

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS  
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA**

**Rafael Cesar Gonçalves Pereira**

**Estudo químico e biológico dos extratos hexânico e clorofórmico de folhas de *Cheiloclinium cognatum* (Miers) A.C.Sm. (Celastraceae) e avaliação do perfil de fragmentação de seus triterpenos friedelânicos por APCI-IT-TOF**

**Belo Horizonte**

**2016**

UFMG-ICEx/DQ. 1142<sup>a</sup>

D. 630<sup>a</sup>

**RAFAEL CESAR GONÇALVES PEREIRA**

**ESTUDO QUÍMICO E BIOLÓGICO DOS EXTRATOS  
HEXÂNICO E CLOROFÓRMICO DE FOLHAS DE  
*Cheiloclinium cognatum* (Miers) A.C.SM.  
(CELASTRACEAE) E AVALIAÇÃO DO PERFIL DE  
FRAGMENTAÇÃO DE SEUS TRITERPENOS  
FRIEDELÂNICOS POR APCI-IT-TOF**

Dissertação apresentada ao Departamento de Química do Instituto de Ciências Exatas da Universidade Federal de Minas Gerais, como parte dos requisitos necessários para a obtenção do grau de Mestre em Química – Química Orgânica.

**Belo Horizonte**

**2016**

P426e  
2016  
D

Pereira, Rafael Cesar Gonçalves  
Estudo químico e biológico dos extratos hexânico e clorofórmico de folhas de *Cheiloclinium cognatum*(Miers) A.C.SM.(Celastraceae) e avaliação do perfil de fragmentação de seus triterpenos friedelânicos por APCI-IT-TOF [manuscrito] / Rafael César Gonçalves Pereira. 2016.  
xi, 95 f. : il.

Orientadora: Lucenir Pains Duarte.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Minas Gerais. Departamento de Química.  
Inclui bibliografia.

1. Química orgânica - Teses 2.Celastraceae- Teses  
3. Produtos naturais - Teses. 4. Terpenios-Tese 5.  
Espectrometria de massa-Teses I.Duarte, Lucenir Pains  
Orientador II. Título.

CDU 043



**"Estudo Químico e Biológico dos Extratos Hexânico e Clorofórmico de Folhas de Cheilochinium cognatum (Miers) A.C.Sm. (Celastraceae) e Avaliação do Perfil de Fragmentação de seus Triterpenos Friedelânicos por APCI-IT-TOF"**

**Rafael Cesar Gonçalves Pereira**

Dissertação aprovada pela banca examinadora constituída pelos Professores:

Profa. Lucienir Pains Duarte - Orientadora  
UFMG

Profa. Rossimiriam Pereira de Freitas  
UFMG

Profa. Adriana Akemi Okuma  
CEFET-MG

Belo Horizonte, 26 de fevereiro de 2016.



O trabalho descrito nesta dissertação foi realizado sob orientação da Professora Doutora Lucienir Pains Duarte e coorientação do Professor Doutor Sidney Augusto Vieira Filho.

“You fail to recognize that it matters not what someone is born, but what they grow to be.”

**J. K. Rowling, Harry Potter and the Goblet of Fire.**

Dedico este trabalho às pessoas que conviveram comigo durante meus momentos de estresse e ainda assim continuaram a me amar. Minha mãe Vânia Gonçalves Ribeiro, minha irmã e madrinha Ludmila Gonçalves Pereira Duque e meu amor Vanderson Ribeiro Gonçalves.

## AGRADECIMENTOS

### AGRADECIMENTOS

Esta dissertação é o desfecho de um longo período de dois anos de trabalho duro e dedicação constante. Agradeço a todos que contribuíram para o meu desenvolvimento intelectual, profissional e afetivo, tornando possível minha chegada até aqui.

Agradeço à minha mãe Vânia, à minha Irmã Ludmila, ao meu irmão Igor e ao meu pai Paulo, que apesar de insistirem em dizer que eu deveria ter sido médico, sempre me apoiaram em todas as minhas decisões.

Agradeço ao meu companheiro, parceiro, futuro cônjuge e consultor pessoal de assuntos financeiros, Vanderson, pelo amor. Sem ele creio que o estresse já teria me consumido.

Agradeço ao meu querido grupo de amigos “Perdido na UFMG”, Cássia (mais conhecida como Gabi), Fabiano (Fabs), e Paula (Poletchy), que também se graduaram na UFV e também ficaram perdidos ao chegarem à UFMG.

Agradeço aos meus amigos do Departamento de Química, pelo carinho e amizade. Às baianas mais mineiras que já conheci, Samara e Ana, aos fiéis companheiros de comida Bruna, Clináscia, Taniris, Léo, Yuri, e meu querido amigo e vizinho Breno Germano, que me forneceu transporte diariamente para a UFMG. À Aura e ao Breno Barbosa, por formarem o melhor grupo de aulas práticas de RMN. À Aretha, minha eterna companheira de café, que abriu minha mente para a espectrometria de massas. Ao Bruno (Babs), pela cumplicidade, carinho, conselhos, e por todos os momentos divertidos (e foram muitos) dentro e fora do DQ.

Agradeço às professoras Rose(meire) e Rossi(míriam), que compartilham sala, compartilharam a disciplina de Orgânica Avançada I, quase compartilham o nome e compartilham de minha admiração. São exemplos de dedicação e de preocupação com o aprendizado de seus alunos. Professores assim são raros.

Agradeço à Dra. Ivana, pelo apoio e ensinamentos na área de ressonância magnética. Melhor companheira para um bom espumante.

Agradeço aos funcionários do DQ, em especial à Marcinha, que ajudam a manter a infraestrutura do departamento funcionando bem e também pela alegria contagiante e pelo carinho que sempre tiveram para comigo. Às meninas da

## AGRADECIMENTOS

limpeza, em especial à Fany, que tornam nosso ambiente de trabalho bem mais limpo e organizado.

Agradeço ao pessoal da secretaria da pós-graduação, sempre eficientes e prontos para acalmar os mais desesperados (eu). Em especial, à Alessandra Dinotte, que carinhosamente adotou a todos nós, alunos de pós, como filhos.

Agradeço aos colaboradores deste trabalho, professora Viviane Gouveia e sua equipe do LBCM, professor Daniel Crístian e ao pós-doutorando Diogo Coelho, pela realização dos testes biológicos, e à professora Maria Olívia Simões, que nos forneceu o material vegetal utilizado neste trabalho.

Agradeço à família NEPLAM, que tornaram meus dias de laboratório menos laboriosos e mais divertidos. Em especial ao Fernando, que me ajudou a montar minha primeira coluna do mestrado, à Vanessa, que me permitiu ser quem eu era desde o primeiro momento, à Josana, guerreira e conselheira de relacionamentos à distância, à Mariana, sem dúvida a pessoa mais eficiente com colunas que já conheci, à Débora, sem ela não aprenderia a usar o MestreNova®, à Aline, pelo carinho com que obteve quase todos os espectros no IV, à Larissa, minha companheira de bancada por um mês, mas que me ajudou a isolar pelo menos seis compostos, ao Thiago, meu querido companheiro de bancada, e quem sabe futuro mestre em fitoquímica.

Agradeço muito, mas muito mesmo à Grasiely, minha irmã no NEPLAM. Meu trabalho não teria seguido em frente, tão eficientemente, se não fosse por suas dicas e conselhos. Ela me ensinou muito mais que experimentos de bancada. Foi uma amiga, companheira de almoço, companheira de estudos, colega de sala dentro e fora da UFMG e é uma das pessoas mais doces que conheci.

Agradeço ao meu coorientador, o professor Bibó (Sidney Vieira), ao qual tive a audácia de inverter o nome pelo apelido. É um exemplo de pessoa com conhecimento interdisciplinar, sempre com sugestões precisas, porém mantendo a humildade acima de tudo. Não conheço ninguém com gosto musical mais refinado que o dele.

Dedico este parágrafo final para agradecer à pessoa que acreditou no meu potencial para química. Agradeço à minha mãe acadêmica, chefe do NEPLAM, diva da fitoquímica e, também, orientadora professora Lucienir. Parafraseando a Vanessa, não há quem não te conheça que não queria sempre estar ao seu lado. E assim pretendo. Muito obrigado por tornar essa dissertação uma realidade.

SUMÁRIO

<b>ÍNDICE DE FIGURAS.....</b>	<b>i</b>
<b>ÍNDICE DE TABELAS.....</b>	<b>iii</b>
<b>LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS.....</b>	<b>v</b>
<b>LISTA DE CONSTITUINTES ISOLADOS DE <i>C. cognatum</i> .....</b>	<b>viii</b>
<b>RESUMO.....</b>	<b>x</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>xi</b>
<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>1</b>
<b>Biossíntese de triterpenos pentacíclicos.....</b>	<b>1</b>
Biossíntese dos precursores IPP e DMAPP .....	1
Biossíntese do esqualeno e oxidoesqualeno.....	4
Oxidoesqualeno ciclases e a diversidade estrutural de triterpenos pentacíclicos.....	5
Citocromo P450: modificações pós-biossintéticas em triterpenos pentacíclicos.....	10
<b>Família Celastraceae .....</b>	<b>12</b>
<b>A espécie <i>Cheiloclinium cognatum</i> (Miers) A.C.Sm. ....</b>	<b>12</b>
<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>14</b>
<b>Objetivo do trabalho.....</b>	<b>14</b>
<b>CAPÍTULO 1: ESTUDO QUÍMICO DOS EXTRATOS.....</b>	<b>15</b>
<b>1 – Parte experimental.....</b>	<b>15</b>
1.1 – Métodos gerais .....	15
1.2 – Coleta e identificação do material vegetal .....	16
1.3 – Preparação dos extratos das folhas de <i>Cheiloclinium cognatum</i> .....	16
1.4 – Elaboração do extrato EH.....	17

## SUMÁRIO

1.5 – Elaboração do extrato EC.....	23
1.5.1 – Elaboração da fração FHEC.....	24
1.5.2 – Elaboração da fração FCEC.....	24
1.5.3 Elaboração da fração FAEC.....	26
1.5.4 Elaboração da fração FMEC.....	28
<b>2 – Determinação estrutural .....</b>	<b>29</b>
2.1 – Compostos graxos.....	29
2.1.1 – <b>S1</b> : Mistura de hidrocarbonetos.....	29
2.1.2 – <b>S6</b> : Mistura de álcoois graxos.....	30
2.1.3 – <b>S13</b> : Mistura de ácidos graxos.....	31
2.2 – Isoprenoides acíclicos.....	32
2.2.1 – <b>S2</b> : Esqualeno .....	32
2.2.2 – <b>S14</b> : Gutta-percha .....	33
2.3 – Esteróide.....	34
2.3.1 – <b>S7</b> : $\beta$ -Sitosterol .....	34
2.4 – Triterpenos pentacíclicos – ursano .....	36
2.4.1 – <b>S3</b> : $3\beta$ -Acil-urs-12-eno.....	36
2.5 – Triterpenos pentacíclicos – 3-oxo-friedelanos.....	38
2.5.1 – <b>S4</b> : 3-Oxo-friedelano (friedelina).....	39
2.5.2 – <b>S8</b> : 3-Oxo-28-hidroxifriedelano .....	41
2.5.3 – <b>S9</b> : 3-Oxo-21 $\alpha$ -hidroxifriedelano .....	43
2.5.4 – <b>S10</b> : Ácido 3,4-seco-friedelan-3-oico.....	45
2.5.5 – <b>S11</b> : 3-Oxo-29-hidroxifriedelano .....	47
2.6 – Triterpenos pentacíclicos - $3\beta$ -hidroxifriedelanos.....	48
2.6.1 – <b>S5</b> : $3\beta$ -Hidroxifriedelano (friedelinol).....	49
2.6.2 – <b>S12</b> : $3\beta,29$ -Di-hidroxifriedelano .....	51
2.6.3 – <b>S15</b> : $3\beta,28,29$ -Tri-hidroxifriedelano.....	53

## SUMÁRIO

2.6.4 – S16: 1-Oxo-3 $\beta$ ,29-di-hidroxifriedelano .....	58
<b>3 – Considerações finais relativas à determinação estrutural.....</b>	<b>62</b>
<b>CAPÍTULO 2: ESTUDO DOS PERFIS DE FRAGMENTAÇÃO DE TRITERPENOS FRIEDELÂNICOS POR APCI-IT-TOF .....</b>	<b>63</b>
<b>1 – Introdução .....</b>	<b>63</b>
1.1 – Surgimento das técnicas de ionização à pressão atmosférica .....	63
1.2 – Análise por espectrometria de massas sequencial .....	65
<b>2 – Parte experimental.....</b>	<b>68</b>
<b>3 – Resultados e discussão .....</b>	<b>69</b>
<b>4 – Considerações finais relativas à fragmentação de triterpenos pentacíclicos .....</b>	<b>73</b>
<b>CAPÍTULO 3: ESTUDO DA ATIVIDADE BIOLÓGICA .....</b>	<b>74</b>
<b>1 – Ensaio de angiogênese utilizando membrana corioalantoica de embrião de galinha .....</b>	<b>74</b>
1.1 – Método HET-CAM para testes de angiogênese.....	74
1.2 – Parte experimental.....	75
1.2.1 – Preparo das amostras .....	75
1.2.2 – Ensaio HET-CAM .....	75
1.2.3 – Análise quantitativa da angiogênese .....	76
1.3 – Resultados e discussão .....	77
<b>2 – Ensaio de toxicidade em <i>Caenorhabditis elegans</i> .....</b>	<b>80</b>
2.1 – <i>C. elegans</i> como modelo <i>in vivo</i> em ensaios de toxicidade.....	80
2.2 – Parte experimental.....	82
2.2.1 – Preparo de amostras .....	82
2.2.2 – Ensaio de toxicidade aguda.....	82
2.3 – Resultados e discussão .....	83
<b>3 – Considerações finais relativas aos testes de atividade biológica...</b>	<b>85</b>

## SUMÁRIO

<b>CONCLUSÃO .....</b>	<b>86</b>
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>88</b>
<b>APÊNDICE .....</b>	<b>96</b>
<b>A. Espectro e cromatogramas de S1 .....</b>	<b>96</b>
<b>B. Espectros de S6 .....</b>	<b>97</b>
<b>C. Espectros de S13 .....</b>	<b>99</b>
<b>D. Espectros de S2 .....</b>	<b>101</b>
<b>E. Espectros de S14 .....</b>	<b>103</b>
<b>F. Espectros de S7.....</b>	<b>104</b>
<b>G. Espectros de S3.....</b>	<b>105</b>
<b>H. Espectros de S4 .....</b>	<b>107</b>
<b>I. Espectros de S8.....</b>	<b>109</b>
<b>J. Espectros de S9.....</b>	<b>110</b>
<b>K. Espectros de S10 .....</b>	<b>114</b>
<b>L. Espectros de S11.....</b>	<b>116</b>
<b>M. Espectros de S5.....</b>	<b>118</b>
<b>N. Espectros de S12 .....</b>	<b>120</b>
<b>O. Espectros de S15 .....</b>	<b>122</b>
<b>P. Espectros de S16 .....</b>	<b>125</b>
<b>Q. Espectros de APCI-MS e APCI-MS/MS de triterpenos     friedelânicos.....</b>	<b>129</b>
<b>R. Resultado do teste de comparações múltiplas de Bonferroni para     o ensaio HET-CAM.....</b>	<b>136</b>
<b>ANEXO.....</b>	<b>137</b>
<b>A. Adutos de sesquiterpenos-triterpenos: <i>cheiloclina</i>s A-I .....</b>	<b>137</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 – Via do mevalonato.....	2
Figura 2 – Formação do DXP .....	2
Figura 3 – Mecanismos propostos para a síntese do 2-C-metileritrol-4-fosfato .....	3
Figura 4 – Formação do 2-C-metileritrol-2,4-ciclodifosfato.....	3
Figura 5 – Etapas finais da síntese do IPP e DMAPP .....	4
Figura 6 – Biossíntese do esqualeno e do oxidoesqualeno .....	5
Figura 7 – Formação dos intermediários da síntese de esteroides e de triterpenos pentacíclicos.....	7
Figura 8 – Formação do cátion 17 $\beta$ -damarenila.....	8
Figura 9 – Formação do cátion lupenila .....	8
Figura 10 – Formação do lupeol e da $\alpha$ -amirina.....	9
Figura 11 – Formação da $\beta$ -amirina e da friedelina.....	10
Figura 12 – Modificações estruturais promovidas por CYPs.....	11
Figura 13 – Triterpenos quinonametídeos inéditos isolados a partir de raízes de <i>C. cognatum</i> .....	13
Figura 14 – Flores, folhas, galhos e frutos de <i>Cheiloclinium cognatum</i> .....	13
Figura 15 – Esquema utilizado para obtenção dos extratos de folhas de <i>C. cognatum</i> .....	17
Figura 16 – Esquema de fracionamento do extrato EH.....	22
Figura 17 – Montagem da <i>dry column vacuum chromatography</i> .....	23
Figura 18 – Esquema da filtração à pressão reduzida para EC .....	24
Figura 19 – Esquema de fracionamento de FCEC .....	26
Figura 20 – Esquema de fracionamento de FAEC .....	27

Figura 21 – Expansão do espectro de RMN de $^1\text{H}$ (0,75-1,15 ppm) para S15.....	53
Figura 22 – Expansão do espectro de RMN de $^1\text{H}$ (3,20-3,95 ppm) para S15.....	54
Figura 23 – Seções expandidas do mapa de contornos HMBC para S15.....	54
Figura 24 – Seção expandida do mapa de contornos NOESY para S15 .....	55
Figura 25 – Principais correlações observadas no mapa de contornos NOESY para S15 .....	56
Figura 26 – Espectro de APCI-MS (modo positivo) para S15 .....	56
Figura 27 – Expansões do espectro de RMN de $^1\text{H}$ (2,20-4,35ppm) para S16.....	58
Figura 28 – Seções expandidas do mapa de contornos HMBC para S16 ( $\delta$ 0,95-1,45 e $\delta$ 2,2-2,9) .....	59
Figura 29 – Principais correlações observadas no mapa de contornos NOESY para S16 .....	60
Figura 30 – Espectro de APCI-MS (modo positivo) para S16 .....	60
Figura 31 – Fonte APCI: esquema do mecanismo de ionização.....	64
Figura 32 – Esquema de funcionamento de um analisador QqQ.....	66
Figura 33 – Triterpenos friedelânicos analisados via APCI-MS.....	69
Figura 34 – Mecanismo proposto para perda de $\text{H}_2\text{O}$ em triterpenos pentacíclicos com carbonila na posição 3 .....	70
Figura 35 – Principais fragmentações observadas para S10 .....	71
Figura 36 – Incubadora automática utilizada nos ensaios HET-CAM .....	76
Figura 37 – Membrana corioalantoica após ensaio HET-CAM para os diferentes tratamentos .....	77
Figura 38 – Percentual de inibição da angiogênese.....	79
Figura 39 – <i>Caenorhabditis elegans</i> – hermafrodita adulto.....	80

## ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1. Frações obtidas e eluentes utilizados para coluna EH.....	18
Tabela 2. Resultados da análise de GC-FID para S1.....	30
Tabela 3. Atribuição e deslocamentos químicos dos sinais de RMN de $^{13}\text{C}$ para S6 ( $\text{CDCl}_3$ + Pyr-d5; 100 MHz) .....	31
Tabela 4. Picos observados no espectro de APCI-MS para S6 .....	31
Tabela 5. Atribuição e deslocamentos químicos dos sinais de RMN de $^{13}\text{C}$ para S13 ( $\text{CDCl}_3$ ; 100 MHz) .....	32
Tabela 6. Picos observados no espectro de APCI-MS para S13 .....	32
Tabela 7. Atribuição e deslocamentos químicos dos sinais de RMN de $^{13}\text{C}$ para S2 ( $\text{CDCl}_3$ ; 100 MHz) .....	33
Tabela 8. Atribuição e deslocamentos químicos dos sinais de RMN de $^{13}\text{C}$ para S14 ( $\text{CDCl}_3$ ; 100 MHz) .....	34
Tabela 9. Atribuição e deslocamentos químicos dos sinais de RMN de $^{13}\text{C}$ para S7 ( $\text{CDCl}_3$ ; 100 MHz) .....	35
Tabela 10. Atribuição e deslocamentos químicos dos sinais de RMN de $^{13}\text{C}$ para S3 ( $\text{CDCl}_3$ ; 50 MHz) .....	37
Tabela 11. Picos observados no espectro de APCI-MS para S3 .....	38
Tabela 12. Atribuição e deslocamentos químicos dos sinais de RMN de $^{13}\text{C}$ para S4 ( $\text{CDCl}_3$ + Pyr-d5; 100 MHz) .....	40
Tabela 13. Atribuição e deslocamentos químicos dos sinais de RMN de $^{13}\text{C}$ para S8 ( $\text{CDCl}_3$ ; 50 MHz) .....	42
Tabela 14. Atribuição e deslocamentos químicos dos sinais de RMN de $^1\text{H}$ e $^{13}\text{C}$ para S9 ( $\text{CDCl}_3$ ; 400 e 100 MHz) .....	44

Tabela 15. Atribuição e deslocamentos químicos dos sinais de RMN de $^{13}\text{C}$ para S10 ( $\text{CDCl}_3$ ; 100 MHz) .....	46
Tabela 16. Atribuição e deslocamentos químicos dos sinais de RMN de $^{13}\text{C}$ para S11 ( $\text{CDCl}_3$ ; 50 MHz) .....	48
Tabela 17. Atribuição e deslocamentos químicos dos sinais de RMN de $^{13}\text{C}$ para S5 ( $\text{CDCl}_3 + \text{Pyr-d}_5$ ; 50 MHz) .....	50
Tabela 18. Atribuição e deslocamentos químicos dos sinais de RMN de $^{13}\text{C}$ para S12 ( $\text{CDCl}_3$ ; 100 MHz) .....	52
Tabela 19. Atribuição e deslocamentos químicos dos sinais de RMN de $^1\text{H}$ e $^{13}\text{C}$ para S15 ( $\text{CDCl}_3$ ; 400 e 100 MHz) .....	57
Tabela 20. Atribuição e deslocamentos químicos dos sinais de RMN de $^1\text{H}$ e $^{13}\text{C}$ para S16 ( $\text{CDCl}_3$ ; 400 e 100 MHz) .....	61
Tabela 21. Resultados das análises dos espectros de APCI-MS.....	69
Tabela 22. Resultado das análises dos espectros de APCI-MS/MS .....	72
Tabela 23. Resultados do efeito sobre angiogênese obtidos através do ensaio HET-CAM.....	78
Tabela 24. Concentração das amostras para teste de toxicidade.....	82
Tabela 25. Resultados do teste de toxicidade aguda em <i>C. elegans</i> .....	83

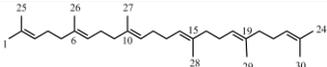
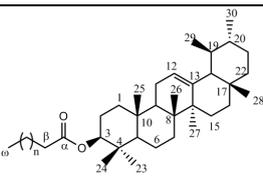
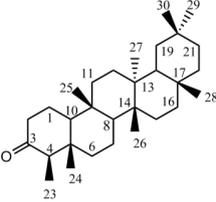
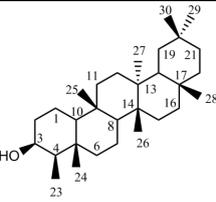
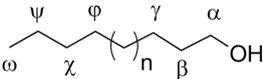
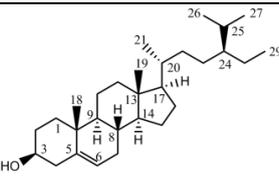
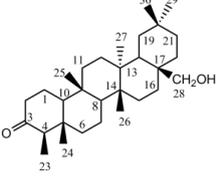
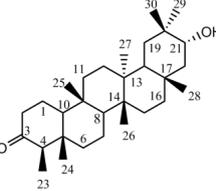
## LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

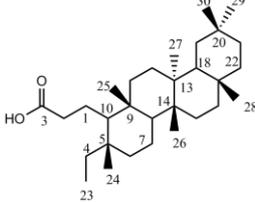
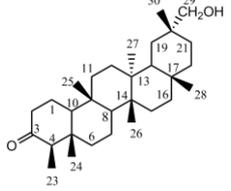
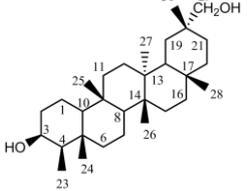
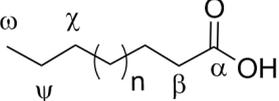
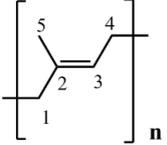
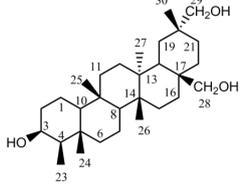
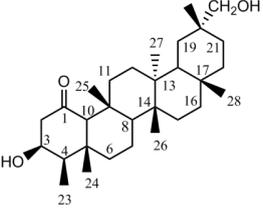
δ	Deslocamento químico
1D	Unidimensional
2D	Bidimensional
ADP	Disfosfato de adenosina, acrônimo em inglês para <i>adenosine diphosphate</i>
APCI	Ionização química à pressão atmosférica, acrônimo em inglês para <i>atmosphere pressure chemical ionization</i>
API	Ionização à pressão atmosférica, acrônimo em inglês para <i>atmosphere pressure ionization</i>
ATP	Trifosfato de adenosina, acrônimo em inglês para <i>adenosine triphosphate</i>
ATR	Refletância total atenuada, acrônimo em inglês para <i>attenuated total reflection</i>
CAM	Membrana corioalantoica, acrônimo em inglês para <i>chorioallantoic membrane</i>
CC	Cromatografia em coluna
CBC	Cadeira-barco-cadeira
CCC	Cadeira-cadeira-cadeira
CCD	Cromatografia em camada delgada de sílica
CDP	Difosfato de citidina, acrônimo em inglês para <i>cytidine diphosphate</i>
CID	Dissociação induzida por colisão, acrônimo em inglês para <i>collision-induced dissociation</i>
CMP	Monofosfato de citidina, acrônimo em inglês para <i>cytidine monophosphate</i>
COSY	Espectroscopia de correlação, acrônimo em inglês para <i>correlation spectroscopy</i>
CTP	Trifosfato de citidina, acrônimo em inglês para <i>cytidine triphosphate</i>
CYP	Citocromo P450
DEPT	Intensificação sem distorção por transferência de polarização, acrônimo em inglês para <i>Distortionless enhancement by polarization transfer</i>

DMAPP	Pirofosfato de dimetilalila, acrônimo em inglês para <i>dimethylallyl pyrophosphate</i>
DXP	1-Desoxi-D-xilulose-5-fosfato
ESI	Ionização por eletrospray, acrônimo em inglês para <i>electrospray ionization</i>
FPP	Pirofosfato de farnesila, acrônimo em inglês para <i>farnesyl pyrophosphate</i>
GC-FID	Cromatografia a gás com detector por ionização em chama, acrônimo em inglês para <i>gas chromatography with flame ionization detector</i>
GC-MS	Cromatografia a gás acoplada a espectrometria de massas, acrônimo em inglês para <i>gas chromatography-mass spectrometry</i>
GPP	Pirofosfato geranila, acrônimo em inglês para <i>geranyl pyrophosphate</i>
HET-CAM	Ensaio na membrana corioalantoica de ovo de galinha, acrônimo em inglês para <i>hen's egg test-chorioallantoic membrane assay</i>
Hex	Hexano
Hz	Hertz
HMBC	Espectroscopia de correlação heteronuclear a múltiplas ligações, acrônimo em inglês para <i>heteronuclear multiple-bond correlation HMBC</i>
HMG	3-Hidroxi-3-metilglutaril-CoA
HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência, acrônimo em inglês para <i>high performance liquid chromatography</i>
HSQC	Espectroscopia de correlação heteronuclear de quantum único, acrônimo em inglês para <i>heteronuclear single quantum correlation</i>
IPP	Pirofosfato isopentenila, acrônimo em inglês para <i>isopentenyl pyrophosphate</i>
IT	Analisador do tipo armadilha de íons, acrônimo em inglês para <i>ion trap</i>
<i>J</i>	Constante de acoplamento
LAREMAR	Laboratório de Ressonância Magnética Nuclear de Alta Resolução

LC	Cromatografia líquida/ cromatógrafo líquido, acrônimo em inglês para <i>liquid chromatography</i>
LC-MS	Cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas, acrônimo em inglês para <i>liquid chromatography-mass spectrometry</i>
LCMS-IT-TOF	Cromatógrafo líquido acoplado a espectrômetro de massas com analisadores do tipo armadilha de íons e tempo de voo, acrônimo em inglês para <i>liquid chromatograph-mass spectrometry-ion trap-time of flight</i>
MPLC	Cromatografia líquida de média pressão, acrônimo em inglês para <i>medium pressure liquid chromatography</i>
MS	Espectrometria de massas/espectro de massas
MS/MS ou MS <sup>2</sup>	Espectrometria de massas sequencial/ espectro de massas sequencial
MVA	Ácido mevalônico, acrônimo em inglês para <i>mevalonic acid</i>
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzido
NOE	Efeito nuclear <i>Overhauser</i> , acrônimo em inglês para <i>nuclear Overhauser effect</i>
NOESY	Espectroscopia do efeito nuclear <i>Overhauser</i> , acrônimo em inglês para <i>nuclear overhauser effect spectroscopy</i>
OSC	Oxidoesqualeno ciclase
Pg.	Página(s)
P	Fosfato
PP	Pirofosfato (ou difosfato)
QqQ	Analisador de massas do tipo triplo quadrupolo
R <sub>f</sub>	Fator de retenção, acrônimo em inglês para <i>retardation factor</i> ou <i>ratio to front</i>
RMN	Ressonância magnética nuclear
RMN de <sup>13</sup> C	Ressonância magnética nuclear de carbono-13
RMN de <sup>1</sup> H	Ressonância magnética nuclear de hidrogênio
SRM	Monitoramento de reação selecionada, acrônimo em inglês para <i>selected reaction monitoring</i>
TMS	Tetrametilsilano
TOF	Analisador de massas do tipo tempo de voo, acrônimo em inglês para <i>time of flight</i>

LISTA DE CONSTITUINTES ISOLADOS DE *C. cognatum*

Código	Nome	Estrutura Química	Página
S1	Mistura de hidrocarbonetos		29
S2	Esqualeno		32
S3	3 $\beta$ -Acil-urs-12-eno		36
S4	3-Oxo-friedelano (friedelina)		39
S5	3 $\beta$ -Hidroxifriedelano (friedelinol)		49
S6	Mistura de álcoois graxos		31
S7	$\beta$ -Sitosterol		34
S8	3-Oxo-28-hidroxifriedelano		41
S9	3-Oxo-21 $\alpha$ -hidroxifriedelano		43

<b>S10</b>	Ácido 3,4-seco-friedelan-3-oico		45
<b>S11</b>	3-Oxo-29-hidroxifriedelano		47
<b>S12</b>	3 $\beta$ ,29-Di-hidroxifriedelano		51
<b>S13</b>	Mistura de ácidos graxos		30
<b>S14</b>	<i>Gutta-percha</i>		33
<b>S15</b>	3 $\beta$ ,28,29-Tri-hidroxifriedelano		53
<b>S16</b>	1-Oxo-3 $\beta$ ,29-di-hidroxifriedelano		58

n = Número de grupos metilênicos na cadeia.

## RESUMO

O estudo fitoquímico dos extratos hexânico e clorofórmico das folhas de *Cheiloclinium cognatum* resultou no isolamento de dezesseis constituintes. Foram isoladas três substâncias de caráter graxo – mistura de hidrocarbonetos de cadeia longa, mistura de álcoois graxos e mistura de ácidos graxos –, dois isoprenoides acíclicos – esqualeno e *gutta-percha* –, um esteroide –  $\beta$ -sitosterol –, mistura de três triterpenos do tipo ursano esterificados com ácidos graxos –  $3\beta$ -palmitoil-urs-12-eno,  $3\beta$ -estearoil-urs-12-eno e  $3\beta$ -eicosanoil-urs-12-eno –, sete triterpenos friedelânicos conhecidos – 3-oxo-friedelano,  $3\beta$ -hidroxifriedelano, 3-oxo-28-hidroxifriedelano, 3-oxo-22 $\alpha$ -hidroxifriedelano, ácido 3,4-seco-friedelan-3-oico, 3-oxo-29-hidroxifriedelano,  $3\beta$ ,29-di-hidroxifriedelano –, e dois triterpenos friedelânicos inéditos na literatura –  $3\beta$ ,28,29-tri-hidroxifriedelano e 1-oxo- $3\beta$ ,29-di-hidroxifriedelano. Os nove triterpenos friedelânicos isolados foram submetidos a análises por MS e MS/MS via APCI-IT-TOF de forma a se obter informações relevantes para a identificação e caracterização rápida e eficiente destes compostos por espectrometria de massas. Foi observado que, independente da função oxigenada no esqueleto triterpênico, houve a perda de uma molécula de água no processo de fragmentação das substâncias. O estudo da atividade biológica consistiu na avaliação do potencial antiangiogênico *in vivo* dos triterpenos friedelânicos a partir do ensaio HET-CAM e do potencial nematicida a partir do ensaio toxicidade aguda utilizando larvas da espécie *Caenorhabditis elegans*. No primeiro ensaio, todas as amostras analisadas apresentaram porcentagem de inibição de crescimento de vasos sanguíneos superior a 50%, evidenciando o grande potencial dos triterpenos friedelânicos sobre atividade antiangiogênica. Para o ensaio de toxicidade, três triterpenos apresentaram taxa de mortalidade superior a 90%, com destaque para o composto 3-oxo-28-hidroxifriedelano que promoveu a morte de 100% das larvas na concentração de 10  $\mu\text{g mL}^{-1}$ .

Palavras-chave: Celastraceae, *Cheiloclinium*, triterpeno, friedelano, APCI-IT-TOF

**ABSTRACT****Chemical and biological study of hexane and chloroform leaf extracts from *Cheiloclinium cognatum* (Miers) A.C.Sm. (Celastraceae) and friedelane triterpenes mass-fingerprinting by APCI-IT-TOF**

Phytochemical study of hexane and chloroform leaf extracts from *Cheiloclinium cognatum* resulted in the isolation of sixteen constituents. The isolation yielded three fatty compounds – mixture of long chain hydrocarbons, mixture of fatty alcohols, and mixture of fatty acids –, two acyclic isoprenoids – squalene and *gutta-percha* –, one steroid –  $\beta$ -sitosterol –, mixture of three fatty acid ursane triterpene esters –  $3\beta$ -palmitoyl-urs-12-ene,  $3\beta$ -stearoyl-urs-12-ene, and  $3\beta$ -eicosanoyl-urs-12-ene –, seven known friedelane triterpenes – 3-oxo-friedelane,  $3\beta$ -hydroxyfriedelane, 3-oxo-28-hydroxyfriedelane, 3-oxo-22 $\alpha$ -hydroxyfriedelane, 3,4-*seco*-friedelan-3-oic acid, 3-oxo-29-hydroxyfriedelane,  $3\beta$ ,29-dihydroxyfriedelane –, and two new friedelane triterpenes –  $3\beta$ ,28,29-trihydroxyfriedelane, and 1-oxo- $3\beta$ ,29-dihydroxyfriedelane. The nine friedelanes isolated were subjected to MS and MS/MS analyses by APCI-IT-TOF in order to obtain relevant information for rapid and efficient identification and characterization of these compounds by mass spectrometry. It was observed that for all oxygen-containing functional groups, an invariable water molecule loss was observed during the fragmentation process. The study of biological activity consisted in the *in vivo* antiangiogenic assessment of friedelane triterpenes through the HET-CAM assay, and their nematocidal potential by the acute toxicity testing using the nematode *Caenorhabditis elegans*. In HET-CAM assay, all samples showed over 50% of vascular growth inhibition, displaying a great antiangiogenic potential associated to friedelane-type triterpenes. In the acute toxicity testing, three triterpenes exhibited mortality rate superior to 90%, giving prominence to the compound 3-oxo-28-hydroxyfriedelane, which killed 100% of the larvae at concentration of 10  $\mu\text{g mL}^{-1}$ .

Keywords: Celastraceae, *Cheiloclinium*, triterpene, friedelane, APCI-IT-TOF

## INTRODUÇÃO

### Biossíntese de triterpenos pentacíclicos

Os triterpenos constituem o grupo de compostos mais abundantes dentre os terpenoides. Estes, que também são chamados de isoprenoides, constituem a classe de produtos naturais mais diversificada e abundante na natureza (OLDFIELD; LIN, 2012; THIMMAPPA et al., 2014).

A biossíntese de triterpenos pentacíclicos, assim como a de outros terpenoides, se inicia nos precursores pirofosfato de isopentenila (IPP) e pirofosfato de dimetilalila (DMAPP) (**Figura 1**, pg. 2), ambos constituídos de cinco carbonos e uma insaturação. A união de duas ou mais moléculas de IPP e DMAPP geram diversos compostos constituídos por  $(C_5)_n$  átomos de carbono, que darão origem aos monoterpenos ( $C_{10}$ ), sesquiterpenos ( $C_{15}$ ), diterpenos ( $C_{20}$ ), sesterterpenos ( $C_{25}$ ), triterpenos ( $C_{30}$ ), sesquaterpenos ( $C_{35}$ ), tetraterpenos ( $C_{40}$ ), entre outros politerpenos (KIRBY; KEASLING, 2009; SATO, 2013).

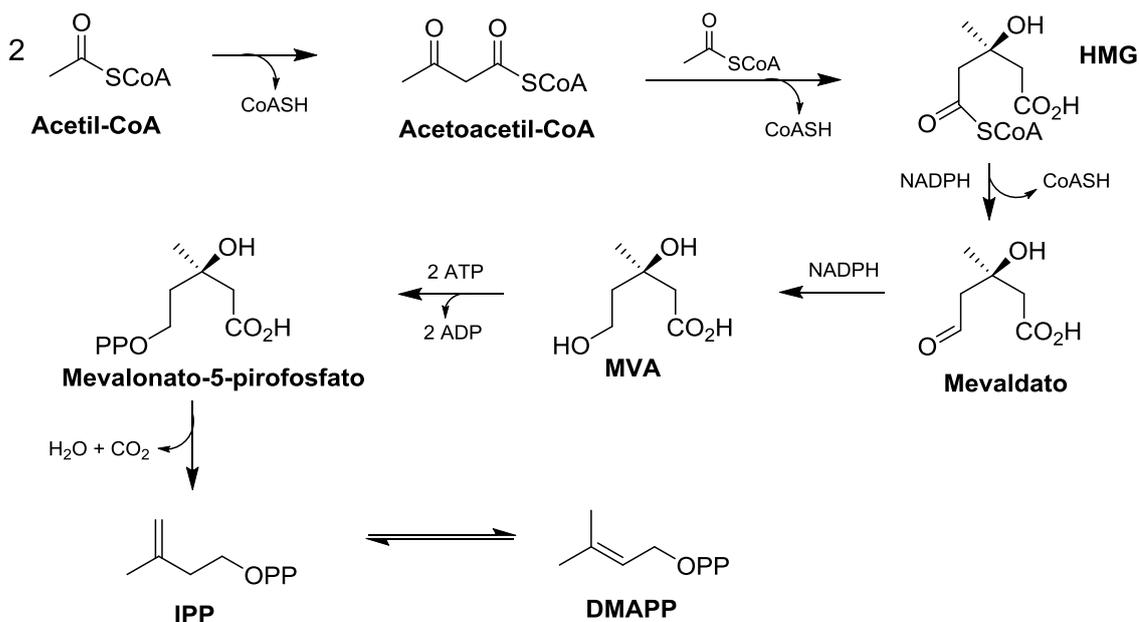
### Biossíntese dos precursores IPP e DMAPP

Até o início da década de 90, acreditava-se que a biossíntese dos precursores IPP e DMAPP ocorria exclusivamente por uma única rota metabólica, conhecida como via do mevalonato (**Figura 1**, pg. 2). Em 1995, dois grupos de pesquisa independentes relataram a descoberta de uma via alternativa na síntese destes precursores, tanto em plantas como em bactérias (GRÄWERT et al., 2011). Essa via é conhecida como não-mevalônica ou rota do 1-desoxi-D-xilulose-5-fosfato (DXP) (**Figura 2**, pg. 2).

A via do mevalonato ocorre em seis etapas, como ilustrado na **Figura 1** (pg. 2), e se inicia a partir da ligação entre duas unidades de acetil-CoA formando uma de acetoacetil-CoA. Outra unidade de acetil-CoA reage com o acetoacetil-CoA dando origem ao 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA (HMG). O HMG sofre redução no grupo tioéster, envolvendo o consumo de duas unidades de nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzido (NADPH), para a formação do ácido mevalônico (MVA). Posteriormente, o MVA é fosfatado por duas vezes na posição 5 e, o então

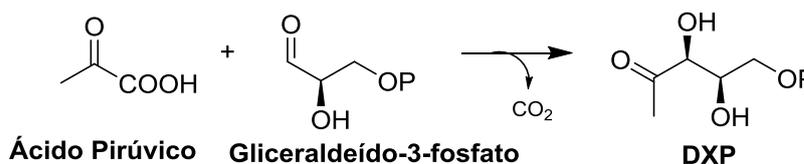
mevalonato-5-pirofosfato, a partir da energia liberada da hidrólise do ATP a ADP, é descarboxilado e desidratado, dando origem ao IPP. Uma etapa extra de isomerização é necessária para a formação do DMAPP a partir do IPP, que é mediada pela enzima IPP isomerase (DEWICK, 2002).

**Figura 1 – Via do mevalonato**



A rota do DXP é constituída por sete etapas, e sua elucidação completa ocorreu somente em 2002 (KIRBY; KEASLING, 2009). Diferentemente da rota do mevalonato, os substratos iniciais da rota do DXP são o ácido pirúvico e gliceraldeído-3-fosfato. A reação entre estes compostos, que envolve a descarboxilação do ácido pirúvico com posterior ataque à carbonila do gliceraldeído-3-fosfato, dá origem ao DXP (Figura 2).

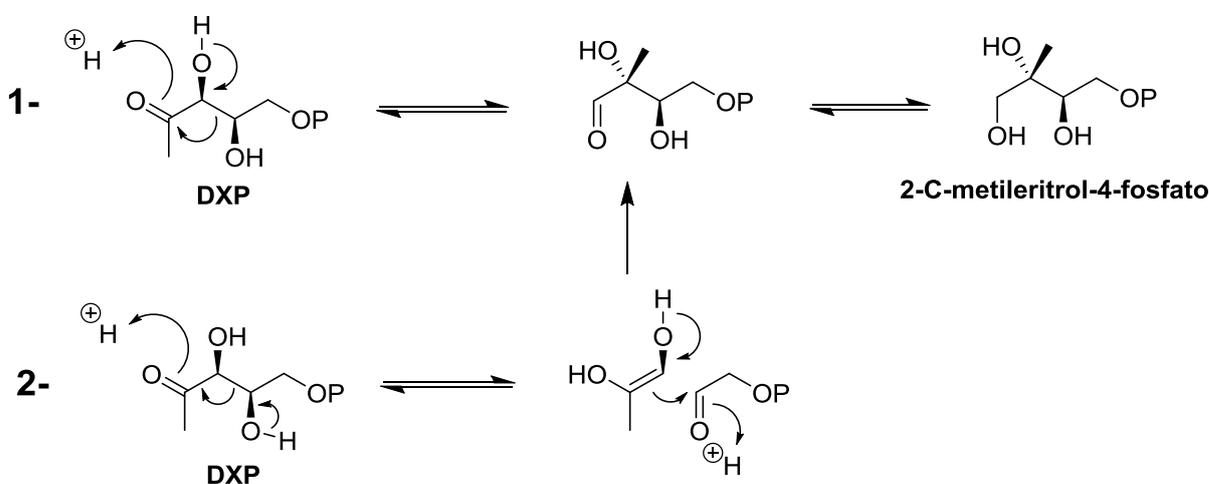
**Figura 2 – Formação do DXP**



O passo seguinte consiste na formação do 2-C-metileritrol-4-fosfato a partir do DXP. A enzima 1-Desoxi-D-xilulose-5-fosfato redutoisomerase (IspC) é responsável pela reação de rearranjo seguido de redução que ocorre entre estes compostos.

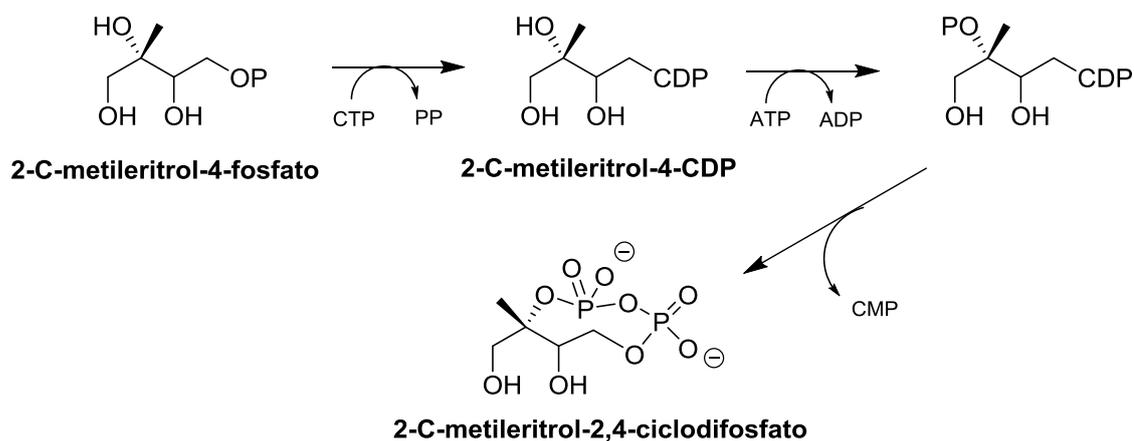
Dois mecanismos distintos foram propostos para essa reação enzimática e estão ilustrados na **Figura 3**. A primeira hipótese retrata um rearranjo sigmatrópico do DXP, formando um aldeído como intermediário que, após uma etapa subsequente de redução da carbonila, forma o 2-C-metileritrol-4-fosfato (LAUW et al., 2008). A segunda proposta se trata de uma reação retroaldólica/aldólica formando o mesmo aldeído intermediário, que então é reduzido ao 2-C-metileritrol-4-fosfato (MUNOS et al., 2009).

**Figura 3 – Mecanismos propostos para a síntese do 2-C-metileritrol-4-fosfato**



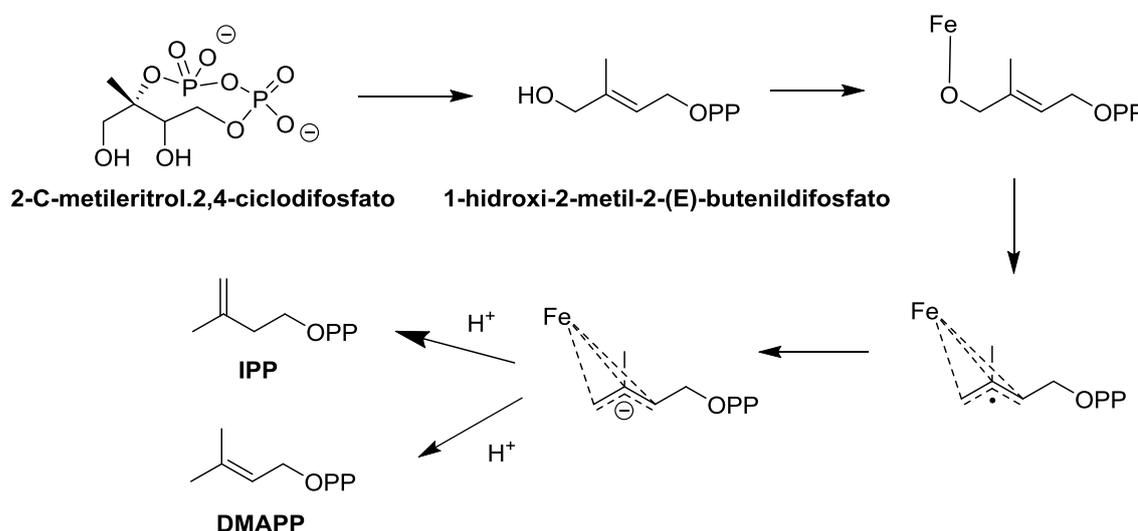
O 2-C-metileritrol-4-fosfato é convertido em um difosfato cíclico passando por três etapas: reação com CTP para formação do 2-C-metileritrol-4-CDP; fosforilação da hidroxila no carbono 2 com o consumo de uma unidade de ATP; e, por fim, uma reação de anelação e formação do 2-C-metileritrol-2,4-ciclodifosfato com posterior liberação de CMP (GRÄWERT et al., 2011) (**Figura 4**).

**Figura 4 – Formação do 2-C-metileritrol-2,4-ciclodifosfato**



A formação de IPP e DMAPP a partir do 2-C-metileritrol-2,4-ciclodifosfato ocorrem em duas etapas (**Figura 5**) e são mediadas por metaloenzimas com sítios de transferência eletrônica e clusters de ferro-enzofre. A primeira reação consiste na abertura do difosfato cíclico e perda da hidroxila na posição 3, formando o 1-hidroxi-2-metil-2-(E)-butenildifosfato. Na etapa seguinte, ocorre quebra da ligação C-O na posição 1, formando um intermediário radical-livre. A transferência de um elétron para o radical livre é mediada por *clusters* de ferro-enzofre, gerando um carbânion alílico. Este carbânion pode ser protonado em duas posições, dando origem ao IPP e DMAPP em proporção de 5:1 (GRÄWERT et al., 2011).

**Figura 5 – Etapas finais da síntese do IPP e DMAPP**



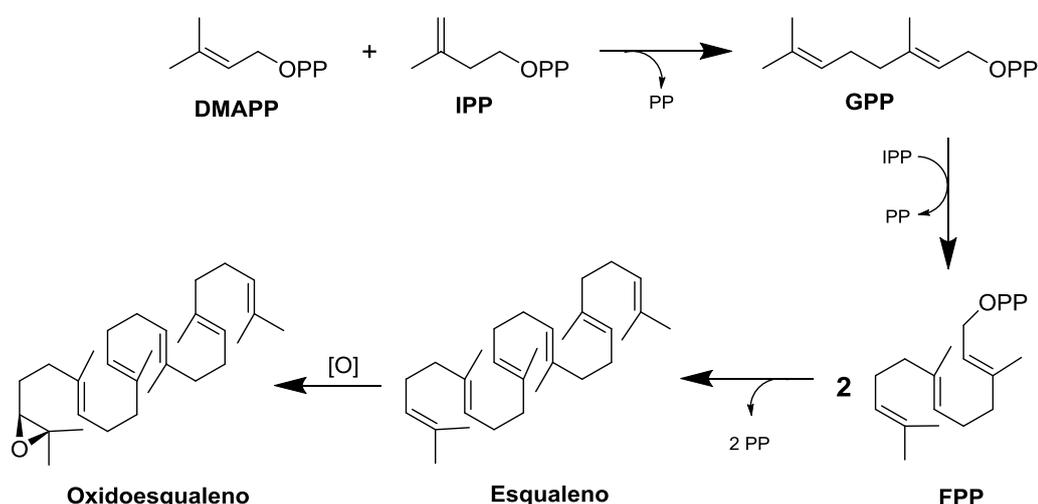
As vias do mevalonato e do DXP ocorrem respectivamente no citosol e nos plastídios de células vegetais. Apesar de sintetizarem os mesmos precursores, IPP e DMAPP, ambas são rotas complementares independentes, ou seja, não são rotas alternativas de síntese de precursores para os mesmos tipos de terpenoides. Com isso, a inexistência de alguma destas rotas biossintéticas provoca deficiências no processo de biossíntese de algumas classes de terpenos (KIRBY; KEASLING, 2009).

### Biossíntese do esqualeno e oxidoesqualeno

O esqualeno e o oxidoesqualeno são compostos alifáticos de trinta carbonos, reconhecidos como precursores diretos dos triterpenos cíclicos e de esteroides. A

biossíntese do esqualeno se inicia na fusão de uma unidade de DMAPP com uma de IPP, formando o pirofosfato de geranila (GPP). Outra unidade de IPP é adicionada à cadeia do GPP originando o pirofosfato de farnesila (FPP). Em seguida, duas unidades de FPP são ligadas entre si pelos terminais fosfatados por meio da enzima esqualeno sintase, havendo a liberação de duas moléculas de pirofosfato. A oxidação do esqualeno ocorre entre os carbonos 2 e 3 e é mediada pela enzima esqualeno epoxidase, levando à formação do oxidoesqualeno (**Figura 6**) (PHILLIPS et al., 2006).

**Figura 6 – Biossíntese do esqualeno e do oxidoesqualeno**



O esqualeno e o oxidoesqualeno, ao sofrerem processos de ciclização enzimática mediados pelas enzimas esqualeno ciclases e oxidoesqualeno ciclases, dão origem aos mais variados esteroides e triterpenos cíclicos. As primeiras são encontradas somente em bactérias (THIMMAPPA et al., 2014), portanto somente as oxidoesqualeno ciclases (OSC) serão abordadas a seguir.

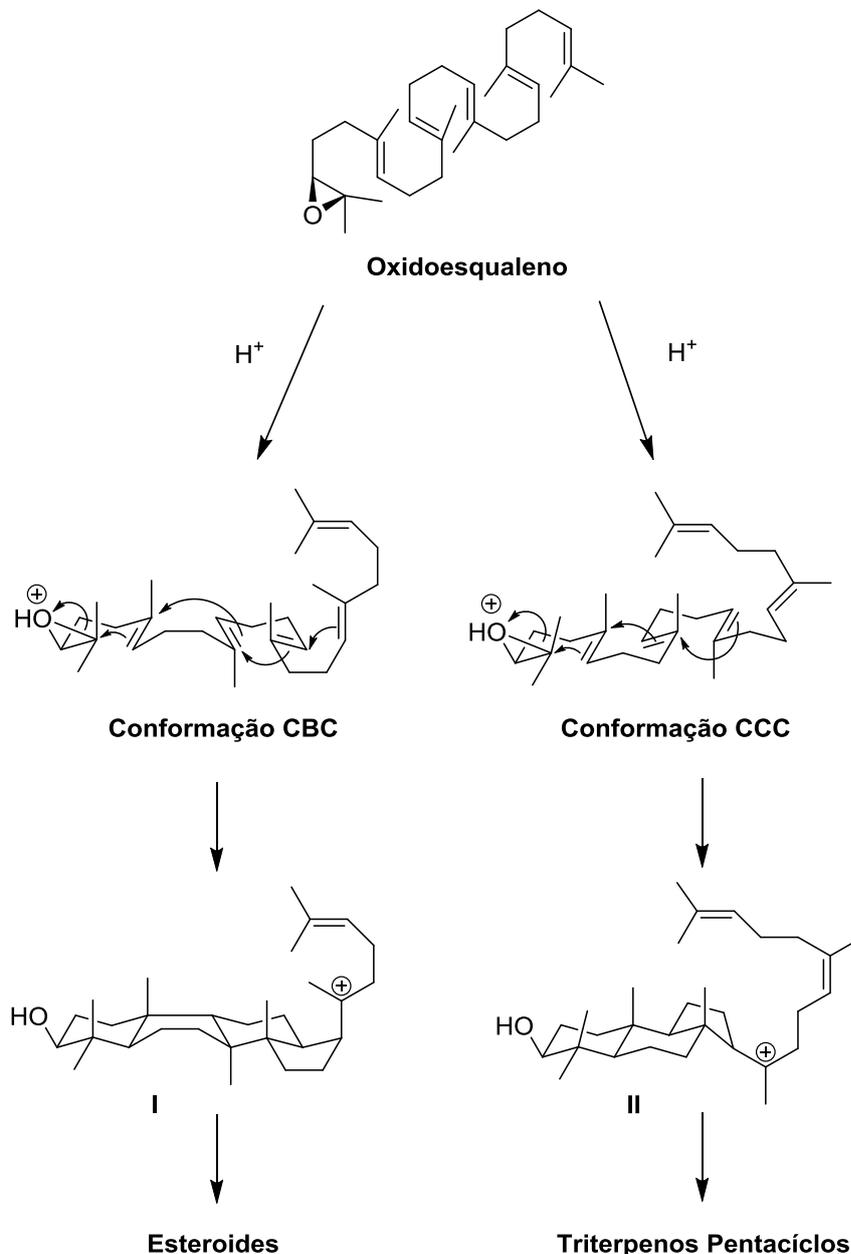
### **Oxidoesqualeno ciclases e a diversidade estrutural de triterpenos pentacíclicos**

As OSCs compõem a classe II de terpeno sintases e são enzimas bastante diversificadas em seres vivos, principalmente em vegetais, o que reflete na sua função ou atividade bioquímica. Mais de 80 OSCs distintas de plantas já foram caracterizadas, sendo grande parte delas obtidas por expressão heteróloga em

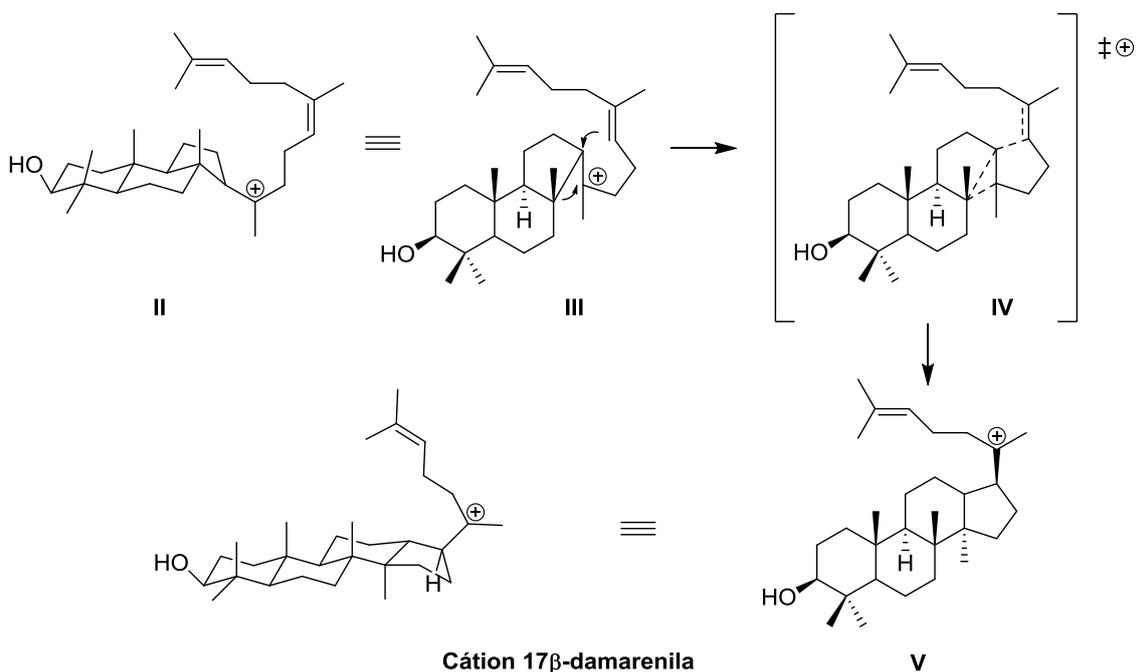
levedura (THIMMAPPA et al., 2014). As OSCs também são enzimas versáteis, pois estão envolvidas na biossíntese de triterpenos mono, di, tri e principalmente tetra e pentacíclicos (XU et al., 2004).

A biossíntese de triterpenos pentacíclicos e de esteroides envolve uma etapa de formação de cátions tetracíclicos – cátion protosterila (**I**) e damarenila (**V**) – (**Figuras 7 e 8**, pg. 7 e 8). No entanto, a conformação de cada um dos anéis destes intermediários influencia diretamente o curso das etapas seguintes da biossíntese. As OSCs inicialmente protonam o oxigênio do grupo oxirano do oxidoesqualeno e dobram o substrato em duas conformações principais: cadeira-barco-cadeira (CBC); e cadeira-cadeira-cadeira (CCC) (**Figura 7**, pg. 7). O oxidoesqualeno, quando dobrado na conformação CBC propicia a formação do intermediário catiônico protosterila (**I**) que dará origem aos esteroides. Por outro lado, quando é dobrado na conformação CCC (**II**) forma o cátion damarenila (**V**) que é precursor dos triterpenos pentacíclicos (ABE, 2007; THIMMAPPA et al., 2014).

**Figura 7 – Formação dos intermediários da síntese de esteroides e de triterpenos pentacíclicos**

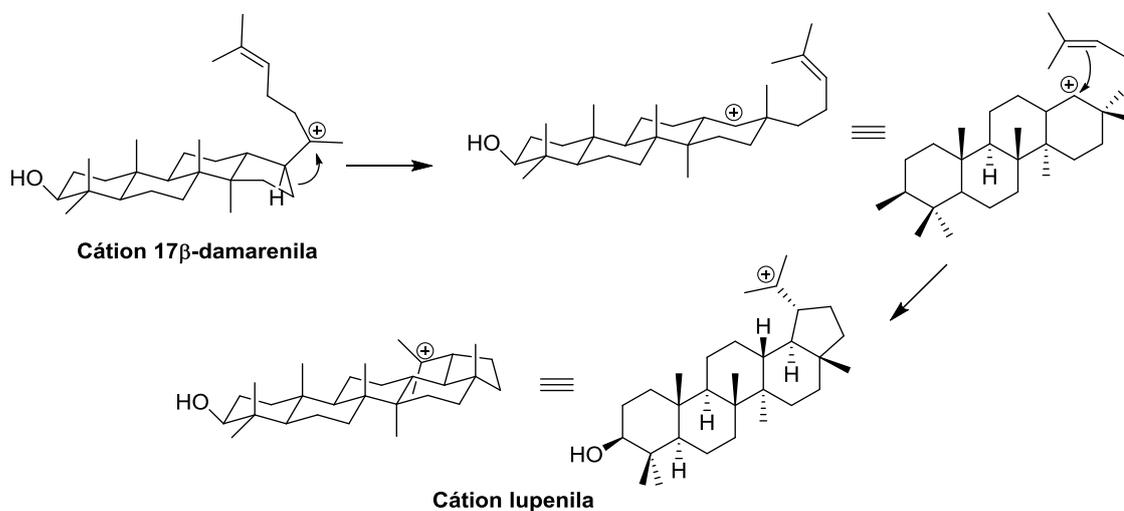


Acreditava-se que a formação do cátion tricíclico, precursor do damarenila, acontecia de forma concertada, originando um cátion secundário 6-6-6 anti-Markovnikov e todos em conformação de cadeira. No entanto, a partir de estudos teóricos, foi proposta uma nova rota sintética na qual ocorre a formação de um intermediário catiônico tricíclico 6-6-5 Markovnikov (**II**), com posterior expansão do anel de cinco membros simultânea ao fechamento do quarto anel (**III** e **IV**), dando origem ao cátion  $17\beta$ -damarenila (**V**) (ABE, 2007) (**Figura 8**, pg. 8).

