



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS FÍSICAS E MATEMÁTICAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA

**ISOLAMENTO DE α -AMIRINA DA RESINA DE COLA NITIDA
E SEMISSÍNTESE DE DERIVADOS COM POTENCIAL
INIBIDOR ENZIMÁTICO FRENTE A α -GLICOSIDASE**

EMANOELE LINDENBERG LORENA PINTO

Florianópolis
Julho/2022

Emanoele Lindenberg Lorena Pinto

**ISOLAMENTO DE α -AMIRINA DA RESINA DE COLA *NITIDA* E
SEMISSÍNTESE DE DERIVADOS COM POTENCIAL INIBIDOR
ENZIMÁTICO FRENTE A α -GLICOSIDASE**

Relatório apresentado ao Departamento de Química
da Universidade Federal de Santa Catarina,
como requisito parcial da disciplina de
Estágio II (QMC 5512)



Documento assinado digitalmente

Louis Pergaud Sandjo

Data: 02/08/2022 17:15:20-0300

CPF: 013.315.999-03

Verifique as assinaturas em <https://v.ufsc.br>

Prof. Dr. Louis Pergaud Sandjo

Florianópolis
Julho/2022

Para todos àqueles que se impressionam com a ciência
à frente de fenômenos naturais bem como crianças
com contos de fadas, como dizia Marie Curie.

AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente, às duas mulheres mais importantes da minha vida: minha avó, Adelaide e minha mãe, Adriana. Elas que sempre me deram forças, apoiaram e incentivaram com muito amor. Juntamente ao meu avô, quero agradecer por vocês me proporcionarem tudo do melhor, sem me deixar faltar nada, me permitindo realizar esse sonho. Sou eternamente grata, vocês sempre foram e serão minha grande inspiração e admiração.

À minha irmã Paula, aos meus tios e a todos os demais familiares e amigos de longa data, pelo carinho e apoio de sempre, mesmo em tantos momentos especiais nos quais não pude estar presente devido às tarefas da graduação. Vocês foram fundamentais, mesmo que de longe. Em especial, àquele que fez uma enorme diferença ao final desta trajetória, José, meu parceiro de todos os momentos, obrigada por tudo.

A todos os amigos e colegas que a graduação me proporcionou, pela presença e trocas. Foram muitas pessoas incríveis que conheci ao decorrer desses anos. Sem deixar de mencionar, principalmente, a minha fiel escudeira e amiga Brena, que foi fundamental durante esses últimos anos de graduação. Ah, se não fosse você... Muito obrigada por toda a parceria, apoio e suporte, bem como por compartilhar tantos momentos e pela amizade que criamos que vai além da universidade. Te levarei comigo! Aproveito para incluir a Bruna, que também se tornou uma amiga especial.

A todos aqueles que a monitoria me fez ter o prazer de conhecer, conviver e ajudar – técnicos, professores e alunos – como a Isa e Wilson que se tornaram pessoas mega especiais. E claro, sem deixar de agradecer imensamente ao Gelso, por toda ajuda, favores, conversas, incentivos, risadas e cafezinhos com pão doce. Se teve alguém que me socorreu e esteve presente durante esses anos, essa pessoa é você. Obrigada Gelsito!

Aos colegas de laboratório e amigos que o LQPN me deu, os quais me acolheram de uma forma maravilhosa – Tizzi, Octo, Geo, Jhuly, Humberto, Lucas, Mona, Gabi, Chantal e Carol. Agradeço a enorme ajuda que tive de cada um, as risadas (que não foram poucas, né Jhuly?!), ao apoio em momentos de desespero e não tão felizes, aos cafezinhos, almoços no RU, bares e aos ensinamentos durante o tempo que permaneci no laboratório. Vocês se tornaram família nos últimos meses e, com certeza, ajudaram a tornar essa etapa mais leve! Quero agradecer, em especial,

ao incrível (e chato) Octo que não mediu esforços para me ajudar e fazer tudo acontecer nesta última etapa da graduação. Mas, agora eu pergunto, que horas vamos para o RU? Bora tomar um cafezinho? Ou partiu bar (sem quebrar copos)? Quem sabe um quentão, né?

A todos os professores da UFSC que me deram aula durante a minha formação e que estiveram dispostos a ajudar e contribuir para um melhor aprendizado, me influenciando profundamente. Destacando aquele que me orientou, meus sinceros agradecimentos ao Louis, pela oportunidade, orientação, confiança e incentivo durante este período de estudo. Te admiro!

À Universidade Federal de Santa Catarina pela infraestrutura e ao Departamento de Química pelo ensino de qualidade, pela chance e por todas as ferramentas que me permitiram chegar ao final desse ciclo.

Não menos importante, a Deus por me mostrar sempre o caminho certo, me dando proteção, saúde e força para continuar.

E, enfim, todos que fazem parte da minha caminhada, mesmo que não mencionados aqui. Sou muito grata por todos que fizeram parte da minha vida, acadêmica ou não. Todos vocês têm um lugarzinho especial em meu coração, contem comigo sempre!

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	11
2 REVISÃO DA LITERATURA	13
2.1 Metabólitos secundários	13
2.2 Triterpenos.....	13
2.3 Triterpeno pentacíclico α -amirina.....	16
2.4 Cola nitida	16
2.5 Bioatividade de triterpenos isolados de plantas	17
2.5.1 Inibição da enzima α -glicosidase.....	18
2.6 Medicamentos semissintéticos.....	19
3 OBJETIVOS.....	22
3.1 Objetivo geral	22
3.2 Objetivos específicos.....	22
4 METODOLOGIA	23
4.1 Materiais e equipamentos.....	23
4.2 Material vegetal e obtenção do extrato	23
4.3 Isolamento e caracterização da α -amirina	24
4.4 Reações semissintéticas	24
4.4.1 Reação de oxidação	24
4.4.2 Reação de condensação de Claisen-Schmidt	25
4.5 Caracterização dos compostos	25
4.6 Inibição de α -glicosidase.....	28
4.7 Segurança no laboratório	29
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	30
5.1 Isolamento e caracterização da α -amirina	30
5.2 Síntese dos derivados semissintéticos.....	33
5.3 Caracterização dos derivados semissintéticos.....	37
5.3.1 Derivado semissintético RM1.....	37
5.3.2 Derivado semissintético RM2.....	39
5.3.3 Derivado semissintético RM3.....	41
5.3.4 Derivado semissintético RM4.....	44
5.3.5 Derivado semissintético RM5.....	46

5.3 Estudo da inibição da enzima α-glicosidase	49
6 CONCLUSÃO	54
7 REFERÊNCIAS.....	55

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura química de triterpenos já estudados.	12
Figura 2. Exemplos estruturais das principais classificação de terpenos.	14
Figura 3. Estruturas químicas de triterpenos pentacíclicos citados.	15
Figura 4. Estrutura química do ursano em comparação com α -amirina.	16
Figura 5. <i>Cola nitida</i> (Vent.) Schott & Endl.	17
Figura 6. Estrutura da enzima α -glicosidase.	19
Figura 7. Estruturas químicas de triterpenos pentacíclicos citados.	21
Figura 8. Esquema reacional para a reação de oxidação.	25
Figura 9. Esquema reacional para as reações de condensação.	25
Figura 10. Placa de CCD da α -amirina em Hex:AcOEt 90:10.	31
Figura 11. Estrutura química da α -amirina.	31
Figura 12. Espectro na região do IV da α -amirina.	32
Figura 13. Espectro de RMN de ^1H da α -amirina.	33
Figura 14. Espectro de RMN de ^{13}C da α -amirina.	33
Figura 15. Placa de CCD da reação de oxidação em Hex:AcOEt 90:10.	34
Figura 16. Placa de CCD da purificação da α -amirina em Hex:AcOEt 95:5.	35
Figura 17. Mecanismo de reação de oxidação da α -amirina com PCC.	35
Figura 18. Mecanismo geral de reação de condensação da α -amirina com aldeídos aromáticos.	36
Figura 19. Exemplo do perfil obtido nas placas de CCD durante as reações de condensação reveladas em câmara de UV 254 nm.	36
Figura 20. Estrutura química da α -amirina.	37
Figura 21. Espectro na região do IV da α -amirina.	38
Figura 22. Espectro de RMN de ^1H da α -amirina.	38
Figura 23. Espectro de RMN de ^{13}C da α -amirina.	39
Figura 24. Estrutura química do derivado semissintético RM2.	39
Figura 25. Espectro na região do IV do derivado semissintético RM2.	40
Figura 26. Espectro de RMN de ^1H do derivado semissintético RM2.	41
Figura 27. Espectro de RMN de ^{13}C do derivado semissintético RM2.	41
Figura 28. Estrutura química do derivado semissintético RM3.	42
Figura 29. Espectro na região do IV do derivado semissintético RM3.	43
Figura 30. Espectro de RMN de ^1H do derivado semissintético RM3.	43
Figura 31. Espectro de RMN de ^{13}C do derivado semissintético RM3.	44
Figura 32. Estrutura química do derivado RM4.	44
Figura 33. Espectro na região do IV do derivado semissintético RM4.	45
Figura 34. Espectro de RMN de ^1H do derivado semissintético RM4.	46
Figura 35. Espectro de RMN de ^{13}C do derivado semissintético RM4.	46
Figura 36. Estrutura química do derivado semissintético RM5.	47
Figura 37. Espectro na região do IV do derivado semissintético RM5.	48
Figura 38. Espectro de RMN de ^1H do derivado semissintético RM5.	48
Figura 39. Espectro de RMN de ^{13}C do derivado semissintético RM5.	49

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Dados obtidos no ensaio da inibição da enzima α -glicosidase a 200 $\mu\text{g/mL}$	50
Tabela 2. Dados obtidos no ensaio da inibição da enzima α -glicosidase a 600 $\mu\text{g/mL}$	50
Tabela 3. Molaridade de cada composto nas duas concentrações utilizadas no ensaio.	51
Tabela 4. Resultado da inibição da enzima α -glicosidase (%) em duas concentrações diferentes.....	51

RESUMO

A *Cola nitida* é uma planta medicinal popularmente utilizada para o tratamento de diversas doenças, como hepatite, malária, inflamação e anemia. Sua resina possui uma alta concentração em triterpenos pentacíclicos, que em geral apresentam diversas atividades biológicas. A α -amirina, um triterpeno pentacíclico presente na resina, foi o composto de interesse deste trabalho. O seu isolamento ocorreu através de técnicas cromatográficas com a finalidade de realizar reações semissintéticas. Cinco derivados semissintéticos foram preparados através da oxidação com PCC e condensação de Claisen-Schmidt com aldeídos aromáticos. As reações de semissíntese foram obtidas com rendimentos entre 31 e 99%. As estruturas moleculares foram confirmadas através dos espectros de IV e RMN de ^1H e ^{13}C . O composto isolado e seus derivados semissintéticos foram avaliados quanto a sua inibição frente a enzima α -glicosidase. Os resultados foram satisfatórios, apresentando porcentagens de inibição acima de 50% para todos os compostos em concentração de amostra de 600 $\mu\text{g/mL}$. Os derivados RM1 e RM3 foram os que apresentaram as melhores inibições enzimáticas nesta faixa de concentração com 62 e 61%, respectivamente.

Palavras-chave: triterpeno; α -amirina; Cola nitida; semissíntese; α -glicosidase.

1 INTRODUÇÃO

O uso de produtos naturais para fins terapêuticos é tão antigo quanto a civilização humana¹. A investigação das plantas e de seus constituintes químicos tem crescido, uma vez que eles podem ser eficazes e promissores para o desenvolvimento de novos fármacos e medicamentos. Isto deve-se ao fato de as plantas possuírem uma diversidade química abrangente, sendo muitas moléculas biologicamente ativas, conhecidas como metabólitos secundários.

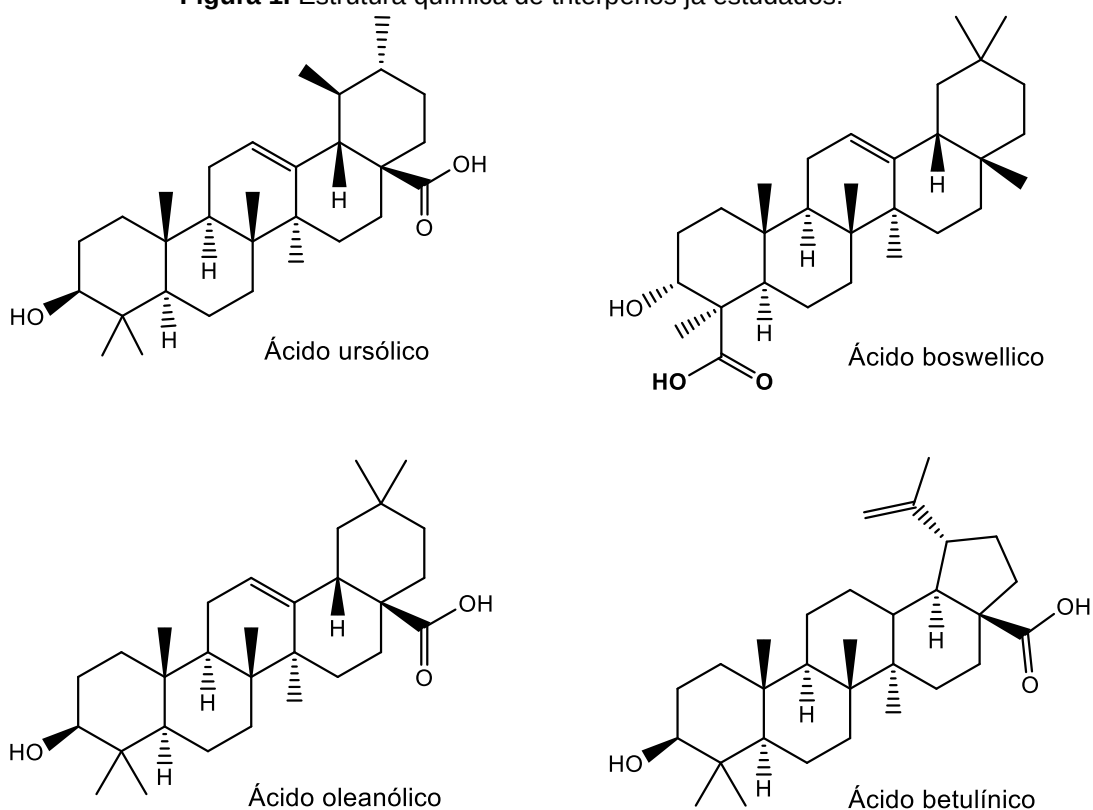
Os metabólitos secundários são produtos naturais sintetizados principalmente por bactérias, fungos e plantas. Essas moléculas, de baixo peso molecular e diversas estruturas químicas, são muito importantes para a saúde humana, podendo ser antibióticos, imunossuppressores, antiparasitários, herbicidas, entre outros. Esses fitoquímicos podem ser classificados em três principais classes: terpenos, compostos fenólicos e alcaloides^{2,3}. Como objeto de estudo na bioprospecção racional de compostos com interesse biológico estão os triterpenos, uma classe de terpenos comumente encontrada em plantas superiores.

Os triterpenos são metabólitos secundários com estruturas versáteis, geralmente pentacíclicos, que apresentam diversos arranjos moleculares e centros estereogênicos em estruturas constituídas por átomos de carbono, hidrogênio e oxigênio. A maior parte dos triterpenos são provenientes dos vegetais, embora estejam presentes em outros organismos, como fungos e bactérias⁴. Estes compostos naturais e seus derivados semissintéticos têm sido explorados por demonstrarem uma gama de atividades biológicas, como anti-inflamatória, antioxidante, antialérgica, antifúngica, antidiabética, antiviral, citotóxica, hepatoprotetora e antiplaquetária⁵⁻⁷.

Entre os triterpenos já estudados (Figura 1), o ácido ursólico apresenta atividades biológicas interessantes, incluindo anticancerígenas, antimicrobianas e antioxidantes⁸; o ácido boswellico demonstrou eficácia contra doenças crônicas como artrite, diabetes, asma, câncer, doença de Parkinson, Alzheimer etc.⁹; o ácido oleanólico é usado na China por mais de 20 anos como um hepatoprotetor, além de exibir demais ações, incluindo antidiabética, antitumoral e anti-inflamatória; e o ácido betulínico e seus derivados foram analisados por sua alta capacidade em efeitos citotóxicos¹⁰. Por fim, as amirinas também são relatadas como ferramenta de estudos com o objetivo de analisar atividades biológicas, tais como anti-hiperglicêmica, hipolipídica, antioxidante e antiviral^{11,12}.

Diante das atividades biológicas previamente descritas relacionadas aos triterpenos e seus derivados, bem como às amirinas, focou-se no triterpeno pentacíclico α -amirina com o intuito de isolar este constituinte da resina de *Cola nitida* (uma planta com alta concentração de triterpenos) e desenvolver derivados semissintéticos do composto para, posteriormente, avaliar o seu potencial inibidor enzimático frente a α -glicosidase.

Figura 1. Estrutura química de triterpenos já estudados.



2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Metabólitos secundários

Os metabólitos secundários são moléculas orgânicas de um grupo de produtos naturais extremamente diversificado sintetizados por plantas, fungos, bactérias, algas e animais. Baseado em sua origem biossintética, a maioria deles são classificados em terpenos, compostos fenólicos e alcaloides. Frequentemente, os metabólitos secundários são associados a espécies dentro de um grupo fitogenérico restrito e constituem o composto bioativo de diversas plantas medicinais, aromáticas, corantes e condimentares e/ou alimentos funcionais¹³.

Diferente do metabolismo primário – compostos imprescindíveis ao desenvolvimento vegetal que participam da nutrição e reprodução, como proteínas, ácidos graxos, polissacarídeos e clorofila –, o metabolismo secundário não é essencial para um organismo viver, isto é, o organismo produtor pode crescer na ausência de sua síntese, pelo menos a curto prazo. No entanto, os metabólitos secundários desempenham um papel na interação do organismo com o seu ambiente, principalmente na proteção das plantas contra estresses bióticos ou abióticos^{13,14}.

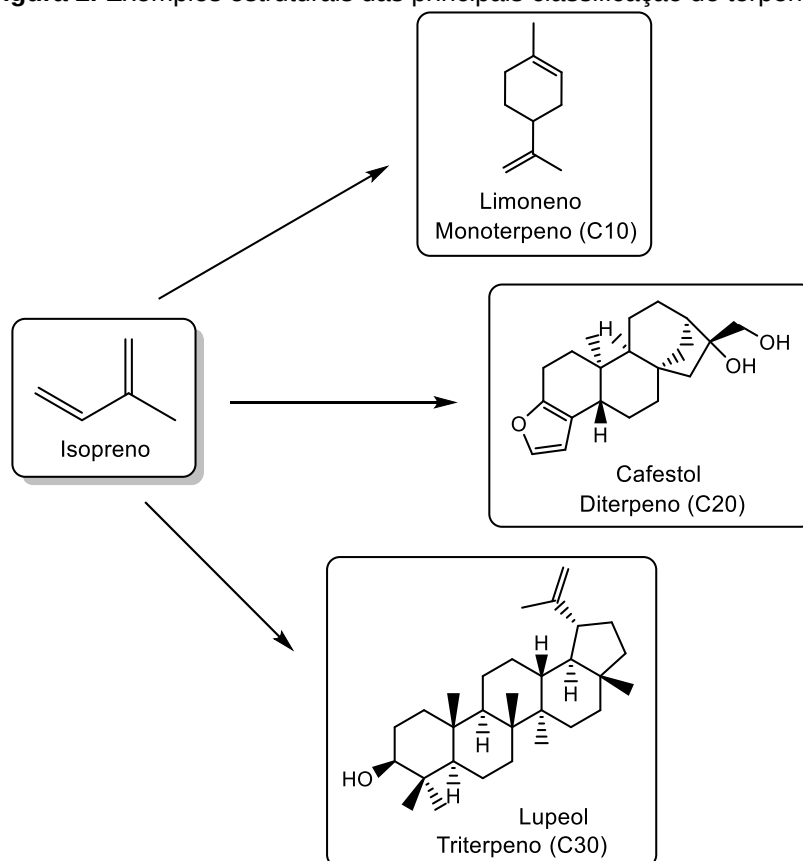
Diante de técnicas tradicionais de separação com sistemas de solventes e reagentes reveladores, tem-se a capacidade de separar e identificar metabólitos secundários das plantas. Dentre as mais conhecidas estão a cromatografia em coluna clássica e a cromatografia em camada delgada, utilizando eluentes e adsorventes como fases móveis e estacionárias a fim de rastrear, separar, fracionar, purificar ou somente analisar esses compostos.

