

Larissa Frankenberger

**TERPENOS DE OLEORESINA DE *Cola nitida* (Vent.) Schott & Endl. (MALVACEAE): CARACTERIZAÇÃO, SEMISSÍNTESE, AVALIAÇÃO ANTIPROTOZOÁRIA E ANTI-INFLAMATÓRIA  
*IN VITRO***

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Farmácia da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do Grau de Mestre em Farmácia, sob orientação do Prof. Dr. Louis Pergaud Sandjo e coorientação da Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Maique Weber Biavatti.

Florianópolis  
2017

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,  
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Frankenberger, Larissa  
Terpenos de oleoresina de Cola nitida (Vent.)  
Schott & Endl. (Malvaceae): caracterização,  
semissíntese, avaliação antiprotozoária e anti  
inflamatória in vitro / Larissa Frankenberger ;  
orientador, Louis Pergaud Sandjo, coorientador,  
Maique Weber Biavatti, 2017.  
136 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de  
Santa Catarina, Centro de Ciências da Saúde,  
Programa de Pós-Graduação em Farmácia, Florianópolis,  
2017.

Inclui referências.

1. Farmácia. 2. Farmacognosia. 3. Cola nitida.  
4. Semissíntese. 5. Atividade biológica. I. Sandjo,  
Louis Pergaud. II. Biavatti, Maique Weber. III.  
Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de  
Pós-Graduação em Farmácia. IV. Título.

**“TERPENOS DE RESINA DE Cola nitida (Vent.)  
Schott & Endl. (MALVACEAE):  
CARACTERIZAÇÃO, SEMISSÍNTESE,  
AVALIAÇÃO ANTIPROTOZOÁRIA E ANTI-  
INFLAMATÓRIA in vitro”**

**POR**

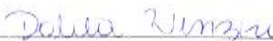
**Larissa Frankenberger**

Dissertação julgada e aprovada em  
sua forma final pelo(a)  
Orientador(a) e membros da  
Banca Examinadora, composta  
pelos Professores Doutores;

**Banca Examinadora:**



Prof(a). Dr(a). Flávio Henrique Reginatto (UFSC – Membro  
Titular)



Prof(a). Dr(a). Dalila Venzke (UFSC – Membro Titular)



Prof(a). Dr(a). Louis Pergand Sandjo (UFSC – Orientador(a))



Prof(a). Dra. Tânia Beatriz Creczynski Pasa  
Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Farmácia da  
UFSC

Florianópolis, 01 de dezembro de 2017.



*Conrado Frankenberger (in  
memoriam), Maria de Lourdes  
Frankenberger e Allan Falchetti  
Magri,*  
Dedico este trabalho a vocês.



## AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador Prof. Dr. Louis Pergaud Sandjo e à minha coorientadora Prof.<sup>a</sup> Dra. Maique Weber Biavatti que acreditaram em mim e prestaram todo o suporte necessário para a realização deste trabalho, além de toda a dedicação e amizade.

À UFSC, ao Programa de Pós-graduação em Farmácia e a todos os professores por dividir tantos conhecimentos e vivências neste período.

À prof.<sup>a</sup> Dra. Miriam de Barcellos Falkenberg, que proporcionou a primeira chance de freqüentar uma disciplina como aluna ouvinte.

À minha família científica e amigos Larissa G., Layzon, Luiz, Tauana, Amanda, Erlon; obrigada pelo carinho, torcida, companhia e aprendizado.

Ao especialista químico Rodrigo Favoretto, pela grande contribuição em informações sobre operações em CG/EM;

Ao prof. Dr. Mario Steindel e Dr.<sup>a</sup>. Milene H. de Moraes do Laboratório de Protozoologia da UFSC pela colaboração nos ensaios antiparasitários.

À prof.<sup>a</sup>. Dr.<sup>a</sup> Fabíola Branco Fillipin Monteiro, Tamara D. Mora e Carolina D. de Siqueira do Laboratório Grupo de Estudos de Interações entre Micro e Macromoléculas da UFSC pela colaboração nos ensaios de viabilidade celular, citotoxicidade e atividade anti-inflamatória.

À equipe do laboratório de Controle de Qualidade da UFSC por permitir realizar as análises de infravermelho.

Ao meu amado Allan, que torceu, incentivou, entendeu quando precisei de tempo para me dedicar a este trabalho e me apoiou na decisão de afastar-me da área magistral.

À minha família, principalmente aos meus pais Lurdes e Conrado (*in memoriam*), Clarice, Sarinha, Jader, meus sogros Sr. Euclides e D. Marlene, aos meus cunhados Sara e Talles, e amigos que apoiaram e torceram incansavelmente por mim.

À Deus, por me dar equilíbrio e ser o meu porto-seguro.





“Quando uma criatura humana desperta para um grande sonho e sobre ele lança toda a força de sua alma, todo o universo conspira a seu favor”.

Johann Wolfgang Von Goethe



## RESUMO

O continente africano, comparado ao Brasil, é rico em diversidade vegetal, onde a espécie *Cola nitida* está presente. A oleoresina extraída do tronco da árvore de *C. nitida* é pouco estudada, por isso o interesse em investigar a sua composição fitoquímica e atividade biológica como em inflamação e em doenças parasitárias. A oleoresina bruta de *C. nitida* foi submetida a uma separação sólido-líquido utilizando DCM-MeOH (1: 1, v / v), originando o extrato resinoso concentrado (ER), que foi novamente fracionado por técnicas cromatográficas, originando as frações Hex, DCM, EtOAc e MeOH. A composição química destas frações foram obtidas utilizando cromatografia de ultra eficiência acoplada à espectrometria de massas e foram investigadas em atividade anti-inflamatória sobre Óxido nítrico (NO) e Fator de necrose tumoral- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) liberadas por macrófagos tipo J774 ativados por lipopolissacarídeos (LPS) e em atividade antiparasitária contra forma amastigota intracelular de *L. amazonensis* e *T. cruzi*. A fração não-volátil, composta exclusivamente por triterpenos pentacíclicos do tipo oleanano e ursano tem 5.25 % de  $\alpha$ -amirina ( $\alpha$ AM), a qual foi utilizada como material de partida para reações semissintéticas de oxidação, com o objetivo de originar esqueletos similares aos identificados nas frações e compará-los perante atividade antiprotozoária *in vitro*. As quatro frações demonstraram atividade inibitória sobre NO e TNF- $\alpha$ . No entanto, somente as frações Hex, AcOEt e MeOH exibiram potente atividade antiparasitária, sendo que os produtos semissintéticos exibiram atividade menor, provavelmente devido à presença de 3-hidroxi-urs-12.15-dieno, predominante nestas frações. Através da hidrodestilação em aparelho de Clevenger foi possível extrair 10 % de óleo essencial a partir do ER, o qual foi submetido a uma caracterização preliminar onde foram identificados 8 monoterpenos, sendo  $\alpha$ -felandreno and *o*-cimeno os compostos majoritários. Estes resultados sugerem que a resina de *C. nitida* pode ser um material vegetal com potencial para o desenvolvimento de medicamentos anti-inflamatórios e antiparasitários.

**Palavras-chave:** *Cola nitida*. CLUE-EM. CG-EM. Terpenos. Semissíntese. Atividade antiparasitária. Atividade anti-inflamatória.



## ABSTRACT

The African countries compared to Brazil, are rich in plant biodiversity, where the *Cola nitida* is present. The oleoresin extracted from the trunk of the *C. nitida* tree is poorly studied, so the interest arose in investigating its phytochemical composition and biological activities in inflammation and parasitic diseases. The crude oleoresin of *C. nitida* was subjected to a solid-liquid separation using DCM-MeOH (1: 1, v / v), affording a resinous extract (RE), which was further fractionated by chromatographic techniques, giving the fractions Hex, DCM, EtOAc and MeOH. The chemical compositions of these fractions were established by using ultra performant liquid chromatography coupled to mass spectrometry and were investigated for their anti-inflammatory activities on NO and TNF- $\alpha$  released by LPS-activated J774 macrophage and antiparasitic activity against the intracellular amastigote forms of *L. amazonensis* and *T. cruzi*. The non-volatile fraction, composed exclusively of pentacyclic triterpenes oleanane and ursane types, has 5.25 %  $\alpha$ -amyrin ( $\alpha$ AM), which was used as a starting material for semi-synthetic reactions including different oxidation reactions, in order to give skeletons similar to those identified in the fractions and to compare their antiprotozoal activities in vitro. The four fractions demonstrated inhibitory activity in NO and TNF- $\alpha$ . However, only the Hex, AcOEt and MeOH fractions exhibited potent antiparasitic activities, unlike semi-synthetic products, which exhibited less activity, probably due to the presence of the 3-Hydroxy-urs-12,15-diene, predominant in these fractions. The hydrodistillation with Clevenger apparatus it was possible to extract 10% of essential oil from the RE, which was subjected to a preliminary characterization, where 8 monoterpenes were identified, with  $\alpha$ -phelandrene and o-cymene being the major compounds. These results suggest that *C. nitida* resin may be a plant material with potential for the development of anti-inflammatory and antiparasitic drugs.

**Key words:** *Cola nitida*. UPLC-MS. GC-MS. Terpenes. Semi-synthesis. Antiparasitic activities. Anti-inflammatory activity.



## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Comparativo entre frutos e noz (sementes) de <i>C. nitida</i> e <i>C. acuminata</i> .....	36
<b>Figura 2.</b> Principais grupos de triterpenos pentacíclicos .....	39
<b>Figura 3.</b> Possíveis alvos para modificação estrutural .....	45
<b>Figura 4.</b> Cromatografia em camada delgada do extrato resinoso e das frações obtidas por cromatografia líquida a vácuo.....	51
<b>Figura 5.</b> Cromatografia em camada delgada - bandas identificadas na fração Hex (método de isolamento 1) após revelação com solução ácida de anisaldeído/aquecimento. ....	54
<b>Figura 6.</b> Cromatografia em camada delgada comparativa. ....	55
<b>Figura 7.</b> Ensaio colorimétrico: reação de Liebermann-Buchard.....	67
<b>Figura 8.</b> CCD do ER (1) e padrões de lupeol (2), taraxerol (3) e $\alpha$ -amirina (4). Fase móvel: Hex/AcOEt (95:5, v/v); revelador: solução ácida de anisaldeído e aquecimento. ....	68
<b>Figura 9.</b> Estruturas dos triterpenos referentes à Figura 8.....	68
<b>Figura 10.</b> Cromatogramas de picos base obtidos por ESI (+) da fração de hexano (1), DCM (2), AcOEt (3) e MeOH (4), conforme descrito no item 4.4.3 .....	70
<b>Figura 11.</b> Mecanismo de fragmentação da substância com TR de 4,53 min; $m/z$ 515,3730 identificado nas frações AcOEt e MeOH. ....	79
<b>Figura 12.</b> Diferença estrutural entre rubiprasina C e ácido 3-O-acetil pomólico .....	79
<b>Figura 13.</b> Mecanismo de fragmentação da substância com TR de 5,67 min; $m/z$ 425,3792 identificada nas frações AcOEt e MeOH.....	80
<b>Figura 14.</b> Diferença estrutural entre anidrosoporadiol e 3-hidroxi-urs-12,15-dieno. ....	81
<b>Figura 15.</b> Mecanismo de fragmentação da substância com TR de 6,66 min; $m/z$ 909,6972, identificada nas frações DCM, AcOEt e MeOH. ....	82
<b>Figura 16.</b> Diferença estrutural entre ácido 3 $\beta$ -hidroxiurs-12,18(30)-dien-28-óico (ácido micromérico) ou ácido 3 $\beta$ -hidroxiurs-12,19(29)-dien-28-óico. ....	83
<b>Figura 17.</b> Mecanismo de fragmentação da substância com TR de 6,84 min; $m/z$ 457,3659, identificada nas frações AcOEt e MeOH.....	84
<b>Figura 18.</b> Diferença estrutural entre ácido oleanólico e ácido ursólico. ....	85
<b>Figura 19.</b> Mecanismo de fragmentação da substância com TR de 6,92 min; $m/z$ 443,3867, identificada nas frações AcOEt e MeOH.....	86

<b>Figura 20.</b> Mecanismo de fragmentação da substância com TR de 7,14 min; $m/z$ 427,3936, identificada nas frações AcOEt e MeOH. ....	87
<b>Figura 21.</b> Diferença estrutural entre $\alpha$ - e $\beta$ -amirina.....	88
<b>Figura 22.</b> Mecanismo de fragmentação da substância com TR de 7,39 min; $m/z$ 441,3737, identificada na fração AcOEt. ....	89
<b>Figura 23.</b> Mecanismo de fragmentação da substância com TR de 8,02 min; $m/z$ 499,3797, identificada nas frações Hex, DCM e AcOEt..	91
<b>Figura 24.</b> Diferença estrutural entre ácido 3- $\beta$ -O-acetil-oleanólico e ácido 3- $\beta$ -O-acetil-ursólico. ....	92
<b>Figura 25.</b> Mecanismo de fragmentação da substância com TR de 8,27 min; $m/z$ 467,3878, identificada nas frações Hex, DCM e AcOEt..	93
<b>Figura 26.</b> Diferença estrutural entre acetato de ursa-12,20(30)-dien-3 $\alpha$ -il ou acetato de urs-12,19(29)-dien-3 $\beta$ -il. ....	94
<b>Figura 27.</b> Mecanismo de fragmentação da substância com TR de 8,68 min; $m/z$ 423,3612, identificada na fração AcOEt. ....	95
<b>Figura 28.</b> Diferença estrutural entre olean-9(11),12-dien-3-ona e ursa-9(11),12-dien-3-ona. ....	96
<b>Figura 29.</b> Mecanismo de fragmentação da substância com TR de 12,60 min; $m/z$ 409,3820, identificada nas frações Hex, AcOEt e MeOH.	97
<b>Figura 30.</b> Espectro de Infravermelho da substância para a substância $\alpha$ -amirina ( $\alpha$ Am, composto 1) obtida através do método de isolamento descrito no item 4.5.....	99
<b>Figura 31.</b> Espectro de RMN $^1\text{H}$ (300 MHz, $\text{CDCl}_3$ , TMS) para a substância $\alpha$ -amirina ( $\alpha$ Am, composto 1) obtida através do método de isolamento descrito no item 4.5.....	99
<b>Figura 32.</b> Espectro de RMN $^{13}\text{C}$ (75 MHz, $\text{CDCl}_3$ , TMS) para a substância $\alpha$ -amirina (composto 1) obtida através do método de isolamento descrito no item 4.4. ....	100
<b>Figura 33.</b> Reação de obtenção do composto 2 conforme método descrito no item 4.6.1.....	103
<b>Figura 34.</b> Espectro de infravermelho da substância $\alpha$ -amirona (composto 2) obtida através da reação descrita no item 4.6.1.....	103
<b>Figura 35.</b> Espectro de RMN $^{13}\text{C}$ (75 MHz, $\text{CDCl}_3$ , TMS) para a substância $\alpha$ -amirona ( <b>composto 2</b> ) obtida através da reação descrita no item 4.5.1.....	104
<b>Figura 36.</b> Reação de obtenção do composto 3.....	106
<b>Figura 37.</b> Espectro de infravermelho do composto 3 obtido através da reação descrita no item 4.5.2.....	107
<b>Figura 38.</b> Espectro de RMN $^{13}\text{C}$ (75 MHz, $\text{CDCl}_3$ , TMS) do composto 3. ....	108
<b>Figura 39.</b> Reação de obtenção do composto 4.....	109



<b>Figura 40.</b> Espectro de Infravermelho do composto 4 obtido através da reação descrita no item 4.5.3 .....	110
<b>Figura 41.</b> Espectro de RMN <sup>13</sup> C (CDCl <sub>3</sub> , TMS, 75 MHz) do composto 4. ....	111
<b>Figura 42.</b> Liberação de citocinas em macrófagos ativados; (A) determinação de NO; (B) determinação de TNF- $\alpha$ . ....	113
<b>Figura 43.</b> Estruturas identificadas na fração volátil de <i>C. nitida</i> . ....	116
<b>Figura 44.</b> Cromatograma de picos base obtido por IE da fração volátil de <i>C. nitida</i> ; analisada conforme as condições descritas no item 4.6 .....	116
<b>Figura 45.</b> Cromatograma expandido (7,60 min a 9,86 min) de picos base obtido por IE da fração volátil de <i>C. nitida</i> analisada conforme as condições descritas no item 4.7 .....	117



## LISTA DE FLUXOGRAMAS

<b>Fluxograma 1.</b>	Obtenção do extrato resinoso de <i>C. nitida</i> . .....	50
<b>Fluxograma 2.</b>	Cromatografia líquida a vácuo (CLV) do extrato resinoso e análise fitoquímica. ....	52
<b>Fluxograma 3.</b>	Isolamento e identificação de $\alpha$ AM .....	57
<b>Fluxograma 4.</b>	Método de extração e análise da fração volátil do extrato resinoso de <i>C.nitida</i> . ....	60



## LISTA DE QUADROS

<b>Quadro 1.</b>	Classificação taxonômica .....	34
<b>Quadro 2.</b>	Caracterização de triterpenos.....	39
<b>Quadro 3.</b>	Classificação da leishmaniose .....	41
<b>Quadro 4.</b>	Possíveis alvos-moleculares para modificação .....	45



## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> - Substâncias identificadas nas frações de Hexano (HEX), Diclorometano (DCM), Acetato de etila (AcOEt) e Metanol (MeOH) por CLUE-EM/EM (ESI (+) , modo positivo, tempo de retenção 4,53 min, 5,67 min e 6,33 min. ....	71
<b>Tabela 2</b> - Substâncias identificadas nas frações de Hexano (HEX), Diclorometano (DCM), Acetato de etila (AcOEt) e Metanol (MeOH) por CLUE-EM/EM (ESI (+) , modo positivo, tempo de retenção 6,51 min, 6,66 min e 6,84 min. ....	72
<b>Tabela 3</b> - Substâncias identificadas nas frações de Hexano (HEX), Diclorometano (DCM), Acetato de etila (AcOEt) e Metanol (MeOH) por CLUE-EM/EM (ESI (+) , modo positivo, tempo de retenção 6,92 min, 7,14 min, 7,39 min e 7,47 min. ....	73
<b>Tabela 4</b> - Substâncias identificadas nas frações de Hexano (HEX), Diclorometano (DCM), Acetato de etila (AcOEt) e Metanol (MeOH) por CLUE-EM/EM (ESI (+) , modo positivo, tempo de retenção 7,65 min, 7,72 min, 7,94 min e 8,02 min. ....	74
<b>Tabela 5</b> - Substâncias identificadas nas frações de Hexano (HEX), Diclorometano (DCM), Acetato de etila (AcOEt) e Metanol (MeOH) por CLUE-EM/EM (ESI (+) , modo positivo, tempo de retenção 8,27 min, 8,38 min, 8,57 min e 8,68 min . ....	75
<b>Tabela 6</b> - Substâncias identificadas nas frações de Hexano (HEX), Diclorometano (DCM), Acetato de etila (AcOEt) e Metanol (MeOH) por CLUE-EM/EM (ESI (+) , modo positivo, tempo de retenção 8,93 min, 9,48 min e 12,60 min, . ....	76
<b>Tabela 7</b> - Substâncias identificadas nas frações de Hexano (HEX), Diclorometano (DCM), Acetato de etila (AcOEt) e Metanol (MeOH) por CLUE-EM/EM (ESI (+) , modo positivo, tempo de retenção 13,19 min e 13,78 min.....	77
<b>Tabela 8</b> - Comparação entre os métodos de extração realizados.....	98
<b>Tabela 9</b> - Dados de RMN <sup>1</sup> H para a substância $\alpha$ -amirina ( $\alpha$ Am, composto 1) obtida através do método de isolamento descrito no item 4.4 e dados comparativos da literatura. ....	100
<b>Tabela 10</b> - Dados de RMN <sup>13</sup> C para a substância $\alpha$ -amirina ( $\alpha$ Am, composto 1) obtida através do método de isolamento descrito no item 4.4 e dados comparativos da literatura. ....	101
<b>Tabela 11</b> - Reações de oxidação realizadas.....	102
<b>Tabela 12</b> - Dados de RMN <sup>13</sup> C (75 MHz, TMS, CDCl <sub>3</sub> ) da substância $\alpha$ -amirona (composto 2) comparados aos dados da literatura. ....	105

<b>Tabela 13</b> - Dados RMN $^{13}\text{C}$ (75 MHz, TMS, $\text{CDCl}_3$ ) do composto 3 comparados com dados da literatura.....	108
<b>Tabela 14</b> - Dados RMN $^{13}\text{C}$ (75 MHz, TMS, $\text{CDCl}_3$ ) do composto 4 comparados com dados da literatura.....	111
<b>Tabela 15</b> - Citotoxicidade em cultura celular de macrófagos linhagem murina J774* das frações isoladas do extrato resinoso de <i>C. nitida</i> . ....	112
<b>Tabela 16</b> - Atividade tripanocida das frações isoladas da resina bruta de <i>C. nitida</i> sobre o crescimento de forma amastigota intracelular <i>T. cruzi</i> . .....	114
<b>Tabela 17</b> - Atividade leishmanicida das frações isoladas da resina bruta de <i>C. nitida</i> sobre o crescimento de forma amastigota intracelular <i>L. amazonensis</i> . .....	114
<b>Tabela 18</b> - Substâncias identificadas na fração volátil da resina bruta de <i>Cola nitida</i> conforme as condições descritas no item 4.6. ....	116



## LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS, FÓRMULAS E UNIDADES

ACN	Acetonitrila
AcOEt	Acetato de etila
AcOH	Ácido acético
$\alpha$ AM	$\alpha$ -amirina
atm	Atmosfera
$\beta$ AM	$\beta$ -amirina
Cat.	Catalisador
CHCl <sub>3</sub>	Clorofórmio
CDCl <sub>3</sub>	Clorofórmio deuterado
CCD	Cromatografia em Camada Delgada
CG-EM	Cromatografia a gás acoplada ao espectrômetro de massas
CLUE-EM;	Cromatografia líquida de ultra eficiência acoplada ao espectrômetro de massas
CLV	Cromatografia Líquida a Vácuo
d	Dupleto
DCM	Diclorometano
dd	Dupleto de dupleto
EM	Espectrometria de massas
eq.	equivalentes
ER	Extrato resinoso concentrado
ESI	Ionização por eletronebulização (do inglês, Electrospray Ionization)
EtOH	Etanol
F.E.	Fase estacionária
F.M.	Fase móvel
°C	Grau Celsius
t	Tempo de reação em horas
IC <sub>50</sub>	Concentração inibitória para 50% dos parasitos
IE	Ionização eletrônica
IS	Índice de seletividade
IV	Espectroscopia de infravermelho
J	Constante de acoplamento (expresso em Hertz, Hz)
KClO <sub>3</sub>	Clorato de potássio
KMnO <sub>4</sub>	Permanganato de potássio
MeOH	Metanol
Mmol	Milimol
<i>m/z</i>	Razão massa/carga

µm	Micrômetros
NIST	do inglês, National Institute of Standards and Technology
nm	Nanômetros
PCC	Clorocromato de piridíno
P.E.	Ponto de ebulição
pH	Potencial hidrogeniônico
ppm	Partes por milhão
Rf	Fator de Retenção (do inglês, Retention factor)
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
RMN <sup>13</sup> C	Ressonância Magnética Nuclear de Carbono
RMN <sup>1</sup> H	Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio
rpm	Rotações por minuto
s	Simpleto
t.a.	Temperatura ambiente
TMS	Tetrametilsilano
TR	Tempo de retenção
UV	Ultravioleta
UV-Vis	Visível em ultravioleta

## SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	31
2	REVISÃO DA LITERATURA .....	33
2.1	A FAMÍLIA MALVACEAE.....	33
2.2	<i>Cola nitida</i> (Vent.) Schott & Endl. (MALVACEAE) .....	33
2.2.1	Aspectos botânicos de <i>Cola nitida</i> .....	33
2.2.2	Aspectos fitoquímicos e biológicos .....	36
2.3	Triterpenos pentacíclicos .....	38
2.3.1	Aspectos farmacológicos .....	38
2.3.1.1	Atividade leishmanicida .....	40
2.3.1.2	Atividade tripanocida.....	41
2.3.2	Atividade anti-inflamatória.....	42
2.3.3	Aspectos analíticos .....	43
2.3.4	Aspectos de modificação estrutural .....	44
2.3.4.1	Escolha da estrutura.....	44
2.3.4.2	Oxidação de alcoóis.....	45
3	OBJETIVOS .....	47
3.1	OBJETIVO GERAL.....	47
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	47
4	MATERIAIS E MÉTODOS.....	49
4.1	EQUIPAMENTOS .....	49
4.2	COLETA DO MATERIAL VEGETAL.....	49
4.3	OBTENÇÃO DO EXTRATO .....	49
4.4	CARACTERIZAÇÃO FITOQUÍMICA DA RESINA.....	51
4.4.1	Reação de Liebermann-Buchard.....	51
4.4.2	Obtenção das frações por cromatografia líquida a vácuo ...	51
4.4.3	Análise cromatográfica por CLUE-EM/EM.....	53
4.5	Purificação do triterpeno.....	53
4.6	Modificações estruturais .....	58
4.6.1	Oxidação da $\alpha$ -amirina com clorocromato de piridínio e sílica gel (reação 1) .....	58
4.6.2	Oxidação da $\alpha$ -amirina com Permanganato de Potássio e Clorato de potássio (reação 2).....	58
4.6.3	Oxidação da $\alpha$ -amirina com Permanganato de Potássio, PCC e Clorato de potássio (reação 3).....	59
4.7	Extração da fração volátil (Hidrodestilação) e análise qualitativa por CG/EM: uma investigação prévia. ....	59
5	ENSAIOS BIOLÓGICOS <i>IN VITRO</i> .....	63
5.1	ENSAIO DE VIABILIDADE CELULAR (MTT) .....	63
5.2	CITOTOXICIDADE .....	63

5.2.1	Cultura celular .....	63
5.2.2	Ensaio de citotoxicidade.....	64
5.3	ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA .....	64
5.4	ATIVIDADE ANTIPROTOZOÁRIA .....	65
5.4.1	Atividades tripanocida e leishmanicida <i>in vitro</i> .....	65
5.5	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	66
6	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	67
6.1	Caraterização dos metabólitos secundários do extrato resinoso de <i>C. nitida</i> .....	67
6.1.1	Análise cromatográfica por CLUE-EM/EM.....	69
6.2	Purificação do composto majoritário.....	97
6.2.1	Composto 1 ( $\alpha$ -amirina; urs-12-em-3 $\beta$ -ol ).....	97
6.3	Obtenção dos derivados semissintéticos de $\alpha$ -amirina .....	101
6.3.1	Composto 2 ( $\alpha$ -amirona; urs-12-em-3-ona).....	102
6.3.2	Composto 3 (12-em-3 $\beta$ -hidroxi-urs-11-ona; 11-oxo- $\alpha$ - amirina) .....	105
6.3.3	Composto 4 (3,11-dioxi-ursan-12-eno; 11-oxo- $\alpha$ -amirona).....	109
6.4	Investigação de atividade biológica <i>in vitro</i> .....	112
6.4.1	Ensaio de viabilidade celular.....	112
6.4.2	Avaliação de atividade inibitória sobre a liberação das citocinas NO e TNF- $\alpha$ .....	113
6.5	ATIVIDADE ANTIPROTOZOÁRIA .....	114
6.6	Análise qualitativa da fração volátil de <i>C. nitida</i> .....	115
7	CONCLUSÃO.....	119
	<b>PERSPECTIVAS FUTURAS.</b> .....	121
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	123

## 1 INTRODUÇÃO

Os materiais vegetais como partes aéreas, sementes, caroços, raízes, cascas de troncos, resinas, entre outros podem ser utilizados *in natura* em diferentes modos, como infusão, decocção, aplicação tópica, preparações galênicas simples (como tinturas, extratos fluidos) e podem ser empregados como matéria-prima para a obtenção de substâncias isoladas com propriedades bioativas (SIMÕES, 2017), como adjuvantes farmacêuticos e na forma de extratos padronizados com marcadores fitoquímicos (DAVID; WOLFENDER; DIAS, 2015).

As resinas têm sido utilizadas há centenas de anos em muitas aplicações, como vernizes, adesivos, incensos em igrejas e no embalsamento no processo de mumificação (DAVIES, 2011; LANGENHEIM, 2003); são ricas em metabólitos secundários os quais são produzidos em resposta a estímulos ambientais como ataque de patógenos (insetos e fungos), além de atuar na cicatrização do tronco. Os principais metabólitos secundários identificados em resinas pertencem à classe dos terpenos, sendo os triterpenos os principais compostos com atividade antimicrobiana e antifúngica (ASSIMOPOULOU; ZLATANOS; PAPAGEORGIOU, 2005).

Além disso, substâncias isoladas com atividades biológicas podem ser utilizadas como material de partida para reações semi-sintéticas e para reações biossintéticas, envolvendo enzimas e/ou microorganismos. Reações semi-sintéticas utilizam um composto isolado ou frações de produto natural como material de partida, o qual é submetido a reações utilizando reagentes sintéticos capazes de transformar o composto inicial em outro produto; diferentemente da síntese orgânica, que utiliza substâncias sintéticas como materiais de partida. A semissíntese tem como objetivo principal a obtenção de um novo composto com melhor afinidade pelo farmacóforo escolhido, para reduzir a toxicidade e melhorar características físico-químicas como solubilidade, pH, lipofilicidade, retardar a sua metabolização, entre outros (SHENG; SUN, 2011).

O continente africano, assim como o Brasil, possui uma grande biodiversidade, com alto número de plantas utilizadas como remédio, alimento e em rituais religiosos; cerca de 80% da população africana utiliza plantas medicinais como recurso para o tratamento de enfermidades. *Cola nitida* está incluída entre as plantas de uso tradicional; a noz, folhas, casca do tronco e sementes são utilizadas para o tratamento de hepatite, malária, úlcera gástrica, inflamação, anemia (ABOU et al., 2016), disenteria amebiana e diarreia (TAMO et al.,

2016), sendo estas as partes vegetais mais estudadas em relação à investigação fitoquímica e atividade biológica. A resina coletada do tronco da árvore de *C. nitida* é pouco estudada, embora seja amplamente utilizada na forma de incenso em tribos africanas como repelente, além de ser empregada em rituais espirituais para “atrair bons espíritos”. Baseado na informação de que resinas são excelentes fontes de triterpenos, e que estes são compostos potencialmente efetivos como anti-inflamatórios, ocorreu a proposta em avaliar a atividade da resina e de seus compostos isolados. No continente africano encontra-se um dos maiores focos de doenças negligenciadas e que causam grande mortalidade; dentre estas estão incluídas diarreia bacteriana e protozoária, hepatite A e E, febre tifóide, doenças causadas por vetores como leishmaniose, Doença de Chagas (SANTOS et al., 2008), malária e febre amarela, HIV/AIDS e tuberculose (TAMO et al., 2016), por isso o interesse em estudar um material vegetal de fácil acesso em grande parte da África e avaliá-la como possível forma de tratamento.

Sendo assim, necessita-se uma investigação sobre a composição fitoquímica da resina bruta de *C. nitida* e avaliá-la em atividade biológica sobre doenças endêmicas no continente africano e americano, como Leishmaniose e Doença de Chagas.

## 2 REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 A FAMÍLIA MALVACEAE

A família Malvaceae é composta por arbustos, subarbustos, ervas, lianas, árvores pequenas e grandes, tendo cerca de 250 gêneros e 4200 espécies, sendo no Brasil encontrados 80 gêneros e 400 espécies (CALIXTO-JUNIOR et al., 2016); e apresentam geralmente atividades antioxidantes (ABOU et al., 2016) e anti-inflamatórias (RAHMAN; GONDHA, 2014), e são utilizadas para o tratamento de doenças como asma e gastrite (GOMES et al., 2015), como anti-séptico, expectorante, depurativo, em infecções cutâneas (CALIXTO-JUNIOR et al., 2016), no tratamento de reumatismo, doenças gastrointestinais e mordidas de cobra (COSTA et al., 2006). Os gêneros *Cola*, *Theobroma* L., *Hibiscus*, *Malva* L., *Luehea* pertencem a esta família, e estão presentes no Brasil; por exemplo, na região sul, a planta conhecida como “açoita-cavalo” (*Luehea divaricata* Mart. & Zucc.) é utilizada na cultura popular para o tratamento de enfermidades como anti-inflamatório, antimicrobiano e doenças gastrointestinais, onde a análise fitoquímica das cascas demonstrou a presença de  $\beta$ -amirina, estigmasterol e lupeol (ROSA et al., 2014). Em um estudo recente de ANTAS e SILVA (2017) foi investigada a composição fitoquímica das partes aéreas de *Herissantia tiubae*, outra espécie da família Malvaceae, encontrada em áreas tropicais como México e América do Sul, na qual foi possível isolar fridelina, lupeol, cicloartenol e cicloeucalenol (ANTAS; SILVA, 2017).