Figura 8 – Formação do cátion 17 $\beta$ -damarenila

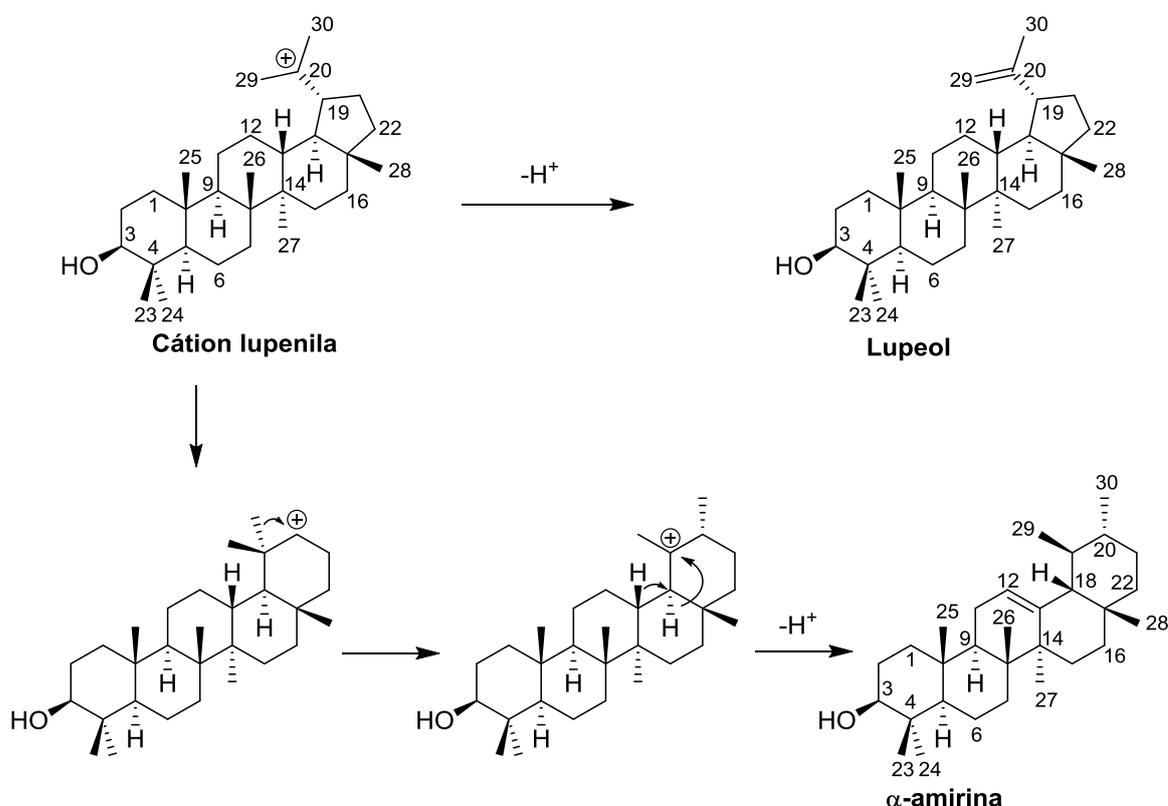
A etapa seguinte consiste na expansão do quarto anel do cátion 17 $\beta$ -damarenila (**Figura 9**). A formação de um carbocátion secundário, bem como a estabilização parcial de todos os carbocátions formados durante a biossíntese de triterpenos pentacíclicos, é explicada por meio da interação de resíduos aromáticos presentes nas enzimas OSC, que promovem interações do tipo cátion- $\pi$  (LODEIRO et al., 2007). Este intermediário tetracíclico 6-6-6-6 sofre uma quinta ciclização originando o cátion lupenila 6-6-6-6-5 (**Figura 9**).

Figura 9 – Formação do cátion lupenila

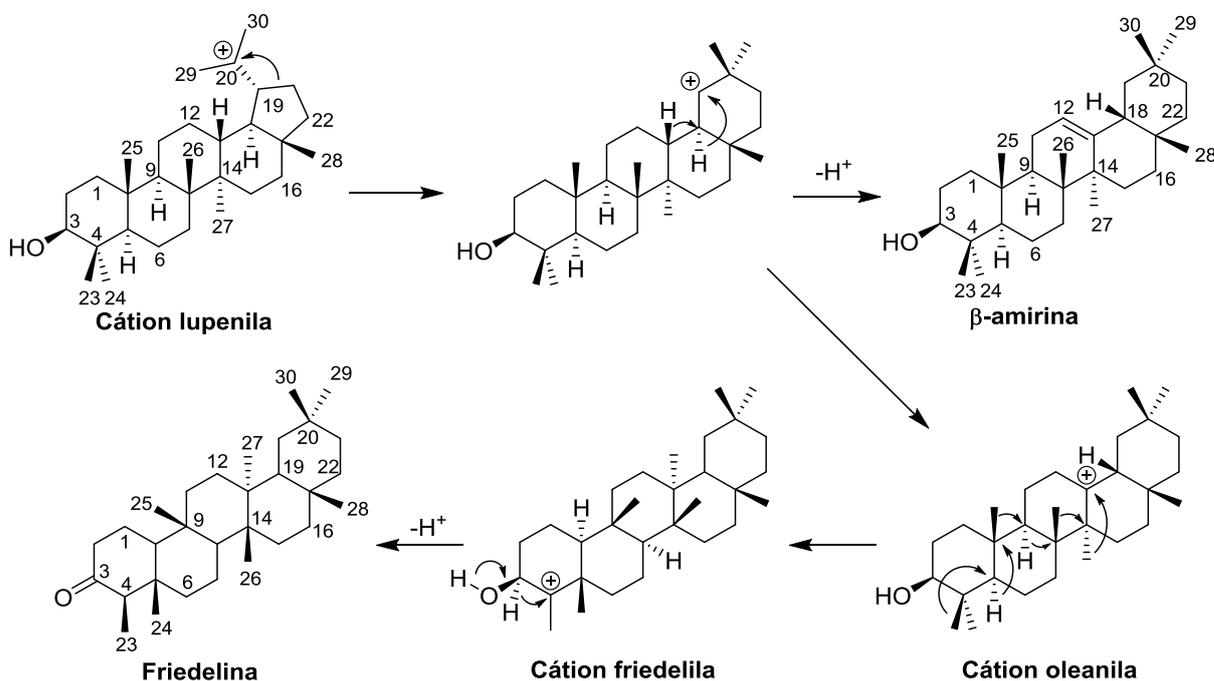


A formação do cátion lupenila é a etapa chave na formação da maioria dos esqueletos de triterpenos pentacíclicos conhecidos (XU et al., 2004) (**Figura 10**). A perda de um próton do carbono 29 dará origem ao lupeol. A expansão do quinto anel pela ligação do carbono 18, seguindo de mais um rearranjo do carbono 30, e dos hidretos  $18\alpha$  e  $13\beta$ , concomitante com a perda de um próton ligado ao carbono 12, dá origem à  $\alpha$ -amirina (**Figura 10**).

**Figura 10 – Formação do lupeol e da  $\alpha$ -amirina**



Caso a expansão do quinto anel ocorra envolvendo a ligação do carbono 21, uma grande diversidade de outros esqueletos triterpênicos é formada (**Figura 11**, pg. 10). Como exemplo, a  $\beta$ -amirina é formada após o rearranjo dos hidrogênios  $18\alpha$  e  $13\beta$ , seguido da perda de um hidrogênio ligado ao carbono 12. A friedelina é o triterpeno pentacíclico formado a partir do maior número possível de rearranjos, 10 no total, e é possivelmente o único triterpeno pentacíclico que não possui insaturação em seu esqueleto (**Figura 11**, pg. 10).

Figura 11 – Formação da  $\beta$ -amirina e da friedelina

Mesmo após a biossíntese, a estrutura química dos triterpenos pentacíclicos pode sofrer modificações, tais como hidroxilação, oxidação, esterificação, formação de derivados glicosilados e outras. Somente de fontes vegetais estima-se que haja mais de 20.000 diferentes triterpenos isolados e caracterizados (LIBY; SPORN, 2012).

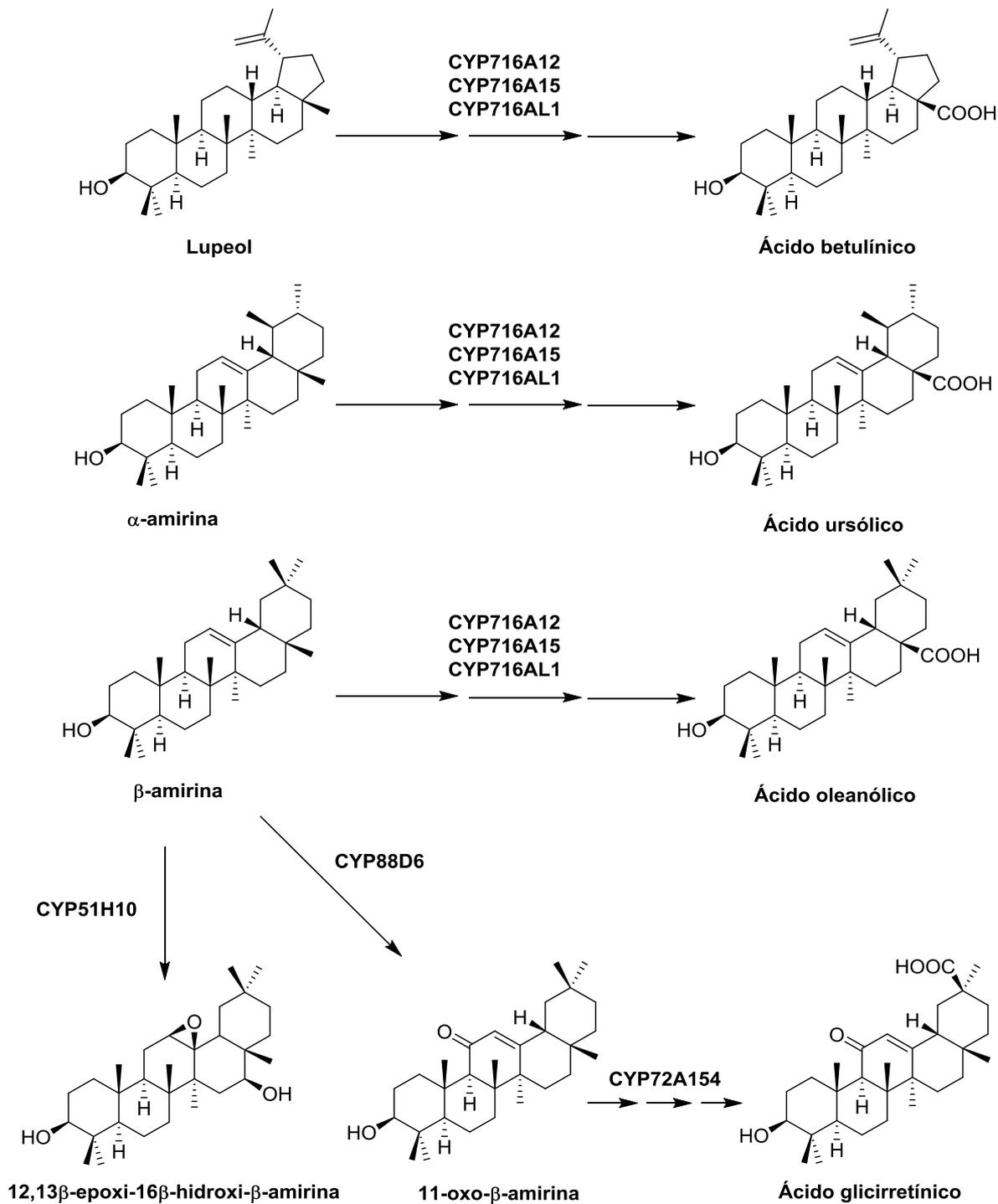
### Citocromo P450: modificações pós-biossintéticas em triterpenos pentacíclicos

Citocromo P450 (CYP) é considerada a superfamília de enzimas com maior número de macromoléculas já identificadas na natureza. As CYPs são hemoenzimas monoméricas de membrana encontradas virtualmente em todos os seres vivos, e estão envolvidas na catálise de diversas reações de oxidação e desmetilação em flavonoides, esteroides, terpenoides e outros (OHNISHI et al., 2009; GEISLER et al., 2013). Mais de 12.000 sequências de genes associadas às CYPs já foram identificadas, no entanto, somente algumas centenas de enzimas foram expressas e tiveram suas funções elucidadas (ZHAO et al., 2014).

Em triterpenos pentacíclicos, as CYPs catalisam reações de hidroxilação, epoxidação, peroxidação e outros tipos de oxidação em regiões específicas dos esqueletos triterpênicos (**Figura 12**, pg. 11). Apesar de as modificações estruturais

serem regio e estereoespecíficas, as CYPs podem atuar em mais de um local nos diferentes esqueletos triterpênicos ou triterpenos pentacíclicos que previamente sofreram algum tipo de modificação pós-biossintética (THIMMAPPA et al., 2014).

**Figura 12 – Modificações estruturais promovidas por CYPs**



## Família Celastraceae

A família Celastraceae compreende cerca de 97 gêneros e mais de 1200 espécies em todo o mundo, e exemplares dessa família podem ser encontrados principalmente na América do Sul, norte da África e no leste Asiático (SIMMONS et al., 2008; MOKOKA et al., 2013). Dentre os compostos isolados a partir do estudo fitoquímico de folhas, galhos e raízes de espécies de Celastraceae, destacam-se os triterpenos quinonametídeos derivados principalmente da friedelina, e os triterpenos pentacíclicos da classe dos lupanos, ursanos, oleananos e friedelanos (ALVARENGA; FERRO, 2006).

O grande interesse no estudo químico e biológico de plantas da família Celastraceae se dá devido à grande variedade de propriedades biológicas atribuídas a extratos e compostos isolados das diferentes partes dos vegetais, dentre elas se destacam as atividades antimicrobiana, antifúngica, citotóxica, algistática, antinociceptiva, etc. (MOKOKA et al., 2013; SILVA et al., 2013; VELOSO et al., 2014; WANG et al., 2014). Tendo como exemplo da importância de espécies dessa família, o extrato padronizado de folhas de *Maytenus ilicifolia* Mart. ex Reissek, que no Brasil já é comercializado como fitoterápico preconizado para o tratamento e prevenção de úlceras gástricas (SANTOS-OLIVEIRA et al., 2009).

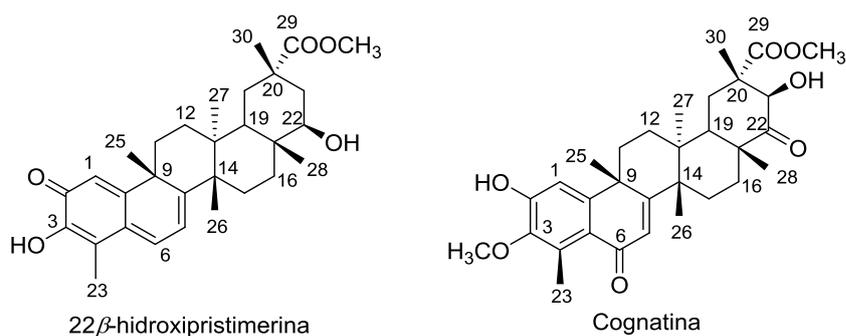
### A espécie *Cheiloclinium cognatum* (Miers) A.C.Sm.

O gênero *Cheiloclinium* é pertencente à subfamília Hippocrateaceae, que compreende outros 23 gêneros e pouco mais de 350 espécies. Assim como as outras plantas da família Celastraceae, são encontradas em regiões tropicais e subtropicais (GOMES et al., 2005). Existem poucos estudos reportados na literatura para plantas deste gênero. No entanto, uma nova classe de moléculas, denominadas *cheiloclinae* A a I (**Apêndice A**, pg. 137), foi descrita a partir do estudo fitoquímico de cascas de raiz de *Cheiloclinium hippocratioides* (MESA-SIVERIO et al., 2005).

O bacupari da mata, como é conhecida popularmente a espécie *Cheiloclinium cognatum* (Miers) A.C.Sm. (**Figura 14**, pg. 13), é uma planta endêmica do cerrado brasileiro, e suas folhas são utilizadas na medicina popular para o tratamento de

febres e edemas. Estudos conduzidos a partir de extratos da casca de raiz desta planta levaram ao isolamento de onze triterpenos quinonametídeos, sendo dois inéditos na literatura (**Figura 13**), e diferentes atividades biológicas foram atribuídas a extratos e a constituintes isolados. Ao extrato em diclorometano foram atribuídas atividades analgésica e anti-inflamatória em ratos e, aos triterpenos quinonametídeos tingenona e tingenol, atividade larvicida contra o protozoário *Trypanossoma cruzi*, causador da doença de Chagas (JELLER et al., 2004; COSTA et al., 2007; LIAO et al., 2008). Apesar do seu uso na medicina popular, até a presente data nenhum estudo químico ou biológico foi realizado utilizando extratos e constituintes isolados de folhas de *C. cognatum*.

**Figura 13 – Triterpenos quinonametídeos inéditos isolados a partir de raízes de *C. cognatum***



**Figura 14 – Flores, folhas, galhos e frutos de *Cheilochlinium cognatum***



**Foto:** Prof<sup>a</sup> Maria Olívia Mercadante Simões – Unimontes (colaboradora)

## OBJETIVOS

### Objetivo do trabalho

Este trabalho teve como objetivo realizar o estudo fitoquímico dos extratos hexânico e clorofórmico das folhas de *Cheiloclinium cognatum* (Miers) A.C.Sm, buscando o isolamento e identificação de novos constituintes, principalmente aqueles da classe dos triterpenos pentacíclicos, e dando continuidade aos estudos químicos e biológicos de plantas da família Celastraceae. Deste modo, fazem parte do escopo deste trabalho:

- Preparação do extrato hexânico e clorofórmico das folhas de *C. cognatum*;
- A realização do estudo fitoquímico destes extratos;
- A elucidação de estruturas químicas de metabólitos isolados;
- O estudo detalhado do perfil de fragmentação a partir das análises de triterpenos friedelânicos em espectrômetro de massas de alta resolução com ionização química a pressão atmosférica (APCI-MS)
- A demonstração de relações fitoquímicas entre espécies da família Celastraceae, contribuindo para o estudo quimiotaxonômico da mesma;
- A realização do estudo da atividade biológica de extratos e constituintes de *C. cognatum*.

## CAPÍTULO 1: ESTUDO QUÍMICO DOS EXTRATOS

### 1 – Parte experimental

#### 1.1 – Métodos gerais

Neste trabalho, para a análise, filtração, separação e purificação das amostras foram utilizadas as seguintes técnicas: cromatografia em camada delgada (CCD), *dry column vacuum chromatography*, cromatografia em coluna (CC) de sílica ou de Sephadex®, cromatografia líquida de média pressão (MPLC) e cromatografia a gás. O critério preliminar adotado para a verificação de pureza da amostra foi feita a partir da observação de uma única mancha em placas de CCD, com eluente adequado para que a mancha apresentasse Rf próximo a 0,5.

Na preparação das cromatoplasmas foram utilizadas 7g de sílica gel 60G para cada 15 mL de água, e a suspensão homogeneizada foi espalhada em suporte de vidro, formando um filme 0,25 mm de espessura. Após a secagem parcial à temperatura ambiente, as placas foram ativadas em estufa a 100 °C por pelo menos 30 minutos. A revelação das placas de CCD foi realizada com o uso de solução na proporção de 1:1 v/v de vanilina (1% m/v em etanol) e ácido perclórico (3% v/v em água), seguido de aquecimento em estufa a 100 °C.

As colunas cromatográficas (CC) clássicas foram preparadas utilizando sílica gel 60 (70-230 mesh ou 230-400 mesh) ou Sephadex® G25-100. Para a *dry column vacuum chromatography* foi utilizada sílica gel 60 (70-230 mesh). As MPLCs foram realizadas no equipamento Biotage® Isolera™ Spektra One, com o uso de colunas SNAP 10 g, 25 g e 50 g, escolhidas de acordo com a quantidade de amostra. Os solventes empregados nas análises foram hexano, clorofórmio, diclorometano, acetona, acetato de etila e metanol. Quando necessária a reutilização de misturas de solventes, a aferição das proporções das misturas foi realizada a partir da comparação dos índices de refração, utilizando refratômetro Biobrix.

A análise por cromatografia a gás (GC-FID) foi realizada em cromatógrafo Agilent HP 7820A, equipado com coluna Agilent HP5 30 m x 0,32 mm x 0,25 µm, hidrogênio como gás de arraste e detector por ionização de chama. Este

equipamento pertence ao Laboratório de Cromatografia do Departamento de Química, ICEX, UFMG.

Os espectros de absorção na região do infravermelho foram obtidos em espectrômetro Perkin Elmer Spectrum One com ATR do laboratório de Química Farmacêutica da Faculdade de Farmácia da UFMG.

Os espectros de RMN foram obtidos utilizando espectrômetros Bruker DPX-200 *Avance* ou *Avance-III* 400 NanoBay ou OneBay do laboratório de Ressonância Magnética de Alta Resolução (LAREMAR) do Departamento de Química da UFMG. Os solventes deutерados utilizados estão indicados em cada análise. Os deslocamentos químicos ( $\delta$ ) foram registrados em ppm, o tetrametilsilano (TMS) foi utilizado como padrão de referência interna ( $\delta_H = \delta_C = 0$ ) e as constantes de acoplamento ( $J$ ) foram calculadas em Hertz (Hz).

Os espectros de massas foram obtidos em equipamento Shimadzu LCMS-IT-TOF de alta resolução do laboratório de Cromatografia do Departamento de Química da UFMG. Os solventes metanol e clorofórmio em grau HPLC foram utilizados no preparo de amostras.

## 1.2 – Coleta e identificação do material vegetal

A coleta das folhas de *Cheiloclinium cognatum* (Miers) A.C.Sm. ocorreu no município de Montes Claros, em Minas Gerais, na propriedade particular do Sr. Ildeci Fonseca, às margens do Km 18 da rodovia BR 365, pela professora Dra. Maria Olívia Mercadante Simões, do departamento de Biologia Geral da Unimontes.

A identificação do material vegetal foi realizada pela própria professora Maria Olívia, e uma exsicata do espécime (BHCB 169874) foi depositada no Herbário do Departamento de Botânica do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG. A licença para o acesso ao patrimônio genético foi concedida pelo CNPQ sob o processo número 010119/2014-0.

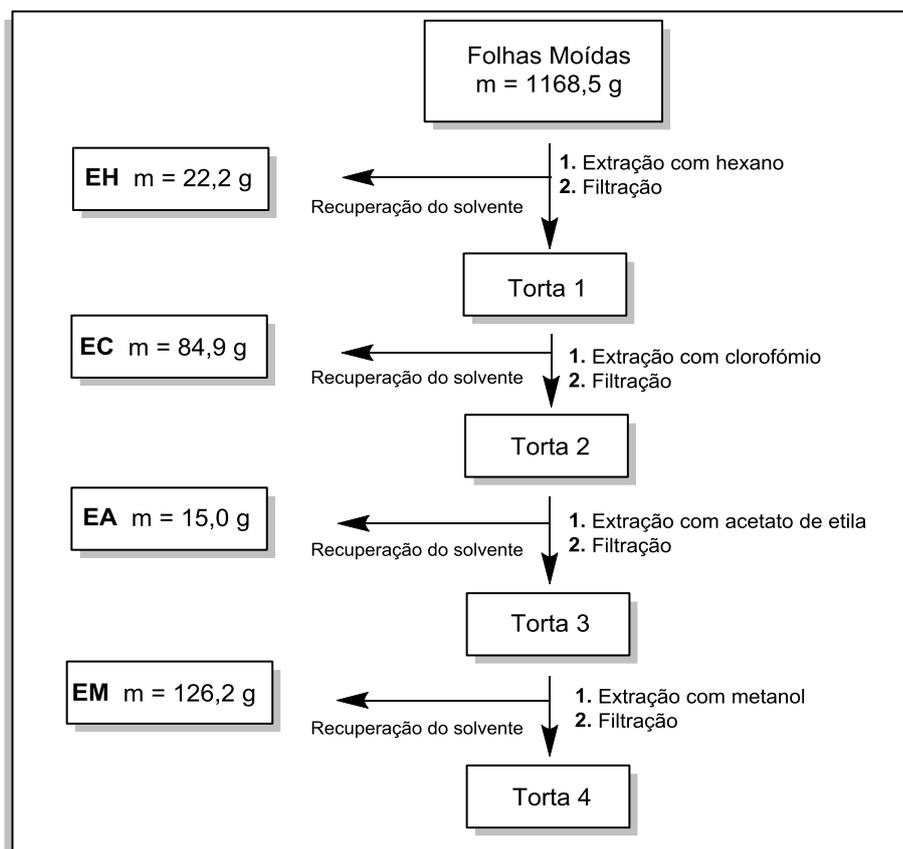
## 1.3 – Preparação dos extratos das folhas de *Cheiloclinium cognatum*

Após a coleta, as folhas de *C. cognatum* foram submetidas à secagem à temperatura ambiente e, após secas, foram pulverizadas em moinho de facas, obtendo-se 1168,5 g de material vegetal moído. Este material foi submetido à

extração exaustiva por maceração à temperatura ambiente com o uso de hexano, clorofórmio, acetato de etila e metanol, todos puros. Cada extrato foi filtrado e o solvente extrator recuperado utilizando evaporador rotativo sob pressão reduzida.

A nomenclatura dos extratos foi estabelecida da seguinte forma: letra E para extrato; letra H para hexânico; letra C para clorofórmico; letra A para acetato etílico; e letra M para metanólico. Portanto, o extrato hexânico foi identificado como EH e o clorofórmico como EC. A esquematização da extração está apresentada na **Figura 15**. A notação para identificação de metabólitos e/ou misturas isolados foi estabelecida como a letra **S**, seguida da ordem de isolamento dos compostos.

**Figura 15 – Esquema utilizado para obtenção dos extratos de folhas de *C. cognatum***



#### 1.4 – Elaboração do extrato EH

EH foi obtido como um material pastoso (22,2 g), de cor verde. Parte deste material (2,0 g) foi reservada para testes químicos e ensaios biológicos e o restante de EH (20,2 g) foi submetido à CC. Foram utilizados 738 g de sílica gel 60 (70-230 mesh) e, como eluente, hexano, clorofórmio, acetato de etila e metanol, puros ou em

misturas em ordem crescente de polaridade. Foram coletadas 210 frações de aproximadamente 200 mL (Tabela 1).

**Tabela 1. Frações obtidas e eluentes utilizados para coluna EH**

Frações	Eluente	Nº de frações
01-35	Hexano	35
36-42	Hex+CHCl <sub>3</sub> 9:1	7
43-50	Hex+CHCl <sub>3</sub> 8:2	8
51-84	Hex+CHCl <sub>3</sub> 7:3	34
85-140	Hex+CHCl <sub>3</sub> 6:4	40
125-137	Hex+CHCl <sub>3</sub> 1:1	13
138-177	Clorofórmio	40
178-184	CHCl <sub>3</sub> -AcOEt 9:1	7
185-192	Acetato de Etila	8
193-210	Metanol	18

As 210 frações foram reunidas em 27 grupos (EH1 a EH27) de acordo com a similaridade dos perfis cromatográficos observados em placas de CCD. Os grupos não mencionados abaixo foram trabalhados, porém não resultou no isolamento de nenhum constituinte químico.

**Grupo EH1 (frações 1 e 2):** Foi obtido um sólido branco (526 mg) e, devido ao caráter fortemente apolar, e o perfil em CCD, suspeitou-se que o grupo EH1 se tratava de uma mistura de hidrocarbonetos (**S1**). 1 µL de solução de **S1** a 1% (m/v) em hexano foi submetida à GC-FID (gradiente de temperatura: 200 °C, 0 min, 10 °C/min, 300 °C; injetor *splitless* a 300 °C; detector a 320 °C) para determinação dos constituintes desta mistura.

**Grupo EH3 (frações 4 e 5):** Foi obtido um líquido viscoso incolor (902 mg) que apresentou somente uma mancha em placa de CCD. EH3 foi submetido à análises por RMN de 1D de <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C. A comparação dos dados obtidos com os da literatura levou à identificação desta fração como sendo o esqualeno (**S2**).

**Grupo EH10 (frações 35 a 42):** Foi obtido um material de cor amarelada (532 mg) que foi submetido a MPLC em coluna SNAP 50 g e, como eluentes, hexano, clorofórmio e metanol, puros ou em mistura. O subgrupo EH10-4 (frações 19 a 50; 489 mg) foi submetido às análises de RMN de 1D de <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C, e espectrometria de

massas. A mistura de três compostos,  $3\beta$ -palmitoil-urs-12-eno (**S3-I**),  $3\beta$ -estearoil-urs-12-eno (**S3-II**) e  $3\beta$ -eicosanoil-urs-12-eno (**S3-III**), foi identificada nesta fração.

**Grupo EH13 (frações 56 a 65):** Foi obtido um sólido alaranjado (2,3 g) que foi tratado com acetona e hexano puros e, após filtração, um sólido branco foi obtido (330 mg). O sólido foi submetido à CCD e foi constatada apenas uma mancha amarelada. Após as análises dos espectros de RMN de 1D de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  e comparação com dados da literatura, o sólido foi identificado como o 3-oxo-friedelano (**S4**).

**Grupo EH14 (frações 66 a 68):** Foi obtido um sólido alaranjado (286 mg) que foi tratado com acetona e hexano puros e em seguida filtrado, obtendo-se um sólido branco (100 mg). A comparação do perfil em CCD com amostras autênticas confirmou a presença da mistura de **S4** e  $3\beta$ -hidroxi-friedelano (**S5**). As análises de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  confirmaram a constituição da mistura.

**Grupo EH15 (frações 69 a 90):** Foi obtido um sólido alaranjado (867 mg) que foi submetido à MPLC utilizando coluna SNAP 50 g, com hexano, clorofórmio, acetato de etila e metanol, puros ou em mistura, como eluentes. O subgrupo EH15-5 (282 mg) foi tratado com acetona e hexano puros, seguido de filtração, e um sólido branco foi obtido (100 mg). Após as análises RMN de 1D de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  e comparação com dados da literatura, o sólido foi identificado como sendo o  $3\beta$ -hidroxifriedelano (**S5**).

**Grupo EH16 (frações 91 a 107):** Foi obtido um sólido alaranjado (1,7 g) que foi tratado com acetona pura, seguida por filtração, e um sólido levemente alaranjado foi obtido (399 mg). A amostra foi submetida a uma CC com 19,5 g de sílica gel 60 (230-400 mesh) e hexano, clorofórmio e acetato de etila, puros ou em mistura, como eluentes. O subgrupo EH16-2 (14 mg) foi submetido às análises de RMN de 1D de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  e MS. O composto foi identificado como sendo mistura de álcoois graxos (**S6**).

**Grupo EH17 (frações de 108 a 110):** Um material verde escuro (256 mg) foi submetido à MPLC utilizando coluna SNAP Ultra 10 g, com hexano, clorofórmio, acetato de etila e metanol, puros ou em mistura, como eluentes. O subgrupo EH17-4 (165 mg) foi submetido a uma CC com 14 g de sílica gel 60 (230-400 mesh) e hexano, clorofórmio e acetato de etila, puros ou em mistura, como eluentes. A fração EH17-4-4 (8 mg) foi submetida às análises de RMN de 1D de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  e identificada como sendo  $\beta$ -sitosterol (**S7**).

**Grupo EH18 (frações 111 a 122):** Foi obtido um sólido verde escuro (1,5 g) que foi submetido a MPLC utilizando coluna SNAP 50 g, com hexano, clorofórmio, acetato de etila e metanol, puros ou em mistura, como eluentes. Foram obtidas 87 frações que foram reunidas em 6 subgrupos. O subgrupo EH18-3 (57 mg) foi tratado com metanol e, após filtração, um sólido branco (17 mg) foi submetido às análises de RMN de 1D de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  e identificado como sendo **S7**. O subgrupo EH18-4 (656 mg) foi submetido a uma CC com 48,7 mL Sephadex® com gradiente de eluente (CARDELLINA, 1983), utilizando hexano, diclorometano e acetona em misturas, e o subgrupo EH18-4-3 (12 mg) foi submetido às análises de RMN de 1D de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  e identificado como sendo o 3-oxo-28-hidroxifriedelano (**S8**). O subgrupo EH18-5 (148 mg) foi submetido a CC com 14,9 g de sílica gel 60 (230-400 mesh) e hexano, clorofórmio e acetato de etila, puro ou em mistura, como eluentes. O subgrupo EH18-5-2 (17 mg) foi submetido a análises de RMN de 1D de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  e identificado como sendo **S7**. O subgrupo EH18-5-5 (12 mg) foi submetido a análises de RMN para obtenção dos espectros 1D e 2D de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ , permitindo a identificação do composto como sendo 3-oxo-21 $\alpha$ -hidroxifriedelano (**S9**).

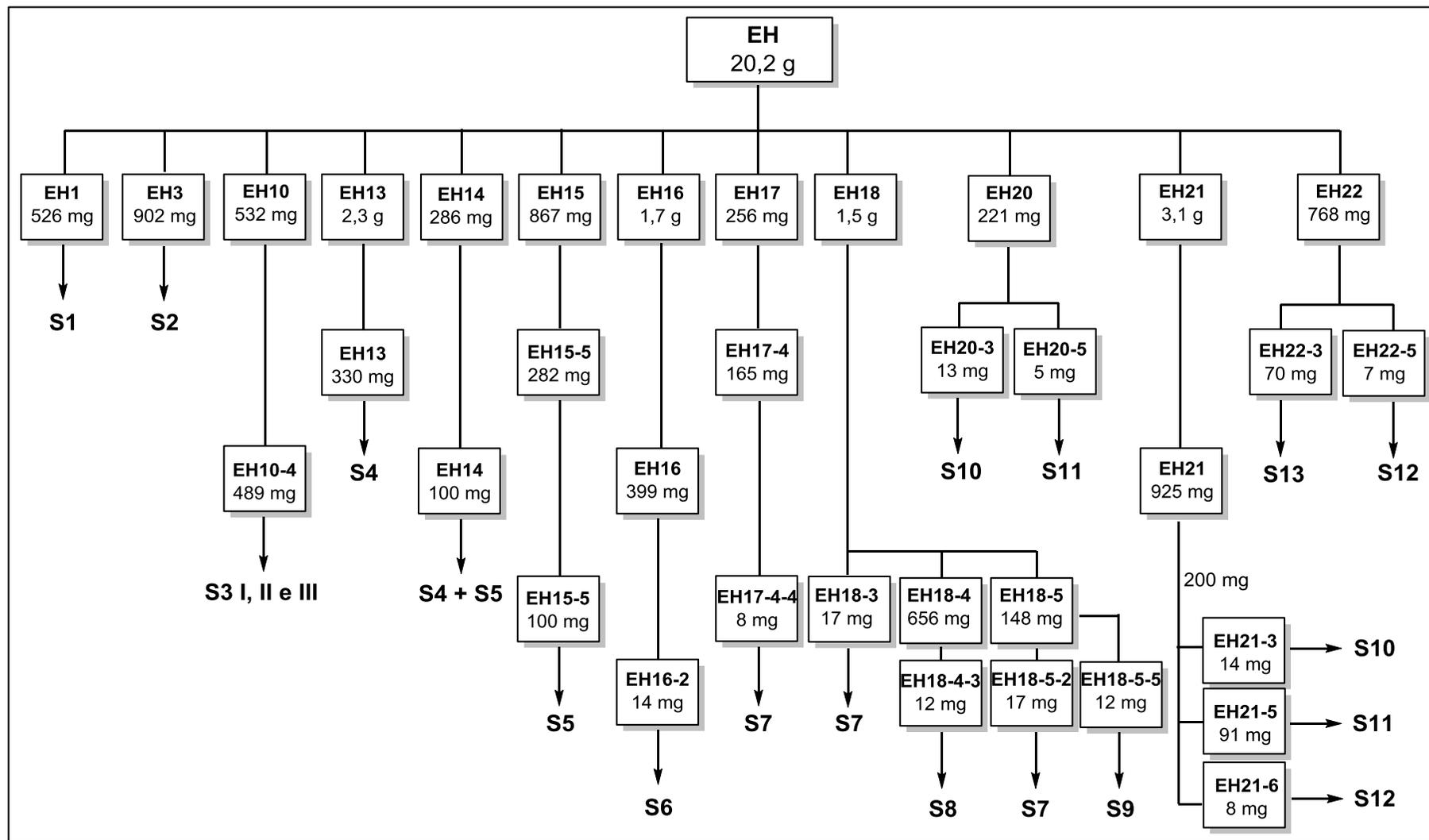
**Grupo EH20 (133 a 143):** Um material verde escuro foi obtido (221 mg) e foi submetido a uma CC com 13 g de sílica gel 60 (230-400 mesh) e hexano, clorofórmio e acetato de etila, puros ou em mistura, como eluentes. Foram obtidas 47 frações reunidas em 6 subgrupos. O subgrupo EH20-3 (13 mg) analisado via RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  e identificado como sendo o ácido 3,4-seco-friedelan-3-oico (**S10**). Foram realizadas análises de RMN de 1D de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  para o subgrupo EH20-5 (5 mg) e o composto 3-oxo-29-hidroxifriedelano (**S11**) foi identificado a partir de comparação com dados da literatura.

**Grupo EH21 (144 a 161):** Foi obtido um sólido verde escuro (3,1 g) que foi tratado com hexano puro e seguido de filtração. Um sólido branco levemente esverdeado (925 mg) foi obtido e, com 200 mg deste sólido, foi realizada uma MPLC utilizando coluna SNAP Ultra 10 g e hexano, clorofórmio e metanol, puros ou em mistura, como eluentes. Foram obtidas 84 frações que foram agrupadas em 6 subgrupos. O subgrupo EH21-3 (14 mg), após análises de RMN de 1D de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ , foi identificado como sendo **S10**. O subgrupo EH21-5 (91 mg) foi identificado como sendo **S11**, após análises de RMN de 1D de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ . O subgrupo EH21-6 (8 mg), após análises de RMN de 1D e 2D de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ , foi elucidado e identificado como sendo o 3 $\beta$ ,29-di-hidroxifriedelano (**S12**).

**Grupo EH22 (162 a 168):** Foi obtido um sólido verde escuro (768 mg) que foi submetido a uma CC com 39 g de sílica gel 60 (230-400 mesh) e hexano, clorofórmio e acetato de etila, puros ou em mistura, como eluentes. Foram obtidas 72 frações reunidas em 6 subgrupos. O subgrupo EH22-3 (70 mg) foi identificado, a partir de análises de RMN de 1D de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ , como sendo mistura de ácidos graxos (**S13**). O subgrupo EH22-5 (7 mg) foi identificado como sendo **S12** após análises de RMN de 1D de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ .

O esquema empregado para o fracionamento da coluna EH está apresentado na **Figura 16** (pg. 22). Os grupos não mencionados foram submetidos às técnicas de fracionamento por CC e MPLC, no entanto, não foi possível o isolamento nem identificação de nenhum metabólito.

Figura 16 – Esquema de fracionamento do extrato EH



### 1.5 – Elaboração do extrato EC

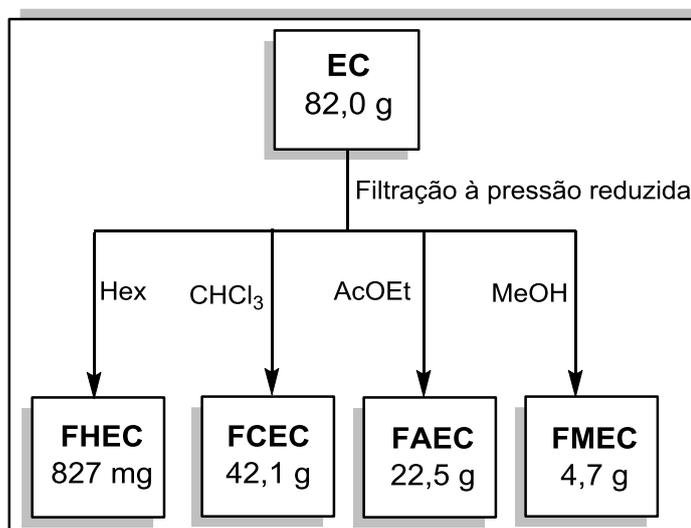
Foram trabalhados 82 g do EC utilizando a metodologia *dry column vacuum chromatography* (PEDERSEN; ROSENBOHM, 2001). Esta metodologia apresenta como vantagens a possibilidade de elaboração de uma maior quantidade de extrato à partir da utilização de menor quantidade de solvente e fase estacionária, e menor dispêndio de tempo em relação às CC padrão. No entanto, a quantidade de sílica utilizada para adsorver a amostra foi muito alta (ao final, foram obtidos 325 g da mistura de sílica mais extrato), e o maior funil sinterizado disponível apresentava tamanho inferior ao necessário para que a metodologia fosse aplicada em sua proposta original. Portanto, utilizando a mesma montagem da coluna como indicada por Pederson e Rosenbohm (**Figura 17**) a amostra foi dividida em três porções de massas semelhantes, e foi realizada uma filtração em pressão reduzida, com quantidade de fase estacionária inferior à sugerida originalmente. Para facilitar a padronização das frações, foram utilizados apenas hexano, clorofórmio, acetato de etila e metanol puros, de forma a se obter quatro grandes frações.

**Figura 17 – Montagem da *dry column vacuum chromatography***



Estas frações foram nomeadas da seguinte forma: letra F de fração, a primeira letra do solvente utilizado na filtração, e EC para extrato clorofórmico. Dessa forma foram obtidos 827 mg da fração hexânica do extrato clorofórmico (FHEC), 42,1 g da fração clorofórmica do extrato clorofórmico (FCEC), 22,5 g da fração acetato etílica do extrato clorofórmico (FAEC) e 4,7 g da fração metanólica do extrato clorofórmico (FMEC). O esquema desta filtração está apresentado na **Figura 18**.

**Figura 18 – Esquema da filtração à pressão reduzida para EC**



#### 1.5.1 – Elaboração da fração FHEC

A amostra FHEC foi submetida a uma CC com 64 g de sílica gel 60 (70-230 mesh) e hexano e clorofórmio, puros ou em mistura, como eluentes. Foram obtidas 165 frações de 10 mL, que foram reunidas em 6 grupos. FHEC1 (184 mg) foi identificado via CCD e por análise do espectro de absorção no IV como sendo **S1**. FHEC2 (206 mg) foi identificado a partir das análises de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  como sendo **S2**.

#### 1.5.2 – Elaboração da fração FCEC

FCEC foi tratada em hexano seguida por filtração, para a retirada do excesso de graxa da amostra. Foram obtidos 36,4 g da amostra FCEC desengordurada, que

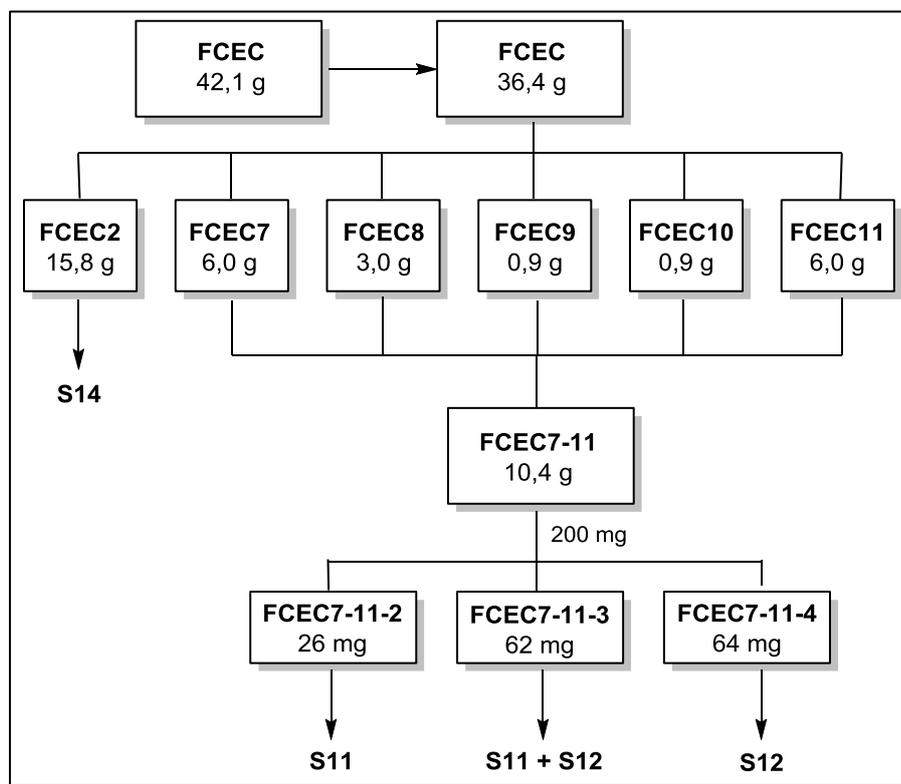
foi submetida a uma CC com 604 g de sílica gel 60 (70-230 mesh), utilizando hexano, clorofórmio, acetato de etila e metanol, puros ou em mistura, como eluentes. Foram obtidas 119 frações reunidas em 13 grupos.

**Grupo FCEC2 (frações 12 a 34):** Foi obtido um sólido amarelado (15,8 g) que foi submetido às análises de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  e identificado como sendo *gutta-percha* (**S14**).

**Grupos FCEC7; FCEC8; FCEC9; FCEC10; FCEC11 (49 a 54; 55 a 59; 60 e 61; 62; 63 a 68 respectivamente):** Foram obtidos sólidos verdes (6,0 g; 3,0 g; 0,9 g; 0,9 g; 6,0 g respectivamente) que apresentaram perfis semelhantes em análise por CCD. Todas as amostras tratadas com acetona e hexano puros e, após filtração, os sólidos resultantes foram submetidos a análises por CCD e espectroscopia na região do IV. A partir dos resultados foi possível inferir que as frações filtradas continham o mesmo tipo de sólido e, portanto, as frações FCEC7-11 foram agrupadas (10,4 g). Foram separados 200 mg da FCEC7-11 e submetidos a MPLC com coluna SNAP Ultra 10 g e hexano, clorofórmio e acetato de etila como eluentes. Foram obtidas 63 frações e reunidas em 5 grupos. FAEC7-11-2 (26 mg), FAEC7-11-3 (62 mg), FAEC7-11-4 (64 mg) foram submetidas às análises de RMN de 1D de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  e identificados como **S11**, mistura de **S11+S12** e **S12** respectivamente.

O esquema empregado para o fracionamento da coluna FCEC está apresentado na **Figura 19** (pg. 26). Os grupos não mencionados foram submetidos às técnicas de fracionamento por CC e MPLC, no entanto não foi possível o isolamento nem identificação de nenhum metabólito.

Figura 19 – Esquema de fracionamento de FCEC



### 1.5.3 Elaboração da fração FAEC

FAEC (22,5 g) foi submetida a uma CC com 297 g de sílica gel 60 (70-230 mesh) com os eluentes hexano e clorofórmio, puros ou em mistura. Foram obtidas 106 frações de 200 mL, que foram reunidas em 10 grupos.

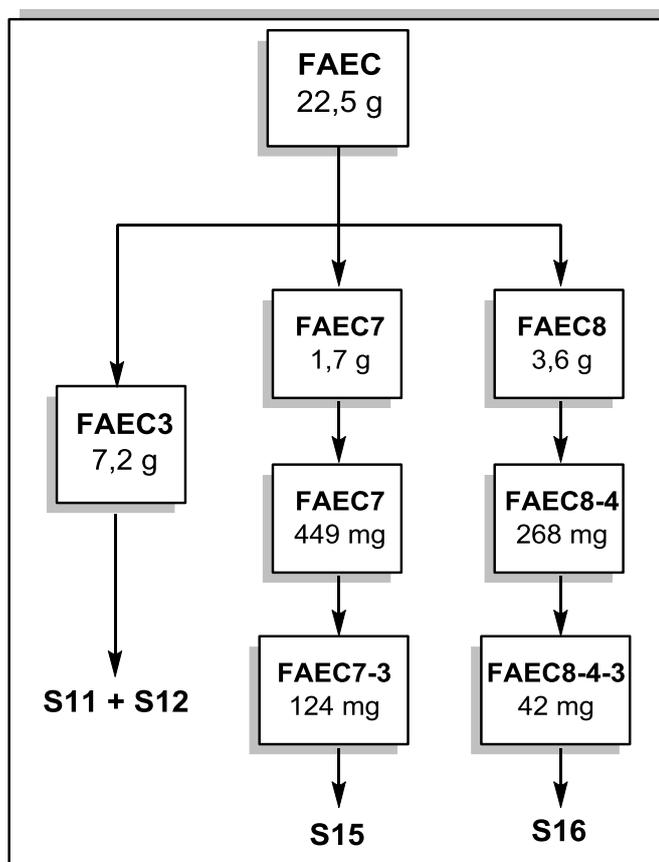
**Grupo FAEC3 (frações 27 a 49):** Um sólido branco foi isolado (7,2 g) e submetido à análise por CCD. Foram identificadas duas manchas na cromatoplaça, que foram comparadas com padrões autênticos de dois triterpenos pentacíclicos, **S11** e **S12**. A partir desta análise pôde-se inferir que a fração FAEC3 é constituída pela mistura de **S11** e **S12**.

**Grupo FAEC7 (frações 75 a 79):** Um sólido verde escuro foi isolado (1,7 g) e submetido a lavagem seguida de filtração com acetona e metanol puros. O sólido resultante (449 mg) foi submetido à CC com 44g de sílica gel 60 (70-230 mesh) e clorofórmio, acetato de etila e metanol, puros ou em mistura, como eluentes. Foram obtidas 91 frações de 10 mL, que foram reunidas em 5 grupos. FAEC7-3 (124 mg) foi submetida às análises de RMN de 1D e 2D de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  e o composto 3 $\beta$ ,28,29-tri-hidroxifriedelano (**S15**) foi identificado, sendo inédito na literatura.

**Grupo FAEC8 (frações 84 a 80):** Um sólido verde escuro foi isolado (3,6 g) e submetido a uma CC com 191 g de Florisil® com clorofórmio e acetato de etila, puros ou em mistura, como eluentes. Foram obtidas 32 frações de 200 mL que foram reunidas em 5 grupos. FAEC8-4 (268 mg) foi purificada em uma CC com 17 g de sílica gel 60 (230-400 mesh) utilizando clorofórmio, acetato de etila ou metanol, puros ou em mistura, como eluentes. 38 frações de 10 mL foram obtidas e reunidas em 4 grupos. FAEC8-4-3 (42 mg) foi submetida às análises de RMN de 1D e 2D de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  e o composto 1-oxo-3 $\beta$ ,29-di-hidroxifriedelano (**S16**) foi identificado, sendo inédito na literatura.

O esquema da elaboração de FAEC está apresentado na **Figura 20**. Os grupos não mencionados foram submetidos a técnicas cromatográficas de separação e purificação, porém não foi possível o isolamento e identificação de nenhum metabólito.

**Figura 20 – Esquema de fracionamento de FAEC**



#### 1.5.4 *Elaboração da fração FMEC*

FMEC foi submetida a uma CC de 133 g sílica gel 60 (70-230 mesh) com hexano, acetato de etila e metanol, puros ou em mistura, como eluentes. Foram obtidas 144 frações de 20 mL que foram reunidas em 6 grupos. O grupo **FMEC2** (frações 12 a 18, 39 mg) foi tratado com acetona e filtrado para a obtenção de um sólido branco (17 mg). Após análise por RMN 1D de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ , o sólido foi identificado como sendo a mistura de **S11** e **S12**. Os grupos não mencionados serão trabalhados em análises futuras.

## 2 – Determinação estrutural

Os 16 compostos isolados foram classificados de acordo com características estruturais em: compostos graxos; isoprenoides acíclicos; esteroide; triterpenos pentacíclicos – ursano; triterpenos pentacíclicos – 3-oxo-friedelanos; e triterpenos pentacíclicos – 3 $\beta$ -hidroxifriedelanos. A determinação estrutural será apresentada por classe e não por ordem de isolamento dos compostos.

### 2.1 – Compostos graxos

#### 2.1.1 – **S1**: Mistura de hidrocarbonetos



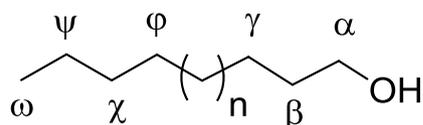
No espectro de absorção no IV (**Apêndice AA**, pg. 96), observaram-se bandas características de estiramentos da ligação C-H de metila e metileno (2955 a 2848  $\text{cm}^{-1}$ ) e deformação angular do tipo balanço, característica entre os grupos metileno de cadeia longa (719 e 729  $\text{cm}^{-1}$ ) (BARBOSA, 2007). Estes dados sugerem que a amostra trata-se de mistura de hidrocarbonetos. Para determinar os componentes da mistura e a porcentagem relativa de cada hidrocarboneto, foi realizado o experimento de GC-FID, utilizando uma solução conhecida de misturas de hidrocarbonetos como padrão externo (**Apêndice AB**, pg. 96) para quantificação e identificação dos constituintes da amostra **S1** (**Apêndice AC**, pg. 97). Os hidrocarbonetos  $\text{C}_{29}\text{H}_{60}$  e  $\text{C}_{31}\text{H}_{64}$  foram encontrados em maior proporção em **S1**, com porcentagem relativa de 49,8% e 19,6% respectivamente (**Tabela 2**, pg. 30).

Tabela 2. Resultados da análise de GC-FID para S1

Hidrocarbonetos	RT* (min)	Área	% relativa
C <sub>27</sub> H <sub>56</sub>	8,117	378071	1,0
C <sub>28</sub> H <sub>58</sub>	8,757	2070543	5,6
C <sub>29</sub> H <sub>60</sub>	9,541	18456583	49,8
C <sub>30</sub> H <sub>62</sub>	10,158	1769149	4,8
C <sub>31</sub> H <sub>64</sub>	10,812	7258156	19,6
C <sub>32</sub> H <sub>66</sub>	11,408	652653	1,8
C <sub>33</sub> H <sub>68</sub>	12,01	825742	2,2
C <sub>34</sub> H <sub>70</sub>	12,654	150042	0,4
outros		5496803	14,8
	área total	37057742	100,0

\*RT: retention time (tempo de retenção).

### 2.1.2 – S6: Mistura de álcoois graxos



Para **S6**, observou-se no espectro de RMN de <sup>1</sup>H (**Apêndice BB**, pg. 98) um tripleto em δ<sub>H</sub> 3,76 (*J* 6,5 Hz, 2H), que pode ser atribuído aos átomos de hidrogênio ligados ao carbono hidroxilado (δ<sub>C</sub> 60,58). O sinal relativo ao átomo de hidrogênio ligado diretamente ao oxigênio não foi observado, no entanto, na análise do espectro de absorção no IV (**Apêndice BA**, pg. 97), está presente uma banda em 3403 cm<sup>-1</sup> característica de estiramento de ligação O-H. Observaram-se somente 8 sinais no espectro de RMN de <sup>13</sup>C (**Apêndice BC**, pg. 98). A partir dos dados do subespectro DEPT-135 (**Apêndice BD**, pg. 98), observou-se que sete sinais são relativos a carbonos metilênicos e um que foi atribuído a um grupo metila. Os dados de RMN de <sup>13</sup>C podem ser encontrados na **Tabela 3** (pg. 31). Os sinais dos carbonos metilênicos centrais apresentaram o mesmo deslocamento químico em δ<sub>C</sub> 28,37, tornando possível a determinação da mistura de álcoois graxos somente a partir da análise do espectro de APCI-MS para **S6** (**Apêndice BE**, pg. 99). Foram observados oito picos de maior intensidade relativa, que estão listados na **Tabela 4** (pg. 31), e que foram relacionados à presença de oito álcoois na mistura, sendo o C<sub>32</sub>H<sub>66</sub>O encontrado em maior proporção.

Tabela 3. Atribuição e deslocamentos químicos dos sinais de RMN de  $^{13}\text{C}$  para S6 ( $\text{CDCl}_3 + \text{Pyr-d}_5$ ; 100 MHz)

Átomo	Tipo	$\delta_{\text{C}}$ octadecan-1-ol <sup>a</sup>	$\delta_{\text{C}}$ S6
$\alpha$	$\text{CH}_2$	63,10	60,58
$\beta$	$\text{CH}_2$	32,85	31,97
$\delta$	$\text{CH}_2$	31,92	30,55
n (22-32 $\text{CH}_2$ )	$\text{CH}_2$	29,65	28,37
$\varphi$	$\text{CH}_2$	29,34	28,01
$\chi$	$\text{CH}_2$	25,75	24,82
$\psi$	$\text{CH}_2$	22,67	21,34
$\omega$	$\text{CH}_3$	14,07	12,77

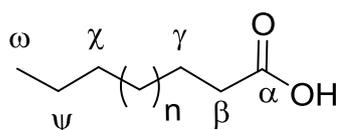
<sup>a</sup>octadecan-1-ol (IWASAKI et al., 2010),  $\text{CDCl}_3$ .

Tabela 4. Picos observados no espectro de APCI-MS para S6

Fórmula molecular	Massa exata (Da) <sup>a</sup>	Massa observada ( $m/z$ ) <sup>b</sup>	Intensidade Relativa (%)
$\text{C}_{29}\text{H}_{59}\text{OH}$	407,4611	407,4664	46,3
$\text{C}_{30}\text{H}_{61}\text{OH}$	421,4768	421,4780	56,8
$\text{C}_{31}\text{H}_{63}\text{OH}$	435,4924	435,4931	41,9
$\text{C}_{32}\text{H}_{65}\text{OH}$	449,5081	449,5031	100,0
$\text{C}_{33}\text{H}_{67}\text{OH}$	463,5237	463,5287	48,7
$\text{C}_{34}\text{H}_{69}\text{OH}$	477,5394	477,5371	26,2
$\text{C}_{37}\text{H}_{75}\text{OH}$	519,5863	519,5834	42,4
$\text{C}_{39}\text{H}_{79}\text{OH}$	547,6176	547,6143	34,8

<sup>a</sup>Calculada a partir do íon  $[\text{M}+\text{H}-\text{H}_2\text{O}]^+$ ; <sup>b</sup> Modo positivo.

## 2.1.3 – S13: Mistura de ácidos graxos



No espectro na região do IV (**Apêndice CA**, pg. 99) observaram-se duas bandas características de ácidos graxos; uma banda alargada e fraca de  $3400\text{-}2700\text{ cm}^{-1}$  e outra em  $1699\text{ cm}^{-1}$ , sendo atribuídas ao estiramento da ligação do grupo hidroxila e da ligação carbonila do grupo carboxila, respectivamente. No espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (**Apêndice CB**, pg. 100) observa-se um tripleto em  $\delta_{\text{H}}$  2,35 ( $J$  7,5 Hz, 2H) relacionado aos hidrogênios ligados ao carbono  $\beta$  ( $\delta_{\text{C}}$  34,13). O sinal relativo ao carbono da carboxila apresentou deslocamento no espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (**Apêndice CC**, pg. 100) em  $\delta_{\text{C}}$  180,41. As atribuições dos deslocamentos químicos para os átomos de carbono se encontram na **Tabela 5** (pg. 32). Foi observado somente um sinal de metila no subespectro DEPT-135 (**Apêndice CD**, pg. 100),

sugerindo a ausência de ramificações na cadeia alifática de **S13**. A determinação da mistura de ácidos graxos foi realizada a partir da análise do espectro de APCI-MS (**Apêndice CE**, pg. 101). Foram observados dois picos atribuídos aos ácidos palmítico ( $C_{16}H_{32}O_2$ ) e esteárico ( $C_{18}H_{36}O_2$ ). Os dados da análise do espectro de APCI-MS (**Tabela 6**) mostraram que **S13** é composto majoritariamente pela mistura de ácido palmítico ( $C_{16}H_{32}O_2$ ) e oleico ( $C_{18}H_{36}O_2$ ).

**Tabela 5. Atribuição e deslocamentos químicos dos sinais de RMN de  $^{13}C$  para S13 ( $CDCl_3$ ; 100 MHz)**

Átomo	Tipo	$\delta_c$ (COUPERUS et al., 1978) <sup>a</sup>	$\delta_c$ S13
$\alpha$	C	180,66	180,41
$\beta$	CH <sub>2</sub>	34,22	34,13
$\delta$	CH <sub>2</sub>	32,03	31,96
n (10 ou 12 CH <sub>2</sub> )	CH <sub>2</sub>	29,17-29,77	29,09-29,72
$\chi$	CH <sub>2</sub>	24,76	24,70
$\psi$	CH <sub>2</sub>	22,76	22,72
$\omega$	CH <sub>3</sub>	14,12	14,14

<sup>a</sup> $CDCl_3$ .