2.2 Triterpenos

Os triterpenos pertencem a classe dos terpenos. Essa classe de substâncias geralmente apresenta uma dupla ligação carbono-carbono sendo caracterizado como um hidrocarboneto insaturado¹⁵. São definidos como um grupo de moléculas cuja estrutura é baseada na quantidade de unidades de isoprenos, sendo classificados principalmente em monoterpenos (C₁₀), diterpenos (C₂₀) e triterpenos que se refere a três monoterpenos, isto é, 30 carbonos agrupados em seis unidades de isopreno¹⁶ (Figura 2).

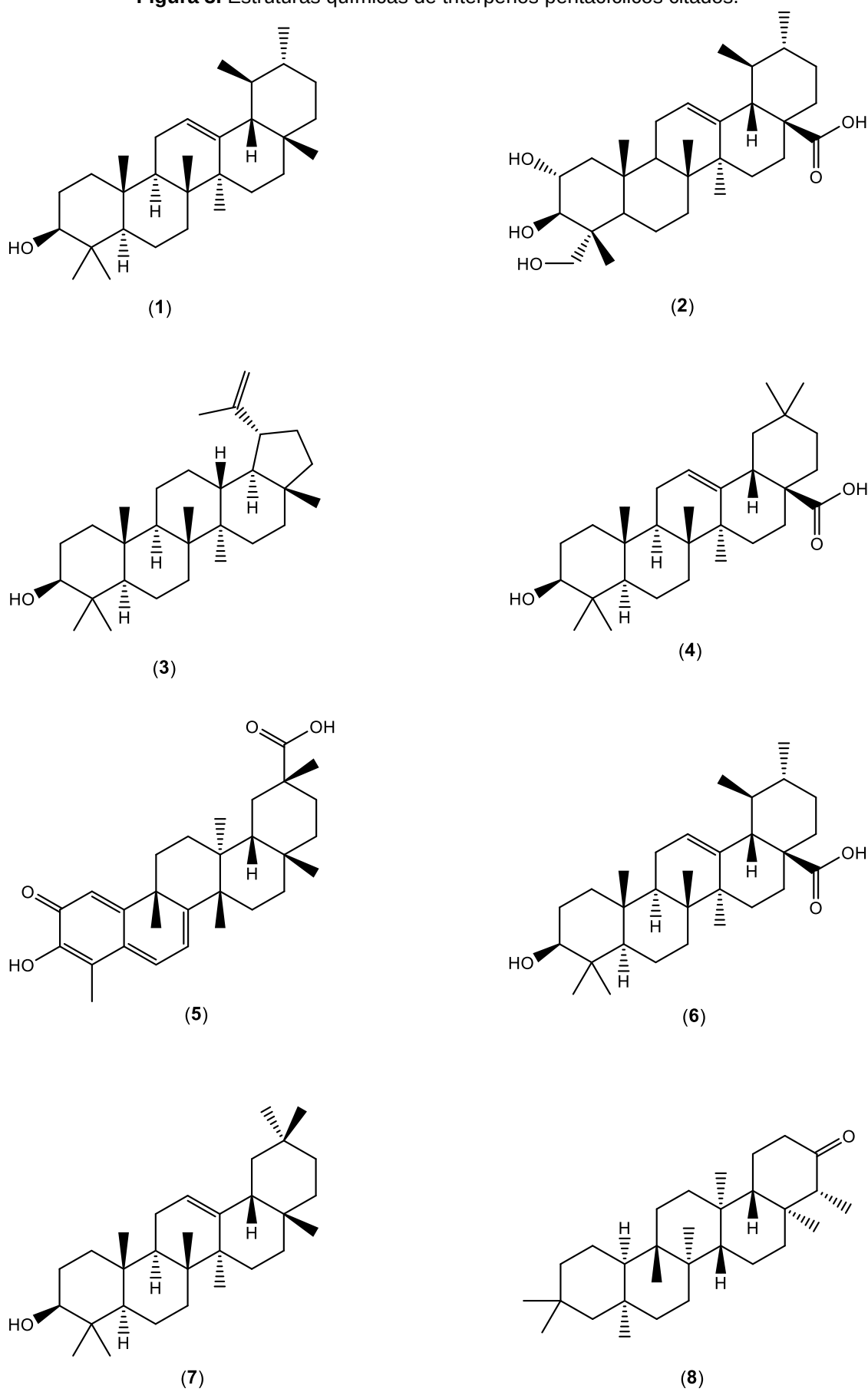
Em geral, os terpenos possuem estruturas cíclicas relativamente complexas, podendo possuir os grupamentos álcoois, aldeídos, ácidos carboxílicos, entre outros em sua constituição¹⁷. Como metabólitos secundários, os terpenos desempenham uma variedade de funções no crescimento e desenvolvimento das plantas¹⁸.

Figura 2. Exemplos estruturais das principais classificação de terpenos.



Os triterpenos, definidos por serem formados por seis unidades de isoprenos, geralmente pentacíclicos, são uma das maiores classes de produtos naturais vegetais. Essas importantes substâncias são numerosas e estruturalmente diversas, sendo conhecidos mais de 20 mil diferentes na natureza relatados até o momento. Eles ocorrem em reino vegetal na grande maioria como principais constituintes de oleorresinas e resinas; também são comuns em outros organismos como animais, fungos e bactérias^{4,19}. Dentre os triterpenos pentacíclicos conhecidos estão: α -amirina (**1**), ácido asiático (**2**), lupeol (**3**), ácido oleanólico (**4**), celastrol (**5**) e ácido ursólico (**6**)²⁰. Esses compostos podem ser identificados e isolados por diferentes técnicas cromatográficas. No entanto, não são visíveis em câmara de UV por não possuírem um grupamento cromóforo²¹.

Figura 3. Estruturas químicas de triterpenos pentacíclicos citados.



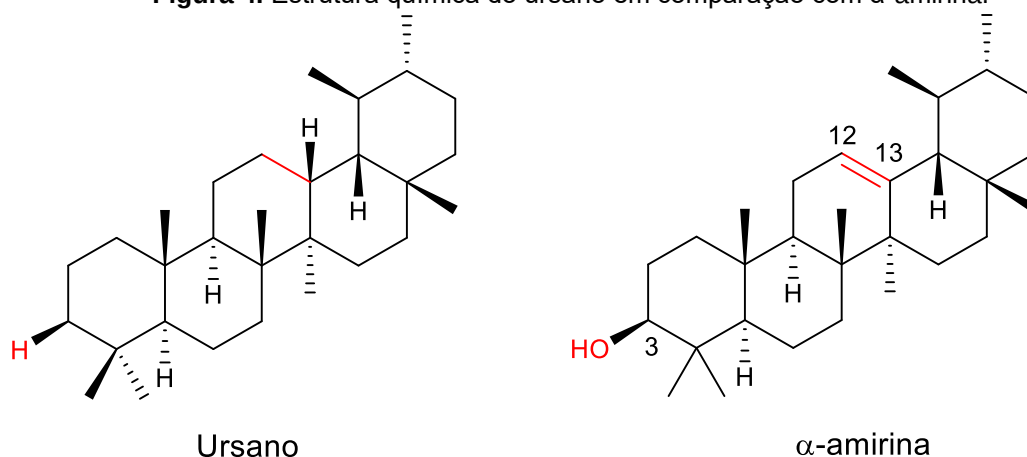
2.3 Triterpeno pentacíclico α -amirina

As amirinas, um exemplo de triterpeno pentacíclico, são designadas aos isômeros α - e β -amirina, ambos com a fórmula química $C_{30}H_{50}O$. Esses compostos químicos são encontrados em várias plantas e materiais vegetais, como folhas, cascas, madeiras, resinas de plantas medicinais e oleorresinas de diversas espécies do gênero *Protium* da família Burseraceae²².

As propriedades físico-químicas das amirinas indicam a característica lipofílica dessas substâncias, sendo insolúveis em água e solúveis em solventes como o éter, hexano, benzeno e clorofórmio²³.

A α -amirina, em destaque, é um triterpeno pentacíclico e um álcool secundário da classe ursano que contém uma ligação dupla entre as posições 12 e 13 e na qual o hidrogênio na posição 3 β é substituído por um grupo hidroxila (Figura 4). Esta molécula contém uma hibridização do tipo Csp^2 e um grupamento doador de ligação de hidrogênio em C-3 (R-OH).

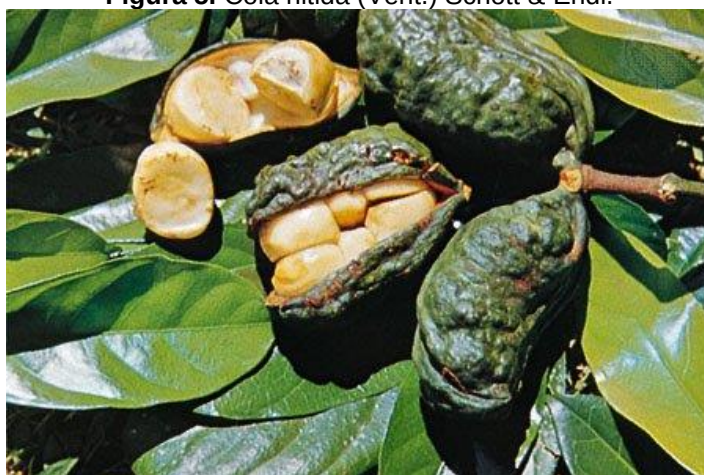
Figura 4. Estrutura química do ursano em comparação com α -amirina.



2.4 Cola nitida

A *Cola nitida* (Vent.) Schott & Endl., apresentada na Figura 5, é uma planta nativa da África, conhecida como “noz-de-cola” ou “cola” no Brasil. Ela está incluída entre as plantas de uso tradicional para tratamento de diversas doenças, como hepatite, malária, úlcera gástrica, inflamação e anemia²⁴. Suas sementes são mascadas e utilizadas popularmente no tratamento de fadiga matinal, enxaqueca, indigestão, diretamente na pele sobre feridas e para limpeza dos dentes²⁵.

Figura 5. Cola nitida (Vent.) Schott & Endl.



Fonte: Britannica²⁶

A sua resina é facilmente solúvel em solventes orgânicos como diclorometano e hexano, insolúvel em água e tornam-se rígidas em contato com o ar. Obtida do tronco, ela constitui-se de uma mistura complexa de terpenos. Embora haja poucos estudos sobre a resina da *Cola nitida*, é de conhecimento que resinas em geral possuem alta concentração de triterpenos, podendo ser citados os seguintes: α -amirina (**1**), β -amirina (**7**), lupeol (**3**), friedelina (**8**), entre outros^{27,28}.

2.5 Bioatividade de triterpenos isolados de plantas

Os triterpenos pentacíclicos, em geral, apresentam uma variedade de efeitos farmacológicos, incluindo anti-inflamatório, antioxidante, antiviral, antidiabético, antitumoral, hepato-protetor, cardioprotetor, antialérgico, fungicida, entre outros que ainda estão sendo explorados, bem como o potencial de restaurar distúrbio vasculares associados à hipertensão, obesidade, diabetes e ainda, na utilização de prevenção e tratamento de doenças metabólicas^{7,29}.

Ainda, compostos triterpenos comumente encontrados na natureza como ácido oleanólico (**4**), ácido ursólico (**6**) e hederagenina (**11**), foram relatados resultados muito promissores da atração molecular na proteína SARS-CoV-2 M^{PRO}, o que aponta ampla possibilidade de aplicação futura³⁰. Recentemente, a metil bardoxolona (**9**), derivado semissintético do ácido oleanólico (**4**), entrou em um ensaio clínico em pacientes hospitalizados com COVID-19³¹.

Para a α -amirina, até o momento, foram atribuídas as atividades anti-inflamatória, analgésica, ansiolítica, antidepressiva, anti-lipoxigenase,

hepatoprotetora, antinociceptiva, anti-hiperglicêmica, hipolipidêmica, antifúngica e antiagregante plaquetária⁵.

2.5.1 Inibição da enzima α -glicosidase

A diabetes mellitus (DM) é caracterizada por níveis anormais de glicose na corrente sanguínea. Essa doença metabólica crônica possui como um dos principais sintomas a hiperglicemia, ocorrendo como resultado de algumas anomalias na produção de insulina, secreção ou de sua ação^{32,33}. A insulina, um hormônio produzido pelas células pancreáticas, controla a quantidade de glicose na corrente sanguínea a qualquer momento, regulando o metabolismo de carboidratos, gorduras e proteínas³⁴. Diante disso, a hiperglicemia crônica pode levar a sérias complicações a longo prazo, incluindo danos nos nervos, doenças cardiovasculares e insuficiência renal³².

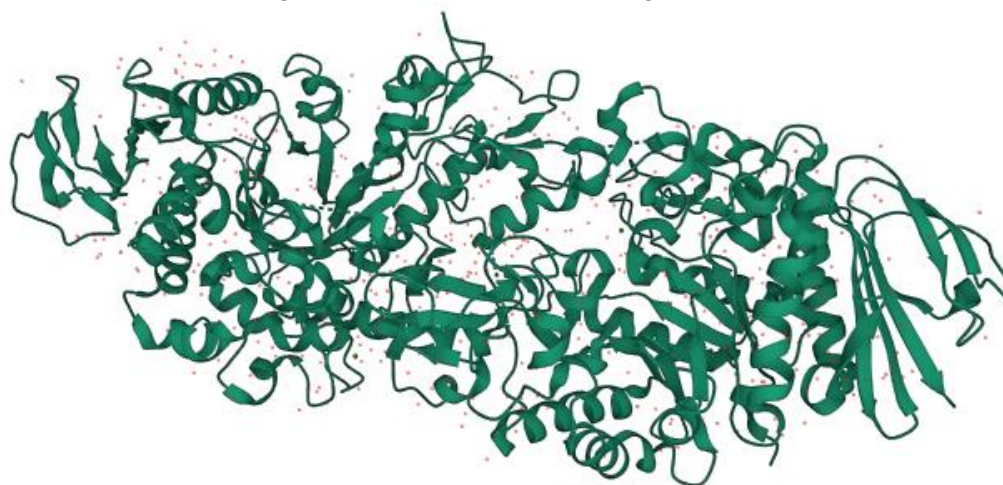
São classificados dois tipos amplos de diabetes: tipo 1 e tipo 2. A diabetes tipo 1 é uma forma autoimune de início precoce conhecida como diabetes dependente de insulina, pois envolve a destruição das células que produzem insulina. Já a diabetes tipo 2 é uma forma não autoimune de início tardio, compreendendo a maioria dos casos. Esta ocorre pela resistência à insulina e/ou pela sua secreção prejudicada³².

Não há de fato um tratamento efetivo para modular essa disfunção metabólica associada a diabetes. No entanto, uma estratégia desenvolvida para a diabetes tipo 2 é a inibição da atividade de α -glicosidase (Figura 6). A enzima, pertencente à família das hidrolases, catalisa o passo final no processo digestivo de carboidratos e inibindo-a pode-se retardar a liberação da glicose e conseqüentemente, da sua absorção, reduzindo os níveis de glicose³⁵. Essa inibição pode ser realizada utilizando medicamentos sintéticos a partir de produtos naturais, já que alguns inibidores se associam a efeitos colaterais gastrointestinais. Nos últimos anos, essa opção alternativa para o controle da hiperglicemia tem sido estudada a fim de identificar inibidores α -glicosidases de fontes naturais^{32,36}.

Uma série de compostos químicos identificados de plantas mostram atividades inibitórias contra a enzima α -glicosidase, sendo a maioria deles metabólitos secundários. Dentre os triterpenos já estudados e relatados como possíveis inibidores α -glicosidase estão o ácido corosólico (**12**)³⁷, ácido betulínico (**13**), ácido ursólico (**6**), ácido oleanólico (**4**)³⁸ e o lupeol (**3**). Assim, a partir dos terpenos em geral, muitos compostos individuais foram e podem ser relatados devido a estrutura especial ou

grupos individuais que possuem e suas possíveis interações com os resíduos de aminoácidos presentes na estrutura da enzima³⁶.

Figura 6. Estrutura da enzima α -glicosidase.



Fonte: PDB - 2ZE0³⁹

2.6 Medicamentos semissintéticos

Entre as maneiras de classificação dos fármacos, pode-se categorizá-los como naturais, sintéticos ou semissintéticos, dependendo de sua procedência. Os ativos naturais são definidos como compostos encontrados na natureza que não sofreram nenhuma modificação estrutural, sendo as plantas, as algas e os microrganismos as principais fontes. Em contrapartida, os sintéticos são produzidos através da síntese orgânica/inorgânica a partir de estruturas químicas simples e, portanto, não são necessariamente encontrados na natureza. Os semissintéticos são produtos sintéticos que utilizam como material de partida um composto natural isolado³⁰.

A fonte mais dominante são as plantas, devido a biodiversidade e variabilidade estrutural de seus constituintes químicos. Por este motivo, cada vez mais, extratos de plantas bioativas estão sendo investigados como intermediários para o desenvolvimento de medicamentos para serem utilizados no tratamento de doenças. Alguns exemplos de medicamentos derivados de plantas são aspirina (da casca de salgueiro), digoxina (da flor *Digitalis lanata*) e a morfina (do ópio)^{40,41}. De todos os fármacos disponíveis no mercado, 80% são produtos naturais ou derivados⁴².

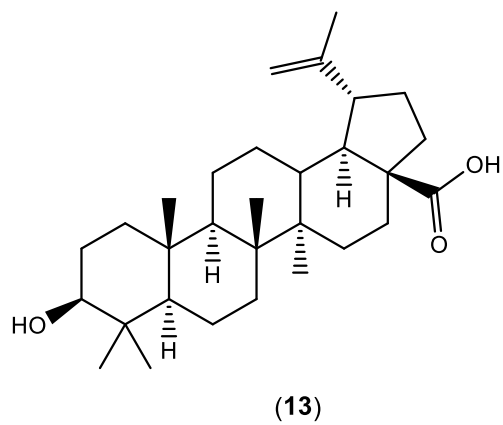
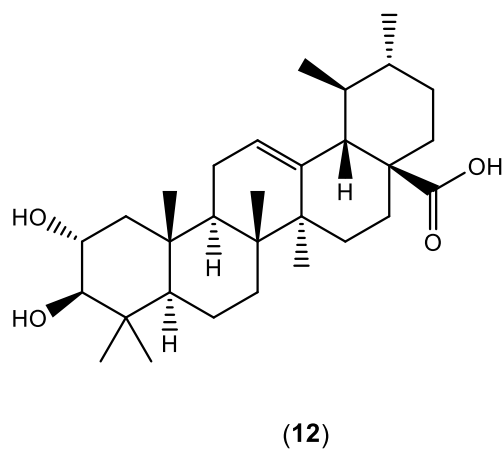
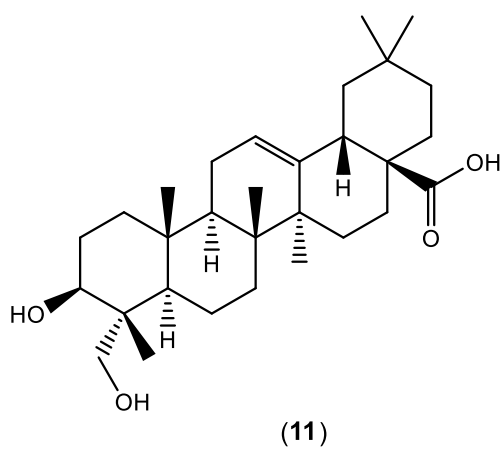
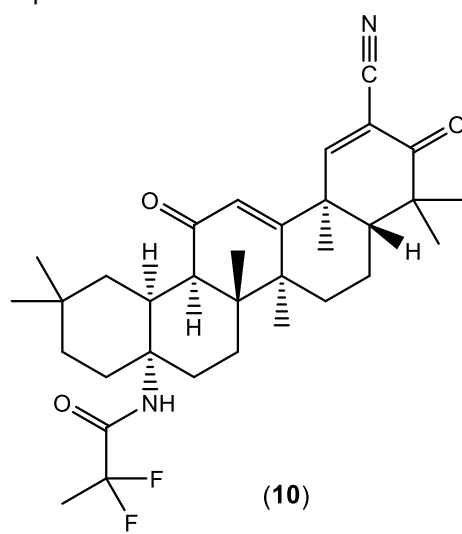
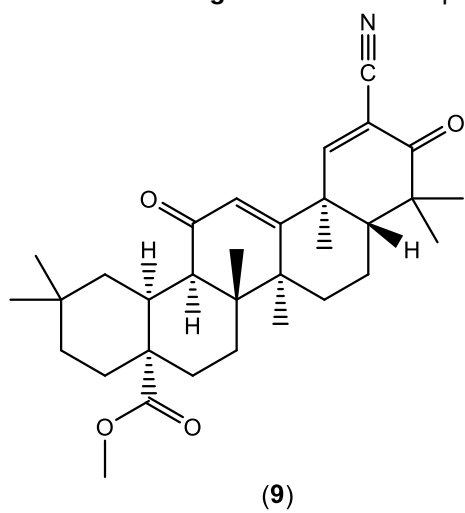
Entende-se que a semissíntese surgiu como uma ferramenta para promover mudanças estruturais com o objetivo de modular e explorar as propriedades biológicas dos produtos naturais puros⁴³. Esse objetivo, por sua vez, resulta na obtenção de

novos compostos que podem possuir propriedades farmacológicas diferentes do que a substância de origem, podendo vir a reduzir a toxicidade e melhorar suas propriedades físico-químicas como solubilidade, pH, lipofilicidade, entre outros⁴⁴.

