

**ESTUDO FITOQUÍMICO E AVALIAÇÃO DA BIOATIVIDADE DE
SUBSTÂNCIAS ISOLADAS E DERIVATIZADAS DE
Hymenaea stigonocarpa (Fabaceae).**

PATRÍCIA SILVANA SILVA ANDREÃO

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE – UENF

CAMPOS DOS GOYTACAZES, RJ
MAIO - 2010

**ESTUDO FITOQUÍMICO E AVALIAÇÃO DA BIOATIVIDADE DE
SUBSTÂNCIAS ISOLADAS E DERIVATIZADAS DE
Hymenaea stigonocarpa (Fabaceae).**

PATRÍCIA SILVANA SILVA ANDREÃO

“Tese apresentada ao Centro de Ciência e Tecnologia da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como parte das exigências para obtenção do título de Doutor em Ciências Naturais”.

Orientador: Prof. Dr. Paulo César Muniz de Lacerda Miranda

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE – UENF

CAMPOS DOS GOYTACAZES, RJ
MAIO – 2010

FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pela Biblioteca do CCT / UENF

29/2010

Andreão, Patrícia Silvana Silva

Estudo fitoquímico e avaliação da bioatividade de substâncias isoladas e derivatizadas de *Hymenaea stigonocarpa* (Fabaceae) / Patrícia Silvana Silva Andreão. – Campos dos Goytacazes, 2010. xxix, 281 f. : il.

Tese (Doutorado em Ciências Naturais) --Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. Centro de Ciência e Tecnologia. Laboratório de Ciências Químicas. Campos dos Goytacazes, 2010.

Orientador: Paulo César Muniz de Lacerda Miranda.

Área de concentração: Ciências Naturais.

Bibliografia: f. 115-126 e 199-208.

1. *Hymenaea* 2. Fitoquímica 3. Terpenos 4. Bioatividade 5. Produtos naturais I. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. Centro de Ciência e Tecnologia. Laboratório de

**ESTUDO FITOQUÍMICO E AVALIAÇÃO DA BIOATIVIDADE DE
SUBSTÂNCIAS ISOLADAS E DERIVATIZADAS DE
Hymenaea stigonocarpa (Fabaceae).**

PATRÍCIA SILVANA SILVA ANDREÃO

“Tese apresentada ao Centro de Ciência e Tecnologia da Universidade Estadual do Norte Fluminense, como parte das exigências para obtenção do título de Doutor em Ciências Naturais”.

Aprovado em 25 de fevereiro de 2010
Comissão Examinadora:

Dr. Walter Luiz Brasil Medeiros – IF Fluminense - *Campus Campos/RJ*

Prof.^a Dr.^a Rosana Aparecida Giacomini - UENF

Prof. Dr. Olney Vieira-da-Motta - UENF

Prof. Dr. Paulo Cesar Muniz de Lacerda Miranda - UENF
(Orientador)

“Os grandes feitos são
conseguidos não pela força,
mas pela perseverança.”

Samuel Johnson

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, José Carlos e Delzina,
que por uma vida de dedicação, amor e
trabalho sempre possibilitaram a seus filhos a
oportunidade de realizar sonhos e conquistas.

Ao meu irmão, Alexandre,
pelo apoio constante.

Ao meu amado esposo Almir pelo
carinho, companheirismo e colaboração
que sempre me impulsionaram.

Ao meu adorado filho, que soube compreender
a ausência de sua mãe em muitos momentos
difíceis por causa dos estudos.

AGRADECIMENTOS

A Deus, que por sua presença, luz e força sempre me abençoa e capacita para tudo aquilo que Ele me destina.

Várias pessoas contribuíram para que este trabalho chegasse a bom termo. A todas elas registro minha gratidão.

Meus agradecimentos aos meus orientadores, professores Dra. Rosana Giacomini e Dr. Paulo Miranda, que além da orientação segura e competente, me ofereceram um convívio sadio e amigável no ambiente profissional. E mais do que orientadores se mostraram amigos que me apoiaram em momentos difíceis que eventualmente surgiram ao longo destes anos.

Aos professores Dr. Milton Kanashiro e Dr. Olney Vieira-da-Motta que pela colaboração possibilitaram a realização dos ensaios biológicos e às alunas Lorena, Luciana Mathias e Thaís Rigueti pela ajuda no desenvolvimento dos testes.

Às minhas grandes e inesquecíveis amigas Karla, Letícia e Neidemar por fazerem parte, sem dúvida alguma, dos melhores momentos desta jornada.

À amiga Carol por ter participado de forma tão ativa no desenvolvimento do trabalho e por ter sido uma companheira de laboratório.

Aos amigos de laboratório Juliana, Leonardo, Marlon, Lindomar não só pela amizade, carinho, mas, principalmente, pelo sorriso e bom humor constantes.

Aos amigos Ana Cristina, Débora, Elaine, Graziella, Ildomar, Jucimar, Lara e Marcelo pelo carinho, amizade, presença e apoio.

Aos funcionários e técnicos de Pós-graduação de Ciências Naturais da UENF que forneceram condições adequadas para o desenvolvimento dos trabalhos: Maristela, Roberto, Robson, Tânea e Ulisses.

Um agradecimento muito especial ao secretário de Pós-graduação em Ciências Naturais Edson Corrêa pela presteza e paciência nos momentos mais complicados desta jornada.

A todos os colegas e professores da pós-graduação do programa Ciências Naturais.

A todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho.

À FAPERJ-UENF pelo apoio financeiro.

SUMÁRIO

Lista de figuras	xiv
Lista de tabelas	xxi
Lista de abreviaturas	xxiii
Resumo	xxv
Abstract	xxvii
Justificativa	xxix

CAPÍTULO 1

ESTUDO FITOQUÍMICO E DERIVATIZAÇÕES DE SUBSTÂNCIAS ISOLADAS DE *Hymenaea stigonocarpa*

1. INTRODUÇÃO	1
1.1. A família Fabacea (Leguminosae)	1
1.2. O gênero <i>Hymenaea</i>	3
1.2.1. <i>Hymenaea stigonocarpa</i>	8
1.3. <i>Hymenaea</i> e a medicina popular	12
1.4. Estudos químicos do gênero <i>Hymenaea</i>	13
1.5. Atividades biológicas de <i>Hymenaea</i>	22
1.5.1. Atividade biológica de <i>Hymenaea stigonocarpa</i>	24
1.6 . Estudos diversos desenvolvidos com o gênero <i>Hymenaea</i>	25
1.6.1. Estudos com a resina de <i>Hymenaea</i>	25

1.6.2. Estudos agronômicos	26
1.6.3. Estudos sobre interação de <i>Hymenaea</i> com outros organismos	29
1.6.4. Estudos nutricionais e na indústria alimentícia	31
1.6.5. Estudos etnobotânicos	31
1.6.6. Outros estudos com <i>Hymenaea</i>	32
2. OBJETIVOS	33
2.1. Gerais	33
2.2. Específicos	33
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	34
3.1. Estudo fitoquímico do extrato hexânico de <i>Hymenaea stigonocarpa</i>	34
3.1.1. Preparação do extrato e extração ácido-base	34
3.1.2. Separação das substâncias presentes na fração neutra	37
3.1.2.1. Isolamento dos sesquiterpenos α -copaeno (15), óxido de cariofileno (29) e espatulenol (30)	37
3.1.2.2. Isolamento do diterpeno caur-16-en-18-ol (31)	41
3.1.2.3. Isolamento dos diterpenos cauran-16 α -ol (32) e caur-16-en-3 α -ol (33)	43
3.1.3. Separação das substâncias da fração ácida	47
3.1.3.1. Isolamento do diterpeno caur-16-en-18-oato de metila (37)	48
3.1.3.2. Isolamento do diterpeno ozato de metila (6a)	51
3.1.3.3. Isolamento do diterpeno caur-15-en-18-oato de metila (38)	52
3.1.3.4. Isolamento do diterpeno isoozato de metila (39)	55
3.2. Procedimentos sintéticos	59
3.2.1. Síntese dos álcoois 40 e 41 a partir dos ésteres 6a e 39	60
3.2.2. Síntese dos tosilatos 42 e 43 a partir dos álcoois 40 e 41	64
3.2.3. Síntese dos trienos 44 e 45 a partir dos tosilatos 42 e 43	67
3.2.4. Tentativa de purificação dos trienos 44 e 45	68
3.3. Recuperação da sílica impregnada com nitrato de prata	69
3.3.1. Avaliação das características físico-químicas da sílica gel recuperada	70
4. CONCLUSÕES	74
5. MATERIAL E MÉTODOS	75
5.1. Generalidades metodológicas	75
5.1.1. Ressonância magnética nuclear de hidrogênio e de carbono	75

5.1.2. Espectroscopia no infravermelho – FTIR	76
5.1.3. Cromatografia gasosa acoplada ao espectrômetro de massas – CG/EM	76
5.1.4. Ponto de fusão	77
5.1.5. Métodos cromatográficos	78
5.1.6. Instrumentos utilizados para aferir qualidade da sílica gel recuperada	79
5.2. Procedimentos	80
5.2.1. Estudo fitoquímico do extrato hexânico	80
5.2.1.1. Coleta do material e identificação da espécie	80
5.2.1.2. Preparação do extrato hexânico e extração ácido-base	80
5.2.1.3. Separação das substâncias presentes na fração neutra	81
5.2.1.4. Separação das substâncias da fração ácida	91
5.2.1.4.1. Esterificação da fração ácida com sulfato de metila - $(\text{CH}_3)_2\text{SO}_4$..	91
5.2.1.4.2. Esterificação da fração ácida com diazometano (34)	92
a) Preparo do Diazald (35)	92
b) Preparo do diazometano (34)	93
c) Esterificação	94
5.2.1.4.3. Pré-purificação da fração esterificada	95
5.2.1.4.4. Separação das substâncias da fração ácida	95
5.2.2. Derivatizações dos ácidos ózico e isoózico	101
5.2.2.1. Preparo do extrato hexânico	101
5.2.2.2. Extração ácido-base	101
5.2.2.3. Esterificação	101
5.2.2.4. Pré-purificação da fração esterificada	102
5.2.2.5. Separação dos ésteres ozato de metila (6a) e isoozato de metila (39)	102
5.2.2.6. Síntese dos álcoois 40 e 41 a partir dos ésteres 6a e 39	103
5.2.2.7. Separação dos álcoois 40 e 41	104
5.2.2.8. Síntese dos tosilatos 42 e 43 a partir dos álcoois 40 e 41	107
5.2.2.9. Separação dos tosilatos 42 e 43	108
5.2.2.10. Síntese dos trienos 44 e 45 a partir dos tosilatos 42 e 43	111
5.2.2.11. Tentativa de purificação dos trienos 44 e 45	112

5.2.3. Recuperação da sílica gel impregnada com prata	113
5.2.3.1. Procedimento de recuperação da sílica gel impregnada com nitrato de prata	113
5.2.3.2. Avaliação das características físico-químicas da sílica gel tratada ..	114
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	115

CAPÍTULO 2

AVALIAÇÃO DA POTENCIAL BIOATIVIDADE DE SUBSTÂNCIAS ISOLADAS E DERIVATIZADAS DO EPICARPO DE *Hymenaea* *stigonocarpa* (Fabaceae)

1. INTRODUÇÃO	127
1.1. Produtos naturais e atividade antimicrobiana	127
1.1.1. <i>Candida</i> sp.	129
1.1.2. <i>Cryptococcus</i> sp.	130
1.1.3. <i>Staphylococcus</i> sp.	132
1.1.4. <i>Escherichia</i> sp.	134
1.2. Atividade frente a células tumorais humanas	135
1.2.1. Câncer	135
1.2.2. Mecanismos de morte celular	137
1.2.2.1. Necrose	137
1.2.2.2. Apoptose	138
1.2.3. Estimativas do câncer no mundo e no Brasil	139
1.2.4. Diterpenos como drogas antitumorais	140
2. OBJETIVOS	142
2.1. Gerais	142
2.2. Específicos	143
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	144

3.1. Avaliação da atividade antimicrobiana das substâncias isoladas e derivatizadas do epicarpo de <i>Hymenaea stigonocarpa</i>	144
3.1.1. Ensaio de inibição do crescimento em meio líquido com <i>Candida albicans</i>	149
3.1.1.1. <i>Candida albicans</i> ATCC 11006	149
3.1.1.2. <i>Candida albicans</i> ATCC 10231	152
3.1.2. Ensaio de inibição do crescimento em meio líquido com <i>Cryptococcus neoformans</i>	155
3.1.3. Ensaio de inibição do crescimento em meio líquido com <i>Staphylococcus aureus</i>	160
3.1.4. Ensaio de inibição do crescimento em meio líquido com <i>Escherichia coli</i>	163
3.2. Atividade frente a células tumorais humanas	166
3.2.1. Avaliação do efeito das substâncias 31 , 37 e 38 na viabilidade celular	167
3.2.2. Avaliação do efeito das substâncias 31 , 37 e 38 na viabilidade celular por LDH	171
3.2.3. Avaliação da indução de apoptose em células tumorais mediada pelas substâncias 31 , 37 e 38	174
3.2.4. Cálculo de dose efetiva 50% das substâncias (IC ₅₀)	184
3.3. Atividade anti-inflamatória	186
3.3.1. Avaliação colorimétrica da concentração de monóxido de nitrogênio liberado pelas células Raw 264.7 estimuladas com LPS	186
4. CONCLUSÕES	191
5. MATERIAL E MÉTODOS	192
5.1. Avaliação da atividade antimicrobiana das substâncias isoladas e derivatizadas do epicarpo de <i>Hymenaea stigonocarpa</i>	192
5.1.1. Ensaio de inibição do crescimento em meio líquido com os fungos <i>Candida albicans</i> e <i>Cryptococcus neoformans</i>	192
5.1.2. Ensaio de inibição do crescimento em meio líquido com as bactérias <i>Staphylococcus aureus</i> e <i>Escherichia coli</i>	194
5.2. Avaliação da atividade das substâncias isoladas e derivatizadas do epicarpo de <i>Hymenaea stigonocarpa</i> frente a células tumorais humanas	195

5.2.1. Cultura da linhagem de célula de origem tumoral	195
5.2.2. Avaliação <i>in vitro</i> da atividade biológica das substâncias frente às células tumorais	195
5.2.3. Avaliação do efeito citotóxico das substâncias frente às células tumorais	196
5.2.4. Avaliação do índice da desidrogenase láctica (LDH) liberada pelas células após incubação com as substâncias	196
5.2.5. Avaliação da apoptose por microscopia de fluorescência	197
5.3. Atividade anti-inflamatória	197
5.3.1. Avaliação colorimétrica da concentração de monóxido de nitrogênio liberado pelas células Raw 264.7 estimuladas com LPS	197
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	199
APÊNDICE	209

LISTA DE FIGURAS

CAPITULO 1

Figura 1 – Folhas de <i>Hymenaea</i>	3
Figura 2 – <i>Hymenaea courbaril</i> (jatobá amazônico) e <i>Hymenaea stigonocarpa</i> (jatobá-do-cerrado)	7
Figura 3 - Foto dos bolsões de resina de <i>Hymenaea</i>	8
Figura 4 – Botão floral em desenvolvimento e botão se abrindo em flor de <i>Hymenaea stigonocarpa</i> (jatobá-do-cerrado)	9
Figura 5 – Frutos de jatobá-do-cerrado coletados na Serra do Cipó em Minas Gerais	10
Figura 6 – Polpa farinácea e sementes dos frutos de jatobá-do-cerrado ..	10
Figura 7 - Substâncias diterpênicas isoladas de <i>Hymenaea</i>	14
Figura 8 - Sesquiterpenos isolados de <i>Hymenaea</i>	20
Figura 9 - Frutos (a) e epicarpós (b) de <i>H. stigonocarpa</i>	35
Figura 10 - Cromatograma da fração de neutros do extrato hexânico do epicarpo de <i>H. stigonocarpa</i>	36
Figura 11 - Cromatograma da fração de ésteres do extrato hexânico do epicarpo de <i>H. stigonocarpa</i>	36
Figura 12 - Cromatograma da fração constituída dos ésteres 6a, 37, 38 e 39	47
Figura 13 - Cromatograma da fração contendo o éster 37.....	48
Figura 14 - Cromatograma da fração contendo o éster 6a	51
Figura 15 - Cromatograma da fração contendo o éster 38.....	53
Figura 16 - Cromatograma da fração contendo o éster 39.....	55
Figura 17 - Redução da posição <i>neo</i> -pentílica	59
Figura 18 - Etapas propostas para a redução da posição <i>neo</i> -pentílica ...	60
Figura 19 - Cromatograma da mistura de isômeros obtida como produtos e subprodutos na reação de redução de Tatsuno/Fujimoto	67

Figura 20 - Reação de redução de Tatsuno/Fujimoto	68
Figura 21 - Gráfico da derivada da perda de massa em função da temperatura obtido na análise termogravimétrica em atmosfera oxidante das amostras de sílica antes e após tratamentos	73

CAPITULO 2

Figura 1 - Substâncias isoladas e derivatizadas do epicarpo de <i>Hymenaea stigonocarpa</i> utilizadas nos ensaios antimicrobianos	146
Figura 2 – Metodologia utilizada para os ensaios biológicos: incubação em meio líquido (a) e difusão em Agar (b)	148
Figura 3 – Efeito das substâncias 15 (122 mM), 29 (114 mM), 30 (114 mM) e Itraconazol (0,07 mM) sobre o crescimento de <i>Candida albicans</i> ATCC 11006.....	149
Figura 4 – Efeito das substâncias 31 (87 mM), 32 (86 mM), 33 (87 mM), 37 (79 mM), 38 (79 mM) e Itraconazol (0,07 mM) sobre o crescimento de <i>Candida albicans</i> ATCC 11006.....	150
Figura 5 – Efeito das substâncias 6a (79 mM), 39 (79 mM) e Itraconazol (0,07 mM) sobre o crescimento de <i>Candida albicans</i> ATCC 11006.....	151
Figura 6 – Efeito das substâncias 40 (87 mM), 41 (87 mM), 42 (56 mM), 43 (56 mM) e Itraconazol (0,07 mM) sobre o crescimento de <i>Candida albicans</i> ATCC 11006.....	151
Figura 7 – Efeito das substâncias 15 (122 mM), 29 (114 mM), 30 (114 mM) e Itraconazol (0,07 mM) sobre o crescimento de <i>Candida albicans</i> ATCC 10231.....	152
Figura 8 – Efeito das substâncias 31 (87 mM), 32 (86 mM), 33 (87 mM), 37 (79 mM), 38 (79 mM) e Itraconazol (0,07 mM) sobre o crescimento de <i>Candida albicans</i> ATCC 10231.....	153

Figura 9 – Efeito das substâncias 6a (79 mM), 39 (79 mM) e Itraconazol (0,07 mM) sobre o crescimento de <i>Candida albicans</i> ATCC 10231.....	154
Figura 10 – Efeito das substâncias 40 (87 mM), 41 (87 mM), 43 (56 mM) e Itraconazol (0,07 mM) sobre o crescimento de <i>Candida albicans</i> ATCC 10231.....	154
Figura 11 – Efeito das substâncias 15 (122 mM), 29 (114 mM), 30 (114 mM) e Itraconazol (0,07 mM) sobre o crescimento de <i>Cryptococcus neoformans</i> ATCC 56990.....	156
Figura 12 – Efeito das substâncias 31 (87 mM), 33 (87 mM) e Itraconazol (0,07 mM) sobre o crescimento de <i>Cryptococcus neoformans</i> ATCC 56990.....	156
Figura 13 – Efeito das substâncias 32 (86 mM), 37 (79 mM), 38 (79 mM) e Itraconazol (0,07 mM) sobre o crescimento de <i>Cryptococcus neoformans</i> ATCC 56990.....	157
Figura 14 – Efeito das substâncias 40 (87 mM), 41 (87 mM) e Itraconazol (0,07 mM) sobre o crescimento de <i>Cryptococcus neoformans</i> ATCC 56990.....	157
Figura 15 – Efeito das substâncias 6a (79 mM), 39 (79 mM), 42 (56 mM), 43 (56 mM) e Itraconazol (0,07 mM) sobre o crescimento de <i>Cryptococcus neoformans</i> ATCC 56990.....	158
Figura 16 – Efeito das substâncias 15 (122 mM), 29 (114 mM), 30 (114 mM) e Gentamicina (21 mM) sobre o crescimento de <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	160
Figura 17 – Efeito das substâncias 31 (87 mM), 32 (86 mM), 33 (87 mM), 37 (79 mM), 38 (79 mM) e Gentamicina (21 mM) sobre o crescimento de <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	161
Figura 18 – Efeito das substâncias 6a (79 mM), 39 (79 mM) e Gentamicina (21 mM) sobre o crescimento de <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	161
Figura 19 – Efeito das substâncias 40 (87 mM), 41 (87 mM), 42 (56 mM), 43 (56 mM) e Gentamicina (21 mM) sobre o crescimento de <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	162

Figura 20 – Efeito das substâncias 15 (122 mM), 29 (114 mM), 30 (114 mM) e Gentamicina (21 mM) sobre o crescimento de <i>Escherichia coli</i> ATCC 33922.....	163
Figura 21 – Efeito das substâncias 31 (87 mM), 32 (86 mM), 33 (87 mM), 37 (79 mM), 38 (79 mM) e Gentamicina (21 mM) sobre o crescimento de <i>Escherichia coli</i> ATCC 33922.....	164
Figura 22 – Efeito das substâncias 6a (79 mM), 39 (79 mM) e Gentamicina (21 mM) sobre o crescimento de <i>Escherichia coli</i> ATCC 33922.....	164
Figura 23 – Efeito das substâncias 40 (87 mM), 41 (87 mM), 42 (56 mM), 43 (56 mM) e Gentamicina (21 mM) sobre o crescimento de <i>Escherichia coli</i> ATCC 33922.....	165
Figura 24 - Substâncias isoladas do epicarpo de <i>Hymenaea stigonocarpa</i> submetidas aos ensaios biológicos com células tumorais	166
Figura 25 – Efeito citotóxico das substâncias 31 , 37 e 38 em diferentes concentrações frente às células U937 após 24 horas de incubação. A avaliação foi realizada utilizando o microensaio colorimétrico com MTT.....	167
Figura 26 – Efeito citotóxico das substâncias 31 , 37 e 38 em diferentes concentrações frente às células H460 após 24 horas de incubação. A avaliação foi realizada utilizando o microensaio colorimétrico com MTT.....	168
Figura 27 – Efeito citotóxico das substâncias 31 , 37 e 38 em diferentes concentrações frente às células Raw 264.7 após 24 horas de incubação. A avaliação foi realizada utilizando o microensaio colorimétrico com MTT.....	169
Figura 28 – Efeito citotóxico das substâncias 31 , 37 e 38 em diferentes concentrações frente às células Colo-205 após 24 horas de incubação. A avaliação foi realizada utilizando o microensaio colorimétrico com MTT.....	170
Figura 29 – Avaliação da liberação de desidrogenase láctica (LDH) em células U937, Colo-205 e H460. As células foram tratadas com diferentes concentrações da substância 31 e com o	

controle positivo (Triton) na concentração de 10 μ M durante 24 horas. A quantidade de LDH liberada foi avaliada através da utilização do kit DOLES.....	172
Figura 30 – Avaliação da liberação de desidrogenase láctica (LDH) em células U937, Colo-205 e H460. As células foram tratadas com diferentes concentrações da substância 37 e com o controle positivo (Triton) na concentração de 10 μ M durante 24 horas. A quantidade de LDH liberada foi avaliada através da utilização do kit DOLES.....	172
Figura 31 – Avaliação da liberação de desidrogenase láctica (LDH) em células U937, Colo-205 e H460. As células foram tratadas com diferentes concentrações da substância 38 e com o controle positivo (Triton) na concentração de 10 μ M durante 24 horas. A quantidade de LDH liberada foi avaliada através da utilização do kit DOLES.....	173
Figura 32 – Microscopia de Fluorescência de células U937 evidenciando as características para classificação das células como mencionadas acima em: 1 – Normais, 2 – Necrose, 3 – Apoptose Primária e 4 – Apoptose-necrose (necrose secundária). As fotos foram feitas após 12 horas de incubação das células com a substância 31 na concentração de 50 μ M.....	175
Figura 33 – Porcentagem de apoptose induzida pela substância 37 em diferentes concentrações na linhagem de células tumorais humanas Colo-205 determinada por microscopia de fluorescência em 12, 24 e 36 horas.....	177
Figura 34 – Porcentagem de apoptose induzida pela substância 37 em diferentes concentrações na linhagem de células tumorais humanas U937 determinada por microscopia de fluorescência em 12, 24 e 36 horas.....	177
Figura 35 – Porcentagem de apoptose induzida pela substância 37 em diferentes concentrações na linhagem de células tumorais humanas H460 determinada por microscopia de fluorescência em 12, 24 e 36 horas.....	178

Figura 36 – Porcentagem de apoptose induzida pela substância 38 em diferentes concentrações na linhagem de células tumorais humanas Colo-205 determinada por microscopia de fluorescência em 12, 24 e 36 horas.....	179
Figura 37 - Porcentagem de apoptose induzida pela substância 38 em diferentes concentrações na linhagem de células tumorais humanas U937 determinada por microscopia de fluorescência em 12, 24 e 36 horas.....	179
Figura 38 - Porcentagem de apoptose induzida pela substância 38 em diferentes concentrações na linhagem de células tumorais humanas H460 determinada por microscopia de fluorescência em 12, 24 e 36 horas.....	180
Figura 39 - Porcentagem de apoptose induzida pela substância 31 em diferentes concentrações na linhagem de células tumorais humanas Colo-205 determinada por microscopia de fluorescência em 12, 24 e 36 horas.....	181
Figura 40 – Porcentagem de apoptose induzida pela substância 31 em diferentes concentrações na linhagem de células tumorais humanas U937 determinada por microscopia de fluorescência em 12, 24 e 36 horas.....	181
Figura 41 – Porcentagem de apoptose induzida pela substância 31 em diferentes concentrações na linhagem de células tumorais humanas H460 determinada por microscopia de fluorescência em 12, 24 e 36 horas.....	182
Figura 42 – Porcentagem de necrose induzida pela substância 31 em diferentes concentrações na linhagem de células tumorais humanas H460 determinada por microscopia eletrônica em 12, 24 e 36 horas.....	183
Figura 43 – Porcentagem de necrose induzida pela substância 31 em diferentes concentrações na linhagem de células tumorais humanas Colo-205 determinada por microscopia eletrônica em 12, 24 e 36 horas.....	183
Figura 44 – Avaliação da inibição de monóxido de nitrogênio (NO) pela substância 31 em diferentes concentrações, pelo controle	

positivo (MO) e pelo controle negativo (MO + LPS) em células Raw 264.7 estimuladas com lipopolissacarídeos (LPS), durante 24, 36 e 48 horas após o tratamento.....	187
Figura 45 – Avaliação da inibição de monóxido de nitrogênio (NO) pela substância 37 em diferentes concentrações, pelo controle positivo (MO) e pelo controle negativo (MO + LPS) em células Raw 264.7 estimuladas com lipopolissacarídeos (LPS), durante 24, 36 e 48 horas após o tratamento.....	188
Figura 46 – Avaliação da inibição de monóxido de nitrogênio (NO) pela substância 38 em diferentes concentrações, pelo controle positivo (MO) e pelo controle negativo (MO + LPS) em células Raw 264.7 estimuladas com lipopolissacarídeos (LPS), durante 24, 36 e 48 horas após o tratamento.....	189

LISTA DE TABELAS

CAPITULO 1

Tabela 1 – Delimitações de espécies e variedades do gênero <i>Hymenaea</i>	5
Tabela 2 – Diferenças entre as variedades de <i>Hymenaea stigonocarpa</i> ...	11
Tabela 3 – Espécies estudadas de <i>Hymenaea</i> , substâncias diterpênicas isoladas, parte da planta e referências bibliográficas	18
Tabela 4 – Espécies estudadas de <i>Hymenaea</i> , substâncias sesquiterpênicas isoladas, parte da planta e referências bibliográficas	21
Tabela 5 – Valores de deslocamentos químicos (δ) de RMN ^1H e de RMN ^{13}C do α -copaeno 15	37
Tabela 6 - Dados de RMN ^1H dos sesquiterpenos óxido de cariofileno 29 e espatulenol 30 de <i>Hymenaea stigonocarpa</i>	40
Tabela 7 – Valores de deslocamento químico (δ) para os hidrogênios H-3eq e H-5 para o álcool (40) e para o ozato de metila (6a).....	62
Tabela 8 – Valores de deslocamento químico (δ) para os hidrogênios H-3eq e H-5 para o álcool (41) e para o isoozato de metila (39)	63
Tabela 9 - Composição das amostras de sílica empregando a fluorescência de raios-X	71
Tabela 10 - Caracterização textural das amostras de sílica antes e após tratamentos	72
Tabela 11 – Frações coletadas da fração de neutros do extrato hexânico do epicarpo de <i>Hymenaea stigonocarpa</i> , sistema de solventes e massas obtidas	81
Tabela 12 – Frações coletadas e reunidas após separação cromatográfica da fração (97-111), sistema de solventes e massas obtidas	83

Tabela 13 – Frações coletadas e reunidas após separação cromatográfica das frações (135-176) e (177-193), sistema de solventes e massas obtidas	86
Tabela 14 – Frações coletadas e reunidas após separação cromatográfica da fração (65-87), sistema de solventes e massas obtidas	88
Tabela 15 – Frações reunidas após separações em coluna de sílica gel da mistura obtida após reação de esterificação com sulfato de metila	91
Tabela 16 – Frações reunidas após separação cromatográfica com sílica gel impregnada com nitrato de prata da fração de ésteres, sistema de solventes e massas obtidas	96

CAPITULO 2

Tabela 1 - Concentrações das substâncias utilizadas nos ensaios antimicrobianos	147
Tabela 2 - Avaliação das células de <i>C. neoformans</i> pós-tratadas com as substâncias testadas	159
Tabela 3 - IC ₅₀ das substâncias frente às células testadas	185

LISTA DE ABREVIATURAS

δ	Deslocamento químico
APT	Attached Proton Test
ATCC	American Tissue Collection
ax	Axial
BHI	Brain Heart Infusion
CCD	Cromatografia em Camada Delgada
CDCl_3	Deuteroclorofórmio
CG/EM	Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas
CIM	Concentração Inibitória Mínima
COSY	COrrrelation SpectroscopY
COX	Cicloxigenase
d	Dupleto
DCM	Diclorometano
dd	Duplo dupleto
ddd	Duplo duplo dupleto
dl	Dupleto largo
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMF	<i>N,N</i> -dimetilformamida
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
D. O.	Densidade Óptica
EM	Espectrometria de Massas
eq	Equatorial
FMS/NAD	Fenazina Metassulfato/Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo
HMBC	Heteronuclear Multiple Bond Coherence
HMQC	Heteronuclear Multiple Quantum Coherence

IC ₅₀	Concentração Inibitória (50%)
IV	Infravermelho
LDH	Desidrogenase láctica
LPS	Lipopolissacarídeo
m	Multiplete
MO	Macrófago
MTT	3(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide
<i>m/z</i>	Razão entre a massa do fragmento e sua carga elétrica
iNO	Monóxido de Nitrogênio sintase induzida
NO	Monóxido de Nitrogênio
<i>ppm</i>	Parte por milhão
qd	Quarteto de dupletos
R _f	Fator de retenção
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
RMN de ¹³ C	Ressonância Magnética Nuclear de Carbono 13
RMN de ¹ H	Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio
s	Simpleto
sl	Simpleto largo
t	Triplete
td	Triplo duplete
THF	Tetraidrofurano
tl	Triplete largo
TMS	Tetrametilsilano
Ts	Tosila

RESUMO

ANDREÃO, Patrícia Silvana Silva, D. S., Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, maio, 2010. **Estudo fitoquímico e avaliação da bioatividade de substâncias isoladas e derivatizadas de *Hymenaea stigonocarpa* (Fabaceae).** Orientador: Paulo César Muniz de Lacerda Miranda. Palavras-chave: *Hymenaea*; fitoquímica; terpenos; bioatividade.

Neste trabalho foi realizado o estudo fitoquímico inédito do extrato hexânico do epicarpo de *Hymenaea stigonocarpa* var. *stigonocarpa* também conhecida como jatobá-do-cerrado. Da fração neutra deste extrato foram isolados os sesquiterpenos α -copaeno (**15**), óxido de cariofileno (**29**) e espatulenol (**30**), os diterpenos com esqueleto caurânico caur-16-en-18-ol (**31**), cauran-16 α -ol (**32**) e caur-16-en-3 α -ol (**33**). Da fração ácida após esterificação, foram isolados os ésteres diterpênicos com esqueleto caurânico caur-16-en-18-oato (**37**) e o caur-15-en-18-oato de metila (**38**) e os da série *ent*-labdânica ozato (**6a**) e isoozato de metila (**39**).

Com o intuito de reciclar a grande quantidade de sílica gel impregnada com nitrato de prata gerada durante a purificação das substâncias isoladas do epicarpo de *H. stigonocarpa*, investigou-se e desenvolveu-se uma metodologia para recuperação desse material. Análises quantitativas e qualitativas foram realizadas para avaliar as características físico-químicas da sílica gel recuperada.

Tanto as substâncias isoladas do extrato de *H. stigonocarpa* **6a**, **15**, **29**, **30**, **31**, **32**, **33**, **37**, **38** e **39** quanto as derivatizadas **40**, **41**, **42** e **43** foram submetidas a ensaios para avaliação da potencial atividade antimicrobiana contra os fungos *Candida albicans* (ATCC 10231 e ATCC 11006) e *Cryptococcus neoformans* (ATCC 56990) e contra as bactérias *Staphylococcus aureus* (cepa 25923) e *Escherichia coli* (cepa 33922).

Os resultados desses ensaios mostraram que nove das substâncias testadas se apresentaram muito ativas contra *C. albicans* ATCC 11006 e apenas três (**15**, **30** e **41**) apresentaram atividade significativa contra *Candida albicans* ATCC 10231. Quanto à levedura *C. neoformans*, as substâncias **6a**, **29**, **39**, **42** e **43** demonstraram considerável atividade enquanto as substâncias **31** e **37** causaram apenas moderada inibição.

Em relação aos ensaios com as bactérias *S. aureus* e *E. coli*, observou-se pronunciada atividade das substâncias **15** e **29** contra a primeira e das substâncias **15**, **29**, **30**, **31**, **40** e **41** contra a última.

Para realização dos ensaios de toxidez contra células tumorais, o álcool **31** e os ésteres de esqueleto caurânico **37** e **38** foram submetidos à avaliação do efeito destes na viabilidade celular, na indução de apoptose em células tumorais e no índice de desidrogenase láctica (LDH) liberada pelas células. As células tumorais testadas foram U937, H460, Colo-205 e Raw 264.7. Em todos estes testes a substância que mostrou os melhores resultados foi o álcool **31**, apesar de se mostrar muito tóxico.

O ensaio colorimétrico que avalia a concentração de monóxido de nitrogênio liberado pelas células Raw 264.7 estimuladas com LPS para detectar a atividade anti-inflamatória foi conduzido com as substâncias **31**, **37** e **38**. Todas apresentaram inibição da produção de monóxido de nitrogênio. No entanto, as substâncias **37** e **38** se mostraram com maior potencial anti-inflamatório.

ABSTRACT

ANDREÃO, Patrícia Silvana Silva, D. S., Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, May, 2010. **Phytochemical study and evaluation of bioactivity of isolated substances and derivatized from *Hymenaea stigonocarpa* (Fabaceae).** Adviser: Paulo César Muniz de Lacerda Miranda. Keywords: *Hymenaea*; phytochemistry; terpenes; bioactivity.

In this work were done the phytochemical study unpublished of the hexanic extract of the epicarp of *Hymenaea stigonocarpa* var. *stigonocarpa* also known as jatobá-do-cerrado. From the neutral fraction of this extract were isolated the sesquiterpenes α -copaene (**15**), caryophyllene oxide (**29**) and spatulenol (**30**), the diterpene with kauranic skeleton kaur-16-en-18-ol (**31**), kauran-16 α -ol (**32**) and kaur-16-en-3 α -ol (**33**). Of the acid fraction after esterification, were isolated the diterpene esters with kauranic skeleton methyl kaur-16-en-18-oate (**37**) and methyl kaur-15-en-18-oate (**38**) and of the *ent*-labdanic series methyl ozate (**6a**) and methyl isoozate (**39**).

With the intention of recycling the large quantity of silica gel impregnated with silver nitrate generated during the purifying of the isolated substances of the epicarp of *H. stigonocarpa*, were investigated and developed a methodology for the recovery of these material. Quantitative and qualitative analysis were made to evaluate the physical-chemical characteristics of the recovered silica gel.

The isolated substances of the extract of *H. stigonocarpa* **6a**, **15**, **29**, **30**, **31**, **32**, **33**, **37**, **38** e **39** as well as the derivatized substances **40**, **41**, **42** e **43** were submitted to trials for evaluation of the potential antimicrobial activity against the fungi *Candida albicans* (ATCC 10231 and ATCC 11006) and *Cryptococcus neoformans* (ATCC 56990) and against the bacteria *Staphylococcus aureus* (cepa 25923) and *Escherichia coli* (cepa 33922).

The results of these tests showed that nine of the substances tested presented themselves very active against *C. albicans* ATCC 11006 and just three (**15**, **30** and **41**) presented significant activity against *C. albicans* ATCC 10231. Regarding the yeast *C. neoformans*, the substances **6a**, **29**, **39**, **42** and **43** demonstrated considerable activity while the substances **6** and **7** caused just moderate inhibition.

Regarding the trials with the bacterias *S. aureus* and *E. coli*, were observed pronounced activity of the substances **15** and **29** against the first and the substances **15**, **29**, **30**, **31**, **40** and **41** against the last.

For the making of the toxicity tests against tumor cells, the alcohol **31** and the esters of kauranic skeleton **37** and **38** were submitted to the evaluation of the effects of these in the cell viability, in the induction of apoptosis in tumor cells and the level of lactate dehydrogenase (LDH) released by the cells. The tumor cells tested were U937, H460, Colo-205 and Raw 264.7. In all these trials the substance that showed the best results was the alcohol **31**, although they show very toxic.

The colorimetric assay that evaluates the concentration of nitrogen monoxide released by the cells Raw 264.7 stimulated with LPS to detect the anti-inflammatory activity was conducted with the substances **31**, **37** and **38**. All demonstrated inhibition of the production of nitrogen monoxide. However, the substances **37** and **38** showed greater anti-inflammatory potential.

JUSTIFICATIVA

A biodiversidade brasileira, considerada uma das maiores do mundo, não é conhecida com precisão tal a sua complexidade, estimando-se a existência de mais de dois milhões de espécies distintas de plantas, animais e microorganismos. A biodiversidade encontra-se praticamente inexplorada e sem estudos conclusivos a respeito de suas potencialidades fitoquímicas.

As plantas são uma fonte importante de produtos naturais biologicamente ativos, muitos dos quais se constituem em modelos para a síntese de um grande número de fármacos e substâncias utilizadas nas mais diversas áreas da indústria. Os produtos encontrados na natureza revelam uma enorme diversidade em termos de estrutura e de propriedades físico-químicas e biológicas.

Apesar do aumento de estudos nessa área, os dados disponíveis revelam que apenas 15 a 17% das plantas foram estudadas quanto ao seu potencial medicinal. Entre as plantas pouco estudadas do nosso território encontra-se o jatobá.

O jatobá (*Hymenaea sp.*) é uma leguminosa (Fabaceae – Caesalpinioideae), distribuída por quase todo o Brasil. Sua casca e resina são amplamente utilizadas na medicina popular, seus frutos são fonte de alimento para pessoas e animais, além de seu cultivo ser indicado na recuperação de áreas degradadas. Apesar disso, são escassos os trabalhos descritos na literatura a respeito das potenciais atividades biológicas desta planta.

Este trabalho teve como objetivo a realização do estudo fitoquímico do epicarpo de *Hymenaea stigonocarpa* var. *stigonocarpa*, ainda não descrito na literatura, e a realização de ensaios biológicos para a avaliação das potenciais atividades antimicrobiana, antitumoral e anti-inflamatória das substâncias isoladas e derivatizadas. Foi desenvolvida também uma metodologia para a recuperação da sílica impregnada com nitrato de prata gerada nas separações e purificações das substâncias isoladas.

CAPÍTULO 1

ESTUDO FITOQUÍMICO E DERIVATIZAÇÕES DE SUBSTÂNCIAS ISOLADAS DE *Hymenaea stigonocarpa* (Fabaceae)

1. INTRODUÇÃO

1.1. A família Fabaceae (Leguminosae)

As plantas capazes de produzir frutos – as Angiospermas – possuem grande representatividade em termos de produtores de resina, especialmente quando se trata de ambientes tropicais e subtropicais (LANGENHEIM & STUBBLEBINE, 1983). Essa classe possui um total de 200.000 espécies distribuídas em 344 famílias, sendo uma delas a Fabaceae (LANGENHEIM *et alii*, 1981).

As plantas superiores da família Fabaceae, ou Leguminosae na nomenclatura antiga, constituem a terceira maior família entre as Angiospermas. São encontradas em quase todos os continentes, exceto Antártica e ocorrem em diversos ambientes, exceto marinho e epifítico (WINK & MOHAMED, 2003). Segundo Lewis e colaboradores (2005) a família é representada por 19.325 espécies, compondo 727 gêneros e 36 tribos. Lima (2000) *apud* Dutra *et alii*. (2005) mencionou para o Brasil 2.100 espécies nativas reunidas em 188 gêneros, distribuídos por diversos ecossistemas brasileiros, como mata atlântica, cerrado, caatinga e floresta amazônica. A principal característica que une a família é o fruto (legume), formado por um único carpelo e vários óvulos, embora

alguns membros tenham frutos tão modificados que raramente lembrem legumes (FARIA *et alii*, 2006).

Os constituintes da família Fabaceae possuem hábitos muito variados e se apresentam desde árvores gigantes até diminutas ervas. Seus membros se destacam pela significância na natureza representando quase 10% de todas as espécies de plantas floríferas (RAVEN *et alii*, 1996). É considerada uma das famílias de maior riqueza florística do bioma, juntamente com Asteraceae e Poaceae (MANTOVANI, 1983; BATALHA & MANTOVANI, 2001).

A família das Leguminosas possui uma importância econômica bastante destacada. É a segunda família mais importante para o homem, perdendo apenas para Poaceae. Mais de 80 espécies fornecem grãos que são consumidos no mundo e representam a segunda maior fonte de alimento. Aproximadamente 20 espécies são cultivadas e as mais importantes são soja, amendoim, lupino, ervilha, lentilhas e diversos feijões (SOSULSKI e SOSULSKI, 2006). Também é uma importante fonte de madeiras-de-lei, tais como pau-brasil, jacarandá, sucupira, copaíba, entre outras (LORENZI, 2002 a e b). Também é representativo nesta família o número de plantas descritas com propriedades medicinais como a copaíba (TAMBE *et alii*, 1996) e o fedegoso (MATOS, 2002). Além disso, muitas espécies são empregadas como fonte de taninos, resinas, substâncias aromatizantes, medicinais e inseticidas (LEWIS, 1989).

A família Fabaceae está subdividida em três subfamílias: Caesalpinioideae, Mimosoideae e Faboideae. As duas primeiras são encontradas principalmente em regiões tropicais, enquanto a subfamília Faboideae apresenta distribuição mundial (LEWIS, 1989). A subfamília Caesalpinioideae compreende a tribo Detarieae, formada por 51 gêneros que apresentam como característica principal a produção de resinas ricas em diterpenos, constituindo-se uma importante fonte de matéria-prima de grande interesse comercial. Como exemplo, o óleo de copaíba, extraído do tronco da *Copaifera*, possui um amplo potencial medicinal, pois além do seu emprego como antisséptico, cicatrizante, adstringente, antitetânico, expectorante e anti-inflamatório,

também apresentou atividade de inibição do crescimento do protozoário *Trypanosoma cruzi* e em células de câncer de pele (CORRÊA, 1984; LEE & LANGENHEIM, 1975).