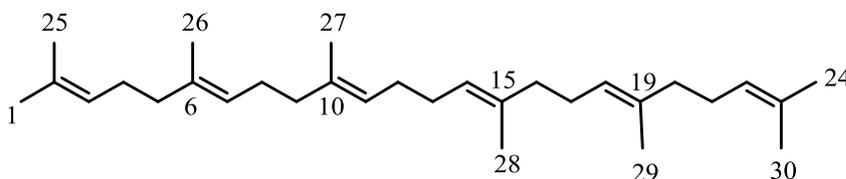
**Tabela 6. Picos observados no espectro de APCI-MS para S13**

Fórmula molecular	Massa exata (Da) <sup>a</sup>	Massa observada (m/z) <sup>b</sup>	Intensidade Relativa (%)
$C_{16}H_{32}O_2$	255,2330	255,2327	100,0
$C_{18}H_{36}O_2$	283,2643	283,2633	79,7

<sup>a</sup>Calculada a partir do íon  $[M-H]^-$ ; <sup>b</sup>Modo negativo.

## 2.2 – Isoprenoides acíclicos

### 2.2.1 – S2: Esqualeno



Observaram-se duas bandas de maior intensidade no espectro na região do IV (**Apêndice DA**, pg. 101) em 1443 e 1377  $cm^{-1}$ , relativas à deformação angular simétrica e assimétrica de grupos metila (BARBOSA, 2007). No espectro de RMN de  $^1H$  (**Apêndice DB**, pg. 101), os sinais entre  $\delta_H$  5,08-5,15 foram atribuídos aos hidrogênios olefínicos,  $\delta_H$  1,95-2,11 aos hidrogênios metilênicos e dois simpletos em

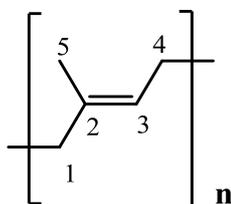
$\delta_H$  1,60 e 1,68 foram relacionados aos hidrogênios metílicos. O espectro de APCI-MS (Apêndice DE, pg. 102) apresentou um pico em  $m/z$  411,3920  $[M+H]^+$  (calc. 411,3986), e foram identificados apenas 15 sinais no espectro de RMN de  $^{13}C$  (Apêndice DC, pg. 102), e 12 sinais no subespectro DEPT-135 (Apêndice DD, pg. 102). Tais observações evidenciam a simetria da estrutura química de **S2** e confirmam o composto como sendo o esqualeno. As atribuições dos sinais observados para os átomos de carbono de **S2** estão apresentadas na Tabela 7.

Tabela 7. Atribuição e deslocamentos químicos dos sinais de RMN de  $^{13}C$  para **S2** ( $CDCl_3$ ; 100 MHz)

Átomo	Tipo	$\delta_c$ (POGLIANI et al., 1994) <sup>a</sup>	$\delta_c$ <b>S2</b>
1 e 30	CH <sub>3</sub>	25,63	25,71
2 e 23	C	131,01	131,26
3 e 22	CH	124,34	124,31
4 e 21	CH <sub>2</sub>	26,79	26,77
5 e 20	CH <sub>2</sub>	39,76	39,76
6 e 19	C	134,94	135,11
7 e 18	CH	124,30	124,28
8 e 17	CH <sub>2</sub>	26,66	26,66
9 e 16	CH <sub>2</sub>	39,74	39,74
10 e 15	C	134,74	134,90
11 e 14	CH	125,45	124,41
12 e 13	CH <sub>2</sub>	28,28	28,28
24 e 25	CH <sub>3</sub>	17,60	17,69
26 e 29	CH <sub>3</sub>	15,93	16,01
27 e 28	CH <sub>3</sub>	15,98	16,05

<sup>a</sup> $CDCl_3$ .

### 2.2.2 – **S14**: Gutta-percha



Duas bandas de maior intensidade em 1445 e 1381  $cm^{-1}$  foram observadas no espectro na região do IV (Apêndice EA, pg. 103), e foram relacionadas à deformação angular simétrica e assimétrica de grupos metila. No espectro de RMN de  $^1H$  (Apêndice EB, pg. 103) observaram-se um tripleto em  $\delta_H$  5,12 ( $J$  6,4 Hz, 1H) atribuído a hidrogênio olefínico, dois multipletos em  $\delta_H$  1,96-2,00 e 2,04-2,08 associados aos hidrogênios metilênicos ligados aos carbonos 1 e 4, e um simpleto

em  $\delta_H$  1,60 relativo aos hidrogênios metílicos. Cinco sinais foram observados no espectro de RMN de  $^{13}C$  (**Apêndice EC**, pg. 103) e quatro sinais no subespectro de DEPT-135 (**Apêndice ED**, pg. 104). A comparação com dados da literatura permitiram a identificação de **S14** como sendo *gutta-percha*. As atribuições dos sinais de  $^{13}C$  para **S14** estão descritas na **Tabela 8**.

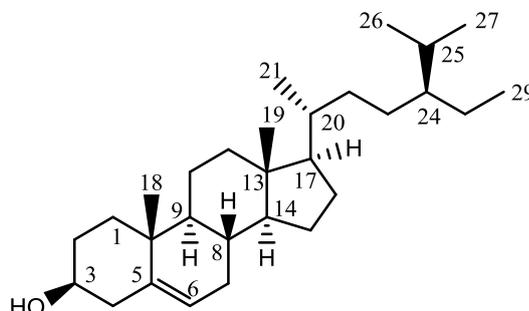
**Tabela 8. Atribuição e deslocamentos químicos dos sinais de RMN de  $^{13}C$  para S14 (CDCl<sub>3</sub>; 100 MHz)**

Átomo	Tipo	$\delta_C$ (SHAHAB; BASHEER, 1979) <sup>a</sup>	$\delta_C$ S14
1	CH <sub>2</sub>	40,20	39,76
2	C	134,90	134,95
3	CH	124,80	124,26
4	CH <sub>2</sub>	27,20	26,74
5	CH <sub>3</sub>	16,10	16,04

<sup>a</sup>CDCl<sub>3</sub>.

## 2.3 – Esteroide

### 2.3.1 – **S7**: $\beta$ -Sitosterol



No espectro de RMN de  $^1H$  (**Apêndice FA**, pg. 104) observaram-se dois multipletos centrados em  $\delta_H$  3,53 (1H) e  $\delta_H$  5,34 (1H) respectivamente atribuídos aos átomos de hidrogênio carbinólico e olefínico. A partir da análise do espectro de RMN de  $^{13}C$  (**Apêndice FB**, pg. 104), o sinal em  $\delta_C$  71,84 foi associado ao carbono carbinólico. Os sinais para os carbonos olefínicos apresentaram deslocamentos  $\delta_C$  140,79 e  $\delta_C$  121,73, e após a análise do subespectro DEPT-135 (**Apêndice FC**, pg. 105), observou-se que o sinal em  $\delta_C$  121,73 foi relacionado ao carbono na posição 6 e, devido a ausência do sinal em  $\delta_C$  140,79 no subespectro de DEPT-135, este sinal foi atribuído ao carbono não hydrogenado na posição 5. Os dados foram comparados com a literatura e **S7** foi identificado como  $\beta$ -sitosterol. A atribuição completa de todos os sinais de carbono está apresentada na **Tabela 9** (pg. 35).

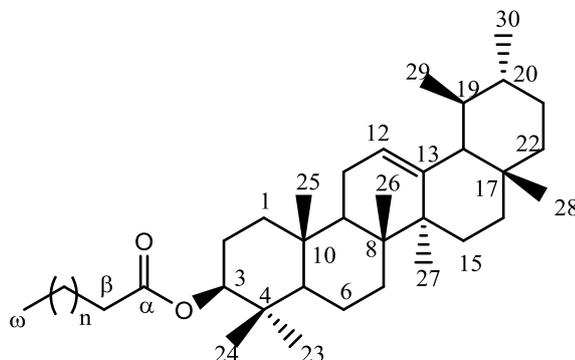
Tabela 9. Atribuição e deslocamentos químicos dos sinais de RMN de  $^{13}\text{C}$  para S7 ( $\text{CDCl}_3$ ; 100 MHz)

Átomo	Tipo	$\delta_{\text{C}}$ (DE-EKNAMKUL; POTDUANG, 2003) <sup>a</sup>	$\delta_{\text{C}}$ S7
1	CH <sub>2</sub>	37,22	37,29
2	CH <sub>2</sub>	31,63	31,68
3	CH	71,80	71,84
4	CH <sub>2</sub>	42,19	42,32
5	C	140,72	140,79
6	CH	121,71	121,73
7	CH <sub>2</sub>	31,87	31,94
8	CH	31,87	31,92
9	CH	50,10	50,18
10	C	36,48	36,54
11	CH <sub>2</sub>	21,07	21,12
12	CH <sub>2</sub>	39,74	39,82
13	C	42,26	42,35
14	CH	56,73	56,81
15	CH <sub>2</sub>	24,29	24,33
16	CH <sub>2</sub>	28,22	28,26
17	CH	56,02	56,11
18	CH <sub>3</sub>	11,84	11,88
19	CH <sub>3</sub>	19,39	19,41
20	CH	36,12	36,17
21	CH <sub>3</sub>	18,76	18,80
22	CH <sub>2</sub>	33,91	33,99
23	CH <sub>2</sub>	26,02	26,15
24	CH	45,81	45,89
25	CH	29,11	29,21
26	CH <sub>3</sub>	19,80	19,83
27	CH <sub>3</sub>	19,01	19,06
28	CH <sub>2</sub>	23,04	23,11
29	CH <sub>3</sub>	11,97	12,00

<sup>a</sup> $\text{CDCl}_3$ .

## 2.4 – Triterpenos pentacíclicos – ursano

### 2.4.1 – **S3**: 3 $\beta$ -Acil-urs-12-eno



Uma banda intensa característica de estiramento da ligação C=O do grupo carbonila foi observada no espectro na região do IV (**Apêndice GA**, pg. 105) em  $1733\text{ cm}^{-1}$  para **S3**. Também se observou uma banda em  $720\text{ cm}^{-1}$  relativa à deformação angular do tipo balanço entre os grupos metileno do composto, indicando presença de cadeia graxa. No espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (**Apêndice GB**, pg. 106), observou-se um tripleto em  $\delta_{\text{H}} 2,29$  ( $J 7,5\text{ Hz}$ , 2H) relativo aos átomos de hidrogênio vizinhos à carbonila de éster. Também foi possível notar dois tripletos aparentes centrados em  $\delta_{\text{H}} 4,51$  associado ao hidrogênio carbinólico na posição 3, e em  $\delta_{\text{H}} 5,12$  associado ao hidrogênio olefínico na posição 12. No espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (**Apêndice GC**, pg. 106) o sinal relacionado ao carbono da carbonila apresentou deslocamento em  $\delta_{\text{C}} 173,69$  e o deslocamento em  $\delta_{\text{C}} 80,59$  foi associado ao carbono carbinólico. Os carbonos olefínicos apresentaram deslocamento em  $\delta_{\text{C}} 139,63$  e  $124,33$ . A partir da análise do subespectro de DEPT-135 (**Apêndice GD**, pg. 106), observou-se que o sinal em  $\delta_{\text{C}} 124,33$  corresponde ao carbono olefínico hidrogenado.

Tabela 10. Atribuição e deslocamentos químicos dos sinais de RMN de  $^{13}\text{C}$  para S3 ( $\text{CDCl}_3$ ; 50 MHz)

Átomo	Tipo	$\delta_{\text{C}}$ (MIRANDA et al., 2006) <sup>a</sup>	$\delta_{\text{C}}$ S3
1	CH <sub>2</sub>	38,51	38,45
2	CH <sub>2</sub>	23,68	23,64
3	CH	80,64	80,59
4	C	37,77	37,75
5	CH	55,32	55,27
6	CH <sub>2</sub>	18,29	18,25
7	CH <sub>2</sub>	32,92	32,87
8	C	40,09	40,03
9	CH	47,69	47,64
10	C	36,85	36,80
11	CH <sub>2</sub>	23,41	23,38
12	CH	124,38	124,33
13	C	139,66	139,63
14	C	42,13	42,08
15	CH <sub>2</sub>	26,65	26,61
16	CH <sub>2</sub>	28,14	28,10
17	C	33,78	33,75
18	CH	59,13	59,07
19	CH	39,65	39,62
20	CH	39,70	39,66
21	CH <sub>2</sub>	31,29	31,26
22	CH <sub>2</sub>	41,58	41,54
23	CH <sub>3</sub>	28,13	28,10
24	CH <sub>3</sub>	16,84	16,87
25	CH <sub>3</sub>	15,75	15,74
26	CH <sub>3</sub>	16,91	16,83
27	CH <sub>3</sub>	23,27	23,24
28	CH <sub>3</sub>	28,77	28,76
29	CH <sub>3</sub>	17,52	17,51
30	CH <sub>3</sub>	21,40	21,41
$\alpha$	C	173,68	173,69
$\beta$	CH <sub>2</sub>	34,87	34,87
n (11, 13 ou 15 CH <sub>2</sub> )	CH <sub>2</sub>	29,20 - 29,72	29,19 - 29,72
$\chi$	CH <sub>2</sub>	31,95	31,94
$\psi$	CH <sub>2</sub>	22,70	22,71
$\omega$	CH <sub>3</sub>	14,12	14,13

<sup>a</sup> $\text{CDCl}_3$ .

Os sinais no espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  relativos aos grupos CH<sub>2</sub> da cadeia graxa apresentaram deslocamentos bastante próximos ou idênticos, tornando a determinação do tamanho da cadeia possível somente a partir das análises por APCI-MS. No espectro de APCI-MS no modo positivo (**Apêndice GE**, pg. 107) pôde-se observar a fragmentação da ligação éster, evidenciando somente um pico,

relativo ao cátion do esqueleto triterpênico, em  $m/z$  409,3832 [M-ácido graxo]<sup>+</sup> (calc. 409,3829). A análise do espectro de APCI-MS no modo negativo (**Apêndice GF**, pg. 107) evidenciou a presença de três picos majoritários relativos aos íons [M-triterpeno] e estão apresentados na **Tabela 11**. Estes picos foram associados aos ácidos graxos esterificados e **S3** identificado como sendo uma mistura dos triterpenos **S3-I** (3 $\beta$ -palmitoil-urs-12-eno), **S3-II** (3 $\beta$ -estearoil-urs-12-eno) e **S3-III** (3 $\beta$ -eicosanoil-urs-12-eno). As atribuições para todos os sinais de <sup>13</sup>C observados para **S3** estão descritas na **Tabela 10** (pg. 37).

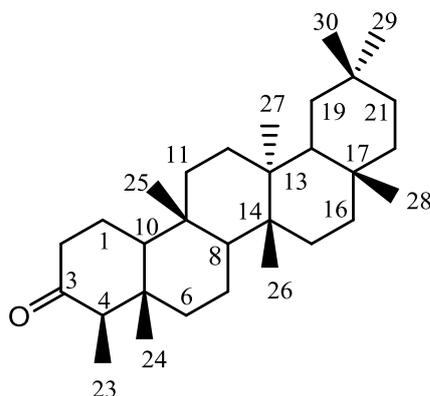
**Tabela 11. Picos observados no espectro de APCI-MS para S3**

Composto	Massa exata (Da) <sup>a</sup>	Massa observada ( $m/z$ ) <sup>b</sup>	Intensidade Relativa (%)
<b>S3-I</b>	255,2329	255,2321	100,0
<b>S3-II</b>	283,2642	283,2611	49,0
<b>S3-III</b>	311,2956	311,2952	16,0

<sup>a</sup>Calculada a partir do íon [M-triterpeno]; <sup>b</sup>Modo negativo.

## 2.5 – Triterpenos pentacíclicos – 3-oxo-friedelanos

Uma observação empírica (“*rule of thumb*”) importante na elucidação estrutural de triterpenos do tipo 3-oxo-friedelanos se aplica na análise do deslocamento de <sup>13</sup>C do grupo metila 23. Os elétrons do sistema  $\pi$  da carbonila na posição 3 promovem uma região de anisotropia magnética (PAVIA et al., 2008). O carbono da metila 23 se encontra na região do cone de proteção gerado pela carbonila e, como consequência, observa-se um valor do deslocamento químico bastante característico para este carbono em torno de  $\delta_C$  7,0. Outra observação importante advém do fato de a metila 23 ser a única ligada a um carbono hidrogenado e, por consequência, o sinal relativo aos hidrogênios da metila devem aparecer no espectro de RMN de <sup>1</sup>H como um duplete com  $J$  próximo a 7 Hz.

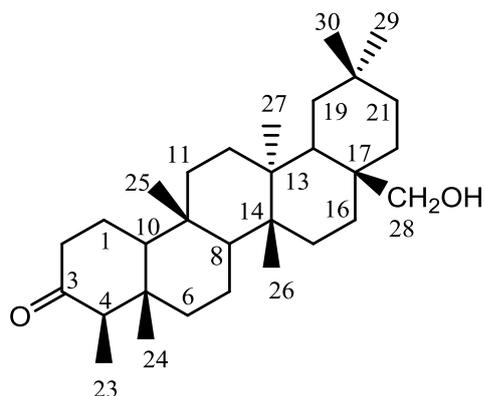
2.5.1 – **S4**: 3-Oxo-friedelano (*friedelina*)

Uma banda característica em  $1713\text{ cm}^{-1}$  foi observada no espectro na região do IV (**Apêndice HA**, pg. 107) relativa ao estiramento do grupo carbonila. O espectro por APCI-MS (**Apêndice HE**, pg. 109) apresentou um pico em  $m/z$  427,3939  $[M+H]^+$  (calc. 427,3935), que foi associado a fórmula molecular  $C_{30}H_{50}O$ . No espectro de RMN de  $^1H$  (**Apêndice HB**, pg. 108), um duplete em  $\delta_H$  0,88 ( $J$  6,7 Hz, 3H) foi associado aos átomos de hidrogênio do grupo metila na posição 23. Sete outros sinais, na forma de simpletos, foram relacionados aos hidrogênios dos grupos metila 24-30 no espectro de RMN em  $\delta_H$  0,72; 0,86; 0,96; 1,00; 1,01; 1,05; 1,18. Observou-se a partir da análise do espectro de RMN de  $^{13}C$  (**Apêndice HC**, pg. 108) que o átomo de carbono da carbonila apresentou deslocamento em  $\delta_C$  213,07, e o carbono 23 apresentou deslocamento em  $\delta_C$  6,79. O subespectro DEPT-135 se encontra no **Apêndice HD** (pg.108). Após a comparação com dados da literatura, **S4** foi identificado como sendo 3-oxo-friedelano. As atribuições para os sinais observados no espectro de RMN de  $^{13}C$  estão apresentados na **Tabela 12** (pg. 40).

Tabela 12. Atribuição e deslocamentos químicos dos sinais de RMN de  $^{13}\text{C}$  para S4 ( $\text{CDCl}_3$  + Pyr-d5; 100 MHz)

Átomo	Tipo	$\delta_{\text{C}}$ (MAHATO; KUNDU, 1994) <sup>a</sup>	$\delta_{\text{C}}$ S4
1	CH <sub>2</sub>	22,30	22,27
2	CH <sub>2</sub>	41,50	41,49
3	C	213,20	213,10
4	CH	58,20	58,14
5	C	42,10	42,11
6	CH <sub>2</sub>	41,30	41,22
7	CH <sub>2</sub>	18,20	18,22
8	CH	53,10	53,05
9	C	37,40	37,41
10	CH	59,40	59,38
11	CH <sub>2</sub>	35,60	35,59
12	CH <sub>2</sub>	30,50	30,49
13	C	39,70	39,68
14	C	38,30	38,27
15	CH <sub>2</sub>	32,40	32,40
16	CH <sub>2</sub>	36,00	36,01
17	C	30,00	29,98
18	CH	42,80	42,79
19	CH <sub>2</sub>	35,30	35,33
20	C	28,10	28,16
21	CH <sub>2</sub>	32,70	32,78
22	CH <sub>2</sub>	39,20	39,24
23	CH <sub>3</sub>	6,80	6,84
24	CH <sub>3</sub>	14,60	14,62
25	CH <sub>3</sub>	17,90	17,92
26	CH <sub>3</sub>	20,20	20,25
27	CH <sub>3</sub>	18,60	18,67
28	CH <sub>3</sub>	32,10	32,09
29	CH <sub>3</sub>	35,00	35,03
30	CH <sub>3</sub>	31,80	31,81

<sup>a</sup> $\text{CDCl}_3$ .

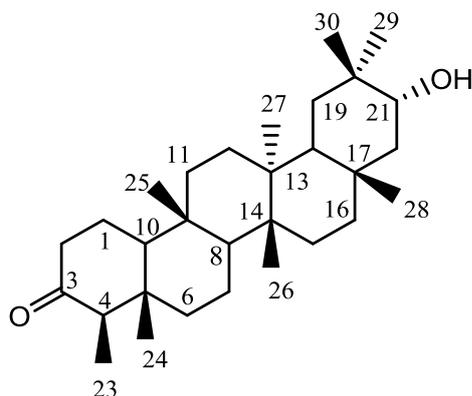
2.5.2 – **S8**: 3-Oxo-28-hidroxifriedelano

Dois picos de maior intensidade relativa foram observados no espectro de APCI-MS (**Apêndice ID**, pg. 110) em  $m/z$  443,3847  $[M+H]^+$  (calc. 443,3886) e  $m/z$  425,3639  $[M+H-H_2O]^+$  (calc. 425,3778). No espectro de RMN de  $^1H$  (**Apêndice IA**, pg. 109) um simpleto aparente em  $\delta_H$  3,64 foi atribuído ao sinal dos hidrogênios na posição 28. A partir da análise de RMN de  $^{13}C$  (**Apêndice IB**, pg. 109) e do subspectro DEPT-135 (**Apêndice IC**, pg. 110), o deslocamento químico em  $\delta_C$  68,05 foi atribuído ao carbono na posição 28. O sinal relacionado ao carbono da carbonila apresentou sinal em  $\delta_C$  213,23 e, como geralmente observado em 3-oxo-friedelanos, o carbono da metila C-23 foi associado ao sinal com deslocamento em  $\delta_C$  6,83. A comparação com dados da literatura permitiu a identificação de **S8** como sendo o 3-oxo-28-hidroxifriedelano. As atribuições para todos os sinais de  $^{13}C$  observados encontram-se na **Tabela 13** (pg. 42).

Tabela 13. Atribuição e deslocamentos químicos dos sinais de RMN de  $^{13}\text{C}$  para S8 ( $\text{CDCl}_3$ ; 50 MHz)

Átomo	Tipo	$\delta_c$ (MAHATO; KUNDU, 1994) <sup>a</sup>	$\delta_c$ S8
1	CH <sub>2</sub>	22,10	22,27
2	CH <sub>2</sub>	41,30	41,51
3	C	212,60	213,23
4	CH	57,80	58,21
5	C	41,90	42,11
6	CH <sub>2</sub>	41,00	41,22
7	CH <sub>2</sub>	18,10	18,23
8	CH	52,20	52,47
9	C	37,30	37,45
10	CH	59,10	59,46
11	CH <sub>2</sub>	35,30	35,43
12	CH <sub>2</sub>	29,90	30,08
13	C	39,10	39,36
14	C	38,00	38,14
15	CH <sub>2</sub>	31,30	31,21
16	CH <sub>2</sub>	29,00	29,13
17	C	35,10	35,15
18	CH	39,20	39,44
19	CH <sub>2</sub>	34,40	34,48
20	C	27,90	28,16
21	CH <sub>2</sub>	31,40	31,37
22	CH <sub>2</sub>	33,20	33,35
23	CH <sub>3</sub>	6,70	6,83
24	CH <sub>3</sub>	14,50	14,66
25	CH <sub>3</sub>	18,00	18,08
26	CH <sub>3</sub>	18,90	19,07
27	CH <sub>3</sub>	19,10	19,20
28	CH <sub>2</sub>	67,00	68,05
29	CH <sub>3</sub>	32,90	32,85
30	CH <sub>3</sub>	34,20	34,26

<sup>a</sup> $\text{CDCl}_3$ .

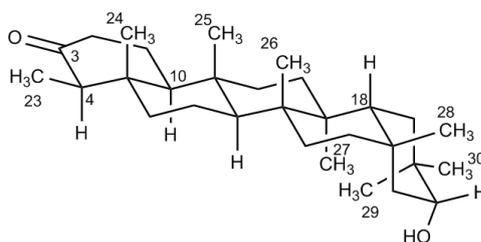
2.5.3 – **S9**: 3-Oxo-21 $\alpha$ -hidroxifriedelano

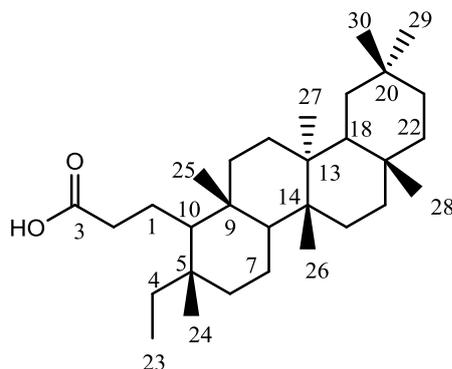
Observaram-se dois picos no espectro de APCI-MS (**Apêndice JD**, pg. 111) relativos aos íons  $[M+H]^+$  em  $m/z$  443,3858 (calc. 443,3886) e  $[M+H-H_2O]^+$   $m/z$  425,3766 (calc. 425,3778). No espectro de RMN de  $^1H$  (**Apêndice JA**, pg. 110) um duplete duplo foi observado em  $\delta_H$  3,70 ( $J$  12,1; 4,2 Hz, 1H) associado ao hidrogênio ligado ao carbono na posição 21. Nos espectros de RMN de  $^{13}C$  (**Apêndice JB**, pg. 111) e DEPT-135 (**Apêndice JC**, pg. 111) observaram-se dois sinais mais desblindados, um com deslocamento em  $\delta_C$  213,42, associado ao carbono da carbonila, e outro em  $\delta_C$  74,54, associado ao carbono 21. Após análise dos espectros em 2D de RMN (HSQC – **Apêndice JE** (pg. 112), HMBC – **Apêndice JF** (pg. 112), COSY – **Apêndice JG** (pg. 113) e NOESY – **Apêndice JH** (pg. 113)) observou-se que os dados espectrais de **S9** relatado por Setzer e colaboradores (2000) para esta mesma substância apresentavam valores de deslocamento químico de  $^{13}C$  para as metilas 25, 26, 29 e 30 atribuídos de forma equivocada. Os dados espectrais corrigidos, obtidos após análise detalhada dos experimentos de RMN 2D, estão apresentados na **Tabela 14** (pg. 44) e o composto **S9** foi identificado como sendo 3-oxo-21 $\alpha$ -hidroxifriedelano.

Tabela 14. Atribuição e deslocamentos químicos dos sinais de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  para S9 ( $\text{CDCl}_3$ ; 400 e 100 MHz)

Átomo	Tipo	$\delta_{\text{C}}$ (SETZER et al., 2000) <sup>a</sup>	$\delta_{\text{C}}$ S9	$\delta_{\text{H}}$	HMBC	COSY	NOESY
1	$\text{CH}_2$	22,30	22,50	1,62 - 1,71 1,93 - 1,99		10	
2	$\text{CH}_2$	41,50	41,70	2,23 - 2,33 2,37 - 2,41	1, 10	1	
3	C	213,20	213,42	-			
4	CH	58,20	58,41	2,20 - 2,28	5, 23, 24	23	10, 23
5	C	42,00	42,28	-			
6	$\text{CH}_2$	41,20	41,44	1,22 - 1,31 1,71 - 1,78			
7	$\text{CH}_2$	18,00	18,47	1,29 - 1,41 1,92 - 1,99			
8	CH	51,50	51,73	1,39 - 1,44			
9	C	37,50	37,70	-			
10	CH	59,50	59,69	1,50 - 1,57			27
11	$\text{CH}_2$	35,30	36,17	1,44 - 1,59 1,61 - 1,66			
12	$\text{CH}_2$	30,20	30,39	1,24 - 1,37			
13	C	39,00	39,22	-			
14	C	38,80	39,02	-			
15	$\text{CH}_2$	30,40	30,61	1,37 - 1,44 1,44 - 1,59			
16	$\text{CH}_2$	36,10	36,30	1,61 - 1,66			
17	C	32,50	32,71	-			
18	CH	44,30	44,53	1,49 - 1,55 1,24 - 1,34			26, 28, 30
19	$\text{CH}_2$	35,90	35,49	1,41 - 1,48			
20	C	34,40	34,57	-			
21	CH	74,30	74,54	3,70; dd; 12,1, 4,2 Hz; $\beta$ (ax)	20, 22, 29, 30	22	22, 30
22	$\text{CH}_2$	47,00	47,19	1,16 - 1,24 $\alpha$ 1,65 - 1,74 $\beta$	21	22	28
23	$\text{CH}_3$	6,80	7,04	0,82 - 0,92	4, 5	4	24
24	$\text{CH}_3$	14,60	14,88	0,72	4, 5, 6, 10		
25 <sup>b</sup>	$\text{CH}_3$	17,70	18,42	0,87	8, 9, 10, 11		26
26 <sup>b</sup>	$\text{CH}_3$	18,20	17,93	0,91	8, 13, 14, 15		
27	$\text{CH}_3$	19,30	19,51	1,11	12, 13, 14, 18		
28	$\text{CH}_3$	33,10	33,34	1,19	16, 17, 18, 22		26
29 <sup>b</sup>	$\text{CH}_3$	31,90	25,12	0,99	19, 21, 30		27
30 <sup>b</sup>	$\text{CH}_3$	24,90	32,10	1,07	19, 21, 29		29

$\text{CDCl}_3$ ; <sup>b</sup>Valores de deslocamento de sinais de RMN de  $^{13}\text{C}$  atribuídos erroneamente na literatura.



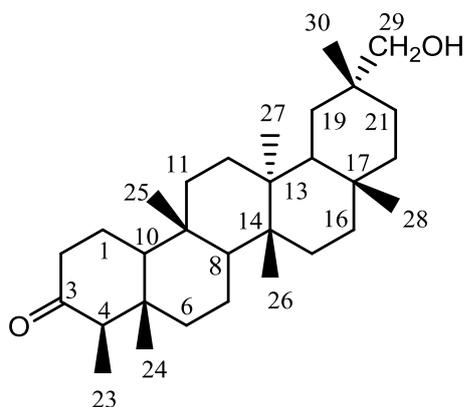
2.5.4 – **S10**: Ácido 3,4-seco-friedelan-3-oico

No espectro na região do IV de **S10** (**Apêndice KA**, pg. 114), observou-se uma banda em  $1701\text{ cm}^{-1}$  que foi associada ao estiramento de ligação do grupo carbonila. Uma banda larga e pouco intensa entre  $3200\text{-}2400\text{ cm}^{-1}$  foi associada ao estiramento de ligação O-H característico de ácidos carboxílicos (BARBOSA, 2007). Nos espectros de APCI-MS foram identificados picos relativos à **S10** tanto no modo positivo ( $m/z\ 427,3910\ [M+H-H_2O]^+$ , calc. 427,3934, **Apêndice KE**, pg. 115) quanto no modo negativo ( $m/z\ 443,3892\ [M-H]^-$ , calc. 443,3894, **Apêndice KF**, pg. 115). No espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (**Apêndice KB**, pg. 114) um tripleto em  $\delta_{\text{H}}\ 2,39$  ( $J\ 8,43\ \text{Hz}$ , 2H) foi associado aos hidrogênios vizinhos à carboxila. Nos espectros de RMN de  $^{13}\text{C}$  (**Apêndice KC**, pg. 115) e DEPT-135 (**Apêndice KD**, pg. 115) observou-se um sinal em  $\delta_{\text{C}}\ 178,43$  associado ao carbono da carboxila e um sinal em  $\delta_{\text{C}}\ 7,60$  atribuído ao carbono da metila C-23. As atribuições completas para os deslocamentos observados no RMN de  $^{13}\text{C}$  estão apresentadas na **Tabela 15** (pg. 46) e foram comparadas com dados da literatura, que permitiram a identificação de **S10** como sendo o ácido 3,4-seco-friedelan-3-oico.

Tabela 15. Atribuição e deslocamentos químicos dos sinais de RMN de  $^{13}\text{C}$  para S10 ( $\text{CDCl}_3$ ; 100 MHz)

Átomo	Tipo	$\delta_{\text{C}}$ (VIEIRA-FILHO et al., 2001) <sup>a</sup>	$\delta_{\text{C}}$ S10
1	CH <sub>2</sub>	21,15	21,08
2	CH <sub>2</sub>	37,24	37,29
3	C	177,78	178,43
4	CH <sub>2</sub>	36,18	36,10
5	C	37,90	37,84
6	CH <sub>2</sub>	39,05	38,95
7	CH <sub>2</sub>	18,16	18,11
8	CH	53,07	53,00
9	C	39,14	39,07
10	CH	59,89	59,82
11	CH <sub>2</sub>	35,28	35,19
12	CH <sub>2</sub>	30,27	30,22
13	C	39,70	39,64
14	C	38,40	38,33
15	CH <sub>2</sub>	32,38	32,29
16	CH <sub>2</sub>	36,15	36,07
17	C	30,07	30,02
18	CH	42,97	42,85
19	CH <sub>2</sub>	35,39	35,32
20	C	28,20	28,17
21	CH <sub>2</sub>	32,95	32,86
22	CH <sub>2</sub>	39,34	39,30
23	CH <sub>3</sub>	7,60	7,60
24	CH <sub>3</sub>	19,50	19,39
25	CH <sub>3</sub>	17,96	17,94
26	CH <sub>3</sub>	20,16	20,16
27	CH <sub>3</sub>	18,74	18,76
28	CH <sub>3</sub>	32,16	32,12
29	CH <sub>3</sub>	34,98	34,98
30	CH <sub>3</sub>	31,88	31,85

<sup>a</sup> $\text{CDCl}_3$ .

2.5.5 – **S11**: 3-Oxo-29-hidroxifriedelano

Duas bandas características foram observadas no espectro na região do IV para **S11** (**Apêndice LA**, pg. 116), uma larga e de baixa intensidade em  $3508\text{ cm}^{-1}$ , relativa ao estiramento de ligação O-H do grupo hidroxila, e outra fina e bastante intensa em  $1704\text{ cm}^{-1}$  associada ao estiramento de ligação do grupo carbonila. A análise do espectro de APCI-MS no modo positivo (**Apêndice LE**, pg. 117) evidenciou dois picos relativos aos íons  $[M+H]^+$  ( $m/z$  443,3836, calc. 443,3884) e  $[M+H-H_2O]^+$  ( $m/z$  425,3737, calc. 425,3778). No espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (**Apêndice LB**, pg. 116), foram observados dois dupletos em  $\delta_{\text{H}}$  3,24 ( $J$  10,4 Hz, 1H) e  $\delta_{\text{H}}$  3,30 ( $J$  10,5 Hz, 1H) associados aos hidrogênios em 29. Os hidrogênios na posição 29 são vizinhos a um centro estereogênico, portanto estes são classificados como diastereotópicos. Átomos diastereotópicos não são quimicamente e nem magneticamente equivalentes. O alto valor de  $J$  advém do acoplamento geminal entre estes átomos, que geralmente apresentam valores acima de 10 Hz (PAVIA et al., 2008). O sinal relativo ao carbono da carbonila foi observado em  $\delta_{\text{C}}$  213,29 no espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (**Apêndice LC**, pg. 117), e o sinal em  $\delta_{\text{C}}$  74,74, relativo a um grupo metileno no espectro de DEPT-135 (**Apêndice LD**, pg. 117), foi associado ao carbono 29. Após comparação com dados da literatura, **S11** foi identificado como sendo 3-oxo-29-hidroxifriedelano. As atribuições de todos os sinais de  $^{13}\text{C}$  observados estão descritos na **Tabela 16** (pg. 48).

Tabela 16. Atribuição e deslocamentos químicos dos sinais de RMN de  $^{13}\text{C}$  para S11 ( $\text{CDCl}_3$ ; 50 MHz)

Átomo	Tipo	$\delta_{\text{C}}$ (MAHATO; KUNDU, 1994) <sup>a</sup>	$\delta_{\text{C}}$ S11
1	CH <sub>2</sub>	22,30	22,28
2	CH <sub>2</sub>	41,60	41,51
3	C	212,20	213,29
4	CH	58,30	58,20
5	C	42,20	42,15
6	CH <sub>2</sub>	41,40	41,26
7	CH <sub>2</sub>	18,30	18,22
8	CH	53,50	53,38
9	C	37,50	37,41
10	CH	59,60	59,43
11	CH <sub>2</sub>	35,70	35,62
12	CH <sub>2</sub>	29,80	29,74
13	C	40,00	39,93
14	C	38,30	38,22
15	CH <sub>2</sub>	32,80	32,71
16	CH <sub>2</sub>	36,00	35,85
17	C	29,80	30,50
18	CH	42,00	41,83
19	CH <sub>2</sub>	30,60	30,57
20	C	33,20	33,10
21	CH <sub>2</sub>	27,90	27,77
22	CH <sub>2</sub>	39,60	39,49
23	CH <sub>3</sub>	6,80	6,83
24	CH <sub>3</sub>	14,70	14,65
25	CH <sub>3</sub>	17,90	17,87
26	CH <sub>3</sub>	18,40	18,45
27	CH <sub>3</sub>	20,80	20,76
28	CH <sub>3</sub>	32,10	32,07
29	CH <sub>2</sub>	74,80	74,74
30	CH <sub>3</sub>	25,90	25,81

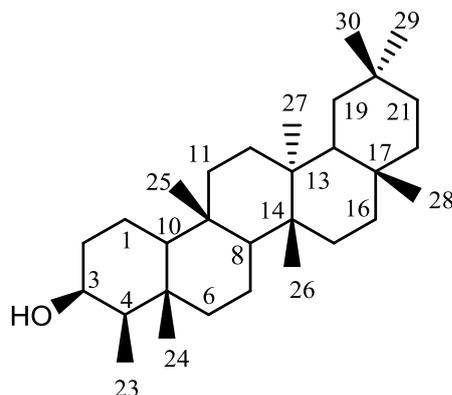
<sup>a</sup> $\text{CDCl}_3$ .

## 2.6 – Triterpenos pentacíclicos - 3 $\beta$ -hidroxifriedelanos

A “*rule of thumb*” para os 3 $\beta$ -hidroxifriedelanos consiste na análise de alguns sinais tanto no espectro de RMN de  $^1\text{H}$ , quanto no de  $^{13}\text{C}$ . O hidrogênio carbinólico em 3 $\alpha$  se encontra em posição equatorial no anel, portanto os ângulos diedro entre este hidrogênio e os hidrogênios em 2 e 4 são de aproximadamente 60°. A partir da equação de Karplus (KARPLUS, 1963), os acoplamentos esperados entre o hidrogênio 3 $\alpha$  e seus vizinhos devem apresentar valores entre 2-6 Hz, gerando um

multiplete alargado e geralmente centrado entre  $\delta_H$  3,5 e 4,0. Para os hidrogênios da metila 23, também é observado um duplete com  $J$  próximo a 7 Hz e no espectro de RMN de  $^{13}C$ , o deslocamento observado para C-23 é em torno de  $\delta_C$  12,0.

### 2.6.1 – S5: 3 $\beta$ -Hidroxifriedelano (friedelinol)

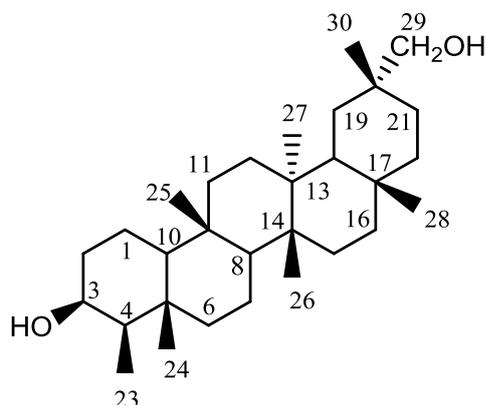


Uma banda de baixa intensidade em  $3456\text{ cm}^{-1}$  foi observada no espectro na região do IV (**Apêndice MA**, pg. 118) e foi associada ao estiramento da ligação O-H. Um pico relativo ao íon  $[M+H-H_2O]^+$  ( $m/z$  411,3979, calc. 411,3986) foi identificado a partir da análise do espectro de APCI-MS (**Apêndice ME**, pg. 119) para **S5**. No espectro de RMN de  $^1H$  (**Apêndice MB**, pg. 118), o sinal relativo ao hidrogênio em 3 apresentou deslocamento em  $\delta_H$  3,96 (m, 1H). No espectro de RMN de  $^{13}C$  (**Apêndice MC**, pg. 119) o sinal associado ao carbono carbinólico apresentou sinal em  $\delta_C$  72,15. O subespectro DEPT-135 (**Apêndice MD**, pg. 119) foi utilizado para classificar os carbonos como sendo C, CH,  $CH_2$  ou  $CH_3$ . Após a análise destes dados e comparação com a literatura, **S5** foi identificado como sendo 3 $\beta$ -hidroxifriedelano. As atribuições para os sinais de  $^{13}C$  observados estão apresentados na **Tabela 17** (pg. 50).

Tabela 17. Atribuição e deslocamentos químicos dos sinais de RMN de  $^{13}\text{C}$  para S5 ( $\text{CDCl}_3 + \text{Pyr-d}_5$ ; 50 MHz)

Átomo	Tipo	$\delta_{\text{C}}$ (SALAZAR et al., 2000) <sup>a</sup>	$\delta_{\text{C}}$ S5
1	CH <sub>2</sub>	16,16	15,95
2	CH <sub>2</sub>	36,14	36,08
3	CH	71,59	72,15
4	CH	49,62	49,37
5	C	38,09	37,92
6	CH <sub>2</sub>	41,99	41,82
7	CH <sub>2</sub>	17,69	17,60
8	CH	53,27	53,21
9	C	37,18	37,11
10	CH	61,65	61,47
11	CH <sub>2</sub>	35,66	35,47
12	CH <sub>2</sub>	30,69	30,65
13	C	38,38	38,36
14	C	39,69	39,67
15	CH <sub>2</sub>	32,34	32,32
16	CH <sub>2</sub>	35,90	35,58
17	C	30,02	30,01
18	CH	42,88	42,81
19	CH <sub>2</sub>	35,36	35,33
20	C	28,17	28,16
21	CH <sub>2</sub>	32,88	32,80
22	CH <sub>2</sub>	39,28	39,27
23	CH <sub>3</sub>	12,09	11,83
24	CH <sub>3</sub>	16,58	16,45
25	CH <sub>3</sub>	18,35	18,28
26	CH <sub>3</sub>	20,13	20,12
27	CH <sub>3</sub>	18,69	18,67
28	CH <sub>3</sub>	32,12	32,09
29	CH <sub>3</sub>	35,02	35,03
30	CH <sub>3</sub>	31,85	31,81

<sup>a</sup> $\text{CDCl}_3$ .

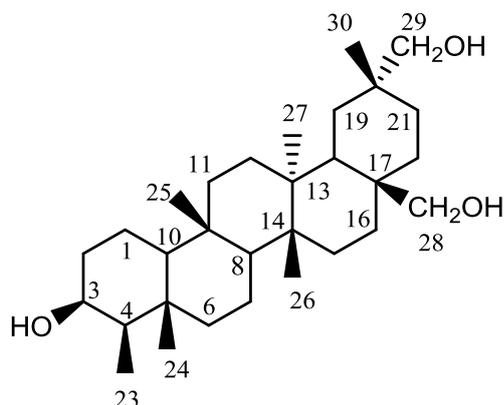
2.6.2 – **S12**: 3 $\beta$ ,29-Di-hidroxifriedelano

Uma banda de média intensidade e bastante alargada em  $3404\text{ cm}^{-1}$  foi identificada e relacionada como sendo relativa ao estiramento da ligação O-H das hidroxilas nas posições 3 $\beta$  e 29 no espectro na região do IV (**Apêndice NA**, pg. 120). No espectro de APCI-MS (**Apêndice NE**, pg. 121) um pico em  $m/z$  427,3960 (calc. 427,3934) foi associado ao íon  $[M+H-H_2O]^+$ . Observou-se no espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (**Apêndice NB**, pg. 120) um sinal  $\delta_{\text{H}}$  3,74 (m, 1H) atribuído ao hidrogênio na posição 3. Os hidrogênios metilênicos em 29 apresentaram sinais em  $\delta_{\text{H}}$  3,24 (d, 10,3 Hz, 1H) e 3,28 (d, 10,4 Hz, 1H), semelhantes aos sinais observados para o composto **S11**. A partir da análise do espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (**Apêndice NC**, pg. 121) e do subespectro DEPT-135 (**Apêndice ND**, pg. 121) observaram-se dois sinais relativos aos carbonos ligados à hidroxila. O sinal em  $\delta_{\text{C}}$  75,01, corresponde a um grupo  $\text{CH}_2$  que foi associado ao carbono C-29, e em  $\delta_{\text{C}}$  72,96, corresponde a um grupo CH que foi atribuído ao carbono C-3. Após comparação com a literatura, **S12** foi identificado como sendo 3 $\beta$ ,29-di-hidroxifriedelano. As atribuições completas para os sinais de  $^{13}\text{C}$  observados estão na **Tabela 18** (pg. 52).

Tabela 18. Atribuição e deslocamentos químicos dos sinais de RMN de  $^{13}\text{C}$  para S12 ( $\text{CDCl}_3$ ; 100 MHz)

Átomo	Tipo	$\delta_{\text{C}}$ (DUARTE, 2000) <sup>a</sup>	$\delta_{\text{C}}$ S12
1	CH <sub>2</sub>	16,07	15,99
2	CH <sub>2</sub>	35,64	35,38
3	CH	71,76	72,96
4	CH	49,54	49,36
5	C	38,04	38,05
6	CH <sub>2</sub>	41,91	41,90
7	CH <sub>2</sub>	17,64	17,75
8	CH	53,56	53,69
9	C	37,12	37,28
10	CH	61,55	61,52
11	CH <sub>2</sub>	35,73	35,76
12	CH <sub>2</sub>	30,72	30,93
13	C	39,94	40,12
14	C	38,30	38,50
15	CH <sub>2</sub>	32,73	32,83
16	CH <sub>2</sub>	36,04	36,13
17	C	30,56	30,75
18	CH	41,98	42,05
19	CH <sub>2</sub>	30,08	29,95
20	C	33,29	33,33
21	CH <sub>2</sub>	27,98	28,00
22	CH <sub>2</sub>	39,78	39,72
23	CH <sub>3</sub>	11,99	11,84
24	CH <sub>3</sub>	16,51	16,60
25	CH <sub>3</sub>	18,24	18,38
26	CH <sub>3</sub>	20,68	20,83
27	CH <sub>3</sub>	18,44	18,66
28	CH <sub>3</sub>	32,13	32,28
29	CH <sub>2</sub>	74,25	75,01
30	CH <sub>3</sub>	26,14	26,01

<sup>a</sup> $\text{CDCl}_3$  + Pyr-d<sub>5</sub>.

2.6.3 – **S15**: 3 $\beta$ ,28,29-Tri-hidroxifriedelano

O composto inédito **S15** foi isolado como um sólido branco não cristalino e sua temperatura de fusão não foi determinada, pois degradou-se a 244,0 °C. Uma banda larga e de média intensidade em 3385 cm<sup>-1</sup> foi observada no espectro na região do IV (**Apêndice OA**, pg. 122) e relacionada ao estiramento da ligação O-H. Observaram-se no espectro de RMN de <sup>1</sup>H (**Apêndice OB**, pg. 122) seis sinais atribuídos aos grupos metilas (**Figura 21**). Um duplete em  $\delta_H$  0,98 ( $J$  7,1 Hz, 3H) foi associado à metila 23. Na região entre  $\delta$  3,00 e  $\delta$  4,00 (**Figura 22** pg. 54), foram observados 5 sinais de hidrogênios geminais a grupos OH e estes foram correlacionados aos sinais de <sup>13</sup>C a partir da análise do mapa de contornos HSQC (**Apêndice OE**, pg. 123):  $\delta_H$  3,33 (d,  $J$  10,3 Hz, 1H) e  $\delta_H$  3,40 (d,  $J$  10,3 Hz, 1H) correlacionados ao sinal em  $\delta_C$  73,81;  $\delta_H$  3,70 (d,  $J$  10,8 Hz, 1H) e  $\delta_H$  3,82 (d,  $J$  10,8 Hz, 1H), correlacionados ao sinal em  $\delta_C$  66,69; e o sinal característico de 3 $\beta$ -hidroxifriedelanos em  $\delta_H$  3,79 (m, 1H) correlacionado ao sinal do carbono em 3 ( $\delta_C$  72,00) . Os espectros de <sup>13</sup>C e DEPT-135 se encontram nos **Apêndices OC** e **OD** (pg. 123) respectivamente.

**Figura 21** – Expansão do espectro de RMN de <sup>1</sup>H (0,75-1,15 ppm) para **S15**

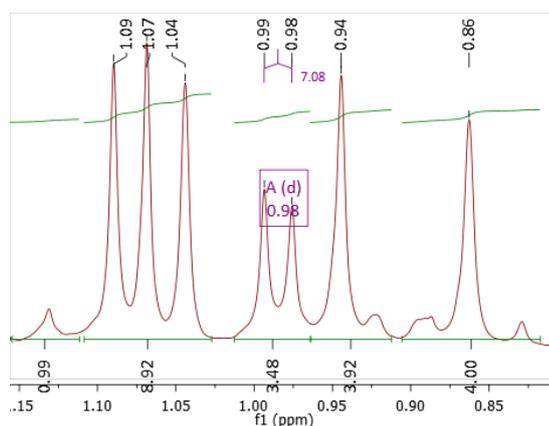
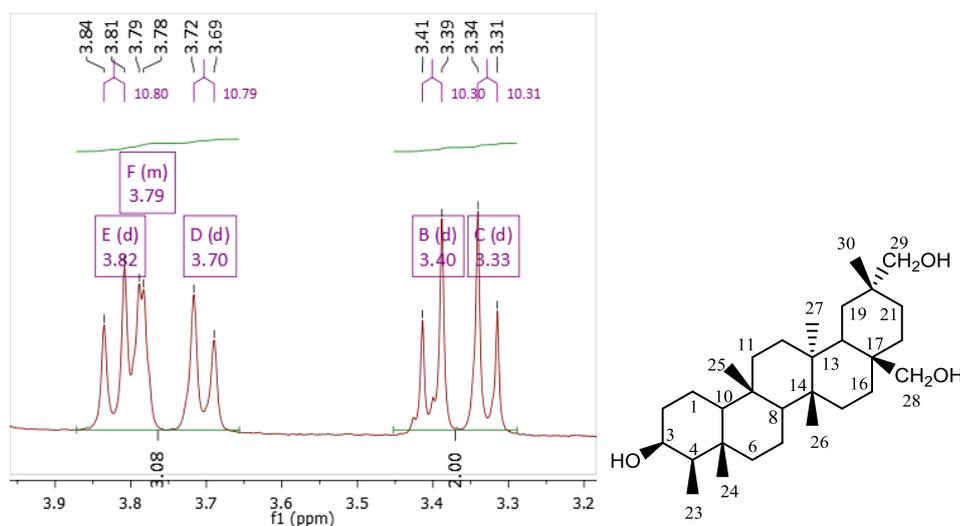
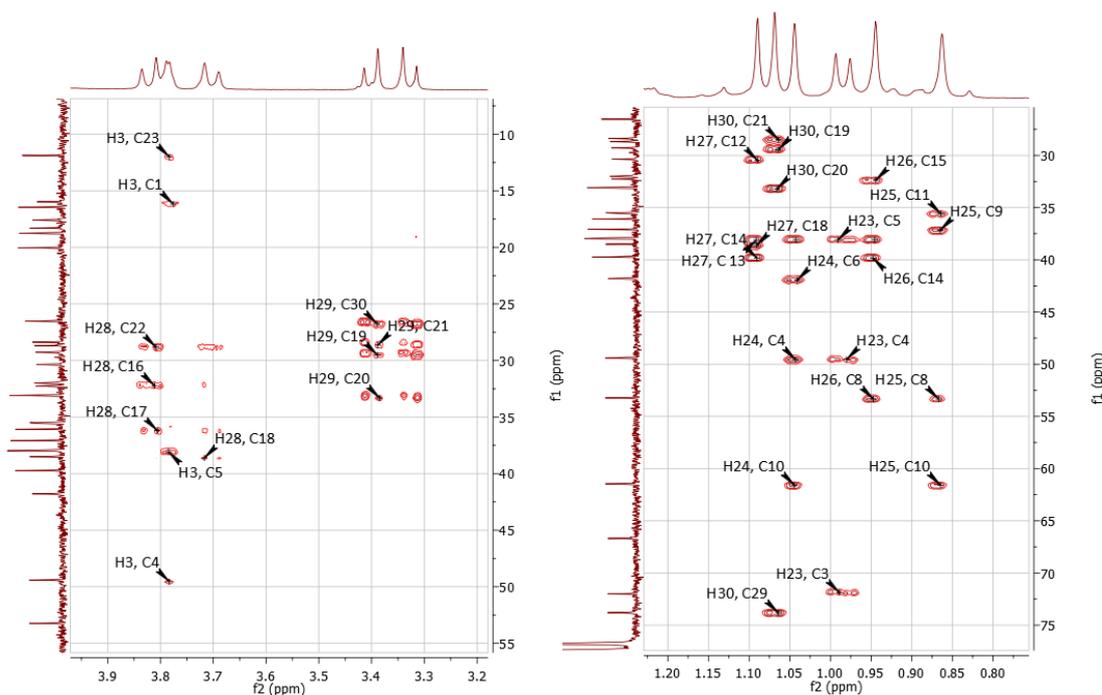


Figura 22 – Expansão do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (3,20-3,95 ppm) para S15

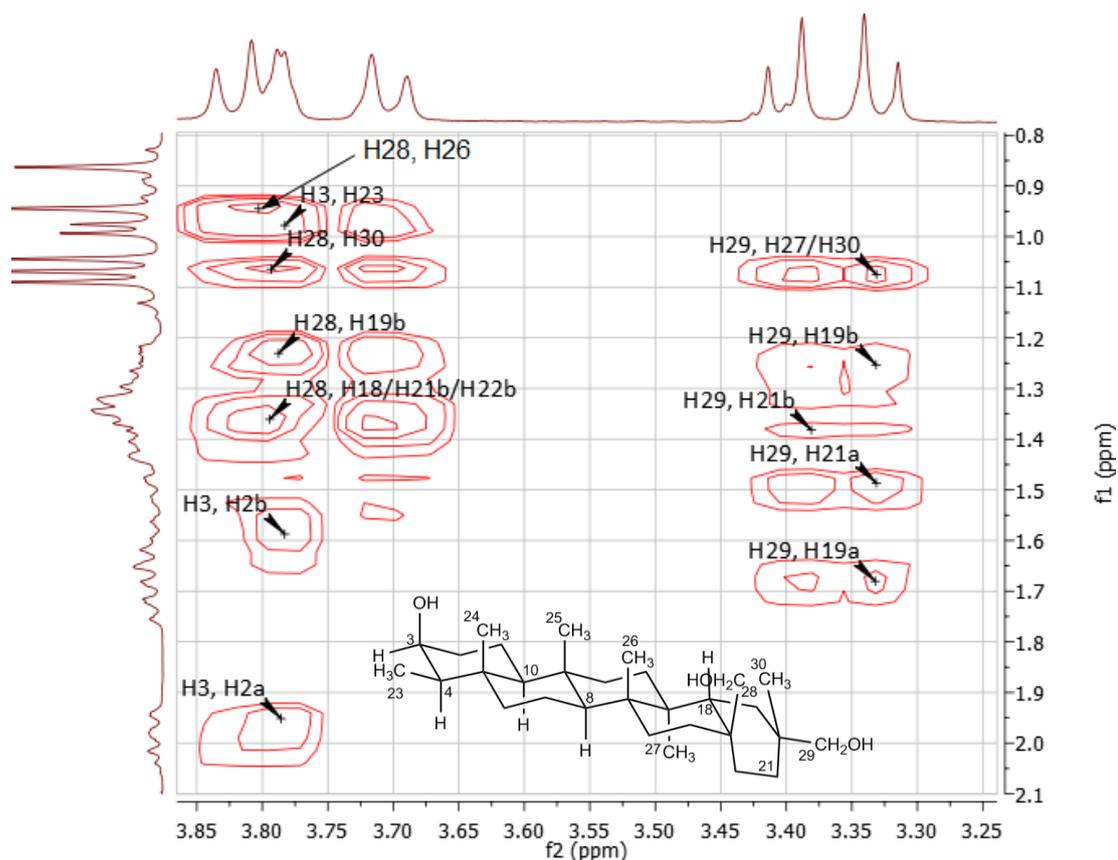
Após a análise das correlações observadas nas expansões do mapa de contornos HMBC nas regiões entre  $\delta$  0,8-1,2 e  $\delta$  3,0-4,0 (**Figura 23**), foi possível identificar os carbonos C-28, associado ao sinal em  $\delta_{\text{C}}$  66,69, e C-29, associado ao sinal em  $\delta_{\text{C}}$  72,00. A atribuição de todos os outros valores de deslocamento químico de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  de **S15** foi realizada após análise minuciosa no mapa de contornos HMBC (**Apêndice OF**, pg. 124).

Figura 23 – Seções expandidas do mapa de contornos HMBC para S15

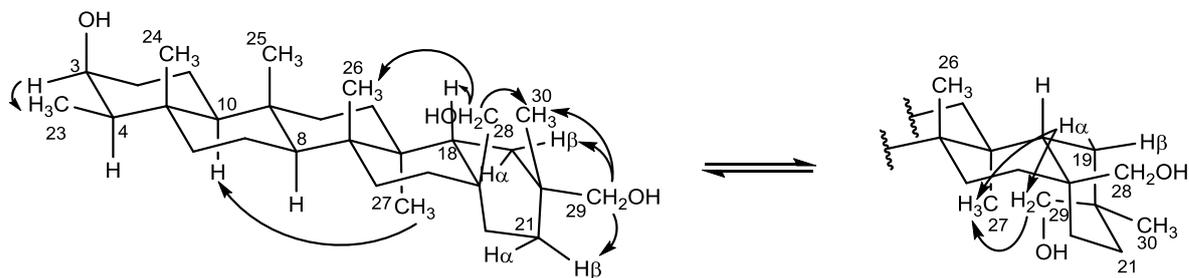


A partir da análise do mapa de contornos NOESY (**Apêndice OH**, pg. 125) foi possível determinar a estereoquímica do composto. Na região entre  $\delta$  3,00 e  $\delta$  4,00 (**Figura 24**), observou-se NOE entre H-29 e H-19 $\alpha$  e  $\beta$ , H-21  $\alpha$  e  $\beta$ , e entre H-29 e H-27. Os sinais de H-28 apresentaram NOE com H-30 e H-18. Tais correlações observadas para H-29 e H-30 sugerem que o anel E está em equilíbrio entre as conformações barco e cadeira, como apresentado na **Figura 25**, pg. 56. Após análise detalhada dos espectros 1D e 2D de RMN, **S15** foi identificado como sendo 3 $\beta$ ,28,29-tri-hidroxifriedelano. A **Tabela 19** (pg. 57) apresenta todas as atribuições realizadas após as análises dos espectros 1D e 2D de RMN.

**Figura 24 – Seção expandida do mapa de contornos NOESY para S15**



**Figura 25 – Principais correlações observadas no mapa de contornos NOESY para S15**



Na análise do espectro de APCI-MS (**Figura 26**), foi identificado um pico de  $m/z$  443,3867 (calc. 443,3884) relativo ao íon  $[M+H-H_2O]^+$ , e outro pico de  $m/z$  425,3786 (calc. 425,3778) relativo ao íon  $[M+H-2H_2O]^+$ , sugerindo que a fórmula molecular proposta para **S15** está de acordo com os dados obtidos por RMN.