Segundo proposto por Atanasov *et al*³¹, os triterpenos pentacíclicos metil bardoxolona (**9**) e omaveloxolona (**10**), derivados semissintéticos do ácido oleanólico (**4**), são ativadores potentes que mostraram efeitos protetores em diversas doenças crônicas animais e estão, atualmente, sendo testados para uma ampla gama de indicações, como doença renal crônica em diabetes tipo 2, hipertensão pulmonar arterial, melanoma, dermatite por irradiação, inflamação ocular e ataxia de Friedreich.

Sendo assim, a diversidade dos compostos derivados da α -amirina através da semissíntese tem como objetivo a investigação de suas propriedades farmacológicas, visando sua aplicação para os sintomas associados a diabetes.

Figura 7. Estruturas químicas de triterpenos pentacíclicos citados.



3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

O presente projeto teve como objetivo geral o isolamento do composto triterpeno pentacíclico α -amirina da resina da *Cola nitida* para realizar modificações estruturais através de reações para obter derivados semissintéticos com potencial inibição enzimática *in vitro* frente a α -glicosidase.

3.2 Objetivos específicos

- I. Isolar por cromatografia em coluna a α -amirina da resina bruta do tronco da *Cola nitida* e caracterizá-la por técnicas espectroscópicas de IV, RMN de ^1H e RMN de ^{13}C ;
- II. Realizar semissínteses da α -amirina previamente isolada e obter derivados a partir de reações de oxidação e condensação de Claisen-Schmidt, caracterizando-os por análises espectroscópicas (IV, RMN ^1H e RMN ^{13}C);
- III. Avaliar o potencial de inibição dos compostos obtidos frente a α -glicosidase a partir do ensaio colorimétrico enzimático utilizando uma leitora de microplacas.

4 METODOLOGIA

4.1 Materiais e equipamentos

Todos os reagentes e solventes de grau P.A. utilizados, foram adquiridos de fontes comerciais e utilizados sem purificação prévia. A cromatografia em camada delgada foi realizada utilizando-se placas obtidas a partir de cromatoplasas de alumínio impregnadas com sílica gel 60 com indicador UV₂₅₄ adquiridas da Macherey-Nagel. A revelação dos compostos foi auxiliada por lâmpadas UV_{254/365} e solução de vanilina sulfúrica seguida de aquecimento, com soprador térmico. As técnicas cromatográficas foram realizadas em colunas abertas utilizando sílica gel Sigma-Aldrich de 60 Å, 70-230 mesh (63-200 µm).

Todos os compostos foram identificados por dados obtidos na Central de Análises do Departamento de Química da UFSC. Os espectros de absorção na região do infravermelho foram registrados em um espectrofotômetro Bruker modelo Alpha utilizando pastilhas de brometo de potássio (KBr) de grau analítico; os espectros de ressonância magnética nuclear de hidrogênio a 400 MHz em espectrômetros Bruker AC-200 e Bruker Avance DRX 400, respectivamente, utilizando tetrametilsilano (TMS) como padrão interno e clorofórmio deuterado (CDCl₃) para solubilizar cada amostra sendo os deslocamentos químicos medidos em unidades adimensionais δ (ppm); e os espectros de ressonância magnética nuclear de ¹³C a 100 MHz.

4.2 Material vegetal e obtenção do extrato

A planta 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, sendo identificada como origem da espécie *Cola nitida* por comparação de exsicata no Herbário Nacional de Yaoundé – Camarões/África (n. 14590SRF).

O material vegetal bruto foi submetido a extração exaustiva em DCM/EtOH (1:1 v/v; 2x2000mL) como solvente extrator por dez dias. Após este período, o extrato foi filtrado e concentrado em rotaevaporador à pressão reduzida (50 °C, 120 rpm) resultando no extrato resinoso avaliado através de cromatografia em camada delgada (CCD). O extrato resinoso foi submetido ao fracionamento por filtração sólido-líquido

em sílica gel para obtenção de frações e a métodos cromatográficos de separação para o isolamento do composto.

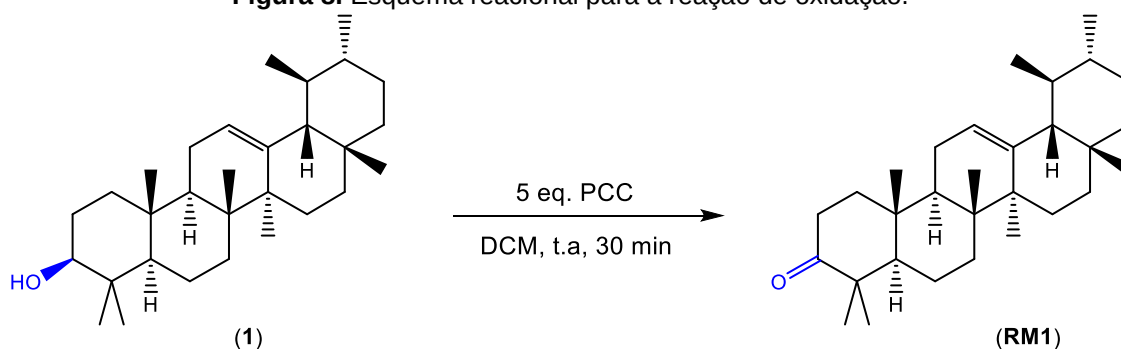
4.3 Isolamento e caracterização da α -amirina

A fração Hex:AcOEt (90:10, 11,339 g) foi submetida ao fracionamento por cromatografia em coluna clássica, empacotada com hexano. Como fase estacionária foi utilizado um leito de sílica gel e a mistura binária de hexano e acetato de etila em condições gradientes como fase móvel, onde a polaridade foi aumentando conforme a eluição se procedia. Desta coluna, as subfrações obtidas foram evaporadas e reunidas conforme a semelhança de R_f monitorado por cromatografia em camada delgada (CCD) reveladas com solução de vanilina sulfúrica (15 g de vanilina em 250 mL de etanol e 2,5 mL de ácido sulfúrico concentrado) seguida de aquecimento. As subfrações foram **a** (41-76), **b** (77-89) e **c** (90-97). A partir da subfração **a** (28 mg) foi conseguido isolar o composto puro identificado como α -amirina (**RM**). Já a subfração **b** (225 mg), que apresentou um sólido branco, continha uma mistura enriquecida de α -amirina e foi analisada e comparada por CCD. Esta foi usada para a reação de oxidação.

4.4 Reações semissintéticas

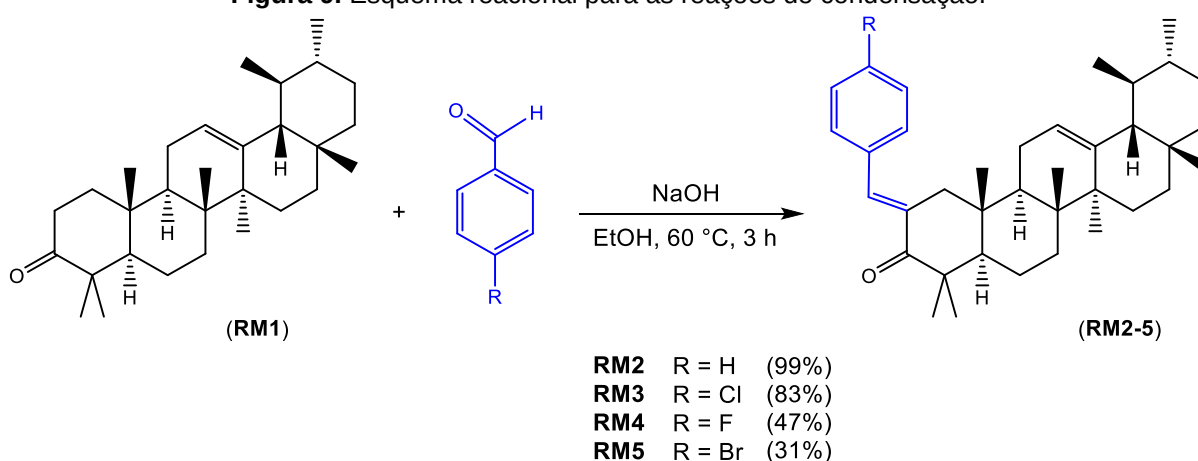
4.4.1 Reação de oxidação

Em um balão de 25 mL, a subfração **b** enriquecida em α -amirina (167 mg; 1 eq.) foi solubilizada em 2 mL de diclorometano (DCM) e, em seguida, adicionado 422 mg (5 eq.) do reagente clorocromato de piridínio (PCC). A solução reacional, monitorada por CCD, ocorreu em temperatura ambiente sob agitação por 30 minutos. Ao término deste tempo, a reação foi interrompida adicionando água destilada e transferida para um funil de separação. A fase orgânica foi extraída exaustivamente com DCM e posteriormente, rotaevaporada. A purificação foi realizada por coluna cromatográfica em sílica gel com sistema de solvente Hex:AcOEt (95:5), obtendo o produto **RM1** identificado como α -amirina. O esquema reacional está resumido na Figura 8.

Figura 8. Esquema reacional para a reação de oxidação.

4.4.2 Reação de condensação de Claisen-Schmidt

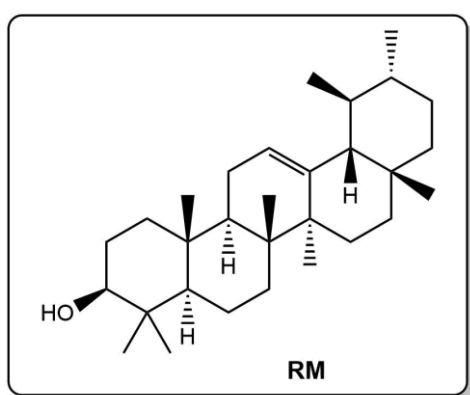
A um balão de 25 mL, adicionou-se o derivado **RM1** (1 eq.), o aldeído aromático (1,2 eq.) e o hidróxido de sódio, solubilizando-os em etanol (2 mL). A reação foi mantida em refluxo sob agitação e temperatura de 60 °C em banho de areia, sendo monitorada por CCD. Ao término da reação, esta foi resfriada em temperatura ambiente, interrompida com água destilada gelada e neutralizada com HCl 0,1 M. Formou-se um precipitado, sendo este filtrado em Buchner e lavado exaustivamente com água destilada gelada, deixando-o secar. Os produtos (**RM2-5**) foram obtidos a partir da purificação por coluna cromatográfica em sílica gel com sistema de solvente Hex:AcOEt (98:2). O esquema reacional está representado na Figura 9.

Figura 9. Esquema reacional para as reações de condensação.

4.5 Caracterização dos compostos

Os compostos isolados (**RM**) e de semissíntese (**RM1-5**) foram caracterizados por ressonância magnética nuclear de ^1H (400 MHz) e ^{13}C (100 MHz) e por infravermelho, confirmando sua estrutura através de dados já descritos na literatura.

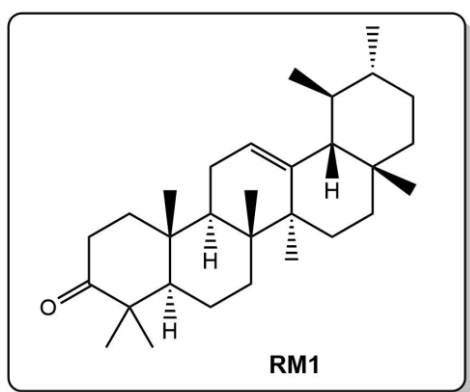
As amostras foram solubilizadas em solvente deuterado CDCl_3 e como padrão interno foi utilizado o tetrametilsilano (TMS). As multiplicidades dos espectros de RMN de ^1H foram representadas da seguinte forma: simpleto (s), duplete (d), duplo duplete (dd) e multiplete (m). Os valores das constantes de acoplamento (J) foram expressos em Hertz (Hz) e com a integração. Os compostos sintetizados neste trabalho, apesar de envolverem metodologias já descritas anteriormente, viabilizaram uma série de produtos inéditos na literatura presente, tais como **RM2**, **RM3**, **RM4** e **RM5**, que foram nomeados conforme as regras de nomenclatura internacional IUPAC.



α -amirina (RM)

Sólido branco. **RMN ^1H** (400 MHz): δ 5,12 (t, J = 3,5 Hz, 1H, H-12); 3,22 (dd, J = 10,70; 5,20 Hz, 1H, H-3). **RMN ^{13}C** (100 MHz): δ 139,93 (C-13); 124,76 (C-12); 79,41 (C-3); 59,41 (C-14); 55,52; 48,06; 42,42; 41,87; 40,35; 40,01; 39,95; 39,13; 39,12; 37,24; 34,10; 33,28; 31,60; 29,09; 28,47; 28,44; 27,60; 26,96; 23,71; 23,61; 21,74; 18,70; 17,82;

17,21; 16,02; 15,97.

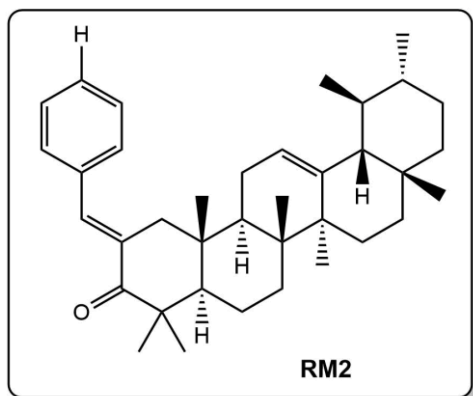


α -amirona (RM1)

Sólido branco. **RMN ^1H** (400 MHz): δ 5,14-5,11 (m, 1H, H-12); 2,57-2,48 (m, 1H, H-2); 2,36 (ddd, J = 15,90, 7,10, 3,70 Hz, 1H, H-2). **RMN ^{13}C** (100 MHz): δ 218,03 (C-3); 140,00 (C-13); 124,48 (C-12); 59,42 (C-14); 55,53; 47,69; 47,20; 42,50; 41,79; 40,27; 39,97; 39,88; 39,77; 36,89; 34,49; 34,07; 32,75; 31,53; 29,07; 28,37; 26,88; 26,87;

23,83; 23,48; 21,80; 21,69; 19,94; 17,78; 17,12; 15,76.

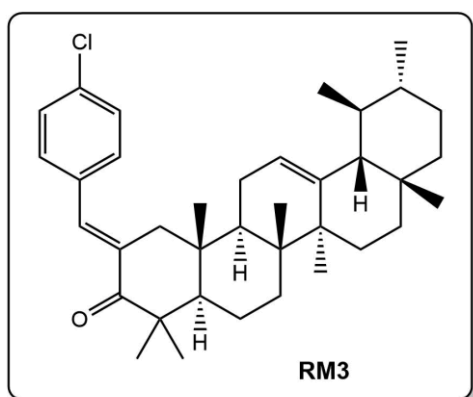
(4aR,6aR,6bS,8aR,11R,12S,12aR,14aR,14bR)-2-((E)-benzilideno)-4,4,6a,6b,8a,11,12,14b-octametil-1,4,4a,5,6,6a,6b,7,8,8a,9,10,11,12,12a,14,14a, 14b-octadeca-hidropicen-3(2H)-ona (RM2)



Sólido amarelo claro. **RMN ^1H** (400 MHz): δ 7,55 (d, $J = 1,60$ Hz, 1H, H vinílico); 7,45-7,41 (m, 4H, H-Ar); 7,36-7,33 (m, 1H, H-Ar). **RMN ^{13}C** (100 MHz): δ 208,27; 140,11; 137,85; 136,32; 134,22; 130,66; 129,28; 128,79; 128,76; 124,56; 59,57; 53,49; 45,69; 45,59; 45,66; 44,46; 41,85; 40,26; 40,11; 39,96; 36,59; 34,18; 32,42; 31,59; 30,01; 29,12; 28,43; 26,90; 24,04; 23,50; 23,10; 21,72;

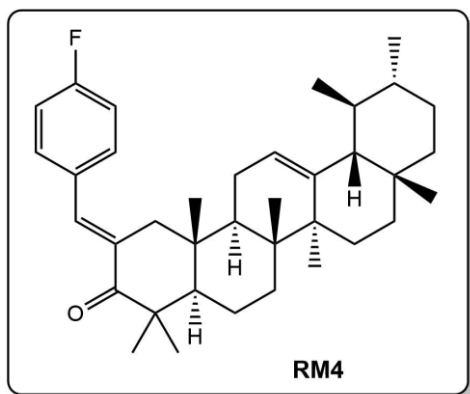
20,73; 17,92; 16,93; 16,00.

(4aR,6aR,6bS,8aR,11R,12S,12aR,14aR,14bR)-2-((E)-4-clorobenzilideno)-4,4,6a,6b,8a,11,12,14b-octametil-1,4,4a,5,6,6a,6b,7,8,8a,9,10,11,12,12a,14,14a,14b-octadeca-hidropicen-3(2H)-ona (RM3)



Sólido branco. **RMN ^1H** (400 MHz): δ 7,49 (s, 1H, H vinílico), 7,39-7,35 (m, 4H, H-Ar). **RMN ^{13}C** (100 MHz): δ 208,03; 140,17; 136,48; 134,73; 134,69; 131,83; 129,06; 128,65; 124,45; 59,56; 53,48; 47,78; 47,26; 45,69; 44,42; 42,68; 41,84; 40,27; 40,12; 36,62; 34,19; 32,41; 31,59; 30,04; 29,12; 28,42; 26,93; 24,05; 23,50; 23,12; 21,73; 20,71; 17,92; 16,93; 16,00.

