

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

ESTUDO FITOQUÍMICO E CITOTÓXICO DE
OLEORRESINAS DE BURSERACEAE

ANDRÉ LUIS RÜDIGER

MANAUS

2012

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

ANDRÉ LUIS RÜDIGER

ESTUDO FITOQUÍMICO E CITOTÓXICO DE
OLEORRESINAS DE BURSERACEAE

Tese Apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Química da
Universidade Federal do Amazonas,
como requisito parcial para obtenção do
título de Doutor em Química, área de
concentração em Química Orgânica.

Orientador: Prof. Dr. Valdir Florêncio da Veiga Junior

MANAUS

2012

Ficha Catalográfica
(Catalogação realizada pela Biblioteca Central da UFAM)

R916e	Rüdiger, André Luis Estudo fitoquímico e citotóxico de oleorresinas de Burseraceae / André Luis Rüdiger. - Manaus: UFAM, 2012. 244 f.; il. color. Tese (Doutorado em Química) — Universidade Federal do Amazonas. Orientador: Prof. Dr. Valdir Florêncio da Veiga Junior 1. Burserácea – Estudo fitoquímico 2. Burserácea - Atividade citotóxica 3. Análise cromatográfica 4. Essências e óleos essenciais 5. Química orgânica I. Veiga Junior, Valdir Florêncio da (Orient.) II. Universidade Federal do Amazonas III. Título CDU (1997): 581.19:582.752.2(043.2)
-------	---

ANDRÉ LUIS RÜDIGER

“ESTUDO FITOQUÍMICO E CITOTÓXICO DE
OLEORRESINAS DE BURSERACEAE”

Tese Apresentada ao Programa de Pós-Graduação
em Química da Universidade Federal do
Amazonas, como requisito parcial para obtenção
do título de Doutor em Química, área de
concentração em Química Orgânica.

Aprovado em 1º de Novembro de 2012

Prof. Dr. Valdir Florêncio da Veiga Junior - Orientador
Universidade Federal do Amazonas – UFAM

Prof. Dr. Ângelo da Cunha Pinto - Membro
Universidade Federal do Rio de Janeiro – UFRJ

Profa. Dra. Maria Lúcia Belém Pinheiro - Membro
Universidade Federal do Amazonas – UFAM

Profa. Dra. Marne Carvalho de Vasconcelos - Membro
Universidade Federal do Amazonas – UFAM

Prof. Dr. Anderson Cavalcante Guimarães - Membro
Universidade Federal do Amazonas - UFAM

Aos meus pais, Dario e Berenice, ao meu irmão Cezar, e a minha companheira Erika, pelo amor e carinho a mim, sendo sempre compreensivos e me apoiando nesta fase de minha vida.

Ao Prof. Dr. Valdir Florêncio da Veiga Junior pela amizade, paciência e orientação, essenciais para o desenvolvimento deste trabalho, e aos professores do Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal do Amazonas pelo conhecimento repassado no período de doutoramento;

Ao Dr^a. Debora de Almeida Azevedo, do Instituto de Química da UFRJ, pela colaboração na realização dos experimentos de CG-EM, a Prof^a. Dr^a. Claudia do Ó Pessoa, do Laboratório de Oncologia Experimental da Universidade Federal do Ceará, pelos ensaios de citotoxicidade apresentados nesta Tese e ao Prof. Dr. Afonso Duarte Leão de Souza, pelas análises realizadas na Central Analítica da UFAM;

Aos todos os amigos do PPGQ - UFAM e do grupo de pesquisa Q-BiomA pelos momentos de descontração e discussões, e em especial aos amigos Alexandre, Janeide, Greta, Iuri, Dayana, Igor e Lidiam, pelo companheirismo nestes anos juntos de trabalho;

Aos professores da banca de qualificação, Prof^a. Dr^a. Maria Lúcia Belém Pinheiro, Prof^a. Dr^a. Maria da Paz Lima e Prof. Dr. Anderson Guimarães, e aos professores da banca de defesa de doutorado Prof^a. Dr^a. Maria Lúcia Belém Pinheiro, Prof. Dr. Anderson C. Guimarães, Prof^a. Dr^a. Marne de C. Vasconcelos e Prof. Dr. Ângelo C. Pinto pelas contribuições dadas, imprescindíveis para a conclusão desta Tese;

Aos meus amigos e familiares de Joinville, pelo apoio e amizade, sempre e acreditando em minhas conquistas, mesmo estando distantes;

A CAPES, CNPq e FAPEAM pelo apoio financeiro, necessário para a conclusão deste trabalho.

AGRADEÇO

.

Cada planta tem centenas de substâncias, e uma delas pode ser mais importante que uma galáxia.

Otto Richard Gottlieb

RESUMO

A família Burseraceae compreende aproximadamente 700 espécies distribuídas em 19 gêneros, sendo que várias destas espécies não apresentam estudos fitoquímicos. Com interesse em descrever a composição química, avaliar a atividade citotóxica e isolar substâncias de interesse químico e citotóxico, o trabalho foi dividido em três partes: determinação do perfil químico dos extratos em hexano; avaliação da citotoxicidade de extratos das oleorresinas contra as linhagens HCT-8 (côlon), MDA/MB-435 (melanoma) e SF-295 (glioblastoma); e isolamento de substâncias presentes nas oleorresinas. As substâncias isoladas foram identificadas pelas técnicas de espectrometria de massas (CG-EM e EMCI-ESI) e ressonância magnética nuclear (RMN). No perfil dos compostos voláteis observou-se que dentre os monoterpenos, o *p*-cimeno foi detectado mais vezes, em 11 das 23 espécies avaliadas. A maior concentração deste composto foi observada em *Protium apiculatum* (2,4%), contudo o componente majoritário nesta espécie é o α -pineno (5,1%). Dentre os sesquiterpenos o componente que apresentou maior concentração foi o junenol, em *P. cf. rubrum* (23,9%) e *P. cf. ferrugineum* (11,3%) sendo isolado e elucidado. As amostras com perfil sesquiterpênico mais complexo foram *P. tenuifolium* e *Tetragastris panamensis*, com detecção em comum de sesquiterpenos das séries bisabolano, cadinano, cubebano, eudesmano, guaiano e muurulano. As avaliações dos cromatogramas de íons totais demonstraram a presença dos α - e β -amirina em todas as amostras, confirmando a presença destes triterpenos como marcadores desta família. Em *P. cf. ferrugineum*, observou-se a ausência de α - e β -amirona, o que diferenciou esta espécie das demais amostras. Dentre os triterpenos, foram detectados o glutinol (primeira descrição nos gêneros estudados) e o multiflorenol (primeira descrição na família). A análise quimiométrica resultou em cinco agrupamentos distintos (C-1 a C-5), onde o C-1 apresentou alta concentração de α - e β -amirona e ausência de breina e maniladiol; o C-2, com espécies potencialmente produtoras de novos triterpenos e de compostos voláteis; o C-3 com concentrações médias entre as variáveis analisadas; o C-4 com concentração elevada de breina e maniladiol; e o C-5, das espécies com alta concentração de α - e β -amirina. Os ensaios de citotoxicidade demonstraram que dois extratos em hexano (*P. cf. rubrum* e *Trattinnickia peruviana* - HrTPE) apresentaram inibição contra as linhagens de células tumorais HCT-8 (93,08 % para ambas as espécies) e SF-295 (93,46 e 86,34%, respectivamente). Nos extratos em acetato de etila foram observadas inibições por *P. giganteum* var *giganteum* e *Trattinnickia glaziovii* contra as linhagens HCT-8 (88,7 e 92,9%, respectivamente) e MDA/MB-435 (97,8 e 96,2%, respectivamente). HrTPE foi submetido a fracionamento, sendo isolado o β -amiradienol. Do extrato em acetato de etila de *P. paniculatum* var. *modestum* foram isolados os triterpenos breina e maniladiol em mistura binária, o ácido 3-hidroxitirucalla-8,24-dieno-21-óico puro e em mistura binária com 3-hidroxitirucalla-7,24-dieno-21-óico. No extrato em acetato de etila de *P. bahianum* foram isolados os ácidos ursólico e oleanólico. Do extrato em acetato de etila de *Tetragastris panamensis* foram isolados um triterpeno inédito (ácido 3-oxo- triptocálico B) e dois triterpenos descritos pela primeira vez na família Burseraceae (ácidos triptocálico B e 3-oxo-katononico). Uma proposta de biossíntese do ácido 2,3-*seco*-isobriônico a partir do multiflorenol foi apresentada. A quimiosistemática da família foi discutida.

Palavras Chave: *Protium*, *Tetragastris*, triterpenos, compostos voláteis, RMN, cromatografia, atividade citotóxica

ABSTRACT

PHYTOCHEMICAL AND CITOTOXIC STUDY OF BURSERACEAE OLEORESINS. The Burseraceae family includes approximately 700 specimens distributed in 19 genres, and many of these specimens do not present phytochemical studies. Interested on describing the chemical composition, evaluate the cytotoxic activity and isolate substances of chemical and cytotoxic interest, this work has been divided in three parts: Determination of the extraction in hexane chemical profiles; cytotoxicity evaluation of oleoresins against HCT-8 (collon), MDA/MB-435 (breast) and SF-295 (glioblastom); and isolation of substances present in the oleoresins. The isolated substances were identified by mass spectrometry techniques (GC-MS and ESI-IT-MS) and nuclear magnetic resonance (NMR). In the volatile compounds profile it was possible to observe that among the monoterpenes, the *p*-cymene was detected more times, in 11 out 23 specimens evaluated. The highest concentration of this compound was observed in *Protium apiculatum* (2.4%), however the compound mostly found in this specimen is α -pinene (5.1%). Among the sesquiterpenes, the compound that presented highest concentration was the junenol, in *P. cf. rubrum* (23.9%) and *P. cf. ferrugineum* (11.3%) being isolated and elucidated. The samples with the most complex sesquiterpenic profile were *P. tenuifolium* and *Tetragastris panamensis*, with common detection of sesquiterpenes of bisabolane, cadinane, cubebane, eudesmane, guaiane and muurulane series. The total ion chromatograms evaluations showed the presence of α - and β -amyrin in all the samples, confirming the presence of these triterpenes as family markers. In *P. cf. ferrugineum*, it has been observed the absence of α - and β -amyrone, and it was the differential of this specimen among other samples. About the triterpenes, glutinol (first description in the genres studied) and the multiflorenol (first description in the family) were detected. The chemometric analysis resulted in five distinct cluster (C-1 to C-5), where C-1 presented high concentration of α - and β -amyrone and absence of brein and maniladiol; C-2, having potentially producers of new triterpene and volatile compound specimens; C-3 with medium concentration among the variables analyzed; C-4 with high concentration of brein and maniladiol; and C-5, having α - and β -amyrin high concentration specimens. Te citotoxicity assays showed that two extracts in hexane (*P. cf. rubrum* e *Trattinnickia peruviana* - HrTPE) showed inhibition against HCT-8 (93.08 % for both specimens) and SF-295 (93.46 e 86.34%, respectively) tumor cells lines. In the extracts in acetate and acetyl, inhibition for *P. giganteum* var *giganteum* and *Trattinnickia glaziovii* against HCT-8 (88.7 e 92.9%, respectively) and MDAM B-435 (97.8 e 96.2%, respectively) lines were observed. HrTPE was submitted to fractioning, being identified the β -amyradienol. From the extract in ethyl acetate of *P. paniculatum* var. *modestum*, breine and maniladiol triterpenes in binary mixture, 3-hydroxy-tirucalla-8,24-diene-21-oic acid, pure and in binary mixture with 3-hydroxy-tirucalla-7,24-dieno-21-oic acid were isolated. In the *P. bahianum* ethyl acetate extract, the ursolic and oleanolic acids were isolated. From the *Tetragastris panamensis* ethyl acetate extract, an unpublished triterpene (3-oxo-triptocallic B acid) and two triterpenes decribed for the first time in the Burseraceae family (triptocallic B and 3-oxo-katononic acids) were isolated. A 2,3-*seco*-isobriononico acid biosynthesis from multiflorenol proposal was presented. The family chemosystematics has been discussed.

Keywords: *Protium*, *Tetragastris*, triterpen, volatile compounds, NMR, chromatography, citotoxic activity

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Estruturas dos esqueletos oleanano, ursano e taraxastano.....	28
Figura 2: Estruturas dos esqueletos triterpênicos taraxarano, friedelano, glutinano e multiflorano	29
Figura 3: Principais triterpenos ursano e oleanano hidroxilados e carbonilados isolados de espécies de Burseraceae.....	30
Figura 4: Principais ácidos triterpênicos das séries ursano e oleanano isolados de espécies de Burseraceae.....	31
Figura 5: Triterpenos ursano e oleanano com anel A aberto.....	32
Figura 6: Triterpenos acetildos de Burseraceae.	33
Figura 7: Triterpenos de esqueleto friedelano, glutinano, multiflorano, taraxarano e taraxastano.	34
Figura 8: Estruturas dos esqueletos triterpênicos lupano, hopano e canarano	35
Figura 9: Ácido canárico, primeiro triterpenos lupano identificado em Burseraceae.....	36
Figura 10: Triterpenos de esqueleto lupano de Burseraceae.....	37
Figura 11: Triterpenos hopano e canarano de Burseraceae.....	38
Figura 12: Estruturas dos triterpenos das séries damarano e eufóides	39
Figura 13: Estruturas dos esqueletos lanostano e cicloartano.	41
Figura 14: Triterpenos ácidos de esqueleto tirucalano de Burseraceae	42
Figura 15: Triterpenos tirucalano e damarano hidroxilados de Burseraceae	43
Figura 16: Triterpenos ciclooxygenados de esqueleto damarano, eufano e tirucalano de Burseraceae.....	45
Figura 17: Triterpenos mansubinano de Burseraceae	46
Figura 18: Triterpenos lanostano e cicloartano de Burseraceae.....	48
Figura 19: Esqueletos monoterpênicos comuns em Burseraceae.....	49
Figura 20: Esqueletos sesquiterpênicos comuns em Burseraceae.....	51
Figura 21: Derivados semissintéticos de triterpenos obtidos de Burseraceae com atividade citotóxica.....	59

Figura 22: Diagrama de extração das oleorresinas das Burseraceae.....	63
Figura 23: Esquema do processo de cromatografia de com sílica impregnada com KOH.....	68
Figura 24: Monoterpenos detectados e suas respectivas séries de esqueletos monoterpênicos.....	83
Figura 25: Sesquiterpenos detectados e suas respectivas séries de esqueletos sesquiterpênicos.....	86
Figura 26: Cromatograma de íons totais do extrato em hexano de PFE.....	87
Figura 27: Cromatograma de íons totais do extrato em hexano de POO.....	88
Figura 28: Ampliação do cromatograma de íons totais de <i>Protium tenuifolium</i> e <i>Tetragastris panamensis</i>	91
Figura 29: Principais fragmentos de derivados de Δ^{12} -Ursano e Δ^{12} -Oleanano.....	93
Figura 30: Principais fragmentos de derivados de $\Delta^{20(29)}$ -lupeno	95
Figura 31: Formação do fragmento m/z 274 e 259 em triterpenos Δ^5 -glutineno	96
Figura 32: Formação dos fragmento m/z 204, m/z 205 e m/z 243 em triterpenos Δ^7 -multifloreno	97
Figura 33: Distribuição de vinte e três espécies por análise dos componentes principais utilizando como variáveis α - e β -amirina, α - e β -amirona, breina e maniladiol	103
Figura 34: Dendograma sobre o Mapa de Fatores representando a dissimilaridade entre as vinte e três espécies.	104
Figura 35: Fluxograma de filtração da amostra biologicamente ativa HrTPE.....	113
Figura 36: Perfil cromatográfico em CCD de HrTPE e suas frações.....	114
Figura 37: Atividade citotóxica das frações de HrTPE.....	115
Figura 38: Fluxograma de obtenção de HrTPE η 'D	116
Figura 39: Comparação do perfil cromatográfico em CCD de HrTPE η D e HrTPE η 'D	117
Figura 40: Fluxograma do fracionamento da amostra HrTPE η 'D.....	118
Figura 41: Perfil por CCD das frações de HrTPE η 'D.....	119
Figura 42: Fluxograma de fracionamento de HrTPE η 'D4.....	120
Figura 43: Cromatograma de íons totais e espectro de massas da fração TPE-1.....	121
Figura 44: Espectro de RMN de ^1H da fração TPE-1 e ampliações dos multipletos.....	123
Figura 45: Espectro de RMN de ^{13}C da fração TPE-1	124
Figura 46: Espectro de correlação heteronuclear (^1H - ^{13}C)-HSQC da fração TPE-1	125
Figura 47: Estrutura do 3 α -hidroxioleana-9(11),12-dieno isolado de <i>Trattinnickia peruviana</i> com sinas de RMN de ^{13}C e correlações do experimento (^1H - ^{13}C)-HMBC	126

Figura 48: Espectro de correlação heteronuclear (^1H - ^{13}C)-HMBC da fração TPE-1	128
Figura 49: Fluxograma do fracionamento de ArPBA	130
Figura 50: Perfil cromatográfico em CCD do fracionamento de ArPBA	130
Figura 51: Fluxograma de obtenção de PBA-1	132
Figura 52: Perfil cromatográfico em CCD do fracionamento de ArPBApH8	132
Figura 53: Varredura completa por EMCI-ESI (m/z 150 a 700) da fração PBA-1 no modo negativo por injeção direta.	133
Figura 54: Espectro de RMN de ^1H de PBA-1 e ampliações dos multipletos	134
Figura 55: Espectros de RMN de ^{13}C , DEPT 90° e DEPT 135° da fração PBA-1	136
Figura 56: Estrutura com sinas de RMN de ^{13}C dos ácidos ursólico e oleanólico isolados de <i>Protium bahianum</i>	138
Figura 57: Correlações de (^1H - ^1H)-COSY e (^1H - ^{13}C)-HMBC para o ácido ursólico	138
Figura 58: Espectro de correlação heteronuclear (^1H - ^{13}C)-HSQC da fração PBA-1	140
Figura 60: Espectro de correlação homonuclear (^1H - ^1H)-COSY da fração PBA-1	141
Figura 59: Espectro de correlação heteronuclear (^1H - ^{13}C)-HMBC da fração PBA-1	143
Figura 61: Fluxograma do fracionamento de HrPFE	145
Figura 62: Perfil do fracionamento de HrPFE avaliado por CCD e eluição de HrPFE-B ...	145
Figura 63: Fluxograma de obtenção de PFE-1	146
Figura 64: Perfil do fracionamento de HrPFE-B avaliado por CCD	147
Figura 65: Cromatograma de íons totais e espectro de massas da fração PFE-1	147
Figura 66: Espectro de RMN de ^1H da fração PFE-1 e ampliações dos multipletos	149
Figura 67: Espectro de correlação homonuclear (^1H - ^1H)-COSY da fração PFE-1	150
Figura 68: Espectro de RMN de ^{13}C da fração PFE-1	151
Figura 69: Espectros de correlação heteronuclear (^1H - ^{13}C)-HSQC da fração PFE-1	152
Figura 70: Estrutura do junenol isolado de <i>Protium cf. ferrugineum</i> com sinas de RMN de ^{13}C , projeção de Newman e correlações do experimento (^1H - ^{13}C)-HMBC e (^1H - ^1H)-COSY	153
Figura 71: Espectro de correlação heteronuclear (^1H - ^{13}C)-HMBC da fração PFE-1	154
Figura 72: Fluxograma do fracionamento de ArPPM com obtenção de PPM-1 e PPM-2. ..	155
Figura 73: Perfil do fracionamento de ArPPM avaliado por CCD	156
Figura 74: Fluxograma de isolamento de PPM-3	157
Figura 75: Perfil do fracionamento de PPM-3 por CCD	158

Figura 76: Cromatograma de íons totais e espectro de massas da fração PPM-1	159
Figura 77: Espectro de RMN de ^1H da fração PPM-1	160
Figura 78: Estrutura com sinas de RMN de ^{13}C da breina e do maniladiol isolados de <i>Protium paniculatum</i> var. <i>modestum</i>	162
Figura 79: Espectro de RMN de ^{13}C , DEPT 90° e DEPT 135° da fração PPM-1	163
Figura 80: Espectro de RMN de ^1H da fração PPM-3	166
Figura 81: Espectro de RMN de ^{13}C , DEPT 90° e DEPT 135° da fração PPM-3	167
Figura 82: Estrutura do ácido α -elemólico isolado de <i>Protium paniculatum</i> var. <i>modestum</i> com correlações do experimento (^1H - ^{13}C)-HMBC	169
Figura 83: Espectros de correlação heteronuclear (^1H - ^{13}C)-HSQC da fração PPM-3	169
Figura 84: Espectro de correlação heteronuclear (^1H - ^{13}C)-HMBC da fração PPM-3	170
Figura 85: Estruturas com sinas de RMN de ^{13}C dos ácidos 3 α -hidroxitirucala-8,24-dieno-21-óico e 3 α -hidroxitirucala-7,24-dieno-21-óico obtidos de <i>Protium paniculatum</i> var. <i>modestum</i>	173
Figura 86: Espectro de RMN de ^1H da fração PPM-2	174
Figura 87: Espectros de RMN de ^{13}C , DEPT 90° e DEPT 135° da fração PPM-2	175
Figura 88: Fluxograma de filtração da amostra em acetato de etila ArTPA	178
Figura 89: Perfil cromatográfico em CCD do fracionamento de ArTPA revelados em SC- IV e VS	178
Figura 90: Fluxograma de filtração da amostra em acetato de etila ArTPApH8	179
Figura 91: Perfil por CCD das frações de ArTPApH8	180
Figura 92: Fluxograma de filtração da amostra em acetato de etila ArTPApH8E1(F1)	181
Figura 93: Perfil por CCD das frações de ArTPA α 8 obtidos por CCF	182
Figura 94: Varredura completa por EMCI-ESI (m/z 100 a 1000) da fração TPA-1 no modo negativo por injeção direta	182
Figura 95: Espectro de RMN de ^1H da fração TPA-1	184
Figura 96: Espectro de RMN de ^{13}C , DEPT 90° e DEPT 135° da fração TPA-1	185
Figura 97: Estrutura do ácido triptocálico B isolado de <i>Tetragastris panamensis</i> com sinas de RMN de ^{13}C e correlações do experimento (^1H - ^1H)-COSY e (^1H - ^{13}C)-HMBC	187
Figura 98: Espectro de correlação heteronuclear (^1H - ^{13}C)-HSQC da fração TPA-1	188
Figura 99: Espectro de correlação heteronuclear (^1H - ^{13}C)-HMBC da fração TPA-1	190
Figura 100: Espectro de correlação homonuclear (^1H - ^1H)-COSY da fração TPA-1	191

Figura 101: Varredura completa por EMCI-ESI (m/z 125 a 700) da fração TPA-2 no modo negativo por injeção direta.	192
Figura 102: Espectro de RMN de ^1H da fração TPA-2.....	193
Figura 103: Espectro de RMN de ^{13}C , DEPT 90° e DEPT 135° da fração TPA-2	194
Figura 104: Estrutura do ácido 3-oxo-triptocálico B isolado de <i>Tetragastris panamensis</i> com sinas de RMN de ^{13}C e correlações do experimento (^1H - ^1H)-COSY e (^1H - ^{13}C)-HMBC	196
Figura 105: Comparação dos sinais de RMN de ^{13}C no anel A dos ácidos triptocálico B e 3-oxo-triptocálico B.....	197
Figura 106: Espectro de correlação heteronuclear (^1H - ^{13}C)-HSQC da fração TPA-2.....	197
Figura 107: Espectro de correlação heteronuclear (^1H - ^{13}C)-HMBC da fração TPA-2.....	199
Figura 108: Espectro de correlação homonuclear (^1H - ^1H)-COSY da fração TPA-2.....	200
Figura 109: Escaneamento Completo EMCI-ESI (m/z 100 a 1000) da fração TPA-3 no modo negativo por injeção direta.	201
Figura 110: Espectro de RMN de ^1H da fração TPA-3.....	202
Figura 111: Espectro de RMN de ^{13}C , DEPT 90° e DEPT 135° da fração TPA-3.....	204
Figura 112: Estrutura do ácido 3-oxo-oleana-12-eno-29-óico isolado de <i>Tetragastris panamensis</i> com sinas de RMN de ^{13}C e correlações do experimento (^1H - ^1H)-COSY e (^1H - ^{13}C)-HMBC	205
Figura 113: Espectro de correlação heteronuclear (^1H - ^{13}C)-HSQC da fração TPA-3.....	206
Figura 114: Espectro de correlação heteronuclear (^1H - ^{13}C)-HMBC da fração TPA-3.....	208
Figura 115: Espectro de correlação homonuclear (^1H - ^1H)-COSY da fração TPA-3.....	209
Figura 116: Proposta da rota biossintética para transformação do multiflorenol em ácido 2,3- <i>seco</i> -isobriononico	211
Figura 117: Sítios de oxidações em triterpenos urs-12-eno e oleana-12-eno em espécies de Burseraceae.....	212

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Classificação sistemática da família Burseraceae segundo APG	24
Tabela 2: Distribuição dos gêneros de Burseraceae nas tribos Beiseliae, Bursereae, Canarieae e Protieae	25
Tabela 3: Espécies de Burseraceae coletadas e número de exsicata.	61
Tabela 4: Rendimento dos extratos das amostras de Burseraceae	64
Tabela 5: Especificações para Cromatografia em Coluna “Flash”	67
Tabela 6: Variação de compostos voláteis e triterpenos nos extratos em hexano das oleorresinas de Burseraceae.....	78
Tabela 7: Composição volátil dos extratos em hexano das oleorresinas de Burseraceae Amazônicas	80
Tabela 8: Composição triterpênica dos extratos em hexano das oleorresinas de Burseraceae Amazônicas.....	99
Tabela 9: Atividade citotóxica por extratos em hexano de Burseraceae na concentração de 50 µg/mL	109
Tabela 10: Atividade citotóxica por extratos em acetato de etila de Burseraceae na concentração de 50 µg/mL	110
Tabela 11: Sinais observados nos experimentos de RMN 1D e 2D para os cristais da fração TPE-1.....	127
Tabela 12: Sinais observados no espectro de RMN de ¹³ C e DEPT para os ácidos ursólico e oleanólico e comparação com a literatura.....	137
Tabela 13: Correlações bidimensionais para o ácido ursólico	142
Tabela 14: Sinais observados nos experimentos de RMN 1D e 2D para os cristais da fração PFE-1	153
Tabela 15: Sinais observados no espectro de RMN de ¹³ C e DEPT para os cristais de breina e maniladiol e comparação com a literatura	164
Tabela 16: Sinais observados nos experimentos de RMN 1D e 2D para os cristais da fração PPM-3.....	171
Tabela 17: Sinais observados no espectro de RMN de ¹³ C e DEPT para os ácidos 3α-hidroxitirucala-8,24-dieno-21-óico e 3α-hidroxitirucala-7,24-dieno-21-óico presentes na fração PPM-2	176

Tabela 18: Sinais observados nos experimentos de RMN 1D e 2D para os cristais da fração TPA-1	189
Tabela 19: Sinais observados nos experimentos de RMN 1D e 2D para os cristais da fração TPA-2	198
Tabela 20: Sinais observados nos experimentos de RMN 1D e 2D para os cristais da fração TPA-1	207
Tabela 21: Espectros de Massas por Impacto Eletrônico (70 eV) e os principais íons obtidos dos triterpenos identificados nos eextratos em hexano.....	239

LISTA DE SÍMBOLOS SIGLAS, E ABREVIações

AcOEt	Acetato de Etila
APG	Grupo de Filogenia de Angiospermas (do inglês <i>Angiosperm Phylogeny Group</i>)
Aprox.	Aproximadamente
CC	Cromatografia em Coluna Aberta
CCD	Cromatografia em Camada Delgada
CCF	Cromatografia em Coluna “Flash”
CCTI	Cromatografia em Coluna Aberta de Troca Iônica
CG-DIC	Cromatografia a Gás com Detector de Ionização de Chama
CG-EM	Cromatografia a Gás com Detector de Espectrometria de Massas
COSY	Espectroscopia de correlação homonuclear (do inglês “ <i>Correlated Spectroscopy</i> ”)
δ	Deslocamento químico
DCM	Diclorometano
DEPT	Espectroscopia de RMN ^{13}C por Intensificação da Distorção por Transferência de Polarização (do inglês “ <i>distortionless enhancement by polarization transfer</i> ”)
EM	Espectrometria de Massas
EMCI	Espectrometria de Massas por Captura de Íons
IES	Ionização por Eletrospray
Hex	Hexano
HMBC	Espectroscopia de coerência heteronuclear através de muitas ligações (do inglês “ <i>Heteronuclear correlations over longer ranges</i> ”)
HSQC	Espectroscopia de correlação heteronuclear múltiplo-quântica (do inglês “ <i>Heteronuclear single quantum coherence spectroscopy</i> ”)

Hz	Hertz
INPA	Instituto Nacional de Pesquisa da Amazônia
IR	Índice de Retenção
<i>J</i>	Constante de acoplamento
ppm	Parte por milhão
Q-BiomA	Grupo de Pesquisa em Química de Biomoléculas do Amazonas
<i>R_f</i>	Fator de Retenção
RMN ¹ H	Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio
RMN ¹³ C	Ressonância Magnética Nuclear de Carbono 13
<i>R_t</i>	Tempo de Retenção
SC IV	Agente Derivatizante Sulfato Cérico IV
“Spot”	ponto de aplicação de amostra para análise por CCD
sp.	Espécie biológica
ssp.	Subespécies entre espécies biológicas
TIC	Cromatograma de Íons Totais (do inglês “ <i>Total Ion Chromatogram</i> ”)
UFRJ	Universidade Federal do Rio de Janeiro
UFRPE	Universidade Federal Rural de Pernambuco
var.	Variedade entre espécies biológicas
VS	Agente Derivatizante Vanilina Sulfúrica
[M] ⁺	Íon molecular no modo positivo
[M-1] ⁻	Íon <i>Quasi</i> molecular no modo negativo

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	19
1.1 Diversidade e Potencial de Burseraceae	20
1.2 Objetivos.....	23
2. REVISÃO DA LITERATURA	24
2.1 A Família Burseraceae.....	24
2.2 Interesse Químico em Burseraceae.....	26
2.3 Química da Família Burseraceae	27
2.3.1 Triterpenos Pentacíclicos de Anéis 6-6-6-6-6	27
2.3.1.1 Triterpenos Ursano e Oleanano	29
2.3.1.2 Triterpenos Friedelano, Glutinano, Multiflorano, Taraxarano e Taraxastano.....	33
2.3.2 Triterpenos Pentacíclicos de Anéis 6-6-6-6-5	34
2.3.2.1 Triterpenos Lupano.....	35
2.3.2.2 Triterpenos Hopano e Canarano	37
2.3.3 Triterpenos Tetracíclicos de Anéis 6-6-6-5	38
2.3.3.1 Triterpenos Damarano e Eufóides	41
2.3.3.2 Triterpenos Lanostano e Cicloartano.....	47
2.3.4 Compostos Voláteis de Burseraceae	48
2.4 Avaliação do Perfil Químico	52
2.5 Potencial Citotóxico contra Linhagens de Células Tumorais.....	54
3. METODOLOGIA.....	60
3.1 Amostras Analisadas	60
3.1.1 Obtenção dos Extratos	62
3.2 Perfil Químico dos Extratos em Hexano	65
3.3 Técnicas para separação, isolamento e purificação	65
3.3.1 Cromatografia em Camada Delgada (CCD).....	65

3.3.2 Cromatografia em Coluna Aberta em Fase Normal (CC)	66
3.3.3 Cromatografia em Coluna “Flash” (CCF)	66
3.3.4 Cromatografia em Coluna com Gel de Sílica Impregnada com KOH (CTI)	67
3.3.4.1 Preparo da Sílica	67
3.3.4.2 Método Cromatográfico Utilizando Sílica Impregnada com KOH	68
3.3.5 Recristalização	70
3.4 Análises Instrumentais	70
3.4.1 Cromatografia a Gás com detector de Ionização de Chama (CG-DIC)	70
3.4.2 Espectrometria de Massas	71
3.4.2.1 Cromatografia a Gás com detector de Espectrômetro de Massas (CG-EM)	71
3.4.2.2 Espectrometria de Massas por Captura de Íons (EMCI)	72
3.4.3 Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear	72
3.5 Análise Estatística Multivariada	73
3.6 Determinação da Atividade Antitumoral <i>in vitro</i>	73
3.6.1 Material	74
3.6.2 Avaliação da Atividade Antitumoral <i>in vitro</i>	74
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	76
4.1 Perfil Químico de Extratos em Hexano de Oleorresinas de Burseraceae Amazônicas	78
4.1.1 Composição Volátil dos Extratos em Hexano das Oleorresinas	79
4.1.2 Composição Triterpênica dos Extratos em Hexano das Oleorresinas	91
4.1.2.1 Quimiodiversidade de triterpenos das séries urs-12-eno e olean-12-eno ...	100
4.1.2.1.1 Análise quimiométrica dos principais triterpenos das séries urs-12-eno e olean-12-eno	103
4.1.2.2 Outros Esqueletos Triterpênicos Detectados	106
4.2 Potencial Citotóxico de Oleorresinas de Burseraceae	108
4.2.1 Seleção dos Extratos com Potencial Citotóxico	108
4.2.2 Fracionamento do Extrato em Hexano HrTPE: extrato citotóxico contra as linhagens HCT-8 e SF-295	112
4.3 Isolamento e Elucidação Estrutural das Substâncias de Oleorresinas de Burseraceae.	115
4.3.1 Fracionamento do Extrato em Hexano de <i>Trattinnickia peruviana</i> (HrTPE)	115
4.3.1.1 Identificação de TPE-1	121

4.3.2 Fracionamento do Extrato em Acetato de Etila de <i>Protium bahianum</i>	129
4.3.2.1 Identificação de PBA-1	133
4.3.3 Fracionamento do Extrato em Hexano de <i>Protium cf. ferrugineum</i>	144
4.3.3.1 Identificação da fração PFE-1	147
4.3.4 Fracionamento do Extrato em Acetato de Etila de <i>Protium paniculatum</i> var. <i>modestum</i>	155
4.3.4.1 Identificação de PPM-1	158
4.3.4.2 Identificação de PPM-2 e PPM-3	165
4.3.5 Fracionamento do Extrato em Acetato de Etila de <i>Tetragastris panamensis</i>	177
4.3.5.1 Identificação de TPA-1.....	182
4.3.5.2 Identificação de TPA-2.....	191
4.3.5.3 Identificação de TPA-3.....	201
4.4 Biossíntese de triterpenos derivados de esqueleto multiflorano no gênero <i>Tetragastris</i>	210
4.5 Considerações Quimiossistemáticas.....	212
5. CONCLUSÃO.....	215
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	219
ANEXO.....	239

1. INTRODUÇÃO

A utilização de recursos naturais tanto para alimentação como para o tratamento de enfermos vem sendo utilizado pelos seres humanos há tempos. O primeiro registro escrito que relata o uso medicinal dos recursos naturais é conhecido como Papiro de Ebers, contendo descrições de aproximadamente 1000 plantas para diferentes inflamações e doenças parasitárias (BORCHARDT, 2002).

Atualmente, a biodiversidade mundial gera vários produtos nos setores alimentícios, de cosméticos e fármacos (fitofármacos, substâncias isoladas de produtos naturais, drogas semissintéticas e como modelos de drogas sintéticas), mas grande parte de seu potencial ainda não é conhecido, pois se estima que muitas espécies de plantas e animais com potencial terapêutico não sejam conhecidos, sendo considerada fonte futura de vários produtos.

Para a geração de um produto não basta apenas conhecer suas aplicações, mas antes de tudo, a composição química que pode ser encontrada dentro de cada espécie, quimiodiversidade esta de extrema importância na descoberta de novas drogas. Através de dados da NEPRALERT, Verpoort (1998) apresentou dados mostrando que das 250 mil espécies de plantas conhecidas no mundo, apenas 14 mil (6%) apresentam estudos de atividade biológica e 38 mil (15%) apresentam estudos fitoquímicos.

Em 2010, uma nova estimativa sobre o estudo de espécies vegetais mostrou-se similar à apresentada em 1998, permanecendo entre 5 e 15%, o que demonstra que uma imensa quantidade de organismos vivos ainda inexplorados apresentam potencial na busca de

produtos naturais inéditos, podendo estas novas substâncias servem para o desenvolvimento de novos fármacos (BRAZ FILHO, 2010).

Com grande papel no desenvolvimento científico mundial, várias pesquisas vêm sendo desenvolvidas no Brasil na busca de desvendar a química e o potencial biológico de sua biodiversidade. Apesar dos esforços exercidos pela comunidade científica nacional para a descrição de nossa biodiversidade, muitos investimentos terão de ser feito para ampliar a representatividade mundial nas pesquisas da biodiversidade.

No final do século passado, dados mostraram que o mercado mundial de fitoterápicos estava avaliado em US\$ 12,4 bilhões, representando 5 % do mercado mundial de produtos farmacêuticos (FERREIRA *et al.*, 1998, pg. 7). Pesquisas neste setor devem alavancar a economia nacional nos setores farmacêutico e de cosmético nas próximas décadas, já que o Brasil hospeda, segundo Lewinsonhn & Prado (2002), cerca de 15 a 20% de toda biodiversidade mundial, onde estão 55 mil das 250 mil espécies de plantas conhecidas.

1.1 Diversidade e Potencial de Burseraceae

Burseraceae é uma família de árvores e arbustos que se destacam por exsudarem uma oleorresina muito aromática. As espécies desta família são conhecidas e utilizadas pelo aroma inebriante exalado pelas suas oleorresinas, sendo conhecidas popularmente por copal, maaliol, breu e gugul, e principalmente por nomes que remetem a histórias da antiguidade, como mirra e frankincenso.

Com aproximadamente 230 espécies na região do Neotrópico, a família Burseraceae se apresenta distribuída em oito gêneros. Na Reserva Florestal Adolpho Ducke, floresta de terra-firme, localizada na Amazônia Ocidental, em Manaus, 41 espécies diferentes

foram identificadas (RIBEIRO & DALY, 1998), representando aproximadamente 17% das espécies Neotropicais de Burseraceae. Em regiões de Terra-Firme esta família é uma das principais, sendo descrita entre as 10 famílias mais abundantes em florestas primárias e secundárias, dados estes coletados no Parque Nacional do Jaú, localizado a 200 Km a noroeste de Manaus (FERREIRA & PRANCE, 1998 e 1999).

São descritas utilizações terapêuticas pela medicina popular como tônicos e estimulantes, hemostáticos, antiblenorrágicos, antirreumáticos, no tratamento de doenças pulmonares, do estômago, e em odontologia, como laxante, cicatrizante, analgésico e contraceptivo, entre outras aplicações (COSTA, 1975; PIO CORREA, 1994).

Por outro lado, na medicina popular, as ações dos produtos naturais estão relacionadas com sintomas como febre, dores em regiões específicas, inflamações, cicatrização entre outros, e não diretamente a uma doença em específico, isto se dá por que um mesmo sintoma pode estar relacionado a diferentes doenças. Além disso, até pouco tempo muitas doenças ainda não eram conhecidas, e conseqüentemente não existiam termos para especificá-las.

Contudo, na busca de novos fármacos provenientes de fontes naturais, não apenas a descrição da utilização popular tem que ser levada em consideração, mas também as substâncias presentes nas espécies a serem estudadas, correlacionando-as com atividades biológicas já relatadas.

A família Burseraceae apresenta diferentes classes de substâncias, onde se destacam os terpenóides: monoterpenos e sesquiterpenos, obtidos das frações voláteis; e diterpenos, triterpenos e esteroides das frações não voláteis. A presença de compostos aromáticos como cumarinas, fenilpropanoides, flavonoides e lignanas também já foi descrita para espécies desta família, demonstrando seu potencial biológico (PERNET, 1972; VEIGA-JUNIOR & RÜDIGER, 2010).

Muitos triterpenos já foram descritos para esta família, aproximadamente cinquenta estruturas em espécies da América do Sul. O perfil químico obtido por cromatografia a gás com detector de ionização de chama para oleorresinas de 37 indivíduos brasileiros desta família apresentou uma quimiodiversidade com uma complexidade maior do que os compostos descritos em literatura, sendo detectadas 75 sinais de substâncias na região de triterpenos por cromatografia a gás (RÜDIGER, 2008).

A análise de dados multivariados deste estudo realizada para estes 37 indivíduos (31 espécies diferentes de cinco gêneros) resultaram na formação de quatro agrupamentos pelo método de Ward. As observações foram correlacionadas com as distribuições taxonômicas e filogenéticas de tribos, gêneros e secções, mostrando que apesar de vários dados terem apresentado correlações com a sistemática, apenas a avaliação da presença não mostrou sensibilidade suficiente, necessitando identificar estes compostos para a determinação das classes de triterpenos para serem avaliados e conhecer mais profundamente a diversidade química que está presente nesta família.

Apesar de vários estudos já terem resultado no isolamento de diversos terpenos em espécies de Burseraceae, os estudos com descrição do perfil químico, isolamento de substâncias e elucidação estrutural são extremamente importantes para a compreensão da quimiosistemática, e aliados a estudos farmacológicos apresentam grande papel na confirmação das propriedades etnofarmacológicas e também para compreender mecanismos de ação em ensaios biológicos, abrindo a possibilidade para o desenvolvimento de novas drogas.

1.2 Objetivos

Partindo dos resultados do estudo realizado anteriormente, em que foram detectados 75 picos na região de triterpenos por cromatografia em fase gasosa nas oleorresinas de Burseraceae Brasileiras, esta tese tem como objetivo geral descrever a quimiodiversidade das oleorresinas de vinte e três espécies de Burseraceae Amazônicas e avaliar seu potencial citotóxico.

Para concluir este trabalho, buscamos como objetivos específicos:

- ✓ Estudar a composição das oleorresinas empregando espectrometria de massa acoplada à cromatografia em fase gasosa;
- ✓ Avaliar a quimiodiversidade dos extratos estudados através de técnicas estatísticas multivariadas;
- ✓ Avaliar a citotoxicidade dos extratos contra linhagens de células tumorais;
- ✓ Isolar e identificar possíveis constituintes citotóxicos;
- ✓ Isolar e identificar os constituintes de interesse químico.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 A Família Burseraceae

As espécies da família Burseraceae são encontradas em várias regiões tropicais e subtropicais do mundo. Sua classificação (Tabela 1) foi recentemente organizada pelo Grupo de Filogenia de Angiospermas (APG, do inglês *Angiosperm Phylogenetic Group*) utilizando as informações contidas nos genes ribossomais *18S*, *rbcL* e *atpB* (APG III, 2009), confirmando a família como pertencente à ordem Sapindales, descrita anteriormente no sistema de Cronquist (RIBEIRO *et al.*, 1999). Junto à família Burseraceae, são descritas ainda na ordem Sapindales as famílias Anacardiaceae, Biebersteiniaceae, Kirkiaceae, Meliaceae, Nitrariaceae, Rutaceae, Sapindaceae e Simaroubaceae (APG III, 2009).

Tabela 1: Classificação sistemática da família Burseraceae segundo APG

Sub-reino	Tracheobionta
Super-divisão	Espermatophyta
Divisão	Magnoliophyta (Angiosperma)
Classe	Magnoliopsida (Dicotiledoneas)
Clado	Rosidae
Divisão de Clado	Malvídeas (Eurosideas II)
Ordem	Sapindales
Família	Burseraceae

O estudo de fósseis de Burseraceae encontrados na América do Norte e na Europa indica a sua origem no período Eoceno, onde a América do Norte foi o possível berço desta família. A avaliação destes fósseis indicou ainda que correntes migratórias teriam provocado

sua distribuição para o sul do continente Americano e para o velho mundo, se estendendo posteriormente para a África, Ásia e Oceania (WEEKS, DALY & SYMPSON, 2005).

Atualmente, no mundo são descritos 19 gêneros na família, onde as 700 espécies encontram-se distribuídas (THULIN *et al.*, 2008). A distribuição atual dos gêneros na família Burseraceae encontra-se na Tabela 2. No continente Americano, mais especificamente a região do Neotrópico, são descritas aproximadamente 230 espécies, distribuídas em oito gêneros: *Beiselia*, *Bursera*, *Commiphora*, *Crepidospermum*, *Dacryodes*, *Protium* e *Tetragastris* e *Trattinnickia* (RIBEIRO & DALY, 1998; WEEKS, DALY & SYMPSON, 2005; FINE *et al.*, 2005).

Tabela 2: Distribuição dos gêneros de Burseraceae nas tribos Beiselieae, Bursereae, Canarieae e Protieae

Tribo¹	Gêneros¹	Numero de sp.²
Beiselieae	<i>Beiselia</i> Forman	1sp.
Bursereae	<i>Aucoumea</i> Pierre	1 sp.
	<i>Bursera</i> Jacq.	aprox. 100 sp.
	<i>Commiphora</i> Jacq.	aprox. 190 sp.
Canarieae	<i>Ambilobea</i> T.B.&R.	1sp.
	<i>Boswellia</i> Roxb.	aprox. 30 sp.
	<i>Canarium</i> L.	aprox. 105 sp.
	<i>Dacryodes</i> Vahl	66 spp.
	<i>Garuga</i> Roxb.	4 spp.
	<i>Haplolobus</i> H.J. Lam	22 spp.
	<i>Pseudodacryodes</i> R. Pierlot	1 sp.
	<i>Rosselia</i> Forman	1 sp.
	<i>Santiria</i> Blume	24 sp.
	<i>Scutinanthe</i> Thwaites	2 sp.
	<i>Trattinnickia</i> Willd.	13 sp.
	<i>Triomma</i> Hook. f.	1sp.
Protieae	<i>Crepidospermum</i> Hook. f.	6 sp.
	<i>Protium</i> Burm. f.	aprox. 150 sp.
	<i>Tetragastris</i> Gaertn.	9 sp.

¹ Determinação das tribos e distribuição dos gêneros segundo Thulin *et al.* (2008);

² Número de espécies por gênero segundo Week, Daly & Simpson (2005) com exceção do gênero *Ambilobea*, descrito por Thulin *et al.* (2008).

2.2 Interesse Químico em Burseraceae

A característica marcante em várias espécies desta família é a exsudação de uma oleorresina de seu tronco. Estas oleorresinas apresentam diferentes aromas e características físicas conforme a espécie que a exsuda. Estas diferenças fizeram com que estas árvores e arbustos fossem conhecidas por diferentes nomes, como almescla, breu, breu-branco, breu-preto, breu-vermelho, breu-terra, breu-limão, breu-manga, caraña, copal, copal-ouro, copal-negro, elemi, manila-elemi, frankincenso, gugul, maaliol, mirra, okume, dentre outros nomes populares (SILVA, SILVA & LISBOA, 1977; PIO CORREA, 1984; GENTRY, 1993).

Esta oleorresina apresenta coloração verniz, esbranquiçada ou incolor, que quando seca apresenta massa cristalizada sobre o ferimento nos troncos (RIBEIRO & DALY, 1999). Segundo Costa (1975), em oleorresinas recém-exsudadas pode se obter de 20-30% de óleo essencial, reduzindo seu percentual para 7-8% em oleorresinas já envelhecidas.

Gilbert (2006) descreveu que em algumas espécies do gênero *Protium*, especialmente a espécie *P. heptaphyllum*, se obtém uma oleorresina dita como rica em α - e β -amirina e outros terpenóides. Esta afirmação da presença majoritária destes triterpenos é anterior aos anos 70, quando Pernet (1972) e Costa (1975) descreveram a presença de α - e β -amirina como componentes majoritários de oleorresinas Amazônicas da família Burseraceae. O mesmo foi reafirmado por Khalid (1983), que descreve a família Burseraceae como acumuladores de triterpenos das séries ursano e oleanano.

Além dos triterpenos de esqueleto oleanano e ursano, a presença de outros esqueletos triterpênicos como o bicíclico polipodano, os triterpenos tetracíclicos damarano, eufano, tirucalano, lanostano e cicloartano, e os pentacíclicos, hopano, lupano, friedelano, taraxarano e taraxastano também são descritos para espécies da família Burseraceae (PERNET, 1972; KHALID, 1983; RÜDIGER *et al.*, 2007, SHEN & LOU, 2008).

A busca do conhecimento da composição química dentre as espécies da família Burseraceae Neotropicais se concentra nos gêneros *Protium* e *Bursera*. Já para as espécies encontradas na África e na Ásia, as descrições químicas se concentram nos gêneros *Canarium*, *Commiphora* e *Boswellia*. Contudo, podem ser encontradas descrições químicas para espécies pertencentes aos gêneros *Aucomea*, *Crepidospermum*, *Dacryodes*, *Santiria*, *Tetragastris* e *Trattinnikia*.

2.3 Química da Família Burseraceae

2.3.1 Triterpenos Pentacíclicos de Anéis 6-6-6-6-6

Em 1903, Tschirch & Saal realizaram estudos com a espécie *Protium carana*, obtendo uma mistura binária de derivados triterpênicos das séries ursano e oleanano, identificados como α - e β -amirina. Estas séries de triterpenos foram considerados como principais constituintes de espécies da família Burseraceae, levando esta família a ser considerada acumuladora de triterpenos ursano e oleanano (PERNET, 1972; KHALID, 1983).

Os triterpenos das séries ursano e oleanano apresentam esqueleto pentacíclico com cinco anéis cicloexânicos fundidos (6-6-6-6-6) com conformação *cadeira-cadeira-cadeira-cadeira-cadeira* (C-C-C-C-C) de seus cinco anéis (XU *et al.*, 2004) (Figura 1). Estes triterpenos pentacíclicos apresentam apenas metilas ligadas ao esqueleto central (XU *et al.*, 2004), modificando entre eles apenas a disposição das metilas no esqueleto pentacíclico.

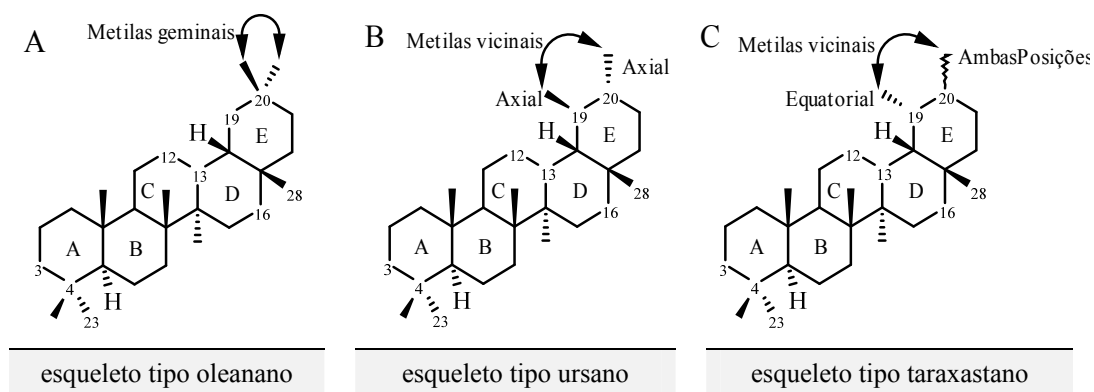


Figura 1: Estruturas dos esqueletos oleanano, ursano e taraxastano

A diferença estrutural entre os esqueletos ursano e oleanano ocorre na posição das metilas ligadas ao anel “E”, sendo que o esqueleto oleanano apresenta duas metilas geminais no carbono de posição 20 (Figura 1-A), e o esqueleto ursano apresenta duas metilas vicinais ligadas aos carbonos 19 e 20 (Figura 1-B) (XU *et al.*, 2004).

O triterpeno taraxastano (Figura 1-C), outro triterpeno pentacíclico de anéis C-C-C-C-C 6-6-6-6-6, é estereoisomero do triterpeno ursano. A diferença entre estes dois triterpenos encontra-se nas metilas ligadas aos carbonos 19 e 20, sendo no esqueleto ursano as duas metilas estão na posição axial e em triterpenos taraxastano com a metila ligada ao carbono 19 na posição equatorial e a metila ligada ao carbono 20 podendo ser encontrada em ambas as posições, axial ou equatorial (XU *et al.*, 2004).

Além dos esqueletos triterpênicos oleanano, ursano e taraxastano, os triterpenos pentacíclicos de anéis C-C-C-C-C 6-6-6-6-6 das séries taraxarano, glutinano, multiflorano e friedelano já foram relatados em Burseraceae. Estes triterpenos apresentam as metilas geminais no anel “E”, como no esqueleto oleanano, variando a posição das metilas dos anéis “A”, “B”, “C” e “D”, o que confere a eles um segundo nome: friedooleanano (Figura 2), precedido pelas letras dos anéis que sofreram migrações das metilas. Além das metilas

geminais no anel E, em todos estes quatro esqueletos é observada a metila 27 na posição 13 equatorial (13β) (AGETA *et al.*, 1995; XU *et al.*, 2004).

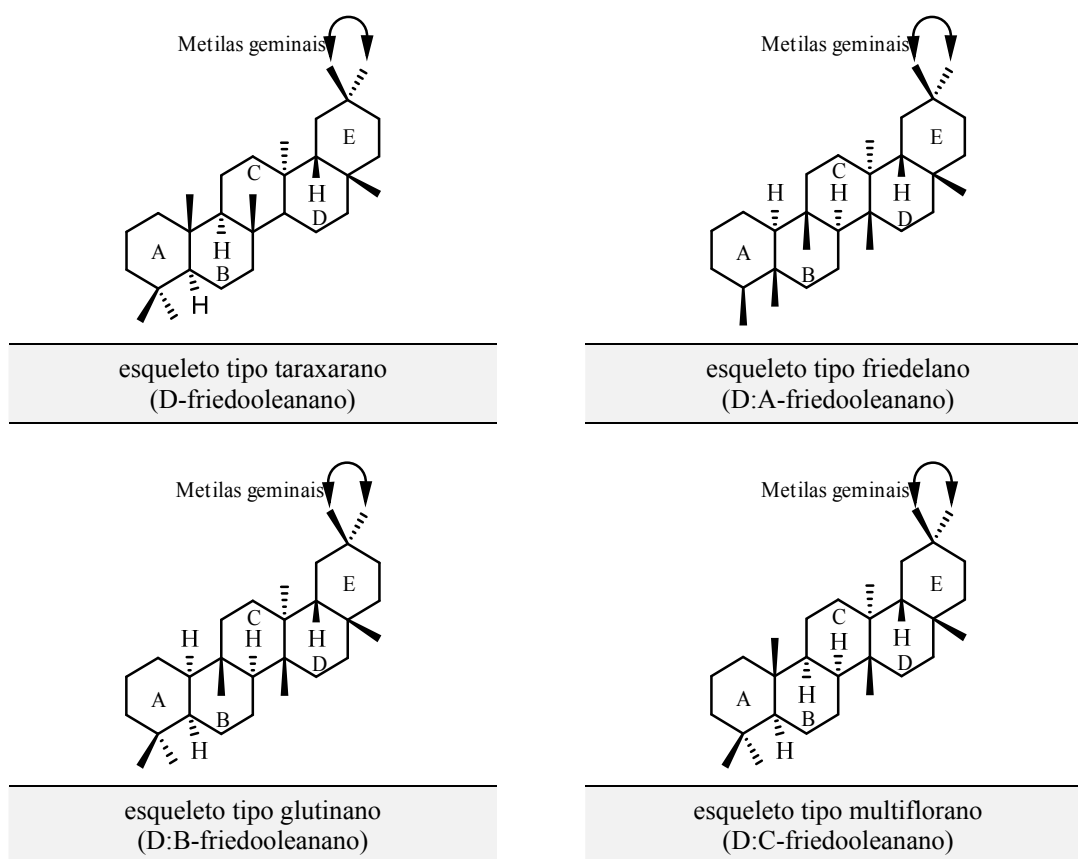


Figura 2: Estruturas dos esqueletos triterpênicos taraxarano, friedelano, glutinano e multiflorano

2.3.1.1 Triterpenos Ursano e Oleanano

Em meados do Século XIX o termo amirina já era utilizado para cristais obtidos de oleorresinas de elemi (PHOEBUS, 1876), mas sua estrutura ainda não tinha sido desvendada, apresentando fórmula molecular (FM) $2(C_{10}H_{16}) \cdot H_2O$, que não condiz com sua FM atual, $C_{30}H_{50}O$ (Figura 3).

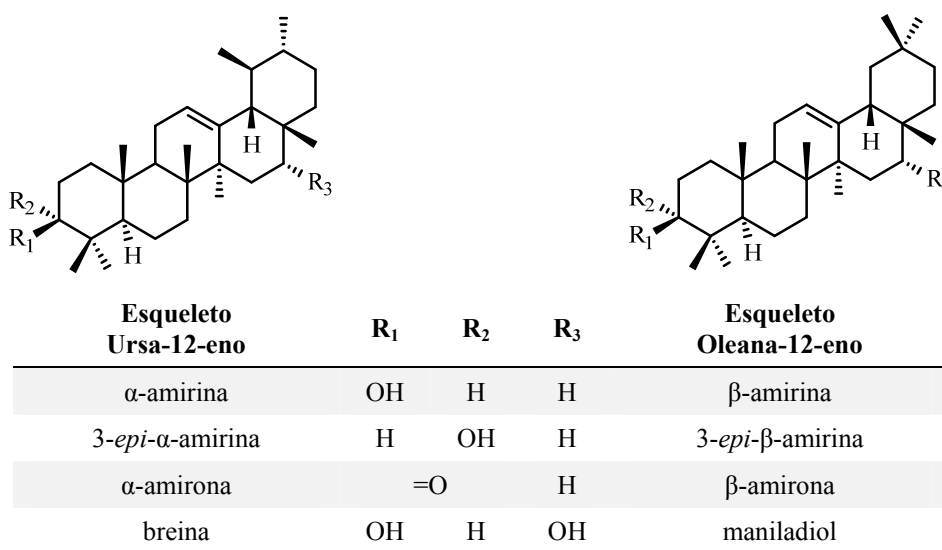


Figura 3: Principais triterpenos ursano e oleanano hidroxilados e carbonilados isolados de espécies de Burseraceae

Os triterpenos hidroxilados α -amirina e β -amirina são considerados os principais constituintes triterpenoídicos de esqueletos ursano e oleanano desta família. Estes dois triterpenos apresentam como características uma insaturação entre os carbonos C-12 e C-13 (Δ^{12}) e uma hidroxila no carbono C-3 do anel “A”. A posição axial é mais comum desta hidroxila no anel hexacíclico A (posição 3β), sendo descritos em alguns trabalhos seus epímeros (3-*epi*- α -amirina e 3-*epi*- β -amirina), que apresentam sua hidroxila na posição equatorial do anel A (posição 3α). Outros constituintes frequentemente mencionados são suas respectivas cetonas, α -amirona e β -amirona, além dos dihidroxilados maniladiol (3 β ,16 α -diidroxioleana-12-eno) e breina (3 β ,16 α -diidroxieursa-12-eno), que apresentam uma hidroxila na posição equatorial (16 α), além da hidroxila na posição 3β (Figura 3).

Além de álcoois e cetonas triterpênicas das séries oleanano e ursano, a presença de derivados ácidos destes esqueletos também são descritos em oleorresinas de Burseraceae. Os primeiros relatos de ácidos destes esqueletos em Burseraceae datam nos anos 60, quando Thomas & Muller (1960) isolaram ácidos de *Commiphora glandulosa*, os quais foram

nomeados como ácido commico A, B, C, D e E. Posteriormente, estes ácidos tiveram suas estruturas elucidadas por Thomas e colaboradores (THOMAS, 1961; THOMAS *et al.*, 1961; THOMAS & WILLHALM, 1964), mostrando a presença de hidroxila na posição 3 β e uma carboxila na posição 23, o que condiz com as estruturas dos ácidos 3-*epi*- α - e 3-*epi*- β -boswélico (Figura 4), para os ácidos commico A e B, respectivamente. Estes ácidos com a hidroxila na posição 3 α são os mais comuns dos ácidos oleanano e ursano em Burseraceae, ácido α - e β -boswélico (Figura 4), além de seus derivados, que são obtidos comumente de frankincenso, oleorresina exsudada de espécies de *Boswellia* (SHEN & LOU, 2008).

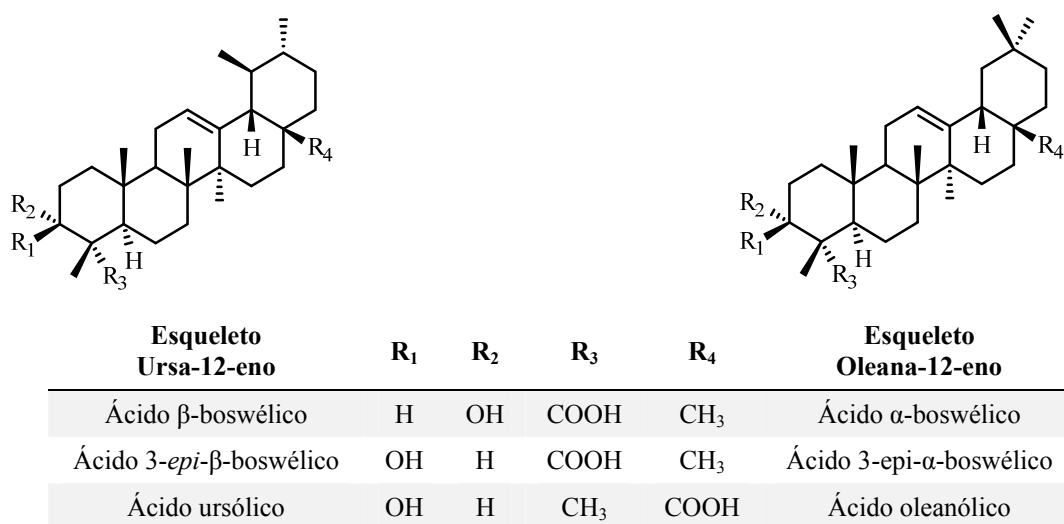


Figura 4: Principais ácidos triterpênicos das séries ursano e oleanano isolados de espécies de Burseraceae

A presença de ácido ursólico e seus derivados foram relatados em apenas uma espécie de *Bursera* (SYAMASUNDAR *et al.*, 1991; SYAMASUNDAR & MALLAVARAPU, 1995), já o ácido oleanólico foi isolado apenas de *Commiphora opobalsamum* (ABBAS *et al.*, 2007) (Figura 4).

Outra característica em triterpenos de esqueletos oleanano e ursano na família Burseraceae é o rompimento da ligação entre os carbonos 3 e 4, ocasionando a abertura do

D. normandii os ácidos 21-oxo-3,4-*seco*-oleana-4(23),12-dieno-3-óico e 21-oxo-3,4-*seco*-ursa-4(23),12-dieno-3-óico (Figura 5) (PARSONS *et al.*, 1991).

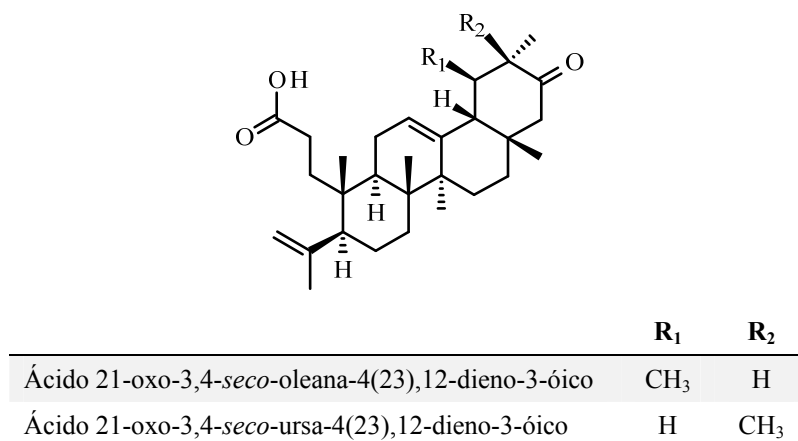


Figura 5: Triterpenos ursano e oleanano com anel A aberto

A acetilação da hidroxila na posição 3 é comumente descrita em espécies de *Boswellia* (Figura 6-A), mais especificamente em derivados do ácido β -boswélico, como o ácido acetil- β -boswélico e o ácido acetil-11-oxo- β -boswélico (AKIHISA *et al.*, 2006; PARDHY & BHATTACHARYYA, 1978A; MAHAJAN *et al.*, 1995; BADRIA *et al.*, 2003), além do derivado do ácido α -boswélico, ácido acetil- α -boswélico (AKIHISA *et al.*, 2006; Badria *et al.*, 2003). Outros triterpenos acetilados foram obtidos da espécie *T. burserifolia* (Figura 6-B), o 3 β -fenilacetóxi-ursa-12-eno, 3 β -fenilacetóxi-oleana-12-eno, onde foram observadas acetilações com o grupo fenilacetil (LIMA *et al.*, 2004).

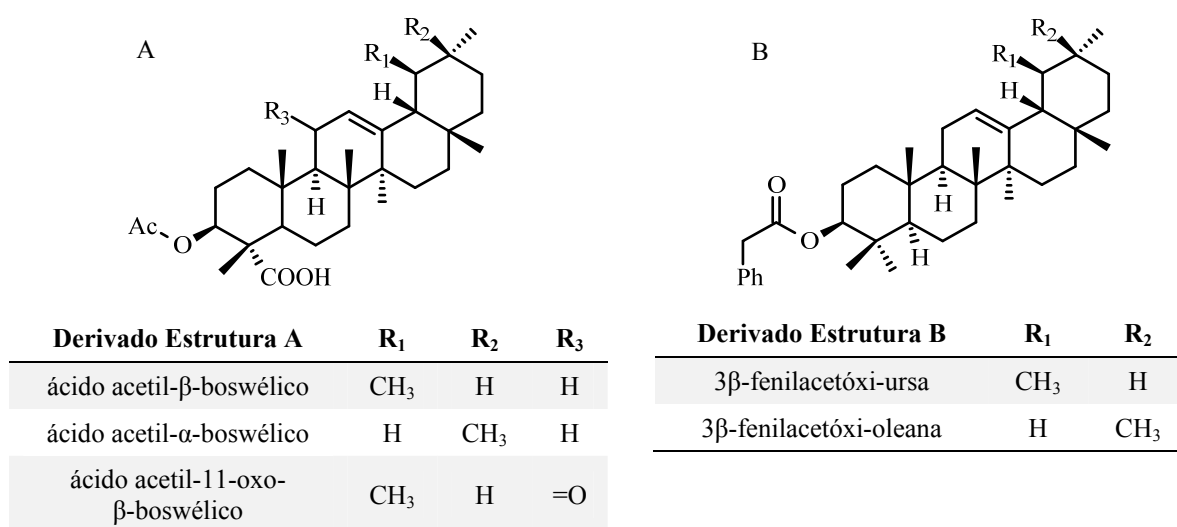


Figura 6: Triterpenos acetildos de Burseraceae.

2.3.1.2 Triterpenos Friedelano, Glutinano, Multiflorano, Taraxarano e Taraxastano

Os demais triterpenos pentacíclicos com seis membros por anel começaram a ser isolados e identificados no ano de 1980, dando início à descoberta destes triterpenos na família pelo taraxerol (Figura 7-E), obtido de *Canarium zeylanicum* (BANDARANAIKE, 1980), posteriormente isolado também das folhas de *Tetragastris altissima* (LIMA *et al.*, 2001). A friedelina (Figura 7-A) foi obtida primeiramente de *Santiria trimera* (da SILVA *et al.*, 1990), sendo descrita posteriormente para os gêneros *Commiphora*, *Protium* e *Tetragastris*. Além da friedelina, canofilal (Figura 7-C) foi obtido das partes aéreas de *C. opobalsamum* (ABBAS *et al.*, 2007), e o 3-*epi*-friedelanol (Figura 7-A) foi obtido obtida das folhas de *P. strumosum* (GUIMARÃES & SIANI, 2007).

O 3-*epi*-glutinol (Figura 7-C), triterpeno de esqueleto glutinano, foi isolado primeiramente de *Bursera simaruba* (PERAZA-SÁNCHEZ *et al.*, 1995), posteriormente, o glutinol (Figura 7-C) foi isolado de *Dacryodes edulis* (LOEMBA-NDEMBI & SILOU, 2006). Já o triterpeno multiflorano, o ácido 2,3-*seco*-isobriônico (Figura 7-D) foi isolado apenas

em *Tetragastris altissima*, não tendo sido identificado em outra espécie de Burseraceae (LIMA *et al.*, 2001), tal como os únicos triterpenos de esqueleto taraxastano (Figura 7-E), isolados apenas de *Protium heptaphyllum* (SUSUNAGA *et al.*, 2001).

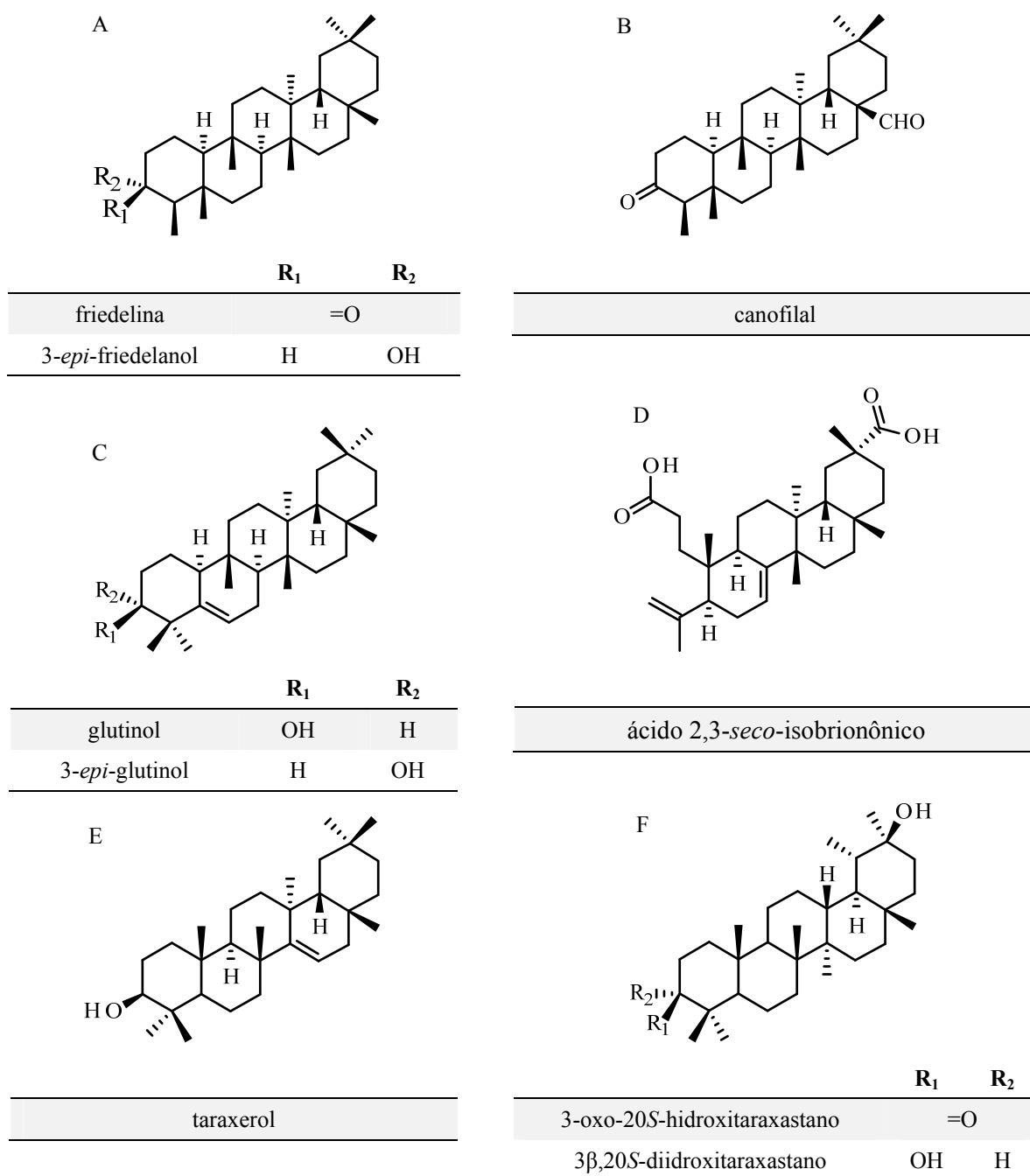


Figura 7: Triterpenos de esqueleto friedelano, glutinano, multiflorano, taraxarano e taraxastano.

2.3.2 Triterpenos Pentacíclicos de Anéis 6-6-6-6-5

As Burseraceae, além de serem consideradas acumuladoras de triterpenos ursano e oleanano (KHALID, 1983) apresentam em sua composição triterpenos de esqueleto lupano (Figura 8-A), principalmente seu álcool, o lupeol (COSTA, 1975). O isolamento de um triterpeno hopano (Figura 8-B) e mais recentemente, um novo esqueleto triterpênico denominado canarano (Figura 8-C) (USUBILAGA *et al.*, 2004; KAMDEM *et al.*, 2011), também fazem parte dos triterpenos pentacíclicos conhecidos em Burseraceae. Estes triterpenos apresentam uma estrutura com quatro anéis de 6 membros e um anel de cinco membros (6-6-6-6-5) *trans*-fundidos. Segundo Ageta *et al.* (1993 & 1994) e Xu *et al.* (2004), os triterpenos de esqueleto lupano e hopano apresentam conformação *cadeira-cadeira-cadeira-cadeira-envelope* (C-C-C-C-E). Esta mesma conformação foi observada para o triterpeno de esqueleto canarano (KAMDEM *et al.*, 2011).

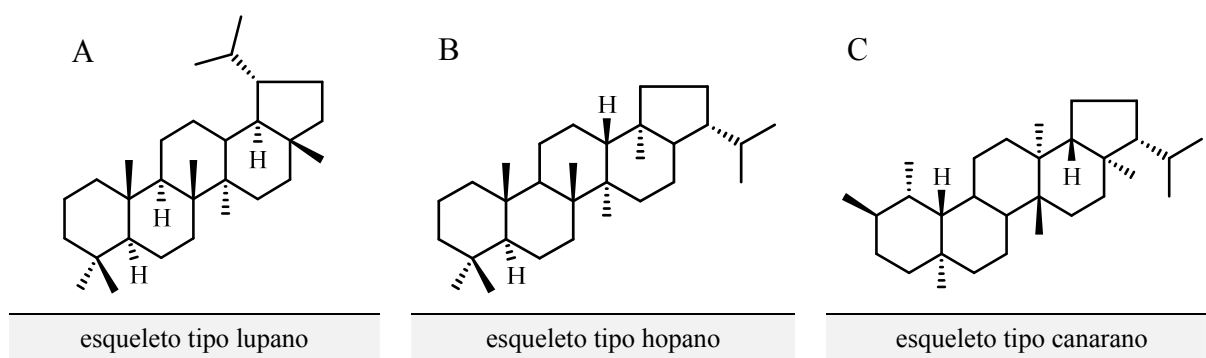


Figura 8: Estruturas dos esqueletos triterpênicos lupano, hopano e canarano

2.3.2.1 Triterpenos Lupano

A primeira descrição de triterpenos de esqueleto lupano em Burseraceae é de 1964, quando o ácido canárico foi obtido da oleorresina de *Canarium muelleri* (Figura 9) (CARMAN & COWLEY, 1964), sendo isolado posteriormente da oleorresina de *Dacryodes edulis* (EKONG & OKOGUN, 1969). O ácido canárico apresenta apenas 4 anéis em sua estrutura, isto se deve ao rompimento da ligação entre os carbonos 3 e 4, ocasionando a abertura do anel A. Esta modificação estrutural foi descrita em esqueletos triterpênicos ursano e oleanano obtidos de *D. normandii* (Figura 5, pg. 32).

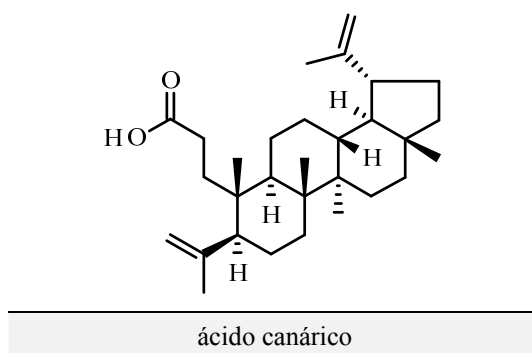


Figura 9: Ácido canárico, primeiro triterpenos lupano identificado em Burseraceae

Apesar do ácido canárico ter sido o primeiro triterpeno de esqueleto lupano relatado em Burseraceae, o triterpenos lupeol, 3-*epi*-lupeol e lupenona (Figura 10-A e 10-B) são mais frequentemente relatados em oleorresinas, galhos e folhas de espécies desta família. Lupeol foi isolado dos gêneros *Boswellia*, *Bursera*, *Dacryodes* e *Protium*. Seu epímero, 3-*epi*-lupeol foi isolado de *Boswellia*, *Bursera* e *Dacryodes*. Já a lupenona foi isolada de espécies do gênero *Protium* e *Trattinnickia* (EKONG & OKOGUN, 1969; GUIMARÃES & SIANI, 2007; LIMA *et al.*, 2004; NAKANISHI *et al.*, 2005; PERAZA-SÁNCHEZ *et al.*, 1995; PROIETTI *et al.*, 1981; VIEIRA JUNIOR *et al.*, 2005; MORIKAWA *et al.*, 2011).

Além do ácido canárico, isolado de espécies de *Canarium* e *Dacryodes*, outros ácidos de esqueleto lupano foram isolados da oleorresina de espécies de *Boswellia*, como o ácido 3 α -hidroxilupa-20(29)-eno-24-óico (ácido lupeólico) (Figura 10-C), o ácido 3 α -acetoxilupeólico (Figura 10-C) obtidos da oleorresina *Boswellia carterii* (AKIHISA *et al.*, 2006) e também das cascas de *Boswellia papyrifera* (PAUL *et al.*, 2012). O ácido triterpênico epoxidado, ácido 3 α -hidroxi-3,25-epoxilupa-20(29)-eno-28-óico (Figura 10-D), denominado benulina, foi obtido de *Bursera arida* em um trabalho fitoquímico com toda a planta (madeira, casca e folhas) (IONESCU *et al.*, 1977).

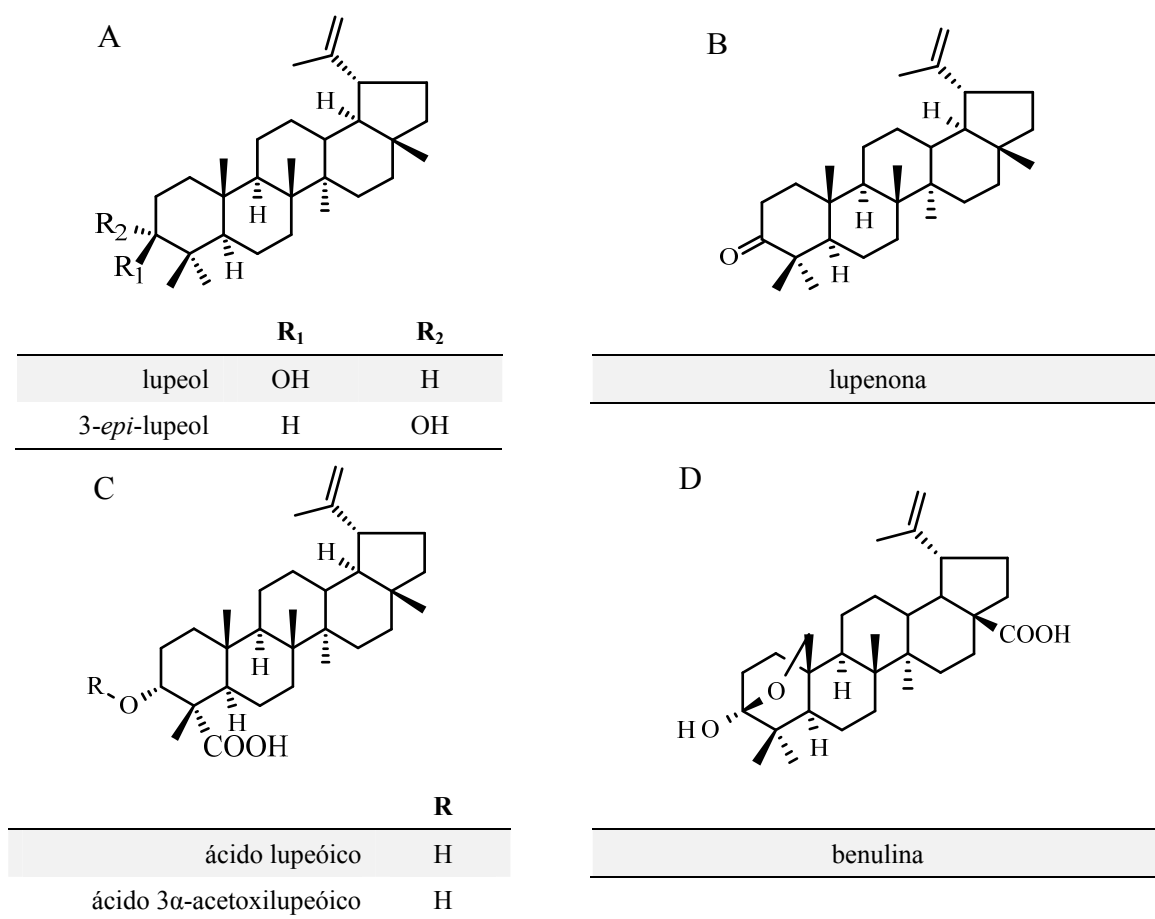


Figura 10: Triterpenos de esqueleto lupano de Burseraceae

2.3.2.2 Triterpenos Hopano e Canarano

O isolamento do primeiro triterpeno hopano de Burseraceae foi realizado por Usabilaga *et al.* (2004), que através de técnicas cromatográficas obtiveram da oleorresina de *Protium crenatum*, o 3 β ,19 α -diidroxihopa-22(29)-eno (Figura 11A). Devido ao esqueleto lupano ser o esqueleto mais comum em espécies de Burseraceae, a confirmação do esqueleto hopano foi obtida através da comparação dos deslocamentos químicos e correlações por RMN. Utilizando apenas a técnica de espectrometria de massas acoplado a cromatógrafo a gás, de-la-Cruz-Canizares *et al.* (2005) identificaram o 3 β -hidroxihopa-22(29)-eno (Figura 11-A) na oleorresina de *Bursera cuneata* através de análises dos dados espectrais.

Já o triterpeno canareno (Figura 11-B), obtido da oleorresina de *Canarium schweinfurthii* retrata a importância desta família, inclusive na biossíntese de um novo esqueleto triterpênico (KAMDEM *et al.*, 2011). Para a elucidação desta nova estrutura foram analisados dados de RMN monodimensionais e bidimensionais além de espectrometria de Raios-X por monocristal. A suposição da rota biossintética sugere que este novo triterpeno derive do cátion hopil, precursor de triterpenos como filicicano, fernano e hopano, este último esqueleto descrito para *Bursera* e *Protium*.

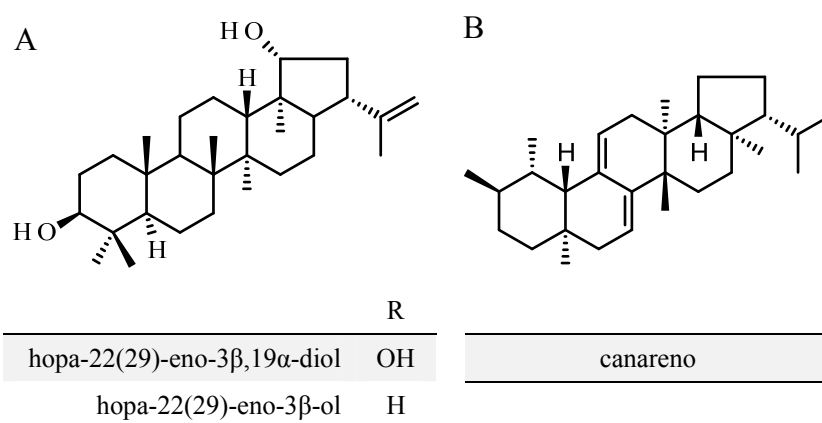


Figura 11: Triterpenos hopano e canarano de Burseraceae

2.3.3 Triterpenos Tetracíclicos de Anéis 6-6-6-5

Triterpenos tetracíclicos são descritos em Burseraceae desde 1972, quando os ácidos triterpênicos 3-hidroxi-eufa-8-enóico e 3-oxoeufa-8-enóico foram apresentados na revisão de Pernet (1972) como parte da composição da oleorresina de *Canarium bengalense* e *C. schweinfurthii* and. A partir deste período, vários outros triterpenos tetracíclicos foram obtidos de espécies de Burseraceae. Atualmente, nas espécies de Burseraceae são conhecidos os triterpenos tetracíclicos das séries damarano, eufano/tirucalano, lanostano e cicloartano.