**Figura 26 – Espectro de APCI-MS (modo positivo) para S15**

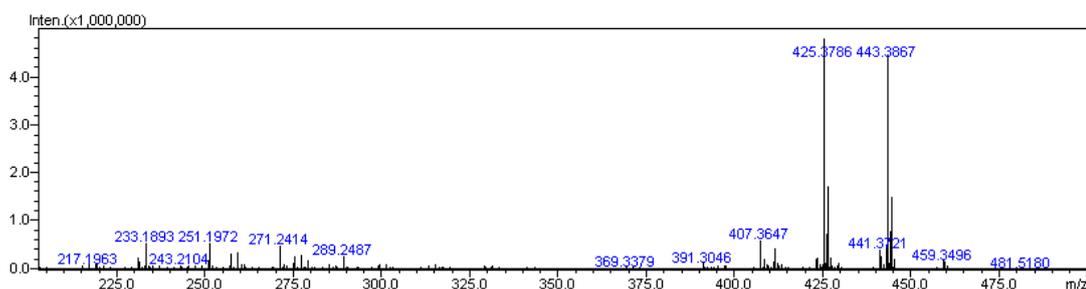
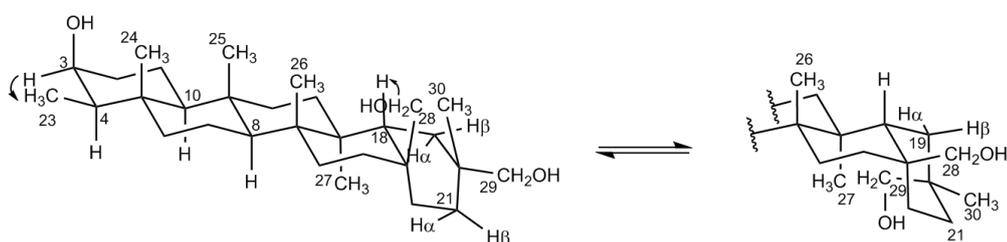
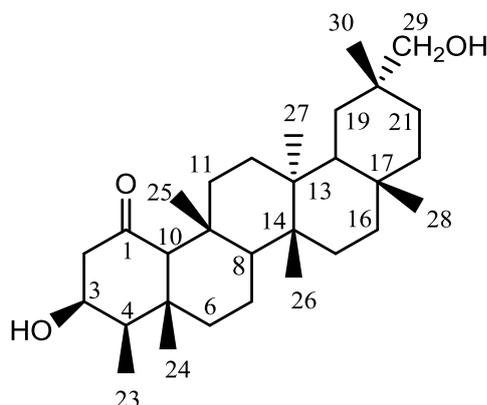


Tabela 19. Atribuição e deslocamentos químicos dos sinais de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  para S15 ( $\text{CDCl}_3$ ; 400 e 100 MHz)

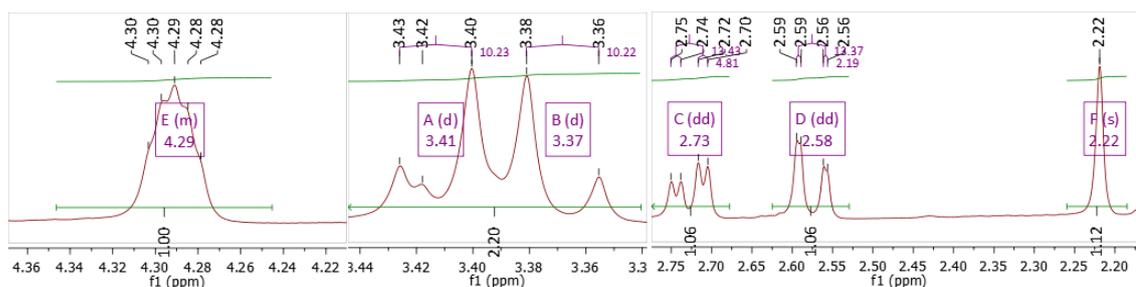
Átomo	Tipo	$\delta_{\text{C}}$ S15 <sup>a</sup>	$\delta_{\text{H}}$	HMBC	COSY	NOESY
1	CH <sub>2</sub>	15,97	1,39 - 1,44 (eq) $\alpha$ 1,62 - 1,68 (ax) $\beta$		1 $\alpha$ , 10	1 $\alpha$ , 25
2	CH <sub>2</sub>	35,54	1,52 - 1,60 (eq) $\beta$ 1,92 - 1,98 (ax) $\alpha$		1 $\alpha$ , 1 $\beta$ , 2 $\beta$	1 $\alpha$ , 1 $\beta$ , 2 $\beta$
3	CH	72,00	3,77 - 3,79 (eq) $\alpha$	1, 4, 5, 23	2 $\alpha$ , 2 $\beta$ , 4	2 $\alpha$ , 2 $\beta$ , 23
4	CH	49,40	1,20 - 1,24		23	6 $\alpha$ , 23
5	C	37,94	-			
6	CH <sub>2</sub>	41,79	0,95 - 1,00 (ax) $\alpha$ 1,72 - 1,77 (eq) $\beta$		6 $\alpha$	23, 24, 25
7	CH <sub>2</sub>	17,75	1,31 - 1,38		6 $\alpha$	25, 26
8	CH	53,23	1,27 - 1,32			
9	C	37,08	-			
10	CH	61,46	0,89 - 0,93			
11	CH <sub>2</sub>	35,49	1,08 - 1,15 1,39 - 1,45		11, 12	
12	CH <sub>2</sub>	30,35	1,29 - 1,36			27
13	C	39,73	-			
14	C	37,98	-			
15	CH <sub>2</sub>	32,26	1,23 - 1,35 (ax) $\alpha$ 1,42 - 1,47 (eq) $\beta$			
16	CH <sub>2</sub>	32,00	1,23 - 1,35 (eq) $\alpha$ 1,60 - 1,65 (ax) $\beta$		15 $\alpha$ , 15 $\beta$ , 16 $\alpha$	16 $\alpha$
17	C	36,08	-			
18	CH	38,50	1,34 - 1,39			
19	CH <sub>2</sub>	29,28	1,20 - 1,27 $\beta$ 1,66 - 1,72 $\alpha$	13, 18, 20, 29, 30	19 $\beta$	19 $\beta$ , 27, 28
20	C	33,09	-			
21	CH <sub>2</sub>	28,37	1,36 - 1,42 $\beta$ 1,47 - 1,52 $\alpha$			
22	CH <sub>2</sub>	28,68	1,26 - 1,35 $\beta$ 1,97 - 2,04 $\alpha$		21 $\alpha$ , 22 $\beta$	30 15 $\alpha$ , 16 $\alpha$
23	CH <sub>3</sub>	11,88	0,98; d; 7,1 Hz	3, 4, 5		
24	CH <sub>3</sub>	16,47	1,04; s	4, 5, 6, 10		
25	CH <sub>3</sub>	18,30	0,86; s	8, 9, 10, 11		
26	CH <sub>3</sub>	20,04	0,94; s	8, 13, 14, 15		
27	CH <sub>3</sub>	18,76	1,09; s	12, 13, 14, 18		10, 29
28	CH <sub>2</sub>	66,69	3,70; d; 10,8 Hz 3,82; d; 10,8 Hz	16, 17, 18, 22		19 $\beta$ , 21 $\beta$ , 22 $\beta$ , 26, 30
29	CH <sub>2</sub>	73,81	3,33; d; 10,3 Hz 3,40; d; 10,3 Hz	19, 20, 21, 30		19 $\alpha$ , 19 $\beta$ , 21 $\alpha$ , 21 $\beta$
30	CH <sub>3</sub>	26,53	1,07; s	19, 20, 21, 29		29



2.6.4 – **S16**: 1-Oxo-3 $\beta$ ,29-di-hidroxifriedelano

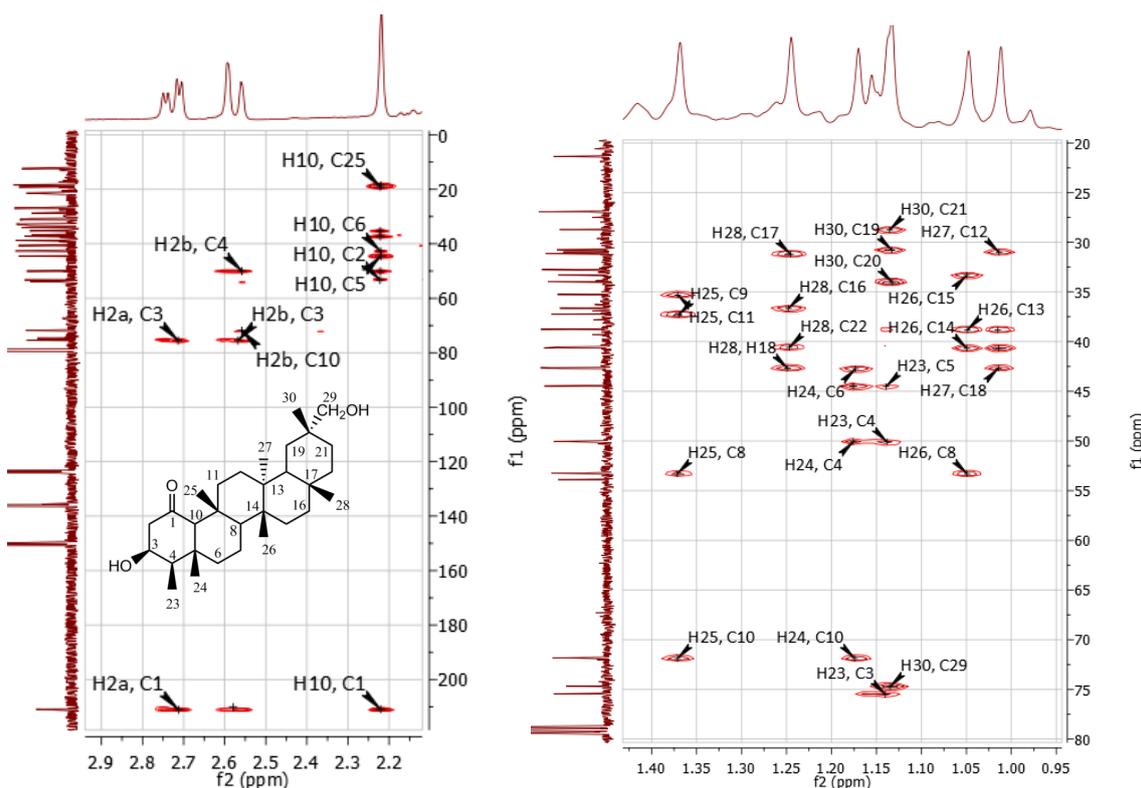
O composto inédito **S16** foi isolado como um sólido branco não cristalino e sua temperatura de fusão não foi determinado, pois degradou-se a 254,9 °C. No espectro na região do IV (**Apêndice PA**, pg. 125), duas bandas de média intensidade e sobrepostas com máximos em 3537 e 3360  $\text{cm}^{-1}$  foram identificadas e relacionadas ao estiramento das ligações O-H das duas hidroxilas, e uma banda fina e de intensa em 1697  $\text{cm}^{-1}$  foi relacionada ao estiramento da ligação C-O de carbonila. No espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (**Apêndice PB**, pg. 126) observaram-se sete sinais associados aos grupos metila entre  $\delta_{\text{H}}$  1,01 e 1,37. Seis sinais de  $^1\text{H}$  na região entre  $\delta$  2,20 e  $\delta$  4,35 (**Figura 27**) foram correlacionados aos seguintes sinais de  $^{13}\text{C}$  a partir da análise do mapa de contornos HSQC (**Apêndice PE**, pg. 127):  $\delta_{\text{H}}$  4,29 (m, 1H) correlacionado ao carbono 3 ( $\delta_{\text{C}}$  75,45);  $\delta_{\text{H}}$  3,41 (d,  $J$  10,2 Hz, 1H) e  $\delta_{\text{H}}$  3,37 (d,  $J$  10,2 Hz, 1H) associados ao sinal em  $\delta_{\text{C}}$  74,70;  $\delta_{\text{H}}$  2,73 (dd,  $J$  13,4; 4,8 Hz, 1H) e  $\delta_{\text{H}}$  2,58 (dd,  $J$  13,4; 2,2 Hz, 1H) correlacionados ao sinal em  $\delta_{\text{C}}$  53,89; e  $\delta_{\text{H}}$  2,22 (s, 1H) associado ao sinal em  $\delta_{\text{C}}$  71,84. Observou-se no espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (**Apêndice PC**, pg. 126) que o sinal relativo ao carbono da carbonila apresentou deslocamento em  $\delta_{\text{C}}$  210,93.

**Figura 27** – Expansões do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (2,20-4,35ppm) para **S16**



Com base na análise do mapa de contornos HMBC (**Apêndice PF**, pg. 127), na região entre 0,95-1,45 ppm (**Figura 28**) foi possível realizar as atribuições de grande parte dos sinais de  $^{13}\text{C}$  observados, iniciando pela correlação dos hidrogênios ligados aos carbonos hidroxilados. A atribuição dos sinais de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  relativos ao carbono 10 se iniciou a partir da análise do mapa de contornos COSY (**Apêndice PG**, pg. 128). O sinal de H-10 não apresentou nenhuma correlação no mapa de contornos COSY, indicando não haver hidrogênios vizinhos. Baseado nessa informação, após análise detalhada das correlações de H-10 no mapa de contornos HMBC (**Figura 28**) foi possível realizar a atribuição de C-10 ( $\delta_{\text{C}}$  71,84) e determinar que a carbonila se encontra na posição 1, uma vez que H-10 apresenta correlação com o sinal em  $\delta_{\text{C}}$  210,93.

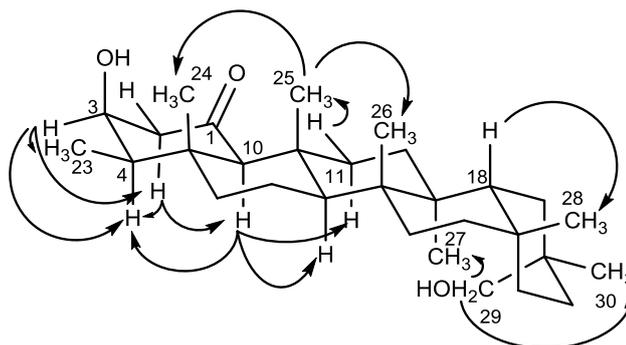
**Figura 28 – Seções expandidas do mapa de contornos HMBC para S16 ( $\delta$  0,95-1,45 e  $\delta$  2,2-2,9)**



A partir da análise do mapa de contornos NOESY (**Apêndice PH**, pg. 128), observaram-se correlações entre H-25 e H-26 e H-24, sugerindo conformação cadeira para os anéis B, C e D. Observou-se NOE entre H-29 e H-27, e H-18 com H-28, e para H-30 foi observada uma única correlação com H-29. Tais informações

sugerem que o anel E deve estar em conformação cadeira, como representado na **Figura 29**. **S16** foi identificado como sendo 1-oxo-3 $\beta$ ,29-di-hidroxi-friedelano, e a **Tabela 20** (pg. 61) apresenta todas as atribuições realizadas após as análises dos espectros 1D e 2D de RMN.

**Figura 29 – Principais correlações observadas no mapa de contornos NOESY para S16**



O espectro de APCI-MS (**Figura 30**) apresentou um pico de  $m/z$  441,3680 (calc. 441,3727) relativo ao íon  $[M+H-H_2O]^+$ , e outro pico de  $m/z$  423,3604 (calc. 423,3621) relativo ao íon  $[M+H-2H_2O]^+$ , sugerindo que a fórmula molecular proposta para **S16** confirma a proposta estrutural realizada com base nos dados de RMN.

**Figura 30 – Espectro de APCI-MS (modo positivo) para S16**

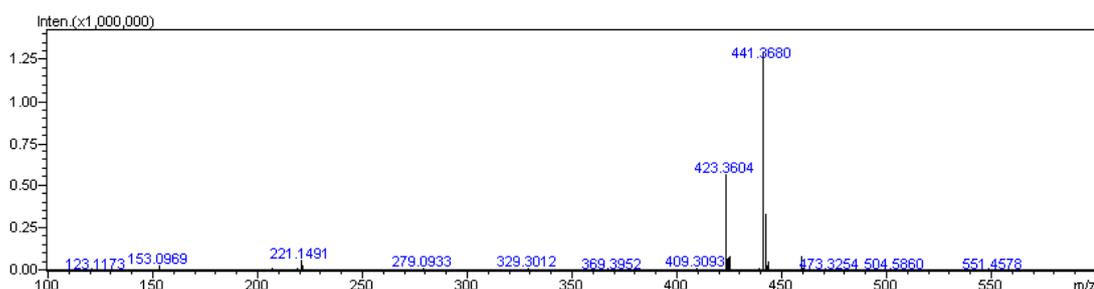


Tabela 20. Atribuição e deslocamentos químicos dos sinais de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  para S16 ( $\text{CDCl}_3$ ; 400 e 100 MHz)

Átomo	Tipo	$\delta_{\text{C}}$ S16 <sup>a</sup>	$\delta_{\text{H}}$	HMBC	COSY	NOESY
1	C	210,93	-			
2	CH <sub>2</sub>	53,89	2,58; dd; 13,4 e 2,2 Hz (eq) $\beta$ 2,73; dd; 13,4 e 4,8 Hz (ax) $\alpha$	1, 3, 4, 10 1, 3	$2\beta$	$2\beta$ , 4, 10
3	CH	75,45	4,29 (eq) $\alpha$		$2\alpha$ , $2\beta$ , 4	$2\alpha$ , 4, 23
4	CH	50,04	1,74 - 1,82	2, 5, 10, 23, 24	23	23
5	C	44,46	-			
6	CH <sub>2</sub>	42,71	1,19 - 1,26 1,74 - 1,81		6	6, 7
7	CH <sub>2</sub>	18,24	1,36 - 1,50			
8	CH	53,25	1,17 - 1,23			
9	C	37,23	-			
10	CH	71,84	2,22; s	1, 2, 4, 5, 6, 9, 11, 24, 25		4, 8, 11 $\alpha$
11	CH <sub>2</sub>	35,25	1,04 - 1,14 (ax) $\alpha$ 2,03 - 2,14 (eq) $\beta$	1, 8, 9, 12, 13, 25	11 $\alpha$	11 $\alpha$ , 25
12	CH <sub>2</sub>	30,95	1,27 - 1,31			
13	C	40,62	-			
14	C	38,76	-			
15	CH <sub>2</sub>	33,29	1,26 - 1,33 1,46 - 1,54			
16	CH <sub>2</sub>	36,63	1,28 - 1,35 1,56 - 1,64			
17	C	31,14	-			
18	CH	42,63	1,65	13, 14, 17, 19, 27, 28		$22\beta$ , 28
19	CH <sub>2</sub>	30,74	1,21 - 1,29 $\alpha$ 1,62 - 1,67 $\beta$	18, 20, 28, 30	19 $\alpha$	
20	C	33,97	-			
21	CH <sub>2</sub>	28,71	1,34 - 1,43 $\beta$ 1,55 - 1,63 $\alpha$	29, 30	21 $\beta$	
22	CH <sub>2</sub>	40,52	0,96 - 1,04 $\beta$ 1,45 - 1,56 $\alpha$		22 $\beta$	
23	CH <sub>3</sub>	12,37	1,12 - 1,19	3, 4, 5		
24	CH <sub>3</sub>	18,42	1,17; s	4, 5, 6, 10		
25	CH <sub>3</sub>	18,99	1,37; s	8, 9, 10, 11		24, 26
26	CH <sub>3</sub>	21,35	1,05; s	8, 13, 14, 15		
27	CH <sub>3</sub>	19,11	1,01; s	12, 13, 14, 18		
28	CH <sub>3</sub>	32,75	1,24; s	16, 17, 18, 22		$22\beta$
29	CH <sub>2</sub>	74,70	3,37; d; 10,2 Hz 3,41; d; 10,2 Hz	19, 20, 21, 30		19 $\alpha$ , 21 $\alpha$ , 27, 30
30	CH <sub>3</sub>	26,92	1,13; s	19, 20, 21, 29		

### 3 – Considerações finais relativas à determinação estrutural

Foram encontrados poucos estudos da composição química de plantas do gênero *Cheiloclinium*. A investigação da composição química de cascas de raiz das espécies *C. cognatum* e *C. hippocratioides* levaram ao isolamento de diversos triterpenos quinonametídeos e adutos de sesquiterpenos-triterpenos inéditos (**Figura 13**, pg. 13 e **Apêndice A**, pg. 137) (JELLER et al., 2004; MESA-SIVERIO et al., 2005; LIAO et al., 2008), no entanto não foram encontrados estudos fitoquímicos de folhas de espécies do gênero. A partir da investigação química dos extratos hexânico e clorofórmico de folhas de *C. cognatum*, foram reportados, neste trabalho, o isolamento de dez triterpenos inéditos para o gênero *Cheiloclinium*, sendo um pertencente à classe dos ursanos (**S3**), e nove à classe dos friedelanos (**S4, S5, S8-S12, S15 e S16**).

Dos diversos compostos já isolados de espécimes vegetais da família Celastraceae, os triterpenos pentacíclicos são os mais recorrentes, principalmente aqueles pertencentes à classe dos friedelanos (ALVARENGA; FERRO, 2006). Estudos da constituição química de diferentes partes vegetais de espécies pertencentes à família Celastraceae exibiram o isolamento dos compostos **S3-S5, S8, S10 e S11** (SALAZAR et al., 2000; VIEIRA-FILHO et al., 2001; MIRANDA et al., 2006; DUARTE et al., 2010; SILVA et al., 2011; RODRIGUES et al., 2012; SOUSA et al., 2014).

Os compostos **S9 e S12** apesar de já terem sido isolados de fontes vegetais (ANJANEYULU; RAVI, 1989; SETZER et al., 2000), não havia relatos do isolamento destes compostos em plantas da família Celastraceae. Os compostos **S15 e S16** são inéditos.

A partir do fracionamento do extrato clorofórmico das folhas de *C. cognatum*, alguns constituintes foram isolados em grande quantidade. Foram obtidos aproximadamente 17,5 g da mistura dos triterpenos friedelânicos **S11 e S12**, correspondendo a 21,3% do extrato clorofórmico, e o composto **S14** foi isolado na quantidade de 15,8 g, o que corresponde a 19,3% deste extrato.

## **CAPÍTULO 2: ESTUDO DOS PERFIS DE FRAGMENTAÇÃO DE TRITERPENOS FRIEDELÂNICOS POR APCI-IT-TOF**

### **1 – Introdução**

#### **1.1 – Surgimento das técnicas de ionização à pressão atmosférica**

O desenvolvimento e aprimoramento de técnicas rápidas, eficientes e precisas na identificação de compostos a partir de matrizes complexas têm se mostrado uma área de pesquisa bastante promissora na atualidade. A espectrometria de massas é uma ferramenta poderosa na identificação dos mais variados constituintes químicos, e seu uso tem se apresentado bastante eficaz devido à sua alta especificidade, seletividade e precisão em análises químicas.

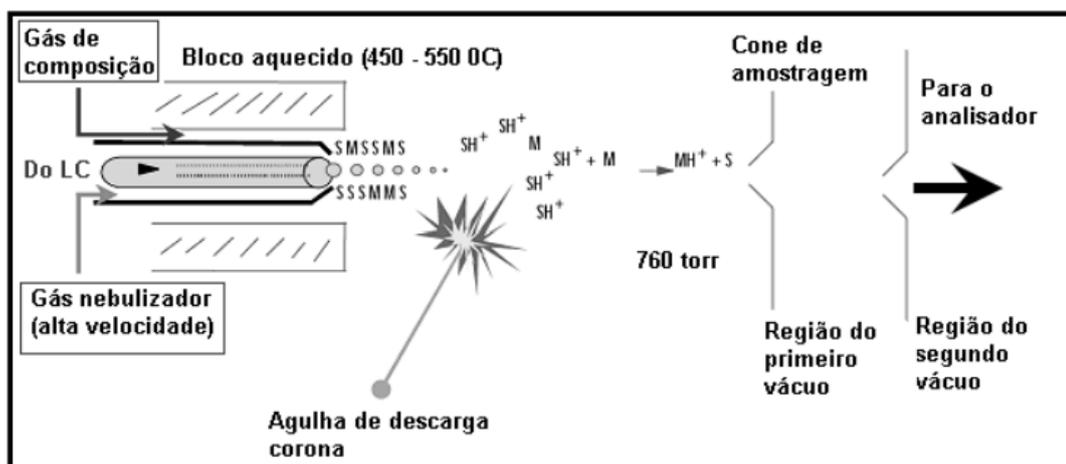
O acoplamento do cromatógrafo a gás com o espectrômetro de massas (GC-MS) durante a década de 60 foi um marco nas análises de alta eficiência, tornando-se uma das técnicas analíticas de maior popularidade devido a sua alta especificidade, sensibilidade e rapidez na identificação de constituintes voláteis e termoestáveis (WATSON, 1998). A grande limitação desta técnica, no entanto, advém das dificuldades em análises de moléculas pouco voláteis ou termolábeis, incompatíveis com a cromatografia gasosa. Em geral, amostras pouco voláteis devem passar por um processo de transformação química, com o intuito de melhorar a volatilização dos constituintes. No entanto, estes procedimentos nem sempre são aplicáveis a todos os tipos de analitos, tornando a identificação de grande parte dos compostos inadequada a partir do uso de GC-MS.

A solução para as análises incompatíveis com GC-MS seria, então, o acoplamento do cromatógrafo líquido (LC) ao espectrômetro de massas (MS), uma vez que amostras pouco voláteis poderiam ser identificadas sem qualquer necessidade de transformações químicas prévias. O grande entrave no acoplamento efetivo entre LC e MS, todavia, foi a adaptação das técnicas de ionização conhecidas com o aparato da cromatografia líquida. A ionização eletrônica (EI) e ionização química (CI) eram as técnicas mais difundidas na época, e se mostraram incompatíveis no acoplamento com a cromatografia líquida devido à presença da fase móvel, que mesmo em pouca quantidade, variava o alto vácuo na câmara de

ionização do espectrômetro, inviabilizando o processo de ionização dos analitos. Somente após a evolução das técnicas de ionização a pressão atmosférica (API), em meados da década de 80, é que o acoplamento da cromatografia líquida e da espectrometria de massas (LC-MS) foi bem sucedido, tornando esta técnica analítica uma das mais utilizadas na atualidade (PULLEN, 2010).

A primeira das técnicas API utilizadas em equipamentos de LC-MS foi a ionização química a pressão atmosférica (APCI). A ionização por APCI (**Figura 31**) consiste na formação de um spray, que passa por um processo de aquecimento para a volatilização da amostra e solvente. Sobre este gás é incidida uma descarga corona, que promove o deslocamento do equilíbrio de autoionização do solvente (em geral água ou metanol), gerando um plasma. Os íons do solvente se chocam com os constituintes da amostra, promovendo a protonação, e formação do íon  $[M+H]^+$ , ou desprotonação, e formação do íon  $[M-H]^-$ , na fase gasosa. O analito ionizado é capturado através de um potencial elétrico aplicado na entrada do espectrômetro, e é direcionado para a região de alto vácuo do equipamento, onde se encontram os analisadores de massas (HOFFMANN; STROOBANT, 2007).

**Figura 31 – Fonte APCI: esquema do mecanismo de ionização**



**Fonte:** <http://graduacao.iqsc.usp.br/files/aula-espect-massas.ppt.pdf>

No fim dos anos 80, uma nova técnica API tornou as análises por LC-MS bastante populares entre os cientistas. A ionização por eletrospray (ESI), desenvolvida por Fenn e colaboradores (1990), permitiu a análise das mais variadas estruturas químicas, desde pequenas moléculas até aos chamados “elefantes voadores”, como peptídeos e proteínas. As fontes ESI promoveram um grande

avanço nas técnicas analíticas de alta eficiência, dando origem, inclusive, às ciências “ômicas” mais modernas, como a metabolômica e proteômica (PULLEN, 2010).

Apesar de sua versatilidade, uma grande desvantagem exibida pela fonte ESI é a reduzida capacidade de ionização de analitos que apresentem baixa polaridade. Uma provável explicação é devido ao modo em que a transferência de carga ocorre nas ionizações por APCI e ESI. Na fonte ESI, ao ser gerado o *spray*, os analitos são ionizados nas próprias gotículas, ou seja, em solução. Deste modo, considerando que a fase móvel seja água, somente compostos menos básicos que  $\text{OH}^-_{(\text{aq})}$  ou menos ácidos que  $\text{H}_3\text{O}^+_{(\text{aq})}$  serão ionizados (HOFFMANN; STROOBANT, 2007). Na fonte APCI, no entanto, os analitos são ionizados na fase gasosa. Em fase gasosa o íon  $\text{H}_3\text{O}^+_{(\text{g})}$  é um ácido muito mais forte do que em solução. Dados da afinidade por próton e da variação da energia livre de Gibbs relativos à ionização da molécula de água em estado gasoso indicaram maior acidez do íon  $\text{H}_3\text{O}^+_{(\text{g})}$  em relação à maioria dos compostos orgânicos, exceto para os hidrocarbonetos saturados, etileno e benzeno (MOYLAN; BRAUMAN, 1983; BOUCHOUX, 2007; TAFT, 2009). Similarmente, o íon  $\text{OH}^-_{(\text{g})}$  apresentou basicidade bastante elevada. Como consequência, observa-se que analitos menos polares que não são ionizados pela fonte ESI, são facilmente ionizados pela fonte APCI.

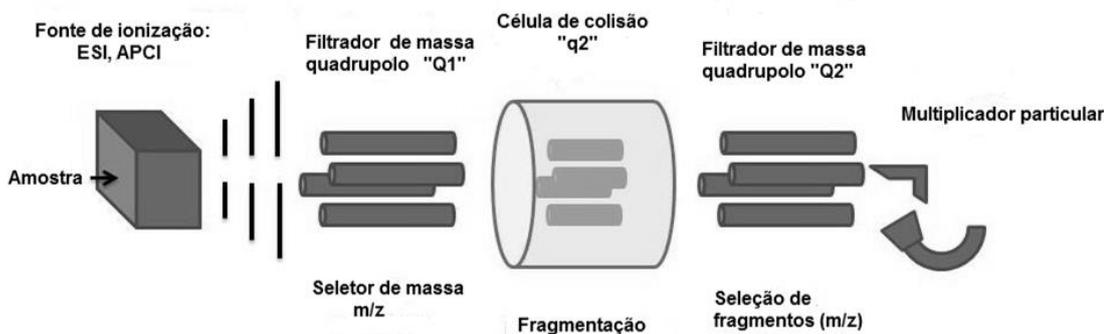
Os triterpenos pentacíclicos são exemplos de moléculas não ionizáveis por ESI, o que torna a fonte APCI a alternativa mais adequada para as análises por LC-MS destes compostos (RHOURE-FRIH et al., 2009).

## **1.2 – Análise por espectrometria de massas sequencial**

Os primeiros relatos de análises sequenciais em espectrometria de massas ocorreram durante o início da década de 70, liderados por dois grupos de pesquisa independentes nos Estados Unidos e na Inglaterra, que relataram a identificação de isômeros constitucionais a partir da análise por espectrometria de massas (MCLAFFERTY, 1993). O grupo de pesquisa estadunidense, liderado pelo Professor McLafferty, foi um dos pioneiros no acoplamento sequencial de três analisadores do tipo quadrupolo, hoje conhecido como triplo quadrupolo (QqQ) (MCLAFFERTY, 1981).

A análise de massas sequencial, também conhecida como MS/MS ou MS<sup>2</sup>, envolve basicamente três etapas. Utilizando como exemplo um equipamento com analisador do tipo QqQ (**Figura 32**), o primeiro quadrupolo realiza a seleção do íon precursor, ou íon-pai, que será direcionado ao segundo analisador. O segundo quadrupolo funciona como uma câmara de colisão; o íon-pai é submetido à dissociação induzida por colisão (CID) com o auxílio de um gás inerte e acelerado – normalmente argônio – e os íons gerados dessa fragmentação, denominados íons produto, ou íons-filho, são encaminhados para o terceiro analisador. A última etapa envolve a análise de massas dos íons-filho pelo terceiro quadrupolo. Caso seja realizada a detecção de apenas um íon-filho, o modo de escaneamento é chamado de SRM (*selected reaction monitoring*). Caso a análise envolva a detecção de todos os íons produto gerados pela fragmentação, o modo é chamado de *product ion scan* (MCLAFFERTY, 1981; HOFFMANN; STROOBANT, 2007).

**Figura 32 – Esquema de funcionamento de um analisador QqQ**



**Fonte:** [https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/3/3c/Triplo\\_quadrupolo.svg](https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/3/3c/Triplo_quadrupolo.svg)

Dentre as vantagens de se trabalhar com espectrometria de massas sequencial, estão o ganho em sensibilidade e seletividade, sendo esta característica fundamental para as análises de alta eficiência, visto que existem poucas chances de íons precursores de mesma massa gerarem exatamente os mesmos íons-filho (HOFFMANN, 1996). Os equipamentos com analisadores do tipo IT-TOF (*ion trap-time of flight*) também permitem a realização de análises do tipo MS/MS. O analisador IT é responsável pela seleção e aprisionamento dos íons precursores, além de funcionar como câmara de colisão. Os íons-filho gerados são ejetados para

o analisador TOF, que permite a identificação de íons com alta resolução, tornando as análises por MS/MS ainda mais seletivas e mais precisas.

Os triterpenos fazem parte de uma classe de moléculas que contém uma grande quantidade de isômeros, apresentando, em alguns casos, modificações bastante sutis em suas estruturas químicas. Devido a essas similaridades, a etapa de separação por HPLC pode gerar picos mal resolvidos ou coeluídos. Desta forma, a alta seletividade das análises de MS/MS pode ser uma alternativa para o problema da baixa resolução da etapa cromatográfica.

Foram encontrados poucos estudos que relacionam o perfil de fragmentação à identificação e caracterização de triterpenos pentacíclicos, e nenhum estudo foi encontrado para triterpenos da classe dos friedelanos. Este capítulo tem como objetivo a análise do perfil de fragmentação de triterpenos friedelânicos isolados das folhas de *C. cogatum* por APCI-IT-TOF a fim de se construir um banco de dados com as informações relevantes obtidas pelos espectros de massas e espectros de massas sequencial, para que seja possível a identificação e caracterização rápida e seletiva dos diferentes triterpenos friedelânicos em futuras análises de alta eficiência por LC-MS/MS.

## 2 – Parte experimental

As soluções das amostras foram preparadas a partir da solubilização de uma pequena quantidade dos triterpenos friedelanos **S4**, **S5**, **S8-S12**, **S15** e **S16** em gotas de  $\text{CHCl}_3$  e foram diluídas em MeOH. Os solventes orgânicos utilizados nos experimentos foram de grau HPLC e a água, Milli-Q®.

As análises foram realizadas utilizando fonte APCI em modo positivo no espectrômetro de massas Shimadzu LCMS-IT-TOF do Departamento de Química da UFMG. O espectrômetro é equipado com um analisador do tipo *ion trap* acoplado a um analisador do tipo *time-of-flight*.

As condições experimentais foram: temperatura do bloco, 400 °C; temperatura de dessolvatação, 250 °C; temperatura do equipamento, 40 °C; tensão do detector, 1,76 KV; tensão da interface: (+) 4,5 KV; tempo de acumulação de íons, 10 ms; energia de colisão do CID, 50%, gás de colisão 50%; faixa de seleção do íon precursor,  $m/z \pm 3,0$  Da. As soluções com as amostras foram injetadas na interface de APCI com uma vazão de 0,2 mL/min de uma mistura de metanol:água (1:1), utilizando a bomba do HPLC.

## 3 – Resultados e discussão

Nove triterpenos friedelânicos foram analisados via APCI-MS de alta resolução (**Figura 33**). A análise dos espectros de MS (**Apêndice Q**, pg. 129 a 136) para estes compostos revelou que, para os triterpenos que possuem ao menos um grupo hidroxila em sua estrutura, o pico referente ao íon  $[M+H-H_2O]^+$  apresentou intensidade relativa acima de 90% (**Tabela 21**). Para o composto **S4**, o único dentre os analisados que não apresenta grupo hidroxila em sua constituição, também foi observada a perda de uma molécula de água, porém o pico relativo ao íon  $[M+H-H_2O]^+$  exibiu intensidade relativa de apenas 19%.

**Figura 33 – Triterpenos friedelânicos analisados via APCI-MS**

Composto	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	R <sub>4</sub>	R <sub>5</sub>
<b>S4</b>	=O	H	H	H	H
<b>S5</b>	βOH	H	H	H	H
<b>S8</b>	=O	OH	H	H	H
<b>S9</b>	=O	H	OH	H	H
<b>S11</b>	=O	H	H	OH	H
<b>S12</b>	βOH	H	H	OH	H
<b>S15</b>	βOH	OH	H	OH	H
<b>S16</b>	βOH	H	H	OH	=O

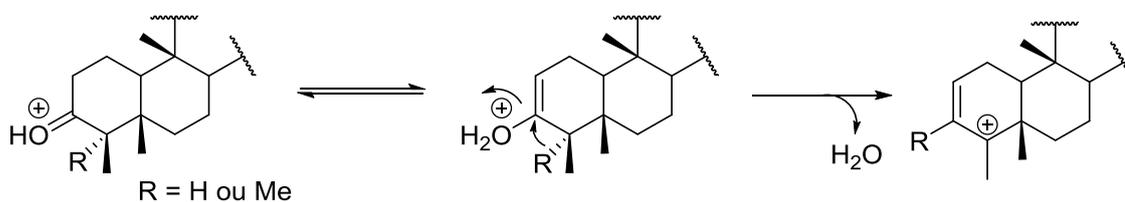
**Tabela 21. Resultados das análises dos espectros de APCI-MS**

Composto	Fórmula Molecular	$[M+H]^+$ <i>m/z</i> (%)	$[M+H-H_2O]^+$ <i>m/z</i> (%)	$[M+H-2H_2O]^+$ <i>m/z</i> (%)	Outro <i>m/z</i> (%)
<b>S4</b>	C <sub>30</sub> H <sub>52</sub> O	427,3939 (100)	409,3843 (19)	-	-
<b>S5</b>	C <sub>30</sub> H <sub>50</sub> O	-	411,3979 (100)	-	-
<b>S8</b>	C <sub>30</sub> H <sub>50</sub> O <sub>2</sub>	443,3847 (86)	425,3739 (100)	-	413,3778 (33) <sup>a</sup>
<b>S9</b>	C <sub>30</sub> H <sub>50</sub> O <sub>2</sub>	443,3871 (27)	425,3766 (100)	407,3693 (10)	-
<b>S10</b>	C <sub>30</sub> H <sub>52</sub> O <sub>2</sub>	-	427,3910 (100)	409,3806 (26)	-
<b>S11</b>	C <sub>30</sub> H <sub>50</sub> O <sub>2</sub>	443,3836 (100)	425,3737 (92)	-	-
<b>S12</b>	C <sub>30</sub> H <sub>52</sub> O <sub>2</sub>	-	427,3960 (100)	409,3844 (18)	235,1657 (29) <sup>d</sup> 217,1475 (19) <sup>b</sup>
<b>S15</b>	C <sub>30</sub> H <sub>52</sub> O <sub>3</sub>	-	443,3867 (93)	425,3786 (100)	407,3647 (13) <sup>c</sup>
<b>S16</b>	C <sub>30</sub> H <sub>50</sub> O <sub>3</sub>	-	441,3680 (100)	423,3604 (44)	-

<sup>a</sup> pico relativo ao íon  $[M+H-CH_2O]^+$ ; <sup>b</sup> picos não identificados; <sup>c</sup> pico relativo ao íon  $[M+H-3H_2O]^+$ ; - não detectado.

A perda de água recorrente da saída do oxigênio da carbonila não foi um fenômeno observado unicamente para o composto **S4**. A partir da análise dos espectros de APCI-MS/MS dos íons  $[M+H-H_2O]^+$  dos compostos **S8**, **S9** e **S11**, a presença do pico  $[M+H-2H_2O]^+$  com intensidade relativa de 100% indica que o mecanismo de fragmentação de carbonilas de 3-oxo-friedelanos ocorre via perda de água (**Tabela 22**, pg. 72). Estudo similar realizado por Li e colaboradores (2014) para o triterpeno 3-oxo-olean-12-eno também evidenciou a perda de uma molécula de  $H_2O$  a partir da fragmentação na região da carbonila, sendo o íon resultante um carbocátion vinílico. No entanto, devido a alta instabilidade de cátions deste tipo, foi proposto um mecanismo alternativo para a perda de água em triterpenos pentacíclicos com carbonila na posição 3 (**Figura 34**). A carbonila protonada está em equilíbrio com sua forma enólica. A perda de água a partir do enol protonado é favorecida pelo rearranjo do hidreto (ou metaneto) adjacente, havendo a formação de um carbocátion terciário alílico, que é estabilizado juntamente pelos efeitos de ressonância e hiperconjugação (ALABUGIN et al., 2011).

**Figura 34 – Mecanismo proposto para perda de  $H_2O$  em triterpenos pentacíclicos com carbonila na posição 3**



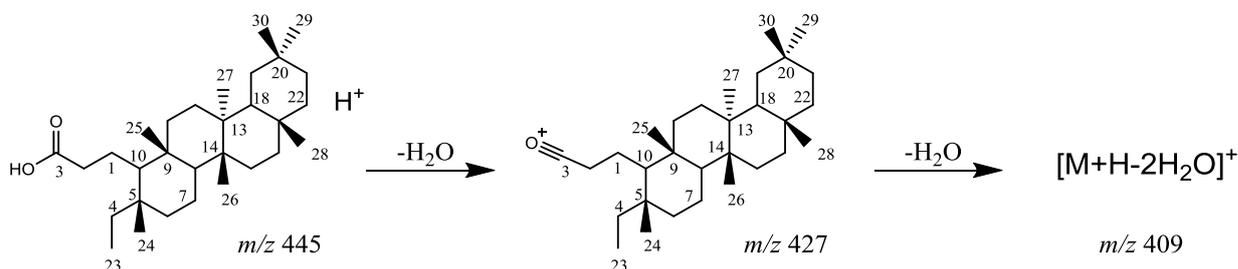
Diferenças no perfil de fragmentação para a perda de água entre diferentes hidroxilas também foram observadas. Para compostos com hidroxilas secundárias (**S5**, **S9**, **S12**, **S15** e **S16**), os picos relativos ao íon  $[M+H]^+$  não foram detectados ou apresentaram baixa intensidade, ao passo que para os triterpenos com hidroxila primária, os pares de picos  $[M+H]^+$  e  $[M+H-H_2O]^+$  (**S8** e **S11**) e  $[M+H-H_2O]^+$  e  $[M+H-2H_2O]^+$  (**S15**) apresentaram intensidades relativas aproximadamente iguais (**Tabela 21**, pg. 69).

O composto **S8** foi o único dentre os friedelanos em que a fragmentação da região da hidroxila não ocorreu exclusivamente pela perda de uma molécula de água, mas também devido à perda de uma molécula de  $CH_2O$  ( $[M+H-CH_2O]^+$ ,  $m/z$  413,3778). Estudos de espectrometria de massas sequencial de triterpenos

oleananos evidenciaram a saída de outros fragmentos a partir do carbono 28, corroborando para os resultados observados para **S8**. Para o composto ácido oleanólico (ácido 3 $\beta$ -hidroxi-olean-12-en-28-oico), foi observada a perda de um fragmento HCO<sub>2</sub>H (46 Da), e para o aldeído 3 $\beta$ -hidroxi-olean-12-en-28-al, houve a saída de uma molécula de CO (28 Da) (VAN DER DOELEN et al., 1998; GENG et al., 2014).

O triterpeno ácido **S10** apresentou perfil de fragmentação em APCI-MS bastante peculiar (**Figura 35**). A ausência do pico relativo ao íon [M+H]<sup>+</sup> devido à perda de uma molécula de água sugere a formação de um cátion relativamente mais estável, um íon acílio de *m/z* 427,3960. Estudo realizado por Geng e colaboradores (2014) sobre o perfil de fragmentação de alguns triterpenos com função ácido via ESI-MS/MS evidenciou a perda de água e provável formação do íon acílio para todos os compostos, sendo também observada uma perda sequencial de uma molécula de CO para estas amostras. No entanto, no espectro de MS<sup>2</sup> do íon-pai de *m/z* 427 para **S10** não foram identificados picos relativos à perda de CO, e sim um pico de *m/z* 409 (100%), relativo ao íon [M+H-2H<sub>2</sub>O]<sup>+</sup>. A ausência do íon [M+H-H<sub>2</sub>O-CO]<sup>+</sup> para **S10** pode ser relacionada ao fato de ser o único dentre os triterpenos ácidos analisados que apresenta carboxila ligada a carbono primário. Dessa forma, com a perda de CO a partir do íon acílio, haveria a formação de um carbocátion primário, tornando esse caminho de fragmentação altamente desfavorável.

**Figura 35 – Principais fragmentações observadas para S10**



Na **Tabela 22** (pg. 72) estão listados os picos presentes nos espectros de APCI-MS/MS para os íons precursores de maior intensidade no espectro de MS. Observou-se que, quando o íon precursor possui um átomo de oxigênio em sua estrutura, o fragmento de maior intensidade no espectro de MS<sup>2</sup> corresponde a um íon com perda de 18 Da, relativo à perda de uma molécula de água. Este resultado foi observado para todos os triterpenos friedelânicos analisados.

Tabela 22. Resultado das análises dos espectros de APCI-MS/MS

Composto	Fórmula Molecular	APCI-MS/MS <i>m/z</i> (%)
<b>S4</b>	C <sub>30</sub> H <sub>50</sub> O	MS <sup>2</sup> [427]: 409(100), 191(89), 217(60), 219(33), 205(22), 203(22) MS <sup>2</sup> [409]: 217(100), 299(94), 189(82), 245(46), 231(40)
<b>S5</b>	C <sub>30</sub> H <sub>52</sub> O	MS <sup>2</sup> [411]: 163(100), 191(72), 217(47), 177(46), 205(42), 219(31), 247(23), 231(23) MS <sup>2</sup> [443]: 425(100), 413(77)
<b>S8</b>	C <sub>30</sub> H <sub>50</sub> O <sub>2</sub>	MS <sup>2</sup> [425]: 407(100), 203(58), 217(54), 191 (35), 189(30), 163(19) MS <sup>2</sup> [413]: 395(100), 203(73) MS <sup>2</sup> [443]: 425(100)
<b>S9</b>	C <sub>30</sub> H <sub>50</sub> O <sub>2</sub>	MS <sup>2</sup> [425]: 426(100), 407(66), 203(61), 201(45), 217(35), 219(11) MS <sup>2</sup> [427]: 409(100), 205(76), 163(52), 217(39), 259(35), 177(33), 231(32), 329(29), 203(28), 191(28), 189(28)
<b>S10</b>	C <sub>30</sub> H <sub>52</sub> O <sub>2</sub>	MS <sup>2</sup> [409]: 245(100), 191(61), 271(51), 205(40), 217(38), 285(32), 203(22), 243(21), 245(20), 163(19) MS <sup>2</sup> [443]: 425(100)
<b>S11</b>	C <sub>30</sub> H <sub>50</sub> O <sub>2</sub>	MS <sup>2</sup> [425]: 407(100), 203(74), 217(53), 177(53), 189(22) MS <sup>2</sup> [427]: 163 (100), 409(67), 217(59), 191(55), 229(27)
<b>S12</b>	C <sub>30</sub> H <sub>52</sub> O <sub>2</sub>	MS <sup>2</sup> [409]: 271(100), 175(85), 285(68), 245(45), 191(41), 257(41), 203(35) MS <sup>2</sup> [235]: 217(100) MS <sup>2</sup> [443]: 425(100), 251(18) MS <sup>2</sup> [425]: 407(100), 217(60), 257(44), 271(33), 315(30), 203(28), 219(22), 247(22), 259(22), 243(20), 329(20), 201(19)
<b>S15</b>	C <sub>30</sub> H <sub>52</sub> O <sub>3</sub>	MS <sup>2</sup> [407]: 203(100), 297(79), 229(64), 365(51), 273(40), 217(31), 201(31), 241(30)
<b>S16</b>	C <sub>30</sub> H <sub>50</sub> O <sub>3</sub>	MS <sup>2</sup> [441]: 423(100), 217(39), 221(25), 189(24), 405(23), 203(18), 207(18), 313(15) MS <sup>2</sup> [423]: 405(100), 215(70), 201(48), 259(47), 233(28), 159(20)

Os resultados das análises dos espectros de MS<sup>2</sup> mostraram que, para cada triterpeno analisado, foram obtidos conjuntos de fragmentos característicos de cada amostra. Devido à similaridade dos esqueletos carbônicos, não foram observados íon-filhos únicos de cada analito. Por consequência, as análises no modo SRM (*selected reaction monitoring*) não seriam convenientes na identificação de triterpenos friedelânicos por LC-MS/MS, sendo o modo *product ion scan* a alternativa mais adequada.

#### 4 – Considerações finais relativas à fragmentação de triterpenos pentacíclicos

Devido à baixa polaridade apresentada por grande parte dos triterpenos pentacíclicos, a fonte APCI é a escolha mais adequada nas análises de moléculas dessa classe. A maior energia de ionização da fonte APCI em relação a outras técnicas API favorece a ocorrência de algumas fragmentações durante o processo de ionização. As fragmentações relacionadas às perdas de moléculas de água são as mais frequentemente observadas, principalmente para triterpenos friedelânicos hidroxilados. Dessa forma, friedelanos com grupos hidroxila apresentarão pico relativo ao íon  $[M+H-H_2O]^+$  com intensidade relativa elevada, podendo, em alguns casos, não apresentar o pico relativo ao íon  $[M+H]^+$ .

Foram encontrados poucos relatos na literatura envolvendo a obtenção do perfil de fragmentação de triterpenos pentacíclicos, e não foram encontrados estudos visando à obtenção do perfil de fragmentação de triterpenos da classe dos friedelanos. Dessa forma, os dados obtidos neste trabalho a partir da avaliação dos espectros de APCI-MS e APCI-MS/MS dos triterpenos friedelânicos isolados de folhas de *C. cognatum* podem ser utilizados na identificação destes compostos por espectrometria de massas a partir das análises de amostras desconhecidas. A espectrometria de massas por ionização química à pressão atmosférica pode ser, portanto, considerada uma poderosa técnica analítica alternativa para identificação e caracterização de triterpenos de forma rápida e eficaz.

## CAPÍTULO 3: ESTUDO DA ATIVIDADE BIOLÓGICA

1 – Ensaio de angiogênese utilizando membrana corioalantoica de embrião de galinha

### 1.1 – Método HET-CAM para testes de angiogênese

A angiogênese é um processo fisiológico que consiste na formação de novos vasos sanguíneos a partir de vasos preexistentes. No fim da década de 30, pesquisadores e médicos perceberam que havia relações entre a atividade pró-angiogênica com o crescimento de tumores malignos no corpo humano. Diversos estudos foram conduzidos desde então, visando o entendimento dos processos pró e antiangiogênicos e como estes afetam o desenvolvimento dos mais variados tipos de câncer (PRAGER; POETTLER, 2012). A atividade angiogênica também está correlacionada a outras enfermidades, como doenças vasculares, reumáticas, oculares, além de estar diretamente vinculada ao processo inflamatório (FOLKMAN, 1995; CARMELIET; JAIN, 2000; GARIANO; GARDNER, 2004; MOR et al., 2004; CLAVEL et al., 2006). Visto a necessidade por alternativas a fármacos utilizados nos tratamentos já existentes no mercado, como o pegaptanibe sódico, o ranibizumabe e o bevacizumabe, torna-se de grande relevância a busca por moléculas que apresentem atividade antiangiogênica, principalmente para o tratamento e combate ao câncer (GASPARINI et al., 2005).

O ensaio de angiogênese utilizando a membrana corioalantoica do embrião de galinha (HET-CAM assay), do inglês *hen's egg test-chorioallantoic membrane assay*, foi inicialmente desenvolvido para estudo de tecidos embrionários e posteriormente adaptado para os testes de angiogênese. Este teste se tornou bastante popular por ser um procedimento *in vivo* simples, relativamente rápido e de baixo custo, além de ser uma alternativa ao uso de animais em pesquisa (VALDES et al., 2002; NORRBY, 2006; NOWAK-SLIWINSKA et al., 2010).

O teste HET-CAM consiste na abertura da casca do ovo embrionado, em condições assépticas, e exposição da membrana corioalantoica (CAM) até o 5<sup>o</sup> dia de incubação. Do 5<sup>o</sup> ao 12<sup>o</sup> dias de incubação ocorre a principal fase de germinação da rede capilar sobre a membrana. Este período é o mais indicado para a realização

do ensaio HET-CAM, pois é possível avaliar de forma mais evidente a estimulação ou supressão da angiogênese (NORRBY, 2006).

Estudos de angiogênese por meio do ensaio HET-CAM apresentaram resultados bastante promissores na inibição da vascularização da membrana corioalantoica para diversos triterpenos pentacíclicos, principalmente àqueles da classe dos lupanos, ursanos e oleananos. Dentre os compostos testados estão o ácido betulínico, ácido ursólico, ácido oleanólico,  $\alpha$ -amirina,  $\beta$ -amirina, bauerenol, betulina e lupeol (SOHN et al., 1995; CÁRDENAS et al., 2004; DEHELEAN et al., 2012; RAGA et al., 2013; VIJAY AVIN et al., 2014). Visto a grande variedade de esqueletos triterpênicos que exibiram expressiva atividade antiangiogênica e a ausência de estudos envolvendo triterpenos da classe dos friedelanos, os compostos **S8-S12**, **S15** e **S16** foram submetidos aos testes de angiogênese por meio do ensaio HET-CAM.

## 1.2 – Parte experimental

### 1.2.1 – Preparo das amostras

Foram preparadas sete soluções aquosas de etanol 10% (v/v) com as amostras **S8-S12**, **S15** e **S16** em concentração final de 100  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . Como controle referência utilizou-se uma solução do fármaco com comprovada atividade antiangiogênica bevacizumabe (250  $\mu\text{L mL}^{-1}$ ). Como controle negativo utilizou-se uma solução de etanol absoluto 10% (v/v). Os triterpenos friedelânicos **S4** e **S5** não foram solúveis em nenhum sistema de solventes compatível com as análises, portanto não foram submetidos aos ensaios HET-CAM.

### 1.2.2 – Ensaio HET-CAM

Os testes foram realizados em parceria com o Laboratório de Tecnologia Farmacêutica, da Faculdade de Farmácia da UFMG, pelo pós-doutorando Diogo Coelho de Pádua Oliveira, sob a orientação do professor Dr. Armando da Silva Cunha Júnior e professor Dr. Daniel Christian Ferreira Soares.

Os ovos embrionados foram incubados à temperatura de 37 °C e umidade relativa do ar em 60% utilizando uma incubadora automática digital Premium

Ecológica (**Figura 36**). Após três dias na incubadora, foi realizada uma abertura de aproximadamente 1 cm de diâmetro na região da câmara de ar de cada ovo, retirando a membrana interna da casca para a exposição da CAM. As aberturas foram lacradas com fita adesiva e os ovos permaneceram na incubadora até o quinto dia de desenvolvimento. Os ovos inviáveis, não embrionados ou com embriões mortos foram descartados.

No quinto dia de incubação, foram colocados discos de celulose de tamanho padronizado sobre a CAM de cada ovo e aplicados 20  $\mu$ L das soluções preparadas previamente sobre estes discos. No sexto dia houve a reaplicação de 20  $\mu$ L das soluções e o descarte de embriões mortos.

No sétimo e último dia do procedimento, realizou-se a extração da CAM e fixação da mesma em solução de formaldeído 3,7% (v/v) por 10 minutos. Em seguida, as membranas retiradas foram fotografadas com uma câmera Motic CAM acoplada a um estereomicroscópio Motic.

**Figura 36 – Incubadora automática utilizada nos ensaios HET-CAM**



**Fonte:** (VIEIRA, 2011)

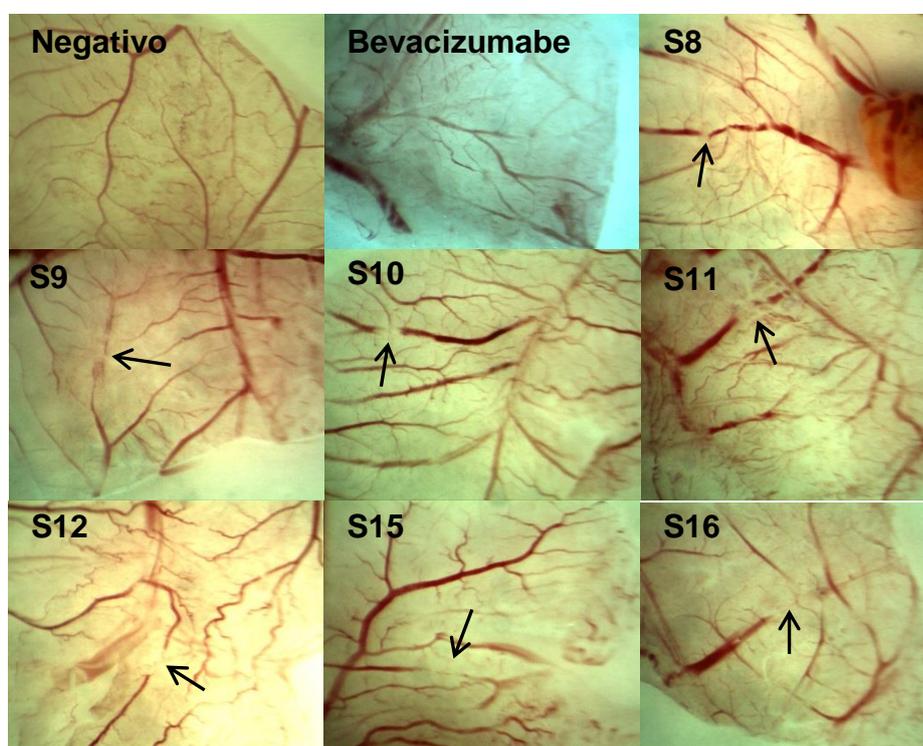
### 1.2.3 – Análise quantitativa da angiogênese

As imagens adquiridas foram processadas no *software* ImageJ®, a fim de se obter o número absoluto de *pixels* correspondente aos vasos sanguíneos existentes na área da membrana em que as soluções foram aplicadas. Os resultados foram expressos em percentual de vasos sanguíneos a partir da comparação com o grupo controle negativo.

### 1.3 – Resultados e discussão

A análise da atividade antiangiogênica dos triterpenos **S8-S12**, **S15** e **S16** foi realizada por meio do ensaio HET-CAM. Em cada ovo, foram aplicados um total 40  $\mu\text{L}$  das soluções do triterpenos ( $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) equivalendo a  $4\mu\text{g}$  de amostra por ovo. Um dos indicativos qualitativos do potencial antiangiogênico dos compostos testados é a existência de interrupções nos vasos sanguíneos nas CAMs analisadas, evidenciadas por meio das setas pretas inseridas na **Figura 37**.

**Figura 37 – Membrana corioalantoica após ensaio HET-CAM para os diferentes tratamentos**



A análise quantitativa da angiogênese foi realizada a partir do número absoluto de pixels relativos aos vasos sanguíneos existentes nas membranas fotografadas, e os resultados também foram expressos em porcentagem de vasos sanguíneos em relação ao controle negativo, que foi ajustado para 100% (**Tabela 23**, pg. 78). Os dados foram obtidos com uma amostragem de 10 ovos por tratamento, e as médias foram analisadas pelo método de análise de variância *one-way* (*one-way ANOVA*) em que  $P < 0,05$  foi considerado estatisticamente diferente.

**Tabela 23. Resultados do efeito sobre angiogênese obtidos através do ensaio HET-CAM**

Amostras	Nome	Vasos sanguíneos (pixels)*	Vasos sanguíneos (%)
<b>Cont. Neg.</b>	Controle Negativo	308950 <sup>a</sup>	100,0
<b>Beva</b>	Bevacizumabe	232886 <sup>b</sup>	75,4
<b>S8</b>	3-Oxo-28-hidroxifriedelina	106278 ± 26632 <sup>d</sup>	34,4 ± 8,6
<b>S9</b>	3-Oxo-21 $\alpha$ -hidroxifriedelano	112662 ± 20998 <sup>d</sup>	36,5 ± 6,8
<b>S10</b>	Ácido 3,4-seco-friedelan-3-oico	118390 ± 24078 <sup>c,d</sup>	38,3 ± 7,8
<b>S11</b>	3-Oxo-29-hidroxifriedelano	146522 ± 36321 <sup>c</sup>	47,4 ± 11,8
<b>S12</b>	3 $\beta$ ,29-Di-hidroxifriedelano	109850 ± 16614 <sup>d</sup>	35,6 ± 5,4
<b>S15</b>	3 $\beta$ ,28,29-Tri-hidroxifriedelano	-	-
<b>S16</b>	1-Oxo-3 $\beta$ ,29-di-hidroxifriedelano	123679 ± 24754 <sup>c,d</sup>	40,0 ± 8,0

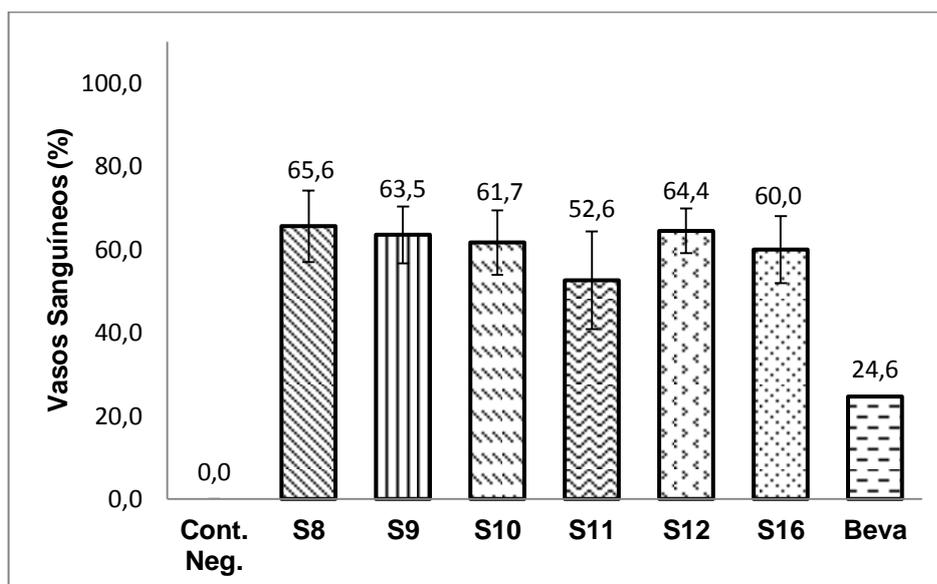
\*resultados seguidos das mesmas letras sobrescritas não apresentaram diferença significativa à  $P < 0,05$  (**Apêndice R**, pg. 136); - amostragem insuficiente devido à morte embrionária.

A partir dos resultados apresentados na **Tabela 23**, observa-se que os testes realizados com **S11** causaram a redução de 52,6% no crescimento dos vasos em relação ao controle negativo. Dentre os triterpenos analisados, o composto **S8** apresentou maior potencial antiangiogênico em valores absolutos, com redução de 65,6% de vasos. Este valor apresentou diferença significativa em relação aos resultados de **S11**. Análises quantitativas da atividade antiangiogênica para o composto **S15** não foram realizadas devido à baixa amostragem causada pela morte de grande parte dos embriões. O fármaco **bevacizumabe** – medicamento com comprovada atividade antiangiogênica, vendido sob o nome de Avastin® – promoveu a redução de 24,6% dos vasos sanguíneos em relação ao controle negativo, valor bastante inferior aos resultados observados para os testes com os triterpenos friedelânicos. Os resultados do ensaio HET-CAM para todos os tratamentos também foram expressos em percentual de inibição da angiogênese na forma de gráfico (**Figura 38**, pg. 79).

Não foi possível relacionar as diferenças químicas específicas entre os triterpenos analisados com o aumento do potencial antiangiogênico. Tal resultado sugere que a atividade antiangiogênica está mais fortemente associada ao esqueleto friedelânico *per se*, do que ao tipo e/ou posição dos substituintes. Ensaio HET-CAM realizados com outros esqueletos triterpênicos apresentaram resultados que corroboram com esta consideração. Raga e colaboradores (2013) observaram que para a mistura de três triterpenos 3 $\beta$ -hidroxilados –  $\alpha$ -amirina (classe dos ursanos),  $\beta$ -amirina (classe dos oleananos) e bauerenol (classe dos baueranos) –

quanto maior a proporção de bauerenol, maior a redução da angiogênese. Sohn e colaboradores (1995) relataram que foi necessário 150% a mais em massa de ácido oleanólico para que se fosse atingida atividade antiangiogênica similar ao ácido ursólico.

