

Ana Paula Ruani

Investigação fitoquímica e biológica da espécie vegetal *Salacia impressifolia*

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do Grau de Mestre em Química. Área de concentração: Química Orgânica.
Orientador: Prof. Dr. Moacir Geraldo Pizzolatti

Florianópolis
2014

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

Ruani, Ana Paula

Investigação fitoquímica e biológica da espécie vegetal
Salacia impressifolia / Ana Paula Ruani ; orientador,
Moacir Geraldo Pizzolatti - Florianópolis, SC, 2014.
108 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa
Catarina, Centro de Ciências Físicas e Matemáticas.
Programa de Pós-Graduação em Química.

Inclui referências

1. Química. 2. Salacia impressifolia. 3. Antioxidante.
4. Acetilcolinesterase. 5. Anti-hiperglicêmica. I.
Pizzolatti, Moacir Geraldo . II. Universidade Federal de
Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Química. III.
Título.

Ana Paula Ruani

Investigação fitoquímica e biológica da espécie vegetal *Salacia impressifolia*

Esta Dissertação foi julgada adequada para obtenção do Título de Mestre em Química, e aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós-Graduação em Química.

Florianópolis, 24 de fevereiro de 2014.

Prof. Dr. Hugo Alejandro Gallardo Olmedo
Coordenador do Curso

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Moacir Geraldo Pizzolatti
Orientador
UFSC

Prof.^a Dr.^a Maique Weber Biavatti
UFSC - CCS

Prof. Dr. Josiel Barbosa Domingos
UFSC

Prof. Dr. Vanderlei Gageiro Machado
UFSC

Dedico este trabalho as minhas famílias,
de sangue e do coração.

AGRADECIMENTOS

A todos aqueles que contribuíram para que este trabalho fosse realizado.

A Deus.

A minha família, meu maior exemplo, minha inspiração constante, meu maior amor.

A minha família do coração, meus amigos. Vocês são meu suporte, meu espelho, minha fortaleza nesses dias de batalha, meu conforto e minha redenção.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Moacir Geraldo Pizzolatti, pelos valiosos ensinamentos, dedicação e paciência.

A minha família LQPN. Aos que me ajudaram durante todos esses anos, independentemente de contato diário ou não: Aldo, Alechania, Andressa, Cristian, Cristiane, Dalila, Francieli, Guilherme, Gustavo, Henrique, Heros, Hugo, Ingrid, Juliana, Leandro, Lizandra, Luciana, Marcos, Mauro, Mayan, Rafael, Suelen e Tiago. Palavras nunca serão suficientes para expressar a importância de vocês em minha vida.

Em especial à Dalila e ao Hugo que iniciaram os trabalhos com a miraruíra e me confiaram a sua continuação. Ao Hugo pelo excelente trabalho, pelo comprometimento e admirável esforço, sem o qual esse trabalho não seria possível.

À Prof.^a Dra. Inês Maria Costa Brighente e aos alunos Aldo, Dalila, Alechania e Mayan pelo auxílio na realização dos ensaios de bancada.

Ao Leandro e ao Gustavo pelas análises de RMN.

À Prof.^a Dra. Fátima Regina Mena Barreto Silva e à aluna Gabrielle pela realização da avaliação da atividade anti-hiperglicêmica.

Ao Prof. Dr. Gustavo Micke e às alunas Melina e Juliana pelas análises de ESI-EM e CG-EM.

Ao Prof. Dr. Daniel Carvalho Pimenta e a Ingrid pelas análises de ESI-IT-Tof.

Ao Chico por providenciar a planta.

À UFSC, ao Departamento de Química e ao Programa de Pós-graduação em Química. A todos os professores, à Graça, ao Jadir, aos funcionários da Central de Análises e a todos que fizeram parte dessa jornada.

A CAPES e ao CNPQ pelo apoio financeiro.

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi efetuar uma investigação fitoquímica do caule da espécie *Salacia impressifolia* e avaliar a potencial atividade biológica do extrato bruto, frações e compostos isolados. O caule seco em pó foi extraído com etanol para obtenção do extrato bruto. Esse extrato foi submetido à extração sólido-líquido a fim de obter as frações clorofórmio e acetato de etila e o resíduo insolúvel. O extrato bruto e as frações foram submetidos à quantificação de fenólicos totais e flavonoides e avaliação da atividade antioxidante utilizando os ensaios de poder redutor e captura do radical DPPH. O extrato bruto e as frações mais polares apresentaram a maior atividade antioxidante. O ensaio *in vitro* demonstrou que o extrato bruto, a fração clorofórmio e a fração acetato de etila apresentaram atividade inibitória moderada frente à enzima acetilcolinesterase. O extrato bruto também apresentou atividade anti-hiperglicêmica nos testes de tolerância oral à glicose e atividade das dissacaridases. Uma mistura de compostos graxos, uma mistura de α e β -amirina e um hidrocarboneto de cadeia longa foram obtidos a partir da fração clorofórmio. O fracionamento cromatográfico em coluna da fração acetato de etila rendeu o hidrocarboneto de cadeia longa, os triterpenos α -amirina, β -amirina e ácido melalúcido e a (-)-epicatequina. Os compostos isolados foram caracterizados através de cromatografia em camada delgada, ponto de fusão, análises espectrométricas (massa, RMN de ^1H , RMN de ^{13}C , DEPT, COSY, HMQC e HMBC) e espectrofotometria de infravermelho.

Palavras-chave: *Salacia impressifolia*. Antioxidante. Acetilcolinesterase. Anti-hiperglicêmica.

ABSTRACT

The objective of this study was to perform a phytochemical investigation of the stems of *Salacia impressifolia* and evaluate potential biological activity of the crude extract, fractions and isolated compounds. The dried and powdered stems were extracted with ethanol to yield the crude extract. This extract was subjected to solid-liquid extraction to obtain the chloroform and ethyl acetate fractions and the insoluble residue. The crude extract and the fractions were submitted to quantification of their total phenolic and flavonoids contents and evaluation of antioxidant activity using reducing power and DPPH radical scavenging assays. The crude extract and polar fractions showed the highest antioxidant activity. *In vitro* assay demonstrated that the crude extract, chloroform fraction and ethyl acetate fraction showed moderate inhibitory activity against acetylcholinesterase. The crude extract also showed antihyperglycemic activity in oral glucose tolerance test and disaccharidases activity. A mixture of fatty compounds, a mixture of α and β -amyrin and a long chain hydrocarbon were obtained from the chloroform fraction. Column chromatographic fractionation of the ethyl acetate fraction yielded the long chain hydrocarbon, the triterpenes α -amyrin, β -amyrin and melaleucic acid and (-)-epicatechin. The isolated compounds were characterized by thin layer chromatography, melting point, spectrometric analysis (mass, $^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$, DEPT, COSY, HMQC and HMBC) and infrared spectrophotometry.

Keywords: *Salacia impressifolia*. Antioxidant. Acetylcholinesterase. Antihyperglycemic.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estruturas moleculares dos compostos identificados no gênero <i>Salacia</i>	28
Figura 2. <i>Salacia impressifolia</i>	34
Figura 3. Extração do extrato bruto do caule de <i>Salacia impressifolia</i>	39
Figura 4. Isolamento dos compostos da fração clorofórmio	39
Figura 5. Isolamento dos compostos da fração acetato de etila	40
Figura 6. Espectro de IV (em filme) da mistura 1	46
Figura 7. Cromatograma de íons totais da mistura 1	46
Figura 8. Estrutura dos compostos identificados na mistura 1	49
Figura 9. Espectro de IV (em KBr) da mistura 2	50
Figura 10. Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) da mistura 2	51
Figura 11. Ampliação do espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) na região de 3,15-3,30 e 5,10-5,25 ppm para a mistura 2	51
Figura 12. Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) da mistura 2	52
Figura 13. Estrutura dos esqueletos olean-12-eno e urs-12-eno	52
Figura 14. Representação dos acoplamentos a longa distância (HMBC)	54
Figura 15. Estrutura dos triterpenos α -amirina [39] e β -amirina [40]	54
Figura 16. Cromatograma da mistura 2 obtido por CG-EM	55
Figura 17. Espectro de massas do triterpeno β -amirina	55
Figura 18. Espectro de massas do triterpeno α -amirina	56
Figura 19. Fragmentação do tipo retro Diels-Alder do anel C de α -amirina ($\text{R}_1 = \text{CH}_3$ e $\text{R}_2 = \text{H}$) e β -amirina ($\text{R}_1 = \text{H}$ e $\text{R}_2 = \text{CH}_3$) (Giese, 2005)	56
Figura 20. Espectro de IV (em KBr) do composto 1	59
Figura 21. Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) do composto 1	60
Figura 22. Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) do composto 1	61
Figura 23. Unidade estrutural "A"	61
Figura 24. Espectros de massa do composto 1	62
Figura 25. Proposta da estrutura do composto 1	62
Figura 26. Espectro de IV (em KBr) do composto 2	63
Figura 27. Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, $\text{CDCl}_3 + \text{CD}_3\text{OD}$) do composto 2	64
Figura 28. Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, $\text{CDCl}_3 + \text{CD}_3\text{OD}$) do composto 2	65
Figura 29. Esqueleto do tipo lupano	65
Figura 30. Representação das correlações heteronucleares (HMBC)	66
Figura 31. Estrutura do ácido melalécico	67
Figura 32. Espectro de IV (em KBr) do composto 3	70
Figura 33. Espectro de RMN de ^{13}C (50 MHz, CD_3OD) do composto 3	71
Figura 34. Espectro de RMN de ^1H (200 MHz, CD_3OD) do composto 3	72
Figura 35. Sistema de acoplamento dos hidrogênios H-2', H-2 e H-3 da (-)-epicatequina	72
Figura 36. Estrutura da (-)-epicatequina	73
Figura 37. Complexação do flavonoide quercetina com Al^{3+}	75

Figura 38. Equação básica da reação do DPPH com um sequestrador de radical livre.....	77
Figura 39. Efeito do extrato bruto na curva de tolerância à glicose oral. Os valores estão expressos em média \pm E.P.M.; n = 6 em duplicata para cada tratamento. Estatisticamente diferente em relação ao grupo hiperglicêmico; * p \leq 0,05.....	79
Figura 40. Efeito in vitro do extrato bruto do caule de <i>Salacia impressifolia</i> na atividade específica das enzimas sacarase, maltase e lactase, na porção duodenal do intestino de rato. Incubação: 5 min. Os valores são expressos como média \pm E.P.M., n = 6 para cada grupo. Significativamente diferente em relação ao grupo controle; ***p \leq 0,001.....	80
Figura 41. Espectros de massa dos componentes identificados da mistura 1	95
Figura 42. Mapa de correlação bidimensional heteronuclear HMQC (400 MHz (^1H), 100 MHz (^{13}C), CDCl_3) da mistura α , β -amirina.....	99
Figura 43. DEPT (100 MHz, CDCl_3) da mistura α , β -amirina	100
Figura 44. Mapa de correlação bidimensional heteronuclear HMBC (400 MHz (^1H), 100 MHz (^{13}C), CDCl_3) da mistura α , β -amirina.....	101
Figura 45. Mapa de correlação bidimensional homonuclear COSY (400 MHz, CDCl_3) da mistura α , β -amirina.....	102
Figura 46. Mapa de correlação bidimensional heteronuclear HMQC (400 MHz (^1H), 100 MHz (^{13}C), CDCl_3) do composto 1	103
Figura 47. DEPT (100 MHz, CDCl_3) do composto 1	103
Figura 48. Mapa de correlação bidimensional heteronuclear HMBC (400 MHz (^1H), 100 MHz (^{13}C), CDCl_3) do composto 1	104
Figura 49. Mapa de correlação bidimensional homonuclear COSY (400 MHz, CDCl_3) do composto 1.....	104
Figura 50. Espectro de ESI-IT-TOF do ácido melalécico.....	105
Figura 51. DEPT (100 MHz, $\text{CDCl}_3 + \text{CD}_3\text{OD}$) do ácido melalécico	105
Figura 52. Mapa de correlação bidimensional heteronuclear HMQC (400 MHz (^1H), 100 MHz (^{13}C), $\text{CDCl}_3 + \text{CD}_3\text{OD}$) do ácido melalécico	106
Figura 53. Mapa de correlação bidimensional heteronuclear HMBC (400 MHz (^1H), 100 MHz (^{13}C), $\text{CDCl}_3 + \text{CD}_3\text{OD}$) do ácido melalécico	107
Figura 54. Mapa de correlação bidimensional homonuclear COSY (400 MHz, $\text{CDCl}_3 + \text{CD}_3\text{OD}$) do ácido melalécico.....	108

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Compostos encontrados em espécies do gênero <i>Salacia</i>	24
Tabela 2. Compostos, tempo de retenção e porcentagem relativa dos constituintes da mistura 1	47
Tabela 3. Dados espectrométricos de RMN de ¹ H (400 MHz) e ¹³ C (100 MHz) em CDCl ₃ do composto majoritário β-amirina e comparação com os deslocamentos de RMN de ¹³ C encontrados na literatura	57
Tabela 4. Dados espectrométricos de RMN de ¹ H (400 MHz) e ¹³ C (100 MHz) em CDCl ₃ + CD ₃ OD do ácido melalécico e comparação dos deslocamentos de RMN de ¹³ C do ácido melalécico (em C ₅ D ₅ N) encontrados na literatura	68
Tabela 5. Dados espectrométricos de RMN de ¹³ C (50 MHz) e ¹ H (200 MHz) em CD ₃ OD da (-)-epicatequina.....	73
Tabela 6. . Comparação dos principais sinais de RMN de ¹³ C e ¹ H da (-)-epicatequina e da (+)-catequina, em CD ₃ OD.	74
Tabela 7. Teor de fenólicos, flavonoides e atividade antioxidante do extrato e frações de <i>Salacia impressifolia</i>	76
Tabela 8. Porcentagem de inibição da acetilcolinesterase do extrato bruto e frações (a 100 ppm) da <i>Salacia impressifolia</i>	78

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

δ	deslocamento
μg	micrograma
μL	microlitro
μm	micrometro
μmol	micromol
ACh	acetilcolina
AChE	acetilcolinesterase
AcoEt	acetato de etila
AG	ácido gálico
ANOVA	<i>Analysis of variance</i> (análise de variância)
ax	axial
BSA	albumina do soro bovino
CC	cromatografia em coluna
CCD	cromatografia em camada delgada
CDCl_3	clorofórmio deuterado
$\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$	piridina deuterada
CD_3OD	metanol deuterado
CG-EM	Cromatografia Gasosa - Espectrometria de massa
COSY	<i>Correlation Spectroscopy</i>
<i>d</i>	duplete
DA	Doença de Alzheimer
<i>dd</i>	duplo duplete
DEPT	<i>Distortionless Enhancement by Polarization Transfer</i>
EB	extrato bruto
EM	Espectrometria de massa
E.P.M.	erro padrão da média
eq	equatorial
ESI-EM	<i>Electrospray ionization-espectrometria de massa</i>
ESI-IT-Tof	<i>Electrospray ionization-Ion Trap-Time-of-flight</i>
EtOH	etanol
FA	Fração acetato de etila
FC	Fração clorofórmio
FOMSC3	<i>First Order Multiplet Simulator/Checker</i>
fr	fração
g	grama
Hex	hexano
HMBC	<i>Heteronuclear multiple-bond correlation spectroscopy</i>
HMQC	<i>Heteronuclear Multiple Quantum Coherence</i>

Hz	hertz
IV	Infravermelho
<i>J</i>	constante de acoplamento
KBr	brometo de potássio
<i>m</i>	multiplete
MeOH	metanol
mg	miligrama
MHz	mega-hertz
min	minutos
mL	mililitro
mmol	milimol
m/z	relação massa/carga
NI	não identificado
OMS	Organização Mundial da Saúde
P.A.	Para análise
p.f.	ponto de fusão
ppm	partes por milhão
RDA	retro Diels-Alder
%REL	porcentagem relativa
R _f	fator de retenção
RI	Resíduo insolúvel
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
RMN de ¹³ C	Ressonância Magnética Nuclear de carbono
RMN de ¹ H	Ressonância Magnética Nuclear de hidrogênio
<i>s</i>	simpleto
<i>S. impressifolia</i>	<i>Salacia impressifolia</i>
<i>sl</i>	simpleto largo
<i>t</i>	triplete
TR	tempo de retenção
UV-Vis	ultravioleta-visível

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	21
2 REVISÃO	23
2.1 Gênero <i>Salacia</i>	23
2.1.1 Aspectos químicos e biológicos	23
2.2 <i>Salacia impressifolia</i>	33
3 OBJETIVOS	35
3.1 Objetivo geral	35
3.2 Objetivos específicos	35
4 METODOLOGIA	37
4.1 Reagentes	37
4.2 Equipamentos	37
4.3 Obtenção e fracionamento do extrato bruto	38
4.4 Fracionamento da fração clorofórmio	39
4.5 Fracionamento da fração acetato de etila	40
4.6 Fracionamento do resíduo insolúvel	41
4.7 Avaliação da atividade antioxidante	41
4.7.1 Determinação do teor de fenólicos totais	41
4.7.2 Determinação do teor de flavonoides	42
4.7.3. Determinação da ação sequestradora de radicais livres	42
4.7.4 Determinação do potencial redutor	42
4.8 Ação inibitória da acetilcolinesterase	43
4.9 Avaliação da atividade anti-hiperglicêmica	43
4.9.1 Teste oral de tolerância à glicose	43
4.9.2 Extração das dissacaridases e ensaios	44
4.9.3 Análise estatística	44
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	45
5.1 Análise fitoquímica	45
5.1.1 Mistura 1	45
5.1.2 Mistura 2	49
5.1.3 Composto 1	59
5.1.4 Composto 2	63
5.1.5 Composto 3	70
5.2 Avaliação das atividades biológicas	74
5.2.1 Atividade antioxidante	74
5.2.2 Ação inibitória da enzima acetilcolinesterase	78
5.2.3 Atividade anti-hiperglicêmica	79
6 CONCLUSÕES	83
REFERÊNCIAS	85
ANEXOS	95

1 INTRODUÇÃO

A utilização de plantas medicinais, em um contexto histórico, possui sólidas raízes. A busca por alívio e cura de doenças pela ingestão de ervas e folhas talvez tenha sido uma das primeiras formas de utilização dos produtos naturais (Viegas Junior *et al.*, 2006). Atualmente, o forte apelo comercial leva ao aumento na demanda por produtos que possuam em sua composição extratos ou compostos de origem natural.

Muitas vezes, o conhecimento popular serve de ponto de partida para iniciar estudos que visam atestar a eficácia das plantas utilizadas na medicina tradicional. A OMS reconhece que grande parte da população dos países em desenvolvimento depende da medicina tradicional para sua atenção primária, tendo em vista que 80% desta população utiliza práticas tradicionais nos seus cuidados básicos de saúde e 85% destes utilizam plantas ou preparações destas (Brasil, 2006). Aliado a isso, a complexidade e a variedade dos produtos naturais estimula a busca de princípios ativos com potencial ação terapêutica ou como fonte de inspiração para o desenvolvimento de fármacos.

Os produtos naturais desempenham um importante papel como fonte de compostos farmacologicamente ativos, sendo que, dos fármacos aprovados no período de 1981-2006, 4% são produtos naturais, 22% são provenientes de produtos naturais com algumas transformações estruturais e 4% são produtos sintéticos baseados em um farmacóforo natural (Newman *et al.*, 2012).

O Brasil, detentor de 22% da biodiversidade vegetal mundial, apresenta em sua flora nativa uma das mais ricas fontes de substâncias com potencial farmacológico (Carvalho, 2009). No entanto, apenas uma pequena parcela destas espécies foi estudada do ponto de vista fitoquímico e farmacológico. A fim de possibilitar a produção e extração das espécies destaca-se a necessidade de uma infraestrutura adequada, além do desenvolvimento de trabalhos em colaboração com diversos grupos de pesquisa, envolvendo áreas multidisciplinares, como botânica, farmacologia e fitoquímica (Maciel *et al.*, 2002).

Diversas espécies do gênero *Salacia* (Celastraceae) têm sido investigadas segundo sua constituição química e seu potencial biológico, uma vez que são empregadas na medicina popular no tratamento de diversas enfermidades. Os estudos fitoquímicos levaram ao isolamento de diversos metabólitos secundários, tais como xantonas, triterpenos, alcaloides sesquiterpênicos, catequinas e glicosídeos. Espécies deste gênero também apresentaram atividade antidiabética, hepatoprotetora, antioxidante e antimicrobiana, entre outras. Levando em consideração esses aspectos, o presente trabalho foi desenvolvido com o objetivo de investigar fitoquímica e biologicamente a espécie *Salacia impressifolia*, principalmente devido à escassez de trabalhos relacionados a esta espécie.

2 REVISÃO

2.1 Gênero *Salacia*

O gênero *Salacia* pertence à família Celastraceae, que possui distribuição predominantemente tropical e subtropical, incluindo cerca de 50 gêneros e 1000 espécies (Souza *et al.*, 2008). Este gênero já foi classificado por alguns autores como pertencente à família Hippocrateaceae que, atualmente, é considerada parafilética e incluída em Celastraceae como duas subfamílias: Hippocrateoideae e Salacioideae (Lombardi, 2010).

O gênero *Salacia* compreende cerca de 200 espécies, distribuídas pela América, Ásia e Europa (Udayan *et al.*, 2012). Constituem-se de arbustos com flores pequenas e frutos comestíveis com polpa mucilaginosa (Paarakh *et al.*, 2008).

2.1.1 Aspectos químicos e biológicos

Na medicina tradicional, as plantas do gênero *Salacia* são utilizadas como adstringentes, anti-inflamatórias, depurativas, analgésicas, emenagogas, tônicas para o fígado e estomáquicas. Também são úteis no tratamento de diabetes, doenças de pele, cólicas, úlceras, hepatopatia, hiperidrose e dispepsia (Paarakh *et al.*, 2008).

Estudos fitoquímicos têm mostrado a presença de diversas classes de metabólitos secundários, incluindo triterpenos, sesquiterpenos, catequinas, xantonas, lignanas, ácidos fenólicos e glicosídeos. Dentre os triterpenos isolados destacam-se os quinonametídeos, que são considerados marcadores quimiotaxonômicos da família Celastraceae (Alvarenga *et al.*, 2005).

A espécie *S. campestris* caracteriza-se pela presença dos triterpenos quinonametídeos (celastrolídeos), tingenona [1], pristimerina [2], tingenina B [3], 20 α -hidroxitingenona [4], celastrol [5] e netzahualcoieno [6] nas suas raízes (Corsino *et al.*, 2000).

A investigação fitoquímica da *S. chinensis* forneceu triterpenos quinonametídeos (tingenona [1], tingenina B [3]), friedelanos (kokoonol [7], ácido salaspêrmico [8]), ursanos (desmetilregelina [9], ácido tripterígico A [10]), glicosídeos megastigmanos (foliasalaciosídeos [11-15]), flavonóides (vitexina [16], isovitexina [17], rutina [18]), entre outros (Deokate *et al.*, 2012; Morikawa *et al.*, 2003; Nakamura *et al.*, 2011; Zhang *et al.*, 2008).

A partir das cascas das raízes de *S. reticulata* foram isolados os triterpenos quinonametídeos tingenona [1], pristimerina [2], isoiguesterinol [19], 30-hidroxipristimerina [20], 22 β -hidroxitingenona [21] e salaciquinona [22], além de diversos triterpenos friedelanos, tais como 21 α ,26-di-hidroxifriedelan-3-ona [23] (Dhanabalasingham *et al.*, 1996), friedelan-3-ona [24], 3-oxo-friedelan-28-al [25] e 21 α -hidroxifriedelan-3-ona [26] (Kumar *et al.*, 1990). Nas raízes também foram encontrados os sais de sulfônio salacinol [27] e kotalanol [28] (Yoshikawa *et al.*, 1998; Yoshikawa *et al.*, 1997), a xantona glicosilada mangiferina [29], as catequinas (-)-epicatequina [30], (-)-epigalocatequina [31] e (-)-4'-*O*-metilepialocatequina [32] e as proantocianidinas (-)-epiafzelequina-(4 β \rightarrow 8)-(-)-4'-*O*-metilepialocatequina [33] e (-)-epicatequina-(4 β \rightarrow 8)-(-)-4'-*O*-metilepialocatequina [34] (Yoshikawa *et al.*, 2001).

Um panorama geral dos compostos isolados a partir de espécies do gênero *Salacia* é apresentado na Tabela 1 e suas estruturas estão representadas na Figura 1.

