



UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

**ESTUDO QUÍMICO E DE ATIVIDADE BIOLÓGICA
COMPARATIVO DO LÁTEX DO LEITE DE AMAPÁ
EXTRAÍDO DE DUAS ESPÉCIES BOTÂNICAS DISTINTAS**

RITA CYNARA DE OLIVEIRA SALLES

MANAUS
2013

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

**ESTUDO QUÍMICO E DE ATIVIDADE BIOLÓGICA
COMPARATIVO DO LÁTEX DO LEITE DE AMAPÁ
EXTRAÍDO DE DUAS ESPÉCIES BOTÂNICAS DISTINTAS**

RITA CYNARA DE OLIVEIRA SALLES

Dissertação de Mestrado apresentada ao
Programa de Pós-graduação em Química,
Universidade Federal do Amazonas, como parte
dos requisitos para a obtenção do título de Mestre
em Química, área de concentração: Química
Orgânica.

Orientadora : Dra. Rita de Cássia Saraiva Nunomura

MANAUS
2013

RITA CYNARA DE OLIVEIRA SALLES

**ESTUDO QUÍMICO E DE ATIVIDADE BIOLÓGICA
COMPARATIVO DO LÁTEX DO LEITE DE AMAPÁ
EXTRAÍDO DE DUAS ESPÉCIES BOTÂNICAS DISTINTAS**

Dissertação de Mestrado apresentada ao
Programa de Pós-graduação em Química,
Universidade Federal do Amazonas, como parte
dos requisitos para a obtenção do título de Mestre
em Química, área de concentração: Química
Orgânica.

BANCA EXAMINADORA

Dra. Rita de Cássia Saraiva Nunomura, Presidente
Universidade Federal do Amazonas (UFAM)

Dra. Ana Frazão Teixeira, Membro
Universidade do Estado do Amazonas (UEA)

Dr. Jefferson Rocha A. Silva, Membro
Universidade Federal do Amazonas

Parecer da banca examinadora: _____

Dedico este trabalho a Deus, aos meus pais (Francisco Salles Filho e Sirley Maria) e aos irmãos (a) que com muito carinho me proporcionaram condições de obter esses conhecimentos, minha eterna gratidão.

AGRADECIMENTOS

À Deus por todos os momentos que me deu força pra sempre continuar;

Aos meus pais, Francisco Salles Filho e Sirley Maria pela paciência e incentivo, a minha irmã, Amanda, aos meus irmãos Francisley, Francisnelson, Francisco, Johnny, pela força;

A minha sobrinha Júlia, pela compreensão nos momentos em que não pude dar atenção;

Aos meus Tios e Tias que sempre me aconselharam na busca pelo conhecimento;

A minha orientadora Dra. Rita de Cássia, pelo apoio, paciência e sabedoria;

Ao Dr. Sergio Nunomura meu agradecimento pelo conhecimento transmitido para o desenvolvimento deste trabalho.

Ao Dr. Emerson Lima pela disponibilidade do seu laboratório para realização das atividades biológicas;

Ao Dr. Norberto Peporine Lopes pela oportunidade de realizar algumas análises em seu grupo de pesquisa e meu agradecimento à técnica Cristina pela assistência durante as análises realizadas na USP- Ribeirão Preto- SP;

Aos meus amigos de graduação;

Aos meus amigos de Pós-graduação e principalmente do LAPAAM pelo companheirismo e pelos conhecimentos compartilhados;

E a todos que de maneira direta ou indireta contribuíram para a realização deste trabalho, meu eterno agradecimento.

RESUMO

As plantas representaram durante séculos, a única fonte de agentes terapêuticos para o homem, e várias espécies têm sido largamente empregadas a partir do conhecimento popular. Na região Amazônica apesar da sua grande biodiversidade de plantas medicinais, existem poucas espécies de plantas medicinais que foram estudadas. Dentre elas destacam-se as espécies conhecidas por amapazeiros, a *Brosimum parinarioides* (Huber) Ducke, da família Moraceae e a *Parahancornia amapa* (Huber), pertencente à família Apocynaceae, respectivamente o amapá amargo e amapá doce. O leite de amapá tem seu principal uso popular na Amazônia como cicatrizante e antiinflamatório, atuando principalmente no trato respiratório e ainda como tônico e fortificante. O presente trabalho descreve o isolamento de cinco triterpenos, o butirospermol, e seu epímero tirucalla-7,24-dien-3 β -ol, o cicloartenol, cicloeucalenol e obtusifoliol, que são descritos ocorrer pela primeira vez na espécie *Brosimum parinarioides*. Também foi realizada a caracterização das misturas de ésteres de lupeol hidroxilados e não hidroxilados isoladas anteriormente da espécie *Parahancornia amapa* pela determinação da cadeia lateral por espectrometria de massas. Foi realizado também um estudo comparativo de perfis cromatográficos das duas espécies de amapazeiros tanto por cromatografia em camada delgada como por cromatografia líquida de alta eficiência, onde se verificou que as mesmas apresentaram constituintes comuns, entre eles os acetatos de α e β -amirina e de lupeol, assim como constituintes distintos como a mistura de ésteres hidroxilados que ocorrem apenas na espécie *P. amapa* e o cicloeucalenol e o obtusifoliol, que ocorreram também na espécie *B. parinarioides*. O uso terapêutico da espécie também foi verificado pela determinação do efeito cicatrizante que foi avaliado pelo efeito coagulante de alguns desses constituintes isolados e dos extratos das duas espécies pelo Teste de Protrombina (TP), utilizando a heparina como controle positivo de anticoagulante, e também pela inibição da enzima lipoxigenase (LOX). Os extratos diclorometânicos e metanólicos, assim como os constituintes isolados não apresentaram atividade coagulante nem anticoagulante. Contudo na avaliação da inibição da enzima lipoxigenase, observou-se um resultado significativo de inibição para os triterpenos acetilados e ambos os extratos, comparáveis ao padrão de quercetina utilizado, corroborando para o uso popular no tratamento de doenças alérgicas.

Palavras-Chave: Látex, Moraceae, Apocynaceae, amapazeiros.

ABSTRACT

For centuries, the plants have been the single source for the treatment of several diseases, and some of them have been employed in the traditional medicine. In the Amazon region, there is a great diversity of medicinal plant, but only a few were studied so far. The species popularly known as “amapazeiros” or “leite de amapa”, *Brosimum paranarioides* (Huber) Ducke from Moraceae family and *Parahancornia amapa* (Huber) from Apocynaceae family, respectively known as “amapa amargo” and “amapa doce”, had not been studied thoroughly yet. These species are used against bleeding, in the treatment of respiratory diseases, or as anti-inflammatory, tonic or fortifiers. Herein, we describe for the first time the isolation of five triterpenes, butyrospermol and your epimer tirucalla-7,24-dien-3 β -ol, cycloartenol, cycloeucalenol and obtusifoliol from *B. parinarioides*. A mixture of hydroxylated and another of non-hydroxylated acyl-lupeol esters isolated from *P. amapa* were also fully characterized by mass spectrometry. Chromatographic profiles, by TLC and HPLC, were also performed and common features between the species were found, such as the presence of the acetates of α , β -amirina and lupeol. On the other hand, the mixture of hydroxylated acyl-lupeol esters occurred solely in *P. amapa*, whereas cycloeucalenol and obtusifoliol in *B. parinarioides*. The pharmacological properties of both species were also evaluated. Due to its popular use, the coagulation capacity was assessed for some of the constituents, and the extracts as well, by the prothrombin test (PT), having heparin as positive control. The inhibition of the enzyme lipooxygenase (LOX) was also evaluated. All tested samples showed no coagulant or anticoagulant activity. However, significant inhibition of LOX, comparable to the positive control of quercetin, was observed for the acetylated triterpenes and both extracts, which is in agreement with the popular use of both species as anti-allergic.

KEYWORDS: Látex, Moraceae, Apocynaceae, amapazeiros

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Estrutura do taxol	10
Figura 2: Estrutura do α -humuleno e <i>trans</i> -cariofileno.	11
Figura 3: Exemplos de espécies de plantas e os tipos de laticíferos que elas apresentam. As setas vermelhas (→) mostram os pontos de articulação entre os membros laticíferos, enquanto que as setas verdes (→) identificam anastomoses (HAGEL <i>et al.</i> , 2008).	14
Figura 4: Estruturas das furanocumarinas psoraleno e bergapteno.	17
Figura 5: Estrutura das substancias isoladas de <i>Brosimum gaudichaudii</i> e <i>rubescens</i>	18
Figura 6: Estrutura da substância isolada de <i>Brosimum acutifolium</i>	18
Figura 7: <i>Brosimum parinarioides</i> : látex, folhas e tronco respectivamente.	19
Figura 8: Estrutura dos alcalóides vincristina e vimblastina.	23
Figura 9: <i>Parahancornia amapa</i> : tronco, galho com látex e folhas respectivamente.	24
Figura 10: Constituintes isolados de <i>Parahancornia amapa</i> encontrados na literatura.	26
Figura 11: Continuação dos constituintes isolados de <i>Parahancornia amapa</i> encontrados na literatura.	27
Figura 12: Formação do esqualeno.	30
Figura 13: Formação de triterpenos tetracíclicos a partir do cátion protosteril.	31
Figura 14: Formação dos triterpenos pentacíclicos a partir do cátion damarenil.	32
Figura 15: Formação do butirospermol e tirucalla-7,24-dien-3- β -ol a partir do cátion damarenil.	33
Figura 16: Produtos da reação de transesterificação com mistura ésteres de lupeol hidroxilado (a) e não hidroxilado (b).	53
Figura 17: Comparação por CCD dos extratos DCM de <i>B. parinarioides</i> (1ª e 2ª coleta) e <i>P. amapa</i> . Placa eluída com hexano/ Acetato de etila (85:15), revelada em anisaldeído.	60
Figura 18: Cromatograma da CLAE da fração Fr5, (a) (254 nm) e (b) (210 nm), método gradiente. Condições cromatográficas: Fase móvel ACN (A)/ H ₂ O (0,05% ac. acético); 0-5 min. (10% B), 5-15min. (10% B -100% A), 15-40 min. (100% A), 40-45 min. (10% B). coluna analítica.	61

Figura 19: (a) Cromatograma da fração Fr5 solubilizada em ACN (100%), com volume de injeção de 50 µL, (a.1) detecção em 254 nm; (a.2) detecção em 210 nm; (b) Cromatograma da fração Fr5 solubilizada em ACN/ i-prOH (80:20), com volume de injeção de 20 µL, (b.1) detecção em 254 nm. (b.2) detecção em 210 nm. Condições cromatográficas: Fase móvel ACN (100%) por 40 min. Utilizando coluna analítica.	63
Figura 20: (a) Cromatogramas das fração Fr4; (b) fração 6; (c) fração 7; Condições cromatográficas: Fase móvel ACN (100%) por 40 min, utilizando coluna analítica, volume de injeção de 20 µL e detecção em 210 nm.	64
Figura 21: Cromatograma da fração 5, durante isolamento, com detecção em 210 nm. Fase móvel ACN (100%). Coluna semi-preparativa.	65
Figura 22: Cromatograma da fração 6, durante isolamento, com detecção em 210 nm. Fase móvel ACN (100%). Coluna semi-preparativa.	65
Figura 23: Cromatograma das substancias isoladas por CLAE em modo reverso, com detecção em 210 nm. Legenda de cores: (----) SUBST-1; (----) SUBST-2; (----) SUBST-3.	66
Figura 24: Cromatograma da fração F (Fr145-149 (Sob)) com fluxo de 0,08 mL/min. com detecção em 210 nm (coluna analítica).	67
Figura 25: Cromatograma da fração F (Fr145-149 (Sob) com fluxo de 0,12 mL/min. com detecção em 210 nm (coluna analítica).	67
Figura 26: Cromatograma da fração F (Fr145-149 (Sob) com fluxo de 3 mL/min. com detecção em 210 nm (coluna semi-preparativa).	68
Figura 27: Cromatograma das substâncias isoladas por CLAE em modo normal, com fluxo de 0,08 mL/min e detecção em 210 nm. Legenda de cores: (----) SUBST-4; (----) SUBST-5.	69
Figura 28: Estrutura da substância codificada como SUBST-1 (butirospermol).....	71
Figura 29: Ampliação do espectro de RMN ¹ H, na região dos sinais referentes às metilas em singletos e dupletos 500 MHz para a SUBST-1.	72
Figura 30: Ampliação da região dos hidrogênios olefínicos e hidrogênio do carbono carbinólico 500 MHz para a SUBST-1.	73
Figura 31: Ampliação do espectro de carbono na região de carbonos quaternários e CH para a SUBST-1.	74
Figura 32: Ampliação do espectro de DEPT 135° na região de CH para a SUBST-1	74
Figura 33: Ampliação do mapa de contorno HMBC, região H (2,9-3,6) para a SUBST-1....	75
Figura 34: Ampliação do mapa de contorno HMBC, região H (5,0-5,35) da para a substância SUBST-1.	76

Figura 35: Ampliação do mapa de contorno HMBC, região H (0-1,8) para a substância BPL-SUBST-1.	77
Figura 36: Estrutura da substância codificada como SUBST-2 (tirucalla-7, 24-dien-3 β -ol).	79
Figura 37: Ampliação do espectro de RMN ^1H , na região dos sinais referentes às metilas em singletos e dubletos 500 MHz para a SUBST-2.	80
Figura 38: Ampliação da região dos hidrogênios olefínicos e hidrogênio do carbono carbinólico 500 MHz para a SUBST-2.	81
Figura 39: Ampliação do espectro de carbono na região de carbonos quaternários e CH para a SUBST-2.	82
Figura 40: Ampliação do espectro de DEPT 135 na região de CH para a SUBST-2.	82
Figura 41: Ampliação do mapa de contorno HMBC, região H (2,8-3,6) para a SUBST-2....	83
Figura 42: Ampliação do mapa de contorno HMBC, região H (4,7-5,5) para a SUBST-2....	84
Figura 43: Ampliação do mapa de contorno HMBC, região H (0-2,0) para a SUBST-2.	85
Figura 44: Estrutura da substância codificada como SUBST-3 (cicloartenol).	87
Figura 45: Ampliação do espectro de RMN ^1H , na região dos sinais referentes às metilas em singletos e dubletos 500 MHz para a SUBST-3.	88
Figura 46: Ampliação do espectro de RMN ^1H , na região dos sinais referentes aos hidrogênios metilênicos do ciclopropano, em 500 MHz para a SUBST-3.	88
Figura 47: Ampliação da região dos hidrogênios olefínicos e hidrogênio do carbono carbinólico 500 MHz para a SUBST-3.	89
Figura 48: Ampliação do espectro de carbono na região de carbonos quaternários e carbono carbinólico para a SUBST-3.	90
Figura 49: Ampliação do mapa de contorno HMBC, região H (0,1- 0,65) para a SUBST-3.	90
Figura 50: Ampliação do mapa de contorno HMBC, região H (4,75-5,30) para a SUBST-3.	91
Figura 51: Ampliação do mapa de contorno HMBC, região H (2,85-3,40) para a SUBST-3.	91
Figura 52: Ampliação do mapa de contorno HMBC, região H (0,55- 1,10) para SUBST-3.	92
Figura 53: Ampliação do mapa de contorno HMBC, região H (0-1,8) para a SUBST-3.	93
Figura 54: Ampliação do mapa de contorno HMBC, região H (0,2-0,6) para a SUBST-3....	93
Figura 55: Estrutura da substância codificada como SUBST-4 (cicloeucaleanol).	95

Figura 56: Ampliação da região dos hidrogênios olefínicos e hidrogênio do carbono carbinólico 500 MHz para a SUBST-4.	96
Figura 57: Ampliação do espectro de RMN ^1H , na região dos sinais referentes aos hidrogênios metilênicos do ciclopropano, em 500 MHz para a SUBST-4.	96
Figura 58: Ampliação do espectro de RMN ^1H , na região dos sinais referentes às metilas em singletos e dubletos 500 MHz para a SUBST-4.	97
Figura 59: Ampliação do espectro de carbono na região de carbonos quaternários e olefínicos para a SUBST-4.	98
Figura 60: Ampliação do espectro de DEPT 135 na região de CH e CH_2 para a SUBST-4. ..	98
Figura 61: Ampliação do mapa de contorno HMBC, região H (0- 0,55) para a SUBST-4....	99
Figura 62: Ampliação do mapa de contorno HMBC, região H (4,40- 4,90) para a SUBST-4.	100
Figura 63: Ampliação do mapa de contorno HMBC, região H (0,70- 1,25) para a SUBST-4.	100
Figura 64: Ampliação do mapa de contorno HMBC, região H (-0,5- 1,5) para a SUBST-4.	101
Figura 65: Ampliação do mapa de contorno HMBC, região H (0,05- 0,45) para a SUBST-4.	101
Figura 66: Estrutura da SUBST-5 (obtusifoliol)	103
Figura 67: Ampliação do espectro de RMN ^1H , na região dos sinais referentes às metilas em singletos e dubletos a 500 MHz (em CDCl_3) para a SUBST-5.	104
Figura 68: Ampliação da região dos hidrogênios olefínicos e hidrogênio do carbono carbinólico 500 MHz (em CDCl_3) para a SUBST-5.....	104
Figura 69: Ampliação do espectro de carbono na região de carbonos quaternários e CH para a substância SUBST-5.	105
Figura 70: Ampliação do mapa de contorno HMBC, região H (4,4- 5,5) para a SUBST-5.	106
Figura 71: Ampliação do mapa de contorno HMBC, região H (4,4- 5,0) para a SUBST-5.	106
Figura 72: Ampliação do mapa de contorno HMBC, região H (0- 1,5) para a SUBST-5. ..	107
Figura 73: Ampliação do mapa de contorno HMBC, região H (0- 1,5) para a SUBST-5. ..	107
Figura 74: Estruturas das substâncias isoladas anteriormente de <i>P.amapa</i>	109
Figura 75: Cromatograma de CG da mistura de triterpenos acetilados isolados de <i>P. amapa</i> (MIST-2).	110

Figura 76: Fragmentações características de triterpenos.	111
Figura 77: Cromatograma da análise por CG-EM da mistura de ésteres de lupeol não hidroxilados.	112
Figura 78: Fragmento característico de ésteres alifáticos de cadeia linear m/z 74.	113
Figura 79: Cromatograma da análise por CG-EM da mistura de ésteres de lupeol hidroxilados	114
Figura 80: CCDC do extrato de <i>B. parinarioides</i> e <i>P. amapa</i> em com os padrões autênticos isolados das duas espécies.....	115
Figura 81: Cromatograma do extrato de <i>B. parinarioides</i> (época de seca).	116
Figura 82: Cromatograma do extrato de <i>B. parinarioides</i> (época de chuva).....	117
Figura 83: Padrão da mistura de ésteres de lupeol não hidroxilado isolado de <i>P.amapa</i>	118
Figura 84: Região ampliada da análise do padrão da mistura de triterpenos acetilados -ac. α , β - amirina e ac. de lupeol) isolada de <i>P.amapa</i>	118
Figura 85: Padrão acetato de lupeol isolado de <i>P.amapa</i>	118
Figura 86: Padrão acetato de lupeol isolado de <i>B. parinarioides</i>	119
Figura 87: Região ampliada da análise do padrão mistura de ésteres de lupeol hidroxilado isolado de <i>P. amapa</i>	119
Figura 88: Padrão cicloartenol isolado de <i>B. parinarioides</i>	120
Figura 89: Padrão butirospermol isolado de <i>B. parinarioides</i>	120
Figura 90: Padrão tirucalla-7,24-dien-3 β -ol isolado de <i>B. parinarioides</i>	121
Figura 91: Padrão cicloeucalenol isolado de <i>B. parinarioides</i>	121
Figura 92: Padrão obtusifoliol isolado de <i>B. parinarioides</i>	122
Figura 93: (a) Perfil do extrato original BPL-DCM-2 (b) Perfil do extrato BPL-DCM-2 com coinjeção do padrão de mistura de ésteres de lupeol não hidroxilado isolado de <i>P.amapa</i> . .	123
Figura 94: (a) Perfil do extrato original BPL-DCM-2 (b) Perfil do extrato BPL-DCM-2 com coinjeção do padrão de mistura de triterpenos acetilados isolada de <i>P.amapa</i> com ampliação da área coinjetada.....	124
Figura 95: (a) Perfil do extrato original BPL-DCM-2 (b) Perfil do extrato BPL-DCM-2 com coinjeção do padrão de acetato de lupeol isolado de <i>P.amapa</i> (c) com coinjeção do padrão de acetato de lupeol isolado de <i>B. parinarioides</i> , com ampliações da área coinjetada.....	124

Figura 96: (a) Perfil do extrato original BPL-DCM-2 (b) Perfil do extrato BPL-DCM-2 com coinjeção do padrão de mistura de ésteres de lupeol hidroxilado isolado de <i>P.amapa</i>	125
Figura 97: (a) Perfil do extrato original BPL-DCM-2 (b) Perfil do extrato BPL-DCM-2 com coinjeção do padrão cicloartenol isolado de <i>B. parinarioides</i>	125
Figura 98: (a) Perfil do extrato original BPL-DCM-2 (b) Perfil do extrato BPL-DCM-2 com coinjeção do padrão butirospermol (c) com coinjeção do padrão tirucalla-7,24-dien-3 β -ol, isolados de <i>B. parinarioides</i>	126
Figura 99: (a) Perfil do extrato original BPL-DCM-2 (b) Perfil do extrato BPL-DCM-2 com coinjeção do padrão cicloeucalenol (c) com coinjeção do padrão obtusifoliol, isolados de <i>B. parinarioides</i>	127
Figura 100: (a) Perfil do extrato original -PAL-DCM-2 (b) Perfil do extrato PAPL-DCM-2 com coinjeção do padrão mistura de ésteres de lupeol não hidroxilado (c) com coinjeção do padrão mistura de triterpenos acetilados (d) com coinjeção do padrão acetato de lupeol (e) com coinjeção do padrão mistura de ésteres de lupeol hidroxilado, isolados de <i>P.amapa</i> . ..	129
Figura 101: (a) Perfil do extrato original -PAL-DCM-2 com região complexa ampliada (b) Perfil do extrato PAPL-DCM-2 com coinjeção do padrão acetato de lupeol isolado de <i>B.parinarioides</i>	130
Figura 102: (a) Perfil do extrato original -PAL-DCM-2 (b) Perfil do extrato PAPL-DCM-2 com coinjeção do padrão cicloartenol isolado de <i>B.parinarioides</i>	131
Figura 103: (a) Perfil do extrato original -PAL-DCM-2 (b) Perfil do extrato PAPL-DCM-2 com coinjeção do padrão butirospermol isolado de <i>B.parinarioides</i>	131
Figura 104: (a) Perfil do extrato original -PAL-DCM-2 (b) Perfil do extrato PAPL-DCM-2 com coinjeção do padrão tirucalla-7,24-dien-3 β -ol isolado de <i>B.parinarioides</i>	132
Figura 105: (a) Perfil do extrato original -PAL-DCM-2 (b) Perfil do extrato PAPL-DCM-2 com coinjeção do padrão cicloeucalenol (c) com coinjeção do padrão obtusifoliol, isolados de <i>B.parinarioides</i>	133

LISTA DE FLUXOGRAMA

Fluxograma 1: Procedimento utilizado para a obtenção dos extratos MeOH e DCM da espécie <i>B. parinarioides</i>	41
Fluxograma 2: Fracionamento preliminar com o extrato diclorometânico da espécie <i>B. parinarioides</i>	42
Fluxograma 3: Cromatografia em coluna realizada com a fração 2 (BPL-DCM-T-2).....	43
Fluxograma 4: Cromatografia em coluna realizada com a fração D (Fr.25-27).....	44
Fluxograma 5: Cromatografia em coluna realizada com a fração D (25-27).....	45
Fluxograma 6: Isolamento por CLAE semi-preparativo com as frações Fr5 e Fr6.....	46
Fluxograma 7: Procedimento de recristalização realizada com a fração F (145-149).....	47
Fluxograma 8: Isolamento por CLAE semi-preparativo com a fração F (Fr145-149 Sob). ..	48
Fluxograma 9: Isolamento de padrões da espécie <i>P.amapa</i>	50
Fluxograma 10: Isolamento de padrões da espécie <i>B. parinarioides</i>	51

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Data da coleta e número da exsicata da espécie <i>B. parinarioides</i> .	40
Tabela 2: Rendimento dos extratos DCM e MeOH de <i>B. parinarioides</i> .	59
Tabela 3: valores de deslocamentos para ^1H , ^{13}C , DEPT 135, HSQC e HMBC, para a SUBST-1 (RMN ^1H , 500 MHz, RMN ^{13}C , 125 MHz, CDCl_3) em comparação com os dados da literatura Teresa <i>et al.</i> , 1987 (em CDCl_3 , com ausência dos dados do aparelho).	78
Tabela 4: valores de deslocamentos para ^1H , ^{13}C , DEPT 135, HSQC e HMBC, para SUBST-2. As análises de RMN ^1H foram obtidos em 500 MHz e de RMN ^{13}C a 125 MHz, utilizando CDCl_3 , em comparação com a literatura (Morlacchi <i>et al.</i> , 2009) em 800 MHz, CDCl_3 .	85
Tabela 5: valores de deslocamentos para RMN ^1H , ^{13}C , DEPT 135, HSQC e HMBC, para a SUBST-3. (RMN ^1H , 500 MHz, RMN ^{13}C , 125 MHz, CDCl_3) em comparação com os dados da literatura Teresa <i>et al.</i> , 1987 (em CDCl_3 , com ausência dos dados do aparelho).	94
Tabela 6: valores de deslocamentos para ^1H , ^{13}C , DEPT 135, HSQC e HMBC, para a SUBST-4 (RMN ^1H , 500 MHz, RMN ^{13}C , 125 MHz, CDCl_3) em comparação com os dados da literatura Kikuchi, <i>et al.</i> , 1986 (em CDCl_3 , 400 MHz).	102
Tabela 7: valores de deslocamentos para ^1H , ^{13}C , DEPT 135°, HSQC e HMBC, para a SUBST-5. (RMN ^1H , 500 MHz, RMN ^{13}C , 125 MHz, CDCl_3) em comparação com os dados da literatura Teresa <i>et al.</i> , 1987 (em CDCl_3 , com ausência dos dados do aparelho).	107
Tabela 8: Fragmentações características de alguns triterpenos.	111
Tabela 9: Identificação da mistura de ésteres de lupeol não hidroxilado e ésteres de lupeol hidroxilado.	114
Tabela 10: Tempos de retenção dos padrões injetados. Volume de injeção 10 μL . Concentração 1mg/mL.	117
Tabela 11: Comparação entre os tempos de retenção no perfil cromatográfico (sem coinjeção) e os tempos de retenção nas coinjeções para os extratos BPL-DCM-2 e PAPL-DCM-2 obtidos do látex do leite de amapá de <i>B. parinarioides</i> (época de seca) e <i>P. amapa</i> .	134
Tabela 12: Avaliação de interferência na atividade de protombina (TP)	136
Tabela 13: Inibição quantitativa <i>in vitro</i> da lipooxigenase por extratos diclorometânicos e metanólicos de <i>P. amapa</i> e <i>B. parinarioides</i> e de algumas substâncias isoladas de <i>P. amapa</i> .	138

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1: Parâmetros necessários para o desenvolvimento de fitoterápicos seguros.	12
Esquema 2: Formação dos terpenóides.....	28

LISTA DE ABREVIATURAS

ACN- Acetonitrila

AcOEt- Acetato de etila

CAS- Cicloartenol sintetase

CC- Cromatografia em Coluna

CCD- Cromatografia em Camada Delgada

CCDC- Cromatografia em Camada Delgada Comparativa

CG-EM- Cromatografia Gasosa acoplada ao Espectrômetro de Massas

CDCl₃- Clorofórmio deuterado

CLAE- Cromatografia Líquida de Alta Eficiência.

DDR- Dose Diária Recomendada

DPPH- Radical Livre 2,2,difenil-1-picril-hidrazila

DMSO- Dimetil sulfóxido

HEX- Hexano

HPLC- High Performance Liquid Chromatography

HMBC- Heteronuclear Multiple Bond Coherence

HSQC- Heteronuclear Single Quantum Coherence

LAS- Lanosterol sintase

LOX- Lipooxygenase

OMS- Organização Mundial de Saúde

OSC- Óxido esqualeno ciclase

PEG- Polietilenglicol

PPP- Plasma pobre em plaquetas

RMN ¹H- Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio

RMN ¹³C- Ressonância Magnética Nuclear de Carbono 13

TP - Teste de Protrombina

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	10
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	13
2.1 LÁTEX	13
2.2 LEITE DE AMAPÁ	15
2.3 MORACEAE	16
2.4 GÊNERO <i>BROSIMUM</i>	17
2.4.1 <i>Brosimum parinarioides</i> (Huber) Ducke	19
2.4.1.1 Nome popular	19
2.4.1.2 Características	19
2.4.1.3 Frutos.....	20
2.4.1.4 Ocorrência	20
2.4.1.5 Uso popular do leite de amapá de <i>Brosimum parinarioides</i>	20
2.4.1.6 Estudos encontrados na literatura de <i>Brosimum parinarioides</i>	21
2.5 APOCYNACEAE.....	22
2.5.1 <i>Parahancornia amapa</i> (Huber).....	23
2.5.1.1 Nome popular	23
2.5.1.2 Características	23
2.5.1.3 Frutos.....	24
2.5.1.4 Ocorrência	24
2.5.1.5 Uso popular do leite de amapá de <i>Parahancornia amapa</i>	24
2.5.1.6 Estudos encontrados na literatura de <i>Parahancornia amapa</i>	25
2.6 TERPENÓIDES	27
2.6.1 Triterpenos	28
3. OBJETIVOS	34
3.1 GERAL	34
3.2 ESPECÍFICOS.....	34
4. MATERIAIS E MÉTODOS	35
4.1 SOLVENTES	35
4.2 EQUIPAMENTOS	35
4.3 MÉTODO DE EXTRAÇÃO	36
4.3.1 Cálculo do teor de extrativo	36
4.4 MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS	37
4.4.1 Obtenção de perfis cromatográficos por camada delgada (CCD ou CCD-RP-18). ...	37
4.4.2. Cromatografia Gasosa acoplado a um Espectrômetro de Massas (CG-EM)	37
4.4.3. Métodos de isolamento	38
4.4.3.1. Cromatografia em coluna (CC)	38
4.4.3.2. Recristalização.....	38
4.4.3.3. Cromatografia líquida de alta eficiência em escala semipreparativa (CLAE-semi-preparativo) e analítica (CLAE-UV-DAD).....	39

4.5. MÉTODOS ESPECTROSCÓPICOS	39
4.5.1. Ressonância Magnética Nuclear (RMN)	39
4.6. MÉTODO ESPECTROMÉTRICO	39
4.6.1. Espectrometria de massa (EM).....	39
5. PARTE EXPERIMENTAL	40
5.1. COLETA E IDENTIFICAÇÃO BOTÂNICA	40
5.2. PREPARAÇÃO DOS EXTRATOS	41
5.3. FRACIONAMENTO DO EXTRATO DICLOROMETÂNICO (DCM) DE <i>B. PARINARIOIDES</i>	42
5.3.1. Fracionamento da fração 2	43
5.3.1.2. Fracionamento da fração D (Fr.111-131).....	43
5.3.1.2.1. Fracionamento da fração D (Fr.25-27)	44
5.3.1.2.2. Condições para isolamento por CLAE- semi-preparativo com as frações (Fr5) e (Fr6) do extrato DCM (1ª coleta) da espécie <i>B. parinarioides</i> em modo reverso	45
5.3.1.2.3. Condição de análise para avaliar pureza das substâncias obtidas no CLAE semi-preparativo em modo reverso	46
5.3.2. Recristalização da fração F (145 -149)	47
5.3.2.1. Isolamento por CLAE semi-preparativo com a fração F (Fr145-149 (Sob) do extrato DCM (1ª coleta) da espécie <i>B. parinarioides</i> em modo normal	48
5.3.2.1.1. Condição de análise para avaliar pureza das substâncias obtidas no CLAE semi-preparativo em modo normal.....	49
5.4. PADRÕES ISOLADOS DE <i>P. AMAPA</i> E <i>B. PARINARIOIDES</i> EM TRABALHOS ANTERIORES	49
5.4.1. Análise por CG-EM da mistura de triterpenos acetilados isolados anteriormente de <i>P. amapa</i>	51
5.4.2. Reação de transesterificação em meio ácido e identificação por CG-EM da cadeia lateral da mistura de ésteres de lupeol isolados em trabalhos anteriores com a espécie <i>P. amapa</i>	52
5.5. PERFIS CROMATOGRÁFICOS POR CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA COMPARATIVA (CCDC)- FASE NORMAL	54
5.6. ANÁLISE DO PERFIL CROMATOGRÁFICO DO LÁTEX DO LEITE DE AMAPÁ EXTRAÍDO DE <i>B. PARINARIOIDES</i> E <i>P. AMAPA</i> POR CLAE-UV-DAD	54
5.6.1. Desenvolvimento do método para análise do perfil cromatográfico.....	54
5.6.1.1. Injeção dos padrões.....	55
5.6.1.2. Coinjeção dos padrões	55
5.7. ATIVIDADE DE COAGULAÇÃO	56
5.7.1. Teste de Interferência na atividade de Protrombina (TAP ou TP)	56
5.8. ENSAIO DE INIBIÇÃO ENZIMÁTICA 5-LIPOXIGENASE (LOX).....	56
5.8.1. Inibição <i>in vitro</i> da enzima 5-lipoxigenase	57
6. RESULTADOS E DISCUSSÃO	59
6.1. RENDIMENTO E COMPARAÇÃO DOS EXTRATOS POR CCD.....	59
6.2. ISOLAMENTO POR CLAE SEMI-PREPARATIVO COM AS FRAÇÕES FR5 E FR6 DO EXTRATO DCM (1ª COLETA) DA ESPÉCIE <i>B. PARINARIOIDES</i> EM FASE REVERSA	61

6.3. ANÁLISE DE PUREZA DAS SUBSTÂNCIAS OBTIDAS NO CLAE SEMI-PREPARATIVO EM MODO REVERSO	66
6.4. ISOLAMENTO POR CLAE SEMI-PREPARATIVO COM FRAÇÃO F (Fr145-149 (SOB) DO EXTRATO DCM (1ª COLETA) DA ESPÉCIE <i>B. PARINARIOIDES</i> EM FASE NORMAL.....	67
6.4.1. Análise de pureza das substâncias obtidas no CLAE semi-preparativo em modo normal.....	68
6.5. SUBSTÂNCIAS ISOLADAS POR CLAE SEMI-PREPARATIVO COM FRAÇÕES DO EXTRATO DCM (1ª COLETA) DA ESPÉCIE <i>B. PARINARIOIDES</i>	69
6.5.1. Identificação estrutural das substâncias isoladas por CLAE da espécie <i>Brosimum parinarioides</i>	71
6.5.1.1. SUBST-1	71
6.5.1.2. SUBST-2	79
6.5.1.3. SUBST-3	87
6.5.1.4. SUBST-4	95
6.5.1.5. SUBST-5	103
6.6. IDENTIFICAÇÃO COMPLEMENTAR (CG-EM E EM-APCI) DOS PADRÕES ISOLADOS DE <i>P. AMAPA</i> E <i>B. PARINARIOIDES</i> EM TRABALHOS ANTERIORES	109
6.6. PERFIS QUÍMICOS POR CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA COMPARATIVA	115
6.6.1. CCDC- Fase Normal.....	115
6.7. ESTUDO DOS PERFIS QUÍMICOS POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (CLAE)	116
6.7.1. Comparação qualitativa dos perfis CLAE dos extratos de <i>Brosimum parinarioides</i> da época de seca e época de chuva	116
6.7.2. Injeção de padrões	117
6.7.3. Identificação das substâncias: coinjeção de padrões	122
6.8. TESTE DE COAGULAÇÃO	135
6.9. INIBIÇÃO DA ENZIMA LIPOOXIGENASE (LOX).....	137
7. CONCLUSÃO.....	139
8. REFERÊNCIAS.....	141
ANEXO -1 A- ESPECTROS DE RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR (¹H, ¹³C, HSQC, HMBC) – <i>B. PARINARIOIDES</i>.....	148
ANEXO -1 B- ESPECTROS DE RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR (¹H, ¹³C) <i>P. AMAPA</i> E <i>B. PARINARIOIDES</i> EM TRABALHOS ANTERIORES.....	171
ANEXO – 2 A- ESPECTROS DE MASSAS OBTIDO POR ANÁLISE EM MICROTOF QII- SUBSTÂNCIAS ISOLADAS DE <i>B. PARINARIOIDES</i>.....	181
ANEXO -2 B- ESPECTROS DE MASSAS OBTIDO POR ANÁLISE EM MICROTOF QII- SUBSTÂNCIAS ISOLADAS DE <i>B. PARINARIOIDES</i> E <i>P. AMAPA</i> EM TRABALHOS ANTERIORES.....	184
ANEXO – 2 C - ANÁLISE POR LC-EM DE SUBST-1 E SUBST-2	186
ANEXO -3 A- ESPECTROS DE MASSAS OBTIDOS DAS ANÁLISES POR CG-EM- MISTURA DE TRITERPENOS ACETILADOS.....	189

ANEXO – 3 B- ESPECTROS DE MASSAS OBTIDOS DAS ANÁLISES POR CG-EM DA MISTURA DE ÉSTERES METÍLICOS.....	192
---	------------

1. INTRODUÇÃO

Dentre os diversos reinos encontrados na natureza, o reino vegetal é o que tem contribuído de forma mais significativa para o fornecimento de substâncias (metabólitos secundários) úteis como medicamentos, cosméticos, alimentos e agroquímicos para o homem (PINTO *et al.*, 2002).

Historicamente, as espécies vegetais desempenham um importante papel, principalmente, na saúde humana. São inúmeros os exemplos de fármacos que foram desenvolvidos direta ou indiretamente, a partir de fontes vegetais, tais como o taxol (Figura 1), diterpeno obtido das cascas do *Taxus brevifolia*, sendo um dos mais promissores medicamentos antineoplásicos utilizados nos últimos anos, contra doenças antitumorais (WANI *et al.*, 1971; ROBBERS *et al.*, 1996).

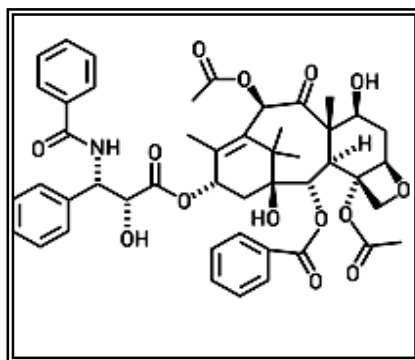


Figura 1: Estrutura do taxol

O elevado custo de alguns medicamentos torna restrito o seu uso por parte da população. De acordo com os dados da Organização Mundial de Saúde (OMS), de 65% a 80% da população mundial (estimada em 6 bilhões de pessoas) não tem acesso ao atendimento primário de saúde, e recorre à medicina popular, especialmente às plantas medicinais. O conhecimento sobre plantas medicinais simboliza muitas vezes o único recurso terapêutico de muitas comunidades e grupos étnicos (AKERELE, 1993).

A OMS define planta medicinal como toda e qualquer planta que quando aplicada sob determinada forma e por alguma via ao homem é capaz de provocar um efeito farmacológico. Assim, o estudo de plantas medicinais tem permitido confirmar o uso popular de diversas plantas utilizadas pelas populações locais para diferentes finalidades (AKERELE, 1993).

A diferença entre planta medicinal e fitoterápico reside na elaboração da planta para uma formulação específica, o que caracteriza um fitoterápico (VEIGA e PINTO 2005). Segundo a OMS, fitoterápico é definido como sendo substâncias ativas presentes na planta como um todo ou em parte dela, na forma de extrato total ou processado (AKERELE, 1993).

O primeiro fitoterápico desenvolvido no Brasil foi o Acheflan®, obtido a partir da erva-baleeira (*Cordia verbenaceae* DC), uma planta que ocorre na Mata Atlântica, produzido pelo Laboratório Aché em colaboração com a Universidade Federal de Santa Catarina (CALIXTO, 2005). Esse medicamento possui dois compostos ativos responsáveis pela atividade antiinflamatória, o α -humuleno e o *trans*-cariofileno (Figura 2) (PASSOS, 2007).

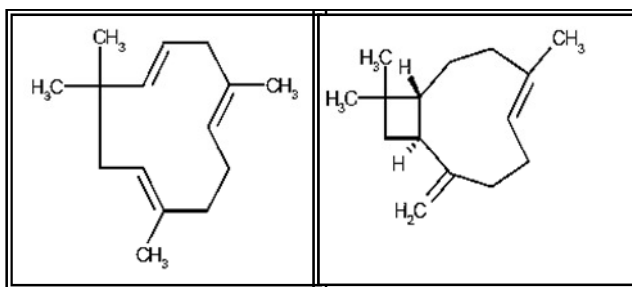


Figura 2: Estrutura do α -humuleno e *trans*-cariofileno.

Para o desenvolvimento seguro de fitoterápicos é necessário eficácia, segurança e garantia da qualidade (esquema 1). Neste contexto, a química de produtos naturais possui um papel chave na garantia da qualidade de produtos fitoterápicos, com o emprego de técnicas de isolamento dos princípios ativos, técnicas espectroscópica para a elucidação estrutural e de ensaios de atividade biológica, possibilitando atender os parâmetros mencionados acima. Por exemplo, a partir do extrato padronizado de *Ginkgo biloba*, Egb 761, foi possível identificar os constituintes ativos da planta e desenvolver um método de controle de qualidade rigoroso por cromatografia líquida de alta eficiência, responsável pelo sucesso de vendas desse produto, com vendas superiores a US\$ 0,5 bilhão por ano (HASLER E STICHER, 1992; Ryan, 2010).



Esquema 1: Parâmetros necessários para o desenvolvimento de fitoterápicos seguros.

Na Amazônia, podemos destacar o leite de amapá que é um produto com elevado valor medicinal. O leite branco, que escorre da casca ao ser cortada, é considerado na região como valioso remédio para asma, bronquite, tuberculose, traumatismo, em particular no tórax, contra fraqueza em geral e doenças intestinais (CAVALCANTE, 1996; MATTA, 2003).

Além de existirem poucos estudos relacionados às atividades biológicas que permitam confirmar a eficácia do leite de amapá, existe outro problema relacionado ao controle de qualidade desse produto medicinal, que é a existência de mais de uma espécie vegetal conhecida vulgarmente como leite de amapá ou amapazeiro. Na Amazônia, o látex do leite de amapá pode ser extraído de espécies botânicas distintas, sendo utilizados tradicionalmente tanto a espécie *Brosimum parinarioides* Ducke, como a espécie *Parahancornia amapa* (Huber) Ducke (BORRÁS, 2003; MATTA, 2003; MORS *et al.*, 2000; SHANLEY *et al.*, 2005). Desse modo, o presente trabalho visou o isolamento e identificação dos principais constituintes químicos de *B. parinarioides* para em seguida ser realizada a comparação com os constituintes químicos isolados em trabalhos anteriores com a espécie *P. amapa*. Também foram realizadas a avaliação da atividade coagulante e/ou anticoagulante e a atividade antiinflamatória pela inibição da enzima Lipooxigenase (LOX) com os constituintes disponíveis para esse procedimento.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Látex

Por definição, o látex é um exsudato que é mantido nas células extremamente alongadas, que se estendem ao longo da planta, e esta estrutura de canal que exsuda látex é chamado laticífero (CAI *et al.*, 2009). Látex é tipicamente uma seiva branca não transparente, mais em alguns casos é clara e tem distinção de cor (KONNO *et al.*, 2011), pode apresentar-se incolor, amarelo, laranja, vermelho e mais comumente, branco (aspecto leitoso) (RIBEIRO *et al.*, 1999). Laticíferos estão distribuídos em raízes, caules, pecíolos e folhas, e em folhas de laticíferos estão associadas principalmente com nervuras.

Em relação ao papel de látex, este ainda não foi completamente estabelecido, mais tem havido várias hipóteses, tais como excreção de metabólitos de resíduos, selar lesões superficiais da planta, a defesa contra herbívoros e defesa contra patógenos. Entre essas hipóteses, há uma série de provas para apoiar as funções de defesa contra herbívoros e patógenos, especialmente os herbívoros (FARRELL *et al.*, 1991; MITHOFER e BOLAND, 2012).

Vários trabalhos mostram que plantas que não continham látex eram danificadas por herbívoros enquanto que outras que continham látex ficavam intactas, ou até mesmo as que continham látex e eram atacadas ocorriam por causa de uma forma que os herbívoros encontram de sabotar as plantas, como no caso do trabalho desenvolvido por LEWINSOHN e NETO (2000), que explica como os insetos sabotam as plantas.

Resina também é uma seiva exsudada dos danos. Em algumas espécies, a resina é transparente, mas em outras espécies de resina é de cor branca que se assemelha látex (KONNO *et al.*, 2011). O que distingue o látex de outras secreções, tais como gomas e resinas, não é sua composição química. Resinas são secretadas em espaços intercelulares. O látex por outro lado, é produzido e mantido em laticíferos, células secretoras vivas e ativas, capazes de crescimento, divisão e capazes também de regular a quantidade e composição química do látex que contém.

Baseado no modo de origem e de desenvolvimento, os laticíferos estão agrupados em dois tipos principais: laticíferos não articulados (não ramificados e ramificados) e os laticíferos articulados (anastomados e não anastomados). Exemplos de

espécies de plantas laticíferas que apresentam essas características encontram-se na figura 3 (HAGEL *et al.*, 2008).

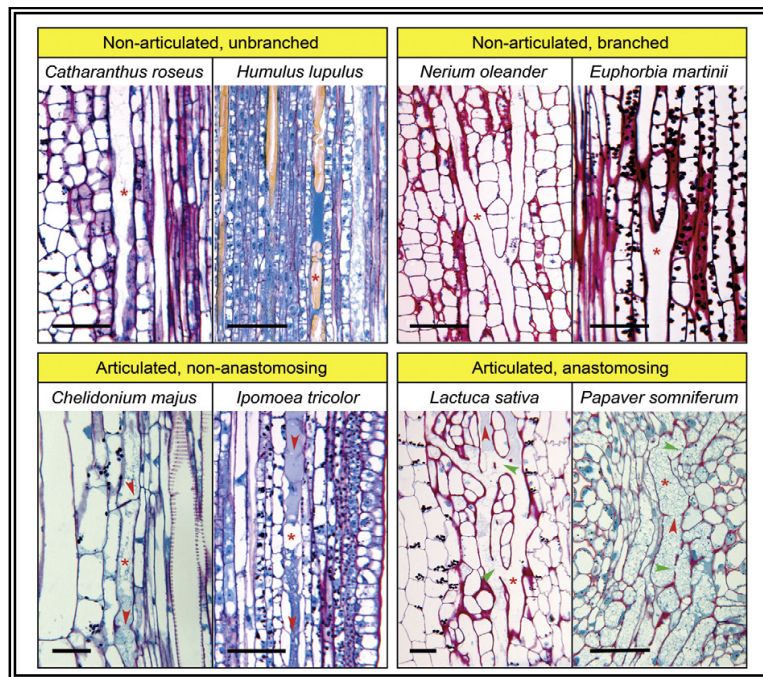


Figura 3: Exemplos de espécies de plantas e os tipos de laticíferos que elas apresentam. As setas vermelhas (→) mostram os pontos de articulação entre os membros laticíferos, enquanto que as setas verdes (→) identificam anastomoses (HAGEL *et al.*, 2008).

Com relação a sua composição, o látex é uma suspensão que contém partículas de hidrocarbonetos do grupo dos terpenos numa matriz aquosa. É considerado um colóide, isto é, uma fase sólida (soluto) dispersa em uma fase líquida (solvente). Onde a fase sólida composta de 30 a 50% é o hidrocarboneto borracha (C_5H_8), chamado isopreno. Enquanto, a fase líquida composta de 50 a 70% é o soro, constituído em sua maior parte por água, ácidos orgânicos e enzimas. O látex tem outras substâncias, como açúcares, alcalóides, ceras, amido, taninos e ainda enzimas tais como proteases, chitinases e glucosidases (SAMONEK, 2006; KONNO *et al.*, 2011).

Vinte famílias botânicas, 900 gêneros e 12.500 espécies produzem látex, das quais oito famílias, 300 gêneros, ou 1800 espécies, tem produção de borracha do látex. (BUSHMAN *et al.*, 2006). A existência de borracha dispersas no fluído como partículas, causa a característica mais frequente observada em látex, como a viscosidade (KONNO *et al.*, 2011).

Algumas famílias de plantas lactíferas são: Euphorbiaceae, Apocynaceae, Clusiaceae, Moraceae, Sapotaceae, Asclepiadaceae, Cichorieae (Asteraceae) e Guttiferae (AGUIAR, 2006).

Dentro desse contexto, a região Amazônica possui uma vasta biodiversidade de plantas medicinais dentre elas destacam-se duas espécies de plantas laticíferas uma pertencente à família Moraceae, a espécie *Brosimum parinarioides* (Huber) Ducke e a outra pertencente à família Apocynaceae, a *Parahancornia amapa* (Huber), onde o látex destas duas espécies é conhecido como leite de amapá.

2.2 Leite de amapá

O leite de amapá é um medicamento de uso popular amazônico usado por populações rurais e urbanas por centenas de anos. As espécies conhecidas como amapazeiros, que produzem um látex comestível, podem se dividir em dois grupos: o amapá amargo e o amapá doce. O grupo do amapá doce é composto por espécies do gênero *Brosimum* da família Moraceae (SHANLEY *et al.*, 2005; BORRÁS, 2003). O grupo do amapá amargo é composto por algumas espécies da família Apocynaceae. Espécies dessa família normalmente apresentam alcalóides, alguns dos quais com atividade biológica já descrita. A *Parahancornia amapa* é a espécie mais comum de amapá amargo (MATTA, 2003), outra espécie também conhecida por amapá amargo por algumas tribos indígenas na Amazônia Oriental é *Couma guianensis*. Contudo, mesmo sendo amplamente usado, as espécies que produzem o leite de amapá (Quadro 1) possuem poucos estudos químicos, especialmente voltados para o controle de qualidade. O látex dessas espécies, conhecido como leite de amapá, é comercializado e utilizado na medicina popular. Entretanto, não é possível garantir a sua autenticidade e origem. Consequentemente estudos voltados para a descrição da composição química e controle de qualidade são fundamentais para garantir a sua qualidade, eficácia e segurança (SHANLEY *et al.*, 2005).

Família	Nome comum	Espécie	Sabor do látex
Apocynaceae	amapá amargo	<i>Parahancornia amapa</i>	forte bem amargo (ingerido com mel)
		<i>Couma guianensis</i>	Amargo
Moraceae	Muirapiranga	<i>Brosimum rubescens</i>	não é utilizado
	Amapaí	<i>Brosimum potabile</i>	desagradável
	amapá doce	<i>Brosimum parinarioides</i>	gosto agradável (ingerido com leite de vaca)

Quadro 1: Várias espécies conhecidas por amapá (SHANLEY *et al.*, 2005).

2.3 Moraceae

A família Moraceae é composta por cerca de 1050 espécies distribuídas em 37 gêneros. Na reserva florestal Adolpho Ducke, a família é representada por 44 espécies (RIBEIRO *et al.*, 1999).

Seus representantes são predominantemente arbóreos ou arbustivos. E quase todos sem exceção têm látex e folhas inteiras, dispostas alternadamente. No Brasil, destacam-se os gêneros *Ficus*, *Brosimum*, *Dorstenia* e *Cecropia* (DALL’STELLA, 2008).

Essa família possui muitas espécies que são comercialmente exploradas pela indústria de madeira, papel, borracha, na alimentação e na produção indireta da seda, como é o caso da *Morus alba* (amora), que tem seus frutos empregados na alimentação e suas folhas são consumidas por lagartas para a produção de sedas de alta qualidade (TEIXEIRA, 1999). Outras apresentam grande importância na produção de moléculas biologicamente ativas, como é o caso da espécie *B. gaudichaudii* de onde foram isolados os compostos, psoraleno e o bergapteno, duas furanocumarinas, substâncias responsáveis pela ação contra o vitiligo (POZETTI, 1969; MCKEON, 1981; VARANDA, 2002) (Figura 4).

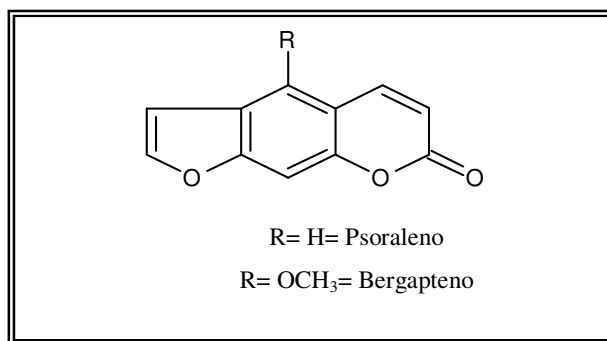


Figura 4: Estruturas das furanocumarinas psoraleno e bergapteno.

2.4 Gênero *Brosimum*

O gênero *Brosimum*, compreende cerca de 13 espécies que ocorrem na América tropical. Porém, apenas duas espécies vêm sendo mais estudadas fitoquimicamente, *B. gaudichaudii* e *B. rubescens* (TORRES *et al.*, 1997). Da espécie *Brosimum rubescens* foram isolados diversas substâncias tais como os triterpenos 3 β -acetoxi-olean-12-eno-28-al e β -sitosterol (HAYASIDA *et al.*, 2008) e ainda um alto teor da cumarina xantilantina (HAYASIDA *et al.*, 2011) que apresenta um potencial biológico, sendo reportada pelas atividades antiplaquetária, antifúngica e herbicida e alguns derivados que possuem atividade em linhagens de células leucêmicas (Figura 5).

Da espécie *B. gaudichaudii*, como foi citado anteriormente já foram isolados as duas furanocumarinas, psoraleno e bergapteno e ainda outras cumarinas como, xantiletina, luvangetina (VIEIRA *et al.*, 1999) (Figura 5).

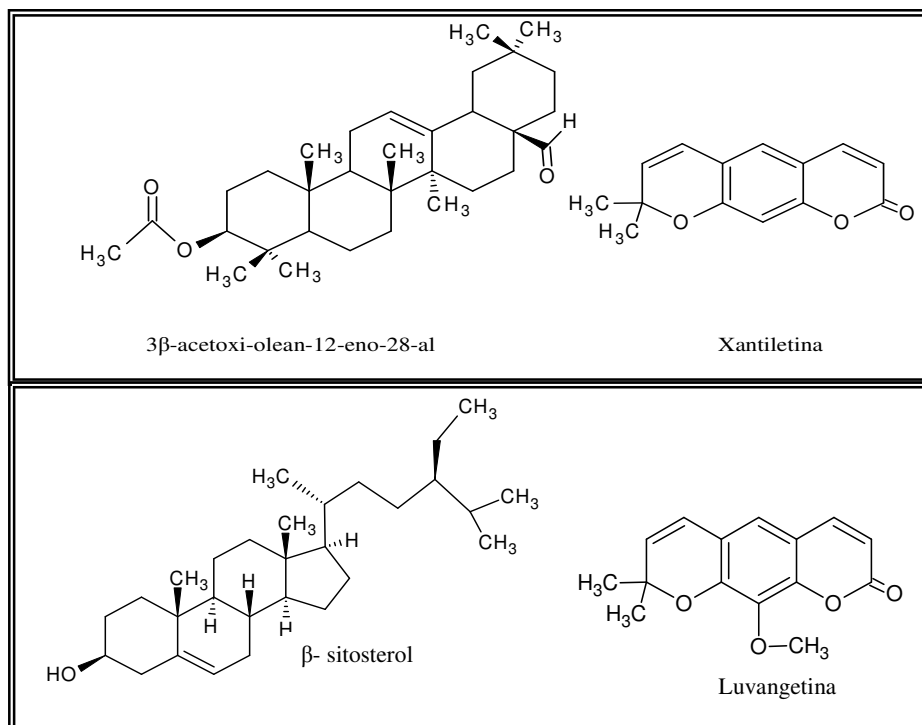


Figura 5: Estrutura das substancias isoladas de *Brosimum gaudichaudii* e *rubescens*.

Da espécie *Brosimum acutifolium* subespécie *acutifolium*, foi isolado a 4',7' –di-hidroxi-8-prefenil- flavana, denominada anaflavana, fitoconstituente então inédito das frações diclorometano do extrato alcoólico (Figura 6). Foi determinada inicialmente a toxicidade empregando-se em camundongos e posteriormente, realizados testes clínicos com o extrato hidroalcoólico das cascas do caule que indicaram uma melhora significativa dos pacientes portadores de artrite reumatóide (TEIXEIRA, 2000).

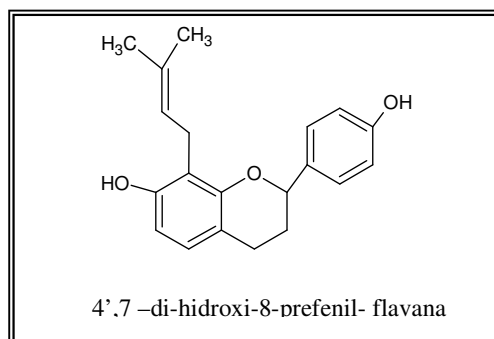


Figura 6: Estrutura da substância isolada de *Brosimum acutifolium*

2.4.1 *Brosimum parinarioides* (Huber) Ducke

2.4.1.1 Nome popular

A espécie *B. parinarioides* tem como nome popular o amapá, amapá-doce, amapá-roxo, amaparana, murerana, amapazeiro (MADY, 2000; BORRÁS, 2003).

2.4.1.2 Características

A espécie *Brosimum parinarioides* Ducke pertence à família Moraceae, é nativa da região da região amazônica e popularmente conhecida como amapá. É uma árvore de grande porte podendo atingir até 40 m de altura. Suas folhas são de tamanhos variáveis com no máximo 22 cm de comprimento e 10 cm de largura, duras e com base mais ou menos arredondada (REVILLA, 2002; CORREA, 1978). Apresenta entrecasca avermelhada e sua madeira interna amarela bem clara. O tronco é cilíndrico e bem ereto. Ao ser cortado, libera um aroma muito agradável e solta um leite (látex) branco e grudento (figura 7). O amapá doce é somente encontrado em terra firme pois não resiste à cheia do rio (SOUZA *et al.*, 2003). É uma espécie comum nas matas da Amazônia, sendo possível encontrar de 3 a 5 indivíduos por hectare (REVILLA, 2002).

Normalmente a produção do látex é artesanal, e devido a não existência de uma organização empresarial sobre esse produto, este corre o perigo de ter adulterações por outra espécie parecida (REVILLA, 2002).



Figura 7: *Brosimum parinarioides*: látex, folhas e tronco respectivamente.

2.4.1.3 Frutos

Seus frutos têm base mais larga, roxa, e quando maduro escura, apresenta polpa doce e comestível (REVILLA, 2002).

2.4.1.4 Ocorrência

B. parinarioides tem ocorrência no Amapá, Amazonas e Pará, com referência também para a Guiana Francesa. Habita frequentemente as matas de terra firme alta em solos sílico-argiloso (LOUREIRO *et al.*, 2000).

2.4.1.5 Uso popular do leite de amapá de *Brosimum parinarioides*

O látex de *B. parinarioides* é extraído através de cortes no tronco sendo usado como um ótimo cicatrizante de feridas, e também, é empregado por sua atividade antitussígena e antiinflamatória. Em emplastos e contusões é utilizado diretamente nas áreas afetadas. É ainda indicado com a finalidade de cura de doenças respiratórias, tônico, fortificante ou energizante, onde se recomenda beber diariamente meio copo do látex. Na cosmética, é utilizado como removedor de manchas na pele (REVILLA, 2002; BORRÁS, 2003).

Devido ao seu alto potencial medicinal, esse látex é muito apreciado pelas comunidades rurais, sendo substituinte do leite bovino na alimentação humana (GALUPPO, 2004).

Segundo Souza *et al.*, 2003, o leite de amapá de *B. parinarioides* também é popularmente empregado para o tratamento de hemorróidas e ameba e já foi muito utilizado por seringueiros na época em que a extração da borracha era uma atividade lucrativa para o caboclo. Eles tinham costume de “batizar” o leite da seringueira com um pouco de leite de amapá, para aumentar o volume de borracha a ser comercializado.

Segundo experiências populares o leite de amapá é consumido há muitos anos pelas populações amazônicas, por administração oral, sendo ingerido *in natura*, diluído em leite ou em água e muitas vezes agitado ou batido no copo manualmente ou mecanicamente com o auxílio de liquidificador. A espuma formada, abundante e densa,

é retirada (BORRÁS, 2003). Outro modo de preparo é tirar duas colheres do leite da árvore, colocar em um prato ou vaso e bater bem com uma colher até conseguir tirar nove escumas (colheres de espumas). Jogar fora estas nove escumas e colocar o que sobrou em um copo. Completar o volume do copo, enchendo-o com leite (em pó, já preparado) ou algum chá (preferencialmente de casca de laranja). Beber uma colher do preparado, três vezes ao dia (manhã, tarde e a noite). Repetir o tratamento até os sintomas desapareçam (SOUZA *et al.*, 2003).

2.4.1.6 Estudos encontrados na literatura de *Brosimum parinarioides*

Até o momento os estudos encontrados para a espécie *Brosimum parinarioides* são voltados apenas à caracterização preliminar das classes de substâncias através de testes fitoquímicos e não por isolamento.

Nesse contexto, Galuppo (2004) evidenciada a presença dos seguintes compostos nas frações testadas de leite do amapá (*Brosimum parinarioides*) liofilizado, tais como os alcalóides, antraquinonas, derivados de cumarina, esteróides e triterpenóides, e purinas. No trabalho desenvolvido por Galuppo, também foi realizado testes físicos e químicos para avaliar o valor nutricional do leite de amapá comparado com o leite de vaca e extrato de soja (leite de soja), todos relacionados com a dose diária recomendada. Como resultado, o leite do amapá-doce apresentou 58% de umidade e boa quantidade de alguns minerais em sua composição. O cálcio presente no leite do amapá-doce foi superior ao do leite de vaca e leite de soja e à “Dose Diária Recomendada” (DDR). Apresentou menor quantidade de fósforo, comparado ao leite de vaca e soja, porém com valor significativo relacionado com a DDR. A presença de magnésio e a porcentagem de proteínas totais também foram próximas à recomendada, sendo os valores de proteínas maiores que os encontrados no leite de vaca e de soja, razão pela qual esta espécie tende a torna-se uma importante fonte alimentar para as famílias da região amazônica.

Com essa mesma idéia, Gai e colaboradores (2009), realizaram trabalho sobre a composição inorgânica de leite de amapá, onde foram analisadas 38 amostras de leite de amapá de três espécies do gênero *Brosimum* (*B. parinarioides*, *B. potable* e *B. utile ovatifolium*) do município de Presidente Figueiredo, AM, onde verificou-se que as amostras de leite de amapá apresentaram maiores concentrações de Mg, P, Na, K e Al e

concentrações semelhantes de Ca e Cl que amostras de leite de vaca, justificando seu uso popular como sucedâneo deste. *Brosimum parinarioides* foi à espécie em que as menores quantidades (em média) de Al e K foram observadas. As menores concentrações de P foram detectadas em *B. potabile*. Portanto, com esses trabalhos fica evidente o potencial nutricional do leite do amapá doce, e o valor do conhecimento sobre o mesmo, como reforço alimentar.

Estudos realizados anteriormente pelo nosso grupo de pesquisa LAPAAM (Laboratório de Princípios Ativos da Amazônia) com o extrato metanólico das cascas de *B. parinarioides* indicaram uma maior atividade antioxidante nas frações mais polares. Porém, ainda não foi observada a presença significativa de atividade antioxidante nas frações do látex de *B. parinarioides* (QUADROS *et al.*, 2008).

2.5 Apocynaceae

Dentre as várias espécies que têm despertado interesse dos químicos de produtos naturais, devido ao uso na medicina popular, em razão de inúmeras aplicações de caráter terapêutico, estão às pertencentes à família Apocynaceae (VELLOSO, 1998).

Apocynaceae é uma família de clima tropical e subtropical com poucos representantes em clima temperado, totalizando cerca de 200 gêneros e 2000 espécies. Até o presente momento foram identificados na reserva florestal Ducke 16 gêneros e 40 espécies (RIBEIRO *et al.*, 1999).

As espécies desta família, normalmente são representadas por árvores de grande e médio porte, arvoretas, lianas e menos frequentemente arbustos. Essas plantas contêm látex branco, em alguns casos visíveis apenas nos ramos terminais, e neste caso, apresentam coloração diferenciada, vermelho-sangue ou acastanhado (*Aspidosperma*) (RIBEIRO *et al.*, 1999).

A família Apocynaceae apresenta grande importância econômica e medicinal, pois fornece madeira, flores, gomas elásticas e, algumas espécies no interior do Brasil, dão frutos como mangaba, mucugé e piquiá (VELLOSO, 1998). Ela pode ser considerada uma das mais importantes fontes de constituintes químicos com utilidade terapêutica na medicina moderna. Como exemplo, temos os alcalóides vimblastina e vincristina (Figura 8), isolados de *Catharanthus roseus* G. Don, considerados

medicamentos indispensáveis para o tratamento da leucemia (HOSTETTMANN *et al.*, 2003).

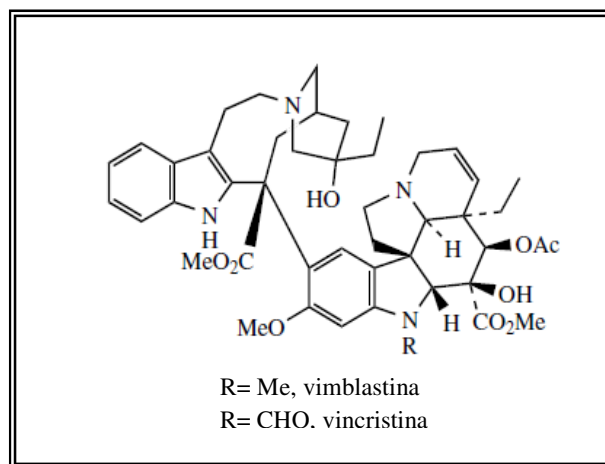


Figura 8: Estrutura dos alcalóides vincristina e vinblastina.

2.5.1 *Parahancornia amapa* (Huber)

2.5.1.1 Nome popular

A espécie *Parahancornia amapa* tem como nome popular o amapá, amapá-amargoso, amapá-branco, amapazinho, amargoso, curupixá, mogno-dourado, sorva-maparajuba, amapá-roxo, amaparana, mururerana, amapazeiro, doekali (Suriname) (LOUREIRO *et al.*, 1979; CLAY *et al.*, 2000). Catáua na fronteira peruana (MATTA, 2003).

2.5.1.2 Características

Parahancornia amapa é uma árvore de grande porte, podendo atingir até 40 m de altura, com diâmetro de 90 cm ou mais (LOUREIRO *et al.*, 1979; COUTINHO e PIRES, 1996). Apresenta tronco ereto e elevado, tendo a copa constituída por muitos galhos opostos, porém independentes entre si. Suas folhas são lanceoladas, lustrosas, opostas, com 12 a 15 nervuras secundárias maiores (MATTA, 2003). Os tamanhos das folhas variam de até 22 cm de comprimento por 10 cm de largura (figura 9) (LOUREIRO *et al.*, 1979; COUTINHO e PIRES, 1996).



Figura 9: *Parahancornia amapa*: galho com látex, folhas e tronco, respectivamente.

2.5.1.3 Frutos

Seu fruto, tem uma baga globosa de cerca de 8 cm de diâmetro, com pericarpo roxo-escuro quando maduro, espesso-carnoso de 1 a 1,5 cm de espessura envolvendo uma polpa doce. Apresenta várias sementes achatadas, sendo considerado um alimento saboroso para sobrevivência das pessoas na floresta (CAVALCANTE, 1996).

2.5.1.4 Ocorrência

Parahancornia amapa é uma árvore típica da Amazônia brasileira, é encontrada no Pará, Amazonas, Acre, Rondônia, Roraima, Mato Grosso, Guianas e Suriname. Desenvolve-se bem nas florestas de terra firme; ao pleno sol ou na sombra, sendo também frequente na várzea alta, em solos humosos (CAVALCANTE, 1976).

2.5.1.5 Uso popular do leite de amapá de *Parahancornia amapa*

O leite de amapá é um produto de alto valor medicinal. O leite branco, que escorre da casca ao ser cortada, é considerado um valioso remédio contra fraqueza em geral, usado como peitoral, contra doenças pulmonares, como asma, bronquite e tuberculose. Tem uso também contra doenças intestinais e traumatismo, em particular

no tórax. É um bom cicatrizante para golpes e feridas, quando aplicado externamente. E como resolutivo é usualmente utilizado pela população em emplastos que ficam aderidos às regiões traumatizadas de 4 a 10 dias, destacando-se, após sumir toda a inflamação (CAVALCANTE, 1996; MATTA, 2003, CLAY *et al.*, 2000).

Conforme experiências populares, o leite de amapá deve ser ingerido tomando uma colher de chá de hora em hora, misturada com mel de abelha (MATTA, 2003; CLAY *et al.*, 2000). Antigamente, esse látex era até vendido em pequenas quantidades para o Sul do País (CAVALCANTE, 1996). A partir do látex dessa espécie, um xarope é elaborado e utilizado no tratamento de tosse e doenças pulmonares. Este xarope é encontrado nas farmácias que comercializam produtos naturais em Manaus (CLAY *et al.*, 2000).

2.5.1.6 Estudos encontrados na literatura de *Parahancornia amapa*

A casca do caule e o látex desta espécie têm sido utilizados na medicina popular local como tônico e anti-sifilítico. Em estudos envolvendo os extratos menos polares da casca, látex, e raízes desta planta, foram isolados triterpenos pentacíclicos: lupeol, α -amirina e β -amirina, seus derivados acetilados, friedelina, ácidos alifáticos e ésteres de lupeol (SOBRINHO *et al.*, 1991; CARVALHO *et al.*, 2001; CARVALHO *et al.*, 2008). Além dos esteróides β -sitosterol, stigmasterol, β -sitosterona isolados das raízes de *Parahancornia amapa* (CARVALHO *et al.*, 2001).

Segundo Carvalho *et al.*, 2008, foi possível identificar no extrato metanólico, uma grande quantidade de mistura de carboidratos, metilmioinositol e derivados de feniletanóides tendo como principal constituinte o cornosídeo. Algumas dessas substâncias citadas acima estão apresentadas na figura 10 e 11.

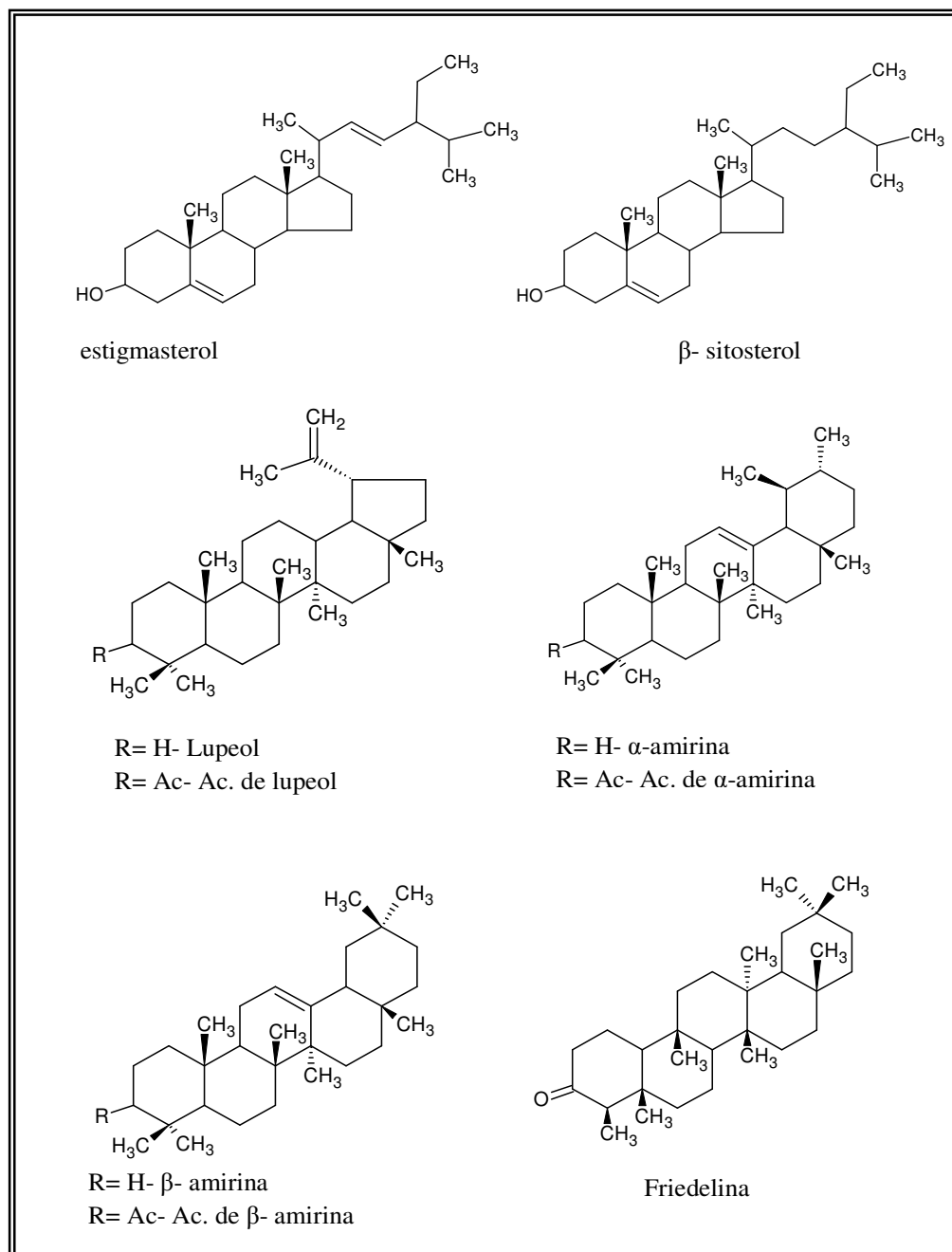


Figura 10: Constituintes isolados de *Parahancornia amapa* encontrados na literatura.

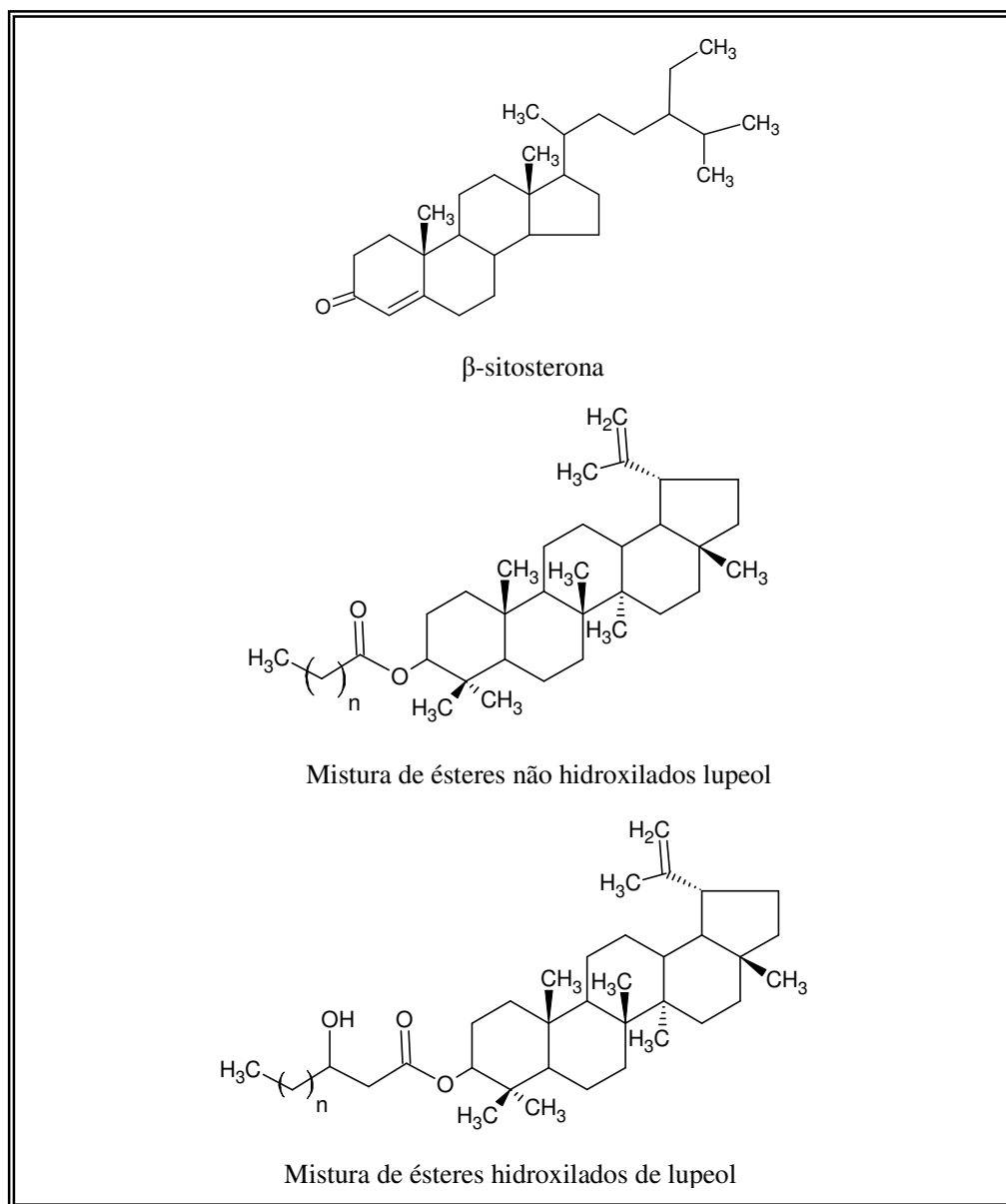
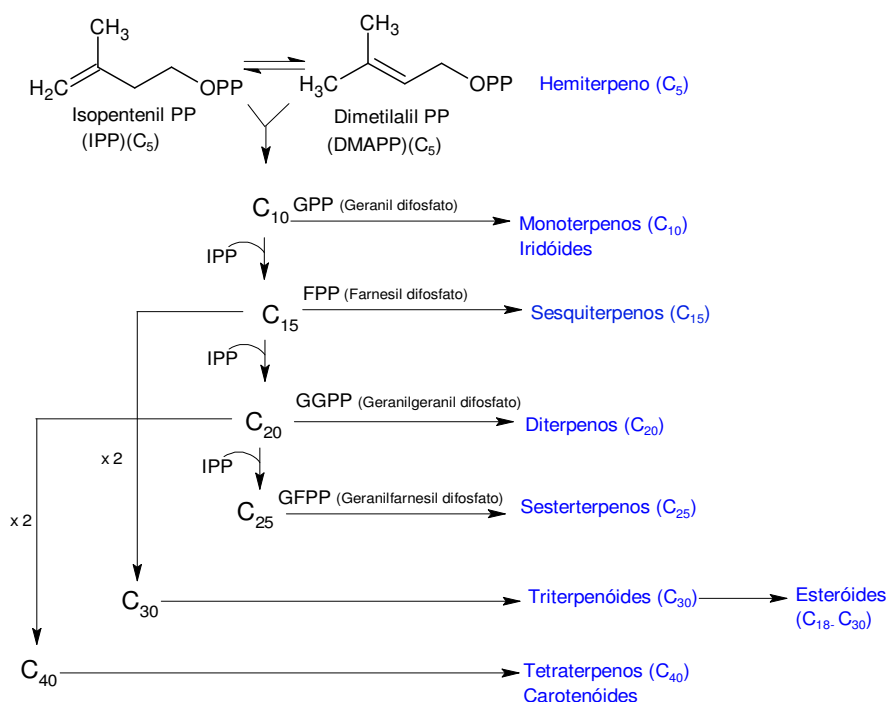


Figura 11. Continuação dos constituintes isolados de *Parahancornia amapa* encontrados na literatura.

2.6 Terpenóides

Os terpenóides compõe uma grande diversidade de estruturas encontradas na natureza, sendo originados da via do mevalonato ou desoxixilulose fosfato, a partir de

unidades de isoprenos (C_5) que se unem por “cabeça- cauda”. Eles são classificados de acordo com a quantidade dessas unidades presentes. Por exemplo: esqueletos de carbono que contém 5 carbono (C_5) são classificados como hemiterpenos, (C_{10}) monoterpenos, (C_{15}) sesquiterpenos, (C_{20}) diterpenos, (C_{25}) sesterterpenos, (C_{30}) triterpenos e (C_{40}) tetraterpenos (Esquema 2), (DEWICK, 2002).



Esquema 2: Formação dos terpenóides.

2.6.1 Triterpenos

Triterpenóides representam uma importante sub-classe de metabólitos secundários presentes na flora e fauna terrestre e marinha (MAHATO *et al.*, 1992). Apresentam uma grande diversidade quanto ao esqueleto e funcionalização que é predominantemente oxigenada. Consistem preponderantemente de constituintes cuja estrutura é policíclica normalmente tetracíclica ou pentacíclica que contém no máximo uma ou duas ligações duplas. Exemplo dessas substâncias são o lupeol, α -amirina, β -amirina e a friedelina (OLEA e ROQUE, 1990).

Quanto à biossíntese, os triterpenos apresentam como cadeia precursora, o esqualeno, constituinte que foi isolado pela primeira vez do fígado de tubarão (*Squalus*

spp.). A cadeia de 30 átomos de carbono é formada a partir da condensação cauda-cauda de duas unidades de pirofosfato de farnesil (FPP) e envolve a enzima esqualeno sintase (Figura 12). A condensação requer a remoção de dois grupos fosfatos e a adição de um hidreto proveniente NADH na posição C-1. Um intermediário desse processo é o pirofosfato de pré-esqualeno também isolado do fígado de rato cuja formação é representada como um ataque de uma molécula de FPP à ligação dupla (C2'-C3') e posterior formação de um cátion terciário, seguida da perda de um hidrogênio e formação de um anel ciclopropânico, originando o pirofosfato de pré-esqualeno. A perda de um grupo difosfato do pré-esqualeno gera um cátion primário desfavorável, que via rearranjo de Wagner-Meerwin causa a expansão do anel e gera um carbocátion secundário. Por fim, a ligação entre C-1 e C-3 é rompida e uma adição de hidreto via NADPH ao C-1 resulta na formação do esqualeno.