### 2.2 *Cola nitida* (Vent.) Schott & Endl. (MALVACEAE)

#### 2.2.1 Aspectos botânicos de *Cola nitida*

*Cola nitida* (Vent.) Schott & Endl. (*C. nitida*) é uma planta nativa da África, originária de florestas em Serra Leoa, Costa do Marfim e Gana (PAN; JACOBS, 2009). Desde 1912 tem sido cultivada extensivamente pelo oeste da Nigéria, e foi trazida para a Jamaica e Brasil pelos escravos no século XIX (OKEKE et al, 2015; CARNEY, 2001). *C. nitida* é popularmente conhecida na África como *gbanja* ou *goro* (ASOGWA et al., 2012) e no Brasil como “noz-de-cola” ou “cola”. A sua nomenclatura binomial *Cola nitida* (Vent.) Schott & Endll. pode ser identificada pelos sinônimos *Cola nitida* A. Chev., *Sterculia nitida* Ventenat (basinômio, conforme Quadro 1) (TROPICOS, 2017) e *Cola vera* K. Schum. (LIM, 2011).

**Quadro 1.** Classificação taxonômica

Reino	Plantae
Grupo	Angiospermas
Divisão	Magnoliofta
Classe	Magnoliopsida
Ordem	Malvales
Família	Malvaceae/Sterculiaceae
Subfamília	Sterculioideae
Gênero	<i>Cola</i>
Espécie	<i>Cola nitida</i>
Sinônimos	<i>Cola nitida</i> A. Chev; <i>Sterculia nitida</i> Ventenat

Fonte: OKEKE et al, 2015; TROPICOS, 2017

A espécie *C. nitida* pertencia anteriormente à família Sterculiaceae, porém esta família foi inserida na família Malvaceae, originando a subfamília Sterculioideae (WILKIE et al., 2006); *C. nitida* está em um grupo de 125 espécies, incluindo *Cola rubra*, *Cola alba*, *Cola pallida*, *Cola acuminata* (Pal. De Beauvoir) Schott e Endlicher e *Cola verticillata* (Thonn) Stapf.

A árvore pode ser encontrada cultivada do Senegal a Nigéria, oeste da Índia e América do Sul; o cultivo na Nigéria vem desde o século XIX e é estimado que o país seja responsável por 70% da produção mundial de noz-de-cola (ASOGWA et al., 2012). Os frutos de *C. nitida* são utilizados na medicina popular africana para tratamento de diversas doenças, como hepatite, malária, úlcera gástrica, inflamação e anemia (ABOU et al., 2016); as sementes são mascadas e utilizadas popularmente no tratamento de fadiga matinal, enxaqueca, indigestão, diretamente na pele sobre feridas e para a limpeza dos dentes (OBE; SWAMY, 2014).

A espécie *C. nitida* caracteriza-se por ser de porte médio, com tamanho médio de 9 a 12 m de altura, podendo chegar a 20 metros de altura. As folhas de espécies de *C. nitida* são simples e alternadas, pecioladas e desprovidas de pêlos (LIM, 2011); possuem 33 cm de comprimento (em média), podem ser estreitas ou arredondadas em direção à base e com enervação proeminente. As flores de *C. nitida* têm um perianto branco ou colorido. Os frutos são curvados, com quilha proeminente para formar um bico curvo, rugoso ou tuberculado, cor verde e textura lisa ao toque. As sementes contêm dois cotilédones (diferente da *C. acuminata* que possui três a quatro cotilédones ou mais) e a sua germinação ocorre quando dois cotilédones permanecem



fechados e o embrião surge fora deles. Em etnobotânica, tribos africanas costumam diferenciar *C. nitida* e *C. acuminata* somente após a primeira floração e aparecimento dos primeiros frutos, conforme Figura 1, devido à similaridade nas folhas e tronco (DAH-NOUVLESSOUNON et al., 2015). A temporada de colheita dura de outubro a dezembro. O tronco tem em média 50 cm de diâmetro, podendo estender-se até 1 metro, em árvores antigas (TACHIE; BROWN, 2004).

Os exsudatos produzidos no tronco de uma árvore podem ser classificados como gomas (polissacarídeos e seus derivados, possui propriedades hidrossolúveis - em contato com água fria formam uma solução viscosa homogênea a geléia - e insolúveis em solventes orgânicos), resinas - facilmente solúvel em solventes orgânicos como diclorometano e hexano, insolúveis em água e tornam-se rígidas em contato com o ar (LANGENHEIM, 2003) ou goma-resinas (mistura de ambas, com traços de óleo essencial). As resinas podem conter uma complexa mistura de terpenos, terpenoides, compostos voláteis (óleos essenciais, neste caso chama-se oleoresina) e não-voláteis. As resinas são utilizadas há centenas de anos, por exemplo, no embalsamamento durante o processo de mumificação, com o objetivo de evitar a proliferação de fungos e bactérias (BUCKLE; EVERSHED, 2001). Além disso, possuem um excelente potencial de mercado; são utilizadas na fabricação de vernizes e solventes, como impermeabilizantes à prova de água, podendo ser misturadas a soluções básicas para a fabricação de sabonetes medicinais, na forma seca para incensos, na preparação de cera para navegação, entre outros produtos. Nas plantas, o fluxo de resina é causado pelo ataque de insetos, onde o exsudato terá a função de repeli-los, além de prevenir o ataque de fungos ou outros micro-organismos. Estes efeitos de proteção devem-se, principalmente, à presença de compostos fenólicos, sesquiterpenos, diterpenos esteróides e triterpenos (CIESLA, 2009; SANDJO; KUETE, 2013).

**Figura 1.** Comparativo entre frutos e noz (sementes) de *C. nitida* e *C. acuminata*



Ilustração comparativa entre 1. frutos de *C. nitida* e 2. frutos de *C. acuminata*; e 3. noz de 3. *C. nitida* e 4. noz de *C. acuminata*. Fonte: DAH-NOUVLESSOUNON et al., 2015.

## 2.2.2 Aspectos fitoquímicos e biológicos

Tradicionalmente, as folhas, galhos, flores, frutos e cascas de *C. nitida* e *C. acuminata* são utilizados para o tratamento de disenteria (TAMO; ESSAMA; ETOA, 2016), tosse, diarreia, vômito e queixas no peito (SONIBARE et al., 2009).

A noz-de-cola (ou semente de cola) contém 13,5% de água, 9,5% de proteínas, 1,4% de lipídeos, 45% de açúcares e amido, 7,0% de celulose, 3,8% de taninos e 3% de cinzas (TACHIE; BROWN, 2004), 2% de cafeína, 1,7% de taninos totais (OLIVEIRA, 2010), ~ 9,5% de proteínas, 0,05% de teobromina (LATEEF et al., 2016). Este órgão vegetativo possui uma grande importância na indústria sendo utilizada na produção de medicamentos (sua descrição está presente na Farmacopéia Brasileira V, 2010), vinhos, balas, em bebidas como *Pepsi-cola* e *Cola-cola* (desenvolvida a partir da cola em 1886 pelo farmacêutico Dr. John S. Pemberton e vendido como um “tônico cerebral e para o sistema nervoso”) (ASOGWA et al., 2012). Culturalmente, a fruta madura de espécies de *Cola* (incluindo as sementes) é utilizada em cerimônias, as quais são oferecidas ao chefe da tribo e convidados para mascá-las e obter o efeito estimulante, de euforia e bem-estar (SONIBARE et al., 2009; IWU, 2014; KANOMA et al., 2014).

Em uma investigação biológica realizada com o extrato hidrossolúvel de noz de *C. nitida* foi demonstrada a atividade *like*

antiestrogênica, provocando o bloqueio da ovulação e do ciclo estrogênico pela atuação via receptores de estrogênio sobre a hipófise e na secreção no hipotálamo (LANS, 2007). No entanto, o extrato da casca do tronco (20 µg/mL) demonstrou atividade inibitória na liberação do hormônio luteinizante de células de pituitária em ratos, sem efeitos sobre a liberação de FSH, podendo auxiliar na regulação gonadotrópica e tendo potencial uso em fertilidade (DAH-NOUVLESSOUNON et al., 2015; RAI et al., 2011).

A noz-de-cola contém compostos antioxidantes como teobromina, catequina, epicatequina (BURDOCK et al., 2009) e colanina (IWU, 2016). O seu uso para tratamento de doenças tem sido reportado por vários autores (DAH-NOUVLESSOUNON et al., 2015). Contudo, para a resina os estudos são escassos, necessitando uma maior atenção para pesquisa. Um trabalho publicado em 2015, por DAH-NOUVLESSOUNON *et al.*, foi avaliado a composição fitoquímica e atividade biológica da casca do tronco de *C. nitida*, demonstrando a presença de taninos, saponinas e flavonóides e efeito (*in vitro*) fungicida, antioxidante, bactericida e antimicrobiano (TACHIE; BROWN, 2004; HERNÁNDEZ-VÁZQUEZ et al., 2011). A protocianidina isolada de *C. acuminata* demonstrou atividade contra o vetor da doença do sono, *Trypanosoma brucei* e com baixa toxicidade em células de mamíferos (IWU, 2014).

As frações predominantes no extrato da casca de tronco de *C. nitida* incluem compostos nitrogenados, polifenólicos, terpênicos e glicosídeos, e apresentam atividade antimicrobiana para diversos microorganismos patogênicos. A concentração inibitória mínima (CIM) para atividade antimicrobiana da fração de acetato de etila é de CIM 0,312 mg/mL para *Candida albicans*; CIM 1,25 mg/mL para *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus mirabilis*, *Proteus vulgaris*, *Enterococcus faecalis* e CIM 2,5 mg/mL para *Micrococcus luteus*; os autores concluíram que o extrato da casca do tronco, se purificado, pode ser útil para a conservação de alimentos e para a produção de medicamentos para humanos (DAH-NOUVLESSOUNON et al., 2015; HERNÁNDEZ-VÁZQUEZ et al., 2011). A atividade antimicrobiana também foi avaliada na cavidade oral, atuando na redução do crescimento de *Streptococcus mutans*, *Actinobacillus actinomycetem comitans*, e *Fusobacterium nucleatum*, além de ação antifúngica para *C. albicans* (HERNÁNDEZ-VÁZQUEZ et al., 2011). O extrato metanólico das sementes de *C. nitida* foi avaliado para atividade antimicrobiana, e apresentou atividade inibitória sobre *Bacillus cereus* (23,67 ± 0,882) de

forma semelhante ao controle-positivo penicilina ( $20,33 \pm 0,333$ ) (OBEY; SWAMY, 2014).

O extrato etanólico de *C. nitida* deve ser evitado em casos de complicações gástricas; em um estudo de OJO et al. (2009) o extrato etanólico da noz-de-cola foi avaliado na concentração de 600 mg/kg por via oral em ratos adultos Winstar, ocorrendo um aumento da secreção gástrica, devido à presença de cafeína e compostos taninos.

### 2.3 *Triterpenos pentacíclicos*

#### 2.3.1 Aspectos farmacológicos

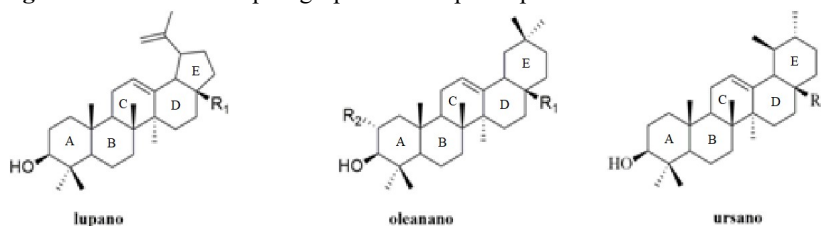
A resina obtida do tronco de *C. nitida* possui poucos estudos (DAH-NOUVLESSOUNON et al., 2015); seu emprego resume-se ao uso na cultura popular e em ritos espirituais.

As resinas, em geral, possuem alta concentração de triterpenos, conforme ilustrado na Figura 2 e Quadro 2, como  $\alpha$ -amirina ( $\alpha$ AM),  $\beta$ -amirina ( $\beta$ AM), lupeol, friedelina, 3-epi-lupeol, entre outros (GONZÁLEZ-COLOMA et al., 2007; HERNÁNDEZ-VÁZQUEZ et al., 2011) e possuem diversas atividades biológicas publicadas, como a propriedade de induzir a apoptose em uma variedade de células tumorais (triterpenos ácidos, atuando nas mitocôndrias), ação antimicrobiana e anti-inflamatória (FLASINSKI; HAC-WYDRO; BRONIATOWSKI, 2014; BRENDOLISE et al., 2011). Os terpenos são uma classe de metabólitos secundários formados por unidades isoprênicas, classificadas conforme o número de carbonos: monoterpenos (C10), sesquiterpenos (C15), diterpenos (C20) e triterpenos (C30).

A pesquisa farmacológica utilizando triterpenos pentacíclicos tem aumentado nos últimos 20 anos, devido à sua extensiva presença no reino Plantae e à versatilidade no seu emprego como material de partida em reações semissintéticas (JÄGER et al., 2009). Triterpenos são produtos de metabólitos secundários (encontrados em casca de frutas, folhas, cascas do tronco, caule e resinas) formados a partir da glicose, gerando acetil CoA, a qual via mevalonato originará difosfato de isopentenila e em menor quantidade difosfato de dimetilalila, que em seguida sofrem ciclização do 2,3-epoxiesqualeno catalisada pela enzima triterpeno ciclase (HALDAR et al., 2014; PATOCKA, 2003; JEMMALI et al., 2016; SIMÕES et al.; 2017); são constituídos por 30 carbonos dispostos em cinco anéis de seis membros (ursanos e oleananos) ou quatro anéis de seis membros e um anel de cinco membros (lupanos), lipossolúveis e com alto ponto de ebulição (PATOCKA, 2003). Neste

grupo estão incluídas as famílias oleanano, ursano e lupano (JÄGER et al., 2009; JEMMALI et al., 2016; FLASINSKI; HAC-WYDRO; BRONIATOWSKI, 2014). Triterpenos do tipo oleanano e ursano podem ser encontrados em resinas vegetais e demonstram efeito anti-inflamatório e hepatoprotetor (MUFFLER et. al, 2011). Compostos isolados, tais como ácido ursólico e ácido oleanólico, podem exercer atividades como cicatrização de feridas, anti-inflamatória, antibacteriana, antiviral, hepatoprotetora e antitumoral (HALDAR et al., 2014; JÄGER et al., 2009), sendo estas atividades demonstradas também pela  $\alpha$ - e  $\beta$ -amirina (JEMMALI et al., 2016).

**Figura 2.** Principais grupos de triterpenos pentacíclicos



**Quadro 2.** Caracterização de triterpenos

Família de triterpeno	Triterpeno	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	M [g/mol]
Lupano	Lupeol	CH <sub>3</sub>		426,70
	Betulina	CH <sub>2</sub> OH	H	442,72
	Ácido betulínico	COOH		456,71
Oleanano	bAM	CH <sub>3</sub>	H	426,70
	Eritrodiol	CH <sub>2</sub> OH	H	442,72
	Ácido oleanólico	COOH	H	456,71
Ursano	Ácido maslínico	COOH	OH	472,70
	$\alpha$ AM	CH <sub>3</sub>		426,70
	Uvaol	CH <sub>2</sub> OH		442,72
	Ácido ursólico	COOH		456,71

Fonte: JÄGER et al., 2009

Os triterpenos pentacíclicos podem exibir atividade inseticida *antifeedant* (como forma de defesa da planta), atuando sobre a regulação do crescimento e sistema reprodutivo, como palmitato de bAM, betulina, derivados do ácido betulínico, entre outros (GONZÁLEZ-COLOMA et al., 2011).

### 2.3.1.1 Atividade leishmanicida

A Leishmaniose é uma doença tropical negligenciada (DTN), onde o agente etiológico é o protozoário flagelado *Leishmania* spp., e representa uma das doenças emergentes com altos níveis de morbidade e de mortalidade. Sua incidência é maior nas áreas tropicais e subtropicais, onde a incidência anual é de aproximadamente de 2 milhões de novos casos, onde cerca de 350 milhões de pessoas vivem em áreas endêmicas. O protozoário é transmitido pela picada de um inseto vetor fêmea, onde dois gêneros podem transmitir para humanos: *Lutzomya* sp. no hemisfério ocidental e *Phlebotomous* sp. nos continentes europeu, africano e asiático (PINK et al., 2005; SHUKLA et al., 2010). Um animal infectado, onde no Brasil predomina em cães e raposas, é picado pelo inseto, o qual aspira macrófagos parasitados ou amastigotas livres, e transmite o sangue contaminado para o homem (RATH et al., 2003).

A prevenção continua sendo a maior forma de reduzir a incidência da doença, já que não existem vacinas efetivas, tampouco investimento para novos fármacos pela indústria farmacêutica (BALANÃ-FOUCE et al., 2012).

O tratamento primário para leishmaniose inclui antimoniais pentavalentes (RATH et al., 2003), que são utilizados desde a década de 1940, como estibogluconato de sódio e antimoniato de N-metilglucamina; porém esta classe de medicamentos tem perdido a eficácia na infecção visceral (HAAVIKKO et al., 2014) e como segunda opção os medicamentos pentamidina, anfotericina B lipossomal e paromomicina. Os medicamentos antimoniato de N-metilglucamina e anfotericina B estão presentes na RENAME – 2017 (Relação Nacional de Medicamentos Essenciais, empregados no Sistema Único de Saúde). Além desses, em 2017 foi inserido a pentoxifilina como medicamento coadjuvante no tratamento de leishmaniose tegumentar mucosa. A resistência à pentamidina tem sido reportada, principalmente em pacientes imunodeprimidos. Em um estudo conduzido por NEVES et al., 2011, concluiu-se que a pentamidina e antimonial pentavalente possuem baixa eficácia para ao tratamento de leishmaniose tegumentar americana, causada por *L. (Viannia) guyanensis*. Além disso, a grande incidência de efeitos adversos, a baixa efetividade e o alto custo provocam a baixa aderência ao tratamento pelos pacientes (LOEDIGE, 2015), como no caso da miltefosina, o qual apresenta eficiência por via oral, porém é contra-indicado para pacientes gestantes por apresentar teratogenicidade (HAAVIKKO et al., 2014). Sendo assim, a busca por

novos medicamentos com menor toxicidade e maior atividade tem aumentado (SANTOS et al., 2008; SHUKLA et al., 2010), sendo um foco em potencial para a proposição de novas estruturas semi-sintéticas.

A doença é classificada de acordo com os órgãos e tecidos afetados, espécies envolvidas e localização geográfica, conforme Quadro 3 (BALANÃ-FOUCE et al., 2012; NEVES et al., 2011).

**Quadro 3.** Classificação da leishmaniose

<b>Doença</b>	<b>Sintomas</b>	<b>Agentes etiológicos</b>	<b>Localização geográfica</b>
Leishmaniose cutânea	Lesões na pele, que podem curar espontaneamente	<i>L. tropica</i> e <i>L. major</i>	Países no Velho Mundo
		<i>L. mexicana</i> e <i>L. amazonensis</i>	América Central e do Sul
Leishmaniose mucocutânea	Lesões graves na pele	<i>L. braziliensis</i>	Países no Novo Mundo
Leishmaniose tegumentar americana		<i>L. (Viannia) guyanensis</i>	Sul dos Estados Unidos até o norte da Argentina, exceto Chile e Uruguai
		<i>L. (Viannia) guyanensis</i> , <i>L. (V.) braziliensis</i> e <i>L. (L.) amazonensis</i>	Brasil, principalmente região Norte
Leishmaniose visceral	Inchaço no baço, fígado, tecido marrom e órgãos linfáticos	<i>L. donovani</i> e <i>L. infantum</i>	Países no Velho Mundo
		<i>L. chagasi</i>	América

Fonte: SANTOS et al., 2008.

### 2.3.1.2 Atividade tripanocida

A doença de Chagas é uma enfermidade endêmica nas regiões Nordeste e Norte do Brasil, entre outros países da América Latina e África, caracterizada por provocar anormalidades cardíacas e digestivas, potencialmente fatais na forma crônica. Estima-se que 10 milhões de pessoas estejam infectadas em todo o mundo, com cerca de 8 mil mortes por ano (BROWNE et al., 2017; CARDOSO REIS-CUNHA; BARTHOLOMEU, 2016).

O agente etiológico, o protozoário *Trypanosoma cruzi*, é capaz de infectar e replicar em uma grande variedade de células em mamíferos. A doença pode ser transmitida através da deposição de fezes de um inseto triatomíneo conhecido como “barbeiro” (vetor) sobre uma lesão cutânea, por transfusão sanguínea, passagem pela placenta e ultimamente relatado a incidência através do consumo de alimentos contaminados com o parasita (ANDRADE et al., 1996; SILVA-DOS-SANTOS et al., 2017).

A transmissão é controlada por pesticidas no Brasil, sendo que o tratamento de primeira escolha para a infecção aguda ou congênita da doença é baseado na utilização do medicamento benznidazol, sendo necessário o desenvolvimento de novos tratamentos para o controle da doença em casos de resistência e agravamento da doença. A enzima tripanotona redutase apresenta-se como o principal alvo de novos medicamentos; compostos naturais como quinonas, flavonóides e terpenos demonstram um grande potencial terapêutico (SAÚDE-GUIMARÃES; FARIA, 2007).

### **2.3.2 Atividade anti-inflamatória**

Os triterpenos ácido ursólico, ácido oleanólico e seus derivados já foram investigados perante atividade anti-inflamatória; o efeito deve-se principalmente através da modulação das enzimas iNOS e COX-2 (VECHIA, GNOATTO E GOSMANN, 2009); além disso, a mistura dos estereoisômeros  $\alpha$ AM e  $\beta$ AM apresentam atividade antinociceptiva e anti-inflamatória (WAGH; GUJAR; GAIKAR, 2012). Estudos conduzidos envolvendo o mecanismo de ação anti-inflamatório de triterpenos tem revelado o seu efeito inibitório das enzimas lipooxigenase-5, óxido nítrico sintetase, ciclooxigenase-2 e fator de ativação nuclear- $\kappa$ B. O grupamento hidrofílico em C-4 no anel A tem alta relevância para a redução da atividade enzimática e atividade da 5-LOX (ZHANG et al., 2013). Infecções virais e microbianas, exposição à radiação, alérgenos, contaminantes químicos, tabagismo, alcoolismo, dieta hipercalórica, obesidade e doenças inflamatórias crônicas constituem nos principais gatilhos do processo inflamatório mediado por citocinas, como fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ), óxido nítrico (NO) e interleucinas, que podem desencadear à longo prazo doenças graves como câncer, infarto e acidente vascular cerebral (REUTER et al., 2010; REILLY; SALTIEL, 2014; VECHIA; GNOATTO; GOSMANN, 2009).



*Protium heptaphyllum* (Burseraceae), uma espécie abundante na América do Sul e principalmente no Brasil, produz um exsudato resinoso o qual é retirado do tronco e é utilizado na cultura popular devido às propriedades anti-inflamatória e analgésica; tais atividades são atribuídas pela presença de  $\alpha$  e  $\beta$ -amirina, triterpenos pentacíclicos com atividades anti-inflamatória, antipruriginosa, gastroprotetora e hepatoprotetora (MELO et al., 2010).

### 2.3.3 Aspectos analíticos

Os triterpenos pentacíclicos podem ser identificados e isolados por diferentes técnicas cromatográficas. No entanto, por não possuírem um grupamento cromóforo, não são visíveis em UV a 200 nm e sua separação é pouco avaliada em CLUE-UV. Por isso, a técnica hifenada CLUE-EM demonstra ser uma alternativa para identificação, e para a análise em CG/EM é necessário realizar uma reação de derivatização com trimetilclorosilano, para aumentar a volatilidade (reduzir o ponto de ebulição) e estabilidade térmica (JEMMALI et al., 2016).

Os monoterpenos podem ser identificados por CG/FID, utilizando uma série homóloga de hidrocarbonetos (C-5 a C25) para a identificação dos compostos, comparando-os com literatura de referência (ADAMS, 1995). Para a técnica de CG/EM, é recomendado utilizar uma coluna apolar, similar ao tipo DB-5 (com 5% de sílica polar = fenilpolisiloxano), e os compostos podem ser identificados comparando os dados como índice de retenção, peso molecular e padrão de fragmentação em ionização eletrônica com base de dados NIST 11 (combinada ao detector do EM) e comparação com dados de referência (ADAMS, 1995).

A cromatografia de camada delgada é utilizada como recurso para obter uma informação preliminar de quantos compostos estão presentes no material vegetal; utilizando placas de sílica-gel e com o auxílio do revelador solução ácida de anisaldeído sulfúrico (0,5 ml de p-anisaldeído, 1 ml de ácido sulfúrico a 97 % em 18 ml de etanol), solução reagente de anidrido acético ou solução etanólica de ácido sulfanílico 10%, seguido por aquecimento a 110° C (MUFFLER et al., 2011) é possível detectar a presença de compostos fenólicos, açúcares, terpenos e esteróides (OLIVEIRA et al.; 2010).

As combinações das técnicas analíticas de RMN e CLUE-EM permitem a identificação de mais de um composto proveniente de produtos naturais, sem a necessidade de realizar isolamento para identificação. Os dados obtidos podem ser comparados a dados

publicados, como na detecção de fragmentos característicos existentes em banco de dados. Sendo assim, a combinação das técnicas proporciona um resultado rápido e com menor volume de solventes, comparados à cromatografia em coluna clássica. A identificação de metabólitos pela comparação com dados experimentais contidos em bibliotecas de espectros de produtos naturais conhecidos é denominada desreplicação (GOMES et al., 2018).

### 2.3.4 Aspectos de modificação estrutural

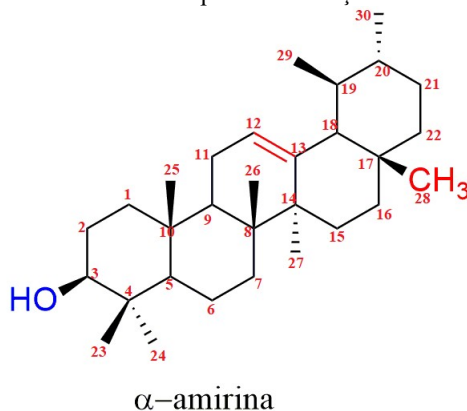
As reações semissintéticas são úteis quando necessita obter moléculas complexas, porém utilizando menos etapas de síntese (SOUZA, 2010).

Os terpenos apresentam grande versatilidade em modificações estruturais, pois possuem diversos centros estereogênicos em estruturas constituídas por átomos de C, H e O (BARREIRO; FRAGA, 2008).

#### 2.3.4.1 Escolha da estrutura

Os triterpenos são estruturas versáteis, apresentam diversos centros estereogênicos e arranjos moleculares. A  $\alpha$ AM contém uma hibridização tipo  $sp_2$ , a qual necessita de 77-88 kcal/mol para rompê-la. Como pode-se visualizar na Figura 3, além da insaturação em C-12 e C-13,  $\alpha$ AM contém um grupamento doador de hidrogênio em C-3 (R-OH) e 11 carbonos quirais (C-3, C-5, C-8, C-9, C-10, C-13, C-14, C-17, C-18, C-19 e C-20) (BARRETO; FRAGA, 2009). A  $\alpha$ AM possui um esqueleto do tipo ursano e bAM possui um esqueleto do tipo oleanano e ambos possuem uma estrutura similar a esteróides, tendo apenas a posição de uma metila no anel E (SOLDI et al., 2008);  $\alpha$ AM e bAM são precursores do ácido ursólico e ácido oleanólico, respectivamente (BRENDOLISE et al., 2011).

**Figura 3.** Possíveis alvos para modificação estrutural



A farmacodinâmica da  $\alpha$ AM pode ser alterada realizando reações semissintéticas para originar terpenóides (produtos de degradação de triterpenos ou derivados semissintéticos, como cetonas, alcoóis, aldeídos, entre outros) (MUFFLER et al., 2011; BARREIRO; FRAGA, 2008). Os possíveis alvos-moleculares para modificação de atividade sobre a  $\alpha$ AM pode ser observado no Quadro 4.

**Quadro 4.** Possíveis alvos-moleculares para modificação

Posição	Grupamento	Reação
C-3	R-OH	Oxidação
C-12	Insaturação	Oxidação
C-13	Insaturação	Oxidação

### 2.3.4.2 Oxidação de alcoóis

A reação de oxidação de alcoóis primários e secundários, além de alcoóis alílicos e benzílicos utilizando PCC e DCM para originar compostos carbonílicos foi desenvolvida por COREY e SUGGS, 1975. PCC é um reagente estável, com alto rendimento e eficiência (necessita 6 vezes menos solvente e apresenta atividade oxidante 4 vezes maior que o tradicional método de Collins), com a desvantagem de ter a alta toxicidade dos reagentes cromados (ação carcinogênica) (HUNSEN, 2005). Além disso, PCC também é conhecido pela ação oxidante seletiva em álcoois alílicos esteroidais (FERNANDES; KUMAR, 2003). A adição do catalisador  $\text{SiO}_2$  pode ser um recurso de tentativa de uma

reação mais eficiente e com melhor rendimento para originar o produto final, além de reduzir o consumo de PCC e o tempo de reação (de 3 h a 8 h para 1 h) (KIM; KOO, 2005).

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 OBJETIVO GERAL

Caracterizar a composição fitoquímica do exsudato resinoso bruto (oleoresina) de *C. nitida*, isolar os componentes majoritários, além de realizar modificações estruturais originando compostos para avaliação de atividade biológica.

#### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Caracterizar os metabólitos secundários do exsudato resinoso bruto do tronco de *C. nitida* por CLUE-EM;

Isolar e purificar compostos utilizando técnicas de separação como cromatografia líquida a vácuo;

Obter derivados semissintéticos através de reações de oxidação a partir de triterpeno isolado do exsudato resinoso, e avaliar a atividade antiprotozoária (leishmanicida e tripanocida) *in vitro*;

Avaliar para atividades antiprotozoária (leishmanicida e tripanocida) e anti-inflamatória *in vitro* dos metabólitos secundários do exsudato resinoso bruto do tronco de *C. nitida*;

Realizar análise qualitativa da fração volátil (óleo essencial) extraída do exsudato resinoso de *C. nitida*, desenvolvendo uma metodologia de análise em CG/EM.



## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 EQUIPAMENTOS

O estudo de desreplicação foi realizado utilizando um cromatógrafo Acquity UPLC system class H (Waters) equipado com detector tipo PDA, amostrador automático e bomba quaternária de solvente, e a detecção de massas foi realizada utilizando o equipamento Xevo G2-S QToF (Waters) com *probe eletrospray* operando nos modos positivo e negativo, e os dados processados pelo *software* MassLynx V4.1 (Waters).

Espectrômetro de Infravermelho – transformada de Fourier marca Perkin Elmer, modelo Spectrum Two.

A cromatografia em camada delgada foi realizada utilizando placas de sílica-gel 60 (230-400 mesh, Merck).

Espectrômetro de ressonância magnética nuclear de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  do fabricante Bruker, modelo Fourier 300.

Para as colunas cromatográficas abertas (clássicas) utilizou-se sílica-gel Siliaflash P60 – SiliCycle, 40 - 63 $\mu\text{m}$  ou 230 - 400 mesh.

### 4.2 COLETA DO MATERIAL VEGETAL

O material botânico de partida, a resina bruta de *C. nitida*, foi coletada na região oeste da República de Camarões – África Central, em Bangangté, capital do departamento de Ndé (5°09'00"N 10°31'00"L) e trazido pelo professor Dr. Louis Pergaud Sandjo em agosto de 2014. O material vegetal foi identificado como origem da espécie *Cola nitida* por comparação de exsicata depositada no Herbário Nacional de Yaoundé – Camarões/Africa (n. 14590SRF).

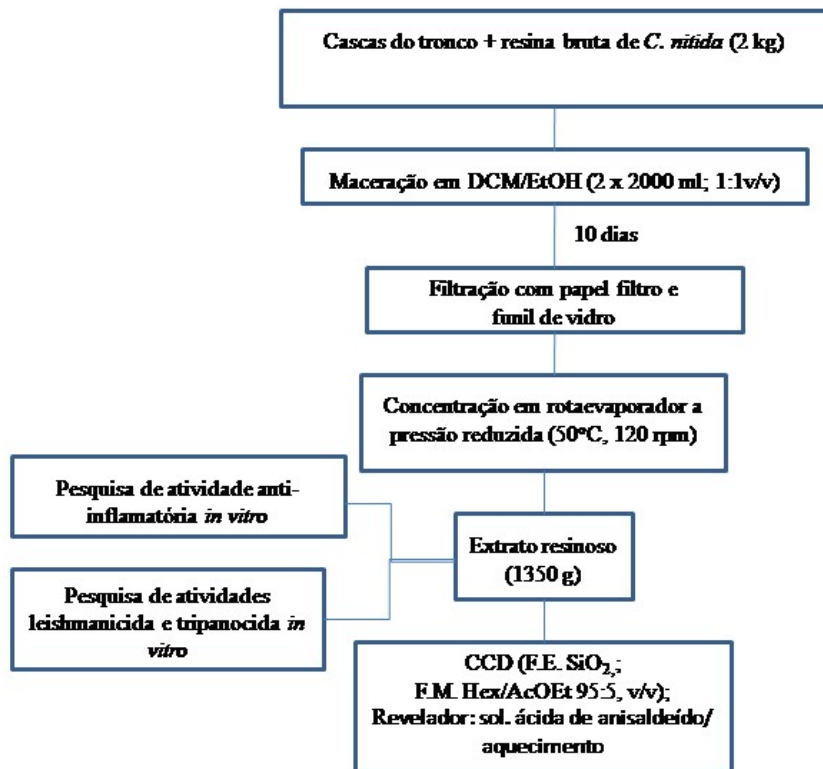
A resina bruta foi devidamente armazenada em recipiente adequado, livre de umidade, ao abrigo da luz e mantida a temperatura ambiente (25° C).