Estes triterpenos tetracíclicos apresentam quatro anéis fundidos, sendo três anéis de seis membros e um anel de cinco membros (6-6-6-5), além da presença de uma cadeia lateral de oito carbonos ligada ao anel de 5 membros. Os triterpenos tetracíclicos podem ser divididos em dois grupos segundo a sua rota biossintética, os derivados do cátion damarenil e os derivados do cátion protosteril, o que confere a eles conformações diferenciada (XU *et al.*, 2004).

A partir do cátion damarenil (ou prototriterpenoide) são derivados os triterpenos da série damarano (Figura 12-A) e da série eufóides (eufano e tirucalano) (Figura 12-B). Entre estas séries podemos destacar três diferenças principais em suas estruturas: a conformação do anel C nos esqueletos triterpênicos, a posição das metilas 18 e 30 e a posição da cadeia lateral ligada ao carbono 17. Estas diferenças são descritas a seguir.

A primeira diferença entre as duas séries dos derivados protriterpenoides está na conformação do anel C. Os triterpenos da série damarano apresentam conformação *cadeira-cadeira-cadeira-envelope*, mesma conformação do cátion damarenil. Já os triterpenos da série eufóides, derivam do cátion damarenil após sucessivas migrações de hidrogênios e metilas, conferindo a conformação *cadeira-cadeira-barco-envelope* (XU *et al.*, 2004; NES, 2011). Contudo, os ácidos 3 α -hidroxitirucala-7,24-dieno-21-óico e 3 α -hidroxitirucala-8,24-dieno-21-óico apresentam conformação *cadeira-meia cadeira-meia cadeira-envelope* (MORA *et al.*, 2001; YOUSUF *et al.*, 2011), esta alteração da conformação se deve à hibridização do carbono 8 em sp² nos triterpenos com instauração nos carbonos 7(8) e 8(9).

A segunda diferença encontra-se na posição das metilas 18 e 30, que em triterpenos da série damarano encontra-se ligadas no carbono 8 (C-8) em posição β e ligada ao C-14 em posição α , respectivamente. Nos triterpenos da série eufóides a metila 18 encontra-se ligadas no C-13 na posição α e as metila 30 ligada ao C14 na posição β (XU *et al.*, 2004).

A terceira diferença entre estas duas séries de triterpenos, esta relacionada à estereoquímica do carbono 17, que em esqueletos damarano a posição da cadeia lateral ligada ao carbono 17 encontra-se acima do plano, conferindo uma configuração 17 β , e em triterpenos eufóides, a cadeia lateral encontra-se para baixo do plano, conferindo a configuração 17 α .

Já os triterpenos derivados do cátion protoesteril (ou protoesteroide), cátion com conformação *cadeira-bote-cadeira-envelope*, são formados após uma sequência de migrações e rearranjos no processo de biossíntese (XU *et al.*, 2004; NES, 2011). O triterpeno lanostano (Figura 13A) adquire a conformação *cadeira-cadeira-cadeira-envelope* (sendo este anel pentacíclico inverso ao anel pentacíclico dos eufóides). O triterpeno cicloartano (Figura 13B) difere do lanostano durante o processo de biossíntese, onde ocorre a ciclização da metila 19 com o carbono 9 do esqueleto central, assim o triterpeno cicloartano adquire a conformação

triterpenos eufóides, a cadeia lateral encontra-se para baixo do plano, conferindo a configuração 17 α .

Já os triterpenos derivados do cátion protoesteril (ou protoesteroide), cátion com conformação *cadeira-bote-cadeira-envelope*, são formados após uma sequência de migrações e rearranjos no processo de biossíntese (XU *et al.*, 2004; NES, 2011). O triterpeno lanostano (Figura 13A) adquire a conformação *cadeira-cadeira-cadeira-envelope* (sendo este anel pentacíclico inverso ao anel pentacíclico dos eufóides). O triterpeno cicloartano (Figura 13B) difere do lanostano durante o processo de biossíntese, onde ocorre a ciclização da metila 19 com o carbono 9 do esqueleto central, assim o triterpeno cicloartano adquire a conformação influenciada pelo anel de 3 membros, sendo ela *cadeira-meia cadeira-cadeira torcida-envelope* e invertendo a configuração entre os anéis B e C, que em triterpenos lanostano adquire uma configuração *trans* e em triterpenos cicloartano uma configuração *cis*.

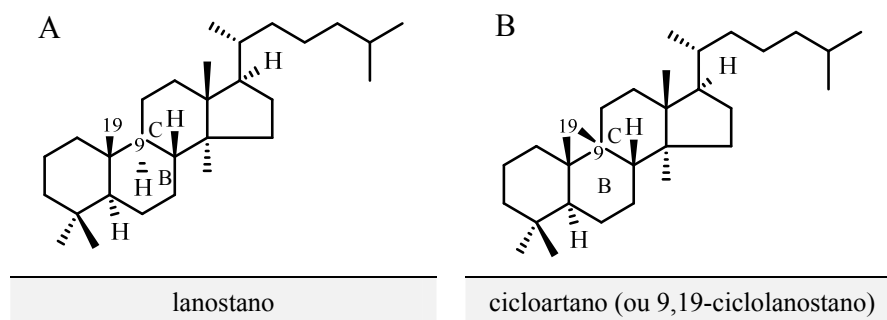


Figura 13: Estruturas dos esqueletos lanostano e cicloartano.

2.3.3.1 Triterpenos Damarano e Eufóides

Ácidos triterpênicos de esqueleto tirucalano apresentam grande importância na composição química da oleorresina de Burseraceae. A pesquisa de varredura realizada por Siani *et al.* (2012) avaliou por cromatografia a gás as oleorresinas de dez diferentes espécies

de Burseraceae Neotropicais (nove espécies de *Protium* e uma espécie de *Trattinnickia*) demonstrando que em 9 destas espécie, ocorrem ácidos de esqueleto tirucalano. A concentração entre as amostras em que foram detectados variou de traços (< 1,0%), como em *Protium spruceanum*, até concentrações acima de 30% (soma das concentrações dos três ácidos avaliados) como em *P. altsonii*.

Estes ácidos da série tirucalano conhecidos como ácido 3 α -hidroxitirucala-7,24-dieno-21-óico, ácido 3 α -hidroxitirucala-8,24-dieno-21-óico, ácido 3-oxotirucala-7,24-dieno-21-óico e ácido 3-oxotirucala-8,24-dieno-21-óico (Figura 14) são os triterpenos tetracíclicos mais comuns em Burseraceae, sendo descritos em espécies de *Aucomea*, *Boswellia*, *Bursera*, *Canarium*, *Protium* e *Trattinnickia* (MAIA *et al.*, 2000; LIMA *et al.*, 2004; ROBLES *et al.*, 2005; TESSIER *et al.*, 1982).

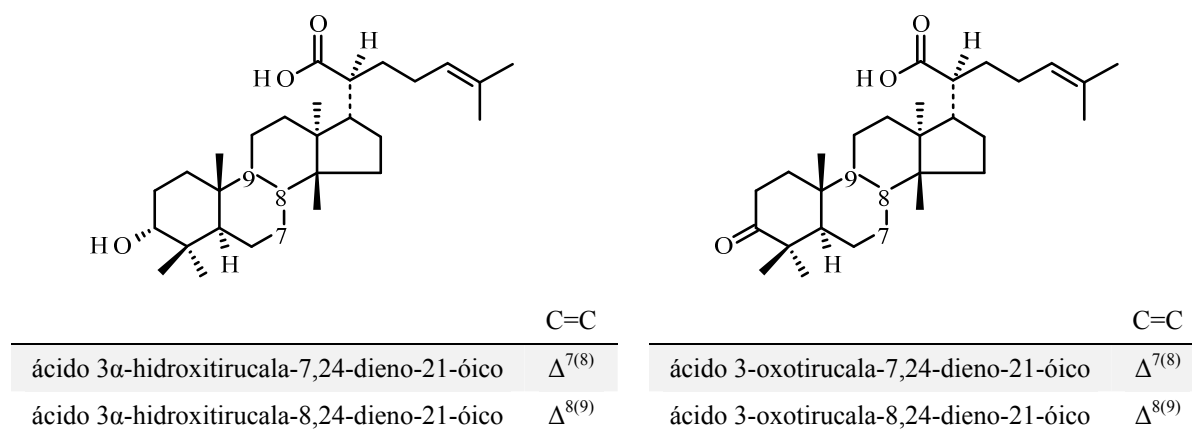


Figura 14: Triterpenos ácidos de esqueleto tirucalano de Burseraceae

Além de ácidos tetracíclicos, a presença dos triterpenos eufóides hidroxilados também fazem parte da composição de Burseraceae, sendo isolado o tirucalol (Figura 15-A) no gênero *Dacryodes*, na espécie Africana *D. edulis* e na espécie Neotropical *D. hopkinsii* (LOEMBA-NDEMBI & SILOU, 2006; LIMA *et al.*, 2004), e o triterpeno dihidroxilado 20,24-diidroxi-eufa-2,8,22-trieno (Figura 15-B) das cascas de *Boswellia serrata* (SINGH & BHAKUNI, 2006a).

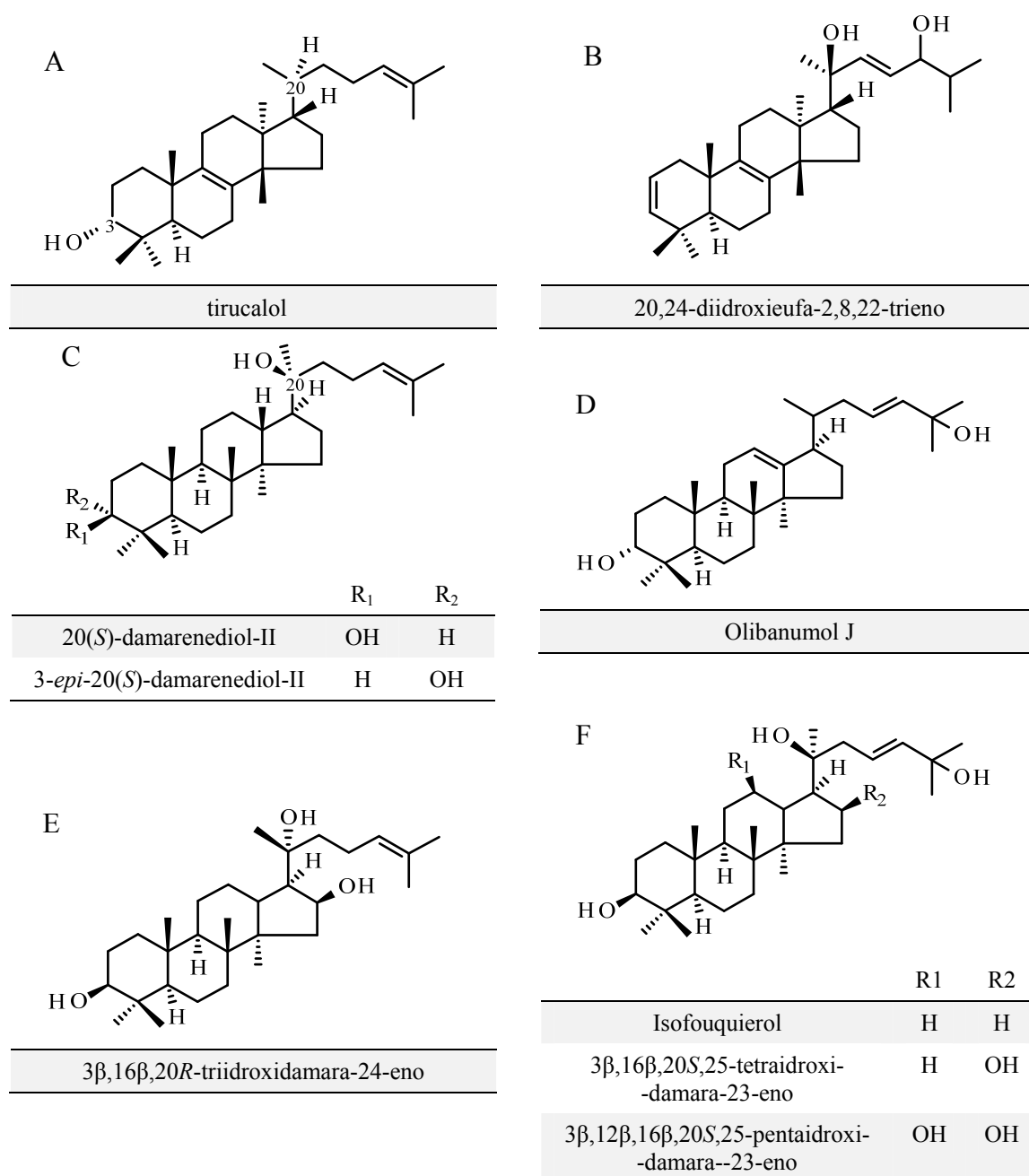


Figura 15: Triterpenos tirucalano e damarano hidroxilados de Burseraceae

Já os triterpenos hidroxilados da série damarano foram descritos inicialmente para os gêneros *Boswellia* e *Commiphora* por Fattorusso *et al.* (1985) e Waterman & Ampofo (1985), sendo reportados também para *Crepidospermum rhoifolium* e *Trattinnickia burserifolia* (LIMA *et al.*, 2001; LIMA *et al.*, 2004). De forma geral, os triterpenos damaranos apresentam no mínimo duas hidroxilas, como o 20(*S*)-damarenodiol-II e seu

de *Commiphora kua* e até cinco hidroxilas, como o 3 β ,12 β ,16 β ,20S,25-pentaidroxidamara-23-eno (Figura 15-F), obtido de *Commiphora confusa*.

Alguns triterpenos tetracíclicos damarano, eufano e tirucalano derivam do cátion 17 β -epóxidamarenil (XU *et al.*, 2004) resultando na ciclização da cadeia lateral de carbonos formando éteres e ésteres cíclicos contendo três membros (epóxi), cinco membros (tetrahydrofurano e γ -lactona), seis membros (tetraidropirano) e sete membros (oxapano). Os primeiros triterpenos com a cadeia lateral cíclica isolados de Burseraceae foram a sapelina A (Figura 16-A) e a sapelina B (Figura 16-B), tirucalanos com um anel tetraidropirano e oxapano, respectivamente, que foram obtidos das folhas de *Bursera klugii* (JOLAD *et al.*, 1977).

O triterpeno cabraleadiol (Figura 16C), triterpeno damarano com anel tetrahydrofurano foi obtido das cascas de *Commiphora dalzielii*, junto com seu derivado cetônico, a cabraleona e seus derivado acetilado (WATERMAN & AMPOFO, 1985). Posteriormente, o cabraleadiol foi obtido das folhas de *Protium apiculatum* (LIMA *et al.*, 2001) e seu derivado acetilado das oleorresinas de *Commiphora confusa* e *C. holtziana* (DEKEBO *et al.*, 2002a; MANGURO *et al.*, 2009).

Recentemente, Singh & Bhakuni (2006b), isolaram da oleorresina de *Boswellia serrata* o eufano com anel epóxi, 20,22-epoxieufa-24-eno-3-ona (Figura 16D). De *Aucoumea klaineana* foram obtidas as únicas lactona triterpênicas em Burseraceae, obtiveram da oleorresina o flindissol γ -lactona e a flindissona γ -lactona (Figura 16F), juntamente a seus derivados flindissol e flindissona, respectivamente (Figura 16 E) (GUANG-YI *et al.*, 1988).

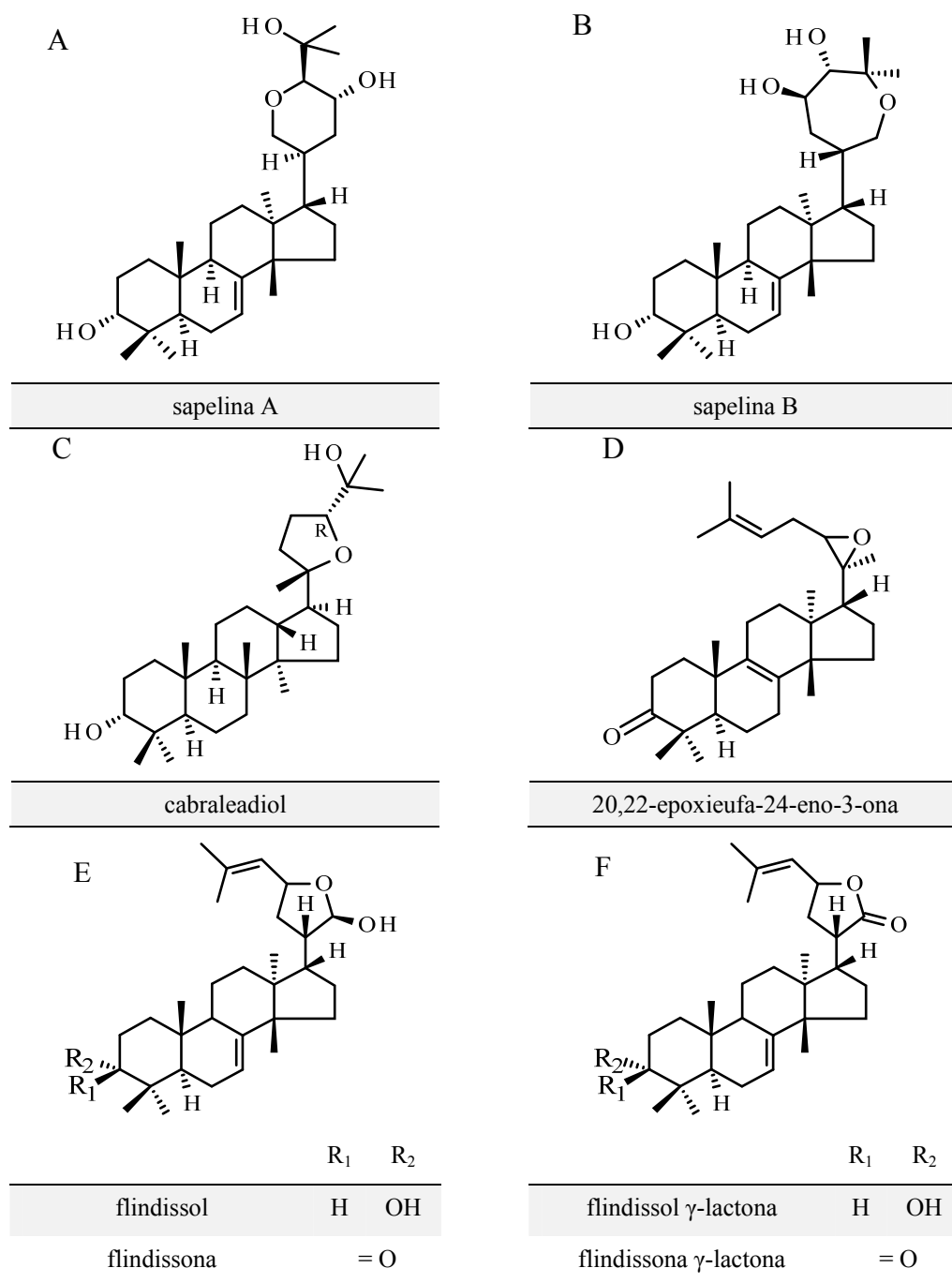


Figura 16: Triterpenos ciclooxygenados de esqueleto damarano, eufano e tirucalano de Burseraceae

Nas espécies dos gêneros *Boswellia* e *Commiphora* foram isolados ainda triterpenos de esqueleto mansubinano (Figura 17). Estes octanortriterpenos são derivados de triterpenos damaranos, após a perda da cadeia carbônica lateral. Inicialmente foram isolados o mansubinol, a mansubinona e o ácido 3,4-*seco*-mansubinóico da oleorresina de *Commiphora*

incisa (PROVAN & WATERMAN, 1986). Mas vários outros triterpenos octanordamaranos, além dos descritos, foram isolados de Burseraceae como o 15 α -hidroximansumbinona e o 28-acetóxi-15 α -hidroximansumbinona da oleorresina de *C. kua* (DEKEBO *et al.*, 2002). A mansumbina-13(17)-eno-3,16-diona; 16-oxo-3 β -hidroximansumbina-13(17)-eno; ácido 16-oxo-3,4-seco-mansumbina-4(28),13(17)-dieno-3-óico foram isolados das cascas de *C. kua* (PROVAN *et al.*, 1992).

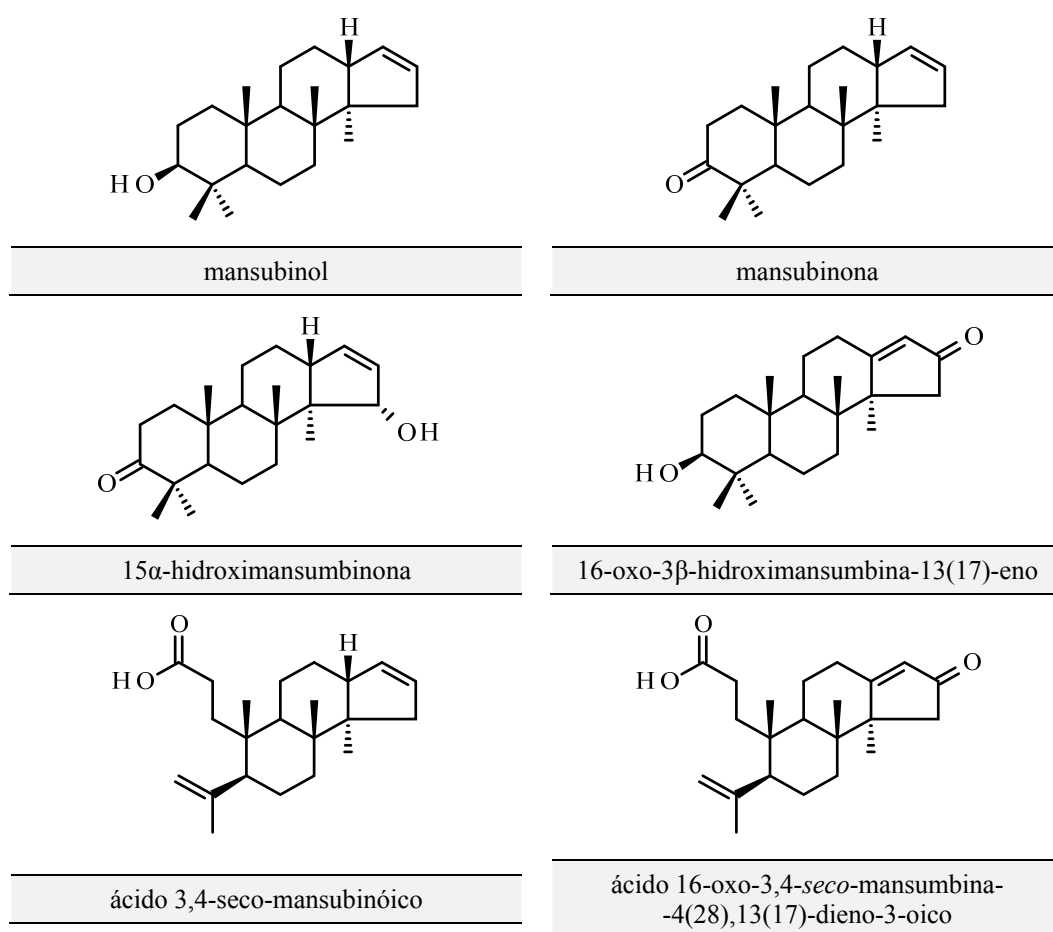


Figura 17: Triterpenos mansubinano (octanordamarano) de Burseraceae

2.3.3.2 Triterpenos Lanostano e Cicloartano

Provan & Waterman (1988) identificaram os primeiros triterpenos tetracíclicos de Burseraceae provenientes do cátion protosteril, isolando o $1\alpha,2\alpha,3\beta$ -triidroxi-29-norlanosta-8,24-dieno (Figura 18-A) e o 1α -acetoxi- 3β -hidroxicicloarta-24-eno da oleorresina de *Commiphora incisa*. Os lanostanos foram obtidos apenas de *Santiria trimera*, sendo identificados os ácidos 3-oxo-20(R)-lanosta-7,24(E)-dieno-26-óico (Figura 18-B) e 6β -acetoxi-3-oxo-20(R)-lanosta-7,24(E)-dieno-26-óico (da SILVA *et al.*, 1990).

Em estudos com os gêneros *Credidospermum* e *Dacryodes* foram isolados os triterpenos hidroxilados $3\beta,24$ -diidroxicicloarta-25-eno (Figura 18-D) e cicloartenol (Figura 18-C), respectivamente (LIMA *et al.*, 2001; LOEMBA-NDEMBI & SILOU, 2006). Já o ácido mangiferólico (Figura 18-E) foi isolado dos frutos de *Protium bahianum* em mistura ternária junto com os triterpenos α - e β -amirina por Oliveira *et al.* (2006), contudo este triterpeno teve apenas sua descrição em anais de congresso, não sendo publicados seus deslocamentos químicos e sua identificação em periódicos científicos até o presente momento.

No gênero *Commiphora*, a presença de triterpenos cicloartânicos com grande variedade de sítios de oxidação foi recentemente descrita por Shen *et al.* (2008) e Yang & Shi (2012), demonstrando a possibilidade de triterpenos da série cicloartano serem encontrados em Burseraceae.

Yang & Shi (2012), identificaram ainda um triterpeno olídeo, o $1\alpha,2\alpha$ -acetonideo- 3β -hidroxicicloarta-24-eno (Figura 18-F). Este triterpeno isolado não foi identificado no extrato bruto da oleorresina através de comparação por CCD, sendo considerado pelos autores possivelmente um artefato.

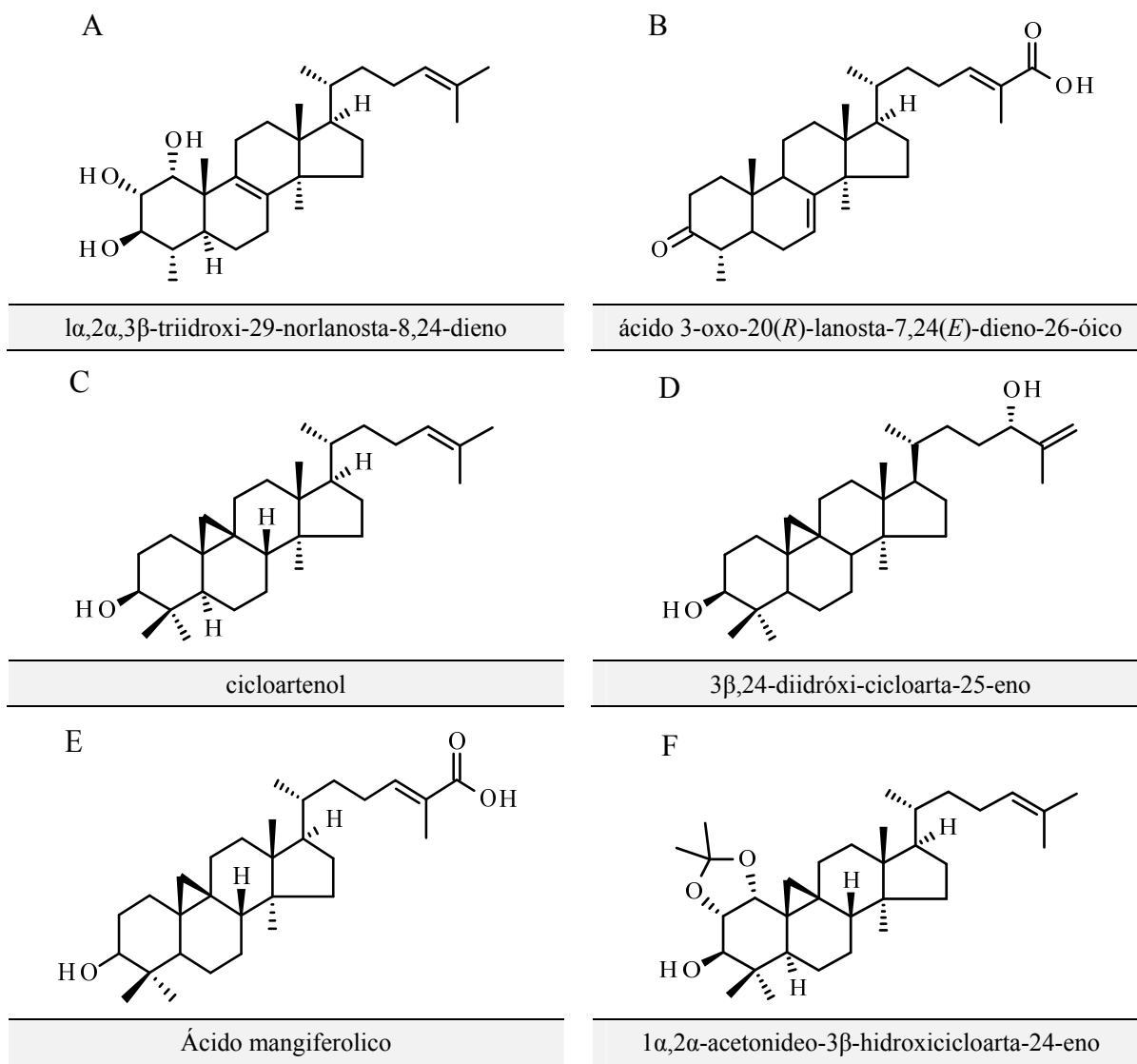


Figura 18: Triterpenos lanostano e cicloartano de Burseraceae

2.3.4 Compostos Voláteis de Burseraceae

Outra característica marcante na família Burseraceae é o aroma exalado por diversas partes da planta, como a oleorresina exsudada do tronco. Seus óleos essenciais também podem ser obtidos por hidrodestilação de folhas, caule e frutos além da oleorresina. Apresentam em sua composição predominantemente monoterpenos e sesquiterpenos, sendo descritos ainda alguns fenilpropanoides e derivados de hidrocarbonetos.

Em Burseraceae, os principais monoterpenos são derivados dos esqueletos das séries *p*-mentano (monocíclico) e pinano (bicíclico) (Figura 19), sendo encontrados majoritariamente nos óleos essenciais das oleorresinas.



Figura 19: Esqueletos monoterpênicos comuns em Burseraceae

A espécie *Protium heptaphyllum* apresenta maior número de estudos na família, por ser uma árvore comum em todo o Brasil. Estudos mostraram que o óleo essencial extraído de sua oleorresina é rico em terpinoleno, *p*-cimeno e γ -terpineno (SIANI *et al.*, 1999a & 1999b). Contudo a mesma espécie encontrada no Ceará apresentou uma constituição diferente em seu óleo essencial, com alta concentração de α -felandreno, limoneno e α -pineno, além de terpinoleno (BANDEIRA *et al.*, 2001).

A variação da composição química do óleo essencial pode ser observada ainda entre subespécies, como foi observado por Ramos *et al.* (2000), entre duas subespécies de *Protium paniculatum*, *P. paniculatum* var. *modestum* e *P. paniculatum* var. *riedelianum*, e por Marques *et al.* (2010), entre duas subespécies de *Protium heptaphyllum*, *P. heptaphyllum* ssp. *heptaphyllum* e *P. heptaphyllum* ssp. *ullei*.

Em *P. paniculatum* var. *modestum* foram observados altas concentrações de *p*-cimeno e α -terpineno no óleo essencial de sua oleorresina. Já em *P. paniculatum* var. *riedelianum* *p*-menta-3-eno, α -felandreno, 1,8-cineol, β -felandreno e *p*-cimeno foram os principais constituintes.

Em *P. heptaphyllum* ssp. *ullei* foram observados limoneno, terpinoleno e *p*-cimeno-8-ol com concentrações acima de 10%. Já para *P. heptaphyllum* ssp. *heptaphyllum* concentrações acima de 10% foram observadas para *p*-cimeno, diidro-4-careno e *n*-tetradecano.

P. strumosum apresenta um óleo essencial rico em *p*-cimeno, α -terpinoleno, β -felandreno e *p*-cimeno-8-ol. Já em *P. spruceanum*, foram detectados concentrações maiores de *p*-cimeno e β -felandreno, sendo observados ainda α -pineno, α -felandreno e *p*-menta-3-eno (RAMOS *et al.*, 2000).

A composição do óleo essencial da oleorresina de *Protium hebetatum* é majoritariamente de *p*-cimeno, como diversos outros óleos essenciais de Burseraceae, apresentando ainda grandes concentrações de α -pineno e β -felandreno. Para a espécie *P. altsoni* os compostos majoritários detectados foram α -pineno, *p*-cimeno e α -felandreno (RAMOS *et al.*, 2000).

No gênero *Trattinnickia burserifolia*, o óleo essencial da oleorresina é composto majoritariamente por α -felandreno, β -felandreno e *o*-cimeno (LIMA, 2000). Já em *T. rhoifolium* foram detectadas concentrações maiores de *p*-cimeno e α -pineno, sendo que *o*-cimeno não foi observado (RAMOS *et al.*, 2003).

A presença de sesquiterpenos também é descrita para espécies da família Burseraceae. Sua ocorrência é observada em óleos essenciais obtidos das folhas, sendo detectados em menores concentrações nas outras partes de algumas espécies. Como característica marcante, os principais sesquiterpenos identificados são derivados de esqueletos das séries muurulano, selinano, humulano e cariofilano (Figura 20).

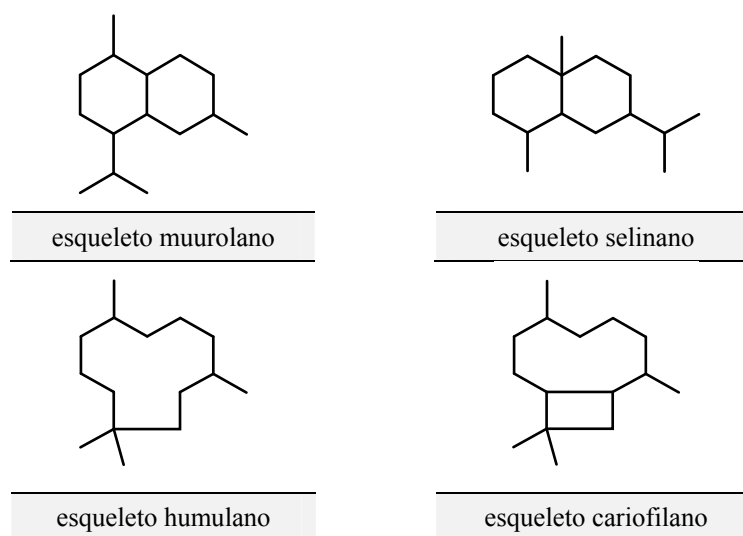


Figura 20: Esqueletos sesquiterpenicos comuns em Burseraceae

O primeiro estudo químico dos óleos essenciais das folhas em Burseraceae foi realizado em 1951, por Bradley & Haagensmit (1951), onde reportaram para *Bursera microphylla* apenas os monoterpenos α - e β -felandreno junto com o ácido tetraidrocúmico. Recentemente, a investigação fitoquímica do óleo essencial das folhas de *B. simaruba*, apresentou a presença majoritária do monoterpeno limoneno e dos sesquiterpenos β -cariofileno, α -humuleno e germacreno D (SYLVESTRE *et al.*, 2007).

Nas folhas de *Protium heptaphyllum* foram detectados os sesquiterpenos derivados de cariofileno: 9-*epi*-(*E*)-cariofileno e 14-hidróxi-9-*epi*-(*E*)-cariofileno, além da *trans*-*iso*-longifolanona em maiores concentrações, e do monoterpeno β -felandreno (PONTES *et al.*, 2007). Uma composição similar de sesquiterpenos para o óleo essencial das folhas desta espécie foi observada por Bandeira *et al.* (2001), apresentando ainda grande concentração do monoterpeno mirceno.

O estudo dos óleos essenciais das folhas de quatro espécies de *Protium* (SIANI *et al.*, 1999b) mostrou maiores concentrações de α -humuleno, δ -cadineno e β -cariofileno em *P. grandifolium*, *P. lewellyni* e *P. hebetatum*. Já em *P. strumosum*, maiores

concentrações dos sesquiterpenos α - e β -selineno, e baixa concentração de β -cariofileno foram observadas no óleo essencial.

Em *Protium icicariba*, a composição do óleo essencial de suas folhas apresentou um percentual de monoterpenos de 23%, sendo os majoritários o α -terpineno e o α -terpinoleno, apresentando concentrações maiores para os sesquiterpenoides biciclogermacreno, α -copaeno e γ -elemeno (SIANI *et al.*, 2004).

Em 1964, a análise do óleo essencial dos galhos de *Bursera graveolens* detectou os monoterpenos limoneno, α -terpineol e carvona (CROWLEY, 1964). Um estudo recentemente publicado para a mesma espécie mostrou perfil similar com limoneno e α -terpineol como majoritários (YOUNG *et al.*, 2007).

2.4 Avaliação do Perfil Químico

A avaliação do perfil químico é uma importante ferramenta para comparação da composição química entre espécies, em especial quando utiliza-se numero de amostras e aplicam-se métodos quimiométricos. A análise do perfil cromatográfico de uma mesma família apresenta grande valor no conhecimento de sua composição, permitindo avaliar espécies que apresentem composição diferenciada, descartando assim estudos de fitoquímica clássica de espécies que levem a obtenção de substâncias já estudadas. Por outro lado, pode-se detectar espécies onde a presença de composição mais similares pode levar a obtenção de uma fonte exclusiva de um composto em específico.

Como ferramenta para confirmar a identificação das substâncias voláteis, Adams (2009) aplica o índice de retenção aritmético (*IR*) obtido em CG-DIC e a técnica de CG-EM.

Assim, duas substâncias com índices de retenção próximos podem ser diferenciadas por meio de seus espectros de massas.

Para o cálculo do *IR* são utilizadas condições cromatográficas específicas para a amostra e para os padrões de hidrocarbonetos (VAN DEN DOOL & KRATZ, 1963), aplicando os dados dos tempos de retenção coletados na seguinte equação,

$$IR = 100 \times P_z + 100 \left[\frac{(Rt_{(x)} - Rt_{(Pz)})}{(Rt_{(Pz+1)} - Rt_{(Pz)})} \right] \quad \text{eq. 1}$$

onde, P_z é o número de carbonos do padrão de hidrocarboneto que elui antes da substância de interesse (anterior ao $Rt_{(x)}$); $Rt_{(x)}$ é o tempo de retenção da substância de interesse, $Rt_{(Pz)}$ é o tempo de retenção do padrão de hidrocarboneto que possui eluição imediatamente anterior ao $Rt_{(x)}$, $Rt_{(Pz+1)}$ é o tempo de retenção do padrão de hidrocarboneto de eluição posterior ao $Rt_{(x)}$.

A espectrometria de massas pode ainda ser utilizada na determinação de triterpenos, pois segundo Djerassi *et al.* (1962); Budzikiewicz *et al.* (1963) e Ogunkoya (1981), o estudo estrutural de triterpenoides policíclicos pode ser usado facilmente através desta técnica.

Os espectros de massas desta classe de substâncias vêm sendo amplamente descritos desde a década de 50. Contudo, os mecanismos envolvidos nas fragmentações mesmo não sendo totalmente compreendido, começaram a ganhar destaque a partir da década de 60, promovendo a identificação de amostras complexas (DJERASSI *et al.*, 1962; BUDZIKIEWICZ *et al.*, 1963; THOMAS & WILLHALM, 1964; KARLINER & DJERASSI, 1966; OGUNKOIA, 1981; SHIOJIMA *et al.*, 1992; PAPAGEORGIOU *et al.*, 1997; ASSIMOPOULOU & PAPAGEORGIOU, 2005a & 2005b).

De-la-Cruz-Cañizares *et al.* (2005), avaliaram as oleorresinas de *Canarium luzonicum* e *Bursera cuneata*, utilizadas como verniz em pinturas. A análise realizada

mostrou variação entre as duas espécies, segundo o perfil por CG-EM. Contudo, a análise realizada apenas por CG-EM pode levar a considerações errôneas, não mostrando a veracidade da composição nas oleorresinas, principalmente se tratando dos compostos voláteis.

Para isto, Silva *et al.* (2009), ao estudarem o extrato em hexano de 7 espécies de *Protium*, realizaram a análise do IR por CG-DIC além da análise por CG-EM para a análise dos compostos voláteis, sendo os triterpenos identificados exclusivamente por CG-EM. Desta forma, este estudo apresentou um resultado mais confiável, pela utilização de duas técnicas de identificação.

Utilizando de índice de retenção e espectrometria de massas Siani *et al.* (2004) avaliaram a composição volátil, de hidrocarbonetos e triterpenoídica para a cera epicuticular obtida das folhas de *Protium icicariba*. Em um trabalho mais recente Siani *et al.* (2012) avaliaram apenas os triterpenos mais comuns de Burseraceae através de CG-EM, identificando assim triterpenos das séries oleanano, ursano, friedelano e tirucalano.

2.5 Potencial Citotóxico contra Linhagens de Células Tumorais

Uma das aplicações de substâncias obtidas de produtos naturais e de seus derivados é sua utilização no tratamento de câncer, iniciado na metade do Século XX, onde os alcaloides vimblastina e vincristina, extraídos de *Catharanthus roseus*; o taxol, um diterpeno alcaloídico extraído de *Taxus brevifolia*; o irinotecano e o topotecano, derivados semissintéticos da camptotecina, um alcalóide quinolínico extraído da *Camptotheca acuminata*; a lignana podofilotoxina e análogos extraídos de espécies de *Podophyllum* se destacam no tratamento de tumores (SOUZA *et al.*, 2007; MONTANARI & BOLZANI,

2001; GRAGG *et al.*, 2009; da ROCHA *et al.*, 2001; NEWMAN *et al.*, 2003; NEWMAN & GRAGG, 2007).

Os óleos-essenciais presentes na oleorresina e nas folhas de espécies de *Protium* mostraram efeito inibitório de crescimento das linhagens de células JJ74 (células monocíticas de rato), SP2/0 (célula de plasmocitoma de rato) e Neuro-2A (células neuroblastoma de rato). Este efeito foi atribuído principalmente à presença de monoterpenos nos óleos essenciais (SIANI *et al.*, 1999b). No óleo essencial das folhas de *Bursera simaruba*, foram observadas atividade citotóxica nas linhagens de células A-549 (carcinoma de pulmão humano) e DLD-1 (adenocarcinoma de colon humano), sendo descrito neste óleo essencial ativo os terpenóides limoneno, β -cariofileno, α -humuleno e germacreno D como constituintes majoritários (SYLVESTRE *et al.*, 2007).

Além do óleo essencial, extratos do caule e da folha vêm sendo testados na busca de novos agentes terapêuticos. Os extratos obtidos das cascas de *Protium heptaphyllum* e *P. unifoliolatum* foram avaliados em oito linhagens de células tumorais (TAYLOR *et al.*, 2006). A citotoxicidade para os extratos destas duas espécies foi observada apenas em duas linhagens de células tumorais A549 e CALU-6 (carcinoma de pulmão humano) para o extrato de *P. heptaphyllum*, e nas linhagens de células tumorais CALU-6 e CACO-2 (carcinoma de cólon humano) no extrato de *P. unifoliolatum*. Em ambas espécies, foram observadas atividade de inibição nas concentrações de 100 e 1000 $\mu\text{g/mL}$, não sendo observada atividade inibitória na concentração de 10 $\mu\text{g/mL}$.

O extrato etanólico da oleorresina de *Boswellia serrata*, contendo ácidos boswéllicos e seus derivados, foi avaliado contra linhagens de células de linfoblastoma humano (K-562 e MOLT-4), de leucemia promielocítica humana (HL-60), de leucemia monocítica humana (U937 e THP-1) e de glioblastoma cerebral humano (LN-18, LN-229). Nos ensaios de atividade citostática, os resultados demonstraram uma maior atividade contra

as linhagens de células leucêmicas K-562, U937 e MOLT-4. No estudo de morte celular foi observada apoptose através de mudanças morfológicas, sendo esta atividade confirmada através de métodos de detecção por citometria de fluxo de DNA marcado por iodeto de propidium (HOSTANSKA *et al.*, 2002).

Em ensaios utilizando extratos metanólicos de casca de *Boswellia dioscorides*, *B. socotrana* e *Commiphora ornifolia*, Mothana *et al.* (2009) obtiveram uma concentração inibitória mínima de 50% (CI₅₀) entre 18,4; e 29,0 µg/mL para a linhagem de célula tumoral 5637 (carcinoma de bexiga urinária humano) e entre 24,9; e 27,6 µg/mL para a linhagem de célula tumoral A-427 (carcinoma pulmonar humano). Já para o extrato metanólico da casca de *C. ornifolia* 5637 foram observadas CI₅₀ de 30,2; 38,5; e 35,1 µg/mL para as linhagens de células tumorais 5637, MCF-7 (carcinoma de mama humano) e A-427, respectivamente.

Outra avaliação de extratos, realizada para dez diferentes espécies de *Commiphora* avaliou o extrato das folhas e dos galhos obtidos por maceração em clorofórmio : metanol (1:1) (PARASKEVA *et al.*, 2008). Dentre as 10 espécies avaliadas apenas *Commiphora glandulosa* apresentou atividade para as três linhagens de células tumorais avaliadas, linhagem HT-29 (adenocarcinoma de colon), MCF-7 (adenocarcinoma humano de mama) e SF-268 (glioblastoma neuronal humano). As menores CI₅₀ contra as linhagens HT-29 foram obtidas do extrato das folhas de *C. glandulosa* (52,3 µg/mL), já para a linhagem MCF-7 a menor CI₅₀ foi obtida para o extrato dos galhos de *C. pyracanthoides* e *C. glandulosa* (20,6 e 24,3µg/mL, respectivamente), e para a linhagem SF-268, e o menor CI₅₀ foi obtido para o extrato das folhas de *C. pyracanthoides* (68,5 µg/mL).

Os estudos com espécies de Burseraceae não ficam apenas em óleos essenciais e extratos, alguns estudos buscam avaliar os compostos presentes em sua composição e até derivados semissintéticos.

Akihisha *et al.* (2006) avaliaram o potencial de dezesseis ácidos triterpênicos em três linhagens de células de neuroblastoma humano (IMR-32, NB-39 e SK-N-SH). As substâncias mais ativas contra a linhagem NB-39 foram os ácidos 11-oxo- β -boswélico, 3-acetil-11 α -metóxi- β -boswélico, 9,11-deidro- β -boswélico e 3 α -hidroxitirucala-7,24-dieno-21-óico, com atividade comparada (CI_{50} entre 13,4 e 28,2 mM) a do padrão cisplatina (CI_{50} 26,0 mM). Contra a linhagem SK-N-SH, os ácidos 3-acetil- α -boswélico (CI_{50} 24,0 mM), acetil-lupeóico (CI_{50} 4,7 mM) e 3 α -acetoxitirucala-7,24-dieno-21-óico (CI_{50} 22,2 mM) exibiram concentrações semelhantes ao padrão (CI_{50} 23,0 mM). Já para a linhagem IMR-32, apenas ácido acetil lupeóico apresentou maior atividade dentre os ácidos testado (CI_{50} 4,1 mM), contudo sua atividade foi muito inferior à cisplatina (CI_{50} 0,73 mM).

Em outro trabalho, uma mistura dos ácidos 3-acetoxi- α - e 3-acetoxi- β -boswélico (1:1) foi testada nas linhagens celulares de linfoblastoma humano (K-562), de leucemia promielocítica humana (HL-60, ML-1, SKNO-1 e NB4) e de leucemia monocítica humana (U937). Os dados sugeriram que a atividade citotóxica nas linhagens NB4 e HL-60 pela mistura destes ácidos triterpênicos esta associada à expressão dos mRNA DR4 e DR5, que leva a ativação indireta da enzima caspase-8, seguido de ativação da caspase-3 induzindo a morte celular por apoptose (Xia *et al.*, 2005).

Já os resultados obtidos para os triterpenos ácidos de esqueleto tirucalano, 3-oxo-tirucala-8,24-dieno-21-óico (Figura 14, pg. 42), 3 α -acetoxi-tirucala-8,24-dieno-21-óico e 3 β -acetoxi-tirucala-7,24-dieno-21-óico, mostraram atividade citotóxica frente às linhagens de células de câncer de próstata LNCaP e PC-3 (ESTRADA *et al.*, 2010). O estudo do mecanismo de ação destas substâncias demonstrou potencial como inibidores de proteína quinase B (Akt), levando a célula tumoral a morte por apoptose, sendo os triterpenos acetilados com maior potencial dentre os três ácidos.

Triterpenos de esqueleto cicloartano isolados por Shen *et al.* (2008) foram avaliados contra as linhagens de células de tumores de próstata humano, PC3 e DU145. Porém os estudos mostraram que as atividades destes triterpenos foram moderadas, não tendo sido dada continuidade aos estudos.

Os estudos atualmente estão avaliando derivados semissintéticos de triterpenos comuns de Burseraceae, como o de Chashoo *et al.* (2011), que avaliaram o efeito de derivado de ácido 11-oxo- β -boswélico, e de Barros *et al.* (2011) que avaliaram a citotoxicidade de quatro derivados dos triterpenos α - e β -amirina.

O ácido 3-O-propionil-11-oxo- β -boswélico (Figura 21 A), sintetizado a partir do ácido 11-oxo- β -boswélico foi avaliado contra oito linhagens de células tumorais humanas IMR-32, SF-295 (ambas de neuroblastoma), PC-3 (próstata), Colo-205 (cólon), MCF-7 (mama), OVCAR-5 (ovário), HL-60, Molt-4 (ambas de leucemia), apresentando significativa atividade citotóxica (CI₅₀ 7,11-15,9 μ g/mL) (CHASHOO *et al.*, 2011). Neste trabalho foi avaliado ainda o mecanismo de morte celular sendo observada ativação de apoptose nas células HL-60 associada à perda de membrana mitocondrial, liberação do citocromo C e ativação de caspases indutoras de clivagem de polimerase adenosina difosfato ribose e inibição de topoisomerasas I e II. Os estudos *in vivo* realizados em murinos revelaram que o ácido 3-O-propionil-11-oxo- β -boswélico apresenta atividade anticancerígena, sendo que estas investigações fornecem um apoio substancial para seu uso na quimioterapia.

Os quatro derivados dos triterpenos α - e β -amirina avaliados contra as linhagens de células tumorais HL-60, MDAMB-435 (melanoma humano), SF-295 (glioblastoma humano), HCT-8 (colon humano) (BARROS *et al.*, 2011) mostraram que o 3-O-carboximaleniato de α - e β -amirina (Figura 21B) apresentou citotoxicidade relevante contra a linhagens HL-60, apresentando valores de CI₅₀ de 0,94 μ g/ml (1,8 μ M) a 1,84 μ g/ml (3,0 μ M). O tratamento dos resultados obtidos em ensaios de análise morfológica,

fragmentação de DNA, externalização de fosfatidilserina e ativação das caspases 3 e 7 constataram que os efeitos citotóxicos pela mistura destes derivados esta relacionado a capacidade de ativação significativa das caspases 3 e 7 nas concentrações de 3 e 6 μM , respectivamente, sugerindo que esta mistura induz a morte celular por apoptose na linhagem celular HL-60.

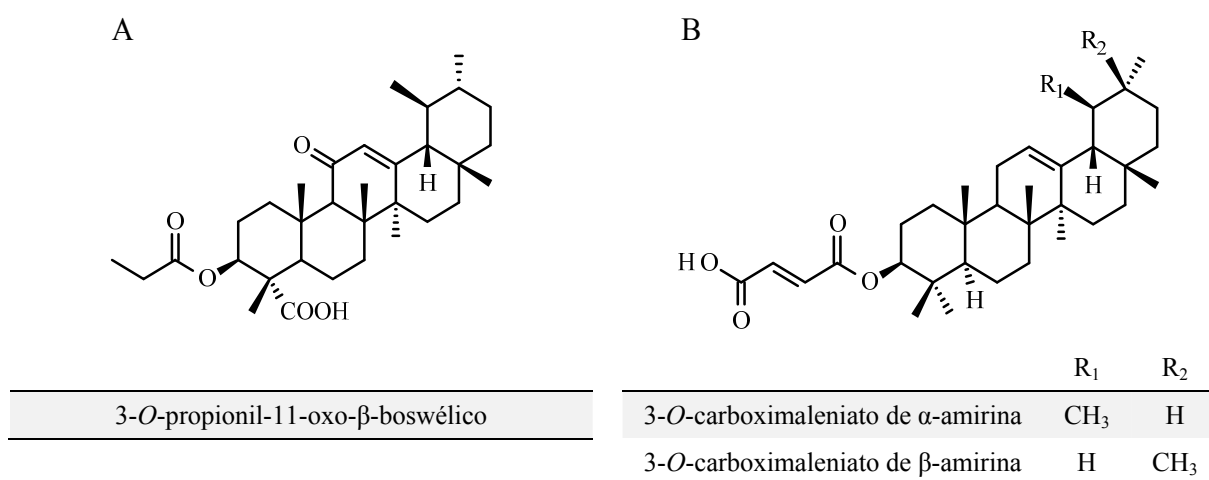


Figura 21: Derivados semissintéticos de triterpenos obtidos de Burseraceae com atividade citotóxica

3. METODOLOGIA

3.1 Amostras Analisadas

Os extratos das oleorresinas de Burseraceae constituem parte das amostras armazenadas do Projeto de Pesquisa Breus da Amazônia do Grupo de Pesquisa Química de Biomoléculas da Amazônia (Q-BiomA). As coletas foram realizadas em várias localidades da Amazônia Brasileira, além de uma amostra proveniente de Pernambuco.

Na Tabela 3 apresentam-se as espécies coletadas para o desenvolvimento deste trabalho, apresentando as siglas utilizadas em imagens, gráficos e Tabelas, o número de registro de exsicata e período de coleta. Partes das espécies coletadas na Reserva Florestal Ducke fizeram parte do Projeto Flora da Reserva Ducke, onde se encontram identificadas e catalogadas.

Tabela 3: Espécies de Burseraceae coletadas e número de exsicata.

NOME CIENTÍFICO	ABREVIATURA	EXSICATA	PERIODO DE COLETA
<i>Dacryodes hopkinsii</i>	DHO	184970 ^(a)	2007
<i>Protium apiculatum</i>	PAP	178204 ^(a)	Junho/2009
<i>P. aracouchini</i>	PAR	178230 ^(a)	Novembro/2006
<i>P. bahianum</i>	PBA	23455 ^(b)	2007
<i>P. decandrum</i>	PDE	191302 ^(a)	Novembro/2006
<i>P. divaricatum</i> ssp. <i>divaricatum</i>	PDD	181013 ^(a)	2007
<i>P. elegans</i>	PEL	PFRD-(2691) ^(c)	Novembro/2006
<i>P. cf. ferrugineum</i>	PFE	178251 ^(a)	Novembro/2006
<i>P. gallosum</i>	PGA	191895 ^(a)	2007
<i>P. giganteum</i> var. <i>giganteum</i>	PGG	178269 ^(a)	2007
<i>P. heptaphyllum</i> ssp. <i>ullei</i>	PHU	191293 ^(a)	Novembro/2006
<i>P. cf. laxiflorum</i>	PLA	PFRD-(1668) ^(c)	Novembro/2006
<i>P. nitidifolium</i>	PNI	191312 ^(a)	Outubro/2009
<i>P. cf. opacum</i> var. <i>opacum</i>	POO	PFRD-(1616) ^(c)	Novembro/2006
<i>P. paniculatum</i> var. <i>modestum</i> (syn. <i>P. paniculatum</i> var. "Nova")	PPM	1413737 ^(d) 191303 ^(a)	Novembro/2006
<i>P. paniculatum</i> var. <i>riedelianum</i>	PPR	191892 ^(c)	Novembro/2006
<i>P. polybotryum</i> ssp. <i>blackii</i>	PPB	178196 ^(a)	Novembro/2006
<i>P. cf. rubrum</i>	PRU	178234 ^(a)	2007
<i>P. spruceanum</i>	PSP	189706 ^(a)	2007
<i>P. strumosum</i>	PST	178257 ^(c)	Novembro/2006
<i>P. tenuifolium</i>	PTE	PFRD-(1654) ^(c)	Novembro/2006
<i>Tetragastris panamensis</i>	TPA	191311 ^(a)	2007
<i>Trattinnickia glaziovii</i>	TGL	178266 ^(a)	2007
<i>Trattinnickia peruviana</i>	TPE	PFRD-(3280) ^(c)	Novembro/2006

^(a) Exsicata depositada no Herbário do INPA, parte do Projeto Flora da Reserva Ducke; ^(b) Amostra cedida pelo Prof. Dr. Claudio Câmara, depositada no Herbário Vasconcelos Sobrinho da UFRPE; ^(c) Indivíduos catalogados no Projeto Flora da Reserva Ducke sem flores/frutos [PFRD-(número de catalogação no projeto)]; ^(d) Exsicata depositada no Herbário do Jardim Botânico de Nova Iorque, proveniente do Projeto Flora da Reserva Ducke.

3.1.1 Obtenção dos Extratos

Os extratos foram obtidos no projeto de mestrado em Química da Universidade Federal do Amazonas intitulado “Estudo Fitoquímico do Óleo-resina de Espécies da Família Burseraceae”, de 2008, com exceção da maceração da segunda amostra de *Protium apiculatum* (PAP-2) e da segunda amostra de *Protium nitidifolium*.

As amostras foram limpas manualmente e armazenadas em refrigerador até o procedimento de extração. A extração foi realizada submetendo as amostras das oleorresinas a cinco extrações para cada solvente em ordem crescente de polaridade (Figura 22). Como solventes foram utilizados hexano P.A. destilado e acetato de etila P.A. destilado. A fração insolúvel em acetato de etila foi avaliada anteriormente (RÜDIGER, 2008). Os extratos foram filtrados e submetidos à concentração em evaporador rotatório sob pressão reduzida. As amostras foram transferidas para frascos de vidro, cobertos por folhas de alumínio, secas à temperatura ambiente, e posteriormente acomodados em dessecador até a pesagem e cálculo de rendimento (Tabela 4). Após, as amostras foram cuidadosamente vedadas e armazenadas em refrigerador.

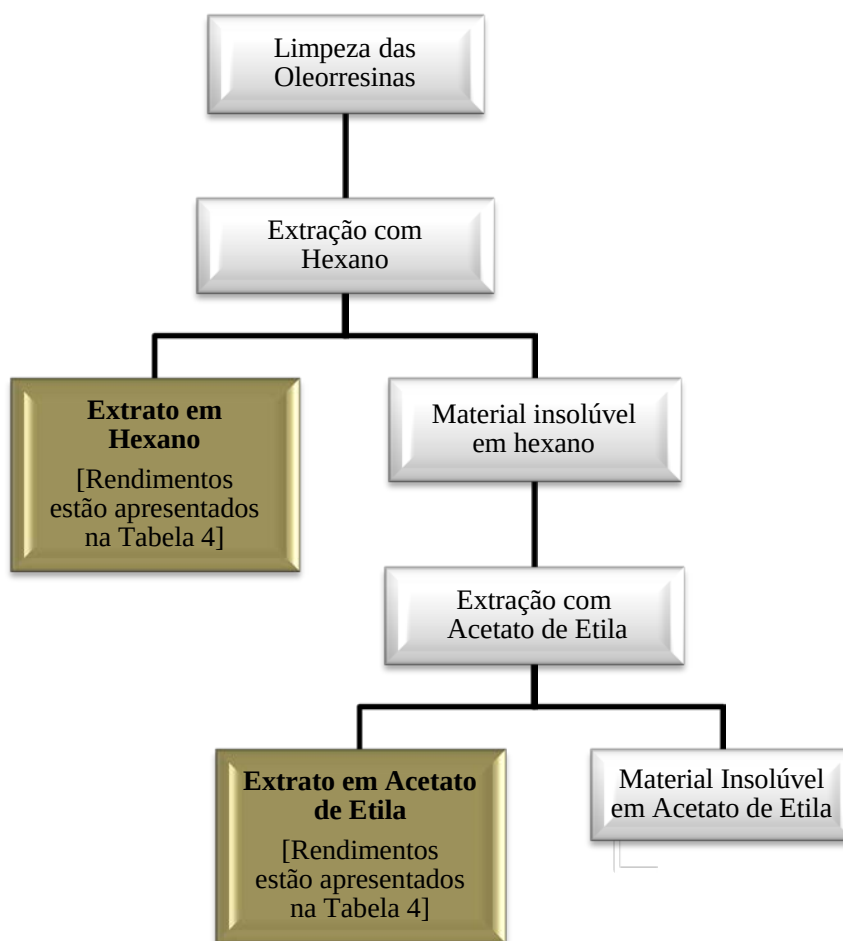


Figura 22: Diagrama de extração das oleorresinas das Burseraceae

Tabela 4: Rendimento dos extratos das amostras de Burseraceae

Amostra	Oleorresina	Extrato em Hexano		Extrato em Acetato de Etila	
	Massa (g)	Massa (g)	Rendimento (%)	Massa (g)	Rendimento (%)
DHO	0,4912	0,1401	28,5	0,0058	1,2
PAP	100,84	51,6471	51,2	46,6791	46,3
PAR	3,0986	1,5440	49,8	1,3010	42,0
PBA	20,7891	13,4082	64,5	5,6054	27,0
PDE	0,6478	0,2677	41,3	0,3158	48,7
PDD	0,0148	0,0101	68,2	0,0018	12,2
PEL	0,4775	0,1574	33,0	0,1765	37,0
PFE	4,1815	3,8385	91,8	0,0561	1,3
PGA	0,0348	0,013	37,4	0,0089	25,6
PGG	1,8918	1,2867	68,0	0,235	12,4
PHU	12,0048	5,4526	45,4	5,1758	43,1
PLA	0,2897	0,2326	80,3	0,0061	2,1
PNI	8,8954	6,1222	68,8	1,5473	17,4
POO	0,8080	0,3557	44,0	0,1504	18,6
PPM	45,3800	9,8987	21,8	27,8791	61,4
PPR	25,1513	18,2432	72,5	4,6516	18,5
PPB	0,7715	0,6117	79,3	0,1092	14,2
PRU	0,1661	0,0389	23,4	0,0606	36,5
PSP	5,8182	2,0922	36,0	2,7146	46,7
PST	36,6724	18,0321	49,2	12,3967	33,8
PTE	8,0093	2,4274	30,3	5,0044	62,5
TPA	14,0502	3,4997	24,9	9,1362	65,0
TGL	1,5136	0,7679	50,7	0,4657	30,8
TPE	30,0026	20,1008	67,0	0,5625	1,9

3.2 Perfil Químico dos Extratos em Hexano

O perfil químico dos compostos voláteis presentes no extrato em hexano das oleorresinas foi obtido pelo Índice de Retenção Aritmético (*IR*) e a comparação dos espectros de massas, segundo Adams (2009). A técnica é utilizada para a identificação de substâncias voláteis em óleos essenciais, podendo ser utilizada para a detecção destes mesmos compostos voláteis em extratos obtidos em hexano. Para o cálculo do *IR* foram utilizadas condições cromatográficas específicas para a amostra e para os padrões de hidrocarbonetos (de C9 a C20).

A avaliação dos compostos não voláteis, como os triterpenos, comuns em oleorresinas de Burseraceae, foi realizada pela comparação dos espectros de massas obtidos por CG-EM com os espectros descritos em literatura.

3.3 Técnicas para separação, isolamento e purificação

3.3.1 Cromatografia em Camada Delgada (CCD)

A avaliação do comportamento cromatográfico de cada amostra foi avaliada por Cromatografia em Camada Delgada (CCD). Para as análises de CCD foram utilizadas placas cromatográficas de gel de sílica CF60 da Sorbent Thecnologies de 5 cm de comprimento e 4 cm de percurso cromatográfico. As amostras foram aplicadas em ponto com uma distância de 0,5 cm entre as amostras. Foram avaliados solventes puros e mistura binárias, ternárias e quaternárias com os solventes n-hexano, diclorometano, éter etílico, clorofórmio, acetato de etila, isopropanol, acetona, etanol e metanol. As separações foram observadas pelos

reveladores físicos UV 365 nm, UV 254 nm e iodo, e pelos reveladores químicos, sulfato cérico IV e vanilina sulfúrica.

3.3.2 Cromatografia em Coluna Aberta em Fase Normal (CC)

Os extratos submetidos à cromatografia em coluna aberta em fase normal utilizaram como fase estacionária gel de sílica Silicycle G60 (70-230 mesh). As eluentes utilizados nos processos foram determinados por CCD. A relação de massa de amostra para massa de sílica seguiu as seguintes proporções:

As CC foram realizadas em colunas de vidro com diâmetro interno ($\varnothing_{\text{int.}}$) de 1 cm, 1,5 cm, 2 cm, 3,5 cm e 4 cm. As colunas foram preparadas com uma base inferior de algodão (1 cm de altura) e uma camada de areia tratada (0,5cm de altura, máximo), base esta de suporte para o gel de sílica.

3.3.3 Cromatografia em Coluna “Flash” (CCF)

A cromatografia em coluna “Flash” foi utilizada para isolamento de substâncias que apresentaram uma diferença do fator de retenção (ΔR_f) por CCD igual ou maior que 0,1 na fração a ser aplicada a técnica. Foi realizado o procedimento descrito por Still, Khan & Mitra (1978), sendo utilizado como fase estacionaria gel de sílica Silicycle SiliaFlash F60 (230-400 mesh), com sistema de eluente isocrático, sob pressão de 2 lbf/pol². A altura da coluna de gel de é estipulado em 15 cm, sendo o volume de eluente, o diâmetro interno da

coluna, a quantidade de frações e a massa de amostra determinado pelo ΔR_f , como mostra a Tabela 5.

Tabela 5: Especificações para Cromatografia em Coluna “Flash”

Diâmetro Interno da Coluna	Volume de Eluente	Massa de Amostra Utilizada (mg)		Volume coletado em cada fração
(mm)	(mL)	$\Delta R_f \geq 0,2$	$\Delta R_f \geq 0,1$	(mL)
10	100	100	40	5
20	200	400	160	10
40	600	1600	600	30

Tabela adaptada de Still, Khan & Mitra (1978)

3.3.4 Cromatografia em Coluna com Gel de Sílica Impregnada com KOH (CTI)

Para a obtenção de ácidos de natureza terpênica de extratos em acetato de etila da oleorresina, estes foram submetidos à cromatografia em coluna com gel de sílica impregnado com KOH (CTI), segundo descrito por Pinto *et al.*, (2000). A técnica consiste em fracionar a amostra em duas partes, uma fração de substâncias não ácidas (constituída de hidrocarbonetos e álcoois), e uma fração ácida, obtida na forma de sais de potássio.

3.3.4.1 Preparo da Sílica

A sílica impregnada com KOH foi preparada adicionando 50 mL de solução de KOH 10% em 100g de gel de sílica 70-230 mesh da Sorbent Technologies, obtendo assim, um gel de sílica totalmente umidificado. Após a preparação, o gel de sílica foi seco em estufa

a 100 °C por 24h obtendo uma secagem total da mesma. O gel de sílica impregnado com KOH foi armazenado em recipiente de plástico até sua utilização.

3.3.4.2 Método Cromatográfico Utilizando Sílica Impregnada com KOH

O processo de CTI ocorre em duas etapas: a etapa 1 consistiu em coletar duas frações: uma primeira onde se utilizou diclorometano, e uma segunda fração onde se utilizou metanol. A fração eluída em diclorometano deu origem a fração de não ácidos e a fração obtida em metanol (fração de sais de potássio) é acidificada na etapa 2 e extraída com diclorometano, dando origem a fração de ácidos terpênicos (Figura 23).

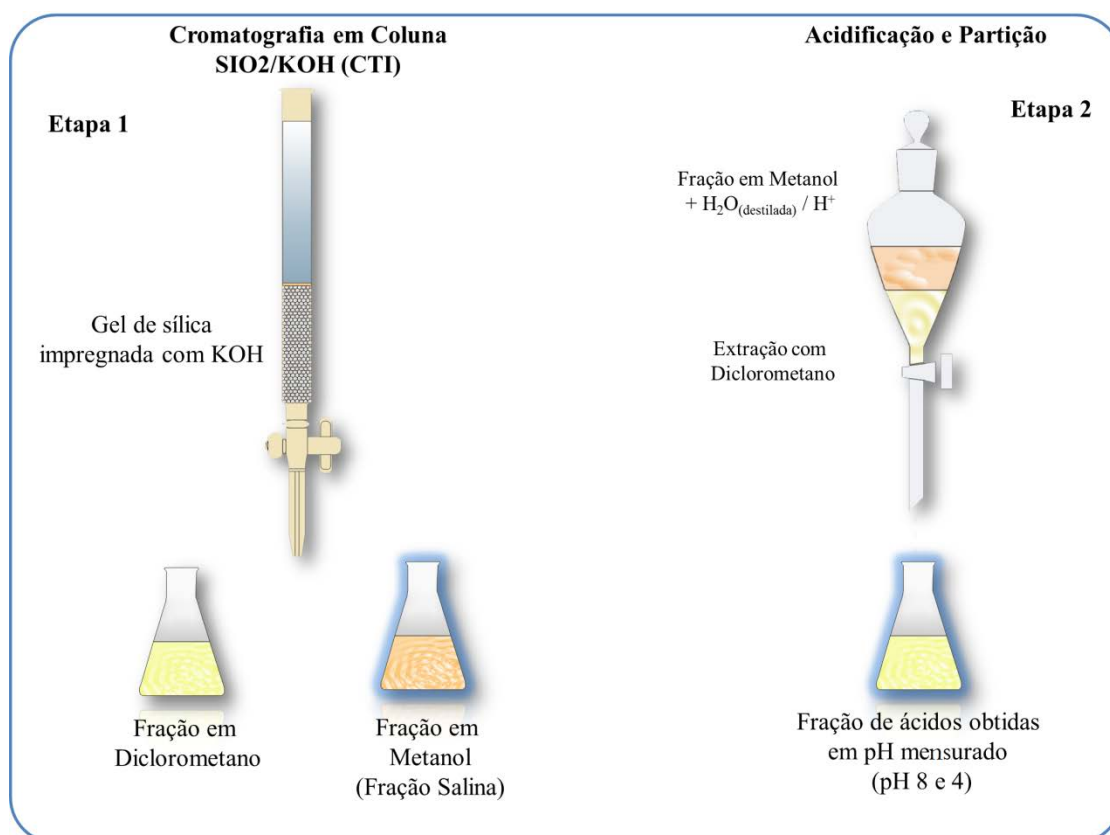


Figura 23: Esquema do processo de cromatografia de com sílica impregnada com KOH

O fracionamento utilizou 10 g de gel de sílica impregnado com KOH para cada grama de extrato obtido em hexano e entre 20 e 30 g de gel de sílica impregnado com KOH para cada 1 g de extrato obtido em acetato de etila.

As frações em metanol foram concentradas imediatamente em evaporador rotatório sob pressão reduzida. Após a concentração foram adicionados 30 mL de $H_2O_{(destilada)}$ e a solução transferida para um funil de separação contendo 30 mL de diclorometano (DCM) e agitado vigorosamente (neste processo ocorre a formação de uma emulsão devido à presença dos sais orgânicos de potássio).

Foram realizadas leituras do pH inicial da solução (pH entre 11 e 14), e em seguida a solução foi acidificada adicionando HCl 1N (a leitura do pH foi realizada utilizando pHmetro Digimed, modelo DM-22).

A solução salina obtida do extrato em hexano foi acidificada até pH 4. Em seguida procedeu-se com cinco extrações de 30 mL de diclorometano, dando origem uma fração de ácidos obtida neste pH.

As soluções salinas obtidas de extratos em acetato de etila foram acidificadas até pH 8, onde se procedeu com cinco extrações de 30 mL de DCM, dando origem uma fração de ácidos obtida no pH 8 (é necessária a adição de uma solução de NaCl saturada seguido de agitação até a quebra da emulsão). Após a extração das frações no pH 8, as soluções foram acidificadas até pH 4, onde se procedeu também com cinco extrações de 30 mL de DCM, dando origem uma fração de ácidos obtida no pH 4.

3.3.5 Recristalização

Em sistemas onde uma substância apresenta-se majoritária na forma de cristais contendo contaminantes, e que apresentem dificuldade de separação pelos processos de cromatografias clássicos, utilizou-se a técnica de recristalização visando obter a substância majoritária cristalizada e a substância minoritária (contaminante) dissolvida no solvente utilizado (água mãe). Para este processo ser eficiente, são necessárias no mínimo três recristalizações. Para cada amostra um solvente (ou mistura de solventes) em específico foi utilizado.

3.4 Análises Instrumentais

3.4.1 Cromatografia a Gás com detector de Ionização de Chama (CG-DIC)

Os extratos obtidos em hexano de 23 espécies da família Burseraceae foram analisados em CG-DIC modelo GC 2010 da Shimadzu. Para a análise foram utilizadas as seguintes condições, temperatura do injetor: 250 °C; modo de injeção: split 1:10, gás de arraste: hélio (He), fluxo de 1,00 mL/min. Coluna CPSIL 5CB (15 m x 0,25 mm x 0,25 µm). A programação do forno teve como temperatura inicial de 60°C com gradiente de 2°C/min até 180 °C, seguido de um gradiente de 20°C/min até 260 °C com um novo gradiente de 2 °C/min até 290 °C com isoterma de 15 min. Total: 94 min. Temperatura do Detector: 300 °C. As áreas determinadas por integração dos picos gerados no cromatograma foram utilizadas para a quantificação das substâncias. Os cromatogramas foram obtidos na Central Analítica do Centro da Biotecnologia da Amazônia (CBA).

3.4.2 Espectrometria de Massas

3.4.2.1 Cromatografia a Gás com detector de Espectrômetro de Massas (CG-EM)

O cromatograma de íons totais (TIC) e os espectros de massas foram obtidos em cromatógrafo a gás modelo GC6890 da Agilent com detector espectrômetro de massas modelo MS5673 no Instituto de Química da Universidade Federal do Rio de Janeiro e no cromatógrafo a gás com detector espectrômetro de massas modelo QP-2010 da Shimadzu, na Central Analítica do Centro de Biotecnologia da Amazônia.

Para a análise do Perfil químico, os TIC's dos extratos em hexano de 23 espécies foram obtidos em cromatógrafo a gás modelo GC6890 da Agilent. Para a análise foram utilizadas as seguintes condições, temperatura do injetor: 250 °C; modo de injeção: split 1:10, gás de arraste: hélio (He), fluxo de 1,00 mL/min. Coluna DB-5 (5%fenil 95%metilpolisiloxano) da Agilent (30m x 0,25mm x 0,25 µm). Foi utilizada a mesma programação de temperatura do forno do CG-DIC. Os espectros de massas foram obtidos por Impacto Eletrônico (70eV).

Para as análises das frações puras e semi-puras, os TIC foram obtidos em cromatógrafo a gás com detector espectrômetro de massas modelo QP-2010 da Shimadzu. Para a análise foram utilizadas as seguintes condições, temperatura do injetor: 250 °C; modo de injeção: split 1:10, gás de arraste: hélio (He), fluxo de 1,00 mL/min. Coluna DB-5 (5% fenil, 95% metilpolisiloxano) da Agilent (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm). A programação do forno teve como temperatura inicial de 60 °C até 250 °C (10 °C/min), seguido de um gradiente de 250 °C até 290 °C (3 °C/min), e em 290 °C a aplicação de isoterma de 10min. Os espectros de massas foram obtidos por ionização gerada por Impacto Eletrônico (70eV).

3.4.2.2 Espectrometria de Massas por Captura de Íons (EMCI)

Os íons *Quasi* moleculares e seus fragmentos foram adquiridos em espectrômetro de massa por captura de íons LCQ-*Fleet*, da Thermo Fisher Scientific, localizado na Central Analítica da UFAM sob supervisão do Prof. Dr. Afonso Duarte de Souza. As amostras foram solubilizadas em metanol HPLC na concentração de $10 \mu\text{g.mL}^{-1}$, pré-ionizadas com $10 \mu\text{L}$ de NH_3OH , e injetadas por inserção direta no espectrômetro de massas com fluxo de $30 \mu\text{L/min}$. Posteriormente, as amostras foram infundidas por uma bomba de injeção automática com um fluxo contínuo de $10 \mu\text{L/min}$ e ionizadas por eletrospray (IES), sendo os íons observados no modo negativo $[\text{M} - \text{H}]^-$. Os Espectros de Massas por Captura de Íons foram editados no software Xcalibur 2.0.7.

3.4.3 Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear

Os experimentos de ressonância magnética nuclear (RMN) unidimensional e bidimensional foram realizados em espectrômetro INOVA-500 da Varian, localizado na Central Analítica do CBA. Os espectros unidimensionais de RMN ^1H foram operados em 500 MHz, de RMN ^{13}C com Hidrogênio Desacoplado e de Intensificação da Distorção por Transferência de Polarização (DEPT – distortionless enhancement by polarization transfer) foram operados 125 MHz. Foram realizados ainda os experimentos de correlação espectroscópica homonuclear (COSY), de correlação heteronuclear múltiplo-quântica (HSQC) e de coerência heteronuclear através de muitas ligações (HMBC).

Como solvente das amostras foram utilizados clorofórmio deuterado (CDCl_3), acetona deuterada ($\text{D}_3\text{CC}(=\text{O})\text{CD}_3$) e metanol deuterado (D_3COD), informação detalhada individualmente nos espectros.

Como referência para os deslocamentos químicos (δ) dos espectros de RMN ^1H e RMN ^{13}C foram utilizados os δ conhecidos dos solventes utilizados. Os FID's (Decaimento de Indução Livre, do inglês "Free Induction Decay") obtidos foram convertidos para o domínio de frequências de ressonância através do software ACD/NMR Processor Academic Edition versão 12.01 da Advanced Chemistry Development, Inc (ACD Labs).

3.5 Análise Estatística Multivariada

As análises estatísticas multivariadas foram realizadas utilizando Software R, versão 2.14.0 com pacote RcmdrPlugin.FactoMineR v.1.01., um programa de software livre desenvolvido pelo R Development Core Team (2011). Os dados obtidos por cromatografia em fase gasosa foram submetidos à Análise de Componentes Principais (PCA) e Agrupamento Hierárquico dos Componentes Principais (HCPC).

3.6 Determinação da Atividade Antitumoral *in vitro*

A atividade antitumoral foi avaliada por Varredura de Alta Capacidade (HTS - high throughput screening) contra as linhagens de células cancerígenas HCT-8 (cólon humano), MDA/MB-435 (melanoma de mama humano) e SF-295 (glioblastoma humano) pelo método do MTT, semelhante ao utilizado no programa de *screening* do *National Cancer Institute* dos

Estados Unidos (NCI), que testa mais de 10.000 amostras a cada ano (SKEHAN *et al.*, 1990). É um método rápido, sensível e barato, descrito primeiramente por Mosman (1983), tendo a capacidade de analisar a viabilidade e o estado metabólico da célula. É uma análise colorimétrica baseada na conversão do sal 3-(4,5-dimetil-2-tiazol)-2,5-difenil-2-H-brometo de tetrazolium (MTT) em azul de formazan, a partir de enzimas mitocondriais presentes somente nas células metabolicamente ativas. O estudo citotóxico pelo método do MTT permite definir facilmente a citotoxicidade, mas não o mecanismo de ação (BERRIDGE *et al.*, 1996).

As amostras de 14 extratos obtidos em hexano e 14 extratos obtidos em acetato de etila da oleorresina de diferentes espécies de Burseraceae foram dissolvidas em DMSO puro estéril e testadas na concentração final de 50 µg/mL. Os experimentos foram realizados no Laboratório de Oncologia Experimental da Universidade Federal do Ceará sob supervisão da Prof^a. Dr^a. Cláudia do Ó Pessoa.

3.6.1 Material

As linhagens tumorais foram cedidas pelo Instituto Nacional do Câncer (EUA), tendo sido cultivadas em meio RPMI 1640, suplementados com 10 % de soro fetal bovino e 1 % de antibióticos, mantidas em estufa a 37 °C e atmosfera contendo 5% de CO₂.

3.6.2 Avaliação da Atividade Antitumoral *in vitro*

As células foram plaqueadas na concentração de $0,1 \times 10^6$ cél/mL para as linhagens MDA/MB-435 e SF-295 e $0,7 \times 10^5$ cél/mL para a linhagem HCT-8. Em seguida

foram adicionadas as amostras na concentração final de 50ug/mL. As placas foram incubadas por 72 horas em estufa a 5% de CO₂ a 37°C. Ao término deste, as mesmas foram centrifugadas e o sobrenadante, removido. Em seguida, foram adicionados 150 µL da solução de MTT (sal de tetrazolium), e as placas foram incubadas por 3h. A absorbância foi lida após dissolução do precipitado com 150 µL de DMSO puro em espectrofotômetro de placa a 595nm.

Os experimentos foram analisados segundo a média $\pm$ desvio padrão da média (DPM) da porcentagem de inibição do crescimento celular usando o programa *GraphPad Prism*.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A presente Tese deu continuidade ao estudo fitoquímico da família Burseraceae do grupo de pesquisa Q-BiomA iniciado em 2005 (RÜDIGER, 2008), quando foram obtidos perfis dos extratos em hexano através de cromatografia em camada delgada (CCD) e cromatografia a gás com detector de ionização de chama (CG-DIC) e dos extratos em acetato de etila através de CCD. No estudo anterior foram analisadas oleorresinas de 31 espécies do Brasil, sendo 28 amazônicas, permitindo avaliar as semelhança e diferenças químicas destes indivíduos por análise estatística multivariada.

A varredura e a análise do perfil cromatográfico do trabalho anterior permitiram a observação de espécies de composição diferenciada, com constituintes distintos dos triterpenos α e β -amirina, por exemplo, e extratos com constituintes que não puderam ser identificados e que, portanto, poderiam tratar-se substâncias inéditas na família Burseraceae. Apesar de toda a composição das oleorresinas terem sido observadas, no trabalho anterior só o perfil de triterpenos foi descrito, não se fazendo menção aos compostos voláteis.

O presente trabalho possui duas partes distintas: A definição do perfil químico/cromatográfico das espécies amazônicas e o isolamento de substâncias de interesse químico e biológico.

Na primeira parte, a composição química de extratos obtidos em hexano das oleorresinas de 23 espécies de Burseraceae amazônicas foi obtida por meio do cálculo do índice de retenção e por espectrometria de massas para a composição volátil; e pelo tempo de retenção relativo e espectrometria de massas para a composição triterpênica.

A segunda parte constituiu-se no isolamento e identificação por técnicas espectroscópicas e espectrométricas de substâncias das oleorresinas de Burseraceae, sendo nesta parte inserida uma espécie nordestina, a *Protium bahianum*. A seleção das amostras a serem submetidas a processos de isolamento foi realizada por três métodos:

1. O extrato em hexano de *Protium* cf. *ferrugineum* foi selecionado para o fracionamento cromatográfico pelo perfil singular obtido por CG-DIC e CG-MS realizados neste trabalho.
2. Os extratos em acetato de etila de *Protium bahianum*, *P. paniculatum* var. *modestum* e *Tetragastris panamensis* foram selecionados para o fracionamento cromatográfico por apresentarem perfis diferenciados por CCD em projeto desenvolvido anteriormente;
3. O extrato em hexano de *Trattinnickia peruviana* foi selecionado pela citotoxicidade contra as linhagens de células tumorais HCT-8 e SKF-295 superior a 80%, em ensaios realizados para 14 extratos em hexano avaliados e 14 extratos em acetato de etila avaliados para a citotoxicidade no Laboratório de Oncologia Experimental da Universidade Federal do Ceará.

Ao final, foram discutidas as implicações quimiossistemática que este trabalho inferiu sobre a composição química da família Burseraceae.

4.1 Perfil Químico de Extratos em Hexano de Oleorresinas de Burseraceae Amazônicas

A investigação dos extratos em hexano das oleorresinas de Burseraceae foi realizada por cromatografia em fase gasosa com detector de ionização de chama (CG-DIC) e espectrometria de massas (CG-EM). Por meio da análise direta dos cromatogramas e espectros de massas foi possível determinar as regiões da fração volátil e da fração triterpênica, cujas concentrações são apresentadas na Tabela 6.