O esqualeno é então epoxidado seletivamente na posição 2, formando o 2,3-oxido-esqualeno (2,3 epóxido de esqualeno) (MANN, 1994). Esse pode tomar várias conformações e ser substrato de enzimas específicas do tipo ciclases.

Em geral, os animais e fungos, tem apenas uma oxido-esqualeno ciclase (OSC) ou lanosterol sintase (LAS), para a biossíntese de esteróis. No entanto, a diversificação das oxido-esqualeno ciclases (OSC) nas plantas superiores, não só para a biossíntese de esteróis, tais como o cicloartenol sintetase (CAS) e LAS (OHYAMA *et al.*, 2009; ABE *et al.*, 1993), mas também para a biossíntese de triterpenos, permite que mais de 100 variações de esqueletos de triterpenóides em plantas. O 2,3-epoxiesqualeno é provavelmente o precursor da maioria dos triterpenoides 3 β -hidroxilados (XU *et al.*, 2004).

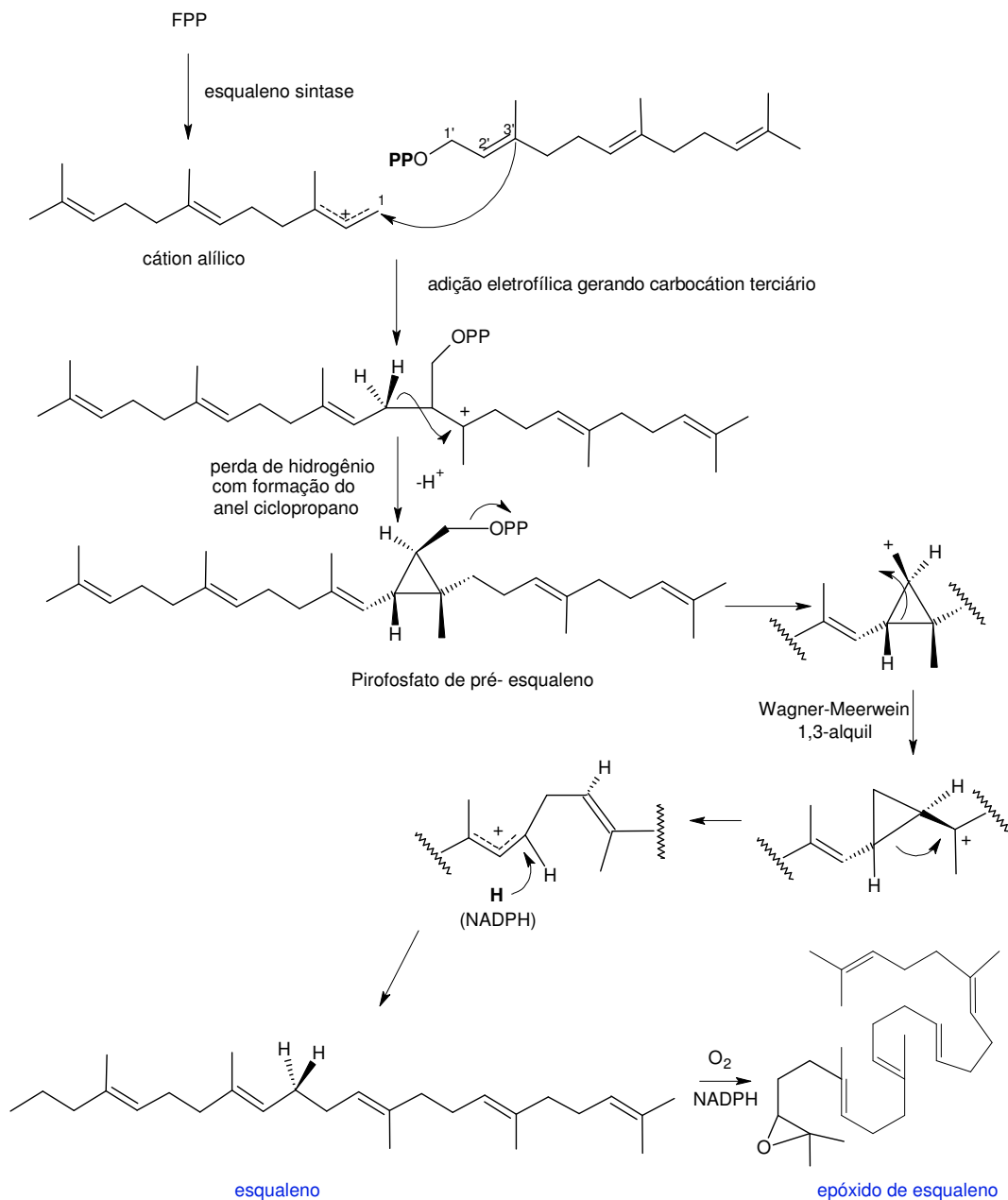


Figura 12: Formação do esqualeno.

Dependendo da conformação inicial do epóxido de esqualeno na superfície da enzima, inicia-se a biossíntese. O óxido de esqualeno pode assumir diferentes conformações como cadeira-cadeira-cadeira-barco e cadeira-barco-cadeira-barco. A clivagem do epóxido por protonação dá origem a uma ciclização concertada, para formar os cátions damarenil e protosteril, a partir de cada uma das conformações (figuras 13 e 14). Uma sequência de deslocamentos de Wagner-Meerwein de hidretos e

grupos metila origina uma série de triterpenos tetracíclicos. O cátion damarenil, por sua vez dá origem aos cátions lupenil e oleanil, a partir dos quais se formam vários triterpenos pentacíclicos (STITI *et al.*, 2007) (Figura 14) e tetracíclicos (Figura 15).

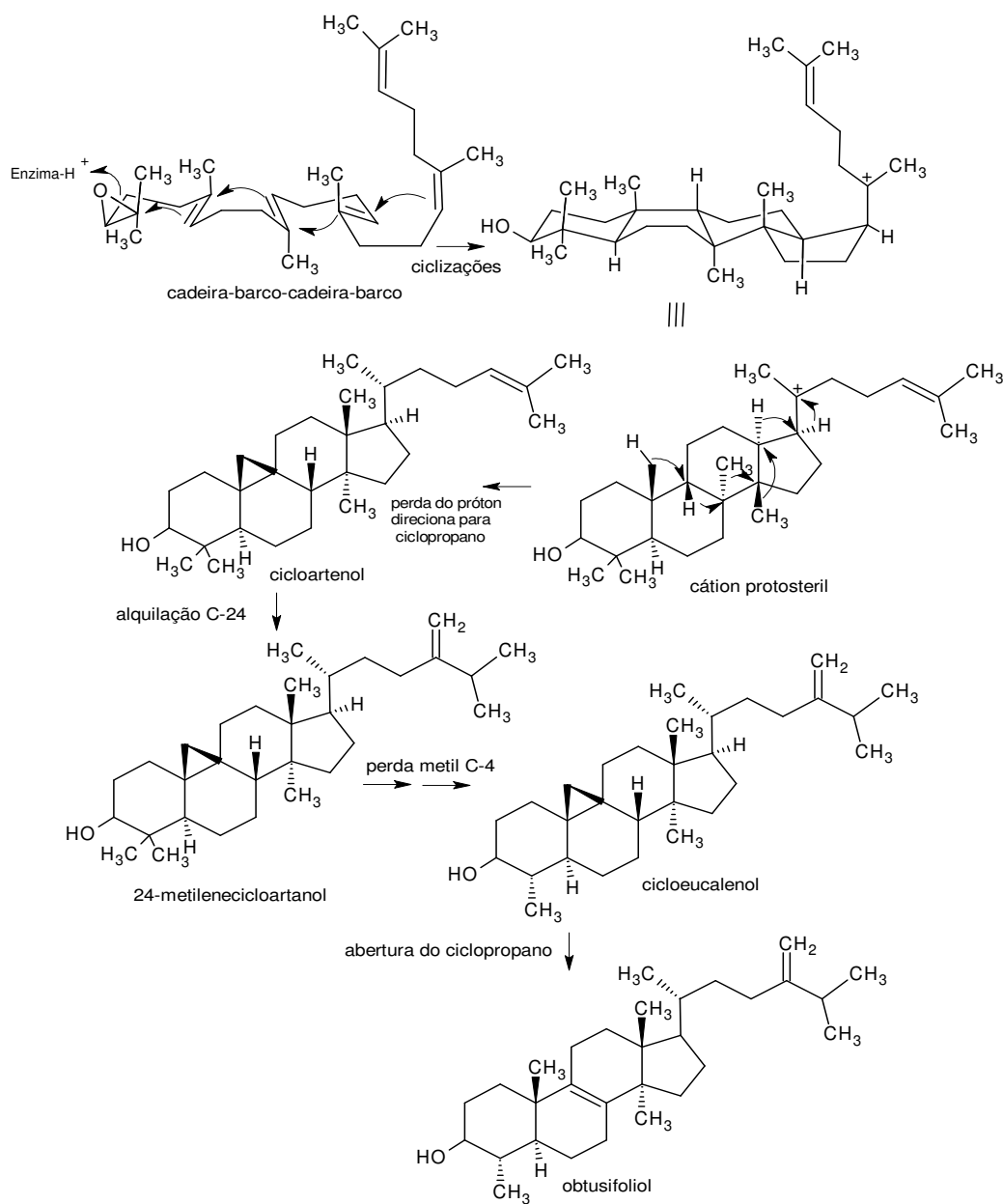


Figura 13: Formação de triterpenos tetracíclicos a partir do cátion protosteril.

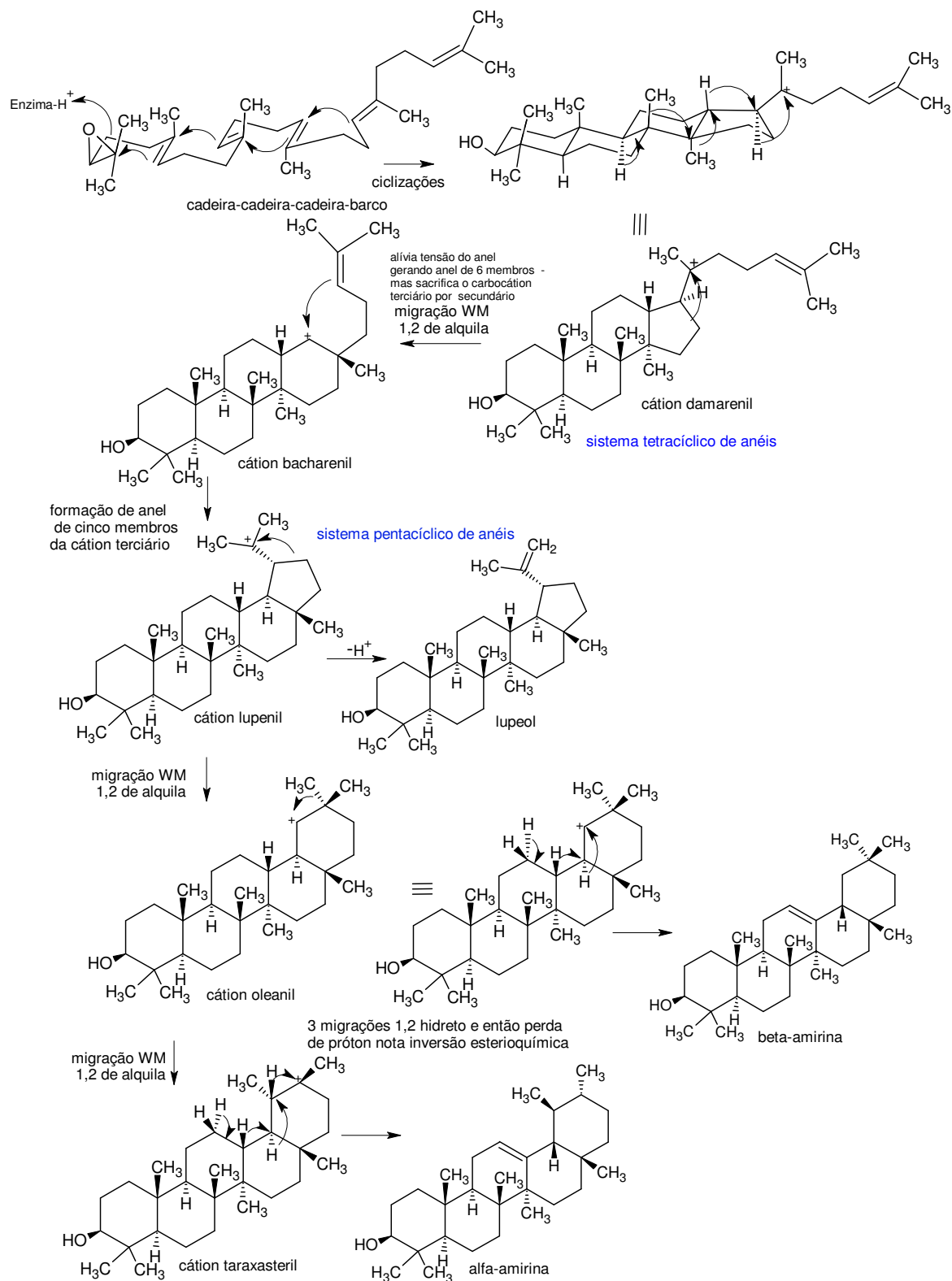


Figura 14: Formação dos triterpenos pentacíclicos a partir do cátion damarenil.

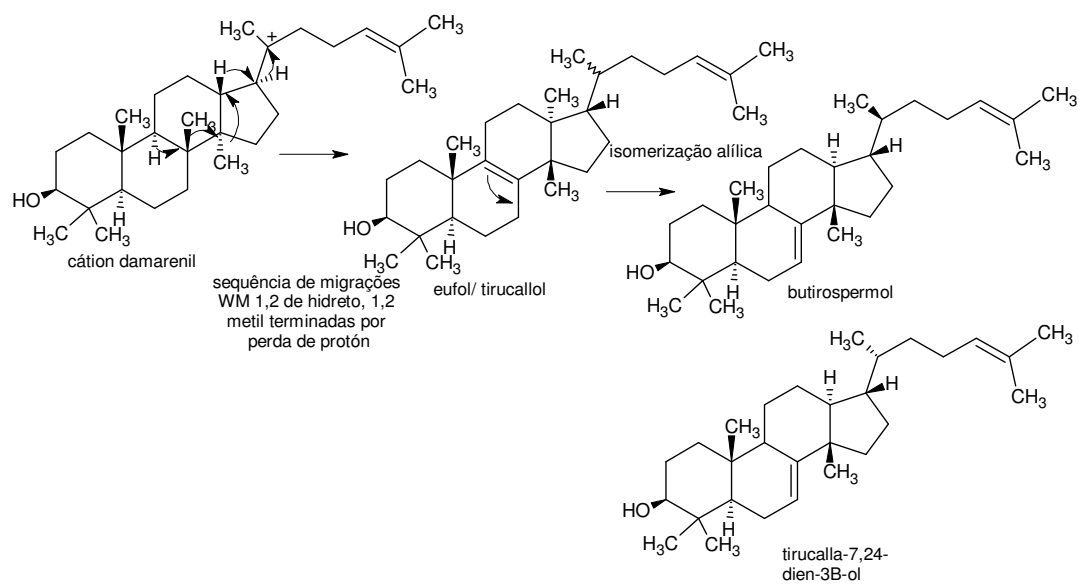


Figura 15: Formação do butirospermol e tirucalla-7,24-dien-3-β-ol a partir do cátion damarenil.

3. OBJETIVOS

3.1 Geral

Estudar a composição química do látex do leite de amapá extraído de *Brosimum parinarioides* e comparar com o látex do leite de amapá extraído de *Parahancornia amapa*.

3.2 Específicos

- * Isolamento dos constituintes presentes no látex de *Brosimum parinarioides*;
- * Elucidar as estruturas das substâncias isoladas, através de análises de Ressonância Magnética Nuclear (^1H , ^{13}C , HSQC, HMBC, DEPT 135) e Espectrometria de Massas (EM);
- * Comparar os perfis cromatográficos dos extratos de *Brosimum parinarioides* e *Parahancornia amapa* por cromatografia em camada delgada (CCD), empregando luz ultravioleta e diferentes reveladores químicos;
- * Comparar os perfis cromatográficos dos extratos das duas espécies por Cromatografia Líquida de Alta eficiência (CLAE), juntamente com os padrões autênticos isolados de *B. parinarioides* e *P. amapa*, utilizando o método de coinjeção;
- * Determinar a cadeia lateral da mistura de ésteres de lupeol hidroxilados e não hidroxilados e analisar a mistura de triterpenos acetilados isolados de *Parahancornia amapa* por CG-EM;
- * Avaliar a atividade anticoagulante pelo teste de interferência na atividade de Protrombina (TP ou TAP) e a atividade antiinflamatória dos extratos e substâncias isoladas disponíveis por inibição da enzima 5-lipoxigenase (LOX);

4 . MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Solventes

Os solventes utilizados no transcorrer do trabalho foram previamente tratados quando necessário (no caso de éter etílico) e purificados por destilação fracionada. Outros foram adquiridos com grau de pureza elevado (grau HPLC).

Para análises de RMN foi utilizado CDCl_3 deuterado da marca Aldrick Chemical Company, inc.

4.2 Equipamentos

- * Balança analítica: Marca Adventurer OHAUS – Toledo, modelo AR2140, limite 210 g;
- * Balança semi-analítica: Marca Adventurer OHAUS – Toledo, modelo ARC120, limite 3100 g;
- * Evaporador Rotativo: Marca Fisatom 802, modelo 550.
- * Lâmpada UV: Marca Spectroline, modelo CX-20, ultraviolet fluorescence analysis cabinet. Onda longa (365 nm) e onda curta (254 nm).
- * Ultrassom: Marca Ultrasonic, modelo USC 1400.
- * Coagulômetro- Aparelho Coatron M1, marca Teco (Medical instruments, production +trading GMBH)
- * Espectrofotômetro UV-visível da Thermo Scientific – TSQ Quantum Access
- * CG-EM (Cromatógrafo com fase gasosa modelo Ultra Trace acoplado a um espectrômetro de massas da marca Thermo Scientific, modelo DSQ-II, equipado com injetor automático modelo AI/AS 3000, do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia.
- * CG-EM (Cromatógrafo com fase gasosa acoplado a um espectrômetro de massas, marca Shimadzu, modelo QP-2010 equipado com injetor automático

AOC-5000 auto injetor, da Universidade de São Paulo (USP)- Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, da Universidade de São Paulo (USP)- Ribeirão Preto.

- * Espectrômetro de RMN marca VARIAN (500 MHz), modelo UNITY INOVA, - Centro de Biotecnologia da Amazônia (CBA);
- * Espectrômetro de RMN da BRUKER (300 MHz) – Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA)
- * Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência, marca Shimadzu Proeminence LC-20 A, equipado com injetor automático SIL-20 A, detector UV-Vis –DAD SPD-M20A, bomba quaternária LC-10AT Vp e Software Lc Solutions;
- * Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência marca Shimadzu composto por duas bombas LC-6AD, detector UV-VIS SPD-10 A VP, controlador SCL-10 A e Software CLASS VP.
- * Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência, marca Shimadzu UFLC, equipado com injetor SIL-20AC, detector SPD-M20A, bomba binária LC-20AD, forno de coluna CTO-20^a, CBM-20^a, acoplado a EM- microTOF-QII Bruker Daltonics Inc, fonte APCI no modo positivo.

4.3 Método de extração

O látex (1^a e 2^a coleta) foram submetidos à extração em aparelho ultrassônico com metanol e posteriormente em diclorometano (fluxograma 1) conforme metodologia adotada em trabalhos anteriores (SALLES *et al.*, 2009).

4.3.1 Cálculo do teor de extrativo

Os teores de extrativos dos extratos obtidos foram determinados conforme a fórmula abaixo:

$$\text{Teor de extrativo (\%)} = \frac{100 \times \text{massa do extrato (g)}}{\text{Massa de látex utilizada (g)}}$$

4.4 Métodos cromatográficos

4.4.1 Obtenção de perfis cromatográficos por camada delgada (CCD ou CCD-RP-18).

As análises dos extratos diclorometânicos de *B. parinarioides* (1ª e 2ª coleta) e *P. amapa* juntamente com os marcadores químicos isolados foram realizadas inicialmente em placas prontas (Merck F254) usando gel de sílica e utilizando procedimento padronizado. Os extratos foram analisados na concentração de 5mg/mL e os padrões na concentração de 1mg/mL, sendo a melhor fase móvel utilizada hexano/acetato de etila (85:15), sendo utilizado anisaldeído sulfúrico como revelador.

Foi também realizada comparação dos extratos de *B. parinarioides* da época de seca (BPL-DCM-2) e da época de chuva (BPL-DCM-2), juntamente com o extrato de *P. amapa*. E para a obtenção dos perfis cromatográficos foi utilizado diferentes métodos de revelação (UV a 254 ou 366 nm; exposição a vapor de iodo) e ainda com reveladores químicos do tipo universal (anisaldeído, vanilina, ácido sulfúrico, ácido fosfomolibdico), também os ditos específicos para classe de compostos (Dragendorff para alcalóides, cloreto férrico para fenólicos, Liebermann-Burchard para terpenóides, NP-PEG para flavonóides, etc) ou específicos para atividades de interesse como a atividade antioxidante (DPPH, β -caroteno).

4.4.2. Cromatografia Gasosa acoplado a um Espectrômetro de Massas (CG-EM)

As análises dos triterpenos acetilados foram realizadas por CG-EM, com um cromatógrafo em fase gasosa acoplado a um espectrômetro de massas, marca Shimadzu, modelo QP-2010 utilizando coluna DB-17MS (30m de comprimento, 0,25mm de diâmetro interno e espessura do filme 0,25 μ m). A descrição desta análise está no item 5.4.1.

As análises de determinação da cadeia lateral dos ésteres de lupeol, também foram realizadas por CG-EM, empregando-se um cromatógrafo em fase gasosa modelo Ultra Trace acoplado a um espectrômetro de massas da marca Thermo Scientific, modelo DSQ-II, equipado com injetor automático modelo AI/AS 3000. A separação

ocorreu com uma coluna Zebron ZB-FFAP da Phenomenex (60 m de comprimento, 0,25 mm de diâmetro interno e espessura do filme 0,25 μm). A descrição desta análise está no item 5.4.2.

No primeiro momento a análise dos triterpenos acetilados foi realizada no CG-EM da Shimadzu, na cidade de ribeirão preto-SP, devido a indisponibilidade deste equipamento em nosso grupo de pesquisa. Posteriormente, foi possível realizar as análises para a mistura de ésteres de lupeol no cromatógrafo da Thermo Scientific do INPA.

4.4.3. Métodos de isolamento

Para isolamento dos constituintes químicos foram empregados dois métodos cromatográficos tais como a cromatografia em coluna (CC) e cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) em escala semi-preparativa, empregando diferentes fases móveis e estacionárias (gel de sílica, sílica derivatizada). Foi também utilizada para a purificação das substâncias, técnica de recristalização utilizando diferentes solventes.

4.4.3.1 . Cromatografia em coluna (CC)

As CC foram realizadas utilizando diferentes fases móveis e estacionárias (gel de sílica). Foram utilizadas sílicas com tamanho de partículas na faixa de 0,063-0,200 mesh e sílica de partícula menor (0,040 -0,063 mesh), sílica flash. Esses suportes foram acondicionados em colunas de vidro, de diâmetros e alturas variadas.

4.4.3.2. Recristalização

A purificação por recristalização consistiu em dissolver o sólido a ser purificado em um solvente a quente, que após a solubilização foi colocado na geladeira para a formação de cristais, que posteriormente foram separados por filtração.

4.4.3.3. Cromatografia líquida de alta eficiência em escala semipreparativa (CLAE- semi-preparativo) e analítica (CLAE-UV-DAD)

O CLAE em escala semi-preparativa foi utilizado para isolar as substâncias da espécie *Brosimum parinarioides* que se apresentavam em forma de uma mistura complexa, que dificilmente seria isolada por cromatografia clássica utilizando sílica gel ou fase reversa. Depois dessa etapa, o CLAE-DAD foi utilizado para desenvolver um método comparativo para avaliar a composição química dos extratos diclorometânicos do látex do leite de amapá extraído das duas espécies, *Brosimum parinarioides* e *Parahancornia amapa* juntamente com os padrões já isolados anteriormente (item 5.6.1).

4.5. Métodos espectroscópicos

4.5.1. Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

As substâncias isoladas foram identificadas por métodos espectroscópicos unidimensionais de RMN ^1H e RMN ^{13}C , DEPT 135 e bidimensionais HSQC, HMBC. Os espectros das substâncias foram obtidos inicialmente no espectrômetro de RMN de modelo UNITY INOVA, marca VARIAN (500 MHz) do Centro de Biotecnologia da Amazônia (CBA). E posteriormente as análises foram realizadas no espectrômetro de RMN da BRUKER (300 MHz) do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA). As amostras foram preparadas utilizando clorofórmio deuterado como solvente.

4.6. Método espectrométrico

4.6.1. Espectrometria de massa (EM)

A detecção por espectrometria de massa foi realizada em um espectrômetro de alta resolução da microTOF-QII Bruker Daltonics Inc, fonte APCI no modo positivo por injeção direta e por LC-MS para as substâncias (**SUBST-1** e **SUBST-2**) em modo isocrático (ACN:H₂O 98:2), utilizando coluna Kinetex 2,6 μm C-18 100 Å com dimensões 150 x 2,1 mm com fluxo de 0,3mL/min.

Os “scans” foram adquiridos no modo positivo, com as seguintes condições: voltagens do *end plate* -500 V e do capilar 4000 V, corona 5000 nA, nebulizer 1.6 bar; dry gas 2,0 L/min; dry temp 250 °C; vaporizer temp 450 °C. Scan range 50-3000. Calibração interna com solução tuning mix APCI (Fluka) modo enhanced quadratic.

Para as análises por injeção direta as substâncias foram preparadas na concentração de 1,0 mg/mL em isopropanol e diluídas com solução de ácido fórmico (1%) para obter concentração final de 0,01 mg/mL.

5. PARTE EXPERIMENTAL

5.1. Coleta e identificação botânica

O látex de *B. parinarioides* foi coletado na Reserva Ducke, localizada no Km 26 da estrada AM-010 (Manaus- Itacoatiara), os indivíduos foram previamente identificados pelo projeto Flora da Reserva Ducke. As exsiccatas da espécie *B. parinarioides* encontram-se depositadas no Herbário do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA), com os seguintes números (tabela 1):

Tabela 1: Data da coleta e número da exsicata da espécie *B. parinarioides*.

Data coleta	<i>B. parinarioides</i>	Volume (mL)	Nº da exsicata	Época
11/10/2010	BPL-2	212	191462	Seca
			191463	
16/04/2011	BPL-3	164	191462	Chuva
			191478	
			191463	

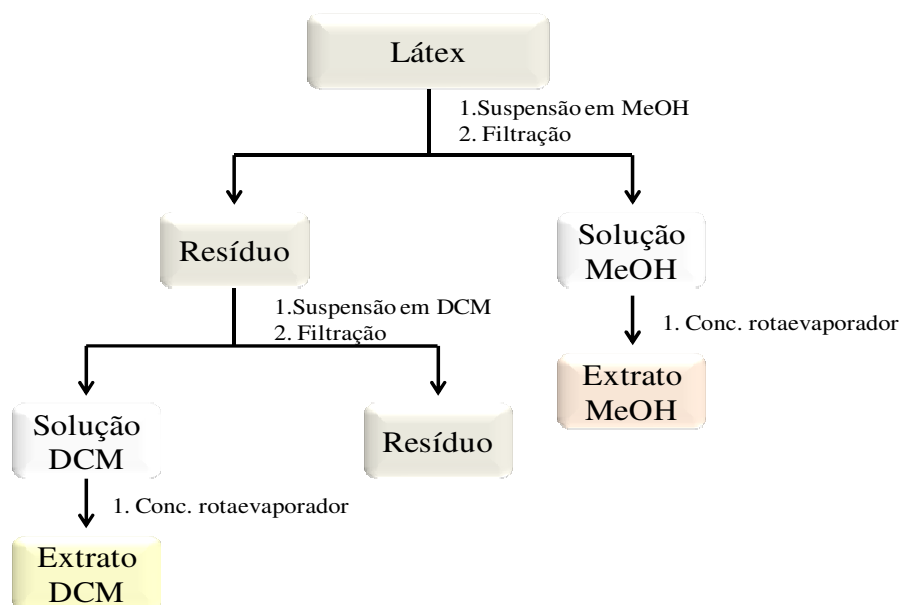
Foram realizadas duas coletas para a espécie *B. parinarioides* sendo a primeira no período de seca em 11 de outubro de 2010 (dois indivíduos) e a segunda no período chuvoso em 16 de abril de 2011 (três indivíduos). Ressaltando que devido ao pouco volume de látex obtido, reuniu-se o látex dos indivíduos referente a cada época de coleta para preparar os extratos.

Ao ser realizada a coleta, verificou-se que o único indivíduo da espécie *Parahancornia amapa* (exsicata 180608), que existia na reserva Ducke foi encontrada sem vida. Portanto, foi realizado um levantamento sobre as possíveis localizações dessa espécie, contudo sem êxito. Desta forma, decidimos aceitar a sugestão da banca examinadora (qualificação), para estudar somente a espécie *B. parinarioides*. Assim, a comparação relacionada à espécie *P. amapa* foi realizada utilizando o extrato do látex preparado em trabalho anterior, como também as substâncias isoladas, já que o látex da espécie não pôde ser coletado.

5.2. Preparação dos extratos

O látex de *B. parinarioides* coletado na época de seca (1^a coleta) e época de chuva (2^a coleta) foi utilizado para preparar os extratos diclorometânicos (DCM) e metanólicos (MeOH).

A preparação dos extratos consistiu em suspender o látex em metanol, e após filtração utilizando funil de Büchner, os extratos foram concentrados em rotaevaporador com pressão reduzida. Em seguida, o resíduo obtido foi novamente suspenso utilizando-se como solvente extrator diclorometano dando origem ao extrato diclorometânico. Esse procedimento foi realizado conforme o fluxograma 1:



Fluxograma 1: Procedimento utilizado para a obtenção dos extratos MeOH e DCM da espécie *B. parinarioides*.

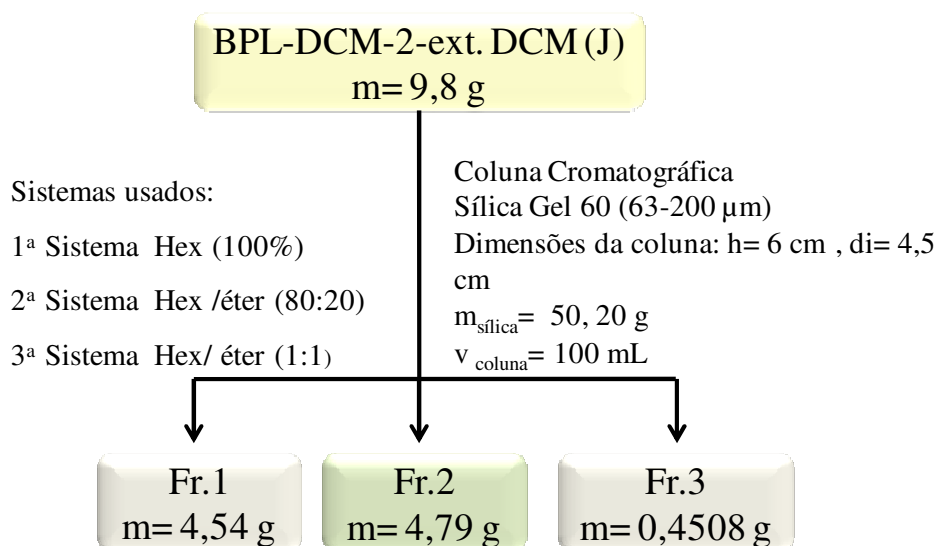
O extrato DCM de *B. parinarioides* obtidos da 1ª e 2ª coleta foram comparados inicialmente por CCD utilizando vários reveladores. Essa comparação foi feita com intuito de verificar alguma diferença entre os constituintes presentes na coleta realizada na época de seca e na época chuvosa. Posteriormente, a comparação foi realizada entre os extratos de *B. parinarioides* obtidos nas duas coletas e o extrato de *P. amapa*.

5.3. Fracionamento do extrato diclorometânico (DCM) de *B. parinarioides*

Após a realização da coleta e preparação dos extratos DCM e MeOH da espécie *B. parinarioides*, iniciou-se o processo de isolamento dos constituintes químicos.

O perfil cromatográfico do extrato DCM, foi analisado, utilizando-se Cromatografia em Camada Delgada (CCD) de fase normal e sistemas de solventes pré-definidos.

Posteriormente, o extrato DCM foi submetido a uma cromatografia em coluna (de 6 cm de altura x 4,5 cm de diâmetro) de sílica gel 60 (0,063-0,2 mm) e como eluente, utilizou-se o sistema de solventes: 3x de hexano (100%), 3x de hexano/éter (80/20) e 3x de hexano/éter (50/50), 300 ml cada sistema. Foram coletadas 3 frações, conforme o fluxograma 2. Este fracionamento foi realizado para separar os componentes presentes no extrato em níveis de polaridade, como em uma coluna “filtrante”.

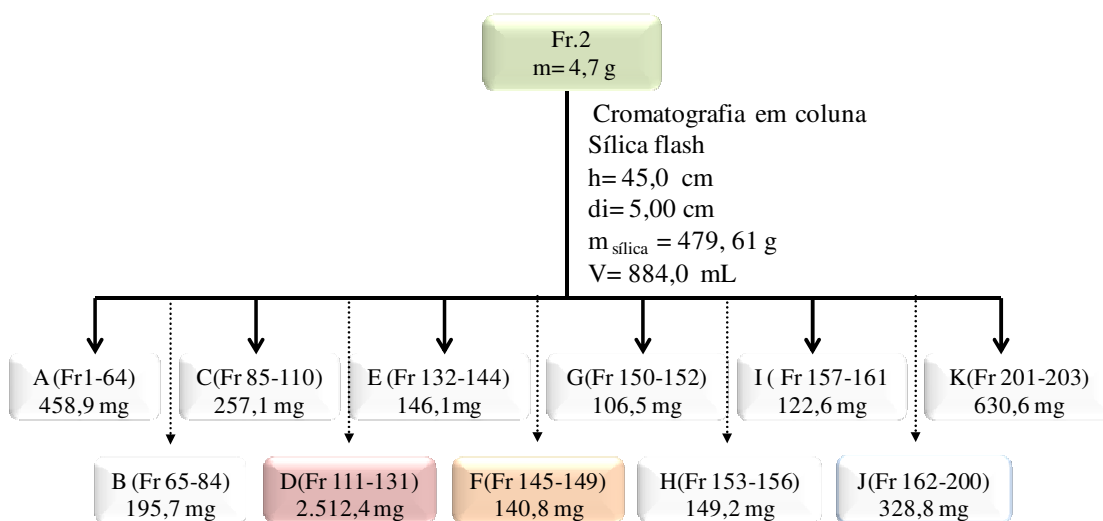


Fluxograma 2: Fracionamento preliminar com o extrato diclorometânico da espécie *B. parinarioides*.

5.3.1. Fracionamento da fração 2

A fim de isolar substâncias de maior polaridade contidas no extrato DCM, a fração 2 (4,7 g) obtida do pré- fracionamento anterior foi analisada em CCD de fase normal em vários sistemas de eluição, sendo o melhor sistema obtido foi utilizando hexano e mistura ($\text{CHCl}_3/\text{AcOEt}$) (98:2).

Assim, a fração 2 foi submetida a uma cromatografia em coluna (45,0 cm de altura x 5,0 cm de diâmetro) de sílica flash (0,040 – 0,063 mm). Utilizou-se como fase móvel os solventes hexano e proporções da mistura ($\text{CHCl}_3/\text{AcOEt}$) (98:2). A coluna foi eluída com hexano e a mistura nas seguintes proporções. 1) 2x hexano/ mistura (80:20), 2) 2x hexano/mistura (70:30), 3) 2x hexano/mistura (60:40), 4) 11x hexano /mistura (50:50), 884 ml de cada vez. Foram coletadas 203 frações (fluxograma 3), que foram analisadas por CCD e reunidas de acordo com a semelhança no perfil cromatográfico obtido. Obtendo-se ao fim de todas as análises 51 frações.

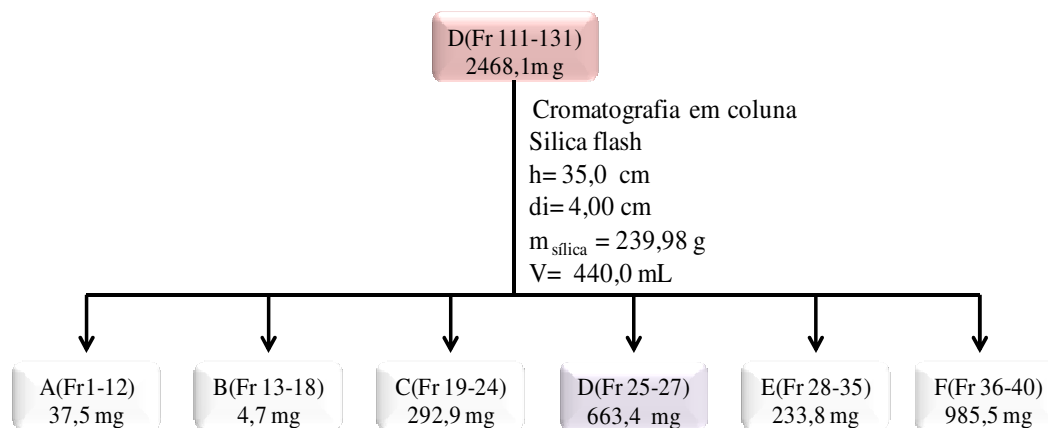


Fluxograma 3: Cromatografia em coluna realizada com a fração 2 (BPL-DCM-T-2).

5.3.1.2. Fracionamento da fração D (Fr.111-131)

A fração D(Fr.111-131) foi submetida a uma cromatografia em coluna (35,0 cm de altura x 4,0 cm de diâmetro) de sílica flash (0,040 – 0,063 mm). Utilizaram-se como

fase móvel os solventes hexano/éter (80:20), com 440 ml de cada vez. Foram coletadas 41 frações (fluxograma 4), onde as mesmas foram posteriormente analisadas por CCD e reunidas de acordo com seu perfil cromatográfico.

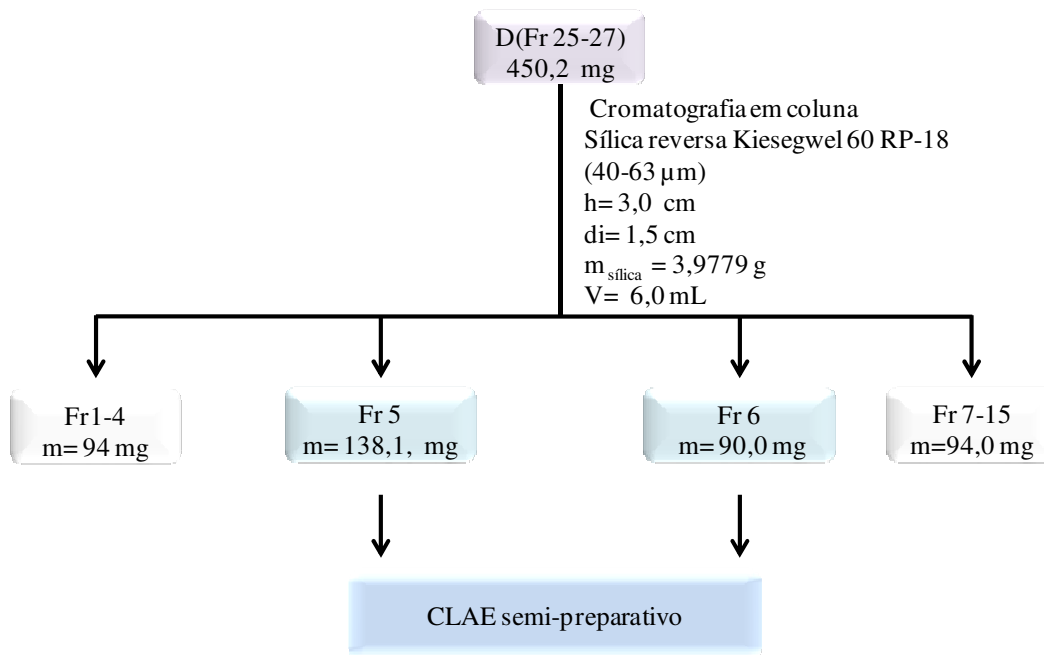


Fluxograma 4: Cromatografia em coluna realizada com a fração D (Fr.25-27).

5.3.1.2.1. Fracionamento da fração D (Fr.25-27)

A fração D (Fr25-27) obtida do fracionamento anterior foi submetida à cromatografia em coluna (3,0 cm de altura x 1,5 cm de diâmetro) utilizando sílica de fase reversa kieselgel 60 RP-18 (0,040 – 0,063 mm) e como fase móvel os solventes ACN (100%) e AcOEt (100%). Foram coletadas 15 frações (fluxograma 5) e analisadas posteriormente por CCD. Sendo a fração 5 enviada para análise de ressonância. Após análise e interpretação dos espectros de RMN ^1H e RMN ^{13}C , verificou-se que a mesma tratava-se de uma mistura. Então, optou-se por separar a mistura utilizando a cromatografia líquida de alta eficiência em escala semi-preparativa (CLAE semi-preparativo).

O passo seguinte foi selecionar as frações que apresentaram um melhor perfil por CCD e uma quantidade de massa suficiente para o isolamento. Então, foram selecionadas as frações 4, 5, 6 e 7 para serem analisadas por CLAE. Porém, foi utilizado somente as frações 5 e 6 para isolamento por CLAE semi-preparativo.



Fluxograma 5: Cromatografia em coluna realizada com a fração D (25-27).

5.3.1.2.2. Condições para isolamento por CLAE- semi-preparativo com as frações (Fr5) e (Fr6) do extrato DCM (1ª coleta) da espécie *B. parinarioides* em modo reverso

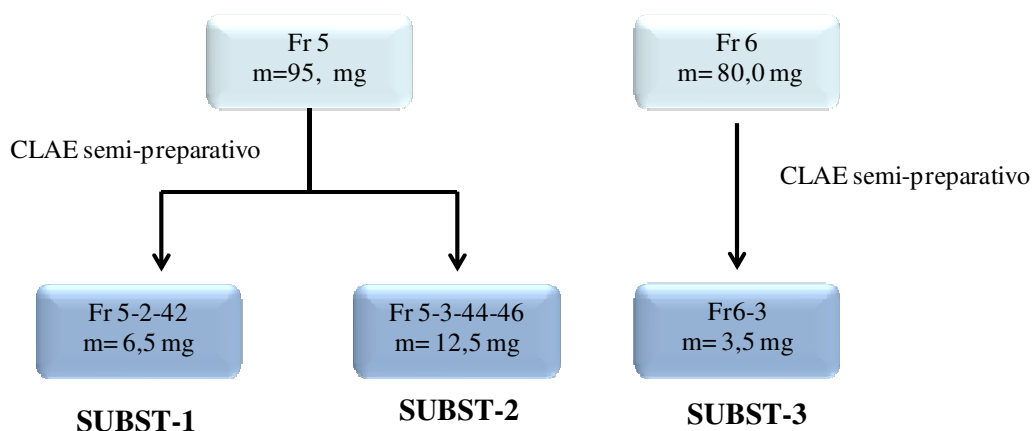
Inicialmente as análises das frações D- Fr5 e D- Fr6 por cromatográfica líquida de alta eficiência (CLAE) foram realizadas utilizando uma coluna analítica Shim-pack PREP – ODS (H) KIT de dimensões 250 x 4,6 mm (5µm), de fase reversa. Para determinar o melhor método de separação por CLAE, as amostras foram preparadas na concentração de 2,0 mg/mL solubilizadas em acetonitrila e injetadas no volume de 50 µL. O método foi desenvolvido seguindo a metodologia que foi adaptada de Dias e colaboradores, 2011.

Assim, feita uma análise exploratória para verificar a complexidade da amostra, onde foi utilizado o modo reverso de eluição, a fase móvel constitui de acetonitrila e água (acidificada com 0,05% de ácido acético) na proporção (90:10) por 5 minutos, aumentando para ACN (100%) em 10 minutos, mantendo isocrático por 25 minutos e voltando a condição inicial em 5 minutos. Após a análise exploratória, o método foi ajustado para obter uma melhor resolução, seletividade e menor tempo de análise.

Assim, o melhor método obtido foi utilizando como fase móvel ACN (100%). A análise foi monitorada com detector Uv-vis nos comprimentos de onda de 254 e 210 nm. Sendo a melhor detecção encontrada em 210 nm. O fluxo utilizado foi de 1 mL/min, volume de injeção 50 µL, pressão gerada durante a análise foi de 864 psi.

Em seguida, o método foi adaptado para a coluna semi-preparativa Shim-pack PREP-ODS (H) KIT com tamanho de partícula de 5 µm, 250 mm de comprimento, 20 mm de diâmetro interno, onde o fluxo utilizado passou a ser de 16 mL/min, e o tempo de corrida foi de 55 minutos.

A solubilização da amostra para o isolamento por CLAE- semi-preparativo foi modificada para ACN/ i-PrOH na proporção 80:20, já que a amostra não solubilizou em ACN, ao preparar uma solução mais concentrada. No entanto, esta mudança não prejudicou a separação da mistura no método desenvolvido. Ao fim deste procedimento, obtiveram-se três substâncias puras codificadas como (SUBST-1), (SUBST-2) e (SUBST-3), respectivamente (Fluxograma 6).



Fluxograma 6: Isolamento por CLAE semi-preparativo com as frações Fr5 e Fr6.

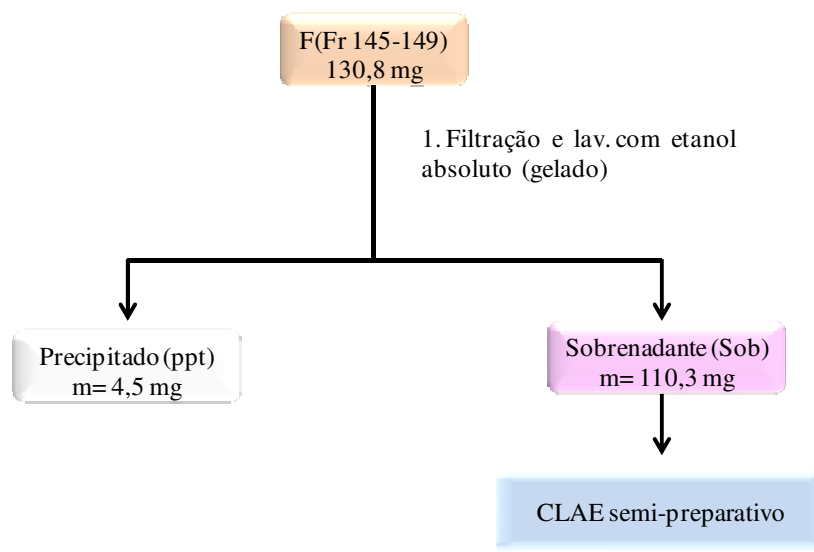
5.3.1.2.3. Condição de análise para avaliar pureza das substâncias obtidas no CLAE semi-preparativo em modo reverso

Das amostras referentes aos picos nos cromatogramas obtidos, foram retiradas alíquotas e solubilizadas em ACN/ i-PrOH (80:20) a 1 mg/ mL. Essas substâncias foram então submetidas a injeções utilizando a coluna analítica Shim-pack PREP – ODS (H) KIT de dimensões 250 x 4,6 mm (5µm), de fase reversa mencionada anteriormente para avaliar a pureza das substâncias obtidas. Utilizou-se o mesmo solvente como fase móvel

(ACN 100%) e as mesmas condições otimizadas para o isolamento. O fluxo utilizado foi de 1mL/minuto com volume de injeção da amostra de 20 μ L.

5.3.2. Recristalização da fração F (145 -149)

A recristalização das frações 145-149 foi realizada em etanol absoluto. O procedimento consistiu em solubilizar a amostra à quente utilizando etanol absoluto, onde em seguida, a amostra foi colocada na geladeira por 24h para a formação de cristais. No dia seguinte, ao ser realizada a filtração dos possíveis cristais e após os mesmos serem lavados com etanol absoluto gelado para retirar qualquer impureza do sobrenadante contida neles, verificou-se que este material apresentava um aspecto de um precipitado amorfo branco e não como cristais. Este procedimento foi realizado duas vezes, a fim de se obter uma quantidade mínima de precipitado para realizar a análise de RMN.



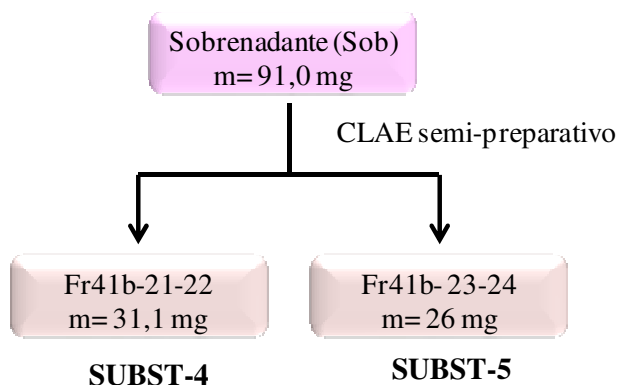
Fluxograma 7: Procedimento de recristalização realizada com a fração F (145-149).

Ao fim desse procedimento, obteve-se um precipitado amorfo impuro de (2,7 mg) da primeira recristalização e (1,8 mg) da segunda (fluxograma 7). No entanto, devido ao precipitado apresentar-se em mistura, optou-se por separar a mistura utilizando cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE semi-preparativo) com o sobrenadante.

5.3.2.1. Isolamento por CLAE semi-preparativo com a fração F (Fr145-149 (Sob) do extrato DCM (1ª coleta) da espécie *B. parinarioides* em modo normal

Assim como no item 5.3.1.2.2, inicialmente as análises das frações F (Fr145-149) (Sob) foram feitas por cromatográfica líquida de alta eficiência (CLAE) utilizando uma coluna analítica Phenomenex Luna Si de 5 μ m 100 A de dimensões 250 x 2 mm de fase normal. Para determinar o melhor método de separação por CLAE, as amostras foram preparadas na concentração de 2,0 mg/mL e solubilizadas em Hexano/ MTBE na proporção 90:10 e injetadas em seguida no seguinte método: Hexano /MTBE (95:5) por 5 minutos, subindo para 70:30 em 15 minutos e mantendo isocrático por 15 minutos e posteriormente voltando à condição inicial em 5 minutos. O fluxo utilizado foi de 0,08 mL/ minuto, com volume de injeção de 10 μ L, sendo as análises monitoradas nos comprimentos de onda de 254 e 210 nm. O melhor método obtido foi utilizando a mistura de Hexano/ MTBE na proporção 80:20 em modo isocrático de eluição por 40 minutos, com fluxo de 0,08 mL/ minuto, sendo posteriormente otimizado para o fluxo 0,12 mL/ minuto.

Depois de otimizada a separação em coluna analítica, o método foi adaptado para o isolamento em coluna semi-preparativa Phenomenex Luna Si 5 micras 100 A 250 x 10 mm, utilizando Hexano/MTBE na proporção 80:20 por 40 minutos, com fluxo de 3 mL por minuto, estando a amostra solubilizada em Hexano/MTBE na proporção 90:10. Ao fim deste procedimento, obtiveram-se duas substâncias puras codificadas como BPL- Fr41b-21-22 e BPL-Fr 41b-23-24 e nomeadas a partir deste ponto como **SUBST-4** e **SUBST-5**, respectivamente. (Fluxograma 8).



Fluxograma 8: Isolamento por CLAE semi-preparativo com a fração F (Fr145-149 Sob).

5.3.2.1.1. Condição de análise para avaliar pureza das substâncias obtidas no CLAE semi-preparativo em modo normal

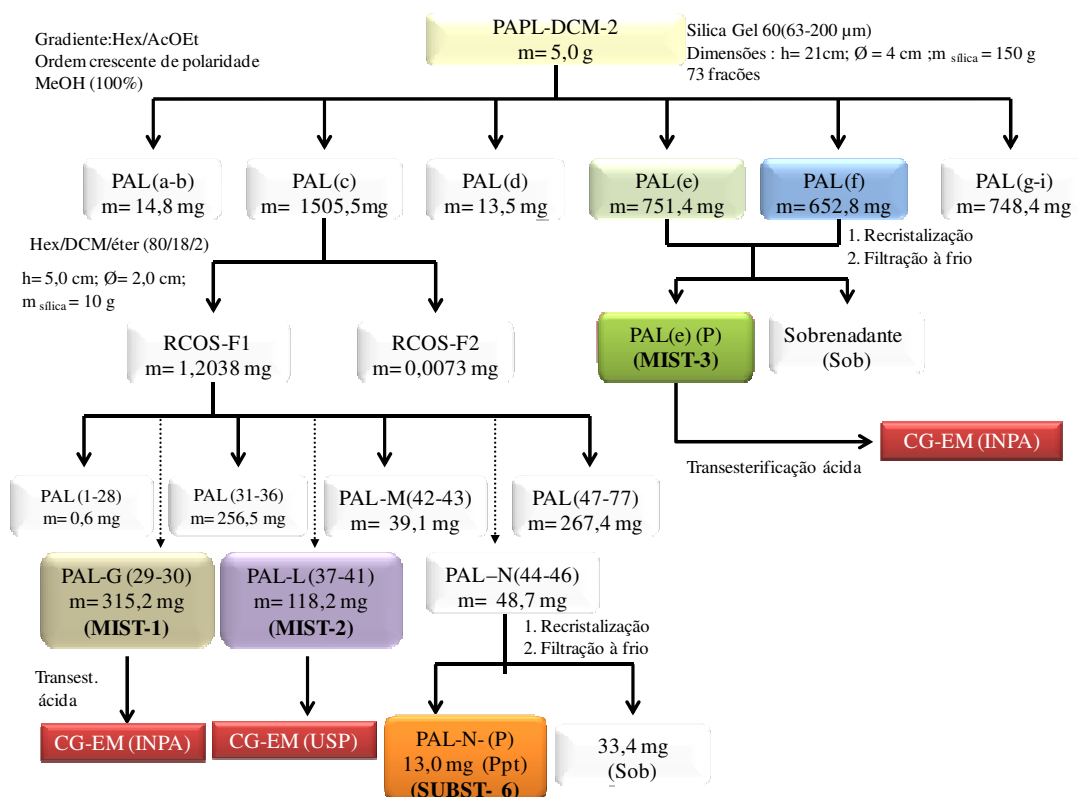
Das amostras referentes aos picos nos cromatogramas obtidos, foram retiradas alíquotas e solubilizadas em Hexano/ MTBE (90:10) a 1,0 mg/mL. Essas substâncias foram então submetidas a injeções utilizando analítica Phenomenex Luna Si 5 micras 100 A de dimensões 250 x 2 mm de fase normal mencionada anteriormente. Utilizou-se o mesmo solvente como fase móvel Hexano/MTBE (80:20). O fluxo utilizado foi de 0,08 mL/minuto com volume de injeção da amostra de 20 µL.

5.4. Padrões isolados de *P. amapa* e *B. parinarioides* em trabalhos anteriores

Durante o Projeto de Iniciação Científica (PIBIC-INPA) (SALLES *et al.*, 2009), foi possível isolar a partir do extrato diclorometânico da espécie *P. amapa* (PAL-DCM-2) três misturas, sendo duas misturas de ésteres de lupeol, uma na forma não hidroxilada (**MIST-1**) e outra na forma hidroxilada (**MIST-3**). A outra mistura isolada (**MIST-2**) era composta por acetato de lupeol, acetato de α - amirina e acetato de β - amirina.

As substâncias foram identificadas por RMN ^1H e ^{13}C (SILVA *et al.*, 2010). No entanto, a determinação da cadeia lateral da mistura de ésteres de lupeol foi determinada durante o mestrado item 6.5. Assim, como a confirmação da mistura de triterpenos acetilados por análise de CG-EM.

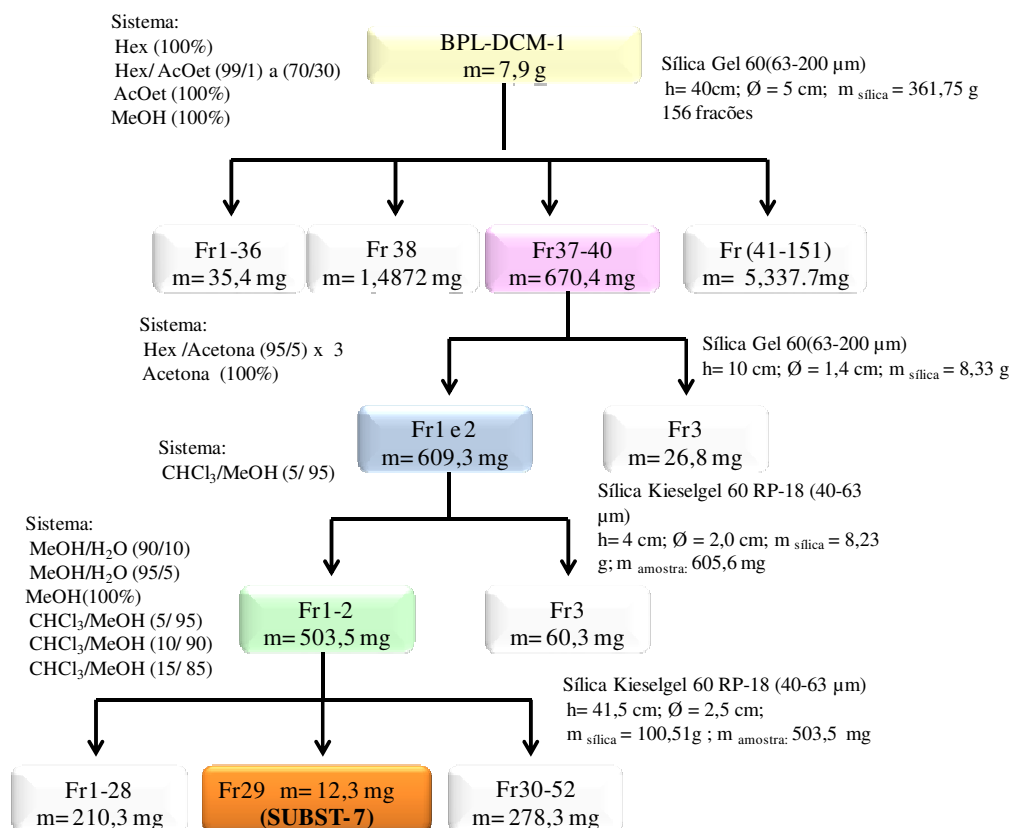
Além disso, foi possível purificar de frações oriundas do fracionamento com o extrato diclorometânico da espécie *P. amapa*, durante o mestrado, o acetato de lupeol de forma isolada (recristalização), como mostra os espectros de RMN ^1H e RMN ^{13}C no (ANEXO -1 B). O procedimento utilizado para o isolamento foi realizado conforme o fluxograma 9 para a espécie *P. amapa* e o fluxograma 10 para a espécie *B. parinarioides*.



Fluxograma 9: Isolamento de padrões da espécie *P. amapa*.

Legenda dos principais códigos:

- **PAL-DCM-2**- Extrato diclorometânico da espécie *P. amapa*
- **MIST-1**- mistura de ésteres de lupeol não hidroxilados
- **MIST-2**- mistura de triterpenos acetilados (acetato de α e β - amirina e acetato de lupeol)
- **MIST-3**- mistura de ésteres de lupeol hidroxilados
- **SUBST-6**- acetato de lupeol isolado de *P. amapa*.



Fluxograma 10: Isolamento de padrões da espécie *B. parinarioides*.

Legenda dos principais códigos:

- **BPL-DCM-1**- Extrato diclorometânico da espécie *B. parinarioides* (PIBIC)
- **SUBST-7**- acetato de lupeol isolado de *B. parinarioides*.

5.4.1. Análise por CG-EM da mistura de triterpenos acetilados isolados anteriormente de *P.amapa*

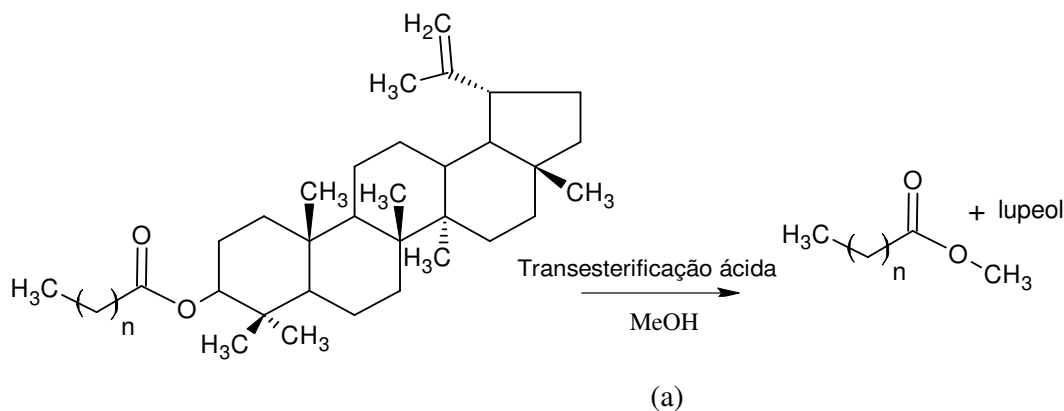
A análise foi realizada utilizando-se um cromatógrafo em fase gasosa acoplado a um espectrômetro de massas, marca Shimadzu, modelo Q-2010 utilizando coluna DB-17MS (30m de comprimento, 0,25mm de diâmetro interno e espessura do filme 0,25 µm) equipado com injetor automático modelo AOC 500 autoinjeter. A programação da temperatura do forno: 120 °C, subindo 20 °C /min até 260 °C, isoterma por 5 min, subindo 2 °C /min até 280 °C, isoterma por 9 min, subindo 2 °C /min até 290 °C, isoterma por 20 min, com o tempo de análise de 56 min. O gás de arraste foi hélio a 1,4 mL/min. A temperatura de injeção foi de 260 °C, a temperatura da linha de transferência 290 °C, o modo de injeção foi split (1:10). A faixa de varredura foi de 50,0

a 550,0 m/z e o espectro de massas foi obtido por impacto de elétrons (IE) a 70 eV. As amostras foram solubilizadas em CHCl_3 tendo como concentração final 1mg/mL e o volume de injeção foi de 1 μL .

A identificação dos constituintes foi feita com base na análise dos espectros obtidos e comparados com os de massas adquiridos disponíveis nas bibliotecas, NIST 2.0, Wiley e com a biblioteca criada pelo laboratório de pesquisa (NPPNS- Núcleo de Pesquisa em Produtos Naturais e síntese/ USP- Ribeirão Preto- SP).

5.4.2. Reação de transesterificação em meio ácido e identificação por CG-EM da cadeia lateral da mistura de ésteres de lupeol isolados em trabalhos anteriores com a espécie *P. amapa*

Os ésteres de lupeol hidroxilado e não hidroxilado foram submetidos à reação de transesterificação realizada segundo a metodologia de Sobrinho *et al.*, 1991, com algumas modificações. As amostras de ésteres de lupeol não hidroxilado foram refluxados por 6 horas com MeOH (5 mL) e HCl (1 mL). Depois de resfriada, a solução foi extraída com hexano grau HPLC. Posteriormente, a fase orgânica foi lavada com H_2O e seca com NaSO_4 anidro e concentrada em rotaevaporador fornecendo lupeol e uma mistura de ésteres metílicos os quais foram analisados por CG-EM. As amostras de ésteres de lupeol hidroxilados foram refluxados com agitação em 10% MeOH-HCl (10 mL) por 6 horas. Depois de resfriada a mistura da reação foi submetida ao mesmo tratamento da reação anterior. Obtendo-se o lupeol e uma mistura de ésteres metílicos (Figura 16).



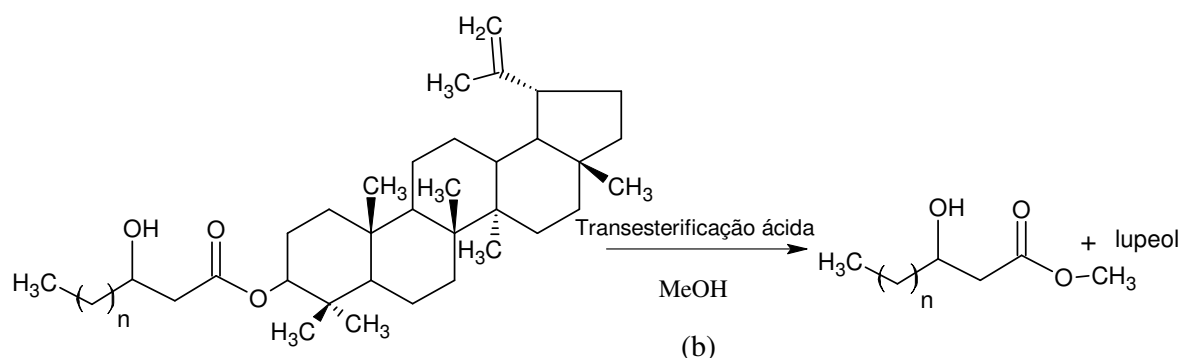


Figura 16: Produtos da reação de transesterificação com mistura ésteres de lupeol hidroxilado (a) e não hidroxilado (b).

A mistura de ésteres de lupeol foram identificadas através de CG-EM empregando-se um cromatógrafo em fase gasosa modelo Ultra Trace acoplado a um espectrômetro de massas da marca Thermo Scientific, modelo DSQ-II, equipado com injetor automático modelo AI/AS 3000. A separação ocorreu com uma coluna Zebron ZB-FFAP da Phenomenex (60 m de comprimento, 0,25 mm de diâmetro interno e espessura do filme 0,25 μm) nas seguintes condições: temperatura de forno 210 $^{\circ}\text{C}$, isoterma por 5 min, subindo 10 $^{\circ}\text{C}$ /min até 260 $^{\circ}\text{C}$, isoterma por 50 min, tempo de análise de 60 min. O injetor foi programado em modo split (1:10) a 250 $^{\circ}\text{C}$. O gás de arraste foi o hélio a 1,8 mL/min. A temperatura da linha de transferência e da fonte foram respectivamente, 275 $^{\circ}\text{C}$. As análises por espectrometria de massas ocorreram em modo full scan (faixa de varredura de 40-500 m/z), modo positivo com fonte de íons operando a 200 $^{\circ}\text{C}$ e os espectros de massas foram obtidos por impacto de elétrons (IE) a 70 eV. As amostras foram solubilizadas em hexano a concentração final 1,0 mg/mL, e em seguida foi realizada a análise nas condições acima descritas.

A identificação dos constituintes foi feita com base na análise dos espectros obtidos e comparados com os espectros de massas adquiridos disponíveis nas bibliotecas NIST 2.0 e Adams.

5.5. Perfis cromatográficos por Cromatografia em Camada Delgada Comparativa (CCDC)- Fase Normal

A cromatografia em camada delgada comparativa (CCDC) por ser um procedimento analítico rápido, de baixo custo, simples e que auxilia na identificação de compostos em mistura e/ou verificação preliminar da pureza, foi empregada para uma comparação preliminar entre os extratos diclorometânicos correspondentes a época de seca (1ª coleta- BPL-DCM-2) e época de chuva (2ª coleta- BPL-DCM-3) da espécie *Brosimum parinarioides* e ainda entre o extrato diclorometânico da espécie *Parahancornia amapa*.

Foi utilizada cromatoplasca de sílica gel 60, em fase normal e o sistema consistiu de Hexano/ AcOEt (85:15) foram aplicados 2,0 µL dos extratos na concentração de 5,0 mg/mL e 2,0 µL padrões na concentração de 1,0 mg/mL.

5.6. Análise do perfil cromatográfico do látex do leite de amapá extraído de *B. parinarioides* e *P. amapa* por CLAE-UV-DAD

O desenvolvimento de metodologias padronizadas para análise de extratos, frações e /ou substâncias e por CLAE requer somente que a amostra seja solúvel na fase móvel e é importante porque permite:

- Monitorar a composição química de extratos;
- Comparar a composição de extratos de diferentes períodos de coleta;
- Avaliar a ocorrência de componentes que podem ter atividade específica;
- Verificar a pureza;
- Confirmar a identidade botânica.

5.6.1. Desenvolvimento do método para análise do perfil cromatográfico

Para obtenção do perfil dos extratos do látex das duas espécies de plantas e seus respectivos padrões isolados, tentou-se o desenvolvimento de um método de análise inicialmente em modo reverso, porém sem êxito. Contudo, foi conseguido um método de comparação em modo normal, após várias tentativas, modificando os gradientes de eluição da fase móvel, o tempo de análise e o fluxo. O método desenvolvido consistiu em um sistema de gradiente utilizando como fase móvel A: Hexano e como fase móvel

B: MTBE nas seguintes condições: 0-5 min. (100% A), 5-28 min. (0-6% B), 28-95 min. (6%) (período de análise), retornando à condição inicial (100 % A) em 5 min. (pós-análise) e permanecendo por mais 20 min (pré- análise), tempo total de análise foi de 120 min. O fluxo da análise foi de 0.2 mL/min e volume de injeção 10µL. A separação cromatográfica foi feita usando uma coluna Luna 5 u Sílica 100 Å de tamanho de poro, 250 x 2.0 mm. As amostras foram detectadas num comprimento de onda de 220 nm. Os extratos estavam na concentração de 5,0 mg/mL em hexano 100% e o volume de injeção foi de 10,0 µL.

5.6.1.1. Injeção dos padrões

Na tentativa de identificar os componentes presentes nos extratos diclorometânicos foram injetados padrões autênticos isolados das duas espécies (item 6.5 e 6.6).

Para isso foram preparadas soluções na concentração de 1,0 mg/mL em hexano grau HPLC e submetidas à análise cromatográfica nas mesmas condições descritas no item 5.6.1. O volume de injeção foi de 10 µL.

5.6.1.2. Coinjeção dos padrões

Para confirmar a presença dos padrões isolados das duas espécies foi empregado o método da coeluição, onde foram feitas coinjeções das substâncias descritas no item 6.5 e 6.6. Para isso, foram preparadas 10 alíquotas do extrato de *B. parinarioides* tanto para a amostra da época de seca como da época de chuva e 10 alíquotas para o extrato de *P. amapa*. Cada alíquota foi resolvida com o sistema cromatográfico descrito no item 5.6.1., exceto para a coinjeção com a substância codificada como **SUBST-5**, onde o tempo de análise foi modificado, já que após análise da coinjeção com o extrato de *Brosimum* ocorreu uma alteração no tempo de retenção das substâncias padrões. Dessa forma, o tempo de análise foi ajustado 10 minutos a mais na proporção 94/6.

O aumento da intensidade dos picos no cromatograma original da amostra em um tempo de retenção já identificado para o padrão autêntico permitiu sugerir a presença das substâncias em cada extrato analisado.

5.7. Atividade de Coagulação

5.7.1. Teste de Interferência na atividade de Protrombina (TAP ou TP)

O teste de interferência na atividade de protombina (TP ou TAP) foi realizado pelo método de Brown (1988) modificado por Osoniyi e Onajobi (2003), utilizando-se um coagulômetro (Teco, modelo Coatrom MI, Alemanha) e o “kit” comercial HemoStat Thomboplastin –SI .

Selecionou-se os extratos DCM e MeOH das duas espécies, as frações obtidas nas partições dos extratos MeOH, e as substâncias isoladas que apresentavam massa suficiente, **MIST-1, MIST-2, MIST-3, SUBST- 6**. As amostras foram dissolvidas em dimetilsulfóxido (DMSO) na concentração inicial de 1,0 mg/mL para substâncias (conc. final de 0,1mg/mL) e para extratos e frações concentração inicial de 10 mg/mL e final de 0,01 mg/mL. O sangue venoso foi coletado de cobaias humanas saudáveis e transferido para tubos com anticoagulante citrato, posteriormente centrifugado a 2500 rpm por 10 min. E somente o sobrenadante coletado (Plasma Pobre em Plaquetas) (PPP) foi utilizado no teste. Para realizar o teste utilizou-se o aparelho Coatrom M₁ (Analyser coagulation).

O procedimento consistiu em utilizar cubetas de formato cônico, onde 45,0 µL do PPP e 5,0 µL das substâncias a serem testadas foram depositadas e transferidas para a cavidade do aparelho. No tempo determinado pelo aparelho, foi pipetado 100,0 µL do reativo TP. Em seguida, os tempos de coagulação foram registrados.

Para o controle negativo utilizou-se DMSO e o reativo TP e como controle positivo (anticoagulante) utilizou-se heparina. Todo o teste foi efetuado em triplicata.

Todos os procedimentos foram realizados conforme as normas, tendo o seguinte número referente ao Certificado de Avaliação Ética (CAAE) - 00868112.9.0000.5020.

5.8. Ensaio de inibição enzimática 5-lipoxigenase (LOX)

* Tampão:

Foi utilizado o tampão Fosfato de Sódio, pH 8 a 20 mM.

* **Enzima:**

5-Lipoxigenase (Tipo V, líquida, suspensão sulfato de amônio 500,000 – 1.000.000 U/mg, 36 mg protein/mL (Buret) 70100 U/mg protein) adquirida da Sigma. Enzima líquida foi diluída em solução tampão fosfato de sódio para obter uma solução 100.000 U/mL de enzima para o ensaio de inibição.

* **Substrato:**

Ácido linoléico (99 + % - SAFC) foi adquirido da Sigma. Para o ensaio enzimático, 40 µM (concentração final) de ácido linoléico em etanol foi usado.

* **Extratos de *P. amapa* e *B. parinarioides* e inibidor de referência da LOX:**

Os extratos diclorometânicos e metanólicos de *P. amapa* e *B. parinarioides* foram dissolvidos em DMSO a uma concentração de inicial de 10 mg/mL. No meio reacional obteve-se a concentração final de cada extrato a 200 µg/mL. As substâncias isoladas e o inibidor de referência da LOX, quercetina, foram dissolvidos em DMSO a uma concentração de 1,0 mg/mL. Depois se obteve no meio reacional a concentração final de 20,0 µg/mL.

* **Equipamento:**

Espectrofotômetro UV-visível da Thermo Scientific – TSQ Quantum Access.

5.8.1. Inibição *in vitro* da enzima 5-lipoxigenase

O teste de inibição enzimática 5-lipoxigenase foi realizado no Laboratório de Atividade Biológica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas – UFAM sob orientação do Prof^o. Dr. Emerson Silva Lima.

A determinação da atividade de inibição da lipoxigenase foi medida como descrito anteriormente, com algumas modificações (AZIZ *et al.*, 2004). Todos os compostos utilizados foram de alto grau de pureza (CLAE).

A mistura de reação continha 470 µL de solução tampão fosfato de sódio (pH=8,0) a 20 mM, 10 µL do composto/extrato a ser testado (concentrações finais que variaram de 20 a 200 µg/mL), 10 µL da solução de ácido linoléico em etanol (concentração final de 40 µM) e 10 µL da solução da enzima 5-lipoxigenase (100.000 U/mL) em tampão fosfato de sódio (pH=8,0), foi adicionado para iniciar a reação.

Para o controle positivo foi utilizado o flavonóide quercetina e para o controle negativo DMSO. A solução resultante foi bem misturada e incubada a temperatura ambiente.

A reação foi iniciada pela adição do ácido linoléico, com a formação do dieno conjugado hidroperóxido (13-HPOD). As substâncias/extratos e controle quercetina foram dissolvidos em DMSO. Após 5 minutos, a mudança de absorbância a 234 nm foi lida para medir a produção de dieno conjugado. O efeito de inibição da substancia/extrato a enzima foi calculado como:

$$\text{Inhibition (\%)} = [(Ac - As)/Ac] \times 100$$

Onde Ac e As foram as absorbâncias de controle (sem amostra teste) e com amostra (substância/extrato), respectivamente. A atividade inibitória foi determinada como a média de medições em triplicata e expressa como o valor da concentração de inibição a 50 % (CI₅₀) do controle sem inibidor.

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1. Rendimento e comparação dos extratos por CCD

Os extratos do látex do leite de amapá indicaram um maior rendimento para o extrato diclorometânico (DCM), tanto da época de seca (24,04%), quanto da época chuvosa (17,00%) (Gráfico 1). Os extratos metanólicos apresentaram um rendimento inferior, porém próximo a 4 %, para as duas épocas. Os rendimentos foram obtidos pela quantidade em massa de látex utilizado, conforme mostra a (tabela 2).

Tabela 2: Rendimento dos extratos DCM e MeOH de *B. parinarioides*

1ª Coleta (época de seca)			
Descrição	Volume de látex (mL)/ massa (g)	Amostra (g)	Rendimento (%)
BPL-DCM-2	212,0/ 221,0	53,15	24,04
BPL-M-2		8,12	3,67
2ª Coleta (época de chuva)			
BPL-DCM-3	164,0/170,4	28,97	17,00
BPL-M-3		6,83	4,00

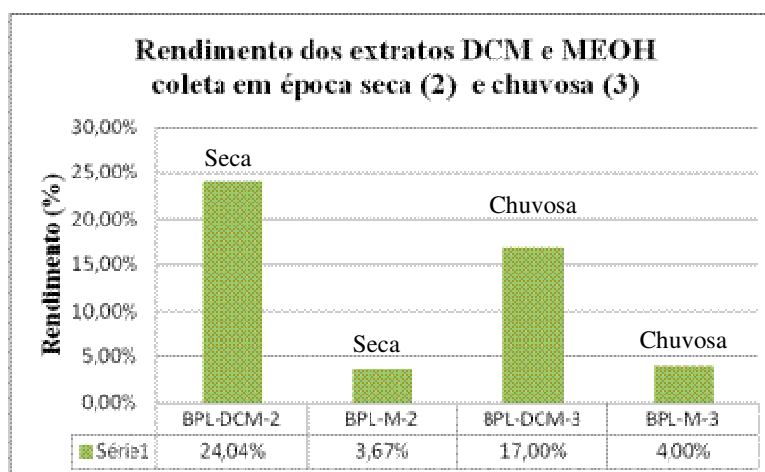


Gráfico 1: Rendimento obtido para os extratos diclorometânicos e metanólicos nas duas épocas de coleta.

Um dos métodos mais usados para estudar o perfil das substâncias químicas presentes em extratos vegetais é a cromatografia em camada delgada (CCD), por ser um

procedimento analítico rápido, de baixo custo, simples e porque necessita de ordem de miligramas. Assim, esse procedimento auxilia na identificação da classe das substâncias, já que a revelação de placas cromatográficas torna-se uma ferramenta muito útil na avaliação preliminar do perfil químico de um extrato bruto, pois existem diversos reveladores químicos, destrutivos ou não descritos na literatura que auxiliam nessa possível identificação (WAGNER, 1996).

Os extratos DCM tanto da época de chuva quanto da época de seca foram comparados por CCD e revelados em diferentes reveladores químicos, através dessa comparação não foi possível observar diferença no perfil cromatográfico entre essas duas épocas. A revelação foi intensa em UV 254nm, consistente com substâncias que possam conter duplas ligações conjugadas, sendo visualizados também em câmara de iodo, que condiz com substâncias que contenham estruturas com insaturações. As cromatoplasmas foram reveladas ainda em anisaldeído, vanilina, ácido fosfomolibdico e também com os reveladores específicos, como DPPH para antioxidantes, com uma leve revelação, Dragendorff e cloreto férrico, onde não houve revelação, o que indica a ausência de alcaloides e grupos fenólicos, o que é consistente já que se trata de extrato de baixa polaridade. Porém, apresentou intensa revelação quando utilizado o reagente específico para terpenos (Liebermann-Buchard).

Foi realizada também uma comparação por CCD do extrato DCM de *B. parinarioides* e *P. amapa* onde foi possível verificar que estes apresentam componentes com R_fs semelhantes quanto distintos (figura 17). A comparação também foi realizada por CLAE juntamente com os padrões isolados das duas espécies.

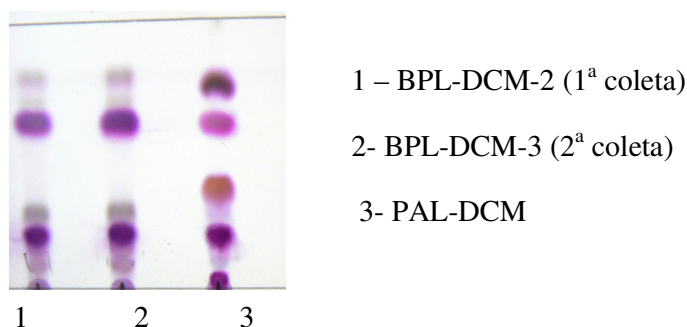
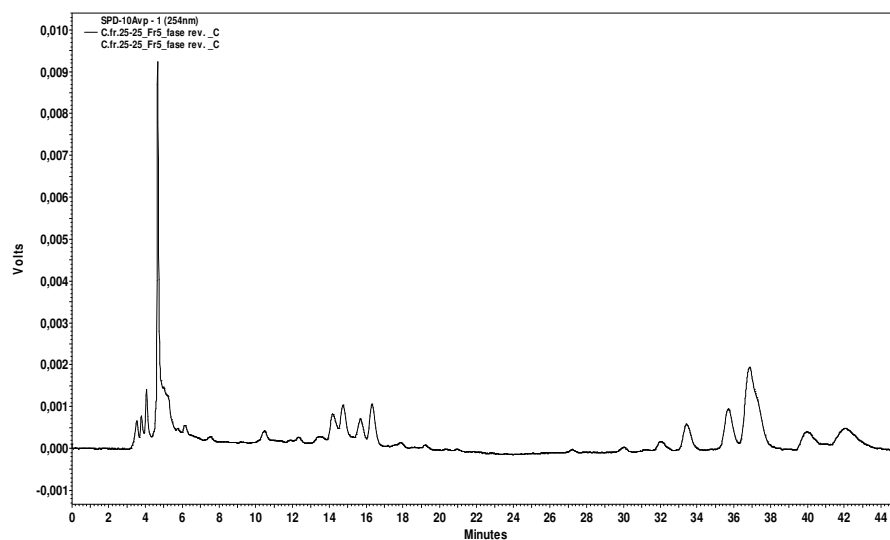


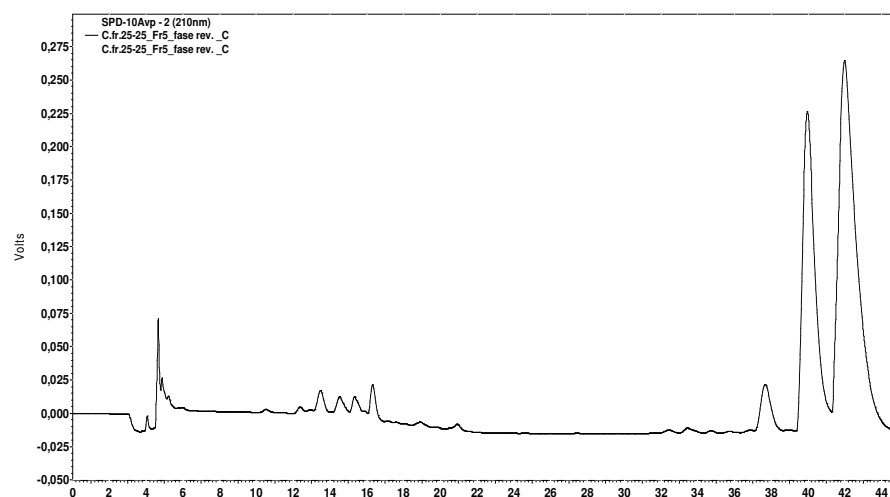
Figura 17: Comparação por CCD dos extratos DCM de *B. parinarioides* (1ª e 2ª coleta) e *P. amapa*. Placa eluída com hexano/ acetato de etila (85:15), revelada em anisaldeído.