### 4.3 OBTENÇÃO DO EXTRATO

O material vegetal bruto (resina e cascas) coletado do tronco da árvore de *C. nitida* (2000 g) foi purificado através de maceração por dez dias utilizando DCM/EtOH (1:1; v/v; 2 x 2000 mL) como solvente extrator. Após este período o extrato bruto foi filtrado e concentrado em rotaevaporador sob pressão reduzida, com temperatura de 50° C a 120

rpm, resultando no extrato resinoso (ER, 1350,00 g), o qual foi avaliado através de cromatografia em camada delgada (CCD, conforme Figura 2). O ER foi armazenado em frascos de vidro transparentes hermeticamente fechados (9 frascos), protegidos com papel alumínio e local seco e arejado (Fluxograma 1). Uma alíquota do extrato resinoso (500 mg) foi concedida ao grupo de pesquisa do Prof. Dr. Mario Stendel para avaliação de atividades leishmanicida e tripanocida e igualmente concedida ao grupo de pesquisa da Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Fabíola Branco Filipin Monteiro para avaliação de atividade anti-inflamatória *in vitro*, conforme descritos no item 5.

**Fluxograma 1.** Obtenção do extrato resinoso de *C. nitida*.





#### 4.4 CARACTERIZAÇÃO FITOQUÍMICA DA RESINA

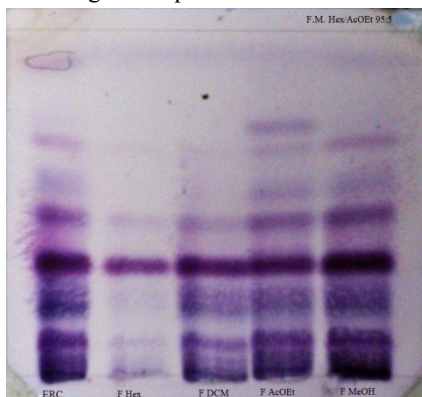
##### 4.4.1 Reação de Liebermann-Buchard

O extrato resinoso concentrado (ER) foi submetido inicialmente à avaliação colorimétrica, utilizando a reação de Liebermann-Buchard, que permite a detecção de triterpenos e esteróides. Clorofórmio ( $\text{CHCl}_3$ , 10 mL), anidrido acético (2 mL) e ER (1 mg) foram misturados, formando uma solução incolor, conforme Figura 7. Em seguida, adicionou-se lentamente ácido sulfúrico ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ , 0,2 mL).

##### 4.4.2 Obtenção das frações por cromatografia líquida a vácuo

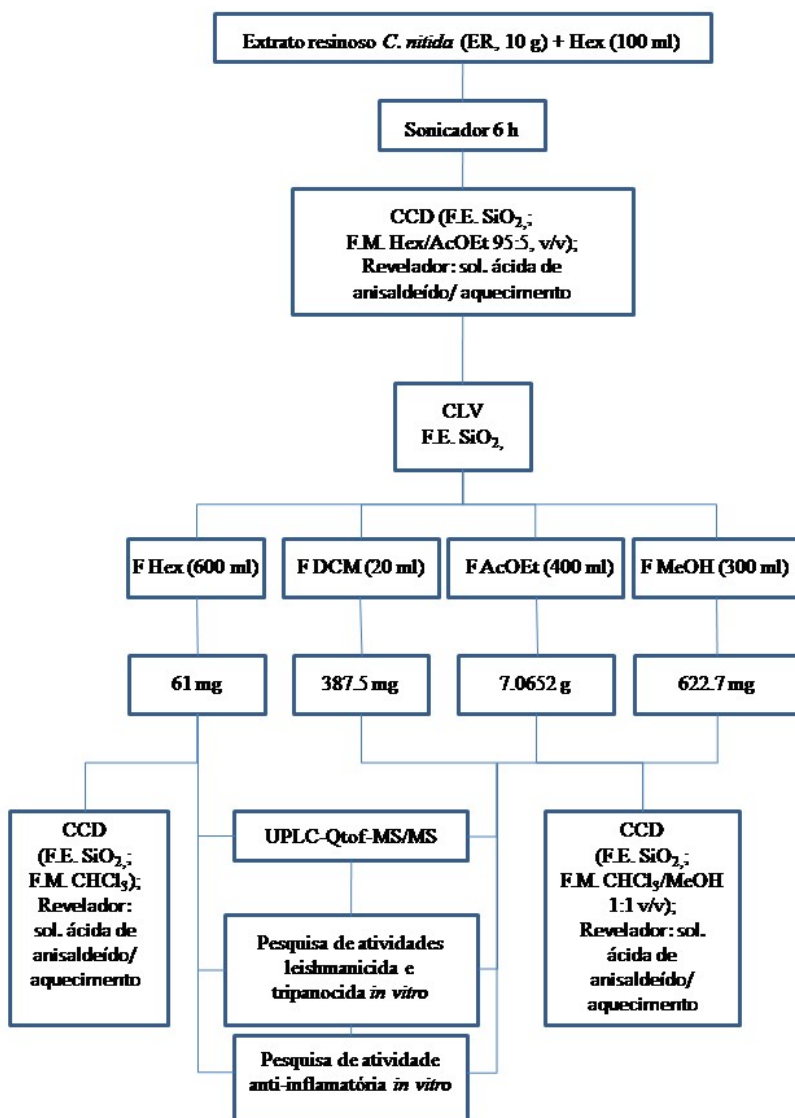
O ER (10 g) foi submetido a uma pré-purificação, inicialmente diluído em n-hexano (100 mL), levado ao sonificador por 6 h até completa dissolução, em seguida realizado separação por cromatografia líquida a vácuo (CLV; F.E. sílica-gel; coluna de vidro de 15,0 cm x 7,5 cm), utilizando como fase móvel um sistema de eluentes adequado à polaridade da respectiva fração, e em seguida concentrados em rotaevaporador sob pressão reduzida (Fluxograma 2). As frações foram monitoradas por cromatografia de camada delgada, conforme Figura 4.

**Figura 4.** Cromatografia em camada delgada do extrato resinoso e das frações obtidas por cromatografia líquida a vácuo



CCD: F.E. sílica-gel; F.M. Hex/AcOEt (95:5 v/v) Banda circulado UV-Vis 254nm; demais bandas visíveis após revelação com solução ácida de anisalaldeído/aquecimento. 1) Extrato resinoso de *C. nitida*; 2) F Hex; 3) F DCM; 4) F AcOEt; 5) F MeOH.

**Fluxograma 2.** Cromatografia líquida a vácuo (CLV) do extrato resinoso e análise fitoquímica.



Para a detecção dos triterpenos em cromatografia de camada delgada o sistema eluente Hex/AcOet 95:5, v/v foi escolhido como fase móvel (SOLDI, 2007; FERREIRA et al., 2017) sendo necessário utilizar como revelador a solução ácida de anisaldeído e aquecimento a 110° C, pois triterpenos como  $\alpha$ -amirina são visíveis a UV-580 nm (MALLICK; DIGHE, 2014).

#### 4.4.3 Análise cromatográfica por CLUE-EM/EM

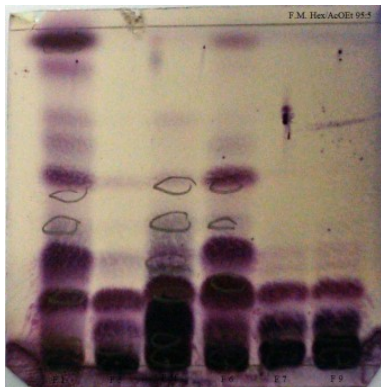
Para a identificação dos compostos presentes no ER foi realizada a técnica hífenada de cromatografia líquida de ultra eficiência acoplada ao espectrômetro de massas em *tandem*, utilizando coluna BEH C18 (50 mm, 1.0 mm, partícula de tamanho 1.7  $\mu$ m, Waters). As temperaturas da coluna e amostra foram de 40° C e 20° C, respectivamente. Um volume de 3  $\mu$ L de amostra (preparada na concentração de 200  $\mu$ L/mL com solvente acetonitrila) foi injetado em um fluxo de gradiente de 0.3 mL/min: eluente A 90 % (A, água/ácido fórmico, 99.9/0.1, v/v) e eluente B 10 % (B, ACN); 1–2 min 90 % de A; 2–10 min 55 % de A; 10–15 min 10 % de A e 15-20 min 90 % de A. A detecção de massas foi realizada operando nos modos positivo e negativo; gas nebulizador: nitrogênio; fluxo de gás na câmara de colisão de 60 L/h; fluxo do gás de dessolvatação (Nitrogênio) de 900 L/h; energia de colisão 30 eV, *source offset* 80 V, energia no capilar 3.5 kV, temperatura de dessolvatação e de ionização foram de 300° C e 120° C, respectivamente; voltagem do capilar de 3 kV; temperatura da fonte 90° C, gás de colisão Argônio. A faixa de detecção de massas foi de 100 a 1500 Da, com tempo de *scan* de 1.0 seg. e tempo de detecção de 20 min, sendo os dados processados pelo *software* MassLynx V4.1 (Waters). Para a identificação dos picos, todas as fórmulas moleculares possíveis foram extraídas com análise dos fragmentos obtidos, utilizando análise por fragmentação do composto e análise dos fragmentos “filhos” (SILVERSTEIN, 2013).

#### 4.5 Purificação do triterpeno

Com o intuito de otimizar o isolamento realizou-se 4 métodos diferentes de extração a partir do ER (ilustrados no Fluxograma 4), para obter um triterpeno purificado com maior rendimento utilizando menor volume de solvente e tempo para purificação.

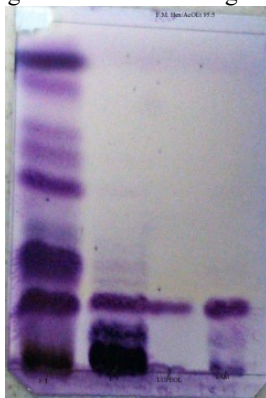
No primeiro método de isolamento, o ER (81,96 g) foi ressuspensionado em hexano (900 mL) e levado ao sonificador por 12 h, tempo necessário para o extrato dissolver-se completamente. O extrato obtido foi submetido à avaliação cromatográfica por CCD utilizando como F.E. sílica-gel e F.M. Hex/AcOEt (95:5; v/v), e como revelador solução ácida de anisaldeído/aquecimento. O extrato foi submetido a uma cromatografia líquida a vácuo utilizando F.E. sílica-gel e F.M. Hex (1800 mL, obtendo 6 frações, demonstradas nas figuras 15 e 16) e em seguida Hex/AcOEt (9:1; v/v, 300 mL). Os solventes foram destilados por rotaevaporador a pressão reduzida e acrescentou-se MeOH ao sólido, o qual foi separado da fração líquida através de filtração com papel-filtro e funil de vidro, lavando com MeOH até completa purificação e monitorado por CCD, conforme Figura 5 (F.E. SiO<sub>2</sub>; F.M. Hex/AcOEt, 95:5, v/v, revelador solução ácida de anisaldeído/aquecimento). A fração hexânica resultou em 4,30 g (rendimento de 5,25 %) de triterpeno purificado (Figura 6). Após análise por Infravermelho e por RMN <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C, e os dados foram comparados com a literatura (HERNÁNDEZ-VÁZQUEZ et al., 2011), confirmando a identidade de αAM. O filtrado metanólico foi concentrado em rotaevaporador a pressão reduzida e reservado para análise posterior, assim como a fração Hex/AcOEt 9:1.

**Figura 5.** Cromatografia em camada delgada - bandas identificadas na fração Hex (método de isolamento 1) após revelação com solução ácida de anisaldeído/aquecimento.



CCD F.E. sílica-gel; FM Hex/AcOEt (95:5 v/v); as bandas podem ser visualizadas após revelação com solução ácida de anisaldeído/aquecimento: Frações referentes a F Hex, método de isolamento 1.

**Figura 6.** Cromatografia em camada delgada comparativa.



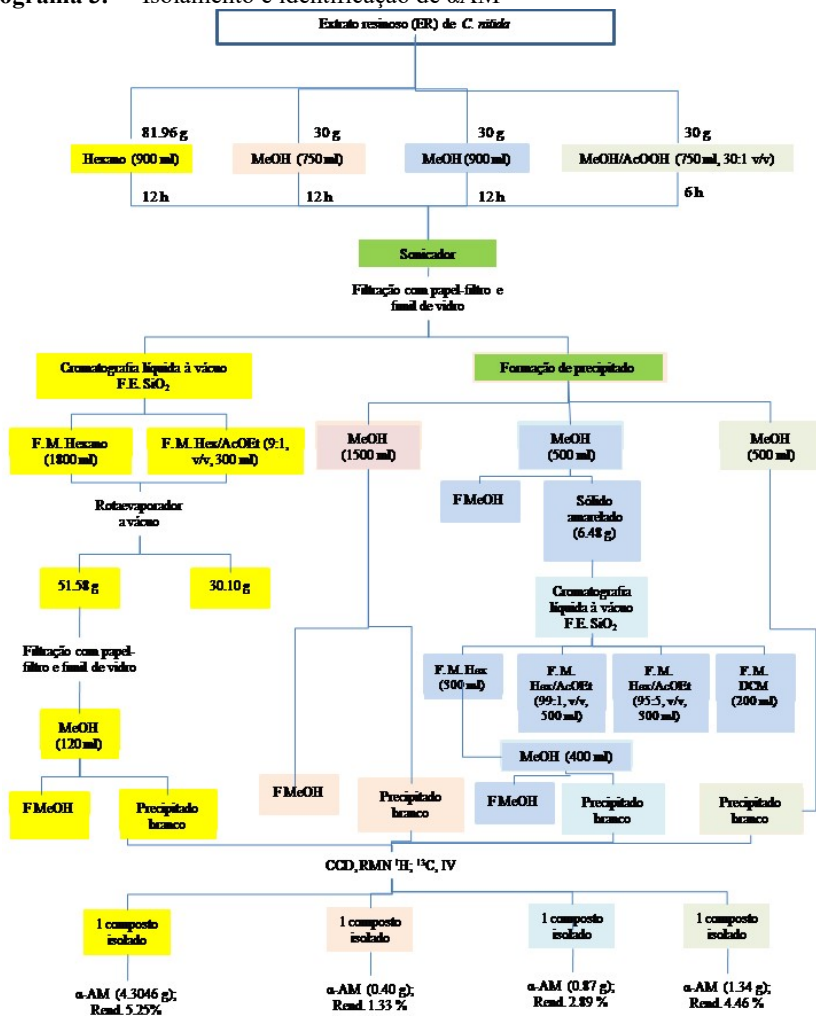
CCD comparativa; F.E. sílica-gel; FM Hex/AcOEt (95:5 v/v); as bandas podem ser visualizadas após revelação com solução ácida de anisaldeído/aquecimento: F1; F5; padrão Lupeol;  $\alpha$ AM isolada do ER, respectivamente.

No segundo método de isolamento, ER (30,00 g) e MeOH (750 mL) foram levados ao sonicador por 12 h, onde observou-se a formação de precipitado branco. O precipitado branco foi separado pelo método de filtração com papel filtro e funil de vidro, lavado com MeOH (1500 mL) e analisado por CCD (F.E. sílica-gel; F.M. Hex/AcOEt, 95:5, v/v, revelador solução ácida de anisaldeído/aquecimento). O precipitado foi submetido a sucessivas recristalizações com objetivo de purificar, resultando em 0,40 g (rendimento de 1,33 %), comprovando o isolamento e identidade do composto  $\alpha$ AM através de análise em RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  os dados foram comparados com a literatura (HERNÁNDEZ-VÁZQUEZ et al., 2011). A fração metanólica foi concentrada em rotaevaporador a pressão reduzida, analisada em CCD (F.E. sílica-gel; F.M. Hex/AcOEt, 95:5, v/v, revelador solução ácida de anisaldeído/aquecimento) e reservada.

No terceiro método de isolamento, ER (30,00 g) e MeOH (900 mL) foram levados ao sonicador por 12 h, onde observou-se a formação de precipitado branco, o qual foi filtrado com papel filtro e funil de vidro, lavado com MeOH (500 mL) e analisado por CCD (F.E. sílica-gel; F.M. Hex/AcOEt, 95:5, v/v, revelador solução ácida de anisaldeído/aquecimento). O precipitado foi submetido a sucessivas recristalizações com objetivo de purificar, resultando em 6,48 g, o qual foi submetido a uma cromatografia líquida a vácuo utilizando F.E. sílica-gel 60 (230-400 mesh, Merck e F.M. Hex (300 mL), em seguida Hex/AcOEt (500 mL, 99:1 v/v), Hex/AcOEt (300 mL, 95:5 v/v) e DCM

(200 mL). Em seguida as frações foram concentradas em rotaevaporador a pressão reduzida e analisadas em CCD (F.E. sílica-gel; F.M. Hex/AcOEt, 95:5, v/v, revelador solução ácida de anisaldeído/aquecimento). A cada fração foi adicionado MeOH (100 mL) ocorrendo a formação de precipitado branco, o qual foi filtrado com papel-filtro e funil de vidro, resultando em 0,87 g (2,89 %) de  $\alpha$ AM, comprovando o isolamento e identidade do composto através de análise em RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  os dados foram comparados com a literatura (HERNÁNDEZ-VÁZQUEZ et al., 2011). A fração metanólica foi concentrada em rotaevaporador a pressão reduzida, analisada em CCD (F.E. sílica-gel; F.M. Hex/AcOEt, 95:5, v/v, revelador solução ácida de anisaldeído/aquecimento) e reservada.

No quarto método de isolamento, ao ER (30,00 g) foi adicionado à uma solução de MeOH/Ac acético (750 mL; 30:1 v/v) e levado ao sonicador por 6 h, onde ocorreu a formação de precipitado branco, o qual foi filtrado com papel-filtro e funil de vidro e lavado várias vezes com MeOH (500 mL), resultando em 1,34 g (rendimento de 4,46%). Para a identificação do composto realizou-se análise de RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  e os dados comparados com a literatura (HERNÁNDEZ-VÁZQUEZ et al., 2011).

Fluxograma 3. Isolamento e identificação de  $\alpha$ AM

Fluxograma identificando os quatro métodos de isolamento de  $\alpha$ AM realizados. Método 1 caixas em amarelo; método 2 em rosa, método 3 em azul e método 4 em cinza.

## 4.6 Modificações estruturais

### 4.6.1 Oxidação da $\alpha$ -amirina com clorocromato de piridínio e sílica gel (reação 1)

Baseado na reação de oxidação desenvolvida por COREY e SUGS (1975) utilizou-se  $\alpha$ AM (150,00 mg, 0,35 mmol), DCM (3 mL), clorocromato de piridínio (PCC, 150,9 mg, 0,70 mmol) e sílica gel ( $\text{SiO}_2$ , 42,06 mg, 0,70 mmol), os quais foram misturados em um balão volumétrico em agitador magnético (a.m.) a temperatura ambiente (t.a.) por 1 h. A reação foi monitorada com CCD (F.E. sílica-gel ; F.M. Hex/AcOEt, 95:5, v/v e revelador solução ácida de anisaldeído/aquecimento), onde foi observado o desaparecimento completo da  $\alpha$ AM, originando uma banda UV-Vis 254 nm. A seguir o produto da reação foi submetido a uma cromatografia líquida a vácuo com F.E. sílica-gel, F.M. DCM (250 mL), retirando o  $\text{H}_2\text{CrO}_3$  e  $\text{SiO}_2$ . Em seguida a fração foi seca em rotaevaporador sob pressão reduzida, tendo o rendimento de 70 %, originando  $\alpha$ -amirona (composto 2; 105,00 mg, 0,25 mmol), a qual foi identificada em análise por IV e RMN  $^{13}\text{C}$ .

### 4.6.2 Oxidação da $\alpha$ -amirina com Permanganato de Potássio e Clorato de potássio (reação 2)

Uma solução contendo acetona (5 mL) e  $\text{KClO}_3$  (56,37 mg; 0,46 mmol) foram inseridos em um balão volumétrico de 50 mL e colocados sob agitação magnética (a.m.) a temperatura ambiente (t.a.). Em seguida foi adicionado uma solução oxidante contendo água purificada (1 mL) e  $\text{KMnO}_4$  (72,7 mg; 0,46 mmol). Após a homogeneização, foi adicionado uma solução contendo DCM (5 mL) e  $\alpha$ AM (100,00 mg; 0,23mmol). A cinética da reação foi monitorada com CCD (F.E. sílica-gel; F.M. Hex/AcOEt, 95:5, v/v e revelador solução ácida de anisaldeído/aquecimento) após 1 h e a cada 12 h. Após 20 h a reação foi interrompida após visualização em CCD (F.E. sílica-gel ; F.M. Hex/AcOEt, 95:5, v/v e revelador solução ácida de anisaldeído/aquecimento); onde ocorreu reação parcial. O produto final foi separado por cromatografia líquida a vácuo com sílica gel 60 (230-400 mesh, Merck) utilizando 200 mL de DCM (F1, F2 e F3) para cada fração, em seguida 400 mL de DCM/MeOH (9:1 v/v) (F4 e F5). Como as 5 frações não estavam puras, todas foram unidas e submetidas a coluna cromatográfica com sílica-gel 60 (230-400 mesh, Merck) com um sistema eluente gradual com Hex e Hex/AcOEt. A fração isolada



originou o composto 3 (25,00 mg; 0,06 mmol; rendimento 25 %), o qual foi identificado em análise por IV e RMN  $^{13}\text{C}$ .

#### 4.6.3 Oxidação da $\alpha$ -amirina com Permanganato de Potássio, PCC e Clorato de Potássio (reação 3)

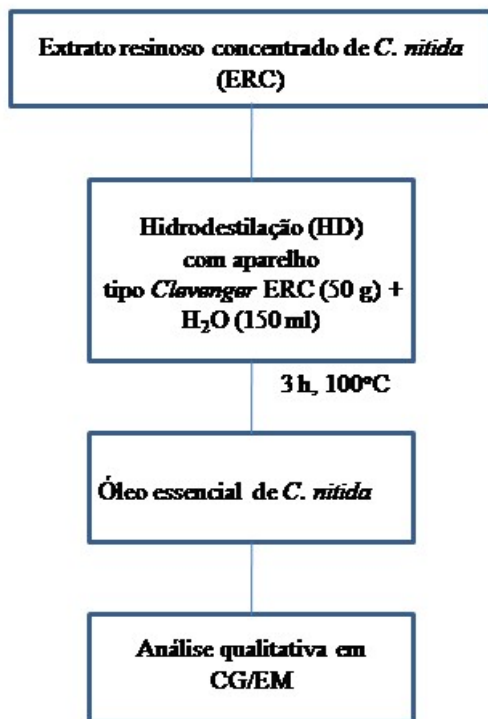
KClO<sub>3</sub> (171,60 mg; 1,40 mmol) , KMnO<sub>4</sub> (221,24 mg; 1,40 mmol), acetonitrila (ACN, 10 mL) e acetona (5 mL) foram adicionados em um balão volumétrico de 50 mL. Em seguida foi adicionado uma solução com PCC (301,80 mg; 1,4 mmol) e água purificada (1 mL), e em seguida a solução contendo  $\alpha$ AM (300,00 mg; 0,70 mmol) e DCM (5 mL). A reação foi submetida à agitação magnética (a.m.) por 20 h a temperatura ambiente (t.a.), monitorada por CCD (F.E. sílica-gel; F.M. Hex/AcOEt, 95:5, v/v e revelador solução ácida de anisaldeído/aquecimento). O produto final foi particionado utilizando DCM (200 mL) e adicionado sulfato de sódio anidro (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 2,00 g) para a retirada de água e resíduos hidrossolúveis. O produto da reação final foi seco em temperatura ambiente em capela e ventilação; após avaliação por CCD observou-se que o produto não estava puro, por isso em seguida realizou-se uma purificação utilizando uma coluna cromatográfica (18 x 2,5 cm) com F.M. sílica-gel, 230-400 mesh (Merk). O produto foi solubilizado em DCM (10 mL) e adicionado em um gral contendo sílica-gel (10,00 g). O sistema de eluição foi iniciado com hexano, aumentando a polaridade gradativamente adicionando acetato de etila em proporções crescentes, finalizando com FM Hex/AcOEt (80:20 v/v). Após a análise de todas as frações em CCD SiO<sub>2</sub> FM Hex/AcOEt (95:5 v/v) e revelação com solução de solução ácida de anisaldeído/aquecimento, separou-se a fração 22, coletada durante a eluição com FM Hex/AcOEt (85:15 v/v), para análise por IV e RMN  $^{13}\text{C}$ . A reação originou o composto 4 (90,00 mg; 0,21 mmol, rendimento de 30 %).

#### 4.7 Extração da fração volátil (Hidrodestilação) e análise qualitativa por CG/EM: uma investigação prévia.

Para extração da fração volátil o ER (50,00 g) foi submetido à técnica de hidrodestilação (HD) utilizando aparelho tipo *Clevenger*, e como solvente água purificada (150 mL). A temperatura de ebulição (100° C) foi alcançada após 5 minutos. O tempo total de extração foi de 3h, com um rendimento de 10 % (Fluxograma 4). O óleo foi cuidadosamente coletado com uma pipeta Pasteur e armazenado em

vidro fechado, protegido da luz e criopreservado (3 a 5° C), e o hidrolato armazenado em vidro fechado sob refrigeração (3 a 5° C).

**Fluxograma 4.** Método de extração e análise da fração volátil do extrato resinoso de *C.nitida*.



A fração volátil obtida foi submetida à identificação de seus componentes através de cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas, utilizando uma solução com 25 µl da fração volátil em 1 mL de éter dietílico PA.; 0.5 µl foram injetados em um cromatógrafo a gás Perkin-Elmer Clarus 680 acoplado a um espectrômetro de massas Perkin-Elmer Clarus SQ8 (Fluxograma 4). Foi utilizado uma coluna capilar de sílica apolar Elite 5mS (30 m x 0.25 mm, espessura de 0.25 µm), gás de arraste Hélio (He<sub>2</sub>, tipo 5.0, com 99.999% de pureza) com fluxo de 1 mL/min; rampa de temperatura: 35°C (4 min) até 90°C a 20°C/min, tem seguida até 130°C a 5°C/min, 130°C (1 min), finalizando

em 250°C a 15°C/min; temperatura do injetor 250°C *solvent-delay* de 4 minutos; injetor automático em modo split (10 mL/min); ionização por impacto eletrônico (IE) a 70 eV, temperatura da fonte de 180°C e linha de transferência 220°C, detector do tipo quadrupolo, faixa de scan 30 a 600 Da. A identificação dos compostos foi realizada com o auxílio da biblioteca NIST-MS (2011) e comparação com padrão de fragmentação (ADAMS, 1995).



## 5 ENSAIOS BIOLÓGICOS *IN VITRO*

Uma amostra de cada fração (500 mg) foi encaminhada para avaliação de atividade antiprotozoária em forma amastigota (intracelular, em células THP-1) de *Trypanosoma cruzi* e *Leishmania amazonensis* no laboratório de Protozoologia/UFSC, sob coordenação do prof. Dr. Mario Steindel e Dr<sup>a</sup>. Milene Hoer de Moraes.

Uma amostra de cada fração (500 mg) foi encaminhada para investigação de atividade anti-inflamatória e citotoxicidade em cultura celular de macrófagos linhagem murina J774 no laboratório do Grupo de Estudos de Interações entre Micro e Macromoléculas (GEIMM), sob coordenação do Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Fabíola Branco Filipin Monteiro.

### 5.1 ENSAIO DE VIABILIDADE CELULAR (MTT)

O ensaio de viabilidade celular foi realizado utilizando células THP-1 (células adultas de leucemia monocítica aguda), as quais foram semeadas em placas com 96 poços ( $4.0 \times 10^4$  células/poço) e tratadas com a aplicação em série das amostras diluídas nas concentrações de 2 µg/mL a 500 µg/mL e incubadas por 72 h a 37 °C, 5% CO<sub>2</sub>. As placas foram centrifugadas ( $3.700 \times g/7$  minutos), o sobrenadante foi removido e as células foram ressuspensas em 50 µL de uma solução de brometo de 4,5-dimetiltiazol-2-il-2,5-difeniltrazolium (MTT, Amresco) a 3 mg/mL em solução tampão salina e incubada por 4 h a 37°C, 5% CO<sub>2</sub> e centrifugadas ( $3.700 \times g/7$  minutos); o sal de formazan foi solubilizado em 100 µL de DMSO. A densidade óptica foi determinada a 540 nm em um espectrômetro Tecan® Infinite M200. DMSO 1% (v/v) e DMSO 50% (v/v) foram os controles negativo e positivo, respectivamente. Os valores de CI<sub>50</sub> foram calculados por regressão linear com o auxílio do programa GraphPad Prism (SAAD et al., 2011; SCHWENDE et al., 1996).

### 5.2 CITOTOXICIDADE

#### 5.2.1 Cultura celular

A cultura de macrófagos murina J774 foi mantida em meio DMEM suplementado com 10% de soro bovino fetal (SBF) contendo 100 U/mL de penicilina, 100 µg/mL de estreptomicina e 10 mM de ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinaetano sulfônico (HEPES). As células

foram cultivadas a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub> e o meio foi alterado a cada 48 h. As células foram cultivadas até confluir 80-90% e depois subcultivadas após a dissociação por raspagem usando um agente de borracha.

### 5.2.2 Ensaio de citotoxicidade

A citotoxicidade das frações foi avaliada utilizando o ensaio de *resazurin* (Alamar blue®). Para os macrófagos,  $3 \times 10^5$  células/poço foram semeadas em meio DMEM suplementado com 10 % SBF (RAMBERSAD, 2012). Após 24 h, o meio foi substituído pelo meio contendo as frações nas concentrações de 1, 2,5, 5, 10, 25, 50 e 100 µg/mL e incubadas a 37° C por 24 h. Em seguida, as células foram incubadas com 100 µL (0,1 mg/mL) de tintura de *resazurin* por 3 h a 37° C. A fluorescência foi verificada após intervalos de 1 h usando o leitor de microplacas (IS55, Perkin Elmer – USA) a 530-590 nm. A regressão linear de cada fração *versus* porcentagem de viabilidade celular foi determinada em ordem de obter a concentração tóxica de 10% (causando 90% de viabilidade celular) usando *GraphPad Prism 5.0* (GraphPad Software 5.0, Inc., San Diego, CA).

### 5.3 ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA

A atividade anti-inflamatória *in vitro* das frações obtidas por cromatografia líquida a vácuo foi avaliada realizando uma metodologia modificada a partir de HERATH et al. (2003) medindo a produção de nitrito, um indicador de síntese de óxido nítrico (NO) no sobrenadante de macrófagos ativados por lipopolissacarídeo (LPS). Para isso, as células foram semeadas em placas de 24 poços ( $2 \times 10^5$  células/poço). Após 24 h, o meio foi trocado e as células viabilizadas (CC<sub>10</sub>) foram adicionadas em meio DMEM suplementado com 10 % SBF. Após 15 minutos, os macrófagos foram estimulados com LPS a 10 µg/mL e incubados por 24 h. A seguir, o sobrenadante foi coletado e a produção de nitrito foi medida adicionando 100 µL de reagente de *Griess* (1 % sulfanilamida e 0,1% *N*-(1-naftil) etilenodiamina em 0,5 % de ácido fosfórico). A absorbância foi determinada com o leitor de microplaca (ELX800, Biotek – USA) a 540 nm. Além disso, a concentração de TNF- $\alpha$  foi determinada pelo ensaio de captura de antígeno ELISA (BD Bioscience – USA) de acordo com instruções fornecidas pelo fabricante.

## 5.4 ATIVIDADE ANTIPROTOZOÁRIA

### 5.4.1 Atividades tripanocida e leishmanicida *in vitro*

A cultura celular de macrófagos THP-1 (ATCC TIB202) cresceu em meio RPMI-1640 sem vermelho de fenol (Sigma-Aldrich, CO. St. Louis, MO, USA), suplementado com 10 % SBF (Life Technologies, USA), 12,5 mM HEPES, penicillina (100 U/mL), estreptomicina (100 µg/mL) e Glutamax (2 mM), a 37° C em incubadora a 5 % CO<sub>2</sub>. Formas promastigotas de *L. amazonensis* MHOM/BR/77/LTB0016 expressando β-galactosidase foram crescidas em meio de Schneider a 26° C (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) suplementado com 5 % de SBF inativado e 2 % de urina humana.