Tabela 1. Compostos encontrados em espécies do gênero *Salacia* (continua)

Espécie	Composto	Referência
<i>S. amplifolia</i>	pristimerina [2], netzahualcoieno [6], friedelan-3-ona [24], isoiguesterina [35], 2 α -hidroxifriedelan-3-ona [36], regeol A [37], 7-hidroxi-6-oxopristimerol [38], α -amirina [39], β -amirina [40], salacenonal [41], wilforlida A [42], wilforlida B [43], lupeol [44], lup-20(29)-en-3,21-diona [45], β -sitosterol [46], β -daucosterol [47]	(Pu <i>et al.</i> , 2009; Wang <i>et al.</i> , 2011)
<i>S. beddomei</i>	pristimerina [2], friedelan-3-ona [24], lup-20(29)-en-3,21-diona [45], β -sitosterol [46], 21 β -hidroxilup-20(29)-en-3-ona [48], 6 β -hidroxilup-20(29)-en-3,21-diona [49], 2 α ,3 β -di-hidroxilup-20(29)-eno [50], betulina [51]	(Deepa <i>et al.</i> , 2003; Deepa <i>et al.</i> , 2004; Hisham <i>et al.</i> , 1995; Hisham <i>et al.</i> , 1996a; Hisham <i>et al.</i> , 1996b)

Tabela 1. Compostos encontrados em espécies do gênero *Salacia* (continuação)

<i>S. campestris</i>	tingenona [1], pristimerina [2], tingenina B [3], 20 α - hidroxitingenona [4], celastrol [5], netzahualcoieno [6], friedelan-3-ona [24], netzahualcoiona [52]	(Carvalho <i>et al.</i> , 2005; Corsino <i>et al.</i> , 2000; Liao <i>et al.</i> , 1997)
<i>S. chinensis</i>	tingenona [1], tingenina B [3], kokoonol [7], ácido salaspêrmico [8], desmetilregelina [9], ácido tripterígico A [10], foliasalaciosídeo E1 [11], foliasalaciosídeo E2 [12], foliasalaciosídeo E3 [13], foliasalaciosídeo F [14], foliasalaciosídeo I [15], vitexina [16], isovitexina [17], rutina [18], mangiferina [29], (-)-epicatequina [30], (-)-epigalocatequina [31] β - amirina [40], ácido wilfórico C [53], salaquinona A [54], salaquinona B [55], ácido ortosfênico [56], β - amirenona [57], ácido 3 β ,22 β -di- hidroxiolean-12-en-29-oico [58], ácido maitenfólico [59], ácido 22 α - hidroxi-3-oxo-olean-12-en-29-oico [60], regeol A [37], triptocalina A [61], 29-hidroxifriedelan-3-ona [62], canferol 3,7-di- <i>O</i> - β - <i>D</i> - glicopiranosídeo [63], canferol 3- <i>O</i> - rutinosídeo-7- <i>O</i> - β - <i>D</i> - glicopiranosídeo [64], canferol 3- <i>O</i> - (2''',6'''- α - <i>L</i> -diramnopiranosil- β - <i>D</i> - glicopiranosídeo)-7- <i>O</i> - β - <i>D</i> - glicopiranosídeo [65], quercetina 3- <i>O</i> -rutinosídeo-7- <i>O</i> - β - <i>D</i> - glicopiranosídeo [66], miricetina-3- <i>O</i> - β - <i>D</i> -rutinosídeo [67], roseosídeo [68], (+)-lioniresinol [69], (+)- isolariciresinol [70], (+)-8-metoxi- isolariciresinol [71]	(Deokate <i>et al.</i> , 2012; Kishi <i>et al.</i> , 2003; Morikawa <i>et al.</i> , 2003; Nakamura <i>et al.</i> , 2008; Zhang <i>et al.</i> , 2008)

Tabela 1. Compostos encontrados em espécies do gênero *Salacia* (continuação)

<i>S. elliptica</i>	28-hidroxfriedelan-3-ona [72], 1,3-dioxo-16 α -hidroxfriedelano [73], 16 α -hidroxfriedelan-3-ona [74], 30-hidroxfriedelan-3-ona [75], 16 α ,28-di-hidroxfriedelan-3-ona [76]	(Duarte <i>et al.</i> , 2010)
<i>S. hainanensis</i>	21 α ,26-di-hidroxfriedelan-3-ona [23], friedelan-3-ona [24], 21 α -hidroxfriedelan-3-ona [26], mangiferina [29], (-)-epicatequina [30], β -amirina [40], wilforlida A [42], lupeol [44], lup-20(29)-en-3,21-diona [45], β -sitosterol [46], 29-hidroxfriedelan-3-ona [62], 30-hidroxfriedelan-3-ona [75], 7 α ,21 α -di-hidroxfriedelan-3-ona [77], 3 β ,30-di-hidroxiolean-12-eno [78], ácido oleanólico [79], 2 β ,3 β -di-hidroxilup-20(29)-eno [80], 2 β ,3 β ,22 α -trihidroxilup-20(29)-eno [81], 3 α -hidroxilup-20(29)-en-2-ona [82], 3 α ,28-di-hidroxilup-20(29)-en-2-ona [83]	(Gao <i>et al.</i> , 2010; Guo <i>et al.</i> , 2013; Guo <i>et al.</i> , 2009; Huang <i>et al.</i> , 2012; Yuan <i>et al.</i> , 2011)
<i>S. kraussi</i>	pristimerina [2], celastrol [5], isoiguesterinol [19], 28-nor-isoiguesterina-17-carbaldeído [84], 17-(metoxicarbonil)-28-nor-isoiguesterina [85], 28-hidroxi-iguesterina [86]	(Figueiredo <i>et al.</i> , 1998a)
<i>S. longipes</i>	mangiferina [29], β -sitosterol [46], estigmasterol [87], salaterpeno A [88], salaterpeno B [89], salaterpeno C [90], salaterpeno D [91]	(Mba'ning <i>et al.</i> , 2011; Mba'ning <i>et al.</i> , 2013)

Tabela 1. Compostos encontrados em espécies do gênero *Salacia* (continuação)

<i>S. madagascariensis</i>	isoiguesterol [19], isoiguesterina [35], 6-oxo-isoiguesterina [92], 20-epi-isoiguesterol [93]	(Thiem et al., 2005)
<i>S. prinoides</i>	salacinol [27], kotalanol [28], lupeol [44], β -sitosterol [46], β -daucosterol [47], 30-hidroxilup-20(29)-en-3-ona [94], 3 β ,30-di-hidroxilup-20(29)-eno [95], ácido ursólico [96], salaprinol [97], ponkoranol [98], canferol-4'-metil éter [99], quercetina [100], quercetina-3',4'-dimetil éter [101], isoramnetina [102], ácido gálico [103], galato de etila [104]	(Gao et al., 2008; Yoshikawa et al., 2008)
<i>S. reticulata</i>	tingenona [1], pristimerina [2], celastrol [5], netzahualcoieno [6], isoiguesterol [19], 30-hidroxi pristimerina [20], 22 β -hidroxitingenona [21], salaciquinona [22], 21 α ,26-di-hidroxi friedelan-3-ona [23], friedelan-3-ona [24], 3-oxo-friedelan-28-al [25], 21 α -hidroxi friedelan-3-ona [26], salacinol [27], kotalanol [28], mangiferina [29], (-)-epicatequina [30], (-)-epigalocatequina [31], (-)-4'-O-metilepigalocatequina [32], (-)-epiafzelequina-(4 β \rightarrow 8)-(-)-4'-O-metilepigalocatequina [33], (-)-epicatequina-(4 β \rightarrow 8)-(-)-4'-O-metilepigalocatequina [34], isoiguesterina [35], β -amirina [40], salacenonal [41], β -sitosterol [46], ácido 3 β ,22 β -di-hidroxiolean-12-en-29-oico [58], ácido maitenfólico [59], 29-hidroxi friedelan-3-ona [62], 28-hidroxi friedelan-3-ona [72],	(Dhanabalasingham et al., 1996; Kumar et al., 1990; Yoshikawa et al., 1998; Yoshikawa et al., 2002a; Yoshikawa et al., 2001; Yoshikawa et al., 1997)

Tabela 1. Compostos encontrados em espécies do gênero *Salacia* (conclusão)

<i>S. reticulata</i>	30-hidroxifriedelan-3-ona [75],	(Yoshikawa <i>et al.</i> , 1998;
	friedelan-3, 21-diona [105], ácido 3-oxo-friedelan-30-oico [106],	Yoshikawa <i>et al.</i> , 2002a;
	acetato de kotalagenina [107],	Yoshikawa <i>et al.</i> , 2001;
	26-hidroxifriedelan-1,3-diona [108],	Yoshikawa <i>et al.</i> , 1997)
	19-hidroxiferruginol [109], ácido lambértico [110]	
<i>S. verrucosa</i>	21 α -hidroxifriedelan-3-ona [26],	26-hidroxifriedelan-1,3-diona [108],
	friedelan-1,3-diona [109],	21 α -hidroxifriedelan-1,3-diona [110],
	30-hidroxifriedelan-1,3-diona [111]	(Somwong <i>et al.</i> , 2011)

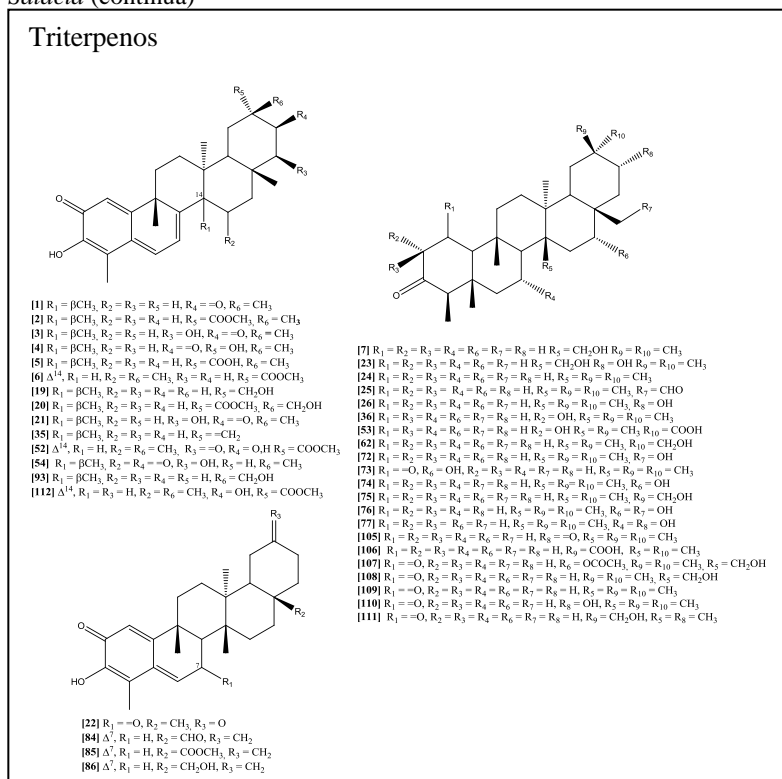
Figura 1. Estruturas moleculares dos compostos identificados no gênero *Salacia* (continua)

Figura 1. Estruturas moleculares dos compostos identificados no gênero *Salacia* (continuação)

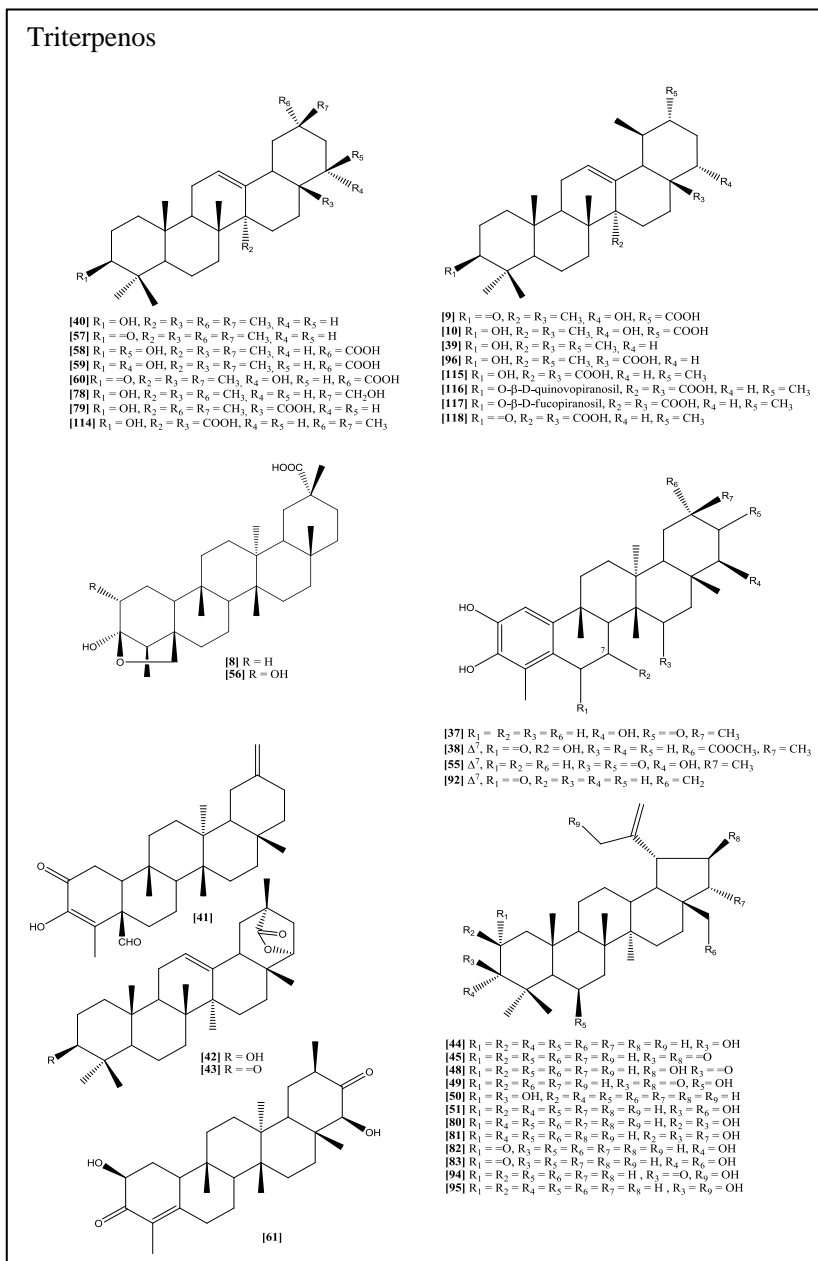
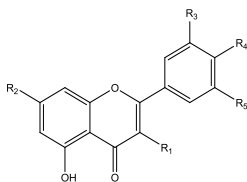
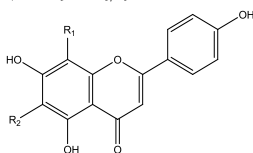


Figura 1. Estruturas moleculares dos compostos identificados no gênero *Salacia* (continuação)

Flavonoides

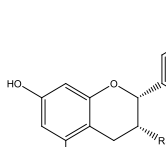


- [18] R₁ = O-rutinosídeo R₂ = R₃ = R₄ = OH R₅ = H
 [63] R₁ = R₂ = O-β-D-glicopiranosídeo, R₃ = R₅ = H, R₄ = OH
 [64] R₁ = O-rutinosídeo, R₂ = O-β-D-glicopiranosídeo, R₃ = R₅ = H, R₄ = OH
 [65] R₁ = 2',6'-*o*-L-diramnopiranosil-β-D-glicopiranosídeo, R₂ = β-D-glicopiranosídeo, R₃ = R₅ = H, R₄ = OH
 [66] R₁ = O-rutinosídeo, R₂ = O-β-D-glicopiranosídeo, R₃ = R₄ = OH, R₅ = H
 [67] R₁ = O-rutinosídeo, R₂ = R₃ = R₄ = R₅ = OH
 [99] R₁ = R₂ = OH R₃ = R₅ = H R₄ = OCH₃
 [100] R₁ = R₂ = R₃ = R₄ = OH, R₅ = H
 [101] R₁ = R₂ = OH, R₃ = R₄ = OCH₃, R₅ = H
 [102] R₁ = R₂ = R₄ = OH, R₃ = OCH₃, R₅ = H



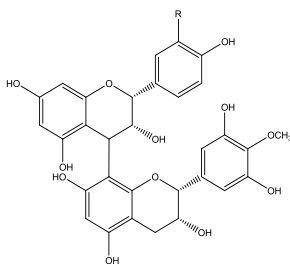
- [16] R₁ = C-β-glicopiranosídeo, R₂ = H
 [17] R₁ = H, R₂ = C-β-glicopiranosídeo

Catequinas



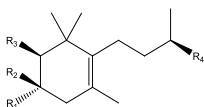
- [30] R₁ = R₂ = OH, R₃ = H
 [31] R₁ = R₂ = R₃ = OH
 [32] R₁ = R₂ = OH, R₃ = OCH₃

Proantocianidinas



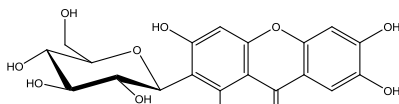
- [33] R = H
 [34] R = OH

Glicosídeos megastigmanos

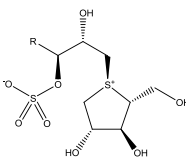


- [11] R₁ = O-α-L-arabinopiranosil-(1 → 6)-β-D-glicopiranosídeo, R₂ = R₃ = H, R₄ = OH
 [12] R₁ = OH, R₂ = R₃ = H, R₄ = O-α-L-arabinopiranosil-(1 → 6)-β-D-glicopiranosídeo
 [13] R₁ = OH, R₂ = R₃ = H R₄ = O-α-L-arabinofuranosil-(1 → 6)-β-D-glicopiranosídeo
 [14] R₁ = R₃ = H, R₂ = O-α-L-arabinopiranosil-(1 → 6)-β-D-glicopiranosídeo, R₄ = OH
 [15] R₁ = R₂ = H, R₃ = OH, R₄ = O-α-L-arabinofuranosil-(1 → 6)-β-D-glicopiranosídeo

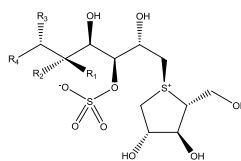
Xantona glicosilada



Sais de sulfônio

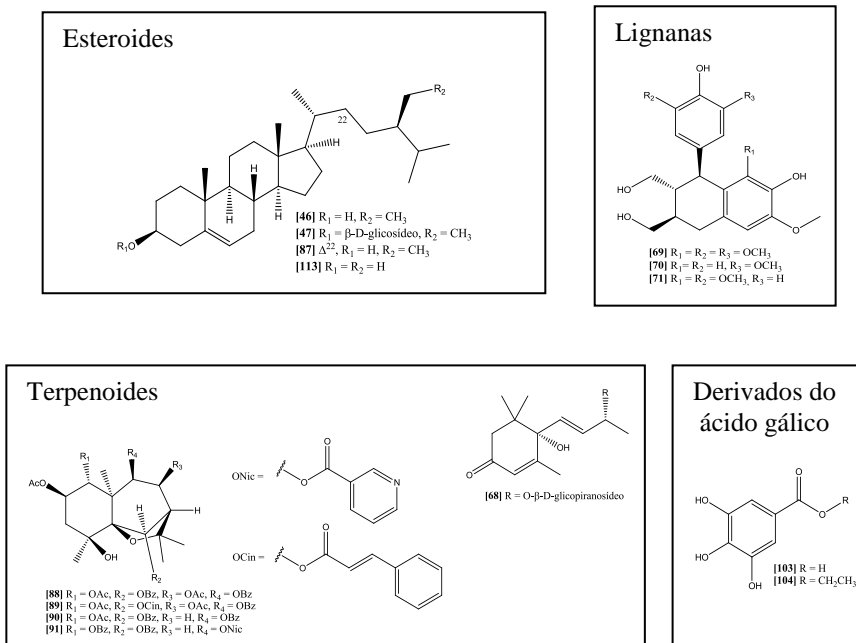


- [27] R = CH₂OH
 [97] R = H



- [28] R₁ = H, R₂ = R₃ = OH, R₄ = CH₂OH
 [98] R₁ = R₄ = OH, R₂ = R₃ = H

Figura 1. Estruturas moleculares dos compostos identificados no gênero *Salacia* (conclusão)



As espécies do gênero *Salacia* apresentam uma variedade de atividades biológicas, dentre as quais se destacam a atividade antidiabética, antimicrobiana, antioxidante, hepatoprotetora, citotóxica, anti-inflamatória, antiobesidade e hipotensiva, comprovando a eficácia da utilização das espécies na medicina popular.

O extrato aquoso de *S. reticulata* apresentou atividade antidiabética, reduzindo os níveis de glicose no sangue em ratos com diabetes induzida por estreptozotocina (Serasinghe *et al.*, 1990). Também foi capaz de inibir a α-glicosidase em ratos e suprimir significativamente a hiperglicemia pós-prandial em voluntários humanos saudáveis no teste de tolerância à sacarose (Shimoda *et al.*, 1998).

A mangiferina [29], isolada a partir das raízes de *S. reticulata*, apresentou atividade inibitória frente às enzimas sucrase, isomaltase e aldose redutase em ratos (Yoshikawa *et al.*, 2001). Das raízes também foram isolados dois potentes inibidores de α-glicosidade: os sais de sulfônio salacinal [27] e kotalanol [28] (Yoshikawa *et al.*, 1998;

Yoshikawa *et al.*, 1997). Estes sais apresentaram atividade inibitória em animais tão forte quanto as dos fármacos voglibose e acarbose, que são amplamente utilizados clinicamente nos dias atuais no tratamento de diabetes mellitus (Muraoka *et al.*, 2008).

O extrato solúvel em água das raízes de *S. reticulata* assim como os compostos isolados mangiferina [29], (-)-4'-*O*-metilepigalocatequina [32] e ácido maitenfólico [59] apresentaram atividade antiobesidade (Shimada *et al.*, 2011; Yoshikawa *et al.*, 2002a).

Estudos com o extrato aquoso e o extrato metanólico das raízes e caule da *S. reticulata* apresentaram um efeito hepatoprotetor em experimentos com ratos (Yoshikawa *et al.*, 2002b). Já a atividade antimicrobiana dos extratos clorofórmio e metanólico da espécie foi testada frente a diversos microrganismos; ambos os extratos apresentaram efeito inibitório (Choudhary *et al.*, 2005).

Os compostos isolados a partir das raízes desta espécie, mangiferina [29], (-)-4'-*O*-metilepigalocatequina [32] e (-)-epicatequina-(4 β →8)-(-)-4'-*O*-metilepigalocatequina [34], apresentaram potente atividade sequestrante do radical livre DPPH (Yoshikawa *et al.*, 2002b).

Estudos com o extrato éter de petróleo das cascas da raiz de *S. oblonga* em ratos com diabetes induzida por estreptozotocina apontaram que o extrato impediu significativamente a hiperglicemia e a hipoinsulinemia, sugerindo sua atividade antidiabética (Krishnakumar *et al.*, 1999). Dois compostos isolados do extrato éter de petróleo demonstraram cerca de 60% e 76% de atividade hipoglicêmica em comparação com uma dose igual de tolbutamida (250 mg kg⁻¹) em ratos albinos, indicando a importância terapêutica de *S. oblonga* (Augusti *et al.*, 1995).

O extrato das raízes de *S. oblonga* apresentou atividade antiperoxidação lipídica no tecido cardíaco de ratos diabéticos. A atividade de enzimas antioxidantes, como a superóxido dismutase, catalase, GSHPxase e GSSGRase foi aumentada no tecido cardíaco de animais diabéticos tratados com este extrato, sugerindo a sua atividade antioxidante (Krishnakumar *et al.*, 1999).

A atividade anti-inflamatória das cascas da raiz em pó de *S. oblonga* foi avaliada em ratos albinos machos utilizando os métodos de edema de pata induzido por carragenina (inflamação aguda) e de granulomas induzidos por pelotas de algodão (inflamação crônica). A amostra exerceu a atividade através de ação antiproliferativa, antioxidante e da estabilização de membranas lisossomais (Ismail *et al.*, 1997).

A espécie *S. petenensis* apresentou atividade antibacteriana, o que conduziu ao isolamento dos triterpenos tingenona [1] e netzahualcoionol [112] como compostos biologicamente ativos contra o microrganismo utilizado no teste (Setzer *et al.*, 2001).

O extrato metanólico do caule de *S. chinensis* mostrou potente efeito anti-hiperglicêmico e foi capaz de inibir a aldose redutase em ratos (Yoshikawa *et al.*, 2003). Seis constituintes isolados da *S. chinensis* (tingenona [1], tingenina B [3], mangiferina [29], regeol A [37], ácido 3 β ,22 β -di-hidroxiolean-12-en-29-oico [58] e triptocalina A [61]) apresentaram atividade inibitória da aldose redutase, sugerindo seu potencial antidiabético (Morikawa *et al.*, 2003).

O extrato etanólico das raízes de *S. macrosperma* apresentou significativa atividade hipoglicêmica em coelhos além da capacidade de reduzir os níveis de glicose no sangue em ratos tratados com aloxano (Venkateswarlu *et al.*, 1993; Venkateswarlu *et al.*, 1990). Estudos também revelaram que o extrato etanólico exibiu significativa atividade antimicrobiana *in vitro* (Venkateswarlu *et al.*, 1992).

Os compostos pristimerina [2], isoiguesterina [19], 28-nor-isoiguesterina-17-carbaldeído [84], 17-(metoxicarbonil)-28-nor-isoiguesterina [85] e 28-hidroxi-iguesterina [86], isolados da espécie *S. kraussi* por fracionamento guiado por bioensaios, mostraram citotoxicidade potente contra células HT-29 (adenocarcinoma de cólon humano) e apresentaram atividade antimalárica (Figueiredo *et al.*, 1998b). Já o triterpeno celastrol [5], encontrado nas raízes de *S. campestris*, apresentou potente atividade antioxidante, inibindo a peroxidação lipídica de membrana em mitocôndrias isoladas do fígado de ratos (Sassa *et al.*, 1994).

2.2 *Salacia impressifolia*

A espécie *Salacia impressifolia* (Miers) A. C. Smith está distribuída pela América Central e América do Sul (Smithsonian Institution). No Brasil pode ser encontrada em cinco estados: Acre, Amazonas, Pará, Rondônia, Roraima e Mato Grosso (Lombardi, 2013). É um cipó escandescendente, com flores amareladas, botões esverdeados e fruto comestível rugoso (The New York Botanical Garden; Universidade de São Paulo).

Salacia impressifolia (Figura 2) possui a seguinte classificação taxonômica (Paarakh *et al.*, 2008):

- Reino: Plantae
- Sub-reino: Tracheobionta
- Divisão: Magnoliophyta
- Classe: Magnoliopsida
- Subclasse: Rosidae
- Ordem: Celastrales
- Família: Celastraceae
- Gênero: *Salacia*
- Espécie: *impressifolia*

Figura 2. *Salacia impressifolia*



Fonte: Universidade de São Paulo

Conhecida na região de Santarém-PA como “cipó-miraruíra”, seu caule é utilizado na medicina popular no combate à diabetes e inflamações (Almeida, 1993). Até o momento há poucos estudos referentes à fitoquímica desta espécie, reportando o isolamento, a partir do caule, dos esteróis β -sitosterol [46], stigmasterol [87] e campesterol [113] dos triterpenos tingenona [1], tingenina B [3], friedelan-3-ona [24], α -amirina [39], β -amirina [40], lupeol [44], (Rocha *et al.*, 2000), ácido cinchólico [114], ácido quinóvico [115], o ácido 3-*O*-[β -*D*-quinovopiranosil]-quinóvico [116] (Costa *et al.*, 2007), 3-*O*-[β -*D*-fucopiranosil]-quinóvico [117] e ácido 3-oxoquinóvico [118] (Ripardo Filho *et al.*, 2008).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

O presente trabalho tem como objetivo realizar o estudo fitoquímico do caule da espécie *Salacia impressifolia* e avaliar a potencial atividade biológica do extrato bruto, frações e compostos isolados.

3.2 Objetivos específicos

- Obter o extrato bruto do caule e efetuar a extração sólido-líquido;
- Isolar, através de métodos cromatográficos, os metabólitos secundários presentes na espécie;
- Determinar as propriedades físico-químicas dos compostos isolados
- Identificar os compostos através de técnicas espectrométricas, como ressonância magnética nuclear e espectrometria de massa e espectrofotometria de infravermelho;
- Avaliar a atividade antioxidante e a capacidade de inibição da enzima acetilcolinesterase do extrato bruto e frações;
- Avaliar a atividade anti-hiperglicêmica do extrato bruto.

4 METODOLOGIA

4.1 Reagentes

Foram utilizados solventes de grau P.A., adquiridos de fontes comerciais. A acetonitrila grau HPLC foi obtida comercialmente (Panreac) e a água ultrapura foi obtida a partir de um sistema de purificação Milli-Q Plus (Millipore). Nos fracionamentos cromatográficos em coluna foi utilizada sílica gel Carlo Erba de granulometria 0,063:0,20 mm, poliamida CC6 Macherey-Nagel com tamanho de partícula menor que 0,07 mm e Sephadex LH-20. Para cromatografias em camada delgada (CCD) foram utilizadas cromatoplasas de alumínio cobertas com uma camada de sílica gel de 0,2 mm de espessura. As placas de CCD foram reveladas por meio de luz ultravioleta com comprimentos de onda de 254 e 365 nm, exposição a vapores de iodo e/ou imersão em solução de anisaldeído sulfúrico, seguida de aquecimento a 110°C.

4.2 Equipamentos

Para a concentração do extrato e frações foi utilizado o evaporador rotatório a vácuo Fisatom, sob temperatura inferior a 60 °C.

Os pontos de fusão foram determinados em um aparelho Microquímica APF-302.

Os experimentos de ESI-EM foram realizados no Laboratório de Catálise e Fenômenos Interfaciais (LACFI) do Departamento de Química da UFSC, com auxílio do professor Gustavo Amadeu Micke, utilizando um espectrômetro de massa triplo quadrupolo QTrap 3200 (Applied Biosystems, Concord, Canadá) em modo negativo. Os espectros de massas foram adquiridos na faixa de m/z 100 a 1000 e os dados foram analisados pelo software Analyst (versão 1.5.1; Applied Biosystems).

Os experimentos de ESI-IT-Tof foram realizados no laboratório de Bioquímica e Biofísica do Instituto Butantan, sob supervisão do professor Daniel Carvalho Pimenta, em um espectrômetro ESI-IT-Tof (Shimadzu Co., Japão), em modo negativo. As amostras foram diluídas em metanol e injetadas diretamente no espectrômetro por injeção manual, com fluxo de $0,025 \mu\text{L min}^{-1}$. A fragmentação foi feita por gás de colisão argônio, com 50% de energia e os espectros foram obtidos na faixa de 50 a 700 m/z . Os dados obtidos foram analisados pelo software LCMSsolution (Shimadzu Co., Japão).

As análises de cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa foram realizadas no Laboratório de Eletroforese Capilar sob supervisão do professor Gustavo Amadeu Micke. Foi utilizado um cromatógrafo gasoso Agilent Technologies 5975 Series MSD, com ionização por elétrons de 70 eV e temperatura de fonte de íons de 170 °C, equipado com coluna DB-5MS (25 m x 250 µm x 0,25 µm). Como gás de arraste foi utilizado hélio com vazão de 1 mL min⁻¹, estando o injetor a 280 °C. A injeção da amostra de 1 µL foi conduzida no modo split 5:1, empregando-se a seguinte rampa de aquecimento: temperatura inicial 60 °C/5 min, seguido de aquecimento a uma taxa de 10 °C/min até 290 °C, permanecendo nesta temperatura por 30 min.