Tabela 6: Variação de compostos voláteis e triterpenos nos extratos em hexano das oleorresinas de Burseraceae

Espécie	Amostra	Concentração (%)	
		Voláteis	Triterpenos
<i>Dacryodes hopkinsii</i>	DHO	5,2	94,8
<i>Protium apiculatum</i>	PAP	32,6	67,4
<i>P. aracouchini</i>	PAR	4,0	96,0
<i>P. decandrum</i>	PDE	4,7	95,3
<i>P. divaricatum</i> ssp. <i>divaricatum</i>	PDD	0,9	99,1
<i>P. elegans</i>	PEL	8,0	92,0
<i>P. cf. ferrugineum</i>	PFE	18,3	81,7
<i>P. gallosum</i>	PGA	2,7	97,3
<i>P. giganteum</i> var. <i>giganteum</i>	PGG	6,0	94,0
<i>P. heptaphyllum</i> ssp. <i>ullei</i>	PHU	7,9	92,1
<i>P. cf. laxiflorum</i>	PLA	5,3	94,7
<i>P. nitidifolium</i>	PNI	15,6	84,4
<i>P. cf. opacum</i> var. <i>opacum</i>	POO	77,1	22,9
<i>P. paniculatum</i> var. <i>modestum</i>	PPM	6,0	94,0
<i>P. paniculatum</i> var. <i>riedelianum</i>	PPR	2,7	97,3
<i>P. polybotryum</i> ssp. <i>blackii</i>	PPB	24,6	75,4
<i>P. cf. rubrum</i>	PRU	17,4	82,6
<i>P. spruceanum</i>	PSP	1,7	98,3
<i>P. strumosum</i>	PST	4,3	95,7
<i>P. tenuifolium</i>	PTE	56,4	43,6
<i>Tetragastris panamensis</i>	TPA	63,1	36,9
<i>Trattinnickia glaziovii</i>	TGL	3,7	96,3
<i>Trattinnickia peruviana</i>	TPE	2,4	97,6

A composição volátil das 23 espécies analisadas apresentou uma média de 16,1%, variando entre os valores de 0,92 a 77,15% para *P. divaricatum* var. *divaricatum* e *P. opacum* var. *opacum*, respectivamente. Já os triterpenos apresentaram uma média de 83,87%, com variação de 22,86 a 99,07% para *P. opacum* var. *opacum* e *P. divaricatum* var. *divaricatum*, respectivamente.

Estas concentrações podem ser relacionadas à descrição de Costa (1975), em que oleorresinas a composição volátil pode variar de 7 a 8% em oleorresinas cristalizadas e de 20 a 30% em oleorresinas recém-exsudadas. Desta forma, avaliando as concentrações apresentadas na Tabela 6, podemos determinar que as espécies *Protium apiculatum*, *P. cf. ferrugineum*, *P. nitidifolium*, *P. opacum* var. *opacum*, *P. polybotryum* ssp. *blackii* e *P. cf. rubrum*, *P. tenuifolium* e *Tetragastris panamensis* se tratam de oleorresinas com exsudação mais recente que as demais amostras analisadas.

4.1.1 Composição Volátil dos Extratos em Hexano das Oleorresinas

Com a análise dos dados obtidos por CG-DIC e CG-EM, e a aplicação dos tempos de retenção dos compostos voláteis e dos padrões de hidrocarbonetos na fórmula de Van den Dool & Kratz (1963) foi possível identificar grande variedade de monoterpenos, sesquiterpenos, e três derivados benzílicos (Tabela 7).

Tabela 7: Composição volátil dos extratos em hexano das oleorresinas de Burseraceae Amazônicas

SUBSTÂNCIA	Rt	IR _{Calc}	CONCENTRAÇÃO RELATIVA (%)																						
			DHO	PAP	PAR	PDE	PEL	PDD	PFE	PGA	PGG	PHU	PLA	PNI	POO	PPM	PPR	PPB	PRU	PSP	PST	PTE	TPA	TGL	TPE
α-pineno	4,39	933	-	5,14	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1,56	-	-	1,18	-	-	-	0,17	1,12	0,85	-	-
canfeno	4,68	947	-	0,25	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1,59	0,93	-	0,52
sabineno	5,28	972	-	2,71	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1,11	-	-	0,20	-	-	0,26	-	-	-	-	-
β-pineno	5,38	980	-	1,73	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,57	-	-	0,25	-	-	-	-	-	-	-	-
α-felandreno	6,18	1005	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,18	-	-	-	-	-	-	-	-	-
p-menta-1-eno	6,27	1012	-	0,43	-	0,40	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
δ-3-careno	6,43	1014	-	-	-	-	-	-	-	-	2,15	-	-	-	-	-	-	-	-	0,17	-	-	-	-	-
p-cimeno	6,68	1022	-	2,40	-	1,35	-	-	-	-	1,70	1,19	-	0,41	-	1,64	0,24	-	-	0,24	1,52	-	-	0,24	1,72
limoneno	7,00	1025	-	0,54	0,28	-	-	-	-	-	-	-	-	4,20	-	-	-	-	-	-	0,56	-	-	-	-
β-felandreno	6,94	1025	-	-	-	-	-	-	-	-	0,52	-	-	-	-	0,82	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1,8-cineol	7,01	1025	-	0,20	0,14	-	-	-	-	-	0,20	0,43	-	-	-	0,36	0,18	-	-	-	-	-	-	-	-
hidrato de cis-sabineno	8,20	1062	-	0,91	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1,08	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,43
fenchona	8,73	1077	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,07	-	-
hidrato de trans-sabineno	9,30	1092	-	0,39	-	-	-	-	-	-	-	0,13	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
óxido de α-pineno	9,42	1099	-	0,42	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
trans-p-menta-2,8-dieno-1-ol	9,65	1111	-	1,01	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,30	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
α-canfolenal	10,31	1121	-	0,56	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
trans-pinocarveol	10,82	1136	-	0,85	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,32	-	-
trans-verbenol	11,42	1139	-	1,50	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,16	-	-
trans-diidro-α-terpineol	11,44	1140	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,99	-	-	-
canfora	10,91	1142	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,17	-	-	-	-	-	0,49	-	-
hidrato de canfeno	11,09	1147	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,19	-	-
p-mentano-1-ol	11,76	1156	-	-	-	0,17	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
borneol	12,34	1163	-	0,28	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,27	-	-
terpinen-4-ol	13,03	1173	-	0,78	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1,25	-	-	0,14	-	-	0,15	-	-	0,25	-	-
p-cimen-8-ol	13,06	1171	-	-	-	1,27	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1,14	-	-	-	-
α-terpineol	13,62	1182	-	0,37	-	-	-	-	-	-	0,37	0,69	-	0,23	-	0,30	-	0,28	-	-	-	-	-	-	-

(-) não detectado; Legendas: DHO – *Dacryodes hopkinsii*; PAP – *Protium apiculatum*; PAR – *P. aracouchini*; PDE – *Protium decandrum*; PEL – *P. elegans*; PDD – *P. divaricatum* var. *divaricatum*; PFE – *P. cf. ferrugineum*; PGA – *P. gallosum*; PGG – *P. giganteum* var. *giganteum*; PHU – *P. heptaphyllum* ssp. *ullei*; PLA – *P. cf. laxiflorum*; PNI – *P. nitidifolium*; POO – *P. cf. opacum* var. *opacum*; PPM – *P. paniculatum* var. *modestum*; PPR – *P. paniculatum* var. *riedelianum*; PPB – *P. polybotrium* var. *blackii*; PRU – *P. cf. rubrum*; PSP – *P. spruceanum*; PST – *P. strumosum*; PTE – *P. tenuifolium*; TPA – *Tetragastris panamensis*; TGL – *Trattinnickia glaziovii*; TPE – *T. peruviana*.

Tabela 7: Composição volátil dos extratos em hexano das oleorresinas de Burseraceae Amazônicas (CONTINUAÇÃO)

SUBSTÂNCIA	Rt	IR _{Calc}	CONCENTRAÇÃO RELATIVA (%)																							
			DHO	PAP	PAR	PDE	PEL	PDD	PFE	PGA	PGG	PHU	PLA	PNI	POO	PPM	PPR	PPB	PRU	PSP	PST	PTE	TPA	TGL	TPE	
mirtenol	13,92	1191	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,35	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
verbenona	13,99	1205	-	1,45	-	0,26	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,65	0,56	-	-	
<i>p</i> -menta-2-eno-1,4-diol	18,24	1266	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,28	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
α -cubebeno	22,63	1349	-	-	-	-	0,25	-	0,24	-	0,15	-	-	-	-	-	0,17	-	-	0,18	-	0,77	0,63	-	0,20	
ciclosativeno	24,07	1364	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	4,11	3,75	-	-	
α -ylangueno	24,25	1370	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,57	-	-	-	
α -copaeno	24,77	1375	-	-	-	-	-	-	0,31	-	0,17	-	-	-	-	-	0,19	-	-	-	-	3,25	2,36	-	-	
β -cubebeno	25,53	1389	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,76	0,65	-	-	
β -elemeno	25,64	1390	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1,52	-	-	-	-	-	-	
cipereno	25,91	1398	-	-	-	-	-	-	-	-	0,22	0,21	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1,29	1,15	-	-	
metil eugenol	26,23	1400	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2,62	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
sesquitujeno	26,96	1402	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,39	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,77	0,70	-	-	
cis- α -bergamoteno	27,42	1414	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,49	-	-	-	-	-	-	-	
β -copaeno	27,63	1427	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1,96	1,56	-	-	
trans- α -bergamoteno	27,92	1434	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,34	-	-	-	-	1,28	-	-	-	-	-	-	-	
<i>Z</i> - β -farneseno	28,40	1442	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	6,06	-	-	-	-	-	-	-	
<i>allo</i> -aromadendreno	29,20	1456	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1,14	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
9- <i>epi</i> -E-cariofileno	29,22	1458	0,52	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
4,5-di- <i>epi</i> -aristolocheno	29,82	1467	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,52	0,42	-	-	
β -acoradieno	30,04	1470	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,37	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
γ -muuruleno	30,29	1475	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2,24	1,68	-	-	
β -selineno	30,59	1481	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1,75	-	-	-	-	-	-	
α -curcumeno	30,85	1484	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,44	-	-	-	-	0,10	-	-	
<i>epi</i> -cubebol	31,21	1493	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,69	-	-	
α -muuruleno	31,81	1499	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3,56	2,51	-	-	
β -bisaboleno	32,25	1506	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,57	-	-	-	-	-	-	-	
γ -cadineno	32,28	1508	-	-	-	-	-	-	0,24	-	-	0,19	1,01	-	-	-	-	0,41	-	-	-	1,34	0,39	-	-	

(-) não detectado; Legenda: DHO – *Dacryodes hopkinsii*; PAP – *Protium apiculatum*; PAR – *P. aracouchini*; PDE – *Protium decandrum*; PEL – *P. elegans*; PDD – *P. divaricatum* var. *divaricatum*; PFE – *P. cf. ferrugineum*; PGA – *P. gallosum*; PGG – *P. giganteum* var. *giganteum*; PHU – *P. heptaphyllum* ssp. *ullei*; PLA – *P. cf. laxiflorum*; PNI – *P. nitidifolium*; POO – *P. cf. opacum* var. *opacum*; PPM – *P. paniculatum* var. *modestum*; PPR – *P. paniculatum* var. *riedelianum*; PPB – *P. polybotryum* var. *blackii*; PRU – *P. cf. rubrum*; PSP – *P. spruceanum*; PST – *P. strumosum*; PTE – *P. tenuifolium*; TPA – *Tetragastris panamensis*; TGL – *Trattinnickia glaziovii*; TPE – *T. peruviana*

Tabela 7: Composição volátil dos extratos em hexano das oleorresinas de Burseraceae Amazônicas (CONTINUAÇÃO)

SUBSTÂNCIA	Rt	IR _{Calc}	CONCENTRAÇÃO RELATIVA (%)																						
			DHO	PAP	PAR	PDE	PEL	PDD	PFE	PGA	PGG	PHU	PLA	PNI	POO	PPM	PPR	PPB	PRU	PSP	PST	PTE	TPA	TGL	TPE
cubebol	32,54	1513	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,68	-	-
trans-calameneno	32,93	1521	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,17	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,68	-	-
δ-cadineno	33,46	1538	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,61	-	-
α-calacoreno	33,71	1547	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,31	-	-
(E)-nerolidol	34,68	1560	-	-	-	-	-	-	0,20	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
maaliol	34,68	1560	-	-	-	-	-	-	0,27	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1α,10α-epoxi-amorfa-4-eno	35,10	1573	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,19	-	-
espatulenol	35,16	1573	1,73	-	-	-	2,06	-	0,23	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,54	-
óxido de cariofileno	35,37	1580	1,65	3,98	1,77	-	1,93	-	0,68	-	0,34	-	-	-	6,23	-	-	-	-	-	-	2,62	1,99	-	-
β-copaeno-4α-ol	35,72	1585	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1,21	-	-
thujopsan-2α-ol	35,94	1586	0,30	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
globulol	36,06	1592	0,59	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
epóxido de humuleno II	36,74	1605	-	0,40	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1,77	-	-	-	-	-	-	1,27	0,22	-	-
1,10-diepi-cubenol	37,51	1613	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1,04	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
diil apiol	37,34	1618	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,75	-	-	-	-	-
junenol	37,43	1618	-	2,09	-	0,23	0,18	-	11,27	-	-	0,29	-	1,36	23,89	-	-	-	-	-	-	2,44	2,62	-	-
epi-α-cadinol	38,79	1636	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1,75	-	-	-	-	-	-	-
α-muurulol	38,80	1640	-	-	-	-	-	-	0,54	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	7,74	5,33	-	-
selina-11-eno-4α-ol	39,51	1654	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,81	2,29	-	-
benzoato de benzila	44,82	1753	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,17	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

(-) não detectado; Legenda: DHO – *Dacryodes hopkinsii*; PAP – *Protium apiculatum*; PAR – *P. aracouchini*; PDE – *Protium decandrum*; PEL – *P. elegans*; PDD – *P. divaricatum* var. *divaricatum*; PFE – *P. cf. ferrugineum*; PGA – *P. gallosum*; PGG – *P. giganteum* var. *giganteum*; PHU – *P. heptaphyllum* ssp. *ullei*; PLA – *P. cf. laxiflorum*; PNI – *P. nitidifolium*; POO – *P. cf. opacum* var. *opacum*; PPM – *P. paniculatum* var. *modestum*; PPR – *P. paniculatum* var. *riedelianum*; PPB – *P. polybotryum* var. *blackii*; PRU – *P. cf. rubrum*; PSP – *P. spruceanum*; PST – *P. strumosum*; PTE – *P. tenuifolium*; TPA – *Tetragastris panamensis*; TGL – *Trattinnickia glaziovii*; TPE – *T. peruviana*

Os dados apresentados na Tabela 7 revelam que em 16 amostras das 23 analisadas foram detectados monoterpenos, não sendo identificados monoterpenos nas amostras *Dacryodes hopkinsii*, *Protium elegans*, *P. divaricatum* var. *divaricatum*, *P. cf. ferrugineum*, *P. gallosum*, *P. opacum* var. *opacum* e *P. cf. rubrum*. Os 30 monoterpenos identificados compreendem seis séries de esqueletos, os *p*-mentano, tujanos, pinanos, bornano, canfanos e carano, sendo eles apresentados na Figura 24, junto a seus derivados detectados.

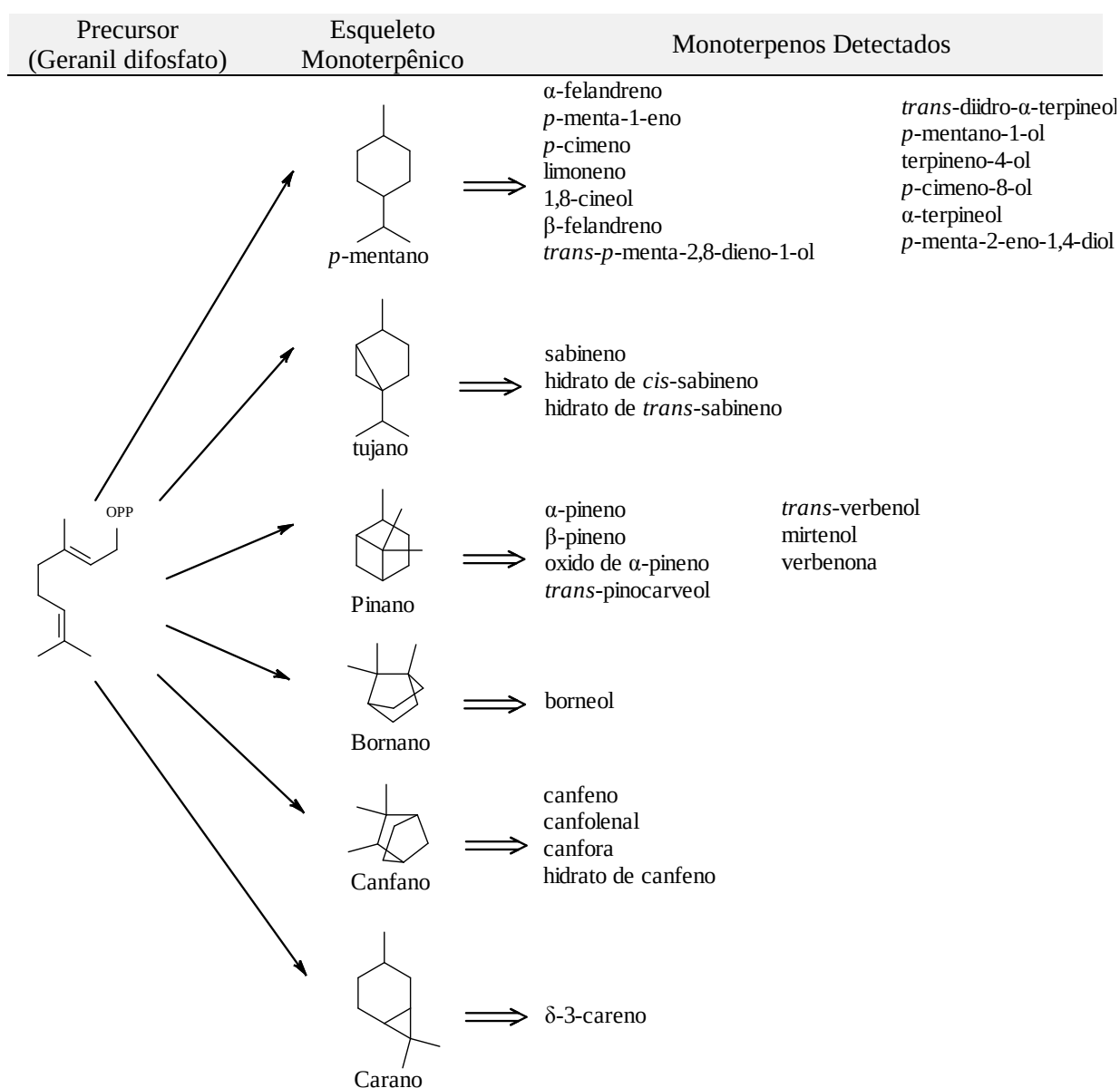


Figura 24: Monoterpenos detectados e suas respectivas séries de esqueletos monoterpênicos

Os monoterpenos da série *p*-mentano, mais comuns em oleorresinas de Burseraceae, apresentam diferentes posições de suas insaturações, hidroxilas e carbonilas. Neste trabalho foram identificados monoterpenos desta série nas espécies *Protium apiculatum*, *P. aracouchini*, *P. decandrum*, *P. giganteum* var. *giganteum*, *P. heptaphyllum* ssp. *ullei*, *P. nitidifolium*, *P. paniculatum* var. *modestum*, *P. paniculatum* var. *riedelianum*, *P. polybotryum* var. *blackii*, *P. strumosum*, *P. spruceanum*, *Tetragastris panamensis*, *Trattinnickia glaziovii* e *Trattinnickia peruviana*.

O *p*-cimeno é o principal representante desta série de monoterpenos, sendo identificado em onze das dezesseis espécies onde esta série de monoterpenos foi observada. Diferente dos demais monoterpenos desta série, o *p*-cimeno apresenta aromaticidade no anel hexacíclico, tendo sido relatada em grande parte de artigos científicos de Burseraceae como componente da fração volátil (Veiga Junior & Rüdiger, 2010). As descrições demonstram que este componente pode variar de 5%, como descrito por Silva *et al.* (2009), para *Protium paniculatum* var. *modestum*, até valores de 74% no óleo essencial de *P. hebetatum* (Ramos *et al.*, 2000). Contudo, nesta pesquisa, os valores máximos observados foram de 2,4% em *P. apiculatum*, valor abaixo do descrito anteriormente para espécies de Burseraceae, e mesmo para esta espécie conforme descrito por Silva *et al.* (2009), que detectou 25% de *p*-cimeno em seu extrato em hexano.

Monoterpenos da série pinano foram observados nas espécies *Protium apiculatum*, *P. decandrum*, *P. nitidifolium*, *P. paniculatum* var. *riedelianum*, *P. strumosum*, *P. tenuifolium*, *Tetragastris panamensis* (Tabela 7).

O α -pineno é o monoterpeno que mais se destaca nesta série, sendo detectado em seis das sete espécies na qual monoterpenos pinanos foram observados. A maior concentração detectada foi na espécie *P. apiculatum*, com 5,14%. Os dados mostram que a variação do

α -pineno pode ocorrer de 1%, como descrito em *Protium paniculatum* var. *modestum* (SILVA *et al.*, 2009), até valores de 62% como descrito para *P. altsonii* (RAMOS *et al.*, 2000).

Os monoterpenos da série canfano foram observados para as espécies *P. apiculatum*, *P. paniculatum* var. *riedelianum*, *P. tenuifolium*, *Tetragastris panamensis* e *Trattinnickia peruviana*, sendo detectados desta série, o canfeno, canfolenal, cânfora e hidrato de canfeno. O canfeno foi o monoterpeno desta série que apresentou maior concentração, observado na espécie *P. tenuifolium*, com 1,59% (Tabela 7).

Da série tujano foram detectados o sabineno e suas formas hidratadas *cis* e *trans* (Figura 24). Esta série foi detectada nas espécies *Protium apiculatum*, *P. heptaphyllum* ssp. *ullei*, *P. nitidifolium*, *P. paniculatum* var. *riedelianum*, *P. spruceanum* e *Trattinnickia peruviana*, tendo a maior concentração de sabineno em *P. apiculatum*, com 2,71% de rendimento.

O δ -3-careno, único monoterpeno da série carano (Figura 24), foi detectado em *Protium giganteum* var. *giganteum* e *P. spruceanum*. Borneol, único monoterpeno da série bornano, foi detectado em *P. apiculatum* e *Tetragastris panamensis*.

Os sesquiterpenos foram detectados em 19 amostras das 23 analisadas (Tabela 7), sendo identificados 41 sesquiterpenos das séries acíclico, elemmano, bergamotano, humulano, bisabolano, eudesmano, cadinano e guaiano. Os sesquiterpenos e suas respectivas séries de esqueletos podem ser observados na Figura 25. A presença de sesquiterpenos não foi observada nas espécies *P. divaricatum* var. *divaricatum*, *P. gallosum*, *P. paniculatum* var. *modestum* e *P. strumosum*.

Destes 41 sesquiterpenos, os que mais se destacam são o óxido de cariofileno e o junenol, observados em 9 das 19 amostras em que sesquiterpenos foram detectados. Além destes, foram detectados α -cubebeno em 7 amostras, γ -cadineno em 6 amostras e o α -copaeno em 5 amostras.

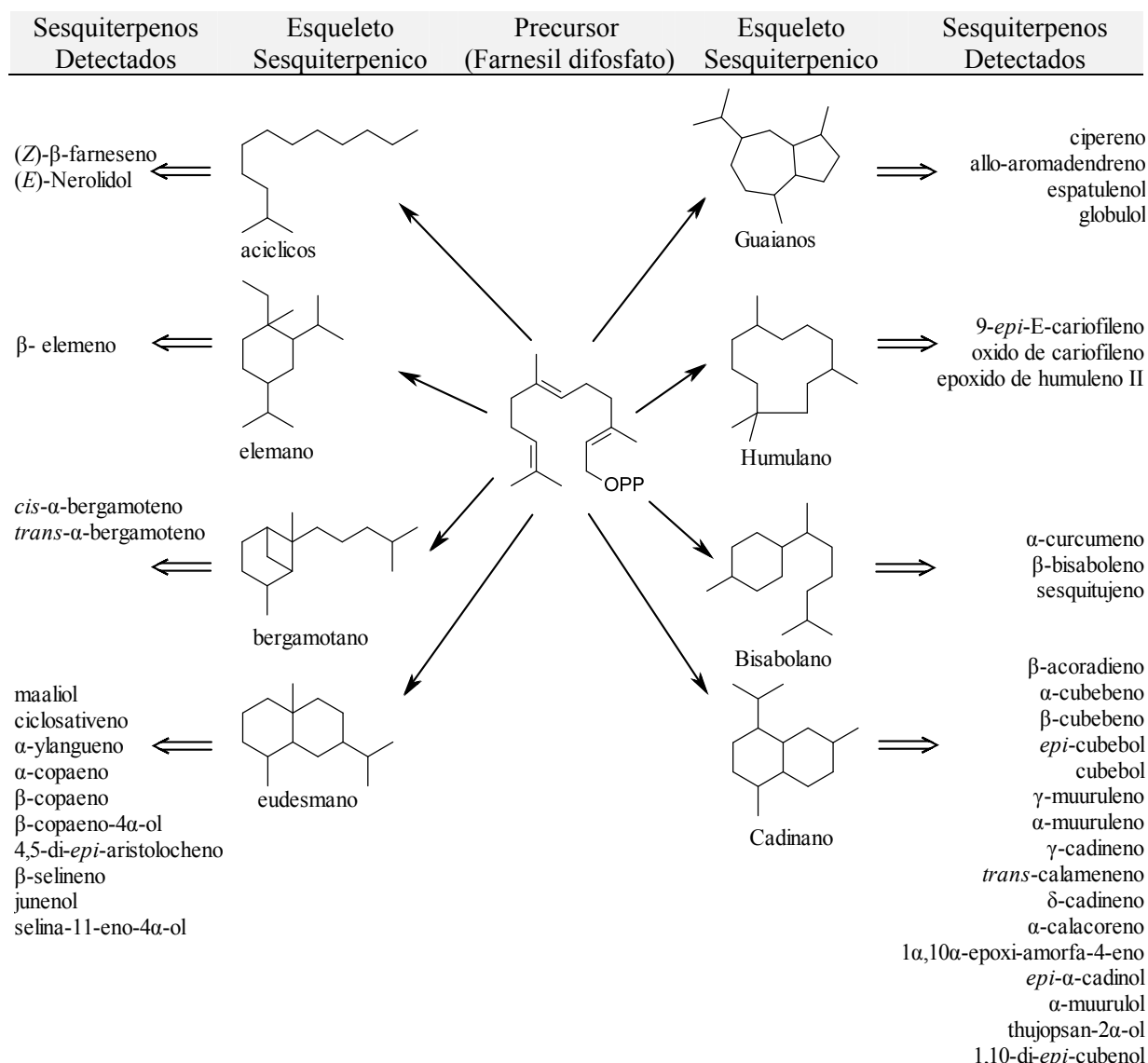


Figura 25: Sesquiterpenos detectados e suas respectivas séries de esqueletos sesquiterpenicos

O extrato em hexano de *P. cf. ferrugineum*, mostrou uma grande concentração de dois sesquiterpenos em sua fração volátil, como pode ser observado no cromatograma de íons totais (Figura 26-A) e sua ampliação (Figura 26-B). O sesquiterpeno detectado no *Rt* 37,43 min, foi identificado como junenol, após comparação do IR (1617) e espectro de massas (m/z 222 $[M]^+$ e m/z 109(100)), na Figura 26-C. Já o segundo sesquiterpeno, detectado no *Rt* 45,02 min (IR = 1752) de fragmentos m/z 238 $[M]^+$ e m/z 41(100) (Figura 26-D) não pode ser identificado pela técnica do IR por não apresentar descrição na literatura.

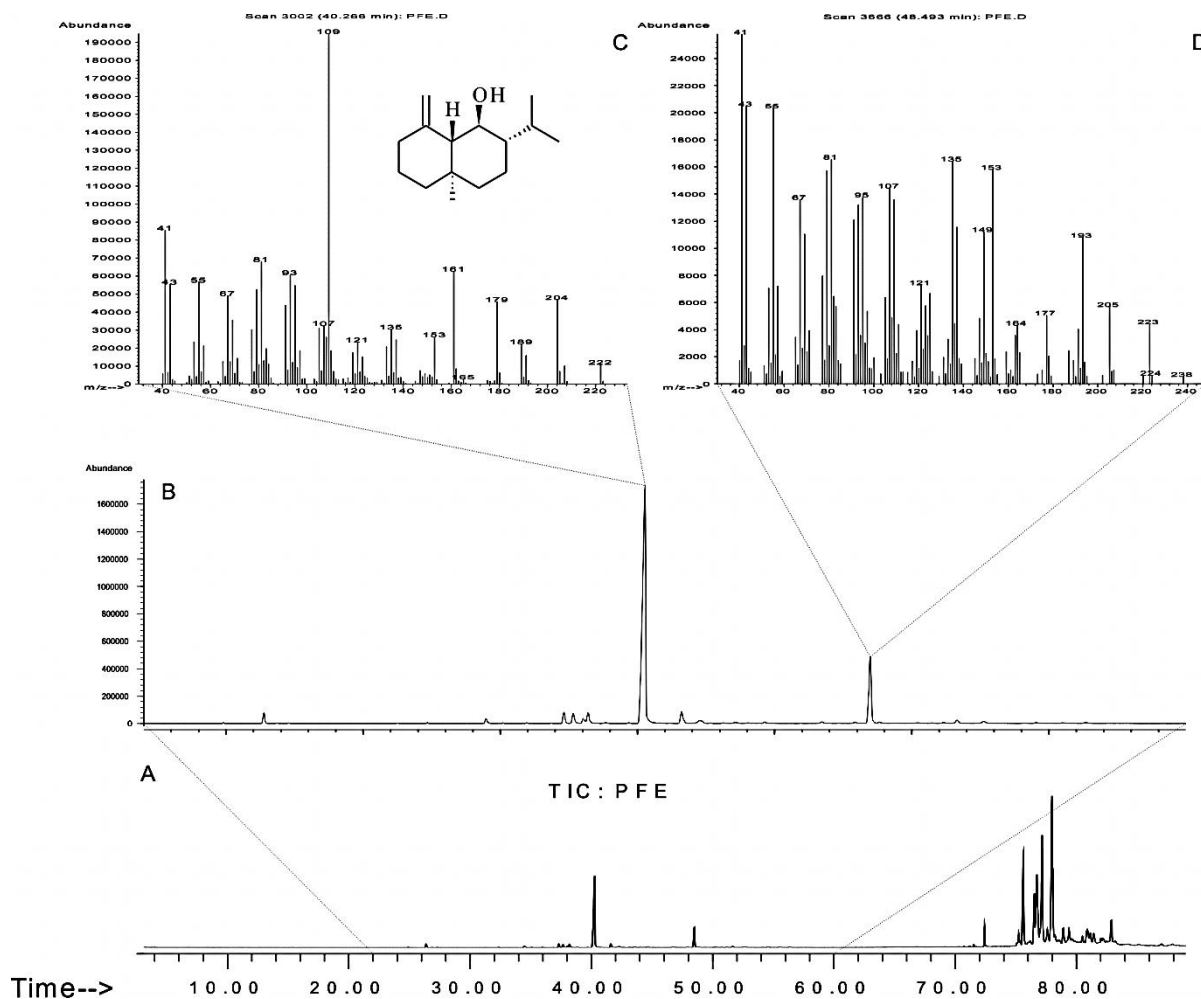


Figura 26: Cromatograma de íons totais do extrato em hexano de PFE (A). Ampliação do TIC entre 22 e 60 min. (B). Espectro de massas de junenol (C). Espectro de massas de sesquiterpeno não identificado (D).

O sesquiterpeno junenol apresentou concentrações maiores em *P. opacum* var. *opacum*, apresentando um percentual de 23,89% (Figura 27-C). Além do junenol, em *P. opacum* var. *opacum* foi detectada a maior concentração de óxido de cariofileno (Figura 27-D), com percentual de 6,23%. Contudo esta amostra apresentou 10 picos na região de sesquiterpenos, como pode ser observado no cromatograma de íons totais (Figura 27-A) e sua ampliação (Figura 27-B). Dentre os demais picos de maior intensidade, foi detectado ainda um sesquiterpeno de $[M]^+$ não determinado com fragmento m/z 147(100) (Figura 27-E) no R_t 46,64 min.

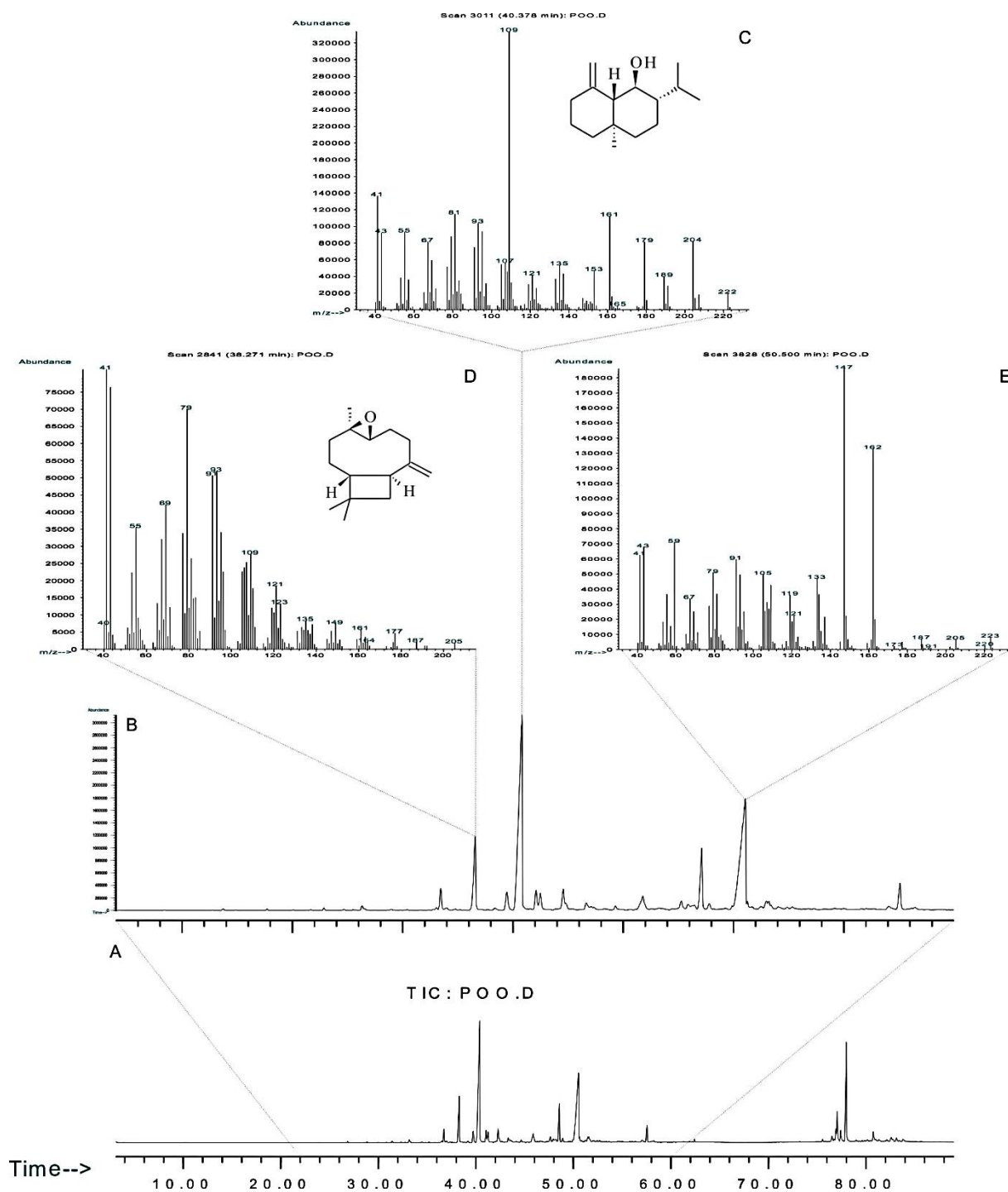


Figura 27: Cromatograma de íons totais do extrato em hexano de POO (A). Ampliação do TIC entre 22 e 60 min (B). Espectro de massas do junenol (C). Espectro de massas do oxido de cariofileno (D). Espectro de massas de sesquiterpenos não identificados (E).

O junenol se trata de um sesquiterpeno de esqueleto eudesmano, tendo esta série de sesquiterpenos detectada nas espécies *Protium apiculatum*, *P. decandrum*, *P. elegans*, *P. cf. ferrugineum*, *P. giganteum* var. *giganteum*, *P. heptaphyllum* ssp. *ullei*, *P. nitidifolium*, *P. opacum* var. *opacum*, *P. paniculatum* var. *riedelianum*, *P. cf. rubrum*, *P. tenuifolium* e *Tetragastris panamensis*.

Já o óxido de cariofileno se trata de um derivado de esqueleto humulano, série de sesquiterpenos esta representada pelo 9-*epi*-(*E*)-cariofileno, óxido de cariofileno e epóxido de humuleno II. Este derivados foram detectados em *Dacryodes hopkinsii*, *Protium apiculatum*, *P. aracouchini*, *P. elegans*, *P. cf. ferrugineum*, *P. giganteum* var. *giganteum*, *P. opacum* var. *opacum*, *P. tenuifolium* e *Tetragastris panamensis*.

As substâncias (*Z*)- β -farneseno e (*E*)-nerolidol foram os únicos sesquiterpenos acíclicos identificados nos extratos em hexano avaliados, sendo detectados em *P. polybotryum* var. *blackii* e *P. cf. ferrugineum*, respectivamente. Os triterpenos acíclicos não são comumente descritos no óleo essencial de Burseraceae, sendo o sesquiterpenos (*E*)-nerolidol detectado no óleo essencial das folhas de *P. grandifolium*, *P. lewelinii*, *P. hebetatum* (SIANI *et al.*, 1999b), e no óleo essencial das oleorresinas de *Commiphora myrrha* (MARONGIU *et al.*, 2005) e *Boswellia serrata* (SINGH *et al.*, 2007); e os sesquiterpenos de esqueleto farneseno (α -farneseno, (*E*)- β - e (*Z*)- β -farneseno) no óleo essencial das folhas de *Commiphora quadricincta* (ASSAD *et al.*, 1997).

O β -elemeno, detectado apenas em *Protium cf. rubrum*, apresenta descrição anterior em oleorresinas de *Protium heptaphyllum* (SIANI *et al.*, 2004), *P. paniculatum* (SILVA *et al.*, 2009), e em várias espécies de *Boswellia*, (HAMM *et al.*, 2005; BASER *et al.*, 2003). Contudo, este sesquiterpeno é comumente descrito em óleos essenciais das folhas de espécies de *Protium* (SIANI *et al.*, 2004, SIANI *et al.*, 1999b, PONTES *et al.*, 2007).

Os sesquiterpenos de esqueleto bergamotano detectados foram o *cis*- α -bergamoteno em *P. polybotryum* var. *blackii*, e o *trans*- α -bergamoteno em *P. polybotryum* var. *blackii* e *P. cf. laxiflorum*. Já os sesquiterpenos da série guaiano foram observados nas espécies *Dacryodes hopkinsii*, *Protium elegans*, *P. cf. ferrugineum*, *P. giganteum* var. *giganteum*, *P. heptaphyllum* ssp. *ullei*, *P. cf. laxiflorum*, *P. tenuifolium* e *Tetragastris panamensis*, sendo detectadas as substâncias cipereno, allo-aromadendreno, espatulenol e globulol.

O sesquiterpenos da série bisabolano foram detectados em quatro espécies, em *Protium heptaphyllum* ssp. *ullei*, *P. polybotryum* ssp. *blackii*, *P. tenuifolium* e *Tetragastris panamensis*. Como representantes desta série estão presentes o α -curcumeno, β -bisaboleno e o sesquitujeno.

A maior variedade de sesquiterpenos foi observada para a série cadinano, sendo detectados dezesseis diferentes sesquiterpenos, nas espécies *Protium apiculatum*, *P. cf. ferrugineum*, *P. giganteum* var. *giganteum*, *P. heptaphyllum* ssp. *ullei*, *P. cf. laxiflorum*, *P. paniculatum* var. *riedelianum*, *P. polybotryum* ssp. *blackii*, *P. spruceanum*, *P. tenuifolium*, *Tetragastris panamensis* e *Trattinnickia peruviana*

As duas amostras com composição mais complexa foram *Protium tenuifolium* e *Tetragastris panamensis*, com um total de 17 e 24 sesquiterpenos identificados (Tabela 7), respectivamente. Além da grande variedade de sesquiterpenos, uma grande relação entre estas duas espécies pôde ser observada, com seis sesquiterpenos da série cadinano, sete sesquiterpenos da série eudesmano, dois sesquiterpenos da série humulano, um sesquiterpeno da série bisabolano e um sesquiterpeno da série guaiano em comum. A semelhança entre os perfis destas duas espécies pode ser observada na Figura 28.

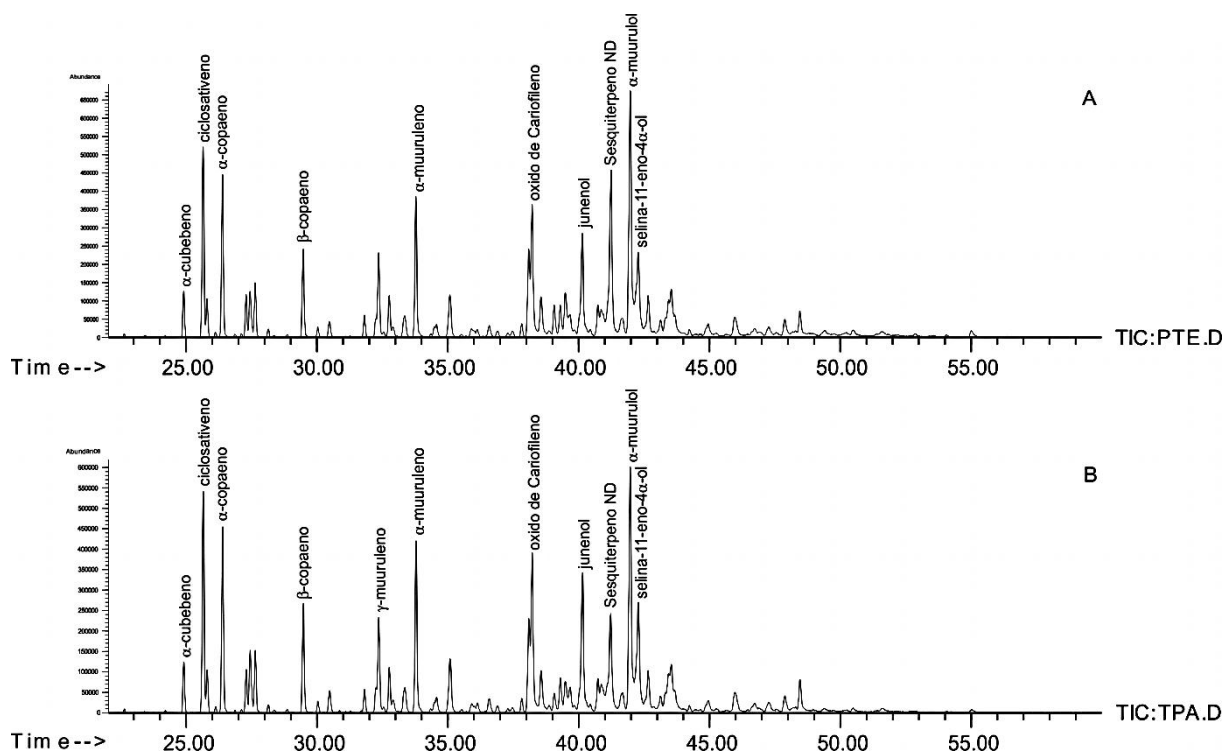


Figura 28: Ampliação do cromatograma de íons totais de *Protium tenuifolium* (A) e *Tetragastris panamensis* (B)

Concluindo as classes presentes nos compostos voláteis detectados nos extratos em hexano das oleorresinas, observou-se dois fenilpropanoides, o metil eugenol em *Protium heptaphyllum* ssp. *ullei* e o dillapiol em *P. spruceanum*. Na espécie *P. heptaphyllum* ssp. *ullei* foi detectado ainda o benzoato de benzila (Tabela 7).

4.1.2 Composição Triterpênica dos Extratos em Hexano das Oleorresinas

Com o estudo dos espectros de massa da fração não volátil, foi possível sugerir a presença de 28 triterpenos nas oleorresinas de 23 espécies de Burseraceae não estudadas.

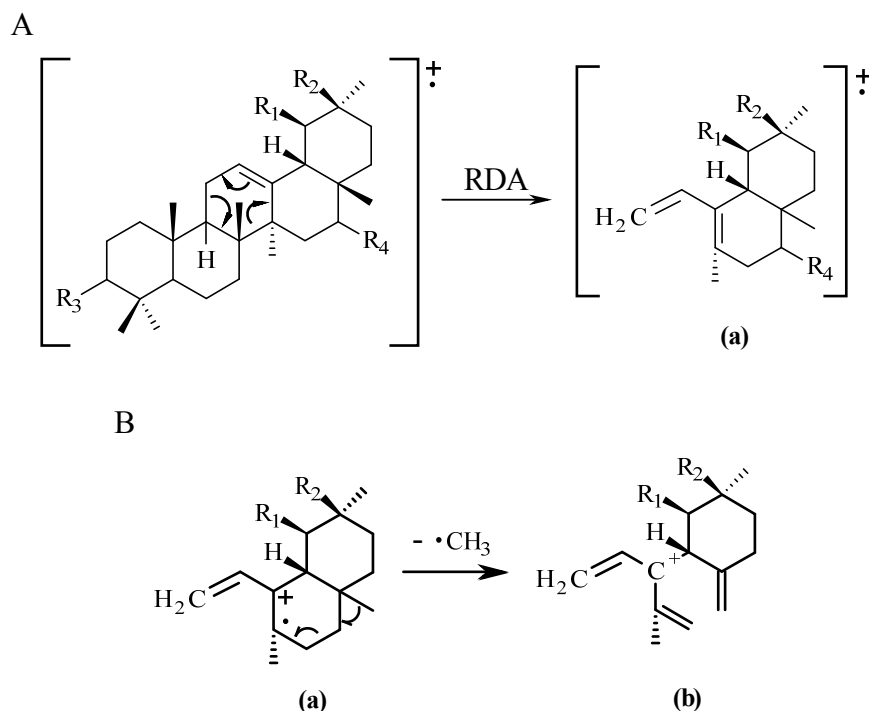
Em estudo semelhante a este, Siani *et al.* (2012), quantificaram os triterpenos de esqueletos ursanos: α -amirina, α -amirona e breina; os triterpenos de esqueletos oleananos: β -amirina, β -amirona e maniladiol; o triterpeno de esqueleto friedelano: friedelina; e os

triterpenos de esqueletos tirucalanos: ácido 3-hidroxi-tirucala-7,24-dieno-21-óico, ácido 3-hidroxi-tirucala-8,24-dieno-21-óico e o ácido 3-oxo-tirucala-8,24-dieno-21-óico em oleorresinas de 11 espécies de Burseraceae brasileiras, além destes triterpenos, outros foram sugeridos segundo seus espectros de massas.

Os triterpenos derivados de esqueleto ursa-12-eno e oleana-12-eno apresentam como característica principal o pico base (PB) formado pelos anéis D e E após a clivagem do anel C pela reação de retro-Diels-Alder (RDA) (Figura 29) (DJERASSI *et al.*, 1962; BUDZIKIEWICZ *et al.*, 1963). A massa do PB pode variar dependendo dos substituintes presentes nos carbonos dos anéis D e E. Nos triterpeno α - e β -amirina e α - e β -amirona este fragmento apresenta o fragmento de m/z 218 (a). Contudo nos triterpenos diidroxilados breina e maniladiol, este fragmento apresenta massa m/z 234 (a), referente a hidroxila presente na posição 16 (anel D) (SIANI *et al.*, 2012).

Outro fragmento importante na identificação destes triterpenos é o cátion de m/z 203 (b), formado pela saída da metila 28 do PB (a) (Figura 29-B) (KARLINER & DJERASSI, 1966). Este fragmento em triterpenos de esqueleto oleanano é aproximadamente duas vezes mais intenso que em esqueletos ursano, propiciando a diferenciação entre estes dois esqueletos.

Através da comparação dos dados obtidos com os dados de fragmentação da literatura, e com os dados das substâncias armazenadas no banco de padrões do Q-BiomA foi possível atribuir os picos eluídos nos R_t 74,90 e 75,70 min nos cromatograma de íons totais (TIC) aos triterpenos 3-hidroxioleana-12-eno (β -amirina) e 3-hidroxiursa-12-eno (α -amirina), respectivamente, os picos eluídos nos R_t 74,37 e 75,08 min aos triterpenos 3-oxo-oleana-12-eno (β -amirona) e 3-oxo-ursa-12-eno (α -amirona) e os picos eluídos nos R_t 79,20 e 80,02 min aos triterpenos 3,16-diidroxioleana-12-eno (maniladiol) e 3,16-diidroxioleana-12-eno (breina).



	M^+	R_1	R_2	R_3	R_4	a	b
ursa-12-eno/oleana-12-eno	410	CH_3 / H	H / CH_3	H	H	m/z 218	m/z 203
α -amirina / β -amirina	426	CH_3 / H	H / CH_3	OH	H	m/z 218	m/z 203
α -amirona / β -amirona	424	CH_3 / H	H / CH_3	=O	H	m/z 218	m/z 203
breina / maniladiol	442	CH_3 / H	H / CH_3	OH	OH	m/z 234	-

Figura 29: Principais fragmentos de derivados de Δ^{12} -Ursano e Δ^{12} -Oleanano

Foi detectado ainda, um pico no R_t 71,46 que por comparação com os dados da literatura sugeriu-se que poderia se tratar do triterpeno ursa-12-eno ou do triterpeno oleana-12-eno.

Além destas substâncias comuns em Burseraceae, os picos eluídos nos R_t 78,63 e 79,41 min, apresentaram o íon molecular de m/z 440 $[M]^+$ e o mesmo PB (a) que observado para os triterpenos breina e maniladiol (m/z 234), o que sugere uma fragmentação envolvendo reação de RDA no anel C com presença de uma hidroxila na posição 16.

Siani *et al.* (2012) observaram estes mesmos fragmentos em *Protium altsonii*, *P. hebetatum*, *P. heptaphyllum*, *P. icicariba*, *P. opacum*, *P. paniculatum* var. *modestum*,

P. paniculatum var. *riedelianum*, *P. strumosum* e *P. spruceanum* sugerindo as substâncias 17-hidroxi-11-oxo-nor- α -amirona e 17-hidroxi-11-oxo-nor- β -amirona

Contudo o fragmento 440 $[M]^+$ indica a ausência de dois hidrogênios entre os anéis A e B. Este aumento no índice de deficiência de hidrogênio (IDH) pode ser relacionada com a oxidação da hidroxila na posição 3 para carbonila (como ocorre com os derivados α - e β -amirona), sugerindo que estas substâncias sejam o 3-oxo-16-hidroxioleana-12-eno e 3-oxo-16-hidroxiursa-12-eno.

Os triterpenos 28-hidroxi e 28-aldeído, derivados de ácido ursólico e oleanólico, apresentam o PB de m/z 203 (**b**), fragmento característico da reação de RDA no anel C (Δ^{12} insaturados) junto com a saída do grupo carboxílico, hidroxila, ou carbonílico no carbono 28 (ASSIMAPOLOU E PAPAGEORGEOU, 2005a e 2005b). Os picos eluídos nos R_t 79,22, 79,68 e 81,05 min apresentaram este PB, sendo identificados como 3,28-dioxo-ursa-12-eno/oleana-12-eno, 28-oxo-3-hidroxioleana-12-eno e 28-oxo-3-hidroxiursa-12-eno, após a comparação dos íons moleculares e demais fragmentos.

Triterpenos pentacíclicos com insaturações $\Delta^{9(11),12}$ apresentam como pico base o seu íon molecular, como já foi reportado por diversos autores (de-la-CRUZ-CANIZARES *et al.*, 2005; SIANI *et al.*, 2012). Neste trabalho foram observados estes fragmentos nos picos eluídos nos R_t 73,17 e 73,50 min, indicando a presença de oleana-9(11),12-dieno-3-ol (β -amiradienol) e ursa-9(11),12-dieno-3-ol (α -amiradienol). Contudo a presença do fragmento no pico eluído no R_t 72,56 de m/z 408 $[M^+]$ (100) sugere o triterpeno $\Delta^{9(11),12}$ -urseno/oleaneno e o fragmento no pico eluído no R_t 72,98 de m/z 422 $[M^+]$ (100) sugere a presença do triterpeno ursa/oleana-9(11),12-dieno-3-ona (α - ou β -amiradienona).

Em triterpenos de esqueleto $\Delta^{20(29)}$ -lupeno, um dos principais íons observado é o de m/z 189 (**d**) (Figura 30). Sua formação é originada da clivagem do anel C, com quebra das ligações C(12) – C(13) e C(8) – C(14), junto à migração de um hidrogênio. Contudo a

migração do hidrogênio não foi completamente estabelecida por marcação isotópica, sendo sugerido por Shiojima *et al.* (1992), que se trata do H(15) e por Assimapolou & Papageorgeou (2005a), sugere que a migração ocorre pelo H(27), devido ao cátion observado no C(27).

Outro fragmento importante em triterpeno lupa-20(29)-eno é formado pela abertura do anel C pelo rompimento das ligações C(9) – C(11) e C(8) – C(14). O fragmento **(c)** pode apresentar variação na relação m/z conforme o substituinte em C-3, como pode ser observado na Figura 30. Estes fragmentos característicos foram observados nos picos nos R_t 74,35 e 76,85 min sendo sugerido que estes picos se tratam do lupa-20(29)-eno-3-ona (lupenona) e lupa-20(29)-eno-3-ol (lupeol), respectivamente.

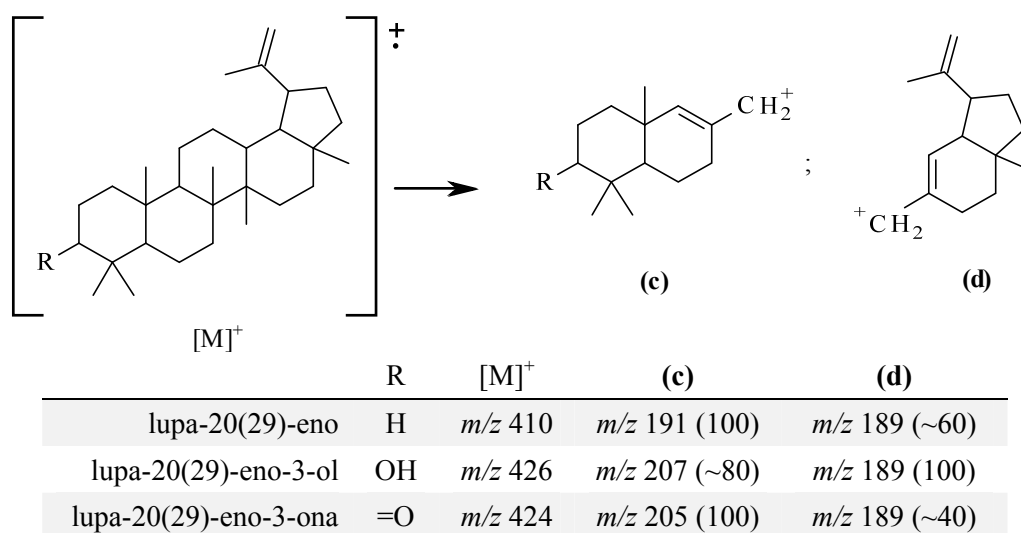


Figura 30: Principais fragmentos de derivados de $\Delta^{20(29)}$ -lupeno

Os derivados dos triterpenos Δ^{20} -taraxastareno e $\Delta^{20(30)}$ -taraxastareno apresentam grande similaridade com os fragmentos do lueol. Em seus espectros de massas apresentando dois fragmentos principais: m/z 189 [análogo de **(d)**] e m/z 207 **(c)** (SHIOJIMA *et al.*, 1992). Estes fragmentos são os mesmos observados para o lueol (Figura 30), contudo no lueol estes sinais apresentam intensidade de 100% e ~80%, diferente do observado para

$\Delta^{20(21)}$ -taraxasteno e $\Delta^{20(30)}$ -taraxastareno, onde ambos apresentam $\sim 100\%$ para os dois sinais. Sua diferenciação é realizada com o tempo de retenção, já que o $\Delta^{20(21)}$ -taraxasterol elui antes de $\Delta^{20(30)}$ -taraxasterol em colunas de 5% fenil-95%metilpolisiloxano (BAUER *et al.*, 2004).

Estes fragmentos foram observados no pico em 77,15 min, contudo, por apresentar apenas um único pico com estes fragmentos característicos, não foi possível sugerir qual dos dois derivados de taraxasterol foi detectado.

Outro esqueleto detectado foi o derivado de esqueleto glutina-5-eno, através dos fragmentos m/z 274 e m/z 259 (SHIOJIMA *et al.*, 1992) como os mais intensos. A formação do cátion de m/z 274 (**e**) ocorre após clivagem do anel B pela reação de RDA (Figura 31), já a formação do cátion m/z 259 (**f**) [(**e**) – 15] se dá pela perda da metila 26.

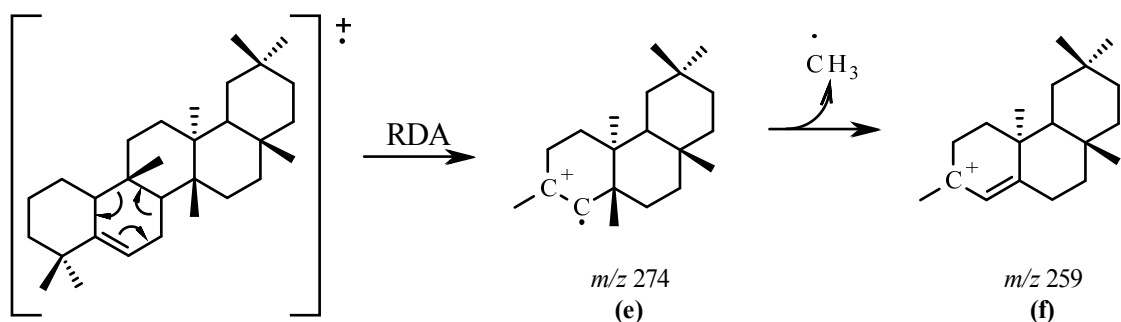
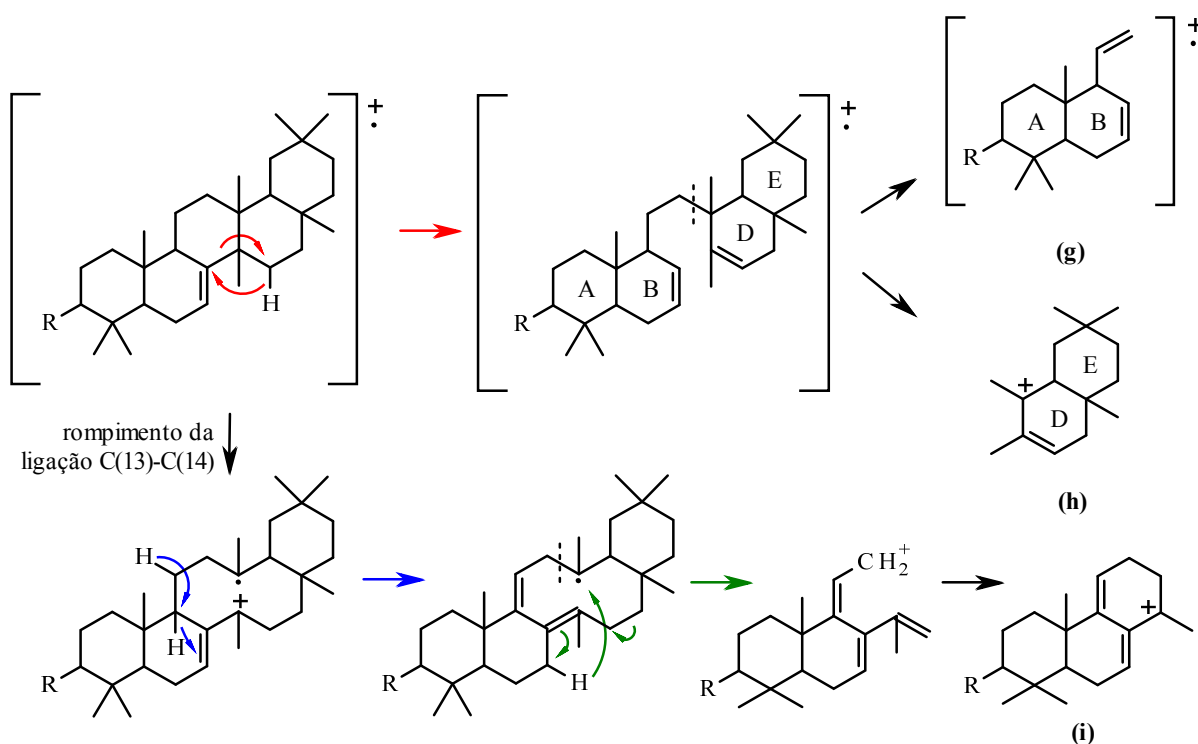


Figura 31: Formação do fragmento m/z 274 e 259 em triterpenos Δ^5 -glutineno

O espectro de massas do pico no R_t 75,66 min apresentou os fragmentos m/z 259 e 274 com maior intensidade. Além dos principais fragmentos foi possível observar o íon molecular de m/z 426, característico de triterpeno oxigenado e o fragmento de m/z 408 (M-18), que confirma a presença da hidroxila na estrutura. A confirmação do 3-hidroxislutina-5-eno (glutinol) se deu pela comparação do espectro de massas obtido com a literatura (BRANCO & PIZZOLATTI, 2002).

Triterpenos multifloranos com insaturação no carbono C-7 apresentam comumente o pico base de m/z 204 (**g**) (Figura 32). Este fragmento dos anéis A e B é formado pela clivagem das ligações C(8) – C(14) e C(13) – C(14) do anel C. Esta mesma clivagem no anel C forma um segundo fragmento dos anéis D e E de m/z 205 (**h**), comumente observado nesta série de triterpenos (SHIOJIMA *et al.*, 1992; BUDZIKIEWICZ *et al.*, 1963).

Outro fragmento importante é o de m/z 243 iniciado pelo rompimento da ligações C(13) – C(14) e posteriormente pelo rompimento das ligações C(12) – C(13) e C(15) – C(16). Além destes fragmentos, os fragmentos de m/z 231 (m/z 247 no Δ^7 -multifloreno-3-ol) e de m/z 257 (m/z 273 no Δ^7 -multifloreno-3-ol), são característicos em triterpenos Δ^7 -multifloreno. (SHIOJIMA *et al.*, 1992).



	R	(g)	(h)	(i)
multiflora-7-eno	H	m/z 204	m/z 205	m/z 243
multiflora-7-eno-3-ol	OH	m/z 220	m/z 205	m/z 259

Figura 32: Formação dos fragmento m/z 204, m/z 205 e m/z 243 em triterpenos Δ^7 -multifloreno

Após a comparação dos dados da literatura (SHIOJIMA *et al.*, 1992; WANG *et al.*, 2011) com o espectro de massas do pico eluído no *Rt* 76,37 min para as espécies *Protium* cf. *ferrugineum*, *P. heptaphyllum* ssp. *ullei*, *P. tenuifolium*, *Tetragastris panamensis*, sugere-se que a substância neste tempo de retenção se trata do triterpeno multiflora-7-eno-3-ol (multiflorenol). Na seção 4.3.5 (pg. 177), é apresentado o isolamento e identificação de dois derivados do triterpeno multiflora-7-eno-3-ol de *Tetragastris panamensis*, dando suporte a sugestão para este triterpeno.

Na Tabela 8, estão apresentados os triterpenos identificados por espectrometria de massas para os extratos em hexano de 23 espécies de Burseraceae Amazônicas.

Tabela 8: Composição triterpênica dos extratos em hexano das oleorresinas de Burseraceae Amazônicas

SUBSTÂNCIA (*)	Rt (min)	CONCENTRAÇÃO RELATIVA (%)																						
		DHO	PAP	PAR	PDE	PDD	PEL	PFE	PGA	PGG	PHU	PLA	PNI	POO	PPM	PPR	PPB	PRU	PSP	PST	PTE	TPA	TGL	TPE
ursa-12-eno	71,46	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,3	-	-	-	-	-	-	-	-	0,3	-	0,2	-	-
Δ ^{9(11):12} -urseno/oleaneno	72,56	-	0,29	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
α- ou β-amiradienona	72,98	0,9	-	-	0,4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,2	-	-	-	-
β-amiradienol	73,17	0,4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1,1
α-amiradienol	73,50	2,7	0,5	0,8	2,8	1,0	1,3	-	-	-	-	-	0,4	-	-	-	0,8	1,5	-	-	-	-	0,3	0,4
Taraxerona	74,05	-	3,1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	5,2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
β-amirona	74,37	8,2	4,5	2,3	6,7	2,5	3,8	-	-	13,7	1,9	1,8	3,5	1,4	6,8	10,8	5,8	2,6	3,2	7,5	2,2	1,4	0,8	19,0
Taraxerol	74,48	-	1,2	-	-	-	0,8	-	-	-	1,6	-	1,5	-	-	-	-	-	-	-	7,7	-	-	-
β-amirina	74,90	7,5	4,0	18,8	12,9	29,7	13,5	10,9	20,5	11,0	17,1	22,5	3,7	2,4	15,8	19,1	16,2	5,9	25,7	14,8	6,4	3,2	22,3	8,2
α-amirona	75,08	12,2	4,0	4,0	11,8	2,1	3,48	-	2,4	29,0	5,5	2,3	4,8	1,2	14,2	20,9	3,3	2,2	2,3	19,5	3,5	2,7	1,8	28,6
α-amirina	75,70	16,5	7,9	61,9	27,7	58,5	51,9	18,3	45,1	14,6	40,6	57,4	6,6	8,7	35,3	34,4	17,7	10,3	52,6	32,2	6,2	2,3	55,5	22,6
Glutinol	75,66	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,6	-	4,8	3,7	-	-
Multiflorenol	76,37	-	-	-	-	-	-	2,8	-	-	0,4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3,1	2,0	-	-
Friedelano-3-ol	76,82	-	-	-	-	-	-	1,6	-	-	0,6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Lupeol	76,85	-	-	-	-	-	-	-	-	1,1	0,9	-	-	-	1,0	-	-	-	1,0	0,2	-	-	0,4	0,8
(?)-taraxasterol	77,15	-	-	0,2	-	-	0,4	-	-	-	0,2	-	-	-	0,2	-	-	-	0,2	-	-	-	0,2	-
3-oxo-oleana-12-em-28-al	77,91	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	9,7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3-oxo-23/24-hidroxi-ursa/oleana-12 eno ⁽¹⁾	78,53	5,1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1,5	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3-oxo-11β-hidroxioleana-12-eno ⁽²⁾	78,54	-	-	-	4,1	0,8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2,2
3-oxo-16-hidroxi-oleana-12-eno	78,63	-	-	-	1,5	-	-	-	-	4,2	-	-	2,0	-	0,9	0,8	18,1	26,9	-	4,6	-	-	0,4	-
3-oxo-11β-hidroxiursa-12-eno ⁽²⁾	78,90	-	-	-	-	-	2,6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1,0	1,7	-	-	-	-	-	-
Maniladiol	79,20	4,0	-	1,1	2,8	-	1,8	-	-	-	5,7	3,8	-	1,4	2,3	1,3	3,3	-	-	2,9	-	-	5,2	-
3-oxo-ursa/oleana-12-eno-28-al	79,22	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1,9	-	0,5	0,9	-	-	-	-	-	-	-	-
3-oxo-16-hidroxi-ursa-12-eno	79,41	-	-	-	-	-	-	-	-	6,0	-	-	-	-	3,4	1,7	-	-	-	2,8	-	-	-	-
3-hidroxioleana-12-eno-28-al	79,68	-	1,1	-	-	-	-	-	-	1,6	1,1	-	3,4	-	0,4	-	-	2,1	0,7	-	-	-	-	-
Breina	80,02	1,9	-	0,9	-	-	1,9	-	-	-	4,1	0,4	-	1,0	5,0	1,3	-	-	-	2,4	-	-	3,7	-
3-hidroxiursa-12-eno-28-al	81,05	-	1,7	-	-	-	-	-	-	0,5	-	-	3,2	-	-	-	-	-	0,7	-	-	-	-	-
TRITERPENSO IDENTIFICADOS (%)		59,4	28,3	90,0	70,6	81,5	94,6	81,5	68,0	82,1	80,7	88,2	46,0	16,5	87,4	91,3	66,2	53,2	88,7	87,4	33,9	15,5	90,6	82,8
NÃO IDENTIFICADOS (%)		35,4	39,0	6,1	24,7	10,5	4,5	10,5	29,3	12,0	11,4	6,5	38,2	6,4	6,7	6,0	9,1	29,5	9,6	8,3	9,7	21,3	5,7	14,8
NÃO IDENTIFICADOS (quantidade)		8	10	7	16	5	4	5	2	14	7	5	11	4	4	11	11	10	6	13	6	15	8	8

⁽¹⁾ comparado com Ali *et al.* (1990); ⁽²⁾ – comaparado com Lima *et al.* (2005); (*) – espectros de massas no Anexo 1; (-) não detectado.
Legenda: DHO – *Dacryodes hopkinsii*; PAP – *Protium apiculatum*; PAR – *P. aracouchini*; PDE – *Protium decandrum*; PEL – *P. elegans*; PDD – *P. divaricatum* var. *divaricatum*; PFE – *P. cf. ferrugineum*; PGA – *P. gallosum* PGG – *P. giganteum* var. *giganteum*; PHU – *P. heptaphyllum* ssp. *ullei*; PLA – *P. cf. laxiflorum*; PNI – *P. nitidifolium*; POO – *P. cf. opacum* var. *opacum*; PPM – *P. paniculatum* var. *modestum*; PPR – *P. paniculatum* var. *riedelianum* PPB – *P. polybotrium* var. *blackii*; PRU – *P. cf. rubrum*; PSP – *P. spruceanum*; PST – *P. strumosum*; PTE – *P. tenuifolium*; TPA – *Tetragastris panamensis*; TGL – *Trattinnickia glaziovii*; TPE – *T. peruviana*

4.1.2.1 Quimiodiversidade de triterpenos das séries urs-12-eno e olean-12-eno

A avaliação das espécies por meio de CG apresentou uma média da concentração de α -amirina de 29,7%, com sua variedade de 2,3 % para *Tetragastris panamensis*, a 61,9 % para *P. aracouchini*. Já o triterpeno β -amirina apresenta uma média de 13,6%, com uma variação de 3,2 % para *Tetragastris panamensis*, a 29,7 % para *P. divaricatum* ssp. *divaricatum*.

Em um trabalho anterior, a variedade observada de α -amirina em sete espécies estudadas foi de 6,5 a 32,3% utilizando análise por GC-MS para *P. paniculatum* var. *modestum* e *P. strumosum*, respectivamente (SILVA *et al.*, 2009). Entretanto, β -amirina apresentou uma variação de 5,0 a 41,1%, para *P. grandifolium* e *P. tenuifolium*, respectivamente. Mais recentemente, Siani *et al.* (2012), demonstraram uma variação de 35,0 % (*P. altsonii*) a 58,9% (*P. opacum*) para α -amirina, e uma variação entre 11,4 % (*Trattinnickia rhoifolia*) a 31,2% (*P. opacum*) para β -amirina.

Para a espécie *P. apiculatum* a concentração de α - e β -amirina foi de 7.0 e 10.0% (SILVA *et al.*, 2009), respectivamente. No presente trabalho, concentrações semelhantes para estes triterpenos foram observadas (Tabela 8). Para *P. tenuifolium*, a mistura de α - e β -amirina, foi descrita como majoritários, 25 e 41 %, respectivamente, contudo, a amostra analisada mostrou que estes triterpenos se encontram em menor concentração, aproximadamente 6% para ambos triterpenos. Já em *P. strumosum*, a concentração dos triterpenos α - e β -amirina descrita anteriormente foi de aproximadamente 32 %, para ambos triterpenos, já a amostra avaliada apresentou concentração semelhante para α -amirina, sendo que para β -amirina, apenas a metade descrita anteriormente foi observada. Já na espécie *P. paniculatum* var. *modestum*, concentrações de 6,5 e 7,5% foram descritas para α - e β -amirina, respectivamente, concentrações bem abaixo das observadas.

Para a espécie com maior número de estudos para o gênero *Protium*, a *P. heptaphyllum*, a concentração dos triterpenos α - e β -amirina descrita anteriormente era de 20 e 18 %, respectivamente (SILVA *et al.*, 2009), um total de 38% da mistura. Esta quantidade total de α - e β -amirina, também apresenta variação em processos de isolamento, com obtenção um rendimento da mistura de α - e β -amirina entre 7 e 45 % (MAIA *et al.*, 2000; VIEIRA JUNIOR *et al.*, 2005; SUSUNAGA *et al.*, 2001).

Os triterpenos α - e β -amirina apresentam grande variação em espécies de *Protium*, podendo estar relacionadas com fatores externos: como solo e clima, e fatores internos, tal como variação entre-espécies e intraespécies.

Interessante observar que os triterpenos carbonílicos, α - e β -amirona não foram observados para a espécie *P. cf. ferrugineum* e β -amirona não foi detectado em *P. gallosum*. O valor médio de α -amirona foi de 8,3%, com uma variação de 1,2 % observado em *P. opacum* var. *opacum* a 29,0 % observado para e *P. giganteum* var. *giganteum*. Para β -amirona a média foi de 5,7%, com variação de 0,8 para *Trattinnickia glaziovii* a 19,0% para *Trattinnickia peruviana*. As amostras ausentes dos triterpenos não foram utilizadas no cálculo da média.

A variação de α -amirona em cinco das setes espécies estudadas por Silva *et al.*, (2009) foi de 2,4 % para *P. heptaphyllum* a 19,0% para *P. apiculatum* , já β -amirona não foi detectada.

Um resultado similar ao observado neste trabalho foi descrito para doze espécies avaliadas por Siani *et al.* (2012). Uma variação de 2,0% (*P. icicariba*) a 21,5% (*Trattinnickia rhoifolia*) para α -amirona e 1,7% (*P. opacum*) a 16,9% (*T. rhoifolia*) para β -amirona, foi observado. Apenas em *P. altsonii*, traço destas duas substâncias foram observadas.

Das 23 espécies analisadas, breina foi observada apenas em 10, e maniladiol foi observada em 12 amostras. A média de breina foi de 2,3% para as amostras detectadas,

variando de 0,4 para *P. cf. laxiflorum* a 5,0% para *P. paniculatum* var. *modestum*. Maniladiol apresentou uma média de 3,0% dentre as amostras onde foi detectado, variando de 1,1 para *P. aracouchini* a 5,7% para *P. heptaphyllum* ssp. *ullei*.

Na avaliação de Siani *et al.* (2012), a variação de breina foi de 2,0% (*P. hebetatum*) a 7,2% (*P. paniculatum* var. *modestum*) em oito das 12 amostras, sendo observado traços desta substância em duas espécies de *P. heptaphyllum* (obtidas no Amazonas e Rio de Janeiro), *P. opacum* e *P. spruceanum*. Maniladiol foi detectada com uma variação de 1,3% (*P. icicariba*) para 4,6% (*P. hebetatum*), sendo observados traços desta substância em *P. heptaphyllum* (obtido no Rio de Janeiro), *P. spruceanum* e *Trattinnickia rhoifolia*.

A presença de dois triterpenos ausentes de oxigênio (ursa-12-eno e $\Delta^{9(11):12}$ -urseno/oleaneno) foram observadas para cinco amostras estudadas, em *P. apiculatum*, *P. heptaphyllum* ssp. *ullei*, *P. nitidifolium*, *P. strumosum* e *Tetragastris panamensis*, contudo suas concentrações foram muito baixa, sendo detectado traços destas substâncias (> 0,4 %). Não existem relatos desta substância em Burseraceae, contudo a detecção destes triterpenos pode ocorrer por se tratar de um derivado de α -amirina e/ou β -amirina.

A presença de outros três dienos conjugados se mostraram presentes nas oleorresinas de treze espécies, contudo as maiores concentração foram observadas para α -amiradienol em *Dacryodes hopkinsii* (2,69 %) e *Protium decandrum* (2,78 %).

Triterpenos com sítio de oxidação na posição 23 não são comuns em espécies da tribo Protieae e não há relatos em espécies da tribo Canariae. A detecção de íons para os triterpenos 3-oxo-23/24-hidroxi-ursa-12-eno e o 3-oxo-23/24-hidroxi-oleana-12-eno, sugere que grandes concentrações de um destes triterpenos em *Dacryodes hopkinsii* (5,1 %) e concentrações mais reduzidas em *Protium paniculatum* var. *modestum* (1,49 %). A única descrição de triterpeno 23/24 hidroxilado em Protieae, foi descrita por Susunaga *et al.* (2001), sendo isolado o triterpeno 3 β ,24-diidroxiursa-12-eno da oleorresina de *Protium heptaphyllum*.

4.1.2.1.1 Análise quimiométrica dos principais triterpenos das séries urs-12-eno e olean-12-eno

Com interesse de conhecer a variação de α -amirina, β -amirina, α -amirona, β -amirona, breina e maniladiol nas espécies estudadas foram realizadas análises estatísticas dos componentes principais (PCA) e de agrupamento hierárquico dos componentes principais (HCPC). A avaliação de dados multivariados foi realizada correlacionando a matriz computada com as 23 espécies para os 3 triterpenos urs-12-eno e os 3 triterpenos olean-12-eno. No gráfico de PCA (Figura 33) foram avaliados a Dimensão 1 (Dim 1) e a Dimensão 2 (Dim 2), representando 73.09% das informações totais.

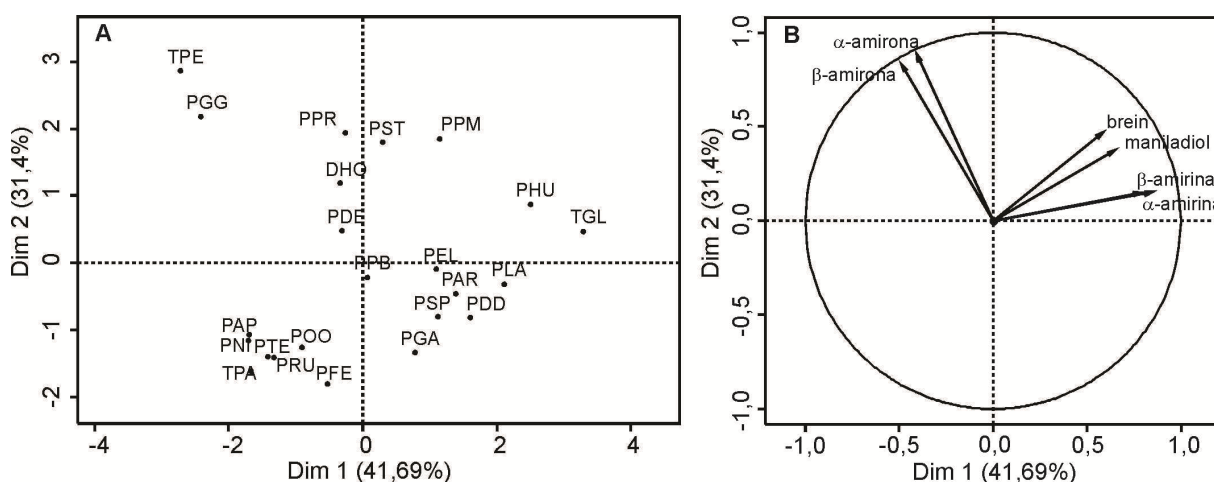


Figura 33: Distribuição de vinte e três espécies por análise dos componentes principais utilizando como variáveis α - e β -amirina, α - e β -amirona, breina e maniladiol. (A) Mapa de Fatores Individuais. (B) Mapa de Variáveis.

A variância mostrou que Dim 1 representa 41.69% de toda a informação, sendo observado no mapa dos fatores das variáveis (Figura 33) um “loaded” positivo para as variáveis breina, maniladiol, α -amirina e β -amirina, e o “loaded” negativo para

O agrupamento **C1** é caracterizado pela alta concentração de α -amirona ($28,8 \pm 0,3\%$) e β -amirona ($16,3 \pm 3,8\%$), concentrações maiores que a observadas para seus análogos α -amirina ($18,6 \pm 5,6\%$) e β -amirina ($9,6 \pm 1,9\%$). Outro fator observado neste grupo foi à ausência dos triterpenos breina e maniladiol. Estas caracterizações foram observadas apenas para duas espécies; *Protium giganteum* var. *giganteum* e *Trattinnickia peruviana*.

O agrupamento **C2** foi caracterizado pela ausência de breina e maniladiol em quase todas as amostras, com exceção de *Protium opacum*. Ainda neste grupo pode-se observar a baixa concentração de α - e β -amirina e α - e β -amirona. Estas características na composição foram observadas para as espécies *Protium apiculatum*, *P. cf. ferrugineum*, *P. nitidifolium*, *P. opacum* ssp. *opacum*, *P. cf. rubrum*, *P. tenuifolium* e *Tetragastris panamensis*.

As espécies *Dacryodes hopkinsii*, *Protium decandrum*, *P. polybotryum* ssp. *blackii*, *P. paniculatum* var. *riedelianum*, *P. strumosum* e *P. paniculatum* var. *modestum*, que compreendem o agrupamento **C3**, apresentaram valores médios de suas concentrações para todas as variáveis analisadas (média intra-variáveis).

O agrupamento **C4**, formado por *P. heptaphyllum* ssp. *ullei* e *Trattinnickia glaziovii*, é caracterizado pelas altas concentrações de α -amirina ($48,0 \pm 10,5\%$) e β -amirina ($19,9 \pm 3,9\%$), pela baixa concentração de α -amirona ($3,6 \pm 2,6\%$) e β -amirona ($1,4 \pm 0,8\%$), e pela alta concentração de breina ($3,9 \pm 0,2\%$) e maniladiol ($5,4 \pm 0,3\%$), comparado aos demais agrupamentos.

O agrupamento **C5**, formado por *P. gallosum*, *P. spruceanum*, *P. divaricatum* ssp. *divaricatum*, *P. elegans*, *P. aracouchini* e *P. cf. laxiflorum* apresentam alto nível de α -amirina ($54,4 \pm 5,8\%$) e β -amirina ($21,8 \pm 5,6\%$) e baixo nível de concentração de α -amirona ($2,7 \pm 0,8\%$) e β -amirona ($2,3 \pm 1,3\%$), sendo diferenciado do agrupamento C4 pela breina e maniladiol por sua baixa concentração.

4.1.2.2 Outros Esqueletos Triterpênicos Detectados

O lupeol, outro triterpeno também descrito em Burseraceae foi detectado nos extratos foi observada para cinco espécies de *Protium* e para as duas espécies de *Trattinnickia*, as concentrações deste triterpeno apresentaram uma variação de 0,2 % (*P. strumosum*) até 1,1 % (*P. giganteum* var. *giganteum*).

Para o gênero *Protium*, a única descrição de lupeol anterior é para a espécie *P. apiculatum* (LIMA *et al.*, 2004), contudo, neste trabalho, este triterpeno não foi detectado para esta espécie.

Descrições de lupeol no gênero *Dacryodes* também foi relatada com o isolamento deste triterpeno em *Dacryodes edulis* e *D. hopkinsii* (EKONG & OKOGUN, 1969; LIMA *et al.*, 2004). Tal detecção não ocorreu na oleorresina de *D. hopkinsii* coletada, mesmo se tratando do mesmo indivíduo estudado por Lima *et al.* (2004).

A presença do lupeol nas duas espécies do gênero *Trattinnickia* é retratada pela primeira vez. Anteriormente, sua detecção nas oleorresinas de espécies do gênero *Dacryodes* indica similaridades quimiotaxonômicas, já que ambos gêneros pertencem a mesma tribo: a *Canarieae*.

A lupenona, tem descrição de seu isolamento apenas nas espécies *Commiphora mirra* e *Boswellia carteri* (MINCIONE & IAVARONE, 1972; MORIKAWA *et al.*, 2010). Sua detecção em uma das espécies estudadas, a *Protium spruceanum*, foi observada na concentração de 1,4 %.