1.2. O gênero *Hymenaea*

Dentre os vários gêneros da tribo produtora de resina (Detarieae), as espécies do gênero *Hymenaea* têm se mostrado como uma das mais importantes. Este gênero foi estabelecido por *Linnaeus* em 1753 quando descreveu a espécie tipo *H. courbaril*. Ocorre em clima tropical e subtropical, principalmente na África e América do Sul; no Brasil este gênero está amplamente distribuído em todo o território Nacional, principalmente nas regiões sudeste e norte do País (LEE & LANGENHEIM, 1975).

A palavra *Hymenaea* deriva de "*hymen*" com o significado de "deus das uniões" em alusão às duas folhas (folíolos) unidas, característica das plantas deste gênero (BARROSO, 1991), como pode ser visto na **Figura 1**.



Figura 1 – Folhas de *Hymenaea*.

Vários são os nomes populares conhecidos para o gênero como jutaicica, jitaí, jutaí-açú, jatobeiro, jataíba, burandã, imbiúva, farinheira, mas os de origem guarani "jatobá" e "jataí" são os mais comuns e significam "folha dura" ou "árvore de fruto duro" e "fruto comestível" respectivamente (LORENZI, 2002a).

Segundo uma revisão do gênero *Hymenaea* publicada por Lee e Langenheim (1975), este gênero é formado por 14 espécies das quais cinco são divididas em variedades. Destas 14 espécies, 13 se encontram distribuídas pela América Central, América do Sul e oeste das Índias (uma variedade) e uma espécie de ocorrência no leste da África (**Tabela 1**).

Tabela 1 – Delimitações de espécies e variedades do gênero *Hymenaea*

Espécies e variedades de <i>Hymenaea</i>	Delimitações de espécies e variedades de <i>Hymenaea</i>
<p><i>H. courbaril</i></p> <p><i>Courbaril</i></p> <p><i>subsessilis</i></p> <p><i>Longifolia</i></p> <p><i>Villosa</i></p> <p><i>Altíssima</i></p> <p><i>stilbocarpa</i></p>	<p>A variedade <i>courbaril</i> ocorre nos mais diversos ecossistemas e pode ser encontrada em quase toda a América. As demais têm ocorrência mais limitada</p> <p>México, Oeste das Índias, Guatemala, Honduras, Costa Rica, Panamá, Venezuela, Colômbia, Guiana, Suriname, Amazônia, Nordeste do Brasil</p> <p>Amazônia</p> <p>Nordeste do Brasil</p> <p>Litoral do Brasil</p> <p>Mata Atlântica nas regiões Sul e Sudeste do Brasil</p> <p>Região Central e Sul do Brasil</p>
<p><i>H. verrucosa</i></p>	<p>Costa Leste da África, matas costeiras, florestas decíduas e semidecíduas, ilhas adjacentes</p>
<p><i>H. oblongifolia</i></p> <p><i>oblongifolia</i></p> <p><i>Davisii</i></p> <p><i>Latifolia</i></p> <p><i>Palustris</i></p>	<p>Encontrada em todos os ecossistemas amazônicos (terra firme, igapó e várzea), além da Mata Atlântica na Bahia e alguns pontos no Nordeste brasileiro.</p> <p>Amazônia e bacias adjacentes</p> <p>Guiana</p> <p>Litoral sul do Brasil</p> <p>Amazônia e bacias adjacentes</p>
<p><i>H. parvifolia</i></p>	<p>Floresta Amazônica, em regiões de terra firme (não alagadiças), Mata Costeira na região Norte</p>
<p><i>H. intermédia</i></p> <p><i>Intermédia</i></p> <p><i>Adenotricha</i></p>	<p>Encontrada somente na Mata Amazônica, em terra firme.</p> <p>Bacia Amazônica Central</p> <p>Bacia Amazônica Central</p>
<p><i>H. reticulata</i></p>	<p>Ecossistema amazônico, em terra firme</p>

<i>H. torrei</i>	Mata Atlântica de Cuba
<i>H. rubiflora</i>	Encontrada no litoral do Brasil.
<i>Rubiflora</i> <i>Glabra</i>	Mata Costeira do Rio Grande do Norte até o Rio de Janeiro Mata Costeira do Rio Grande do Norte até o Rio de Janeiro
<i>H. áurea</i>	Mata Atlântica da Bahia e do Rio de Janeiro
<i>H. stigonocarpa</i>	Encontrada em ecossistemas de Caatinga, Cerrado e Cerradão
<i>Stigonocarpa</i> <i>Pubescens</i> <i>Brevipetiolata</i>	Região Central do Brasil e Paraguai Região Central do Brasil e Paraguai Sul do Brasil e Paraguai
<i>H. maranhensis</i>	Cerrado da Chapada Maranhense
<i>H. martiana</i>	Caatinga, Mata Costeira e Mata Atlântica
<i>H. velutina</i>	Mata Costeira do Nordeste do Brasil
<i>H. eriogyne</i>	Caatinga do Nordeste do Brasil

As árvores deste gênero apresentam variação considerável do seu porte: de 3 a 40 m de altura dependendo da espécie, sendo a mais alta *Hymenaea courbaril*, conhecida como jatobá amazônico e a menor *Hymenaea stigonocarpa* ou jatobá-do-cerrado (LANGENHEIM *et alii*, 1982) (**Figura 2**). A espécie *Hymenaea courbaril* é a espécie com distribuição mais ampla, ocorrendo em quase toda a extensão de distribuição do gênero (LANGENHEIM *et alii*, 1973).



Figura 2 – *Hymenaea courbaril* (jatobá amazônico) e *Hymenaea stigonocarpa* (jatobá-do-cerrado).

A madeira de *Hymenaea* é usada em obras hidráulicas, carroçarias, postes, tonéis, dormentes, móveis, laminados, esteios, tacos; também é utilizada como mourões e estacas para cercas; para fazer pontes e na construção civil como vigas, caibros, ripas, tábuas e forros (LISBOA *et alii*, 1991 & ALVINO *et alii*, 2005).

As resinas que exsudam do tronco de *Hymenaea* são conhecidas como “jutaicas” ou “Copal da América” que se apresentam como fragmentos vítreos formando blocos de até três quilogramas à volta de árvores mais velhas rente ao solo (JOLY, 1966 *apud* IMAMURA, 1978). A resina do epicarpo é um líquido amarelado, transparente e se concentra cristalizado em pedaços, com cheiro aromático e brilho, tendo grande aplicação medicinal e poder terapêutico. Muitas vezes ela ocorre na forma de bolsões, como pode ser visto na **Figura 3**.

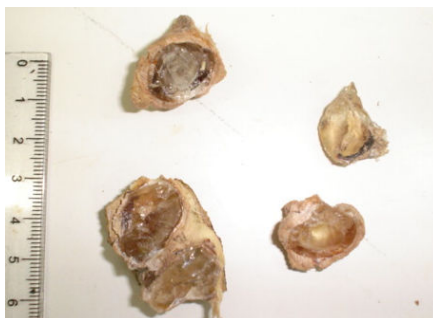


Figura 3 - Foto dos bolsões de resina de *Hymenaea*

1.2.1. *Hymenaea stigonocarpa*

A espécie *Hymenaea stigonocarpa* Mart. ex Hayne tem sua distribuição restrita a ambientes sazonais, tais como os cerrados do centro e do sudeste do Brasil (GIBBS *et alii*, 1999), por esta razão, é popularmente conhecida como “jatobá-do-cerrado” (MEIRA NETO & SAPORETTI, 2002). É reconhecida também pelos nomes de jatobá-da-serra, jatobá-capão, jatobá-de-casca-fina, jataí e como “jatobá do campo”, por ser encontrada em formações abertas do cerrado e campo-cerrado. Ela está distribuída nos estados do Amazonas, Pará, Ceará, Maranhão, Piauí, Tocantins, Goiás, Bahia, Minas Gerais, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul e São Paulo (ALMEIDA *et alii*, 1998; LORENZI, 1998).

É uma das 26 espécies que ocorre em, pelo menos, 50% das 98 áreas de cerrado comparadas por Ratter *et alii* (1996), nas quais foram encontradas 534 espécies. Apesar de ter ampla distribuição nos cerrados, apresenta baixa densidade de indivíduos (CASTRO, 1987; CAVASSAN, 1990), tendo sido estudada em poucos trabalhos.

As árvores desta espécie têm de pequeno a médio porte, atingindo de 3 a 10 m de altura, apresentam copa frondosa e tronco de 30 a 50 cm de diâmetro. Planta semidecídua (perde parte de suas folhas em certas épocas do ano), heliófita (intolerante ao sombreamento), secundária, produz anualmente abundante quantidade de sementes viáveis, prontamente disseminadas pela fauna (LEE & LANGENHEIM, 1975; ALMEIDA *et alii*, 1998; LORENZI, 1998).

O jatobá-do-cerrado possui madeira pesada (densidade = 0,90 g/cm³), muito dura e resistente e moderadamente durável quando exposta a intempéries (CORRÊA, 1984). É muito apreciada para a construção civil como moirões em cercas e também para a construção naval; outrora foi muito utilizada na construção de embarcações, a ponto de ser considerada por decreto imperial, em 1799, como de exploração restrita para esse fim. Além disso, é muito utilizada como lenha e carvão (ALMEIDA *et alii*, 1998; LORENZI, 1998).

Possuem folhas compostas, com um par de folíolos coriáceos (forma de couro), glabros (sem pêlos) ou densamente pilosos nas duas faces, com lâminas que podem chegar a 24 x 16 cm ou mais (LEE & LANGENHEIM, 1975; LORENZI, 2002a). A espécie apresenta as maiores flores encontradas no gênero (**Figura 4**) e é a única que produz flores de janeiro a março, no meio da estação chuvosa (GIBBS *et alii*, 1999).



Figura 4 – Botão floral em desenvolvimento e botão se abrindo em flor de *Hymenaea stigonocarpa* (jatobá-do-cerrado).

A árvore de *H. stigonocarpa* produz frutos robustos variando entre 10-20 cm de comprimento por 4-6 cm de largura (RIZZINI, 1971). Os frutos são oblongos a cilíndricos (**Figura 5**), e sua liberação acontece entre outubro e novembro, podendo haver alteração destes intervalos dependendo do regime de chuvas (LEWINSOHN, 1980). A casca produz resina para vernizes e corantes.



Figura 5 – Frutos de jatobá-do-cerrado coletados na Serra do Cipó em Minas Gerais.

A polpa dos frutos de *Hymenaea stigonocarpa* Mart. (**Figura 6**) é farinácea, adocicada, comestível pela espécie humana e por outras espécies da fauna e de sabor e cheiro muito característicos. Pode ser consumida *in natura* ou utilizada na confecção de iguarias regionais na forma de geléias, licores, sorvetes, doces e farinhas para receitas de biscoitos, bolos, mingaus e pães (ROCHA *et alii*, 1992 e SILVA *et alii*, 1994).



Figura 6 – Polpa farinácea e sementes dos frutos de jatobá-do-cerrado.

Cada fruto contém de seis a doze sementes (LEE & LANGENHEIM, 1975). A produção de mudas do jatobá-do-cerrado é fácil por meio de sementes, que podem ser colocadas para germinar logo que colhidas em saquinhos individuais ou em canteiros. A taxa de germinação das sementes de frutos recém-colhidos é de até 90% e normalmente ocorre de 15 a 30 dias. Sementes submetidas à escarificação mecânica podem germinar em menos de 10 dias. O desenvolvimento das mudas é rápido, estando pronta para transplante (quando for o caso) em menos de 4 meses. O desenvolvimento das mudas no campo é um pouco mais lento (DE-CARVALHO *et alii*, 2005).

Por se tratar de uma espécie muito procurada pela fauna e por ser uma árvore ornamental, é bastante apreciada no paisagismo e útil em programas de reflorestamento de áreas degradadas, destinadas à recomposição da vegetação arbórea. Apresenta dispersão ampla e um tanto irregular, porém sempre em terrenos bem drenados (LORENZI, 1998; OLIVEIRA *et alii*, 2002).

Segundo Lee e Langenheim (1975) a espécie *H. stigonocarpa* ocorre em toda a região do cerrado brasileiro em três variedades (*stigonocarpa*, *brevipetiolata* e *pubescens*). As principais diferenças entre as variedades são descritas na **Tabela 2**.

Tabela 2 – Diferenças entre as variedades de *Hymenaea stigonocarpa*

Diferenças	<i>H. stigonocarpa</i> var.		
	<i>Stigonocarpa</i>	<i>brevipetiolata</i>	<i>pubescens</i>
Altura	~ 5 m	~ 10 m	3 – 10 m
Folíolos	Glabros em ambas as superfícies ou ligeiramente pilosos na face inferior quando novos	Densamente pilosos na face inferior 10 x 6 cm	Densamente pilosos na face inferior 12 - 24 x 8 - 16 cm
Pecíolos	1,5 - 3,5 cm longos, glabros	5 - 6 mm, longos, densamente pilosos	1,5 - 4,5 cm longos, densamente pilosos

1.3. *Hymenaea* e a medicina popular

Segundo a crença popular, a folha do jatobá parece um par de pulmões, o que já indicaria suas propriedades medicinais no fortalecimento das vias respiratórias superiores e do aparelho cardio-vascular.

Guarim Neto e Moraes (2003) relatam o uso do jatobá na medicina popular. As suas cascas em infusão são utilizadas no combate de febres; a resina fervida é utilizada no tratamento de cistites e problemas respiratórios. Emprega-se a resina aquecida, externamente, como expectorante ou pode ser aplicada em forma de emplastro sobre as partes doloridas do corpo. Esta é ainda usada como vermífugo e para aliviar dores de estômago, peito e costas. A casca curtida no aguardente estimula o apetite e o chá do epicarpo é bom medicamento para a próstata, podendo ser ingerido várias vezes ao dia. Também é empregado para problemas de rins, fígado, infecção intestinal e como cicatrizante.

A seiva do jatobá pode ser encontrada em lojas de produtos naturais e barracas de raizeiros em sua região de ocorrência. Segundo Martins (1989), na Amazônia, os nativos costumam retirar a seiva dessa árvore e bebê-la para tratamento das afecções pulmonares, devendo, entretanto, fazê-lo em pequenas doses, pois como é adstringente, causa constipação intestinal; acrescenta ainda que da casca do caule, pode ser feito chá pelo método de decocção para lavar ferimentos e para irrigações vaginais.

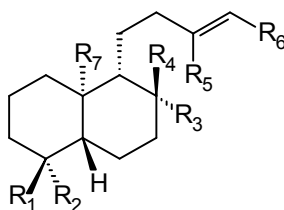
Para problemas como tosse, bronquite, catarro, asma e fraqueza pulmonar, diarreia, disenteria e cólica intestinal pode ser utilizado um preparado a partir do chá das cascas dos galhos picadas e mel (PANIZZA, 1998). E ainda de acordo com Bontempo (2000), a casca em cozimento é aconselhada para combater hemoptises (expectoração sanguínea através da tosse), hematúria (emissão de urina com sangue), e acrescenta que o vinho de jatobá retirado do caule é usado como fortificante.

1.4. Estudos químicos do gênero *Hymenaea*

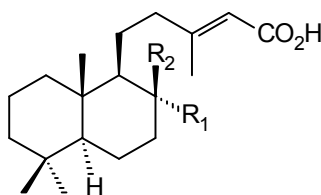
O estudo fitoquímico de plantas nativas brasileiras por grupos de pesquisa nacionais é de suma importância, uma vez que grupos estrangeiros podem patentear o uso de muitas delas, em especial aquelas que têm aplicações na medicina popular.

Para as espécies de *Hymenaea* alguns trabalhos fitoquímicos revelam que os principais constituintes das resinas e dos extratos do tronco e da casca do fruto são predominantemente substâncias diterpênicas acompanhados em menor quantidade por alguns sesquiterpenos (MARTIN & LANGENHEIM, 1974, LEE & LANGENHEIM, 1975; LANGENHEIM *et alii*, 1977, LANGENHEIM & STUBBLEBINE, 1983). No entanto, para a espécie *Hymenaea stigonocarpa* var. *stigonocarpa*, nenhum estudo fitoquímico foi descrito na literatura, sendo portanto o objetivo principal deste trabalho.

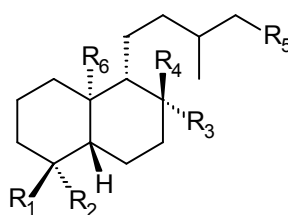
As **Figuras 7 e 8** e as **Tabelas 3 e 4** apresentados a seguir foram elaborados através de uma revisão bibliográfica realizada com o objetivo de compilar os dados até então disponíveis a respeito das substâncias já isoladas do gênero *Hymenaea*. Eles relacionam as espécies já estudadas, as estruturas das substâncias sesquiterpênicas e diterpênicas com esqueleto labdânico isoladas, as partes das plantas das quais elas foram isoladas e as referências bibliográficas correspondentes.



- 1a $R_1=R_2=R_5=R_7= \text{CH}_3$; $R_3= \text{CH}_2$; $R_6= \text{COOH}$ ácido copálico
 1b $R_1=R_6= \text{COOH}$; $R_2=R_5=R_7= \text{CH}_3$; R_3 e $R_4= \text{CH}_2$ ácido guamáico
 1c $R_1=R_2=R_4=R_5=R_7= \text{CH}_3$; $R_3= \text{OH}$; $R_6= \text{COOH}$ ácido *ent*-labd-13-en-8 β -ol-15-óico



- 1d $R_1= \text{OH}$; $R_2= \text{CH}_3$ ácido labd-13(*E*)-en-8-ol-15-óico
 1e R_1 e $R_2= \text{CH}_2$ ácido labd-8(17),13(*E*)-dien-15-óico



- 2a $R_1=R_5= \text{COOH}$; $R_2=R_6= \text{CH}_3$; R_3 e $R_4= \text{CH}_2$ ácido *ent*-labd-8(20)-en-15,18-dióico
 2b $R_1=R_2=R_3=R_6= \text{CH}_3$; $R_4= \text{OH}$; $R_5= \text{COOH}$ ácido *ent*-13-epilabdanóico
 2c $R_1=R_2=R_4=R_6= \text{CH}_3$; $R_3= \text{OH}$; $R_5= \text{COOH}$ ácido *ent*-labdan-8 β -ol-15-óico
 2d $R_1=R_2=R_6= \text{CH}_3$; R_3 e $R_4= \text{CH}_2$; $R_5= \text{COOH}$ ácido *ent*-labd-8(17)-en-15-óico

Figura 7 – Substâncias diterpênicas isoladas de *Hymenaea*.

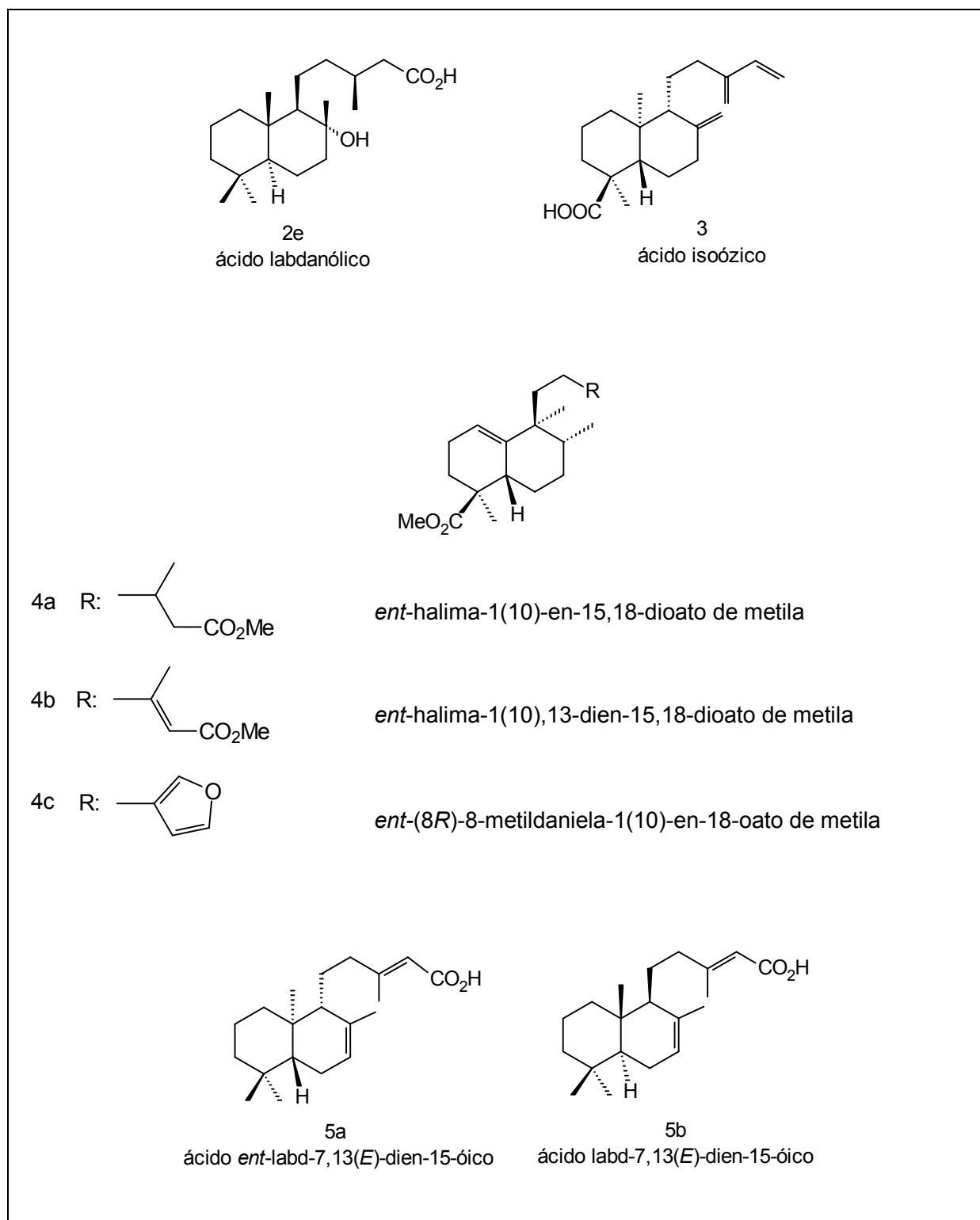
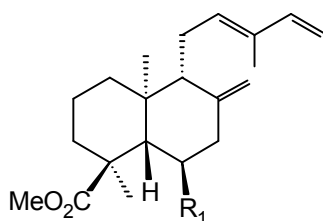


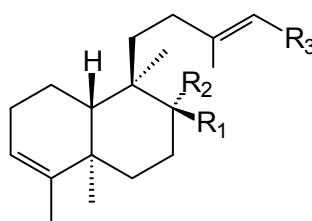
Figura 7 – Substâncias diterpênicas isoladas de *Hymenaea*.

6a $R_1 = H$

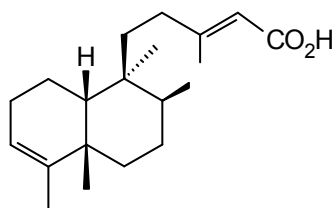
ozato de metila

6b $R_1 = OAc$

zanzibarato de metila

7a $R_1 = H; R_2 = CH_3; R_3 = COOH$

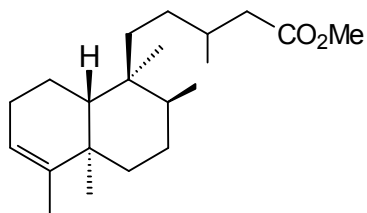
ácido kolavênico

7b $R_1 = CH_3; R_2 = H; R_3 = COOH$ ácido *ent*-(5*R*,8*S*,9*S*,10*R*)-cleroda-3,13(*E*)-dien-15-óico

8

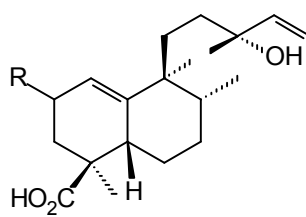
ácido *ent*-(5*S*,8*S*,9*S*,10*R*)-cleroda-3,13(*E*)-dien-15-óico

Figura 7 – Substâncias diterpênicas isoladas de *Hymenaea*.

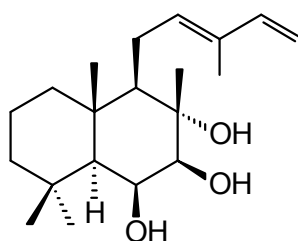


9

ent-(5*R*,8*S*,9*S*,10*R*)-cleroda-3-en-15-oato de metila



- | | | |
|-----|-------|--|
| 10a | R= H | ácido <i>ent</i> -(13 <i>R</i>)-13-hidroxi-1(10),14-halimadien-18-óico |
| 10b | R= OH | ácido <i>ent</i> -(2 <i>S</i> ,13 <i>R</i>)-2,13-diidroxi-1(10),14-halimadien-18-óico |
| 10c | R= O | ácido <i>ent</i> -(13 <i>R</i>)-2-oxo-13-hidroxi-1(10),14-halimadien-18-óico |



11

crotomaclina

Figura 7 – Substâncias diterpênicas isoladas de *Hymenaea*.

Tabela 3 – Espécies estudadas de *Hymenaea*, substâncias diterpênicas isoladas, parte da planta e referências bibliográficas.

Espécie	Estruturas Isoladas	Parte da planta	Referência
<i>H. courbaril</i>	1a	Resina comercial	NAKANO T, DJERASSI C (1961) <i>The Journal of Organic Chemistry</i> 26:167-173.
<i>H. oblongifolia</i>	2a, 1b	Resina do tronco	(a) CUNNINGHAM, A.; MARTIN, S. S.; LANGENHEIM, J. H. (1973) <i>Phytochemistry</i> 12:633-635.
<i>H. parvifolia</i>	2b	Resina do tronco	(a) CUNNINGHAM, A.; MARTIN, S. S.; LANGENHEIM, J. H. (1973) <i>Phytochemistry</i> 12:633-635.
<i>H. courbaril</i>	1c	Resina do tronco	(b) CUNNINGHAM, A.; MARTIN, S. S.; LANGENHEIM, J. H. (1973) <i>Phytochemistry</i> 13:294-295.
<i>H. courbaril</i>	3, 4a, 4b, 4c	Resina da casca do fruto	KHOO, S. F.; OEHLISCHLAGER, A. C.; OURISSON, G. (1973) <i>Tetrahedron</i> 29:3379-3388.
<i>H. verrucosa</i>	3	Resina do tronco	MARTIN, S. S., LANGENHEIM, J. H., (1974) <i>Phytochemistry</i> 13:523-525.
<i>H. courbaril</i>	1c, 2c, 5a	Resina do tronco	MARSAIOLI, A. J.; LEITÃO FILHO, H. F.; CAMPELLO, J. P. (1975) <i>Phytochemistry</i> 14:1882-1883.
<i>H. stigonocarpa</i> var. <i>pubescens</i>	2a, 2c	Casca do tronco	IMAMURA, P. M. (1978) <i>Isolamento, reações e ressonância magnética nuclear de ¹³C de diterpenos de Hymenaea</i> . Dissertação (Ms. Química)

<i>H. courbaril</i> var. <i>stilbocarpa</i>	3,6a, 7a, 7b, 8	Casca do fruto	NOGUEIRA, R. T.; SHEPARD, G. J.; LAVERDE JR. ^a , A.; MARSAIOLI, A. J.; IMAMURA, P. M. (2001) <i>Phytochemistry</i> 58:1153-1157.
<i>H. courbaril</i> var. <i>altissima</i>	1a, 2d, 9	Casca do tronco	NOGUEIRA, R. T.; GIACOMINI, R. A.; SHEPARD, G. J.; IMAMURA, P. M. (2002) <i>Journal of Brazilian Chemical Society</i> 13(3):389-391.
<i>H. courbaril</i> var. <i>altissima</i>	3, 6a, 6b, 7a	Casca do fruto	NOGUEIRA, R. T.; GIACOMINI, R. A.; SHEPARD, G. J.; IMAMURA, P. M. (2002) <i>Journal of Brazilian Chemical Society</i> 13(3): 389-391. GIACOMINI, R. A.; MIRANDA, P. C. M. L.; IMAMURA, P. M. (2004) <i>Magnetic Resonance in Chemistry</i> , 42(6):561-563.
<i>H. courbaril</i>	10a, 10b, 10c	Folhas, tronco e galhos	ABDEL-KADER, M.; BERGER, J. M.; SLEBODNICK, C.; HOCH, J.; MALONE, S.; WISSE, J. H.; WERKHOVEN, M. C. M.; MAMBER, S.; KINGSTON, D. G. I. (2002) <i>Journal of the Natural Products</i> 65: 11-15.
<i>H. courbaril</i>	1d, 1e, 2e, 5b, 11	Casca do fruto	JAYAPRAKASAM, B.; ALEXANDER-LINDO R. L.; DEWITT D. L.; NAIR, M. G. (2007) <i>Food Chemistry</i> 105: 485-490.

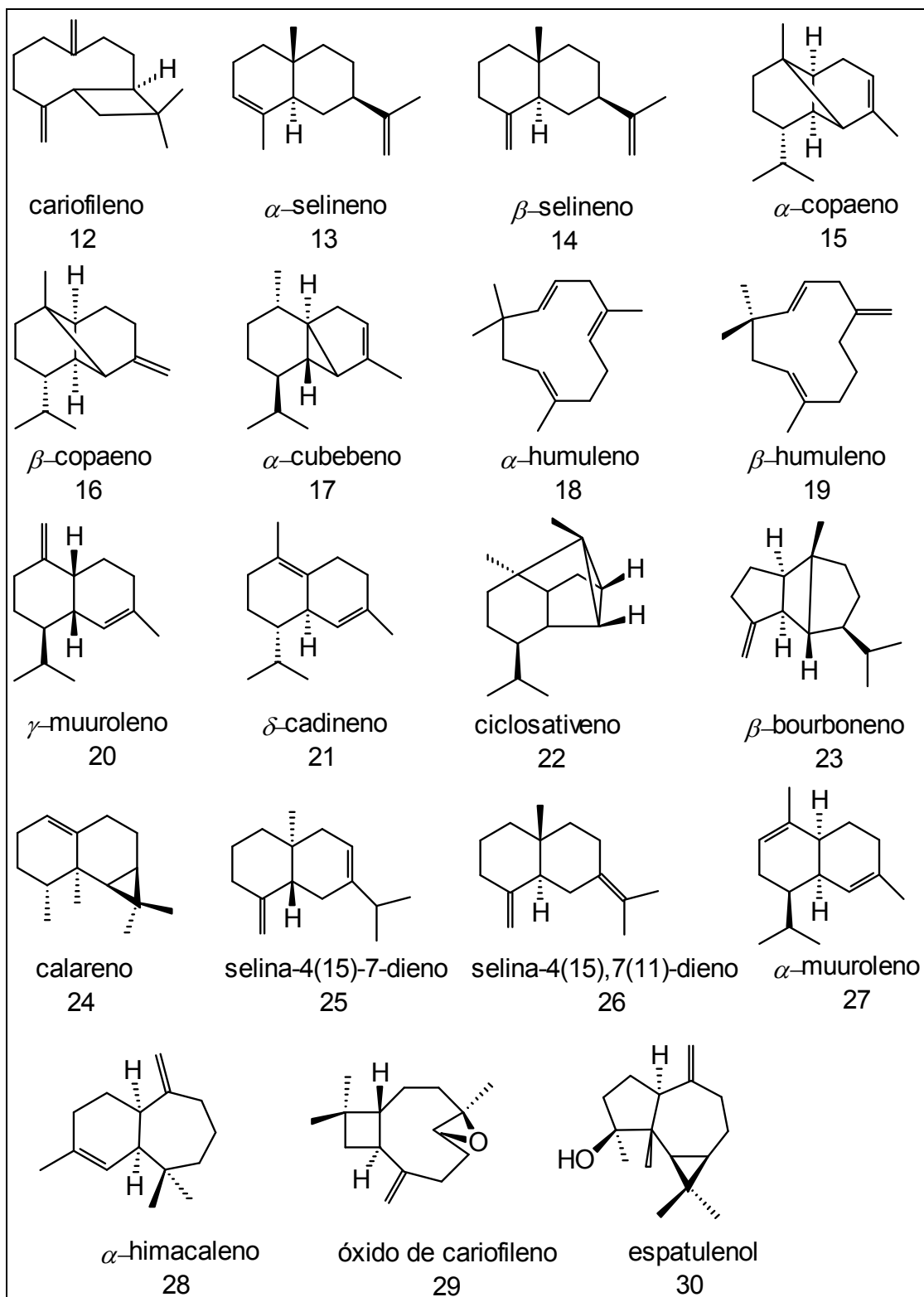


Figura 8 – Sesquiterpenos aislados de *Hymenaea*.

Tabela 4 – Espécies estudadas de *Hymenaea*, substâncias sesquiterpênicas isoladas, parte da planta e referências bibliográficas.

Espécie	Substâncias isoladas	Parte da planta	Referência
<i>H. courbaril</i>	cariofileno (12), α e β -selineno (13) e (14), α e β -copaeno (15) e (16), α -cubebeno (17), α e β -humuleno (18) e (19), γ -muuroleno (20), δ -cadineno (21)	Folhas	MARTIN, S. S., LANGENHEIM, J. H., (1972) <i>Phytochemistry</i> , 11: 3049-3051.
<i>H. courbaril</i>	ciclosativeno (22), β -bourboneno (23), cariofileno (12), calareno (24), α -humuleno (18), δ -cadineno (21), selina-4(14)-7-dieno (25), selina-4(14),7(11)-dieno (26), α -muuroleno (27), α -himacaleno (28)	Casca do fruto	KHOO, S. F.; OEHLISCHLAGER, A. C.; OURISSON G. (1973) <i>Tetrahedron</i> 29: 3379-3388.
<i>H. courbaril</i> var. <i>altissima</i>	óxido cariofileno (29), espatulenol (30), α -copaeno (15)	Casca do fruto	GIACOMINI, R. A. (2002) <i>Estudo Fitoquímico de Hymenaea courbaril var. altissima e Síntese de derivados odoríferos do tipo âmbar-gris e sesquiterpenos da classe drimano a partir do (-)-ácido ózico.</i> Tese (Doutorado em Química)
<i>H. courbaril</i>	espatulenol (30)	Casca do fruto	JAYAPRAKASAM, B.; ALEXANDER-LINDO R. L.; DEWITT D. L.; NAIR, M. G. (2007) <i>Food Chemistry</i> 105: 485-490.

1.5. Atividades biológicas de *Hymenaea*

Nas árvores a resina produzida em diferentes partes da planta apresenta composição diversificada. Nas folhas, pétalas, sépalas e em tecidos de árvores jovens, a resina secretada é rica em sesquiterpenos. Já no tronco, raízes e frutos, a resina é constituída principalmente por ácidos diterpênicos e por pequenas quantidades de hidrocarbonetos sesquiterpênicos (LEE & LANGENHEIM, 1975; STUBBLEBINE & LANGENHEIM, 1980).

Diversos estudos mostram que os terpenos constituem uma classe de produtos naturais que oferecem uma diversidade muito grande de metabólitos secundários com ampla variedade de estruturas e atividades biológicas pronunciadas como antibacteriana e antifúngica (BENNAMARA *et alii*, 1999), anti-inflamatória e citotóxica (THOMSON, 1993; TOPCU *et alii*, 1999; HANSON, 2001), deterrente alimentar contra besouros (SCHROEDER *et alii*, 1999), atividade biológica analgésica, sedativa (OKUYAMA *et alii*, 1991) e de inibição de herbivoria em insetos (MILES *et alii*, 1990; VIEGAS JÚNIOR, 2003).

Apesar de serem escassos os relatos na literatura a respeito da atividade biológica de extratos ou substâncias puras ou biossintetizadas por espécies do gênero *Hymenaea*, alguns estudos já foram reportados, principalmente para a espécie *H. courbaril*.

Os extratos de 153 plantas do Panamá pertencentes a 28 espécies diferentes foram testados contra *Biomphalaria glabrata*, um caramujo transmissor do parasita causador da esquistossomose, para avaliação da atividade moluscicida (MARSTON *et alii*, 1996). Destes extratos, quinze foram ativos, sendo que o de *H. courbaril* esteve entre os dois mais potentes.

Abdel-Kader e colaboradores (2002) verificaram atividade citotóxica contra células causadoras de câncer no ovário humano para o ácido (13*R*)-13-hidroxi-1(10),14-*ent*-halimadien-18-óico (**10a**) (**Figura 7**) isolado do extrato de *Hymenaea courbaril*.

Após verificarem que formigas cortadeiras *Atta cephalotes* L. (Formicidae, Attini) não atacavam árvores de *H. courbaril*, Hubbel e colaboradores (2003) propuseram a presença de algum repelente de formigas nas folhas desta espécie. Realizado o monitoramento dos extratos da folha através de ensaios biológicos, procedeu-se ao isolamento e identificação de substâncias e descobriu-se que essencialmente apenas um terpenóide era o responsável pelo efeito repelente de formigas: o óxido de cariofileno. De acordo com os pesquisadores, como as folhas servem de substrato para a cultura de fungos que serão utilizados como alimento pelo formigueiro, a hipótese mais provável é a de que as formigas evitam seletivamente espécies de plantas que contenham compostos tóxicos para seus fungos. Para comprovar a hipótese, testou-se o óxido de cariofileno e este apresentou potente atividade antifúngica, não somente contra os fungos das formigas estudadas, mas também contra outros tipos de fungos (HUBBEL *et alii*, 2003).

Giacomini e colaboradores (2005) submeteram compostos isolados de extratos do epicarpo de *H. courbaril* var. *altissima* a bioensaios simples. Os testes avaliaram a medida de letalidade com *Artemia salina* e com as bactérias *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhimurum*, *Rodococcus equi* e *Escherichia coli*. Do extrato hexânico do epicarpo foram isolados, após tratamento com diazometano, quatro ésteres dos ácidos diterpênicos isoóxico (**3**), óxico (**6a**), zanzibárico (**6b**) e kolavênico (**7a**) (**Figura 7**). Do extrato do epicarpo obtido com acetato de etila foram isolados além dos três primeiros, dois novos clerodanos isômeros do ácido kolavênico (**8** e **9**) (**Figura 7**). Todos os compostos se mostraram ativos contra *Artemia salina* e contra as bactérias *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus* e *Rodococcus equi*.

Em outro trabalho, desenvolvido por Granato e colaboradores (2005), foi realizado o estudo da atividade antimicrobiana de extratos obtidos a partir de rejeitos industriais de madeiras nobres. O extrato metanólico de *Hymenaea courbaril* foi ativo contra as bactérias *Klebsiella pneumoniae*, *Micrococcus luteus*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Proteus mirabilis*.

Fernandes e colaboradores (2005) avaliaram a atividade antimicrobiana de *H. courbaril* *in vitro*. O extrato hidroalcoólico do epicarpo apresentou atividade contra *Staphylococcus sp.* com concentração inibitória mínima (CIM) de 2,5 mg.mL⁻¹.

Além de isolar seis substâncias dos frutos de *H. courbaril*, Jayaprakasam e colaboradores (2007) reportaram a atividade anti-inflamatória usando as enzimas cicloxigenase-1 (COX-1) e cicloxigenase-2 (COX-2) e a atividade de inibição da peroxidação lipídica de algumas destas substâncias. A 100 ppm, as substâncias **1d**, **5b** e **11** (**Figura 7**) causaram inibição da peroxidação lipídica (46-75%), enquanto as substâncias **2e** e seu respectivo éster metílico inibiram a COX-2 (40 e 43% respectivamente) também a 100 ppm.

1.5.1. Atividade biológica de *Hymenaea stigonocarpa*

Para a espécie *H. stigonocarpa*, o número de estudos desenvolvidos para avaliação da potencial atividade biológica da espécie é menor ainda.

Oliveira e colaboradores (2002) avaliaram o efeito alelopático de extratos aquosos e etanólicos de folhas e frutos de jatobá-do-cerrado. Eles concluíram que a taxa de germinação de alface (*Lactuca sativa*) foi reduzida no extrato etanólico de frutos e houve atraso na germinação em extratos aquosos de folhas e frutos, indicando que os aleloquímicos de *H. stigonocarpa* encontram-se, principalmente, nos frutos. Perceberam também que os aleloquímicos presentes nas folhas persistem no solo por até 90 dias.

No trabalho de Novais e colaboradores (2003) foi comprovada atividade antibacteriana significativa contra *Staphylococcus aureus* para o extrato clorofórmico das folhas desta espécie.

Procurando alternativas fitoterápicas para o controle de verminose ovina no estado do Paraná, Furtado (2006) selecionou como um promissor anti-helmíntico o extrato

hidroalcoólico da polpa de *Hymenaea stigonocarpa* por causar inibição acima de 80% no desenvolvimento de ovos de trichostrongilídeos (formação de larva) comparativamente ao sulfóxido de albendazol.

1.6. Estudos diversos desenvolvidos com o gênero *Hymenaea*

1.6.1. Estudos com a resina de *Hymenaea*

A pressão evolutiva sofrida em ambientes tropicais é muito grande (pela presença de herbívoros e patógenos em grande quantidade) e tanto a composição como a produção de resinas vegetais, sofrem a influência do meio ambiente (LANGENHEIM *et alii*, 1982).

Vários estudos foram desenvolvidos por Langenheim e colaboradores com a resina produzida por *Hymenaea* sob diferentes aspectos. O efeito do estresse úmido na composição e produção da resina foliar de *Hymenaea courbaril* (LANGENHEIM *et alii*, 1979), a variação na composição da resina entre órgãos, tecidos e populações de *Hymenaea courbaril* e *verrucosa* (LANGENHEIM *et alii*, 1978), a influência de fatores físicos, como a incidência de luz, temperatura e stress hídrico na produção de resina foliar nas variedades *H. courbaril* var. *courbaril* e *H. courbaril* var. *subsessilis* (LANGENHEIM *et alii*, 1981).

Em outro trabalho Langenheim e colaboradores (1982) procuraram interpretar os padrões de variação na produção e composição da resina de 11 espécies de *Hymenaea* nos contextos ecológicos e sistemáticos. E já em 1983, Langenheim e Hall estudaram também a relação entre a concentração de sesquiterpenos (principalmente cariofileno) da resina foliar de *Hymenaea stigonocarpa* e a herbivoria dos lepidópteros *Stenoma ferrocanella* e *Spodoptera exigua*. Neste mesmo ano, Langenheim e Stubblebine investigaram a variação da composição da resina da folha entre árvore parental, plântulas e progênie e as implicações para a herbivoria nos trópicos úmidos (LANGENHEIM & STUBBLEBINE, 1983).

Arrhenius e Langenheim (1983) verificaram o efeito inibitório da resina foliar de *Hymenaea* e *Copaifera* contra o fungo *Pestalotia subcuticularis*. A relação entre herbivoria de lepidópteros e sesquiterpenos da folha foi analisada em árvores de *H. stigonocarpa* em duas florestas do sudeste brasileiro (LANGENHEIM *et alii*, 1986).

1.6.2. Estudos agronômicos

Rocha (1988) analisou as proteínas de reserva das sementes de algumas espécies de *Hymenaea* com a finalidade de obter padrões protéicos que pudessem auxiliar na taxonomia do grupo, uma vez que a revisão do gênero feita por Lee e Langenheim (1975) havia sido baseada sobretudo em caracteres morfológicos e da anatomia das folhas. Entretanto, concluiu que não é possível a separação de *taxa* através de padrões protéicos.

Botelho e colaboradores (2000) buscando contribuir para a ampliação do conhecimento da flora lenhosa do Cerrado e na produção de mudas em viveiro, descreveu e ilustrou aspectos morfológicos externos e internos de seus frutos e sementes, do processo germinativo e a morfologia das plântulas e mudas.

Pesquisas desenvolvidas por Aidar e colaboradores (2002) mostraram que os exemplares de *Hymenaea courbaril* crescidas sob concentrações enriquecidas de CO₂, se estabelecem mais rapidamente em seu ambiente natural e podem também servir como um mecanismo de sequestro de carbono pela floresta.

