A saponina neotigogenina Sp2 (**49**) não foi ativa frente às cepas virais ensaiadas, no entanto mostrou-se altamente citotóxica frente às células VERO (CC₅₀ = $2,03 \pm 0,03$ µg/ml), sugerindo potencial atividade antitumoral. Dados da literatura indicam que esta substância foi ensaiada *in vivo* e *in vitro* frente a linhagens tumorais de leucemia (P388), carcinoma de pulmão (Lewis) e melanoma (B16) em estudo realizado pelo Instituto Nacional de Câncer dos EUA; porém, foi inativa em todos os modelos (Developmental Therapeutics Program NCI/HH, 2008). Por outro lado, a saponina Sp3 (**51**) mostrou significativa atividade antiherpética (CI₅₀ = $170,8 \pm 1,7$ µg/ml) e anti-vaccinia (EC₅₀ = $177,0 \pm 3,3$ µg/ml), além de baixa citotoxicidade (CC₅₀ > 400 µg/ml). A tabela 34 mostra as concentrações do extrato bruto e das substâncias isoladas de *S. paniculatum* necessárias para produzir a redução de 50% da viabilidade celular nos ensaios antivirais e de citotoxicidade.

Os resultados indicam que o extrato bruto de *S. paniculatum* constitui uma fonte promissora de substâncias com atividade antiherpética e anti-vaccinia, sendo a saponina **51**, um dos compostos responsáveis pela atividade antiviral do extrato. Os resultados de atividade biológica aqui relatados fornecem evidências para corroborar o uso tradicional de *S. paniculatum* como antiviral. Estudos posteriores *in vivo* são necessários para comprovar esta potencialidade.

O efeito antiviral de glicosídeos esteroidais como **52** e **53** isolados de espécies de *Solanum* (*S. nigrum*, *S. dulcamara*) foi demonstrado frente ao vírus da

herpes humana tipo 1 (HHV-1) e a citotoxicidade relatada para linhagens de células tumorais humanas de pulmão (PC-12) e cólon (HCT-116) (IKEDA et al., 2003; IKEDA et al., 2000; NAKAMURA et al., 1996). Segundo IKEDA et al. (2003), a potência da atividade antiviral apresentada pelos glicosídeos esteroidais de *Solanum* está relacionada com a natureza da aglicona, sendo as de núcleo espirostânico as mais potentes. Os autores também sugerem que a estereoquímica de C-25 é um fator importante para a atividade citotóxica, sendo os compostos com configuração 25*R* dez vezes mais potentes do que a cisplatina (CDDP) empregada como controle positivo.



52: R = H; 25*R*

53: R = H; 25 S:*R* (2:1)

Tabela 34 - Citotoxicidade (CC₅₀) e atividade antiviral (CI₅₀) *in vitro* do extrato bruto e substâncias isoladas de *S. paniculatum*.

Amostras	CC ₅₀ (µg/ml)			CI ₅₀ (µg/ml)		
	Células Vero	HHV-1 ^a	IT ^b	EMCv ^c	VACV-WR ^d	IT ^b
Extrato	428,9 ± 19,2	298,0 ± 11,2	1,4	NA ^e	NA ^e	
Sp2 (49)	2,03 ± 0,03	NA ^e		NA ^e	NA ^e	
Sp3 (51)	> 400	170,8 ± 1,7	> 2,3	NA ^e	177,0 ± 3,3	> 2,2
Aciclovir		^f 40				
α-2a Interferon				^{fg} 1,5 × 10 ²	^{fg} 2,0 × 10 ³	

Nota: ^bIT, índice terapêutico; ^atítulo viral 2,5 × 10⁶ TCID₁₀₀/ml em 48 h; ^ctítulo viral 1,0 × 10⁶ TCID₁₀₀/ml em 48 h; ^dtítulo viral 1,0 × 10⁶ TCID₁₀₀/ml em 72 h; ^eNA: não ativo nas concentrações ensaiadas; ^f80 a 100% de inibição do efeito citopático; ^gconcentração em UI/ml.

5.3.2 Ensaio *ex vivo* de absorção de lipídeos

Uma das propostas iniciais do trabalho era empregar um ensaio *in vitro*, de simples execução, para monitorar o fracionamento dos extratos, visando isolar os constituintes bioativos, responsáveis pelo efeito das espécies sobre o metabolismo de lipídeos. A revisão da literatura indicou o ensaio *in vitro* com alças intestinais evertidas como adequado ao nosso propósito. Neste modelo, o jejuno dos animais é retirado, lavado *in situ*, evertido, preenchido com solução serosa e então separado em sacos de aproximadamente 2 cm. Os sacos são mergulhados em solução mucosa contendo a substância ensaiada. É um modelo simples e bastante empregado para avaliar a absorção intestinal de diferentes moléculas tais como AZT-Ac e AZT-Iso, duas novas pro-drogas derivadas do AZT (QUEVEDO; BRIÑÓN, 2009); midazolam, enzima do citocromo P450 (ARELLANO et al., 2007) e do fármaco antiarrítmico amiodarona (SHAYEGANPOUR et al., 2008).

Previamente à avaliação dos extratos no modelo escolhido, decidiu-se ensaiar o fitoterápico que contém os extratos das três espécies em estudo, além de uma espécie exótica (*E. centaurium*), já que ele apresentou atividade nos modelos *in vivo* (BOTION et al, 2005). Os experimentos foram realizados utilizando-se um grupo controle G1 (sem a adição do fitoterápico à solução mucosa), e cinco grupos experimento, G2, G3, G4, G5 e G6, nos quais se adicionou à solução mucosa volumes da formulação fitoterápica (1, 3, 10, 30 e 100 µL, respectivamente). Todos os grupos (G1, G2, G3, G4, G5 e G6) foram ensaiados em triplicata.

Os resultados obtidos mostraram que a administração da formulação fitoterápica à solução mucosa, em volumes crescentes, não resultou em aumento estatisticamente significativo, a um nível de confiança de 95%, nos triglicérides absorvidos pela membrana intestinal nos grupos experimento, em relação ao grupo controle (Tabela 35, Figura 34).

Os resultados obtidos sugerem que a formulação não atua no mecanismo de absorção intestinal de lipídeos, ou seja, provavelmente não é este o mecanismo de ação pelo qual a administração do fitoterápico resulta no alívio dos sintomas de má digestão. Este resultado sugere a participação de outros mecanismos possíveis como a formação e liberação de quilomícrons, a secreção hormonal ou a síntese e liberação de bile, como responsáveis pela atividade do fitoterápico. Modelos *in vivo*

para avaliação de fluxo biliar e secreção hormonal podem fornecer indícios sobre o mecanismo de ação (LEWIS et al., 1995; MANSBACH; NEVIN, 1998). Assim, considerando os resultados obtidos, os extratos das espécies em estudo não foram ensaiados no modelo *in vitro* de absorção de lipídeos. Optou-se, então, pela avaliação somente em ensaios *in vivo*.

Tabela 35 - Concentrações de triglicérides absorvidos (mmol/mL) em alças intestinais evertidas, determinadas para o grupo controle (G1) e para os grupos tratados com o fitoterápico (G2, G3, G4, G5 e G6).

Grupos (volume de fitoterápico μL)	Concentração de triglicérides (mmol/mL)
G1 - Controle	$2,16 \pm 0,74$
G2 (1)	$1,83 \pm 0,61$
G3 (3)	$1,75 \pm 0,58$
G4 (10)	$1,92 \pm 0,79$
G5 (30)	$1,82 \pm 0,62$
G6 (100)	$1,92 \pm 0,65$

Nota: Para o cálculo da estatística *t* de Student ($p > 0,05$), utilizada no teste de igualdade de médias, foi considerado que as amostras são independentes e têm variâncias diferentes.

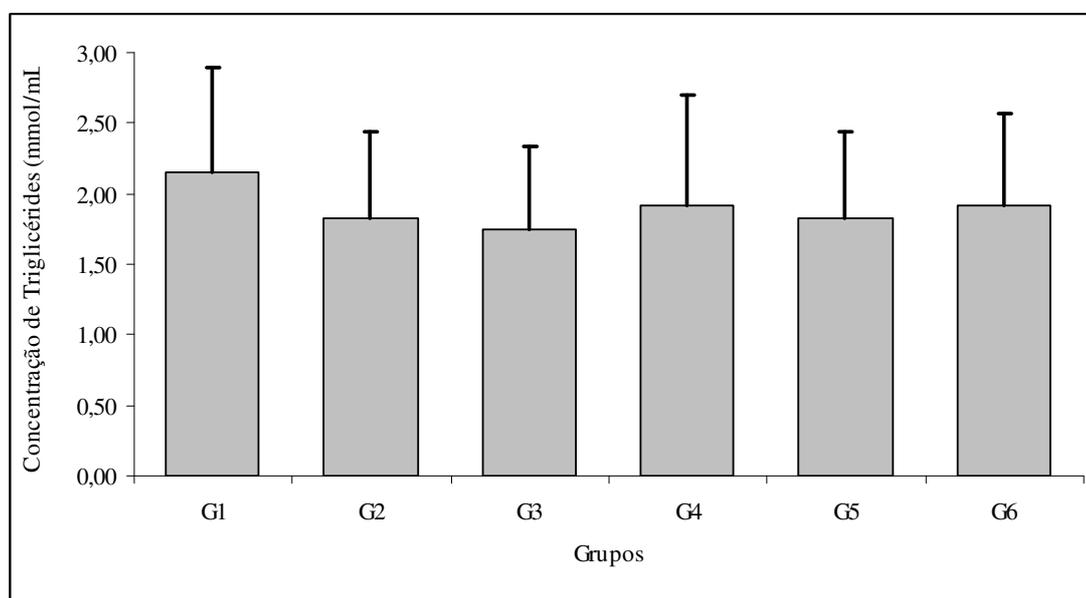


Figura 34 - Concentração de triglicérides (mmol/mL) determinada no experimento com alças intestinais evertidas para o grupo controle (G1) e grupos tratados com volumes crescentes do fitoterápico (G2, 1 μL ; G3, 3 μL ; G4, 10 μL ; G5 30 μL ; G6, 100 μL).

5.3.3 Ensaio *in vivo* de absorção de lipídeos

Experimentos anteriores com uma formulação fitoterápica contendo os extratos fluidos das três espécies em estudo (*J. caroba*, *R. ferruginea*, *S. paniculatum*), além de *Erythraea centaurium*, mostraram que o produto não afeta os níveis plasmáticos de glicose, colesterol total e HDL de animais tratados com o fitoterápico, em relação ao grupo controle. Porém, o nível plasmático de triglicérides (TAG) do grupo tratado mostrou um aumento dose-dependente ($2,59 \pm 0,18$ mmol/mL), em relação ao grupo controle ($2,00 \pm 0,18$ mmol/mL). (BOTION et al., 2005). No mesmo estudo, a atividade da lipase lipoprotéica (LPL) do tecido adiposo epididimal de animais tratados apresentou um aumento de 35,29% na atividade em relação ao grupo controle (BOTION et al., 2005). Segundo os autores, o aumento da concentração de TAG nos animais tratados com dieta hiperlipídica poderia ser explicado pelo incremento na absorção de lipídeos ou pela redução de partículas ricas em TAG, principalmente quilomícrons, no estado pós-prandial. Os resultados obtidos indicaram que a administração do fitoterápico, anteriormente à ingestão de dieta hiperlipídica, produz um aumento de lipídeos no plasma, demonstrando o efeito da associação dos extratos sobre a absorção de triglicérides.

O nível plasmático de TAG é determinado pelo balanço entre a absorção dietética deste macronutriente, sua síntese endógena e utilização pelos tecidos periféricos. Dentre as enzimas relacionadas ao metabolismo lipídico, a LPL exerce papel chave. A LPL é uma enzima responsável pelo *clearance* das lipoproteínas circulantes, estando localizada no endotélio vascular de tecidos extra-hepáticos, como tecido adiposo, coração e músculo esquelético. Sua atividade pode ser alterada rapidamente em resposta ao estado nutricional (BOTHAM et al, 1997).

No presente trabalho, a fim de avaliar o efeito de cada uma das espécies no metabolismo de TAG, previamente demonstrado para o fitoterápico composto de *R. ferruginea*, *S. paniculatum* e *J. caroba*, os extratos de cada uma das espécies foram ensaiados *in vivo* em ratos submetidos a dieta hiperlipídica, nas concentrações de 0,1, 1,0 e 5,0 mg/Kg de peso corporal (PC). A atividade da LPL foi avaliada em amostras de tecido adiposo epididimal dos animais de cada grupo.

Na dose de 0,1 mg/Kg de PC, nenhum dos extratos administrados provocou alteração significativa nos níveis plasmáticos de TAG, em relação aos animais do

grupo controle ($p < 0,05$) (Figura 35). Por outro lado, o aumento da dose administrada para 1,0 mg/Kg de PC induziu aumento significativo nos níveis de TAG plasmático para *R. ferruginea*, *S. paniculatum* e *J. caroba*. Na dose de 5,0 mg/Kg de PC, os níveis de TAG plasmático permaneceram aumentados para *R. ferruginea* e *J. caroba*, porém equipararam-se novamente ao grupo controle com a administração de *S. paniculatum*. A administração dos extratos de cada uma das espécies na dose de 10 mg/Kg de PC não apresentou qualquer efeito significativo sobre os níveis de TAG plasmático.

A administração dos extratos de *R. ferruginea*, *S. paniculatum* e *J. caroba* (0,1 mg/Kg de PC) em animais tratados com dieta hiperlipídica resultou em aumento significativo ($p < 0,05$) na atividade da enzima LPL para todos os grupos em relação ao grupo controle. Entretanto, quando administrados na dose de 1,0 mg/Kg de PC, nenhum dos extratos alterou a atividade da LPL em relação ao grupo controle. A administração dos extratos na dose de 5,0 mg/Kg de PC resultou no aumento da atividade da LPL apenas para o grupo tratado com *S. paniculatum* ($p < 0,05$). A Figura 35 ilustra os efeitos observados para os extratos sobre o nível de TAG plasmático e sobre a atividade da LPL.

Os resultados obtidos indicam uma correlação inversa entre o aumento da atividade da LPL (enzima responsável pela hidrólise dos TAG circulantes) e o nível de triglicérides plasmático para os animais tratados com *R. ferruginea*, *S. paniculatum* e *J. caroba* na dose de 1,0 mg/Kg de PC. Maiores doses dos extratos não alteraram a atividade da LPL, com exceção de *S. paniculatum*, cuja administração de 5,0 mg/Kg de PC promoveu aumento na atividade enzimática.

Estudos prévios corroboram os resultados obtidos no presente trabalho e indicam uma correlação inversa entre os níveis de TAG plasmático e a atividade da enzima LPL. Baroukh et al (2004) demonstraram que camundongos que superexpressam a apolipoproteína A5 apresentam um decréscimo no nível de TAG plasmático, induzido pela aceleração do catabolismo de TAG, resultante da ativação direta da LPL. Xie et al (2007) atribuíram o efeito hipolipidêmico da espécie *Ananas comosus* à ativação seletiva da LPL, resultando na redução dos níveis de lipídeos circulantes.

As espécies *J.caroba*, *R.ferruginea* e *S. paniculatum*, são constituintes de um produto fitoterápico empregado no tratamento de dispepsias, como previamente mencionado. A administração do fitoterápico a ratos tratados com dieta hiperlipídica promoveu um aumento dos níveis de TAG plasmático (BOTION et al., 2005). Os experimentos realizados com cada espécie isoladamente mostraram que o efeito dos extratos no metabolismo de lipídeos deriva da indução da absorção intestinal de TAG e do *clearance*, dose-dependente, dos TAG's circulantes, resultante da ativação da LPL. Os resultados do presente trabalho comprovam a participação dos extratos no efeito relatado previamente para o fitoterápico.

A atividade anti-hiperlipidêmica dos ácidos ursólico e oleanólico foi demonstrada em ratos geneticamente hipertensos (Dahl, DSS), observando-se um decréscimo superior a 50% nos níveis de TAG plasmático e LDL após seis semanas de tratamento (SOMOVA et al., 2003). Estes dados sugerem a participação do ácido ursólico no efeito dos extratos de *J. caroba* e *R. ferruginea* sobre o metabolismo de lipídeos, visto que este triterpeno foi isolado de ambas as espécies no presente trabalho. Estudos adicionais são necessários para confirmar a participação deste composto e de outros triterpenos no efeito observado.

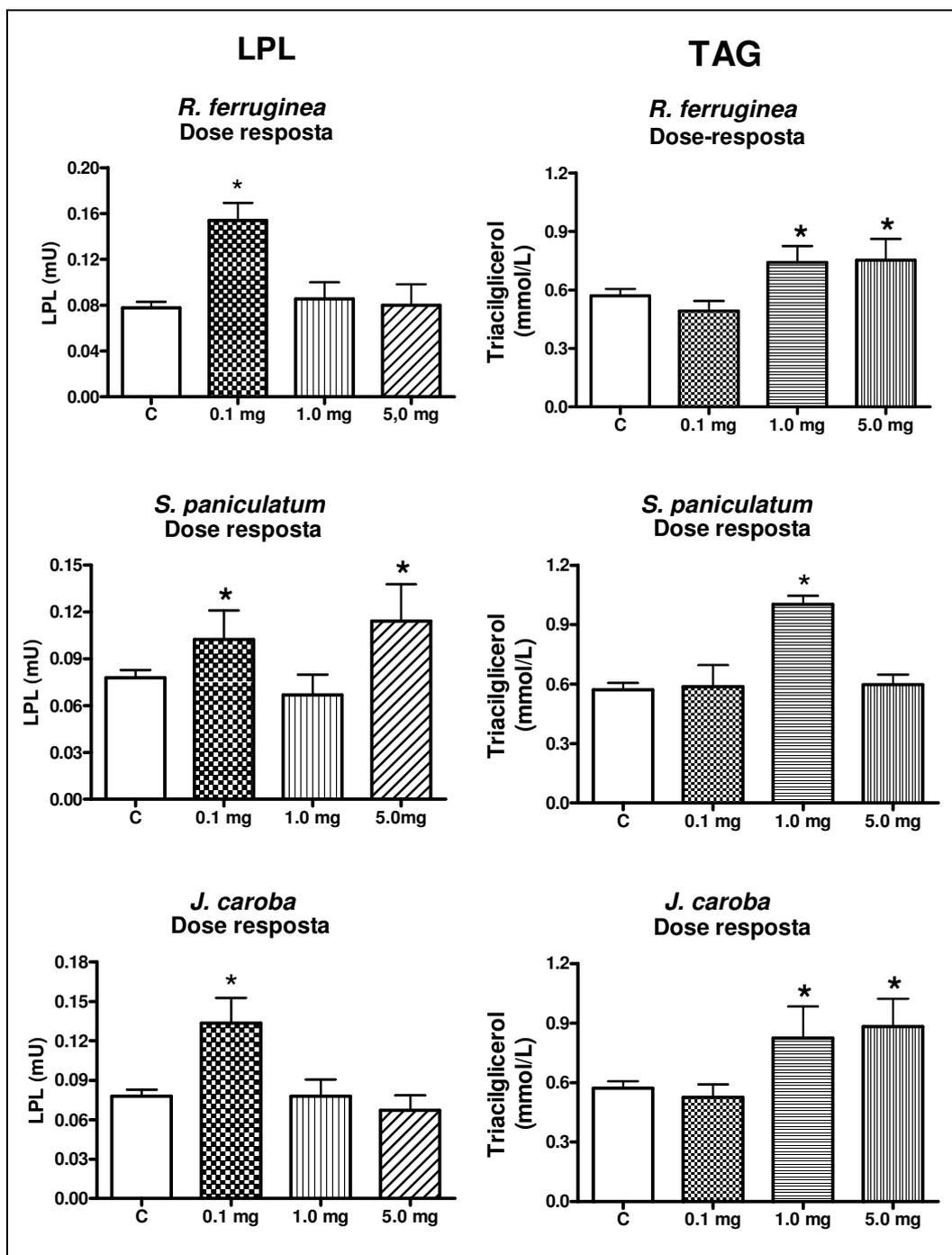


Figura 35 - Efeito dos extratos avaliados no nível de TAG plasmático e na atividade da LPL.

C: grupo controle.

6 CONCLUSÕES

- O fracionamento de *J. caroba* levou ao isolamento dos ácidos ursólico e oleanólico, que correspondem a aproximadamente 4% da composição total do extrato, além de β -sitosterol. De *R. ferruginea* foram obtidos ácido ursólico, β -sitosterol e estigmasterol, inéditos na espécie. O fracionamento de *S. paniculatum* resultou no isolamento da sapogenina espirostânica neotigogenina, inédita no gênero, e da saponina inédita 3-O- β -D-glicopiranosídeo $\Delta^{25(27)}$ -tigogenina, além de uma mistura de β -sitosterol e estigmasterol.
- *S. paniculatum* apresentou atividade antiviral *in vitro* frente aos vírus HHV-1 e EMCv, e a saponina 3-O- β -D-glicopiranosídeo $\Delta^{25(27)}$ -tigogenina foi identificada como substância bioativa frente a ambas linhagens virais.
- Os extratos de *S. paniculatum*, *R. ferruginea* e *J. caroba* induziram aumento da absorção de lipídeos em animais tratados com dieta hiperlipídica. Os extratos promoveram aumento da atividade da lipase lipoprotéica, observando-se uma correlação inversa entre os níveis de triglicérides plasmáticos e a atividade enzimática.
- Um produto fitoterápico contendo extratos de *S. paniculatum*, *R. ferruginea* e *J. caroba* não resultou em aumento significativo na absorção de triglicérides em preparações *ex vivo* de alça intestinal evertida.

PARTE 2

Transformações Químicas dos Ácidos Ursólico e Oleanólico

7 REVISÃO DA LITERATURA

Triterpenos são compostos com 30 átomos de carbono, derivados biossinteticamente da ciclização do esqualeno. Os triterpenos compreendem um grande número de substâncias naturais, observando-se uma expressiva variedade de grupos funcionais (HONDA, 2000).

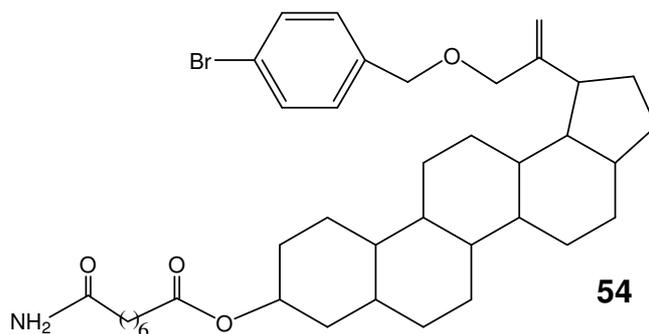
Os ácidos ursólico (**31**) e oleanólico (**42**) são isômeros constitucionais, distinguindo-se apenas quanto à localização de dois grupos metila no anel E: no ácido ursólico eles se localizam em C-20 e em C-19, enquanto no ácido oleanólico ambos estão em C-20. São triterpenos de ampla distribuição, sendo encontrados em espécies alimentícias, medicinais e outras, seja na sua forma livre (agliconas) ou como heterosídeos (saponinas). Durante as últimas décadas, diversos trabalhos relatando o isolamento, modificações estruturais, avaliação de atividades farmacológicas, toxicidade e ensaios clínicos foram publicados para estes dois triterpenos, refletindo o grande interesse científico e as potencialidades dessas substâncias na terapêutica (LIU; 1995; LIU, 2005; MA et al., 2005; SULTANA; ATA, 2009).

Entre as diversas atividades biológicas já relatadas para os ácidos ursólico e oleanólico destacam-se as ações hepatoprotetora (SARAVANAN et al., 2006), antiinflamatória (IKEDA et al., 2008; SINGH et al., 1992), hipolipidêmica e antiaterosclerótica (MA, 1986; SARAVANAN et al., 2006; SOMOVA et al., 2003), hipocolesterolemizante (LIN et al., 2009), tripanossomicida (CUNHA et al., 2003; LEITE et al., 2006), imunomoduladora (RAPHAEL; KUTTAN, 2003), antimicrobiana, (MALLAVADHANI et al., 2004), anti-HIV (KASHIWADA et al., 2000; LEE et al., 2008), antibacteriana (FONTANAY et al., 2008), antiúlcera gástrica e gastroprotetora (GOMES et al., 2009), hipoglicêmica (LIU et al., 1995), antiosteoporótica (LEE et al., 2008), antidiabética (JANG et al., 2009) e anticoncepcional (LIU., 1995).

Os ácidos ursólico e oleanólico também apresentam atividade antitumoral *in vitro* e *in vivo*, atuando como agentes antimutagênicos, inibidores da iniciação, diferenciação e proliferação de células tumorais (HSU et al., 2000; RESENDE et al., 2006). Ambos os triterpenos apresentam atividade inibitória da angiogênese e da proliferação tumoral, bloqueando a diferenciação das células tumorais, processos

envolvidos na formação de metástases. Portanto, esses compostos podem potencialmente inibir diversos estágios do desenvolvimento de tumores. O ácido ursólico mostrou atividade *in vitro* contra leucemia, melanoma, hepatoma e carcinomas de pulmão, ovário, cólon, cérvix e cérebro. Por sua vez, o ácido oleanólico foi ativo *in vitro* contra leucemia e carcinomas de pulmão, ovário, cólon, pâncreas, rim e mama (ANDERSSON et al., 2003; LI et al., 2002; OVESNÁ et al., 2004).

A atividade antiplasmódica *in vitro* também foi previamente relatada para os ácidos ursólico e oleanólico (STEELE et al., 1999), bem como para os triterpenos lupeol (ALVES et al., 1997) e ácido betulínico (STEELE et al., 1999). Foram obtidos diversos derivados sintéticos do lupeol, incluindo X4Y10 (**54**), o qual se mostrou nove vezes mais ativo *in vitro* contra o *Plasmodium falciparum* ($CI_{50} = 13,07 \mu\text{g/mL}$) que a substância de origem ($CI_{50} = 117 \mu\text{g/mL}$), indicando a potencialidade de derivados de triterpenos como fonte de novos agentes antimaláricos (KAUR et al., 2009).



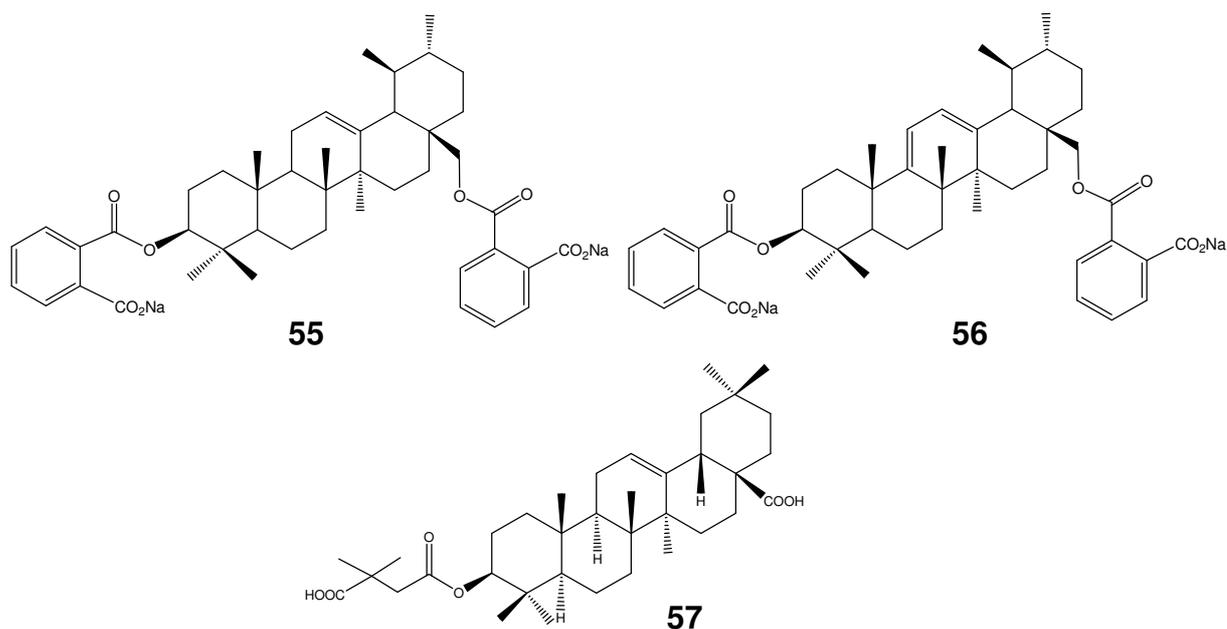
Os dados sobre a composição química de *R. ferruginea* relatados no presente trabalho, incluindo o isolamento de ácido ursólico e de outros triterpenos (Capítulo I, item 5.1.2), permitem-nos supor que o uso tradicional da espécie como antimalárico esteja associado à presença de substâncias dessa classe. Além disso, a espécie *Jacaranda caroba* também constitui uma fonte abundante desses triterpenos (Capítulo I, item 5.1.1), especialmente dos ácidos ursólico e oleanólico, o que motivou sua utilização como material de partida para a síntese de derivados, no presente trabalho. Tendo em vista relatos anteriores sobre a potencial atividade antitumoral dos ácidos oleanólico e ursólico, bem como sobre a atividade antiplasmódica de derivados do lupeol, os produtos de transformação química obtidos no presente estudo foram avaliados *in vitro* frente a linhagens tumorais

humanas e, também, frente a *Plasmodium falciparum*, um dos agentes etiológicos da malária.

7.1 Transformações químicas dos ácidos ursólico e oleanólico

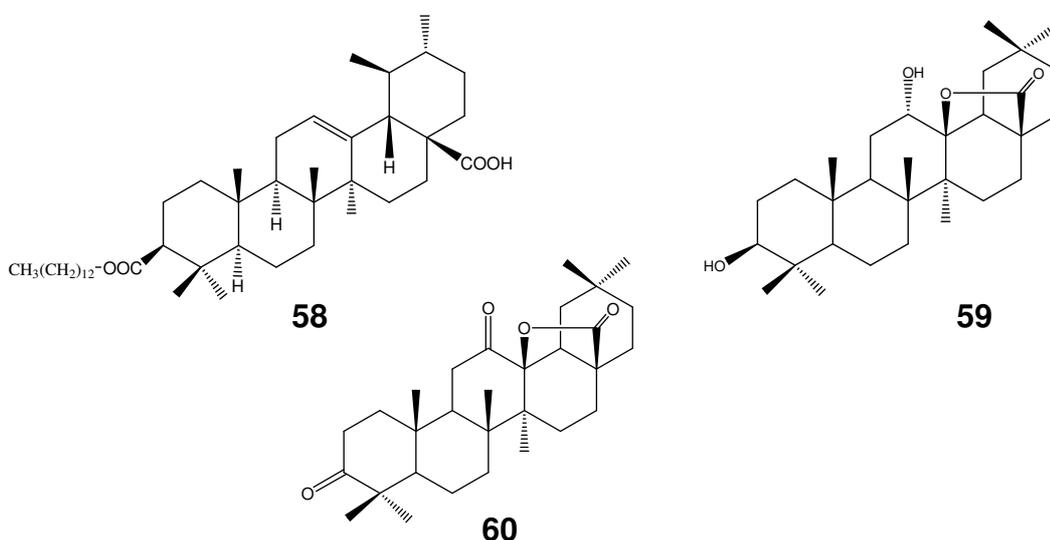
Diversos derivados sintéticos dos ácidos ursólico e oleanólico encontram-se descritos na literatura, os quais tiveram suas atividades biológicas avaliadas em modelos variados, indicando a potencialidade dessas substâncias como fonte de novas moléculas bioativas. Assim, derivados do ácido ursólico com substituintes em C-3 e C-28 apresentaram potente atividade antiúlcera *in vivo* (**55**, $DE_{50} = 3,7$ mg/Kg; **56**, $DE_{50} = 16,8$ mg/Kg peso corporal), 5 a 20 vezes superior à carbenoxolona utilizada como controle positivo ($DE_{50} = 62$ mg/Kg peso corporal) (FARINA et al., 1998; SÁNCHEZ et al., 2006).

A atividade anti-HIV dos ácidos oleanólico (**42**) e ursólico (**31**) foi descrita em ensaios *in vitro* com linfócitos H9 [**42**, $CI_{50} = 3,7$ μ g/mL e IT (Índice Terapêutico) = 12,9; **31**, $CI_{50} = 4,4$ μ g/mL e IT = 3,3] (KASHIWADA et al., 2000). Esses resultados motivaram a síntese de derivados do ácido oleanólico, os quais foram avaliados *in vitro*, empregando-se AZT como controle positivo ($CI_{50} = 0,01$ μ g/mL e IT = 50000) e possibilitaram identificar o composto **57** com elevada atividade ($CI_{50} = 0,0039$ μ g/mL e IT = 3570) (ZHU et al., 2001). Derivados do ácido ursólico também foram avaliados; porém, estes não se mostraram tão promissores.



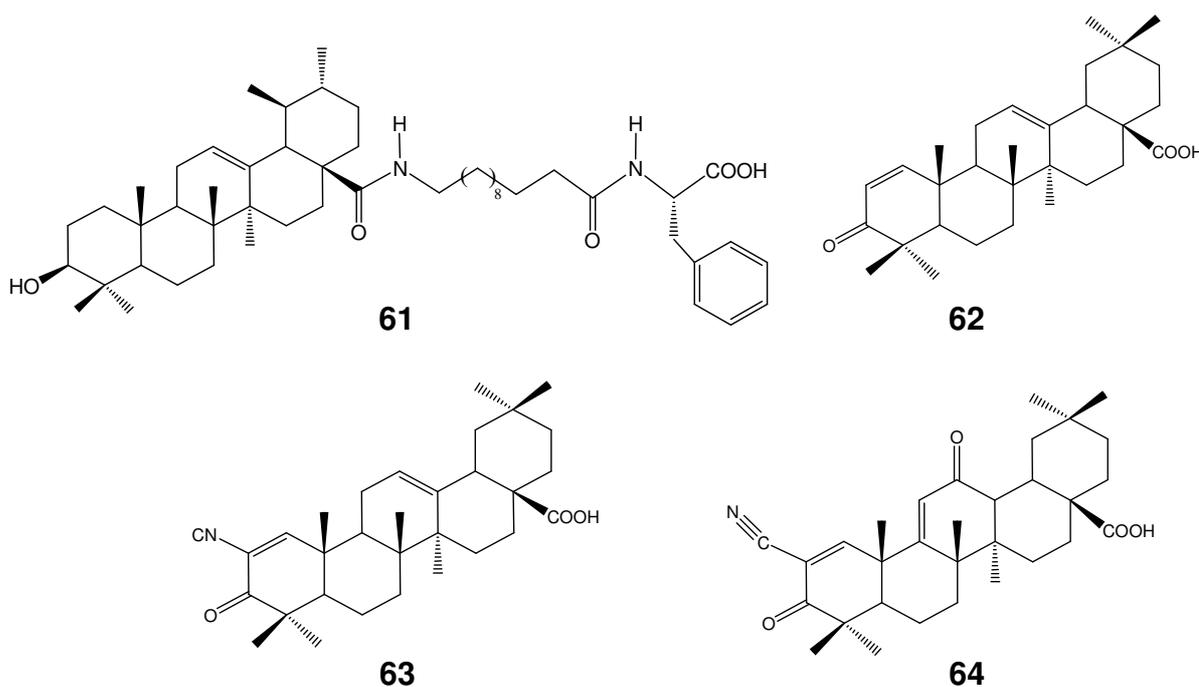
A atividade antimicrobiana *in vitro* de derivados do ácido ursólico foi avaliada frente à bactéria gram negativa *Pseudomonas syringae*, sendo o composto **58** cerca de 1,6 vezes mais ativo que a tetraciclina empregada como controle (MALLAVADHANI et al., 2004). Cunha et al. (2007) avaliaram a atividade antimicrobiana dos ácidos ursólico e oleanólico, bem como de seus derivados sintéticos modificados nas posições 3 e 28 frente a *Streptococcus mutans*, *Streptococcus mitis*, *Streptococcus sanguinis*, *Streptococcus salivarius*, *Streptococcus sobrinus* e *Enterococcus faecalis*, microorganismos responsáveis pela formação de cáries dentais em humanos. Todos os triterpenos ensaiados mostraram atividade frente aos microorganismos, indicando sua potencialidade como agentes anti-placa e anti-cárie. Porém, os derivados sintéticos foram menos ativos que seus precursores, sugerindo que a hidroxila livre em C-3 e a carboxila em C-28 são importantes para a atividade.

Chen et al., (2006) identificaram o ácido oleanólico e alguns derivados sintéticos (contendo grupos 3-oxo, 3-O-acila, 28-ésteres e 28-amino) como uma nova classe de agentes hipoglicemiantes que atuam através da inibição da glicogênio fosforilase, enzima responsável pela quebra de glicogênio e conseqüente produção de glicose. A inibição α -glicosidase, presente no intestino delgado e responsável pela hidrólise da glicose, também foi descrita por Ali et al., (2002) para o ácido oleanólico e alguns derivados sintéticos. Todos os derivados foram ativos, sugerindo promissora atividade hipoglicemiante, sendo que o ácido oleanólico (**42**) e as lactonas **59** e **60** apresentaram atividade (**42**, $CI_{50} = 11,16 \mu M$; **59**: $CI_{50} = 7,97 \mu M$; **60**: $CI_{50} = 21,63 \mu M$) superior ao controle positivo desoxinojirimicina ($CI_{50} = 353 \mu M$).



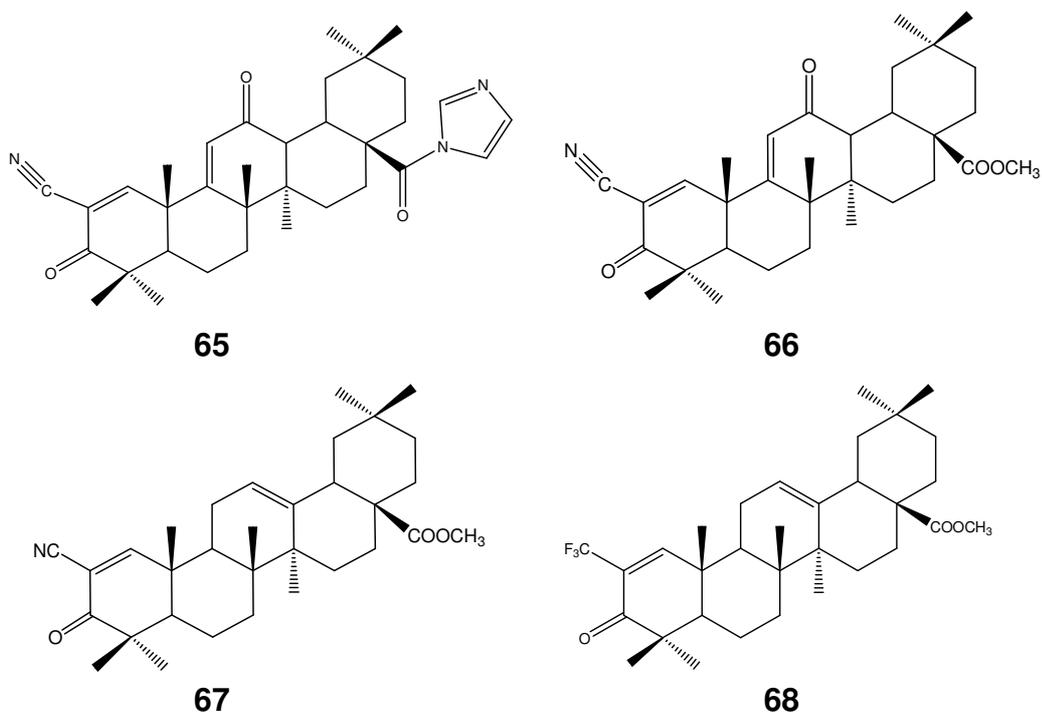
Zhang et al. (2006) demonstraram que o ácido ursólico e seu derivado sintético UA0713 (**61**) são promissores para o tratamento de diabetes tipo II e obesidade através da inibição competitiva da enzima proteína tirosina fosfatase 1B (PTP1B), associada à resistência à insulina. O derivado UA0713 ($CI_{50} = 570$ nM) foi dez vezes mais potente que o ácido ursólico ($CI_{50} = 3,08$ μ M) e eqüipotente a uma molécula monofosfatada ($CI_{50} = 614$ nM) cujos testes pré-clínicos já se encontram na fase II.

Ursanos e oleananos com modificações nos anéis A e C apresentam elevada atividade inibitória da produção de óxido nítrico, induzido por interferon- γ , sugerindo o potencial destes compostos como agentes quimiopreventivos de câncer, visto que a produção excessiva de NO está relacionada ao processo de carcinogênese (HONDA et al., 2000a). Derivados ursan-1-en-3-ona e olean-1-en-3-ona (**62**) com a presença de grupos nitrila em C-2 (**63**) ($CI_{50} = 0,01 - 0,1$ μ M) foram de 10 a 100 vezes mais potentes que os precursores ácido ursólico e oleanólico. Os derivados ursan-9(11)-en-12-ona, 12-en-11-ona e 13(18)-en-11-ona e olean-9(11)-en-12-ona, 12-en-11-ona e 13(18)-en-11-ona foram de 2 a 10 vezes mais potentes que os precursores. Quando foram realizadas modificações nos anéis A e C, obteve-se o derivado **64** (2-ciano-3,12-dioxoolean-1,9(11)-en-12-ona; CDDO), extremamente potente ($CI_{50} = 0,1$ nM) (HONDA et al., 2000b).



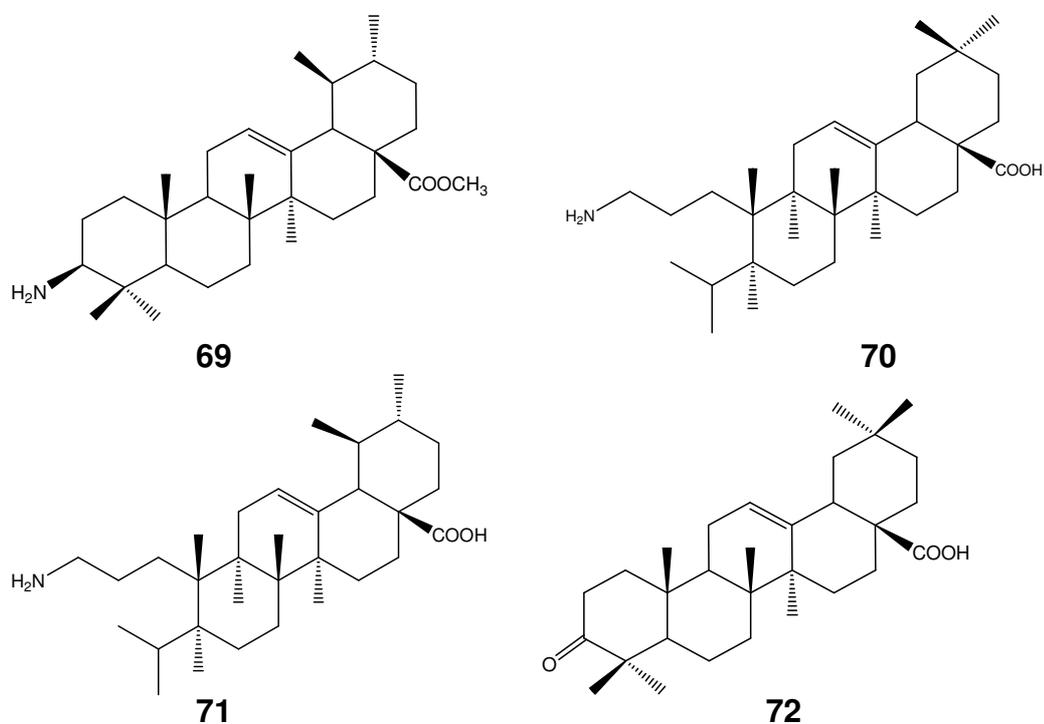
Place et al. (2003) observaram que o derivado 1[2-ciano-3,12-dioxolean-1,9(11)-dien-28-oi]imidazol (**65**) ($Cl_{50} = 10$ nM) possui maior atividade citotóxica *in vitro* quando comparado com o derivado estruturalmente relacionado **64** ($Cl_{50} = 200$ nM), frente às linhagens de células tumorais THP-1, U960 e HL-60. Estes resultados também se reproduziram *in vivo*, sendo **65** mais potente, inibindo 75% do crescimento de tumores de melanoma B16 na dose de 100 μ g por dia. Segundo os autores, este é um derivado altamente potente e bastante promissor para o tratamento do câncer e como agente quimiopreventivo.

Tendo como base estudos prévios que relataram a potente atividade citotóxica do derivado do ácido oleanólico (**64**), associada à presença do grupo eletronegativo ciano na posição 2, Chadalapaka et al. (2008) sintetizaram análogos esterificados na posição 28 e avaliaram a atividade citotóxica *in vitro* frente às linhagens de células tumorais de bexiga (253JB-V e KU7) e pâncreas (Panc 1 e Panc 28). O derivado **66** foi empregado como controle positivo, com valores de Cl_{50} variando entre 5,9 e 7,3 μ M para as distintas linhagens celulares. Dentre os derivados ensaiados, os compostos **67** e **68** se mostraram promissores, com valores de Cl_{50} variando entre 0,17 e 1,13 μ M.



A atividade citotóxica *in vitro* do ácido ursólico e derivados sintéticos com modificações nas posições C-3, C-28 e C-11 foi relatada por Ma et al. (2005) para linhagens de células tumorais HL-60, BGC, Bel-7402 e Hela. O derivado 3 β -amino **69** (Cl_{50} = 2,5 μ g/mL) foi cerca de trinta e seis vezes mais potente que o precursor ácido ursólico (Cl_{50} = 72,0 μ g/mL) frente à linhagem HL-60 e cerca de vinte vezes mais potente frente às demais linhagens celulares.

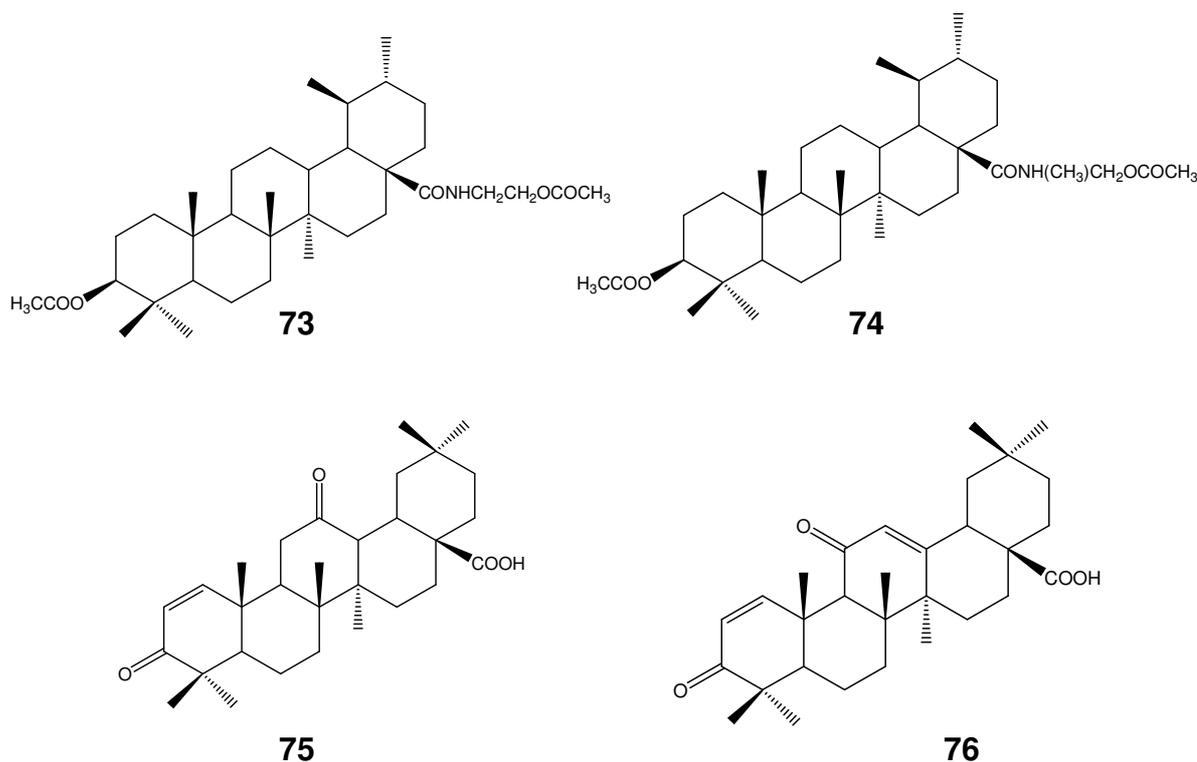
A atividade citotóxica dos ácidos ursólico, oleanólico e derivados foi avaliada *in vitro* frente a linhagens de células tumorais de próstata NRP.152 e NRP.154, sendo TGF- β empregado como controle positivo. Os derivados **70** e **71** foram os mais ativos (**70**, Cl_{50} = 0,7 μ M; **71**, Cl_{50} = 0,3 μ M; TGF- β , Cl_{50} = 0,000014 μ M) (FINLAY et al., 1997). Assefa et al. (1999) avaliaram a citotoxicidade do ácido oleanólico e derivados frente cultura de células tumorais humanas de melanoma SK-MEL. Entre os derivados ensaiados, a cetona **72** (Cl_{50} = 54 μ M) se mostrou o mais promissor, sendo 3,6 vezes mais potente que o precursor ácido oleanólico (Cl_{50} = 112 μ M).



Derivados do ácido ursólico (**31**) contendo grupamentos amina, amida e éster nas posições C-3 e C-28 foram avaliados *in vitro* frente a linhagens de células tumorais humanas gástricas BGC-823 e de ovário SKOV3. Paclitaxol foi empregado

como controle positivo (BGC-823 Cl_{50} = 0,018 μ M e SKOV3 Cl_{50} = 0,016 μ M). Os derivados **73** (BGC-823 Cl_{50} > 10 μ M e SKOV3 Cl_{50} = 6,09 μ M) e **74** (BGC-823 Cl_{50} = 8,53 μ M e SKOV3 Cl_{50} = 2,24 μ M) foram os mais ativos para as linhagens ensaiadas (MENG et al., 2009).

Os ceto-derivados (**75** e **76**) do ácido oleanólico foram selecionados dentre 80 derivados dos ácidos ursólico e oleanólico como os mais promissores com potencial atividades quimiopreventiva do câncer e antiinflamatória. Ambos os derivados foram capazes de suprimir *in vitro* a formação das enzimas NO sintase (**75**, Cl_{50} = 3,9 μ M; **76**, Cl_{50} = 4,2 μ M) e COX-2, sendo a formação desta suprimida pelo derivado **76** na concentração de 10 μ M. Estes resultados indicam a potencialidade de emprego destes derivados como agentes quimiopreventivos do câncer ou outras doenças crônicas com um componente inflamatório (câncer de cólon, esclerose múltipla, Parkinson e Alzheimer), nas quais se observa produção exacerbada de NO ou prostaglandinas (SUH et al., 1998).



Alguns estudos relatam a baixa toxicidade dos ácidos ursólico e oleanólico. Singh et al. (1992) administraram 1g/kg de ácido oleanólico em ratos e camundongos, via subcutânea, durante 5 dias, sem nenhuma mortalidade. A administração, por via oral de 180 mg/Kg de peso corporal, durante 10 dias não

provocou nenhuma alteração no cérebro, coração, pulmão, fígado, rins, tireóide, estômago ou intestino. O emprego clínico também já foi avaliado e nos setenta casos nos quais se empregou o ácido oleanólico na dose de 60 – 90 mg/dia, durante 53 dias, para o tratamento de hepatites, demonstrou sua eficiência terapêutica e ausência de efeitos colaterais (XU; WAN, 1980). O uso crônico (mais de 3 meses) também foi avaliado em 188 casos de hepatites crônica, indicando a segurança do triterpeno (XU, 1985 *apud* LIU, 1995).

Tendo em vista as diversas atividades biológicas já relatadas para os ácidos ursólico e oleanólico, bem como para seus derivados sintéticos, além da baixa toxicidade dessas substâncias, é grande o interesse na síntese de derivados dos ácidos ursólico e oleanólico, visando obter substâncias bioativas que poderão viabilizar estudos futuros de relação estrutura química-atividade biológica, constituindo o ponto de partida para o desenvolvimento de novos fármacos.

Segundo dados da literatura, apresentados nessa breve revisão, as posições 3, 11 e 28, e os anéis A, C e D do esqueleto triterpênico são alvos potenciais para transformações químicas, visando o incremento das atividades quimiopreventiva de câncer e citotóxica. Assim, tendo como objetivo a obtenção de substâncias biologicamente ativas, no presente trabalho foram sintetizados derivados do ácido ursólico e do ácido oleanólico, com modificações nas posições C-3, C-11 e C-28 do esqueleto triterpênico.

8 OBJETIVOS

8.1 A proposta do trabalho

O isolamento dos ácidos ursólico e oleanólico em grandes quantidades (Parte 1, item 4.6.1) possibilitou sua utilização como substrato para a obtenção de derivados por transformações químicas. Esta parte do trabalho foi realizada na Universidade de Salamanca (USAL), Espanha, durante o período de estágio de doutorado sanduíche. As substâncias obtidas foram avaliadas em ensaios *in vitro* de atividade antitumoral e antiplasmódica, tendo em vista relatos na literatura dessas atividades biológicas para os ácidos ursólico, oleanólico e derivados.

Os principais objetivos desta parte do trabalho foram:

- Obter derivados dos ácidos ursólico e oleanólico através de transformações químicas nas posições C-3, C-11 e C-28 do esqueleto triterpênico.
- Caracterizar os produtos obtidos por métodos espectrométricos usuais (infravermelho, espectrometria de massas, ressonância magnética nuclear de hidrogênio e de carbono-13).
- Avaliar *in vitro* a potencial atividade antitumoral dos derivados frente a linhagens celulares tumorais humanas.
- Avaliar *in vitro* a potencial atividade antiplasmódica dos derivados frente a culturas de *Plasmodium falciparum*.

As Figuras 36, 37 e 38 representam o esquema de síntese proposto no presente trabalho para a obtenção dos derivados.

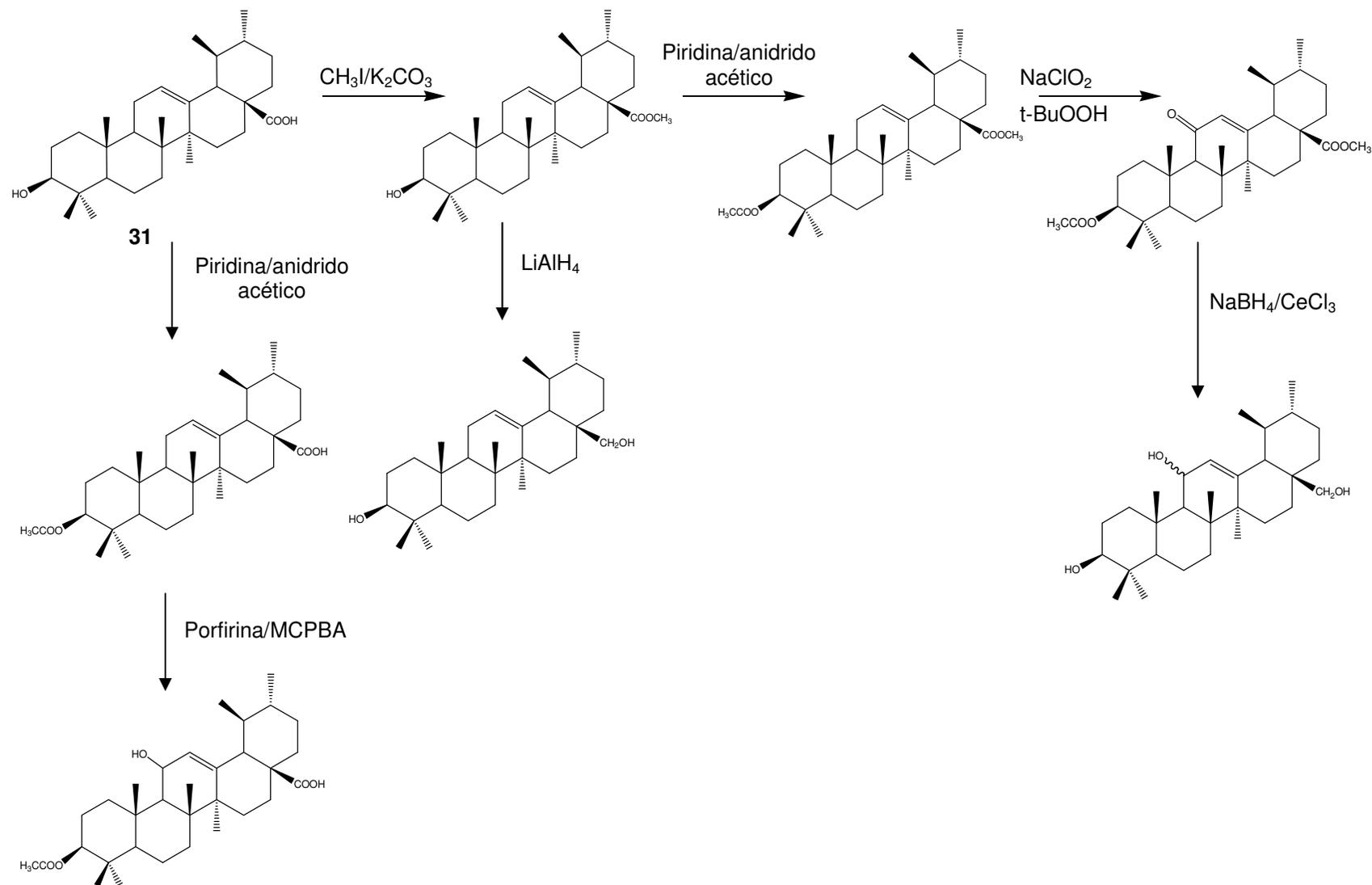


Figura 36 - Esquema de síntese proposto para obtenção de derivados do ácido ursólico.

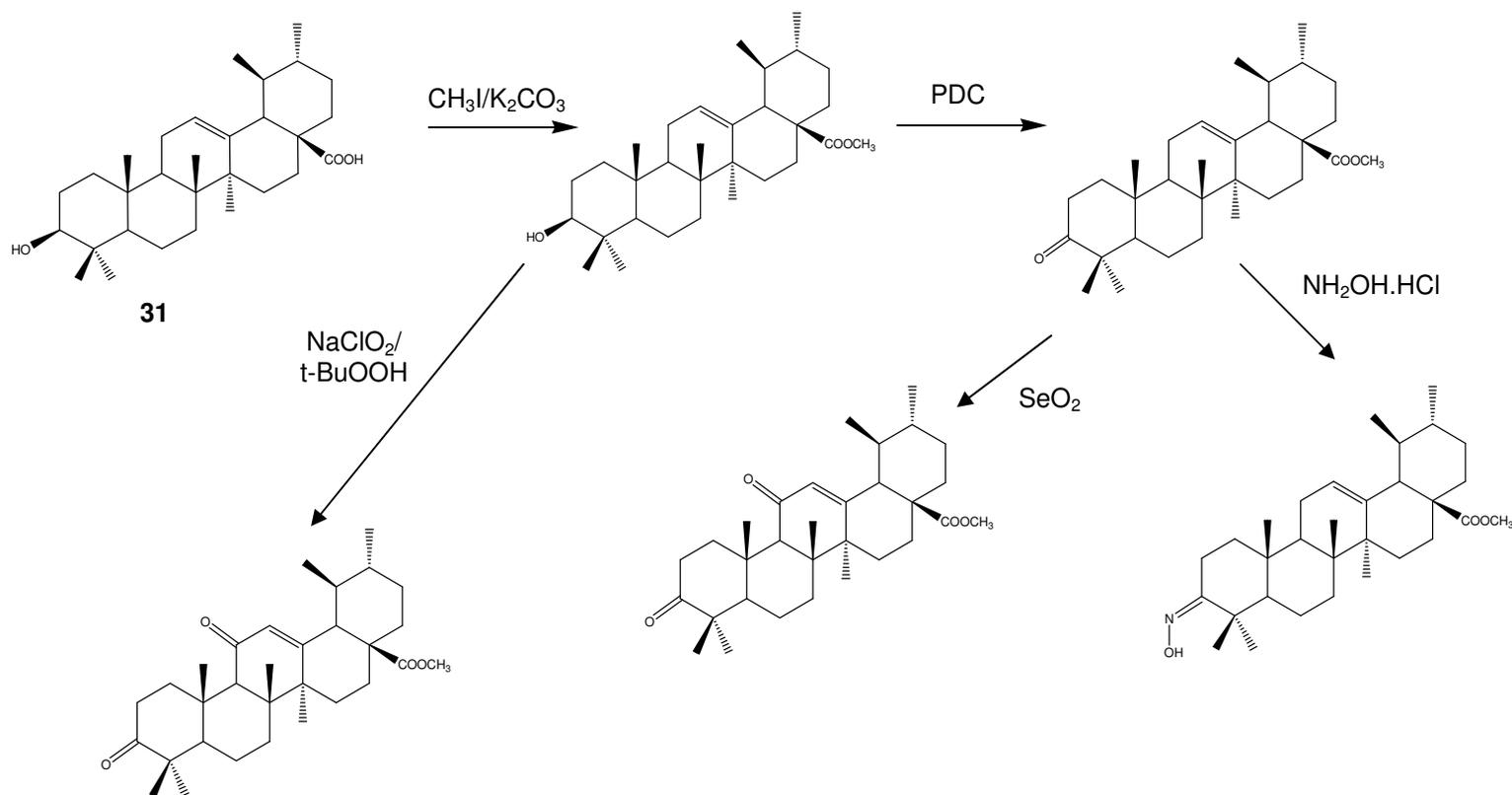


Figura 37 - Esquema de síntese proposto para obtenção de derivados do ácido ursólico.

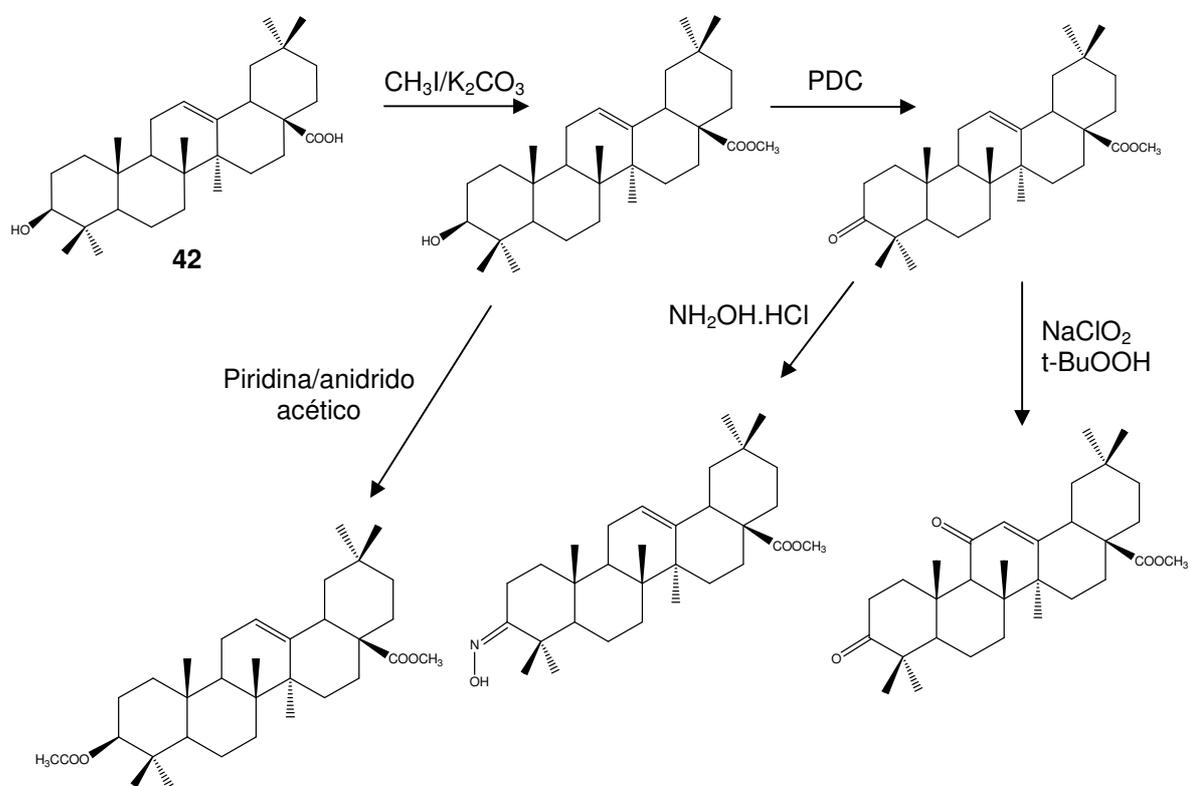


Figura 38 - Esquema de síntese proposto para obtenção de derivados do ácido oleanólico.

9 MATERIAIS E MÉTODOS

9.1 Procedimentos gerais

Os valores de poder rotatório específico $[\alpha]_D$, foram medidos em polarímetro Perkin-Elmer 241 (Laboratório de Química Farmacêutica, USAL, ES), a 20°C.

Os espectros de ressonância magnética nuclear foram obtidos em espectrômetros WP 200 SY e Avance DRX 400, ambos da Bruker (Laboratórios de Ressonância Magnética Nuclear, Departamento de Química, USAL, ES; Laboratório de Ressonância Magnética Nuclear, Departamento de Química, UFMG). Foram empregados como padrão interno o tetrametilsilano ou o próprio solvente deuterado. Os valores de deslocamento químico foram descritos em ppm.

Os espectros no IV foram obtidos em aparelho Spectrum One, Perkin-Elmer (Laboratório de Química Farmacêutica, FAFAR, UFMG), acoplado ao acessório de refletância difusa.

Os espectros de massa da alta resolução foram obtidos em espectrômetro de quadrupolo-tempo modelo QSTAR XL (Applied Biosystems), empregando eletrospray como modo de ionização a 5500 V e um analisador de tempo de voo ESI-Q-TOF (Laboratório de Espectroscopia de Massas, Departamento de Química, USAL, ES).

A evolução das reações foi acompanhada por cromatografia em camada delgada de sílica, empregando-se lâminas de poliéster Polychrom Si F₂₅₄ de 0,25 mm de espessura, com cobertura de sílica gel com indicador fluorescente UV₂₅₄ nm.

As purificações por cromatografia em coluna de sílica (CCS) foram realizadas com sílica gel 60 (0,063-0,200 mm / 70-230 mesh, Merck) e os eluentes empregados estão descritos em cada procedimento. Como reveladores foram empregados solução etanólica de ácido fosfomolibdico 20% e, eventualmente solução etanólica de ácido sulfúrico 15%, ambos com aquecimento.

9.2 Transformações químicas do ácido ursólico

9.2.1 Síntese do 3 β -hidróxi-urs-12-en-28-oato de metila (77)

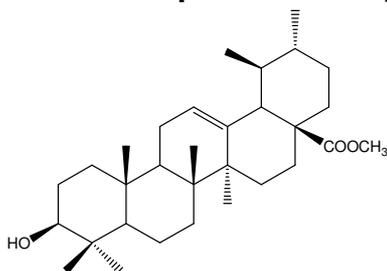
Método I

A uma suspensão de 100 mg (0,22 mmol) de ácido ursólico (**31**) em acetona anidra (5,0 mL) adicionaram-se 122 mg de K₂CO₃ (0,88 mmol) e 0,5 mmol de CH₃I. A mistura reacional foi mantida sob agitação, em atmosfera inerte e temperatura ambiente por 4 horas, sendo monitorada por CCD de sílica gel (*n*-hexano:EtOAc 7:3). Adicionou-se acetona ao produto de reação, filtrou-se, secou-se com Na₂SO₄ anidro e eliminou-se o solvente em evaporador rotatório. Foram obtidos 92 mg de **77** com um rendimento de 89%. A fim de obter quantidades adicionais de **77**, o procedimento foi repetido 21 vezes com diferentes massas de **31**, obtendo-se rendimentos na faixa de 75 a 90%.

Método II

A uma suspensão de 200 mg (0,44 mmol) de ácido ursólico (**31**) em dimetilformamida anidra (4,0 mL) adicionaram-se 244 mg de K₂CO₃ (1,76 mmol) e 1,0 mmol de CH₃I. A mistura reacional foi mantida sob agitação, em atmosfera inerte e temperatura ambiente por 4 horas, sob monitoramento por CCD de sílica gel (*n*-hexano:EtOAc 7:3). Adicionou-se água ao produto da reação, extraiu-se vigorosamente com EtOAc e lavou-se a fase orgânica com solução aquosa saturada de NaCl. A fase orgânica foi filtrada e seca em Na₂SO₄ anidro, sendo o solvente eliminado em rotavapor. Foram obtidos 179 mg de **77** com um rendimento de 87%. Este procedimento foi realizado 9 vezes com diferentes massas de **31** e rendimento entre 85 e 90%.

Dados físico-químicos do 3 β -hidróxi-urs-12-en-28-oato de metila (77)



Sólido cristalino branco

F.M.: C₃₁H₅₀O₃

M.M.: 470,74 g.mol⁻¹

HRMS calculado para $C_{31}H_{50}O_3 [M + Na]^+$: 493,3658, encontrado: 493,3610.

IV ($\bar{\nu}_{\max}$, cm^{-1}): 3525 (O-H); 2969 (C-H); 1718 (C=O); 1384 (C-O-H); 1230 (C-O).

$[\alpha]_D$ + 41,16 (*c* 1, MeOH)

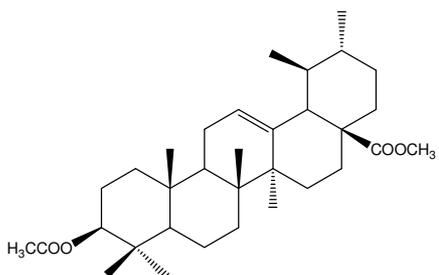
RMN de 1H (δ ; $CDCl_3$; 200 MHz): 5,25 (t, 1H; *J* 3,5 Hz, H-12); 3,61 (s, 1H, $COOCH_3$); 3,22 (m, 1H, H-3); 2,23 (d, 1H, *J* 12,0 Hz, H-18); 1,08 (s, 3H, C-27H₃); 0,99 (s, 3H, C-25H₃); 0,93 (d, 3H, *J* 6,3 Hz, C-30H₃); 0,92 (s, 3H, C-23H₃); 0,86 (d, 3H, *J* 6,3 Hz, C-29H₃); 0,78 (s, 3H, C-26H₃); 0,74 (s, 3H, C-24H₃).

RMN de ^{13}C (δ ; $CDCl_3$; 50 MHz): 178,09 (C-28); 138,18 (C-13); 125,61 (C-12); 79,04 (C-3); 55,26 (C-18); 52,91 (C-5); 51,51 ($COOCH_3$); 44,13 (C-17); 47,62 (C-9); 42,03 (C-14); 39,53 (C-8); 39,09 (C-19); 38,91 (C-20); 38,80 (C-4); 38,69 (C-1); 37,00 (C-10); 36,67 (C-22); 33,03 (C-7); 30,71 (C-21); 28,18 (C-23); 28,07 (C-15); 27,26 (C-2); 24,28 (C-16); 23,66 (C-27); 23,36 (C-11); 21,23 (C-30); 18,36 (C-6); 17,08 (C-26); 16,97 (C-29); 15,68 (C-25); 15,50 (C-24).

9.2.2 Síntese do 3 β -acetóxi-urs-12-en-28-oato de metila (78)

A um balão de fundo redondo (25 mL) adicionaram-se 252 mg de **77** (0,54 mmol), 1,0 ml de piridina e 1,0 ml de anidrido acético. A mistura reacional foi deixada em repouso, à temperatura ambiente e ao abrigo da luz por 24 horas. Adicionou-se gelo moído e manteve-se em agitação durante 10 minutos. Extraiu-se com EtOAc e lavou-se com HCl 2N. Secou-se sobre Na_2SO_4 anidro e eliminou-se o solvente em rotavapor rotatório. O produto reacional foi monitorado por CCD de sílica gel (*n*-hexano:EtOAc 7:3). Obtiveram-se 236,1 mg de **78** (86%). Esta reação foi repetida 17 vezes com o rendimento variando entre 84 e 89%.

Dados físico-químicos do 3 β -acetóxi-urs-12-en-28-oato de metila (78)



Sólido cristalino branco

F.M.: $C_{33}H_{52}O_4$

M.M.: 512,77 $g \cdot mol^{-1}$

HRMS calculado para C₃₃H₅₂O₄ [M + Na]⁺: 535,3763; encontrado: 535,3686.

IV ($\bar{\nu}_{\max}$, cm⁻¹): 2978 (C-H); 1726 (C=O); 1706 (C=O); 1229 (C-O).

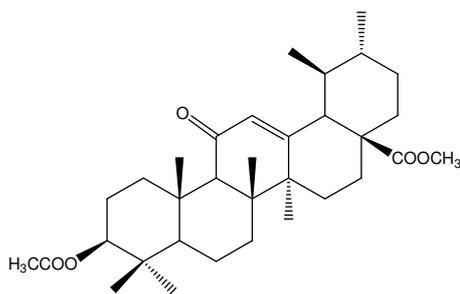
[α]_D +57,2 (*c* 1, CHCl₃)

RMN de ¹H (δ; CDCl₃; 200 MHz): 5,20 (t, 1H, *J* 3,6 Hz, H-12); 4,46 (m, 1H, H-3); 3,57 (s, 3H, COOCH₃); 2,17 (d, 1H, *J* 11 Hz, H-18); 2,02 (s, 3H, OCOCH₃); 1,01 (s, 3H, C-27H₃); 0,88 (s, 3H, C-25H₃); 0,81 (s, 3H, C-23H₃); 0,79 (s, 3H, C-26H₃); 0,68 (s, 3H, C-24H₃).

RMN de ¹³C (δ; CDCl₃; 50 MHz): 177,99 (C-28); 170,90 (OCOCH₃); 138,15 (C-13); 125,43 (C-12); 55,27 (C-5); 52,85 (C-18); 51,41 (COOCH₃); 47,48 (C-9); 44,04 (C-17); 41,97 (C-14); 39,47 (C-8); 39,03 (C-19); 38,88 (C-20); 38,26 (C-1); 37,67 (C-4); 36,86 (C-10); 36,64 (C-22); 32,89 (C-7); 30,65 (C-21); 28,00 (C-15); 28,00 (C-23); 24,18 (C-16); 23,56 (C-27); 23,30 (C-2); 21,20 (C-30); 21,20 (OCOCH₃); 18,19 (C-6); 17,09 (C-29); 16,90 (C-26); 16,75 (C-25); 15,50 (C-24).

9.2.3 Síntese do 3β-acetóxi-11-oxo-urs-12-en-28-oato de metila (79) e do 3β-acetóxi-urs-9,12-dien-28-oato de metila (80)

A um balão de fundo redondo (25 mL) contendo 288 mg de **78** (0,56 mmol) dissolvido em 10 mL de EtOAc adicionaram-se 0,35 mL de *t*-BuOOH 6M em *n*-decano (2,10 mmol) e 162,7 mg de NaClO₂ (1,80 mmol). A mistura reacional foi mantida sob agitação magnética e refluxo, sendo monitorada por CCD de sílica gel (*n*-hexano:EtOAc 7:3). Após 20 horas de reação, adicionou-se solução aquosa de sulfito de sódio a 10% e extraiu-se com EtOAc. Lavou-se a fase orgânica sucessivamente com solução aquosa saturada de NaHCO₃ e água; secou-se sobre Na₂SO₄ anidro e eliminou-se o solvente em rotavapor. O produto bruto da reação (290 mg) foi submetido à cromatografia em coluna de sílica gel (dimensões da coluna empacotada: 17 × 250 mm) empregando-se *n*-hexano:EtOAc (9:1) como eluente. Recolheram-se 20 frações de aproximadamente 5 mL, que foram reunidas de acordo com os perfis obtidos por CCD de sílica gel e dados de RMN de ¹H. O dieno **80** foi obtido nas frações 5-6 (26,6 mg, 9%) e a cetona **79** nas frações 10-15 (196,84 mg, 67%).

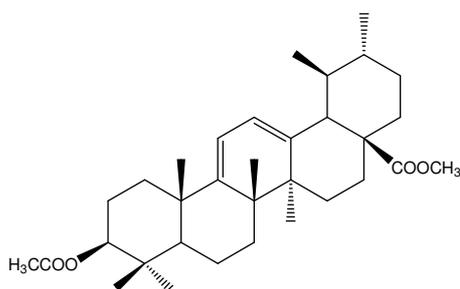
Dados físico-químicos do 3 β -acetóxi-11-oxo-urs-12-en-28-oato de metila (79)

Sólido cristalino branco

F.M.: C₃₃H₅₀O₅**M.M.:** 526,76 g.mol⁻¹**HRMS calculado para C₃₃H₅₀O₅ [M + Na]⁺:** 549,3556; encontrado: 549,3541.**IV ($\bar{\nu}_{\max}$, cm⁻¹):** 2971 (C-H); 1726 (C=O); 1654 (C=O); 1620 (C=O); 1233 (C-O).**[α]_D** +45,15 (c 2, CHCl₃).

RMN de ¹H (δ ; CDCl₃; 200 MHz): 5,60 (s, 1H, H-12); 4,51 (dd, 1H, J 10 e 5,3; H-3); 3,61 (s, 3H, COOCH₃); 2,41 (d, 1H, J 10,8, H-18); 2,05 (s, 3H, OCOCH₃); 1,29 (s, 3H, C-25H₃); 1,14 (s, 3H, C-26H₃); 0,98 (s, 3H, C-27H₃); 0,91 (s, 3H, C-29H₃); 0,89 (s, 3H, C-30H₃); 0,87 (s, 3H, C-23H₃); 0,86 (s, 3H, C-24H₃).

RMN de ¹³C (δ ; CDCl₃; 50 MHz): 199,75 (C-11); 177,22 (C-28); 171,01 (OCOCH₃); 162,96 (C-13); 130,65 (C-12); 80,60 (C-3); 61,37 (C-9); 55,05 (C-5); 52,74 (C-18); 51,89 (COOCH₃); 47,67 (C-14); 44,69 (C-14); 43,74 (C-8); 38,81 (C-1); 38,59 (C-19); 38,59 (C-20); 38,04 (C-4); 37,01 (C-10); 35,98 (C-22); 32,97 (C-21); 28,37 (C-15); 28,11 (C-23); 23,93 (C-16); 23,56 (C-2); 21,35 (C-27); 21,02 (C-30); 18,85 (C-26); 17,34 (C-6); 17,16 (C-29); 16,76 (C-25); 16,28 (C-24).

Dados físico-químicos do 3 β -acetóxi-urs-9,12-dien-28-oato de metila (80)

Sólido cristalino branco

F.M.: C₃₃H₅₁O₄**M.M.:** 511,77 g.mol⁻¹**HRMS calculado para C₃₃H₅₁O₄ [M + Na]⁺:** 534,6885; encontrado: 533,3603.**IV ($\bar{\nu}_{\max}$, cm⁻¹):** 2924 (C-H); 1732 (C=O); 1723 (C=O); 1026 (C-H).**[α]_D** +158,60 (c 0,5, CHCl₃).