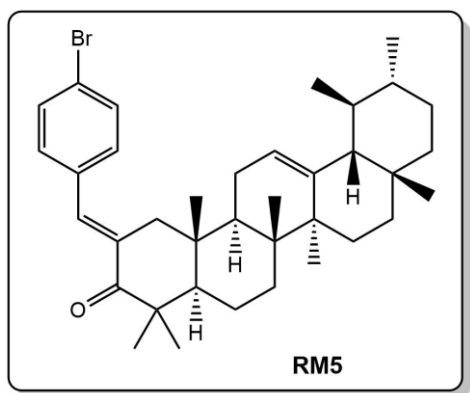
(4aR,6aR,6bS,8aR,11R,12S,12aR,14aR,14bR)-2-((E)-4-fluorobenzilideno)-4,4,6a,6b,8a,11,12,14b-octametil-1,4,4a,5,6,6a,6b,7,8,8a,9,10,11,12,12a,14,14a,14b-octadeca-hidropicen-3(2H)-ona (RM4)



Sólido branco. **RMN ¹H** (400 MHz): δ 7,51 (s, 1H, H vinílico), 7,44-7,41 (m, 2H, H-Ar); 7,11 (t, J = 8,7 Hz, 2H, H-Ar). **RMN ¹³C** (100 MHz): δ 208,09; 164,13; 140,18; 136,70; 133,88; 132,56; 124,47; 116,02; 115,80; 59,56; 53,45; 47,78; 45,69; 44,41; 42,67; 41,84; 40,27; 40,12; 39,95; 36,59; 34,19; 32,40; 31,58; 30,02; 29,12; 28,42; 26,89; 24,06; 23,50; 23,10; 21,73; 20,72; 20,72; 17,92; 16,93;

16,00.

(4aR,6aR,6bS,8aR,11R,12S,12aR,14aR,14bR)-2-((E)-4-bromobenzilideno)-4,4,6a,6b,8a,11,12,14b-octametil-1,4,4a,5,6,6a,6b,7,8,8a,9,10,11,12,12a,14,14a,14b-octadeca-hidropicen-3(2H)-ona (RM5)



Sólido amarelo. **RMN ¹H** (400 MHz): δ 7,55 (d, J = 8,4 Hz, 2H, H-Ar), 7,47 (s, 1H, H vinílico), 7,29 (d, J = 8,3 Hz, 2H, H-Ar). **RMN ¹³C** (100 MHz): δ 208,02; 140,17; 136,51; 135,17; 134,88; 132,06; 132,01; 129,06; 124,45; 59,56; 53,50; 45,69; 45,64; 44,41; 42,68; 41,84; 40,27; 40,13; 39,95; 36,62; 34,19; 32,41; 31,59; 29,97; 29,12; 28,43; 26,89; 24,06; 23,50; 21,73; 20,70; 17,92; 16,93; 16,00.

4.6 Inibição de α -glicosidase

O ensaio enzimático para inibição da enzima α -glicosidase foi realizada no próprio laboratório de pesquisa. As soluções utilizadas durante o ensaio foram preparadas seguindo adaptações para as concentrações descritas por Yuca *et al*⁴⁵, sendo elas: solução tampão fosfato (0,1 M em pH 6,8), solução de parada (carbonato de potássio 1 M), solução substrato (*p*-nitrofenil-D-glicopiranosídeo 2 mM) e solução de enzima (α -glicosidase 0,1 U).

Em cada poço foi adicionado 50 µL de solução tampão, seguido de 20 µL de amostra (200 e 600 µg/mL) e 10 µL da solução de enzima. O branco instrumental foi preparado na primeira coluna da microplaca, sendo adicionado 80 µL de solução tampão e 20 µL de amostra. No controle negativo foi adicionado 20 µL de DMSO.

A microplaca foi incubada à 37 °C por 10 min. Em seguida, foi adicionado em todos os poços 20 µL de substrato, incubando-se a placa à 37 °C por 30 min. Um volume de 50 µL de solução de parada foi adicionado e a microplaca foi submetida à uma leitora de microplacas da marca BioTek, modelo Synergy 2 em 405 nm.

Os dados de absorvância obtidos pela leitura das microplacas foram tratados em software Excel e os percentuais de inibição enzimática estabelecidos através da seguinte equação:

$$\% \text{ Inibição} = \left(\frac{Abs_{controle\ negativo} - Abs_{amostra}}{Abs_{controle\ negativo}} \right) \times 100$$

4.7 Segurança no laboratório

O trabalho foi realizado usando sempre o material de proteção (luvas, óculos, máscaras etc.), além do jaleco de algodão com mangas compridas. Todos os compostos orgânicos tóxicos foram manipulados com cuidado, dentro de capelas, evitando a inalação e contato direto. Os solventes utilizados foram previamente recuperados em etapas de lavagem e extração, quando possível. Os demais resíduos gerados foram resíduos líquidos originados das soluções orgânicas ou aquosas, os quais foram separados, identificados e descartados adequadamente. Estes foram recolhidos por pessoas autorizadas para o tratamento adequado, bem como outros materiais como luvas, papéis contaminados e eppendorfs.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

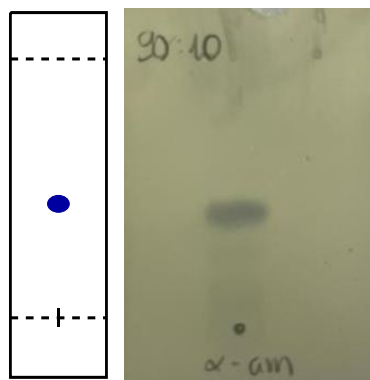
A α -amirina encontrada na resina da *Cola nitida* foi ferramenta de estudo por Frankenberger *et al*⁴⁶, que teve como objetivo analisar sua atividade anti-inflamatória e antiparasitária. Visto que a literatura revela um interesse evidenciado na α -amirina devido as suas propriedades biológicas, estes foram utilizados para realizar o estudo de modificação estrutural de semissíntese deste trabalho. Estudos revelaram que as modificações estruturais de produtos naturais e seus derivados semissintéticos são fontes valiosas de novos candidatos a medicamentos com uma variedade de atividades biológicas e farmacológicas⁴⁷. De acordo com Raghuvanshi⁴⁸, é possível realizar uma abordagem rápida para o desenvolvimento de derivados do triterpeno pentacíclico ácido oleanólico. Essa abordagem empregou a preparação de novas estruturas através da condensação de Claisen-Schmidt do composto oxidado com benzaldeído na presença de etanol e hidróxido de potássio.

Baseado nas informações destes dois estudos, realizou-se as modificações estruturais na α -amirina isolada da resina da *Cola nitida* por meio de reações semissintéticas, utilizando como precursor o seu derivado oxidado α -amirona e foi possível sintetizar quatros derivados (RM2, RM3, RM4 e RM5).

5.1 Isolamento e caracterização da α -amirina

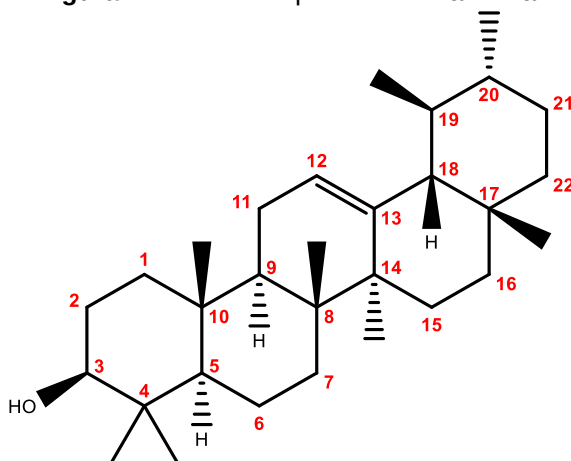
Para o isolamento da α -amirina, a cromatografia em coluna clássica foi utilizada já que se trata de uma técnica popular amplamente usada para isolar substâncias de interesse em misturas. O produto **RM** apresentou um aspecto oleoso transparente. No entanto, quando em contato com metanol, o triterpeno precipita formando um sólido branco, devido a diferença de polaridade entre o soluto e solvente. Obtido da subfração **a**, foi eluído com a mistura binária de hexano e acetato de etila (95:5). Em CCD, a α -amirina não é visível a UV 254/365 nm, uma vez que não possui grupo cromóforo. Porém, foi facilmente visualizada quando a placa era revelada com solução de vanilina sulfúrica e aquecimento (Figura 10).

Figura 10. Placa de CCD da α -amirina em Hex:AcOEt 90:10.



As técnicas de cromatografia em camada delgada são comuns para observar amirinas em plantas, pois fornecem de maneira fácil e rápida o perfil dos extratos e assim, permitem identificar parcialmente os compostos presentes²⁸. A α -amirina foi observada como uma mancha azul escura com $R_f = 0,44$ em Hex:AcOEt (90:10). Por ser um triterpeno com um grupamento hidroxila em C-3, este composto pode fazer ligações de hidrogênio com a fase estacionária, logo, possui interação com a sílica gel. Ao mesmo tempo por ter caráter lipofílico esta interação compete com a fase móvel, o que justifica o fator de retenção apresentado.

Figura 11. Estrutura química da α -amirina.



No espectro na região do infravermelho (Figura 12) foram observadas intensas absorções em, aproximadamente, 3250 cm^{-1} para o estiramento característico de ligação O-H, em torno de 3000 cm^{-1} para estiramentos de ligação C-H de Csp^3 e na região de 1500 cm^{-1} para o estiramento de ligação C=C presente na estrutura.

O espectro de ressonância magnética nuclear (RMN) de ^1H (Figura 13) apresentou um sinal em δ 3,22 ($J = 10,70$ e $5,12$ Hz), característico de triterpenos do tipo 3-OH e em δ 5,12 que corresponde ao CH olefínico. Essa análise foi confirmada através do espectro de RMN de ^{13}C (Figura 14) que apresentou um sinal em 79,41 ppm, atribuído ao carbono carbinólico C-3. Na região de alcenos foram observados dois sinais mais intensos, sendo eles a 139,93 e 124,76 ppm correspondentes ao C-13 e C-12, respectivamente. Os demais sinais correspondem aos grupos CH_3 , CH_2 e CH que compõem o esqueleto do composto.

Os valores da integração dos sinais do espectro de RMN de ^1H na região de olefinas e do hidrogênio carbinólico permitiram a identificação do triterpeno α -amirina através da comparação de dados já reportados na literatura, bem como os demais carbonos presentes na estrutura^{49,50}.

Figura 12. Espectro na região do IV da α -amirina.

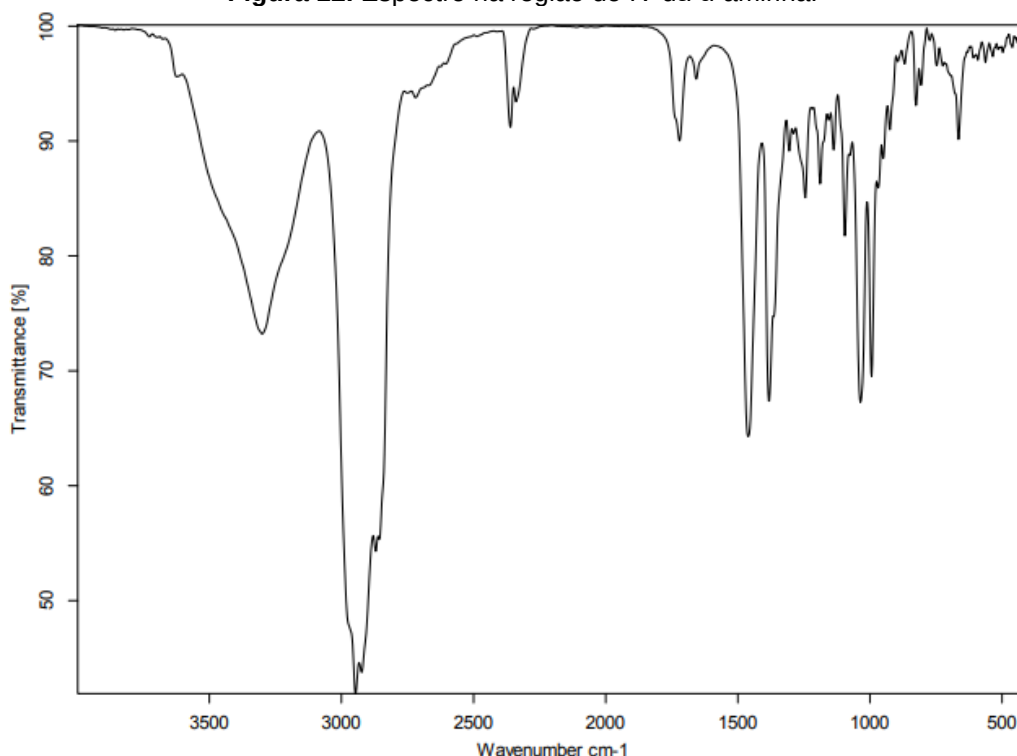


Figura 13. Espectro de RMN de ^1H da α -amirina.

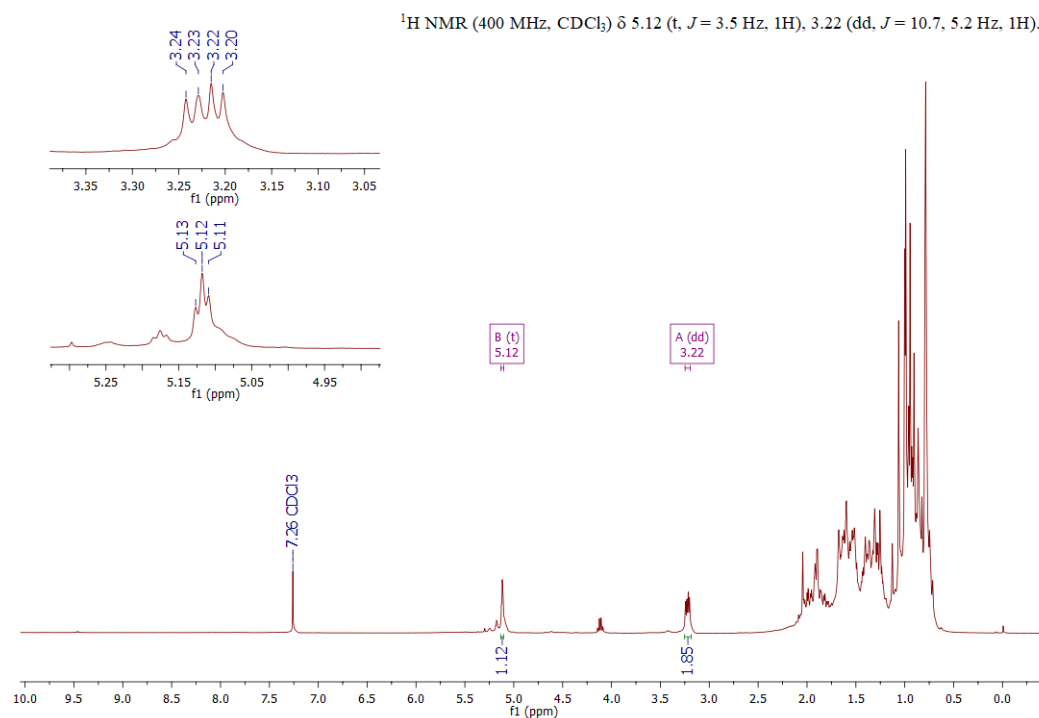
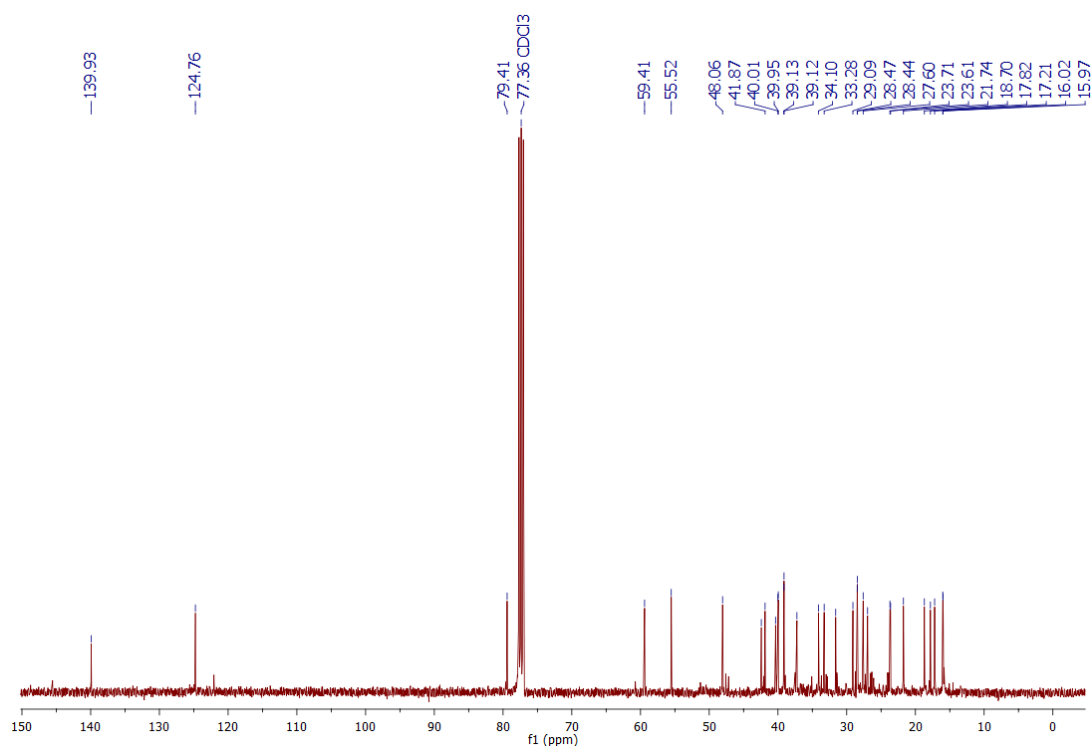


Figura 14. Espectro de RMN de ^{13}C da α -amirina.



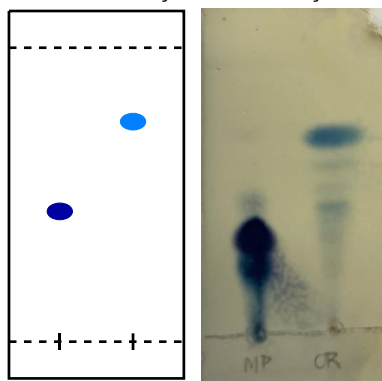
5.2 Síntese dos derivados semissintéticos

A oxidação se deu pela subfração **b** enriquecida de α -amirina com o reagente PCC (clorocromato de piridínio) em diclorometano. Este agente oxidante brando é um

bom reagente para a oxidação de carbonos alílicos, isto é, converte álcoois secundários em cetonas. O mecanismo de reação está apresentado na Figura 17.

Alíquotas durante a reação foram coletadas em intervalos de 15 minutos para o monitoramento via CCD reveladas em vanilina sulfúrica, notando-se que a mancha correspondente ao precursor de $R_f = 0,44$ some durante a reação, enquanto uma mancha de coloração azul mais clara ($R_f = 0,75$) começa a surgir (Figura 15). Isso significa que a α -amirina da mistura foi consumida para dar origem ao produto.

Figura 15. Placa de CCD da reação de oxidação em Hex:AcOEt 90:10.



Ainda, ambos os compostos possuem grupos funcionais polares, portanto são capazes de fazer ligações de hidrogênio com a fase estacionária polar. No entanto, de acordo com as estruturas químicas, o produto é menos polar do que o material de partida. Diante disso e analisando a CCD, observou-se que o produto obtido interagiu mais com a fase móvel, uma vez que teve um R_f maior em comparação com o R_f do material de partida. Essa observação é condizente com o esperado, já que a fase móvel utilizada é principalmente apolar devido à alta porcentagem de hexano, mas é mais polar que o hexano puro, pela presença de acetato de etila.

Para o isolamento do produto foi realizado o procedimento de purificação através de uma rápida coluna cromatográfica com sílica gel e sistema binário de Hex:AcOEt 95:5, obtendo um sólido branco. A Figura 16 mostra a placa de CCD obtida durante a purificação, sendo ela revelada em vanilina sulfúrica, visto que o produto oxidado também não possui grupos cromóforos para a visualização em câmara de UV.

Figura 16. Placa de CCD da purificação da α -amirona em Hex:AcOEt 95:5.