Uma faixa de cerrado *sensu stricto*, de 63,56 ha pertencente à Universidade de Brasília-DF, foi estudada para avaliação da produção energética na forma de calor da biomassa seca de 47 espécies de árvores com diâmetro igual ou superior a 5 cm. Com massas específicas e poderes caloríficos superiores acima da média encontrou-se *Hymenaea stigonocarpa* e *Pouteria ramiflora*, sendo a primeira uma das maiores produtoras individuais de biomassa seca. A espécie de maior massa específica básica para a

madeira e para a casca foi *Hymenaea stigonocarpa*. O poder calorífico superior médio da madeira foi de 9.942,10 kJ/kg, e o da casca, de 20.264,42 kJ/kg. Do ponto de vista da comunidade, a espécie *H. stigonocarpa* teve um valor muito baixo de IVC (1,69), o índice de valor de cobertura, que verifica o comportamento da espécie no âmbito da estrutura da comunidade o que gerou um resultado de produção total de energia muito abaixo da média da comunidade (VALE *et alii*, 2002).

A formação do sistema radicular e da parte aérea das plantas está associada à boa capacidade de aeração, drenagem, retenção de água e disponibilidade balanceada dos substratos utilizados na germinação. Carvalho Filho *et alii* (2003) avaliaram o efeito de diferentes ambientes, misturas de substratos e tamanhos de recipientes na emergência e no crescimento de mudas de *Hymenaea courbaril* L.. Eles demonstraram em experimento que o melhor substrato para a germinação das sementes de jatobá foi aquele composto por solo, areia e esterco de boi na proporção de 1:2:1, utilizando sacos de polietileno de 15 x 20cm, semeados em pleno sol.

Comparando as espécies vicariantes *Hymenaea courbaril* var. *stilbocarpa* e *Hymenaea stigonocarpa* a fim de detectar diferenças ecológicas entre matas e cerrados, Dechoum (2004) estudou as diferenças relacionadas à adaptação e estabelecimento de plântulas das espécies citadas nos seus respectivos ambientes naturais (mata ciliar e cerrado), utilizando parâmetros de fotossíntese e crescimento. Para isto, a pesquisadora utilizou diferentes intensidades de luz e diferentes substratos. Pôde-se perceber que a espécie da mata, no início do desenvolvimento investiu no crescimento da parte aérea e foi mais tolerante à sombra e menos tolerante à luz, e já a espécie do cerrado foi mais tolerante à luz e desenvolveu mais a parte subterrânea. Foi verificado também que mudas de *H. stigonocarpa* apresentaram alta mortalidade na mata, mas *H. courbaril* estabeleceu-se em ambos os ambientes. A partir destes resultados, Dechoum chega a postular que a espécie *H. stigonocarpa* tenha se originado a partir da espécie *H. courbaril* devido à menor plasticidade apresentada por aquela espécie em relação à esta, ou seja, uma baixa capacidade de ocupação de novos ambientes.

Na mesma linha de pesquisa, Melo *et alii* (2004) realizaram o estudo morfológico de sementes, germinação e plântulas de *H. intermedia* var. *adenotricha* em condições de viveiro e laboratório.

As características biométricas do fruto, a quantificação da germinação e análise do efeito de diferentes métodos de escarificação mecânica na germinação de sementes de *H. stigonocarpa* foram determinadas por De-Carvalho e colaboradores (2005). O mesmo estudo foi realizado com a espécie *H. intermedia* (CRUZ *et alii*, 2001).

A caracterização morfológica de plântulas de *H. stigonocarpa* var. *stigonocarpa*, *H. stigonocarpa* var. *brevipetiolata* e *H. courbaril* e a verificação do potencial taxonômico destas características na determinação das espécies em suas fases juvenis foi realizada por Kodama e Sartori (2007). Os resultados indicaram diferenças nas três espécies quanto à coloração, forma e indumento dos cotilédones.

Considerando escassos os trabalhos sobre a ultraestrutura e anatomia do nectário de flores quiropterófilas, Paiva e colaboradores procuraram analisar as modificações celulares e estruturais que ocorrem dentro dos nectários durante os diferentes estágios de desenvolvimento floral de *H. stigonocarpa* (PAIVA & MACHADO, 2008a) e também a descoberta de protuberâncias intercelulares (PAIVA & MACHADO, 2008b).

Com a intenção de encontrar as condições de temperatura, luz e substratos ideais para germinação de sementes de espécies arbóreas nativas do cerrado em condições laboratoriais, que viessem favorecer e viabilizar a produção comercial de mudas, Azevedo (2008) estudou as sementes de quatro espécies: *Hymenaea stigonocarpa*, *Buchenavia tomentosa*, *Guazuma ulmifolia* e *Enterolobium gummiferum*. Foram estudados o teor de umidade inicial e o comportamento germinativo das sementes, variando-se quatro substratos diferentes: rolo de papel, papel de filtro, vermiculita e algodão; dois regimes de temperatura: constante (25 °C) e alternada (20-30 °C); dois níveis de luz: ausência e presença de luz. Para o jatobá-do-cerrado, a temperatura alternada apresentou efeito positivo sobre a germinação. Associada à suscetibilidade

da ausência de luz e ao substrato vermiculita, a pesquisa indicou que a espécie germina e apresenta um bom desenvolvimento em locais com características semelhantes. Avaliando a velocidade de germinação, a melhor combinação observada foi o substrato vermiculita com o regime de temperatura constante, favorecendo os maiores valores, independentemente do nível de luz utilizado.

Azevedo (2008) trabalhando ainda com as mesmas quatro espécies nativas do Cerrado, propôs a restauração de um fragmento de Cerradão no Centro Agrotecnológico de Palmas – TO. O estudo foi baseado na avaliação do arranque inicial por meio da porcentagem de sobrevivência e do estabelecimento pós-plantio das mudas sob condições diferenciadas de adubação. A espécie *H. stigonocarpa* apresentou alta porcentagem de sobrevivência e estabelecimento na região, mas a adubação não contribuiu para o crescimento das plantas nos primeiros meses. Concluiu-se neste estudo que esta espécie pode ser recomendada para a restauração florestal de fragmentos com condições ambientais semelhantes à área pesquisada sendo recomendada a adição de adubação mineral no plantio.

1.6.3. Estudos sobre interação de *Hymenaea* com outros organismos

Lewinsohn (1980) investigou a predação de sementes de diversas espécies de *Hymenaea*, tentando situar os resultados obtidos em um âmbito comunitário. Como resultado observou que as espécies de *H. courbaril* var *stilbocarpa* apresentam uma baixa diversidade de predadores, quando comparada a outras espécies de Leguminosas, sendo estes altamente específicos e estratégicos para conseguirem romper as barreiras de proteção impostas pela espécie, tais como a dureza das cascas dos frutos e das sementes após a maturação.

Oliveira e colaboradores (1995) descobriram que formigas *Mycocepurus goeldii* apresentam uma alta interação com *H. courbaril*, pois elas retiram os resíduos de amido

da polpa dos frutos da superfície das sementes, evitando o ataque de fungos e elevando o percentual de germinação.

Foram observados em plantas de jatobá (*Hymenaea stigonocarpa*) sintomas de lesões foliares de onde foi isolado o fungo *Phomopsis* sp. que tem sido encontrado associado a sementes de espécies comuns nos cerrados, como baru (*Dipteryx alata* Vog.) e caroba [*Cybistax antisyphilitica* (Mart.) Mart.] (SANTOS, 1996), e à mancha foliar em aroeira (*Myracrodruon urundeuva* Fr. All.) (ANJOS *et alii*, 2001). Este foi o primeiro relato de *Phomopsis* sp. em folhas de jatobá, no Brasil, em condições naturais. O trabalho desenvolvido por Charchar e colaboradores (2003) procurou identificar o agente causal da lesão foliar em jatobá, determinar sua patogenicidade, e avaliar a reação de outras espécies vegetais ao isolado do estudo.

Lee e Langenheim (1975) propuseram, baseados no tipo de inflorescência, na largura da flor e na presença de um nectário no hipanto, que 11 espécies do gênero *Hymenaea* seriam polinizadas por morcegos, incluindo *Hymenaea stigonocarpa*. De fato, Gibbs e colaboradores (1999), verificaram a visita de morcegos e mariposas às flores de *H. stigonocarpa*, sendo que somente os morcegos parecem efetivamente entrar em contato com as anteras e os estigmas durante a visita. Assim sendo, *H. stigonocarpa* é uma das cinco espécies quiropterófilas de cerrados brasileiros e é a única que produz flores no meio da estação chuvosa (janeiro-março).

Ainda relacionado a estudos com morcegos polinizadores, em 2006, Oliveira registrou a biologia floral e descreveu as variações na taxa de secreção e na concentração de solutos do néctar nas flores de *Hymenaea stigonocarpa* ao longo da noite. O estudo foi desenvolvido durante a estação chuvosa no Pantanal do Mato Grosso do Sul. A pesquisadora verificou que a produção de néctar foi maior no início da noite diminuindo ao longo da noite, mas a concentração de solutos não diferiu significativamente e o peso da flor influenciou positivamente. O morcego frugífero *Artibeus jamaicensis* foi a espécie com o maior número de capturas e a frequência de captura em plantas com flores teve relação positiva com o número de flores abertas na noite.

1.6.4. Estudos nutricionais e na indústria alimentícia

As sementes das leguminosas são utilizadas como fonte de galactomananas e xiloglucanas, do grupo das fibras solúveis, por indústrias farmacêuticas e de alimentos. Matuda e Netto (2005) analisaram sementes de jatobá-do-cerrado e estas mostram-se pobre em macronutrientes quando comparada a leguminosas utilizadas na alimentação, mas encontraram alto teor de fibras, que pode levar ao aproveitamento rentável dessas sementes.

O fruto do jatobá, além de poder ser consumido ao natural, pode ter a sua polpa (após serem secas e peneiradas) utilizada na confecção de bolos e biscoitos, substituindo, em parte, a farinha de trigo. Silva e colaboradores (1998) e Chang e colaboradores (1998) produziram biscoitos do tipo cookie substituindo 10% da farinha de trigo por farinha de jatobá (*Hymenaea stigonocarpa*). Estes biscoitos apresentaram boa qualidade tecnológica e bom nível de aceitação mostrando-se bastante competitivos com produtos comerciais similares.

Ainda sobre trabalhos com *Hymenaea* na indústria alimentícia, uma mistura de gomas de *Acacia glomerosa*, *Enterolobium cyclocarpum* e *Hymenaea courbaril* foi utilizada como estabilizante para a fabricação de sorvetes apresentando resultados satisfatórios (RINCÓN *et alii*, 2006). Essas gomas servem para retardar o ponto de congelamento, melhorar a textura e reduzir o processo de recristalização da lactose. Após avaliação de diversos fatores como viscosidade e propriedades sensoriais, a mistura apresentou boa funcionalidade na preparação de sorvete.

1.6.5. Estudos etnobotânicos

A espécie *Hymenaea courbaril* está citada em alguns trabalhos de etnobotânica realizados no Brasil. Em pesquisa realizada em duas vilas vizinhas do município de Barcarena (PA), situadas às margens da baía de Marajó, foi verificado que o jatobá foi

uma das espécies medicinais mais citadas no estudo, sendo sua casca utilizada no tratamento de gripe e dor no peito na forma de xarope (AMOROZO & GÉLY, 1988). Albuquerque e Andrade (2002) citaram a utilização como alimento e medicamento entre a população do município de Alagoinha, estado de Pernambuco.

Guarim Neto e Moraes (2003) fizeram uma revisão bibliográfica sobre as plantas medicinais do Cerrado de Mato Grosso, tendo sido a espécie *H. Courbaril*, uma das mais citadas em trabalhos etnobotânicos, etnoecológicos, taxonômicos e florísticos.

Segundo Pinto e Maduro (2003), em trabalho realizado com raizeiros da cidade de Boa Vista, estado de Roraima, o jatobá está entre os produtos de origem vegetal mais procurados para fins medicinais, sendo a casca e a resina indicadas como antianêmicos, para próstata e inflamações. Outros trabalhos retratam o uso medicinal do jatobá (*H. courbaril*): Amorozo (2002), no município de Santo Antônio do Leverger, Mato Grosso e Alcântara e colaboradores (2005) município de Itaberaba, Bahia.

1.6.6. Outros estudos com *Hymenaea*

Os estudos filogeográficos são usados para investigar os efeitos de mudanças climáticas passadas na estrutura genética de plantas e animais que permitem planejar estratégias de conservação de biomas. Desenvolvendo seu trabalho nesta área de estudos, pesquisadores relacionaram a distribuição geográfica das populações de *H. stigonocarpa* em três grupos diferenciados em função das mudanças climáticas no cerrado brasileiro (RAMOS *et alii*, 2007).

Durante a avaliação de oito madeiras brasileiras como alternativas para substituição do carvalho em barris usados para envelhecimento de cachaça, o jatobá esteve entre os três melhores candidatos após comparações da porcentagem de fenóis totais, diferenças no UV-visível e testes de aceitação sensorial: cor, sabor e aroma (FARIA *et alii*, 2003).

2. OBJETIVOS

2.1. Gerais

Considerando a importância do estudo das plantas e a comprovada atividade biológica dos produtos naturais isolados delas, este trabalho teve como objetivo a realização do estudo fitoquímico do extrato do epicarpo de *Hymenaea stigonocarpa* var. *stigonocarpa*, até então não descrito na literatura, e a derivatização estrutural das substâncias isoladas para a realização de ensaios biológicos. Objetivou-se também o desenvolvimento de uma metodologia para a recuperação da sílica impregnada com nitrato de prata gerada nas separações e purificações das substâncias isoladas.

2.2. Específicos

Investigar a composição química da resina do epicarpo da espécie *H. stigonocarpa* a partir da extração com hexano;

Isolar da resina do epicarpo de *H. stigonocarpa* os (-)-ácidos ózico e isoózico e realizar a partir deles derivatizações estruturais;

Desenvolver uma metodologia para o tratamento da sílica gel impregnada com nitrato de prata gerada durante a purificação das substâncias;

Realizar análises quantitativas e qualitativas para avaliar as características físico-químicas da sílica gel recuperada.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Estudo fitoquímico do extrato hexânico de *Hymenaea stigonocarpa*

3.1.1. Preparação do extrato e extração ácido-base

O material de *Hymenaea stigonocarpa* coletado em setembro de 2006 no Parque Nacional da Serra do Cipó – MG foi devidamente identificado pelo Dr. Vidal de Freitas Mansano e sua exsicata (Mansano, V. F. RB 431908) encontra-se depositada no Herbário do Jardim Botânico no Rio de Janeiro.

Dos frutos maduros de *H. stigonocarpa* foram obtidos os epicarpos sem polpa (**Figura 9**), que foram lavados e secos à sombra. Os epicarpos foram moídos em moinho de martelos submetidos à extração com hexano para fornecer em torno de 3,5% em massa de extrato após a evaporação do solvente.



Figura 9 - Frutos (a) e epicarpus (b) de *H. stigonocarpa*

A seguir, o extrato hexânico foi diluído em éter etílico e extraído com porções de uma solução aquosa de hidróxido de potássio (KOH) $0,6 \text{ mol.L}^{-1}$ até a completa extração das substâncias ácidas. Desta forma, obtiveram-se duas frações: a orgânica contendo as substâncias neutras e constituída predominantemente de sesquiterpenos e, a fração aquosa contendo predominantemente os ácidos diterpênicos na forma de sais. À fração aquosa foi adicionado acetato de etila e então, pequenas porções de uma solução aquosa de ácido clorídrico (HCl) 1 mol.L^{-1} até a neutralização do meio para a obtenção dos ácidos.

A fase orgânica contendo as substâncias ácidas foi separada da fase aquosa, seca com sulfato de sódio (Na_2SO_4) e evaporada fornecendo cerca de 68,6% da fração inicial do extrato hexânico. Esta fração composta por ácidos foi então esterificada. Alíquotas de ambas as fases (contendo as substâncias neutras e os ésteres) foram analisadas em cromatógrafo gasoso para avaliação da composição das fases. Os cromatogramas podem ser visualizados a seguir (**Figuras 10 e 11**).

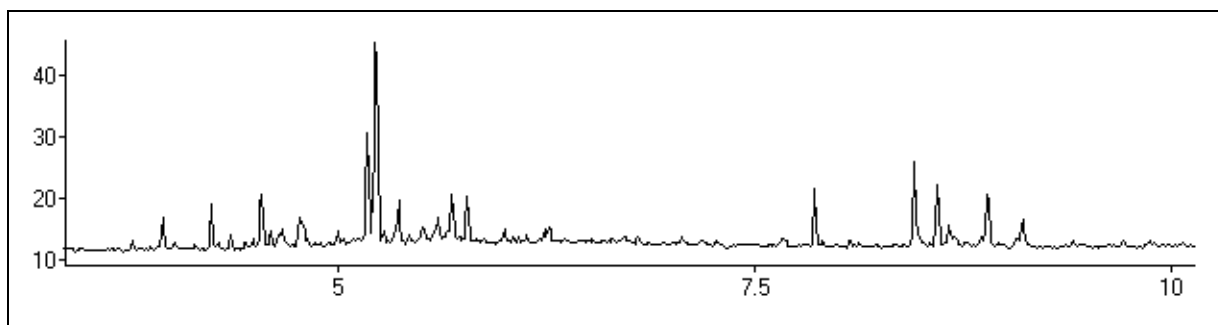


Figura 10 - Cromatograma da fração de neutros do extrato hexânico do epicarpo de *H. stigonocarpa*.

Da fração de neutros, os sesquiterpenos espatulenol e óxido de cariofileno se apresentavam em maior quantidade com os respectivos tempos de retenção: $t_R=5,17$ min. e $t_R = 5,22$ min. conforme pode ser visto na **Figura 10**.

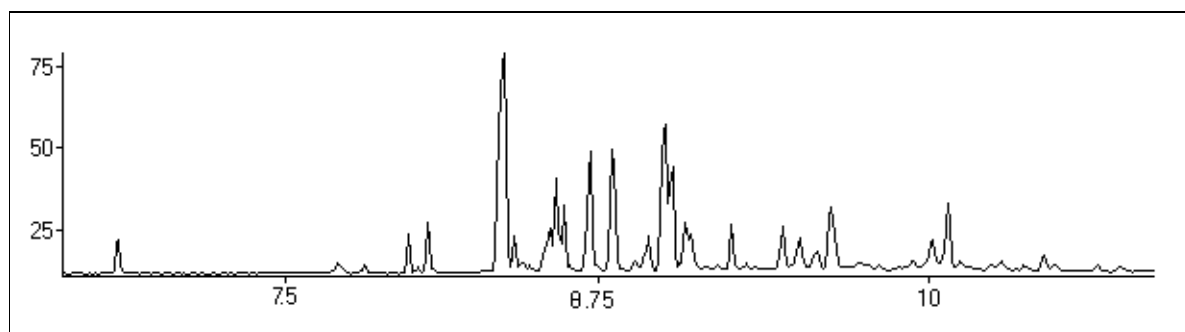


Figura 11 - Cromatograma da fração de ésteres do extrato hexânico do epicarpo de *H. stigonocarpa*.

O cromatograma da fração ácida após esterificação (**Figura 11**) mostra uma complexa mistura de ésteres.

Estas duas frações foram então, submetidas a separações cromatográficas para isolamento e purificação das substâncias presentes.

3.1.2. Separação das substâncias presentes na fração neutra

3.1.2.1. Isolamento dos sesquiterpenos α -copaeno (15), óxido de cariofileno (29) e espatulenol (30)

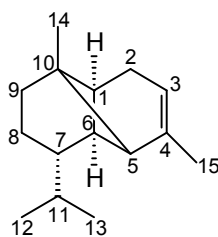
A fração neutra obtida após extração ácido-base e várias separações cromatográficas em coluna forneceu os sesquiterpenos α -copaeno **15** (50,9 mg), óxido de cariofileno **29** (57,3 mg) e espatulenol **30** (79,7 mg). A identificação das substâncias isoladas foi realizada através das técnicas de Espectrometria de Massas, Infravermelho e RMN ^1H e de ^{13}C . Os espectros estão no Apêndice e os principais dados são listados nas tabelas a seguir (**Tabela 5**).

Tabela 5 – Valores de deslocamentos químicos (δ) de RMN ^1H e de RMN ^{13}C do α -copaeno **15**.

	RMN ^1H δ (ppm)/multiplicidade	RMN ^{13}C δ (ppm)
1	1,45 – 1,77 m	54,3 CH
2	2,18 tl	36,2 CH ₂
3	5,20 tl	116,2 CH
4	-	144,0 C
5	2,08 sl	44,2 CH
6	1,45 – 1,77 m	44,7 CH
7	1,45 – 1,77 m	36,8 CH
8	1,45 – 1,77 m	21,8 CH ₂
9	1,45 – 1,77 m	30,1 CH ₂
10	-	39,6 C
11	1,45 – 1,77 m	32,1 CH
12	0,83 d	19,9 CH ₃
13	0,85 d	19,7 CH ₃
14	0,78 s	19,4 CH ₃
15	1,66 s	23,2 CH ₃

Como essas substâncias já haviam sido isoladas do epicarpo de *Hymenaea* sp. e devidamente caracterizadas (GIACOMINI, 2002) e são comumente encontrados na literatura (BROCHINI & ROQUE, 2000; JAYAPRAKASAM *et alii*, 2007), não foi necessário a realização de todas as análises espectrométricas para confirmação das estruturas das substâncias.

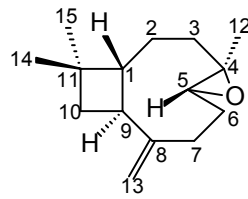
O sesquiterpeno α -copaeno **15** foi isolado como um óleo amarelo. Seu espectro de RMN ^1H (Figura 1A, Apêndice) mostrou um complexo conjunto de sinais na faixa de $\delta = 1,45$ - $1,77$ referente a seis hidrogênios metínicos e metilênicos. Apresentou também um simpleto em $\delta = 1,66$ referente à metila ligada ao carbono insaturado (CH_3 -15), um simpleto em $\delta = 0,78$ referente à metila ligada ao carbono quaternário (CH_3 -14), dois dupletos relacionado às duas metilas do grupo isopropil (CH_3 -12 e CH_3 -13) em $\delta = 0,83$ e $\delta = 0,85$ respectivamente, e um sinal em $\delta = 5,20$ característico de hidrogênio vinílico.



15

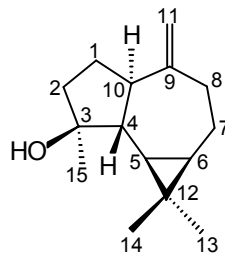
No espectro de RMN ^{13}C (Figura 2A, Apêndice), observou-se 15 carbonos dos quais dois são quaternários, sendo um deles ($\delta = 144,0$) característico de carbono olefínico (C-4). Os demais sinais indicaram quatro carbonos metílicos, três metilênicos e seis metínicos, dos quais o sinal em $\delta = 116,2$ pertence a um carbono insaturado (C-3).

O sesquiterpeno óxido de cariofileno (**29**) se apresentou como um óleo incolor de $R_f = 0,65$ (hexano:acetato de etila 9:1; sílica gel).

**29**

No espectro de RMN ^1H do óxido de cariofileno (Figura 4A, Apêndice) observou-se sinais referentes às três metilas, duas mais protegidas em $\delta = 1,00$ e $\delta = 1,02$ e uma ligada à oxirana em $\delta = 1,22$. Constatou-se também dois simpletos em $\delta = 4,87$ e $\delta = 4,99$ relativos aos sinais dos hidrogênios da dupla exocíclica.

A substância (**30**) se apresentou como um óleo incolor de $R_f = 0,61$ (hexano:acetato de etila 9:1; sílica gel) e após comparações com dados da literatura foi constatado se tratar do espatulenol.

**30**

O espectro de RMN ^1H do espatulenol apresentou sinais de dois hidrogênios de um exometileno em $\delta = 4,66$ e $\delta = 4,69$. Este espectro também exibiu três sinais metílicos em $\delta = 1,04$, $\delta = 1,06$ e $\delta = 1,29$ como podem ser vistos na Figura 7A, Apêndice.

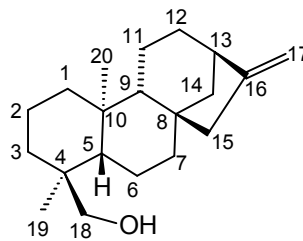
Os dados de RMN ^1H do óxido de cariofileno (**29**) e do espatulenol (**30**) estão descritos na **Tabela 6**.

Tabela 6 - Dados de RMN ^1H dos sesquiterpenos óxido de cariofileno **29** e espatulenol **30** de *Hymenaea stigonocarpa*.

Hidrogênio	Óxido de cariofileno δ (ppm)/multiplicidade	Espatulenol δ (ppm)/multiplicidade
1	1,78 tl	1,61 - 1,68 m 1,80 - 1,90 m
2	1,57 – 1,72 m	1,52 – 1,58 m 1,67 – 1,73 m
3	0,94 – 1,02 m 2,08 – 2,18 m	-
4	-	1,26 - 1,33 m
5	2,89 dd	0,47 dd
6	1,28 – 1,38 m 2,23 – 2,30 m	0,72 ddd
7	2,08 – 2,18 m 2,33 – 2,38 m	1,00 – 1,03 m 1,90 – 2,02 m
8	-	2,10 – 2,23 m 2,42 dd
9	2,63 dd	-
10	1,57 – 1,72 m	2,10 – 2,23 m
11	-	4,66 sl 4,69 sl
12	1,20 s	-
13	4,86 sl 4,98 sl	1,04 s
14	1,02 s	1,06 s
15	1,00 s	1,29 s

3.1.2.2. Isolamento do diterpeno caur-16-en-18-ol (**31**)

Da purificação de duas frações reunidas da separação cromatográfica anterior, (135-176) e (177-193), foi isolada a substância **31**. A identificação foi realizada através da análise dos dados obtidos a partir da espectrometria de massas, IV, RMN ^1H e ^{13}C , encontrados nas Figuras 8A-11A do Apêndice. A partir desses dados e comparando-os com a literatura (GONZÁLEZ *et alii*, 1973; GONZÁLEZ *et alii*, 1981; MÜLLER, 2004) concluiu-se que se tratava do álcool de esqueleto caurênico caur-16-en-18-ol (**31**).



31

O álcool **31** foi isolado do extrato como um sólido branco cristalino de ponto de fusão na faixa entre 103 – 105 °C, com $R_f = 0,38$ (hexano:acetato de etila 9:1; sílica gel). O espectro de massas (Figura 8A, Apêndice) mostra o pico do íon molecular em $m/z = 288$. O pico em $m/z = 273$ refere-se à perda de metila e $m/z = 257$ corresponde à perda de CH_2OH . Os demais picos são provenientes de fragmentações e rearranjos da estrutura policíclica e estão de acordo com a literatura (ANTHONSEN & CHANTHARASAKUL, 1971).

O espectro de Infravermelho de caur-16-en-18-ol (**31**) (Figura 9A, Apêndice) mostra um sinal largo e intenso em 3355 cm^{-1} , característico de deformação axial O-H. Podem ser observados também os sinais característicos de estiramento C-H de carbono sp^2 em 2986 cm^{-1} e C=C em 1655 cm^{-1} . Os sinais característicos de metileno terminal podem ser observados em 1441 cm^{-1} para a deformação angular de C-H e em 870 cm^{-1} para a deformação fora do plano do grupo $=\text{CH}_2$.

O espectro de RMN ^{13}C (Figura 11A, Apêndice) indicou a presença de 20 átomos de carbonos.

O espectro de RMN ^1H do álcool **31** (Figura 10A do Apêndice) confirmou a presença de hidrogênios de duas metilas sobre um carbono quaternário na forma de dois simpletos em $\delta = 0,75$ e $\delta = 1,05$, que estão ligados aos carbonos 20 e 19 ($\delta = 17,5$ e $\delta = 18,0$, respectivamente) que podem ser vistos no espectro de RMN ^{13}C (Figura 11A, Apêndice). Observou-se também um duplete em $\delta = 3,10$ e outro em $\delta = 3,41$ provenientes dos hidrogênios da posição 18, com $J = 12$ Hz característico de acoplamento de hidrogênios geminais.

Os deslocamentos químicos de RMN ^1H em $\delta = 4,80$ e $\delta = 4,71$ foram atribuídos aos hidrogênios de uma dupla terminal. Estes foram relacionados com o sinal no espectro de RMN ^{13}C em $\delta = 103,0$ atribuído ao carbono sp^2 desta dupla terminal. O sinal em $\delta = 2,63$ é referente ao hidrogênio da posição 13. Os demais hidrogênios ligados aos carbonos cíclicos se apresentam na forma de multipletos na região entre $\delta = 2,07$ e $\delta = 0,76$.

González *et alii* (1981) estudou as variações de deslocamentos químicos em diversos diterpenos com esqueletos caurânicos hidroxilados. Eles observaram que, quando ligado ao C-4, o grupo CH_2OH na posição equatorial apresenta um sinal em deslocamento químico maior (em torno de $\delta = 71,8$) que o mesmo grupo na posição axial (em torno de $\delta = 65,4$), o que está de acordo com a estrutura proposta ($\delta = 72,5$).

Outro fator que deve ser levado em consideração para as atribuições dos esqueletos caurânicos é o efeito *γ -gauche* (CREWS & KHO-WISEMAN, 1978; GONZÁLEZ *et alii*, 1981). Este efeito causa a blindagem em algumas posições quando substituintes hidroxila estão presentes nas posições C-3, C-18 e C-19. Quando o grupo hidroxila está presente no C-18, ocorre o efeito de blindagem nas posições C-3 e C-5, diferentemente do que ocorre quando o grupo hidroxila se encontra no C-19. Possivelmente reflete as

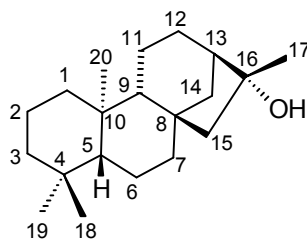
diferentes conformações dos grupos. Quando são comparados os deslocamentos químicos dos carbonos C-3 ($\delta = 35,3$) e C-5 ($\delta = 49,9$) do álcool **31** com os deslocamentos químicos do caureno correspondente sem hidroxila, C-3 ($\delta = 42,0$) e C-5 ($\delta = 56,1$), observa-se, como era esperado, a blindagem causada pelo efeito γ -*gauche* da hidroxila ligada ao carbono 18.

3.1.2.3. Isolamento dos diterpenos cauran-16 α -ol (**32**) e caur-16-en-3 α -ol (**33**)

A análise por CG/EM da fração (65-87) obtida em separações cromatográficas anteriores da fração neutra, mostrou ser constituída principalmente por uma mistura de dois diterpenos com esqueleto caurano. Esta foi então, cromatografada algumas vezes para purificação das substâncias, mas como se tratavam de isômeros com fatores de retenção (R_f) coincidentes, não foi possível a separação das substâncias por cromatografia em coluna.

Optou-se então, por utilizar o método de recristalização por gradiente térmico, baseando-se na pequena diferença de solubilidade dos dois isômeros em diclorometano. Então, através de recristalizações sucessivas foi possível obter os dois isômeros puros **32** (16 mg) e **33** (30 mg).

A identificação das substâncias através de técnicas de RMN ^1H , ^{13}C , COSY, HMQC e HMBC provou se tratar das substâncias cauran-16 α -ol (**32**) e o caur-16-en-3 α -ol (**33**). Os espectros encontram-se no Apêndice.

**32**

As atribuições para a substância **32** foram feitas de acordo com dados já descritos na literatura (HUGEL *et alii*, 1965 & HANSON *et alii*, 1976). O álcool foi isolado como um sólido branco de ponto de fusão 210-212 °C. O espectro de massas (Figura 12A, Apêndice) mostra o pico do íon molecular em $m/z = 290$. O pico em $m/z = 272$ refere-se à perda de H₂O e $m/z = 257$ corresponde à perda de metila. Os demais picos são provenientes de fragmentações e rearranjos da estrutura policíclica e estão de acordo com a literatura (ANTHONSEN & CHANTHARASAKUL, 1971).

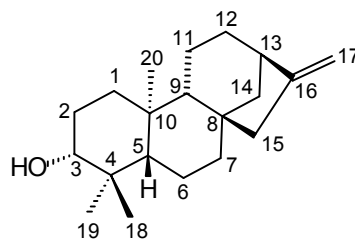
O espectro de infravermelho do cauran-16 α -ol (**32**) (Figura 13A, Apêndice) apresenta um sinal largo e intenso em 3400 cm⁻¹, característico de deformação axial O-H. Podem ser observados também os sinais característicos de estiramento C-H de carbonos alifáticos primários, secundários e terciários em 2910 cm⁻¹, em 1461 cm⁻¹ sinal de deformação angular de CH₂ e em 1045 cm⁻¹ deformação angular de O-H. Os sinais característicos para a deformação angular de C-H em 875 cm⁻¹ podem ser observados.

No espectro de RMN ¹H do álcool **32** (Figura 14A do Apêndice) constatou-se a presença de hidrogênios de quatro metilas ligados a carbonos quaternários na forma de simpletos $\delta = 0,79$, $\delta = 0,84$, $\delta = 1,01$ e $\delta = 1,35$, que de acordo com as correlações observadas no espectro de RMN ¹H, ¹³C (HMQC) estão ligados aos carbonos 19 ($\delta = 21,6$), 18 ($\delta = 33,7$), 20 ($\delta = 17,7$) e 17 ($\delta = 24,7$) respectivamente. Os demais hidrogênios ligados aos carbonos cíclicos se apresentam na forma de multipletos na região entre $\delta = 1,92$ e $\delta = 0,72$.

O espectro de RMN ^{13}C (Figura 15A, Apêndice) indicou a presença de 20 átomos de carbonos. De acordo com o espectro de RMN ^{13}C obtido pela técnica DEPT 135 (Figura 16A, Apêndice) foram detectados nove grupos metilênicos e sete grupos metínicos e metílicos. Desses sete grupos, três são metínicos ($\delta = 49,1$, $\delta = 56,3$ e $\delta = 56,9$) como mostra o espectro de RMN ^{13}C obtido pela técnica DEPT 90 (Figura 17A, Apêndice). A diferença entre os números de sinais dos espectros obtidos pelas duas técnicas (APT e DEPT) indicou a existência de quatro sinais correspondentes a átomos de carbonos quaternários, sendo um deles um sp^3 oxigenado ($\delta = 79,5$).

De acordo com Hanson *et alii* (1976), é possível descobrir a posição do grupo hidroxila em um esqueleto caurênico a partir do efeito de desblindagem dos deslocamentos químicos que este grupo causa no carbono hidroxilado e nos carbonos diretamente ligados a ele. Comparando os valores dos deslocamentos químicos dos carbonos 13 ($\delta = 49,1$), 15 ($\delta = 58,2$) e 16 ($\delta = 79,5$) da substância **32** com o correspondente caureno não hidroxilado ($\delta = 44,2$, $\delta = 49,2$ e $\delta = 54,0$) observa-se a variação dos valores dos deslocamentos químicos para valores maiores, o que comprova a estrutura do álcool na posição 16.

Para a substância **33** foram feitas as atribuições de acordo com dados já descritos na literatura (GONZÁLEZ *et alii*, 1981). O espectro de massas (Figura 21A, Apêndice) mostra o pico do íon molecular em $m/z = 288$. O pico em $m/z = 273$ refere-se à perda de metila e o $m/z = 255$ à sequente perda de H_2O . Os demais picos são provenientes de fragmentações e rearranjos da estrutura policíclica e estão de acordo com a literatura (ANTHONSEN & CHANTHARASAKUL, 1971).

**33**

Analisando o espectro de infravermelho do álcool **33** (Figura 22, Apêndice) pode-se constatar um sinal largo e intenso em 3335 cm^{-1} , característico de deformação axial. O espectro apresenta também absorções em 1655 e 872 cm^{-1} referentes à presença de uma olefina exocíclica, em 2866 cm^{-1} relativa ao estiramento C-H de carbono sp^2 e em 1442 cm^{-1} para a deformação angular de C-H.

O espectro de RMN ^1H (Figura 23A do Apêndice) apresentou em $\delta = 0,76$, $\delta = 0,96$ e $\delta = 1,02$ três simpletos característicos de metilas ligadas a carbonos quaternários, que de acordo com as correlações observadas no espectro de RMN ^1H , ^{13}C (HMQC, Figura 26A do Apêndice) pertencem aos carbonos 19 ($\delta = 15,6$), 18 ($\delta = 28,5$) e 20 ($\delta = 17,6$) respectivamente. Apresentou também dois sinais em $\delta = 4,80$ e $\delta = 4,73$ atribuídos aos hidrogênios da dupla exocíclica e um sinal em $\delta = 2,64$ na forma de um simpleto largo referente ao hidrogênio H-13. Foi ainda observado um duplo duplete em $\delta = 3,62$ relativo ao hidrogênio H-3 ligado ao carbono onde se encontra o grupo hidroxila ($\delta = 79,1$), o que foi confirmado pela correlação observada no espectro de RMN ^1H , ^{13}C (HMQC, Figura 26A do Apêndice). Os demais hidrogênios ligados aos carbonos cíclicos se apresentam na região entre $\delta = 2,05$ e $\delta = 0,75$.

O espectro de RMN ^{13}C do caur-16-en-3 α -ol (**33**) (Figura 24A, Apêndice) indicou a presença de 20 átomos de carbonos: sete carbonos CH e CH_3 e treze carbonos C e CH_2 .

Comparando os valores dos carbonos 2 ($\delta = 27,4$), 3 ($\delta = 79,1$) e 4 ($\delta = 39,0$) da substância **33** com o correspondente caureno não hidroxilado ($\delta = 18,7$, $\delta = 42,0$ e $\delta = 33,3$) observa-se o deslocamento químico indicando a estrutura do caureno com a hidroxila na posição 3. Comparando também a variação causada pelo efeito γ -*gauche*, observa-se que o C-19 do álcool **33**, apresenta sinal em $\delta = 15,6$. Este sinal encontra-se mais blindado do que o sinal do C-19 do caureno sem substituição correspondente ($\delta = 21,7$) o que confirma a estrutura proposta do álcool.

A Figura 24A do Apêndice mostra ainda dois sinais em $\delta = 103,1$ e $\delta = 156,0$ atribuídos aos carbonos da dupla ligação exocíclica.

3.1.3. Separação das substâncias da fração ácida

Após o fracionamento da fração neutra do extrato hexânico, iniciou-se o processo de estudo da fração ácida. Como a esterificação da fração ácida com sulfato de metila apresentou baixo rendimento, esta foi submetida à reação com diazometano (**34**), que apresentou melhores resultados. Inicialmente, então, foi preparado o diazometano a partir do Diazald (**35**) que, por sua vez, foi sintetizado pela reação do cloreto de tosila (**36**) com metilamina em meio básico e nitrito de sódio em ácido acético de acordo com a metodologia descrita por De Boer e Backer (1963).

Após a esterificação e separação cromatográfica em coluna de gel de sílica, obteve-se uma fração com $R_f = 0,8$ (hexano:acetato de etila 9:1; sílica gel) em CCD. Nesta fração, após análise em CG/EM, verificou-se a presença de quatro ésteres majoritários que foram designados como **6a**, **37**, **38** e **39**, como pode ser observado no cromatograma apresentado na **Figura 12**.

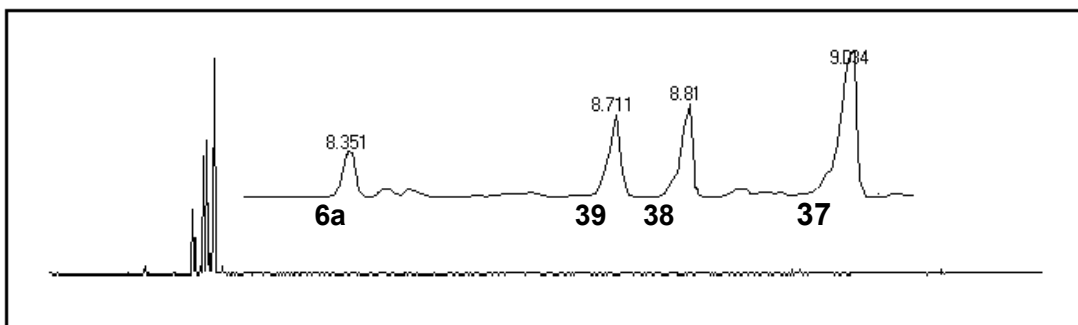


Figura 12 - Cromatograma da fração constituída dos ésteres **6a**, **37**, **38** e **39**.

Esses ésteres foram submetidos à separação cromatográfica em coluna de gel de sílica impregnada com AgNO_3 (10%) e eluídos com uma mistura de hexano e acetato de etila com proporções crescentes do solvente mais polar.

Após análise das frações por CG/EM, foi constatado o isolamento de quatro substâncias que também foram caracterizadas através das análises dos espectros obtidos no Infravermelho, RMN ^1H , RMN ^{13}C , por técnicas bidimensionais e por espectrometria de massas.

3.1.3.1. Isolamento do diterpeno caur-16-en-18-oato de metila (37)

A substância majoritária na mistura dos ésteres, **37**, foi a primeira a ser eluída da coluna cromatográfica com uma mistura de hexano:acetato de etila 9,7:0,3. O cromatograma da fração está mostrado na **Figura 13**, onde pode ser observado que a substância foi obtida com alto grau de pureza.

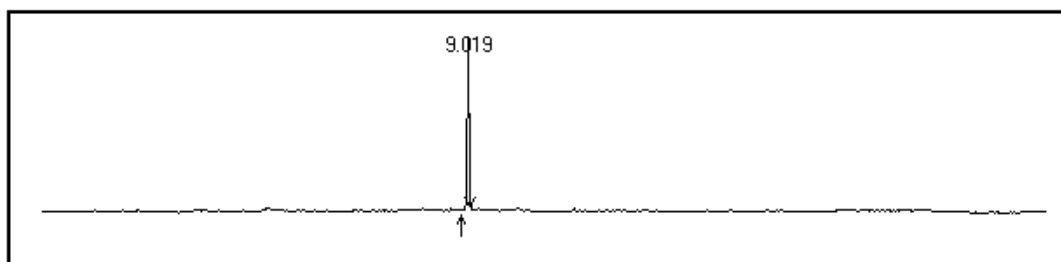
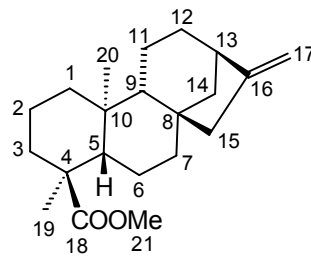


Figura 13 - Cromatograma da fração contendo o éster **37**.

O éster **37** foi obtido como um sólido cristalino branco de ponto de fusão na faixa de 108 – 110 °C e $R_f = 0,8$. Após realizada a análise dos espectros, este apresentou sinais coerentes com a estrutura do caur-16-en-18-oato de metila (**37**) (HUGEL *et alii*, 1965; YAMASAKI *et alii*, 1976; GONZÁLEZ *et alii*, 1981; HSIEH *et alii*, 2004).

**37**

A confirmação estrutural da substância **37** foi feita, inicialmente, pela análise do seu espectro no infravermelho (Figura 29A, Apêndice) que apresentou sinais característicos de estiramento C-H de carbono sp^2 em 3020 cm^{-1} e C=C em 1655 cm^{-1} . O sinal intenso em 1717 cm^{-1} corresponde ao estiramento C=O do éster, enquanto que em 1248 cm^{-1} encontra-se o sinal de deformação axial do C-O. Os sinais característicos de metileno terminal podem ser observados em 1437 cm^{-1} para a deformação angular de C-H e em 874 cm^{-1} para a deformação angular fora do plano do grupo $=\text{CH}_2$.