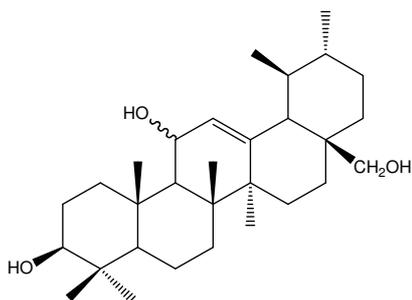
RMN de ^1H (δ ; CDCl_3 ; 200 MHz): 5,58 (d, 1H, J 6,0 Hz, H-11); 5,51 (d, 1H, J 6,0 Hz, H-12); 4,51 (dd, 1H, J 10,4 e 5,7 Hz, H-3); 3,62 (s, 3H, COOCH_3); 2,35 (d, 1H, J 11,2 Hz, H-18); 2,04 (s, 3H, OCOCH_3); 0,97 (s, 3H, C-27H₃); 0,93 (d, 3H, J 5,4 Hz, C-30H₃); 0,92 (s, 3H, C-25H₃); 0,90 (s, 3H, C-23H₃); 0,88 (s, 3H, C-26H₃); 0,86 (s, 3H, C-24H₃).

RMN de ^{13}C (δ ; CDCl_3 ; 50 MHz): 178,10 (C-28); 171,12 (OCOCH_3); 154,54 (C-9); 139,44 (C-13); 123,30 (C-12); 115,55 (C-11); 80,63 (C-3); 51,67 (COOCH_3); 51,23 (C-18); 51,23 (C-5); 47,52 (C-17); 42,67 (C-8); 40,68 (C-14); 38,73 (C-10); 38,62 (C-19); 38,33 (C-20); 37,89 (C-4); 36,90 (C-1); 36,49 (C-22); 31,97 (C-7); 30,57 (C-21); 28,15 (C-23); 27,08 (C-15); 25,21 (C-25); 24,62 (C-16); 21,35 (C-26); 21,35 (OCOCH_3); 20,94 (C-27); 20,94 (C-30); 18,15 (C-6); 17,01 (C-29); 16,79 (C-24).

9.2.4 Síntese do 3 β ,11,28-triidróxi-urs-12-eno (**81**)

A um balão de duas bocas (50 mL) contendo 345 mg de LiAlH_4 (9,08 mmol) adicionaram-se 2,0 mL de éter seco. Manteve-se a suspensão sob agitação magnética e então adicionaram-se 230 mg de **79** (0,45 mmol), solubilizados em 8,0 mL de éter seco. A mistura reacional foi mantida à temperatura ambiente e sob agitação magnética por 20 horas. O excesso de LiAlH_4 foi consumido com o gotejamento de éter úmido e, em seguida com o gotejamento de água. Extraiu-se com solução saturada de NaCl , secou-se a fase orgânica sobre Na_2SO_4 anidro e eliminou-se o solvente em evaporador rotatório. Obtiveram-se 179 mg de **81** (87%). Este procedimento foi realizado 19 vezes, obtendo-se rendimentos entre 83 e 87%. As reações foram monitoradas por CCD de sílica gel, empregando-se como eluente *n*-hexano:EtOAc (1:1).

O produto obtido da oitava repetição da reação (134 mg) foi submetido à cromatografia em coluna de sílica gel (dimensões da coluna empacotada: 25 × 244 mm), empregando-se como eluentes misturas de *n*-hexano:EtOAc (7:3 e 1:1). Coletaram-se 18 frações de aproximadamente 5 mL. As frações 3-9 foram reunidas de acordo com as semelhanças nos perfis por CCD de sílica gel (*n*-hexano:EtOAc 7:3) e dados de RMN de ^1H , fornecendo 102,6 mg do éter cíclico **84** (80%).

Dados físico-químicos do 3 β ,11,28-trihidroxi-urs-12-eno (81)

Sólido amorfo branco

F.M.: C₃₀H₅₀O₃**M.M.:** 458,73 g.mol⁻¹**HRMS calculado para C₃₀H₅₀O₃ [M + Na]⁺:** 481,3657; encontrado: 481,3651.**IV ($\bar{\nu}$ max, cm⁻¹):** 3676 (O-H); 2921 (C-H); 1045 (C-O).

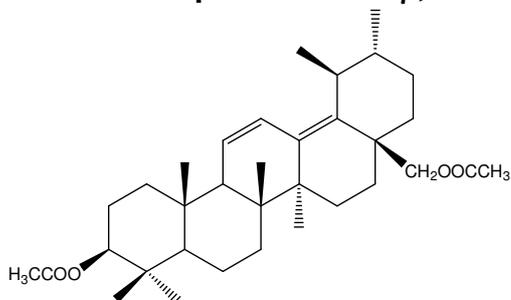
RMN de ¹H (δ; CDCl₃; 200 MHz): 5,22 (d, 1H, *J* 4,2 Hz, H-12); 4,35 (dl, 1H, *J* 4,2, H-11); 3,33 (d, 1H, *J* 10 Hz, H-28a); 3,19 (m, 1H, H-3); 3,17 (d, 1H, *J* 10 Hz, H-28b); 2,00 (m, 1H, H-18); 1,37 (s, 3H, C-27H₃); 1,22 (s, 3H, C-25H₃); 1,01 (s, 3H, C-23H₃); 0,95 (s, 3H, C-30H₃); 0,93 (s, 3H, C-29H₃); 0,78 (s, 3H, C-26H₃); 0,76 (s, 3H, C-24H₃).

9.2.5 Síntese do 3 β ,28-diacetóxi-urs-11,13(18)-dieno (85)

O resíduo contendo **102** (321 mg) foi submetido à cromatografia em coluna de sílica gel (dimensões da coluna empacotada: 25 × 244 mm), empregando-se como eluentes misturas de *n*-hexano:EtOAc (8:2 e 1:1). Coletaram-se 20 frações de aproximadamente 5 mL. As frações 4-10 (81 mg) foram reunidas de acordo com as semelhanças nos perfis por CCD de sílica gel (*n*-hexano:EtOAc 7:3) e dados de RMN de ¹H. As frações 12-18 (202 mg), cujo perfil cromatográfico indicou a presença de **102**, também foram reunidas. As frações 4-10, foram transferidas para um balão de fundo redondo (25 mL), adicionaram-se, 0,5 mL de piridina e 0,5 mL de anidrido acético. A mistura reacional foi deixada em repouso, à temperatura ambiente e ao abrigo da luz, por 24 horas. Adicionou-se gelo moído e manteve-se sob agitação durante 10 minutos. Extraiu-se com EtOAc, lavou-se a fase orgânica com HCl 2N, sendo esta seca sobre Na₂SO₄ anidro e o solvente eliminado em rotavapor. Obtiveram-se 68,2 mg de produto, sendo este submetida à cromatografia em coluna de sílica gel impregnada com 20% de AgNO₃ (dimensões da coluna empacotada: 20 × 220 mm), empregando-se como eluente *n*-hexano:EtOAc (95:5). Recolheram-se 8 frações de aproximadamente 5 mL, as quais foram reunidas de

acordo com os perfis obtidos por CCD de sílica gel. No grupo de frações reunidas 3-6 (54,7 mg) obteve-se o dieno **85** (17%).

Dados físico-químicos do 3 β ,28-diacetóxi-urs-11,13(18)-dieneo (**85**)



Sólido cristalino branco

F.M.: C₃₃H₅₀O₄

M.M.: 510,76 g.mol⁻¹

IV ($\bar{\nu}_{\max}$, cm⁻¹): 2940 (C-H); 1728 (C=O); 1237 (C-O).

[α]_D -25,00 (c 1, CHCl₃).

RMN de ¹H (δ ; CDCl₃; 200 MHz): 6,41 (dd, 1H, *J* 3,0 e 11,0 Hz, H-11); 5,60 (d, 1H, *J* 11,0 Hz, H-12); 4,51 (dd, 1H, *J* 6,2 e 10,0, H-3); 4,28 (d, 1H, *J* 11,2 Hz, H-28a); 3,87 (d, 1H, *J* 11,2 Hz, H-28b); 2,06 (s, 3H, OCOCH₃); 2,05 (s, 3H, OCOCH₃); 1,02 (s, 3H, C-27H₃); 0,94 (s, 3H, C-25H₃); 0,91 (d, 3H, *J* 6,8 Hz; C-29H₃); 0,89 (s, 3H, C-23H₃); 0,86 (s, 3H, C-26H₃); 0,85 (s, 3H, C-30H₃); 0,76 (s, 3H, C-24H₃).

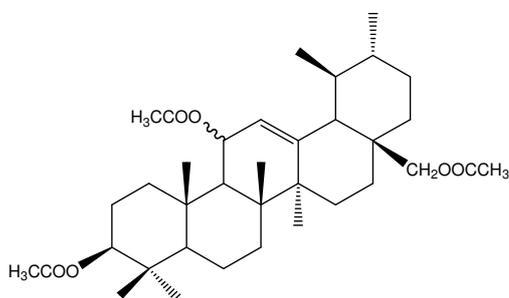
RMN de ¹³C (δ ; CDCl₃; 50 MHz): 171,19 (OCOCH₃); 171,08 (OCOCH₃); 138,37 (C-18); 136,86 (C-13); 126,98 (C-12); 125,25 (C-11); 80,89 (C-3); 66,26 (C-28); 54,98 (C-5); 54,21 (C-9); 42,74 (C-17); 40,68 (C-14); 38,44 (C-10); 37,89 (C-1); 37,89 (C-22); 37,78 (C-8); 36,56 (C-19); 36,49 (C-4); 34,62 (C-20); 32,12 (C-21); 29,95 (C-16); 29,95 (C-7); 27,82 (C-23); 24,36 (C-15); 23,44 (C-2); 22,67 (C-27); 21,39 (C-30); 21,35 (OCOCH₃); 21,35 (OCOCH₃); 20,65 (C-26); 18,15 (C-29); 16,72 (C-25); 16,20 (C-24).

9.2.6 Síntese do 3 β ,11,28 β -triacetoxi-urs-12-eno (**82**)

A um balão de fundo redondo (25 mL) adicionaram-se 76 mg de **81** (0,17mmol), 0,5 ml de piridina e 0,5 ml de anidrido acético. A mistura reacional foi deixada em repouso, à temperatura ambiente e ao abrigo da luz por 24 horas. A reação foi monitorado por CCD de sílica gel (*n*-hexano:EtOAc 8:2). Adicionou-se gelo moído e manteve-se por agitação durante 10 minutos. Extraíu-se com EtOAc e

lavou-se com HCl 2N, sendo a fase orgânica seca sobre Na₂SO₄ anidro e o solvente removido em rotavapor. Obtiveram-se 70 mg do produto bruto da reação, o qual foi cromatografado em coluna de sílica gel (dimensões da coluna empacotada: 18 × 170 mm), utilizando como eluente misturas de *n*-hexano:EtOAc (85:15 e 50:50). Recolheram-se 20 frações de aproximadamente 5 mL, cujos perfis foram comparados por CCD de sílica gel (*n*-hexano:EtOAc 8:2). As frações 8-12 foram reunidas, obtendo-se o triol acetilado **82** (35,6 mg), com rendimento de 37%.

Dados físico-químicos do 3β,11,28β-triacetoxi-urs-12-eno (**82**)



Sólido cristalino branco

F.M.: C₃₆H₅₆O₆

M.M.: 584,84g.mol⁻¹

HRMS calculado para C₃₆H₅₆O₆ [M + Na]⁺: 607,3975, encontrado: 607,3988.

IV ($\bar{\nu}_{\max}$, cm⁻¹): 2928 (C-H); 1728 (C=O); 1232 (C-O).

RMN de ¹H (δ; CDCl₃; 50 MHz): 5,43 (dd, 1H, *J* 8,6 e 3,6, H-11); 5,17 (d, 1H, *J* 3,6, H-12); 4,46 (dd, 1H, *J* 10 e 5,6, H-3); 3,97 (d, 1H, *J* 11,0 Hz, H-28a); 3,58 (d, 1H, *J* 11,0 Hz, H-28b); 2,04 (s, 3H, OCOCH₃); 2,03 (s, 3H, OCOCH₃); 1,94 (s, 3H, OCOCH₃); 1,19 (s, 3H, C-27H₃); 1,05 (s, 3H, C-25H₃); 1,03 (s, 3H, C-23H₃); 0,92 (s, 3H, C-30H₃); 0,86 (s, 3H, C-26H₃); 0,85 (s, 3H, C-24H₃); 0,80 (d, 3H, *J* 5,8 Hz, C-29H₃).

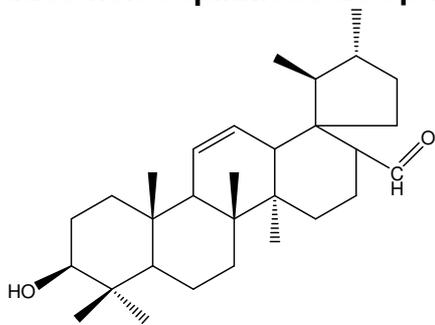
RMN de ¹³C (δ; CDCl₃; 50 MHz): 171,23 (OCOCH₃); 171,12 (OCOCH₃); 171,12 (OCOCH₃); 144,10 (C-13); 124,29 (C-12); 80,52 (C-3); 70,77 (C-11); 54,93 (C-9); 52,91 (C-18); 51,92 (C-5); 43,18 (C-8); 41,75 (C-14); 39,11 (C-19); 39,11 (C-20); 38,73 (C-1); 37,85 (C-10); 37,85 (C-17); 36,60 (C-4); 35,36 (C-22); 32,71 (C-7); 30,39 (C-21); 28,00 (C-23); 26,24 (C-15); 23,59 (C-2); 23,30 (C-16); 22,49 (C-27); 21,68 (C-30); 21,68 (OCOCH₃); 21,35 (OCOCH₃); 21,02 (OCOCH₃); 18,19 (C-6); 17,82 (C-26); 17,31 (C-29); 16,79 (C-25); 16,53 (C-24).

9.2.7 Síntese do 3 β -hidróxi-urs-12-en-28-al (**83**) e do 3 β -hidróxi-urs-11-en-28,13 β -eter (**84**)

Condição A

A uma solução de 458 mg de **81** (0,99 mmol) em 25 mL de CH₂Cl₂ (seco com CaCl₂ e filtrado sobre NaHCO₃), em atmosfera inerte, adicionaram-se 54 μ L de BF₃·Et₂O bidestilado (0,42 mmol). Manteve-se a mistura reacional sob agitação e temperatura ambiente durante 2 horas, com monitoramento por CCD de sílica gel (*n*-hexano:EtOAc 6:4). Após este período, realizou-se extração com EtOAc, sendo a fase orgânica lavada com solução saturada de NaCl, seca sobre Na₂SO₄ e o solvente removido em evaporador rotatório. O resíduo obtido (398 mg) foi submetido à cromatografia em coluna de sílica gel (dimensões da coluna empacotada: 20 \times 300 mm), utilizando como eluente misturas de *n*-hexano:EtOAc (8:2 e 1:1). Foram recolhidas 35 frações de aproximadamente 5 mL. As frações 9-10, eluídas com *n*-hexano:EtOAc (8:2) foram reunidas de acordo com os perfis obtidos por CCD de sílica gel e dados de RMN de ¹H, fornecendo 42,9 mg de **83** (11% de rendimento).

Dados físico-químicos do 3 β -hidróxi-urs-12-en-28-al (**83**)



Sólido cristalino branco

F.M.: C₃₀H₄₉O₂

M.M.: 441,72g.mol⁻¹

HRMS calculado para C₃₀H₄₄O₂ [M + Na]⁺: 464,3630; encontrado: 464,3633.

IV ($\bar{\nu}_{\max}$, cm⁻¹): 3413 (O-H); 2928 (C-H); 1716 (C=O).

[α]_D +23,40 (c 1,5, MeOH).

RMN de ¹H (δ ; CDCl₃; 200 MHz): 9,29 (s, 1H, H-28); 5,60 (d, 1H, *J* 10,4 Hz, H-12); 5,42 (d, 1H, *J* 10,4, H-11); 3,21 (dd, 1H, *J* 10,4 e 5,8 Hz, H-3); 2,0 (sl, 1H, H-9); 1,03 (d, 3H, *J* 6,3 Hz, C-30H₃); 0,99 (d, 3H, *J* 5,2 Hz, C-29H₃); 0,96 (s, 3H, C-23H₃); 0,91 (s, 3H, C-26H₃); 0,82 (s, 3H, C-25H₃); 0,75 (s, 3H, C-24H₃); 0,71 (s, 3H, C-27H₃).

RMN de ^{13}C (δ ; CDCl_3 ; 50 MHz): 206,35 (C-28); 133,81 (C-12); 123,54 (C-11); 78,93 (C-3); 54,61 (C-5); 52,61 (C-13); 52,18 (C-18); 47,29 (C-17); 44,28 (C-9); 41,04 (C-10); 39,87 (C-14); 39,46 (C-19); 39,35 (C-20); 38,83 (C-8); 37,99 (C-1); 36,38 (C-4); 32,19 (C-7); 30,34 (C-21); 30,11 (C-15); 27,74 (C-23); 27,02 (C-2); 25,72 (C-16); 20,43 (C-25); 18,56 (C-30); 18,26 (C-6); 17,01 (C-26); 16,38 (C-29); 16,06 (C-27); 14,97 (C-24).

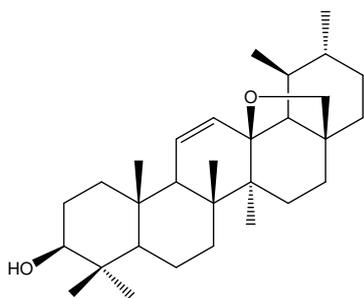
Condição B

A uma solução de 213 mg de **81** (0,44 mmol) em 10 mL de CH_2Cl_2 (seco em CaCl_2 e filtrado sobre NaHCO_3), em atmosfera inerte, adicionaram-se 24 μL de $\text{BF}_3\text{-Et}_2\text{O}$ bidestilado (0,19 mmol). Manteve-se a mistura reacional sob agitação à temperatura de -78°C , durante 2 horas, com monitoramento por CCD de sílica gel (*n*-hexano:EtOAc 7:3). Após este período, extraiu-se EtOAc, sendo a fase orgânica lavada com solução aquosa saturada de NaCl, seca sobre Na_2SO_4 e o solvente eliminado em evaporador rotatório. O resíduo obtido (172,4 mg) foi submetido à cromatografia em coluna de sílica gel (dimensões da coluna empacotada: 20 \times 210 mm), utilizando como eluente misturas de *n*-hexano:EtOAc (7:3 e 1:1), sendo recolhidas 20 frações de 5 mL. As frações 6-8, eluídas com *n*-hexano:EtOAc (7:3) foram reunidas de acordo com perfis obtidos por CCD de sílica gel e dados de RMN de ^1H , fornecendo 79,8 mg do éter cíclico **84** (39%).

Também foram avaliadas 5 outras reações com $\text{BF}_3\text{-Et}_2\text{O}$, variando-se a temperatura e o tempo de reação, conforme descrito na Tabela 36. Em todas as condições ensaiadas foram obtidos a mistura de aldeído, éter e dienos, em diferentes proporções.

Tabela 36 - Condições reacionais avaliadas no tratamento de 81 com $\text{BF}_3\text{-Et}_2\text{O}$ (0,19 mmol).

Reação	Temperatura ($^\circ\text{C}$)	Tempo (horas)
A	ambiente	2
B	-78	2
C	0	1
D	0	2
E	50	1
F	ambiente	20
G	ambiente	4

Dados físico-químicos do 3 β -hidróxi-urs-11-en-28,13 β -eter (84)

Sólido cristalino branco

F.M.: C₃₀H₄₄O₂**M.M.:** 436,68 g.mol⁻¹**HRMS calculado para C₃₀H₄₄ O₂ [M + H]⁺:** 436,3341; encontrado: 436,3716.**IV ($\bar{\nu}$ max, cm⁻¹):** 3306 (O-H); 2920 (C-H); 1022 (C-O-C); 989 (C-O-C).**[α]_D** +94,6 (c 1, CHCl₃).**RMN de ¹H (δ ; CDCl₃; 200 MHz):** 5,73 (d, 1H, *J* 10,3 Hz, H-12); 5,48 (dd, 1H, *J* 10,3 e 3,2 Hz, H-11); 3,66 (d, 1H, *J* 6,5 Hz, H-28a); 3,21 (d, 1H, *J* 6,5, H-28b); 3,20 (dd, 1H, *J* 11,3 e 4,9 Hz, H-3); 1,07 (s, 3H, C-26H₃); 1,03 (s, 3H, C-27H₃); 1,00 (s, 3H, C-23H₃); 0,98 (d, *J* 6,4 Hz, 3H, C-29H₃); 0,96 (d, *J* 5,7 Hz, 3H, C-30H₃); 0,89 (s, 3H, C-25H₃); 0,77 (s, 3H, C-24H₃).**RMN de ¹³C (δ ; CDCl₃; 50 MHz):** 132,99 (C-12); 129,62 (C-11); 84,97 (C-13); 79,01 (C-3); 77,06 (C-28); 61,37 (C-18); 54,83 (C-5); 53,03 (C-9); 44,32 (C-14); 42,45 (C-17); 41,71 (C-8); 40,83 (C-19); 38,95 (C-4); 38,29 (C-1); 37,78 (C-20); 36,42 (C-10); 35,06 (C-22); 31,46 (C-21); 31,46 (C-7); 27,82 (C-23); 27,12 (C-15); 25,43 (C-16); 25,43 (C-2); 19,51 (C-27); 19,29 (C-30); 18,26 (C-29); 17,78 (C-6); 17,78 (C-26); 17,23 (C-25); 14,99 (C-24).**9.2.8 Tentativas de epoxidação de 81**

A uma solução de 50 mg (0,11 mmol) de **81** em 4 mL de CH₂Cl₂, adicionaram-se 32,54 mg de MCPBA (0,19 mmol) e 155 mg de NaHCO₃ (1,85 mmol). A mistura reacional foi mantida sob agitação à temperatura ambiente, durante 2 horas. Após este período adicionou-se água à mistura reacional e extraiu-se com EtOAc, lavando-se a fase orgânica sucessivamente com solução aquosa saturada de Na₂S₂O₃, solução aquosa saturada de NaHCO₃ e solução aquosa saturada de NaCl. A fase orgânica foi então seca em Na₂SO₄ anidro e o solvente eliminado em evaporador rotatório, resultando na obtenção de 41 mg do produto de partida **81**.

A reação foi repetida utilizando-se as mesmas condições anteriormente descritas e 26 mg do produto **81**. Após elaboração da reação, foram obtidos 21 mg do produto de partida **81**.

9.2.9 Tentativas de isomerização de 57 com HI

A 50 mg de **81** (0,11 mmol) dissolvidos em 5,0 mL de benzeno, adicionaram-se 0,26 mL de HI 57% (1,97 mmol) (MARCOS et al., 2003). Manteve-se a mistura reacional em atmosfera inerte, sob agitação à temperatura ambiente, por 2 horas, sendo a evolução da reação monitorada por CCD de sílica gel (*n*-hexano:EtOAc 7:3). Após esse período, extraiu-se a mistura reacional com EtOAc, lavando-se a fase orgânica sucessivas vezes com soluções aquosas saturadas de NaHCO₃ e NaCl, até pH neutro. A fase orgânica foi seca sobre Na₂SO₄ anidro e o solvente evaporado em evaporador rotatório, resultando em 47 mg de um sólido.

A reação foi repetida variando-se as condições reacionais de temperatura, tempo de reação e concentração de reagentes, conforme descrito na Tabela 37.

Tabela 37 - Condições reacionais avaliadas no tratamento de 81 (0,11 mmol) com HI 57%.

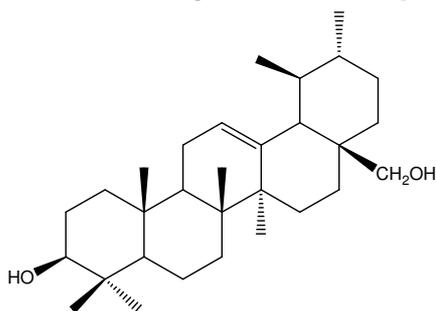
Reação	HI 57% (mmol/mL)	Temperatura (°C)	Tempo (min.)
A	1,90/0,26	ambiente	120
B	1,90/0,26	100	30
C	1,90/0,26	100	15
D	1,90/0,26	100	10
E	1,90/0,26	50	10
F	0,36/0,05	50	30
G	0,36/0,05	50	60
H	0,36/0,05	100	30

Realizaram-se três repetições da reação na condição E. O sólido obtido (125 mg) foi submetido à cromatografia em coluna de sílica gel (dimensões da coluna empacotada: 20 × 310 mm), empregando-se como eluente *n*-hexano:EtOAc (8:25). Foram recolhidas 30 frações de aproximadamente 5 mL, que foram reunidas de acordo com os perfis obtidos por CCD de sílica gel (*n*-hexano:EtOAc 7:3) e dados de RMN de ¹H. As frações reunidas 17-23 forneceram 58,7 mg de **83** (47%).

9.2.10 Síntese do 3 β ,28-diidroxi-urs-12-eno (86)

A um balão de duas bocas (50 mL) adicionaram-se 90 mg de LiAlH₄ (2,37 mmol) e 1,0 mL de éter etílico seco. Manteve-se a suspensão sob agitação magnética e então adicionaram-se 60 mg de **77** (0,13 mmol) solubilizados em 4,0 mL de éter etílico seco. A mistura reacional foi mantida à temperatura ambiente, sob agitação, por 20 horas. Ao término deste período, o excesso de LiAlH₄ foi consumido com o gotejamento de éter úmido e, em seguida com o gotejamento de água. Extraíu-se a mistura reacional com solução saturada de NaCl; a fase orgânica foi seca em Na₂SO₄ anidro e o solvente eliminado em evaporador rotatório. A evolução da reação foi monitorada por CCD de sílica gel, empregando-se como eluente *n*-hexano:EtOAc (7:3). Obtiveram-se 50 mg de **86** (89%). A reação foi realizada outra vez, nas mesmas condições, obtendo-se o rendimento de 87%.

Dados físico-químicos do 3 β ,28-diidroxi-urs-12-eno (86)



Sólido amorfo branco

F.M.: C₃₀H₅₀O₂

M.M.: 442,3 g.mol⁻¹

HRMS calculado para C₃₀H₅₀O₂ [M + Na]⁺: 465,3708; encontrado: 465,3730.

IV ($\bar{\nu}_{\max}$, cm⁻¹): 3642 (O-H); 2921 (C-H); 1045 (C-O).

[α]_D +71,10 (*c* 1, CHCl₃).

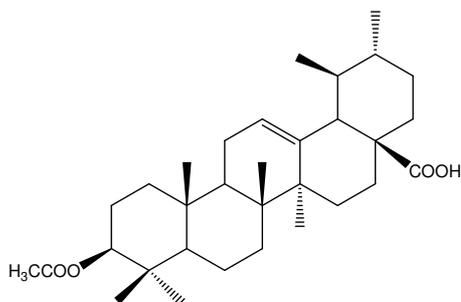
RMN de ¹H (δ ; CDCl₃; 200 MHz): 5,13 (t, 1H, *J* 3,6, H-12); 3,54 (d, 1H, *J* 10,9 Hz, H-28a); 3,20 (d, 1H, *J* 10,9 Hz, H-28b); 3,18 (m, 1H, H-3); 1,10 (s, 3H, C-27H₃); 1,00 (s, 3H, C-25H₃); 0,99 (s, 3H, C-23H₃); 0,95 (s, 3H, C-26H₃); 0,93 (s, 3H, C-30H₃); 0,82 (s, 3H, C-24H₃); 0,79 (s, 3H, C-29H₃).

RMN de ^{13}C (δ ; CDCl_3 ; 50 MHz): 138,77 (C-13); 125,06 (C-12); 79,04 (C-3); 69,93 (C-28); 55,19 (C-5); 54,05 (C-18); 47,70 (C-9); 42,08 (C-14); 40,06 (C-8); 39,39 (C-20); 39,39 (C-19); 38,81 (C-1); 38,03 (C-4); 36,90 (C-10); 36,90 (C-17); 35,24 (C-22); 32,85 (C-7); 30,68 (C-21); 28,18 (C-23); 27,27 (C-15); 26,05 (C-2); 23,33 (C-11); 23,33 (C-16); 26,33 (C-27); 21,39 (C-30); 18,37 (C-6); 17,42 (C-29); 16,83 (C-26); 15,69 (C-25); 15,69 (C-24).

9.2.11 Síntese do ácido 3 β -acetóxi-urs-12-en-28-óico (87)

Submeteram-se 200 mg de **31** (0,44 mmol) à acetilação com 1,0 mL de piridina e 1,0 mL de anidrido acético. Após 24 horas de reação, acrescentou-se gelo moído e deixou-se sob agitação por 15 min. Extraiu-se a mistura reacional com EtOAc e lavou-se com HCl 0,5N. A fase orgânica foi seca em Na_2SO_4 anidro e o solvente eliminado em evaporador rotatório, resultando na obtenção de 194,8 mg de **87** (89,2%). A reação foi repetida outras 4 vezes, com rendimentos variando entre 89 e 94%.

Dados físico-químicos do ácido 3 β -acetóxi-urs-12-en-28-óico (87)



Sólido amorfo branco

F.M.: $\text{C}_{32}\text{H}_{50}\text{O}_4$

M.M.: 498,75 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$

HRMS calculado para $\text{C}_{30}\text{H}_{50}\text{O}_2$ [$\text{M} + \text{Na}$] $^+$: 521,3606; encontrado: 521,3730.

IV ($\bar{\nu}_{\text{max}}$, cm^{-1}): 3661 (O-H); 2924 (C-H); 1733 (C=O); 1694 (C=O); 1242 (C-O); 1455 (C-O-H); 1369 (C-O).

$[\alpha]_{\text{D}}$ +54,30 (c 1, CHCl_3).

RMN de ^1H (δ ; CDCl_3 ; 200 MHz): 5,29 (t, 1H, J 3,6, H-12); 4,49 (m, 1H, H-3); 2,17 (d, 1H, J 11,5 Hz, H-18); 2,04 (s, 1H, OCOCH_3); 1,08 (s, 3H, C-27 H_3); 0,94 (s, 3H, C-25 H_3); 0,86 (d, 3H, J 6,1 Hz, C-30 H_3); 0,86 (s, 3H, C-23 H_3); 0,83 (s, 3H, C-26 H_3); 0,80 (s, 3H, C-24 H_3).

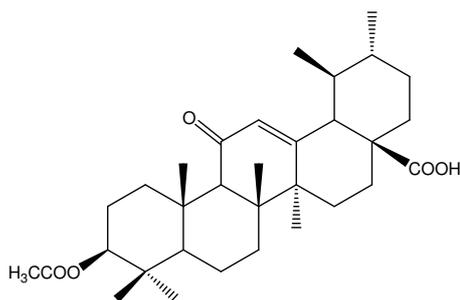
RMN de ^{13}C (δ ; CDCl_3 ; 50 MHz): 180,00 (C-28); 172,96 (C-28); 171,12 (OCOCH_3); 137,42 (C-13); 126,24 (C-12); 80,96 (C-3); 55,35 (C-5); 52,70 (C-18); 49,35 (C-17); 47,52 (C-9); 42,22 (C-14); 39,65 (C-8); 39,14 (C-19); 38,77 (C-20); 38,40 (C-1); 37,74 (C-4); 36,90 (C-10); 35,83 (C-22); 33,04 (C-7); 30,50 (C-21); 28,11 (C-23); 28,11 (C-15); 24,25 (C-16); 23,59 (C-11); 23,59 (C-2); 23,37 (C-27); 21,39 (COCOCH_3); 21,16 (C-30); 18,22 (C-6); 17,27 (C-29); 17,01 (C-26); 16,79 (C-25); 15,62 (C-24).

9.2.12 Tentativas de oxidação de **87** com MCPBA catalisada por 5,10,15,20-tetrakis(pentaflorofenil) porfirina

A uma solução de **87** (50 mg; 0,10 mmol) em 4,0 mL de CH_2Cl_2 , adicionou-se 5,10,15,20-tetrakis(pentaflorofenil) porfirina (3,3 mg; 3 mol%) e MCPBA 55% (20,71 mg; 0,07 mmol). Manteve-se a mistura reacional sob agitação e atmosfera inerte, a -78°C , durante 4 horas. Ao término deste período, adicionou-se ao meio reacional as soluções aquosas saturadas de NaHCO_3 e $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$, realizando-se então extração com EtOAc. A fase orgânica foi lavada com solução saturada de NaCl e seca sobre Na_2SO_4 , sendo o solvente eliminado em evaporador rotatório. Foram obtidos 45 mg do produto de partida.

9.2.13 Síntese do ácido 3 β -acetóxi-11-oxo-urs-12-en-28-óico (**88**)

A um balão de fundo redondo (25 mL) contendo 54 mg de **87** (0,10 mmol) dissolvidos em 5 mL de EtOAc, adicionaram-se 0,1 mL de *t*-BuOOH 6M em *n*-decano (0,6 mmol) e 58,8 mg de NaClO_2 (0,65 mmol). A mistura reacional foi mantida sob agitação magnética e refluxo (100 - 110°C), sendo a evolução da reação monitorada por CCD de sílica gel (*n*-hexano:EtOAc 7:3). Após 12 horas de reação, adicionou-se solução aquosa de Na_2SO_3 a 10% e extraiu-se com EtOAc. Lavou-se a fase orgânica sucessivamente com solução aquosa saturada de NaHCO_3 e água; secou-se sobre Na_2SO_4 anidro e eliminou-se o solvente em rotavapor, obtendo-se 50 mg de **88** (90,1%). A reação foi repetida outras 3 vezes, com o rendimento variando entre 90 e 95%.

Dados físico-químicos do ácido 3 β -acetóxi-11-oxo-urs-12-en-28-óico (88)

Sólido amorfo branco

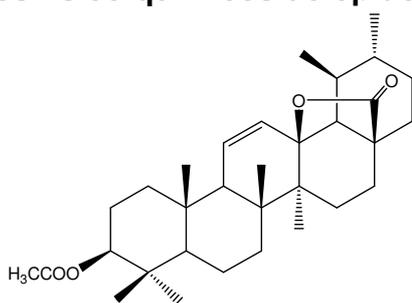
F.M.: C₃₂H₄₄O₅**M.M.:** 508,70 g.mol⁻¹

RMN de ¹H (δ; CDCl₃; 200 MHz): 5,57 (s, 1H, H-12); 4,47 (dd, 1H, *J* 10,9 e 5,5 Hz, H-3); 3,58 (s, 3H, COOCH₃); 2,29 (s, 1H, H-9); 2,02 (s, 3H, OCOCH₃); 1,13 (s, 3H, C-27H₃); 0,96 (s, 3H, C-25H₃); 0,91 (s, 3H, C-23H₃); 0,90 (s, 3H, C-30H₃); 0,88 (s, 3H, C-26H₃); 0,86 (s, 3H, C-24H₃); 0,84 (d, 3H, *J* 5 Hz, C-29H₃).

9.2.14 Síntese de 3 β -acetóxi-urs-12-en-28,13 β -lactona (89)

A um balão de duas bocas (25 mL) adicionaram-se 58 mg de LiAlH₄ (1,53 mmol) e 1,0 mL de éter seco. Manteve-se a suspensão sob agitação magnética e adicionou-se 58 mg de **88** (0,11 mmol), solubilizados em 4,0 mL de éter etílico seco. A mistura reacional foi mantida sob agitação a 0°C, durante 1 hora. A evolução da reação foi monitorada por CCD de sílica gel, empregando-se como eluente *n*-hexano:EtOAc (7:3 e 1:1). Ao término deste período, eliminou-se o excesso de LiAlH₄ com o gotejamento de éter úmido e, em seguida, com o gotejamento de água. Adicionou-se HCl 2N, extraiu-se com EtOAc e lavou-se com solução aquosa saturada de NaCl. A fase orgânica foi seca sobre Na₂SO₄ anidro e o solvente eliminado em evaporador rotatório, resultando em 44,9 mg de uma mistura de substâncias.

A mistura obtida (44,9 mg) foi submetida à acetilação com piridina/anidrido acético e o resíduo resultante foi em seguida cromatografado em coluna de sílica gel (dimensões da coluna empacotada: 15 × 270 mm), empregando-se como eluentes misturas de *n*-hexano:EtOAc (9:1; 8:2; 6:4). Recolheram-se 28 frações, de aproximadamente 3 mL, as quais foram reunidas de acordo com seus perfis por CCD de sílica gel (*n*-hexano:EtOAc 7:3) e dados de RMN de ¹H. As frações 9–18 (10 mg) foram reunidas e forneceram o derivado **89** (16%). As demais frações apresentaram-se como misturas, cuja massa disponível inviabilizou o isolamento dos componentes.

Dados físico-químicos do 3 β -acetóxi-urs-11-en-28,13 β -lactona (89)

Sólido amorfo branco

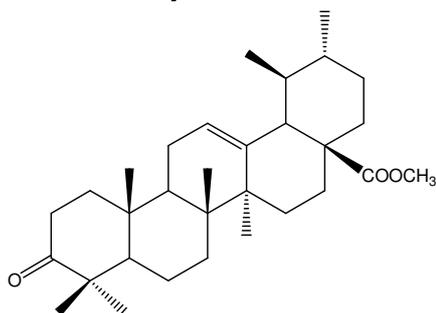
F.M.: C₃₂H₄₈O₄**M.M.:** 496,73 g.mol⁻¹**IV ($\bar{\nu}_{\max}$, cm⁻¹):** 2923 (C-H); 1755 (C=O); 1728 (C=O); 1238 (C-O).**[α]_D** +41,00 (*c* 0,5, CHCl₃).

RMN de ¹H (δ ; CDCl₃; 200 MHz): 5,95 (d, 1H, *J* 10,4 Hz, H-12); 5,54 (dd, 1H, *J* 10,4 e 3,0 Hz, H-11); 4,50 (m, 1H, H-3); 3,61 (s, 3H, COOCH₃); 2,06 (s, 3H, OCOCH₃); 1,16 (s, 3H, C-27H₃); 1,05 (s, 3H, C-25H₃); 1,02 (d, 3H, *J* 6,1 Hz, C-30H₃); 0,99 (s, 3H, C-23H₃); 0,94 (s, 3H, C-26H₃); 0,92 (d, 3H, *J* 5,3 Hz, C-29H₃); 0,86 (s, 3H, C-24H₃).

RMN de ¹³C (δ ; CDCl₃; 50 MHz): 180,01 (C-28); 171,12 (OCOCH₃); 133,37 (C-12); 128,96 (C-11); 89,71 (C-13); 80,66 (C-3); 60,60 (C-18); 54,86 (C-5); 52,96 (C-9); 45,13 (C-17); 41,97 (C-14); 41,75 (C-8); 40,31 (C-19); 38,70 (C-20); 38,00 (C-1); 37,89 (C-4); 36,31 (C-10); 31,35 (C-7); 31,20 (C-22); 30,87 (C-21); 27,78 (C-23); 25,58 (C-15); 23,37 (C-2); 22,86 (C-16); 21,39 (OCOCH₃); 19,22 (C-30); 18,96 (C-26); 18,04 (C-25); 17,93 (C-29); 17,60 (C-6); 16,09 (C-27 e C-24).

9.2.15 Síntese do 3-oxo-urs-12-en-28-oato de metila (90)

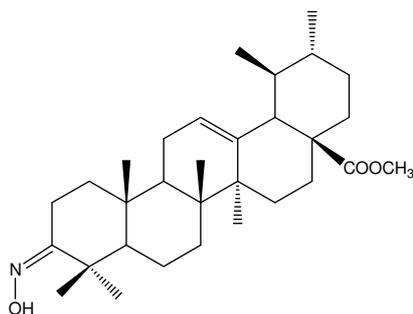
A uma solução contendo 500 mg de **77** (1,06 mmol) em CH₂Cl₂ anidro (20 mL), acrescentaram-se 716 mg de PDC (3,3 mmol). Manteve-se a mistura reacional sob agitação e temperatura ambiente, durante 3 horas. Monitorou-se a evolução da reação por CCD de sílica gel empregando-se *n*-hexano:EtOAc (8:2) como eluente. Ao final das 3 horas, evaporou-se o solvente em rotavapor, sendo o resíduo obtido cromatografado em coluna de sílica gel (dimensões da coluna empacotada: 30 × 310 mm), empregando-se CH₂Cl₂ e CH₂Cl₂:EtOAc (1:1) como eluentes, resultando em 371,9 mg de **90** (75% de rendimento). A reação foi realizada 9 vezes, com rendimentos entre 72 e 89%.

Dados físico-químicos do 3-oxo-urs-12-en-28-oato de metila (90)

Sólido cristalino branco

F.M.: C₃₁H₄₄O₃**M.M.:** 464,69 g.mol⁻¹**HRMS calculado para C₃₁H₄₄O₃ [M + Na]⁺:** 487,3188; encontrado: 487,3449.**IV ($\bar{\nu}_{\max}$, cm⁻¹):** 2978 (C-H); 1726 (C=O); 1706 (C=O); 1241 (C-O).**[α]_D** +89,20 (c 1, CHCl₃).**RMN de ¹H (δ ; CDCl₃; 200 MHz):** 5,26 (t, 1H, *J* 3,4, H-12); 3,60 (s, 3H, COOCH₃); 2,23 (d, 1H, *J* 11,0 Hz, H-18); 1,07 (s, 3H, C-27H₃); 1,03 (s, 3H, C-25H₃); 0,94 (s, 3H, C-23H₃); 0,94 (sl, 3H, C-30H₃); 0,94 (s, 3H, C-26H₃); 0,85 (d, 3H, *J* 6,2 Hz, C-29H₃); 0,78 (s, 3H, C-24H₃).**RMN de ¹³C (δ ; CDCl₃; 50 MHz):** 217,75 (C-3); 178,02 (C-28); 138,29 (C-13); 125,35 (C-12); 55,26 (C-5); 52,95 (C-18); 51,49 (COOCH₃); 48,14 (C-17); 47,41 (C-4); 46,78 (C-9); 42,15 (C-14); 39,47 (C-8); 38,47 (C-10); 39,32 (C-1); 39,06 (C-19); 38,88 (C-20); 36,64 (C-22); 34,21 (C-2); 32,52 (C-7); 30,68 (C-21); 28,04 (C-15); 26,57 (C-23); 24,22 (C-16); 23,44 (C-27); 23,44 (C-11); 21,53 (C-24); 21,20 (C-30); 19,62 (C-6); 17,09 (C-29); 16,90 (C-26); 15,21 (C-25).**9.2.16 Síntese do 3-hidroxi-oxima-urs-12-en-28-oato de metila (91)**

A uma solução contendo 100 mg de **90** (0,21 mmol) em EtOH absoluto (10 mL) acrescentou-se piridina anidra (0,1 mL) e (NH₃OH)Cl (25 mg; 0,36 mmol). Manteve-se o meio reacional sob agitação magnética e refluxo, à temperatura de 95–100°C, durante 3 horas. Monitorou-se a evolução da reação por CCD de sílica gel, empregando-se *n*-hexano:EtOAc (8:2) como eluente. Ao final deste período, evaporou-se o EtOH e acrescentou-se EtOAc, seguindo-se lavagem com solução aquosa saturada de NaCl. A fase orgânica foi seca em Na₂SO₄ anidro e, após eliminação do solvente em evaporador rotatório, foram obtidos 98 mg de **91** (95% de rendimento).

Dados físico-químicos do 3-hidroxi-oxima-urs-12-en-28-oato de metila (91)

Sólido amorfo branco

F.M.: C₃₁H₄₉O₃N**M.M.:** 483,73 g.mol⁻¹**HRMS calculado para C₃₁H₄₉O₃N [M + Na]⁺:** 506,3610; encontrado: 507,3305.**IV ($\bar{\nu}_{\max}$, cm⁻¹):** 3660 (O-H); 2945 (C-H); 1721 (C=O); 931 (N-O).**[α]_D** +22,00 (c 1, CHCl₃).

RMN de ¹H (δ; CDCl₃; 200 MHz): 5,24 (sl, 1H, H-12); 3,59 (s, 3H, COOCH₃); 3,06 (m, 1H, H-2b); 2,22 (m, 1H, H-2a); 2,22 (d, 1H, J 11 Hz, H-18); 1,14 (s, 3H, C-27H₃); 1,04 (s, 3H, C-25H₃); 1,02 (d, 3H, C-23H₃); 0,93 (sl, 3H, C-30H₃); 0,84 (d, 3H, J 6,2 Hz, C-29H₃); 0,76 (s, 3H, C-26H₃); 0,76 (s, 3H, C-24H₃).

RMN de ¹³C (δ; CDCl₃; 50 MHz): 178,10 (C-28); 166,85 (C-3); 138,26 (C-13); 125,51 (C-12); 55,82 (C-18); 52,96 (C-5); 51,52 (COOCH₃); 44,14 (C-17); 47,11 (C-9); 42,11 (C-14); 40,35 (C-4); 39,58 (C-8); 39,06 (C-19); 38,88 (C-20); 38,66 (C-1); 37,04 (C-10); 36,64 (C-22); 32,74 (C-7); 30,68 (C-2); 30,68 (C-21); 28,00 (C-15); 27,34 (C-23); 24,25 (C-16); 24,25 (C-11); 23,33 (C-27); 21,20 (C-24); 21,20 (C-30); 19,07 (C-6); 17,01 (C-26); 17,01 (C-29).

9.2.17 Tratamento de 77 com HI 57%

Em um balão de fundo redondo (25 mL) contendo 44 mg de **77** (0,10 mmol) adicionou-se C₆H₆ (4 mL) e HI 57% (0,25 mL; 1,89 mmol). Manteve-se a mistura reacional sob agitação magnética e refluxo (80°C), por 75 minutos, monitorando-se a evolução da reação por CCD de sílica gel (*n*-hexano:EtOAc 8:2) em intervalos de 15 min. Após os 75 minutos, acrescentou-se EtOAc e lavou-se, sucessivamente, com soluções aquosas saturadas de NaHCO₃ e de NaCl. A fase orgânica foi seca em Na₂SO₄ anidro, seguindo-se eliminação do solvente em evaporador rotatório. Obtiveram-se 35 mg do próprio produto de partida (**77**).

9.2.18 Tentativa de oxidação de **90** com SeO_2

A uma solução de 42 mg de **90** (0,09 mmol) em EtOH absoluto (3 mL) adicionaram-se 35,5 mg de SeO_2 (0,32 mmol). Manteve-se a mistura reacional sob agitação magnética, a 60°C, durante 20,5 horas. A evolução da reação foi monitorada por CCD de sílica gel, empregando-se *n*-hexano:EtOAc (1:1) como eluente. Ao término deste período evaporou-se o EtOH e acrescentou-se éter etílico, seguindo-se lavagem com solução aquosa saturada de NaCl. Secou-se a fase orgânica sobre Na_2SO_4 anidro e eliminou-se o solvente em evaporador rotatório, resultando em 40,4 mg do produto de partida (**90**).

Foram realizadas 4 outras tentativas com a reação, alterando-se o tempo e a temperatura, conforme descrito na Tabela 38. Porém, não foi possível obter o produto de oxidação em nenhuma das condições avaliadas.

Tabela 38 - Condições reacionais avaliadas na oxidação do produto **90 (42 mg; 0,09 mmol) com SeO_2**

Condição	Temperatura (°C)	Tempo (horas)
A	60	20,5
B	110	2
C	110	4
D	60	20,5
	110	2
E	110	8

9.2.19 Tentativa de oxidação de **90** com *t*-BuOOH/ SeO_2

A uma solução contendo 45 mg de **90** (0,10 mmol) em CH_2Cl_2 (3 mL), adicionou-se SeO_2 (8,5 mg; 0,075 mmol). A mistura reacional foi mantida em atmosfera inerte, adicionando-se gota a gota, com auxílio de um funil de adição, *t*-BuOOH 6M (0,1mL; 0,6 mmol) em CH_2Cl_2 (1,7 mL). Manteve-se a mistura reacional sob agitação e temperatura ambiente, por 5 horas. Ao término deste período, acrescentou-se CH_2Cl_2 , lavou-se com solução aquosa saturada de NaCl e secou-se sobre Na_2SO_4 anidro. A eliminação do solvente em evaporador rotatório resultou em 38 mg de uma mistura, não identificada.

Este procedimento foi realizado outras 3 vezes, alterando-se o tempo de reação, conforme descrito na Tabela 39. Porém, não se alcançou o sucesso na obtenção do produto de oxidação em nenhuma das condições experimentadas.

Tabela 39 - Condições reacionais avaliadas nas tentativas de oxidação de **90 com *t*-BuOOH/SeO₂.**

Condição	Temperatura (°C)	Tempo (horas)
A	ambiente	5
B	ambiente	24
C	ambiente	1
D	ambiente	3

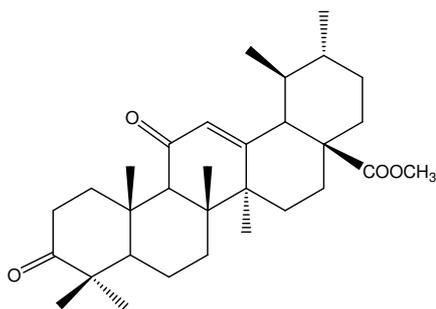
9.2.20 Síntese do 3,11-dioxo-urs-12-en-28-oato de metila (**92**)

Em um balão de fundo redondo (25 mL) contendo 100 mg de **90** (0,21 mmol) dissolvidos em 5 mL de EtOAc adicionaram-se 0,2 mL de *t*-BuOOH 6M em *n*-decano (1,20 mmol) e 66 mg de NaClO₂ (0,73 mmol). A mistura reacional foi mantida em agitação magnética sob refluxo (100 - 110°C), sendo monitorada por CCD de sílica gel (*n*-hexano:EtOAc 7:3). Após 12 horas de reação, adicionou-se solução aquosa de Na₂SO₃ a 10% e extraiu-se com EtOAc. Lavou-se a fase orgânica sucessivamente com solução aquosa saturada de NaHCO₃ e água; secou-se sobre Na₂SO₄ anidro e eliminou-se o solvente em evaporador rotatório, resultando em 91 mg de **92** (88% de rendimento).

Esta condição reacional foi encontrada após várias tentativas de otimização da reação, com alterações no tempo e temperatura, conforme descrito na Tabela 40.

Tabela 40 - Condições reacionais avaliadas na oxidação de **90 com NaClO₂/*t*-BuOOH.**

Condição	Temperatura (°C)	Tempo (horas)
A	50	168
B	50	24
C	50	12
D	100	16
E	100	10
F	100	12

Dados físico-químicos do 3,11-dioxo-urs-12-en-28-oato de metila (92)

Sólido amorfo branco

F.M.: C₃₁H₄₄O₄**M.M.:** 480,69 g.mol⁻¹**HRMS calculado para C₃₁H₄₄O₄ [M + Na]⁺:** 503,3137; encontrado: 503,3442.**IV ($\bar{\nu}_{\max}$, cm⁻¹):** 2928 (C-H); 1726 (C=O); 1658 (C=O); 1199 (C-O).**[α]_D** +57,10 (c 1, CHCl₃).

RMN de ¹H (δ ; CDCl₃; 200 MHz): 5,61 (s, 1H, H-12); 3,60 (s, 3H, COOCH₃); 2,95 (m, 1H, H-2a); 2,89 (m, 1H, H-2b); 2,37 (s, 1H, H-9); 1,13 (s, 3H, C-27H₃); 1,12 (d, 3H, C-25H₃); 1,01 (s, 3H, C-23H₃); 0,84 (d, 1H, *J* 5,0 Hz, C-29H₃); 0,74 (s, 3H, C-26H₃); 0,74 (s, 3H, C-24H₃).

RMN de ¹³C (δ ; CDCl₃; 50 MHz): 217,35 (C-3); 199,23 (C-11); 177,26 (C-28); 163,44 (C-13); 130,62 (C-12); 60,79 (C-9); 55,42 (C-18); 52,81 (C-5); 51,96 (COOCH₃); 47,70 (C-17); 47,70 (C-4); 44,54 (C-14); 43,88 (C-8); 39,76 (C-1); 38,66 (C-19); 38,66 (C-20); 36,79 (C-10); 35,94 (C-22); 34,29 (C-2); 32,41 (C-7); 30,32 (C-21); 28,44 (C-15); 26,44 (C-23); 23,88 (C-16); 23,88 (C-6); 21,44 (C-27); 21,02 (C-30); 21,02 (C-24); 18,78 (C-26); 15,58 (C-25).

9.2.21 Tentativa de oxidação de 78 com SeO₂/AcOH

A uma solução de **78** (43 mg; 0,08 mmol) em ácido acético (3,0 mL) adicionou-se SeO₂ (27 mg; 0,24 mmol). A mistura reacional foi mantida sob agitação magnética e temperatura ambiente, durante 72 horas. Monitorou-se a evolução da reação por CCD de sílica gel, empregando-se *n*-hexano:EtOAc (8:2) como eluente. Ao término deste período, acrescentou-se água e extraiu-se com EtOAc, seguindo-se lavagem da fase orgânica com soluções aquosas saturadas de NaHCO₃ e de NaCl. Secou-se a fase orgânica sobre Na₂SO₄ anidro e eliminou-se o solvente em evaporador rotatório, sendo recuperados 40,2 mg do composto de partida.

9.2.22 Tentativa de oxidação de **90** com SeO_2/AcOH

A uma solução de **90** (50,6 mg; 0,11 mmol) em ácido acético (3,0 mL) adicionou-se SeO_2 (32 mg; 0,29 mmol). A mistura reacional foi mantida sob agitação magnética e refluxo (130-135°C), durante 2 horas, sendo sua evolução monitorada por CCD de sílica gel, empregando-se *n*-hexano:EtOAc (8:2) como eluente. Ao término desse período, acrescentou-se água e extraiu-se com EtOAc, seguindo-se lavagem da fase orgânica com soluções aquosas saturadas de NaHCO_3 e de NaCl . Secou-se a fase orgânica sobre Na_2SO_4 anidro e eliminou-se o solvente em evaporador rotatório, sendo recuperados 44,1 mg do composto de partida.

O mesmo procedimento reacional também foi empregado para outros 50 mg de **66**, mantendo-se as mesmas concentrações dos reagentes e temperatura. porém alterando-se o tempo para 8 horas. Nessas condições foram obtidos 47 mg do composto de partida.

9.2.23 Tentativa de rearranjo de **90** com $\text{BF}_3\text{-Et}_2\text{O}$

A uma solução de 54 mg de **90** (0,11 mmol) em 5 mL de CH_2Cl_2 (seco sobre CaCl_2), mantida sob atmosfera inerte e a -20°C, adicionaram-se 50 μL de $\text{BF}_3\text{-Et}_2\text{O}$ bidistilado (0,39 mmol). Manteve-se a mistura reacional sob agitação, nas condições descritas acima, durante 1,5 horas, com monitoramento por CCD de sílica gel (*n*-hexano:EtOAc 8:2). Após este período, adicionou-se CH_2Cl_2 e lavou-se com solução saturada de NaCl . A fase orgânica foi seca em Na_2SO_4 anidro e, após eliminação do solvente em evaporador rotatório, foram recuperados 47,9 mg do produto de partida.

Realizaram-se outras duas tentativas, empregando-se porções de 50 mg de **66**. Na primeira, empregou-se temperatura de 0°C, 100 μL de $\text{BF}_3\text{-Et}_2\text{O}$ e tempo de reação de 1,5 horas. Adicionaram-se, então, outros 50 μL de $\text{BF}_3\text{-Et}_2\text{O}$ e manteve-se a reação por mais 1,5 horas. Após elaboração da reação foram recuperados 40mg do produto de partida.

Na segunda tentativa utilizaram-se 100 μL de $\text{BF}_3\text{-Et}_2\text{O}$, mantendo-se a mistura reacional sob agitação, à temperatura ambiente, durante 3 horas. Recuperaram-se 47,2 mg do produto de partida.

9.2.24 Tentativas de redução de 92

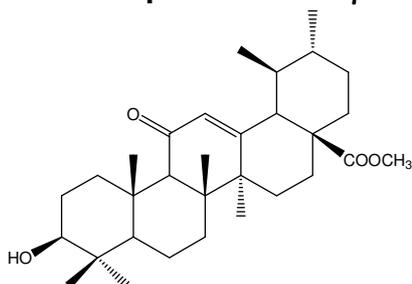
9.2.24.1 Redução de 92 com NaBH₄/CeCl₃·7H₂O

A uma solução de **92** (56 mg; 0,12 mmol) em MeOH/THF (1:1; 5 mL), adicionou-se CeCl₃·7H₂O (82 mg; 0,22 mmol) e NaBH₄ (10,90 mg; 0,28 mmol). Manteve-se a mistura reacional sob agitação magnética a 0°C, durante 45 minutos e, em seguida, à temperatura ambiente por 3 horas. Monitorou-se a evolução da reação por CCD de sílica gel (*n*-hexano:EtOAc 8:2). Ao término deste período, evaporou-se o solvente, adicionou-se Et₂O e lavou-se com solução de HCl 2N e solução aquosa saturada de NaCl. A fase orgânica foi seca em Na₂SO₄ anidro e o solvente foi removido em evaporador rotatório, resultando em 43,6 mg do produto de partida.

Na segunda tentativa, 50 mg de **92** (0,10 mmol) foram dissolvidos em 5 mL da mistura MeOH/THF (1:1). Adicionaram-se 164 mg de CeCl₃·7H₂O (0,44 mmol) e 22 mg de NaBH₄ (0,57 mmol), mantendo-se a mistura reacional sob agitação à temperatura ambiente por 6 horas. Monitorou-se a evolução da reação por CCD de sílica gel (*n*-hexano:EtOAc 8:2), em intervalos de 1 hora. Empregou-se o mesmo procedimento de extração, sendo obtidos 38,7 mg de produto bruto.

Na terceira tentativa, o produto bruto da segunda tentativa foi (38,7 mg) utilizado como produto de partida. Solubilizou-se na mistura de MeOH/THF (1:1), e adicionou-se 127 mg de CeCl₃·7H₂O (0,34 mmol) e 16,8 mg de NaBH₄ (0,44 mmol). Manteve-se a mistura reacional sob agitação e temperatura ambiente durante 6 horas, seguindo-se o mesmo procedimento de extração empregado nas tentativas anteriores e resultando na obtenção de 32,25 mg do produto **93** (83% de rendimento).

Dados físico-químicos do 3β-hidróxi-11-oxo-urs-12-en-28-oato de metila (**93**)



Sólido amorfo branco

F.M.: C₃₁H₄₄O₄

M.M.: 480,69 g.mol⁻¹

HRMS calculado para C₃₁H₄₄O₄ [M + Na]⁺: 503,3137; encontrado: 503,3442.

IV ($\bar{\nu}_{\text{max}}$, cm⁻¹): 3675 (O-H); 2970 (C-H); 1725 (C=O); 1659 (C=O).

[α]_D +108,57 (c 0,7, CHCl₃).

RMN de ¹H (δ ; CDCl₃; 200 MHz): 5,60 (s, 1H, H-12); 3,61 (s, 3H, COOCH₃); 3,22 (m, 1H, H-3); 2,80 (m, 1H, H-2a); 2,75 (m, 1H, H-2b); 2,42 (d, 1H, *J* 11,2 Hz, H-18); 2,30 (s, 1H, H-9); 1,12 (s, 3H, C-27H₃); 0,99 (s, 3H, C-25H₃); 0,96 (d, 3H, *J* 5,0 Hz, C-30H₃); 0,90 (s, 3H, C-23H₃); 0,86 (d, 1H, *J* 6,1 Hz, C-29H₃); 0,79 (s, 3H, C-26H₃); 0,79 (s, 3H, C-24H₃).

RMN de ¹³C (δ ; CDCl₃; 50 MHz): 200,01 (C-11); 177,29 (C-28); 162,96 (C-13); 130,73 (C-12); 78,83 (C-3); 61,52 (C-9); 55,01 (C-18); 52,76 (C-5); 51,92 (COOCH₃); 47,70 (C-17); 44,72 (C-14); 43,77 (C-8); 39,17 (C-1); 38,66 (C-19); 38,66 (C-20); 37,19 (C-10); 37,19 (C-4); 36,01 (C-22); 33,07 (C-7); 30,35 (C-21); 28,44 (C-15); 28,15 (C-23); 27,34 (C-2); 23,99 (C-16); 21,05 (C-30); 21,05 (C-27); 18,89 (C-26); 17,49 (C-6); 17,16 (C-24); 16,28 (C-29). 15,65 (C-25).

9.2.24.2 Redução de 92 com NaBH₄/alumina

A uma solução de **92** (50 mg; 0,10 mmol) em 4,0 mL de CH₂Cl₂, acrescentou-se alumina neutra (180 mg) e levou-se ao evaporador rotatório até a completa incorporação, resultando em um pó amarelado. Acrescentou-se NaBH₄ (20mg; 10% em relação à alumina) e homogeneizou-se manualmente, com o auxílio de um bastão de vidro. A mistura foi transferida para um béquer contendo aproximadamente 2 cm de sílica gel e submetida à radiação de microondas (990 watts de potência). Foram realizadas 2 irradiações de 30 segundos, seguidas de 4 irradiações de 60 segundos, procedendo-se ao monitoramento da mistura reacional por CCD de sílica gel (*n*-hexano:EtOAc 7:3) após cada irradiação. Então, dividiu-se a amostra em duas partes e à primeira adicionou-se EtOAc, agitou-se, filtrou-se e eliminou-se o solvente em evaporador rotatório. A segunda porção da mistura reacional foi novamente irradiada em microondas (5 × 120 segundos), seguindo-se extração com EtOAc. Ambas as frações foram monitoradas por CCD e RMN de ¹H e forneceram o mesmo derivado reduzido **93** com 68% de rendimento.

9.2.24.3 Tentativa de redução de **92** com $\text{NaBH}_4/\text{GuHCl}$

O produto **92** (50 mg; 0,10 mmol) foi adicionado a uma solução de cloridrato de guanidina (GuHCl , 5,0 mg; 5% mol) em água (4,0 mL). Agitou-se a mistura reacional vigorosamente por 30 minutos e, em seguida, adicionou-se NaBH_4 (4,0 mg; 0,11 mmol), seguindo-se a agitação por mais 20 minutos. Após este período, extraiu-se com EtOAc , secou-se a solução em Na_2SO_4 anidro e eliminou-se o solvente em evaporador rotatório, sendo obtidos 43,2 mg do produto de partida.

9.2.24.4 Tentativa de redução de **92** com $\text{InCl}_3/\text{NaBH}_4$

O derivado **92** (80 mg; 0,17 mmol) foi solubilizado em CH_3CN (2,0 mL) e mantido em atmosfera inerte, sendo então adicionados, com auxílio de um funil de adição, InCl_3 (11,06 mg; 0,05 mmol) e NaBH_4 (18,4 mg; 0,49 mmol) dissolvidos em 2,0 mL de CH_3CN . Manteve-se a mistura reacional sob agitação e temperatura ambiente durante 3 horas, sendo a evolução da reação monitorada por CCD de sílica gel (*n*-hexano: EtOAc 7:3), em intervalos de 30 minutos. Findas 3 horas, acrescentou-se água e extraiu-se com EtOAc . Lavou-se com solução aquosa saturada de NaCl , secou-se sobre Na_2SO_4 anidro e eliminou-se o solvente em evaporador rotatório, resultando em 75,4 mg do produto de partida.

Realizou-se uma nova tentativa de redução, empregando-se 75,4 mg de **92** como produto de partida e as mesmas condições reacionais, alterando-se o tempo para 19 horas. Nessas condições, recuperaram-se 62,1 mg do produto de partida (**92**).

9.2.24.5 Tentativa de redução de **92** com NaBH_4

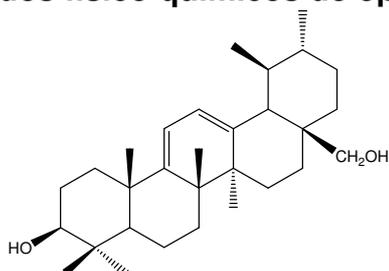
A uma suspensão de NaBH_4 (50 mg; 1,33 mmol) em EtOH (2,0 mL) acrescentaram-se 50 mg de **92** (0,10 mmol) dissolvidos em MeOH (3,0 mL). Manteve-se a mistura reacional sob agitação e à temperatura ambiente, durante 24 horas. Monitorou-se a evolução da reação por CCD de sílica gel, empregando-se *n*-hexano: EtOAc (7,5:2,5) como eluente. Ao final de 24 horas, o perfil cromatográfico foi idêntico ao obtido para o material de partida. Adicionou-se, então, $\text{CeCl}_3 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (38,7 mg; 0,10 mmol) e manteve-se as mesmas condições reacionais por 24 horas

adicionais. Ao final deste período não se observou evolução da reação por CCD de sílica gel e então aqueceu-se a mistura reacional em banho de silicone, elevando a temperatura para 35-40°C, por 4 horas. Após esse período, extraiu-se a mistura reacional com EtOAc, lavou-se com H₂O e solução aquosa saturada de NaCl. Em seguida, secou-se a fase orgânica em Na₂SO₄ anidro e eliminou-se o solvente em evaporador rotatório, sendo recuperados 40,9 mg do composto de partida.

9.2.25 Síntese de 3β,28-diidroxi-urs-9,12-dieno (**94**) e 3β-hidroxi-urs-11-en-28,13β-eter (**84**)

Em um balão de duas bocas (25 mL) adicionaram-se 62 mg de LiAlH₄ (1,63 mmol) e 2,0 mL de éter etílico seco. Manteve-se a suspensão sob agitação magnética e então adicionaram-se 62 mg de **92** (0,13 mmol), solubilizados em 4,0 mL de éter etílico seco. A mistura reacional foi mantida sob agitação à temperatura ambiente, durante 4 horas. A reação foi monitorada por CCD de sílica gel, empregando-se como eluentes as misturas de *n*-hexano:EtOAc (7:3 e 1:1). Ao término deste período, eliminou-se o excesso de LiAlH₄ com o gotejamento de éter úmido, seguido do gotejamento de água. Adicionou-se HCl 2N, extraiu-se com EtOAc e lavou-se a fase orgânica com solução aquosa saturada de NaCl. Secou-se a fase orgânica em Na₂SO₄ anidro e após eliminar o solvente em evaporador rotatório foram obtidos 44 mg de um resíduo. Este foi submetido a fracionamento em coluna de sílica gel (dimensões da coluna empacotada: 10 × 186 mm), empregando-se as misturas de *n*-hexano:EtOAc (8:2 e 1:1) e EtOAc como eluentes. Recolheram-se 13 frações de aproximadamente 3 mL, que foram reunidas de acordo com os perfis obtidos por CCD de sílica gel (*n*-hexano:EtOAc 1:1) e dados de RMN de ¹H. O dieno **94** foi obtido das frações reunidas 3-6 (5,2 mg, 9%) e o éter **84** das frações 10-13 (16,2 mg, 29%).

Dados físico-químicos do 3β,28-diidroxi-urs-9,12-dieno (**94**)



Sólido amorfo branco

F.M.: C₃₀H₄₄O₂

M.M.: 436,68 g.mol⁻¹

HRMS calculado para C₃₀H₄₄O₂ [M + Na]⁺: 459,3239; encontrado: 459,3553.

IV ($\bar{\nu}_{\max}$, cm⁻¹): 3662 (O-H); 2941 (C-H); 1690 (C=C); 1240 (C-O).

[α]_D +7,80 (*c* 3,5, CHCl₃).

RMN de ¹H (δ ; CDCl₃; 200 MHz): 5,58 (d, 1H, *J* 6,0 Hz, H-11); 5,51 (d, 1H, *J* 6,0 Hz, H-12); 3,60 (d1 3H, *J* 11 Hz, H-28a); 3,24 (d, 1H, *J* 11 Hz, H-28b); 3,22 (m, 1H, H-3); 1,21 (s, 3H, C-27H₃); 1,16 (s, 3H, C-25H₃); 1,03 (s, 3H, C-23H₃); 0,94 (d, 3H, *J* 5 Hz, C-30H₃); 0,95 (s, 3H, C-26H₃); 0,83 (d, 3H, *J* 5 Hz, C-29H₃); 0,82 (s, 3H, C-24H₃).

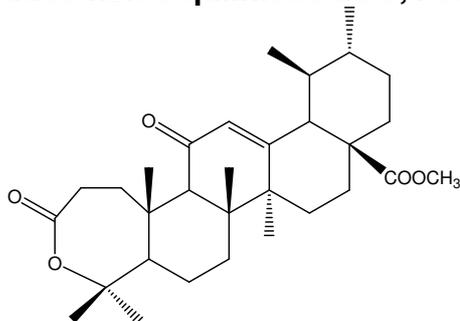
RMN de ¹³C (δ ; CDCl₃; 50 MHz): 155,09 (C-9); 140,19 (C-13); 123,45 (C-12); 115,29 (C-11); 78,76 (C-3); 70,21 (C-28); 52,37 (C-18); 51,12 (C-5); 43,11 (C-8); 40,72 (C-14); 39,36 (C-19); 38,73 (C-20); 38,07 (C-4); 38,07 (C-17); 37,30 (C-22); 35,17 (C-1); 31,93 (C-7); 30,61 (C-21); 29,77 (C-15); 28,26 (C-23); 27,93 (C-2); 25,47 (C-16); 25,47 (C-27); 21,53 (C-30); 18,33 (C-6); 17,66 (C-26); 17,31 (C-29). 15,69 (C-25); 15,69 (C-24).

9.2.26 Síntese do 3,4-seco-11-oxo-urs-12-en-28-oato de metila (95)

A uma solução do derivado **92** (50 mg; 0,10 mmol) em 5 mL de CH₂Cl₂, acrescentou-se MCPBA (55,3 mg; 0,25 mmol) e NaHCO₃ (147,2 mg; 1,75 mmol). Manteve-se a mistura reacional sob agitação à temperatura ambiente por 24 horas e, então, acrescentou-se quantidade adicional de MCPBA (47,3 mg; 0,21 mmol). Manteve-se a mistura reacional sob as mesmas condições por mais 16 horas. A evolução da reação foi monitorada por CCD de sílica gel, empregando-se *n*-hexano:EtOAc (7:3) como eluente. Ao término das 40 horas de reação, acrescentou-se EtOAc e lavou-se sucessiva e exaustivamente com soluções aquosas saturadas de Na₂S₂O₃, NaHCO₃ e NaCl. A fase orgânica foi seca em Na₂SO₄ anidro e o solvente eliminado em evaporador rotatório, resultando em 40,4 mg de um sólido. Este foi submetido à filtração em coluna de sílica gel (10 × 170 mm) empregando-se misturas de *n*-hexano:EtOAc (8:2 e 1:1) e EtOAc como eluentes. Recolheram-se 3 frações de 25 mL; aquela eluída com *n*-hexano:EtOAc (1:1) forneceu 24,9 mg da lactona **95** (44% de rendimento) e as demais frações foram descartadas.

A reação também foi realizada empregando-se 0,12 mmol de MCPBA, durante 24 horas, resultando no mesmo produto de reação, porém em menor rendimento (38%).

Dados físico-químicos do 3,4-seco-11-oxo-urs-12-en-28-oato de metila (95)



Sólido amorfo branco

F.M.: C₃₁H₄₄O₅

M.M.: 496,69 g.mol⁻¹

HRMS calculado para C₃₁H₄₄O₅ [M + Na]⁺: 519,3086; encontrado: 519,3265.

IV ($\bar{\nu}_{\max}$, cm⁻¹): 2923 (C-H); 1721 (C=O); 1654 (C=O); 1232 (C-O); 1030 (C-O).

[α]_D +135,00 (c 0,5, CHCl₃).

RMN de ¹H (δ; CDCl₃; 200 MHz): 5,65 (s, 1H, H-12); 3,61 (s, 3H, COOCH₃); 2,61 (m, 2H, H-2a e H-2b); 2,51 (s, 1H, H-9); 2,44 (d, 1H, J 12 Hz, H-18); 1,435 (s, 3H, C-27H₃); 1,31 (s, 3H, C-25H₃); 0,98 (s, 3H, C-23H₃); 0,94 (s, 3H, C-24H₃); 0,93 (s, 3H, C-26H₃); 0,88 (s, 3H, C-30H₃); 0,82 (d, 3H, J 6,5 Hz, C-29H₃).

RMN de ¹³C (δ; CDCl₃; 50 MHz): 198,53 (C-11); 177,22 (C-28); 175,67 (C-3); 163,21 (C-13); 130,79 (C-12); 85,67 (C-4); 61,11 (C-9); 54,46 (C-5); 52,73 (C-18); 51,96 (COOCH₃); 47,74 (C-17); 44,61 (C-14); 43,99 (C-8); 39,69 (C-10); 38,88 (C-1); 38,70 (C-20); 38,70 (C-19); 35,98 (C-22); 32,34 (C-7); 32,34 (C-2); 30,35 (C-21); 28,37 (C-15); 26,05 (C-24); 23,92 (C-16); 23,92 (C-6); 22,12 (C-27); 20,98 (C-30); 18,41 (C-25); 17,49 (C-29); 17,12 (C-26).

9.2.27 Síntese do 3-oxo,11-hidroxi-urs-12-en-28-oato de metila (96)

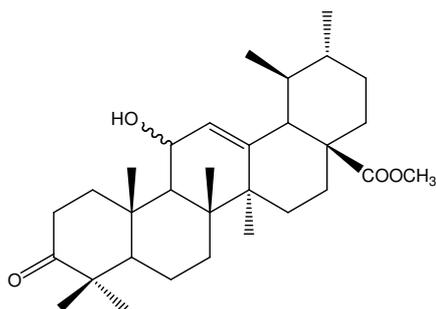
A uma solução de **90** (50 mg; 0,11 mmol) em 4,0 mL de CH₂Cl₂ adicionou-se 5,10,15,20-tetrakis(pentafluorofenil) porfirina (3,5 mg; 3 mol%) e MCPBA 55% (44,32 mg; 0,26 mmol). Manteve-se a mistura reacional sob agitação e atmosfera inerte, a -78°C, durante 30 horas. Ao término deste período, adicionaram-se soluções

aquosas saturadas de NaHCO_3 e $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$, seguindo-se extração com EtOAc. A fase orgânica foi lavada com solução aquosa saturada de NaCl, seca sobre Na_2SO_4 anidro e o solvente eliminado em evaporador rotatório, resultando na obtenção de 44,9 mg de um resíduo. Este foi cromatografado em coluna de sílica gel (dimensões da coluna empacotada: 10 × 220 mm), empregando-se misturas de *n*-hexano:EtOAc (9:1; 8:2; 1:1) como eluentes. Recolheram-se 15 frações de aproximadamente 3 mL, que foram reunidas de acordo com os perfis obtidos por CCD de sílica gel e dados de RMN de ^1H . O produto de partida **90** (17,4 mg) foi recuperado das frações reunidas 2-5; já as frações 6-10 forneceram 13,3 mg (30%) de **92**, enquanto das frações 11-13 foram obtidos 25,1 mg da mistura de isômeros **96** (56%).

Outras 7 tentativas de otimizar a obtenção do produto **96** foram realizadas, alterando-se a concentração do MCPBA, o tempo e temperatura da reação, conforme descrito na Tabela 41. O produto da reação obtido na condição G, também foi submetido a fracionamento cromatográfico em coluna de sílica gel, empregando-se as mesmas condições e eluentes. Obtiveram-se 3 grupos de frações reunidas nas quais também puderam ser identificados os alcoóis alílicos **96** (46%), o produto **92** (24%) e o material de partida **90** (30%).

Tabela 41 - Condições avaliadas na oxidação de **90** com MCPBA, catalisada por 5,10,15,20-tetrakis(pentafluorofenil) porfirina.

Condição	Temperatura (°C)	Tempo (horas)	MCPBA (mmol)
A	-78	4	0,13
B	-78	20	0,13
C	0	4	0,13
D	ambiente	36	0,13
E	-20	24	0,13
F	ambiente	4	0,13
G	ambiente	7	0,13
H	-78	30	0,26

Dados físico-químicos do 3-oxo,11-hidróxi-urs-12-en-28-oato de metila (96)

Sólido amorfo branco

F.M.: C₃₁H₄₄O₄**M.M.:** 480,69 g.mol⁻¹**HRMS calculado para C₃₁H₄₄O₄ [M + Na]⁺:** 503,3137; encontrado: 503,3453.**IV ($\bar{\nu}_{\max}$, cm⁻¹):** 3646 (O-H); 2921 (C-H); 1726 (C=O); 1706 (C=O); 1241 (C-O).

RMN de ¹H (δ; CDCl₃; 200 MHz): 5,30 (d, 1H, *J* 3,6 Hz, H-12); 4,29 (dd, *J* 3,6 e 8,8 Hz, 1H, H-11); 3,61 (s, 3H, COOCH₃); 2,27 (d, 1H, *J* 10,4 Hz, H-18); 1,10 (s, 3H, C-27H₃); 1,06 (s, 3H, C-25H₃); 0,96 (d, 3H, *J* 5,3 Hz, C-30H₃); 0,94 (s, 3H, C-23H₃); 0,91 (s, 3H, C-26H₃); 0,88 (d, 3H, *J* 6,4 Hz, C-29H₃); 0,84 (s, 3H, C-24H₃).

RMN de ¹³C (δ; CDCl₃; 50 MHz): 217,91 (C-3); 178,03 (C-28); 139,88 (C-13); 129,55 (C-12); 68,27 (C-11); 55,62 (C-9); 52,18 (C-5); 51,78 (C-18); 51,71 (COOCH₃); 47,74 (C-17); 47,37 (C-4); 42,89 (C-8); 42,89 (C-14); 40,68 (C-1); 38,73 (C-19); 38,73 (C-20); 38,26 (C-10); 36,42 (C-22); 34,54 (C-7); 34,43 (C-2); 30,57 (C-21); 28,07 (C-15); 26,94 (C-23); 24,14 (C-16); 23,44 (C-27); 21,31 (C-30); 19,69 (C-6); 18,78 (C-29); 18,22 (C-26); 17,16 (C-24); 17,01 (C-25).

9.2.28 Tentativa de oxidação de 31 com NaClO₂/*t*-BuOOH

A um balão de fundo redondo (25 mL) contendo 53 mg de **31** (0,12 mmol) dissolvidos, sob aquecimento, em 6 mL de EtOAc, adicionaram-se 0,1 mL de *t*-BuOOH 6M em *n*-decano (0,6 mmol) e 32 mg de NaClO₂ (0,35 mmol). A mistura reacional foi mantida sob agitação magnética e refluxo, durante 12 horas. Após este período, adicionou-se solução aquosa de Na₂SO₃ a 10% e extraiu-se com EtOAc. Lavou-se a fase orgânica sucessivamente com solução aquosa saturada de NaHCO₃ e água; secou-se sobre Na₂SO₄ anidro e eliminou-se o solvente em rotavapor, obtendo-se 45,7 mg de um sólido. Sua análise por CCD de sílica gel, utilizando-se *n*-hexano:EtOAc (7:3) como eluente, e os dados de RMN de ¹H indicaram a obtenção de uma mistura complexa, impossibilitando o isolamento.