Células THP-1 ( $4,0 \times 10^4$  /poço) foram cultivadas em placas com 96 poços em um meio RPMI-1640 e incubado com 100 ng/mL de 13-acetato-12-miristato de forbol (PMA, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) por 72 h a 37° C em 5% CO<sub>2</sub>, para permitir a diferenciação de células THP-1 para dentro de macrófagos não-divididos (SCHWENDE et al., 1996). Após quatro dias as culturas de promastigotas ( $4,0 \times 10^6$  parasitas/mL) foram lavadas com solução tampão fosfato salina pH 7,4 (PBS), e incubadas em meio RPMI-1640 suplementado com 10 % de serum humano B+ aquecido e inativado por 1 h a 34° C para a opsonização do parasita. As células THP-1 foram incubadas com uma proporção de 10:1 parasitas/célula por 4 h a 34° C e 5% CO<sub>2</sub>. Após este período os parasitas que não aderiram foram removidos por uma lavagem com PBS e as células infectadas foram incubadas com 180 µL de meio completo suplementado RPMI-1640 por mais 24 h para permitir a transformação de forma promastigota para amastigota intracelular.

A β-galactosidase de *Trypanosoma cruzi*, cepa Tulahuén, foi fornecida pelo Laboratório de Parasitologia Celular e Molecular, Centro de Pesquisas René Rachou, FIOCRUZ, Belo Horizonte. A cultura derivada de tipomastigotas de linhagem de células L929 infectadas usada para diferenciar de THP-1 infectados ( $4,0 \times 10^4$  células/poço) em microplacas de 96 poços e uma proporção de 2:1 de parasitas/célula e incubadas *overnight* a 37° C em atmosfera de 5% CO<sub>2</sub>. O meio contendo parasitas não-aderidos foi removido e substituído com 180 µL de meio fresco (BUCKNER et al., 1996).

As amostras foram solubilizadas em dimetilsulfóxido (DMSO) e diluídas em série (500 µg/mL a 2 µg/mL). Células infectadas em

monocamada foram tratadas pela adição de 20  $\mu$ L de cada amostra, em triplicate, seguida pela incubação por 48 h a 34° C ou 37° C, 5 % CO<sub>2</sub>. Após o tratamento, as células foram cuidadosamente lavadas com PBS e incubadas por 16 h a 37° C com 250  $\mu$ l de vermelho de clorofenol- $\beta$ -D-galactopiranosídeo (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA, CPRG) a 100  $\mu$ M e Nonidet P-40 (Amresco Inc, Solon, Ohio, USA, NP-40) 0,1%. A densidade óptica foi lida a 570/630 nm no equipamento Infinite M200 TECAN, Austria (SIEUWERTS et al, 1995; VAN DE LOOSDRECHT et al., 1991). A concentração de cada amostra que reduziu a viabilidade do parasita em 50 % quando comparado ao controle negativo (CI<sub>50</sub>) foi estimado pela curva de regressão-linear de concentração-resposta. Anfotericina B (Sigma-Aldrich) e benznidazol (Sigma-Aldrich) foram utilizados como controle-positivos para atividade leishmanicida e tripanocida, respectivamente e DMSO 1 % como controle negativo. A concentração capaz de inibir 50 % (CI<sub>50</sub>) dos parasitas e a proliferação de células THP-1 (CC<sub>50</sub>) foi utilizada para expressar a atividade antiparasitária e a citotoxicidade, respectivamente. Índice de seletividade (IS) de cada amostra foi determinado pela razão CC<sub>50</sub>/CI<sub>50</sub>.

## 5.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram demonstrados como a média  $\pm$  desvio padrão (DP) dos três experimentos. A análise de variância de *One-way* seguida pelo teste de comparação múltipla de Dunnett foi realizada, e o nível de significância em um conjunto de  $p < 0.05$  (*GraphPad Software 5.0*, Inc., San Diego, CA.). serão considerados os dados obtidos pelas amostras, controle positivo e controle negativo.



## 6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 6.1 Caracterização dos metabólitos secundários do extrato resinoso de *C. nitida*

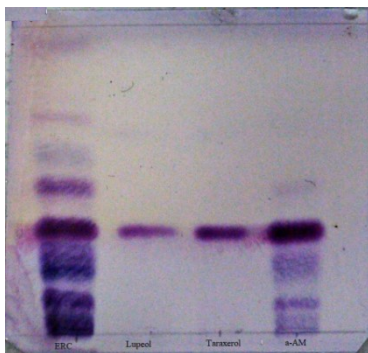
O material vegetal apresentava odor agradável e adocicado e a coloração variava de marrom claro a castanho claro.

O ER foi submetido à reação de Liebermann-Buchard (conforme item 4.4.1) revelando o aparecimento da cor marrom escuro, comprovando a presença do anel ciclopentanodehidrofenatreno, presente em triterpenos e esteróides (Figura 7).



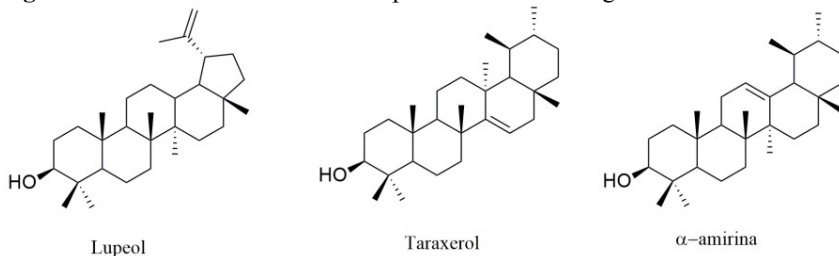
Em uma análise comparativa do extrato resinoso (conforme item 4.3) com padrões de lupeol, taraxerol e  $\alpha$ AM utilizando CCD (F.E. sílica-gel, F.M. Hex/AcOEt, 95:5, v/v, e revelador solução ácida de anisaldeído/aquecimento) foi observado que a fração pré-purificada apresentava substâncias com valores de  $R_F$ 's semelhantes aos dos triterpenos utilizados como padrões (Figura 8 e Figura 9).

**Figura 8.** CCD do ER (1) e padrões de lupeol (2), taraxerol (3) e  $\alpha$ -amirina (4). Fase móvel: Hex/AcOEt (95:5, v/v); revelador: solução ácida de anisaldeído e aquecimento.



CCD F.E. SiO<sub>2</sub>; FM Hex/AcOEt (95:5 v/v); as bandas podem ser visualizadas após revelação com solução ácida de anisaldeído/aquecimento. 1) Extrato resinoso; 2) Lupeol; 3) Taraxerol; 4)  $\alpha$ AM isolada do ER.

**Figura 9.** Estruturas dos triterpenos referentes à Figura 8.



Os triterpenos pentacíclicos  $\alpha$ -amirina e  $\beta$ -amirina podem ser facilmente extraídos como solventes orgânicos como o etanol, propanol ou metanol, sendo este último o mais efetivo uma vez que favorece a precipitação dos triterpenos devido à diferença de polaridade entre o soluto e solvente propiciando elevado rendimento (WAGH et al., 2012).

Dentre as formas de caracterização de triterpenos tem-se a cromatografia, utilizando reações de derivatização para obter um analito com menor ponto de ebulição. Em CCD,  $\alpha$ AM não é visível a UV 254 nm e 366 nm, porém é facilmente visualizada se a placa for revelada com spray de solução ácida de anisaldeído e aquecimento (105° C) ou vanilina sulfúrica e aquecimento (SOLDI et al., 2008). Um problema a ser considerado é de que os triterpenos e esteróides, por possuírem estruturas e polaridades semelhantes, podem apresentar coeluição,

sendo necessário outros métodos de identificação complementares (XU et al., 1988; BHAWANI et al., 2010).

Os triterpenos  $\alpha$ AM e  $\beta$ AM foram anteriormente isolados por WAGH, GUJAR E GAIKAR (2012) do latex de *Calotropis gigantea* (Apocynaceae) através da técnica de Soxhlet utilizando os solventes metanol e clorofórmio, sendo o solvente mais polar o mais efetivo para extração. (WAGH; GUJAR; GAIKAR, 2012).

O composto obtido a partir dos 4 métodos de purificação utilizados (Fluxograma 3),  $\alpha$ AM ( $3\beta$ -hidroxi-urs-12-en-3-ol), tem a fórmula molecular  $C_{30}H_{50}O$ , ponto de fusão (PF) 184-186° C, em EM apresenta o pico  $m/z$   $[M+H]^+$  426,2975. O espectro de infravermelho (IV) identifica  $\mu_{\max}$  (KBr): 3450 (-OH) e 2895 (H-C=)  $cm^{-1}$ . Em CCD, apresenta um Rf de 0,65 – F.E. sílica gel; F. M. Hex/AcOet 95:5, revelando-se como uma banda violeta não visível em UV, assim como a mistura de  $\alpha$ - e  $\beta$ -amirina (HERNÁNDEZ-VÁZQUEZ et al., 2011). Os sinais característicos (demonstrados em Figura 31 e Figura 32) são os obtidos de H-3 (3,16 MHz,  $dd$ ,  $J = 5,1$  e 11,2MHz, deslocamento característico de hidroxila), H-12 (1,85 MHz,  $t$ ,  $J = 3,2$  MHz, deslocamento característico de ligação  $sp_2$ ), H-22 (1,85 MHz,  $dt$ ,  $J = 3,0$  MHz e 7,0 MHz, deslocamento característico de metila), H-29 (0,85 MHz,  $d$ ,  $J = 6,0$  MHz) e H-30 (0,73 MHz,  $d$ ,  $J = 7,0$  MHz), sendo estes dois últimos relacionados à duas metilas semelhantes.

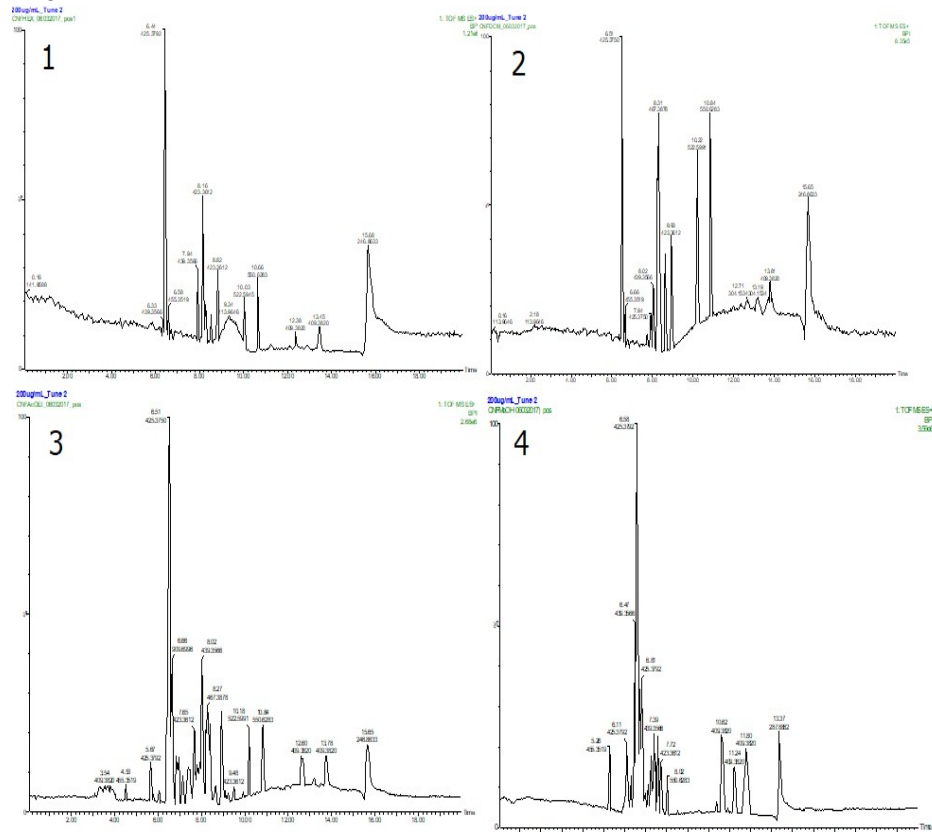
### 6.1.1 Análise cromatográfica por CLUE-EM/EM

A técnica de cromatografia líquida de ultraeficiência acoplada à espectrometria de massas permite a análise de amostras complexas, as quais possuem compostos que apresentam o comportamento semelhante em CCD (mesmos Rf's), e que não são facilmente identificadas por RMN (KIND; FIEHN, 2017). Os triterpenos  $\alpha$ AM e  $\beta$ AM, por exemplo, apresentaram Rf de 0,66 em placas de sílica e F. M. hex/AcOEt 95:5 e revelador solução ácida de anisaldeído sulfúrico/aquecimento; através da análise em cromatografia de camada delgada foi possível detectar 9 compostos, porém em investigação posterior por CLUE-EM foi possível identificar 20 compostos, conforme demonstrado na 0 utilizando como base de identificação os valores da massa molecular, dos fragmentos gerados, além da comparação do fragmento principal de cada composto com publicações relacionadas em bases de dados como REAXYS (com margem de 5 ppm de filtro de precisão) e ChemSpider.

O estudo de desrepliação das frações obtidas por cromatografia líquida a vácuo (Hex, DCM, AcOEt e MeOH) consistiu em separar os

compostos por cromatografia líquida de ultra eficiência, gerando os cromatogramas ilustrados na Figura 10, e identificá-los através dos fragmentos gerados, utilizando a espectrometria de massas em *tandem*. Através da análise por CLUE-EM/EM, foi possível identificar a presença de dezessete compostos (listados nas Tabelas 1 a 7) os quais foram submetidos ao analisador triplo quadrupolo; o primeiro quadrupolo seleciona um íon específico, o segundo atua como célula de colisão (dissociação induzida por colisão) e o terceiro separa os íons produzidos, fornecendo os “íons filhos” (SILVERSTEIN, 2013).

**Figura 10.** Cromatogramas de picos base obtidos por ESI (+) da fração de hexano (1), DCM (2), AcOEt (3) e MeOH (4), conforme descrito no item 4.4.3



Eixo X: tempo, em min; eixo Y: porcentagem relativa.

**Tabela 1 -** Substâncias identificadas nas frações de Hexano (HEX), Diclorometano (DCM), Acetato de etila (AcOEt) e Metanol (MeOH) por CLUE-EM/EM (ESI (+) , modo positivo, tempo de retenção 4,53 min, 5,67 min e 6,33 min.

TR	$m/z$ [M+H] <sup>+</sup> experimental	Massa teórica ( $m/z$ )	Formula molecular	Fragmentos EM/EM	Proposta de estrutura	HEX	DCM	AcOEt	MeOH
4,53	515,3730	515,3736 [M+H] <sup>+</sup>	C <sub>32</sub> H <sub>50</sub> O <sub>5</sub>	455,3518; 437,3442; 409,3488; 397,3110; 343,2635; 313,2548; 295,2458; 257,1937; 251,1651; 245,1920; 203,1775; 201,1653; 189,1643; 187,1501; 173,1347; 121,1030;	Rubiprasina C ou ácido 3-O-acetil pomólico			p	p
5,67	425,3792	425,3783 [M+H] <sup>+</sup>	C <sub>30</sub> H <sub>48</sub> O	407,3693; 271,2441; 245,2273; 221,1935; 217,1968; 203,1804; 191,1808; 161,1359; 147,1194; 133,1028; 109,1031.	Anidroforadiol			p	p
6,33	457,3659	457,3683 [M+H] <sup>+</sup>	C <sub>30</sub> H <sub>48</sub> O <sub>3</sub>		Ácido ursólico				p

**Tabela 2 -** Substâncias identificadas nas frações de Hexano (HEX), Diclorometano (DCM), Acetato de etila (AcOEt) e Metanol (MeOH) por CLUE-EM/EM (ESI (+)), modo positivo, tempo de retenção 6,51 min, 6,66 min e 6,84 min.

TR	$m/z$ [M+H] <sup>+</sup> experimental	Massa teórica ( $m/z$ )	Formula molecular	Fragmentos EM/EM	Proposta de estrutura	HEX	DCM	AcOEt	MeOH
6,51	425,3750	425,3783 [M+H] <sup>+</sup>	C <sub>30</sub> H <sub>48</sub> O	407,3651; 311,2744; 271,2441; 217,1938; 203,1804; 191,1808; 175,1480; 147,1169; 133,1028; 123,1165; 109,1031.	3-hidroxi-urs- 12,15-dieno	p	p	p	p
6,66	909,6996	909,6972 [2M+H] <sup>+</sup>	C <sub>30</sub> H <sub>46</sub> O <sub>3</sub>	437,3442; 419,3312; 409,3447; 369,2801; 313,2548; 311,2383; 295,2458; 257,1937; 245,1920; 201,1653; 203,1833; 189,1643; 187,1501; 159,1501; 133,1028; 109,1031.	Ácido 3β- hidroxiurs-12,18- dien-28-oico ou ácido micromérico ou ácido 3β- hidroxiurs- 12,19(29)-dien- 28-oico		p	p	p
6,84	457,3659	457,3682 [M+H] <sup>+</sup>	C <sub>30</sub> H <sub>48</sub> O <sub>3</sub>	439,3609; 421,3522; 393,3505; 343,2635; 313,2584; 295,2423; 269,2303; 255,2132; 229,1971; 201,1653; 187,1501; 159,1173; 135,1182; 109,1031.	Ácido Oleanólico			p	p

**Tabela 3 -** Substâncias identificadas nas frações de Hexano (HEX), Diclorometano (DCM), Acetato de etila (AcOEt) e Metanol (MeOH) por CLUE-EM/EM (ESI (+)), modo positivo, tempo de retenção 6,92 min, 7,14 min, 7,39 min e 7,47 min.

TR	$m/z$ [M+H] <sup>+</sup> experimental	Massa teórica ( $m/z$ ) [M+H] <sup>+</sup>	Formula molecular	Fragmentos EM/EM	Proposta de estrutura	HEX	DCM	AcOEt	MeOH
6,92	443,3867	443,3889 [M+H] <sup>+</sup>	C <sub>30</sub> H <sub>50</sub> O <sub>2</sub>	425,3792; 407,3651; 315,2705; 297,2593; 259,2048; 247,2072; 243,2106; 229,1971; 215,1821; 187,1473; 175,1507; 161,1333; 149,1355; 135,1182; 123,1182; 109,1031.	Eritrodiol			p	p
7,14	427,3936	427,3940 [M+H] <sup>+</sup>	C <sub>30</sub> H <sub>50</sub> O	409,3820; 299,2760; 271,2441; 229,1971; 217,1968; 191,1808; 189,1643; 163,1489; 149,1330; 137,1321; 135,1182; 123,1188; 121,1030; 109,1009.	<i>A</i> -amirina ou <i>β</i> - amirina			p	p
7,39	441,3737	441,3733 [M+H] <sup>+</sup>	C <sub>30</sub> H <sub>48</sub> O <sub>2</sub>	423,3654; 405,3533; 315,2705; 297,2593; 287,2397; 269,2303; 259,2048; 247,2072; 241,1991; 229,1971; 215,1821; 201,1682; 189,1643; 175,1507; 161,1333; 149,1355; 135,1182; 109,1031.	Dehidrouvaol			p	
7,47	427,3936				Não identificado				p

**Tabela 4 -** Substâncias identificadas nas frações de Hexano (HEX), Diclorometano (DCM), Acetato de etila (AcOEt) e Metanol (MeOH) por CLUE-EM/EM (ESI (+)), modo positivo, tempo de retenção 7,65 min, 7,72 min, 7,94 min e 8,02 min.

TR	$m/z$ [M+H] <sup>+</sup> experimental	Massa teórica ( $m/z$ ) [M+H] <sup>+</sup>	Formula molecular	Fragmentos EM/EM	Proposta de estrutura	HEX	DCM	AcOEt	MeOH
7,65	441,3737	441,3733 [M+H] <sup>+</sup>	C <sub>30</sub> H <sub>48</sub> O <sub>2</sub>	423,3654; 405,3533; 315,2705; 297,2593; 259,2048; 247,2072; 241,1991; 229,1971; 215,1821; 189,1671; 177,1674; 161,1359; 149,1355; 135,1182; 121,1030; 109,1031.	Isômero de Dehidrouvaol		p	p	
7,72	443,3867	423,3627 [M+H] <sup>+</sup>	C <sub>30</sub> H <sub>46</sub> O						p
7,94	485,3981	485,3995 [M+H] <sup>+</sup>	C <sub>32</sub> H <sub>52</sub> O <sub>3</sub>	425,3750; 407,3693; 297,2628; 235,2115; 217,1968; 205,1968; 191,1808; 177,1647; 163,1489; 149,1330; 135,1182; 121,1030; 109,1031.	3-acetoxi-urs- 12,15-dieno		p		
8,02	499,3794	499,3787 [M+H] <sup>+</sup>	C <sub>32</sub> H <sub>50</sub> O <sub>4</sub>	439,3566; 355,2642; 343,2635; 297,2593; 241,1959; 229,1971; 217,1968; 203,1804; 201,1653; 191,1808; 189,1643; 187,1501; 135,1182; 121,1007; 109,1009.	Ácido oleanólico 3- acetato	p	p	p	



**Tabela 5 -** Substâncias identificadas nas frações de Hexano (HEX), Diclorometano (DCM), Acetato de etila (AcOEt) e Metanol (MeOH) por CLUE-EM/EM (ESI (+)), modo positivo, tempo de retenção 8,27 min, 8,38 min, 8,57 min e 8,68 min .

TR	$m/z$ [M+H] <sup>+</sup> experimental	Massa teórica ( $m/z$ ) [M+H] <sup>+</sup>	Formula molecular	Fragmentos EM/EM	Proposta de estrutura	HEX	DCM	AcOEt	MeOH
8,27	467,3878	467,3889 [M+H] <sup>+</sup>	C <sub>32</sub> H <sub>50</sub> O <sub>2</sub>	407,3651; 323,2731; 311,2744; 297,2593; 283,2434; 271,2441; 269,2303; 217,1968; 203,1804; 191,1808; 189,1643; 161,1333; 147,1169; 133,1028; 109,1009.	Acetato de urs- 12,20(30)-dien- 3 $\alpha$ -ila ou acetato de urs- 12,19(29)-dien- 3 $\beta$ -ila ou acetato de gigantursenil A	p	p	p	
8,38	499,3794	499,3787 [M+H] <sup>+</sup>	C <sub>32</sub> H <sub>50</sub> O <sub>4</sub>	439,3566; 421,3480; 405,3533; 393,3505; 313,2584; 297,2593; 295,2423; 247,2072; 241,1959; 229,1971; 203,1804; 191,1808; 189,1643; 161,1359; 147,1169; 135,1182; 121,1007; 109,1009.	Ácido 3 $\beta$ -O- acetilursólico	p		p	
8,57	439,3524								p
8,68	423,3612	423,3627 [M+H] <sup>+</sup>	C <sub>30</sub> H <sub>46</sub> O	405,3533; 297,2558; 269,2303; 255,2132; 241,1959; 229,1971; 201,1653; 189,1643; 187,1501; 149,1355; 135,1182; 121,1030; 109,1031.	Olean-9(11),12- dien-3-ona			p	

**Tabela 6 -** Substâncias identificadas nas frações de Hexano (HEX), Diclorometano (DCM), Acetato de etila (AcOEt) e Metanol (MeOH) por CLUE-EM/EM (ESI (+)), modo positivo, tempo de retenção 8,93 min, 9,48 min e 12,60 min, .

TR	$m/z$ [M+H] <sup>+</sup> experimental	Massa teórica ( $m/z$ ) [M+H] <sup>+</sup>	Formula molecular	Fragmentos EM/EM	Proposta de estrutura	HEX	DCM	AcOEt	MeOH
8,93	441,3737	441,3733	C <sub>30</sub> H <sub>48</sub> O <sub>2</sub>	423,3612; 405,3533; 297,2558; 269,2303; 255,2132; 241,1959; 229,1971; 201,1653; 189,1643; 187,1501; 149,1355; 135,1182; 121,1030; 109,1031.	Isômero de Dehidrouvaol	p	p	p	
9,48	423,3612	423,3627	C <sub>30</sub> H <sub>46</sub> O	405,3533; 297,2558; 269,2303; 255,2132; 241,1959; 229,1971; 201,1653; 189,1643; 187,1501; 149,1355; 135,1182; 121,1030; 109,1031.	Ursa-9(11),12- dien-3-ona			p	
12,60	409,3820	409,3820	C <sub>30</sub> H <sub>48</sub>	299,2725; 271,2441; 257,2265; 243,2138; 231,2140; 217,1968; 205,1939; 203,1804; 191,1808; 163,1489; 149,1330; 135,1182; 123,1188; 109,1009.	Olean-11,13(18)- dieno	p		p	p

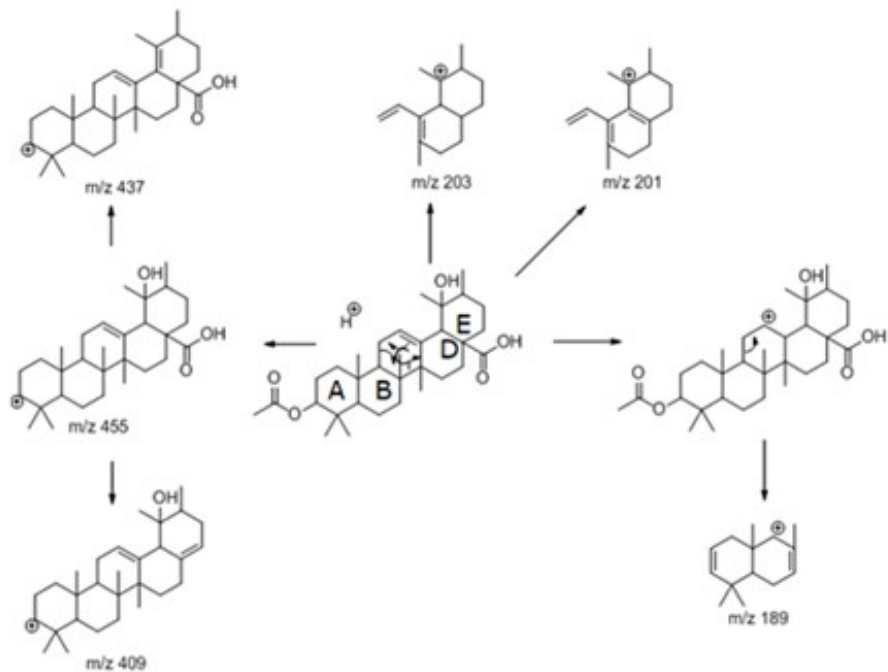
**Tabela 7 -** Substâncias identificadas nas frações de Hexano (HEX), Diclorometano (DCM), Acetato de etila (AcOEt) e Metanol (MeOH) por CLUE-EM/EM (ESI (+)), modo positivo, tempo de retenção 13,19 min e 13,78 min.

TR	$m/z$ [M+H] <sup>+</sup> experimental	Massa teórica ( $m/z$ ) [M+H] <sup>+</sup>	Formula molecular	Fragmentos EM/EM	Proposta de estrutura	HEX	DCM	AcOEt	MeOH
13,19	409,3820	409,3820 [M+H] <sup>+</sup>	C <sub>30</sub> H <sub>48</sub>		Isômero de olean- 11,13(18)-diene			p	p
13,78	409,3820	409,3820 [M+H] <sup>+</sup>	C <sub>30</sub> H <sub>48</sub>	313,2910; 285,2605; 259,2443; 257,2298; 231,2109; 203,1833; 177,1647; 149,1330; 137,1345; 123,1188; 109,1031.	Isômero de olean- 11,13(18)-diene	p	p	p	p

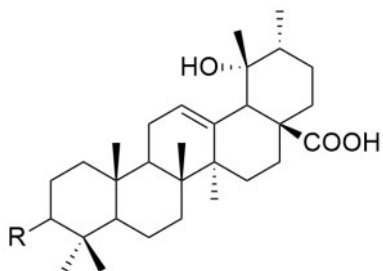
As frações obtidas pela CLV (F Hex, F DCM, F AcOEt e F MeOH) tiveram a melhor ionização no modo positivo para aquisição do cromatograma, onde foi possível identificar 17 triterpenos pentacíclicos do tipo oleanano e ursano. O pico predominante nas quatro frações corresponde ao composto 3-Hidroxi-urs-12,15-dieno, que possui estrutura semelhante à  $\beta$ am, porém apresenta uma insaturação a mais no anel D.

O primeiro composto, com tempo de retenção de 4,53 min, exibiu um pico base de massa  $m/z$  455,3518, 60 Da ( $\text{H}_3\text{CCO}_2\text{H}$ ) a menos que a massa  $m/z$  515,3730 observada no mesmo espectro de massas. A fórmula molecular  $[\text{C}_{32}\text{H}_{50}\text{O}_5+\text{H}]^+$  foi então deduzida. A massa em tandem (Figura 11) corresponde ao fragmento  $m/z$  455,3518 correspondente à perda de ácido acético (60 Da). Este último eliminou ainda  $\text{H}_2\text{O}$  (18 Da) e  $\text{HCO}_2\text{H}$  (46 Da), para originar os fragmentos  $m/z$  437,3442 e  $m/z$  409,3488, respectivamente. Supondo que a ionização ocorreu na OH localizada no anel E, o íon decalina foi formado a partir do mecanismo de *Retro-Diels-Alder* (RDA) abrindo o anel C, o qual pôde originar os fragmentos  $m/z$  203,1775 ou  $m/z$  201,1653 após a perda de  $[\text{H}_2\text{O}$  (18 Da);  $\text{CO}_2$  (44 Da)] ou  $[\text{H}_2\text{O}$  (18 Da);  $\text{HCO}_2\text{H}$  (46 Da)], respectivamente. Após uma pesquisa detalhada na literatura da fórmula molecular dos fragmentos acima foi possível identificar os compostos rubiprasina-C, identificada por ITOKAWA et al. (1989) no extrato etanólico das raízes de *Rubia cordifolia* (Rubiaceae) através de análise por IV, RMN e EM ou ácido 3-O-acetil pomólico, identificado por SONG et al. (2013) na subfração AcOEt extraída no extrato metanólico do cálice de *Fragaria ananassa*, o qual demonstrou efeito inibitório na melanogênese (54,6%, na concentração de 12,5  $\mu\text{M}$ ) em células B16-F10 e em meio de cultura de melanina, sendo diferenciados somente pela estereoquímica do grupamento carboxila em C-3, conforme demonstrado na Figura 12.

**Figura 11.** Mecanismo de fragmentação da substância com TR de 4,53 min;  $m/z$  515,3730 identificado nas frações AcOEt e MeOH.



**Figura 12.** Diferença estrutural entre rubiprasina C e ácido 3-O-acetil pomólico

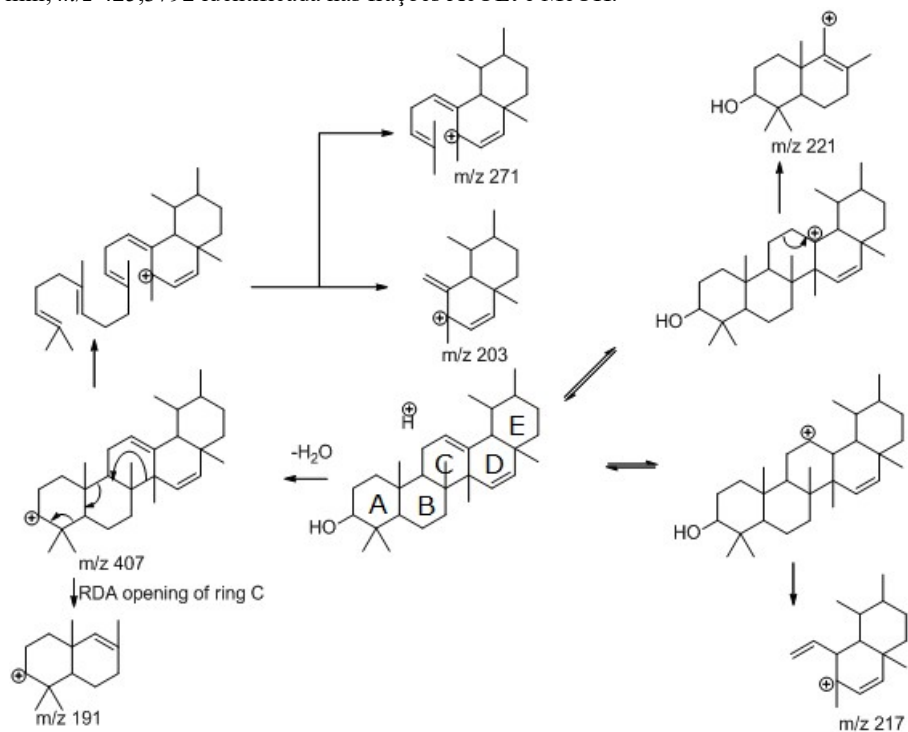


R =  $\alpha$ -COOH = rubiprasina C

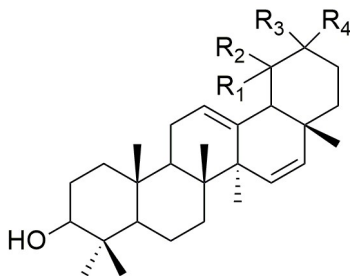
R = B-COOH = ácido 3-O- acetil pomólico

A massa de valor  $m/z$  425,3792 (TR 5,67 min) identificada no segundo pico corresponde à fórmula molecular  $[C_{30}H_{48}O+H]^+$  e originou os íon filho  $m/z$  407,3693 após a perda de uma molécula de  $H_2O$  (18 Da). Este íon também originou o fragmento  $m/z$  191,1808 pela abertura do anel C por RDA. Adicionalmente, outros fragmentos ilustrados na Figura 13 permitiram a atribuição da estrutura de massa  $m/z$  425,3792 como anidrosoforadiol. Um padrão de fragmentação similar foi observado para o composto detectado em 6,51 min, o qual possui a mesma massa  $m/z$  425,3750  $[C_{30}H_{48}O+H]^+$ . A comparação com fragmentos conhecidos na literatura proporcionou identificar o composto como 3-hidroxi-urs-12,15-dieno (Figura 14).