O espectro de massas obtido para a substância **37** (Figura 28A, Apêndice) apresentou um pico do íon molecular ($m/z = 316$) relativamente intenso, característico de ésteres carboxílicos de massa elevada. Os picos em $m/z = 301$ e 257 são referentes à perda de respectivamente, CH_3 e COOMe da função éster. Os demais picos são provenientes de fragmentações e rearranjos da estrutura policíclica e estão de acordo com a literatura (ANTHONSEN & CHANTHARASAKUL, 1971).

O espectro de RMN ^1H do caur-16-en-18-oato de metila, Figura 30A do Apêndice, mostra dois simpletos referentes às metilas 20 ($\delta = 1,07$) e 19 ($\delta = 1,16$). A função éster é confirmada pelo simpleto em $\delta = 3,65$ proveniente da metoxila. Os hidrogênios da dupla ligação 17 dão origem aos sinais em $\delta = 4,80$ e $4,73$. O simpleto em $\delta = 2,63$ é referente ao hidrogênio da posição 13. Os demais hidrogênios ligados aos carbonos cíclicos se apresentam na forma de multipletos na região entre $\delta = 2,1$ e $\delta = 0,8$.

A análise do espectro de RMN ^{13}C do caur-16-en-18-oato de metila (**37**) da Figura 31A (Apêndice) demonstrou se tratar de uma substância com 21 átomos de carbono. Na

fase inversa do espectro foram encontrados seis sinais de metilas e grupos metínicos e na fase positiva quinze sinais de grupos metilênicos e carbonos quaternários.

O espectro confirmou a presença de duas metilas sobre um carbono quaternário em $\delta = 16,5$ e $\delta = 18,0$, que foram evidenciadas por RMN 2D ^1H , ^{13}C (HMQC, Figura 33A do Apêndice) em $\delta = 1,07$ e $\delta = 1,16$, respectivamente.

Em $\delta = 103,1$ atribuiu-se ao carbono sp^2 (CH_2) de uma dupla terminal que foi confirmado por RMN 2D ^1H , ^{13}C (HMQC, Figura 33A do Apêndice) onde os deslocamentos químicos $\delta = 4,73$ e $\delta = 4,80$ foram atribuídos aos hidrogênios desta dupla terminal.

A atribuição do grupo carboximetil (COOMe) do C-4 em posição equatorial baseou-se no deslocamento químico do C-5 ($\delta = 50,6$). Quando esta função se encontra na posição axial, o deslocamento químico esperado para o C-5 ocorre em torno de $\delta = 56,0$, o que não foi observado nesse caso devido ao efeito γ -*gauche* de blindagem dos átomos de oxigênio do grupo carboximetil no C-5 (MONTE *et alii*, 1988; VELANDIA *et alii*, 1998). Outro fator que confirmou a posição do grupo COOMe , foi o deslocamento químico da metila ligada ao C-4. Esta metila quando em posição equatorial apresenta deslocamento químico próximo de $\delta = 30,0$ (YAMASAKI *et alii*, 1976; VELANDIA *et alii*, 1998) e quando em posição axial apresenta deslocamento químico próximo de $\delta = 20,0$ (GONZÁLEZ *et alii*, 1981), que é o caso da substância **37**, cujo deslocamento químico é $\delta = 18,0$.

3.1.3.2. Isolamento do diterpeno ozato de metila (6a)

O segundo éster a ser obtido da coluna foi a substância **6a**, também com uma mistura de hexano:acetato de etila 9,7:0,3. Seu cromatograma está mostrado na **Figura 14**.

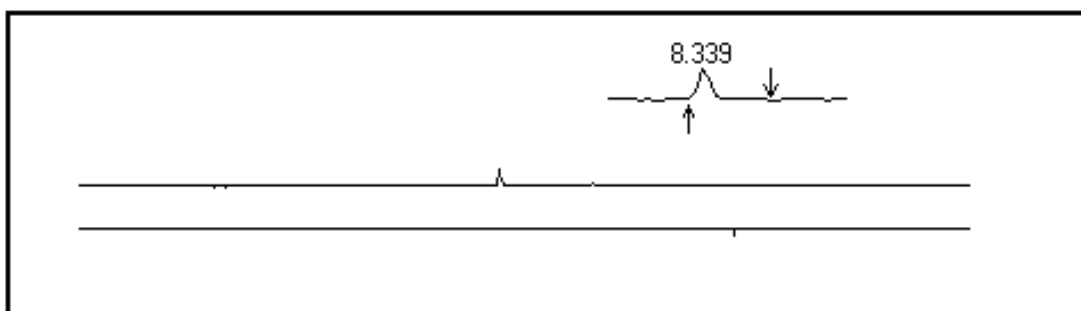
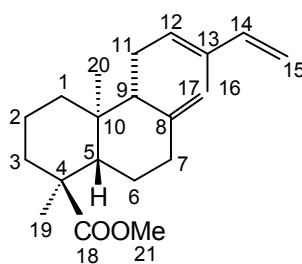


Figura 14 - Cromatograma da fração contendo o éster **6a**.

A substância **6a**, obtida na forma de um óleo incolor, foi submetida à análise por espectrometria de massas, RMN ^1H , RMN ^{13}C e por técnicas bidimensionais, apresentando sinais coerentes com a estrutura do ozato de metila, já isolado de outras espécies de *Hymenaea* sp. (GONZÁLEZ *et alii*, 1981; NOGUEIRA, 1999; GIACOMINI, 2002).



6a

O espectro de massas obtido para a substância (Figura 35A, Apêndice) apresentou um pico do íon molecular ($m/z = 316$) e os picos em $m/z = 301$ e 257 referentes à perda de respectivamente, CH_3 e COOMe . Os demais picos são provenientes de fragmentações

e rearranjos da estrutura policíclica. O espectro de massas obtido está de acordo com o descrito na literatura (ATKINSON & CROW, 1970).

O espectro de RMN ^1H do ozato de metila (**6a**), Figura 36A do Apêndice, mostra três simpletos referentes às duas metilas ligadas a carbonos quaternários: 20 ($\delta = 0,76$) e 19 ($\delta = 1,16$) e à uma metila vinílica $\delta = 1,74$. A função éster é confirmada pelo simpleto proveniente da metoxila 21 ($\delta = 3,65$). Os hidrogênios ligados aos carbonos insaturados dão origem aos dupletos centrados em $\delta = 4,87$ e $5,03$ do carbono 15, ao duplo duplete centrado em $\delta = 6,34$ do carbono 14, e aos dois simpletos em $\delta = 4,48$ e $4,83$ do carbono 17 e a um tripleto largo em $\delta = 5,40$ relativa ao hidrogênio dos C-12. Os demais hidrogênios ligados aos carbonos cíclicos se apresentam na forma de multipletos na região entre $\delta = 2,4$ e $1,15$.

A análise do espectro de RMN ^{13}C (Figura 37A do Apêndice) mostrou a presença de 21 carbonos correspondentes a quatro carbonos metílicos, oito carbonos metilênicos, quatro carbonos metínicos e cinco carbonos quaternários.

O deslocamento químico em $\delta = 108,1$ foi atribuído ao carbono sp^2 da dupla terminal (C-17) o que foi confirmado no espectro de RMN 2D ^1H , ^{13}C (HMQC, Figura 39A do Apêndice) por apresentar correlação com os hidrogênios ligados ao C-17. Da mesma forma, os deslocamentos químicos $\delta = 110,0$, $\delta = 133,9$ e $\delta = 141,8$ foram atribuídos aos carbonos 15 (dupla terminal monossubstituída), 12 e 14 respectivamente, após observação das correlações entre H e C no espectro de RMN 2D ^1H , ^{13}C (HMQC).

3.1.3.3. Isolamento do diterpeno caur-15-en-18-oato de metila (**38**)

A quarta fração a ser eluída da coluna cromatográfica com uma mistura de hexano:acetato de etila 9,5:0,5 forneceu a substância **38** como pode ser observado no cromatograma da **Figura 15**. A substância se apresentou como um sólido cristalino branco de ponto de fusão na faixa de $111-112\text{ }^\circ\text{C}$.

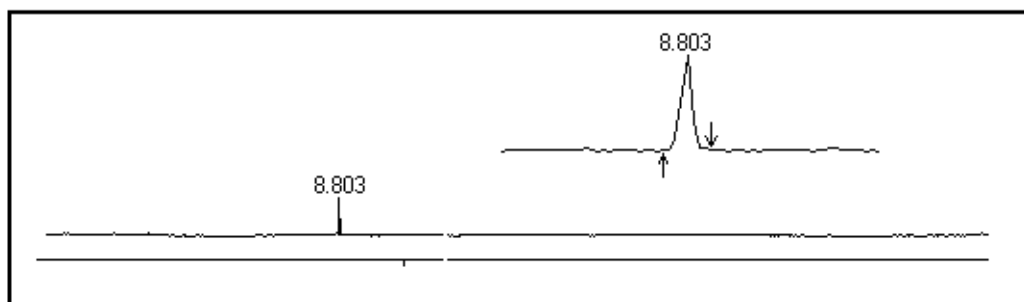
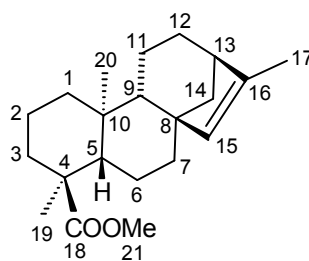


Figura 15- Cromatograma da fração contendo o éster **38**.

Essa substância foi submetida à análise no Infravermelho, de RMN ^1H , ^{13}C , RMN 2D e por espectrometria de massas para identificação da molécula. Comparando os resultados com os dados da literatura (HUGEL *et alii*, 1965; YAMASAKI *et alii*, 1976; GONZÁLEZ *et alii*, 1981), a concluiu-se que a substância se tratava do caur-15-en-18-oato de metila (**38**).



38

O espectro de massas mostrado na Figura 41A do **Apêndice** apresenta um padrão de fragmentação muito semelhante ao da substância caur-16-en-18-oato de metila (**37**), por apresentar esqueleto muito semelhante. O espectro de massas obtido para esta substância apresentou um pico do íon molecular ($m/z = 316$) e os picos em $m/z = 301$ e 257 referentes à perda de respectivamente, CH_3 e COOMe da função éster. Os demais picos são provenientes de fragmentações e rearranjos da estrutura policíclica e estão de acordo com o observado na literatura (HUGEL *et alii*, 1964).

A análise de infravermelho da Figura 42A (Apêndice) apresentou sinais característicos de deformação axial C-H de carbono sp^2 em 3030 cm^{-1} . A deformação axial C=C endocíclico aparece como um sinal pouco intenso em 1637 cm^{-1} . O sinal intenso em 1720 cm^{-1} corresponde ao estiramento C=O do éster e a deformação axial de C-O é evidenciada pelo sinal em 1244 cm^{-1} . O sinal de intensidade média em 816 cm^{-1} é característico de deformação angular fora do plano de alquenos trissubstituídos.

O espectro de RMN ^1H do caur-15-en-18-oato de metila (**38**), Figura 43A (Apêndice), apresenta dois simpletos referentes às metilas 20 ($\delta = 1,04$) e 19 ($\delta = 1,12$). Esta substância apresenta um sinal referente a mais uma metila quando comparado ao caur-16-en-18-oato de metila (**37**) em $\delta = 1,68$ (simpleto). Este sinal é característico de metila ligada a carbono insaturado e pode justificar a dupla endocíclica neste isômero. A função éster é confirmada pelo simpleto em $\delta = 3,64$ proveniente da metoxila ligada ao carbono 21. O sinal em $\delta = 2,30$ é referente ao hidrogênio da posição 13. O simpleto em $\delta = 5,05$ refere-se ao hidrogênio 15. Os demais hidrogênios ligados aos carbonos cíclicos se apresentam na forma de multipletos na região entre $\delta = 1,80$ e $0,77$.

A análise do espectro de RMN ^{13}C do caur-15-en-18-oato de metila (**38**) da Figura 44A (Apêndice) demonstrou se tratar também de uma substância com 21 átomos de carbono. Na fase positiva do espectro foram encontrados oito sinais de metilas e grupos metínicos e na fase inversa do espectro treze grupos metilênicos e carbonos quaternários.

O espectro de RMN ^{13}C juntamente com o espectro de RMN 2D $^1\text{H}, ^{13}\text{C}$ (HMQC, Figura 46A do Apêndice) confirmou a presença de duas metilas ligadas a carbonos quaternários em $\delta = 15,5$ (C-20) e $\delta = 18,1$ (C-19) que se correlacionam com os sinais em $\delta = 1,04$ e $\delta = 1,12$, respectivamente. Também foi possível correlacionar o sinal da metila ligada ao carbono insaturado (C-17) em $\delta = 14,3$ com o sinal dos seus respectivos hidrogênios em $\delta = 1,68$. E ainda, no espectro de RMN ^{13}C foi possível atribuir os sinais

em $\delta = 135,4$ e $\delta = 142,6$ como sendo pertencentes aos carbonos trissubstituído e tetrassubstituído da dupla ligação endocíclica, respectivamente.

O grupo carboximetil (COOMe) do C-4 do éster (**38**) também se encontra em posição equatorial, o que foi possível descobrir baseado no deslocamento químico do carbono metínico C-5 ($\delta = 49,0$) e da metila C-19 ($\delta = 18,1$).

3.1.3.4. Isolamento do diterpeno isoozato de metila (**39**)

A última substância a ser eluída da coluna cromatográfica (**39**), com uma mistura de hexano:acetato de etila 8:2, foi obtida pura na forma de um óleo incolor (**Figura 16**).

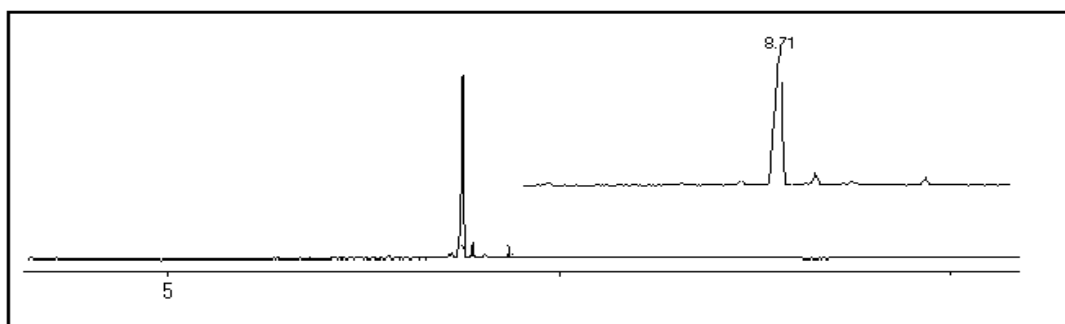
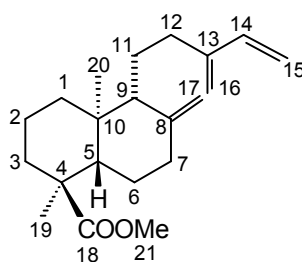


Figura 16 - Cromatograma da fração contendo o éster **39**.

Essa substância foi submetida à análise no Infravermelho e de RMN ^1H e ^{13}C , apresentando sinais coerentes com a estrutura do isoozato de metila (**39**) quando comparados com os dados da literatura (MARTIN & LANGENHEIM, 1974; GONZÁLEZ *et alii*, 1981; NOGUEIRA, 1999; GIACOMINI, 2002). O isoozato de metila é um diterpeno conhecido com esqueleto labdânico e que também já foi isolado de outras espécies de *Hymenaea* sp.

**39**

O espectro de massas mostrado na Figura 48A do Apêndice apresenta um padrão de fragmentação muito semelhante ao da substância ozato de metila (**6a**), porque estas moléculas apresentam esqueletos muito semelhantes. O espectro de massas obtido para esta substância (Figura 48A do Apêndice) apresentou um pico do íon molecular ($m/z = 316$) e picos em $m/z = 301$ e 257 referentes à perda de CH_3 e COOMe da função éster respectivamente. Os demais picos são provenientes de fragmentações e rearranjos da estrutura policíclica. O espectro de massas obtido está de acordo com o descrito na literatura (ATKINSON & CROW, 1970).

O espectro de RMN ^1H do isoozato de metila (**39**), Figura 49A (Apêndice), mostra dois simplesos referentes às metilas 20 ($\delta = 0,71$) e 19 ($\delta = 1,14$). A função éster é confirmada pelo simpleso em $\delta = 3,66$ proveniente da metoxila ligada ao C-21. O espectro permitiu também identificar sete hidrogênios ligados a carbonos insaturados. Os sinais em $\delta = 4,97$ e $5,01$ se apresentam como dois simplesos atribuídos aos hidrogênios do C-16. Centrados em $\delta = 5,05$ e em $\delta = 5,22$ observa-se dois dupletos dos hidrogênios ligados ao C-15. Os dois simplesos em $\delta = 4,57$ e $4,85$ foram atribuídos aos hidrogênios do C-17. E finalmente, o duplo duplete em $\delta = 6,36$ é referente ao hidrogênio ligado ao carbono 14. Os demais hidrogênios ligados em carbonos saturados se apresentam na forma de multipletos na região entre $\delta = 2,45$ e $1,18$.

O espectro de RMN ^{13}C (Figura 50A do Apêndice) apresentou 21 sinais correspondentes a três carbonos metílicos, dez carbonos metilênicos, três carbonos metínicos e cinco carbonos quaternários.

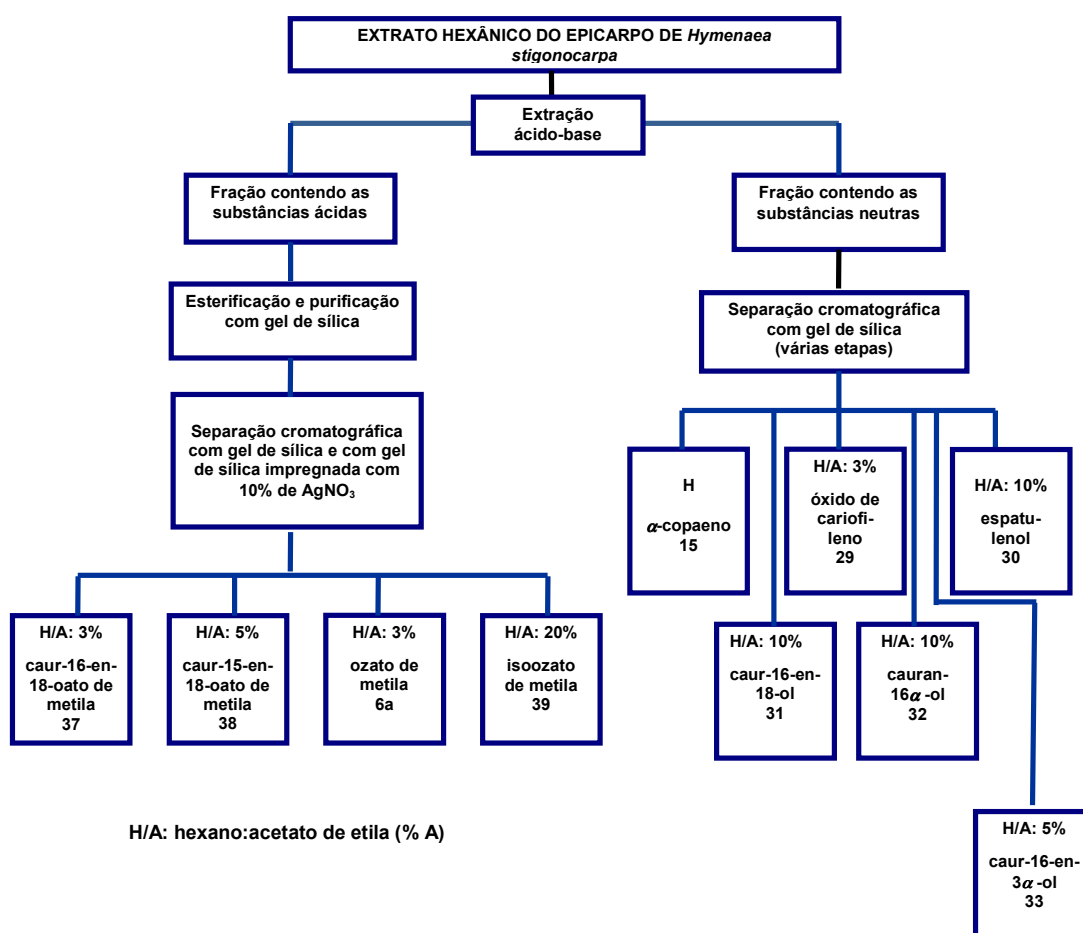
A análise conjunta dos dados de RMN ^{13}C e RMN 2D ^1H , ^{13}C (HMQC, Figura 52A do Apêndice) permitiu identificar a presença de duas olefinas dissustituídas terminais em $\delta = 107,0$ (C-17, CH_2)/ $148,0$ (C-8, C) e em $\delta = 115,7$ (C-16, CH_2)/ $147,1$ (C-13, C). O espectro apresentou também os deslocamentos químicos de uma olefina monossustituída em $\delta = 113,3$ (C-15, CH_2)/ $139,1$ (C-14, CH).

O processo de separação das substâncias do epicarpo de *Hymenaea stigonocarpa* está resumido no **Organograma 1**.

Todos os diterpenos com esqueleto caurânico das frações neutra e ácida isolados já são descritos na literatura. O cauran-16 α -ol (**32**) foi encontrado pela primeira vez no óleo essencial de *Podocarpus spicatus* em 1960 (McGIMPSEY e MURRAY, 1960) e mais tarde foi isolado do fungo *Gibberella fujikuroi* (CROSS, *et alli*, 1963). Hugel e colaboradores (1965) também isolaram o álcool **32** de *Trachylobium verrucosum* juntamente com os ácidos correspondentes aos caur-15-en-18-oato de metila (**38**) e caur-16-en-18-oato de metila (**37**). Já o diterpeno caur-16-en-18-ol (**31**) foi isolado de *Sideritis candicans* por González e colaboradores em 1973 (GONZALEZ *et alli*, 1973).

No entanto, estas substâncias não são encontradas em nenhum estudo com o gênero *Hymenaea* e os dados espectrais aqui apresentados e discutidos para tais substâncias são mais detalhados do que os encontrados na literatura.

Organograma 1 – Procedimento realizado para o estudo do extrato hexânico do epicarpo de *H. stigonocarpa*



3.2. Procedimentos sintéticos

Baseados em dados da literatura em que substâncias com esqueleto labdânico apresentando a posição C-18 (carboxila) reduzida possuem atividades biológicas diversas (IWAGAWA *et alii*, 1993; CHINOUE *et alii*, 1994; DEMETZOS *et alii*, 1994; GIACOMINI *et alii*, 2005; JAYAPRAKASAM *et alii*, 2007), optou-se por realizar a redução dos ácidos ózico e isoózico como mostrado na **Figura 17**.

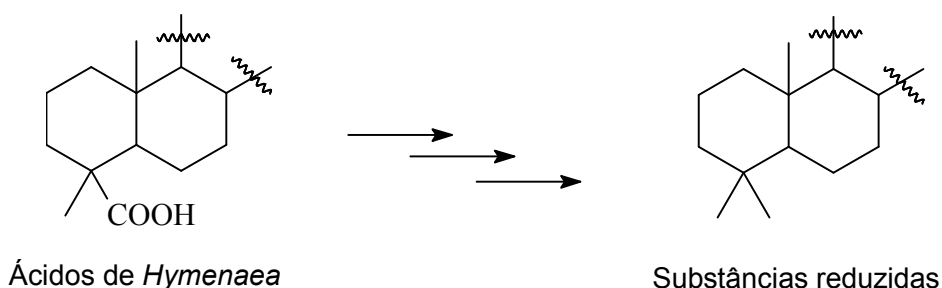
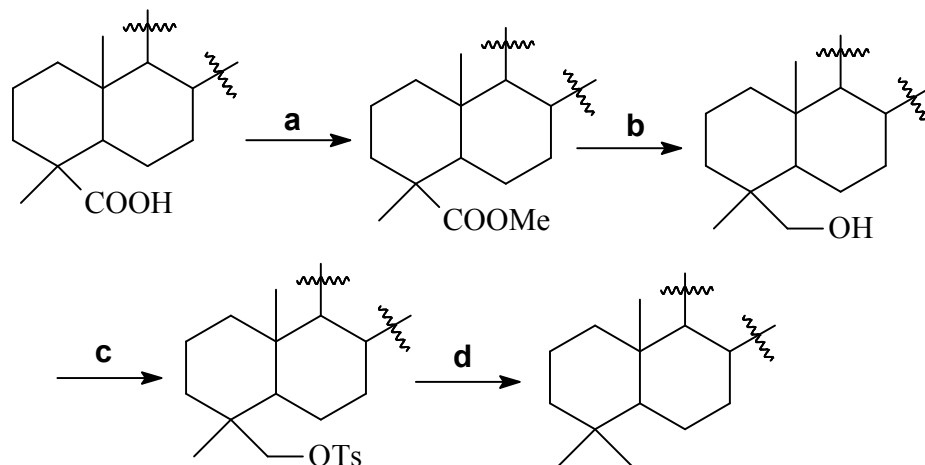


Figura 17 - Redução da posição *neo*-pentílica.

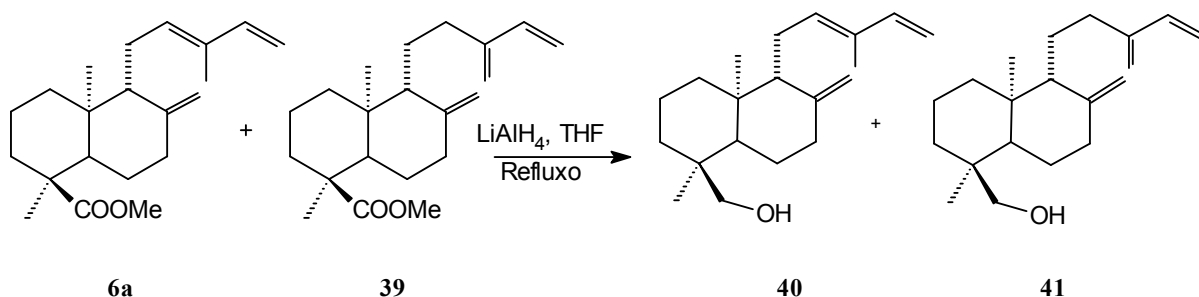
Para isso, utilizou-se a metodologia de Fujimoto/Tatsuno (FUJIMOTO & TATSUNO, 1976), empregada em reações de redução de sulfonas a hidrocarbonetos. Esta redução é descrita na literatura com uma metodologia que emprega quatro etapas (**Figura 18**): primeiramente os ácidos devem ser convertidos em ésteres, depois estes em alcoóis, a seguir os alcoóis são convertidos nos seus respectivos tosilatos para finalmente serem reduzidos. A última etapa, no entanto, normalmente apresenta problemas devido à grande quantidade de subprodutos formados (LEE *et alii*, 2001).



a) CH_2N_2 , éter, 0 °C; b) LiAlH_4 , THF, 0 °C; c) TsCl, piridina, 25 °C; d) NaI/Zn, DMF, 105 °C

Figura 18 - Etapas propostas para a redução da posição *neo*-pentílica.

3.2.1. Síntese dos álcoois **40** e **41** a partir dos ésteres **6a** e **39**



Para redução dos ácidos de *Hymenaea stigonocarpa*, realizou-se novamente as etapas de extração com hexano, extração ácido-base, esterificação com diazometano e isolamento de frações enriquecidas com os ésteres ozato (**6a**) e isoozato de metila (**39**).

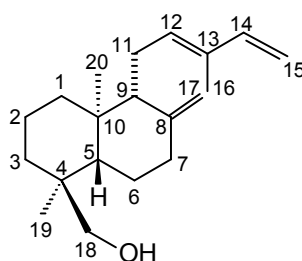
A redução dos ésteres foi realizada com hidreto de lítio e alumínio em tetrahydrofurano sob refluxo para obtenção dos álcoois **40** e **41**. O rendimento da reação foi de 92% com a obtenção de 3,31 g da mistura de álcoois. A fase orgânica foi cromatografada em coluna de sílica gel utilizando como solvente hexano:acetato de etila 9,5:0,5 para uma pré-purificação. A seguir, uma pequena porção da mistura dos álcoois (239 mg) foi

submetida à separação cromatográfica utilizando sílica incorporada com 10% de nitrato de prata (AgNO_3). A coluna foi eluída inicialmente com hexano:acetato de etila 9,5:0,5 e posteriormente com hexano:acetato de etila 9:1, obtendo-se ao final as duas substâncias puras, o que foi acompanhado por análises sucessivas em aparelho de CG/EM.

A primeira substância a ser eluída foi o álcool reduzido a partir do éster isoozato de metila (**41**) e a seguir foi isolado o álcool obtido a partir da redução do ozato de metila (**40**). A confirmação estrutural dos isômeros se deu pela análise dos espectros no Infravermelho, de massas, de RMN ^1H , ^{13}C , e 2D apresentados no Apêndice.

O álcool (**40**) foi obtido como um óleo incolor e após realizada a análise dos espectros, este apresentou sinais coerentes com a estrutura do álcool do ozato de metila, diterpeno de esqueleto labdânico já obtido Giacomini (2002).

As Figuras 54A-59A do Apêndice apresentam os espectros de massas e de RMN ^1H , ^{13}C , e 2D do álcool **40**.



40

O espectro de massas obtido para a substância (Figura 54A, Apêndice) apresentou um pico do íon molecular ($m/z = 288$) e os picos em $m/z = 273$ e 257 referentes à perda de respectivamente, CH_3 e CH_2OH . Os demais picos são provenientes de fragmentações e rearranjos da estrutura policíclica. O espectro de massas obtido está de acordo com o descrito na literatura (ATKINSON & CROW, 1970).

No espectro de RMN ^1H (Figura 55A do Apêndice) observou-se que a substituição do grupo COOMe pelo CH_2OH no produto levou os sinais dos hidrogênios H-3_{eq} e H-5 a aparecerem mais blindados em relação a seus equivalentes na substância de partida, como pode ser observado na **Tabela 7**.

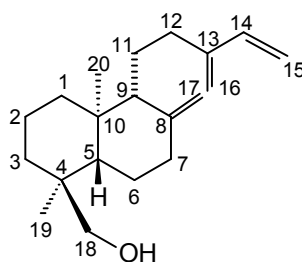
Tabela 7 – Valores de deslocamento químico (δ) para os hidrogênios H-3_{eq} e H-5 para o álcool (**40**) e para o ozato de metila (**6a**).

	Ozato de metila (6a) δ (ppm)	Álcool do ozato de metila (40) δ (ppm)
H-3 _{eq}	1,53-1,63	1,12
H-5	1,97	1,43-1,49

Observou-se ainda o desaparecimento do sinal da metoxila (C-21) em $\delta = 3,65$ e o aparecimento dos dupletos centrados em $\delta = 3,13$ e $\delta = 3,41$ referentes aos hidrogênios do carbono neopentílico (C-18) após redução.

O espectro de RMN ^{13}C (Figura 56A do Apêndice) do isômero **40** apresentou sinais para 20 carbonos, agora com quatro carbonos quaternários, nove carbonos metilênicos e três metilas. Ocorreu o desaparecimento dos sinais em $\delta = 51,8$, do carbono da metoxila (C-21), e em $\delta = 179,1$ do carbono quaternário do grupo carboximetil (C-18). No entanto, pode ser observado o sinal em $\delta = 72,1$ do carbono metilênico ligado à hidroxila. Dessa forma fica claro que ocorreu a redução do éster ozato de metila formando o álcool esperado.

O outro isômero obtido após a purificação da fase orgânica da reação de redução foi o álcool do éster isoozato (**41**). Este também se apresentou como um óleo incolor e após realizada a análise dos espectros, observou-se sinais coerentes com a estrutura do álcool do isoozato de metila, um diterpeno de esqueleto labdânico.

**41**

O espectro de massas obtido para a substância (Figura 60A, Apêndice) apresentou um pico do íon molecular ($m/z = 288$) e os picos em $m/z = 273$ e 257 referentes à perda de respectivamente, CH_3 e CH_2OH . Os demais picos são provenientes de fragmentações e rearranjos da estrutura policíclica. O espectro de massas obtido está de acordo com o descrito na literatura (ATKINSON & CROW, 1970).

Observou-se no espectro de RMN ^1H (Figura 61A do Apêndice), como era esperado, o desaparecimento do sinal da metoxila (C-21) em $\delta = 3,66$ e o aparecimento dos dupletos centrados em $\delta = 3,10$ e $\delta = 3,41$ referentes aos hidrogênios do carbono (C-18).

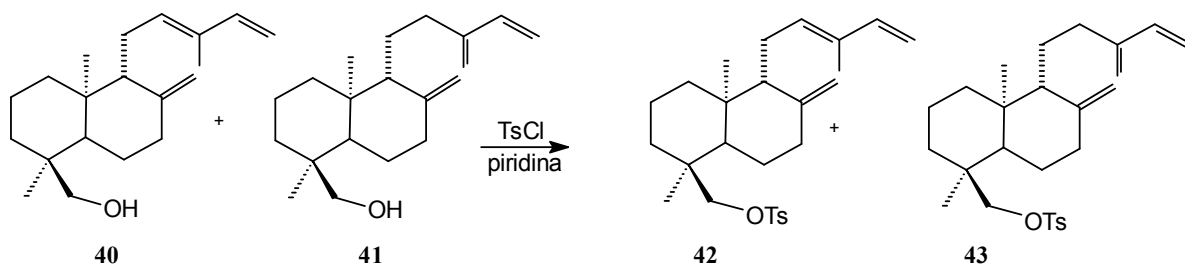
Como aconteceu com o outro isômero, no espectro de RMN ^1H do álcool **41** (Figura 61A do Apêndice) observou-se que a substituição do grupo COOMe pelo CH_2OH levou os sinais dos hidrogênios H-3_{eq} e H-5 a aparecerem mais blindados em relação a seus equivalentes na substância de partida, como pode ser conferido na **Tabela 8**.

Tabela 8 – Valores de deslocamento químico (δ) para os hidrogênios H-3_{eq} e H-5 para o álcool (**41**) e para o isoozato de metila (**39**).

	Isoozato de metila (6a) δ (ppm)	Álcool do isoozato de metila (40) δ (ppm)
H-3_{eq}	1,52-1,63	1,05
H-5	1,95	1,40-1,50

O espectro de RMN ^{13}C (Figura 62A do Apêndice) do isômero **41** apresentou sinais para 20 carbonos, agora com dois carbonos metílicos, onze carbonos metilênicos e quatro carbonos quaternários. Ocorreu o desaparecimento dos sinais em $\delta = 52,0$, do carbono da metoxila (C-21), e em $\delta = 179,4$, do carbono quaternário do grupo carboximetil (C-18). No entanto, pode ser observado o sinal em $\delta = 72,2$ do carbono metilênico ligado à hidroxila. Novamente, fica evidente a formação do álcool **41** através da redução do éster isoozato de metila.

3.2.2. Síntese dos tosilatos **42** e **43** a partir dos álcoois **40** e **41**



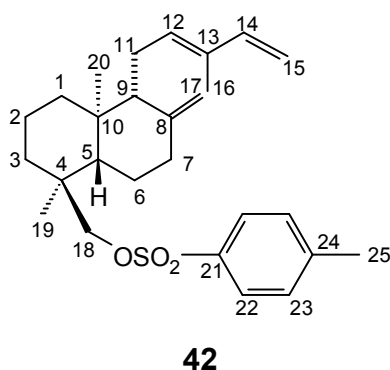
Uma mistura enriquecida com os álcoois **40** e **41** (90%) foi submetida à reação de tosilção com cloreto de tosilato em piridina. Quando a reação se mostrou finalizada, o meio reacional foi vertido em um funil de separação e adicionou-se acetato de etila. A fase orgânica foi lavada com solução de ácido clorídrico 5% até eliminação de toda piridina. Em seguida, a fase orgânica foi lavada com bicarbonato de sódio (NaHCO_3), seca com sulfato de magnésio e filtrada para um balão. Após evaporação do solvente em evaporador rotatório foram obtidos 4,91 g de fase orgânica.

Para obtenção da mistura dos tosilatos, a fase orgânica foi cromatografada em coluna de sílica gel utilizando como solvente hexano:acetato de etila 9,5:0,5. Foram reunidos 1,9 g da mistura dos tosilatos **42** e **43** puros e foi recuperado 0,14 g dos álcoois **40** e **41**.

A separação dos tosilatos foi realizada com sílica gel impregnada com nitrato de prata. O acompanhamento da separação das substâncias não pôde ser realizado por análise

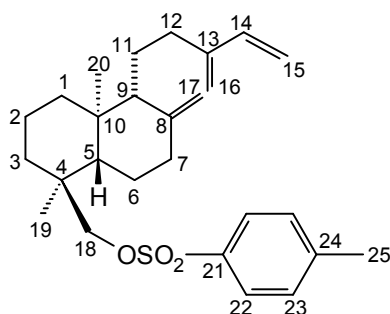
em CG/EM, pois os tosilatos são decompostos na coluna capilar sob altas temperaturas. Então, as frações foram reunidas de 5 em 5 para análise por RMN ^1H . As frações contendo os tosilatos foram novamente reunidas fornecendo nesta ordem de eluição: 97 mg do tosilato **43** e 147 mg do tosilato **42**. Ambos se apresentavam na forma de óleos incolores. A confirmação das substâncias isoladas foi realizada através das técnicas de RMN ^1H , ^{13}C e por técnicas bidimensionais (Apêndice).

O tosilato obtido a partir do álcool do ozato de metila (**42**) apresentou sinais coerentes com a estrutura proposta quando se comparou os dados obtidos com os da literatura (GIACOMINI *et alii*, 2002).



A confirmação estrutural da substância **42** foi feita pela análise do seu espectro de RMN ^1H (Figura 66A do Apêndice) onde foram observados os sinais relativos aos hidrogênios benzênicos do grupo toсила com deslocamentos químicos em $\delta = 7,76$ para os dois hidrogênios menos blindados (C-22) e $\delta = 7,34$ (C-23) para os dois hidrogênios em posição *orto* ao substituinte metila. Observou-se ainda o aparecimento de um sinal de metila (C-25) ligada a anel aromático do grupo toсила em $\delta = 2,45$.

A outra substância obtida após purificação da fase orgânica da reação de tosilacão foi o tosilato (**43**). Ele também foi obtido como um óleo incolor e após realizada a análise dos espectros, apresentou sinais coerentes com a estrutura proposta.

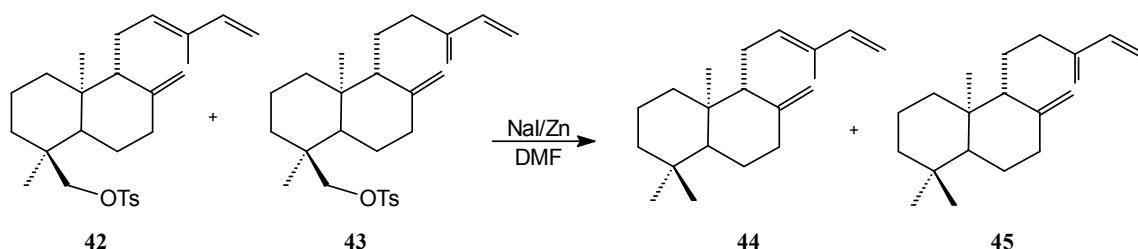
**43**

A confirmação estrutural da substância **43** foi realizada, inicialmente, pela análise do seu espectro de RMN ^1H (Figura 68A do Apêndice) onde foram observados os sinais relativos aos hidrogênios do grupo tosila em $\delta = 7,79$ para os dois hidrogênios menos blindados (C-22) e $\delta = 7,35$ (C-23) para os dois hidrogênios mais blindados. Observou-se ainda o aparecimento de um simpleto de uma metila em $\delta = 2,45$ ligada a anel aromático do grupo tosila (C-25).

O espectro de RMN ^{13}C (Figura 62A do Apêndice) do isômero **43** apresentou sinais para 24 carbonos, sendo 4 aromáticos devido à simetria do anel benzênico. Os deslocamentos químicos em $\delta = 133,0$ e $\delta = 144,8$ referem-se aos carbonos quaternários do anel aromático (C-24 e C-21) e os deslocamentos químicos em $\delta = 128,0$ e $\delta = 129,9$ referem-se aos sinais dos carbonos trissubstituídos (C-22 e C-23), o que é comprovado pelas correlações observadas no espectro de RMN 2D ^1H , ^{13}C (HMQC, Figura 71A do Apêndice).

No espectro de RMN ^{13}C observa-se ainda o deslocamento químico em $\delta = 22,0$, que o espectro de RMN ^{13}C do álcool **41** não apresenta, por se tratar da metila ligada ao anel aromático do grupo tosila (C-25). A comprovação foi feita pela correlação existente no espectro de RMN 2D ^1H , ^{13}C (HMQC) com o simpleto em $\delta = 2,45$ referente à mesma metila.

3.2.3. Síntese dos trienos **44** e **45** a partir dos tosilatos **42** e **43**



A redução de Tatsuno/Fujimoto é empregada em reações de redução de sulfonas a hidrocarbonetos. Por isso, os tosilatos **42** e **43** obtidos do processo anterior foram submetidos à reação com iodeto de sódio e zinco em pó em dimetilformamida. Ao final do processo, parte dos tosilatos que não reagiram foram recuperados e 480 mg da mistura dos trienos (**44** e **45**) e subprodutos formados foram obtidos.

A mistura dos trienos e subprodutos foi analisada por CG/EM e observou-se que esta era composta por 12 substâncias majoritárias representadas no cromatograma a seguir (**Figura 19**).

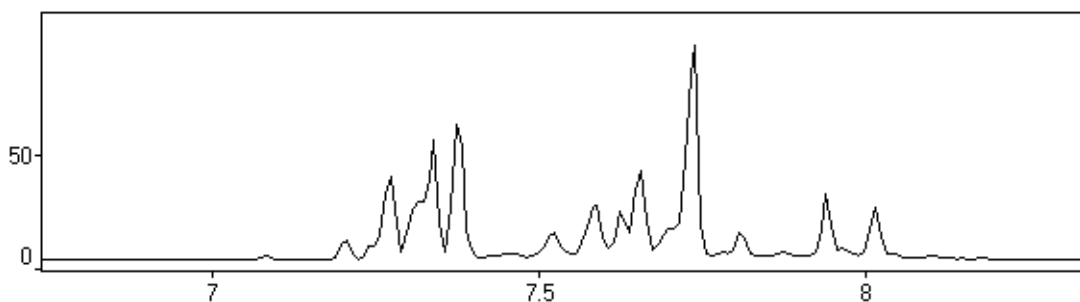


Figura 19 - Cromatograma da mistura de isômeros obtida como produtos e subprodutos na reação de redução de Tatsuno/Fujimoto.

A reação de redução de Fujimoto/Tatsuno passa por um intermediário iodetado (**46**), conforme demonstrado na **Figura 20**.

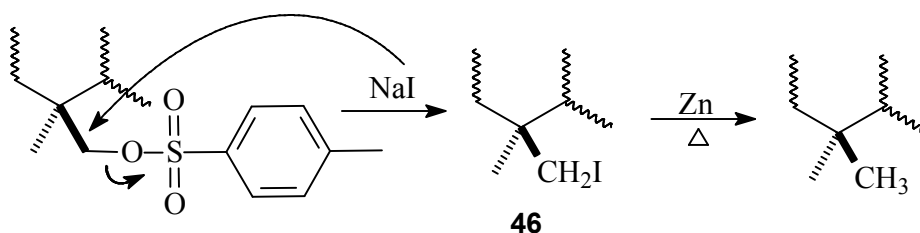


Figura 20 - Reação de redução de Tatsuno/Fujimoto.

A reação do intermediário iodetado com o zinco leva ao hidrocarboneto desejado. Em muitos casos, a reação ocorre com bom rendimento e sem formação de subprodutos em solventes como éter, DMF ou glima (FUJIMOTO & TATSUNO, 1976). Em outros, no entanto, o produto formado não é o esperado (GERESH *et alii*, 1998; BURNELL *et alii*, 1993). Quando esta reação é usada para redução na posição *neo*-pentílica em alguns diterpenos de esqueleto *trans*-decalínico, observa-se baixo rendimento para a obtenção do produto principal, a formação de subprodutos com duas unidades de massa a menos que o produto esperado (GIACOMINI, 2002) e o aparecimento de sinais na região de hidrogênios olefínicos nos espectros de H¹ RMN. A relação produto/subproduto e o número de subprodutos formados variam com o substrato.