9.2.29 Esterificação de **88** com $\text{CH}_3\text{I}/\text{K}_2\text{CO}_3$

A uma solução do derivado **88** (101,2 mg; 0,20 mmol) em acetona anidra (3,0 mL), adicionou-se K_2CO_3 (131,3 mg; 0,95 mmol) e CH_3I (3,0 mL). Manteve-se a mistura reacional sob agitação e atmosfera inerte, à temperatura ambiente, durante 12 horas. Ao final deste período, adicionou-se acetona, filtrou-se e eliminou-se o solvente em evaporador rotatório, obtendo-se 91 mg do produto **79** (rendimento de 88%).

9.2.30 Tentativas de epoxidação de **79** com $\text{H}_2\text{O}_2/\text{NaOH}$

A uma solução de **79** (68 mg; 0,13 mmol) em MeOH (0,5 mL), adicionou-se H_2O_2 33% (410 μL) e solução recém preparada de NaOH 6M (100 μL), gota a gota, durante 2 minutos. A reação foi mantida em banho de gelo e sob agitação durante 2 horas. A reação foi monitorada por CCD de sílica gel, empregando-se *n*-hexano:EtOAc (7:3) como eluente. Ao final deste período, acrescentou-se H_2O e extraiu-se com EtOAc. Lavou-se a fase orgânica com solução saturada de NaCl, secou-se em Na_2SO_4 anidro e eliminou-se o solvente em evaporador rotatório, resultando em 57,7 mg do produto de partida.

Foram realizadas ainda outras duas tentativas de epoxidação. Na primeira, empregaram-se as mesmas condições descritas acima, aumentando-se o tempo de reação para 4 horas. Na segunda, dobraram-se os volumes das soluções de H_2O_2 e NaOH, matendo-se o tempo da reação em 2 horas. Em ambas as tentativas não se obteve sucesso, obtendo-se o próprio produto de partida.

9.2.31 Tentativas de epoxidação de **79** com MCPBA

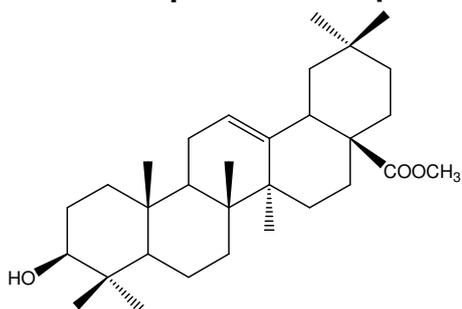
Na tentativa de epoxidar o produto **79**, este (44,3 mg; 0,09 mmol) foi solubilizado em CH_2Cl_2 (5,0 mL), seguindo-se adição de NaHCO_3 (147 mg; 1,75 mmol) e MCPBA 77% (102,78 mg; 0,45 mmol). Manteve-se a mistura sob agitação à temperatura ambiente, por 69 horas. Ao final deste período, acrescentou-se EtOAc ao meio e lavou-se sucessiva e exaustivamente com soluções aquosas saturadas de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$, NaHCO_3 e NaCl. A fase orgânica foi seca em Na_2SO_4 anidro e o solvente eliminado em evaporador rotatório, resultando na recuperação de 36,7 mg do produto de partida.

9.3 Transformações químicas do ácido oleanólico

9.3.1 Síntese do 3β-hidróxi-olean-12-en-28-oato de metila (97)

A uma suspensão de 100 mg (0,22 mmol) de ácido oleanólico (**42**) em acetona anidra (5,0 mL) adicionaram-se 121 mg de K_2CO_3 (0,88 mmol) e 0,5 mmol de CH_3I . A mistura reacional foi mantida sob agitação, em atmosfera inerte e temperatura ambiente, por 4 horas, sendo a evolução da reação monitorada por CCD de sílica gel (*n*-hexano:EtOAc 7:3), em intervalos de 30 minutos. Ao final do período, adicionou-se acetona, filtrou-se, secou-se a solução com Na_2SO_4 e eliminou-se o solvente em evaporador rotatório. Foram obtidos 91,9 mg de **97** (89% de rendimento). Este procedimento foi repetido outras 4 vezes com diferentes massas de **42**, com rendimentos entre 74 e 94%.

Dados físico-químicos do 3β-hidróxi-olean-12-en-28-oato de metila (97)



Sólido cristalino branco

F.M.: $C_{31}H_{50}O_3$

M.M.: $470,74 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$

HRMS calculado para $C_{31}H_{50}O_3 [M + Na]^+$: 493,3657; encontrado: 493,3635

IV ($\bar{\nu}_{\text{max}}$, cm^{-1}): 3331 (O-H); 2944 (C-H); 1726 (C=O); 1162 (C-O).

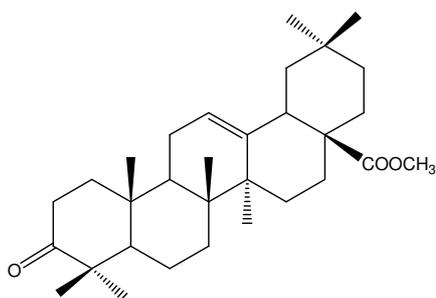
RMN de 1H (δ ; $CDCl_3$; 200 MHz): 5,30 (m, 1H, H-12); 3,63 (s, 3H, $COOCH_3$); 3,22 (dd, 1H, J 9,7 e 5,7 Hz, H-3); 2,86 (dd, 1H, J 13,5 e 3,7 Hz, H-18); 1,13 (s, 3H, C-27H₃); 0,99 (s, 3H, C-25H₃); 0,92 (s, 3H, C-23H₃); 0,90 (s, 3H, C-30H₃); 0,90 (s, 1H, C-29H₃); 0,78 (s, 1H, C-26H₃); 0,72 (s, 3H, C-24H₃).

RMN de ^{13}C (δ ; $CDCl_3$; 50 MHz): 178,32 (C-28); 143,77 (C-13); 122,38 (C-12); 78,94 (C-3); 52,27 (C-5); 51,60 ($COOCH_3$); 47,63 (C-9); 46,75 (C-17); 45,90 (C-19); 41,64 (C-14); 41,31 (C-18); 39,28 (C-8); 38,77 (C-4); 38,44 (C-1); 37,04 (C-10); 33,88 (C-21); 33,18 (C-29); 32,67 (C-7); 32,41 (C-22); 30,72 (C-20); 28,15 (C-23); 27,71 (C-15); 25,98 (C-27); 23,66 (C-30); 23,44 (C-16). 23,08 (C-11); 18,37 (C-6); 16,86 (C-26); 15,69 (C-24); 15,36 (C-25).

9.3.2 Síntese do 3-oxo-olean-12-en-28-oato de metila (98)

A uma solução de **97** (405 mg; 0,86 mmol) em CH₂Cl₂ anidro (15 mL) acrescentou-se PDC (610 mg; 2,83 mmol). Manteve-se a mistura reacional sob agitação e temperatura ambiente, durante 3 horas. Monitorou-se a evolução da reação por CCD de sílica gel, empregando-se *n*-hexano:EtOAc (8:2) como eluente. Ao final das 3 horas, evaporou-se o solvente em rotavapor, sendo o resíduo obtido cromatografado em coluna de sílica gel (dimensões da coluna empacotada: 30 × 315 mm), empregando-se CH₂Cl₂ e CH₂Cl₂:EtOAc (1:1) como eluentes. Obtiveram-se 387 mg de **98** (96% de rendimento). Este procedimento foi realizado outras 4 vezes, com o rendimento variando entre 89 e 96%.

Dados físico-químicos do 3-oxo-olean-12-en-28-oato de metila (98)



Sólido cristalino branco

F.M.: C₃₁H₄₄O₃

M.M.: 464,69 g.mol⁻¹

HRMS calculado para C₃₁H₄₄O₃ [M + Na]⁺: 487,3188; encontrado: 487,3437.

IV ($\bar{\nu}_{\max}$, cm⁻¹): 2988 (C-H); 1724 (C=O); 1702 (C=O).

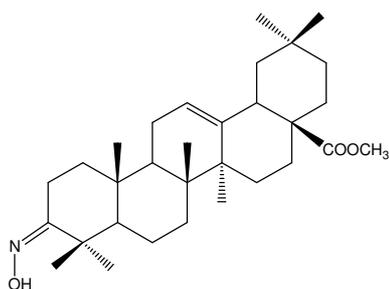
RMN de ¹H (δ; CDCl₃; 200 MHz): 5,30 (dd, 1H, *J* 7,1 e 3,5 Hz, H-12); 3,63 (s, 3H, COOCH₃); 2,87 (dd, 1H, *J* 14,0 e 3,8 Hz, H-18); 1,14 (s, 3H, C-27H₃); 1,08 (s, 3H, C-25H₃); 1,04 (s, 3H, C-23H₃); 1,04 (s, 3H, C-30H₃); 0,92 (s, 3H, C-29H₃); 0,90 (s, 1H, C-26H₃); 0,77 (s, 1H, C-24H₃).

RMN de ¹³C (δ; CDCl₃; 50 MHz): 217,71 (C-3); 178,24 (C-28); 143,88 (C-13); 122,15 (C-12); 55,34 (C-5); 51,59 (COOCH₃); 47,44 (C-4); 44,88 (C-9); 44,74 (C-17); 45,82 (C-19); 41,78 (C-14); 41,37 (C-18); 39,28 (C-8); 39,13 (C-1); 36,78 (C-2); 34,17 (C-21); 33,87 (C-29); 33,14 (C-22); 32,37 (C-7); 32,18 (C-20); 30,71 (C-15); 27,70 (C-23); 26,45 (C-27); 25,86 (C-11); 23,66 (C-16); 23,51 (C-30). 23,07 (C-11); 21,52 (C-24); 19,61 (C-6); 16,78 (C-26); 15,02 (C-25).

9.3.3 Síntese do 3-hidroxi-oxima-olean-12-en-28-oato de metila (99)

A uma solução de **98** (100 mg; 0,21 mmol) em EtOH absoluto (10 mL) acrescentou-se piridina anidra (0,1 mL) e $\text{NH}_2\text{OH}\cdot\text{HCl}$ (25 mg; 0,36 mmol). Manteve-se o meio reacional sob agitação magnética e refluxo (95–100°C), por 4 horas. Monitorou-se a evolução da reação por CCD de sílica gel, empregando-se *n*-hexano:EtOAc (8:2) como eluente. Após este período, acrescentou-se EtOAc ao meio, lavou-se com solução aquosa saturada de NaCl, secou-se a fase orgânica em Na_2SO_4 anidro. Após eliminar o solvente em evaporador rotatório foram obtidos 97,3 mg de **99** (94%). A reação foi realizada mais uma vez, obtendo-se um rendimento de 89%.

Dados físico-químicos do 3-hidroxi-oxima-olean-12-en-28-oato de metila (99)



Sólido cristalino branco

F.M.: $\text{C}_{31}\text{H}_{50}\text{O}_3\text{N}$

M.M.: 484,74 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$

HRMS calculado para $\text{C}_{31}\text{H}_{50}\text{O}_3\text{N}$ $[\text{M}]^+$: 484,3790; encontrado: 484,3785.

IV ($\bar{\nu}_{\text{max}}$, cm^{-1}): 3661 (O-H); 2926 (C-H); 1726 (C=O); 1163 (C-O), 940 (N-O).

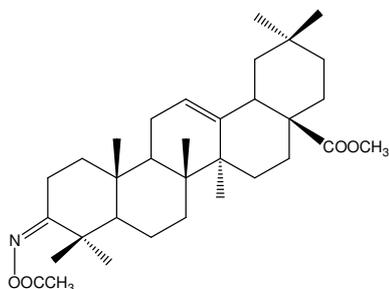
RMN de ^1H (δ ; CDCl_3 ; 200 MHz): 5,25 (m, 1H, H-12); 3,61 (s, 3H, COOCH_3); 3,08 (d, 2H, J 3,3 Hz, H-2); 2,86 (dd, 1H, J 13 e 4,5 Hz, H-18); 1,14 (s, 3H, C-27 H_3); 1,09 (s, 3H, C-25 H_3); 1,04 (s, 3H, C-23 H_3); 1,01 (s, 3H, C-30 H_3); 0,90 (s, 3H, C-29 H_3); 0,87 (s, 1H, C-26 H_3); 0,74 (s, 1H, C-24 H_3).

RMN de ^{13}C (δ ; CDCl_3 ; 50 MHz): 178,32 (C-28); 166,82 (C-3); 143,85 (C-13); 122,27 (C-12); 55,93 (C-5); 51,60 (COOCH_3); 47,22 (C-9); 45,83 (C-19); 41,75 (C-14); 41,34 (C-18); 40,42 (C-4); 39,36 (C-8); 38,55 (C-1); 37,15 (C-10); 33,88 (C-21); 33,18 (C-29); 32,41 (C-7); 32,41 (C-22); 32,41 (C-2); 30,72 (C-20); 27,71 (C-15); 27,12 (C-23); 25,87 (C-27); 23,70 (C-30); 23,52 (C-16). 23,08 (C-11); 19,03 (C-6); 17,12 (C-26); 16,90 (C-24); 14,95 (C-25).

9.3.4 Acetilação de 99

Em um balão de fundo redondo (25 mL) contendo 40,2 mg de **99** (0,08 mmol) adicionaram-se 0,5 ml de piridina e 0,5 ml de anidrido acético. A mistura reacional foi deixada em repouso à temperatura ambiente, sob abrigo da luz, por 24 horas. A evolução da reação foi monitorado por CCD de sílica gel (*n*-hexano:EtOAc 9:1). Ao término deste período, adicionou-se gelo moído e manteve-se sob agitação durante 10 minutos. Extraíu-se com EtOAc, lavou-se com HCl 2N e com solução aquosa saturada de NaCl. Secou-se a fase orgânica em Na₂SO₄ e eliminou-se o solvente em evaporador rotatório, sendo obtidos 37 mg de **100** (rendimento de 85%).

Dados físico-químicos do 3-acetóxi-imino-olean-12-en-28-oato de metila (**100**)



Sólido cristalino branco.

F.M.: C₃₃H₅₂O₄N.

M.M.: 526,789g.mol⁻¹

HRMS calculado para C₃₁H₅₀O₃N [M + Na]⁺: 549,3794; encontrado: 549,3713.

IV ($\bar{\nu}_{\max}$, cm⁻¹): 2929 (C-H); 1726 (C=O); 1654 (C=N); 1163 (C-O).

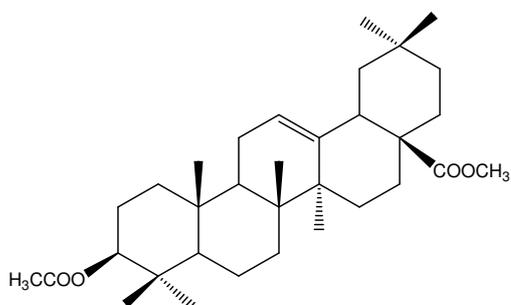
RMN de ¹H (δ; CDCl₃; 200 MHz): 5,27 (dd, 1H, *J* 3,8 e 7,1 Hz, H-12); 3,61 (s, 3H, COOCH₃); 2,97 (dd, H, *J* 4,0 e 5,3 Hz, H-2b); 2,84 (dd, 1H, *J* 4,0 e 5,5 Hz, H-2a); 2,17 (s, 3H, OCOCH₃); 1,24 (s, 3H, C-27H₃); 1,11 (s, 3H, C-25H₃); 1,10 (s, 3H, C-23H₃); 1,01 (s, 3H, C-30H₃); 0,91 (s, 3H, C-29H₃); 0,88 (s, 1H, C-26H₃); 0,75 (s, 1H, C-24H₃).

RMN de ¹³C (δ; CDCl₃; 50 MHz): 178,28 (C-28); 174,72 (OCOCH₃); 169,87 (C-3); 143,99 (C-13); 122,09 (C-12); 55,86 (C-5); 51,60 (COOCH₃); 47,19 (C-9); 46,75 (C-17); 45,83 (C-19); 41,75 (C-14); 41,38 (C-18); 39,32 (C-8); 39,32 (C-4); 38,73 (C-1); 37,01 (C-10); 33,88 (C-21); 33,15 (C-29); 32,37 (C-7); 32,37 (C-22); 32,37 (C-2); 30,76 (C-20); 27,71 (C-15); 27,08 (C-23); 25,87 (C-27); 23,66 (C-30); 23,52 (C-16); 23,15 (C-11); 20,10 (OCOCH₃); 19,47 (C-26); 19,00 (C-6); 16,86 (C-24); 15,14 (C-25).

9.3.5 Síntese do 3-acetóxi-olean-12-en-28-oato de metila (101)

Em um balão de fundo redondo contendo 200 mg de **97** (0,44 mmol) adicionaram-se 1,0 ml de piridina e 1,0 ml de anidrido acético. A mistura reacional foi deixada em repouso à temperatura ambiente, sob abrigo da luz, por 24 horas. A evolução da reação foi monitorada por CCD de sílica gel (*n*-hexano:EtOAc 8:2). Adicionou-se gelo moído e manteve-se sob agitação durante 10 minutos. Extraíu-se o meio com EtOAc, lavou-se com HCl 2N e com solução aquosa saturada de NaCl. Secou-se a fase orgânica em Na₂SO₄ anidro e eliminou-se o solvente em rotavapor, resultando em 180 mg de **101** (rendimento de 83%).

Dados físico-químicos do 3-acetóxi-olean-12-en-28-oato de metila (101)



Sólido cristalino branco

F.M.: C₃₃H₅₂O₄.

M.M.: 512,77 g.mol⁻¹

HRMS calculado para C₃₃H₅₂O₄ [M + Na]⁺: 535,3763; encontrado: 535,3721.

IV ($\bar{\nu}_{\max}$, cm⁻¹): 2938 (C-H); 1724 (C=O); 1287 (C-O).

RMN de ¹H (δ; CDCl₃; 200 MHz): 5,26 (dd, 1H, *J* 7,2 e 3,6 Hz, H-12); 4,48 (m, 1H, H-3); 3,61 (s, 3H, COOCH₃); 2,85 (dd, 1H, *J* 13,3 e 4,3 Hz, H-18); 2,04 (s, 3H OCOCH₃); 1,12 (s, 3H, C-27H₃); 0,93 (s, 3H, C-25H₃); 0,92 (s, 3H, C-23H₃); 0,89 (s, 3H, C-30H₃); 0,85 (s, 3H, C-29H₃); 0,84 (s, 1H, C-26H₃); 0,71 (s, 1H, C-24H₃).

RMN de ¹³C (δ; CDCl₃; 50 MHz): 178,29 (C-28); 171,01 (OCOCH₃); 143,81 (C-13); 122,31 (C-12); 80,93 (C-3); 55,31 (C-5); 51,56 (COOCH₃); 47,55 (C-9); 44,75 (C-17); 45,86 (C-19); 41,64 (C-14); 41,31 (C-18); 39,28 (C-8); 38,11 (C-1); 37,70 (C-4); 36,93 (C-10); 33,88 (C-21); 33,15 (C-29); 32,63 (C-7); 32,41 (C-22); 30,72 (C-20); 28,07 (C-23); 27,71 (C-2); 27,71 (C-15); 25,91 (C-27); 23,66 (C-30); 23,55 (C-16). 23,44 (C-11); 21,35 (OCOCH₃); 18,22 (C-6); 16,86 (C-26); 16,75 (C-24); 15,39 (C-25).

9.4 Ensaios Biológicos

9.4.1 Avaliação da atividade citotóxica das substâncias obtidas a partir do ácido ursólico

O ácido ursólico (31) e os derivados 80, 83, 84, 85, 86, 89, 92 e 95 tiveram sua atividade citotóxica avaliada em linhagens de células tumorais humanas. Os ensaios foram realizados na empresa BIOMAR S.A., sediada em Madrid, Espanha, em colaboração com o Departamento de Química Farmacêutica da Faculdade de Farmácia da Universidade de Salamanca, Salamanca, Espanha. A metodologia empregada foi aquela descrita por Castro et al. (2004) e Skehan et al. (1990).

9.4.2 Linhagens celulares empregadas

As células tumorais empregadas nos experimentos foram adquiridas de ATCC (American Type Culture Collection). Utilizaram-se linhagens celulares humanas de carcinoma de pulmão A-549 (ATCC # CCL-185), adenocarcinoma colo-retal HT-29 (ATCC # HTB-38) e adenocarcinoma de mama MDA-MB-231 (ATCC # HTB-26).

9.4.3 Culturas celulares

As linhagens celulares foram multiplicadas em meio DMEM (meio Dulbecco's Eagle's modificado) suplementado com 10% de plasma fetal bovino, penicilina e streptomina (100 U/mL), em ambiente com 5% de CO₂, a 37°C. As culturas foram incubadas em triplicata por 72 horas na presença (grupos experimento) ou ausência (grupo controle) dos compostos ensaiados.

9.4.4 Ensaios de Citotoxicidade

O ensaio colorimétrico empregando sulforodamina B (SRB) foi adaptado para mensurar quantitativamente o crescimento e a viabilidade celular, como descrito por Skehan et al. (1990).

As suspensões celulares foram distribuídas em microplacas de 96 cavidades contendo 5×10^3 células/cavidade. As culturas foram incubadas em atmosfera úmida, por 24 horas e uma placa de cada linhagem celular foi corada e empregada como referência para o número de células do grupo controle no tempo zero. As demais

células foram tratadas com veículo (grupo controle) ou com os compostos ensaiados (grupos experimento) nas concentrações de 10 a 0,0026 µg/mL e em seguida incubadas por 72 horas. A citotoxicidade foi evoluída segundo análise colorimétrica e comparação com o controle.

Para mensurar o crescimento celular, as células foram lavadas por duas vezes com tampão fosfato, fixadas por 15 minutos em solução de glutaraldeído 1% e novamente lavadas em tampão fosfato. Em seguida, foram mantidas em solução SRB 0,4%, em temperatura ambiente. Após 30 min, as células foram lavadas com solução de ácido acético 1% e a SRB extraída com 10 mM de trizma. A absorbância foi mensurada a 490 nm. As células sobreviventes foram expressas como porcentagem do crescimento das células do grupo controle, onde CI_{50} = concentração que provoca 50% de inibição do crescimento celular.

9.4.5 Avaliação da atividade antiplasmódica dos derivados obtidos

Os ensaios foram realizados pela Profa. Dra. Maria Fâni Dolabela, Faculdade de Farmácia, UFPA e pelo Dr. Fernando de Pilla Varoti, Laboratório de Fitoquímica, FAFAR, UFMG.

A atividade antiplasmódica *in vitro* foi avaliada para o ácido ursólico **31** e para os derivados sintéticos **79**, **80**, **83**, **84**, **86**, **89**, **90**, **91**, **92** e **95**. Foram preparadas soluções estoque em DMSO para todas as substâncias ensaiadas (10 mg/mL); estas foram diluídas para a concentração de 0,002% e estocadas a -20°C.

Para a realização dos ensaios empregou-se a linhagem de *Plasmodium falciparum*. Os parasitas foram cultivados em eritrócitos humanos, suspensos em meio RPMI suplementado com 10% de plasma humano de acordo com Trager e Jensen (1976). A sincronização dos parasitas foi realizada por tratamento em sorbitol (LAMBROS et al., 1979) e a parasitemia foi determinada microscopicamente em esfregaços corados com Giemsa.

A atividade antimalárica dos compostos ensaiados foi determinada com a adição de [³H]-hipoxantina como descrito por Andrade et al. (2007) e Desjardins et al. (1979). Empregou-se cloroquina como controle. Os valores de CI_{50} foram estimados por comparação com o grupo controle e interpolação linear (HUBER et al., 1993). Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

10 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A massa disponível dos ácidos ursólico e oleanólico (item 4.6.1) e o amplo espectro de atividades biológicas já descritas para ambos os triterpenos e seus derivados, apresentada na revisão da literatura, motivou o emprego dessas substâncias como material de partida para transformações químicas no presente trabalho, visando obter novas substâncias bioativas. Alguns dos derivados obtidos foram posteriormente avaliados em ensaios *in vitro* de atividade citotóxica e antiplasmódica.

Todos os derivados sintetizados (Figuras 39, 65 e 73) tiveram como material de partida os ácidos ursólico ou oleanólico e, portanto, os dados espectrométricos obtidos para esses produtos se assemelham bastante àqueles dos precursores (Itens 5.2.1.2 e 5.2.1.3). Dessa forma, visando simplificar a apresentação dos dados espectrométricos de cada produto obtido, a discussão dos espectros será focada nas características que possibilitaram definir inequivocamente as transformações químicas observadas e as diferenças em relação aos produtos de partida.

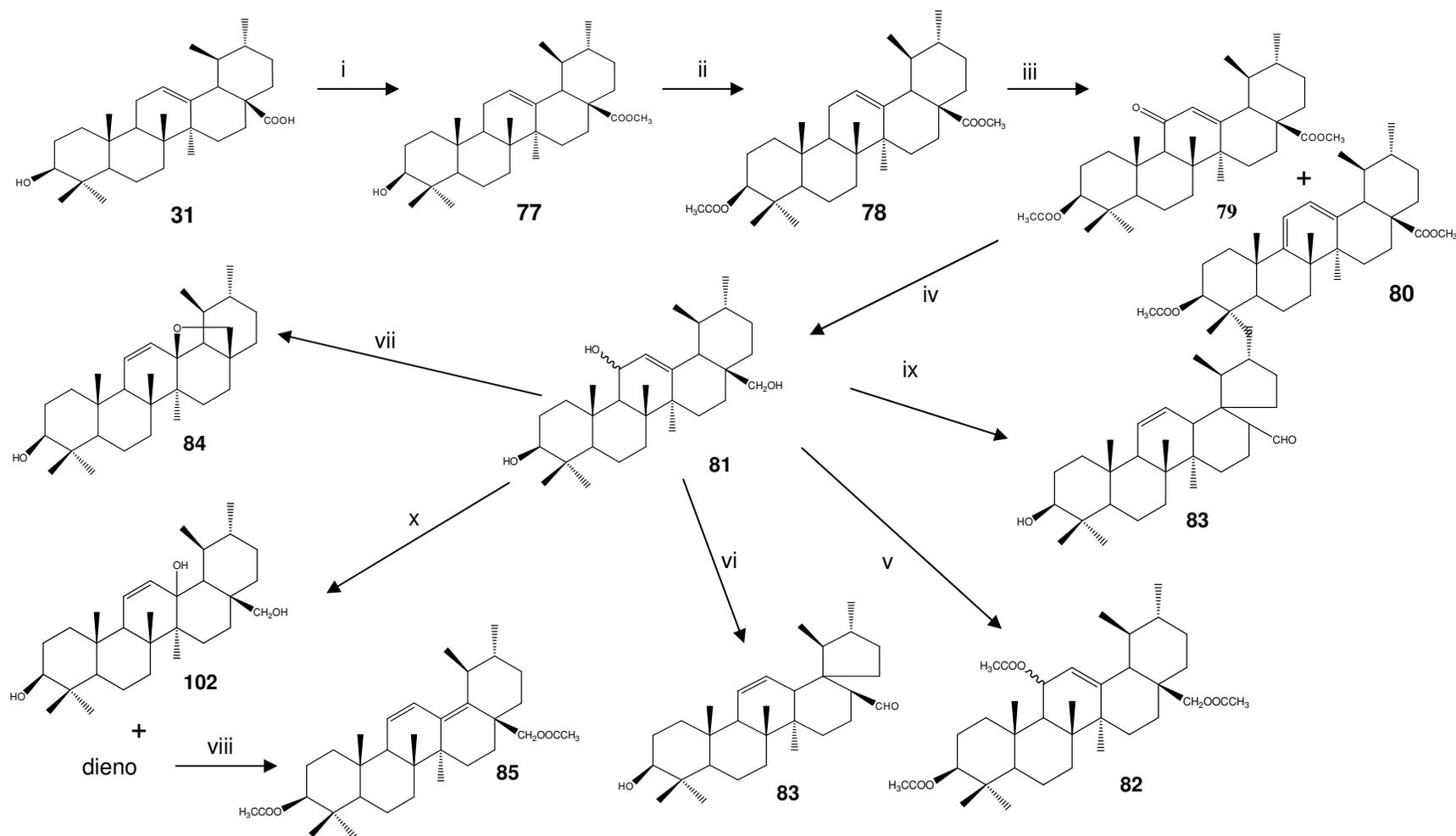


Figura 39 - Esquema de síntese para a obtenção dos derivados do ácido ursólico. i) K_2CO_3/CH_3I , t amb, 90%; ii) piridina/anidrido acético, t amb, 89%; iii) $NaClO_2/t-BuOOH$, 100 °C, 66% (79), 9% (80); iv) $LiAlH_4$, t amb, 88%; v) piridina/anidrido acético, t amb, 37%; vi) BF_3-Et_2O , t amb, 11%; vii) BF_3-Et_2O , -78 °C, 39%; viii) piridina/anidrido acético, t amb, 17%; ix) HI 57%, t amb, 47%; x) H^+ , t. amb.

10.1 Transformações químicas do ácido ursólico

10.1.1 Síntese do 3 β -hidróxi-urs-12-en-28-oato de metila (77)

O tratamento de **31** com $\text{CH}_3\text{I}/\text{K}_2\text{CO}_3$, em presença de acetona ou dimetilformamida em temperatura ambiente, conduziu à formação do derivado esterificado **77** (Figura 39). A reação foi realizada segundo metodologia descrita por Zhu et al. (2004), na qual a base K_2CO_3 promove a ionização do hidrogênio ácido e o ânion carboxilato formado atua como nucleófilo na reação de substituição via $\text{S}_{\text{N}}2$.

A acetona utilizada como solvente nas primeiras reações foi substituída por dimetilformamida em algumas reações posteriores, para garantir a total solubilização do ácido ursólico; porém, não se obteve aumento expressivo do rendimento da reação, possivelmente devido às sucessivas lavagens para eliminação da dimetilformamida (rendimentos de 75 a 90% em acetona e 85 a 90% em dimetilformamida). Optou-se, então, pelo uso da acetona como solvente da reação.

A identificação de **77** como produto da reação foi confirmada pelo aparecimento das bandas de deformação axial de $\text{C}=\text{O}$ em 1718 cm^{-1} e $\text{C}-\text{O}$ entre 1230 e 1028 cm^{-1} . A observação da banda de deformação axial de OH livre em 3525 cm^{-1} sugeriu a presença da hidroxila em C-3. O espectro de RMN de ^1H obtido para **77** apresentou como principal diferença em relação ao ácido ursólico a presença do simpleto em δ 3,61, atribuído aos hidrogênios do grupo metoxila (vide apêndice, pag. 275). No espectro de RMN de ^{13}C (vide apêndice, pag. 276), a presença dos sinais em δ 51,51 e δ 178,09, atribuídos respectivamente aos carbonos dos grupos metoxila e carbonila, confirmaram a formação do derivado esterificado, e estão de acordo com os dados relatados por Zaprutko et al. (2004).

10.1.2 Síntese de 3 β -acetóxi-urs-12-en-28-oato de metila (78)

A introdução do grupo acetila pelo tratamento com anidrido acético em piridina é um método rotineiro em síntese orgânica (GARCÍA-GRANADOS et al., 2004). A obtenção de **78** (Figura 39) foi confirmada pelo espectro de IV onde se observou o desaparecimento da banda de deformação de OH livre em 3525 cm^{-1} e o aparecimento das bandas de deformação axial de $\text{C}=\text{O}$ e $\text{C}-\text{O}$ de éster em 1726

cm^{-1} e 1229 cm^{-1} , respectivamente. No espectro de RMN de ^1H observou-se o deslocamento do sinal em δ 3,22, atribuído a H-3 no ácido ursólico, para δ 4,46 em **78**, devido à desproteção induzida pela carbonila (vide apêndice, pag. 277). A formação do produto também foi confirmada a partir dos dados obtidos do espectro de RMN de ^{13}C (vide apêndice, pag. 278), no qual a presença dos sinais em δ 170,90 e 21,20 foram atribuídos, respectivamente, aos carbonos carbonílico e metílico do grupo acetato (HONDA et al., 1997).

10.1.3 Síntese de 3 β -acetóxi-11-oxo-urs-12-en-28-oato de metila (**79**) e 3 β -acetóxi-urs-9,12-dien-28-oato de metila (**80**)

O recente interesse no uso de NaClO_2 em oxidações alílicas é devido, entre outras razões, ao seu baixo custo e às pequenas quantidades utilizadas, comparado a outros agentes oxidantes (SILVESTRE; SALVADOR, 2007). O mecanismo da reação envolve a formação de radicais livres. Segundo Geng et al. (2005), o aquecimento de NaClO_2 leva à formação de radicais $\text{ClO}_2\cdot$ e estes iniciam o processo através da clivagem homolítica do *t*-BuOOH, originando radicais *t*-BuOO \cdot extremamente reativos, os quais abstraem o hidrogênio alílico, levando à formação do radical olefina que é posteriormente oxidado à enona correspondente (Figura 40) (MARWAH et al., 2004; SILVESTRE; SALVADOR, 2007).

O perfil cromatográfico em CCD de sílica gel do produto evidenciou a presença da mancha característica do produto principal e de uma mancha secundária, com valor de *R_f* superior. Uma amostra da mistura (110,2 mg) foi, então, submetida à cromatografia em coluna de sílica gel, resultando na obtenção de dois sólidos, um deles correspondente ao derivado **79** obtido como produto principal da reação, e outro (10,1 mg) cuja elucidação estrutural possibilitou identificar o dieno homoanular **80**.

A formação do derivado **79** foi evidenciada pela análise de seu espectro no IV onde se observou a presença de banda de deformação axial de C=O de cetona α,β -insaturada em 1654 cm^{-1} , inexistente em **78**. No espectro de RMN de ^{13}C dessa substância foram observados sinais em δ 199,75, δ 130,65 e δ 162,96, atribuídos ao carbono carbonílico C-11 e aos carbonos olefínicos C-12 e C-13, respectivamente. A formação do derivado **79** também foi confirmada por dados do espectro de RMN de

^1H (vide apêndice, pag. 279), no qual, em comparação com o espectro do precursor **78**, a principal diferença se deu na multiplicidade do sinal obtido para o hidrogênio olefínico H-12. Pôde-se observar o desaparecimento do tripleto em δ 5,18, presente no espectro do ácido ursólico e o surgimento do simpleto em δ 5,60, condizente com a presença de carbonila cetônica em C-11 e com dados relatados na literatura para o derivado estruturalmente relacionado do ácido oleanólico (ZAPRUTKO et al., 2004).

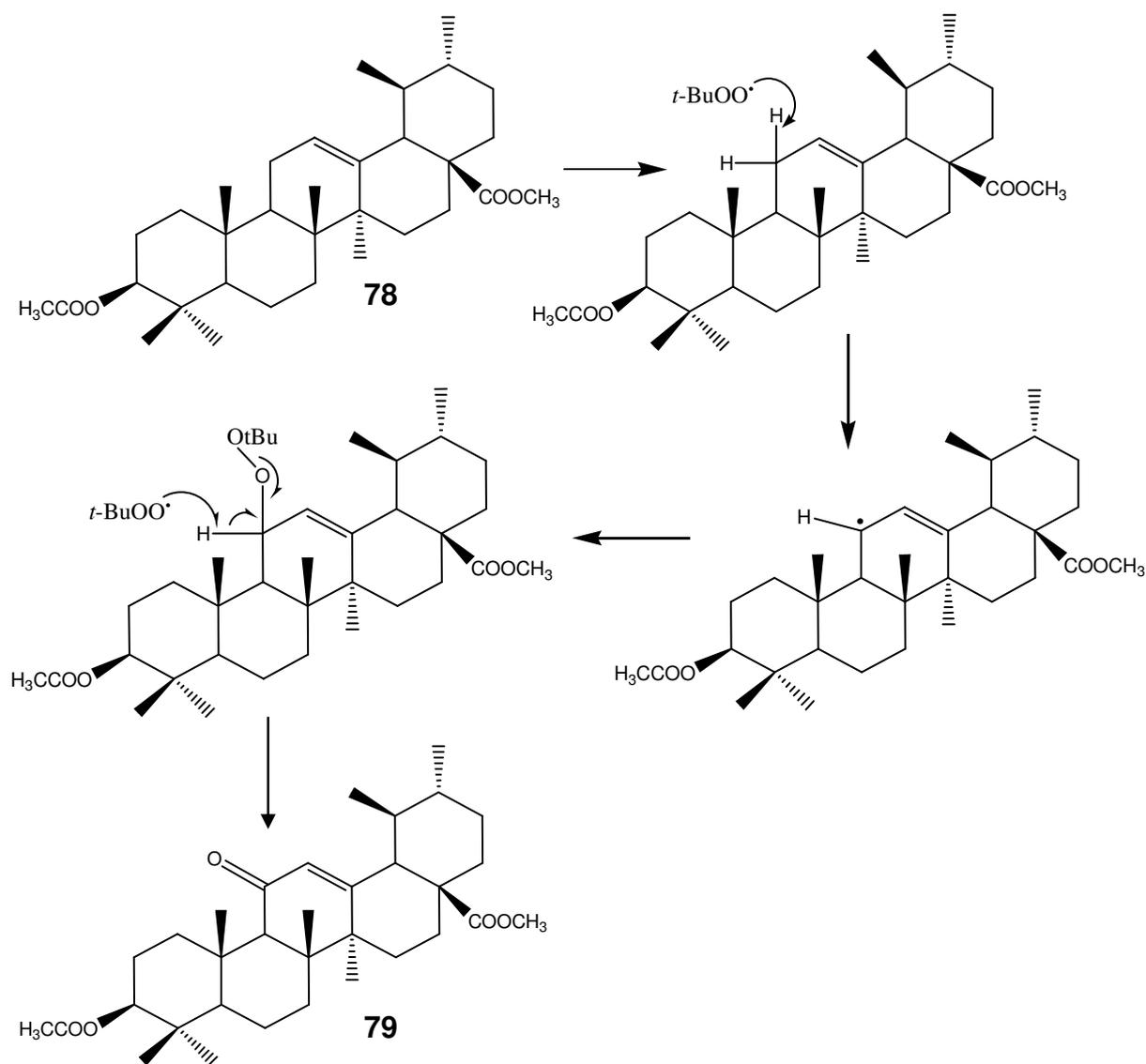
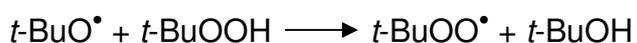


Figura 40: Mecanismo proposto para a formação de **79** (MARWAH et al., 2004).

No espectro de RMN de ^1H obtido para **80** (vide apêndice, pag. 281), os dupletos em δ 5,58 e 5,51, com constante de acoplamento de 6,0 Hz, foram atribuídos aos hidrogênios olefínicos H-11 e H-12, respectivamente. No espectro de RMN de ^{13}C (vide apêndice), os valores de deslocamento químico encontrados para C-9 (δ 154,54), C-11 (δ 115,55), C-12 (δ 123,30) e C-13 (δ 139,44) são condizentes com os deslocamentos esperados para carbonos de um sistema olefínico conjugado (GARCIA-GRANADOS et al., 2004).

A análise do mapa de contornos HMQC (Figura 41, pag. 184) apontou as correlações entre os carbonos e hidrogênios C-12/H-12 (δ 123,30/5,51), C-11/H-11 (δ 115,55/5,58), C-3/H-3 (δ 80,63/4,51), C-18/H-18 (δ 51,23/2,35), $\text{COO}\underline{\text{C}}\text{H}_3/\text{COO}\underline{\text{C}}\text{H}_3$ (δ 51,67/3,62) e $\text{OCO}\underline{\text{C}}\text{H}_3/\text{OCO}\underline{\text{C}}\text{H}_3$ (δ 21,35/2,05). Os carbonos olefínicos não hidrogenados não apresentaram manchas de correlação, confirmando as atribuições efetuadas nos espectros monodimensionais.

Entre as correlações heteronucleares observadas no mapa de contornos HMBC (Figura 42, pag. 185), as correlações entre C-12/H-18 (δ 123,30/2,35), C-13/H-18 (δ 139,44/2,35), C-13/H-11 (δ 139,44/5,58) e C-9/H-12 (δ 154,54/5,51), permitiram confirmar a obtenção do dieno homoanular e, conseqüentemente a localização das duplas entre os carbonos C-9/C-11 e C12/C-13 do anel C.

A massa molecular obtida por espectrometria de massas de alta resolução permitiu confirmar a estrutura proposta para o derivado inédito **80**.

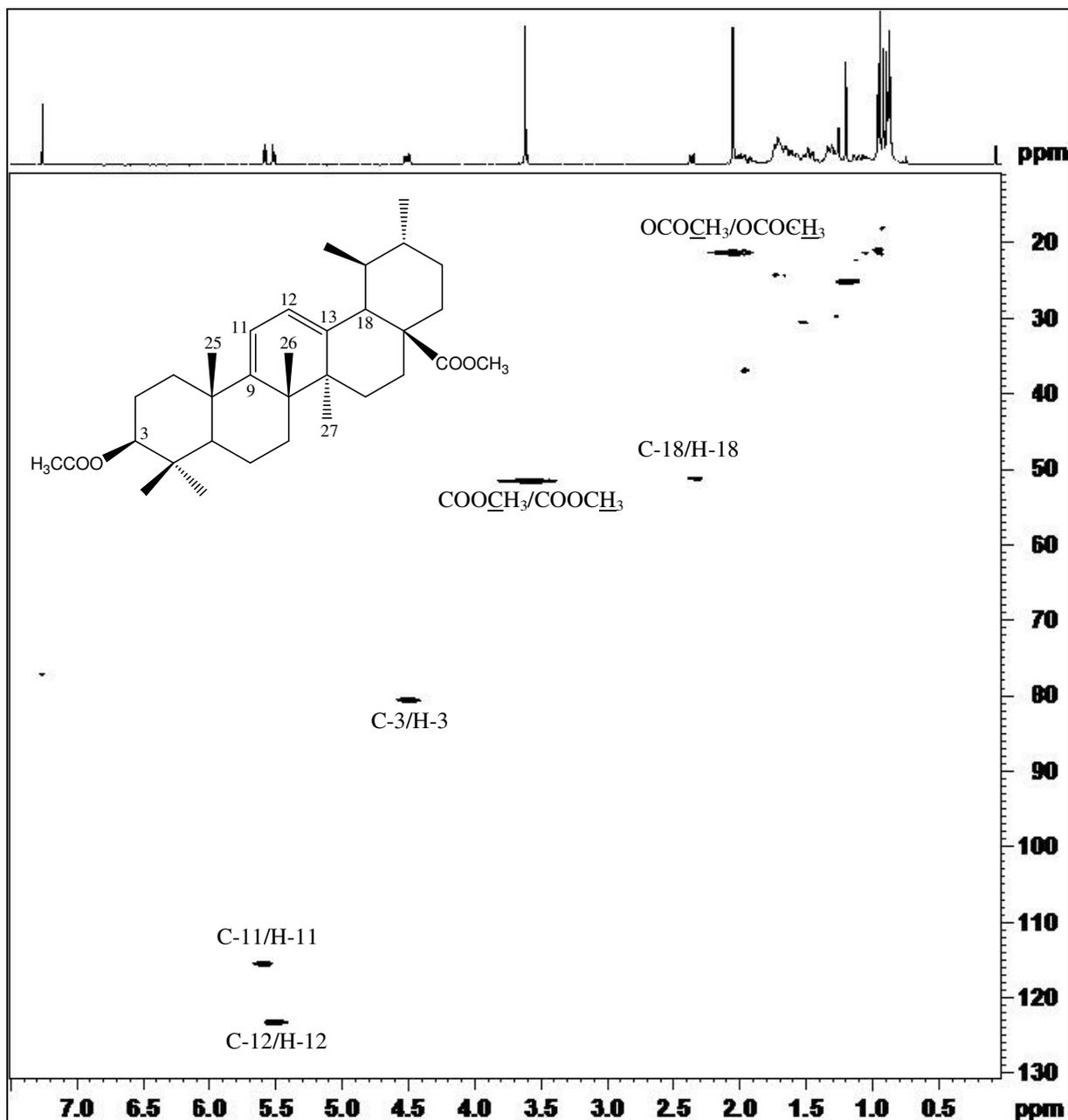


Figura 41 - Mapa de contornos HMQC obtido para 80 (100 MHz, CDCl₃).

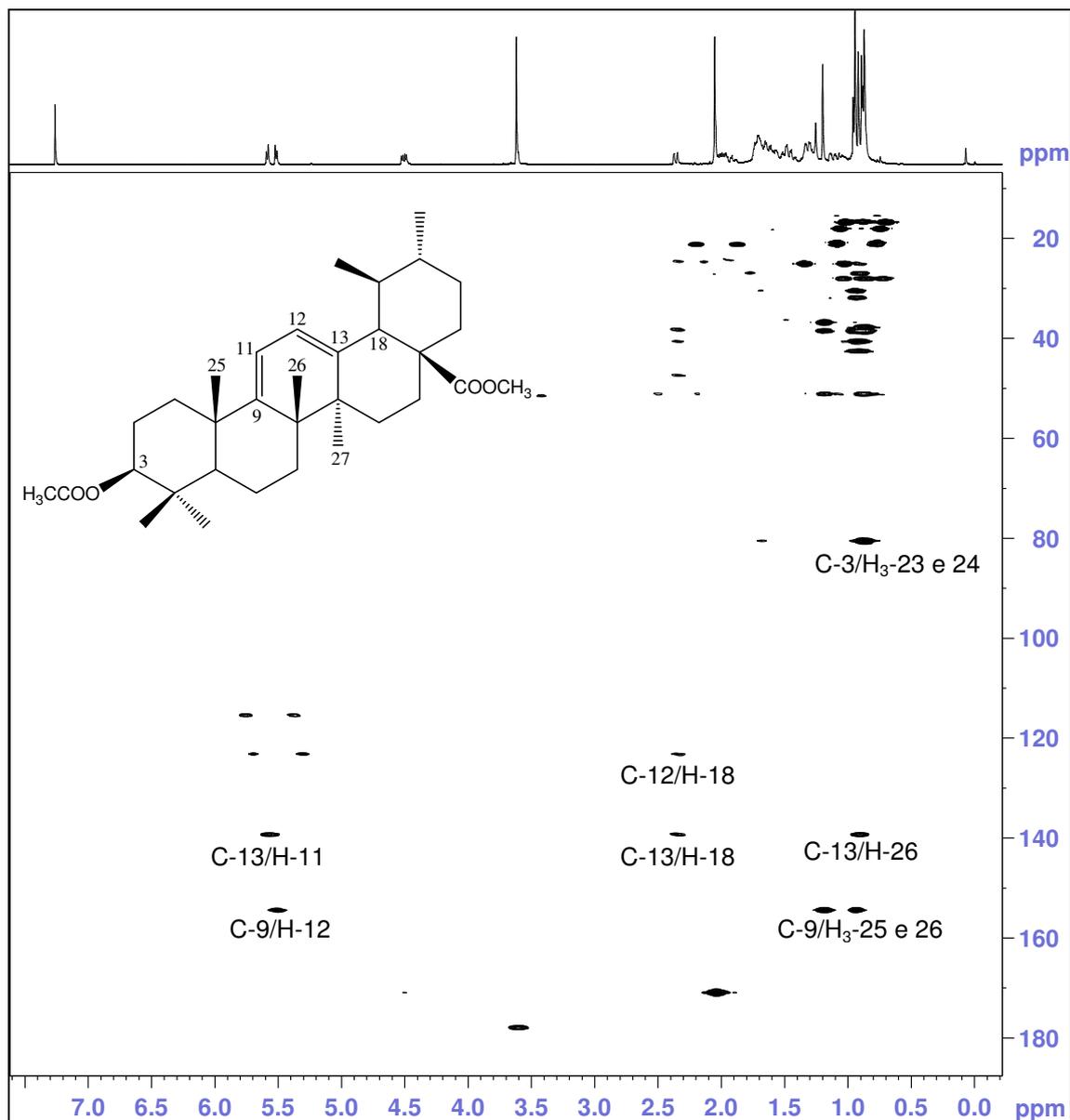


Figura 42 – Mapa de contornos HMBC obtido para 80 (100 MHz, CDCl_3).

10.1.4 Síntese de 3 β ,11,28-triidroxi-urs-12-eno (81)

Na tentativa de se obter o álcool alílico a partir da cetona **79**, foram avaliados vários reagentes e condições de reação distintas, tais como CeCl_3 e NaBH_4 , NaBH_4 em microondas, GuHCl e NaBH_4 (HEYDARI et al., 2007; MATSUMOTO et al., 1996; VARMA; SAINI, 1997). Como todas as condições ensaiadas foram insatisfatórias, optou-se pelo emprego de LiAlH_4 como agente redutor.

O LiAlH_4 é um poderoso agente doador de hidretos, reduzindo rapidamente ésteres, ácidos, nitrilas, amidas, aldeídos e cetonas. O mecanismo da redução

envolve a transferência nucleofílica do hidreto à carbonila correspondente, sendo possível a transferência dos quatro hidretos (CAREY; SUNDBERG, 1993). Os produtos de redução são liberados por hidrólise do alcóxido de alumínio ao final da reação. O LiAlH_4 reage muito rapidamente com solventes próticos para captar hidrogênio; portanto, as reduções com este reagente devem ser feitas em solventes apróticos como éter ou tetrahidrofurano. A Figura 43 ilustra o mecanismo para a obtenção do derivado **81**, segundo proposto por Carey e Sundberg (1993).

A obtenção do derivado **81** como produto de redução de **79** foi sugerida pela presença das bandas de deformação axial de OH livre em 3676 cm^{-1} e deformação axial de C-O de alcoóis em 1045 cm^{-1} . A ausência de bandas na região de absorção de carbonila (1870 a 1500 cm^{-1}) indicou a redução tanto da cetona quanto dos ésteres.

A redução dos três grupos também foi indicada pelos dados do espectro de RMN de ^1H de **81**, obtido imediatamente após a elaboração da reação. O desaparecimento do simpleto em δ 5,60, atribuído a H-12 no precursor **79**, e a presença do duplete em δ 5,22 e do duplete largo em δ 4,35 ($J = 4,2\text{ Hz}$) atribuídos, respectivamente, aos hidrogênios H-12 e H-11 confirmaram a obtenção do derivado reduzido, bem como a presença do hidrogênio carbinólico H-3 (δ 3,19), com valor de deslocamento químico semelhante àqueles descritos para outros derivados hidroxilados (TAKEOKA et al., 2000; TKACHEV et al., 1994). Por fim, o multiplete centrado em δ 3,26 e δ 3,17, referentes aos hidrogênios metilênicos diastereoisotópicos H-28a e H-28b, com constante de acoplamento de 10 Hz, confirmaram a redução total do derivado **79** (Figura 44).

A presença de um pequeno duplete próximo ao sinal atribuído a H-12 e a possibilidade de formação de mistura de isômeros em reduções empregando LiAlH_4 , sugeriram a obtenção de uma mistura de epímeros em C11.

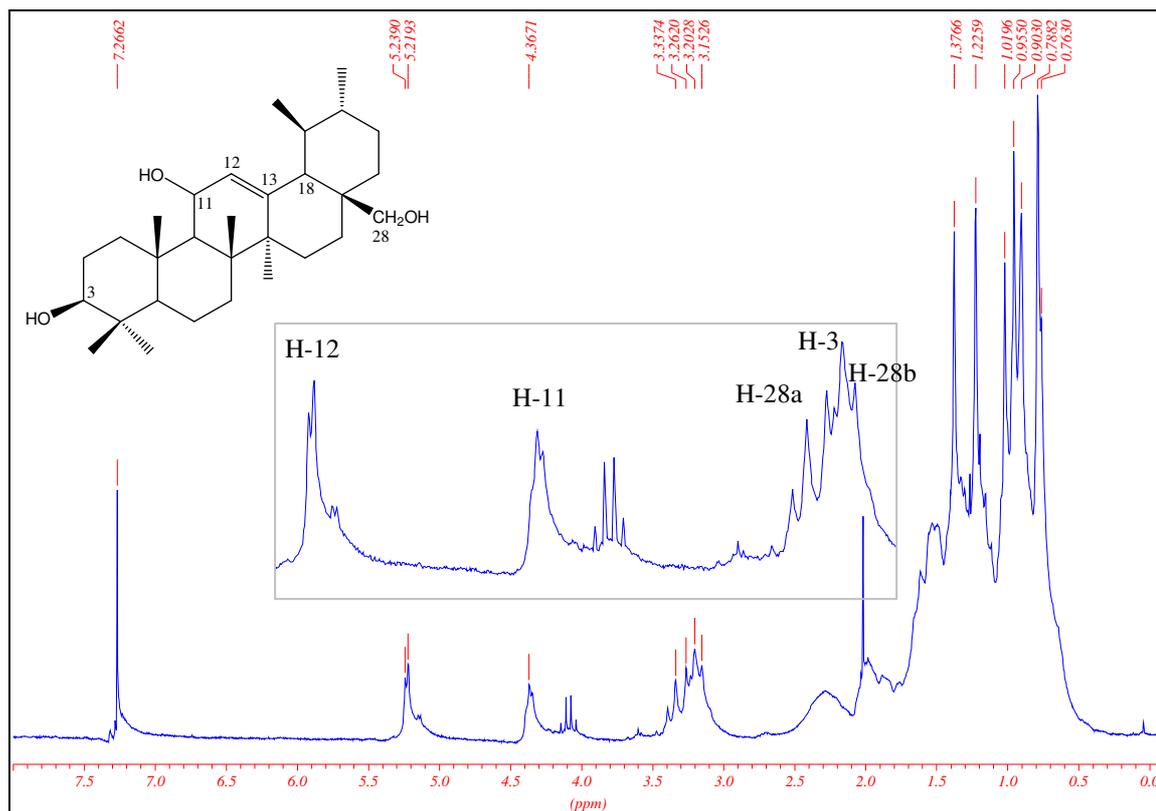


Figura 44 - Espectro de RMN de ¹H obtido para o derivado **81** (200 MHz, CDCl₃).

Conforme mencionado anteriormente, o derivado **81** foi caracterizado pelo espectro de RMN de ¹H, obtido imediatamente após a elaboração da reação. O espectro de RMN de ¹³C do produto foi obtido 10 dias após a síntese e os dados obtidos não foram compatíveis com o álcool alílico previamente identificado. Foi então obtido o espectro de RMN de ¹³C para outra amostra do derivado **81** que estava armazenada há 5 dias e ambos os espectros se mostraram idênticos. A análise dos espectros sugeriu que, durante o armazenamento, ocorreu a isomerização do álcool alílico **81** na presença de traços de ácido clorídrico oriundos do clorofórmio deuterado, empregado como solvente para dissolução da amostra para obtenção dos espectros de RMN, resultando no álcool terciário **102** (Figura 45). Foram obtidos espectros de RMN de ¹H para estas amostras do derivado **81** armazenadas em tempos variados e estes se mostraram distintos daqueles obtidos logo após a elaboração da reação. Os dados de RMN de ¹H foram condizentes com a obtenção do álcool terciário **102**.

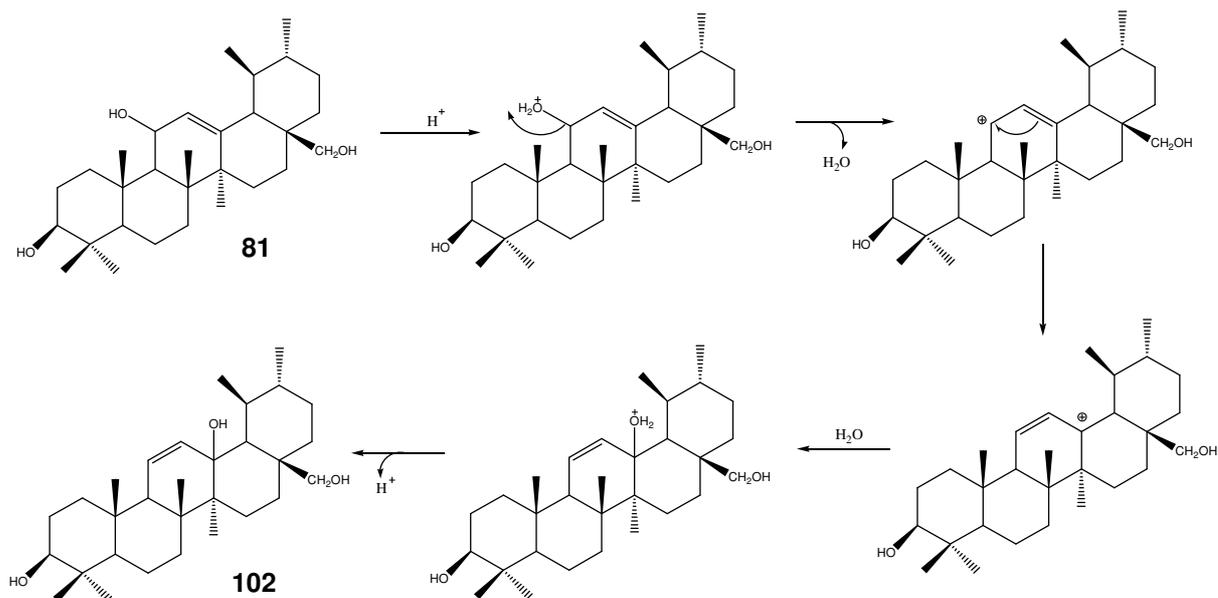


Figura 45 - Mecanismo proposto para a isomerização do álcool alílico 81.

O álcool terciário **102** originário da isomerização do derivado **81** foi caracterizado por dados espectrais de RMN. Assim, no espectro de RMN de 1H (Figura 46), o duplete centrado em δ 5,74 ($J = 10,3$ Hz) foi atribuído ao hidrogênio H-12 em acoplamento com H-11. A presença do duplete duplo centrado em δ 5,48 ($J = 10,3$ e $3,3$ Hz), atribuído ao hidrogênio H-11 em acoplamento com os hidrogênios H-12 e H-9, indicou a isomerização da ligação dupla de C-12/C-13 para C-11/C-12. A multiplicidade e o valor de deslocamento químico encontrados para H-9 (d, δ 1,80) foram condizentes com valores relatados na literatura para triterpenos com dupla ligação entre C-9 e C-11 (GARCIA-GRANADOS ET AL., 2004).

No espectro de RMN de ^{13}C o sinal em δ 85,16 foi atribuído ao carbono não hidrogenado C-13, de acordo com dados relatados na literatura para os triterpenos rubiprasin A e B, também hidroxilados nesta posição (MAHATO; KUNDU, 1994). Os sinais em δ 129,73 e δ 133,08 atribuídos aos carbonos olefínicos C-12 e C-11, também estão de acordo com dados relatados na literatura (TKACHEV et al., 1994). A ausência do sinal em δ 168,36, referente ao carbono carbonílico C-28, bem como dos sinais em δ 51,89 e δ 21,02, confirmam a redução dos grupos dos grupos carbo metoxila e acetila, respectivamente (Figura 47).

A confirmação das atribuições efetuadas nos espectros de RMN de 1H e de ^{13}C foi obtida pela análise do mapa de contorno COSY (Figura 48), onde se pôde observar a conectividade entre os hidrogênios H-12/H-11 (δ 5,74/ δ 5,48) e H-28a/H-

28b (δ 3,66/ δ 3,20), assim como a superposição dos sinais dos hidrogênios H-3 (δ 3,21) e H-28b (δ 3,20).

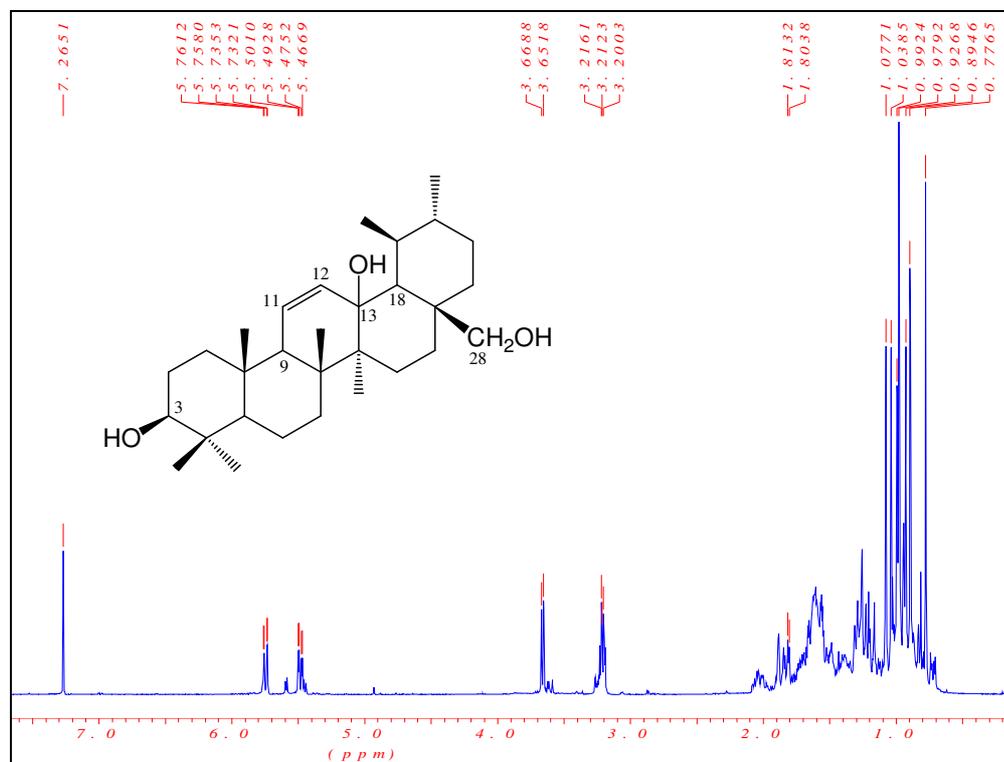


Figura 46 - Espectro de RMN de ^1H obtido para o derivado 102 (400 MHz, CDCl_3).

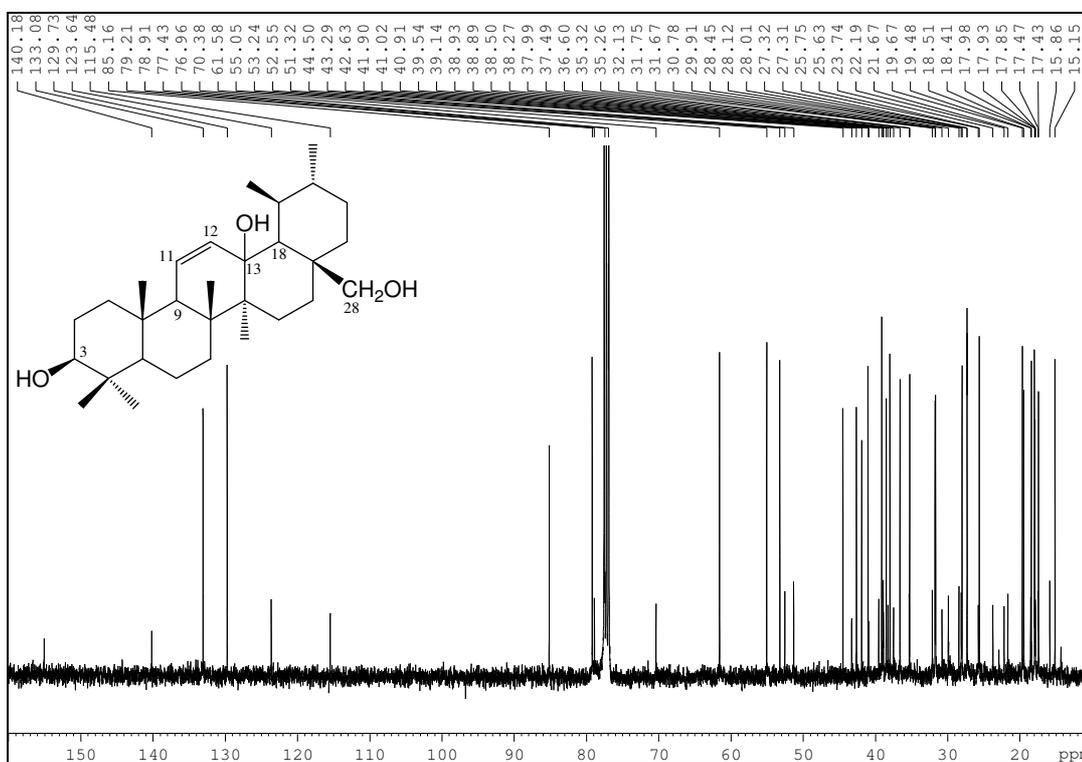


Figura 47 - Espectro de RMN de ^{13}C obtido para 102 (100 MHz, CDCl_3).

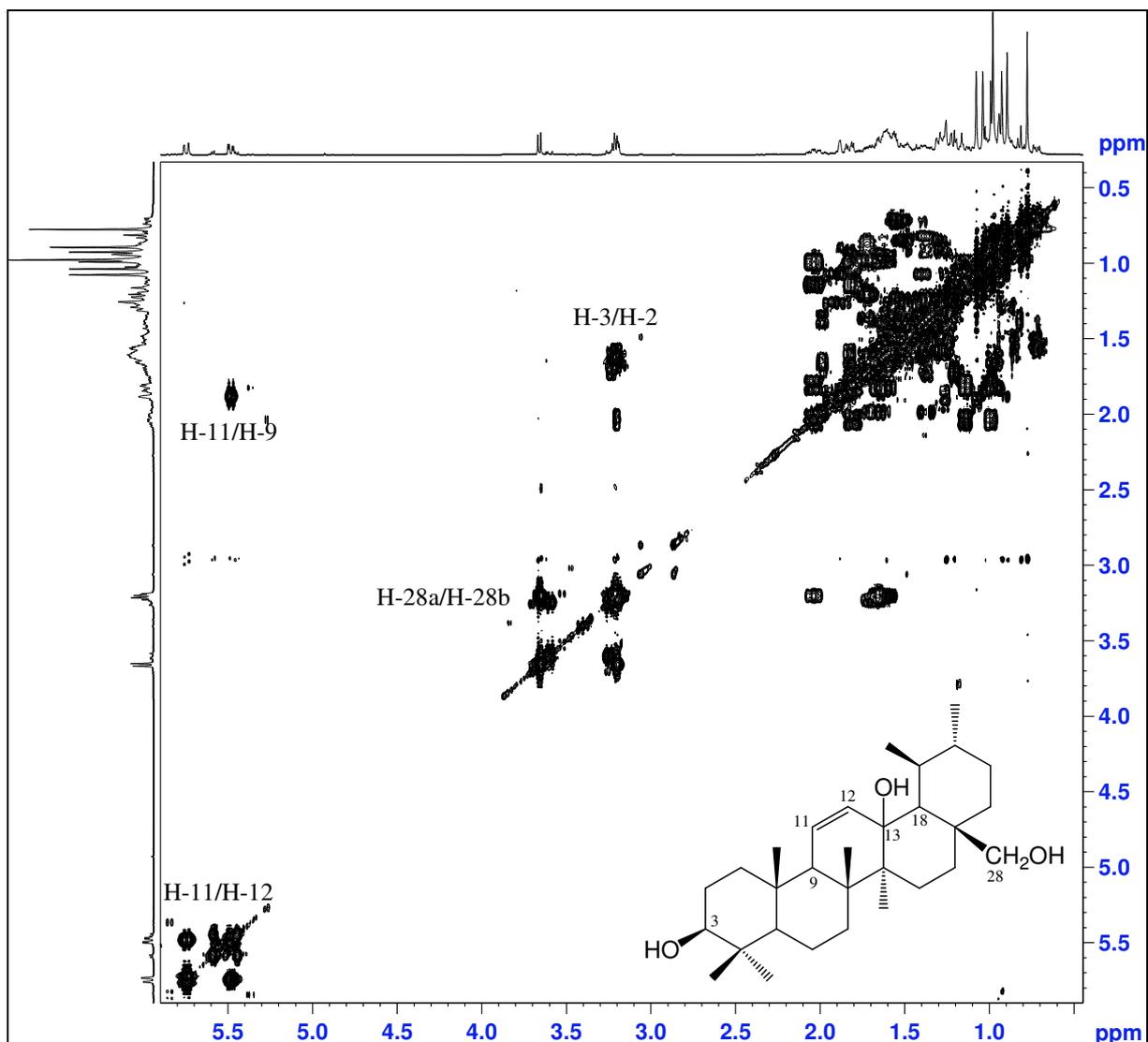


Figura 48 - Mapa de contornos COSY obtido para 102 (100 MHz, CDCl_3).

A análise do mapa de contornos HMQC (Figura 49), permitiu observar manchas de correlação entre os sinais dos carbonos em δ 133,08 (C-12); δ 129,73 (C-11); δ 79,21 (C-3) e δ 76,96 (C-28) e os hidrogênios em δ 5,74 (H-12); δ 5,48 (H-11); δ 3,66/ δ 3,20 (H-28a/H-28b). O sinal atribuído ao carbono não hydrogenado C-13 (δ 85,16), no qual se encontra o álcool terciário, não apresentou mancha de correlação.

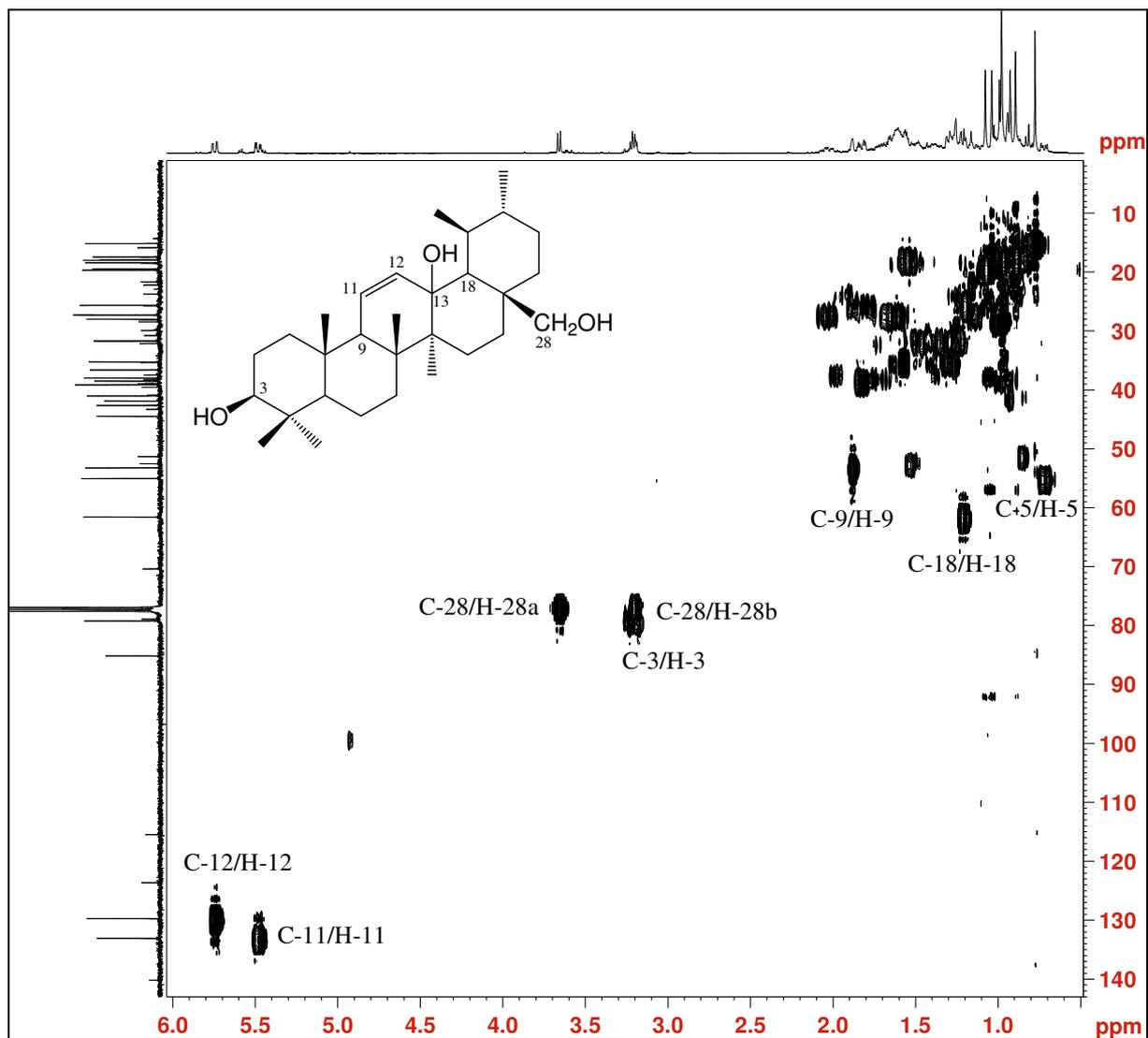


Figura 49 – Mapa de contornos HMBC obtido para **102** (100 MHz, CDCl_3).

A presença de sinais de intensidade inferior àqueles atribuídos ao derivado (**102**) no espectro de RMN de ^{13}C evidenciou a obtenção de um produto secundário. O derivado **102** foi cromatografado em coluna de sílica, levando à obtenção de uma mistura de dienos e do próprio derivado **102**. Esta mistura foi acetilada, visando facilitar a separação dos dienos, porém, as várias tentativas de separação cromatográfica não foram bem sucedidas. Optou-se então pelo emprego de cromatografia em coluna de sílica impregnada com AgNO_3 , método usado para a separação de compostos de polaridade semelhante. O processo resultou no isolamento do dieno heteroanular **85**, derivado inédito do ácido ursólico, e na mistura

dos dienos **80**, já obtido anteriormente e **85**. A figura 50 ilustra o mecanismo proposto para a formação do dieno **85**.

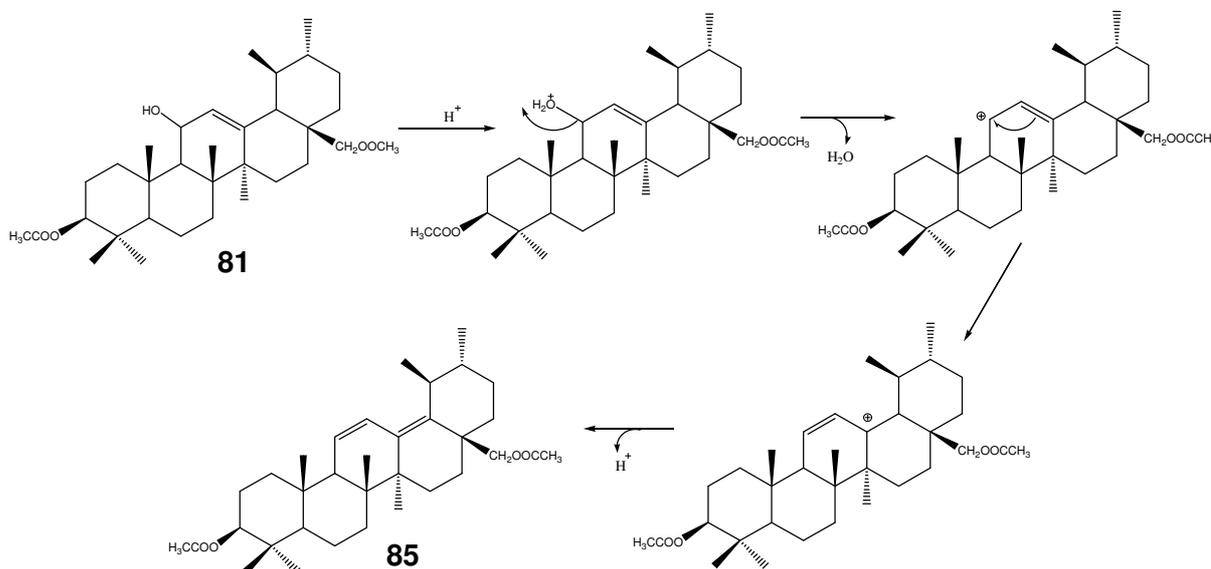


Figura 50 - Proposta de mecanismo de formação do dieno 85.

O espectro de UV obtido para **85** apresentou um máximo de absorção em 252 nm, indicativo da existência de um sistema dieno heteroanular (KOBAYASHI et al., 1981; SHIMIZU et al., 1985).

O espectro de RMN de 1H obtido para **85** (vide apêndice) apresentou dois simples em δ 2,06 e δ 2,05, atribuídos aos hidrogênios metílicos dos grupos acetila introduzidos na molécula. O duplete duplo centrado em δ 6,41 foi atribuído ao hidrogênio H-11 ($J = 11,0$ e $3,0$ Hz), sendo a multiplicidade resultante de seu acoplamento com H-12 e H-9. Já o duplete centrado em δ 5,60 foi atribuído ao hidrogênio H-12 ($J = 11,0$ Hz). Os dupletos centrados em δ 4,28 e δ 3,87, atribuídos aos hidrogênios metilênicos diastereotópicos H-28a e H-28b ($J = 11,2$ Hz), apresentam valores de deslocamento químicos mais afastados do TMS do que aqueles obtidos para **81**, devido à proximidade da carbonila.

No espectro de RMN de ^{13}C , os sinais em δ 125,25, δ 126,98, δ 136,86 e δ 138,37 foram atribuídos aos carbonos olefínicos C-11, C-12, C-13 e C-18, respectivamente. Essas atribuições basearam-se na comparação com dados da literatura relatados para um dieno estruturalmente relacionado do ácido oleanólico

(GARCIA GRANADOS et al., 2004). Por sua vez, os sinais em δ 171,19, δ 171,08 e δ 21,35 foram atribuídos aos carbonos carbonílicos e metílicos dos grupos acetila introduzidos na molécula (vide apêndice).

O mapa de contornos COSY (Figura 51) obtido para **85** confirmou algumas das atribuições efetuadas nos espectros de RMN de ^1H , a partir das manchas de correlação entre os hidrogênios H-11/H-12 (δ 6,41/ δ 5,60), H-11/H-9 (δ 6,41/ δ 1,90) e H-28a/H-28b (δ 4,28/ δ 3,87). De maneira semelhante, as manchas de correlação heteronuclear observadas no mapa de contornos HMQC (Figura 52) permitiram confirmar algumas das atribuições dos espectros monodimensionais, destacando-se as correlações entre C-12/H-12 (δ 126,98/ δ 5,60), C-11/H-11 (δ 125,25/ δ 6,41), C-3/H-3 (δ 80,89/ δ 4,51), C-28/H-28a e H-28b (δ 66,26/ δ 4,28 e δ 3,87) e C-9/H-9 (δ 54,21/ δ 1,90).

As correlações heteronucleares observadas no mapa de contornos HMBC (Figura 53), destacando-se as correlações entre C-18/H-12 (δ 138,37/5,60) e C-12/H-9 (δ 126,98/1,93), permitiram confirmar a obtenção do dieno heteroanular e, conseqüentemente a localização das duplas entre os carbonos C-11/C-12 e C13/C-18.