**Figura 38 – Percentual de inibição da angiogênese**



Resultados quantitativos do potencial de inibição da angiogênese para o composto **S11**, o menos ativo dentre os analisados, mostraram que 4 µg de amostra resultou na inibição de 52,6% do crescimento de vasos sanguíneos. Para uma mistura de  $\alpha$ -amirina,  $\beta$ -amirina e bauerenol (proporção de 2:2:3 respectivamente), foram aplicados cerca de 7 µg por ovo e observou-se uma redução no crescimento de vasos em 38% (RAGA et al., 2013). A partir da aplicação de 20 µg de ácido betulínico por ovo, foi relatada a inibição de 44,4% (DEHELEAN et al., 2012). Por meio destes resultados foi possível concluir que os triterpenos da classe dos friedelanos exibiram expressiva atividade antiangiogênica, e superior a triterpenos de outras classes.

## 2 – Ensaio de toxicidade em *Caenorhabditis elegans*

### 2.1 – *C. elegans* como modelo *in vivo* em ensaios de toxicidade

*Caenorhabditis elegans* (Figura 39) é um nematoide microscópico (BRENNER, 1974), de aproximadamente 1 mm de comprimento no estágio adulto, não parasitário, não patogênico, cujo habitat natural é o solo de países de clima temperado, associado a regiões com abundância de matéria orgânica (FÉLIX; BRAENDLE, 2010). *C. elegans* é hermafrodita capaz de realizar autofecundação, sendo os machos presentes na população com baixa frequência (0,1%). Outras importantes características fisiológicas sobre o *C. elegans* estão relacionadas à sua elevada progênie, curto ciclo de vida – quatro dias para se atingir a vida adulta – e curto tempo de vida – de duas a três semanas. As características fisiológicas deste nematoide, em associação ao baixo custo das análises e fácil manutenção em laboratório tornaram os testes utilizando *C. elegans* muito difundidos no meio científico, principalmente em áreas como a neurociência, microbiologia e toxicologia (DENG; VAN MEEL, 2004; LEUNG et al., 2008; KOBET et al., 2014; O'REILLY et al., 2014).

**Figura 39 – *Caenorhabditis elegans* – hermafrodita adulto**



**Fonte:** <http://www.deretilnature.com/wp-content/uploads/2015/03/elegans.png>

Modelos tradicionais de estudos *in vivo* com mamíferos apresentam uma série de limitações, pois são procedimentos mais laboriosos, demorados e caros, além de apresentarem restrições éticas. Ensaio com *C. elegans* já estão sendo

utilizados como forma de substituição parcial ou total de animais em alguns estágios de testes clínicos, sendo este um modelo bastante utilizado em análises de grande escala para investigação de agentes antimicrobianos, anti-helmínticos, antitumorais, ensaios de toxicidade, senescência, entre outros (ARVANITIS et al., 2013; KOBET et al., 2014; O'REILLY et al., 2014; BURNS et al., 2015).

Os ensaios de toxicidade *in vitro* têm sido utilizados desde os anos 80 como alternativa aos testes *in vivo* em mamíferos para testes de grande escala, os chamados *high throughput screenings*. No entanto, diversas limitações são relacionadas a estes testes, principalmente devido às grandes diferenças existentes entre os mecanismos de transporte, distribuição, metabolização e excreção de compostos químicos entre um sistema de cultura de células e um animal completo (LI, Y. et al., 2013).

Os testes *in vivo* de toxicidade aguda e crônica utilizando *C. elegans* como modelo se mostraram bastante promissores devido a dois importantes aspectos. O primeiro deles é a possibilidade de realização de ensaios de toxicidade de grande escala, sendo uma alternativa mais interessante em relação às técnicas *in vitro* devido à possibilidade de estudo dos mecanismos de ação de compostos químicos em um organismo multicelular. O segundo aspecto está relacionado ao fato de que os resultados de toxicidade encontrados para *C. elegans* possuem altas correlações com os resultados encontrados para modelos murinos ao serem testados os mesmos compostos, e estas correlações são, inclusive, maiores que as obtidas entre ratos e camundongos. Por este motivo, testes de toxicidade em *C. elegans* podem ser uma alternativa aos testes em alguns vertebrados (DENG G; VAN MEEL, 2004; LEUNG et al., 2008; LI, Y. et al., 2013).

Visando avaliar a toxicidade dos triterpenos pentacíclicos isolados, os compostos **S4-S5**, **S8-12** e **S15-S16** foram submetidos aos ensaios de toxicidade aguda, bem como os extratos hexânico (**EH**) e clorofórmico (**EC**) das folhas de *C. cognatum*, a fim de se avaliar o potencial anti-helmíntico dos extratos e de seus constituintes sobre *C. elegans*.

## 2.2 – Parte experimental

Os testes foram realizados em parceria com o grupo de pesquisa da professora Dra. Viviane Alves Gouveia, do Laboratório de Biologia Celular de Microrganismos, do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG.

### 2.2.1 – Preparo de amostras

Soluções estoque das amostras **EH**, **EC**, **S4-S5**, **S8-12** e **S15-S16** foram preparadas em DMSO 100% de forma a se obter soluções na concentração máxima possível. Devido às diferenças de solubilidade neste solvente, foram obtidos valores de concentração distintos para cada amostra. Na **Tabela 24** estão apresentadas as concentrações das soluções estoque de cada composto e extrato, e também a concentração final destas amostras durante os ensaios de toxicidade.

**Tabela 24. Concentração das amostras para teste de toxicidade**

Amostra	Nome	Solução Estoque (mg mL <sup>-1</sup> )	Concentração final no ensaio (µg mL <sup>-1</sup> )
<b>S4</b>	3-Oxo-friedelano	0,5	10,0
<b>S5</b>	3β-Hidroxifriedelano	0,5	10,0
<b>S8</b>	3-Oxo-28-hidroxifriedelina	0,5	10,0
<b>S9</b>	3-Oxo-21α-hidroxifriedelano	0,5	10,0
<b>S10</b>	Ácido 3,4-seco-friedelan-3-oico	0,5	10,0
<b>S11</b>	3-Oxo-29-hidroxifriedelano	0,5	10,0
<b>S12</b>	3β,29-Di-hidroxifriedelano	0,5	10,0
<b>S15</b>	3β,28,29-Tri-hidroxifriedelano	5,0	100,0
<b>S16</b>	1-Oxo-3β,29-di-hidroxifriedelano	0,5	10,0
<b>EH</b>	Ext. Hex. folhas <i>C. cognatum</i>	0,5	10,0
<b>EC</b>	Ext. CHCl <sub>3</sub> folhas <i>C. cognatum</i>	5,0	100,0

### 2.2.2 – Ensaio de toxicidade aguda

Os ensaios foram realizados em microplacas de 24 poços. Em cada poço foram adicionados cerca de 100 µL de meio S-completo, aproximadamente 50 larvas L1 de *C. elegans* e 20 µL das soluções estoque. Todas as exposições foram realizadas a 25 °C e na presença de alimentação normal (*Escherichia coli* OP50) durante o período de 96 h (PORTA-DE-LA-RIVA et al., 2012). Utilizou-se DMSO como controle negativo. A letalidade foi avaliada diariamente até o fim do

experimento. Os resultados foram expressos em relação à da taxa de sobrevivência após o período de 96 h. Para os tratamentos com até 90% de sobrevivência a amostra foi classificada como 'não tóxica', de 90 a 50% como potencial 'nematostático', e abaixo de 50% como potencial 'nematicida'.

### 2.3 – Resultados e discussão

A partir da análise dos ensaios de toxicidade (**Tabela 25**) foi possível observar que os compostos **S4** e **S5** apresentaram taxa de sobrevivência de 50%, sendo ambos considerados potenciais nematicidas na concentração de 10 µg mL<sup>-1</sup>. É possível inferir, portanto, que a presença da carbonila na posição 3 para o triterpeno friedelânico **S4** ou da hidroxila na posição 3β para **S5** conferem a estas substâncias toxicidade semelhante frente à *C. elegans*.

**Tabela 25. Resultados do teste de toxicidade aguda em *C. elegans***

Amostra	Nome	Taxa de Sobrevivência (%)	Potencial
<b>Controle</b>	DMSO	>90	Não tóxica
<b>S4</b>	3-Oxo-friedelano	50	Nematicida
<b>S5</b>	3β-Hidroxifriedelano	50	Nematicida
<b>S8</b>	3-Oxo-28-hidroxifriedelina	0	Nematicida
<b>S9</b>	3-Oxo-21α-hidroxifriedelano	<50	Nematicida
<b>S10</b>	Ácido 3,4-seco-friedelan-3-oico	>50	Nematostático
<b>S11</b>	3-Oxo-29-hidroxifriedelano	>90	Não tóxica
<b>S12</b>	3β,29-Di-hidroxifriedelano	>90	Não tóxica
<b>S15*</b>	3β,28,29-Tri-hidroxifriedelano	<10	Nematicida
<b>S16</b>	1-Oxo-3β,29-di-hidroxifriedelano	<10	Nematicida
<b>EH</b>	Ext. Hex. folhas <i>C. cognatum</i>	<10	Nematicida
<b>EC*</b>	Ext. CHCl <sub>3</sub> folhas <i>C. cognatum</i>	<10	Nematicida

\*Concentração final no ensaio de 100 µg mL<sup>-1</sup>, dez vezes superior em relação às outras amostras.

Diferentes modificações estruturais observadas nos demais triterpenos friedelânicos testados acarretaram no aumento ou diminuição da toxicidade destes compostos em relação às amostras **S4** e **S5**.

Para os triterpenos **S11** e **S12**, por exemplo, observou-se que a hidroxila na posição 29 foi responsável pela diminuição drástica da toxicidade destas amostras frente ao modelo *C. elegans*, sendo ambas consideradas não tóxicas na concentração de 10 µg mL<sup>-1</sup>.

Comparativamente, para o triterpeno **S8**, a hidroxila na posição 28 potencializou o efeito tóxico deste composto, promovendo a morte total das larvas, sendo esta a amostra que apresentou maior toxicidade frente ao *C. elegans*. O composto **S15**, com hidroxila nas posições 28 e 29, também apresentou atividade potencial nematicida, porém não promoveu a morte absoluta das larvas mesmo em concentração dez vezes superior que a testada para **S8**. A menor toxicidade observada de **S15** em relação a **S8** está relacionada à hidroxila no carbono 29.

Os resultados para a amostra **S16** mostraram uma taxa de sobrevivência inferior a 10%, sendo este composto considerado um potencial nematicida. Esta amostra apresentou toxicidade bastante superior à observada para **S11**, indicando que a carbonila na posição 1 foi responsável pelo aumento significativo do efeito tóxico sobre *C. elegans*.

Para o triterpeno **S9** observou-se um ligeiro aumento da toxicidade em relação à **S4**, sendo este aumento associado à hidroxila na posição 21 $\alpha$ . O resultado observado para **S10** indicou que a abertura do primeiro anel deste triterpeno está associada a uma pequena diminuição da toxicidade em relação também à **S4**.

A partir dos resultados obtidos para os extratos, observou-se que **EH** apresentou atividade nematicida similar para **EC**, mesmo em concentração dez vezes inferior. A presença de mais de 20% dos triterpenos não tóxicos **S11** e **S12** em **EC** corroboram para a menor atividade observada para este extrato em relação à **EH** frente ao modelo *C. elegans*.

### 3 – Considerações finais relativas aos testes de atividade biológica

Os resultados para o ensaio HET-CAM indicaram que todos os triterpenos friedelânicos testados exibiram expressiva atividade antiangiogênica. A comparação da porcentagem de inibição da angiogênese com diversos triterpenos de outras classes sugere que aqueles pertencentes à classe dos friedelanos apresentaram maior atividade na redução dos vasos sanguíneos.

No teste de toxicidade aguda em *C. elegans*, foi observado que os triterpenos com hidroxila na posição 29 (**S11** e **S12**) não interferiram no crescimento das larvas, não apresentando, portanto, potencial nematicida. O composto **S8** (com hidroxila na posição 28), na mesma concentração que os triterpenos anteriores, matou 100% das larvas, e o composto **S15** (com hidroxila nas posições 28 e 29) não foi capaz de matar 100% das larvas, mesmo em concentração 10 vezes superior que os anteriores. Para o triterpeno **S16**, observou-se uma taxa de sobrevivência de apenas 10%, indicando que o aumento na toxicidade foi devido à carbonila na posição 1. Estes resultados indicaram que a hidroxila na posição 29 promove uma redução na no efeito tóxico dos triterpenos friedelânicos frente ao *C. elegans*, ao passo que a carbonila na posição 1 e a hidroxila na posição 28 potencializaram a toxicidade dos compostos.

## CONCLUSÃO

Realizou-se neste trabalho o estudo químico dos extratos hexânico e clorofórmico das folhas de *Cheiloclinium cognatum* (Miers) A.C.Sm. (Celastraceae), de forma a isolar e identificar os principais constituintes químicos, além de avaliar o potencial antiangiogênico e nematocida dos compostos isolados. Realizou-se também um estudo do perfil de fragmentação via APCI-IT-TOF de todos os triterpenos friedelânicos identificados.

No estudo fitoquímico dos extratos hexânico e clorofórmico foram isolados e identificados 16 constituintes. Dentre eles, foram isolados três compostos graxos – mistura de hidrocarbonetos de cadeia longa (**S1**), mistura de álcoois graxos (**S6**) e mistura de ácidos graxos (**S13**) –, dois isoprenoides acíclicos – esqualeno (**S2**) e *gutta-percha* (**S14**) –, um esteroide –  $\beta$ -sitosterol (**S7**) –, mistura de três triterpenos do tipo ursano esterificados com ácidos graxos –  $3\beta$ -palmitoil-urs-12-eno (**S3-I**),  $3\beta$ -estearoil-urs-12-eno (**S3-II**) e  $3\beta$ -eicosanoil-urs-12-eno (**S3-III**) – e nove triterpenos da classe dos friedelanos – 3-oxo-friedelano (**S4**),  $3\beta$ -hidroxifriedelano (**S5**), 3-oxo-28-hidroxifriedelano (**S8**), 3-oxo-22 $\alpha$ -hidroxifriedelano (**S9**), ácido 3,4-*seco*-friedelan-3-oico (**S10**), 3-oxo-29-hidroxifriedelano (**S11**),  $3\beta,29$ -di-hidroxifriedelano (**S12**),  $3\beta,28,29$ -tri-hidroxifriedelano (**S15**) e 1-oxo- $3\beta,29$ -di-hidroxifriedelano (**S16**). Todos os metabólitos isolados foram descritos pela primeira vez como constituintes de plantas do gênero *Cheiloclinium*. Os compostos **S9** e **S12** foram identificados como inéditos na família Celastraceae e o isolamento e identificação de **S15** e **S16** foi relatado pela primeira vez neste trabalho.

Os compostos **S11**, **S12** e **S14** foram isolados em grande quantidade a partir do fracionamento do extrato clorofórmico das folhas de *C. cognatum*. Obteve-se cerca de 17,5 g da mistura dos triterpenos **S11** e **S12**, o que correspondeu a 21,3% do extrato clorofórmico, e 15,8 g de **S14**, correspondendo a 19,3% deste mesmo extrato.

O estudo por APCI-MS e APCI-MS/MS de triterpenos friedelânicos nunca havia sido realizado, e demonstrou ser uma possível alternativa na identificação e caracterização destes constituintes em amostras desconhecidas de forma rápida e eficaz. A partir do perfil de fragmentação dos triterpenos friedelânicos isolados de *C. cognatum* por APCI-IT-TOF foi possível observar que friedelanos hidroxilados

apresentam perda de uma molécula de água durante o processo de ionização. Para a maioria dos triterpenos analisados, o pico relativo ao íon  $[M+H-H_2O]^+$  foi o que apresentou maior intensidade relativa e, em alguns casos, o pico para o íon  $[M+H]^+$  não foi detectado. Na análise dos espectros de massas sequencial dos triterpenos friedelanos, observou-se que houve geração de picos com mesmo valor de  $m/z$  em mais de um constituinte, com isso não foi possível a identificação de íons-produto específicos de cada amostra. No entanto, a fragmentação induzida por colisão gerou perfis únicos de íons-filho para cada triterpeno, tornando possível a identificação destes compostos a partir de análises por APCI-MS e APCI-MS/MS utilizando o modo *product ion scan*.

Os resultados da atividade antiangiogênica para os triterpenos friedelânicos evidenciou o grande potencial desta classe de triterpenos frente à inibição do crescimento de vasos sanguíneos *in vivo* a partir do ensaio HET-CAM. Para 4  $\mu$ g de amostra por ovo, foi obtido um percentual de inibição da angiogênese entre 52,6% e 65,6%, valor superior aos encontrados na literatura para triterpenos de outras classes.

A partir dos resultados dos testes de toxicidade aguda em *C. elegans* foi verificado que triterpenos contendo hidroxila na posição 29 apresentam atividade nematocida reduzida ou ausente, ao passo que a presença da hidroxila na posição 28 e da carbonila na posição 1 sugerem aumento significativo da toxicidade das amostras frente ao *C. elegans*.

## REFERÊNCIAS

- ABE, I. Enzymatic synthesis of cyclic triterpenes. **Natural Product Reports**, v. 24, n. 6, p. 1311-1331, 2007.
- ALABUGIN, I. V.; GILMORE, K. M.; PETERSON, P. W. Hyperconjugation. **Wiley Interdisciplinary Reviews: Computational Molecular Science**, v. 1, n. 1, p. 109-141, 2011.
- ALVARENGA, N.; FERRO, E. A. Bioactive Triterpenes and Related Compounds from Celastraceae. In: ATTA UR, R. (Ed.). **Studies in Natural Products Chemistry**: Elsevier, v. 33, 2006. p.239-307. ISBN 1572-5995.
- ANJANEYULU, V.; RAVI, K. Terpenoids from *Euphorbia antiquorum*. **Phytochemistry**, v. 28, n. 6, p. 1695-1697, 1989.
- ARVANITIS, M.; GLAVIS-BLOOM, J.; MYLONAKIS, E. *C. elegans* for anti-infective discovery. **Current Opinion in Pharmacology**, v. 13, n. 5, p. 769-774, 2013.
- BARBOSA, L. C. A. **Espectroscopia no infravermelho na caracterização de compostos orgânicos**. Ed. UFV, 2007. ISBN 9788572692809.
- BOUCHOUX, G. Gas-phase basicities of polyfunctional molecules. Part 1: Theory and methods. **Mass Spectrometry Reviews**, v. 26, n. 6, p. 775-835, 2007.
- BRENNER, S. The Genetics of *Caenorhabditis elegans*. **Genetics**, v. 77, n. 1, p. 71-94, 1974.
- BURNS, A. R.; LUCIANI, G. M.; MUSSO, G.; BAGG, R.; YEO, M.; ZHANG, Y.; RAJENDRAN, L.; GLAVIN, J.; HUNTER, R.; REDMAN, E.; STASIUK, S.; SCHERTZBERG, M.; ANGUS MCQUIBBAN, G.; CAFFREY, C. R.; CUTLER, S. R.; TYERS, M.; GIAEVER, G.; NISLOW, C.; FRASER, A. G.; MACRAE, C. A.; GILLEARD, J.; ROY, P. J. *Caenorhabditis elegans* is a useful model for anthelmintic discovery. **Nature Communications**, v. 6, 2015.
- CARDELLINA, J. H. Step Gradient Elution in Gel Permeation Chromatography. A New Approach To Natural Products Separations. **Journal of Natural Products**, v. 46, n. 2, p. 196-199, 1983.
- CÁRDENAS, C.; QUESADA, A. R.; MEDINA, M. Á. Effects of ursolic acid on different steps of the angiogenic process. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 320, n. 2, p. 402-408, 2004.
- CARMELIET, P.; JAIN, R. K. Angiogenesis in cancer and other diseases. **Nature**, v. 407, n. 6801, p. 249-257, 2000.
- CLAVEL, G.; VALVASON, C.; YAMAOKA, K.; LEMEITER, D.; LAROCHE, L.; BOISSIER, M.-C.; BESSIS, N. Relationship between angiogenesis and inflammation

in experimental arthritis. **European Cytokine Network**, v. 17, n. 3, p. 202-210, 2006.

COSTA, E. A.; SANTOS, L. R.; PONTES, I. S.; MATOS, L. G.; SILVA, G. A.; LIÃO, L. M. Analgesic and anti-inflammatory effects of *Cheiloclinium cognatum* root barks. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 17, p. 508-513, 2007.

COUPERUS, P. A.; CLAGUE, A. D. H.; VAN DONGEN, J. P. C. M. Carbon-13 chemical shifts of some model carboxylic acids and esters. **Organic Magnetic Resonance**, v. 11, n. 12, p. 590-597, 1978.

DE-EKNAMKUL, W.; POTDUANG, B. Biosynthesis of  $\beta$ -sitosterol and stigmasterol in *Croton sublyratus* proceeds via a mixed origin of isoprene units. **Phytochemistry**, v. 62, n. 3, p. 389-398, 2003.

DEHELEAN, C.; FEFLEA, S.; MOLNÁR, J.; ZUPKO, I.; SOICA, C. Betulin as an Antitumor Agent Tested in vitro on A431, HeLa and MCF7, and as an Angiogenic Inhibitor in vivo in the CAM Assay. **Natural Product Communications**, v. 7, n. 8, p. 981-9825, 2012.

DENGG, M.; VAN MEEL, J. C. *Caenorhabditis elegans* as model system for rapid toxicity assessment of pharmaceutical compounds. **Journal of pharmacological and toxicological methods**, v. 50, n. 3, p. 209-14, 2004.

DEWICK, P. M. The biosynthesis of C5-C25 terpenoid compounds. **Natural Product Reports**, v. 19, n. 2, p. 181-222, 2002.

DUARTE, L. P. Estudo químico, estrutural e da atividade antibacteriana de triterpenos pentacíclicos isolados dos galhos e raízes de *Austroplenckia populnea*. **Tese de Doutorado. Departamento de Química. Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG.**, 2000.

DUARTE, L. P.; FIGUEIREDO, R. C.; SOUSA, G. F. D.; SOARES, D. B. D. S.; RODRIGUES, S. B. V.; SILVA, F. C.; SILVA, G. D. D. F.; VIEIRA FILHO, S. A. Chemical constituents of *Salacia elliptica* (Celastraceae). **Química Nova**, v. 33, p. 900-903, 2010.

FÉLIX, M.-A.; BRAENDLE, C. The natural history of *Caenorhabditis elegans*. **Current Biology**, v. 20, n. 22, p. R965-R969, 2010.

FENN, J. B.; MANN, M.; MENG, C. K.; WONG, S. F.; WHITEHOUSE, C. M. Electrospray ionization—principles and practice. **Mass Spectrometry Reviews**, v. 9, n. 1, p. 37-70, 1990.

FOLKMAN, J. Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease. **Nature Medicine**, v. 1, n. 1, p. 27-30, 1995.

GARIANO, R. F.; GARDNER, T. W. Retinal angiogenesis in development and disease. **Nature**, v. 438, n. 7070, p. 960-966, 2004.

GASPARINI, G.; LONGO, R.; TOI, M.; FERRARA, N. Angiogenic inhibitors: a new therapeutic strategy in oncology. **Nature Clinical Practice Oncology**, v. 2, n. 11, p. 562-577, 2005.

GEISLER, K.; HUGHES, R. K.; SAINSBURY, F.; LOMONOSSOFF, G. P.; REJZEK, M.; FAIRHURST, S.; OLSEN, C.-E.; MOTAWIA, M. S.; MELTON, R. E.; HEMMINGS, A. M.; BAK, S.; OSBOURN, A. Biochemical analysis of a multifunctional cytochrome P450 (CYP51) enzyme required for synthesis of antimicrobial triterpenes in plants. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 110, n. 35, p. E3360-E3367, 2013.

GENG, C.-A.; CHEN, H.; CHEN, X.-L.; ZHANG, X.-M.; LEI, L.-G.; CHEN, J.-J. Rapid characterization of chemical constituents in *Saniculiphyllum guangxiense* by ultra fast liquid chromatography with diode array detection and electrospray ionization tandem mass spectrometry. **International Journal of Mass Spectrometry**, v. 361, p. 9-22, 2014.

GOMES, S. M. A.; SILVA, E. A. M. D.; LOMBARDI, J. A.; AZEVEDO, A. A.; VALE, F. H. A. Anatomia foliar como subsídio à taxonomia de Hippocrateoideae (Celastraceae) no Sudeste do Brasil. **Acta Botanica Brasilica**, v. 19, p. 945-961, 2005.

GRÄWERT, T.; GROLL, M.; ROHDICH, F.; BACHER, A.; EISENREICH, W. Biochemistry of the non-mevalonate isoprenoid pathway. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 68, n. 23, p. 3797-3814, 2011.

HOFFMANN, E. Tandem mass spectrometry: A primer. **Journal of Mass Spectrometry**, v. 31, n. 2, p. 129-137, 1996.

HOFFMANN, E.; STROOBANT, V. **Mass Spectrometry: Principles and Applications**. Wiley, 2007. ISBN 9780470033104.

IWASAKI, T.; AGURA, K.; MAEGAWA, Y.; HAYASHI, Y.; OHSHIMA, T.; MASHIMA, K. A Tetranuclear-Zinc-Cluster-Catalyzed Practical and Versatile Deprotection of Acetates and Benzoates. **Chemistry – A European Journal**, v. 16, n. 38, p. 11567-11571, 2010.

JELLER, A. H.; SILVA, D. H.; LIAO, L. M.; BOLZANI VDA, S.; FURLAN, M. Antioxidant phenolic and quinonemethide triterpenes from *Cheiloclinium cognatum*. **Phytochemistry**, v. 65, n. 13, p. 1977-1982, 2004.

KARPLUS, M. Vicinal Proton Coupling in Nuclear Magnetic Resonance. **Journal of the American Chemical Society**, v. 85, n. 18, p. 2870-2871, 1963.

KIRBY, J.; KEASLING, J. D. Biosynthesis of Plant Isoprenoids: Perspectives for Microbial Engineering. **Annual Review of Plant Biology**, v. 60, n. 1, p. 335-355, 2009.

KOBET, R. A.; PAN, X.; ZHANG, B.; PAK, S. C.; ASCH, A. S.; LEE, M.-H. *Caenorhabditis elegans*: A Model System for Anti-Cancer Drug Discovery and

Therapeutic Target Identification. **Biomolecules & Therapeutics**, v. 22, n. 5, p. 371-383, 2014.

LAUW, S.; ILLARIONOVA, V.; BACHER, A.; ROHDICH, F.; EISENREICH, W. Biosynthesis of isoprenoids – studies on the mechanism of 2C-methyl-d-erythritol-4-phosphate synthase. **FEBS Journal**, v. 275, n. 16, p. 4060-4073, 2008.

LEUNG, M. C. K.; WILLIAMS, P. L.; BENEDETTO, A.; AU, C.; HELMCKE, K. J.; ASCHNER, M.; MEYER, J. N. *Caenorhabditis elegans*: An Emerging Model in Biomedical and Environmental Toxicology. **Toxicological Sciences**, v. 106, n. 1, p. 5-28, 2008.

LI, C.; HUANG, C.; LU, T.; WU, L.; DENG, S.; YANG, R.; LI, J. Tandem mass spectrometric fragmentation behavior of lignans, flavonoids and triterpenoids in *Streblus asper*. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v. 28, n. 21, p. 2363-70, 2014.

LI, Y.; GAO, S.; JING, H.; QI, L.; NING, J.; TAN, Z.; YANG, K.; ZHAO, C.; MA, L.; LI, G. Correlation of chemical acute toxicity between the nematode and the rodent. **Toxicology Research**, v. 2, n. 6, p. 403-412, 2013.

LIAO, L. M.; SILVA, G. A.; MONTEIRO, M. R.; ALBUQUERQUE, S. Trypanocidal activity of quinonemethide triterpenoids from *Cheilochlinium cognatum* (Hippocrateaceae). **Zeitschrift für Naturforschung C**, v. 63, n. 3-4, p. 207-210, 2008.

LIBY, K. T.; SPORN, M. B. Synthetic Oleanane Triterpenoids: Multifunctional Drugs with a Broad Range of Applications for Prevention and Treatment of Chronic Disease. **Pharmacological Reviews**, v. 64, n. 4, p. 972-1003, 2012.

LODEIRO, S.; XIONG, Q.; WILSON, W. K.; KOLESNIKOVA, M. D.; ONAK, C. S.; MATSUDA, S. P. T. An Oxidosqualene Cyclase Makes Numerous Products by Diverse Mechanisms: A Challenge to Prevailing Concepts of Triterpene Biosynthesis. **Journal of the American Chemical Society**, v. 129, n. 36, p. 11213-11222, 2007.

MAHATO, S. B.; KUNDU, A. P. <sup>13</sup>C NMR Spectra of pentacyclic triterpenoids—a compilation and some salient features. **Phytochemistry**, v. 37, n. 6, p. 1517-1575, 1994.

MCLAFFERTY, F. W. Tandem mass spectrometry. **Science**, v. 214, n. 4518, p. 280-287, 1981.

\_\_\_\_\_. Tandem mass spectrometry: From infancy to maturity in twenty-five years. **Organic Mass Spectrometry**, v. 28, n. 12, p. 1403-1406, 1993.

MESA-SIVERIO, D.; CHÁVEZ, H.; ESTÉVEZ-BRAUN, A.; RAVELO, Á. G. Cheiloclones A–I. First examples of octacyclic sesquiterpene-triterpene hetero-Diels–Alder adducts. **Tetrahedron**, v. 61, n. 2, p. 429-436, 2005.

MIRANDA, R. R. S.; SILVA, G. D. F.; DUARTE, L. P.; FORTES, I. C. P.; FILHO, S. A. V. Structural determination of 3 $\beta$ -stearoyloxy-urs-12-ene from *Maytenus salicifolia* by 1D and 2D NMR and quantitative <sup>13</sup>C NMR spectroscopy. **Magnetic Resonance in Chemistry**, v. 44, n. 2, p. 127-131, 2006.

MOKOKA, T. A.; MCGAW, L. J.; MDEE, L. K.; BAGLA, V. P.; IWALEWA, E. O.; ELOFF, J. N. Antimicrobial activity and cytotoxicity of triterpenes isolated from leaves of *Maytenus undata* (Celastraceae). **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 13, n. 1, p. 111-119, 2013.

MOR, F.; QUINTANA, F. J.; COHEN, I. R. Angiogenesis-Inflammation Cross-Talk: Vascular Endothelial Growth Factor Is Secreted by Activated T Cells and Induces Th1 Polarization. **The Journal of Immunology**, v. 172, n. 7, p. 4618-4623, 2004.

MOYLAN, C. R.; BRAUMAN, J. I. Gas Phase Acid-Base Chemistry. **Annual Review of Physical Chemistry**, v. 34, n. 1, p. 187-215, 1983.

MUNOS, J. W.; PU, X.; MANSOORABADI, S. O.; KIM, H. J.; LIU, H.-W. A Secondary Kinetic Isotope Effect Study of the 1-Deoxy-d-xylulose-5-phosphate Reductoisomerase-Catalyzed Reaction: Evidence for a Retroaldol-Aldol Rearrangement. **Journal of the American Chemical Society**, v. 131, n. 6, p. 2048-2049, 2009.

NORRBY, K. In vivo models of angiogenesis. **Journal of cellular and molecular medicine**, v. 10, n. 3, p. 588-612, 2006.

NOWAK-SLIWINSKA, P.; BALLINI, J.-P.; WAGNIÈRES, G.; VAN DEN BERGH, H. Processing of fluorescence angiograms for the quantification of vascular effects induced by anti-angiogenic agents in the CAM model. **Microvascular Research**, v. 79, n. 1, p. 21-28, 2010.

O'REILLY, L. P.; LUKE, C. J.; PERLMUTTER, D. H.; SILVERMAN, G. A.; PAK, S. C. *C. elegans* in high-throughput drug discovery. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 69-70, p. 247-253, 2014.

OHNISHI, T.; YOKOTA, T.; MIZUTANI, M. Insights into the function and evolution of P450s in plant steroid metabolism. **Phytochemistry**, v. 70, n. 17-18, p. 1918-1929, 2009.

OLDFIELD, E.; LIN, F.-Y. Terpene Biosynthesis: Modularity Rules. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 51, n. 5, p. 1124-1137, 2012.

PAVIA, D.; LAMPMAN, G.; KRIZ, G.; VYVYAN, J. **Introduction to Spectroscopy**. Cengage Learning, 2008. ISBN 9780495114789.

PEDERSEN, D. S.; ROSENBOHM, C. Dry Column Vacuum Chromatography. **Synthesis**, v. 2001, n. 16, p. 2431-2434, 2001.

PHILLIPS, D. R.; RASBERY, J. M.; BARTEL, B.; MATSUDA, S. P. T. Biosynthetic diversity in plant triterpene cyclization. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 9, n. 3, p. 305-314, 2006.

POGLIANI, L.; CERUTI, M.; RICCHIARDI, G.; VITERBO, D. An NMR and molecular mechanics study of squalene and squalene derivatives. **Chemistry and Physics of Lipids**, v. 70, n. 1, p. 21-34, 1994.

PORTA-DE-LA-RIVA, M.; FONTRODONA, L.; VILLANUEVA, A.; CERÓN, J. Basic *Caenorhabditis elegans* Methods: Synchronization and Observation. **Journal of Visualized Experiments : JoVE**, n. 64, p. 4019, 2012.

PRAGER, G. W.; POETTLER, M. Angiogenesis in cancer. Basic mechanisms and therapeutic advances. **Hämostaseologie**, v. 32, n. 2, p. 105-114, 2012.

PULLEN, F. The fascinating history of the development of LC-MS; a personal perspective. **Chromatography Today**, p. 4-7, 2010.

RAGA, D.; HERRERA, A.; SHEN, C.-C.; RAGASA, C. Triterpenes from *Ardisia cf. elliptica* (subgenus *Tinus*) limit vascular density and promote von Willebrand factor expression on duck chorioallantoic membrane. **Pharmaceutical Chemistry Journal**, v. 47, n. 1, p. 44-49, 2013.

RHOURRI-FRIH, B.; CHAIMBAULT, P.; CLAUDE, B.; LAMY, C.; ANDRE, P.; LAFOSSE, M. Analysis of pentacyclic triterpenes by LC-MS. A comparative study between APCI and APPI. **Journal of mass spectrometry : JMS**, v. 44, n. 1, p. 71-80, 2009.

RODRIGUES, V. G.; DUARTE, L. P.; SILVA, G. D. F.; SILVA, F. C.; GÓES, J. V.; TAKAHASHI, J. A.; PIMENTA, L. P. S.; VIEIRA FILHO, S. A. Evaluation of antimicrobial activity and toxic potential of extracts and triterpenes isolated from *Maytenus imbricata*. **Química Nova**, v. 35, p. 1375-1380, 2012.

SALAZAR, G. C. M.; SILVA, G. D. F.; DUARTE, L. P.; VIEIRA FILHO, S. A.; LULA, I. S. Two epimeric friedelane triterpenes isolated from *Maytenus truncata* Reiss: <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C chemical shift assignments. **Magnetic Resonance in Chemistry**, v. 38, n. 11, p. 977-980, 2000.

SANTOS-OLIVEIRA, R.; COULAUD-CUNHA, S.; COLAÇO, W. Revisão da *Maytenus ilicifolia* Mart. ex Reissek, Celastraceae. Contribuição ao estudo das propriedades farmacológicas. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 19, p. 650-659, 2009.

SATO, T. Unique Biosynthesis of Sesquiterpenes (C<sub>35</sub> Terpenes). **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v. 77, n. 6, p. 1155-1159, 2013.

SETZER, W. N.; SETZER, M. C.; PEPPERS, R. L.; MCFERRIN, M. B.; MEEHAN, E. J.; CHEN, L.; BATES, R. B.; NAKKIEW, P.; JACKES, B. R. Triterpenoid Constituents in the Bark of *Balanops australiana*. **Australian Journal of Chemistry**, v. 53, n. 9, p. 809-812, 2000.

SHAHAB, Y. A.; BASHEER, R. A. Nuclear magnetic resonance spectroscopy of partially saturated diene polymers. II.  $^{13}\text{C}$ -NMR spectra of partially hydrogenated natural rubber, gutta percha, and cis-1,4-polybutadiene. **Journal of Polymer Science: Polymer Chemistry Edition**, v. 17, n. 3, p. 919-921, 1979.

SILVA, F. C.; DUARTE, L. P.; SILVA, G. D. F.; VIEIRA-FILHO, S. A.; LULA, I. S.; TAKAHASHI, J. A.; SALLUM, W. S. T. Chemical constituents from branches of *Maytenus gonoclada* (Celastraceae) and evaluation of antimicrobial activity. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 22, p. 943-949, 2011.

SILVA, F. C.; GUEDES, F. A. F.; FRANCO, M. W.; BARBOSA, F. A. R.; MARRA, C. A.; DUARTE, L. P.; SILVA, G. D. F.; VIEIRA-FILHO, S. A. Algistatic effect of a quinonamethide triterpene on *Microcystis novacekii*. **Journal of Applied Phycology**, v. 25, n. 6, p. 1723-1728, 2013.

SIMMONS, M. P.; CAPP, J. J.; ARCHER, R. H.; FORD, A. J.; EICHSTEDT, D.; CLEVINGER, C. C. Phylogeny of the Celastreae (Celastraceae) and the relationships of *Catha edulis* (qat) inferred from morphological characters and nuclear and plastid genes. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 48, n. 2, p. 745-757, 2008.

SOHN, K.-H.; LEE, H.-Y.; CHUNG, H.-Y.; YOUNG, H.-S.; YI, S.-Y.; KIM, K.-W. Anti-angiogenic activity of triterpene acids. **Cancer Letters**, v. 94, n. 2, p. 213-218, 1995.

SOUSA, G. F. D.; SOARES, D. C. F.; MUSSEL, W. D. N.; POMPEU, N. F. E.; SILVA, G. D. D. F.; VIEIRA FILHO, S. A.; DUARTE, L. P. Pentacyclic triterpenes from branches of *Maytenus robusta* and in vitro cytotoxic property against 4T1 cancer cells. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 25, p. 1338-1345, 2014.

TAFT, R. W. **Progress in Physical Organic Chemistry**. Wiley, 2009. ISBN 9780470172148.

THIMMAPPA, R.; GEISLER, K.; LOUVEAU, T.; O'MAILLE, P.; OSBOURN, A. Triterpene Biosynthesis in Plants. **Annual Review of Plant Biology**, v. 65, n. 1, p. 225-257, 2014.

VALDES, T. I.; KREUTZER, D.; MOUSSY, F. The chick chorioallantoic membrane as a novel in vivo model for the testing of biomaterials. **Journal of biomedical materials research**, v. 62, n. 2, p. 273-82, 2002.

VAN DER DOELEN, G. A.; VAN DEN BERG, K. J.; BOON, J. J.; SHIBAYAMA, N.; RENÉ DE LA RIE, E.; L. GENUIT, W. J. Analysis of fresh triterpenoid resins and aged triterpenoid varnishes by high-performance liquid chromatography–atmospheric pressure chemical ionisation (tandem) mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 809, n. 1–2, p. 21-37, 1998.

VELOSO, C. D. C.; RODRIGUES, V. G.; AZEVEDO, A. D. O.; OLIVEIRA, C. D. C.; LINDISLE, F. G.; DUARTE, L. P.; DUARTE, I. D.; KLEIN, A.; PEREZ, A. D. C. Antinociceptive effects of *Maytenus imbricata* Mart. ex. Reissek (Celastraceae) root

extract and its tingenone constituent. **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 8, n. 1, p. 68-76, 2014.

VIEIRA-FILHO, S. A.; DUARTE, L. P.; SILVA, G. D. F.; LULA, I. S.; DOS SANTOS, M. H. Total assignment of <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C NMR spectra of two 3,4-secofriedelanes from *Austroplenckia populnea*. **Magnetic Resonance in Chemistry**, v. 39, n. 12, p. 746-748, 2001.

VIEIRA, L. C. Desenvolvimento de sistemas de liberação prolongada de ácido rosmarínico para o tratamento de doenças oculares causadoras de neovascularização: obtenção e caracterização dos sistemas. **Dissertação de Mestrado. Faculdade de Farmácia. Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG**, 2011.

VIJAY AVIN, B. R.; PRABHU, T.; RAMESH, C. K.; VIGNESHWARAN, V.; RIAZ, M.; JAYASHREE, K.; PRABHAKAR, B. T. New role of lupeol in reticence of angiogenesis, the cellular parameter of neoplastic progression in tumorigenesis models through altered gene expression. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 448, n. 2, p. 139-144, 2014.

WANG, K.-W.; JU, X.-Y.; ZHANG, C.-C.; ZHANG, J.-Y. Phytochemical and chemotaxonomic study on *Microtropis triflora*. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 52, n. 0, p. 1-3, 2014.

WATSON, J. T. A historical perspective and commentary on pioneering developments in gas chromatography/mass spectrometry at MIT. **Journal of mass spectrometry : JMS**, v. 33, n. 2, p. 103-8, 1998.

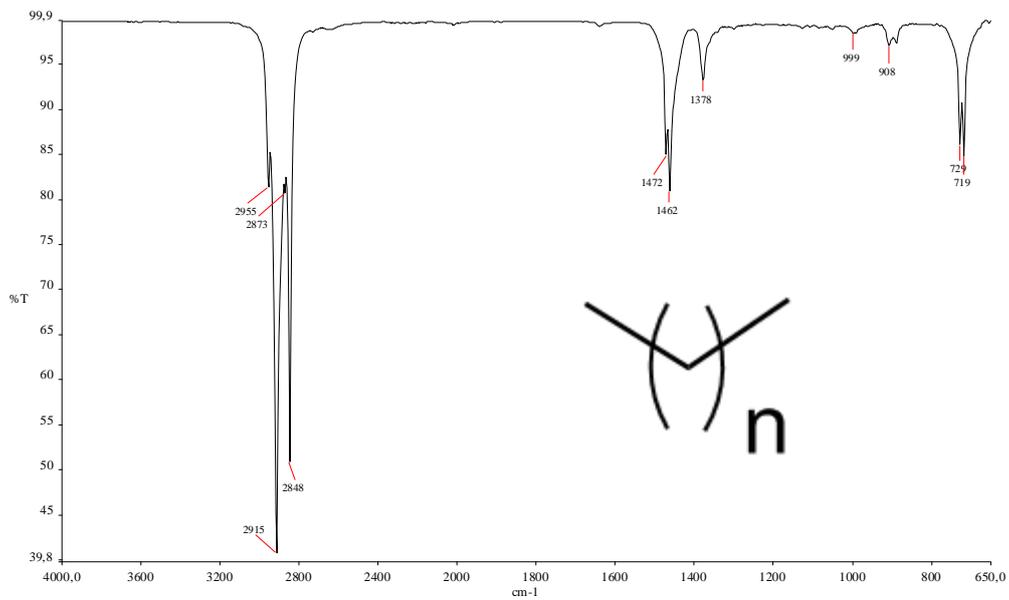
XU, R.; FAZIO, G. C.; MATSUDA, S. P. T. On the origins of triterpenoid skeletal diversity. **Phytochemistry**, v. 65, n. 3, p. 261-291, 2004.

ZHAO, Y.-J.; CHENG, Q.-Q.; SU, P.; CHEN, X.; WANG, X.-J.; GAO, W.; HUANG, L.-Q. Research progress relating to the role of cytochrome P450 in the biosynthesis of terpenoids in medicinal plants. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 98, n. 6, p. 2371-2383, 2014.

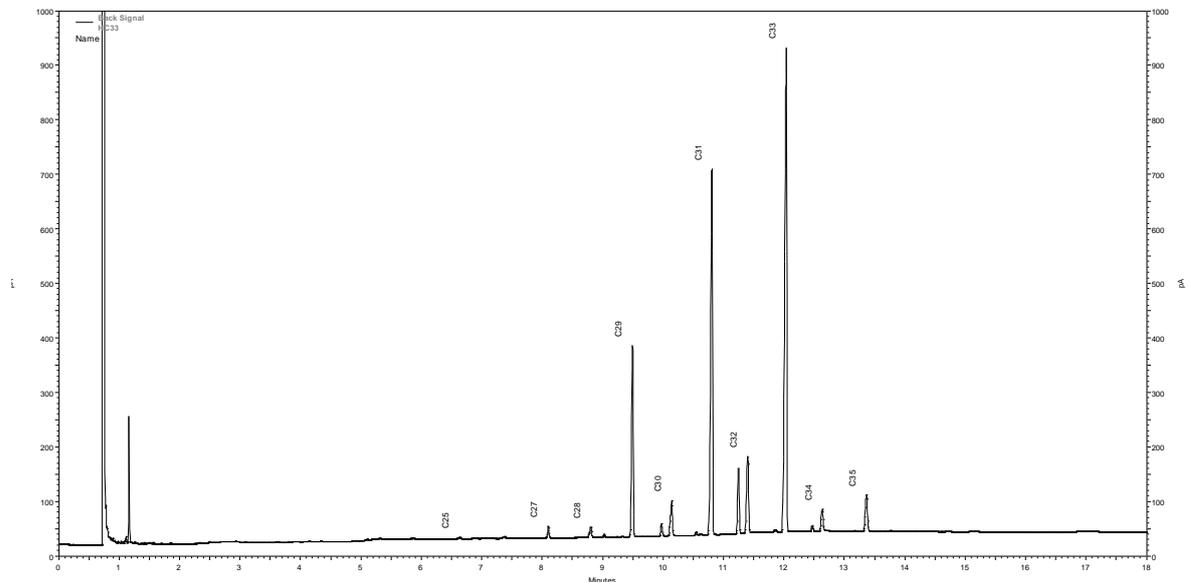
## APÊNDICE

## A. Espectro e cromatogramas de S1

## Apêndice AA – Espectro na região do IV para S1 (ATR)

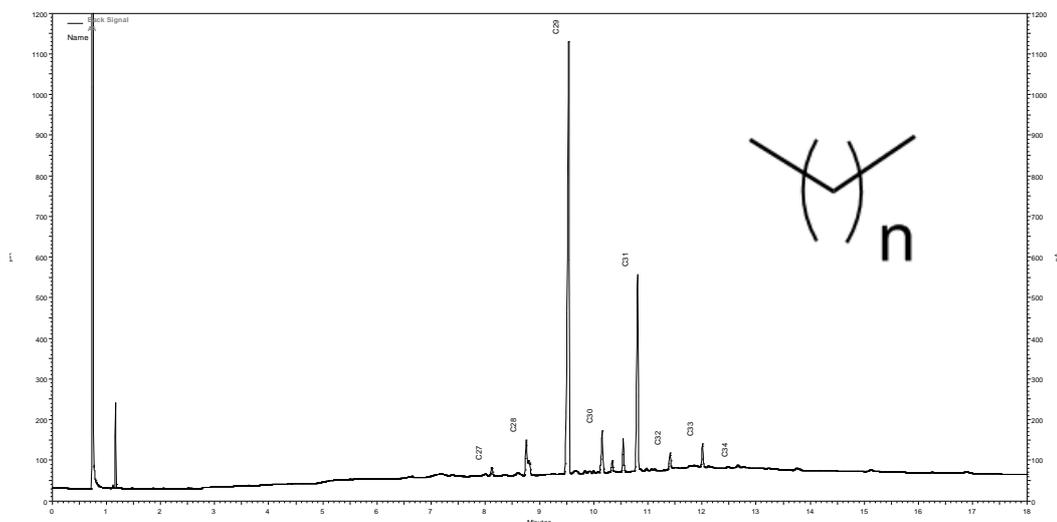


## Apêndice AB – Cromatograma GC-FID para padrão de hidrocarbonetos



Gradiente de temperatura: 200 °C, 0 min, 10 °C/min, 300 °C; injetor *splitless* a 300 °C; detector a 320 °C.

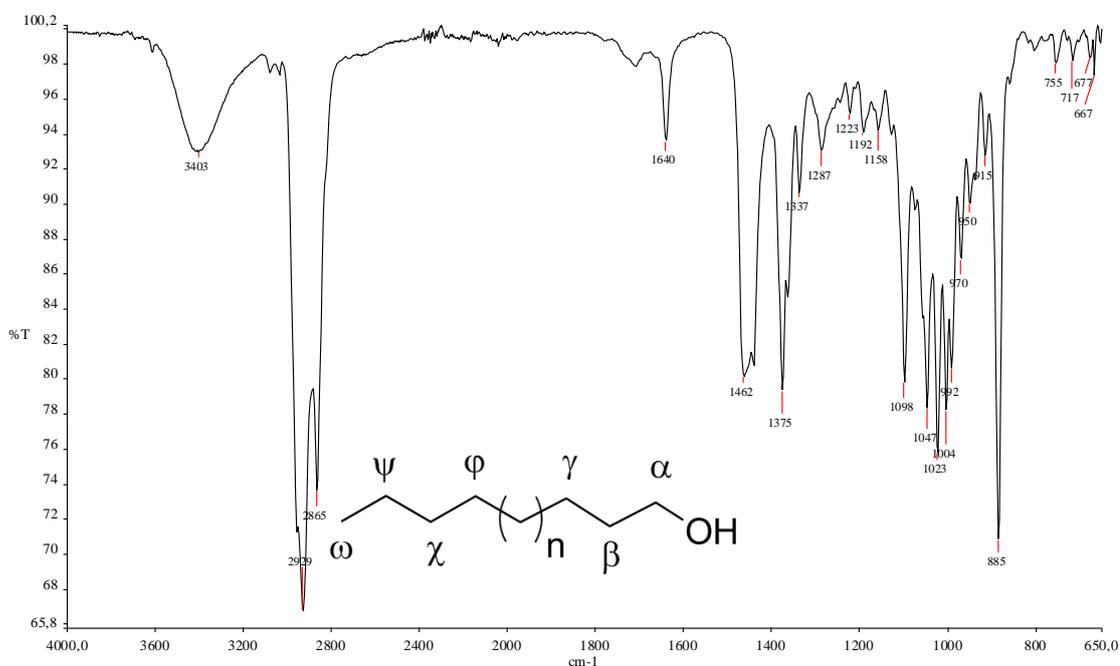
Apêndice AC – Cromatograma GC-FID para S1



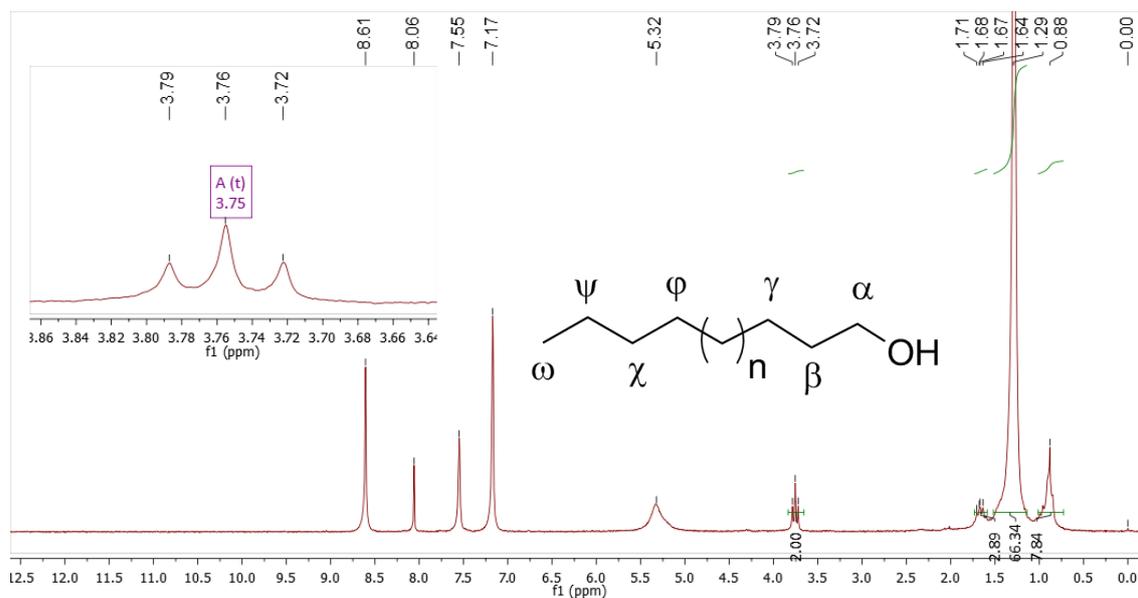
Gradiente de temperatura: 200 °C, 0 min, 10 °C/min, 300 °C; injetor *splitless* a 300 °C; detector a 320 °C.

B. Espectros de S6

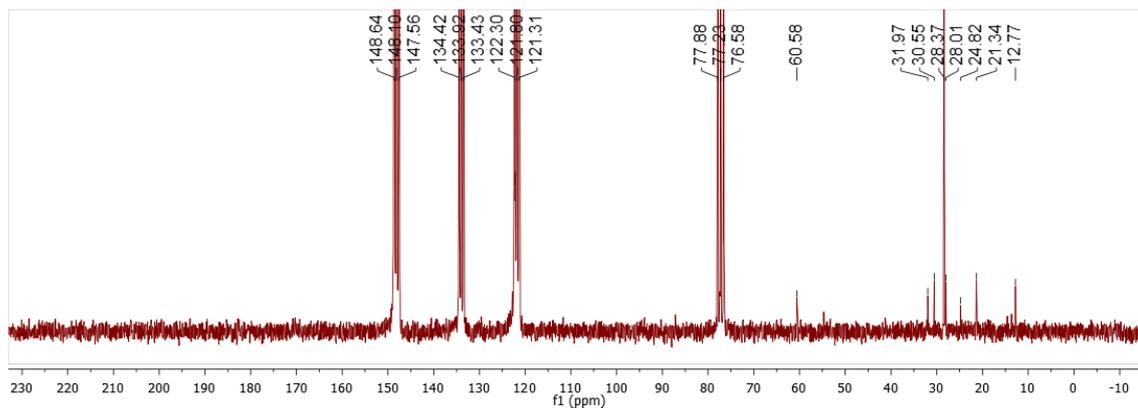
Apêndice BA – Espectro na região do IV de S6 (ATR)



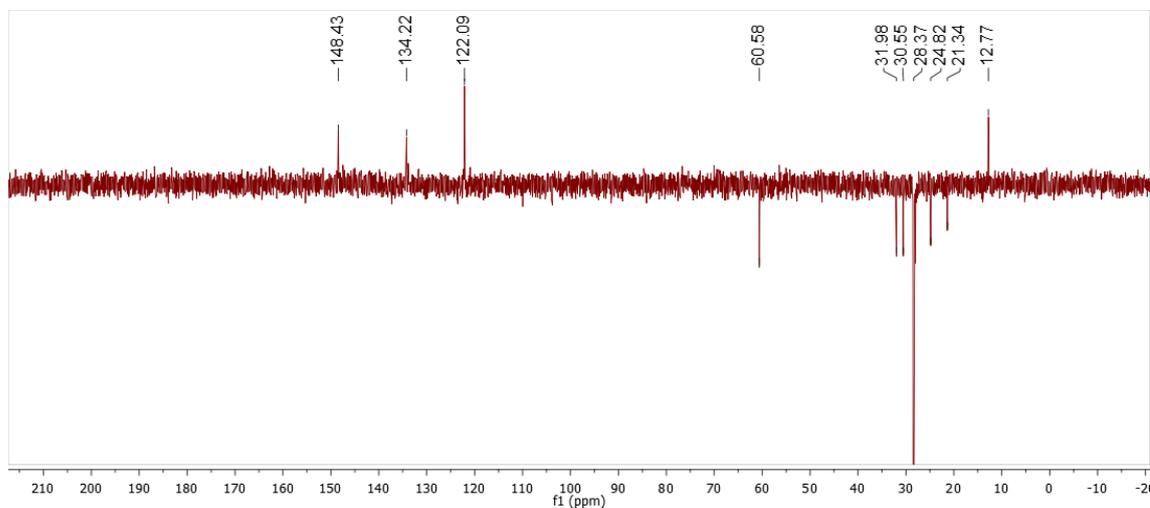
Apêndice BB – Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (400 MHz) de **S6**,  $\text{CDCl}_3$  + Pyr-d5



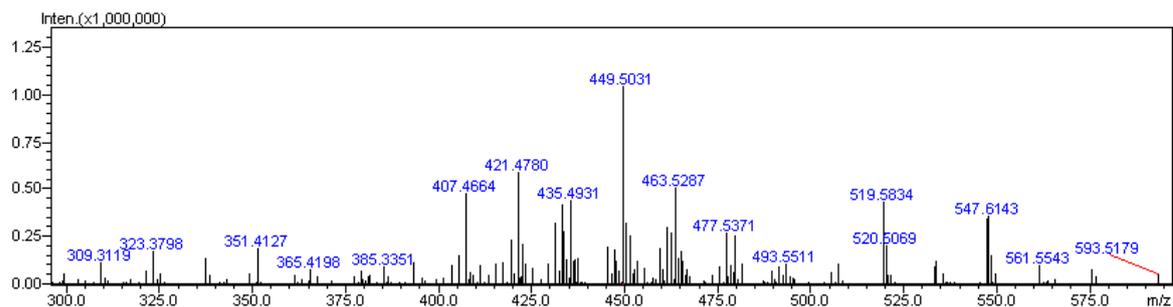
Apêndice BC – Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (100 MHz) de **S6**,  $\text{CDCl}_3$  + Pyr-d5



Apêndice BD – Subespectro DEPT-135 (100 MHz) de **S6**,  $\text{CDCl}_3$  + Pyr-d5

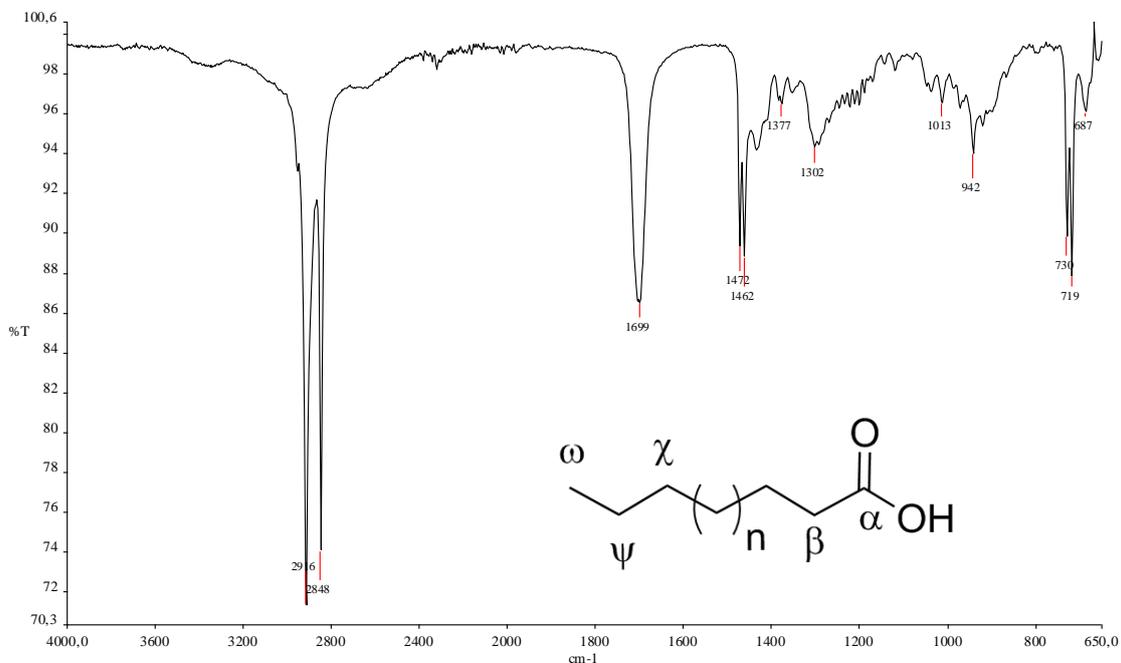


Apêndice BE – Espectro de APCI-MS (modo positivo) para S6

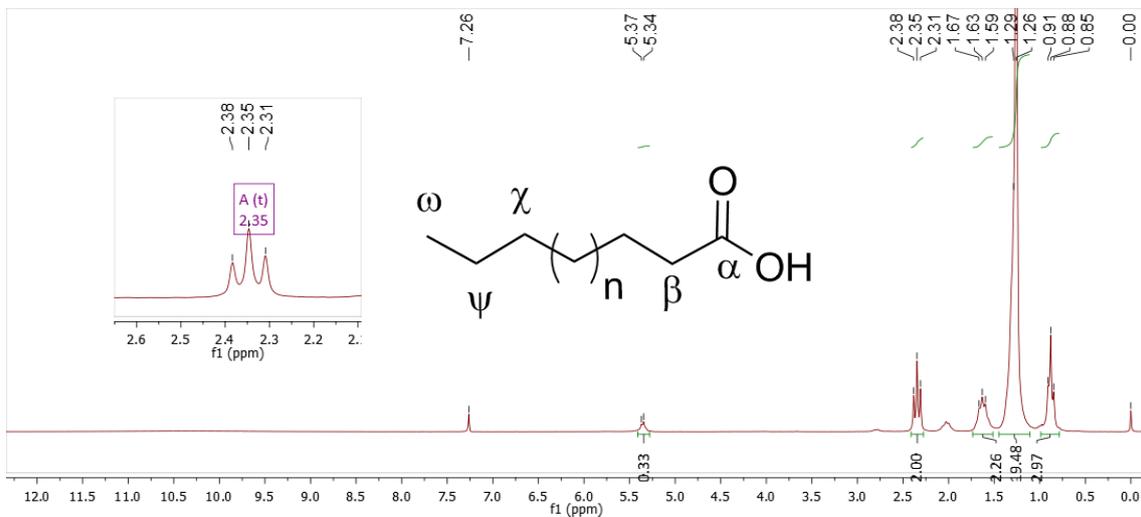


C. Espectros de S13

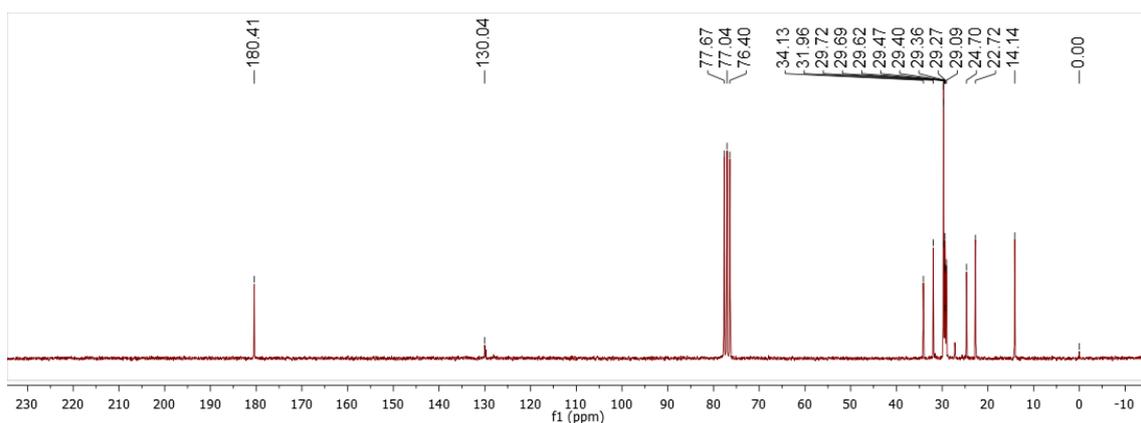
Apêndice CA – Espectro na região do IV de S13 (ATR)