Outro triterpeno descrito uma única vez em espécies de Burseraceae é o derivado de esqueleto taraxastano, isolado de *Protium heptaphyllum* (SUSUNAGA *et al.*, 2001). Contudo, mesmo não podendo determinar a posição da insaturação, foi possível detectar um triterpeno deste esqueleto em *P. heptaphyllum* ssp. *ulei*, além de *P. aracouchini*, *P. elegans*,

P. paniculatum ssp. *modestum*, *P. spruceanum* e em *Trattinnickia glaziovii*, em concentrações que não ultrapassaram 0,4 %.

Os derivados da série friedooleanano foram detectados oito espécies de *Protium* e em *Tetragastris panamensis*. O taraxerol, foi detectado nas espécies *Protium apiculatum*, *P. elegans*, *P. heptaphyllum* ssp. *ullei*, *P. nitidifolium* e *P. tenuifolium*, já seu derivado, a taraxerona, foi detectado nas espécies *P. apiculatum* e *P. nitidifolium* em concentrações maiores que sua forma hidroxilada. Este esqueleto triterpênico foi isolado anteriormente nas cascas de *Canarium zeylanicum* (BANDARANAIKE *et al.*, 1980) e nas folhas de *Tetragastris altissima* (LIMA *et al.*, 2001).

A friedelina, mais comum dos triterpenos friedooleanano descrito em Burseraceae foi detectado em *P. ferrugineum* e *P. heptaphyllum* ssp. *ullei*. Este triterpeno já foi isolado das partes aéreas de *Commiphora opobalsamum* (ABBAS *et al.*, 2007), da oleorresina de *P. crenatum* e *P. heptaphyllum* (USUBILAGA *et al.*, 2004; SUSUNAGA *et al.*, 2001), das folhas de *P. strumosum* (GUIMARÃES & SIANI, 2007) e *Tetragastris altissima* (LIMA *et al.*, 2001), e das cascas de *Santiria trimera* (da SILVA *et al.*, 1990), além de ter sido detectado na oleorresina de *P. altsoni*, *P. icicariba* e *P. spruceanum*. (SIANI *et al.*, 2012).

Neste trabalho, foi identificado o glutinol pela primeira vez para as espécies *Protium spruceanum*, *P. tenuifolium* e *Tetragastris panamensis*. Peraza-Sánchez *et al.* (1995) e Loemba-Ndembi & Silou, (2006) isolaram este triterpenos anteriormente em oleorresinas de *Bursera simaruba* e *Dacryodes edulis*, espécies das tribos Bursereae e Canarieae, respectivamente, sendo reportado pela primeira vez em espécies da tribo Protieae.

O multiflorenol esta sendo reportado pela primeira vez na família Burseraceae, sendo detectado nas espécies *Protium* cf. *ferrugineum* e, *P. tenuifolium*, *P. heptaphyllum* ssp. *ullei* e em *Tetragastris panamensis*. Uma substância de esqueleto multiflorano foi isolado anteriormente das cascas de *Tetragastris altissima* (LIMA *et al.*, 2001), com a obtenção do

ácido 2,3-*seco*-isobronônico, mas seu precursor, o multiflorenol, ainda não havia sido identificado em Burseraceae.

4.2 Potencial Citotóxico de Oleorresinas de Burseraceae

4.2.1 Seleção dos Extratos com Potencial Citotóxico

Dos 23 extratos em hexano avaliados por CG, foram selecionados 14 extratos, os quais foram submetidos a ensaios de citotoxicidade contra a linhagens de células tumorais HCT-8, MDA/MB-435 e SF-295. Os resultados estão expressos em porcentagem de inibição na concentração de 50 µg/mL, na Tabela 9.

Para a determinação dos extratos ativos foi utilizada como valor de corte, a atividade de inibição acima de 80%, sendo considerada esta atividade elevada. Os extratos com atividades entre 50 a 79 % foram consideradas moderadamente ativos, e abaixo de 50% pouco ativos.

A avaliação dos ensaios citotóxicos demonstraram que os extratos em hexano HrPNI (*Protium nitidifolium*), HrPRU (*Protium* cf. *rubrum*) e HrTPE (*Trattinnickia peruviana*) apresentaram alta atividade contra a linhagem HCT-8. Contra a linhagem SF-295, foram observadas atividades elevadas dos extratos HrPRU e HrTPE. Contudo, para a linhagem MDA/MB-435, nenhuns dos extratos apresentaram atividades elevadas.

A relação dos dados do perfil químico demonstrou que a amostra HrTPE apresenta em sua composição os monoterpenos *trans*-*p*-mentano, *p*-ment-3-eno, e os triterpenos α -amiradienol e lupeol, além de outros seis triterpenos não identificados, que não foram detectados nas demais amostras em que a citotoxicidade foi avaliada.

Tabela 9: Atividade citotóxica por extratos em hexano de Burseraceae na concentração de 50 µg/mL

Extrato em Hexano	Citotoxicidade(%)		
	HCT-8	MDA/MB-435	SF-295
HrPAP	68,78 (± 22,63)	47,33 (± 2,31)	53,08 (± 16,83)
HrPDE	69,68 (± 39,41)	54,49 (± 10,31)	45,40 (± 45,33)
HrPEL	40,05 (± 14,18)	36,02 (± 4,44)	43,94 (± 34,02)
HrPGG	52,78	43,54	43,25
HrPHU	55,76 (± 3,53)	40,73 (± 6,13)	36,93 (± 22,19)
HrPNI	89,20 (± 5,09)	44,37 (± 10,58)	64,46 (± 14,99)
HrPOO	SA	26,21	SA
HrPPM	42,47 (± 0,35)	9,43 (± 1,51)	25,03 (± 20,06)
HrPPB	38,48	39,22	17,60
HrPRU	93,08 (± 4,01)	53,81 (± 28,07)	93,46 (± 14,09)
HrPTE	78,88 (± 9,49)	35,76 (± 12,44)	68,46 (± 0,81)
HrTPA	23,85	44,09	SA
HrTPE	93,08 (± 11,63)	68,57 (± 41,78)	86,34 (± 20,21)
HrTGL	52,86 (± 0,12)	7,48 (± 17,07)	46,54 (± 4,19)
DOX	98,60	100,00	91,35
DOX – Droga padrão. SA – Sem Atividade			

Já a amostra HrPRU, apresentou em sua composição os sesquiterpenos β -elemeno; β -selineno; outros dois sesquiterpenos não identificados, e o triterpenos lupenona; além de outros oito triterpenos não identificados, que não foram detectados nas demais amostras em que a citotoxicidade foi avaliada.

No extrato HrPNI, foi observada uma alta concentração de limoneno (4,20 %) em relação a outro extrato em que esta substância foi detectada (HrPAP, 0,54%) o e o mirtenol, detectado apenas em HrPNI. Dentre os triterpenos, três picos por CG foram observados por

apenas em PNI, contudo apenas um deste foi identificado, o 3-hidroxiursa-12-eno-28-al, na concentração de 9,74%.

Visando avaliar os extratos de maior polaridade, as amostras obtidas em acetato de etila provenientes das mesmas espécies que as amostras em hexano foram submetidas à mesma avaliação de atividade biológica (Tabela 10).

Tabela 10: Atividade citotóxica por extratos em acetato de etila de Burseraceae na concentração de 50 µg/mL

Extrato em Acetato de Etila	Citotoxicidade(%)		
	HCT-8	MDA/MB-435	SF-295
ArPAP	86,58 (±12,50)	53,49 (±20,80)	72,98 (±5,14)
ArPDE	59,18	65,06	31,80
ArPEL	50,47	69,47	14,61
ArPGG	88,74	97,84	74,50
ArPHU	47,66 (±0,87)	SA	29,03 (±0,73)
ArPNI	61,33 (±1,68)	38,72 (±7,02)	49,03 (±6,54)
ArPOO	5,08	27,82	2,20
ArPPN	31,25 (±1,50)	SA	10,53 (±3,67)
ArPPB	40,50 (±0,12)	6,47 (±8,71)	53,34 (±24,10)
ArPRU	68,04	54,62	23,57
ArPTE	55,36 (±1,10)	SA	36,20 (±12,20)
ArTPA	46,91	73,93	5,11
ArTPE	33,93	49,36	21,85
ArTGL	92,88	96,23	23,15
DOX	98,60	100,00	91,35
DOX – Droga padrão. SA – Sem Atividade			

Os resultados apresentados na tabela 10 para os extratos em acetato de etila mostraram que a atividade inibitória elevada ocorreu em amostras de espécies diferentes das

observadas nos extratos em hexano. A alta atividade contra a linhagem HCT-8 foi observada para os extratos ArPAP (*Protium apiculatum*), ArPGG (*Protium giganteum* var *giganteum*) e ArTGL (*Trattinnickia glaziovii*), apresentando inibição de 86,58; 88,74; e 92,88%, respectivamente. Contra a linhagem MDA/MB-435, foram observadas atividades elevadas dos extratos ArPGG e ArTGL, onde inibições de 97,84 e 96,23%, respectivamente, foram obtidas.

Os resultados apresentados nas Tabelas 9 e 10 demonstram que a citotoxicidade contra a linhagem SF-295, foi observada apenas para extratos obtidos em hexano, já a linhagem MDAM B-435 apresentou atividade apenas por extratos obtidos em acetato de etila. Estes resultados demonstraram que a citotoxicidade entre as linhagens SF-295 e MDAM B-435 apresentam sensibilidades diferentes para substâncias obtidas em processos de extração com solventes em diferentes polaridades.

A atividade do extrato em hexano pode estar relacionado com alguns compostos voláteis. O potencial citotóxico de compostos voláteis já foi descrito anteriormente por algumas espécies de Burseraceae, como o ensaio contra a linhagens de células JJ74, SP2/0 e Neuro-2A, testadas com o óleo essencial das folhas e quatro espécies de *Protium*, e pelo óleo essencial da oleorresina de *P. heptaphyllum* (SIANI *et al.*, 1999b), e contra as linhagens A-549 e DLD-1, sendo descrito como constituintes majoritários deste óleo essencial o limoneno, β -cariofileno, α -humuleno e germacreno D (SYLVESTRE *et al.*, 2007).

Não existem descrições de citotoxicidade para o α -amiradienol identificado no extrato HrTPE, contudo o triterpeno 3-hidroxiursa-12-eno-28-al apresentou uma CI_{50} de 6,4 μ M em ensaio de citotoxicidade na linhagem celular B16 2F2 (melanoma de rato) (HATA *et al.*, 2002), o que sugere que esta substância pode estar envolvida na atividade observada contra a linhagem HCT-8. Contudo, triterpenos de baixa e média polaridade, não apresentam grandes valores de atividade citotóxica, como demonstrou os resultados para triterpenos de esqueleto

cicloartano, que apresentaram atividade moderada (SHEN *et al.*, 2008). Atividade moderada esta como a observada para alguns dos extratos avaliados.

Para dar continuidade ao estudo de citotoxicidade, foi selecionada a amostra HrTPE, para dar segmento ao estudo, sendo esta amostra submetida a fracionamento cromatográfico visando o isolamento de possíveis compostos bioativos.

4.2.2 Fracionamento do Extrato em Hexano HrTPE: extrato citotóxico contra as linhagens HCT-8 e SF-295

O extrato HrTPE (1,0230g) foi submetido à cromatografia em coluna com gel de sílica 60 (70-230 mesh) impregnada com KOH obtendo duas frações (Figura 35). Uma fração de substâncias não ácidas, obtida com diclorometano (DCM), dando origem a fração não ácida HrTPE η ; e uma fração salina, obtida em metanol, dando origem a fração salina denominada HrTPE σ K.

A fração HrTPE η (822,2 mg) foi submetida à cromatografia em coluna com gel de sílica 60 (70-230 mesh) ($\varnothing_{\text{int}} = 2$ cm, $h_{\text{sílica}} = 12,5$ cm, $m_{\text{sílica}} = 18$ g, pastilha – 2g SiO₂). Foram recolhidas cinco frações, sendo a fração “A” eluída com 300 mL de hexano 100%, a fração “B” com 300 mL de hexano:DCM (1:1), a fração “C” com 300 mL de DCM 100%, a fração “D” com 300 mL de DCM:AcOEt (1:1) e uma fração “E” com 100 mL de MeOH.

A fração HrTPE σ K foi transferida para um funil de separação com 50 mL de água destilada junto a 30 mL de DCM. Em seguida foi realizada a leitura do pH (pH 11) e acidificada com HCl 1N até pH 4. Após a acidificação a fração orgânica foi extraída, sendo realizadas mais quatro extrações com 30 mL de DCM, sendo reunidas posteriormente e concentradas originando a fração de ácidos HrTPE $\text{pH}4$.

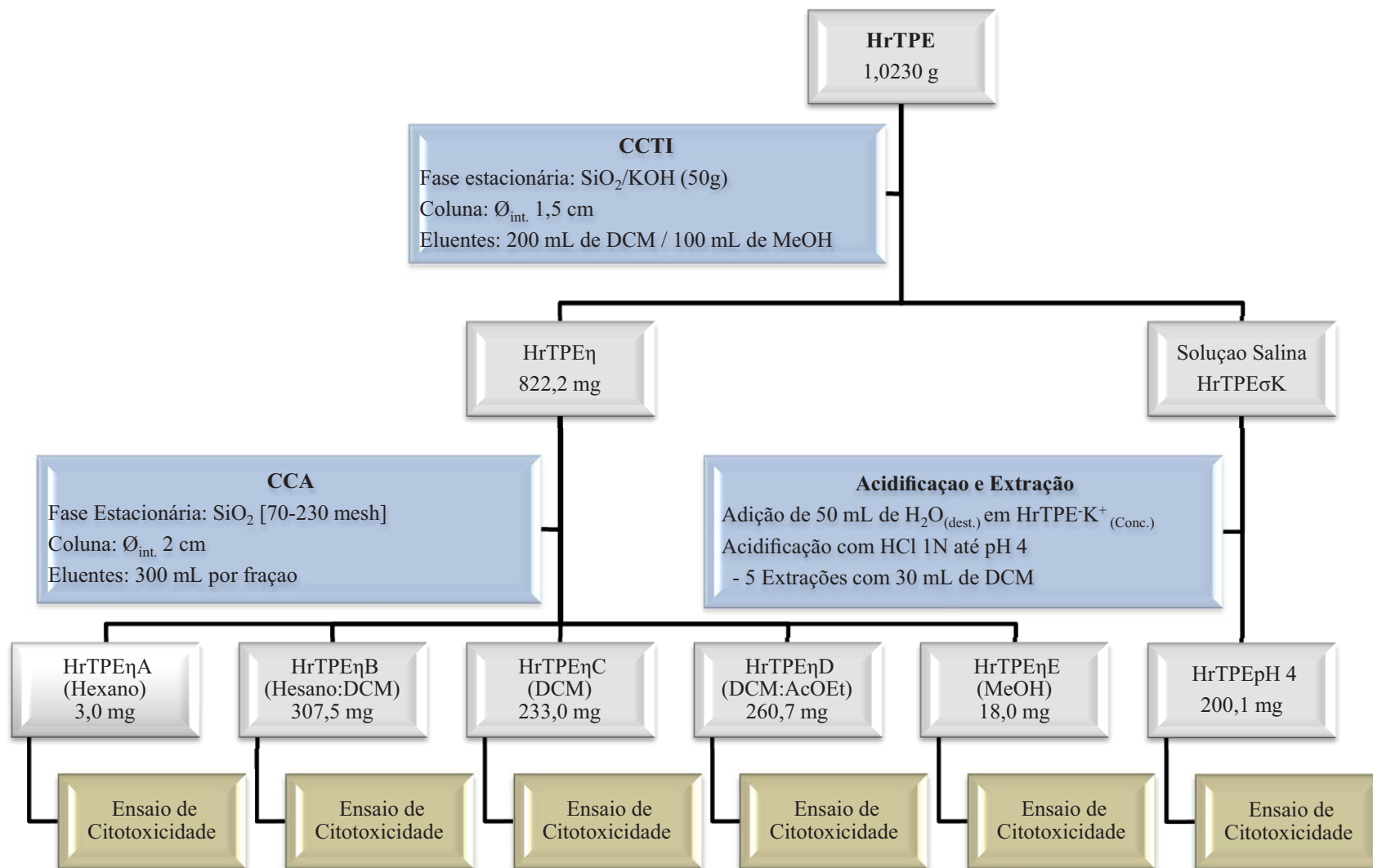


Figura 35: Fluxograma de filtração da amostra biologicamente ativa HrTPE

A eficiência na separação das cinco subfrações de não ácidos HrTPE η A, HrTPE η B, HrTPE η C, HrTPE η D e HrTPE η E e da fração de ácidos HrTPEpH4 foi avaliada por CCD (Figura 36). Como o processo cromatográfico se mostrou eficiente, as seis frações foram enviadas para avaliação de citotoxicidade contra as linhagens de células tumorais HCT-8, MDA/MB-435 e SF-295.

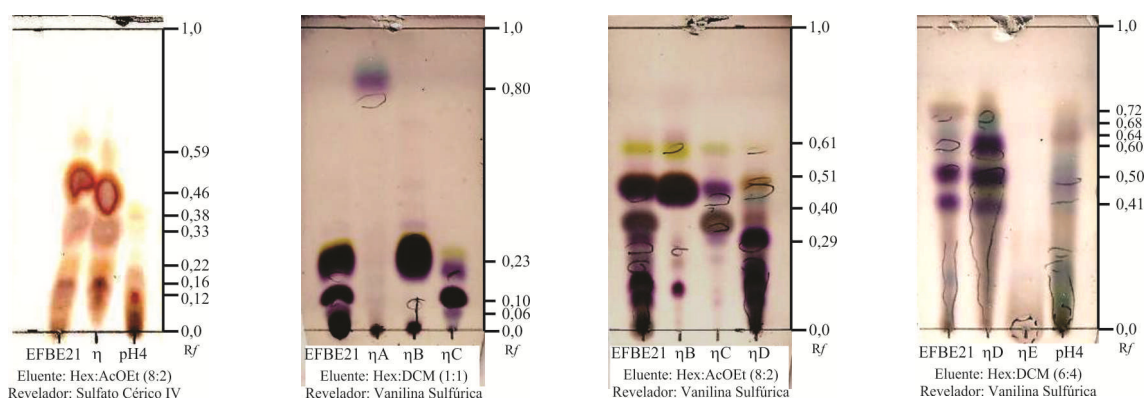


Figura 36: Perfil cromatográfico em CCD de HrTPE e suas frações

Após a avaliação da citotoxicidade, foi verificado que apenas para uma das seis frações avaliadas, ocorreu inibição de crescimento: a fração HrTPE η D (Figura 37). A avaliação do extrato havia demonstrado uma inibição de 93% contra a linhagem HCT-8 e 86% contra a linhagem SF-295.

Contudo, o resultado demonstrou citotoxicidade elevada apenas contra a linhagem HCT-8 (94,7%), esta inibição foi obtida pela fração HrTPE η D. Já a fração HrTPEpH4 apresentou apenas atividade moderada contra esta linhagem tumoral (66,7%). As demais frações não apresentaram efeito citotóxico contra esta linhagem de célula tumoral.

Contra a linhagem SF-295, a atividade de maior valor observada foi de 71,8% pela fração HrTPEpH4. Já a fração HrTPE η D apresentou pouca atividade, com inibição de 49,8%. Esta redução na atividade inibitória pode estar relacionada a efeitos sinérgicos entre substâncias presentes no extrato não fracionado, HrTPE.

Buscando conhecer a composição química da fração ativa, foram realizados novos experimentos de cromatografia em coluna, com obtenção de maiores quantidades da fração HrTPE η D, e isolamento de substâncias desta fração (Seção 4.3.1).

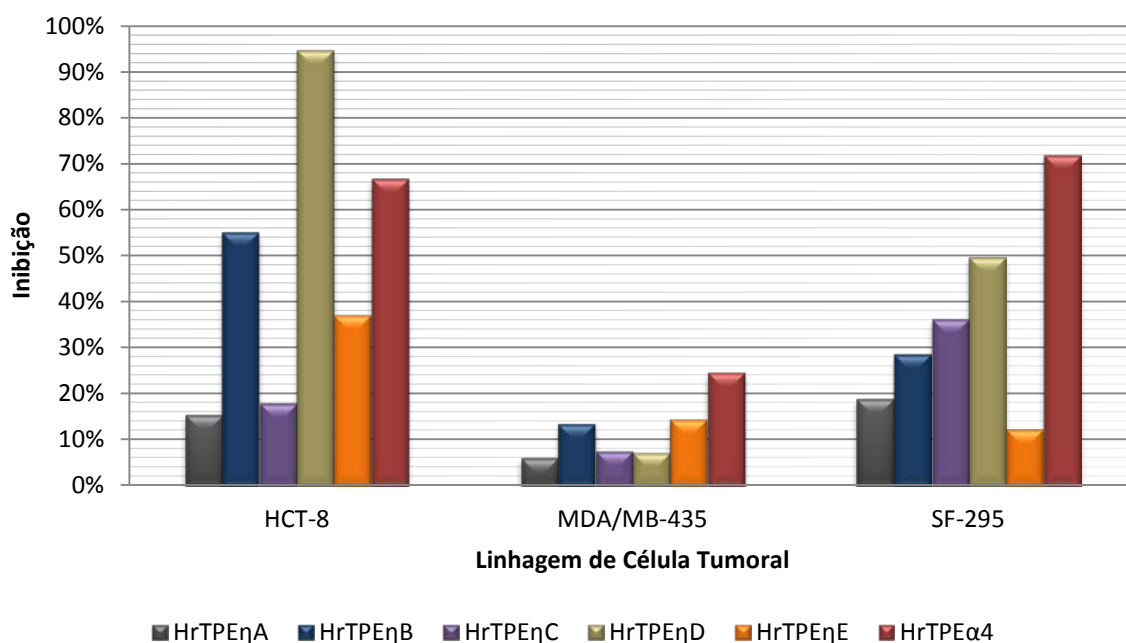


Figura 37: Atividade citotóxica das frações de HrTPE

4.3 Isolamento e Elucidação Estrutural das Substâncias de Oleorresinas de Burseraceae

4.3.1 Fracionamento do Extrato em Hexano de *Trattinnickia peruviana* (HrTPE)

A amostra HrTPE foi selecionada para fracionamento químico devido à citotoxicidade que apresentou para uma de suas frações, a HrTPE η D (seção 4.2.2, pg. 112). Para o aumento da quantidade da fração HrTPE η D, o extrato HrTPE foi submetido a um novo

fracionamento, com aumento da massa inicial e reformulação dos parâmetros do experimento de cromatografia em coluna.

Parte do extrato HrTPE (6,0346g) foi submetida à cromatografia em coluna com gel de sílica 60 (70-230 mesh) impregnada com KOH ($\varnothing_{\text{int}} = 3,6 \text{ cm}$, $h_{\text{sílica}} = 7 \text{ cm}$, $m_{\text{sílica}} = 60 \text{ g}$, aplicação da amostra: líquida – 10 ml de DCM). Foi coletada apenas a amostra de interesse, eluída com 1000 mL de DCM. A fração em DCM, após concentrada deu origem a fração não ácida HrTPE η' (5,6806).

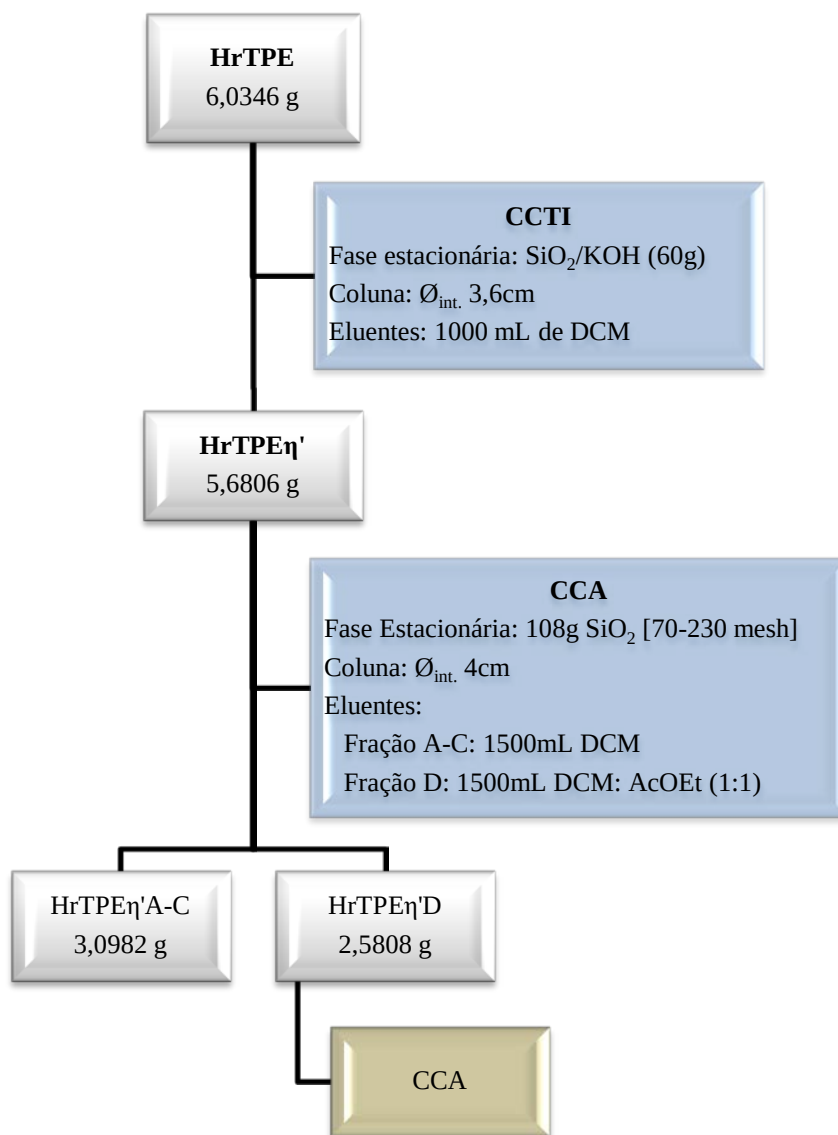


Figura 38: Fluxograma de obtenção de HrTPE η' D

A fração HrTPE η ' (5,6806 g) foi submetida à cromatografia em coluna com gel de sílica 60 (70-230 mesh) ($\varnothing_{\text{int}} = 4$ cm, $h_{\text{sílica}} = 19,5$ cm, $m_{\text{sílica}} = 108$ g, aplicação da amostra: líquida – 10 mL de DCM). Foram recolhidas duas frações, sendo a fração “A-C” eluída com 1500 mL de DCM 100%, e a fração “D” eluída com 1500 mL de DCM:AcOEt (1:1), obtendo 2,5808g da fração denominada HrTPE η 'D, como mostra o fluxograma na Figura 38. A comparação por CCD entre a fração enviada para avaliação citotóxica (HrTPE η D) e a obtida no processo de ampliação de amostra (HrTPE η 'D), esta apresentada na Figura 39, mostrando semelhança entre os dois processos de fracionamento.

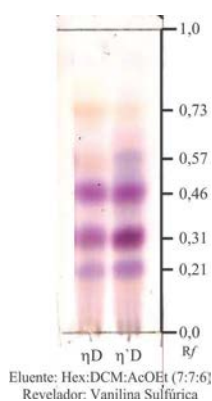


Figura 39: Comparação do perfil cromatográfico em CCD de HrTPE η D e HrTPE η 'D

A fração HrTPE η 'D (1,0020g) foi submetida à cromatografia em coluna com gel de sílica 60 (70-230 mesh) ($\varnothing_{\text{int}} = 2$ cm, $h_{\text{sílica}} = 20,6$ cm, $m_{\text{sílica}} = 30$ g, aplicação da amostra: líquida – 5 mL de Hexano e DCM (1:1)). Foram obtidas cinco frações, sendo a primeira fração eluída com 120 mL da mistura hexano e DCM (1:1), a segunda fração eluída com 120 mL da mistura de hexano e DCM (1:1) com 5% de acetato de etila, a terceira fração eluída com 120 mL da mistura de hexano e DCM (1:1) com 15% de acetato de etila, a quarta fração eluída com 120 mL da mistura de hexano e DCM (1:1) com 25% de acetato de etila e a quinta fração eluída com 120 mL de metanol, como mostra o fluxograma (Figura 40).

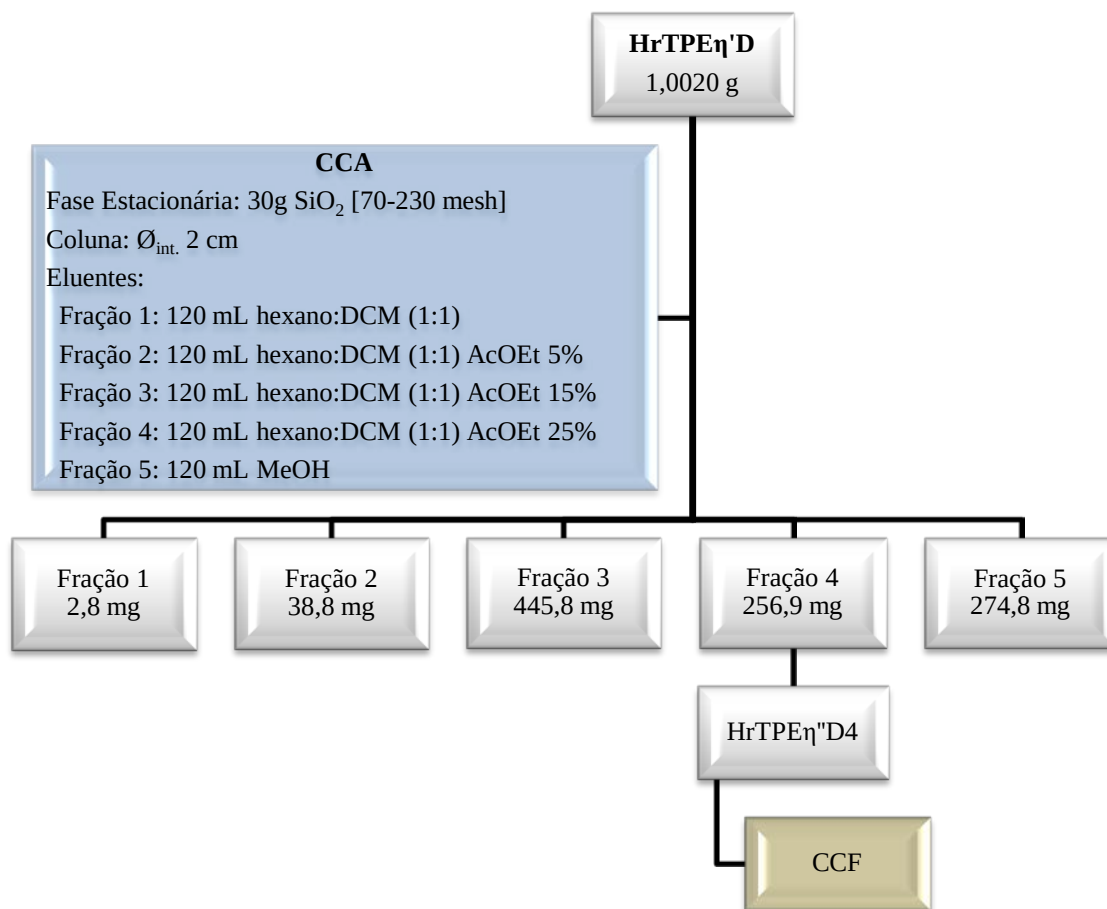


Figura 40: Fluxograma do fracionamento da amostra HrTPEη'D

A eficiência na separação das cinco sub-frações obtidas no fracionamento de HrTPEη'D foi avaliada por CCD (Figura 41), sob eluição da mistura de solventes Hexano e DCM (1:1) com acetato de etila 15%. Os resultados apresentados pela avaliação de CCD determinou interesse pela fração HrTPEη'D4 pelas manchas de R_f 0,44 e R_f 0,33, sendo estas duas frações submetidas fracionamento por cromatografia em coluna "Flash".

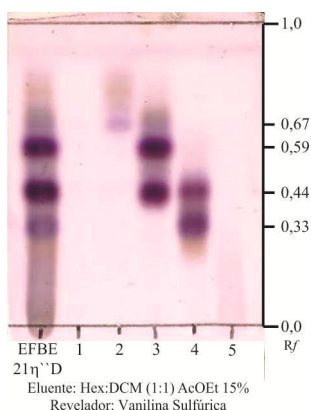


Figura 41: Perfil por CCD das frações de HrTPEη'D

A fração HrTPEη'D4 (256,9 mg) foi submetida à cromatografia em coluna “flash” ($\varnothing_{\text{int}} = 2 \text{ cm}$, $h_{\text{silica}} = 15,0 \text{ cm}$, $m_{\text{silica}} = 25 \text{ g}$). Para a eluição foram utilizados dois eluentes: 200 mL de uma mistura de hexano e acetato de etila (8:2), onde foram coletadas 20 frações de 10 mL; e 200 mL de uma mistura de hexano e acetato de etila (7:3), onde foram coletadas outras 20 frações de 10 mL (Figura 42). Não foi realizada a coleta do volume morto. Para a limpeza do material retido na coluna foi coletada uma única fração de 120 mL em metanol.

Após a avaliação por CCD, foram reunidas as frações 18 a 24 que apresentaram uma única mancha em CCD no R_f 0,23, fornecendo 42,8 mg de uma amostra denominada TPE-1. Para identificação da amostra TPE-1, 10 mg foram submetidas a análises de espectrometria de massas acoplada a cromatógrafo a gás (CG-EM) e ressonância magnética nuclear (RMN de ^1H , ^{13}C e os bidimensionais (^1H - ^{13}C)-HSQC e (^1H - ^{13}C)-HMBC).

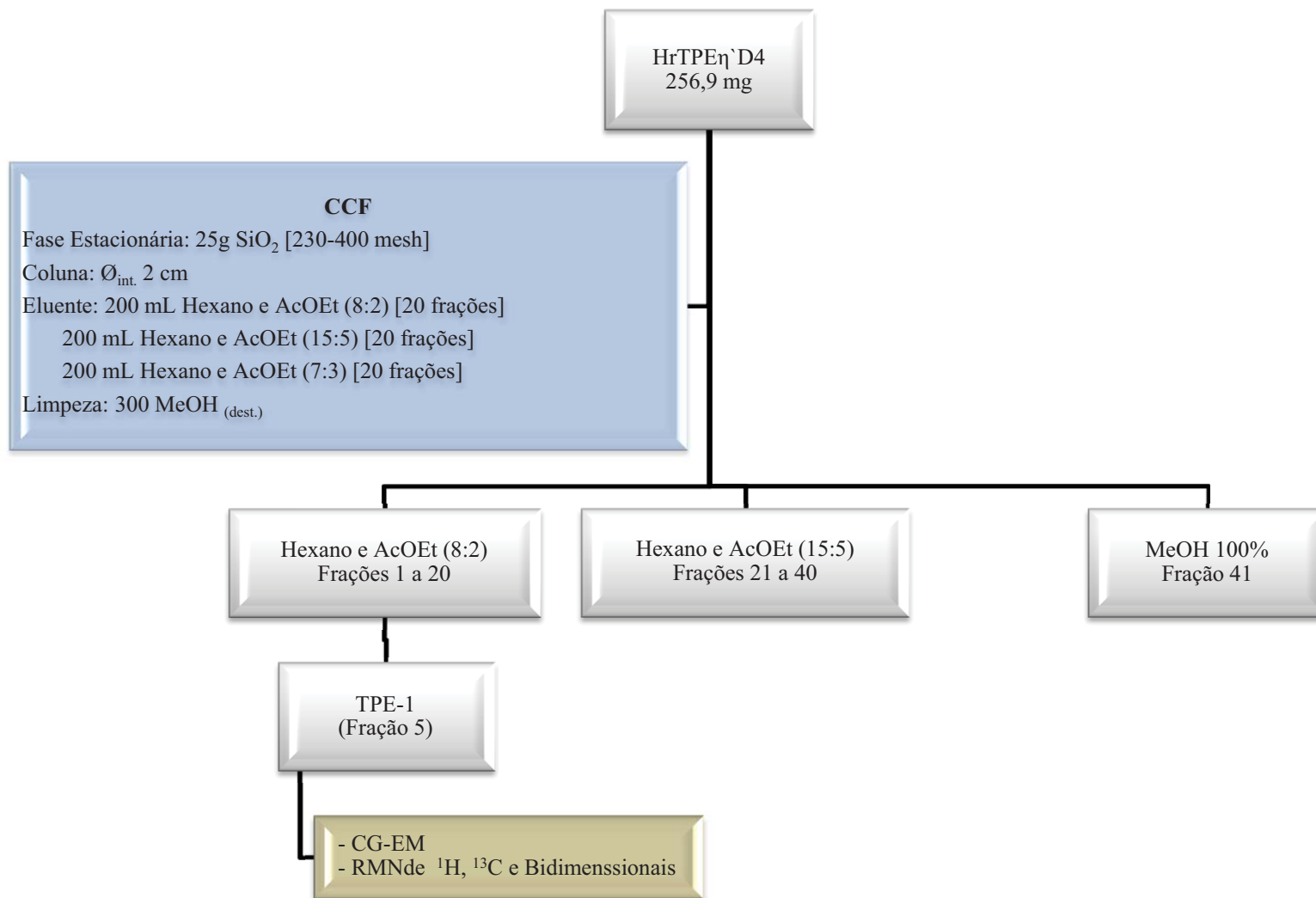


Figura 42: Fluxograma de fracionamento de HrTPE η 'D4

4.3.1.1 Identificação de TPE-1

A fração identificada como TPE-1 apresentou sólidos de coloração branca e formato de agulha após recristalização em DCM. A análise da fração por CG-EM (Figura 43-A) mostrou a presença de um único pico no R_t 36,99 min. O espectro de massas (Figura 43-B) apresentou fragmento de m/z 424 $[M]^+$ (100).

A presença do íon molecular $[M]^+$ como pico base (PB), é característico de triterpenos pentacíclicos com insaturações $\Delta^{9(11):12}$, como já foi reportado por Cruz-Cañizares *et al.*, 2005 e Siani *et al.*, 2012 para os triterpenos oleana-9(11),12-dieno-3-ol e ursina-9(11),12-dieno-3-ol.

O espectro de massas apresentou ainda o íon m/z 409 $[M^+ - 15]$, característico de perda de metila, perda comum observada em terpenos. Os íons m/z 406 $[M^+ - 18]$ e m/z 391 $[m/z$ 409 - 18], indicam fragmento característico de perda de água, o que sugere a presença de hidroxila na estrutura.

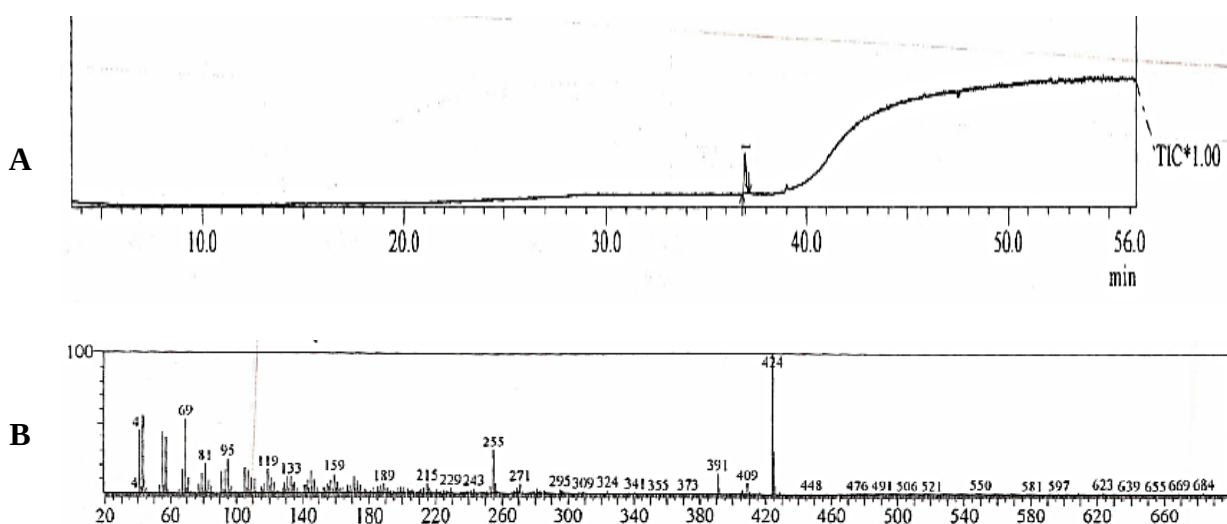


Figura 43: Cromatograma de íons totais (A) e espectro de massas (B) da fração TPE-1

No espectro de RMN de ^1H (Figura 44) foram detectados sete simpletos nos sinais em δ 0,88 (6H), 0,90 (3H), 0,91 (3H), 1,01 (3H), 1,03 (3H), 1,15 (3H) e 1,22 (3H), sugerindo a presença de oito hidrogênios de grupos metílicos.

A presença de um duplo duplete em δ 2,14 (dd, $J=13,2, 4,4$ Hz, 1H), sugere a presença de um hidrogênio de grupo metínico na posição axial acoplado com dois hidrogênios, um na posição axial e outro na posição equatorial.

Dois hidrogênios metínicos na região de olefinas foram observados com os dupletos em δ 5,52 (d, $J=5,9$ Hz, 1 H) e 5,61 (d, $J=5,9$ Hz, 1 H), sendo que suas constantes de acoplamento sugerem que se tratam de hidrogênios de carbonos vizinhos. A presença de hidroxila, sugerida pelo espectro de massa, foi confirmada pelo tripleto em δ 3,42 ($J=2,7$ (x2) Hz, 1H), região de hidrogênio ligado a grupo carbinólico, sua posição foi estabelecida pelo multiplete com $J=2,7$ Hz, que sugere que o hidrogênio se encontre na posição equatorial e a hidroxila na posição axial (posição α).

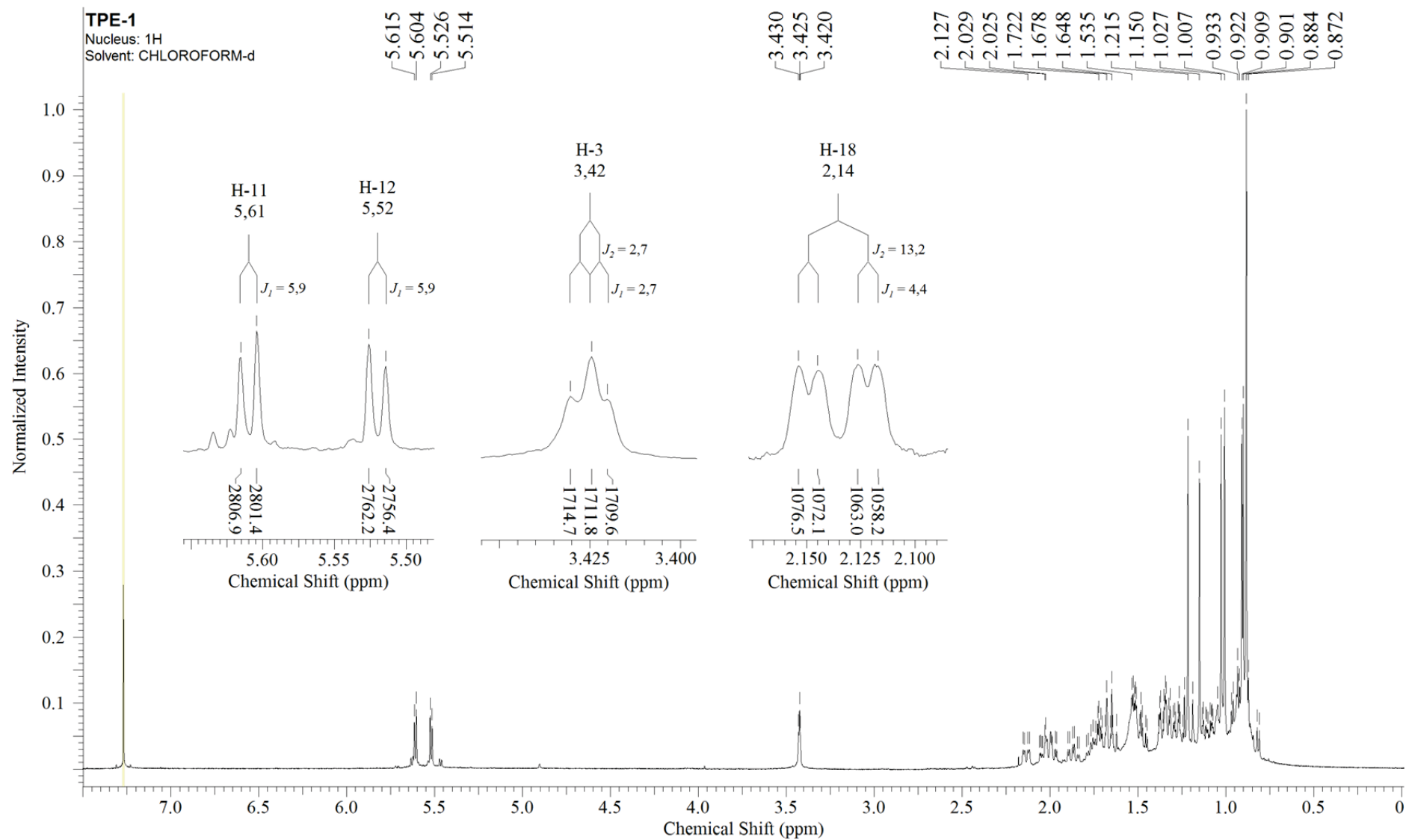


Figura 44: Espectro de RMN de ^1H da fração TPE-1 e ampliações dos multipletos (500 MHz, Solvente/Referência: CDCl_3)

No experimento RMN de ^{13}C (Figuras 45) foram detectados a presença de 30 sinais. Dentre os sinais observados, a presença de um carbono carbinólico em δ 75,7, reafirma novamente a hidroxila sugerida pelo espectro de massas e pelo espectro de RMN de ^1H .

O espectro de RMN de ^{13}C apresentou ainda quatro sinais em δ 115,4; 120,7; 147,0 e 154,5, referentes a carbonos olefinicos, confirmando a presença de duas insaturações sugerida pelo espectro de massas.

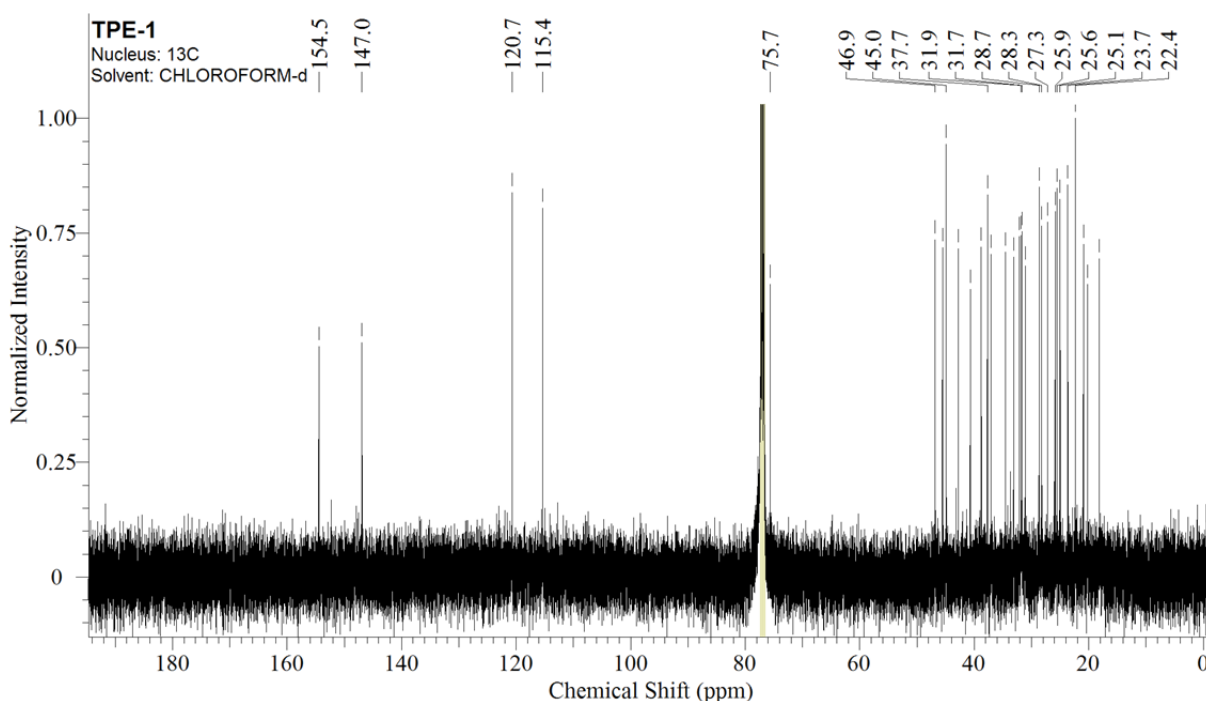


Figura 45: Espectro de RMN de ^{13}C da fração TPE-1 (125 MHz, Solvente/Referência: CDCl_3)

A atribuição das correlações dos sinais de RMN de ^1H dos hidrogênios de TPE-1 para seus respectivos carbonos, foram obtidas através do espectro de correlação heteronuclear (^1H - ^{13}C)-HSQC (Figura 46).

O experimento de correlação (^1H - ^{13}C)-HSQC demonstrou que dos quatro sinais de carbonos olefinicos, somente os carbonos em δ 115,4 e 120,7 se correlacionam com hidrogênios, sendo estes em δ 5,61 e 5,52, respectivamente.

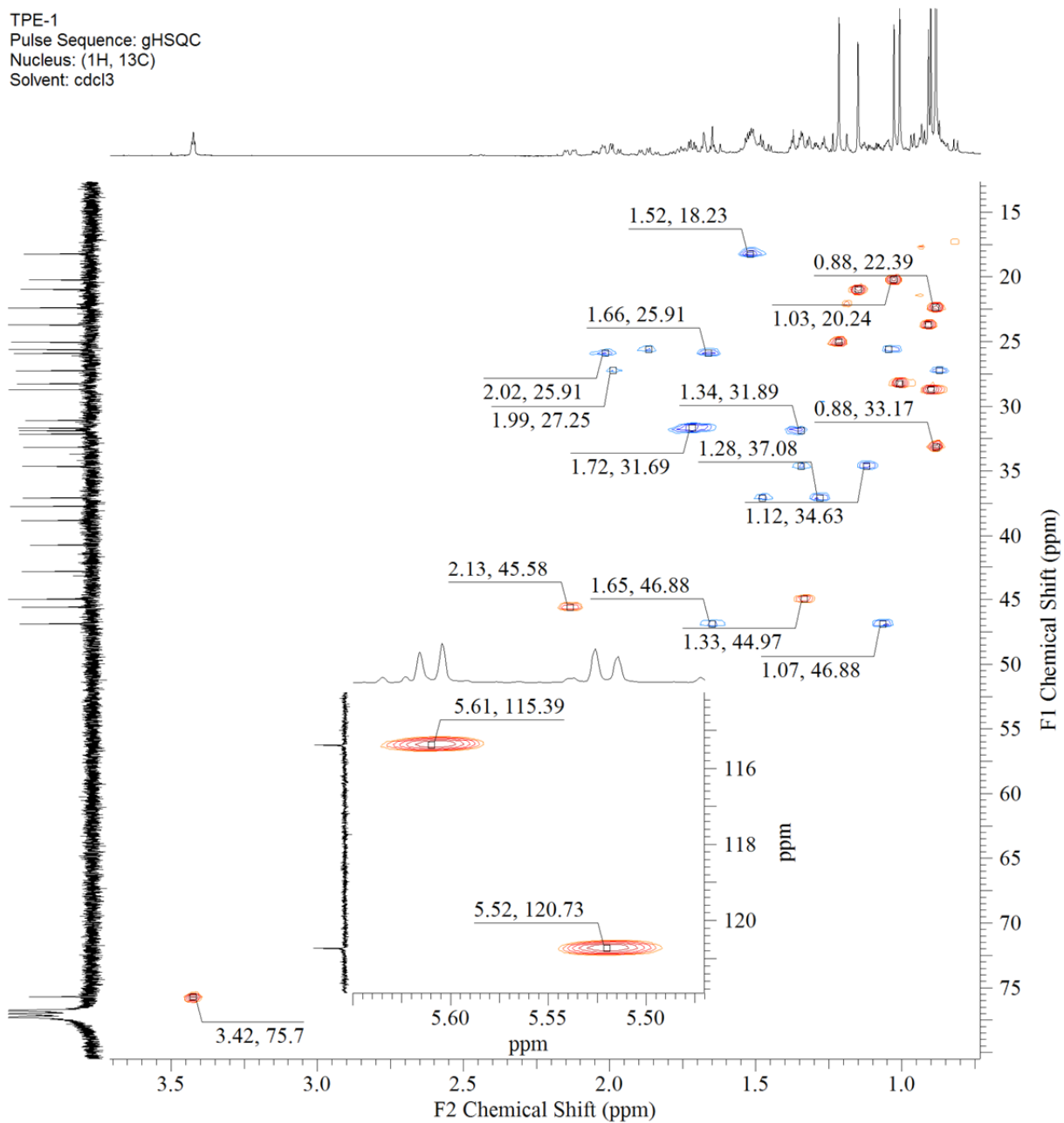


Figura 46: Espectro de correlação heteronuclear (^1H - ^{13}C)-HSQC da fração TPE-1 (Solvente: CDCl_3)

O experimento (^1H - ^{13}C)-HMBC (Figura 48) mostrou que os hidrogênios metílicos em δ 1,01 (H-23) e 0,88 (H-24), se correlacionam com os carbonos em δ 37,7 (C-4) e 45,0 (C-5), que o hidrogênio H-23 se correlaciona com o carbono carbinólico C-3 (δ 75,7) e com o carbono C-24 (δ 22,4) e que o hidrogênio H-24 se correlaciona com o carbono C-23 (δ 28,3), sugerindo uma parte do anel A da estrutura.

No experimento (^1H - ^{13}C)-HMBC pôde-se determinar a relação entre os anéis B, C e D. O sinal do hidrogênio metílico H-25 (δ 1,22) se correlaciona com os carbonos em δ 31,7 (C-1), 45,0 (C-5), 154,5 (C-9) e 38,8 (C-10). O hidrogênio metílico em δ 1,15 (H-26) se correlaciona com os carbonos em δ 31,9 (C-7), 42,8 (C-8), 154,5 (C-9) e 40,7 (C-14). O hidrogênio metílico em δ 1,03 (H-27) apresentou correlação com os carbonos C-8 e C-14, além dos carbonos em δ 147,0 (C-13) e 25,6 (C-15).

Os hidrogênios metílicos H-29 (δ 0,91) e H-30 (δ 1,25) se correlacionam no experimento (^1H - ^{13}C)-HMBC com os carbonos em δ 46,9 (C-19), 31,1 (C-20) e 34,6 (C-21), sendo que o hidrogênio H-29 se correlaciona com o carbono C-30 (δ 33,2) e que o hidrogênio H-30 se correlaciona com o carbono C-29 (δ 23,7), sugerindo uma parte do anel E. A relação entre o anel E e o anel D foi observado pelo hidrogênio metilênico em δ 0,90 (H-28), que se correlaciona com os carbonos em δ 27,3 (C-16); 32,2 (C-17); 45,6 (C-18); 46,9 (C-19); 34,6 (C-21) e 37,1 (C-22).

Após avaliação dos dados de RMN 1D e 2D, e comparação dos dados de RMN de ^{13}C com os apresentados por Tanaka e Matsunaga (1988) (Tabela 11), confirmou-se que a fração TPE-1 se trata do triterpeno 3-hidroxioleana-9(11),12-dieno (Figura 47-A), com a hidroxila na posição axial ($3\alpha\text{-OH}$). As demais correlações observadas pelo experimento (^1H - ^{13}C)-HMBC estão apresentadas na Figura 47-B.

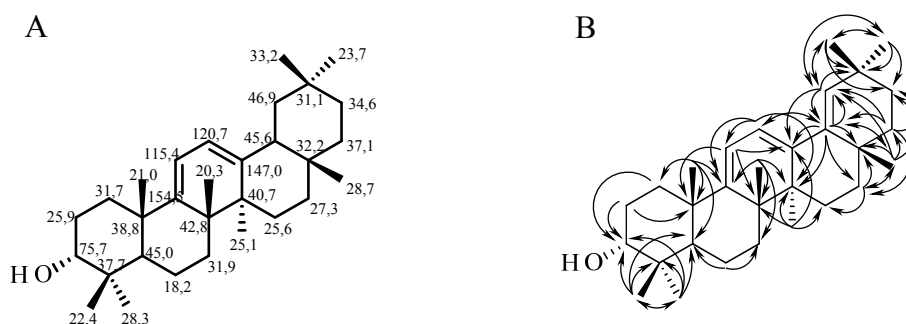


Figura 47: Estrutura do 3 α -hidroxioleana-9(11),12-dieno isolado de *Trattinnickia peruviana* com sinais de RMN de ^{13}C (A) e correlações do experimento (^1H - ^{13}C)-HMBC (B)

Tabela 11: Sinais observados nos experimentos de RMN 1D e 2D para os cristais da fração TPE-1

C n°	δ_C (ppm)	HSQC δ_H (ppm) [m, J, $\int$]	HMBC C (n°)	δ_C^a (ppm)
1	31,7	1,69 – 1,73 [m]	C-3	32,9
2	25,9	1,63 – 1,68 [m] 1,98 – 2,03 [m]	C-3; C-10 -	27,9
3	75,7	3,42 [t, J=2,7 (x2) Hz, 1H]	-	78,6
4	37,7	-	-	38,9
5	45,0	1,29 – 1,36 [m]	-	51,2
6	18,2	1,48 – 1,55 [m]	C-7; C-5	18,8
7	31,9	1,33 – 1,38 [m]	-	38,8
8	42,8	-	-	42,8
9	154,5	-	-	154,3
10	38,8	-	-	40,7
11	115,4	5,61 [d, J=5,9 Hz, 1H]	C-8; C-13; C-10	115,8
12	120,7	5,52 [d, J=5,9 Hz, 1H]	C-9; C-14; C-11; C-18	120,7
13	147,0	-	-	147,1
14	40,7	-	-	37,0
15	25,6	1,00 – 1,05 [m] 1,83 – 1,90 [m]	- -	25,7
16	27,3	0,84 – 0,89 [m] 1,95 – 2,01 [m]	- C-15; C-17; C-28	27,3
17	32,2	-	-	32,2
18	45,6	2,14 [dd, J=13,2; 4,4 Hz, 1H] 1,01 – 1,10 [m]	C-12; C-13; C-14; C-16; C-17; C-19; C-28 -	45,6
19	46,9	1,59 – 1,68 [m]	C-13; C-18; C-20; C-29; C-30	46,9
20	31,1	-	-	31,1
21	34,6	1,09 – 1,43 [m] 1,32 – 1,36 [m]	- -	34,6
22	37,1	1,25 – 1,30 [m] 1,44 – 1,49 [m]	- C-16; C-19; C-21; C-28	37,2
23	28,3	1,01 [s]	C-3; C-4; C-5; C-24	28,3
24	22,4	0,88 [s]	C-3; C-4; C-5; C-23	15,1
25	25,1	1,22 [s]	C-1; C-5; C-9; C-10	25,3
26	21,0	1,15 [s]	C-7; C-8; C-9; C-14	21,0
27	20,3	1,03 [s]	C-8; C-13; C-14; C-15	20,1
28	28,7	0,90 [s]	C-16; C-17; C-18; C-19; C-21; C-22	28,7
29	23,7	0,91 [s]	C-19; C-20; C-21; C-30	23,7
30	33,2	0,88 [s]	C-19; C-20; C-21; C-29	33,2
^a – δ de RMN de ^{13}C obtido na literatura (Tanaka e Matsunaga, 1988)				

TPE-1
Pulse Sequence: gHMBC
Nucleus: (1H, 13C)
Solvent: cdcl3

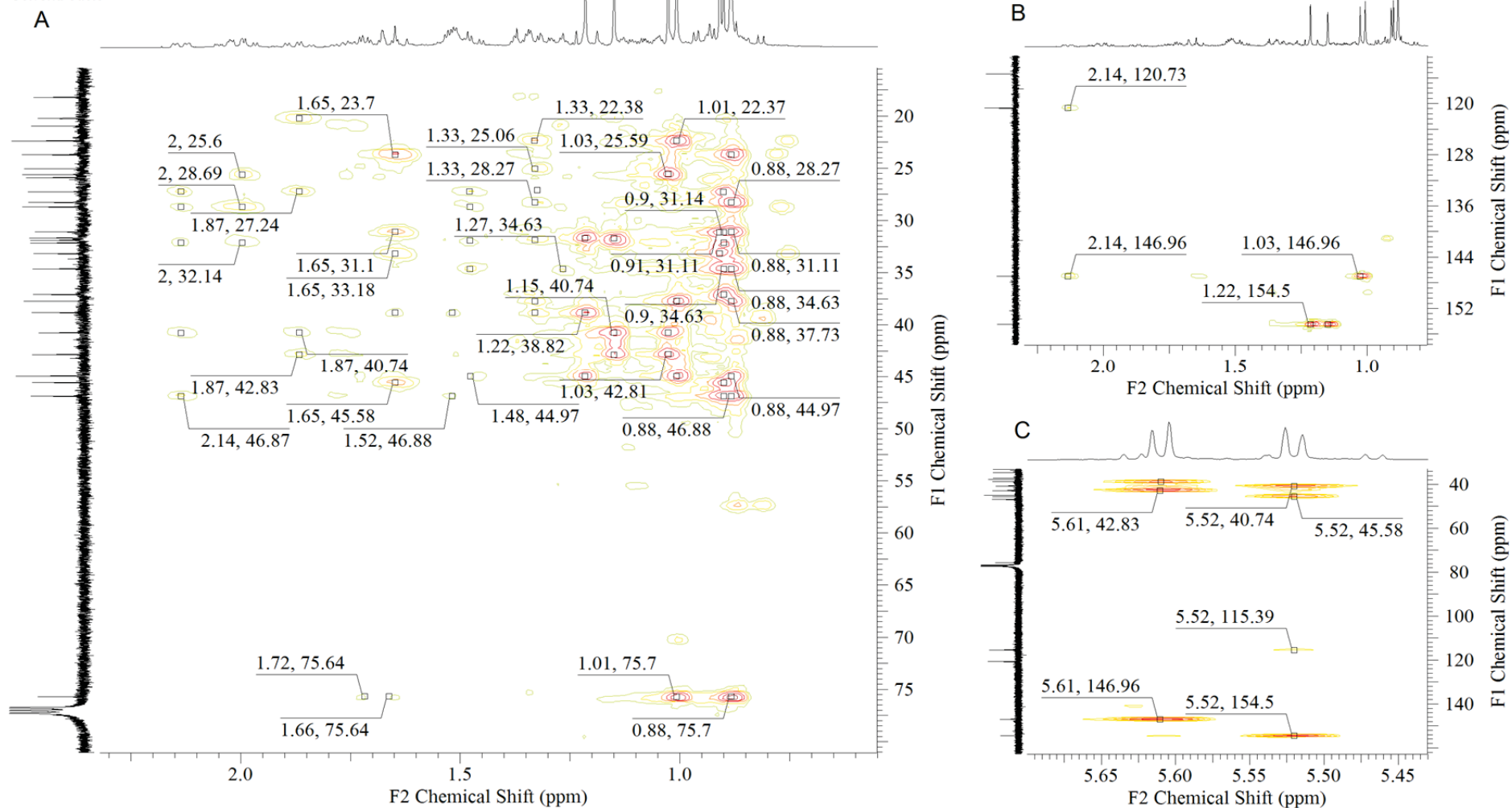


Figura 48: Espectro de correlação heteronuclear (^1H - ^{13}C)-HMBC da fração TPE-1. Ampliação das correlações entre δ_{H} 0,5-2,5 e δ_{C} 15,0-85,0 (A). Ampliação das correlação entre δ_{H} 0,7-2,3 e δ_{C} 112,0-156,0 (B). Ampliação das correlações entre δ_{H} 5,4-5,7 e δ_{C} 30,0-150,0 (C) (Solvente: CDCl_3)

4.3.2 Fracionamento do Extrato em Acetato de Etila de *Protium bahianum*

Uma porção do extrato obtido em acetato de etila da oleorresina de *Protium bahianum* (ArPBA) (2,1857 g) foi submetida à cromatografia em coluna com gel de sílica 60 (70-230 mesh) impregnada com KOH ($\varnothing_{\text{int}} = 3,5 \text{ cm}$, $h_{\text{sílica}} = 13,3 \text{ cm}$, $m_{\text{sílica}} = 100 \text{ g}$; aplicação da amostra: líquida (2 mL de diclorometano (DCM)) como mostra o fluxograma (Figura 49). Foram coletadas duas frações, a primeira onde utilizou-se 500 mL de DCM e uma segunda fração onde utilizou-se 300 mL de metanol (MeOH). Após concentradas, a fração em DCM deu origem a fração não ácida (ArPBA η) e a fração em MeOH deu origem a uma fração salina identificada como ArPBA σ K (pH_i 11).

A solução de ArPBA σ K foi levada ao pH 8 com adição de HCl 1N, após agitação houve a formação de emulsão que foi quebrada com a adição de NaCl. Após a extração com 30 mL DCM (5 x), foi obtida uma fração denominada ArPBApH8.

O perfil por CCD da filtração da amostra bruta ArPBA é apresentado na Figura 50, sendo o no primeiro “spot” foi aplicado o extrato bruto ArPBA, no segundo “spot” foi aplicada a fração de não ácidos, ArPBA η e no terceiro “spot” a fração de ácidos ArPBApH8. No cromatograma por CCD, obtido com o eluente isocrático contendo clorofórmio e acetato de etila (7:3), pode se observar a eficiência na separação da mancha presente no R_f 0,54, que está presente apenas no extrato bruto ArPBA e na fração ArPBApH8.

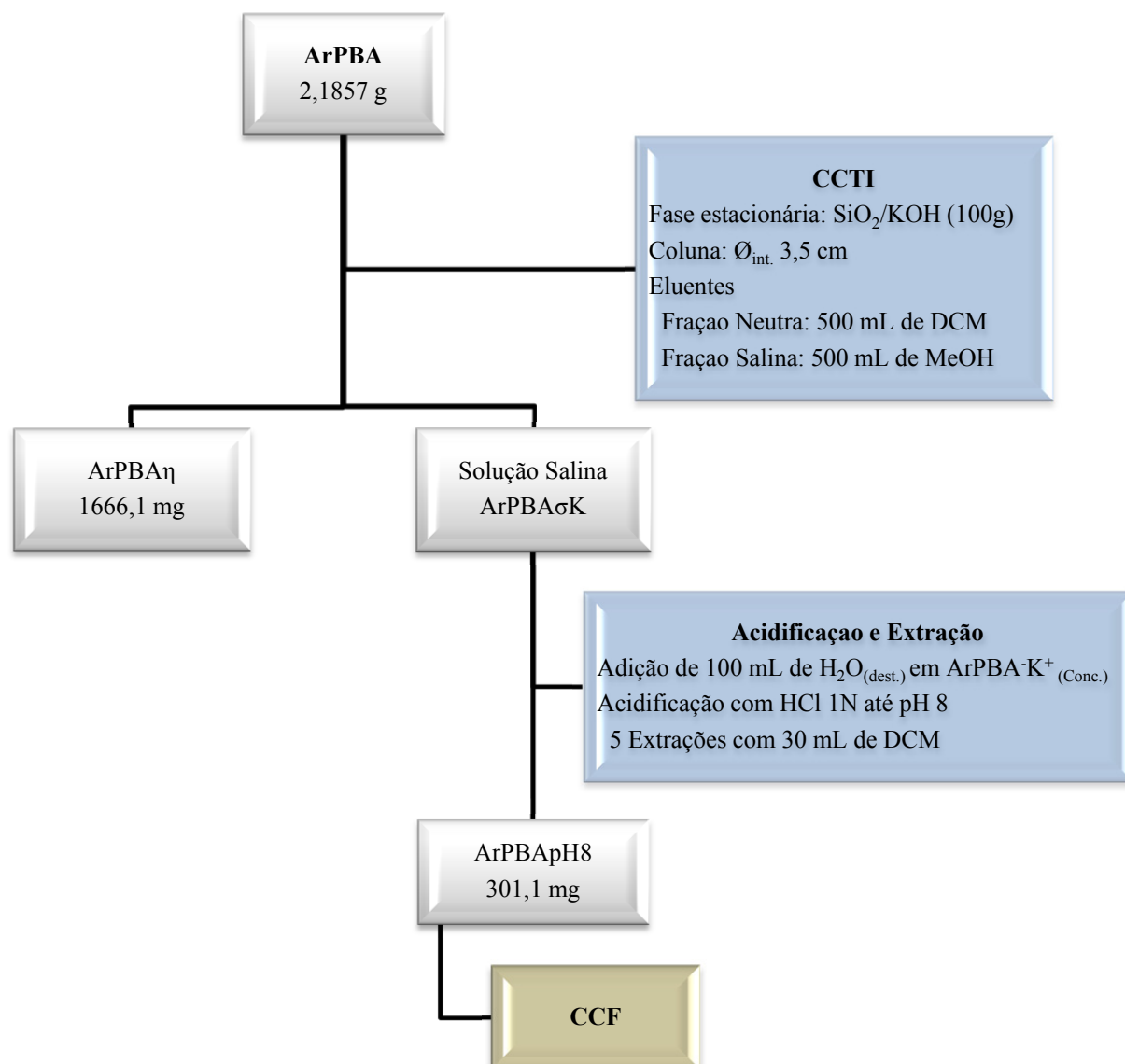


Figura 49: Fluxograma do fracionamento de ArPBA

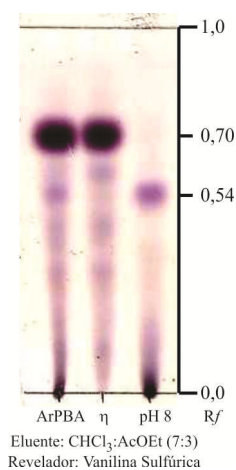


Figura 50: Perfil cromatográfico em CCD do fracionamento de ArPBA

Para o isolamento da mancha observada no R_f 0,54 da fração ArPBAPh8, a amostra foi submetida a um fracionamento por cromatografia em coluna “flash”. Para isto 303,1 mg de ArPBAPh8 foram submetidos à cromatografia em coluna em gel de sílica F60 ($\varnothing_{\text{int}} = 3,8$ cm, $h_{\text{sílica}} = 16$ cm, $m_{\text{sílica}} = 74$ g), como é apresentado no fluxograma (Figura 51). Como eluente foram utilizados 700 mL de uma mistura de clorofórmio e acetato de etila (7:3) em sistema isocrático. A coleta das frações se deu após o recolhimento de 100 mL do volume morto, sendo coletadas 20 frações de 30 mL. Para a limpeza do material retido na coluna foi coletada uma única fração de 300 mL em metanol.

Através da avaliação do perfil cromatográfico por CCD para o fracionamento de ArPBAPh8 (Figura 52), observou-se que a mancha de R_f 0,54 estava presente nas frações de 8 a 19, e que as frações 9 a 13 apresentavam grande pureza desta mancha. As frações 9 a 13 foram reunidas obtendo uma massa de 30,8 mg, sendo posteriormente recristalizada em 2 mL de acetato de etila obtendo assim 18,4 mg de PBA-1. Visando a elucidação de PBA-1, a amostra foi submetida à espectrometria de massas (EMCI-IES) e ressonância magnética nuclear (RMN de ^1H , ^{13}C , DEPT, COSY, HSQC e HMBC).

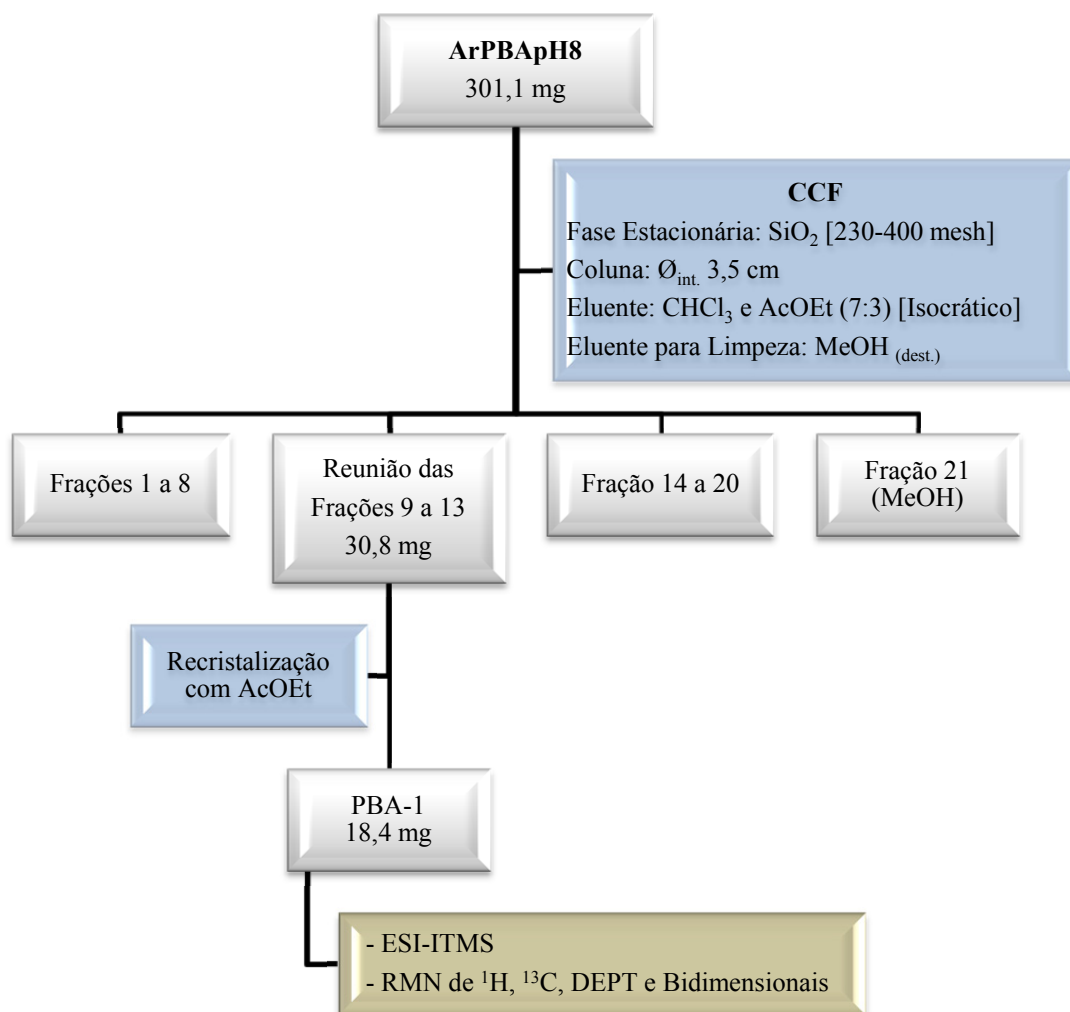


Figura 51: Fluxograma de obtenção de PBA-1

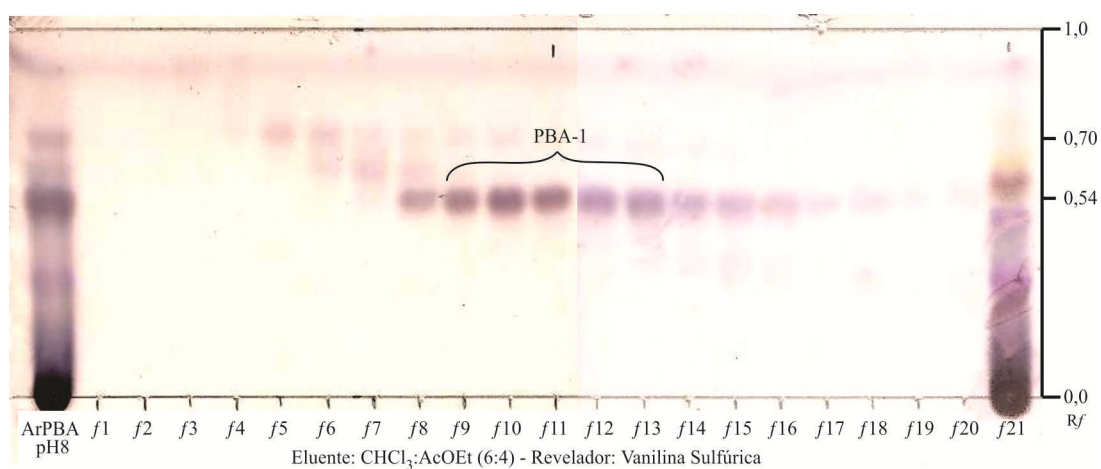


Figura 52: Perfil cromatográfico em CCD do fracionamento de ArPBAPh8

4.3.2.1 Identificação de PBA-1

O espectro de massas da fração PBA-1 obtido por IES-CI-EM no modo negativo forneceu um íon *quasi*-molecular de m/z 455,48 $[M-H]^-$ (Figura 53), referente a massa molecular m/z 456.

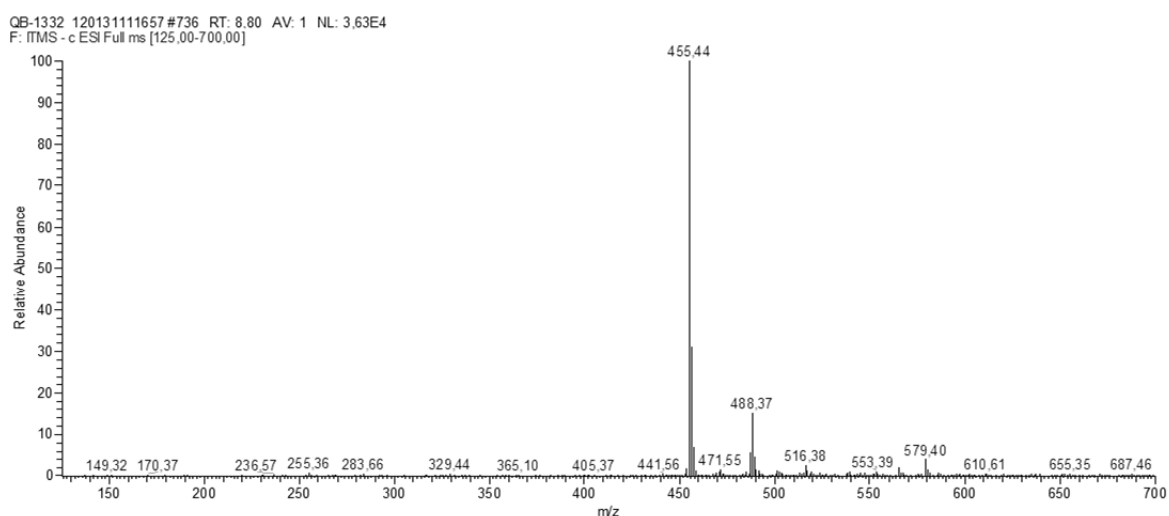


Figura 53: Escaneamento Completo EMCI-ESI (m/z 150 a 700) da fração PBA-1 no modo negativo por injeção direta.

O espectro de RMN de ^1H para a amostra PBA-1 (Figura 54) mostrou a presença sete sinais com integração para três hidrogênios em δ 0,66 (s), 0,71 (s), 0,75 (d, $J=6,6$ Hz), 0,82 (s), 0,84 (d), 0,87 (s), 0,98 (s).

A análise da região de alquenos apresentou sinais em δ 5,13 (t, $J=3,4$ Hz) e em δ 5,16 (t, $J=3,6$ Hz). Estes dois sinais de hidrogênios olefinicos são comumente descritos para triterpenos de esqueleto Δ^{12} -urseno e Δ^{12} -oleaneno.

A presença de hidrogênio carbinólico foi observada em δ 3,08 (dd, $J=8,4$; 7,6 Hz), sugerindo que um dos oxigênios presentes na formula molecular $C_{30}H_{46}O_3$ se trata de uma hidroxila. A presença do duplo duplete sugere que a hidroxila se encontre na posição β (equatorial).

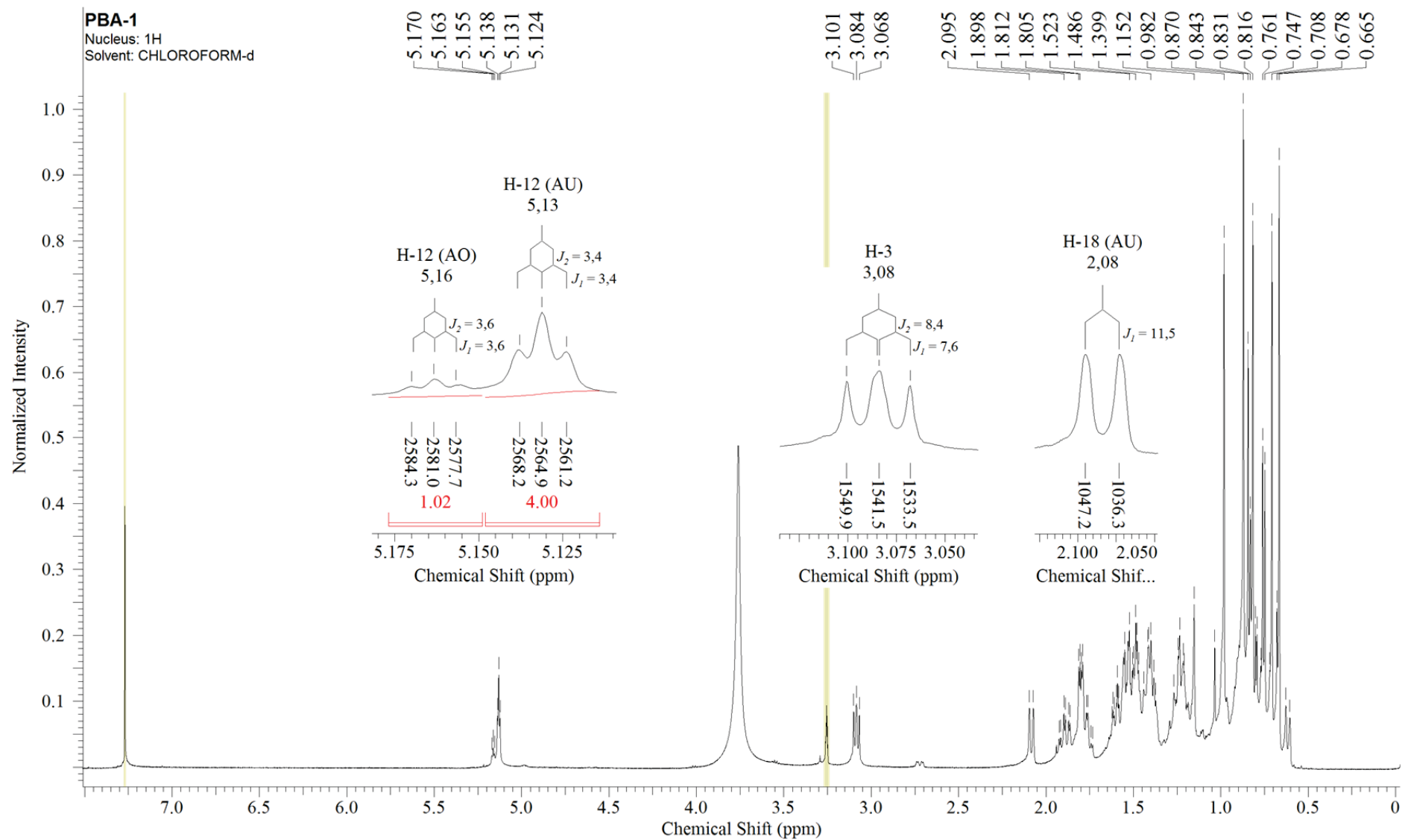


Figura 54: Espectro de RMN de ^1H de PBA-1 e ampliações dos multipletos (500 MHz, Solvente/Referência: CDCl_3)

O espectro de RMN de ^{13}C (Figura 55-A) apresentou 56 sinais de deslocamento químico (δ), sugerindo a presença de duas substâncias, como foi observado na análise do experimento de RMN de ^1H , pela presença de dois hidrogênios olefínicos em δ 5,13 e 5,16, com relação de 4:1, respectivamente. Devido a grande diferença na proporção entre as duas substâncias, foi possível observar que dentre os 56 sinais no espectro de RMN de ^{13}C , 28 sinais apresentaram intensidade superior a 0,38, e 28 sinais apresentaram intensidade inferior a 0,23.