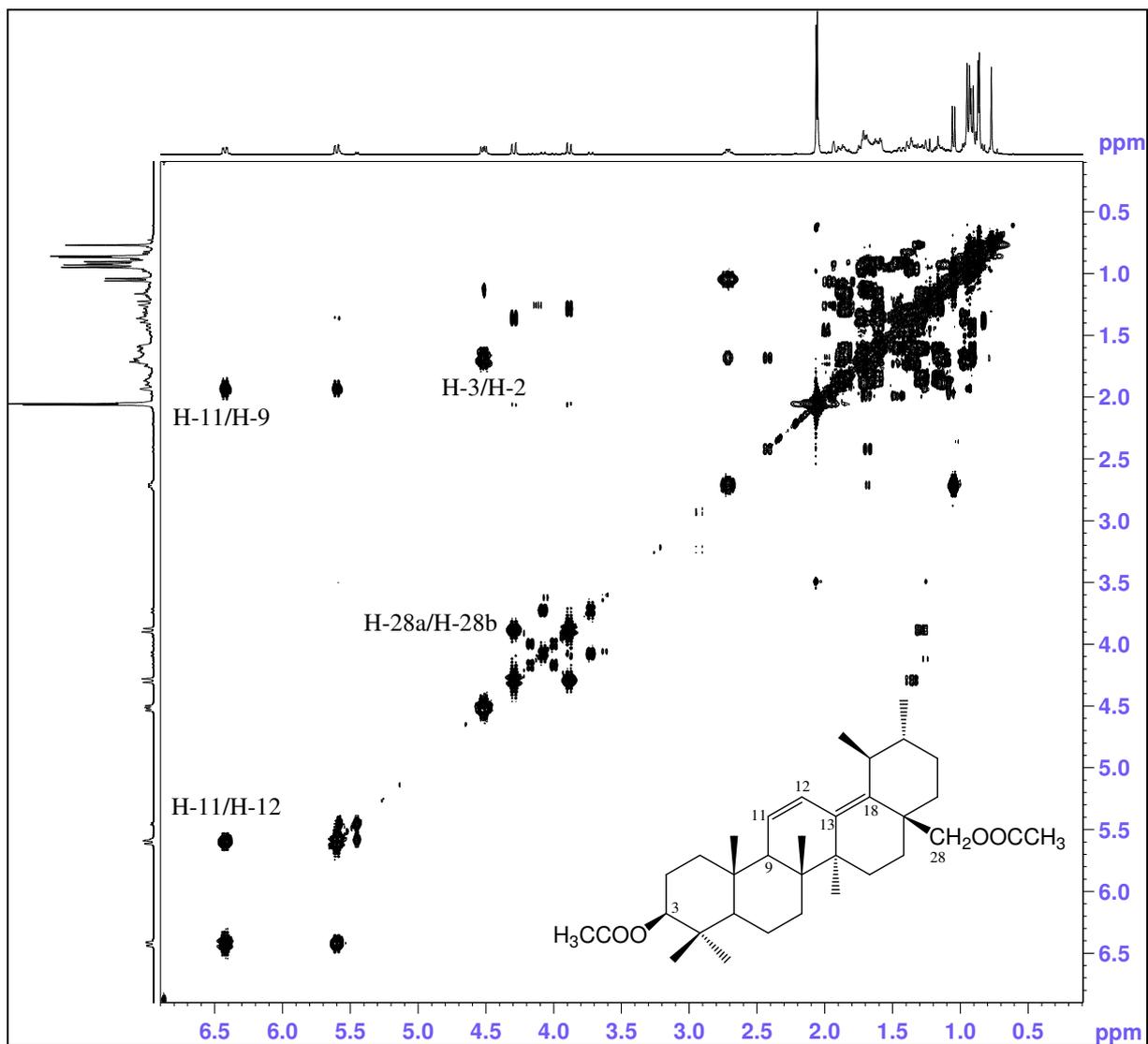


Figura 51 - Mapa de contornos COSY obtido para 85 (400 MHz, CDCl₃).

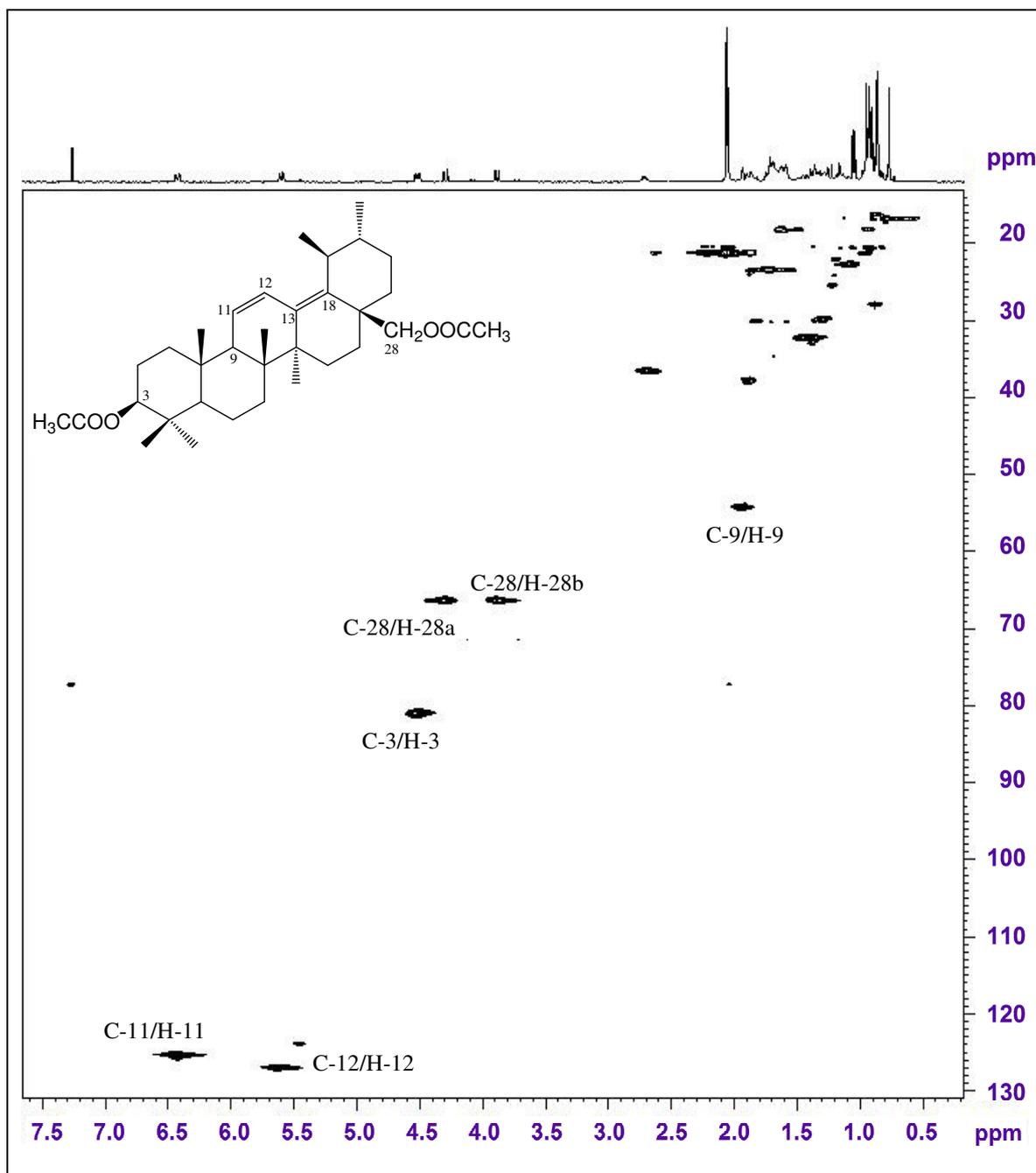


Figura 52 – Mapa de contornos HMBC obtido para 85 (100 MHz, CDCl₃).

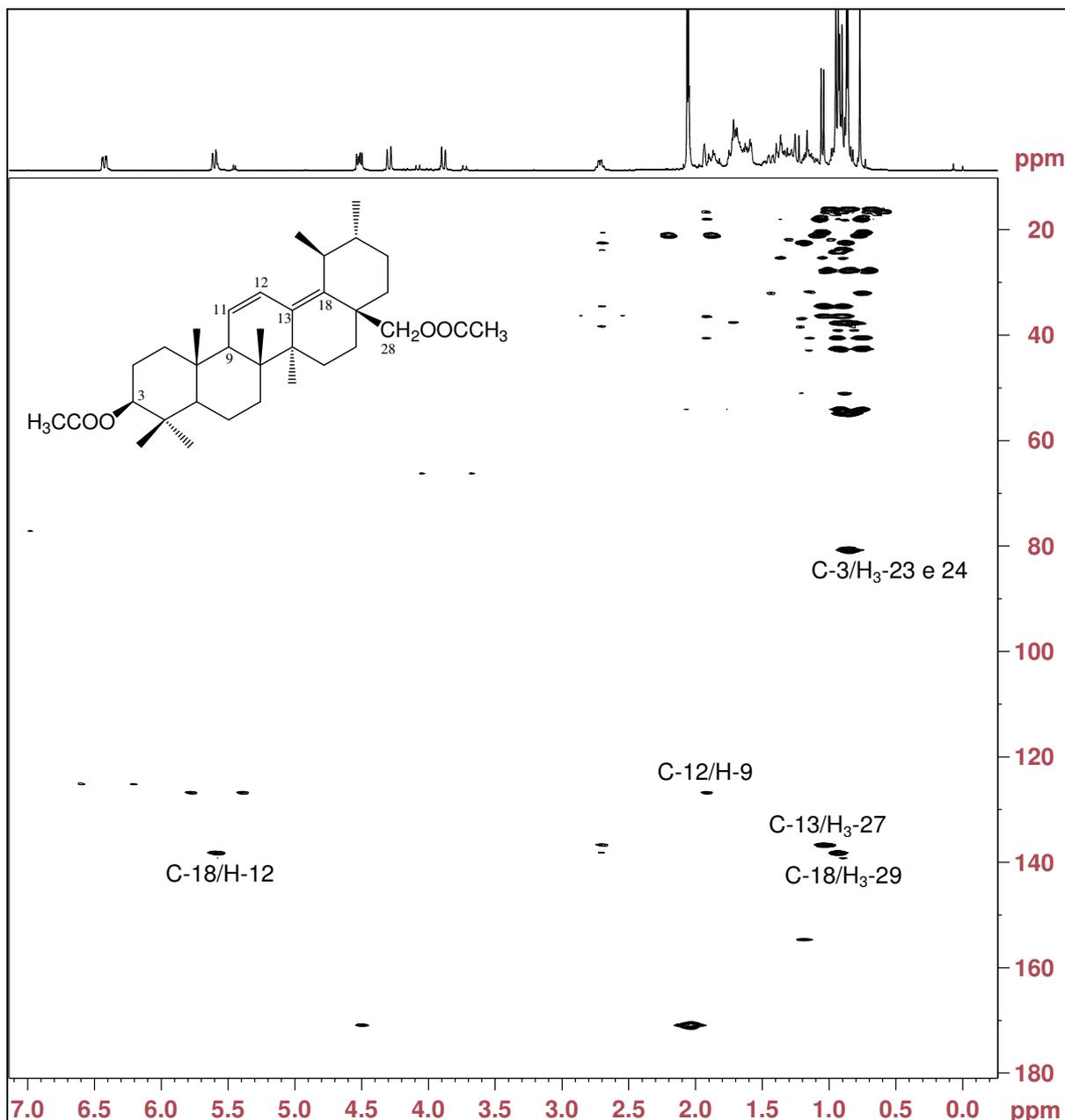


Figura 53 – Mapa de contornos HMBC obtido para 85 (100 MHz, CDCl_3).

10.1.5 Síntese de 3 β ,11,28-triacetóxi-urs-12-eno (82)

Em vista do exposto, a fim de confirmar inequivocamente a obtenção do álcool alílico **81** como produto de redução de **79**, procedeu-se à sua acetilação, imediatamente após sua síntese, e realizou-se sua caracterização por dados de RMN de ^1H e de ^{13}C . Como a acetilação proporciona maior estabilidade à molécula, não ocorre isomerização em meio ácido.

A mistura de diastereoisômeros **81** foi submetida à acetilação empregando-se anidrido acético em piridina, resultando na obtenção de **82** (Figura 39, pag. 179). O sucesso da acetilação foi constatado pela análise do espectro no IV obtido para **82**, no qual se observou a ausência de bandas de deformação axial de hidroxila de alcoóis, na região de 3500 cm^{-1} e a presença de bandas de absorção em 1728 e 1232 cm^{-1} , atribuídas a deformações axiais de C=O e C-O de ésteres, respectivamente.

A análise do espectro de RMN de ^1H (vide apêndice) confirmou a formação do derivado acetilado e os simpletos em δ 2,04, δ 2,03 e δ 1,94 foram atribuídos aos carbonos metílicos dos grupos acetila introduzidos na reação. Os dupletos centrados em δ 3,97 e δ 3,58, atribuídos aos hidrogênios metilênicos H-28a e H-28b ($J = 11,0$ Hz), encontram-se mais afastados do TMS em relação aos sinais correspondentes obtidos para **81**, devido ao efeito de ressonância da carbonila do grupo acetila. A localização da dupla ligação entre as posições 12 e 13 foi confirmada pela presença do duplete duplo em δ 5,43, atribuído a H-11 ($J = 8,6$ e $3,6$ Hz) em acoplamento com H-9 e H-12 e do duplete em δ 5,17 ($J = 3,6$ Hz) atribuído a H-12 (vide apêndice). Neste caso, o sinal correspondente ao hidrogênio H-11 se encontra mais afastado do TMS, devido à presença do grupo acetila. O duplete duplo centrado em δ 4,46 ($J = 10,0$ e $5,6$ Hz) foi atribuído a H-3.

A introdução dos grupos acetila na molécula também foi evidenciada ao se analisar o espectro de RMN de ^{13}C (vide apêndice), no qual os sinais em δ 171,23 e δ 171,12 foram atribuídos aos carbonos carbonílicos e os sinais em δ 21,68, δ 21,35 e δ 21,02 aos metílicos. O sinal do carbono não hydrogenado em δ 144,10, atribuído a C-13 e dos carbonos olefínico e metínico, respectivamente em δ 124,29 e δ 70,77, atribuídos a C-12 e C-11, confirmaram a localização da ligação dupla em C-12/C-13 e a acetilação na posição 11. Os valores de deslocamentos encontrados foram condizentes com valores descritos na literatura (MAHATO; KUNDU, 1994).

A comparação com os dados espectrais obtidos para **102**, os valores de deslocamento químico e as respectivas multiplicidades dos sinais permitiram identificar o número e a posição dos grupos acetila introduzidos na molécula, confirmando a obtenção do derivado **82**.

O mapa de contornos HMQC (Figura 54) permitiu confirmar as atribuições efetuadas nos espectros de RMN de ^1H e de ^{13}C . O sinal de carbono em δ 124,29 (C-12) apresentou mancha de correlação com o sinal de hidrogênio em δ 5,17 (H-12). O sinal em δ 70,77, atribuído aos carbonos C-11 e C-28, correlacionou-se com o sinal de hidrogênio em δ 5,43 (H-11) e também com os sinais em δ 3,97 (H-28a) e δ 3,58 (H-28b), confirmando a atribuição efetuada no espectro de RMN de ^{13}C .

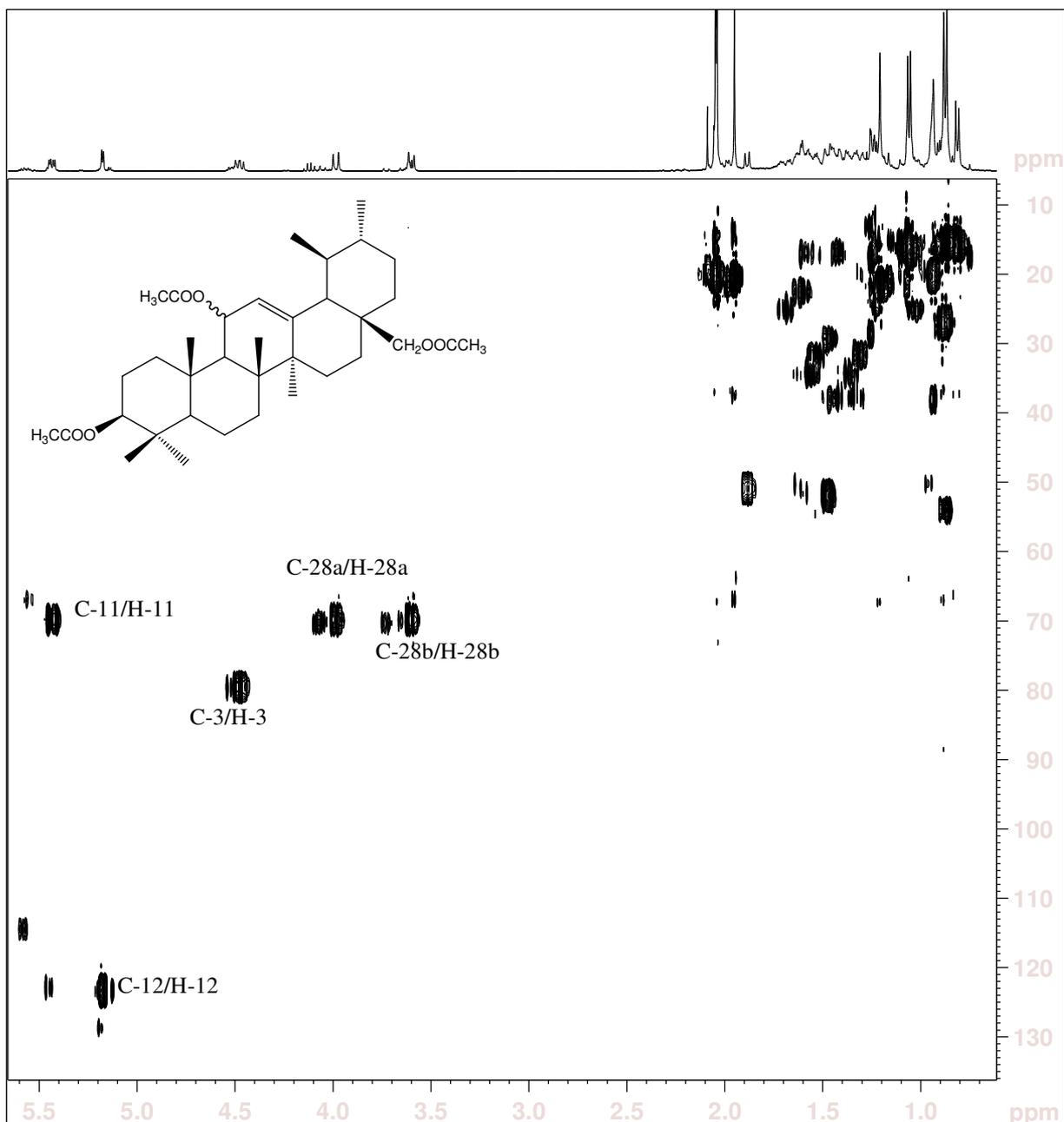


Figura 54 – Mapa de contornos HMQC obtido para 82 (CDCl_3 , 100 MHz).

10.1.6 Síntese de 3 β -hidróxi-urs-12-en-28-al (**83**) e 3 β -hidróxi-urs-11-en-28,13 β -éter (**84**)

Alcoóis alílicos podem facilmente sofrer rearranjo na presença de um ácido de Lewis, levando, várias vezes, à formação de um novo esqueleto. Esta clivagem pode gerar consideráveis quantidades de produtos anômalos, ou seja, aqueles que contêm um átomo de carbono a menos que o esperado (DOS SANTOS; MAGALHÃES, 1991). As reações de rearranjo envolvendo espécies contendo pares de elétrons não compartilhados são processos altamente eficientes e rápidos, requerendo quase sempre um tempo de reação bem pequeno (TONDER; TANNER, 2003).

O triol **81** foi submetido a tratamento com BF₃-Et₂O em CH₂Cl₂, imediatamente após sua síntese, segundo procedimento descrito por Halterman e McEvoy (1990) e Marson (2000), empregando diferentes condições experimentais, visando obter derivados distintos, resultantes de possíveis rearranjos da molécula.

Quando a reação foi realizada à temperatura ambiente, por duas horas, obteve-se como produto uma mistura complexa contendo o aldeído **83**, como produto principal, isolado por técnicas cromatográficas usuais e caracterizado como um derivado inédito.

A formação do aldeído espirânico **83** pode ser explicada através de sucessivas migrações de elétrons de C-11 para C-13 e para C-18. A aptidão migratória depende do caráter doador de elétrons e determina se o produto será anômalo ou não. A contração do anel E resultou em carga positiva em C-17, a qual foi estabilizada pela migração de hidreto, levando a C-28 carregado positivamente, sendo este estabilizado pelo par de elétrons do oxigênio adjacente. A perda subsequente de H⁺ resultou na oxidação da função alcoólica correspondente a aldeído (BHATTACHARYA et al., 1997). A Figura 55 ilustra esta proposta de mecanismo para a formação de **83**.

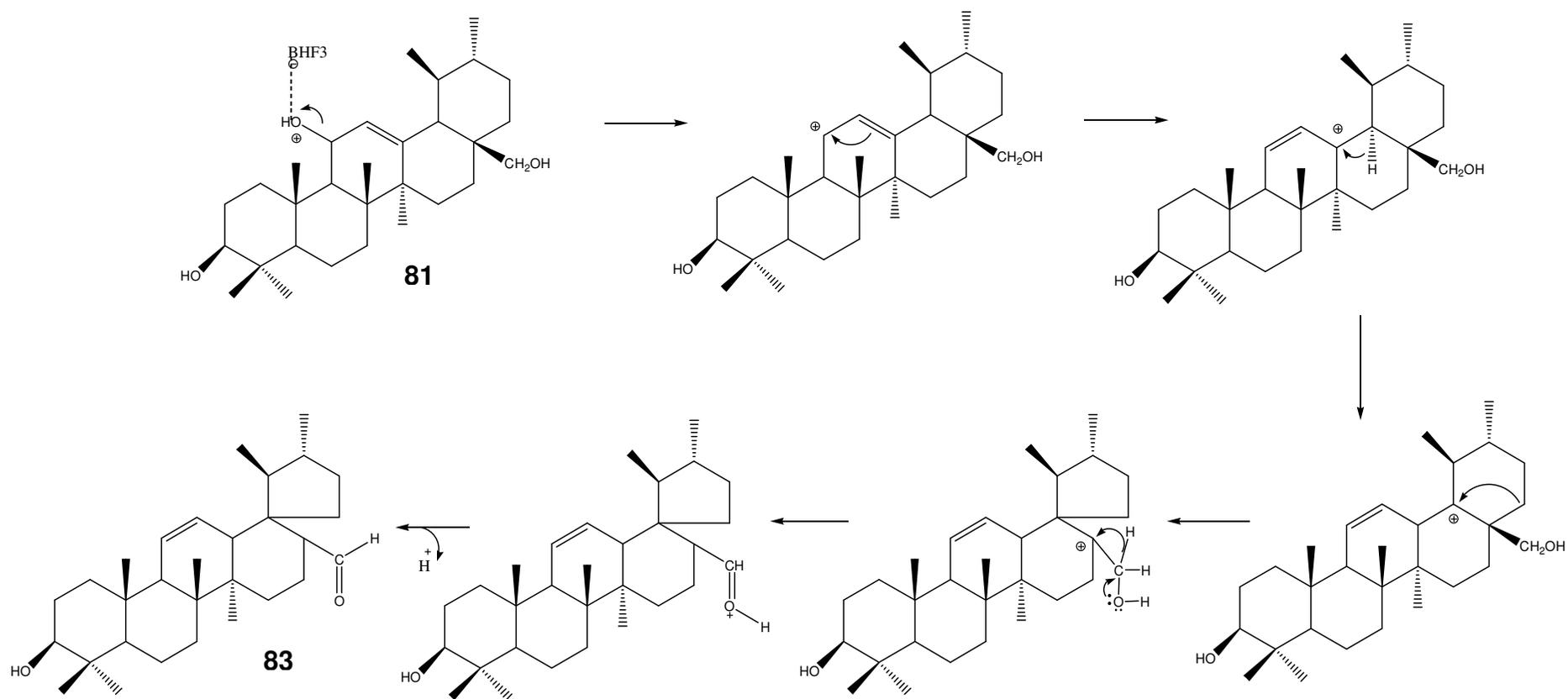


Figura 55 - Proposta de mecanismo para a formação do produto de rearranjo 83.

Visando analisar a influência da temperatura e do tempo de reação na formação dos produtos, foram realizadas várias repetições da reação, empregando as condições descritas na Tabela 42. Quando a reação foi efetuada a -78°C por 2h (condição B), obteve-se o éter cíclico **84**, caracterizado como um novo derivado do ácido ursólico. As demais variações das condições reacionais avaliadas não levaram à obtenção de produtos distintos, resultando sempre na mesma mistura constituída do derivado **83** como produto principal.

Tabela 42 - Condições reacionais avaliadas no tratamento de 81 com $\text{BF}_3\text{-Et}_2\text{O}$ (0,19 mmol) visando obter o produto de rearranjo 83.

Condição	Temperatura ($^{\circ}\text{C}$)	Tempo (horas)
A	ambiente	2
B	-78	2
C	0	1
D	0	2
E	50	1
F	ambiente	20
G	ambiente	4

A análise dos espectros de RMN de ^1H , de ^{13}C e subespectro DEPT obtidos para **83** possibilitaram confirmar a estrutura proposta para o derivado. No espectro de RMN de ^1H (vide apêndice, pag. 286) observou-se a presença de um simpleto em δ 9,29, sendo este valor de deslocamento químico afastado do TMS resultante do efeito de anisotropia diamagnética, característica de hidrogênio de aldeído e, portanto, atribuído à H-28. Os dupletos largos centrados em δ 5,60 e δ 5,42, com constante de acoplamento de 10,4 Hz, foram atribuídos aos hidrogênios olefínicos H-12 e H-11, respectivamente. O duplete duplo centrado em δ 3,21 ($J = 10,4$ e 5,8 Hz) foi atribuído a H-3. Os sinais dos hidrogênios metílicos foram atribuídos a partir da análise dos mapas de contornos HMQC e HMBC (Figuras 56, 57 e 58). Os dupletos centrados em δ 1,03 e δ 0,99 ($J = 6,3$ e 5,2 Hz) foram atribuídos aos hidrogênios metílicos de C-30 e C-29, respectivamente. Já os simpletos em δ 0,96, δ 0,91, δ 0,82, δ 0,75 e δ 0,71 foram atribuídos aos hidrogênios metílicos em C-23, C-26, C-25, C-24 e C-27, respectivamente.

A análise dos mapas de contornos HMQC e HMBC (Figuras 56, 57 e 58) permitiu atribuir inequivocamente os sinais de RMN de ^{13}C de **83**. Assim, o mapa de contornos HMBC indicou correlação entre o sinal do carbono em δ 78,93 (C-3) e os sinais de hidrogênio em δ 0,75 (H-24) e 0,96 (H-23) que, por sua vez, apresentaram correlação com os sinais de carbono em δ 36,38 (C-4) e 54,61 (C-5). A Tabela 43 mostra as principais correlações do mapa de contornos HMBC obtido para **83**.

A presença do sinal de carbono metínico em δ 47,29, atribuído a C-17, no espectro de RMN de ^{13}C e as correlações entre os sinais em δ 52,18 (C-18), δ 39,46 (C-19) e δ 39,35 (C-20) e δ 1,63 (H-17), no mapa de contornos HMBC, confirmaram a contração do anel E. No espectro do precursor **81**, C-17 aparece como um sinal de carbono não hidrogenado em δ 36,42. As Tabelas 44 e 45 apresentam as principais atribuições do espectro de RMN de ^{13}C e de ^1H feitas para o aldeído **83** a partir das correlações observadas no mapa de contornos HMBC.

Tabela 43 - Correlações observadas no mapa de contornos HMBC obtido para 83 (400 MHz, CDCl_3).

Carbono	δ_{C}	δ_{H}
1	37,99	0,82 (H-25)
4	36,38	0,96 (H-23), 0,75 (H-24)
5	54,61	1,99 (H-9), 0,96 (H-23), 0,75 (H-24), 0,82 (H-25)
8	38,83	0,91 (H-26)
9	44,28	5,42 (H-11), 5,60 (H-12), 0,91 (H-26)
10	41,04	5,42 (H-11), 0,82 (H-25)
11	123,54	5,60 (H-12), 1,99 (H-9)
12	133,81	5,42 (H-11), 1,99 (H-9), 1,63 (H-17)
13	52,61	5,42 (H-11), 5,60 (H-12), 9,29 (H-28)
14	39,87	5,60 (H-12), 0,91 (H-26), 0,71 (H-27)
18	52,18	9,29 (H-28), 5,42 (H-11), 5,60 (H-12), 1,63 (H-17), 0,99 (H-29)
19	39,45	1,63 (H-17), 0,99 (H-29), 1,03 (H-30)
20	39,35	1,63 (H-17), 0,99 (H-29), 1,03 (H-30)

Tabela 44 - Atribuição dos sinais do espectro de RMN de ^1H obtido para **83** (400 MHz, CDCl_3).

Hidrogênio	δ_{H} (JHz)
3	3,21 dd (10,4 e 5,8)
9	1,99 sl
11	5,42 dl (10,4)
12	5,60 dl (10,4)
23	0,96 s
24	0,75 s
25	0,82 s
26	0,91 s
27	0,71 s
28	9,29 s
29	0,99 d (5,2)
30	1,03 d (6,3)

A análise do mapa de contornos COSY (Figura 59) permitiu confirmar algumas atribuições do espectro de RMN de ^1H monodimensional, a partir das manchas de correlação entre os hidrogênios H-12/H-11 (δ 5,60/ δ 5,42), H-12/H-13 (δ 5,60/ δ 1,82) e H-11/H-9 (δ 5,42/ δ 1,99).

No espectro obtido na região do IV, a presença da banda em 1716 cm^{-1} , característica de vibração de deformação axial de aldeído, confirmou a obtenção do produto de rearranjo **83**.

Tabela 45 - Atribuição dos sinais do espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) de 83.

Carbono	δ_{C}	Tipo
1	37,99	CH_2
2	27,02	CH_2
3	78,93	CH
4	36,38	C
5	54,60	CH
6	18,25	CH_2
7	32,19	CH_2
8	38,82	C
9	44,28	CH
10	41,04	C
11	123,54	CH
12	133,81	CH
13	52,61	CH
14	39,87	C
15	30,10	CH_2
16	25,72	CH_2
17	47,28	CH
18	52,18	C
19	39,45	CH
20	39,35	CH
21	30,33	CH_2
22	32,19	CH_2
23	27,74	CH_3
24	14,96	CH_3
25	20,45	CH_3
26	17,01	CH_3
27	16,06	CH_3
28	206,35	CH
29	16,38	CH_3
30	18,55	CH_3

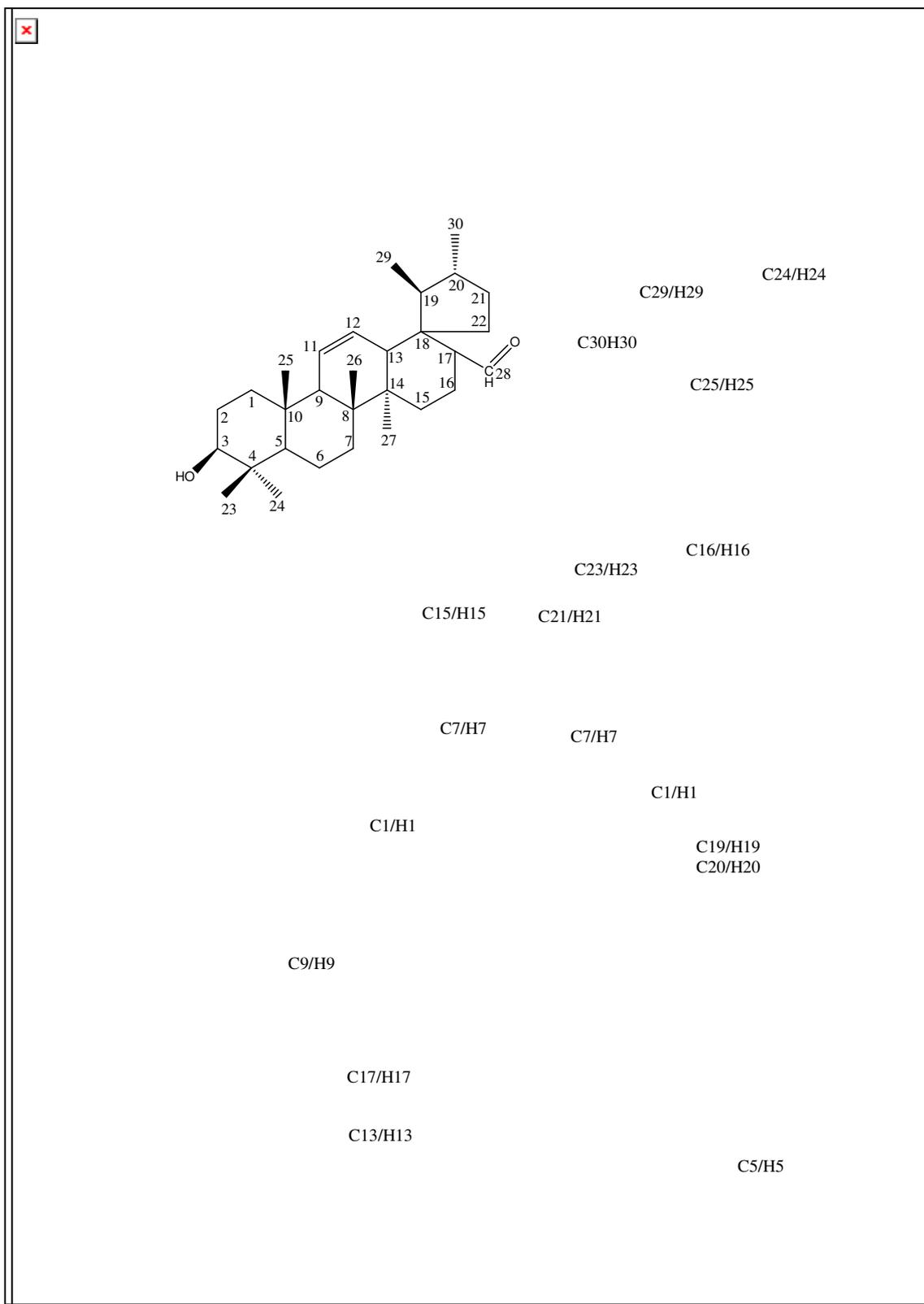


Figura 56 - Seção expandida do mapa de contornos HMQC de 83 (400 MHz, CDCl₃).

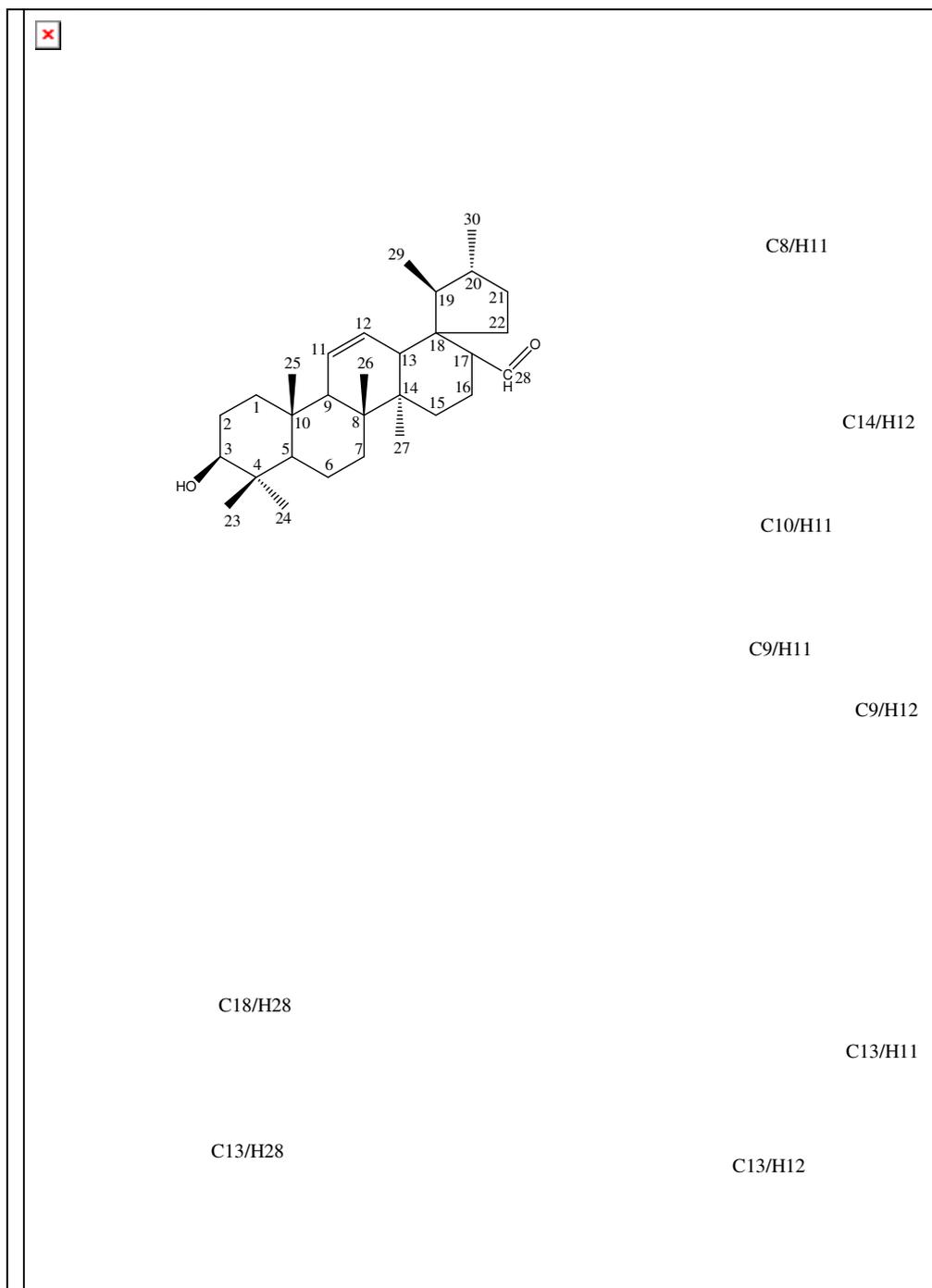


Figura 57 - Seção expandida do mapa de contornos HMBC de 83 (400 MHz, CDCl₃).

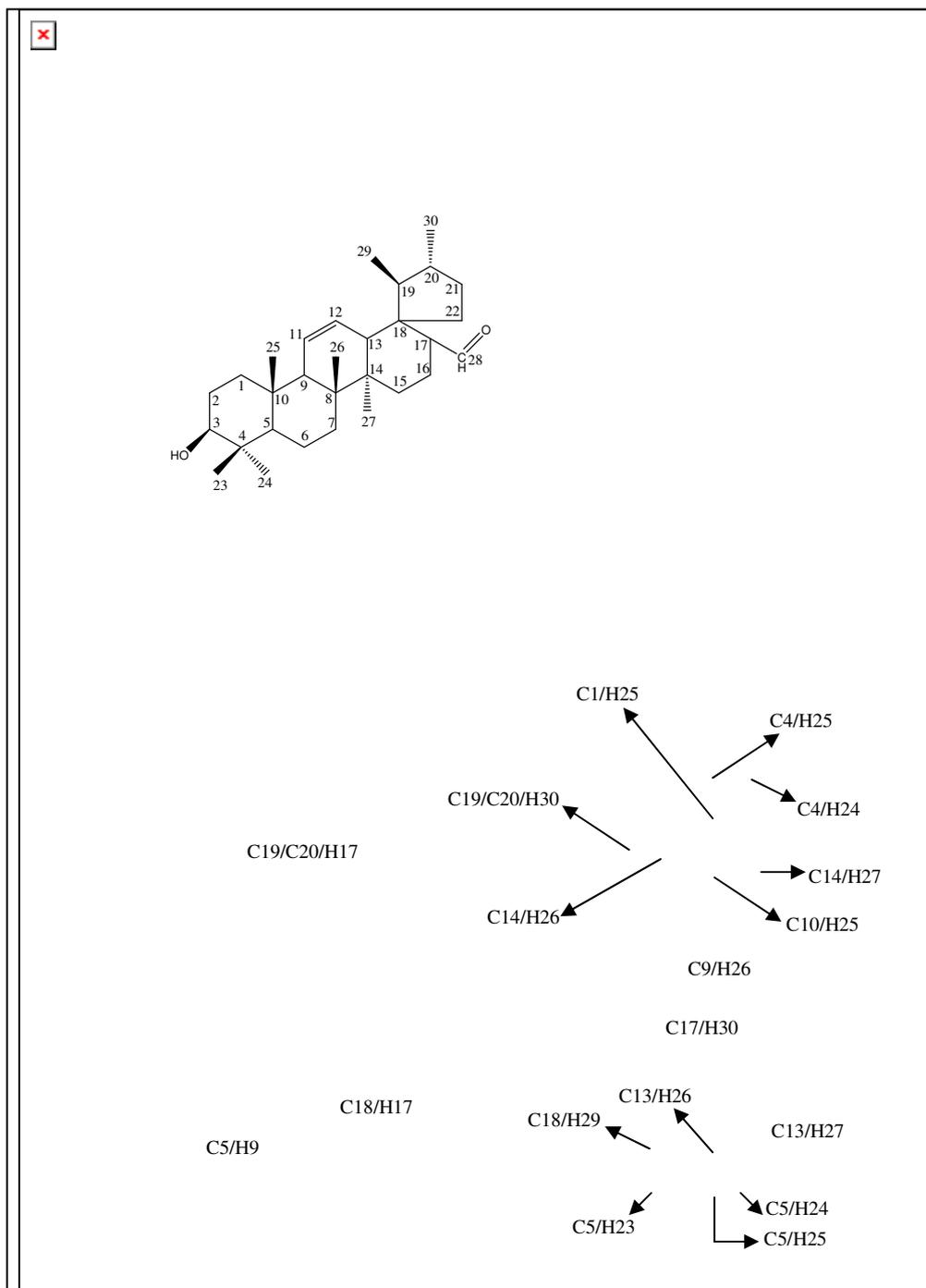


Figura 58 - Seção expandida do mapa de contornos HMBC de 83 (400 MHz, CDCl₃).

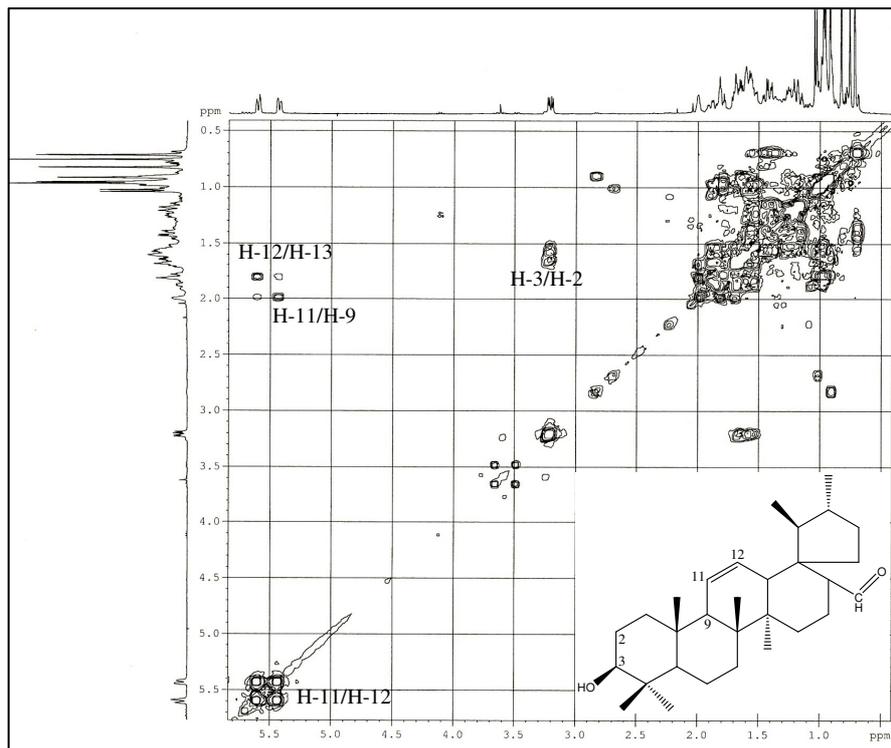


Figura 59 - Mapa de contornos COSY obtido para 83 (400 MHz, CDCl_3).

Quando a reação foi conduzida à temperatura de $-78\text{ }^\circ\text{C}$ por 2 horas (condição B) obteve-se como produto o éter cíclico **84**. A Figura 60 ilustra a proposta de mecanismo para a formação de **84**.

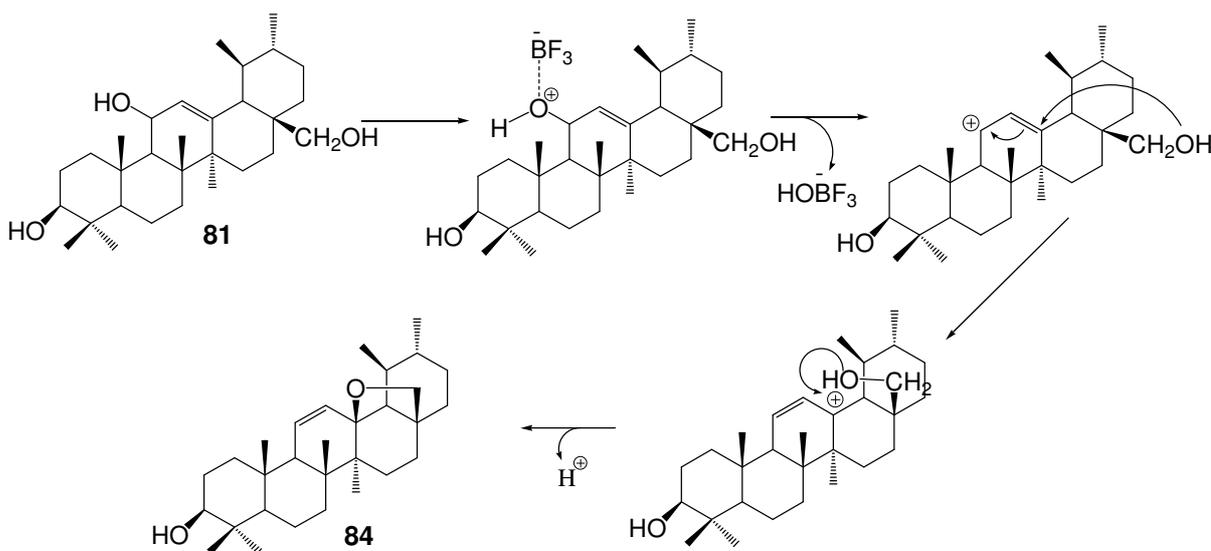


Figura 60 - Proposta de mecanismo para a formação de **84**.

A análise dos espectros obtidos para o produto de reação na condição B possibilitou caracterizar o derivado inédito **84**. No espectro de IV dessa substância pôde-se observar a presença de bandas entre 1022 e 989 cm^{-1} características de deformação axial assimétrica de C-O-C de éter. No espectro de RMN de ^1H (vide apêndice) pôde-se atribuir os dupletos centrados em δ 3,21 e δ 3,66 ($J = 6,5$ Hz) aos hidrogênios metilênicos H-28a e H-28b. O duplete duplo centrado em δ 3,20 ($J = 11,3$ e $4,9$ Hz), parcialmente superposto ao sinal de H-28a, foi atribuído ao hidrogênio H3. O duplete em δ 5,73 ($J = 10,3$ Hz) foi atribuído a H-12 em acoplamento com H-11, com orientação sinclinal, enquanto o duplete duplo centrado em δ 5,48 foi atribuído a H-11, sendo a multiplicidade do sinal resultante de seu acoplamento com H-12 e H-9 ($J = 10,3$ e $3,2$ Hz, respectivamente).

A conectividade entre alguns sinais de hidrogênio no mapa de contornos COSY (Figura 61) possibilitou confirmar as atribuições feitas a partir do espectro de RMN de ^1H monodimensional. Assim, evidenciou-se a conectividade entre os dupletos centrados em δ 3,21 e δ 3,66, atribuídos aos hidrogênios metilênicos em C-28. A conectividade entre o duplete em δ 5,73, atribuído a H12, e o duplete duplo em δ 5,48, atribuído a H-11, também foi identificada através de análise do mapa de contorno COSY.

O espectro de RMN de ^{13}C (vide apêndice) obtido para **84** apresentou 30 sinais cuja análise do subespectro DEPT possibilitou identificá-los como 7CH_3 , 9CH_2 , 8CH e 6C . A atribuição dos sinais baseou-se na comparação com o espectro da substância de origem **81** e na análise detalhada dos mapas de contornos HMBC e HMQC (Figuras 62 e 63). As Tabelas 46 e 47 resumem as atribuições dos espectros de RMN de ^{13}C e de ^1H feitas para **84**.

O mapa de contornos HMQC (Figura 62) permitiu confirmar as atribuições efetuadas nos espectros de RMN de ^1H e de ^{13}C , as correlações entre o sinal em δ 77,06 (C-28) e os hidrogênios metilênicos H-28a e b (δ 3,66 e δ 3,21), bem como entre o sinal em δ 61,37 (C-18) e o sinal correspondente ao hidrogênio H-18 (δ 1,20) foram identificadas no espectro. Também se observou a correlação entre o sinal em δ 79,01, atribuído a C-3 e o sinal do hidrogênio H-3 (δ 3,20).

Tabela 46 - Atribuição do espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) obtido para **84**.

Hidrogênio	δ_{H} (J Hz)
3	3,20 dd (11,3 e 4,9)
9	1,88
11	5,48 dd (10,3 e 3,2)
12	5,73 d (10,3)
23	0,98 s
24	0,77 s
25	0,89 s
26	1,07 s
27	1,03
28a	3,66 d (6,5)
28b	3,21 d (6,5)
29	0,99 d (6,4)
30	0,94 d (5,7)

A análise do mapa de contornos HMBC (Figuras 63 e 64) indicou as correlações de longa distância entre os carbonos do ciclo formado e os hidrogênios de átomos vizinhos, confirmando a estrutura proposta para **84**. Assim, o sinal em δ 84,96, atribuído a C-13, apresentou manchas de correlação com os sinais de hidrogênio em δ 5,73 (H-12), δ 3,66 (H-28a), δ 1,2 (H-18) e δ 1,03 (H-27). Por sua vez, o sinal de carbono em δ 61,36, atribuído a C-18, mostrou correlação com os sinais de hidrogênio em δ 0,99 (H-29), δ 1,58 (H-21/H-22) e δ 3,66 (H-28a). Já para o sinal correspondente a C-17, em δ 42,45, foram observadas correlações com os sinais de hidrogênio em δ 3,66 (H-28a), 3,21 (H-28b) e δ 1,2 (H-18). A Tabela 48 lista as principais correlações heteronucleares ^1H - ^{13}C de longa distância observadas no mapa de contornos HMBC para **84**.

Tabela 47 - Atribuição dos sinais do espectro de RMN de ^{13}C obtido para 84 (100 MHz, CDCl_3).

Carbono	δ_{C}	Tipo
1	38,29	CH_2
2	25,43	CH_2
3	79,01	CH
4	38,95	C
5	54,83	CH
6	17,78	CH_2
7	31,46	CH_2
8	41,71	C
9	53,03	CH
10	36,42	C
11	129,62	CH
12	132,99	CH
13	84,97	C
14	44,32	C
15	27,12	CH_2
16	25,43	CH_2
17	42,45	C
18	61,37	CH
19	40,83	CH
20	37,78	CH
21	31,46	CH_2
22	35,06	CH_2
23	27,82	CH_3
24	14,99	CH_3
25	17,23	CH_3
26	17,78	CH_3
27	19,51	CH_3
28	77,06	CH_2
29	18,26	CH_3
30	19,29	CH_3

Tabela 48 - Correlações observadas no mapa de contornos HMBC obtido para 84 (400 MHz, CDCl_3).

Carbono	δ_{C}	δ_{H}
3	79,01	0,98 (H-23), 0,77 (H-24)
4	38,95	0,98 (H-23), 0,77 (H-24)
5	54,83	0,98 (H-23), 0,77 (H-24), 0,89 (H-25)
8	41,71	1,88 (H-9), 5,73 (H-12), 1,03 (H-27)
9	53,03	5,48 (H-11), 5,73 (H-12)
10	36,42	1,88 (H-9), 5,48 (H-11)
11	129,62	1,88 (H-9)
12	132,99	1,88 (H-9), 1,20 (H-18)
13	84,97	5,73 (H-12), 3,66 (H-28a), 1,20 (H-18), 1,03 (H-27)
14	44,32	1,88 (H-9), 5,48 (H-11), 1,20 (H-18)
17	42,45	3,66 (H-28a), 3,21 (H-28b), 1,20 (H-18)
18	61,37	3,66 (H-28a), 1,58 (H-21/H-22), 0,99 (H-29)

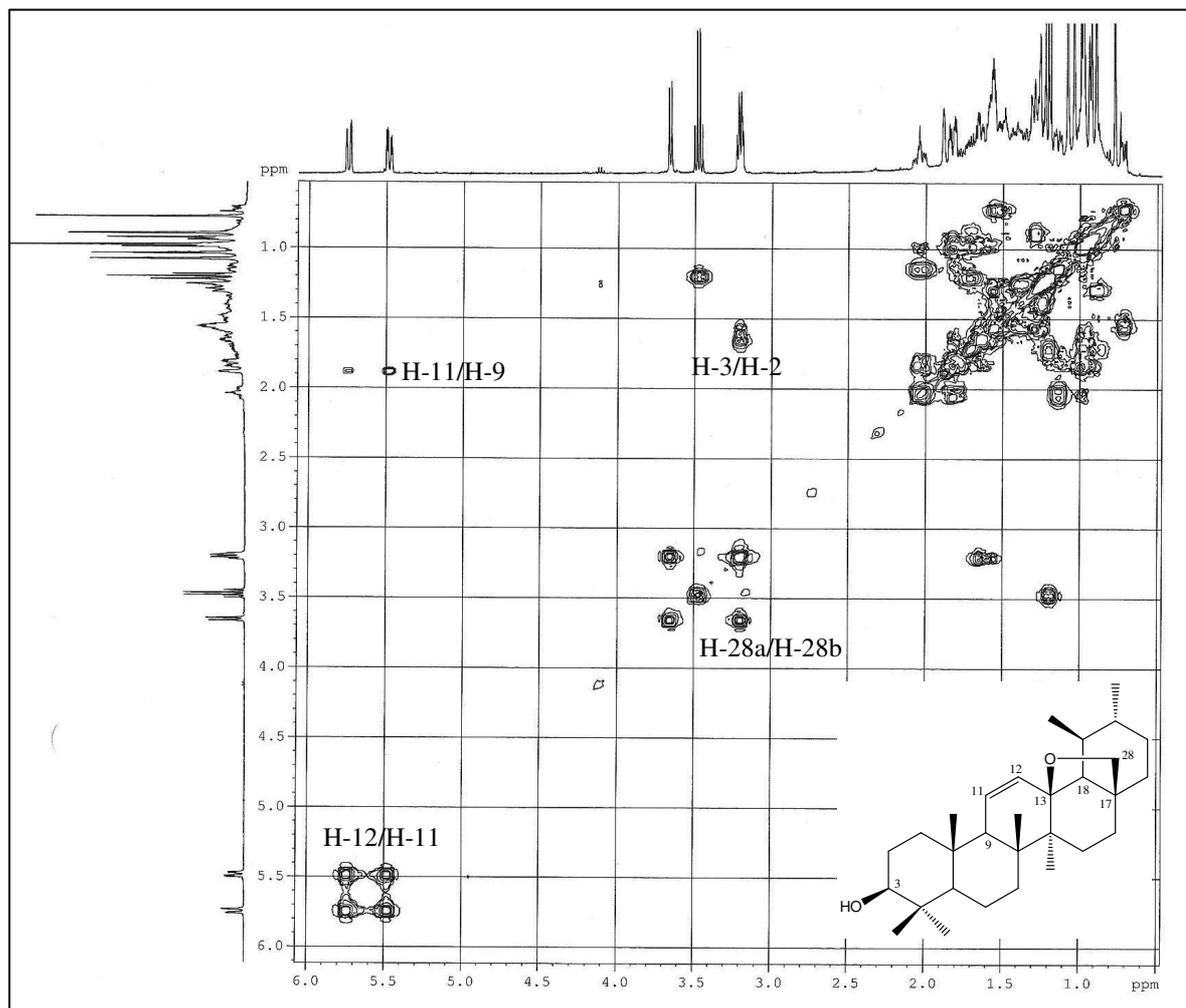


Figura 61 - Mapa de contornos COSY obtido para 84 (400 MHz, CDCl₃).

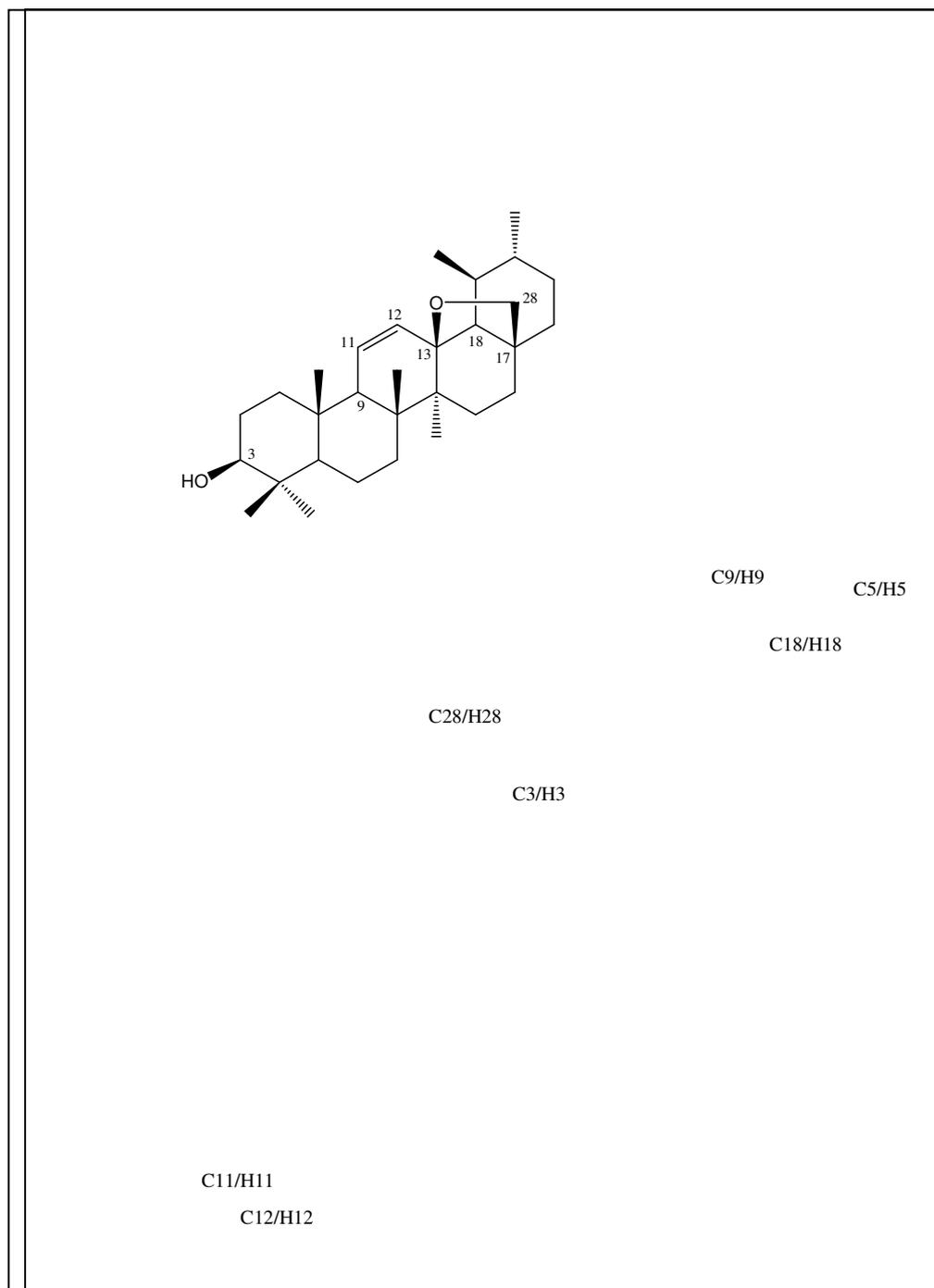


Figura 62 - Mapa de contornos HMQC obtido para 84 (400 MHz, CDCl₃).

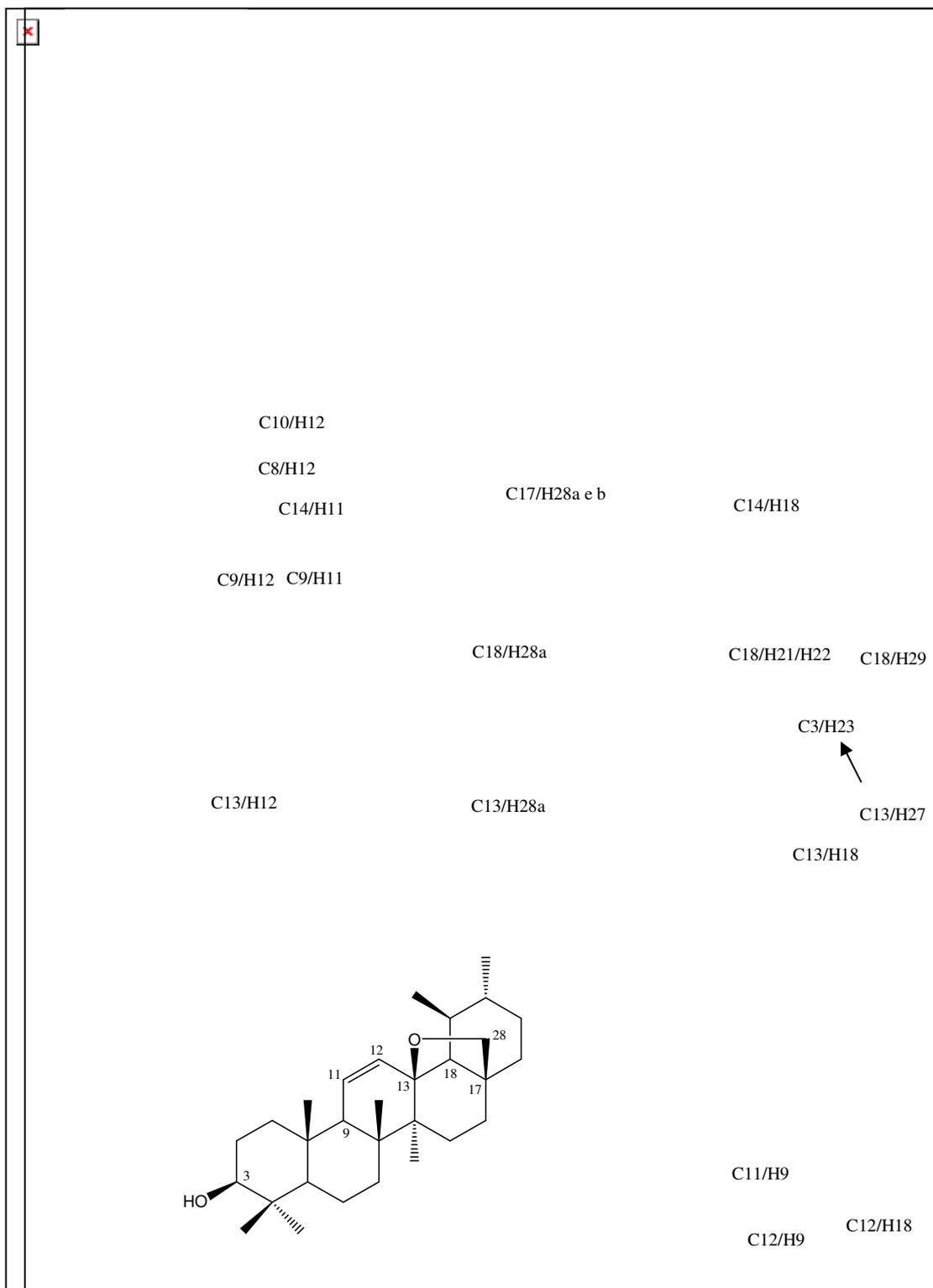


Figura 63 - Mapa de contornos HMBC obtido para 84 (400 MHz, CDCl₃).

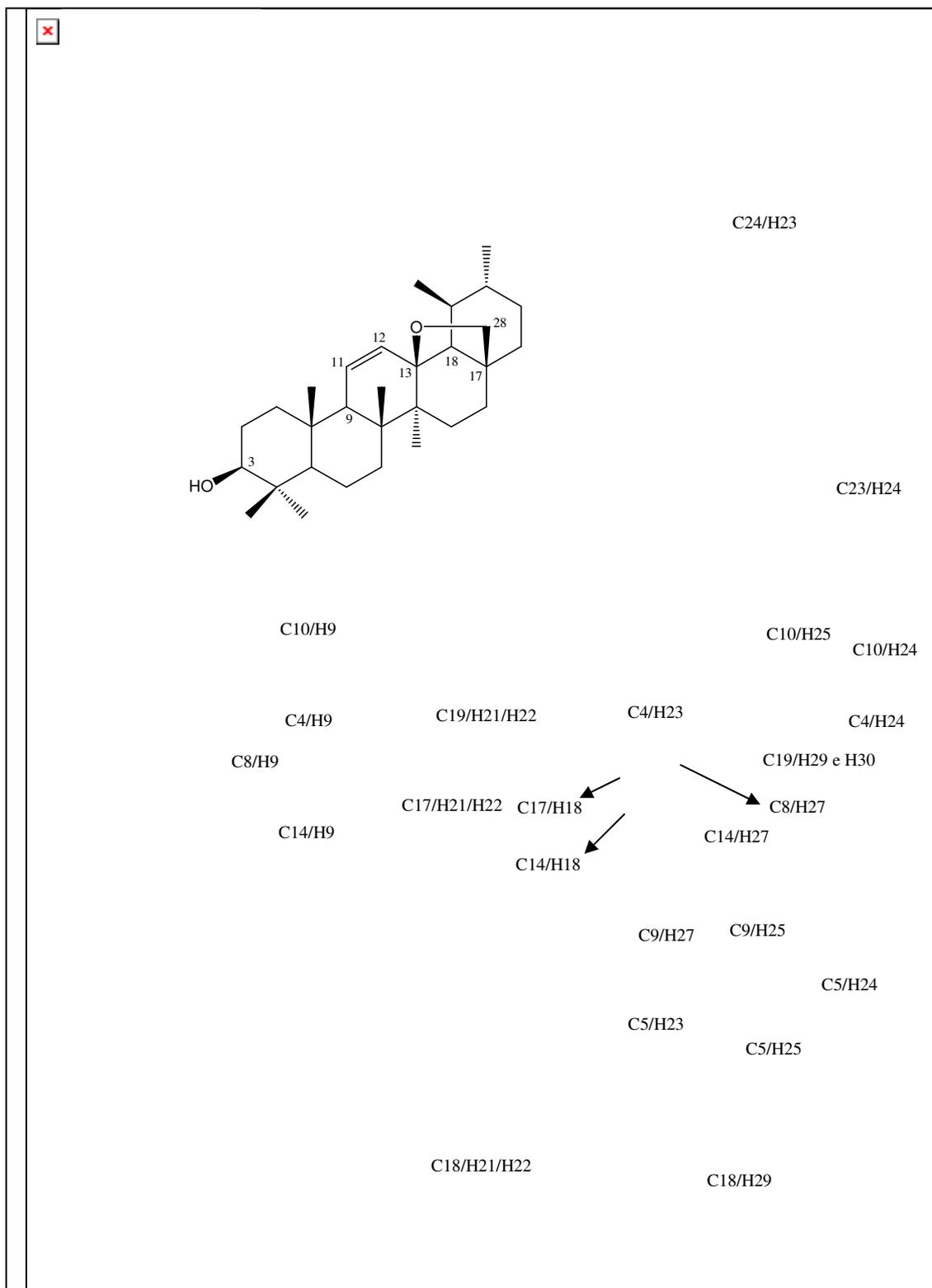


Figura 64 - Seção expandida do mapa de contornos HMBC obtido para 84 (400 MHz, CDCl₃).

10.1.7 Tentativas de epoxidação de **81**

Na tentativa de se obter um epóxido a partir de **81**, este produto foi submetido ao tratamento com MCPBA, durante 2 horas. Porém, não se obteve sucesso no procedimento e o produto obtido após elaboração da reação foi o próprio material de partida **81**.

Avaliou-se, também, a possibilidade de formação do epóxido a partir do éter cíclico **84**, submetendo-o ao mesmo tratamento com MCPBA, alterando o tempo de reação para 4,5 horas. A reação não levou à formação do epóxido desejado, resultando na recuperação do próprio produto de partida. Possivelmente o impedimento estérico das substâncias utilizadas como produto de partida, **81** e **84**, foi o fator limitante para o sucesso da epoxidação, segundo observado por Tkachev et al. (1994).

10.1.8 Tratamento de **81** com HI 57%

O triol **81** foi submetido a tratamento com HI 57% em presença de benzeno, visando obter derivados com a ligação dupla isomerizada de acordo com Marcos et al. (2003a e 2003b). Foram empregadas diversas condições reacionais, variando-se a temperatura, tempo de reação e concentração de reagentes. Todas as condições avaliadas resultaram na mesma mistura de produtos, porém em diferentes proporções. Esta mistura foi cromatografada em coluna de sílica gel, resultando na obtenção do aldeído **83**, anteriormente identificado como produto do tratamento de **81** com $\text{BF}_3\text{-Et}_2\text{O}$ (Condição A), como produto principal, além de uma mistura complexa de vários compostos minoritários que devido à pequena massa não puderam ser identificados.

10.1.8.1 Síntese do 3 β ,28 β -diidróxi-urs-12-eno (**86**)

Para a síntese do diol **86**, o produto **77** foi submetido à redução com LiAlH_4 em éter etílico seco. Após elaboração da reação obteve-se o derivado **86**. A confirmação da estrutura química desse produto de redução foi realizada a partir da análise dos espectros de IV e de RMN de ^1H e de ^{13}C .

No espectro de IV observou-se a presença de banda característica de deformação axial de OH em 3642 cm^{-1} e ausência de bandas na região característica de absorção de carbonila de éster em $1750\text{-}1735\text{ cm}^{-1}$, indicando o sucesso da redução. A mesma conclusão pôde ser obtida a partir do espectro de RMN de ^1H (vide apêndice, pag. 292), no qual os dupletos centrados em δ 3,54 e δ 3,20 foram atribuídos aos hidrogênios metilênicos H-28a e H-28b ($J = 10,9\text{ Hz}$), e o multiplete em δ 3,18 ao hidrogênio carbinólico H-3. Cabe ressaltar, o desaparecimento do simpleto em δ 3,61, atribuído à metoxila do grupo acetila presente no precursor **77**. Os demais sinais apresentaram valores de deslocamento químico semelhantes aos obtidos para o produto de partida.

No espectro de RMN de ^{13}C obtido para **86** (vide apêndice, pag. 293) observaram-se sinais em δ 79,04 e δ 69,93, atribuídos aos carbonos carbinólicos C-3 e C-28, respectivamente. Os valores de deslocamento químico desses carbonos são bastante próximos aos descritos para o diol correspondente do ácido oleanólico (GARCIA-GRANADOS et al., 2003).

10.1.9 Síntese de **87**

O tratamento do ácido ursólico (**31**) com anidrido acético em piridina resultou na obtenção do derivado acetilado **87** (Figura 65). O espectro no IV obtido para **87** apresentou bandas em 1733 cm^{-1} e 1694 cm^{-1} , características de deformações axiais de C=O de ésteres e ácidos carboxílicos, respectivamente. Ao se analisar o espectro de RMN de ^1H (vide apêndice, pag. 294), pôde-se observar sinais referentes ao grupamento acetila introduzido na molécula. Assim, o simpleto em δ 2,04, atribuído ao grupo metila e o multiplete em δ 4,49, referente ao hidrogênio H-3, com valor de deslocamento químico mais afastado do TMS do que seu precursor **31**, resultante do efeito de ressonância exercido pela carbonila, possibilitaram caracterizar a obtenção do derivado **87**. No espectro de RMN de ^{13}C (vide apêndice, pag. 295) os sinais em δ 171,12 e δ 21,39 foram atribuídos, respectivamente, aos carbonos carbonílico e metílico do grupo acetila. Os valores de deslocamento químico dos sinais de RMN de ^1H e de ^{13}C apresentam correspondência com os relatados por Garcia-Granados et al. (2007).

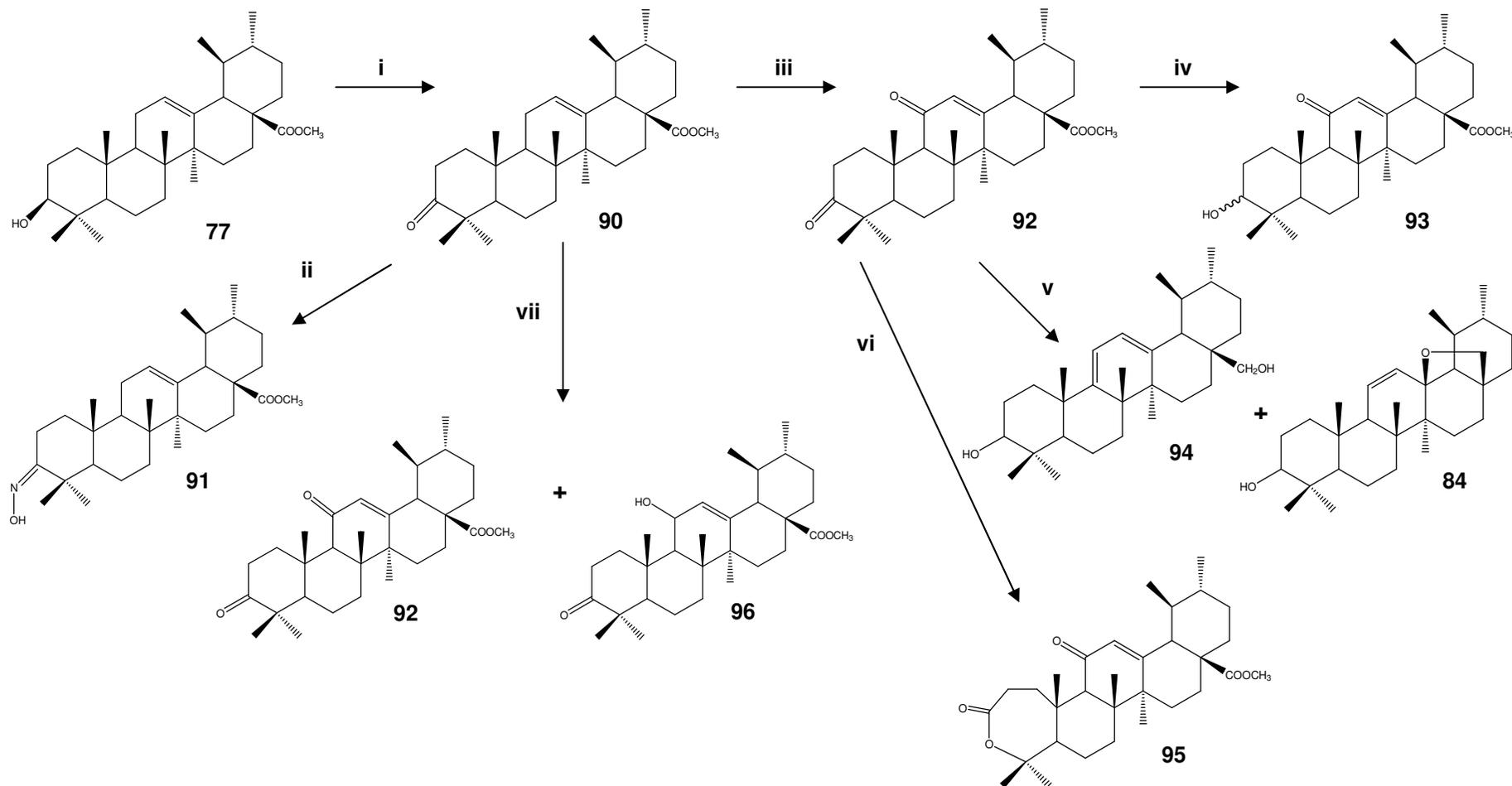


Figura 65 - Esquema de síntese para a obtenção dos derivados 90, 91, 92, 93, 94, 95 e 96. i) PDC/CH₂Cl₂, t. amb, 75%; ii) (NH₃)OHCl/EtOH/piridina, 95°C, 95%; iii) NaClO₂/t-BuOOH, 100°C, 88%; iv) NaBH₄/CeCl₃, MeOH/THF, t. amb; NaBH₄/alumina, microondas, 83%; v) LiAlH₄/éter seco, t. amb, 84% (84), 9% (94); vi) MCPBA/NaHCO₃, t. amb, 44%; vii) MCPBA/porfirina, -78°C, 56% (96).

10.1.10 Tentativas de oxidação de **87** com MCPBA catalisado por 5,10,15,20-tetrakis(pentafluorofenil) porfirina

Na tentativa de se obter o álcool alílico, o derivado **87** foi submetido a tratamento com MCPBA catalisado por 5,10,15,20-tetrakis(pentafluorofenil) porfirina, empregando-se as mesmas condições reacionais descritas por Konoike et al (1999) para o mesmo material de partida (Figura 65). Porém, a reação não evoluiu, mesmo aumentando-se o tempo de reação para 6 e 9 horas. Em ambas as tentativas não se obteve o produto desejado sendo que, na primeira, o produto de partida foi recuperado e na segunda, obteve-se uma mistura complexa constituída majoritariamente pelo produto de partida e por vários outros compostos minoritários, inviabilizando o isolamento dos constituintes.

10.1.11 Síntese do ácido 3 β -acetóxi-11-oxo-urs-12-en-28-óico (**88**)

O tratamento de **87** com NaClO₂/*t*-BuOOH (Figura 65) resultou na obtenção do produto de oxidação **88** (Figura 65). No espectro de RMN de ¹H (vide apêndice, pag. 296) observou-se a presença de dois simpletos em δ 5,57 e δ 2,02, ausentes no espectro do precursor **87**, os quais foram atribuídos aos hidrogênios H-12 e H-9, e possibilitaram confirmar a obtenção de **88**. De maneira geral, os dados espectrométricos obtidos foram semelhantes àqueles relatados por Siddiqui et al. (1990) para o mesmo derivado. Não foram obtidos espectros de RMN de ¹³C para este derivado.

10.1.12 Síntese de 3 β -acetóxi-urs-11-en-28,13 β -lactona (**89**)

O derivado **88** foi submetido à redução com LiAlH₄, porém obteve-se como produto uma mistura de vários compostos, impossibilitando a separação. Optou-se, então, por acetilar a mistura, visando o isolamento de seus constituintes. A mistura acetilada foi submetida à cromatografia em coluna de sílica gel, levando ao isolamento do constituinte majoritário, o derivado **89**. A Figura 66 ilustra o esquema de síntese para a obtenção do derivado **89**.

O espectro de IV obtido para **89** mostrou a presença de bandas em 1728 cm⁻¹ e 1238 cm⁻¹, bem como em 1755 cm⁻¹ características de deformações axiais de C=O

e C-O de ésteres e C=O de lactonas, respectivamente. Não se observaram bandas referentes a grupos hidroxila.