**Figura 13.** Mecanismo de fragmentação da substância com TR de 5,67 min;  $m/z$  425,3792 identificada nas frações AcOEt e MeOH.



**Figura 14.** Diferença estrutural entre anidrosoforadiol e 3-hidroxi-urs-12,15-dieno.

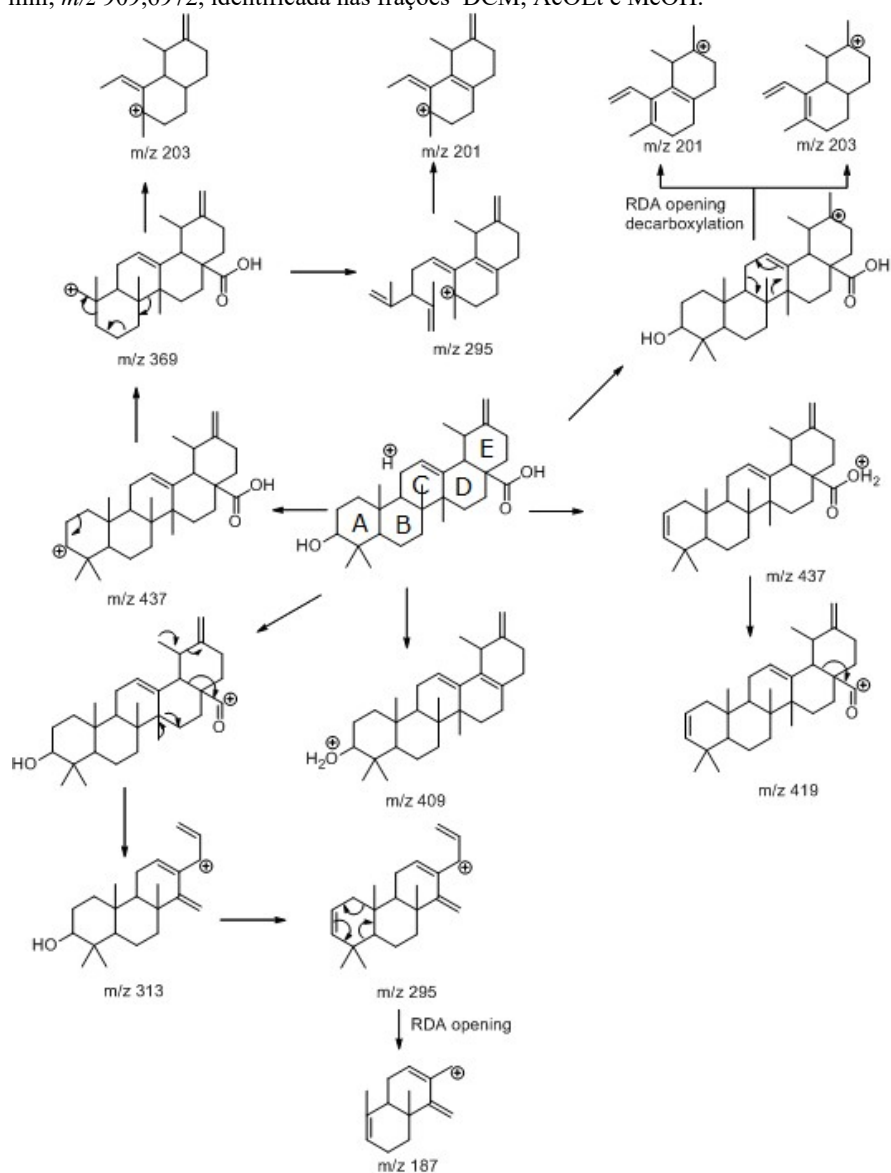


$R_1; R_2 = H; R_3; R_4 = CH_3 =$  anidrosoforadiol

$R_1; R_3 = H; R_2; R_4 = CH_3 =$  3-hidroxi-urs-12,15-dieno

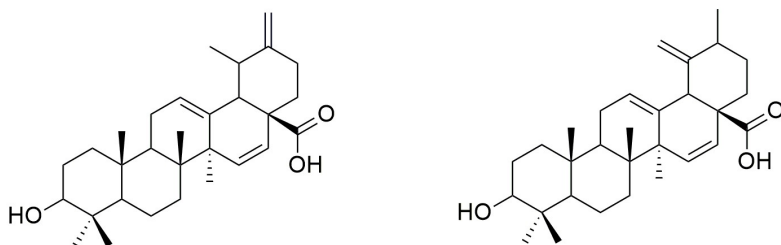
A massa  $m/z$  909,6996 detectada em 6,66 min corresponde ao dímero  $[2C_{30}H_{46}O_3+H]^+$ . Os fragmentos  $m/z$  437,3442 e  $m/z$  419,3312 foram originados após a perda de uma (18 Da) e duas  $H_2O$  (36 Da) respectivamente, no espectro em tandem. Este íon primário sofreu uma descarboxilação ( $HCO_2H$ , 46 Da) originando  $m/z$  409,3447; três espécies iônicas (Figura 15) foram identificadas com massa de  $m/z$  437,3442 e entre elas, uma com a carga positiva sobre o carbono carbonílico. Conforme ilustrado na Figura 15, o composto sofreu uma abertura do anel E com a eliminação da porção hidrocarboneto, produzindo o fragmento  $m/z$  313,2526 e que por sua vez perdeu  $H_2O$  (18 Da) para originar o fragmento  $m/z$  295,2558. Aliás, se a ionização ocorrer no anel E ocorrerá a abertura do anel C por RDA originando o composto decalina, formada pelos anéis D e E. Os íons  $m/z$  203,1833 e  $m/z$  201,1653 foram formados à parte da decalina, após a descarboxilação de  $CO_2$  (44 Da) e  $HCO_2H$  (46 Da), respectivamente. As informações mencionadas acima indicaram a identidade do composto ácido  $3\beta$ -hidroxiurs-12,18(30)-dien-28-óico (ácido micromérico) ou ácido  $3\beta$ -hidroxiurs-12,19(29)-dien-28-óico. Estes dois metabólitos diferenciam-se pela posição da dupla ligação (Figura 16), a qual não foi estabelecida pela proposta de mecanismo de formação do fragmento.

**Figura 15.** Mecanismo de fragmentação da substância com TR de 6,66 min;  $m/z$  909,6972, identificada nas frações DCM, AcOEt e MeOH.





**Figura 16.** Diferença estrutural entre ácido 3 $\beta$ -hidroxiurs-12,18(30)-dien-28-óico (ácido micromérico) ou ácido 3 $\beta$ -hidroxiurs-12,19(29)-dien-28-óico.

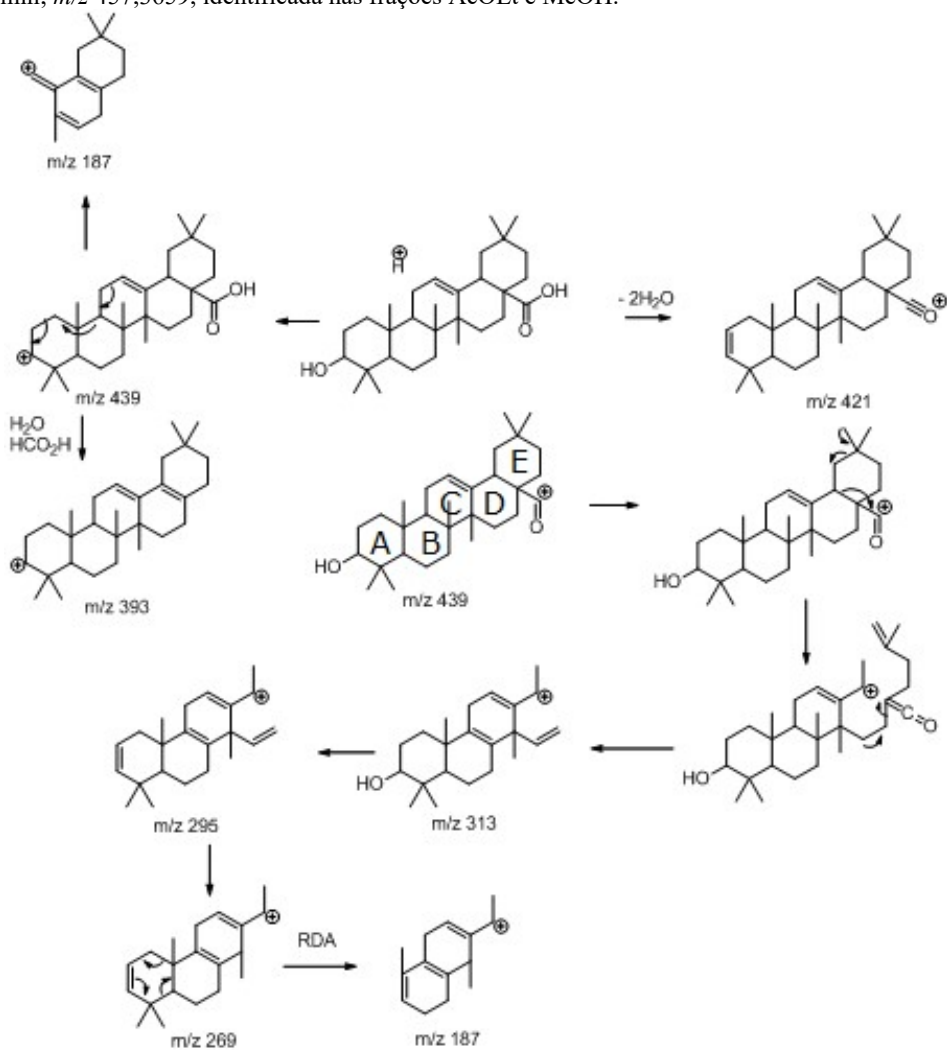


3 $\beta$ -hidroxiurs-12,18(30)-dien-28-óico ou  
Ácido micromérico

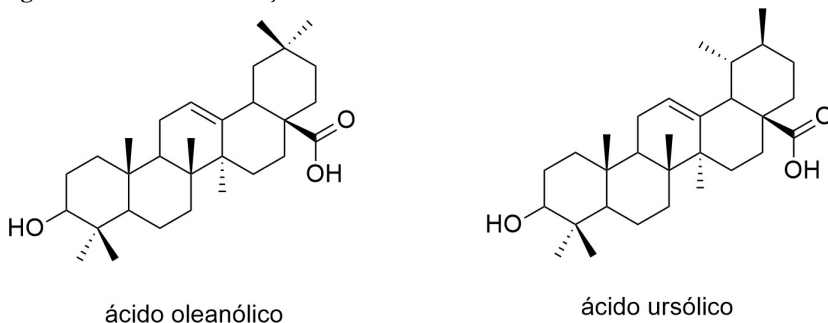
3 $\beta$ -hidroxiurs-12,19(29)-dien-28-óico

O composto de massa  $m/z$  457,3659 (TR 6,84 min) corresponde à fórmula molecular  $[C_{30}H_{48}O_3+H]^+$ . No espectro  $MS^2$  foi possível identificar os fragmentos  $m/z$  439,3609,  $m/z$  421,3522 e  $m/z$  393,3505 formados após a perda de  $H_2O$ ,  $2H_2O$  e  $H_2O/HCO_2H$ , respectivamente. O precursor demonstrou dois íons com massa  $m/z$  439,3609, entre eles um fragmento carregado no carbono carbonílico. A posição da carga induziu o deslocamento e a abertura dos anéis D e E para originar o fragmento  $m/z$  313,2584, o qual após a perda de  $H_2O$  originou  $m/z$  295,2423 (Figura 17); a partir dos dados encontrados pode-se supor que os compostos referem-se ao ácido oleanólico e ácido ursólico (Figura 18). O ácido oleanólico apresenta baixa biodisponibilidade por via oral (25 a 50 mg/kg em ratos,  $F_{1/4}$  0,7 %), e tem sido utilizado como medicamento para doença hepática na China. O ácido ursólico apresenta atividade hipoglicemiante, antiaterosclerótica e antioxidante; e a mistura dos dois triterpenos na concentração de 60 mg/kg por 6 semanas promove prevenção no desenvolvimento de hipertensão severa, aterosclerose e diminuição da resistência à insulina. Além disso, triterpenos ácidos exibem potente atividade diurética, inibindo a reabsorção de  $Na^+$  e  $K^+$  na porção anterior do túbulo distal (SHENG; SUN, 2011).

**Figura 17.** Mecanismo de fragmentação da substância com TR de 6,84 min;  $m/z$  457,3659, identificada nas frações AcOEt e MeOH.

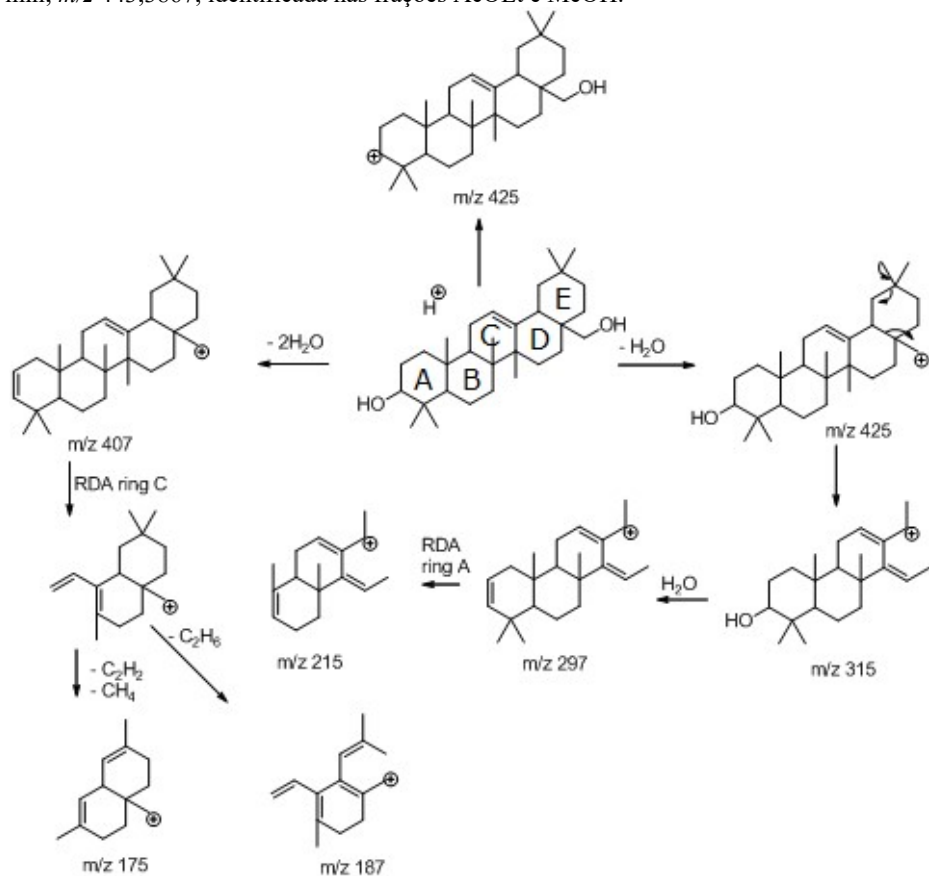


**Figura 18.** Diferença estrutural entre ácido oleanólico e ácido ursólico.



O composto  $m/z$  443,3867  $[\text{C}_{30}\text{H}_{50}\text{O}_2+\text{H}]^+$  identificado em 6,92 min exibiu no espectro de  $\text{MS}^2$  picos correspondentes à perda de  $\text{H}_2\text{O}$  e  $2\text{H}_2\text{O}$  para  $m/z$  425,3792 e  $m/z$  407,3651, respectivamente. A abertura do anel C do fragmento  $m/z$  407,3651 ocorreu pelo mecanismos de RDA resultando no fragmento  $m/z$  175,1505 após a perda de um acetileno. O fragmento  $m/z$  425,3792 contém um carbocátion primário, o qual originou o fragmento  $m/z$  315,2705 após a abertura dos anéis D e E, e perda do grupo metila (16 Da) (Figura 19). Além disso,  $m/z$  297,2593 possui 18 Da a menos que  $m/z$  315,2705, onde foi possível supor a perda de  $\text{H}_2\text{O}$ . A combinação de todas as informações dos fragmentos encontrados resultou na caracterização do composto fitoesterol eritrodíol. Este composto foi identificado em um estudo de BOTELHO et al. (2014) através da extração das sementes de *Sesamum indicum* L. por fluido de  $\text{CO}_2$  supercrítico, relatando a atividade neuroprotetora em doenças neurodegenerativas, como na prevenção de acidente vascular cerebral.

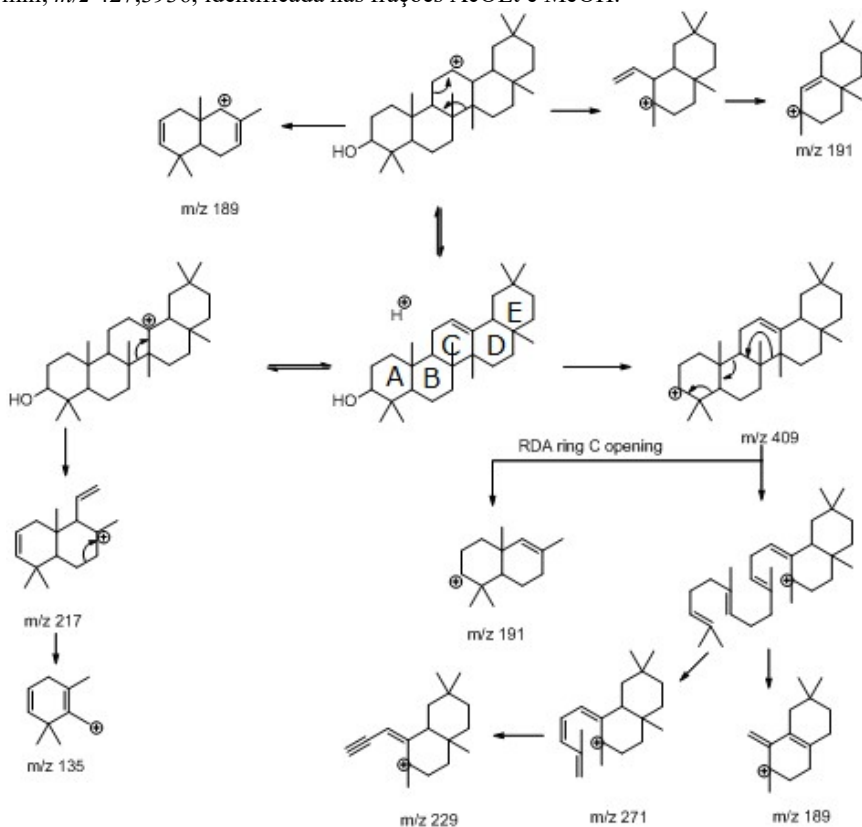
**Figura 19.** Mecanismo de fragmentação da substância com TR de 6,92 min;  $m/z$  443,3867, identificada nas frações AcOEt e MeOH.



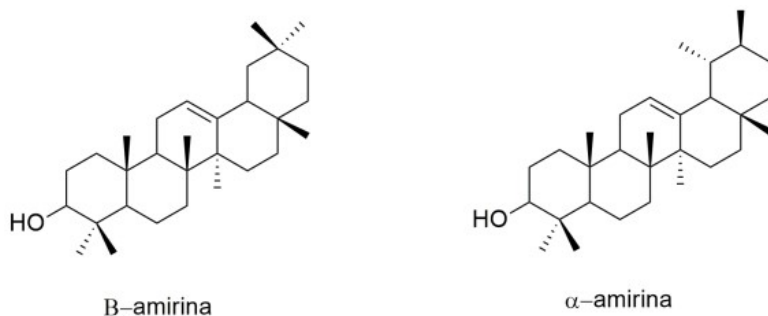
A massa  $m/z$  427,3936 encontrada no pico em 7,14 min corresponde à fórmula molecular  $[C_{30}H_{50}O+H]^+$ . No espectro de  $MS^2$  foi identificado o fragmento  $m/z$  409,3820, originado pela perda de  $H_2O$  (18 Da). Este fragmento sofreu a abertura do anel C pelo mecanismo de RDA (Retro-Diels Alder) produzindo  $m/z$  191,1808. O deslocamento da carga positiva em cascata promoveu a abertura dos anéis A, B e C e perda de íon residual na porção hidrocarboneto (Figura 20), originando os 86PM86  $m/z$  189,1643 e  $m/z$  271,2441; posteriormente ocorreu a eliminação de um radical propeno originando o fragmento  $m/z$

229,1971. Outro fragmento encontrado foi  $m/z$  217,1968 após a ionização na ligação dupla carbono-carbono formando um carbocátion terciário. Este íon desencadeou a abertura do anel C e após a eliminação dos anéis fundidos D e E ou  $H_2O$ , o fragmento  $m/z$  217,1968 foi produzido. Todos os fragmentos identificados  $m/z$  427,3936 levam à única conclusão que os dois compostos correspondem à  $\alpha$ - e  $\beta$ -amirina (Figura 21).

**Figura 20.** Mecanismo de fragmentação da substância com TR de 7,14 min;  $m/z$  427,3936, identificada nas frações AcOEt e MeOH.

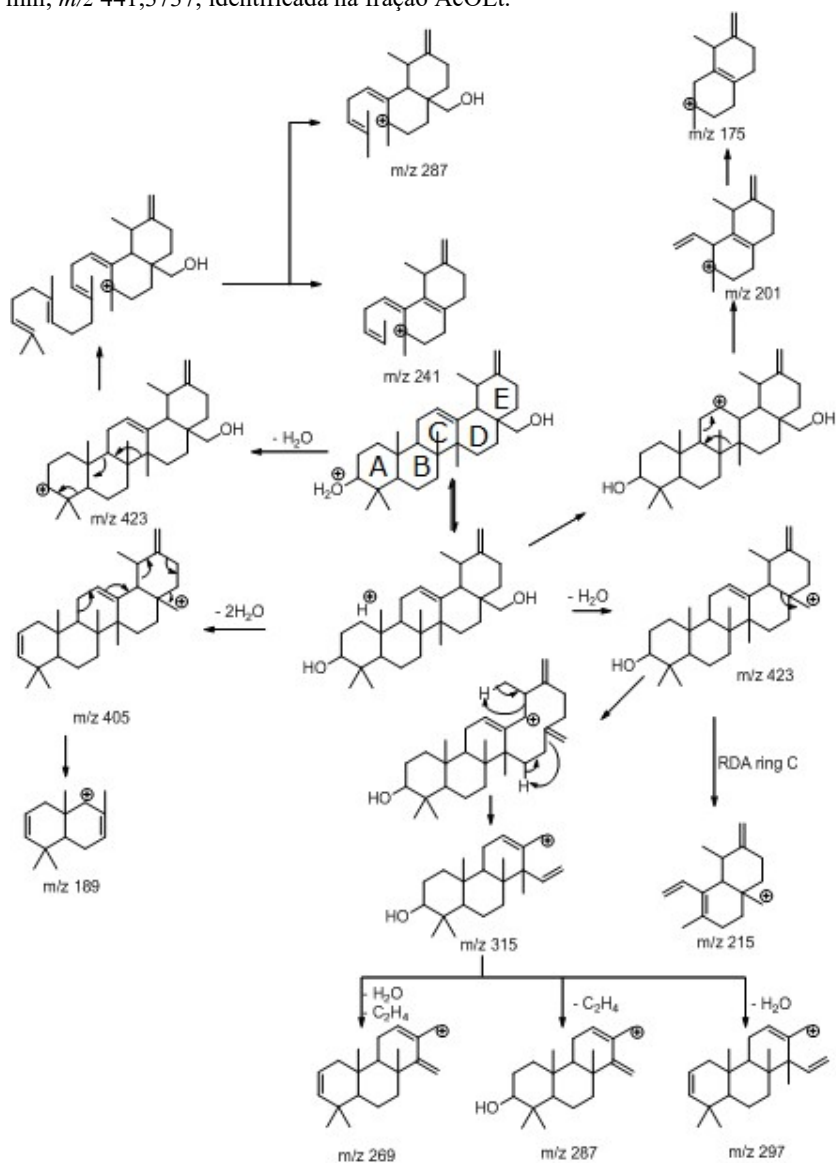


**Figura 21.** Diferença estrutural entre  $\alpha$ - e  $\beta$ -amirina



A análise do espectro de massa em tandem do fragmento  $m/z$  441,3737  $[\text{C}_{30}\text{H}_{48}\text{O}_2+\text{H}]^+$  (TR 7.39 min) produziu os íons  $m/z$  423,3654 e  $m/z$  405,3533 correspondentes à perda de  $\text{H}_2\text{O}$  e  $2\text{H}_2\text{O}$ , respectivamente. Dois íons foram encontrados com valores de massa  $m/z$  423,3654, e entre eles um apresentou-se carregado com um carbocátion primário abrindo o anel C pelo mecanismo de RDA originando  $m/z$  215,1821; enquanto isso, a deslocalização da carga no mesmo carbocátion primário originou a combinação dos anéis D e E. Em adição, a perda do resíduo de hidrocarboneto demonstrado na Figura 22 levou aos fragmentos  $m/z$  315,2705 que por sua vez originou os fragmentos de menor massa  $m/z$  297,2593,  $m/z$  287,2397 e  $m/z$  269,2303 após a perda de respectivamente  $\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{C}_2\text{H}_4$  (28 Da) e  $\text{H}_2\text{O}/\text{C}_2\text{H}_4$ . O segundo fragmento  $m/z$  423,3654 carregado com um carbocátion secundário sofreu a deslocalização da carga através da via retrobiossintética através de sete átomos de carbono. A perda de um fragmento de hidrocarboneto envolvendo os anéis A e B originaram o fragmento  $m/z$  287,2397 que por sua vez eliminou um radical isopreno (68 Da) e MeOH (32 Da) para formar  $m/z$  201,1682. Os dados acima mencionados em combinação originaram a identificação do composto  $m/z$  441,3737 como dehidrouvaol. Os isômeros foram detectados em 7,65 min e 8,93 com o mesmo padrão de fragmentação.

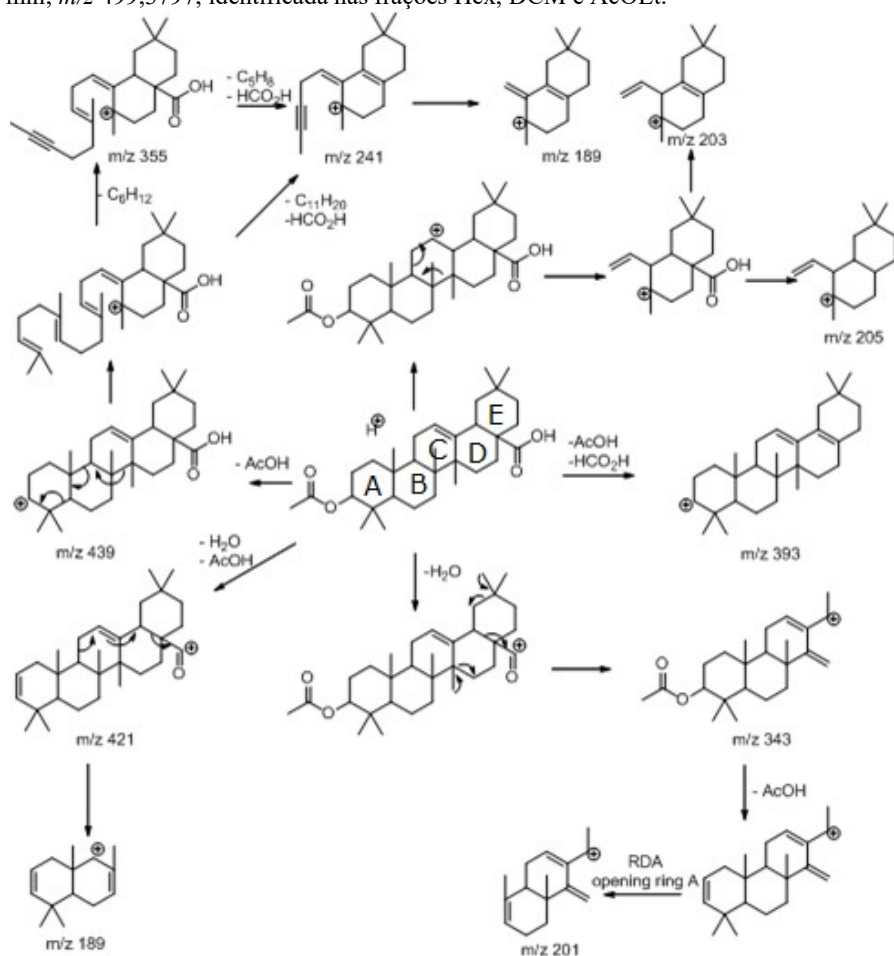
**Figura 22.** Mecanismo de fragmentação da substância com TR de 7,39 min;  $m/z$  441,3737, identificada na fração AcOEt.



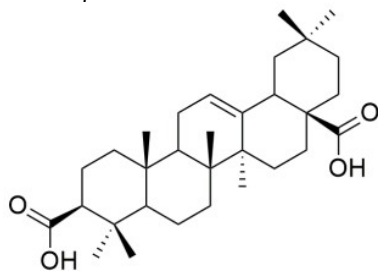
O pico identificado em 8,02 min de massa  $m/z$  499,3794  $[C_{32}H_{50}O_4+H]^+$  possui os fragmentos  $m/z$  439,3599;  $m/z$  421,3480 e  $m/z$  393,3546 correspondentes aos fragmentos formados após a eliminação de  $H_3CCO_2H$  (60 Da),  $H_3CCO_2H/H_2O$  (78 Da) e  $H_3CCO_2H/HCO_2H$  (106 Da), respectivamente (Figura 23). O precursor  $m/z$  499,3794 após a perda de  $H_2O$  e o deslocamento da carga positiva no fragmento seguido pela perda da porção hidrocarboneto nos anéis D e E resultaram em  $m/z$  343,2673; o qual após a eliminação de  $H_3CCO_2H$  (60 Da) e abertura do anel A por RDA originou o fragmento  $m/z$  201,1653. O 90PM filho  $m/z$  439,3599 foi identificado após o deslocamento da carga positiva, ocorrendo abertura do anel A-C pelo modo retro-biosintético. Além disso, o fragmento intermediário após a perda de  $C_6H_{12}$  (84 Da), e  $C_{11}H_{20}/HCO_2H$  (198 Da) resultaram nos fragmentos  $m/z$  355,2642 and  $m/z$  241,1959, respectivamente. Os dados encontrados associados puderam sugerir que o composto encontrado foi ácido 3-acetato oleanólico (Figura 23). Outro composto, detectado em 8.38 min, possui o mesmo valor de massa e fragmentação similar, sugerindo ser o ácido  $3\beta$ -O-acetilursólico (Figura 24).



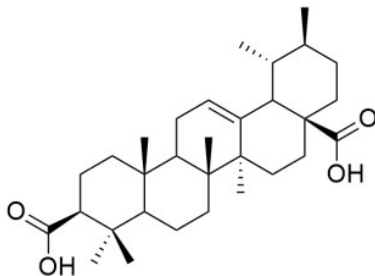
**Figura 23.** Mecanismo de fragmentação da substância com TR de 8,02 min;  $m/z$  499,3797, identificada nas frações Hex, DCM e AcOEt.