Contudo, a análise por EMCI-ESI (Figura 53), apresentou íon *quasi*-molecular 455,48, característico de triterpenos contendo 30 carbonos. Para os sinais com intensidade superior a 0,38, a diferença do número de carbonos encontra-se nos sinais em δ 27,8 e 38,5, que apresentam um “ombro” ao lado do pico, indicando a presença de um segundo sinal. Foram observados ainda um sinal em δ 78,7, característico de carbono carbinólico, e um sinal em δ 180,4, que indicou a presença de carboxila. Pode ser observado ainda dois sinais em δ 125,3 e 138,0, confirmando a presença de carbonos olefínicos.

Para os sinais com intensidade inferior a 0,23 foram detectados um sinal em δ 180,0, característico de carboxila, e dois sinais em δ 122,1 e 143,7, o que indicou a presença de mais dois carbonos olefínicos.

A análise dos espectros de DEPT 90° (Figura 55-B) e DEPT 135° (Figura 55-C) indicaram que dentre estes sinais mais intensos (acima de 0,38, ver figura 56-A), 8 sinais são referentes a carbonos metilênicos, 7 a grupos metila, 7 a carbonos metínicos. Contudo, pela análise de DEPT não foi possível determinar os tipo de carbonos observados com intensidade abaixo de 0,23.

A comparação dos dados de RMN de ^{13}C com os apresentados por Seebacher *et al.*, (2003) (Tabela 12), demonstraram que a fração PBA-1 se trata de uma mistura dos ácidos ursólico (AU) e oleanólico (AO) (Figura 56).

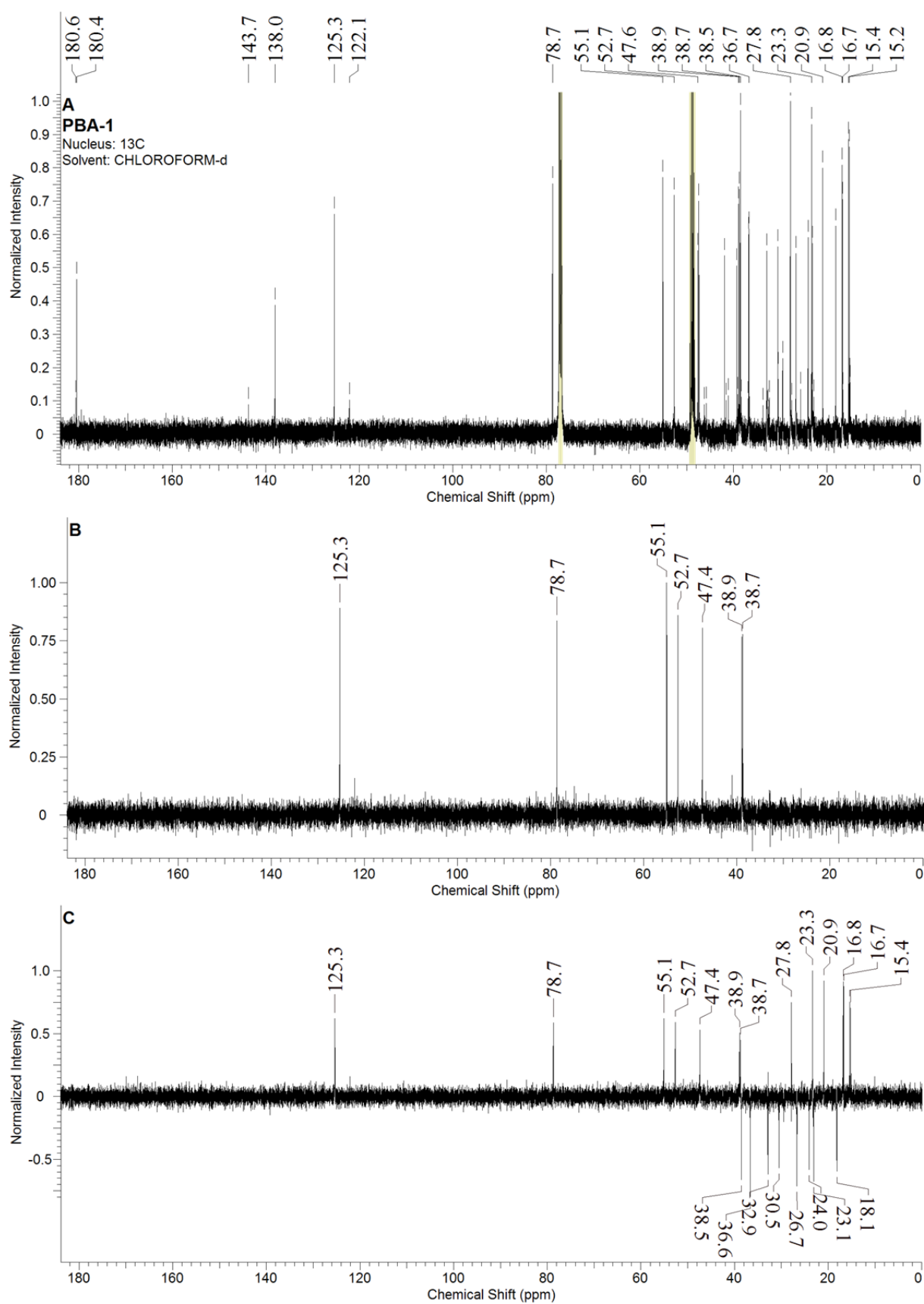


Figura 55: Espectros de RMN de ^{13}C (A), DEPT 90° (B) e DEPT 135° (C) da fração PBA-1 (125 MHz, Solvente/Referência: CDCl_3)

Tabela 12: Sinais observados no espectro de RMN de ^{13}C e DEPT para os ácidos ursólico e oleanólico e comparação com a literatura

Carbono n°	ácido ursólico			ácido oleanólico		
	δ (ppm) ¹	DEPT ¹	δ (ppm) Lit ²	δ (ppm) ¹	DEPT ¹	δ (ppm) Lit ²
1	38,5	CH ₂	39,2	38,3	-	39,0
2	26,7	CH ₂	28,2	29,5	CH ₂	28,1
3	78,7	CH	78,2	<i>no</i>	-	78,2
4	38,5	C	39,6	38,7	-	39,4
5	55,1	CH	55,9	<i>no</i>	-	55,9
6	18,1	CH ₂	18,8	18,1	-	18,8
7	32,9	CH ₂	33,7	32,6	CH ₂	33,4
8	39,3	C	40,1	39,1	-	39,4
9	47,4	CH	48,1	47,5	-	48,2
10	36,8	C	37,5	36,8	-	37,4
11	23,1	CH ₂	23,7	22,9	-	23,8
12	125,3	CH	125,7	122,1	CH	122,6
13	138,0	C	139,3	143,7	-	144,8
14	41,9	C	42,6	41,6	-	42,2
15	27,8	CH ₂	28,8	27,5	-	28,4
16	24,0	CH ₂	25,0	24,0	-	23,8
17	47,6	C	48,1	46,2	-	46,7
18	52,7	CH	53,6	41,1	CH	42,1
19	38,9	CH	39,5	45,8	-	46,6
20	38,7	CH	39,4	30,5	-	31,0
21	30,5	CH ₂	31,1	33,7	-	34,3
22	36,7	CH ₂	37,4	32,4	-	33,2
23	27,8	CH ₃	28,8	27,8	CH ₃	28,8
24	15,2	CH ₃	16,5	15,3	CH ₃	16,5
25	15,4	CH ₃	15,7	15,1	-	15,6
26	16,7	CH ₃	17,5	16,6	-	17,5
27	23,3	CH ₃	24,0	25,6	-	26,2
28	180,4	COOH	179,7	180,6	-	180,0
29	16,8	CH ₃	17,5	32,8	CH ₃	33,4
30	20,9	CH ₃	21,4	23,2	-	23,4

¹ Dados obtidos; ² Dados extraídos de Seebacher *et al.*, 2003; *no* – não observado

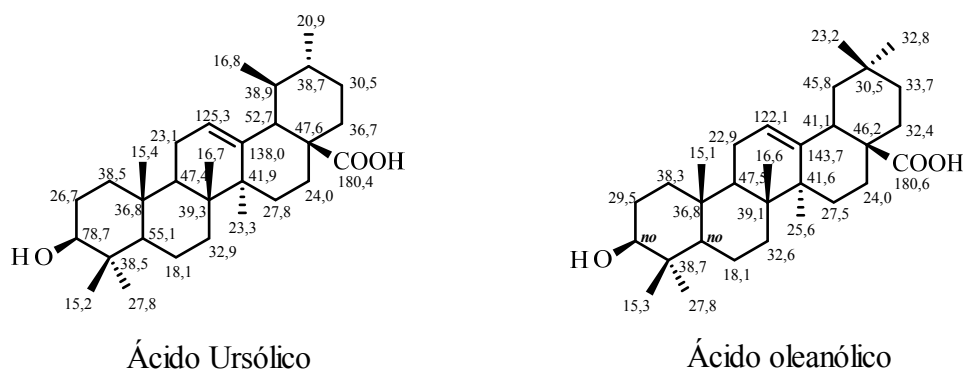


Figura 56: Estrutura com sinas de RMN de ^{13}C dos ácidos ursólico e oleanólico isolados de *Protium bahianum*

As correlações apresentadas na Figura 57 para o ácido ursólico foram obtidas através da análise dos experimentos HSQC (Figura 58), HMBC (Figura 59) e COSY (Figura 60) realizados para a fração PBA-1, as correlações estão apresentadas (Tabela 13). As correlações estão de acordo com o ácido ursólico segundo Kontogianni *et al.* (2009).

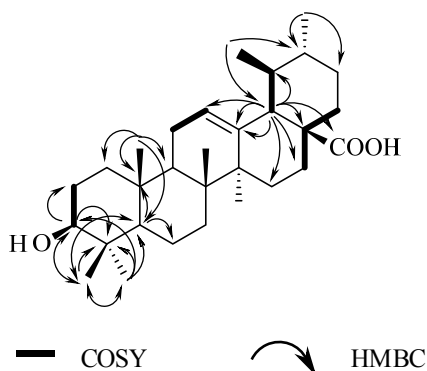


Figura 57: Correlações de $(^1\text{H}-^1\text{H})$ -COSY e $(^1\text{H}-^{13}\text{C})$ -HMBC para o ácido ursólico

O espectro de correlação heteronuclear $(^1\text{H}-^{13}\text{C})$ -HMBC para os sinais de RMN de ^{13}C respectivos ao ácido ursólico, mostrou que o sinal do grupo CH_3 em δ 27,8 se correlaciona com os dos carbonos em δ 78,7 (CH), 38,5 (C), 55,1 (CH) e 15,2 (CH_3) e que o CH_3 em δ 15,2 se correlaciona com os dos carbonos em δ 78,7 (CH), 38,5 (C), 55,1 (CH) e

27,8 (CH₃). O grupo CH₃ em δ 15,4 se correlaciona com os dos carbonos em δ 38,5 (C), 36,8 (C), 47,4 (CH) e 55,1 (CH). O carbono carbinólico (CHOH) em δ 78,7 apresentou correlação com os carbonos em δ 26,7 (CH₂), 38,5 (C) e 27,8 (CH₃), e que o carbono metínico em δ 55,1 e correlaciona com os carbonos em 15,2 (CH₃), 18,1 (CH₂), 6,8 (C) e 47,4 (CH). O mapa de correlação homonuclear (¹H-¹H)-COSY mostrou que o tripleto em δ 3,08 (H-3) se correlaciona com o H-2 (δ 1,48). Através destas correlações foi possível determinar as correlações para os anéis A e B do ácido ursólico.

O anel E, foi confirmado pelas correlações heteronuclear (¹H-¹³C)-HMBC do H-18, H-29 e H-30 e pelo mapa de correlação homonuclear (¹H-¹H)-COSY dos H-18 e H-29. O experimento HSQC mostrou que o grupo CH₃ em δ 16,8 se correlaciona com os carbonos em 30,5 (CH₂) e 38,7 (CH), e que o grupo CH₃ em δ 20,9 se correlaciona com os carbonos em 38,7 (CH) e 52,7 (CH). O grupo metínico C-18 (δ 52,7) se correlaciona com os carbonos olefínicos em δ 125,3 (C-12) e 138,0 (C-13), com os carbonos metínicos em δ 47,6 (C-17) e 38,9 (C-19), com os carbonos metilênicos em δ 27,8 (C-15) e 24,0 (C-16) e com a carboxila em δ 180,4 (C-28). O mapa de correlação homonuclear (¹H-¹H)-COSY mostrou que o duplete em δ 2,08 (H-18) se correlaciona com o H-19 (δ 1,22) e que o H-29 se correlaciona com o H-19 (δ 0,75).

Como se trata de uma mistura foi possível determinar a proporção entre os dois triterpenos por meio da razão entre as integrais dos hidrogênios H-12 nos δ 5,13 (ursano) e 5,16 (oleanano), apresentando a relação 1:4 entre os ácidos oleanólico e ursólico, respectivamente (Figura 55, integração na ampliação dos sinais em δ 5,13 e 5,16).

A comparação dos resultados obtidos com os sinais descritos em literatura para triterpenos ácidos isolados de Burseraceae indicaram o isolamento de ácido ursólico e do ácido oleanólico na proporção de 4:1, respectivamente (integração dos sinais 5,13 (t, $J=3,6$ (x2) Hz) e 5,16 ppm (t, $J=3,4$ (x2) Hz) na ampliação na Figura 54, pg. 134).

O ácido ursólico e derivados foram obtidos apenas de uma espécie de Burseraceae, da oleorresina de *Bursera delpechiana* (SYAMASUNDAR *et al.*, 1991; SYAMASUNDAR & MALLAVARAPU, 1995), contudo o ácido oleanólico e derivados foram obtidos apenas das partes aéreas e cascas de duas espécies de *Commiphora* (ABBAS *et al.*, 2007; ASRES *et al.*, 1998), sendo a primeira descrição destes triterpenos com carboxila no carbono C-28 em triterpenos oleanano e ursano no gênero *Protium*.

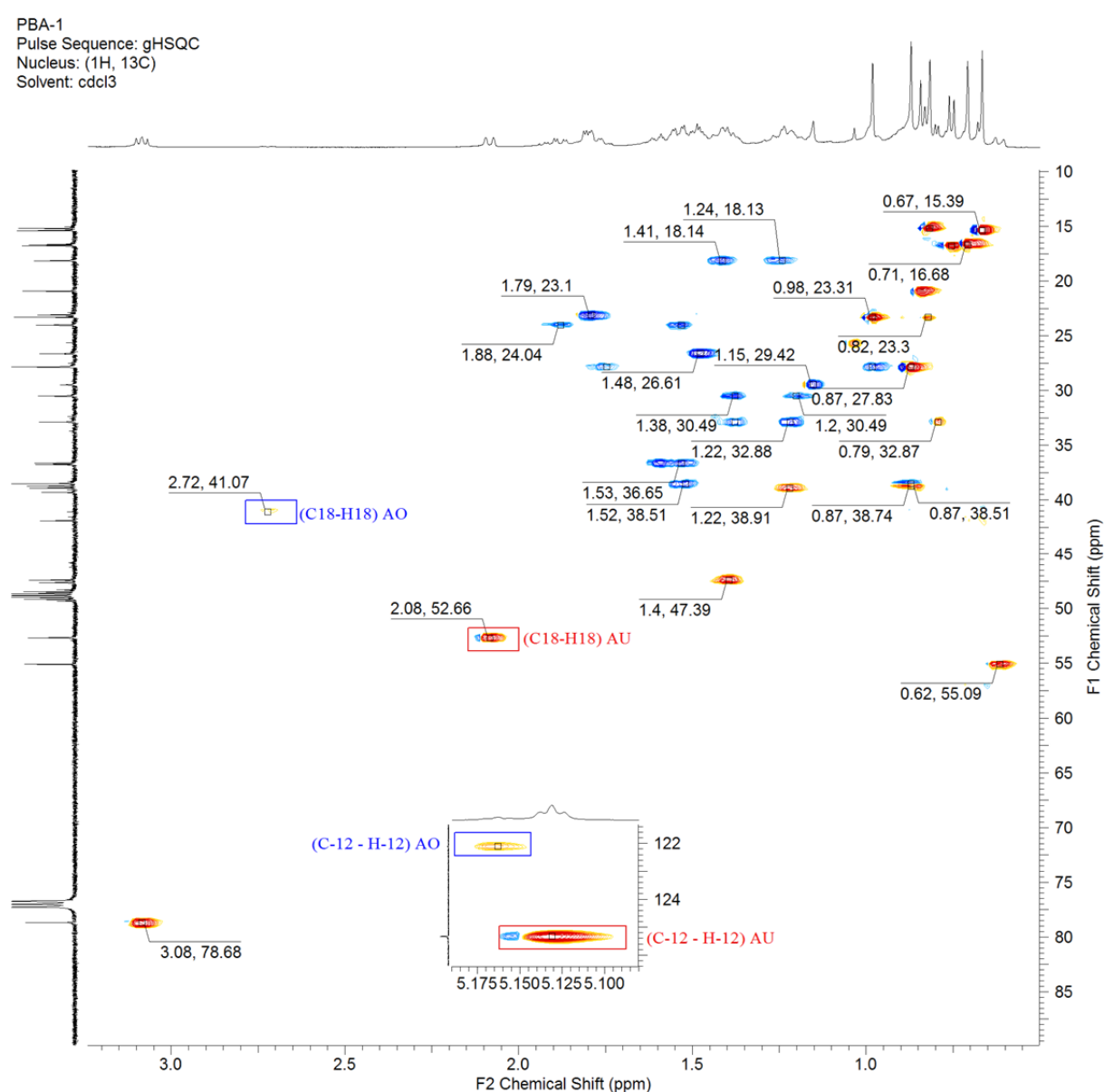


Figura 58: Espectro de correlação heteronuclear (^1H - ^{13}C)-HSQC da fração PBA-1 (Solvente: CDCl_3)

A espécie *P. bahianum* apresenta a descrição de três triterpenos obtidos de seus frutos, os triterpenos α - e β -amirina e o ácido mangiferólico foram identificados em mistura ternária (OLIVEIRA *et al.*, 2006). O isolamento da mistura dos ácidos ursólico e oleanólico demonstra a importância de estudar melhor o gênero *Protium*, e principalmente a espécie *P. bahianum*, produtora destes ácidos de grande importância farmacológica.

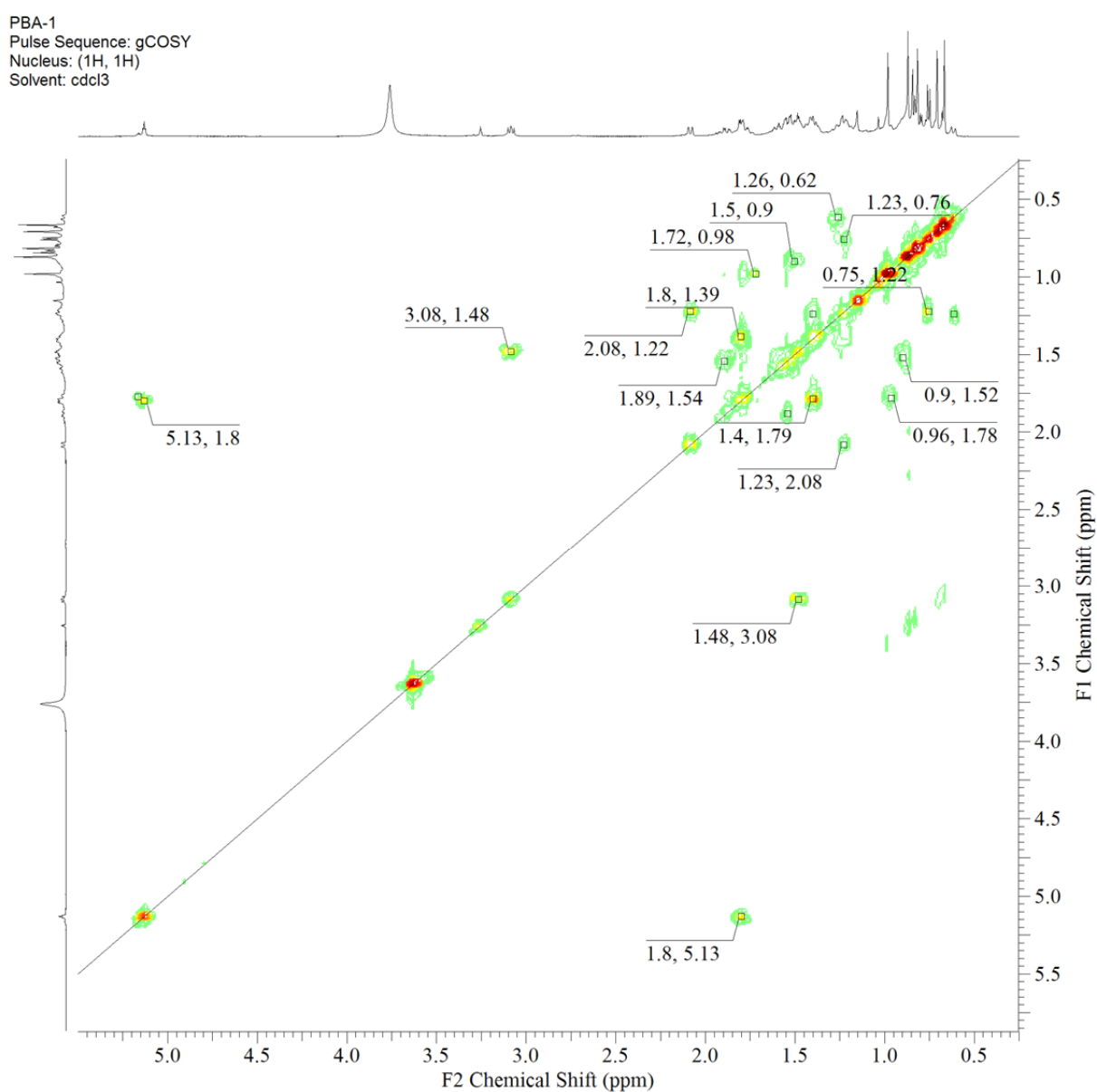


Figura 59: Espectro de correlação homonuclear (^1H - ^1H)-COSY da fração PBA-1 (Solvente: CDCl_3)

Tabela 13: Correlações bidimensionais para o ácido ursólico

C n°	δ (ppm)	HSQC δ_H (ppm) [m, J]	COSY H (n°)	HMBC C (n°)
1	38,5	0,84 – 0,91 [m] 1,50 – 1,55 [m]	-	-
2	26,7	1,44 – 1,50 [m]	H-3	-
3	78,7	3,08 [dd, $J=8,4; 7,6$ Hz]	H-2	C-2; C-4; C-24
4	38,5	-	-	-
5	55,1	0,59 – 0,64 [m]	-	C-6; C-9; C-24; C-10
6	18,1	1,23 – 1,27 [m] 1,37 – 1,44 [m]	-	-
7	32,9	1,18 – 1,23 [m] 1,35 – 1,40 [m]	-	-
8	39,3	-	-	-
9	47,4	1,35 – 1,43 [m]	-	C-1; C-5; C-8; C-11; C-14; C-24; C-26
10	36,8	-	-	-
11	23,1	1,74 – 1,82 [m]	H-12	-
12	125,3	5,13 [t, $J=3,6$ (x2) Hz]	H-11	C-9; C-11; C-14; C-18
13	138,0	-	-	-
14	41,9	-	-	-
15	27,8	-	-	-
16	24,0	1,54 [dd, $J=13,5; 3,5$ Hz] 1,89 [dd, $J=13,5; 4,4$ Hz]	H-16 H-21; H-16	- -
17	47,6	-	-	-
18	52,7	2,08 [d, $J=11,0$ Hz]	H-19	C-14; C-16; C-17; C-12; C-13; C-19; C-28; C-29
19	38,9	1,17 – 1,26 [m]	H-29; H-18	-
20	38,7	0,83-0,92 [m]	-	-
21	30,5	1,17 – 1,2 [m] 1,35 – 1,41 [m]	-	-
22	36,7	1,47 – 1,62 [m]	H-16	-
23	27,8	0,87 [s]	-	C-3; C-4; C-5; C-24
24	15,2	0,82 [s]	-	C-3; C-4; C-5; C-23
25	15,4	0,67 [s]	-	C-4; C-5; C-9; C-10
26	16,7	0,71 [s]	-	C-7; C-8; C-9; C-14
27	23,3	0,98 [s]	-	C-8; C-12; C-14; C-23
28	180,4	-	-	-
29	16,8	0,75 [d, $J=6,6$ Hz]	H-19	-
30	20,9	0,84 [d, $J=6,2$ Hz]	-	-

PBA-1
Pulse Sequence: gHMBC
Nucleus: (1H, 13C)
Solvent: cdcl3

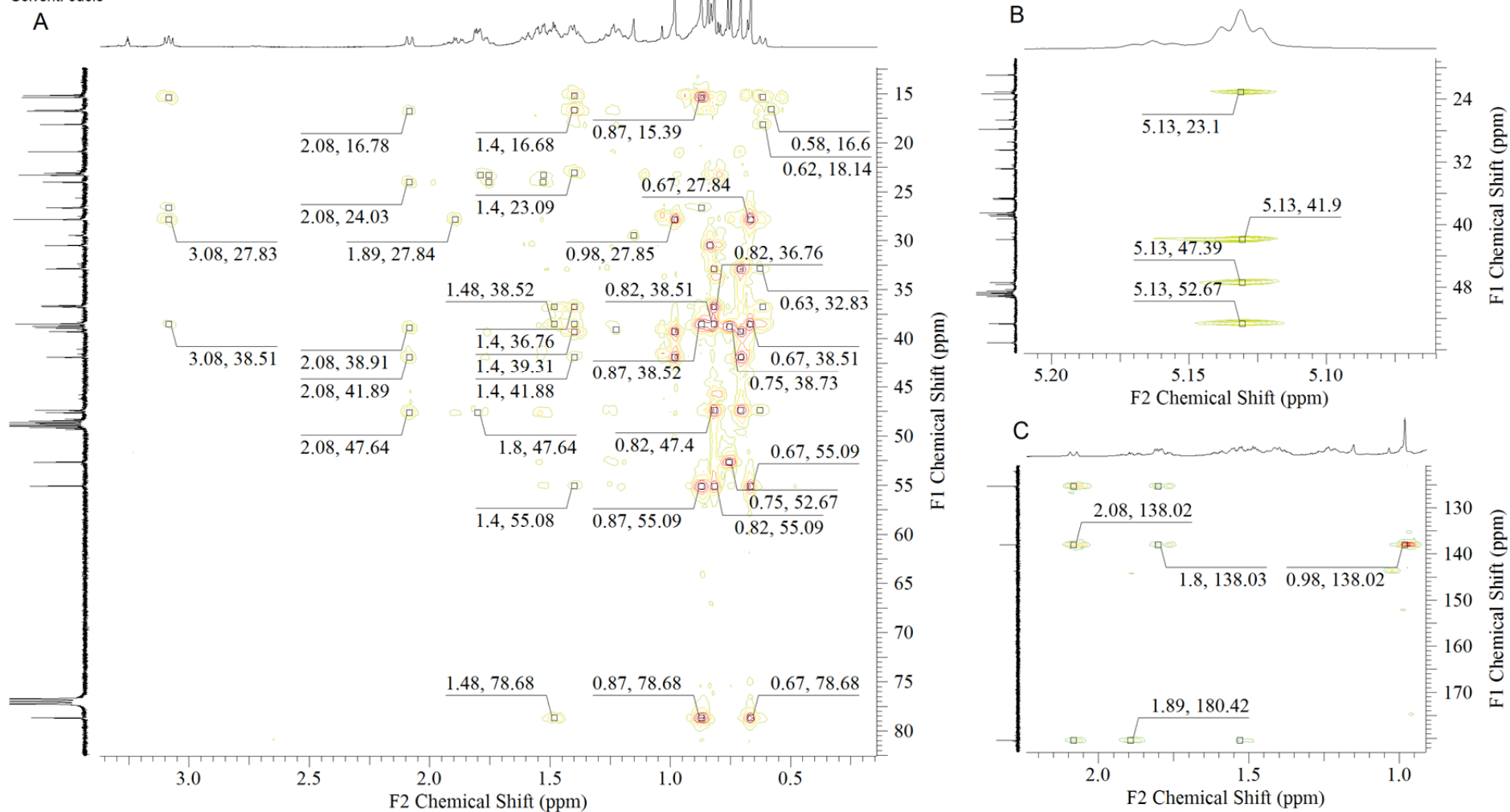


Figura 60: Espectro de correlação heteronuclear (^1H - ^{13}C)-HMBC da fração PBA-1. Ampliação das correlações entre δ_{H} 0,2-3,5 e δ_{C} 12,0-82,0 (A). Ampliação das correlações entre δ_{H} 5,0-5,2 e δ_{C} 20,0-56,0 (B). Ampliação das correlações entre δ_{H} 0,9-2,2 e δ_{C} 120,0-180,0 (C) (Solvente: CDCl_3)

4.3.3 Fracionamento do Extrato em Hexano de *Protium cf. ferrugineum*

Uma porção de HrPFE (3,0058 g) foi submetida à cromatografia em coluna com gel de sílica G60 (70-230 mesh) ($\varnothing_{\text{int}} = 3,5$ cm, $h_{\text{silica}} = 18$ cm, $m_{\text{silica}} = 60$ g, aplicação da amostra: líquida (4 mL de hexano)). Foram recolhidas cinco frações, sendo a fração “A” eluída com 600 mL de hexano 100%, a fração “B” com 600 mL de hexano:DCM (1:1), a fração “C” com 600 mL de DCM 100%, a fração “D” com 600 mL de DCM:AcOEt (1:1) e uma fração “E” com 150 mL de MeOH (Figura 61).

A filtração da amostra bruta tem seu perfil demonstrado na Figura 62-A, sendo o primeiro “spot” o extrato bruto HrPFE, do segundo ao sexto “spot”, as frações de “A” à “E”, respectivamente, obtidas no processo cromatográfico, e o sétimo “spot” o padrão da mistura de α - e β -amirina. Em comparação com o padrão pode se concluir que a fração HrPFE-C apresenta majoritariamente a mistura de α - e β -amirina. Para o isolamento da mancha intensa observada no R_f 0,49 da fração HrPFE-B (Figura 62-B, “spot” B), foi determinado como eluente isocrático a mistura de hexano e acetato de etila (24:1) para isolamento por cromatografia em coluna “flash”.

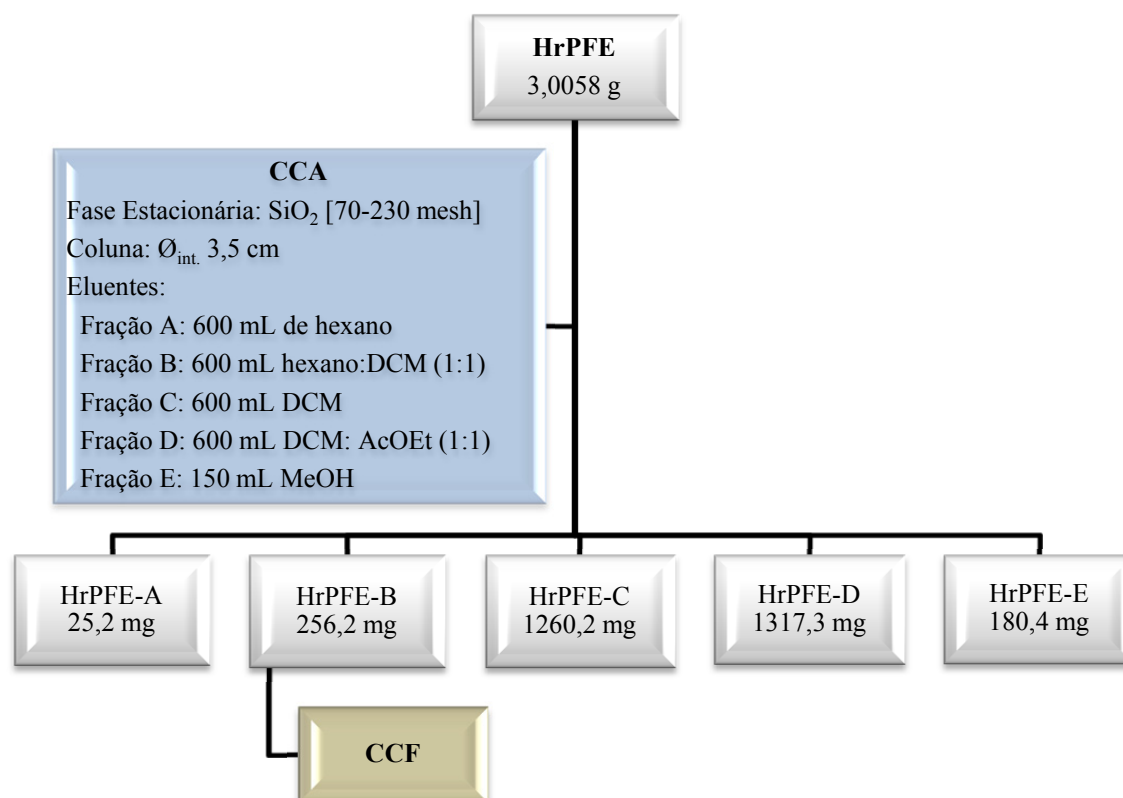


Figura 61: Fluxograma do fracionamento de HrPFE

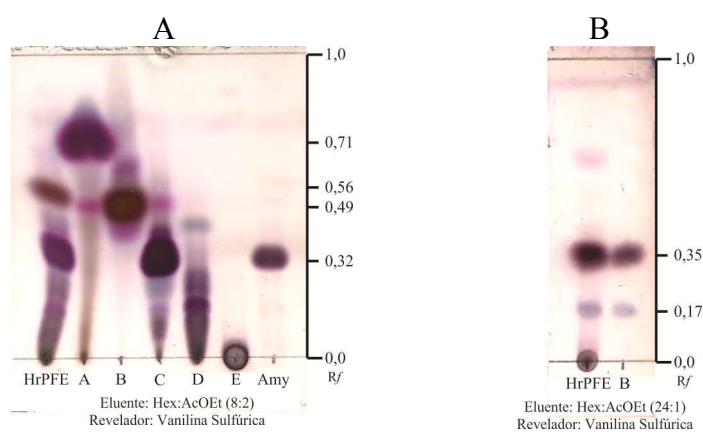


Figura 62: Perfil do fracionamento de HrPFE avaliado por CCD (A) e eluição de HrPFE-B (B)

A fração HrPFE-B (256,2 mg) foi submetida à cromatografia em coluna “flash” ($\varnothing_{\text{int}} = 2 \text{ cm}$, $h_{\text{silica}} = 15,5 \text{ cm}$, $m_{\text{silica}} = 25 \text{ g}$, $p = 2 \text{ lbf/pol}^2$, aplicação: pastilha [1 g SiO_2]). Como eluente foi utilizado 200 mL de uma mistura de hexano e acetato de etila (24:1) em sistema isocrático. A coleta das frações foi iniciada após a coleta de 30 mL do volume morto, sendo coletadas 20 frações de 10 mL (Figura 63).

Através da avaliação do perfil cromatográfico por CCD para o fracionamento de HrPFE-B (Figura 64), observou-se que a mancha de R_f 0,24 estava presente nas frações de 9 a 20, e que as frações 10 a 14 apresentavam maior massa e livre de impurezas visível. As frações 10 a 14 foram então reunidas e identificada como PFE-1 (93,2 mg). Para a identificação de PFE-1, a amostra foi submetida à espectrometria de massas acoplada a cromatógrafo a gás (CG-EM) e ressonância magnética nuclear (RMN de ^1H , ^{13}C , DEPT, COSY, HSQC e HMBC).

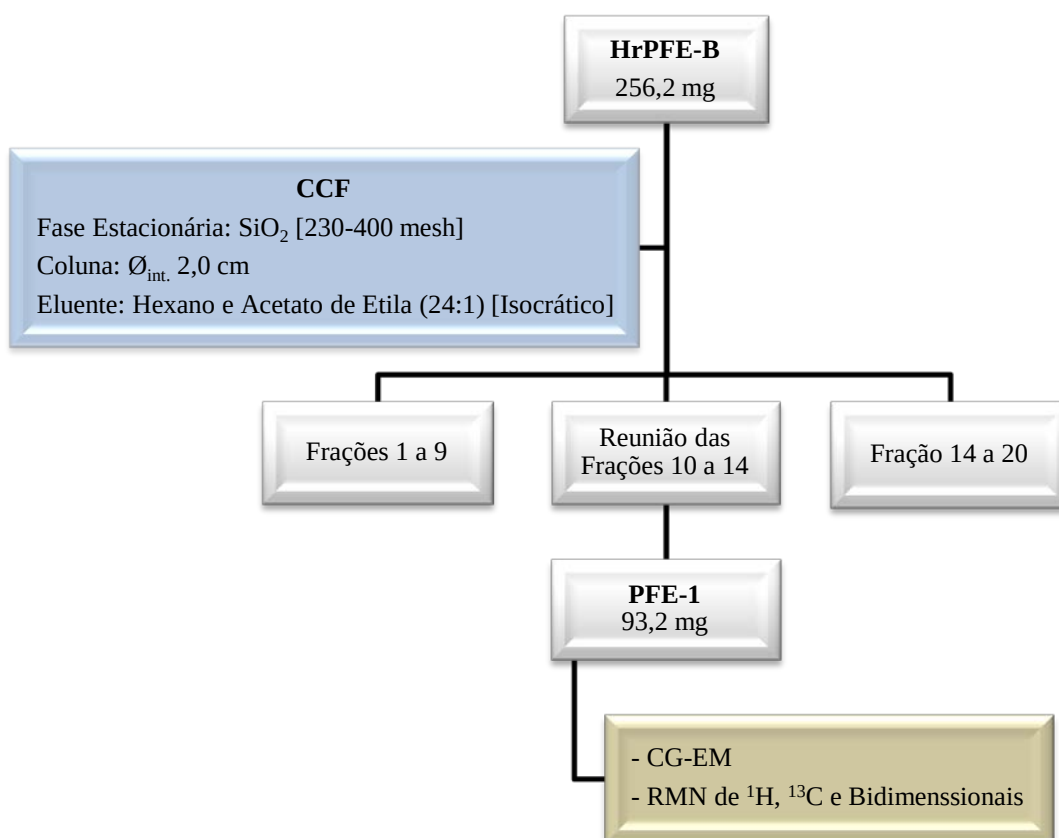


Figura 63: Fluxograma de obtenção de PFE-1

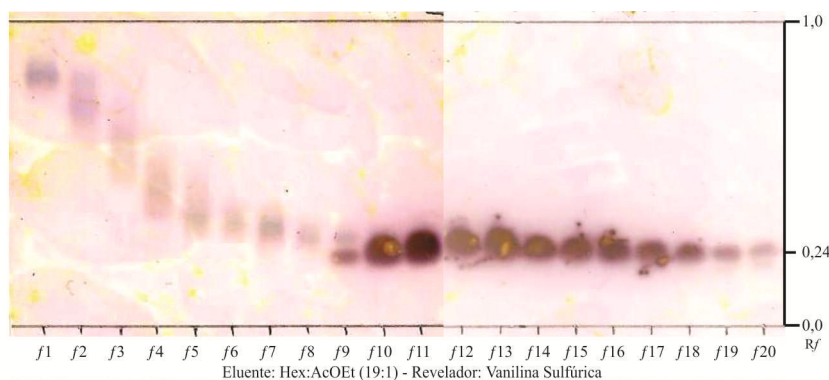


Figura 64: Perfil do fracionamento de HrPFE-B avaliado por CCD

4.3.3.1 Identificação da fração PFE-1

A fração identificada como PFE-1 apresentou sólidos de coloração branca, sendo que em recipiente fechado, exposto a temperatura ambiente, houve a formação de sólidos em forma de agulha no interior do frasco. Esta fração quando revelada com vanilina sulfúrica em análise de CCD apresentou uma única mancha de coloração roxa no R_f 0,24 com o eluente hexano e acetato de etila (19:1).

A análise da fração por CG-EM (Figura 65-A e 65-B) mostrou a presença de um único pico no tempo de retenção em 10,914 min, apresentando o íon molecular de m/z 222 $[M]^+$ e o pico base de m/z 109, indicando que se trata de um sesquiterpeno.

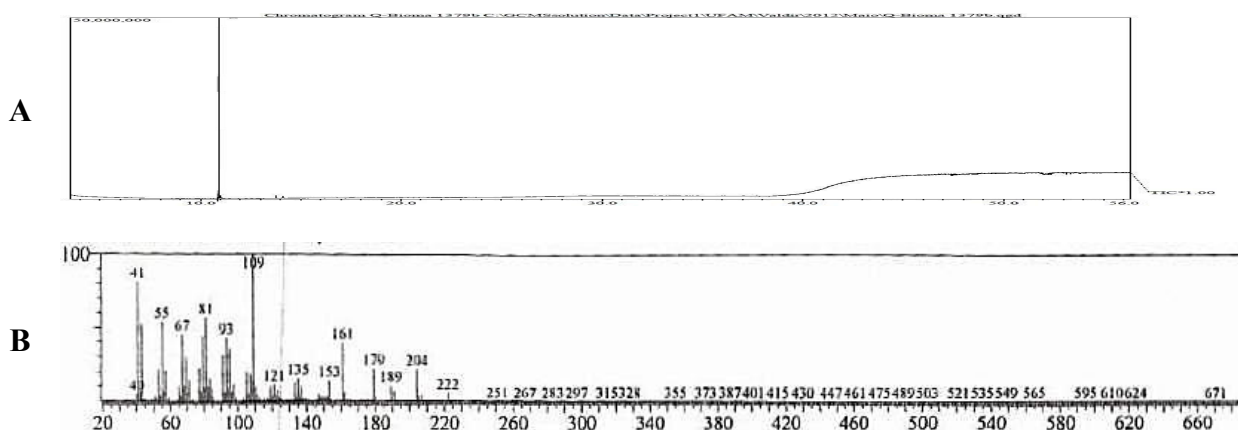


Figura 65: Cromatograma de íons totais e espectro de massas da fração PFE-1

Através da comparação do espectro de massas (Figura 65-B) com o espectro de massas do sesquiterpeno junenol, identificado no extrato em hexano de *Protium cf. ferrugineum*, na concentração de 11,2% (seção 4.1.1, pg 79), se observou os mesmos íon molecular e pico base, além do mesmo padrão de fragmentação.

Os dados obtidos por RMN de ^1H (Figura 66) para a fração PFE-1 mostrou a presença de três sinais com integração para três hidrogênios, sendo um sinal de simpleto em δ 0,73 (s, 3H), que se encontra ligado a um carbono desidrogenado, e dois dupletos em δ 0,87 (d, $J=6,9$ Hz, 3H) e 0,95 (d, $J=7,3$ Hz, 3H), ligados a um carbono metilênico.

Foram detectados ainda dois dupletos na região de hidrogênios vinílicos, em δ 4,67 (d, $J=1,46$ Hz, 1H) e 4,97 (d, $J=1,09$ Hz, 1H), suas constantes e acoplamento (J) sugerem que se tratam de dois hidrogênios geminais. A presença de um tripleto na região de hidrogênio carbinólico em δ 3,66 (t, $J=9,70$ Hz, 1H) sugere a presença de uma hidroxila na posição equatorial.

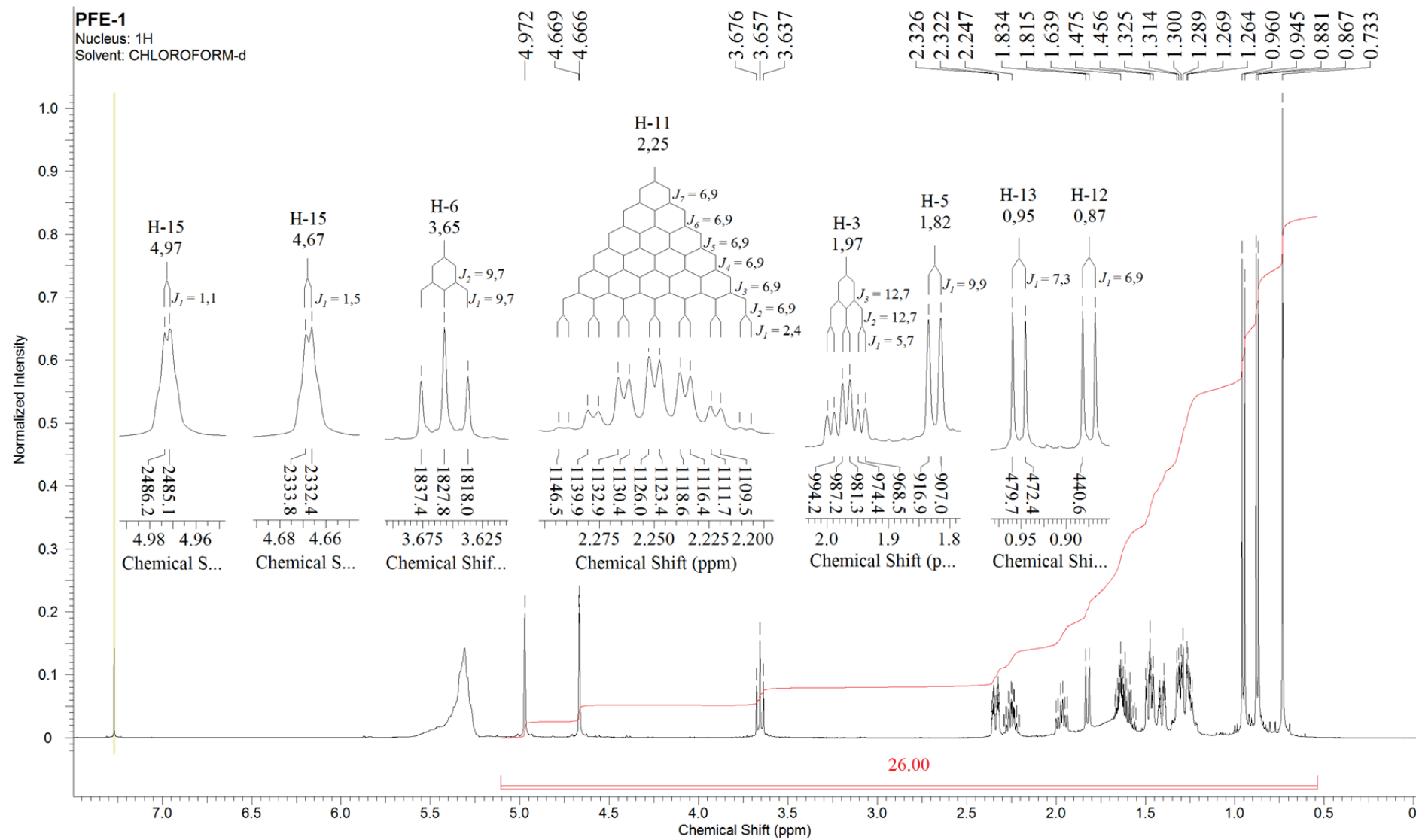


Figura 66: Espectro de RMN de ^1H da fração PFE-1 e ampliações dos multipletos (500 MHz, Solvente/Referência: CDCl_3)

O mapa de correlação homonuclear (^1H - ^1H)-COSY (Figura 67) mostrou que os dupletos em δ 0,87 (H-12) e 0,95 (H-13) se correlacionam com o H-11 (dsept, $J=6,89$ (x6), 2,38 Hz, 1 H). Pode-se observar ainda o tripeto em δ 3,66 (H-6) correlacionando com o duplete em δ 1,82 (H-5), tal como o inverso também observado, além dos dois hidrogênios olefinicos geminais (δ 4,67 e 4,96) se correlacionando entre si.

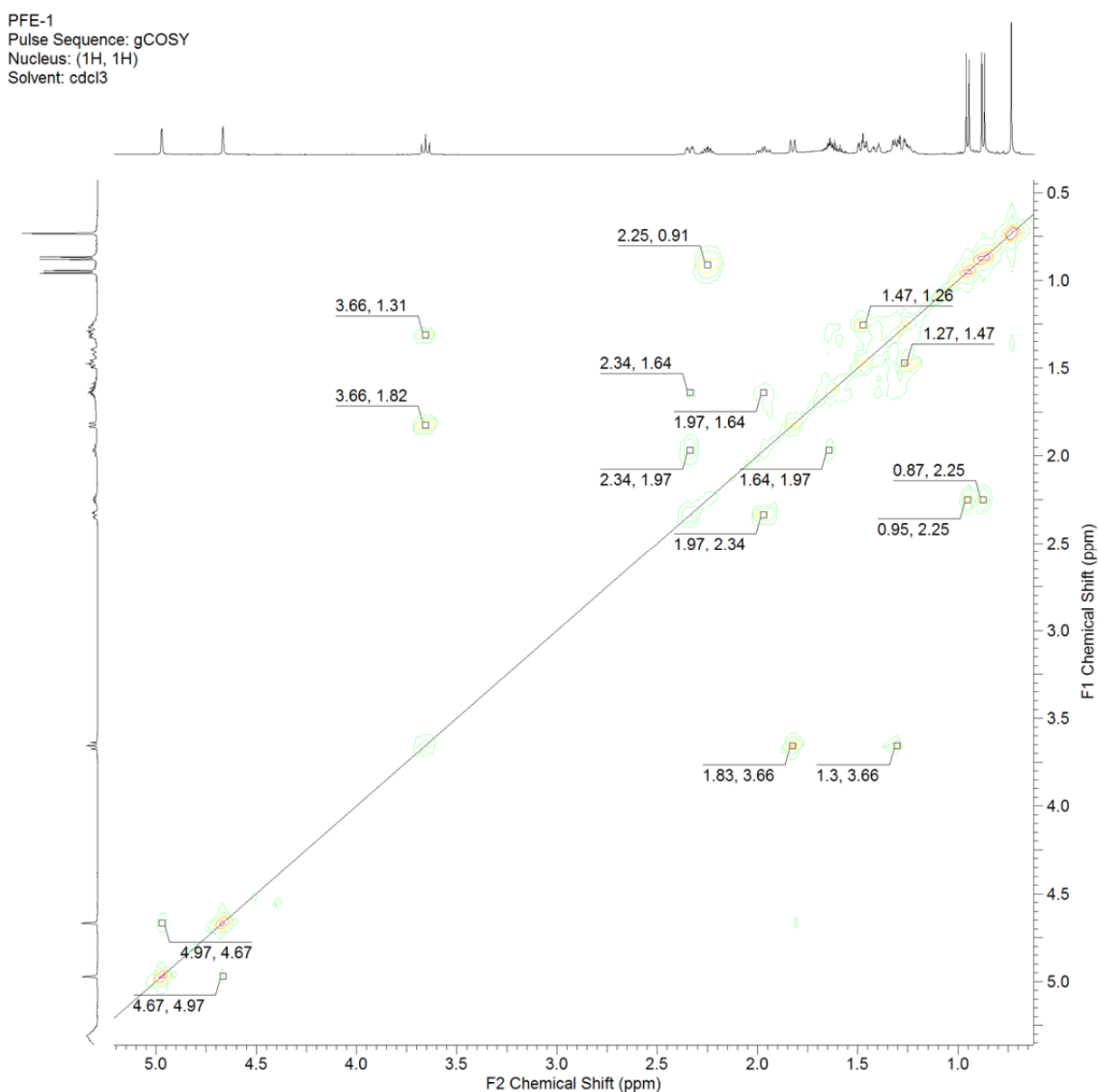


Figura 67: Espectro de correlação homonuclear (^1H - ^1H)-COSY da fração PFE-1

A análise por RMN de ^{13}C (Figura 68) apresentou 15 sinais entre os δ 16,2 e 148,3, confirmando que se trata de um sesquiterpeno. O sinal característico de carbono carbinólico em δ 67,2, confirmou a hidroxila, e dois sinais com δ 106,3 e 148,3 ppm, indicaram a presença de dois carbonos vinílicos.

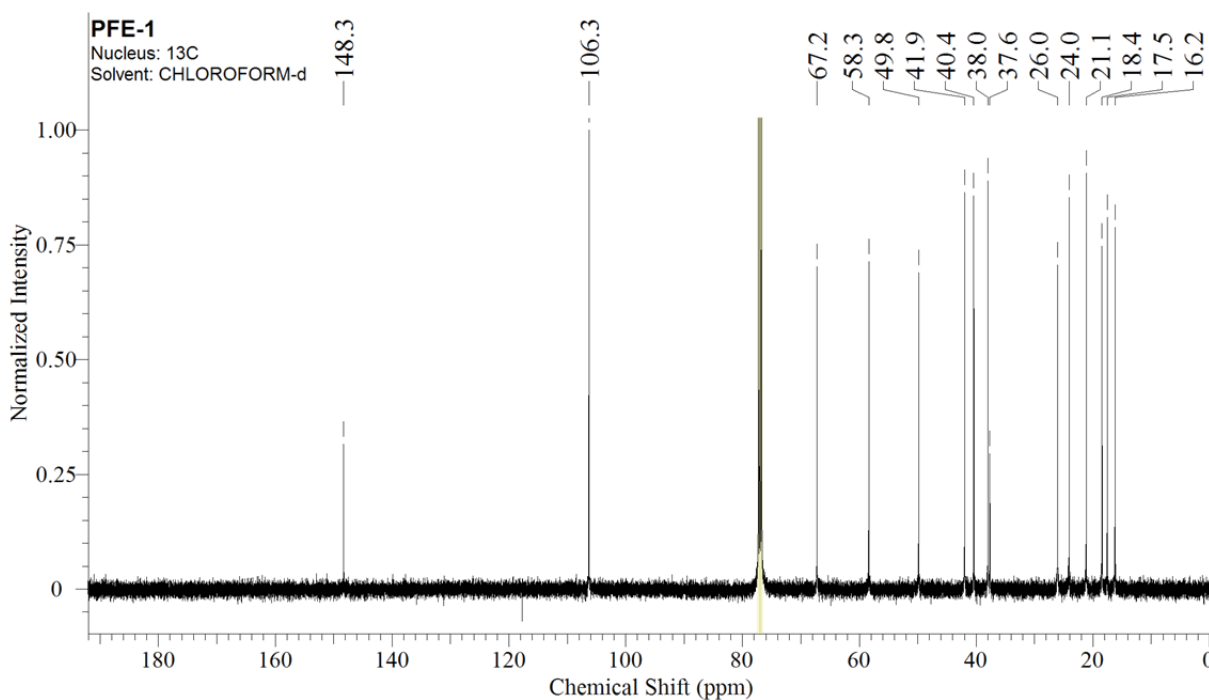


Figura 68: Espectro de RMN de ^{13}C da fração PFE-1 (125 MHz, Solvente/Referência: CDCl_3)

Através do espectro de correlação heteronuclear (^1H - ^{13}C)-HSQC (Figura 69) foi possível atribuir todos os sinais dos hidrogênios para os seu respectivos carbonos (Tabela 14).

O espectro de correlação heteronuclear a longa distância (^1H - ^{13}C)-HMBC (Figura 71) mostrou que o H-3 acopla com os carbonos em δ 148,3 (C-4), 24,1 (C-2) e 106,3 (C-15), que o H-5 acopla com os carbonos em δ 67,2 (C-6), 17,5 (C-14), 37,6 (C-10), 106,3 (C-4) e 148,3 (C-15) e que o H-14 acopla com os carbonos em δ 40,4 (C-1), 41,9 (C-9), 58,3 (C-5) e 37,6 (C-10). Através deste experimento foi possível determinar quais sinais pertencem ao anel A do sesquiterpeno.

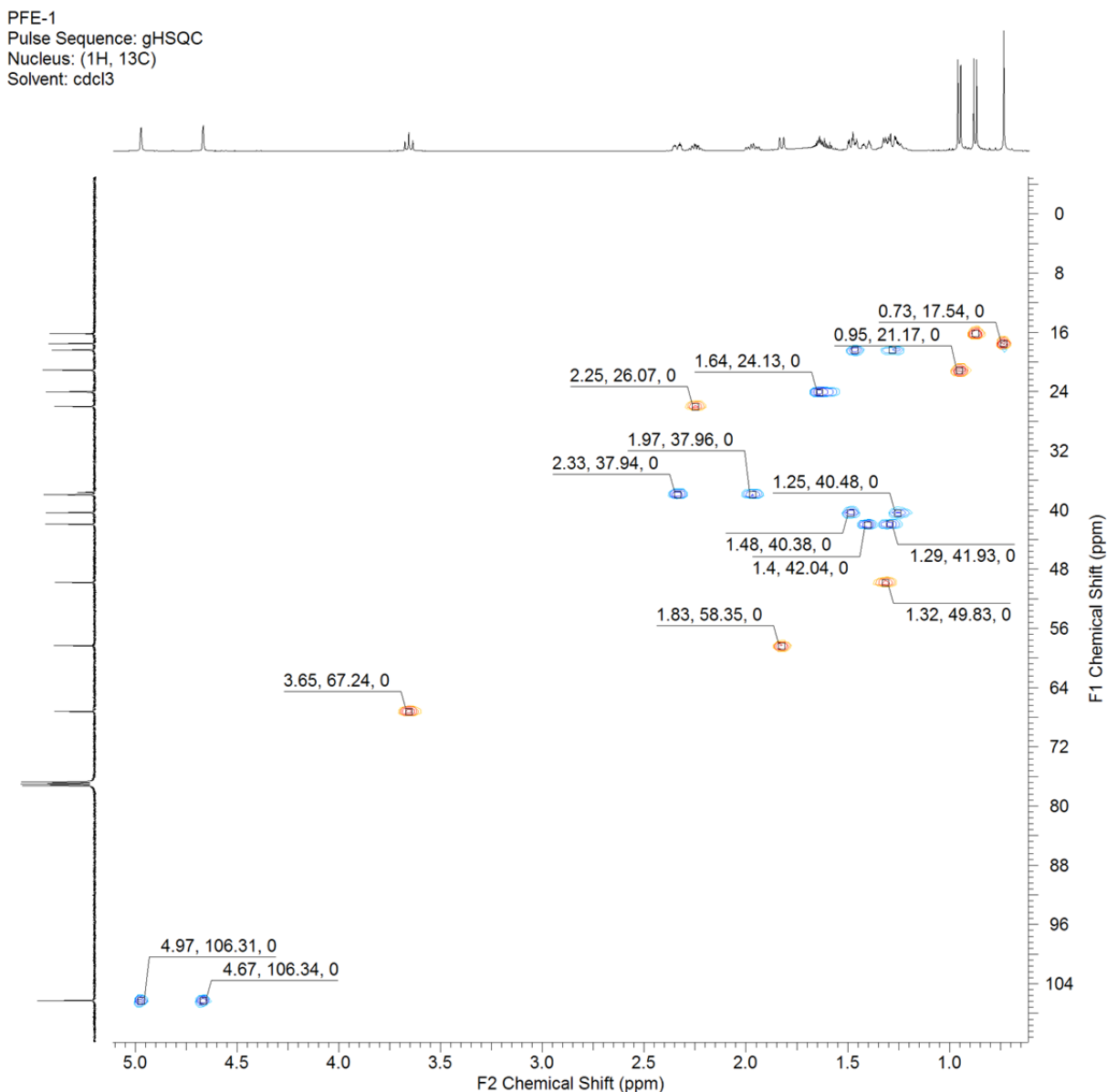


Figura 69: Espectros de correlação heteronuclear (^1H - ^{13}C)-HSQC da fração PFE-1

O grupo isopropil presente no anel B do sesquiterpeno foi confirmado com as correlações que mostraram que o H-11 se correlaciona com os carbonos em δ 16,2 (C-12) e 21,1 (C-13), que o H-12 se correlaciona com os carbonos em δ 26,0 (C-11) e 49,8 (C-7) e que o H-13 se correlaciona com os carbonos em δ 49,8 (C-7), 16,2 (C-12) e 26,0 (C-11).

As correlações (^1H - ^{13}C)-HMBC e (^1H - ^1H)-COSY estão apresentadas na Figura 70-A. A hidroxila na posição equatorial pode ser observada na projeção de Newman

(Figura 67-B), devido ao H-6 apresentar J (9,70 Hz) característico de acoplamento $H_{axial}-H_{axial}$. Os δ do junenol e as correlações estão apresentados na Figura 70-C e Tabela 14.

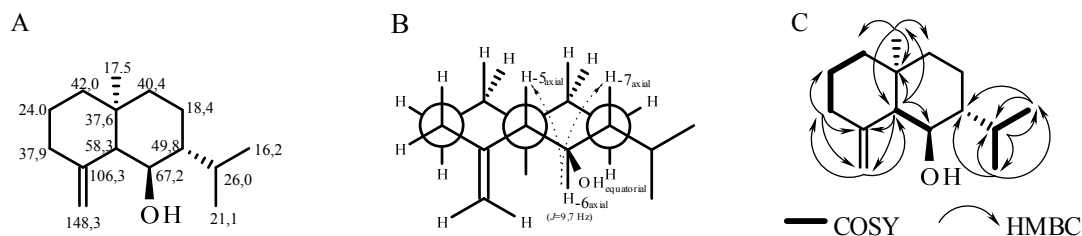


Figura 70: Estrutura do junenol isolado de *Protium cf. ferrugineum* com sinais de RMN de ^{13}C (A), projeção de Newman (B) e correlações do experimento ($^1\text{H}-^{13}\text{C}$)-HMBC e ($^1\text{H}-^1\text{H}$)-COSY (C)

Tabela 14: Sinais observados nos experimentos de RMN 1D e 2D para os cristais da fração PFE-1

C	δ_{C} (ppm)	HSQC δ_{H} [m, J, $\int$]	COSY δ_{H} (ppm)	HMBC δ_{C} (ppm)	$\delta_{\text{C}}^{\text{a}}$ (ppm)
1	40,4	-	-	-	40,3
2	24,1	-	-	-	24,0
3	38,0	1,97 ppm [td, $J=12,7$; 5,7 Hz, 1H] 2,34 ppm [m, 1H]	2,34 1,97	148,3; 24,1; 106,3 -	37,9
4	148,3	-	-	-	148,3
5	58,3	1,82 ppm [d, $J=9,9$ Hz, 1H]	3,65	148,3, 67,2; 17,5; 37,6; 106,3	58,3
6	67,2	3,65 ppm [t, $J=9,7$ Hz, 1H]	1,82	-	67,2
7	49,8	-	-	-	49,8
8	18,4	-	-	-	18,4
9	41,9	1,41 ppm [m, 1H]	-	-	41,9
10	37,6	-	-	-	37,6
11	26,0	2,25 ppm [dsept, $J=6,9$ (x6), 2,4 Hz, 1H]	0,87 0,95	C-13; C-12	26,0
12	16,2	0,87 ppm [d, $J=6,9$ Hz, 2H]	2,25	26,0; 49,8	16,2
13	21,1	0,95 ppm [d, $J=7,3$ Hz, 2H]	2,25	49,8; 16,2; 26,0	21,1
14	17,5	0,73 [s, 3H]	-	40,4; 41,9; 58,3; 37,6	17,5
15	106,3	4,67 ppm [d, $J=1,5$ Hz, 1H] 4,97 ppm [d, $J=1,1$ Hz, 1H]	4,97 4,67	58,3; 37,9 58,3; 37,9	106,3

^a – δ de RMN de ^{13}C obtido na literatura (YUKAWA *et al.*, 2004).

PFE-1
Pulse Sequence: gHMBC
Nucleus: (1H, 13C)
Solvent: cdcl3

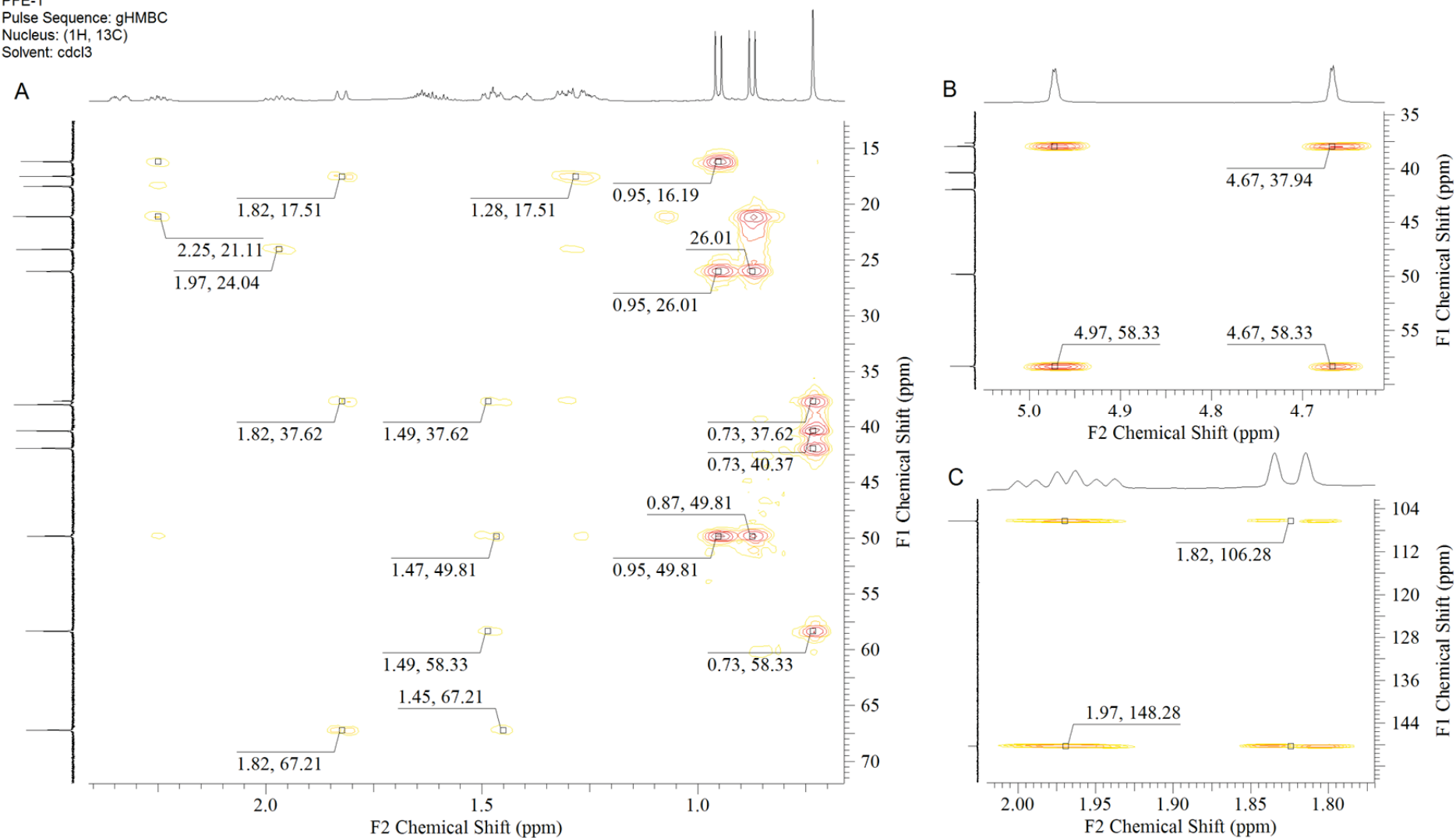


Figura 71: Espectro de correlação heteronuclear (^1H - ^{13}C)-HMBC da fração PFE-1. Ampliação das correlações entre δ_{H} 0,5-2,5 e δ_{C} 13,0-74,0 (A). Ampliação das correlações entre δ_{H} 4,6-5,1 e δ_{C} 35,0-60,0 (B). Ampliação das correlações entre δ_{H} 1,7-2,4 e δ_{C} 104,0-152,0 (C) (Solvente: CDCl_3)

4.3.4 Fracionamento do Extrato em Acetato de Etila de *Protium paniculatum* var. *modestum*

Uma porção de ArPPM (1,0089 g) foi submetida a cromatografia em coluna com gel de sílica G60 (70-230 mesh) ($\varnothing_{\text{int}} = 2,5$ cm, $h_{\text{sílica}} = 17$ cm, $m_{\text{sílica}} = 40$ g). Foram recolhidas uma fração de 200 mL com diclorometano, sete frações de 200 mL com diclorometano e acetato de etila nas proporções 2%, 5%, 10%, 15%, 20%, 25% e 50%; uma fração de 200 mL de acetato de etila e uma fração final de 200 mL de metanol para a limpeza do material retido na coluna, como mostra o fluxograma na Figura 72.

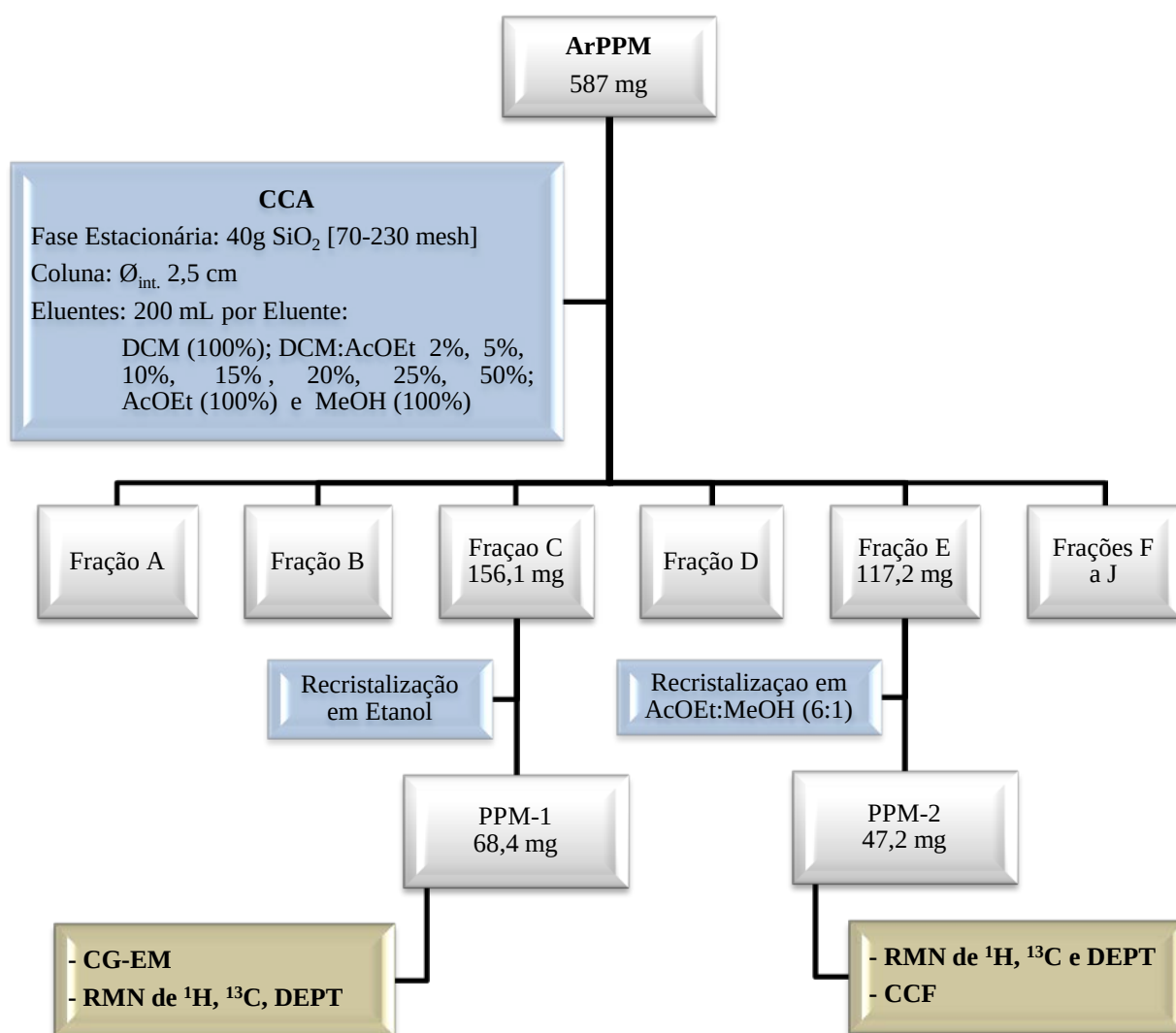


Figura 72: Fluxograma do fracionamento de ArPPM com obtenção de PPM-1 e PPM-2.

Na avaliação do perfil por CCD (Figura 73) para as frações de ArPPM foi observada eficácia na separação entre cada fração obtida. A fração ArPPM-B (“spot B” na Figura 73-A) apresenta duas manchas, uma mais intensa no R_f 0,56 majoritária e uma minoritária, sendo que a mancha mais intensa se trata da mistura de α - e β -amirina. A fração ArPPM-C, quando revelada com sulfato cérico IV apresentou mancha marrom (“spot C” na Figura 73-A), que quando deixada em condições ambientes durante 30 min sua coloração modificou para verde (“spot C” na Figura 69-B). Esta fração (ArPPM-C) foi recristalizada em etanol fornecendo sólidos em forma de agulha denominado PPM-1 (68,4 mg). A amostra PPM-1 foi submetida a análises de espectrometria de massas acoplada a cromatografo a gás (CG-EM) e ressonância magnética nuclear (RMN de ^1H , ^{13}C , DEPT) para a sua identificação.

A fração ArPPM-E apresentou duas manchas por CCD. Sua característica visual apresentava cristais transparentes de formato hexagonal e um óleo amarelo, esta fração foi recristalizada em acetato de etila e metanol (3:1), fornecendo 47,2 mg de cristais sem a presença do óleo, denominada PPM-2. Esta amostra foi submetida a análises de ressonância magnética nuclear (RMN de ^1H , ^{13}C , DEPT) para a sua identificação em mistura binária e submetida a um novo fracionamento cromatográfico, visando à separação das duas substâncias (R_f 0,65 e 0,74, “spot E” na Figura 73-C).

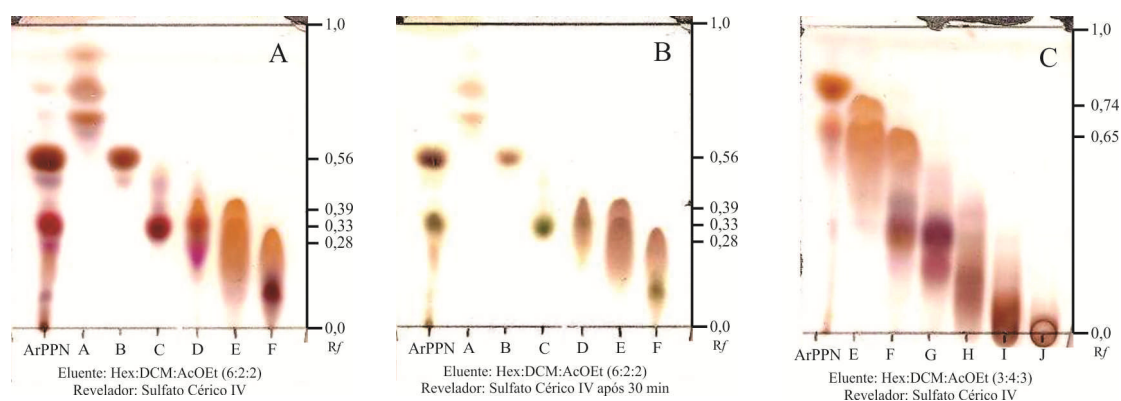


Figura 73: Perfil do fracionamento de ArPPM avaliado por CCD

A fração PPM-2 (47,2 mg) foi submetida a cromatografia em coluna “flash” ($\varnothing_{\text{int}} = 2 \text{ cm}$, $m_{\text{silica}} = 25 \text{ g}$). Como eluente foi utilizado 200 mL de uma mistura de clorofórmio e acetato de etila (7:3) em sistema isocrático, como mostra a Figura 74. A coleta das frações foi iniciada com 30 mL do volume morto, sendo coletadas 19 frações de 10 mL. Para a limpeza do material retido na coluna foi coletada uma única fração de 100 mL em metanol.

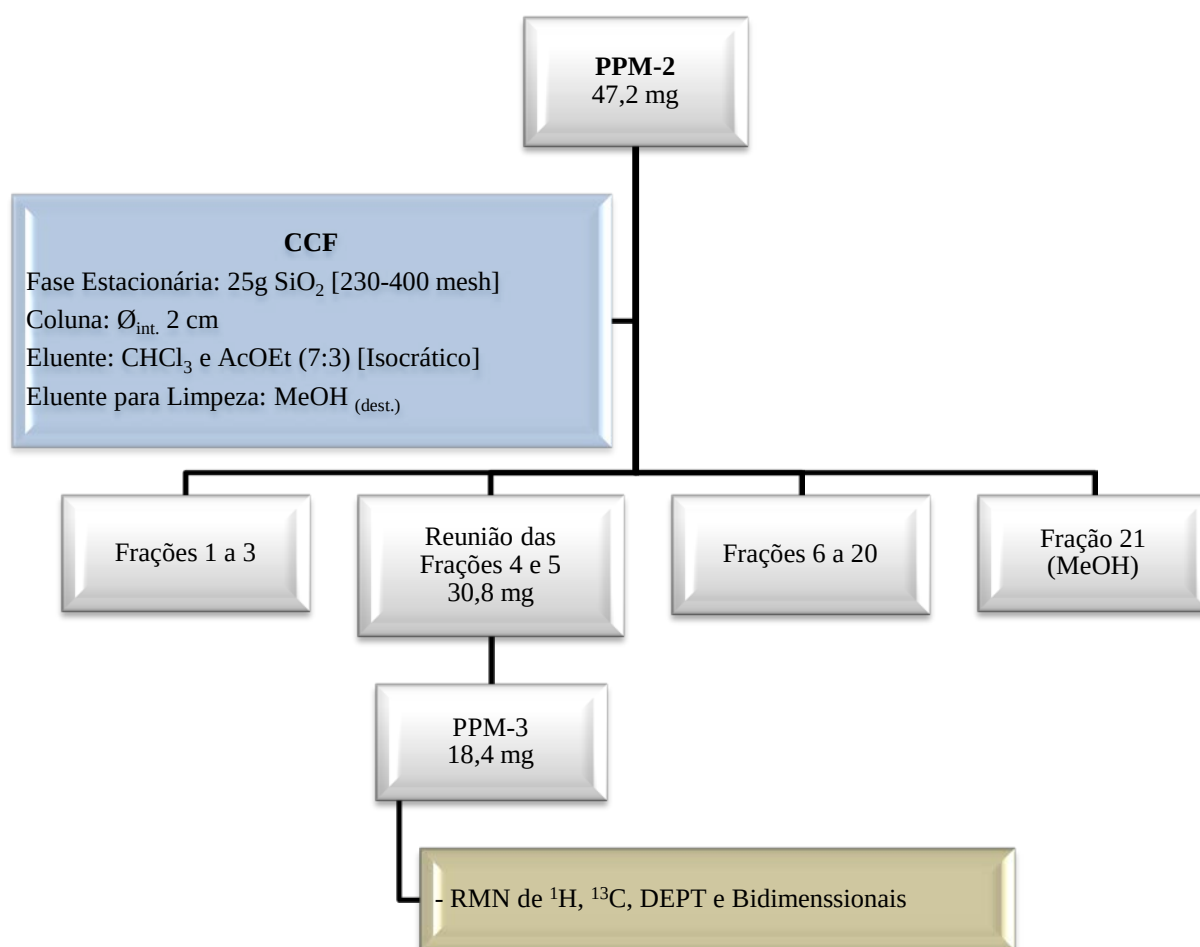


Figura 74: Fluxograma de isolamento de PPM-3

Após a análises do perfil das frações por CCD (Figura 75), as frações 4 e 5 foram reunidas, obtendo 8,2 mg do cristal que apresentou mancha no R_f 0,65 (clorofórmio e acetato

de etila (15:5)), sendo denominada PPM-3, e submetida a análises de ressonância magnética nuclear (RMN de ^1H , ^{13}C , DEPT, COSY, HSQC e HMBC) para a sua identificação.

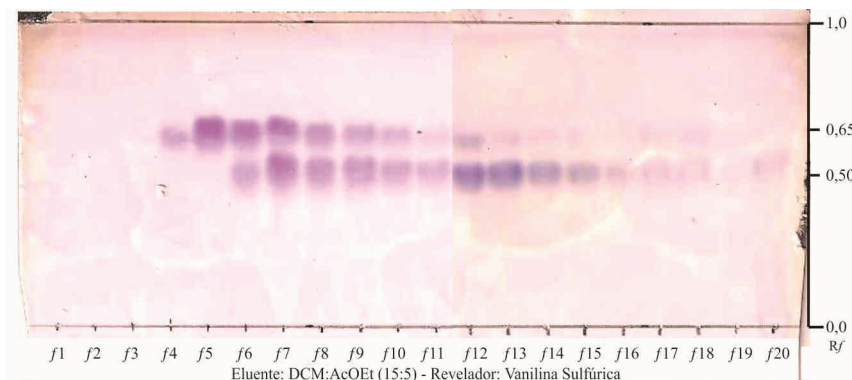


Figura 75: Perfil do fracionamento de PPM-3 por CCD

4.3.4.1 Identificação de PPM-1

A fração identificada como PPM-1 apresentou sólidos de coloração branca e formato de agulha após recristalização em etanol. Estes cristais quando revelados com sulfato cérico IV em análise de CCD, apresentaram uma única mancha, de coloração marron, após a revelação, contudo após 30 minutos a mancha marron mudou para coloração verde, que segundo Vieira Junior *et al.* (2007) é um indicativo dos triterpenos diidroxilados: breina e maniladiol (variação de coloração apresentada entre as Figuras 73-A e 73-B, pg. 156).

A análise da fração PPM-1 por CG-EM (Figura 76-A) mostrou a presença de duas substâncias majoritárias com relação de 1:2,8, para os picos nos tempos de retenção em 32,942 e 33,881 min respectivamente.

A análise dos fragmentos obtidos por CG-EM (Figuras 76-B e 76-C) mostrou que ambas as substâncias apresentaram o mesmo íon molecular de 442 m/z $[\text{M}]^+$ e o íon 424 m/z $[\text{M}-18]^+$, característicos de perda de água, e o mesmo pico base (m/z 234), característico de abertura no anel C pela reação de retro Diels-Alder, abertura esta do anel C, característica de

triterpenos ursano e oleanano com insaturação na posição Δ^{12} , e com hidroxila na posição 16 (BUDZIKIEWICZ *et al.*, 1963), sugerindo que se trata dos triterpenos breina e maniladiol.

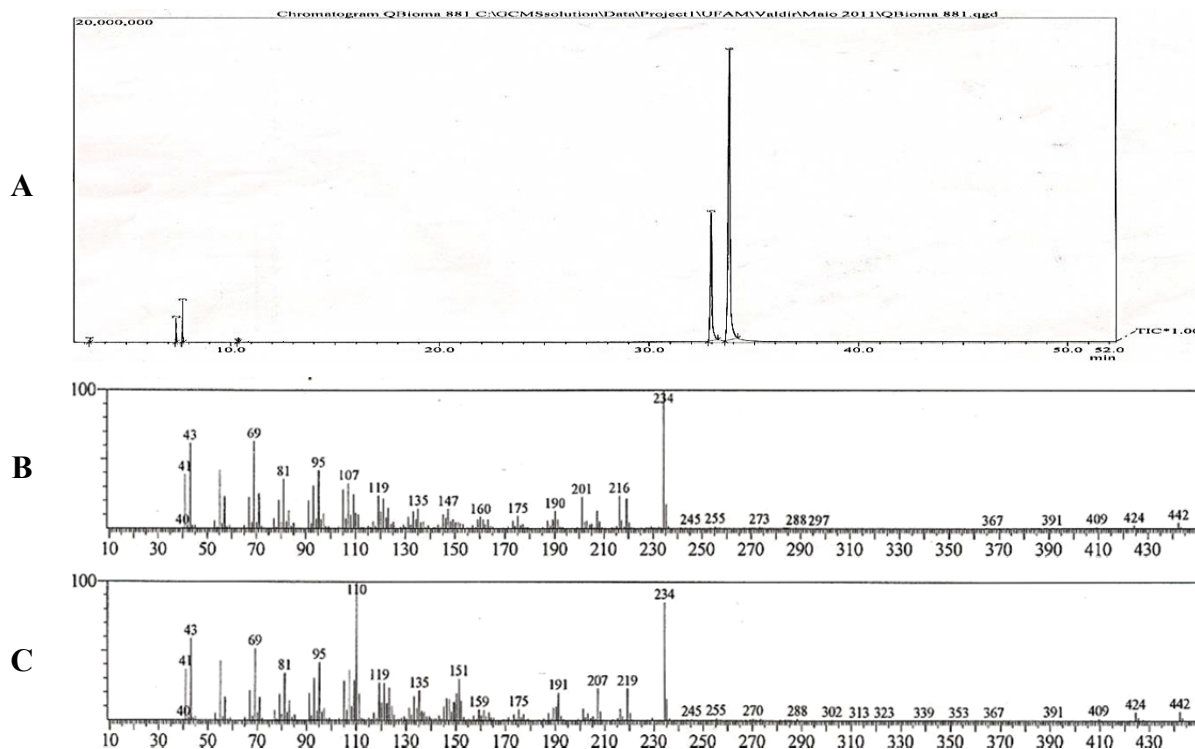


Figura 76: Cromatograma de ions totais e espectro de massas da fração PPM-1

No espectro de RMN de ^1H (Figura 77) foram observados a presença de 10 simpletos em δ 1,22; 1,16; 1,03; 1,01; 1,00; 0,95; 0,80; 0,80; 0,79; 0,78 e dois dupletos em δ 0,91 ($J=7,02$ Hz), 0,96 ($J=8,54$ Hz) na região de hidrogênio metílicos sugerindo um mínimo de doze metilas, o que se justifica pela presença de duas substâncias observada por CG-EM.