Para os espectros de absorção na região do IV, utilizou-se o espectrofotômetro ABB, modelo FTLA 200, na Central de Análises do Departamento de Química da UFSC, em filme ou pastilha de KBr.

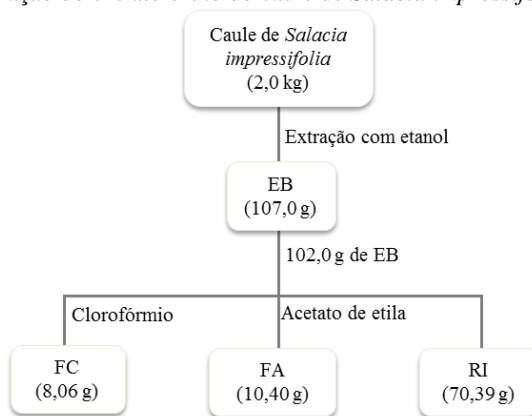
Os espectros de RMN foram obtidos em espectrômetro Varian NMR AS 400, operando a 400 MHz para ¹H e 100 MHz para ¹³C, e em espectrômetro Bruker AC 200, operando a 200 MHz para ¹H e 50 MHz para ¹³C, do Departamento de Química da UFSC.

4.3 Obtenção e fracionamento do extrato bruto

O extrato bruto hidroalcolico (EB) de *Salacia impressifolia* foi obtido por maceração em Etanol 96% do caule seco e pulverizado (2,0 kg), adquirido comercialmente (A REGIONAL, Parintins, AM). O tempo de maceração foi de sete dias, e o procedimento de extração foi repetido por três vezes. Os extratos obtidos foram reunidos, filtrados e o solvente evaporado em rotaevaporador sob pressão reduzida rendendo 107 g de extrato bruto seco.

Uma alíquota de 102 g do EB foi submetida à extração sólido-líquido, sucessivamente, com clorofórmio e acetato de etila, rendendo 8,06g da fração clorofórmio (FC), 10,40 g da fração acetato de etila (FA) e 70,39 g do resíduo insolúvel (RI) (Figura 3). Alíquotas do extrato bruto e das frações FC, FA e RI foram reservadas para realização de ensaios para avaliação de suas potenciais atividades biológicas.

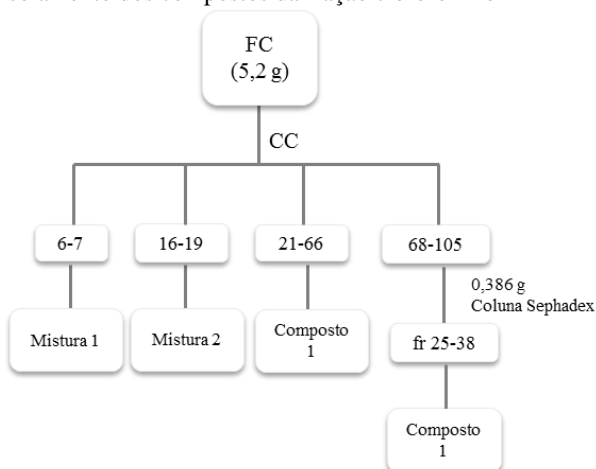
Figura 3. Extração do extrato bruto do caule de *Salacia impressifolia*



4.4 Fracionamento da fração clorofórmio

A FC (5,20 g) foi submetida à cromatografia em sílica gel, utilizando solventes de polaridade crescente. Iniciou-se a eluição com hexano 100%, aumentando gradativamente a polaridade do eluente com adição de acetato de etila e metanol, até a polaridade de 100 % de metanol. Foram coletadas 105 frações de 125 mL cada, as quais foram reunidas conforme CCD (Figura 4).

Figura 4. Isolamento dos compostos da fração clorofórmio



As frações 6-7 renderam um óleo amarelo, denominado mistura 1, o qual foi analisado através de IV e CG-EM.

As frações 16-19 foram purificadas através de recristalização em acetona rendendo um sólido branco (Mistura 2), que foi submetido às análises de IV e RMN (^1H , ^{13}C , DEPT, HMQC, HMBC e COSY) e determinação do ponto de fusão.

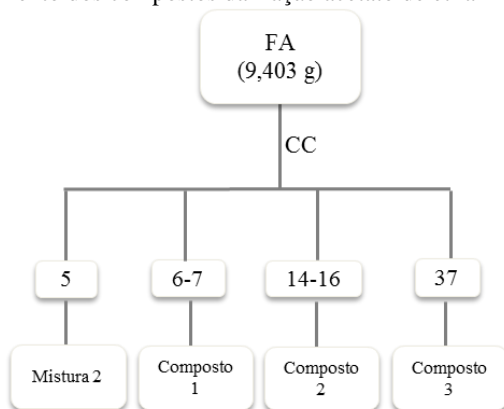
As frações 21-66 foram reunidas e recristalizadas em hexano/acetona, resultando num sólido de coloração laranja (Composto 1) que foi submetido às análises de p.f., Rf, IV, RMN uni e bidimensional e EM para elucidação estrutural.

As frações 68-105 reunidas foram submetidas à purificação por cromatografia por exclusão utilizando Sephadex LH-20 como fase estacionária e metanol:clorofórmio (75:25) como eluente, aumentando a polaridade com metanol e água, até 100 % de água. Este procedimento resultou no isolamento de um composto alaranjado, submetido às análises físicas e espectroscópicas, através das quais se observou que correspondia ao Composto 1.

4.5 Fracionamento da fração acetato de etila

A FA (9,40 g) foi submetida ao fracionamento cromatográfico em sílica gel, utilizando hexano/acetato de etila como eluente em gradientes de polaridade crescente, com posterior adição de metanol, até a polaridade de 100 % de metanol. Foram obtidas 52 frações, que foram reunidas por similaridade cromatográfica após análise por CCD (Figura 5).

Figura 5. Isolamento dos compostos da fração acetato de etila



A fração 5, após purificação em acetona, rendeu um sólido branco que, após análise de RMN de ^1H e comparação em CCD, foi denominado Mistura 2, previamente isolado a partir da FC.

A partir das frações 6-7 reunidas, obteve-se um sólido laranja, correspondente ao Composto 1, após comparação do RMN de ^1H .

As frações 14-16 foram reunidas e purificadas em acetato de etila rendendo um sólido branco (Composto 2) que foi submetido às análises de p.f., Rf, IV e RMN uni e bidimensional para sua determinação estrutural.

O Composto 3 foi isolado da fração 37 na forma de um sólido marrom, o qual teve seu ponto de fusão determinado e suas análises de RMN de ^1H e ^{13}C realizadas.

4.6 Fracionamento do resíduo insolúvel

O RI (500 mg) foi submetido à separação cromatográfica utilizando poliamida como fase estacionária. Iniciou-se a eluição com água:metanol (80:20) e diminuiu-se a polaridade com a adição de metanol e acetona, até a polaridade de acetona 100 %. Foram coletadas 54 frações, reunidas conforme similaridade cromatográfica após análise por CCD.

As frações 18-23, após procedimentos de purificação e análise cromatográfica, resultaram no Composto 3, isolado anteriormente a partir do fracionamento cromatográfico da FA.

4.7 Avaliação da atividade antioxidante

A avaliação da atividade antioxidante dos extratos, frações e compostos isolados foi realizada através de diferentes ensaios: determinação de fenólicos totais, determinação do teor de flavonoides, determinação do poder redutor e determinação da capacidade sequestradora do radical livre DPPH. Estes ensaios foram realizados no próprio Laboratório de Química de Produtos Naturais do Departamento de Química da UFSC, sob a supervisão da professora Dr^a Inês Maria Costa Brighente.

4.7.1 Determinação do teor de fenólicos totais

A quantificação dos fenólicos totais foi determinada pelo método Folin-Ciocalteu (Anagnostopoulou *et al.*, 2006) utilizando o ácido gálico como padrão de referência. Uma alíquota de 0,5 mL de cada

solução teste (extrato e frações a 1000 ppm, dissolvidos em metanol) foi misturada com 5,0 mL de água destilada e 0,5 mL do reagente de Folin-Ciocalteu. Após 3 minutos 1,0 mL de carbonato de sódio saturado foi adicionado. As soluções foram agitadas e após 1 hora as absorvâncias foram medidas a 725 nm utilizando um espectrofotômetro UV-Vis. Como branco utilizou-se uma solução preparada conforme descrito acima, porém sem a presença da solução teste. Foi construída uma curva analítica com soluções padrão de ácido gálico, nas concentrações de 25 a 500 ppm, diluídas em etanol, para comparação ($y = 5,64x + 7,79$; $r^2 = 0,999$). Todas as análises foram realizadas em triplicatas. Os resultados foram expressos em mg de ácido gálico por g de extrato ou fração seco.

4.7.2 Determinação do teor de flavonoides

O teor de flavonoides foi avaliado através do método de complexação com cloreto de alumínio ($AlCl_3$) (Woisky, 1998). Foram misturados 0,5 mL de solução teste (extrato e frações na a 1000 ppm dissolvidos em metanol), 2,5 mL de etanol e 0,5 mL de uma solução de $AlCl_3$ 2 %. Após 1 hora as absorvâncias foram medidas em espectrofotômetro a 420 nm. Foi construída uma curva de calibração com soluções padrão de quercetina nas concentrações de 1 a 100 $\mu g mL^{-1}$, diluídas em etanol, para comparação ($y = 10,36x - 9,63$; $r^2 = 0,999$). Os resultados foram expressos em mg de quercetina por g de extrato ou fração.

4.7.3. Determinação da ação sequestradora de radicais livres

A determinação da atividade antioxidante utilizando o cromóforo 2,2-difenil-1-picril hidrazil (DPPH) (Cavin *et al.*, 1998) foi efetuada pela adição de soluções metanólicas do extrato e frações a uma solução de DPPH 0,004 %. Após 30 minutos, procedeu-se a leitura a 517 nm em espectrofotômetro para obtenção da absorvância de cada solução a 100 ppm. O resultado foi expresso em termos de % de diminuição da concentração de DPPH. A análise foi feita em triplicata.

4.7.4 Determinação do potencial redutor

A avaliação do potencial redutor consistiu na adição de 8,5 mL de água deionizada a 100 μL das soluções testes (extrato bruto e frações a 1000 ppm, em metanol). Adicionou-se então 1,0 mL da solução de $FeCl_3$ 0,1 $mol L^{-1}$ e, após 3 minutos, 1,0 mL da solução de ferricianeto de

potássio $0,08 \text{ mol L}^{-1}$. Após 15 minutos, realizou-se a leitura da absorbância da solução a 720 nm (Price *et al.*, 1977; Waterman *et al.*, 1994). Foi construída uma curva de calibração com soluções padrão de ácido ascórbico nas concentrações de 100 a 1000 ppm, diluídas em etanol, para comparação ($y = 2,43x + 1,94$; $r^2 = 0,999$). Todos os testes foram realizados em triplicata. O potencial redutor foi determinado em equivalentes de ácido ascórbico, ou seja, mg de ácido ascórbico por g de amostra.

4.8 Ação inibitória da acetilcolinesterase

O bioensaio de inibição da acetilcolinesterase foi realizado em nosso laboratório (LQNP) sob a supervisão da professora Dra. Inês Maria Costa Brighente, conforme descrito por Mata e colaboradores (Mata *et al.*, 2007) com modificações.

A amostra dissolvida em metanol (1 mg mL^{-1}) foi adicionada ao tampão tris-HCl 50 mmol L^{-1} pH = 8 em uma cubeta, seguida da adição da enzima acetilcolinesterase. Após 15 minutos, acrescentou-se iodeto de acetiltiocolina e o reagente de Ellman. A leitura em espectrofotômetro UV-Vis a 405 nm foi efetuada após 30 minutos. Como controle positivo utilizou-se a galantamina, do fármaco comercial Reminyl ($0,01 \text{ mg mL}^{-1}$) e como controle negativo utilizou-se metanol, onde a atividade enzimática foi considerada 100%. Na referência foram utilizados todos os reagentes exceto a enzima.

Os resultados dos ensaios foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e teste de Fisher para múltiplas comparações fixando-se $p < 0,05$ para indicar diferença significativa.

4.9 Avaliação da atividade anti-hiperglicêmica

A avaliação da atividade anti-hiperglicêmica do extrato bruto foi efetuada através dos ensaios *in vivo* de teste oral de tolerância à glicose e atividade das dissacaridases, realizados no Laboratório de Hormônios & Transdução de Sinais do Departamento de Bioquímica da UFSC, sob supervisão da professora Dra. Fátima R. M. B. Silva.

4.9.1 Teste oral de tolerância à glicose

Ratos em jejum foram divididos em diferentes grupos de seis animais cada. Grupo I, ratos hiperglicêmicos que receberam glicose (4 g

kg^{-1} , 8,9 M); Grupo II, ratos que receberam doses do EB. A glicemia foi medida antes de os ratos receberem o tratamento (tempo zero). Os ratos foram alimentados com o extrato (dissolvido em água) e depois de 30 minutos foram administrados com glicose (4g kg^{-1} , 8,9 M) por via oral. A glicemia foi medida a 15, 30, 60 e 180 minutos após a administração de glicose. Todos os tratamentos foram administrados por gavagem.

4.9.2 Extração das dissacaridases e ensaios

Um segmento do intestino delgado de ratos foi removido, lavado em solução de NaCl a 0,9 %, seco em papel de filtro, pesado, cortado e homogeneizado (300 rpm) com NaCl a 0,9% (400 mg de duodeno por mL) durante 1 min a 4 °C. O homogenato resultante foi centrifugado a $8000 \times g$ durante 8 minutos e o sobrenadante foi recolhido. O sobrenadante foi usado para a medição das atividades *in vitro* da maltase, sacarase e lactase e para determinação de proteína total. As atividades da maltase, lactase e sucrase foram determinadas utilizando um kit de diagnóstico de glicose baseado no reagente de glicose oxidase. Para a determinação da atividade de dissacaridases 50 μL de sobrenadante foram pré-incubados a 37 ° C durante 5 minutos, na ausência (controle) ou na presença do EB (grupo tratado). Os sobrenadantes foram então incubados a 37 °C durante 5 min com 25 mL de substrato correspondente a 0,056 mmol L^{-1} de maltose, sacarose ou lactose (Pereira *et al.*, 2011). Uma unidade de enzima (U) foi definida como a quantidade de enzima que catalisou a liberação de 1 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de glicose por minuto nas condições do ensaio. A atividade específica foi definida como a atividade da enzima (U) por mg de proteína. A concentração de proteína foi determinada utilizando albumina do soro bovino (BSA) como padrão (Lowry *et al.*, 1951). Os ensaios foram realizados em duplicata e conduzidos juntamente com os controles apropriados.

4.9.3 Análise estatística

Os resultados foram expressos como a média \pm E.P.M. As comparações estatísticas foram realizadas através da análise de variância de uma via (ANOVA) seguida pelo pós-teste de Bonferroni ou teste “t” de Student para identificar diferenças significativas entre grupos utilizando o software Graphpad Prism (versão 3.0). As diferenças encontradas foram consideradas estatisticamente significativas para um “p” igual ou menor que 0,05.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Análise fitoquímica

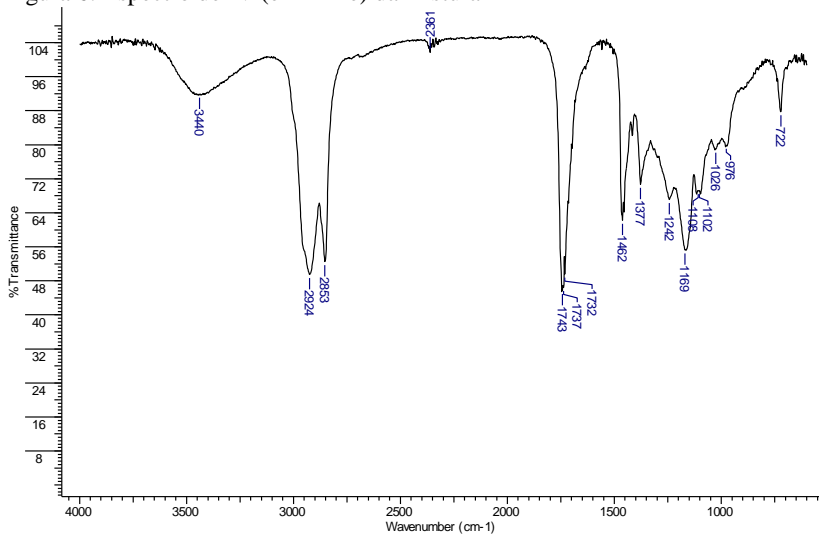
O interesse em desenvolver este estudo ocorreu devido ao potencial biológico das espécies do gênero *Salacia* e aos poucos trabalhos referentes à espécie *Salacia impressifolia*. Iniciou-se o trabalho com a obtenção do extrato bruto hidroalcolólico através da maceração em etanol durante sete dias, por três vezes, do caule seco e moído (2,0 kg). Obtiveram-se 107,0 g de EB (5,35% m/m), dos quais 102,0 g foram submetidos à extração sólido-líquido com clorofórmio e acetato de etila, resultando nas frações: clorofórmio (FC), acetato de etila (FA) e resíduo insolúvel (RI), com os respectivos rendimentos em relação ao caule seco: 0,40%; 0,52% e 3,5% (m/m).

As frações foram submetidas a fracionamentos cromatográficos a fim de isolar os metabólitos secundários, os quais foram caracterizados através de suas propriedades físicas (ponto de fusão e fator de retenção cromatográfica) e espectroscópicas (IV, EM e RMN uni e bidimensional).

5.1.1 Mistura 1

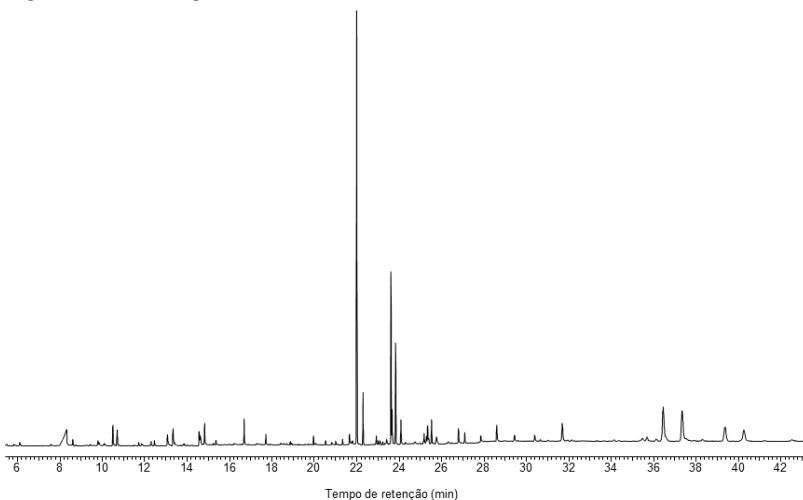
Um óleo amarelo (425 mg) foi obtido a partir da separação cromatográfica em sílica gel da fração clorofórmio. A análise através de espectrofotometria de infravermelho (em filme) (Figura 6) apontou a presença de duas bandas intensas em 2924 cm^{-1} e 2853 cm^{-1} referentes a ligações C-H alifáticas atribuídas a uma grande cadeia carbônica. A observação de intensas bandas de absorção em 1743 cm^{-1} , 1737 cm^{-1} e 1732 cm^{-1} correspondentes a carbonilas de éster e o grupo de deformações angulares, juntamente com a intensa absorção de estiramento C-H alifático e a presença da banda de estiramento da ligação C-O em 1169 cm^{-1} (Figura 6), sugere se tratar de uma mistura de ésteres de ácidos graxos. A fraca banda de absorção em 3440 cm^{-1} , para O-H, pode corresponder a algum resíduo de água na amostra ou devido a componentes minoritários.

Figura 6. Espectro de IV (em filme) da mistura 1



A fim de obter maiores informações com respeito à composição do óleo, este foi analisado através da técnica de CG-EM. O cromatograma (Figura 7) apresentou uma composição complexa, tendo ácidos graxos como componentes majoritários.

Figura 7. Cromatograma de íons totais da mistura 1



A análise quantitativa dos componentes da mistura 1 foi realizada através das áreas relativas dos picos do cromatograma. A identificação dos constituintes foi baseada na biblioteca NIST[®] 98 em conjunto com a análise dos espectros de massa (Anexo Figura 41) e comparação com a literatura (Adams, 1995; Mass Spectra) (Tabela 2).

Pode-se observar que o composto majoritário é o éster hexadecanoato de etila [119], representando 16,73 % do óleo total. A maioria dos compostos identificados são ésteres graxos, corroborando com as informações obtidas a partir do espectro de IV. Também foi possível identificar ácidos graxos, aldeídos graxos e álcoois graxos, além do esteroide estigmasta-3,5-dien-7-ona [120] e dos triterpenos acetato de lupeol [121], β -amirenona [57] e friedelan-3-ona [24], dos quais os dois últimos já foram encontrados no gênero (Corsino *et al.*, 2000; Hisham *et al.*, 1995; Morikawa *et al.*, 2003). A Tabela 2 apresenta os compostos identificados neste óleo e sua abundância relativa.

Tabela 2. Compostos, tempo de retenção e porcentagem relativa dos constituintes da mistura 1 (continua)

	Composto	TR (min)	% Rel
[122]	ácido hexanoico	8,334	4,29
[123]	octanal	8,619	0,39
[124]	4,5-dimetil-2-hepten-3-ol	10,508	0,99
[125]	nonanal	10,699	0,86
[126]	octanoato de etila	12,309	0,34
-	NI	12,463	0,36
[127]	cicloundecanona	13,086	0,76
[128]	<i>trans</i> -2-decenal	13,349	1,14
-	NI	14,579	0,87
[129]	2-undecenal	14,828	1,03
-	NI	15,355	0,33
[130]	9-oxo-nonanoato de etila	16,673	1,26
[131]	dodecanoato de etila	17,720	0,65
[132]	tetradecanoato de etila	19,954	0,47
[133]	6,10,14-trimetil-2-pentadecanona	20,510	0,30
[134]	etil-13-metil-tetradecanoato	20,986	0,31
[135]	hexadecanoato de metila	21,316	0,37
[136]	ácido n-hexadecanoico	21,645	0,82
[119]	hexadecanoato de etila	21,982	16,73

TR: tempo de retenção; %REL: porcentagem relativa; NI: não identificado

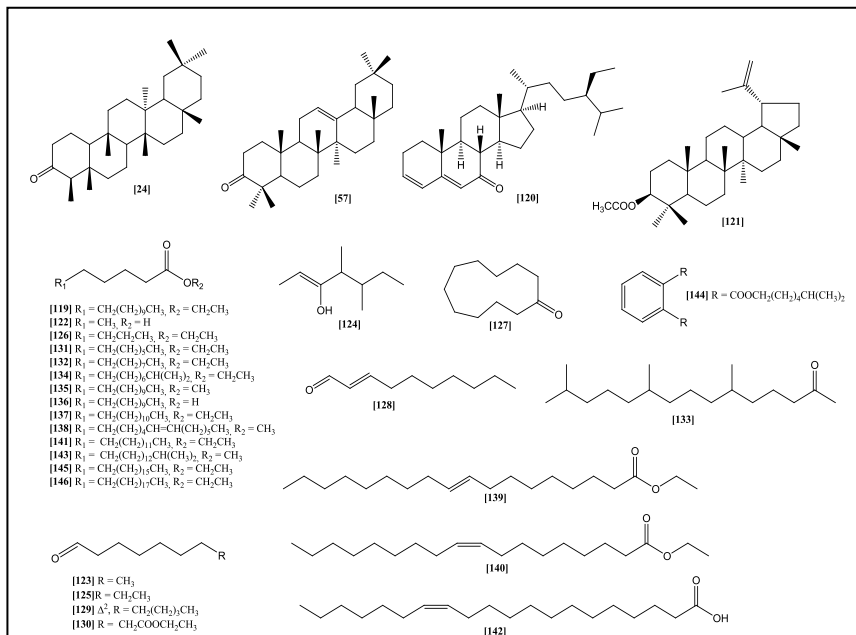
Tabela 2. Compostos, tempo de retenção e porcentagem relativa dos constituintes da mistura 1 (conclusão)

	Composto	TR (min)	% Rel
-	NI	22,282	2,14
[137]	heptadecanoato de etila	22,919	0,52
[138]	11-octadecenoato de metila	23,007	0,36
-	NI	23,102	0,35
-	NI	23,410	0,55
[139]	<i>trans</i> -9-octadecenoato de etila	23,615	6,57
[140]	<i>cis</i> -9-octadecenoato de etila	23,666	1,56
[141]	octadecanoato de etila	23,827	4,17
-	NI	24,076	1,28
-	NI	25,167	0,81
[142]	ácido <i>cis</i> -13-eicosenoico	25,335	1,50
[143]	19-metil-eicosanoato de metila	25,526	1,26
-	NI	25,775	0,83
[144]	diisocetil ftalato	26,814	1,08
[145]	docosanoato de etila	27,100	0,94
-	NI	27,847	1,28
[146]	tetracosanoato de etila	28,594	1,99
-	NI	29,428	0,85
-	NI	30,402	1,09
-	NI	30,673	0,86
-	NI	31,698	2,35
-	NI	34,122	1,43
-	NI	35,469	1,88
[57]	β -amirenona	35,689	2,09
-	NI	36,121	1,59
-	NI	36,443	7,17
[120]	estigmasta-3,5-dien-7-ona	37,314	6,78
-	NI	38,288	1,35
[121]	acetato de lupeol	39,357	4,70
[24]	friedelan-3-ona	40,257	5,48
-	NI	42,527	2,41

TR: tempo de retenção; %REL: porcentagem relativa; NI: não identificado

As estruturas dos compostos identificados são apresentadas na Figura 8.

Figura 8. Estrutura dos compostos identificados na mistura 1

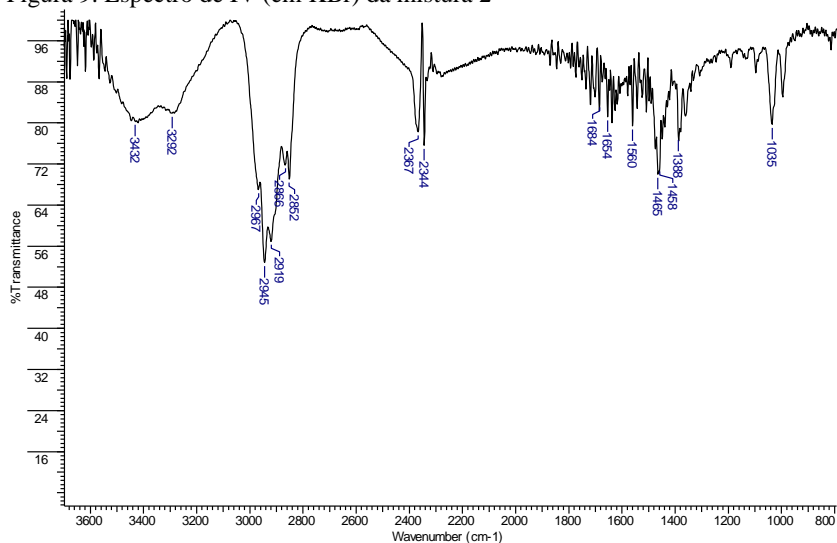


5.1.2 Mistura 2

Os fracionamentos cromatográficos das FC e FA resultaram no isolamento de 22 mg e 6 mg, respectivamente, de um sólido branco que apresentou uma faixa de fusão entre 188,5 e 192,7 °C.

O perfil de absorção do espectro de IV (Figura 9) sugeriu uma estrutura triterpênica ou esteroidal. Esta proposta está fundamentada na presença de dois grupos distintos de absorção de alta intensidade devido aos estiramentos C-H alifáticos em 2967, 2945, 2919 cm^{-1} e 2866, 2852 cm^{-1} , que são característicos de uma grande cadeia carbônica não linear e cíclica. O espectro apresentou duas bandas de absorção referentes a estiramentos de ligação O-H em 3432 cm^{-1} e 3292 cm^{-1} , além de uma banda típica de ligação C-O em 1035 cm^{-1} .