A formação do derivado **89** pôde ser confirmada pela análise do seu espectro de RMN de ^1H (vide apêndice). Observou-se um duplete centrado em δ 5,95, atribuído ao hidrogênio H-12 ($J = 10,4$ Hz) e um duplete duplo centrado em δ 5,54, atribuído a H-11 ($J = 10,4$ e $3,0$ Hz). O multiplete em δ 4,50 foi atribuído ao hidrogênio H-3, enquanto o simpleto em δ 2,04 foi atribuído aos hidrogênios metílicos do grupo acetila

No espectro de RMN de ^{13}C (vide apêndice) dessa substância os sinais em δ 89,71, δ 45,13, δ 60,60 e δ 180,01 foram atribuídos aos carbonos do anel pirolactônico, C-13, C-17, C-18 e C-28, respectivamente. O sinal em δ 80,66 foi atribuído ao carbono C3 e os sinais em δ 128,96 e δ 133,37 aos carbonos olefínicos C-11 e C-12. Os sinais em δ 171,12 e δ 21,39 referem-se aos carbonos carbonílico e metílico do grupo acetila. A análise dos dados espectrométricos obtidos e sua comparação com valores descritos na literatura para o mesmo composto, permitiram identificar **89** como a 3 β -acetóxi-urs-11-en-28,13 β -lactona (TKACHEV et al., 1994).

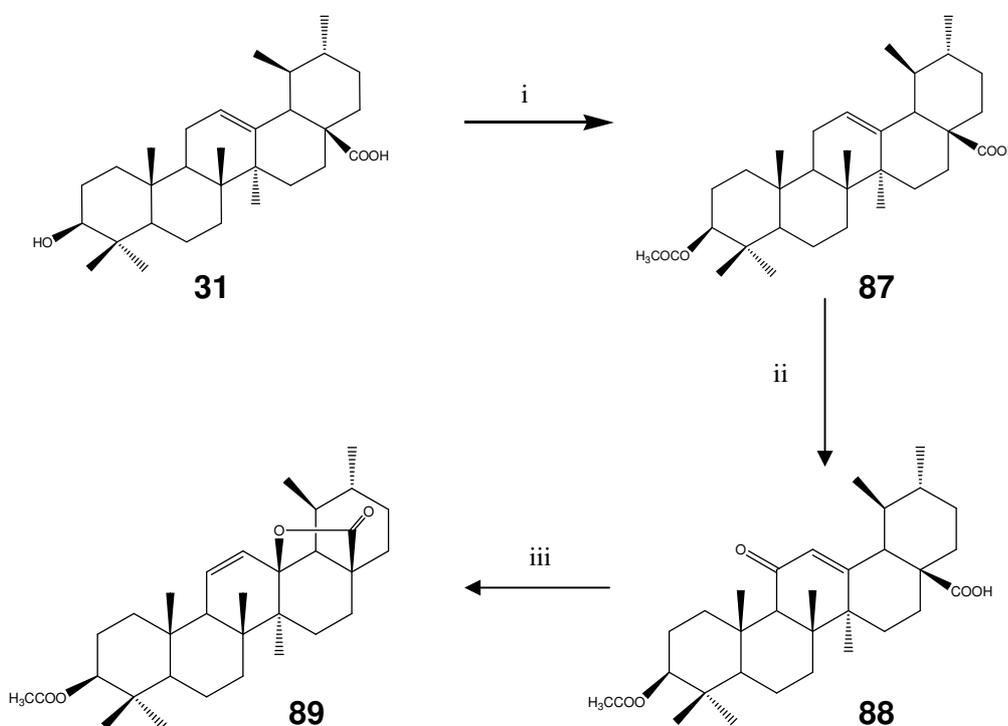


Figura 66 - Esquema de síntese para obtenção do derivado **89**. i) piridina/anidrido acético, t amb; ii) $\text{NaClO}_2/t\text{-BuOOH}$, 100°C ; iii) LiAlH_4 , 0°C ; piridina/anidrido acético, t amb.

10.1.13 Síntese de 3-oxo-urs-12-en-28-oato de metila (90)

A oxidação de **77** empregando-se PDC como agente oxidante foi realizada segundo metodologia descrita por Gordaliza et al. (1995). A reação resultou na obtenção do derivado **90** (Figura 65). O mecanismo proposto para a oxidação de **77** com o dicromato de piridínio, segundo Carey e Sundberg (1993), está representado na Figura 67.

O espectro no IV obtido para **90** apresentou bandas de deformação axial de C=O de cetonas em 1726 cm^{-1} . A análise dos espectros de RMN de ^1H e de ^{13}C (vide apêndice) possibilitou atestar a oxidação em C-3, a partir do desaparecimento do sinal referente à H-3 em δ 3,22, presente no espectro do precursor **77** e surgimento do sinal em δ 217,75, referente ao carbono carbonílico de cetona C-3. Os demais sinais apresentam valores de deslocamento químico semelhantes àqueles relatados por Ma et al. (2005) para a mesma substância.

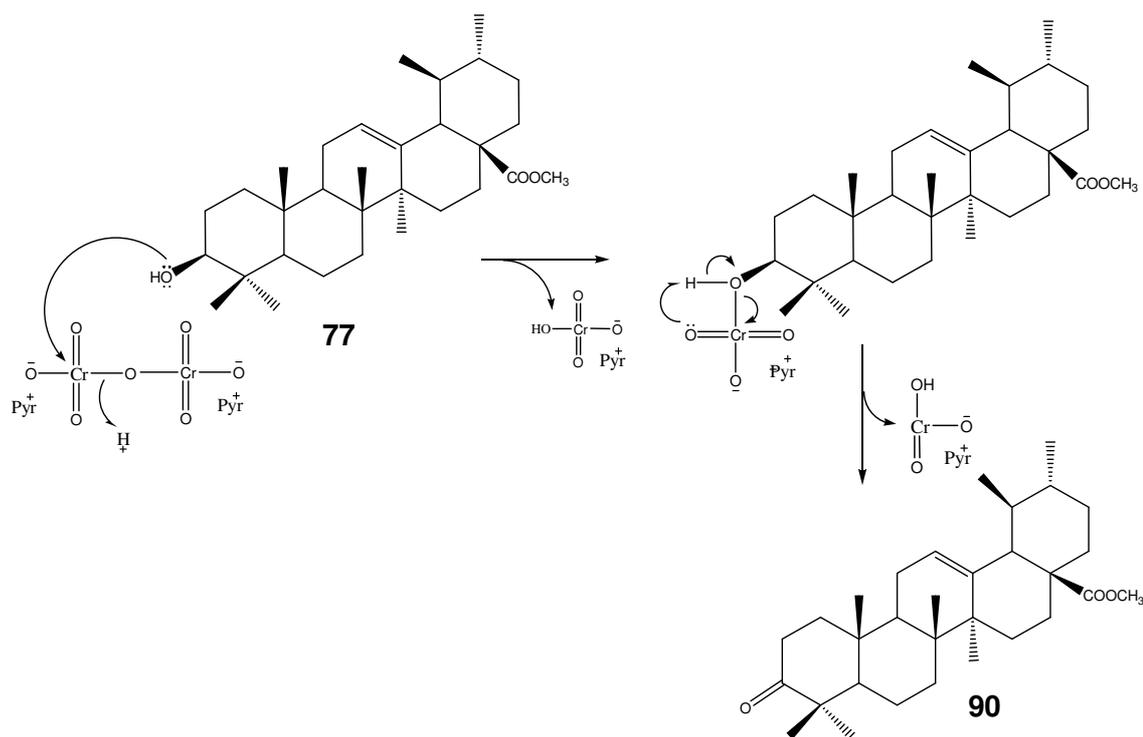


Figura 67 - Proposta de mecanismo para a formação do derivado **90**, segundo Carey e Sundberg (1993).

10.1.14 Síntese de 3-hidroxi-oxima-urs-12-en-28-oato de metila (91)

O tratamento de **90** com cloridrato de hidroxilamina resultou na formação da oxima **91** (Figura 65). A reação, realizada segundo Chen et al. (2006), ocorre através de uma adição nucleofílica à carbonila. A rápida transferência do próton gera um intermediário que geralmente não é isolado; em seguida, ocorre a desidratação induzida pelo ácido e a eliminação da água produz a oxima (Figura 68).

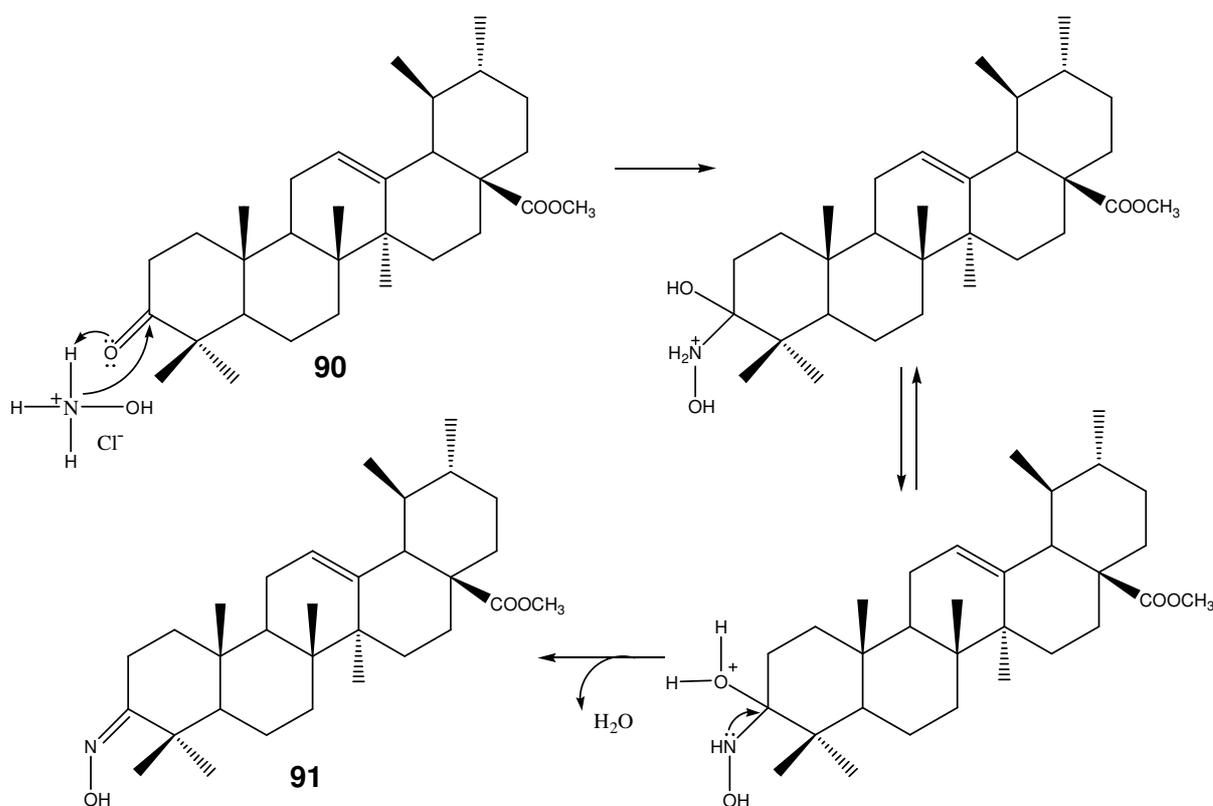


Figura 68 - Proposta de mecanismo para a formação de **91**.

A obtenção da oxima **91** como produto da reação pôde ser confirmada através da análise dos dados espectrais de RMN de ¹H e de ¹³C (vide apêndice). No espectro de RMN de ¹³C de **91** observou-se um sinal em δ 166,85, que foi atribuído a C-3, com valor de deslocamento químico condizente com o relatado na literatura para a oxima do ácido ursólico (MA et al., 2005). Já os multipletos centrados em δ

2,22 e δ 3,06 presentes no espectro de RMN de ^1H foram atribuídos aos hidrogênios metilênicos H-2.

A formação do produto **91** também foi evidenciada pelo espectro de IV, no qual se observou banda em 3660 cm^{-1} atribuída ao estiramento O-H e banda em 931 cm^{-1} característica de estiramento N-O de oxima e distinta das vibrações características de C-O de alcoóis entre 1200 e 1000 cm^{-1} .

10.1.15 Tratamento de **77** com HI 57%

Na tentativa de se obter um derivado isomerizado da dupla ligação em C-12 e C-13, o derivado **77** foi submetido a tratamento com HI 57% em benzeno. Porém, devido ao impedimento estérico da molécula, a reação não evoluiu, sendo obtido o próprio produto de partida.

10.1.16 Tentativa de oxidação de **90** com SeO_2

O composto **90** foi tratado com SeO_2 , buscando-se obter um derivado oxidado. Porém, mesmo com as várias tentativas de otimização realizadas, variando-se condições de tempo e temperatura, não se obteve sucesso na reação. Em todas as condições experimentadas, obteve-se uma mistura de três ou mais compostos, sendo sempre o precursor **90** o majoritário. Devido à diferença de proporção entre os produtos obtidos, não foi possível identificar os componentes minoritários.

10.1.17 Tentativa de oxidação com *t*-BuOOH/ SeO_2

Ainda na tentativa de se obter um derivado oxidado, **90** foi tratado com *t*-BuOOH/ SeO_2 , sob diferentes condições de reação. Mais uma vez, não se conseguiu sucesso e somente o material de partida foi isolado.

10.1.18 Síntese de 3,11-dioxo-urs-12-en-28-oato de metila (**92**)

Devido às dificuldades encontradas nas tentativas de oxidação de **90**, optou-se por uma metodologia distinta e o derivado foi então tratado com NaClO_2 /*t*-BuOOH

segundo Silvestre e Salvador (2007). Após diversas variações nas condições de tempo e temperatura, visando à otimização da reação, obteve-se a dicetona **92** como produto da reação (Figura 65, pag. 219).

O espectro obtido no IV mostrou a presença de bandas de deformação axial de C=O de cetonas em 1726 cm^{-1} e 1658 cm^{-1} , referentes, respectivamente, ao grupo ceto em C-3 e em C-11. A diferença nas absorções se dá pelo fato da cetona em C-11 ser α,β -insaturada, com conseqüente deslocalização dos elétrons π e redução do caráter de ligação dupla, levando à absorção em menor número de ondas (SILVERSTEIN; WEBSTER, 2000).

A estrutura foi confirmada com base na análise dos espectros de RMN de ^1H e de ^{13}C (vide apêndice, pag. 303 e 304) e comparação com dados da literatura (HONDA et al., 2000). O surgimento do simpleto em δ 5,61, atribuído ao hidrogênio H-12, e dos sinais de carbono em δ 199,23, δ 130,62 e δ 163,44, atribuídos, respectivamente, aos carbonos carbonílico C-11 e olefínicos C-12 e C-13, confirmaram a obtenção da cetona em C-11. Os demais sinais encontram-se com valores de deslocamento químicos semelhantes aos obtidos para a cetona de partida **90**.

10.1.19 Tentativas de oxidação de 78 e 90 com SeO_2/AcOH

Visando obter derivados oxidados das substâncias **78** e **90**, estas foram submetidas a tratamento com SeO_2/AcOH . Porém, mesmo aumentando o tempo de reação, não se obteve sucesso e os próprios derivados empregados como materiais de partida foram obtidos como produto final.

10.1.20 Tentativa de rearranjo de 92 com $\text{BF}_3\text{-Et}_2\text{O}$

A dicetona **92** foi submetida a tratamento com $\text{BF}_3\text{-Et}_2\text{O}$, empregando as condições descritas por Srikrishna e Ramasastry (2003). Porém, a reação não evoluiu, recuperando-se o próprio produto de partida. Na tentativa de se encontrar as condições ideais para a reação, alterou-se a temperatura e as concentrações de $\text{BF}_3\text{-Et}_2\text{O}$ foram aumentadas. No entanto, também não se obteve sucesso no procedimento.

10.1.21 Tentativas de redução de **92**

Na tentativa de se obter alcoóis como produtos de redução da dicetona **92**, esta foi submetida a tratamento com vários agentes redutores, sob distintas condições.

O álcool alílico, produto almejado da redução de **92**, é considerado um bom produto de partida para reações de rearranjo devido à presença de pares de elétrons livres, podendo atuar como base de Lewis e então reagir com ácidos de Lewis como BF_3 , empregado no presente trabalho (TONDER; TANNER, 2003). Esperava-se que esta reação gerasse um carbocátion resultando em transposições na molécula, como aquela ocorrida na formação do aldeído **83**, isso não ocorreu nas condições ensaiadas para **92**.

10.1.21.1 Redução de **92** com $\text{NaBH}_4/\text{CeCl}_3 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$

A dicetona **92** foi submetida a tratamento com $\text{NaBH}_4/\text{CeCl}_3 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ em MeOH/THF (1:1) segundo Matsumoto et al. (1996). Realizaram-se algumas alterações na concentração dos reagentes e na temperatura, buscando-se as condições ideais para a reação; porém, não foi possível a obtenção do álcool alílico. Obteve-se, no entanto, o álcool **93**, produto de redução de **92** na posição 3 (Figura 65, pag. 219). As demais posições não foram reduzidas.

Ao se analisar os espectros de RMN de ^1H e de ^{13}C (vide apêndice) pôde-se constatar a redução da posição 3, pelo surgimento do multiplete em δ 3,22 e do sinal em δ 78,83, atribuídos ao hidrogênio e carbono carbinólico em 3. Por outro lado, a presença dos simpletos em δ 5,60, δ 2,30 e δ 3,61, atribuídos respectivamente aos hidrogênios H-12, H-9 e OCH_3 , bem como dos sinais em δ 200,01 e δ 177,29, atribuídos aos carbonos C-11 e C-28, confirmaram a manutenção das funções cetona e éster, posicionadas em C-11 e C-28, respectivamente. No espectro obtido no IV para essa substância pôde-se notar o surgimento da banda larga relativa à deformação axial de grupo hidroxila em 3675 cm^{-1} . A presença das bandas em 1725 e 1659 cm^{-1} , características de deformação axial de $\text{C}=\text{O}$ de ésteres e cetonas conjugadas, confirmaram a manutenção da função cetona em C-11.

10.1.21.2 Redução de **92** com NaBH_4 /alumina

O derivado **92** foi também submetido à redução com NaBH_4 em alumina e exposição a microondas, conforme relatado por Varma e Saini (1997) para a redução de compostos carbonilados. Porém, não se obteve o álcool almejado e o produto obtido da redução foi o derivado **93** também obtido como produto de redução de **92** com $\text{NaBH}_4/\text{CeCl}_3 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$.

10.1.21.3 Tentativa de redução de **92** com $\text{NaBH}_4/\text{GuHCl}$

Ainda na tentativa de se obter o produto de redução alílica, a dicetona **92** foi submetida à redução com $\text{NaBH}_4/\text{GuHCl}$ em água, segundo metodologia empregada na redução de carbonilas α,β insaturadas descrita por Heydari et al. (2007). Novamente a reação esperada não ocorreu e nenhum produto de redução foi obtido, recuperando-se somente o derivado **92** empregado como produto de partida.

10.1.21.4 Tentativa de redução de **92** com $\text{InCl}_3/\text{NaBH}_4$

O derivado **92** também foi submetido a tratamento com $\text{InCl}_3/\text{NaBH}_4$ em CH_3CN , segundo descrito por Brindaban e Sampak (2003). Porém, mesmo aumentando-se o tempo de reação, a redução não ocorreu, obtendo-se somente o material de partida **92**.

10.1.21.5 Tentativa de redução de **92** com NaBH_4

Em mais uma tentativa, o derivado **92** foi submetido a tratamento utilizando-se NaBH_4 segundo método descrito por Dos Santos et al. (2005) para a redução de carbonilas α,β insaturadas. Ao final de 24 horas de reação, como não havia ocorrido redução, adicionou-se $\text{CeCl}_3 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ e promoveu-se o aquecimento do meio reacional. Porém, não se obteve sucesso e o produto obtido foi o próprio derivado **92**, empregado como produto de partida.

10.1.22 Síntese de 3 β ,28-diidroxi-urs-9,12-dieno (**94**) e 3 β -hiiróxi-urs-11-en-28,13 β -éter (**84**)

Devido às dificuldades encontradas na obtenção do produto de redução alílica, optou-se por uma redução inespecífica, empregando-se LiAlH₄ em éter etílico. A redução de **92** com LiAlH₄ resultou na obtenção de dois compostos inéditos, o dieno homoanular **94** e o éter cíclico **84** (Figura 65, pag. 219), também obtido no tratamento de **81** com BF₃-Et₂O.

O espectro no IV obtido para o dieno **94** mostrou a presença de banda larga centrada em 3662 cm⁻¹, característica de deformação axial de OH e banda em 1690 cm⁻¹ característica de deformação axial de C=C de dienos conjugados. No espectro de RMN de ¹H dessa substância, os dupletos centrados em δ 5,58 e δ 5,51 ($J = 6,0$ Hz) foram atribuídos aos hidrogênios olefínicos H-11 e H-12. O surgimento do multiplete em δ 3,22, atribuído ao hidrogênio H-3 e dos dupletos centrados em δ 3,60 e δ 3,24 ($J = 11,0$ Hz) atribuídos aos hidrogênios metilênicos diastereoisotópicos H-28a e H-28b, confirmaram a redução da molécula nas posições 3 e 28 (vide apêndice). Valores de deslocamento químico muito semelhantes foram descritos por García-Granados et al (2004) para um dieno estruturalmente relacionado do ácido oleanólico.

O espectro de RMN de ¹³C (vide apêndice, pag. 308) obtido para **94** confirmou a análise anterior, sendo os sinais em δ 155,09, δ 115,29, δ 123,45 e δ 140,19 atribuídos aos carbonos olefínicos do sistema conjugado C-9, C-11, C-12 e C-13, respectivamente. Já os sinais em δ 70,21 e δ 78,76 foram atribuídos aos carbonos carbinólicos C-28 e C-3.

Algumas das atribuições realizadas a partir dos espectros de monodimensionais de RMN de ¹H e de ¹³C foram confirmadas por espectros 2D. Assim, o mapa de contornos COSY (Figura 69) apontou as correlações entre os hidrogênios H11/H-12 (δ 5,58/ δ 5,51) e H-28a/H-28b (δ 3,60/ δ 3,24). Já o mapa de contornos HMQC (Figura 70) indicou as correlações entre os carbonos e hidrogênios olefínicos C-11/H-11 (δ 115,29/ δ 5,58) e C-12/H-12 (δ 123,45/ δ 5,51), bem como aquelas entre os carbonos e hidrogênios carbinólicos C-3/H-3 (δ 78,76/ δ 3,22) e C-28/H-28a e H-28b (δ 70,21/ δ 3,60 e δ 3,24).

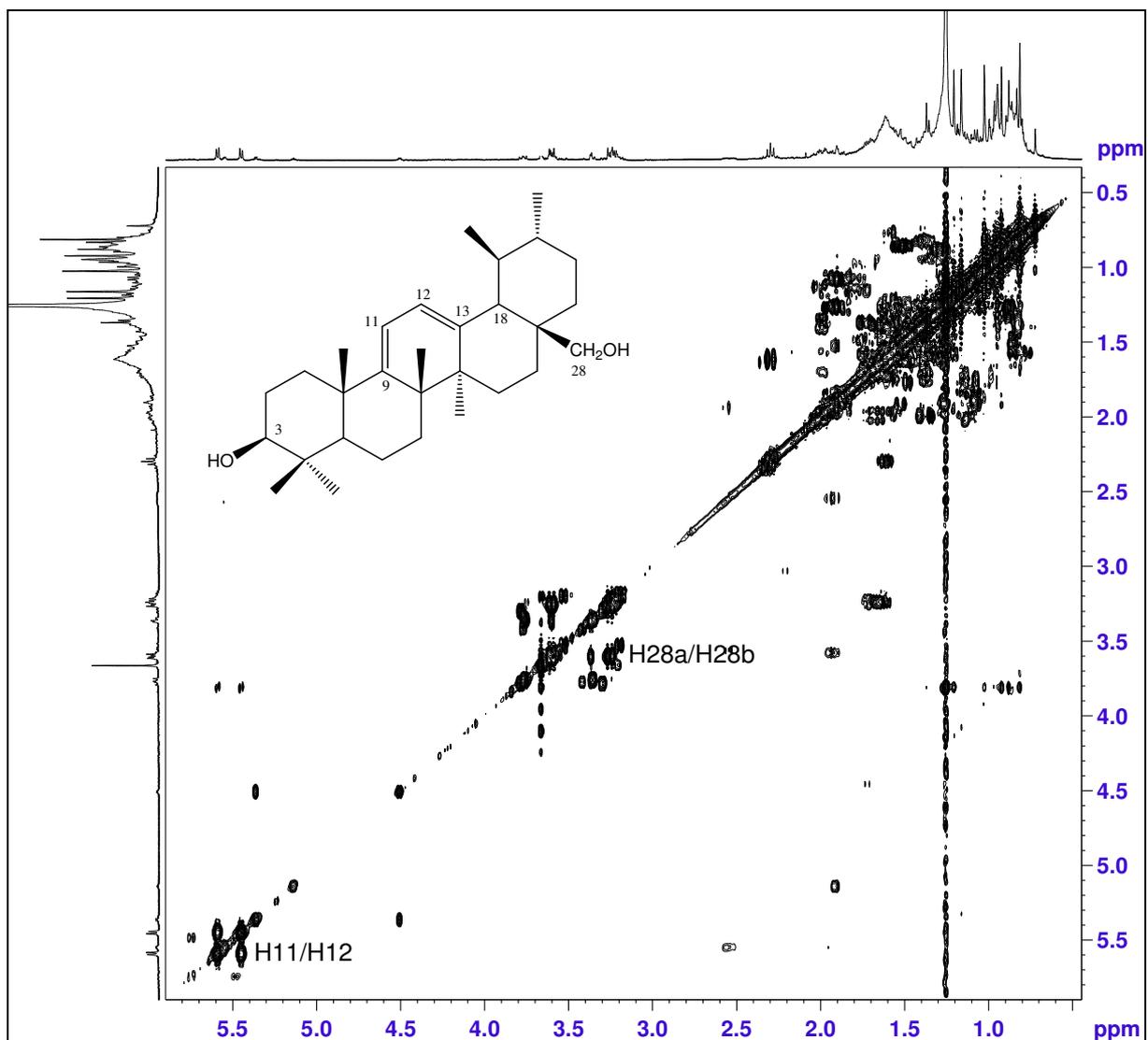


Figura 69 - Mapa de contornos COSY obtido para 94 (400 MHz, CDCl₃).

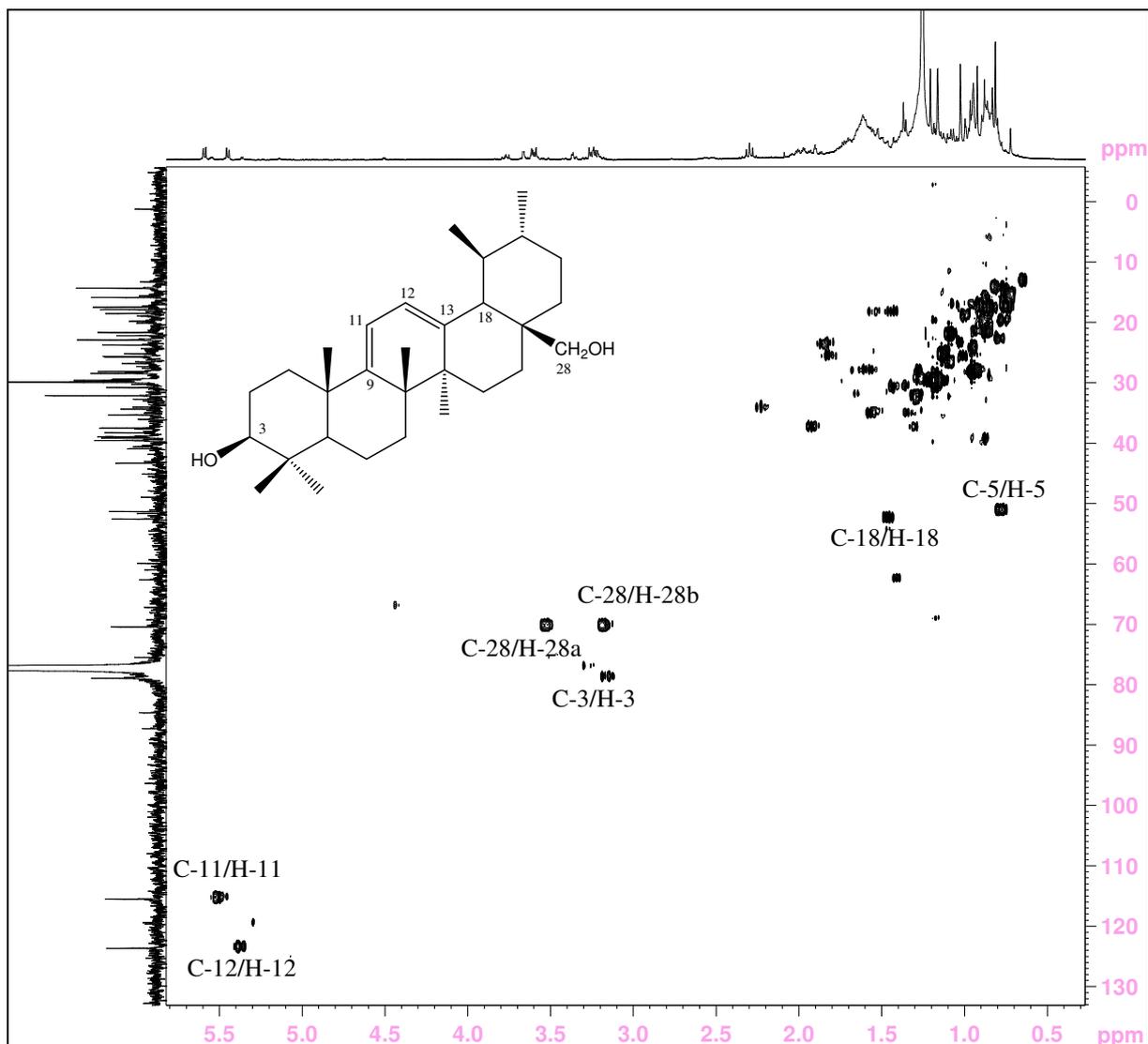


Figura 70 – Mapa de contornos HMBC obtido para 94 (100 MHz, CDCl_3).

10.1.23 Síntese de 3,4-seco-11-oxo-urs-12-en-28-oato de metila (95)

A dicetona **92** foi submetida a tratamento com MCPBA em CH_2Cl_2 e obteve-se como produto a lactona inédita **95** (Figura 65, pag. 219). A formação da lactona se deu através de rearranjo de Baeyer-Villiger, no qual cetonas cíclicas são transformadas em lactonas, segundo mecanismo proposto por Carey e Sundberg (1993) (Figura 71).

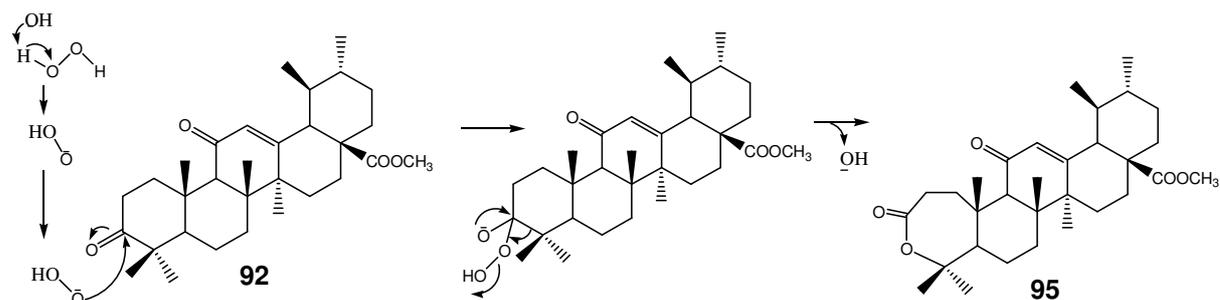


Figura 71 - Mecanismo proposto para a formação da lactona **95, segundo Carey e Sundberg (1993).**

No espectro de RMN de ^1H obtido para **95** (vide apêndice, pag. 310) observou-se o multipeto em δ 2,61 referente aos hidrogênios metilênicos H-2, mais protegidos do que os hidrogênios correspondentes do precursor **92**, devido ao efeito de desproteção da carbonila de éster, inferior ao exercido pela carbonila cetônica de **92**. Os demais sinais do espectro apresentaram deslocamentos químicos muito semelhantes aos obtidos para o produto de partida.

A análise do espectro de RMN de ^{13}C (vide apêndice, pag. 311) indicou o surgimento de novos sinais que possibilitaram confirmar a formação da lactona no anel A. Assim, os sinais em δ 38,88, δ 32,34, δ 175,67, δ 85,67, δ 54,46 e δ 39,69 foram atribuídos, respectivamente, aos carbonos C-1, C-2, C-3, C-4, C-5 e C-10 do anel lactônico. Esses valores são semelhantes àqueles descritos na literatura para a lactona estruturalmente relacionada do ácido oleanólico (SHIRANE et al., 1996). No espectro obtido no IV para essa substância pôde-se observar a presença da banda em 1721 cm^{-1} , característica de deformação axial de C=O de lactonas.

A análise do mapa de contornos HMQC (Figura 72) possibilitou confirmar algumas das atribuições, a partir das manchas de correlação entre os sinais de carbono e hidrogênio do anel lactônico, a saber C-1/H-1 (δ 38,88/ δ 1,06), C-2/H-2 (δ 32,34/ δ 2,61), C-5/H-5 (δ 54,46/ δ 1,62).

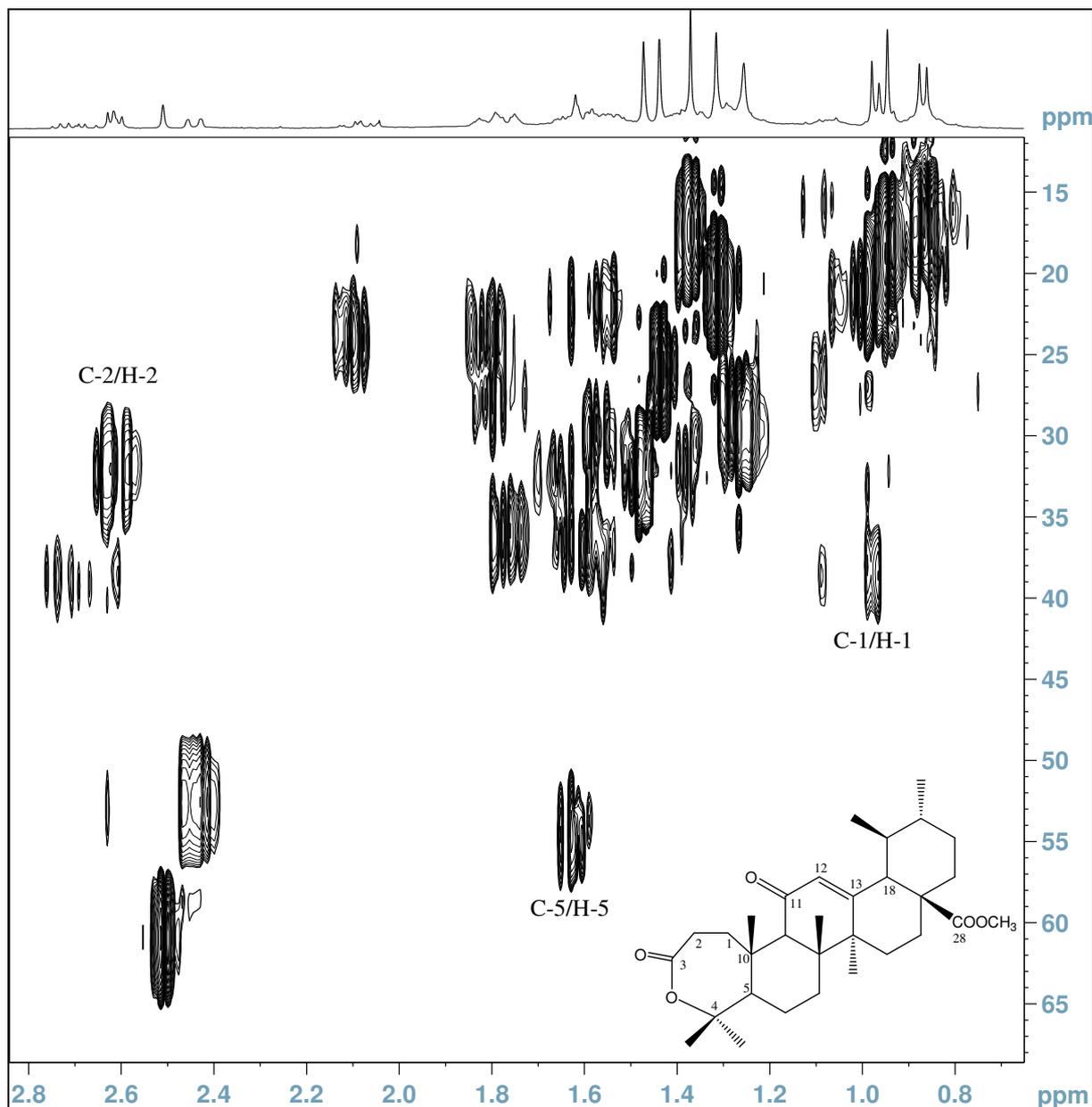


Figura 72 – Mapa de contornos HMBC obtido para 95 (100 MHz, CDCl_3).

10.1.24 Síntese de 3-oxo,11-hidróxi-urs-12-en-28-oato de metila (96)

Na tentativa de se obter o álcool alílico, o derivado **90** foi submetido à oxidação com MCPBA catalisada por 5,10,15,20-tetrakis(pentafluorofenil) porfirina, de acordo com método descrito por Konoike et al. (1999) para a oxidação alílica de olefinas estericamente impedidas. Foram realizadas diversas alterações nas condições originalmente descritas buscando-se otimizar a reação e, conseqüentemente, obter o álcool alílico como produto de redução. Nas diferentes

condições avaliadas (tempo, temperatura e concentração de MCPBA) obteve-se êxito no aumento do rendimento do produto desejado; porém, não foi possível eliminar a formação de subprodutos. Em todas as condições avaliadas obteve-se uma mistura de três ou mais substâncias em diferentes proporções e a melhor condição encontrada foi à temperatura de -78°C , tempo de reação de 30 horas e concentração de MCPBA de 0,26 mM, que após cromatografia em coluna de sílica gel, resultou na obtenção da mistura de isômeros **96** em maior proporção (56%) do que os demais compostos (**90**, 15%; **92**, 30%).

No espectro obtido no IV para **96** pôde-se notar a presença de banda larga característica de deformação axial de OH livre centrada em 3646 cm^{-1} , a qual indicou a oxidação da posição alílica. A obtenção do produto de redução alílica foi confirmada a partir do espectro de RMN de ^1H (vide apêndice), no qual se observou o surgimento de dois sinais: um duplete em δ 5,30 ($J = 3,6\text{ Hz}$), atribuído à H-12 em acoplamento com H-11, e o duplete duplo em δ 4,29 ($J = 8,8$ e $3,6\text{ Hz}$), atribuído à H-11 em acoplamento com H-9 e H-12. O surgimento de sinais duplicados, porém de menor intensidade, referentes aos hidrogênios olefínicos, confirmou a obtenção da mistura de isômeros em C-11. A presença do simpleto em δ 5,64, atribuído ao hidrogênio H-12 da dicetona **92**, indicou a presença de traços deste derivado como contaminante do produto **96**.

No espectro de RMN de ^{13}C (vide apêndice), obtido para **96**, os sinais em δ 139,88 e δ 129,55 foram atribuídos aos carbonos olefínicos C-13 e C-12, com valores de deslocamento químico mais afastados do TMS em relação aos mesmos sinais obtidos para o precursor **90**, devido à presença da hidroxila em C-11.

10.1.25 Tentativa de oxidação de **31** com $\text{NaClO}_2/t\text{-BuOOH}$

O ácido ursólico **31** foi submetido à oxidação com $\text{NaClO}_2/t\text{-BuOOH}$, seguindo as mesmas condições otimizadas para a obtenção de **92**, na qual se empregou a cetona **90** como produto de partida. Porém, nas condições empregadas, **31** foi degradado, resultando em uma mistura complexa de produtos não identificados.

10.1.26 Esterificação de **88** com $\text{CH}_3\text{I}/\text{K}_2\text{CO}_3$

O tratamento de **88** com $\text{CH}_3\text{I}/\text{K}_2\text{CO}_3$ resultou na obtenção do derivado esterificado **79** já obtido como produto da reação de **78** com $t\text{-BuOOH}/\text{NaClO}_2$.

10.1.27 Tentativas de epoxidação de **79** com $\text{H}_2\text{O}_2/\text{NaOH}$

Os epóxidos estão entre os intermediários mais versáteis em síntese orgânica. A polaridade e tensão do anel de três membros faz com que substâncias dessa classe sejam susceptíveis a reações com um grande número de reagentes (SHIKRISHNA; RAMASASTRY, 2005). A pronunciada eletrofilia dos epóxidos é atribuída à combinação da natureza polarizante do oxigênio e à tensão do anel de três membros, o que facilita a abertura do mesmo (SHIKRISHNA; RAMASASTRY, 2005).

A grande variedade de reações com epóxidos deriva da possibilidade de abertura nucleofílica do anel, inter ou intramolecular, resultando em alcoóis, que podem sofrer desidratação produzindo alquenos e também rearranjos, levando a compostos carbonilados e alcoóis alílicos. Produtos derivados da abertura de epóxido seguido de ciclizações, iniciadas com ácidos de Lewis, são extensivamente estudados (MARSON, 2000).

Com o intuito de se obter um derivado epoxidado, a substância **79** foi submetida a tratamento com $\text{H}_2\text{O}_2/\text{NaOH}$. Embora tenham sido avaliadas modificações nas condições reacionais, com alterações nas concentrações dos reagentes e no tempo de reação, não se obteve o epóxido desejado. Em todas elas obteve-se somente o derivado **79**, empregado como produto de partida.

Optou-se, então, pelo emprego de outro método também utilizado na epoxidação de compostos orgânicos, o tratamento com MCPBA. Porém, a reação também não evoluiu, não sendo possível obter o derivado desejado.

Nas reações com MCPBA, devido ao excesso de ácido perbenzóico no meio reacional, o epóxido se abre após sua formação, levando a formação de compostos com hidroxila e grupo benzoato. O uso de NaHCO_3 evita que o anel se abra, neutralizando o excesso de ácido benzóico e evitando a protonação do epóxido e sua posterior abertura.

Segundo Tkachev et al. (1994) um dos fatores limitantes desta reação com derivados do ácido ursólico é a presença da metila em C-29, que impede o ataque pela face α à dupla ligação, posição de ataque predominante do ácido perbenzóico, reagente empregado nas tentativas de reação. Ainda segundo o autor, o uso de peróxido de hidrogênio, reagente também empregado na reação, considerado por ele um agente epoxidante fraco, também não é um bom método para a obtenção de epóxidos do ácido ursólico. Majumder e Bagchi (1983) concluíram que a presença do grupamento ácido carboxílico em C-28 é condição essencial para a epoxidação da dupla ligação em derivados do ácido ursólico. Alguns derivados como metil ésteres poderão reagir, mas muito lentamente em presença de peróxido de hidrogênio, com o uso de ácido acético como solvente e temperaturas elevadas. Esta dificuldade é devida ao impedimento estérico causado pela introdução do grupo metila consideravelmente mais volumoso do que o hidrogênio do ácido carboxílico precursor (SIDDIQUI et al., 1989).

Diante da dificuldade de se obter epóxidos derivados do ácido ursólico, o triol **81** foi selecionado como produto de partida para as reações de rearranjo com $\text{BF}_3\text{-Et}_2\text{O}$ (Página 200).

10.2 Transformações químicas do ácido oleanólico

O ácido oleanólico (**42**) também foi submetido a transformações químicas visando à obtenção de derivados bioativos (Figura 73). O ácido oleanólico empregado como material de partida para essas reações encontrava-se em mistura com o ácido ursólico (**31**). Dessa forma, os derivados **97**, **98**, **99**, **100** e **101** foram obtidos em mistura com os derivados correspondentes do ácido ursólico, e mesmo após tentativas de separação cromatográfica não foi possível a separação dos isômeros. Tendo em vista a dificuldade para a separação cromatográfica dessas substâncias, com rendimento adequado para as transformações químicas posteriores, optou-se por concentrar o trabalho na obtenção dos derivados do ácido ursólico.

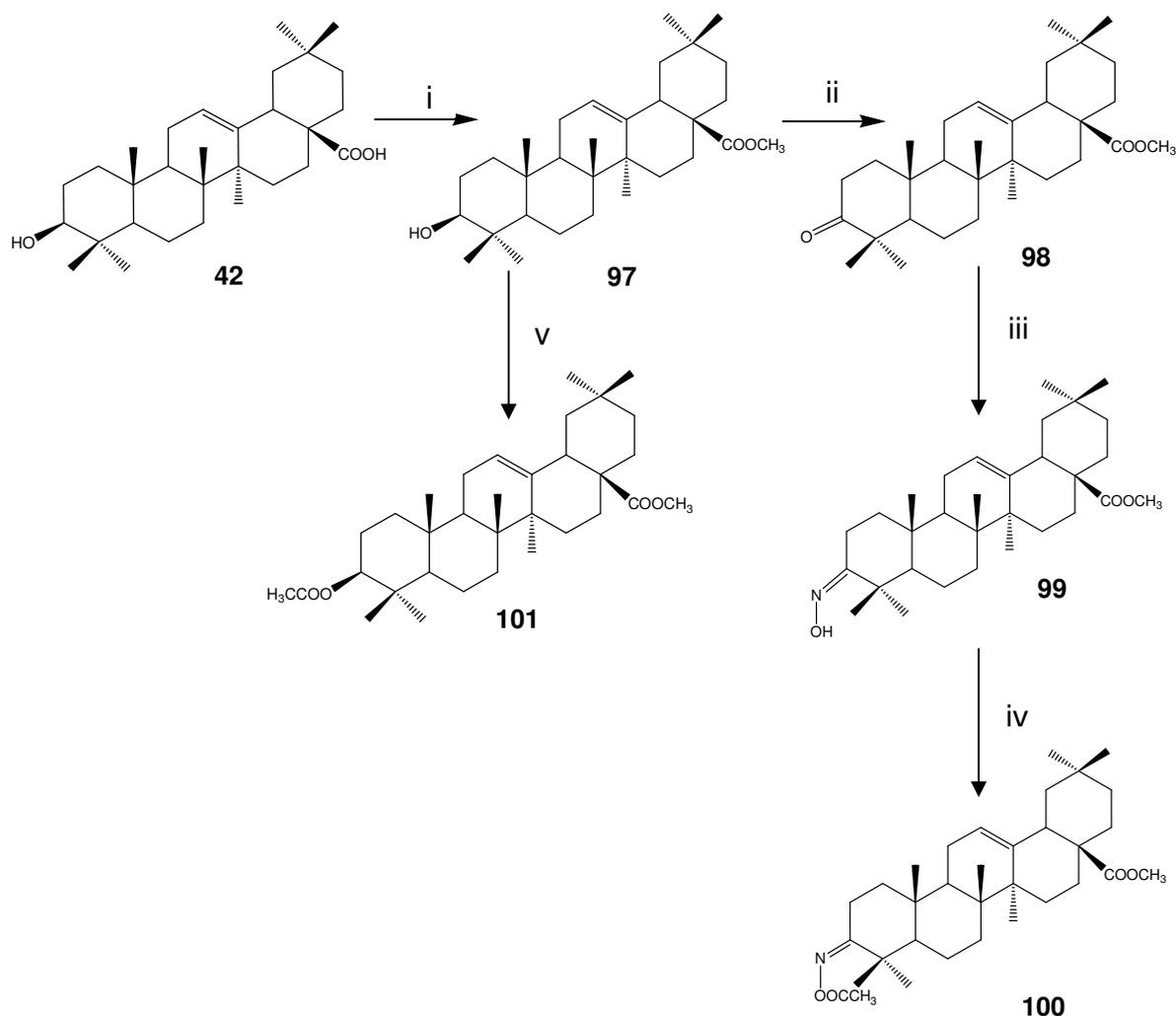


Figura 73 - Esquema de síntese de derivados do ácido oleanólico. i) K₂CO₃/CH₃I, t amb, 89%;
 ii) PDC, t amb, 96%; iii) (NH₃OH)Cl, 95 °C, 94%; iv) piridina/anidrido acético, 85%; v)
 piridina/anidrido acético, 83%.

10.2.1 Síntese de 3β-hidróxi-olean-12-en-28-oato de metila (97)

O tratamento do ácido oleanólico (42) com CH₃I/K₂CO₃, em presença de acetona, conduziu à formação do derivado esterificado 97 (Figura 73).

A estrutura do éster foi confirmada pela análise dos espectros de IV, de RMN de ¹H e de ¹³C obtidos para 97 (vide apêndice), bem como pela comparação com dados da literatura (ZAPRUTKO et al., 2004). No espectro de RMN de ¹H pôde-se observar o surgimento do simpleto em δ 3,63, atribuído ao grupo metoxila introduzida na molécula. O mesmo foi observado no espectro de RMN de ¹³C, no qual os sinais em δ 178,32 e δ 51,60, inexistentes no precursor, foram atribuídos aos

carbonos carbonílico e metílico do éster. No espectro obtido no IV para a substância, observou-se a presença da banda característica de carbonila de éster em 1726 cm^{-1} .

10.2.2 Síntese de 3-oxo-olean-12-en-28-oato de metila (98)

A oxidação de **97** empregando-se PDC como agente oxidante foi realizada segundo metodologia descrita por Gordaliza et al. (1995). A reação resultou na obtenção do derivado **98** (Figura 73).

No espectro obtido no IV para essa substância observou-se a presença da banda característica de deformação axial de C=O de cetonas em 1724 cm^{-1} . A análise conjunta dos espectros de RMN de ^1H e de ^{13}C (vide apêndice), bem como a comparação com dados da literatura (ZAPRUTKO et al., 2004), confirmaram a obtenção do derivado oxidado **98**. No espectro de RMN de ^1H pôde-se observar o desaparecimento do duplete duplo em δ 3,22 atribuído à H-3, bem como o surgimento do sinal em δ 217,71 no espectro de RMN de ^{13}C , caracterizando a presença na carbonila cetônica na posição 3.

10.2.3 Síntese de 3-hidroxi-oxima-olean-12-en-28-oato de metila (99)

A oxima **99** foi obtida como produto da reação de **98** (Figura 73) com cloridrato de hidroxilamina, segundo metodologia descrita por Chen et al. (2006).

No espectro de RMN de ^1H (vide apêndice), os sinais centrados em δ 3,22 e δ 2,86 foram atribuídos aos hidrogênios metilênicos H2a e b, respectivamente. No espectro de RMN de ^{13}C , a presença do sinal em δ 166,81, atribuído a C-3 e com valor de deslocamento químico característico de carbono de oxima, confirmou o sucesso da reação. Os demais sinais apresentaram valores de deslocamento químico semelhantes aos descritos por Zaprutko et al. (2004) para esta substância. No espectro de IV de **99** observaram-se, também, bandas em 3661 e 940 cm^{-1} características de estiramento de OH e N-O de oximas, respectivamente.

10.2.4 Acetilação de **99**

A oxima **99** foi submetida à acetilação com piridina e anidrido acético, resultando na obtenção do derivado acetilado **100** (Figura 73).

A estrutura foi confirmada com base na análise dos espectros de RMN de ^1H e de ^{13}C (vide apêndice). O simpleto em δ 3,61 foi atribuído aos hidrogênios metílicos do grupo acetila e os sinais em δ 169,87 e δ 21,10 foram atribuídos aos carbonos carbonílico e metílico, respectivamente. Bandas características de deformação C=O e C—O de ésteres em 1726 e 1163 cm^{-1} também foram observadas no espectro obtido no IV para **100**.

10.2.5 Síntese de 3-acetóxi-olean-12-en-28-oato de metila (**101**)

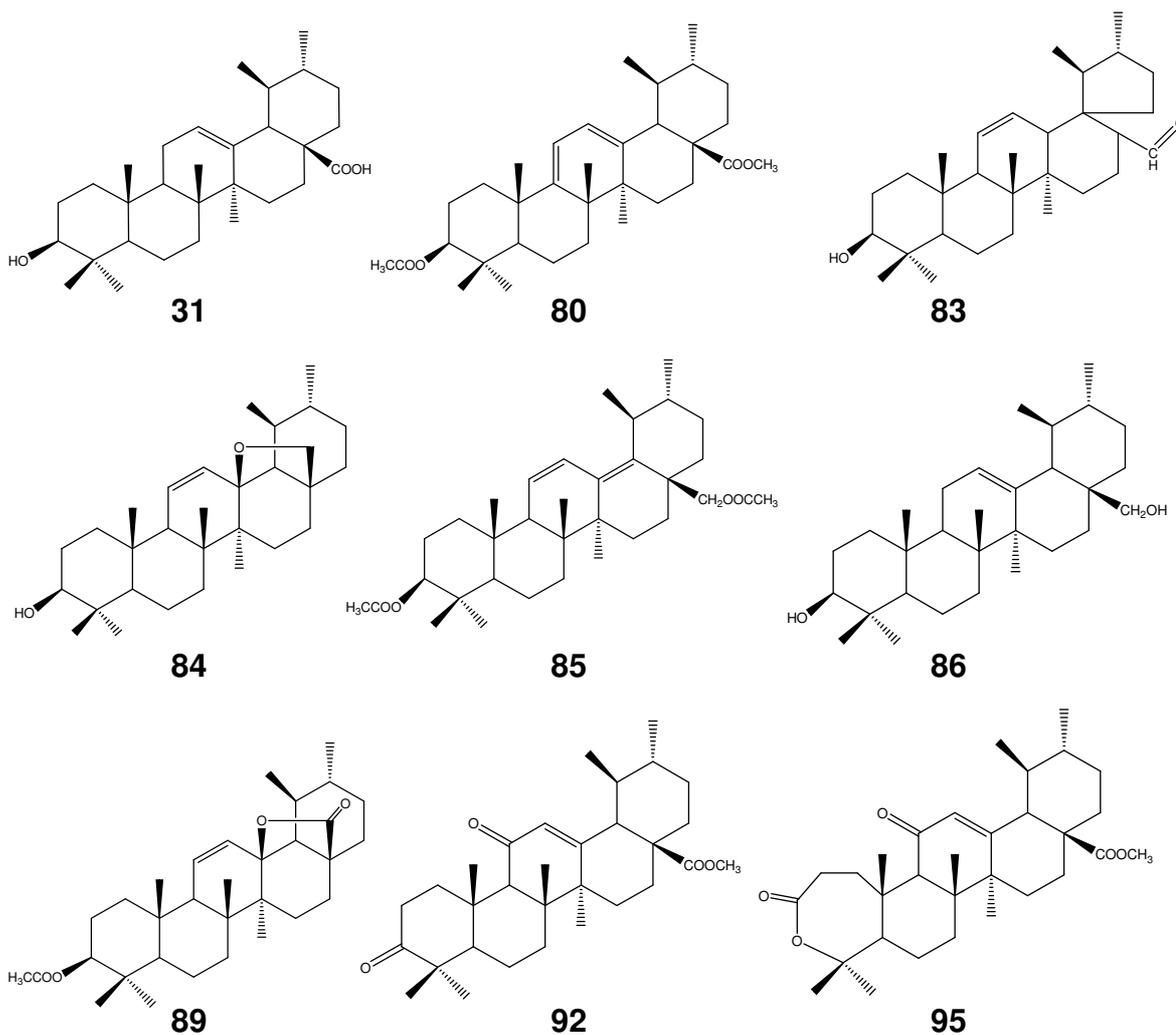
O derivado **101** foi obtido como produto da acetilação de **97** com piridina e anidrido acético (Figura 73). A análise dos espectros de IV e de RMN de ^1H e de ^{13}C (vide apêndice), bem como a comparação com dados da literatura (ZAPRUTKO et al., 2004) confirmaram a obtenção do produto acetilado. A presença dos sinais em δ 171,01 e δ 21,35, referentes aos carbonos carbonílico e metílico no espectro de RMN de ^{13}C ; o sinal em δ 4,48, atribuído ao hidrogênio H-3 no espectro de RMN de ^1H ; o desaparecimento da banda de deformação de OH livre em 3500 cm^{-1} e o aparecimento das bandas de deformação axial de C=O e C—O de éster em 1724 e 1287 cm^{-1} evidenciaram a introdução do grupo acetila.

10.3 Ensaios biológicos

10.3.1 Avaliação da atividade citotóxica dos produtos obtidos

Alguns dos derivados do ácido ursólico sintetizados no presente trabalho foram avaliados quanto à atividade citotóxica *in vitro* frente a diferentes linhagens de células tumorais humanas A-549 (carcinoma de pulmão), HT-29 (adenocarcinoma colo-retal) e MDA-MB-231 (adenocarcinoma de mama). Os resultados obtidos são apresentados em valores de CI_{50} (μM) e referem-se à concentração necessária para inibir 50% do crescimento das células tumorais em relação ao grupo controle.

Os derivados ensaiados foram selecionados de acordo com os diferentes grupos químicos introduzidos nas posições C-3, C-11 e C-28. Assim, foram avaliados ácido ursólico (**31**), os derivados inéditos **80**, **83**, **84**, **85** e **95** e os derivados **86**, **89** e **92**. Os resultados obtidos encontram-se na Tabela 49.



A maioria dos derivados ensaiados não apresentou atividade citotóxica nas concentrações avaliadas (10 a 0,026 µg/mL). Apenas o ácido ursólico (**31**) e o derivado **86** foram citotóxicos frente às linhagens de células tumorais empregadas.

Observou-se um considerável aumento na potência para o derivado **86**, especialmente frente às linhagens celulares MDA-MB231 (**31** Cl_{50} = 18,6 µM; **86** Cl_{50} = 1,99 µM) e HT-29 (**31** Cl_{50} = 19 µM, **86** Cl_{50} = 2,94 µM). Estes resultados indicam que a presença de grupo carboxila ou hidroxila na posição 28, bem como de hidroxila na posição 3 são importantes para a atividade citotóxica. A introdução de diferentes funcionalizações no anel C do esqueleto triterpênico (derivados **80**, **83**, **84**, **85**, **89**, **92** e **95**) resultou em derivados inativos. De maneira semelhante, transformações químicas da hidroxila em C-3 forneceram compostos inativos (derivados **80**, **85**, **89**, e **92**). Por outro lado, a redução do grupo carboxila na posição 28 para hidroxila, observada no derivado **86**, aumentou significativamente a citotoxicidade em relação ao precursor ácido ursólico. A importância deste grupo na atividade fica evidente ao se analisar os derivados inativos **83** e **84** que, apesar da presença da hidroxila na posição 3, possuem outros grupos funcionais na posição 28.

Os resultados obtidos indicam que os substituintes afetam claramente a potência da atividade citotóxica dos derivados triterpênicos e apontam para a necessidade de futuros estudos com compostos desta classe, visando obter novos produtos de transformação química do ácido ursólico e de outros triterpenos, com potencial para o desenvolvimento de novos fármacos antitumorais.

A influência de grupos funcionais distintos na atividade citotóxica de derivados do ácido ursólico também foi investigada anteriormente por alguns grupos. Kashiwada et al. (2000) e Ma et al. (2005) relataram que a presença de função ácido carboxílico ou hidroxila nas posições 3 e 28 são importantes para a atividade citotóxica frente a linhagens de células tumorais HL-60, BGC e Bel-7402. Os autores também relataram que a esterificação das posições 3 e 28 leva à perda da atividade citotóxica, indicando que a presença de grupo doador de hidrogênio em ambas as posições, ou em uma delas, é essencial para a atividade citotóxica nas linhagens tumorais ensaiadas. No mesmo trabalho, também foram sintetizados derivados aminados na posição 3, sendo os isômeros com orientação β em C-3 cerca de 20

vezes mais potentes do que os isômeros 3 α correspondentes, revelando que a estereoquímica da posição 3 também é importante para a atividade citotóxica.

Tabela 49 - Atividade citotóxica do ácido ursólico e derivados frente a linhagens tumorais humanas.

Substâncias Ensaçadas	Linhagens celulares (CI ₅₀ μ M)		
	MDA-MB231	HT-29	A-549
31	18,6	19,0	10,9
80	n.d.	n.d.	n.d.
83	n.d.	n.d.	n.d.
84	n.d.	n.d.	n.d.
85	n.d.	n.d.	n.d.
86	1,99	2,94	4,52
89	n.d.	n.d.	n.d.
92	n.d.	n.d.	n.d.
95	n.d.	n.d.	n.d.

n.d.: não ativo nas concentrações ensaiadas.

Meng et al. (2009) também relataram a atividade citotóxica de derivados sintéticos do ácido ursólico frente a linhagens de células tumorais HeLa, SKOV3 e BGC-823. Tendo como ponto de partida as observações de relação estrutura química/atividade biológica relatados por Kashiwada et al. (2000) e Ma et al. (2005), os autores introduziram grupamentos amino-alcoóis ou benzilaminas nas posições 3 e 28 e os derivados obtidos apresentaram potência bastante superior, com valores de CI₅₀ 6 vezes menores que os obtidos para o ácido ursólico. Os autores sugeriram que o mecanismo pelo qual estes derivados atuam inibindo o crescimento celular é através da indução de apoptose e inibição do ciclo de progressão celular na fase S.

Chadalapaka et al. (2008) relataram que a introdução de grupos doadores de elétrons na posição 2 aumenta consideravelmente a potência de derivados do ácido ursólico 1-en-3-ona, já relatados como compostos citotóxicos.

Os resultados encontrados no presente trabalho corroboram os resultados relatados por Ma et al. (2005), visto que a presença de hidroxila na posição 3 também se mostrou necessária para a atividade citotóxica nos derivados ensaiados.

O mesmo pôde ser observado para a posição 28, sendo o derivado diidroxilado **62** mais potente que o precursor ácido ursólico frente às linhagens celulares ensaiadas. Além disso, a introdução de grupos volumosos na posição 28 também não forneceu derivados ativos, condizente com o relatado por Kashiwada et al. (2000). Isto indica que os derivados do ácido ursólico contendo grupos hidroxila em C-3 e C-28, ou seja, grupos com caráter doador de hidrogênio são moléculas promissoras para o desenvolvimento futuro de fármacos antitumorais. Porém, estudos adicionais com um número maior de derivados são necessários para uma melhor avaliação da relação estrutura química/atividade biológica, visando à síntese de produtos mais ativos, potencialmente úteis para o desenvolvimento futuro de fármacos antitumorais.

10.3.2 Avaliação da atividade antiplasmódica

Diversos triterpenos e derivados apresentam pronunciada atividade antiplasmódica (BAREN et al. 2006; SRINIVASAN et al., 2002). Assim, no presente trabalho, a potencial atividade antiplasmódica do ácido ursólico e dos derivados **79**, **80**, **83**, **84**, **86**, **89**, **90**, **91**, **92** e **95**, foi ensaiada *in vitro* em culturas de *Plasmodium falciparum* resistente à cloroquina.

Somente o derivado **90** ($CI_{50} = 42 \mu\text{g/mL}$) apresentou atividade moderada frente ao *P. falciparum* quando comparado ao controle ($CI_{50} = 0,023 \mu\text{g/mL}$), sendo os demais derivados ensaiados inativos.

Derivados esterificados do lupeol na posição 3, assim como derivados esterificados e acetilados do ácido betulínico nas posições 3 e 28, mostraram atividade antimalárica *in vitro* (DE SA et al., 2009; SRINIVASAN et al., 2002). Porém, esta é a primeira vez em que se relata a atividade antiplasmódica para um ceto derivado nesta posição. Os resultados apontam a necessidade de estudos visando a obtenção de novos derivados triterpênicos com atividade antiplasmódica.

11 CONCLUSÕES

- As transformações químicas nas posições 3, 11 e 28 do ácido ursólico, isolado de *J. caroba* e *R. ferruginea*, levaram à obtenção 21 derivados sendo 6 destes substâncias inéditas: **80**, **83**, **84**, **85**, **94** e **95**.
- O derivado diidroxilado em C-3 e C-28 foi cerca de nove vezes mais potente que o ácido ursólico nos ensaios de atividade citotóxica em culturas de células tumorais humanas de mama MDA-MB-231, cólon HT29 e pulmão A549.
- A introdução de diferentes funcionalizações no anel C do esqueleto triterpênico e transformações químicas da hidroxila em C-3 resultaram em compostos inativos nos ensaios com células tumorais.
- Entre os derivados avaliados para atividade antiplasmódica *in vitro*, somente o derivado **90** contendo um grupo ceto em C-3 apresentou atividade moderada frente ao *Plasmodium falciparum*, sendo os demais inativos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACHARYA D.; MITAINE-OFFER A. C.; KAUSHIK N.; MIYAMOTO, T.; PAULULAT, T.; MIRJOLET J. F.; DUCHAMP, O.; LACAILLE-DUBOIS M. A. Cytotoxic spirostane-type saponins from the roots of *Chlorophytum borivillianum*. **Journal of Natural Products**, v. 72, p. 177-181, 2009.

AGRAWAL, P. K.; JAIN, D. C.; GUPTA, R. K.; THAKUR, R. S. Carbon-13 NMR spectroscopy of steroidal sapogenins and steroidal saponins. **Phytochemistry**, v. 24, n. 11, p. 2479-2496, 1985.

ALI, M. S.; JAHANGIR, M.; HUSSAN, S. S.; CHOUDHARY, M. I. Inhibition of alpha-glucosidase by oleanolic acid and its synthetic derivatives. **Phytochemistry**, v. 60, n. 3, p. 295-299, 2002.

ALI, R.M.; HOUGHTON, P.J. A new phenolic fatty acid ester with lipoxigenase inhibitory activity from *Jacaranda filicifolia*. **Planta Medica**, v. 65, p. 455-457, 1999.

ALVES, T. M.; NAGEM, T. J.; DE CARVALHO, L. H.; KRETTLI, A. U.; ZANI, C. L. Antiplasmodial triterpene from *Vernonia brasiliiana*. **Planta Medica**, v. 63, n. 6 p. 544-545, 1997.

ANDERSSON, D.; LIU, J. J.; NILSSON, A.; DUAN, R. D. Ursolic acid inhibits proliferation and stimulates apoptosis in HT29 cells following activation of alkaline sphingomyelinase. **Anticancer Research**, v. 23, n. 4, p. 3317-3322, 2003.

ANDRADE, A. A.; VAROTTI, F. P.; FREITAS, I. O.; SOUZA, M. V. N.; VASCONCELOS, T. R. A.; BOECHAT, N.; KRETTLI, A. U. E. Enhanced activity of mefloquine and artesunic acid against *Plasmodium falciparum* in vitro and *P.berghei* in mice by combination with ciprofloxacin. **European Journal of Pharmacology**, v. 558, p. 194-198, 2007.

ANDRADE-NETO, V. F.; BRANDÃO, M. G. L.; STEHMANN, J. R.; OLIVEIRA, L. A.; KRETTI, A. Antimalarial activity of Cinchona-like plants used to treat fever and malaria in Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 87, n. 2-3, p. 253-256, 2003.

ANTONIO, J. M.; GRACIOSO, J. S.; TOMA, W.; LOPEZ, L. C.; OLIVEIRA, F.; SOUZA BRITO, A. R. M. Antiulcerogenic activity of ethanol extract of *Solanum variable* (false "jurubeba"). **Journal of Ethnopharmacology**, v. 93, p. 83-88, 2004.

ARELLANO, C.; PHILIBERT, C.; VACHOUX, C.; WOODLEY, J.; HOUIN, G. The metabolism of midazolam and comparison with other CYP enzyme substrates during intestinal absorption: in vitro studies with rat everted gut sacs. **Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Science**, v. 10, n. 1, p. 26-36, 2007.

ASSEFA, H.; NIMROD, A.; WALKER, L.; SINDELAR, R. Synthesis and evaluation of potential complement inhibitory semisynthetic analogs of oleanolic acid. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**, v. 9, n. 14, p. 1889-1894, 1999.

BACCHI, E. M. Antiulcer and cicatrization action of some Brazilian plants. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 1, n. 1, p. 93-100, 1986.

BACCHI, E. M.; RIOS, J. P. C.; DIAS, T. G. Fraction responsible for *Jacaranda caroba* DC. Antiulcer action. In: IUPAC INTERNATIONAL CONFERENCE ON BIODIVERSITY, 2., 1999, Belo Horizonte, MG. **Anais....** p. 173.

BAREN, V. C.; ANAO, I.; DI LIRA, L. P.; DEBENEDETTI, S.; HOUGHTON, P.; CROFT, S.; MARTINO, V. Triterpenic acids and flavonoids from *Satureja parviflora*. Evaluation of their antiprrozoal activity. **Zeitschrift für Naturforschung**, v. 61, n. 3-4, p. 189-192, 2006.

BAROUKH, N.; BAUGE, E.; AKIYAMA, J.; CHANG, J.; AFZAL, V.; FRUCHART, J.; RUBIN, E.M.; FRUCHART-NAJIB, J.; LEN, A. Analysis of apolipoprotein A5, C3, and plasma triglyceride concentrations in genetically engineered mice. **Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology**, v. 24, p. 1297-1302, 2004.

BARROS, G. S. G.; VIEIRA, J. E. V.; MIRIAN, P. S.; MATOS, J. A. Pharmacological screening of some Brazilian Northeastern plants. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 4, p. 195-204, 1967.

BELFRAGE, P.; VAUGHAN M. Simple liquid-liquid partition system for isolation of labeled oleic acid from mixtures with glycerides. **Journal of Lipid Research**, v. 10, p. 341-344, 1969.

BENNETT, S. C. The uptake of oleic acid by rat small intestine: a comparison of methodologies. **Journal of Lipid Research**, v. 12, p. 43-50, 1971.

BERNARDO, R. R.; PINTO, A. V.; PARENTE, J. P. Steroidal saponins from *Smilax officinalis*. **Phytochemistry**, v. 43, p. 465-469, 1996.

BETANCUR-GALVIS, L.A.; MORALES, G.E.; FORERO, J.E.; ROLDAN, J. Cytotoxic and Antiviral Activities of Colombian Medicinal Plant Extracts of the Euphorbia genus. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 97, p. 541-546, 2002.

BETANCUR-GALVIS, L.A.; SAEZ, J.; GRANADOS, H.; SALAZAR, A.; OSSA, J.E. Antitumor and Antiviral Activity of Colombian Medicinal Plant Extracts. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 94, p. 531-535, 1999.

BEZERRA, M. Z. B.; CAMPELO, P. A.; MATTOS, J. A. Constituintes químicos isolados de três espécies de gênero *Sclerolobium*. **Química Nova**, v. 17, n. 3, p. 205-209, 1994.

BHATTACHARYA, A. K.; JAIN, D. C.; SHARMA, R. P. Boron trifluoride-acetic anhydride catalysed rearrangement of dihydroarteannuin B. **Tetrahedron**, v. 53, n. 44, p. 14975-14990, 1997.

BISSCHOPS, R.; KARAMANOLIS, G.; ARTS, J.; CAENEPEEL, P.; VERBEKE, K.; JANSSENS, J.; TACK, J. Relationships between symptoms and ingestion of a meal in functional dyspepsia. **Gut**, v. 57, p. 1495-1503, 2008.

BLANKEMEYER, J.T.; MC WILLIAMS, M.L.; RAYBURN, J.R.; WEISSENBERG, M.; FRIEDMAN, M. Developmental toxicology of solamargine and solasonine glycoalkaloids in frog embryos. **Food and Chemical Toxicology**, v. 36, p. 383-389, 1998.

BLATT, C. T. T.; DOS SANTOS, M. D.; SALATINO, A. Flavonoids of bignoneaceae from the "cerrado" and their possible taxonomic significance. **Plant Systematics and Evolution**, v. 210, p. 289-292, 1998.

BLUMENTHAL, M. The complete German Commission E monographs. Therapeutic Guide to Herbal Medicines. Austin, TX: Americal Botanical Council, 1988. In: THOMPSON C.; ERNST, E. Systematic review: herbal medical products for non-ulcer dyspepsia. **Alimentary Pharmacology and Therapeutics**, v. 16, p. 1689-1699, 2002.

BOTHAM, K. M.; AVELLA, M.; CANTAFORA, A.; BRAVO, E. The lipolysis of chylomicrons derived from different dietary fats by lipoprotein lipase in vitro. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1349, p. 257-263, 1997.

BOTION, L. M.; FERREIRA, A. V. M.; CÔRTEZ, S. F.; LEMOS, V. S.; BRAGA, F. C. Effects of the Brazilian phytopharmaceutical product Ierobina[®] on lipid metabolism and intestinal tonus. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 102, p. 137-142, 2005.

BOTSARIS, A. S. Planst used traditionally to treat malaria in Brazil: the archives of flora medicinal. **Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine**, v. 3, p. 18-21, 2007.

BRINDABAN, R. B. C.; SAMPACK, S. Reduction of activated alkenes by the $\text{InCl}_3\text{-NaBH}_4$ reagent system. **Tetrahedron**, v. 59, p. 7901-7906, 2003.

BURGER, M. C. M.; MOURA, B. H. F.; MENEZES, A. C. S.; MENDES, M. M. Avaliação da atividade coagulante das frações obtidas dos frutos de *Solanum paniculatum* (Solanaceae). In: SIMPÓSIO DE PLANTAS MEDICINAIS DO BRASIL, 20 e CONGRESSO INTERNACIONAL DE ETNOFARMACOLOGIA, 10, 2008, São Paulo. **Anais...** 2008.

CAREY, F. A.; SUNDBERD, R. J. **Advanced Organic Chemistry**, 3rd edition, New York, Plenum Press, 1990.

CARVALHO, A.C.B.; BALBINO, E.E.; MACIEL, A.; PERFEITO, J.P.S. Situação do registro de medicamentos fitoterápicos no Brasil. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 18, n. 2, p. 314-319, 2008.

CASTRO, M. A.; DEL CORRAL, J. M. M.; GORDALIZA, M.; GARCÍA, P. A.; GÓMEZ-ZURITA, M. A.; GARCÍA-GRAVALOS, M. D.; IGLESIA-VICENTE, J.; GAJATE, C.; AN, F.; MOLLINEDO, F.; FELICIANO, A. S. Syththesis and biological evaluation of new selective cytotoxic cyclolignans derived from podophyllotoxin. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 46, n. 5, p. 1214-1222, 2004.

CESAR, A. T.; SOLLERO, P. A.; PEREIRA, C.; SOLLERO, G. Jacarandá caroba, medicamento de Mure. **Cultura Homeopática**, v. 6, p. 6-7, 2004.

CHADALAPAKA, G.; JUTOORU, I.; MCALEES, A.; STEFANAC, T.; SAFE, S. Structure-dependnet inhibition of bladder and pancreatic cancer cell growth by 2-substituted glycyrrhethinic and ursolic acid derivatives. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**, v. 18, p. 2633-2639, 2008.

CHAKRAVARTY, A. K.; DHAR, T. K.; PAKRASHI, S. C. Hispigenin, a novel 22 β O-spirostane from *Solanum hispidum*. **Tetrahedron Letters**, v. 40, p. 3875-3878, 1978.

CHEN, J.; LIU, J.; ZHANG, L.; WU, G.; HUA, W.; WU, X.; SUN, H. Pentacyclic triterpenes. Part 3 : Synthesis and biological evaluation of oleanolic acid derivatives as novel inhibitors of glycogen phosphorylase. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**, v. 16, p. 2915-2919, 2006.

CHEN, Z. Clinical and experimental study on non-ulceratic dyspepsia treated with shenxiahewining. In: THOMPSON C.; ERNST, E. Systematic review: herbal medical products for non-ulcer dyspepsia. **Alimentary Pharmacology and Therapeutics**, v. 16, p. 1689-1699, 2002.

CHIANG, H. C.; TSENG, T. H.; WANG, C. J.; CHEN, C. F.; KAN, W. S. Experimental antitumor agents from *Solanum indicum* L. **Anticancer Research**, v. 11, n. 5, p. 1911-1917, 1991.

CORRÊA, M. P. **Dicionário de Plantas Úteis do Brasil e das Exóticas Cultivadas**. Rio de Janeiro: Di Giorgio, 1974.

COSTA, A. F.; **Farmacognosia**. 3 ed. Lisboa: Fundação Calouste-Gulbenkian, v. 2. p. 712-713, 1975.

CUNHA, S. L. C.; SILVA, A. M. L.; FURTADO, C. N. A.; VINHOLIS, A. H.; MARTINS, G. C. H.; FILHO, S. A. A. CUNHA, W. R. Antibacterial activity of triterpene acids and semi-synthetic derivatives against oral pathogens. **Zeitschrift für Naturforschung**, v. 62, n. 9-10, p. 668-972, 2007.

CUNHA, W. R.; MARTINS, C.; DA SILVA, F. D.; CROTTI, A. E.; LOPES, N. P. ALBUQUERQUE, S. In vitro trypanocidal activity of triterpenes from miconia species. **Planta Medica**, v. 69, p. 470-472, 2003.

DAUNTER, B.; CHAM, B. E. Solasodine glycosides. In vitro preferential toxicity for human cancer cells. **Cancer Letters**, v. 55, p. 209-220, 1990.

DAVID, J. P.; SILVA, E. F.; MOURA, D. L.; GUEDES, M. L.; ASSUNÇÃO, R. J.; DAVID, J. M. Lignanas e triterpenos do extrato citotóxico de *Eriope blanchetii*. **Química Nova**, v. 24, n. 6, p. 730-733, 2001.

DE SÁ, M. S.; COSTA, J. F. O.; KRETTLI, A. U.; ZALIS, M. G.; MAIA, G. L.; SETTE, I. M. F.; CÂMARA, C. A.; BARBOSA FILHO, J. M.; GIULIETTI, HARLEY, A. M.; DOS SANTOS, R. R.; SOARES, M. B. P. Antimalarial activity of brtulinic acid and derivatives in vitro against *Plasmodium falciparum* and in vivo in *P. berghei*-infected mice. **Parasitology Research**, v. 105, p. 275-279. 2009.

DESJARDINS, R. E.; CANFIELD, C. J.; HAYNES, J. D.; CHULAY, J. D. Quantitative assessment of antimalarial activity in vitro by a semiautomated microdilution technique. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 16, p. 710-718, 1979.

Developmental Therapeutics Program NCI/NIH. Disponível em <<http://dtp.nci.nih.gov/index.html>>. Acesso em 25 de novembro de 2008.

DI STASI, L. C.; HIRUMA-LIMA, C. A. (Org.). Plantas Medicinais na Amazônia e na Mata Atlântica. 2 ed. São Paulo: Editora Unesp, 2002.

DIAZ, J. G.; SAZATORNIL, J. G.; RODRIGUEZ, M. L.; MESIA, L. R.; ARANA, G. V. Five new alkaloids from the leaves of *Remijia peruviana*. *Journal of Natural Products*, v. 67, n. 10, p. 1667-1671, 2004.

DIXIT, V. P.; VARMA, M.; MATHUR, R.; SHARMA, S. Hypocholesterolemic and antiatherosclerotic effects of solasodine in cholesterol fed rabbits. *Phytotherapy Research*, v. 6, p. 270-273, 1992.

DODRELL, D. M.; KHONG, P. W.; LEWIS, K. G. The stereochemical dependence of ¹³C chemical shifts in olean-12-enes and urs-12-enes as aid to structural assignment. *Tetrahedron Letters*, v. 27, p. 2381-2384, 1974.