6.2. Isolamento por CLAE semi-preparativo com as frações Fr5 e Fr6 do extrato DCM (1ª coleta) da espécie *B. parinarioides* em fase reversa

A escolha inicial do gradiente exploratório permitiu verificar a complexidade da amostra e identificar a porcentagem da fase móvel que poderia ser utilizada para uma separação eficiente em modo isocrático. A figura 18, mostra o perfil da fração 5 utilizando o método em modo gradiente. Os cromatogramas foram registrados nos comprimentos de onda: 254 e 210 nm, sendo a melhor detecção encontrada em 210 nm.



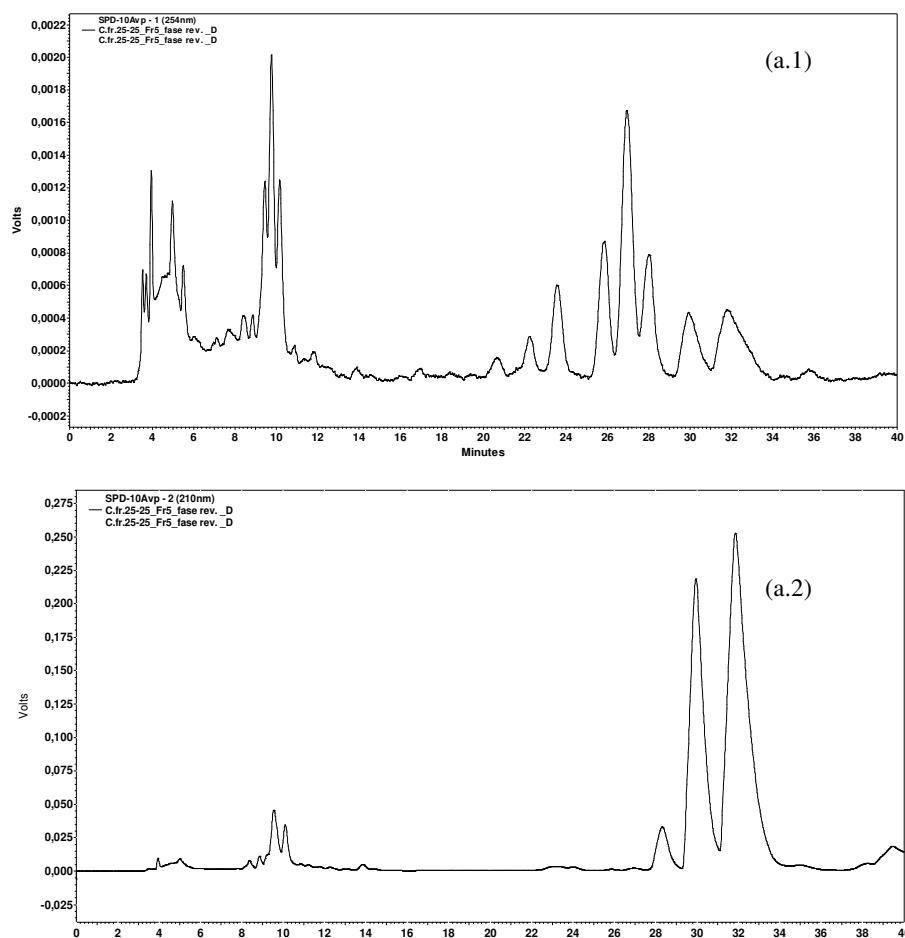
(a) detecção em 254 nm



(b) detecção em 210 nm

Figura 18: Cromatograma da CLAE da fração Fr5, (a) (254 nm) e (b) (210 nm), método gradiente. Condições cromatográficas: Fase móvel ACN (A)/ H₂O (0,05% ac. acético); 0-5 min. (10% B), 5-15min. (10% B -100% A), 15-40 min. (100% A), 40-45 min. (10% B). Coluna analítica (250 x 4,6 mm) da Shim pack PREP-ODS KIT (5µm).

Porém o melhor método de análise obtido foi método isocrático com ACN (100%) conforme o cromatograma da figura 19 (a.1 e a.2) e como citado anteriormente a mudança na solubilização da amostra de ACN (100%) para ACN/ i-PrOH (80:20) não interferiu na separação das bandas no método desenvolvido, como mostra o cromatograma na figura 19 (b.1 e b.2) para a fração fr5.



(a) Cromatograma da fração 5 solubilizada em ACN (100%), o volume de injeção foi de 50 μ L e detecção em 254 nm (a.1) e (a.2) 210 nm.

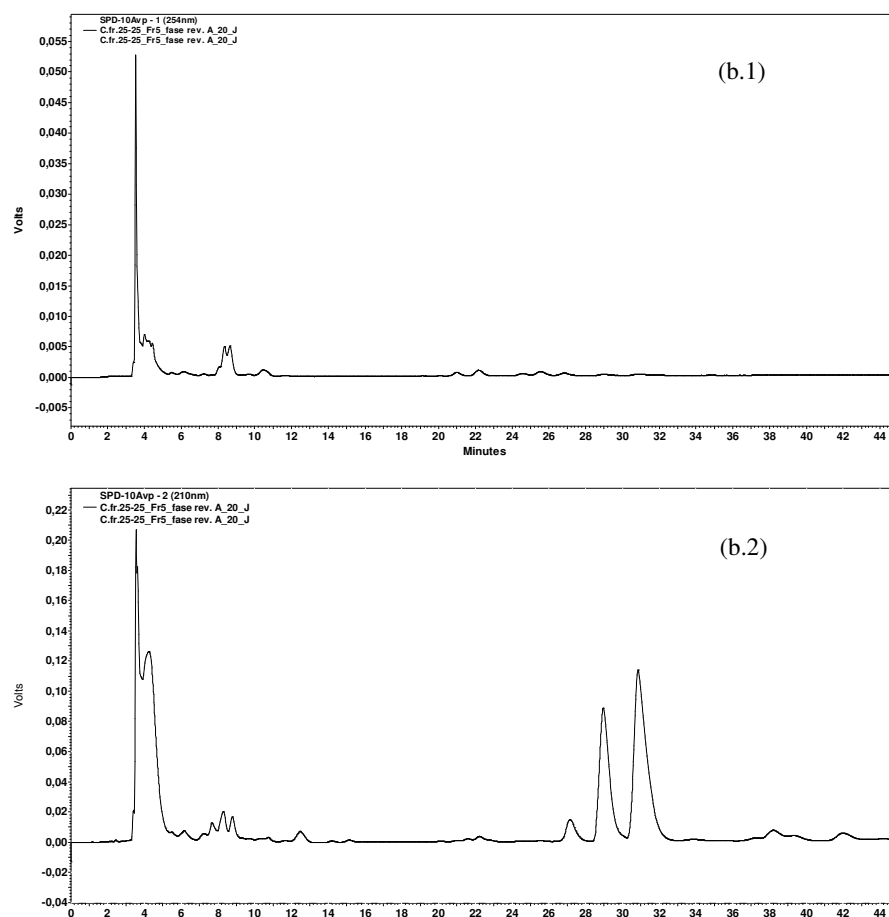


Figura 19: (a) Cromatograma da fração Fr5 solubilizada em ACN (100%), com volume de injeção de 50 μ L, (a.1) detecção em 254 nm; (a.2) detecção em 210 nm; (b) Cromatograma da fração Fr5 solubilizada em ACN/ i-PrOH (80:20), com volume de injeção de 20 μ L, (b.1) detecção em 254 nm. (b.2) detecção em 210 nm. Condições cromatográficas: Fase móvel ACN (100%) por 40 min. Utilizando coluna analítica (250 x 4,6 mm) da Shim pack PREP-ODS KIT (5 μ m).

Depois da obtenção do melhor método, foi realizada também a análise das outras frações que poderiam conter um bom perfil para isolamento. Sendo selecionadas as frações 4, 6, 7, por apresentarem uma maior massa. O perfil das frações com detecção em 210 nm, encontram-se na figura 20 (a) fração 4, (b) fração 6 e (c) fração 7.

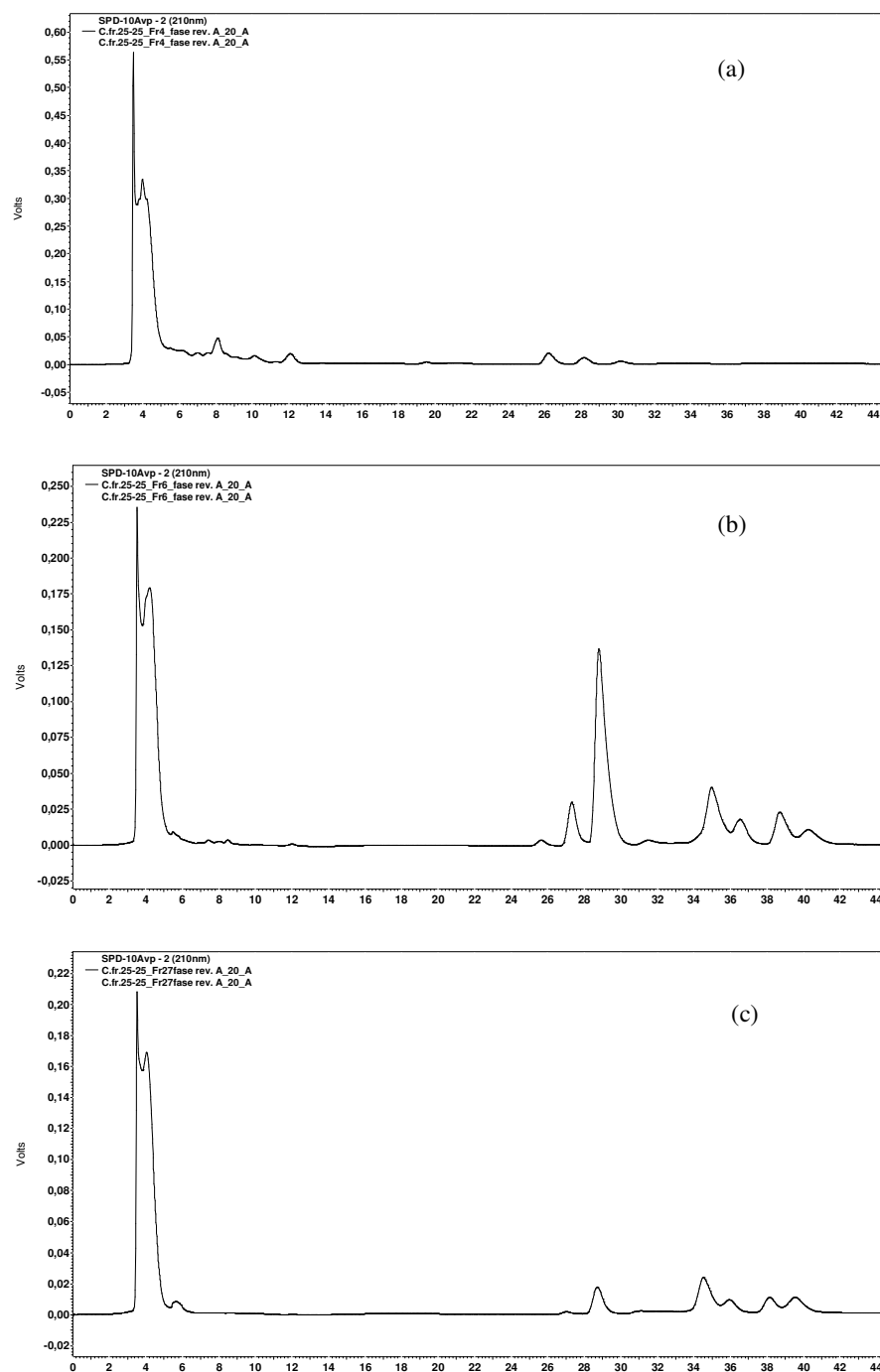


Figura 20: (a) Cromatogramas das fração Fr4; (b) fração 6; (c) fração 7; Condições cromatográficas: Fase móvel ACN (100%) por 40 min, utilizando coluna analítica, volume de injeção de 20 μ L e detecção em 210 nm.

Após obtenção do perfil das frações acima, foi realizado o isolamento com a fração 5 e com a fração 6. Da fração 5, foi possível isolar duas substâncias nomeada como **SUBST-1** e **SUBST-2**, estando em destaque com setas as bandas coletadas

durante a corrida. Da fração 6 foi feito isolamento de uma substância, **SUBST-3** também em destaque. Os cromatogramas das frações realizadas em coluna semi-preparativa encontram-se nas figuras 21 (fração 5) e 22 (fração 6).

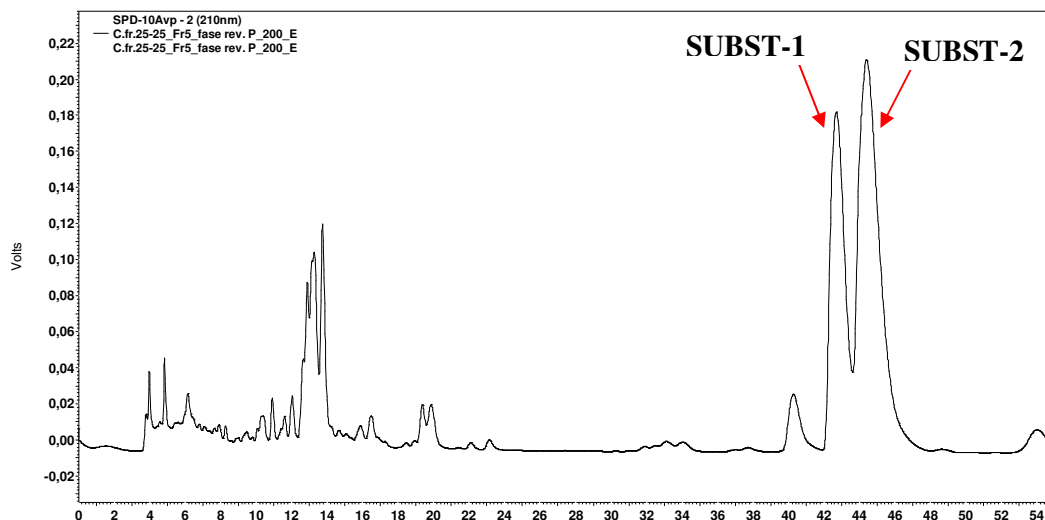


Figura 21: Cromatograma da fração 5, durante isolamento, com detecção em 210 nm. Fase móvel ACN (100%). Coluna semi-preparativa (250 x 20 mm) da Shim pack PREP-ODS KIT (5 μ m).

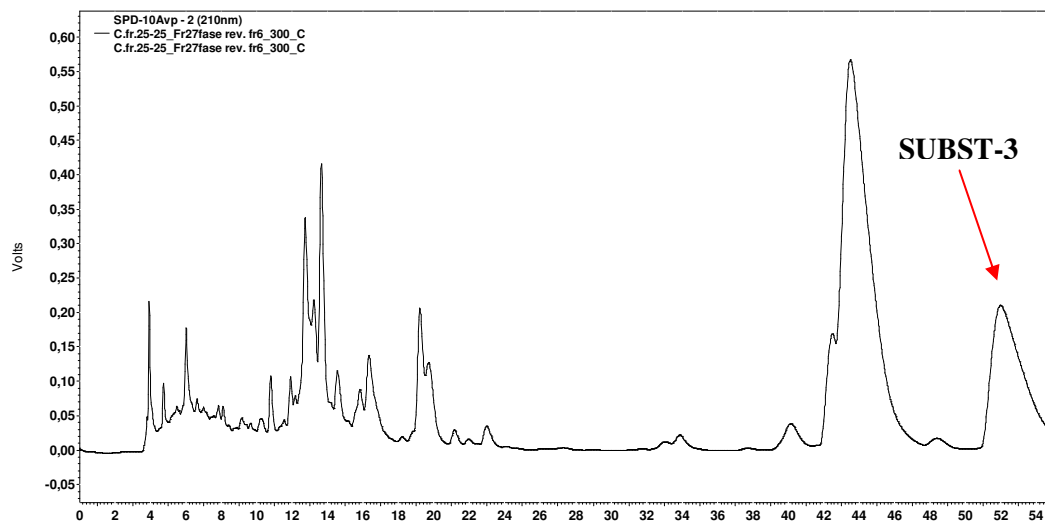


Figura 22: Cromatograma da fração 6, durante isolamento, com detecção em 210 nm. Fase móvel ACN (100%). Coluna semi-preparativa (250 x 20 mm) da Shim pack PREP-ODS KIT (5 μ m).

6.3. Análise de pureza das substâncias obtidas no CLAE semi-preparativo em modo reverso

A figura 23, mostra o cromatograma das análises de pureza dos picos coletados a partir do fracionamento mencionado para a fração 5 e fração 6, do item 6.2, onde tem-se que os dois primeiros picos refere-se as duas substâncias isoladas a partir da fração 5 nomeadas como (**SUBST-1** e **SUBST-2**), e o terceiro pico refere-se a substância **SUBST-3**, obtida a partir do isolamento com a fração 6. As identificações dessas substâncias estão descritas no item 6.5.

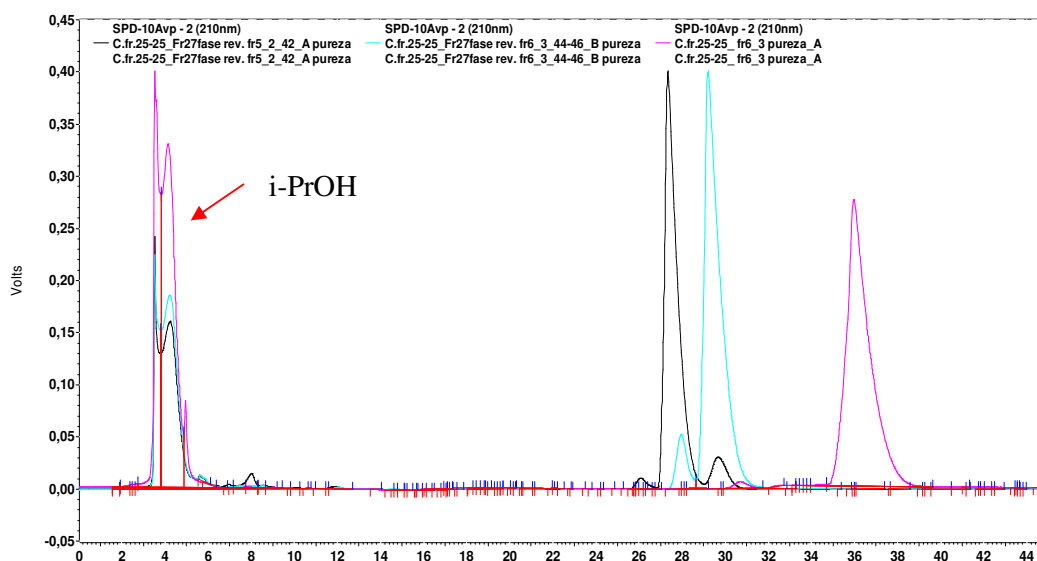


Figura 23: Cromatograma das substâncias isoladas por CLAE em modo reverso, com detecção em 210 nm. Legenda de cores: (----) SUBST-1; (---) SUBST-2; (---) SUBST-3.

Ao analisar o cromatograma (Figura 23), foi possível verificar que as substâncias oriundas da fração 5, não apresentaram-se totalmente puras. Onde a **SUBST-1** mostra absorção baixa de dois picos próximos e a **SUBST-2** mostrou absorção de resquícios da 1. No entanto, esses picos não prejudicaram na determinação da estrutura por análise de Ressonância Magnética Nuclear.

A substância **SUBST-3** isolada a partir da fração 6, apresentou uma pureza mais elevada comparada as duas substâncias anteriores, o que justifica a identificação da sua estrutura mesmo com a massa obtida.

6.4. Isolamento por CLAE semi-preparativo com fração F (Fr145-149 (Sob)) do extrato DCM (1ª coleta) da espécie *B. parinarioides* em fase normal

O melhor método de análise obtido foi utilizando como eluente hexano/MTBE na proporção (80:20), como mostra o cromatograma da figura 24, utilizando o fluxo de 0,08 mL/minuto. Porém, conforme o item 5.3.2 foi realizada a otimização do fluxo para 0,12 mL/minuto, figura 25.

Essa mudança melhorou o tempo de análise e a resolução dos picos, o que pode ser explicado pelo fato de o alargamento da banda estar diretamente relacionado a fatores de difusão. Dessa forma, com o aumento do fluxo a difusão tende a ser zero o que acarretaria uma diminuição do alargamento da banda (LANÇAS, 2009).

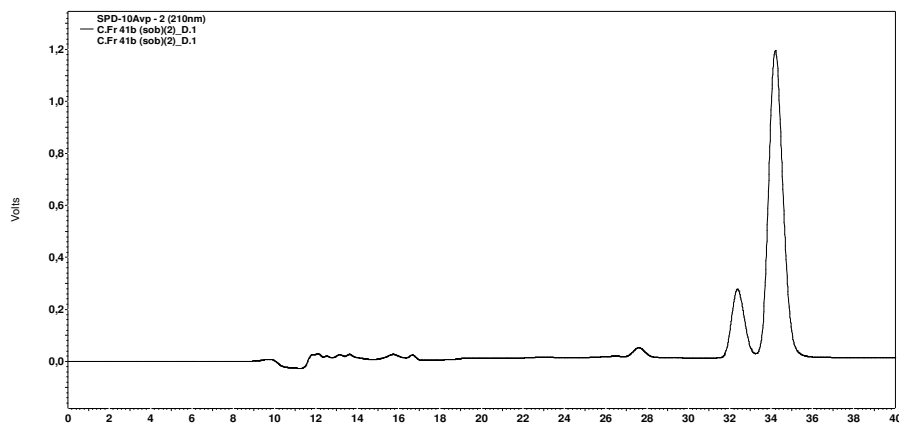


Figura 24: Cromatograma da fração F (Fr145-149 (Sob)) com fluxo de 0,08 mL/min. com detecção em 210 nm (coluna analítica 250 x 2,0 mm da Phenomenex Luna Si 5 μ m 100 Å).

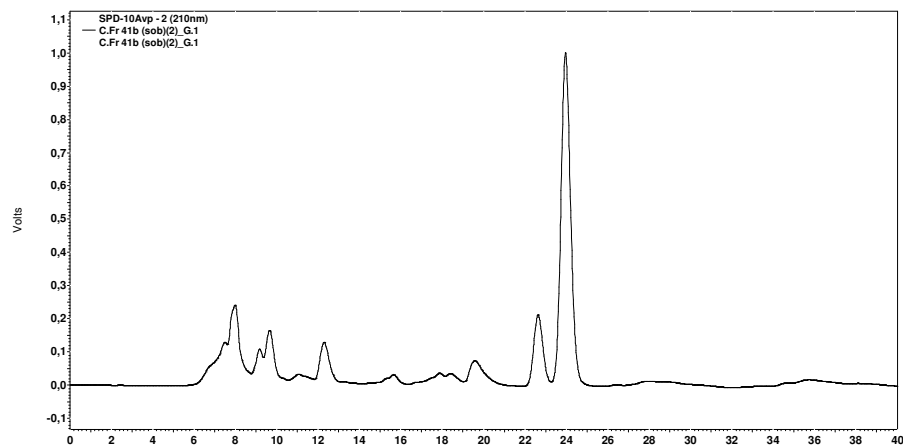


Figura 25: Cromatograma da fração F (Fr145-149 (Sob)) com fluxo de 0,12 mL/min. com detecção em 210 nm (coluna analítica 250 x 2,0 mm da Phenomenex Luna Si 5 μ m 100 Å).

Após obtenção do perfil da fração F (Fr145-149 (Sob)), foi realizado o isolamento de duas substâncias codificadas como **SUBST-4** e **SUBST-5** (Fluxograma 8). O cromatograma da análise da fração realizada em coluna semi-preparativa está apresentado na figura 26. Observa-se que houve uma boa reprodução do método desenvolvido em coluna analítica (figura 25) para coluna semi-preparativa.

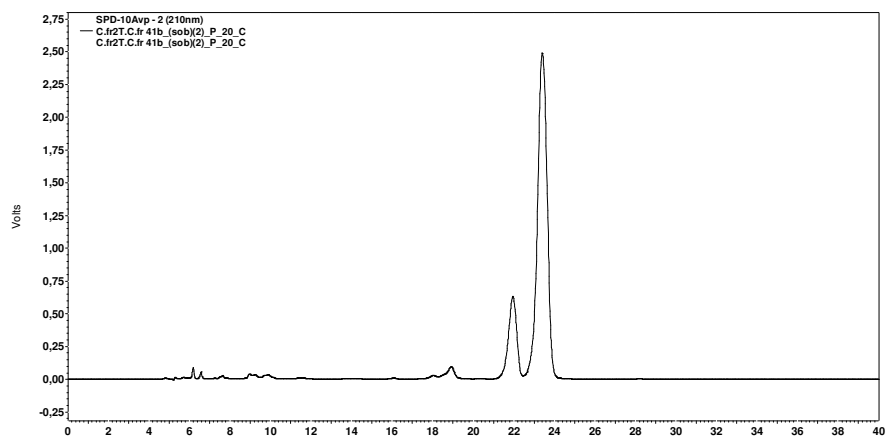


Figura 26: Cromatograma da fração F (Fr145-149 (Sob)) com fluxo de 3 mL/min. com detecção em 210 nm (coluna semi-preparativa 250 x 10 mm da Phenomenex Luna Si 5 μ m 100 Å).

6.4.1. Análise de pureza das substâncias obtidas no CLAE semi-preparativo em modo normal

Para verificar a pureza das substâncias foi utilizado o mesmo método do isolamento. Sendo a fase móvel Hex/MTBE (80:20), usando coluna analítica.

O cromatograma da análise de pureza dos picos coletados a partir do fracionamento mencionado para a fração F (Fr145-149 (Sob)) encontra-se na figura 27, onde se verifica que as substâncias com boa pureza no comprimento de onda analisado (210 nm).

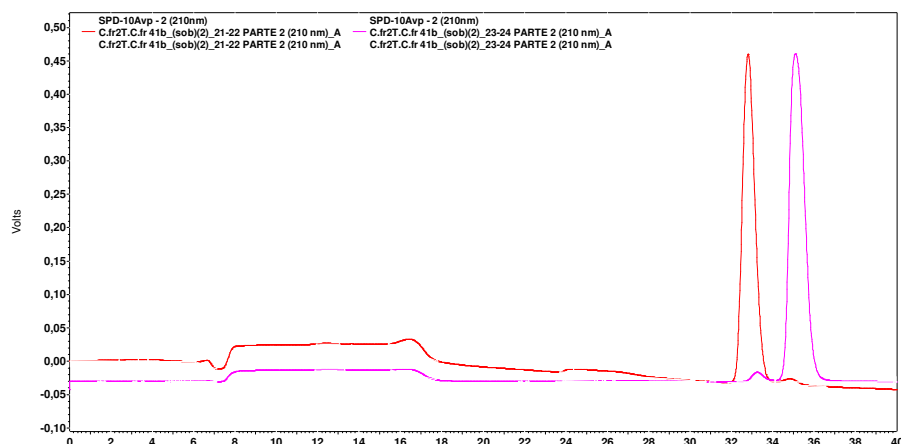


Figura 27: Cromatograma das substâncias isoladas por CLAE em modo normal, com fluxo de 0,08 mL/min e detecção em 210 nm. Legenda de cores: (---) SUBST-4; (---) SUBST-5.

6.5. Substâncias isoladas por CLAE semi-preparativo com frações do extrato DCM (1ª coleta) da espécie *B. parinarioides*

O estudo fitoquímico do extrato diclorometânico do látex do leite de amapá extraído de *Brosimum parinarioides* possibilitou o isolamento de cinco substâncias descritos a seguir, com indicação de suas estruturas, códigos, nomes, massa obtida, página com descrição do isolamento e página de discussão da identificação estrutural.

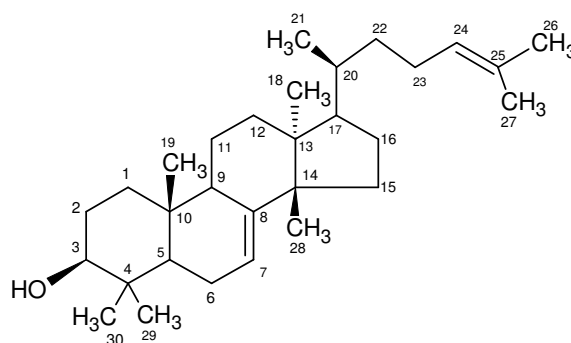
Código: **SUBST-1**

Nome: butirospermol

Massa: 6,5 mg

Isolamento: pág. 46

Identificação: pág. 71



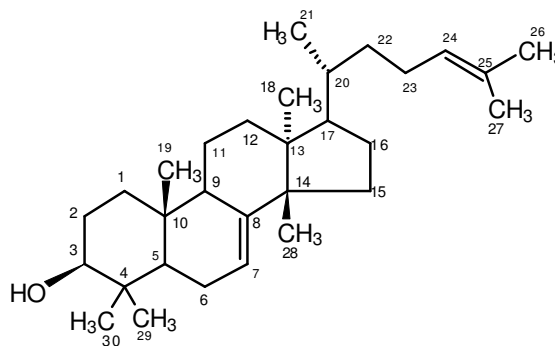
Código: **SUBST-2**

Nome: tirucalla-7,24-dien-3β-ol

Massa: 12,5 mg

Isolamento: pág. 46

Identificação: pág. 79



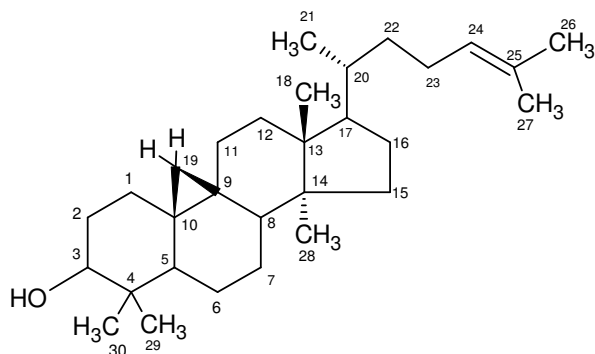
Código: **SUBST-3**

Nome: cicloartenol

Massa: 3,5 mg

Isolamento: pág. 46

Identificação: pág. 87



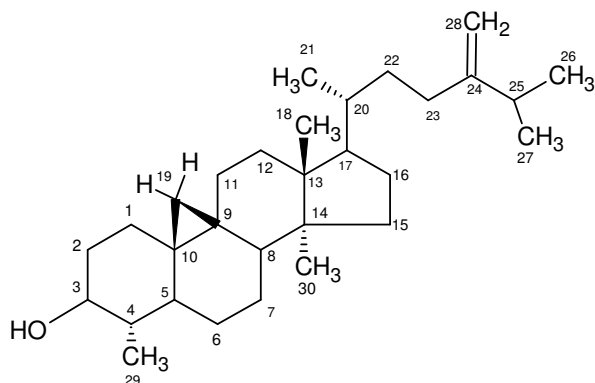
Código: **SUBST-4**

Nome: cicloeucalenol

Massa: 31,1 mg

Isolamento: pág. 48

Identificação: pág. 95



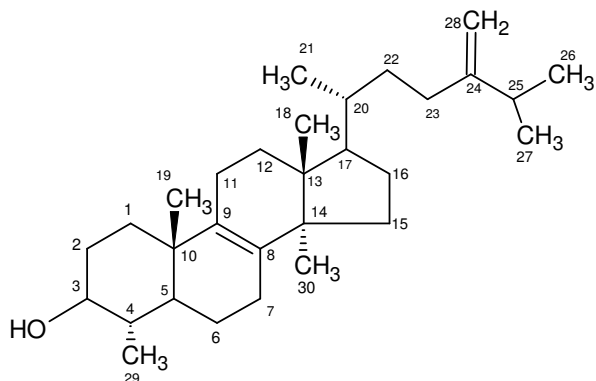
Código: **SUBST-5**

Nome: obtusifoliol

Massa: 26,0 mg

Isolamento: pág. 48

Identificação: pág. 104



Todos os espectros originais de Ressonância Magnética Nuclear das substâncias isoladas encontram-se no ANEXO -1 A (página 148), e as ampliações encontram-se no decorrer da discussão dos resultados para um melhor entendimento.

6.5.1. Identificação estrutural das substâncias isoladas por CLAE da espécie *Brosimum parinarioides*

6.5.1.1. SUBST-1

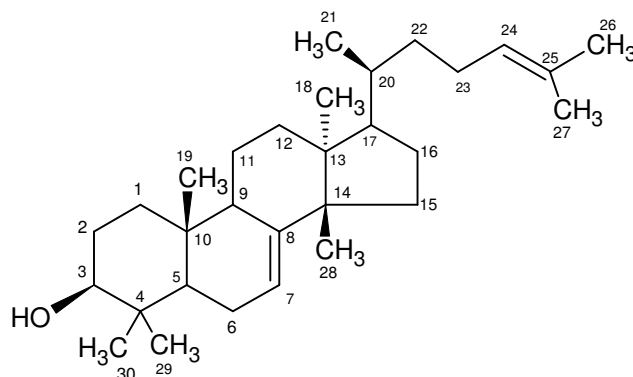


Figura 28: Estrutura da substância **SUBST-1** (butirospermol)

A substância codificada como **SUBST-1**, isolada por CLAE semi-preparativo (fluxograma 6) foi identificada através da análise dos espectros de RMN ^1H , RMN ^{13}C , HSQC, HMBC, DEPT 135 e por EM.

O espectro de RMN de ^1H em CDCl_3 da substância apresentou 5 sinais na forma de singletos na região de δ 0,744-0,970 (s) e um dubleto em 0,849 (3H, d, $J=6,5$ Hz) referentes a hidrogênios dos grupos metílicos. Os singletos em 1,604 (3H, s, H-26) e 1,682 (3H, s, H-27) revelam a presença de CH_3 ligados a carbono sp^2 (Figura 29). A desblindagem desses grupos metílicos pode ser explicada por dois fatores, efeito da eletronegatividade atribuída à ligação dupla e ao efeito de anisotropia diamagnética.

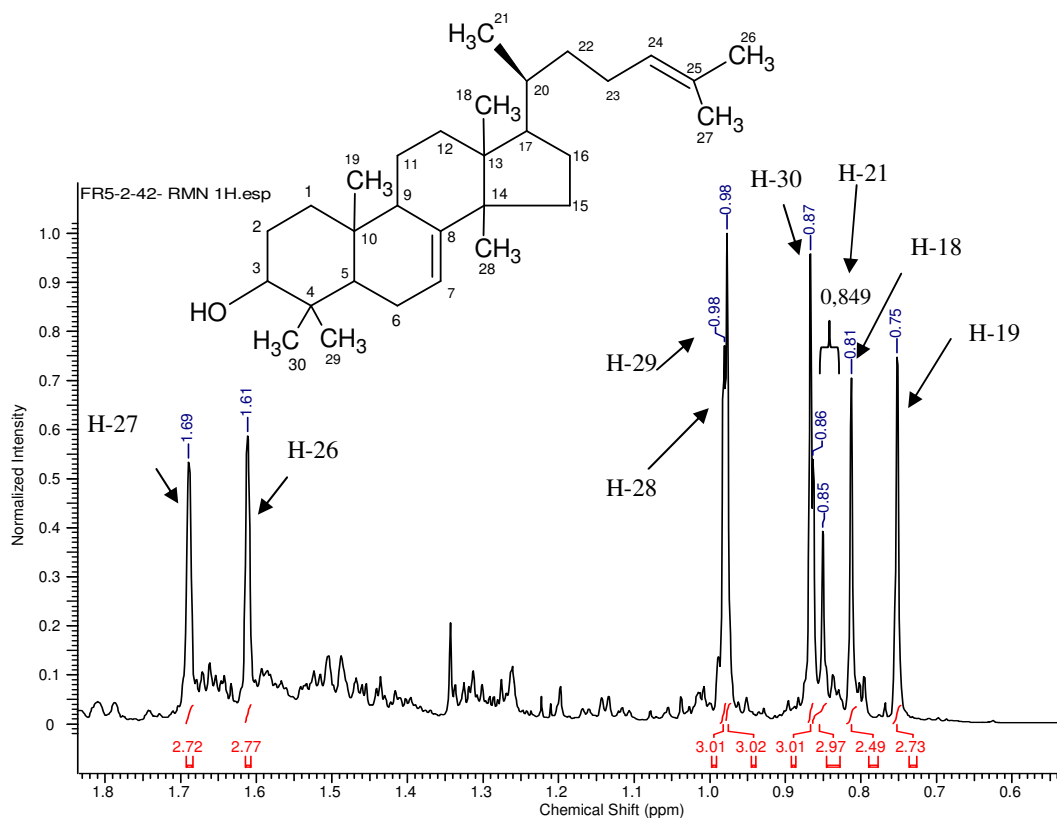


Figura 29: Ampliação do espectro de RMN ^1H , na região dos sinais referentes às metilas em singletos e dupletos 500 MHz para a SUBST-1.

Observaram-se também sinais em δ 5,253 (1H, dd, $J = 7,0; 3,0$ Hz,) e δ 5,102 (m, 1H) que são compatíveis com deslocamento químicos de hidrogênios olefínicos. Esses sinais são relativos às posições dos hidrogênios H-7 e H-24. A presença do sinal em 3,242 (1H, dd, $J = 11,5; 4,0$) refere-se ao H do carbono carbinólico metínico, na posição 3. A figura 30 mostra as ampliações dos espectros com a região dos sinais acima descritos, destacando os respectivos valores de integração e a posição na estrutura.

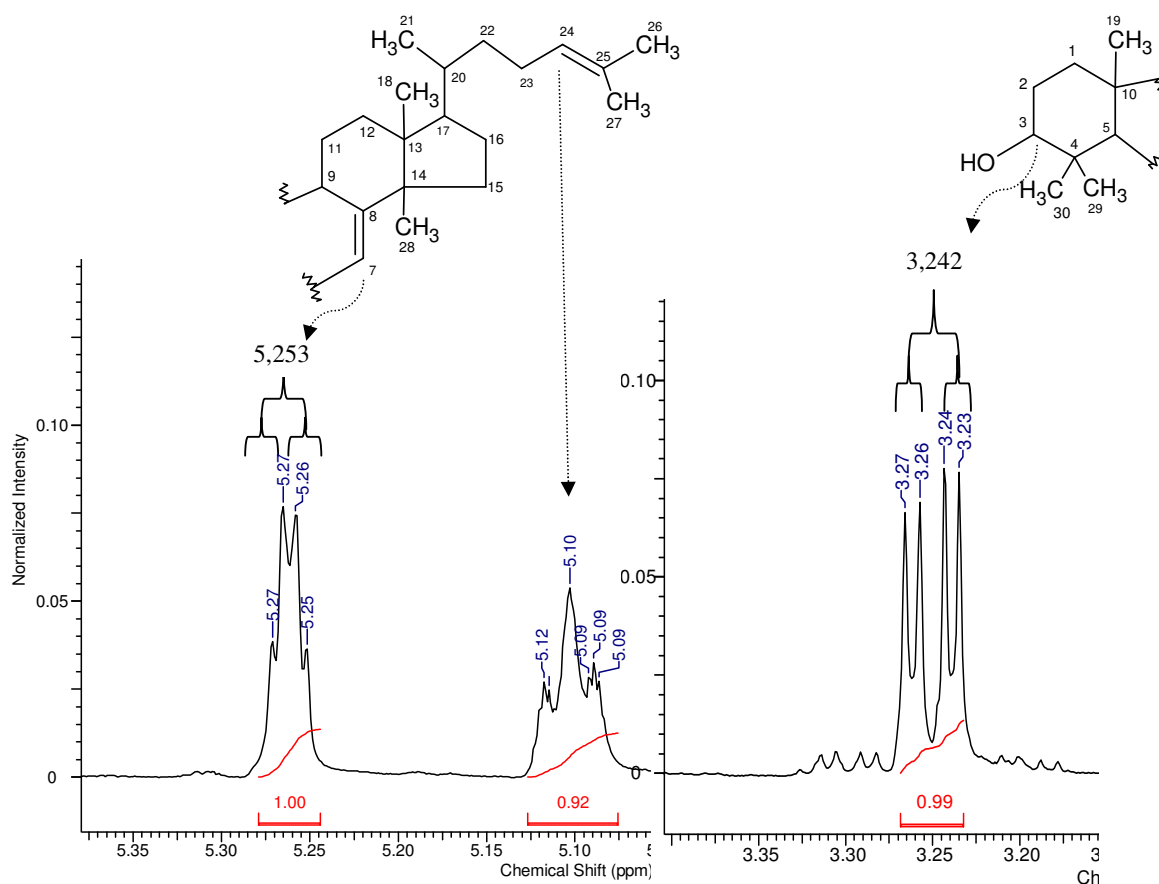


Figura 30: Ampliação da região dos hidrogênios olefínicos e hidrogênio do carbono carbinólico 500 MHz para a SUBST-1.

O espectro de RMN de ^{13}C mostrou a presença de sinais em δ 146,246 e δ 131,278 atribuídos aos carbonos quaternários C-8 e C-25 e δ 125,488 e δ 118,142 em C-7 e C-24 correspondentes às duplas ligações trissubstituídas. O sinal em δ 79,623 foi atribuído ao carbono carbinólico C-3 presente na estrutura (Figura 31). Esses sinais foram confirmados pela ausência (carbonos quaternários) ou presença dos carbonos metílicos (CH_3), metilênicos (CH_2) e metínicos (CH) na análise de DEPT 135 (Figura 32).

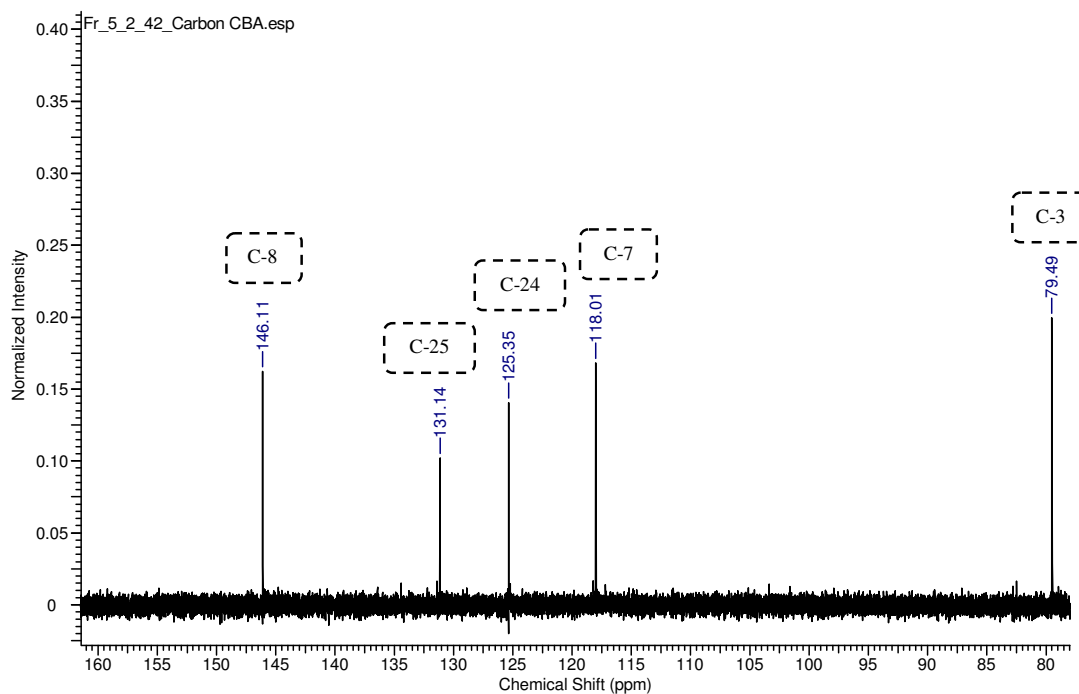


Figura 31: Ampliação do espectro de carbono na região de carbonos quaternários e CH para a SUBST-1.

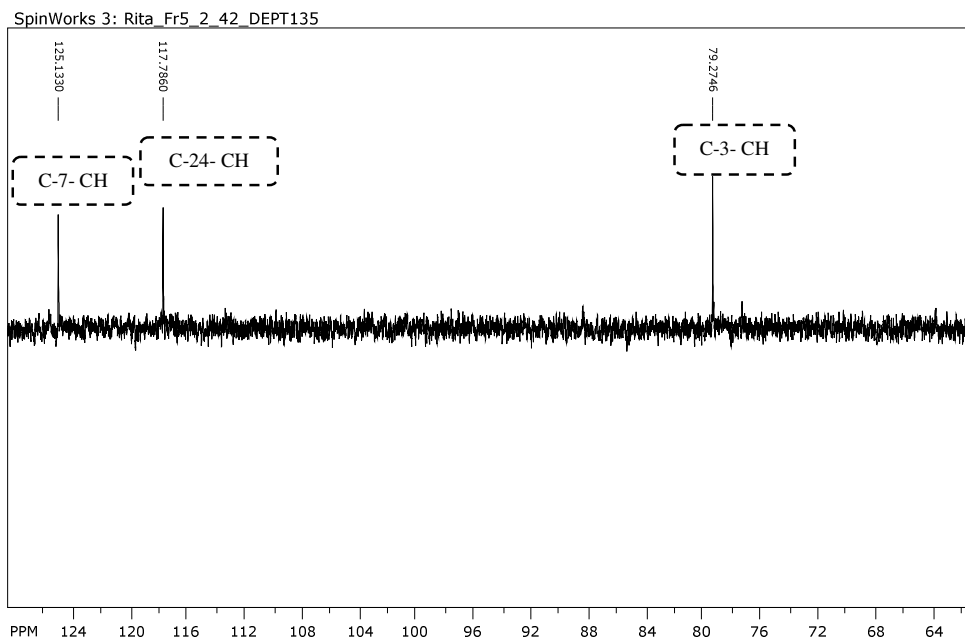


Figura 32: Ampliação do espectro de DEPT 135 na região de CH para a SUBST-1

O mapa de correlação de HSQC (ANEXO -1 A, página 151) possibilitou a definição das correlações dos hidrogênios ligados diretamente aos carbonos como

mostra a Tabela 3. Já a análise de HMBC (ANEXO -1 A, página 152), pôde ajudar de forma mais eficaz na confirmação da posição dos átomos pelas correlações entre carbonos e hidrogênios a duas ou três ligações (^2J e ^3J) que essas análises fornecem.

O mapa de contorno de HMBC mostrou correlação entre o sinal em δ 3,242 (1H, dd, $J=11,5$; 4,0) atribuído ao hidrogênio H-3 com os sinais em δ 27,957 e δ 15,074 conferidos aos carbonos C-29 e C-30 indicando a presença das duas metilas em singlete na posição 4 (Figura 33). O hidrogênio δ 5,253 (1H, dd, $J= 7,0$; 3,0 Hz, H-7), apresentou correlação com o carbono δ 49,275 (C-9). O hidrogênio com deslocamento em δ 5,102 (1H, m, H-24) correlacionou com os sinais em δ 25,709; δ 18,014 e δ 26,075 dos carbonos C-23, C-26 e C-27, confirmando assim a parte da estrutura (Figura 34).

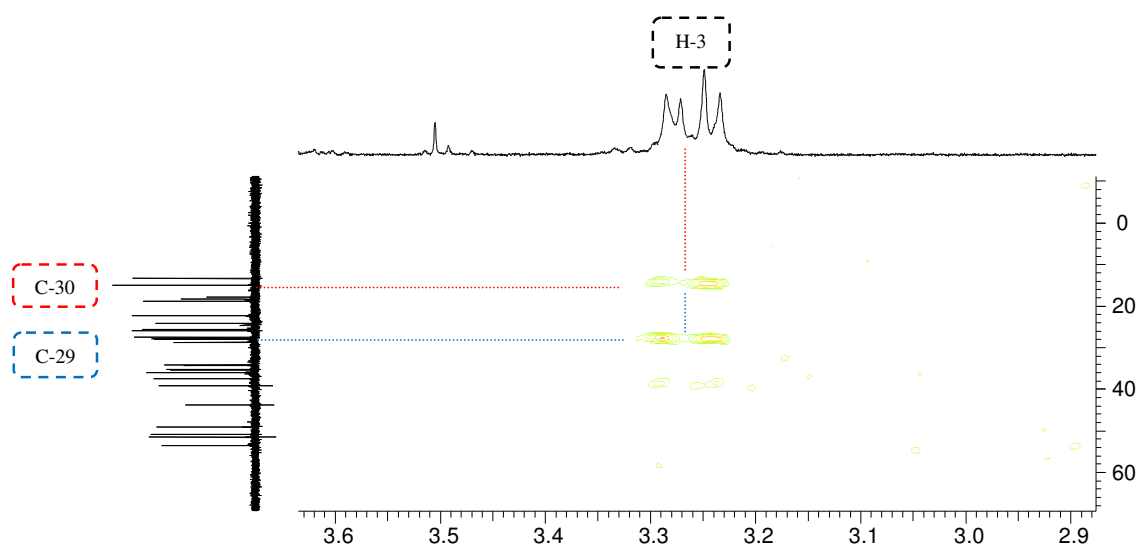


Figura 33: Ampliação do mapa de contorno HMBC, região H (2,9-3,6) para a SUBST-1

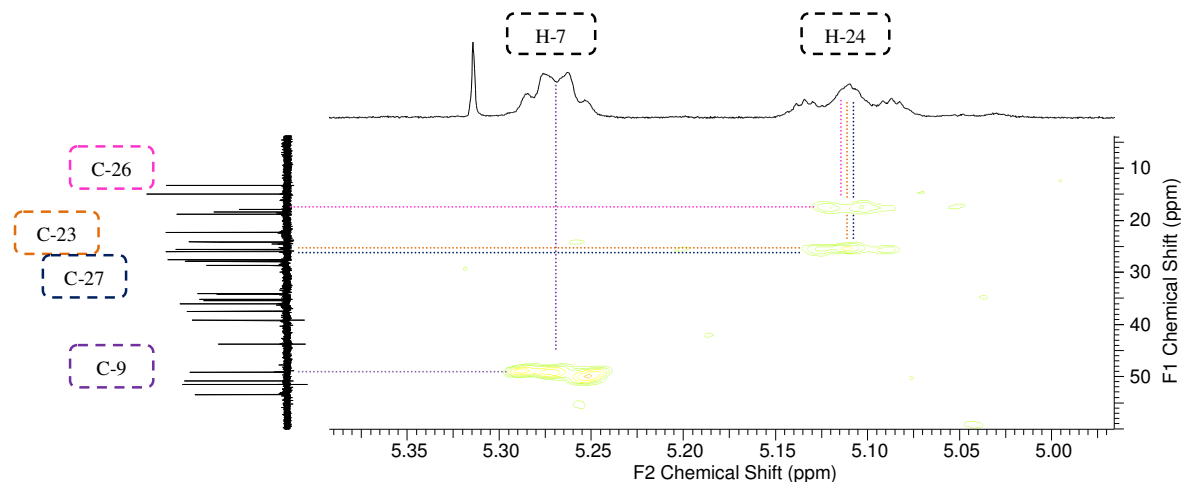


Figura 34: Ampliação do mapa de contorno HMBC, região H (5,0-5,35) da para a substância **SUBST-1**.

A posição das 8 metilas presentes na estrutura pôde ser atribuída pelas correlações com J_2 e J_3 obtidas no mapa de correlação HMBC (tabela 3). Como por exemplo, o sinal do hidrogênio da metila com δ 0,805 (3H, s, H-18) apresentou correlação com os carbonos em δ 34,179 (C-12), δ 43,891 (C-13) e 51,633 (C-14). O hidrogênio da metila com δ 0,744 (3H, s, H-19) correlacionou com os carbonos δ 37,559 (C-1); δ 50,992 (C-5) e δ 35,296 (C-10). O hidrogênio em δ 0,849 (3H, d, $J=6,5$ Hz, H-21) apresentou relação com os carbonos (C-17) δ 53,581 e (C-20) δ 36,142. Já os hidrogênios da metila 26 (δ 1,604, 3H, s) correlacionaram com os carbonos em δ 26,075 (C-27), δ 125,488 (C-24) e δ 131,278 (C-25). Os hidrogênios da metila 27 (δ 1,682, 3H, s) correlacionaram com os sinais de carbono δ 18,014 (C-26), δ 125,488 (C-24) e δ 131,278 (C-25). Os hidrogênios da metila com δ 0,970 (H-28) correlacionaram a ^3J com os carbonos em δ 146,246 (C-8) e δ 34,315 (C-15) e a J_2 com o carbono em δ 43,891 (C-13), já o outro hidrogênio com deslocamento também em 0,970 (3H, s, H-29) correlacionou com os sinais de carbono em δ 79,623 (C-3), δ 39,317 (C-4), δ 50,992 (C-5) e δ 15,074 (C-30) assim como os hidrogênios da metila (H-30, δ 0,860, 3H, s) correlacionaram com os sinais dos carbonos C-3, C-4, C-5 e C-29 com δ 79,623, δ 39,317, δ 50,992 e δ 27,957 respectivamente, conforme a figura 35.

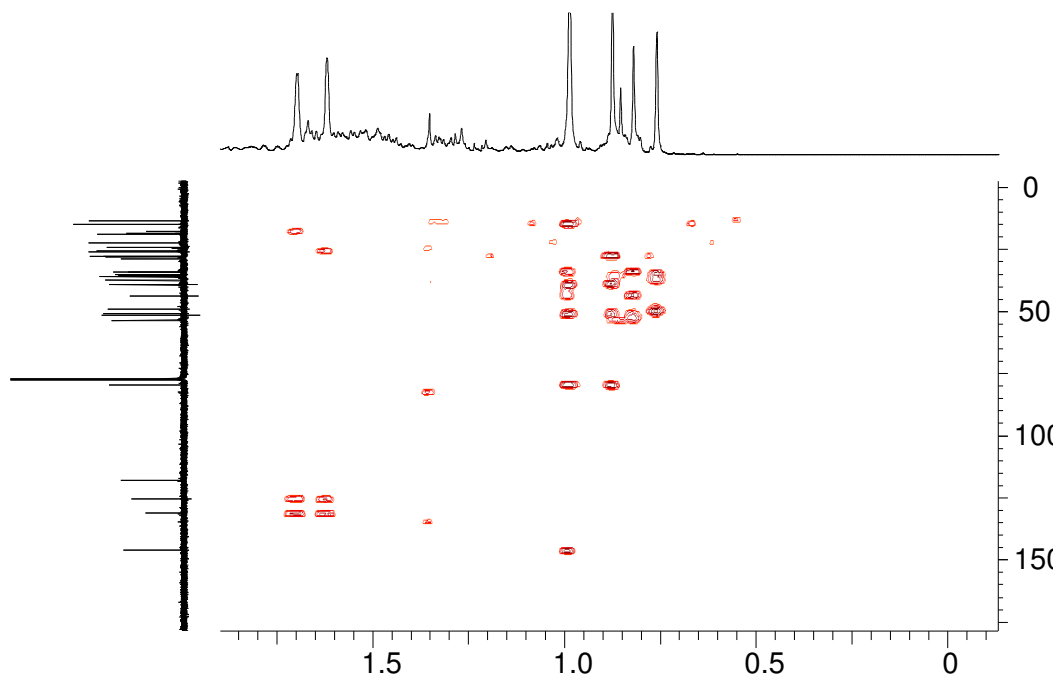


Figura 35: Ampliação do mapa de contorno HMBC, região H (0-1,8) para a substância BPL- SUBST-1.

Assim, a identificação da substância foi baseada nas informações obtidas com os espectros de RMN ^1H , RMN ^{13}C , DEPT 135 e os dados das correlações obtidos por HSQC e HMBC. Portanto, com todos esses dados aliados e comparados com dados obtidos na literatura (TERESA *et al.*, 1987, AKIHISA *et al.*, 2010; FERRAZ, 2011) pôde-se sugerir que a substância trata-se de um triterpeno tipo eufano, o butirospermol (Figura 28) e tabela 3.

Tabela 3: valores de deslocamentos para ^1H , ^{13}C , DEPT 135, HSQC e HMBC, para a **SUBST-1** (RMN ^1H , 500 MHz, RMN ^{13}C , 125 MHz, CDCl_3) em comparação com os dados da literatura TERESA *et al.*, 1987 (em CDCl_3 , com ausência dos dados do aparelho).

P	Lit. RMN ^{13}C (TERESA <i>et al.</i> , 1987)	$\delta^{13}\text{C}$ SUBST-1	$\delta^1\text{H}$ SUBST-1	Lit. RMN ^1H (TERESA <i>et al.</i> , 1987)	HMBC (H→C) (^2J - ^3J) SUBST-1
1	37,32	37,559	1,662 (1H)		
2	27,81	28,052	1,130(1H)		
3	79,32	79,623	1,647 (2H)		
4	39,03	39,317	3,242 (dd, $J=11,5$; 4,0)	3,26 (1H) (m)	C-29/C-30
5	50,77	50,992	-		
6	24,03	24,299	1,300 (1H)		
			2,146(1H)		
			1,983 (1H)		
7	117,88	118,142	5,253(dd, $J=7,0$; 3,0 Hz)		C-9
8	145,94	146,246	-		
9	49,05	49,275	2,190 (1H)		
10	35,04	35,296	-		
11	18,23	18,498	1,513 (2H)		
12	33,93	34,179	1,781 (1H)		
			1,624 (1H)		
13	43,65	43,891	-		
14	51,35	51,633	-		
15	34,05	34,315	1,459 (2H)		
16	28,49	28,807	1,261 (1H)		
			1,923 (1H)		
17	53,31	53,581	1,481 (1H)		
18	13,17*	22,427	0,805 (3H) (s)	0,81(1H) (s)	C-12/C-13/C-14
19	22,13*	13,451	0,744(3H) (s)	0,75 (3H) (s)	C-1/C-5/C-10
20	35,84	36,142	1,420 (1H)		
21	18,63	18,934	0,849(3H) (d, $J=6,5$ Hz)	0,84(3H) (d)	C-17/C-20
22	35,28	35,523	1,59 (2H)		
23	25,42	25,709	2,031 (1H)		
			1,864 (1H)		
24	125,22	125,488	5,102 (m)	5,10 (1H) (m)	C-23/ C-26/C-27
25	130,89	131,278	-		
26	17,70	18,014	1,604 (3H) (s)	1,60 (3H) (s)	C-27/C-24/C-25
27	25,73	26,075	1,682(3H) (s)	1,68 (3H) (d)	C-26/C-24/C-25
	27,67				
28		27,664	0,970(3H) (s)	0,97(3H) (s)	C-8/C-13/C-15
29	27,37	27,957	0,970(3H) (s)	0,97(3H) (s)	C-3/C-4/C-5/C-30
30	14,77	15,074	0,860(3H) (s)	0,86 (3H) (s)	C-3/C-4/C-5/C-29

P= posição; * posições trocadas de acordo com as correlações de HMBC, obtidas neste trabalho.

Para confirmação da estrutura da substância **SUBST-1** foi realizada a análise por LC-MS para obtenção do espectro de massas, conforme item 4.6.1. O espectro de massas obtido no modo positivo por ionização química à pressão atmosférica (APCI) mostrou o pico correspondente ao íon molecular em m/z 427,3913 (M^{+1}) (valor teórico m/z 427,3939) e um pico m/z 409,3845 ($M^{+1}-H_2O$) (valor teórico m/z 409,3834) proveniente da perda, a partir do pico do íon molecular, de uma molécula de água. O Espectro de massas encontra-se no ANEXO -2 C (página 188), juntamente com os cromatogramas obtidos por LC.

6.5.1.2. SUBST-2

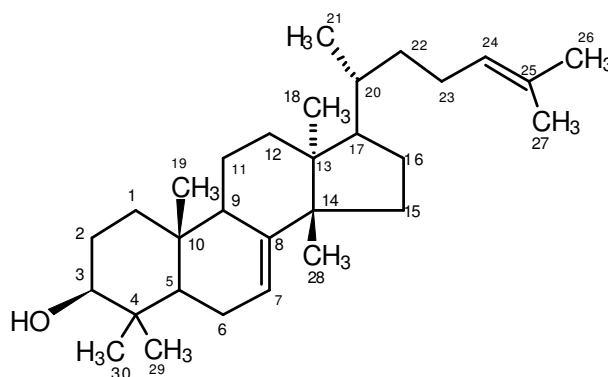


Figura 36: Estrutura da substância **SUBST-2** (tirucalla-7, 24-dien-3β-ol).

A substância **SUBST-2** também foi identificada através das análises de RMN ^1H , RMN ^{13}C , HSQC, HMBC, DEPT 135 e EM. Ao comparar os dados de RMN ^1H obtidos para a **SUBST-2** com os da **SUBST-1** verificou-se que as duas apresentaram uma grande semelhança, diferenciando apenas no deslocamento da metila da posição 21 que apresentou um valor mais desblindado de δ 0,883. Tais informações associadas às mesmas correlações obtidas por HMBC e a possibilidade de se obter uma substância com diferente configuração em comparação com dados da literatura (MORLACCHI *et al.*, 2009), permitiu sugerir que a **SUBST-2** trata-se epímero do butirospermol, conhecido por tirucalla-7,24-dien-3β-ol (figura 36).

O espectro de RMN de ^1H em $CDCl_3$ para a **SUBST-2**, apresentou sinais na forma de singletos referentes aos hidrogênios metílicos na região de δ 0,748-0,971 (s).

Apresentou também dois singletos em 1,603 (3H, s, H-26) e 1,683 (3H, s, H-27) mais desblindados por essas metilas estarem ligados a carbono olefínico (C-25).

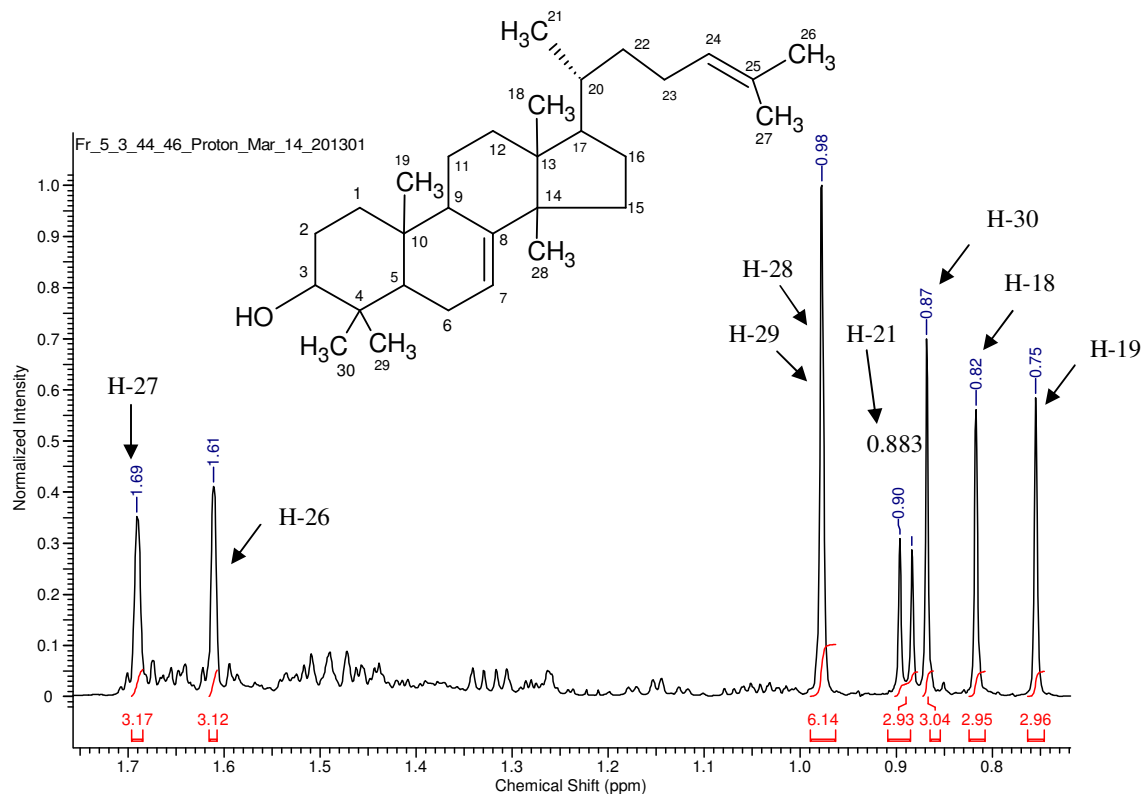


Figura 37: Ampliação do espectro de RMN ^1H , na região dos sinais referentes às metilas em singletos e dubletos 500 MHz para a SUBST-2.

O espectro de RMN ^1H também permitiu a visualização de sinais em δ 5,235 (H-7) e δ 5,093 (H-24), característicos de hidrogênios olefínicos e a presença do sinal em 3,242 (H-3) relativo ao hidrogênio carbinólico. A figura 38 mostra a ampliação dos espectros com a região dos sinais acima descritos, destacando os respectivos valores de integração e a posição na estrutura.

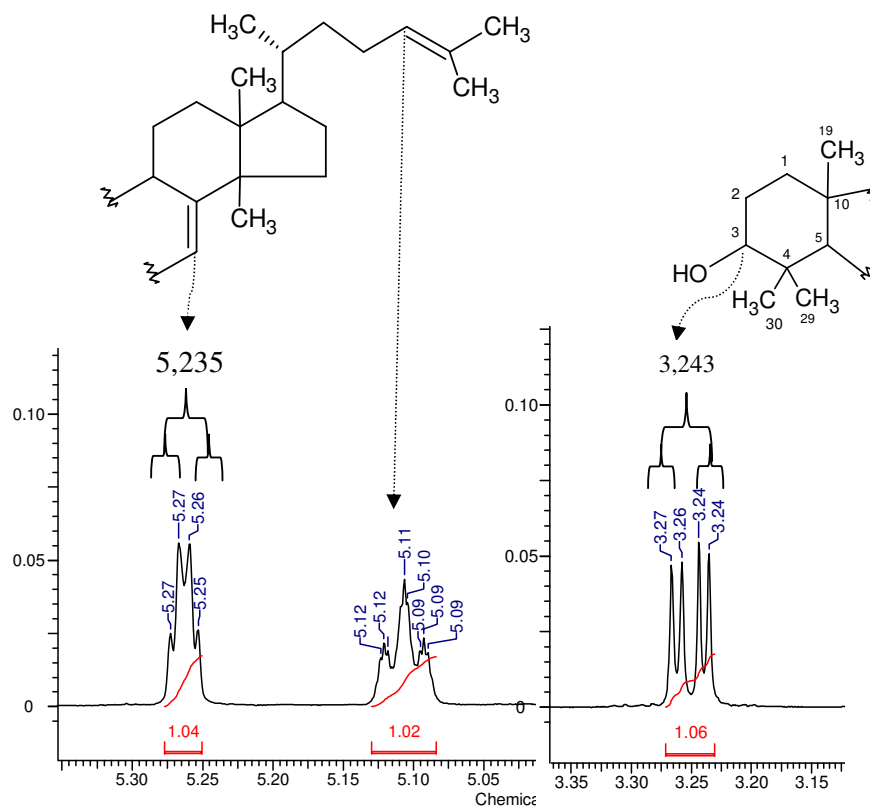


Figura 38: Ampliação da região dos hidrogênios olefínicos e hidrogênio do carbono carbinólico 500 MHz para a SUBST-2.

De acordo com o evidenciado nos espectros de RMN de ^{13}C e DEPT 135 para a SUBST-2 foram observados os mesmos sinais da SUBST-1, sinais esses referentes aos carbonos olefínicos em δ 146,249 e δ 131,264, atribuídos aos carbonos quaternários C-8 e C-25 e sinais em δ 125,573 e δ 118,157 dos carbonos C-7 e C-24, correspondentes às duplas ligações trissubstituídas. O sinal em δ 79,620 foi atribuído ao carbono carbinólico C-3 presente na estrutura (Figura 39). A figura 40 mostra a região ampliada dos carbonos olefínicos e carbono carbinólico no espectro de DEPT.

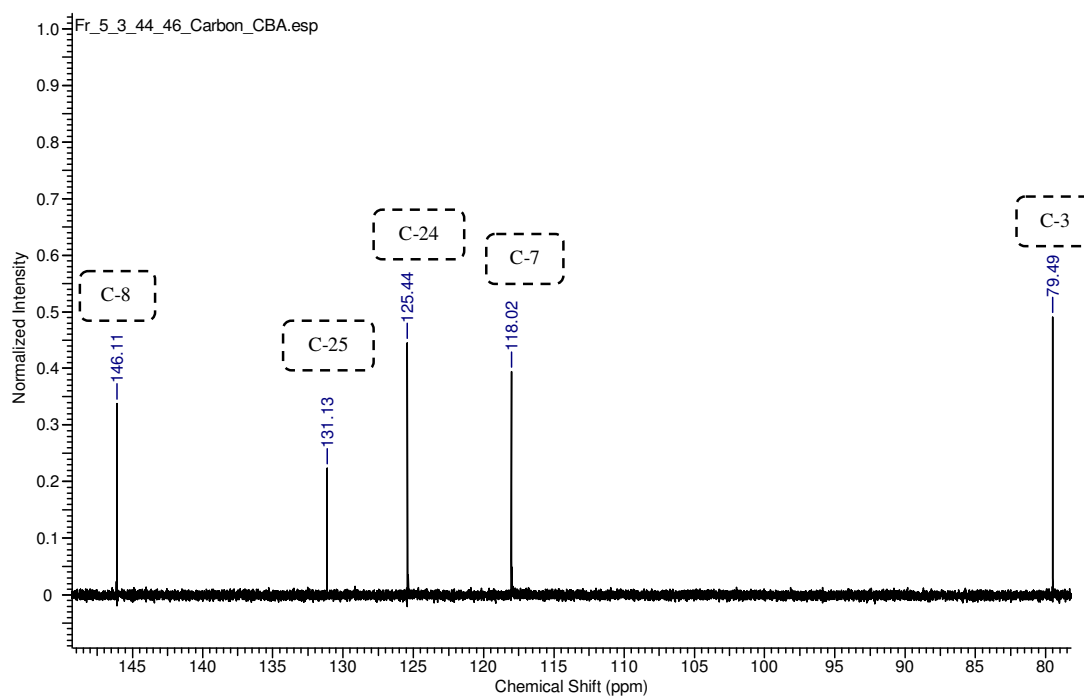


Figura 39: Ampliação do espectro de carbono na região de carbonos quaternários e CH para a SUBST-2.

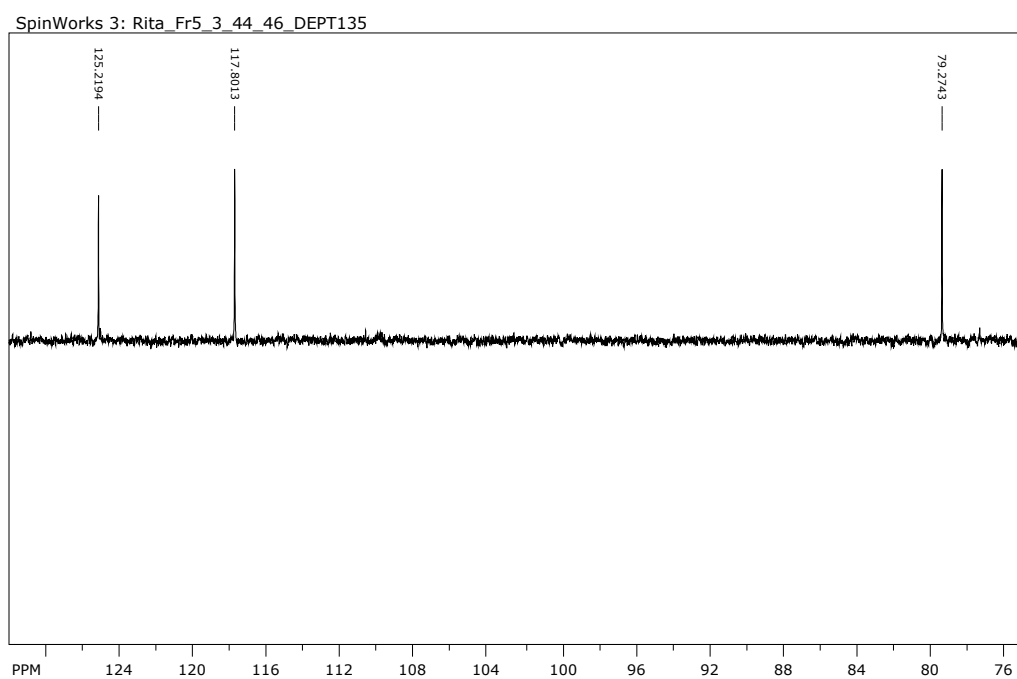


Figura 40: Ampliação do espectro de DEPT 135 na região de CH para a SUBST-2.

O mapa de correlação de HSQC (ANEXO -1 A, página 148) mostrou as correlações dos hidrogênios ligados diretamente aos carbonos como mostra a Tabela 4. A análise de HMBC para a **SUBST-2** mostrou praticamente as mesmas correlações observadas para a **SUBST-1**. Foi possível observar correlação do hidrogênio 3 com δ 3,243 (1H, dd, $J=11,0$; 4,25) com os carbonos C-29 e C-30 com sinais em δ 27,961 e δ 15,074 o que confirma a presença das duas metilas na posição 4 (Figura 41). O hidrogênio δ 5,235 (1H, dd, $J=6,5$; 3,0 Hz, H-7), apresentou correlação com o carbono C-9 com deslocamento em δ 49,322. O hidrogênio com deslocamento em δ 5,093 (1H, m, H-24) correlacionou com os sinais em δ 17,985 e δ 26,068 dos carbonos C-26 e C-27 (Figura 42).

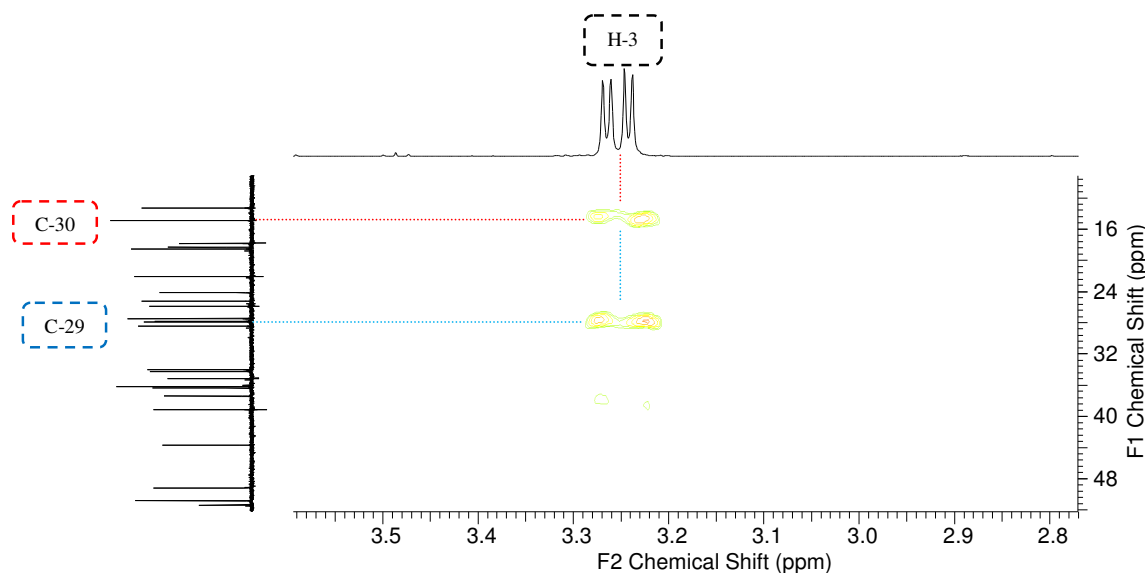


Figura 41: Ampliação do mapa de contorno HMBC, região H (2,8-3,6) para a **SUBST-2**.

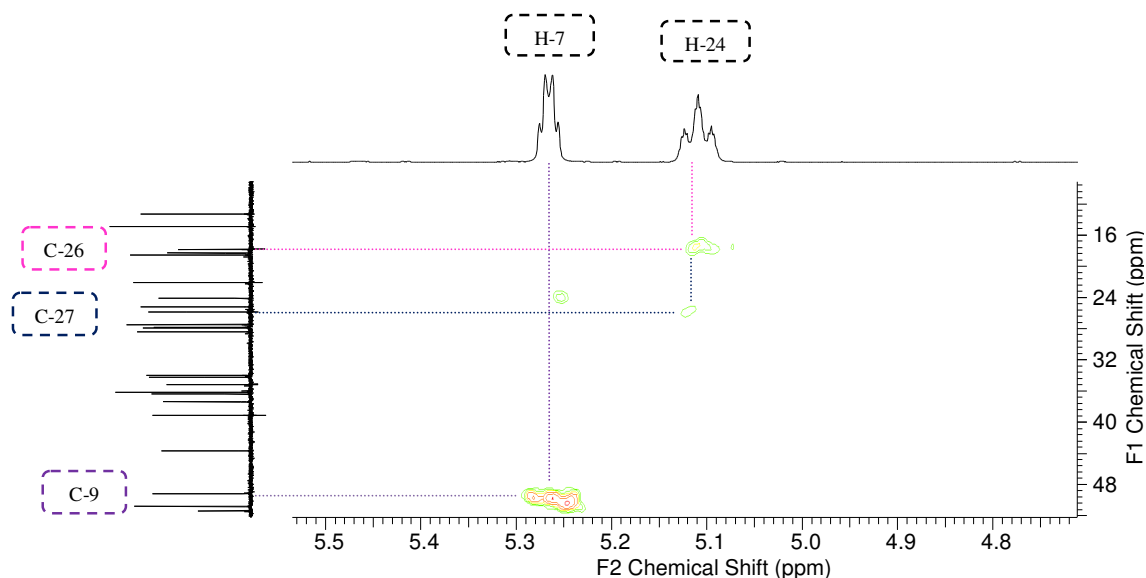


Figura 42: Ampliação do mapa de contorno HMBC, região H (4,7-5,5) para a **SUBST-2**.

A posição das 8 metilas presentes na estrutura foi confirmada pelas correlações a ^2J e ^3J obtidas pela análise por HMBC (tabela 4). O sinal do hidrogênio da metila com δ 0,810 (3H, s, H-18) apresentou correlação com os carbonos em δ 34,154 (C-12), δ 43,880 (C-13) e δ 51,505 (C-14). O hidrogênio da metila com δ 0,748 (3H, s, H-19) correlacionou com os carbonos δ 37,570 (C-1); δ 50,996 (C-5) e δ 35,293 (C-10).

O H-21 que aparece mais desblindado como mencionado anteriormente apresentou correlação com os carbonos (C-17) δ 53,307, (C-20) δ 36,545 e (C-22) δ 36,322, assim como a **SUBST-1**. A análise do mapa de correlação HMBC, também nos forneceu correlações referentes aos hidrogênios das metilas 26 (δ 1,603, 3H, s) e 27 (δ 1,683, 3H, s) com os sinais de carbono δ 26,068 (C-27) e δ 17,985 (C-26) respectivamente. E com os sinais de carbonos com δ 125,573 (C-24) e δ 131,264 (C-25). O hidrogênio da metila com δ 0,971 (H-28) correlacionou a ^3J com os carbonos em δ 146,249 (C-8) e δ 34,392 (C-15) e a ^2J com o carbono em δ 43,880 (C-13), já o outro hidrogênio com deslocamento também em 0,971 (3H, s, H-29) correlacionou com os sinais de carbono em δ 79,620 (C-3), δ 39,317 (C-4), δ 50,996 (C-5) e δ 15,074 (C-30) assim como o hidrogênio da metila (H-30, δ 0,861, 3H, s) correlacionou com os sinais dos carbonos C-3, C-4, C-5 e C-29 com δ 79,620, δ 39,317, δ 50,996 e δ 27,961 respectivamente, conforme a figura 43.

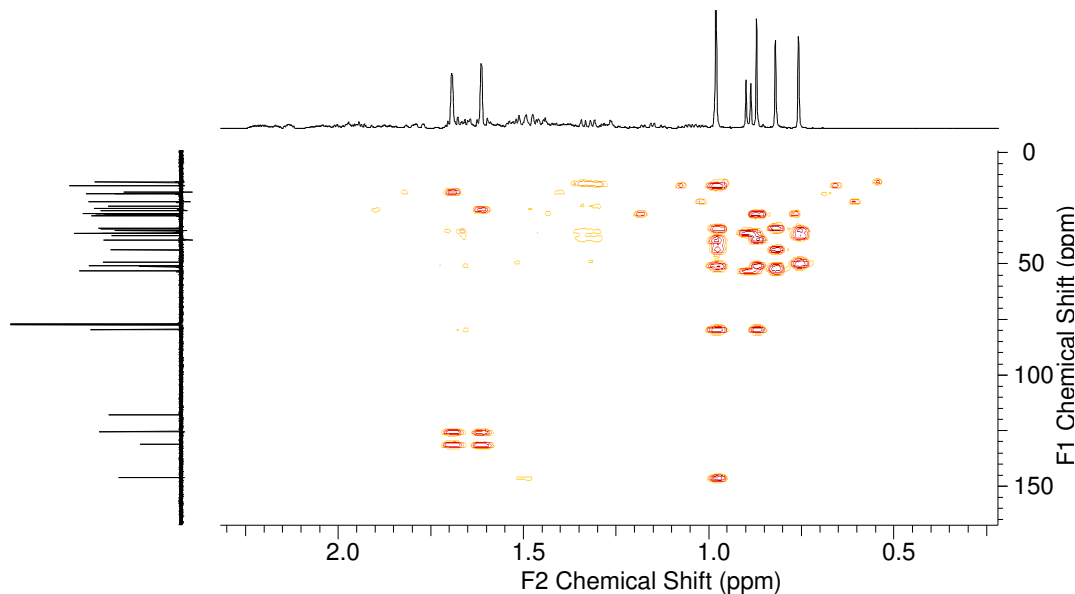


Figura 43: Ampliação do mapa de contorno HMBC, região H (0-2,0) para a SUBST-2.