Figura 9. Espectro de IV (em KBr) da mistura 2



O espectro de RMN de ^1H (Figura 10) apresentou uma grande quantidade de sinais na região de campo alto, entre 0,7 e 2,1 ppm, característica de uma estrutura triterpênica. Nesta região pode-se observar claramente um grupo de oito metilas simpleto em 0,80; 0,84; 0,88 (2CH_3); 0,94; 0,97; 1,00; e 1,14 ppm, que indica uma estrutura triterpênica de esqueleto oleanano.

O duplo duplete centrado em 3,22 ppm ($J_{\text{ax-ax}} = 10,9$ Hz e $J_{\text{ax-eq}} = 4,7$ Hz) (Figura 11) foi atribuído ao sinal do hidrogênio ligado ao C-3 oxigenado. A estereoquímica relativa do grupo OH em C-3 pode ser deduzida através das constantes de acoplamento do H-3, que mostra acoplamentos ax-ax e ax-eq com os átomos de H do C-2, indicando que o grupo OH está equatorialmente orientado, portanto o C-3 é β -hidroxilado. Também se pode observar a presença de uma ligação dupla endocíclica trissubstituída através da absorção em 5,19 ppm na forma de um tripleto com constante de acoplamento $J = 3,5$ Hz.

A observação de dois tripletos centrados em 5,19 ppm, de maior intensidade, e 5,13 ppm (Figura 11), de menor intensidade, típicos de dupla ligação trissubstituída de triterpenos, sugere tratar-se de uma mistura de compostos. Através da integração relativa destes dois sinais, foi possível estimar a proporção relativas dos dois triterpenos como sendo de 83:17.

Figura 10. Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) da mistura 2

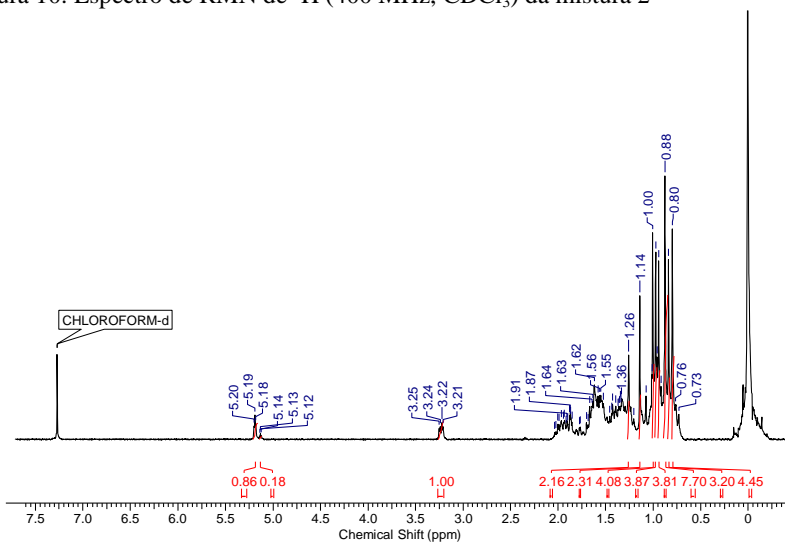
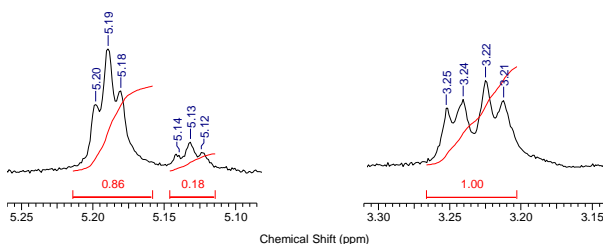


Figura 11. Ampliação do espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) na região de 3,15-3,30 e 5,10-5,25 ppm para a mistura 2



O espectro de RMN de ^{13}C (Figura 12) também apresentou um perfil típico de triterpenos, com mais de trinta sinais, corroborando com a hipótese de uma mistura de triterpenos. Os sinais em 145,2 e 121,7 ppm, para o composto majoritário, e em 140,0 e 124,4 ppm, para o composto minoritário, foram atribuídos aos carbonos olefínicos C-13 e C-12, que de acordo com dados da literatura são característicos dos esqueletos olean-12-eno e urs-12-eno (Olea *et al.*, 1990) (Figura 13). Foi possível distinguir o sinal em 124,4 ppm através da observação da correlação, no mapa de correlação HMQC (Anexo Figura 42), com o

sinal de hidrogênio centrado em 5,13 ppm. A presença do grupo OH em C-3 é confirmada pelo sinal em 79,0 ppm.

Figura 12. Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) da mistura 2

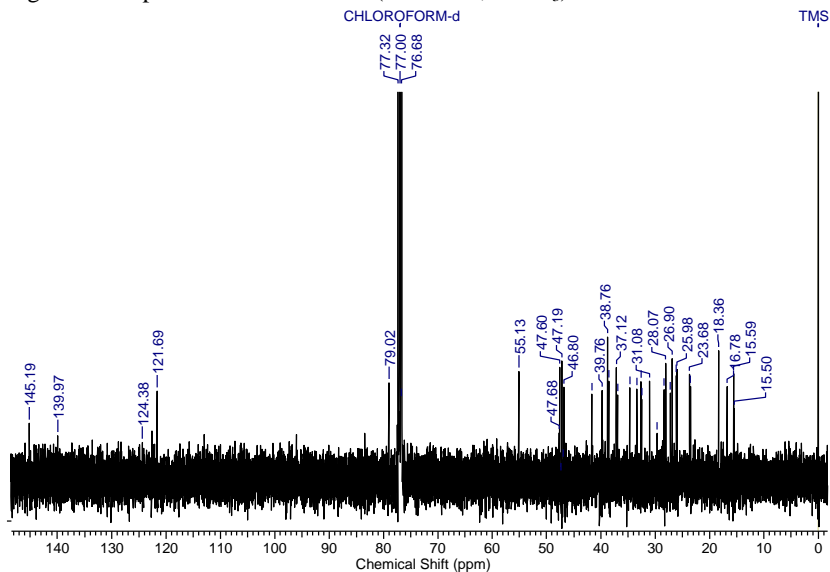
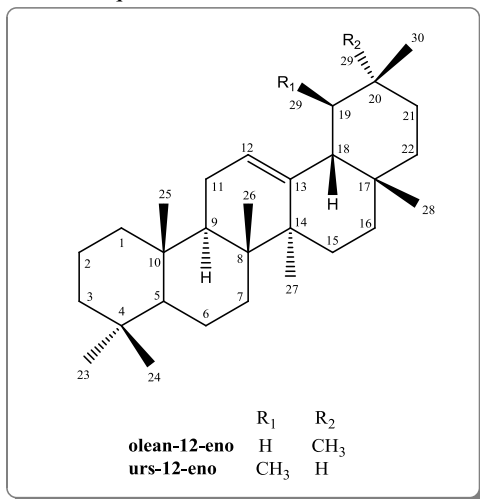


Figura 13. Estrutura dos esqueletos olean-12-eno e urs-12-eno



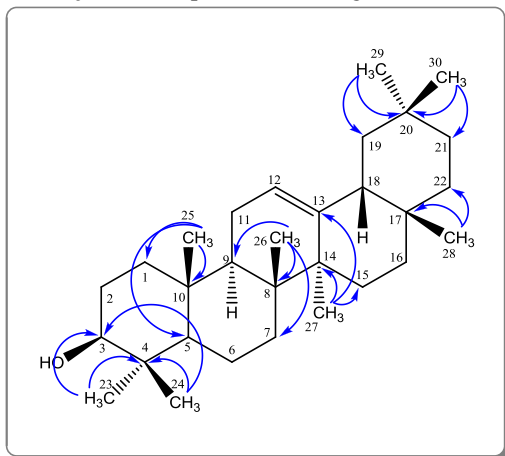
Através do mapa de correlação heteronuclear HMQC (1J) (Anexo Figura 42), que correlaciona núcleos de hidrogênio e núcleos de carbono diretamente ligados, verificou-se que o hidrogênio em 3,22 ppm está ligado ao C-3 (79,0 ppm). O sinal centrado em 0,88 ppm corresponde a duas metilas, confirmadas através da correlação com os sinais de carbono em 33,3 e 23,7 ppm. Os átomos de hidrogênio olefínico dos grupos olean-12-eno e urs-12-eno, centrados em 5,19 ppm e 5,13 ppm, apresentaram correlação com C-12 em 121,7 ppm e 124,4 ppm, respectivamente.

No espectro de DEPT (Anexo Figura 43), em relação ao triterpeno majoritário, observou-se a presença de cinco grupos metínicos (CH), nove grupos metilênicos (CH₂) e oito metilas (CH₃) que está de acordo com a proposta de um triterpeno oleanano com hidroxilação em C-3 e uma dupla endocíclica trissubstituída.

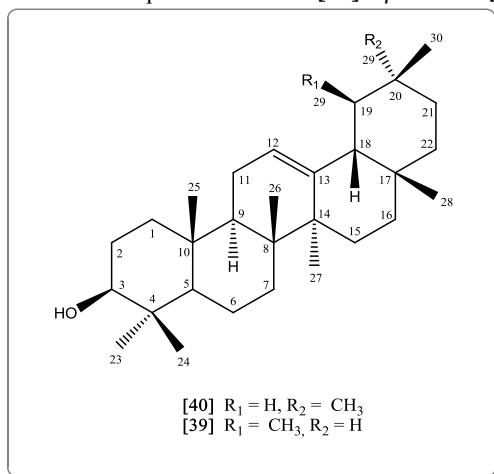
A análise conjunta dos mapas de correlação HMQC, HMBC (Anexo Figura 44) e COSY (Anexo Figura 45), permitiu a atribuição dos deslocamentos químicos para os átomos de hidrogênio e carbono do triterpeno majoritário, que estão sumarizados na Tabela 3. Conforme observado no HMBC, o C-3 (79,0 ppm) apresentou correlação com os átomos de hidrogênio em 1,00 e 0,80 ppm, referentes às metilas C-23 e C-24, respectivamente. O acoplamento 2J do hidrogênio em 0,94 ppm (CH₃, 15,5 ppm) com o carbono C-10 (36,9 ppm) e 3J com os átomos de carbono C-1 (38,6 ppm), C-5 (55,1 ppm) e C-9 (47,6 ppm) permitiu a sua atribuição como CH₃-25. Os átomos de hidrogênio em 0,97 (CH₃, 16,8 ppm) foram atribuídos como CH₃-26 devido ao seu acoplamento 2J com o carbono C-8 (39,8 ppm) e 3J com os átomos de carbono C-9 (47,6 ppm) e C-7 (32,6 ppm). O acoplamento dos átomos de hidrogênio em 1,14 ppm (CH₃, 26,0 ppm) com os átomos de carbono C-13 (145,2 ppm), C-14 (41,7 ppm) e C-15 (26,1 ppm) permitiu sua atribuição como CH₃-27; a atribuição dos átomos de hidrogênio em 0,84 (CH₃, 28,4 ppm) como CH₃-28 também foi possível através da presença de acoplamento 2J com C-17 (32,5 ppm) e 3J com C-18 (47,2 ppm) e C-22 (37,1 ppm). O átomo de carbono C-20 (31,1 ppm) apresentou acoplamento a longa distância com os átomos de hidrogênio em 0,88 ppm, correspondentes às metilas geminais C-29 e C-30.

A Figura 14 ilustra os principais acoplamentos entre os núcleos de carbono e hidrogênio observados no mapa de correlação HMBC.

Figura 14. Representação dos acoplamentos a longa distância (HMBC)



A comparação dos deslocamentos químicos dos espectros de RMN de ^{13}C e ^1H da mistura com os registrados na literatura (Dias *et al.*, 2011) juntamente com a análise dos espectros de correlação indicou que os dois compostos presentes são a β -amirina [40] (majoritário) e α -amirina [39] (Figura 15). A presença dos dois triterpenos corrobora com relatos da literatura que reportam a obtenção de α e β -amirina a partir do caule de *Salacia impressifolia* (Rocha *et al.*, 2000).

Figura 15. Estrutura dos triterpenos α -amirina [39] e β -amirina [40]

Confirmando essa proposta, a análise de CG-EM (Figura 16) apresentou dois picos com tempo de retenção de 36,25 min (β -amirina) e 37,11 min (α -amirina), de proporção 83:17, de acordo com o que foi deduzido através das integração dos átomos de hidrogênio H-12 no espectro de RMN de ^1H . Os espectros de massa obtidos (Figura 17 e Figura 18) apresentaram o pico referente ao íon molecular m/z 426, além do pico base m/z 218, oriundo da fragmentação do tipo retro Diels-Alder do anel C típica de esqueletos ursano e oleanano (Ogunkoya, 1981) (Figura 19). Em adição, observa-se o fragmento em m/z 203 mais proeminente para β -amirina devido a maior facilidade de perda de metila quaternária a partir do fragmento m/z 218.

Figura 16. Cromatograma da mistura 2 obtido por CG-EM

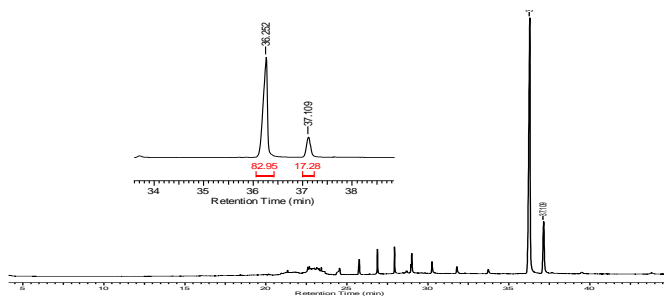


Figura 17. Espectro de massas do triterpeno β -amirina

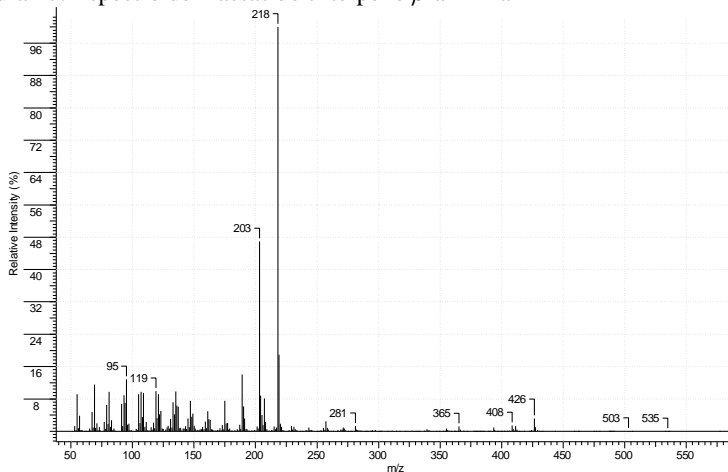


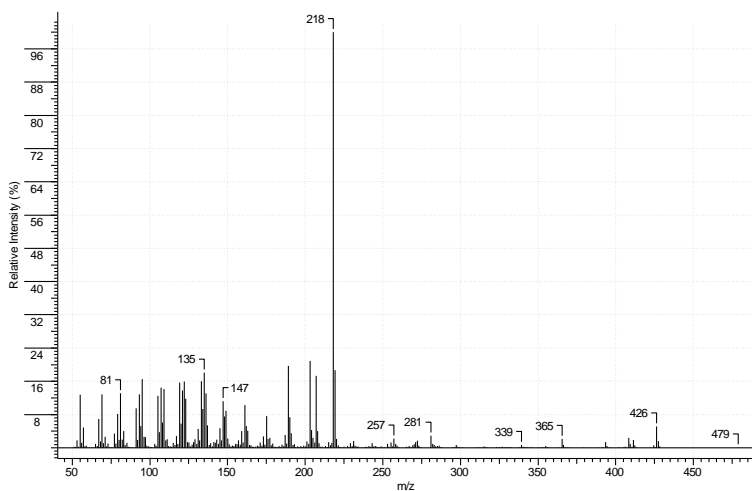
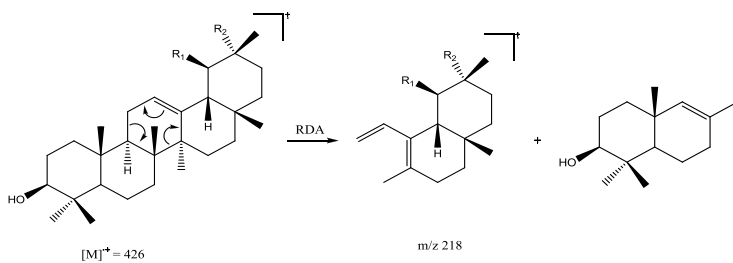
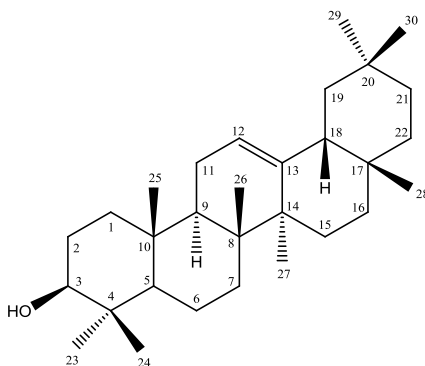
Figura 18. Espectro de massas do triterpeno α -amirinaFigura 19. Fragmentação do tipo retro Diels-Alder do anel C de α -amirina ($R_1 = \text{CH}_3$ e $R_2 = \text{H}$) e β -amirina ($R_1 = \text{H}$ e $R_2 = \text{CH}_3$) (Giese, 2005)

Tabela 3. Dados espectrométricos de RMN de ^1H (400 MHz) e ^{13}C (100 MHz) em CDCl_3 do composto majoritário β -amirina e comparação com os deslocamentos de RMN de ^{13}C encontrados na literatura (continua)



Carbono	β -amirina (Dias <i>et al.</i> , 2011) δ_{C} (ppm)	β -amirina Experimental δ_{C} (ppm)	^1H - ^{13}C - HMQC- J_{CH} (ppm)	DEPT	H-H COSY	^1H - ^{13}C - HMBC
1	38,7	38,6	1,64; 0,98	CH_2	0,98 1,62; 1,64	0,94
2	27,2	27,2	1,62	CH_2	3,22; 0,98	-
3	79,3	79,0	3,22 <i>dd</i> , $J = 10,9$ Hz e $J = 4,7$ Hz	CH	1,62	1,00; 0,80
4	38,5	38,8	-	C	-	1,00; 0,80
5	55,1	55,1	0,75 <i>d</i> , $J = 11,3$ Hz	CH	1,41	1,00; 0,94; 0,80;
6	18,6	18,4	1,56; 1,41	CH_2	1,35 0,75	0,75
7	32,4	32,6	1,35	CH_2	1,56	0,97
8	39,8	39,8	-	C	-	1,14; 0,97
9	47,6	47,6	1,55	CH	1,35; 1,88	0,94; 0,97

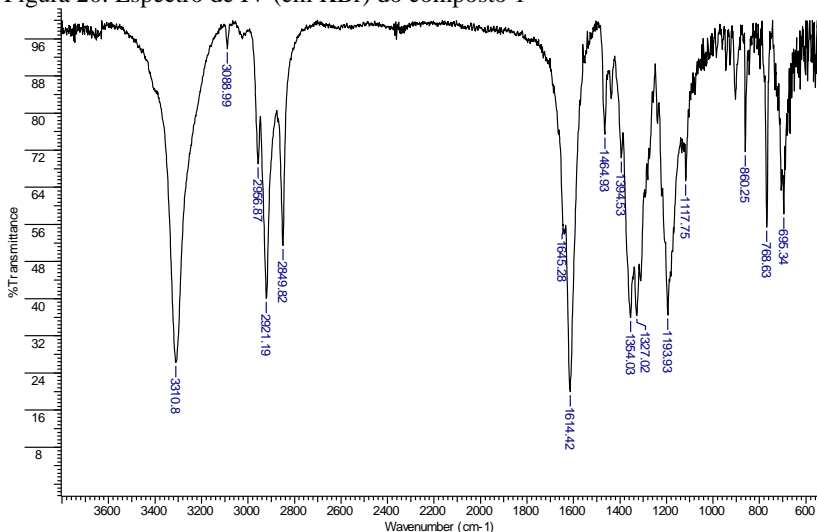
Tabela 3. Dados espectrométricos de RMN de ^1H (400 MHz) e ^{13}C (100 MHz) em CDCl_3 do composto majoritário β -amirina e comparação com os deslocamentos de RMN de ^{13}C encontrados na literatura (conclusão)

Carbono	β -amirina (Dias <i>et al.</i> , 2011) δ_{C} (ppm)	β -amirina Experimental δ_{C} (ppm)	^1H - ^{13}C – HMQC- $^1J_{\text{CH}}$ (ppm)	DEPT	H-H COSY	^1H - ^{13}C – HMBC
10	36,9	36,9	-	C	-	0,94
11	23,6	23,5	1,88	CH_2	5,19; 1,55	-
12	121,7	121,7	5,19 <i>t, J = 3,5 Hz</i>	CH	1,88	-
13	145,2	145,2	-	C	-	1,14
14	41,7	41,7	-	C	-	1,14; 0,97
15	26,2	26,1	1,17	CH_2	-	1,14
16	26,1	26,9	2,00; 0,81	CH_2	-	0,84
17	32,6	32,5	-	C	-	0,84
18	47,2	47,2	1,97	CH	1,01; 1,67	0,84
19	46,8	46,8	1,67; 1,01	CH_2	1,97; 1,01	0,88
20	31,0	31,1	-	C	-	0,88
21	34,7	34,7	1,13	CH_2	-	0,88
22	37,1	37,1	1,20 1,26	CH_2	-	0,84
23	28,0	28,1	1,00	CH_3	0,80	0,80
24	15,4	15,6	0,80	CH_3	1,00	1,00; 0,75
25	15,4	15,5	0,94	CH_3	-	-
26	16,8	16,8	0,97	CH_3	-	-
27	25,9	26,0	1,14	CH_3	-	-
28	28,4	28,4	0,84	CH_3	-	-
29	33,8	33,3	0,88	CH_3	-	0,88
30	23,7	23,7	0,88	CH_3	-	1,67; 0,88

5.1.3 Composto 1

O composto 1 foi isolado na forma de cristais escamosos de uma fraca coloração alaranjado brilhante, p.f. 124,0 – 127,4°C e Rf 0,54 (Hex:AcoEt:Ácido acético 50:50:1) a partir do fracionamento da fração clorofórmio (sub frações 21-66 e 68-105 (subfrações 25-38)) e acetato de etila (subfrações 6-7 (80 mg)). Foi o composto majoritário na fração clorofórmio, rendendo 1,346 g. O espectro de IV (Figura 20) apresentou uma fina e intensa banda de estiramento da ligação O-H em 3311 cm⁻¹, duas intensas e finas bandas de absorção em 2850 e 2921 cm⁻¹ características de estiramento de ligação C-H alifático de cadeia linear, uma banda de absorção fina e de baixa intensidade em 3089 cm⁻¹ atribuída ao estiramento da ligação C-H olefínica, uma intensa e fina banda de absorção para estiramento C=C em 1614 cm⁻¹, uma banda de absorção observada na região de 1194 cm⁻¹ atribuída ao estiramento de ligação C-O e demais absorções referente a deformações angulares.

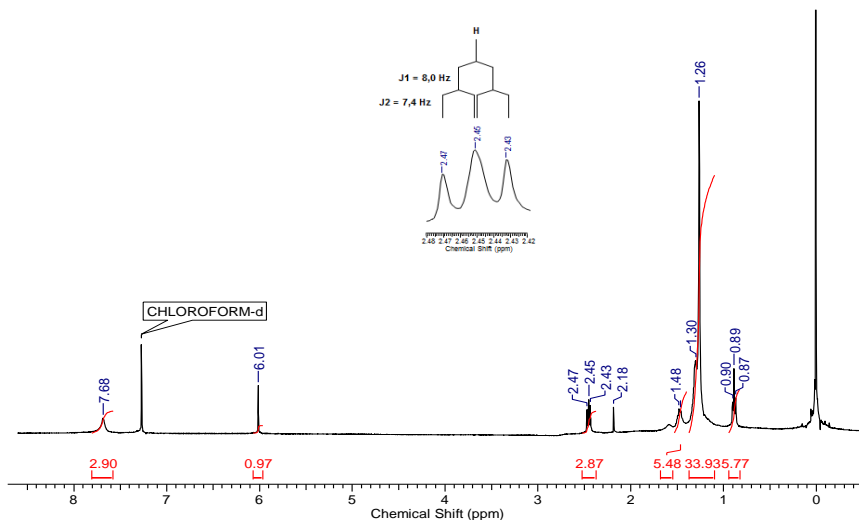
Figura 20. Espectro de IV (em KBr) do composto 1



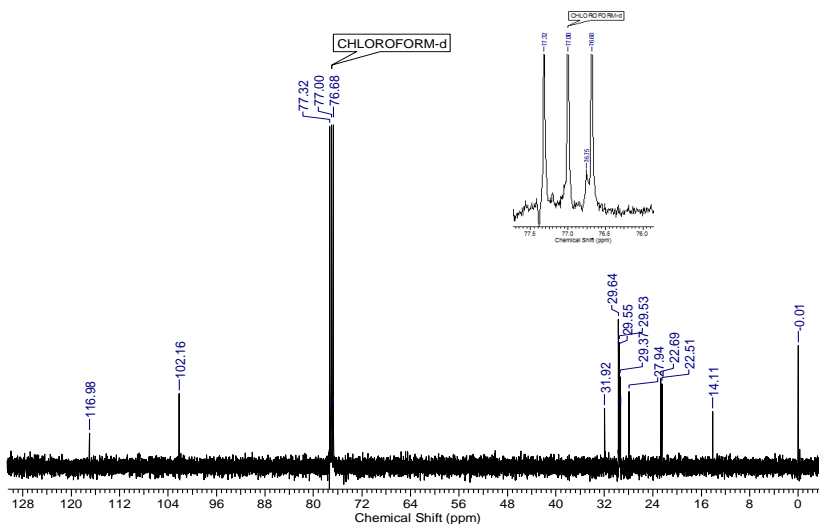
O espectro de RMN de ¹H (Figura 21) apresentou um sinal intenso em 1,26 ppm que juntamente com o triplete em 0,89 ppm (*J* = 6,5 Hz) com integração para seis átomos de H e os sinais em 1,30 e 1,48 ppm indicam a presença de duas cadeias hidrocarbonadas lineares. Em 6,01 ppm observou-se um simpleto correspondente a um átomo de

hidrogênio ligado a carbono sp^2 sugerindo a presença de ligação dupla trissubstituída. O duplo duplete centrado em 2,45 ppm ($J = 8,0$ e $7,4$ Hz) foi atribuído aos átomos de hidrogênio de um CH_2 alfa à ligação dupla. O sinal largo em 7,68 ppm, foi atribuído à presença de grupo hidroxí.

Figura 21. Espectro de RMN de 1H (400 MHz, $CDCl_3$) do composto 1

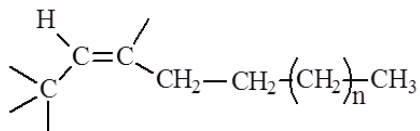


O RMN de ^{13}C (Figura 22) apresentou dezesseis sinais. Os sinais em 117,0 ppm (C) e 102,2 (CH) ppm foram atribuídos à ligação dupla trissubstituída, que foi confirmada pela análise do mapa de correlação HMQC (Anexo Figura 46) mostrando acoplamento entre o carbono a 102,2 ppm e o hidrogênio em 6,01 ppm. O sinal em 76,7 ppm indicou a presença de carbono terciário ligado à hidroxila, confirmado pelo DEPT (Anexo Figura 47). O sinal em 14,1 ppm foi atribuído a carbono metílico e os sinais entre 22,5 e 31,9 ppm, juntamente com os intensos sinais em 29,6; 29,5 e 29,5 ppm, corroboram para a presença de longa cadeia hidrocarbonada linear.