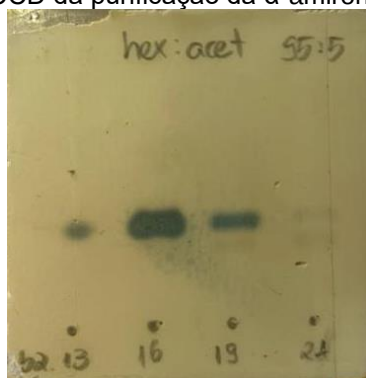
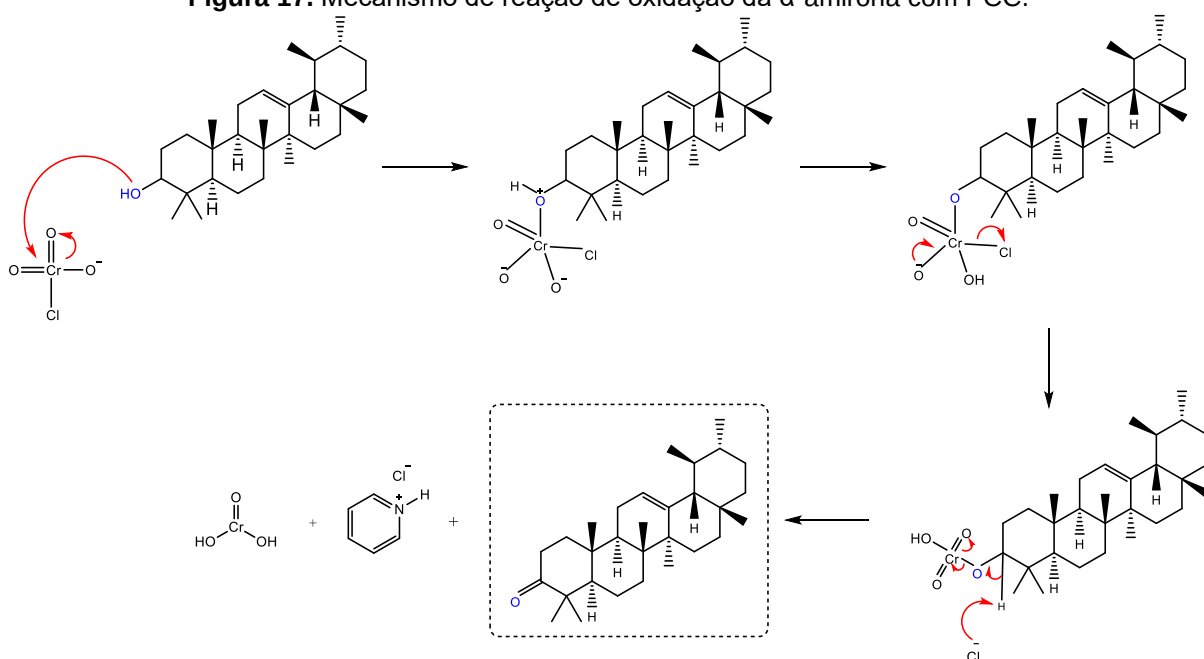
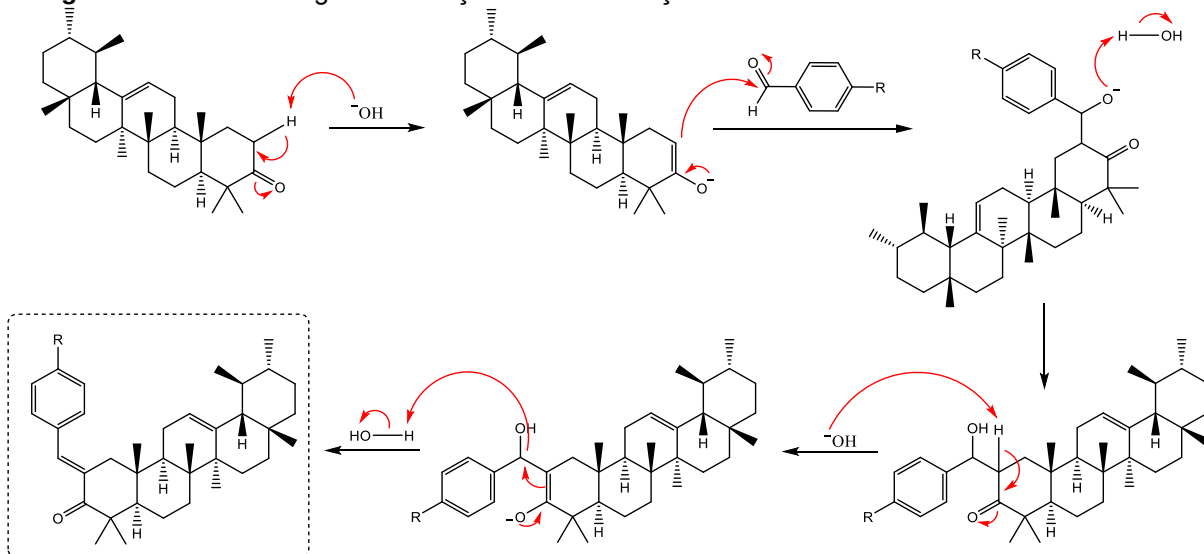


Figura 17. Mecanismo de reação de oxidação da α -amirona com PCC.



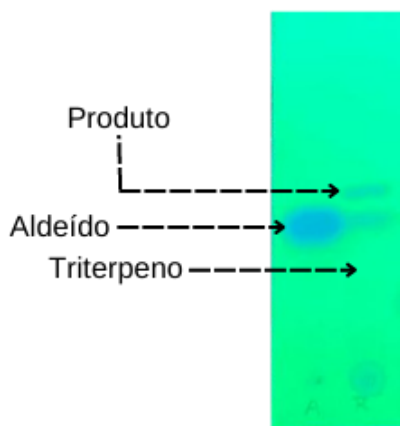
A preparação dos produtos **RM2-5** se deu através da reação de condensação de Claisen-Schmidt com diferentes aldeídos aromáticos. A semissíntese ocorreu na presença de uma quantidade catalítica de NaOH proporcionando os derivados após a perda de uma molécula de água. Foi examinada a capacidade catalítica da base K_2CO_3 com o triterpeno e o aldeído aromático, mas a reação não ocorreu, nem mesmo após 24 h e aumento de temperatura chegando até a $100\text{ }^\circ\text{C}$. No entanto, já era esperado pois a reação de condensação só prossegue quando uma base forte está presente removendo um próton alfa e gerando o íon enolato. A formação adicional da ligação carbono-carbono ocorre por ataque nucleofílico pelo enolato no carbono carbonílico eletrofílico do aldeído aromático⁵¹, como demonstrado no mecanismo geral de reação está representado na Figura 18.

Figura 18. Mecanismo geral de reação de condensação da α -amirona com aldeídos aromáticos.



As reações foram acompanhadas por CCD reveladas em câmara de UV 254 nm, dado que estes compostos formaram dupla ligação conjugada com o aldeído aromático. Em seguida, a placa era revelada em vanilina sulfúrica para monitorar o consumo do material de partida, α -amirona. Todos os produtos eluíram um pouco acima do R_f do triterpeno, em torno de 0,48 no sistema Hex:AcOAt 90:10. A Figura 19 apresenta a placa de CCD realizada durante uma das reações, na qual observa-se o produto sendo formado conforme o aldeído era consumido. Também foi indicado onde o triterpeno estava aparecendo quando revelado em vanilina sulfúrica e aquecimento.

Figura 19. Exemplo do perfil obtido nas placas de CCD durante as reações de condensação reveladas em câmara de UV 254 nm.



Os resultados mostraram que a síntese foi eficiente, com rendimentos brutos de 99% para RM2, 83% para RM3, 47% para RM4 e 31% para RM5. Diante desses

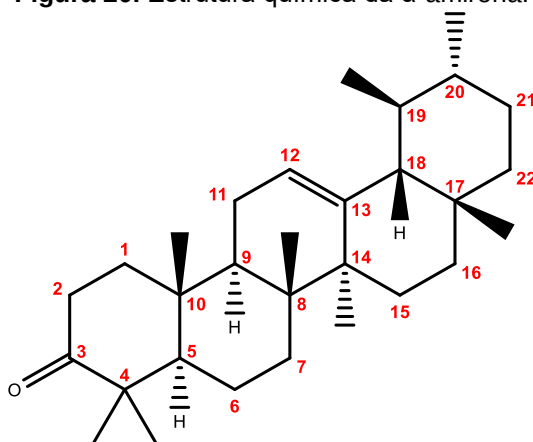
valores, nota-se que a síntese apresentou melhores rendimentos quando se utilizou benzaldeído e 4-clorobenzaldeído.

5.3 Caracterização dos derivados semissintéticos

5.3.1 Derivado semissintético RM1

O derivado oxidado **RM1** foi sintetizado conforme esquema reacional apresentado na Figura 8.

Figura 20. Estrutura química da α -amirona.



No espectro na região do IV (**Erro! Fonte de referência não encontrada.**) observamos o desaparecimento da banda intensa em torno de 3250 cm^{-1} referente ao estiramento da hidroxila de álcool e o aparecimento da banda atribuída a carbonila ($\text{C}=\text{O}$) de grupo cetona em, aproximadamente, 1720 cm^{-1} . Os demais estiramentos referentes a ligação $\text{C}-\text{H}$ de Csp^3 e a ligação $\text{C}=\text{C}$ presente na estrutura, se mantiveram.

Através do espectro de RMN de ^1H (Figura 22) do composto em relação ao seu precursor α -amirina, foi observado o desaparecimento dos sinais em 3,22 ppm, atribuídos ao H-3 (ligado ao carbono carbinólico) em consonância ao surgimento do sinal de carbono em 218,03 ppm no espectro de RMN ^{13}C (Figura 23), confirmando a modificação estrutural pela presença de carbonila de cetona em C-3. Os demais sinais correspondem aos grupos CH_3 , CH_2 e CH que compõem o esqueleto dos triterpenos pentacíclicos. A análise dos dados apresentados em comparação ao precursor e a literatura levaram à estrutura da α -amirona⁴⁹.

Figura 21. Espectro na região do IV da α -amirona.

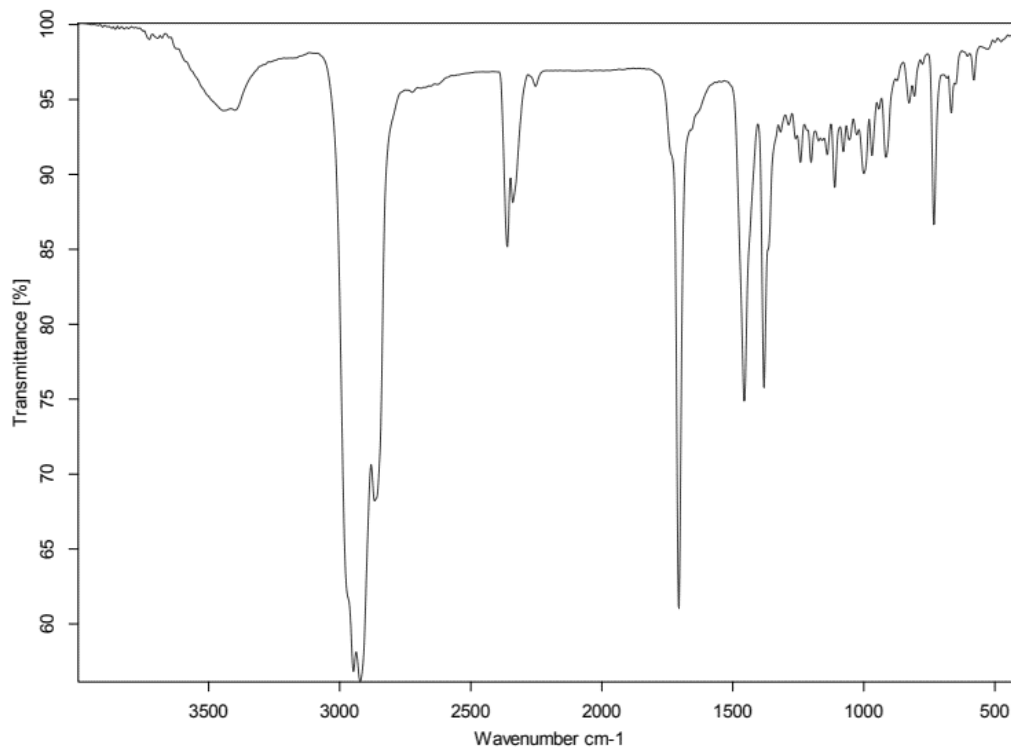


Figura 22. Espectro de RMN de ^1H da α -amirona.

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 5.14 – 5.11 (m, 1H), 2.57 – 2.48 (m, 1H), 2.36 (ddd, J = 15.9, 7.1, 3.7 Hz, 1H).

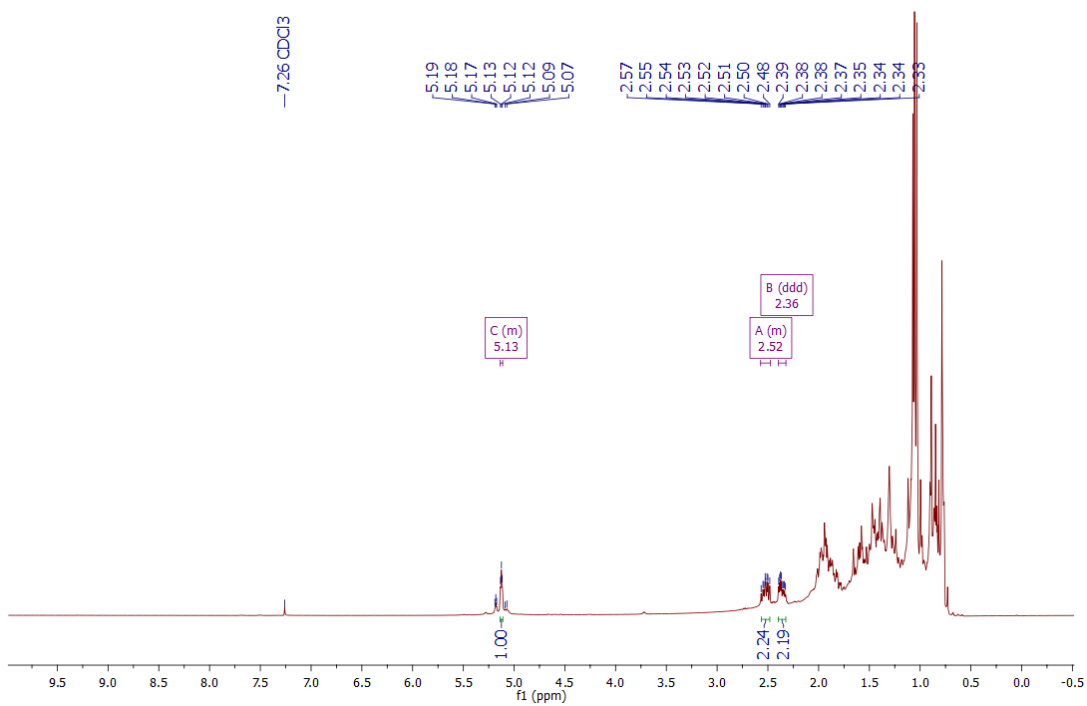
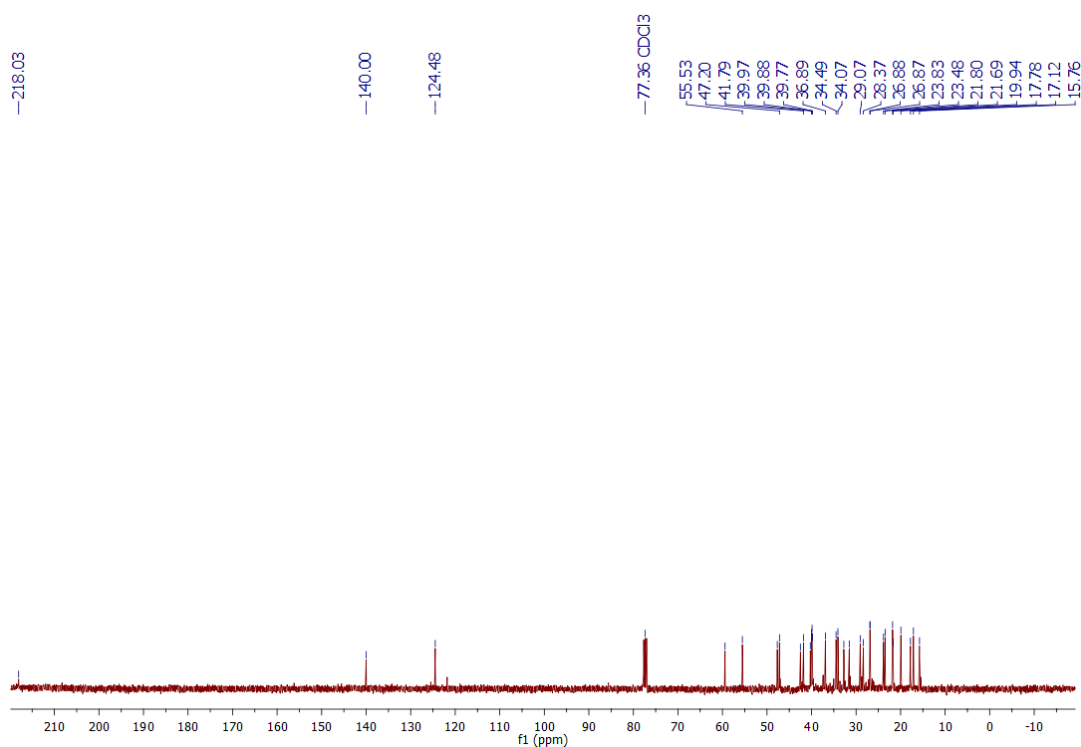


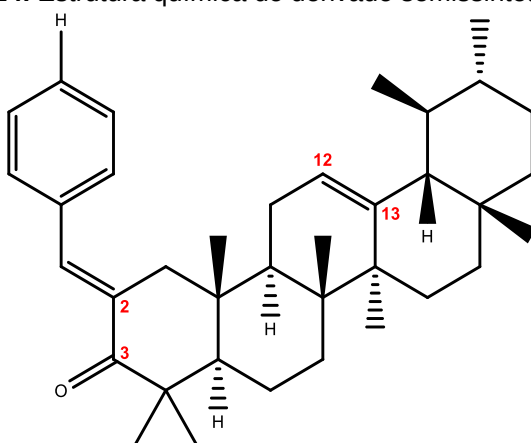
Figura 23. Espectro de RMN de ^{13}C da α -amirona.



5.3.2 Derivado semissintético RM2

A α -amirona (**RM1**) foi utilizada como substrato para a preparação dos demais derivados, conforme mostra o esquema da Figura 9. Para o derivado semissintético **RM2** foi utilizado o benzaldeído.

Figura 24. Estrutura química do derivado semissintético RM2.



No espectro na região do IV (Figura 25) observamos que, ao compará-lo com seu precursor RM1, a banda atribuída ao estiramento da ligação da carbonila de grupo cetona em, aproximadamente, 1720 cm^{-1} se manteve, assim como àquela

correspondente ao estiramento da ligação C-H de Csp^2 e Csp^3 em, aproximadamente, 3000 cm^{-1} . Ainda, foi observado o surgimento das bandas em torno de 1600 cm^{-1} devido ao estiramento da ligação C=C conjugado a carbonila e em 1400 cm^{-1} relacionadas ao estiramento da ligação C=C de aromático. A banda intensa na região de 3500 cm^{-1} indica que havia água no composto, sendo confirmada através dos demais espectros de caracterização.

No espectro de RMN de ^1H (Figura 26) foi observado o surgimento de sinais na região desblindada referentes a um hidrogênio vinílico em 7,55 ppm e cinco hidrogênios aromáticos em 7,33 a 7,45 ppm – faixa dos hidrogênios diretamente ligados a um anel aromático. Bem como o surgimento de sinais no espectro de RMN de ^{13}C (Figura 27) na faixa de, aproximadamente, 129-138 ppm referente aos sete novos carbonos na estrutura, sendo seis aromáticos e um vinílico. Os sinais maiores nesta região correspondem a atribuição de dois carbonos que contribuem para a absorção. Os demais sinais permaneceram os mesmos e correspondem aos grupos CH_3 , CH_2 e CH da estrutura.