Os dados obtidos para a SUBST-2 encontram-se na tabela 4.

Tabela 4: valores de deslocamentos para ¹H, ¹³C, DEPT 135, HSQC e HMBC, para SUBST-2. As análises de RMN ¹H foram obtidos em 500 MHz e de RMN ¹³C a 125 MHz, utilizando CDCl₃, em comparação com a literatura (MORLACCHI et al., 2009) em 800 MHz, CDCl₃.

P	Liter. ^δ ¹³ C (MORLACCHI et al., 2009)	^δ ¹³ C SUBST-2	^δ ¹ H SUBST-2	Liter. RMN ¹ H (MORLACCHI et al., 2009)	HMBC (H→C) (² J- ³ J) SUBST-2
1	32,7	37,57	1,146(1H) 1,659(1H)	1,143 (td, J=13,3; 4,0 Hz) 1,681 (dt, J=13,0; 3,5 Hz)	C-29/C-30
2	27,7	28,06	1,579 (2H)	1,598 (dddd, J=13,9; 13;11,8; 3,7 Hz)	
3	79,3	79,62	3,243 (dd, J=11,0; 4,25)	3,245 (ddd, J= 11,6; 5,7; 4,0 Hz)	
4	39	39,317	-		
5	50,6	50,996	1,315 (1H)	1,317 (dd, J=12,1;5,6 Hz)	
6	23,9	24,302	2,130(1H) 1,976 (1H)	2,139 (dddd, J=17,8;12,1; 2,9; 1,1 Hz) 1,964 (dddd, J= 17,8; 12,1; 2,9; 1,1 Hz)	
7	117,8	118,157	5,235 (dd, J=6,5; 3,0 Hz)	5,256 (dt, J= 4,3; 2,9 Hz)	C-9
8	145,9	146,249	-		
9	48,9	49,322	2,201 (1H)	2,203 (dtq, J= 13,4; 3,7; 2,8 Hz)	
10	34,9	35,293	-		
11	18,1	18,483	1,517 (2H)	1,526 (m)	
12	33,8	34,154	1,781 (1H) 1,633 (1H)	1,782 (ddl, J= 14,2; 9,9 Hz) 1,619 (ddd, J= 12,4; 10,3; 8,8 Hz)	
13	43,5	43,88	-	-	

14	51,1	51,505	-	-	
15	34	34,392	1,450 (2H)	1,490 (m)	
16	28,2	28,569	1,273 (1H)	1,265 (dddd, J=13,7; 11; 8,3; 2,5 Hz)	
			1,934 (1H)	1,939 (dtd, 13,6; 9,4; 7,3 Hz)	
17	52,9	53,307	1,474 (1H)	1,472 (ql; J= 9 Hz)	
18	21,9	22,255	0,810 (s)	0,809 (d, J= 0,7 Hz)	C-12/C-13/C-14
19	13,1	13,466	0,748 (s)	0,747 (d, J= 0,8 Hz)	C-1/C-5/C-10
20	36,2	36,545	1,387 (1H)	1,372 (tdq, J= 9,1; 6,5; 2,7 Hz)	
21	18,3	18,685	0,883 (d) (J=6,5 Hz)	0,882 (d, J= 6,4 Hz)	C-20/C-22
22	36	36,322	1,413 (1H)	1,433 (dddd, J= 13,7; 10; 8,9; 5 Hz)	
			1,045 (1H)	1,033 (dddd, 13,7; 10; 8,9; 5,0 Hz)	
23	25	25,372	2,032 (1H)	2,039 (m)	
			1,865 (1H)	1,859 (dq, J= 14,8)	
24	125,2	125,573	5,093 (m)	5,099 t de sept (J= 7,1; 1,4 Hz)	C-26/C-27
25	130,9	131,264	-	-	
26	25,7	17,985	1,603 (s)	1,684 (J= qd 14,8)	C-24/C-25/C-27
27	17,6	26,068	1,683 (s)	1,604 (m)	C-24/C-25/C-26
28	27,26	27,664	0,971 (s)	0,968 (d, J=1,2)	C-8/C-13/C-15
29	27,6	27,961	0,971 (s)	0,971 (d, J=0,4 Hz)	C-3/C-4/C-5/C-30
30	14,72	15,074	0,861 (s)	0,861 (s)	C-3/C-4/C-5/C-29

P= posição *posição pode estar trocada.

O espectro de massas para a **SUBST-2** apresentou o pico correspondente ao íon molecular em m/z 427,3918 (M^{+1}), (valor teórico m/z 427,3939) e um pico com m/z 409,3857 ($M^{+1}-H_2O$), (valor teórico m/z 409,3834) proveniente da perda, de uma molécula de água, a partir do íon molecular. O Espectro de massas encontra-se no ANEXO -2 C (página 148).

6.5.1.3. SUBST-3

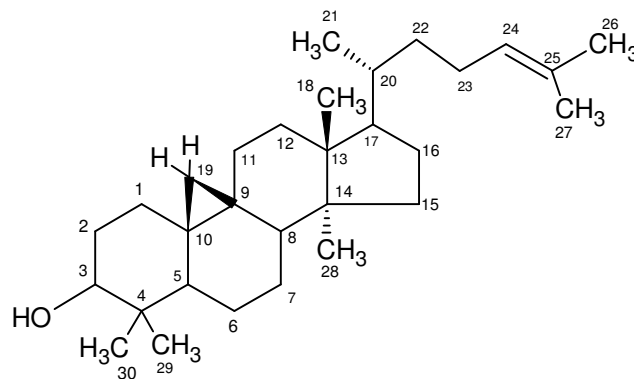


Figura 44: Estrutura da substância **SUBST-3 (cicloartenol)**.

A substância codificada como **SUBST-3** teve sua identificação estrutural realizada através de dados de espectro de RMN¹H, RMN¹³C, HSQC, HMBC, em comparação com os dados disponíveis na literatura (TERESA *et al.*, 1987; KHUONG *et al.*, 1975), que sugeriu tratar de um triterpeno tipo cicloartano, o cicloartenol (Figura 44). Os deslocamentos químicos estão listados na tabela 5.

O espectro de RMN ¹H apresentou um dubleto em δ 0,886 (1H, d, $J=7,0$ Hz, H-21) e cinco singletos em δ 0,970 (6H), δ 0,893 (3H), δ 0,811 (3H), δ 1,685 (3H) e δ 1,606 (3H), atribuídos aos hidrogênios de grupos metílicos (Figura 45). Apresentou também sinais de dois dubletos blindados, em δ 0,331 (1H, d, $J=4,0$ Hz, H-19) e δ 0,558 (1H, d, $J=4,5$ Hz, H-19), característicos de hidrogênios metilênicos de ciclopropano (Figura 46).

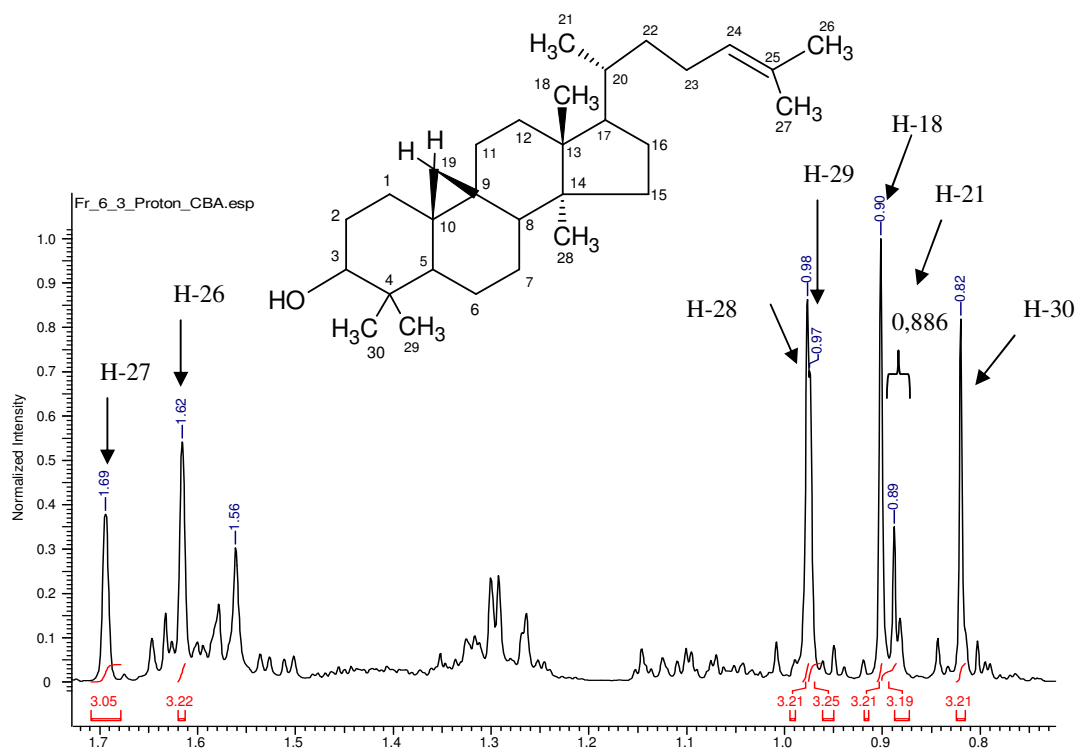


Figura 45: Ampliação do espectro de RMN ^1H , na região dos sinais referentes às metilas em singletos e dubletos 500 MHz para a SUBST-3.

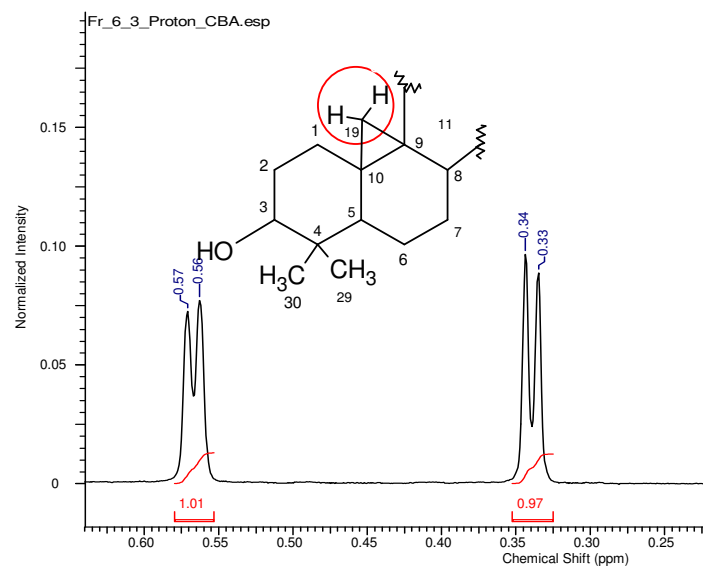


Figura 46: Ampliação do espectro de RMN ^1H , na região dos sinais referentes aos hidrogênios metilênicos do ciclopropano, em 500 MHz para a SUBST-3.

Observou-se sinal referente a um duplo dubleto, não muito resolvido com deslocamento em δ 3,294 (1H, dd, $J=11,5, 4,25$ Hz) referente ao hidrogênio H-3 em carbono carbinólico. A constante de acoplamento para este sinal sugeriu a posição β para a hidroxila, assim o H-3 apresentou configuração α -axial (OH- β -equatorial) conforme descrito por Silva *et al.*, 2005. O sinal em δ 5,102 (m) é relativo ao hidrogênio olefínico em H-24. A figura 47 mostra a região ampliada do espectro para esses sinais.

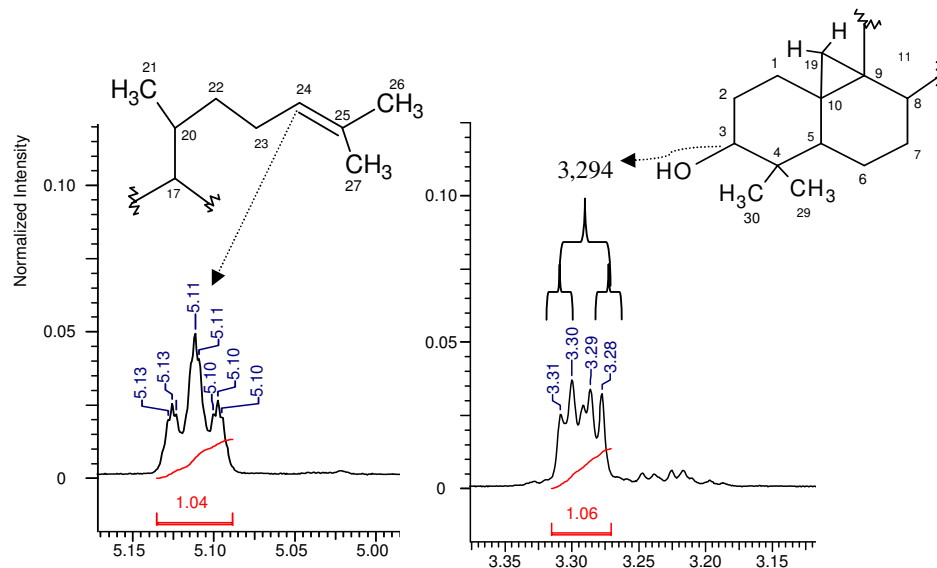


Figura 47: Ampliação da região dos hidrogênios olefínicos e hidrogênio do carbono carbinólico 500 MHz para a SUBST-3.

O espectro de RMN ^{13}C apresentou trinta sinais, entre eles de um carbono carbinólico com δ 79,209 (C-3) e dois sinais em δ 131,242 (C-25) e δ 125,624 (C-24) referentes aos carbonos olefínicos (Figura 48).

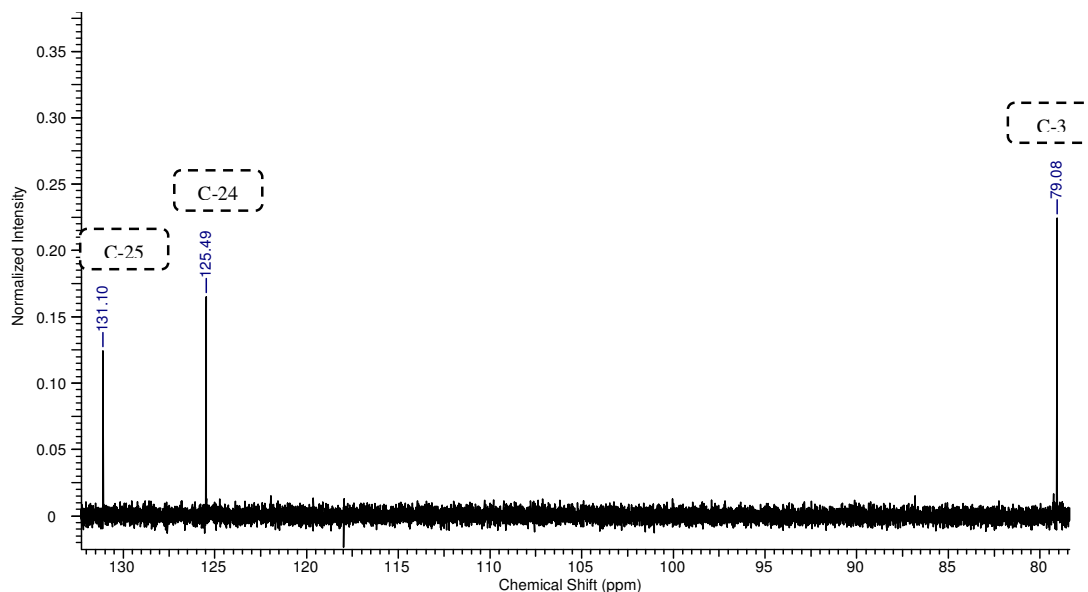


Figura 48: Ampliação do espectro de carbono na região de carbonos quaternários e carbono carbinólico para a **SUBST-3**.

Pelo mapa de correlação HSQC (ANEXO -1 A, página 156), pode-se atribuir os hidrogênios ligados diretamente aos carbonos (^1J), tendo como ponto principal os hidrogênios ligados aos carbonos metílicos e ainda os dois hidrogênios em dubletos ligado ao carbono metilênico do anel ciclopropano H-19, Figura 49.

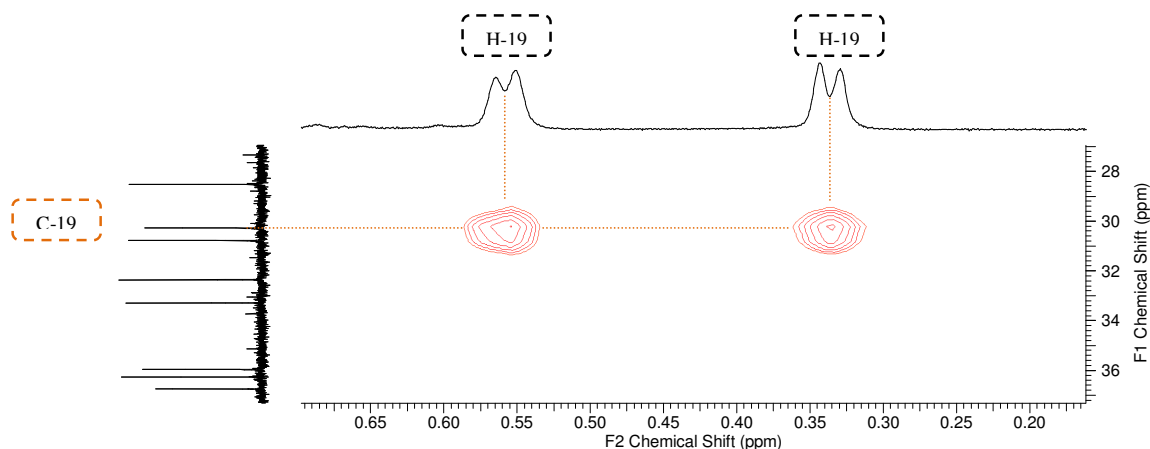


Figura 49: Ampliação do mapa de contorno HMBC, região H (0,1- 0,65) para a **SUBST-3**.

O espectro de RMN ^{13}C para a **SUBST-3**, já havia mostrado a presença de dois carbonos olefínicos com deslocamentos bem parecidos com os encontrados para a substância **SUBST-1** e **SUBST-2**, o que sugeria a posição da dupla ligação no carbono 24. Essa possibilidade foi confirmada pelos dados obtidos no mapa de contorno de

HMBC (ANEXO -1 A, página 157) que apresentou praticamente as mesmas correlações. O sinal do hidrogênio em δ 5,102 (H-24, m) correlacionou com os carbonos δ 26,368 (C-26) e δ 17,985 (C-27) (Figura 50). Verificou-se também que o hidrogênio carbinólico H-3 com δ 3,294 (1H, dd, $J=11,5$, 4,25 Hz) apresentou correlação com o sinal em δ 14,352 correspondente ao carbono metílico C-30 indicando assim a presença da metila na posição 4 (Figura 51). Assim como a posição da metila 29 no carbono 4 foi confirmada pela correlação entre o hidrogênio (H-30, δ 0,810, s) com o carbono em δ 26,068 (C-29) correspondente a essa metila. A figura 52 mostra a correlação confirmando a posição da metila C-29 no carbono (C-4).

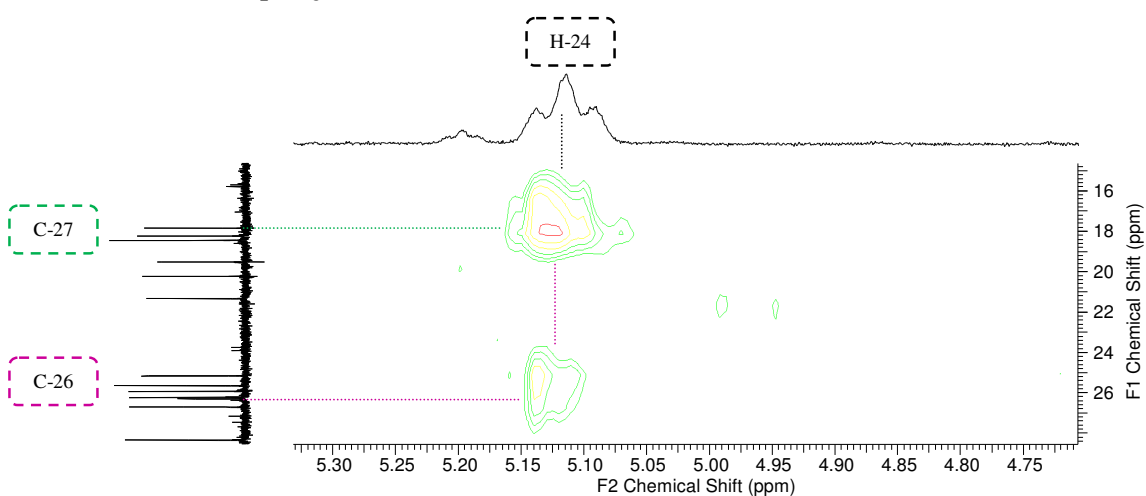


Figura 50: Ampliação do mapa de contorno HMBC, região H (4,75-5,30) para a SUBST-3.

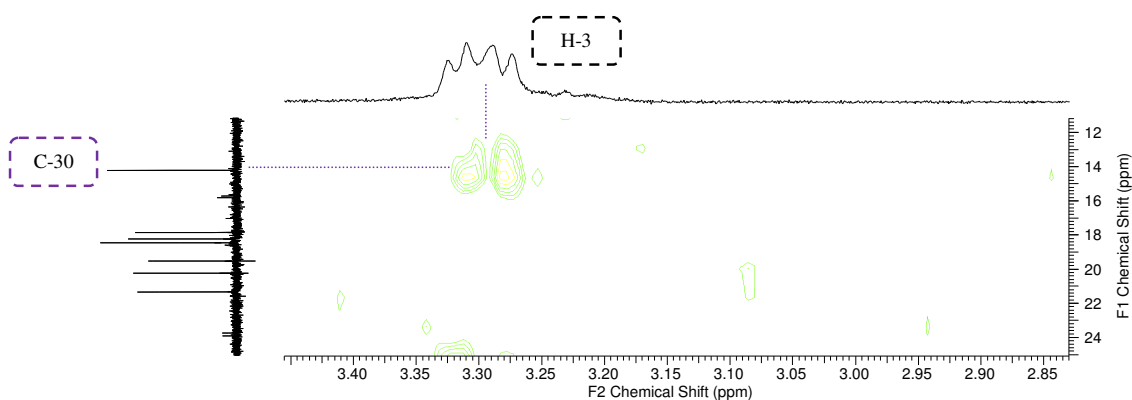


Figura 51: Ampliação do mapa de contorno HMBC, região H (2,85-3,40) para a SUBST-3.

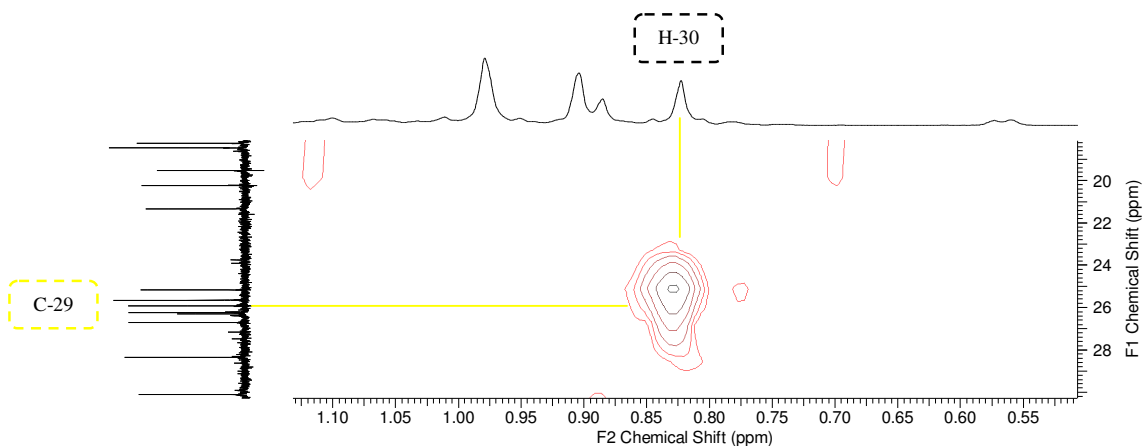


Figura 52: Ampliação do mapa de contorno HMBC, região H (0,55- 1,10) para **SUBST-3**.

A análise do mapa de contorno HMBC também forneceu dados para atribuir a posição das outras 4 metilas presentes na estrutura, também pelas correlações a ^2J e ^3J , conforme os dados da tabela 5.

O hidrogênio da metila com δ 0,893 (3H, s, H-18) apresentou correlação com os carbonos em δ 43,891(C-13), 51,633 (C-14) e δ 52,655 (C-17). O hidrogênio em δ 0,886 (3H, d, $J=7,0$ Hz, H-21) apresentou relação com os carbonos (C-17) δ 52,655, (C-20) δ 36,237 e (C-22) δ 36,714. Já os hidrogênios das metilas 26 (δ 1,606, 3H, s) e 27 (δ 1,685, 3H, s) correlacionaram com os sinais de carbono δ 17,985 (C-27) e δ 26,368 (C-26) respectivamente e ainda com os sinais de carbonos com δ 125,624 (C-24) e δ 131,242 (C-25). O hidrogênio da metila com δ 0,970 (H-28) correlacionou a ^3J com os carbonos em δ 48,330 (C-8) e δ 45,653 (C-13) e a ^2J com o carbono em δ 49,165 (C-14), já o outro hidrogênio com deslocamento também em 0,970 (3H, s, H-29) correlacionou com os sinais de carbono em δ 79,209 (C-3), δ 40,844 (C-4), δ 47,480 (C-5) e δ 14,352 (C-30) assim como o hidrogênio da metila (H-30, δ 0,810, 3H, s) correlacionou com os sinais dos carbonos C-3, C-4, C-5 e C-29 com δ 79, 209, δ 40,844, δ 47,480 e δ 26,068 respectivamente, conforme a figura 53. Os hidrogênios H-19 do ciclopropano com δ 0,558 (1H, d, $J=4,0$) e δ 0,331 (1H, d, $J=4,5$) correlacionaram com os carbonos δ 32,326 (C-1); δ 20,373 (C-9) e δ 26,448 (C-10) e δ 25,793 (C-11) (Figura 54).

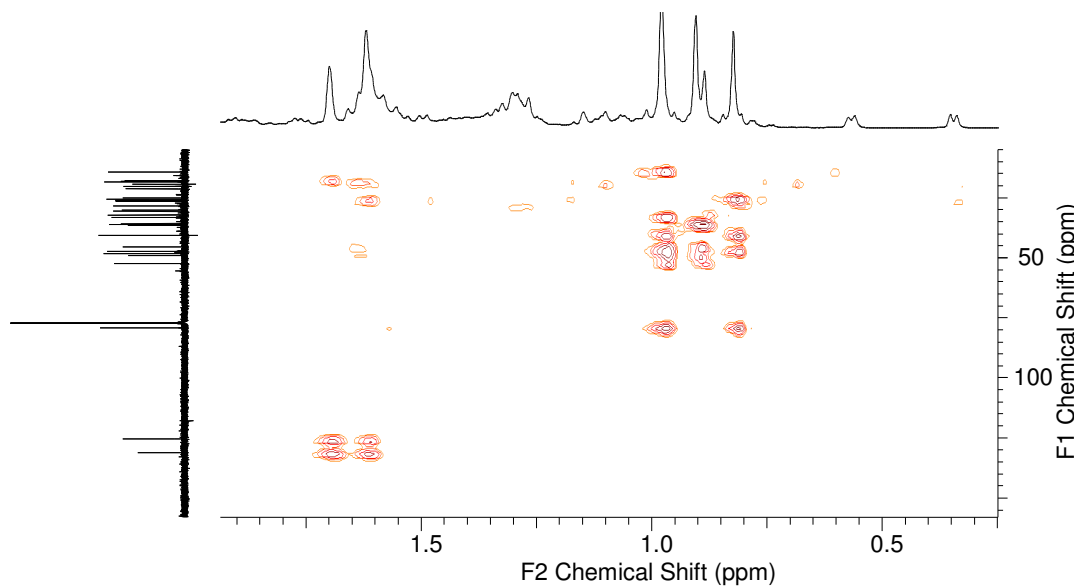


Figura 53: Ampliação do mapa de contorno HMBC, região H (0-1,8) para a **SUBST-3**.

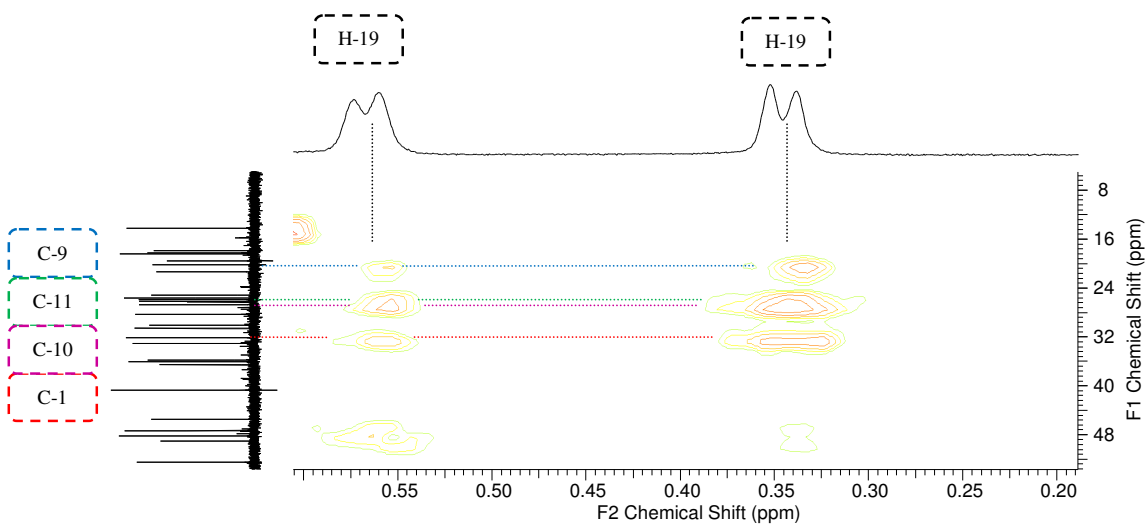


Figura 54: Ampliação do mapa de contorno HMBC, região H (0,2-0,6) para a **SUBST-3**.

Tabela 5: valores de deslocamentos para RMN ^1H , ^{13}C , DEPT 135, HSQC e HMBC, para a **SUBST-3**. (RMN ^1H , 500 MHz, RMN ^{13}C , 125 MHz, CDCl_3) em comparação com os dados da literatura TERESA *et al.*, 1987 (em CDCl_3 , com ausência dos dados do aparelho).

P	Lit. RMN ^{13}C (TERESA <i>et al.</i> , 1987)	δC SUBST-3	δH SUBST-3	Lit. RMN ^1H (TERESA <i>et al.</i> , 1987)	HMBC (H $\rightarrow$ C)(^2J - ^3J) SUBST-3
1	32,07	32,326	1,267(2H)(m)*		
2	30,47	30,755	1,261(2H)(m)*		
3	78,86	79,209	3,294 (dd, $J=11,5, 4,25$ Hz)	3,28(1H) (m)	C-30
4	40,55	40,844	-		
5	47,22	47,480	1,317 (1H) (m)*		
6	21,18	21,475	1,584 (2H) (m)*		
7	28,19	28,496	1,291 (1H) (m)* 1,904 (1H) (m)*		
8	48,00	48,330	1,512 (1H) (m)*		
9	20,1	20,373	-		
10	26,22	26,448	-		
11	26,09	25,793	2,043 (2H) (m)*		
12	35,59	33,264	1,624 (2H) (m)*		
13	45,39	45,653	-		
14	48,88	49,165	-		
15	33,02	35,941	1,322 (2H) (m)*		
16	26,6	26,851	1,980 (2H) (m)*		
17	52,39	52,655	1,569 (1H) (m)*		
18	18,07	19,662	0,893 (3H)(s)		C-13/C-14/C-17
19	29,91	30,246	0,558 (1H) (d)($J=4,0$ Hz) 0,331 (1H) (d)($J=4,5$ Hz)	0,55(1H) (d) 0,33(1H) (d)	C-1/ C-9/C-10/C-11 C-1/ C-9/C-10/C-11
20	35,95	36,237	1,509 (1H) (m)*		
21	18,33	18,373	0,886 (d) ($J=7,0$ Hz)	0,88 (3H) (d)	C-17/ C-20/C-22
22	36,45	36,714	1,040 (2H) (m)*		
23	25,03	25,306	1,880 (2H) (m)*		
24	125,36	125,624	5,102 (1H) (m)*	5,10 (1H) (t)	C-26/C-27
25	130,79	131,242	-		
26	17,68°	26,368	1,606 (s)	1,60(3H) br (s)	C-24/C-25/C-27
27	25,76°	17,985	1,685 (s)	1,68(3H) (s)	C-24/C-25/C-26
28	19,38	18,593	0,970 (s)	0,89(3H) (s)	C-8/C-13/C-14
29	14,04†	26,068	0,970 (s)	0,96(3H) (s)	C-3/C-4/C-5/C-30
30	25,52†	14,352	0,810 (s)	0,81(3H) (s)	C-3/C-4/C-5/C-29

*não é possível distinguir; ° Posição pode estar trocada; † Posição trocada, confirmada pela análise de HMBC obtida para a **SUBST-3**, conforme os dados da tabela.

O Espectro de massas (ANEXO -2 A, página 181) também apresentou o pico m/z 427,3925 (M^{+1}) (valor teórico m/z 427,3939) correspondente ao íon molecular e o

pico intenso do íon m/z 409, 3824 ($M^{+1}-H_2O$) (valor teórico m/z 409,3834) corresponde à perda de uma molécula de água.

6.5.1.4. SUBST-4

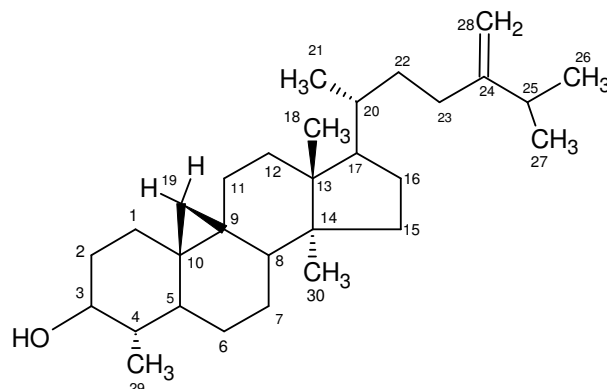


Figura 55: Estrutura da substância **SUBST-4** (cicloeucaleanol).

A substância codificada como **SUBST-4** (Figura 55) foi identificada por análise de RMN¹H, RMN ¹³C, DEPT 135°, HMBC, HSQC e EM. O espectro de massas apresentou dois picos intensos, sendo o pico m/z 427,3954 (M^{+1}), correspondente ao íon molecular (valor teórico m/z 427,3939) e o pico com m/z 409,3838 ($M^{+1}-H_2O$) correspondente à perda de uma molécula de água (valor teórico m/z 409,3834) (ANEXO -2 A, página 182).

O espectro de RMN ¹H mostraram sinais em: δ 4,714 (s, 1) e δ 4,661 (d, $J=1,5$) característicos de hidrogênios de dupla terminal; sinal em δ 3,210 (m), característico de H carbinólico (Figura 56); dois dubletos em δ 0,140 (d, $J= 3,5$) e δ 0,387 (d, $J= 3,5$) ao qual foi atribuído ao H-19, referentes a hidrogênios metilênicos de anel ciclopropano, de triterpeno da série cicloartano (Figura 57).

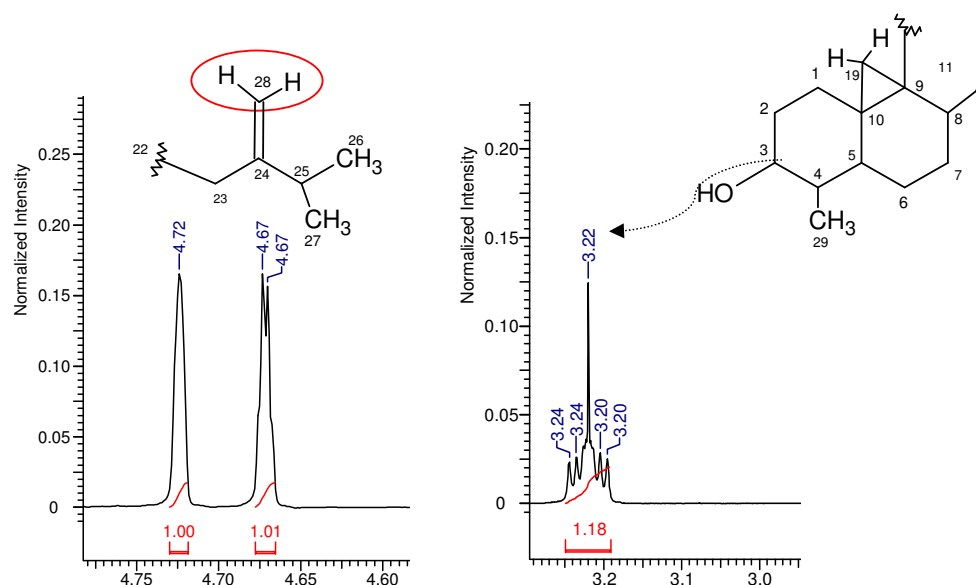


Figura 56: Ampliação da região dos hidrogênios olefínicos e hidrogênio do carbono carbinólico 500 MHz para a SUBST-4.

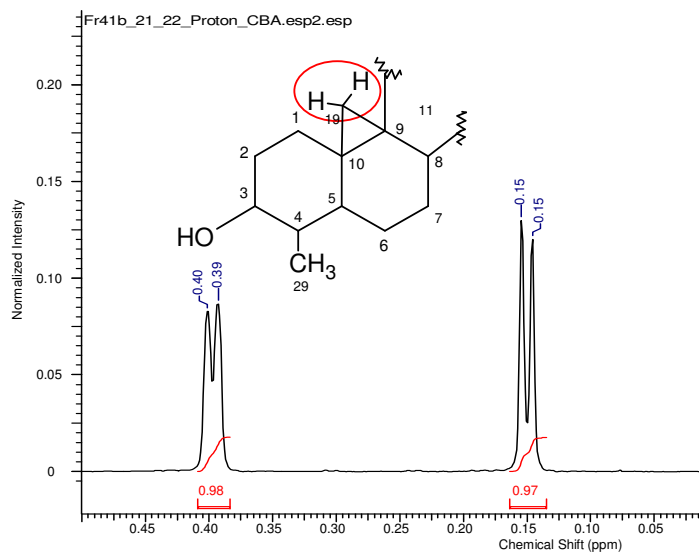


Figura 57: Ampliação do espectro de RMN ^1H , na região dos sinais referentes aos hidrogênios metilênicos do ciclopropano, em 500 MHz para a SUBST-4.

O espectro de RMN ^1H apresentou seis sinais referentes aos carbonos metílicos, sendo que cinco desses sinais apresentaram-se em duplete com δ 0,896 (3H, d, $J=6,5$ Hz, H-21), δ 1,019 (3H, d, $J=2,5$ Hz, H-26), δ 1,033 (3H, d, $J=2,5$ Hz, H-27), δ 0,979

(3H, d, $J=6,5$ Hz, H-29) e δ 0,894 (3H, s, H-30) e ainda um sinal em simpleto em δ 0,970 (3H, s, H-18), atribuídos aos hidrogênios das metilas (Figura 58).

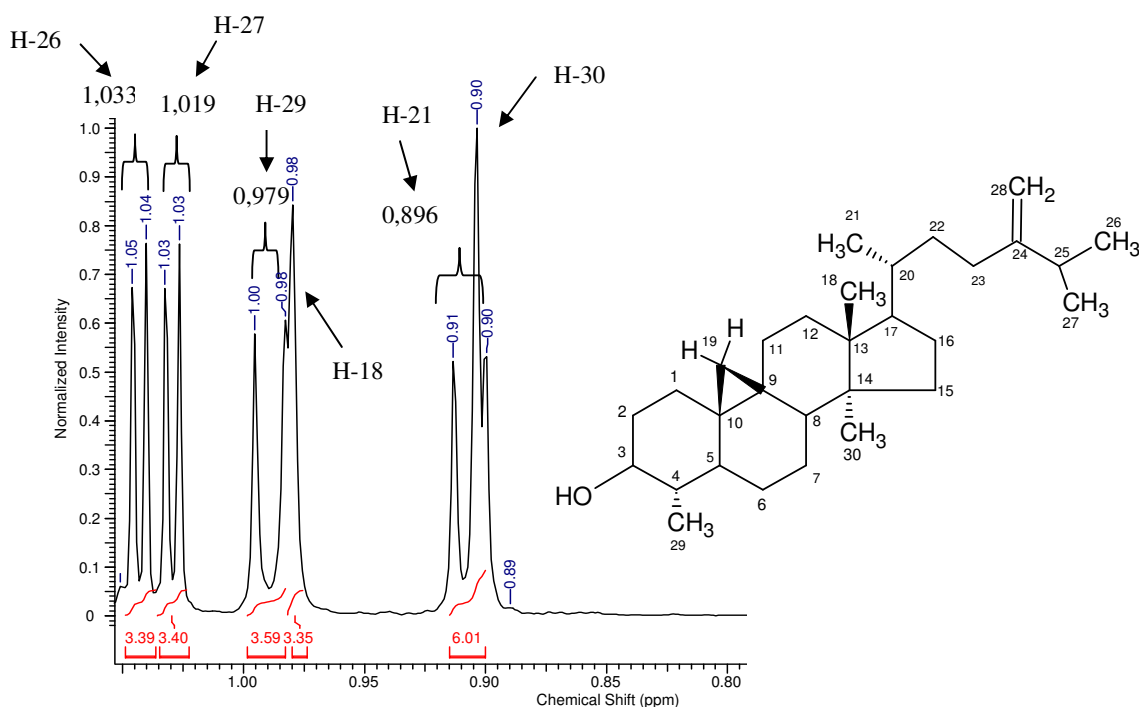


Figura 58: : Ampliação do espectro de RMN ^1H , na região dos sinais referentes às metilas em singletos e dubletos 500 MHz para a SUBST-4.

O espectro de RMN ^{13}C mostrou sinais de referente à presença de carbono carbinólico em δ 76,928 (C-3), de carbonos olefínicos em δ 157, 261 e δ 106, 288 os quais foram atribuídos, respectivamente, a C-24 e C-28 (Figura 59). Esses dados de RMN ^{13}C , juntamente com os dados da análise de DEPT 135° puderam confirmar que a estrutura apresenta cinco carbonos quaternários (ausentes em DEPT), seis carbonos metílicos (CH_3), doze carbonos metilênicos (CH_2) e sete carbonos metínicos (CH), sendo apresentado na figura 60 à região ampliada em DEPT do carbono olefínico e carbono carbinólico.

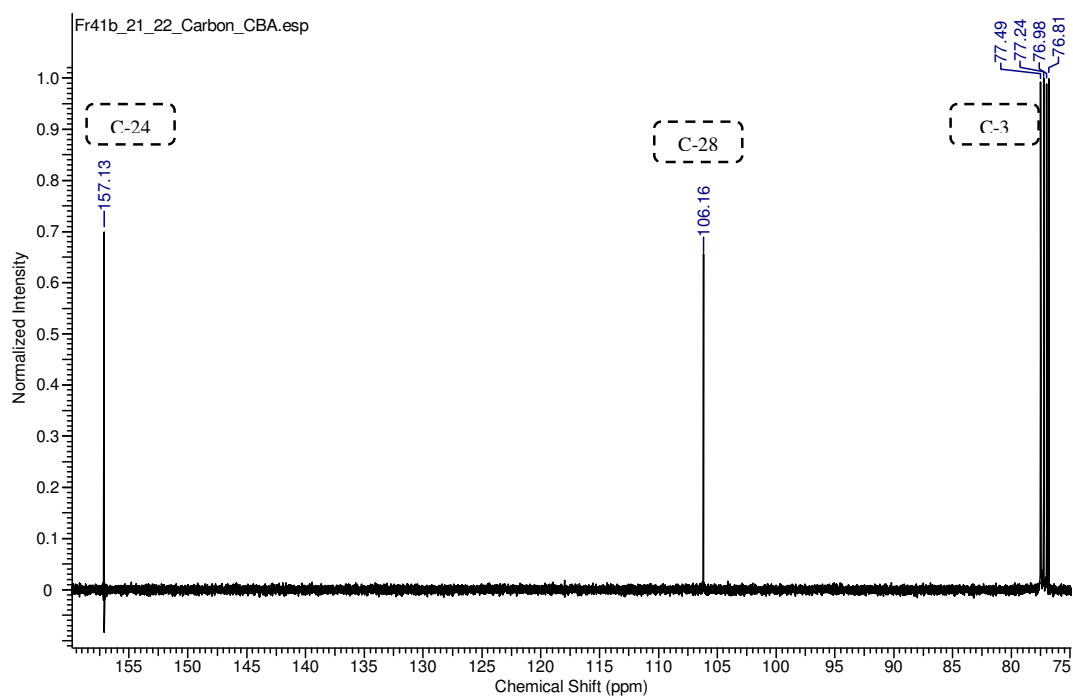


Figura 59: Ampliação do espectro de carbono na região de carbonos quaternários e olefinicos para a SUBST-4.

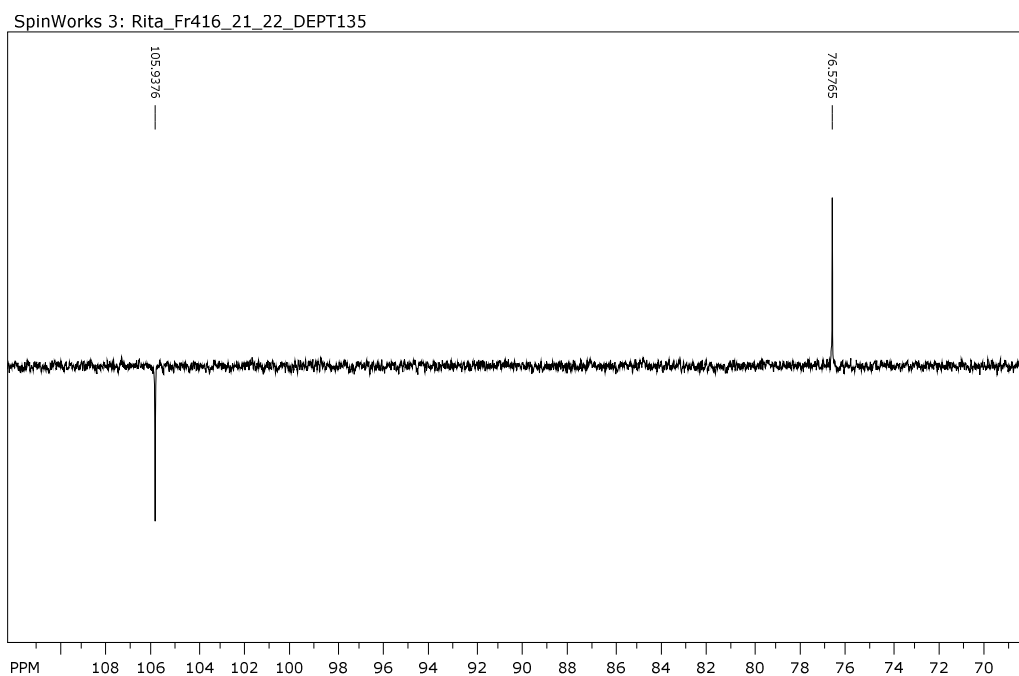


Figura 60: Ampliação do espectro de DEPT 135 na região de CH e CH₂ para a SUBST-4.

A atribuição dos hidrogênios ligados diretamente aos carbonos (^1J) foi dada pela análise de HSQC (ANEXO -1 A, página 165). Assim, foi possível atribuir os hidrogênios ligados aos carbonos metílicos e ainda os dois hidrogênios em dubletos ligados ao carbono metilênico do anel ciclopropano (H-19). A Figura 61 mostra a correlação dos dois dubletos blindados referente aos hidrogênios do ciclopropano com o carbono 19.

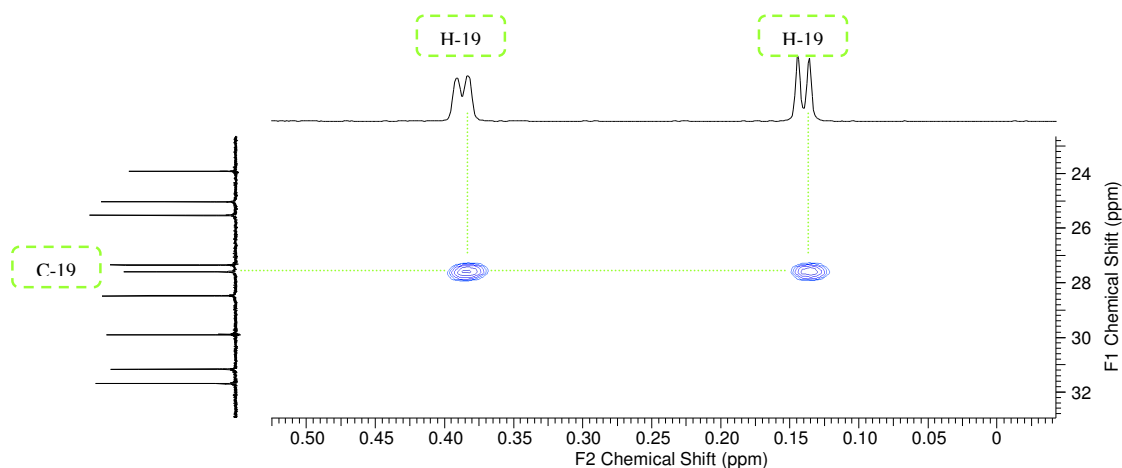


Figura 61: Ampliação do mapa de contorno HMBC, região H (0- 0,55) para a SUBST-4.

As posições dessas metilas e do anel ciclopropano foram confirmadas pelos dados obtidos das análises no mapa de contorno HMBC (ANEXO -1 A, página 166), que fornece as informações dos hidrogênios ligados aos carbonos a duas (^2J) e três ligações (^3J), conforme a tabela 6.

Pelo mapa de correlação HMBC, pode-se atribuir a posição da ligação dupla nos carbonos C-24 e C-25 pelas correlações dos hidrogênios (H-28) em δ 4,714 (1H, s) e δ 4,661 (1H, d $J= 1,5$ Hz) que correlacionaram com os carbonos δ 31,667 (C-23) e δ 34,161 (C-25), respectivamente (figura 62). Verificou-se também que o hidrogênio carbinólico H-3 com δ 3,294 (1H, dd, $J=11,5, 4,25$ Hz) não apresentou correlação impossibilitando a confirmação da metila 29 no carbono 4 (C- 4), porém, essa posição foi confirmada pela correlação entre o hidrogênio (H-29, δ 0,979, d, $J=6,5$ Hz) com o carbono em δ 76,928 (C-3) correspondente ao carbono carbinólico. A figura 63 mostra a correlação confirmando a posição da metila 29 no carbono (C-4).

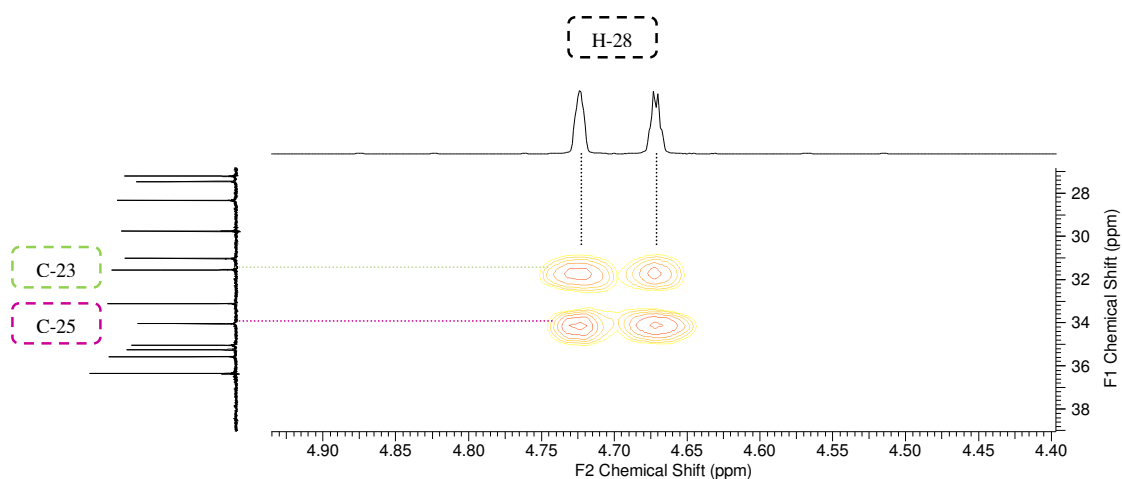


Figura 62: Ampliação do mapa de contorno HMBC, região H (4,40- 4,90) para a **SUBST-4**.

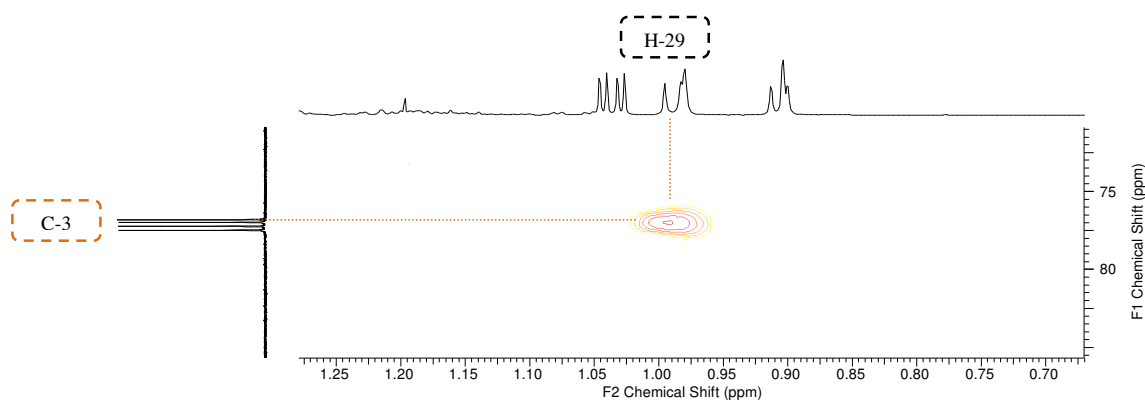


Figura 63: Ampliação do mapa de contorno HMBC, região H (0,70- 1,25) para a **SUBST-4**.

As posições das outras metilas foram obtidas pelas correlações entres os sinais de hidrogênio em δ 0,970 (3H, s, H-18) que apresentou correlação com os carbonos em δ 33,238 (C-12), δ 45,704 (C-13), δ 49,256 (C-14) e δ 52,560 (C-17). O hidrogênio em δ 0,898 (3H, d, $J=4,7$ Hz, H-21) apresentou relação com os carbonos (C-17) δ 52,560, carbono (C-20) δ 36,475 e carbono (C-22) com δ 35,373. Já os hidrogênios das metilas 26 (δ 1,019, 3H, d, $J= 2,5$ Hz) e 27 (δ 1,033, 3H, d, $J= 2,5$ Hz) correlacionaram com os sinais de carbono δ 22,219 (C-27) e δ 22,343 (C-26) respectivamente e ainda com os sinais de carbonos em δ 157,261 (C-24) e δ 34,161 (C-25). O hidrogênio da metila com δ 0,894 (H-30) correlacionou a ^3J com os carbonos em δ 47,209 (C-8) e δ 45,704 (C-13) e a ^2J com o carbono em δ 49,256 (C-14), conforme a figura 64. O hidrogênio H-19 do ciclopropano com δ 0,387 (1H, d, $J=3,5$) correlacionou com os carbonos δ 31,143 (C-1); δ 43,683 (C-5) e δ 47,209 (C-8) e δ 27,327 (C-11) e o hidrogênio em δ 0,140 (1H, d,

$J=3,5$) correlacionou com os carbonos δ 31,143 (C-1); δ 43,683 (C-5), δ 47,209 (C-8), δ 23,900 (C-9) e δ 27,327 (C-11), conforme mostra a Figura 65.

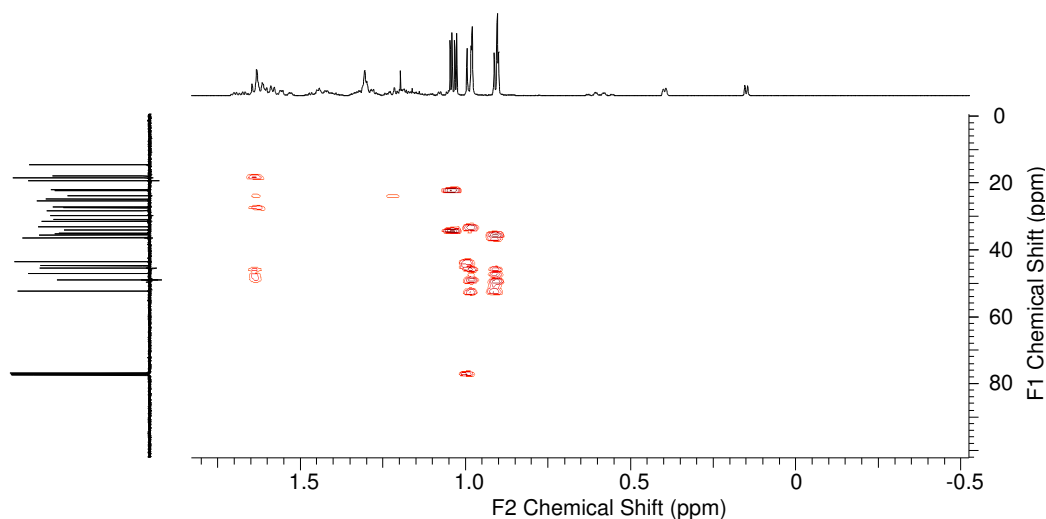


Figura 64: Ampliação do mapa de contorno HMBC, região H (-0,5- 1,5) para a **SUBST-4**.

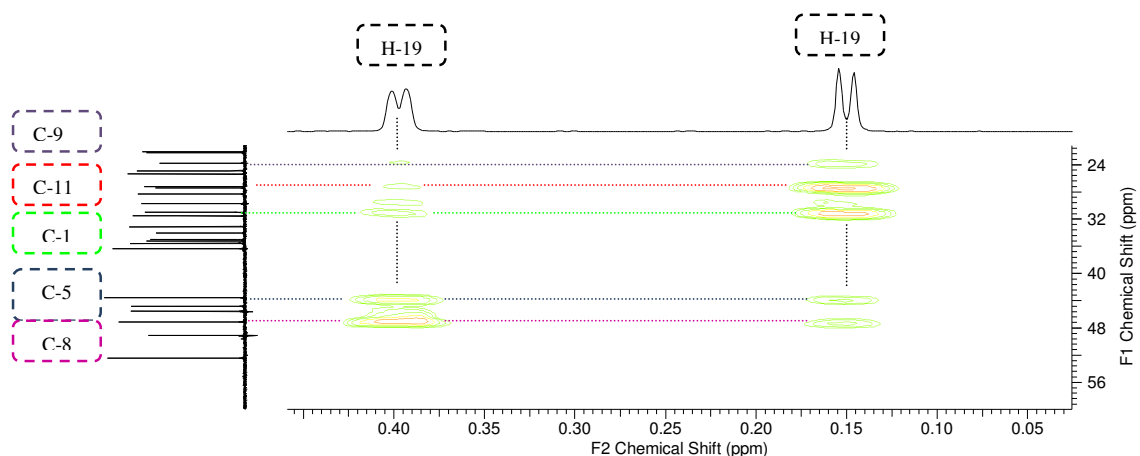


Figura 65: Ampliação do mapa de contorno HMBC, região H (0,05- 0,45) para a **SUBST-4**.

A análise dos dados obtidos em comparação com dados da literatura (KIKUCHI *et al.*, 1986) permitiu identificar **SUBST-4** como um triterpeno de esqueleto cicloartano denominado cicloeucalenol. A confirmação foi obtida de forma mais satisfatória quando as correlações obtidas por HSQC, HMBC mostraram claramente as correlações esperadas para a estrutura proposta. Os dados encontram-se na tabela 6.

Tabela 6: valores de deslocamentos para ^1H , ^{13}C , DEPT 135, HSQC e HMBC, para a **SUBST-4** (RMN ^1H , 500 MHz, RMN ^{13}C , 125 MHz, CDCl_3) em comparação com os dados da literatura KIKUCHI *et al.*, 1986 (em CDCl_3 , 400 MHz).

P	Lit. RMN ^{13}C (KIKUCHI <i>et al.</i> , 1986)	RMN ^{13}C SUBST-4	δH SUBST-4	Lit. RMN ^1H (KIKUCHI <i>et al.</i> , 1986)	HMBC (H $\rightarrow$ C) (^2J - ^3J) SUBST-4
1	30,88	31.143	1,543 (1H) 1,269 (1H)	1,550 1,283	
2	34,90	35.164	1,988 (2H)	1,983 1,423	
3	76,64	76.928	3,210 (1H) (m)	3,213 (ddd) (J= 10,5; 9; 4,5)	
4	44,69	44.942	1,176 (1H)	1,16	
5	43,43	43.686	1,187 (1H)	1,206	
6	24,73	25.013	1,664 (1H) 0,598 (1H) qd	1,678 0,585 qd (J= 12,5; 3)	
7	25,22	25.507	1,313 (1H) 1,072 (1H)	1,055 1,309	
8	46,90	47.209	1,569 (1H)	1,583	
9	23,64	23.900			
10	29,65	29.884			
11	27,08	27.327	1,205 (1H) 1,958 (1H)	1,204 1,969	C-8/C-9/C-12/C-13/C-19 C-9/C-10/C-12/C-19
12	32,99	33.238	1,622 (2H)	1,624	C-9/C-11/C-18
13	45,45	45.704			
14	49,00	49.256			
15	35,42	35.692	1,289 (2H)	1,30	C-16
16	28,18	28.455	1,919 (1H) 1,296 (1H)	1,92 1,30	C-15
17	52,31	52.560	1,605 (1H)	1,62	
18	17,84	18.124	0,970 (3H) (s)	0,970 (s)	C-12/C-13/C-14/C-17
19	27,28	27.576	0,140 (1H) (d) (J= 3,5 Hz) 0,387 (1H) (d) (J= 3,5 Hz)	0,143 (d) (J=4,0Hz) 0,387 (d) (J=4,0Hz)	C-1/C-5/C-8/C-9/C-11 C-1/C-5/C-8
20	36,21	36.475	1,403 (1H)	1,40	
21	18,42	18.688	0,896 (3H) (d) (J= 6,5Hz)	0,898 (d) (J= 6.5 Hz)	C-17/C-20/C-22
22	35,13	35.373	1,579 (1H) 1,130 (1H)	1,577 1,139	
23	31,41	31.667	2,123 (1H) 1,888 (1H)	2,124 1,890	C-24 C-24/C-28
24	156,89	157.261			
28	106,05	106.288	4,714 (1H) 4,661 (1H) (d)(J=1,5Hz)	4,714 4,662 (d) (J= 1Hz)	C-23/C-25 C-23/C-25

25	33,90	34,161	2,234 (1H) sept	2,233 sept	C-23/C-24/C-26/C-27/C-28
26	22,06	22,343	1,019 (3H) (d) (J= 2,5Hz)	1,026 (d) (J= 7,0 Hz)	C-24/C-25/C-27
27	21,94	22,219	1,033 (3H) (d) (J= 2,5Hz)	1,031 (d) (J= 6,7Hz)	C-24/C-25/C-26
29	14,46	14,737	0,979 (3H) (d) (J= 6,5Hz)	0,980 (d) (J= 7,0Hz)	C-3/C-4/C-5
30	19,21	19,479	0,894 (3H) (s)	0,893 (s)	C-8/C-13/C-14/C-17

6.5.1.5. SUBST-5

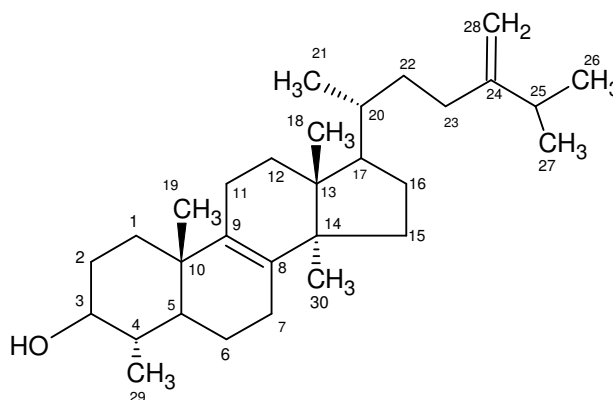


Figura 66: Estrutura da substância **SUBST-5** (*obtusifoliol*)

No espectro de RMN¹H, observaram-se 4 sinais característicos de hidrogênios metílicos em dubletos com δ 0,929 (d, J= 6,0Hz, H-21, 3H); δ 1,034 (d, J=3,0 Hz, H-26, 3H); δ 1,020 (d, J=3,0 Hz, H-27,3H); δ 0,995 (d, J= 6,5Hz, H-29,3H) e três sinais em singleto referente as metilas nas posições 18, 19 e 30 com δ 0,712 (3H, s); δ 0,970 (3H, s) e δ 0,888 (3H, s), respectivamente (Figura 67). O sinal com δ 3,098 (ddd) (1H) (J= 10,10,5Hz) indicou a presença de um hidrogênio em carbono carbinólico (H-3). Observou-se também os sinais em δ 4,715 (s) e δ 4,662 referentes aos dois hidrogênios da ligação dupla terminal, o que evidencia que as substâncias **SUBST-4** e **SUBST-5** apresentam a mesma cadeia lateral (Figura 68).

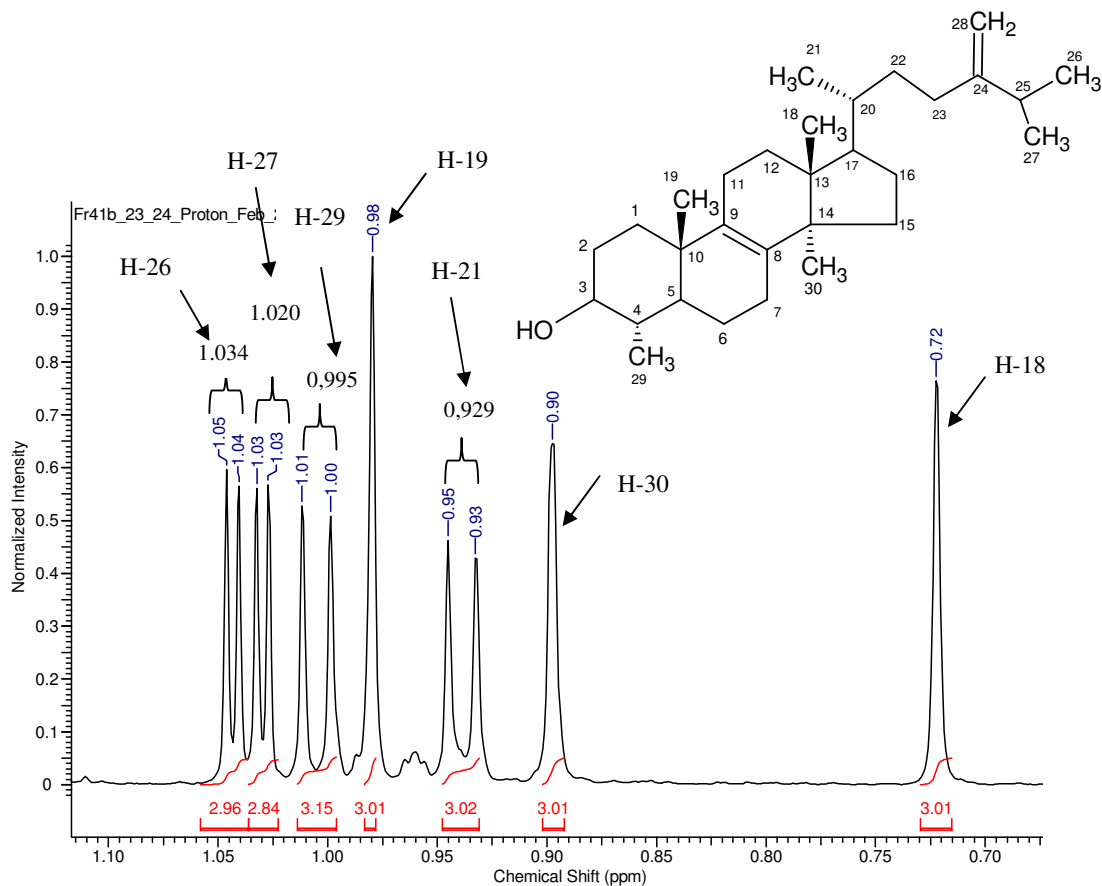


Figura 67: Ampliação do espectro de RMN ^1H , na região dos sinais referentes às metilas em singletos e dubletos a 500 MHz (em CDCl_3) para a SUBST-5.

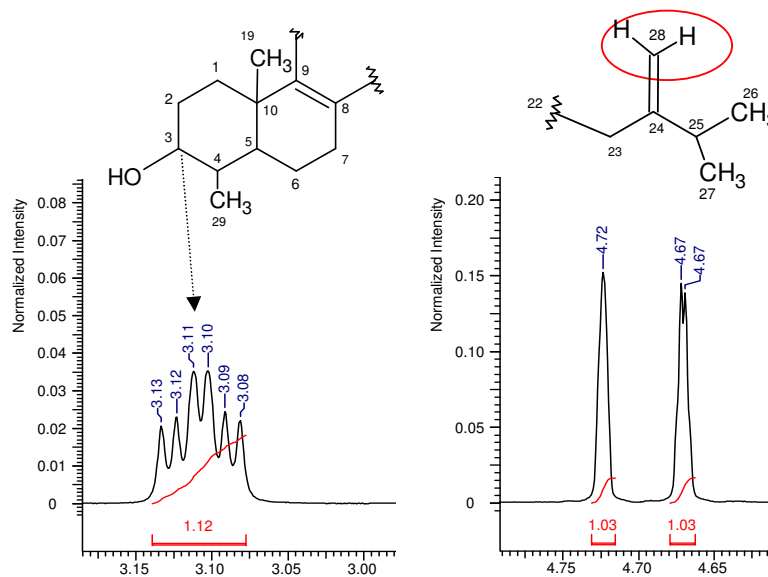


Figura 68: Ampliação da região dos hidrogênios olefínicos e hidrogênio do carbono carbinólico 500 MHz (em CDCl_3) para a SUBST-5.

O espectro de RMN ^{13}C , apresentou 30 sinais de carbonos, dentre eles sinais referentes a carbonos olefínicos em δ 157,265 (C-24); δ 106,295 (C-28); δ 135 010 (C-8); δ 133 970 (C-9) e ainda um sinal de carbono carbinólico com δ 76,902 (C-3) (Figura 69).

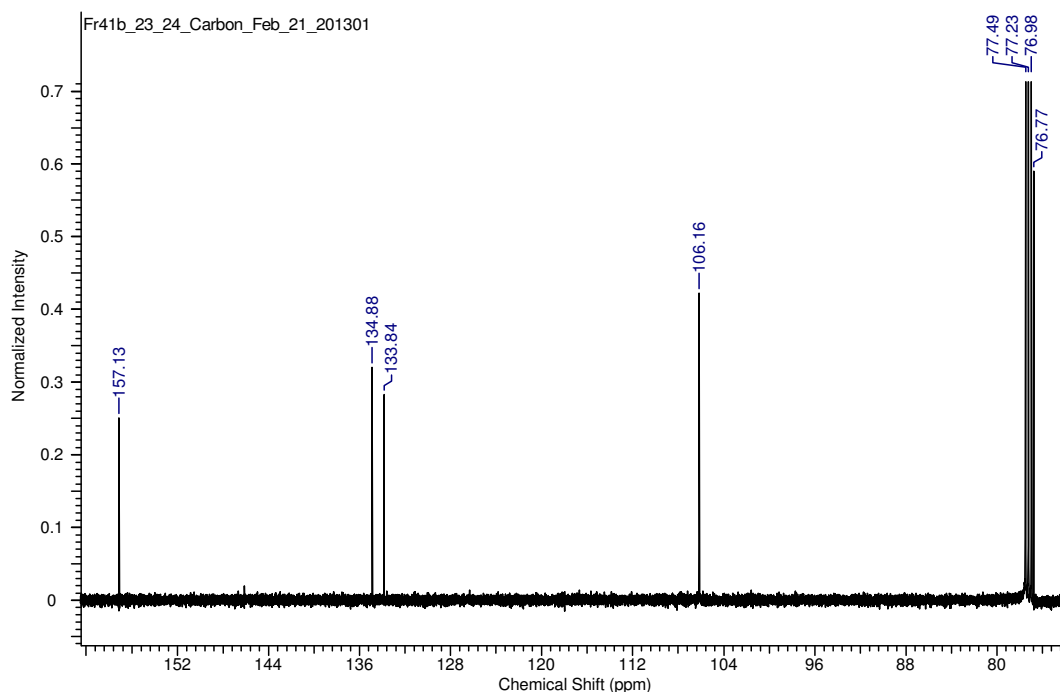


Figura 69: Ampliação do espectro de carbono na região de carbonos quaternários e CH para a substância **SUBST-5**.

Os dados da correlação de HSQC e HMBC (ANEXO -1 A, página 169 e 170) encontram-se na tabela 7. Pelo mapa HMBC observaram-se as correlações dos hidrogênios olefínicos (H-28) com δ 4,715 (1H) (s) e δ 4,662 (1H, d, $J=1$ Hz) com os carbonos C-23 (δ 31,656), C-25 (δ 34,172) e C-24 (δ 157,265) e (Figura 70 e 71), bem como os dos hidrogênios metílicos do C-27 com C-24, C-25, C-26 e os hidrogênios metílicos do C-26 com C-24, C-25, C-27 (Figura 72 e 73).

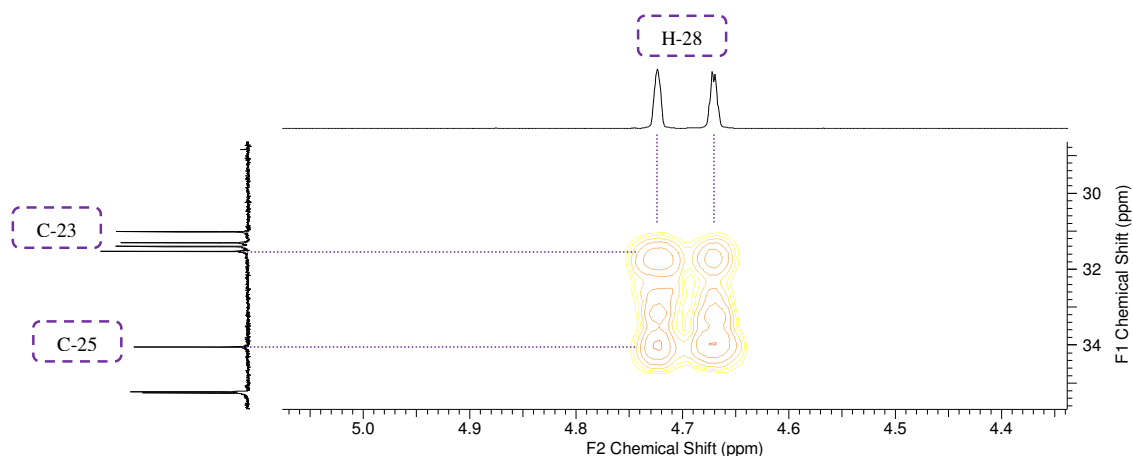


Figura 70: Ampliação do mapa de contorno HMBC, região H (4,4- 5,5) para a **SUBST-5**.

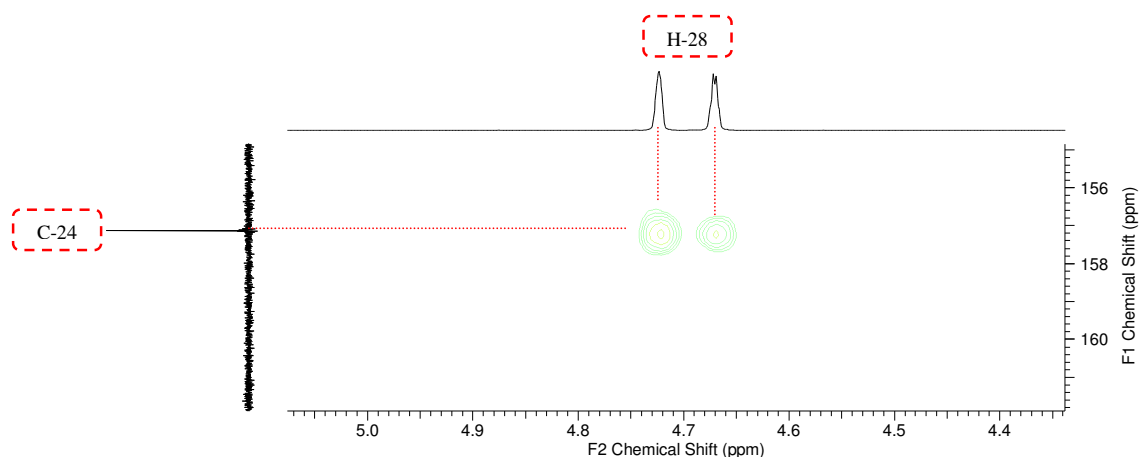


Figura 71: Ampliação do mapa de contorno HMBC, região H (4,4- 5,0) para a **SUBST-5**.

Observaram-se também as correlações dos hidrogênios (H-29) δ 0,995 (3H, d, $J=6,5$) com os carbonos C-4 (δ 39,585), C-5 (δ 47,429) e C-3 (δ 76,902), o que confirma a posição da metila no carbono C-4, assim como a posição das outras metilas pelas seguintes correlações: H-19 com δ 0,970 (s) correlacionou com os carbonos C-1 (δ 35,355); C-5 (δ 47,429); C-9 (δ 133,970) e C-10 (δ 36,699); H-21 com δ 0,929 (3H, d, $J=6,0$) com os carbonos C-17 (δ 50,769); C-20 (δ 36,845) e C-22 (δ 35,384); H-30 com δ 0,888 (s) com os carbonos C-8 (δ 135,010), C-13 (δ 44,891), C-14 (δ 50,220) e C-15 (δ 31,140), bem como o H-18 com δ 0,712 (s) com os carbonos C-13 (δ 44,891) e C-14 (δ 50,220) (Figuram 72 e 73).

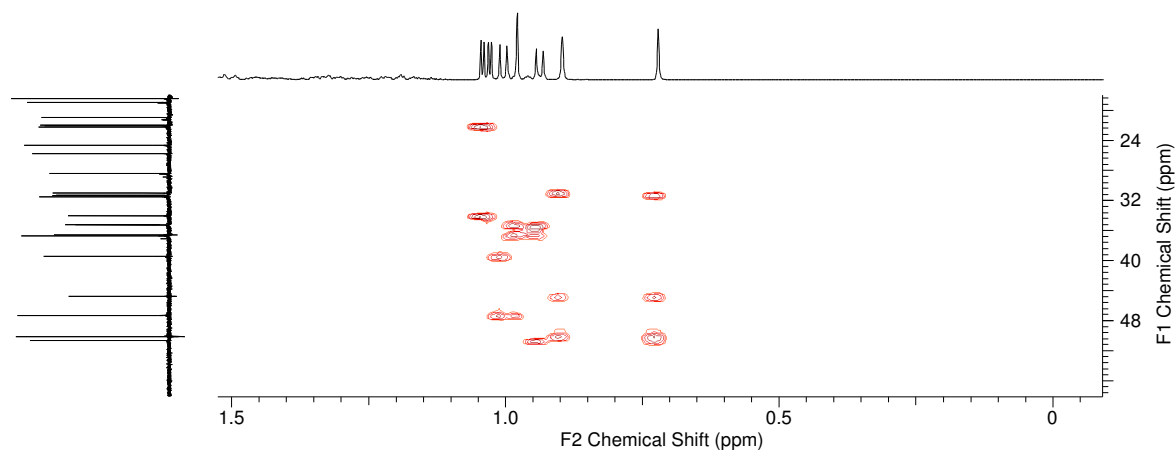


Figura 72: Ampliação do mapa de contorno HMBC, região H (0- 1,5) para a **SUBST-5**.

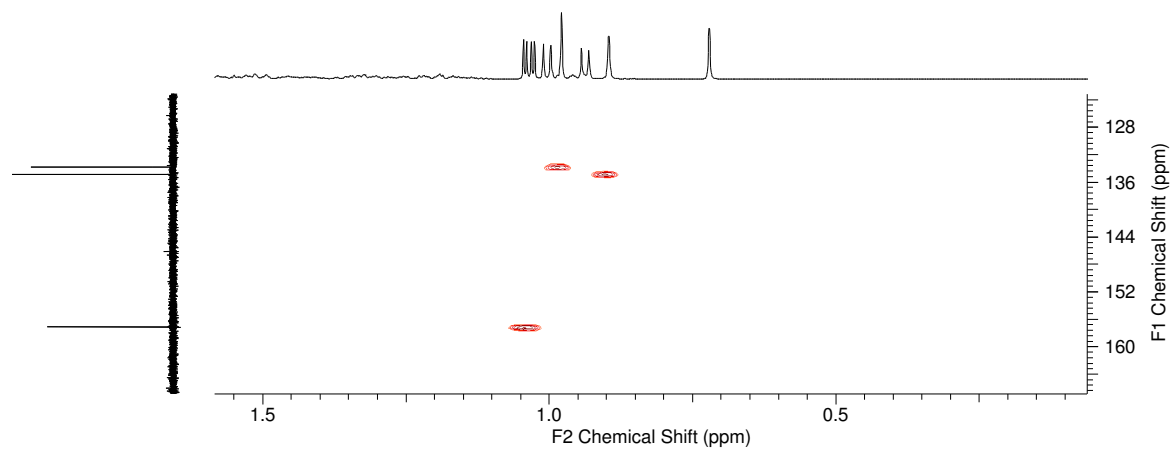


Figura 73: Ampliação do mapa de contorno HMBC, região H (0- 1,5) para a **SUBST-5**.