Figura 22. Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) do composto 1

O mapa de correlação HMQC (Anexo Figura 46) mostra as correlações direta dos átomos de H em 0,89 ppm com o carbono em 14,1 ppm; H em 2,45 ppm com C a 22,5 ppm, H a 1,48 ppm e C a 27,9, e o sinal de H em 1,26 ppm com os demais átomos de carbono CH_2 . O mapa de correlação HMBC (Anexo Figura 48) mostra as correlações entre o sinal em 0,89 ppm, que foi atribuído a dois grupos CH_3 , com os átomos de carbono CH_2 em 22,7 ppm e 31,9 ppm, corroborando com a hipótese de duas cadeias hidrocarbonadas lineares. Os átomos de H atribuídos ao grupo CH_2 alílico em 2,45 ppm, correlacionam com os carbonos em 27,9 ppm (CH_2) e 117,0 ppm (C). Por outro lado, no mapa de correlação COSY (Anexo Figura 49) são observados os acoplamentos entre os átomos de hidrogênio em 2,45 ppm e 1,48 ppm, e este com o sinal em 1,26 ppm, que juntamente com a correlação entre as metilas em 0,89 ppm com os CH_2 em 1,26 ppm, permitiu deduzir a unidade estrutural “A” (Figura 23).

Figura 23. Unidade estrutural “A”



Na análise de EM com ionização por *electrospray* (Figura 24) em modo negativo pode-se observar a presença do íon quasimolecular $[M-H]^-$ de razão massa carga m/z 321,198 e o fragmento $[M-H]-28$ a m/z 293,169. Assumindo uma massa molar de 322,198 para o Composto 2 correspondente à fórmula molecular $C_{22}H_{42}O$ (calculado $M=322,323$) com duas insaturações, sendo uma ligação dupla e um ciclo. Como resultado desta análise foi possível propor a estrutura (Figura 25) para o composto MC21-66, onde “ $n + m$ ” = 10 CH_2 .

Figura 24. Espectros de massa do composto 1

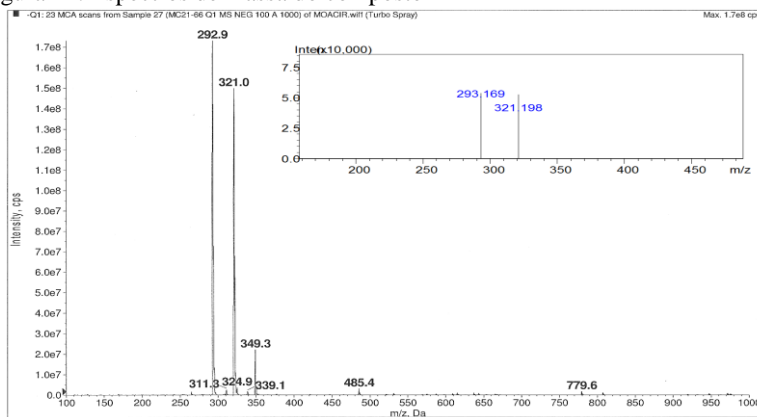
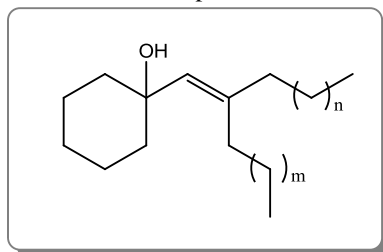


Figura 25. Proposta da estrutura do composto 1



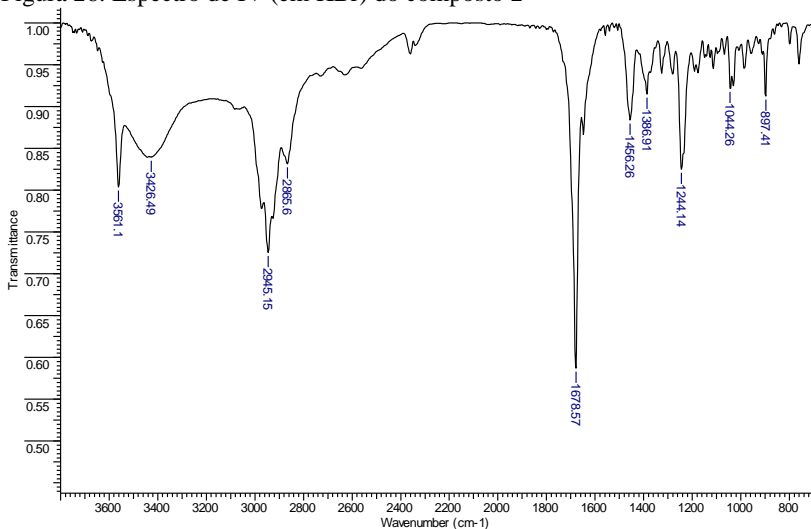
A fim de obter maiores informações com relação à estrutura do composto, pretende-se realizar outras análises, tais como espectrometria de RMN de alta resolução e difratometria de Raios X.

5.1.4 Composto 2

O fracionamento cromatográfico da fração acetato de etila resultou no isolamento de um sólido branco (24 mg) de p.f. 318,8 - 320,3 °C e Rf 0,66 (Hex:AcoEt:ácido acético 75:25:1).

O espectro de IV (Figura 26) apresentou intensas bandas de absorção com máximos em 2945 e 2865 cm^{-1} características de estiramentos C-H alifáticos de cadeia carbônica não linear e cíclica, bandas em 3561 e 3426 cm^{-1} características da ligação O-H, absorção em 1678 cm^{-1} referente ao estiramento de carbonila de ácido carboxílico, absorção em 1244 cm^{-1} própria de estiramento C-O e demais deformações angulares.

Figura 26. Espectro de IV (em KBr) do composto 2

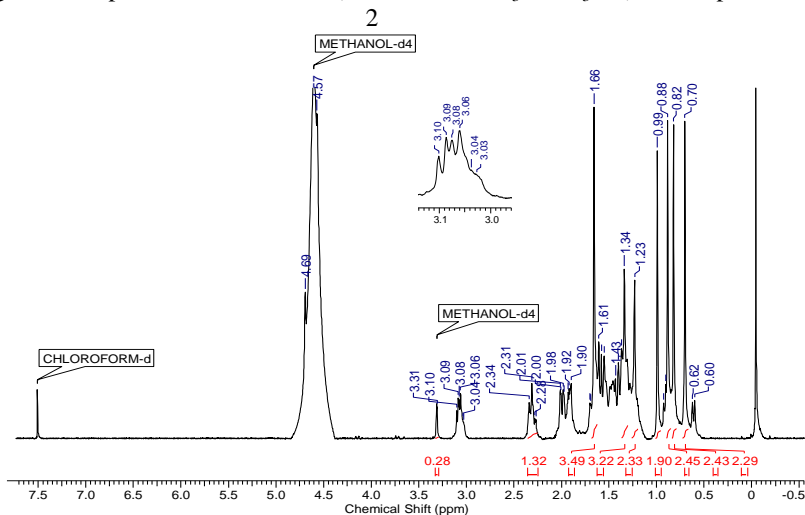


O espectro de massa ESI-IT-ToF (Anexo Figura 50) apresentou o íon quasimolecular $[M-H]^-$ m/z 485,309, sugerindo que o composto apresenta uma massa molar de 486,309 e fórmula molecular $C_{30}H_{46}O_5$.

O espectro de RMN de 1H (Figura 27) apresentou uma grande quantidade de sinais entre 0,6 e 2,3 ppm, correspondentes a hidrogênios alifáticos, típicos de substâncias esteroidais ou triterpênicas. Foram observados cinco simples em 0,70, 0,82, 0,88, 0,99 e 1,66 ppm atribuídos a cinco grupos metila. Outro sinal característico é o duplo duplete centrado em 3,08 ppm ($J_{ax-ax} = 10,4$ Hz e $J_{ax-eq} = 4,1$ Hz), pertencente ao hidrogênio ligado ao C-3 oxigenado. O H-3 apresentou

acoplamentos axial-axial e axial-equatorial com os átomos de H-2, indicando que o grupo hidroxila está em posição equatorial; portanto o C-3 é β -hidroxilado. Em 4,57 e 4,69 ppm observaram-se dois simples topos típicos de um grupo metileno terminal de triterpenos com esqueleto lupano (Magina, 2008).

Figura 27. Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, $\text{CDCl}_3 + \text{CD}_3\text{OD}$) do composto



A partir da análise do espectro de RMN de ^{13}C (Figura 28) foi possível observar os sinais referentes a trinta átomos de carbono, corroborando com a hipótese de uma estrutura triterpênica. Na região de 16,0 a 60,2 ppm constatou-se a presença de 25 sinais, sendo cinco sinais de grupos metila. A presença da hidroxila em C-3 foi confirmada através da observação do sinal em 79,1 ppm. Em 179,8 e 178,9 ppm foram observados os sinais relativos a dois átomos de carbono de ácidos carboxílicos. Também foram observados dois sinais em 110,3 e 150,8 ppm característicos de grupos olefínicos (C-20 e C-29) de triterpenos lupanos (Cursino *et al.*, 2009) (Figura 29).

Figura 28. Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, $\text{CDCl}_3 + \text{CD}_3\text{OD}$) do composto 2

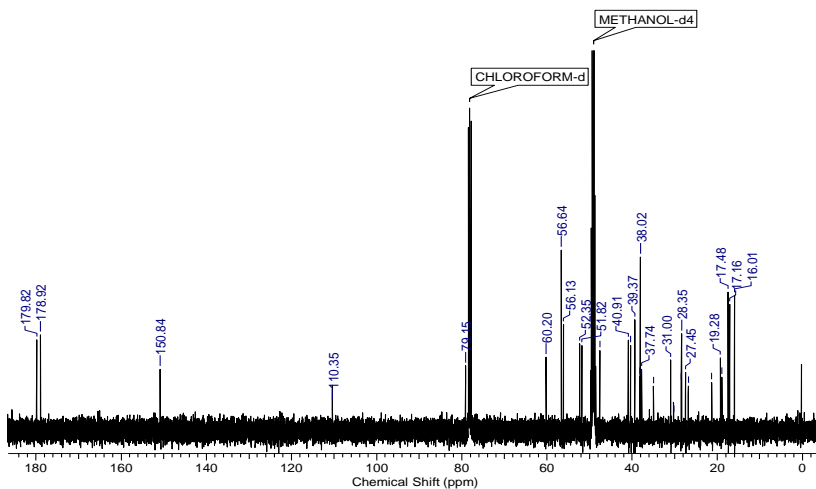
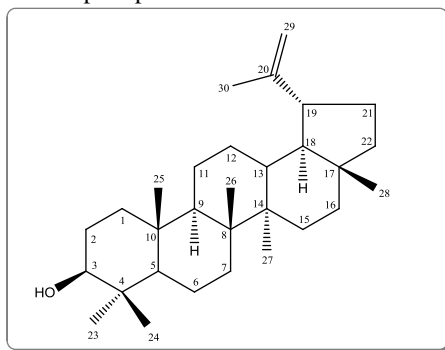


Figura 29. Esqueleto do tipo lupano

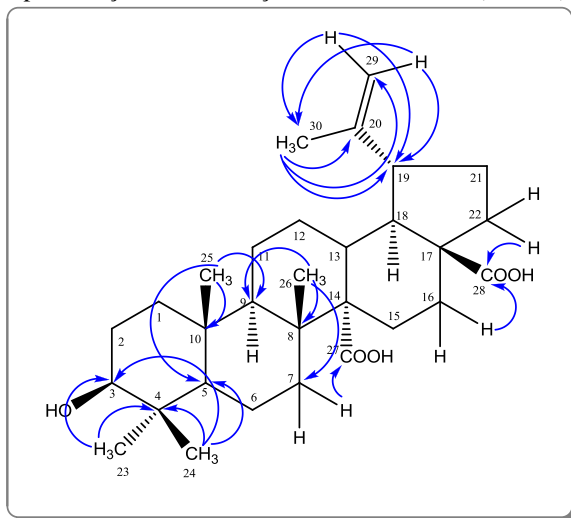


No espectro de DEPT (Anexo Figura 51), puderam-se observar seis grupos CH, onze grupos CH_2 e cinco grupos CH_3 , que está de acordo com a proposta de um triterpeno de esqueleto lupano com hidroxilação em C-3 e uma dupla terminal.

Através do mapa de correlação heteronuclear HMQC (^1J) (Anexo Figura 52, Tabela 4), verificou-se que o hidrogênio em 3,08 ppm está diretamente ligado ao C-3 (79,1 ppm). Os átomos de hidrogênio em 4,57 e 4,69 ppm, pertencentes ao metileno terminal, apresentaram correlação com o carbono a 110,3 ppm.

A análise conjunta dos mapas de correlação HMQC, HMBC (Anexo Figura 53) e COSY (Anexo Figura 54) permitiu a atribuição dos deslocamentos químicos dos átomos de carbono e hidrogênio do triterpeno, conforme Tabela 4. No mapa de correlação HMBC, o C-3 apresentou correlação à longa distância com os átomos de hidrogênio em 0,88 e 0,70 ppm, pertencentes às metilas C-23 e C-24, respectivamente. O acoplamento 2J do hidrogênio em 0,82 ppm (CH_3 , 17,2 ppm) com o carbono C-10 (38,0 ppm) e 3J com os átomos de carbono C-1 (39,4 ppm), C-5 (56,1 ppm) e C-9 (51,8 ppm) permitiu a sua atribuição como CH_3 -25. Os átomos de hidrogênio em 0,99 ppm (CH_3 , 17,5 ppm) foram atribuídos como CH_3 -26 devido ao seu acoplamento 2J com C-8 (40,9 ppm) e 3J com os átomos de carbono C-7 (38,2 ppm) e C-9 (51,8 ppm). Os átomos de hidrogênio em 1,66 ppm (CH_3 -30; 19,3 ppm) apresentaram acoplamento 2J com o carbono sp^2 C-20 (150,8 ppm) e 3J com os átomos de carbono-19 (47,6 ppm) e C-29 (110,3 ppm). Também foram observados os acoplamentos a longa distância do hidrogênio H-7 a 1,61 ppm com a carbonila de ácido em 179,8 ppm (C-27) e o acoplamento dos hidrogênio H-16 (1,32 ppm) e H-22 (1,92 ppm) com a carbonila de ácido em 178,9 ppm (C-28), que confirmam a oxidação a nível de ácidos carboxílicos nos átomos de carbono C-14 e C-17. As principais correlações heteronucleares a longa distância estão representadas na Figura 30.

Figura 30. Representação das correlações heteronucleares (HMBC)



Estes dados espectrométricos permitiram identificar o composto como o triterpeno ácido melalécico (ácido 3 β -hidroxilup-20(29)-eno-27,28-dioico) [147] (Figura 31), e cuja estrutura foi confirmada por comparação com os dados da literatura (Tabela 4). Esta foi a primeira vez que o ácido melalécico foi isolado na família Celastraceae; a literatura reporta seu isolamento a partir de espécies do gênero *Melaleuca* (Mirtaceae) (Chopra *et al.*, 1965; Lee, 1998; Vieira *et al.*, 2004), da espécie *Heteropanax fragrans* (Araliaceae) (Renhua *et al.*, 1988), da espécie *Anomospermum grandifolium* (Menispermaceae) (Plaza *et al.*, 2003) e da espécie *Ampelozizyphus amazonicus* (Rhamnaceae) (Lins Brandao *et al.*, 1992).

Figura 31. Estrutura do ácido melalécico

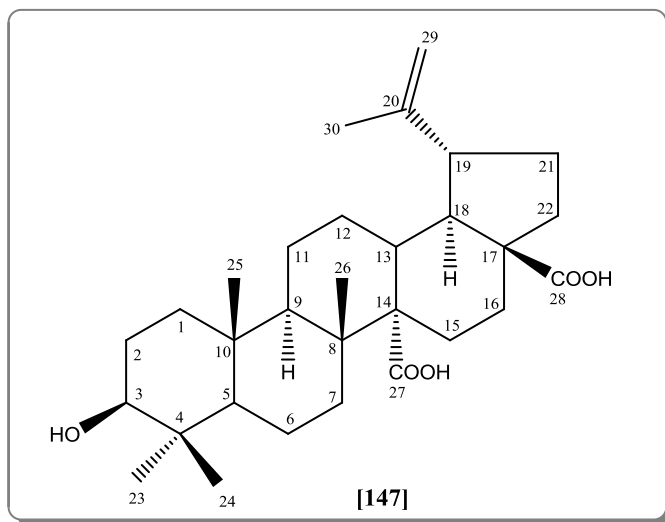


Tabela 4. Dados espectrométricos de RMN de ^1H (400 MHz) e ^{13}C (100 MHz) em $\text{CDCl}_3 + \text{CD}_3\text{OD}$ do ácido melalécico e comparação dos deslocamentos de RMN de ^{13}C do ácido melalécico (em $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$) encontrados na literatura (continua)

Carbono	Ácido melalécico (Renhua <i>et al.</i> , 1988) δ_c (ppm)	Ácido melalécico Experimental δ_c (ppm)	^1H - ^{13}C – HMQC- $^1\text{J}_{\text{CH}}$ (ppm)	DEPT	^1H - ^1H – COSY	^1H - ^{13}C – HMBC
1	40,3	39,4	1,70 e 0,86	CH_2	1,55	0,82
2	28,5	27,4	1,55	CH_2	3,08; 1,70; 0,86	-
3	78,0	79,1	3,08	CH	1,55	0,88; 0,70;
4	38,4	39,7	-	C	-	0,88; 0,82; 0,70; 0,61
5	56,1	56,1	0,61 <i>d</i>	CH	1,33	0,88; 0,82; 0,70
6	18,9	18,9	1,47 1,33	CH_2	1,34 1,61	0,61
7	31,2	38,2	1,34 1,61	CH_2	1,47 1,33;	0,99
8	40,9	40,9	-	C	-	1,41; 0,99
9	51,8	51,8	1,41	CH	-	0,99; 0,82
10	37,7	38,0	-	C	-	0,82; 1,41
11	21,3	21,3	1,45 e 1,23	CH_2	1,99	-
12	28,3	28,4	1,99 <i>dd</i>	CH_2	1,45; 1,23	-
13	39,4	40,4	2,27 <i>d</i>	CH	1,99; 1,55	1,55
14	60,2	60,2	-	C	-	0,99
15	27,0	26,8	1,58	CH_2	2,31	-

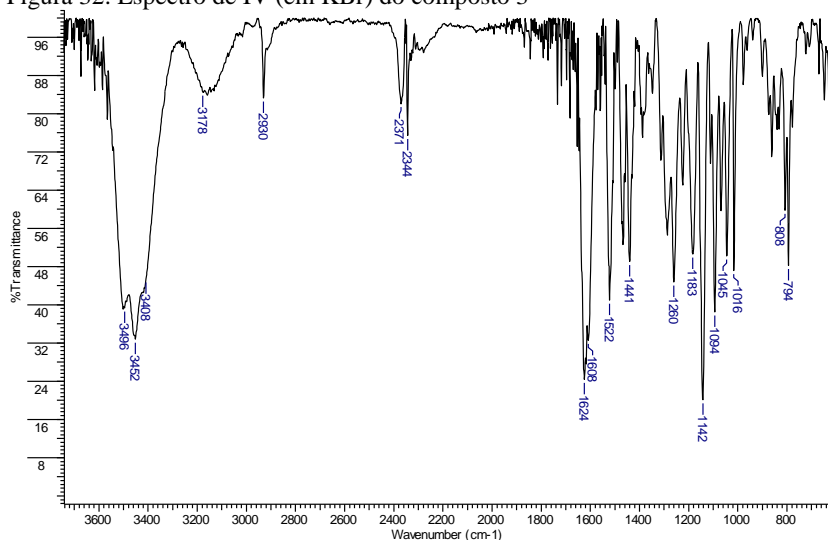
Tabela 4. Dados espectrométricos de RMN de ^1H (400 MHz) e ^{13}C (100 MHz) em $\text{CDCl}_3 + \text{CD}_3\text{OD}$ do ácido melalécico e comparação dos deslocamentos de RMN de ^{13}C do ácido melalécico (em $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$) encontrados na literatura (continuação)

Carbono	Ácido melalécico (Renhua <i>et al.</i> , 1988) δ_c (ppm)	Ácido melalécico Experimental δ_c (ppm)	^1H - ^{13}C – HMQC- $^1\text{J}_{\text{CH}}$ (ppm)	DEPT	^1H - ^1H – COSY	^1H - ^{13}C – HMBC
16	37,9	35,0	2,31 e 1,32	CH_2	1,58	1,58
17	56,6	56,6	-	C	-	1,58; 1,32
18	52,5	52,3	1,54 <i>d</i>	CH	3,02; 2,27	-
19	47,9	47,6	3,02	CH	1,54	4,69; 4,57; 1,66; 1,54
20	151,1	150,8	-	C	-	1,66
21	30,0	31,0	1,33	CH_2	1,92	-
22	35,5	37,7	1,92 <i>dd</i>	CH_2	1,33	-
23	28,7	28,3	0,88	CH_3	-	3,08; 0,70
24	16,4	16,0	0,70	CH_3	-	0,88; 0,61
25	17,0	17,2	0,82	CH_3	-	0,61
26	17,6	17,5	0,99	CH_3	-	1,41
27	178,4	179,8	-	C	-	1,61
28	179,2	178,9	-	C	-	1,32; 1,92
29	110,3	110,3	4,69 e 4,57	CH_2	1,66	1,66
30	19,3	193	1,66	CH_3	4,69; 4,57	4,69; 4,57

5.1.5 Composto 3

O composto 3 foi isolado a partir da FA (181,7 mg) e do resíduo insolúvel (10 mg) na forma de um sólido marrom com ponto de fusão 227,6 - 230,1 °C. O espectro de IV (Figura 32) apresentou bandas de absorção em 3400 cm⁻¹ características de ligação O-H e em 1142 cm⁻¹ referente às ligações C-O. Também se observaram bandas na região de 3178 cm⁻¹, referente ao estiramento da ligação C-H aromático, e bandas típicas de C=C aromático em 1624 cm⁻¹ e 1522 cm⁻¹.

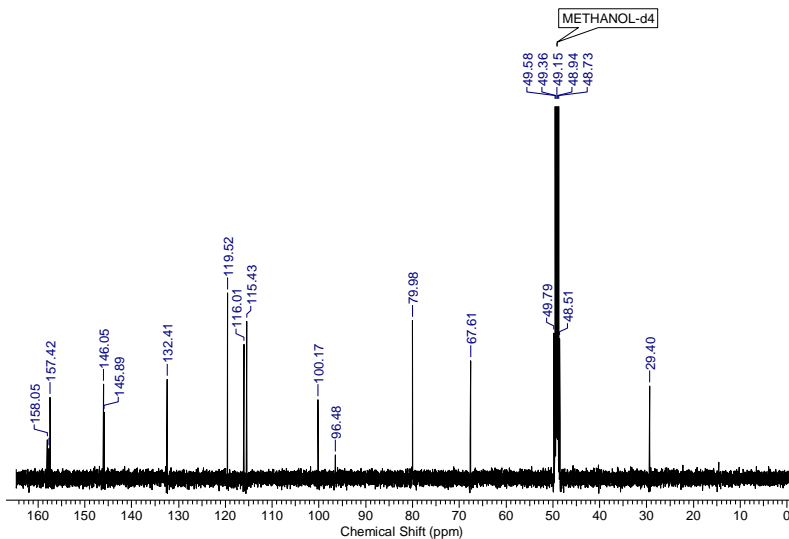
Figura 32. Espectro de IV (em KBr) do composto 3



Através do RMN de ¹³C (Figura 33) foi possível observar quinze sinais correspondentes a quinze átomos de carbono, sendo doze átomos de C sp² aromático e três átomos de C sp³, dos quais dois oxigenados (80,0 e 67,6 ppm). A ausência de sinal para carbonila e a presença de um CH₂ em 29,4 ppm indica tratar-se de um flavan-3-ol. Identificaram-se cinco sinais de carbono sp² oxigenados, sendo dois em posição orto, correspondente aos sinais 146,0 e 145,9 ppm. Estes sinais mais protegidos para carbonos aromáticos oxigenados são devido à proteção mútua que o efeito de ressonância dos átomos de oxigênio exercem sobre o carbono orto. O maior deslocamento químico do carbono em 80,0 ppm é devido ao fato de que além de ser oxigenado também está ligado ao grupo fenil que exerce um efeito de desblindagem sobre este

carbono. Os sinais devido aos átomos de carbono oxigenado, em conjunto com o sinais referentes ao carbono metilênico (29,4 ppm) definem o anel pirano de um flavan-3-ol, com conformação meia cadeira e estereoquímica relativa 3-OH pseudo α (Haslam, 1998; Lôbo *et al.*, 2008), deduzida pelos valores das constantes de acoplamento conforme descrito a seguir.

Figura 33. Espectro de RMN de ^{13}C (50 MHz, CD_3OD) do composto 3



O RMN de ^1H (Figura 34) apresentou um perfil de flavan-3-ol no qual foram observados padrões de substituição 5,7 e 3',4' para os anéis aromáticos A e B, respectivamente. O padrão de substituição do anel B foi definido pelo duplete centrado em 6,76 ppm com acoplamento *orto* ($J = 8,2$ Hz), duplo duplete centrado em 6,82 ppm com constantes de acoplamento orto-meta ($J = 8,2$ e $J = 2,6$ Hz) e duplete (aqui com a aparência de um simpleto largo, $J=2,6$ Hz calculado pela largura do pico a 2/3 de sua altura e com ajuda do simulador FOMSC3) centrado em 6,98 ppm com acoplamento meta, que foram atribuídos aos átomos de hidrogênio 5', 6' e 2' respectivamente do anel B. Um par de dupletos centrados em 5,95 e 5,93 ppm, com $J = 2,2$ Hz, correspondem aos átomos de hidrogênio 6 e 8 do anel A. Os duplos dupletos em 2,73 e 2,88 ppm foram atribuídos aos átomos de hidrogênio H-4 pseudo-axial e H-4 pseudo-equatorial, que acoplam entre si ($J = 16,8$ Hz) e com o H-3

($J = 3,1$ Hz e $J = 4,6$ Hz). Em 4,82 ppm observou-se um simpleto largo referente ao H-2. Com auxílio do simulador de RMN FOMSC3 foi possível estimar os valores de J para os átomos de hidrogênio H-2 e H-3, centrados em 4,82 e 4,18 ppm, respectivamente, obtendo-se $J_{(H3,H2)} = 1,6$ Hz, $J_{(H3,H4\alpha)} = 4,5$ Hz e $J_{(H3,H4\beta)} = 3,1$ Hz (Figura 35).

Figura 34. Espectro de RMN de ^1H (200 MHz, CD_3OD) do composto 3

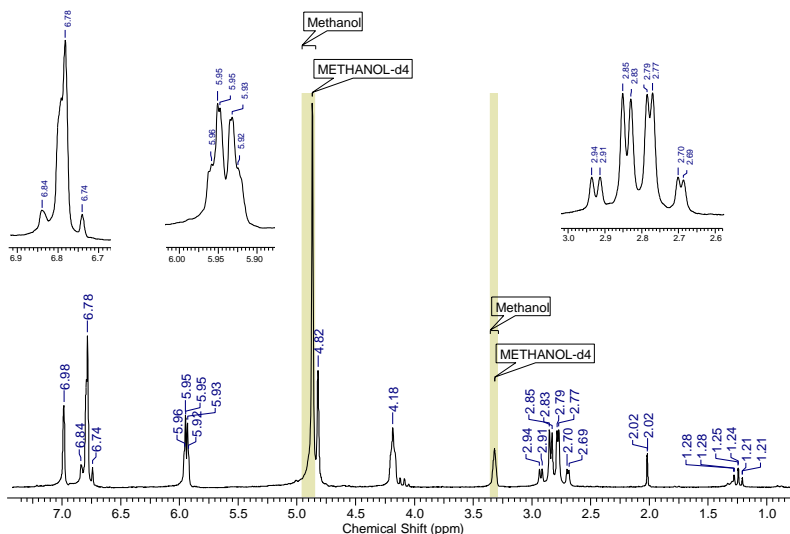
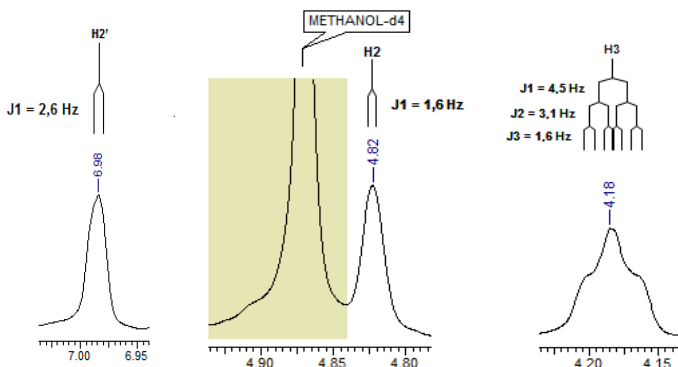


Figura 35. Sistema de acoplamento dos hidrogênios H-2', H-2 e H-3 da (-)-epicatequina



Através da análise dos dados físicos e espectrométricos e em comparação com dados da literatura (Tabela 5) (p.f. 230 - 232 °C (Choi *et al.*, 2008)) identificou-se o composto como (-)-epicatequina [30] (Figura 36), isolado pela primeira vez nesta espécie.