3.2.4. Tentativa de purificação dos trienos 44 e 45

A mistura foi então submetida várias vezes à separação cromatográfica utilizando sílica incorporada com nitrato de prata (AgNO₃) em coluna e em camada preparativa para separação dos isômeros 44 e 45. No entanto, não foi possível purificar os isômeros principais e nenhum deles foi obtido completamente puro.

Dessa forma, as substâncias isoladas do extrato hexânico do epicarpo de *Hymenaea stigonocarpa* (6a,15, 29, 30-33, 37-39) e derivatizadas (40-43) foram então, numa etapa posterior submetidas aos ensaios para avaliação de potenciais atividades biológicas (Capítulo 2).

3.3. Recuperação da sílica impregnada com nitrato de prata

A cromatografia já vem sendo usada para separação de misturas desde meados do século XIX (BRAITHWAIT & SMITH, 1999). Desde então, essa técnica de separação de misturas vem sofrendo modificações de modo a torná-la mais eficaz ou mais adequada para algumas situações.

Uma importante evolução da cromatografia foi a impregnação da fase estacionária com íons de Ag (I) para separação de misturas contendo compostos orgânicos insaturados. Os complexos formados entre o cátion de prata e as olefinas começaram a ser estudados a partir de trabalhos publicados na década de 1930 (EBERZ *et alii*, 1937; WINSTEIN & LUCAS, 1938). O seu uso em cromatografia teve início alguns anos mais tarde, tendo sido intensamente usada na década de 1960. Nas décadas seguintes, entretanto, sua utilização teve um declínio (WILLIAMS & MANDER, 2001). Apesar disso, até hoje a técnica ainda é empregada e tem sido utilizada para a separação de triterpenos (LI *et alii*, 1995), esteróides (JARUSIEWICZ & SHERMA, 2005), triglicerídeos (DAMYANOVA, 1999), lipídeos (MOMCHILOVA & DAMYANOVA, 2003), e na resolução de misturas de terpenos com estruturas muito semelhantes (NOGUEIRA *et alii*, 2002).

A cromatografia que utiliza sílica gel impregnada com íons Ag (I) tem se mostrado bastante útil na separação de compostos orgânicos insaturados (LI *et alii*, 1995). Entretanto, a utilização dessa técnica em grande escala nos laboratórios gera alguns problemas. A quantidade de resíduo de sílica contaminada com compostos orgânicos e ainda, no caso da sílica impregnada com prata, o resíduo de prata, pode atingir grandes proporções. Tal fato dificulta o descarte e torna o processo bastante dispendioso, já que esta apresenta um alto custo.

Com a intenção de reutilizar a sílica e recuperar a prata, foi desenvolvido um método simples e prático (ANDREÃO *et alii*, 2010) . A prata presente nos resíduos gerados por este tipo de cromatografia encontra-se reduzida a Ag^0 , insolúvel em água. Para que

seja realizada a separação da sílica é necessário a sua conversão em Ag (I) na forma de um sal solúvel (AgNO_3). Em seguida, a sílica, livre da prata residual, é submetida ao tratamento convencional já descrito na literatura (TEIXEIRA *et alii*, 2003) com H_2SO_4 e H_2O_2 para degradação da matéria orgânica. A prata, então, é recuperada através da precipitação de cloreto de prata (AgCl).

O tratamento foi realizado em três etapas. Na primeira, a sílica gel impregnada com prata foi tratada com 3,0 equivalentes de HNO_3 e H_2O_2 suficiente para cobrir o material, com a finalidade de converter toda a prata em nitrato de prata (AgNO_3). A seguir o excesso de matéria orgânica residual foi retirado com metanol. E então, foi realizado o tratamento com H_2SO_4 e H_2O_2 para degradação de resíduos de material orgânico.

Para aferir a qualidade da fase estacionária recuperada foram realizadas análises quantitativas e qualitativas entre a sílica gel tratada pelo procedimento descrito acima, sílica gel nova e a sílica gel tratada segundo a literatura (TEIXEIRA *et alii*, 2003).

3.3.1. Avaliação das características físico-químicas da sílica gel recuperada

Apesar de o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) ser um bom oxidante ($E_{red}^0 = 1,77 \text{ eV}$), possuindo potencial de oxidação suficiente para oxidar a prata ($E_{red}^0 = 0,80 \text{ eV}$), e tenha sido empregado anteriormente na recuperação de sílica gel, seu uso isolado ou com ácido sulfúrico mostrou-se insuficiente para a remoção da prata (RIEHL & PINTO, 1988; TEIXEIRA *et alii*, 2003). Tanto o óxido de prata quanto o sulfato de prata são insolúveis e o emprego destas técnicas não é adequado para a completa remoção do metal pesado. Entretanto, se o ácido empregado for o HNO_3 , este problema é contornado, pois o sal solúvel nitrato de prata (AgNO_3) é formado.

O íon Ag(I) liberado nas reações de óxido-redução foi recuperado pela precipitação com cloreto de sódio, formando o sal insolúvel cloreto de prata ($K_{PS} = 1,8 \times 10^{-10}$). A taxa de recuperação foi 93,8% em média.

Foram avaliados resíduos de prata nas amostras de sílica gel recuperada **R** (a impregnada com íons Ag(I), posteriormente recuperada com HNO₃/H₂O₂ e depois com H₂SO₄/H₂O₂), de sílica gel da literatura **L** (a tratada com H₂SO₄/H₂O₂) e de sílica gel nova (**N**) pela técnica de fluorescência de raios-X. Comparados os resultados, não se observou a presença do metal pesado em nenhuma amostra de sílica gel, como pode ser observado na **Tabela 9**.

Tabela 9 - Composição das amostras de sílica empregando a fluorescência de raios-X.

Amostra de Sílica	% Ag	% Si	% S	% Ca	% Fe	% K
Nova	0,000	92,407	5,496	0,550	0,615	0,932
Recuperada	0,000	93,962	6,038	0,000	0,000	0,000
Literatura	0,000	93,983	6,017	0,000	0,000	0,000

O tratamento empregado para a recuperação das amostras de sílica recuperada **R** e da literatura **L** promoveu a redução da quantidade de impurezas solúveis em relação à sílica gel nova (**N**), embora tenha aumentado em 10% o teor de enxofre original.

A caracterização textural da sílica gel recuperada foi verificada para comparar mudanças após tratamento com altas temperaturas. Avaliaram-se as isotermas de adsorção/dessorção de nitrogênio para uma amostra de sílica gel 60 (Merck®) com granulometria entre 70 e 230 mesh nova (**N**), uma amostra desta mesma sílica impregnada com prata e posteriormente recuperada (**R**) e uma amostra da sílica gel usada e recuperada segundo a literatura (**L**). Os dados estão descritos na **Tabela 10**.

Tabela 10 - Caracterização textural das amostras de sílica antes e após tratamentos.

Amostra de Sílica	Área BET (m ² · g ⁻¹)	Volume de poros (cm ³ · g ⁻¹)	Diâmetro médio de poros (Å)
Nova	372	0,67	62
Recuperada	346	0,61	62
Literatura	337	0,60	62

As sílicas tratadas apresentaram um decréscimo de área específica e de volume de poros de aproximadamente 10% em relação ao material de origem, como mostram os dados da **Tabela 10**. O resultado foi praticamente o mesmo para todos os tratamentos testados, dentro da margem de erro da técnica ($\pm 2\%$). O valor do diâmetro médio de poros não se alterou com o tratamento em nenhum dos casos.

Analisando o gráfico da derivada da perda de massa em função da temperatura, **Figura 21**, observa-se que todos os processos de perda massa acontecem nas mesmas temperaturas. Todas as amostras têm exatamente os mesmos processos de perda de massa, variando apenas a sua intensidade. Portanto, é possível excluir a presença de carbono nas amostras, uma vez que elas foram aquecidas até 800 °C em atmosfera oxidante. A maior diferença de perda de massa apresentada entre os termogramas foi na faixa de 50 a 170 °C, onde a sílica gel nova (**N**) proporcionou as maiores taxas de perda em função de seu maior grau de hidratação. As curvas dos termogramas das amostras de sílica gel recuperada (**R**) e da literatura (**L**) mostraram-se idênticas entre 170 e 800 °C. Dentro desta faixa as maiores diferenças, quando estas duas são comparadas com a sílica **N**, ficaram em torno de 0,01%, o que comprova a eficiência dos processos de recuperação empregados.

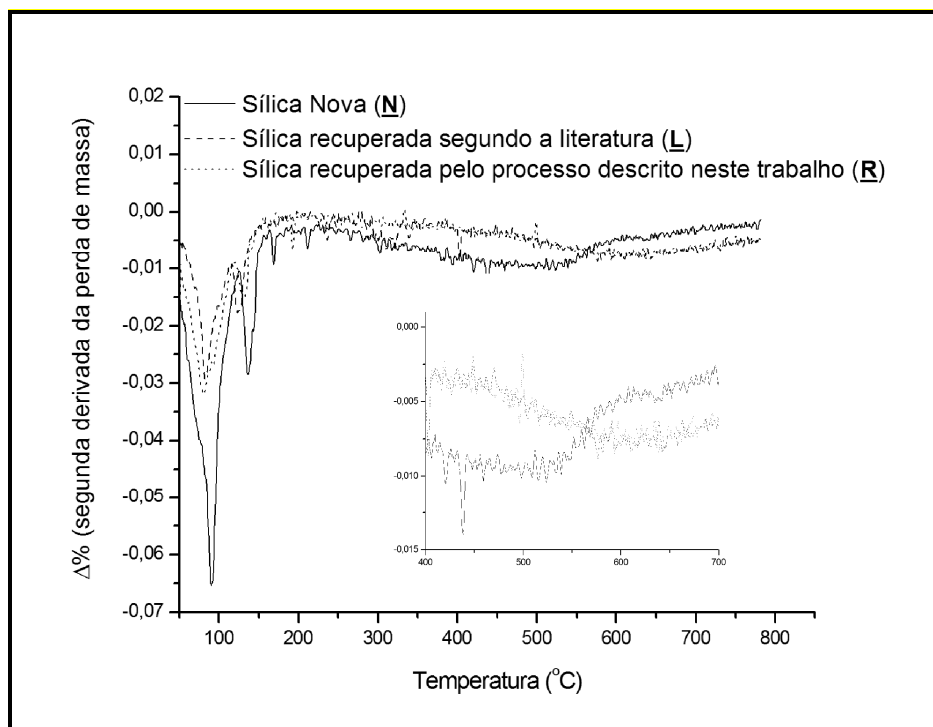


Figura 21 - Gráfico da derivada da perda de massa em função da temperatura obtido na análise termogravimétrica em atmosfera oxidante das amostras de sílica antes e após tratamentos.

A análise de CLAE em fase reversa (octadecilsilano) com detector de arranjo de diodos de um extrato metanólico de todas as três amostras (sílicas **N**, **R** e **L**) forneceu cromatogramas idênticos e absolutamente livres de contaminação.

4. CONCLUSÕES

Realizou-se o estudo fitoquímico do epicarpo de *Hymenaea stigonocarpa* var. *stigonocarpa* ainda não descrito na literatura. Da fração neutra do extrato resultou o isolamento e determinação de três sesquiterpenos: α -copaeno, óxido de cariofileno e espatulenol e três diterpenos caurânicos: caur-16-en-18-ol, cauran-16 α -ol e caur-16-en-3 α -ol. O estudo fitoquímico da fração ácida, após esterificação com diazometano, resultou no isolamento e identificação de quatro ésteres diterpênicos: ozato, isoozato, caur-16-en-18-oato e caur-15-en-18-oato de metila. Apesar de as substâncias não serem inéditas, este trabalho descreve pela primeira vez o isolamento dos diterpenos caurânicos a partir do gênero *Hymenaea* e a determinação estrutural mais detalhada destas substâncias.

A partir dos (-)-ácidos ózico e isoózico isolados do extrato de *H. stigonocarpa* foram obtidos pela reação de redução os alcoóis correspondentes e deles os tosيلات, pela reação com cloreto de tosila. Estas substâncias foram submetidas a ensaios biológicos para avaliação da potencial atividade biológica.

Com a finalidade de minimizar o resíduo de sílica contaminado com metal pesado gerado durante a purificação das substâncias isoladas do epicarpo de *H. stigonocarpa*, foi elaborado um tratamento da fase estacionária primeiramente com H₂O₂/HNO₃ e, posteriormente, com H₂O₂/H₂SO₄, permitindo a recuperação eficiente tanto da sílica quanto da prata. Análises quantitativas e qualitativas de composição e eficiência não mostraram diferenças significativas entre a sílica gel nova, a impregnada com prata e posteriormente recuperada pela técnica aqui descrita e a tratada segundo a literatura.

5. MATERIAL E MÉTODOS

5.1. Generalidades metodológicas

5.1.1. Ressonância magnética nuclear de hidrogênio e de carbono

Os espectros de RMN de ^1H foram obtidos em um espectrômetro JEOL Eclipse + 400 (400 MHz). Os deslocamentos químicos foram registrados em δ , tomando-se como padrão de referência interna o tetrametilsilano (TMS, $\delta = 0,00$). O solvente utilizado nas análises era clorofórmio deuterado. As constantes de acoplamento (J) foram citadas em Hertz. Em alguns casos, dados adicionais foram obtidos pelo uso da técnica COSY, permitindo verificar em mapas de contorno o acoplamento entre hidrogênios a três ligações.

Os espectros de RMN de ^{13}C foram obtidos em espectrômetros JEOL Eclipse + 400 (100 MHz) e Varian – INOVA 500 (125,7 MHz). Os deslocamentos químicos foram registrados em δ , tomando-se como padrão de referência interna o tetrametilsilano (TMS, $\delta = 0,00$). O número de hidrogênios ligados aos átomos de carbono foi determinado através dos espectros de RMN de ^{13}C , com o auxílio das técnicas de RMN de $^{13}\text{C}/\text{DEPT}$ (90 e 135, onde $\text{CH}_3/\text{CH} =$ sinal positivo, $\text{CH}_2 =$ sinal negativo e $\text{C}_{\text{quaternário}} =$ ausente) e também com o auxílio das técnicas de RMN de $^{13}\text{C}/\text{APT}$.

Além disso, espectros bidimensionais de correlações ^1H , ^{13}C a uma ligação (HMQC) e múltiplas ligações (HMBC) foram utilizados nas assinalações dos dados espectroscópicos. Os gráficos foram feitos no programa Origin.

5.1.2. Espectroscopia no infravermelho – FTIR

Os espectros de absorção na região do infravermelho foram obtidos entre pastilhas de NaCl para líquidos (filme) ou em pastilha de KBr (sólidos), empregando-se um espectrofotômetro SHIMADZU, modelo FTIR 8300. Os gráficos foram feitos no programa Origin.

5.1.3. Cromatografia gasosa acoplada ao espectrômetro de massas – CG/EM

As análises de CG/EM foram realizadas empregando-se um cromatógrafo gasoso acoplado a um espectrômetro de massas SHIMADZU modelo QP5050A. Para as frações de neutros foi utilizado um método com as seguintes especificações:

- Coluna: DB-1, 30 metros, DI 0,25 mm.
- Gás de arraste: Hélio.
- Temperatura do injetor: 280 °C.
- Programa de temperatura para a coluna:
 - Temperatura inicial: 50 °C.
 - Temperatura final: 280 °C.
 - Gradiente de temperatura: 5 °C/min.
- Temperatura do detector: 280 °C.
- Programa de pressão:
 - Pressão inicial: 65 kPa.
 - Pressão final: 203 kPa.
 - Gradiente de Pressão: 3 kPa/min.
 - Volumes injetados: 1 µL de solução
 - Ionização por impacto eletrônico (IE) 70 eV.

Obtenção do cromatograma de íons totais (TIC)

Para as frações de ácidos foi utilizado um método com as seguintes especificações:

- Coluna: DB-5, 30 metros, DI 0,25 mm.
- Gás de arraste: Hélio.
- Temperatura do injetor: 280 °C.
- Programa de temperatura para a coluna:
 - Temperatura inicial: 100 °C.
 - Temperatura final: 280 °C.
 - Gradiente de temperatura: 20 °C/min.
- Temperatura do detector: 280 °C.
- Programa de pressão:
 - Pressão inicial: 111 kPa.
 - Pressão final: 194 kPa.
 - Gradiente de Pressão: 9,5 kPa/min.
 - Volumes injetados: 1 µL de solução
 - Ionização por impacto eletrônico (IE) 70 eV.

Obtenção do cromatograma de íons totais (TIC)

5.1.4. Ponto de fusão

Os pontos de fusão foram determinados em um aparelho GEHAKA. A determinação foi realizada a uma taxa de aquecimento de 2 °C/min. e os valores obtidos não foram corrigidos.

5.1.5. Métodos cromatográficos

As cromatografias em camada delgada (CCD), para monitoramento das reações e purificação dos produtos por cromatografia em coluna, foram efetuadas em cromatofolhas de alumínio MERCK com gel de sílica 60 GF₂₅₄ como fase estacionária. A visualização dos compostos em CCD foi feita por irradiação com lâmpada de ultravioleta no comprimento de onda de 254 nm e por pulverização com uma mistura de vanilina, ácido sulfúrico, ácido acético e metanol e subsequente aquecimento em uma chapa elétrica.

As cromatografias em coluna (CC) foram realizadas utilizando-se sílica gel 60 da Merck, com granulometria 70-230 mesh e solventes destilados. O diâmetro interno e a altura das colunas cromatográficas variaram de acordo com a quantidade de substrato a ser separado. As placas cromatográficas em camada preparativa (CCP) foram preparadas com sílica gel GF254 sobre placas de vidro 20 x 20 cm e com 1,0 mm de espessura.

As cromatografias em coluna e em camada delgadas adsorvidas com nitrato de prata foram preparadas de acordo com Norin & Westfelt (1963).

Todos os solventes utilizados nas reações e separações foram de grau técnico, tendo sido previamente tratados de acordo como é indicado por Perrin & Armarego (1988). Os solventes foram evaporados em um evaporador rotatório FISATOM, operando à pressão reduzida.

5.1.6. Instrumentos utilizados para aferir a qualidade da sílica gel recuperada

A área específica, o volume de poros e a distribuição de diâmetros dos poros foram determinados por fisissorção de nitrogênio, empregando-se um equipamento Autosorb 1C da Quantachrome®. As amostras foram previamente aquecidas sob vácuo, a 373 K, durante 3 h. As isotermas de adsorção/dessorção foram obtidas a 77 K. As áreas específicas foram determinadas pelo modelo BET (pressões relativas entre 0,05 e 0,30) e a distribuição de diâmetro dos poros foi calculada pela Equação de Barrett-Joyner-Halenda (BJH) no ramo da dessorção, ambas através do programa Autosorb for Windows®, versão 1.24.

As análises termogravimétricas foram realizadas em uma balança termogravimétrica SDT 2960 DSC/TGA simultâneos da TA Instruments®, sob atmosfera oxidante. Os dados foram tratados e as curvas foram construídas com o programa Origin 6.0 da Microcal®.

As análises de CLAE foram realizadas em um cromatógrafo Shimadzu SPD-M10AVP com detector espectrofotométrico de arranjo de diodos e equipado com uma coluna ODS-Lichrospher com 150 mm x 4,6 mm da Regis Technologies®. De forma geral, uma alíquota de 20 μ L dos resíduos de tratamento foi injetada em modo isocrático com 100% de metanol.

As análises de fluorescência de raios-X foram realizadas em um espectrômetro de raios-X de energia dispersiva da Shimadzu modelo EDX 700 equipado com um tubo de ródio e um detector de silício (Ítíio) semiconductor.

5.2. Procedimentos

5.2.1. Estudo fitoquímico do extrato hexânico

5.2.1.1. Coleta do material e identificação da espécie

A coleta do material botânico para confecção da exsicata e identificação da espécie e os frutos maduros foi realizada em setembro de 2006 no Parque Nacional da Serra do Cipó em Jaboticatubas – Minas Gerais (MG). Esta reserva é administrada pelo Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis – IBAMA e é situada a 90 km a nordeste de Belo Horizonte na região sul da Cordilheira do Espinhaço, entre os paralelos 19 e 20 °S e 43 e 44 °W a 810 m de altitude.

A exsicata encontra-se depositada no Herbário do Jardim Botânico no Rio de Janeiro sob o número Mansano, V. F. RB 431908. A identificação foi realizada pelo Dr. Vidal de Freitas Mansano pesquisador do Jardim Botânico do Rio de Janeiro.

5.2.1.2. Preparação do extrato hexânico e extração ácido-base

Os epicarpós foram separados da polpa, lavados e secos à sombra. Posteriormente, foram moídos em moinho de martelo e deixados em hexano para extração por 10 dias. Filtrou-se e evaporou-se em evaporador rotatório. Um total de 1000 g de epicarpo moído forneceu 36,3 g de extrato, aproximadamente 3,6%.

O extrato hexânico de *H. stigonocarpa* (36,3 g) foi diluído em 250 mL de éter etílico e extraído quatro vezes com 400 mL de solução de KOH 0,6 mol.L⁻¹. As fases orgânicas (com os compostos neutros) e aquosa (com os compostos ácidos) foram separadas. A fase neutra foi concentrada e forneceu um total de 9,0 g de compostos neutros correspondendo a 24,8% do extrato hexânico. Colocou-se a fase aquosa em banho de

gelo e em seguida, adicionou-se 300 mL de acetato de etila e HCl 1 mol.L⁻¹ lentamente até a neutralização (70 mL). Em um funil de separação, separaram-se novamente as fases orgânica e aquosa. A fase orgânica foi seca com MgSO₄ e evaporada, fornecendo 24,9 g de uma fração contendo os compostos ácidos, 68,6% do extrato bruto.

5.2.1.3. Separação das substâncias presentes na fração neutra

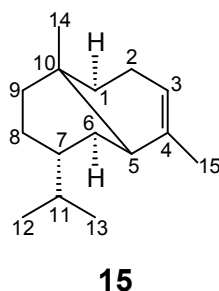
Uma parte da fração neutra obtida após extração ácido-base do extrato bruto (6,5 g) foi dissolvida em diclorometano e incorporada à sílica gel. Uma coluna de tamanho adequado foi preenchida com sílica gel (26,0 g) em hexano e uma sequência de eluentes em ordem crescente de polaridade (hexano e acetato de etila) foi utilizada para a separação cromatográfica. As frações coletadas, foram reunidas de acordo com seus valores de R_fs e estão representadas na tabela a seguir juntamente com suas respectivas massas.

Tabela 11 – Frações coletadas da fração de neutros do extrato hexânico do epicarpo de *Hymenaea stigonocarpa*, sistema de solventes e massas obtidas.

Frações	Sistema de solventes	Massa (mg)
1 – 5	Hexano	Descartado
6 – 9	Hexano	41,0
10 – 43	Hexano	1173,5
44 – 96	Hexano: acetato de etila (9,7:0,3)	52,8
97 – 111	Hexano: acetato de etila (9,5:0,5)	898,0
112 – 134	Hexano: acetato de etila (9,5:0,5)	449,0
135 – 176	Hexano: acetato de etila (9,5:0,5)	1034,0
177 – 193	Hexano: acetato de etila (9:1)	577,2
194 – 230	Hexano: acetato de etila (9:1)	453,8
231 - 258	Hexano: acetato de etila (50:50)	900,6
259 - 300	Acetato de etila	434,8

Da fração (6-9) após evaporação do solvente foi obtida uma substância pura na forma de um óleo incolor (41,0 mg) que foi caracterizada como sendo o sesquiterpeno α -copaeno (**15**).

Dados referentes ao α -copaeno (15**): Figuras 1A e 2A**



CCD: $R_f = 0,87$ (hexano; sílica gel).

RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ : 0,78 (s, 3H, CH_3 -14), 0,83 (d, 3H, $J = 4,7$, CH_3 -12), 0,85 (d, 3H, $J = 4,7$ Hz, CH_3 -13), 1,45-1,77 (m, 8H, H-1, H-6, H-7, 2H-8, 2H-9 e H-11), 1,66 (s, 3H, CH_3 -15), 2,08 (sl, 3H, $J = 4,7$ Hz, H-5), 2,18 (tl, 2H, $J = 1,8$ Hz, H-2), 5,20 (tl, 1H, $J = 1,8$ Hz, H-3).

RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) δ : 19,4 (C-14, CH_3), 19,7 (C-13, CH_3), 19,9 (C-12, CH_3), 21,8 (C-8, CH_2), 23,2 (C-15, CH_3), 30,1 (C-9, CH_2), 32,1 (C-11, CH), 36,2 (C-2, CH_2), 36,8 (C-7, CH), 39,4 (C-10, C), 44,2 (C-5, CH), 44,7 (C-6, CH), 54,3 (C-1, CH), 116,2 (C-3, CH), 144,0 (C-4, C).

EM (70 eV) m/z (%): 204 (24), 161 (99), 119 (100), 105 (96), 91 (51), 41 (37).

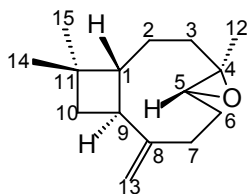
A partir da fração (97-111) um novo fracionamento cromatográfico foi realizado e novas frações foram obtidas conforme a tabela a seguir.

Tabela 12 – Frações coletadas e reunidas após separação cromatográfica da fração (97-111), sistema de solventes e massas obtidas.

Frações	Sistema de solventes	Massa (mg)
1 – 19	Hexano	273,2
20 – 51	Hexano	14,7
52 – 66	Hexano: acetato de etila (9,7:0,3)	16,7
67 – 72	Hexano: acetato de etila (9,7:0,3)	57,5
73 – 80	Hexano: acetato de etila (9,5:0,5)	11,6
81 – 91	Hexano: acetato de etila (9,5:0,5)	117,7
92 – 97	Hexano: acetato de etila (9,5:0,5)	10,5
98 – 103	Hexano: acetato de etila (9:1)	19,1
104 – 112	Hexano: acetato de etila (9:1)	32,8
113 – 128	Hexano: acetato de etila (9:1)	29,3
129 – 138	Hexano: acetato de etila (8:2)	13,7
139 – 147	Hexano: acetato de etila (8:2)	94,4

A partir da fração (67-72) foram obtidos 57,5 mg da substância identificada como o sesquiterpeno óxido de cariofileno (**29**) na forma de um óleo incolor.

Dados referentes ao óxido de cariofileno (29): Figuras 3A e 4A



29

CCD: $R_f = 0,65$ (hexano: acetato de etila 9:1; sílica gel).

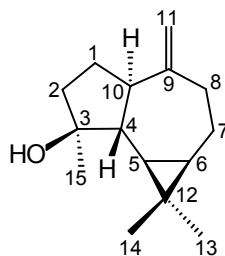
IV (filme líquido, cm^{-1}) $\nu_{\text{máx}}$: 3068, 2928, 2859, 1726, 1678, 1631, 1455, 1384, 1368, 1279, 1165, 1121, 963, 890, 863.

RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ : 0,94-1,02 (m, 1H, H-3), 1,00 (s, 3H, H-15), 1,02 (s, 3H, H-14), 1,20 (s, 3H, H-12), 1,28-1,38 (m, 1H, H-6), 1,57-1,72 (m, 3H, H-2 e H-10), 1,76 (tl, 1H, $J = 10,0$ Hz, H-1), 2,08-2,18 (m, 2H, H-3 e H-7), 2,23-2,30 (m, 1H, H-6), 2,33-2,38 (m, 1H, H-7), 2,63 (dd, 1H, $J = 18,3$ Hz; 9,7 Hz, H-9), 2,89 (dd, 1H, $J = 10,6$ Hz; 4,3 Hz, H-5), 4,86 (s, 1H, H-13), 4,98 (s, 1H, H-13).

EM (70 eV) m/z (%): 91 (51), 79 (68), 69 (41), 55 (35), 41 (100).

A fração (98-103) se apresentava como um óleo incolor puro que foi identificado como o sesquiterpeno espatulenol (**30**).

Dados referentes ao espatulenol (30): Figuras 5A-7A



30

CCD: $R_f = 0,61$ (hexano: acetato de etila 9:1; sílica gel).

IV (filme líquido, cm^{-1}) $\nu_{\text{máx}}$: 3380, 3081, 2951, 2927, 2865, 1636, 1455, 1375, 1293, 1248, 1096, 915, 889, 760.

RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ : 0,47 (dd, 1H, $J = 9,6$ Hz e 11,8 Hz, H-5), 0,72 (ddd, 2H, $J = 6,4$ Hz; 9,6 Hz; 10,7 Hz, H-6), 1,00-1,03 (m, 1H, H-7), 1,04 (s, 3H, H-13), 1,06 (s, 3H, H-14), 1,26-1,33 (m, 1H, H-4), 1,29 (s, 3H, H-15), 1,52-1,58 (m, 1H, H-2), 1,61-1,68 (m, 1H, H-1), 1,67-1,73 (m, 1H, H-2), 1,80-1,90 (m, 1H, H-1), 1,90-2,02 (m, 1H, H-7), 2,10-2,23 (m, 2H, H-8, H-10), 2,42 (dd, 1H, $J = 6,1$ Hz e 13,3 Hz, H-8), 4,66 (sl, 1H, H-11), 4,69 (sl, 1H, H-11).

EM (70 eV) m/z (%): 205 (22), 187 (9), 159 (20), 147 (15), 131 (15), 119 (30), 105 (33), 91 (48), 79 (37), 67 (26), 55 (26), 43 (100).

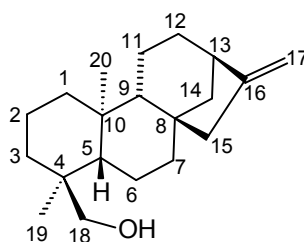
Duas frações obtidas da separação cromatográfica anterior, (135-176) e (177-193), constituídas principalmente por uma mistura de dois diterpenos com esqueleto caurano foram reunidas e novamente cromatografadas para purificação das substâncias. Na tabela a seguir são apresentadas as frações obtidas após separação cromatográfica.

Tabela 13 – Frações coletadas e reunidas após separação cromatográfica das frações (135-176) e (177-193), sistema de solventes e massas obtidas.

Frações	Sistema de solventes	Massa (mg)
1 – 38	Hexano: acetato de etila (9,7:0,3)	43,0
39 – 46	Hexano: acetato de etila (9,5:0,5)	26,2
47 – 64	Hexano: acetato de etila (9:1)	360,5
65 – 87	Hexano: acetato de etila (9:1)	598,5
88 – 110	Hexano: acetato de etila (9:1)	429,4
111 – 130	Hexano: acetato de etila (9:1)	37,7
131 – 150	Acetato de etila	40,0

Após injeções de alíquotas em cromatógrafo gasoso das frações obtidas, a análise confirmou para a fração (111-130), a presença de um único composto majoritário, que após uma rápida purificação em coluna nos forneceu 35 mg de um sólido branco identificado como sendo o caur-16-en-18-ol (**31**).

Dados referentes ao caur-16-en-18-ol (31): Figuras 8A-11A



31

CCD: $R_f = 0,61$ (hexano: acetato de etila 9:1; sílica gel).

PF: 103-105 °C

IV (KBr, cm^{-1}) $\nu_{\text{máx}}$: 3355, 3063, 2986, 2926, 1655, 1441, 1381, 1032, 870.

RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ : 0,75 (s, 3H, H-20), 0,76-0,83 (m, 1H, H-1), 0,98-1,04 (m, 2H, H-3 e H-5), 1,05 (s, 3H, H-19), 1,07-1,13 (m, 2H, H-9 e H-14), 1,29-1,37 (m, 1H, H-6), 1,38-1,44 (m, 2H, H-2), 1,45-1,53 (m, 3H, 2H-7 e H-12), 1,54-1,65 (m, 4H, H-6, 2H-11 e H-12), 1,66-1,71 (m, 1H, H-3), 1,79-1,87 (m, 1H, H-1), 1,96-2,01 (m, 1H, H-14), 2,02-2,07 (m, 2H, H-15), 2,63 (sl, 1H, H-13), 3,10 (d, 1H, $J= 12,0$ Hz, H-18), 3,41 (d, 1H, $J= 12,0$ Hz, H-18), 4,71 (s, 1H, H-17), 4,80 (m, 1H, H-17).

RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) δ : 17,5 (C-20, CH_3), 18,0 (C-19, CH_3), 18,1 (C-11, CH_2), 18,2 (C-2, CH_2), 19,9 (C-6, CH_2), 33,3 (C-12, CH_2), 35,3 (C-3, CH_2), 37,6 (C-10, C), 39,1 (C-4, C), 39,9 (C-14, CH_2), 40,0 (C-1, CH_2), 40,9 (C-7, CH_2), 44,0 (C-13, CH), 44,1 (C-8, C), 49,1 (C-15, CH_2), 49,9 (C-5, CH), 56,9 (C-9, CH), 72,5 (C-18, CH_2), 103,0 (C-17, CH_2), 155,9 (C-16, C).

EM (70 eV) m/z (%): 288 (M^+ , 22), 273 (25), 257 (80), 229 (30), 161 (36), 131 (33), 123 (53), 91 (83), 81 (100), 67 (47), 41 (58).

Pela análise do cromatograma da fração (65-87) observou-se que esta era composta principalmente por duas substâncias com esqueleto caurânico. Então, foi novamente realizada a separação cromatográfica na tentativa de obter as substâncias puras.

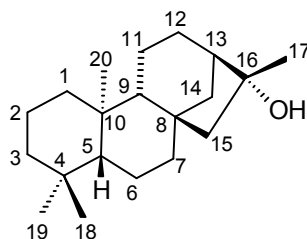
Tabela 14 – Frações coletadas e reunidas após separação cromatográfica da fração (65-87), sistema de solventes e massas obtidas.

Frações	Sistema de solventes	Massa (mg)
1 – 52	Hexano: acetato de etila (9,7:0,3)	Descartado
53 – 70	Hexano: acetato de etila (9,5:0,5)	21,0
71 – 99	Hexano: acetato de etila (9,5:0,5)	152,0
100 – 120	Hexano: acetato de etila (9,5:0,5)	226,4
121 – 141	Hexano: acetato de etila (9,5:0,5)	43,1
142 – 151	Hexano: acetato de etila (9:1)	14,0
152 – 160	Hexano: acetato de etila (9:1)	36,0
161 – 193	Hexano: acetato de etila (8:2)	75,6

No entanto, como se tratavam de isômeros com fatores de retenção (R_f) coincidentes, a separação destas substâncias por cromatografia em coluna não foi possível. Optou-se então, por utilizar outra metodologia baseando-se na pequena diferença de solubilidade em diclorometano dos dois isômeros. Então, através de recristalizações sucessivas da fração (100-120) utilizando o método de recristalização por gradiente térmico, foi possível obter os dois isômeros puros **32** (16 mg) e **33** (30 mg) como sólidos brancos.

A identificação das substâncias realizada através das técnicas no Infravermelho, de RMN ^1H , ^{13}C , COSY, HMQC e HMBC provou se tratar das substâncias cauran-16 α -ol (**32**) e o caur-16-en-3 α -ol (**33**).

Dados referentes ao cauran-16 α -ol (32): Figuras 12A-20A



32

CCD: $R_f = 0,61$ (hexano: acetato de etila 9:1; sílica gel).

PF: 210-212 °C

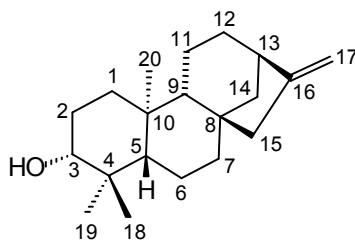
IV (KBr, cm^{-1}) $\nu_{\text{máx}}$: 3400, 2910, 1461, 1045, 875.

RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ : 0,72-0,78 (m, 2H, H-1 e H-5), 0,79 (s, 1H, H-19), 0,84 (s, 1H, H-18), 0,96-1,00 (m, 1H, H-9), 1,01 (s, 1H, H-20), 1,05 (m, 1H, H-3), 1,35 (s, 1H, H-17), 1,42-1,67 (m, 14H, 2H-2, H-3, 2H-6, 2H-7, 2H-12, 2H-11, H-14 e 2H-15), 1,75-1,84 (m, 2H, H-1 e H-13), 1,92 (d, 1H, $J = 13,5$ Hz, H-14).

RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) δ : 17,7 (C-20, CH_3), 18,0 (C-11, CH_2), 18,8 (C-2, CH_2), 20,6 (C-6, CH_2), 21,6 (C-19, CH_3), 24,7 (C-17, CH_2), 27,1 (C-12, CH_2), 33,3 (C-4, C), 33,7 (C-18, CH_3), 37,8 (C-14, CH_2), 39,5 (C-10, C), 40,4 (C-7, CH_2), 42,1 (C-1, CH_2), 42,1 (C-3, CH), 45,6 (C-8, C), 49,1 (C-13, CH), 56,3 (C-5, CH), 56,9 (C-9, CH), 58,2 (C-15, CH_2), 79,5 (C-16, C).

EM (70 eV) m/z (%): 290 (M^+ , 6), 272 (61), 257 (43), 232 (63), 217 (39), 134 (57), 123 (83), 109 (52), 94 (74), 69 (78), 55 (65), 43 (100).

Dados referentes ao caur-16-en-3 α -ol (33): Figuras 21A-27A



33

CCD: $R_f = 0,61$ (hexano: acetato de etila 9:1; sílica gel).

IV (KBr, cm^{-1}) $\nu_{\text{máx}}$: 3335, 2866, 1655, 1442, 872.

RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ : 0,75-0,81 (m, 1H, H-5), 0,76 (s, 1H, H-19), 0,84 (sl, 1H, H-12), 0,90 (td, 1H, $J = 3,6$ Hz, H-1), 0,96 (s, 1H, H-18), 1,00-1,05 (m, 1H, H-9), 1,02 (s, 1H, H-20), 1,10 (dd, 1H, $J = 6,4$ Hz e 10,7 Hz, H-14), 1,47-1,67 (m, 9H, 2H-2, 2H-6, 2H-7, 2H-11 e H-12), 1,84 (td, 1H, $J = 3,6$ Hz, H-1), 1,96 (d, 1H, $J = 10,7$ Hz, H-14), 2,04 (s, 2H, H-15), 2,64 (sl, 1H, H-13), 3,62 (dd, 1H, $J = 5,5$ Hz e 10,5 Hz, H-3), 4,73 (s, 1H, H-17), 4,80 (s, 1H, H-17),

RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) δ : 15,6 (C-19, CH_3), 17,6 (C-20, CH_3), 18,3 (C-11, CH_2), 20,0 (C-6, CH_2), 27,4 (C-2, CH_2), 28,5 (C-18, CH_3), 33,3 (C-12, CH_2), 38,7 (C-1, CH_2), 38,9 (C-4, C), 39,1 (C-10, C), 39,8 (C-14, CH_2), 41,2 (C-7, CH_2), 44,0 (C-8, C), 44,0 (C-13, CH), 49,0 (C-15, CH_2), 55,3 (C-5, CH), 55,9 (C-9, CH), 79,1 (C-3, CH), 103,1 (C-17, CH_2), 156,0 (C-16, C),

EM (70 eV) m/z (%): 288 (M^+ , 38), 273 (13), 255 (67), 227 (54), 131 (64), 119 (48), 105 (71), 91 (100), 79 (71), 55 (60), 41 (90).

5.2.1.4. Separação das substâncias da fração ácida

5.2.1.4.1. Esterificação da fração ácida com sulfato de metila - $(\text{CH}_3)_2\text{SO}_4$

Prepararam-se 450 mL de uma solução aquosa com 12,00 g de NaOH (348,84 mmol) e 25,00 g (235,76 mmol) de Na_2CO_3 . Dissolveram-se os 24,89 g dos ácidos orgânicos obtidos da extração ácido-base nesta solução. Transferiu-se para um balão de 1 L equipado com agitador magnético e condensador. Em seguida, foram adicionados lentamente 80,00 mL (842,10 mmol) de $(\text{CH}_3)_2\text{SO}_4$. A reação foi deixada sob refluxo e sob agitação por 40 h, como ainda havia material de partida, adicionou-se mais 20 mL (210,53 mmol) de $(\text{CH}_3)_2\text{SO}_4$ e após mais 20 h optou-se por fazer refluxo (50 °C) por 7 h, para finalmente encerrar a reação, mesmo havendo ainda material de partida.

Toda a mistura foi extraída três vezes com 100 mL de hexano/diclorometano 7:3, seca com sulfato de magnésio e concentrada em evaporador rotatório. A fase orgânica com os ésteres e o restante dos ácidos foi submetida à separação cromatográfica. Ao final do processo, as frações semelhantes foram reunidas (**Tabela 15**).

Tabela 15 – Frações reunidas após separações em coluna de sílica gel da mistura obtida após reação de esterificação com sulfato de metila

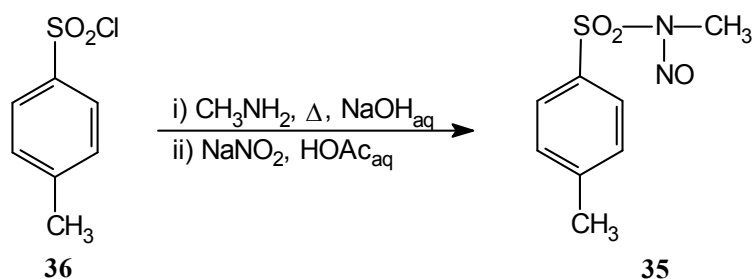
Frações	Massa (g)
Sesquiterpenos	315,3 mg
Sesquiterpenos + Ésteres	748,2 mg
Ésteres	6,2 g
Ácidos	9,8 g

A reação com sulfato de metila forneceu apenas 6,2 g de ésteres ($R_f = 0,8$ em hexano/acetato de etila 9,7:0,3; sílica gel). O procedimento realizado apresentou rendimento muito baixo, pois uma grande quantidade de ácidos não esterificados foi

recuperada. Optou-se então por utilizar outra metodologia para realizar uma esterificação mais eficiente.

5.2.1.4.2. Esterificação da fração ácida com diazometano (34)

a) Preparo do Diazald (35)



Foram pesados 10,0 g de cloreto de tosila - TsCl (**36**) divididos em 3 porções: 6,0 g, 2,8 g e 1,2 g. Adicionou-se 6 g de TsCl com agitação por mais ou menos 5 minutos em 5,4 mL de metilamina (CH₃NH₂) em um erlenmeyer de 50 mL. Aqueceu-se entre 80-90 °C para manter a metilamida sulfonila líquida. Após terminar a adição, agitou-se vigorosamente e para evitar a ebulição (com perda de metilamina), esfriou-se suavemente em água.

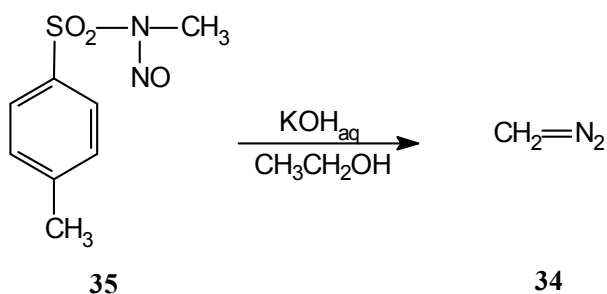
Tão logo a mistura começou a ficar ácida, 1,6 mL de solução de NaOH 50% foi adicionada cuidadosamente com agitação. Em seguida, adicionou-se imediatamente e gradualmente a porção de 2,8 g de TsCl. Quando a mistura ficou ácida, 0,8 mL de solução de NaOH (2,2 g de NaOH em 2,2 mL de água gelada) foi adicionada, seguida pela adição final de 1,2 g de TsCl. Novamente, após a acidificação da solução adicionou-se o restante da solução de NaOH (1,4 mL).