Através das análises e dos dados apresentados em comparação ao precursor foi possível caracterizar o novo composto como (4aR,6aR,6bS,8aR,11R,12S,12aR,14aR,14bR)-2-((E)-benzilideno)-4,4,6a,6b,8a,11,12,14b-octametil-1,4,4a,5,6,6a,6b,7,8,8a,9,10,11,12,12a,14,14a,14b-octadeca-hidropicen-3(2H)-ona.

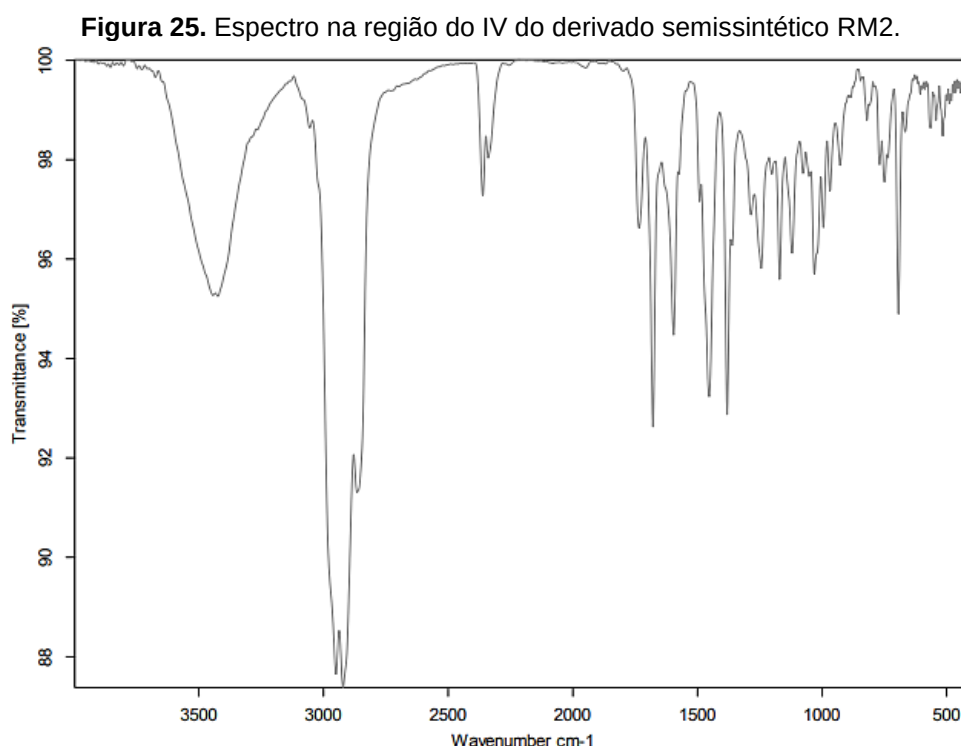
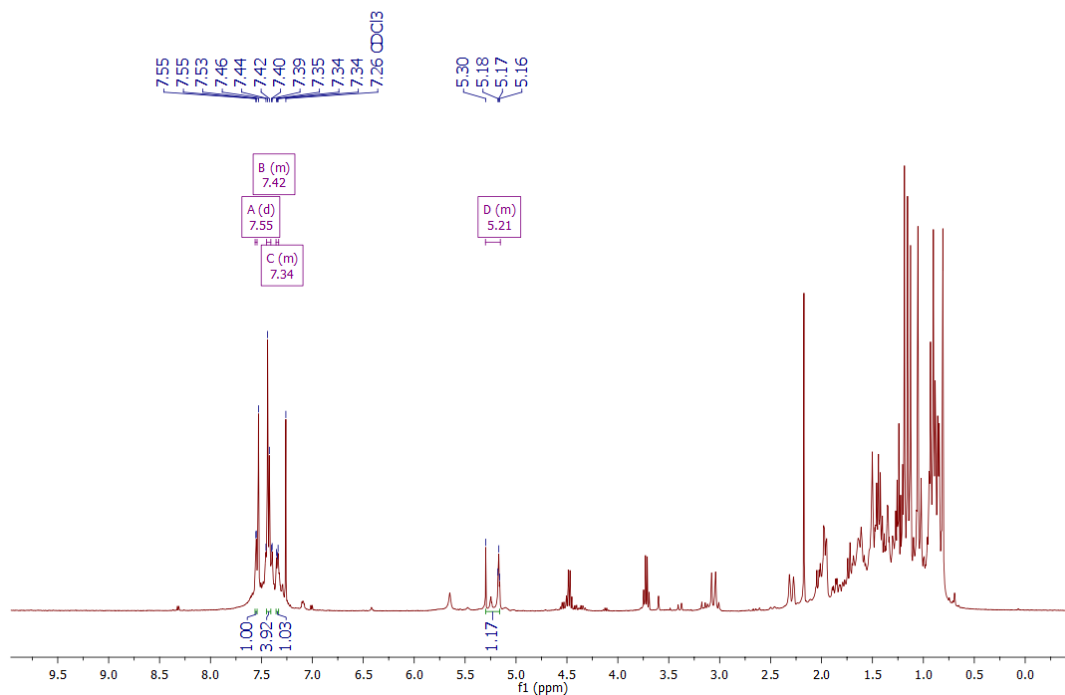
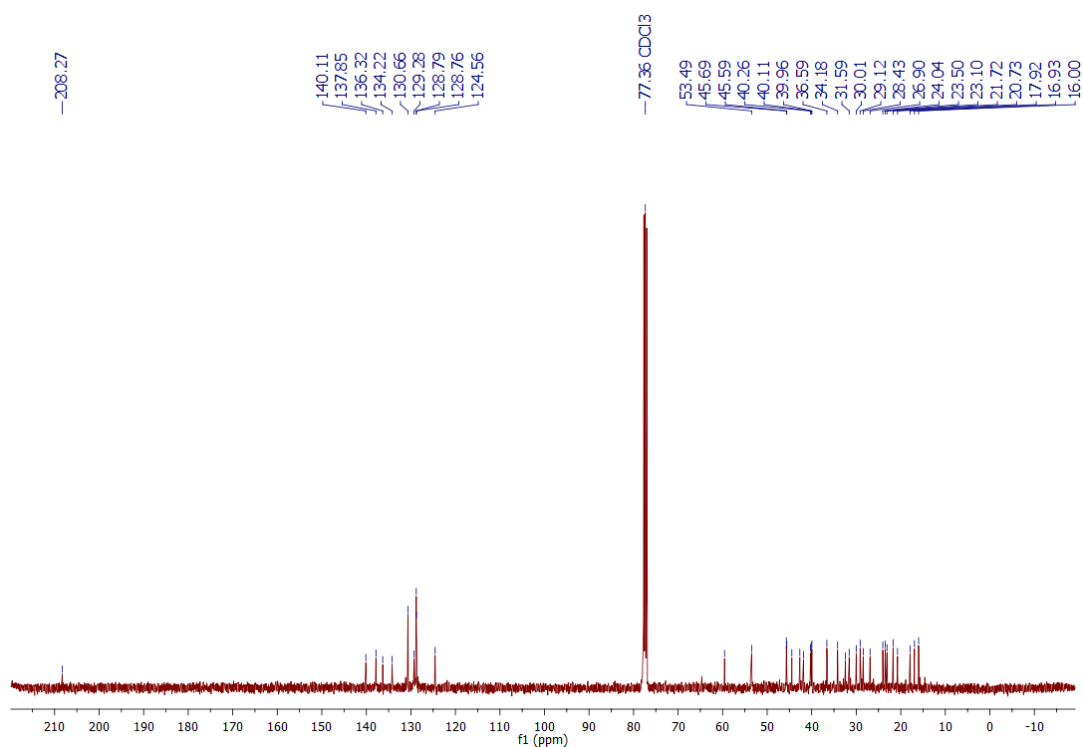


Figura 26. Espectro de RMN de ^1H do derivado semissintético RM2.

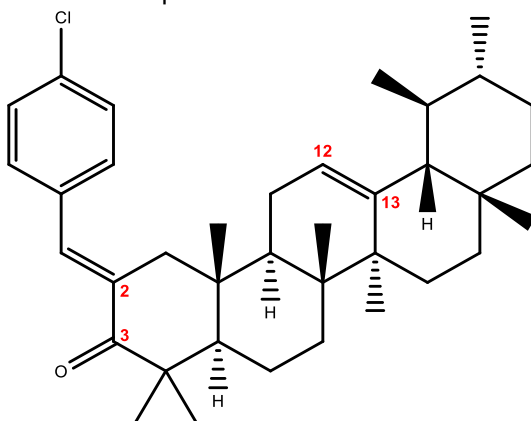
^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 7.55 (d, $J = 1.6$ Hz, 1H), 7.45 – 7.41 (m, 4H), 7.36 – 7.33 (m, 1H), 5.30 – 5.15 (m, 1H).

**Figura 27.** Espectro de RMN de ^{13}C do derivado semissintético RM2.

5.3.3 Derivado semissintético RM3

Para o derivado semissintético **RM3** foi utilizado o 4-clorobenzaldeído.

Figura 28. Estrutura química do derivado semissintético RM3.



No espectro na região do IV (Figura 29) observamos que, em relação ao seu precursor RM1, as bandas atribuídas ao estiramento da ligação da carbonila e ao estiramento da ligação C-H de Csp^2 e Csp^3 em, aproximadamente, 1720 cm^{-1} e 3000 cm^{-1} , respectivamente. O surgimento das bandas em torno de 1600 cm^{-1} se deve ao estiramento da ligação C=C conjugado a carbonila e em 1400 cm^{-1} ao estiramento da ligação C=C de aromático. A banda na região de 3500 cm^{-1} indica que havia água no composto, sendo confirmada através dos demais espectros de caracterização.

No espectro de RMN de ^1H (Figura 30) foi observado, na região desblindada, o surgimento de sinais referentes a um hidrogênio vinílico em 7,49 ppm e quatro hidrogênios aromáticos em 7,35 - 7,41 ppm. Já no espectro de RMN de ^{13}C (Figura 31), os novos sinais entre 129 e 136 ppm surgiram decorrente aos carbonos do anel aromático *para* substituído. Os demais sinais permaneceram os mesmos correspondem aos grupos CH_3 , CH_2 e CH da estrutura.

Através das análises e dos dados apresentados em comparação ao precursor foi possível caracterizar o novo composto como sendo (4aR,6aR,6bS,8aR,11R,12S,12aR,14aR,14bR)-2-((E)-4-clorobenzilideno)-4,4,6a,6b,8a,11,12,14b-octametil-1,4,4a,5,6,6a,6b,7,8,8a,9,10,11, 12,12a,14,14a,14b-octadeca-hidropicen-3(2H)-ona.

Figura 29. Espectro na região do IV do derivado semissintético RM3.

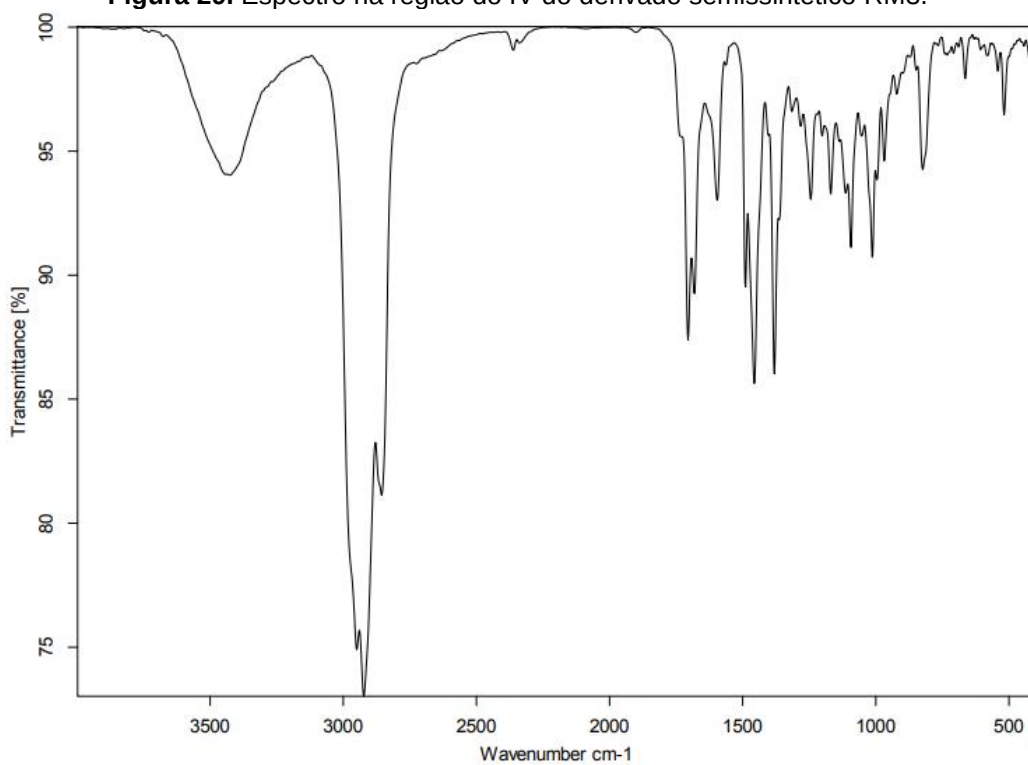


Figura 30. Espectro de RMN de ¹H do derivado semissintético RM3.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.49 (s, 1H), 7.39 – 7.35 (m, 4H).

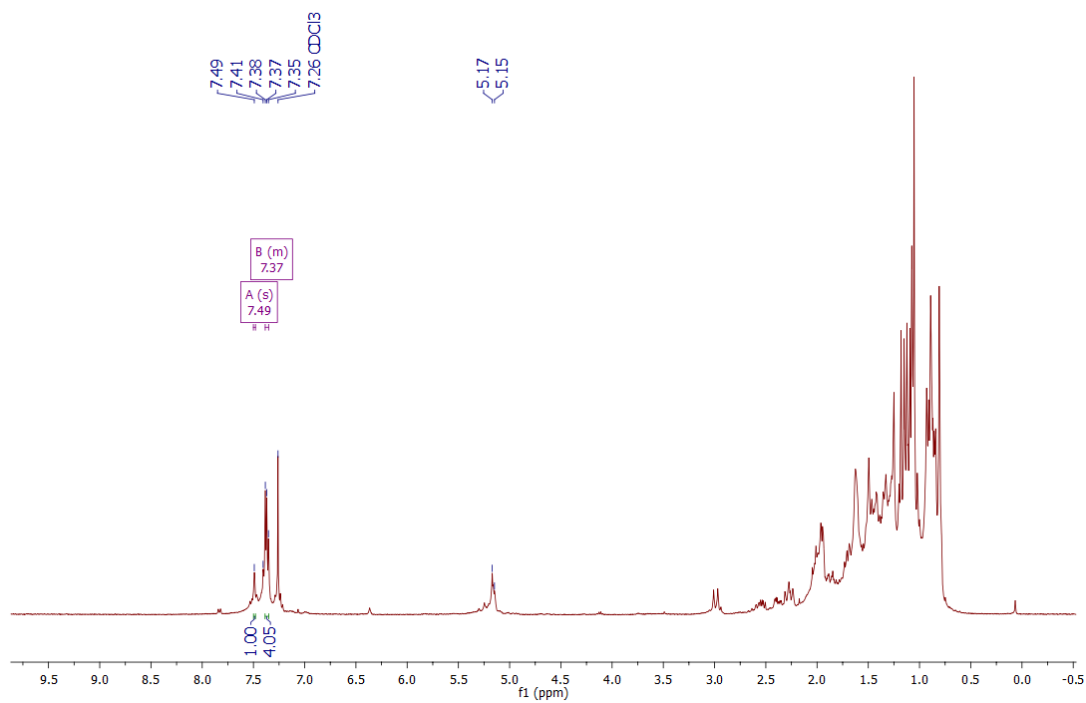
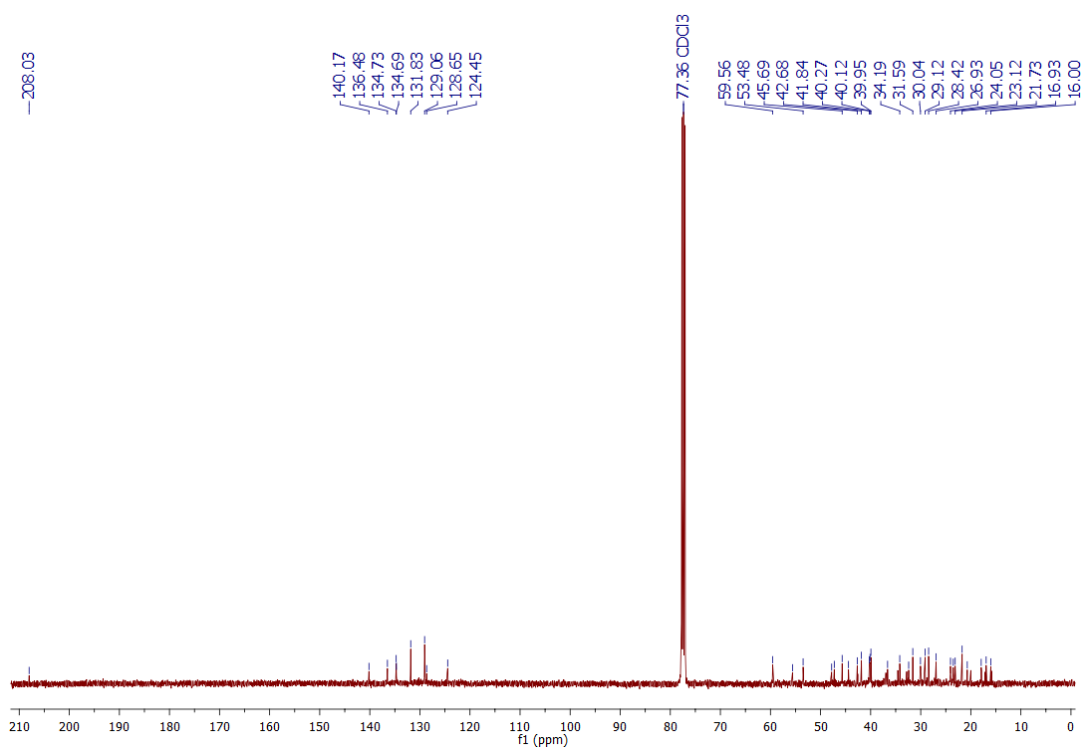
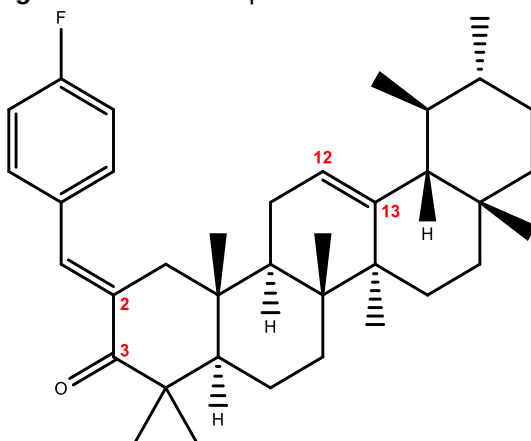


Figura 31. Espectro de RMN de ^{13}C do derivado semissintético RM3.

5.3.4 Derivado semissintético RM4

Para o derivado semissintético **RM4** foi utilizado o 4-flúorbenzaldeído.

Figura 32. Estrutura química do derivado RM4.

No espectro na região do IV (Figura 33), em relação ao seu precursor RM1, as mesmas bandas atribuídas a carbonila em 1720 cm^{-1} e ao estiramento da ligação C-H de Csp^2 e Csp^3 em torno de 3000 cm^{-1} . No entanto, observamos o surgimento das bandas em torno de 1600 cm^{-1} referente ao estiramento da ligação C=C conjugado a carbonila e em 1400 cm^{-1} ao estiramento da ligação C=C de aromático. Já a banda na

região de 3500 cm^{-1} indica água presente no composto, sendo confirmada através dos demais espectros de caracterização.