Figura 36. Estrutura da (-)-epicatequina

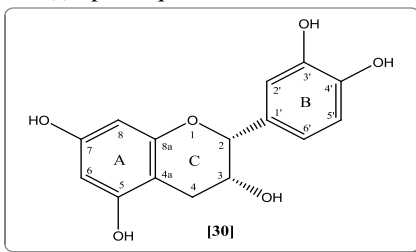


Tabela 5. Dados espectrométricos de RMN de ^{13}C (50 MHz) e ^1H (200 MHz) em CD_3OD da (-)-epicatequina

Carbono	Experimental		Literatura (Appidi, 2010; Lôbo <i>et al.</i> , 2008)	
	δ_{C} (ppm)	δ_{H} (ppm)	δ_{C} (ppm)	δ_{H} (300 MHz) (ppm)
2	80,0	4,82 (1H, <i>d</i> , $J = 1,6$ Hz)	79,8	4,82 (1H, <i>sl</i>)
3	67,6	4,18 (1H, <i>ddd</i> , $J = 4,6$ Hz; $J = 3,1$ Hz e $J = 1,6$ Hz)	67,4	4,17 (1H, <i>sl</i>)
4	29,4	2,88 (1H, <i>dd</i> , $J = 4,6$ Hz e $J = 16,8$ Hz, 4α) 2,73 (1H, <i>dd</i> , $J = 3,1$ Hz e $J = 16,8$ Hz, 4β)	29,2	2,85 (1H, <i>dd</i> , $J = 4,5$ Hz e $J = 16,8$ Hz, 4α) 2,72 (1H, <i>dd</i> , $J = 2,4$ Hz e $J = 16,8$ Hz, 4β)
4a	100,2	-	100,2	-
5	157,7	-	157,5	-
6	96,5	5,95 (1H, <i>dd</i> , $J = 0,6$ e $J =$ 2,2 Hz)	96,5	5,93 (1H, <i>d</i> , $J = 1,8$ Hz)
7	158,0	-	157,9	-
8	96,5	5,93 (1H, <i>dd</i> , $J = 0,6$ e $J =$ 2,2 Hz)	96,0	5,91 (1H, <i>d</i> , $J = 1,8$ Hz)
8a	157,4	-	157,3	-
1'	132,4	-	132,2	-
2'	115,4	6,98 (1H, <i>d</i> , $J = 2,6$ Hz)	115,5	6,97 (1H, <i>d</i> , $J = 1,2$ Hz)
3'	146,0	-	145,9	-
4'	145,9	-	145,7	-
5'	116,0	6,76 (1H, <i>d</i> , $J = 8,2$ Hz)	116,0	6,75 (1H, <i>d</i> , $J = 8,1$ Hz)
6'	119,5	6,82 (1H, <i>dd</i> , $J = 8,2$ e $J =$ 2,6 Hz)	119,5	6,79 (1H, <i>dd</i> , $J = 1,2$ Hz e $J = 8,1$ Hz)

Os espectros de RMN da (-)-epicatequina são muito similares aos do seu epímero em C-3, (+)-catequina. É possível distinguir os espectros de ^{13}C através do deslocamento dos sinais referentes aos carbonos C-2, C-3 e C-4; os espectros de ^1H diferem principalmente nos valores das constantes de acoplamento (Tabela 6).

Tabela 6. . Comparação dos principais sinais de RMN de ^{13}C e ^1H da (-)-epicatequina e da (+)-catequina, em CD_3OD .

Carbono	(-)-epicatequina		(+) -catequina	
	δ_{C} (ppm)	δ_{H} (200 MHz) (ppm)	δ_{C} (ppm) (Goetz <i>et al.</i> , 1999)	δ_{H} (300 MHz) (ppm) (Lôbo <i>et al.</i> , 2008)
2	80,0	4,82 (1H, <i>d</i> , $J = 1,6$ Hz)	83,1	4,57 (<i>d</i> , $J = 7,5$ Hz)
3	67,6	4,18 (1H, <i>ddd</i> , $J = 4,6$ Hz; $J = 3,1$ Hz e $J = 1,6$ Hz)	69,1	3,97 (<i>m</i>)
4	29,4	2,88 (1H, <i>dd</i> , $J = 4,6$ Hz e $J = 16,8$ Hz, 4α) 2,73 (1H, <i>dd</i> , $J = 3,1$ Hz e $J = 16,8$ Hz, 4β)	28,7	2,85 (<i>dd</i> , $J = 5,5$ Hz e $J = 16,1$ Hz, 4α) 2,51 (<i>dd</i> , $J = 8,2$ Hz e $J = 16,1$ Hz, 4β)

5.2 Avaliação das atividades biológicas

5.2.1 Atividade antioxidante

Os danos celulares e teciduais induzidos pelo stress oxidativo têm sido relacionados com a etiologia de várias doenças, incluindo doenças degenerativas tais como as cardiopatias, aterosclerose e problemas pulmonares (Bianchi *et al.*, 1999). A utilização de compostos antioxidantes é um dos mecanismos de defesa contra os radicais livres que podem ser empregados nas indústrias de alimentos, cosméticos, bebidas e também na medicina (Weijl *et al.*, 1997). Entre os antioxidantes presentes nos vegetais, os mais ativos e frequentemente encontrados são os compostos fenólicos, tais como os flavonoides (Bianchi *et al.*, 1999).

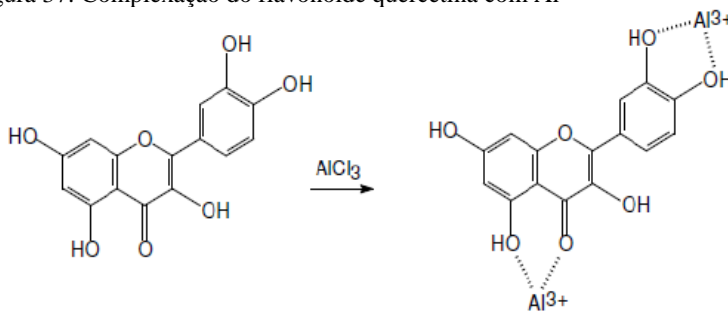
Com relação ao gênero *Salacia* foram reportados estudos relatando efetiva atividade para a fração solúvel em éter de petróleo do extrato de *S. oblonga* (Krishnakumar *et al.*, 1999), extrato metanólico de *S. chinensis* (Yoshikawa *et al.*, 2003) e para compostos isolados a partir de *S. reticulata* (Paarakh *et al.*, 2008), *S. campestris* (Carvalho *et al.*, 2005) e *S. chinensis* (Kishi *et al.*, 2003).

O estudo fitoquímico tem reportado a presença de triterpenos e esteróis nas cascas da espécie *Salacia impressifolia*, porém não há relatos a respeito da atividade antioxidante desta espécie. Desta maneira foram efetuados testes para avaliar a capacidade do extrato bruto e frações através dos métodos de captura de radicais DPPH e poder redutor, além da determinação do conteúdo de fenólicos e flavonoides, a fim de correlacionar estes dados com a atividade antioxidante.

A determinação do conteúdo de compostos fenólicos totais utiliza o reagente de Folin-Ciocalteu (Anagnostopoulou *et al.*, 2006), que consiste em uma mistura de ácidos fosfomolibdídico e fosfotúngstico, no qual o molibdênio e o tungstênio encontram-se no estado de oxidação 6+. Na presença de certos agentes redutores, como os compostos fenólicos forma-se o chamado molibdênio azul e tungstênio azul, cujo estado de oxidação se encontra entre +5 e +6. Essa coloração azul permite a determinação da concentração das substâncias redutoras (Chaves *et al.*, 2010; Waterman *et al.*, 1994). Esta metodologia, porém, não apresenta seletividade para subtipos de compostos fenólicos vegetais, e podem ser detectados no teste, além de flavonoides, catequinas, compostos fenólicos simples e seus polímeros, como os taninos hidrolisáveis, dentre outras substâncias (Magina, 2008).

A determinação do teor de flavonoides foi realizada através do método utilizando a complexação com o cloreto de alumínio ($AlCl_3$). Esse agente forma um quelato com as hidroxilas orto fenólicas e com o grupo carbonila nos flavonoides (Figura 37), proporcionando um deslocamento batocrômico das bandas de absorção no espectro de UV-Vis para uma região característica (Simões, 2003).

Figura 37. Complexação do flavonoide quercetina com Al^{3+}



Na Tabela 7 encontram-se os resultados da determinação do teor dos compostos fenólicos e dos flavonoides e dos testes antioxidantes realizados no extrato bruto e frações de *S. impressifolia*.

Tabela 7. Teor de fenólicos, flavonoides e atividade antioxidante do extrato e frações de *Salacia impressifolia*

Extrato/ fração	Fenólicos ^(a)	Flavonoides ^(b)	Poder Redutor ^(c)	% Atividade DPPH ^(d)
EB	385,74±1,89*	8,17±0,04	682,99±2,17	92,98±0,28
FA	354,35±0,97	4,09±0,02	764,11±1,86	100,00±0,00*
FC	185,33±0,99	1,48±0,01 [†]	99,17±0,78	86,73±1,21
RI	387,42±0,28*	1,22±0,01 [†]	653,25±1,13	100,00±0,00*

^(a) mg ácido gálico / g de amostra. ^(b) mg quercetina/ g de amostra ^(c) mg ácido ascórbico/ g de amostra ^(d) % realizada na concentração de 100 ppm. Os símbolos *[†]* significam que não há diferença estatisticamente significativa.

Observou-se que dentre as frações, a FA e o RI apresentaram o maior teor de fenólicos, o que é esperado para as frações mais polares oriundas do fracionamento do extrato bruto.

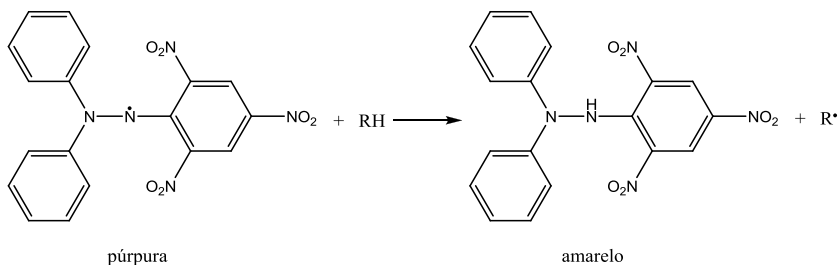
Em relação ao conteúdo de flavonoides, o extrato bruto apresentou a maior concentração (8,17 mg quercetina / g de extrato seco), seguido da fração acetato de etila (4,09 mg quercetina / g de fração seca).

A capacidade de reduzir íons metálicos ou intermediários do processo de peroxidação lipídica, através da doação de elétrons, é caracterizada como potencial redutor de uma amostra (Yen *et al.*, 1995). O ensaio para a determinação do potencial redutor baseia-se no fato de que, quando um íon fenolato, presente nos compostos e extratos vegetais, é oxidado, o íon férrico é reduzido para íon ferroso, e detectado a partir da formação de um complexo azul, Fe₃[Fe(CN)₆]₂, com o reagente ferricianeto de potássio (Waterman *et al.*, 1994).

O ensaio utilizando o radical livre relativamente estável DPPH avalia a capacidade sequestradora de radicais livres da amostra analisada. A ação sequestrante do DPPH deve-se à abstração de um radical hidrogênio de compostos presentes nos extratos e frações, geralmente fenólicos (Figura 38). O DPPH, de forte coloração púrpura, ao reagir, forma espécies mais estáveis, de coloração amarela, o que

pode ser facilmente determinado sob luz visível (517 nm) (Magina *et al.*, 2010).

Figura 38. Equação básica da reação do DPPH com um sequestrador de radical livre



Analisando os resultados da Tabela 7, a FA apresentou maior capacidade redutora sobre íons férricos, com valores de atividade de 764,11 mg de equivalentes de ácido ascórbico / g de fração seca. Além da FA, o EB e o RI também apresentaram elevados valores de atividade antioxidante. O teste do potencial redutor apresentou correlação ($r^2 = 0,8594$) com o conteúdo de fenólicos totais, porém não apresentou correlação com o conteúdo de flavonoides ($r^2 = 0,1493$), indicando que os flavonoides possuem uma participação mais discreta no efeito antioxidante global do extrato.

Na avaliação preliminar da capacidade de sequestrar o radical livre DPPH, a FA e o RI apresentaram a maior atividade antioxidante. Este resultado sugere que a elevada atividade antioxidante das frações mais polares deve-se provavelmente à presença de substâncias com grupos hidroxila disponíveis (fenólico ou não) para doar um átomo de hidrogênio e capazes de estabilizar radicais (Mansur, 2011). Não foi observada relação entre a capacidade sequestrante do DPPH e o teor de fenólicos ($r^2 = 0,4771$) e de flavonoides ($r^2 = 0,49952$). Esta participação mais discreta dos compostos fenólicos, incluindo os flavonoides, no efeito antioxidante, sugere a presença de outros metabólitos estruturalmente diferentes (aqui não identificados) com importante propriedade antioxidante.

Apesar de apresentar um elevado teor de fenólicos e a maior quantidade de flavonoides, de maneira geral o extrato bruto não apresentou a maior atividade antioxidante, o que pode ser associado à complexidade da matriz.

5.2.2 Ação inibitória da enzima acetilcolinesterase

A doença de Alzheimer (DA) é uma das principais causadoras de demência em idosos e afeta cerca de 35,6 milhões de pessoas em todo o mundo. Esta doença causa a diminuição da atividade dos neurônios colinérgicos, um problema que pode ser tratado aumentando a quantidade do neurotransmissor acetilcolina (ACh). Atualmente uma forma bastante eficaz de reduzir os sintomas da doença é através do uso de fármacos inibidores da enzima acetilcolinesterase (AChE) para evitar a degradação da ACh (Petronilho *et al.*, 2011).

Um dos inibidores da AChE aprovados para o tratamento da DA é a galantamina, um alcaloide isolado de várias espécies vegetais da família Amaryllidaceae, o que desperta o interesse na busca de substâncias com atividade anticolinesterásica em plantas e micro-organismos (Viegas Junior *et al.*, 2004).

Estudos realizados com espécies do gênero *Maytenus* e *Gymnosporia senegalensis*, pertencentes à família Celastraceae, reportaram, para extratos e compostos isolados, significativa atividade de inibição da enzima acetilcolinesterase (Céspedes A *et al.*, 2006; Mulaudzi *et al.*, 2012).

Neste trabalho, foi avaliada a atividade inibitória da AChE para o extrato bruto e frações obtidos do caule da espécie *Salacia impressifolia*.

A Tabela 8 apresenta os valores de % de inibição da enzima AChE para o extrato e as frações. Observou-se que extrato bruto e as frações clorofórmio e acetato de etila apresentaram atividade moderada (Aderogba *et al.*, 2013), com destaque para o extrato bruto, que apresenta composição mais complexa em termos de constituintes, e a fração acetato de etila.

Tabela 8. Porcentagem de inibição da acetilcolinesterase do extrato bruto e frações (a 100 ppm) da *Salacia impressifolia*

Amostra	% Inibição
Extrato Bruto	59,66*
Fração Acetato de Etila	55,73*
Fração Clorofórmio	48,02
Resíduo Insolúvel	13,36
Reminyl®	99,73

* significa que não há diferença estatisticamente significativa.

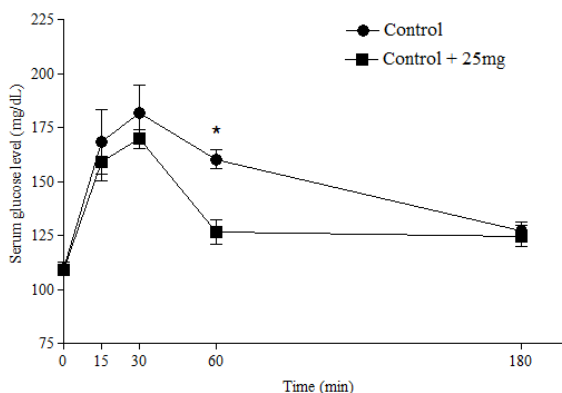
5.2.3 Atividade anti-hiperglicêmica

O diabetes mellitus é uma desordem metabólica crônica caracterizada por hiperglicemia e associada com uma deficiência absoluta ou relativa na ação ou secreção da insulina (Kim *et al.*, 2006). O tratamento da hiperglicemia no diabetes envolve o controle da dieta, exercícios e uso de fármacos antidiabéticos orais, terapia de insulina ou a combinação de ambos (Diagnosis and classification of diabetes mellitus, 2010).

Em relação a plantas, cerca de 1200 espécies têm sido citadas pelo seu uso no tratamento de diabetes (Marles *et al.*, 1995). Várias espécies vegetais têm sido estudadas como benéficas no controle da diabetes (Dornas *et al.*, 2009), inclusive espécies pertencentes ao gênero *Salacia*.

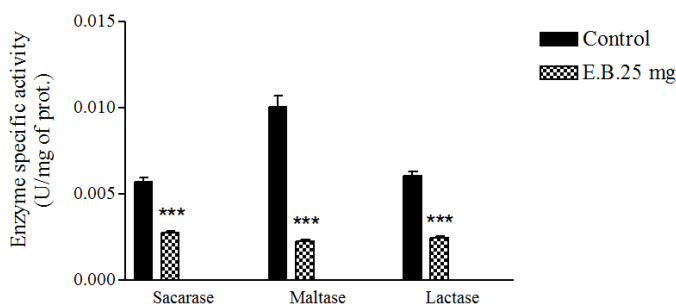
Neste trabalho a atividade anti-hiperglicêmica do extrato bruto foi avaliada através do teste de tolerância à glicose. Ratos normais hiperglicêmicos foram comparados com o grupo tratado com o extrato bruto (Figura 39). Como esperado, após iniciar o teste a concentração de glicose sérica foi significativamente maior quando comparada ao tempo zero. A administração oral do extrato bruto reduziu os níveis de glicemia a 30 e 60 minutos em comparação com o controle hiperglicêmico. Aos 180 minutos, o nível glicêmico foi similar ao resultado para o grupo controle hiperglicêmico.

Figura 39. Efeito do extrato bruto na curva de tolerância à glicose oral. Os valores estão expressos em média \pm E.P.M.; n = 6 em duplicata para cada tratamento. Estatisticamente diferente em relação ao grupo hiperglicêmico; * p \leq 0,05



Uma vez que há estudos reportando a inibição de dissacaridasas intestinais, por flavonoides, com uma conseqüente redução da absorção intestinal de glicose (Pereira *et al.*, 2011), a atividade anti-hiperglicêmica também foi avaliada através da atividade de dissacaridasas intestinais. Pode-se observar que o extrato bruto foi capaz de reduzir a atividade das enzimas sacarase, maltase e lactase em comparação com o grupo controle (Figura 40). Em consonância com esses resultados, estudos mostram o efeito inibitório sobre dissacaridasas pelos extratos de *Salacia chinensis* (Oku *et al.*, 2012) e *Salacia oblonga* (Mustad *et al.*, 2006).

Figura 40. Efeito in vitro do extrato bruto do caule de *Salacia impressifolia* na atividade específica das enzimas sacarase, maltase e lactase, na porção duodenal do intestino de rato. Incubação: 5 min. Os valores são expressos como média \pm E.P.M., n = 6 para cada grupo. Significativamente diferente em relação ao grupo controle; *** $p \leq 0,001$.



Estudos prévios mostram que os triterpenos α , β -amirina são capazes de reduzir os níveis de glicose no teste oral de tolerância (Santos *et al.*, 2012), assim como a (-)-epicatequina tem sido reportada por possuir ação antidiabética (Rizvi *et al.*, 2001). Estes metabólitos estão presentes no extrato bruto de *S. impressifolia*, e a eles pode ser atribuída parte da atividade anti-hiperglicêmica encontrada.

Em conclusão, o extrato bruto do caule da miraruíra, conhecida popularmente como planta antidiabética, exibiu potencial ação anti-hiperglicêmica. A redução dos níveis de glicose sérica e a inibição da atividade enzimática corroboram com relatos da literatura que reportam atividade anti-hiperglicêmica para espécies do gênero *Salacia*. Estes dados preliminares mostram o potencial terapêutico no tratamento do diabetes e a importância da continuidade dos estudos com as frações e

os metabólitos isolados a partir da *S. impressifolia* com a elucidação dos mecanismos de ação farmacológica.

6 CONCLUSÕES

Através do estudo fitoquímico do caule de *Salacia impressifolia* conclui-se que:

As técnicas utilizadas para separação e caracterização dos compostos se mostraram eficazes, uma vez que foi possível isolar e caracterizar duas misturas e três compostos, sendo dois inéditos na espécie e um inédito na família Celastraceae.

As técnicas de IV e RMN uni, bidimensional e DEPT e a espectrometria de massas ESI-EM e ESI-IT-Tof permitiram identificar os compostos α -amirina, β -amirina, ácido melalécico e (-)-epicatequina e forneceram importantes informações a respeito do hidrocarboneto de cadeia longa.

Os ensaios simples de bancada permitiram a determinação do teor de fenólicos e flavonoides no extrato bruto e frações.

Através dos testes antioxidantes foi observada maior atividade para o extrato bruto e as frações mais polares (fração acetato de etila e resíduo aquoso) e a correlação entre o potencial redutor e o conteúdo de fenólicos.

Em relação ao teste de inibição da acetilcolinesterase, o extrato e as frações clorofórmio e acetato de etila apresentaram atividade moderada.

Os resultados encontrados a partir do estudo preliminar de atividade anti-hiperglicêmica do extrato bruto reforçam dados da medicina popular quanto ao uso da miraruíra como antidiabética.

Os resultados obtidos neste trabalho confirmaram a importância da continuidade do estudo das frações das cascas da espécie *Salacia impressifolia* e do isolamento dos seus constituintes, na determinação dos metabólitos responsáveis pelas atividades apresentadas.

REFERÊNCIAS

- ADAMS, R. P. **Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectroscopy**. Carol Stream, Ill.: Allured Pub. Corp., 1995.
- ADEROGBA, M. et al. Antimicrobial and Selected In Vitro Enzyme Inhibitory Effects of Leaf Extracts, Flavonols and Indole Alkaloids Isolated from *Croton menyharthii*. **Molecules**, v. 18, n. 10, p. 12633-12644, 2013.
- ALMEIDA, E. R. **Plantas medicinais brasileiras: conhecimentos populares e científicos**. Hemus, 1993.
- ALVARENGA, N.; FERRO, E. A. Bioactive triterpenes and related compounds from celastraceae. In: **Studies in Natural Products Chemistry**. ATTA UR, R. (Ed.): Elsevier, v.30, 2005. p.635-702.
- ANAGNOSTOPOULOU, M. A. et al. Radical scavenging activity of various extracts and fractions of sweet orange peel (*Citrus sinensis*). **Food Chemistry**, v. 94, n. 1, p. 19-25, 2006.
- APPIDI, J. R. **Evaluation of antidiarrhoeal and toxicological properties of *Hermannia incana* cav a South African medicinal plant**. 2010. Tese (Doutorado em Filosofia: Botânica (Fitomedicina)). Universidade de Fort Hare
- AUGUSTI, K. T.; JOSEPH, P.; BABU, T. D. Biologically active principles isolated from *Salacia oblonga* wall. **Indian Journal of Physiology and Pharmacology**, v. 39, n. 4, p. 415-7, 1995.
- BIANCHI, M. D. L. P.; ANTUNES, L. M. G. Radicais livres e os principais antioxidantes da dieta. **Revista de Nutrição**, v. 12, p. 123-130, 1999.
- BRASIL. Ministério da Saúde. **Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos**. Brasília. 2006
- CARVALHO, L. P. A proteção da biodiversidade Brasileira : o caso das plantas medicinais. **Revista da ABPI** n. 101, p. 9-18, 2009.
- CARVALHO, P. R. F. et al. Antioxidant Quinonemethide Triterpenes from *Salacia campestris*. **Chemistry & Biodiversity**, v. 2, n. 3, p. 367-372, 2005.
- CAVIN, A. et al. Antioxidant and lipophilic constituents of *Tinospora crispa*. **Planta Medica**, v. 64, n. 5, p. 393-6, 1998.
- CÉSPEDES A, C. L. et al. Chapter 1 Natural compounds as antioxidant and molting inhibitors can play a role as a model for search of new botanical pesticides. In: **Advances in Phytomedicine**. MAHENDRA, R. e MARÍA CECILIA, C. (Ed.): Elsevier, v.3, 2006. p.1-27.

CHAVES, M. H. et al. Fenóis totais, atividade antioxidante e constituintes químicos de extratos de *Anacardium occidentale* L., Anacardiaceae. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 20, p. 106-112, 2010.

CHOI, J.-Y. et al. Topoisomerase I and II inhibitory constituents from the bark of *Tilia amurensis*. **Archives of Pharmacal Research**, v. 31, n. 11, p. 1413-1418, 2008/11/01 2008.

CHOPRA, C. S. et al. Triterpene compounds - VII : The constitution of melaleucic acid. **Tetrahedron**, v. 21, n. 6, p. 1529-1536, 1965.

CHOUDHARY, G.; VIJAY KANTH, M. Antimicrobial activity of root bark of *Salacia reticulata*. **Ancient Science of Life**, v. 25, n. 1, p. 4-7, 2005.

CORSINO, J. et al. Biosynthesis of friedelane and quinonemethide triterpenoids is compartmentalized in *Maytenus aquifolium* and *Salacia campestris*. **Phytochemistry**, v. 55, p. 741-748, 2000.

COSTA, N. L. S. D. et al. Triterpenos oleano e ursano do caule de *Salacia impressifolia* (HIPPOCRATEACEAE). In: **30^a Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química - Livro de Resumos**. (Ed.), 2007.

CURSINO, L. M. D. C. et al. Triterpenos das folhas de *Minquartia guianensis* Aubl. (Olacaceae). **Acta Amazonica**, v. 39, p. 181-185, 2009.

DEEPA, M. A. et al. A new benzoid system with antifeedant and antimicrobial properties from the leaves of *Salacia beddomei* Gamble. **Biosciences Biotechnology Research Asia**, v. 1, p. 121-122, 2003.

DEEPA, M. A. et al. An oxaza cyclohexane moiety with antimicrobial and antifeedant activity from nutrient stress callus of *Salacia beddomei*. **Research Journal of Chemistry and Environment**, v. 8, p. 74-75, 2004.

DEOKATE, U. A.; KHADABADI, S. S. Phytopharmacological aspects of *salacia chinensis*. **Pharmacophore**, v. 3, n. 3, p. 156-163, 2012.

DHANABALASINGHAM, B. et al. Biogenetically important quinonemethides and other triterpenoid constituents of *Salacia reticulata*. **Phytochemistry**, v. 42, n. 5, p. 1377-1385, 1996.

DIAGNOSIS and classification of diabetes mellitus. **Diabetes Care**, v. 33, n. 1, p. S62-S69, 2010.

DIAS, M. O.; HAMERSKI, L.; PINTO, A. C. Separação semipreparativa de α e β -amirina por cromatografia líquida de alta eficiência. **Química Nova**, v. 34, n. 4, p. 704-706, 2011.