DOS SANTOS, A. A.; CASTELANI, P.; FOGO JUNIOR, J.; COSTA, C. E.; COMASSETO, J. V. Chemoselective reduction of β -butyltellanyl α,β -unsaturated carbonyl compounds to allylic alcohols. *Tetrahedron*, v. 61, p. 9173-9179, 2005.

DOS SANTOS, M. L.; MAGALHÃES, G. C. Clivagem oxidativa de ligações duplas carbono-carbono. Alcoóis alílicos: um caso particular. *Química Nova*, v. 15, n. 3, p. 211-218, 1992.

DZUBAK, P.; HAJDUCH, M.; VYDRA, D.; HUSTOVA, A.; KVASNICA, M.; BIEDERMANN, D.; MARKOVA, L.; URBAN, M.; SAREK, J. Pharmacological activities of natural triterpenoids and their therapeutic implications. *Natural Products Report*, v. 23, p. 394-411, 2006.

ESTEVEZ-SOUZA, A.; SARMENTO DA SILVA, T. M.; ALVES, C. C. F.; DE CARVALHO, M. G.; BRAZ-FILHO, R.; ECHEVARRIA, A. Cytotoxic activities against Ehrlich carcinoma and human K562 leukemia of alkaloids and flavonoids from two *Soalnum* species. *Journal of Brazilian Chemical Society*, v. 13, p. 838-842, 2002.

EVANS, W.C. Trease and Evans. *Pharmacognosy*. 13 ed. Londres: Balillière Tindall, 1989. 832p.

FARINA, C.; PINZA, M.; PIFFERI, G. Synthesis and anti-ulcer activity of new derivatives of glycyrrhetic, oleanolic and ursolic acids. *II Farmaco*, v. 53, p. 22-32, 1998.

FARMACOPÉIA DOS ESTADOS UNIDOS DO BRASIL. 2 ed. São Paulo: Editora Gráfica Siqueira, 1959.

FAUCHER, A.; MONNET, R. Étude cinétique de l'inhibition de la cholinestérase sérique de cheval par certains alcaloïdes stéroïdiques de *Solanum*. *C. R. Acad. Sc. Paris*, v. 264, p. 2247-2249, 1967. In: SANTOS, M. T. **Atividades gastrointestinais e hepáticas da jurubeba (*Solanum paniculatum* L.)**. 1996. Tese - Universidade Federal de São Paulo, Escola Paulista de Medicina, São Paulo.

FLORA BRASILIENSIS. Disponível em: <http://www.florabrasiliensis.cria.ord.br>. Acesso em: 05 de agosto de 2009.

FINLAY, H. J.; HONDA, T.; GRIBBLE, G. W.; DANIELPOUR, D.; BENOIT, N. E.; SUH, N.; WILLIAMS, C.; SPORN, M.B. Novel A-ring cleaved analogs of oleanolic and ursolic acids which affect growth regulation in NRP.152 protate cells. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**, v. 7, n. 13, p. 1769-1772, 1997.

FONTANAY, S.; GRARE, M.; MAYER, J.; FINANCE, C.; DUVAL, R. E. Ursolic, oleanolic and betulinic acids: antibacterial spectra and selectivity indexes. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 120, n. 2, p. 272-276, 2008.

FREITAS, A. **Estrutura de mercado do segmento de fitoterápicos no contexto atual da indústria farmacêutica brasileira**. Brasília: Ministério da Saúde – Área de Economia da Saúde e Desenvolvimento, 2007. 15p.

FRIEDMAN, M.; LEE, K.; KIM, H.; LEE, I.; KOZUKUE, N. Anticarcinogenic effects of glycoalkaloids from potatoes against human cervical, liver, lymphoma, and stomach cancer cells. **Journal of Agricultural Food Chemistry**, v. 53, p. 6162-6169, 2005.

FURLAN, C. M.; KATO, E. T. M.; OLIVEIRA, F. Caracterização farmacognóstica da droga e do extrato fluido de *Solanum variabile* Mart. Parte 1. **Lecta-USF**, v. 17, n. 2, p. 9-35, 1999.

GACHET, M. S.; SCHÜHLY, W. Jacaranda – An ethnopharmacological and phytochemical review. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 121, p. 14-27, 2009.

GARCÍA-GRANADOS, A.; LÓPEZ, P.; MELGUIZO, E.; PARRA, A.; SIMEÓ, Y. Remote hydroxylation of methyl groups by regioselective cyclopalladation. Partial synthesis of hyptatic acid-A. **The Journal of Organic Chemistry**, v. 72. n. 9, p. 3500-3509, 2007.

GARCÍA-GRANADOS, A.; LÓPEZ, P.; PARRA, A.; SIMEÓ, Y. Oxidation of several triterpenic diene and triene systems. Oxidative cleavage to obtain chiral intermediates for drimane and phenanthrene semi-synthesis. **Tetrahedron**, v. 60, p. 3831-3845, 2004.

GARCÍA-GRANADOS, A.; LÓPEZ, P., MELGUIZO, E., PARRA, A., SIMEÓ, Y. Partial synthesis of C-ring derivatives from oleanolic and maslinic acids. Formation of several triene systems by chemical and photochemical isomerization processes. **Tetrahedron**, v. 60, p. 1491-1503, 2004.

GARCÍA-GRANADOS, A.; LÓPEZ, P.; MELGUIZO, E.; MOLIZ, J. N.; PARRA, A.; SIMEÓ, Y. Epoxides, cyclic sulfites, and sulfate from natural pentacyclic triterpenoids: theoretical calculations and chemical transformations. **The Journal of Organic Chemistry**, v. 68, n. 12, p. 4833-4844, 2003.

GEEVENBROEK, M. M. J.V.; DE BRUIN, T. W. A. Chylomicron síntesis by intestinal cells *in vitro* and *in vivo*. **Atherosclerosis**, v. 141, supl. 1, p. S9-S16, 1998.

GENG, x.; WANG, Z.; LI, X.; ZHANG, C. A simple method for epoxidation of olefins using sodium chlorite as an oxidant without a catalyst. **The Journal of Organic Chemistry**, v. 70, n. 23, p. 9610-9613, 2005.

GEOCITES. Disponível em: <http://www.geocietes.com/ladyervas/ervas-saude/JO2-jurubeba.html>. Acesso em: 05 de agosto de 2009.

GERMANN, I.; HALGELAUER, D.; KELBER, O. Antioxidative properties of the gastrointestinal phytopharmaceutical remedy STW 5. **Phytomedicine**, v. 13, suppl.V, p. 45-50, 2006.

GHOSH, S.; PLAYFORD, R. J. Bioactive natural compounds for the treatment of gastrointestinal disorders. **Clinical Science**, v. 104, p. 547-556, 2003.

GILANI, A. H.; RAHMAN, A. Trends in ethnopharmacology. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 100, p. 43-49, 2005.

GOMES, G. W.; MANENTI, A. A.; GUARISE, R.; MENDES, M. C. S.; MELLO, J. R. B. Estudo da toxicidade pré-clínica de fitoterápico contendo *Casearia sylvestris* Swartz, *Jacaranda caroba* Vell e *Peschiera fuchiaefolia* Miers em ratos wistar. In: SALÃO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA, 15, 2003, Porto Alegre, RS. **Anais.....** p. 515-516.

GOMES, R. C.; BONAMIN, F.; DARIN, D. D.; SEITO, L. N.; DI STASI, L. C.; DOKKEDAL, A. L.; VILEGAS, W.; BRITO, A. R. M. S.; HIRUMA-LIMA, C. A. Antioxidative action of methanolic extract and buthanolic fraction of *Volchysia tucanorum* Mart. In the gastroprotection. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 121, p. 466-471, 2009.

GONZALEZ, M.; ZAMILPA, A.; MARQUINA, S.; NAVARRO, V.; ALVAREZ, L. Antimycotic spirostanol saponins from *Solaunm hispidum* leaves and their structure – activity relationships. **Journal of Natural Products**, v. 67, p. 938-941, 2004.

GORDALIZA, M.; DEL CORRAL, J. M. M.; CASTRO, M. A.; LÓPEZ-VAZQUEZ, M. L.; SAN FELICIANO, A.; GARCÍA-GRÁVALOS, M. D.; CARPY, A. Synthesis and evaluation of pyrazolignans. A new class of cytotoxic agents. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 3, n. 9, p. 1203-1210, 1995.

GOULART, M. O. F.; SANT'ANA, A. E. G.; LIMA, R. A.; CAVALCANTE, S. H.; CARVALHO, M. G.; BRAZ FILHO, R. Fitoconstituintes químicos isolados de *Jatropha elliptica*. Atribuição dos deslocamentos químicos dos átomos de carbono e hidrógeno dos diterpenos jatrolonas A e B. **Química Nova**, v. 16, n. 2, p. 95-100, 1993.

GRIGOLEIT, H. G.; GRIGOLEIT, P. Gastrointestinal clinical pharmacology of peppermint oil. **Phytomedicine**, v. 12, p. 607-611, 2005.

HALTERMAN, R. L.; MCEVOY, M. A. Diastereoselectivity in the reduction of sterically unbiased 2,2-diarylcyclopentanones. **Journal of the American Chemical Society**, v. 112, p. 6690-6695, 1990.

HEYDARI, A.; AREFI, A.; ESFANDYARI, M. Direct reductive amination of aldehydes and selective reduction of α,β -unsaturated carbonyl compounds by NaBH_4 in the presence of guanidine hydrochloride in water. **Journal of Molecular Catalysis A: Chemical**, v. 274, p. 169-172, 2007.

HILLER, O.; GHORBANI, M.; SCHILCHER, H. Antiespasmodic and relaxant activity of chelodone, protopine, coptisine and Chelodonium majus extracts on isolated guinea-pig ileum. **Planta Medica**, v. 64, n. 8, 1998.

HILLS, J. M.; AARONSON, P. I. The mechanism of action of peppermint oil on gastrointestinal smooth muscle. An analysis using patch clamp electrophysiology and isolated tissue pharmacology in rabbit and guinea pig. **Gastroenterology**, v. 101, p. 55-65, 1991.

HIRSCHHANN, G. S.; ARIAS, A. R. A survey of medicinal plants of Minas Gerais, Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 29, p. 159-172, 1990.

HOHENESTER, B.; RÜHL, A.; KELBER, O.; SCHEMANN, M. The herbal preparation STW5 (Iberogast®) has potent and region-specific effects on gastric motility. **Neurogastroenterology and Motility**, v. 16, p. 765-773, 2004.

HOLTMANN, G.; ADAM, B.; VINSON, B. Evidence-based medicine and phytotherapy for functional dyspepsia and irritable bowel syndrome: a systematic analysis of evidence for the herbal preparation Iberogast. **Wiener Medizinische Wochenschrift**, v. 154, n. 21, p. 528-534, 2004.

HONDA, T.; GRIBBLE, G. W.; SUH, N.; FINLAY, H. J.; ROUNDS, B. V.; BORE, L.; FAVALORO, F. G.; WANG, Y.; SPORN, M. B. Novel synthetic oleanane and ursane triterpenoids with various enone functionalities in ring A as inhibitors of nitric oxide production in mouse macrophages. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 43, p. 1866-1877, 2000.

HONDA, T.; ROUNDS, B. V.; BORE, L.; FINLAY, H. J.; FAVALORO, Jr. F. G.; SUH, N.; WANG, Y.; SPORN, M. B.; GRIBBLE, G. W. Synthetic oleanane and ursane triterpenoids with modified rings A and C: a series of highly active inhibitors of nitric oxide production in mouse. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 43, p. 4233-4246, 2000.

HONDA, T.; FINLAY, H. J.; GRIBBLE, G. W.; SUH, N.; SPORN, M. B. New enone derivatives of oleanolic acid and ursolic acid as inhibitors of nitric oxide production in mouse macrophages. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**, v. 7, n. 13, p. 1623-1628, 1997.

HSU, Y.; KUO, P.; LIN, C. Proliferative inhibition, cell-cycle dysregulation, and induction of apoptosis by ursolic acid in human non-small cell lung cancer A549 cells. **Life Sciences**, v. 75, p. 2303-2316, 2004.

HU, K.; KOBAYASHI, H.; DONG, A.; JING, Y.; IWASAKI, S.; YAO, X. Antineoplastic agents III: steroidal glycosides from *Solanum nigrum*. **Planta Medica**, v. 65, p. 35-38, 1999.

HUBER, W.; KOELLA, J. C. A comparison of three methods of estimating EC50 in studies of drug resistance of malaria parasites. **Acta Tropica**, v. 55, p. 257-261, 1993.

IKEDA, Y.; MURAKAMI, A.; OHIGASHI, H. Ursolic acid: an anti and pro-inflammatory triterpenoid. **Molecular Nutrition & Food Research**, v. 52, n. 1, p. 26-42, 2008.

IKEDA, T.; TSUMAGARI, H.; HONBU, T.; NOHARA, T. Cytotoxic activity of steroidal glycosides from *Solanum* plants. **Biological Pharmaceutical Bulletin**, v. 26, n. 8, p. 1198-1201, 2003.

ITOH, A.; TANAHASHI, T.; NAGAKURA, N.; NISHI, T. Two triterpenoids saponins from *Neonauclea sessifolia*. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v. 51, n. 11, p. 1335-1337, 2003.

IVERIUS, P.H.; OSTLUND-LINDQUIST, A.M. Preparation, characterization and measurement of lipoprotein lipase. **Methods in Enzymology**, v. 129, p. 691-704, 1986.

JAN TACK; LEE, J. K. Pathophysiology and treatment of functional dyspepsia. **Spectrum of Gastrointestinal Disorders**, v. 39, p. 221-216, 2005.

JANG, S. M.; YEE, S. T.; CHOI, M. S.; DO, G. M.; JEON, S. M.; YEO, J.; KIM, M. J.; SEO, K. I.; LEE, M. K. Ursolic acid enhances the cellular immune system and pancreatic beta-cell function in streptozotocin-induced diabetic mice fed a high-fat diet. **International Immunopharmacology**, v. 9, n. 1, p. 11-119, 2009.

JI, F.; LUO, X. G.; LIU, B.; YU, S. X. Effects of manganese source and calcium on manganese uptake by in vitro everted gut sacs of broilers' intestinal segments. **Poultry Science**, v. 85, n. 7, p. 1217-1225, 2006.

KANG, W. Y.; DU, Z. Z.; YANG, X. S.; HAO, X. J. A new triterpene from *Luculia pinciana* Hook. **Journal of Asian Natural Products Research**, v. 7, n. 1, p. 91-94, 2005.

KANOKMEDHAKUL, K.; KANOKMEDHAKUL, S.; PHATCHANA, R. Biological activity of anthraquinones and triterpenoids from *Prismatomeris fragans*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 100, p. 284-288, 2005.

KASHIWADA, Y.; NAGAO, T.; HASHIMOTO, A.; IKESHIRO, Y.; OKABE, H.; COSENTINO, L. M.; LEE, K. Anti-AIDS agents 38. Anti-HIV activity of 3-O-acyl ursolic acid derivatives. **Journal of Natural Products**, v. 63, p. 1619-1622, 2000.

KAUR, K.; JAIN, M.; KAUR, T.; JAIN, R. Antimalarials from nature. Review. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 17, n. 9, p. 3229-3256, 2009.

KHAN, I. A. Issues related botanicals. **Life Sciences**, v. 78, p. 2033-2038, 2006.

KELBER, O.; WITWER, A.; LAPKE, C.; KROLL, U.; WEISER, D.; OKPANYI, S. N.; HEILMANN, J. Ex vivo/in vitro absorption of STW 5 (Iberogast®) and its extract components. **Phytomedicine**, v. 13, p. 107-113, 2006.

KEUKENS, E. A. J.; VRIJE, T.; FABRIE, C. H. J.; DEMEL, R. A.; JONGEN, W. M. F.; KRUIJFF, B. Dual specificity of sterol-mediated glycoalkaloid induced membrane disruption. **Biochemical and Biophysical Acta**, v. 1110, p. 127-136, 1992.

KOBAYASHI, Y.; TAKEDA, T.; OGIHARA, Y. New triterpenoid glycosides from the leaves of *Bupleurum rotundifolium* L. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v. 29, n. 8, p. 2222-2229, 1981.

KONOIKE, T.; ARAKI, Y.; KANDA, Y. A novel hydroxylation of sterically hindered olefins by Fe-porphyrin-catalyzed *m*CPBA oxidation. **Tetrahedron Letters**, v. 40, p. 6971-6974, 1999.

KOWASLKI, R. Studies of selected plant raw materials as alternative sources of triterpenes of oleanolic and ursolic acid types. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, n. 3, p. 656-662, 2007.

KUMAR, P. A.; DAS, S. K. A colorimetric assay to evaluate the cytotoxic activity of the intestinal intraepithelial lymphocytes of chickens. **Veterinary Research Communications**, v. 20, p. 513-518, 1996.

KUO, K. W.; HSU, S. H.; LI, Y. P.; LIN, W. L.; LIU, L. F.; CHANG, L. C.; LIN, C. C.; SHEU, H. M. Anticancer activity evaluation of the *Solanum* glycoalkaloid solamargine. Triggering apoptosis in human hepatoma cells. **Biochemical Pharmacology**, v. 60, p. 1865-1873, 2000.

KUPKE, D.; VON SANDEN, H.; TRINCZEK-GARTNER, H. An evolution of the choleric activity of a plant-based cholagogue. **Zeitschrift für Allgemeinmedizin**, v. 67, p. 1046-1058, 1991.

LAMBROS, C.; VANDERBERG, J. P. Synchronization of *Plasmodium falciparum* erythrocytic stages in culture. **Journal of Parasitology**, v. 65, p. 418-420, 1979.

LEE, K.; KOZUKUE, N.; HAN, J.; PARK, J.; CHANG, E.; BAEK, E.; CHANG, J.; FRIEDMAN, M. Glycoalkaloids and metabolites inhibit the growth of human colon (HT29) and liver (HepG2) cancer cells. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, p. 2832-2839, 2004.

LEE, S. U.; PARK, S. J.; KWAK, H. B.; OH, J.; MIN, Y. K.; KIM, S. H. Anabolic activity of ursolic acid in bone: stimulating osteoblast differentiation in vitro and inducing new bone formation in vivo. **Pharmacological Research**, v. 58, n. 5-6, p. 290-296, 2008.

LEITE, J. P. V.; OLIVEIRA, A. B.; LOMBARDI, J. A.; FILHO, J. D.; CHIARI, E. Trypanocidal activity of triterpenes from *Arrabidaea triplinervia* nad derivatives. **Biological Pharmaceutical Bulletin**, v. 29, n. 11, p. 2307-2309, 2006.

LEWIS, M.; BRIECADDY, L. E.; ROOT, C. Effects of 2164U90 on ileal bile acid absorption and serum cholesterol in rats and mice. **Journal of Lipid Research**, v. 36, p. 1098-1105, 1995.

LI, J.; GUO, W.; YANG, Q. Effects of ursolic acid and oleanolic acid on human colon carcinoma cell line HCT15. **World Journal of Gastroenterology**, v. 8, n. 3, p. 493-495, 2002.

LIN, Y.; VERMEER, M. A.; TRAUTWEIN, E. A. Triterpenic acids present in hawthorn lower plasma cholesterol by inhibiting intestinal ACAT activity in hamsters. **eCAM Advance Access**, v. 19, p. 1-9, 2009.

LING, W. H.; JONES, P. J. H. Minireview. Dietary phytosterols: a review of metabolism, benefits and side effects. **Life Sciences**, v. 57, n. 3, p. 195-206, 1995.

LIU, C. Y.; MÜLLER, M. H.; GLATZLE, J.; WEISER, D.; KELBER, O.; ENCK, P.; KREIS, M. E. The herbal preparation STW 5 (Iberogast®) desensitizes intestinal afferents in the rat small intestine. **Neurogastroenterology and Motility**, v. 16, p. 759-764, 2004.

LIU, J. Pharmacology of oleanolic and ursolic acid. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 100, p. 92-94, 2005.

LIU, J. Oleanolic acid and ursolic acid: Research perspectives. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 49, p. 57-68, 1995.

LUI, Y.; WANG, M. Botanical drugs: challenges and opportunities contribution to Linnaeus Memorial Symposium 2007. **Life Sciences**, v. 82, p. 445-449, 2008.

LOURENÇO, M.V.; FRANÇA, S.C.; PEREIRA, A.M.S. Triterpenos em partes aéreas de *Jacaranda decurrens* Cham. In: SIMPÓSIO DE PLANTAS MEDICINAIS DO BRASIL, 17, 2002, Cuiabá. **Anais...** Cuiabá: Universidade Federal do Mato Grosso, 2002, CD.

LU, Y.; LUO, J.; HUANG, X.; KONG, L. Four new steroidal glycosides from *Solanum torvum* and their cytotoxic activities. **Steroids**, v. 74, p. 95-101, 2009.

MA, C.; CAI, J.; WANG, R.; TU, P.; HATTORI, M.; DANESHTALAB, M. The cytotoxic activity of ursolic acid derivatives. **European journal of Medicinal Chemistry**, v. 40, p. 582-589, 2005.

MACARI, P. A. T.; EMERECIANO, V. P.; FERREIRA, Z.M.G.S. Identificação dos triterpenos de *Miconia albicanstriana* através de análise por "micro computador". **Química Nova**, v. 13, n. 4, p. 260-264, 1990.

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

MAHATO, S. B.; SEN, S. Advances in triterpenoids research. **Phytochemistry**, v. 44, n. 7, p. 1185-1236, 1997.

MAIA, R. M.; BARBOSA, P. R.; CRUZ, F. G.; ROQUE, N. F.; FASCIO, M. Triterpenos da resina de *Protium heptaphyllum* March (Bourseraceae): caracterização em misturas binárias. **Química Nova**, v. 23, n. 5, p. 623-626, 2000.

MAJUMDER, P. L.; BAGCHI, A. Oxidatives transformations of triterpenoids of the ursane and oleanane skeletal with hydrogen peroxide. Introduction of 11,12-double bond and 13(28)oxide moiety in the ursane system. **Tetrahedron**, v. 39, n. 4, p. 649-655, 1983.

MALLAVADHANI, U. V.; MAHAPATRA, A.; JAMIL, K.; REDDY, P. S. Antimicrobial activity of some pentacyclic triterpenes and their synthesized 3-O-lipophilic chains. **Biological Pharmaceutical Bulletin**, v. 27, n. 10, p. 1576-1579, 2004.

MANENTI, A. A.; GOMES, G. W.; GUARISE, R.; MENDES, M. C. S.; MELLO, J. R. B. Investigação sobre a toxicidade pré-clínica de fitoterápico contendo *Casearia sylvestris* Swartz, *Jacaranda caroba* Vell e *Peschiera fuchiaefolia* Miers em coelhos. In: **SALÃO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA**, 15, 2003, Porto Alegre. Anais..... Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul, p. 515.

MÁÑEZ, S.; RECIO, M. C.; GINER, R. M.; RIOS, J. L. Effect of selected triterpenoids on chronic dermal inflammation. **European Journal of Pharmacology**, v. 3, n. 1, p. 103-105, 1997.

MANSBACH, C. M.; NEVIN, P. Intracellular movement of triacylglycerols in the intestine. **Journal of Lipid Research**, v. 39, p. 963-968, 1998.

MARCOS, I. S.; LADERAS, M.; DÍEZ, D.; BASABE, P.; MORO, R. F.; GARRIDO, N. M.; URONES, J. G. Synthesis and absolute configuration of (-)-chrysollic acid and (+)-isofregenedol. **Tetrahedron letters**, v. 44, p. 5419-5422, 2003.

MARCOS, I. S.; PEDRERO, A. B.; SEXMERO, M. J.; DÍEZ, D.; BASABE, P.; HERNÁNDEZ, F. A.; URONES, J. G. Synthesis and absolute configuration of three natural *ent*-halimanolides with biological activity. **Tetrahedron Letters**, v. 44, p. 369-372, 2003.

MARSON, C. M. Oxygen-directed carbocyclizations of epoxides. **Tetrahedron**, v. 56, p. 8779-8794, 2000.

MARTÍN, F.; HAY, A.; CONDORETTY, V. R. Q.; CRESSEND, D.; REIST, M.; GUPTA, M. P.; CARRUPT, P.; HOSTETTMANN, K. Antioxidant phenylethanoid glycosides and a neolignan from *Jacaranda caucana*. **Journal of Natural Products**, v. 72, p. 852-856, 2009.

MARWAH, P.; MARWAH, A.; LARDY, H. A. An economical and green approach for the oxidation of olefins to enones. **Green Chemistry**, v. 6, p. 570-577, 2004.

MATOS FILHO, T. R.; ARAUJO, C. E. P.; PEREIRA, J. A. ARAUJO, L. C. L. OLIVEIRA, F. Efeito do pós-tratamento com o extrato bruto hidroalcolólico desidratado de *Solanum paniculatum* L. em lesões hepáticas induzidas pelo tetracloreto de carbono. **Lecta- USF**, v.15 (1/2), p.143-175, 1997.

MATOS FILHO, J. A. **Introdução a Fitoquímica Experimental**. 2ª edição. Fortaleza: Editora UFC, 1997.

MATSUDA, H.; PONGPIRIYADACHA, Y.; MORIKAWA, T.; KISHI, A.; KATAOKA, S.; YOSHIKAWA, M. Protective effects of steroid saponins from *Paris polyphylla* var. *yunnanensis* on ethanol or indomethacin-induced gastric mucosal lesions in rats: structural requirement for activity and mode of action. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 13, p. 1101-1106, 2003.

MATSUMOTO, T.; TAKEDA, Y.; SOH, K., GOTOH, H., IMAI, S. Synthesis of Pygmaecocine E, a linear abietane diterpene from *Pygmaeopremna herbacea* (ROXB) Moldenke. **Chemical & Pharmaceutical Bulletin**, v. 44, n. 7, p. 1318-1325, 1996.

MAY, B.; KUNTZ, H. D.; KLESER, M. Efficacy of a fixed peppermint oil/caraway oil combination in non-ulcer dyspepsia. **Arzneimittelforschung**, v. 46, p. 1149-1153, 1996.

MCKAY, D. L.; BLUMBERG, J. B. A Review of the bioactive and potential health benefits of peppermint tea (*Mentha piperita* L.). **Phytotherapy Research**, v. 20, p. 619-633, 2006.

MELZER, J.; RÖSCH, W.; REICHLING, J.; BRIGNOLI, R.; SALLER, R. Meta-analysis: phytotherapy of functional dyspepsia with the herbal drug preparation STW 5 (Iberogast). **Alimentary Pharmacology and Therapeutics**, v. 20, p. 1279-1287, 2004.

MENEZES, P.R.; CONTIN, A.; SCHWARZ, E.A.; SANTOS, C.A.M. Atividade antioxidante de espécies de uso medicinal coletadas na região da usina hidrelétrica Salto Caxias. In: SIMPÓSIO DE PLANTAS MEDICINAIS DO BRASIL, 17, 2002, Cuiabá. **Anais....** Cuiabá: Universidade Federal do Mato Grosso, 2002, CD.

MENG, Y.; LIU, D.; CAI, L.; CHEN, H.; CAO, B.; WANG, Y. The synthesis of ursolic acid derivatives with cytotoxic activity and the investigation of their preliminary mechanism of action. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 17, p. 848-854, 2009.

MERSCHJOHANN, K.; SPORER, F.; STEVERDING, D.; WINK, M. In vitro effect of alkaloids on bloodstream forms of *Trypanosoma brucei* and *T. congolense*. **Planta Medica**, v. 67, p. 623-627, 2001.

MESIA-VELA, S.; SANTOS, M.T.; SOUCCAR, C.; LIMA-LANDMAN, M. T. R.; LAPA, A. J. *Solanum paniculatum* L. (Jurubeba): Potent inhibitor of gastric acid secretion in mice. **Phytomedicine**, v. 9, p. 508-514, 2002.

MICHAEL, S.; KELBER, O.; HAUSCHILDT, S.; SPANEL-BOROWSKI, K.; NIEBER, K. Inhibition of inflammation-induced alterations in rat small intestine by the herbal preparations STW 5 and STW 6. **Phytomedicine**, v. 16, p. 161-171, 2009.

MICHALSKA, L.; NAGEL, G.; SWINIARSKI, E.; ZYDOWO, M. M. The effects of α -solanine on the active calcium transport in rat intestine. **General Pharmacology: The Vascular System**, v. 16, n. 1, p. 69-70, 1985.

MILOSAVLJEVIC, T.; JOVANOVIC, I. Invited Review: Functional dyspepsia. **Archives of Gastroenterohepatology**, v. 19, n. 1-2, 2000.

MORITA, T.; ASSUMPCÃO, R. M. V. Manual de Soluções, Reagentes & Solventes. 2.ed. São Paulo: Edgard Blucher, **1981**.

MOSMANN, T. Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays. **Journal of Immunological Methods**, v. 65, p. 55-63, 1983.

MOURA-LETTS, G.; VILLEGAS, L. F.; MARCADO, A.; HAMMOND, C. B. In vivo wound-healing activity of oleanolic acid derived from the acid hydrolysis of *Anredera diffusa*. **Journal of Natural Products**, v. 69, p. 978-979, 2006.

MU, H.; HOY, C. Review. The digestion of dietary triacylglycerols. **Progress in Lipid Research**, v. 43, p. 105-133, 2004.

MULLER, M. H.; LIU, C. Y.; GLATZLE, J.; WEISER, D.; KELBER, O.; ENCK, P.; GRUNDY, D.; KREIS, M. E. STW 5 (Iberogast[®]) reduces afferent sensitivity in the rat small intestine. **Phytomedicine**, v. 13, p. 100-106, 2006.

NAKAMURA, T.; KOMORI, C.; LEE, Y.; HASHIMOTO, F.; YAHARA, S.; NAHARA, T.; EJIMA, A. Cytotoxic activities of Solanum steroidal glycosides. **Biological Pharmaceutical Bulletin**, v. 19, n. 4, p. 564-566, 1996.

NES, W. D.; NORTON, R. A.; BENSON, M.; Carbon-13 NMR studies on sitosterol biosynthesized from [¹³C] mevalonates. **Phytochemistry**, v. 31, n. 3, p. 805-811, 1992.

NICASIO, P.; MECKES, M. Hypotensive effect of the hydroalcoholic extract from *Jacaranda mimosaeifolia* leaves in rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 97, p. 301-304, 2005.

NILSSON-EHLE, P.E.; SCHOTZ, M.C. A stable, radioactive substrate emulsion for assay of lipoprotein lipase. **Journal of Lipid Research**, v.17, p.536-41, 1976.

OGURA, M.; CORDELL, G. A.; FARNSWORTH, R. Potential anticancer agents. III. Jacaranona, a novel phytoquinoid from *Jacaranda caucana*. **Lloydia**, v. 39, p. 255-257, 1976.

OGURA, M.; GEOFFREY, A.C.; NORMAN, R.F. Potential anticancer agents. IV. Constituents of *Jacaranda caucana* Pittier (Bignoniaceae). **Lloydia**, v.40, p.157-168, 1977.

OLIVEIRA, E. Contribuição para o estudo da jurubeba. **Revista de Química e Farmácia**, v. 12, n. 11, p. 9, 1947.

OUDENHOVE, L. V.; TACK, J. New epidemiologic evidence on functional dyspepsia subgroups and their relationship to psychosocial dysfunction. **Gastroenterology**, 137, n. 1, p. 23-26, 2009.

OVESNÁ, Z.; VACHALCOVÁ, A.; HORVÁTHOVÁ, K.; TÓTHOVÁ, D. *Pentacyclic triterpenoic acids: new chemoprotective compounds*. **Neoplasma**, v. 51, n. 5, p. 327-333, 2004.

PANORAMIO. Disponível em: <http://www.panoramio.com/photo/5350694> Acesso em: 05 de agosto de 2009.

PASSERO, L. F. D.; CASTRO, A. A.; TOMOKANE, T. Y.; KATO, M. J.; PAULINETTI, T. F.; CORBETT, C. E. P.; LAURENTI, M. D. Anti-leishmania activity of semi-purified fraction of Jacaranda puberula leaves. **Parasitology Research**, v. 101, p. 677-680, 2007.

PATIL, B. C.; SHARMA, R. P.; SALUNKHE, D. K.; SALUNKE, K. Evaluation of Solanine toxicity. **Food and Chemical Toxicology**, v. 10, p. 395-398, 1972.

PILICHIEWICZ, A.N.; HOROWITZ, M.; RUSSO, A. Effects of Iberogast on proximal gastric volume, antropyloroduodenal motility and gastric emptying in healthy men. **American Journal of Gastroenterology**, v. 102, p. 1276-1283, 2007.

PLACE, A. E.; SUH, N.; WILLIAMS, C. R.; RISINGSONG, R.; HONDA, T.; HONDA, Y.; GRIBBLE, G. W.; LEESNITZER, L. M.; STIMMEL, J. B.; WILLSON, T. M.; ROSEN, E.; SPORN, M. B. The novel synthetic triterpenoid, CDDO-imidazolidine, inhibits inflammatory response and tumor growth *in vivo*. **Clinical Cancer Research**, v. 9, p. 2798-2806, 2003.

QUEVEDO, M. A.; BRIÑÓN, M. C. In vitro and in vivo pharmacokinetic characterization of two prodrugs of zidovudine. **Antiviral Research**, v. 83, p. 103-111, 2009.

QUIGLEY, E.M.M.; KEOHANE, J. Dyspepsia. **Current Opinion in Gastroenterology**, v. 24, p. 692-697, 2008.

RAPHAEL, T. J.; KUTTAN, G. Effect of naturally occurring triterpenoids glycyrrhizic acid, ursolic acid, oleanolic acid and nomilin on the immune system. **Phytomedicine**, v. 10, n. 6-7, p. 483-489, 2003.

REED, L.J.; MUENCH, H. A simple method for estimating fifty percent endpoints. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 27, p. 493-497, 1938.

RESENDE, F. A.; BARLACA, C. A. M. A.; FARIA, M. C. S.; KATO, F. H.; CUNHA, W. R.; TAVARES, D. C. Antimutagenicity of ursolic acid and oleanolic acid against doxorubicin-induced clastogenesis in Balb/c mice. **Life Sciences**, v. 22, n. 13, p. 1268-1273, 2006.

RIBEIRO, S. R.; FORTES, C. C.; OLIVEIRA, S. C. C.; CASTRO, C. F. S. Avaliação da atividade antioxidante de *Solanum paniculatum* (Solanaceae). **Arquivos de Ciência e Saúde da Unipar, Umuarama**, v. 11, n. 3, p. 179-183, 2007.

RIBEIRO, V.; VIEIRA, I. L. B. F.; SILVA, E. M.; ROSA, T. M.; CIESLAK, J. F.; FERREIRA, H. D.; CARVALHO, S. Avaliação do potencial citotóxico da *Solanum paniculatum* L. em células somáticas de *Drosophila melanogaster*: SMART/asa. In: CONGRESSO DE GENÉTICA DO CENTRO-OESTE, 1, 2008, Brasília. **Anais...2008**.

RIPPERGER, H.; SCHREIBER, K. Structure of paniculonin A and B, two new spirostane glycosides from from *Solanum paniculatum* L. **Chemische Berische**, v.101, p.2450-8, 1968.

RIPPERGER, H.; SCHREIBER, K.; BUDZIKIEWICZ, H. Isolation of neochlorogenin and paniculogenin from *Solanum paniculatum* L.: concerning the structure of paniculidin. **Chemische Berische**, v.100, p.1741-52, 1967.

RODDICK, J. G. The acetylcholinesterase-inhibitory activity of steroidal glycoalkaloids and their aglycones. **Phytochemistry**, v. 28, n. 10, p. 2631-2634, 1990.

RODRIGUES, V. E. G.; CARVALHO, D. A. Levantamento etnobotânico de plantas medicinais no domínio do cerrado na região do Alto Rio Grande – Minas Gerais. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 25, p.102-123, 2001.

ROJAS, J. J.; OCHOA, V. J.; OCAMPO, S. A.; MUÑOZ, J. F. Screening for antimicrobial activity of tem medicinal plants used in Colombian folkloric medicine: a possible alternative in the treatment of non-nosocomial infections. **Biomed Central Complementary and Alternative Medicine**, v. 6, p. 1-6, 2006.

ROS, E. Review article. Intestinal absorption of triglicéride and cholesterol. Dietary and pharmacological inhibition to reduce cardiovascular risk. **Atherosclerosis**, v. 151, p. 357-379, 2000.

RÖSCH, W.; LIEBREGTS, T.; GUNDERMANN, J. K.; VINSON, B.; HOLTMANN, G. Phytotherapy for functional dyspepsia: A review of the clinical evidence for the herbal preparation STW 5. **Phytomedicine**, v. 13, p. 114-121, 2006.

RUIZ-MESIA, L.; RUIZ-MESIA, W.; REINA, M.; MARTINEZ-DIAZ, R.; INES, C.; GUADANO, A.; GONZALES-COLOMA, A. Bioactive cinchona alkaloids from *Remijia peruviana*. **Journal of Agricultural Food and Chemistry**, v. 23, n. 53, p. 1921-1926, 2005.

SAAD, R. J.; CHEY, W. D. Review article: current and emerging therapies for functional dyspepsia. **Alimentary Pharmacology Therapeutics**, v. 1, n. 3, p. 475-492, 2006.

SALLER, R.; ITEN, F.; REICHLING, J. Dyspeptic pain and phytotherapy – a review of traditional and modern herbal drugs. **Forschende Komplementärmedizin und Klassische Naturheilkd**, v. 8, n. 5, p. 263-273, 2001.

SÁNCHEZ, M.; THEODULOZ, C.; SCHMEDA-HIRSCHMANN, G.; RAZMILIC, I.; YÁÑEZ, T.; RODRIGUEZ, J. A. Gastroprotective and ulcer-healing activity of oleanolic acid derivatives: In vitro-in vivo relationships. **Life Sciences**, v. 79, p. 1349-1356, 2006.

SANTOS, M. T. **Atividades gastrointestinais e hepáticas da jurubeba (*Solanum paniculatum* L.)**, 1996. Tese - Universidade Federal de São Paulo, Escola Paulista de Medicina, São Paulo.

SARAVANAN, R.; VISWANATAHN, P.; PUGALENDI, K. V. Protective effect of ursolic acid on ethanol-mediated experimental liver damage in rats. **Life Sciences**, v. 78, n. 11, p. 713-718, 2006.

SCHEMPP, H.; HIPPELI, S.; KELBER, O.; ELSTNER, E. F. Comparison of the inhibition of myeloperoxidase-catalysed hypochlorite formation *in vivo* and in whole blood by different plant extracts contained in a phytopharmakon treating functional dyspepsia. **Arzneimittelforschung**, v. 54, n. 7, p. 389-395, 2004.

SCHEMANN, M.; MICHEL, K.; ZELLER, F.; HOHENESTER, B.; RÜHL, A. Region-specific effects of STW 5 (Iberogast®) and its components in gastric fundus, corpus and antrum. **Phytomedicine**, v. 13, p. 90-99, 2006.

SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; PETROVICK, P. R. Produtos de origem vegetal e o desenvolvimento de medicamentos. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; PETROVICK, P. R.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A. (org.). **Farmacognosia da planta ao medicamento**. 5. ed. Florianópolis, Porto Alegre: Editora da UFRGS/Editora da UFSC, 2003. cap. 15, p. 301-332.

SCHREIBER, K.; RIPPERGER, H. Jurubine, a novel type of steroidal saponin with (25S)-3 β -amino-5 α -furostane-22 α ,26-diol O(26)- β -D-glucopyranoside structure from *Solanum paniculatum* L. **Tetrahedron Letters**, v. 48, p. 5997-6002, 1966.

SHAYEGANPOUR, A.; HAMDY, D. A.; BROCKS, D. R. Effects of intestinal constituents and lipids on intestinal formation and pharmacokinetics of desethylamidarone formed from amiodarone. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 60, n. 12, p. 1625-1632, 2008.

SHI, H. M.; MIN, Z. D. Two new triterpenoids saponiins from *Adina pilulifera*. **Journal of Asian Products Research**, v. 5 (1), p. 11-16, 2003.

SHIMIZU, K.; AMAGAYA, S.; OGIHARA, Y. New derivatives of Saikosaponins. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v. 33, n. 8, p. 3349-3355, 1985.

SHIRANE, N., HASHIMOTO, Y., UEDA, K., TAKENAKA, H., KATOH, K. Ring-A cleavage of 3-oxo-olean-12-en-28-oic acid by the fungus *Chaetomium longirostre*. **Phytochemistry**, v. 43, n. 1, p. 99-104, 1996.

SKEHAN, P.; STORENG, R.; SCUDIERO, D.; MONKS, A.; MCMAHON, J.; VISTICA, D.; WAREN, J. T.; BOKESCH, H.; KENNEY, S.; BOYD, M. R. New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer drug screening. **Journal of National Cancer Institute**, v. 82, p. 1107-1112, 1990.

SRIKRISHNA, A.; RAMASASTRY, S. S. V. A novel boron trifluoride etherate mediated deep-seated rearrangement of an α,β -epoxyketone. **Tetrahedron: Asymmetry**, v. 16, p. 2973-2979, 2005.

SIDDIQUI, S.; BEGUM, S.; SIDDIQUI, B. S.; HAFEEZ, F. Kanerin and 12,13-dihydrourosolic acid, two new pentacyclic triterpenes from the leaves of *Nerium oleander*. **Journal of Natural Products**, v. 52, n. 1, p. 57-62, 1989.

SIDDIQUI, S.; SIDDIQUI, B. S.; ADIL, Q.; BEGUM, S. Prolonged treatment of acetylmethyl ursolic acid with H₂O₂/acetic acid – A facile one-pot synthesis of 15 α -hydroxy analogue. **Tetrahedron**, v. 46, n. 10, p. 3569-3580, 1990.

SILVERSTEIN, R. M.; WEBSTER, F. X. **Identificação Espectrométrica de Compostos Orgânicos**, 6 ed., Rio de Janeiro: Editora LTC, 2000. 460 p.

SILVESTRE, S. M.; SALVADOR, J. A.; Allylic and benzylic oxidation reactions with sodium chlorite. **Tetrahedron**, v. 63, p. 2439-2445, 2007.

SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P. A pesquisa e a produção brasileira de medicamentos a partir de plantas medicinais: a necessária interação da indústria com a academia. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 12 (1), p. 35-40, 2002.

SINGH, G. B.; BANI, S.; GUPTA, B. D.; BANERJEE, S. K. Anti-inflammatory activity of oleanolic acid in rats and mice. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 44, p. 456-458, 1992.

SINGH, H.; YE, A.; HORNE, D. Structuring food emulsions in the gastrointestinal tract to modify lipid digestion. Review. **Progress in Lipid Research**, v. 48, n. 2, p. 92-100, 2009.

SIQUEIRA, J. C. **Utilização popular das plantas do cerrado**. São Paulo: Edições Loyola, 1981.

SKEHAN, P.; STORENG, R.; SCUDIERO, D.; MONKS, A.; MCMAHON, J.; VISTICA, D.; WARREN, J. T.; BOKESCH, H.; KENNEY, S.; BOYD, M. R. New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer drug screening, *Journal of the National Cancer Institute*, v. 82, p. 1107-1112, 1990.

SOMOVA, L.O.; NADAR, A.; RAMMANAN, P.; SHODE, F. O. Cardiovascular, antihyperlipidemic and antioxidant effects of oleanolic and ursolic acids in experimental hypertension. **Phytomedicine**, v. 10, p. 115–121, 2003.

SOTIROUDIS, T. G.; KYRTOPOULOS, S. A. Anticarcinogenic compounds of olive oil and related biomarkers. **European Journal of Nutrition**, v. 47, n. 2, p. 69-72, 2008.

SRIKRISHNA, A.; RAMASASTRY, S. S. V. A novel boron trifluoride etherate mediated deep-seated rearrangement of an α,β -epoxyketone. **Tetrahedron Asymmetry**, v. 16, p. 2973-2979, 2005.

SRINIVASAN, T.; SRIVASTAVA, G. K.; PATHAK, A.; BATRA, S.; RAJ, K.; SINGH, K.; PURI, S. K.; KUNDU, B. Solid-phase synthesis and bioevaluation of lupeol-based libraries as antimalarial agents. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 12, p. 2803-2806, 2002.

STEELE, J. C.; WARHURST, D. C.; KIRBY, G. C.; SIMMONDS, M. S. In vitro and in vivo evaluation of betulinic acid as an antimalarial. **Phytotherapy Research**, v. 13, n. 2, p. 115-119, 1999.

SUH, N.; HONDA, T.; FINLAY, H. J. ; BARCHOWSKY, A. ; WILLIAMS, C.; BENOIT, N. E.; XIE, Q.; NATHAN, C.; GRIBBLE, G. W.; SPORN, M. B. Novel triterpenoids suppress inducible nitric oxide synthase (iNOS) and inducible cyclooxygenase (COX-2) in mouse macrophages. **Cancer Research**, v. 58, n. 15, p. 717-723, 1998.

SULTANA, N.; ATA, A. Oleanolic acid and related derivatives as medicinally important compounds. **Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry**, v. 23, n. 6, p. 739-756, 2008.

TAGLIATI, C.; SILVA, R. P.; FERES, C. A. O.; JORGE, R. M.; ROCHA, O. A.; BRAGA, F. C. Acute and chronic toxicological studies of the Brazilian phytopharmaceutical product Ierobina. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18 (suppl.), p. 676-682, 2008.

TAKEOKA, G.; DAO, L.; TERANISHI, R.; WONG, R.; FLESSA, S.; HARDEN, L.; EDWARDS, R. Identification of three triterpenoids in *Almond hulls*. **Journal of Food and Chemistry**, v. 48, n. 8, p. 3437-3439, 2000.

TALLEY, N. J. Subdividing functional dyspepsia: a paradigm shift? **Gut**, v. 57, p. 1487-1489, 2008.

TALLEY, N. J.; VAKIL, N. Guidelines for the management of dyspepsia. **American Journal of Gastroenterology**, v. 100, n. 10, p. 2324-2337, 2005.

TAYLOR, P. G.; CESARI, I. M.; ARSENAK, M.; BALLEEN, D.; ABAD, M. J.; FERNÁNDEZ, A.; MILANO, B.; RUIZ, M. C.; WILLIAMS, B.; MICHELANGELO, F. Evaluation of Venezuelan medicinal plant extracts for antitumor and antiprotease activities. **Pharmaceutical Biology**, v. 44, p. 349-362, 2006.

THOMPSON, J. C.; ERNST, E. Systematic review: herbal medical products for non-ulcer dyspepsia. **Alimentary and Pharmacology and Therapeutics**, v. 16, p. 1689-1699, 2002.

TKACHEV, A. V.; DENISOV, A. Y.; GATILOV, Y. V.; BAGRYANSKAYA, I. Y.; SHEVTSOV, S. A.; RYBALOVA, T. V. Stereochemistry of hydrogen peroxide – acetic acid oxidation of ursolic acid and related compounds. **Tetrahedron**, v. 50, n. 39, p. 11459-11488, 1994.

TONDER, J.; TANNER, D. Toward the enantioselective total synthesis of lyngbyatoxin A: on the stereocontrolled introduction of the quaternary stereogenic centre. **Tetrahedron**, v. 59, p. 6937-6945, 2003.

TORRES-SANTOS, E. C.; RODRIGUES-OLIVEIRA, R.; CARAUTA, J. P.P.; BANDEIRA-FALCÃO, C. A.; KAPLAN, M. A. C.; ROSSI-BERGMANN, B. Antileishmanial activity of isolated triterpenoids from *Pourouma guianensis*. **Phytomedicine**, v. 11, p. 114-120, 2004.

TRAGER, W.; JENSEN, J. B. Human malaria parasites in continuous culture. **Science**, v. 193, p.673-675, 1976.

TWENTYMAN, P. R., LUSCOMBE, M. A study of some variables in a tetrazolium dye (MTT) based assay for cell growth and chemosensitivity. **British Journal of Cancer**, v. 56, p. 279-285, 1987.

VARANDA, E.M.; ZÚNIGA; SALATINO, A.; ROQUE, N.F.; CORCUERA, L.J. Effect of ursolic acid from epicuticular waxes of *Jacaranda decurrens* on *Schizaphis graminum*. **Journal of Natural Products**, v.55, p.800-803, 1992.

VARMA, R. S.; SAINI, R. K. Microwave-Assisted reduction of carbonyl compounds in solid state using sodium borohydride supported on alumina. **Tetrahedron Letters**, v. 38, n. 25, p. 4337-4338, 1997.

VIEIRA, P. M. Estudo do potencial mutagênico e antimutagênico de *Solanum paniculatum* L. pelo teste do micronúcleo em camundongos. **Revista de Biologia Neotropical**, v. 4, n. 2, p. 173-174, 2007.

WAGNER, H.; BLADT, S.; ZGAINSKY, E.M. **Plant drug analysis: a thin layer chromatography atlas**. Berlin: Springer Verlag, 1984. 320 p.

WANG, H. X.; NG, T. B. Natural products with hypoglycemic, hypotensive, hypocholesterolemic, antiatherosclerotic and antithrombotic activities. **Life Sciences**, v. 65, n. 5, p. 2663-2677, 1999.

WILSON, T. H.; WISEMAN, G. Metabolic activity of the small intestine of the rat and golden hamster (*Mesocricetus auratus*). **Journal of Physiology**, v. 123, p. 126-130, 1954.

WILSON, T. H.; WISEMAN, G. The use of sacs of everted small intestine for the study of the transference of substances from the mucosal to the serosal surface. **Journal of Physiology**, v. 123, p. 116-125, 1954.

WU, G.; JIANG, S.; JIANG, F.; WU, H.; JIANG, S. Steroidal glycosides from *Tribulus terrestris*. **Phytochemistry**, v. 42, n. 6, p. 1677-1681, 1996.

XIE, W.; WANG, W.; SU, H.; XING, D.; CAI, G.; DU, L. Hypolipdemic mechanisms of *Ananas comosus* L. leaves in mice: different from fibrates but similar to statins. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 103, p. 267-274, 2007.

XU, H.; ZHANG, N.; CASIDA, J. E. Insecticides in Chinese medicinal plants: survey leading to jacaranone, a neurotoxicant and glutathione-reactive quinol. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, p. 2544-2547, 2003.

XU, L. Z.; WAN, Z. X. The effect of oleanolic acid on acute hepatitis (70 cases). **Human Medicine**, v. 7, p. 50-52, 1980.

XU, S. L. Effects of oleanolic acid on chronic hepatitis: 188 cases reports. *Symposium on oleanolic acid*, p. 23-25, 1985. Apud LIU, J. Pharmacology of oleanolic acid and ursolic acid. Review. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 49, p. 57-68, 1995.

XU, Y.; CHEN, H.; LIU, W.; GU, Z.; LIANG, H. Two sapogenins from *Tribulus terrestris*. **Phytochemistry**, v. 49, n. 1, p. 199-201, 1998.

YABUCHI, T.; TANAKA, T.; SASATSUKA, T.; YAMAHARA, J. FUJIMURA, H. Extraction of oleanolic acid from sugar beets for treatment of liver failure. Chemical abstracts 108, p.82082, 1988. In: LIU, J. Oleanolic acid and ursolic acid: Research perspectives. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 49, p. 57-68, 1995.

YIM, T. K.; WU, W. K.; PAK, W. F.; KO, K. M. Hepatoprotective action of an oleanolic acid-enriched of *Ligustrum lucidum* fruits is mediated through an enhancement on hepatic glutathione regeneration capacity in mice. **Phytotherapy Research**, v. 15, p. 589-592, 2001.

YOSHIKAWA, M.; MORIKAWA, T. LI, N.; NAGATOMO, A.; LI, X.; MATSUDA, H. Bioactive saponins and glucosides. XXIII. Triterpene saponins with gastroprotective effect from the seeds of *Camellia sinensis* – theasaponins E₃, E₄, E₅, E₆ and E₇. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v. 53, n. 12, p. 1559-1564, 2005.

ZAMILPA, A.; TORTORIELLO, J.; NAVARRO, V.; DELGADO, G.; ALVAREZ, L. Five new steroidal saponins from *Solanum chrysotrichum* leaves and their antimycotic activity. **Journal of Natural Products**, v. 65, p. 1815-1819, 2002.

ZAPRUTKO, L.; PARTYKA, D.; BEDNARCZYK-CWYNAR, B. Triterpenoids. Part 21. Oleanolic acid azaderivatives as percutaneous transport promoters. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 14; 4723-4726, 2004.

ZHANG, W.; HONG, D.; ZHOU, Y.; ZHANG, Y.; SHEN, Q.; LI, J.; HU, L.; LI, J. Ursolic acid and its derivative inhibit protein tyrosine phosphatase 1B, enhancing insulin receptor phosphorylation and stimulating glucose uptake. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1760, p. 1505-1512, 2006.

ZHU, X.; GUAN, J.; XIAO, Z.; COSENTINO, L. M.; LEE, K. Anti-AIDS agents. Part 61: Anti-HIV activity of new podophyllotoxin derivatives. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 12, p. 4267-4273, 2004.

ZHU, Y. M.; SHEN, J. K.; WANG, H. K.; COSENTINO, L. M. LEE, K. H. Synthesis and anti-HIV activity of oleanolic acid derivatives. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**, v. 11, n. 24, p. 3115-3118, 2001.

APÊNDICE

ESPECTROS DE RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR

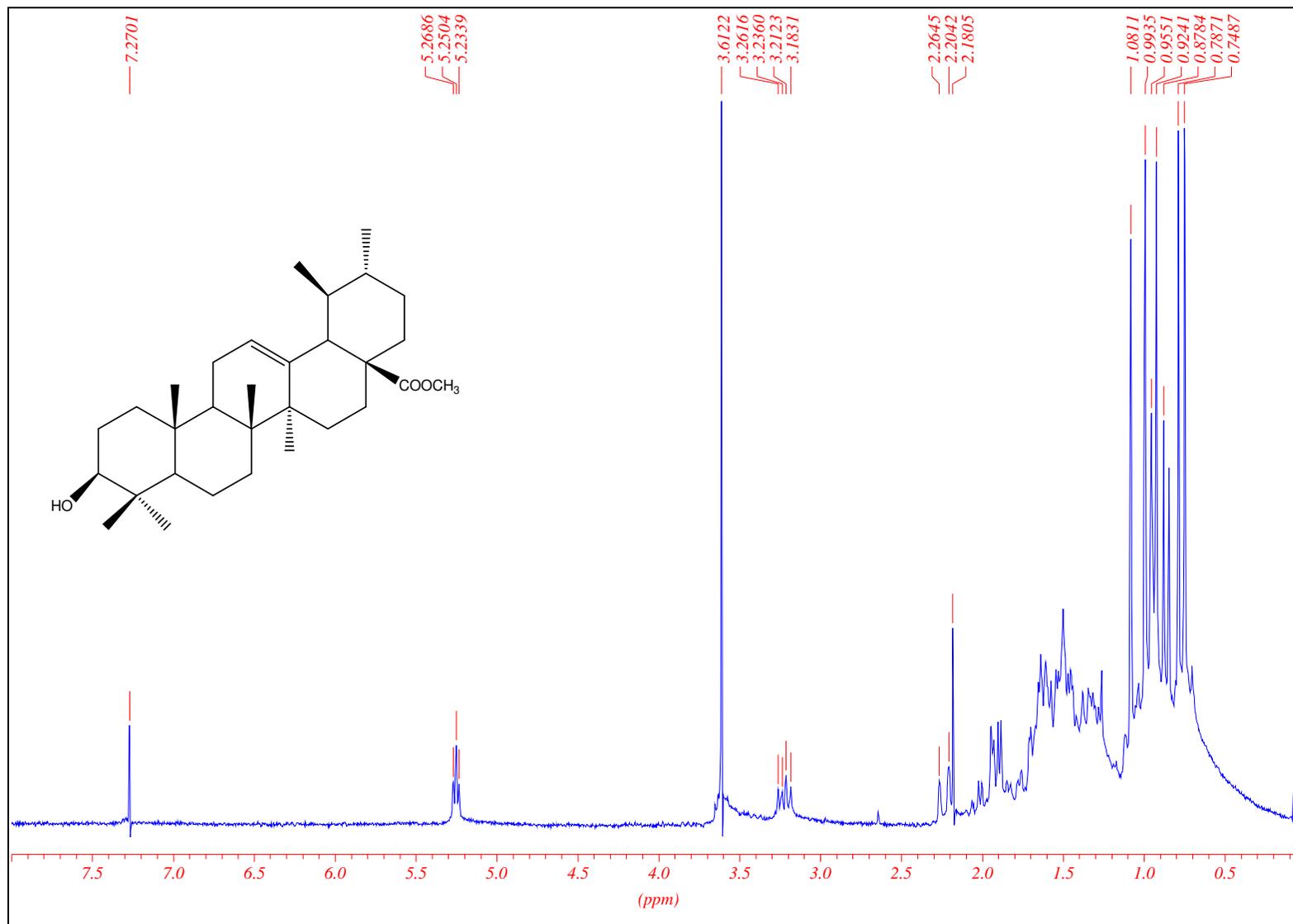


Figura 74 - Espectro de RMN de ¹H de 77 (200 MHz, CDCl₃).

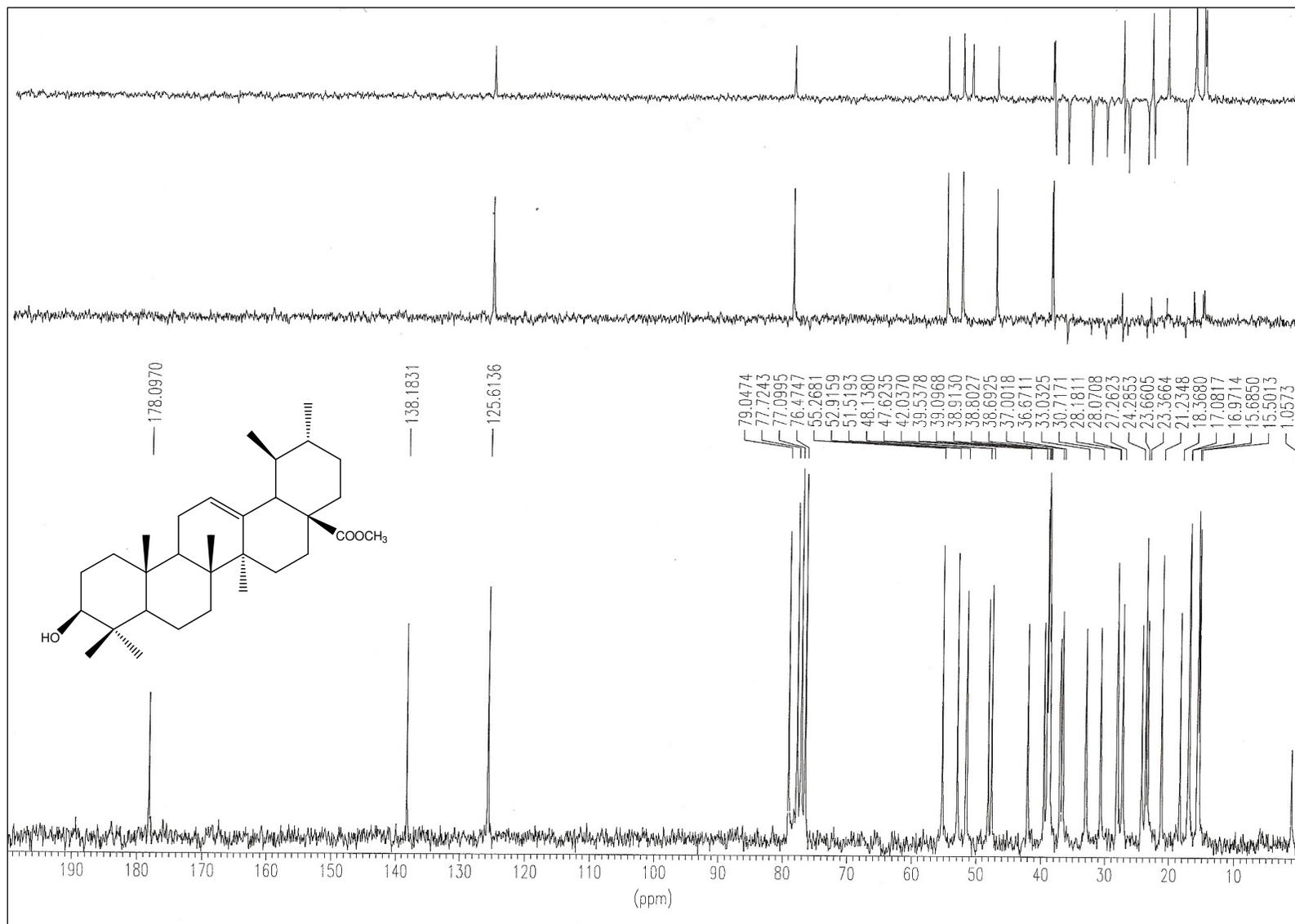


Figura 75 - Espectro de RMN de 13C de 77 (50 MHz, CDCl₃).

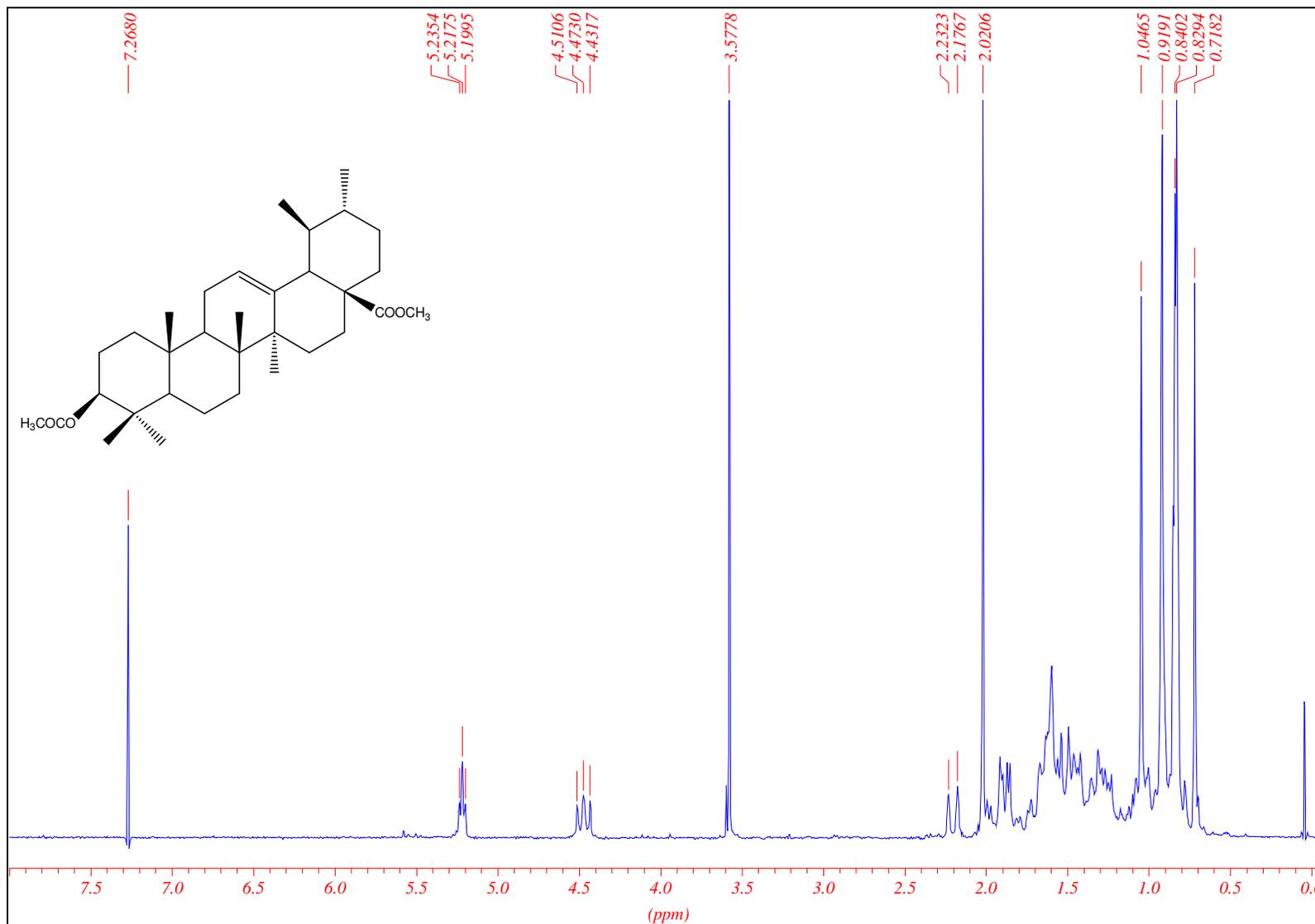


Figura 76 - Espectro de RMN de ¹H de 78 (200 MHz, CDCl₃).

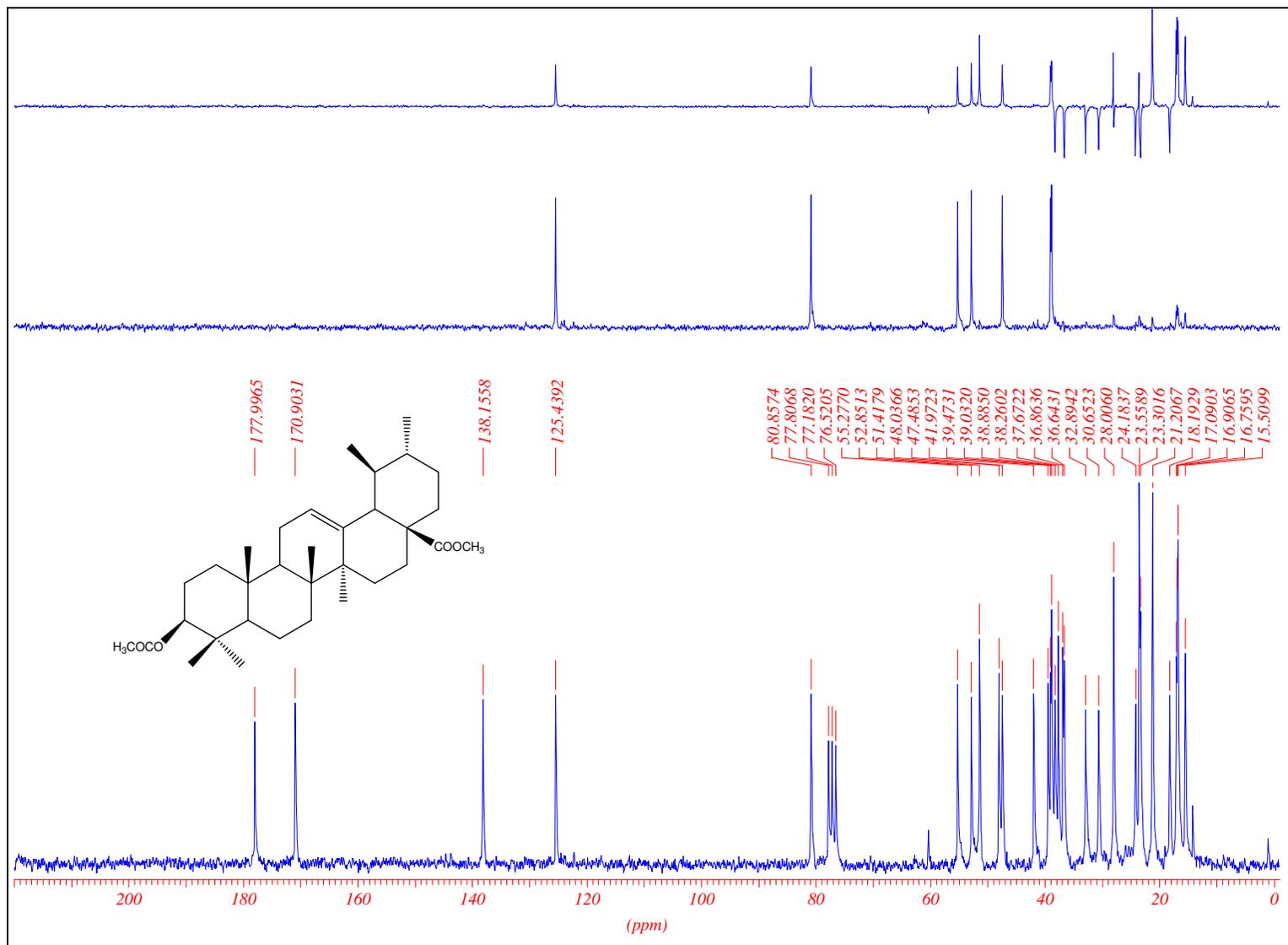


Figura 77 - Espectro de RMN de ¹³C de 78 (50 MHz, CDCl₃).

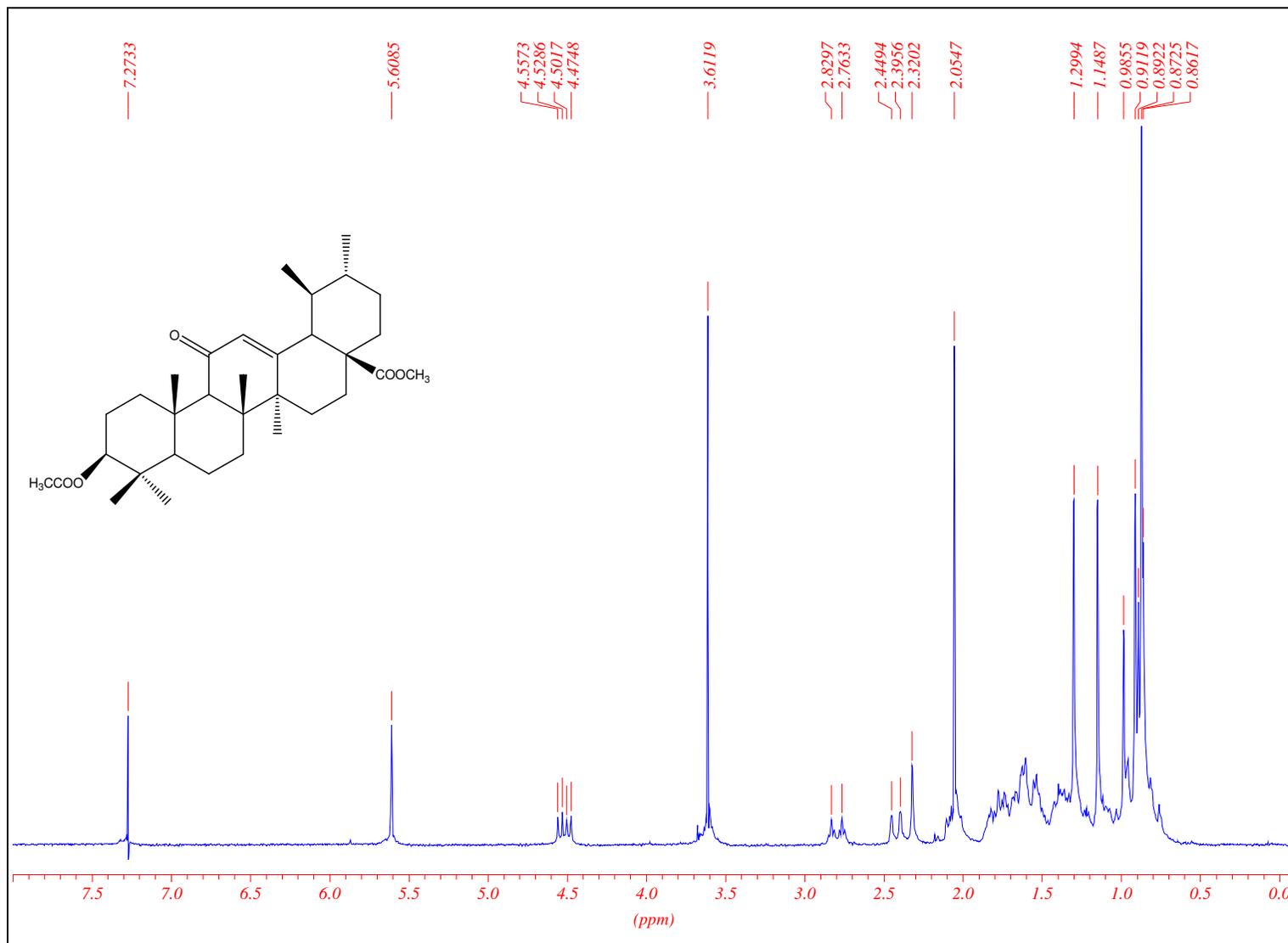


Figura 78 - Espectro de RMN de ^1H de 79 (200 MHz, CDCl_3).

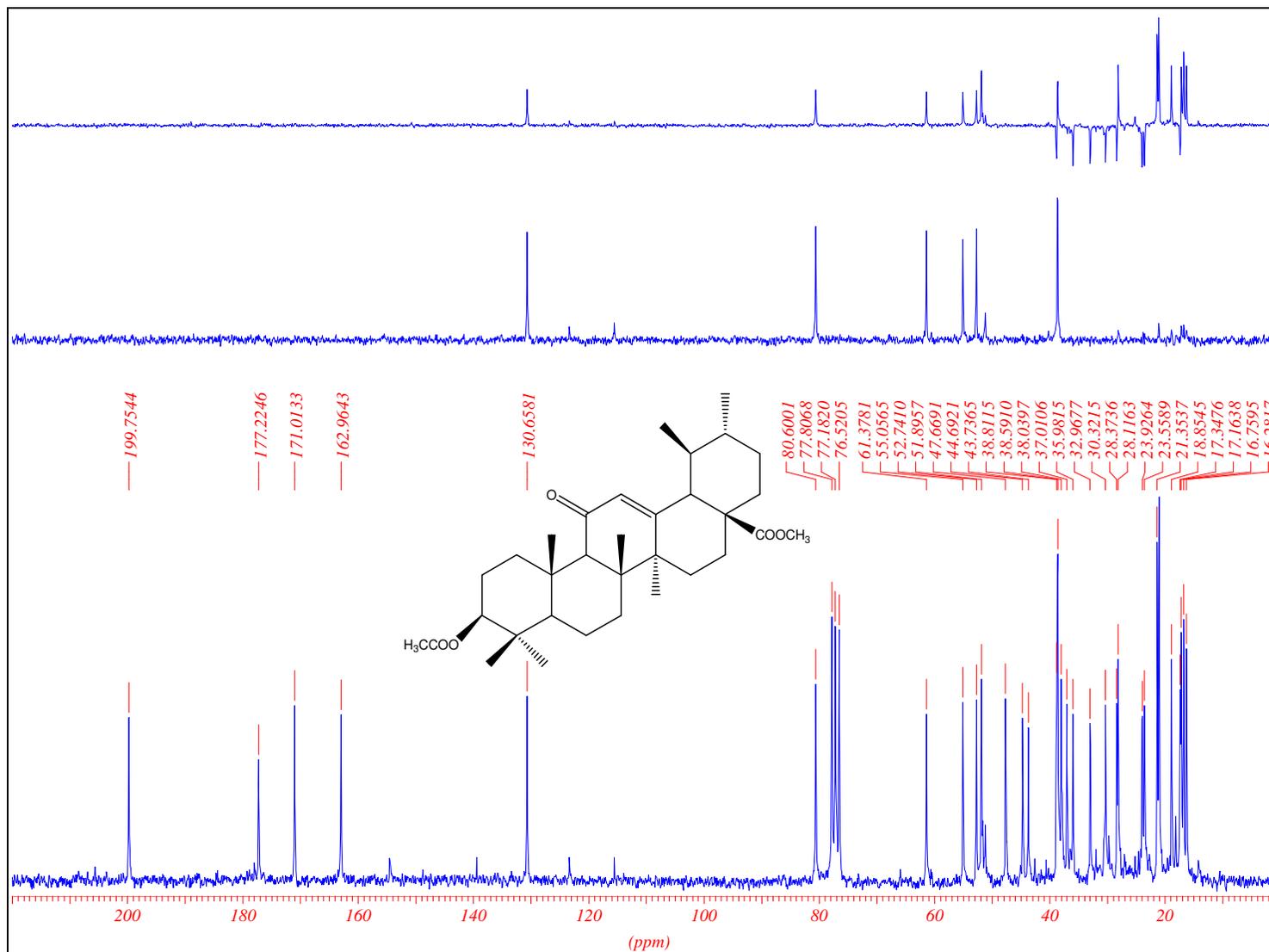


Figura 79 - Espectro de RMN de ¹³C de 79 (50 MHz, CDCl₃).

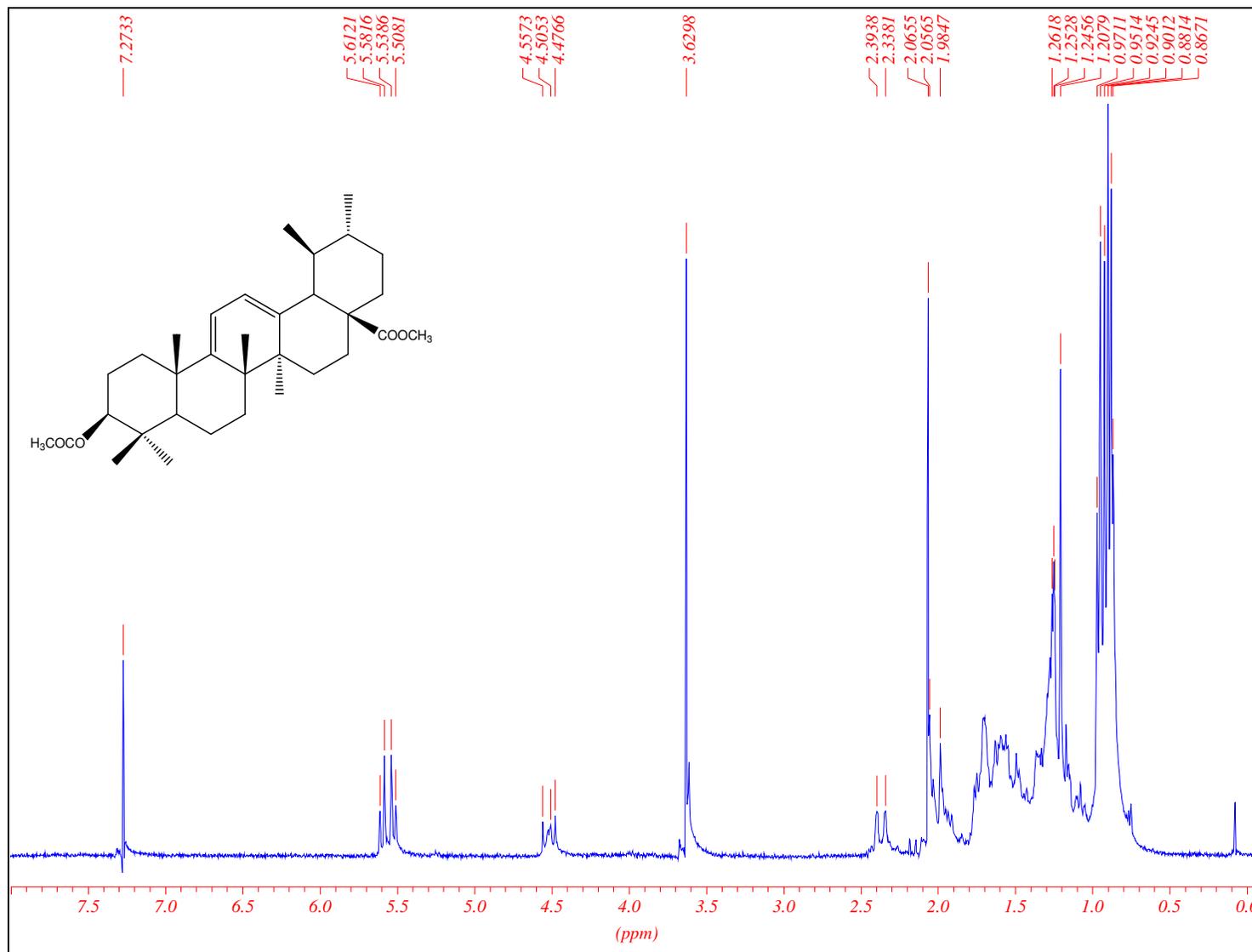


Figura 80 - Espectro de RMN de ^1H de 80 (200 MHz, CDCl_3).