As paredes do frasco foram lavadas com 10 mL de água, a reação foi completada pelo aquecimento da mistura em banho-maria com agitação por 15 minutos. A mistura apresentou duas fases e um sólido (NaCl).

A mistura reacional quente foi então vertida para um erlenmeyer contendo 47 mL de ácido acético glacial e o frasco anterior lavado com 7,8 mL do mesmo ácido. Ela foi então, resfriada em banho de gelo a 5 °C e agitada mecanicamente. Solução de NaNO₂ (3,2 g de NaNO₂ em 7,8 mL de água) foi gotejada com a ajuda de um funil de adição durante 45 minutos. A temperatura foi mantida abaixo de 10 °C durante a adição e a agitação permaneceu por mais 15 minutos ao final do processo. O composto nitroso **35** precipitou como um cristal amarelo.

À mistura foram adicionados 31 mL de água e o precipitado foi separado por filtração e lavado com 15 mL de água. O produto foi transferido para um béquer e agitado bem com 15 mL de água fria para então, ser novamente filtrado e lavado no funil. O processo foi repetido mais uma vez para retirar o excesso de ácido acético. Depois de seco, a substância **35** - Diazald (N-metil-N-nitroso-*p*-toluenossulfonamida) foi pesada e guardada em freezer. A partir da massa de Diazald (m = 10,86 g) determinou-se o rendimento da reação, 96,6%.

b) Preparo do diazometano (34)



Montou-se um sistema adequado para a síntese do diazometano (**34**), um composto com propriedades tóxicas e explosivas. O sistema consiste em um balão de fundo redondo acoplado a um condensador (sem emendas e sem partes esmerilhadas) conectado a um erlenmeyer através de uma rolha de borracha. Este erlenmeyer estava mergulhado em banho de gelo com sal grosso dentro de um isopor vedado com papel alumínio para manter a temperatura baixa. No condensador passava água mantida gelada por um refrigerador; um funil de adição se adaptava ao balão através de outra rolha de borracha. Ao balão foram adicionados 3,25 g de KOH, 5,2 mL de água e 15,6 mL de etanol que foram aquecidos em banho de água a 65 °C. A adição de 13 g de Diazald (**35**) dissolvidos em 130 mL de éter etílico foi realizada gota a gota com a ajuda do funil de adição por 3 horas.

Quando todo o Diazald havia sido adicionado, deixou-se o sistema sob agitação por aproximadamente 15 minutos. O erlenmeyer com diazometano foi tampado com rolha de borracha, enrolado em papel alumínio e guardado em freezer.

c) Esterificação

A fração ácida restante da esterificação com sulfato de metila (9,8 g) foi dissolvida em um pouco de éter etílico, colocada em banho de gelo dentro de um isopor e tampada com rolha de borracha. Quantidades pequenas de diazometano em éter foram adicionadas de tempo em tempo com a ajuda de uma pipeta de Pasteur e entre as adições foram feitas placas cromatográficas para acompanhar a esterificação. Adicionou-se diazometano (**34**) até completa esterificação dos ácidos que resultou em 9,25 g do material.

5.2.1.4.3. Pré-purificação da fração esterificada

Para uma posterior injeção em aparelho de CG/EM a fração esterificada foi filtrada em coluna de sílica gel para eliminar quaisquer resíduos de ácidos e de sesquiterpenos. Para isso, uma coluna cromatográfica foi preenchida com 18,5 g de sílica gel com uma mistura de hexano/acetato de etila 9,7:0,3. A coluna foi eluída com esta mistura até completa separação dos ésteres.

As frações dos ésteres com $R_f = 0,8$ (hexano: acetato de etila – 9:1; sílica gel) foram reunidas e uma amostra foi analisada em aparelho de cromatografia gasosa acoplado à espectrometria de massas. A análise indicou a presença de vários ésteres, sendo quatro ésteres isoméricos majoritários.

5.2.1.4.4. Separação das substâncias da fração ácida

A fração constituída pela mistura de ésteres isoméricos foi posteriormente submetida à separação cromatográfica em coluna de gel de sílica impregnada com 10 % de nitrato de prata (AgNO_3).

Em um béquer foram pesados 24 g de gel de sílica. Em outro recipiente, protegido da luz, pesaram-se 2,6 g de AgNO_3 . Diluiu-se este sal em quantidade de água destilada suficiente para umedecer todo o volume de sílica gel. Após a dissolução completa do AgNO_3 , misturou-se esta solução à sílica gel. Protegeu-se o recipiente da luz com folhas de papel alumínio, deixando na parte superior pequenos orifícios para a saída do vapor de água. Em seguida, este sistema foi deixado em uma estufa por três dias a 75 °C. Após o tempo de ativação, a sílica gel foi retirada da estufa e o recipiente aberto (em local protegido da luz) para não haver condensação de umidade até que atingisse a temperatura ambiente.

A coluna foi preenchida com a sílica gel impregnada com prata através da suspensão da fase estacionária em hexano. Após a compactação do leito cromatográfico a mistura dos ésteres (400 mg) foi adicionada na forma de uma pastilha preparada em sílica gel sem nitrato de prata.

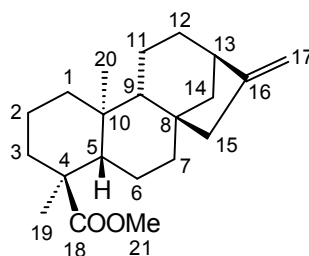
A coluna foi eluída inicialmente com hexano. Aumentou-se lentamente a polaridade do eluente até uma solução de 50% de acetato de etila em hexano. A resolução da mistura foi acompanhada por um aparelho de cromatografia gasosa, fornecendo as frações que foram reunidas de acordo com a sua composição. Ao final os quatro diterpenos puros foram obtidos como pode ser visto na **Tabela 16**.

Tabela 16 – Frações reunidas após separação cromatográfica com sílica gel impregnada com nitrato de prata da fração de ésteres, sistema de solventes e massas obtidas.

Substâncias presentes nas frações reunidas	Sistema de solventes	Massa (mg)
37	Hexano: acetato de etila (9,7:0,3)	142,0
37 + 6a	Hexano: acetato de etila (9,7:0,3)	6,0
6a	Hexano: acetato de etila (9,7:0,3)	24,0
38	Hexano: acetato de etila (9,5:0,5)	76,0
38 + 39	Hexano: acetato de etila (8:2)	12,0
39	Hexano: acetato de etila (8:2)	48,0

As substâncias **37** e **38** foram obtidas como sólidos brancos enquanto as substâncias **6a** e **39** na forma de óleos incolores. A identificação dessas substâncias através de técnicas de RMN ^1H , ^{13}C , COSY, HMQC e HMBC nos provou se tratar das substâncias caur-16-en-18-oato de metila (**37**), ozato de metila (**6a**), caur-15-en-18-oato de metila (**38**) e isoozato de metila(**39**).

Dados referentes ao caur-16-en-18-oato de metila (37): Figuras 28A-34A



37

CCD: $R_f = 0,8$ (hexano: acetato de etila 9:1; sílica gel).

PF: 108-110 °C

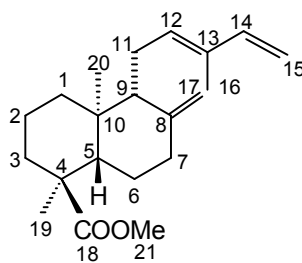
IV (KBr, cm^{-1}) $\nu_{\text{máx}}$: 3020, 2991, 2930, 2864, 1717, 1655, 1437, 1381, 1248, 1176, 1140, 874.

RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ : 0,80-0,90 (m, 1H, H-1), 1,00 (sl, 1H, H-5), 1,07 (s, 3H, H-20), 1,09-1,14 (m, 2H, H-9 e H-14), 1,16 (s, 3H, H-19), 1,40-1,46 (m, 3H, H-2, H-6 e H-12), 1,47-1,60 (m, 6H, H-2, H-3, H-6, 2H-7 e H-12), 1,61-1,75 (m, 3H, H-3 e 2H-11), 1,77-1,87 (m, 1H, H-1), 1,92-2,04 (m, 1H, H-14), 2,03-2,14 (m, 2H, H-15), 2,64 (s, 1H, H-13), 3,65 (s, 3H, H-21), 4,73 (s, 1H, H-17), 4,80 (m, 1H, H-17).

RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) δ : 16,5 (C-20, CH_3), 17,9 (C-11, CH_2), 18,0 (C-2, CH_2), 18,0 (C-19, CH_3), 23,3 (C-6, CH_2), 33,3 (C-12, CH_2), 36,9 (C-3, CH_2), 38,4 (C-10, C), 39,0 (C-1, CH_2), 39,1 (C-14, CH_2), 39,8 (C-7, CH_2), 44,0 (C-13, CH), 44,4 (C-8, C), 47,8 (C-4, C), 49,1 (C-15, CH_2), 50,6 (C-5, CH), 51,9 (C-21, CH_3), 56,1 (C-9, CH), 103,1 (C-17, CH_2), 155,8 (C-16, C), 178,0 (C-18, C).

EM (70 eV) m/z (%): 316 (M^+ , 16), 301 (9), 273 (28), 257 (26), 241 (48), 213 (30), 131 (22), 105 (50), 91 (100), 79 (94), 67 (68), 54 (64), 41 (98).

Dados referentes ao ozato de metila (6a): Figuras 35A-40A



6a

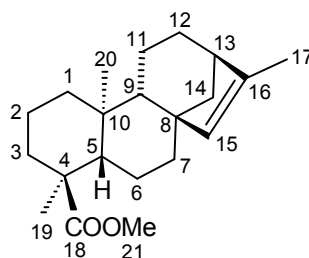
CCD: $R_f = 0,8$ (hexano: acetato de etila 9:1; sílica gel).

RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ : 0,76 (s, 3H, H-20), 1,16 (s, 3H, H-19), 1,17-1,26 (m, 2H, H-1 e H-6), 1,44 (qd, 1H, $J = 4,4$ Hz e 12,8 Hz, H-6), 1,53-1,63 (m, 3H, 2H-2 e H-3), 1,74 (s, 3H, H-16), 1,75-1,87 (m, 3H, H-1, H-3 e H-9), 1,97 (dd, 1H, $J = 2,3$ Hz e 12,8 Hz, H-5), 2,00-2,12 (m, 1H, H-11), 2,20-2,14 (m, 1H, H-7), 2,33 (m, 1H, H-7), 2,38 (dl, 1H, $J = 6,3$ Hz, H-11), 3,65 (s, 3H, H-21), 4,48 (sl, 1H, H-17), 4,83 (sl, 1H, H-17), 4,87 (d, 1H, $J = 10,9$ Hz, H-15), 5,03 (d, 1H, $J = 17,2$ Hz, H-15), 5,40 (tl, 1H, $J = 6,3$ Hz, H-12), 6,34 (dd, 1H, $J = 10,9$ Hz e 17,2 Hz, H-14).

RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) δ : 11,9 (C-16, CH_3), 14,8 (C-20, CH_3), 16,7 (C-19, CH_3), 18,6 (C-2, CH_2), 23,0 (C-11, CH_2), 26,7 (C-6, CH_2), 37,1 (C-3, CH_2), 37,7 (C-7, CH_2), 38,2 (C-1, CH_2), 39,0 (C-10, C), 47,9 (C-4, C), 49,9 (C-5, CH), 51,8 (C-21, CH_3), 57,2 (C-9, CH), 108,1 (C-17, CH_2), 110,0 (C-15, CH_2), 133,4 (C-13, C), 133,9 (C-12, CH), 141,8 (C-14, CH), 148,1 (C-8, C), 179,1 (C-18, C).

EM (70 eV) m/z (%): 316 (M^+ , 24), 301 (12), 257 (34), 241 (42), 175 (82), 161 (32), 147 (20), 134 (20), 134 (31), 121 (100), 119 (50), 105 (50), 93 (50), 91 (48), 81 (64), 79 (74), 55 (48), 41 (50).

Dados referentes ao caur-15-en-18-oato de metila (38): Figuras 41A-47A



38

CCD: $R_f = 0,8$ (hexano: acetato de etila 9:1; sílica gel).

PF: 111-112 °C

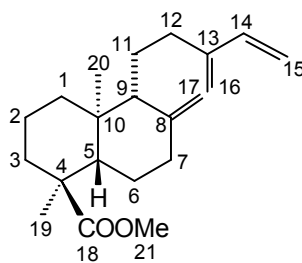
IV (KBr, cm^{-1}) $\nu_{\text{máx}}$: 3030, 2991, 2860, 1720, 1637, 1437, 1244, 1175, 1190, 816.

RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ : 0,77-0,87 (m, 1H, H-7), 0,89-1,00 (m, 2H, H-5 e H-6), 1,04 (s, 3H, H-20), 1,12 (s, 3H, H-19), 1,25-1,33 (m, 2H, H-11), 1,37-1,54 (m, 7H, H-1, 2H-2, H-3, H-6 e 2H-12), 1,59-1,70 (m, 3H, H-1, H-3 e H-9), 1,68 (s, 3H, H-17), 1,80 (d, 1H, $J = 12,8$ Hz, H-7), 2,02 (d, 2H, $J = 9,9$ Hz, H-14), 2,30 (s, 1H, H-13), 3,64 (s, 3H, H-21), 5,05 (s, 1H, H-15).

RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) δ : 14,3 (C-17, CH_3), 15,5 (C-20, CH_3), 17,8 (C-2, CH_2), 18,1 (C-19, CH_3), 18,6 (C-11, CH_2), 22,5 (C-6, CH_2), 25,1 (C-12, CH_2), 37,0 (C-3, CH_2), 39,0 (C-1, CH_2), 39,0 (C-10, C), 39,6 (C-7, CH_2), 43,9 (C-14, CH_2), 45,0 (C-13, CH), 48,0 (C-4, C), 49,0 (C-5, CH), 49,1 (C-8, C), 49,1 (C-9, CH), 51,9 (C-21, CH_3), 135,4 (C-15, CH), 142,6 (C-16, C), 179,7 (C-18, C).

EM (70 eV) m/z (%): 316 (M^+ , 26), 301(8), 273 (15), 257(19), 259 (26), 241 (33), 187 (28), 159 (23), 119 (26), 106 (61), 94 (100), 91 (61), 79 (44), 41 (26).

Dados referentes ao isoozato de metila (39): Figuras 48A-53A



39

CCD: $R_f = 0,8$ (hexano: acetato de etila 9:1; sílica gel).

RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ : 0,71 (s, 3H, H-20), 1,14 (s, 3H, H-19), 1,18-1,28 (m, 2H, H-1 e H-6), 1,45 (qd, 1H, $J = 4,3$ Hz e 15,0 Hz, H-6), 1,52-1,63 (m, 4H, 2H-2, H-3 e H-11), 1,64-1,79 (m, 4H, H-1, H-3, H-9 e H-11), 1,95 (dd, 1H, $J = 3,0$ Hz e 10,7 Hz, H-5), 1,99-2,10 (m, 2H, H-7 e H-12), 2,28-2,43 (m, 2H, H-7 e H-12), 3,66 (s, 3H, H-21), 4,57 (s, 1H, H-17), 4,85 (s, 1H, H-17), 4,97 (s, 1H, H-16), 5,01 (s, 1H, H-16), 5,05 (d, 1H, $J = 12,0$ Hz, H-15), 5,22 (d, 1H, $J = 18,0$ Hz, H-15), 6,36 (dd, 1H, $J = 12,0$ Hz e 18,0 Hz, H-14).

RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) δ : 14,9 (C-20, CH_3), 16,7 (C-19, CH_3), 18,6 (C-2, CH_2), 22,2 (C-11, CH_2), 27,0 (C-6, CH_2), 30,2 (C-12, CH_2), 37,1 (C-3, CH_2), 37,9 (C-7, CH_2), 38,0 (C-1, CH_2), 39,1 (C-10, C), 47,9 (C-4, C), 50,0 (C-5, CH), 52,0 (C-21, CH_3), 56,6 (C-9, CH), 107,0 (C-17, CH_2), 113,3 (C-15, CH_2), 115,7 (C-16, CH_2), 139,1 (C-14, CH), 147,1 (C-13, C), 148,0 (C-8, C), 179,4 (C-18, C).

EM (70 eV) m/z (%): 316 (M^+ , 1), 301 (10), 257 (40), 241 (43), 187 (15), 163 (13), 133 (23), 121 (100), 107 (28), 93 (43), 79 (40), 55 (35), 41 (55).

5.2.2. Derivatizações dos ácidos ózico e isoózico

5.2.2.1. Preparo do extrato hexânico

O mesmo procedimento realizado na etapa do estudo fitoquímico foi realizado para obtenção do extrato hexânico. Os epicarpós dos frutos maduros de *Hymenaea stigonocarpa* coletados na Reserva Nacional da Serra do Cipó em Jaboticatubas - MG, em novembro de 2007, foram separados da polpa, lavados e secos à sombra. Posteriormente, foram moídos em moinho de martelo e deixados em hexano para extração por 10 dias. Filtrou-se e evaporou-se em evaporador rotatório. Um total de 500 g de epicarpo moído forneceu 17,7 g de extrato, aproximadamente 3,5%.

5.2.2.2. Extração ácido-base

O extrato hexânico de *H. stigonocarpa* (17,7 g) foi diluído em 120 mL de éter etílico e extraído quatro vezes com 200 mL de solução de KOH 0,6 mol.L⁻¹. As fases orgânica e aquosa foram separadas. Da fase neutra todo o solvente foi retirado em evaporador rotatório e forneceu um total de 4,4 g de substâncias neutras. Colocou-se a fase aquosa em banho de gelo e em seguida, adicionou-se 150 mL de acetato de etila e HCl 1 mol.L⁻¹ lentamente até a neutralização (35 mL). Em um funil de separação, separaram-se novamente as fases orgânica e aquosa. A fase orgânica foi seca com MgSO₄ e evaporada, fornecendo 12,1 g de uma fração contendo as substâncias ácidas.

5.2.2.3. Esterificação

A fração ácida obtida da extração ácido-base descrita no item **5.2.2.2.** (12,1 g) foi dissolvida em um pouco de éter etílico, colocada em banho de gelo dentro de um isopor e tampada com rolha de borracha. Quantidades pequenas de diazometano em éter foram adicionadas de tempo em tempo com a ajuda de uma pipeta de Pasteur e entre

as adições foram feitas placas cromatográficas para acompanhar a esterificação. Adicionou-se diazometano até completa esterificação dos ácidos que resultou em 11,5 g do material.

5.2.2.4. Pré-purificação da fração esterificada

Para uma posterior análise em aparelho de CG/EM a fração esterificada foi filtrada em coluna de sílica gel para eliminar quaisquer resíduos de ácidos e de sesquiterpenos. Para isso, uma coluna cromatográfica foi empacotada com de sílica gel com uma mistura de hexano: acetato de etila 9,7:0,3. A coluna foi eluída com esta mistura até completa separação dos ésteres.

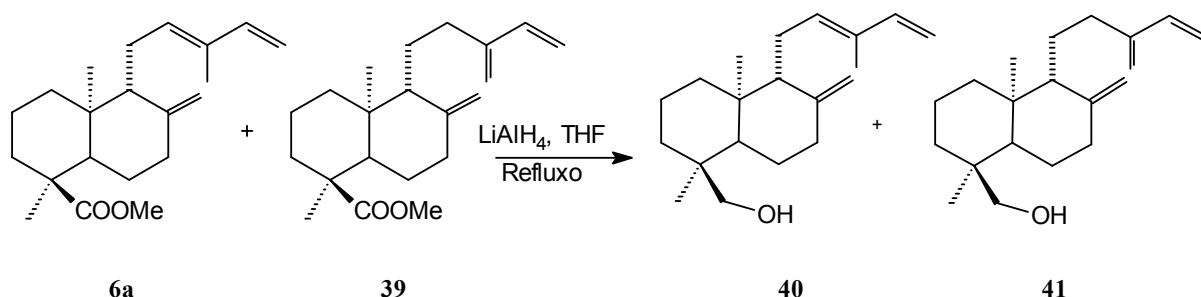
As frações foram reunidas e uma amostra foi analisada em aparelho de cromatografia gasosa acoplado a espectrometria de massas. O resultado indicou a presença de vários ésteres e dentre eles o ozato de metila (**6a**) e o isoozato de metila (**39**) como majoritários, constituindo 80% da mistura.

5.2.2.5. Separação dos ésteres ozato de metila (6a) e isoozato de metila (39)

Todo o material obtido na esterificação foi cromatografado em coluna de sílica gel para separação da fração enriquecida com os diterpenos ozato de metila e isoozato de metila para posterior utilização em reações.

A coluna foi preenchida com a sílica gel suspendida em hexano e a mistura de ésteres adicionada na forma de uma pastilha preparada em sílica gel. A coluna foi eluída com volumes crescentes de acetato de etila, obtendo-se ao final várias frações enriquecidas com os isômeros de interesse. Essas frações foram submetidas a algumas transformações sintéticas para que os produtos formados pudessem ser utilizados em ensaios biológicos após serem devidamente purificados.

5.2.2.6. Síntese dos álcoois 40 e 41 a partir dos ésteres 6a e 39



A um balão de duas bocas de 250 mL acoplado com sistema de refluxo em atmosfera de nitrogênio foram adicionados 70 mL de THF seco e 1,16 g (33,8 mmol) de LiAlH_4 com a ajuda de um funil, em banho de gelo. Logo após adicionou-se vagarosamente uma mistura enriquecida com 90% dos ésteres ozato de metila (**6a**) e isoozato de metila (**39**) (4,4 g) dissolvidos em THF até completar 140 mL de solvente, também em banho de gelo.

A reação foi mantida sob refluxo por 8 horas. Após este tempo a análise por CCD indicou que não havia material de partida.

À solução reacional adicionou-se gotas de solução de NaOH 15% até que restasse uma solução límpida e um sólido branco agarrado às paredes do balão. A solução transparente foi vertida em um erlenmeyer, seca com sulfato de magnésio e filtrada para um balão. Após evaporação do solvente em evaporador rotatório foram obtidos 4,2 g de fase orgânica.

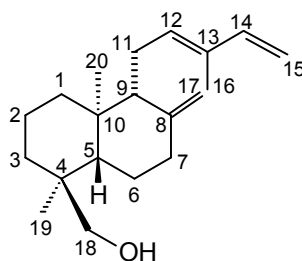
Para uma pré-purificação da mistura dos álcoois **40** e **41**, a fase orgânica foi cromatografada em coluna de sílica gel utilizando como solvente hexano: acetato de etila 9,5:0,5. O rendimento médio da reação foi de 92,0% com a obtenção de 3,31 g da mistura de álcoois.

5.2.2.7. Separação dos álcoois **40** e **41**

Uma pequena porção da mistura dos álcoois **40** e **41** (239 mg) foi submetida a uma separação cromatográfica utilizando sílica gel incorporada com nitrato de prata (AgNO_3). A coluna – em ambiente protegido da luz - foi preenchida com a sílica gel impregnada com prata suspendida em hexano:acetato de etila (9,5:0,5) e a mistura de álcoois adicionada na forma de uma pastilha preparada em sílica gel sem nitrato de prata. A coluna foi eluída inicialmente com hexano:acetato de etila 9,5:0,5 e posteriormente com hexano:acetato de etila 9:1, obtendo-se ao final os duas substâncias puras na forma de óleos incolores. O primeiro composto a ser eluído foi o álcool **41** (98 mg) e depois então, o álcool **40** (125 mg). A separação cromatográfica foi acompanhada por análises sucessivas em aparelho de CG/EM.

A confirmação das estruturas das substâncias foi realizada através das técnicas de Espectrometria de Massas, RMN ^1H , ^{13}C e por técnicas bidimensionais: COSY, HMQC e HMBC.

Dados referentes ao álcool do ozato de metila (40): Figuras 54A-59A



40

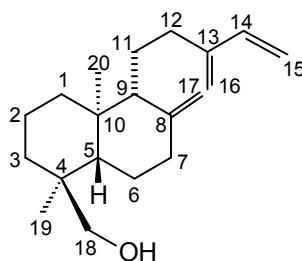
CCD: $R_f = 0,23$ (hexano: acetato de etila 9:1; sílica gel).

RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ : 0,75 (s, 6H, H-19 e H-20), 1,12 (td, 1H, $J = 4,3$ Hz e 12,5 Hz, H-3), 1,25-1,42 (m, 2H, H-1 e H-6), 1,43-1,49 (m, 2H, H-1 e H-5), 1,53-1,65 (m, 3H, 2H-2 e H-6), 1,73 (s, 3H, H-16), 1,75-1,83 (m, 2H, H-3 e H-9), 1,97-2,08 (m, 1H, H-7), 2,07-2,19 (m, 1H, H-11), 2,31-2,38 (m, 2H, H-7 e H-11), 3,13 (d, 1H, $J = 12,6$ Hz, H-18), 3,41 (d, 1H, $J = 12,6$ Hz, H-18), 4,44 (s, 1H, H-17), 4,80 (s, 1H, H-17), 4,86 (d, 1H, $J = 10,7$ Hz, H-15), 5,02 (d, 1H, $J = 17,7$ Hz, H-15), 5,40 (tl, 1H, $J = 6,6$ Hz, H-12), 6,32 (dd, 1H, $J = 10,7$ Hz e 17,7 Hz, H-14).

RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) δ : 11,9 (C-16, CH_3), 14,9 (C-20, CH_3), 17,7 (C-19, CH_3), 18,9 (C-2, CH_2), 23,2 (C-11, CH_2), 23,8 (C-6, CH_2), 35,4 (C-1, CH_2), 37,8 (C-7, CH_2), 38,1 (C-4, C), 38,8 (C-3, CH_2), 39,4 (C-10, C), 48,4 (C-5, CH), 57,0 (C-9, CH), 72,1 (C-18, C), 107,8 (C-17, CH_2), 109,9 (C-15, CH_2), 133,6 (C-13, C), 134,0 (C-12, CH), 141,8 (C-14, CH), 148,3 (C-8, C).

EM (70 eV) m/z (%): 288 (M^+ , 13), 273 (9), 257 (41), 175 (22), 147 (30), 133 (26), 119 (28), 107 (26), 93 (61), 81 (100), 55 (48), 41 (54).

Dados referentes ao álcool do isoozato de metila (41): Figuras 60A-65A



41

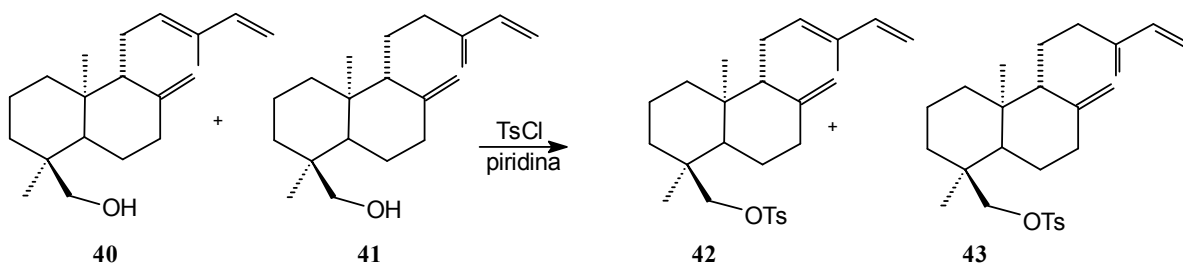
CCD: $R_f = 0,23$ (hexano: acetato de etila 9:1; sílica gel).

RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ : 0,72 (s, 3H, H-20), 0,74 (s, 3H, H-19), 1,05 (td, 1H, $J = 4,2$ Hz e 12,4 Hz, H-3), 1,21-1,32 (m, 1H, H-1), 1,35 (dd, 1H, $J = 4,4$ Hz e 15,0 Hz, H-6), 1,40-1,50 (m, 2H, H-1 e H-5), 1,51-1,64 (m, 4H, 2H-2, H-6 e H-11), 1,65-1,79 (m, 3H, H-3, H-9 e H-11), 1,92-2,13 (m, 2H, H-7 e H-12), 2,35-2,42 (m, 2H, H-7 e H-12), 3,10 (d, 1H, $J = 10,9$ Hz, H-18), 3,41 (d, 1H, $J = 10,9$ Hz, H-18), 4,57 (s, 1H, H-17), 4,85 (s, 1H, H-17), 4,94 (s, 1H, H-16), 4,97 (s, 1H, H-16), 5,04 (d, 1H, $J = 10,7$ Hz, H-15), 5,20 (d, 1H, $J = 16,8$ Hz, H-15), 6,36 (dd, 1H, $J = 10,7$ Hz e 16,8 Hz, H-14).

RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) δ : 15,1 (C-20, CH_3), 17,7 (C-19, CH_3), 18,8 (C-2, CH_2), 22,5 (C-11, CH_2), 24,6 (C-6, CH_2), 30,4 (C-12, CH_2), 35,6 (C-1, CH_2), 38,1 (C-4, CH_2), 38,2 (C-3, C), 38,6 (C-7, CH_2), 39,6 (C-10, C), 48,7 (C-5, CH), 56,7 (C-9, CH), 72,2 (C-18, C), 106,5 (C-17, CH_2), 113,2 (C-15, CH_2), 115,5 (C-16, CH_2), 139,2 (C-14, CH), 147,2 (C-13, C), 148,5 (C-8, C).

EM (70 eV) m/z (%): 288 (M^+ , 1), 273 (11), 257 (66), 147 (30), 135 (43), 121 (40), 107 (51), 93 (96), 81 (100), 67(53), 55 (66), 41(77).

5.2.2.8. Síntese dos tosilatos **42** e **43** a partir dos álcoois **40** e **41**



A um balão de 250 mL de duas bocas sob atmosfera de nitrogênio foram adicionados 73 mL de piridina e 1,6 g da mistura enriquecida com 90% dos álcoois **40** e **41**. À solução em agitação foram adicionados 1,9 g (9,9 mmol) de cloreto de tosilato (TsCl) e a mistura foi mantida sob agitação à temperatura ambiente por dez horas. Logo após, foi feita uma placa cromatográfica, o que indicou que ainda havia material de partida. Então, adicionou-se mais 350 mg de TsCl (1,8 mmol) e aqueceu-se por mais cinco horas para então encerrar a reação.

O meio reacional foi vertido em um funil de separação e adicionou-se acetato de etila. A fase orgânica foi lavada exaustivamente com solução de HCl 5% até eliminação de toda piridina. Em seguida, a fase orgânica foi lavada com NaHCO₃, seca com sulfato de magnésio e filtrada para um balão. Após evaporação do solvente em evaporador rotatório foram obtidos 2,1 g de fase orgânica.

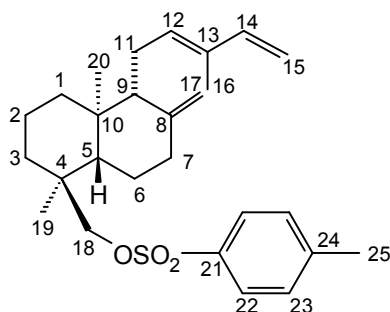
Para uma pré-purificação da mistura dos tosilatos, a fase orgânica foi cromatografada em coluna de sílica gel utilizando como solvente hexano:acetato de etila 9,5:0,5. Foram reunidos 1,9 g da mistura dos tosilatos **42** e **43** puros e recuperado 0,14 g dos álcoois **40** e **41**, perfazendo um rendimento médio de 89,0%.

5.2.2.9. Separação dos tosilatos **42** e **43**

A mistura dos tosilatos **42** e **43** (250 mg) também foi submetida à separação cromatográfica utilizando sílica gel incorporada com nitrato de prata (AgNO_3). A coluna - em ambiente protegido da luz - foi preenchida com a sílica gel (impregnada com prata) suspendida em hexano:acetato de etila (9,5:0,5) e a mistura de álcoois adicionada na forma de uma pastilha preparada em sílica gel sem nitrato de prata. A coluna foi eluída com hexano:acetato de etila 9,5:0,5. Como o acompanhamento da separação das substâncias não podia ser realizado por análise em CG/EM, pois os tosilatos são decompostos na coluna capilar sob altas temperaturas, as frações foram reunidas de 5 em 5 para posterior análise por RMN ^1H . Após reunião das frações foram obtidos 147 mg do tosilato **42** e 97 mg do tosilato **43**. Ambos se apresentavam na forma de óleos incolores.

A confirmação das substâncias isoladas foi realizada também através das técnicas de Infravermelho, RMN ^1H , ^{13}C e por técnicas bidimensionais e nos comprovou a síntese dos tosilatos esperados.

Dados referentes ao tosilato ozato (42): Figuras 66A e 67A

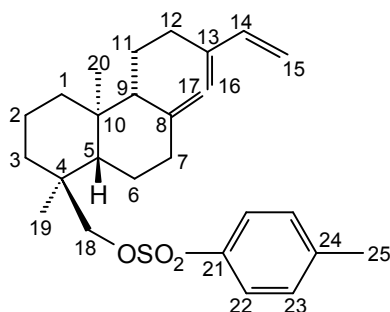


42

CCD: $R_f = 0,40$ (hexano: acetato de etila 9:1; sílica gel).

RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ : 0,70 (s, 3H, H-20), 0,75 (s, 3H, H-19), 0,81-0,99 (m, 2H, H-1 e H-6), 1,00-1,11 (m, 1H, H-3), 1,12-1,29 (m, 1H, H-6), 1,30-1,44 (m, 2H, H-1 e H-5), 1,45-1,58 (m, 2H, H-2), 1,72 (s, 3H, H-16), 1,76 (sl, 2H, H-3 e H-9), 1,81-1,95 (m, 1H, H-7), 2,05-2,20 (m, 1H, H-11), 2,19-2,26 (m, 1H, H-7), 2,27-2,38 (m, 1H, H-11), 2,45 (s, 3H, H-25), 3,47 (d, 1H, $J = 9,2$ Hz, H-18), 3,71 (d, 1H, $J = 9,2$ Hz, H-18), 4,43 (s, 1H, H-17), 4,77 (s, 1H, H-17), 4,87 (d, 1H, $J = 11,0$ Hz, H-15), 5,02 (d, 1H, $J = 17,2$ Hz, H-15), 5,37 (t, 1H, $J = 6,6$ Hz, H-12), 6,31 (dd, 1H, $J = 11,0$ Hz e 17,2 Hz, H-14), 7,34 (d, 1H, $J = 6,6$ Hz, H-23), 7,76 (d, 1H, $J = 6,6$ Hz, H-22).

Dados referentes ao tosilato isoozato (43): Figuras 68A e 72A



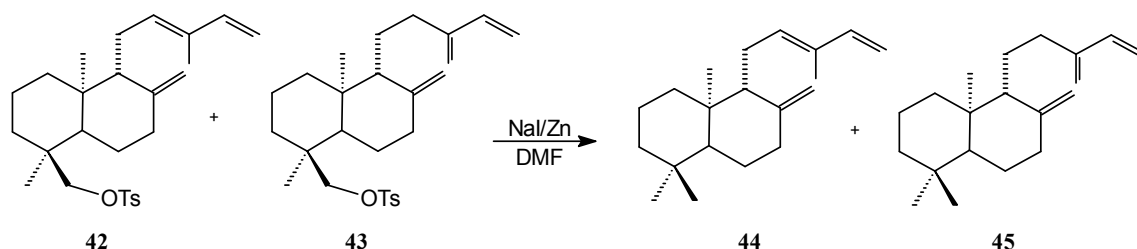
43

CCD: $R_f = 0,40$ (hexano: acetato de etila 9:1; sílica gel).

RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ : 0,68 (s, 3H, H-20), 0,72 (s, 3H, H-19), 1,02 (m, 2H, H-1 e H-3), 1,25 (sl, 2H, H-1 e H-6), 1,40-1,59 (m, 4H, 2H-2, H-5 e H-6), 1,60-1,75 (m, 4H, H-3, H-9 e 2H-11), 1,82-2,05 (m, 2H, H-7 e H-12), 2,23-2,42 (m, 2H, H-7 e H-12), 2,45 (s, 3H, H-25), 3,49 (d, 1H, $J = 9,1$ Hz, H-18), 3,73 (d, 1H, $J = 9,1$ Hz, H-18), 4,56 (s, 1H, H-17), 4,84 (s, 1H, H-17), 4,94 (s, 1H, H-16), 4,98 (s, 1H, H-16), 5,04 (d, 1H, $J = 10,7$ Hz, H-15), 5,20 (d, 1H, $J = 16,8$ Hz, H-15), 6,35 (dd, 1H, $J = 10,7$ Hz e 16,8 Hz, H-14), 7,35 (d, 1H, $J = 7,7$ Hz, H-23), 7,79 (d, 1H, $J = 7,7$ Hz, H-22).

RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) δ : 15,0 (C-20, CH_3), 16,8 (C-19, CH_3), 18,6 (C-2, CH_2), 22,0 (C-25, CH_3), 22,5 (C-11, CH_2), 24,1 (C-6, CH_2), 30,1 (C-12, CH_2), 35,2 (C-1, CH_2), 37,4 (C-4, C), 37,8 (C-7, CH_2), 38,1 (C-3, CH_2), 39,5 (C-10, C), 48,3 (C-5, CH), 56,4 (C-9, CH), 78,0 (C-18, C), 106,8 (C-17, CH_2), 113,6 (C-15, CH_2), 115,6 (C-16, CH_2), 128,0 (C-22, CH), 129,9 (C-23, CH), 133,0 (C-24, C), 139,1 (C-14, CH), 144,8 (C-21, C), 147,1 (C-13, C), 147,9 (C-8, C).

5.2.2.10. Síntese dos trienos **44** e **45** a partir dos tosilatos **42** e **43**



Em um balão de 50 mL de duas bocas equipado com barra magnética e condensador contendo 1g (2,26 mmol) da mistura dos tosilatos **42** e **43**, foram adicionados 24 mL de dimetilformamida (DMF) seca, 1,85 g (12,33 mmol) de NaI e 1,60 g (24,61 mmol) de zinco em pó tratado. Em seguida, o sistema foi aquecido até 120 °C e permaneceu sob agitação por 12 h. Após a análise de placa cromatográfica, observou-se que ainda havia material de partida, então adicionou-se mais 1,0 g de NaI (6 mmol) e deixou-se reagir sob aquecimento por mais 12 h.

Após este tempo, o aquecimento foi retirado e deixou-se atingir a temperatura ambiente. O meio reacional foi então, diluído com diclorometano e filtrado. Em seguida, a solução foi lavada sucessivamente com ácido clorídrico e solução aquosa de tiosulfato de sódio. Após evaporação do solvente foram obtidos 770 mg de fase orgânica.

Para recuperação do material de partida que não reagiu, a fase orgânica foi cromatografada em coluna de sílica gel utilizando como solvente inicialmente hexano puro para recolher a mistura dos trienos e hexano:acetato de etila 9:1 para recuperação dos tosilatos que não reagiram. Obteve-se então, 480 mg da mistura dos trienos **44** e **45** e de outros isômeros formados durante a reação e foi recuperado 0,5 g dos tosilatos **42** e **43**.

5.2.2.11. Tentativa de purificação dos trienos 44 e 45

A mistura dos trienos e subprodutos, obtida da reação de redução do ítem anterior, foi analisada por CG/EM e após análise de uma alíquota observou-se que a mistura era composta por 12 substâncias majoritárias, todos isômeros.

Uma parte da mistura (290 mg) foi então, submetida à separação cromatográfica utilizando sílica gel incorporada com nitrato de prata (AgNO_3). A coluna foi eluída com hexano e posteriormente com polaridades crescentes de acetato de etila até atingir a proporção de hexano:acetato de etila (9,5:0,5). A mistura dos isômeros foi adicionada na forma de pastilha preparada em sílica gel sem nitrato de prata.

Ao final do processo de separação cromatográfica, nenhum dos isômeros foi obtido completamente puro, as frações foram reunidas de acordo com as substâncias majoritárias e armazenadas em freezer.

Várias tentativas de purificação utilizando os métodos cromatográficos de separação em coluna e em camada preparativa (CCD) com sílica gel impregnada com nitrato de prata foram realizadas, mas não foi possível purificar os isômeros reduzidos **44** e **45**.

5.2.3. Recuperação da sílica gel impregnada com prata

A utilização da técnica de separação cromatográfica com impregnação de prata gera um resíduo para o qual não se encontrava tratamento descrito na literatura. Procurando minimizar estes problemas, buscou-se desenvolver uma metodologia simples, mas eficiente e de baixo custo para recuperar a sílica gel e o metal (Ag) gerados no laboratório para poder reutilizá-los.

5.2.3.1. Procedimento de recuperação da sílica gel impregnada com nitrato de prata

O procedimento para o tratamento da sílica gel impregnada com nitrato de prata foi realizado de acordo com a metodologia descrita em Andreão e colaboradores (2010). E abrange três etapas:

- Tratamento da sílica gel impregnada com prata com 3,0 equivalentes de HNO_3 e H_2O_2 (suficiente para cobrir o material);
- Retirada do excesso de matéria orgânica residual com metanol;
- Tratamento com H_2SO_4 e H_2O_2 para degradação de resíduos de material orgânico.

Após ser utilizada nos processos de separação cromatográfica, a sílica gel impregnada com nitrato de prata foi armazenada. A 100 g dessa sílica gel foram adicionados 200 mL de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) 30% e 11,5 mL de ácido nítrico HNO_3 65%. A adição de H_2O_2 foi realizada bem lentamente e em banho de gelo, devido ao grande aquecimento do meio, e em capela com exaustão. Depois de ficar em repouso por dez dias, com periódica homogeneização com bastão de vidro, a sílica gel foi decantada, lavada com 100 mL de água destilada e filtrada em funil de Büchner. Lavou-se a sílica gel por mais cinco vezes com porções de 100 mL de água destilada até que o pH do filtrado se mostrou próximo de 6. Ainda no funil, lavou-se a sílica gel com 200 mL de

metanol para a remoção de alguns resíduos orgânicos polares menos solúveis em água. Deixou-se secar.

À sílica gel seca do tratamento anterior, foram adicionados 200 mL de H_2O_2 e 1 mL de H_2SO_4 concentrado. Deixou-se a mistura em repouso por dez dias, também com homogeneizações periódicas. O material então, foi filtrado e lavado sucessivas vezes com porções de 100 mL de água destilada, de forma semelhante à anterior, até o clareamento da sílica gel. Ativou-se a sílica gel em estufa a 120 °C por 12 h.

Todos os filtrados foram reunidos e a esta mistura adicionou-se solução saturada de cloreto de sódio (NaCl) para precipitar a prata na forma de cloreto de prata (AgCl). O sólido formado foi separado da solução por filtração.

5.2.3.2. Avaliação das características físico-químicas da sílica gel tratada

Para avaliação da qualidade da fase estacionária recuperada foram realizadas análises quantitativas e qualitativas de composição e eficiência entre a sílica gel tratada pelo procedimento descrito acima, sílica gel nova e a sílica gel tratada segundo a literatura (TEIXEIRA *et alii*, 2003).

Foram realizadas análises da área específica, volume de poros e distribuição de diâmetros dos poros para verificar se houve modificação estrutural com o tratamento, análises termogravimétricas para avaliar a perda de massa em função da temperatura e também análises de fluorescência de raios-X para avaliar possíveis resíduos de prata. Foram realizados ainda testes em CLAE para verificar a existência de matéria orgânica.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDEL-KADER, M.; BERGER, J. M.; SLEBODNICK, C.; HOCH, J.; MALONE, S.; WISSE, J. H.; WERKHOVEN, M. C. M.; MAMBER, S.; KINGSTON, D. G. I. (2002) Isolation and absolute configuration of *ent*-halimane diterpenoids from *Hymenaea courbaril* from the Suriname rain forest. *Journal of Natural Products* 65(1):11-15.

AIDAR, M. P. M.; MARTINEZ, C. A.; COSTA, A. C.; COSTA, P. M. F.; DIETRICH, S. M. C.; BUCKERIDGE, M. S. (2002) Effect of atmospheric CO₂ enrichment on the establishment of seedlings of jatobá, *Hymenaea courbaril* L. (Leguminosae, Caesalpinioideae). *Biota Neotropica* 2(1):1-10.