**Figura 24.** Diferença estrutural entre ácido 3- $\beta$ -O-acetil-oleanólico e ácido 3- $\beta$ -O-acetil-ursólico.



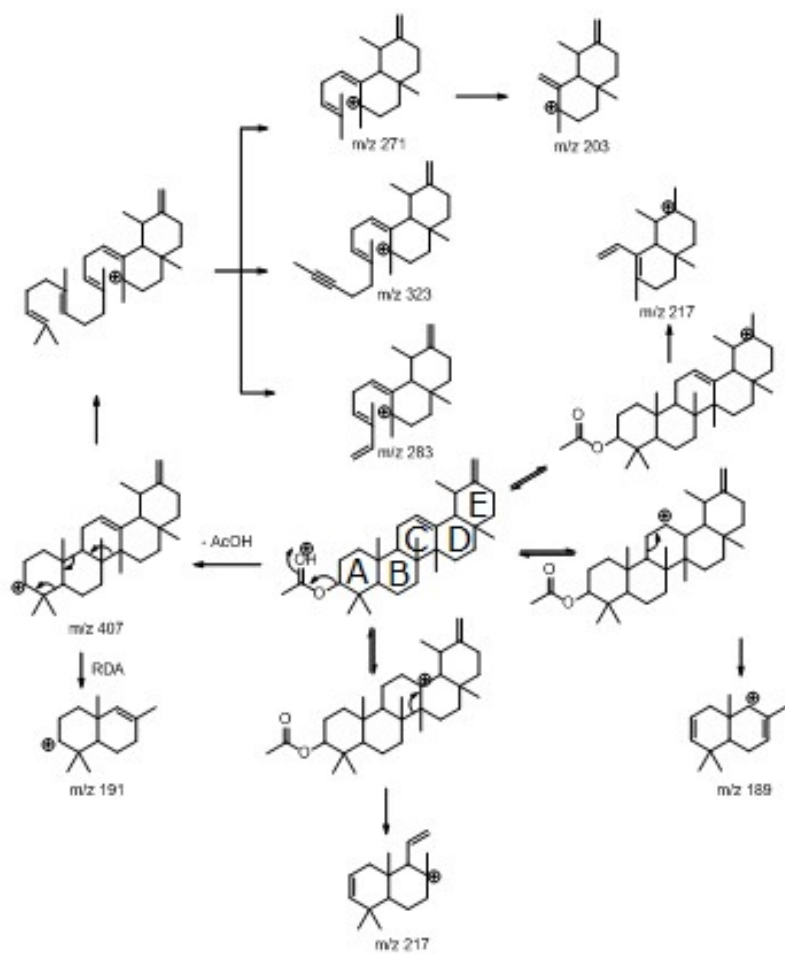
ácido 3- $\beta$ -O-acetil-oleanólico



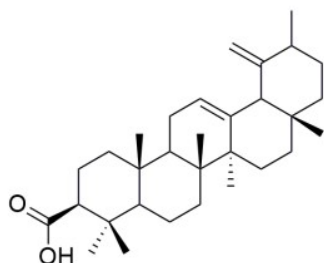
ácido 3- $\beta$ -O-acetil-ursólico

O fragmento  $m/z$  467,3878  $[C_{32}H_{50}O_2+H]^+$  detectado em 8,27 min demonstrou no espectro em tandem o fragmento  $m/z$  407,3651 após a perda de  $H_3CCO_2H$  (60 Da). Este 92PM filho produziu o fragmento  $m/z$  191,1808 após a abertura do anel C pelo mecanismo de RDA. Ocorreu a abertura dos anéis A-C durante o deslocamento da carga, ocorrendo uma estrutura intermediária com perda de duas unidades isoprenil ( $C_{10}H_{16}$ , 136 Da) resultando no fragmento  $m/z$  271,2441; do fragmento  $m/z$  203,1804 originou-se  $m/z$  271,2441 após a perda de uma unidade de isoprenil (68 Da). Baseado nos dados obtidos (Figura 25) pode-se supor que a estrutura identificada foi acetato de urs-12,20(30)-dien-3 $\alpha$ -il ou acetato de urs-12,19(29)-dien-3 $\beta$ -il (Figura 26).

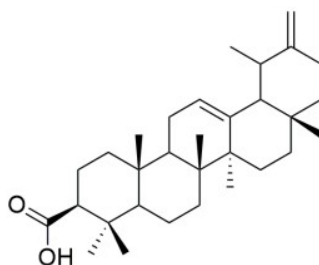
**Figura 25.** Mecanismo de fragmentação da substância com TR de 8,27 min;  $m/z$  467,3878, identificada nas frações Hex, DCM e AcOEt.



**Figura 26.** Diferença estrutural entre acetato de urs-12,20(30)-dien-3 $\alpha$ -il ou acetato de urs-12,19(29)-dien-3 $\beta$ -il.



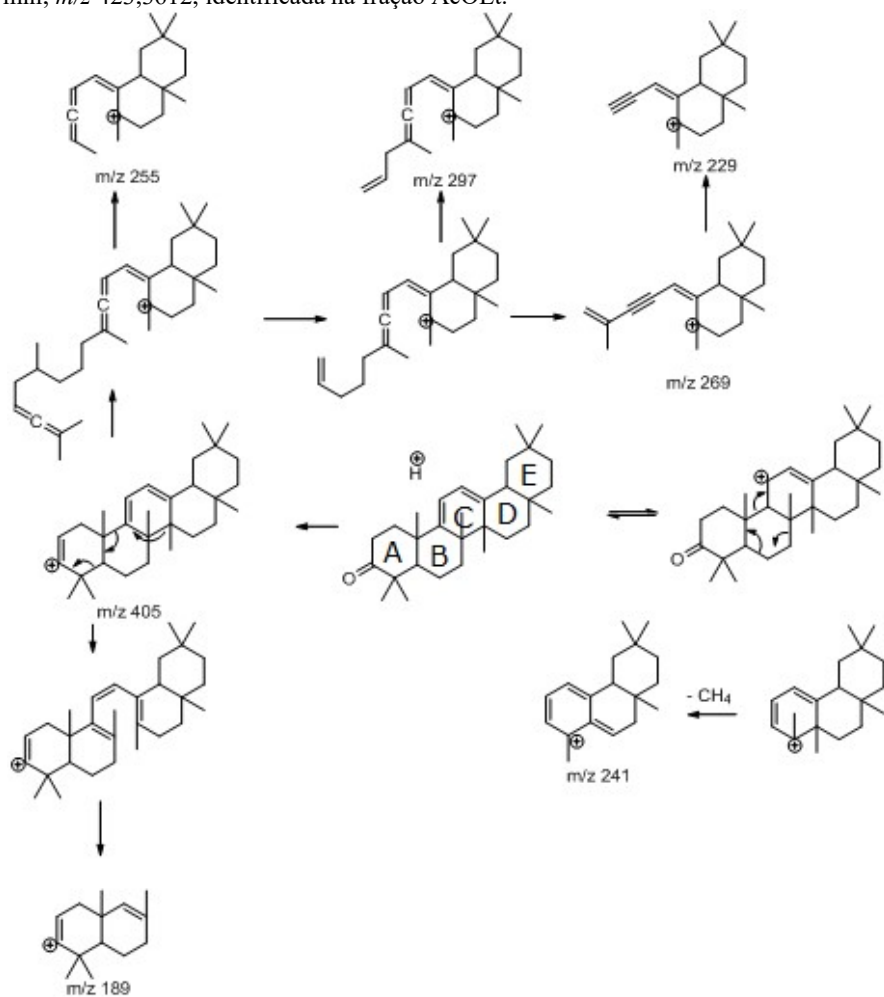
acetato de urs-12,19(29)-dien-3 $\beta$ -il.



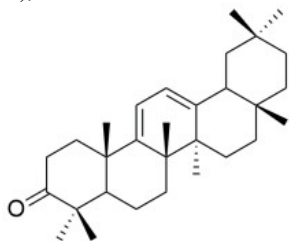
acetato de urs-12,20(30)-dien-3 $\alpha$ -il

Dois compostos similares foram identificados em 8,68 min e 9,48 min com o valor de massa de  $m/z$  423,3612 correspondente a  $[\text{C}_{30}\text{H}_{46}\text{O}+\text{H}]^+$ . Ambos os compostos sofreram fragmentação na análise de  $\text{MS}^2$ . O fragmento filho de massa  $m/z$  405,3533 foi originado a partir de seu precursor após a perda de  $\text{H}_2\text{O}$  (18 Da). Como demonstrado na Figura 27, ocorreu abertura dos anéis A-C no fragmento  $m/z$  405,3533 após o deslocamento da carga positiva e a perda de um radical hidrocarboneto, conduzindo a formação de  $m/z$  255,2132,  $m/z$  297,2558;  $m/z$  269,2303 e  $m/z$  229,1971 (0); os fragmentos encontrados (Figura 27) sugerem que os compostos são olean-9(11),12-dien-3-ona e urs-9(11),12-dien-3-ona (Figura 28).

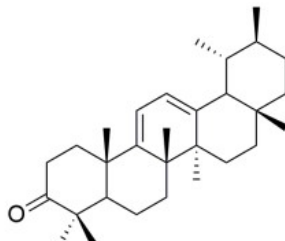
**Figura 27.** Mecanismo de fragmentação da substância com TR de 8,68 min;  $m/z$  423,3612, identificada na fração AcOEt.



**Figura 28.** Diferença estrutural entre olean-9(11),12-dien-3-ona e urs-9(11),12-dien-3-ona.



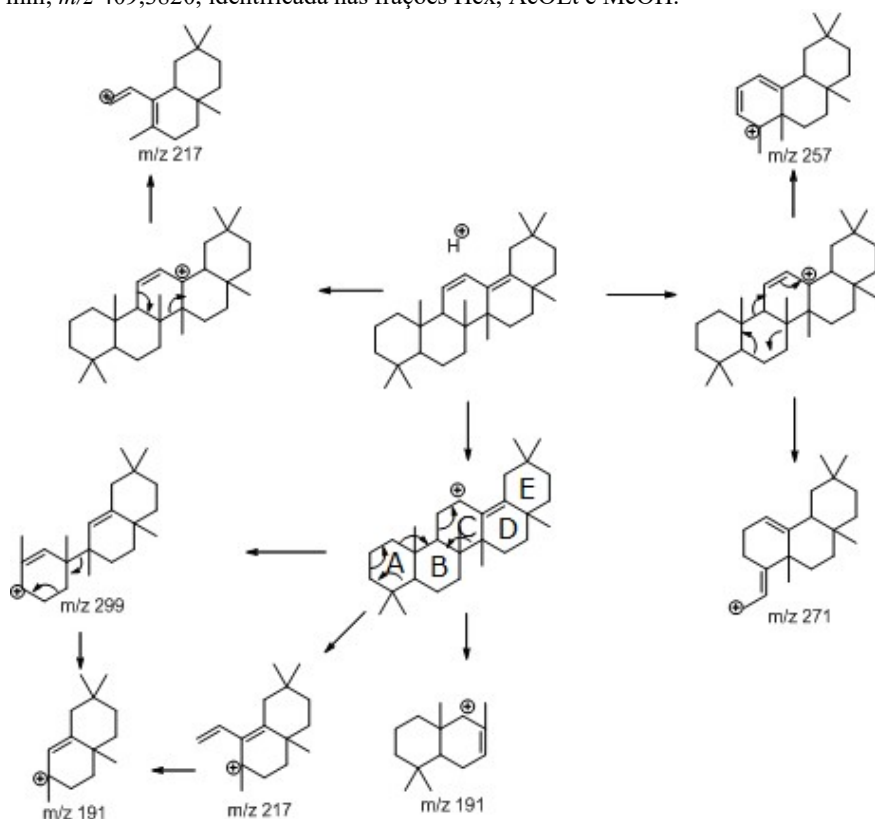
olean-9(11),12-dien-3-ona



ursa-9(11),12-dien-3-ona

Os dois últimos metabólitos foram detectados em 12,60 min e 13,78 min com valores idênticos de massa  $m/z$  409,3820 que corresponde a  $[C_{30}H_{48}+H]^+$ . Baseado no perfil de fragmentação demonstrado na Figura 29, podendo sugerir a identificação do composto olean-11,13(18)-dieno.

**Figura 29.** Mecanismo de fragmentação da substância com TR de 12,60 min;  $m/z$  409,3820, identificada nas frações Hex, AcOEt e MeOH.



## 6.2 Purificação do composto majoritário

### 6.2.1 Composto 1 ( $\alpha$ -amirina; urs-12-em-3 $\beta$ -ol)

Para o isolamento e identificação do triterpeno  $\alpha$ -amirina, foram realizados quatro métodos, conforme Fluxograma 3, onde foram avaliados pelo tempo de extração em horas e volume de solvente necessário. No método de extração 1 foi possível obter um rendimento de 5,25 %, porém foi necessário 12 horas em banho de ultrassom e 3 litros de solvente orgânico para purificar 81,96 g de extrato resinoso; os rendimentos foram menores pelos métodos de extração 2 e 3; o método 4 demonstrou ser eficiente, onde foi necessário 750 ml de solvente para

purificar 30,00 g de extrato resinoso na metade do tempo dos outros três métodos, resultando em 4,46 % de substância isolada. Os dados comparativos referentes aos quatro métodos podem ser observados na Tabela 8 -. A substância isolada foi identificada por IV, RMN  $^1\text{H}$  e RMN  $^{13}\text{C}$ .

O método de espectroscopia de infravermelho foi utilizado para a identificação dos grupos funcionais presentes no composto isolado, assim como nos produtos de reação obtidos a seguir. A análise de RMN  $^1\text{H}$  e RMN  $^{13}\text{C}$  foi empregada como um recurso para identificar a disposição do esqueleto hidrocarbônico (RIBEIRO; DE SOUZA, 2007).

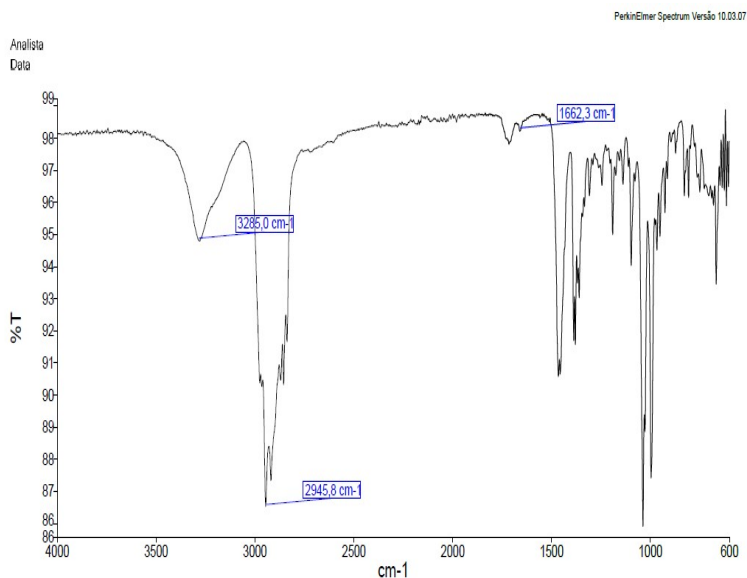
**Tabela 8 -** Comparação entre os métodos de extração realizados.

Método de extração	Tempo (h)	ER (g)	Volume de solvente (mL)				massa $\alpha\text{AM}$ (g)	Rend $\alpha\text{AM}$ (%)
			Hex	DCM	AcOEt	MeOH		
1	12	81,96	2990	-	10	-	4,30	5,25
2	12	30,00	-	-	-	2250	0,40	1,33
3	12	30,00	1084	200	16	1500	0,87	2,89
4	6	30,00	726 /24 (ácido acético)				1,34	4,46

Conforme identificado no espectro relativo à Figura 30, o valor de  $3285,0\text{ cm}^{-1}$  e  $2945,8\text{ cm}^{-1}$  correspondem as bandas de vibração da hidroxila e de CH respectivamente;  $1662,3\text{ cm}^{-1}$  corresponde à frequência de deformação axial de  $\text{C}=\text{C}$  em sistema cíclico (SILVERSTEIN, 2013). Os dados de RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  (Tabela 9 - e Tabela 10 -) foram comparados aos dados anteriormente publicados por HERNÁNDEZ-VÁZQUEZ et al., 2011 e EBAJO JR. et al., et al., 2015, sendo os espectros demonstrados em Figura 31 e Figura 32. Para identificar se o composto seria alfa ou beta-amirina; os valores de deslocamento em C-12 (124,4 ppm) e C-13 (139,9 ppm) foram determinantes para a identificação da  $\alpha$ -amirina. Há uma diferença no valor de deslocamento em C-29 considerável entre  $\alpha$  e  $\beta$ -amirina, onde foi observado o deslocamento de 17,5 ppm da amostra, coincidindo novamente com o dado da  $\alpha$ -amirina. Foi realizada uma busca sobre publicações relacionando  $\alpha$ -amirina e espécies do gênero *Cola*, porém nenhuma referência foi encontrada.

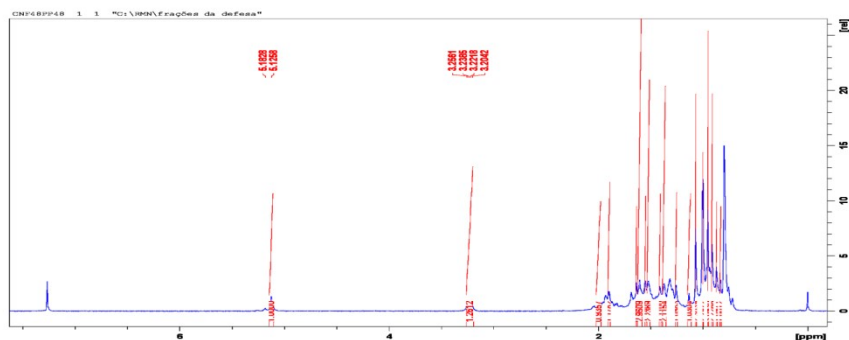


**Figura 30.** Espectro de Infravermelho da substância para a substância  $\alpha$ -amirina ( $\alpha$ Am, composto 1) obtida através do método de isolamento descrito no item 4.5



Espectro de varredura no infravermelho (IV): eixo X = número de ondas (cm<sup>-1</sup>); eixo Y = porcentagem de transmitância.

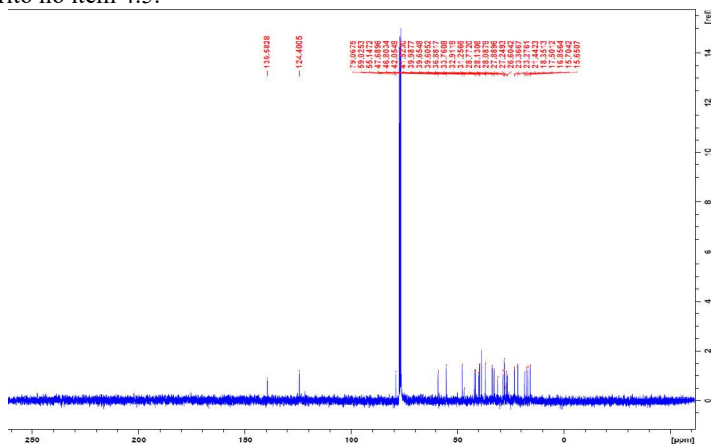
**Figura 31.** Espectro de RMN <sup>1</sup>H (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>, TMS) para a substância  $\alpha$ -amirina ( $\alpha$  Am, composto 1) obtida através do método de isolamento descrito no item 4.5



**Tabela 9 -** Dados de RMN  $^1\text{H}$  para a substância  $\alpha$ -amirina ( $\alpha\text{Am}$ , composto 1) obtida através do método de isolamento descrito no item 4.5 e dados comparativos da literatura.

Posição	$\alpha\text{AM}$ isolada (composto 1) $\text{CDCl}_3/\text{TMS}$ $\delta$ (100PM); J (MHz)	$\alpha\text{AM}$ (HERNÁNDEZ- VÁZQUEZ et al., 2011) $\delta$ (100PM); J (MHz)	$\alpha\text{AM}$ (EBAJO JR., et al., 2015) $\delta$ (100PM); J (MHz)	$\beta\text{AM}$ (HERNÁNDEZ -VÁZQUEZ et al., 2011) $\delta$ (100PM); J (MHz)
	$\delta^1\text{H}$ (300 MHz)	$\delta^1\text{H}$	$\delta^1\text{H}$ (600 MHz)	$\delta^1\text{H}$
H-3	3,23 (dd, 5,1; 10,0)	3,16 (dd, 5,1; 11,2)	3,15	3,15 (dd, 4,4; 10,8)
H-5		0,67 (d, 11,6)	0,67	0,68 (d, 11,0)
H-12	5,13 (t, 3,5)	5,06 (t, 3,2)	5,12	5,12 (t, 3,2)
H-15	1,98 (td, 4,0; 13,5H $\beta$ )	1,94 (td, 4,5; 13,5 H $\beta$ )		1,89 (td, 4,0; 13,5 H $\beta$ )
H-16		1,76 (td, 5,0; 13,5 H $\beta$ )		1,70 (td, 4,3; 13,5 H $\beta$ )
H-19	1,91 (dd, 3,3; 11,6)			1,93 (dd, 4,0; 13,7 H $\beta$ )
H-22	1,85 (dt, 2,88; 8,6)	1,85 (dt, 3,0; 7,0)		1,80m
H-23	0,93s	0,93s	0,95s	0,77s
H-24	0,9s	0,74s	0,76s	0,90s
H-25	0,72s	0,73s	0,75s	0,73s
H-26	0,87s	0,89s	0,89s	0,93s
H-27	1,00s	1,01s	1,01s	1,19s
H-28	0,95s	0,94s	0,95s	1,07s
H-29	0,88 (d, 11,09)	0,85 (d, 6,0)	0,85 (d, 6,0)	0,87s
H-30	0,73(d, 10,0)	0,73 (d, 7,0)	0,75 (d, 7,0)	0,80s

**Figura 32.** Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , TMS) para a substância  $\alpha$ -amirina (composto 1) obtida através do método de isolamento descrito no item 4.5.



**Tabela 10 -** Dados de RMN  $^{13}\text{C}$  para a substância  $\alpha$ -amirina ( $\alpha$ Am, composto 1) obtida através do método de isolamento descrito no item 4.5 e dados comparativos da literatura.

Posição	$\alpha$ Am isolada (composto 1) $\delta^{13}\text{C}$ (101PM) ( $\text{CD}_3\text{Cl}$ , TMS, 75 MHz)	$\alpha$ Am (HERNÁNDEZ- VÁZQUEZ et al., 2011) $\delta$ (101PM)	$\alpha$ Am (FINGOLO et al., 2013) $\delta$ (101PM) ( $\text{CD}_3\text{Cl}$ , 100 MHz)	$\beta$ Am (HERNÁNDEZ- VÁZQUEZ et al., 2011) $\delta$ (101PM)	$\beta$ Am (FINGOLO et al., 2013) $\delta$ (101PM) ( $\text{CD}_3\text{Cl}$ , 100 MHz)
C-1	38,7	38,7		38,7	
C-2	28,7	28,7		27,2	
C-3	79,07	79,6	79,0	79,3	79,0
C-4	38,7	38,7		38,5	
C-5	55,1	55,1		55,1	
C-6	18,4	18,4		18,6	
C-7	32,9	32,2		32,4	
C-8	40,0	40,7		39,8	
C-9	47,7	40,7		47,6	
C-10	36,8	36,6		36,9	
C-11	23,4	23,3	23,6	23,6	23,6
C-12	124,4	124,4	124,4	121,7	121,8
C-13	139,6	139,5	139,5	145,2	145,2
C-14	42,0	42,0		41,7	
C-15	27,2	27,2		26,2	
C-16	26,6	26,6		26,1	
C-17	33,8	33,7		32,6	
C-18	59,0	59,0		47,2	
C-19	39,7	39,6		46,8	
C-20	39,6	39,6		31,0	
C-21	31,3	31,2		34,7	
C-22	41,5	41,5		37,1	
C-23	28,1	28,1		28,0	
C-24	15,6	15,6		15,4	
C-25	15,6	15,6		15,4	
C-26	16,9	16,8		16,8	
C-27	23,3	23,2		25,9	
C-28	28,1	28,1		28,4	
C-29	17,5	17,4		33,8	
C-30	21,4	21,4		23,7	

### 6.3 Obtenção dos derivados semissintéticos de $\alpha$ -amirina

Considerando que o composto isolado do extrato resinoso de *C. nitida* foi o triterpeno pentacíclico  $\alpha$ -amirina, o qual possui 2 grupos funcionais (C3-OH e uma insaturação entre C-12 e C-13) o mesmo foi alvo de modificação estrutural com o intuito de otimizar a estrutura perante as atividades leishmacida e tripanocida, conforme Tabela 11 -.

**Tabela 11 -** Reações de oxidação realizadas

Reação	A	B	C	Solvente	Tempo de reação	Produto final obtido
1	<b>Composto 1</b> , 1 eq	PCC, 2 eq	SiO <sub>2</sub> , 2 eq	DCM, 3 mL	1 h	<b>Composto 2</b> , rend. 70 %
2	<b>Composto 2</b> , 1 eq	KmnO <sub>4</sub> / KClO <sub>3</sub> , 2 eq	-	DCM/Acetona/ H <sub>2</sub> O 5:5:1, v/v, 11 mL	20 h	<b>Composto 3</b> , rend. 25 %
3	<b>Composto 1</b> , 1 eq	PCC/KmnO <sub>4</sub> / KClO <sub>3</sub> , 2 eq	SiO <sub>2</sub> , 2 eq	DCM/Acetona/ H <sub>2</sub> O/ACN 5:5:1:10, v/v, 21 mL	20 h	<b>Composto 4</b> , rend. 30 %

Condições de reação aplicadas: t.a. = temperatura ambiente; a.m. = agitação magnética.

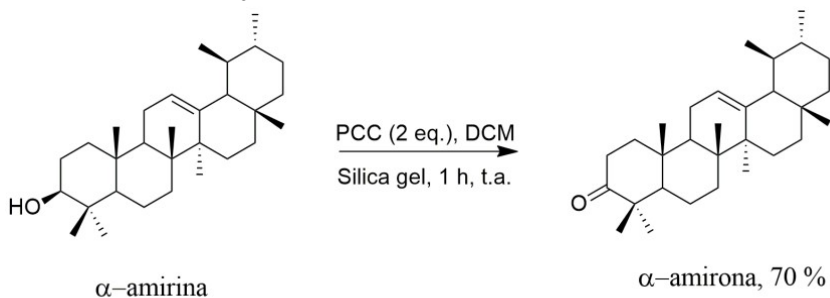
### 6.3.1 Composto 2 ( $\alpha$ -amirona; urs-12-em-3-ona)

Baseado na reação de COREY e SUGGS (1975) realizou-se duas reações de oxidação secundárias (hidroxila na posição C-3); utilizando  $\alpha$ -amirina como material de partida, PCC e DCM, sendo que após meia hora de reação o rendimento máximo obtido foi de 34 %; com a adição de sílica-gel (SiO<sub>2</sub>) como agente catalisador em uma hora de reação chegou-se ao rendimento de 70 % (Figura 33).

A oxidação de alcoóis secundários resulta no máximo em grupamento cetona, porque para continuar a oxidação para ácido carboxílico seria necessária a quebra de uma ligação C-C (SOLOMONS; FRYHLE, 2013). As reações foram monitoradas com o auxílio de CCD (F.E. sílica-gel; F.M. Hex/AcOEt 9:1, v/v; revelador: sol. ácida de anisaldeído/aquecimento). Com isso, o método de reação de 1 hora com agente catalisador foi eleito para a obtenção do **composto 2** ( $\alpha$ -amirona) (FERNANDES et al. 2003; KIM et al., 2005). A substância foi identificada através de análise em IV (Figura 34) e <sup>13</sup>C (Figura 35).

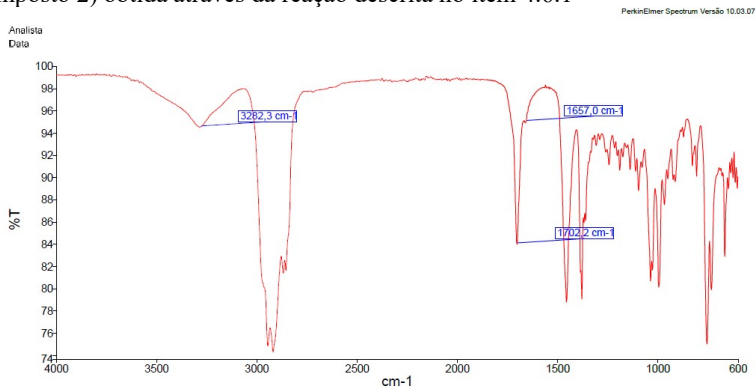
O composto 2 pode ser obtido a partir de uma outra reação, conforme GALERON, VAULTIER e RONTANI (2016), utilizando CrO<sub>3</sub>/piridina em DCM a temperatura ambiente, por 1 hora, obtendo rendimento de 70 %.

**Figura 33.** Reação de obtenção do composto 2 conforme método descrito no item 4.6.1



A reação envolvendo PCC em DCM como solvente é capaz de oxidar álcool secundário para cetona (SOUZA, 2010). Conforme identificado no espectro relativo à Figura 30, a banda de  $3285,0\text{ cm}^{-1}$  correspondente à vibração da hidroxila sofreu um aumento da transmitância, comparado ao espectro do composto 1 (Figura 30) indicando que a hidroxila foi oxidada para formar o grupamento cetona, sendo visualizado nas bandas  $1702,2\text{ cm}^{-1}$  e  $1657,0\text{ cm}^{-1}$  correspondente às bandas de vibrações de C=O e C=C, respectivamente.

**Figura 34.** Espectro de infravermelho da substância  $\alpha$ -amirona (composto 2) obtida através da reação descrita no item 4.6.1

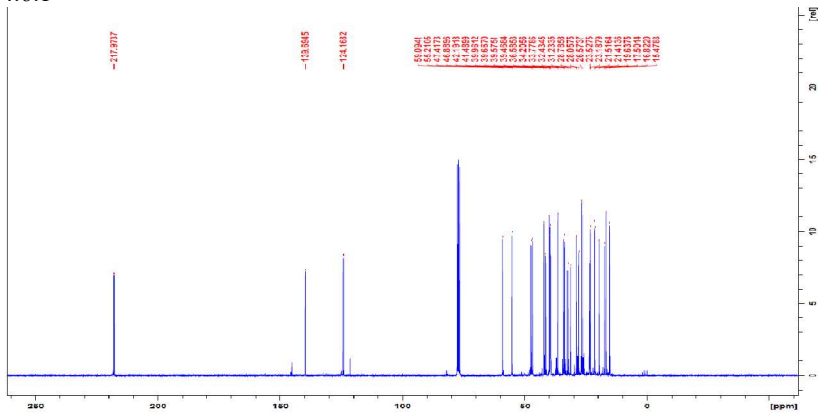


Espectro de varredura no infravermelho (IV): eixo X = número de ondas ( $\text{cm}^{-1}$ ); eixo Y = porcentagem de transmitância.

Os dados obtidos no espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  (Figura 35) para identificação do composto 2 foram comparados com os dados

anteriormente publicados por CARVALHO et al, 1998, o qual ocorreu um deslocamento relevante em C-3 (79,0 ppm para 218,0 ppm, relativo à mudança do grupamento álcool para cetona), conforme Tabela 12 -.

**Figura 35.** Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , TMS) para a substância  $\alpha$ -amirona (**composto 2**) obtida através da reação descrita no item 4.6.1



**Tabela 12 -** Dados de RMN  $^{13}\text{C}$  (75 MHz, TMS,  $\text{CDCl}_3$ ) da substância  $\alpha$ -amirona (composto 2) comparados aos dados da literatura.

Posição	$\alpha$ -amirona (composto 2) $\delta^{13}\text{C}$ (105PM) ( $\text{CD}_3\text{Cl}$ , TMS, 75 MHz)	$\alpha$ -amirona $\delta^{13}\text{C}$ (105PM) (CARVALHO et al, 1998; $\text{CD}_3\text{Cl}$ , TMS, 50.3 MHz)
C-1	39,4	39,2
C-2	36,6	33,8
C-3	218,0	219,9
C-4	-	47,2
C-5	55,2	55,2
C-6	-	18,3
C-7	39,7	32,5
C-8	40,0	39,6
C-9	47,4	46,8
C-10	39,6	37,0
C-11	21,5	17,0
C-12	124,2	121,4
C-13	140,0	145,2
C-14	42,2	41,5
C-15	27,2	26,8
C-16	26,6	26,8
C-17	34,2	32,4
C-18	59,0	47,2
C-19	46,7	46,7
C-20	31,2	31,0
C-21	32,3	34,8
C-22	41,5	37,5
C-23	28,1	28,4
C-24	19,6	16,0
C-25	15,6	15,7
C-26	16,8	16,1
C-27	23,5	26,3
C-28	-	28,7
C-29	33,8	33,5
C-30	21,4	23,6

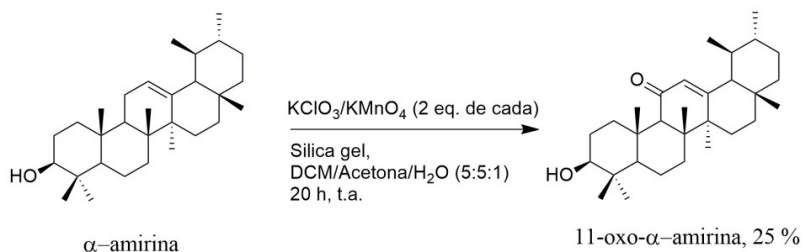
### 6.3.2 Composto 3 (12-em-3 $\beta$ -hidroxi-urs-11-ona; 11-oxo- $\alpha$ -amirina)

A partir dos agentes oxidantes clorato de potássio e permanganato de potássio realizou-se a reação de oxidação utilizando  $\alpha$ -amirina como material de partida, sílica gel para estabilizar a reação, DCM como solvente do triterpeno, acetona como solvente do clorato de potássio e água como solvente do permanganato de potássio; foram necessários 20 h para a obtenção do produto final, sendo monitorada por CCD (conforme reação 4.6.2) obtendo o rendimento de 25 % (Figura 36). A substância foi identificada através de análise em IV (Figura 37) e  $^{13}\text{C}$  (Figura 38).