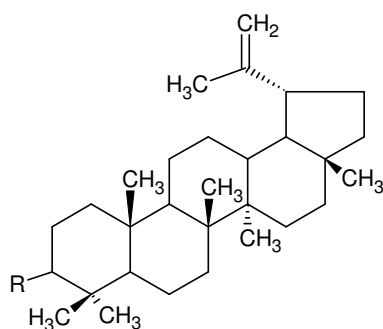
Tabela 7: valores de deslocamentos para ^1H , ^{13}C , DEPT 135, HSQC e HMBC, para a **SUBST-5**. (RMN ^1H , 500 MHz, RMN ^{13}C , 125 MHz, CDCl_3) em comparação com os dados da literatura TERESA *et al.*, 1987 (em CDCl_3 , com ausência dos dados do aparelho).

P	RMN ^{13}C (TERESA <i>et al.</i> , 1987)	RMN ^{13}C	δH	Lit. RMN ^1H (TERESA <i>et al.</i> , 1987)	HMBC (H $\rightarrow$ C) (J_2 - J_3)
1	33,05	35,355 (CH ₂)	1,780 (1H) 1,221 (1H)		
2	31,26	31,433(CH ₂)	1,718(1H) 1,485(1H)		
3	76,61	76,902 (CH)	3,098 (1H) (m)	3,12 (1H) (ddd) ($J=10, 10, 5$ Hz)	
4	39,32	39,585 (CH)	1,312 (1H)		
5	47,19	47,429 (CH)	0,950(1H)		
6	20,81	21,080 (CH ₂)	1,268 (2H) 1,754 (1H)		

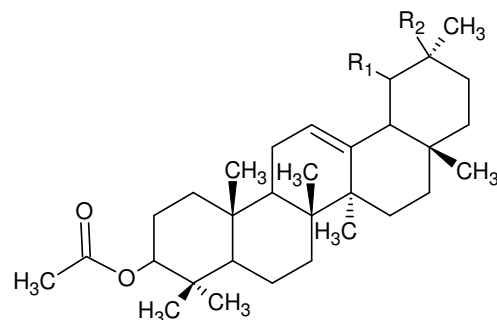
7	28,24	28,543 (CH ₂)	1,943 (1H) 1,924 (1H)		
8	133,73*	135,010 (C)			
9	134,77	133,970 (C)			
10	36,43	36,699 (C)			
11	21,85	22,120 (CH ₂)	2,058 (1H) 2,023 (1H)		
12	25,64	25,910 (CH ₂)	2,008 (1H) 1,970 (1H)		
13	44,65	44,891 (C)			
14	49,96	50,220 (C)			
15	31,39	31,140 (CH ₂)	1,595 (1H) 1,183 (1H)		
16	31,19	31,524 (CH ₂)	1,844 (2H)		
17	50,52	50,769 (CH)	1,512 (1H)		
18	15,81	16,088 (CH ₃)	0,712 (3H) (s)	0,73 (1H) (s)	C-13/C-14
19	18,79	18,567 (CH ₃)	0,970 (3H) (s)	0,99 (1H) (s)	C-1/C-5/C-9/C-10
20	36,55	36,845 (CH)	1,457 (1H)		
21	18,26	19,084 (CH ₃)	0,929 (3H) (d) (J= 6,0Hz)	1,01 (3H) (d) (J= 6,8Hz)	C-17/C-20/C-22
22	35,14	35,384 (CH ₂)	1,561 (1H) 1,219 (1H)		
23	30,87	31,656 (CH ₂)	2,117 (1H) 1,887 (1H)		
24	156,94	157,265 (C)			
25	33,91	34,1729 (CH)	2,234 (1H) sept		C-23/C-24/C-26/C-28
26	21,92	22,347 (CH ₃)	1,034 (3H) (d) (J=3,0 Hz)	1,05(3H) (d) (J= 6,8Hz)	C-24/C-25/C-27
27	22,05	22,215 (CH ₃)	1,020 (3H)(d) (J=3,0 Hz)	1.05 (3H) (d) (J= 6,8Hz)	C-24/C-25/C-26
28	106.03	106,295 (CH ₂)	4,715 (1H) (s) 4,662 (1H) (d) (J=1 Hz)	4,78 (br s) 4,68 (br s)	C-23/C-25 C-23/C-25
29	15.11	15,411 (CH ₃)	0,995 (3H) (d) (J= 6,5Hz)	0.95 (3H)(d) (J= 6,1Hz)	C-3/C-4/C-5
30	24.30	24,782 (CH ₃)	0,888 (3H) (s)	0.91 (3H)(s)	C-8/C-13/C-14/C-15

Através da análise dos dados obtidos em comparação os dados espectrais descritos por TERESA *et al.*, 1987 foi possível confirmar a estrutura proposta, para sua **SUBST-5**, como sendo o triterpeno obtusifoliol. Essa proposta foi confirmada pela análise de EM por APCI em modo positivo apresentando pico do íon molecular m/z 427,3896 como era esperado (M⁺) (valor teórico m/z 427,3939) (ANEXO -2 A, página 183).

6.6. Identificação complementar (CG-EM e EM-APCI) dos padrões isolados de *P. amapa* e *B. parinarioides* em trabalhos anteriores



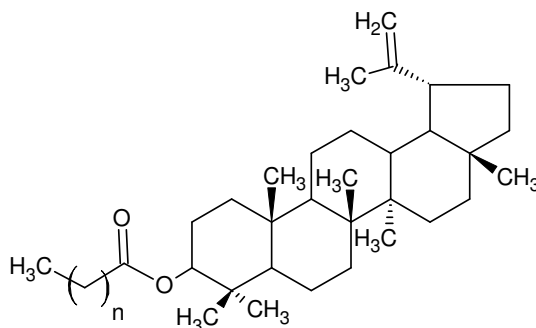
R= ac- ac. de lupeol



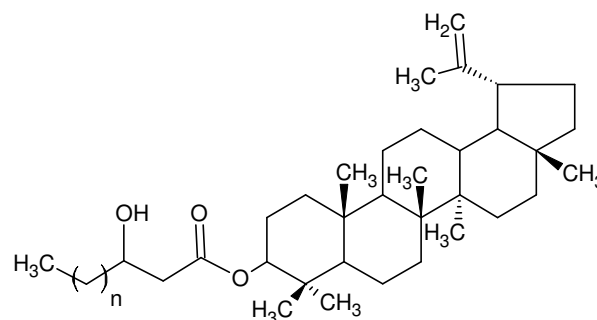
R₁= CH₃; R₂= H ac. de α-amirina

R₁= H; R₂= CH₃ ac. de β-amirina

Mistura de triterpenos acetilados
(ac. β e α- amirina e ac. lupeol) (**MIST-2**)



Mistura de ésteres não hidroxilados lupeol
MIST-1



Mistura de ésteres hidroxilados de lupeol
MIST-3

Figura 74: Estruturas das substâncias isoladas anteriormente de *P. amapa*.

As substâncias isoladas anteriormente de *P. amapa* (Figura 74) foram identificadas por espectros de RMN ¹H, RMN ¹³C (ANEXO -1 B, página 171) (Salles *et al.*, 2009). E a fim de confirmar as identificações dessas substâncias que seriam utilizadas como padrões neste trabalho e com a finalidade de determinar a cadeia lateral dos ésteres de lupeol, foram então, realizadas análises por EM com fonte APCI e análises por CG-EM.

A mistura de triterpenos acetilados (**MIST-2**) também foi analisada por CG- EM para confirmar a presença dos três triterpenos acetilados verificados através dos dados de RMN ^1H e principalmente de RMN ^{13}C . A análise do perfil (Figura 75) mostra a presença de três componentes majoritários na mistura, sendo o componente com tempo de retenção de 32,168 minutos e área de 54,60 % equivalente ao acetato de β -amirina, o componente com tempo de retenção de 34,583 e área de 27,21 % correspondente ao acetato de α -amirina e o terceiro componente sendo o acetato de lupeol com tempo de retenção de 34,961 min. e área de 5,98 %.

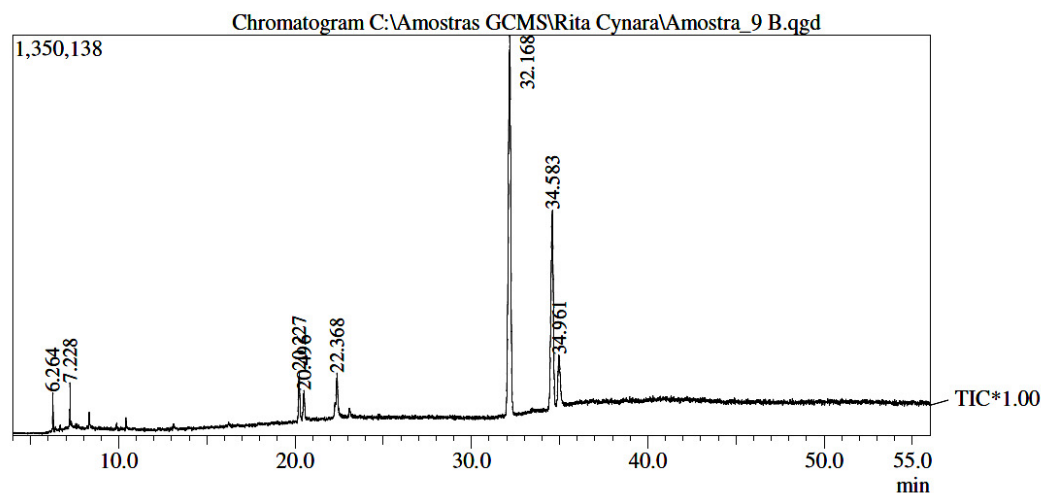


Figura 75: Cromatograma de CG da mistura de triterpenos acetilados isolados de *P. amapa* (**MIST-2**).

Assim, pela análise dos espectros de massas obtidos para MIST-2 (ANEXO – 3 A, página 189) e a consulta às bibliotecas de espectros disponíveis no equipamento (NIST, Wiley e a biblioteca criada pelo Laboratório de Pesquisa (NPPNS - Núcleo de Pesquisa em Produtos Naturais e síntese), mostrou ser a mistura de triterpenos esperada, com IS 95% para o acetato de β -amirina, IS 96 % para o acetato de α -amirina e IS 88% para o acetato de lupeol.

Os espectros de massas para o acetato de β -amirina e para o acetato de α -amirina, mostraram o mesmo padrão de fragmentações com picos mais abundantes em m/z 218, m/z 203 e m/z 189 (ANEXO- 3 A, página 189 e 190), que são compatíveis com fragmentações características dos triterpenos pentacíclicos (Figura 76, tabela 8). Para triterpenos que possuem uma instauração na posição C-12 a fragmentação mais característica ocorre via uma reação Retro- Diels-Alder no anel C, padrão para as séries ursano e oleanano, com sinal de fragmentação m/z 218 (MATHÉ & CULIOLI, 2004).

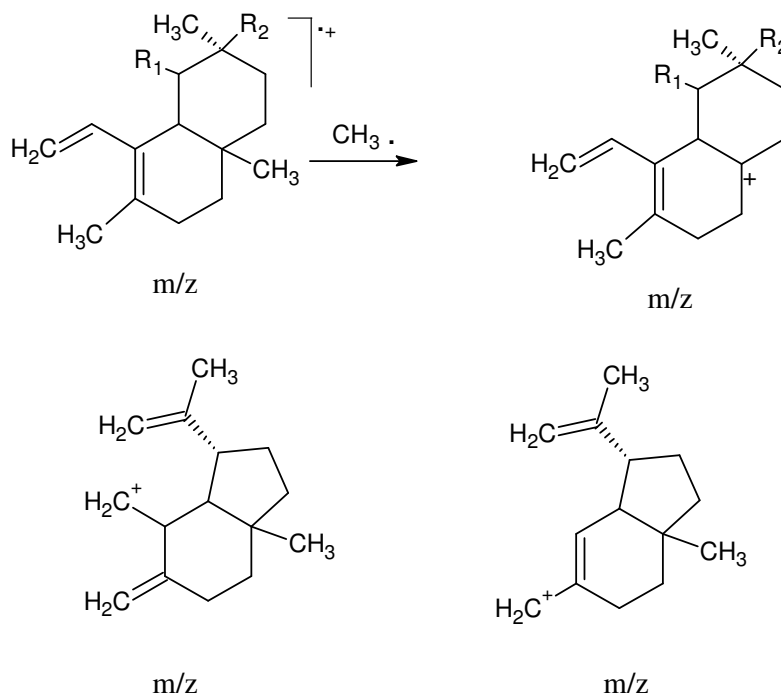


Figura 76: Fragmentações características de triterpenos.

Tabela 8: Fragmentações características de alguns triterpenos

Triterpenos	Fragmentação (m/z)
α -amirina	426 (M+), 218 (100%), 207, 203, 189
Acetato de α -amirina	468 (M), 408, 365, 249, 218 (100%), 203, 189
Acetato β -amirina	468 (M), 408, 365, 249, 218 (100%), 203, 189
β -amirina	426 (M+); 218 (100%), 207, 203, 189
δ -amirina	426 (M+); 411, 408, 229, 218, 205, 189, 109 (100%); 95
Lupeol	426 (M+), 234, 219, 207, 189 (100%); 135, 121, 107
Acetato de lupeola	468 (M+), 408, 365, 218, 189 (100%)
Germanicol	426 (M+); 408, 393, 231, 218, 204 (100%); 189, 177
Acetato de Germanicol	426 (M+); 408, 393, 231, 218, 204 (100%); 189, 177

O espectro de massa para o TR= 34,96 (acetato de lupeol) mostrou uma maior intensidade do pico de 189 (ANEXO- 3 A, página 191) compatível com os dados obtidos pela biblioteca do equipamento e pela literatura.

A identificação da mistura de ésteres não- hidroxilados de lupeol (**MIST-1**) e ésteres hidroxilados (**MIST-3**), se deu pela análise dos ésteres metílicos preparados pela reação de transesterificação do produto natural obtido (item 5.4.2). Os espectros de massas dos picos observados no cromatograma (Figura 75) foram analisados levando

em consideração a presença dos íons característicos m/z 74, m/z 87 e m/z 103, usados para caracterizar as porções acilas.

A reação de transesterificação da mistura de éster de lupeol não hidroxilado, forneceu o lupeol com tempo de retenção 38,30 e espectro de massa com pico intenso em m/z 189, conforme o esperado (ANEXO- 3 B, página 192 a 195). A análise da mistura de quatro ésteres metílicos (**MIST-1-a'-d'**) (Tabela 9) foi realizada a partir dos espectros de massas obtidos em comparação com os disponíveis na biblioteca do equipamento e os dados disponíveis na literatura, onde foi possível confirmar a presença do íon característico de ésteres alifáticos de cadeia linear de grande intensidade m/z 74, que aparece devido ao rearranjo de McLafferty com quebra de ligação β em relação ao grupo $C=O$ (Figura 78). O pico m/z 87 corresponde ao íon $[CH_2CH_2COOCH_3]^+$ (SILVERSTEIN *et al.*, 2007; PAVIA., *et al.*, 2001). Esses ésteres apresentaram variação de “n” de 18 a 24 carbonos.

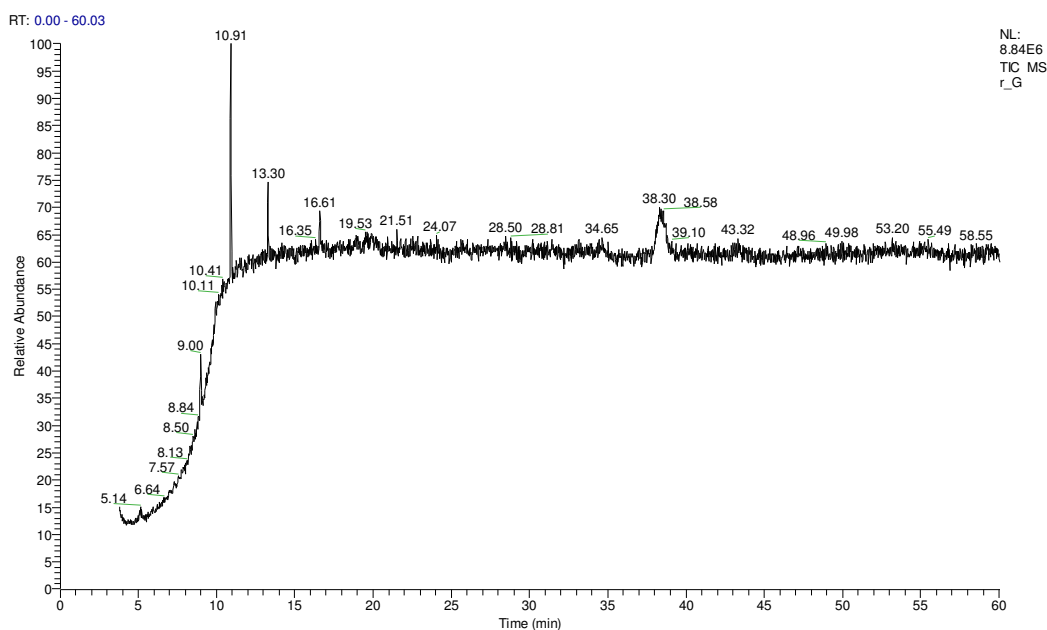


Figura 77: Cromatograma da análise por CG-EM da mistura de ésteres de lupeol não hidroxilados.

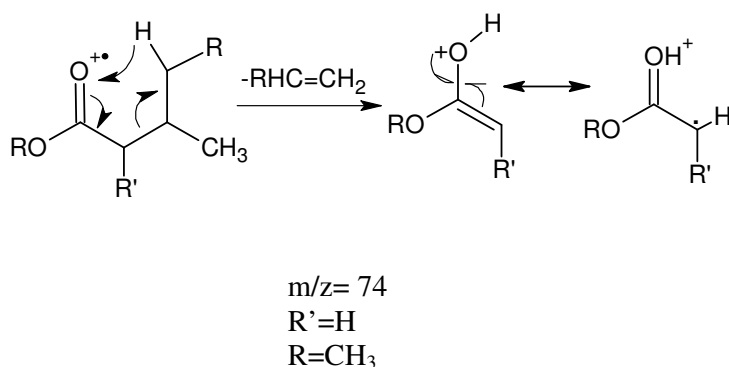


Figura 78: Fragmento característico de ésteres alifáticos de cadeia linear m/z 74.

O cromatograma da mistura dos ésteres metílicos hidroxilados encontra-se na figura 80. E a identificação, foi baseada na presença do pico característico m/z 103, que evidencia a presença de ésteres hidroxilados o que confirma os dados obtidos por RMN ^1H e RMN ^{13}C (ANEXO- 1 B, página 179 a 180), justificando assim a hidroxila na cadeia lateral. Na ausência do íon molecular para estes ésteres contendo o grupo hidroxila no C-3' utilizou-se o íon $[M-18]$ correspondente a perda da molécula de água (ANEXO- 3 B, página 197 a 200).

Após análise dos resultados foi possível verificar uma grande correlação com os dados encontrados por Sobrinho e colaboradores, (1991), onde a grande diferença se deu pelo fato da cadeia lateral da mistura de ésteres metílicos não hidroxilados ser composta de ésteres com cadeia de carbonos variando entre 16 a 22, enquanto que neste trabalho a variação foi de 14 a 20. EIMS m/z (rel. int): MIST-1-**a'** 326 (17), 283 (17), 241 (9), 199 (15), 143 (33), 129 (17), 87 (99), 75 (32), 74 (100); MIST-1-**b'** 354 (M^+ , 18), 311 (16), 225 (0,08), 213 (6), 199 (21), 143 (40), 87 (78), 75 (32), 74 (100); MIST-1-**c'** 382 (M^+ , 26), 339 (15), 283 (9), 241 (2), 199 (21), 143 (44), 87 (80), 75 (41), 74 (100); MIST-1-**d'** 410 (M^+ , 16), 367 (10), 311 (5), 199 (13), 143 (51), 87 (69), 75 (37), 74 (100). Para a mistura de ésteres hidroxilados foi obtido uma variação na cadeia de 16 a 22 carbonos por Sobrinho e colaboradores, (1991) e neste trabalho a variação foi de 14 a 18 carbonos. EIMS m/z (rel. int): MIST-3- **a'** 296 (0,7, $M-H_2O$), 103 (100); MIST-3- **b'** 324 (0,7, $M-H_2O$), 103 (100); MIST-3- **c'** 352 (1, $M-H_2O$), 103 (100); MIST-3- **d'** 380 (1, $M-H_2O$), 103 (100) (Tabela 9).

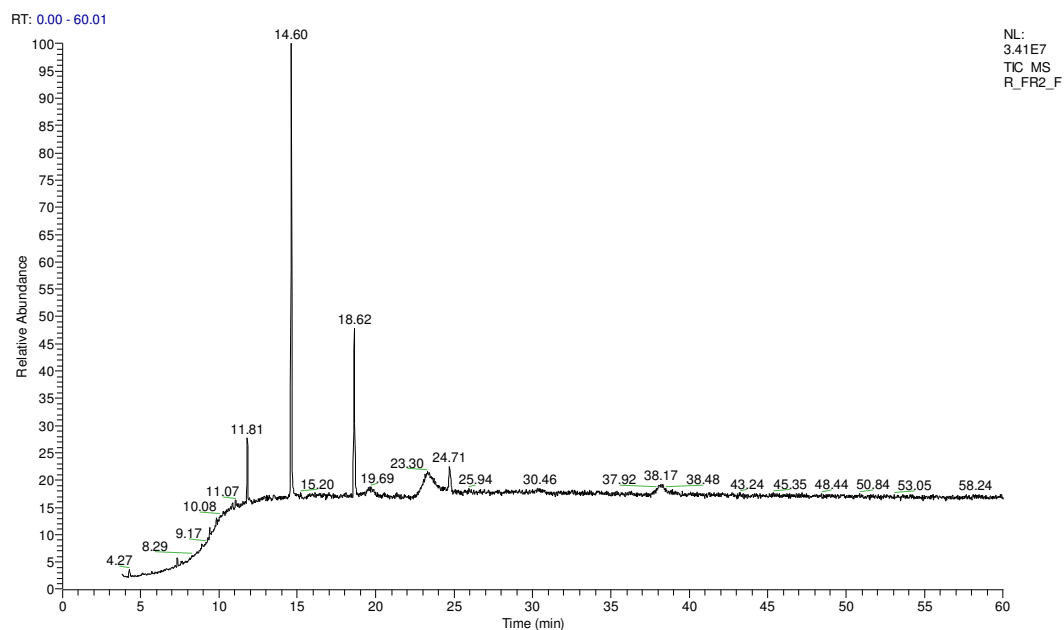


Figura 79: Cromatograma da análise por CG-EM da mistura de ésteres de lupeol hidroxilados

Tabela 9: Identificação da mistura de ésteres de lupeol não hidroxilado e ésteres de lupeol hidroxilado.

Variação de n	Composto	CG		EM (M ⁺)	
		Tempo de retenção	Abundancia relativa (%)	M/Z	Intensidade relativa (%)
n=18	MIST-1- a'	9	11,12	326	16,85
n=20	MIST-1- b'	10,91	24,48	354	17,85
n=22	MIST-1- c'	13,30	6,75	382	26,20
n=24	MIST-1- d'	16,60	1,45	410	16,10
n=14	MIST-3- a'	11,81	8,46	296	0,75
n=16	MIST-3- b'	14,60	50,05	324	0,71
n=18	MIST-3- c'	18,62	24,52	352	1,03
n=20	MIST-3- d'	24,71	6,39	380	1,19

As análises de massas para o acetato de lupeol obtido de *B. parinarioides* e de *P. amapa* apresentou o íon m/z 409 referente à perda do grupo acetil (ANEXO- 2 B, página 184 a 185).

6.6. Perfis químicos por cromatografia em Camada Delgada Comparativa

6.6.1. CCDC- Fase Normal

Como os extratos diclorometânicos de *B. parinarioides* correspondentes a época de seca (BPL-DCM-2) e época de chuva (BPL-DCM-3) apresentaram o mesmo perfil por CCDC (item 6.1), a comparação com o extrato de *P. amapa*, juntamente com os padrões foi realizada utilizando o extrato da 1ª coleta de *B. parinarioides* (época de seca) (Figura 80).

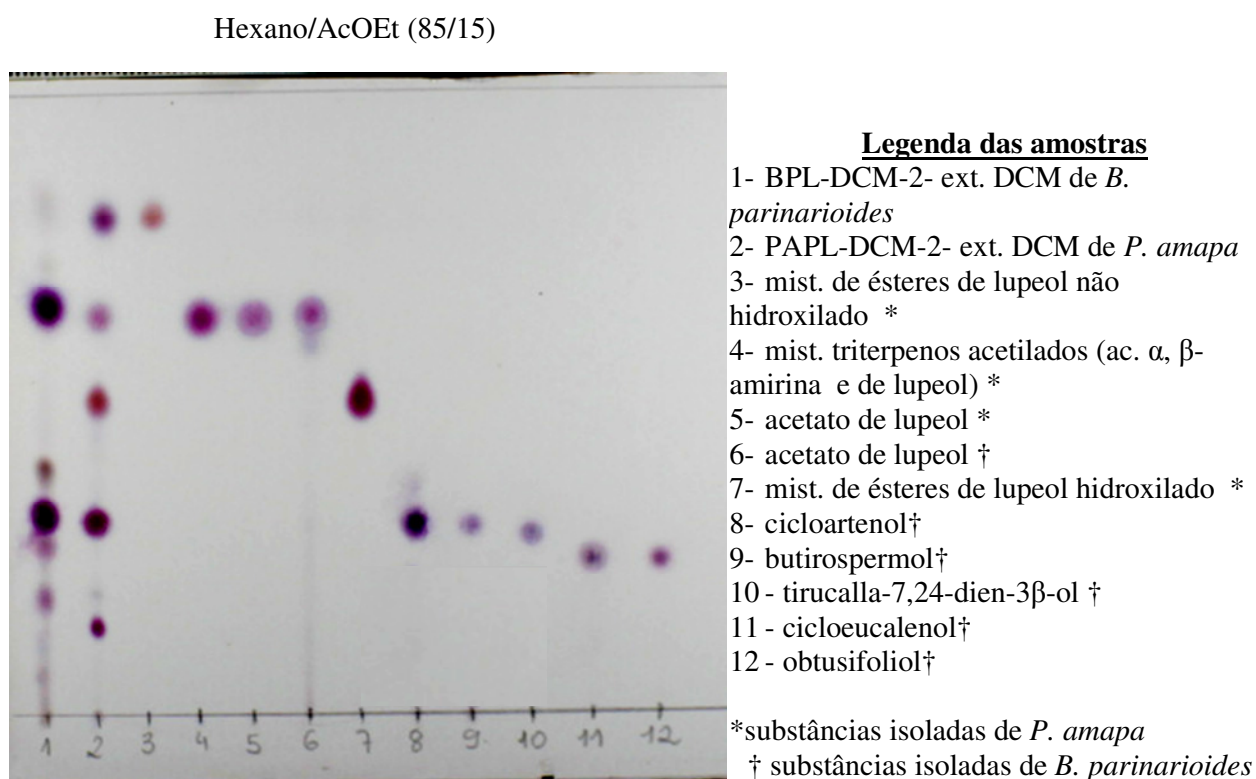


Figura 80: CCDC do extrato de *B. parinarioides* e *P. amapa* em com os padrões autênticos isolados das duas espécies.

A análise comparativa dos extratos diclorometânicos da espécie *B. parinarioides* e da espécie *P. amapa* por CCDC mostrou que ambas apresentam substâncias comuns e também distintas (Figura 80). Essa técnica ajudou preliminarmente na avaliação da composição química das duas espécies e ajudou na busca por esses marcadores. Contudo, com o intuito de melhor avaliar qualitativamente o perfil desses extratos, foi realizada a análise comparativa de forma qualitativa também por CLAE, utilizando o método de coinjeção com os padrões autênticos isolados das duas espécies.

6.7. Estudo dos perfis químicos por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

Os triterpenos foram analisados por um longo período, e continuam a ser amplamente analisados e caracterizados por cromatografia gasosa com espectrometria de massa de impacto eletrônico, mas este método requer uma reação de sililação para fazer esses compostos se tornarem voláteis antes da análise de CG (RHOURLI-FRIH *et al.*, 2008). Portanto, como os extratos que seriam analisados apresentavam de baixa a média polaridade decidiu-se realizar essa comparação por CLAE, já que as substâncias isoladas apresentam ligações duplas, pares de elétrons isolados, capazes de comportar como a região cromófora presente na substância a ser detectada por UV.

6.7.1. Comparação qualitativa dos perfis CLAE dos extratos de *Brosimum parinarioides* da época de seca e época de chuva

As figuras 81 e 82 apresentam os cromatogramas obtidos para os extratos de *B. parinarioides* durante a época de seca e época de chuva. Segundo os resultados obtidos as duas amostras exibem perfis químicos similares, sendo a intensidade dos picos assinalados a principal diferença. Dessa forma, esses resultados confirmam a comparação realizada por CCDC, como foi visto no item 6.1, onde não se verifica diferença entre os constituintes presentes nas duas épocas coletadas.

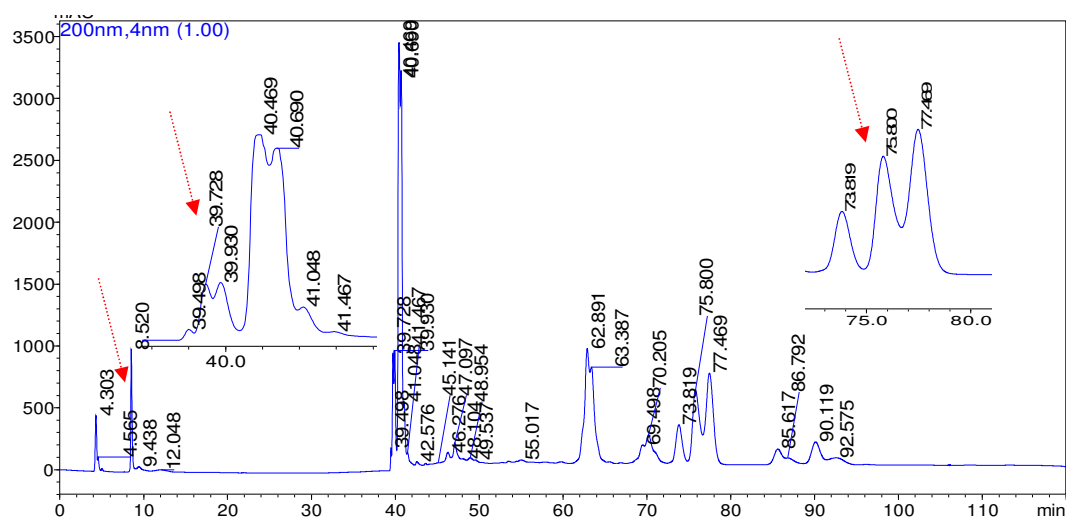


Figura 81: Cromatograma do extrato de *B. parinarioides* (época de seca).

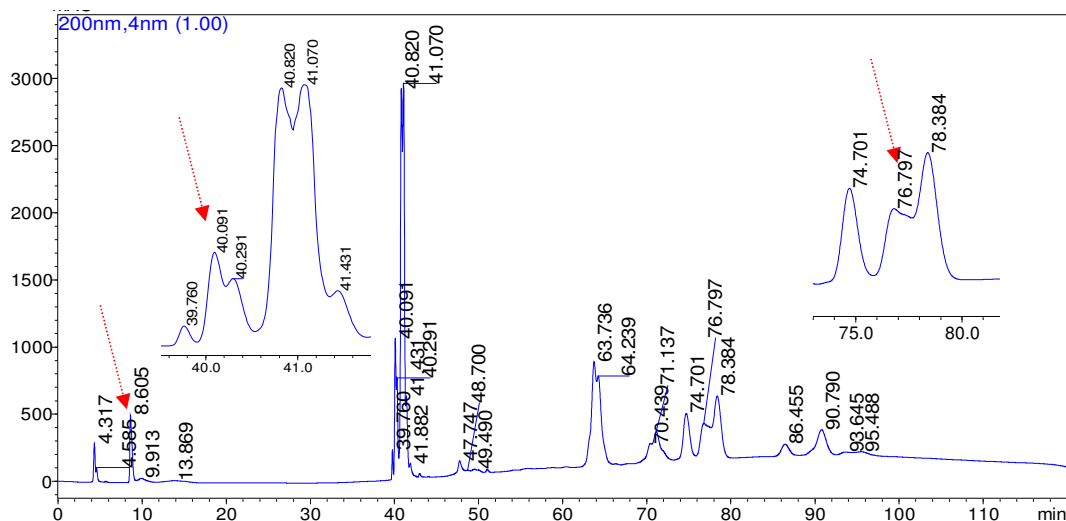


Figura 82: Cromatograma do extrato de *B. parinarioides* (época de chuva).

6.7.2. Injeção de padrões

Para identificar os componentes presentes nos extratos, injetaram-se padrões autênticos isolados das duas espécies descritos nos itens 6.4 e 6.5. Os tempos de retenção dos padrões testados são apresentados na tabela 10. E os cromatogramas nas figuras 83-92.

Tabela 10: Tempos de retenção dos padrões injetados. Volume de injeção 10µL. Concentração 1mg/mL.

Padrões isolados de <i>B. parinarioides</i> e <i>P. amapa</i>	TR (minutos)
Mistura de ésteres de lupeol ã hidroxilado	8.208
Mistura de triterpenos acetilados (ac. α , β - amirina e ac. de lupeol)	39.663
	39.883
	40.483
Acetato de lupeol isoaldo de <i>P. amapa</i>	40.453
Acetato de lupeol isolado de <i>B. parinarioides</i>	40.607
Mistura de ésteres de lupeol hidroxilado	59.002
	59.532
cicloartenol	75.538
butirospermol	77.179
tirucalla-7,24-dien-3 β -ol	81.162
cicloeucaleanol	86.885
obtusifoliol	93.382

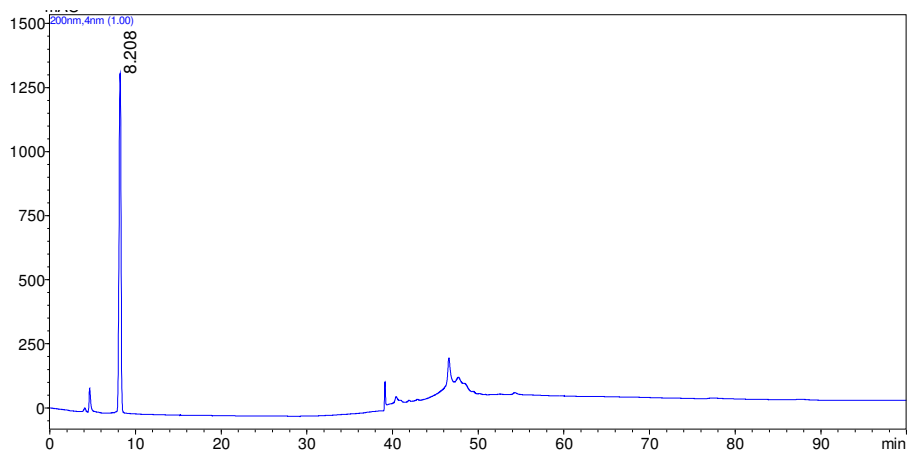


Figura 83: Padrão da mistura de ésteres de lupeol não hidroxilado isolado de *P. amapa*

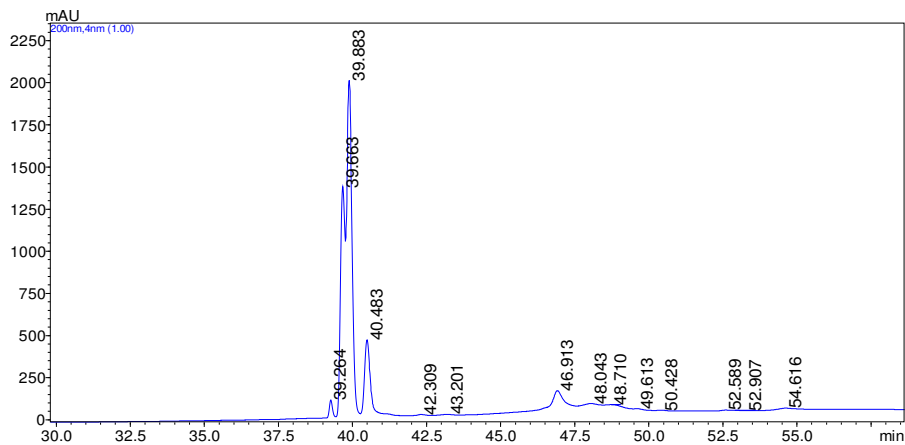


Figura 84: Região ampliada da análise do padrão da mistura de triterpenos acetilados -ac. α , β -amirina e ac. de lupeol) isolada de *P. amapa*.

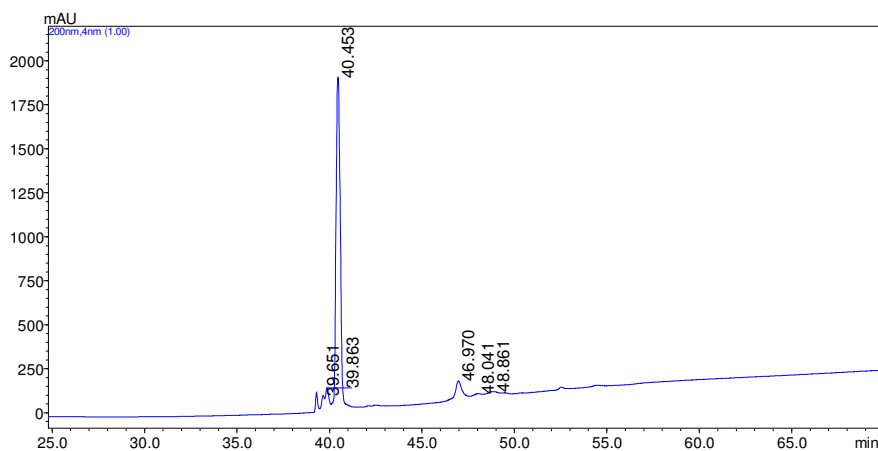


Figura 85: Padrão acetato de lupeol isolado de *P. amapa*.

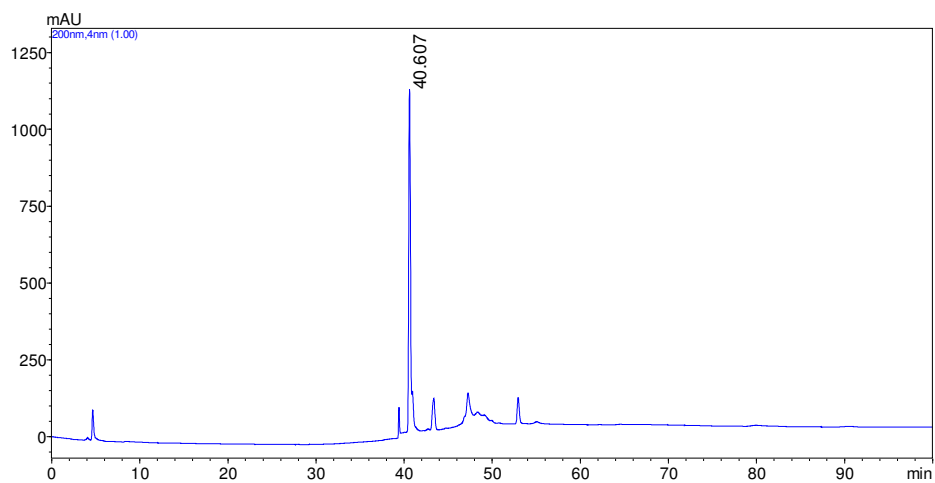


Figura 86: Padrão acetato de lupeol isolado de *B. parinarioides*.

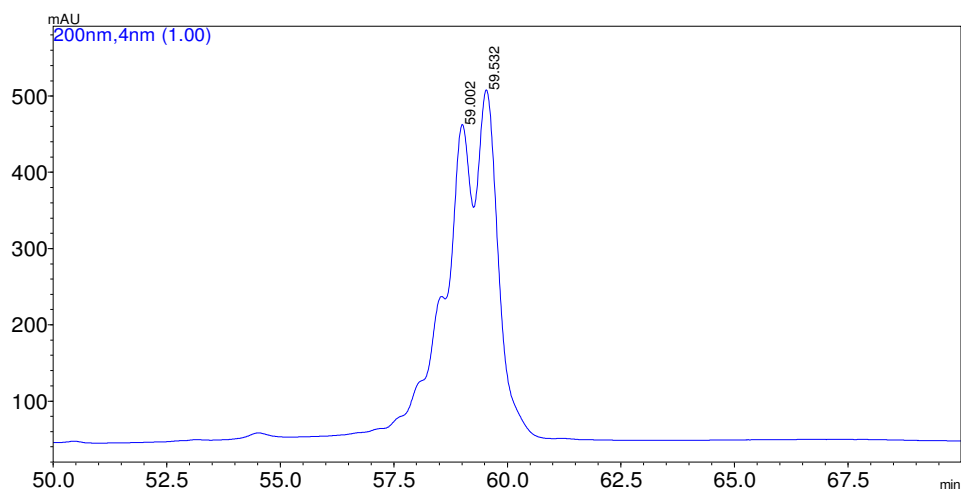


Figura 87: Região ampliada da análise do padrão mistura de ésteres de lupeol hidroxilado isolado de *P. amapa*.

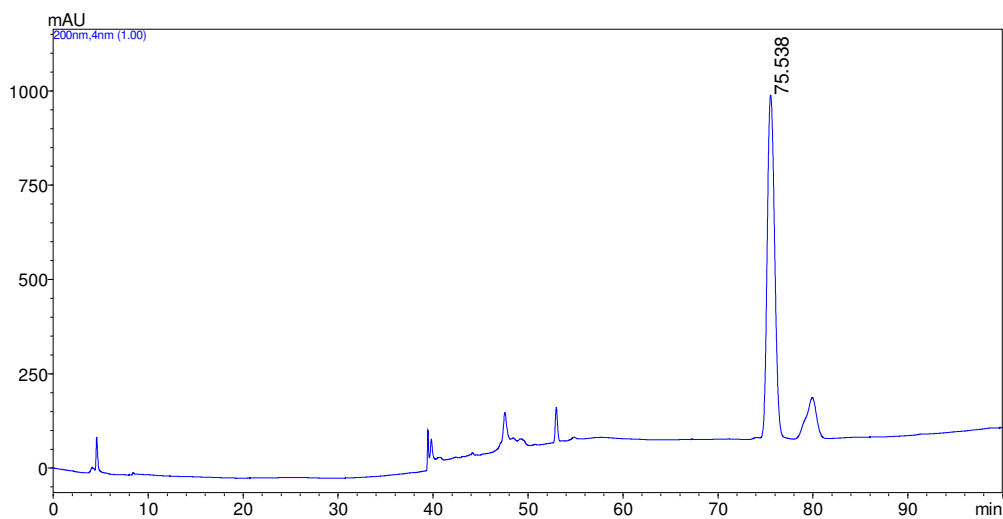


Figura 88: Padrão cicloartenol isolado de *B. parinarioides*.

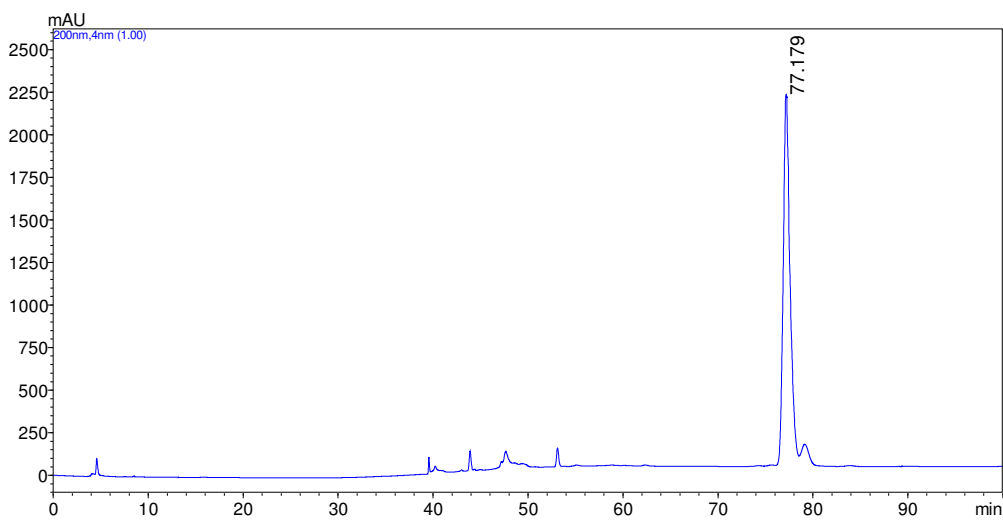


Figura 89: Padrão butirospermol isolado de *B. parinarioides*.

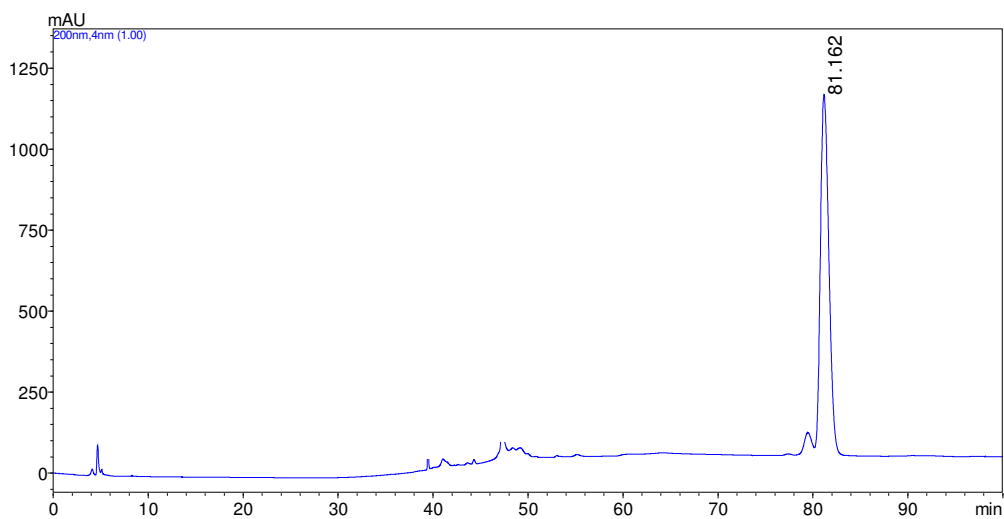


Figura 90: Padrão tirucalla-7,24-dien-3β-ol isolado de *B. parinarioides*.

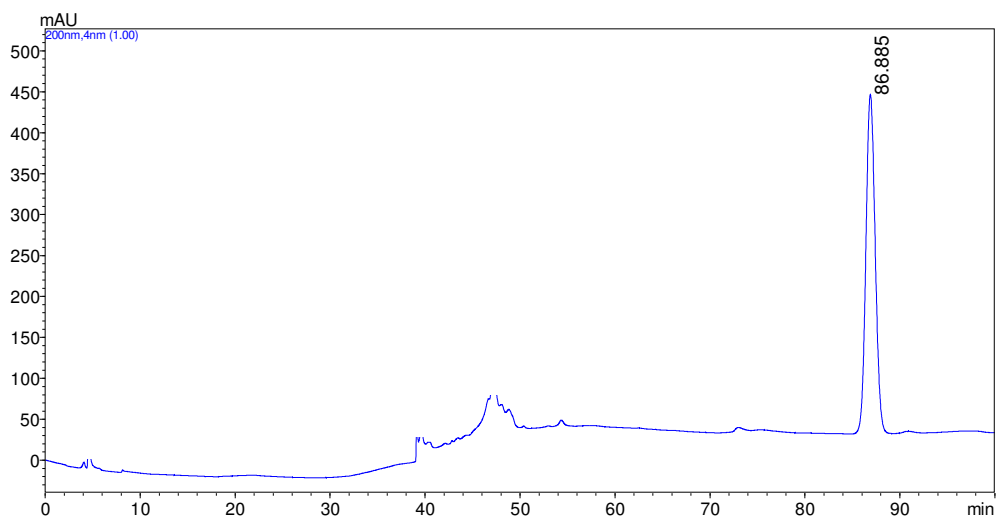


Figura 91: Padrão cycloeucalenol isolado de *B. parinarioides*.

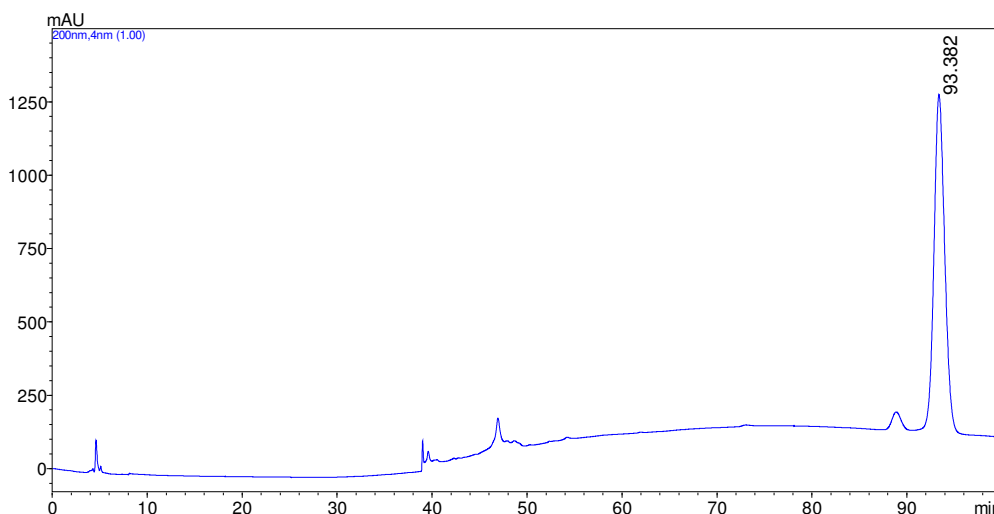


Figura 92: Padrão obtusifoliol isolado de *B. parinarioides*.

6.7.3. Identificação das substâncias: coinjeção de padrões

Inicialmente foi realizada a comparação dos tempos de retenção dos padrões injetados com os extratos. Posteriormente para determinar a presença dos possíveis padrões testados na seção anterior foram feitas coinjeções dos extratos de *B. parinarioides* da época de seca (BPL-DCM-2) e da época de chuva (BPL-DCM-3) e de *P. amapa* (PAL-DCM-2) com cada substância. Para isso uma alíquota do extrato na concentração de 5mg/mL foi utilizada juntamente com uma quantidade conhecida de cada padrão. Para algumas análises foi realizada a diluição em 50% do extrato para uma melhor visualização da coeluição do padrão.

O aumento da intensidade (altura) dos picos dos padrões e a diminuição dos outros picos no cromatograma original em um tempo de retenção já identificado para um padrão autêntico permitiu confirmar a presença ou a ausência das substâncias nas amostras.

Os cromatogramas obtidos para os extratos BPL-DCM-2 são apresentados nas figuras 93 a 99, e nas figuras 100 a 105 para o extrato PAL-DCM-2. O extrato da época de chuva (BPL-DCM-3) também foi utilizado para realização das coinjeções, porém como os resultados mostraram ser similares ao da época de seca (BPL-DCM-2), não houve necessidade de apresentar os cromatogramas.

Para uma melhor visualização dos resultados, será apresentado o cromatograma do extrato original (sem coinjeção) seguido do cromatograma com coinjeção, para ser comparada a intensidade do pico coinjetado e até mesmo dos outros componentes presentes no extrato como referência para o caso dos extratos que apresentam uma absorção elevada do componente que esta sendo verificado.

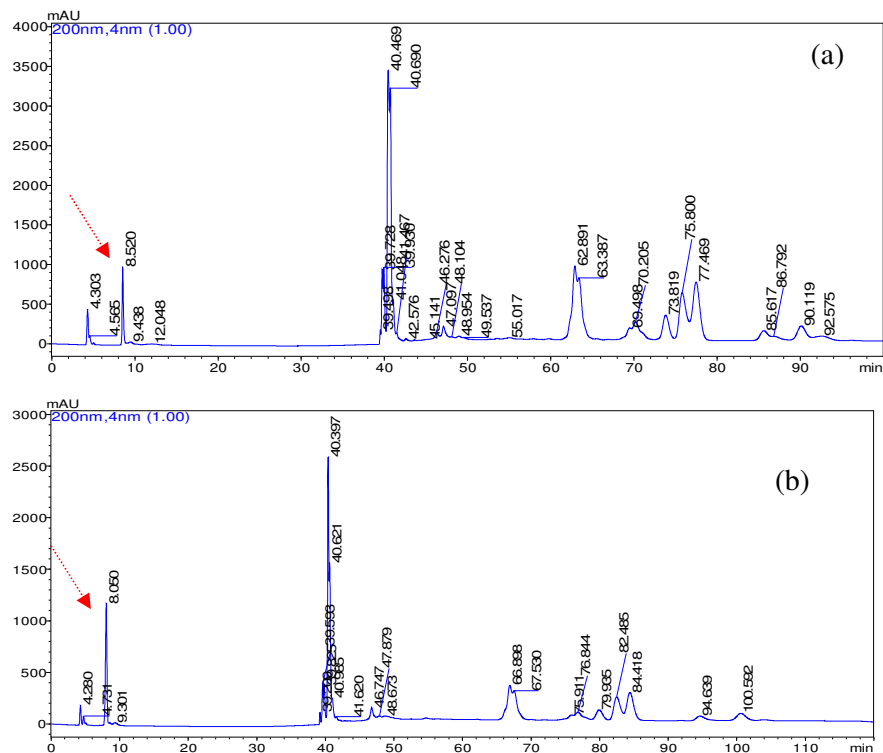
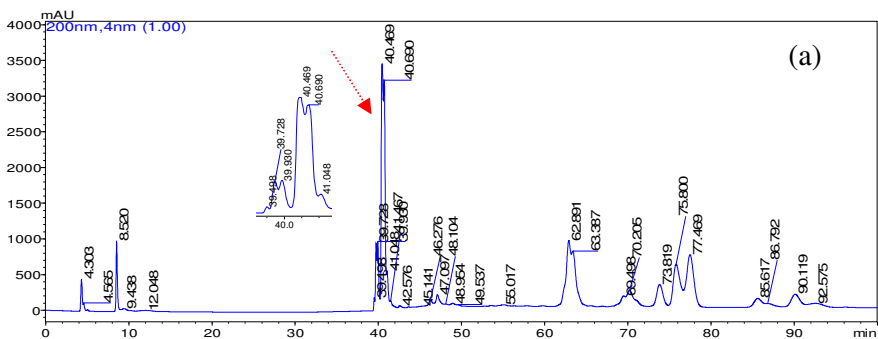


Figura 93: (a) Perfil do extrato original BPL-DCM-2 (b) Perfil do extrato BPL-DCM-2 com coinjeção do padrão de mistura de ésteres de lupeol não hidroxilado isolado de *P.amapa*.



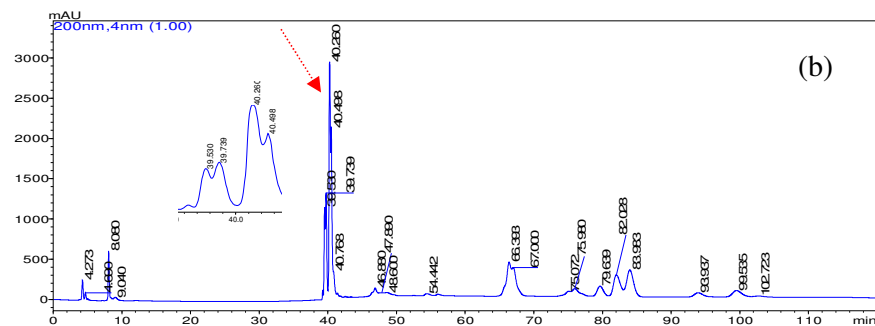


Figura 94: (a) Perfil do extrato original BPL-DCM-2 (b) Perfil do extrato BPL-DCM-2 com coinjeção do padrão de mistura de triterpenos acetilados isolada de *P.amapa* com ampliação da área coinjetada.

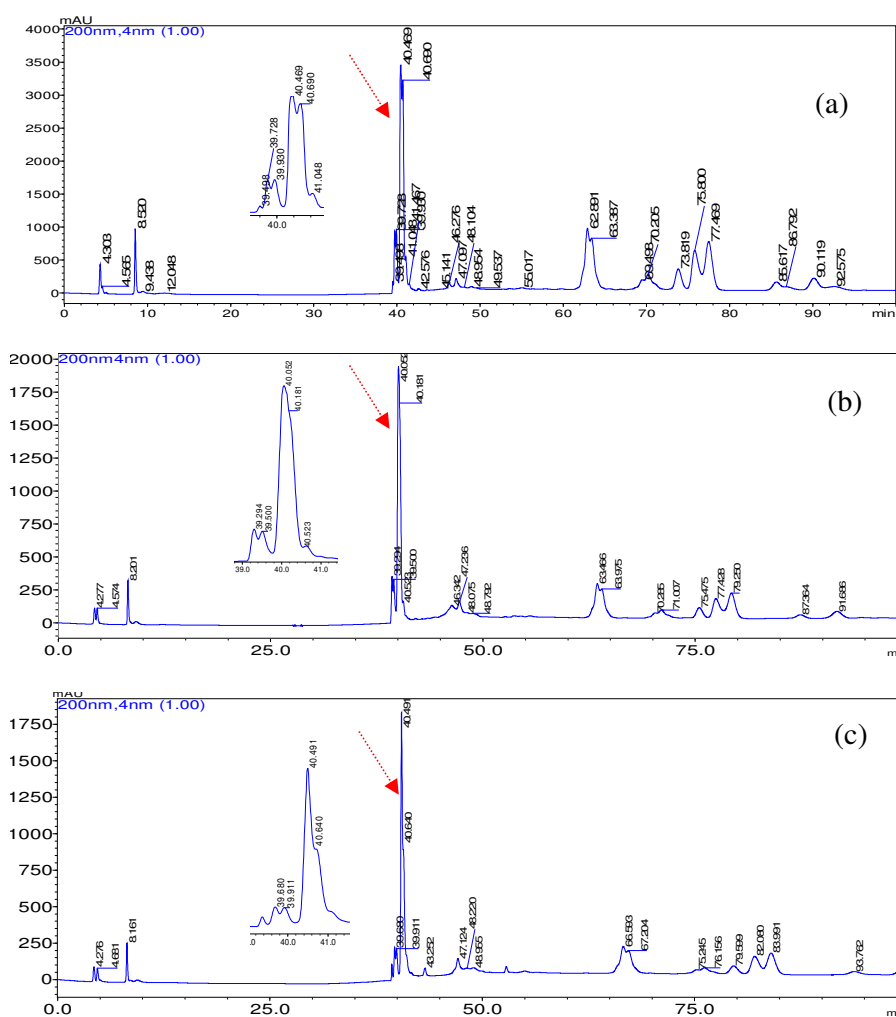


Figura 95: (a) Perfil do extrato original BPL-DCM-2 (b) Perfil do extrato BPL-DCM-2 com coinjeção do padrão de acetato de lupeol isolado de *P. amapa* (c) com coinjeção do padrão de acetato de lupeol isolado de *B. parinarioides*, com ampliações da área coinjetada.

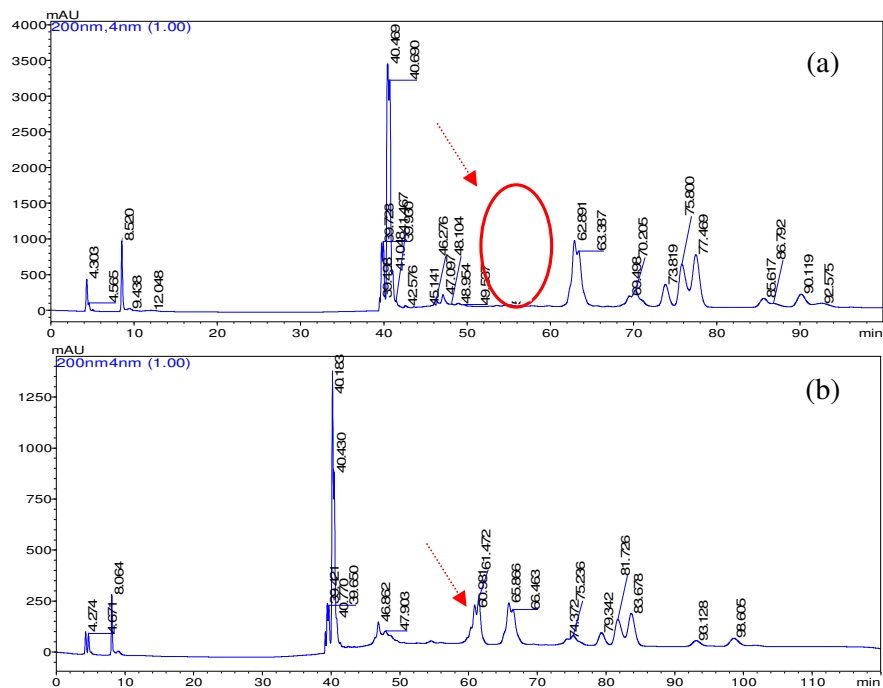


Figura 96: (a) Perfil do extrato original BPL-DCM-2 (b) Perfil do extrato BPL-DCM-2 com coinjeção do padrão de mistura de ésteres de lupeol hidroxilado isolado de *P. amapa*.

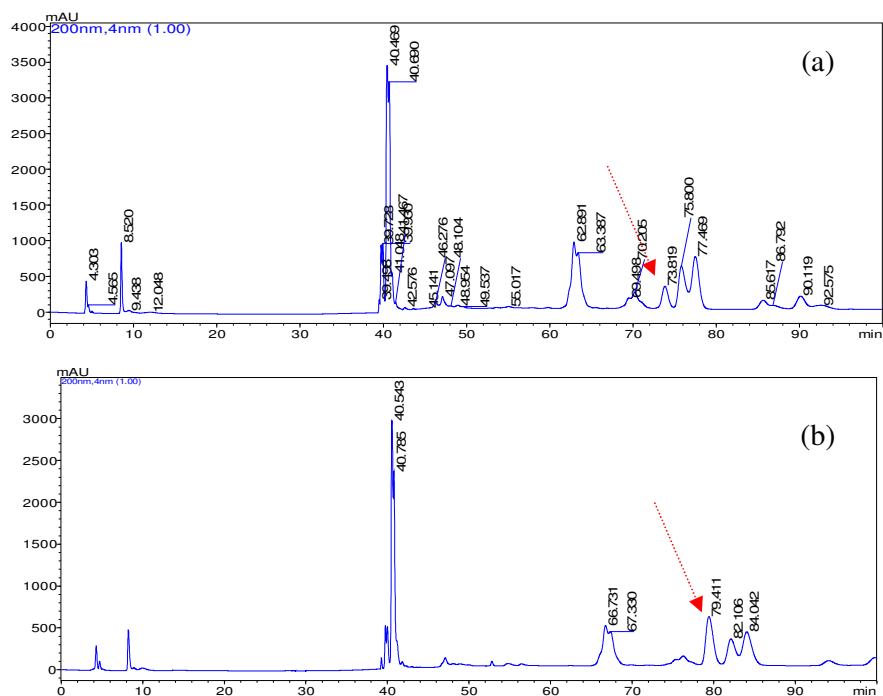


Figura 97: (a) Perfil do extrato original BPL-DCM-2 (b) Perfil do extrato BPL-DCM-2 com coinjeção do padrão de cicloartenol isolado de *B. parinarioides*.

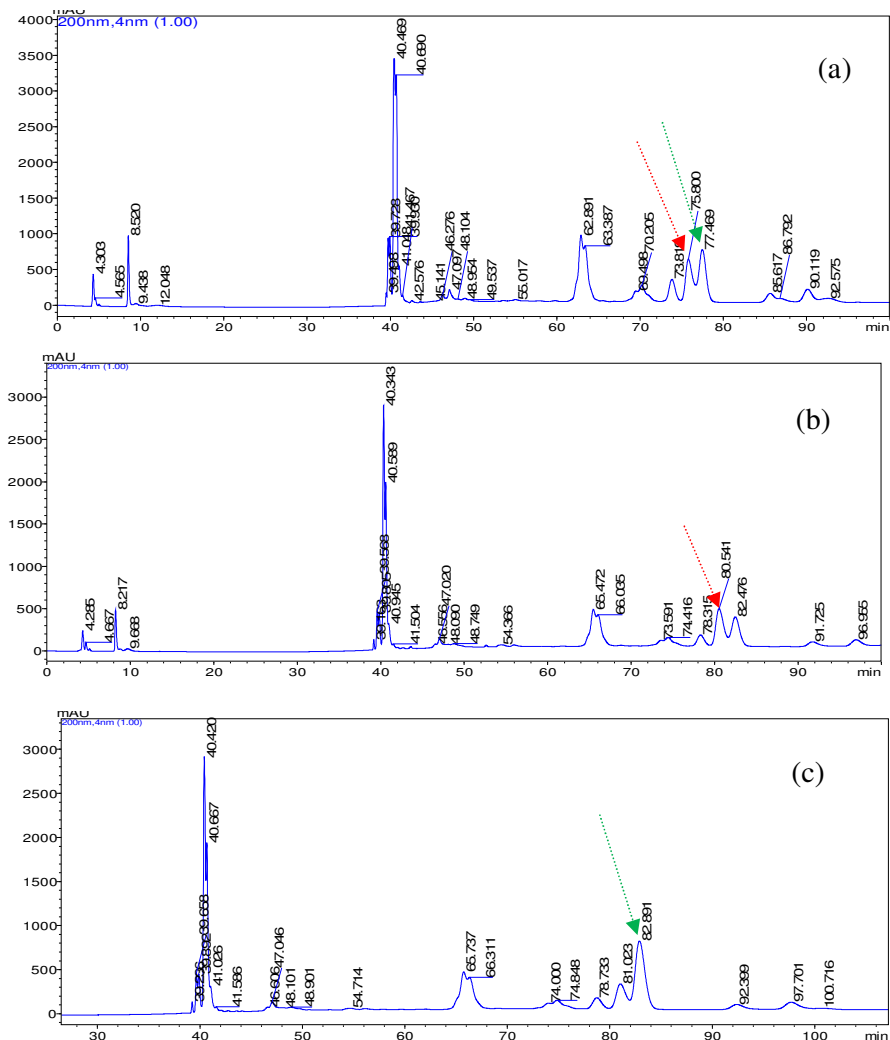
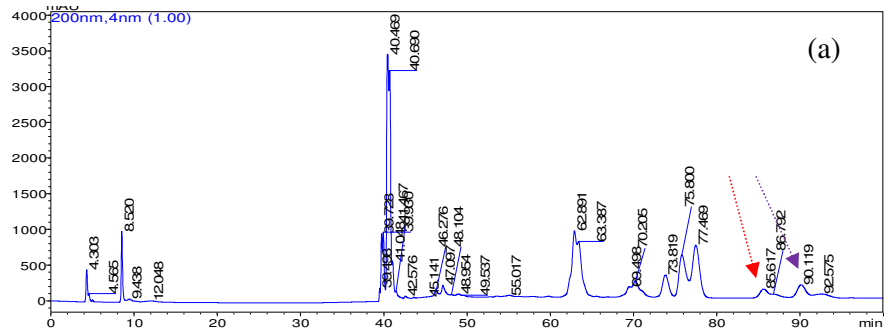


Figura 98: (a) Perfil do extrato original BPL-DCM-2 (b) Perfil do extrato BPL-DCM-2 com coinjeção do padrão butyrospermol (c) com coinjeção do padrão tirucalla-7,24-dien-3 β -ol, isolados de *B. parinarioides*.



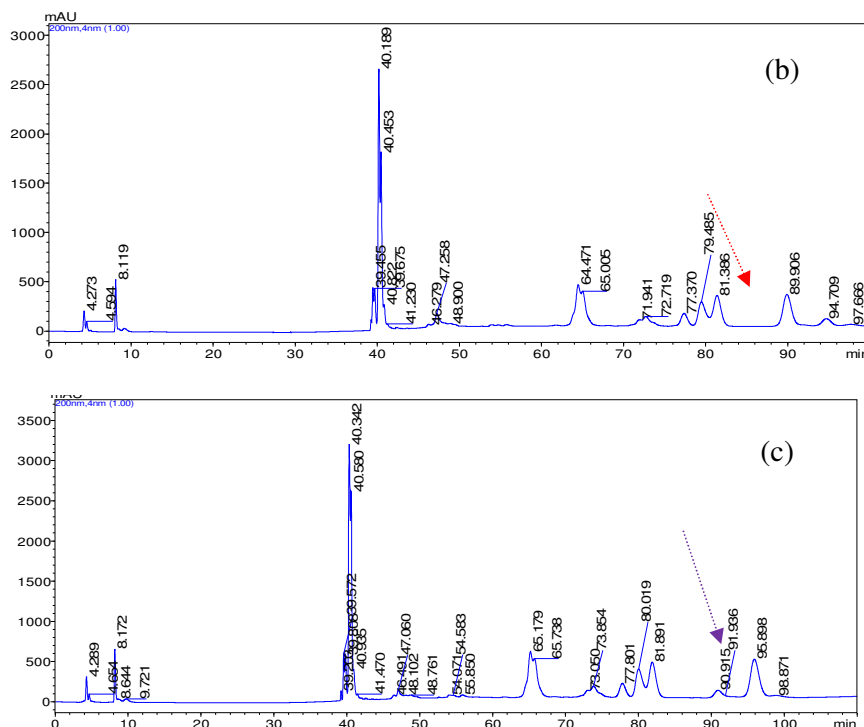
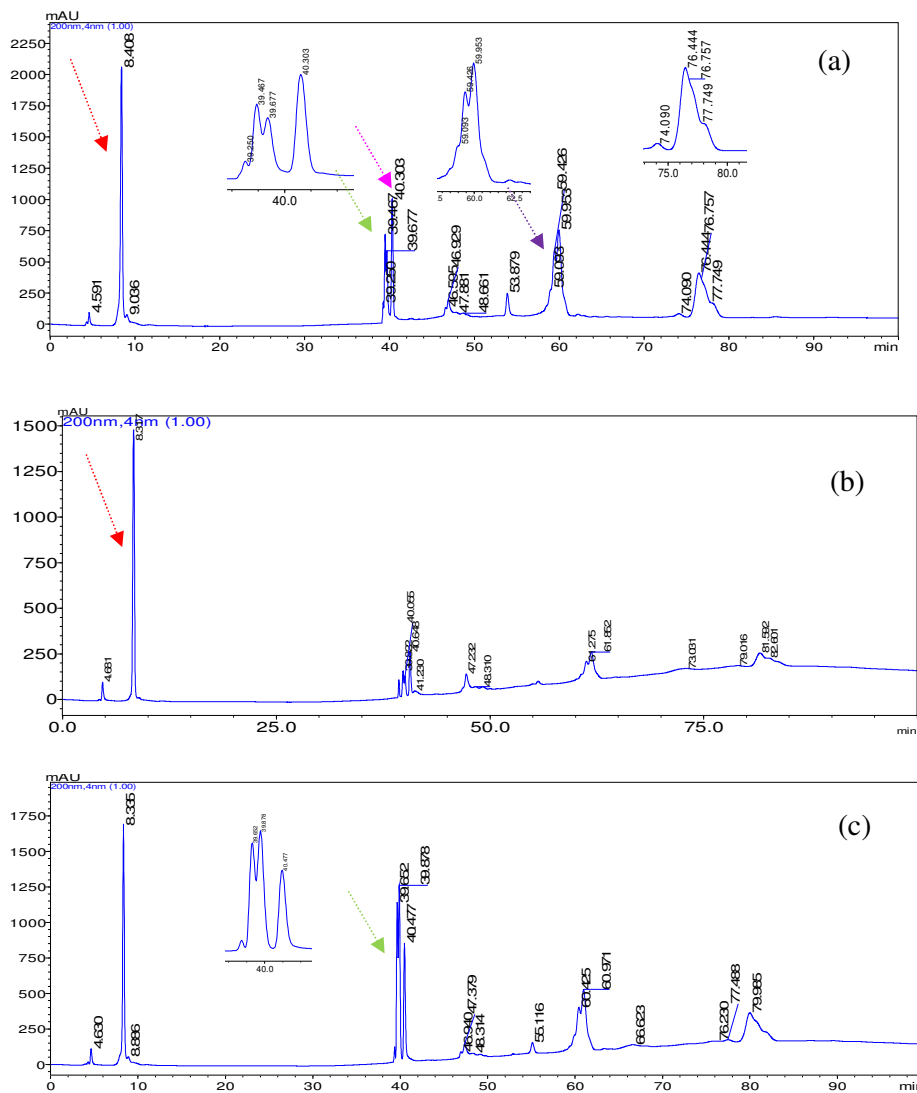


Figura 99: (a) Perfil do extrato original BPL-DCM-2 (b) Perfil do extrato BPL-DCM-2 com coinjeção do padrão cicloeucalenol (c) com coinjeção do padrão obtusifoliol, isolados de *B. parinarioides*.

No geral os cromatogramas das coinjeções apresentados para a espécie *B. parinarioides* pode sugerir a presença dos padrões acetato de α e β -amirina e de lupeol como mostra os cromatogramas das figuras 94 e 95 e ainda mostrou a presença dos padrões cicloartenol, butirospermol, tirucalla-7,24-dien-3 β -ol, cicloeucalenol e do obtusifoliol, padrões esses isolados da mesma espécie analisada. Porém a presença da mistura de ésteres de lupeol não hidroxilado não foi conclusiva como é mencionado na tabela 11, devido esse padrão não ter apresentado uma pureza elevada do pico e pela análise preliminar por CCDC do padrão no extrato também não ter apresentado as mesmas características do padrão original figura 80. No entanto, a análise de coinjeção da mistura dos ésteres de lupeol hidroxilados foi clara, mostrando a ausência do padrão no extrato conforme mostra a figura 96. Tal resultado é considerado de grande relevância, pois essa diferença de composição pode ser empregada no desenvolvimento de um método de autenticidade do látex utilizado. Ressaltando que este trabalho evidencia o isolamento de substâncias que são descritos ocorrer pela primeira vez na espécie *Brosimum parinarioides*. Sendo, portanto, a primeira vez que se realiza análise

do perfil do látex do leite de amapá das espécies *P. amapa* e *B. parinarioides*, ambas conhecidas como amapá, juntamente com seus padrões autênticos.

O mesmo foi realizado com o extrato da espécie *P. amapa* onde a figura 100 mostra os perfis das coinjeções do extrato de *P. amapa* com os padrões de mistura de ésteres de lupeol não hidroxilado, mistura de triterpenos acetilados, acetato de lupeol e a mistura de ésteres de lupeol hidroxilado, padrões esses, isolados da própria espécie.



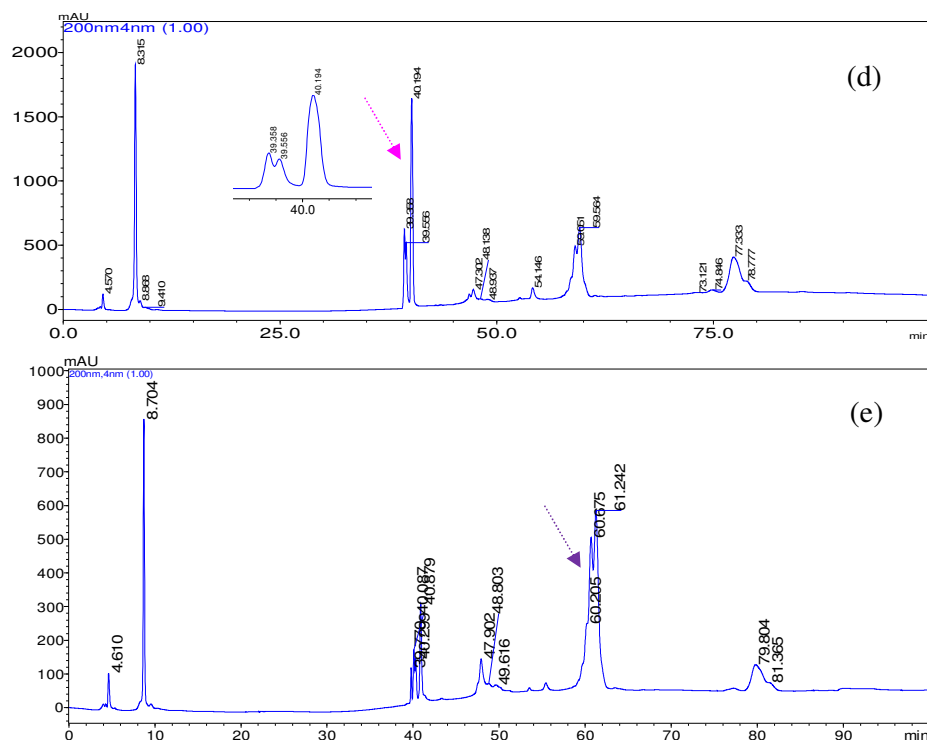


Figura 100: (a) Perfil do extrato original -PAL-DCM-2 (b) Perfil do extrato PAPL-DCM-2 com coinjeção do padrão mistura de ésteres de lupeol não hidroxilado (c) com coinjeção do padrão mistura de triterpenos acetilados (d) com coinjeção do padrão acetato de lupeol (e) com coinjeção do padrão mistura de ésteres de lupeol hidroxilado, isolados de *P. amapa*.

Foi realizada também a análise de coinjeção do padrão acetato de lupeol isolado da espécie *B. parinarioides*, o qual mostrou o mesmo perfil obtido para o acetato de lupeol isolado da espécie *P. amapa* com diferença apenas na intensidade. Ressaltando, que os extratos foram inicialmente diluídos em 50% para uma melhor visualização desse padrão. Portanto, verificou-se que a altura do pico do padrão teve um aumento significativo já que pela diluição deveria ter uma altura inferior como se verifica para os outros componentes presentes no extrato, por ex. para o acetato de α e de β -amirina (figura 101).

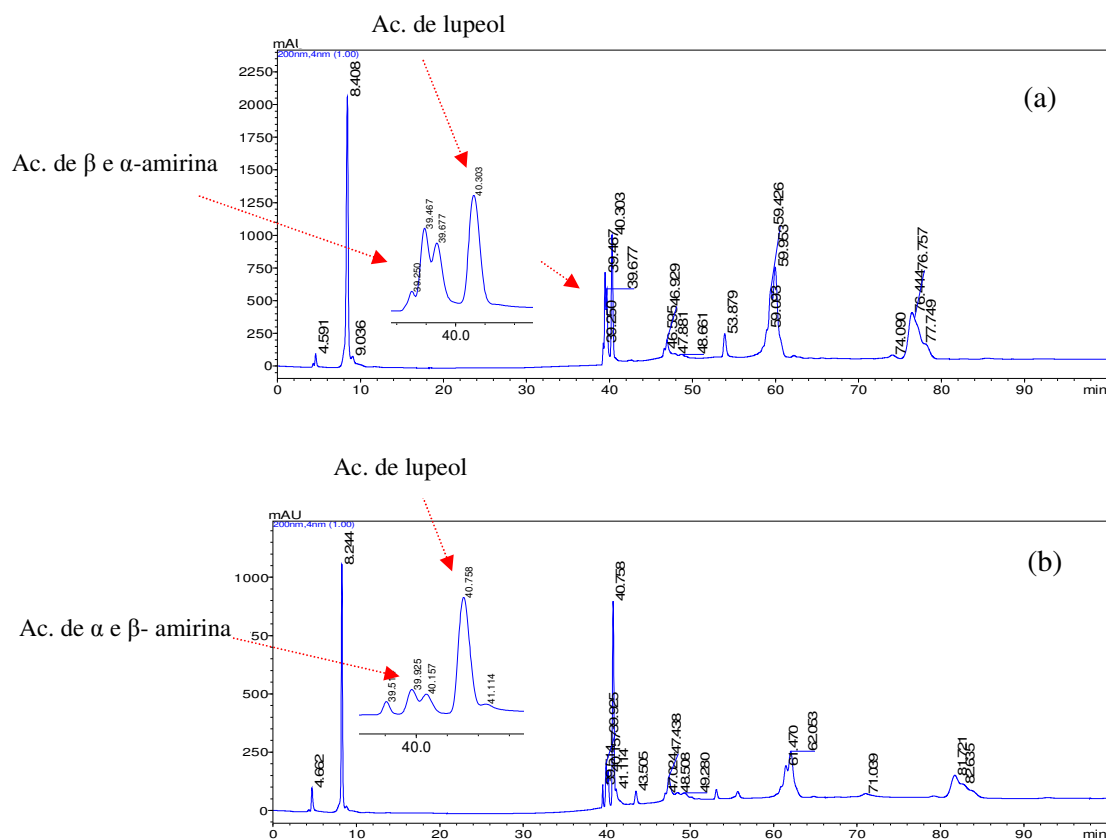
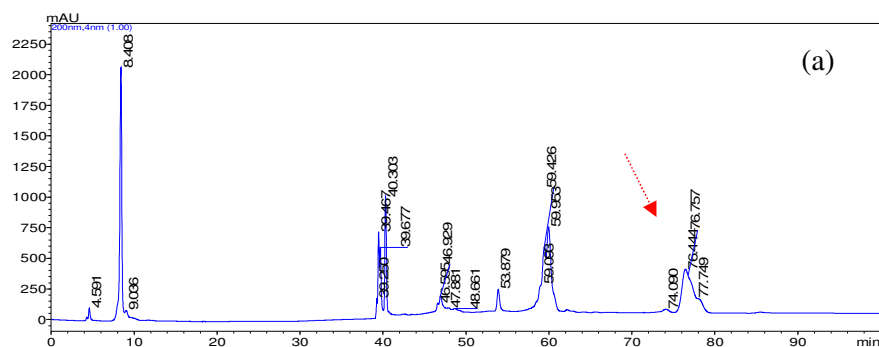


Figura 101: (a) Perfil do extrato original -PAL-DCM-2 com região complexa ampliada (b) Perfil do extrato PAL-DCM-2 com coinjeção do padrão acetato de lupeol isolado de *B. parinarioides*.

Os cromatogramas das coinjeções do extrato de *P. amapa* (PAL-DCM-2) com os padrões isolados da espécie *B. parinarioides* encontram-se nas figuras 101 a 105.



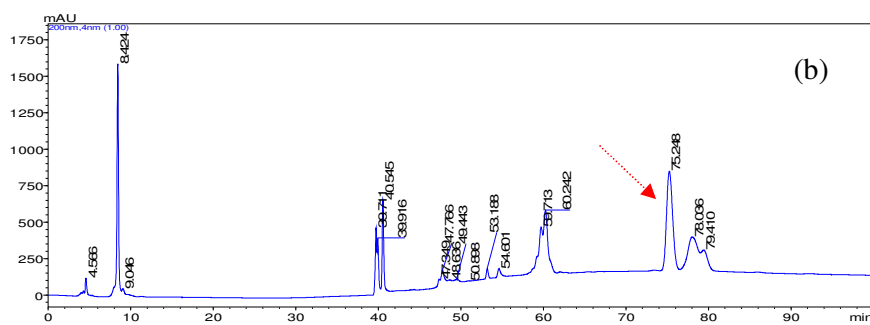


Figura 102: (a) Perfil do extrato original -PAL-DCM-2 (b) Perfil do extrato PAPL-DCM-2 com coinjeção do padrão cicloartenol isolado de *B.parinarioides*.