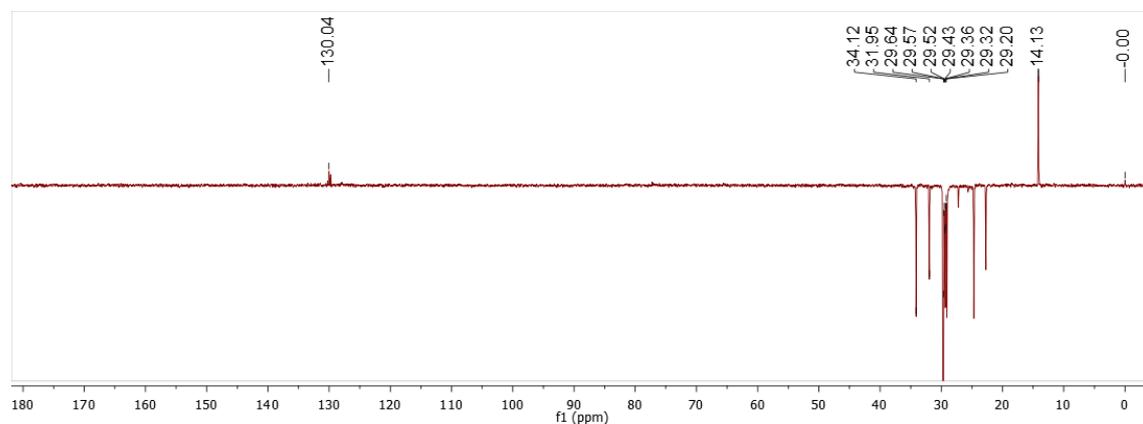
Apêndice CB – Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (400 MHz) de **S13**,  $\text{CDCl}_3$



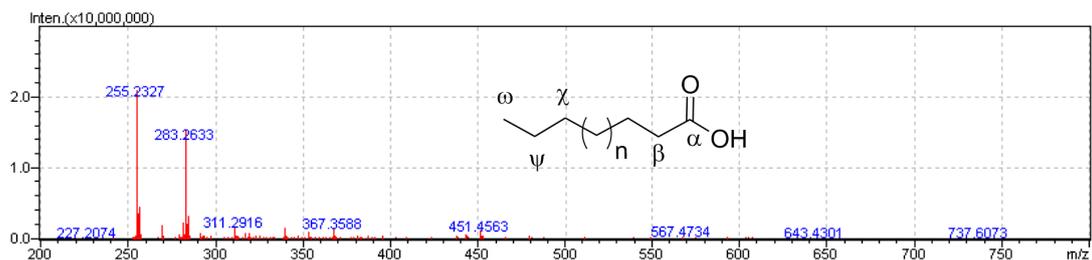
Apêndice CC – Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (100 MHz) de **S13**,  $\text{CDCl}_3$



Apêndice CD – Subespectro DEPT-135 (100 MHz) de **S13**,  $\text{CDCl}_3$

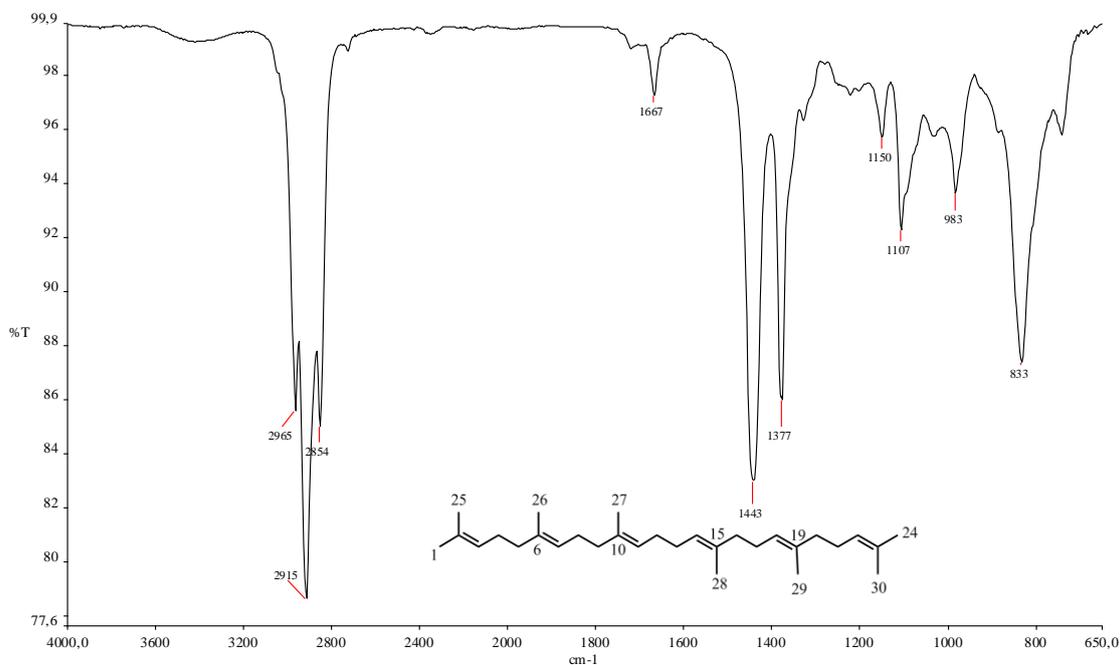


Apêndice CE – Espectro de APCI-MS (modo negativo) para S13

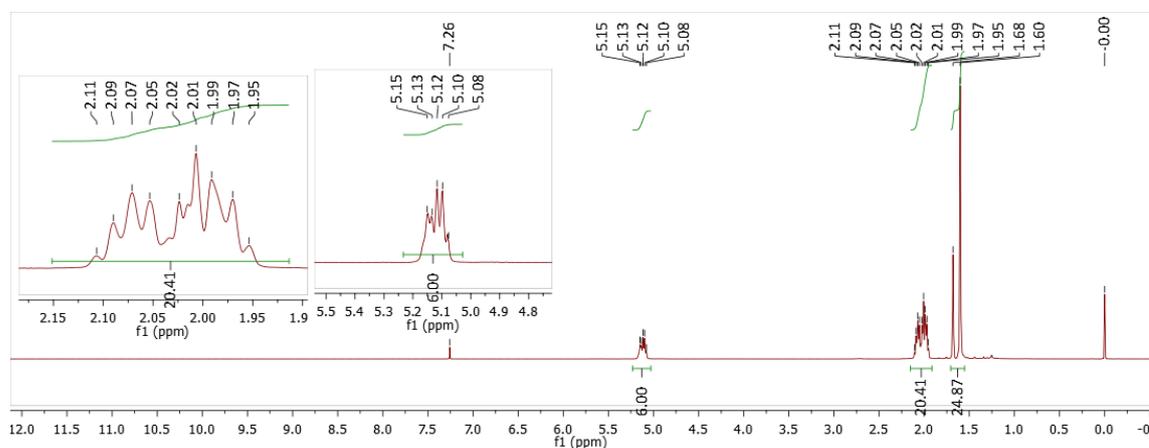


D. Espectros de S2

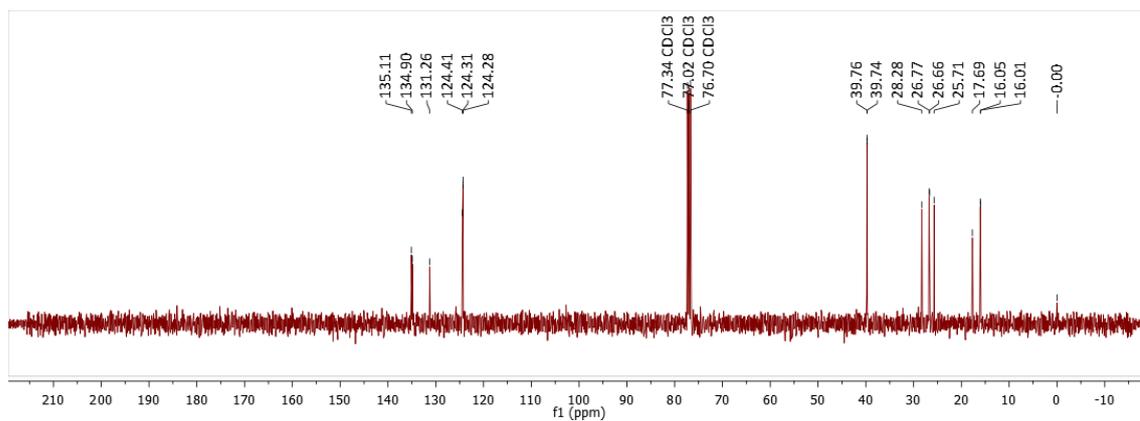
Apêndice DA – Espectro na região do IV de S2 (ATR)



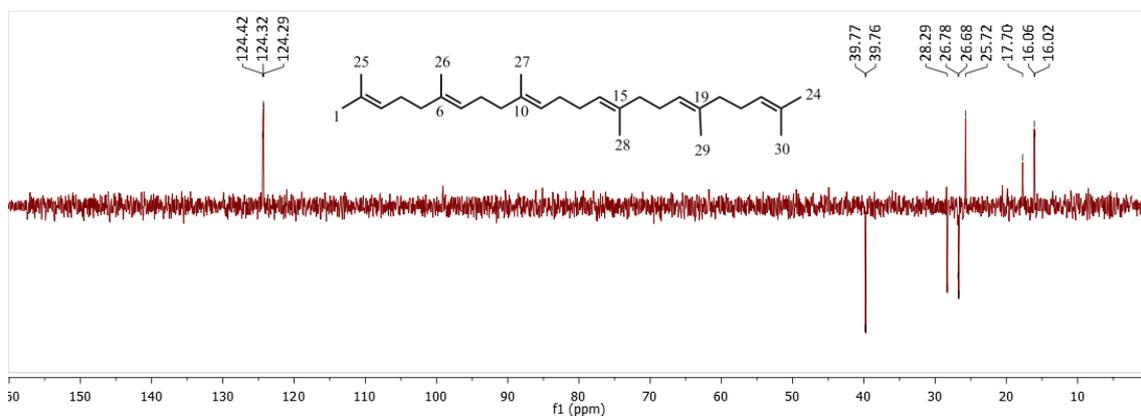
Apêndice DB – Espectro de RMN de <sup>1</sup>H (400 MHz) de S2, CDCl<sub>3</sub>



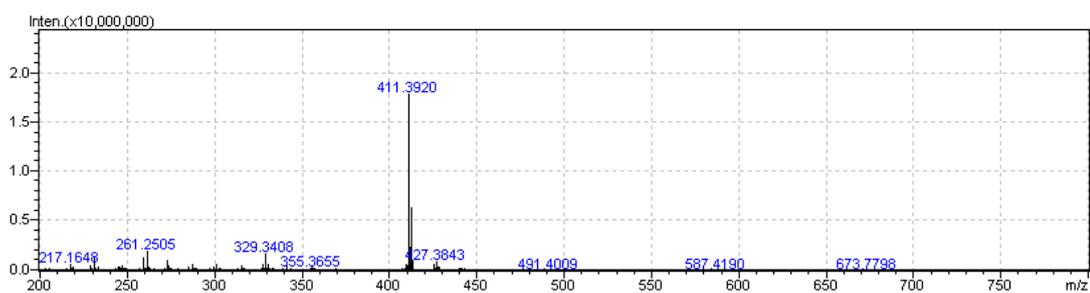
Apêndice DC – Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (100 MHz) de **S2**,  $\text{CDCl}_3$



Apêndice DD – Subespectro DEPT-135 (100 MHz) de **S2**,  $\text{CDCl}_3$

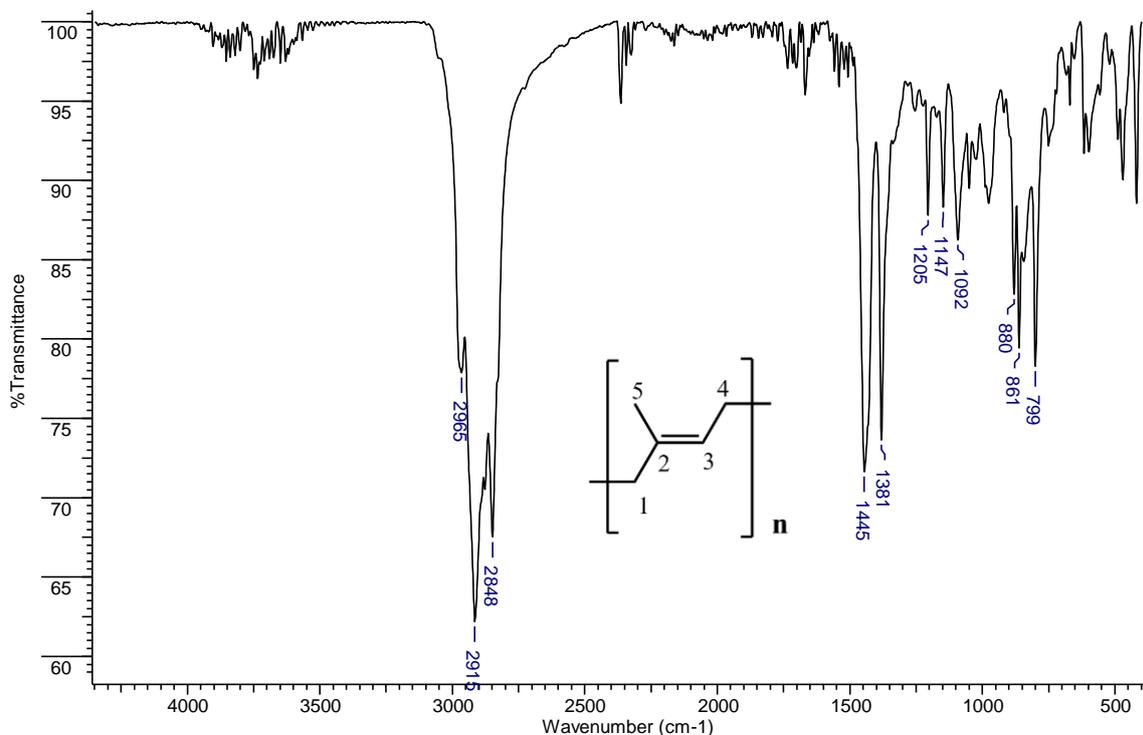


Apêndice DE – Espectro de APCI-MS (modo positivo) para **S2**

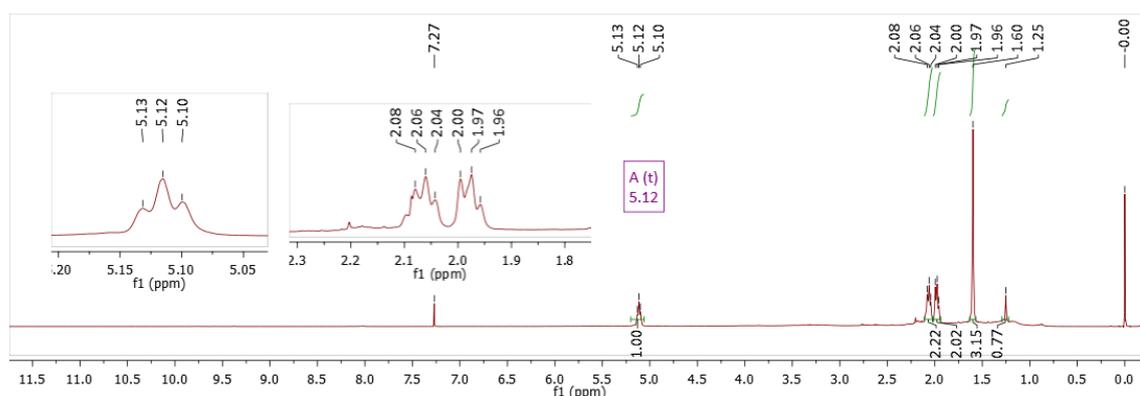


E. Espectros de S14

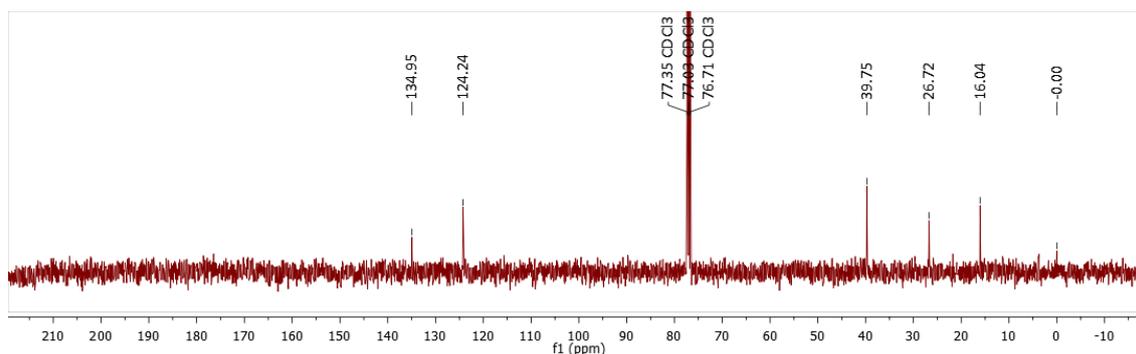
Apêndice EA – Espectro na região do IV de **S14** (ATR)



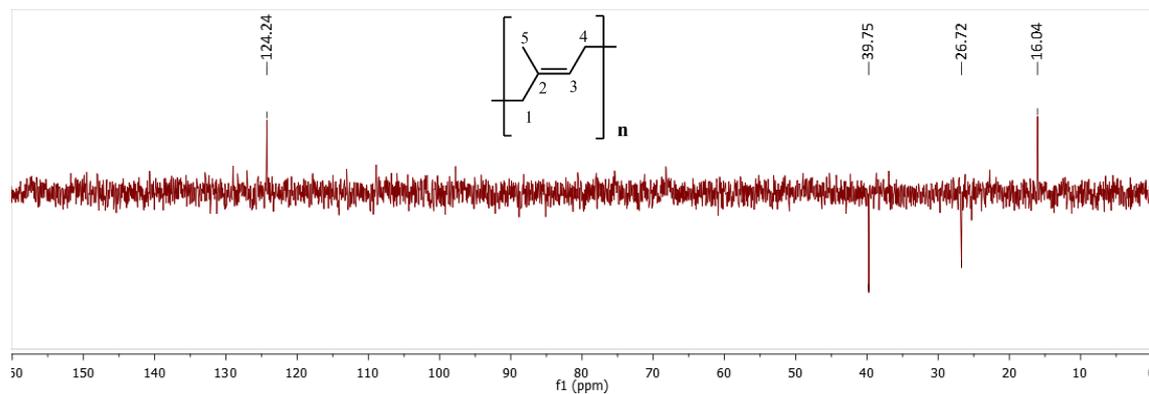
Apêndice EB – Espectro de RMN de <sup>1</sup>H (400 MHz) de **S14**, CDCl<sub>3</sub>



Apêndice EC – Espectro de RMN de <sup>13</sup>C (100 MHz) de **S14**, CDCl<sub>3</sub>

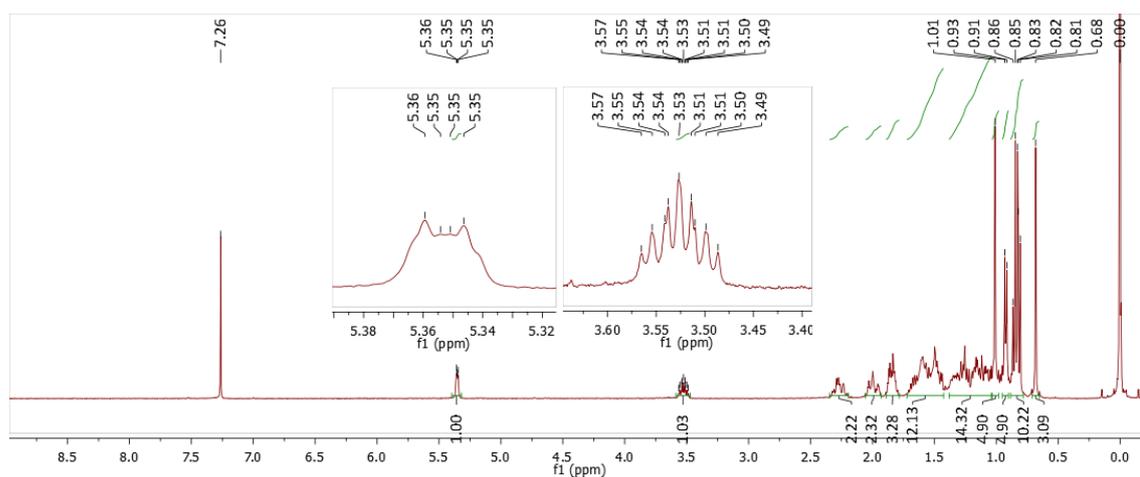


Apêndice ED – Subespectro DEPT-135 (100 MHz) de **S14**,  $\text{CDCl}_3$

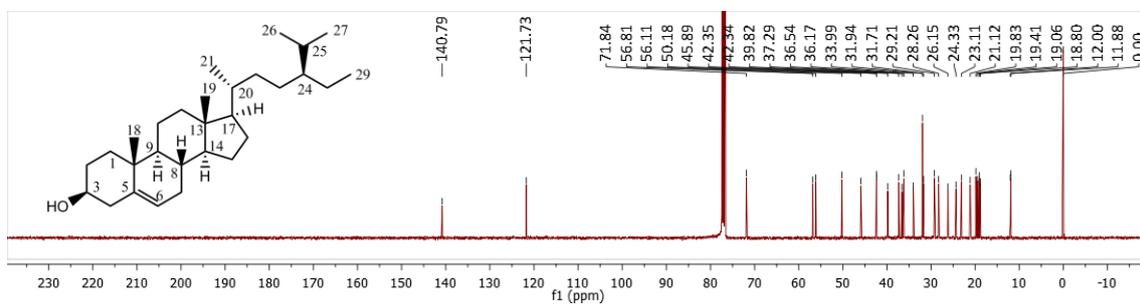


F. Espectros de **S7**

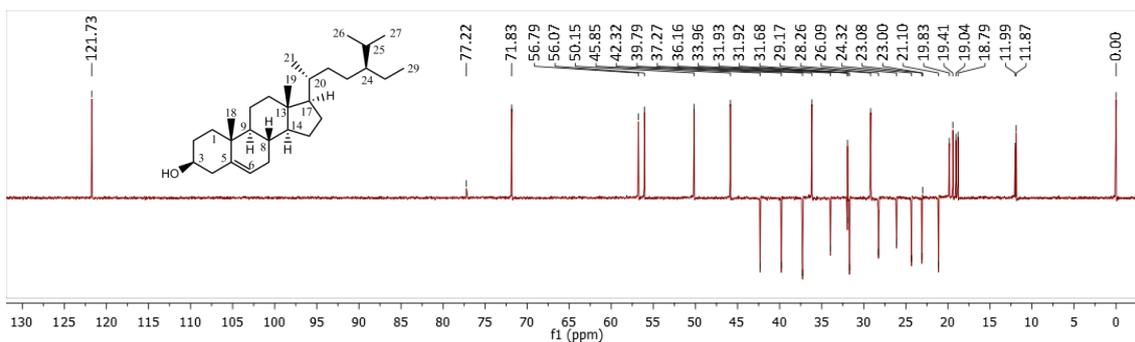
Apêndice FA – Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (400 MHz) de **S7**,  $\text{CDCl}_3$



Apêndice FB – Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (100 MHz) de **S7**,  $\text{CDCl}_3$

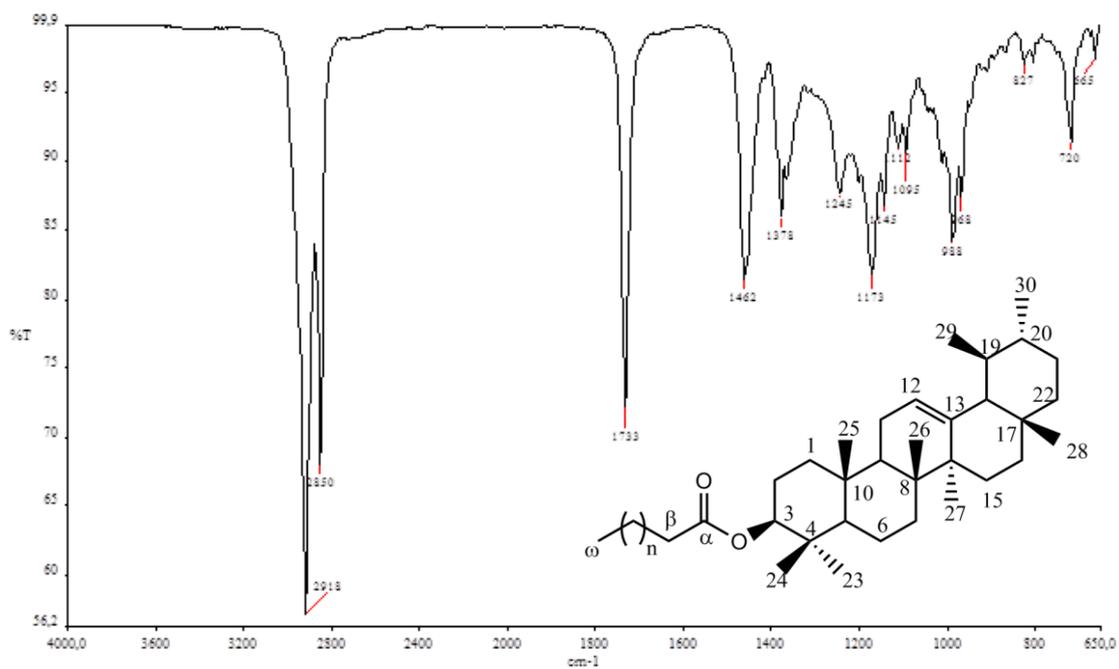


Apêndice FC – Subespectro DEPT-135 (100 MHz) de **S7**, CDCl<sub>3</sub>

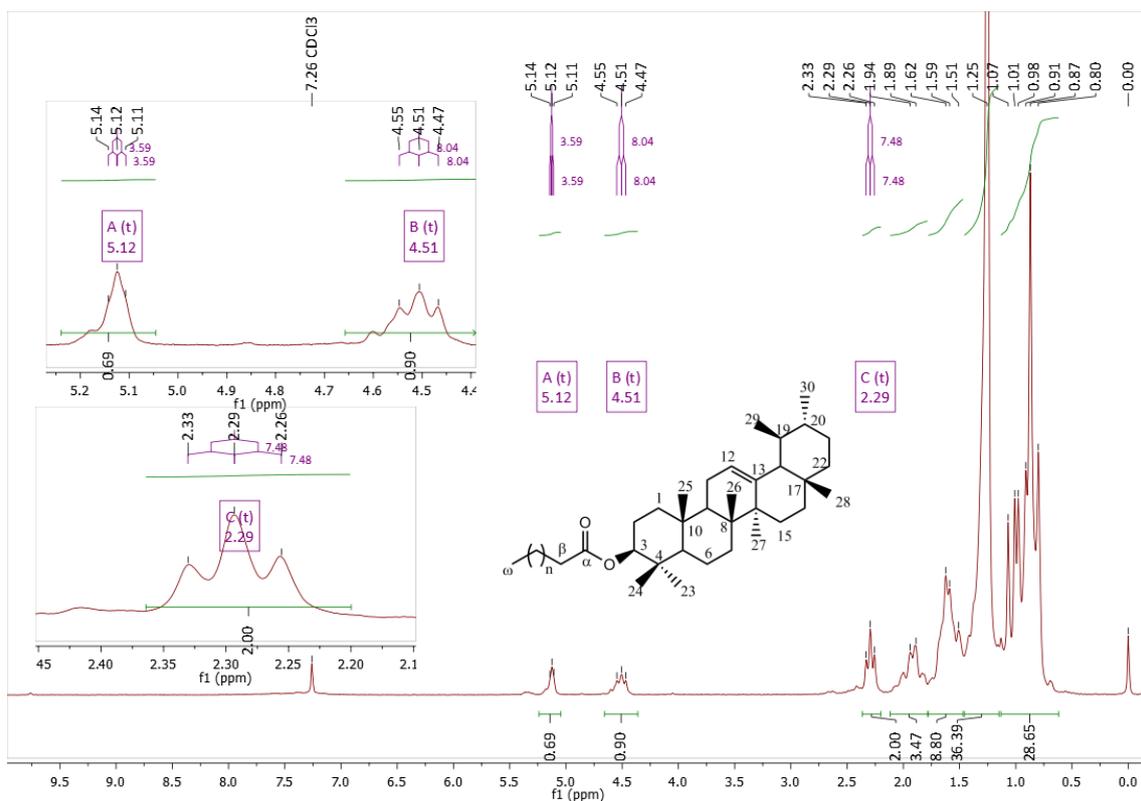


G. Espectros de S3

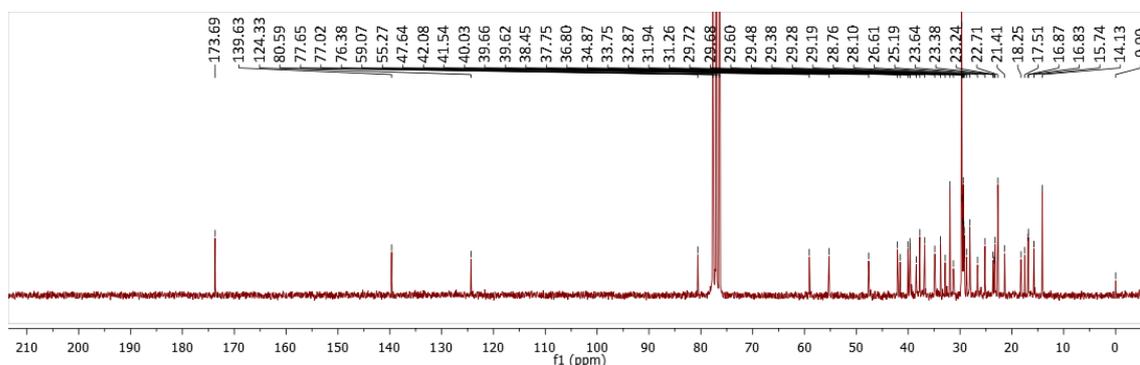
Apêndice GA – Espectro na região do IV de **S3** (ATR)



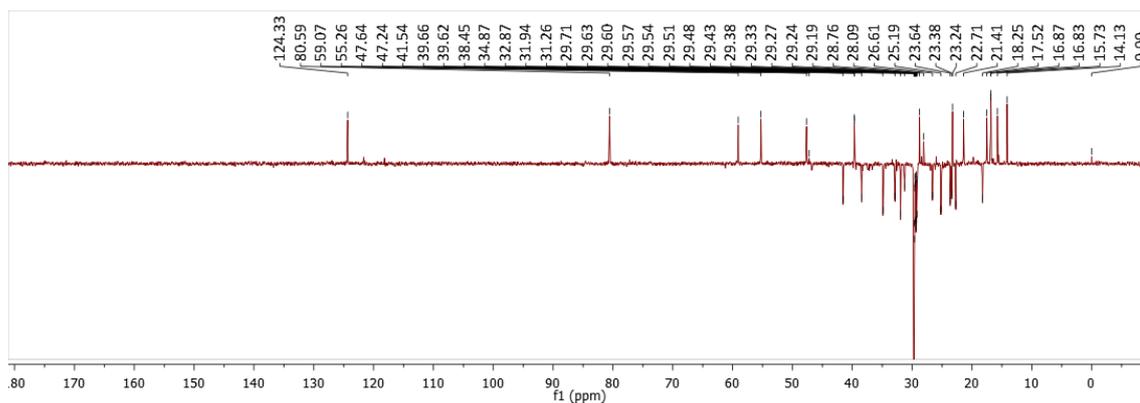
Apêndice GB – Espectro de RMN de <sup>1</sup>H (200 MHz) de **S3**, CDCl<sub>3</sub>



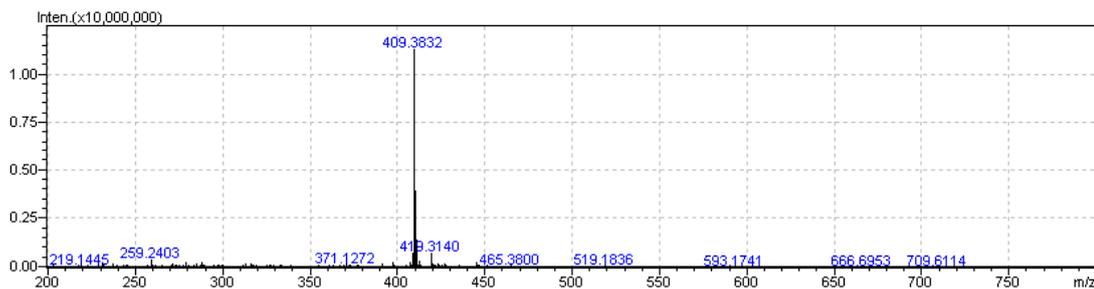
Apêndice GC – Espectro de RMN de <sup>13</sup>C (50 MHz) de **S14**, CDCl<sub>3</sub>



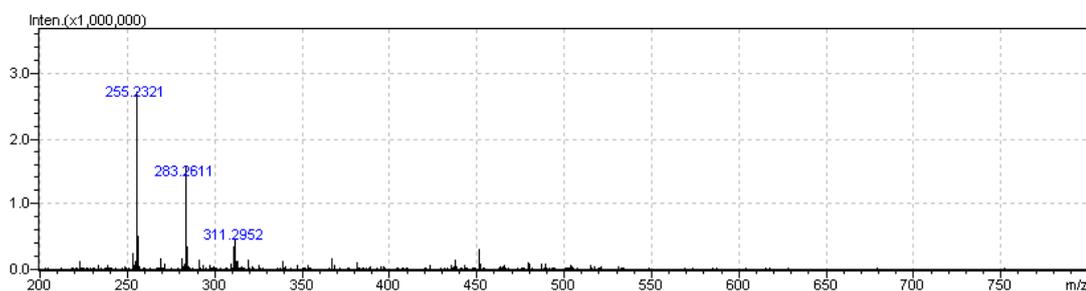
Apêndice GD – Subespectro DEPT-135 (50 MHz) de **S3**, CDCl<sub>3</sub>



**Apêndice GE – Espectro de APCI-MS (modo positivo) para S3**

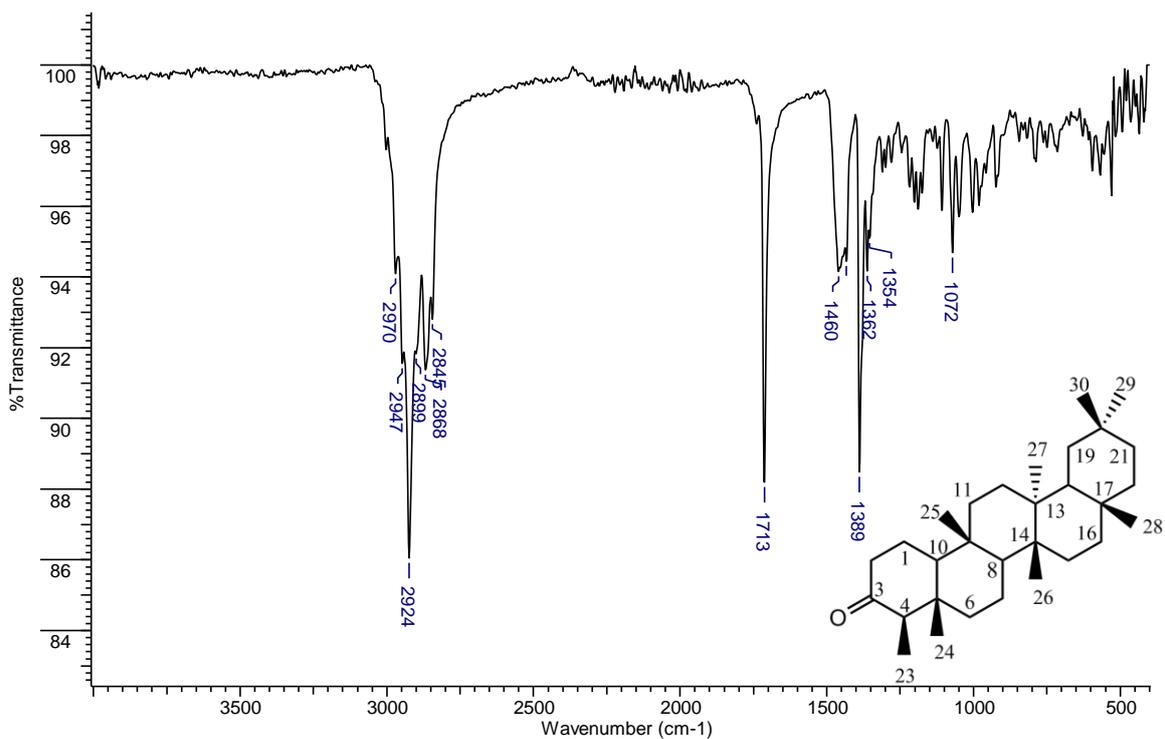


**Apêndice GF – Espectro de APCI-MS (modo negativo) para S3**

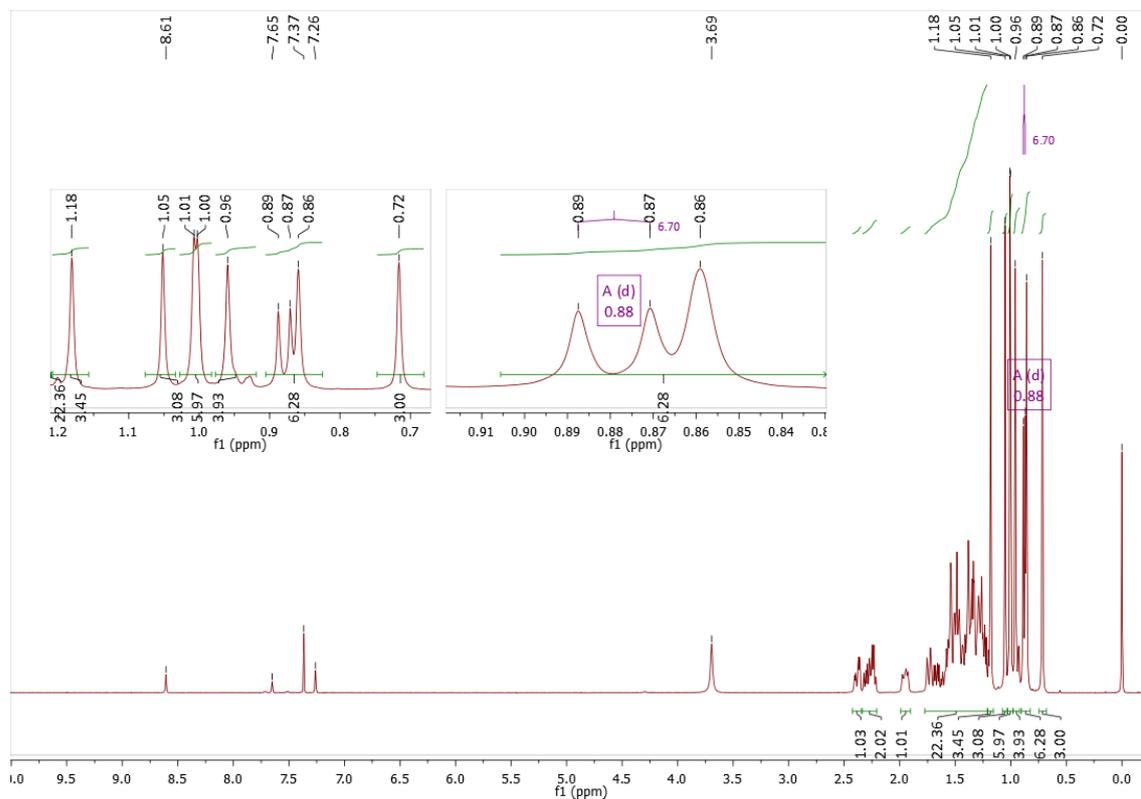


**H. Espectros de S4**

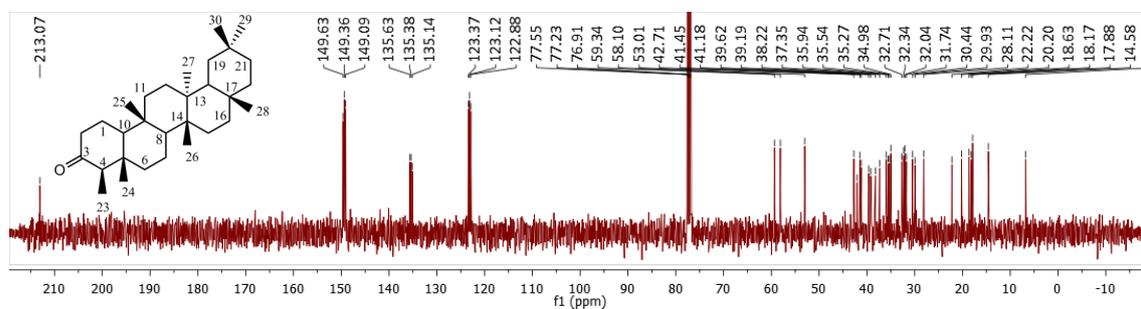
**Apêndice HA – Espectro na região do IV de S4 (ATR)**



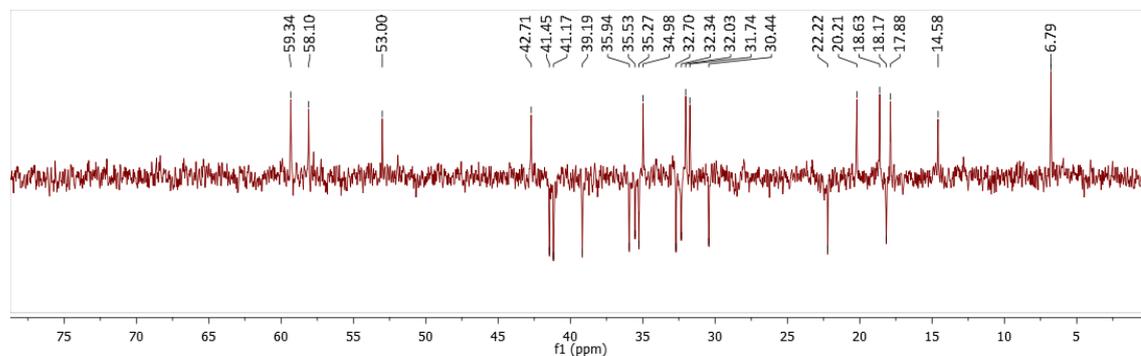
Apêndice HB – Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (400 MHz) de **S4**,  $\text{CDCl}_3+\text{Pyr-d}_5$



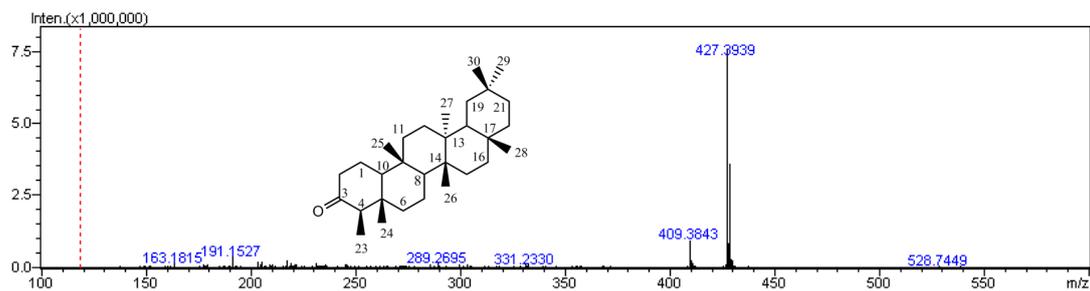
Apêndice HC – Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (100 MHz) de **S4**,  $\text{CDCl}_3+\text{Pyr-d}_5$



Apêndice HD – Subespectro DEPT-135 (100 MHz) de **S4**,  $\text{CDCl}_3+\text{Pyr-d}_5$

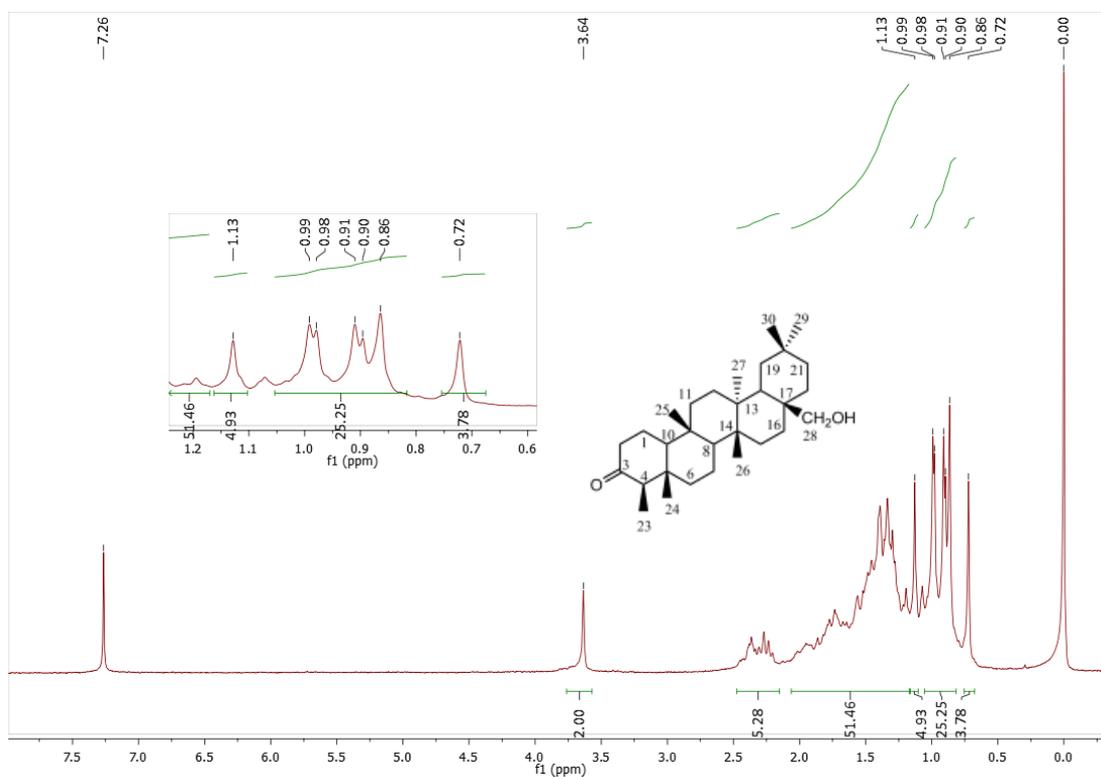


Apêndice HE – Espectro de APCI-MS (modo positivo) para **S4**

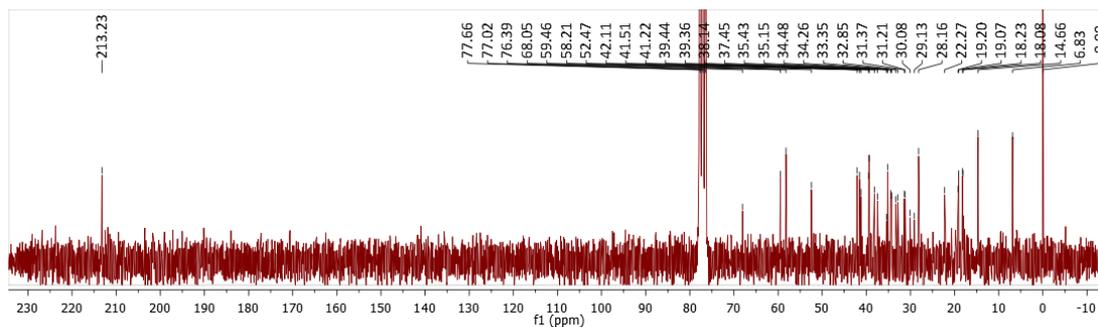


I. Espectros de S8

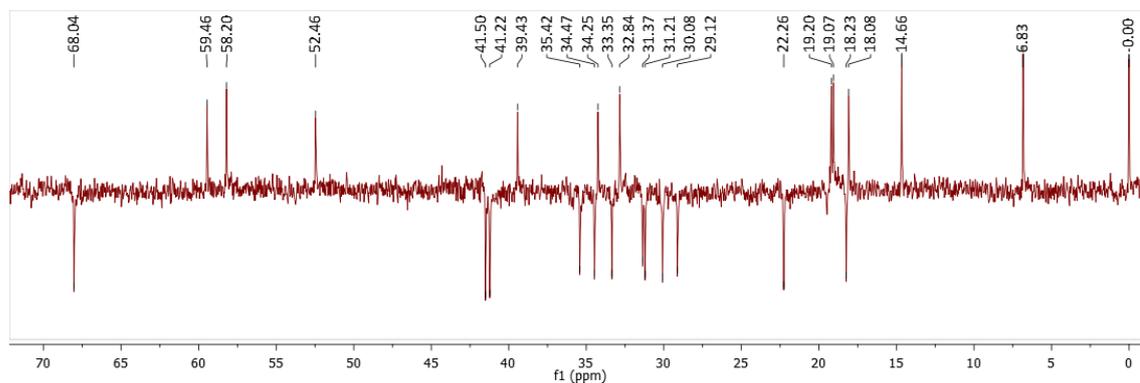
Apêndice IA – Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (200 MHz) de **S8**,  $\text{CDCl}_3$



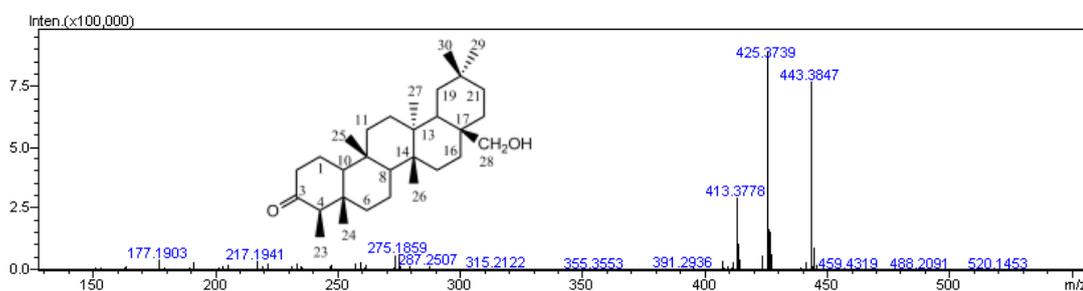
Apêndice IB – Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (50 MHz) de **S8**,  $\text{CDCl}_3$



Apêndice IC – Subespectro DEPT-135 (50 MHz) de **S8**, CDCl<sub>3</sub>

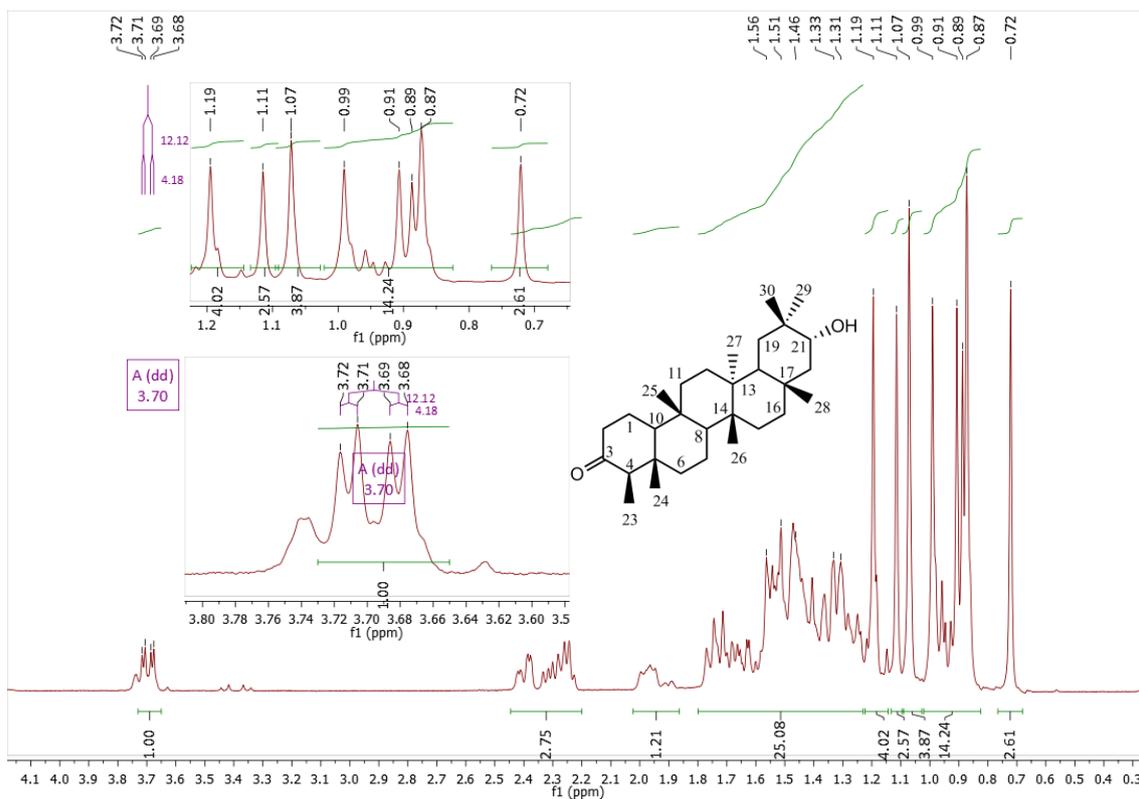


Apêndice ID – Espectro de APCI-MS (modo positivo) para **S8**

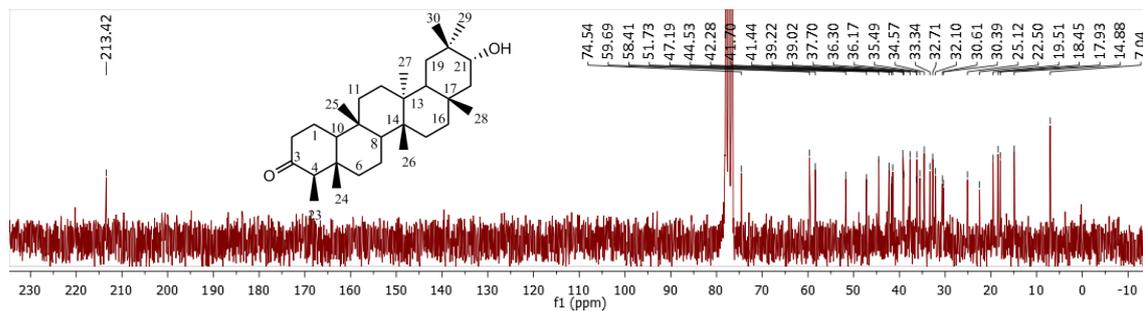


J. Espectros de **S9**

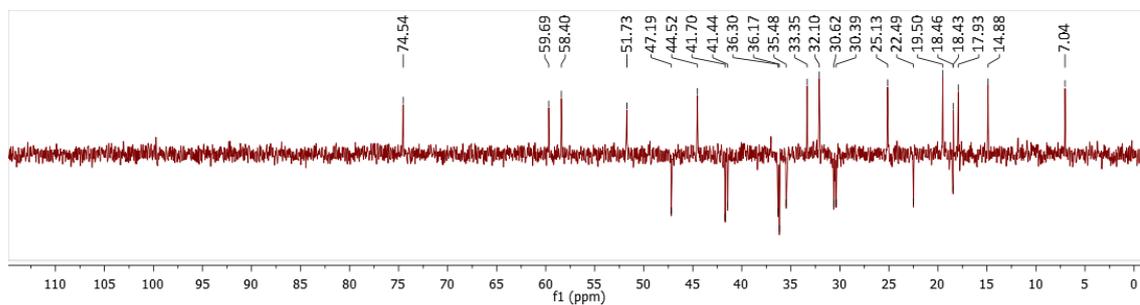
Apêndice JA – Espectro de RMN de <sup>1</sup>H (400 MHz) de **S9**, CDCl<sub>3</sub>



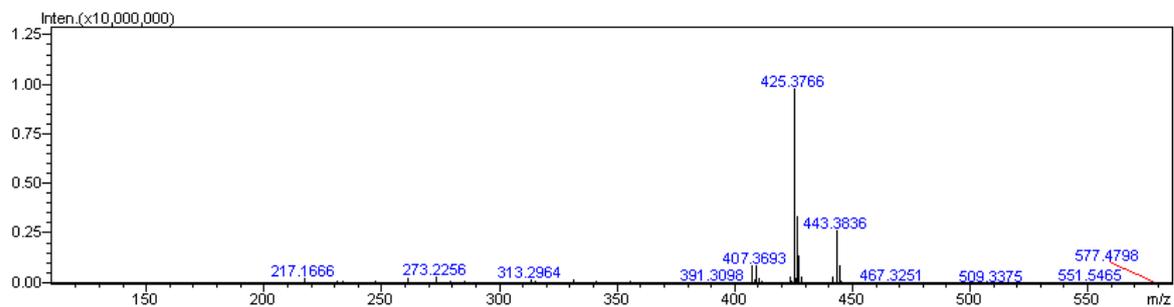
Apêndice JB – Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (100 MHz) de **S9**,  $\text{CDCl}_3$



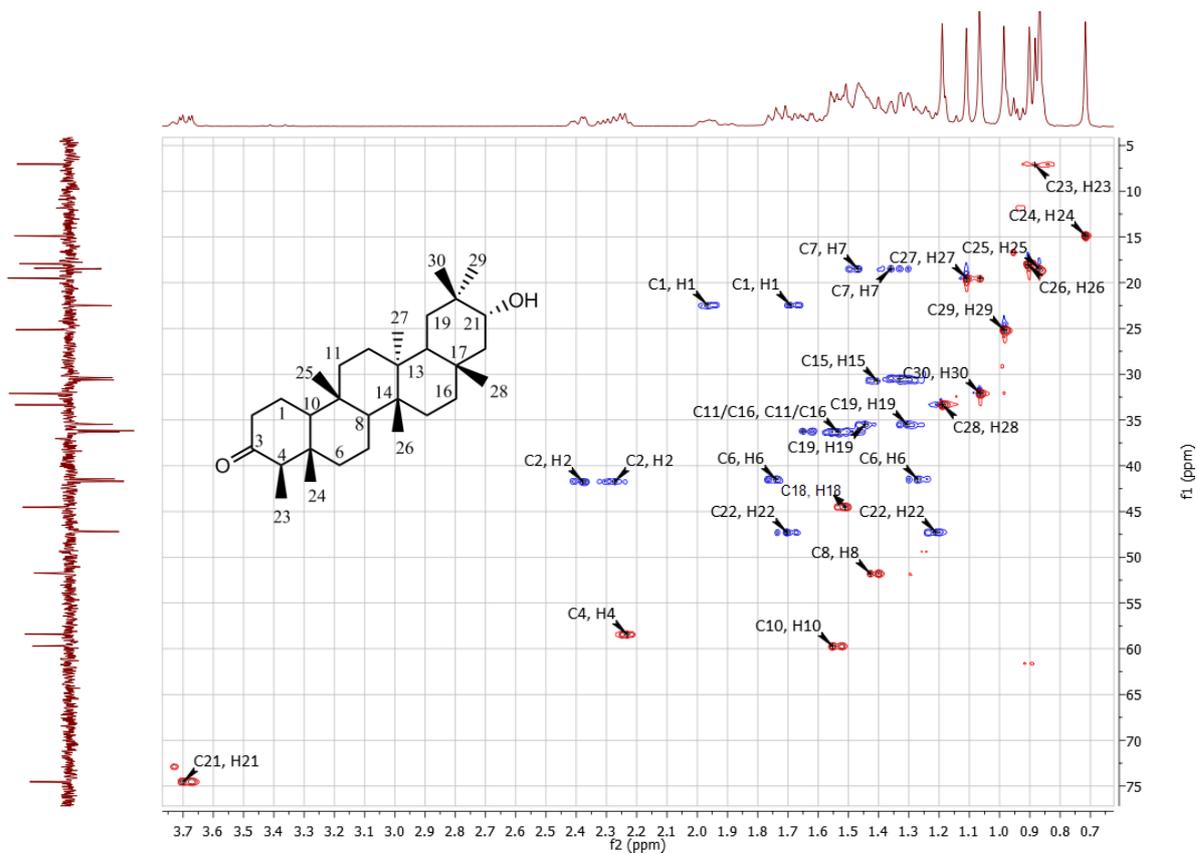
Apêndice JC – Subespectro DEPT-135 (100 MHz) de **S9**,  $\text{CDCl}_3$