A presença das hidroxilas nas posições 3 e 16 foram confirmadas com os três duplos dupletos observados entre em δ 3,23, 4,40 e 4,22. O hidrogênio carbinólico H-3, em δ 3,23 (dd, $J=10,9$; 5,2 Hz), encontra-se na posição axial, o que sugere que a hidroxila encontra-se na posição equatorial ($3\beta\text{-OH}$). Os hidrogênios carbinólicos H-16, em δ 4,22 (dd, $J=11,3$; 5,2 Hz, breina) e 4,20 (dd, $J=11,6$; 4,9 Hz, maniladiol), encontram-se na posição axial, o que sugere as hidroxilas na posição equatorial ($16\beta\text{-OH}$).

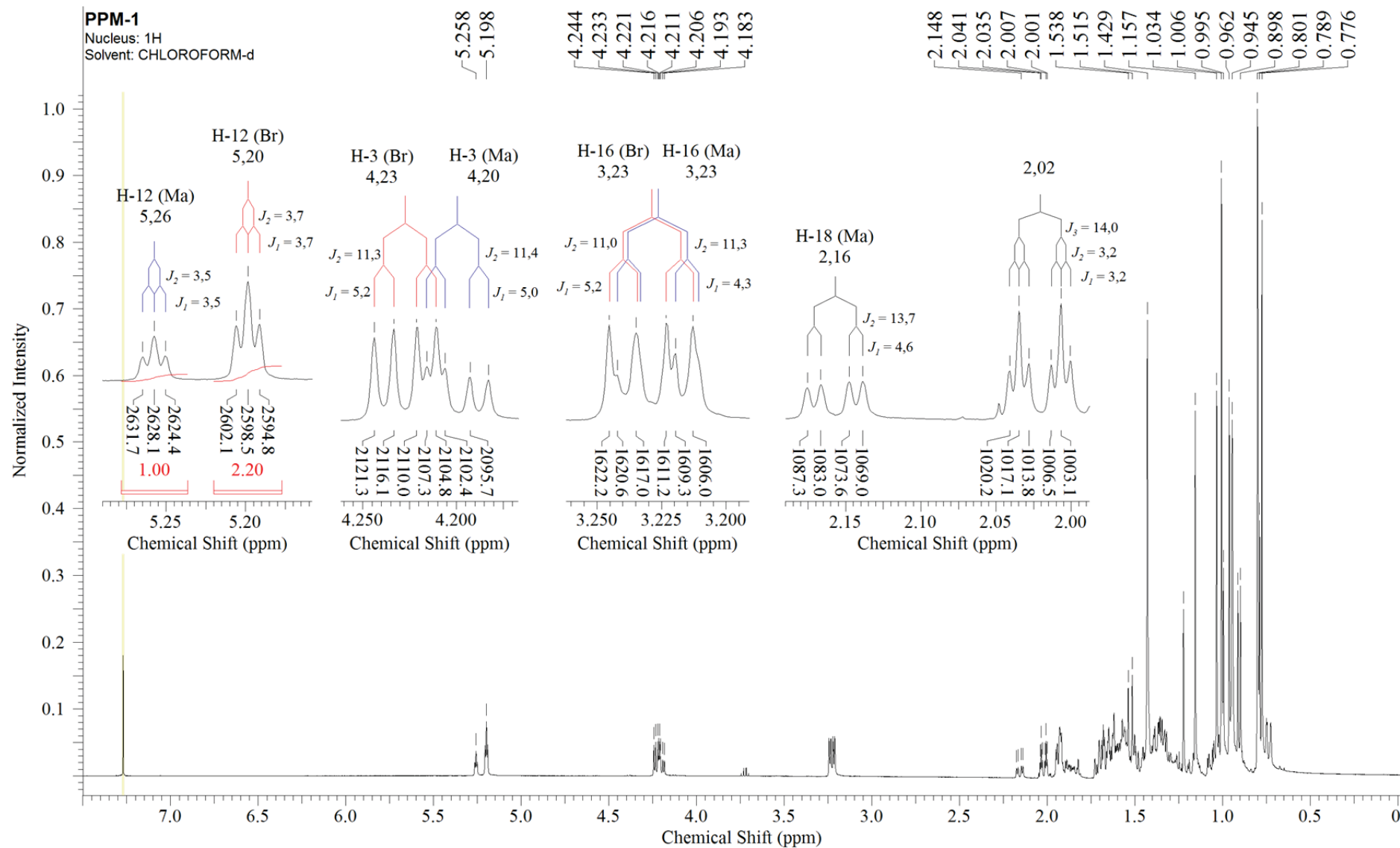


Figura 77: Espectro de RMN de ^1H da fração PPM-1 (500 MHz, Solvente/Referência: CDCl_3). Legenda: Br – Breina; Ma – Maniladiol.

Pôde-se observar ainda nos espectros de RMN de ^1H , a presença de hidrogênios olefinicos pela presença do tripleto em δ 5,26 ($J = 3,5$ Hz) e 5,20 ($J = 3,6$ Hz), região característica de alquenos.

Para confirmar a mistura entre breina e maniladiol foi realizado o RMN de ^{13}C (Figuras 79-A) onde foram detectados a presença de 59 sinais. Os dados de RMN de ^{13}C apresentaram quatro sinais em δ 67,0, 66,0, 78,98 e 78,96, região característica de metino ligado a hidroxila. Estes 4 sinais comparados com a literatura demonstram os mesmo deslocamentos químicos das hidroxilas para a breina e o maniladiol. Sua confirmação se deu com a comparação dos 4 sinais dos carbonos vinílicos em δ 122,3, 125,1, 137,9, e 143,5, que na comparação com a literatura, os carbonos em δ 122,3 (CH) e 143,5 (C), se referem aos carbonos 12 e 13 de maniladiol, e os carbonos em δ 125,1 (CH) e 137,9 (C) se referem aos carbonos 12 e 13 de breina.

Com a análise de DEPT 90° (Figura 79-B) e DEPT 135° (Figura 79-C) foi possível confirmar que 16 sinais de deslocamento químico se tratavam carbonos metílicos (CH_3), 17 sinais de carbonos metilênicos (CH_2), 14 sinais referentes a carbonos metínicos (CH) sendo que 2 sinais em δ 122,30 e 125,11, se tratavam de CH olefinicos. A presença de sinais observados somente no espectro de RMN de ^{13}C e não nos espectros de DEPT confirmaram a presença de 12 carbonos não ligados a hidrogênios.

A comparação dos dados obtidos de RMN de ^{13}C com os apresentados por Maia *et al.*, (2000) (Tabela 15), demonstraram que a fração PPM-1 se trata de uma mistura dos triterpenos breina e maniladiol (Figura 78).

A proporção entre os dois triterpenos presentes na mistura foi determinado através da razão entre as integrais dos hidrogênios H-12 em δ 5,20 (ursano) e 5,26 (oleanano), sendo sugerido uma relação de 1:2,3 para maniladiol e breina, respectivamente. Portanto, na análise

por CG-EM os picos observados com t_R em 32,942 e 33,881 min (Figura 76-A) são relativos à maniladiol e breina respectivamente.

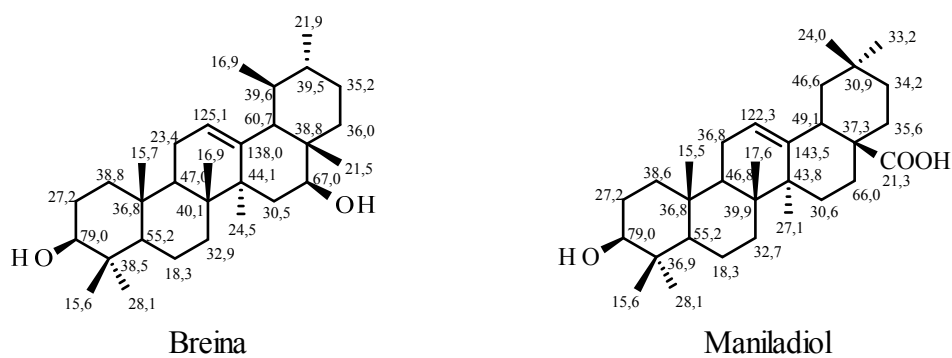


Figura 78: Estrutura com sinas de RMN de ^{13}C da breina e do maniladiol isolados de *Protium paniculatum* var. *modestum*

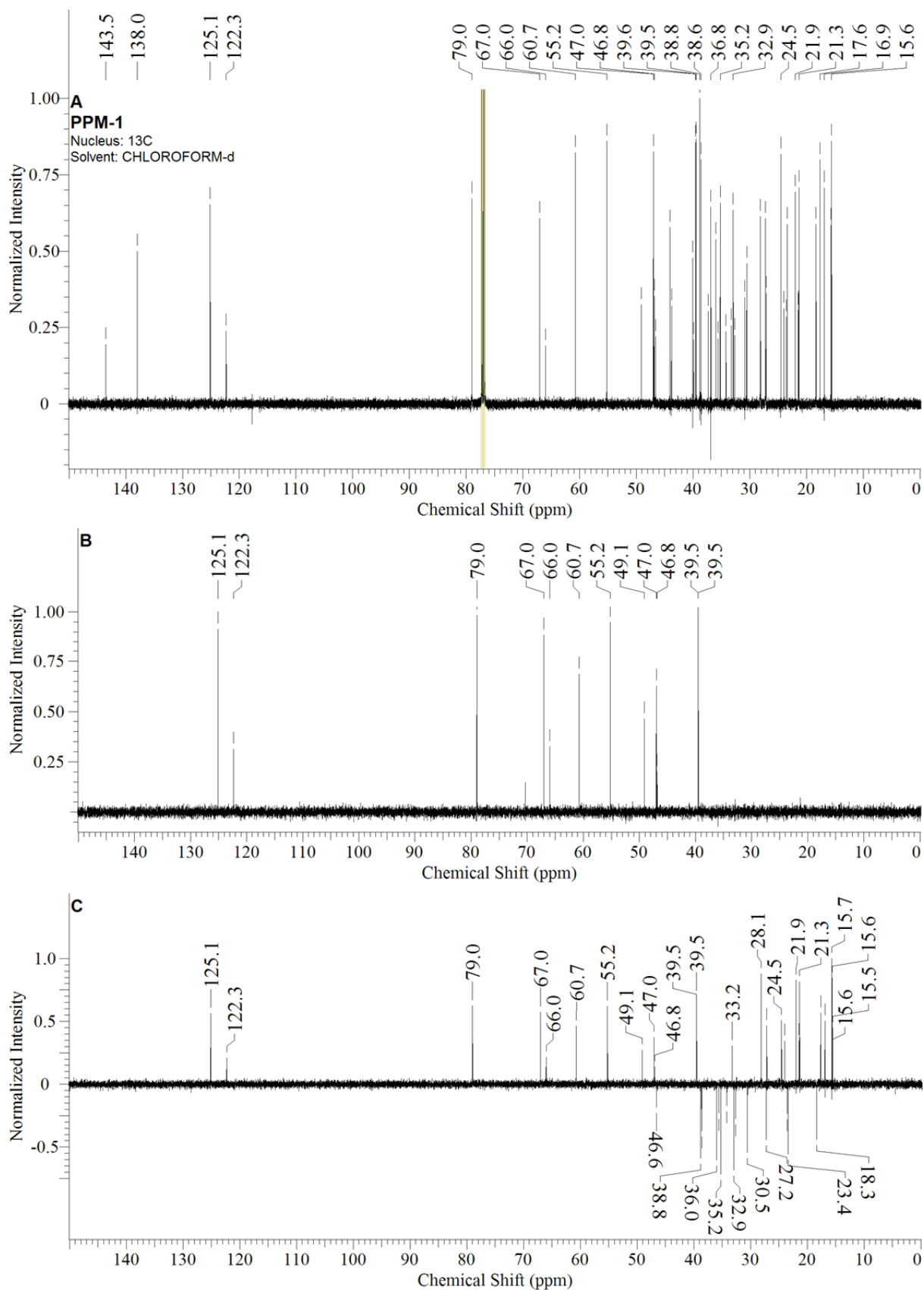


Figura 79: Espectro de RMN de ^{13}C (A), DEPT 90° (B) e DEPT 135° (C) da fração PPM-1 (125 MHz, Solvente/Referência: CDCl_3)

Tabela 15: Sinais observados no espectro de RMN de ^{13}C e DEPT para os cristais de breina e maniladiol e comparação com a literatura

Carbono n°	Breina			Maniladiol		
	δ (ppm)	DEPT	δ (ppm) Lit ¹	δ (ppm)	DEPT	δ (ppm) Lit ¹
1	38,8	CH ₂	38,33	38,6	CH ₂	38,04
2	27,2	CH ₂	26,74	27,2	CH ₂	26,74
3	79,0	CH	78,44	79,0	CH	78,44
4	38,5	C	38,27	36,9	C	38,27
5	55,2	CH	54,75	55,2	CH	54,75
6	18,3	CH ₂	17,82	18,3	CH ₂	17,82
7	32,9	CH ₂	32,45	32,7	CH ₂	32,21
8	40,1	C	39,59	39,9	C	39,41
9	47,0	CH	46,53	46,8	CH	46,37
10	36,8	C	36,36	36,8	C	36,82
11	23,4	CH ₂	22,88	23,5	CH ₂	23,02
12	125,1	CH	124,60	122,3	CH	121,78
13	138,0	C	137,53	143,5	C	143,05
14	44,1	C	43,57	43,8	C	43,31
15	30,5	CH ₂	35,51	30,6	CH ₂	35,13
16	67,0	CH	66,46	66,0	CH	65,45
17	38,8	C	38,05	37,3	C	36,81
18	60,7	CH	60,29	49,1	CH	48,65
19	39,6	CH	39,05	46,6	CH ₂	46,11
20	39,5	CH	39,01	30,9	C	30,36
21	35,2	CH ₂	30,05	34,2	CH ₂	33,70
22	36,0	CH ₂	34,71	35,6	CH ₂	29,14
23	28,1	CH ₃	27,63	28,1	CH ₃	27,63
24	15,6	CH ₃	15,08	15,6	CH ₃	15,08
25	15,7	CH ₃	15,15	15,5	CH ₃	14,98
26	16,9	CH ₃	16,39	17,6	CH ₃	17,08
27	24,5	CH ₃	24,01	27,1	CH ₃	26,74
28	21,5	CH ₃	21,44	21,3	CH ₃	20,96
29	16,9	CH ₃	17,01	33,2	CH ₃	32,70
30	21,9	CH ₃	21,44	24,0	CH ₃	23,46

¹ Dados extraídos de Maia *et al.*, 2000

4.3.4.2 Identificação de PPM-2 e PPM-3

O espectro de RMN de ^1H (Figura 80) de PPM-3 mostrou sinais de 7 simpletos na região de hidrogênios metílicos, em δ 0,85 (s, 3H), 0,87 (s, 3H), 0,91 (s, 3H), 0,95 (s, 3H), 0,98 (s, 3H), 1,58 (s, 3H) e 1,66 (s, 3H), indicando a ligação destas metilas com carbonos quaternários.

O triplo triplete observado no δ em 5,12 ppm (tt, $J=7,2$, 1,2 Hz, 1H) indica a presença de um CH (sp_2) ligado a um CH_2 . A presença de um simpleto largo em δ 2,81 indica a presença de uma hidroxila no composto isolado. A presença de hidrogênio carbinólico foi observada em δ 3,36 [t, $J=2,7$ (x2) Hz, 1H], a análise da constante de acoplamento, sugere que este hidrogênio encontra-se na posição axial.

No RMN de ^{13}C (Figura 81-A), 30 sinais de deslocamento químico (δ) foram observados, o que sugere a presença de um único triterpeno na fração, confirmando que a mancha visualizada por CCD se trata de uma única substância. A análise por RMN de ^{13}C mostrou um sinal em δ 75,54, característico de carbono ligado à hidroxila, um sinal em δ 177,4 foi observado, o que indicou a presença de carboxila. Pôde ser observado ainda quatro sinais em δ 125,0; 132,3; 133,8 e 135,8, o que mostrou a presença de carbonos insaturados.

A análise dos espectros DEPT 90° (Figura 81-B) e DEPT 135° (Figura 81-C) indicaram que a estrutura apresenta 10 grupos metílicos, 7 grupos metila, 5 grupos metínicos, sendo que o carbono metínico em δ 122,67 ppm apresenta hibridização sp^2 . Comparando os espectros de RMN de ^{13}C e DEPT 135°, observou-se que 8 sinais presentes no RMN de ^{13}C não estão presentes no espectro de DEPT 135°, concluindo-se que estes são referentes a carbonos quaternários.

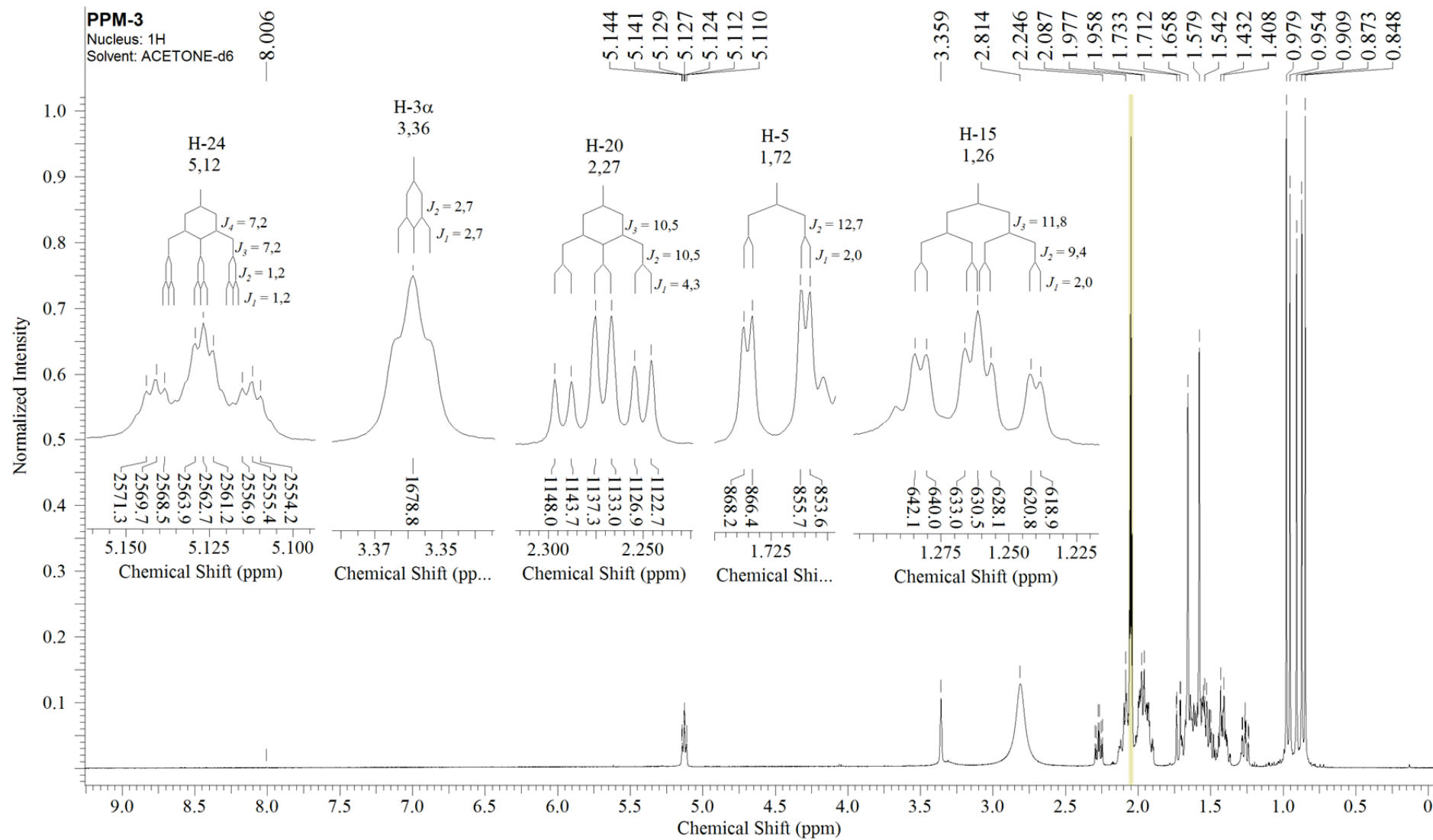


Figura 80: Espectro de RMN de ^1H da fração PPM-3 (500 MHz, Solvente/Referência: Acetona deuterada)

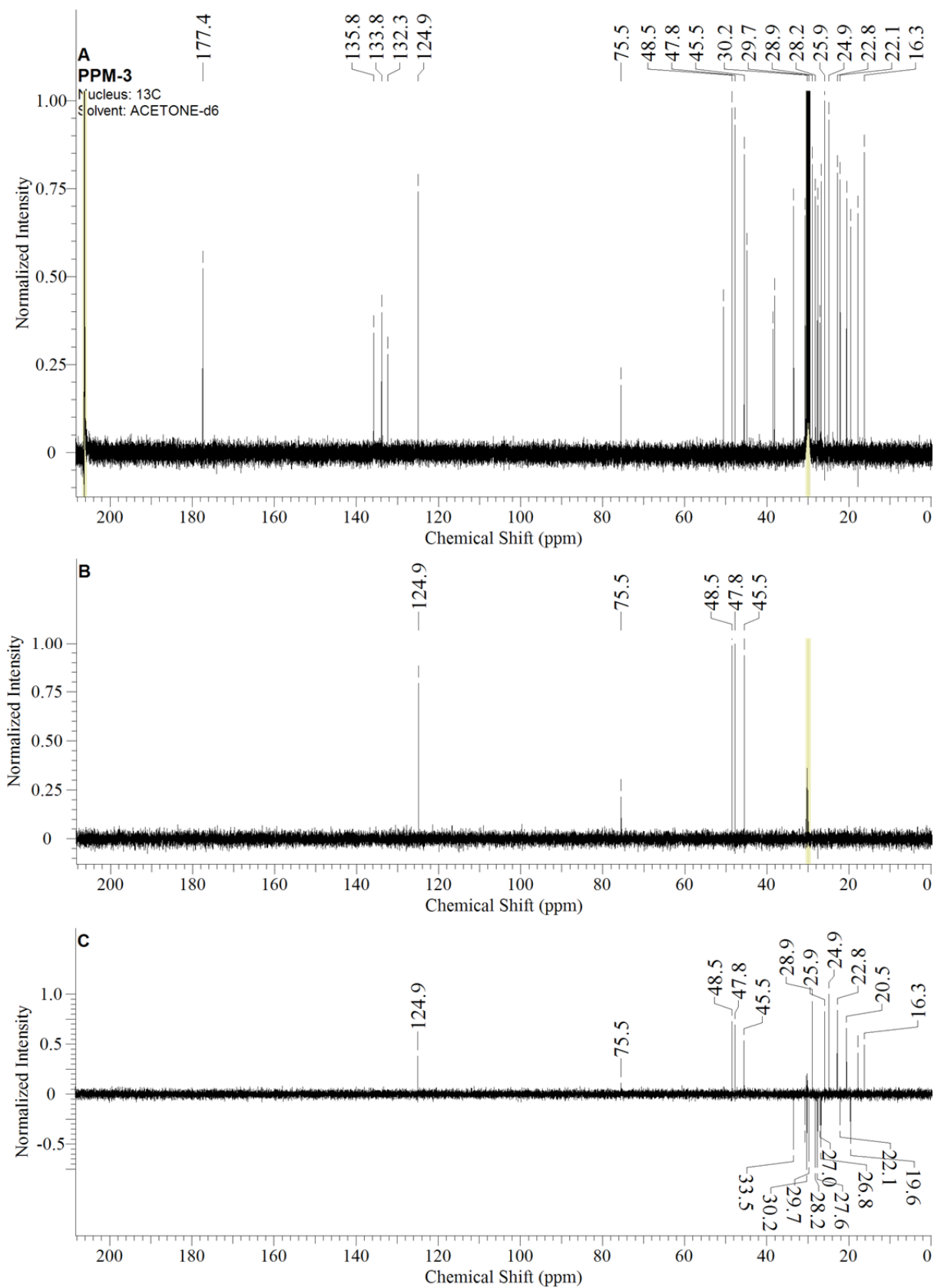


Figura 81: Espectro de RMN de ^{13}C (A), DEPT 90° (B) e DEPT 135° (C) da fração PPM-3 (125 MHz, Solvente/Referência: Acetona deuterada)

Através das análises dos espectros de correlação heteronuclear (^1H - ^{13}C)-HSQC (Figura 83) e (^1H - ^{13}C)-HMBC (Figura 84) foi possível observar que os hidrogênios metílicos H-28 (δ 0,95) e H-29 (δ 0,85) correlacionam com os carbonos em δ 38,5 (C-4), 45,5 (C-5) e 75,5 (C-3), sendo que H-28 correlaciona com o carbono C-29 (δ 22,8) e o H-29 se correlaciona com o carbono C-28 (δ 28,9) e que o hidrogênio metílico H-19 (δ 0,98) correlaciona com os carbonos em δ 30,6 (C-1), 135,8 (C-9) e 38,1 (C-10). Estas informações junto as correlações do H-5 (δ 1,72) com os carbonos em δ 19,6 (C-6), 38,5 (C-4), 135,8 (C-9), 20,5 (C-19), 22,8 (C-29), 28,2 (C-7), 28,9 (C-28) e 38,1 (C-10) e do hidrogênio H-6 (δ 1,59-164) com os carbonos em δ 28,2 (C-7), 45,5 (C-5), 133,8 (C-8) e 38,1 (C-10) permitiu determinar os sinais dos anéis A e B do triterpeno.

O hidrogênio metílico H-18 (δ 0,87) correlaciona com os carbonos em δ 29,7 (C-12), 47,8 (C-17), 44,8 (C-13) e 50,5 (C-14) e o hidrogênio metílico H-30 (δ 0,91 ppm) se correlaciona com os carbonos em δ 30,2 (C-15), 44,8 (C-13), 50,5 (C-14), 133,8 (C-8) pelo experimento (^1H - ^{13}C)-HMBC. Estes sinais junto às correlações observadas para os hidrogênios H-12, H-15, H-16 e H-17 possibilitou determinar os sinais dos anéis C e D do triterpeno.

Concluindo as correlações do experimento (^1H - ^{13}C)-HMBC, observou-se que o H-17 (δ 2,05) se correlaciona com os carbonos em δ 48,5 (C-20) e 44,8 (C-13) e que o H-20 (δ 2,27 ppm) se correlaciona com o carbono em δ 47,8 (C-17), 33,5 (C-22) e o 177,4 ppm (C-21). Analisando as correlações do H-22, H-24, H-26 e H-27 foi possível determinar os sinais da cadeia lateral de 8 carbonos.

Após avaliação dos dados de RMN 1D e 2D, e comparação dos dados de RMN de ^{13}C com os apresentados por Usubilaga *et al.* (2004) (Tabela 16), confirmou-se que a fração PPM-3 se trata do ácido 3 α -hidroxi-tirucala-8,24-dieno-21-óico, ou α -elemólico.

As correlações observadas pelo experimento (^1H - ^{13}C)-HMBC estão representadas por setas na Figura 82.

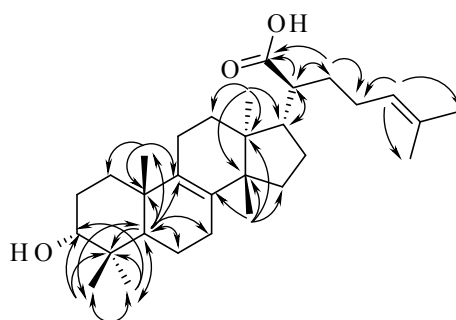


Figura 82: Estrutura do ácido α -lemnólico isolado de *Protium paniculatum* var. *modestum* com correlações do experimento (^1H - ^{13}C)-HMBC

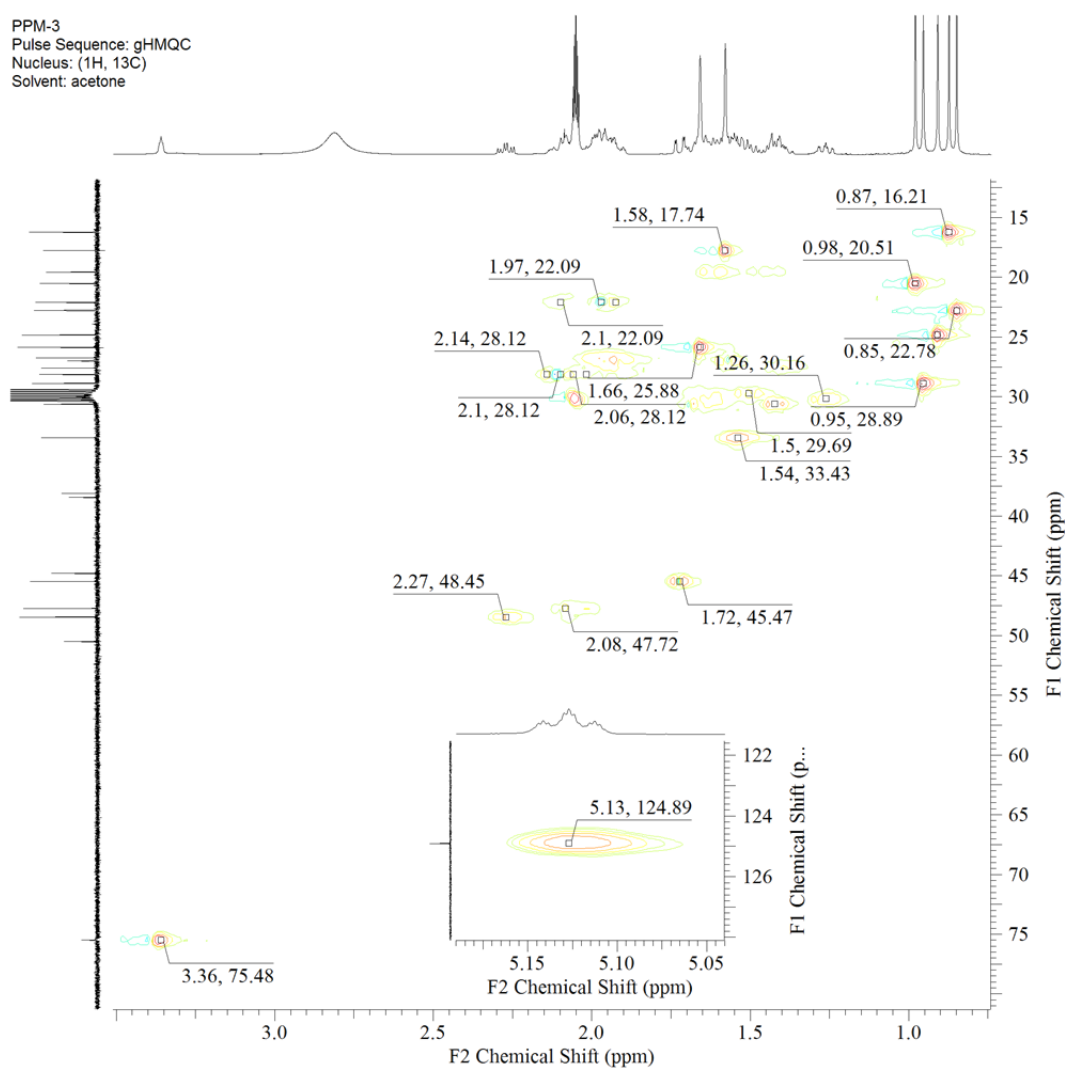


Figura 83: Espectros de correlação heteronuclear (^1H - ^{13}C)-HSQC da fração PPM-3 (Solvente: Acetona- D_6)

PPM-3
Pulse Sequence: gHMBC
Nucleus: (1H, 13C)
Solvent: acetone

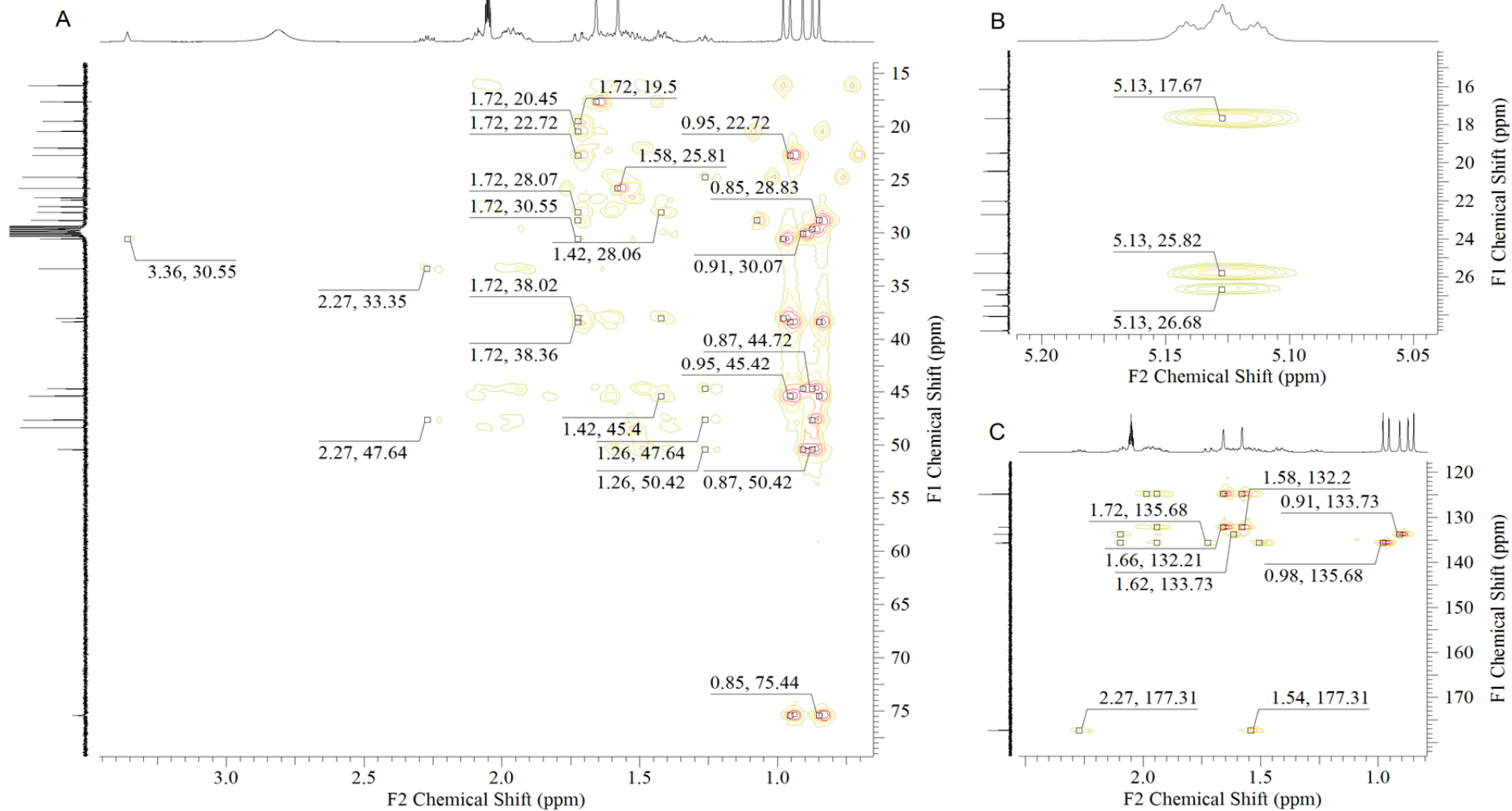


Figura 84: Espectro de correlação heteronuclear (^1H - ^{13}C)-HMBC da fração PPM-3. Ampliação das correlações entre δ_{H} 0,7-3,5 e δ_{C} 14,0-75,8 (A). Ampliação das correlações entre δ_{H} 5,0-5,2 e δ_{C} 14,0-32,0 (B). Ampliação das correlações entre δ_{H} 0,8-2,5 e δ_{C} 118,0-180,0 (C) (Solvente: Acetona- D_6)

Tabela 16: Sinais observados nos experimentos de RMN 1D e 2D para os cristais da fração PPM-3

C n°	δ_C (ppm)	DEPT	HSQC δ_H (ppm) [m, J]	HMBC C (n°)	δ_C^a (ppm)
1	30,7	CH ₂	1,38 – 1,45 [m]	C-5; C-7; C-10	29,7
2	27,0	CH ₂	1,54 – 1,60 [m]	-	26,8
3	75,5	CH	3,36 [t, $J=2,7$ (x2) Hz]	C-1	76,1
4	38,5	C	-	-	37,2
5	45,5	CH	1,72 [dd, $J=12,7, 2,0$ Hz]	C-4; C-6; C-7; C-9; C-10; C-19; C-28; C-29	44,5
6	19,6	CH ₂	1,59 – 1,64 [m]	C-5; C-7, C-8; C-10	20,4
7	28,2	CH ₂	-	-	21,3
8	133,8	C	-	-	134,4
9	135,8	C	-	-	132,9
10	38,1	C	-	-	37,7
11	27,6	CH ₂	-	-	26,0
12	29,7	CH ₂	1,47 – 1,54 [m]	C-9; C-13; C-14; C-16; C-18	28,7
13	44,8	C	-	-	43,8
14	50,5	C	-	-	49,6
15	30,2	CH ₂	1,26 [ddd, $J=11,8; 9,4; 2,0$]	C-13; C-14; C-17; C-30	29,4
16	22,1	CH ₂	1,93 – 2,10[m]	C-5; C-8; C-12; C-13; C-17; C-18, C-20; C-22, C-25	17,7
17	47,8	CH	2,05 [m]	C-13; C-18; C-20; C-22	47,7
18	16,3	CH ₃	0,87 [s]	C-12; C-13; C-14; C-17	15,8
19	20,6	CH ₃	0,98 [s]	C-1; C-9; C-10	19,6
20	48,5	CH	2,27 [td, $J=10,5$ (x2), 4,3]	C-17; C-21; C-22	46,9
21	177,4	C	-	-	182,4
22	33,5	CH ₂	1,53 [m]	C-20; C-21; C-23	32,7
23	26,8	CH ₂	-	-	25,8
24	124,9	CH	5,12 [tt, $J=7,2$ (x2), 1,2 (x2)]	C-23; C-26; C-27	123,7
25	132,3	C	-	-	132,2
26	17,8	CH ₃	1,58 [s]	C-24; C-25; C-27	17,6
27	25,9	CH ₃	1,66 [s]	C-24; C-25; C-26	25,6
28	28,9	CH ₃	0,95 [s]	C-3; C-4; C-5; C-29	26,6
29	22,8	CH ₃	0,85 [s]	C-3; C-4; C-5; C-28	21,1
30	24,9	CH ₃	0,91 [s]	C-8; C-13; C-14; C-15	24,2
^a – δ de RMN de ¹³ C obtido na literatura (Usubillaga <i>et al.</i> , 2004).					

A fração a PPM-2 (precursora do ácido 3 α -hidroxitirucala-8,24-dieno-21-óico – PPM-3), foi analisada por RMN de ^1H , RMN de ^{13}C e DEPT. O espectro de RMN de ^1H (Figura 86) da fração PPM-2 mostrou os 7 simpletos na região de hidrogênios metílicos, nos δ 0,85; 0,87; 0,91; 0,95; 0,98; 1,58 e 1,66 ppm referentes ao ácido 3 α -hidroxi-tirucala-8,24-dieno-21-óico e mais 7 simpletos com δ 0,79; 0,90; 0,92; 0,93; 1,00; 1,01 e 1,66 ppm.

A presença de hidrogênio carbinólicos H-3 em δ 3,36 (t, $J=2,75$ Hz) (referente à PPM-3) e 3,39 (t, $J=2,56$ Hz) (referente a segunda substância observada por CCD) sugere que ambas hidroxilas encontram-se na posição axial.

O triplo tripleto observado na região de hidrogênios vinílicos em δ 5,12 (tt, $J=7,2$ (x2), 1,4 (x2) Hz) é referente ao H-24 de ambas as substâncias. Nesta mesma região foi detectado outro multipeto em δ 5,28 (td, $J=4,0$; 2,9 (x2) Hz), que não havia sido detectado anteriormente no RMN de ^1H do ácido 3 α -hidroxi-tirucala-8,24-dieno-21-óico (Figura 80, pg. 166). Como o ácido 3 α -hidroxi-tirucala-8,24-dieno-21-óico é descrito em mistura binária com o ácido 3 α -hidroxi-tirucala-7,24-dieno-21-óico, observou-se que este sinal em δ 5,28 é referente ao H-7 desde segundo triterpeno.

A confirmação da mistura se deu com os espectros de RMN de ^{13}C (Figura 87-A) e DEPT (Figura 87-B e C). Os experimentos demonstraram a presença de dois sinais em δ 75,9, referentes ao grupo metíno carbinólico na posição 3 (C-3), de dois sinais de grupo carboxila em δ 177,3 e 177,5 referente aos carbonos C-21 e de oito sinais de carbonos vinílicos em δ 119,3; 124,92; 124,94; 132,30; 132,33; 133,8; 135,8 e 146,8.

A comparação dos dados obtidos de RMN de ^{13}C com os apresentados por Usubilaga *et al.*, (2004) (Tabela 17), demonstraram que a fração PPM-2 se trata de uma mistura dos ácidos 3 α -hidroxitirucala-8,24-dieno-21-óico e 3 α -hidroxi-tirucala-7,24-dieno-21-óico (Figura 85).

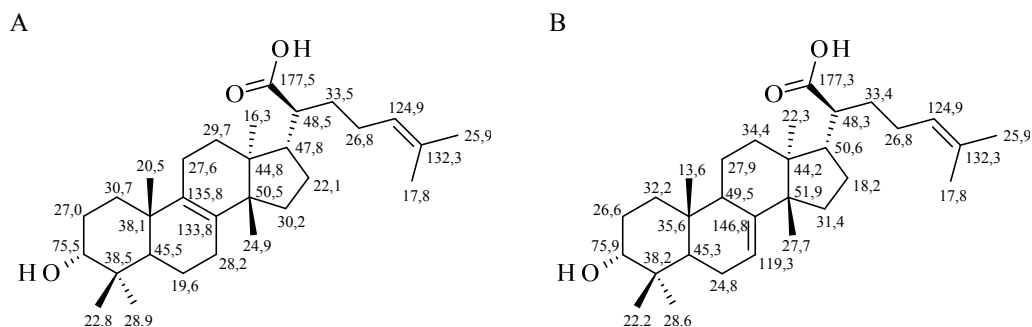


Figura 85: Estruturas com sinas de RMN de ^{13}C dos ácidos 3 α -hidroxitirucala-8,24-dieno-21-óico (A) e 3 α -hidroxitirucala-7,24-dieno-21-óico (B) obtidos de *Protium paniculatum* var. *modestum*

A relação entre as duas substâncias foi avaliada pela integração dos hidrogênios H-12 em δ 3,36 e 3,39, apresentando uma proporção de 1 para 1,96 de 3 α -hidroxitirucala-8,24-dieno-21-óico e 3 α -hidroxitirucala-7,24-dieno-21-óico, respectivamente.

Os ácidos 3 α -hidroxitirucala-8,24-dieno-21-óico e 3 α -hidroxitirucala-7,24-dieno-21-óico são comuns em algumas espécies da família Burseraceae sendo descrito para as espécies sul-americanas da família, *Protium heptaphyllum* e *P. crenatum* (MAIA *et al*, 2000; USUBILLAGA *et al*, 2004). Mas o conhecimento sobre esta substância na composição do oleorresina é descrita desde 1950, quando Buvanendrwamil *et al*. (1950) relataram sua presença na oleorresina de *Canarium schweinfurthii* podendo ser um marcador químico de algumas espécies na família, além dos alcoóis α - e β -amirina e seus derivados.

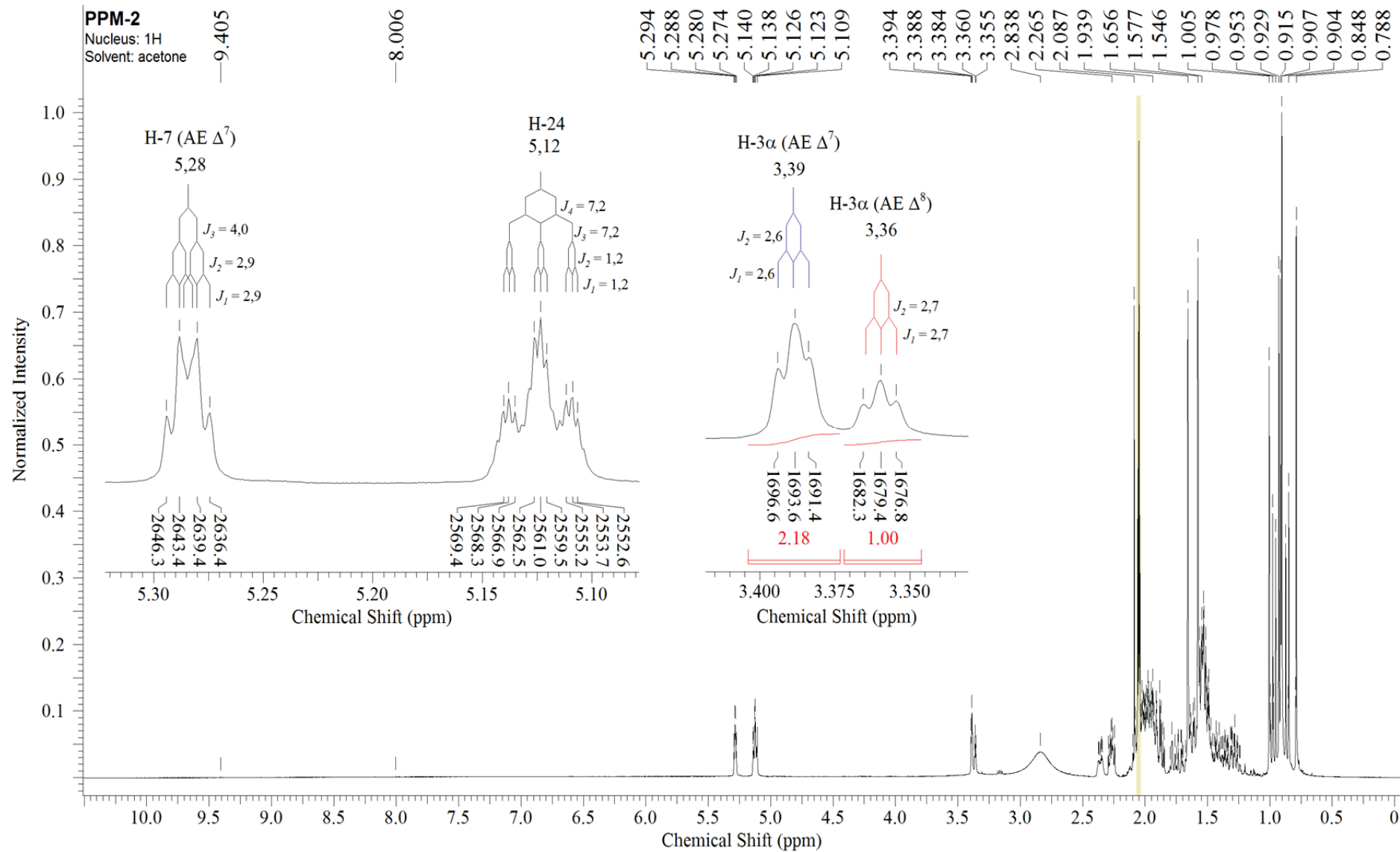


Figura 86: Espectro de RMN de ^1H da fração PPM-2 (500 MHz, Solvente/Referência: Acetona deuterada)

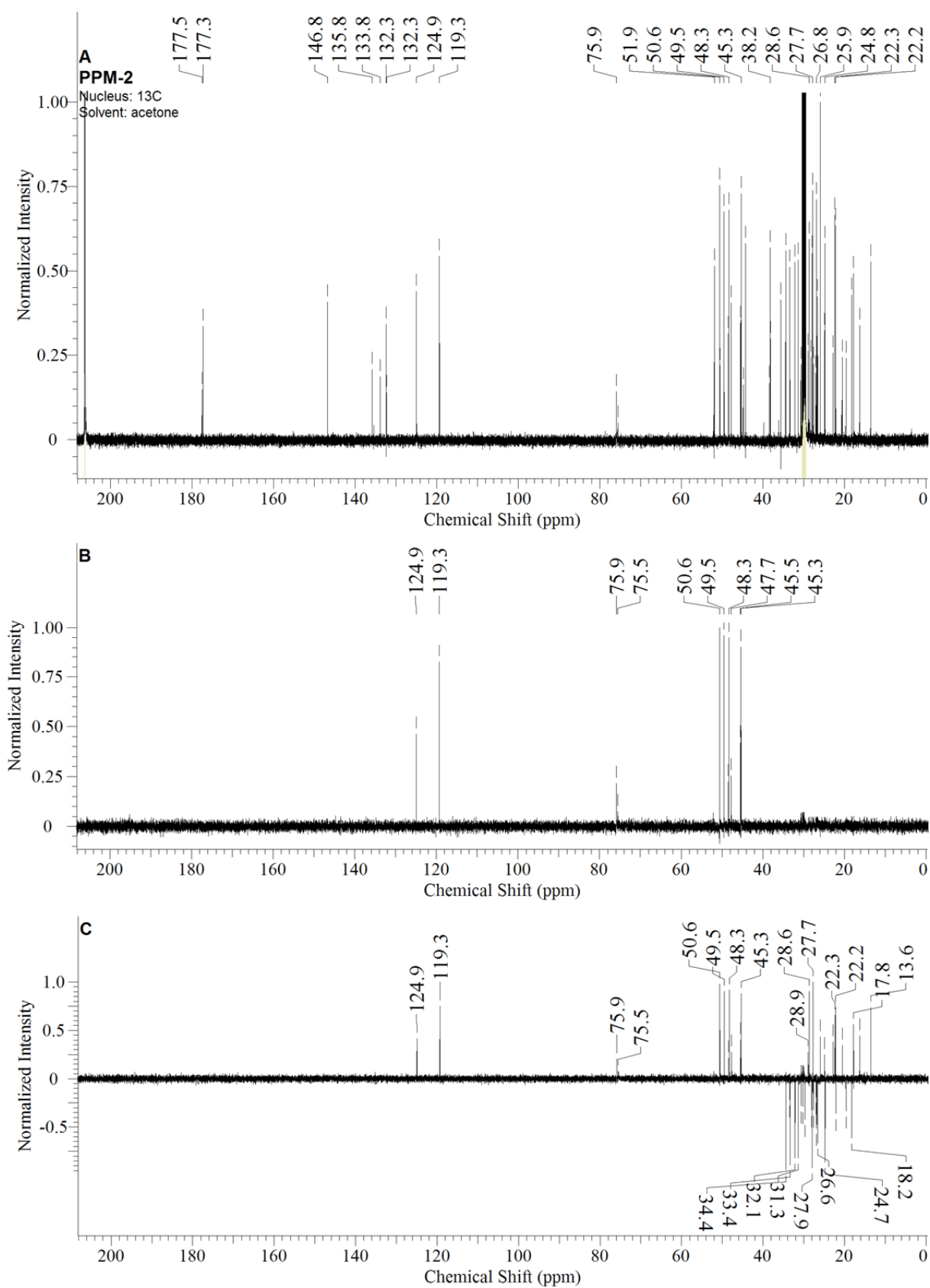


Figura 87: Espectros de RMN de ^{13}C (A), DEPT 90° (B) e DEPT 135° (C) da fração PPM-2 (125 MHz, Solvente/Referência: Acetona deuterada)

Tabela 17: Sinais observados no espectro de RMN de ^{13}C e DEPT para os ácidos 3 α -hidroxitirucala-8,24-dieno-21-óico e 3 α -hidroxitirucala-7,24-dieno-21-óico presentes na fração PPM-2

Carbono nº	ácido 3 α -hidroxitirucala-8,24- dieno-21-óico			ácido 3 α -hidroxitirucala-7,24- dieno-21-óico		
	δ (ppm) ¹	DEPT ¹	δ (ppm) Lit ²	δ (ppm) ¹	DEPT ¹	δ (ppm) Lit ²
1	30,7	CH ₂	29,7	32,2	CH ₂	31,2
2	27,0	CH ₂	26,8	26,6	CH ₂	25,3
3	75,5	CH	76,1	75,9	CH	76,5
4	38,5	C	37,2	38,2	C	37,3
5	45,5	CH	44,5	45,3	CH	44,5
6	19,6	CH ₂	20,4	24,8	CH ₂	23,9
7	28,2	CH ₂	21,3	119,3	CH	118,2
8	133,8	C	134,4	146,8	C	145,3
9	135,8	C	132,9	49,5	CH	48,2
10	38,1	C	37,7	35,6	C	34,8
11	27,6	CH ₂	26,0	27,9	CH ₂	27,0
12	29,7	CH ₂	28,7	34,4	CH ₂	33,4
13	44,8	C	43,8	44,2	C	43,3
14	50,5	C	49,6	51,9	C	51,0
15	30,2	CH ₂	29,4	31,4	CH ₂	30,2
16	22,1	CH ₂	17,7	18,2	CH ₂	17,5
17	47,8	CH	47,7	50,6	CH	49,7
18	16,3	CH ₃	15,8	22,3	CH ₃	21,8
19	20,5	CH ₃	19,6	13,6	CH ₃	12,9
20	48,5	CH	46,9	48,3	CH	47,8
21	177,5	C	182,4	177,3	C	181,8
22	33,5	CH ₂	32,7	33,4	CH ₂	32,4
23	26,78	CH ₂	25,8	26,84	CH ₂	26,0
24	124,9	CH	124,9	124,9	CH	123,7
25	132,3	C	132,3	132,3	C	132,1
26	17,8	CH ₃	17,6	17,8	CH ₃	17,6
27	25,9	CH ₃	25,6	25,9	CH ₃	25,7
28	28,9	CH ₃	26,6	28,6	CH ₃	27,7
29	22,8	CH ₃	21,1	22,2	CH ₃	21,7
30	24,9	CH ₃	24,2	27,7	CH ₃	27,3

¹ Dados obtidos; ² Dados extraídos de Usubillaga *et al.*, 2004;

4.3.5 Fracionamento do Extrato em Acetato de Etila de *Tetragastris panamensis*

Parte do extrato ArTPA (1,0085g) foi submetida à cromatografia em coluna com gel de sílica 60 (70-230 mesh) impregnada com KOH ($\varnothing_{\text{int}} = 3 \text{ cm}$, $h_{\text{sílica}} = 8,5 \text{ cm}$, $m_{\text{sílica}} = 50 \text{ g}$, aplicação da amostra: líquida – 2mL de DCM) como mostra o fluxograma (Figura 88). Foram coletadas duas frações, a primeira onde utilizou-se 650 mL de DCM e uma segunda fração onde utilizou-se 350 mL de MeOH. A fração em DCM, após concentrada deu origem a 252,8 mg da fração não ácida, denominada ArTPA η . A fração em MeOH foi concentrada e transferida para um funil de separação contendo 30 mL de DCM, sendo adicionado posteriormente 50 mL de água destilada. A solução foi agitada formando uma emulsão, sendo realizada a leitura do pH em 13.

A solução foi acidificada até pH 8 adicionando gradativamente HCl 1N, sendo necessária a adição de uma solução de NaCl saturada seguido de agitação até a quebra da emulsão. Seguiu-se com a partição em DCM (5 extrações com 30 mL de DCM) dando origem a fração no pH 8 denominada ArTPApH8 (587,9 mg). Após a extração, acidificou-se a solução até o pH 4,02, sendo extraído novamente com DCM (5 extrações com 30 mL de DCM), dando origem a fração obtida no pH 4, denominada ArTPApH4 (152,8 mg).

Após avaliação por CCD da fração ArTPApH8, observou-se a presença de manchas de coloração rosa nos R_f 's 0,37 e 0,48 quando revelada em sulfato cérico IV (Figura 89-A) e manchas com coloração amarela nos R_f 's 0,48 e 0,54 quando revelada com vanilina sulfúrica (Figura 89-B).

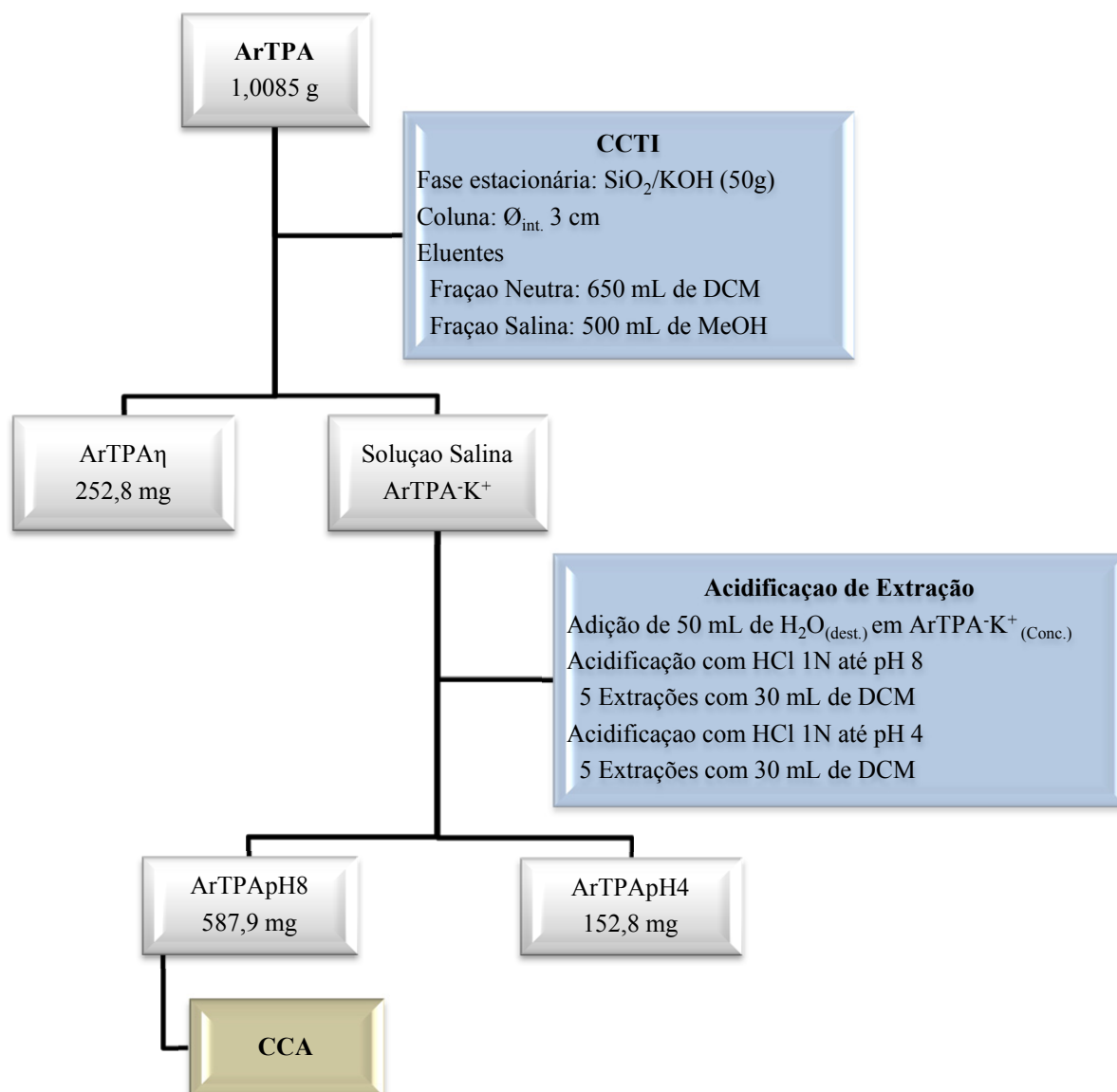


Figura 88: Fluxograma de filtração da amostra em acetato de etila ArTPA

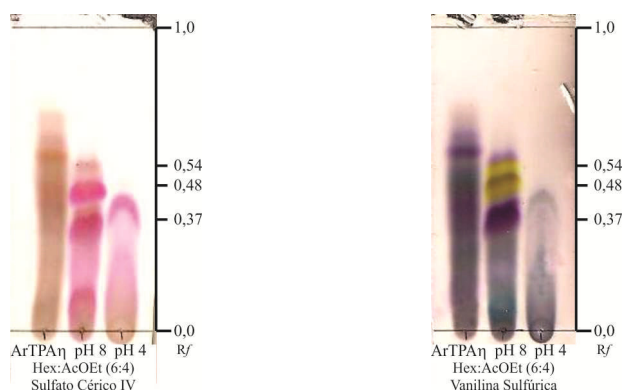


Figura 89: Perfil cromatográfico em CCD do fracionamento de ArTPA revelados em SC- IV e VS

Para o isolamento destas manchas foi realizado um fracionamento de ArTPApH8 (587,9 mg) por cromatografia em coluna com gel de sílica G60 (70-230 mesh) ($\varnothing_{\text{int}} = 2$ cm, $h_{\text{sílica}} = 17,1$ cm, $m_{\text{sílica}} = 25$ g). Foram recolhidas 1 fração de 150 mL com o eluente hexano e clorofórmio (1:1), 36 frações de 50 mL com o eluente hexano e clorofórmio (1:1) e gradiente com acetato de etila (150 mL de eluente nas concentrações de 2,4%, 4,8%, 9,6%, 14,4%, 19,2%, 24%, 30%, 50%, 60%, 70%, 80% e 90%, sendo coletadas 3 frações por eluente), e uma fração de 150 mL de MeOH para a limpeza do material retido na coluna, como mostra o fluxograma (Figura 90).

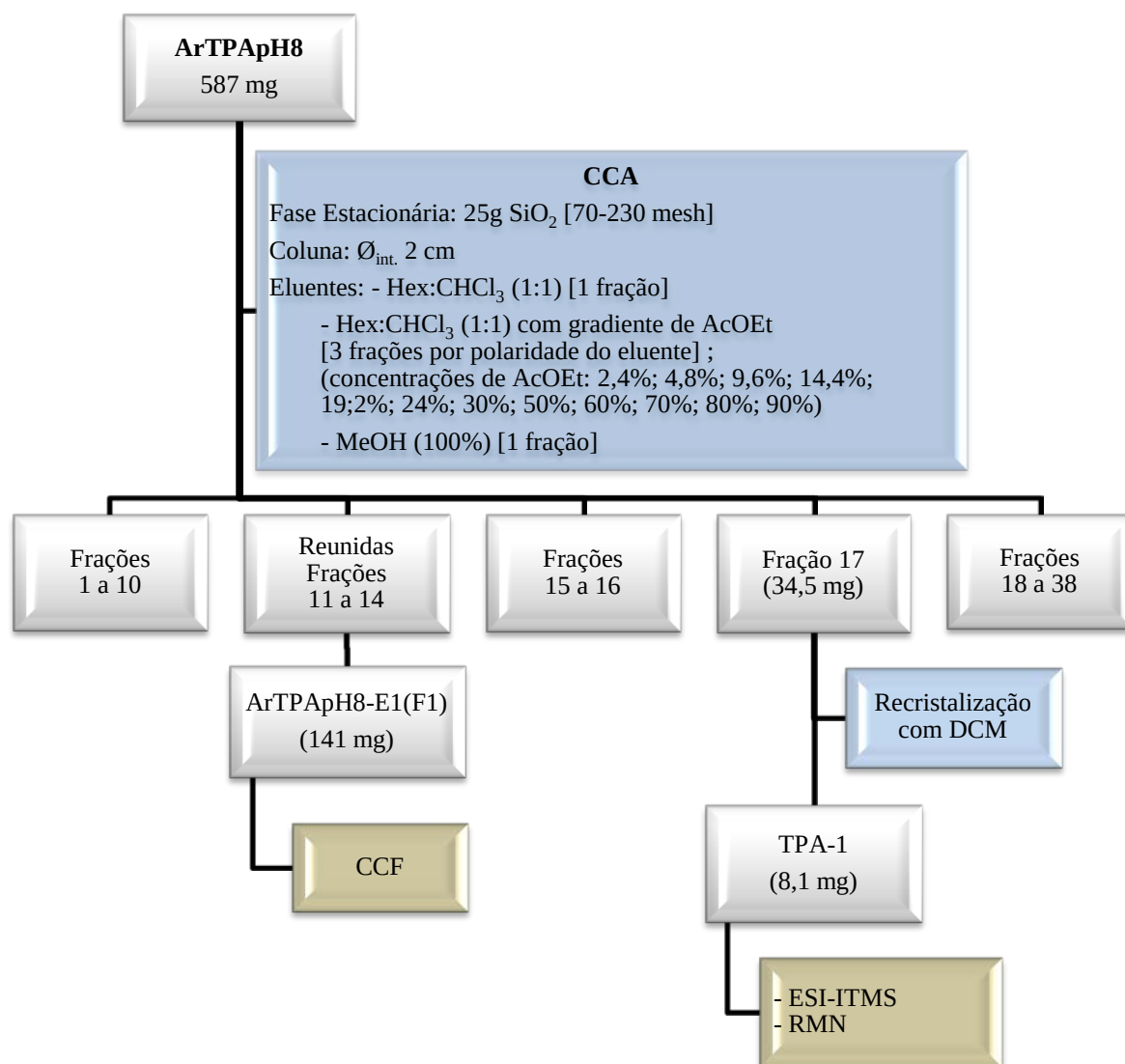


Figura 90: Fluxograma de filtração da amostra em acetato de etila ArTPApH8

Após avaliação da filtração de ArTPApH8 por CCD (Figura 91-A), foram reunidas as frações de 11 a 14, denominada ArTPApH8_{E1(F1)} (141 mg), sendo submetida a novo processo cromatográfico. A fração 17, na avaliação por CCD apresentou três manchas nos R_fs 0,32, 0,42 e 0,50 (Figura 91-B), devido a presença de sólidos com características cristalinas a fração foi recristalizada com 1 mL de DCM por 3 vezes, obtendo um sólido de em formato agulha com R_f 0,32 em avaliação em CCD (Figura 91-C) denominada TPA-1 (8,1 mg). A amostra TPA-1 foi submetida a análises de espectrometria de massas (ESI-ITMS) e ressonância magnética nuclear (RMN de ¹H, ¹³C, DEPT, COSY, HSQC e HMBC) visando suas identificações.

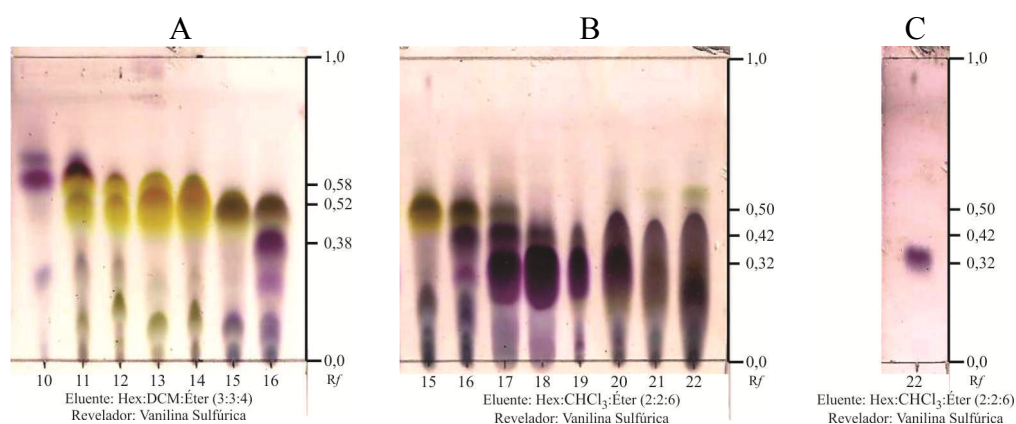


Figura 91: Perfil por CCD das frações de ArTPApH8

A fração ArTPApH8_{E1(F1)} (141 mg) foi submetida à cromatografia em coluna “flash” ($\varnothing_{\text{int}} = 2$ cm, $h = 16$ cm, $m_{\text{silica}} = 25$ g). Como eluente foi utilizado 230 mL de uma mistura de hexano, diclorometano e éter etílico (1:1:3) em sistema de eluição isocrática, como mostra fluxograma (Figura 92). A coleta se deu após o recolhimento de 30 mL do volume morto, sendo coletadas 19 frações de 10 mL. Para a limpeza do material retido na coluna foi coletada uma única fração de 100 mL em metanol.

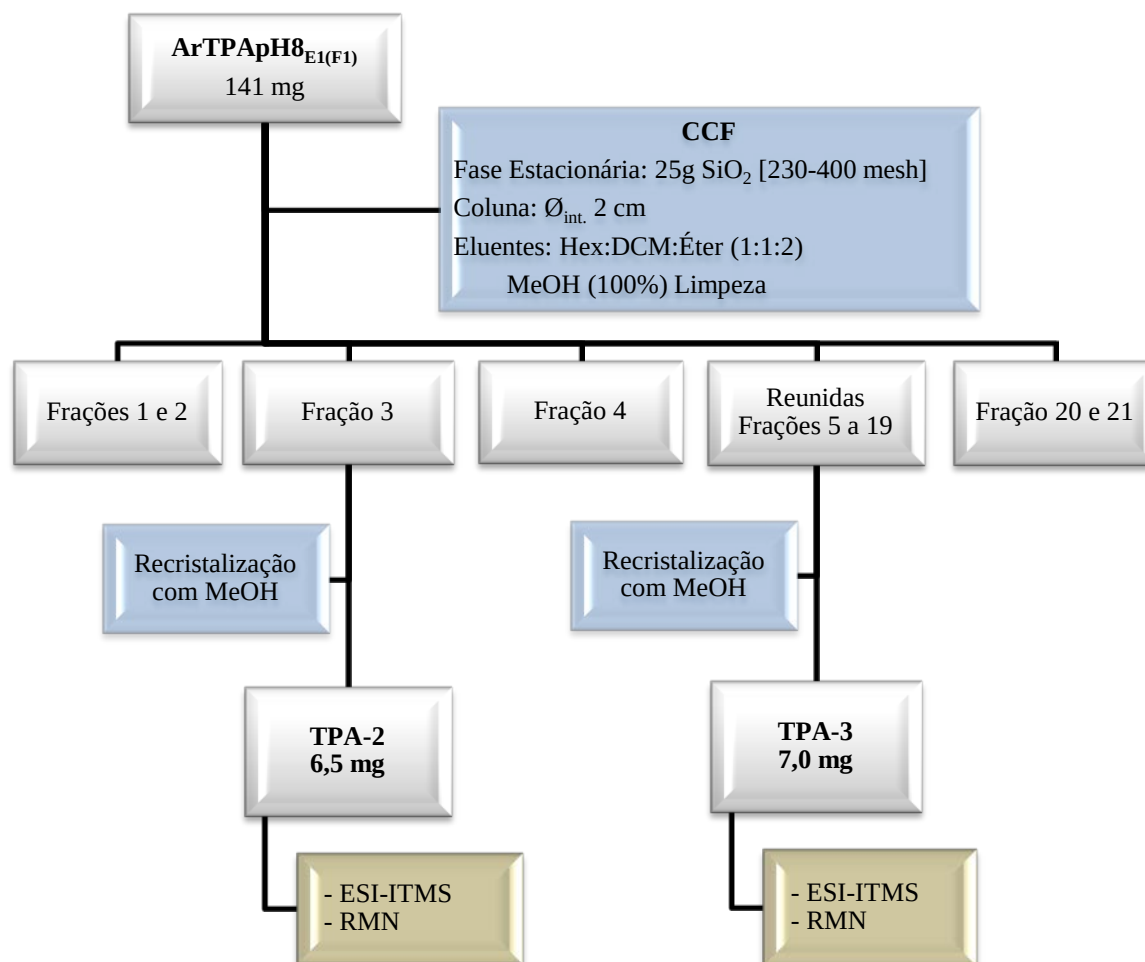


Figura 92: Fluxograma de filtração da amostra em acetato de etila ArTPApH8E1(F1)

Após avaliação por CCD (Figura 93), a Fração 3 foi recristalizada em metanol obtendo 6,5 mg de uma amostra denominada TPA-2, e a fração derivada da reunião das frações 9 a 19 foi recristalizada em metanol, obtendo 7,0 mg de uma amostra denominada TPA-3. As amostras TPA-2 e TPA-3 foram submetidas a análises de espectrometria de massas (ESI-ITMS) e ressonância magnética nuclear (RMN de ^1H , ^{13}C , DEPT, COSY, HSQC e HMBC).

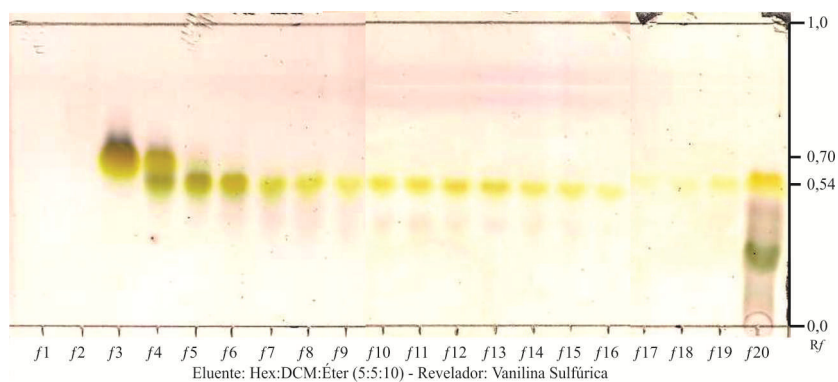


Figura 93: Perfil por CCD das frações de ArTPA α 8 obtidos por CCF

4.3.5.1 Identificação de TPA-1

A fração identificada como TPA-1, isolada de *Tetragastris panamensis*, apresentou coloração roxa quando revelada com vanilina sulfúrica e coloração marron quando revelada com sulfato cérico IV, apresentando R_f em 0,35 quando eluída com uma mistura de hexano, clorofórmio e éter (2:2:6).

O espectro de massas obtido por injeção direta no modo negativo forneceu um íon *Quasi* molecular 455,44 m/z [M-H] (Figura 94), referente ao íon molecular 456 m/z , sugerindo a massa molecular de triterpenos contendo três oxigênios (C₃₀H₄₈O₃).

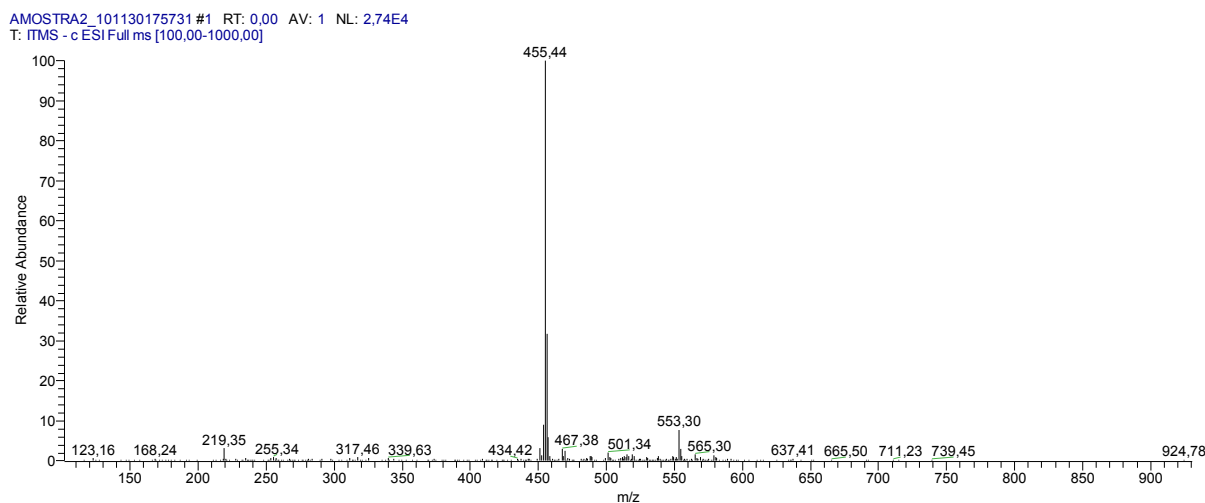


Figura 94: Varredura completa por EMCI-ESI (m/z 100 a 1000) da fração TPA-1 no modo negativo por injeção direta

Os dados de RMN de ^1H para TPA-1 (Figura 95) apresentou 7 simpletos com integração para 3 hidrogênios em δ 0,77; 0,85; 0,95; 1,00; 1,01; 1,03 e 1,18. A presença de outros três simpletos em δ 2,02; 2,04 e 2,16 foi observada. A presença de um simpleto largo em δ 4,58 pode ser um atribuído ao hidrogênio da hidroxila, a grande intensidade do pico deve se deve a absorção de umidade por efeito do solvente utilizado, metanol deuterado.

Foi observado ainda um duplo duplete na região de carbonos carbinólicos em δ 3,18 ($J=10,4$, 5,5 Hz, 1H), indicativo de H-3 na posição axial (hidroxila na posição equatorial). A presença de hidrogênio olefinico foi observado com o multiplete em δ 5,47.

A análise dos espectros de RMN de ^{13}C (Figura 96-A) apresentou apenas 29 sinais de deslocamento químico (δ), o que relacionado com a massa obtida por EMCI-ESI, leva à dedução que um sinal de RMN de ^{13}C não foi detectado na fração TPA-1.

Os resultados dos espectros DEPT 90° (Figura 96-B) e DEPT 135° (Figura 96-C) indicaram que a estrutura apresenta 7 metilas, 10 carbonos metilênicos e 5 metínicos, sendo que o carbono metínico em δ 122,67 apresenta hibridização sp^2 . Comparando os espectros de RMN de ^{13}C e DEPT 135°, observou-se que 7 sinais registrados no RMN de ^{13}C não estão presentes no espectro de DEPT 135°, concluindo-se que estes são referentes a carbonos tetra-substituídos.

Um sinal referente ao carbono carbinólico C-3 foi observado em δ 80,0 e a presença de dois sinais de carbonos olefínicos foi observado em δ 118,7 e 146,6, caracterizando uma insaturação na estrutura.

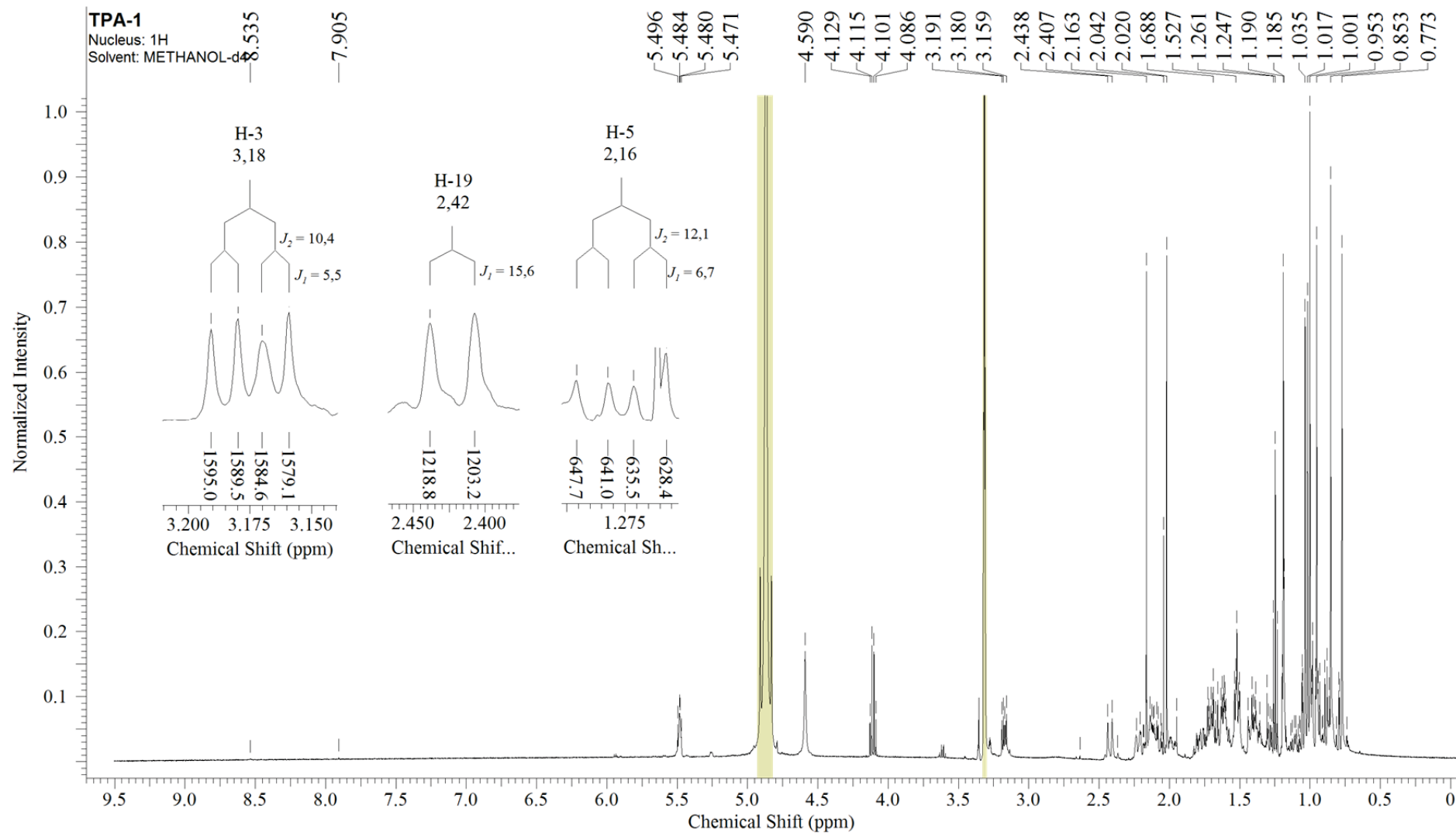


Figura 95: Espectro de RMN de ^1H da fração TPA-1 (500 MHz, Solvente/Referência: CD_3OD)

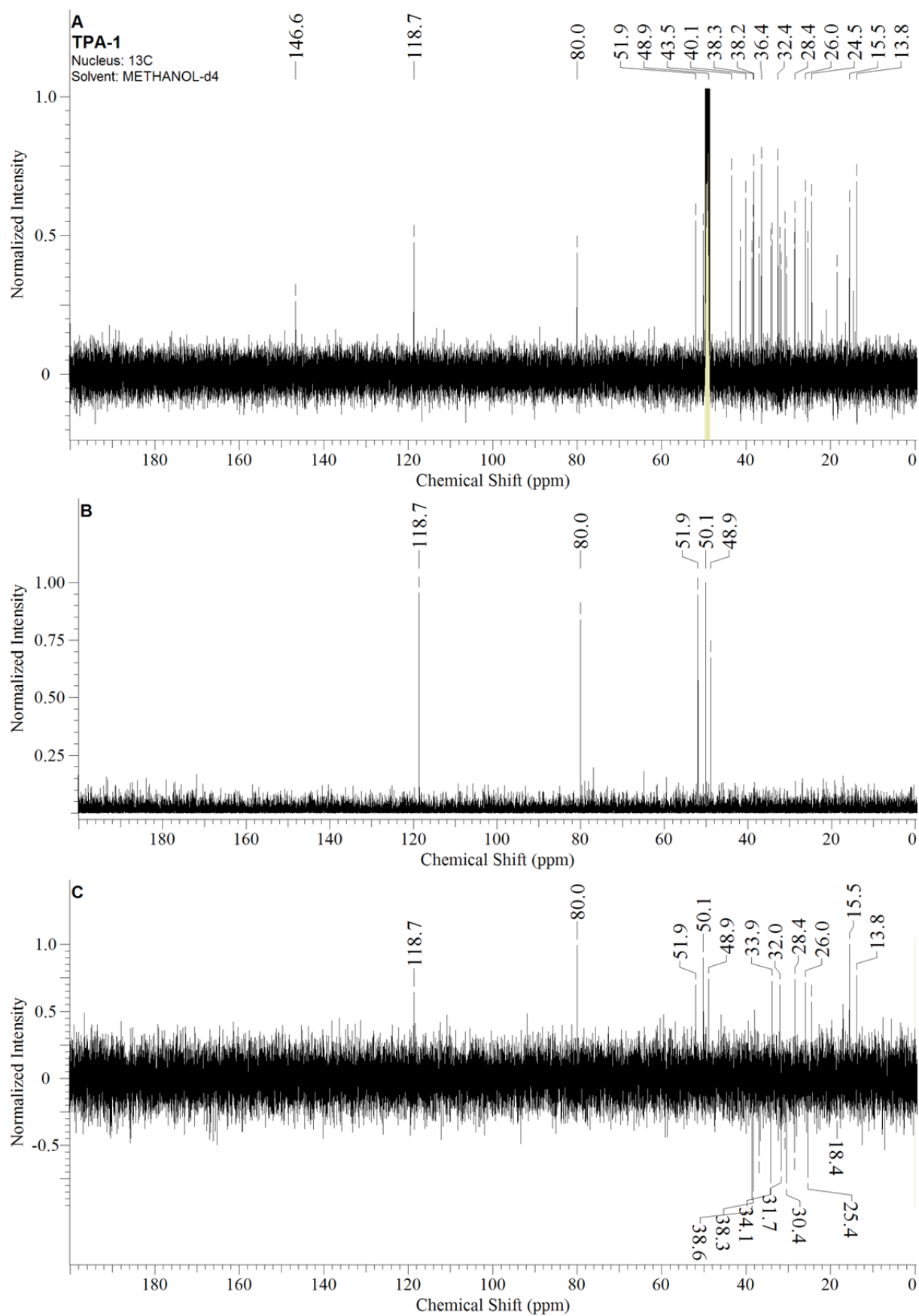


Figura 96: Espectro de RMN de ^{13}C (A), DEPT 90° (B) e DEPT 135° (C) da fração TPA-1 (125 MHz, Solvente/Referência: CD_3OD)

Através do espectro de correlação heteronuclear (^1H - ^{13}C)-HSQC (Figura 98) foi possível atribuir alguns sinais dos hidrogênios e seus respectivos carbonos (Tabela 18). A estrutura do triterpeno foi elucidada pelas correlações heteronuclear (^1H - ^{13}C)-HMBC (Figura 99) e homonuclear (^1H - ^1H)-COSY (Figura 100), sendo os dados comparados com a literatura.