O espectro de RMN de ^1H (Figura 34) apresentou, na região desblindada, o surgimento de sinais referentes a um hidrogênio vinílico em 7,51 ppm e quatro hidrogênios aromáticos em 7,11 a 7,5 ppm. Além disso, foi possível observar os novos sinais gerados decorrente aos carbonos do anel aromático *para* substituído no espectro de RMN de ^{13}C (Figura 35), uma vez que os demais sinais permaneceram os mesmos correspondendo aos grupos CH_3 , CH_2 e CH da estrutura.

Através das análises e dos dados apresentados em comparação ao precursor foi possível caracterizar o novo composto como (4aR,6aR,6bS,8aR,11R,12S,12aR,14aR,14bR)-2-((E)-4-fluorobenzilideno)-4,4,6a,6b,8a,11,12,14b-octametil-1,4,4a,5,6,6a,6b,7,8,8a,9,10,11,12,12a,14,14a,14b-octadeca-hidropicen-3(2H)-ona.

Figura 33. Espectro na região do IV do derivado semissintético RM4.

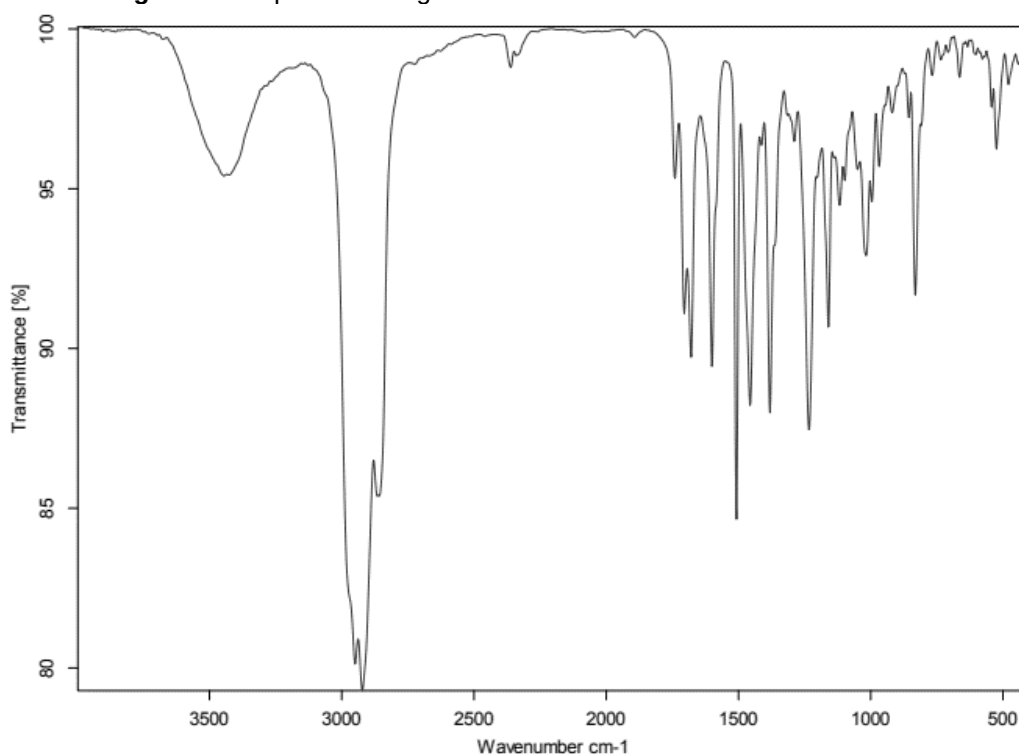
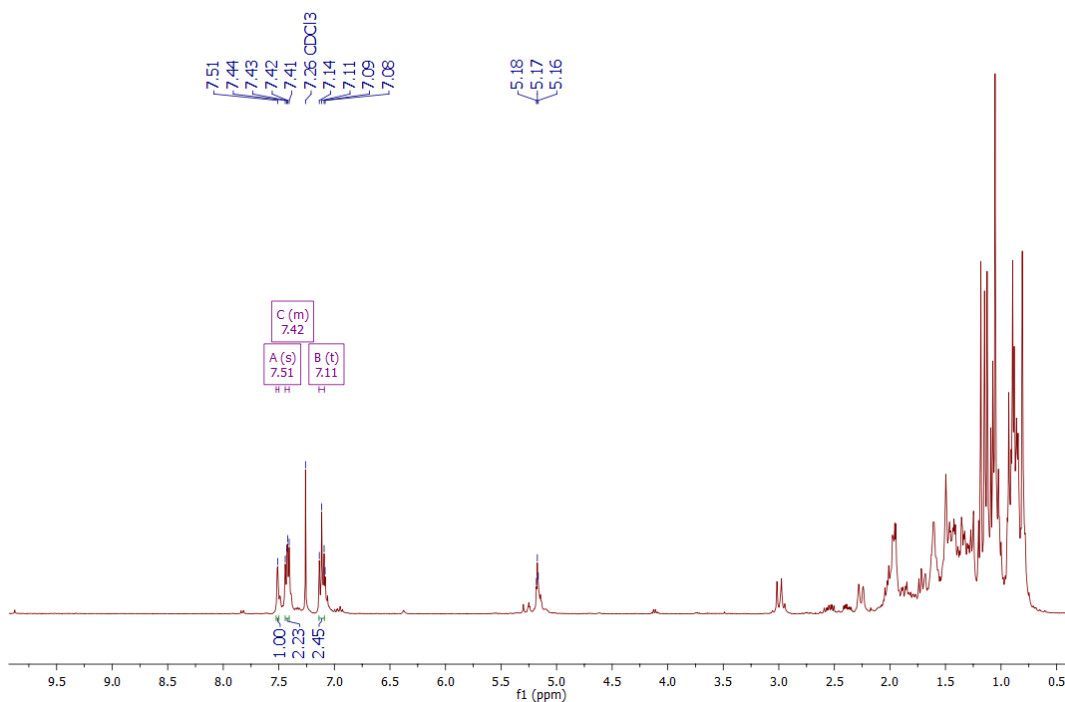
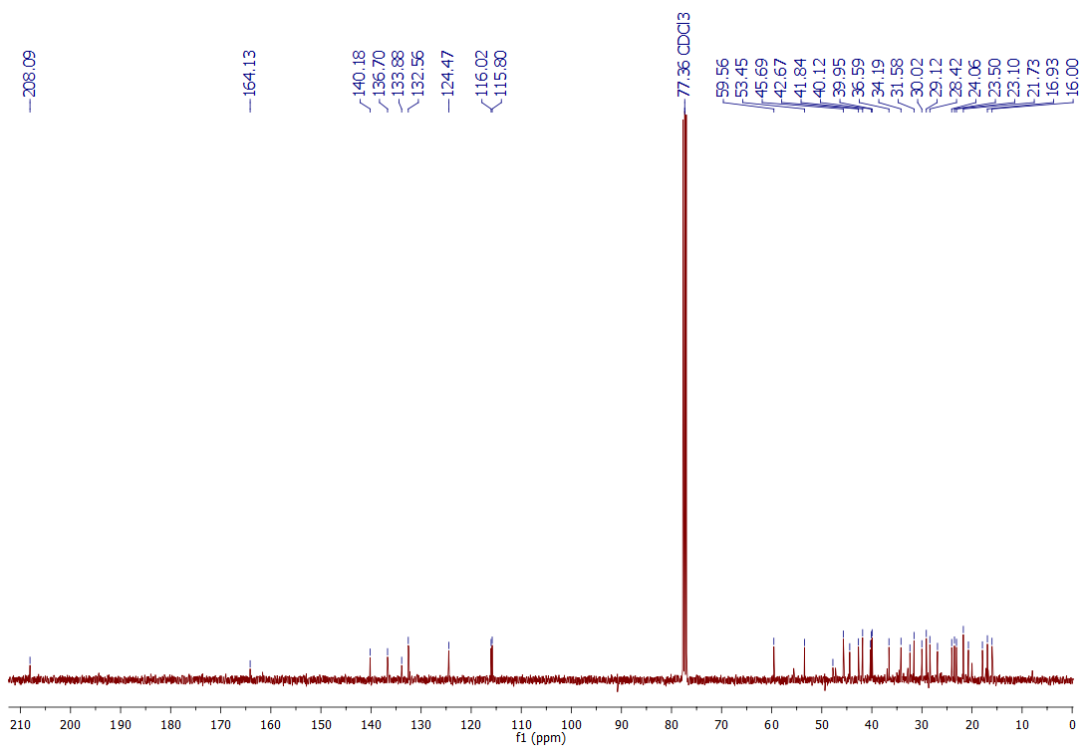
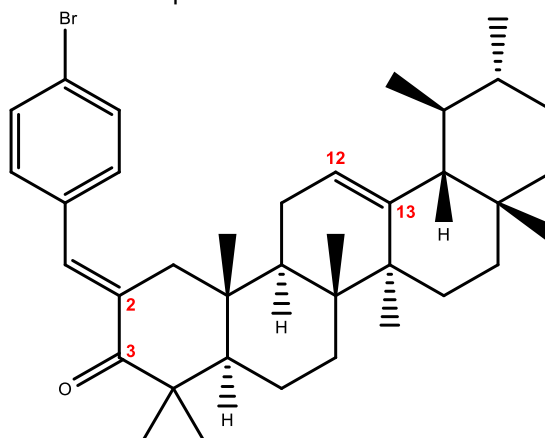


Figura 34. Espectro de RMN de ^1H do derivado semissintético RM4. ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 7.51 (s, 1H), 7.44 – 7.41 (m, 2H), 7.11 (t, $J = 8.7$ Hz, 2H).**Figura 35.** Espectro de RMN de ^{13}C do derivado semissintético RM4.

5.3.5 Derivado semissintético RM5

Para a semissíntese do derivado **RM5** foi utilizado o 4-bromobenzaldeído.

Figura 36. Estrutura química do derivado semissintético RM5.



No espectro na região do IV (Figura 37), em relação ao seu precursor RM1, observamos as mesmas bandas atribuídas a carbonila em 1720 cm^{-1} e ao estiramento da ligação C-H de Csp^2 e Csp^3 em torno de 3000 cm^{-1} . Entretanto, ocorreu o surgimento das bandas em torno de 1600 cm^{-1} referente ao estiramento da ligação C=C conjugado a carbonila e em 1400 cm^{-1} ao estiramento da ligação C=C de aromático. A intensa banda na região de 3500 cm^{-1} indica água presente no composto.

É possível observar no seu espectro de RMN de ^1H (Figura 38) o surgimento de sinais presentes na região desblindada referentes a um hidrogênio vinílico em 7,47 ppm e quatro hidrogênios aromáticos em 7,55 e 7,29 ppm. Bem como no espectro de RMN de ^{13}C (Figura 39) que foi possível observar novos sinais na faixa de 129 a 136 ppm, gerados decorrente aos carbonos do anel aromático *para* substituído, sendo que os demais correspondendo aos grupos CH_3 , CH_2 e CH da estrutura permaneceram os mesmos.

Através das análises e dos dados apresentados em comparação ao precursor foi possível caracterizar o novo composto como (4aR,6aR,6bS,8aR,11R,12S,12aR,14aR,14bR)-2-((E)-4-bromobenzilideno)-4,4,6a,6b,8a,11,12,14b-octametil-1,4,4a,5,6,6a,6b,7,8,8a,9,10,11,12,12a,14,14a,14b-octadeca-hidropicen-3(2H)-ona.

Figura 37. Espectro na região do IV do derivado semissintético RM5.

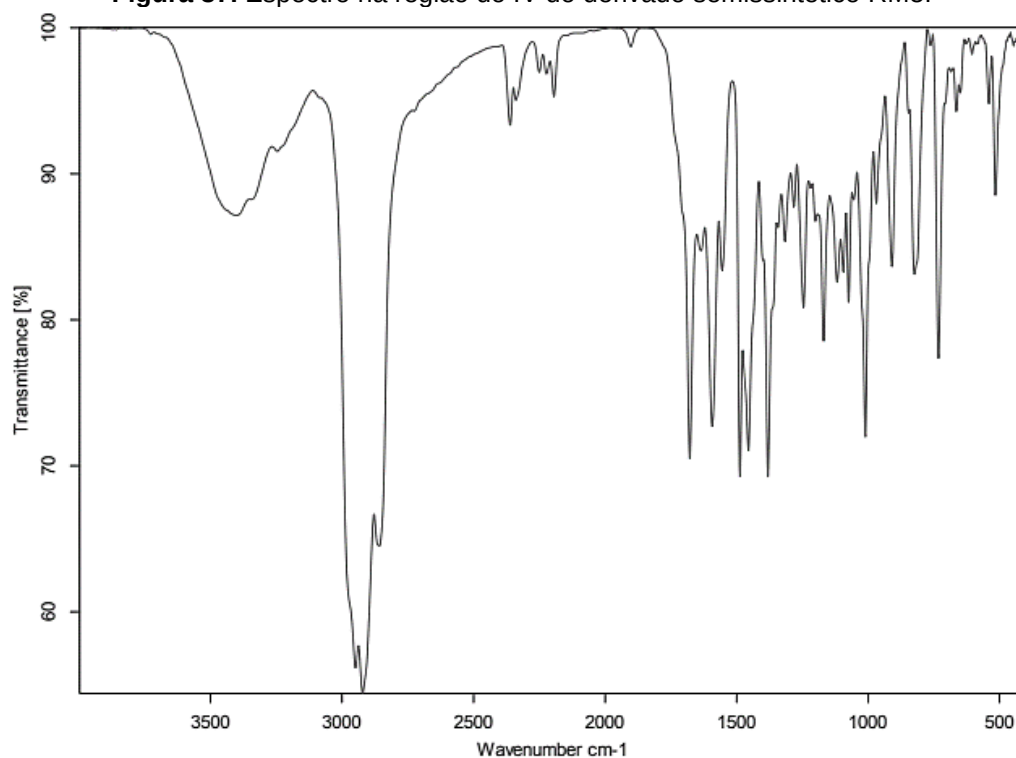


Figura 38. Espectro de RMN de ¹H do derivado semissintético RM5.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.55 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H), 7.47 (s, 1H), 7.29 (d, *J* = 8.3 Hz, 2H).

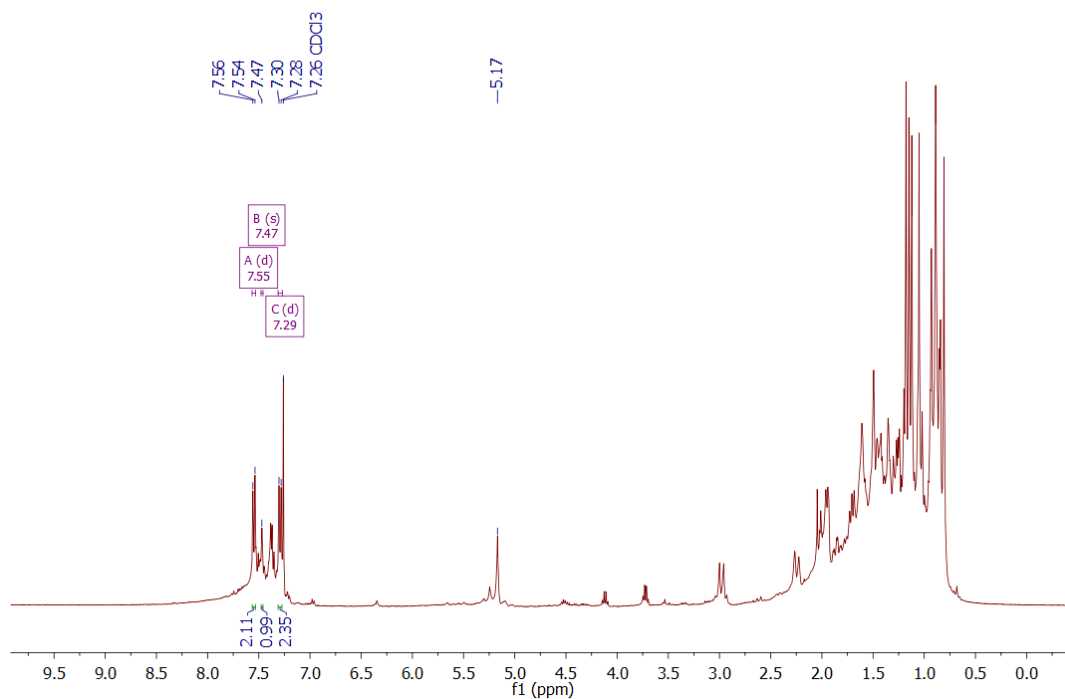
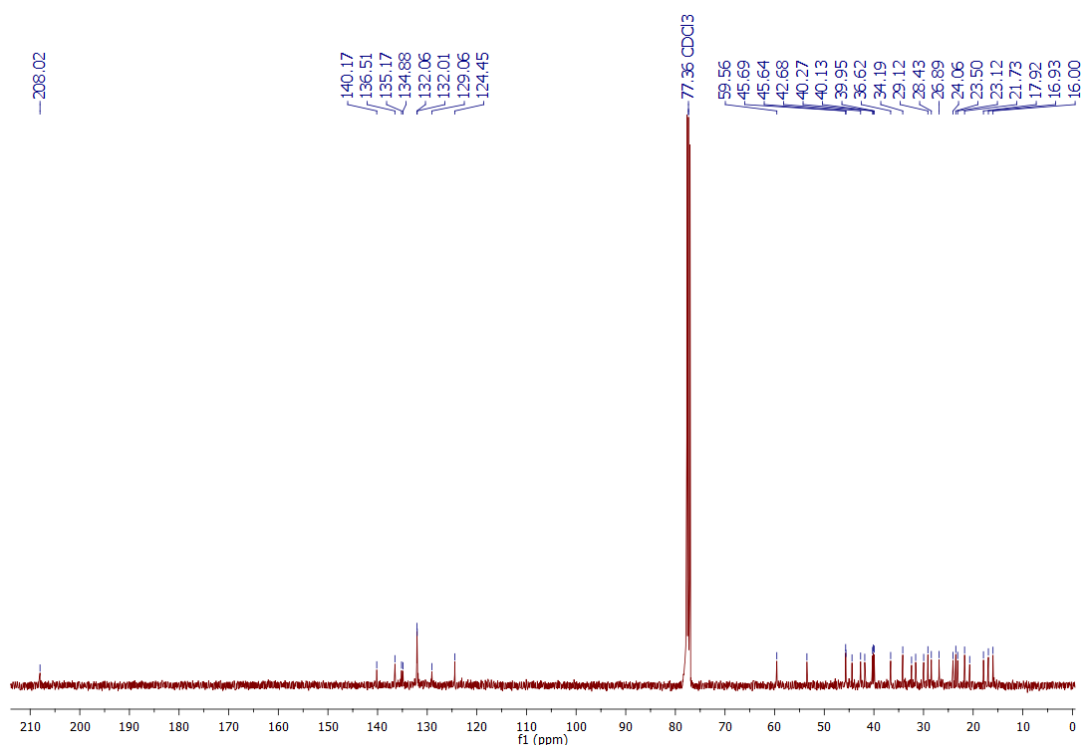


Figura 39. Espectro de RMN de ^{13}C do derivado semissintético RM5.

O deslocamento químico de ressonância magnética nuclear do hidrogênio vinílico nos espectros apresentados ocorreu em uma região mais desblindada devido ao efeito anisotrópico do anel aromático presente na estrutura. Já os deslocamentos químicos de RMN de carbono em compostos aromáticos são sensíveis aos efeitos dos substituintes, dado que são eles que determinam a reatividade química do anel aromático⁵². Entre os quatros novos compostos semissintéticos é possível notar a diferença nos espectros de RMN de ^{13}C a cada grupo R na posição *para*. Essa influência no deslocamento químico dos sinais está correlacionada com mudanças na estrutura de ligação e efeitos de doação ou retirada de densidade eletrônica. Como os substituintes dos compostos sintetizados são halogênios (F, Cl e Br), eles acabam causando um forte efeito indutivo no deslocamento químico, principalmente no carbono diretamente ligado a ele por causa da sua eletronegatividade.