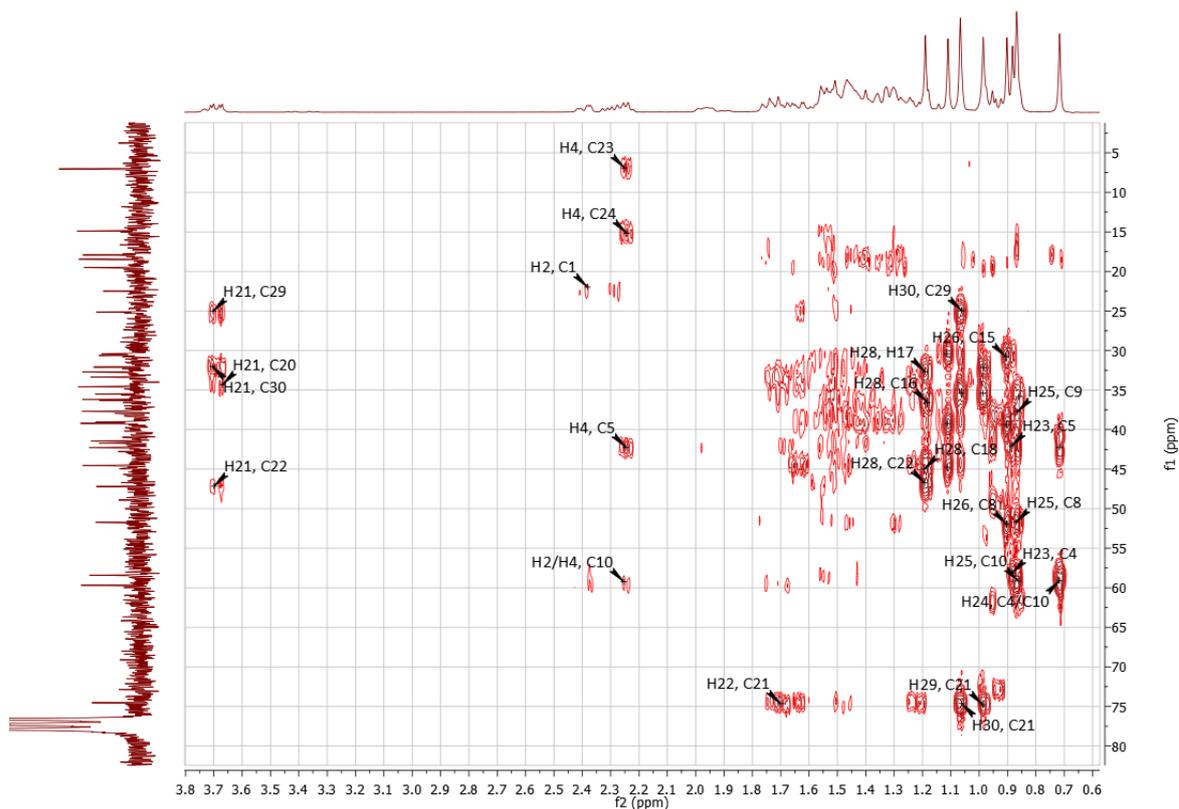
Apêndice JD – Espectro de APCI-MS (modo positivo) para **S9**



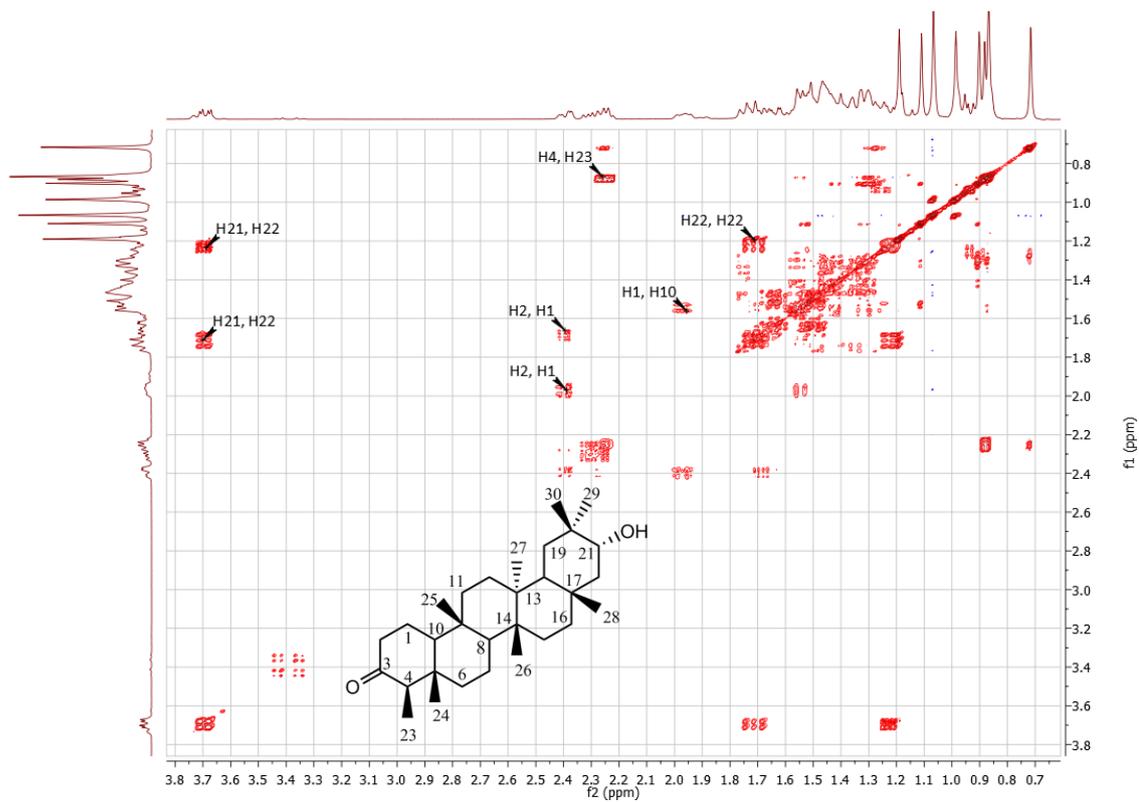
Apêndice JE – Mapa de Contornos HSQC (400 MHz) de **S9**, CDCl<sub>3</sub>



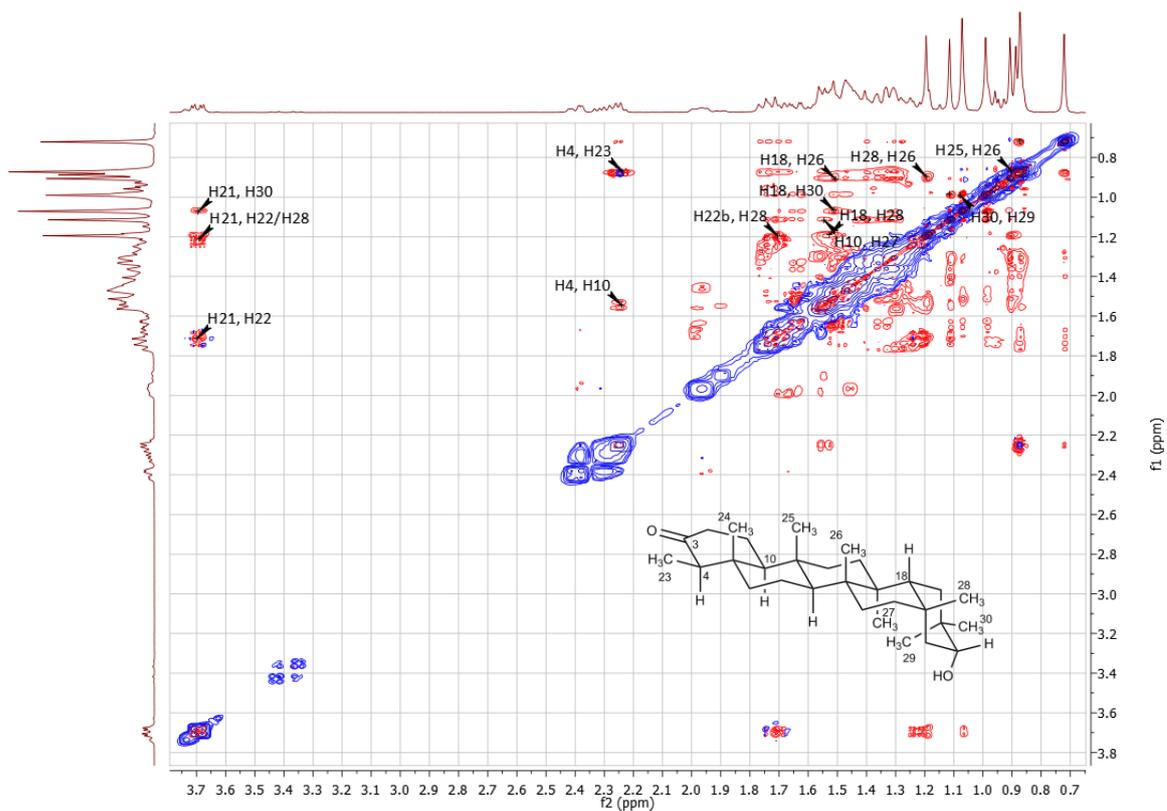
Apêndice JF – Mapa de Contornos HMBC (400 MHz) de **S9**, CDCl<sub>3</sub>



Apêndice JG – Mapa de Contornos COSY (400 MHz) de **S9**, CDCl<sub>3</sub>

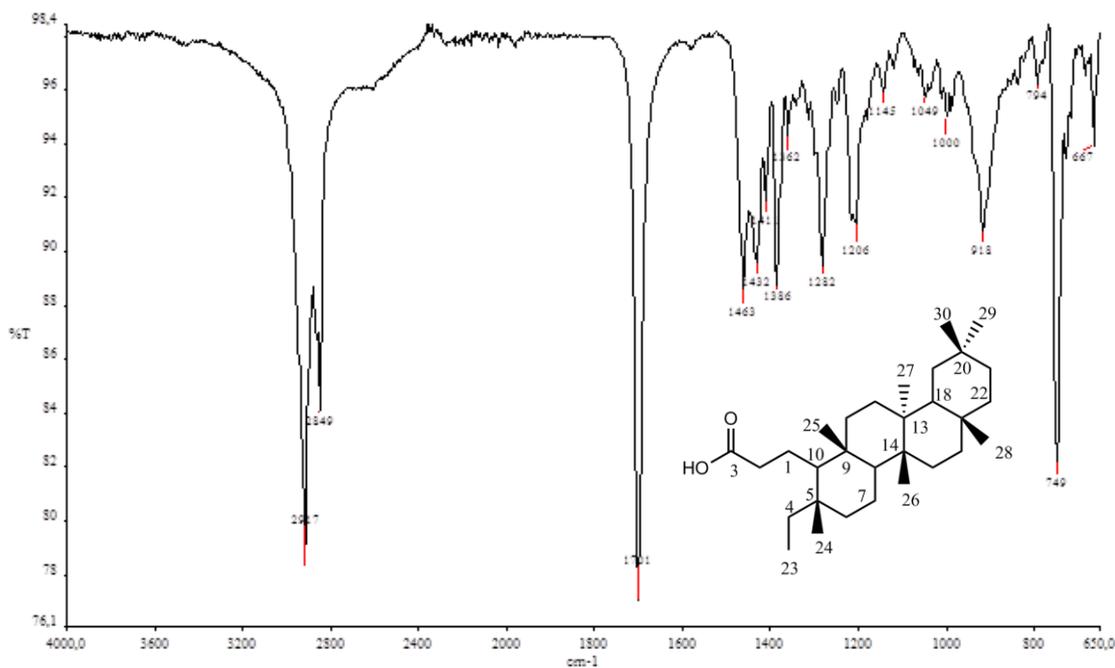


Apêndice JH – Mapa de Contornos NOESY (400 MHz) de **S9**, CDCl<sub>3</sub>

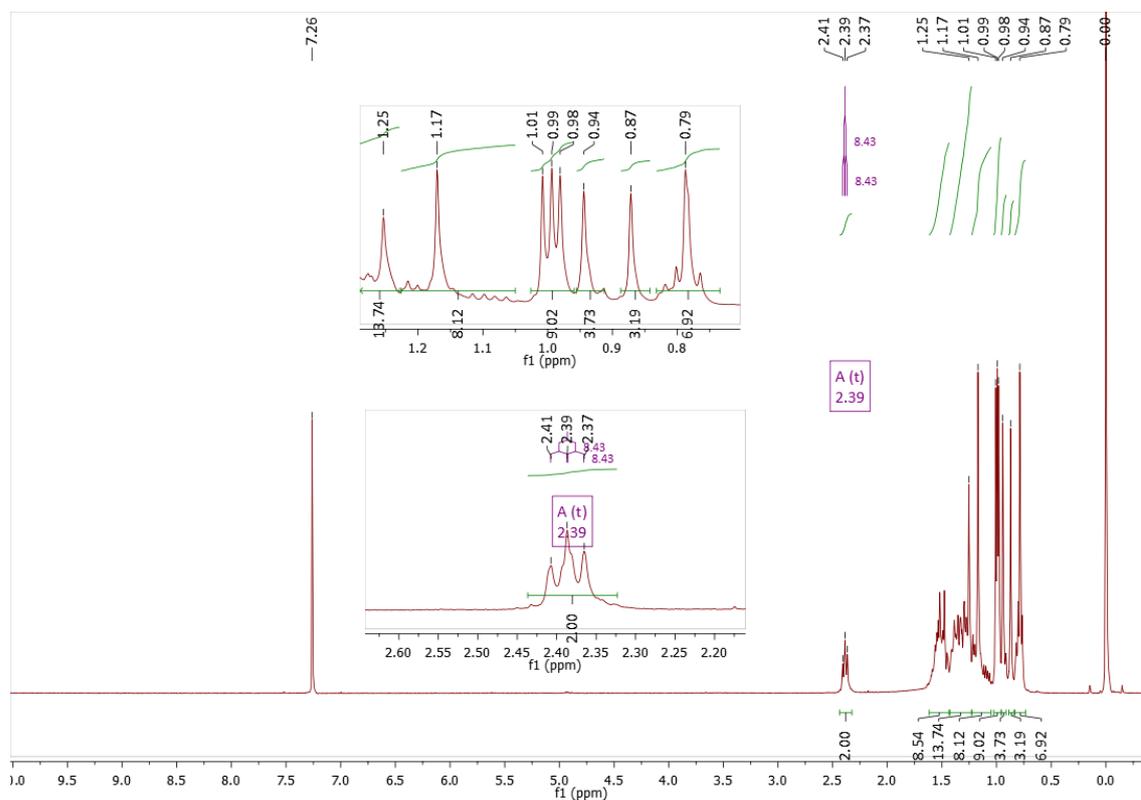


K. Espectros de S10

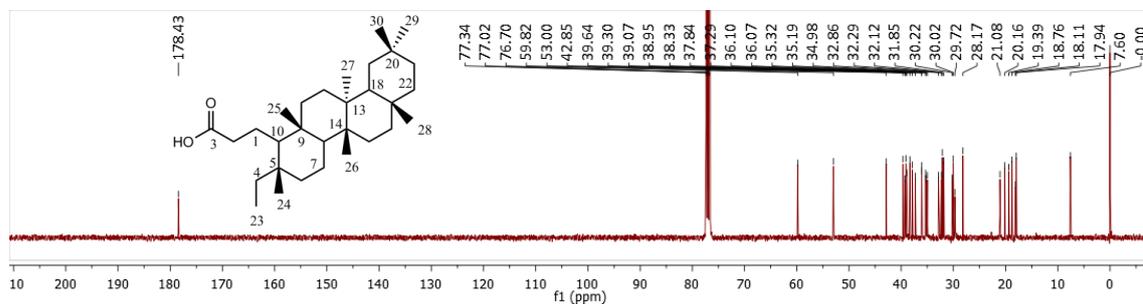
Apêndice KA – Espectro na região do IV de S10 (ATR)



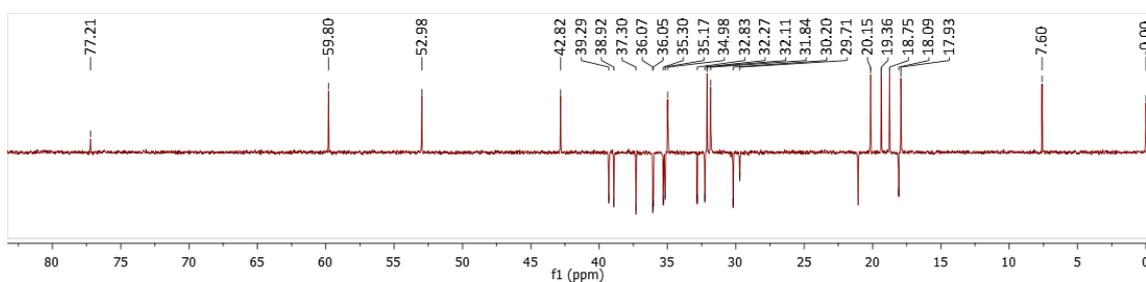
Apêndice KB – Espectro de RMN de <sup>1</sup>H (400 MHz) de S10, CDCl<sub>3</sub>



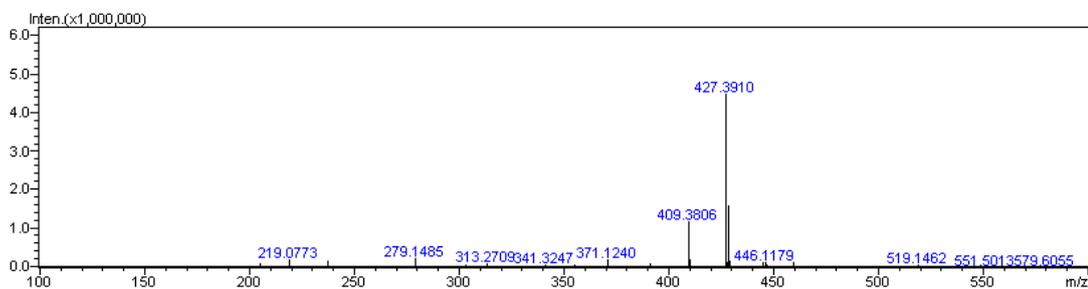
Apêndice KC – Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (100 MHz) de **S10**,  $\text{CDCl}_3$



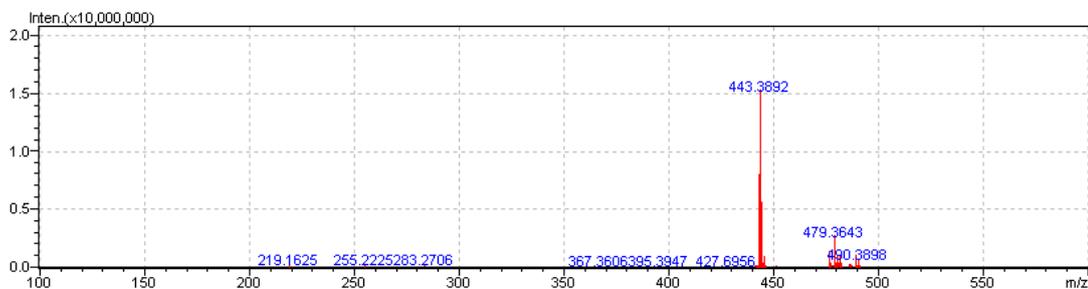
Apêndice KD – Subespectro DEPT-135 (100 MHz) de **S10**,  $\text{CDCl}_3$



Apêndice KE – Espectro de APCI-MS (modo positivo) para **S10**

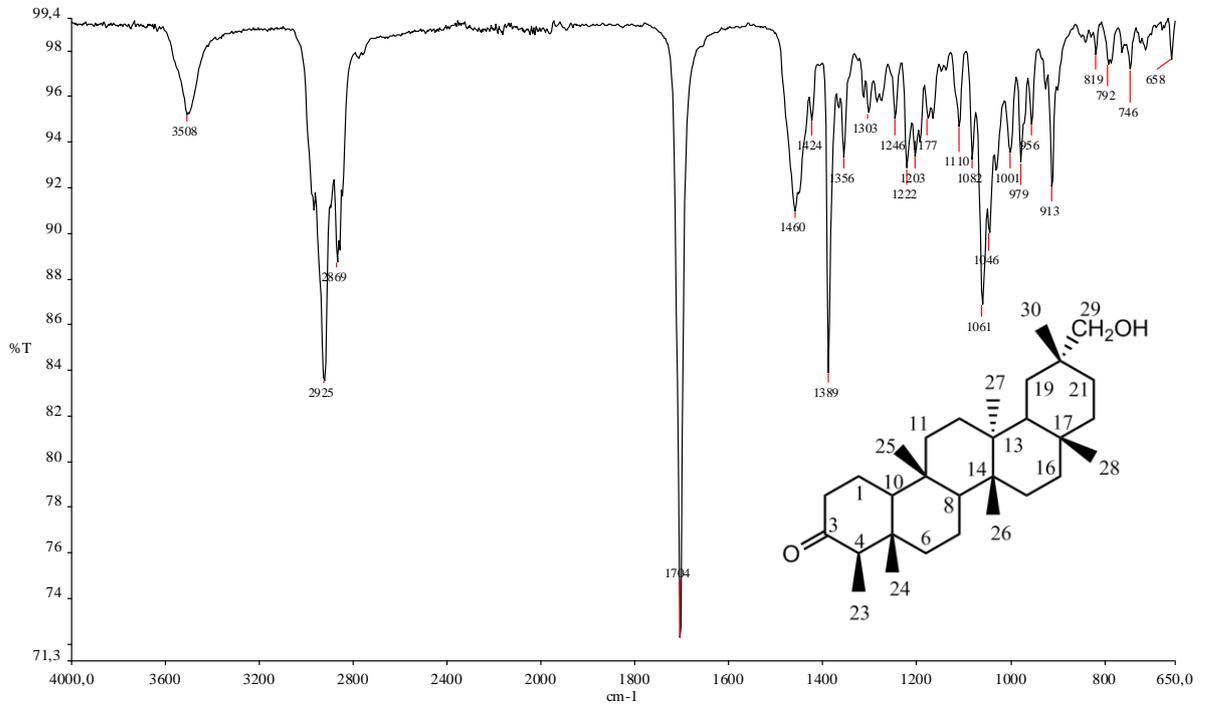


Apêndice KF – Espectro de APCI-MS (modo negativo) para **S10**

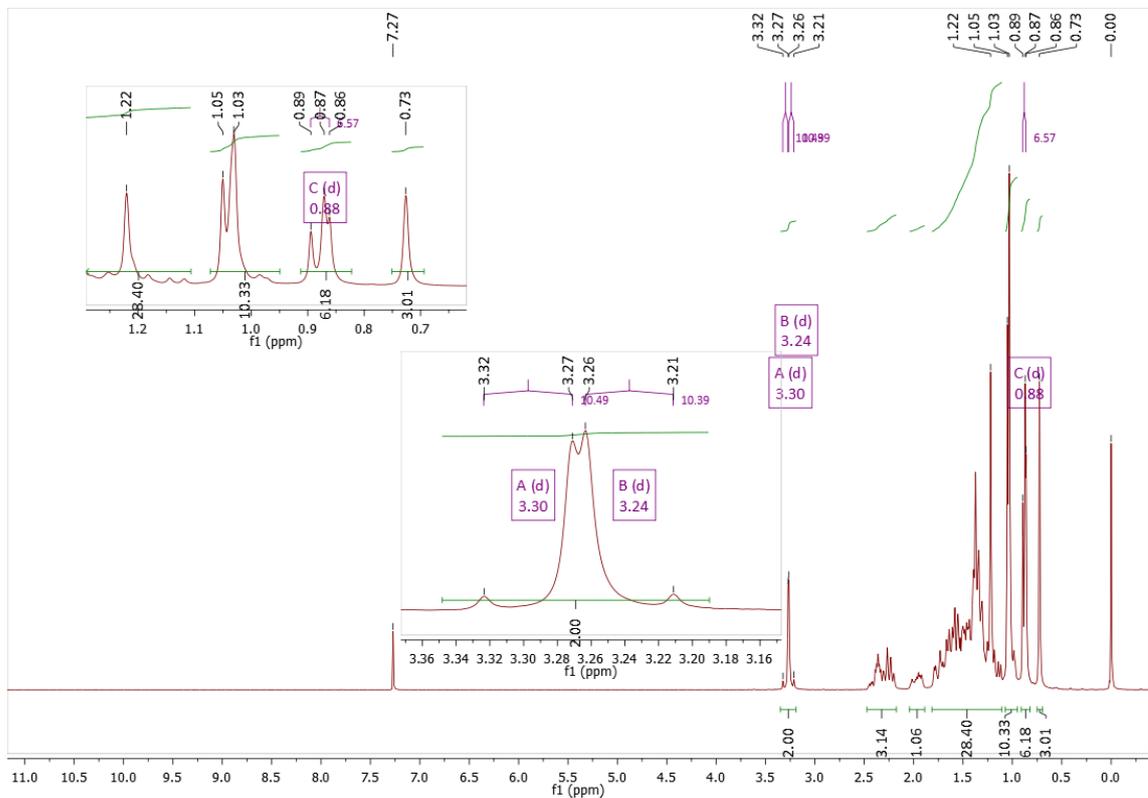


L. Espectros de S11

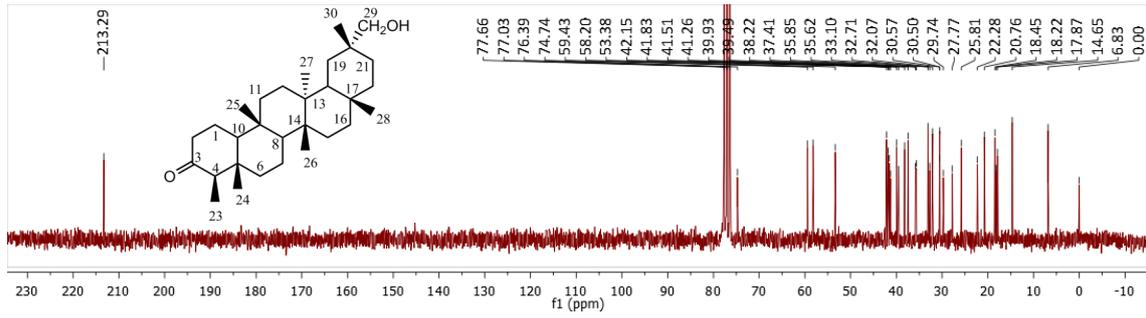
Apêndice LA – Espectro na região do IV de S11 (ATR)



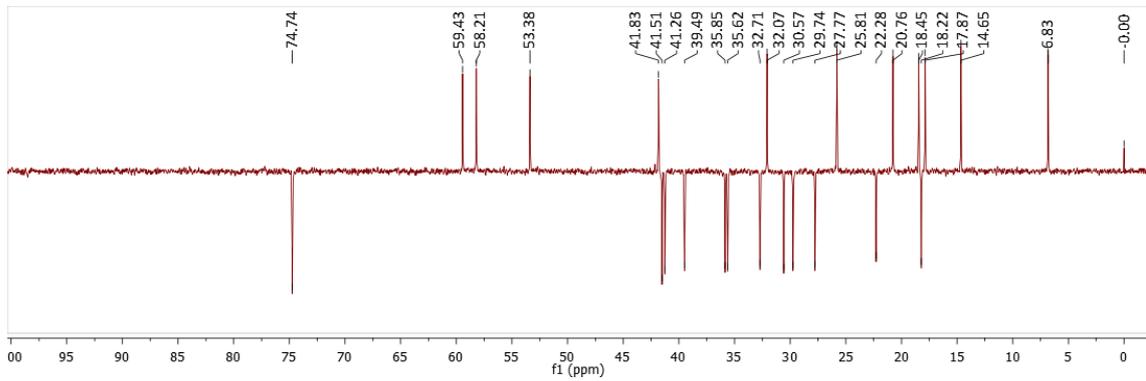
Apêndice LB – Espectro de RMN de <sup>1</sup>H (200 MHz) de S11, CDCl<sub>3</sub>



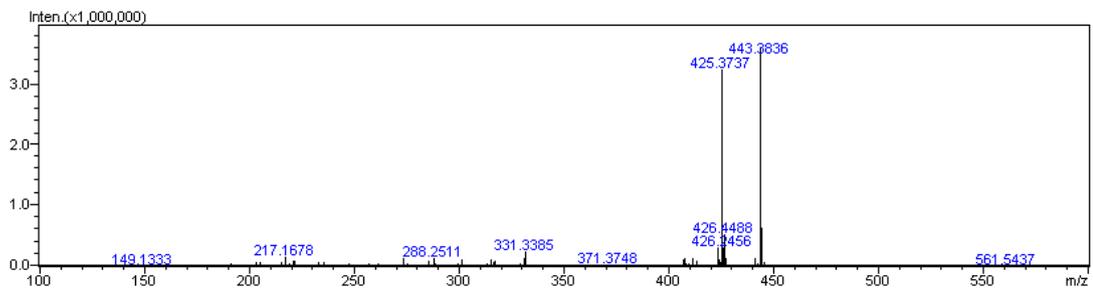
Apêndice LC – Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (50 MHz) de **S11**,  $\text{CDCl}_3$



Apêndice LD – Subespectro DEPT-135 (50 MHz) de **S11**,  $\text{CDCl}_3$

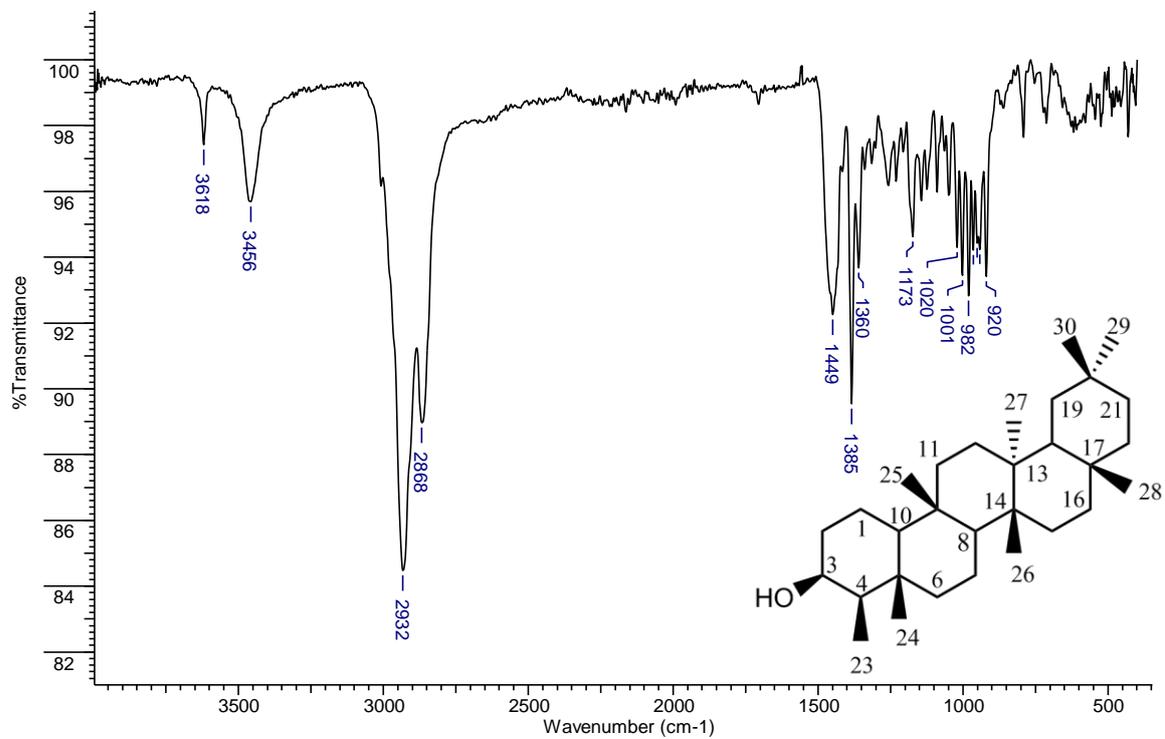


Apêndice LE – Espectro de APCI-MS (modo positivo) para **S11**

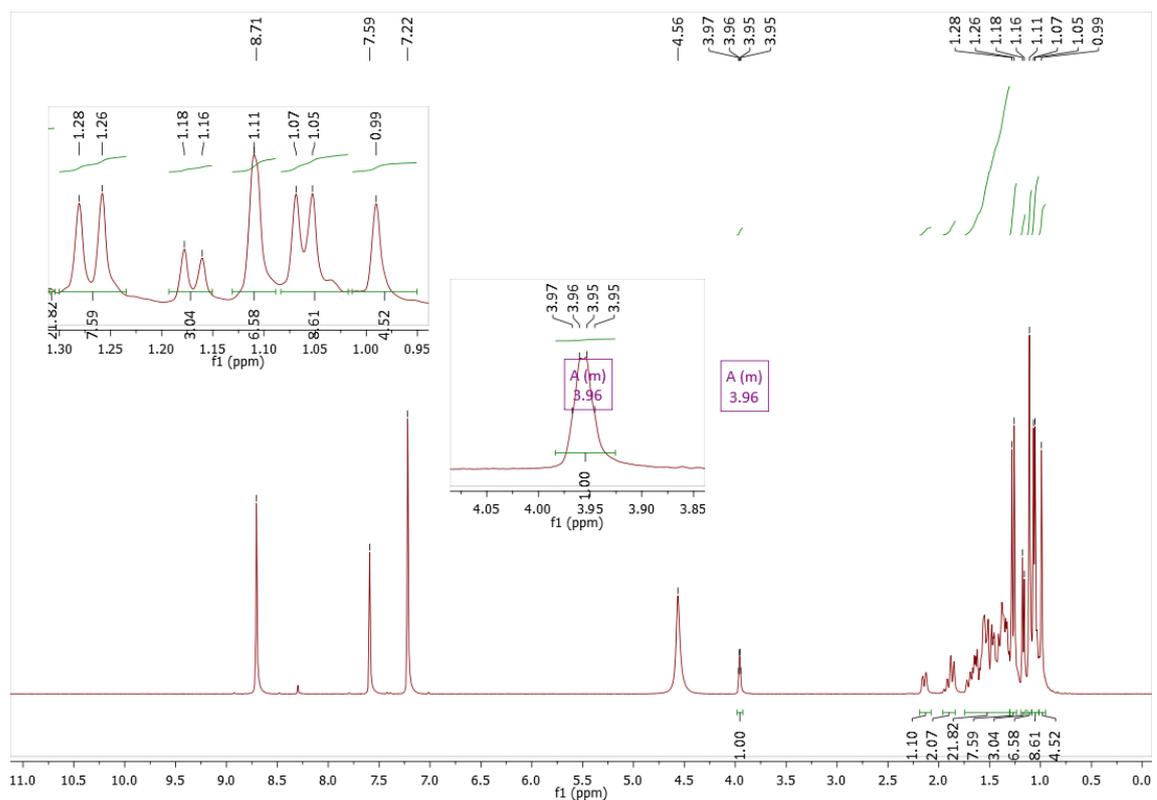


M. Espectros de S5

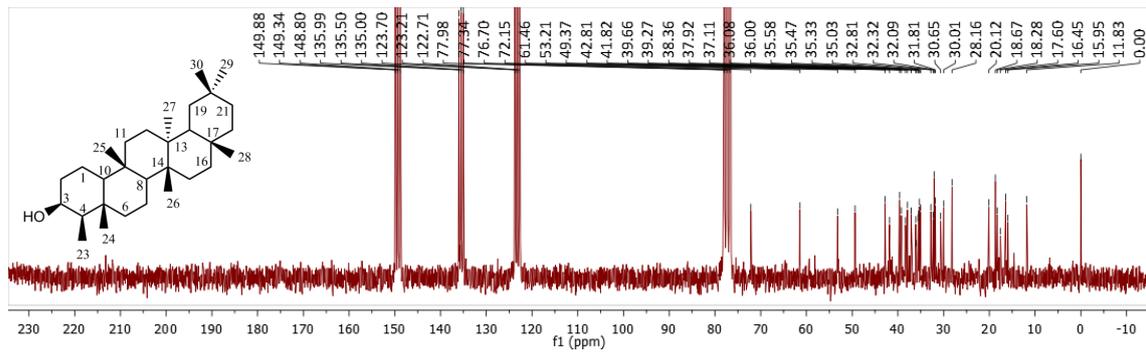
Apêndice MA – Espectro na região do IV de S5 (ATR)



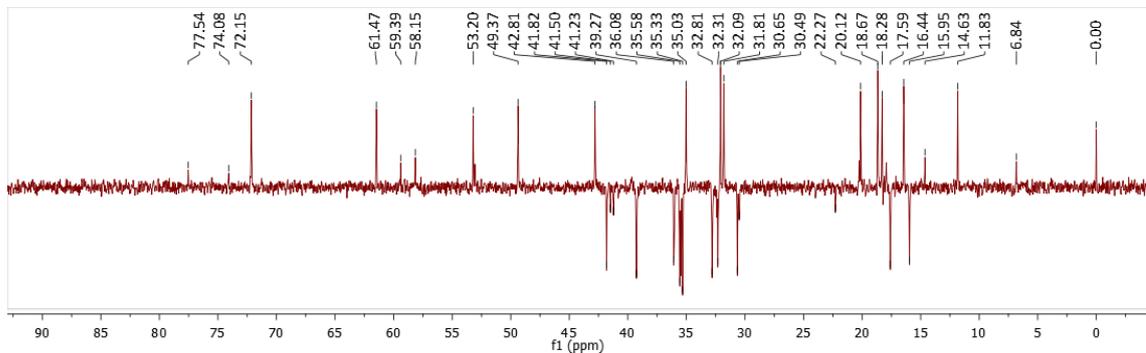
Apêndice MB – Espectro de RMN de <sup>1</sup>H (400 MHz) de S5, Pyr-d5, 50 °C



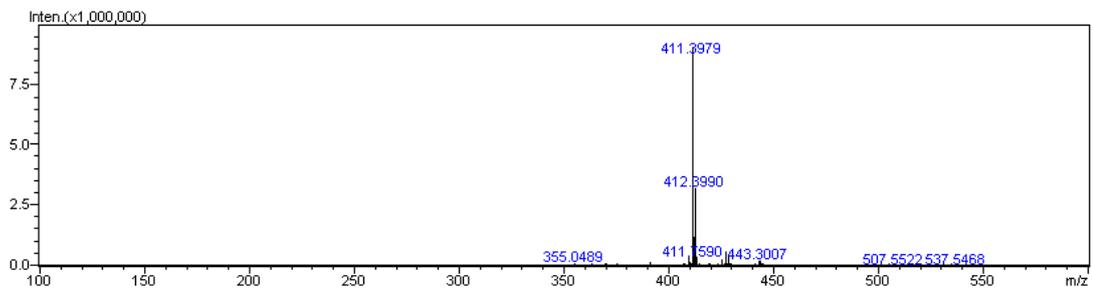
Apêndice MC – Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (50 MHz) de **S5**,  $\text{CDCl}_3$



Apêndice MD – Subespectro DEPT-135 (50 MHz) de **S5**,  $\text{CDCl}_3$

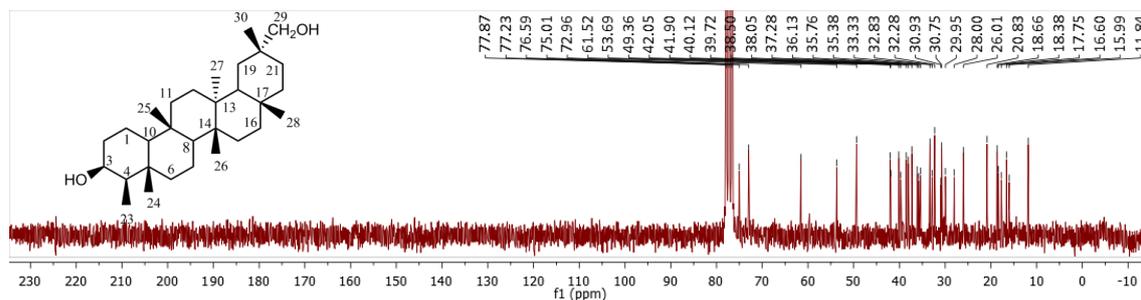


Apêndice ME – Espectro de APCI-MS (modo positivo) para **S5**

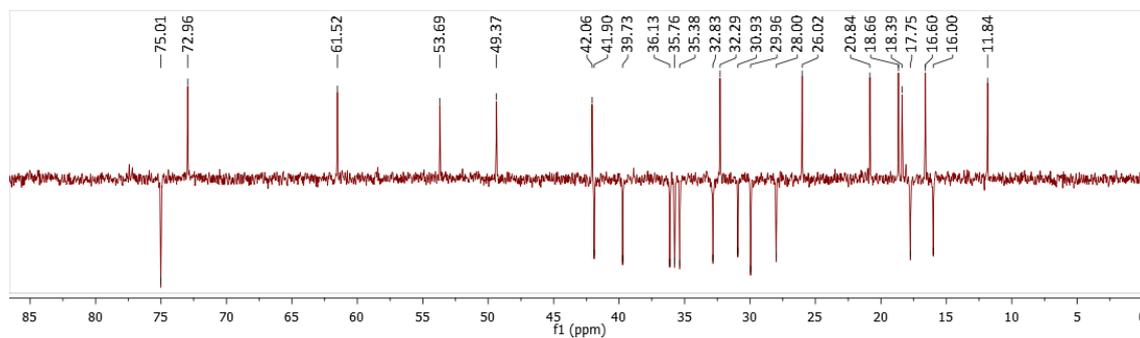




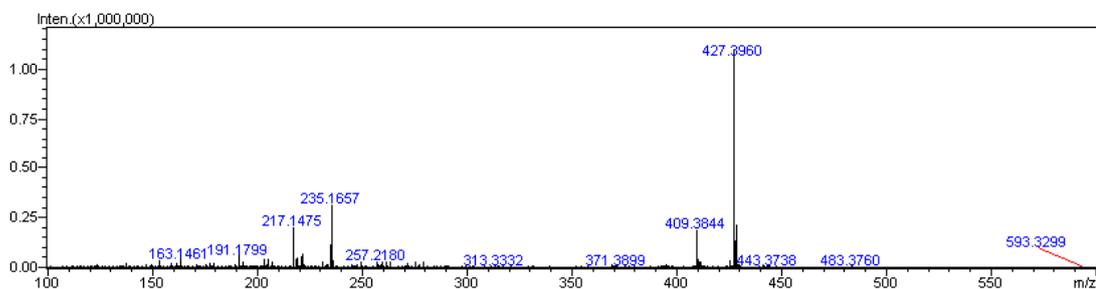
Apêndice NC – Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (100 MHz) de **S12**,  $\text{CDCl}_3$



Apêndice ND – Subespectro DEPT-135 (100 MHz) de **S12**,  $\text{CDCl}_3$

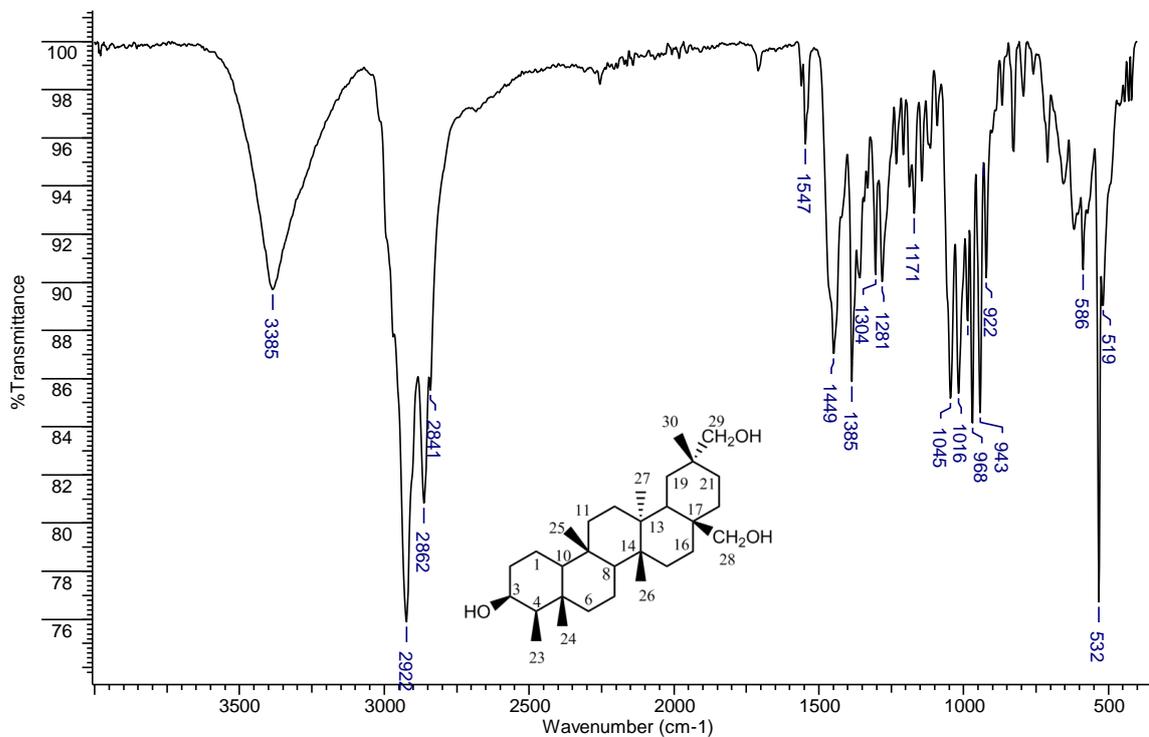


Apêndice NE – Espectro de APCI-MS (modo positivo) para **S12**

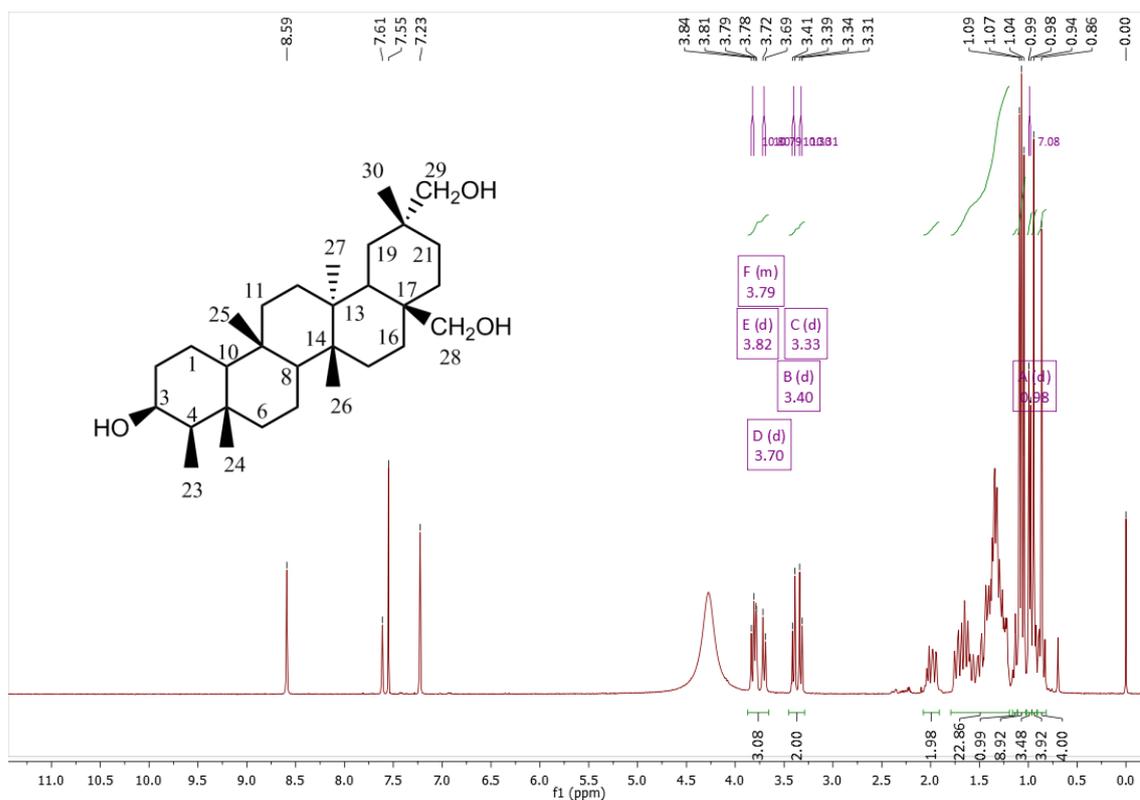


O. Espectros de S15

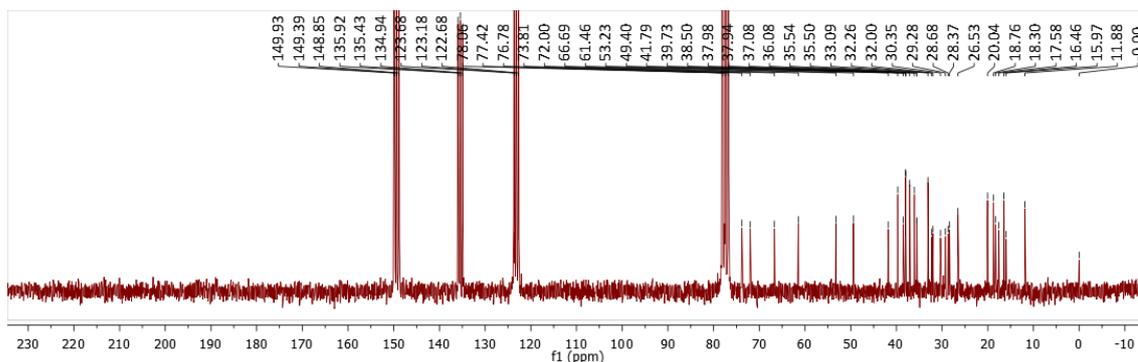
Apêndice OA – Espectro na região do IV de S15 (ATR)



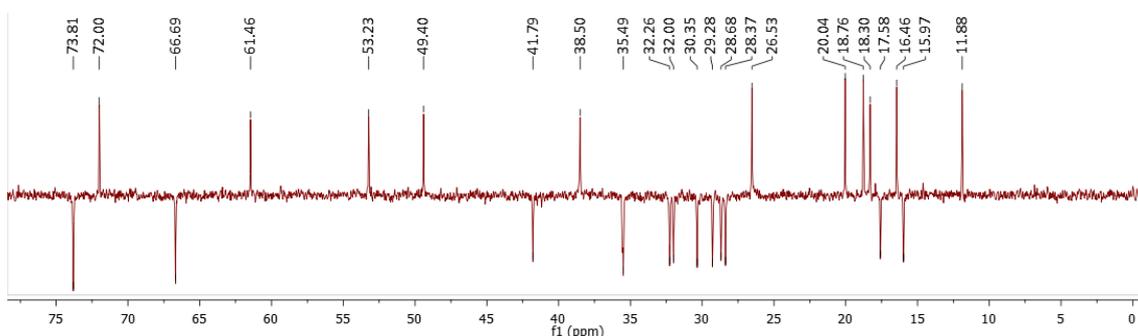
Apêndice OB – Espectro de RMN de <sup>1</sup>H (400 MHz) de S15, CDCl<sub>3</sub>+Pyr-d<sub>5</sub>



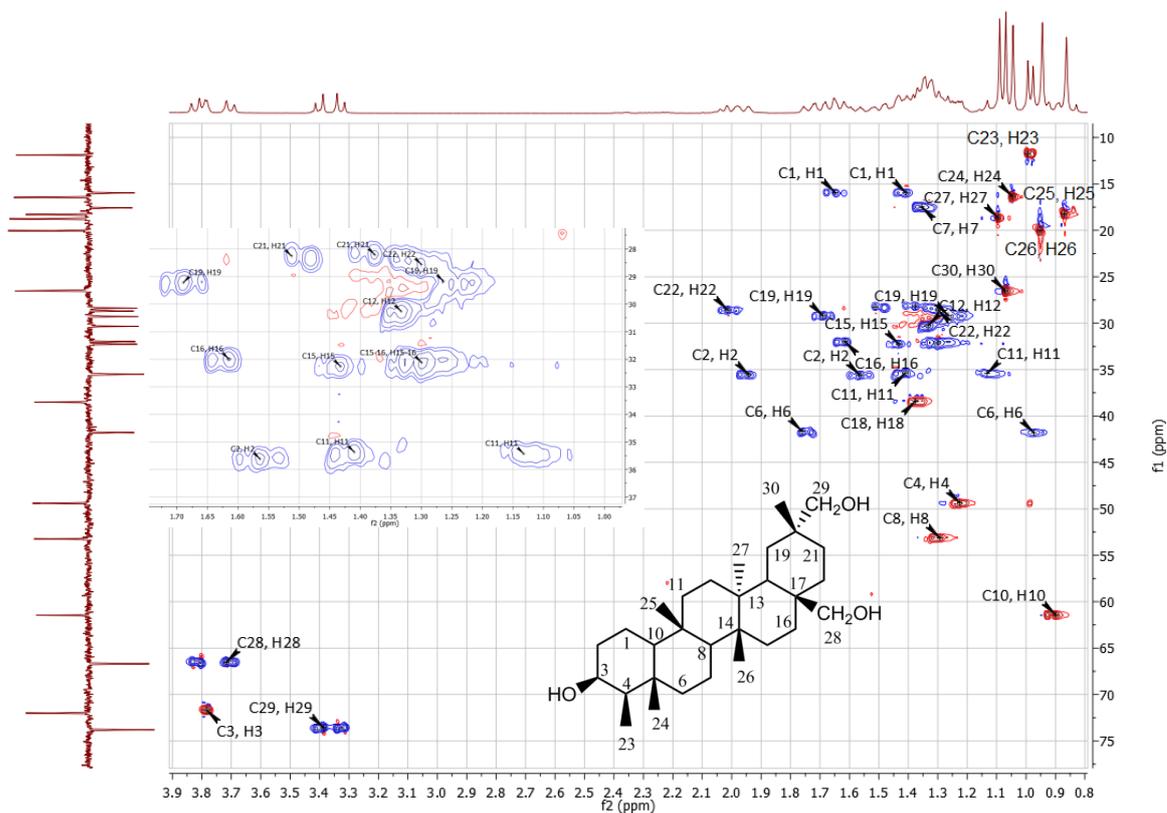
Apêndice OC – Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (100 MHz) de **S15**,  $\text{CDCl}_3+\text{Pyr-d}_5$



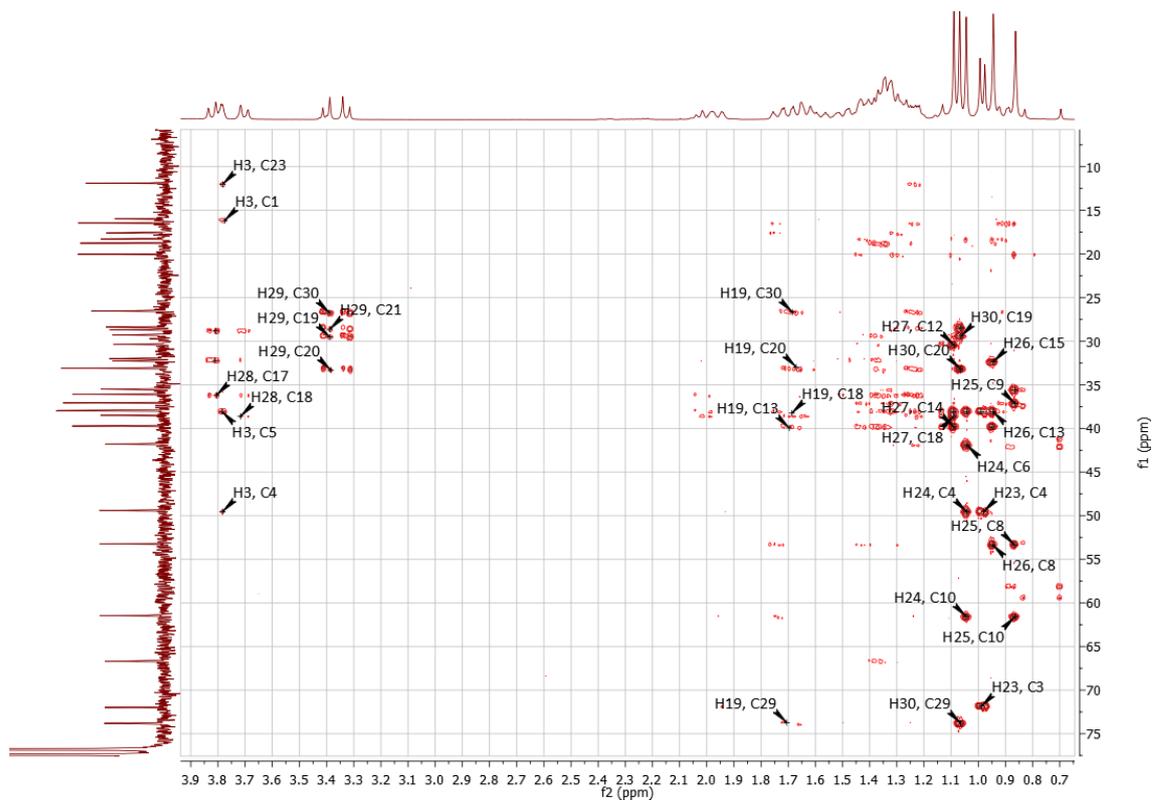
Apêndice OD – Subespectro DEPT-135 (100 MHz) de **S15**,  $\text{CDCl}_3+\text{Pyr-d}_5$



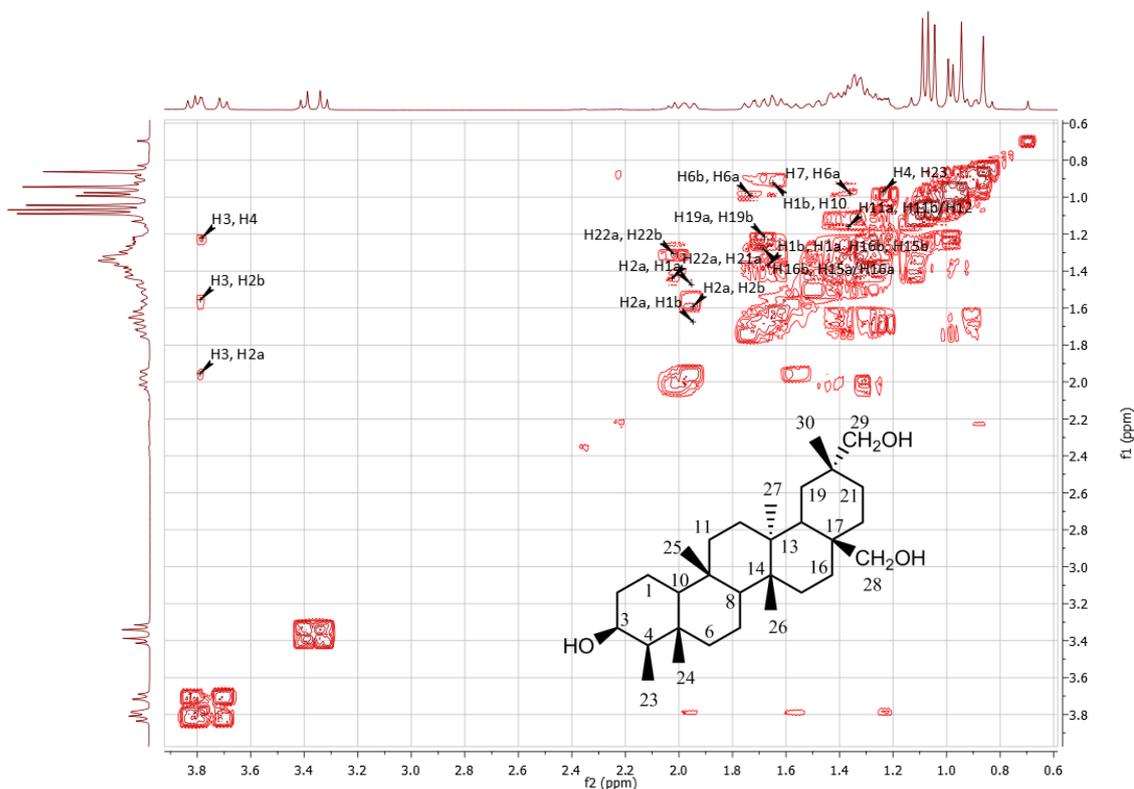
Apêndice OE – Mapa de contornos HSQC (400 MHz) de **S15**,  $\text{CDCl}_3+\text{Pyr-d}_5$



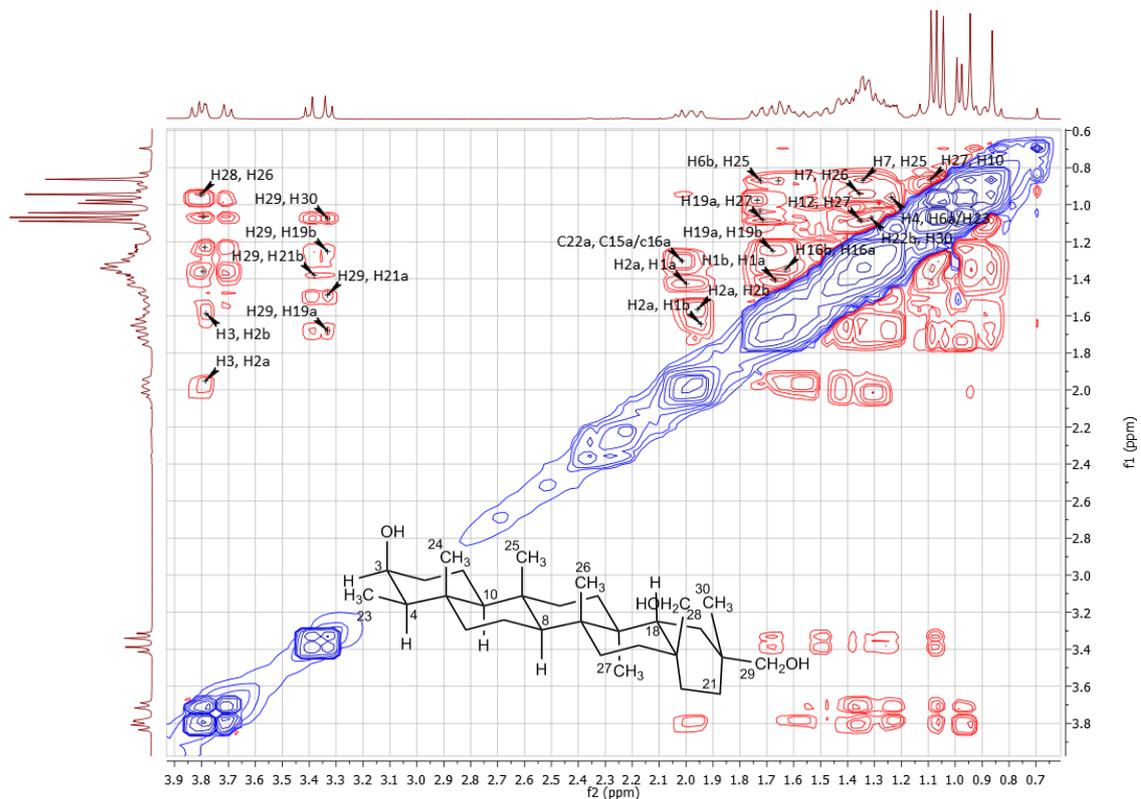
Apêndice OF – Mapa de contornos HMBC (400 MHz) de **S15**, CDCl<sub>3</sub>+Pyr-d<sub>5</sub>