No mapa de correlação (^1H - ^{13}C)-HMBC foi possível observar o sinal do trigésimo carbono, que não tinha sido detectado no RMN de ^{13}C , sendo este observado na região de carboxilas (δ 183,2). Através da análise das correlações em que este sinal da carboxila foi detectado foi possível atribuir os sinais que pertencem ao anel E do triterpeno. O experimento mostrou que o hidrogênio metílico em δ 1,18 (H-30), se correlaciona com os carbonos em δ 30,8 (C-21); 31,7 (C-19); 41,4 (C-20) e 183,2 (C-29) e que o carbono metílico em δ 1,04 (H-28) se correlaciona com os carbonos em δ 33,9 (C-30); 32,4 (C-17); 38,3 (C-16) e 48,8 ppm (C-18). A correlação dos hidrogênios metilênicos em δ 1,7 (H_β -19) e 2,42 (H_α -19) com os carbonos do anel E pode ser observada pelos sinais em δ 30,8 (C-21); 32,4 (C-17); 33,9 (C-30); 41,4 (C-20); 48,8 (C-18) e 183,2 (C-29).

As correlações por (^1H - ^{13}C)-HMBC mostrou que o hidrogênio metílico em δ 0,85 (H-24) se correlaciona com os carbonos em δ 28,4 (C-23), 40,1 (C-4), 51,9 (C-5) e 80,0 (C-3) e que o hidrogênio metílico em δ 0,95 (H-23) se correlaciona com os carbonos com δ 15,6 (C-24), 40,1 (C-4), 51,9 (C-5) e 80,0 (C-3). O hidrogênio metílico em δ 0,77 (H-25) se correlaciona com os carbonos em δ 36,4 (C-10), 38,6 (C-1), 50,1 (C-9) e 51,9 (C-5). Através das correlações do hidrogênio metínico H-5 (δ 1,28), foi possível correlacionar os carbonos em δ 13,77 (C-25), 15,6 (C-24), 25,4 (C-6), 36,4 (C-10), 40,1 (C-4) e 50,1 (C-9). Através destes mapas de contornos foi possível determinar algumas correlações referentes aos anéis A e B.

As posições das metilas C-26 e C-27 foram determinadas pelas correlações do sinal em δ 1,00 (H-26) com os carbonos em δ 30,4 (C-15), 43,4 (C-14); 146,6 (C-8) e do sinal em δ 1,01 (H-27) com os carbonos em δ 32,4 (C-17), 37,0 (C-22); 38,3 (C-19) e 48,8 (C-18), sugerindo que ambas encontram-se ligadas a carbonos entre os anéis C e D do triterpeno.

A posição do carbono C-2 (δ 28,6) foi determinada pelo mapa de correlação homonuclear (^1H - ^1H)-COSY que demonstrou correlação entre o H-3 (δ 3,18) com o multiplete em δ 1,61. Já o carbono vinílico em δ 118,7 (C-7) apresentou correlação com o multiplete em δ 2,13, tal como o inverso também foi observado.

Os dados de RMN 1D e 2D levaram a determinação de TPA-1 sendo o ácido 3 β -hidroximultiflora-7-eno-29-óico (ácido triptocálico B, Figura 97), este ácido foi apresentado pela primeira vez por Nakano *et al.*, 1997. As demais correlações observadas pelo experimento (^1H - ^1H)-COSY (^1H - ^{13}C)-HMBC estão apresentadas na Figura 47-B.

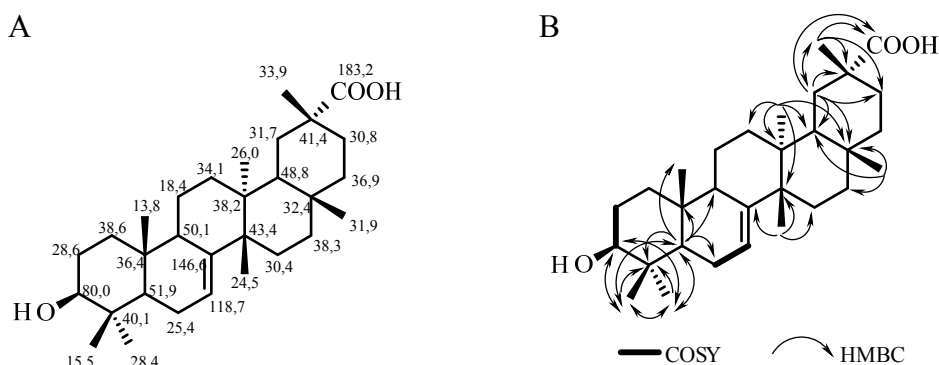


Figura 97: Estrutura do ácido triptocálico B isolado de *Tetragastris panamensis* com sinais de RMN de ^{13}C (A) e correlações do experimento (^1H - ^1H)-COSY e (^1H - ^{13}C)-HMBC (B)

A comparação dos sinais do RMN de ^1H referentes às metilas, ao carbono carbinólico e ao carbono olefínico apresentaram os mesmos sinais, contudo quando os dados

de RMN de ^{13}C foram comparados, observou-se que 8 sinais não estavam de acordo com a literatura (NAKANO *et al.*, 1997).

Com a análise das correlações homonuclear e heteronuclear desta substância foi possível corrigir as atribuições dos sinais de RMN de ^{13}C . Segundo Nakano *et al.* (1997) os sinais em δ 25,2 e 24,5 são referentes aos carbonos C-6 e C-26, respectivamente, contudo os mapas de correlações sugeriram que o sinal em δ 24,5 é referente ao C-6 em que o sinal em δ 25,4 é referente ao C-26. Os carbonos C-2 e C-27, com sinais descritos em δ 27,6 e 27,8, respectivamente, tiveram seus sinais observados em δ 28,6 e 26,0, respectivamente. Os carbonos C-15 e C-21, descritos em δ 30,9 e 29,5, respectivamente, tiveram seus sinais observados em δ 30,4 e 20,8, respectivamente. Concluindo, os sinais de C-12 e C-30, descritos em δ 33,5 e 33,3, respectivamente, tiveram seus sinais observados em δ 34,1 e 33,9, respectivamente.

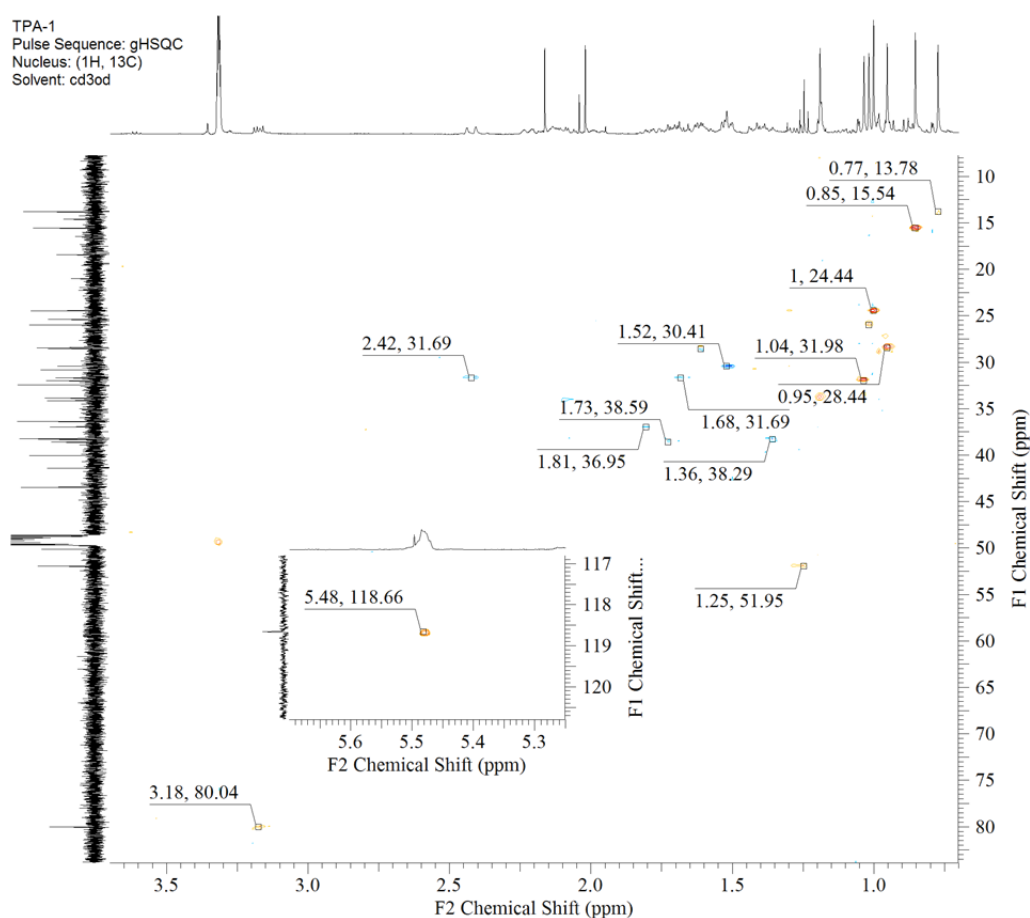


Tabela 18: Sinais observados nos experimentos de RMN 1D e 2D para os cristais da fração TPA-1

C n°	δ_C (ppm)	DEPT	HSQC δ_H [m, J, J]	COSY δ_H (ppm)	HMBC δ_C (ppm)	δ_C^a (ppm)
1	38,6	CH ₂	1,73	-	-	37,6
2	28,6	CH ₂	1,61	-	-	27,6
3	80,0	CH	3,18 [dd, J=5,5; 10,4 Hz]	1,61 [m]	15,5; 28,4	79,3
4	40,1	-	-	-	-	39,2
5	51,9	CH	1,28 [dd, J=6,7; 12,1 Hz]	-	15,5; 25,4; 36,4; 40,0; 50,1; 13,8	50,7
6	25,4	CH ₂	2,13 [m]	2,13 [m]	-	24,5
7	118,7	CH	5,47	5,47	-	117,6
8	146,6	-	-	-	-	145,7
9	50,1	CH	2,11	-	-	48,3
10	36,4	-	-	-	-	35,5
11	18,4	-	1,60 [m]	-	-	17,5
12	34,1	CH ₂	2,08	-	-	33,3
13	38,2	-	-	-	-	37,3
14	43,4	-	-	-	-	42,5
15	30,4	CH ₂	1,52	-	24,4; 32,4; 38,2; 43,4	30,9
16	38,3	CH ₂	1,36	-	-	37,3
17	32,4	-	-	-	-	31,6
18	48,8	CH	-	-	-	45,8
19	31,7	CH ₂	1,7 2,42 [d, J=15,6 Hz]	- -	33,8; 41,4; 183,2 30,8; 32,4; 41,4; 48,8; 183,2	29,5
20	41,4	-	-	-	-	40,6
21	30,8	CH ₂	-	-	-	30,9
22	37,0	CH ₂	1,81	-	-	36
23	28,4	CH ₃	0,95[s]	-	15,5; 40,0; 51,9; 80,0	27,8
24	15,6	CH ₃	0,85 [s]	-	28,4; 40,0; 51,9; 80,0	15
25	13,8	CH ₃	0,77 [s]	-	36,4; 38,6; 50,1; 51,9	13,4
26	24,5	CH ₃	1,00 [s]	-	30,4; 43,4; 146,6	25,2
27	26,0	CH ₃	1,01 [s]	-	48,8; 36,9; 38,2; 32,4; 43,4	27,8
28	32,0	CH ₃	1,04 [s]	-	33,8; 32,4; 38,3; 48,8	31,5
29	183,2 ^b	-	-	-	-	182,8
30	33,9	CH ₃	1,18 [s]	-	30,8; 31,7; 41,4; 183,2	33,5

^a – δ de RMN de ¹³C obtido na literatura (Nakano *et al.*, 1997). ^b – sinal observado apenas no mapa de correlação heteronuclear (¹H-¹³C)-HMBC

TPA-1
Pulse Sequence: gHMBC
Nucleus: (1H, 13C)
Solvent: cd3od

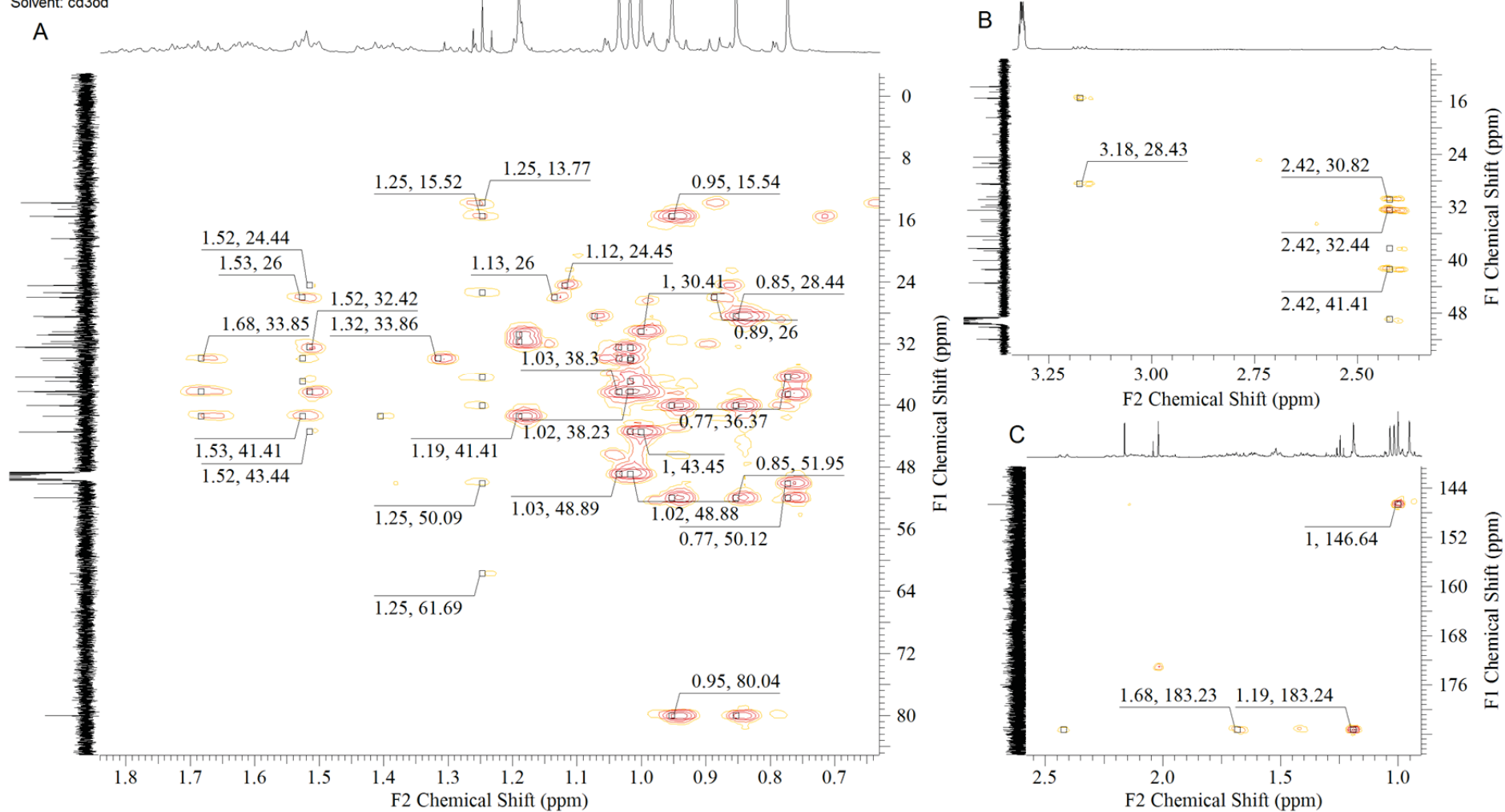


Figura 99: Espectro de correlação heteronuclear (^1H - ^{13}C)-HMBC da fração TPA-1. Ampliação das correlações entre δ_{H} 0,6-1,8 e δ_{C} 0,0-83,0 (A). Ampliação das correlações entre δ_{H} 2,3-3,2 e δ_{C} 10,0-53,0 (B). Ampliação das correlações entre δ_{H} 0,9-2,5 e δ_{C} 144,0-185,0 (C) (Solvente: CD_3OD)

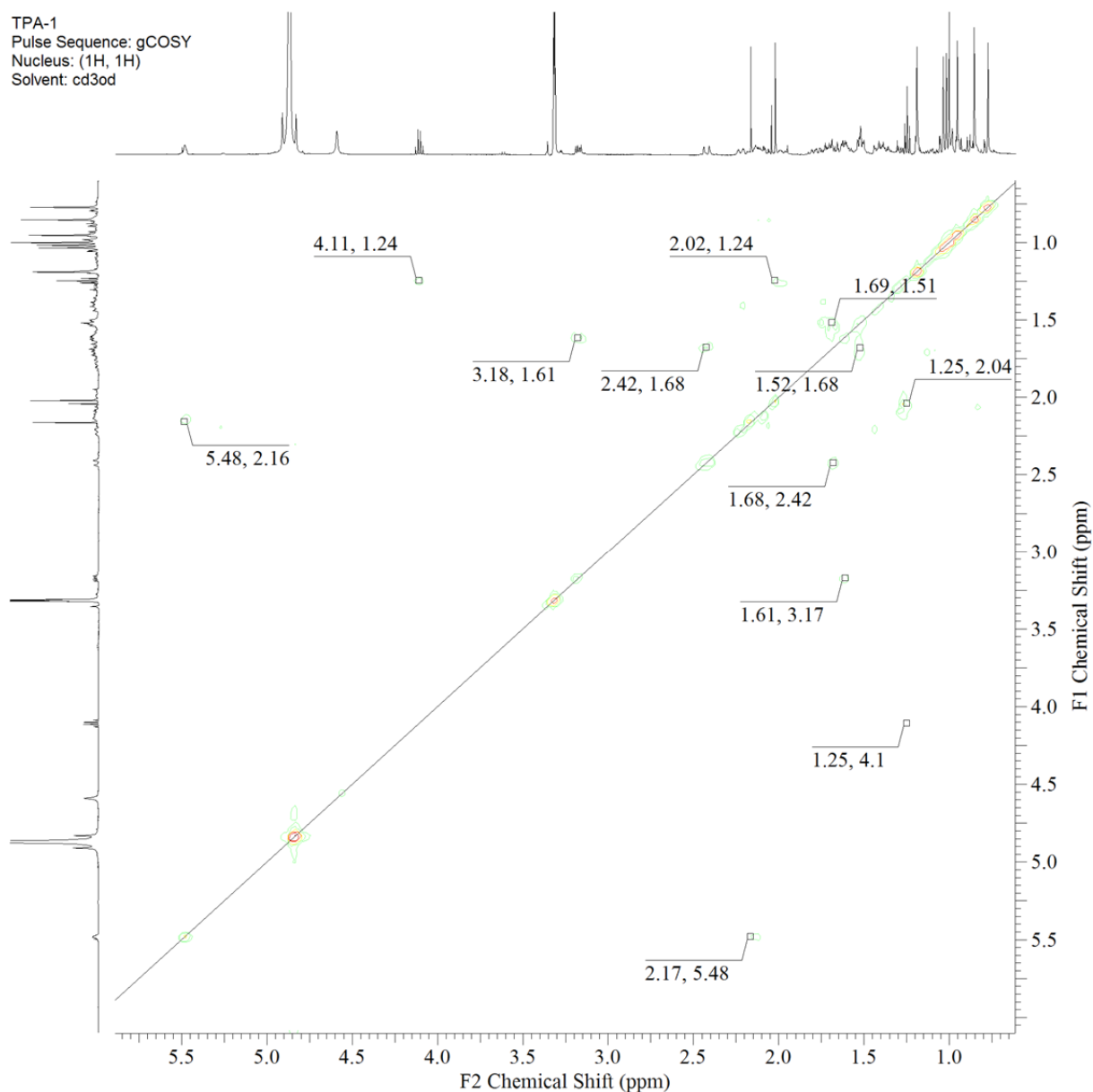


Figura 100: Espectro de correlação homonuclear (^1H - ^1H)-COSY da fração TPA-1(Solvente: CD_3OD)

4.3.5.2 Identificação de TPA-2

O espectro de massas da fração TPA-3, obtido por injeção direta no modo negativo forneceu um íon *quasi*-molecular 453,46 m/z $[\text{M}-\text{H}]^-$ (Figura 101), referente a massa molecular 454, sugerindo que esta fração também se trata de um de triterpenos contendo três oxigênios ($\text{C}_{30}\text{H}_{46}\text{O}_3$).

QB-1336_120131111657 #1 RT: 0,00 AV: 1 NL: 1,57E4
T: ITMS - c ESI Full ms [125,00-700,00]

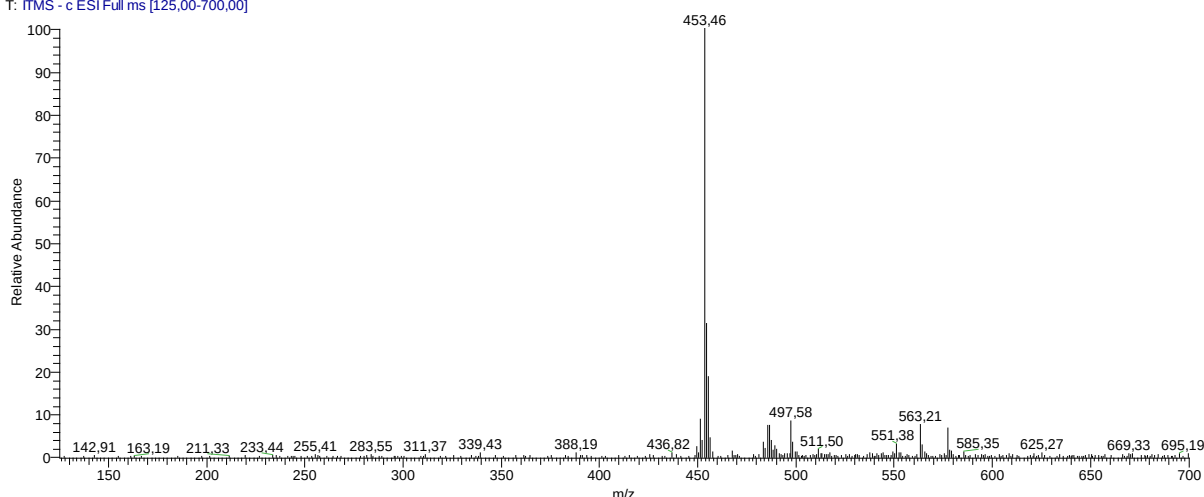


Figura 101: Varredura completa por EMCI-ESI (m/z 125 a 700) da fração TPA-2 no modo negativo por injeção direta.

Os dados obtidos por RMN de ^1H da fração TPA-2 (Figura 102) mostrou a presença seis sinais de simpletos em δ 1,019 (3H); 1,021 (3H); 1,039 (6H); 1,043 (3H); 1,12 (3H) e 1,19 (3H). Um duplete e um triplete duplo com integração para dois hidrogênios foram observados em δ 2,42 (d, $J=15,7$ Hz, 2H) e 2,83 ($J=14,6$; 5,5 Hz, 2H), sugerindo a presença de hidrogênios metilênicos. Um duplo duplo duplete na região de hidrogênios olefínicos foi observado em δ 5,54 [ddd, $J=3,2(\times 3)$ Hz, 1H].

No espectro de RMN de ^{13}C (Figura 103-A) foram detectados 29 sinais de deslocamento químico (δ), o que indica a presença de um único triterpeno na fração. A análise por RMN de ^{13}C mostrou um sinal em δ 219,5, característico de carbono carbonílico, um sinal em δ 183,1, o que indicou a presença de carboxila. Pode ser observado ainda sinais em δ 118,6 e 146,8, o que mostrou a presença de carbonos vinílicos.

A análise dos espectros DEPT 90° (Figura 103-B) e DEPT 135° (Figura 103-C) indicaram que a estrutura apresenta sete carbonos metílicos, dez carbonos metilênicos e quatro metínicos, sendo que um dos carbonos metínicos se trata de um carbono vinílico (δ 118,6).

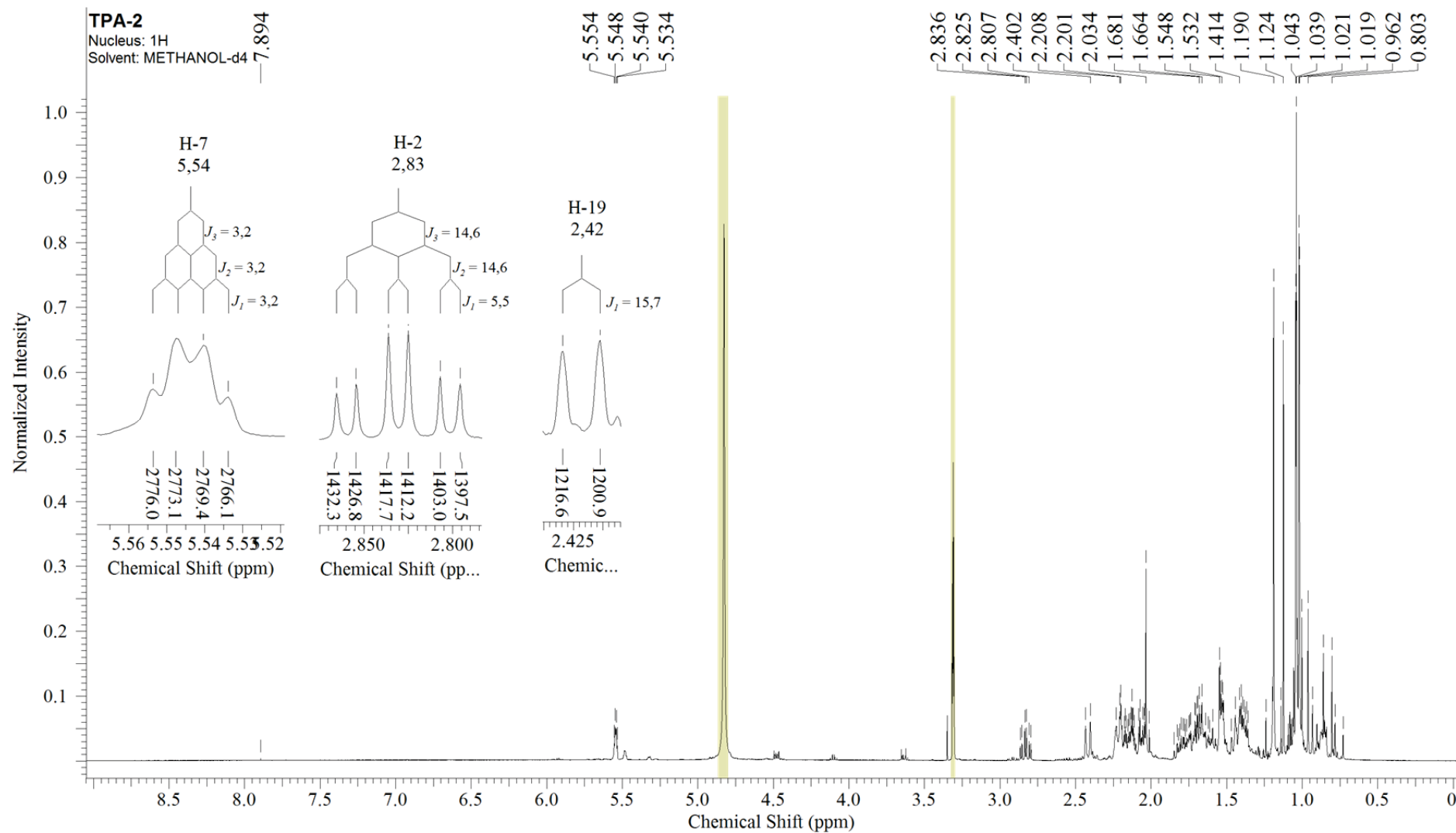


Figura 102: Espectro de RMN de ^1H da fração TPA-2 (500 MHz, Solvente/Referência: CD_3OD)

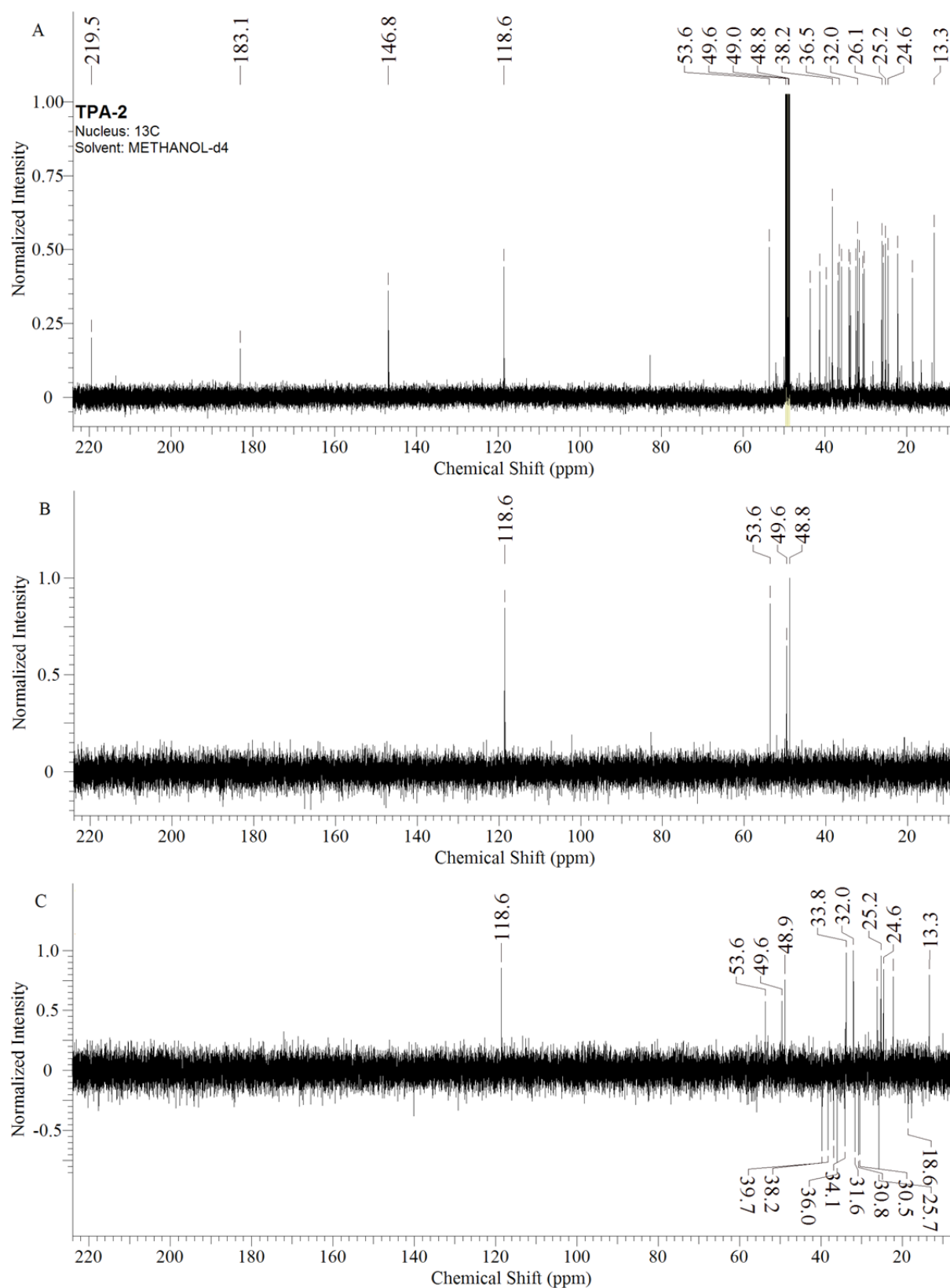


Figura 103: Espectro de RMN de ^{13}C (A), DEPT 90° (B) e DEPT 135° (C) da fração TPA-2 (125 MHz, Solvente/Referência: CD_3OD)

Através do espectro de correlação heteronuclear (^1H - ^{13}C)-HSQC (Figura 106) foi possível atribuir alguns sinais de δ dos hidrogênios para os seus respectivos carbonos, apresentados na Tabela 19. A estrutura do triterpeno foi elucidada pelas correlações heteronuclear (^1H - ^{13}C)-HMBC (Figura 107) e homonuclear (^1H - ^1H)-COSY (Figura 108).

O experimento (^1H - ^{13}C)-HMBC mostrou que os hidrogênios metílicos em δ 1,02 (H-23) e 1,12 (H-24), se correlacionam com os carbonos em δ 219,5 (C-3); 49,0 (C-4) e 53,6 (C-5) e sendo que o H-23 se correlaciona com o carbono em δ 22,2 (C-24) e que o H-24 se correlaciona com o carbono em δ 25,2 (C-23). O hidrogênio metínico C-5 se correlacionou com o carbono metilênico em δ 25,7 (C-6) e com os carbonos metílicos C-24 e C-25 (δ 22,2 e 13,3, respectivamente). O hidrogênio metílico em δ 1,04 (H-25) se correlaciona com o carbonos em δ 39,7 (C-1); 49,6 (C-9) e 36,5 (C-10). O hidrogênio metilênico H-2 (δ 2,83) se correlaciona com os carbonos C-1 e C-3.

O experimento (^1H - ^1H)-COSY mostrou ainda a correlação entre o H-2 (δ 2,83) com o H-1 e que o H-7 (δ 5,54) se correlaciona com o H-6 (δ 2,13). Através destas correlações foi possível sugerir parte do anel A e B da estrutura.

O sinal do hidrogênio metílico H-30 (δ 1,19) se correlaciona com os carbonos em δ 31,6 (C-19); 41,3 (C-20) e 30,8 (C-21) e com o carbono carboxílico em δ 46,8 (C-29) através do experimento (^1H - ^{13}C)-HMBC. Neste mesmo experimento pode-se observar que o hidrogênio metílico H-28 se correlaciona com os carbonos em δ 38,2 (C-16); 32,4 (C-17) e 34,1 (C-22).

Através das correlações (^1H - ^{13}C)-HMBC pôde-se observar que no sinal em δ 38,4 atribuído ao carbono C-16 (CH_2) ocorre a presença de um segundo sinal, este atribuído ao carbono tetra-substituído (C-13). Na correlação do hidrogênio metílico H-27 (δ 1,02) observou-se a correlação com este carbono em δ 38,4 (C-13), além das correlações com os

carbonos em δ 36,9 (C-12); 43,6 (C-14) e 48,9 (C-18). A relação entre estas metilas C-30, C-28 e C-27 foi observada pelos hidrogênios H-18 e H-19.

O hidrogênio metílico H-26 (δ 1,19) mostrou correlação com os carbonos em δ 146,8 (C-8); 43,6 (C-14) e 30,5 (C-15). Por intermédio destas correlações foi possível sugerir parte do anel C, D e E, e a relação entre o anel C e B (pelo carbono olefínico).

Após a avaliação dos dados de RMN 1D e 2D foi sugerida a estrutura de um triterpeno inédito (Figura 104), denominado ácido 3-oxo-multiflora-7-eno-29-óico (ácido 3-oxo-triptocálico B). Os sinais de RMN de ^{13}C estão apresentados na Figura 104-A e na Tabela 19. As demais correlações observadas pelo experimento (^1H - ^{13}C)-HMBC estão apresentadas na Figura 104-B.

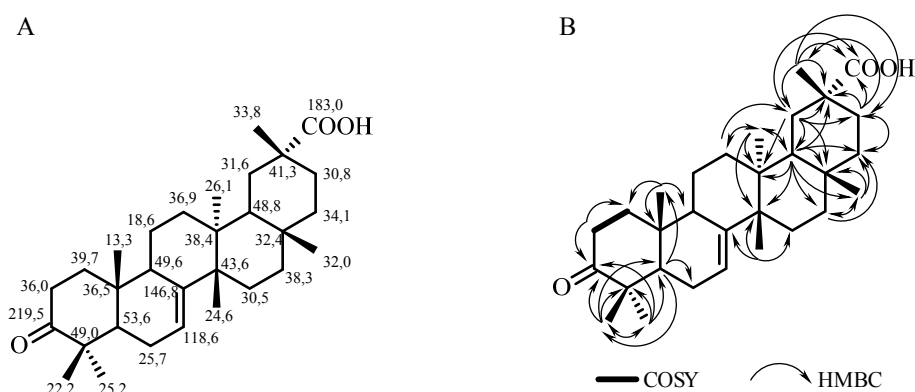


Figura 104: Estrutura do ácido 3-oxo-triptocálico B isolado de *Tetragastris panamensis* com sinais de RMN de ^{13}C (A) e correlações do experimento (^1H - ^1H)-COSY e (^1H - ^{13}C)-HMBC (B)

Para confirmar a estrutura, foi realizada a comparação dos sinais de RMN de ^{13}C de TPA-2 com os sinais do ácido triptocálico B. A avaliação demonstrou valores dos sinais de deslocamento químico próximo entre os carbonos na mesma posição, com exceção dos carbonos do anel A, que sofrem efeito de desblindagem pela carbonila em C-3 (Figura 105). Em C-3 observou-se um aumento 139 ppm (efeito α) no ácido 3-oxo-triptocálico B. Nos carbonos β (C-2 e C-4), observou-se um aumento de cerca de 7 e 9 ppm no ácido 3-oxo-

triptocálico B. O efeito γ foi observado diferentemente entre os carbonos metílicos (C-24 e C-25) e os carbonos metilênico (C-1) e metínico (C-5). Nos carbonos C-1 e C-5, observou-se um aumento de cerca de 1 ppm, contudo para C-24 observou-se um aumento de 7 ppm e para C-3, observou-se uma redução de 3 ppm, estas variações no deslocamento químico das metilas se deve a mudança da configuração espacial devido a hibridização em sp^2 do carbono C-3.

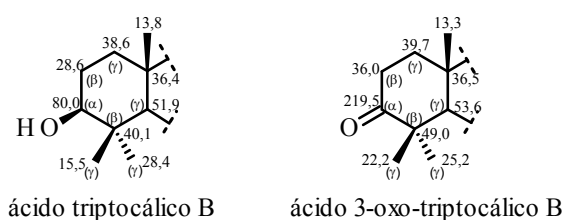


Figura 105: Comparação dos sinais de RMN de ^{13}C no anel A dos ácidos triptocálico B e 3-oxo-triptocálico B

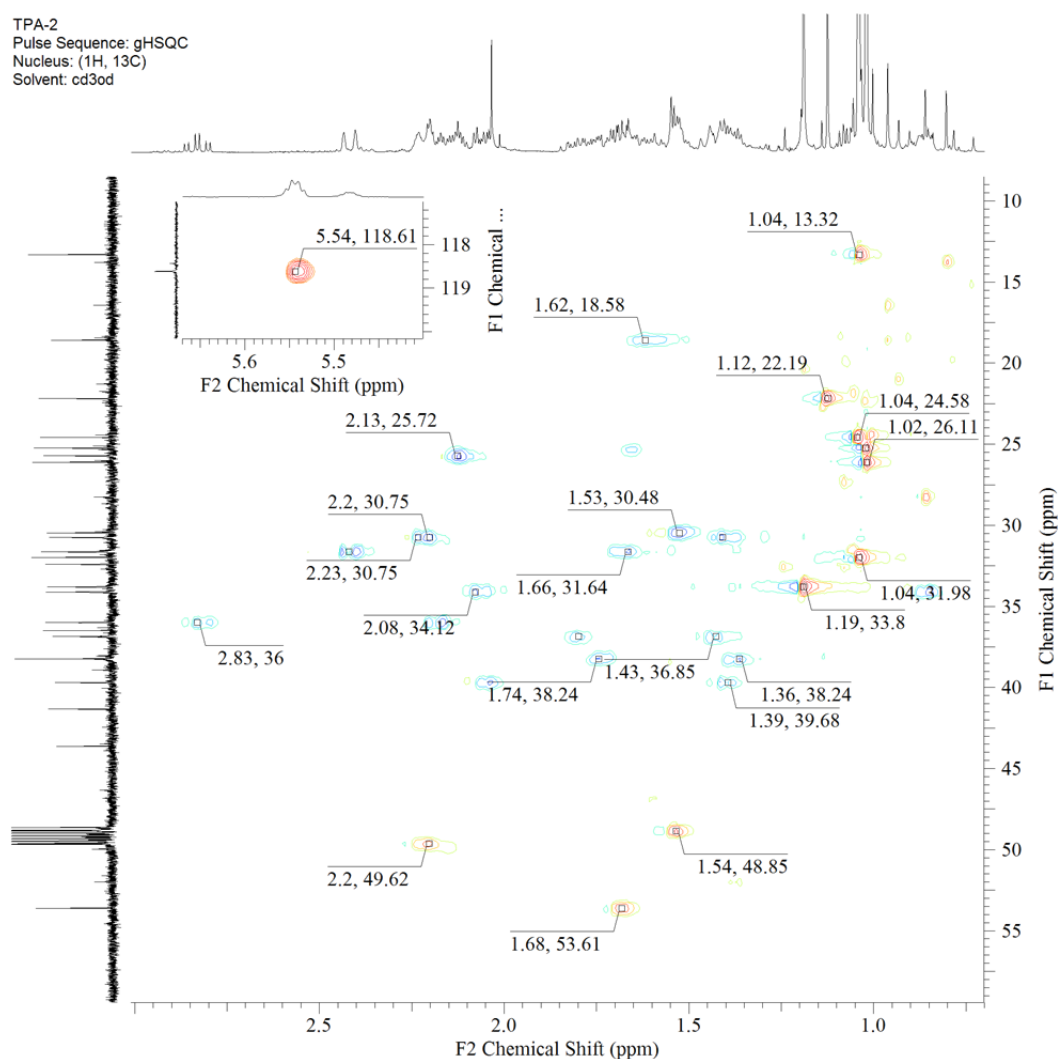


Figura 106: Espectro de correlação heteronuclear (^1H - ^{13}C)-HSQC da fração TPA-2 (Solvente: CD_3OD)

Tabela 19: Sinais observados nos experimentos de RMN 1D e 2D para os cristais da fração TPA-2

C n°	δ_C (ppm)	DEPT	HSQC δ_H [m, J, J]	COSY δ_H (ppm)	HMBC δ_C (ppm)	δ_C^* (ppm)
1	39,7 ^(γ)	CH ₂	1,39 [m]	-	-	38,6
2	36,0 ^(β)	CH ₂	2,83 [td, J=14,6; 5,5 Hz, 2H]	H-1	C-1; C-3	28,6
3	219,5 ^(α)	-	-	-	-	80,0
4	49,0 ^(β)	-	-	-	-	40,1
5	53,6 ^(γ)	CH	1,68 [m]	-	C-6; C-25; C-24;	51,9
6	25,7	CH ₂	2,13 [m]	-	-	25,4
7	118,6	CH	5,54 [ddd, J=3,2(x3) Hz, 1H]	H-6	-	118,7
8	146,8	-	-	-	-	146,6
9	49,6	CH	2,20 [m]	-	-	50,1
10	36,5	-	-	-	-	36,4
11	18,6	CH ₂	-	-	-	18,4
12	36,9	CH ₂	1,43 [m] 1,8 [m]	-	- C-19; C-27	34,1
13	38,4	-	-	-	-	38,2
14	43,6	-	-	-	-	43,4
15	30,5	CH ₂	1,53 [m]	-	-	30,4
16	38,2	CH ₂	1,36 [m] 1,74 [m]	-	- C-22; C-28	38,3
17	32,4	-	-	-	-	32,4
18	48,9	CH	1,53 [m]	-	C-12; C-13; C-16; C-17; C-20; C-22; C-26; C-27; C-28	48,8
19	31,6	CH ₂	2,42 [d, J=15.7 Hz, 2H]	1,68	C-16; C-21; C-17; C-20; C-18; C-29	31,7
20	41,3	-	-	-	-	41,4
21	30,8	CH ₂	1,41 [m] 2,22 [m]	-	C-22; C-18; C-20; C-27; C-29; C-30 -	30,8
22	34,1	CH ₂	2,08 [m]	-	C-28	37,0
23	25,2 ^(γ)	CH ₃	1,02 [s, 3H]	-	C-3; C-4; C-5; C-24	28,4
24	22,2 ^(γ)	CH ₃	1,12 [s, 3H]	-	C-3; C-4; C-5; C-23	15,6
25	13,3	CH ₃	1,04 [s, 3H]	-	C-1; C-9; C-10	13,8
26	24,6	CH ₃	1,04 [s, 3H]	-	C-8; C-14; C-15	24,5
27	26,1	CH ₃	1,02 [s, 3H]	-	C-12; C-13; C-14; C-18	26,0
28	32,0	CH ₃	1,04 [s, 3H]	-	C-16; C-17; C-22	32,0
29	183,1	-	-	-	-	183,2
30	33,8	CH ₃	1,19 [s, 3H]	-	C-19; C-20; C-21; C-29	33,9

* – δ de seu análogo ácido triptocálico B. ^(γ) - efeitos γ devido a carbonila em C-3. ^(β) - efeitos β devido a carbonila em C-3. ^(α) - efeitos α devido a carbonila em C-3.

TPA-2
Pulse Sequence: gHMBC
Nucleus: (1H, 13C)
Solvent: cd3od

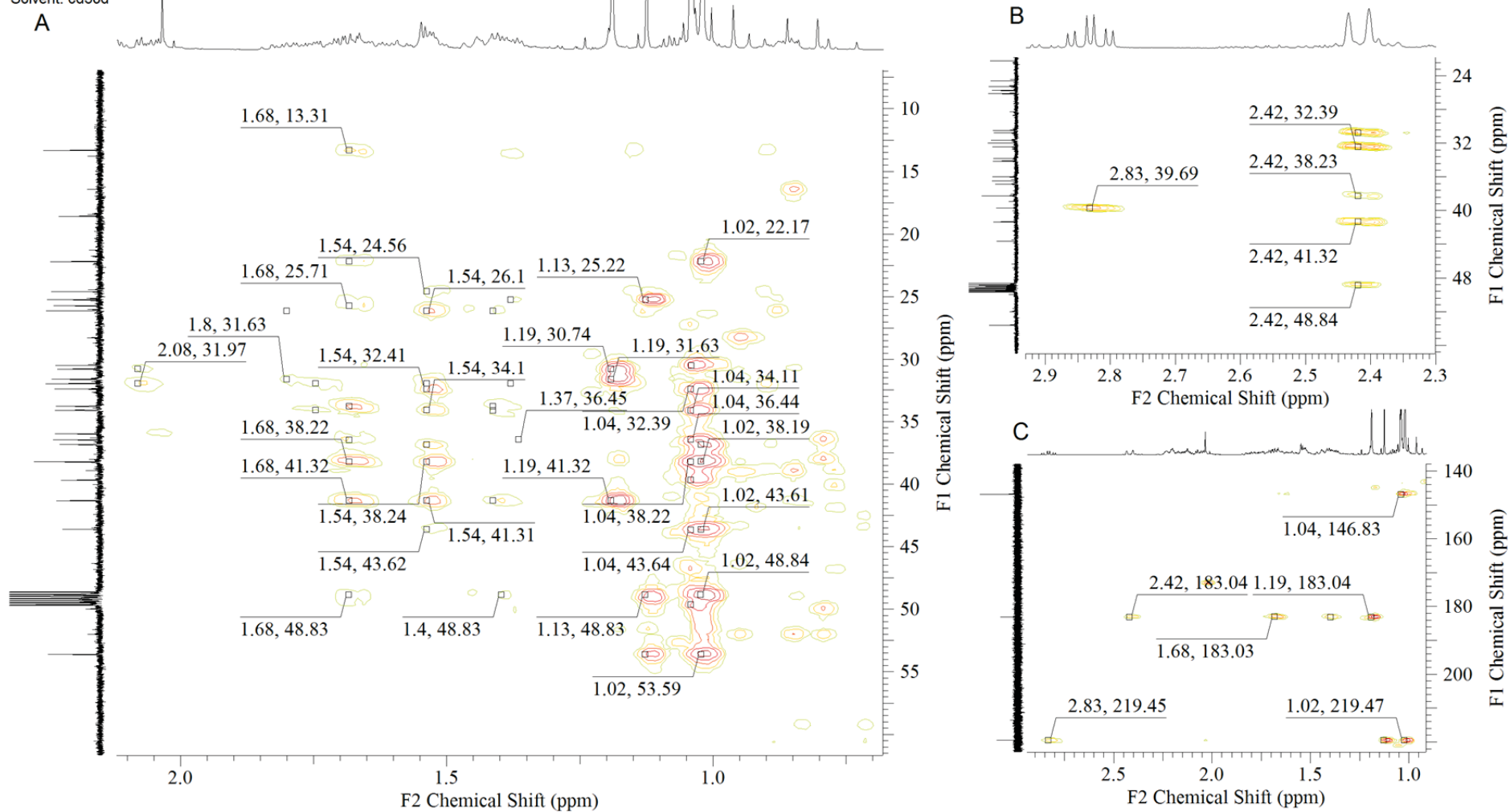


Figura 107: Espectro de correlação heteronuclear (^1H - ^{13}C)-HMBC da fração TPA-2. Ampliação das correlações entre δ_{H} 0,7-2,1 e δ_{C} 7,0-60,0 (A). Ampliação das correlação entre δ_{H} 2,3-2,9 e δ_{C} 24,0-56,0 (B). Ampliação das correlações entre δ_{H} 0,9-3,0 e δ_{C} 140,0-220,0 (C) (Solvente: CD_3OD)

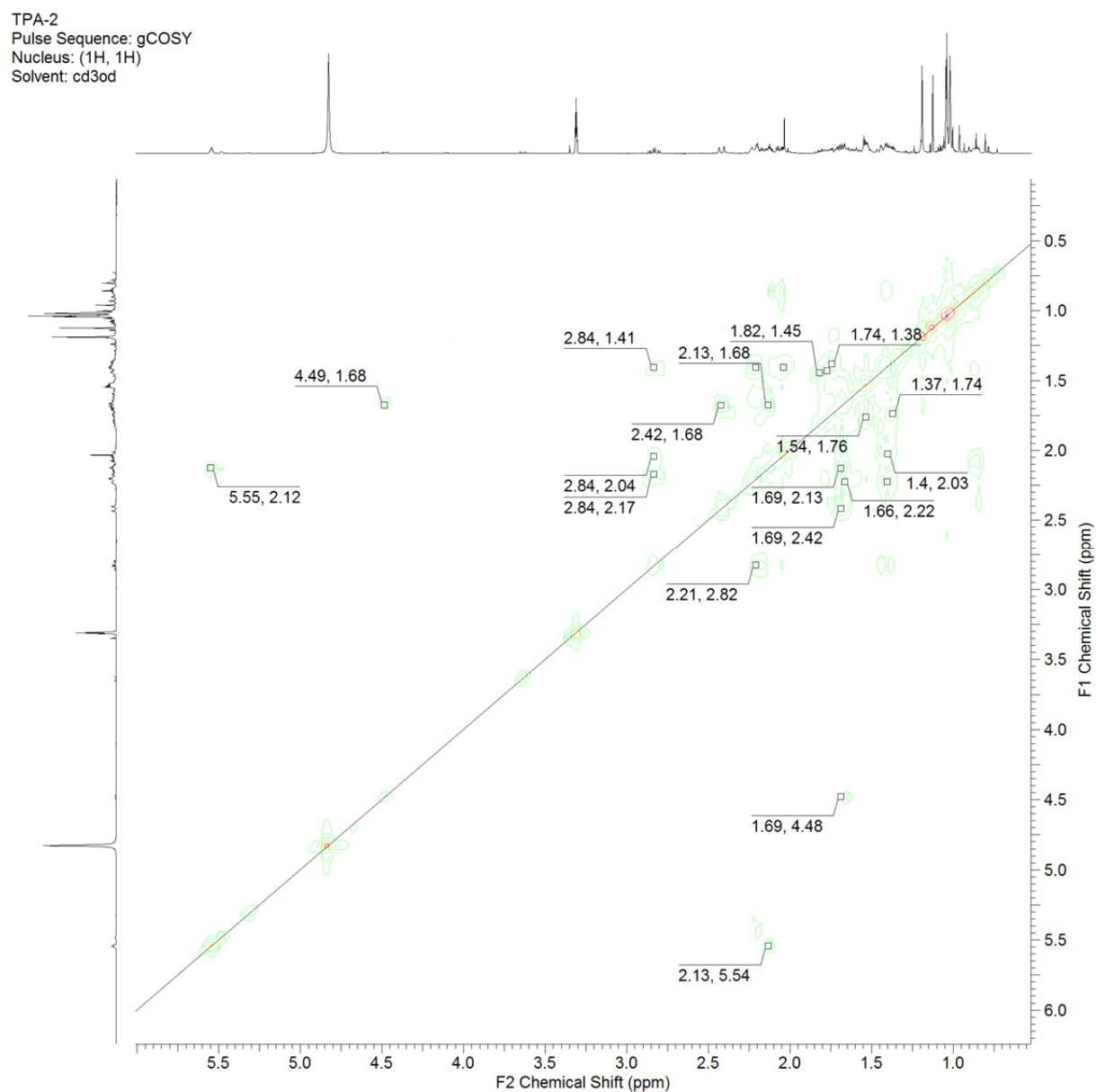


Figura 108: Espectro de correlação homonuclear (^1H - ^1H)-COSY da fração TPA-2 (Solvente: CD_3OD)

4.3.5.3 Identificação de TPA-3

O espectro de massas da fração TPA-3 obtido por injeção direta no modo negativo forneceu um íon *Quasi* molecular 453,45 m/z [M-H], referente ao íon molecular m/z 454 (Figura 109) indicando massa molecular de triterpenos trioxigenados, de forma molecular $C_{30}H_{46}O_3$.

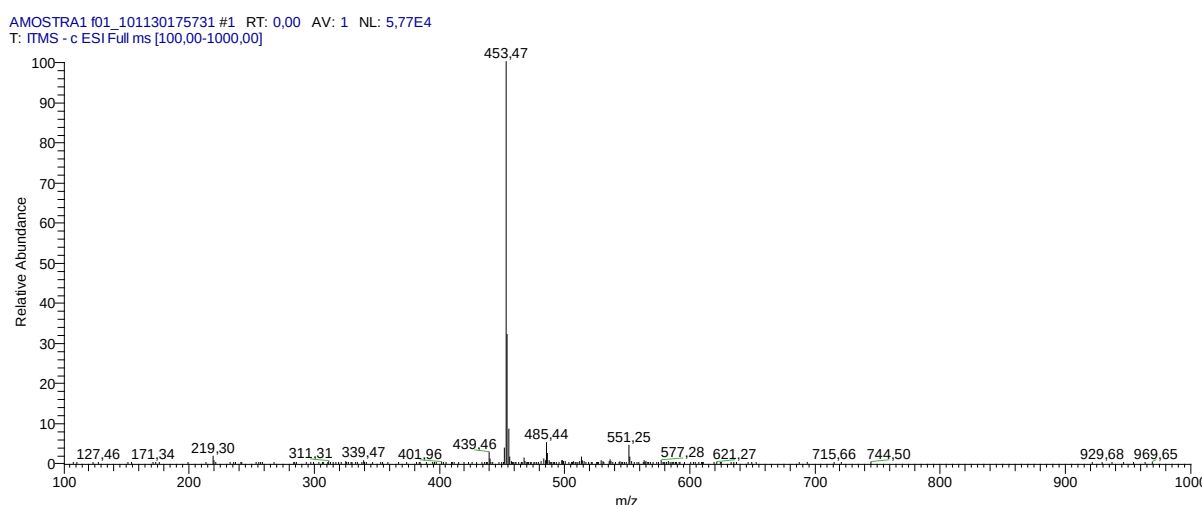


Figura 109: Escaneamento Completo EMCI-ESI (m/z 100 a 1000) da fração TPA-3 no modo negativo por injeção direta.

O espectro de RMN de ^1H (Figura 110) apresentou sete simpletos na região de hidrogênios metílicos nos sinais em δ 0,88; 1,03; 1,06; 1,08; 1,11; 1,26 e 1,25, indicando a ligação destas metilas com carbonos quartenários. O tripleto em δ 5,16 (1H, $J = 3,66$ Hz) sugere a presença de hidrogênio vinílico ligado a um CH_2 .

Foram observados dois duplo dupletos em δ 2,37 ($J=6,6, 3,7$ Hz) e 2,40 (dd, $J=7,0, 3,7$ Hz), e um duplo duplo duplete em δ 2,55 ($J=15,7, 11,0, 7,3$ Hz). Estes multipletos nesta região são referentes aos hidrogênios H-2 α (δ 2,39) e para os H-2 β (2,48) na presença de carbonila na posição C-3. Estes sinais do H-1 e H-2 foram descritos para o ácido 3-oxo-tirucala-8,24-dieno-21-óico, por Usubilaga *et al.*(2004).

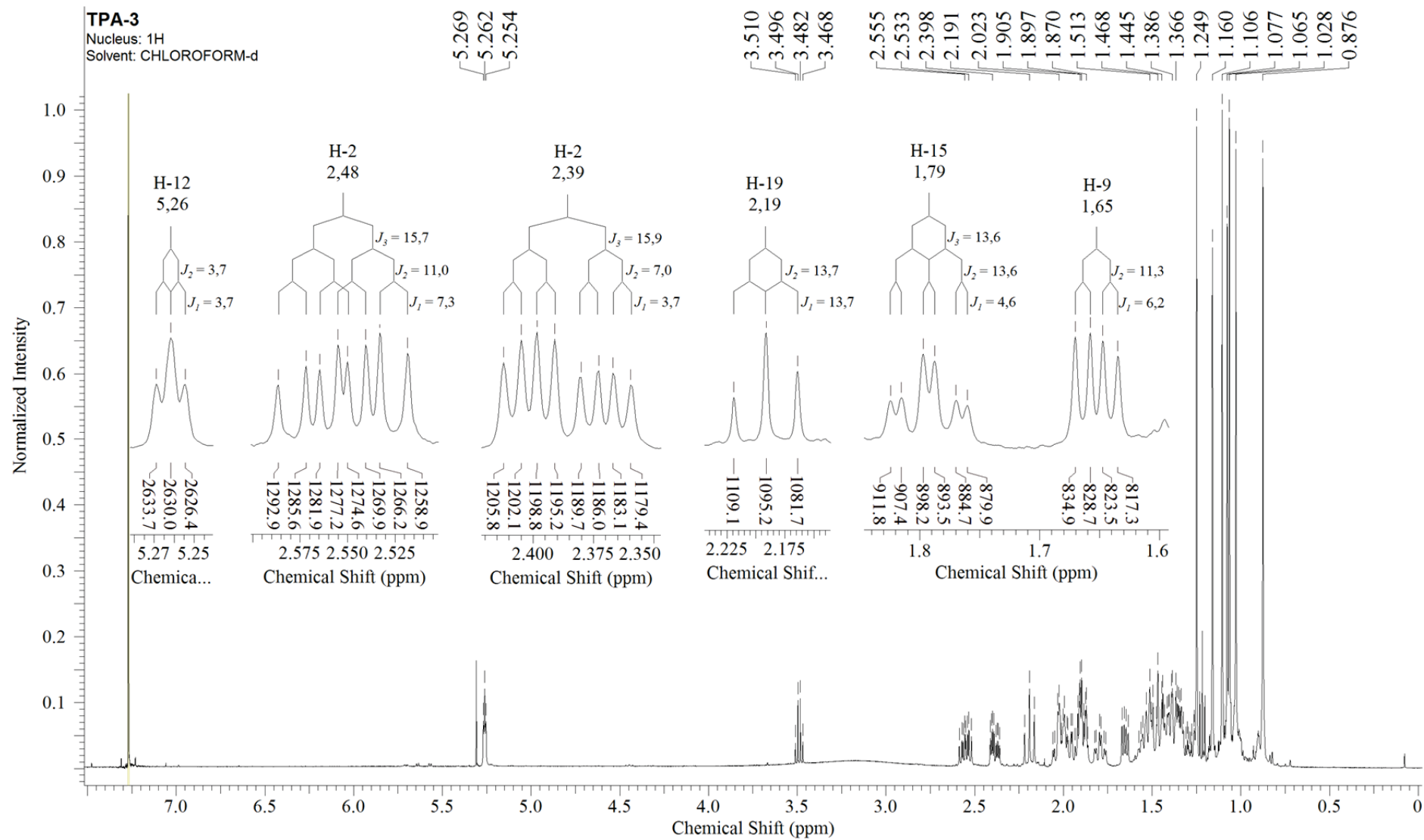


Figura 110: Espectro de RMN de ^1H da fração TPA-3 (500 MHz, Solvente/Referência: CDCl_3)

No espectro de RMN de ^{13}C (Figura 111-A) foram detectados 30 sinais de deslocamento químico (δ), o que indica a presença de um único triterpeno na fração. A análise por RMN de ^{13}C mostrou um sinal em δ 217,7, característico de carbono carbonílico, um sinal em δ 183,4, o que indicou a presença de carboxila. Podem ser observados ainda sinais característicos de carbonos vinílicos em δ 122,7 e 144,0.

A análise dos espectros DEPT 90° (Figura 111-B) e DEPT 135° (Figura 111-C) indicaram que a estrutura apresenta dez carbonos metilênicos, sete carbonos metílicos, quatro metínicos, sendo que um dos carbonos metínicos se trata de um carbono vinílicos (δ 122,7).

Através do espectro de correlação heteronuclear (^1H - ^{13}C)-HSQC (Figura 113) foi possível atribuir alguns sinais de δ dos hidrogênios para os seus respectivos carbonos, apresentados na Tabela 20. A estrutura do triterpeno foi elucidada pelas correlações heteronuclear (^1H - ^{13}C)-HMBC (Figura 114) e homonuclear (^1H - ^1H)-COSY (Figura 115), sendo os dados comparados com a literatura.

O experimento (^1H - ^{13}C)-HMBC mostrou que os hidrogênios metílicos em δ 1,11 (H-23) e 1,06 (H-24), se correlacionam com os carbonos em δ 217,7 (C-3); 47,4 (C-4) e 55,2 (C-5) e sendo que o H-23 se correlaciona com o carbono C-24 (δ 21,5) e que o H-24 se correlaciona com o carbono C-23 (δ 26,5), sugerindo uma parte do anel A da estrutura.

O sinal do hidrogênio metílico H-25 (δ 1,08) se correlaciona com os carbonos em δ 39,3 (C-1); 46,8 (C-9) e 36,7 (C-10). O carbono C-9 apresentou correlação com o hidrogênio metílico em δ 1,03 (H-26). Este hidrogênio em δ 1,03 (H-26) se correlaciona ainda com os carbonos em δ 32,1 (C-7), 39,8 (C-8) e 41,8 (C-14). O hidrogênio metílico em δ 1,16 (H-27) apresentou correlação com os carbonos C-8 e C-14, além dos carbonos em δ 144,0 (C-13) e 25,9 (C-15), sugerindo a relação entre os anéis B, C e D.

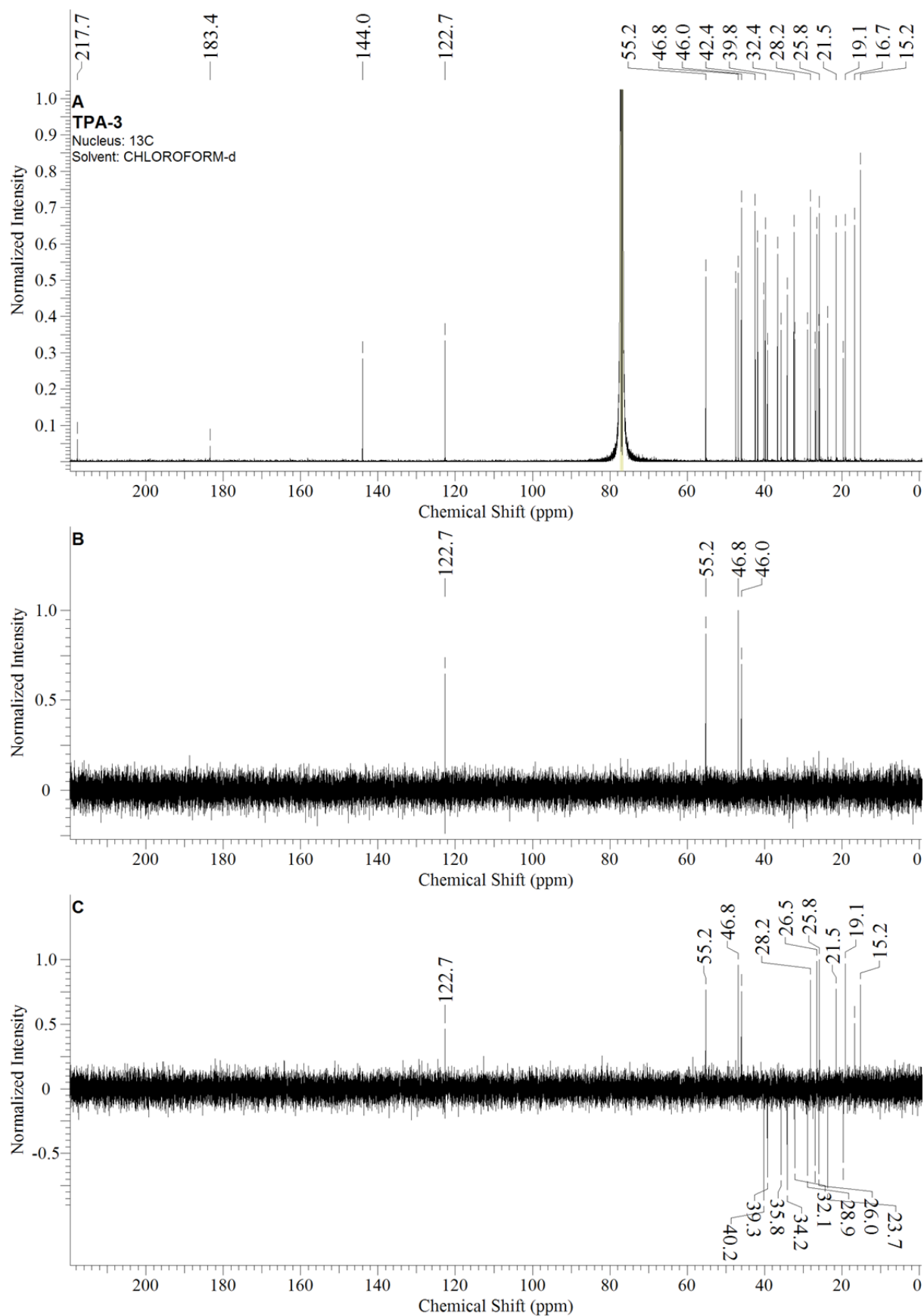


Figura 111: Espectro de RMN de ^{13}C (A), DEPT 90° (B) e DEPT 135° (C) da fração TPA-3 (125 MHz, Solvente/Referência: CDCl_3)

O hidrogênio metílico H-30 (δ 1,25) se correlaciona com os carbonos em δ 40,2 (C-19), 28,9 (C-21), 42,4 (C-20) e com o carbono carboxílico em δ 183,4 (C-29), sugerindo uma parte do anel E. A relação entre o anel E, e o anel D foi observado pelo hidrogênio metilênico em δ 0,88 (H-28), que se correlaciona com os carbonos em δ 26,9 (C-16); 35,7 (C-22); 46,0 (C-18) e 32,4 (C-17).

A análise das partes da molécula levaram a suposição do ácido 3-oxo-oleana-12-eno-29-óico (ácido 3-oxo-katononico, Figura 112), que foi confirmado com a comparação dos δ de RMN de ^{13}C com os dados de Kaneda *et al.* 1992, para este ácido.

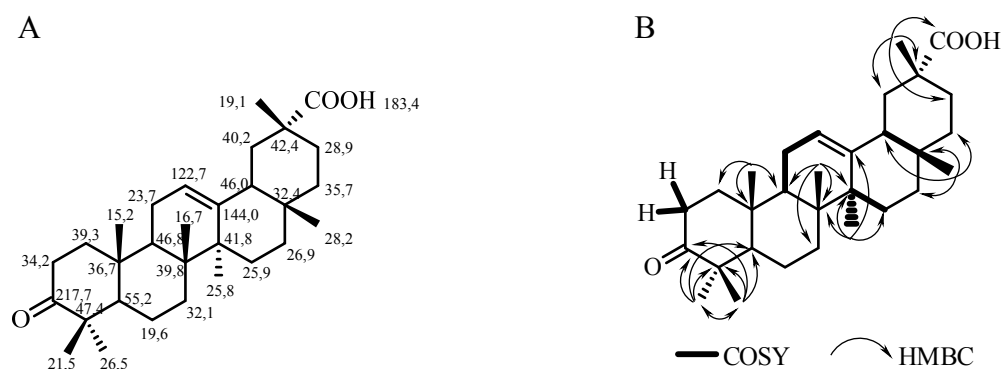


Figura 112: Estrutura do ácido 3-oxo-oleana-12-eno-29-óico isolado de *Tetragastris panamensis* com sinais de RMN de ^{13}C (A) e correlações do experimento (^1H - ^1H)-COSY e (^1H - ^{13}C)-HMBC (B)

Mesmo não se tratando de uma substância inédita, é a primeira vez que esta substância é reportada para a família Burseraceae, a estrutura se trata de um esqueleto triterpênico oleanano, comum em espécies da família Burseraceae, com insaturação no carbono 12 e com um grupo carbonílico no carbono 3, como descrito para a α -amirona, apresentando uma carboxila no carbono 29.

Anteriormente, o ácido 3-oxo-oleana-12-eno-29-óico foi isolado de espécie do gênero *Sandoricum* (Meliaceae), *Maytenus laevis* e *Tripterygium wilfordii* (Celastraceae) (KANEDA *et al.*, 1992; NAKANO *et al.* 1997; TANAKA *et al.* 2001; NAKAGAWA *et al.*,

2004). Sua potencialidade como agente antitumoral já foi reportado para as linhagens de células KB (carcinoma faringonasal), KB-V1 (forma resistente de KB), LNCaP (tumor de próstata), Lu1(pulmão), Mel2 (melanoma), ZR-75-1 (mama) e P-388 (leucemia linfocítica de camundongo) (KANEDA *et al.*, 1992).

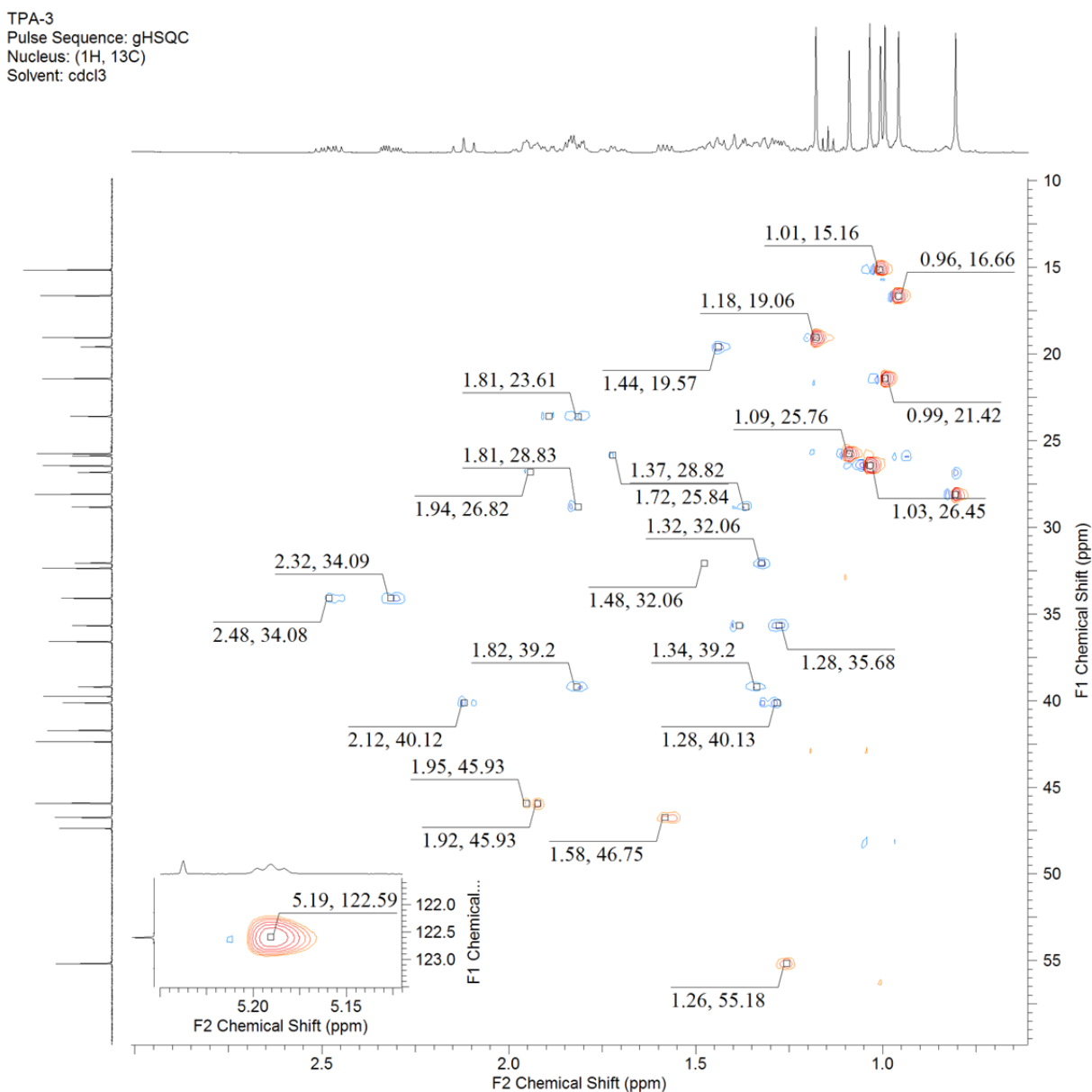


Figura 113: Espectro de correlação heteronuclear (^1H - ^{13}C)-HSQC da fração TPA-3 (Solvente: CD_3OD)

Tabela 20: Sinais observados nos experimentos de RMN 1D e 2D para os cristais da fração TPA-1

C (n°)	δ_C (ppm)	DEPT	HSQC δ_H (ppm) [m, J, $\int$]	COSY H (n°)	HMBC C (n°)	δ_C^a (ppm)
1	39,3	CH ₂	1,38 – 1,45 [m] 1,85 – 1,94 [m]	-	C-10; C-3	39,2
2	34,2	CH ₂	2,39 [ddd, J=15,9; 7,0, 3,7 Hz] 2,48 [ddd, J=15,7; 11,0; 7,3 Hz]	H-2 α H-2 β	- C-1; C-3	34,1
3	217,7	C	-	-	-	217,8
4	47,4	C	-	-	-	47,3
5	55,2	CH	1,32 – 1,37 [m]	-	C-24; C-25	55,1
6	19,6	CH ₂	1,47 – 1,53 [m]	-	C-10	19,6
7	32,1	CH ₂	1,37 – 1,41 [m] 1,50 – 1,57 [m]	-	C-5; C-8; C-9; C-25; C-26	32,0
8	39,8	C	-	-	-	39,7
9	46,8	CH	1,65 [dd, J=11,3; 6,2 Hz]	-	C-8; C-10; C-11; C-14; C-25; C-26	46,7
10	36,7	C	-	-	-	36,6
11	23,7	CH ₂	1,86 – 1,92 [m] 1,95 – 1,98 [m]	H-12; H-9 H-12; H-9	C8; C12	23,6
12	122,7	CH	5,26 [t, J=3,7 Hz]	-	-	122,5
13	144,0	C	-	-	-	143,9
14	41,8	C	-	-	-	41,7
15	26,0	CH ₂	1,79 [td, J=13,6; 4,6 Hz]	H-26	C8; C14; C16; C27	25,9
16	26,9	CH ₂	1,40 – 1,47 [m] 1,86 – 1,92 [m]	-	C17; C28	26,8
17	32,4	C	-	-	-	32,3
18	46,0	CH	1,98 – 2,04 [m]	H-28	C12; C13; C14; C17; C28	45,9
19	40,2	CH ₂	1,32 – 1,39 [m] 2,19 [dd, J=13,7(x2) Hz]	- -	-	40,1
20	42,4	C	-	-	-	42,5
21	28,9	CH ₂	1,40 – 1,47 [m] 1,85 – 1,94 [m]	-	C20	28,7
22	35,8	CH ₂	1,32 – 1,37 [m] 1,43 – 1,47 [m]	-	C18; C20; C21; C30	35,7
23	26,5	CH ₃	1,11 [s]	-	C4; C5; C3; C24	26,4
24	21,5	CH ₃	1,06 [s]	-	C4; C5; C3; C23	21,4
25	15,2	CH ₃	1,08 [s]	-	C1; C9; C10	15,1
26	16,7	CH ₃	1,03 [s]	-	C7; C8; C9; C14	16,6
27	25,8	CH ₃	1,16 [s]	-	C8; C14; C13; C15	25,7
28	28,2	CH ₃	0,88 [s]	H-18	C16; C17; C18; C22	28,1
29	183,4	C	-	-	-	185,3
30	19,1	CH ₃	1,25 [s]	-	C21; C19; C20; C29	19,0

^a – δ de RMN de ¹³C obtido na literatura (Kaneda *et al.* 1992).

TPA-3
Pulse Sequence: gHMBC
Nucleus: (1H, 13C)
Solvent: cdcl3

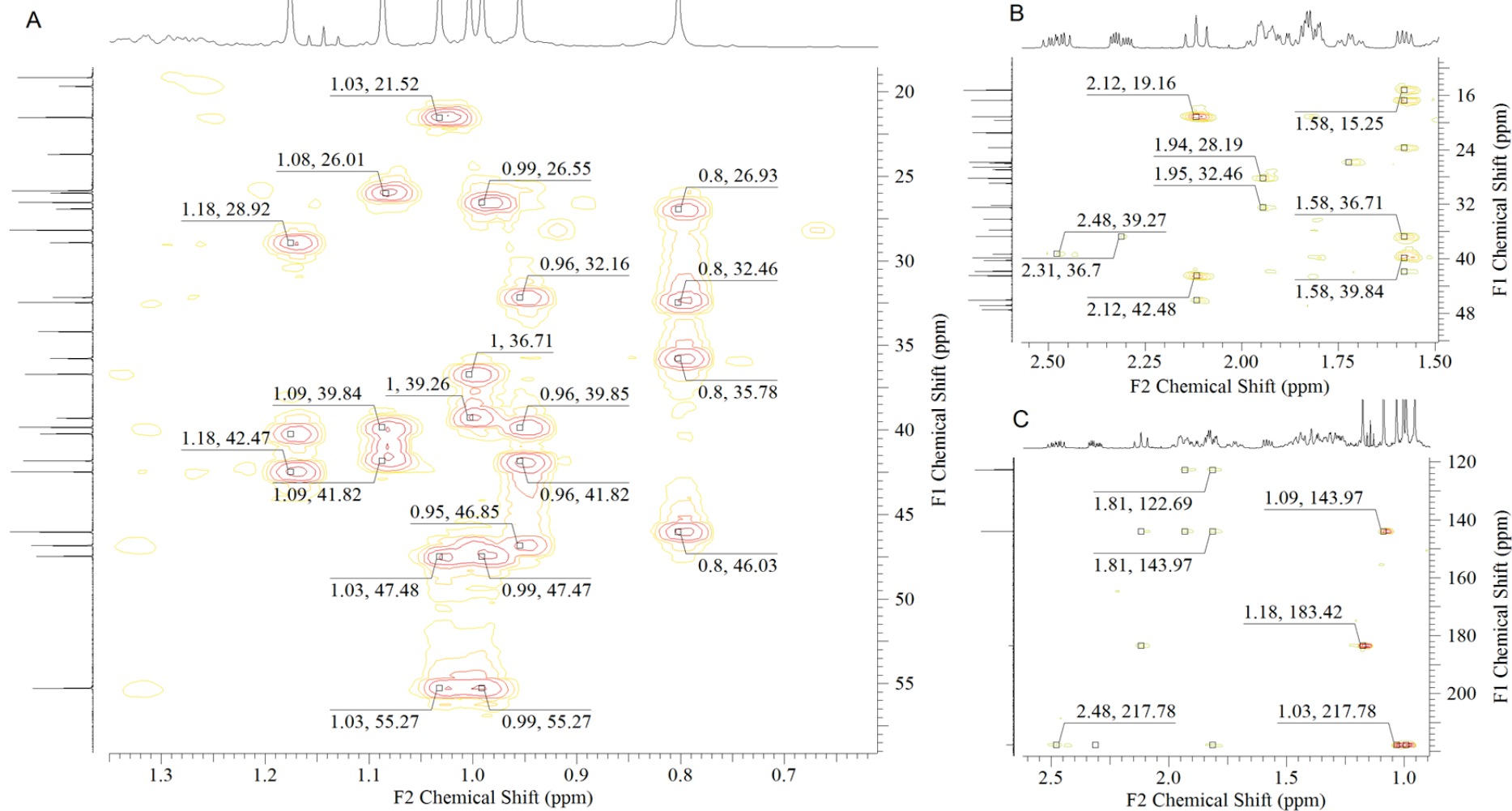


Figura 114: Espectro de correlação heteronuclear (^1H - ^{13}C)-HMBC da fração TPA-3. Ampliação das correlações entre δ_{H} 0,6-1,3 e δ_{C} 18,0-60,0 (A). Ampliação das correlações entre δ_{H} 1,5-2,6 e δ_{C} 10,0-53,0 (B). Ampliação das correlações entre δ_{H} 0,9-2,6 e δ_{C} 120,0-220,0 (C) (Solvente: CD_3OD)

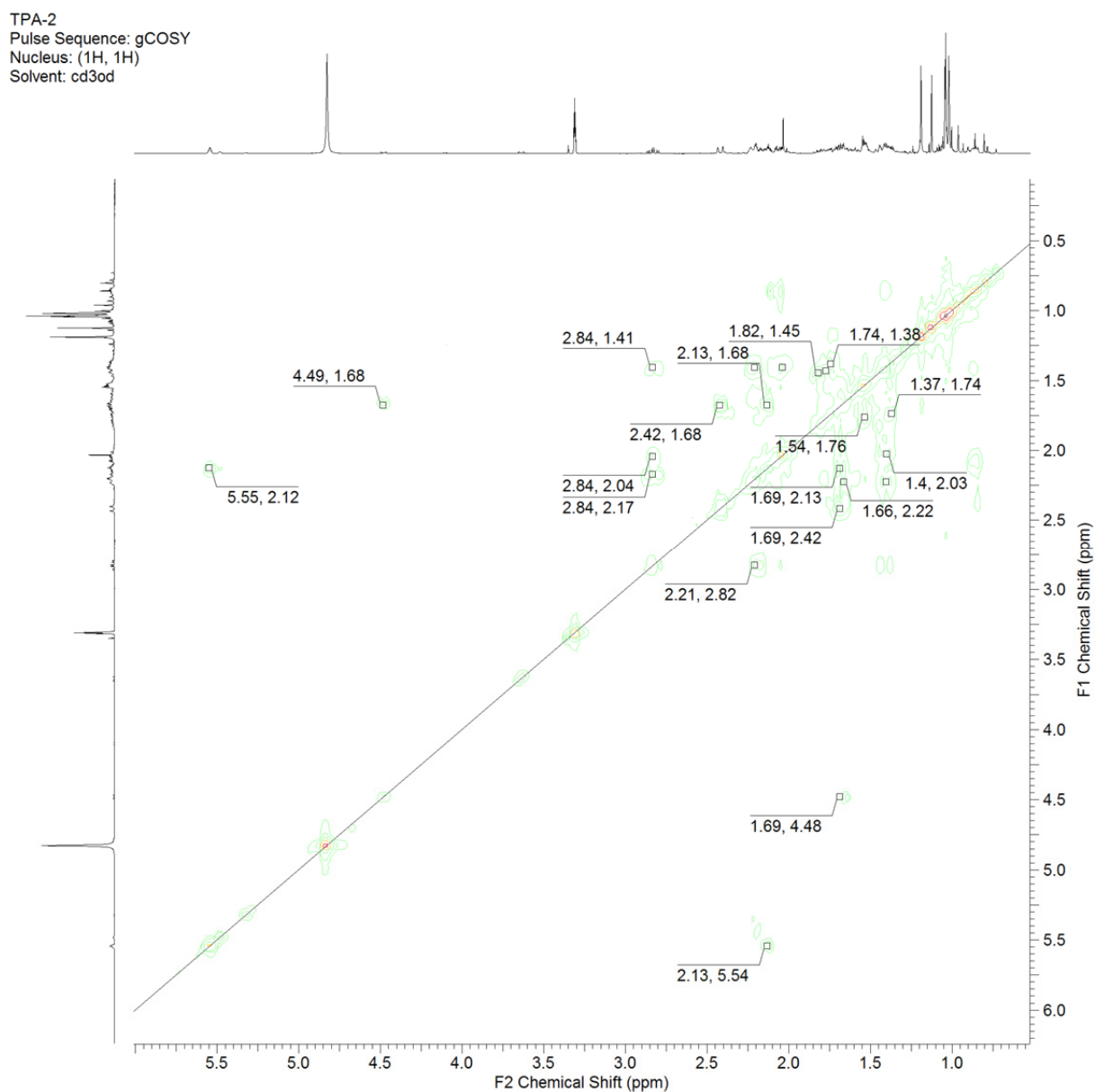


Figura 115: Espectro de correlação homonuclear (^1H - ^1H)-COSY da fração TPA-3 (Solvente: CD_3OD)

4.4 Biossíntese de triterpenos derivados de esqueleto multiflorano no gênero *Tetragastris*

O primeiro triterpeno de esqueleto multiflorano descrito na família Burseraceae foi o ácido 2,3-*seco*-isobrionônico, isolado de *Tetragastris altissima* (LIMA *et al.*, 2001). Contudo, este triterpeno permanecia sendo o único desta série na família. Através de técnicas cromatográficas e espectrométricas, foi possível identificar o multiflorenol e elucidar os triterpenos ácidos: triptocálico B e 3-oxo-triptocálico B, três triterpenos de esqueleto multiflora-7-eno.