- DORNAS, W. C. et al. Efeitos antidiabéticos de plantas medicinais. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 19, p. 488-500, 2009.
- DUARTE, L. P. et al. Chemical constituents of *Salacia elliptica* (Celastraceae). **Química Nova**, v. 33, p. 900-903, 2010.
- FIGUEIREDO, J. N.; RAZ, B.; SEQUIN, U. Novel quinone methides from *Salacia kraussii* with in vitro antimalarial activity. **Journal of Natural Products**, v. 61, n. 6, p. 718-23, 1998a.
- FIGUEIREDO, J. N.; RAZ, B.; SEQUIN, U. Novel quinone methides from *Salacia kraussii* with in vitro antimalarial activity. **Journal of Natural Products** v. 61, n. 6, p. 718-23, 1998b.
- GAO, H. Y. et al. New triterpenes from *Salacia hainanensis* Chun et How with alpha-glucosidase inhibitory activity. **Journal of Asian Natural Products Research**, v. 12, n. 10, p. 834-42, 2010.
- GAO, X. H.; XIE, N.; FENG, F. [Studies on chemical constituents of *Salacia prinoides*]. **Zhong Yao Cai**, v. 31, n. 9, p. 1348-51, 2008.
- GOETZ, G. et al. Resistance factors to grey mould in grape berries: identification of some phenolics inhibitors of *Botrytis cinerea* stilbene oxidase. **Phytochemistry**, v. 52, n. 5, p. 759-767, 1999.
- GUO, Z.-H. et al. New inhibitors of α -glucosidase in *Salacia hainanensis* Chun et How. **Journal of Natural Medicines**, v. 67, p. 844-849, 2013.
- GUO, Z. H. et al. A new triucallane derivative from *Salacia hainanensis* Chun et How. **Yaoxue Xuebao**, v. 44, n. 10, p. 1123-1126, 2009.
- HASLAM, E. **Practical Polyphenolics: From Structure to Molecular Recognition and Physiological Action**. Cambridge University Press, 1998.
- HISHAM, A. et al. Salacianone and salacianol, two triterpenes from *Salacia beddomei*. **Phytochemistry**, v. 40, n. 4, p. 1227-1231, 1995.
- HISHAM, A. et al. $1\beta,15\alpha$ -Dihydroxyfriedelan-3-one, a triterpene from *Salacia beddomei*. **Phytochemistry**, v. 43, p. 843-845, 1996a.
- HISHAM, A. et al. 20,29-epoxysalacianone and 6β -hydroxysalacianone, two lupane triterpenes from *Salacia beddomei*. **Phytochemistry**, v. 42, p. 789-794, 1996b.
- HUANG, J. et al. Three new triterpenoids from *Salacia hainanensis* Chun et How showed effective anti- α -glucosidase activity. **Phytochemistry Letters** v. 5, p. 432-437, 2012.

ISMAIL, T. S. et al. Anti-inflammatory activity of *Salacia oblonga* Wall. and *Azima tetracantha* Lam. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 56, n. 2, p. 145-52, 1997.

KIM, S. H.; HYUN, S. H.; CHOUNG, S. Y. Anti-diabetic effect of cinnamon extract on blood glucose in db/db mice. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 104, n. 1-2, p. 119-23, 2006.

KISHI, A. et al. Structures of new friedelane- and norfriedelane-type triterpenes and polyacylated eudesmane-type sesquiterpene from *Salacia chinensis* LINN. (*S. prinoides* DC., Hippocrateaceae) and radical scavenging activities of principal constituents. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v. 51, n. 9, p. 1051-5, 2003.

KRISHNAKUMAR, K.; AUGUSTI, K. T.; VIJAYAMMAL, P. L. Hypoglycaemic and anti-oxidant activity of *Salacia oblonga* Wall. extract in streptozotocin-induced diabetic rats. **Indian Journal of Physiology and Pharmacology**, v. 43, n. 4, p. 510-4, 1999.

KUMAR, V.; WIJERATNE, D. B. T.; ABEYGUNAWARDENA, C. 21 α ,30-Dihydroxy-D:A-friedooleanan-3-one from *Salacia reticulata* var. β -*Diandra* stem bark. **Phytochemistry**, v. 29, n. 1, p. 333-335, 1990.

LEE, C.-K. New Triterpenes from the Heartwood of *Melaleuca leucadendron* L. **Journal of the Chinese Chemical Society**, v. 45, n. 2, p. 303-306, 1998.

LIAO, L. M. et al. Crystal structure of wilforine, a sesquiterpene pyridine alkaloid from *Salacia campestris*. **Anais da Associacao Brasileira de Quimica**, v. 46, p. 184-188, 1997.

LINS BRANDAO, M. G. et al. Triterpene saponins from the roots of *Ampelozizyphus amazonicus*. **Phytochemistry**, v. 31, n. 1, p. 352-354, 1992.

LÔBO, L. T. et al. Potencial alelopático de catequinas de *Tachigali myrmecophyla* (leguminosae). **Química Nova**, v. 31, p. 493-497, 2008.

LOMBARDI, J. Notas nomenclaturais em *Salacioideae* (Celastraceae). **Rodriguésia**, v. 61, n. 1, p. 123-125, 2010.

LOWRY, O. H. et al. Protein Measurement with the Folin phenol reagent. **Journal of Biological Chemistry**, v. 193, n. 1, p. 265-275, November 1, 1951.

MACIEL, M. A. M. et al. Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. **Química Nova**, v. 25, p. 429-438, 2002.

MAGINA, M. A. et al. Atividade antioxidante de três espécies de *Eugenia* (Myrtaceae). **Latin American Journal of Pharmacy**, v. 29, n. 3, p. 376-82, 2010.

MAGINA, M. D. A. **Estudo fitoquímico e biológico de espécies do gênero Eugenia**. 2008. (Doutorado). Departamento de Química, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

MANSUR, M. C. P. P. R. **Estudo preliminar das atividades fotoprotetora e antioxidante dos extratos das folhas de Bauhinia microstachya var. massambabensis Vaz numa formulação antissolar**. 2011. (Dissertação de Mestrado). Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.

MARLES, R. J.; FARNSWORTH, N. R. Antidiabetic plants and their active constituents. **Phytomedicine**, v. 2, n. 2, p. 137-89, 1995.

MASS Spectra. In: **NIST Chemistry WebBook, NIST Standard Reference Database Number 69**. LINSTROM, P. J. e MALLARD, W. G. (Ed.). Gaithersburg: National Institute of Standards and Technology

MATA, A. T. et al. Antioxidant and antiacetylcholinesterase activities of five plants used as Portuguese food spices. **Food Chemistry**, v. 103, n. 3, p. 778-786, 2007.

MBA'NING, B. M. et al. Salacetal, an oleanane-type triterpene from *Salacia longipes* var. *camerunensis*. **Zeitschrift für Naturforschung B: Chemical Sciences**, v. 66, p. 1270-1274, 2011.

MBA'NING, B. M. et al. Antiplasmodial sesquiterpenes from the seeds of *Salacia longipes* var. *camerunensis*. **Phytochemistry (Elsevier)**, v. 96, p. 347-352, 2013.

MORIKAWA, T. et al. Structures of New Friedelane-Type Triterpenes and Eudesmane-Type Sesquiterpene and Aldose Reductase Inhibitors from *Salacia chinensis*. **Journal of Natural Products**, v. 66, n. 9, p. 1191-1196, 2003.

MULAUDZI, R. B. et al. Pharmacological properties and protein binding capacity of phenolic extracts of some Venda medicinal plants used against cough and fever. **J Ethnopharmacol**, v. 143, n. 1, p. 185-93, 2012.

MURAOKA, O. et al. On the structure of the bioactive constituent from ayurvedic medicine *Salacia reticulata*: revision of the literature. **Tetrahedron Letters**, v. 49, n. 51, p. 7315-7317, 2008.

MUSTAD, V. A. et al. Evaluation of *Salacia Oblonga* Extract on Postprandial Blood Glucose Response to Different Carbohydrate Sources in Zucker Rats. **FASEB Journal**, v. 20, n. A1019, 2006.

NAKAMURA, S. et al. Megastigmane glycosides from the leaves of *Salacia chinensis*. **Heterocycles**, v. 75, p. 131-143, 2008.

NAKAMURA, S. et al. Chemical structures and hepatoprotective effects of constituents from the leaves of *Salacia chinensis*. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v. 59, p. 1020-1028, 2011.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural Products As Sources of New Drugs over the 30 Years from 1981 to 2010. **Journal of Natural Products**, v. 75, n. 3, p. 311-335, 2012.

OGUNKOYA, I. Application of mass spectrometry in structural problems in triterpenes. **Phytochemistry**, v. 20, n. 1, p. 121-126, 1981.

OKU, T.; HASHIGUCHI, M.; NAKAMURA, S. **Inhibitory Effects of the Phytochemicals Partially Hydrolyzed Alginate, Leaf Extracts of *Morus alba* and *Salacia* Extracts on Dental Caries**. Contemporary Approach to Dental Caries INTECH Open Access Publisher 2012.

OLEA, R. S. G.; ROQUE, N. F. Análise de misturas de triterpenos por RMN de ¹³C. **Química Nova**, v. 13, n. 4, p. 278-81, 1990.

PAARAKH, P. M.; PATIL, L. J.; THANGA, S. A. Genus *Salacia*: A Comprehensive Review. **Journal of Natural Remedies**, v. 8, n. 2, p. 116-131, 2008.

PEREIRA, D. F. et al. Effects of flavonoids on α -glucosidase activity: Potential targets for glucose homeostasis. **Nutrition (Burbank, Los Angeles County, Calif.)**, v. 27, n. 11, p. 1161-1167, 2011.

PETRONILHO, E. D. C.; PINTO, A. C.; VILLAR, J. D. F. **Acetilcolinesterase: Alzheimer e guerra química**. Revista Militar de Ciência e Tecnologia: 3-14 p. 2011.

PLAZA, A. et al. New Triterpene Glycosides from the Stems of *Anomospermum grandifolium*. **Journal of Natural Products**, v. 66, n. 12, p. 1606-1610, 2003.

PRICE, M. L.; BUTLER, L. G. Rapid visual estimation and spectrophotometric determination of tannin content of sorghum grain. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 25, n. 6, p. 1268-1273, 1977.

PU, J. et al. Study on Chemical Constituents from *Salacia amplifolia*. **Chinese Journal of Modern Applied Pharmacy**, v. 26, n. 11, p. 916-920, 2009.

RENHUA, S. et al. Studies on the chemical constituents from *Heteropanax fragrans*. **Acta Botanica Yunnanica**, v. 10, n. 4, p. 457-465, 1988.

RIPARDO FILHO, H. S. et al. Outros triterpenos do caule de *salacia impressifolia* (Hippocrateaceae). In: **31ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química - Livro de Resumos**. (Ed.), 2008.

- RIZVI, S. I.; ZAID, M. A. Intracellular reduced glutathione content in normal and type 2 diabetic erythrocytes: effect of insulin and (-)epicatechin. **Journal of Physiology and Pharmacology**, v. 52, n. 3, p. 483-8, 2001.
- ROCHA, W. C.; CORDEIRO, M. D. S. C. Estudo fitoquímico de *Salacia impressifolia* (Miers.) A. C. Smith. (Hippocrateaceae). In: **23ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química - Livro de Resumos**. (Ed.), 2000.
- SANTOS, F. et al. Antihyperglycemic and hypolipidemic effects of alpha, beta-amyrin, a triterpenoid mixture from *Protium heptaphyllum* in mice. **Lipids in Health and Disease**, v. 11, n. 1, p. 98, 2012.
- SASSA, H. et al. Structural basis of potent antiperoxidation activity of the triterpene celastrol in mitochondria: effect of negative membrane surface charge on lipid peroxidation. **Free Radical Biology and Medicine** v. 17, n. 3, p. 201-7, 1994.
- SERASINGHE, S. et al. Oral hypoglycemic effect of *Salacia reticulata* in the streptozotocin induced diabetic rat. **Phytotherapy Research**, v. 4, n. 5, p. 205-206, 1990.
- SETZER, W. N. et al. Isolation and Frontier Molecular Orbital Investigation of Bioactive Quinone-Methide Triterpenoids from the Bark of *Salacia petenensis*. **Planta Medica**, v. 67, n. 01, p. 65-69, 2001.
- SHIMADA, T. et al. *Salacia reticulata* inhibits differentiation of 3T3-L1 adipocytes. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 136, n. 1, p. 67-74, 2011.
- SHIMODA, H.; KAWAMORI, S.; KAWAHARA, Y. Effects of an Aqueous Extract of *Salacia reticulata*, a Useful Plant in Sri Lanka, on Postprandial Hyperglycemia in Rats and Humans. **Nippon Eiyo Shokuryo Gakkaishi**, v. 51, n. 5, p. 279-287, 1998.
- SIMÕES, C. M. O. M. A. **Farmacognosia : da planta ao medicamento**. Florianópolis, SC; Porto Alegre, RS: Editora da UFSC ; Editora da UFRGS, 2003.
- SMITHSONIAN INSTITUTION. Smithsonian Tropical Research Institute Herbarium. **Family: Hippocrateaceae; *Salacia impressifolia* (Miers) A.C. Sm.**, Disponível em: <<http://biogeodb.stri.si.edu/herbarium/species/?spnumber=2642>>. Acesso em: out 2013.
- SOMWONG, P.; SUTTISRI, R.; BUAKEAW, A. A new 1,3-diketofriedelane triterpene from *Salacia verrucosa*. **Fitoterapia**, v. 82, p. 1047-1051, 2011.
- SOUZA, V. C.; LORENZI, H. **Botânica sistemática : guia ilustrado para identificação das famílias de Fanerógamas nativas e exóticas no Brasil em APG II**. Nova Odessa, SP, Brasil: Instituto Plantarum de Estudos da Flora, 2008.

THE NEW YORK BOTANICAL GARDEN. **Hippocrateaceae: Salacia cf. impressifolia (Miers) A. C. Sm.**, Disponível em: <<http://sweetgum.nybg.org/vh/specimen.php?irn=172384>>. Acesso em: out 2013.

THIEM, D. A. et al. Bisanortriterpenes from *Salacia madagascariensis*. **Journal of Natural Products**, v. 68, p. 251-254, 2005.

UDAYAN, P. S. et al. A new species of *Salacia* (Hippocrateaceae) from South India. **Edinburgh Journal of Botany**, v. 69, n. 02, p. 255-258, 2012.

UNIVERSIDADEDE SÃO PAULO. **Hippocrateaceae: Salacia impressifolia**. Guia Igapó, Disponível em: <http://ecologia.ib.usp.br/guiaigapo/familias/hippocrateaceae/salacia_impressifolia/salacia_impressifolia.html>. Acesso em: out 2013.

VENKATESARULU, V. et al. Antimicrobial activity of chemoconstituents of roots of *salacia macrosperma*. **Ancient Science of life**, v. 12, n. 1-2, p. 251-6, 1992.

VENKATESWARLU, V. et al. Antidiabetic Activity of Roots of *Salacia macrosperma*. **Planta Medica**, v. 59, n. 5, p. 391-3, 1993.

VENKATESWARLU, V. et al. Pharmaceutical investigations on *salacia macrosperma*-1. **Ancient Science of life**, v. 9, n. 4, p. 215-9, 1990.

VIEGAS JUNIOR, C.; BOLZANI, V. D. S.; BARREIRO, E. J. Os produtos naturais e a química medicinal moderna. **Química Nova**, v. 29, p. 326-337, 2006.

VIEGAS JUNIOR, C. et al. Produtos naturais como candidatos a fármacos úteis no tratamento do Mal de Alzheimer. **Química Nova**, v. 27, p. 655-660, 2004.

VIEIRA, T. R. et al. Constituintes químicos de *Melaleuca alternifolia* (Myrtaceae). **Química Nova**, v. 27, p. 536-539, 2004.

WANG, Y. et al. Chemical constituents from *Salacia amplifolia*. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 39, n. 3, p. 205-208, 2011.

WATERMAN, P. G.; MOLE, S. **Analysis of phenolic plant metabolites**. Oxford; Boston: Blackwell Scientific, 1994.

WEIJL, N. I.; CLETON, F. J.; OSANTO, S. Free radicals and antioxidants in chemotherapy-induced toxicity. **Cancer Treatment Reviews**, v. 23, n. 4, p. 209-40, 1997.

WOISKY, R. G. S. A. Analysis of propolis: Some parameters and procedures for chemical quality control. **Journal of Apicultural Research**, v. 37, n. 2, p. 99, 1998.

YEN, G.-C.; CHEN, H.-Y. Antioxidant Activity of Various Tea Extracts in Relation to Their Antimutagenicity. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 43, n. 1, p. 27-32, 1995.

YOSHIKAWA, M. et al. Kotalanol, a potent alpha-glucosidase inhibitor with thiosugar sulfonium sulfate structure, from antidiabetic ayurvedic medicine *Salacia reticulata*. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v. 46, n. 8, p. 1339-1340, 1998.

YOSHIKAWA, M. et al. *Salacia reticulata* and its polyphenolic constituents with lipase inhibitory and lipolytic activities have mild antiobesity effects in rats. **Journal of Nutrition**, v. 132, n. 7, p. 1819-24, 2002a.

YOSHIKAWA, M. et al. Hepatoprotective and antioxidative properties of *Salacia reticulata*: preventive effects of phenolic constituents on CCl₄-induced liver injury in mice. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v. 25, n. 1, p. 72-6, 2002b.

YOSHIKAWA, M. et al. Polyphenol constituents from *Salacia* species: quantitative analysis of mangiferin with alpha-glucosidase and aldose reductase inhibitory activities. **Yakugaku Zasshi**, v. 121, n. 5, p. 371-8, 2001.

YOSHIKAWA, M. et al. Salacinol, potent antidiabetic principle with unique thiosugar sulfonium sulfate structure from the Ayurvedic traditional medicine *Salacia reticulata* in Sri Lanka and India. **Tetrahedron Letters**, v. 38, n. 48, p. 8367-8370, 1997.

YOSHIKAWA, M. et al. Biological activities of *Salacia chinensis* originating in Thailand: the quality evaluation guided by alpha-glucosidase inhibitory activity. **Yakugaku Zasshi**, v. 123, n. 10, p. 871-80, 2003.

YOSHIKAWA, M. et al. Salaprinol and ponkoranol with thio-sugar sulfonium sulfate structure from *Slacia prinoides* and α -glucosidase inhibitory activity of ponkoranol and kotalanol desulfate. **Heterocycles**, v. 75, p. 1397-1405, 2008.

YUAN, G. et al. Chemical constituents of ethanol extract from root of *Salacia hainanensis*. **Shizhen Guoyi Guoyao**, v. 22, p. 1345-1346, 2011.

ZHANG, Y. et al. Absolute Structures of New Megastigmane Glycosides, Foliasalaciosides E1, E2, E3, F, G, H, and I from the Leaves of *Salacia chinensis*. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v. 56, n. 4, p. 547-553, 2008.

ANEXOS

Figura 41. Espectros de massa dos componentes identificados da mistura 1 (continua)

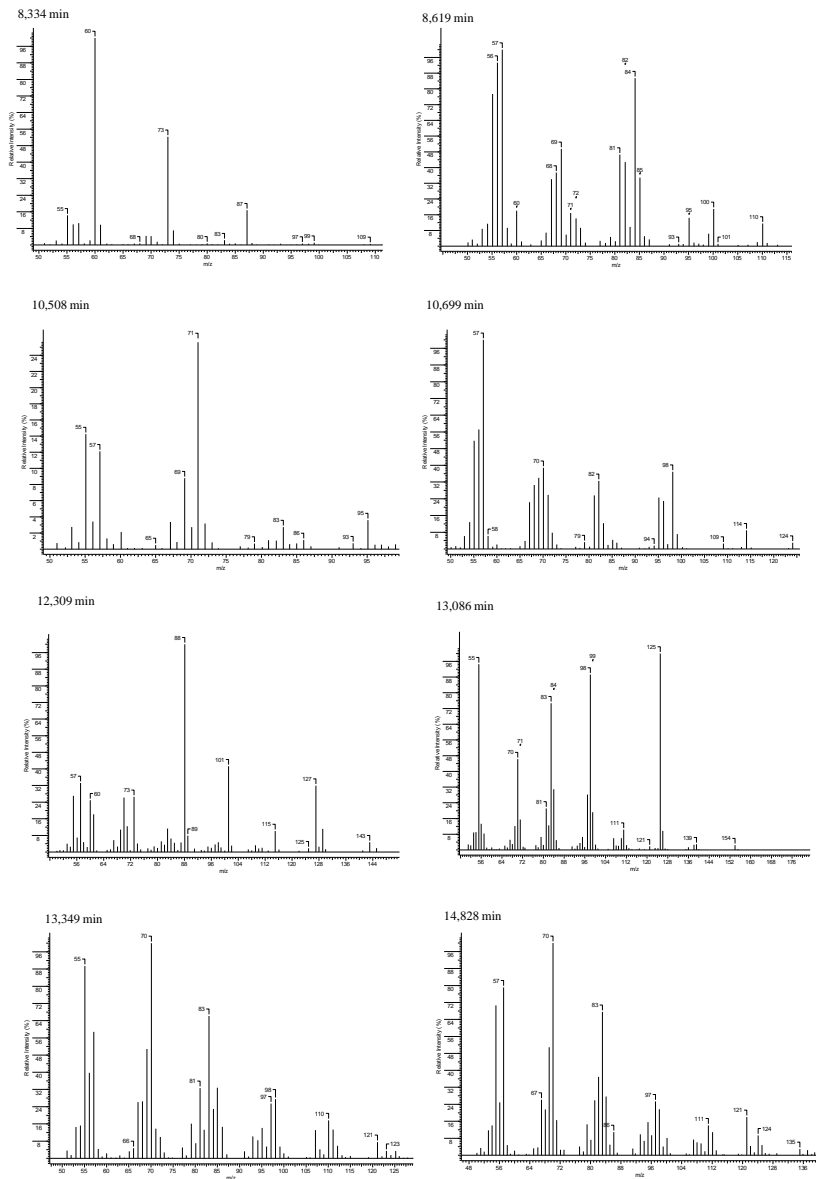


Figura 41. Espectros de massa dos componentes identificados da mistura 1 (continuação)

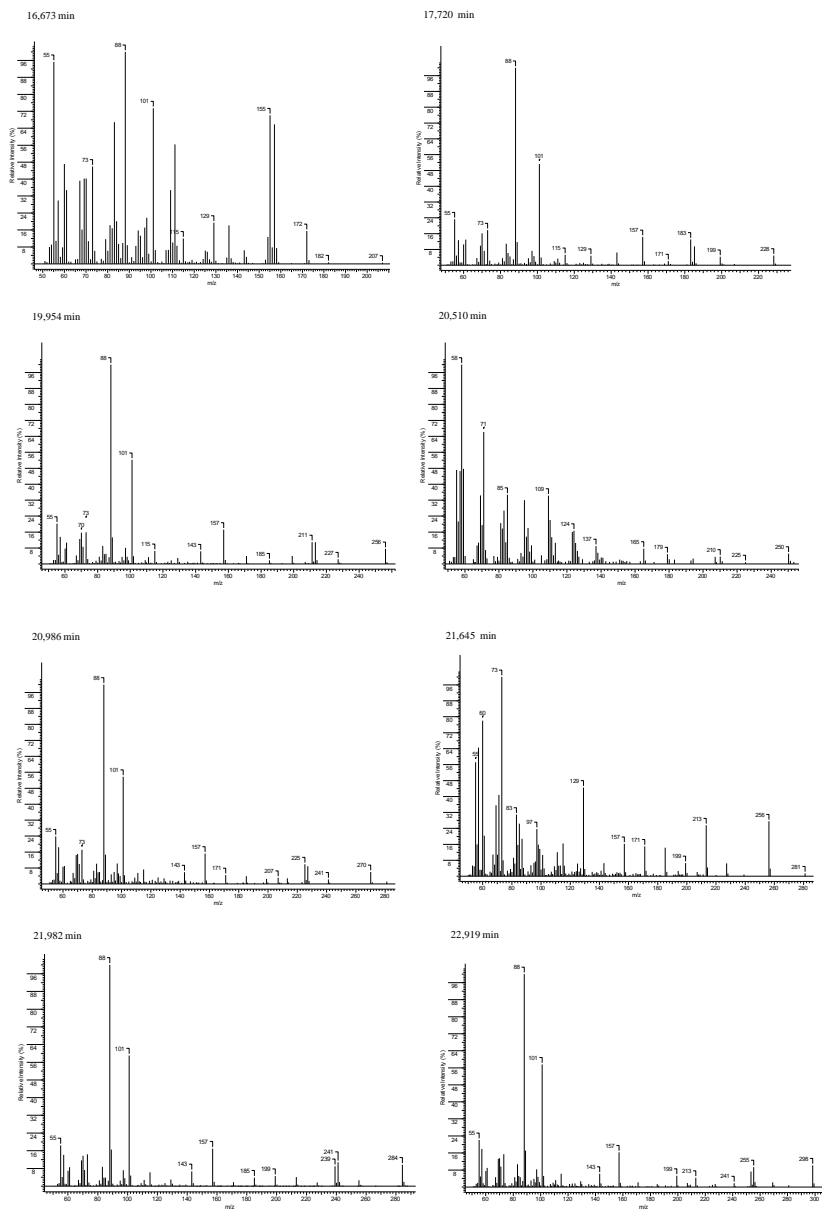


Figura 41. Espectros de massa dos componentes identificados da mistura 1 (continuação)

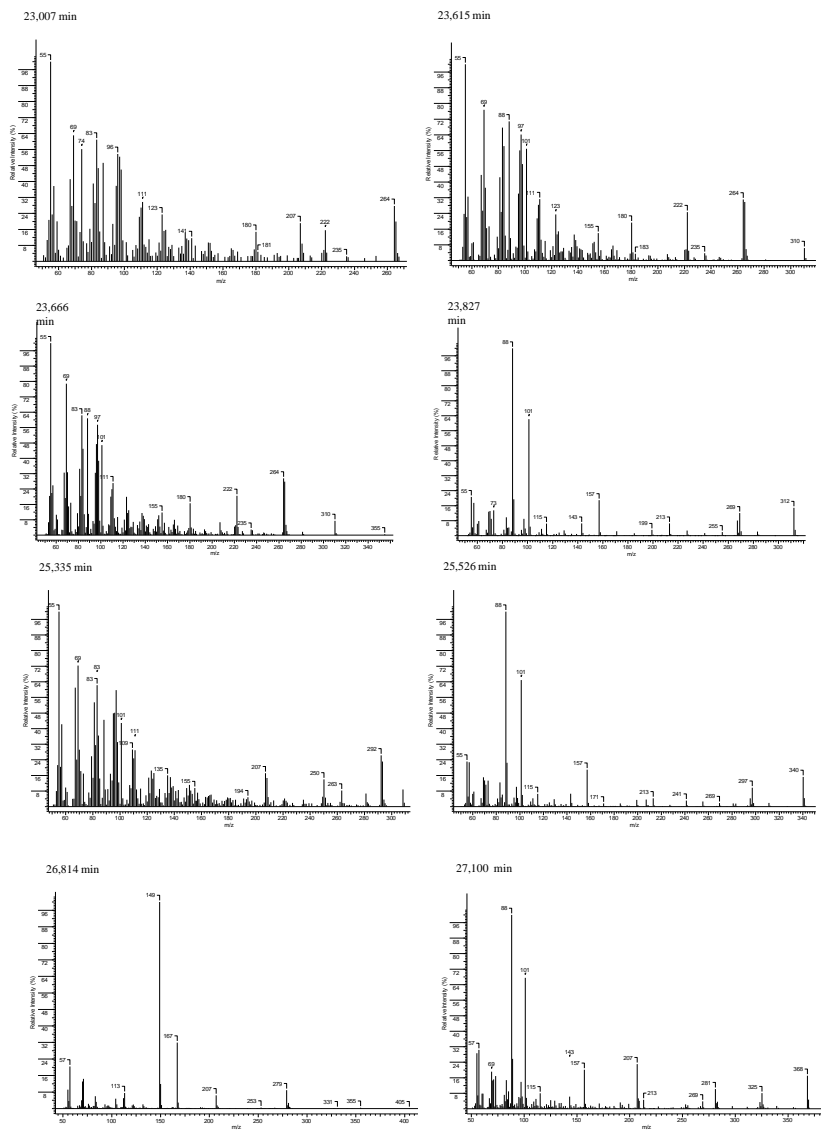
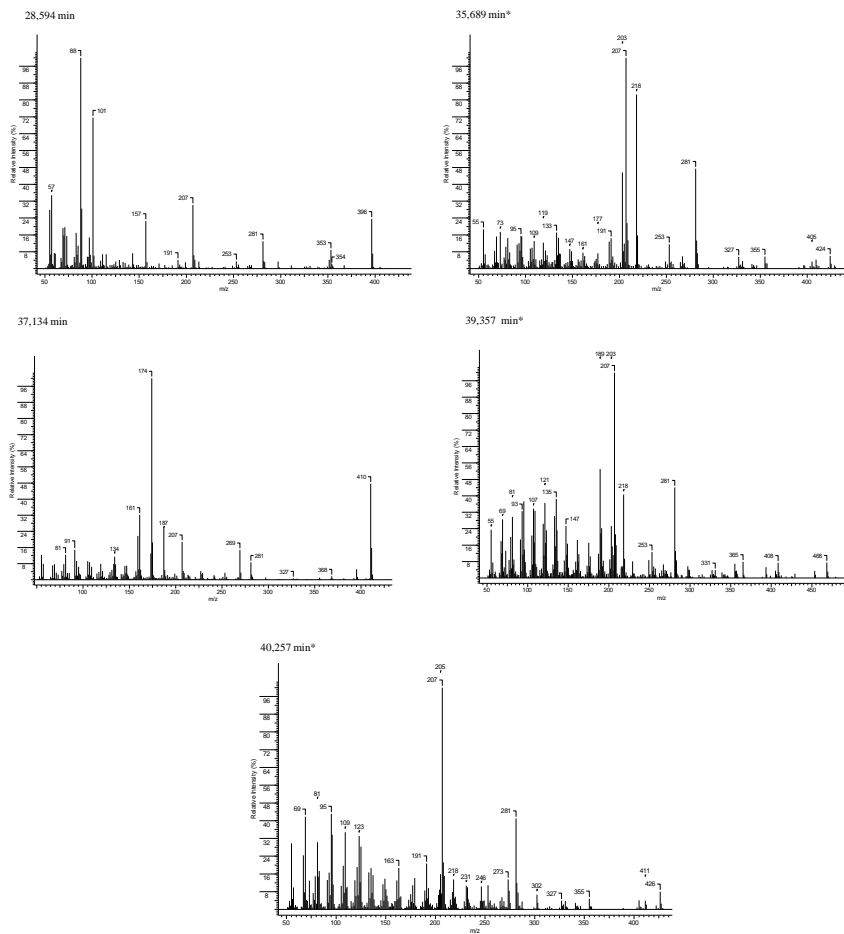


Figura 41. Espectros de massa dos componentes identificados da mistura 1 (conclusão)



*os picos de m/z 207 e 281 são característicos de siloxanos, provenientes da sangria da coluna.