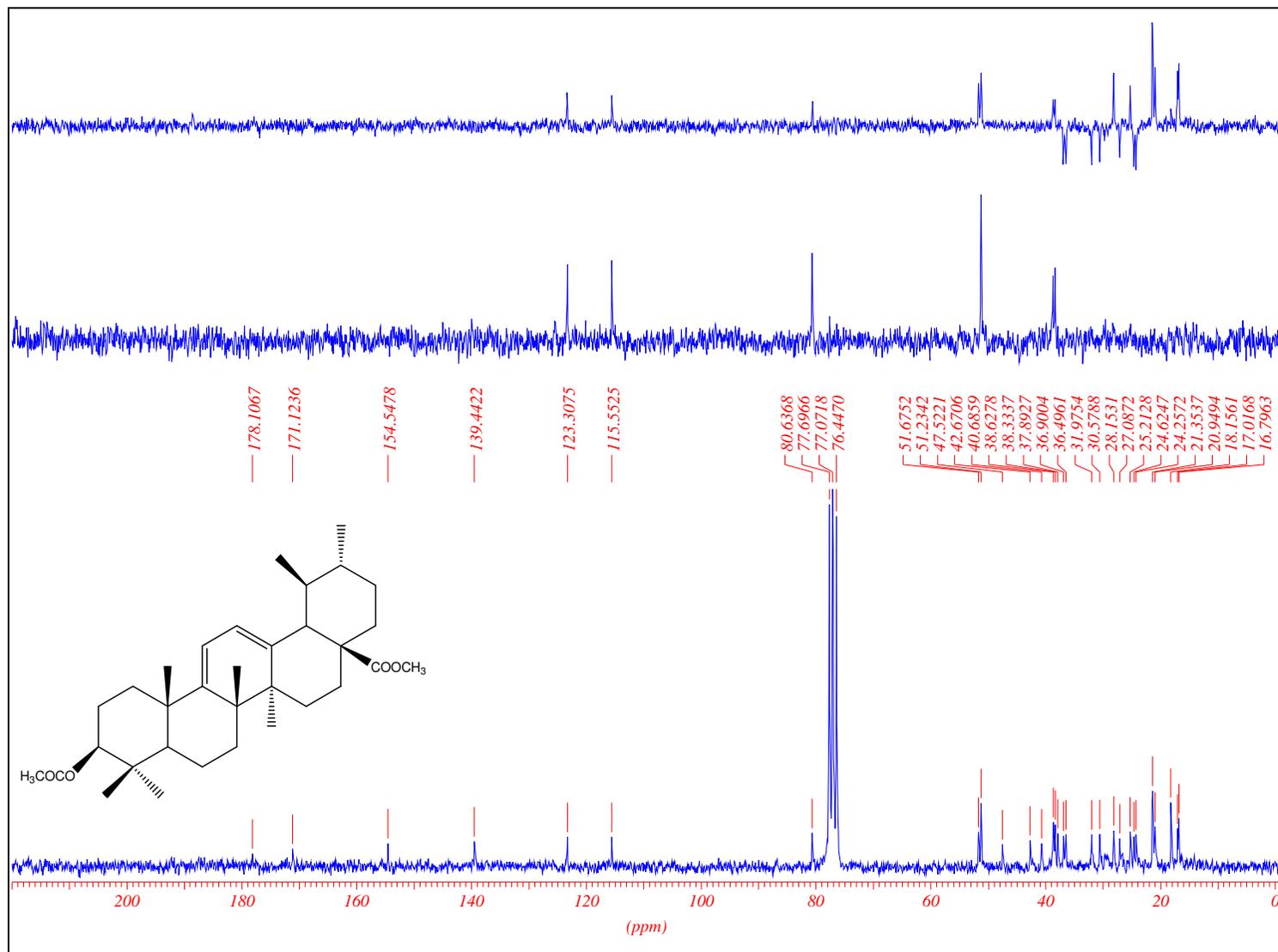


Figura 81 - Espectro de RMN de ¹³C de 80 (50 MHz, CDCl₃).

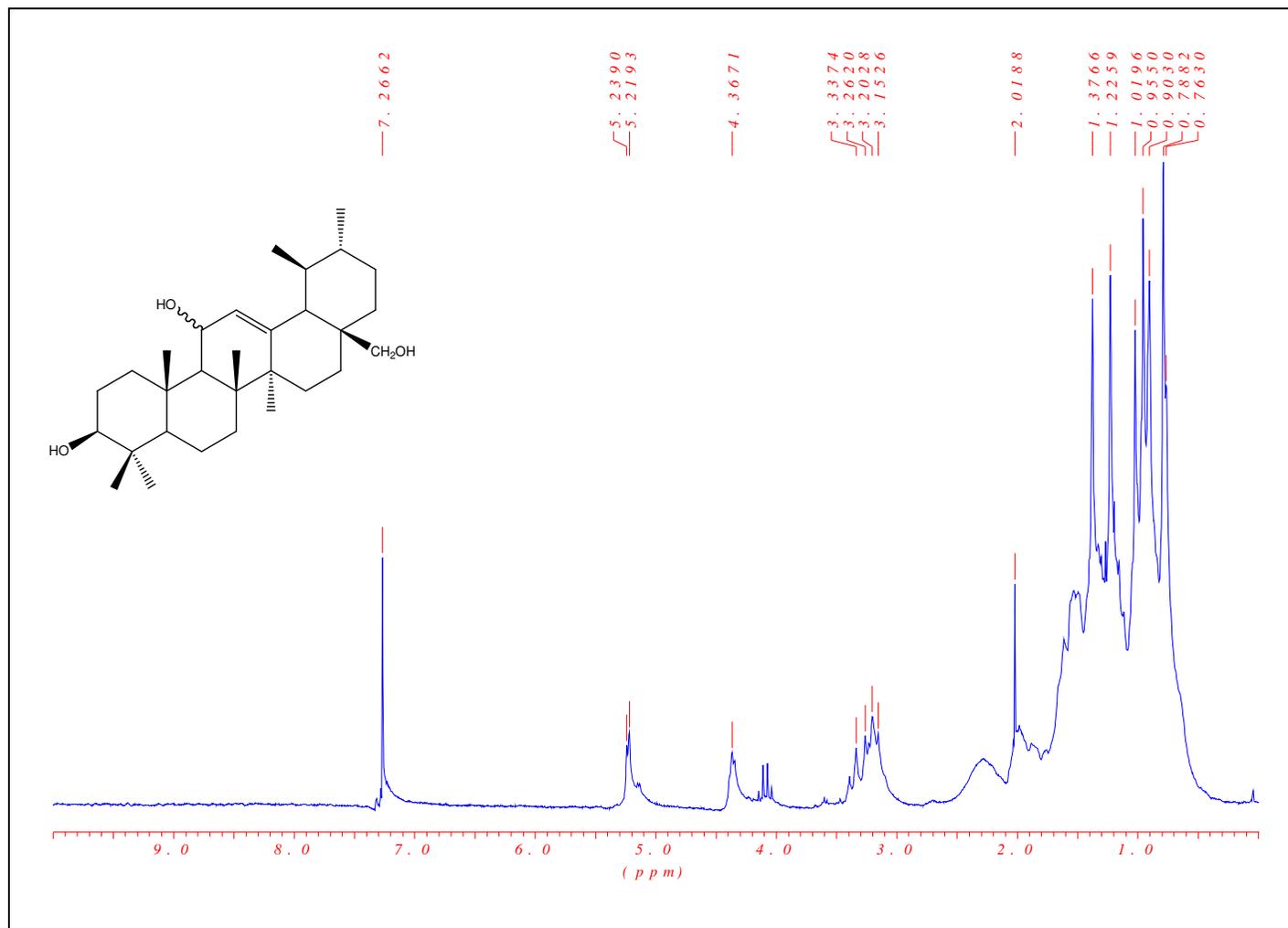


Figura 82 - Espectro de RMN de ^1H de 81 (200 MHz, CDCl_3).

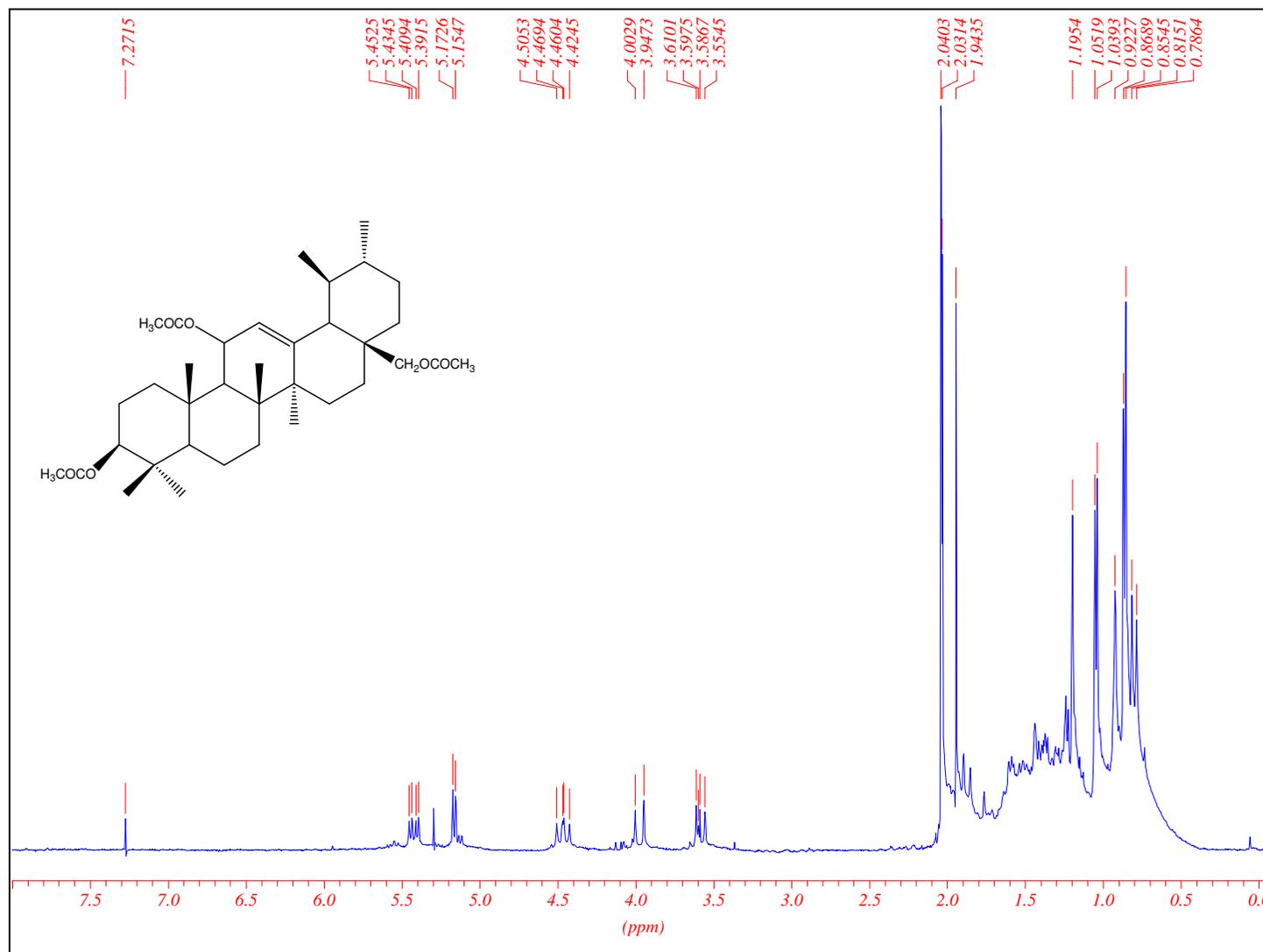


Figura 83 - Espectro de RMN de ¹H de 82 (200 MHz, CDCl₃).

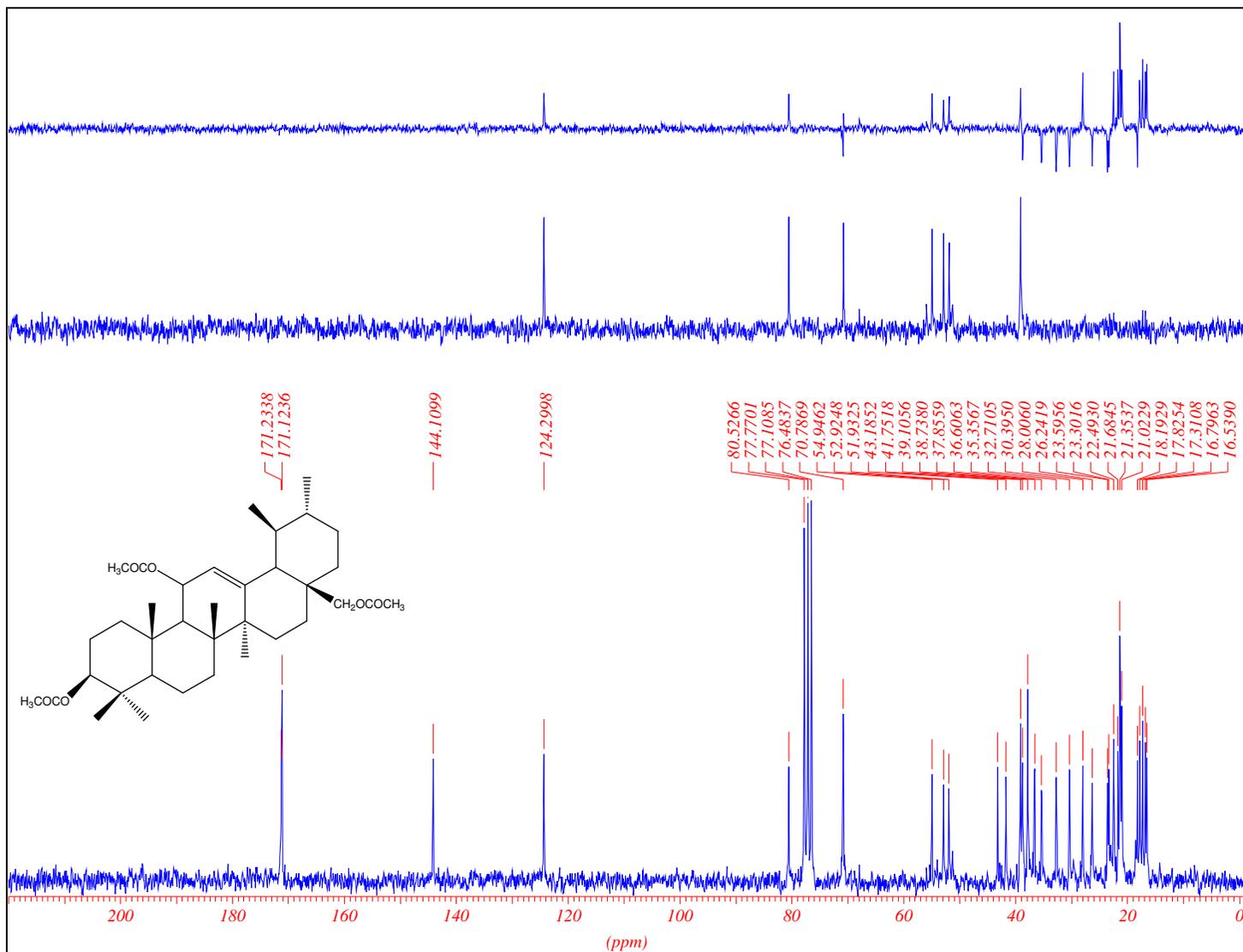


Figura 84 - Espectro de RMN de ^{13}C de 82 (50 MHz, $CDCl_3$).

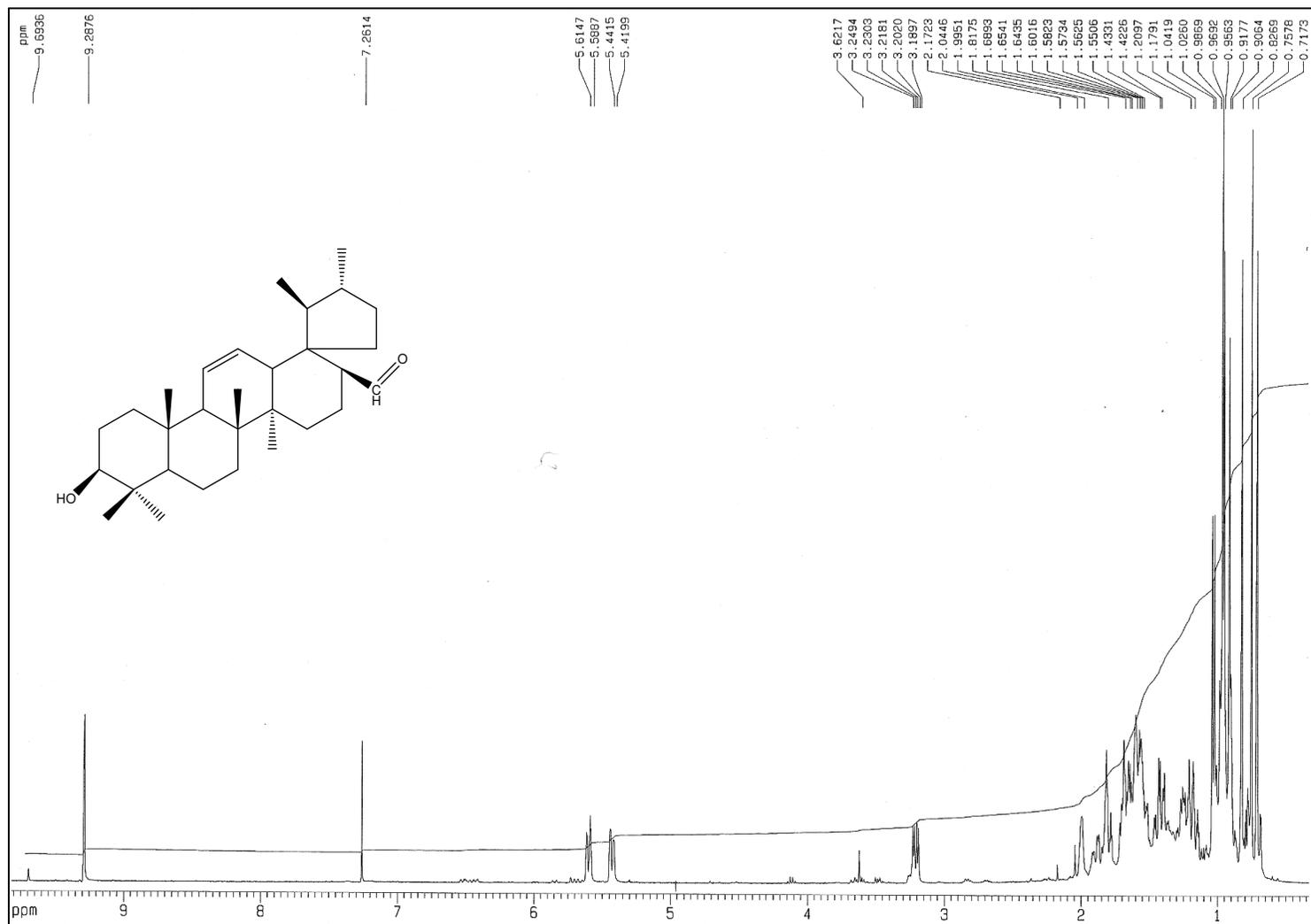


Figura 85 - Espectro de RMN de ¹H de 83 (400 MHz, CDCl₃).

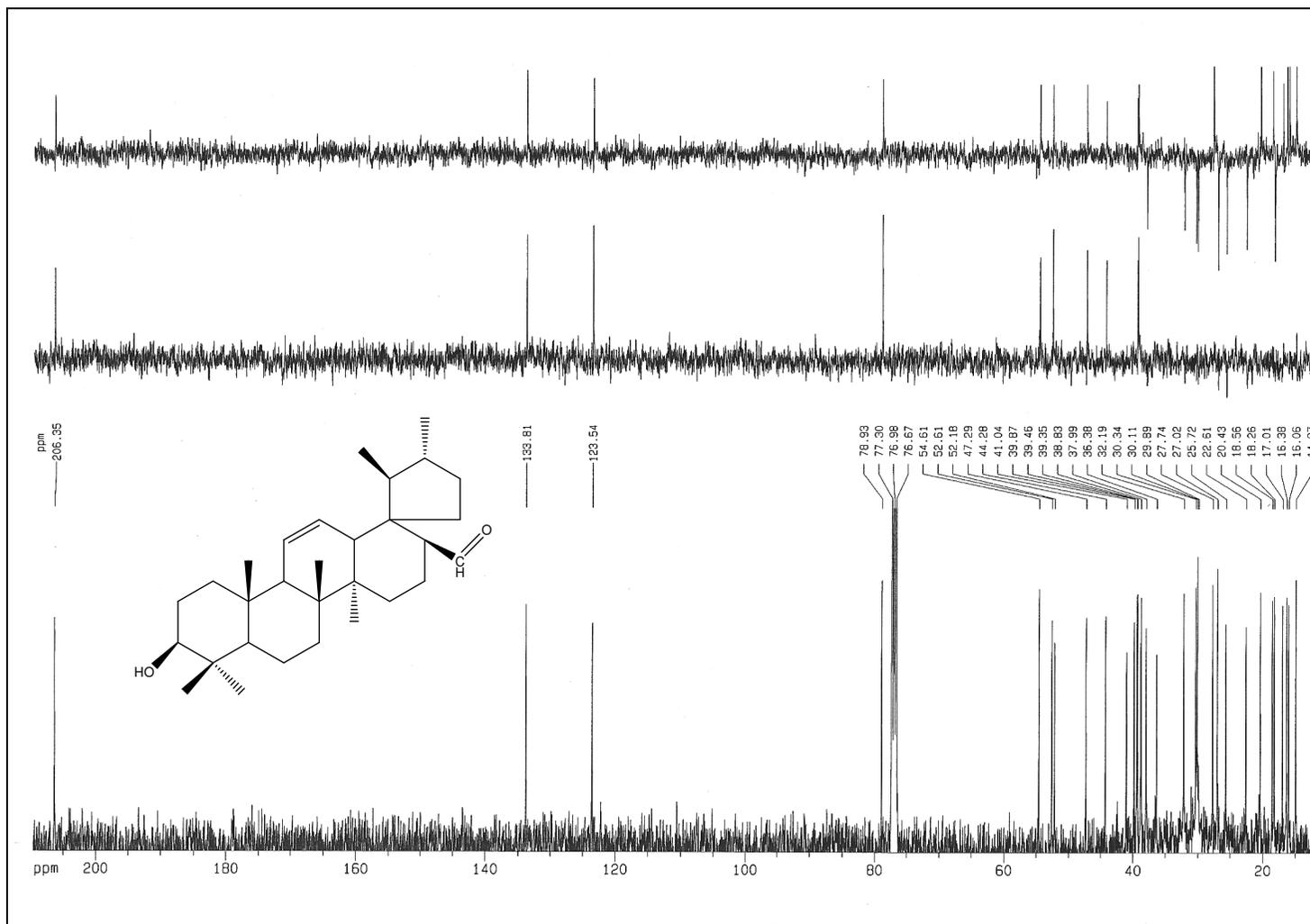


Figura 86 - Espectro de RMN de ^{13}C de 83 (100 MHz, CDCl_3).

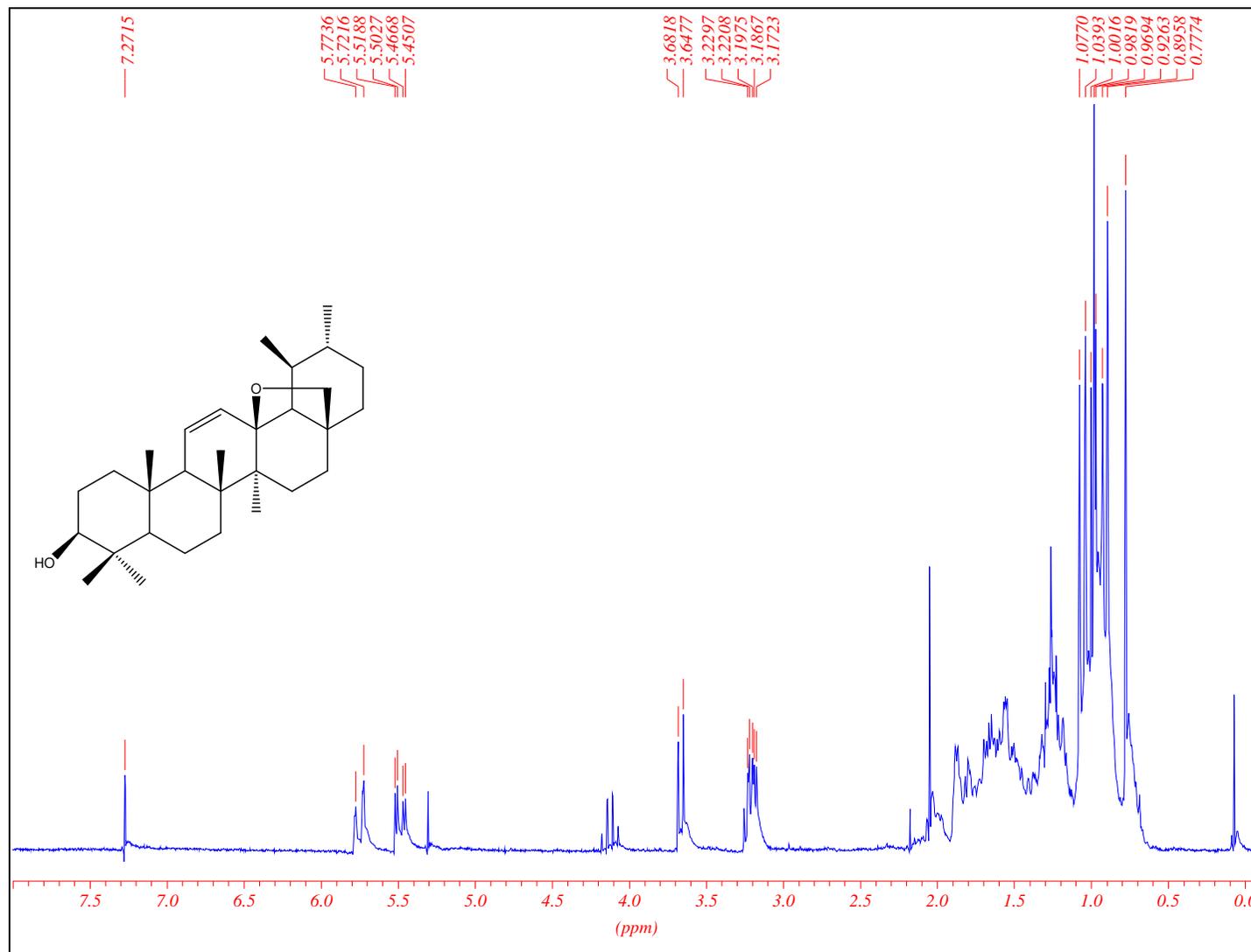


Figura 87 - Espectro de RMN de ^1H de 84 (200 MHz, CDCl_3).

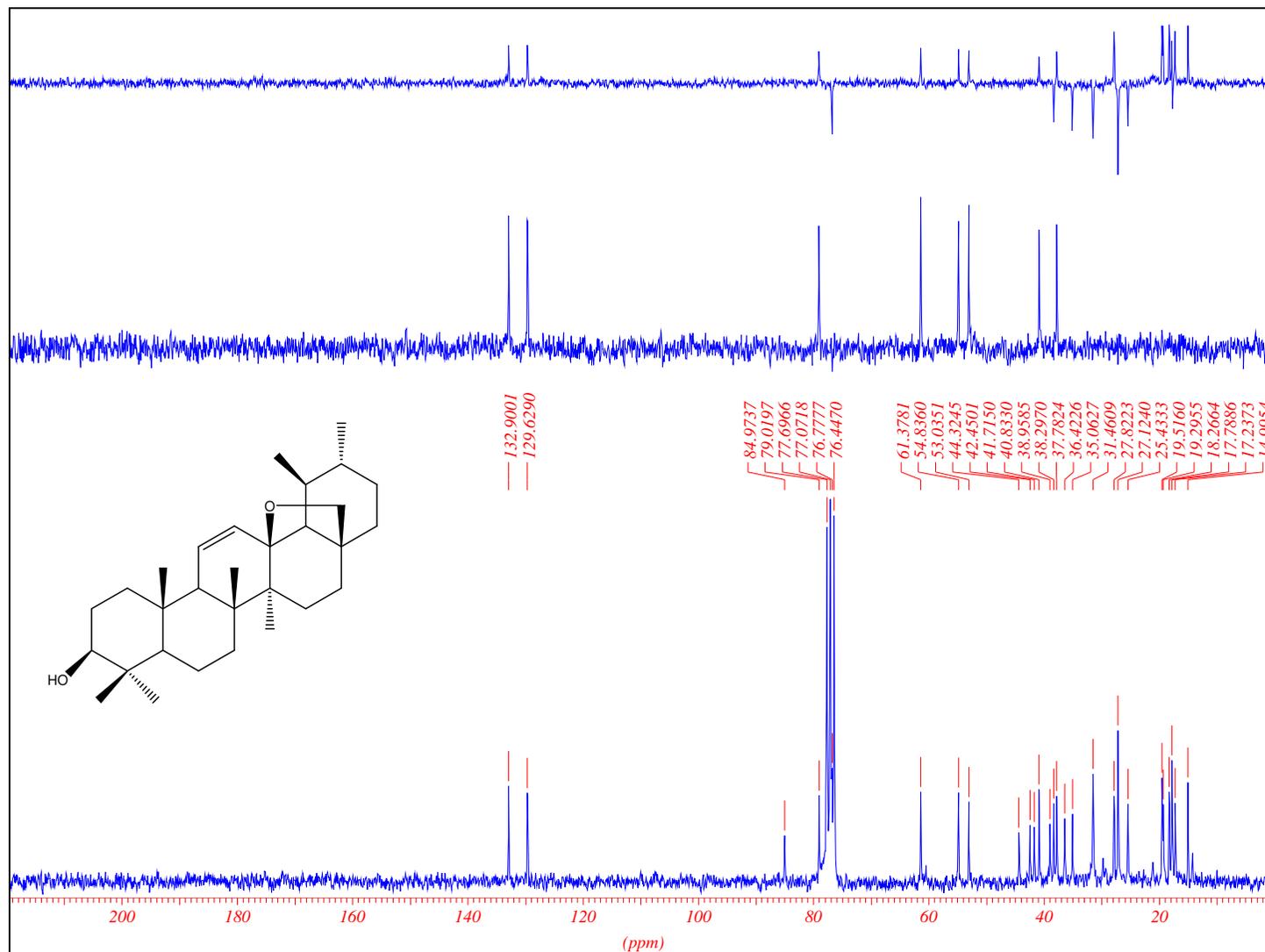


Figura 88 - Espectro de RMN de ¹³C de 84 (50 MHz, CDCl₃).

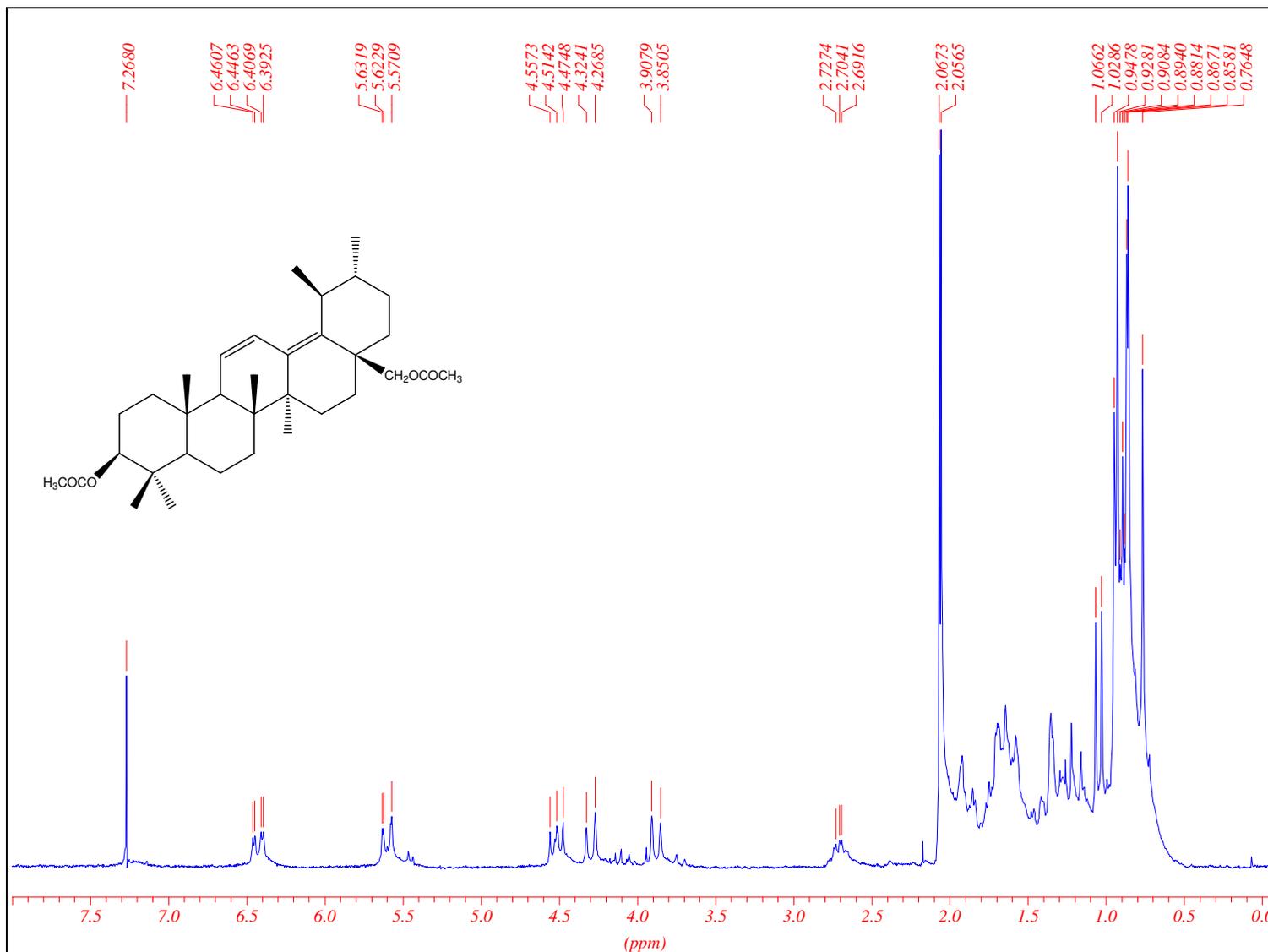


Figura 89 - Espectro de RMN de ¹H de 85 (200 MHz, CDCl₃).

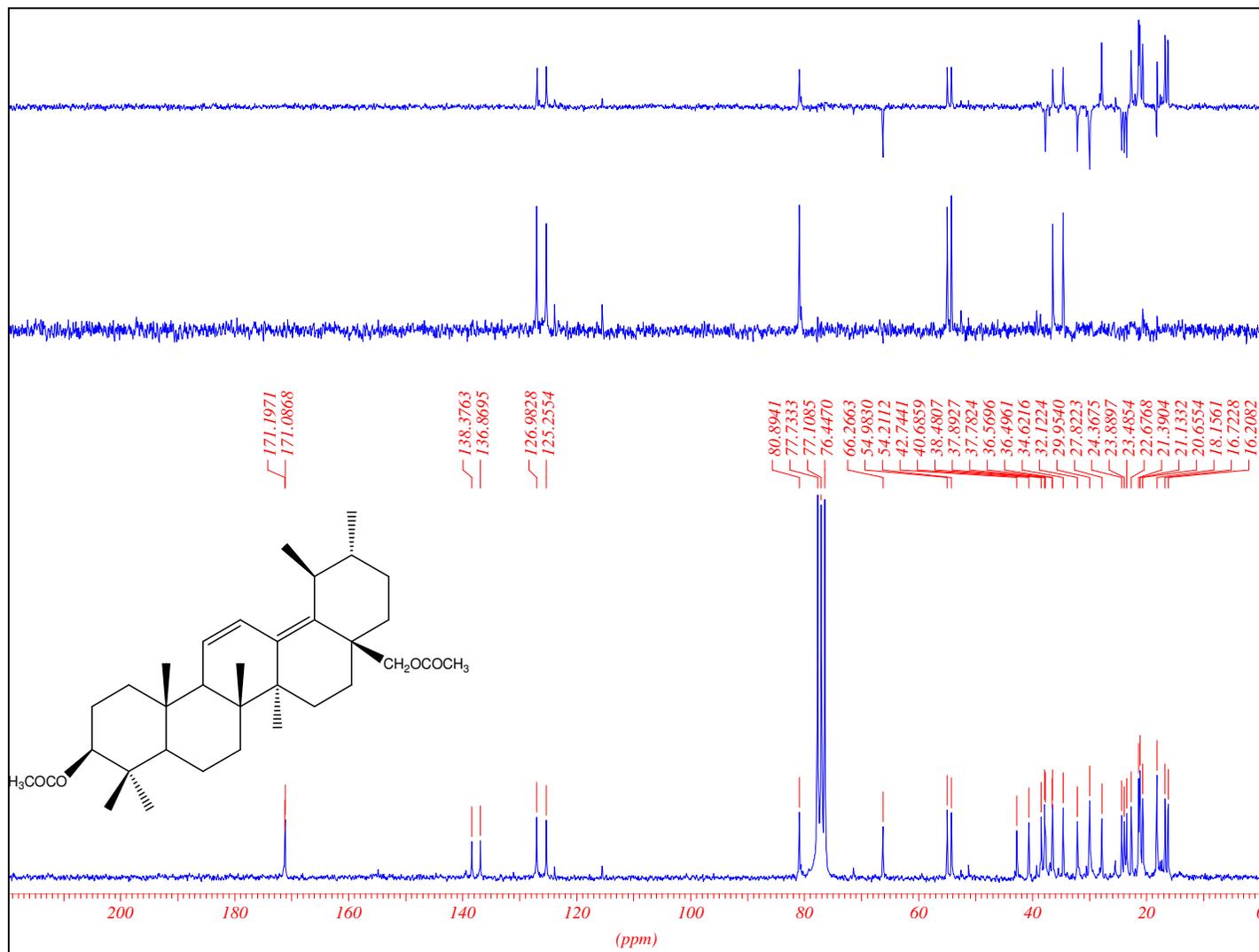


Figura 90 - Espectro de RMN de ¹³C de 85 (50 MHz, CDCl₃).

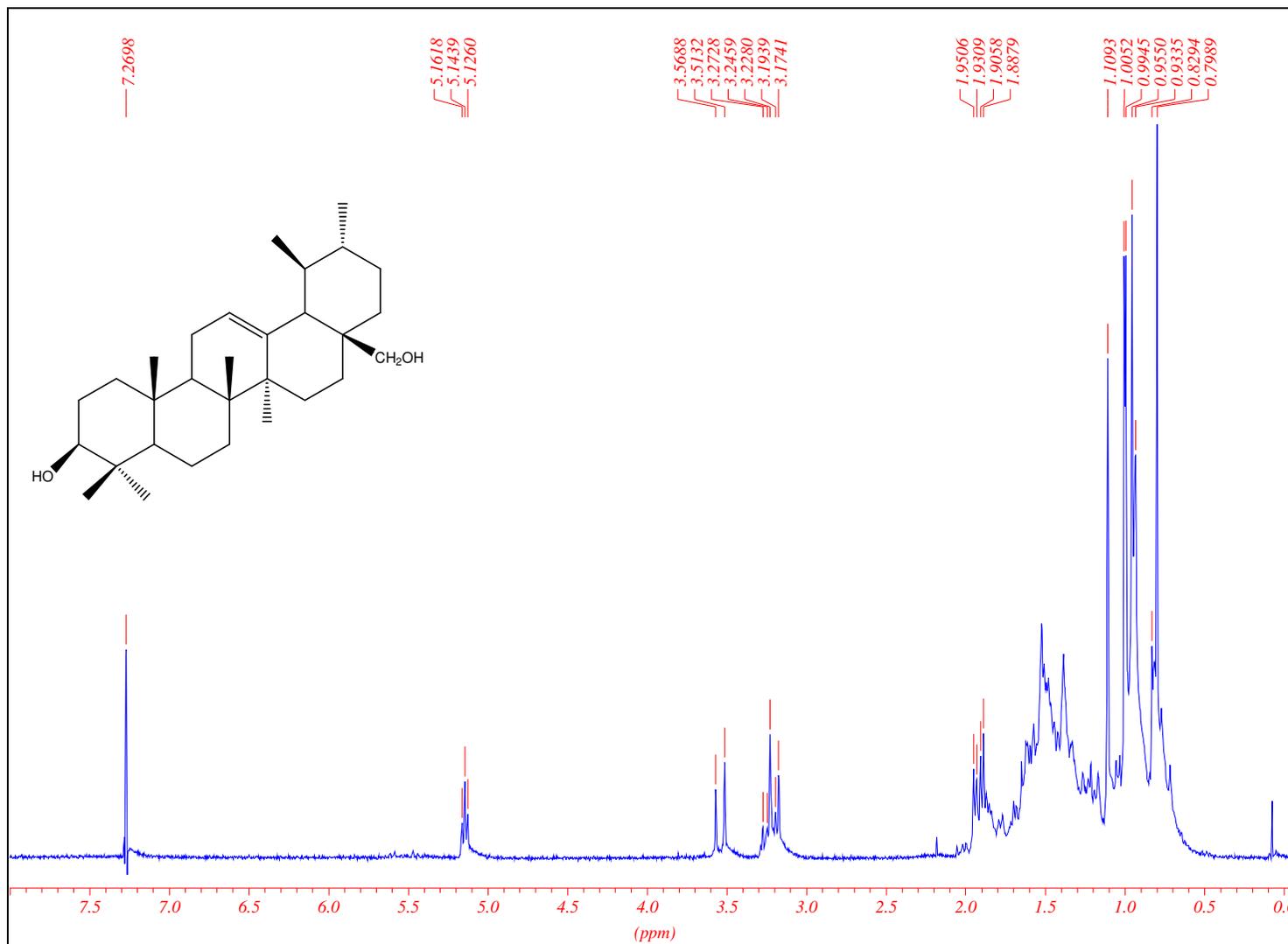


Figura 91 - Espectro de RMN de ¹H de 86 (200 MHz, CDCl₃).

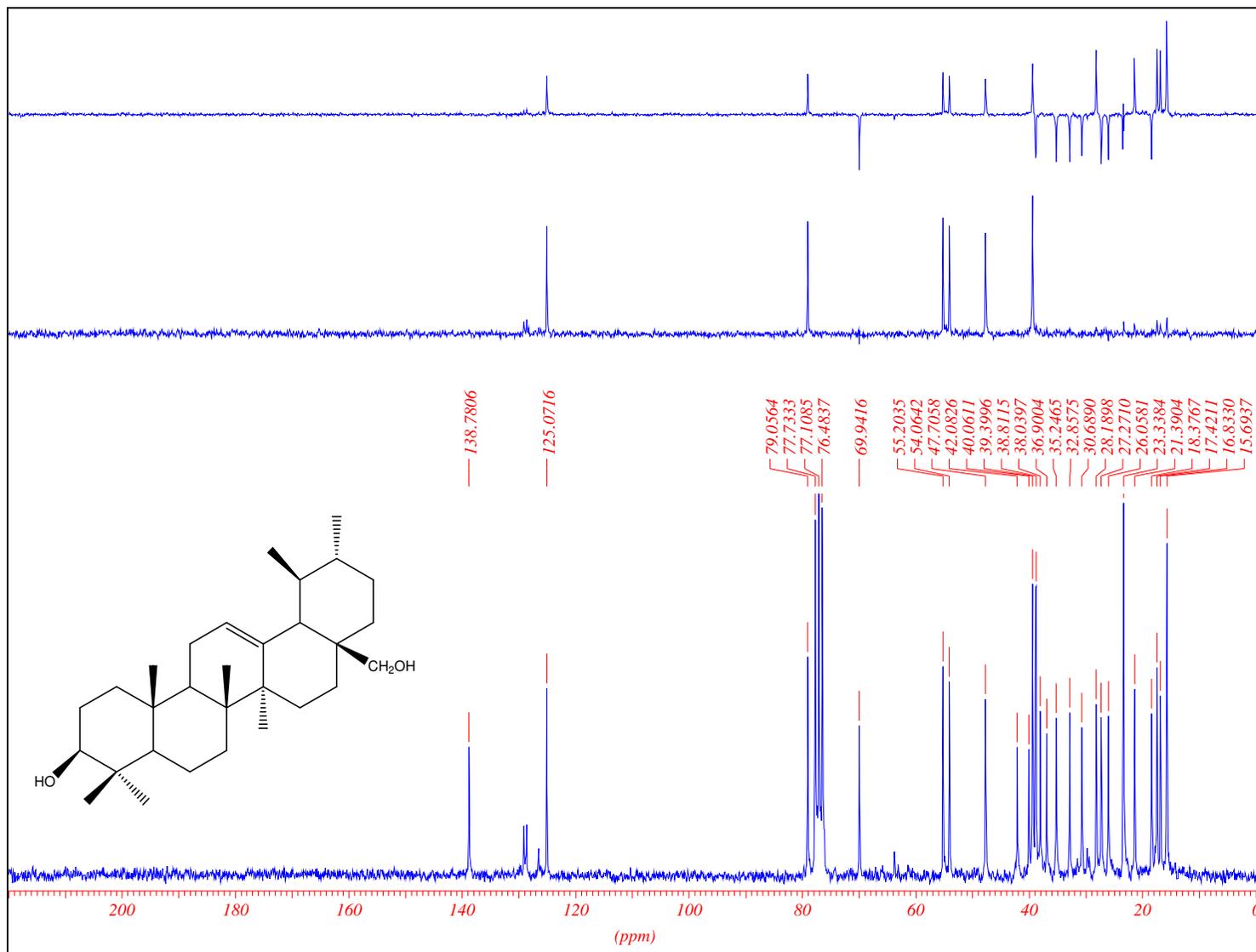


Figura 92 - Espectro de RMN de ^{13}C de 86 (50 MHz, CDCl_3).

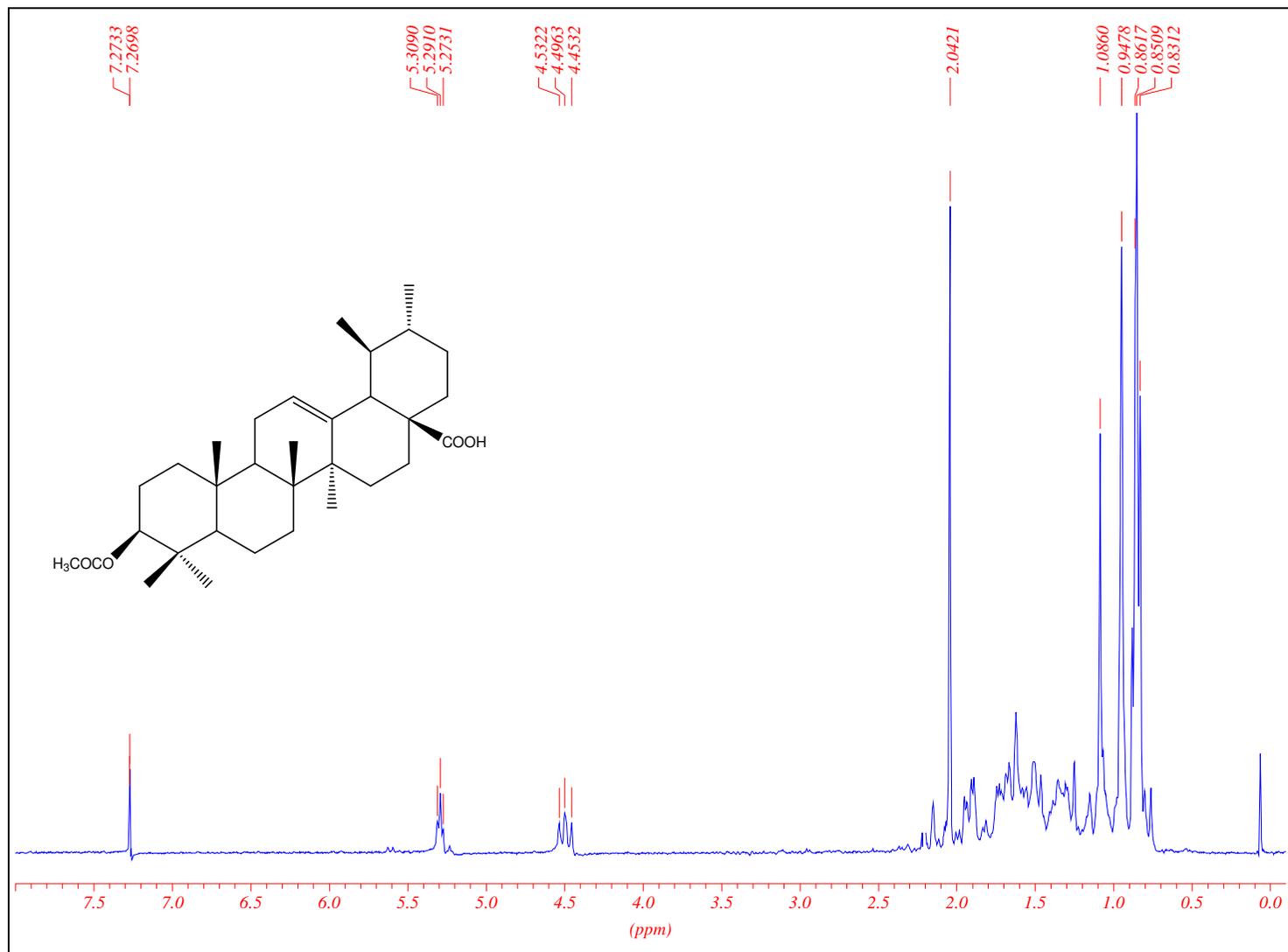


Figura 93 - Espectro de RMN de ¹H de 87 (200 MHz, CDCl₃).

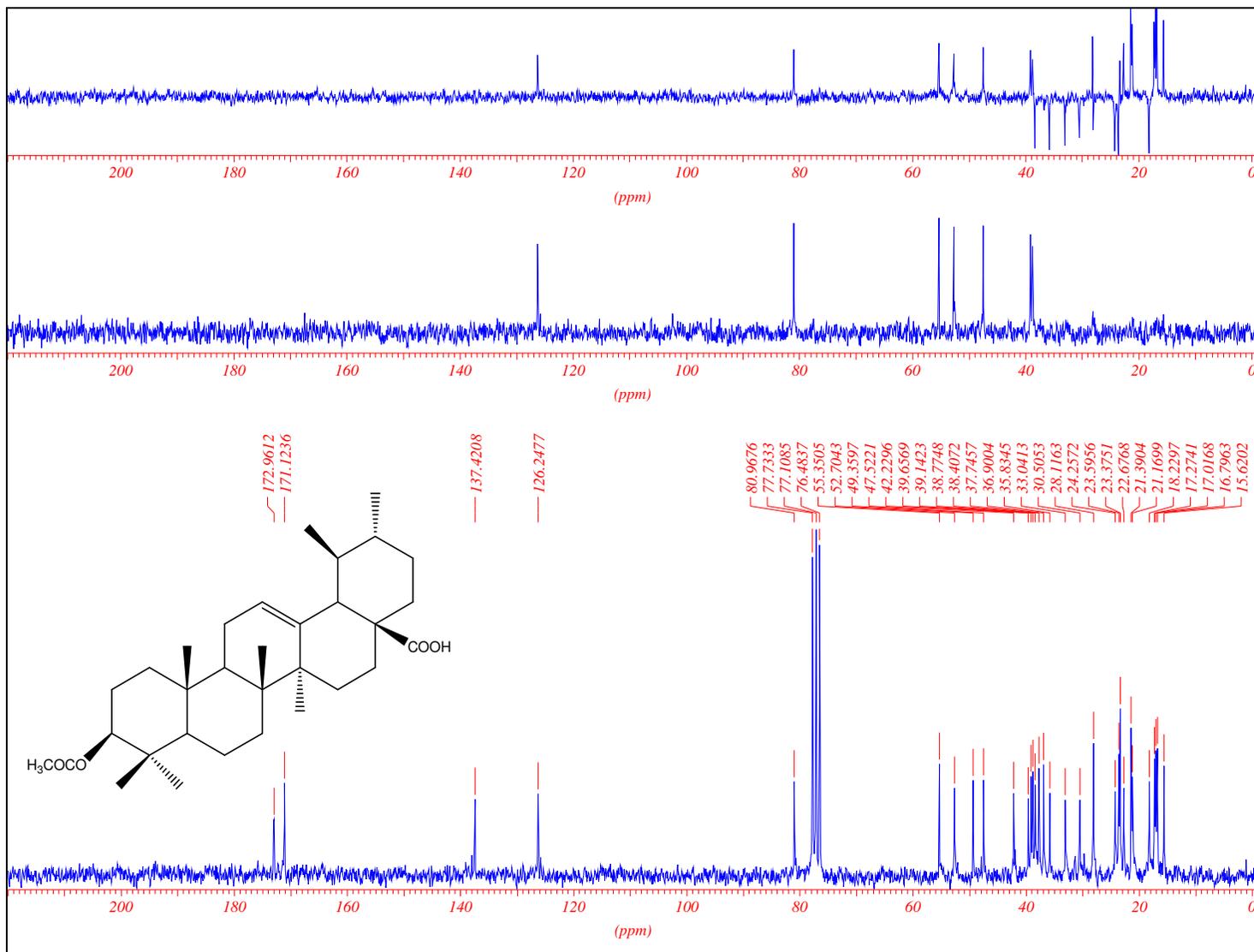


Figura 94 - Espectro de RMN de ^{13}C de 87 (50 MHz, CDCl_3).

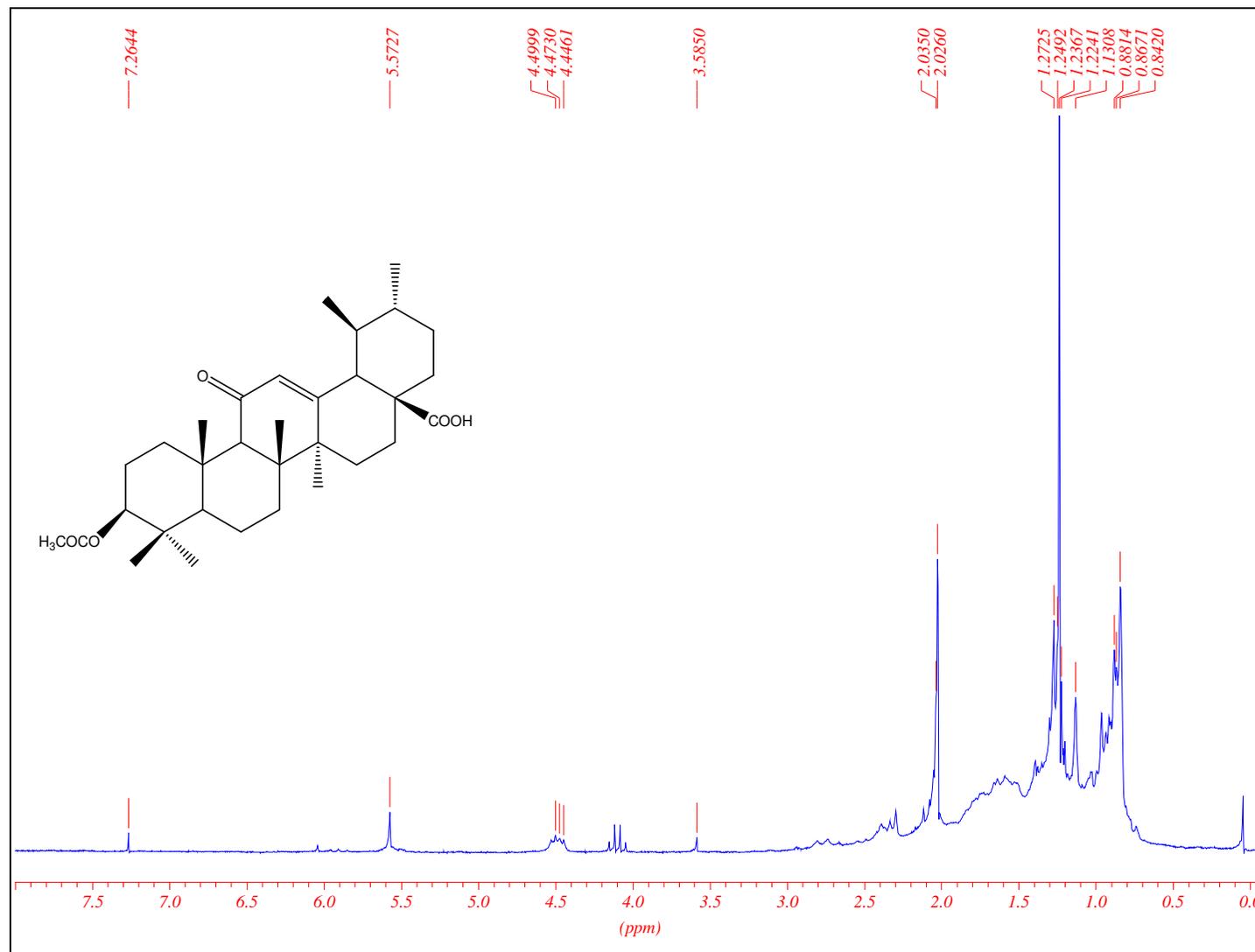


Figura 95 - Espectro de RMN de ¹H de 88 (200 MHz, CDCl₃).

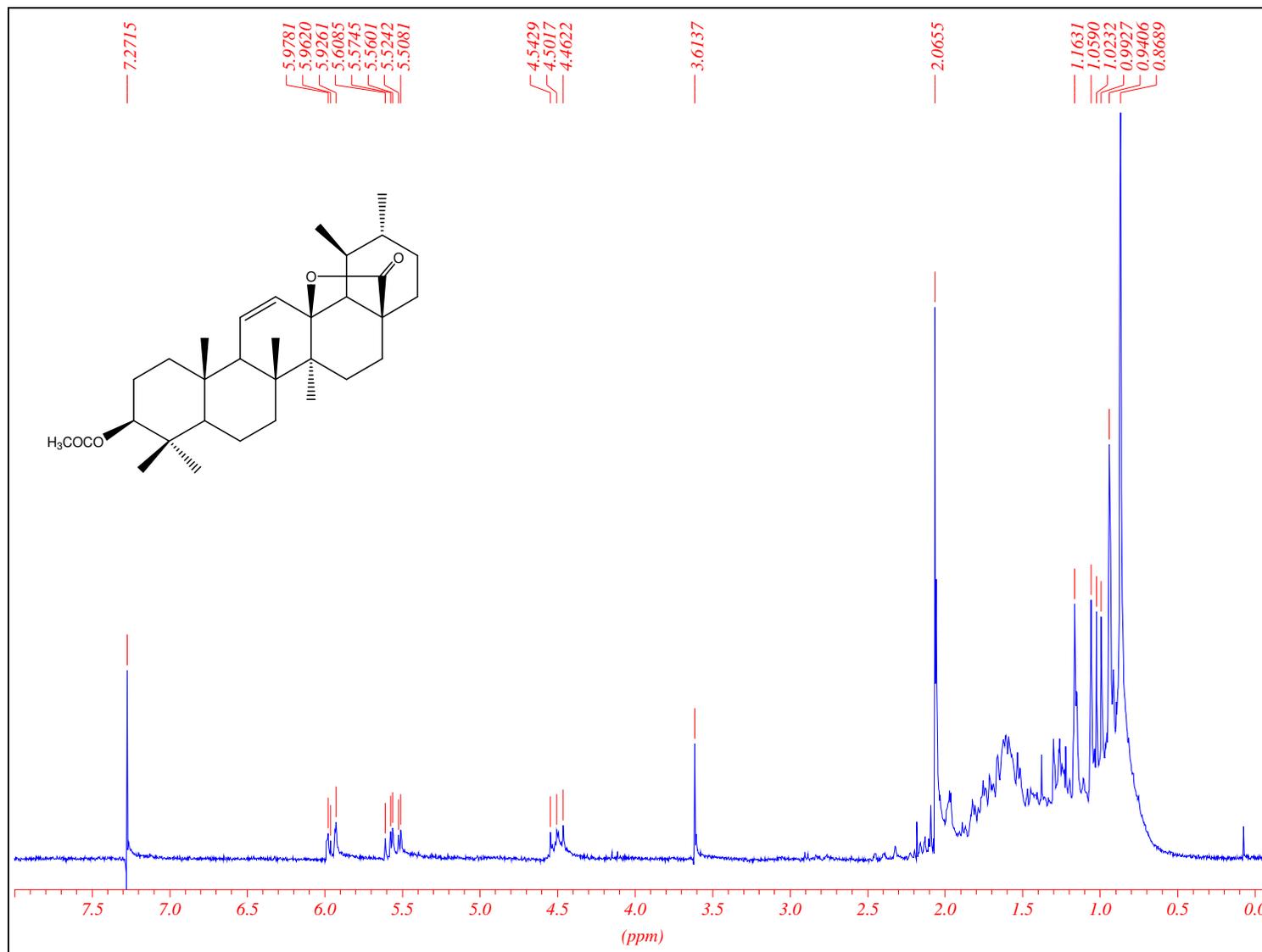


Figura 96 - Espectro de RMN de ¹H de 89 (200 MHz, CDCl₃).

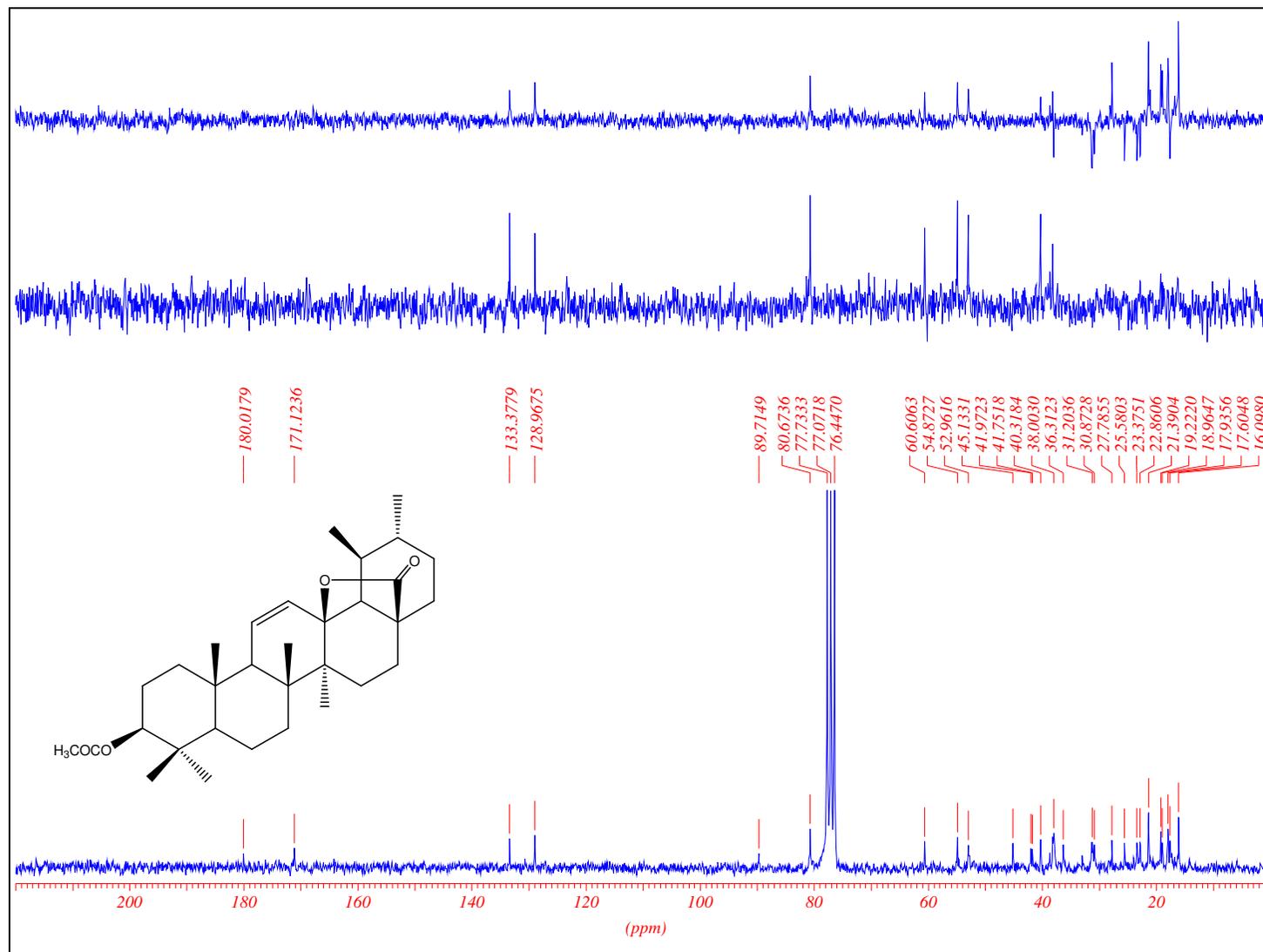


Figura 97 - Espectro de RMN de ^{13}C de 89 (50 MHz, CDCl_3).

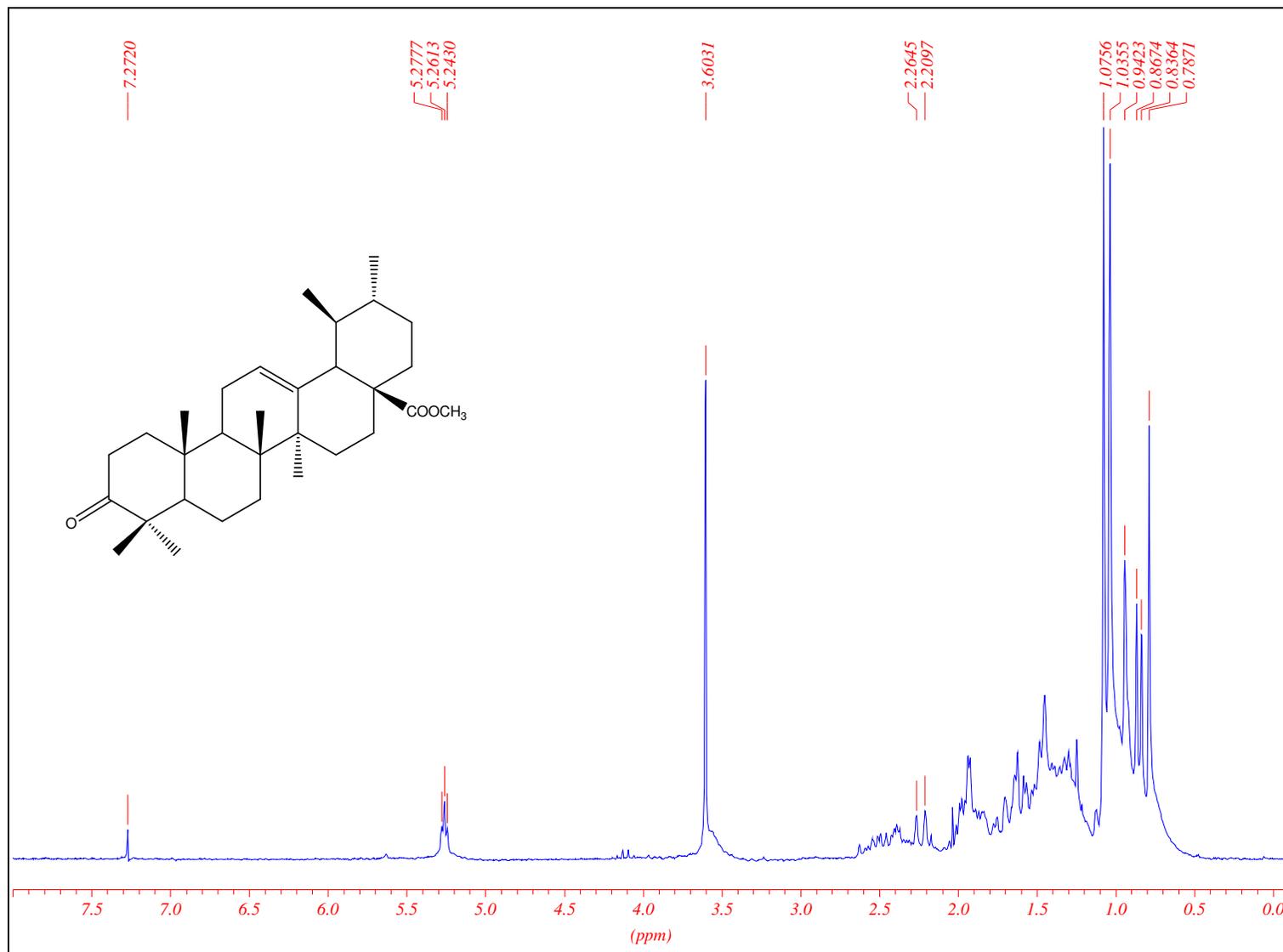


Figura 98 - Espectro de RMN de ^1H de 90 (200 MHz, CDCl_3).

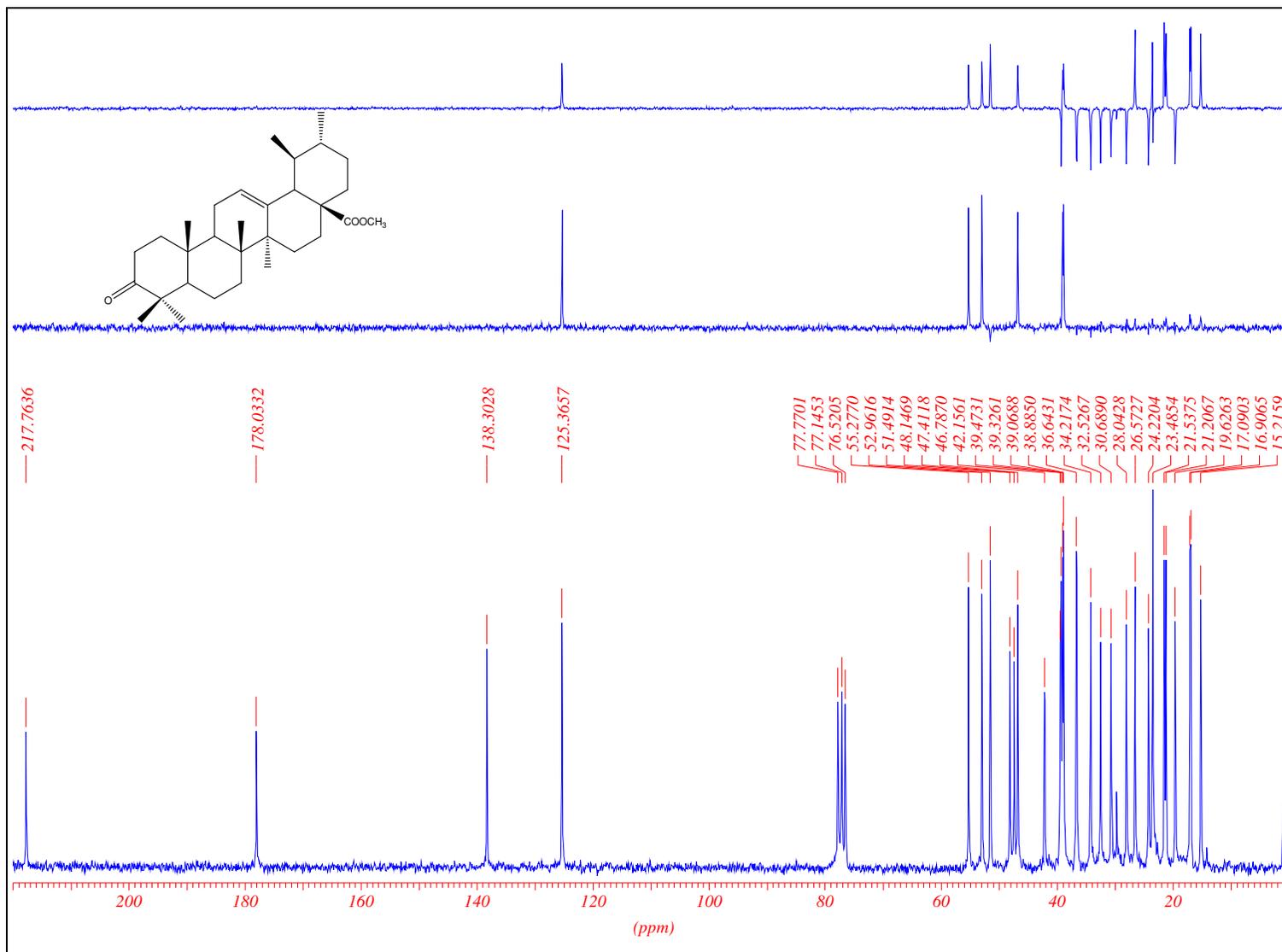


Figura 99 - Espectro de RMN de ^{13}C de 90 (50 MHz, CDCl_3).

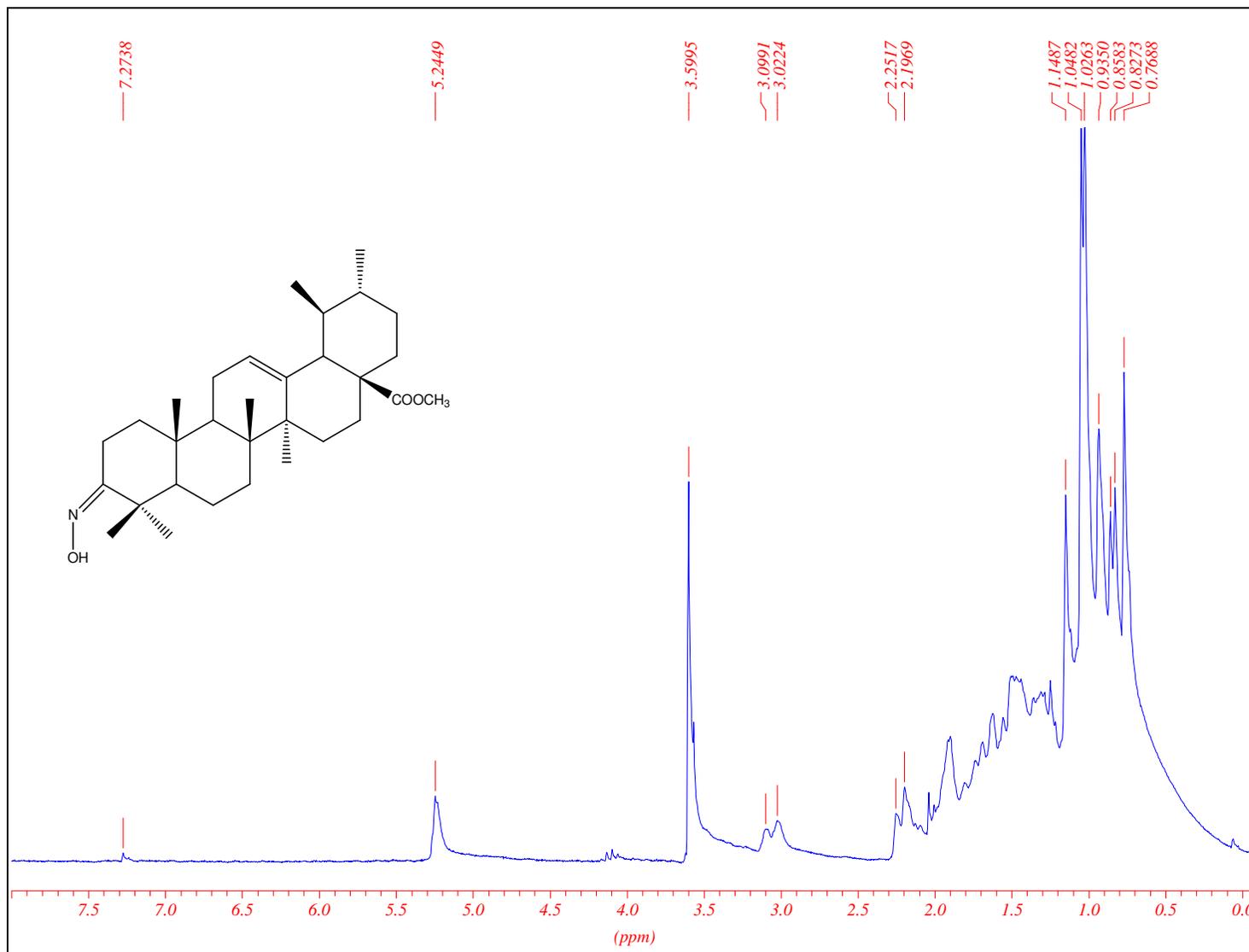


Figura 100 - Espectro de RMN de ¹H de 91 (200 MHz, CDCl₃).