Com a identificação destes triterpenos, foi possível sugerir uma proposta de rota biossintética (Figura 116) a partir do multiflorenol, até o ácido 2,3-*seco*-isobrionônico, passando pelos ácidos triptocálico B e ácido 3-oxo-triptocálico B.

A formação tem início com a oxidação do carbono 29, convertendo o multiflorenol em 3,29-diidroximultiflora-7-eno. Na biossíntese, o triterpeno diidroxilado sofre dois processos de oxidação na posição 29, formando primeiramente o aldeído 3-hidroximultiflora-7-eno-29-al e em seguida o ácido triptocálico B. Esta proposta de biossíntese é análoga a oxidação do carbono 30 na proposta de biossíntese do ácido glicerrítico a partir da β -amirina (SEKI *et al.*, 2011), cuja confirmação demandaria a realização de experimentos com marcadores radioativos.

A abertura do anel A para a formação do ácido 2,3-*seco*-isobrionônico inicia com a oxidação da hidroxila na posição 3 (ácido triptocálico B) em carbonila (ácido 3-oxo-triptocálico B). Através de uma reação de oxidação pela Baeyer-Villiger monooxidase (BVMO) converte a cetona na posição 3 em uma lactona (SCHULZ *et al.*, 2005), seguido por uma hidrólise, abrindo o anel A. O mecanismo de reação envolvendo a Baeyer-Villiger monooxidase para a abertura do anel A foi sugerido por Muffer *et al.* (2011) na

biotransformação do ácido oleanólico em ácido 4-hidroxi-3,4-*seco*-oleana-12-eno-3,28-dióico. Contudo para a formação do ácido 2,3-*seco*-isobrionônico é sugerida uma etapa seguinte, na qual ocorre a desidratação da hidroxila na posição 4.

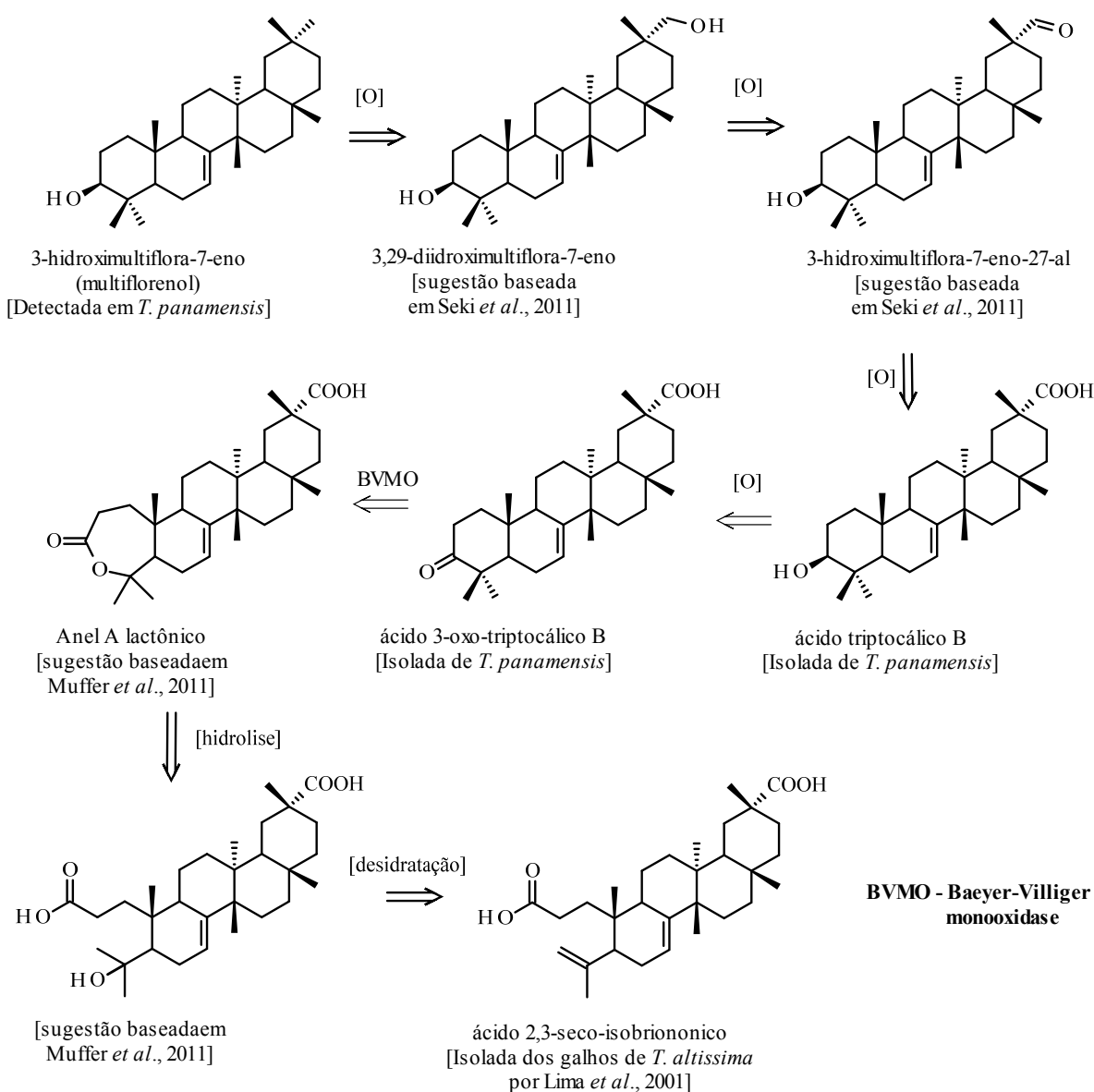


Figura 116: Proposta da rota biossintética para transformação do multiflorenol em ácido 2,3-*seco*-isobrionônico

4.5 Considerações Quimiossistemáticas

Dentre os triterpenos pentacíclicos de anéis 6-6-6-6-6, os derivados de oleanano e ursano são onipresentes na família Burseraceae (LIMA *et al.*, 2004). Contudo, dentre os gênero, é possível verificar diferenças sítios de oxidações específicos para alguns gêneros da família (Figura 117).

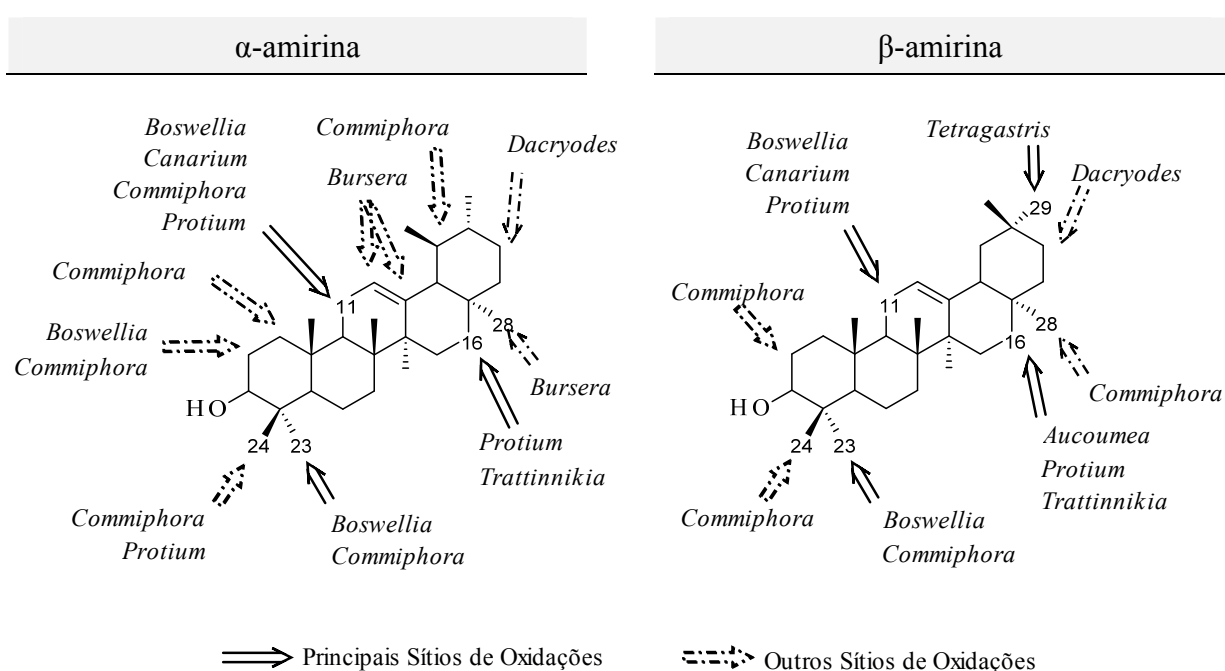


Figura 117: Sítios de oxidações em triterpenos ursano-12-eno e oleanano-12-eno em espécies de Burseraceae

A presença de oxidação na posição 16 (em breina e maniladiol) é descrita na família Burseraceae apenas para os gêneros *Aucoumea* (tribo Bursereae), *Protium* (tribo Protieae) e *Trattinnickia* (tribo Canarieae) (GUANG-YI *et al.*, 1988; RÜDIGER *et al.*, 20007; SIANI *et al.*, 2012). Neste trabalho foi reafirmada a presença destes triterpenos nos gêneros *Protium* e *Trattinnickia*.

Através da detecção por CG-EM foi possível descrever a ocorrência destes triterpenos diidroxilados em *Trattinnickia glaziovii*. Do gênero *Trattinnickia* a oxidação na

posição 16 tinha sido reportada apenas na oleorresina de *T. rhoifolia* (SIANI *et al.*, 2012). Contudo, na espécie *Trattinnickia peruviana*, estes triterpenos não foram detectados, indicando uma dissimilaridade entre esta espécie e as duas em que foram detectados neste gênero.

A presença de ácidos das séries oleanano e ursano é comumente descrita para o gênero *Boswellia*, de onde são obtidos os ácidos que apresentam carboxila na posição 23: α -boswellico, β -boswellico e seus derivados (SHEN & LOU, 2008). Dentre os triterpenos ursano e oleanano com carboxila na posição 28, o ácido ursólico e seus derivados foram obtidos de *Bursera delpechiana* (SYAMASUNDAR & MALLAVARAPU, 1995) e o ácido oleanólico apenas de *Commiphora tenuis* (ABBAS *et al.*, 2007). A presença dos ácidos ursólico e oleanólico em *Protium bahianum* é o primeiro registro destas substâncias no gênero *Protium*.

O isolamento de triterpeno ácido da série oleanano com oxidação do carbono 29 na família sugere enzimas específicas no gênero *Tetragastris*. A estas mesmas enzimas são atribuídas o sítio de oxidação observado para este gênero em triterpenos da série multiflorano, como o ácido 3,4-seco-isobrionônico isolado Lima *et al.* (2001) em *Tetragastris altíssima*, e os ácidos triptocálico B e 3-oxo-triptocálico B isolados de *Tetragastris panamensis* neste trabalho.

A presença de grupos carboxílicos no carbono 29 do esqueleto oleanano e multiflorano já foi descrito para a espécie *Sandoricum koedjape* (Meliaceae) (KANEDA *et al.*, 1992), espécie pertencente também a ordem Sapindales.

O isolamento de dois triterpenos de esqueleto multiflorano possibilitou a sugestão do triterpeno multiflorenol no gênero *Tetragastris*, sendo a primeira vez descrito na família Burseraceae. A comparação com os picos de mesmo tempo de retenção e espectros de massas

das demais espécies avaliadas sugeriu ainda a presença deste triterpeno em três espécies de *Protium*: *P. cf. ferrugineum*, *P. heptaphyllum* ssp. *ullei*, e *P. tenuifolium*.

A identificação de triterpenos da série multiflorano em espécies do gênero *Protium* e *Tetragastris* (ambas as espécies da tribo Protieae) sugere a presença de enzimas específicas para as migrações 27(14→13)abeo e 26(8→13)abeo em esqueleto oleanano, formando os triterpenos das séries multiflorano (D:C-friedooleano).

O glutinol, isolado apenas da oleorresina de *Bursera simaruba* e *Dacryodes edulis* (PERAZA-SÁNCHEZ *et al.*, 1995; LOEMBA-NDEMBI & SILOU, 2006), foi detectado em duas espécies de *Protium*: *P. strumossum* e *P. tenuifolium* e *Tetragastris panamensis*, considerando as espécies de Burseraceae pertencentes a tribo Protieae potencialmente produtoras deste triterpeno glutinano (D:B-friedooleano).

5. CONCLUSÃO

O estudo fitoquímico através de técnicas analíticas de alta eficiência, como a cromatografia em fase gasosa, junto a técnicas de espectrometria de massas, utilizadas neste trabalho contribuiu para a descrição da composição química não de apenas uma espécie, como observado em vários trabalhos de pesquisa em produtos naturais, mas para a descrição da composição química da oleorresina de vinte e três espécies de Burseraceae Amazônicas.

Através da análise dos perfis cromatográficos foram selecionados 14 extratos em hexano que foram submetidos à avaliação da atividade citotóxica contra três linhagens de células tumorais. Afim de comparação, outros 14 extratos em acetato de etila, pertencentes a mesma espécies foram submetidos a mesma análise. Os resultados demonstraram 4 extratos com atividade inibitória, sendo que um destes extratos foi submetido a processos cromatográficos, levando ao isolamento de um triterpeno.

A avaliação do perfil possibilitou ainda a seleção de outras quatro espécies, que levaram ao isolamento de compostos conhecidos de interesse químico e de novos compostos na família Burseraceae.

A avaliação da fração volátil dos extratos em hexano das vinte e três oleorresinas demonstrou uma grande variedade de monoterpenos e sesquiterpenos, sendo identificados ainda outros três benzenos derivados. Dentre os monoterpenos foram observados os das séries *p*-mentano, tujanos, pinanos, bornano, canfanos e carano. Já entre os sesquiterpenos, foram observados derivados de esqueleto acíclico e das séries elemmano, bergamotano, humulano, bisabolano, eudesmano, cadinano e guaiano.

O perfil da porção triterpênica presente nos extratos em hexano das vinte e três oleorresinas demonstrou a presença de grande número de triterpenos de esqueleto ursano e oleanano. Como comumente é descrito para espécies de Burseraceae Amazônicas, os triterpenos α - e β - amirina foram detectados em todas as amostras analisadas. Já os seus derivados cetônicos, α - e β - amirona, sempre descritos em conjunto com os triterpenos α - e β - amirina, não foram detectados em *Protium* cf. *ferrugineum*. Novas análises são sugeridas para esta espécie visando determinar se a ausência destes triterpenos pode ser devido à ausência de enzima de oxidação da hidroxila na posição 3, ou apenas um efeito de intemperismo no período da coleta.

A presença de hidroxila nos triterpenos ursano e oleanano na posição 16, não é exclusiva de todas as espécies estudadas. Dentre as 23 espécies avaliadas, apenas em 12 espécies foram observados os triterpenos breina e/ou maniladiol.

Além dos triterpenos ursano e oleanano, a análise dos fragmentos por espectrometria de massa levou a identificação de triterpenos de esqueleto lupano, taraxastano, taraxarano, friedelano, glutinano e multiflorano, resultado de grande importância para o conhecimento quimiosistemático para a família Burseraceae.

Na comparação entre a composição química das espécies, foi possível determinar grande semelhança entre as espécies *Protium tenuifolium* e *Tetragastris panamensis*, sendo detectados sesquiterpenos das séries bisabolano, cadinano, cubebano, eudesmano, guaiano e muurulano em comum para estas duas amostras. Quanto aos triterpenos, foram obtidas relações entre a composição para estas duas espécies com a presença do glutinol e do multiflorenol.

As técnicas cromatográficas aplicadas para o isolamento das substâncias presentes nas oleorresinas levaram ao isolamento de um sesquiterpeno, cinco triterpenos isolados e mais três frações contendo triterpenos em misturas binárias.

A detecção e isolamento do sesquiterpeno junenol em oleorresinas de espécies Sul-Americanas de Burseraceae é inédita. Anteriormente este sesquiterpeno já tinha sido descrito nas espécies *Bursera graveolens* e *Canarium* sp.

As misturas binárias dos triterpenos diidroxilados breina e maniladiol, e dos ácidos 3 α -hidroxitirucala-8,24-dieno-21-óico e 3 α -hidroxitirucala-7,24-dieno-21-óico isolados de *Protium paniculatum* var. *modestum*, é inédito nesta espécie, contudo vários trabalhos já isolaram estes triterpenos de outras espécies de *Protium*. Mesmo não se tratando de triterpenos inéditos, o isolamento destes triterpenos irá fortalecer as parcerias com grupos de pesquisa que desenvolvem pesquisa de atividades biológicas.

Os processos cromatográficos utilizando SiO₂ impregnado com KOH aplicado para os extratos obtidos com acetato de etila de *T. panamensis* e *Protium bahianum* apresentaram grande eficiência, fornecendo frações ricas em ácidos triterpênicos.

O isolamento de ácido ursólico e oleanólico em *Protium bahianum* é o primeiro registro destas substâncias no gênero *Protium*. Este resultado sugere a presença de enzimas específicas para oxidação do carbono 28 nesta espécie. A pesquisa direcionada na busca destes triterpenos em outras espécies do gênero *Protium* é sugerida, podendo fornecer fontes destes triterpenos na família Burseraceae, que vem sendo pesquisado exaustivamente na busca de novos agentes fitoterápicos, agregando valor as espécies da família.

O isolamento dos triterpênicos ácido triptocálico B e ácido 3-oxo-triptocálico B, a detecção do multiflorenol na oleorresina de *Tetragastris panamensis*, além do isolamento reportado por Lima *et al.* (2001) do ácido 2,3-seco-isobriononico dos galhos de *Tetragastris altíssima*, demonstram o potencial do gênero *Tetragastris* na obtenção de uma nova classe de triterpenos, de esqueletos da série multiflora-7-eno, na família Burseraceae.

Outra característica observada no gênero *Tetragastris* é a presença da carboxila na posição 29. Primeiramente descrita a carboxila nesta posição por Lima *et al.* (2001), o

isolamento de três novos ácidos para este gênero com a carboxila na posição 29, sendo dois ácidos derivados do esqueleto multiflora-7-eno e o ácido 3-oxo-katonônico (esqueleto da série oleanano), sugere que a oxidação da metila 29 pode servir como marcador quimiossistemático para *Tetragastris*, já que foi observada somente para este gênero na família Burseraceae.

A avaliação da atividade citotóxica pelas oleorresinas estudadas demonstrou inibição pelos extratos em hexano de *Protium* cf. *rubrum* e *Trattinnickia peruviana* (HrTPE) contra as linhagens de células tumorais HCT-8 e SF-295, e pelos extratos em acetato de etila de *P. giganteum* var. *giganteum* e *Trattinnickia glaziovii* contra as linhagens de células tumorais HCT-8 e MDAM B-435.

Contudo o potencial das substâncias presentes na oleorresina não pode ser confirmada. Isto se deve ao fato de apenas uma substância ter sido isolada da fração ativa de HrTPE η D: o β -amiradienol. Para o isolamento das demais substâncias presentes na fração citotóxica HrTPE η D é sugerida a execução de métodos cromatográficos de alta eficiência, permitindo o isolamento das demais substâncias presentes na fração, outrora observadas por cromatografia em camada delgada.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBAS, F. A.; AL-MASSARANY, S. M.; KHAN, S.; AL-HOWIRINY, T. A.; MOSSA, J. S.; ABOURASHED, E. A. Phytochemical and biological studies on Saudi *Commiphora opobalsamum* L. *Natural Product Research*, v.21, n.5, p.383-391, 2007.

ADAMS, Robert P. Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography/Mass Spectrometry, 4ed, Allured Business/Alluredbooks: Carol Stream, USA, 2009.

AGETA, H.; SHIOJIMA, K.; ARAI, Y.; SUZUKI, H.; KIYOTANI, T. NMR spectra of triterpenoids . II. Hopane and migrated hopanes. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, v.42, n.1, p.39-44, 1994.

AGETA, H.; ARAI, Y.; SUZUKI, H.; KIYOTANI, T.; KITABAYASHI, M. NMR spectra of triterpenoids . III. Oleananes and migrated oleananes. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, v.43, n.2, p.198-203, 1995.

AGETA, H.; SHIOJIMA, K.; SUZUKI, H.; NAKAMURA, S. NMR spectra of triterpenoids . I. Conformation of the side chain of hopane and isohopane, and their derivatives. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, v.41, n.11, p.1939-1943, 1993.

AKIHISA, T.; TABATA, K.; BANNO, N.; TOKUDA, H.; NISHIHARA, R.; NAKAMURA, Y.; KIMURA, Y.; YASUKAWA, K.; SUZUKI, T. Cancer Chemopreventive Effects and Cytotoxic Activities of the Triterpene Acids from the Resin of *Boswellia carteri*. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, v.29, n.9, p.1976-1979, 2006.

ALI, M.; BHUTANI, K. K.; SRIVASTAVA, T. N. Triterpenoides from *Symplocos racemosa* bark. *Phytochemistry*, v.29, n.11, p.3601-3604, 1990.

APG III. Angiosperm phylogeny group classification for the orders and families of flowering plants: APG III. *Botanical Journal of the Linnean Society*, v.161, n.1, p.105–121, 2009.

ASRES, K.; TEL, A.; MOGES, G.; SPORER, F.; WINK, M. Terpenoid composition of the wound-induced bark exudate of *Commiphora tenuis* from Ethiopia. *Planta Medica*, v.64, n.5, p.473-475, 1998.

ASSAD, Y. O. H.; TORTO, B.; HASSANALI, A.; NJAGI, P. G. N.; BASHIR, N. H. H.; MAHAMAT, H. Seasonal variation in the essential oil composition of *Commiphora quadricincta* and its effect on the maturation of immature adults of the desert locust, *Schistocerca gregaria*. *Phytochemistry*, v.44, n.5, p.833-841, 1997.

ASSIMOPOULOU, A. N.; PAPAGEORGIOU, V. P. GC-MS analysis of penta- and tetracyclic triterpenes from resins of *Pistacia* species. Part I. *Pistacia lentiscus* var. Chia. *Biomedical Chromatography*, v.19, n.4, p.285-311, 2005a.

ASSIMOPOULOU, A. N.; PAPAGEORGIOU, V. P. GC-MS analysis of penta- and tetracyclic triterpenes from resins of *Pistacia* species. Part II. *Pistacia terebinthus* var. Chia. *Biomedical Chromatography*, v.19, n.8, p. 586–605, 2005b.

BADRIA, F. A.; MIKHAEIL, B. R.; MAATOOQ, G. T.; AMER, M. M. A. Immunomodulatory triterpenoids from the oleogum resin of *Boswellia carterii* Birdwood. *Zeitschrift Fur Naturforschung C - A Journal of Biosciences*, v.58, n.7-8, p.505-516, 2003.

BANDARANAYAKE, W. M. Terpenoids of *Canarium zeylanicum*. *Phytochemistry*, v.19, n.2, p.255-257, 1980.

BANDEIRA, P. N.; MACHADO, M. I. L.; CAVALCANTI, F. S.; LEMOS, T. L. G. Essential oil composition of leaves, fruits and resin of *Protium heptaphyllum* (Aubl.) March. *Journal of Essential Oil Research*, v.13, n.1, p.33-34, 2001.

BARROS, F. W. A.; BANDEIRA, P. N.; LIMA, D. J. B.; MEIRA, A. S.; de FARIAS, S. S.; ALBUQUERQUE, M. R. J. R.; dos SANTOS, H. S.; LEMOS, T. L. G.; de MORAIS, M. O.; COSTA-LOTUFO, L. V.; PESSOA, C. D., Amyrin esters induce cell death by apoptosis in HL-60 leukemia cells. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, v.19, n.3, p.1268-1276, 2011.

BASER, K. H. C.; DEMIRCI, B.; DEKEBO, A.; DAGNE, E. Essential oils of some *Boswellia* spp., myrrh and opopanax. *Flavour and Fragrance Journal*, v.18, n.2, p.153-156, 2003.

BAUER, S.; SCHULTE, E.; THEIR, H. P. Composition of the surface wax from tomatoes I. Identification of the components by GC/MS. *European Food Research and Technology*, v.219, n.3, p.223–228, 2004.

BHUVANENDRAM, R.; MANSON, W.; SPRING, F. S. Triterpene resinols and related acids .19. Isolation of a triterpene diol from *Canarium schweinfurthii* resin. *Journal of the Chemical Society*, p.3472-3474, 1950.

BORCHARDT, J.K. The Beginnings of Drug Therapy: Ancient Mesopotamian Medicine. *Drug News Perspective*. v.15, p.187-192, 2002. Apub. CRAGG, G. M.; GROTHAUS, P. G.; NEWMAN, D. J. Impact of Natural Products on Developing New Anti-Cancer Agents. *Chemical Review*. v.109, p.3012-3043, 2009.

BRADLEY, C. E.; HAAGENS MIT, A. J., The essential oil of *Bursera microphylla*. *Journal of the American Pharmaceutical Association-Scientific Edition*, v.40, n.11, p.591-592, 1951.

BRANCO, A.; PIZZOLATTI, M. G. CGAR e CGAR-EM na análise dos constituintes químicos isolados do extrato hexânico de *Sebastiania argutidens* (EUPHORBIACEAE). *Quimica Nova*, v.25, n.1, p.15-19, 2002.

BRAZ FILHO, R. Contribuição da fitoquímica para o desenvolvimento de um país emergente. *Quimica Nova*, v.33, n.1, p.229-239, 2010.

BUDZIKIEWICZ, H.; WILSON, J. M.; DJERASSI, C. Mass spectrometry in structural and stereochemical problems. XXXII. Pentacyclic triterpenes. *Journal of the American Chemical Society*, v.85, n. 22, p.3688-3699, 1963.

CARMAN, R. M.; COWLEY, D. E., Canaric Acid - a 3,4-Secotriterpene Acid from *Canarium muelleri*. *Tetrahedron Letters*, v.11, n.2, p.627-629, 1964.

CHASHOO, G.; SINGH, S. K.; SHARMA, P. R.; MONDHE, D. M.; HAMID, A.; SAXENA, A.; ANDOTRA, S. S.; SHAH, B. A.; QAZI, N. A.; TANEJA, S. C.; SAXENA, A. K. A propionyloxy derivative of 11-keto-beta-boswellic acid induces apoptosis in HL-60 cells mediated through topoisomerase I & II inhibition. *Chemico-Biological Interactions*, v.189, n.1-2, p.60-71, 2011.

CHEN, Q.; ZHANG, Y.; ZHANG, W.; CHEN, Z. Identification and quantification of oleanolic acid and ursolic acid in Chinese herbs by liquid chromatography-ion trap mass spectrometry. *Biomedical Chromatography*, v.25, p.1381-1388, 2011.

COSTA, A. F. *Farmacognosia*, V. 1. Lisboa: Fundação Calouste Gulbeukian, 1975.

de-la-CRUZ-CANINZARES, J.; DOMENECH-CARBO, M. T.; GIMENO-ADELANTADO, J. V.; MATEO-CASTRO, R.; BOSCH-REIG, F. Study of Burseraceae resins used in binding media and varnishes from artworks by gas chromatography-mass spectrometry and pyrolysis-gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, v.1093, n.1-2, p.177-194, 2005.

CROWLEY, K. J. Some terpenic constituents of *Bursera graveolens* var. *villosula* Cuatr. *Journal of the Chemical Society*, p.4254-4256, 1964.

DJERASSI, C.; BUDZIKIEWICZ, H.; WILSON, J. M. Mass spectrometry in structural and stereochemistry problems: unsaturated pentacyclic triterpenoids. *Tetrahedron Letters*, v.3, n.7, p.263-270, 1962.

DEKEBO, A.; DAGNE, E.; CURRY, P.; GAUTUN, O. R.; AASEN, A. J. Dammarane triterpenes from the resins of *Commiphora confusa*. *Bulletin of the Chemical Society of Ethiopia*, v.16, n.1, p.81-86, 2002a.

DEKEBO, A.; DAGNE, E.; HANSEN, L. K.; GAUTUN, O. R.; AASEN, A. J., Two octanordammarane triterpenes from *Commiphora kua*. *Phytochemistry*, v.59, n.4, p.399-403, 2002.

EKONG, D. E. U.; OKOGUN, J. I. West African timbers. XXIII. Triterpenoids of *Dacryodes edulis*. *Phytochemistry*, v.8, n.3, p.669-671, 1969.

ESTRADA, A. C.; SYROVETS, T.; PITTERLE, K.; LUNOV, O.; BUCHELE, B.; SCHIMANA-PFEIFER, J.; SCHMIDT, T.; MORAD, S. A. F.; SIMMET, T. Tirucallic acids are novel pleckstrin homology domain-dependent Akt inhibitors inducing apoptosis in prostate cancer cells. *Molecular Pharmacology*, v.77, n.3, p.378-387, 2010.

FATTORUSSO, E.; SANTACROCE, C.; XAASAN, C. F. Dammarane triterpenes from the resin of *Boswellia frererana*. *Phytochemistry*, v.24, n.5, p.1035-1036, 1985.

FERREIRA, L. V.; PRANCE, G. T. Ecosystem recovery in terra firme forests after cutting and burning: a comparison on species richness, floristic composition and forest structure in the Jau National Park, Amazonia. *Botanical Journal of the Linnean Society*, v.130, n.2, p.97-110, 1999.

FERREIRA, L. V.; PRANCE, G. T. Species richness and floristic composition in four hectares in the Jaú National Park in upland forests in Central Amazonia. *Biodiversity and Conservation*, v.7, n. 10, p.1349-1364, 1998.

FINE, P. V. A.; DALY, D. C.; MUÑOZ, G. V.; MESONES, I.; CAMERON, K. M. The contribution of edaphic heterogeneity to the evolution and diversity of Burseraceae trees in the western Amazon. *Evolution*, v.59, n.7, p.1464-1478, 2005.

FERREIRA, S.H.; BARATA, L.E.S.; SALLES FILHO, S.L.M.; DE QUEIROZ, S.R.R.; CORAZA, R.; FARIAS, R.C. *Medicamentos a partir de plantas medicinais no Brasil*. ABC, 1998.

GENTRY, A. H. *Woody Plants of Northwest South America (Colombia, Ecuador, Peru)*. Washington DC: Conservation International, 1993.

GILBERT, B., Produtos naturais industrializáveis da Amazônia. *Revista Fitos*, v.2, n.3, p.30-38, 2006.

GRAGG, G. M.; GROTHAUS, P. G.; NEWMAN, D. J. Impact of natural products on developing new anti-cancer agents. *Chemical Reviews*, v.109, n7, p.3012-3043, 2009.

GUANG-YI, L.; GRAY, A. I.; WATERMAN, P. G., Chemistry of the Burseraceae .9. Tirucallane and oleanane triterpenes from the resin of *Aucoumea klaineana*. *Phytochemistry* v.27, n.7, p.2283-2286, 1988.

GUIMARÃES, A. C.; SIANI, A. C. Triterpenos das folhas de *Protium strumosum*. *Revista Fitos*, v.3, n.1, p.67-76, 2007.

HAMM, S.; LESELLIER, E.; BLETON, J.; TCHAPLA, A. Optimization of headspace solid phase microextraction for gas chromatography/mass spectrometry analysis of widely different

volatility and polarity terpenoids in olibanum. *Journal of Chromatography A*, v.1018, n.1, p.73-83, 2003.

HATA, K.; HORI, K.; TAKAHASHI S. Differentiation- and apoptosis-inducing activities by pentacyclic triterpenes on a mouse melanoma cell line. *Journal of Natural Products*. v.65, n.5, p.645-648, 2002.

HOSTANSKA, K.; DAUM, G.; SALLER, R. Cytostatic and apoptosis-inducing activity of boswellic acids toward malignant cell lines in vitro. *Anticancer Research*, v.22, n.5, p.2853-2862, 2002.

IONESCU, F., JOLAD S.D., COLEe, J.R., ARORA, S.K., BATES R.B. Structure of benulin, a new pentacyclic triterpene hemiketal isolated from *Bursera arida* (Burseraceae). *Journal of Organic Chemistry*, v.42, n.9, p.1627-1629, 1977.

JOLAD, S.D., WIEDHOPF, R.M., AND COLE, J.R. Cytotoxic agents from *Bursera klugii* (Burseraceae) .1. Isolation of sapelins-A and B. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, v.66, n.6, p.889-890, 1977.

KAMDEM, R. S. T.; WAFO, P.; YOUSUF, S.; ALI, Z.; ADHIKARI, A.; RASHEED, S.; KHAN, I. A.; NGADJUI, B. T.; FUN, H. K.; CHOUDHARY, I. Canarene: A triterpenoid with a unique carbon skeleton from *Canarium schweinfurthii*. *Organic Letters*, v.13, n.20, p.5492-5495, 2011.

KANEDA, N., PEZZUTO, J.M., KINGHORN, A.D.; FARNSWORTH, N.R. Plant anticancer agents, L. Cytotoxic triterpenes from *Sandoricum koetjape* stems. *Journal of Natural Products*. v.55, n.5, p.654-659, 1992.

KARLINER, J.; DJERASSI, C. Terpenoids. LVII. Mass spectral and nuclear magnetic resonance studies of pentacyclic triterpene hydrocarbons. *Journal of Organic Chemistry*, v.31, n.6, p.1945-1956, 1966.

KHALID, S.A. Chemistry of the Burseraceae. In: Waterman P.G. and Grundon, M.G. Chemistry and chemical taxonomy of the Rutales. Academic Press, New York, p. 281-299, 1983.

KONTOGIANNI, V. G.; EXARCHOU, V.; TROGANIS, A.; GEROTHANASSIS, I. P. Rapid and novel discrimination and quantification of oleanolic and ursolic acids in complex plant extracts using two-dimensional nuclear magnetic resonance spectroscopy—Comparison with HPLC methods. *Analytica Chimica Acta*, v.635, n.2, p.188-195, 2009.

LEWINSONHN, T. M.; PRADO, P. I. *Biodiversidade Brasileira – Síntese do Estado Atual do Conhecimento*, 1ª. ed., Ed. Pinsky: São Paulo, 2002, cap. 1, p. 17-25. Apub: BARREIRO, E. J.; BOLZANI, V. S. Biodiversidade: fonte potencial para a descoberta de fármacos. *Quimica Nova*, v.32, n.3, p.679-688, 2009.

LIMA, F.V.; MALHEIROS, A.; OTUKI, M.F.; CALIXTO, J.B.; YUNES, R.A.; CECHINEL FILHO, V.; MONACHE, F.D. Three new triterpenes from the resinous bark of *Protium kleinii* and their antinociceptive activity. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, v.16, n.3B, p.578-582, 2005.

LIMA, M.P. Investigação fitoquímica e quimiosistemática de *Trattinickia burserifolia*, *T. rhoifolia*, *Crepidospermum rhoifolia*, *Dacryodes* sp. (BURSERACEAE) e *Spathelia excelsa* (RUTACEAE). Tese (Doutorado) – Programa de Pós Graduação em Química, Universidade Federal de São Carlos, 2000.

LIMA, M.P.; BRAGA, P.A.C.; MACEDO, M.L.; SILVA, M.F.G.F.; FERREIRA, A.G.; FERNANDES, J.B.; VIEIRA, P.C. Phytochemistry of *Trattinnickia burserifolia*, *T. rhoifolia*, and *Dacryodes hopkinsii*: chemosystematic implications. *Journal of Brazilian Chemical Society*, v.15, n.3, p.385-394, 2004.

LIMA, M.P., CASTRO, F.B.G., SILVA, M.F.G.F., FERREIRA, A.G., FO, E.R., FERNANDES, J.B. AND VIEIRA, P.C. Phytochemistry of *Crepidospermum rhoifolium*,

Tetragastris altissima, *Protium icicariba* and *P. apiculatum*: chemisystematics implications. *Revista Latinoamericana de Química*, v.29, n.3, p.135-144, 2001.

LOEMBA-NDEMBI, J.; SILOU, T. Study of the triterpene alcohols of the insaponifiable fraction of safou (*Dacryodes edulis*) pulp oil. *Journal de la Societe Ouest-Africaine de Chimie*, v.11, n.21, p.29-34, 2006.

MAHAJAN, B.; TANEJA, S. C.; SETHI, V. K.; DHAR, K. L. Two Triterpenoids from *Boswellia serrata* Gum Resin. *Phytochemistry*, v.39, n.2, p.453-455, 1995.

MAIA, R.M.; BARBOSA, P.R.; CRUZ, F.G.; ROQUE, N.F.; FASCIO, M. Triterpenos da resina de *Protium heptaphyllum* March (BURSERACEAE): caracterização em misturas binárias. *Química Nova*, v.23, n.5 p.623-626, 2000.

MANGURO, L. O. A.; OPIYO, S. A.; HERDTWECK, E.; LEMMEN, P. Triterpenes of *Commiphora holtziana* oleo-gum resin. *Canadian Journal of Chemistry*, v.87, n.8, p.1173-1179, 2009.

MARONGIU, B.; PIRAS, A.; PORCEDDA, S.; SCORCIAPINO, A. Chemical composition of the essential oil and supercritical CO₂ extract of *Commiphora myrrha* (Nees) Engl. and of *Acorus calamus* L. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.53, n.20, p.7939-7943, 2005.

MARQUES, D. D.; SARTORI, R. A.; LEMOS, T. L. G.; MACHADO, L. L.; SOUZA, J. S. N.; MONTE, F. J. Q. Chemical composition of the essential oils from two subspecies of *Protium heptaphyllum*. *Acta Amazônica*, v.40, n.1, p.227-230, 2010.

MINCIONE, E.; IAVARONE, C. Terpenes from *Commiphora myrra* from Arabia .1. *La Chimica & L'Industria*, v.54, n.5, p.424-&, 1972.

MONTANARI, C.A.; BOLZANI, V.S. Planejamento racional de fármacos baseado em produtos naturais. *Química Nova*, v.24, n.1, p.105-111, 2001.

MORA, A. J.; DELGADO, G.; DELGADO, G. D.; USUBILLAGA, A.; KHOURI, N.; BAHSAS, A., 3 α -hydroxytirucalla-7,24-dien-21-oic acid: a triterpene from *Protium crenatum* Sandwith. *Acta Crystallographica Section C-Crystal Structure Communications*, v.57, n.5, p.638-640, 2001.

MORIKAWA, T.; OOMINAMI, H.; MATSUDA, H.; YOSHIKAWA, M. Four new ursane-type triterpenes, olibanumols K, L, M, and N, from traditional egyptian medicine olibanum, the gum-resin of *Boswellia carterii*. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*, v.58, n.11, p.1541-1544, 2010.

MORIKAWA, T.; OOMINAMI, H.; MATSUDA, H.; YOSHIKAWA, M., New terpenoids, olibanumols D-G, from traditional Egyptian medicine olibanum, the gum-resin of *Boswellia carterii*. *Journal of Natural Medicines*, v.65, n.1, p.129-134, 2011.

MOSSMAN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunology Methods*, v.65, n.1-2, p.55-63, 1983.

MOTHANA, R. A.; LINDEQUIST, U.; GRUENERT, R.; BEDNARSKI, P. J. Studies of the in vitro anticancer, antimicrobial and antioxidant potentials of selected Yemeni medicinal plants from the island Soqatra. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, v.9, n.7, p.1-11, 2009.

MUFFLER, K.; LEIPOLD, D.; SCHLLER, M. C.; HASS, C.; STEINGROEWER, J.; BLEY, T.; NEUHAUS, E.; MIRATA, M. A.; SCHRADER, J.; ULBER, R. Biotransformation of triterpenes. *Process Biochemistry*, v.46, n.1, p.1-15, 2011.

NAKANISHI, T.; INATOMI, Y.; MURATA, H.; SHIGETA, K.; IIDA, N.; INADA, A.; MURATA, J.; FARRERA, M. A. P.; IINUMA, M.; TANAKA, T.; TAJIMA, S.; OKU, N. A new and known cytotoxic aryltetralin-type lignans from stems of *Bursera graveolens*. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*, v. 53, n.2, p.229-231, 2005.

NAKANO, K.; OOSE, Y.; MASUDA, Y.; HIKARI, K.; TAKAISHI, Y. Diterpenoid and triterpenes from tissue cultures of *Tripterygium wilfordii*. *Phytochemistry*, v.45, n.2, p.293-296, 1997.

NAKAGAWA, H., TAKAISHI, Y., FUJIMOTO, Y., DUQUE, C., GARZON, C., SATO, M., OKAMOTO, M., OSHIKAWA, T., Ahmed, S.U. Chemical constituents from the Colombian medicinal plant *Maytenus laevis*. *Journal of Natural Products*. v.67, p.1919-1924, 2004.

NES, W. D. Biosynthesis of cholesterol and other sterols. *Chemical Reviews*. v.111, n.11, p. 6423–6451, 2011.

NEWMAN, D. J.; GRAGG, G. M. Natural products as sources of new drugs over the last 25 years. *Journal of Natural Products*, v.70, n.3, p.461-477, 2007.

NEWMAN, D. J.; GRAGG, G. M.; SNADER, K. M. Natural products as sources of new drugs over the period 1981-2002. *Journal of Natural Products*, v.66, n.7, p.1022-1037, 2003.

OGUNKOIA, L. Application of mass spectrometry in structural problems in triterpenes. *Phytochemistry*, v.20, n1, p.121-126, 1981.

OLIVEIRA, J. C. S.; ROCHA, M. K. L.; SILVA, L. L. D.; CÂMARA, C. A. G. Identificação por RMN ^{13}C de triterpenos em mistura ternária dos frutos de *Protium bahianum* (Burseraceae). In *29ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química*, 2006.

PAPAGEORGIOU, V. P.; BAKOLA-CHRISTIANOPOULOU, M. N.; APAZIDOU, K. K.; PSARROS E. E. Gas chromatographic–mass spectroscopic analysis of the acidic triterpenic fraction of mastic gum. *Journal of Chromatography A*, v.769, n.2, p.263–273, 1997.

PARASKEVA, M. P.; VILJOEN, A. M.; VAN VUUREN, S. F.; VAN ZYL, R. L.; DAVIDS, H. The in vitro biological activity of selected South African *Commiphora* species. *Journal of Ethnopharmacology*, v.119, n.3, p.673-679, 2008.

PARDHY, R. S.; BHATTACHARYYA, S. C. β -Boswellic Acid, Acetyl- β -Boswellic Acid, Acetyl-11-Keto- β -Boswellic Acid and 11-Keto- β -Boswellic Acid, 4 Pentacyclic Triterpene Acids from Resin of *Boswellia serrata* Roxb. *Indian Journal of Chemistry Section B-Organic Chemistry Including Medicinal Chemistry*, v.16, n.3, p.176-178, 1978.

PARSONS, I.C.; GRAY, A.I.; LAVAUD, C.; MASSIOT, G.; WATERMAN, P.G. Secoring-a triterpene acids from the resin of *Dacryodes normandii*. *Phytochemistry*, v.30, n.4, p.1221-1223, 1991.

PAUL, M.; BRUENING, G.; BERGMANN, J.; JAUCH, J. A thin-layer chromatography method for the identification of three different olibanum resins (*Boswellia serrata*, *Boswellia papyrifera* and *Boswellia carterii*, respectively, *Boswellia sacra*). *Phytochemical Analysis*, v.23, n.2, p.184-189, 2012.

PERAZASANCHEZ, S. R.; SALAZARAGUILAR, N. E.; PENARODRIGUEZ, L. M., A New Triterpene from the Resin of *Bursera simaruba*. *Journal of Natural Products*, v.58, n.2, p.271-274, 1995.

PERNET, R. Phytochimie des Burseracees. *Journal of Natural Products (Lloydia)*, v.35, p.280-287, 1972.

PHOEBUS, P. H. The chemical composition of elemi. *Journal of Chemical Society*, v.29, p.614-615, 1876.

PINTO, A.C.; BRAGA, F.B.; REZENDE, C.M.; GARRIDO, F.M.S.; VEIGA JUNIOR, V.F.; BERGTER, L.; PATITUCCI, M.L.; ANTUNES, O.A.C.; Separation of Acid Diterpenes of *Copaifera cearensis* Huber ex Ducke by Flash Chromatography Using Potassium Hydroxide Impregnated Silica Gel. *Journal of Brazilian Chemical Society*. v.11, n.4, p.355-360, 2000.

PIO CORREA, M. *Dicionários de plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas*, volume 1. Brasília: Ministério da Agricultura, 1984.

PONTES, W. J. T.; OLIVEIRA, J. C. S.; CÂMARA, C. A. G.; LOPES, A. C. H. R.; GONDIM, M. G. C.; OLIVEIRA, J. V.; SCHWARTZ, M. O. E. Composition and acaricidal activity of the resin's essential oil of *Protium bahianum* Daly against two spotted spider mite (*Tetranychus urticae*). *Journal of Essential Oil Research*, v.19, n.4, p.379-383, 2007.

PROIETTI, G.; STRAPPAGHETTI, G.; CORSANO, S. Triterpenes of *Boswellia frereana*. *Planta Medica*, v.41, n.4, p.417-418, 1981.

PROVAN, G. J.; GRAY, A. I.; Waterman, P. G. Mansumbinane derivatives from stem bark of *Commiphora kua*. *Phytochemistry*, v.31, n.6, p.2065-2068, 1992.

PROVAN, G. J.; WATERMAN, P. G. Major triterpenes from the resins of *Commiphora incisa* and *C. kua* and their potential chemotaxonomic significance. *Phytochemistry*, v.27, n.12, p.3841-3843, 1988.

PROVAN, G. J.; WATERMAN, P. G., The Mansumbinanes: octanordammaranes from the resin of *Commiphora incisa*. *Phytochemistry*, v.25, n.4, p.917-922, 1986.

RAMOS, M. F. S.; GUIMARÃES, A. C.; SIANI, A. C., Volatile monoterpenes from the oleoresin of *Trattinnickia rhoifolia*. *Biochemical Systematics and Ecology*, v.31, n.3, p.309-311, 2003.

RAMOS, M. F. S.; SIANI, A. C.; TAPPIN, M. R. R.; GUIMARÃES, A. C.; RIBEIRO, J. E. L. D. Essential oils from oleoresins of *Protium* spp. of the Amazon region. *Flavour and Fragrance Journal*, v.15, n.6, p.383-387, 2000.

RIBEIRO, J.E.L.; DALY, D.C. Burseraceae. In: RIBEIRO, J.E.L. *et al.* *Flora da reserva Ducke: Guia de identificação das plantas vasculares de uma floresta de terra firme na Amazônia Central*. Manaus: INPA-DFID, 1999. p.534-543.

RIBEIRO, J. E. L.; HOPKINS, M. J. G.; VICENTINI, A.; SOTHERS, C. A.; COSTA, M. A. S.; BRITO, M. J.; SOUZA, M. A. D.; MARTINS, L. H. P.; LOHMANN, L. G.; ASSUNÇÃO, P. A. C. L.; PERREIRA, E. C.; SILVA, C. S.; 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*. Manaus: INPA-DFID, 1999.

ROBLES, J. R., TORRENEGRA, A. I., GRAY, C., PIÑEROS, L. ORTIZ, L.; SIERRA, M. Triterpenos aislados de corteza de *Bursera graveolens* (Burseraceae) y su actividad biológica, *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v.15, n.4, p.283-286, 2005.

da ROCHA, A. B.; LOPES, R. M.; SCHWARTSMANN, G. Natural products in anticancer therapy. *Current Opinion in Pharmacology*, v.1, n.4, p.364–369, 2001.

RÜDIGER, A. L. Estudo fitoquímico do Óleo-resina Exsudado de Espécies de Burseraceae. 203 p. Dissertação (Mestrado) – Química de Produtos Naturais, Universidade Federal do Amazonas, 2008.

RÜDIGER, A. L.; SIANI, A. C.; VEIGA JUNIOR, V. F. The chemistry and pharmacology of the South America genus *Protium* Burm. f. (Burseraceae). *Pharmacognosy Reviews*, v.1, n.1, p.93-104, 2007.

SCHULZ, F.; LECA, F.; HOLLMANN, F.; REETZ, M. T. Towards practical biocatalytic Baeyer-Villiger reactions: applying a thermostable enzyme in the gram-scale synthesis of optically active lactones in a two-liquid-phase system. *Beilstein Journal of Organic Chemistry*, v.1, n.10, p.1-9, 2005.

SEEBACHER, W.; SIMIC, N.; WEIS, R.; SAF, R.; KUNERT, O. Complete assignments of ^1H and ^{13}C NMR resonances of oleanolic acid, 18α -oleanolic acid, ursolic acid and their 11-oxo derivatives. *Magnetic Resonance in Chemistry*, v.41, n.8, p.636-638, 2003.

SEKI, H.; SAWAI, S.; OHYAMA, K.; MIZUTANI, M.; OHNISHI, T.; SUDO, H.; FUKUSHIMA, E. O.; AKASHI, T.; AOKI, T.; SAITO, K.; MURANAKA, T. Triterpene functional genomics in licorice for identification of CYP72A154 involved in the biosynthesis of glycyrrhizin. *The Plant Cell*, v.23, n.11, p.4112–4123, 2011.

SHIOJIMA, K.; ARAI, Y.; MATSUDA, K.; TAKASE, Y.; AGETA, T.; AGETA, H. Mass spectra of pentacyclic triterpenoids. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, v.40, n.7, p.1683-1690, 1992.

SHEN, T.; LOU, H. X. Bioactive constituents of myrrh and frankincense, two simultaneously prescribed gum resins in chinese traditional medicine. *Chemistry & Biodiversity*, v.5, n.4, p.540-553, 2008.

SHEN, T.; YUAN, H. Q.; WAN, W. Z.; WANG, X. L.; WANG, X. N.; JI, M.; LOU, H. X. Cycloartane-type triterpenoids from the resinous exudates of *Commiphora opobalsamum*. *Journal of Natural Products*, v.71, n.1, p.81-86, 2008.

SIANI, A. C.; GARRIDO, I. S.; MONTEIRO, S. S.; CARVALHO, E. S.; RAMOS, M. F. S. *Protium icicariba* as a source of volatile essences. *Biochemical Systematics and Ecology*, v.32, n.5, p.477-489, 2004.

SIANI, A. C.; RAMOS, M. F. S.; GUIMARÃES, A. C.; SUSUNAGA, G. S.; ZOGHBI, M. G. B. Volatile constituents from oleoresin of *Protium heptaphyllum* (Aubl.) March. . *Journal of Essential Oil Research*, v.11, n.1, p.72-74, 1999a.

SIANI, A.C.; RAMOS, M.F.S.; LIMA JUNIOR, O.M.; SANTOS, R.R.; FERREIRA, E.F.; SOARES, R.O.A.; ROSAS, E.C.; SUSUNAGA, G.S.; GUIMARÃES, G.S.; ZOGHBI, M.G.B.; HENRIQUES, M.G.M.O. Evaluation of anti-inflammatory-related of essential oil from the leaves and resin of species of *Protium*. *Journal of Ethnopharmacology*, v.66, n.1, p.57-69, 1999b.

SIANI, A. C.; NAKAMURA, M. J.; TAPPIN, M. R. R.; MONTEIRO, S. S.; GUIMARÃES, A. C.; RAMOS, M. F. S. Chemical composition of South American Burseraceae non-volatile oleoresins e preliminar solubility assessment of their comercial blend. *Phytochemical Analysis*, v.23, n.5, p.529-539, 2012.

SILVA, M.F.; LISBÔA, P.L.B.; LISBÔA, R.C.L. *Nomes vulgares de plantas*. Belém: INPA, 1977.

SILVA, J. R. D.; ZOGHBI, M. D. B.; PINTO, A. D.; GODOY, R. L. O.; AMARAL, A. C. F. Analysis of the hexane extracts from seven oleoresins of *Protium* species. *Journal of Essential Oil Research*, v.21, n.4, p.305-308, 2009.

da SILVA, M. F. G. F.; FRANCISCO, R. H. P.; GRAY, A. I.; LECHAT, J. R.; WATERMAN, P. G. Lanost-7-en triterpenes from stem bark of *Santiria trimera*. *Phytochemistry*, v.29, n.5, p.1629-1632, 1990.

SINGH, B.; KUMAR, R.; BHANDARI, S.; PATHANIA, S.; LAL, B., Volatile constituents of natural *Boswellia serrata* oleo-gum-resin and commercial samples. *Flavour and Fragrance Journal*, v.22, n.2, p.145-147, 2007.

SINGH, T.; BHAKUNI, R. S. A new euphane triterpene and a lipid constituent from the bark of *Boswellia serrata*. *Journal of the Indian Chemical Society*, v.83, n.6, p.588-590, 2006a.

SKEHAN, P., STORENG, R., SCUDIERO, D., MONKS, A., MCMAHON, J., VISTICA, D., WARREN, J. T., BODESCH, H., KENNEY, S., BOYD, M. R. New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer – drug screening. *Journal of National Cancer Institute*, v.82, n.13, p.1107-1112, 1990.

SOUZA, M. V. N.; PINHEIRO, A. C.; FERREIRA, M. L.; GONÇALVES, R. S. B.; LIMA, C. H. C. Produtos naturais em fase avançada de testes clínicos no tratamento contra o câncer. *Revista Fitos*, v.3, n.2, p.25-42, 2007.

STILL, W.C.; KAHN, M.; MITRA, A. Rapid Chromatographic Technique for Preparative Separations with Moderate Resolution. *Journal of Organic Chemistry*. V.43, n.14, p.2923-2925, 1978.

SUSUNAGA, G. S.; SIANI, A. C.; PIZZOLATTI, M. G.; YUNES, R. A.; DELLE-MONACHE, F. Triterpenes From Resin of *Protium heptaphyllum*. *Fitoterapia*, v.72, n.6, p.709-711, 2001.

SYAMASUNDAR, K. V., MALLAVARAPU, G. R., KRISHNA, E. M. Triterpenoids of the resin of *Bursera delpechiana*. *Phytochemistry*, v.30, n.1, p.362-363, 1991.

SYAMASUNDAR, K. V.; MALLAVARAPU, G. R. Two triterpenoid lactones from the resin of *Bursera delpechiana*. *Phytochemistry*, v.40, n.2, p.337-339, 1995.

SYLVESTRE, M.; LONGTIN, A. P. A.; LEGAULT, J. Volatile leaf constituents and anticancer activity of *Bursera simaruba* (L.) Sarg. essential oil. *Natural Product Communications*, v.2, n.12, p.1273-1276, 2007.

TANAKA, T.; KOYANO, T.; KOWITHAYAKOM, T.; FUJIMOTO, H.; OKUYAMA, E.; HAYASHI, M.; KOMIYAMA, K.; ISHIBASHI, M. New multiflorane-type triterpenoid acids from *Sandoricum indicum*. *Journal of Natural Products*, v.64, n.9, p. 1243-1245, 2001.

TAYLOR, P. G.; CESARI, I. M.; ARSENAK, M.; BALLEEN, D.; ABAD, M. J.; FERNANDEZ, A.; MILANO, B.; RUIZ, M. C.; WILLIAMS, B.; MICHELANGELI, F. Evaluation of Venezuelan medicinal plant extracts for antitumor and antiprotease activities. *Pharmaceutical Biology*, v.44, n.5, p.349-362, 2006.

TESSIER, A. M.; DELAVEAU, P.; PIFFAULT, N. Oléo-résine d` *Aucoumea klaineana* .1. triterpenes neutres et acides. *Planta Medica*, v.44, n.4, p.215-217, 1982.

THOMAS, A. F.; MULLER, J. M. Triterpene acids from *Commiphora glandulosa* Schinz. *Experientia*, v.16, n.2, p.62-64, 1960.

THOMAS, A. F. Triterpenes of *Commiphora* .2. Structures of commic acid C and commic acid D. *Tetrahedron*, v.15, n.1-4, p.212-216, 1961.

THOMAS, A. F.; HEUSLER, K.; MULLER, J. M. Triterpenes of *Commiphora* .3. Structure of commic acid E. *Tetrahedron*, v.16, n.1-4, p.264-270, 1961.

THOMAS, A. F.; WILLHALM, B. The triterpenes of *Commiphora* .4. Mass spectra and organic analysis .5. Mass spectroscopic studies and the structure of commic acid A and B. *Tetrahedron Letters*, v.43, n.4, p.3177-3183, 1964.

THULIN, M.; BEIER, B. A.; RAZAFIMANDIMBISON, S. G.; BANKS, H. I. *Ambilobea*, a new genus from Madagascar, the position of *Aucoumea*, and comments on the tribal classification of the frankincense and myrrh family (Burseraceae). *Nordic Journal of Botany*, v.26, n.3-4, p.218-229, 2008.

TSCHIRCH, A.; SAAL, O. Carana elemi from *Protium carana*. *Journal of Chemical Society*, v.241, p.149-159, 1903.

USUBILLAGA, A.; KHOURI, N.; BAHSAS, A.; ABAD, A.; ROJAS, L. B., Triterpenes from the resin of *Protium crenatum* Sandwith. *Revista Latinoamericana de Quimica*. v.32, n.2, p.101-108, 2004.

VAN DEN DOOL, H., KRATZ, P.D. A generalization of the retention index system including liner temperature programmed gas-liquid partition chromatography. *Journal of Chromatography*, v.11, p.463-471, 1963.

VEIGA JUNIOR, V. F.; RÜDIGER, A. L. Chemical Constituents and Pharmacology of the Neotropical Burseraceae. In: GUPTA, V. K.; TANEJA, S.C.; GUPTA, B.D. Comprehensive Bioactive Natural Products, Vol.6: Extraction, Isolation & Characterization. Studium Press LLC, p. 1-23, 2010.

VERPOORT, R. Exploration of nature's chemodiversity: the role of secondary metabolites as leads in drug development. *DDT*, v.3, n.5, p.232-238, 1998.

VIEIRA JUNIOR, G.M.; SOUZA, C.M.L.; CHAVES, M.H. Resina de *Protium heptaphyllum*: isolamento, caracterização e avaliação das propriedades térmicas. *Química Nova*, v.28, n.2, p.183-187, 2005.

VIEIRA JUNIOR, G. M.; CARVALHO, A. A.; GONZAGA, W. D.; CHAVES, M. H., Cromatografia em coluna com resina de almécega: um projeto para aula de química orgânica experimental. *Química Nova*, v.30, n.2, p.491-493, 2007.

WANG, Z.; GUHLING, O.; YAO, R.; LI, F.; YEATS, T, H.; ROSE, J. K. C.; JETTER, R. Two oxidosqualene cyclases responsible for biosynthesis of tomato fruit cuticular triterpenoids. *Plant Physiology*, v.155, n.1, p.540-552, 2011.

WATERMAN, P. G.; AMPOFO, S. Dammarane triterpenes from the stem bark of *Commiphora dalzielii*. *Phytochemistry*, v.24, n.12, p.2925-2928, 1985.

WEEKS, A.; DALY, D.C.; SYMPSON, B.B. The phylogenetic history and biogeography of the frankincense and myrrh family (Burseraceae) based on nuclear and chloroplast sequence data. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, v.35, n.1, p.85-101, 2005.

XIA, L. J.; CHEN, D.; HAN, R.; FAN, Q. C.; WAXMAN, S.; JING, Y. K. Boswellic acid acetate induces apoptosis through caspase-mediated pathways in myeloid leukemia cells. *Molecular Cancer Therapeutics*, v.4, n.3, p.381-388, 2005.

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

YANG, J. L.; SHI, Y. P. Cycloartane-type triterpenoids and sesquiterpenes from the resinous exudates of *Commiphora opobalsamum*. *Phytochemistry*, v.76, p.124-132, 2012.

YOUNG, D. G.; CHAO, S.; CASABIANCA, H.; BERTRAND, M. C.; MINGA, D. Essential oil of *Bursera graveolens* (Kunth) triana et planch from Ecuador. *Journal of Essential Oil Research*, v.19, n.6, p.525-526, 2007.

YOUSUF, S.; KAMDEM, R. S. T.; NGADJUI, B. T.; WAFO, P.; FUN, H. K., 3 α -Hydroxytirucalla-8,24-dien-21-oic acid. *Acta Crystallographica Section E – Structure Reports Online*, v.67, n.4, p.o937-o1082, 2011.

YUKAWA, C.; IWABUCHI, H.; KOMEMUSHI, S.; SAWABE, A. Eudesmane-type sesquiterpenoids in the volatile oil from *Bursera graveolens*. *Journal of Oleo Science*, v.53, n.7, p.343-348, 2004.

ANEXO

Tabela 21: Espectros de Massas por Impacto Eletrônico (70 eV) e os principais íons obtidos dos triterpenos identificados nos eextratos em hexano

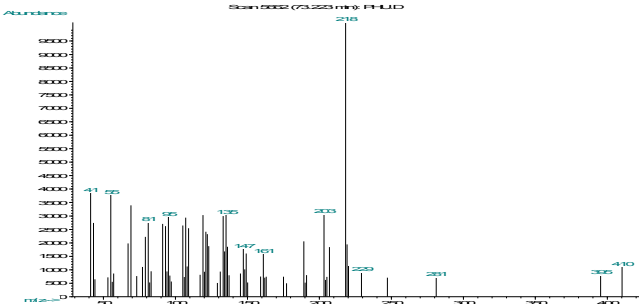
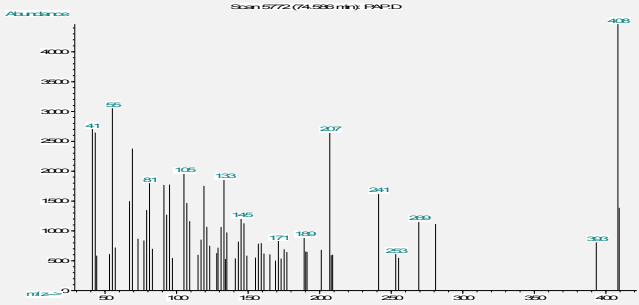
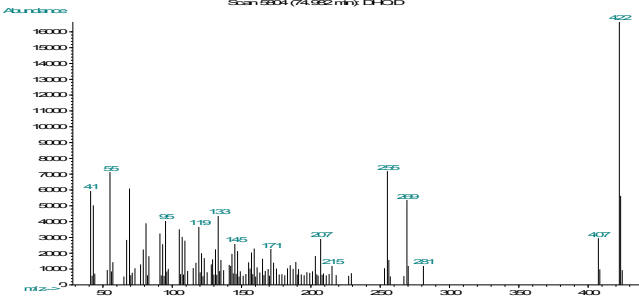
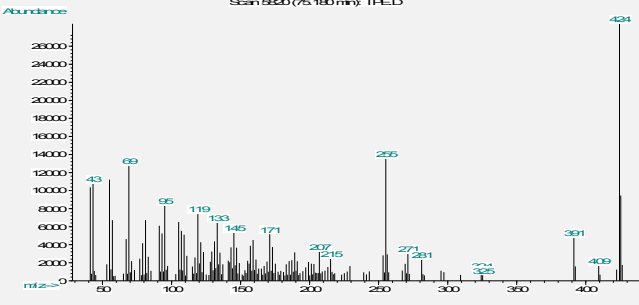
Substância (<i>Rt</i>)	Espectro Obtido	Principais Íons <i>m/z</i> (%)
ursa-12-eno (71,46 min)		410 [M] ⁺ (11), 395 (8), 281 (7), 247 (7), 229 (9), 218 (100), 203 (30), 189 (20), 175 (7), 161 (16), 147 (18), 135 (30), 133 (29), 119 (30), 107 (29), 95 (29)
$\Delta^{9(11):12}$ - urseno/oleaneno (72,56 min)		408 [M] ⁺ (100), 393 (18), 281 (25), 269 (26), 255 (12), 253 (14), 241 (36), 207 (59), 189 (20), 171 (19), 159 (18), 145 (27), 133 (42), 119 (39), 105 (44), 95 (40), 91 (40)
α - ou β -amiradienona (72,98 min)		422 [M] ⁺ (100), 407 (18), 281 (7), 269 (32), 255 (43), 229 (4), 215 (7), 207 (18), 189 (9), 171 (14), 159 (14), 145 (16), 133 (26), 119 (22), 105 (21), 95 (24), 81 (23)
β -amiradienol (73,17 min)		424 [M] ⁺ (100), 409 (6), 391 (17), 324 (4), 309 (2), 295 (4), 281 (8), 271 (10), 255 (47), 229 (6), 215 (9), 207 (11), 189 (11), 171 (18), 159 (16), 145 (19),

Tabela 21: Espectros de Massas por Impacto Eletrônico (70 eV) e os principais íons obtidos dos triterpenos identificados nos eextratos em hexano (CONTINUAÇÃO)

Substância (<i>Rt</i>)	Espectro Obtido	Principais Íons <i>m/z</i> (%)
α -amiradienol (73,50 min)		424 [M] ⁺ (100), 409 (8), 391 (6), 324 (4), 309 (2), 295 (7), 281 (4), 271 (15), 255 (44), 243 (4), 229 (4), 215 (7), 207 (6), 189 (8), 171 (14), 159 (12), 145 (14)
taraxerona (74,05 min)		424 [M] ⁺ (1), 410 (8), 395 (4), 281 (1), 271 (1), 243 (1), 204(100), 189 (46), 175 (20), 161 (9), 148 (10), 133 (13), 119 (16), 105 (20), 95 (19), 81 (21), 69 (21)
β -amirona (74,423)		424 [M] ⁺ (9); 218(100); 203(52); 189 (19)
taraxerol		426 [M] ⁺ (9), 410 (14), 395 (5), 392 (6), 377 (20), 307 (3), 281 (12), 257 (5), 218 (38), 204(100), 189 (41), 175 (29), 147 (24), 135 (29), 109 (45)
β -amirina (74,950)		426 [M] ⁺ (3); 411 (1); 218 (100); 203 (51); 189 (15)

Tabela 21: Espectros de Massas por Impacto Eletrônico (70 eV) e os principais íons obtidos dos triterpenos identificados nos eextratos em hexano (CONTINUAÇÃO)

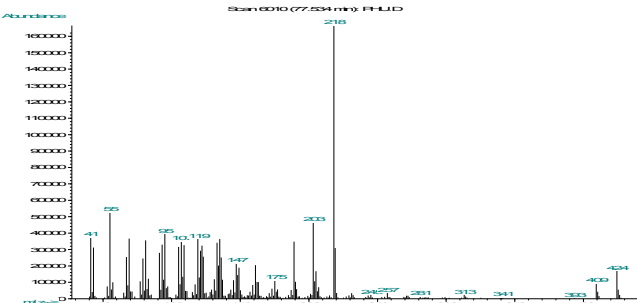
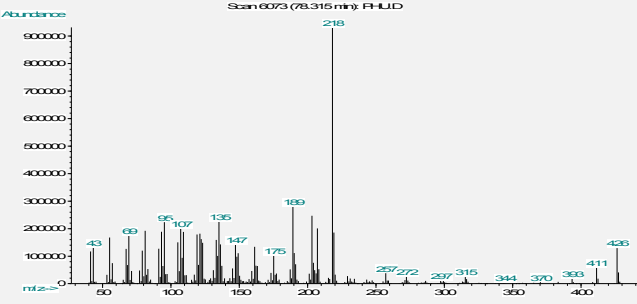
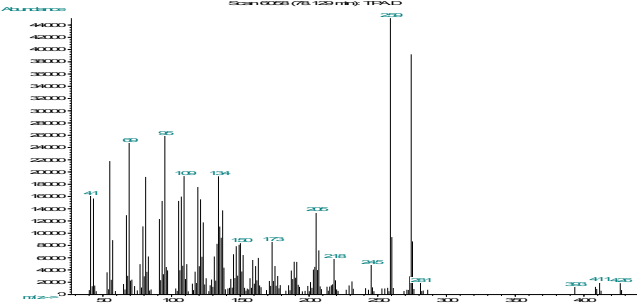
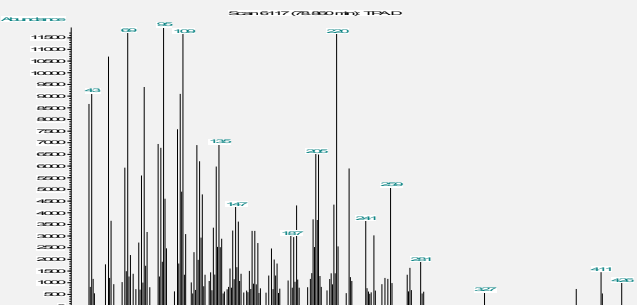
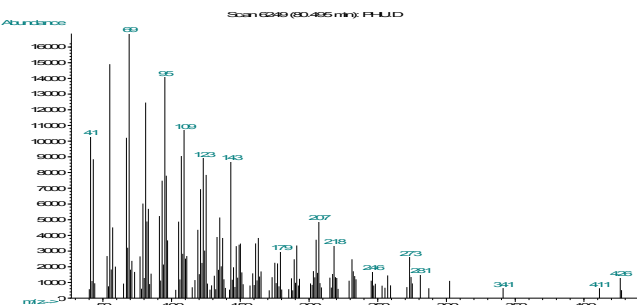
Substância (<i>R_t</i>)	Espectro Obtido	Principais Íons <i>m/z</i> (%)
α -amirona (75,198)		424 [M] ⁺ (10); 218 (100); 203 (27); 189 (18)
α -amirina (75,716)		426 [M] ⁺ (8); 411 (2); 218 (100); 203 (22); 189 (19)
glutinol (75,66 min)		426 [M] ⁺ (4), 411 (4), 393 (3), 281 (4), 274 (87), 259 (100), 245 (11), 218 (13), 205 (30), 173 (19), 150 (19), 134 (43), 109 (43), 95 (57), 81 (43), 69 (55), 55 (48), 43 (35)
multiflorenol (76,37 min)		426 [M] ⁺ (8), 411 (12), 327 (5), 281 (16), 259 (43), 241 (31), 229 (49), 220 (98), 205 (55), 203 (39), 147 (36), 135 (58), 109 (98), 95 (100), 79 (47), 69 (98), 55 (90)
friedelan-3-ol (76,82 min)		426 [M] ⁺ (8), 411 (4), 341 (4), 302 (7), 281 (9), 273 (16), 246 (10), 218 (20), 207 (29), 179 (18), 143 (52), 123 (53), 109 (64), 95 (84), 81 (74), 69 (100), 55 (88)

Tabela 21: Espectros de Massas por Impacto Eletrônico (70 eV) e os principais íons obtidos dos triterpenos identificados nos eextratos em hexano (CONTINUAÇÃO)

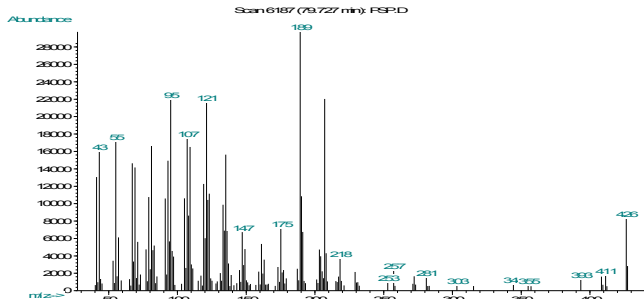
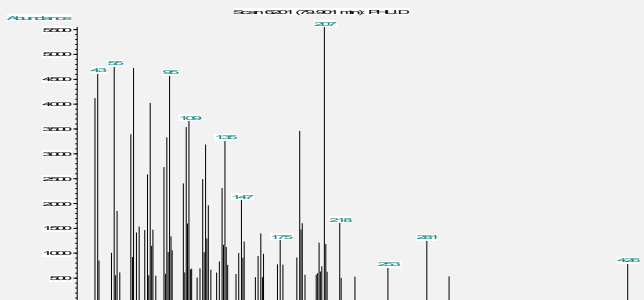
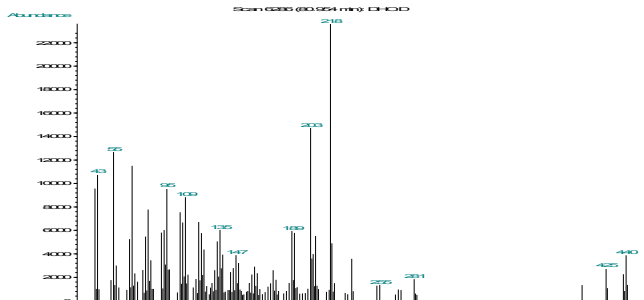
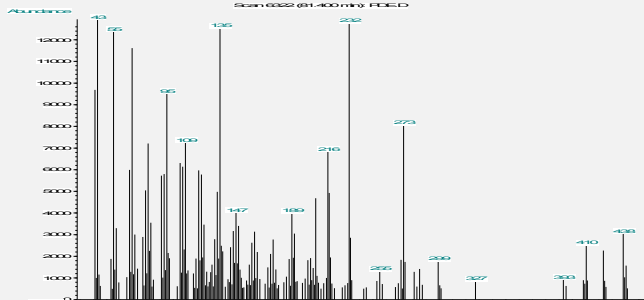
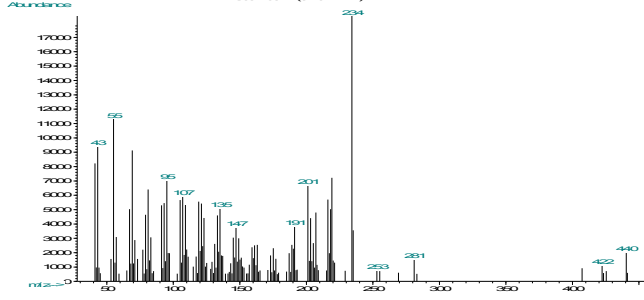
Substância (<i>R_t</i>)	Espectro Obtido	Principais Íons <i>m/z</i> (%)
lupeol (76,85 min)		426 [M] ⁺ (28), 411 (6), 408 (5), 393 (4), 355 (2), 344 (2), 281 (5), 257 (8), 218 (12), 207(74), 189 (100), 175 (24), 147 (23), 135 (53), 121 (73), 107 (59)
taraxasterol (77,15 min)		426 [M] ⁺ (14), 297 (10), 281 (23), 229 (9), 218 (29), 207(100), 189 (62), 175 (23), 147 (37), 135 (59), 121 (57), 109 (66), 95 (82), 81 (72), 69 (85), 55 (86), 43 (83)
3-oxo-23/24-hidroxi- ursa/oleana-12 eno (78,53 min)		440 [M] ⁺ (16), 425 (12), 407 (6), 281 (8), 255 (6), 234(15), 218 (100), 203 (62), 189 (25), 147 (16), 135 (26), 109 (37), 95 (41), 81 (33), 69 (49), 55 (54), 43 (46)
3-oxo-11- hidroxioleana-12-eno (78,54 min)		438 [M] ⁺ (24), 423(18), 410(20), 393 (7), 327 (7), 299 (14), 273 (63), 255(10), 232 (100), 216 (54), 189 (31), 135 (98), 109 (57), 95 (74), 81 (56)
3-oxo-16-hidroxi- olean-12-eno (78,47 min)		440 [M] ⁺ (10); 422 (6); 234 (100); 219 (34); 216 (30); 201 (34); 110 (10)

Tabela 21: Espectros de Massas por Impacto Eletrônico (70 eV) e os principais íons obtidos dos triterpenos identificados nos eextratos em hexano (CONTINUAÇÃO)

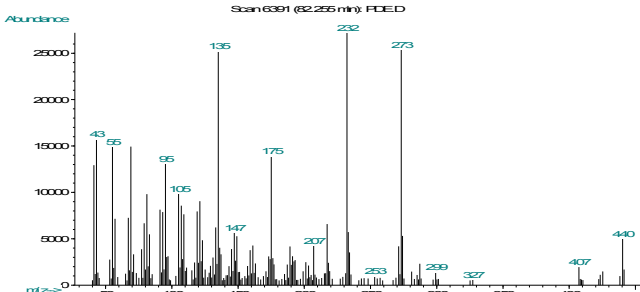
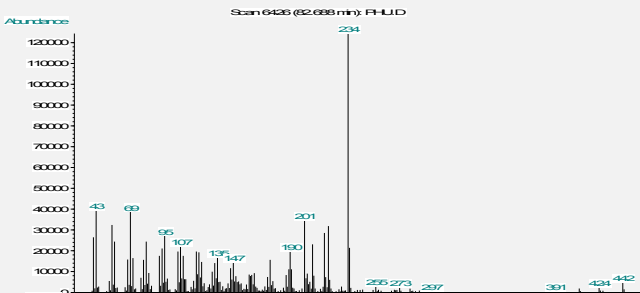
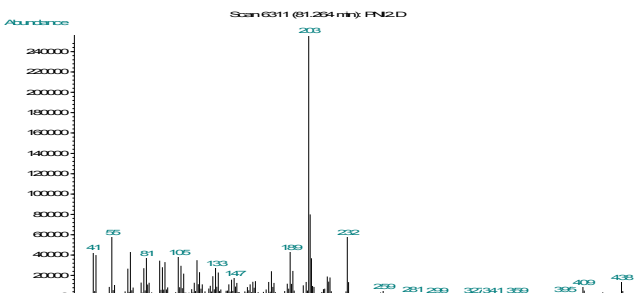
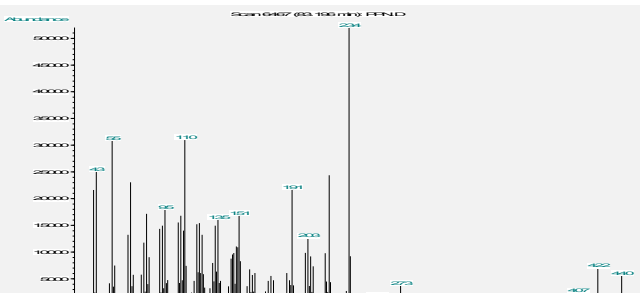
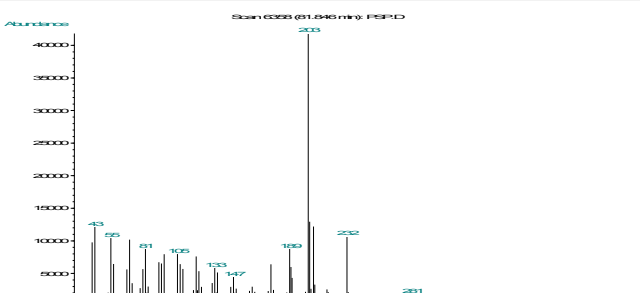
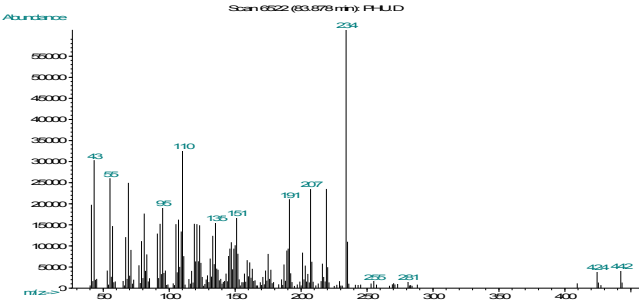
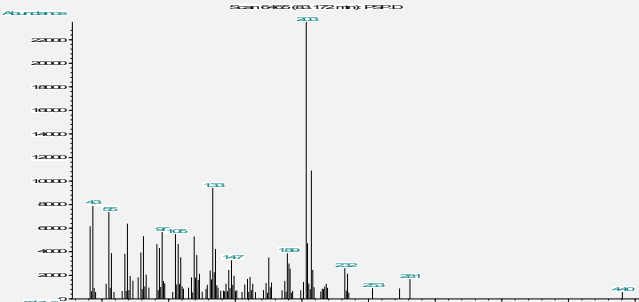
Substância (<i>R_t</i>)	Espectro Obtido	Principais Íons <i>m/z</i> (%)
3-oxo-11-hidroxiursa- 12-eno (78,90 min)		440 [M] ⁺ (19), 425 (5), 423 (4), 407 (7), 327 (2), 299 (5), 273 (93), 253 (4), 232 (100), 207 (16), 175 (51), 147 (21), 135 (93), 105 (36), 95 (48)
maniladiol (79,168)		442 [M] ⁺ (4); 424 (2); 234 (100); 219 (26); 190 (16); 110 (10)
3-oxo-ursa/oleana-12- eno-28-al (79,22 min)		438 [M] ⁺ (5), 409 (4), 395 (1), 359 (1), 341 (1), 299 (1), 281 (1), 232(23), 203 (100), 189 (17), 177 (5), 147 (7), 133 (11), 119 (14)
3-oxo-16-hidroxi-urs- 12-eno (79,41 min)		440 [M] ⁺ (10); 422 (14); 234 (100); 219 (48); 216 (19); 110 (64)
3-hidroxioleana-12- eno-28-al (79,68 min)		440 [M] ⁺ (2), 411 (1), 281 (4), 253 (2), 232 (26), 203 (100), 189 (21)

Tabela 21: Espectros de Massas por Impacto Eletrônico (70 eV) e os principais íons obtidos dos triterpenos identificados nos eextratos em hexano (CONTINUAÇÃO)

Substância (<i>Rt</i>)	Espectro Obtido	Principais Íons <i>m/z</i> (%)
breina (79,99 min)		442 [M] ⁺ (6); 424 (6); 234 (100); 219 (38); 191 (34); 110 (52)
3-hidroxiursa-12-eno-28-al (81,05 min)		440 [M] ⁺ (3), 281 (7), 273 (4), 253 (4), 232 (11), 203(100), 189 (16), 147 (14), 133 (40)