5.3 Estudo da inibição da enzima α -glicosidase

O composto isolado e seus cinco derivados semissintéticos foram avaliados em relação a sua capacidade em inibir a atividade da enzima α -glicosidase segundo a metodologia descrita anteriormente realizada no próprio laboratório de pesquisa.

Esse ensaio para a potencial inibição da enzima foi realizado através do método colorimétrico-enzimático em triagem de alta performance utilizando-se uma leitora de microplacas. A inibição enzimática ocorreu através da estimativa do *p*-nitrofenol liberado a partir do *p*-nitrofenil-D-glicopiranosídeo como solução substrato⁵³. A formação deste composto produziu uma solução de coloração amarelada, posteriormente medida em espectrofotômetro a 405 nm.

As Tabelas 1 e 2 apresentam os valores de absorvâncias corrigidas obtidos em cada replicata realizada durante o ensaio, bem como as absorvâncias do controle negativo nas concentrações avaliadas de 200 e 600 µg/mL, respectivamente.

Tabela 1. Dados obtidos no ensaio da inibição da enzima α -glicosidase a 200 µg/mL.

Amostra	Absorvância corrigida			Absorvância média
Negativo	2,160	2,373	2,286	2,273
RM	2,465	2,404	2,536	2,468
RM1	2,149	2,495	2,071	2,238
RM2	2,134	2,261	2,512	2,302
RM3	2,094	2,121	2,173	2,130
RM4	1,589	1,656	1,690	1,645
RM5	-	-	-	-

Tabela 2. Dados obtidos no ensaio da inibição da enzima α -glicosidase a 600 µg/mL.

Amostra	Absorvância corrigida			Absorvância média
Negativo	2,378	2,423	2,152	2,400
RM	1,107	1,063	0,964	1,045
RM1	0,922	1,022	0,867	0,937
RM2	0,967	1,071	0,990	1,009
RM3	0,812	1,006	0,984	0,934
RM4	0,974	1,086	1,045	1,035
RM5	1,116	0,997	1,048	1,054

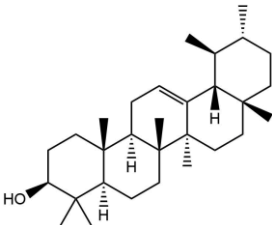
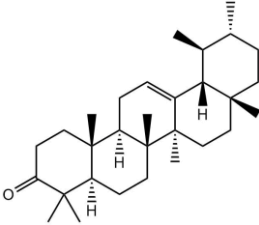
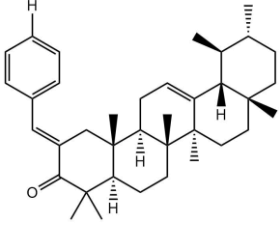
A depender da estrutura de cada composto e sua respectiva massa molar, tem-se na Tabela 3 os valores de suas molaridades correspondente a cada concentração em µg/mL utilizada no estudo preliminar.

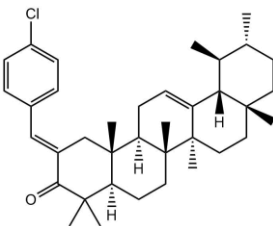
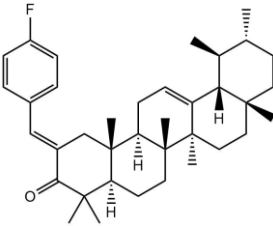
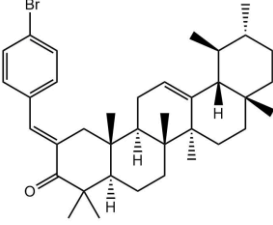
Tabela 3. Molaridade de cada composto nas duas concentrações utilizadas no ensaio.

Composto	Massa Molar (g/mol)	Molaridade (μM)	
		200 $\mu\text{g/mL}$	600 $\mu\text{g/mL}$
RM	426,73	469	1406
RM1	424,71	471	1413
RM2	512,82	390	1170
RM3	547,26	365	1096
RM4	530,81	377	1130
RM5	591,72	338	1014

A Tabela 4 apresenta os resultados calculados através da equação apresentada na metodologia referente a inibição em porcentagem dos compostos a partir das absorvâncias das duas diferentes concentrações (200 e 600 $\mu\text{g/mL}$) e da absorvância do controle negativo.

Tabela 4. Resultado da inibição da enzima α -glicosidase (%) em duas concentrações diferentes.

Composto	Estrutura Química	% Inibição $\pm$ DP	
		200 $\mu\text{g/mL}$	600 $\mu\text{g/mL}$
RM		n.i	56,48 $\pm$ 1,36
RM1		1,53	61,97 $\pm$ 1,71
RM2		n.i	57,95 $\pm$ 2,72

RM3		6,28	61,09 ± 5,86
RM4		27,63	56,88 ± 3,80
RM5		n.d	56,11 ± 3,95

n.i.: não ocorreu inibição

n.d.: não determinada

Os dados mostram que todos os compostos apresentaram porcentagens satisfatórias de inibição, sendo elas maiores que 50% na concentração de 600 µg/mL. Os derivados semissintéticos **RM1** e **RM3** se destacam (62 e 61%) e os demais, bem como o precursor **RM**, apresentaram uma porcentagem de inibição em torno de 56%.

Ainda, vale destacar que o composto oxidado apresentou melhor atividade em relação ao seu precursor, com inibições de 62 e 56%, respectivamente. Já os demais derivados obtidos através da condensação de Claisen-Schmidt mantiveram a atividade observada para o produto oxidado em torno de 56%, no entanto, ocorreu uma melhora na inibição com o derivado aromático *para*-cloro substituído, 61%. Este mesmo derivado semissintético também se destaca frente aos demais compostos em relação a concentração utilizada, uma vez que apresentou alta porcentagem de inibição em 1096 µM, até mesmo comparado ao derivado oxidado (62% em 1413 µM).

Diante disso, o estudo preliminar realizado demonstrou promissores protótipos inibidores da enzima α-glicosidase, podendo estes avançarem nos estudos de IC₅₀ e futuros ensaios *in vivo*. Uma vez que demais triterpenos e seus derivados já foram

relatados na literatura apresentando bons resultados de inibição. Por exemplo, o estudo de Yuca *et al.*⁵⁴ demonstrou que a mistura de betulina e ácido betulíno, ambos triterpenos, apresentaram IC₅₀ de 248 µM, enquanto derivados do lupeol apresentaram IC₅₀ de 2585 µM. Esses resultados sugerem que os derivados do triterpeno α-amirina possuem potente atividade inibitória frente a α-glicosidade, uma vez que os dados apresentados neste trabalho corroboram com a literatura, variando a concentração inibitória dos compostos avaliados entre 1000 e 1400 µM, na faixa de concentração de 600 µg/mL.

6 CONCLUSÃO

Baseado em todos os resultados obtidos neste trabalho, foi possível isolar o triterpeno pentacíclico α -amirina da resina da *Cola nitida* através de métodos cromatográficos e realizar modificações estruturais através das reações de oxidação com o reagente PCC e condensação de Claisen-Schmidt com diferentes aldeídos aromáticos na presença de uma quantidade catalítica de base forte, de maneira a obter cinco derivados semissintéticos, dos quais quatro são inéditos na literatura (RM2, RM3, RM4 e RM5). Todos os compostos foram caracterizados por técnicas espectroscópicas de IV, RMN de ^1H e de ^{13}C em comparação com dados já reportados na literatura.

Esses compostos obtidos foram avaliados em relação a sua capacidade de inibição frente a enzima α -glicosidase e todos tiveram bons resultados, sendo eles com porcentagens de inibição maiores que 50% em concentrações entre 1000 e 1400 μM , uma vez que corroboram com dados reportados na literatura referente a atividade inibitória de triterpenos já estudados. Destes, destacam-se os compostos oxidado e condensado *para*-cloro substituído que apresentaram 62 e 61% de inibição na faixa de concentração de 600 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente. Diante dos resultados, conclui-se então que o estudo preliminar realizado através do ensaio colorimétrico-enzimático foi satisfatório indicando que a α -amirina e seus derivados semissintéticos possuem potencial inibidor frente a enzima α -glicosidase.

Os resultados apresentados instigam que os compostos sejam submetidos ao *docking molecular* para uma melhor orientação de ajuste do ligante na enzima α -glicosidase, caracterizando o comportamento das interações das moléculas no seu sítio ativo. Ainda, pode-se considerar outros tipos de testes biológicos, uma vez que triterpenos pentacíclicos apresentam diversas atividades farmacológicas, como citadas ao decorrer do trabalho.

7 REFERÊNCIAS

- ¹NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural Products as Sources of New Drugs over the Nearly Four Decades from 01/1981 to 09/2019. **Journal of Natural Products**, American Chemical Society, 2020.
- ²GUERRIERO, G. et al. Production of plant secondary metabolites: Examples, tips and suggestions for biotechnologists. **Genes**. v. 9, n. 6, p. 309, 2018.
- ³SANCHEZ, S.; DEMAINE, A. L. Secondary Metabolites. **Comprehensive Biotechnology**, Second Edition. Elsevier Inc., v. 1p. 155–167, 2011.
- ⁴GONÇALVES PEREIRA, R. C. et al. Cytotoxic Activity of Triterpenoids from *Cheiloclinium cognatum* Branches against Chronic and Acute Leukemia Cell Lines. **Chemistry and Biodiversity**, v. 17, n. 12, 2020.
- ⁵MONADI, T. et al. A comprehensive review on the ethnopharmacology, phytochemistry, pharmacology, and toxicology of the mandragora genus; from folk medicine to modern medicine. **Current Pharmaceutical Design**, v. 27, n. 34, p. 3609–3637, 2021.
- ⁶HILL, R. A.; CONNOLLY, J. D. Triterpenoids. **Natural Product Reports**, v. 28, n. 6, p. 1087-1117, 2011.
- ⁷PATOČKA, J. Biologically active pentacyclic triterpenes and their current medicine signification. **Journal of Applied Biomedicine**, v. 1, p. 7–12, 2003.
- ⁸KHWAZA, V.; OYEDEJI, O. O.; ADERIBIGBE, B. A. Ursolic acid-based derivatives as potential anti-cancer agents: An update. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 16, p. 5920, 2020.
- ⁹ROY, N. K. et al. An update on pharmacological potential of boswellic acids against chronic diseases. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 17, p. 4101, 2019.
- ¹⁰ZUCO, V. et al. Selective cytotoxicity of betulinic acid on tumor cell lines, but not on normal cells. **Cancer letters**, v. 175, n. 1, p. 17-25, 2002.
- ¹¹SANTOS, F. A. et al. Antihyperglycemic and hypolipidemic effects of α,β -amyrin, a triterpenoid mixture from *Protium heptaphyllum* in mice. **Lipids in Health and Disease**, v. 11, 2012.
- ¹²PARVEZ, M. K. et al. Analysis of antioxidative and antiviral biomarkers β -amyrin, β -sitosterol, lupeol, ursolic acid in *Guiera senegalensis* leaves extract by validated HPTLC methods. **Saudi Pharmaceutical Journal**, v. 26, n. 5, p. 685–693, 2018.

- ¹³AGOSTINI-COSTA, T. da S. et al. Chromatography and its applications. **Plant secondary metabolites**, cap. 8, p. 131-164, 2012.
- ¹⁴PAGARE, S. et al. Secondary metabolites of plants and their role: Overview. **Current Trends in Biotechnology and Pharmacy**, v. 9, n. 3, p. 293-304, 2015.
- ¹⁵McMURRY, J. **Química Orgânica**. 7a. ed. 2011.
- ¹⁶SANDJO, L. P.; KUETE, V. Triterpenes and Steroids from the Medicinal Plants of Africa. In: **Medicinal Plant Research in Africa: Pharmacology and Chemistry**. Elsevier Inc., p. 135–202, 2013.
- ¹⁷LUDWICZUK, A.; SKALICKA-WOŹNIAK, K.; GEORGIEV, M. I. Terpenoids. **Pharmacognosy: Fundamentals, Applications and Strategy**. Elsevier Inc., p. 233–266, 2017.
- ¹⁸PERES, L. E. P. Metabolismo Secundário. Piracicaba – São Paulo: Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz. ESALQ/Universidade de São Paulo, p. 1-10, 2004.
- ¹⁹THIMMAPPA, R. et al. Triterpene biosynthesis in plants. **Annual Review of Plant Biology**. Annual Reviews Inc., 2014.
- ²⁰SHANMUGAM, M. K. et al. Targeted inhibition of tumor proliferation, survival, and metastasis by pentacyclic triterpenoids: Potential role in prevention and therapy of cancer. **Cancer Letters**, Elsevier Ireland Ltd, 2012.
- ²¹JEMMALI, Z. et al. 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.
- ²²RAMOS-HRYB, A. B. et al. Natural Polyphenols and Terpenoids for Depression Treatment: Current Status. In: **Studies in Natural Products Chemistry**. Elsevier B.V., v. 55, p. 181–221, 2017.
- ²³MOREIRA, F. de L. **Estudo de metabolismo in vitro do triterpeno pentacíclico amirina empregando microssomas hepático de ratos**. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo. 2013.
- ²⁴ABOU, B. et al. Evaluation of the hepatoprotective activity of aqueous and ethanolic extracts from gomphrena celesiodides, cola nitida and entendrophragma angolense against CCl₄ induced hepatotoxicity in rats. **World Journal Of Pharmacy And Pharmaceutical Sciences Sjif Impact Factor 6**, v. 041, n. 10, p. 53–62.

- ²⁵OBEY, 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.
- ²⁶BRITANNICA. **Cola nitida**. Disponível em: <<https://www.britannica.com/plant/Cola-nitida>>. Acesso em: 22 mai 2022.
- ²⁷GONZÁLEZ-COLOMA, A. et al. Triterpene-based plant defenses. **Phytochemistry Reviews**, v. 10, n. 2, p. 245–260, 2011.
- ²⁸HERNÁNDEZ-VÁZQUEZ, L.; PALAZON, J.; NAVARRO-OCAÑA, A. **The pentacyclic triterpenes α , β -amyryns: A review of sources and biological activities**. 2012.
- ²⁹FURTADO, N. A. J. C. et al. Pentacyclic triterpene bioavailability: An overview of in vitro and in vivo studies. **Molecules**, v. 22, n. 3, p. 400, 2017.
- ³⁰PAWEŁCZYK, A.; ZAPRUTKO, L. Anti-COVID drugs: Repurposing existing drugs or search for new complex entities, strategies and perspectives. **Future Medicinal Chemistry**, Future Medicine Ltd., v. 12, n. 19, p. 1743-1757, 2020.
- ³¹ATANASOV, A. G. et al. Natural products in drug discovery: advances and opportunities. **Nature Reviews Drug Discovery**. Nature Research, v. 20, n. 3, p. 200-216, 2021.
- ³²DIRIR, A. M. et al. A review of alpha-glucosidase inhibitors from plants as potential candidates for the treatment of type-2 diabetes. **Phytochemistry Reviews**. Springer Science and Business Media B.V., p 1-31, 2021.
- ³³MAHNASHI, M. H. et al. HPLC-DAD phenolics analysis, α -glucosidase, α -amylase inhibitory, molecular docking and nutritional profiles of Persicaria hydropiper L. **BMC Complementary Medicine and Therapies**, v. 22, n. 1, p. 1-20, 2022.
- ³⁴JAFFE, L. **What Is Insulin?**. Disponível em: <<https://www.endocrineweb.com/conditions/type-1-diabetes/what-insulin>>. Acesso em: 25 jun 2022.
- ³⁵KUMAR, S. et al. α -glucosidase inhibitors from plants: A natural approach to treat diabetes. **Pharmacognosy Reviews**, v. 5, n.9, p.19-29, 2011.
- ³⁶ASSEFA, S. T. et al. Alpha glucosidase inhibitory activities of plants with focus on common vegetables. **Plants**, 2020.
- ³⁷W. et al. Triterpene acids isolated from lagerstroemia speciosa leaves as α -glucosidase inhibitors. **Phytotherapy Research: An International Journal Devoted**

to Pharmacological and Toxicological Evaluation of Natural Product Derivatives, v. 23, p. 614–618, 2009.

³⁸GENET, C. et al. Structure - Activity relationship study of betulinic acid, a novel and selective TGR5 agonist, and its synthetic derivatives: Potential impact in diabetes. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 53, n. 1, p. 178–190, 2010.

³⁹SEHNAL, D. et al. Mol* Viewer: modern web app for 3D visualization and analysis of large biomolecular structures. **Nucleic Acids Research**, v. 49, n. W1, p. W431–W437, 2021.

⁴⁰SAWER, I. K.; BERRY, M. I.; FORD, J. L. The killing effect of cryptolepine on *Staphylococcus aureus*. **Letters in Applied Microbiology**, v. 40, n. 1, p. 24–29, 2005.

⁴¹MATHUR, S.; HOSKINS, C. Drug development: Lessons from nature. **Biomedical Reports**, v. 6, n. 6, p. 612–614, 2017.

⁴²DE OLIVEIRA, M. H. et al. Semi-síntese: uma solução para problemas farmacológicos de produtos naturais. **Revista eletrônica de Farmácia**, v. 9, n. 1, p. 27-27, 2012.

⁴³CHING, J. et al. Identification of active compounds from medicinal plant extracts using gas chromatography-mass spectrometry and multivariate data analysis. **Journal of Separation Science**, v. 35, n. 1, p. 53–59, 2012.

⁴⁴SHENG, 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 Product Reports**, v. 28, n. 3, p. 543-593, 2011.

⁴⁵YUCA, H. et al. α -Glucosidase and α -amylase inhibitory potential of main compounds and drug candidates from *Elaeagnus rhamnoides* (L.) A. Nelson. **Chemical Papers**, v. 76, n. 2, p. 913–922, 2022.

⁴⁶FRANKENBERGER, L. et al. UPLC-ESI-QTOF-MS² characterisation of *Cola nitida* resin fractions with inhibitory effects on NO and TNF- α released by LPS-activated J774 macrophage and on *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania amazonensis*. **Phytochemical Analysis**, v. 29, n. 6, p. 577–589, 2018.

⁴⁷MAJHI, S.; DAS, D. Chemical derivatization of natural products: Semisynthesis and pharmacological aspects- A decade update. **Tetrahedron**, Elsevier Ltd, v. 78, 2021.

⁴⁸RAGHUVANSHI, D. S. et al. Design and synthesis of novel oleanolic acid based chromenes as anti-proliferative and anti-inflammatory agents. **New Journal of Chemistry**, v. 42, n. 20, p. 16782–16794, 2018.

- ⁴⁹DE ALMEIDA, P. D. O. et al. Anti-inflammatory activity of triterpenes isolated from *Protium paniculatum* oil-resins. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2015, 2015.
- ⁵⁰MAHATO, S. B.; KUNDU, A. P. ¹³C NMR spectra of pentacyclic triterpenoids-a compilation and some salient features. **Phytochemistry**, v. 37, n. 6, p. 1517-1575, 1994.
- ⁵¹YADAV, G. D.; WAGH, D. P. Claisen-Schmidt condensation using green catalytic processes: A critical review. **Chemistry Select**, v. 5, n. 29, p. 9059–9085, 2020.
- ⁵²VIESSER, R. V. et al. The halogen effect on the ¹³C NMR chemical shift in substituted benzenes. **Physical Chemistry Chemical Physics**, v. 20, n. 16, p. 11247–11259, 2018.
- ⁵³DO NASCIMENTO, G. O. **Avaliação da atividade antioxidante e da inibição da enzima α -glicosidase presente no chá das folhas de *Coffea arabica***. Dissertação (Mestrado em Química). Universidade Federal do Ceará, Fortaleza. 2019.
- ⁵⁴YUCA, H. **Assessment of α -glucosidase and α -amylase inhibitory potential of *Paliurus spina-christi* Mill. and its terpenic compounds**. 2022.