Figura 42. Mapa de correlação bidimensional heteronuclear HMQC (400 MHz (^1H), 100 MHz (^{13}C), CDCl_3) da mistura α , β -amirina

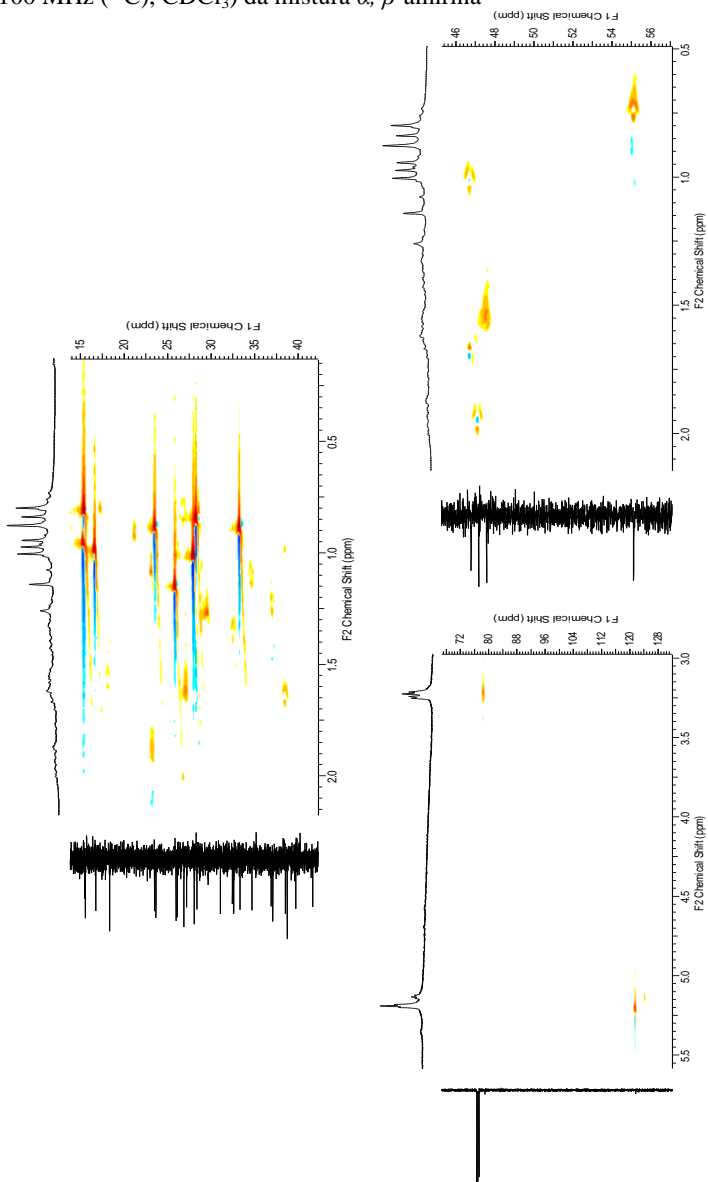


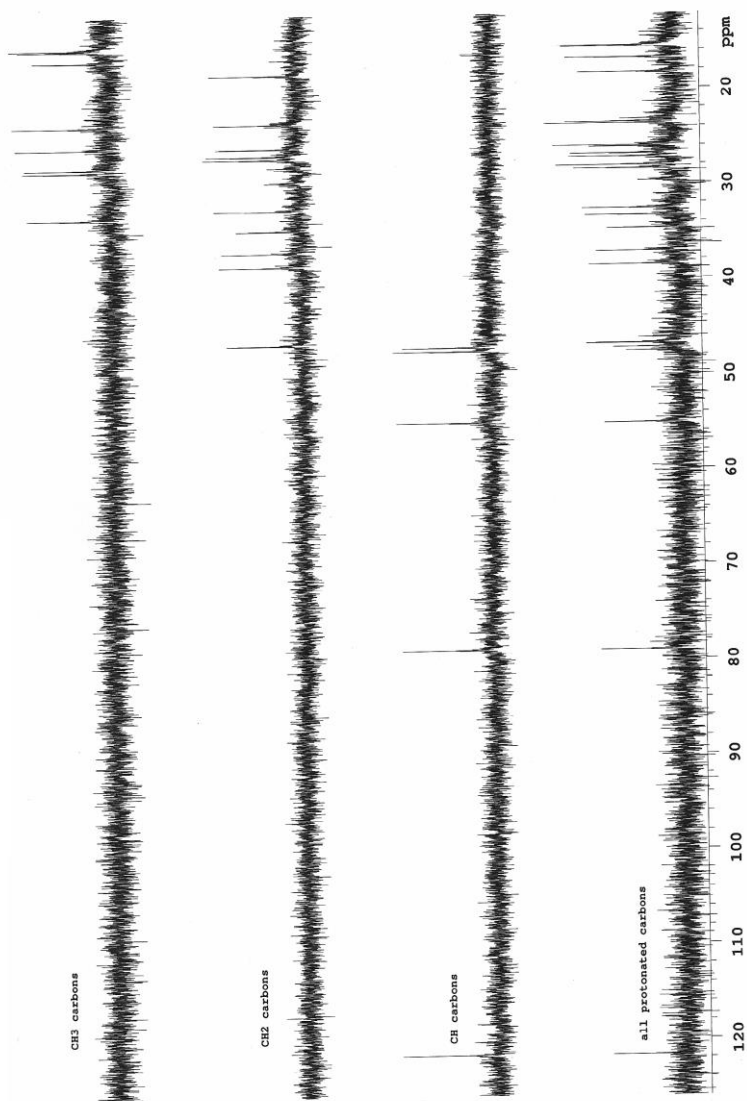
Figura 43. DEPT (100 MHz, CDCl₃) da mistura α , β -amirina

Figura 44. Mapa de correlação bidimensional heteronuclear HMBC (400 MHz (^1H), 100 MHz (^{13}C), CDCl_3) da mistura α , β -amirina

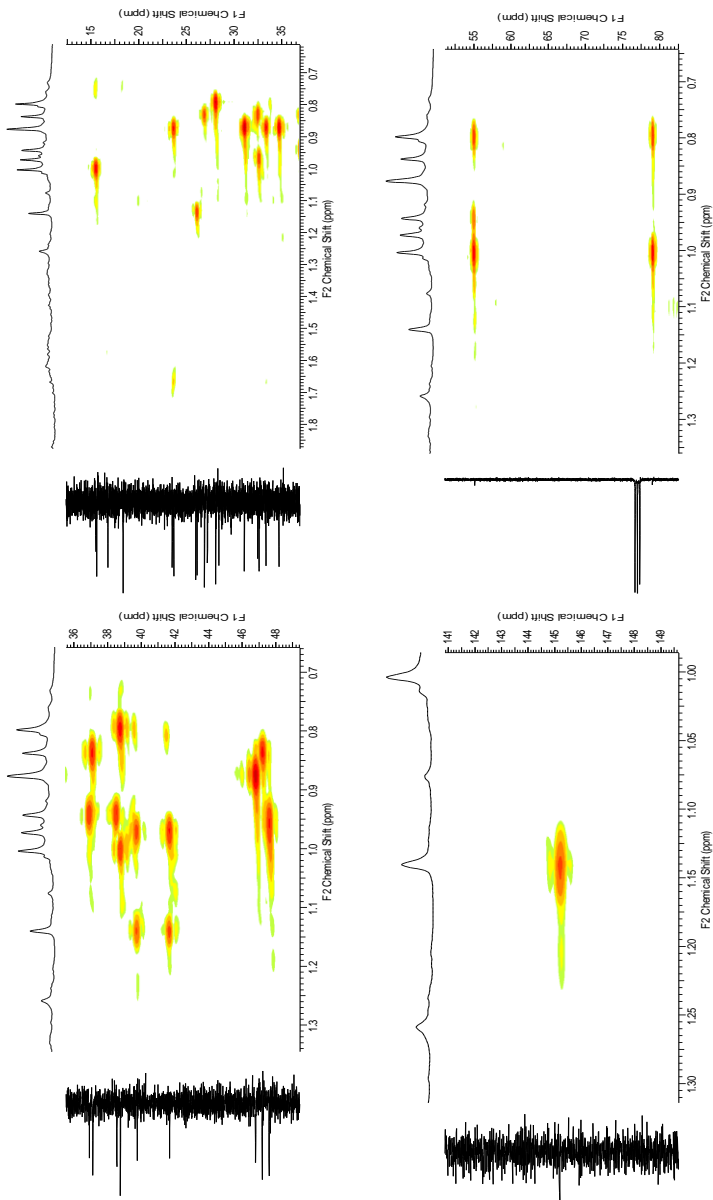


Figura 45. Mapa de correlação bidimensional homonuclear COSY (400 MHz, CDCl_3) da mistura α , β -amirina

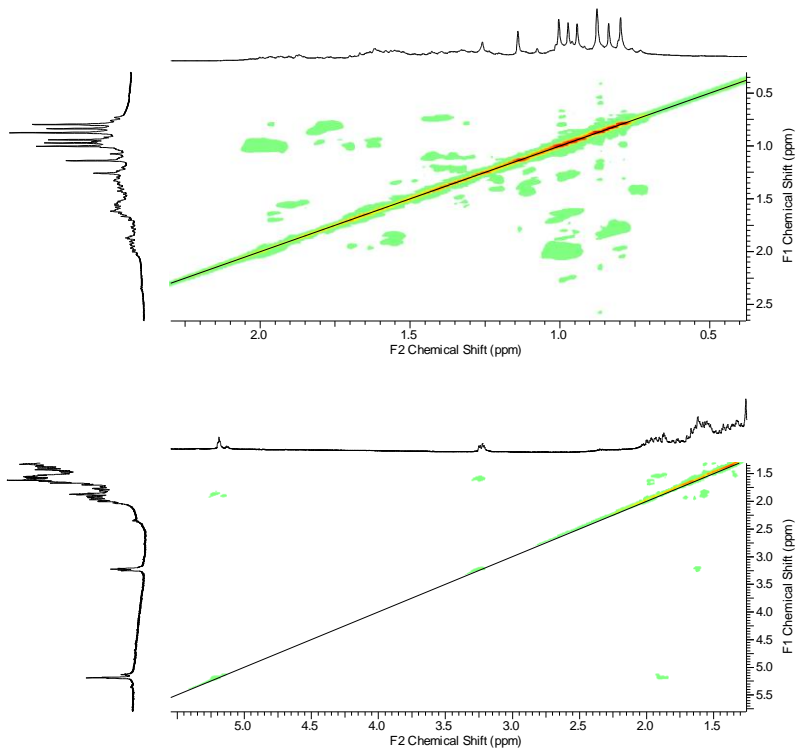


Figura 46. Mapa de correlação bidimensional heteronuclear HMQC (400 MHz (^1H), 100 MHz (^{13}C), CDCl_3) do composto 1

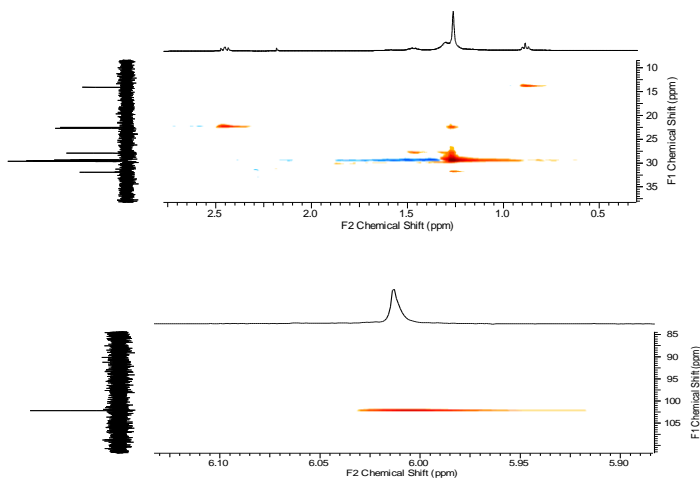


Figura 47. DEPT (100 MHz, CDCl_3) do composto 1

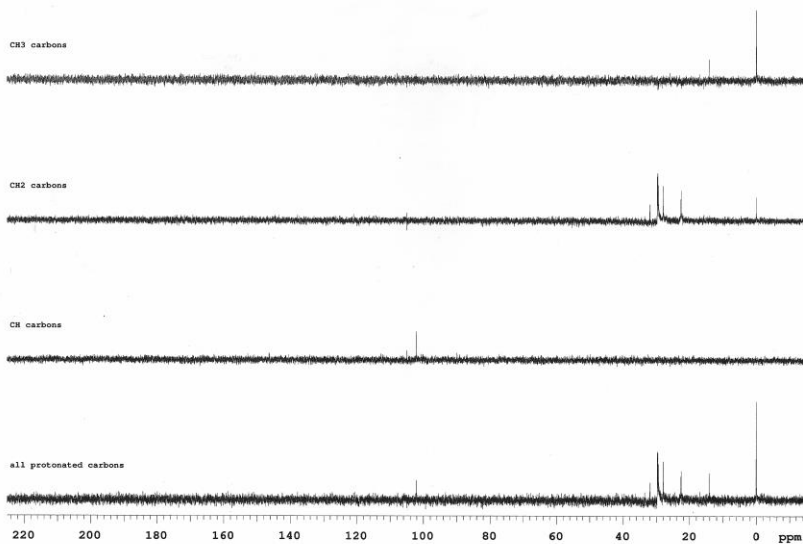


Figura 48. Mapa de correlação bidimensional heteronuclear HMBC (400 MHz (^1H), 100 MHz (^{13}C), CDCl_3) do composto 1

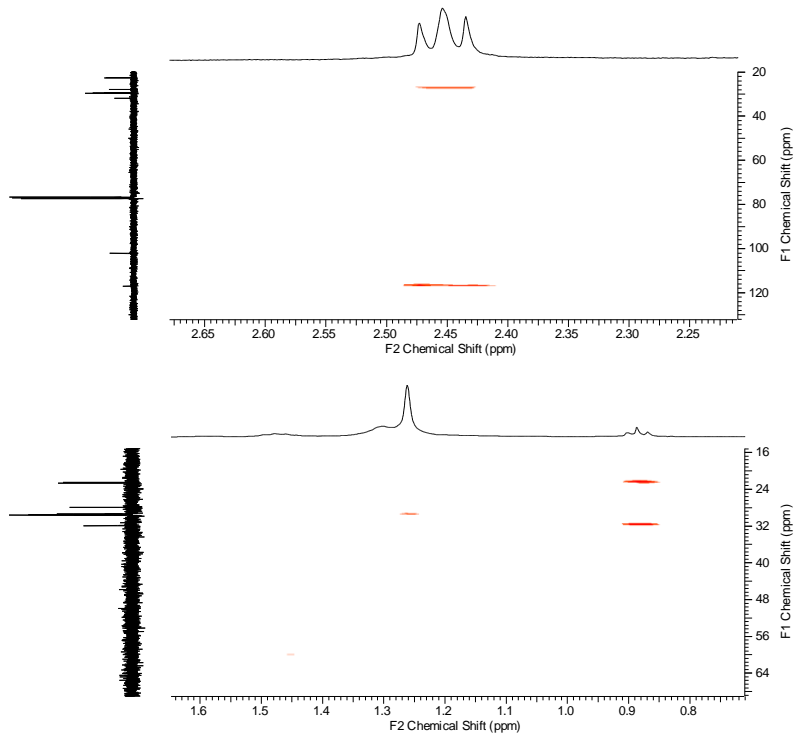


Figura 49. Mapa de correlação bidimensional homonuclear COSY (400 MHz, CDCl_3) do composto 1

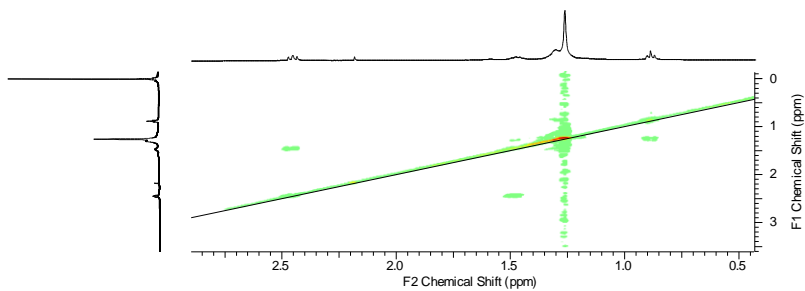


Figura 50. Espectro de ESI-IT-TOF do ácido melalúxico

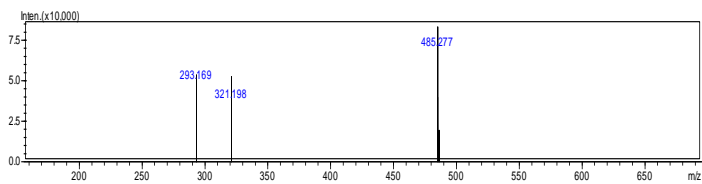
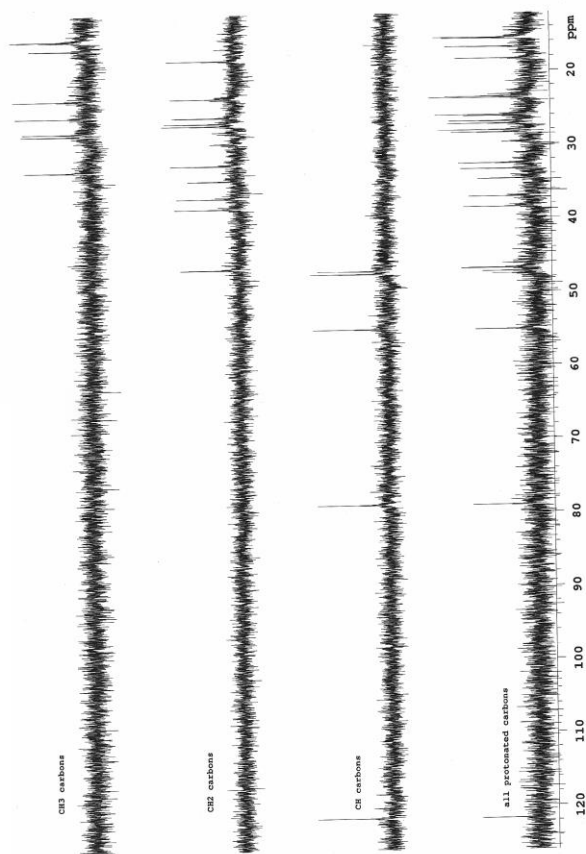
Figura 51. DEPT (100 MHz, $\text{CDCl}_3 + \text{CD}_3\text{OD}$) do ácidu melalúxico

Figura 52. Mapa de correlação bidimensional heteronuclear HMQC (400 MHz (^1H), 100 MHz (^{13}C), $\text{CDCl}_3 + \text{CD}_3\text{OD}$) do ácido melaléuico

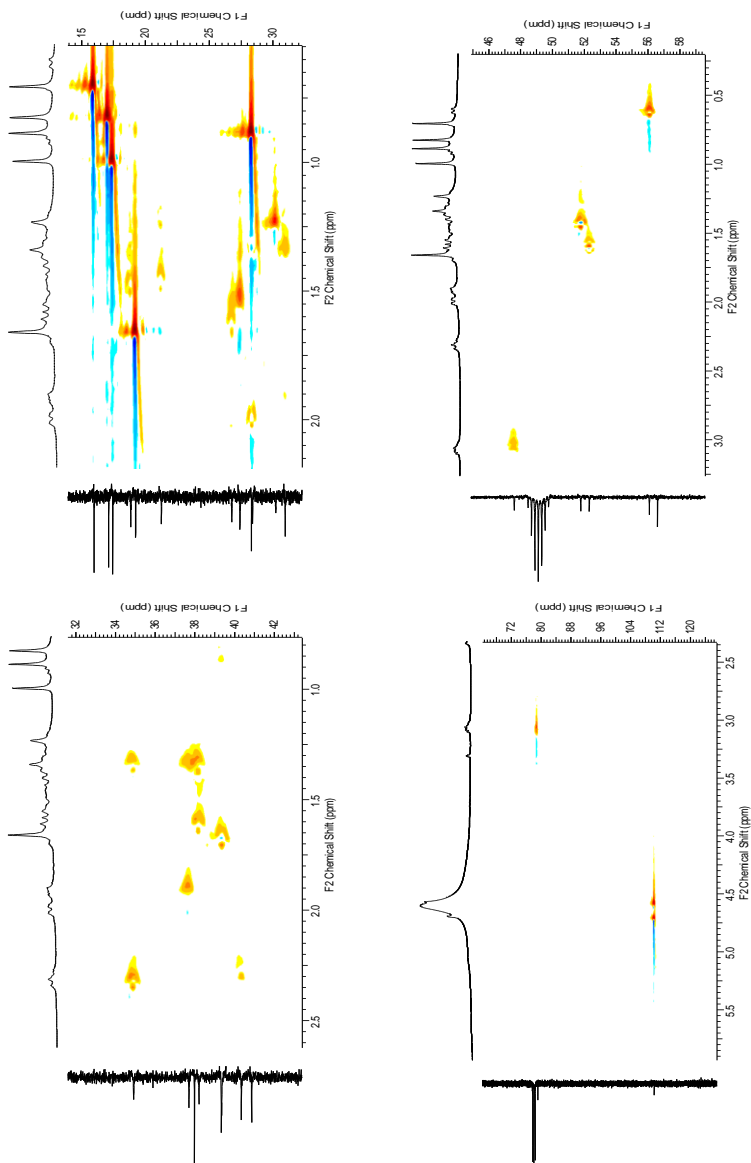


Figura 53. Mapa de correlação bidimensional heteronuclear HMBC (400 MHz (^1H), 100 MHz (^{13}C), $\text{CDCl}_3 + \text{CD}_3\text{OD}$) do ácido melaléutico

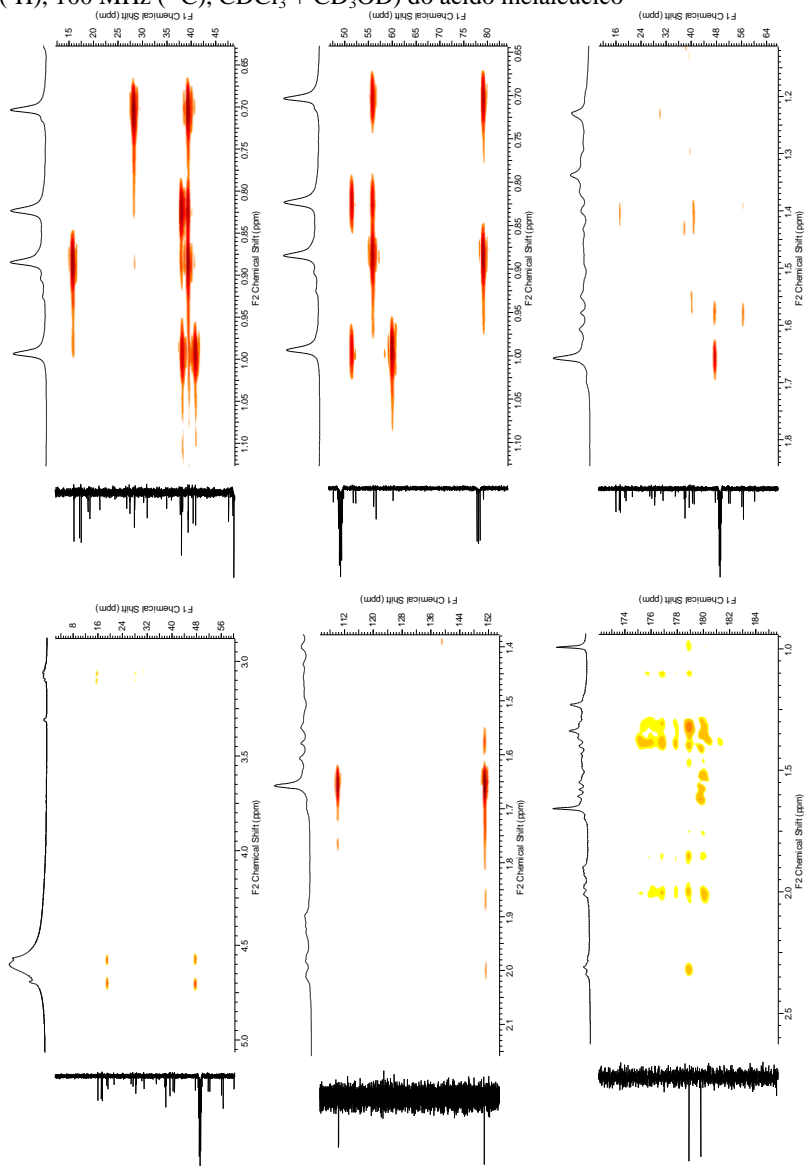


Figura 54. Mapa de correlação bidimensional homonuclear COSY (400 MHz, $\text{CDCl}_3 + \text{CD}_3\text{OD}$) do ácido melaléucico