ALBUQUERQUE, U. P.; ANDRADE, L. H. C. (2002) Conhecimento botânico tradicional e conservação em uma área de Caatinga no Estado de Pernambuco, Nordeste do Brasil. *Acta botânica brasílica* 16(3):273-285.

ALMEIDA, S. P.; PROENÇA, C. E. B.; SANO, S. M.; RIBEIRO, J. F. (1998) *Cerrado: espécies vegetais úteis*. Planaltina: EMBRAPA-CPAC, 464p.

ALVINO, P. de O.; SILVA, M. F. F. da; RAYOL, B. P. (2005) Potencial de uso das espécies arbóreas de uma floresta secundária, na Zona Bragantina, Pará, Brasil. *Acta amazonica*. 35(4):413-420.

AMOROZO, M. C. M. (2002) Uso e diversidade de plantas medicinais em Santo Antonio do Leverger, MT. *Acta botânica brasílica* 16(2):189-203.

AMOROZO, M. C. M.; GÉLY, A. (1988) Uso de plantas medicinais por caboclos do baixo Amazonas. Barcarena, PA, Brasil. *Boletim do Museu Paraense Emílio Goeldi, série botânica* 4:47-131.

ANDREÃO, P. S. S.; LIGIÉRO, C. B. P.; MIRANDA, P. C. M. L.; GIACOMINI, R. A.; STUMBO, A. M.; WALDMAN, W. R.; BRAZ-FILHO, R. (2010) Utilização e recuperação de sílica gel impregnada com nitrato de prata. *Química Nova* 33(1):212-215.

ANJOS, J. R. N. dos; CHARCHAR, M. J. D. A.; GUIMARÃES, D. P. (2001) Ocorrência de queima das folhas causada por *Phomopsis* sp. em aroeira no Distrito Federal. *Fitopatologia Brasileira* 26:649-650.

- ANTHONSEN, T.; CHANTHARASAKUL, S. (1971) Isolation of *ent*-16-Kauren-19-oic Acid and *ent*-16-Kauren-19-ol from *Abrotanella nivigena* Muell. *Acta Chemica Scandinavica* 25(5):1925-1927.
- ARRHENIUS, S. P.; LANGENHEIM, J. H. (1983) Inhibitory effects of *Hymenaea* and *Copaifera* leaf resins on the leaf fungus, *Pestalotia subcuticularis*. *Biochemical Systematics Ecology* 11(4):361-366.
- ATKINSON, P. W.; CROW, W. D. (1970) Natural and thermal isomers of methyl trans-communate: a chemical, spectroscopic and mechanistic consideration of the assigned structures. *Tetrahedron* 26(8):1935-1941.
- AZEVEDO, M. I. R. (2008) *Estrutura e restauração de cerradão em Palmas-TO e germinação de sementes de Buchenavia tomentosa Eichler, Hymenaea stigonocarpa Mart. ex Hayne, Guazuma ulmifolia Lam. e Enterolobium gummiferum (Mart.) J. F. Macbr.* Tese (Doutorado em Ciência Florestal) – Viçosa – MG, Universidade Federal de Viçosa – UFV, 118p.
- BARROSO, G. M. (1991) *Sistemática de Angiospermas do Brasil*. Viçosa: UFV, Imprensa Universitária, v.2, 377p.
- BATALHA, M. A.; MANTOVANI, W. (2001) Floristic composition of the cerradão in the Pé-de-Gigante Reserve (Santa Rita do Passa Quatro, Southeastern Brazil). *Acta Botanica Brasilica* 15(3):289-304.
- BENAMARA, A.; ABOURRICHE, A.; BERRADA, M.; CHARROUF, M.; CHAIB, M.; BOUDOUMA, M.; GARNEAU, F. X. (1999) Methoxybifurcarenone: an antifungal and antibacterial meroditerpenoid from the brown alga *Cystoseira tamariscifolia*. *Phytochemistry* 52(1):37-40.
- BONTEMPO, M. (2000) *Medicina natural*. São Paulo – SP: Nova Cultural, 584p.
- BOTELHO, S. A.; FERREIRA, R. A.; MALAVASI, M. M.; DAVIDE, A. C. (2000) Aspectos morfológicos de frutos, sementes, plântulas e mudas de jatobá-do-cerrado (*Hymenaea stigonocarpa* Mart.ex Hayne) – Fabaceae. *Revista Brasileira de Sementes* 22:144-152.
- BRAITHWAIT, A.; SMITH, F. J. (1999) *Chromatographic Methods*. 5. ed. The Netherlands: Kluwer Academic Publishers, 559p.
- BROCHINI, C. B.; ROQUE, N. F. (2000) Two New Cneorubin Related Diterpenes from the Leaves of *Guarea guidonia* (Meliaceae). *Journal of Brazilian Chemical Society* 11(4):361-364.
- BURNELL, R. H.; CÔTÉ, C.; GIRARD, M. (1993) Approaches to the Synthesis of Aromatic Diterpenes Oxygenated in Ring a: Synthesis of Margocilin o-Methyl Ether. *Journal of Natural Products* 56(4):461-472.

CARVALHO FILHO, J. L. S.; ARRIGONI-BLANK, M. F.; BLANK, A. F.; RANGEL, M. S. A. (2003) Produção de mudas de jatobá (*Hymenaea courbaril* L.) em diferentes ambientes, recipientes e composições de substratos. *Cerne* 23(1):109-118.

CASTRO, A. A. J. F. (1987) *Florística e fitossociologia de um cerrado marginal brasileiro, Parque Estadual de Vaçununga, Santa Rita do Passa Quatro – SP*. Tese (Mestrado em Ciências Biológicas – Campinas – SP, Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP, 240p.

CAVASSAN, O. (1990) *Florística e fitossociologia da vegetação lenhosa em um hectare de cerrado no Parque Ecológico Municipal de Bauru (SP)*. Tese (Doutorado em Ciências) - Campinas – SP, Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP, 206p.

CHANG, Y. K.; SILVA, M. R.; GUTKOSKI, L. C.; SEBIO, L.; SILVA, M. A. A. P da. (1998) Development of Extruded Snacks Using Jatobá (*Hymenaea Stigonocarpa* Mart) Flour and Cassava Starch Blends. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 78:59-66.

CHARCHAR, M. J. D'A.; ANJOS, J. R. N. dos; MELO, J. T. (2003) Infecção natural de jatobá por *Phomopsis* sp. no Distrito Federal. *Fitopatologia Brasileira* 28(3):316-318.

CHINO, I.; DEMETZOS, C.; HARVALA, C.; ROUSSAKIS, C.; VERBIST, J. F. (1994) Cytotoxic and antibacterial labdane-type diterpenes from the aerial parts of *Cistus incanus* subsp. *creticus*. *Planta Medica* 60:34-36

CORRÊA, M. P. (1984) *Dicionário das plantas úteis do Brasil*. Brasília – DF: Ministério da Agricultura-IBDF, v.2, 777p.

CREWS, P.; KHO-WISEMAN, E. (1978) Stereochemical assignments in marine natural products by ^{13}C NMR γ effects. *Tetrahedron Letters* 19(28):2483-2486.

CROSS, B. E. *et alli*. (1963) New metabolites of *Gibberella fujikuroi*. Part II. The isolation of fourteen new metabolites. *Journal of the Chemical Society* 2937-2943.

CRUZ, E. D.; MARTINS, F. de O.; CARVALHO, J. E. U. de (2001) Biometria de frutos e sementes e germinação de jatobá-curuba (*Hymenaea intermedia* Ducke, Leguminosae - Caesalpinioideae). *Revista Brasileira de Botânica* 24(2):161-165.

(a) CUNNINGHAM, A.; MARTIN, S. S.; LANGENHEIM, J. H. (1973) Resins acids from two amazonian species of *Hymenaea*. *Phytochemistry* 12(3):633-635.

(b) CUNNINGHAM, A.; MARTIN, S. S.; LANGENHEIM, J. H. (1973) Labd-13-en-8-ol-15-oic acid in the trunk resin of amazonian *Hymenaea courbaril*. *Phytochemistry* 13(1):294-295.

- DAMIANOVA, B. N. (1999) Quantitative thin-layer chromatography of triacylglycerols. principles and application. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies* 22(10):1513-1537.
- DE BOER, T. J.; BACKER, H. J. (1963) *Organic Syntheses*, Coll. v.4, p.943.
- DE-CARVALHO, P. S.; MIRANDA, S. do C.; SANTOS, M. L. dos (2005) Germinação e dados biométricos de *Hymenaea stigonocarpa* Mart. ex Hayne (Leguminosae-Caesalpinioideae) – jatobá-do-cerrado. *Revista Anhangüera* 6:101-116.
- DECHOUM, M. de S. (2004) *Crescimento inicial, alocação de recursos e fotossíntese em plântulas das espécies vicariantes Hymenaea courbaril var. stilbocarpa (Hayne) Lee & Lang. (jatobá) e Hymenaea stigonocarpa Mart. (jatobá-do-cerrado) (Leguminosae-Caesalpinioideae)*. Tese (Mestrado em Biologia Vegetal) – Campinas – SP, Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP, 159p.
- DEMETZOS C.; MITAKU S.; COULADIS M.; HARVALA C.; KOKKINOPOULOS D. (1994) Natural metabolites of ent-13-epi-manoyl oxide and other cytotoxic diterpenes from the resin LADANO of *Cistus creticus*. *Planta Medica* 60(6):590-591.
- DUTRA, V. F.; MESSIAS, M. C. T. B.; GARCIA, F. C. P. (2005) *Papilionoideae* (Leguminosae) nos campos ferruginosos do Parque Estadual do Itacolomi, Minas Gerais, Brasil: florística e fenologia. *Revista Brasileira de Botânica* 28(3):493-504.
- EBERZ, W. F.; WELGE, H. J.; YOST, D. M.; LUCAS, H. J. (1937) The Hydration of Unsaturated Compounds. IV. The Rate of Hydration of Isobutene in the Presence of Silver Ion. The Nature of the Isobutene-Silver Complex. *Journal of the American Chemical Society* 59(1):45-49.
- FARIA, B. F.; CARDELLO, H. M. A. B.; BOSCOLO, M.; ISIQUE, W. D.; ODELLO, L.; FRANCO, D. W. (2003) Evaluation of Brazilian woods as an alternative to oak for cachaças aging. *European Food Research and Technology* 218(1):83-87.
- FARIA, J. P.; SANO, S. M.; COSTA, T. S. A. (2006) Jatobá-do-cerrado. In: Vieira, R. F.; Costa, T. S. A.; Silva, D. B.; Ferreira, F. R.; Sano, S. M. (eds.) *Frutas Nativas da Região Centro-Oeste do Brasil*. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, p. 174-188.
- FERNANDES, T. T.; SANTOS, A. T. F. DOS; PIMENTA, F. C. (2005) Atividade antimicrobiana das plantas *Plathymenia reticulata*, *Hymenaea courbaril* e *Guazuma ulmifolia*. *Revista de Patologia Tropical* 34(2):113-122.
- FUJIMOTO, Y.; TATSUNO, T. (1976) A novel method for reductive removal of tosyloxy and mesiloxy groups. *Tetrahedron Letters* 37:3325-3326.

FURTADO, S. K. (2006) *Alternativas fitoterápicas para o controle da verminose ovina no estado do Paraná: testes in vitro e in vivo*. Tese (Doutorado em Ciências) – Curitiba – PR, Universidade Federal do Paraná – UFPR.

GERESH, S.; VALIYAVEETIL, T. J.; LAVIE, Y.; SHANI, A. (1998) Chemoenzymatic Synthesis of (R)-(+)-2-methyl-butal-1-ol, a Chiral Synthone for the Preparation of Optically Active Pheromones. *Tetrahedron Asymmetry* 9(1):89-96.

GIACOMINI, R. A. (2002) *Estudo Fitoquímico de Hymenaea courbaril var. altissima e Síntese de derivados odoríferos do tipo âmbar-gris e sesquiterpenos da classe drimano a partir do (-)-ácido ózico*. Tese (Doutorado em Química) – Campinas – SP, Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP, 344p.

GIACOMINI, R. A.; MIRANDA, P. C. M.; IMAMURA, P. M. (2004) A complete ^1H e ^{13}C NMR data assignment for the diterpene methyl (-)-zanzibarate by 2D spectroscopy and NOE experiments. *Magnetic Resonance in Chemistry*, 42(6):561-563.

GIACOMINI, R. A.; SANTOS, C.; NOGUEIRA, R. T.; CARVALHO, J. E.; LUNARDI, I.; SORIANO, M. P. DEL C.; IDE, R. M.; IMAMURA, P.M. (2005) Atividade biológica de alguns ácidos diterpênicos naturais e de seus derivados semi-sintéticos. *Revista Fitos*, 1(1):60-66.

GIBBS, P. E.; OLIVEIRA, P. E.; BIANCHI, M. B. (1999) Postzygotic control of selfing in *Hymenaea stigonocarpa* (Leguminosae-Caesalpinioideae), a bat-pollinated tree of Brazilian Cerrados. *International Journal of Plant Sciences* 160(1):72-78.

GONZÁLEZ, A. G.; FRAGA, B. M.; HERNÁNDEZ, M. G.; LUIS, J. G. (1973) New diterpenes from *Sideritis candicans*. *Phytochemistry* 12(11):2721-2723.

GONZÁLEZ, A. G.; FRAGA, B. M.; HERNÁNDEZ, M. G.; LUIS, J. G. (1973) New diterpenes from *Sideritis canariensis*. *Phytochemistry* 12(5):1113-1116.

GONZÁLEZ, A. G.; FRAGA, B. M.; HERNÁNDEZ, M. G.; HANSON, J. R. (1981) The ^{13}C NMR spectra of some *ent*-18-hydroxykaur-16-enes. *Phytochemistry* 20(4):846-847.

GRANATO, D.; NUNES, D. S.; MATTOS, P. P.; RIOS, E. M.; GLINSKI, A.; RODRIGUES, L. C.; ZANUSSO JÚNIOR, G. (2005) Chemical and biological evaluation of rejects from the wood industry. *Brazilian Archives of Biology and Technology* 48(1):237-241.

GUARIM NETO, G.; MORAES, R. G. (2003) Recursos medicinais de espécies do cerrado de Mato Grosso: um estudo bibliográfico. *Acta Botanica Brasilica* 17(4):561-584.

HANSON, J. R. (2001) Diterpenoids. *Natural Products Reports*, 18(1):88-94.

- HANSON, J. R.; SIVERNS, M.; PIOZZI, F.; SAVONA, G. (1976) The ^{13}C nuclear magnetic resonance spectra of kauranoid diterpenes. *Journal of the Chemical Society Perkin I*. 1:114-118.
- HSIEH, T-J; WU, Y-C; SU-CHING, C.; HUANG, C-S.; CHEN, C-Y. (2004) Chemical constituents from *Annona glabra*. *Journal of the Chinese Chemical Society*. 51(1):869-876.
- HUBBEL, S. P.; WIEMER, D. F.; ADEJARE, A. (2003) An antifungal terpenoid defends a neotropical tree (*Hymenaea*) against attack by fungus-growing ants (*Atta*). *Oecologia* 60(3):321-327.
- HUGEL, G.; LODS, L.; MELLOR, J. M.; THEOBALD, D. W., OURISSON, G. (1965) Diterpênes de *Trachylobium*. *Bulletin de la Société Chimique de France* 2882-2887.
- IMAMURA, P. M. (1978) *Isolamento, reações e ressonância magnética nuclear de ^{13}C de diterpenos de Hymenaea*. Tese (Mestrado em Química) – Campinas – SP, Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP, 171p.
- IWAGAWA, T.; YAGUCHI, S.; HASE, T.; OKUBO, T.; KIM, M. (1993) Diterpene glucosides from *Viburnum suspensum*. *Phytochemistry* 32(6):1515-1518.
- JARUSIEWICZ, J; SHERMA, J. (2005) Separations of sterols by reversed phase and argentation thin layer chromatography. Their identification in snail bodies. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies* 28(16):2607-2617.
- JAYAPRAKASAM, B.; ALEXANDER-LINDO R. L.; DEWITT D. L.; NAIR, M. G. (2007) Terpenoids from stinging toe (*Hymenaea courbaril*) fruits with cyclooxygenase and lipid peroxidation inhibitory activities. *Food Chemistry* 105(2):485-490.
- JOLY, A. B. *apud* IMAMURA, P. M. (1978) *Isolamento, reações e ressonância magnética nuclear de ^{13}C de diterpenos de Hymenaea*. Tese (Mestrado em Química) – Campinas – SP, Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP, 171p.
- KHOO, S. F.; OEHLISCHLAGER, A. C.; OURISSON, G. (1973) Structure and stereochemistry of the diterpenes of *Hymenaea courvaril* (Caesalpinioideae) seed pod resin. *Tetrahedron* 29(21):3379-3388.
- KODAMA, M. T.; SARTORI, A. L. B. (2007) Caracterização morfológica de plântulas de *Hymenaea stigonocarpa* var. *stigonocarpa* Mart. ex Hayne, *H. stigonocarpa* Hayne var. *brevipetiolata* Mattos e *H. courbaril* L. *Revista Brasileira de Biociências* 5(S1):663-665.
- LANGENHEIM, J. H.; ARRHENIUS, S. P.; NASCIMENTO, J. C. (1981) Relationship of light intensity to leaf composition and yield in the tropical leguminous genera *Hymenaea* and *Copaifera*. *Biochemical Systematics Ecology* 9(1):27-37.

- LANGENHEIM, J. H.; CONVIS, C. L.; MACEDO, C. A.; STUBBLEBINE, W. H. (1986) *Hymenaea* and *Copaifera* leaf sesquiterpenes in relation to lepidopteran herbivory in Southeastern Brazil. *Biochemical Systematics Ecology* 14(1):41-49.
- LANGENHEIM, J. H.; HALL, G. D. (1983) Sesquiterpene deterrence of a leaf-tying lepidopteran, *Stenoma ferrocaneella*, on *Hymenaea stigonocarpa* in Central Brazil. *Biochemical Systematics Ecology* 11(1):29-36.
- LANGENHEIM, J. H.; LEE, Y-T.; MARTIN, S. S. (1973). An evolutionary and ecological perspective of Amazonian Hylaea species of *Hymenaea* (Leguminosae: Caesalpinioideae). *Acta Amazonica* 3(1):5-38.
- LANGENHEIM, J. H.; LINCOLN, D. E.; STUBBLEBINE, W. H.; GABRIELLI, A. C. (1982) Evolutionary implications of leaf resin pocket patterns in the tropical tree *Hymenaea* (Caesalpinioideae: Leguminosae). *American Journal of Botany* 69(4):595-607.
- LANGENHEIM, J. H.; STUBBLEBINE, W. H. (1983) Variation in leaf resin composition between parent tree and progeny in *Hymenaea*: implications for herbivory in humid tropics. *Biochemical Systematics Ecology* 11(2):97-106.
- LANGENHEIM, J. H.; STUBBLEBINE, W. H.; FOSTER, C. E. (1979) Effect of moisture stress on composition and yield in leaf resin of *Hymenaea courbaril*. *Biochemical Systematics Ecology* 7(1):21-28.
- LANGENHEIM, J. H.; STUBBLEBINE, W. H.; FOSTER, C. E.; NASCIMENTO, J. C. (1977) Estudos comparativos da variabilidade na composição da resina da folha entre árvore parental e progênie de espécies selecionadas de *Hymenaea*. *Acta Amazonica* 7(3):335-354.
- LANGENHEIM, J. H.; STUBBLEBINE, W. H.; LINCOLN, D. E.; FOSTER, C. E. (1978) Implications of variation in resin composition among organs, tissues and populations in the tropical legume *Hymenaea*. *Biochemical Systematics Ecology* 6(4):299-313.
- LEE, Y-T; LANGENHEIM, J. H. (1975) A Systematics revision of the genus *Hymenaea*. University of California. *Publications in Botany* 69:1-109.
- LEE, H-J.; MATTHEW, M. R.; COATES, R. M. (2001) Synthesis and characterization of abietadiene, levopimaradiene, palustradiene, and neoabietadiene: hydrocarbon precursors of the abietane diterpene resin acids. *Tetrahedron* 57(29):6155-6167.
- LEWINSOHN, T. M. (1980) *Predação de sementes em Hymenaea* (Leguminosae: Caesalpinioideae): *aspectos ecológicos e evolutivos*. Tese (Mestrado em Biologia) – Campinas – SP, Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP, 193p.
- LEWIS, G. P.; OWEN, P. E. (1989) *Legumes of the Ilha de Maraca*. Kew: Royal Botanic Gardens, 95p.

LEWIS, G.; SCHRIRE, B.; MACKINDER, B.; LOCK, M. (eds.) (2005). *Legumes of the world*. Kew: Royal Botanic Gardens, 577p.

LISBOA, P. L. B.; TEREZO, E. F. de M; SILVA, J. C. A. da. (1991) Madeiras amazônicas: considerações sobre exploração, extinção de espécies e conservação. *Boletim do Museu Paraense Emílio Goeldi, série botânica* 7(2):521-542.

Li, T. S.; Li, J. T.; Li, H. Z. (1995) Modified and convenient preparation of sílica impregnated with silver nitrate and its application to the separation of steroids and triterpenes. *Journal of Chromatography A*. 715(2):372-375.

LORENZI, H. (1998) *Árvores Brasileiras: Manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil*. Nova Odessa, SP: Editora Plantarum, 368p.

(a) LORENZI, H. (2002) *Árvores brasileiras – Manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil*. 4. ed. Nova Odessa, SP: Instituto Plantarum, 384p.

(b) LORENZI, H. (2002) *Árvores brasileiras – Manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil*. 2. ed. Nova Odessa, SP: Instituto Plantarum, v. 02, 384p.

MANTOVANI, W. (1983) *Composição e similaridade florística, fenologia e espectro biológico do cerrado da reserva biológica de Moji Guaçu, estado de São Paulo*. Dissertação (Mestrado em Ecologia) – Campinas – SP, Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP, 147p.

MARSAIOLI, A. J.; LEITÃO FILHO, H. F.; CAMPELLO, J. P. (1975) Diterpenes in the bark of *Hymenaea courbaril*. *Phytochemistry* 14(8):1882-1883.

MARSTON, A.; DUDAN, G.; GUPTA, M. P.; SOLIS, P. N.; CORREA, M. D.; HOSTETTMANN, K. (1996) Screening of Panamanian plants for molluscicidal activity. *Pharmaceutical Biology*, 34(1):15-18.

MARTIN, S. S.; LANGENHEIM, J. H. (1972) Sesquiterpenes in leaf pocket resin of *Hymenaea courbaril*. *Phytochemistry* 11(10):3049-3051.

MARTIN, S. S.; LANGENHEIM, J. H. (1974) *Enantio-8(17),13(16),14-labdatrien-18-oic acid from trunk resin of kenyan Hymenaea verrucosa*. *Phytochemistry* 13(2):523-525.

MARTINS, J. E. C. (1989) *Plantas medicinais de uso na Amazônia*. 2. ed., Belém – Pará: Cultural CEJUP, 107p.

MATOS, F. J. A. (2002) *Farmácias Vivas – Sistemas de utilização de plantas medicinais projetado para pequenas comunidades*. 4. ed. Fortaleza: Editora UFCE, 267p .

MATUDA, T. G.; NETTO, F. M. (2005) Caracterização química parcial da semente de jatobá-do-cerrado (*Hymenaea stigonocarpa* Mart.) *Ciência e Tecnologia de Alimentos* 25(2):353-357.

McGIMPSEY, J. R.; MURRAY, J. (1960) Essential oils of New Zealand. Podocarpaceae. II. *Journal of Applied Chemistry*, 10(8)340-344.

MEIRA NETO, J. A. A.; SAPORETTI JÚNIOR, A. W. (2002) Parâmetros fitossociológicos de um cerrado no Parque Nacional da Serra do Cipó, MG. *R. Árvore* 26(5):645-648.

MELO, M. da G. G. de; MENDONÇA, M. S. de; MENDES, A. M. da S. (2004) Análise morfológica de sementes, germinação e plântulas de jatobá (*Hymenaea intermedia* Ducke var. *adenotricha* (Ducke) Lee & Lang.) (Leguminosae – Caesalpinioideae). *Acta Amazonica* 34(1):9-14.

MENDONÇA, R. C.; FELFILI, J. M.; WALTER, B. M. T.; SILVA JÚNIOR, M. C.; REZENDE, A. V.; FILGUEIRAS, T. S.; NOGUEIRA, P. E. (1998) Flora Vascular do bioma cerrado. In: Sano, M.; Almeida, S. P. (eds.) *Cerrado: ambiente e flora*. Planaltina: Embrapa-CPAC. p. 287-556.

MILES, D. H.; CHITTAWONG, V.; PAYNE, A. M.; HEDIN, P. A. (1990) Cotton boll weevil antifeedant activity and antifungal activity (*Rhizoctonia solani* and *Pythium ultimum*) of extracts of the stems of *Wedelia biflora*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 38(7):1591-1594.

MOMCHILOVA, S.; DAMYANOVA, B. N. (2003) Stationary phases for silver ion chromatography of lipids: preparation and properties. *Journal of Separation Science* 26(3):261-270.

MONTE, F. J. Q.; DANTAS, E. M. G.; BRAZ-FILHO, R. (1988) New diterpenoids from *Croton argyrophylloides*. *Phytochemistry* 27(10):3209-3212.

MÜLLER, S. (2004) *Isolierung und Strukturaufklärung terpenoider Inhaltsstoffe aus Montanoa hibiscifolia und Oyedaea verbesinoides sowie Untersuchungen ihrer biologischen Aktivität*. Tese (Mestrado) - Friburgo em Brisgóvia - Alemanha, Fakultät für Chemie, Pharmazie und Geowissenschaften der Albert-Ludwigs-Universität, 313p.

NAKANO, T.; DJERASSI, C. (1961) Terpenoids. XLVI. Copalic acid. *The Journal of Organic Chemistry* 26(1):167-173.

NORIN, T.; WESTFELT, L. (1963) Thin layer, column, and gas liquid chromatography of resin acid esters and related terpenes. *Acta Chemica Scandinavica* 17(6):1828-1830.

- NOVAIS, T. S.; COSTA, J. F. O.; DAVID, J. M.; QUEIROZ, L. P.; FRANÇA, F.; GIULIETTI, A. M.; SOARES, M. B. P.; SANTOS, R. R. (2003) Atividade antibacteriana em alguns extratos de vegetais do semi-árido brasileiro. *Revista Brasileira de Farmacognosia* 14(1):05-08.
- NOGUEIRA, R. T.; SHEPARD, G. J.; LAVERDE Jr., A.; MARSAIOLI, A. J.; IMAMURA, P. M. (2001) Clerodane-type diterpenes from the seed pods of *Hymenaea courbaril* var. *stilbocarpa*. *Phytochemistry* 58(8):1153-1157.
- NOGUEIRA, R. T.; GIACOMINI, R. A.; SHEPARD, G. J.; IMAMURA, P. M. (2002) A new *ent*-clerodane diterpene from the *Hymenaea courbaril* var. *altissima*. *Journal of Brazilian Chemical Society* 13(3):389-391.
- OKUYAMA, E.; NISHIMURA, S.; YAMAZAKI, M. (1991) Analgesic principles from *Aralia cordata* THUNB. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin* 39(2):405-407.
- OLIVEIRA, M. N. S.; MERCADANTE, M. O.; LOPES, P. S. N.; GOMES, I. A. C.; GUSMÃO, E.; RIBEIRO, L. M. (2002) Efeitos alelopáticos dos extratos aquoso e etanólico de jatobá-do-cerrado. *Unimontes Científica* 4(2):1-12.
- OLIVEIRA, P. S., GALETTI, M., PEDRONI, F.; MORELLATO, L. P. C. (1995) Seed cleaning by *Mycocepurus goeldii* Ants (Attini) facilitates germination in *Hymenaea courbaril* (Caesalpinioideae). *Biotropica* 27(4):518-522.
- OLIVEIRA, R. (2006) *Secreção de néctar e atividades de morcegos em Hymenaea stigonocarpa* (Leguminosae – Caesalpinioideae) no pantanal da Nhecolândia e remanescente urbano de cerrado, Mato Grosso do Sul. Tese (Mestrado em Ecologia) – Campo Grande – MS, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul – UFMS, 31p.
- (a) PAIVA, E. A. S.; MACHADO, S. R. (2008) The floral nectary of *Hymenaea stigonocarpa* (Fabaceae, Caesalpinioideae): structural aspects during floral development. *Annals of Botany* 101(1):125-133.
- (b) PAIVA, E. A. S.; MACHADO, S. R. (2008) Intercellular pectic protuberances in *Hymenaea stigonocarpa* (Fabaceae, Caesalpinioideae): occurrence and functional aspects. *Comptes Rendus Biologies* 331(4):287-293.
- PANIZZA, S. (1998) *Plantas que curam (cheiro de mato)*. 15. ed. São Paulo: IBRASA, 279p.
- PERRIN, D. D.; ARMAREGO, W. L. F. (1988) *Purification of laboratory chemicals*. Oxford, England: Pergamon Press, 3 ed., 1-391.
- PINTO, A. C.; MADURO, C. B. (2003) Produtos e subprodutos da medicina popular comercializados na cidade de Boa Vista, Roraima. *Acta Amazonica* 33(2):281-290.

- RAMOS, A. C. S.; LEMOS-FILHO, J. P.; RIBEIRO, R. A.; SANTOS, F. R.; LOVATO, M. B. (2007) Phylogeography of the tree *Hymenaea stigonocarpa* (Fabaceae: Caesalpinioideae) and the influence of Quaternary climate changes in the Brazilian Cerrado. *Annals of Botany* 100(6):1219-1228.
- RATTER, J. A.; BRIDGEWATER, S.; ATKINSON, R.; RIBEIRO, J. F. (1996) Analysis of the floristic composition of the Brazilian Cerrado vegetation II: comparison of the woody vegetation of 98 areas. *Edinburgh Journal of Botany* 53(2):153-180.
- RAVEN, P. H.; EVERT, R. F.; EICHHORN, S. E. (1996) *Biologia Vegetal*. 5. ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan, 857p.
- RIEHL, C. A. S.; PINTO, A. C.; (1988) Sílica gel: uma alternativa. *Química Nova* 11:329-330.
- RINCÓN, F.; PINTO, G. L. de; BELTRÁN, O. (2006) Behaviour of a mixture of *Acacia glomerosa*, *Enterolobium cyclocarpum* and *Hymenaea courbaryl* gums in ice cream preparation. *Food Science and Technology International* 12(1):13-17.
- RIZZINI, C. T. (1971) *Plantas do Brasil: árvores e madeiras úteis do Brasil - manual de dendrologia brasileira*. São Paulo: Edgard Blucher, 294 p.
- ROCHA, M. R.; BORGES, J. D.; NAVES, R. V.; VIDAL, V. L. (1992) Estudos sobre a emergência de plântulas de jatobá-do-cerrado (*Hymenaea stigonocarpa* Mart.; *Caesalpinaceae*). *Revista Brasileira de Fruticultura* 14(1):61-64.
- SANTOS, M. F. (1996) *Análise da micoflora associada ao baru* (*Dipteryx alata* Vog.) e a *caroba* (*Cybistax antisyphilitica* (Mart.) Mart.). Tese (Mestrado em Fitopatologia) - Brasília – DF, Universidade de Brasília – UnB, 106p.
- SCHROEDER, F. C.; GONZALEZ, A.; EISNER, T. MEINWALD, J. (1999) Miriamin, a defensive diterpene from the eggs of a land slug (*Arion*, sp.). *Proceedings of the National Academy of Sciences* 96(24):13620-13625.
- SILVA, J. A.; SILVA, D. B.; JUNQUEIRA, N. T. V.; ANDRADE, L. R. M. (1994) *Frutas nativas dos cerrados*. Planaltina: EMBRAPA-CPAC, 165 p.
- SILVA, M. R.; SILVA, M. A. A. P. DA; CHANG, Y. K. (1998) Utilização da farinha de jatobá (*Hymenaea stigonocarpa* Mart.) na elaboração de biscoitos tipo cookie e avaliação de aceitação por testes sensoriais afetivos univariados e multivariados. *Ciência e Tecnologia de Alimentos* 18(1):25-34.
- SOSULSKI, F. W.; SOSULSKI, K. (2006) Legumes: horticulture, properties and processing. In: Hui, Y. H. (Ed.), *Handbook of food science, technology and engineering*. New York, CRC Press, v.1, p.18.1-18.2.

- STUBBLEBINE, W. H.; LANGENHEIM, J. H. (1980) Estudos comparativos da variabilidade na composição da resina da folha entre árvore parental e progênie de espécies selecionadas de *Hymenaea*: comparação de populações Amazônicas com uma população do sudeste brasileiro. *Acta Amazonica* 10(2):293-309.
- TAMBE, I.; TSUJIUCHI, H.; HONDA, G. (1996) Gastric cytoprotection of the non-steroidal anti-inflammatory sesquiterpene, β -caryophyllene. *Planta Medica* 62(5):469-470.
- TEIXEIRA, S. C. G.; MATHIAS, L.; CANELA, M. C. (2003) Recuperação de sílica-gel utilizando processos oxidativos avançados: uma alternativa simples e de baixo custo. *Química Nova* 16(6):931-933.
- TOPCU, G.; ERENLER, R.; CAKMAK, O.; JOHANSSON, C. B.; CELIK, C.; CHAI, H. B.; PEZZUTO, J. M. (1999) Diterpenes from the berries of *Juniperus excelsa*. *Phytochemistry* 50(7):1195-1199.
- THOMSON, R. H. (1993) *The Chemistry of Natural Products*, 2. ed. London: Blackie & Professional, 452p.
- VALE, A. T.; BRASIL, M. A. M.; LEÃO, A. L. (2002) Quantificação e caracterização energética da madeira e casca de espécies do cerrado. *Ciência Florestal* 12(1):71-80.
- VELANDIA, J. R.; CARVALHO, M. G.; BRAZ-FILHO, R. (1998) Ácido *ent*-16 α ,17-diidroxicauran-19-óico isolado de *Ouratea semiserrata* e os desafios estereoquímicos dos carbonos quirais C-4 e C-16. *Química Nova* 21(4):397-404.
- VIEGAS JÚNIOR, C. (2003) Terpenos com atividade inseticida: uma alternativa para o controle químico de insetos. *Química Nova* 26(3):390-400.
- WILLIAMS, C. M.; MANDER, L. N. (2001) Chromatography with silver nitrate. *Tetrahedron* 57(3):425-447.
- WINK, M.; MOHAMED, G. I. A. (2003) Evolution of chemical defense traits in the Leguminosae: mapping of distributions patterns of secondary metabolites on a molecular phylogeny inferred from nucleotide sequences of the *rbcl* gene. *Biochemical Systematics and Ecology* 31(8):897-917.
- WINSTEIN, S.; LUCAS, J. H. (1938) The Coordinations of silver ions with unsaturated compounds, *Journal of the American Chemical Society* 60(4):836-847.
- YAMASAKI, K.; KOHDA, H.; KOBAYASHI, T.; KASAI, R.; TANAKA, O. (1976) Structures of *Stevia* diterpene-glucosides: application of ^{13}C NMR. *Tetrahedron Letters* 17(13):1005-1008.

CAPÍTULO 2

AVALIAÇÃO DA POTENCIAL BIOATIVIDADE DE SUBSTÂNCIAS ISOLADAS E DERIVATIZADAS DO EPICARPO DE *Hymenaea stigonocarpa* (Fabaceae)

1. INTRODUÇÃO

1.1. Produtos naturais e atividade antimicrobiana

A natureza é uma fonte atrativa de substâncias farmacologicamente ativas candidatas ao tratamento de patologias devido à enorme diversidade química encontrada nas espécies de plantas, animais e microrganismos (ROCHA *et alii*, 2001).

Substâncias biologicamente ativas, em particular as derivadas de plantas medicinais, destacam-se como potenciais fármacos ou candidatos a novas drogas estruturalmente e funcionalmente diversas, além de constituírem modelos moleculares de referência para síntese de novos compostos medicinais (KOEHN & CARTER, 2005). Apesar do interesse na modelagem molecular, na química combinatória e outras técnicas de síntese química pelas instituições de pesquisa e indústrias farmacêuticas, os produtos naturais e, particularmente, as plantas medicinais, permanecem como uma importante fonte de novos agentes terapêuticos contra doenças infecciosas (fúngicas ou bacterianas), câncer, dislipidemias e imunomodulação (ROCHA *et alii*, 2001).

A elucidação dos componentes ativos presentes nas plantas, bem como seu mecanismo de ação, vem sendo um dos maiores desafios para a química farmacêutica, bioquímica e a farmacologia (GEBHARDT, 2000). As plantas contêm inúmeros constituintes e seus extratos, quando testados, podem apresentar efeitos sinérgicos entre os diferentes princípios ativos devido à presença de substâncias de classes ou estruturas diferentes contribuindo para a mesma atividade (WATTENBERG, 1985).

Alternativas ao combate às infecções causadas por diversos microrganismos têm sido utilizadas e bastante divulgadas, como o uso de princípios ativos presentes em extratos de plantas. Os fungos e bactérias têm sido motivo de intensa preocupação devido às inúmeras patologias tanto de caráter humano quanto animal a eles associadas.

As drogas disponíveis para o tratamento de tais doenças têm custo elevado, efeitos colaterais indesejáveis, pouca efetividade devido ao espectro de atuação, e forçam sobremaneira o surgimento de isolados resistentes aos mais diversos princípios ativos. Assim, o desenvolvimento de métodos alternativos para o tratamento de tais infecções torna-se imprescindível (PERLROTH *et alii*, 2007).

Devido ao aumento de sérias infecções e ao concomitante aparecimento de resistência aos agentes antifúngicos e antibacterianos, os testes de susceptibilidade às drogas antimicrobianas tornaram-se importantes (REX *et alii*, 2001). Estes testes podem ser usados não somente na pesquisa de sensibilidade aos antimicrobianos, como também na busca por novos fármacos pela verificação da atividade biológica de amostras complexas, como extratos vegetais, e de substâncias puras (GULLUCE *et alii*, 2006; CORDELL & COLVARD, 2005). As metodologias para a avaliação da atividade antifúngica e antibacteriana de produtos naturais são variáveis, sendo realizadas a bioautografia, a difusão em ágar e a diluição em ágar e caldo.

Os produtos naturais têm sido ferramentas valiosas contra as infecções microbianas, no combate às células tumorais, bem como para o desenvolvimento de novos fármacos (NEWMAN *et alii*, 2003). Estima-se que as substâncias derivadas de plantas constituem

aproximadamente 25% do receituário médico nos países industrializados, sendo que 50% dos medicamentos utilizados são de origem sintética e os 25% restantes referem-se às outras fontes de produtos naturais (minerais, microbianos, entre outros) (CARVALHO, 2001; RATES, 2001; GUERRA & NODARI, 2003).

1.1.1. *Candida* sp.

Leveduras do gênero *Candida* são responsáveis pela colonização, por infecções fúngicas superficiais em imunocompetentes e por infecções sistêmicas em imunodeprimidos. A variedade de apresentações da doença leva à necessidade de utilização de diferentes métodos de diagnósticos e esquemas terapêuticos (REX *et alii*, 2000). Estas infecções receberam destaque nos últimos anos devido ao aumento de pacientes imunodeprimidos (CLEFF *et alii*, 2007).

Candida albicans, constituinte da microbiota normal da pele e mucosas de animais e humanos, pode se tornar patógeno oportunista de regiões mucocutâneas, trato digestivo e genital, além de envolver pele, unhas e trato respiratório com riscos de desencadear fungemias (FERREIRO *et alii*, 2002).

Em medicina humana, o gênero *Candida* possui uma enorme relevância, principalmente em ambientes de Unidades de Tratamentos Intensivos (UTIs) (BARROS *et alii*, 2007). *Candida albicans* é o patógeno mais comum nas candidíases cutâneas e da orofaringe, porém as espécies não *albicans* têm aumentado em número e em importância nas candidíases vaginal e sistêmica (REX *et alii*, 2000).

Em veterinária, os relatos de casos envolvendo este agente ainda são escassos (CLEFF *et alii*, 2007), mas possuem grande importância na clínica de pequenos animais, sendo agentes causadores de infecções oportunistas.

Muitas das espécies não *albicans* mais comumente isoladas são menos susceptíveis aos derivados azólicos, dificultando o tratamento dessas infecções. Embora a susceptibilidade das leveduras do gênero *Candida* aos antifúngicos disponíveis seja variável e previsível, nem sempre uma determinada amostra isolada segue o padrão geral. Essa é uma das razões da crescente importância dos testes de susceptibilidade (CROCCO *et alii*, 2004).

1.1.2. *Cryptococcus* sp.

A criptococose é uma doença fúngica infecciosa, potencialmente fatal, associada com excrementos de pássaros (BRUMMER, 1998), podendo afetar o homem, gatos, cães, equinos e outras espécies animais (MALIK *et alii*, 1997; BEATTY *et alii*, 2000).

O agente causador da criptococose é a levedura *Cryptococcus neoformans*, um fungo patogênico oportunista, encontrado tanto no ambiente como nos animais infectados. Esse fungo apresenta na sua estrutura microbiológica uma cápsula polissacarídica que é essencial para a sua patogenicidade.

A levedura *C. neoformans* se aloja nos pulmões podendo chegar aos alvéolos e causar uma micose sistêmica (WICKES *et alii*, 1996). A criptococose, com localização inicial nos pulmões do hospedeiro pode regredir ou progredir com disseminação hematogênica para o cérebro e meninges e eventualmente para outros órgãos. Quando há disseminação para o cérebro, os indivíduos infectados frequentemente adquirem meningoencefalite, forma letal de infecção caso não seja tratada, mas que também pode ser fatal se a resposta imune mediada por célula do hospedeiro não funcionar adequadamente na presença do tratamento (MITCHELL & PERFECT, 1995).

O fungo tem peculiaridades que podem representar fontes de infecção aos humanos, tais como presença em excretas de aves e em poeira domiciliar. Sendo assim, como zoonose, *C. neoformans* pode representar um alto risco para os pacientes

imunodeprimidos, tendo em vista a exposição ambiental dos indivíduos em ambientes contaminados, especialmente com fezes de aves silvestres (PASSONI, 1998 e 1999).

O aumento populacional dos indivíduos com doenças como a síndrome da imunodeficiência adquirida (SIDA), leucêmicos, transplantados, portadores de tumores e pacientes em uso prolongado de corticóides e antibióticos tem aumentado o número de casos de criptococose (RIPPON, 1988).

Nos indivíduos imunocompetentes esta infecção frequentemente é assintomática e limitada ao pulmão. Porém, em pacientes imunodeprimidos, ocorre uma disseminação extrapulmonar para o sistema nervoso central levando a meningoencefalites. Esta doença é atualmente uma infecção incurável em pacientes com SIDA, pois a terapia existente não erradica a infecção na presença de uma supressão imune (FELDMESSER *et alii*, 2001; ZUGER *et alii*, 1986). Pouca atenção tem sido dada às defesas humanas contra *C. neoformans* var. *gatti* (KWON-CHUNG *et alii*, 1992), um sério patógeno que pode levar muitos pacientes à cegueira (LALLOO *et alii*, 1994) e que requer tratamento prolongado e agressivo (PEACHY *et alii*, 1998; MITCHELL *et alii*, 1995).

Os fatores de virulência mais importantes são a cápsula polissacarídica e o pigmento melanina que funciona como antioxidante. Este último trata-se de um pigmento marrom que contém compostos difenólicos e é secretado por vários fungos de importância médica. A capacidade de produzir este pigmento é uma característica que diferencia isolados de *C. neoformans* patogênicos dos não-patogênicos e outras espécies de *Cryptococcus* (BOSE *et alii*, 2003; CASADEVALL *et alii*, 2000; LANGFELDER *et alii*, 2003).

Várias drogas são indicadas para o tratamento de doenças em animais causadas por fungos, especialmente os derivados azólicos no tratamento de pequenos animais com criptococose (ROCHETTE *et alii.*, 2003). No entanto, é necessário o desenvolvimento de novas terapias devido à frequente pressão exercida sobre estes microrganismos no

tratamento de doenças, o que tem ocasionado o surgimento de isolados resistentes às drogas disponíveis no mercado, além disso, as infecções fúngicas têm desempenhado forte crescimento nas infecções nosocomiais em humanos (PERLROTH *et alii.*, 2007).