Apêndice OG – Mapa de contornos COSY (400 MHz) de **S15**, CDCl<sub>3</sub>+Pyr-d<sub>5</sub>

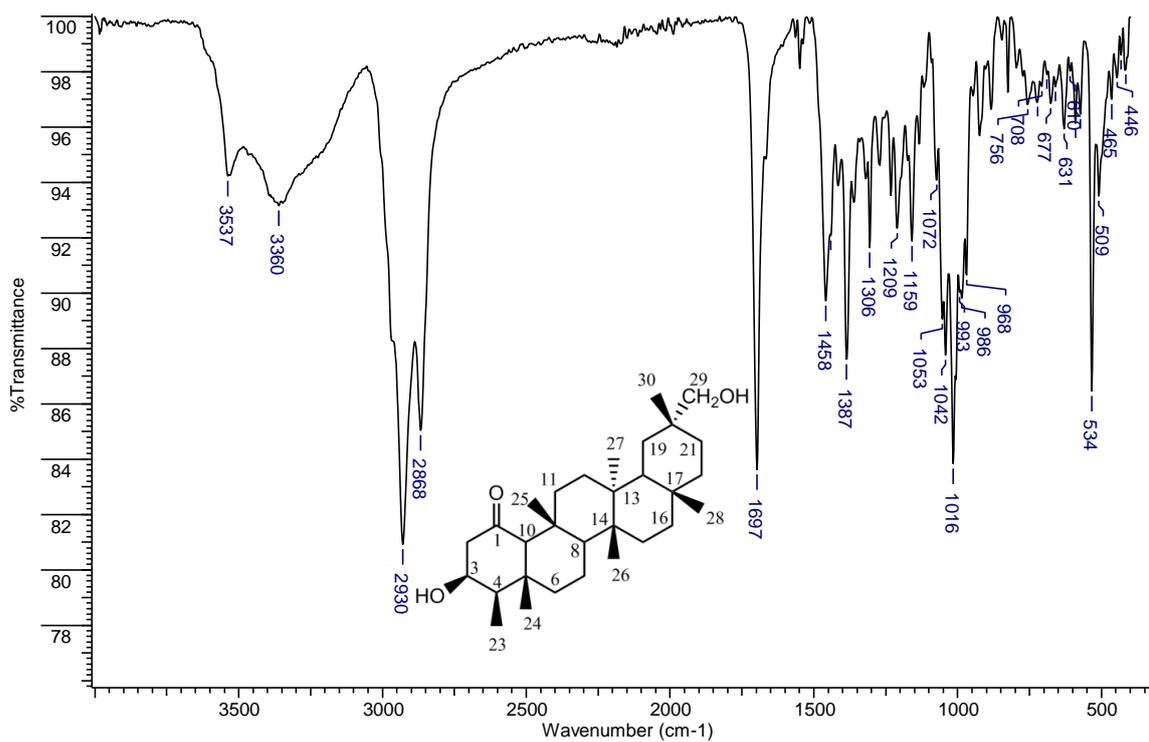


Apêndice OH – Mapa de contornos NOESY (400 MHz) de **S15**, CDCl<sub>3</sub>+Pyr-d<sub>5</sub>

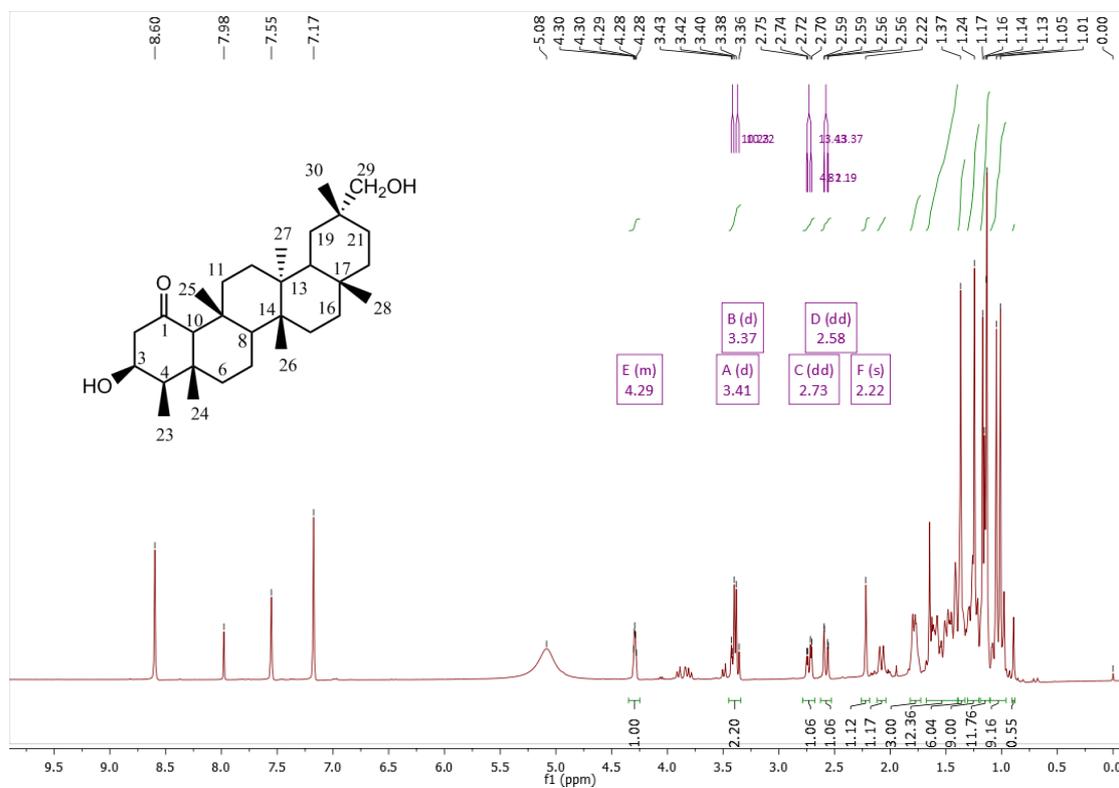


P. Espectros de S16

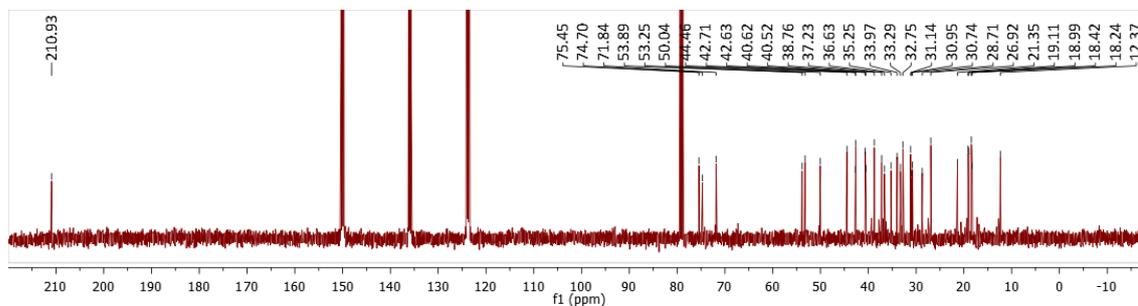
Apêndice PA – Espectro na região do IV de **S16** (ATR)



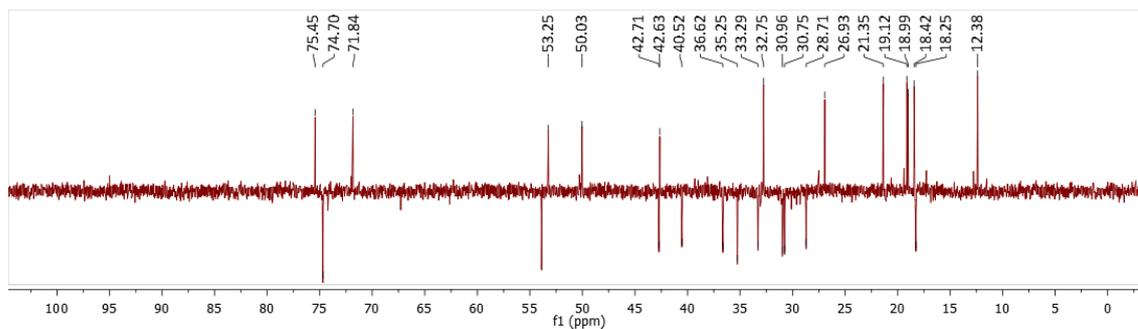
Apêndice PB – Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (400 MHz) de **S16**,  $\text{CDCl}_3 + \text{Pyr-d}_5$



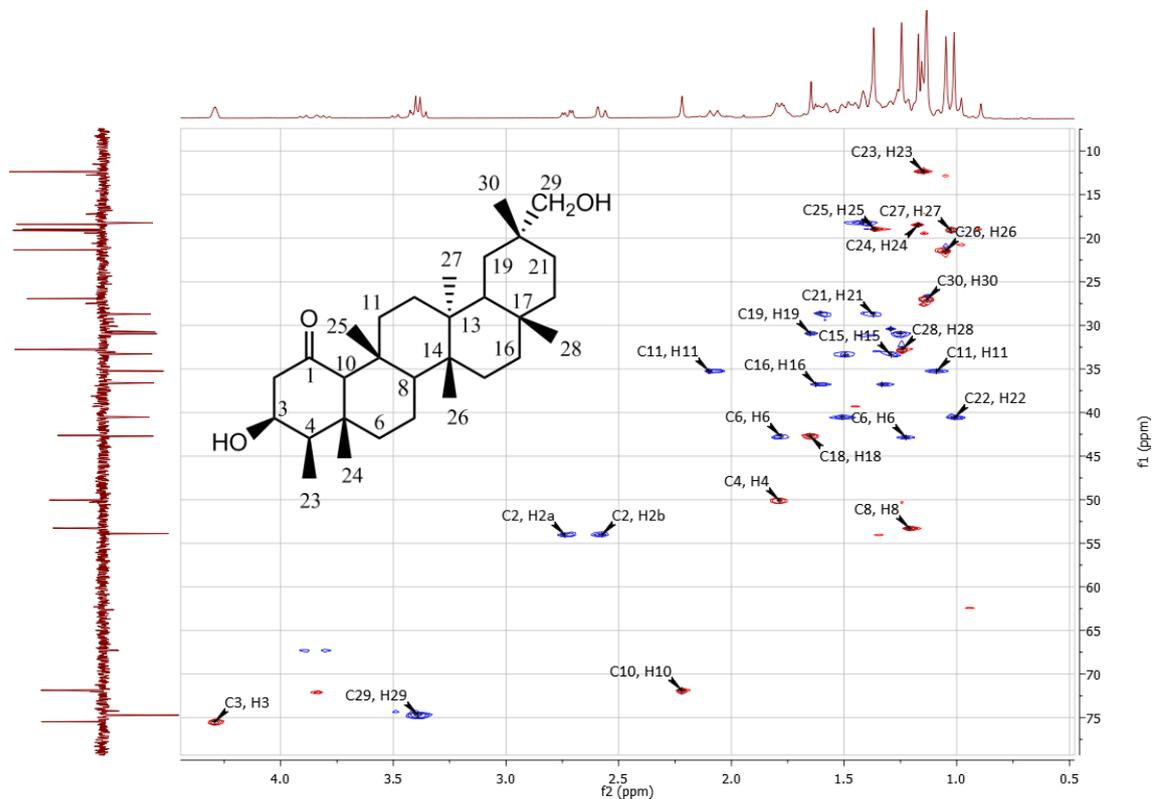
Apêndice PC – Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (100 MHz) de **S16**,  $\text{CDCl}_3 + \text{Pyr-d}_5$



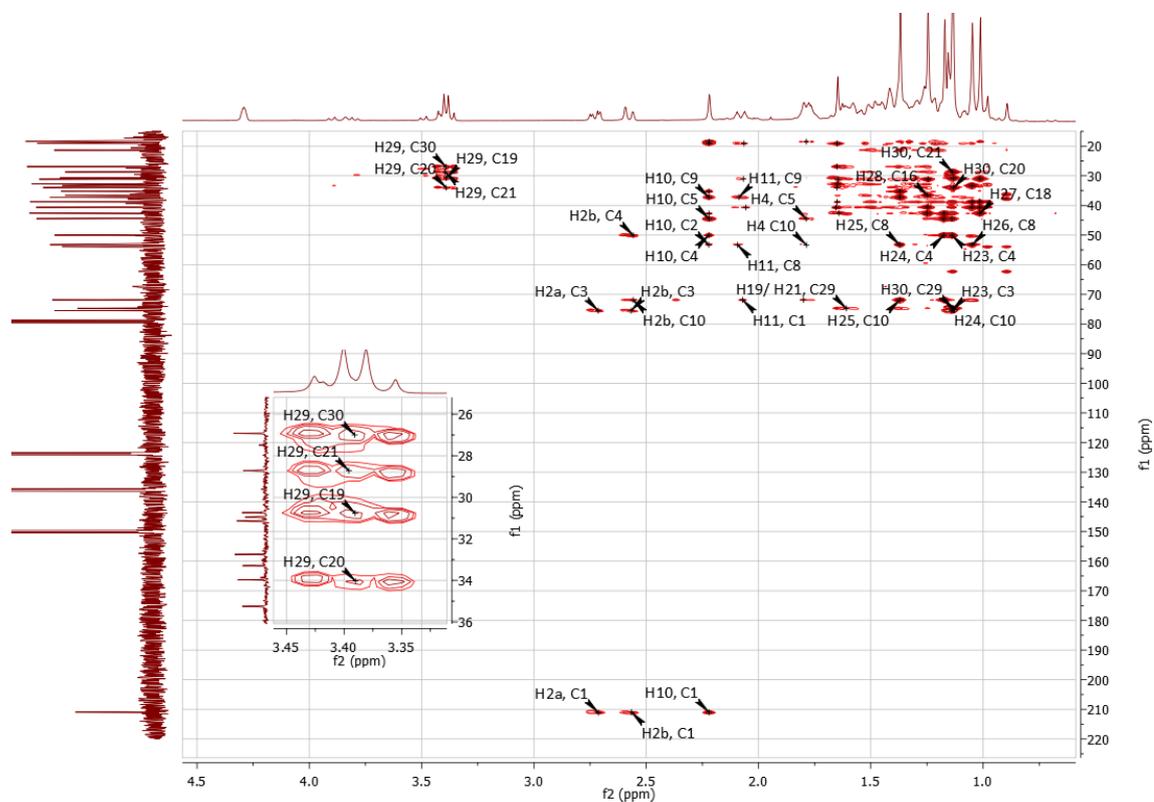
Apêndice PD – Subespectro DEPT-135 (100 MHz) de **S16**,  $\text{CDCl}_3 + \text{Pyr-d}_5$



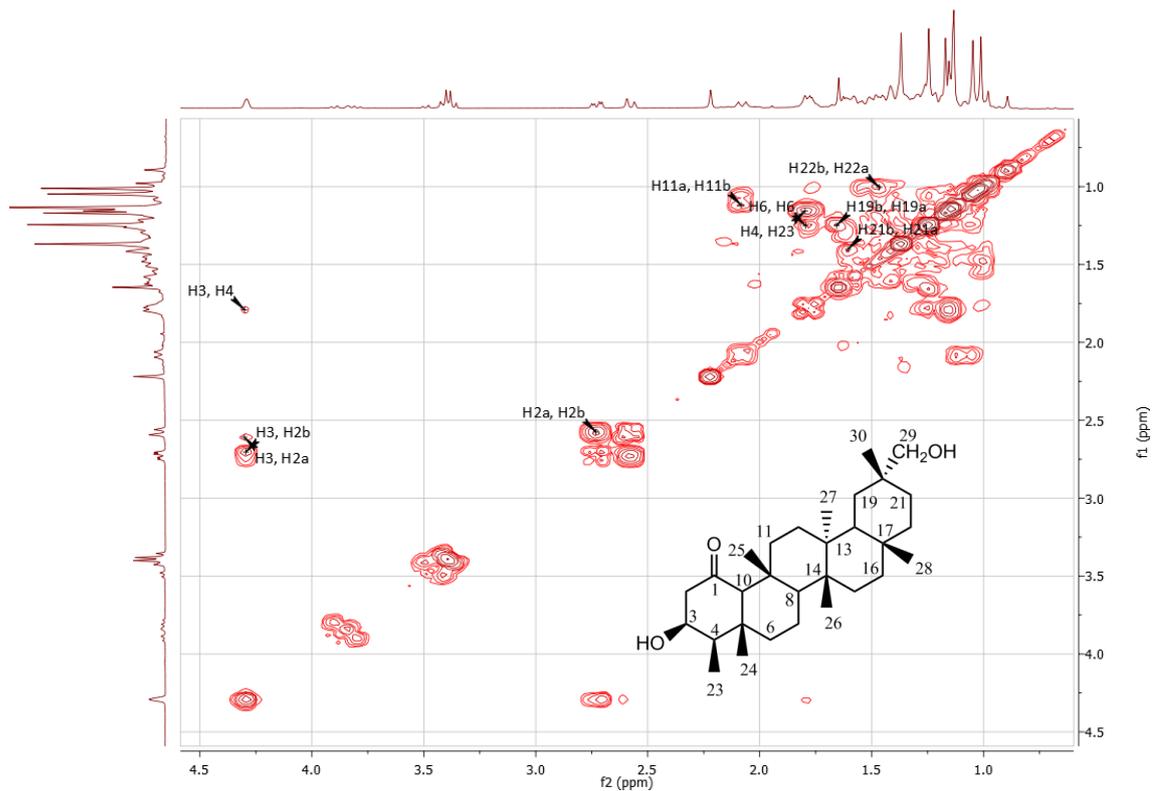
Apêndice PE – Mapa de contornos HSQC (400 MHz) de **S16**, CDCl<sub>3</sub>+Pyr-d<sub>5</sub>



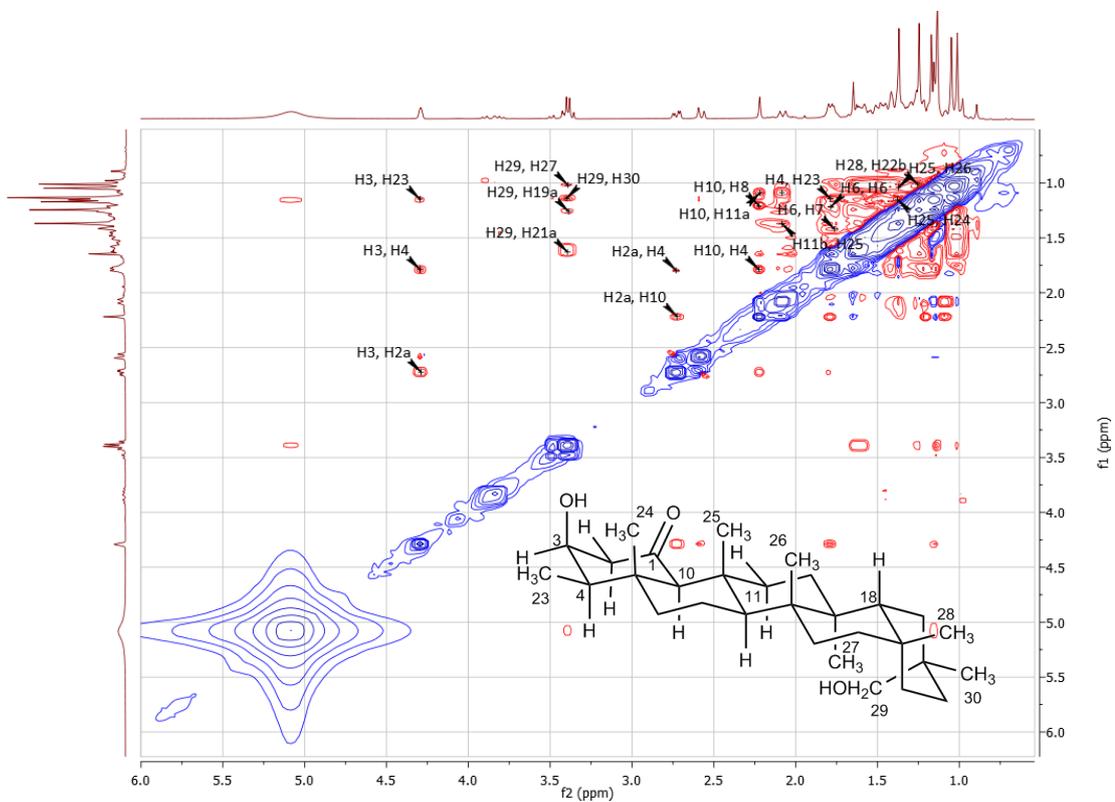
Apêndice PF – Mapa de contornos HMBC (400 MHz) de **S16**, CDCl<sub>3</sub>+Pyr-d<sub>5</sub>



Apêndice PG – Mapa de contornos COSY (400 MHz) de **S16**, CDCl<sub>3</sub>+Pyr-d<sub>5</sub>

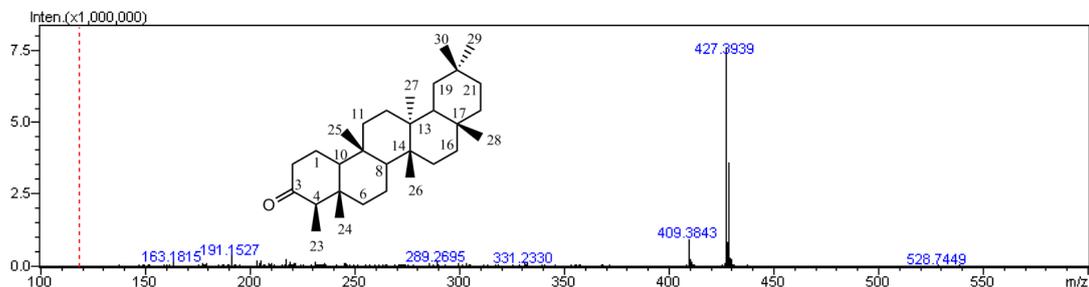


Apêndice PH – Mapa de contornos NOESY (400 MHz) de **S16**, CDCl<sub>3</sub>+Pyr-d<sub>5</sub>

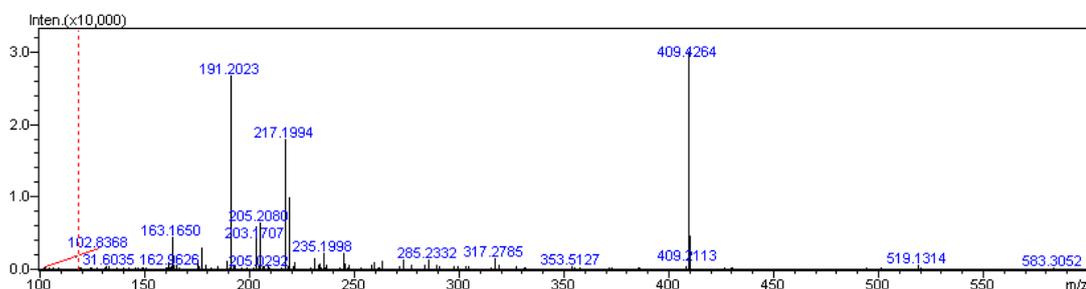


Q. Espectros de APCI-MS e APCI-MS/MS de triterpenos friedelânicos

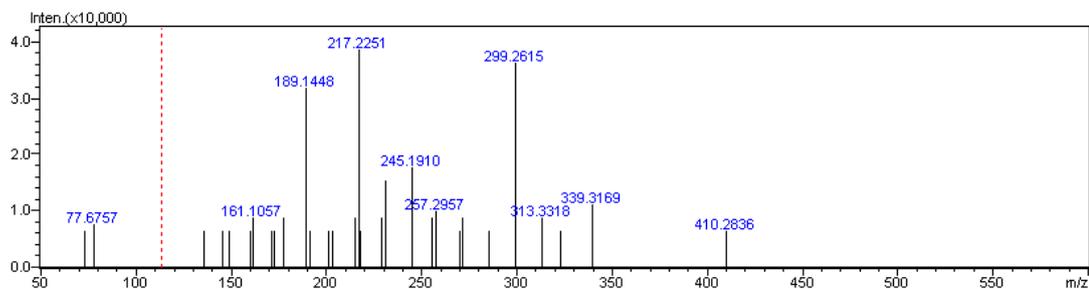
Apêndice QAA – Espectro de APCI-MS para S4



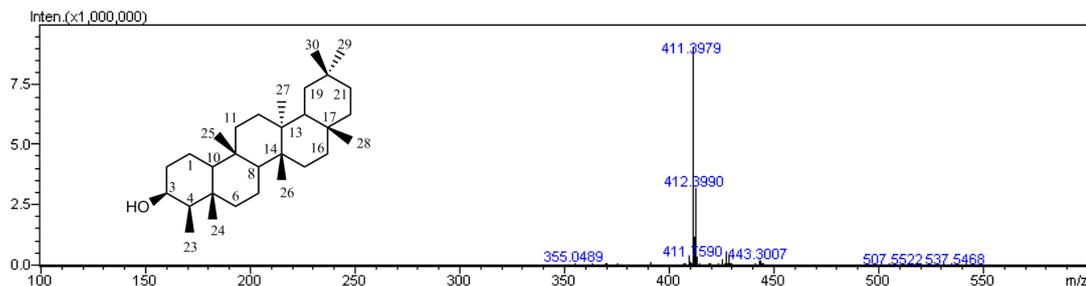
Apêndice QAB – Espectro de APCI-MS/MS (m/z 427) para S4



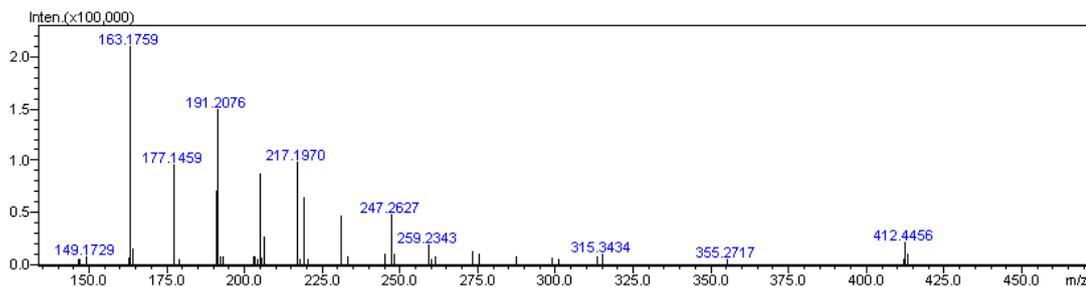
Apêndice QAC – Espectro de APCI-MS/MS (m/z 409) para S4



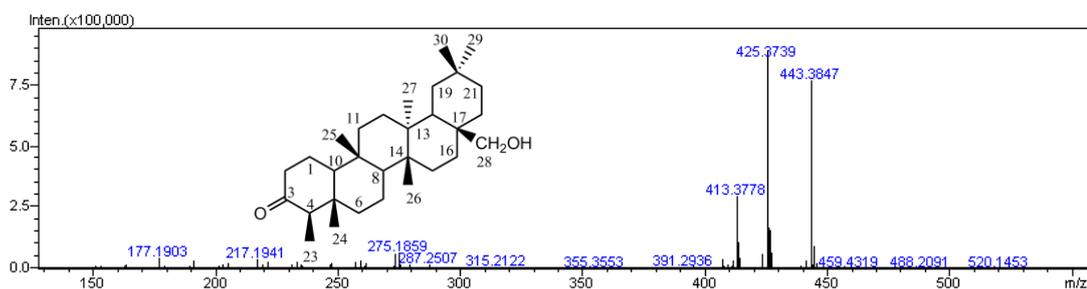
Apêndice QBA – Espectro de APCI-MS para S5



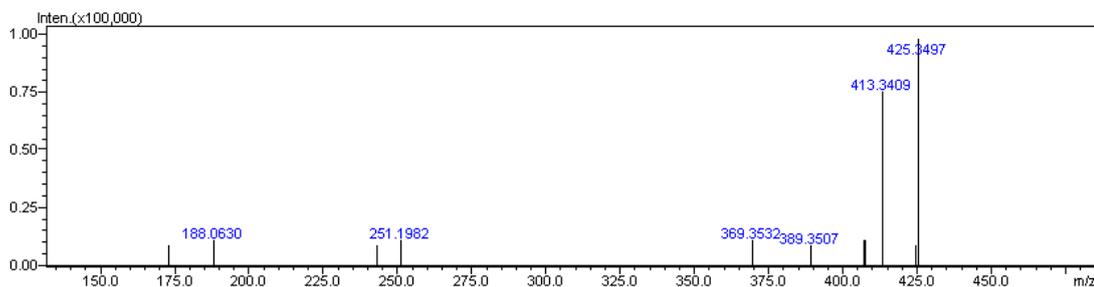
**Apêndice QBB – Espectro de APCI-MS/MS ( $m/z$  411) para S5**



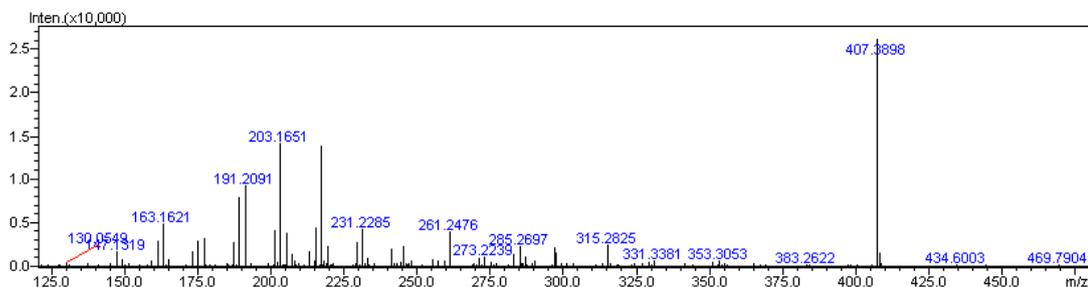
**Apêndice QCA – Espectro de APCI-MS para S8**



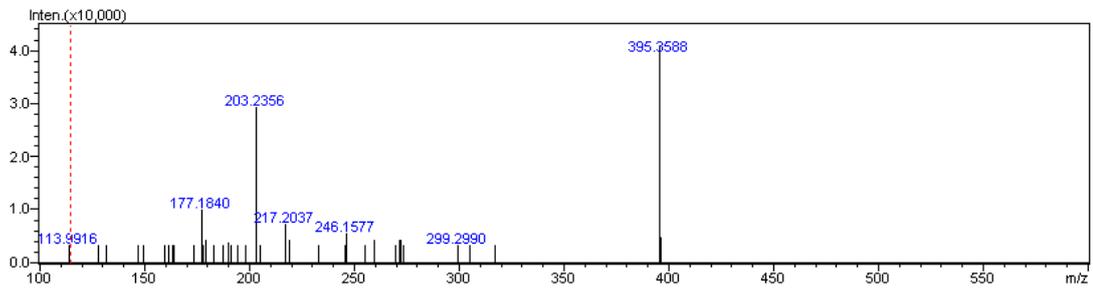
**Apêndice QCB – Espectro de APCI-MS/MS ( $m/z$  443) para S8**



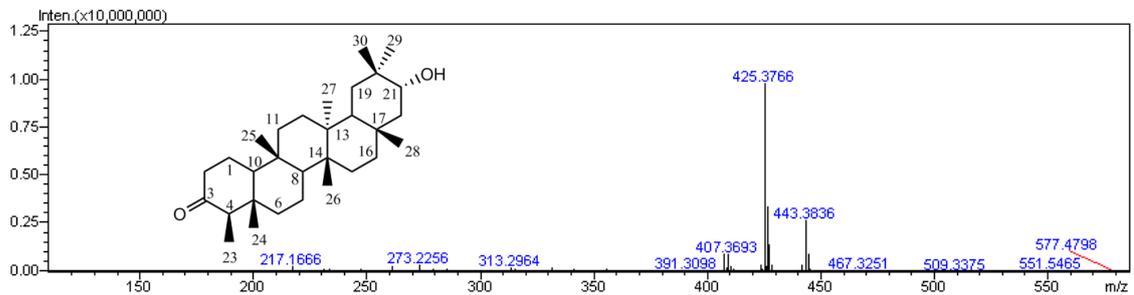
**Apêndice QCC – Espectro de APCI-MS/MS ( $m/z$  425) para S8**



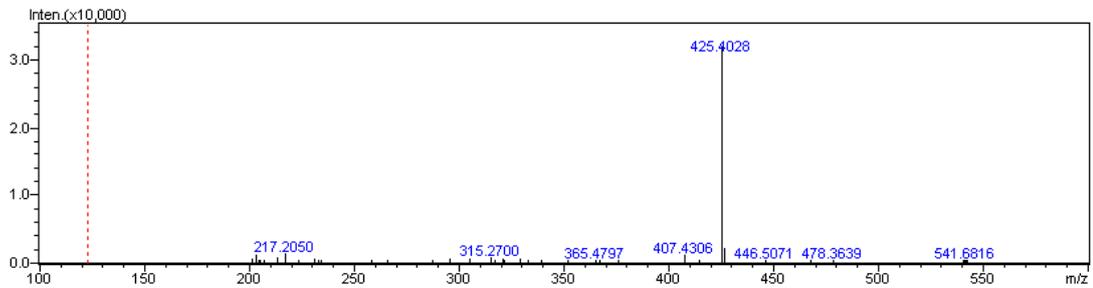
**Apêndice QCD – Espectro de APCI-MS/MS ( $m/z$  413) para S8**



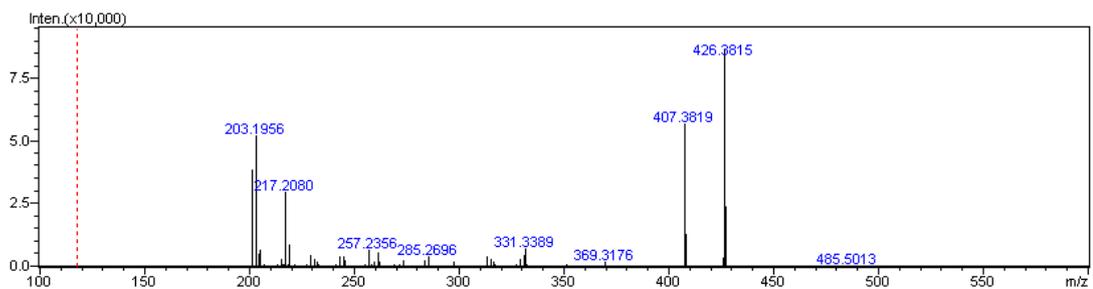
**Apêndice QDA – Espectro de APCI-MS para S9**



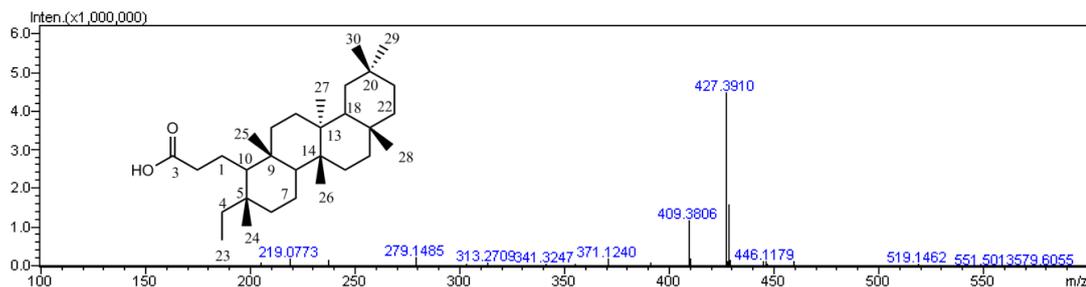
**Apêndice QDB – Espectro de APCI-MS/MS ( $m/z$  443) para S9**



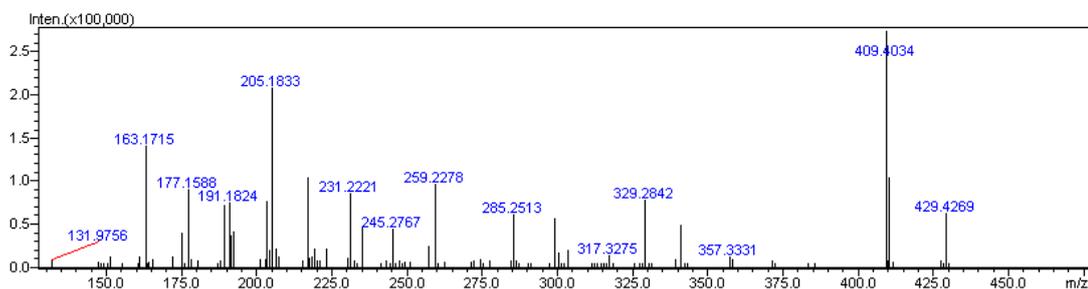
**Apêndice QDC – Espectro de APCI-MS/MS ( $m/z$  425) para S9**



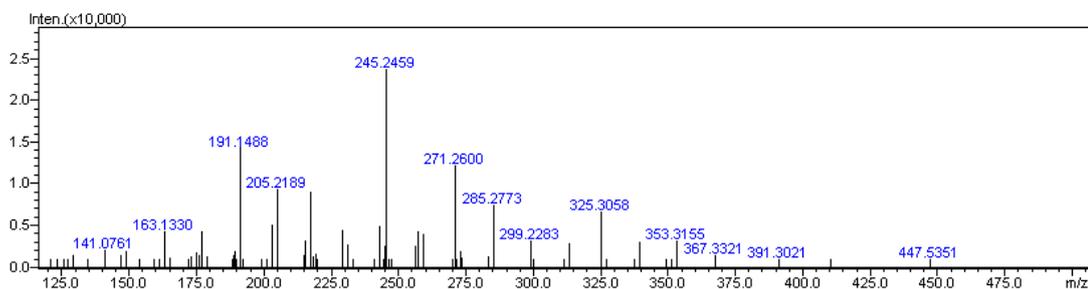
**Apêndice QEA – Espectro de APCI-MS para S10**



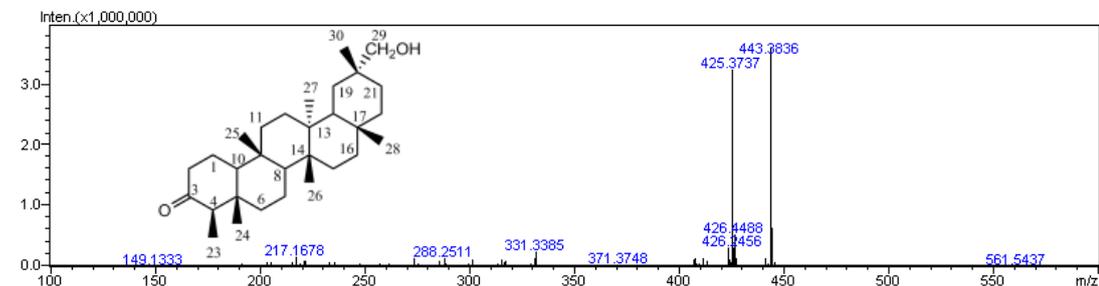
**Apêndice QEB – Espectro de APCI-MS/MS (m/z 427) para S10**



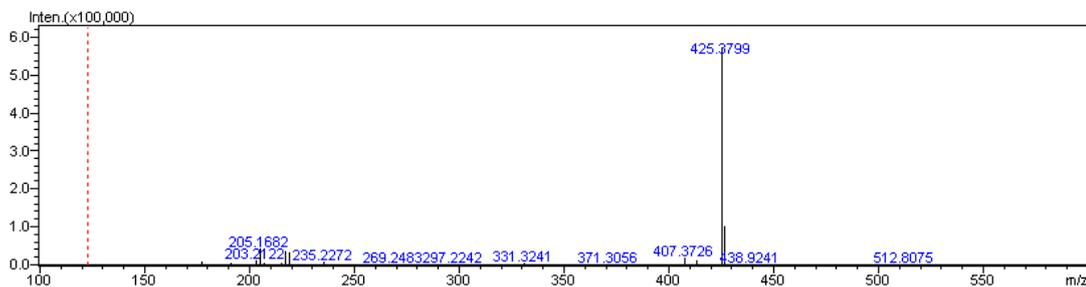
**Apêndice QEC – Espectro de APCI-MS/MS (m/z 409) para S10**



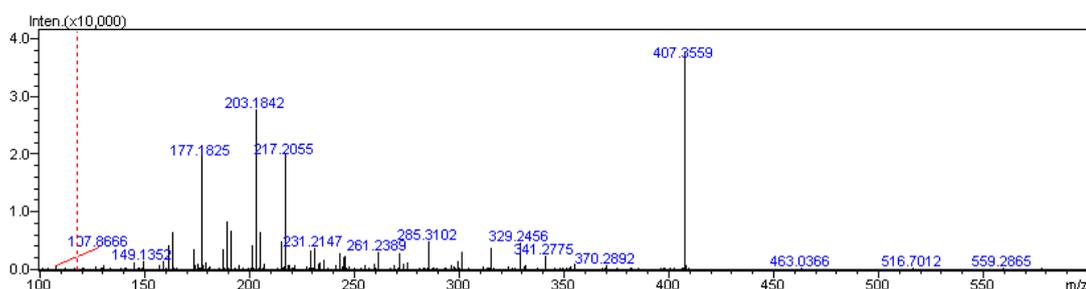
**Apêndice QFA – Espectro de APCI-MS para S11**



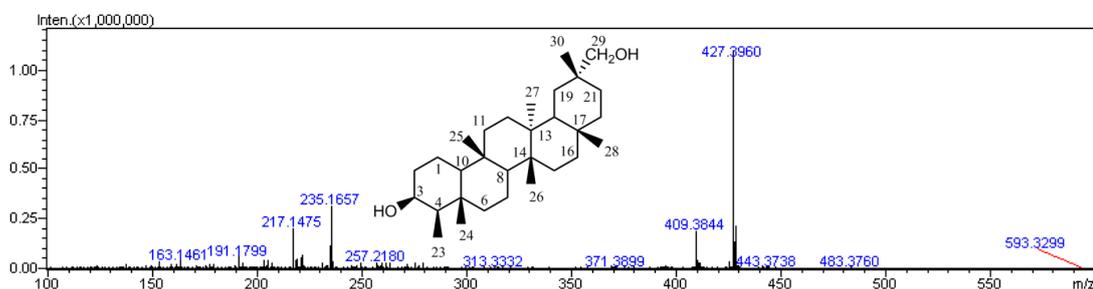
Apêndice QFB – Espectro de APCI-MS/MS ( $m/z$  443) para S11



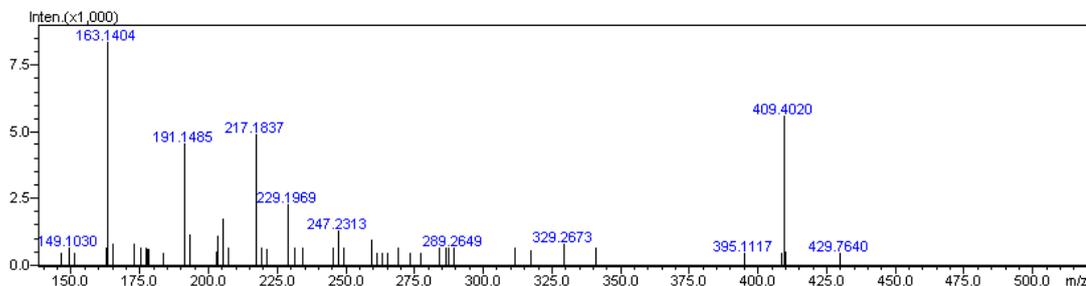
Apêndice QFC – Espectro de APCI-MS/MS ( $m/z$  425) para S11



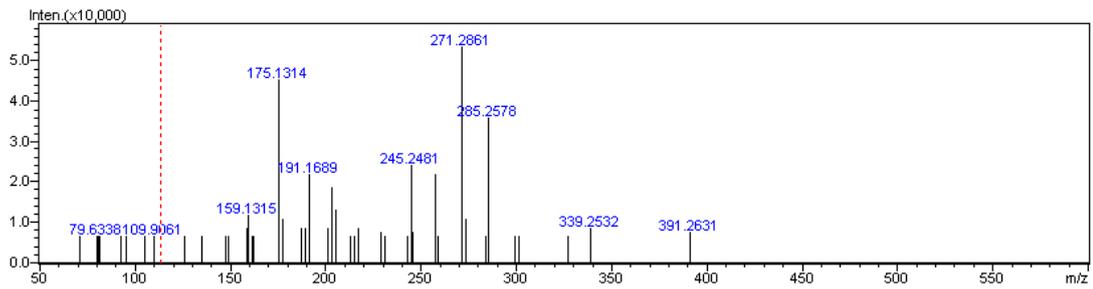
Apêndice QGA – Espectro de APCI-MS para S12



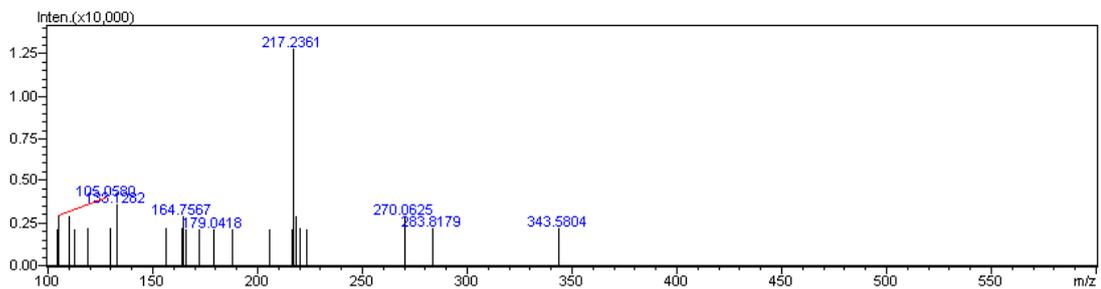
Apêndice QGB – Espectro de APCI-MS/MS ( $m/z$  427) para S12



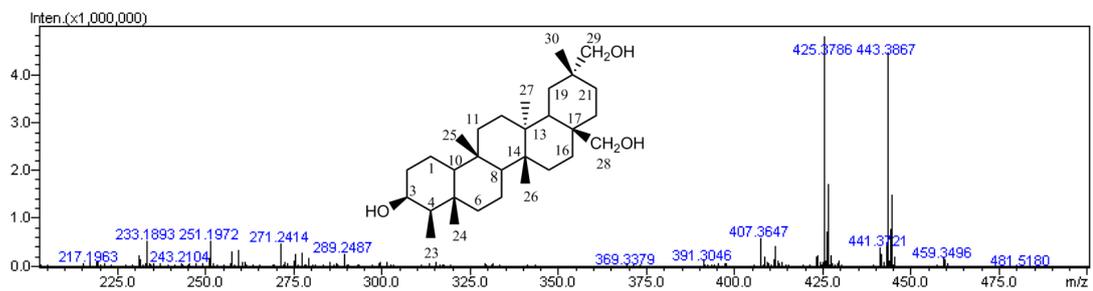
**Apêndice QGC – Espectro de APCI-MS/MS ( $m/z$  409) para S12**



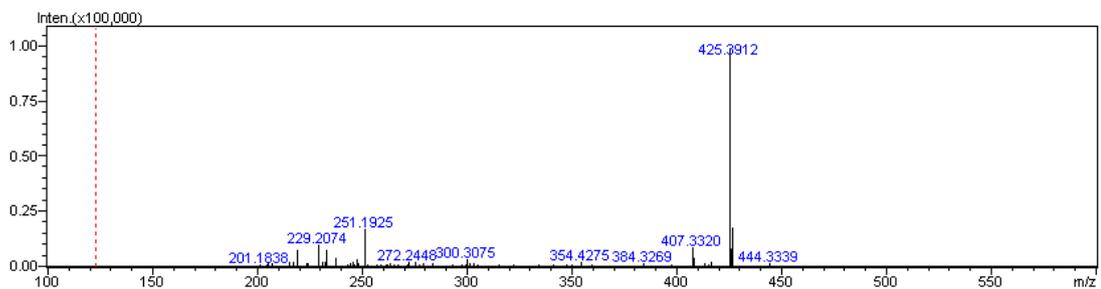
**Apêndice QGD – Espectro de APCI-MS/MS ( $m/z$  235) para S12**



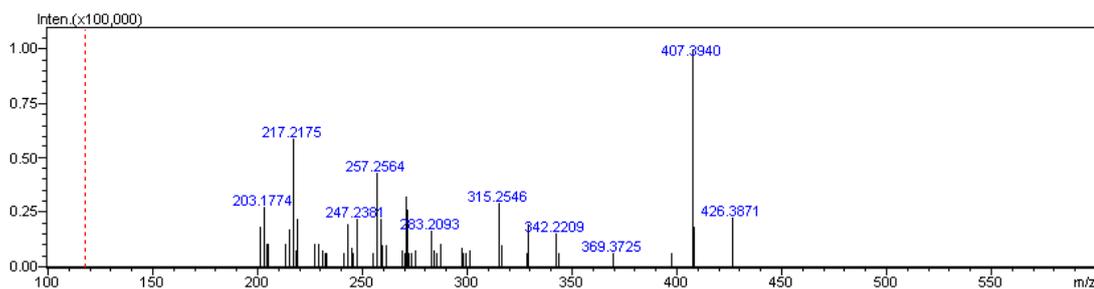
**Apêndice QHA – Espectro de APCI-MS para S15**



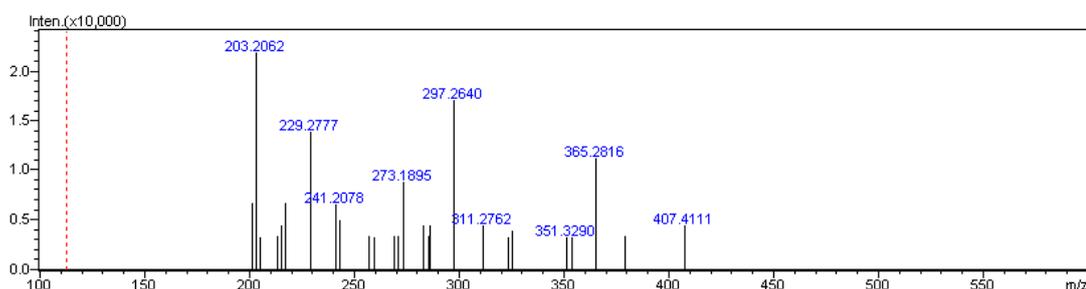
**Apêndice QHB – Espectro de APCI-MS/MS ( $m/z$  443) para S15**



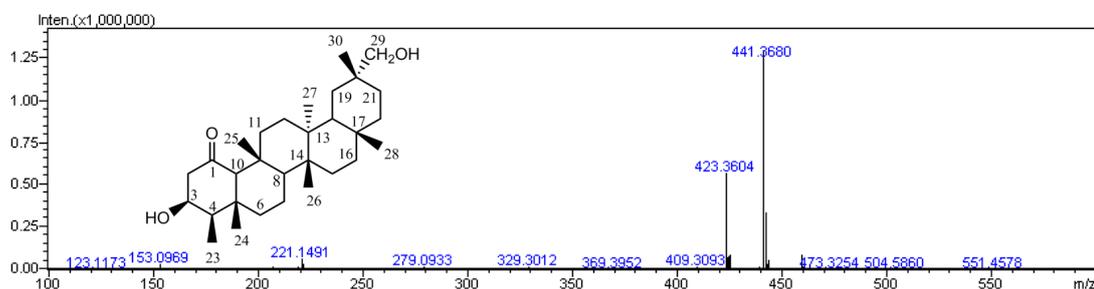
**Apêndice QHC – Espectro de APCI-MS/MS (*m/z* 425) para S15**



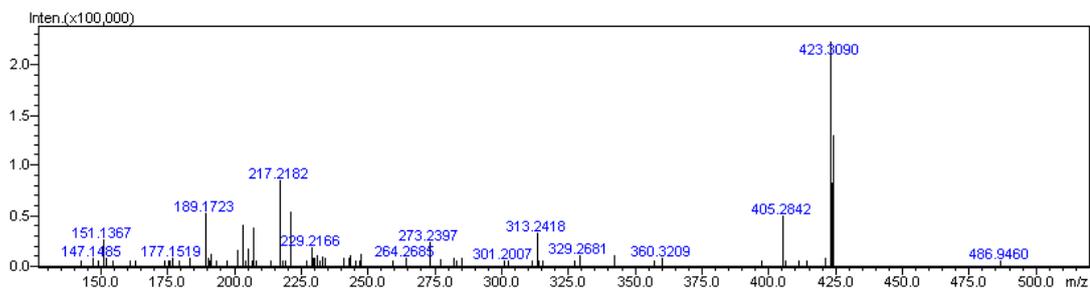
**Apêndice QHD – Espectro de APCI-MS/MS (*m/z* 407) para S15**



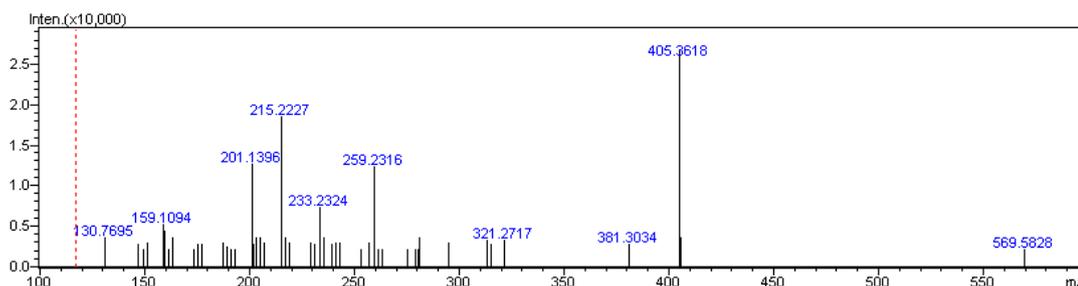
**Apêndice QIA – Espectro de APCI-MS para S16**



**Apêndice QIB – Espectro de APCI-MS/MS (*m/z* 441) para S16**



Apêndice QIC – Espectro de APCI-MS/MS (*m/z* 423) para S15

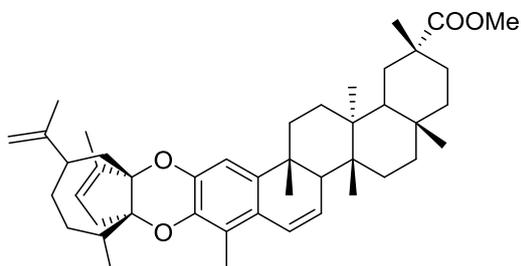
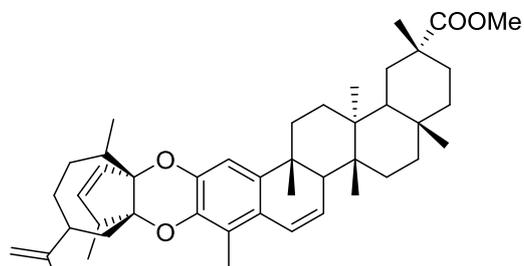
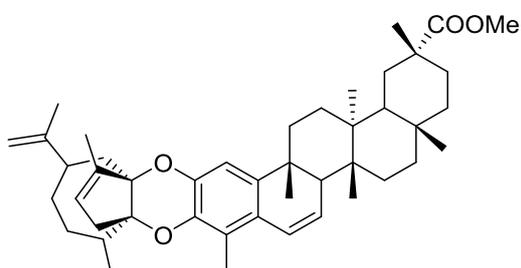
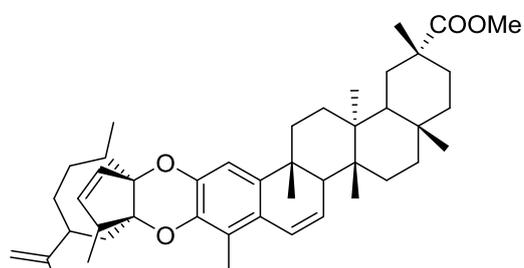
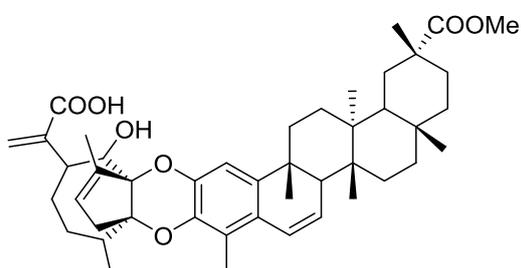
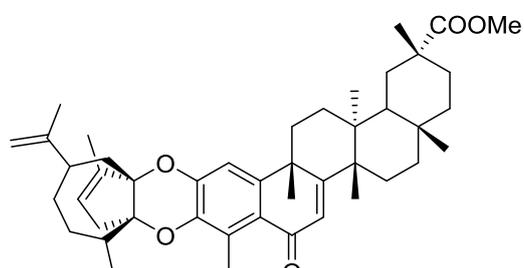
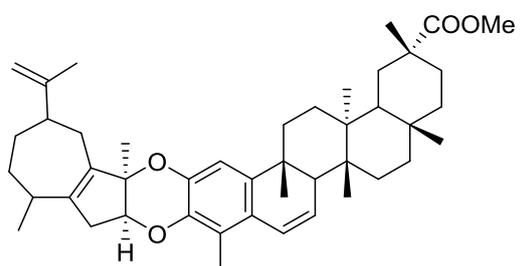
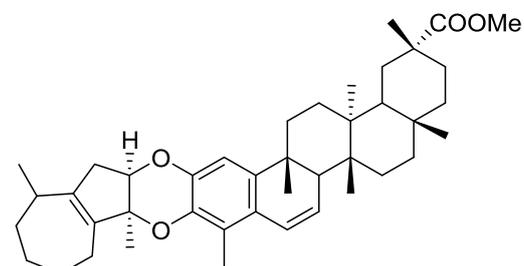
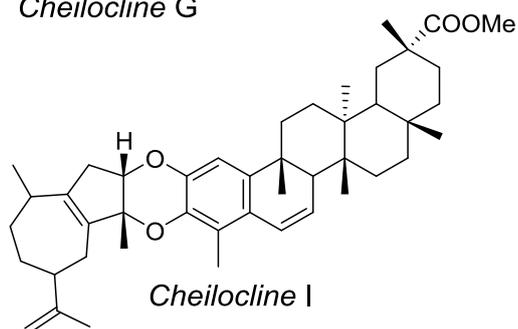


R. Resultado do teste de comparações múltiplas de Bonferroni para o ensaio HET-CAM

<b>Bonferroni's multiple comparisons test</b>	<b>Mean Diff,</b>	<b>95% CI of diff,</b>	<b>Significant?</b>	<b>Summary</b>
Controle Negativo vs. S11	162428	130232 to 194624	Yes	****
Controle Negativo vs. S12	199100	166904 to 231296	Yes	****
Controle Negativo vs. S10	190560	158364 to 222756	Yes	****
Controle Negativo vs. Bevacizumabe	76064	43868 to 108260	Yes	****
Controle Negativo vs. S16	185271	153075 to 217467	Yes	****
Controle Negativo vs. S9	196288	164092 to 228484	Yes	****
Controle Negativo vs. S8	202672	170476 to 234868	Yes	****
S11 vs. S12	36671	4475 to 68867	Yes	*
S11 vs. S10	28132	-4064 to 60328	No	ns
S11 vs. Bevacizumabe	-86364	-118560 to -54168	Yes	****
S11 vs. S16	22843	-9353 to 55039	No	ns
S11 vs. S9	33859	1663 to 66055	Yes	*
S11 vs. S8	40244	8048 to 72440	Yes	**
S12 vs. S10	-8539	-40735 to 23657	No	ns
S12 vs. Bevacizumabe	-123036	-155232 to -90840	Yes	****
S12 vs. S16	-13829	-46025 to 18367	No	ns
S12 vs. S9	-2812	-35008 to 29384	No	ns
S12 vs. S8	3573	-28623 to 35769	No	ns
S10 vs. Bevacizumabe	-114496	-146692 to -82300	Yes	****
S10 vs. S16	-5289	-37485 to 26907	No	ns
S10 vs. S9	5728	-26469 to 37924	No	ns
S10 vs. S8	12112	-20084 to 44308	No	ns
Bevacizumabe vs. S16	109207	77011 to 141403	Yes	****
Bevacizumabe vs. S9	120224	88028 to 152420	Yes	****
Bevacizumabe vs. S8	126608	94412 to 158804	Yes	****
S16 vs. S9	11017	-21179 to 43213	No	ns
S16 vs. S8	17401	-14795 to 49597	No	ns
S9 vs. S8	6385	-25811 to 38581	No	ns

ns: não significativo; \*  $P < 0,05$ ; \*\*  $P < 0,01$ ; \*\*\*  $P < 0,001$ ; \*\*\*\*  $P < 0,0001$

## ANEXO

A. Adutos de sesquiterpenos-triterpenos: *cheiloclinae* A-I*Cheiloclina A**Cheiloclina B**Cheiloclina C**Cheiloclina D**Cheiloclina E**Cheiloclina F**Cheiloclina G**Cheiloclina H**Cheiloclina I*