O composto 3 pode ser obtido a partir de uma outra reação, conforme GALERON, VAULTIER e RONTANI (2016), em três

passos: 1. Acetilação utilizando piridina/anidrido acético (2:1, v/v), em temperatura ambiente por 12 h; 2. Oxidação sobre o acetato formado com  $\text{RuCl}_3$  e t-butanol em ciclohexano a temperatura ambiente por 16 h; 3. Hidrólise alcalina com KOH (1M, em água/metanol, 1:1, v/v) e refluxo por 2 h, obtendo rendimento de 40 %. Comparando esta reação à realizada neste trabalho, é possível observar que foi possível obter o mesmo produto utilizando uma reação de um passo em menor tempo, porém com menor rendimento.

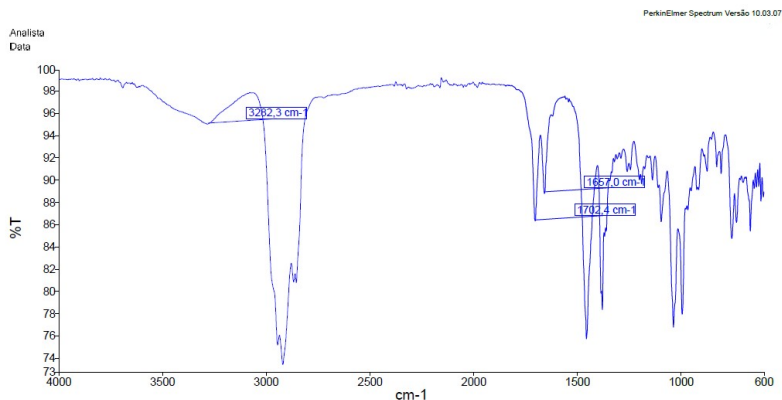
**Figura 36.** Reação de obtenção do composto 3



A reação envolvendo permanganato de potássio e perclorato de potássio originou um produto com a formação de cetona na posição C-11, diferentemente do esperado, pois os agentes oxidantes atuaram sobre o álcool primário (SOUZA, 2010). Conforme identificado no espectro relativo à 0, o valor de  $3282,3 \text{ cm}^{-1}$  corresponde à banda de vibração da hidroxila em carbono saturado, observando uma redução na transmitância comparado ao espectro da Figura 34 indicando que a hidroxila continua presente; além disso, pode ser visualizada as bandas  $1702,4 \text{ cm}^{-1}$  e  $1657,0 \text{ cm}^{-1}$  correspondentes às bandas de vibrações de C=O e C=C, respectivamente.



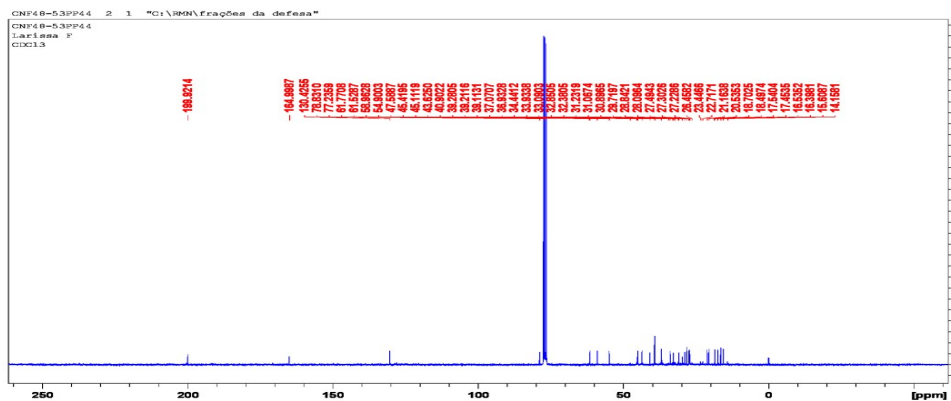
**Figura 37.** Espectro de infravermelho do composto 3 obtido através da reação descrita no item 4.6.2



Espectro de varredura no infravermelho (IV): eixo X = número de ondas ( $\text{cm}^{-1}$ ); eixo Y = porcentagem de transmitância.

A reação de oxidação utilizando  $\text{KMnO}_4$  e  $\text{KClO}_3$  resultou no **composto 3** (12-em-3 $\beta$ -hidroxi-urs-11-ona, rendimento de 25 %), onde ocorreu a oxidação na posição alílica em C-11, originando um grupamento cetona (carbono vizinho aos carbonos insaturados C-12 e C-13) e curiosamente não ocorreu oxidação na posição C-3. Os dados pode ser observados na Tabela 13 -) Sendo assim, esta combinação de agentes oxidantes pode promover uma oxidação apenas em carbonos saturados e não em hidroxilas. Os dados obtidos no espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  (Figura 38) para identificação do composto 3 foram comparados com os dados anteriormente publicados GONZÁLEZ (1990) e FINGOLO et al. (2013), o qual ocorreu um deslocamento relevante em C-11 (23,4 ppm para 200,0 ppm, relativo à oxidação na posição alílica, originando um grupamento cetona), conforme Tabela 13 -. este composto foi identificado previamente na planta inteira da espécie *Dorstenia arifolia* (Moraceae), a qual exibe atividade analgésica e anti-inflamatória (FINGOLO et al., 2013).

**Figura 38.** Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , TMS) do composto 3.



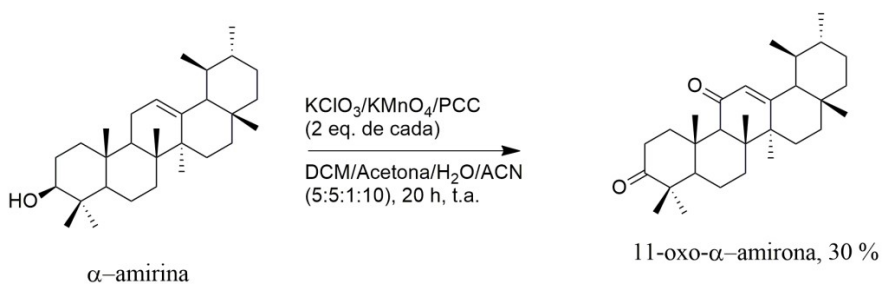
**Tabela 13 -** Dados RMN  $^{13}\text{C}$  (75 MHz, TMS,  $\text{CDCl}_3$ ) do composto 3 comparados com dados da literatura.

Posição	$\alpha$ AM isolada (composto 1) $\delta^{13}\text{C}$ (ppm) ( $\text{CD}_2\text{Cl}_2$ , 75 MHz)	composto 3 $\delta^{13}\text{C}$ (ppm) ( $\text{CD}_3\text{Cl}$ , 75 MHz)	(GONZALEZ, 1990) $\delta^{13}\text{C}$ (ppm) ( $\text{CD}_2\text{Cl}_2$ , 50 MHz)	11-oxo- $\alpha$ -amirina (FINGOLO et al., 2013) $\delta$ (108PM) ( $\text{CD}_3\text{Cl}$ , 100 MHz)
C-1	38,7	39,1	40,0	
C-2	28,7	34,0	34,4	
C-3	79,1	79,0	Não encontrado	78,8
C-4	38,7	43,6	47,9	
C-5	55,1	55,0	55,6	
C-6	18,4	18,5	19,00	
C-7	32,9	33,0	32,4	
C-8	40,0	41,0	43,9	
C-9	47,7	59,0	60,9	
C-10	36,8	37,0	36,8	
C-11	23,4	200,0	199,2	199,8
C-12	124,4	130,4	130,5	130,4
C-13	139,6	165,0	165,5	164,9
C-14	42,0	39,2	45,1	
C-15	27,2	30,0	29,8	
C-16	26,6	27,5	27,4	
C-17	33,8	31,0	34,3	
C-18	59,0	59,0	59,2	
C-19	39,7	39,2	39,4	
C-20	39,6	39,2	39,4	
C-21	31,3	30,0	31,0	
C-22	41,5	41,0	41,0	
C-23	28,1	28,0	26,5	
C-24	15,6	21,0	21,6	
C-25	15,6	17,5	15,9	
C-26	16,9	17,5	18,5	
C-27	23,3	20,6	20,6	
C-28	28,1	29,0	29,0	
C-29	17,5	17,5	17,6	
C-30	21,4	21,0	21,3	

### 6.3.3 Composto 4 (3,11-dioxi-ursan-12-eno; 11-oxo- $\alpha$ -amirona)

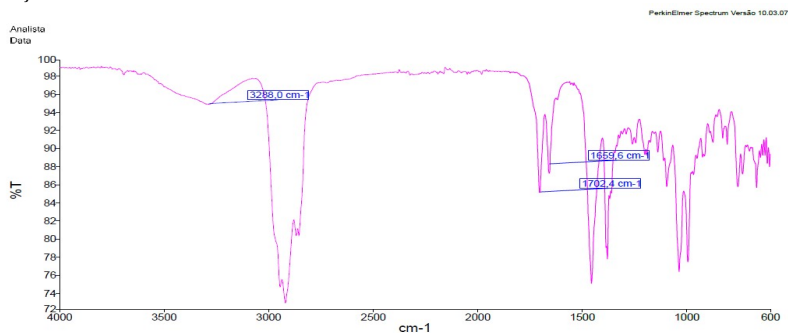
A partir dos agentes oxidantes clorato de potássio, permanganato de potássio e PCC realizou-se a reação de oxidação utilizando  $\alpha$ -amirina como material de partida, DCM como solvente do triterpeno, acetona como solvente do clorato de potássio, água como solvente do permanganato de potássio e acetonitrila; foram necessários 20 h para a obtenção do produto final, sendo monitorada por CCD (conforme reação 4.6.3, e ilustrado na Figura 39) obtendo o rendimento de 30 % (Figura 39). A substância foi identificada através de análise em IV (Figura 40) e  $^{13}\text{C}$  (Figura 41).

**Figura 39.** Reação de obtenção do composto 4.



Conforme identificado no espectro relativo à Figura 40, o valor de  $3288,0\text{ cm}^{-1}$  corresponde à banda de vibração da hidroxila, observando um aumento da transmitância indicando que a hidroxila foi oxidada para formar o grupamento cetona, visualizado no sinal de  $1702,4\text{ cm}^{-1}$  e o sinal de  $1659,6\text{ cm}^{-1}$  corresponde à banda de vibração de C=C.

**Figura 40.** Espectro de Infravermelho do composto 4 obtido através da reação descrita no item 4.6.3

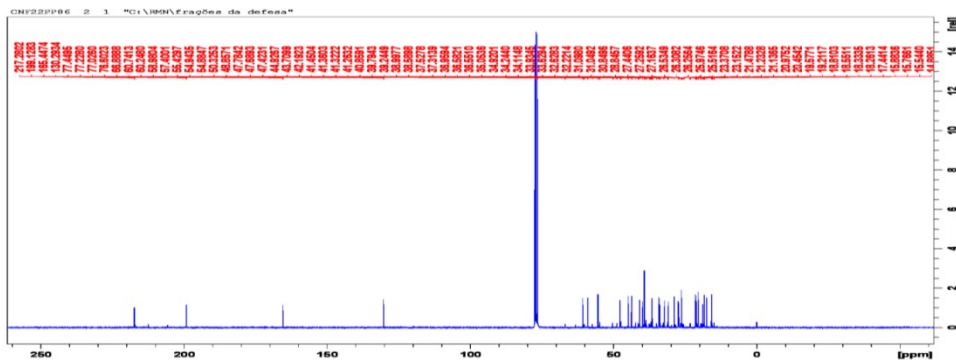


Espectro de varredura no infravermelho (IV): eixo X = número de ondas ( $\text{cm}^{-1}$ ); eixo Y = porcentagem de transmitância.

A combinação dos reagentes oxidantes PCC,  $\text{KMnO}_4$  e  $\text{KClO}_3$  por 20.0 h resultou como produto final o **composto 4** (3,11-dioxi-ursan-12-eno, rendimento de 30 %), ocorrendo oxidação na posição C-3 e C-11. A estrutura do produto da reação foi elucidada através de análise de RMN  $^{13}\text{C}$  (Tabela 14 -), sendo que na posição C-3 (79,0 ppm para 217,0 ppm) e C-11 (23,0 ppm para 200,0 ppm) ocorreram variações de deslocamento relevantes comprovando a presença de grupamento cetona nas duas posições; o oxidação em C-11 promoveu alteração discreta nos valores de deslocamento em C-12 e C-13. Os dados conferem com os mesmos deslocamentos publicados por LI et al. (2011).

O composto 4 pode ser obtido a partir de uma outra reação, conforme GALERON, VAULTIER e RONTANI (2016), em quatro passos: 1. Acetilação utilizando piridina/anidrido acético (2:1, v/v), em temperatura ambiente por 12 h; 2. Oxidação sobre o acetato formado com  $\text{RuCl}_3$  e t-butanol em ciclohexano a temperatura ambiente por 16 h; 3. Hidrólise alcalina com KOH (1M, em água/metanol, 1:1, v/v) e refluxo por 2 h, e 4. Oxidação com  $\text{CrO}_3$ /piridina em DCM a temperatura ambiente por 1 h, obtendo rendimento de 70 %. Comparando esta reação à realizada neste trabalho, é possível observar que foi possível obter o mesmo produto utilizando uma reação de um passo em menor tempo, porém com menor rendimento.

**Figura 41.** Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ , TMS, 75 MHz) do composto 4.



**Tabela 14 -** Dados RMN  $^{13}\text{C}$  (75 MHz, TMS,  $\text{CDCl}_3$ ) do composto 4 comparados com dados da literatura.

Posição	$\alpha\text{M}$ isolada (composto 1) $\delta^{13}\text{C}$ (ppm) ( $\text{CD}_2\text{Cl}_2$ , 75 MHz)	Composto 4 $\delta^{13}\text{C}$ (ppm) ( $\text{CD}_2\text{Cl}_2$ , 75 MHz)	(LI et al, 2012) $\delta^{13}\text{C}$ (ppm) ( $\text{CD}_2\text{Cl}_2$ , 100 MHz)
C-1	38,7	39,8	40,84
C-2	28,7	27,3	27,2
C-3	79,07	217,3	78,7
C-4	38,7	39,3	39,1
C-5	55,1	55,5	54,9
C-6	18,4	18,8	17,4
C-7	32,9	32,25	32,7
C-8	40,0	39,3	39,2
C-9	47,7	60,8	61,5
C-10	36,8	41,0	39,1
C-11	23,4	200,0	199,9
C-12	124,4	130,0	130,4
C-13	139,6	165,0	164,9
C-14	42,0	45,0	45,7
C-15	27,2	26,32	26,4
C-16	26,6	27,3	27,2
C-17	33,8	33,9	33,8
C-18	59,0	59,0	58,9
C-19	39,7	39,5	39,1
C-20	39,6	39,8	39,2
C-21	31,3	31,0	30,8
C-22	41,5	36,6	36,4
C-23	28,1	29,0	28,0
C-24	15,6	15,8	16,5
C-25	15,6	15,8	16,5
C-26	16,9	17,7	16,4
C-27	23,3	20,5	20,5
C-28	28,1	27,5	28,7
C-29	17,5	18,8	17,4
C-30	21,4	21,15	21,1

Foram realizadas outras tentativas de reações de quais não obtiveram sucesso, considerando o monitoramento das reações, utilizando CCD (F.M. sílica gel, F. E. Hex/AcOEt 95:5, v/v; revelador

sol. ácida de anisaldeído/aquecimento) sendo as seguintes: 1.  $\text{KMnO}_4$  (2 eq.), DCM/acetona/ $\text{H}_2\text{O}$  (1.5:10:1; v/v), 3 dias, t.a., a.m.; 2.  $\text{KMnO}_4$  (3 eq.), DCM/acetona/ácido acético glacial (2: 1 :2; v/v), 5 dias, t.a., a.m.; 3. PCC (2 eq.),  $\text{SiO}_2$  (2 eq.), DCM/ácido acético glacial (2: 0.0013; v/v), 4.5 dias, t.a., a.m.; 4.  $\text{KMnO}_4$  (1 eq.),  $\text{KClO}_3$  (5 eq.), DCM/acetona/ $\text{H}_2\text{O}$  (15:10:1; v/v), 3 dias, t.a., a.m.; 5. PCC (5 eq.),  $\text{KClO}_3$  (10 eq.),  $\text{SiO}_2$  (5 eq.), DCM/acetona/ $\text{H}_2\text{O}$  (4:9:1; v/v), 24 h, t.a., a.m.; 6. PCC (5 eq.),  $\text{CaCO}_3$  (1.4 eq.), DCM (5 mL), 1 h, sistema fechado com  $\text{N}_2$ , a.m.

#### 6.4 Investigação de atividade biológica in vitro

##### 6.4.1 Ensaio de viabilidade celular

Para avaliar a citotoxicidade das frações obtidas por cromatografia líquida a vácuo (item 4.4.2) foi realizado o ensaio de viabilidade celular, utilizando o ensaio baseado em resazurin, afim de determinar o  $\text{CC}_{10}$ , sendo esta a concentração capaz de manter a sobrevivência de 90 % das células testadas (capazes de realizar funções metabólicas, reprodutivas e de crescimento) Conforme observado na Tabela 15 -, os macrófagos J774 foram menos sensíveis à FHex (12,63  $\mu\text{g/mL}$ ) comparado a FDCM (8,1  $\mu\text{g/mL}$ ) e FMeOH (8,8  $\mu\text{g/mL}$ ), sendo a FAcOEt menos citotóxica (4,7  $\mu\text{g/mL}$ ).

**Tabela 15 -** Citotoxicidade em cultura celular de macrófagos linhagem murina J774\* das frações isoladas do extrato resinoso de *C. nitida*.

Fração	$\text{CC}_{10}$ ( $\mu\text{g/mL}$ )
FHex	12,63±6,60 $\mu\text{g/mL}$
FDCM	8,1±3,39 $\mu\text{g/mL}$
FAcOEt	4,7±1,83 $\mu\text{g/mL}$
FMeOH	8,8±1,53 $\mu\text{g/mL}$

\*Ensaio de resazurin para a determinação das concentrações necessárias para manter 90 % de viabilidade celular.

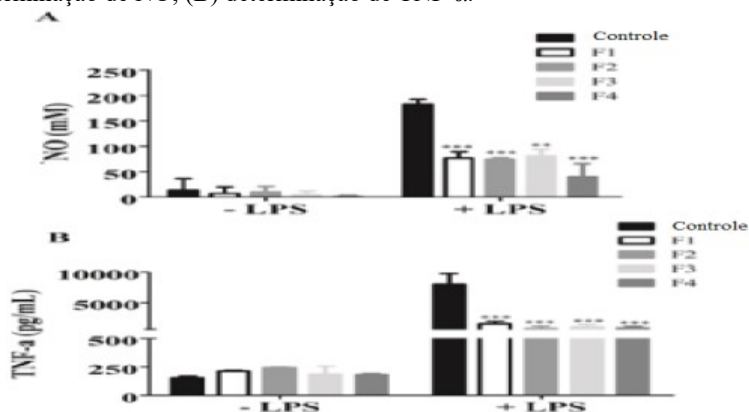
A fração AcOEt contém três compostos (dehidrouvaol, olean-9(11),12-dien-3-ona e ursan-9(11),12-dien-3-ona) que não foram detectados nas frações restantes. Estas substâncias podem ser as responsáveis pela maior citotoxicidade em macrófagos J774. A fração Hex revelou a presença de menos constituintes, sugerindo que os compostos presentes nas frações DCM e MEOH excedentes à fração Hex sejam os responsáveis por afetar a viabilidade dos macrófagos.

### 6.4.2 Avaliação de atividade inibitória sobre a liberação das citocinas NO e TNF- $\alpha$

As citocinas foram identificadas no sobrenadante da cultura de macrófagos J774 com ou sem lipopolissacarídeos (LPS). Os dados foram determinados considerando o desvio padrão  $\pm$  DP nos experimentos acima. Anova de uma-via seguida pela comparação múltipla de Dunnett foram utilizadas para determinar a significância estatística. \*\*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*\*  $p < 0.001$  comparando ao grupo controle LPS+.

As quatro frações (Hex, DCM, AcOEt e MeOH) foram ativas na inibição da liberação das citocinas NO e TNF- $\alpha$ , independente da composição das frações (Figura 42). No entanto, uma explicação sobre a atividade seria devido à presença de triterpenos pentacíclicos como  $\alpha$ AM e  $\beta$ AM, ácido oleanólico e seus derivados, os quais já foram ativos inibindo a produção de NO em macrófagos RAW 264.7 e J774A.1 ativados por LPS (BHANDARI et al., 2014). Além disso, o ácido oleanólico e seus derivados 3-oxo e 3-oxo-28-metil ester presentes nas frações demonstraram igual atividade anti-inflamatória, sugerindo que as diferentes funções estruturais como oxidantes ou com presença de insaturações não interferem na atividade anti-inflamatória.

**Figura 42.** Liberação de citocinas em macrófagos ativados; (A) determinação de NO; (B) determinação de TNF- $\alpha$ .



## 6.5 ATIVIDADE ANTIPROTOZOÁRIA

**Tabela 16 -** Atividade tripanocida das frações isoladas da resina bruta de *C. nitida* sobre o crescimento de forma amastigota intracelular *T. cruzi*.

Componente (50µg/mL)	% Inibitória	CI <sub>50</sub> (µg/mL)	I.S.
FHex	96,87 (±1,13)	3,94 (±0,43)	14,97
FDCM	70,87 (±2,78)	24,22 (±1,08)	2,93
FAcOEt	99,06 (±0,68)	3,58 (±0,31)	24,55
FMeOH	98,34 (±0,25)	3,82 (±0,33)	16,57
$\alpha$ -amirina	-	NA	-
$\alpha$ -amirona	-	NA	-
11-oxo- $\alpha$ -amirina		16,76 (±0,76)	8,40
11-oxo- $\alpha$ -amirina		8,67 (±0,55)	3,52
Benznidazol* 20µg/mL	93,38 (±0,80)	2,65 (±0,08)	>49,06

\* Benznidazol = controle positivo.

**Tabela 17 -** Atividade leishmanicida das frações isoladas da resina bruta de *C. nitida* sobre o crescimento de forma amastigota intracelular *L. amazonensis*.

Componente (50µg/mL)	% Inibitória	CI <sub>50</sub> (µg/mL)	I.S.
FHex	82,66 (±0,90)	8,08 (±1,64)	7,30
FDCM	56,49 (±0,66)	27,73 (±3,41)	2,56
FAcOEt	80,64 (±1,55)	7,15 (±1,60)	12,29
FMeOH	87,60 (±0,29)	8,23 (±1,20)	7,69
$\alpha$ -amirina	-	NA	-
$\alpha$ -amirona	-	NA	-
11-oxo- $\alpha$ -amirina		19,43 (±2,28)	7,24
11-oxo- $\alpha$ -amirina		11,6 (±2,68)	2,63
Anfotericina B* 2 µg/mL	96,92 (±0,51)	0,13 (±0,02)	198

\* Anfotericina B = controle positivo.

As frações Hex, AcOEt e MeOH demonstraram melhor atividade tripanocida. Sete compostos da fração hexânica estão presentes nas outras frações. No entanto, o ácido oleanólico 3-acetato, olean-11,13(18)-dieno, ursan-11,13(18)-dieno e dehidrouvaol foram identificados apenas nas frações AcOEt e MeOH. Enquanto isso, a fração DCM foi 8 vezes menos ativa (F DCM: CI<sub>50</sub> de 24,22 µg/mL e I.S. 2,93) que as outras frações, mesmo contendo composição similar. Esta fração contém o metabólito de m/z 467,3878 (acetato de ursan-12,20(30)-dien-3 $\beta$ -il ou acetato de gigantursenil como o segundo maior componente, reduzindo assim a concentração dos compostos ativos.

Características similares foram observadas para a atividade leishmanicida; as frações Hex, AcOEt e MeOH inibiram as formas amastigotas de *L. amazonensis* com a mesma potência. No entanto, o efeito leishmanicida da fração AcOEt foi levemente maior (CI<sub>50</sub> de 7,15 µg/mL e I.S. 12,29), sugerindo que os compostos dehidrouvaol, olean-9(11),12-dien-3-ona e ursan-9(11),12-dien-3-ona presentes exclusivamente nesta fração sejam os responsáveis pela maior atividade.



A fração DCM foi fracamente ativa neste parasita, e 3 vezes menos potente que as outras frações, devido provavelmente à sua composição fitoquímica.

Todas as frações com exceção da fração DCM exibiram atividade antiprotozoária com toxicidade moderada em células THP-1. O composto de  $m/z$  467,3878 identificado como acetato de ursan-12,20(30)dien-3 $\alpha$ -il, acetato de ursan-12,19(29)dien-3 $\beta$ -il ou acetato de gigantursenil A predominante na fração DCM, pode estar relacionado à alteração da viabilidade celular em células THP-1.

Em geral, a atividade antiparasitária de triterpenos pentacíclicos e extratos ricos nesses compostos é bem documentada (LEITE et al., 2006; HAAVICKO et al., 2013). Interessantemente, metabólitos secundários derivados de oleanano e ursano demonstraram moderada, porém significativa (F AcOEt:  $CI_{50}$  de 3,58  $\mu\text{g/mL}$  e I.S. 24,55 como tripanocida e  $CI_{50}$  de 7,15  $\mu\text{g/mL}$  e I.S. 12,29 como leishmanicida) atividade contra ambos os parasitas. No entanto, exceto para  $\alpha$ AM e  $\alpha$ -amirona, derivados dioxigenados foram ativos contra ambos os parasitas e suas potências foram menores que as frações avaliadas. Este evento sugere a ocorrência de um efeito sinérgico entre os triterpenos pentacíclicos combinados nas frações.

### 6.6 Análise qualitativa da fração volátil de *C. nitida*

Os óleos essenciais possuem elevada importância na indústria farmacêutica, pois apresentam diversas atividades biológicas, como antimicrobiano, antifúngico, anti-inflamatório, ansiolítico, inseticida, entre outros. Pela definição de SIMÕES (2017), os constituintes majoritários de um óleo essencial consistem em terpenos com teor de 20 a 95 %, os constituintes secundários presentes em 1 a 20 % e os componentes traços abaixo de 1 %.

Os estudos de caracterização do óleo essencial são escassos, por isso ocorreu o interesse em avaliá-lo por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM, cromatograma obtido apresentado na Figura 44 e Figura 45).

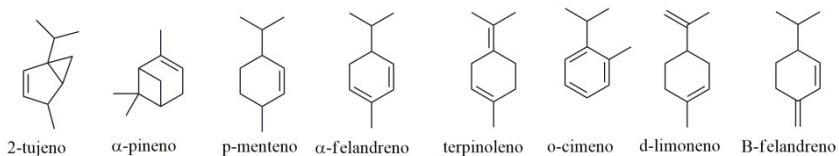
A composição do óleo essencial de *C. nitida* é constituída basicamente por monoterpenos, conforme observado na 0; através da análise realizada por injeção automática do óleo essencial hidrodestilado em CG/EM foi possível identificar 2 compostos majoritários ( $\alpha$ -felandreno e o-cimeno) e 6 compostos secundários, conforme apresentado na Tabela 18 -

**Tabela 18 -** Substâncias identificadas na fração volátil da resina bruta de *Cola nitida* conforme as condições descritas no item 4.7.

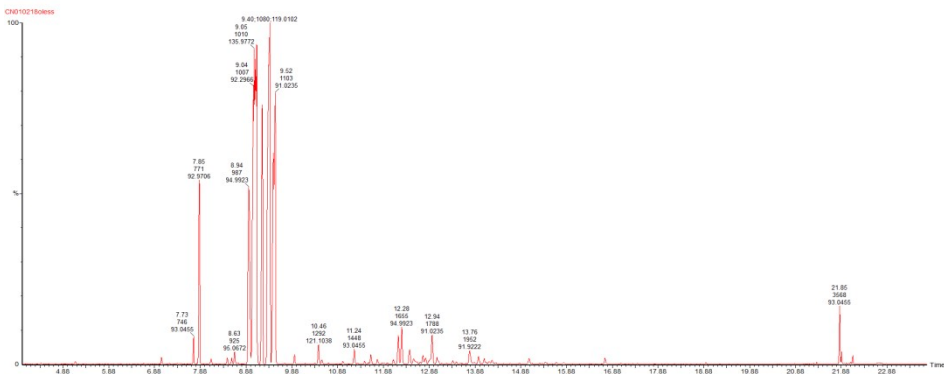
PM	Composto	Fragmento principal ( $m/z$ )		Quantidade aproximada
		TR (min)	HD-CG/EM	
136	2-tujeno	7,73	93,04	1 %
136	$\alpha$ -pineno	7,85	92,97	11,95 %
138	p-menteno	8,94	94,99	11,55 %
136	$\alpha$ -felandreno	9,11	91,55	30 %
136	terpinoleno	9,23	121,10	10 %
134	<i>o</i> -cimeno	9,40	119,01	25,8 %
136	d-limoneno	9,48	93,04	6,97 %
136	$\beta$ -felandreno	9,52	91,02	8,96 %

PM = peso molecular; TR = tempo de retenção; HD-CG/EM (hidrodestilação e análise qualitativa por injeção automática em cromatógrafo a gás acoplado ao espectrômetro de massas).

**Figura 43.** Estruturas identificadas na fração volátil de *C. nitida*.



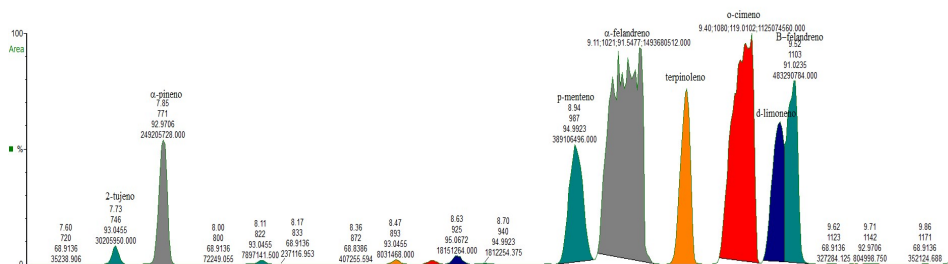
**Figura 44.** Cromatograma de picos base obtido por IE da fração volátil de *C. nitida*; analisada conforme as condições descritas no item 4.7



Cromatograma obtido por CG-EM do óleo essencial de *C. nitida* obtido pela técnica de hidrodestilação. Eixo X= tempo em min.; eixo Y = porcentagem relativa.

As concentrações dos compostos predominantes foram calculadas medindo a área sob a curva (conforme Figura 45), onde pode ser observado que os compostos  $\alpha$ -felandreno (30 %) e o-cimeno (25,8 %) são os majoritários.

**Figura 45.** Cromatograma expandido (7,60 min a 9,86 min) de picos base obtido por IE da fração volátil de *C. nitida* analisada conforme as condições descritas no item 4.7



Cromatograma expandido obtido por CG-EM do óleo essencial de *C. nitida* obtido pela técnica de hidrodestilação. Eixo X= tempo em min.; eixo Y = porcentagem relativa.



## 7 CONCLUSÃO

A composição da resina bruta de *C. nitida* foi analisada através de cromatografia a vácuo (originando quatro frações de diferentes polaridades), associada ao estudo de desreplacação em CLUE-EM<sup>2</sup>. Foram identificados 20 triterpenos pentacíclicos, 7 triterpenos do tipo oleanano e 13 triterpenos do tipo ursano. A fração AcOEt contém 3-hidroxi-urs-12,15-dieno como o composto predominante, sendo provavelmente o responsável pela maior atividade antiparasitária comparada ao controle-positivo. Estes resultados sugerem que o extrato resinoso possa ser um candidato em potencial para o desenvolvimento de uma nova associação de medicamentos para o tratamento de Leishmaniose e Doença de Chagas. Sugere-se em um estudo posterior, realizar o isolamento de 3-hidroxi-urs-12,15-dieno e investigá-lo para as mesmas atividades avaliadas.

A  $\alpha$ AM presente no extrato resinoso de *C. nitida* foi isolada com um rendimento de 5,25 % pelo método de isolamento 1, porém pelo método de isolamento 4, foi possível extrair 4,46 % de  $\alpha$ AM utilizando solvente orgânico em condição ácida utilizando metade do tempo (6 horas) dispendido pelos métodos 1, 2 e 3. As frações restantes dos processos de isolamento não foram quantificadas, sendo necessário um novo estudo para a caracterização. A  $\alpha$ AM (**composto 1**) foi utilizada como material de partida para reações de semissíntese, as quais originaram três compostos:  $\alpha$ -amirona (**composto 2**), 12-em-3 $\beta$ -hidroxi-urs-11-ona (**composto 3**), anteriormente reportado apenas como um composto de origem vegetal, obtido pelo extrato alcoólico da planta *Saussurea oligantha* (LI et al., 2012) e 3,11-dioxi-ursan-12-eno (**composto 4**), anteriormente reportado como um composto de origem vegetal, obtido pelo extrato de folhas de *Salvia mellifera* (GONZÁLEZ et al., 1989), identificados por RMN <sup>13</sup>C e comparação com dados da literatura.