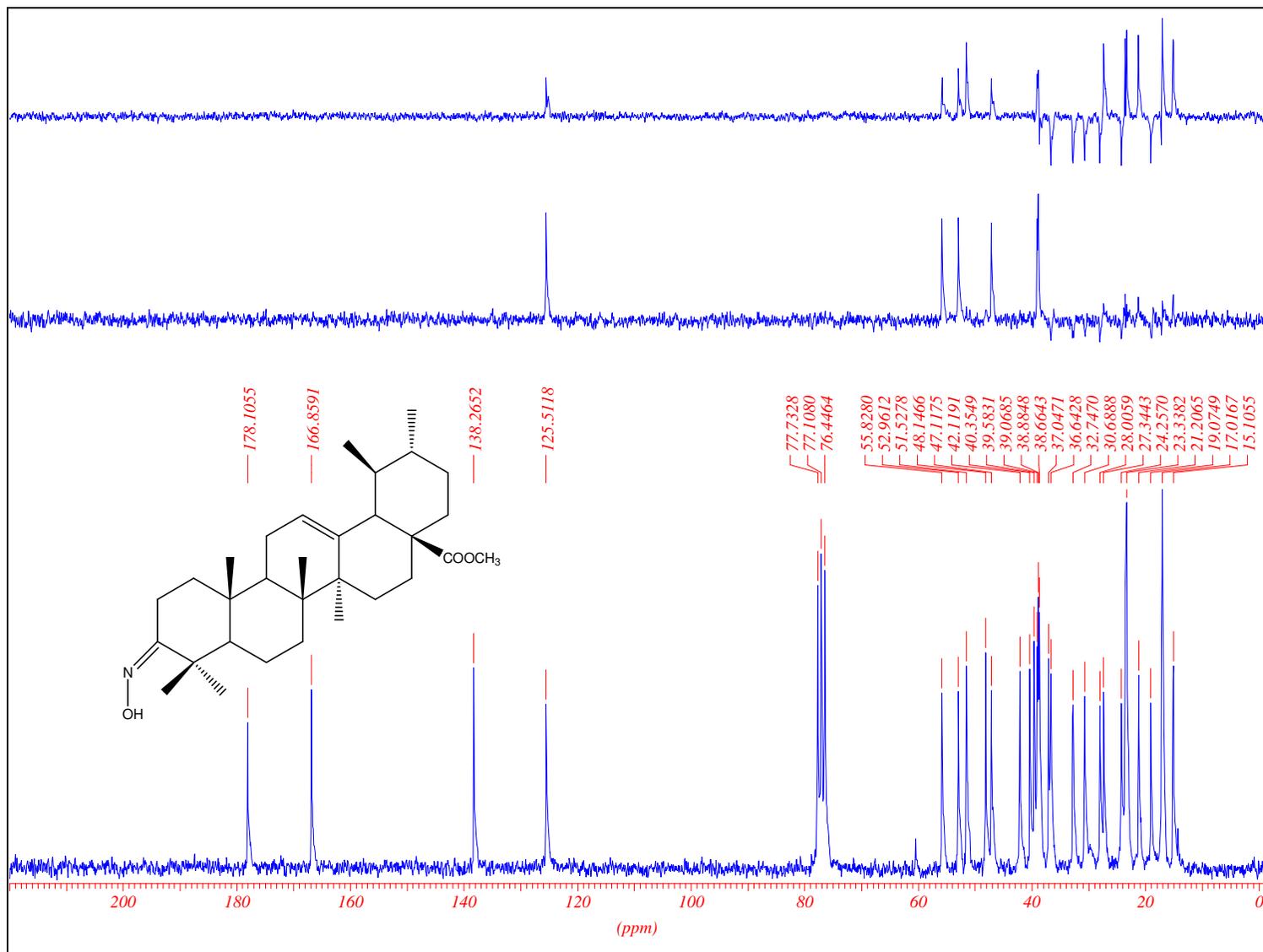


Figura 101 - Espectro de RMN de ¹³C de 91 (50 MHz, CDCl₃).

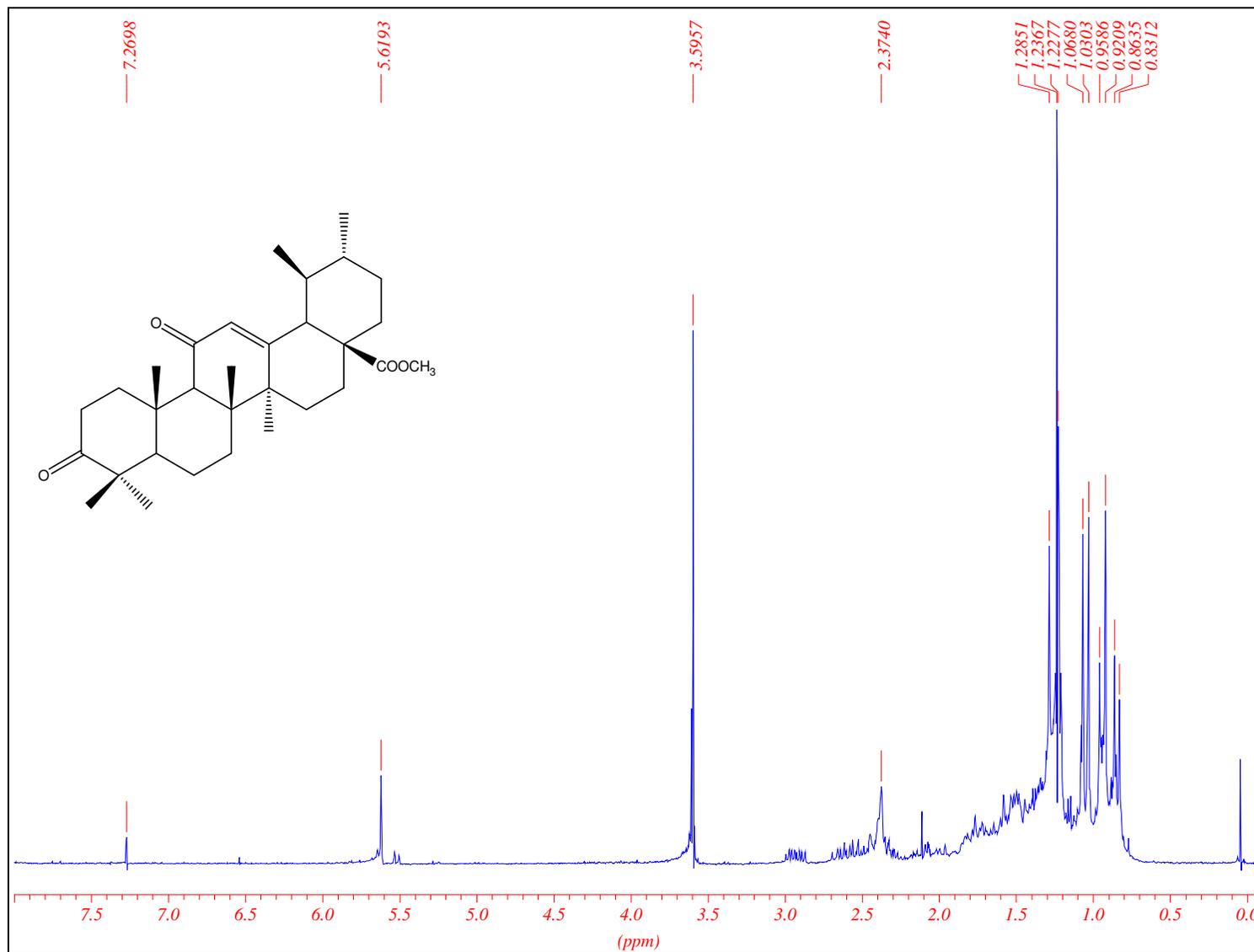


Figura 102 - Espectro de RMN de ^1H de 92 (200 MHz, CDCl_3).

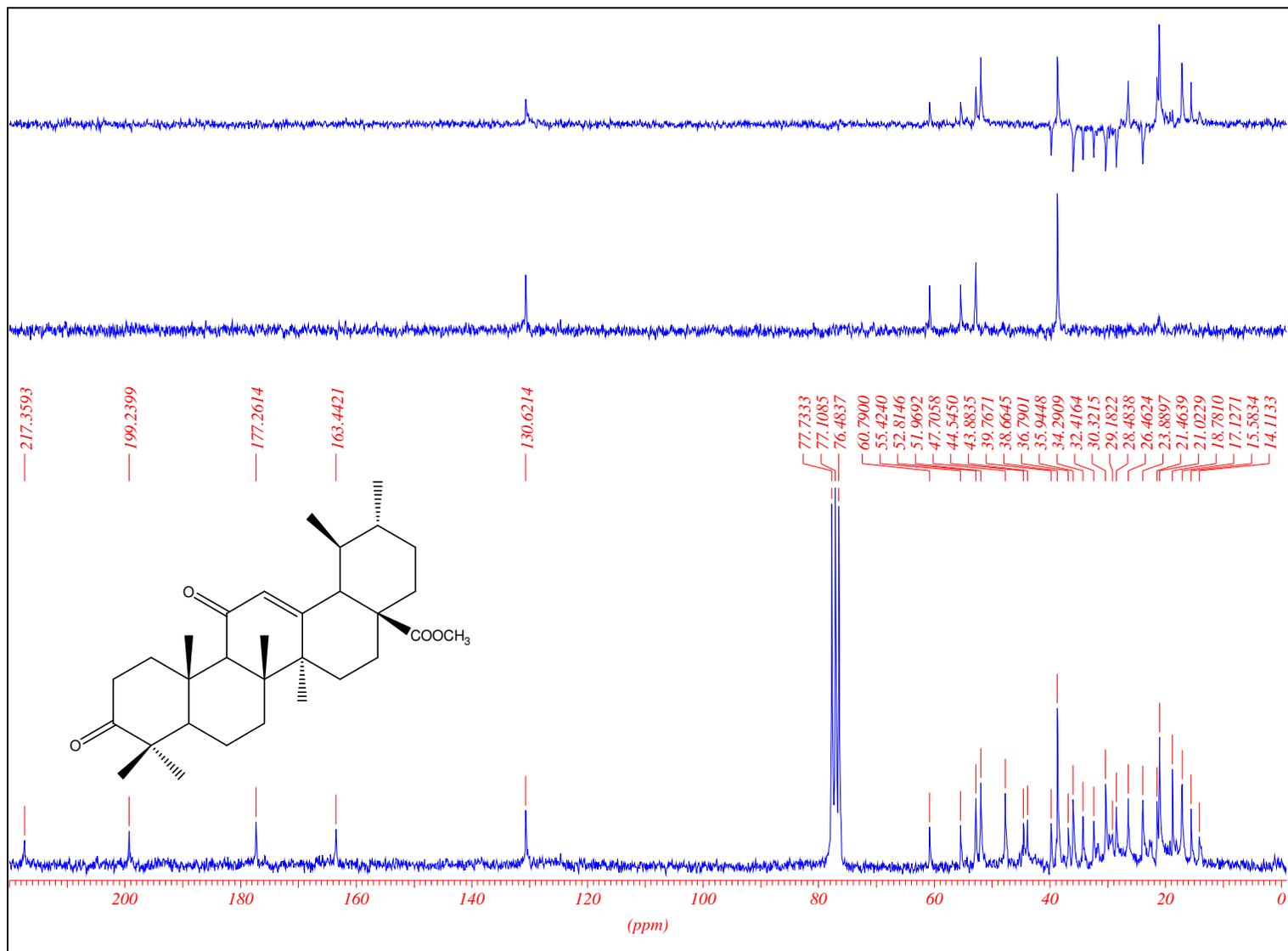


Figura 103 - Espectro de RMN de ¹³C de 92 (50 MHz, CDCl₃).

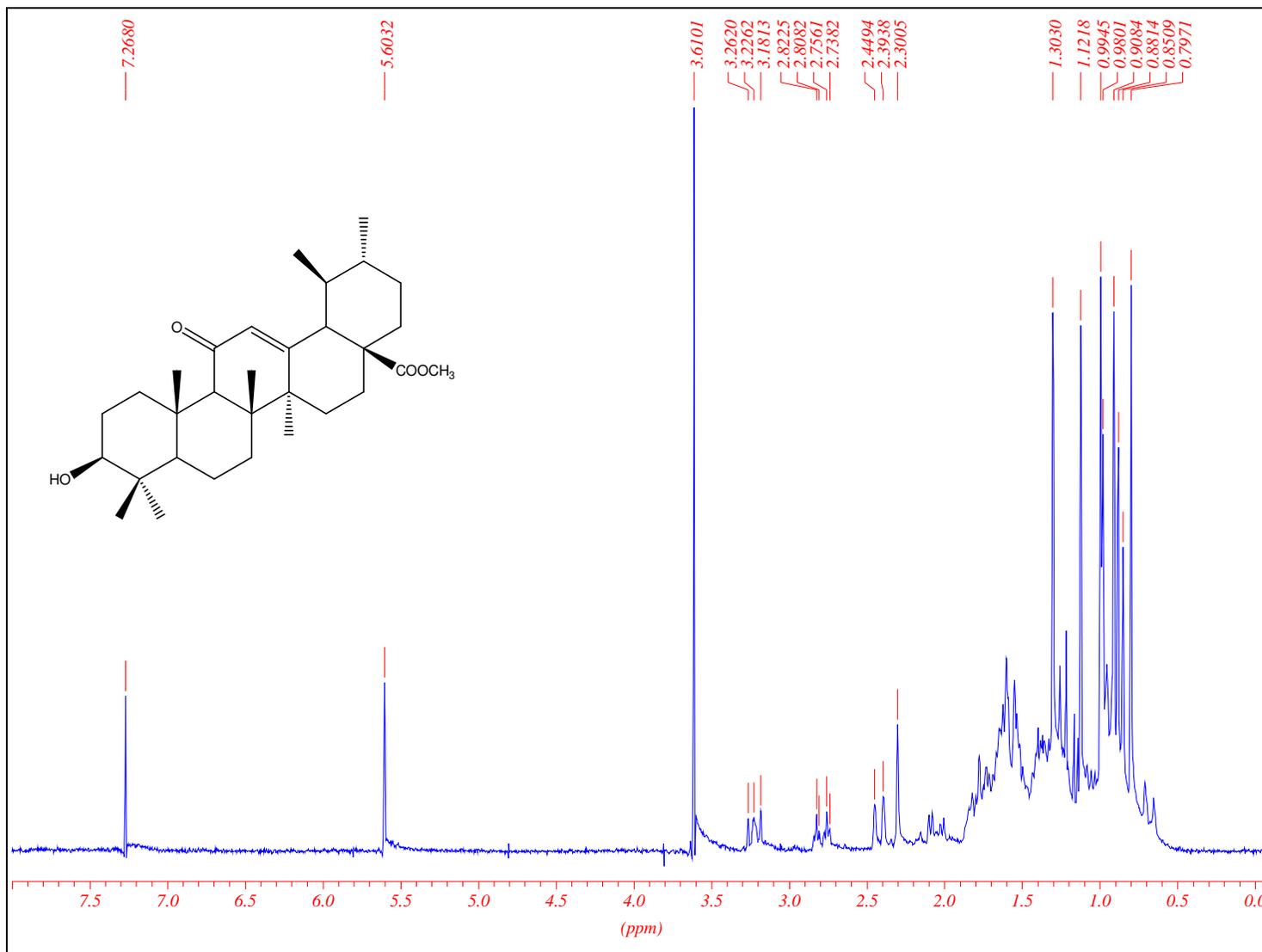


Figura 104 - Espectro de RMN de ¹H de 93 (200 MHz, CDCl₃).

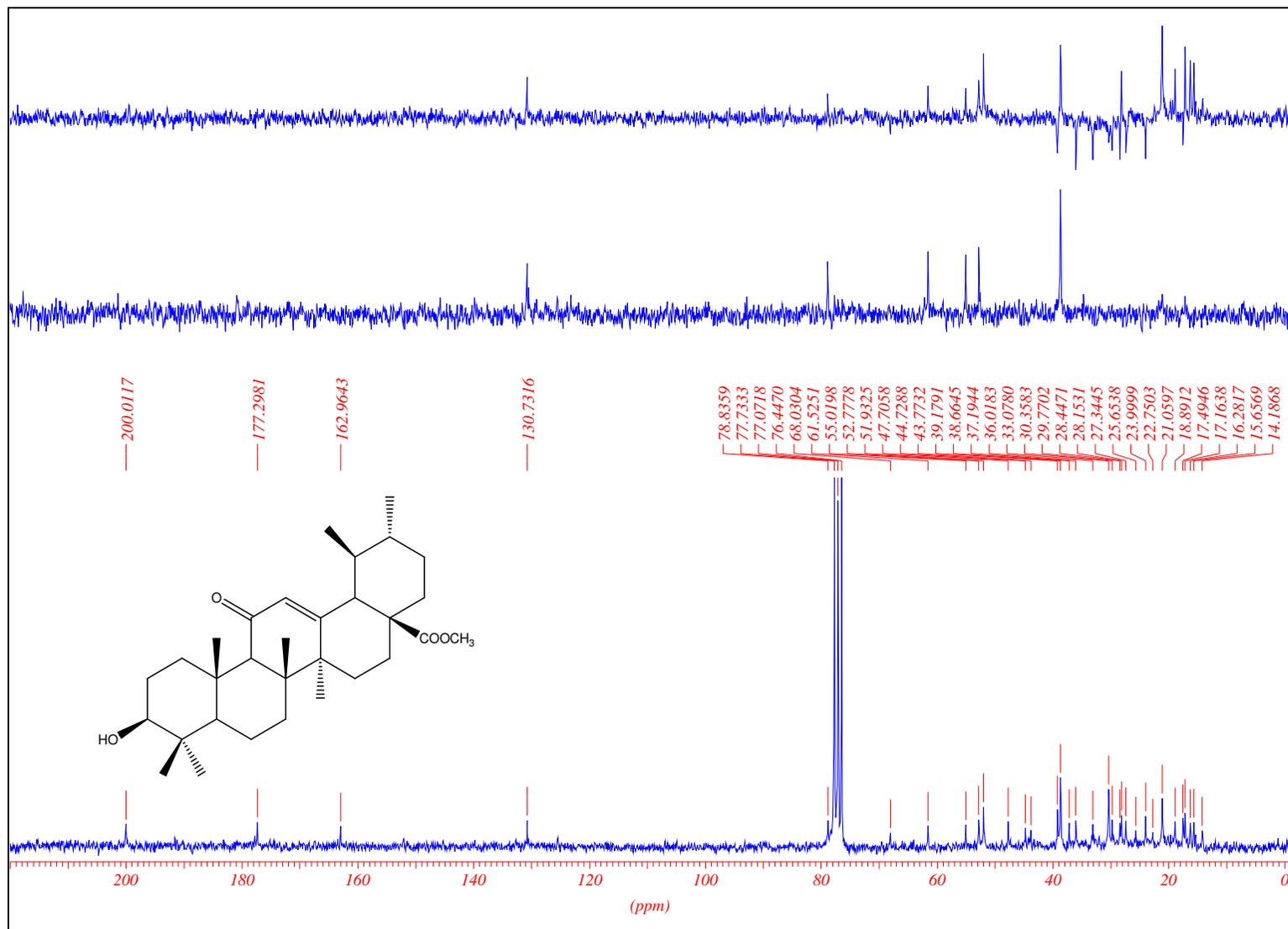


Figura 105 - Espectro de RMN de ¹³C de 93 (50 MHz, CDCl₃).

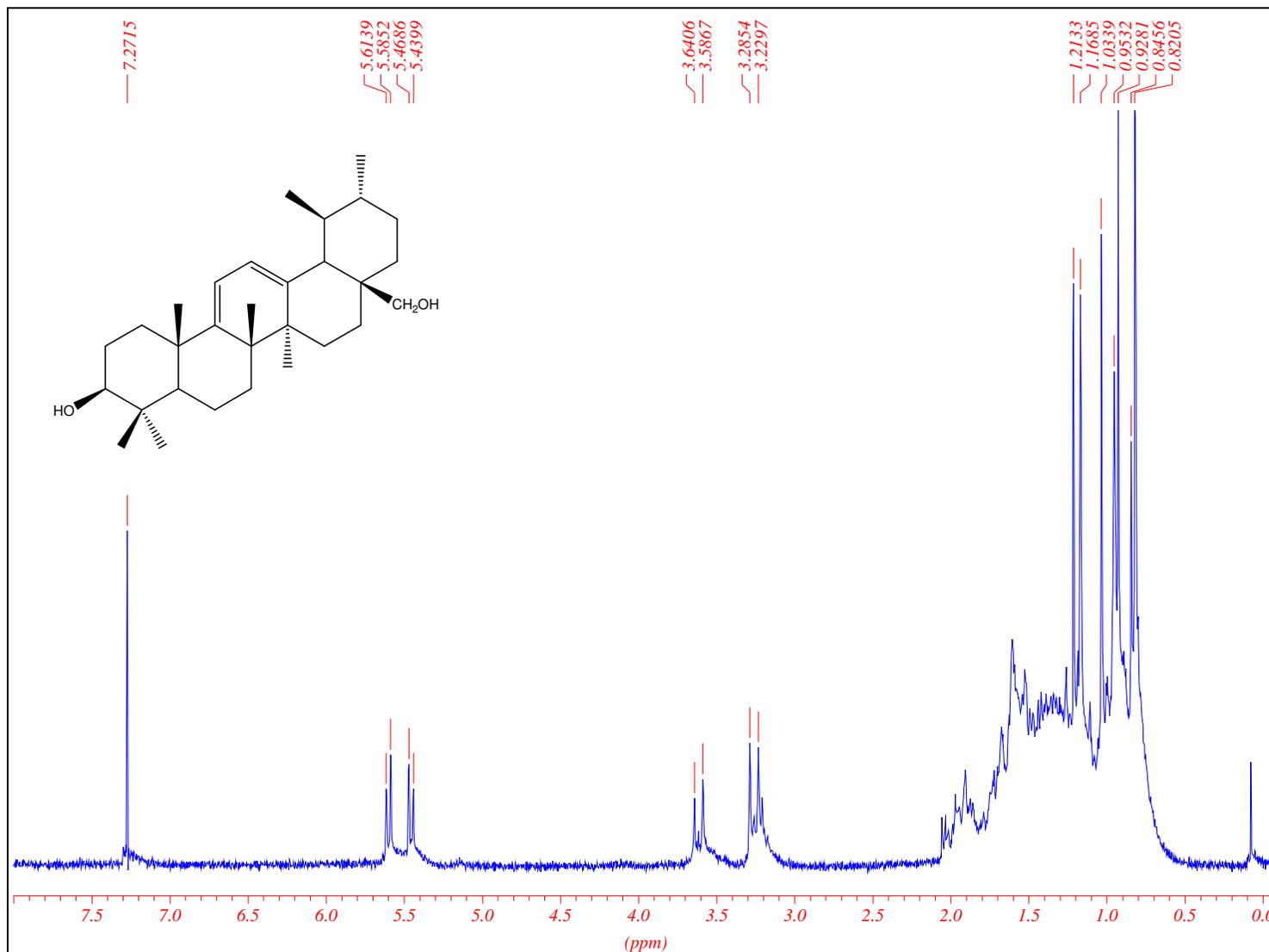


Figura 106 - Espectro de RMN de ¹H de 94 (200 MHz, CDCl₃).

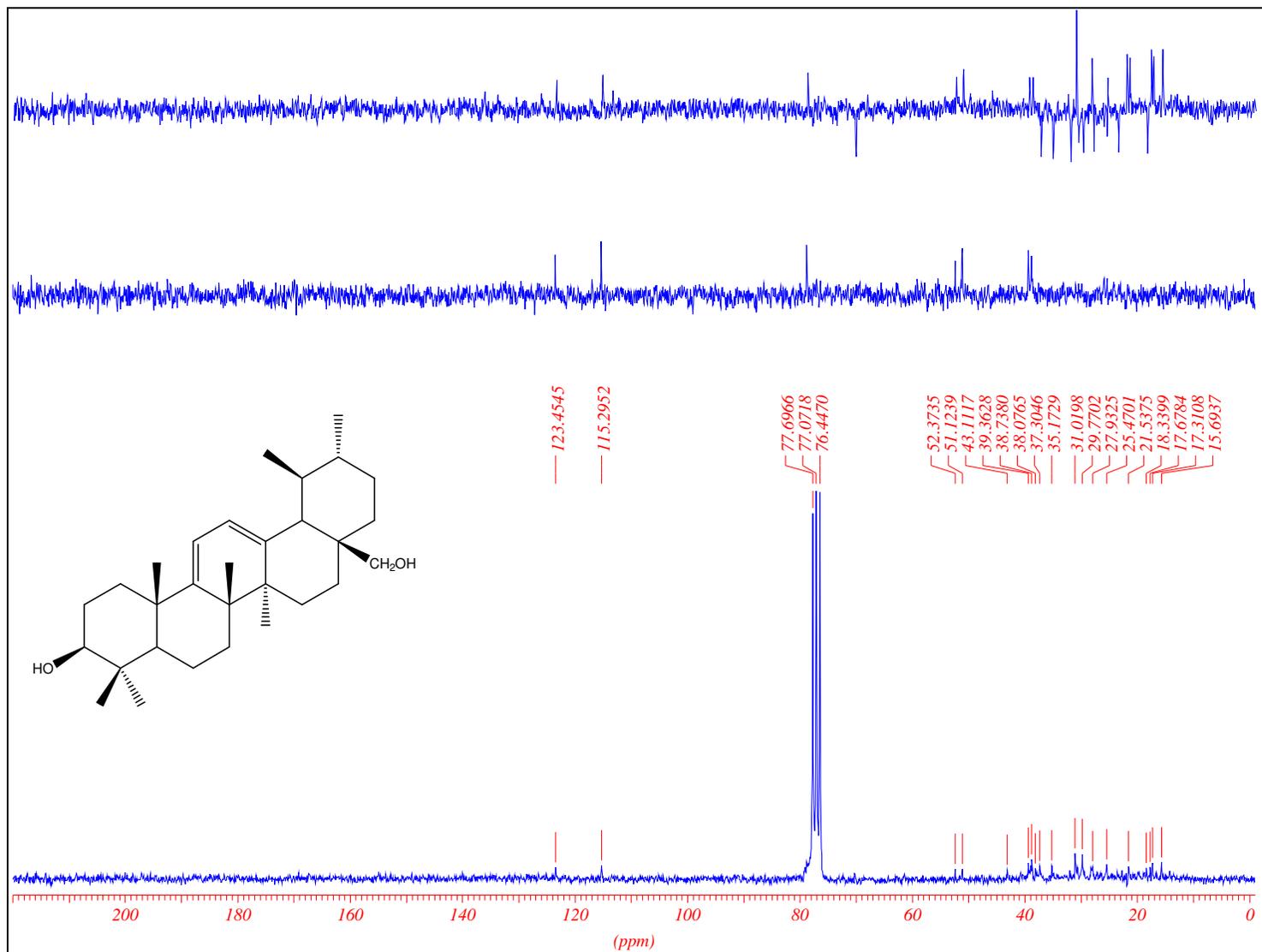


Figura 107a - Espectro de RMN de ¹³C de 94 (50 MHz, CDCl₃).

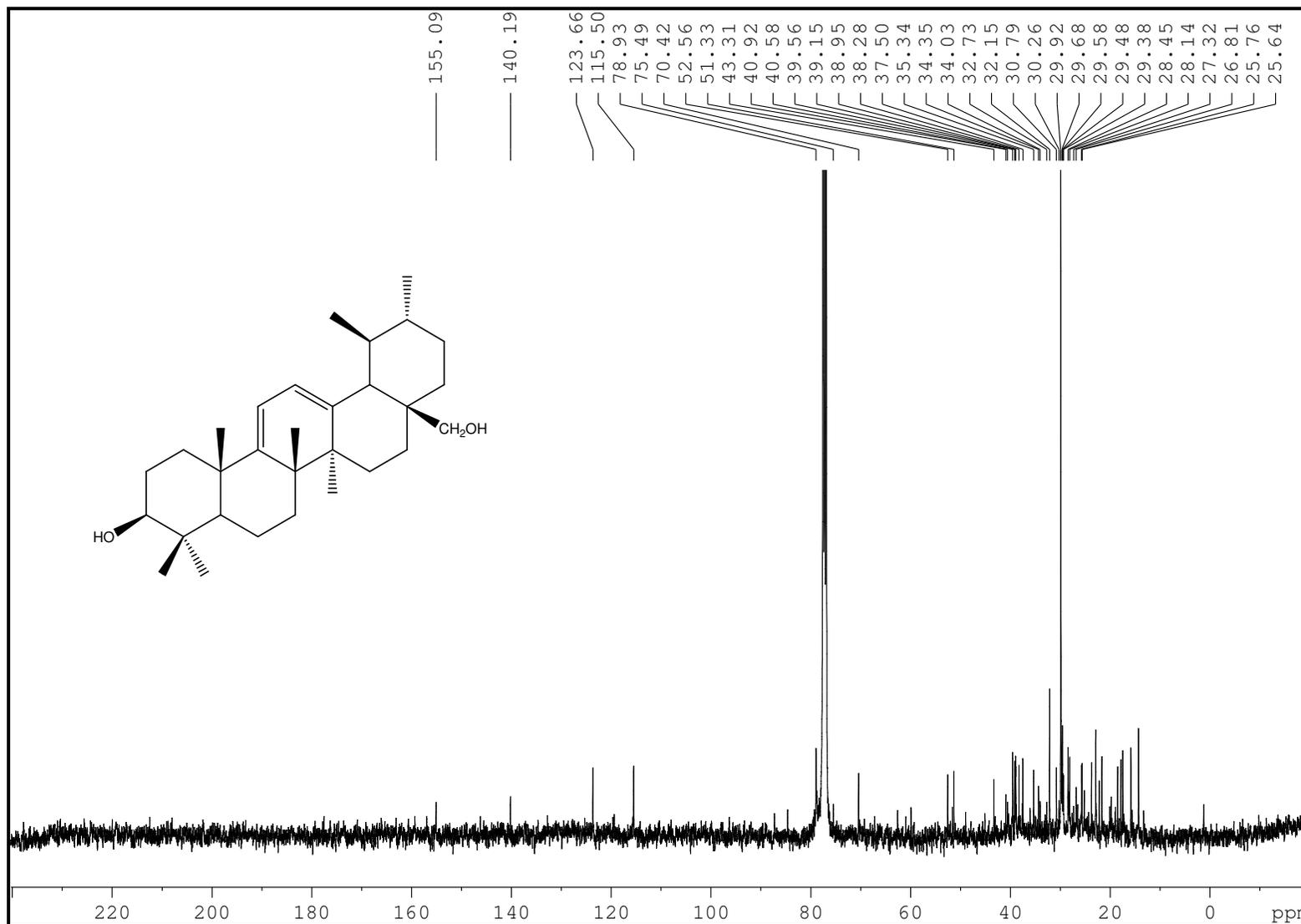


Figura 107b - Espectro de RMN de ¹³C de 94 (50 MHz, CDCl₃).

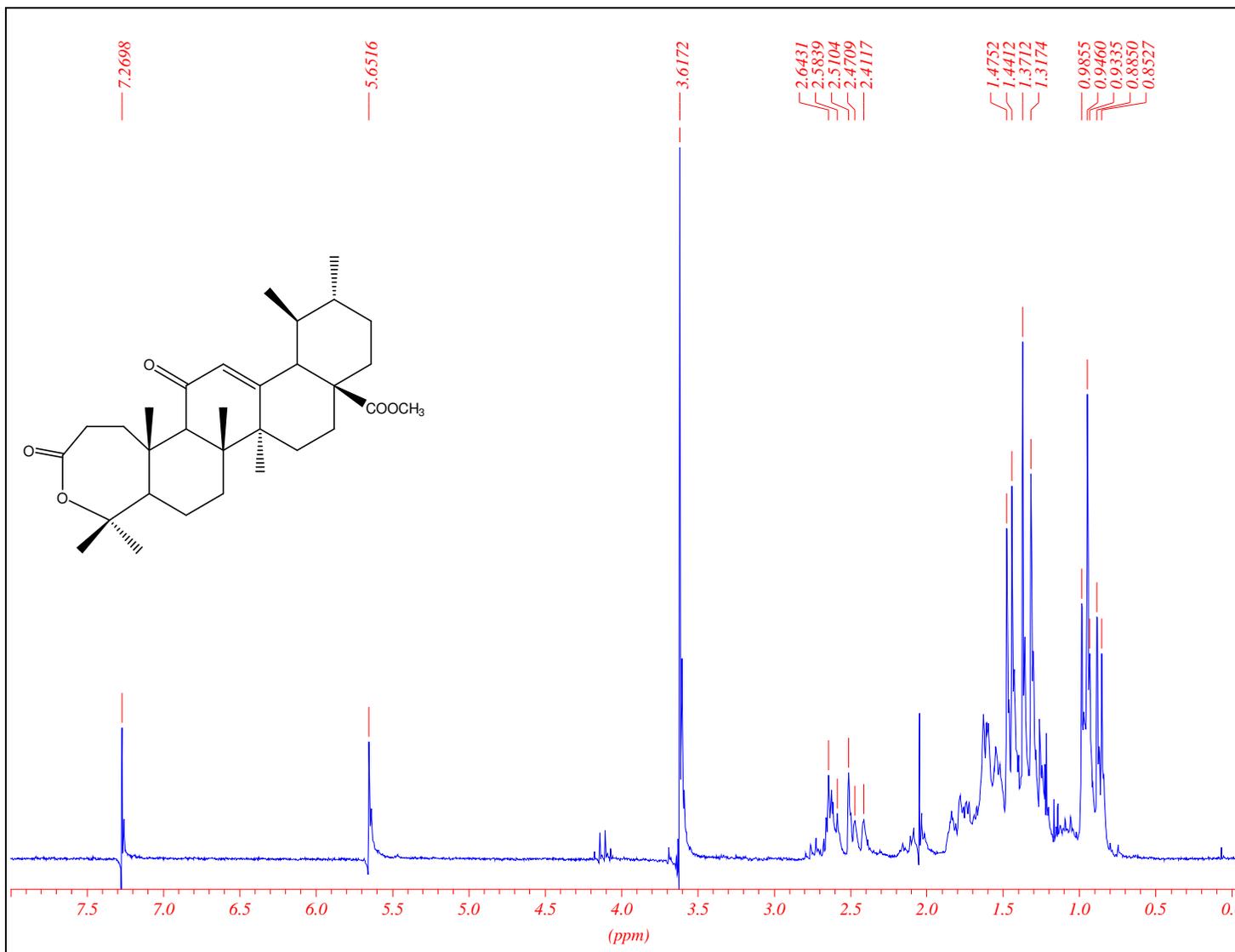


Figura 108 - Espectro de RMN de ¹H de 95 (200 MHz, CDCl₃).

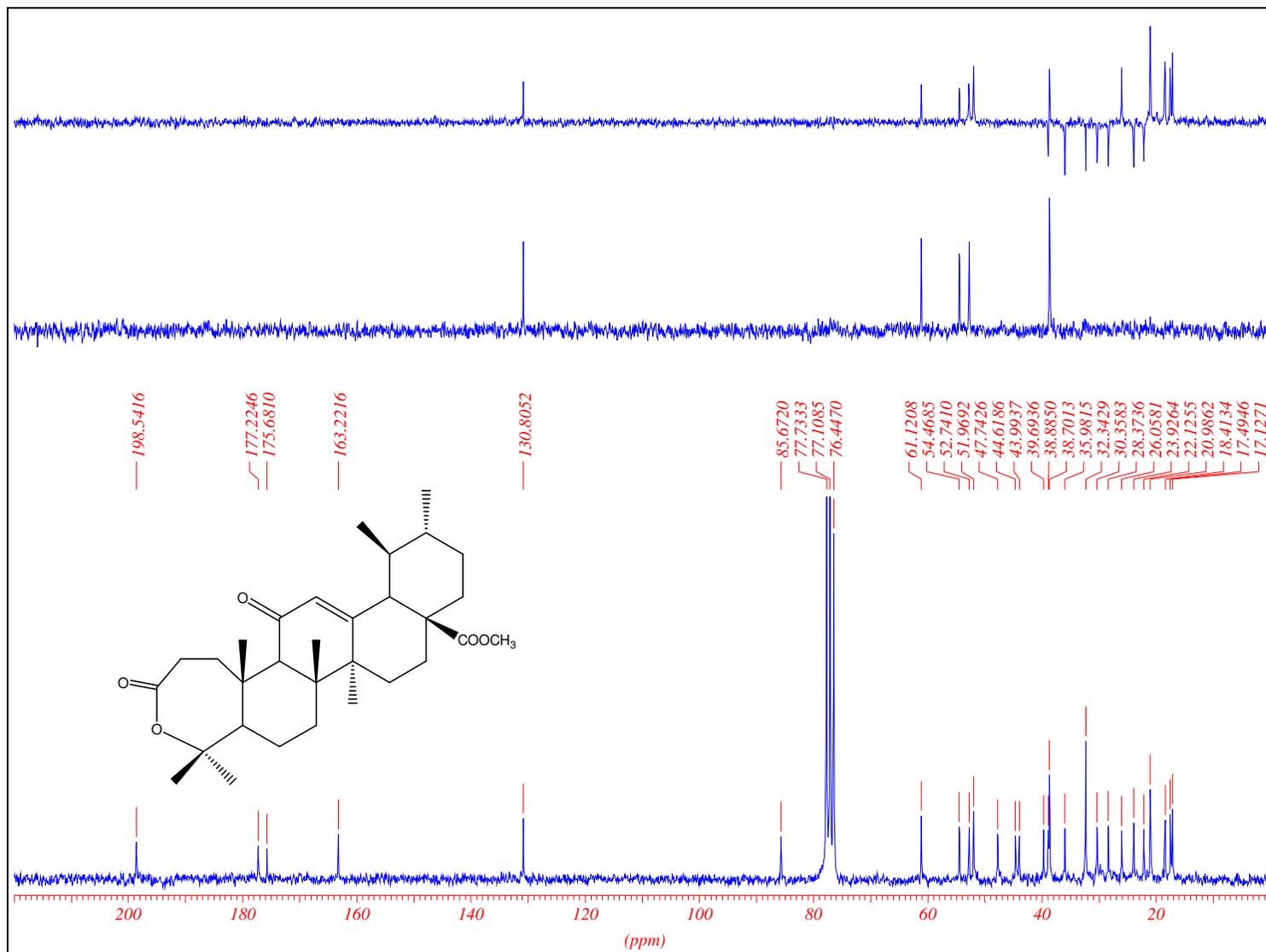


Figura 109 - Espectro de RMN de ^{13}C de 95 (50 MHz, CDCl_3).

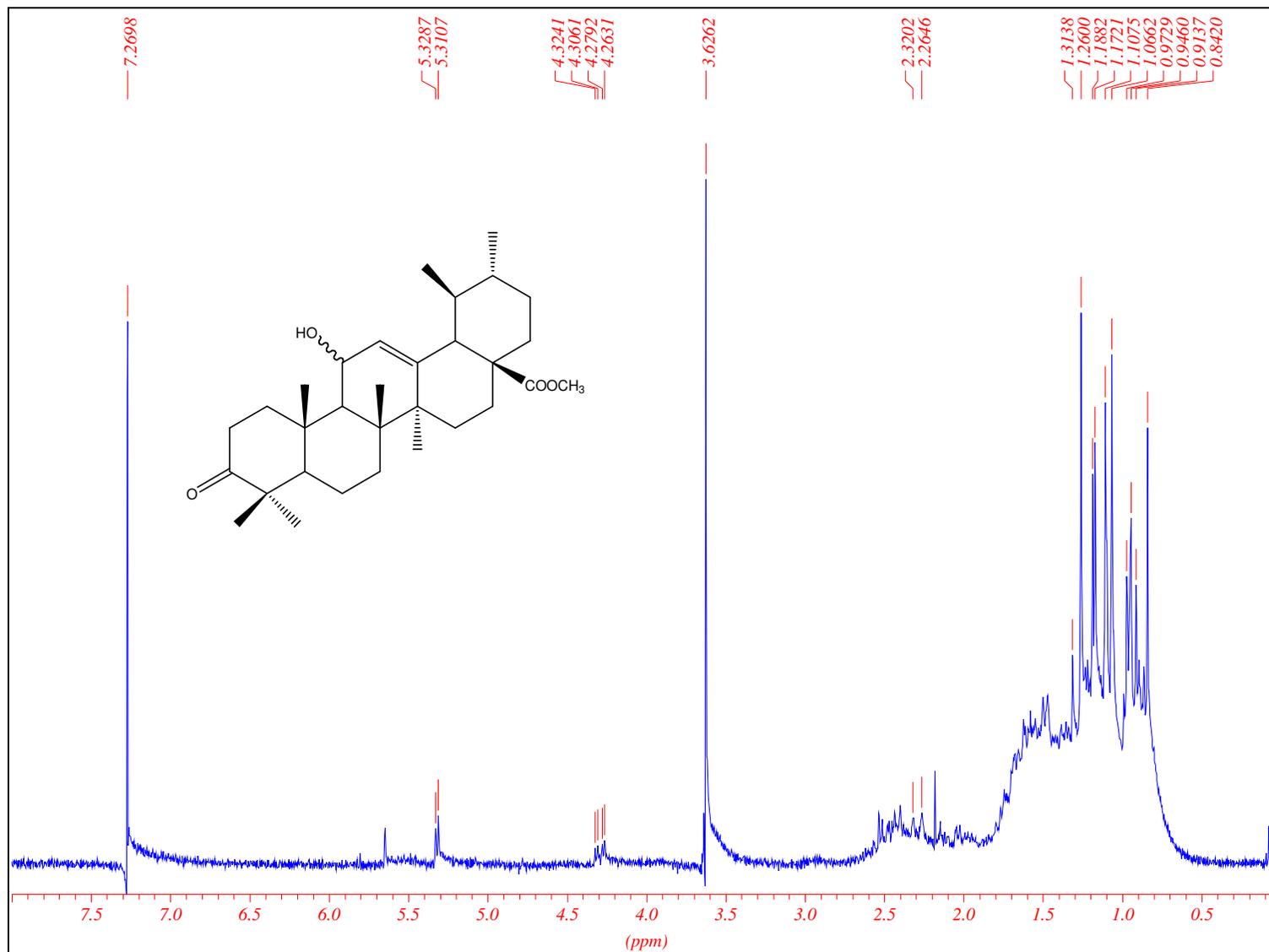


Figura 110 - Espectro de RMN de ^1H de 96 (200 MHz, CDCl_3).

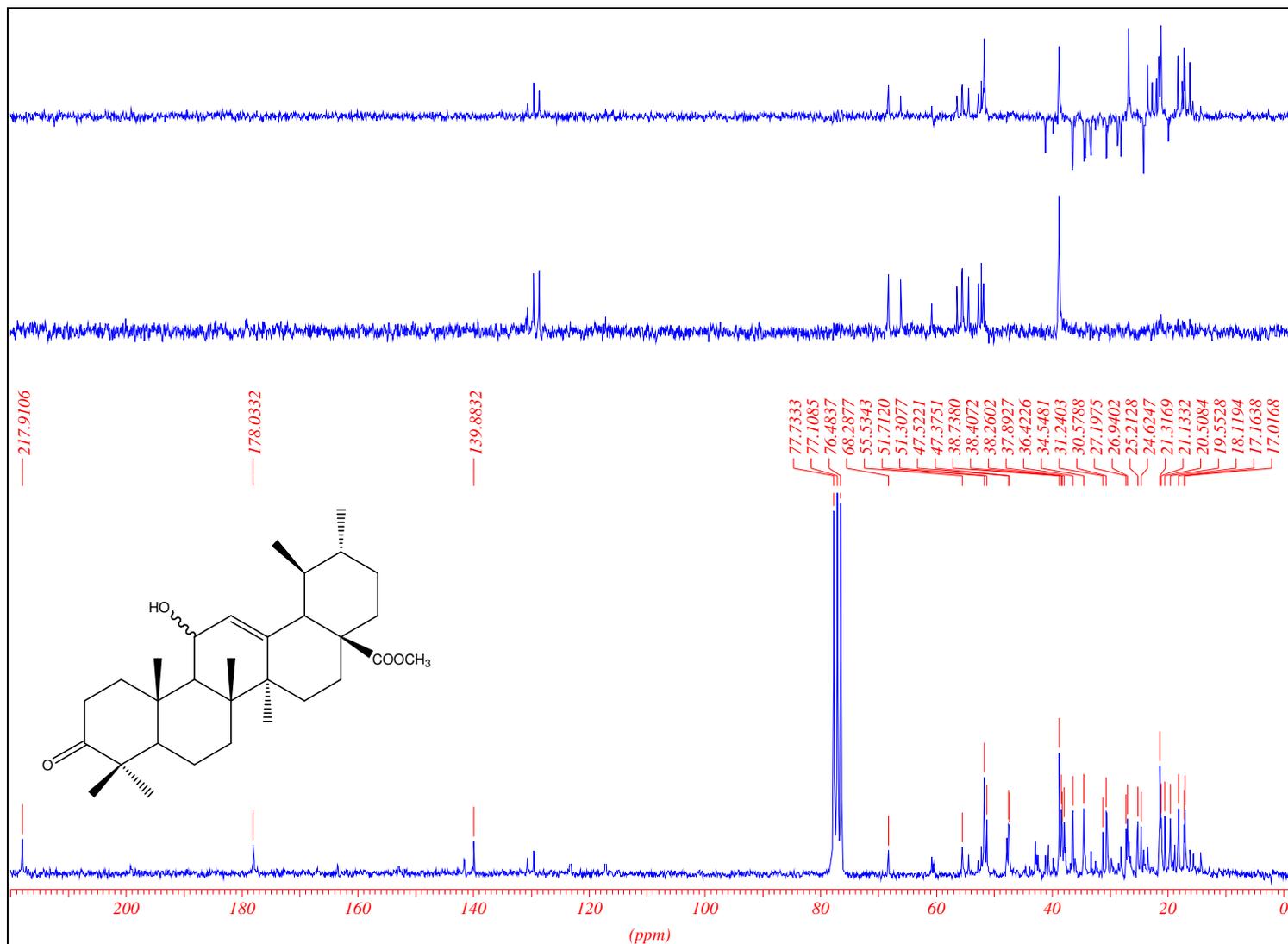


Figura 111 - Espectro de RMN de ¹³C de 96 (50 MHz, CDCl₃).

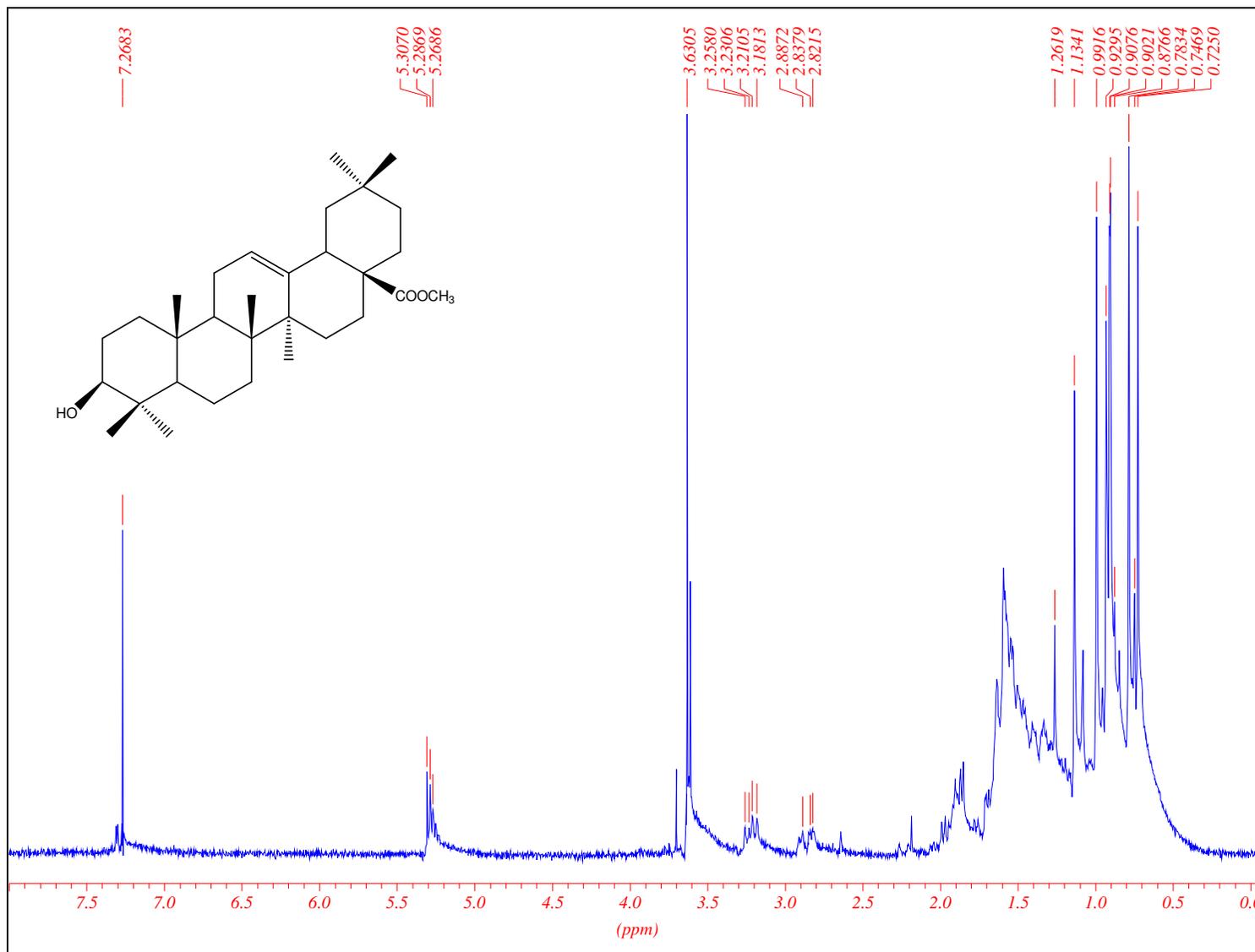


Figura 112 - Espectro de RMN de ¹H de 97 (200 MHz, CDCl₃).

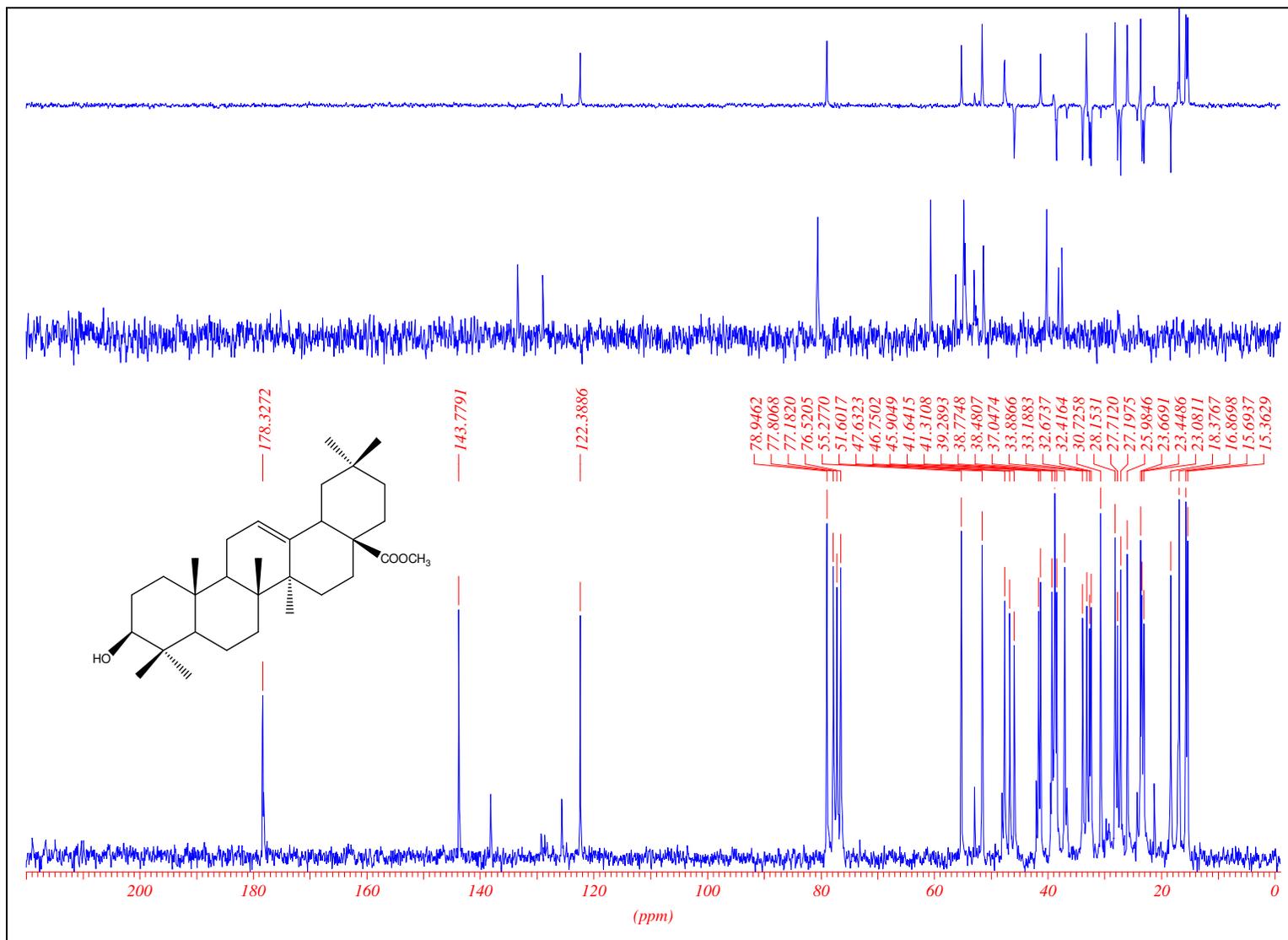


Figura 113 - Espectro de RMN de ¹³C de 97 (50 MHz, CDCl₃).

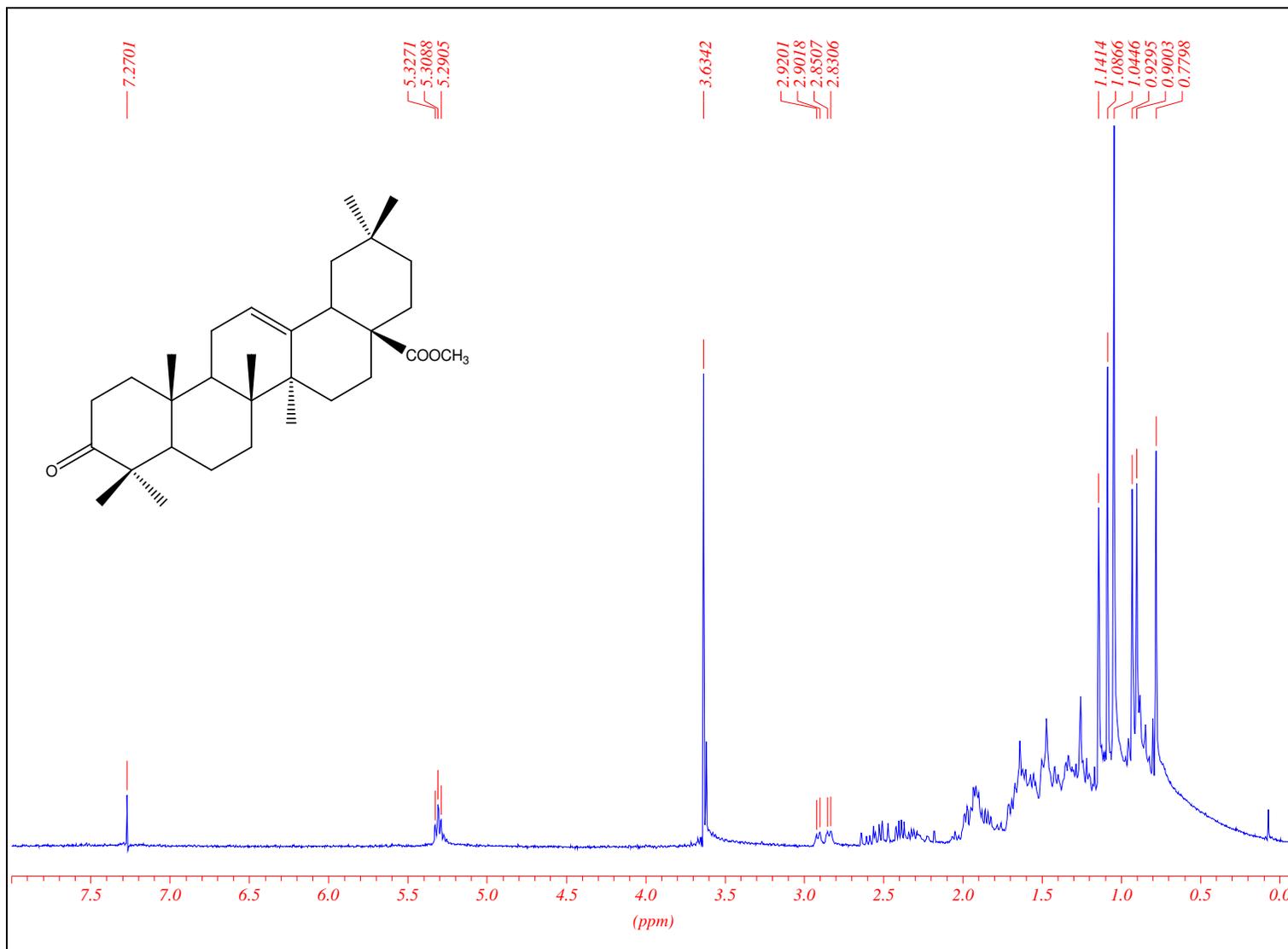


Figura 114 - Espectro de RMN de ^1H de 98 (200 MHz, CDCl_3).

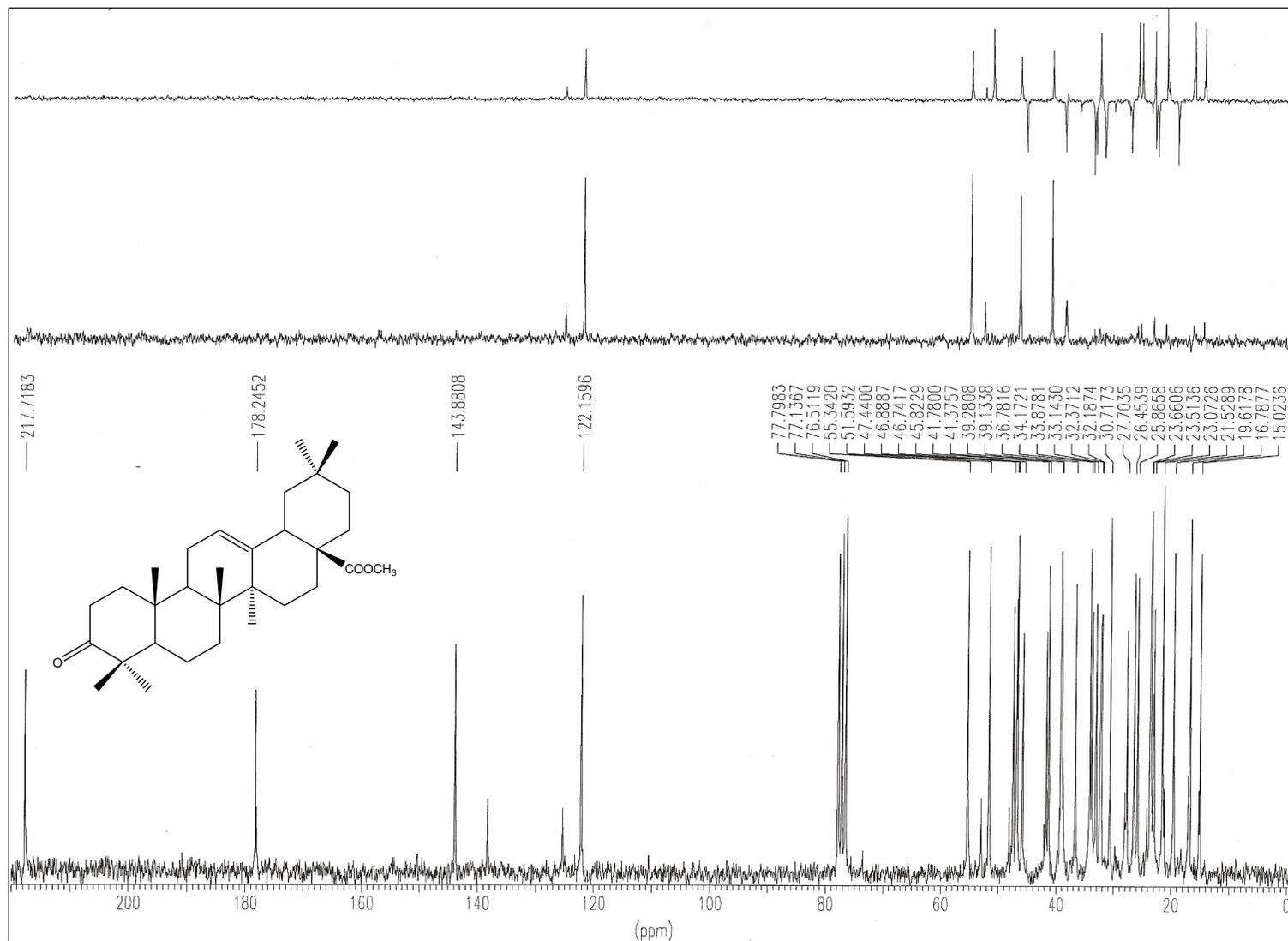


Figura 115 - Espectro de RMN de ¹³C de 98 (50 MHz, CDCl₃).

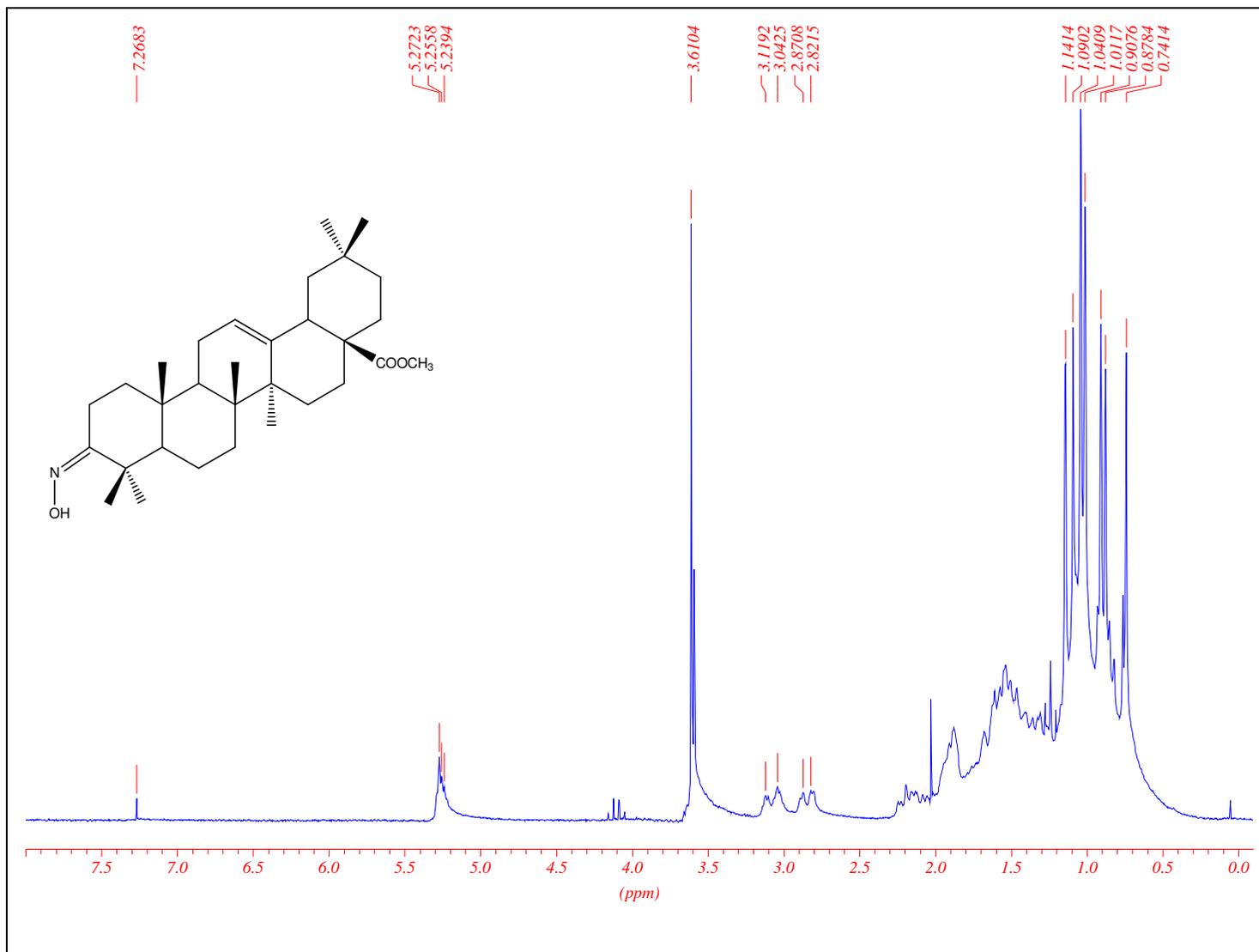


Figura 116 - Espectro de RMN de ^1H de 99 (200 MHz, CDCl_3).

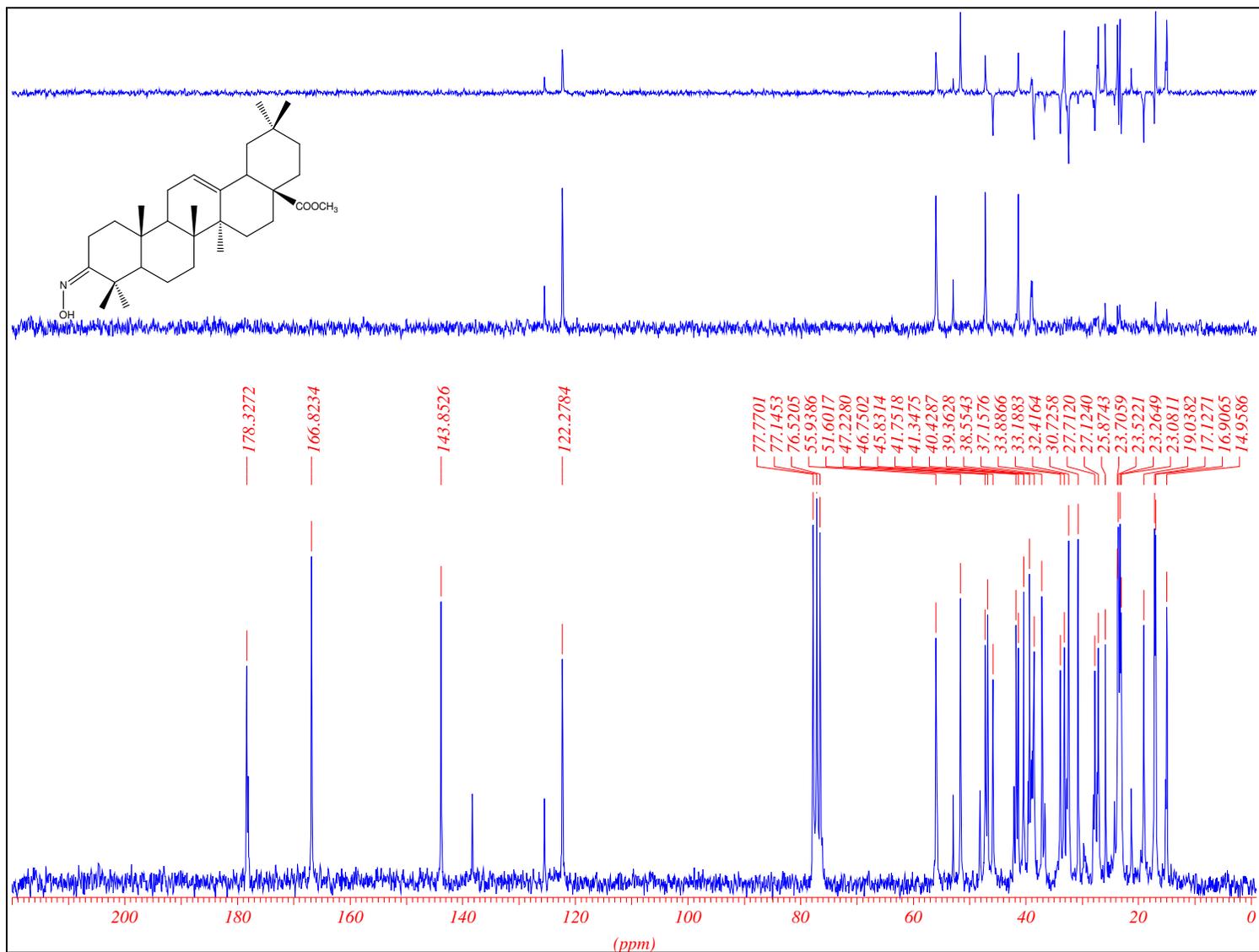


Figura 117 - Espectro de RMN de ¹³C de 99 (50 MHz, CDCl₃).

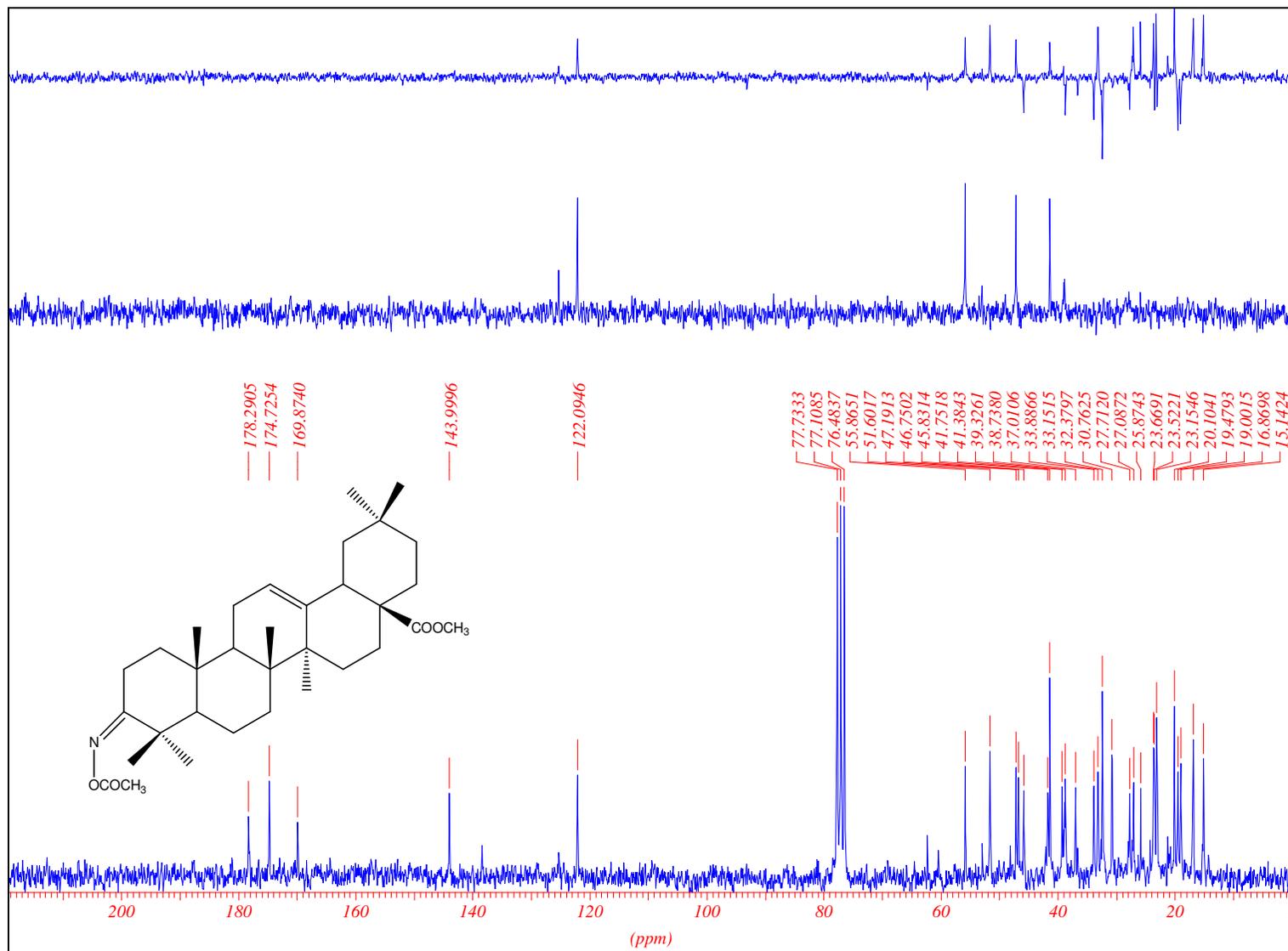


Figura 119 - Espectro de RMN de ^{13}C de 100 (50 MHz, CDCl_3).

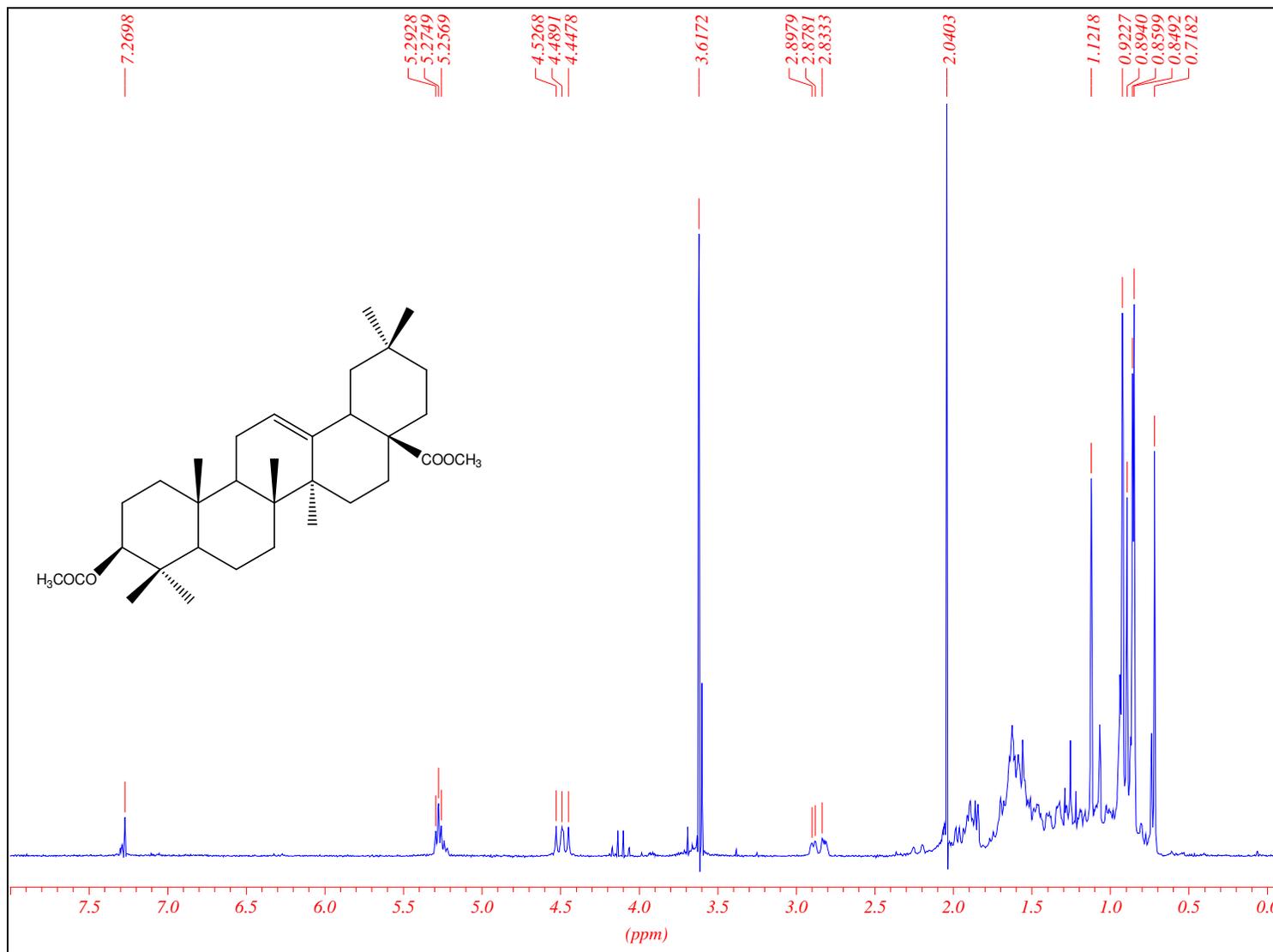


Figura 120 - Espectro de RMN de ^1H de 101 (200 MHz, CDCl_3).

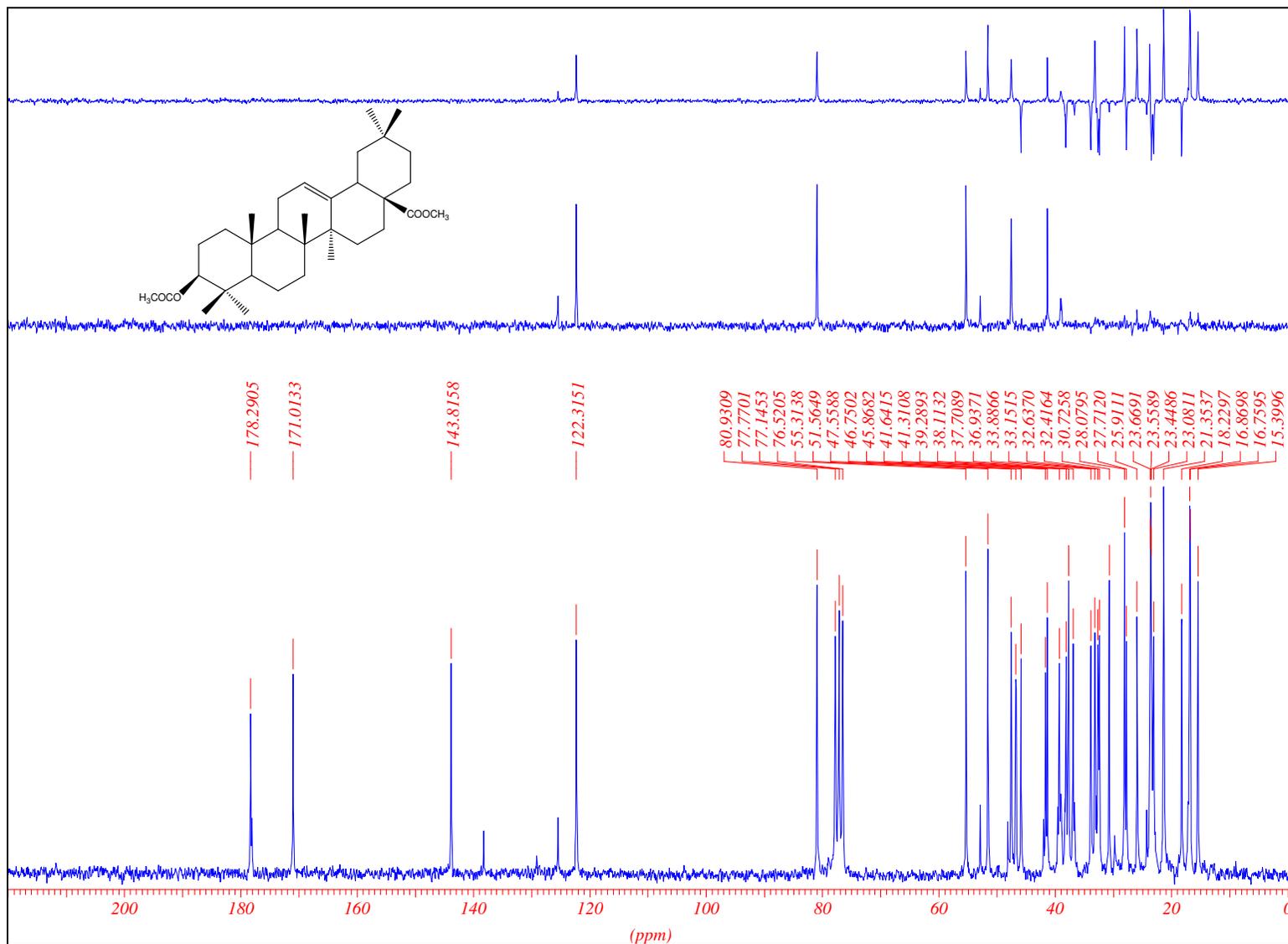


Figura 121 - Espectro de RMN de ¹³C de 101 (50 MHz, CDCl₃).