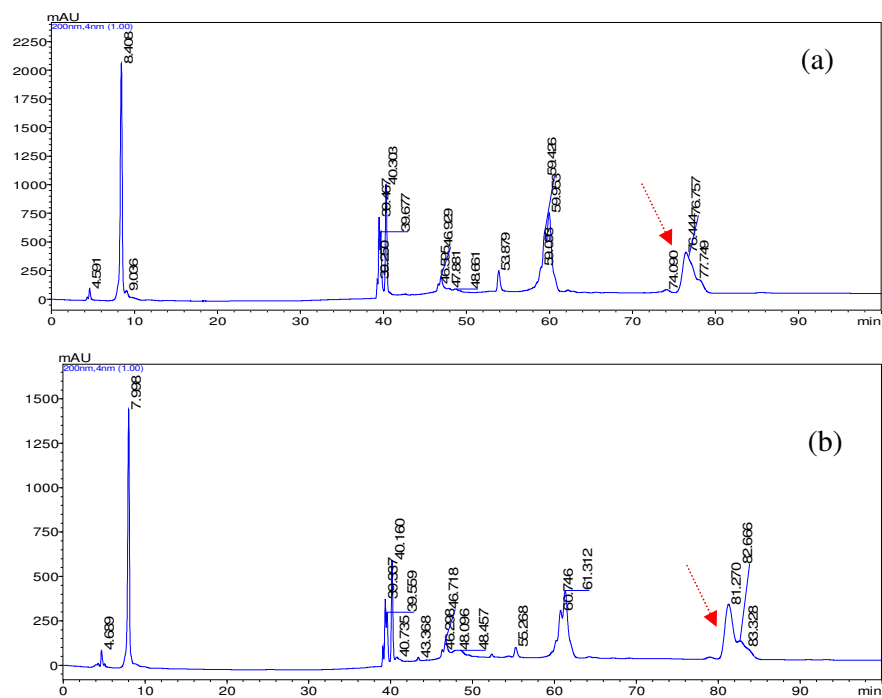


Figura 103: (a) Perfil do extrato original -PAL-DCM-2 (b) Perfil do extrato PAPL-DCM-2 com coinjeção do padrão butirospermol isolado de *B.parinarioides*.

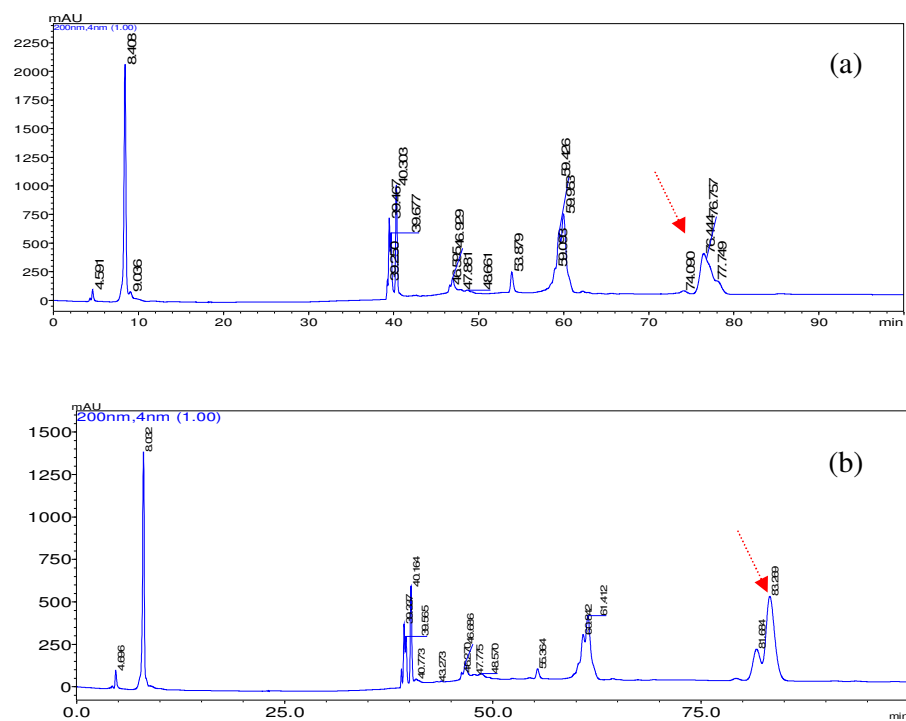
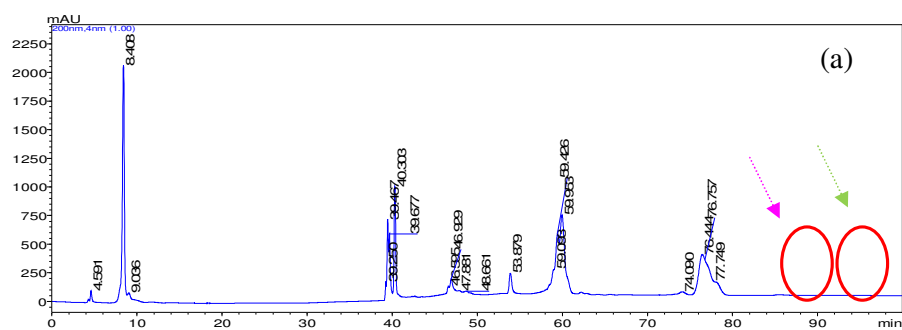


Figura 104: (a) Perfil do extrato original -PAL-DCM-2 (b) Perfil do extrato PAPL-DCM-2 com coinjeção do padrão tirucalla-7,24-dien-3 β -ol isolado de *B.parinarioides*.



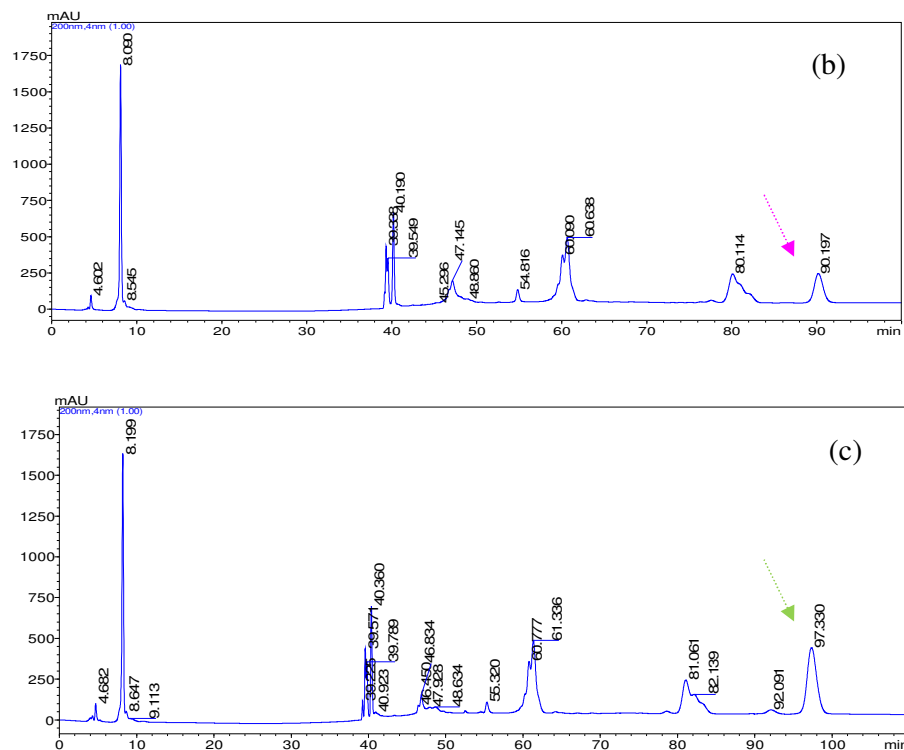


Figura 105: (a) Perfil do extrato original -PAL-DCM-2 (b) Perfil do extrato PAPL-DCM-2 com coinjeção do padrão cicloecalenol (c) com coinjeção do padrão obtusifoliol, isolados de *B.parinarioides*.

De forma geral foi possível sugerir a presença dos padrões butirospermol tirucalla-7,24-dien-3 β -ol e cicloartenol conforme as figuras 102 a 104 e a ausência dos padrões cicloecalenol e obtusifoliol, confirmando assim a análise preliminar realizada por CCDC com esses padrões.

Portanto, as comparações qualitativa dos perfis por CLAE, apresentou um resultado satisfatório, contribuindo de forma relevante para o estudo da composição química das duas espécies de amapá.

Tabela 11: Comparação entre os tempos de retenção no perfil cromatográfico (sem coinjeção) e os tempos de retenção nas coinjeções para os extratos BPL-DCM-2 e PAPL-DCM-2 obtidos do látex do leite de amapá de *B. parinarioides* (época de seca) e *P. amapa*.

BPL-DCM-2			
Padrões	TR (min.) s/ coinjeção	TR (min.) c/ coinjeção	Resultado
mistura de ésteres de lupeol (não hidroxilado)	8,520	8,050	+
mistura de triterpenos acetilados (ac. α e β - amirina e de lupeol)	39,728	39,530	++
	39,930	39,739	++
	40,469	40,260	++
acetato de lupeol (P)	40,469	40,052	++
acetato de lupeol (B)	40,469	40,491	++
mistura de ésteres de lupeol (hidroxilado)	--	60,981	-
	--	61,472	-
cicloartenol	73,819	79,411	++
butirospermol	75,800	80,541	++
tirucalla-7-24-dien-3 β -ol	77,469	82,891	++
cicloeucaleanol	85,617	89,906	++
obtusifoliol	90,119	95,898	++
PAPL-DCM			
Padrões	TR (min.) s/ coinjeção	TR (min.) c/ coinjeção	Resultado
mistura de ésteres de lupeol (não hidroxilado)	8,408	8,317	++
mistura de triterpenos acetilados (ac. α e β - amirina e de lupeol)	39,467	39,662	++
	39,677	39,878	++
	40,303	40,477	++
acetato de lupeol (P)	40,403	40,194	++
acetato de lupeol (B)	40,303	40,758	++
mistura de ésteres de lupeol (hidroxilado)	59,426	60,675	++
	59,953	61,242	++
cicloartenol	74,090	75,248	++
butirospermol	76,444	81,270	++
tirucalla-7-24-dien-3 β -ol	77,749	83,269	++
cicloeucaleanol	--	90,197	-
obtusifoliol	--	97,330	-

(++) O resultado da coinjeção sugere a presença do padrão no extrato.

(+) O resultado da coinjeção não é conclusivo sobre a presença do padrão no extrato.

(-) O resultado da coinjeção confirma a ausência do padrão no extrato.

6.8. Teste de Coagulação

Como apresentado na tabela 12, nos testes efetuados de coagulação, o DMSO (controle negativo), conforme esperado, não interferiu no tempo de coagulação sanguínea. Quando examinados pelo TP, os extratos diclorometânicos e metanólicos de *P.amapa* PAP-DCM-2 e PAP-M-2, respectivamente, não apresentaram atividade coagulante e nem anticoagulante significativa pelo método TP, pois a média do tempo de coagulação para os extratos e substâncias isoladas apresentaram valores próximos ao controle negativo (DMSO), e ao comparar com a média do valor obtido para o controle positivo de anticoagulante (heparina), os valores foram bem distintos, o que indica uma atividade anticoagulante não significativa também.

No entanto, embora o resultado tenha sido negativo para atividade coagulante e anticoagulante pelo método TP, vale ressaltar que é de grande importância ter sido realizada a avaliação dos extratos e substâncias isoladas do látex dessa espécie, pois a mesma tem sido utilizada pela população amazônica como cicatrizante. E segundo CARNEIRO *et al*, 2010 e MANDELBAUM *et al.*, 2003, a coagulação é uma das primeiras etapas envolvidas no processo de cicatrização, que compreende de uma forma mais completa a coagulação, inflamação, proliferação, contração da ferida e remodelação. Deste modo, vale ressaltar que ainda é necessário uma avaliação envolvendo a via intrínseca pelo Tempo de tromboplastina parcialmente ativada (TTPa), para que possa ser descartada o seu uso como cicatrizante .

Tabela 12: Avaliação de interferência na atividade de protombina (TP)

Amostra	Concentração final ^a	Tempo de coagulação(s) ^b
DMSO		14,4 ± 0,3
BPL-DCM-2	1mg/mL	14,8 ± 0,1
BPL-M-2	1mg/mL	13,2 ± 0,2
BPL-M-2-F-DCM	1mg/mL	13,7 ± 0,06
DMSO		13,8 ± 0,1
BPL-M-2-F-AcOEt	1mg/mL	13,5 ± 0,3
BPL-M-2-F-Hidro.	1mg/mL	13,5 ± 0,2
MIST-1	0,1 mg/mL	14,7 ± 0,06
MIST-2	0,1 mg/mL	14,4 ± 0,1
DMSO		14,6 ± 0,1
PAPL-DCM-2	1 mg/mL	13,9 ± 0,2
PAPL-M-2	1 mg/mL	14,8 ± 0,1
PAP-M-F- AcOEt	1 mg/mL	14,1 ± 0,1
SUBST-6	0,1 mg/mL	15,8 ± 0,4
MIST-3	0,1 mg/mL	14,4 ± 0,3
DMSO		17,4 ± 0,3
PAPL-M-2-F-Hidro.	1 mg/mL	16,9 ± 0,2
PAPL-M-2-F-DCM	1 mg/mL	14,5 ± 0,2
heparina ^c	0,05 mg/mL	42,9 ± 0,005

^a A concentração inicial foi de 1mg/ mL para substâncias puras e 10 mg/mL para extratos.

^bValores são a média do experimento em triplicata; ± média do desvio padrão

^cControle positivo (anticoagulante)

Legenda :

- **BPL-DCM-2/ PAPL-DCM-2-** Extrato diclorometânico da espécie *B.parinarioides* e *P.amapa*.
- **BPL-M-2/ PAPL-M-2-** Extrato metanólico da espécie *B. parinarioides* e *P.amapa*.
- **BPL-M-2-F-DCM/ PAP-M-F- DCM-** Fase DCM da partição com extrato metanólico de *B.parinarioides* e *P.amapa*.
- **BPL-M-2-F-AcOEt/ PAP-M-F- AcOEt** - Fase AcOEt da partição com extrato metanólico de *B. parinarioides* e *P.amapa*.
- **BPL-M-2-F-Hidro/ PAPL-M-2-F-Hidro-** Fase hidroalcoólica da partição com extrato metanólico de *B. parinarioides* e *P.amapa*.
- **MIST-1-** mistura de ésteres de lupeol não hidroxilados
- **MIST-2-** mistura de triterpenos acetilados (acetato de α e β - amirina e acetato de lupeol)
- **MIST-3-** mistura de ésteres de lupeol hidroxilados
- **SUBST-6-** acetato de lupeol isolado de *P.amapa*.

6.9. Inibição da enzima Lipooxigenase (LOX)

Lipoxigenases (LOX) são enzimas responsáveis pela síntese de hidroxiácidos e leucotrienos a partir do ácido araquidônico. Os 5-12- e 15-LOX são os mais importantes para a síntese de espécies de leucotrienos e hidroxiácidos que tem grande importância nas inflamações e reações alérgicas. A inibição das enzimas fosfolipase, ciclooxigenase, e lipoxigenase reduz a produção de ácido araquidônico, prostaglandinas, e leucotrienos, que são mediadores cruciais no mecanismo da inflamação (KIM *et al.*, 2004; MIYASHIRO, 2010).

Algumas agliconas como quercetina e kaempferol apresentaram inibição à enzima 15-lipoxigenase da soja (ALCARAZ & HOULT, 1985) e atividade anti-inflamatória (GABOR *et al.*, 1984; MELO, 1991).

No ensaio de inibição enzimática lipoxigenase a quercetina foi utilizada como controle positivo. Os dados de percentagens de inibição da lipoxigenase dos extratos metanólicos e diclorometânicos do látex do leite de amapa de *B. parionarioides* e *P. amapa* são mostrados na tabela 13, as percentagens são apresentadas na menor concentração que apresentou inibição acima de 50 %. Na análise dos resultados foi possível observar que os extratos diclorometânicos e metanólicos de ambas as espécies apresentam potencial inibitório. Assim, como a MIST-2 (mistura de triterpenos acetilados) e o acetato de lupeol isolado de *P. amapa* que apresentaram ativos na mesma concentração de quercetina.

Os dados de inibição enzimática dos extratos do látex do leite de amapá corroboram com o uso popular recomendado para problemas pulmonares como asma, uma vez que a inibição da lipoxigenase reduziria a formação dos leucotrienos C4 e D4, leucotrienos esses relacionados a várias doenças alérgicas em particular bronquite asmática.

Tabela 13: Inibição quantitativa *in vitro* da lipooxigenase por extratos diclorometânicos e metanólicos de *P. amapa* e *B. parinarioides* e de algumas substâncias isoladas de *P. amapa*.

Extrato de <i>Parahancornia amapa</i> -PAPL-2		
Extratos/Substâncias	Concentração inibitória mínima (µg/mL)	Inibição (%)^a
PAPL-DCM-2	200	95,4
PAP-M-2	200	97,6
mistura de triterpenos acetilados (MIST-2)	200	85,8
mistura de ésteres de lupeol hidrox. (MIST-3)	20	-50
mistura de ésteres de lupeol n-hidrox. (MIST-1)	20	-50
acetato de lupeol (P)- SUBST-6	20	84,3
Extrato de <i>Brosimum parinarioides</i> -BPL-2		
Extratos/Substâncias	Concentração inibitória mínima (µg/mL)	Inibição (%)^a
BPL-DCM-2	200	97,6
BPL-M-2	200	87,9
Quercetina ^b	20	94,6

^aValores são a média do experimento em triplicata

^bControle positivo

7. CONCLUSÃO

O leite de amapá é um medicamento de uso popular amazônico usado por populações ribeirinhas e urbanas há tempos e devido à existência de várias espécies conhecidas por nome “amapá”, os estudos voltados para a descrição da composição química e controle de qualidade tem sido de grande importância. Portanto, esse trabalho contribuiu de forma significativa através do estudo da composição química e comparação dos perfis do látex das espécies *Parahancornia amapa* e *Brosimum parinarioides*.

As análises dos extratos diclorometânicos da época de seca (BPL-DCM-2) e época de chuva (BPL-DCM-3) quando comparados qualitativamente tanto por cromatografia em camada delgada comparativa (CCDC) quanto por CLAE-DAD-UV em modo normal, indicaram que os mesmos contêm a mesma composição química, diferenciando apenas na intensidade dos picos, ou seja, a maior concentração das substâncias acetato de β ou α -amirina no extrato de época de chuva e do acetato de lupeol e do butirospermol no extrato coletado na época de seca.

O estudo da composição química do látex de *B. parinarioides* resultou no isolamento e identificação de cinco triterpenos, cicloartenol, butirospermol e seu epímero tirucalla-7-24-dien-3 β -ol, cicloeucalenol e o obtusifoliol, obtidos do extrato em diclorometano e até então não descritos para essa espécie.

A caracterização da cadeia dos ésteres de lupeol hidroxilado e não hidroxilado, obtidos do látex de *P. amapa*, realizada através de transesterificação ácida e seguida de análise por CG-EM, revelou que os ésteres não hidroxilados têm como característica uma cadeia que varia de 18 a 24 carbonos, enquanto que os ésteres hidroxilados apresentaram uma variação na cadeia de 14 a 20 carbonos. Esses resultados são diferentes da caracterização dos ésteres de lupeol encontrados na literatura citada.

Nesse trabalho também foi desenvolvida uma metodologia de análise por CLAE, em fase normal, para obtenção dos perfis cromatográficos do extrato diclorometânico de *B. parinarioides* e *P. amapa* juntamente com os padrões autênticos isolados das duas espécies, tais como a mistura de ésteres de lupeol hidroxilado e não hidroxilado, mistura de triterpenos acetilados isolados, acetato de lupeol, cicloartenol, butirospermol, tirucalla-7,24-dien-3 β -ol, cicloeucalenol e o obtusifoliol. Os resultados obtidos mostraram que os extratos de *B. parinarioides* e de *P. amapa* apresentaram constituintes comuns como os acetatos de α e β -amirina e de lupeol e distintos como a mistura de ésteres hidroxilados, que ocorreu apenas na espécie *P. amapa* e o cicloeucalenol e o obtusifoliol, que ocorreu apenas na espécie *B. parinarioides*. Tal diferença pode ser usada para determinação de um método de controle de qualidade do látex utilizado pela população local.

A avaliação da atividade terapêutica da mistura de ésteres hidroxilado e não hidroxilado, mistura de triterpenos acetilados, acetato de lupeol e dos extratos em diclorometano e em metanol das duas espécies foi obtida através do ensaio de coagulação, onde não foi possível verificar um resultado positivo utilizando o Teste de Protrombina que avalia a via extrínseca de coagulação. Porém, ainda é necessário uma avaliação envolvendo a via intrínseca pelo Tempo de tromboplastina parcialmente ativada (TTPa), para que possa ser descartada o seu uso como cicatrizante.

Quanto à avaliação de atividade antiinflamatória indicada, foi possível confirmar a inibição da enzima lipooxigenase para a mistura de triterpenos acetilados (ac. de α e β -amirina e de lupeol) e ambos os extratos, o que corrobora para o uso popular contra asma e doenças pulmonares, uma vez que a enzima lipooxigenase está envolvida em processos inflamatórios relacionados a essas doenças anteriormente citadas.

8. REFERÊNCIAS

- ABE, I.; ROHMER, M.; PRESTWICH, G. D. Enzymatic cyclization of squalene and oxidosqualene to sterols and triterpenes. **Chemical Reviews**, v. 93, p. 2189–2206, 1993.
- AGUIAR, V. C. **Aspectos bioquímicos, toxicológicos e alergênicos do látex da planta *Calotropis procera* (Ait.) R. Br.** Fortaleza: UFC, Tese (Doutorado em Bioquímica) – Universidade Federal do Ceará, 2006. 183 p.
- AKERELE O. Summary of WHO guidelines for the assessment of herbal medicines. **HerbalGram**, v. 28, p. 13-19, 1993.
- AKIHISA, T.; KOJIMA, N.; KIKUCHI, T.; YASUKAWA, K.; TOKUDA, H.; MASTERS, E. T.; MANOSROI, A.; MANOSROI, J. Anti-Inflammatory and Chemopreventive Effects of Triterpene Cinnamates and Acetates from Shea Fat. **Journal of Oleo Science**, v. 59, n. 6, p. 273-280, 2010.
- ALCARAZ, M. J.; HOULT, J. R. S. Effects of hypolaetin-8-glucoside and related flavonoids on soyabean lipoxygenase and snake venenon phospholipase A2. **Arch Int Pharmacodyn**, v. :4, p. 278, 1985.
- ANJANEYULU, V.; RAVI, K.; PRASAD, K. H.; CONNOLLY, J. D. Triterpenoids From *Magnifera Indica*. **Phytochemistry**, v. 28, n. 5, p. 1471-1477, 1989.
- AZIZ-UR-REHMAN, M. A.; RIAZ, N.; AHMAD, H.; NAWAZ, S. A.; CHOUDHARY, M. I. Lipoxygenase Inhibiting Constituents from *Indigofera hetrantha*. **Chemical & Pharmaceutical Bulletin**, v. 53, n. 3, p. 263-266, 2005.
- BORRÁS, M. R. L. **Plantas da Amazônia: medicinais ou mágicas – Plantas comercializadas no Mercado municipal Adolpho Lisboa.** Governo do Estado do Amazonas: Ed. Valer, 2003, 737 p.
- BUSHMAN, B. S.; SCHOLTE, A. A.; CORNISH, K.; SCOTT, D. J.; BRICHTA, J. L.; VEDERAS, J. C.; OCHOA, O.; MICHELMORE, R. W.; SHINTANI, D. K.; KNAPP, S. J. Identification and comparison of natural rubber from two *Lactuca* species. **Phytochemistry**, v. 67, p. 2590–2596, 2006.
- CAI, X.; LI, W.; YIN, L. Ultrastructure and cytochemical localization of acid phosphatase of laticifer in *Euphorbia kansui* Liou. **Protoplasma**, v. 238, p. 3-10, 2009.
- CALIXTO, J. B. Twenty-five years of research on medicinal plants in Latin America, A personal view. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 100, p. 101-134, 2005.
- CARNEIRO, M. I. da S.; RIBAS-FILHO J. M.; MALAFAIA, O.; RIBAS, C. A. P. M.; SANTOS, C. A. M.; CAVALCANTI, T. C. S.; CZECZKO, L. E. A. Estudo comparativo do uso de extrato de *Pfaffia glomerata* e do laser de baixa potência (hélio–

neônio) na cicatrização de feridas em ratos. **ABCD: arquivos brasileiros de cirurgia digestiva**, v. 23, n. 3, p. 163-167, 2010.

CARVALHO, M. G.; VELLOSO, C. R. X.; BRAZ-FILHO, R.; COSTA, W. F. Acyl-lupeol Esters from *Parahancornia amapa* (Apocynaceae). **Journal Of The Brazilian Chemical Society**, v. 12, n. 4, 556-559, 2001.

CARVALHO, M. G.; ALBUQUERQUE, L. A.; ALVES, C. C. F.; CASCON, V. Revista Brasileira de Farmacognosia. **Brasiliam Journal of Pharmacognosy**, v. 18 (Supl.), p. 667- 669, 2008.

CAVALCANTE, P. B. **Frutas Comestíveis da Amazônia**. 3ª Ed. Belém: INPA, 1976.

CAVALCANTE, P. B. **Frutos comestíveis da Amazônia**. 6ª Ed.- Belém: CNPQ / Museu Paraense Emílio Goeldi. (Coleção Adolpho Ducke), 1996.

CLAY, W.; SAMPAIO, P. T. B.; CLEMENT, C. R. **Biodiversidade Amazônica: exemplos e estratégias de utilização**. Manaus: Programa de Desenvolvimento Empresarial e Tecnológico, 2000, 409 p.

CORREA, P. M. **Dicionário das plantas úteis do brasil e das exóticas cultivadas**. Rio de janeiro, imprensa nacional, 1978.

COUTINHO, S. C.; PIRES, M. J. **Jari: Um Banco Genético para o Futuro**. Rio de Janeiro, 1996, 244 p.

DALL'STELLA, D. S. G. **Estudo Fitoquímico Aplicado da Fração Solúvel do Extrato Etanólico Bruto da *Dorstenia multiformis***. Miquel (MORACEAE). Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Paraná, Brasil, 2008.

DEWICK, P. M. **Medicinal Natural Products – A Biosynthetic Approach**. West Sussex: John Wiley & Sons, 2002.

DIAS, M. O. D.; HAMERSKI, L.; PINTO, C. A. Separação semipreparativa de α e β -amirina por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência. **Química Nova**, v. 34, n. 4, p. 704-706, 2011.

FARRELL, B. D.; DUSSOURD, D. E.; MITTER, C. Escalation of plant defense: do latex and resin canals spur plant diversification? **American Naturalist**, v. 138, p. 881-900, 1991.

FERRAZ, C. G. **Derivados Poliprenilados De Benzofenonas, Triterpenos, Esteróides, Bifenila E Xantona De *Clusia Burlemarxii* E Atividade Citotóxica Contra Células *GI-15*, De *Glioblastoma Humano***. Tese em Química Organica . Salvador – BA, 2011.

GABOR, M. apud. 1979. Antiinflammatory and anti-allergic properties of flavonoids. CODY, V.; MIDDLETON JR. E.; HARBONE, J. B. eds. **Plant flavonoids in biology and medicine:**

biochemical, pharmacological and structure – activity relationships. New York, Alan R. Liss, p. 471-480, 1986.

GAI, J. E. M.; CAMPELO, M.; SILVA, C. C.; VEIGA JUNIOR, V. F. **Composição Inorgânica de leite de amapá (*Brosimum parinarioides*, *Brosimum potabile* e *Brosimum utile ovatifolium*).** In: 32ª Reunião anual da Sociedade brasileira de Química, 2009, Fortaleza - CE. Anais da 32ª Reunião anual da Sociedade brasileira de Química, 2009.

GALUPPO, S. C. **Documentação do uso e valorização do óleo de piquiá (*caryocar villosum* (aubl) pers.) E do leite do amapá-doce (*brosimum parinarioides ducke*) para a comunidade de piquiatuba , floresta nacional do tapajós.estudos físicos, químicos, fitoquímicos e farmacológicos.** Dissertação mestrado em Ciências Florestais- Universidade Federal Rural da Amazônia, Belém- PA. 2004.

HAGEL, J. M.; YEUNG, E. C.; FACCHINI, P. J. Got milk? The secret life of laticifers. **Trends in Plant Science**, v.13 n. 12, 2008.

HASLER, A.; STICHER, O. Identification and determination of the flavonoids from *Ginkgo biloba* by high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatograph**, v. 605, p.41-48, 1992.

HAYASIDA, W.; SOUZA, A. S. de; LIMA, M. da P.; NASCIMENTO, C. C. do; FERREIRA, A. G. Proposta de aproveitamento em resíduos de pau-rainha (*Brosimum rubescens*) descartados pelo setor madeireiro. **Acta Amazonica**, v. 38, n. 4, p. 749-752, 2008.

HAYASIDA, W.; LIMA, M. da P.; NASCIMENTO, C. C. do; FERREIRA, A. G. Resíduos madeireiros do alburno de pau-rainha (*Brosimum rubescens*): Investigação de metabólitos secundários e alguns aspectos tecnológicos. **Acta Amazonica**, v. 41, n. 2, p. 285-288, 2011.

HOSTETTMANN, K; QUEIROZ, E.F.; VIEIRA, P. C. **Princípios Ativos de Plantas Superiores.** São Carlos: EdUFSCAR, (Série de textos da Escola de Verão em Química), v. IV, 2003, 152p.

KHUONG-HUU, F.; SANGARE , M.; CHARI, V. M., BEKAERT, A., DEVYS, M., BARBIER, M.; LUKACS, G. **Tetrahedron Letters**, 1789, (1975)

KIKUCHI, T.; KODOTA, S.; TSUBONO, K. Proton and carbon-13 signal assignments of cycloeucalenol- type triterpenes from *Nervilia purpurea* Schlechter by two-dimensional nuclear magnetic resonance spectroscopy. **Chemical & Pharmaceutical Bulletin**, v. 34, p. 2479-2486, 1986.

KIM, H. P. *et al.* Anti-inflammatory plant flavonoids and cellular action mechanisms. **Journal of Pharmacological Sciences**, Tokyo, v. 96, n. 3, p. 229-245, 2004.

KONNO, K. Plant latex and other exudates as plant defense systems: Roles of various defense chemicals and proteins contained therein. **Phytochemistry**, v. 72, p. 1510-1530, 2011.

LANÇAS, F. M. **Cromatografia líquida moderna: HPLC/CLAE**. Editora Átomo, 2009, 382 p.

LEWINSOHN, T.M.; VASCONCELLOS- NETO, J. Como insetos sabotam defesas de plantas: o caso do látex. pp 281-298. In Martins, R.P., Lewinsohn, T.M.& Barbeiros, M. S. (eds). Ecologia e comportamentos de Insetos. Série Oecologia Brasiliensis, vol. VIII. PPGE-UFRJ. Rio de Janeiro, Brasil, 2000.

LOUREIRO, A. A.; SILVA, M. F.; ALENCAR, J. C. **Essências madeireiras da Amazônia**. v. II. INPA/SUFRAMA; Manaus, AM, Brasil, 1979.

LOUREIRO, A. A.; DE FREITAS, J.; ALVES, R.; LOUREIRO, K. B.; DE FREITAS, C. A. A. **Essências Madeireiras da Amazônia**. Manaus: MCT/INPA-CRPF, 2000, 191p,

MADY, F. T. M. **Conhecendo a madeira**. 1ª ed. Manaus: SEBRAE/AM. Programa de Desenvolvimento Empresarial e Tecnológico, 2000.

MAHATO, S. B.; NANDY, A. K.; ROY, G. **Phytochemistry** 31 (1992) 2199. Mandelbaum, Samuel Henrique; Di Santis, Érico Pampado; Mandelbaum, Maria Helena Sant'Ana. Cicatrização: conceitos atuais e recursos auxiliares -Parte I. **An. bras Dermatol**, Rio de Janeiro, 78(4):393-410, jul./ago. 2003.

MANN, J. Chemical Aspects of Biosynthesis. Oxford Chemistry Primers- Oxford Science Publications (1994)

MATHE, C.; CULIOLI, G. Characterization of archaeological frankincense by gas chromatography-mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1023, p. 277-285, 2004.

MATTA, A. **Flora Médica Brasileira**. 3ª. Edição revista. Manaus: Editora Valer, 2003, 356 p.

MCKEON, J. J. 1981. PUVA for psoriasis. American Pharmacy 9. 530-532. Mithofer, Axel; Boland, Wilhelm. Plant Defense Against Herbivores: Chemical Aspects. **Rev. Plant Biol**. 2012. 63:431-50

MIYASHIRO, C. A. H. V. Avaliação da atividade antioxidante e antiinflamatória do flavonóide rutina e derivados contendo metal de transição. Dissertação de Mestrado – Universidade Bandeirante de São Paulo - Programa de Farmácia, 2010.

MORLACCHI, P.; WILSON, W. K; XIONG, Q.; BHADURI, D. S.; KOLESNIKOVA, D. M.; MATSUDA, S. Product Profile of PEN3: The Last Unexamined Oxidosqualene Cyclase in *Arabidopsis thaliana*. **Organic Letters**, 2009, No 12, 2627-2630.

MORS, W. B.; RIZZINI, C. T.; Pereira, N. A. Medicinal Plants of Brasil. **Reference Publications**, Inc, Algonac-Michigan, v. 246, p. 27, 2000.

OHYAMA, K.; SUZUKI, M.; KIKUCHI, J.; SAITO, K.; MURANAKA, T. Dual biosynthetic pathways to phytosterol via cycloartenol and lanosterol in *Arabidopsis*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, U.S.A. v. 106, p. 725-730, 2009.

OLEA, R.S. G.; ROQUE, N. F. Análise de Misturas de Triterpenos por RMN ¹³ C. **Química Nova**, São Paulo, v.13, supl.4, p.278-281, 1990.

OSONIYI, O.; ONAJOBI, F. Coagulant and anticoagulant activities in *Jatropha curcas* latex. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 89, p. 101-105, 2003.

PASSOS, G. F. F. E.; DA CUNHA, F. M.; FERREIRA, J.; PIANOWSKI, L. F.; CAMPOS, M.; CALIXTO, J. B. Anti-inflammatory and anti-allergic properties of the essential oil and active compounds from *Cordia verbenae*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 110, p. 323- 333, 2007.

PAVIA, D.L. **Introdução à Espectroscopia** – 4ª edição; Editora Cengage Learning (2010).

PINTO, A. C.; SILVA, D. H. S.; BOLZANI, V. S.; PEPORINE, N. L.; EPIFANIO, R. A. Produtos naturais: atualidade, desafios e perspectivas. **Química Nova**, São Paulo, v. 25, supl.1, p.45-61, 2002.

POZETTI, G. L. Chemical study of *Brosimum gaudichaudii* trecul. 1. Isolation and identification of bergapten, and psoralene from the roots of *Brosimum gaudichaudii* trecul. **Revista da Faculdade de Farmácia e Odontologia de Araraquara**, v. 3, p. 215-223, 1969.

QUADROS, D. S.; NUNOMURA, S. M.; NUNOMURA, R. de C. S. **Atividade antioxidante da espécie *Brosimum parinarioides***. In: 31ª. Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 2008, Águas de Lindóia. Livro de resumos da 31ª . Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, v. 1. p 88-88, 2008.

REVILLA, J. **Plantas da Amazônia- Oportunidades Econômicas e Sustentáveis**. Manaus- AM: Ed.INPA e SEBRAE, 2002, 532 pp.

RIBEIRO, J. E. L. da S.; HOPKINS, M. J. G.; VICENTINI, A.; SOTHERS, C. A.; COSTA, M. A. da S.; DE BRITO, J. M.; DE SOUZA, M. A. D.; MARTINS, L. H. P.; LOHMANN, L. G.; ASSUNÇÃO, P.; APÓSTOLO, C. L.; PEREIRA, E. da C.; DA SILVA, C. F.; MESQUITA, M. R.; PROCÓPIO, L. C. **Flora da Reserva Ducke: Guia de identificação das plantas vasculares de uma floresta de terra-firme na Amazônia Central**/ José Eduardo L. Da S. Ribeiro [et al.]. Manaus: INPA, 816 p, 1999.

ROBBERS, J. E.; SPEEDIE, M. K.; TYLER, V. E. **Pharmacognosy and Pharmacobiotechnology**, 315 p, 1996.

RYAN, M. P. Patent Incentives, Technology Markets, and Public- **Private Bio- Medical Innovation Networks in Brazil**. v. 38, n. 8, p. 1082-1093, 2010.

SALLES, R. C. DE O.; NUNOMURA, S. M. N.; NUNOMURA, de C. S. **Estudo fitoquímico do látex do leite de amapá. Jornada de Iniciação Científica do PIBIC /CNPQ/FAPEAM/INPA, 2009**). Anais/XVII Jornada de Iniciação Científica do PIBIC /CNPQ/FAPEAM/INPA; Resumos expandidos, 20 a 24 de julho de 2009, Manaus, AM. Manaus: INPA, 2009.

SAMONEK, FRANCISCO. A Borracha Vegetal Extrativa na Amazônia: Um estudo de caso dos novos encauchados de vegetais no Estado do Acre. Dissertação: Rio Branco, ACRE, 2006.

SHANLEY, P; MEDINA, G.; CORDEIRO, S. **Frutíferas e plantas úteis na vida amazônica**, 2005, 101 p.

SILVA, M. do S. S. da.; CITÓ, A. M. das G. L.; CHAVES, M. H.; LOPES, J. A. D. Triterpenoides Tipo Cicloartano de própolis de Teresina-PI. **Química Nova**, v. 28, n. 5, p. 801-804, 2005.

SILVA, P. S. da P.; SALLES, R. C. DE O.; NUNOMURA, S. M. N.; NUNOMURA, de C. S. **Estudo fitoquímico do extrato metanólico do látex do leite de amapá. Jornada de Iniciação Científica do PIBIC /CNPQ/FAPEAM/INPA, 2010**). Anais/XIX Jornada de Iniciação Científica do PIBIC /CNPQ/FAPEAM; Resumos expandidos, 20 a 24 de julho de 2010, Manaus, AM. Manaus: INPA, 2010.

SILVERSTEIN, R. M.; WEBSTER, F. X.; KIEMLE, D. J. **Identificacao espectrometrica de compostos organicos**. 7 ed. Rio de Janeiro: LTC, 2007. 490p.

SOBRINHO, D. C.; HAUPTLI, M. B.; APPOLINÁRIO E. V.; KOLLENZ, CARMEM L. M.; CARVALHO, M. G.; BRAZ-FILHO, R. Triterpenoids Isolated from *Parahancornia amapa*. **Journal Of The Brazilian Chemical Society**, v.2, n. 15-20, 1991.

SOUZA, M. N.; DA SILVA, A. F. C; MARTINS, F. de S. M; FERREIRA, G. dos S.; FERREIRA, C. F. A.; RAMOS, F. M.; PEREIRA, R. de O. **Plantas Medicinais etnobotânica na Varzea do Mamirauá**. Manaus: Ed S.F.R. Rocha, F.M. Scarda, 2003, 218 p.

STITI, N.; TRIKI, S.; HARTMANN, M. A. **Formation of Triterpenoids throughout Olea europaea Fruit Ontogeny**. *Lipids* (2007) 42: 55–67.

TEIXEIRA, A. F. Estudo **Químico e Biológico das cascas do caule de *Brosimum acutifolium* (MURURÉ)**. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Amazonas, Brasil, 1999.

TERESA, J. P.; URONES, J. G.; MARCOS, I. S.; BASABE, P.; CUADRADO, M^a J. S.; MORO, R. F. Triterpenes From *Euphorbia Broteri*. **Phytochemistry**, v. 26, n. 6, p. 1767-1776, 1987.

TORRES, S. L.; MONTEIRO, J. C. M.; ARRUDA, M. S.; MULLER, A. H.; ARRUDA, A. C. Two flavans from *Brosimum acutifolium*. **Phytochemistry**, v. 44, p. 347-349, 1997.

VARANDA, E. A.; POZETTI, G. L.; LOURENÇO, M. V.; VILEGAS, W.; RADDI, M. S. G. Genotoxicity of *Brosimum gaudichaudii* measured by the Salmonella/microsome assay and chromosomal aberrations in CHO cells. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 81, p. 257-264, 2002.

VEIGA, V. F. J.; Pinto, A. C. Plantas medicinais: cura segura? **Química Nova**, v. 28, n. 3, p. 519-528, 2005.

VELLOSO, C. R. X. **Triterpenos Isolados de *Parahancornia amapa* (Apocynaceae) e Diterpenos Isolados de *Pinus caribaea* var. *bahamensis* Barr et Golf.** Dissertação de Mestrado. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Brasil, 1998.

VIEIRA, I. C.; MATHIAS, L.; MONTEIRO, V. F. F.; BRAZ-FILHO, R.; RODRIGUES-FILHO, E. E. A New Coumarin from *Brosimum gaudichaudii* Trecul. **Natural Product Research**, v. 13, n. 1, p. 47-52, 1999.

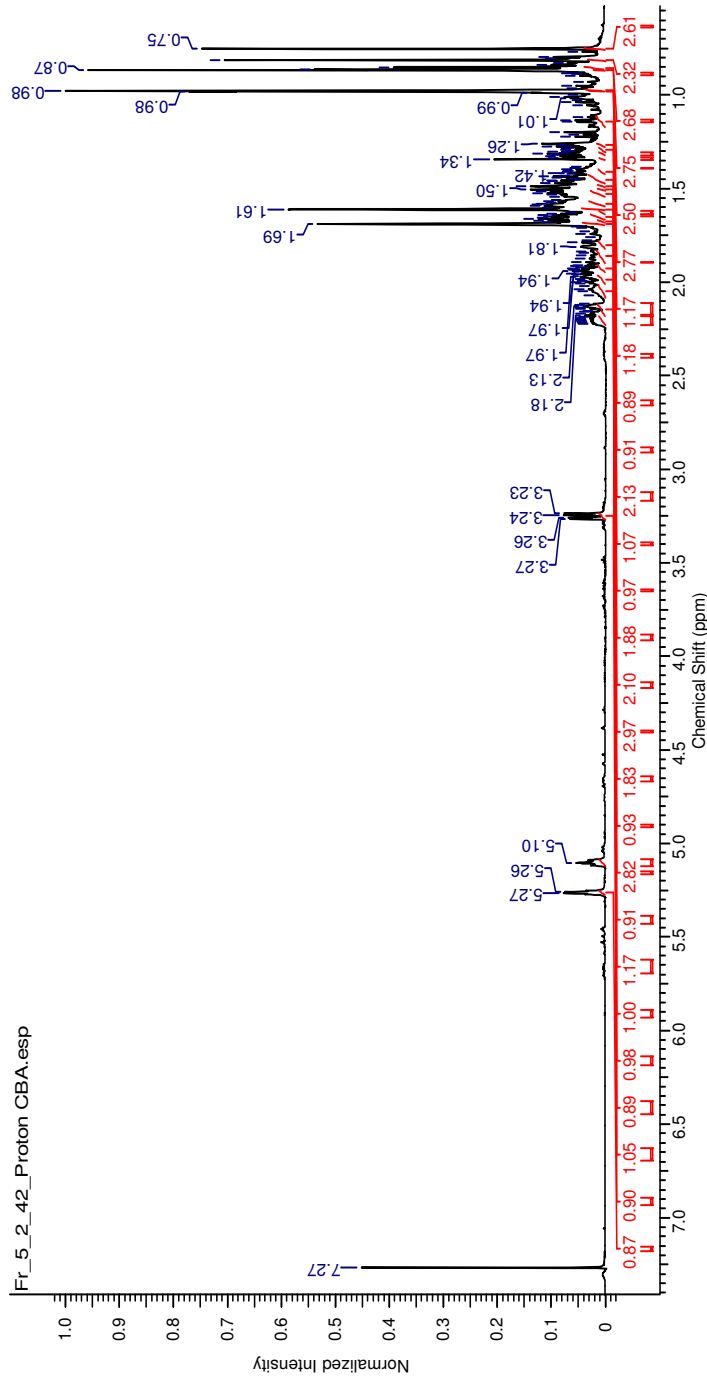
XU, R.; FAZIO, G. C.; MATSUDA, S. P. T. On the origins of triterpenoid skeletal diversity. **Phytochemistry**, v. 65, p. 261-291, 2004.

WAGNER, H. B. S. **Plant drug analysis**. 2nd ed. Heidelberg: Springer Verlag, 1996.

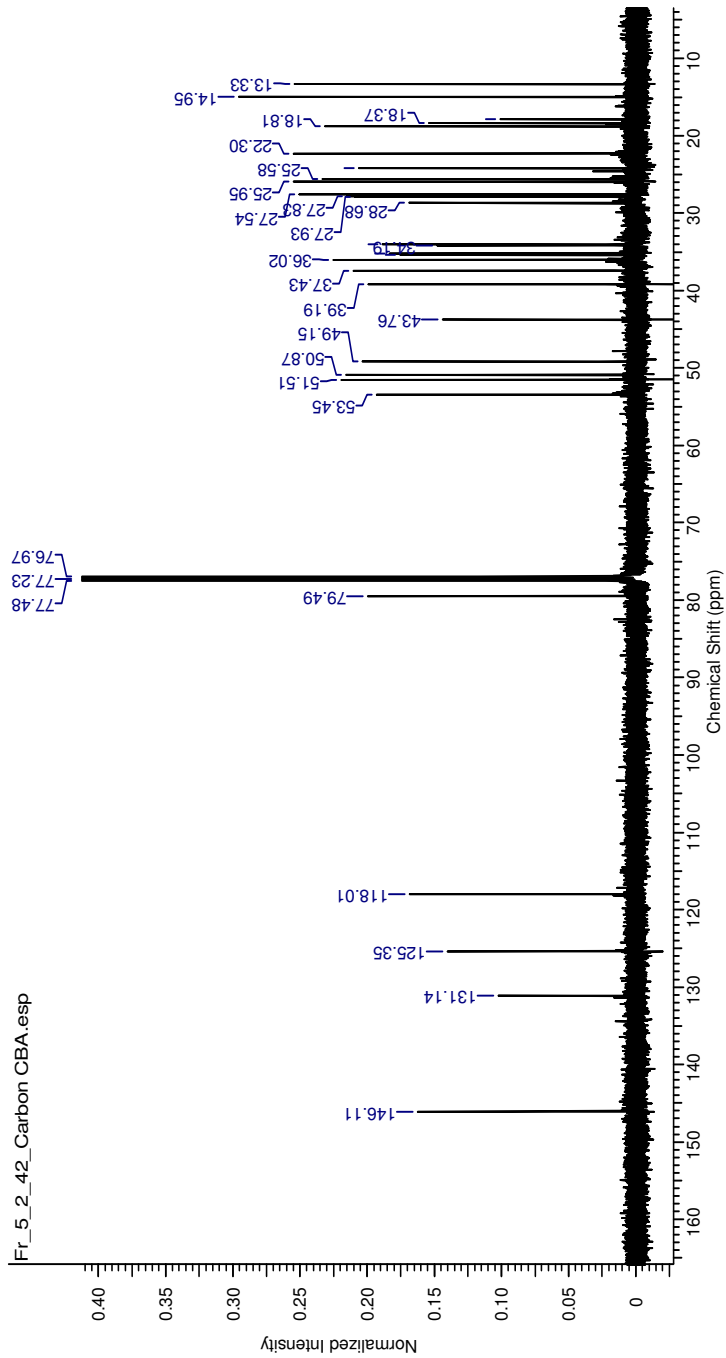
WANI, M. C.; TAYLOR, H. L.; WALL, M. E.; COGGON, P.; MCPHAIL, A. T. Plant antitumor agents. VI. Isolation and structure of taxol, a novel anti-leukemic and antitumor agent from *Taxus brevifolia*. **Journal of the American Chemical Society**, v. 93, p. 2325-2327, 1971.

ANEXO -1 A- ESPECTROS DE RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR (1H, 13C, HSQC, HMBC) – B.
PARINARIOIDES

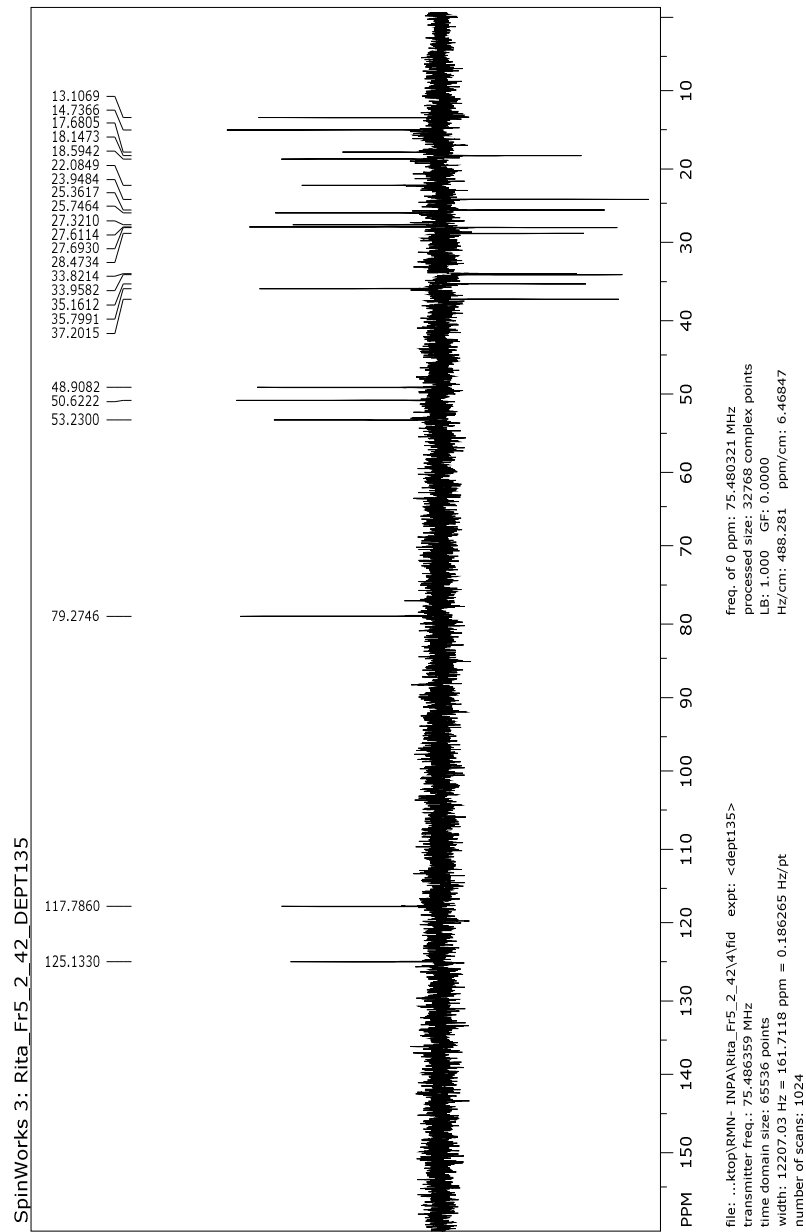
Acquisition Time (sec)	2.0436	Comment	Fr 5_2_42	Date	Mar 14 2013	Date Stamp	Mar 14 2013
File Name	C:\Users\Rita Cynara\Desktop\FIDS PARTE 2\parte 3\Fr 5_2_42_Proton Mar 14 201301.fid					Frequency (MHz)	499.86
Nucleus	1H	Number of Transients	64	Original Points Count	16384	Points Count	16384
Pulse Sequence	s2pul	Receiver Gain	26.00	Solvent	CHLOROFORM-d		
Spectrum Offset (Hz)	2999.1580	Spectrum Type	STANDARD	Sweep Width (Hz)	7897.80	Temperature (degree C)	28.000

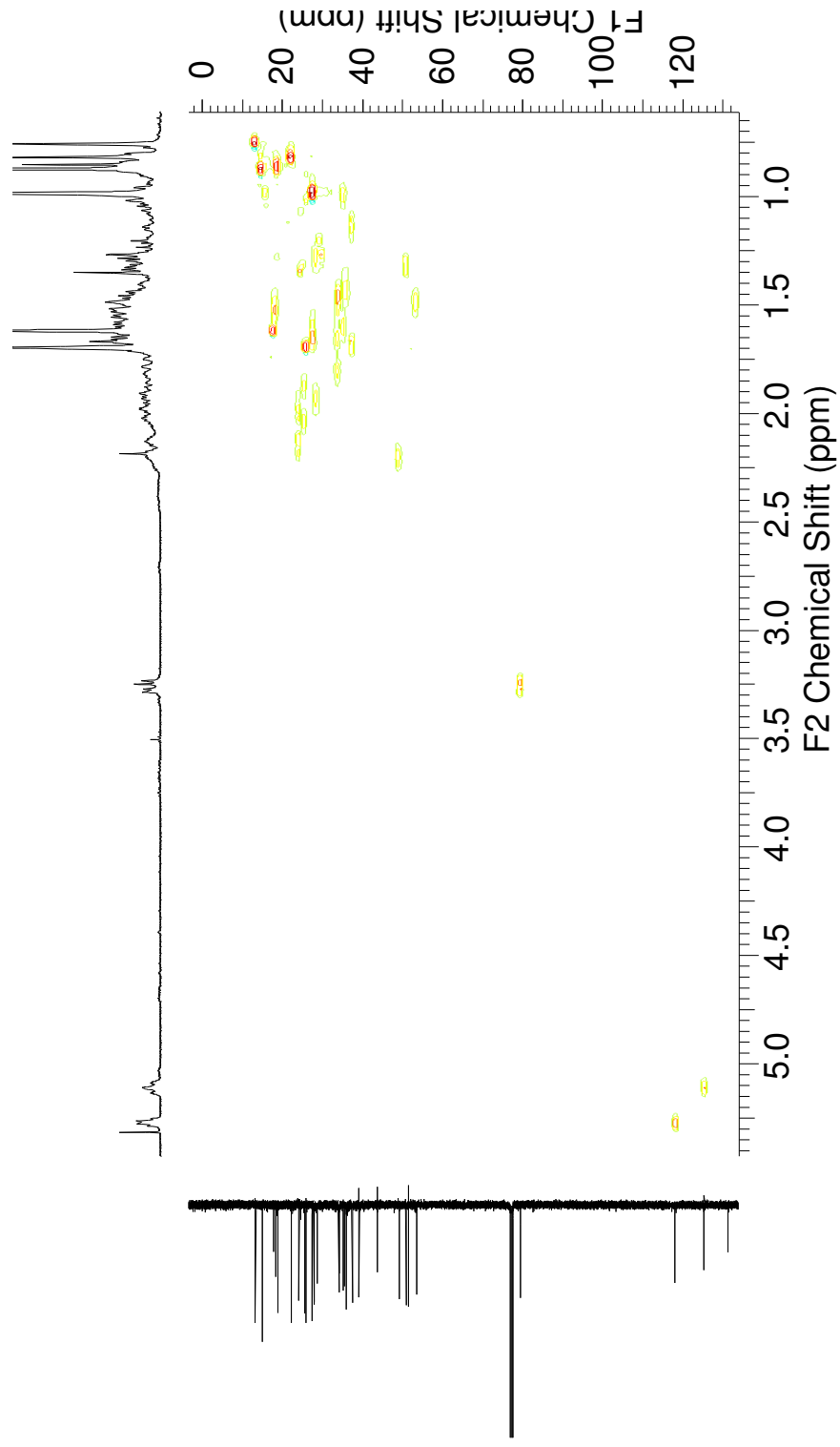


Acquisition Time (sec)	1.3005	Comment	Fr 5 2 42	Date	Mar 14 2013	Date Stamp	Mar 14 2013
File Name	C:\Users\Rita Cynara\Desktop\FIDS PARTE 2\parte 3\Fr 5 2 42_Carbon Mar 14 201301.fid						Frequency (MHz)
Nucleus	¹³ C	Number of Transients	2000	Original Points Count	38230	Points Count	125.70
Pulse Sequence	s2oul	Receiver Gain	30.00	Solvent	CHLOROFORM-d		85536
Spectrum Offset (Hz)	13197.3818	Spectrum Type	STANDARD	Sweep Width (Hz)	30165.91	Temperature (degree C)	28.000

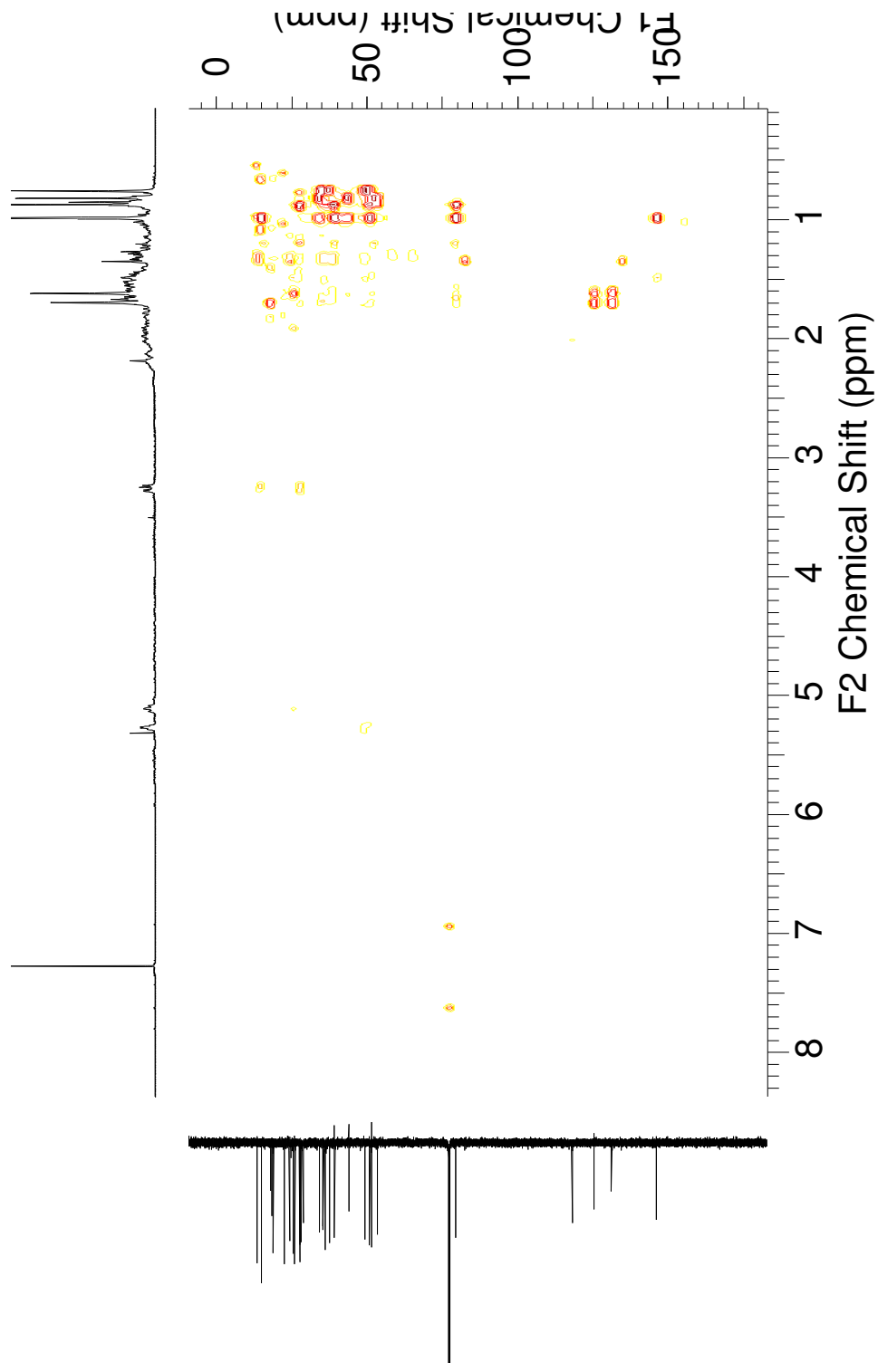


Espectro de RMN ¹³C do butirospermol, 125 MHz em CDCl₃.

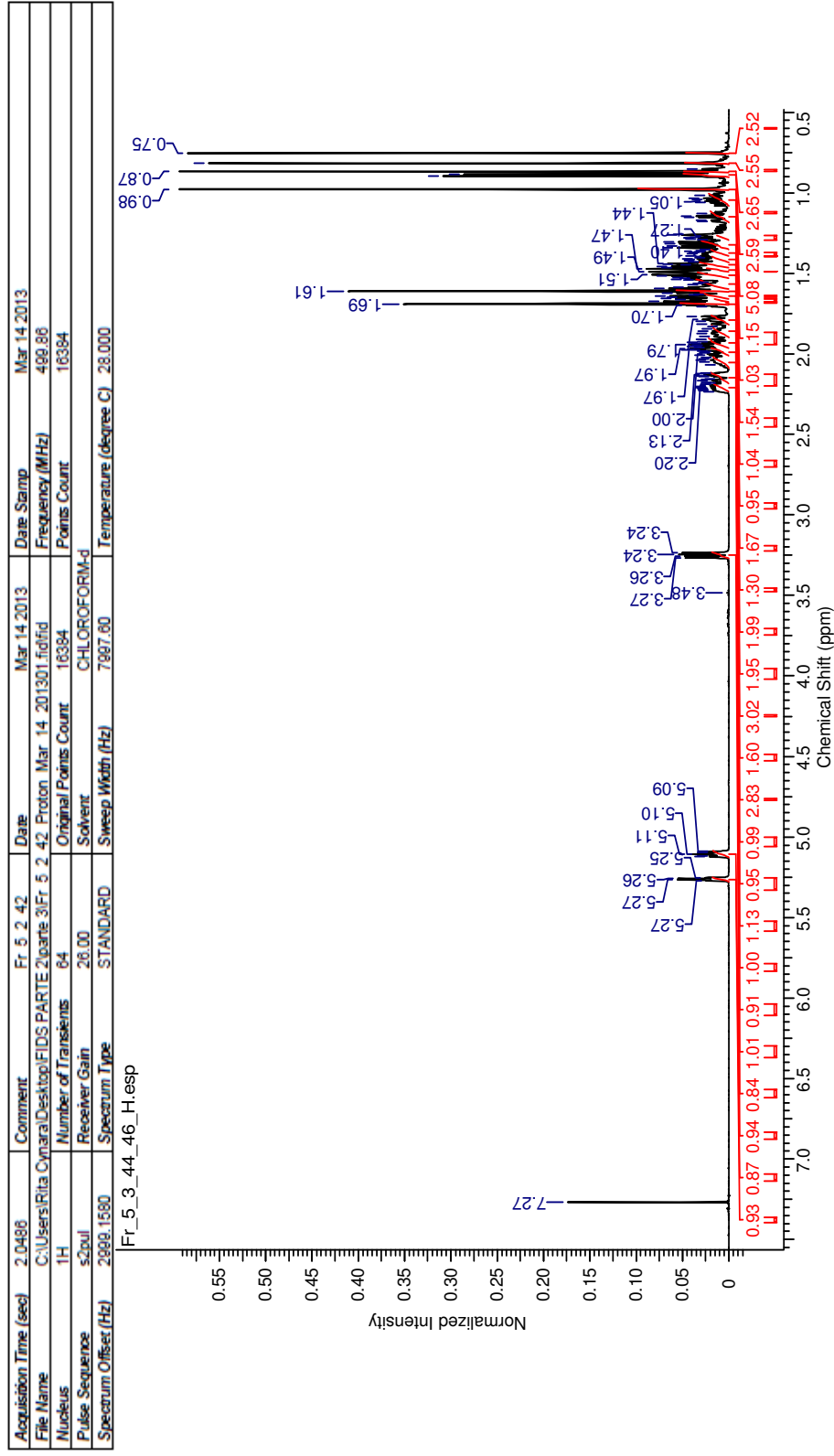
Espectro de DEPT do butirospermol, 75 MHz em CDCl_3 .



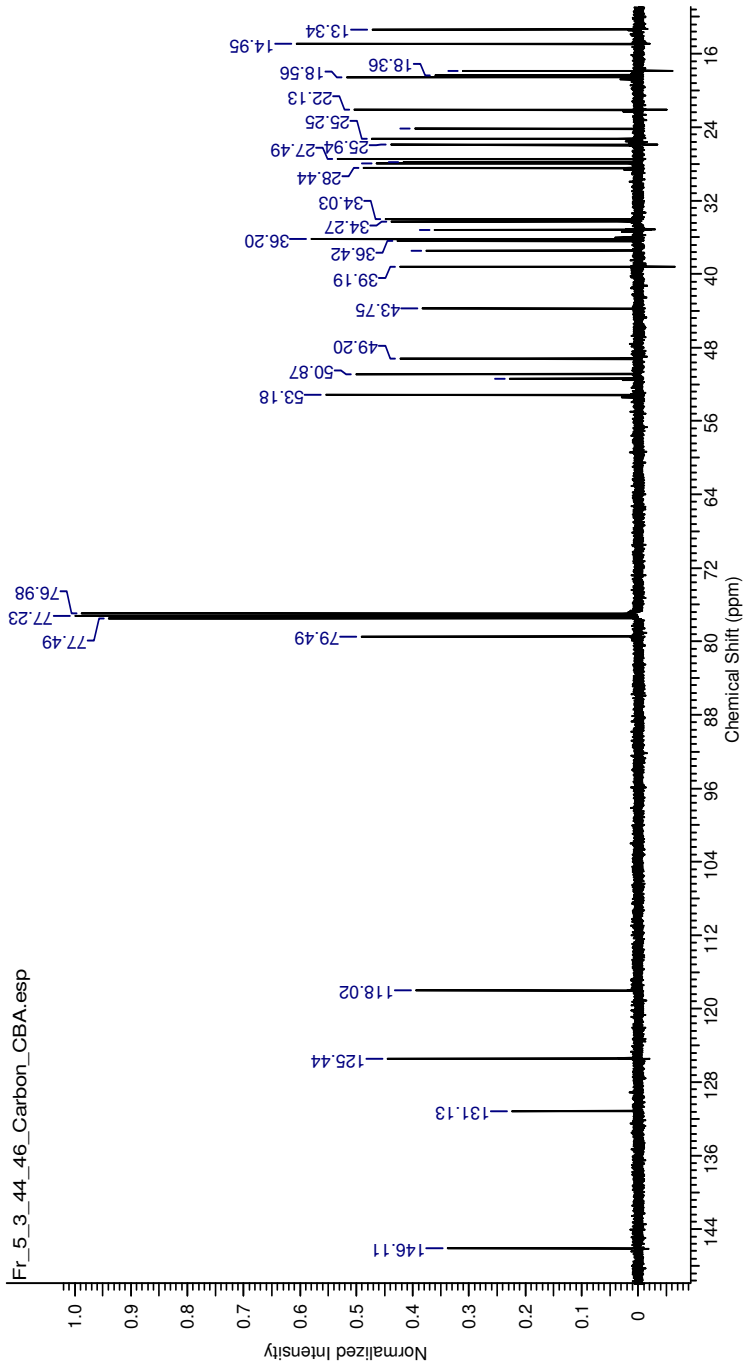
Mapa de correlação HSQC do butirospermol, 300 MHz em CDCl_3 .



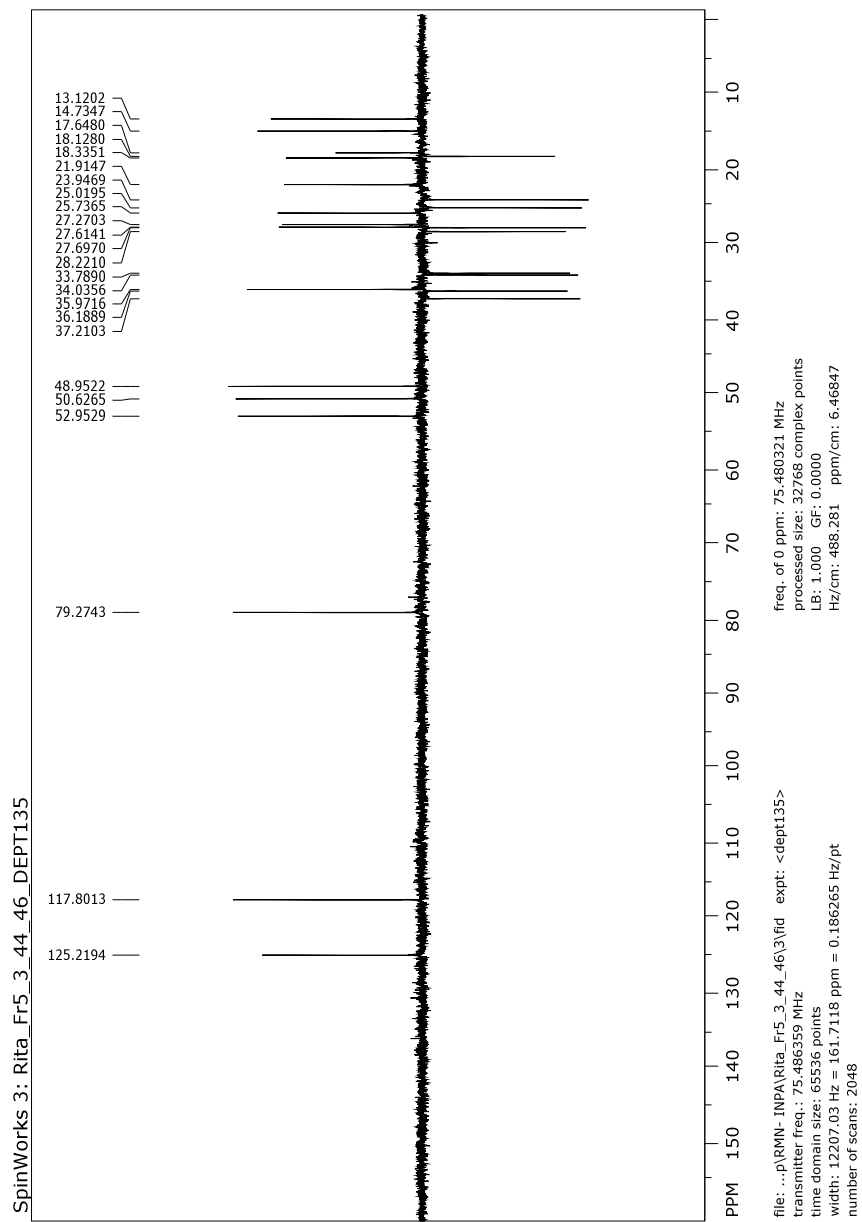
Mapa de correlação HMBC do butirospermol, 300 MHz em CDCl_3 .

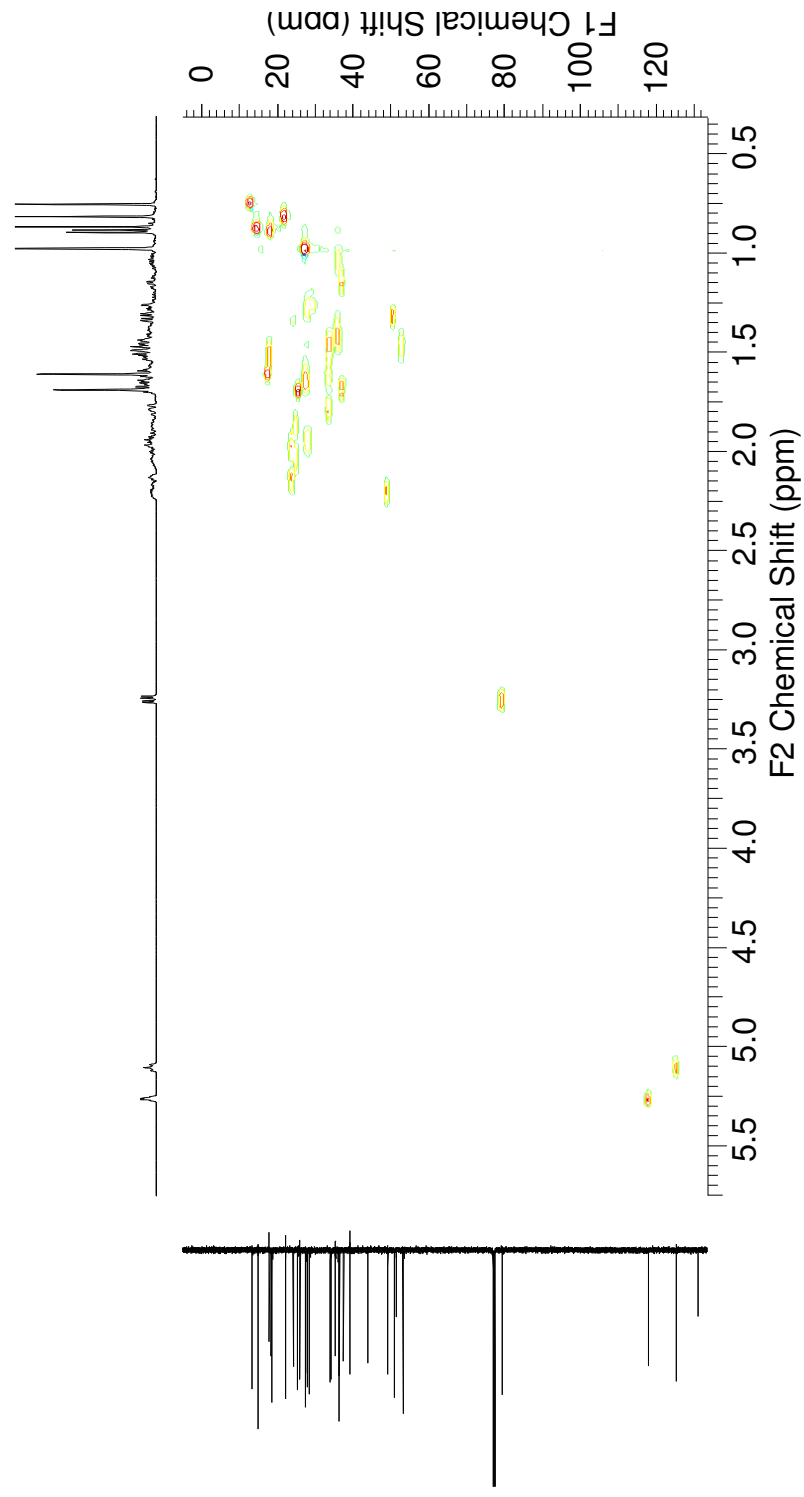
Espectro de RMN ^1H do tirucalla-7,24-dien-3 β -ol, 500 MHz em CDCl_3 .

Acquisition Time (sec)	1.3005	Comment	Fr. 5. 3. 44. 46	Date	Mar 14 2013	Date Stamp	Mar 14 2013
File Name	C:\Users\Rita Cynara\Desktop\FIDS PARTE 2\parte 3\Fr. 5. 3. 44. 46 Carbon Mar 14 201301.fid	Original Points Count	1472	Carbon Mar 14 201301.fid	39230	Frequency (MHz)	125.70
Nucleus	13C	Number of Transients	1472	Original Points Count	39230	Points Count	65536
Pulse Sequence	s2pul	Receiver Gain	30.00	Solvent	CHLOROFORM-d		
Spectrum Offset (Hz)	13197.3818	Spectrum Type	STANDARD	Sweep Width (Hz)	30166.81	Temperature (degree C)	28.000

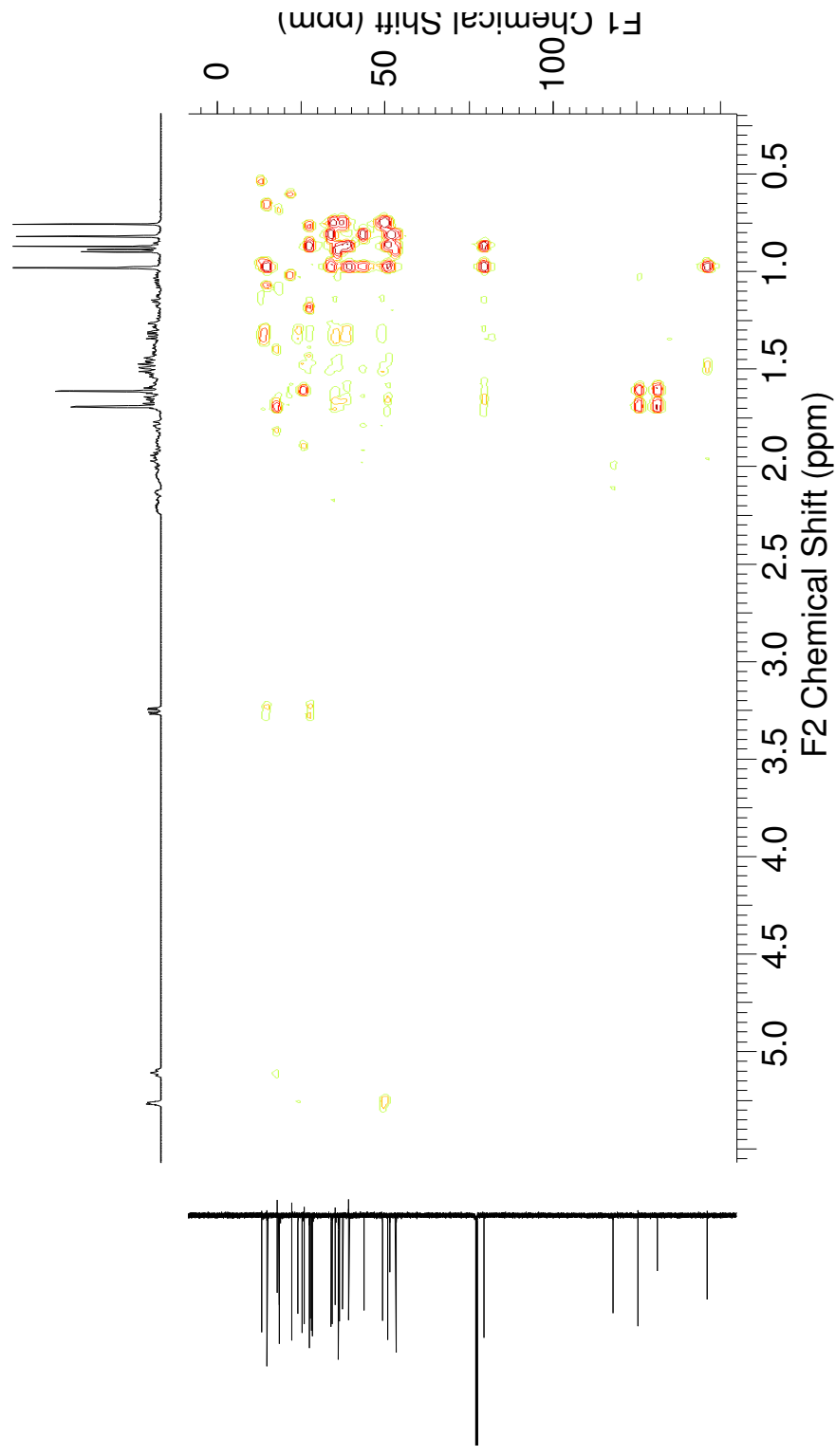


Espectro de RMN¹³C do butirospermol, 125 MHz em CDCl₃.

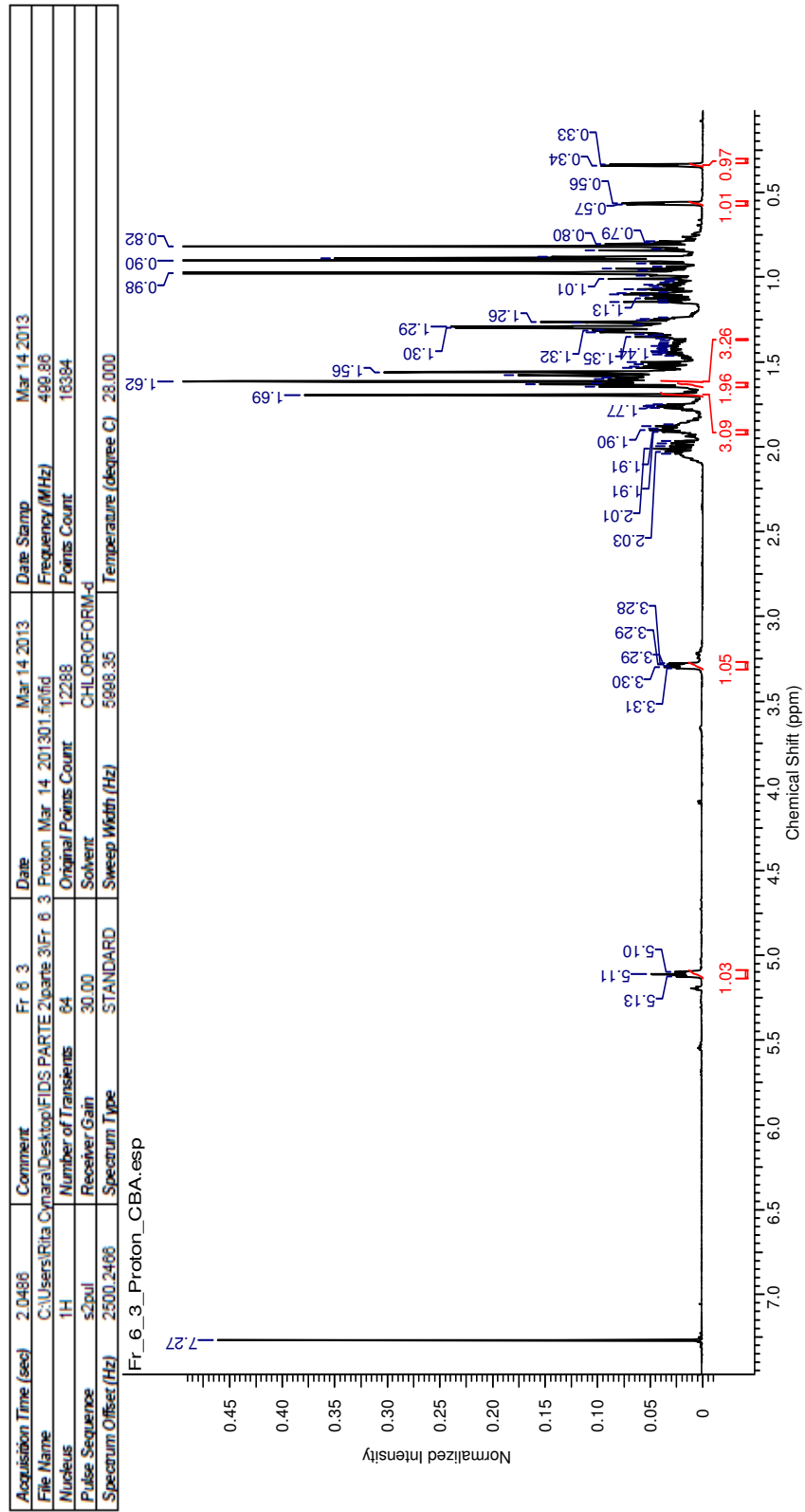
Espectro de DEPT 135 tirucalla-7,24-dien-3 β -ol, 75 MHz em CDCl₃.