O extrato resinoso concentrado contém 10 % de óleo essencial, sendo possível extraí-lo por hidrodestilação em aparelho de Clevenger. Através de uma análise preliminar por CG/EM foi possível verificar que o óleo essencial é composto por monoterpenos (C-10), sendo  $\alpha$ -felandreno e *p*-cimeno os compostos majoritários. Através da análise qualitativa em CG-EM (HD/CG-EM) foi possível identificar os 8 compostos predominantes.



## PERSPECTIVAS FUTURAS

Espera-se publicar a composição fitoquímica da fração não-volátil - triterpenos pentacíclicos obtidos da resina bruta de *C. nitida* - assim como as reações de semissíntese obtidas a partir do triterpeno isolado  $\alpha$ AM, além dos resultados de atividade leishmanicida, tripanocida e anti-inflamatória;

Realizar as metodologias de identificação auxiliares para obter dados para a publicação da composição fitoquímica da fração volátil; para a identificação dos compostos minoritários do óleo essencial, serão necessárias análises complementares como curva de calibração utilizando padrões internos (monoterpenos hidrocarbonetos e monoterpenos hidroxilados), além do uso de série homóloga de alcanos e destilações fracionadas para isolamento dos terpenos majoritários. Supõe-se que os terpenos  $\alpha$ -felandreno e o-cimeno sejam os constituintes majoritários, devido à intensidade dos picos no cromatograma, porém existe a possibilidade de ocorrer coeluição no tempo de retenção do o-cimeno, onde podem estar presentes p-cimeno e m-cimeno, pela similaridade nos tempos de retenção; além de análise por RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  para identificar os terpenos purificados.

Em um estudo posterior, sugere-se a quantificação de cada terpeno pertencente à fração volátil e não-volátil, assim como desenvolver técnicas de separação e modificação estrutural dos compostos isolados (utilizando processos de química verde), com o objetivo de avaliar a atividade inseticida e repelente.

Investigar a atividade da oleoresina bruta de *C. nitida*, as frações F Hex, F DCM, F AcOEt, F MeOH e óleo essencial de *C. nitida* no sistema nervoso central, partindo de informações etnofarmacológicas da oleoresina, a qual é utilizada em tribos africanas durante cerimônias e rituais espirituais.





## REFERÊNCIAS

ABOU, B., HOUPHUET Y. F., KONAN, G., BERNARD, D. N., MONKOUÉ, O. D., N'GUESSAN Z. E. Evaluation of the hepatoprotective activity of aqueous and ethanolic extracts from *Gomphrena celesioides*, *Cola nitida* and *Entendrophragma angolense* against CCL4 induced hepatotoxicity in rats. **World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v. 5, n. 10, p. 53-62, 2016.

ADAMS, R. P.; **Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography/Mass Spectrometry**, Allured Publishing Corp.: Carol Stream, USA, 1995.

ANDRADE, A. L. S. S.; ZICKER, F.; OLIVEIRA, R. M.; SILVA, S. A.; LUQUETTI, A.; TRAVASSOS, L. R.; ALMEIDA, I. C.; ANDRADE, S. S.; ANDRADE, J. G. Randomised trial of efficacy of benznidazole in treatment of early *Trypanosoma cruzi* infection. **The Lancet**, v. 348, p. 1407-1413, 1996.

ANTAS E SILVA, D.; FALCÃO-SILVA, V. S.; GOMES, A. Y. S.; COSTA, D. A.; LEMOS, V. S.; AGURA, M. F.; BRAZ-FILHO, R.; SILQUEIRA0JUNIOR, J. P.; SOUZA, M. F. V. Triterpenes and phenolic compounds isolated from the aerial parts of *Herissantia tiubae* and evaluation of 5,4',-dihydroxy-3,6,7,8,3'-pentamethoxyflavone as a modulator of bacterial drug resistance. **Pharmaceutical Biology**, v. 47, n. 4, p. 279-284, 2017.

ASOGWA, E. U.; ADEDEJI, A. R.; OYEDOKUN, A. V.; OTUONYE, A. H.; MOKWUNYE, F. C.; AGBONGIARHUOYI, A. E. Strategies for Improving Production and Storage of Kolanuts in Nigeria. **American-Eurasian Journal Agriculture & Environmental Science**, v.12, n.1, p. 37-43, 2012.

ASSIMOPOULOU, A. N.; ZLATANOS, S. N.; PAPAGEORGIOU, V. P. Antioxidant activity of natural resins and bioactive triterpenes in oil substrates. **Food Chemistry**, v. 92, p. 721-727, 2005.

BALANÑA-FOUCE, R.; CALVO-ÁLVAREZ, E.; ÁLVAREZ-VELILLA, R.; PRADA, C. F.; PÉREZ-PERTEJO, Y.; REGUERA, R. M. Role of trypanosomatid's arginase in polyamine biosynthesis and

pathogenesis. **Molecular & Biochemical Parasitology**, v. 181, p. 85-93, 2012.

BARREIRO, E. J.; FRAGA, C. A. M. **Química medicinal: as bases moleculares da ação dos fármacos**, 2<sup>a</sup>. Ed., Editora Artmed, Porto Alegre, Brasil, p. 161, 215, 2008.

BHAWANI, S. A.; SULAIMAN, O.; HASHIM, R.; IBRAHIM, M. N. M. Thin-layer chromatographic analysis of steroids: a review. **Tropical Journal of Pharmaceutical Research**, v. 9, n. 3, p. 301-313, 2010.

BOTELHO, J. R. S.; MEDEIROS, N. G.; RODRIGUES, A. M. C.; ARAÚJO, M. E.; MACHADO, N. T.; SANTOS, A. G.; SANTOS, I. R.; GOMES-LEAL, W.; CARVALHO JUNIOR, R. N. Black sesame (*Sesamum indicum* L.) seeds extracts by CO<sub>2</sub> supercritical fluid extraction: Isotherms of global yield, kinetics data, total fatty acids, phytosterols and neuroprotective effects. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 93, p. 49-55, 2014.

BRENDOLISE, C.; YAU, Y.; EBERHARD, E. D.; WANG, M.; CHAGNE, D.; ANDRE, C.; GREENWOOD, D. R.; BEUNING, L. L. An unusual plant triterpene synthase with predominant  $\alpha$ -amyrin-producing activity identified by characterizing oxidoesqualene cyclases from *Malus x domestica*. **The FEBS Journal**, p. 2485-2499, 2011.

BROWNE, A. J.; GUERRA, C. A.; ALVES, R. V.; COSTA, V. M.; WILSON, A. L.; PIGOTT, D. M.; HAY, S. I.; LINDSAY, S. W.; GOLDING, N.; MOYES, C. L. The contemporary distribution of *Trypanosoma cruzi* infection in humans, alternative hosts and vectors. **Scientific Data**, v. 4, 2017.

BUCKNER, F.S.; VERLINDE, C. L.; LA FLAMME, A. C.; VAN VOORHIS, W. C. Efficient technique for screening drugs for activity against *Trypanosoma cruzi* using parasites expressing  $\beta$ -galactoside. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 40, p. 2592-2597, 1996.

BURDOCK, G. A.; CARABIN, I. G.; CRINCOLI, C. M. Safety assessment of kola nut extract as a food ingredient. **Food and Chemical Toxicology**, v. 47, p. 1725-1732, 2009.

CALIXTO-JUNIOR, J. T.; MORAIS, S. M.; COLARES, A. V.; COUTINHO, H. D. M. The Genus *Luehea* (Malvaceae-Tiliaceae): review about chemical and pharmacological aspects. **Journal of Pharmaceutics**, v. 2016, p. 1-9, 2016.

CARDOSO, M. S.; REIS-CUNHA, J. L.; BARTHOLOMEU, D. C. Evasion of the immune response by *Trypanosoma cruzi* during acute infection. **Frontiers in Immunology**, v. 6, n. 659, p. 1-15, 2016.

CARNEY, J. Navegando contra a corrente: o papel dos escravos e da flora africana na botânica do período colonial. **África: Revista do Centro de Estudos Africanos. USP**, São Paulo, p. 22-23:25-47, 1999/2000/2001.

CARVALHO, M. G.; VELANDIA, J. R.; OLIVEIRA, L. F.; BEZERRA, F. B. Triterpenos isolados de *Eschweilera longipes* Miers (Lecythidaceae). **Química Nova**, v. 21, n. 6, p. 740-744, 1998.

CHEMSPIDER: <http://www.chemspider.com/>

CIESLA, W. M. Products of resin processing. **Forests and Forest Plants**, v. 2, 2009.

COREY, E. J.; SUGGS, J. W. (1975). Pyridinium chlorochromate. An efficient reagent for oxidation of primary and secondary alcohols to carbonyl compounds. **Tetrahedron Letters**, v. 16, n. 31, p. 2647-2650, 1975.

COSTA, D. A., SILVA, D. A., CAVALCANTI, A. C., MEDEIROS, M. A. A., LIMA, J. T., CAVALCANTE, J. M. S., SILVA, B. A., AGRA, M. F., SOUZA, M. F. V. Chemical constituents from *Bakeridesia pickelii* Monteiro (Malvaceae) and the relaxant activity of kaempferol-3-*O*- $\beta$ -D-(6''-*E*-*p*-coumaroyl) glucopyranoside on guinea-pig ileum. **Química Nova**, v. 30, n. 4, p. 901-903, 2007.

DAH-NOUVLESSOUNON, D.; ADOUKONOU-SAGBADJA, H.; DIARRASSOUBA, N.; ADJANOHOON, A.; BABA-MOUSSA, F.; ALPHONSE, S.; BABA-MOUSSA, L. Indigenous knowledge and socio-economic values of three Kola species (*Cola nitida*, *Cola acuminata* and *Garcinia kola*) used in southern Benin. **European Scientific Journal**, v. 11, n. 36, p. 206-227, 2015.

DAH-NOUVLESSOUNON, D.; ADOUKONOU-SAGBADJA, H.; DIARRASSOUBA, N.; SINA, H.; ADJANOHOUN, A.; INOUSSA, M.; AKAKPO, D.; GBENOU, J. D.; KOTCHONI, S. O.; DICKO, M. H.; BABA-MOUSSA, L. Phytochemical analysis and biological activities of *Cola nitida* bark. **Biochemistry Research International**, v. 2015, p. 1-12, 2015.

DAVIES, E. Mummy mania. **Chemistry World**, p. 48-51, 2011.

DAVIS, B.; WOLFENDER, J.; DIAS, D. A. The pharmaceutical industry and natural products: historical status and new trends. **Phytochemistry Review**, v. 14, n. 2, p. 299-315, 2015.

EBAJO JR, V. D.; SHEN, C.; RAGASA, C. Y. Terpenoids and sterols from *Hoya multiflora* blume. **Journal of Applied Pharmaceutical Science**, v. 5, n. 04, p. 33-39, 2015.

FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 5. ed, V. II, **Agência Nacional de Vigilância Sanitária**, Brasília, p. 1168, 2010.

FERNANDES, R. A.; KUMAR, P. PCC-mediated novel oxidation reactions of homobenzylic and homoallylic alcohols. **Tetrahedron Letters**, v. 44, n. 6, p. 1275–1278, 2003.

FERREIRA, R. G. S.; SILVA JÚNIOR, W. F.; VEIGA JUNIOR, V. F.; LIMA, A. A. N.; LIMA, E. S. Physicochemical characterization and biological activities of the triterpenic mixture  $\alpha,\beta$ -amyrenone. **Molecules**, v. 22, n. 298, p. 1-9, 2017.

FINGOLO, C. E.; SANTOS, T. S.; VIANNA FILHO, M. D. M.; KAPLAN, M. A. Triterpene esters: natural products from *Dorstenia arifolia* (Moraceae). **Molecules**, v. 18, p. 4247-4256, 2013.

FLASINSKI, M.; HAC-WYDRO, K.; BRONIATOWSKI, M. Incorporation of pentacyclic triterpenes into mitochondrial membrane-studies on the interactions in model 2D lipid systems. **The Journal of Physical Chemistry**, v. 118, p. 12927-12937, 2014.

GALERON, M. A.; VAULTIER, F.; RONTANI, J. F. Oxidation products of  $\alpha$ - and  $\beta$ -amyrins: potencial tracers of abiotic degradation of vascular-plant organic matter in aquatic environments. **Environmental Chemistry**, v. 13, n. 4, p. 732-744, 2016.

GOMES, N. G. M.; PEREIRA, D. M.; VALENTÃO, P.; ANDRADE, P. B. Hybrid MS/NMR methods on the prioritization of natural products: Applications in drug discovery. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 147, p. 234-249, 2018.

GOMES, R. A., TELES, Y. C. F., PEREIRA, F. O., RODRIGUES, L. A. S., LIMA, E. O., AGRA, M. F., SOUZA, M. F. V. Phytoconstituents from *Sidastrum micranthum* (A. St.-Hil.) Fryxell (Malvaceae) and antimicrobial activity of pheophytin A. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 51, n. 4, p. 861-867, 2015.

GONZÁLEZ-COLOMA, A.; LÓPEZ-BALBOA, C.; SANTANA, O.; REINA, M.; FRAGA, B. M. Triterpene-based plant defenses. **Phytochemistry Review**, v. 10, p. 245-260, 2011.

GONZÁLEZ, G. A.; ANDRÉS, L., S.; RAVELO, A., G.; LUIS, J., G.; BAZZOCCHI, I. L.; WEST, J. Terpenoids from *Salvia mellifera*. **Phytochemistry**, v. 29, n. 5, p. 1691-1693, 1990.

HAAVIKKO, R.; NASEREDDIN, A.; SACERDOTI-SIERRA, N.; KOPELYANSKY, D.; ALAKURTTI, S.; TIKKA, M.; JAFFE, C. L.; YLI-KAUHALUOMA, J. Heterocycle-fused lupane triterpenoids inhibit *Leishmania donovani* amastigotes. **MedChemComm**, v. 5 p. 445-451, 2014.

HALDAR, S.; KALE, B. S.; JADHAV, D. D.; THULASIRAM, H. V. Lipase mediated separation of triterpene structural isomers,  $\alpha$ - and  $\beta$ -amyrin. **Tetrahedron Letters**, v. 55, p. 3122-3125, 2014.

HERATH, H. M, TAKANO-ISHIKAWA, Y.; YAMAKI, K.. Inhibitory effect of some flavonoids on tumor necrosis factor-alpha production in lipopolysaccharide-stimulated mouse macrophage cell line J774.1. **Journal of Medicinal Food**, v. 6, n. 4, p. 365-70, 2003.

HERNÁNDEZ-HERNÁNDEZ-VÁZQUEZ, L.; MANGAS, S.; PALAZON, J.; NAVARRO-OCAÑA, A. Valuable medicinal plants and resins: Commercial phytochemicals with bioactive properties. **Industrial Crops and Products**, v. 31, p. 476-480, 2010.

HERNÁNDEZ-HERNÁNDEZ-VÁZQUEZ, L.; PALAZON, J.; NAVARRO-OCAÑA, A. The Pentacyclic Triterpenes  $\alpha,\beta$ -amyrins: A Review of Sources and Biological Activities. **Phytochemicals – A Global Perspective of Their Role in Nutrition and Health**, InTech, Chap. 23, p. 478–502, 2011.

HUNSEN, M. Pyridinium chlorochromate catalyzed oxidation of alcohols to aldehydes and ketones with periodic acid. **Tetrahedron Letters**, v. 46, n.10, p. 1651–1653, 2005.

ITOKAWA, H.; QIAO, Y.; TAKEYA, K.; IITAKA, Y. New triterpenoids from *Rubia cordifolia* Var. *Pratensis* (Rubiaceae). **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v. 37, n. 6, p. 1670-1672, 1989.

IWU, M. M. **Handbook of african medicinal plants**. CRC Press, 2 ed., p. 190, 2014.

JÄGER, S.; TROJAN, H.; KOPP, T.; LASZCZYK, M. N.; SCHEFFLER, A. Pentacyclic triterpene distribution in various plants - rich sources for a new group of multi-potent plant extracts. **Molecules**, v.14, n.6, p. 2016–2031, 2009.

JEMMALI, Z.; CHARTIER, A.; DUFRESNE, C.; ELFAKIR, C. Optimization of the derivatization protocol of pentacyclic triterpenes prior to their gas chromatography-mass spectrometry analysis in plant extracts. **Talanta**, v. 147, p. 35-43, 2016.

KANOMA, A. I.; MUHAMMAD, I.; ABDULLAHI, S.; SHEHU, K.; MAISHANU, H. M.; ISAH, A. D. Qualitative and quantitative phytochemical screening of Cola nuts (*Cola nitida* and *Cola acuminata*). **Journal of Biology, Agriculture and Healthcare**, v. 4, n. 5, p. 89-97, 2014.

KIM, H. J.; KOO, S. Preparation of 1,4-hydrobenzoquinones by the PCC/SiO<sub>2</sub>-promoted double oxidation of 3-cyclohexene-1,2-diols. **Organic & Biomolecular Chemistry**, v. 3, p. 3479–3481, 2005.

KIND, T.; FIEHN, O. Strategies for dereplication of natural compounds using high-resolution tandem mass spectrometry. **Phytochemistry letters**, v. 21, p. 313-319, 2017.

LANGENHEIM, J.H. **Plant resins: chemistry, evolution, ecology, and ethnobotany**. Timber Press Inc., Portland, Cambridge, p. 365, 2003.

LANS, C. Ethnomedicines used in Trinidad and Tobago for reproductive problems. **Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine**, v. 3, n. 13, p. 1-12, 2007.

LATEEF, A.; OJO, S.A.; FOLARIN, B. I.; GUEGUIM-KANA, E. B.; BEUKES, L. S. Kolanut (*Cola nitida*) mediated synthesis of silver-gold nanoparticles: antifungal, catalytic, larvicidal and thrombolytic applications. **Journal of Cluster Science**, v. 27, p. 1561-1577, 2016.

LEITE, J. P. V.; OLIVEIRA, A. B.; LOMBARDI, J. A.; DIAS S. FILHO, J.; CHIARI, E. Trypanocidal activity of triterpenes from *Arrabidaea triplinervia* and derivatives. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 29, n. 11, p. 2307-2309, 2006.

LI, X.; LIANG, J.; LU, XI.; TAO, L. Chemical constituents from *Saussurea oligantha*. **Chemistry of Natural Compounds**, v. 48, n. 2, p. 344-345, 2012.

LIM, T. K. Edible Medicinal and Non Medicinal Plants. *Cola nitida*, v. 3, *Fruits*, ed. Springer, p. 175-183, 2012.

LOEDIGE, M. Design and synthesis of novel antileishmanial compounds. **International Journal of Medicinal Chemistry**, v. 2015, p. 1-21, 2015.

MALLICK S. S.; DIGHE, V. V. Detection and estimation of *alpha*-amyrin, *beta*-sitosterol, lupeol, and *n*-tricontane in two medicinal plants by high performance thin layer chromatography. **Advances in Chemistry**, v. 2014, p. 1-7, 2014.

MELO, C. M.; CARVALHO, K. M. M. B.; NEVES, J. C. S.; MORAIS, T. C.; RAO, V. S.; SANTOS, F. A.; BRITO, G. A. C.; CHAVES, M. H.  $\alpha,\beta$ -amyrin, a natural triterpenoid ameliorates L-arginine-induced acute pancreatitis in rats. **World Journal of Gastroenterology**, v. 16, n. 34, p. 4272-4280, 2010.

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

NEVES, L. O.; GADELHA, E. P. N.; GUERRA, J. A. O.; TALHARI, S.; TALHARI, A. C.; JÚNIOR, R. M. S.; FERREIRA, L. C. L. A randomized clinical trial comparing meglumine antimoniate, pentamidine and amphotericin B for the treatment of cutaneous leishmaniasis by *Leishmania guyanensis*. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 86, n. 6, p. 1092-1101, 2011.

OBEY, J. K.; SWAMY, T. A. Antibacterial activity of methanolic extracts of *Cola nitida* seeds on selected pathogenic organisms. **International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences**, v. 3, n. 8, p. 999-1009, 2014.

OJO, G. B.; NWOHA, P. U.; OFUSORI, D. A.; AJAYI, S. A.; ODUKOYA, S. A.; UKWENYA, V. O.; BAMIDELE, O.; OJO, O. A.; OLUWAYINKA, O. P. Microanatomical effects of ethanolic extract of *Cola nitida* on the stomach mucosa of adult Wistar rats. **African Journal Traditional, Complementary and Alternative Medicines**, v. 7, n. 1, p. 47-52, 2010.

OKEKE, C. U.; EZEBARA, C. A.; CHIMEZIE, H.; UDECHUKWU, C. D.; AZIAGBA, B. O. Comparative phytochemical and proximate compositions of *Cola acuminata* (P. Beauv.) Schott and *Cola nitida* (Vent) Schott and Endl. **Plant**, v. 3, n. 3, p. 26-29, 2015.

OLIVEIRA, F.; RITTO, J. L. A.; AKISUE, G.; BACCHI, E. M. **Fundamentos de cromatografia aplicada a fitoterápicos**. 1<sup>a</sup> ed, São Paulo, Brasil, Editora Atheneu, 2010.



OMWIRHIREN, E.; ABASS, A. O.; JAMES, S. A. The phytochemical constituents and relative antimicrobial activities against clinical pathogens of different seed extracts of *Cola nitida* (Vent.), *Cola acuminata* (Beauvois) and *Garcinia kola* (Heckel) grown in South West, Nigeria. **Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry**, v. 6, n. 1, p. 493-501, 2017.

PAN, A. D.; JACOBS, B. F. The earliest record of the genus *Cola* (Malvaceae *sensu lato*: Sterculioideae) from Late Oligocene (28-27 Ma) of Ethiopia and leaf characteristics within the genus. **Plant Systematics and Evolution**, v. 283, p. 247-262, 2009.

PATOCKA, J. Biologically active pentacyclic triterpenes and their current medicine signification. **Journal of Applied Biomedicine**, v. 1; n. 7, p. 7-12, 2003.

PAVIA, D. L., LAMPMANM G. M., KRIZ, G. S., VYVYAN, J. R. **Introdução à espectroscopia**. 2. Ed., São Paulo, ed. CENGAGE learning, p. 106, 2015.

PELISSARI, D. M.; CECHINEL, M. P.; SOUZA-GOMES, M. L.; LIMA JÚNIOR, F. E. F. Tratamento da leishmaniose visceral e leishmaniose tegumentar americana no Brasil. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, v. 20, n. 1, p. 107-110, 2011.

PINK, R.; HUDSON, A.; MOURIÈS, M.; BENDIG, M. Opportunities and challenges in parasitic drug discovery. **Nature Reviews**, v. 4, p. 727-740, 2005.

RAHMAN, A. H. M. M.; GONDHA, R. Taxonomy and traditional medicine practices on Malveceae (Mallow family) of Rajshahi, Bangladesh. **Open Journal of Botany**, v. 1, n. 2, p. 19-24, 2014.

RAI, M.; ACHARYA, D.; RIOS, J. L. **Etnomedicinal Plants: Revitalizing of Tradicional Knowledge of Herbs**. CRC Press, p. 128, 2011.

RAMPERSAD, S. N. Multiple applications of Alamar Blue as an indicator of metabolic function and cellular health in cell viability bioassays. **Sensors**, v. 12, p. 12347-12360, 2012.

RATH, S.; TRIVELIN, L. A.; IMBRUNITO, T. R.; TOMAZELA, D.

M.; JESÚS, M. N.; MARZAL, P. C.; ANDRADE, H. F. A.; TEMPONE, A. G. Antimoniais empregados no tratamento da leishmaniose: estado da arte. **Química nova**, v. 26, n. 4, p. 550-555, 2003.

REAXYS: <http://www.reaxys.com>

REHMAN, S.; LATIEF, R.; BHAT, K. A.; KHUROO, M. A.; SHAWL, A. S.; CHANDRA, S. Comparative analysis of the aroma chemicals of *Melissa officinalis* using hydrodistillation and HS-SPME techniques. **Arabian Journal of Chemistry**, v. 10, p. 2485-2490, 2017.

REILLY, S. M.; SALTIEL, A. R. Coutering inflammatory signals in obesity. **Nature**, v. 15, n. 5, p. 410-411, 2014.

REUTER, S.; GUPTA, S. C.; CHATUVERDI, M. M.; AGGARWAL, B. B. Oxidative stress, inflammation, and cancer: How are they linked? **Free Radical Biology & Medicine**, v. 49, p. 1603-1616, 2010.

RIBEIRO, C. M. R.; DE SOUZA, N. A. Esquema geral para elucidação de substâncias orgânicas usando métodos espectroscópico e espectrométrico. **Química Nova**, v. 30, n. 4, p. 1026-1031, 2007.

ROSA, R. L.; NARDI, G. M.; JANUÁRIO, A. G. F.; BOÇOIS, R.; BAGATINI, K. P.; BONATTO, S. J. R.; PINTO, A. O.; FERREIRA, J. R. N.; MARIANO, L. N. B.; NIERO, R.; IAGHER, F. Anti-inflammatory, analgesic, and immunostimulatory effects of *Luehea divaricata* Mart. & Zucc. (Malvaceae) bark. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 50, n. 3, p. 599-610, 2014.

SAAD, B.; ABOUATTA, B. S.; BASHA, W.; HMADE, A.; KMAIL, A.; KHASIB, S.; SAID, O. *Hypericum triquetrifolium* – derived factors downregulate the production levels of LPS-induced nitric oxide and tumor necrosis factor  $\alpha$  in THP-1 cells. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2011, p. 1-7, 2011

SANDJO, L.P.; KUETE, V. Triterpenes and steroids from the medicinal plants of Africa. **Medicinal Plant Research in Africa: Pharmacology and Chemistry**, 1. Ed., cap. 4, Ed.: Elsevier, Editor: Victor Kuete, p.135-201, 2013.

SANTOS, D. O.; COUTINHO, C. E. R.; MADEIRA, M. F.; BOTTINO, C. G.; VIEIRA, R. T.; NASCIMENTO, S. B.; BERNARDINO, A.; BOURGUIGNON, S. C.; CORTE-REAL, S.; PINHO, R. T.; RODRIGUES, C. R.; CASTRO, H. C. Leishmaniasis treatment- a challenge that remains: a review. **Parasitology Research**, v. 103, p. 1-10, 2008.

SAÚDE-GUIMARÃES, D. A.; FARIA, A. R. Substâncias da natureza com atividade anti-*Trypanossoma cruzi*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 17, n. 3, p. 455-465, 2007.

SCHWENDE, H.; FITZKE, E.; AMBS, P.; DIETER, P. Differences in the state of differentiation of THP-1 cells induced by phorbol ester and 1,25-dihydroxyvitamin D3. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 59, p. 555-561, 1996.

SHENG, H.; SUN, H. Synthesis, biology and clinical significance of pentacyclic triterpenes: a multi-target approach to prevention and treatment of metabolic and vascular diseases. **Natural Products Report**, v. 28, p. 543-593, 2011.

SHUKLA, A. K.; SINGH, B. K.; PARA, S.; DUBEY, V. K. Rational approaches for drug designing against leishmaniasis. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 160, p. 2208-2218, 2010.

SIEUWERTS, A. M.; KLIJN, J. G. M.; PETERS, H. A.; FOEKENS, J. A. The MTT tetrazolium salt assay scrutinized: how to use this assay reliably to measure metabolic activity of cell cultures in vitro for the assessment of growth characteristics, IC<sub>50</sub>-values and cell survival. **Clinical Chemistry and Laboratory Medicine**, v. 33, p. 813-824, 1995.

SILVA-DOS-SANTOS, D.; BARRETO-DE-ALBUQUERQUE, J.; GUERRA, B.; MOREIRA, O. C.; BERBERT, L. R.; RAMOS, M. T.; MASCARENHAS, B. A. S.; BRITTO, C.; MORROT, A.; VILLAVERDE, D. M. S.; GARZONI, L. R.; SAVINO, W.; COTTA-DE-ALMEIDA, V.; MEIS, J. Unraveling Chagas disease transmission through the oral route: Gateways to *Trypanossoma cruzi* infection and target tissues. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 11, n. 4., p. 1-26, 2017.

SILVERSTEIN, R. M.; WEBSTER, F. X.; KIEMLE, D. J. Identificação espectrométrica de compostos orgânicos, 7ª edição, editora LTC, Rio de Janeiro, Brasil, p. 12, 83, 85, 89, 117, 121, 2013.

SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia: do produto natural ao medicamento**, 1ª ed., Porto Alegre, Brasil, Editora Artmed, p. 153-160, 2017.

SOLDI, C.; PIZZOLATTI, M. G. ; LUIZ, A. P.; MARCON, R.; MEOTTI, F. C.; MIOTO, L. A.; SANTOS, A. R. S. Synthetic derivatives of de  $\alpha$ - and  $\beta$ -amyrin triterpenes and their antinociceptive properties. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 16, p. 3377-3386, 2008.

SOLOMONS, T. W. G.; FRYHLE, C. B. **Química Orgânica**, v. I, Rio de Janeiro, ed. LTC, p. 560, 561, 2013.

SOLOMONS, T. W. G.; FRYHLE, C. B. **Química Orgânica**, v. II, Rio de Janeiro, ed. LTC, p. 205, 319, 2013.

SONG, N.; CHO, J.; IM, D.; LEE, D.; WU, Q.; SEO, W.; KANG, H. C.; LEE, Y.; BAEK, N. Triterpenoids from *Fragaria ananassa* calyx and their inhibitory effects on melanogenesis in B16-F10 mouse melanoma cells. **Natural Products Research**, v. 27, n. 23, p. 2219-2223, 2013.

SONIBARE, M. A.; SOLADOYE, M. O.; ESAN, O. O.; SONIBARE, O. O. Phytochemical and antimicrobial studies of four species of *Cola* Schott & Endl. (StERCNuliaceace). **African Journal Tradicional, Complementary and Alternative Medicines**, v. 6, n. 4, p. 518-525, 2009.

SOUZA, M. V. N. de. **Estudo da síntese orgânica: baseado em substâncias bioativas**. 1ª ed., São Paulo, Brasil, editora Átomo, p. 118, 120, 221, 2010.

SUN, H.; FANG, W.; WANG, W.; HU, C. Structure-activity relationships of oleanane- and ursane-type triterpenoids. **Botanical Studies**, v. 47, p. 339-368, 2006.

TACHIE-OBENG, E.; BROWN, N. Kolanuts (*Cola nitida* & *Cola acuminata*). The key non-timber forest products of Central Africa: state of the knowledge. **Technical Paper**, SD Publication Series Office of Sustainable Development Bureau for Africa, US Agency for International Development, Ghana, ed. Clark LE, Sunderland TCH, n. 122, p. 87–120, 2004.

TAMO, S. P. B.; ESSAMA, S. H. R.; ETOA, F. X. Plants used in Bandjoun village (La'Djo) to cure infectious diseases: An ethnopharmacology survey and *in-vitro* time-kill assessment of some of them against *Escherichia coli*. **The Journal of Phytopharmacology**, v. 5, n. 2, p. 56-70, 2016.

TROPICOS.ORG, (2016). **Nomenclatural and specimen database of the Missouri Botanical Garden**, *Cola nitida* (Vent.) Schott & Endl., Acessado em: 10/02/2016, 2016, disponível em: <http://tropicos.org/Name/30401611>

VAN DE LOOSDRECHT, A.; NENNIE, E.; OSSENKOPPELE, G.; BEELEN, R.; LANGENHUIJSEN, M. Cell mediated cytotoxicity against U 937 cells by human monocytes and macrophages in a modified colorimetric MTT assay. A methodological study. **Journal of Immunological Methods**, v. 141, p. 15-22, 1991.

VECHIA, L. D.; GNOATTO, S. C. B.; GOSMANN, G. Derivados oleananos e ursanos e sua importância na descoberta de novos fármacos com atividade antitumoral, anti-inflamatória e antioxidante. **Química nova**, v. 32, n. 5, p. 1245-1252, 2009.

XU, S.; NORTON, R. A.; CRUMLEY, F. G.; NES, D. Comparison of the chromatographic properties of sterols, select additional steroids and triterpenoids: gravity-flow column liquid chromatography, thin-layer chromatography, gas-liquid chromatography and high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography**, v. 452, p. 377-398, 1988.

WAGH, S. J., GUJAR, J. G., GAIKAR, V. G. Experimental and modeling studies on extraction of amyryns from latex of mandar (*Calotropis gigantea*). **Indian Journal of Chemical Technology**, v. 19, p. 427-433, 2012.

WILKIE, P.; CLARK, A.; PENNINGTON, R. T.; CHEEK, M.; BAYER, C.; WILCOCK, C. C. Phylogenetic relationships within the subfamily Sterculioideae (Malvaceae/Sterculiaceae-Sterculieae) using the chloroplast gene *ndhF*. **Systematic Botany**, v. 31, n. 1, p. 160-170, 2006.

ZHANG, Y., NING, Z., LU, C., ZHAO, S., WANG, J., LIU, B., XU, X. Triterpenoid resinous metabolites from the genus *Boswellia*: pharmacological activities and potential species-identifying properties. **Chemistry Central Journal**, v. 7, n. 153, p. 1-16, 2013.