Mapa de correlação HSQC tirucalla-7,24-dien-3 β -ol, 300 MHz em CDCl_3 .

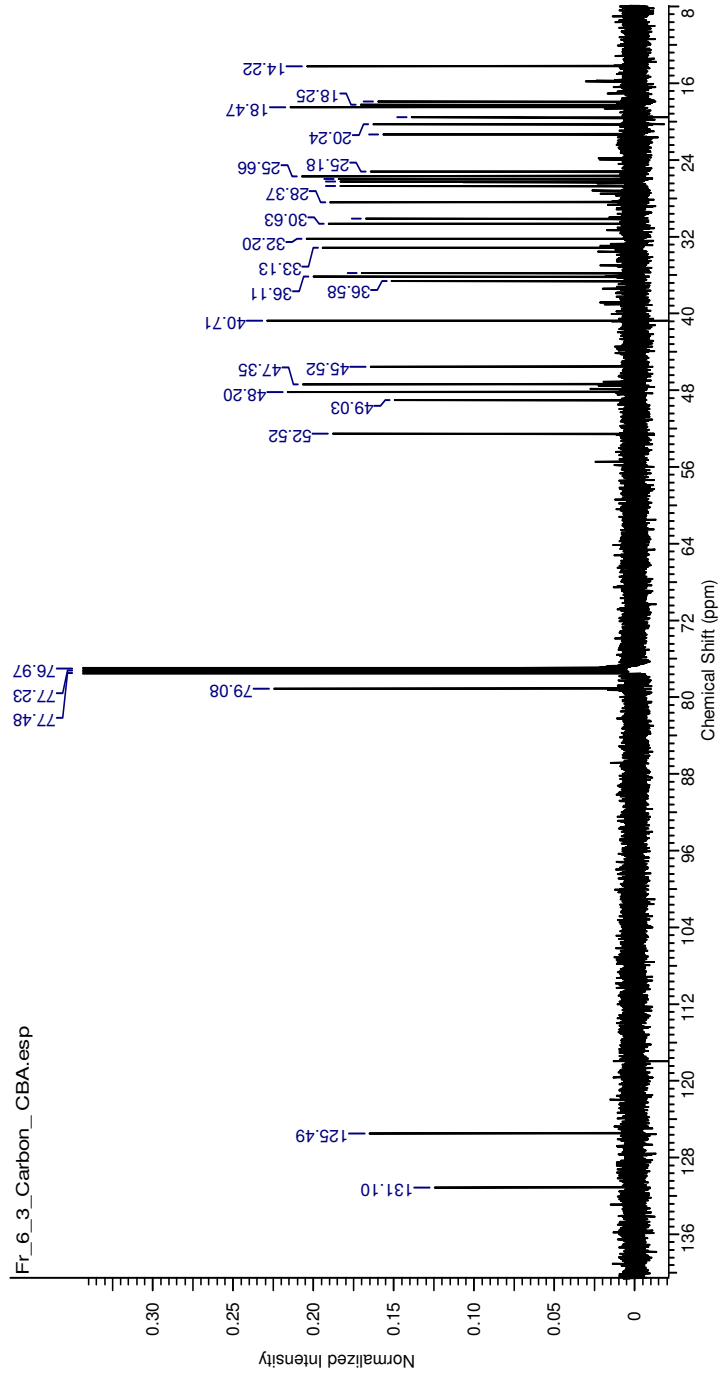


Mapa de correlação HMBC do tirucalla-7,24-dien-3 β -ol, 300 MHz em CDCl₃.

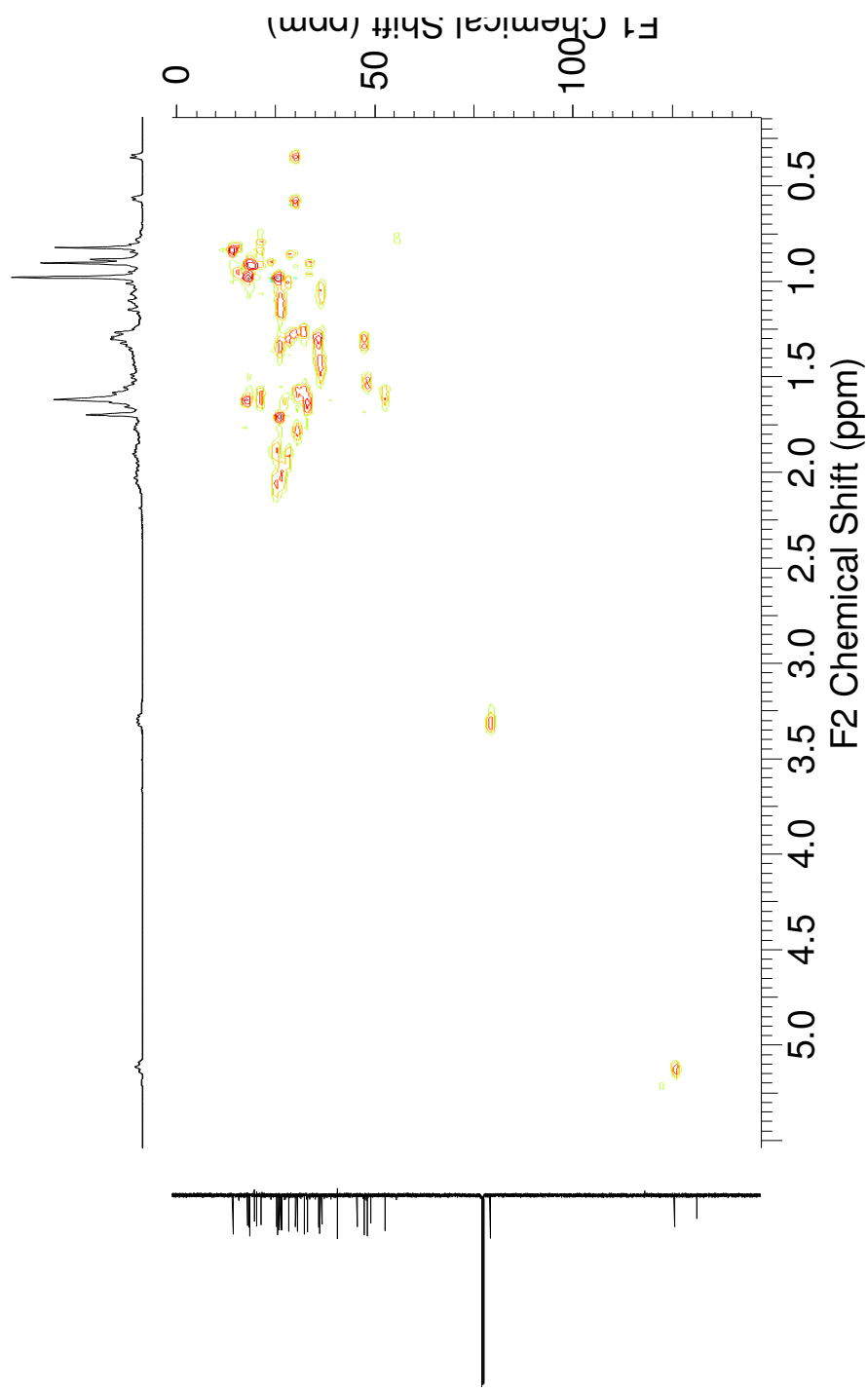


Espectro de RMN¹H do cicloartenol, 500 MHz em CDCl₃.

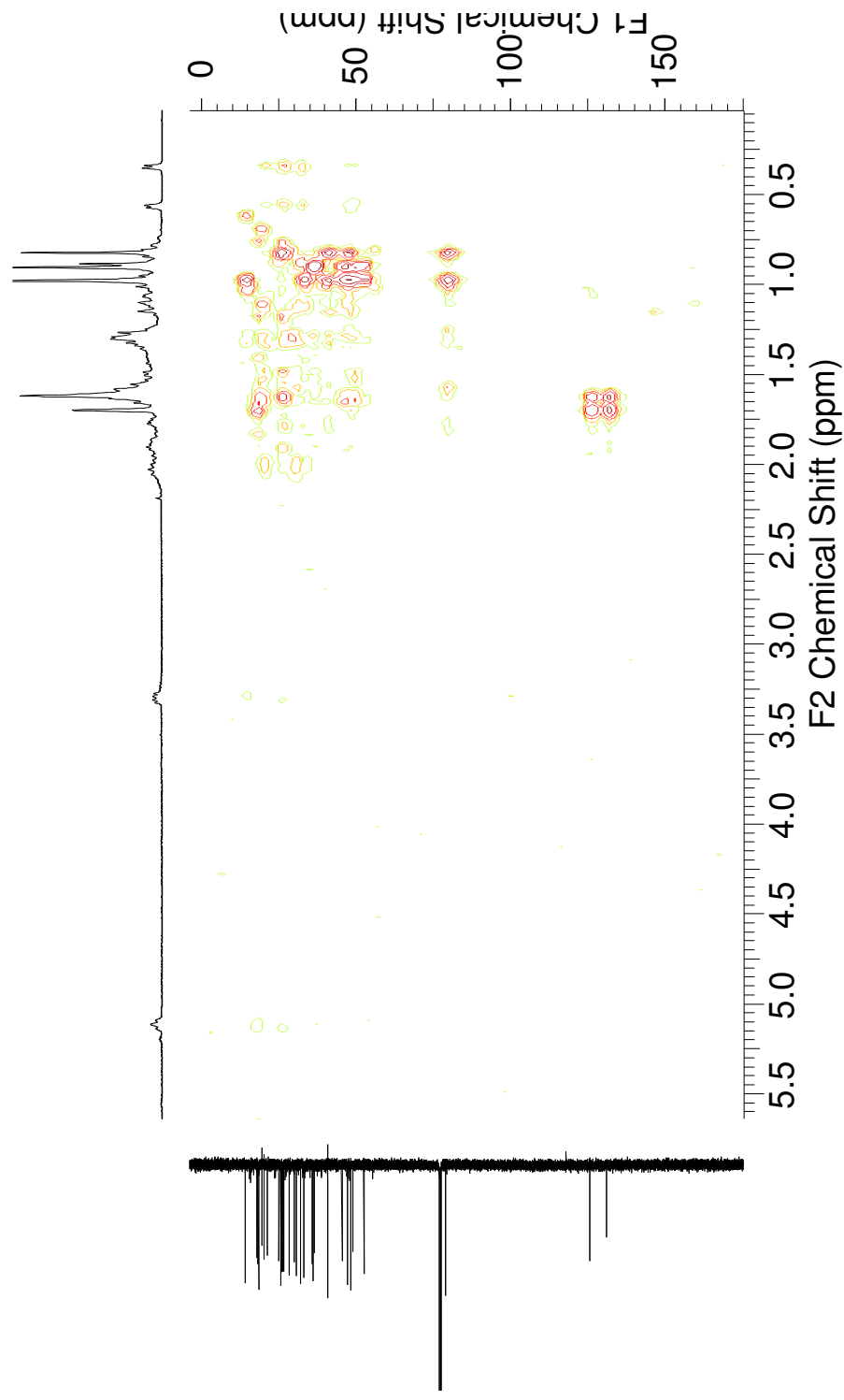
Acquisition Time (sec)	1.3005	Comment	Std proton	Date	Mar 14 2013	Date Stamp	Mar 14 2013
File Name	C:\Users\Rita Cynara\Desktop\FIDS PARTE 2\parte 3\Fr 6_3_Carbon Mar 14_201301.fid.tif						Frequency (MHz)
Nucleus	13C	Number of Transients	2000	Original Points Count	38230	Points Count	125.70
Pulse Sequence	s2pul	Receiver Gain	30.00	Solvent	CHLOROFORM-d		65536
Spectrum Offset (Hz)	13197.3818	Spectrum Type	STANDARD	Sweep Width (Hz)	30165.91	Temperature (degree C)	28.000



Espectro de RMN¹³C do cicloartenol, 125 MHz em CDCl₃.

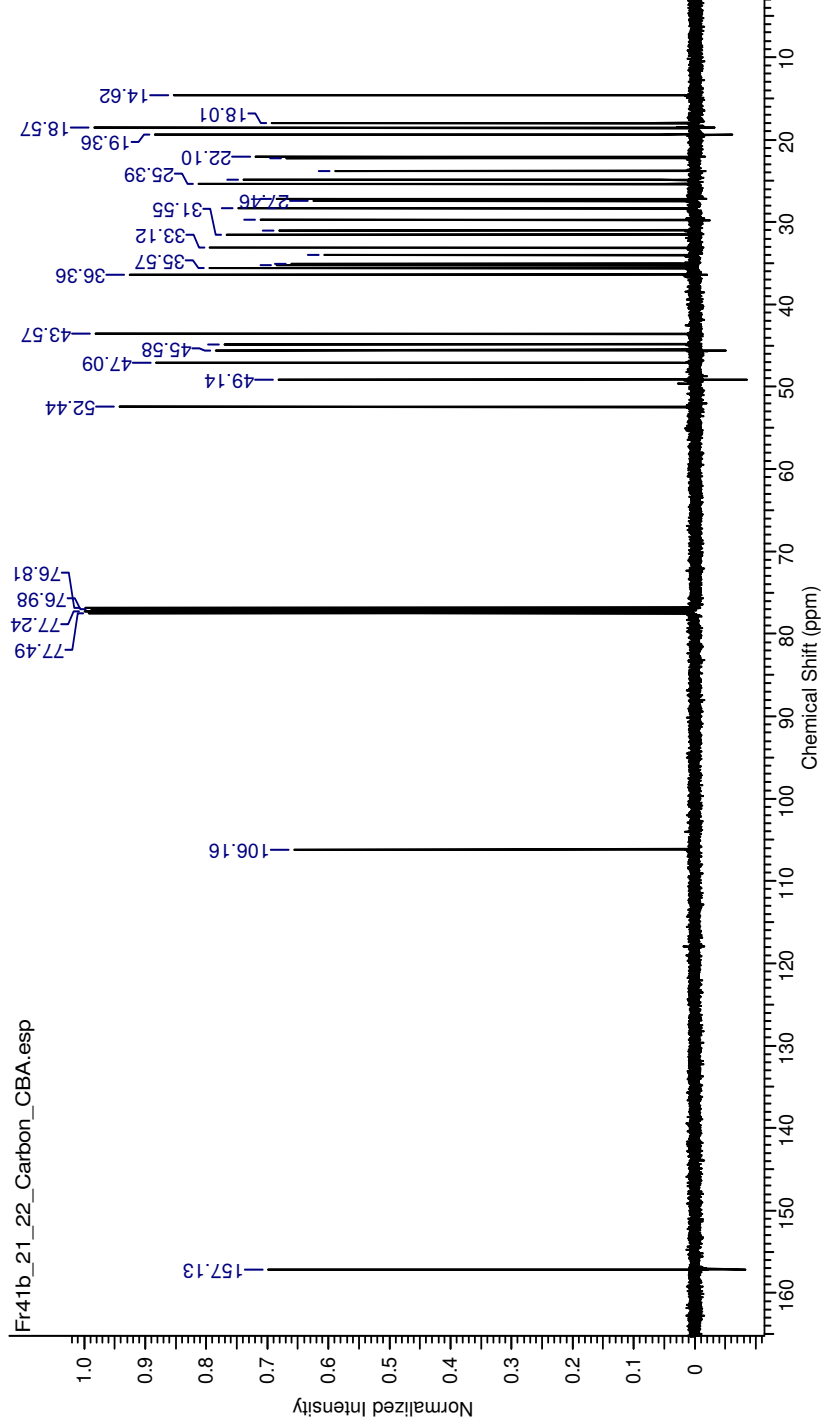


Mapa de correlação HSQC do cicloartenol, 300 MHz em CDCl_3 .

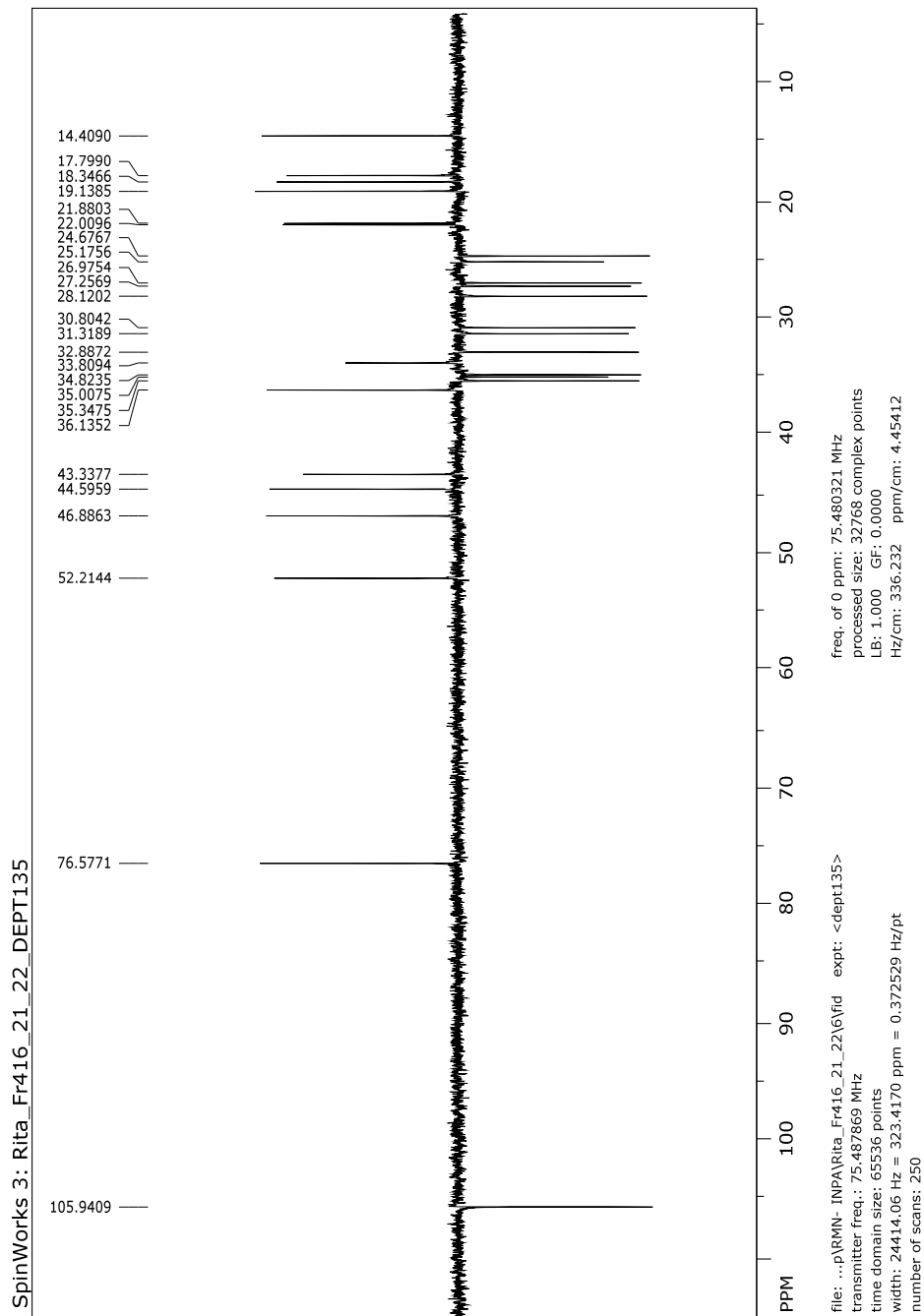


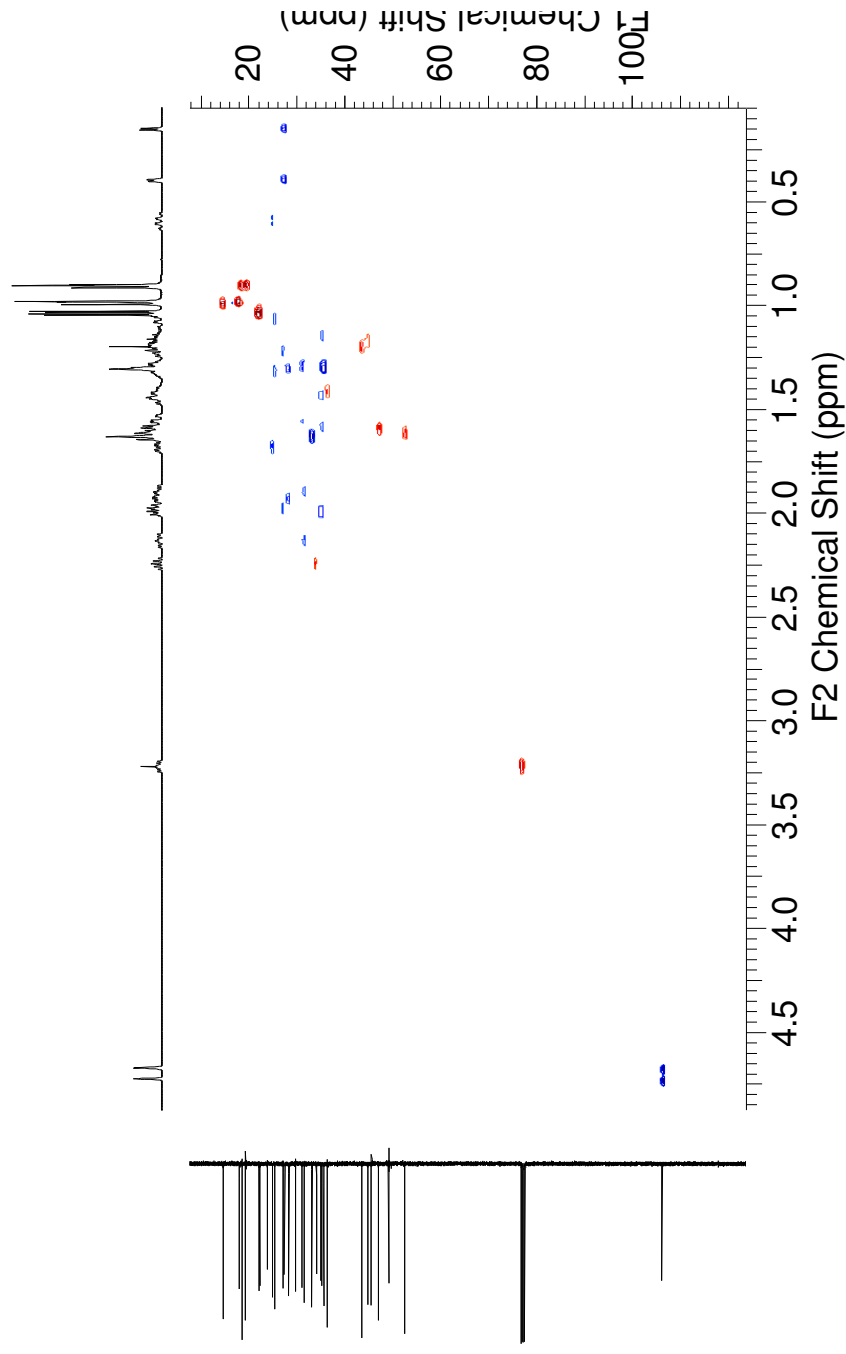
Mapa de correlação HMBC do cicloartenol, 300 MHz em CDCl₃.

Acquisition Time (sec)	1.3005	Comment	Sid proton	Date	Feb 21 2013	Date Stamp	Feb 21 2013
File Name	C:\Users\Rita Cynara\Desktop\FIDS PARTE 2\Fr41b_21_22_Carbon	Original Points Count	39230	Frequency (MHz)	125.70	Points Count	65536
Nucleus	13C	Receiver Gain	30.00	Solvent	CHLOROFORM-d	Temperature (degree C)	28.000
Pulse Sequence	s2ou1	Spectrum Type	STANDARD	Sweep Width (Hz)	30165.91		
Spectrum Offset (Hz)	13197.3818						

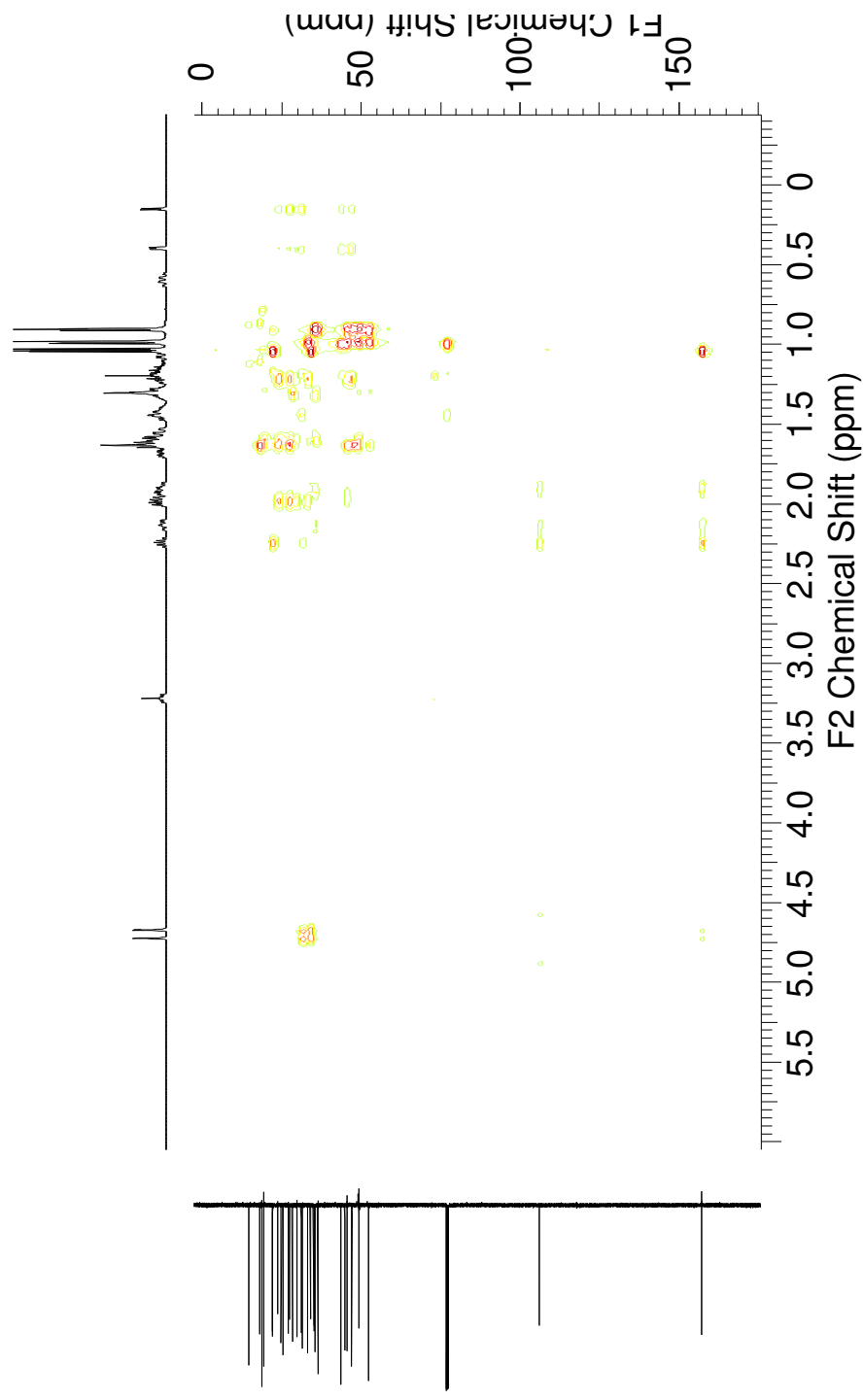


Espectro de RMN¹³C ciclooctenol, 125 MHz em CDCl₃.

Espectro de DEPT 135 do ciclohexanol, 75MHz em CDCl_3 .

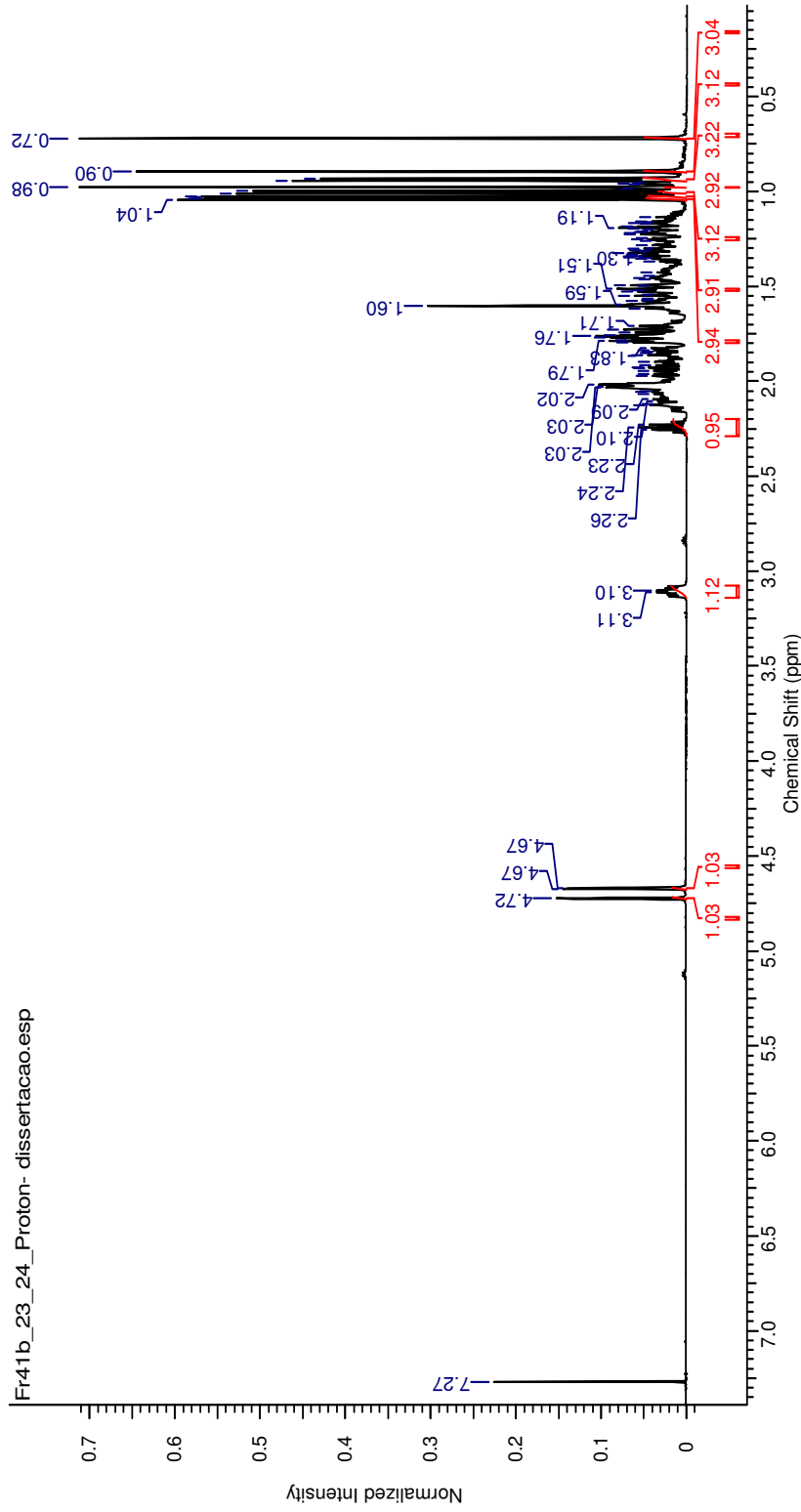


Mapa de correlação HSQC do ciclohexenol, 500 MHz em CDCl_3 .



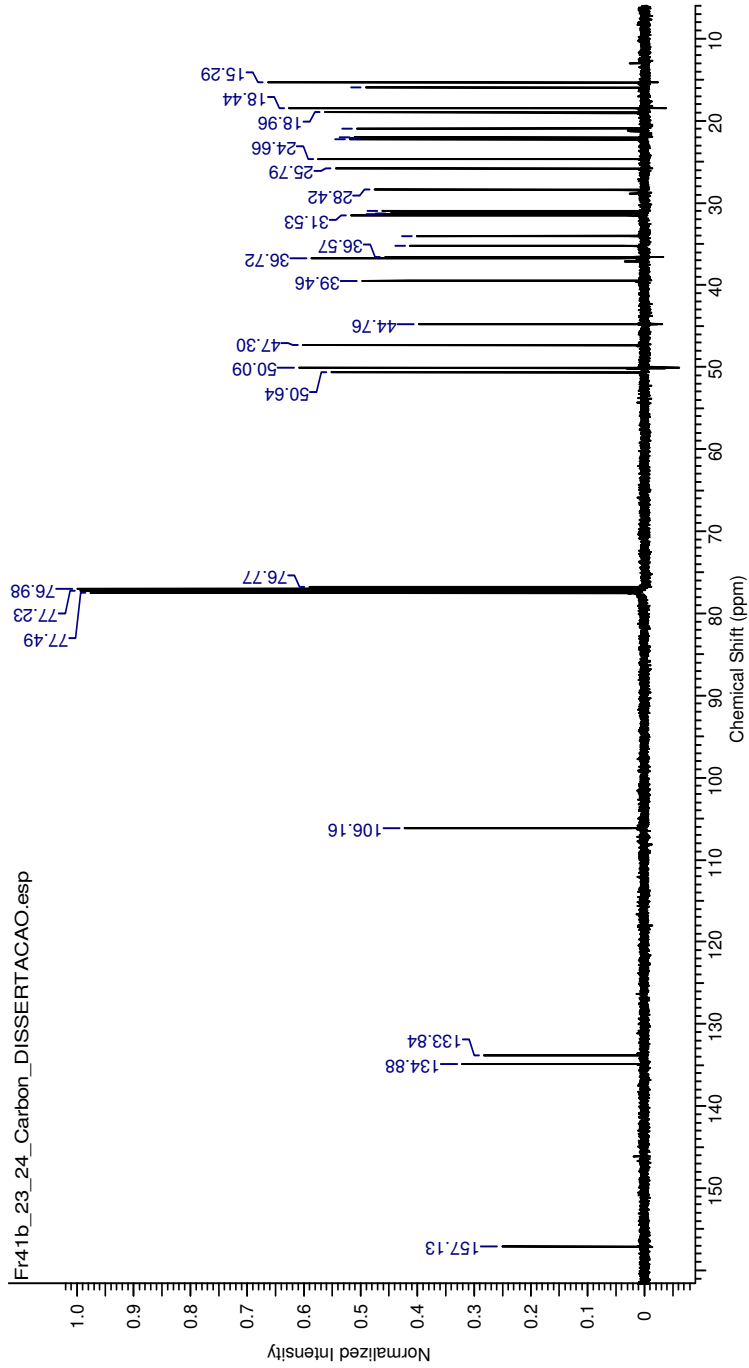
Mapa de correlação HMBC do ciclohexanol, 500 MHz em CDCl_3 .

Acquisition Time (sec)	2.0488	Comment	Fr41b_23_24	Date	Feb 21 2013	Date Stamp	Feb 21 2013
File Name	C:\Users\Rita Onyiah\Desktop\FIDS PARTE 2\Fr41b_23_24	Proton	Feb 21 201301.fid	Frequency (MHz)	499.86	Points Count	16384
Nucleus	¹ H	Number of Transients	64	Original Points Count	12288	Solvent	CHLOROFORM-d
Pulse Sequence	s2pul	Receiver Gain	30.00	Sweep Width (Hz)	5998.35	Temperature (degree C)	28.000
Spectrum Offset (Hz)	2499.2581	Spectrum Type	STANDARD				

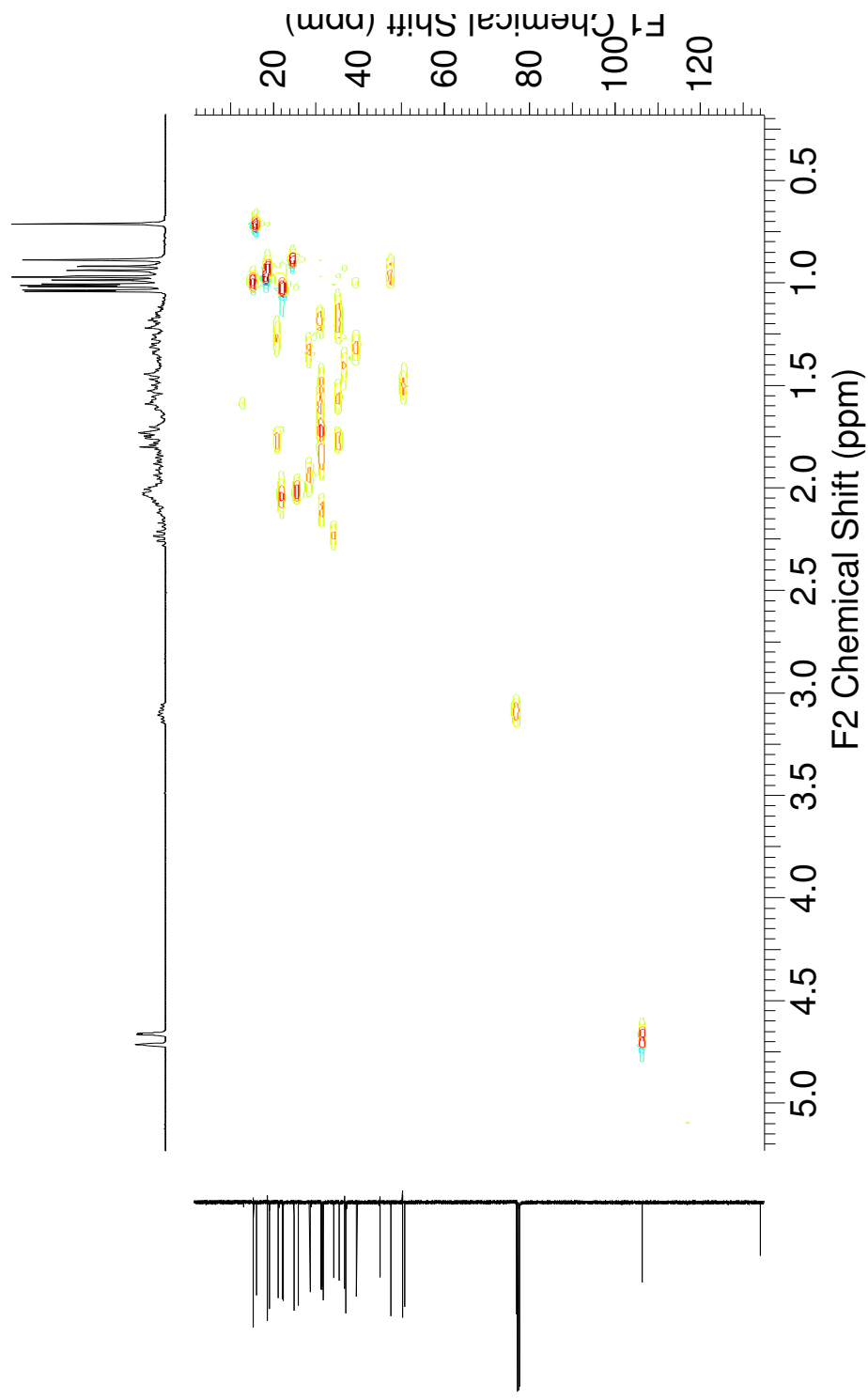


Espectro de RMN¹H do obtusifolioside, 500 MHz em CDCl₃.

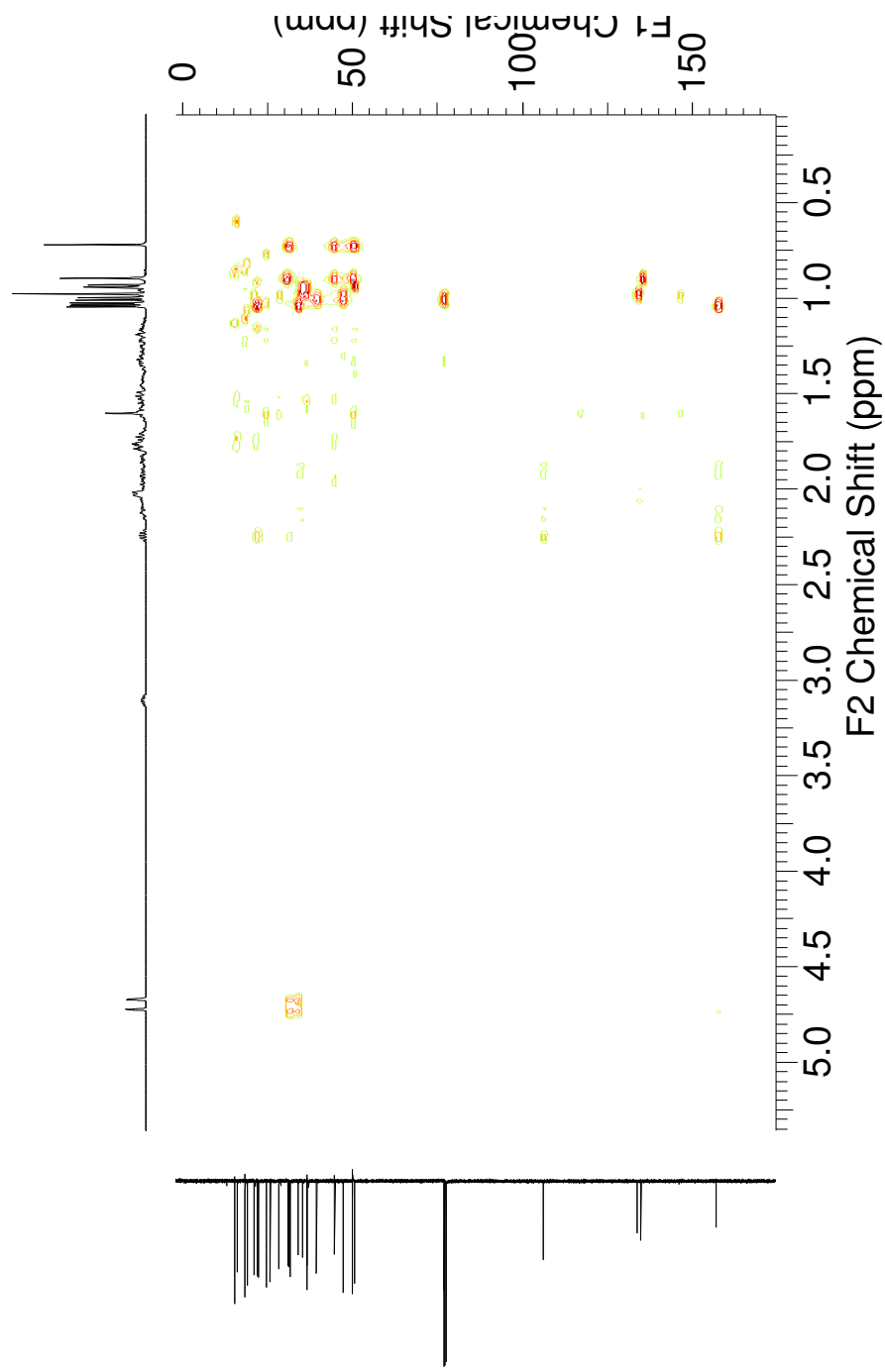
Acquisition Time (sec)	1.3005	Comment	Fr41b_23_24	Date	Feb 21 2013	Date Stamp	Feb 21 2013
File Name	C:\Users\Rita Cynara\Desktop\FIDS PARTE 2\Fr41b_23_24_Carbon_Feb 21 201301.fid					Frequency (MHz)	125.70
Nucleus	13C	Number of Transients	2000	Original Points Count	39230	Points Count	65536
Pulse Sequence	s2oul	Receiver Gain	30.00	Solvent	CHLOROFORM-d		
Spectrum Offset (Hz)	13197.3818	Spectrum Type	STANDARD	Sweep Width (Hz)	30165.81	Temperature (degree C)	28.000



Espectro de RMN¹³C do obtusifolioside a 125 MHz em CDCl₃.



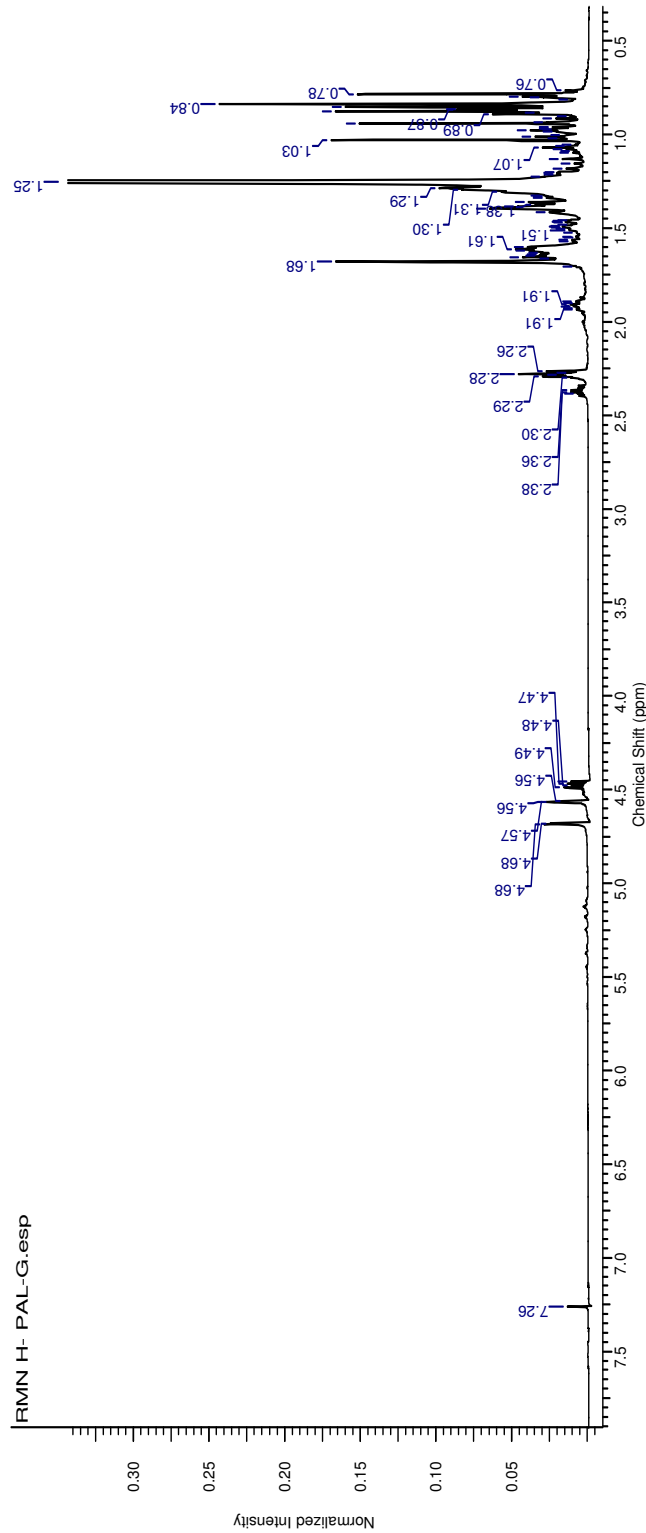
Mapa de correlação HSQC do obtusifolioside a 300 MHz em CDCl_3 .



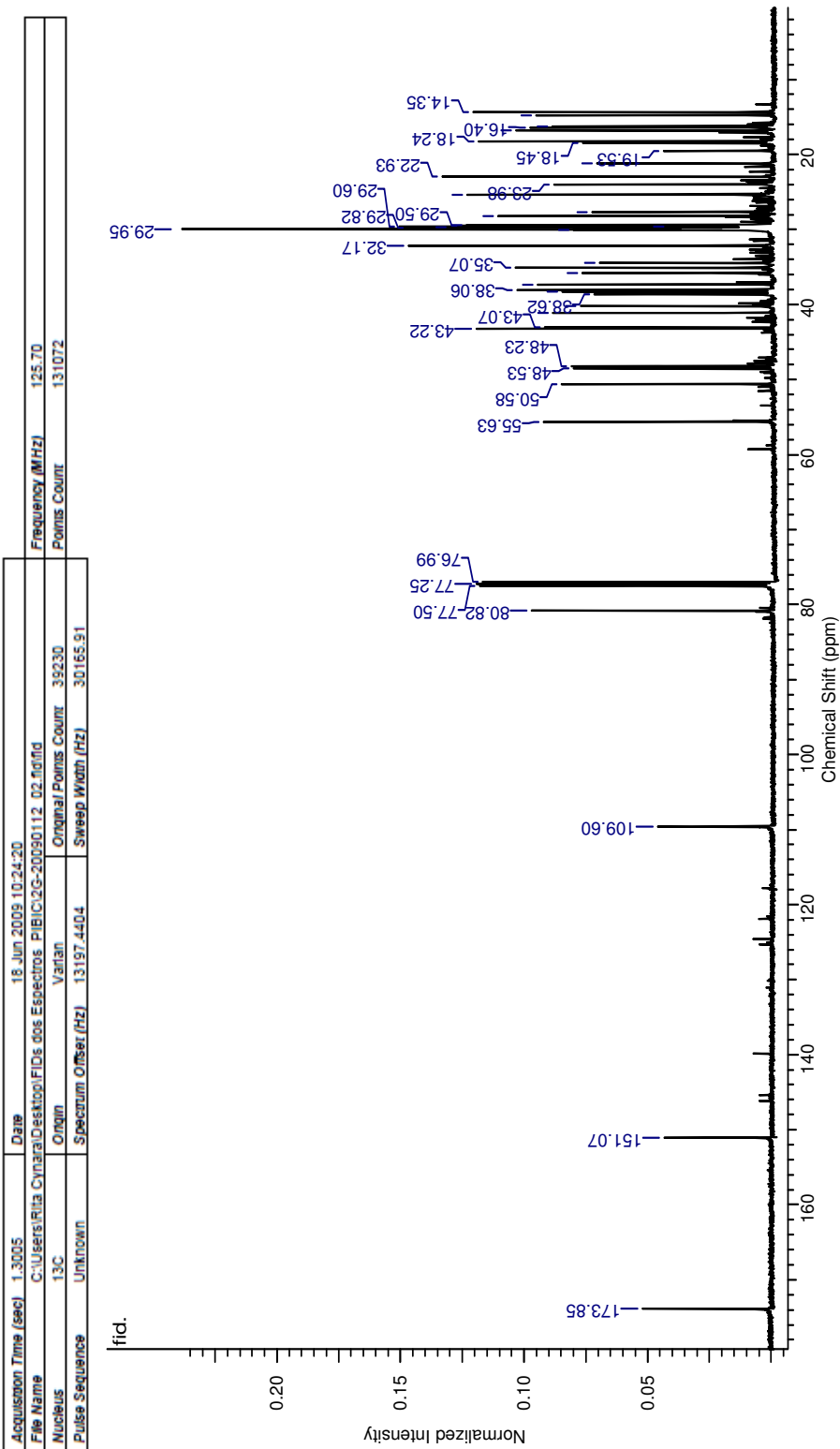
Mapa de correlação HMBC do obtusifolioside a 300 MHz em CDCl_3 .

ANEXO -1 B- ESPECTROS DE RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR (1H, 13C) *P. AMAPA E B.*
PARINARIOIDES EM TRABALHOS ANTERIORES

Acquisition Time (sec)	2.0496	Date	18 Jun 2009 10:19:58
File Name	C:\Users\Rita Cynara\Desktop\FIDs dos Espectros PIBIC2G-20090112_01.fid.tifd		
Nucleus	1H	Origin	Varian
Pulse Sequence	Unknown	Spectrum Offset (Hz)	2494.3542
		Original Points Count	12288
		Sweep Width (Hz)	5898.35
		Frequency (MHz)	499.86
		Points Count	32768

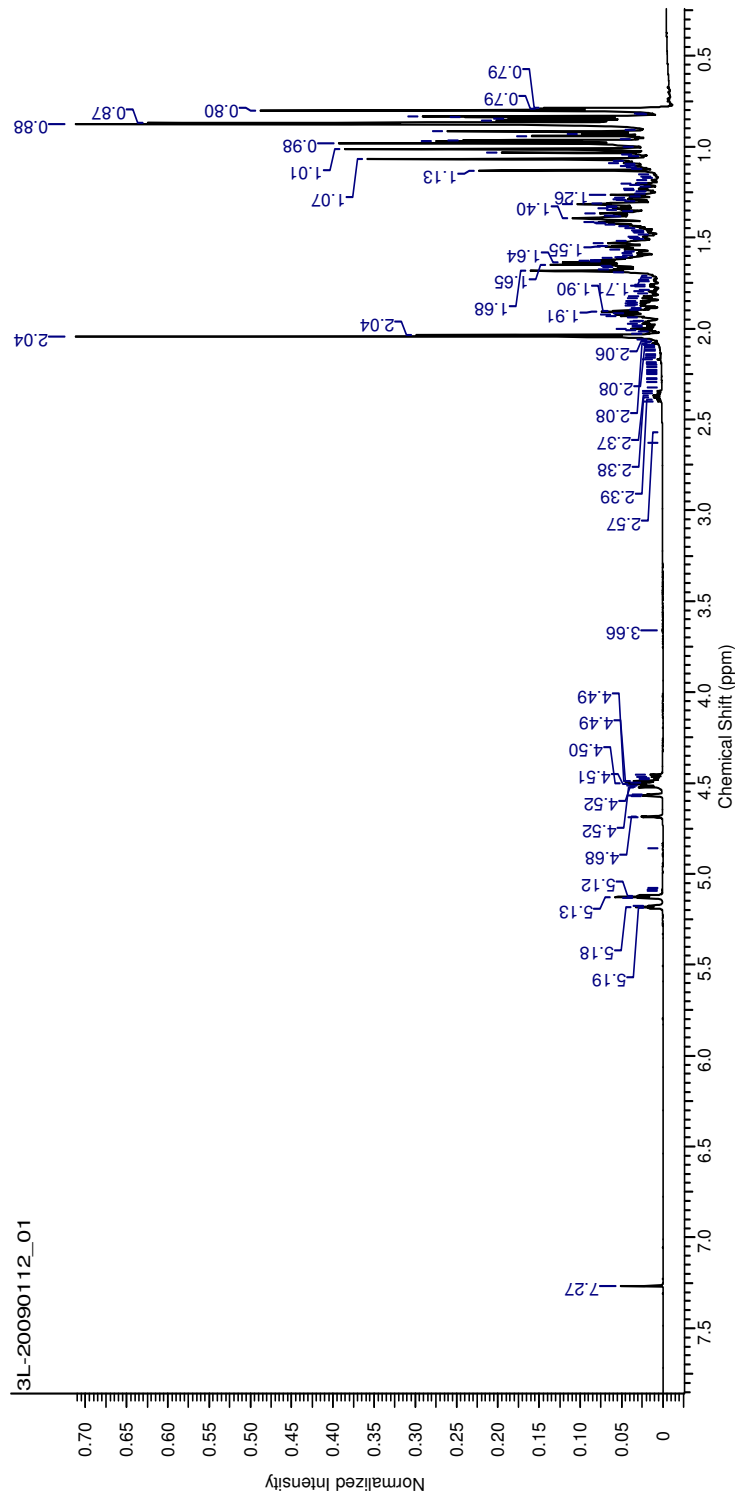


Espectro de RMN¹H da mistura de éster não hidroxilado de lupeol a 500 MHz em DCI₃.



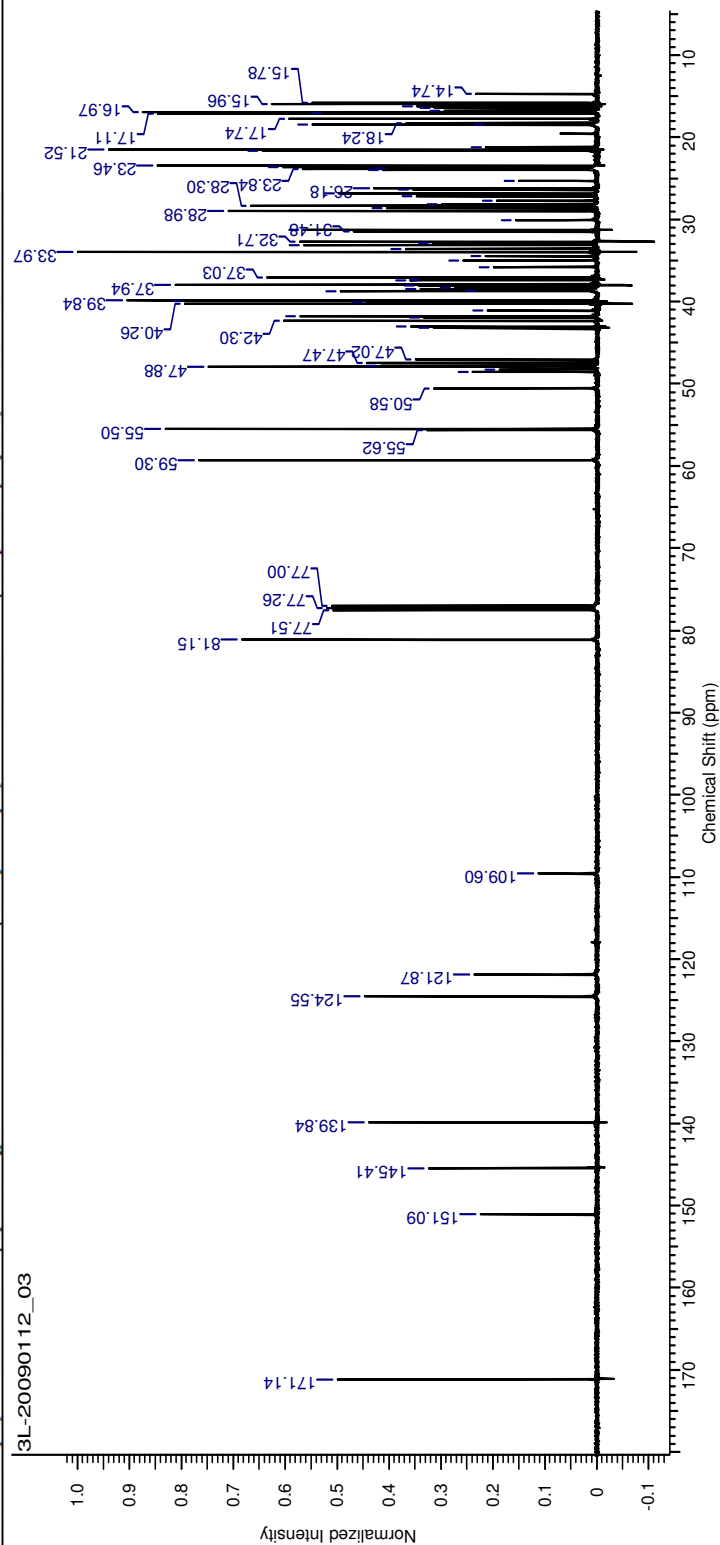
Espectro de RMN¹³C da mistura de éster não hidroxilado de lupeol a 125 MHz em DCI₃.

Acquisition Time (sec)	2.0486	Comment	3L	Date	Jan 12 2009	Date Stamp	Jan 12 2009
File Name	C:\Users\Rita Cynara\Desktop\FIDs dos Espectros	PIBICI3L-20090112_01.fid		Frequency (MHz)	499.86	Nucleus	¹ H
Number of Transients	16	Points Count	16394	Pulse Sequence	s2pul	Receiver Gain	10.00
Solvent	CHLOROFORM-d	Original Points Count	12288	Spectrum Type	STANDARD	Sweep Width (Hz)	5998.35



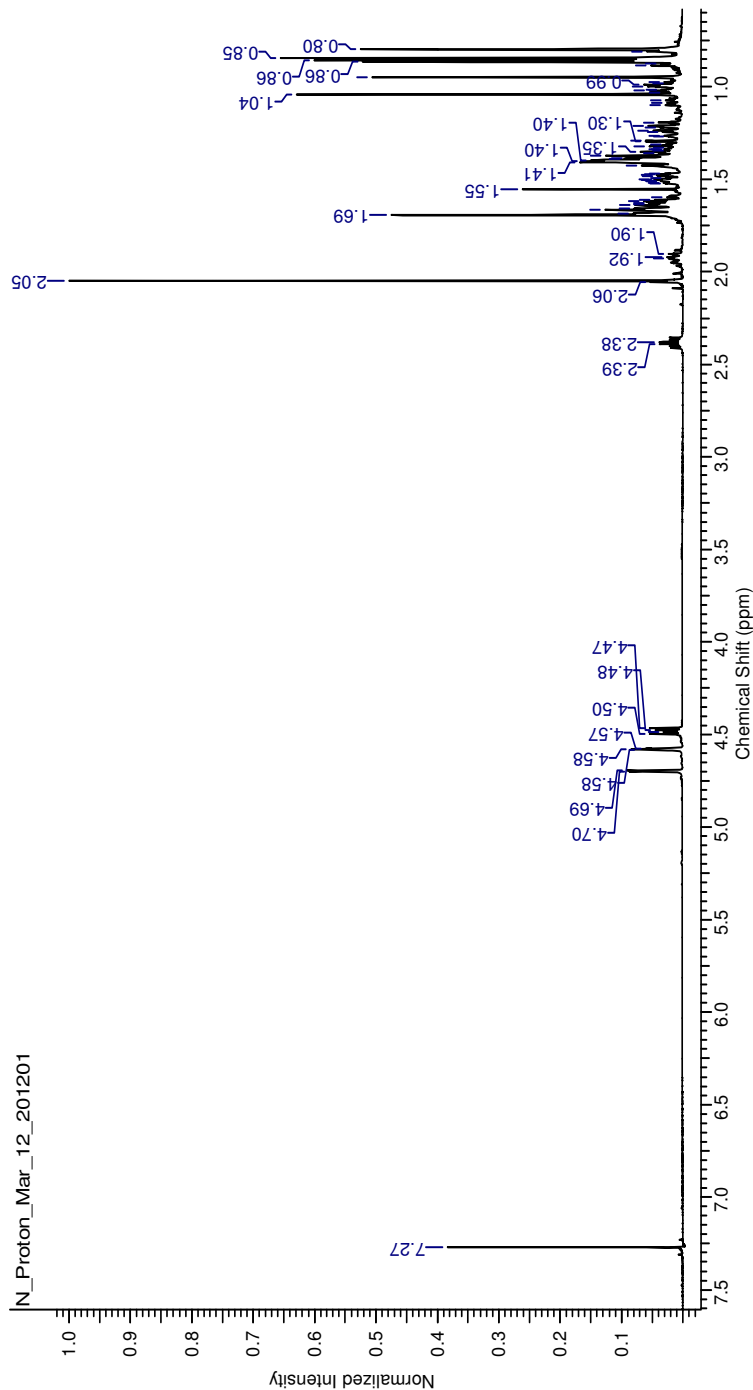
Espectro de RMN¹H da mistura da mistura triterpenos acetilados (ac. α , β -amirina e lupeol) a 500 MHz em CDCl₃.

Acquisition Time (sec)	1.3005	Comment	3L	Date	Jan 12 2009	Date Stamp	Jan 12 2009
File Name	C:\Users\Rita Cynara\Desktop\FID dos Espectros PIBICI3L-20090112_03.fid.tif						
Nucleus	¹³ C	Number of Transients	3904	Original Points Count	39230	Frequency (MHz)	125.70
Pulse Sequence	s2bul	Receiver Gain	28.00	Solvent	CHLOROFORM-d	Points Count	65536
Spectrum Offset (Hz)	13197.3818	Spectrum Type	STANDARD	Sweep Width (Hz)	30165.91	Temperature (degree C)	AMBIENT TEMPERATURE



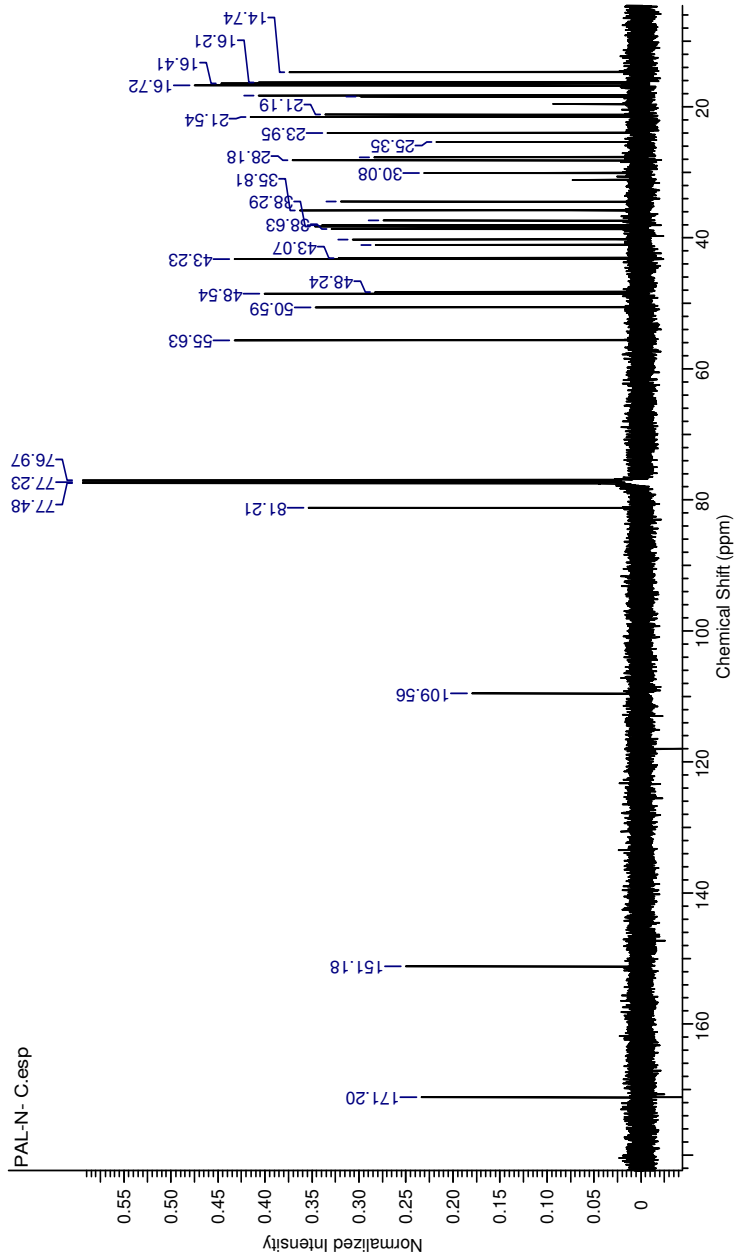
Espectro de RMN¹³C da mistura da mistura triterpenos acetilados (ac. α, β-amirina e lupeol) a 125 MHz em CDCl₃.

Acquisition Time (sec)	2.0486	Comment	N	Date	Mar 12 2012	Date Stamp	Mar 12 2012
File Name	C:\Users\Rita Cynara\Desktop\N_Proton	Mar 12 2012\1d\fid	Proton	400.86	400.86	Frequency (MHz)	1H
Number of Transients	16	Original Points Count	10240	Points Count	16384	Pulse Sequence	zgpg30
Solvent	CHLOROFORM-d	CHLOROFORM-d	2240.3578	Spectrum Offset (Hz)	STANDARD	Spectrum Type	400.86
						Sweep Width (Hz)	4008.44



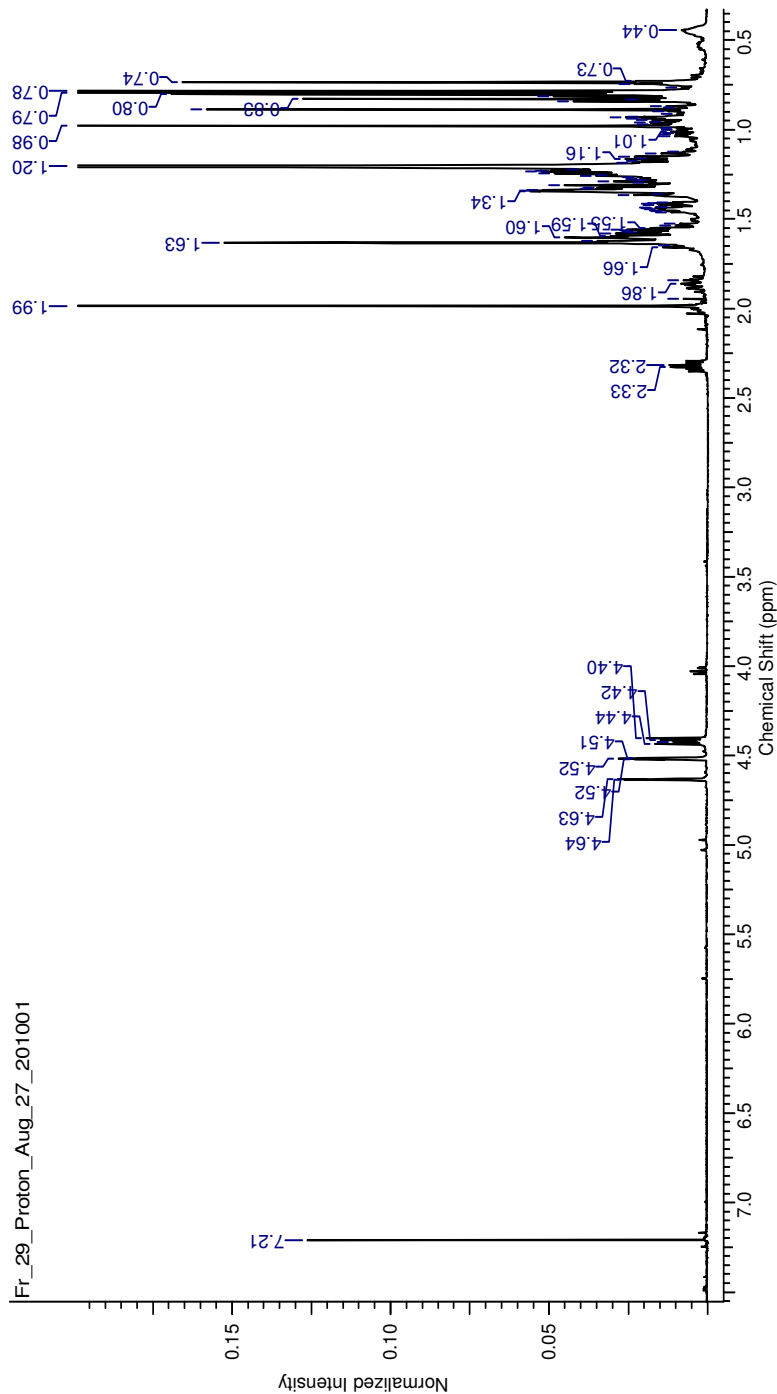
Espectro de RMN¹H do acetato de lupeol isolado de *P. amapa* a 500 MHz em CDCl₃.

Acquisition Time (sec)	1.3005	Comment	Std proton	Date	Oct 18 2012	Date Stamp	Oct 18 2012
File Name	C:\Users\Rita\Myra\Desktop\fd			Frequency (MHz)	125.70	Nucleus	¹³ C
Original Points Count	30230	Points Count	65536	Pulse Sequence	s2pul	Receiver Gain	1856
Spectrum Offset (Hz)	13197.3818	Spectrum Type	STANDARD			Solvent	CHLOROFORM-d
						Temperature (degree C)	25.000
						Sweep Width (Hz)	30165.91



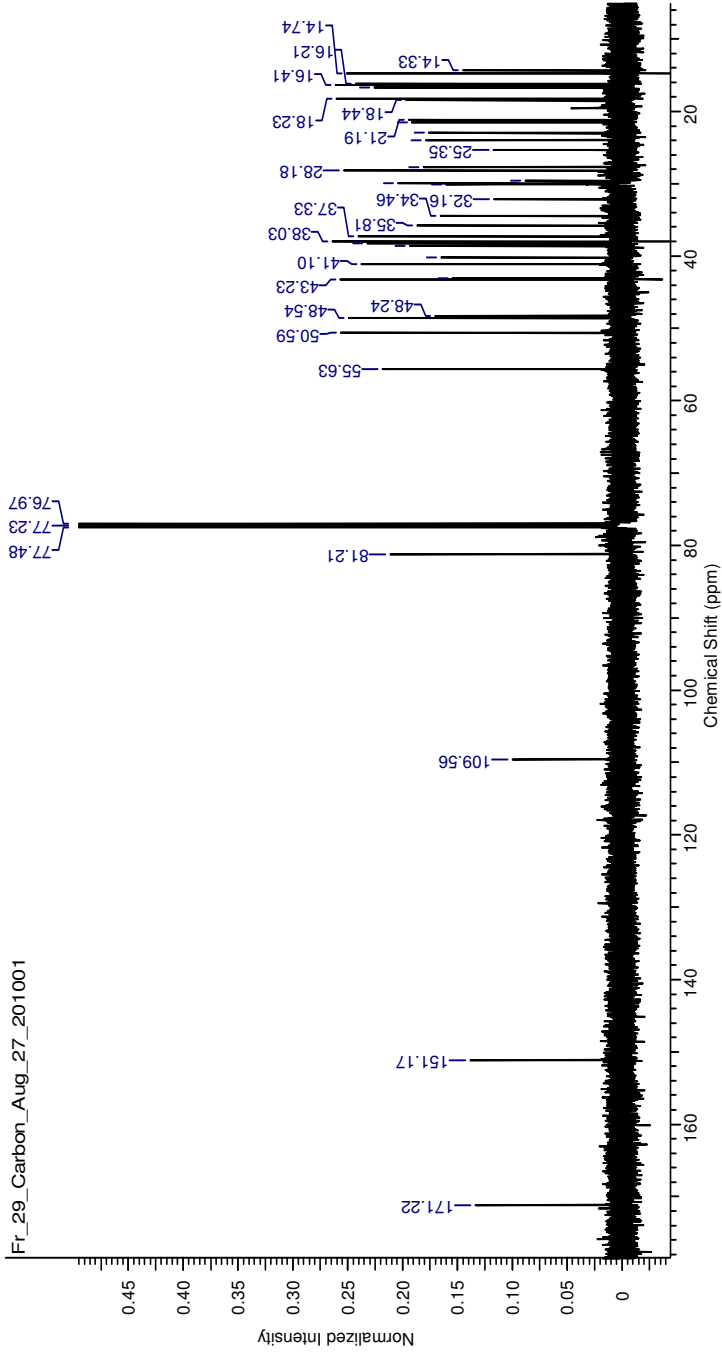
Espectro de RMN¹³C do acetato de lupeol isolado de *P. amapa* a 125 MHz em CDCl₃.

Acquisition Time (sec)	2.0486	Comment	Fr.29	Date	Aug. 27 2010	Date Stamp	Aug. 27 2010
File Name	C:\Users\Rita Cynara\Desktop\FIDs dos Espectros	PBIC\FR29\Fr. 29	Proton	Aug. 27 201001.fid	Frequency (MHz)	499.86	
Nucleus	¹ H	Number of Transients	8	Original Points Count	16384	Points Count	16384
Pulse Sequence	s2pul	Receiver Gain	26.00	Solvent	CHLOROFORM-d		
Spectrum Offset (Hz)	2988.8359	Spectrum Type	STANDARD	Sweep Width (Hz)	7887.80	Temperature (degree C)	28.000



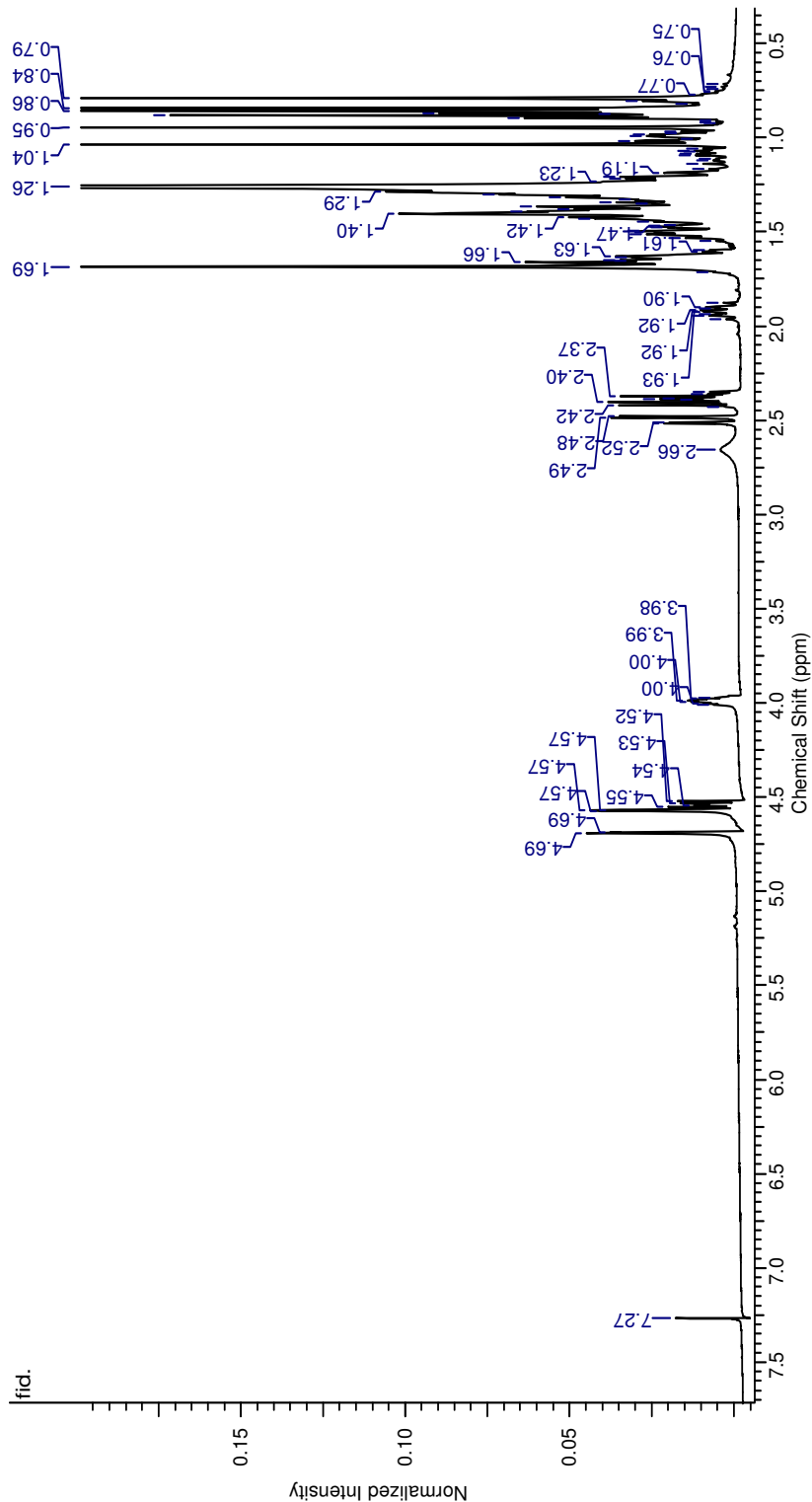
Espectro de RMN¹H do acetato de lupeol isolado de *B. parinarioides* a 500 MHz em CDCl₃.

Acquisition Time (sec)	1.3005	Comment	Fr 29	Date	Aug 27 2010	Date Stamp	Aug 27 2010
File Name	C:\Users\Rita Cytara\Desktop\FIDs dos Espectos	PIBICI.FR29.F1	29	Carbon	Aug 27 201001.fid.tif	Frequency (MHz)	125.70
Nucleus	13C	Number of Transients	1000	Original Points Count	39230	Points Count	65536
Pulse Sequence	sgzgug	Receiver Gain	30.00	Solvent	CHLOROFORM-d		
Spectrometer Offset (Hz)	133197.3618	Shimming Time	STANDARD	Sweep Width (Hz)	30165.91	Temperature (degrees C)	28.000



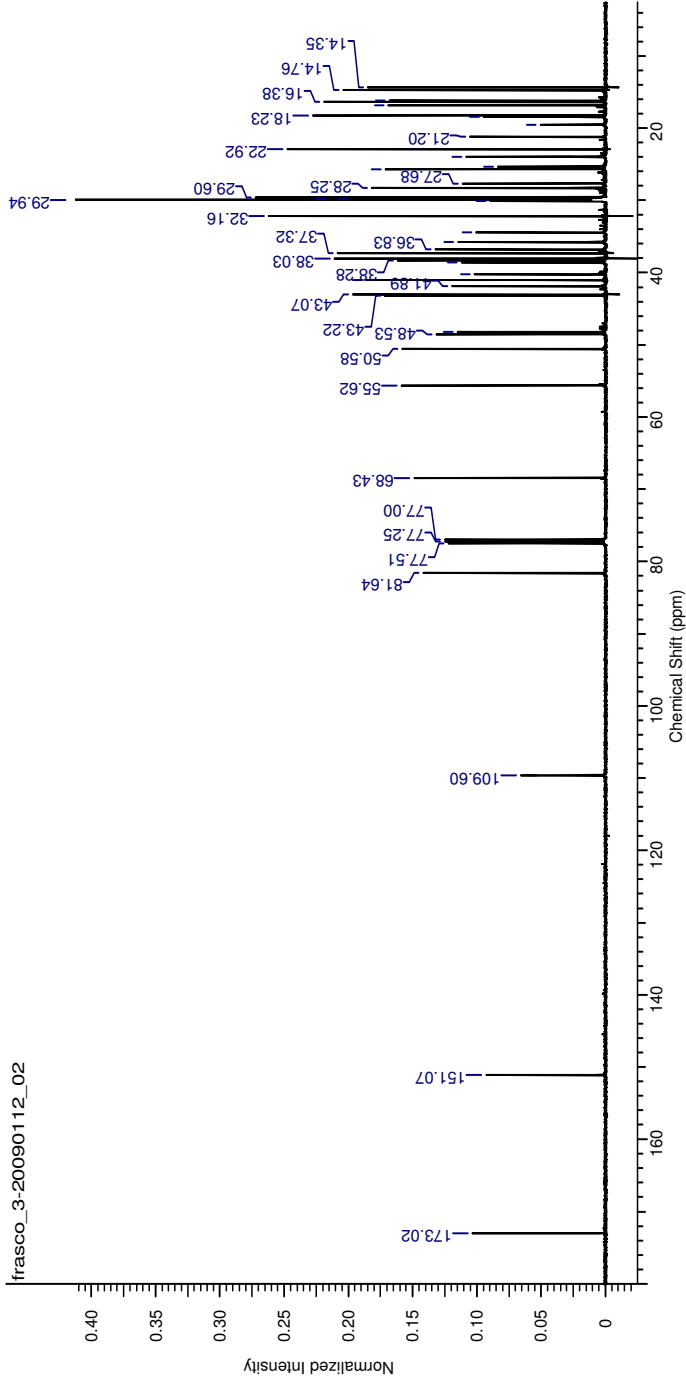
Espectro de RMN¹³C d acetato de lupeol isolado de *B. parinarioides* a 125 MHz em CDCl₃.

Acquisition Time (sec)	2.0486	Date	18 Jun 2009 10:25:12
File Name	C:\Users\Rita Cynara\Desktop\FID6 dos Espectros_PIBIC\frasco_3-20090112_01.fid	Origin	Vatran
Nucleus	¹ H	Original Points Count	10240
Pulse Sequence	Unknown	Spectrum Offset (Hz)	2249.3579
		Sweep Width (Hz)	4998.44
		Frequency (MHz)	499.86
		Points Count	32768



Espectro de RMN¹H da mistura de éster hidroxilado de lupeol a 500 MHz em CDCl₃.

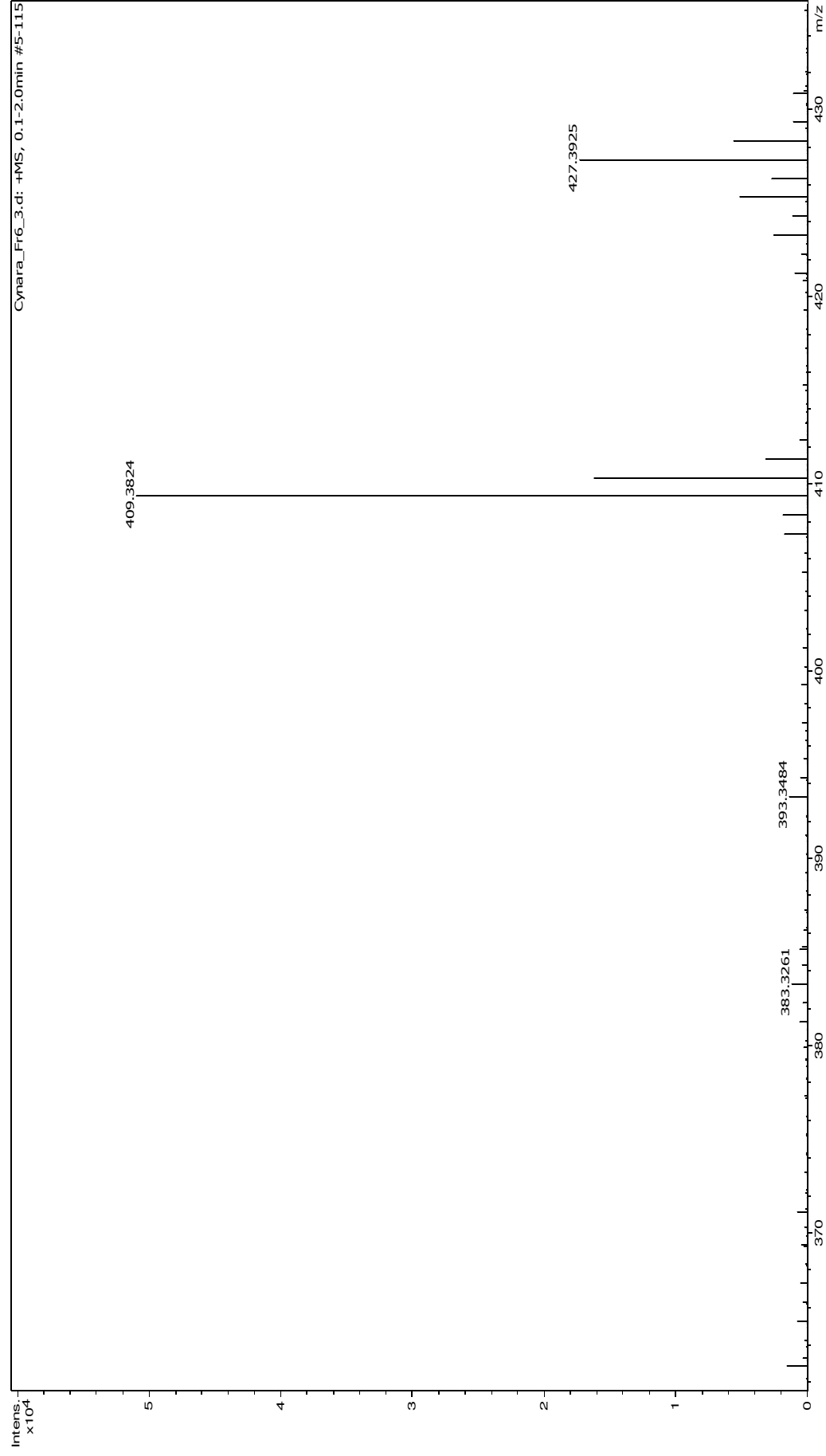
Acquisition Time (sec)	1.3005	Comment	frasco_3	Date	Jan 12 2009	Date Stamp	Jan 12 2009
File Name	C:\Users\Rita Cynara\Desktop\FDs dos Espectros	PIBIC\frasco_3-20090112_02.fid				Frequency (MHz)	125.70
Nucleus	¹³ C	Number of Transients	3648	Original Points Count	39230	Points Count	65536
Pulse Sequence	s2bul	Receiver Gain	26.00	Solvent	CHLOROFORM-d		
Spectrum Offset (Hz)	13197.3818	Spectrum Type	STANDARD	Sweep Width (Hz)	30165.91	Temperature (degree C)	AMBIENT TEMPERATURE



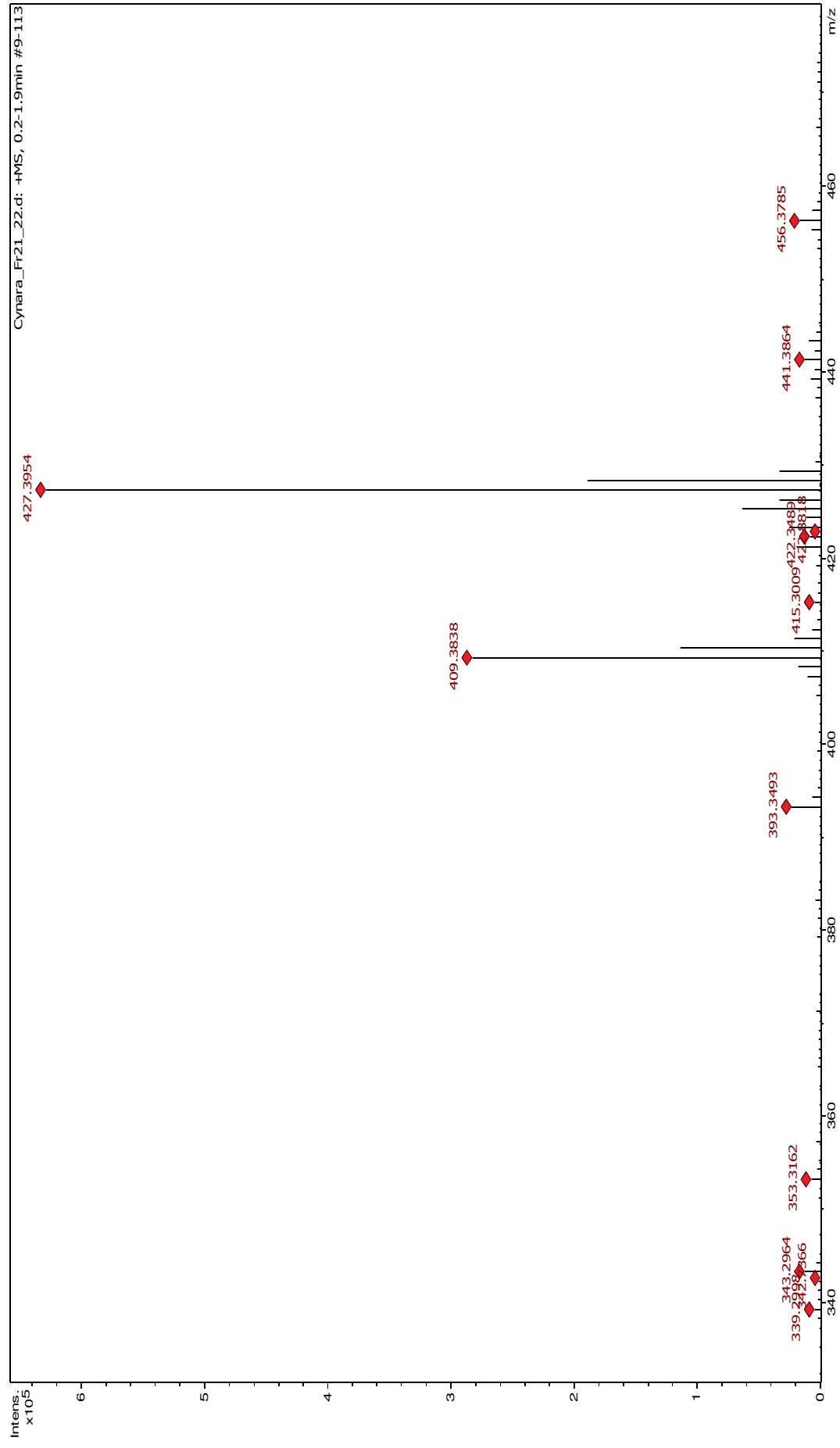
Espectro de RMN¹³C da mistura de éster hidroxilado de lupeol a 125 MHz em CDCl₃.

**ANEXO – 2 A- ESPECTROS DE MASSAS OBTIDO POR ANÁLISE EM MICROTOF QII- SUBSTÂNCIAS
ISOLADAS DE *B. PARINARIOIDES***

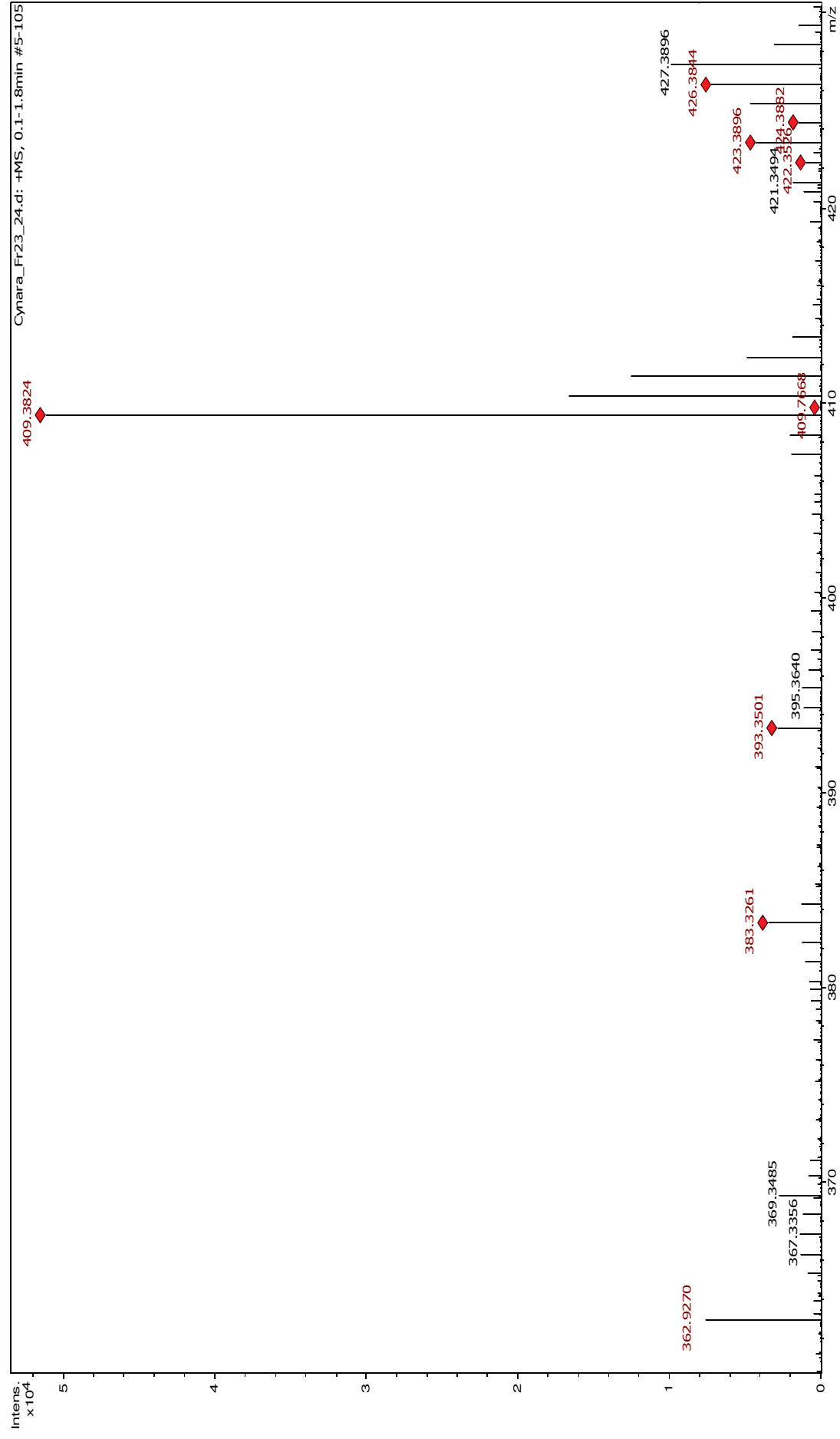
- Espectro de massa da substância cicloartenol- SUBST- 3



- Espectro de massas do cicloeucaleenol –SUBST-4

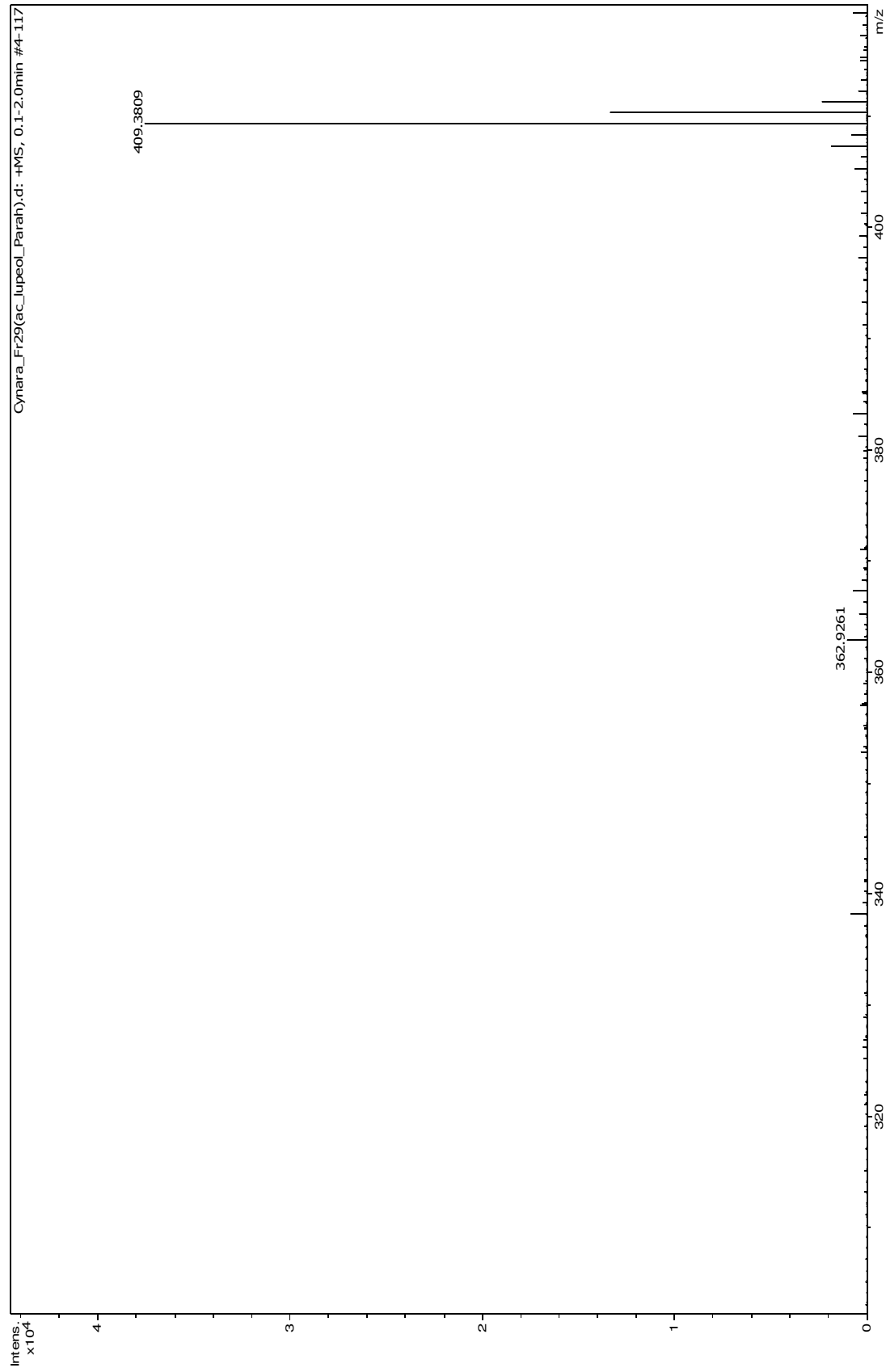


- Espectro de massas do obtusifoliol – SUBST- 5

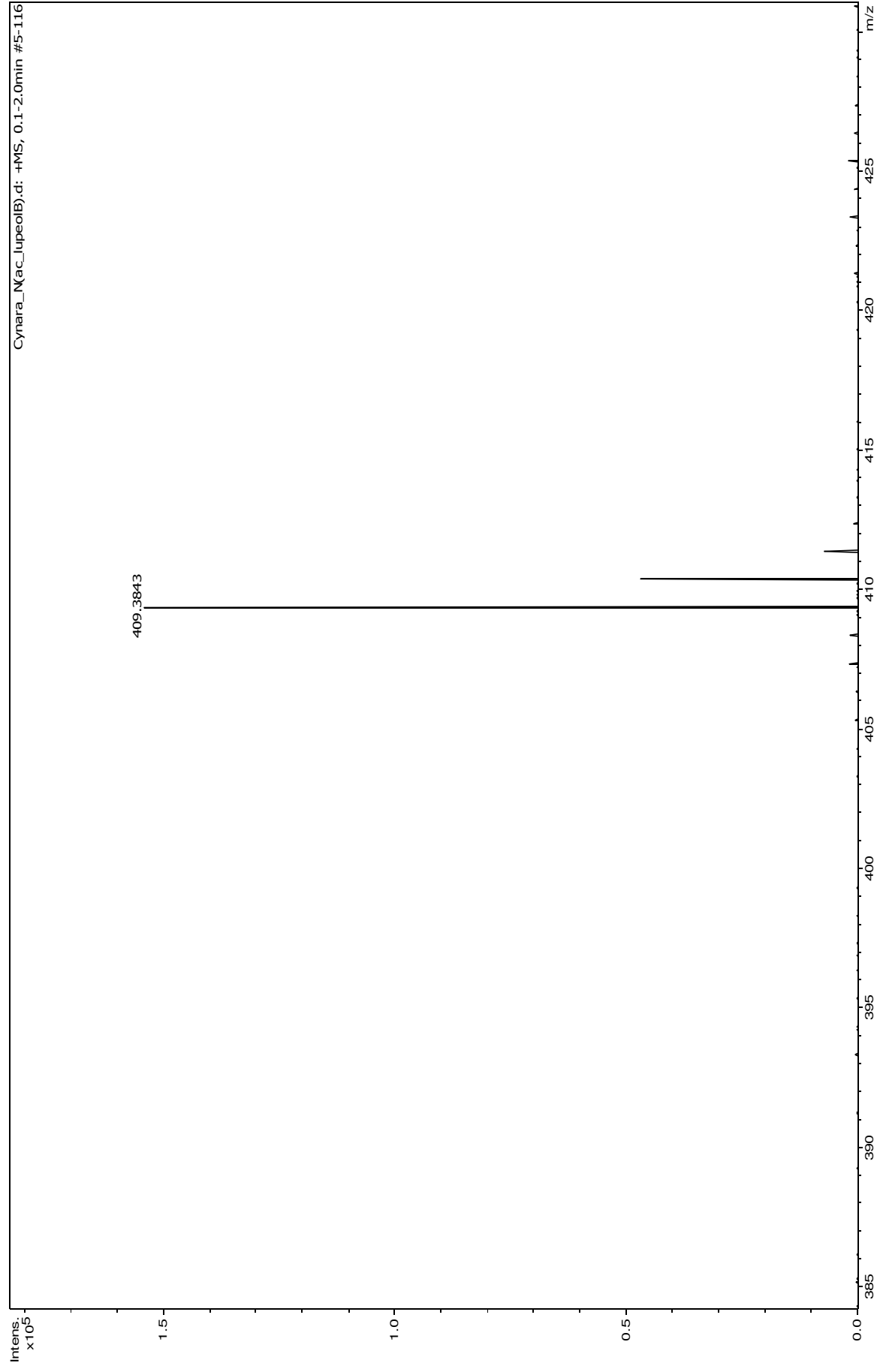


ANEXO -2 B- ESPECTROS DE MASSAS OBTIDO POR ANÁLISE EM MICROTOF QII- SUBSTÂNCIAS ISOLADAS DE *B. PARINARIOIDES* E *P. AMAPA* EM TRABALHOS ANTERIORES.

- Espectro de massa do acetato de lupeol isolado de *B. parinarioides* – SUBST-7



- Espectro de massa do acetato de lupeol isolado de *P. amapa-* SUBST-6



ANEXO – 2 C - ANÁLISE POR LC-EM DE SUBST-1 E SUBST-2

Análise por LC-MS:

1. CLAE:

Cromatógrafo Shimadzu UFLC com sistema binário LC-20AD, detector SPD-M20A, injetor SIL-20AC HT, forno de coluna CTO-20A, CBM-20A

coluna Kinetex C18 100A, 2,6 μ m, 150x2,1 mm

sistema isocrático ACN/H₂O (98:2) a 0,3 mL/min

injeção 10 μ L da amostra 1,0 mg/mL em i-PrOH

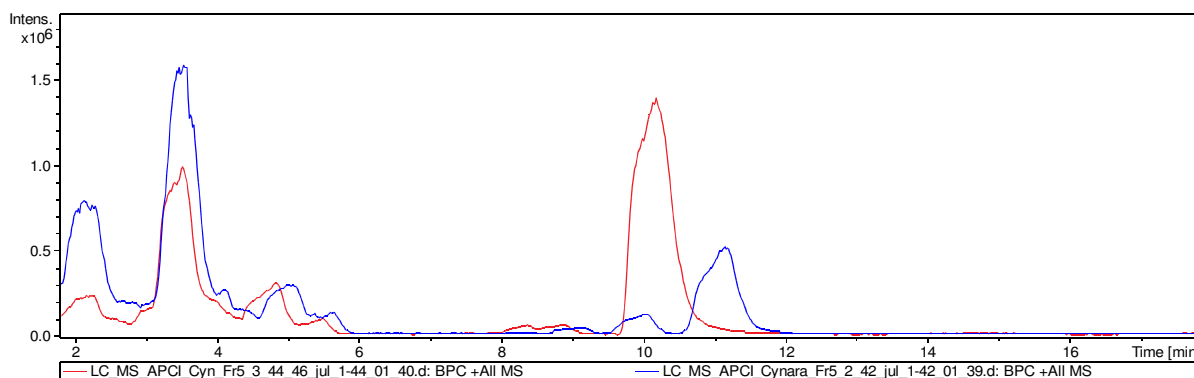
2. EM:

Espectrômetro de alta resolução microTOF-QII Bruker Daltonics Inc, fonte APCI no modo positivo

end plate -500V; capillary 4000 V; corono 5000 nA; nebulizer 1.6 bar; dry gas 2,0 L/min; dry temp 250 C; vaporizer temp 450 C.

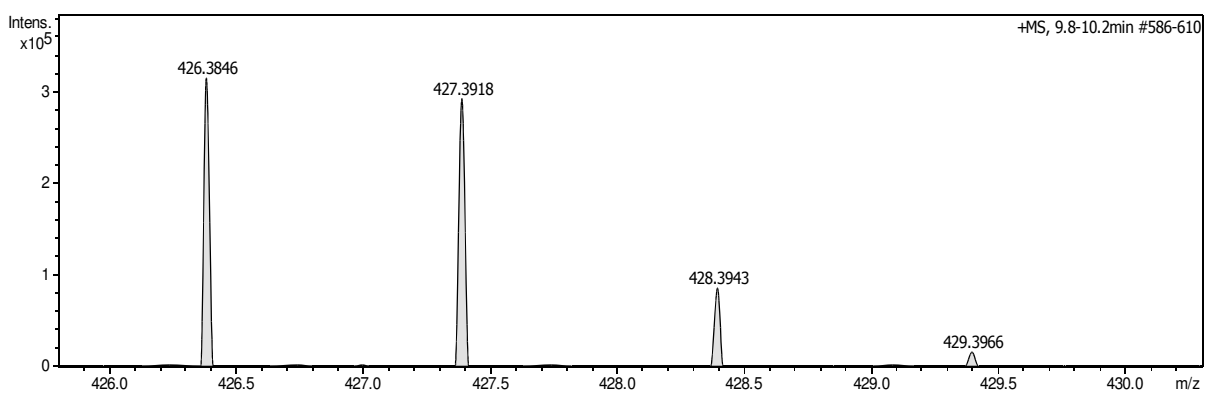
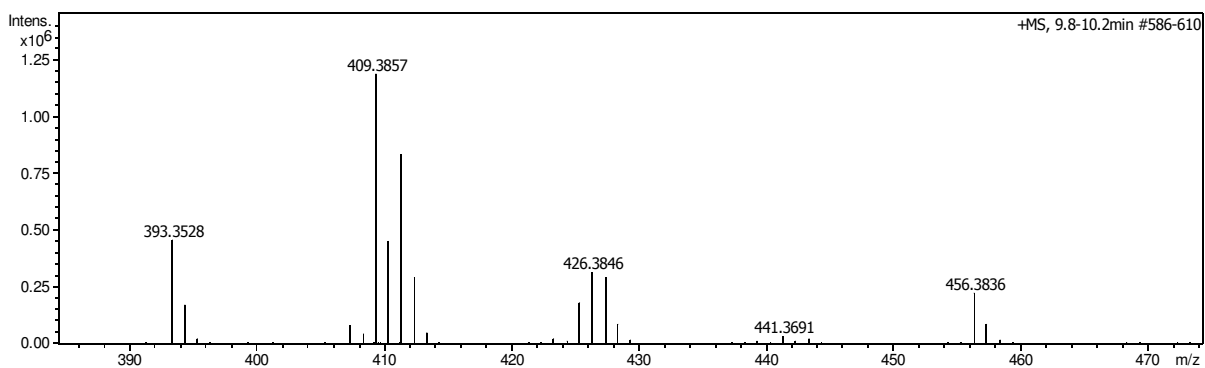
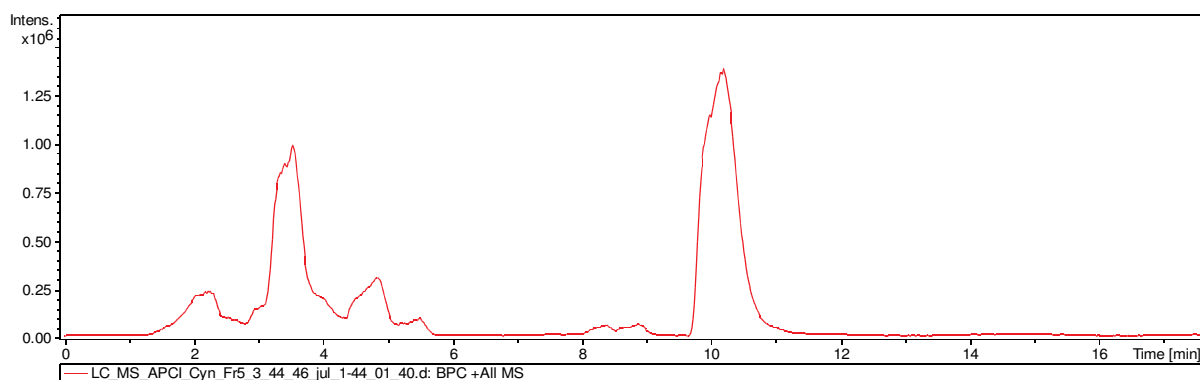
Scan range 50-3000

Calibração interna com solução tuning mix APCI (Fluka) modo enhanced quadratic.



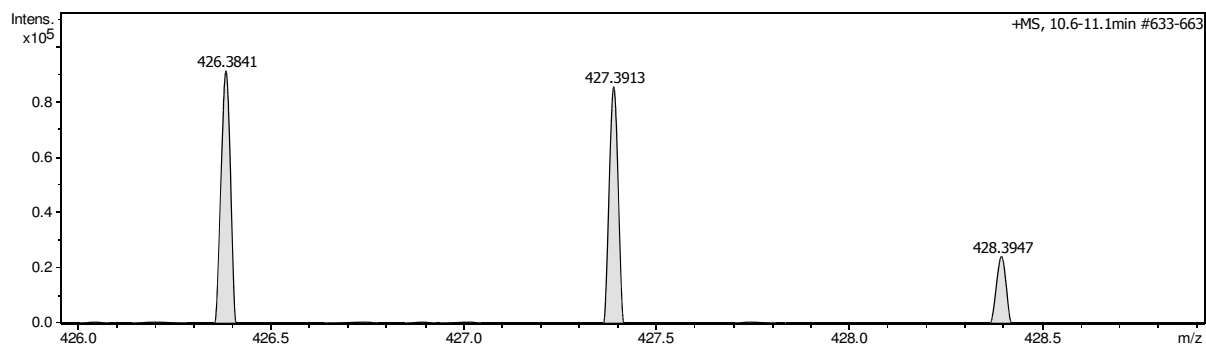
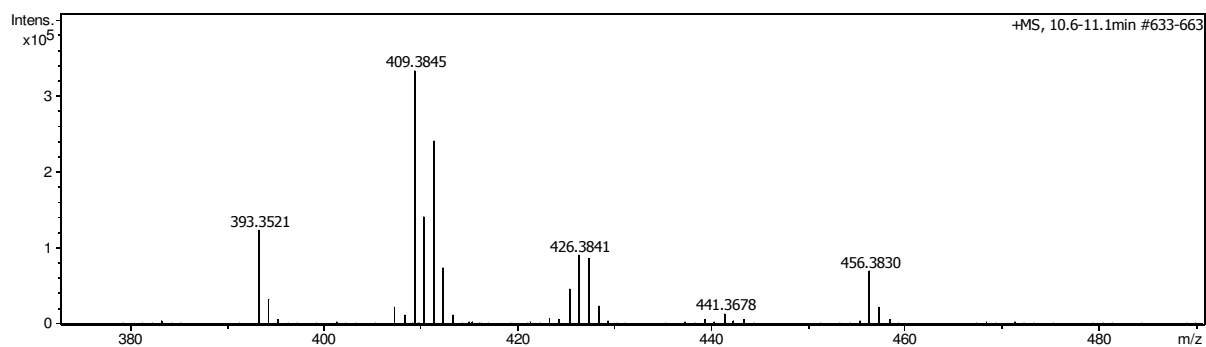
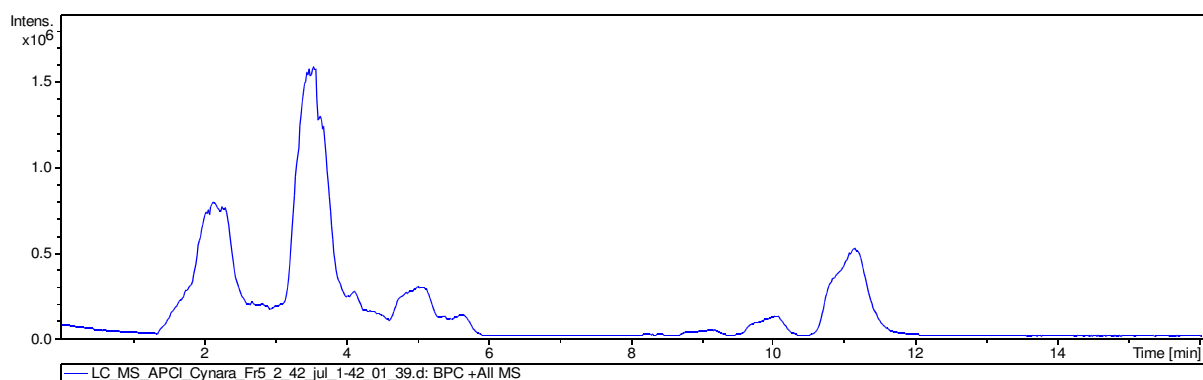
Cromatograma de íons totais (vermelho tirucalla-7,24-dien-3 β -ol e azul butirospermol) na análise de fase reversa nas condições acima.

Análise por LC-MS de tirucalla-7,24-dien-3 β -ol- SUBST-2



Amostra	Ion	Massa observada	Massa teorica	Erro (ppm)
Cynara Fr5-3 44-46	M	427,391800	427,393900	4,91

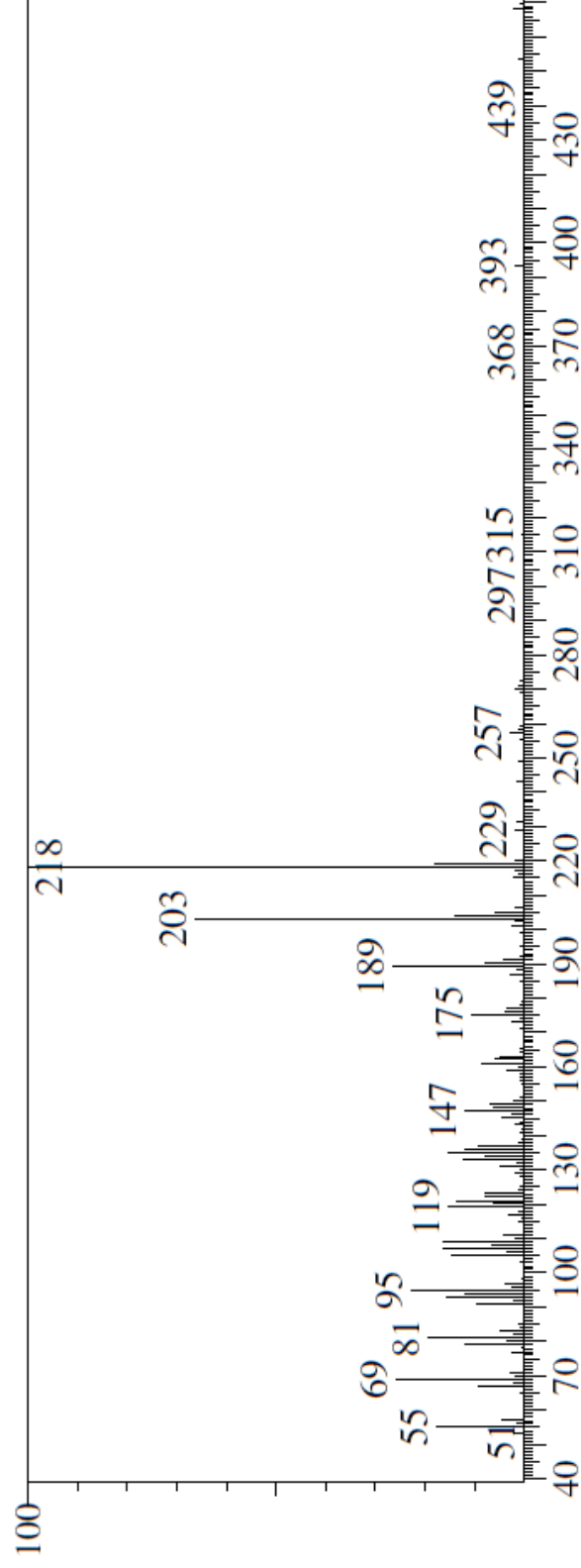
Análise por LC-MS de butirospermol-SUBST-1



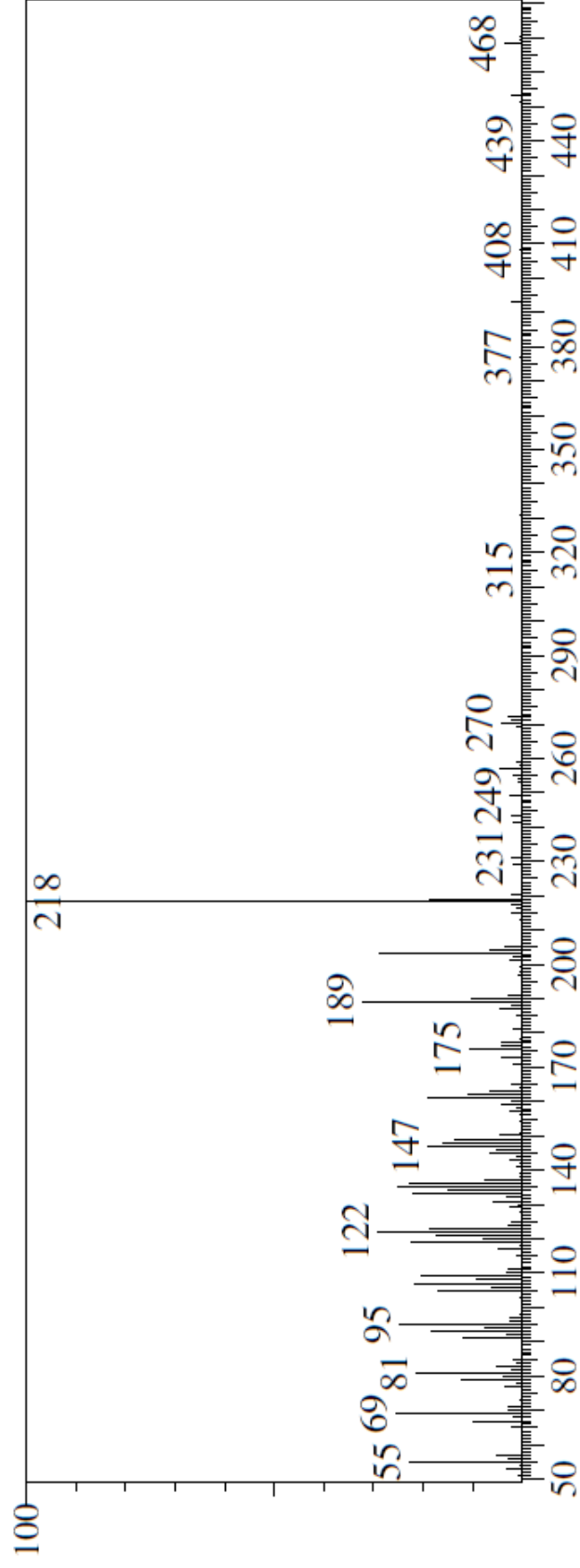
Amostra	Ion	Massa observada	Massa teorica	Erro (ppm)
Cynara Fr5-2 42	M	427,391300	427,393900	6,08

ANEXO -3 A- ESPECTROS DE MASSAS OBTIDOS DAS ANÁLISES POR CG-EM- MISTURA DE TRITERPENOS ACETILADOS

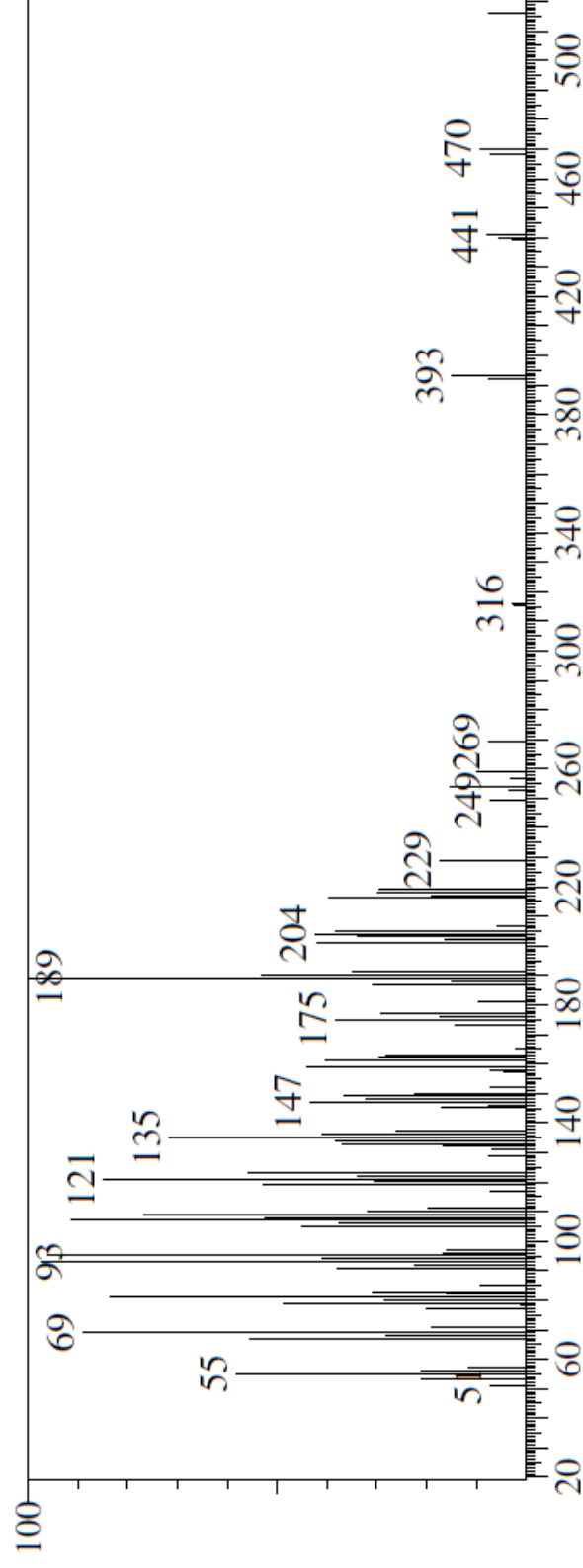
- Espectro de massa obtido por CG-EM para o pico TR= 32, 168 (acetato de β - amirina)



- Espectro de massa obtido por CG-EM para o pico TR= 34, 583 (acetato de α - amirina)



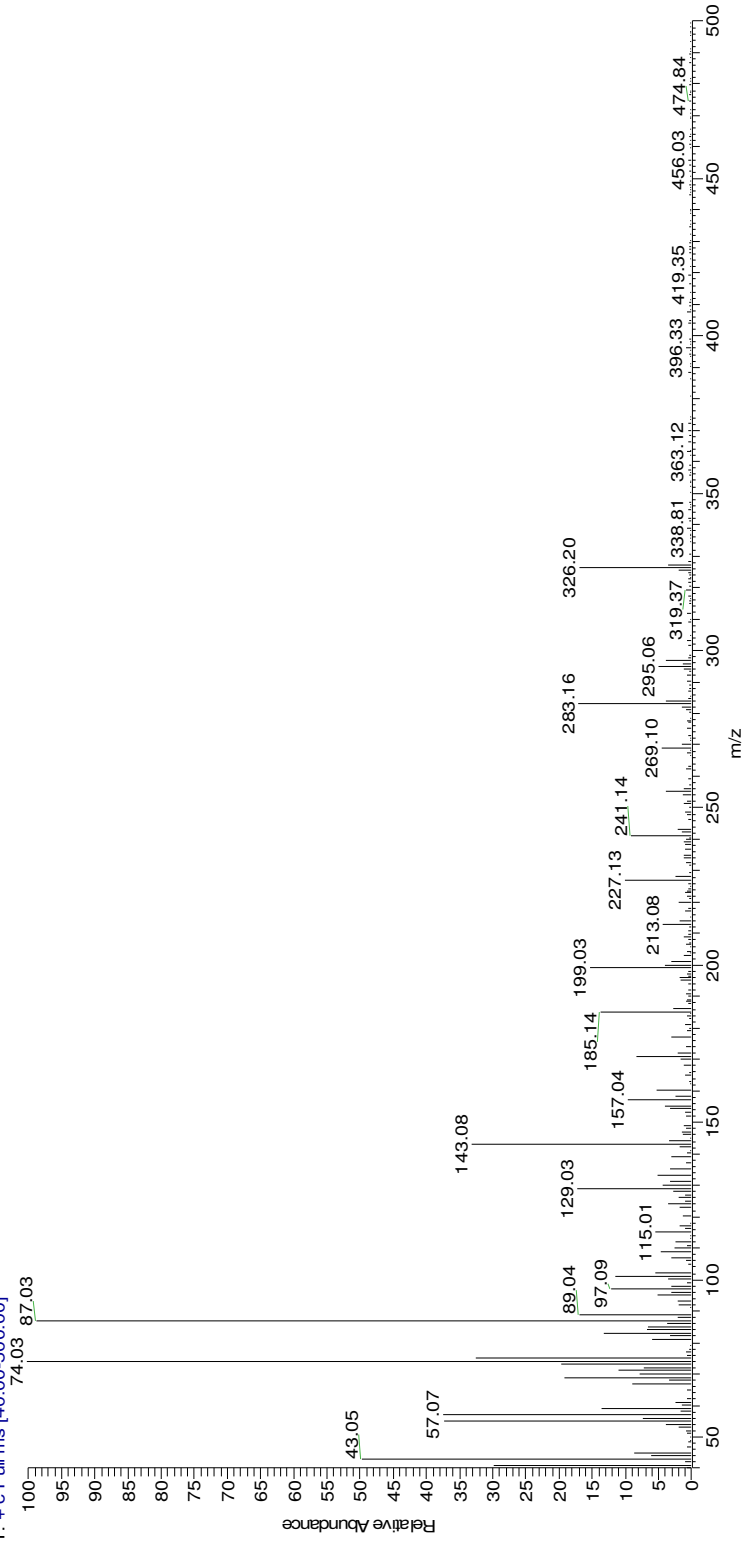
- Espectro de massa obtido por CG-EM para o pico TR= 34, 958 (acetato de lupeol)



ANEXO – 3 B- ESPECTROS DE MASSAS OBTIDOS DAS ANÁLISES POR CG-EM DA MISTURA DE ÉSTERES METÍLICOS

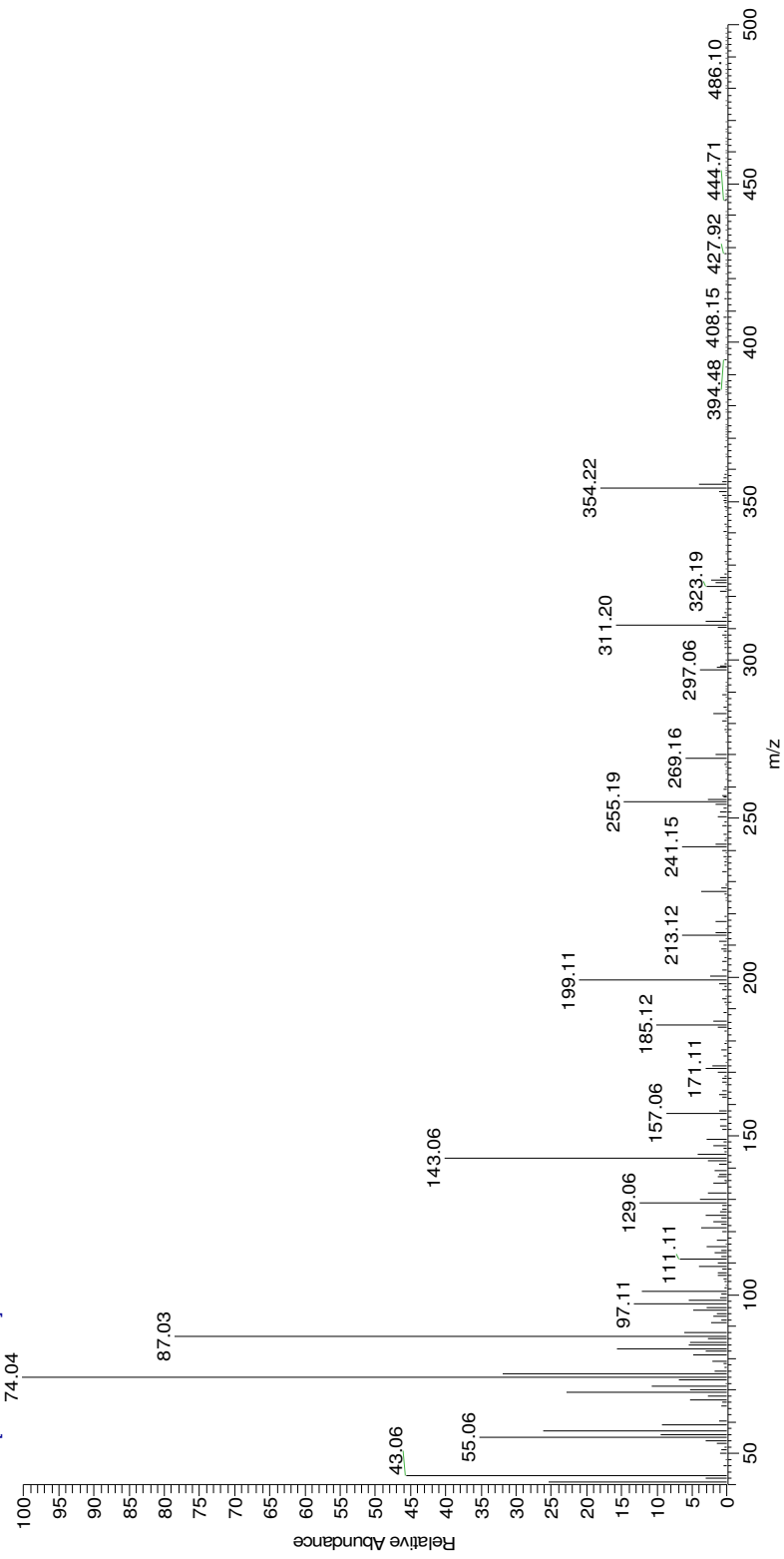
Ésteres metílicos obtidos da mistura de ésteres não hidroxilados – MIST-1

r.G #329-334 RT: 8.95-9.03 AV: 6 SB: 11 8.78-8.92 , 9.19 NL: 8.17E4
T: + c Full ms [40.00-500.00]



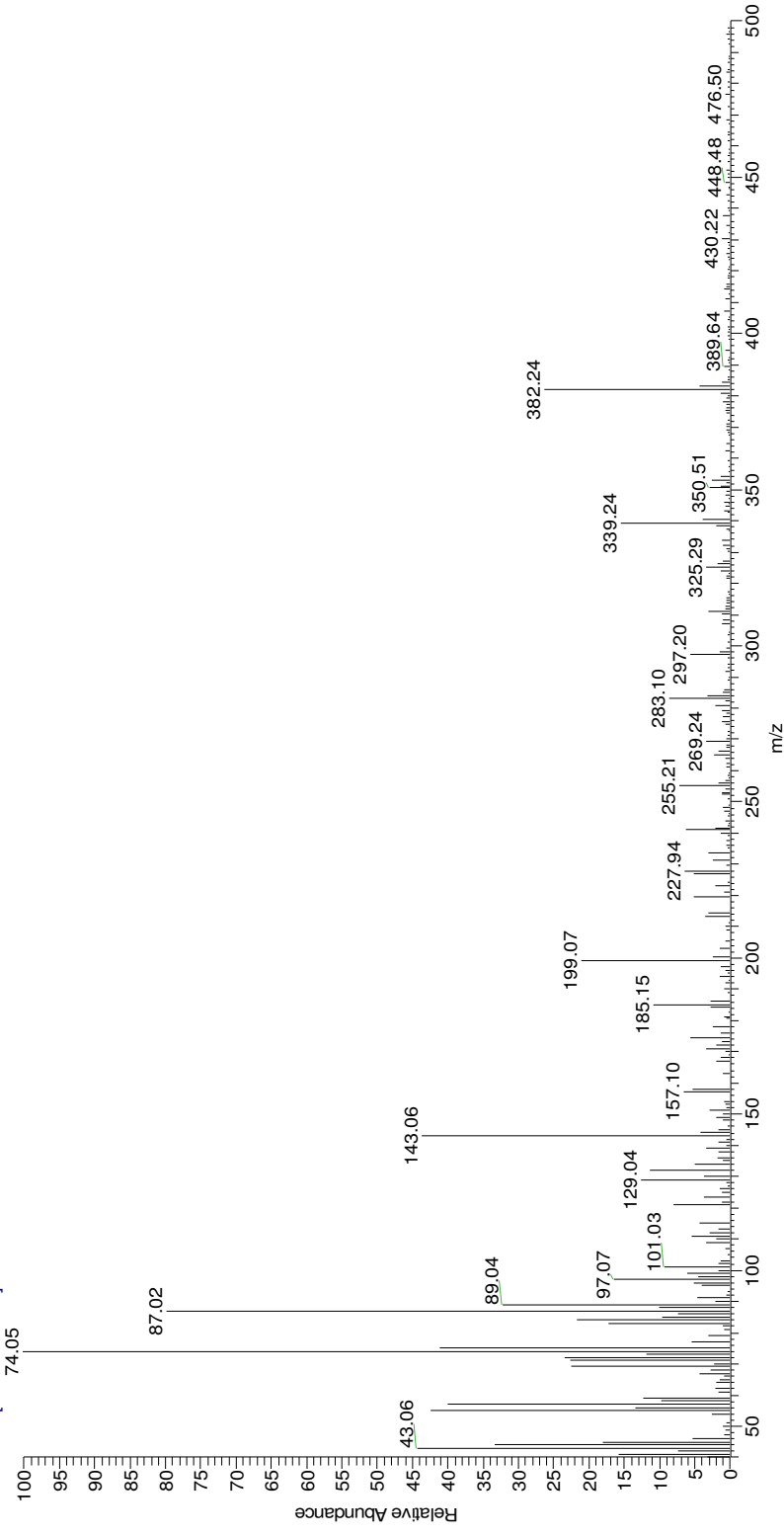
TR 9 – MIST-1-a'

r.G #450-459 RT: 10.85-10.99 AV: 10 SB: 20 10.73-10.79, 11.10-11.32 NL: 1.74E5
T: + c Full ms [40.00-500.00]



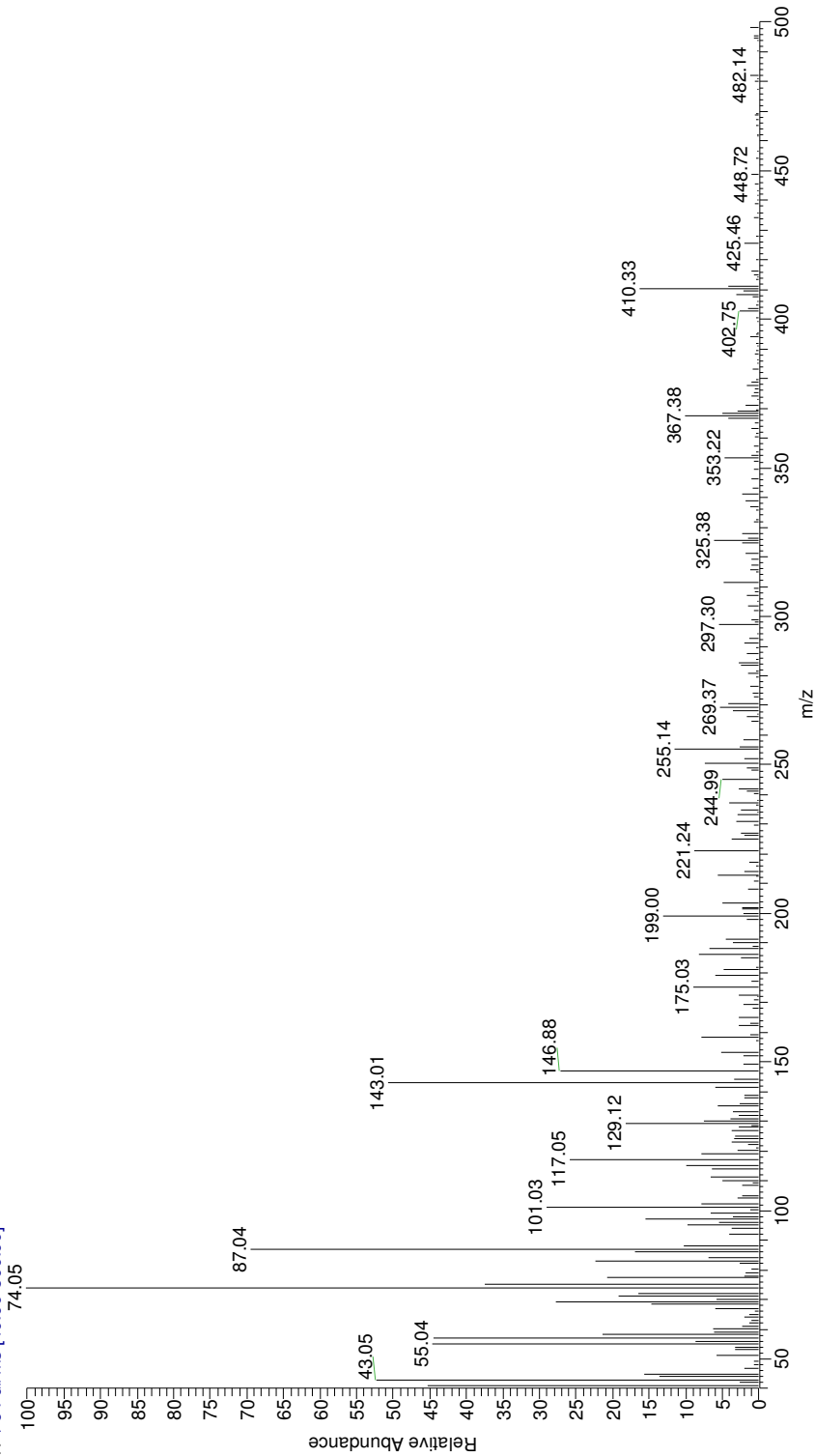
TR 10.91 - MIST-1-b'

r_G #602-609 RT: 13.24-13.35 AV: 8 SB: 30 12.81-13.03 , 13.50-13.72 NL: 6.02E4
T: + c Full ms [40.00-500.00]



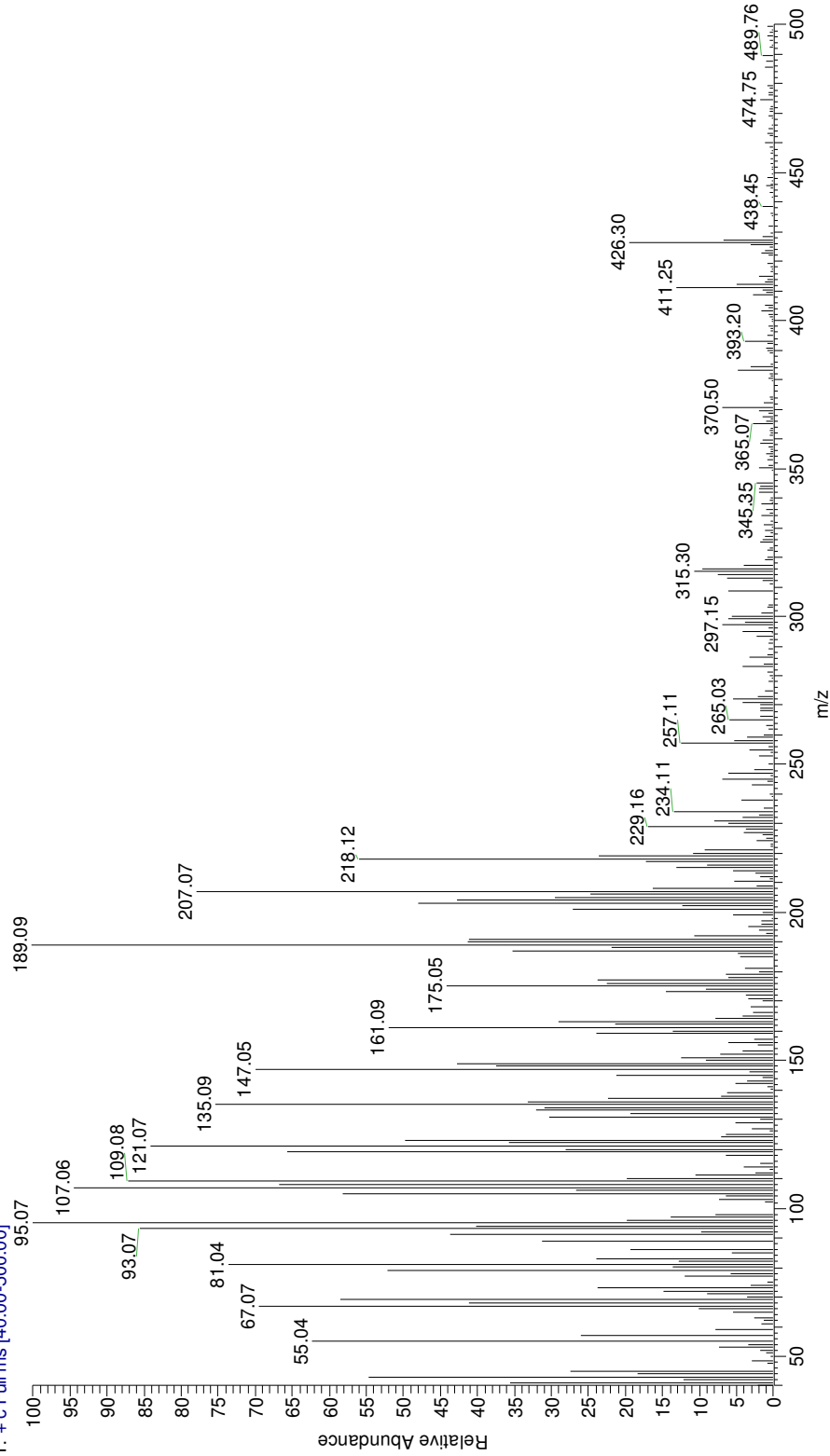
TR 13.30- MIST-1-c'

r_G#817 RT: 16.61 AV: 1 SB: 24 16.27-16.44, 16.96-17.13 NL: 6.57E4
T: + c Full ms [40.00-500.00]



TR 16.60- MIST-1-d'

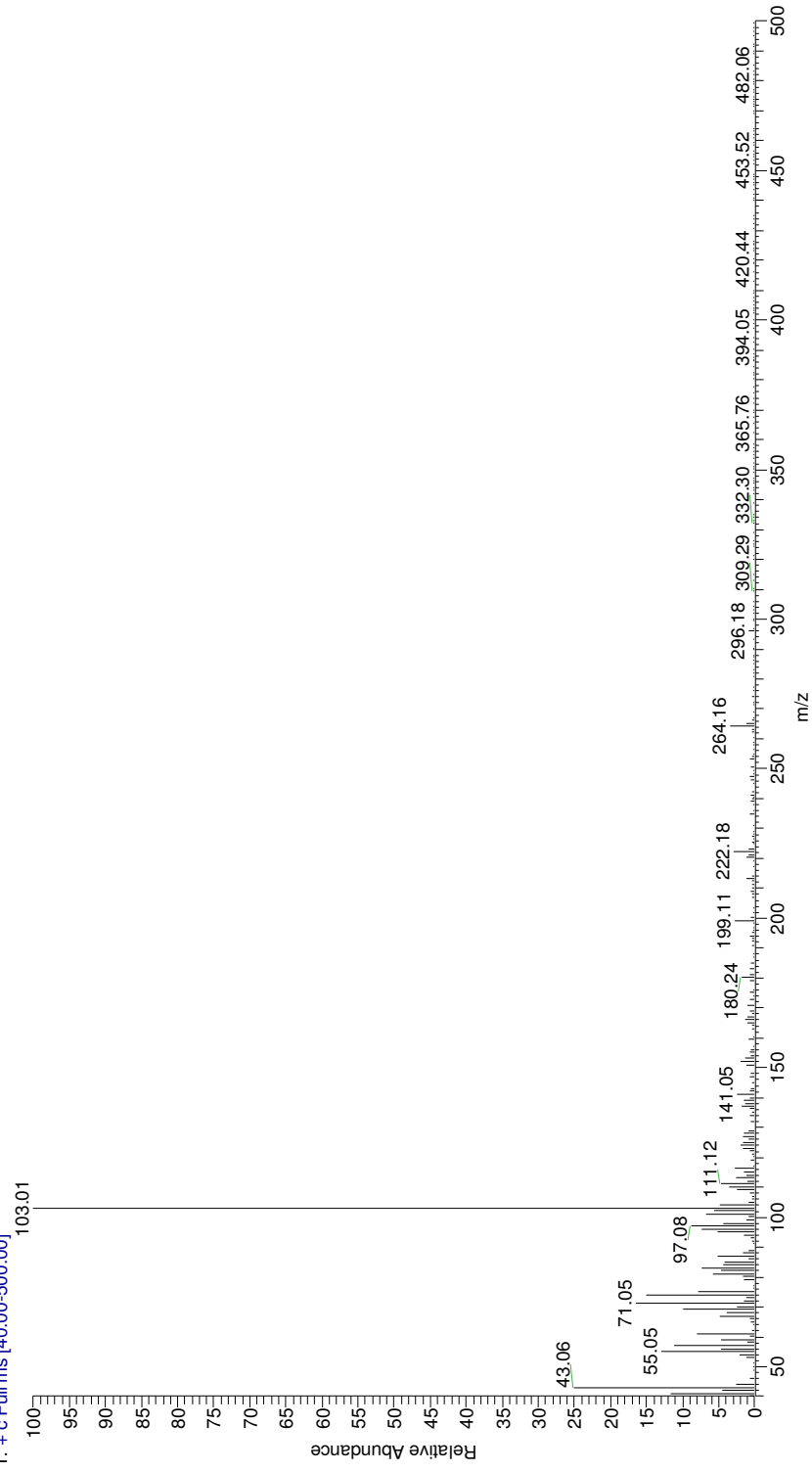
r_G #2184-2224 RT: 38.08-38.70 AV: 41 SB: 105 36.55-37.54, 39.47-40.10 NL: 1.56E4
T: + c Full ms [40.00-500.00]



TR 38.30- acetato de lupeol

Ésteres metílicos obtidos da mistura de ésteres hidroxiilados- MIST-3

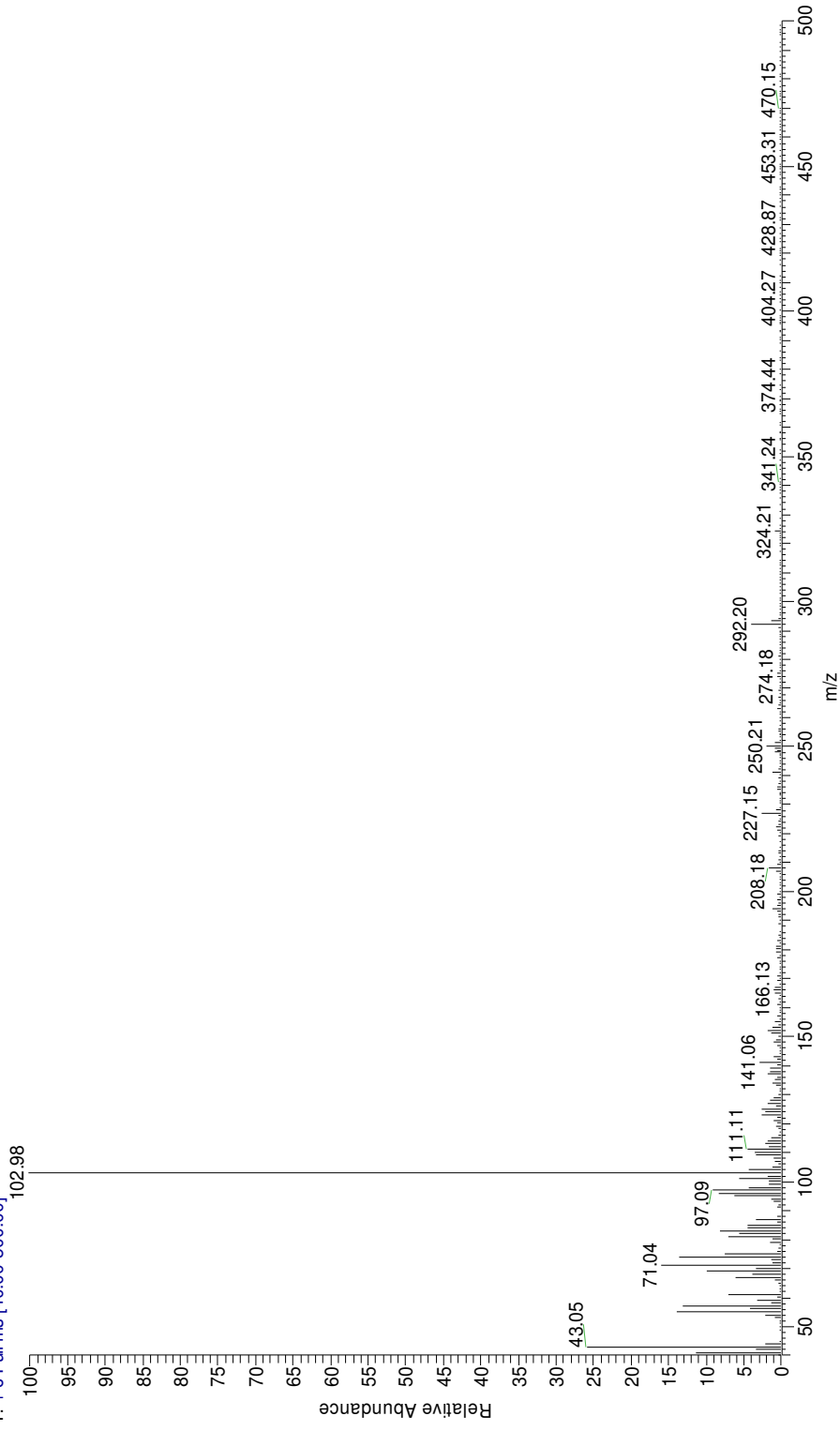
R: FR2 F #509-513 RT: 11.78-11.84 AV: 5 SB: 7 11.67-11.70, 11.93-11.98 NL: 6.24E5
T: + c Full ms [40.00-500.00]



TR 11.81- MIST-3 -a'

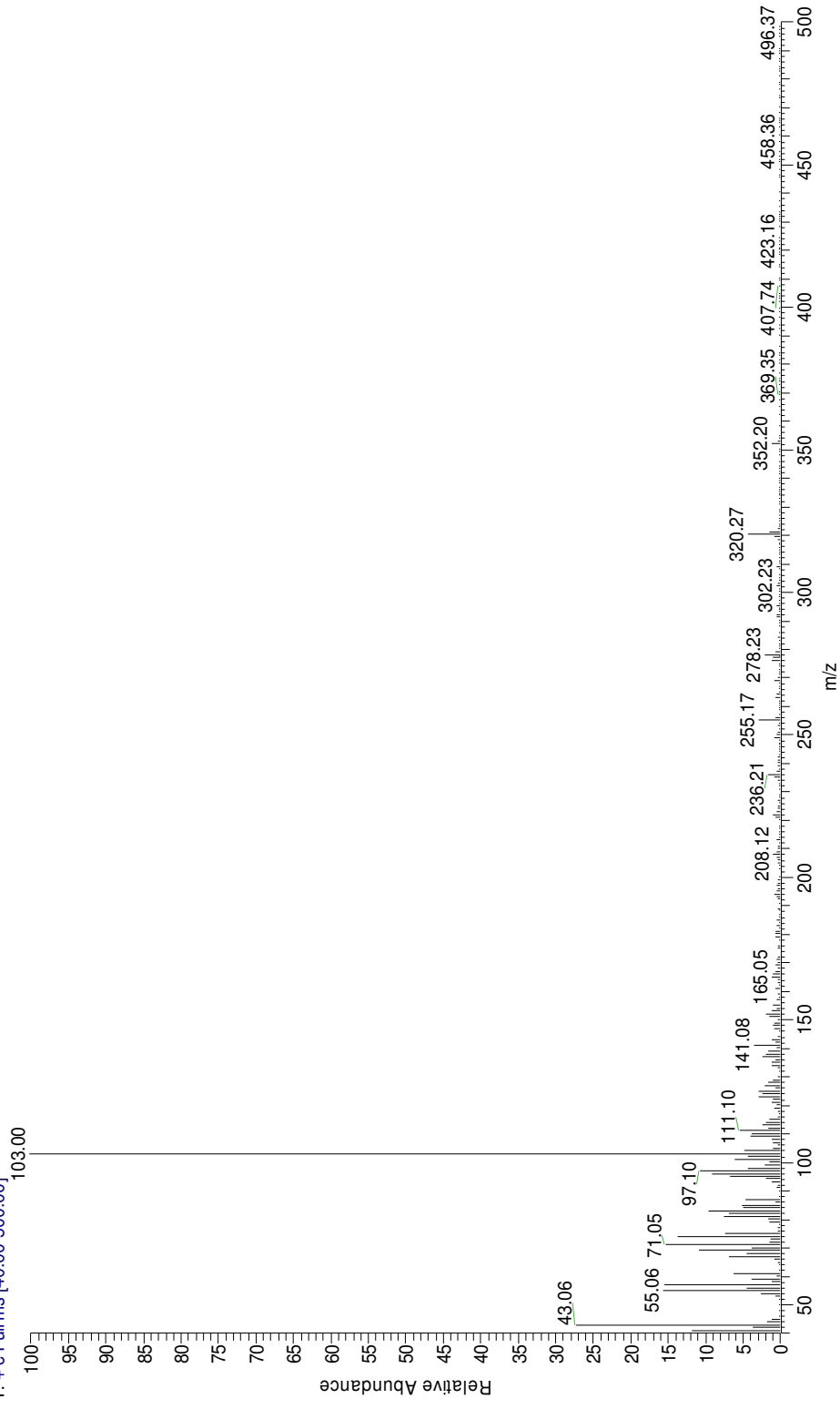
R_FR2_F #686-692 RT: 14.56-14.65 AV: 7 SB: 32 14.08-14.32, 14.87-15.11 NL: 3.75E6

T: + c Full ms [40.00-500.00]



TR 14.60- MIST-3-b'

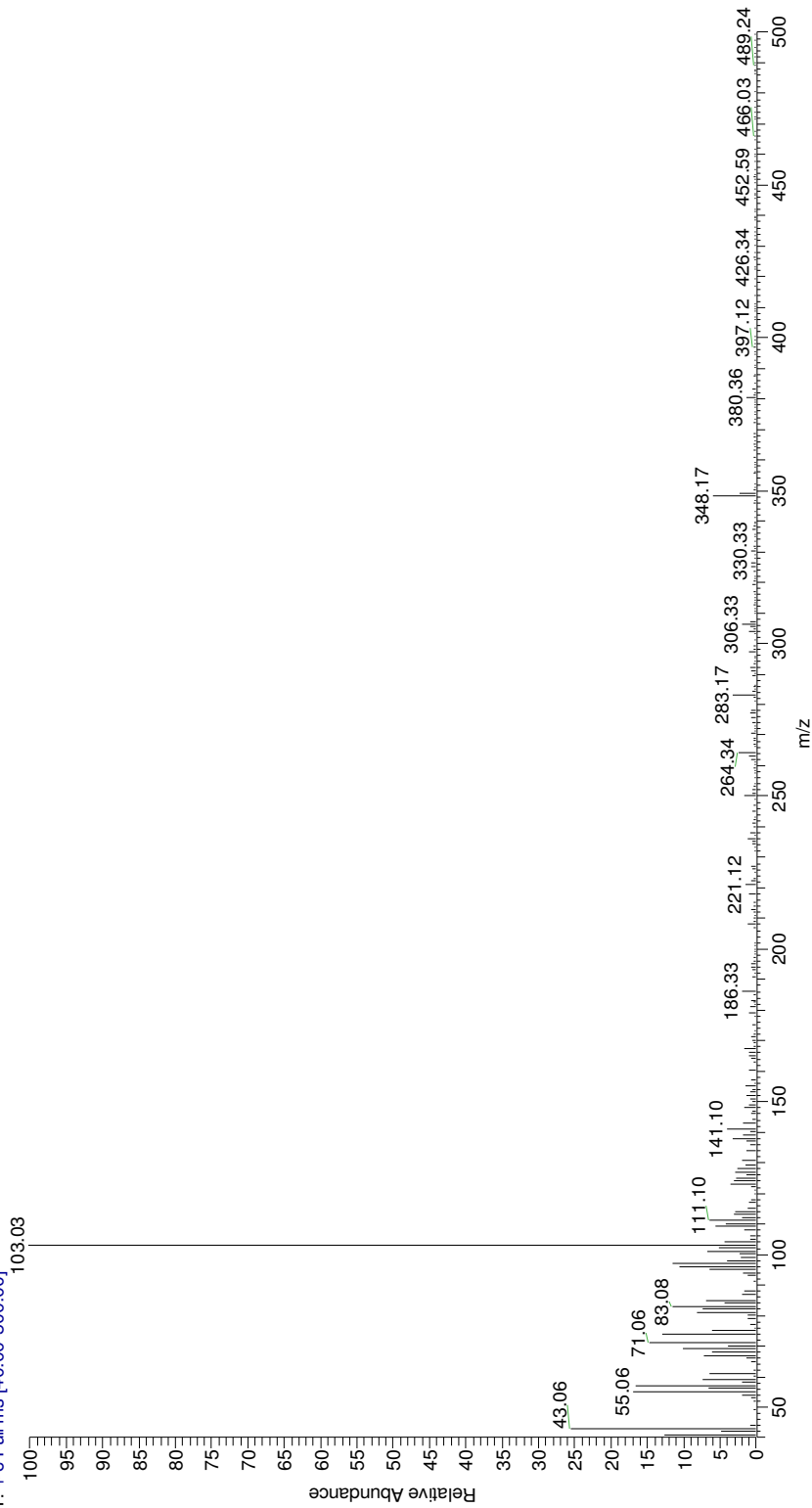
R_FR2_F #939-951 RT: 18.53-18.72 AV: 13 SB: 26 18.12-18.31 , 18.97-19.16 NL: 9.79E5
T: + c Full ms [40.00-500.00]



TR 18.62- MIST-3- ϵ

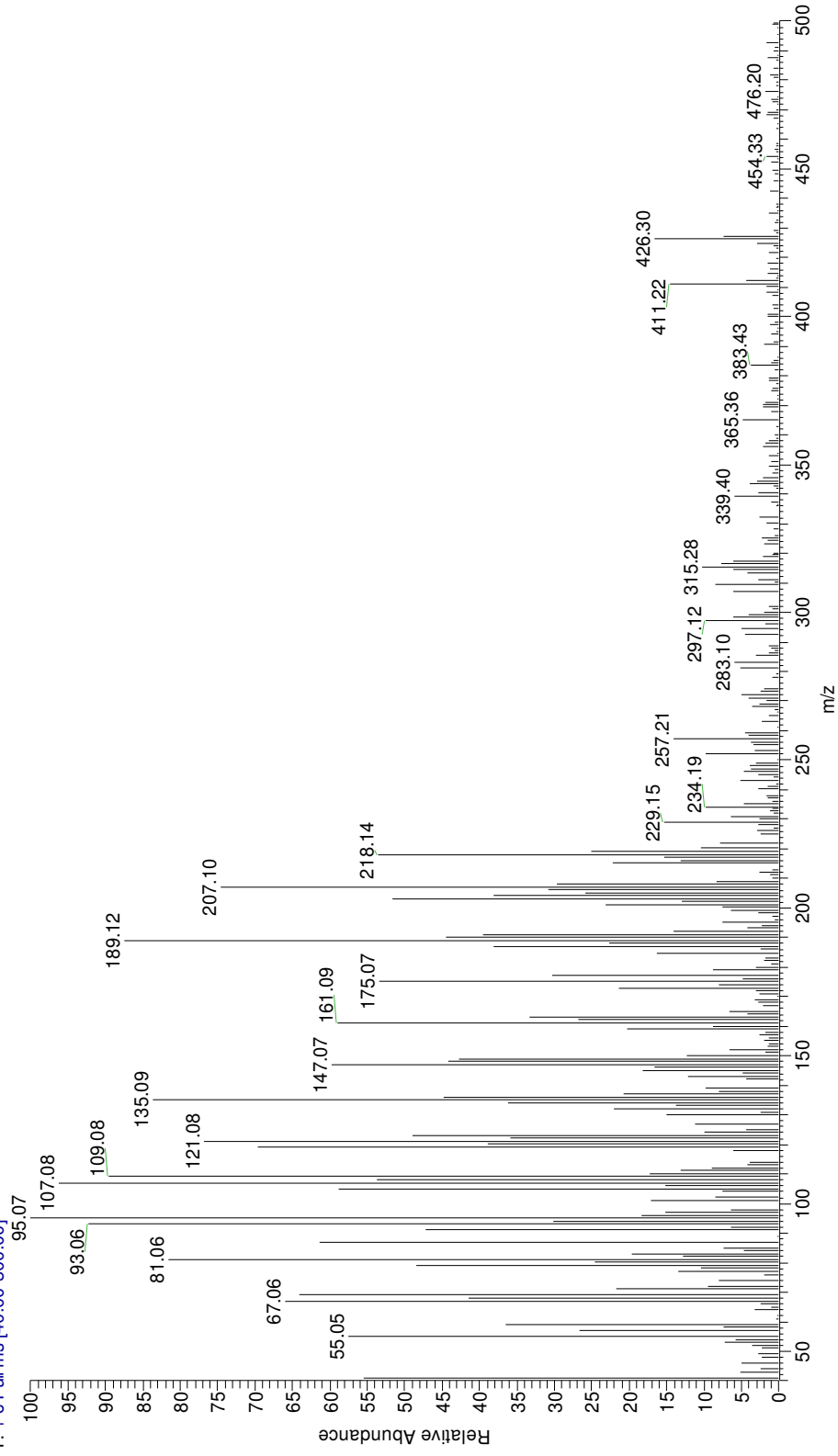
R_FR2_F#1328-1336 RT: 24.64-24.76 AV: 9 SB: 20 24.32-24.48 , 24.98-25.11 NL: 2.24E5

T: + c Full ms [40.00-500.00]



TR 24.71- MIST-3-d'

R_FR2_F #2173-2196 RT: 37.90-38.26 AV: 24 SB: 92 36.65-37.27, 39.21-39.99 NL: 1.46E4
T: + c Full ms [40.00-500.00]



TR 38.17- acetato de lupeol