Assim sendo, novas tecnologias são urgentes para suprir possíveis necessidades de combate aos agentes resistentes, para tratamento de patologias causadas por *Cryptococcus neoformans*.

1.1.3. *Staphylococcus* sp.

Staphylococcus sp. são bactérias esféricas do grupo dos cocos Gram-positivos, imóveis, agrupados em massas irregulares ou em cachos de uva. Aeróbios ou anaeróbios facultativos, fermentam a glicose com produção de ácido, e nisso se diferenciam dos microrganismos do gênero *Micrococcus*, que só fermentam em aerobiose (KLOOS & BANNERMAN, 1999).

São células esféricas de cerca de 1 μm de diâmetro para os estafilococos patogênicos e são maiores e desiguais em se tratando de estafilococos ou micrococos saprófitas. As culturas jovens de certas cepas podem exibir cápsula, porém de um modo geral, consideram-se os estafilococos como acapsulados (KLOOS & BANNERMAN, 1999).

O gênero *Staphylococcus* é atualmente composto por cerca de 41 espécies, sendo algumas frequentemente associadas a uma ampla variedade de infecções de caráter oportunista, em seres humanos e animais. As principais espécies de estafilococos encontradas em seres humanos são os *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* e *Staphylococcus saprophyticus* (EUZEBY, 2010; SCHLEIFER & KROPPESTEDT, 1990).

Estão associados, principalmente com a pele e mucosas de vertebrados de sangue quente, mas isolados de produtos alimentares, pó e água. Algumas espécies são

patógenos oportunistas dos animais e do homem, onde produzem toxinas extracelulares (DEVRIESE, 1990). O *S. epidermidis* é encontrado primariamente como residente da pele, tendo um baixo potencial patogênico, assim como o *S. saprophyticus*, que faz parte da microbiota normal da região periuretral do homem e da mulher e da pele. Ao contrário, o *S. aureus* é um patógeno em potencial e pode ser encontrado na região da nasofaringe e também nas fossas nasais (SCHLEIFER & KROPPESTEDT, 1990).

A distribuição de *S. aureus* é muito ampla, visto que essa bactéria é significativamente capaz de resistir à dessecação e ao frio, podendo permanecer viável por longos períodos em partículas de poeira. Esse microrganismo pode ser encontrado no ambiente de circulação do ser humano, sendo o próprio homem seu principal reservatório, além de estar presente em diversas partes do corpo, como fossas nasais, garganta, intestinos e pele. Desses sítios anatômicos, as narinas possuem o maior índice de colonização, cuja prevalência é de cerca de 40% na população adulta, podendo ser ainda maior dentro de hospitais (CARVALHO *et alii*, 2005).

A espécie de maior interesse médico, principalmente em ambiente nosocomial, é o *S. aureus*, que está frequentemente relacionado com diversas infecções em seres humanos (CASSETARI *et alii*, 2005).

As doenças provocadas pelo *S. aureus* podem ser decorrentes da invasão direta dos tecidos, de bacteremia primária ou, exclusivamente, ser devidas às toxinas que ele produz. Essas infecções podem se localizar em um ou em múltiplos sítios, e, de acordo com a localização e outras características, recebem diferentes designações, como foliculite (infecção do folículo piloso); sico (bicho de pé); carbúnculo ou antraz; furúnculos localizados na região cervical posterior; hordeolo (terçol); hidradenite (inflamação das glândulas sudoríparas) e impetigo. Além das piogênicas, o *S. aureus* pode causar outras infecções mais graves como pneumonia, meningite, endocardite, síndrome do choque tóxico, septicemia e outras (SCHECHTER & MARANGONI, 1998; CASSETARI *et alii*, 2005).

1.1.4. *Escherichia* sp.

Os representantes de *Escherichia* sp., membros da família Enterobacteriaceae são facultativamente anaeróbicos, bastonetes Gram-negativos que podem ser móveis ou imóveis. Também são produtores de catalase (KAPER *et alii*, 2004).

Escherichia coli é considerada o principal microrganismo na casuística de infecções do trato urinário no homem e em animais (SIQUEIRA *et alii*, 2008). Também está entre as principais causas de toxinfecção alimentar, colecistite, apendicite, peritonite, meningite, infecções de feridas e septicemia (MURRAY, 2004).

A *Escherichia coli* é um habitante normal dos animais de sangue quente. Bovinos possuem 1000 *E. coli* por grama de fezes; equinos possuem 10000 *E. coli* por grama de fezes. Carnívoros possuem maior abundância de *E. coli* do que herbívoros. Essa bactéria é procurada no exame bacteriológico da água e sua presença indica contaminação fecal (VILLARROEL *et alii*, 2002).

As cepas patogênicas de *Escherichia coli* são associadas com doença no intestino (enterite) e com fulminantes septicemias do recém nascido ou animais jovens e com a doença no trato respiratório de aves. Segundo Franco (1983) as cepas de *Escherichia coli* que causam enterites são classificadas como:

- ETEC (enterotoxigenic): cepas que produzem enterotoxinas.
- EPEC (enteropathogenic): cepas de *E. coli* que não produzem toxinas, causam enterites através de mecanismos desconhecidos.
- EIEC (enteroinvasive): cepas que invadem enterócitos e profundas camadas da mucosa do intestino causando diarreia.
- AEEC (attaching and effacing): cepas de *E.coli* que colonizam o intestino produzindo toxinas *shigalike* e destroem a camada microvilosa através de meios desconhecidos.

Normalmente cepas não patogênicas também podem causar infecções oportunistas no úbere, útero e outros lugares do organismo. A doença depende de vários fatores para ocorrer. Um fator crítico é o estado imune do animal recém nascido. Se o animal não recebe uma quantidade adequada de imunoglobulinas, através do colostro com os anticorpos específicos, estes animais têm uma maior chance de serem susceptíveis a *E. coli* que causará enterite ou septicemia. Circunstâncias como frio, constituição fraca ou o animal não ter uma exposição à cepa de *E. coli* de uma forma indireta pode predispor o animal à colibacilose.

1.2. Atividade frente a células tumorais humanas

1.2.1 Câncer

O câncer é uma doença que tem por característica o crescimento desordenado e difuso de células anormais, causado por diversos fatores, externos (químicos, tabaco, radiações e infecções por microrganismos) e internos (mutações que podem ocorrer durante o metabolismo, mutações herdadas, hormônios e condições imunológicas). Fatores como esses promovem o início da carcinogênese atuando juntos ou em sequência (COTRAN *et alii*, 2000).

De todos os cânceres, aproximadamente 5% são hereditários, conferindo alto risco de desenvolvimento de um ou mais tipos específicos de câncer. Contudo, a maior parte dos cânceres não é proveniente de genes hereditários mutados, mas sim de genes que sofreram mutação durante o tempo de vida de um indivíduo, ou seja, mutações ocorridas em células somáticas (COTRAN *et alii*, 2000).

Originado devido ao mau funcionamento de vários sistemas de controle de uma célula o câncer é um processo complexo envolvendo geralmente mais de uma alteração genética (DIRKS & RUTKA, 1997; SOMPAYRAC, 2004). Sem a ação adequada dos sistemas de controle, a célula mutante sofre uma proliferação anormal que leva à

formação de uma população de células tumorais que crescem ativamente. A progressão do tumor continua com mutações adicionais que ocorrem nas células em proliferação. Essas mutações podem ter uma variedade de efeito nas células, mas eventualmente resultam em um crescimento ainda mais acelerado (COOPER, 1993).

No processo de progressão tumoral, algumas células do tumor primário podem perder a capacidade de adesão, invadir a membrana basal do tecido de origem por meio da produção de enzimas proteolíticas, atravessar a parede dos vasos sanguíneos, cair na circulação e formar áreas de proliferação em outros tecidos. Esse processo é denominado metástase (BRENTANI *et alii*, 2003).

O sistema imunológico muitas vezes não reconhece as células tumorais como sendo uma perigosa ameaça que deve ser eliminada, pois essas células, mesmo transformadas, ainda possuem um fenótipo muito similar aos das células normais. Dessa forma, as células tumorais acabam por induzir tolerância imunológica através de diversos mecanismos, o que impede o organismo de produzir uma resposta imune eficaz contra o tumor, permitindo assim, que a massa de células transformadas cresça sem nenhum controle imunológico efetivo (MAPARA & SYKES, 2004).

Os diversos cânceres são classificados de acordo com o tecido e tipo de célula dos quais se originam. Cânceres originados de células epiteliais são denominados carcinomas; aqueles originados a partir de tecidos conjuntivos ou células musculares são denominados sarcomas. Os que não se encaixam em nenhuma dessas categorias incluem os vários tipos de leucemia, derivados de células hematopoiéticas, e os derivados de células do sistema nervoso. Aproximadamente 90% dos cânceres humanos são carcinomas, talvez porque a maioria das células em proliferação no corpo se encontra no epitélio, ou porque os tecidos epiteliais são mais expostos às várias formas de danos físicos e químicos que favorecem o desenvolvimento (ALBERT *et alii*, 2002).

1.2.2. Mecanismos de morte celular

1.2.2.1. Necrose

Os mecanismos de morte celular são divididos em apoptose e necrose. A necrose é o mecanismo pelo qual as células morrem de modo não-fisiológico, promovendo lesões tissulares e a sintomatologia de várias doenças. A morte é patológica ou "acidental" quando a célula é impedida de manter seus processos vitais por lesões físicas ou químicas causadas por fatores externos, como temperaturas extremas, radiação, traumas, produtos tóxicos e falta de oxigênio, como no infarto do miocárdio e na gangrena (ALBERT *et alii*, 1997; JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2000).

As lesões podem ter ainda origem biológica, como nas infecções por bactérias ou vírus. Esse tipo de morte celular foi a única conhecida pelos cientistas mais antigos. Ela é morfológicamente caracterizada por um inchaço celular e de organelas do citoplasma, em particular as mitocôndrias, danificadas, mas o núcleo não sofre alterações significativas. Tais lesões impedem o controle do equilíbrio interno: a água e alguns íons (em especial sódio e cálcio), normalmente bombeados para fora, fluem livremente para dentro da célula, que incha e se rompe. A ruptura libera no tecido vizinho o conteúdo celular, rico em proteases e outras substâncias tóxicas. Além da toxicidade direta para as células vizinhas, o derrame gera substâncias que atraem células do sistema imune, causando intensa reação inflamatória: alguns tipos de glóbulos brancos convergem para o tecido em necrose e fagocitam as células mortas (KANDUC *et alii*, 2002).

A inflamação, típica da necrose, é importante para limitar infecções e remover restos de células, mas a atividade e as secreções dos glóbulos brancos podem também danificar tecidos normais vizinhos, às vezes de maneira devastadora (KANDUC *et alii*, 2002).

1.2.2.2. Apoptose

Aproximadamente 60 bilhões de células são produzidas por dia, logo, um número igual de células devem morrer através da apoptose para manter a homeostase no organismo. Não é surpreendente que a desregulação do processo apoptótico possa culminar em um acúmulo de células imortais contribuindo para o desenvolvimento de tumores (COTTER, 2009).

A apoptose é uma via multipasso altamente regulada que é responsável não só pela morte de células em organismos em desenvolvimento como também pelo controle do número de células em organismos multicelulares adultos. Este processo pode ser ativado em resposta a estímulos específicos ou a várias formas de injúria celular ou estresse (HANNUN, 1996; COTTER, 2009).

Segundo Cotter (2009), a morte celular por apoptose é caracterizada pelo encolhimento da célula, condensação da cromatina, e fragmentação do núcleo. Estas características resultam na formação dos corpos apoptóticos que são engolfados pelas células fagocíticas vizinhas. Distinguindo-se, assim da morte por necrose pela ausência de uma resposta inflamatória.

Por muitos anos a ação de drogas quimioterápicas foi relacionada somente à habilidade destas em induzir dano genotóxico. Durante a década passada, no entanto, evidências acumuladas, mostraram que agentes quimioterapêuticos podem induzir morte celular por apoptose. A morte de células tumorais por indução de apoptose é agora reconhecida como tendo um papel estratégico na identificação de drogas anticâncer (SUBHASHINI *et alii*, 2005).

1.2.3. Estimativas do câncer no mundo e no Brasil

Embora a incidência de alguns cânceres seja comparável em todo mundo, muitos variam dramaticamente por país. Diferenças de hereditariedade ou ambientais podem explicar bem essas variações; estudos epidemiológicos mostraram que o ambiente é o determinante dominante das variações entre países na incidência do câncer (WEINBERG, 2008).

Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS) o número de mortes por câncer no mundo está projetado para aumentar 45% de 2007 a 2030 (de 7,9 milhões a 11,5 de milhões de mortes), isso será influenciado em parte pelo aumento da expectativa de vida e aumento da população mundial. A elevação calculada leva em consideração ligeiros declínios no índice de mortalidade em países desenvolvidos. São calculados novos casos de câncer no mesmo período para saltar de 11,3 milhões em 2007 para 15,5 milhões em 2030. Devido ao aumento do número de mortes e novos casos, estimativas apontam o câncer como a principal causa de morte mundial para o ano de 2030 (WHO, 2010).

No Brasil, de acordo com o Instituto Nacional do Câncer (Inca), as estimativas para o ano de 2010, apontam que ocorrerão 479.270 casos novos de câncer. Os tipos mais incidentes, à exceção do câncer de pele do tipo não melanoma, serão os cânceres de próstata e de pulmão, no sexo masculino, e os cânceres de mama e de colo do útero, no sexo feminino, acompanhando o mesmo perfil da magnitude observada no mundo. Estima-se que o câncer de pele do tipo não melanoma (113.850 casos novos) será o mais incidente na população brasileira, seguido pelos tumores de próstata (52.350), de mama feminina (49.240), de pulmão (27.630), de cólon e reto (28.110), de estômago (21.500) e de colo do útero (18.430) (INCA, 2010).

1.2.4. Diterpenos como drogas antitumorais

A descoberta de drogas a partir de plantas medicinais possui um importante papel no tratamento do câncer e, de fato, muitas das novas aplicações clínicas de metabólitos secundários oriundos de plantas e seus derivados têm sido direcionados no combate ao câncer (NEWMAN *et alii*, 2003).

Substâncias bioativas de origem vegetal, originadas do metabolismo secundário em plantas ou derivadas destes, têm se destacado na prevenção e tratamento do câncer. A importância de compostos naturais no tratamento do câncer pode ser observada pela porcentagem relativa dessa classe de drogas em relação aos demais tipos existentes. Dados da literatura revelam que de todas as drogas antitumorais disponíveis entre 1940 e 2002, aproximadamente 40% eram originadas de produtos naturais, enquanto que outros 8% eram moléculas derivadas de compostos naturais (NEWMAN *et alii*, 2003; BUTLER, 2004).

O paclitaxel (Taxol®), um diterpenóide polioxigenado, foi isolado da casca de *taxus brevifolia* (taxaceae) durante um extensivo programa de *screening* por agentes antineoplásicos em materiais vegetais (WANI *et alii*, 1971). A pesquisa mostrou resultados promissores em cânceres de pulmão, ovário, mama e carcinomas de células escamosas de cabeça e pescoço, e foi aprovado pela FDA (Food and Drugs Administration) para tratamento de metástase de carcinoma de ovário.

Woerdenbag e colaboradores (1996) isolaram dois diterpenos *ent*-cauranos da erva chinesa *Pteris multifida*, conhecida pelas suas propriedades citotóxicas. Este estudo relatou a moderada atividade citotóxica das duas substâncias usando o ensaio com MTT contra o tumor ascítico de Ehrlich.

Fatope e colaboradores, em 1996, mostraram que diterpenos com esqueleto *ent*-caurano extraídos da espécie *Annona senegalensis* apresentam atividade citotóxica frente a células tumorais como MCF-7 (câncer de mama) e PC-3 (câncer de próstata).

O gênero *Tripterygium* tem sido utilizado na tradicional medicina chinesa para tratamento de câncer e como inseticida por milhares de anos. Foram encontrados na espécie *Tripterygium doianum* (Celastraceae) cinco diterpenos do tipo caurano com atividade moderada na inibição da replicação das linhagens de câncer de mama A549b e MCF-7 (TANAKA *et alii*, 2004).

O diterpeno *ent*-16 β -17 α -diidroxicaurano extraído da espécie *Croton malambo* utilizado na medicina popular da Venezuela, também demonstrou possuir efeito inibitório no crescimento de células MCF-7 (MORALES *et alii*, 2005). Ge e colaboradores (2008) isolaram dois diterpenos do tipo caurano na espécie *Pteris multifida* que apresentaram citotoxicidade frente a linhagem tumoral HepG2 com IC₅₀ avaliada em menos de 10 μ M.

Baseados na evidência de diversos trabalhos que comprovam a potencial atividade biológica de extratos e substâncias puras obtidas a partir de *Hymenaea* sp. contra fungos, bactérias e células tumorais e na necessidade cada vez maior de estudos relacionados com o desenvolvimento de novos produtos para serem utilizados como fármacos, as substâncias isoladas e derivatizadas do epicarpo de *Hymenaea stigonocarpa* foram submetidas a ensaios biológicos.

2. OBJETIVOS

2.1. Gerais

Esta parte do trabalho teve como um dos objetivos a avaliação da potencial atividade antimicrobiana de substâncias isoladas e derivatizadas do epicarpo de *Hymenaea stigonocarpa* sobre os fungos *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans* e contra as bactérias *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*.

Objetivou-se também a avaliação *in vitro* da atividade citotóxica de substâncias extraídas do epicarpo de *Hymenaea stigonocarpa* frente a linhagens tumorais humanas (U937, Colo 205 e H460) e murina (Raw 264.7) bem como a avaliação da inibição da produção de monóxido de nitrogênio em células Raw 264.7 estimuladas com lipopolissacarídeo bacteriano.

2.2. Específicos

Avaliar o efeito *in vitro* das substâncias sobre os fungos *Candida albicans* (ATCC 11006 e ATCC10231) e *Cryptococcus neoformans* (ATCC 56990);

Avaliar o efeito *in vitro* das substâncias sobre as bactérias *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) e *Escherichia coli* (ATCC 33922);

Avaliar os efeitos das substâncias na viabilidade celular;

Avaliar a indução de apoptose mediada pelas substâncias nas células de origem tumoral;

Avaliar a liberação da enzima desidrogenase láctica pelas células após incubação com as substâncias;

Avaliar a inibição da produção de monóxido de nitrogênio pelos compostos em células Raw 264.7 estimuladas com Lipopolissacarídeo bacteriano (LPS).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Avaliação da atividade antimicrobiana das substâncias isoladas e derivatizadas do epicarpo de *Hymenaea stigonocarpa*

O crescente número de microrganismos resistentes aos antimicrobianos, assim como os efeitos indesejáveis de alguns medicamentos, faz com que a busca por novos agentes antimicrobianos se torne uma importante estratégia no estabelecimento de terapias alternativas para o tratamento de infecções bacterianas e fúngicas (MACHADO *et alii*, 2003; PEREIRA *et alii*, 2006).

Alguns trabalhos com o gênero *Hymenaea* já comprovam o seu potencial biológico antimicrobiano. Fernandes e colaboradores (2005) avaliaram *in vitro* a atividade antimicrobiana do extrato de *Hymenaea courbaril*. Os extratos apresentaram atividade na concentração de 2,5 mg.mL⁻¹ inibindo 54% do crescimento de *Staphylococcus* sp. Em outro trabalho, foi comprovada a atividade contra *Staphylococcus aureus* do extrato clorofórmico das folhas de *Hymenaea stigonocarpa* (NOVAIS *et alii*, 2003). Arrhenius e Langenheim (1983) verificaram o efeito inibitório da resina da folha de *Hymenaea courbaril* contra o fungo *Pestalotia subcuticularis*.

Para as espécies de *Hymenaea* alguns trabalhos fitoquímicos revelam que os principais constituintes das resinas e dos extratos do tronco e da casca do fruto são predominantemente substâncias diterpênicas acompanhados em menor quantidade por alguns sesquiterpenos (MARTIN & LANGENHEIM, 1972, LEE & LANGENHEIM, 1975; LANGENHEIM *et alii*, 1977, LANGENHEIM & STUBBLEBINE, 1983)

Segundo Lee e Langenheim (1975), a resina de *Hymenaea* é rica em terpenos, metabólitos secundários que apresentam características lipofílicas e, provavelmente, por este motivo, os terpenos consigam, uma vez em contato com a membrana, causar sua expansão, aumento da fluidez ou desordem da sua estrutura, além de inibir as enzimas ali presentes. De acordo com Sikkema e colaboradores (1995), estes efeitos podem ser os responsáveis pela já comprovada atividade antimicrobiana de alguns terpenos.

Em vista disso, as substâncias naturais **15, 29, 30, 31, 32, 33, 37, 38, 39** e **6a** isoladas do epicarpo de *Hymenaea stigonocarpa* e as derivatizadas **40, 41, 42** e **43** (**Figura 1**) foram avaliadas contra microrganismos de importância humana e veterinária: fungos *Candida albicans* (ATCC 11006 e ATCC10231) e *Cryptococcus neoformans* (ATCC 56990), bactérias *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) e *Escherichia coli* (ATCC 33922).

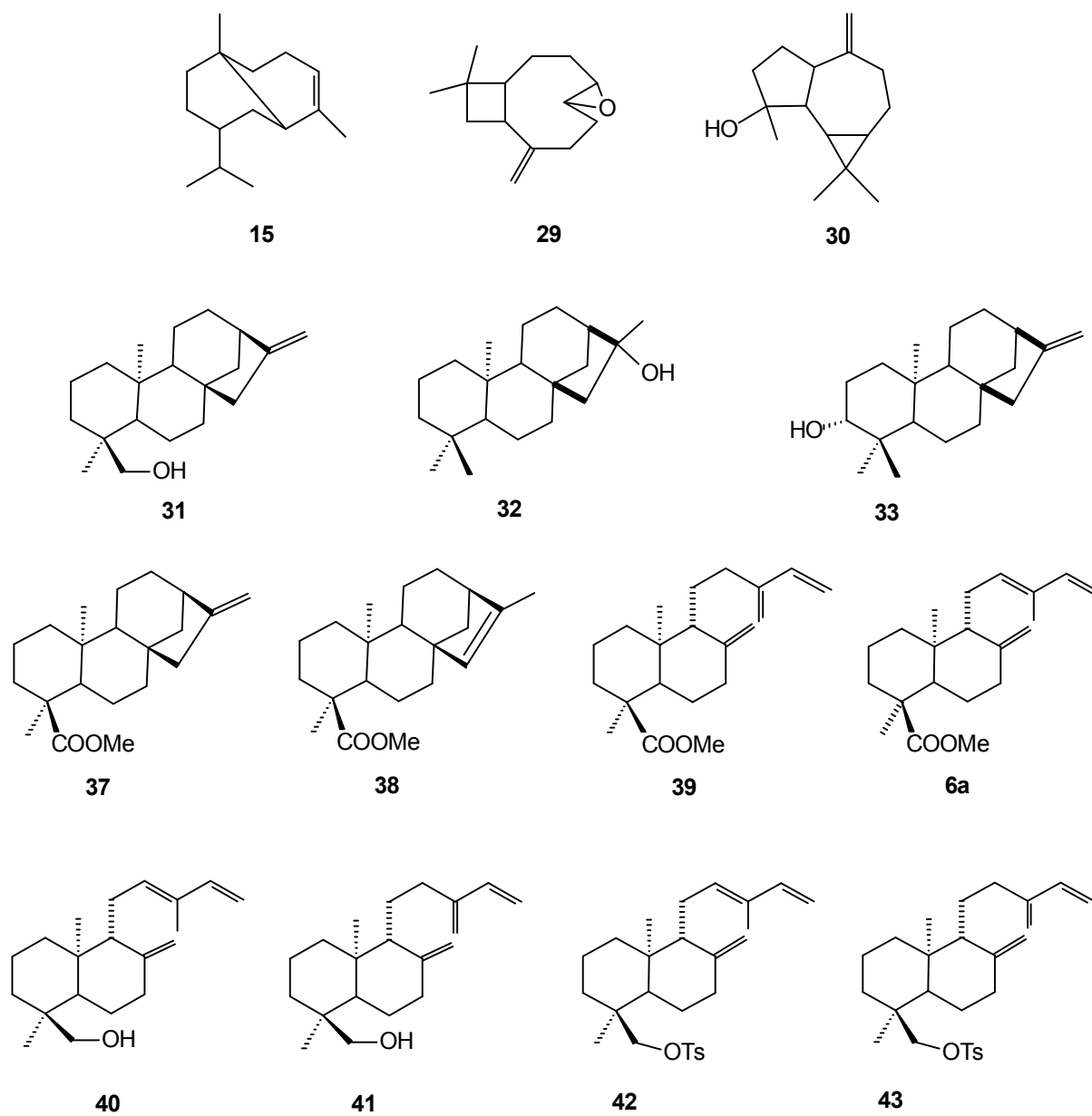


Figura 1 - Substâncias isoladas e derivatizadas do epicarpo de *Hymenaea stigonocarpa* utilizadas nos ensaios antimicrobianos.

As substâncias foram testadas em diferentes concentrações de acordo com a **Tabela 1**.

Tabela 1 - Concentrações das substâncias utilizadas nos ensaios antimicrobianos.

Substância	Concentração (mM)	Substância	Concentração (mM)
15	122	38	79
29	114	39	79
30	114	6a	79
31	87	40	87
32	86	41	87
33	87	42	56
37	79	43	56
Gentamicina	21	Itraconazol	0,07

Os ensaios de inibição do crescimento em meio líquido com os microrganismos *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans*, *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* foram realizados de acordo com a **Figura 2**.

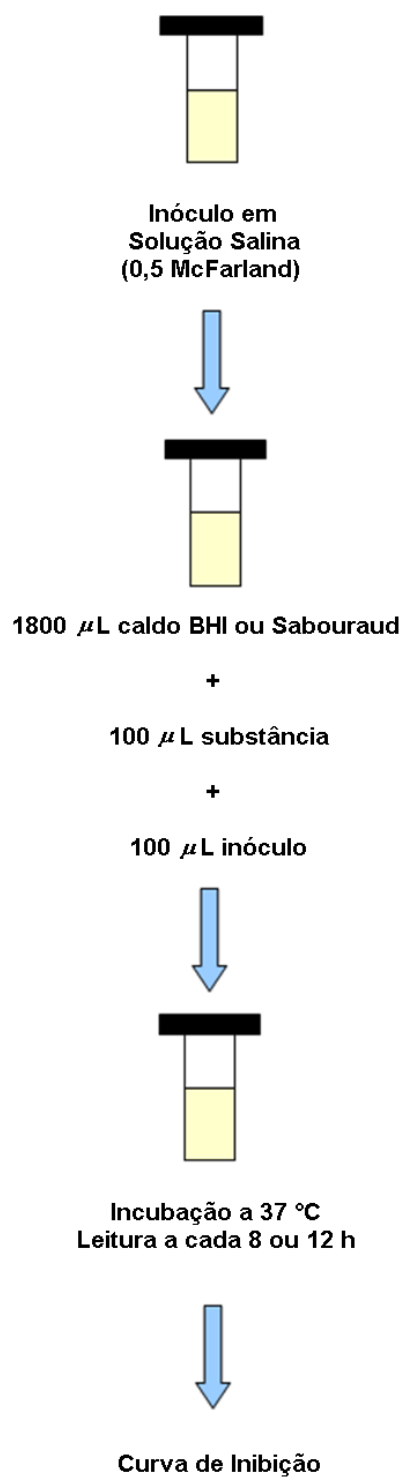


Figura 2 – Metodologia utilizada para os ensaios biológicos de incubação em meio líquido.

3.1.1. Ensaios de inibição do crescimento em meio líquido com *Candida albicans*

As suscetibilidades de *Candida Albicans* ATCC 11006 e ATCC 10231 às substâncias isoladas e derivatizadas de *Hymenaea stigonocarpa* utilizadas nestes bioensaios, estão listadas nas **Figuras 3 - 10**.

3.1.1.1. *Candida albicans* ATCC 11006

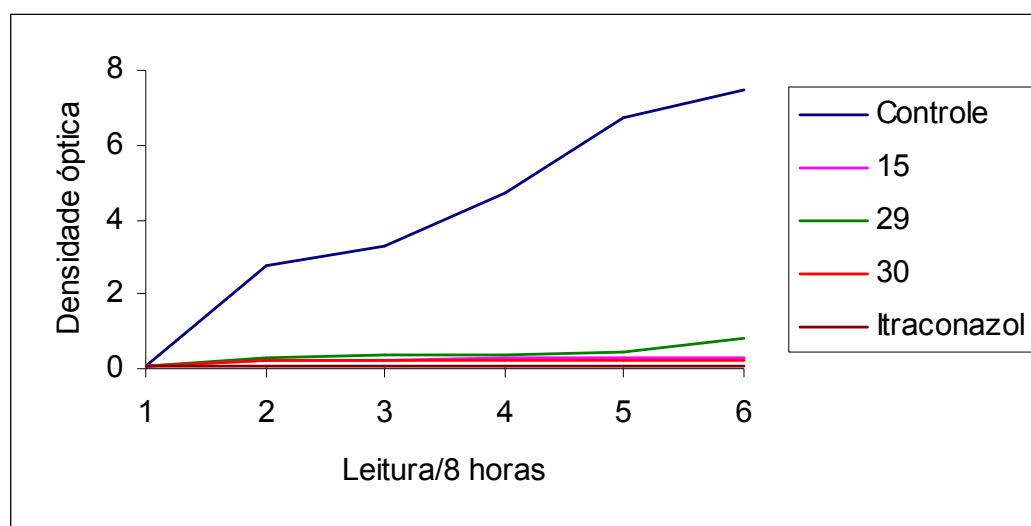


Figura 3 – Efeito das substâncias **15** (122 mM), **29** (114 mM), **30** (114 mM) e Itraconazol (0,07 mM) sobre o crescimento de *Candida albicans* ATCC 11006.

Na **Figura 3** observa-se que as três substâncias testadas **15**, **29** e **30** apresentaram efeito inibitório sobre o crescimento de *C. albicans* ATCC 11006 durante todo o experimento (48h) muito semelhante ao antifúngico itraconazol utilizado como controle positivo nos ensaios com os fungos.

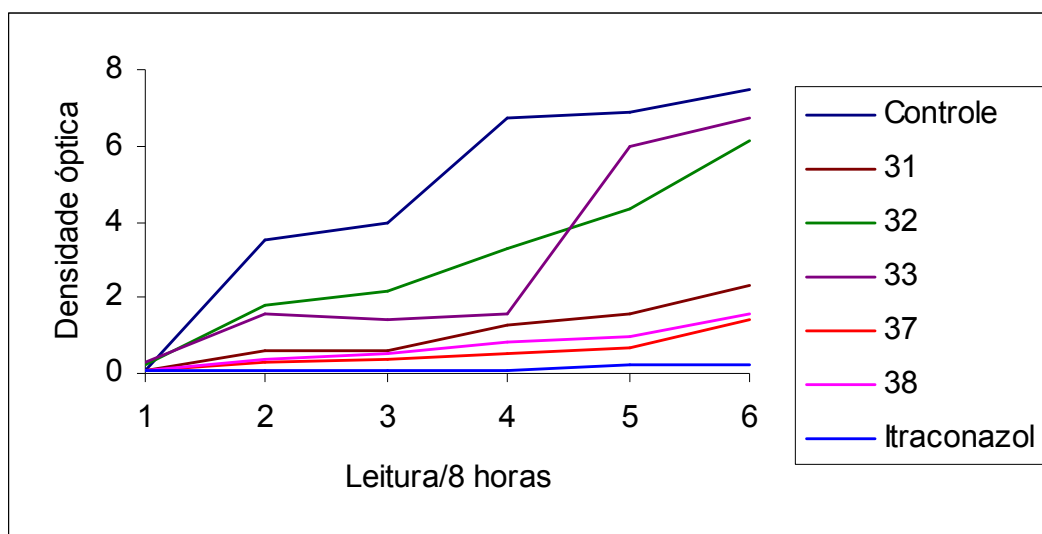


Figura 4 – Efeito das substâncias **31** (87 mM), **32** (86 mM), **33** (87 mM), **37** (79 mM), **38** (79 mM) e Itraconazol (0,07 mM) sobre o crescimento de *Candida albicans* ATCC 11006.

A **Figura 4** mostra que de uma forma geral ocorreu uma diminuição da densidade óptica causada por todas as substâncias testadas sobre o crescimento de *Candida albicans* ATCC 11006. No entanto, as substâncias **31**, **38** e, principalmente, a **37** foram as mais ativas.

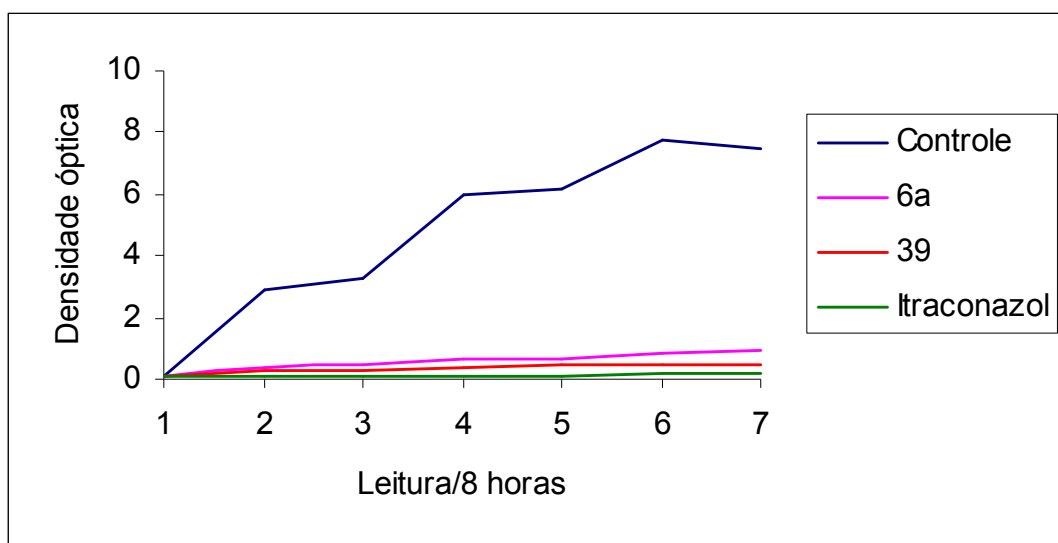


Figura 5 – Efeito das substâncias **6a** (79 mM), **39** (79 mM) e Itraconazol (0,07 mM) sobre o crescimento de *Candida albicans* ATCC 11006.

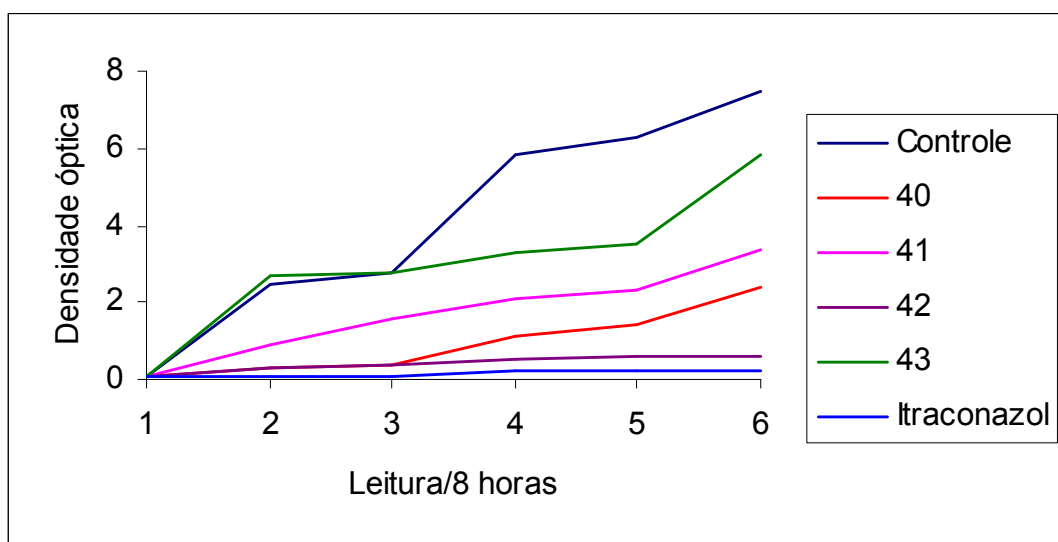


Figura 6 – Efeito das substâncias **40** (87 mM), **41** (87 mM), **42** (56 mM), **43** (56 mM) e Itraconazol (0,07 mM) sobre o crescimento de *Candida albicans* ATCC 11006.

A espécie *Candida albicans* (ATCC11006) teve seu crescimento fortemente inibido pelos ésteres isoozato **39**, ozato de metila **6a** e pelo tosilato **42**, como pode ser constatado pelos gráficos representados nas **Figuras 5 e 6**. Os álcoois **40** e **41** apresentaram efeito inibitório enquanto o tosilato **43** apresentou efeito moderado.

3.1.1.2. *Candida albicans* ATCC 10231

Os resultados dos ensaios com *C. albicans* ATCC 10231 mostram esta levedura mais resistente ao efeito das substâncias avaliadas como pode ser verificado nas **Figuras 7, 8, 9 e 10**. Os sesquiterpenos **15** e **30** apresentaram expressiva atividade de inibição.

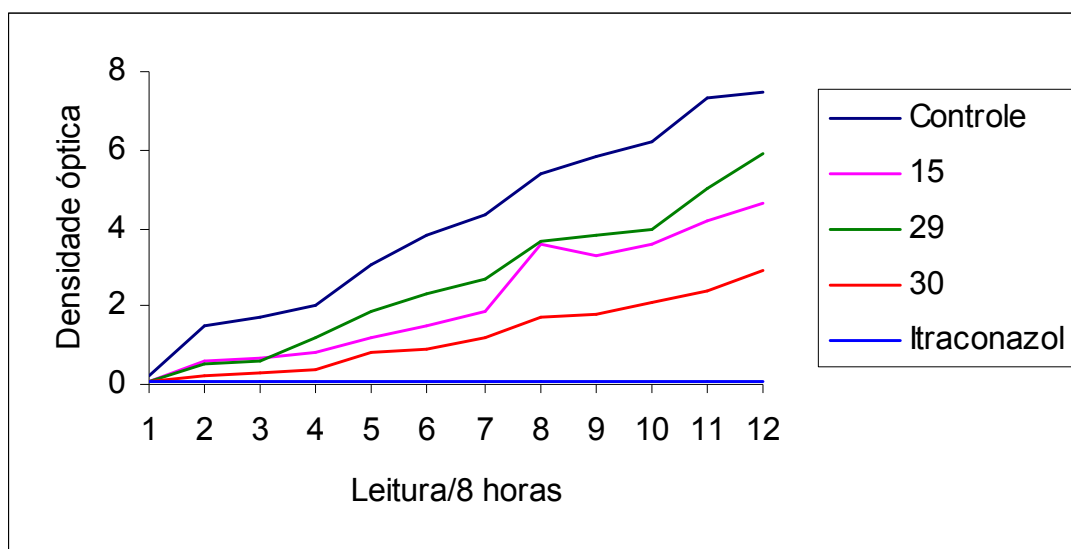


Figura 7 – Efeito das substâncias **15** (122 mM), **29** (114 mM), **30** (114 mM) e Itraconazol (0,07 mM) sobre o crescimento de *Candida albicans* ATCC 10231.

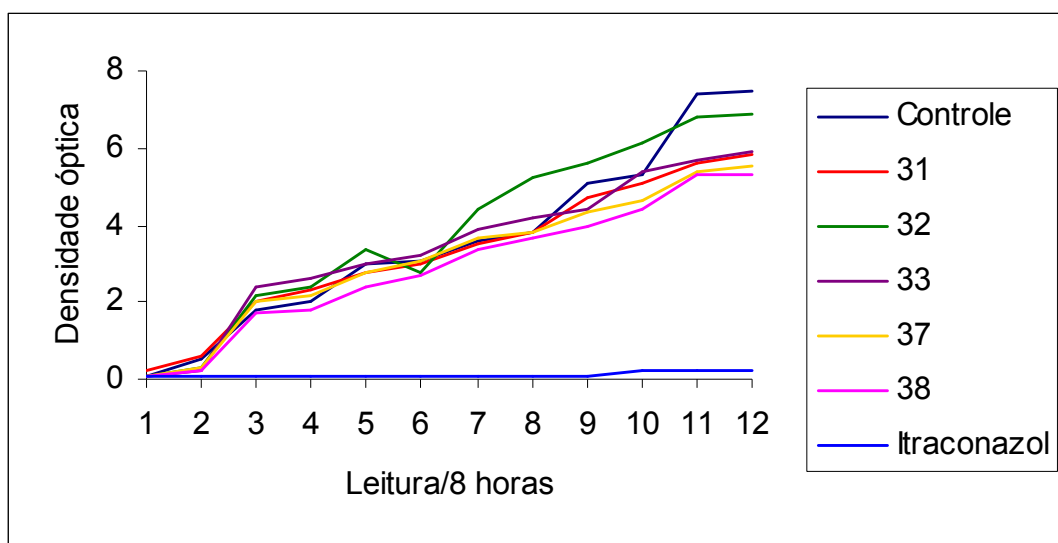


Figura 8 – Efeito das substâncias **31** (87 mM), **32** (86 mM), **33** (87 mM), **37** (79 mM), **38** (79 mM) e Itraconazol (0,07 mM) sobre o crescimento de *Candida albicans* ATCC 10231.

Observa-se também uma moderada diminuição da densidade óptica para os diterpenos **6a**, **40** e **41** e uma leve inibição causada pela substância **43**. Observa-se também um início de inibição do crescimento de *C. albicans* para as substâncias **33**, **31**, **37** e **38** após longo contato com os fungos.

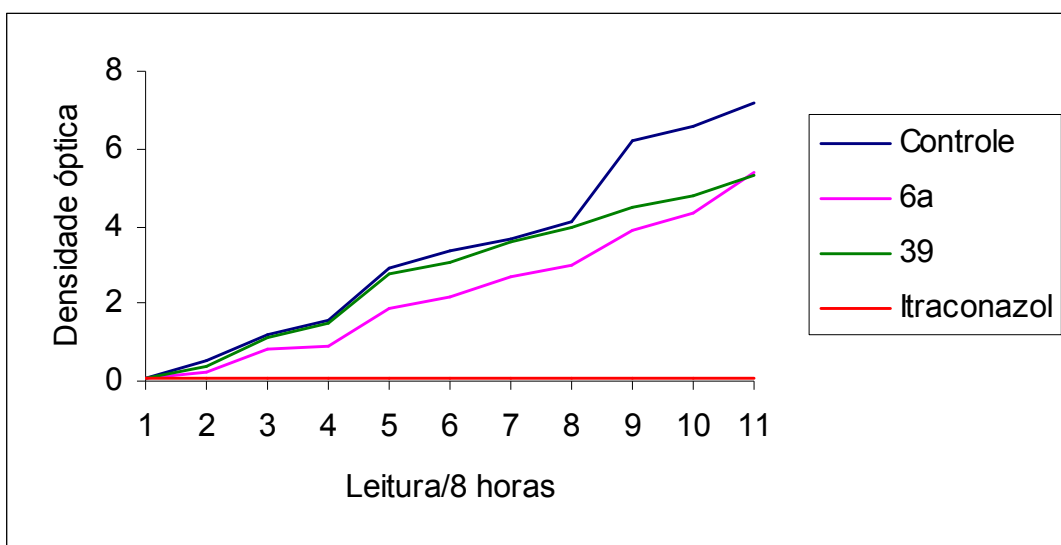


Figura 9 – Efeito das substâncias **6a** (79 mM), **39** (79 mM) e Itraconazol (0,07 mM) sobre o crescimento de *Candida albicans* ATCC 10231.

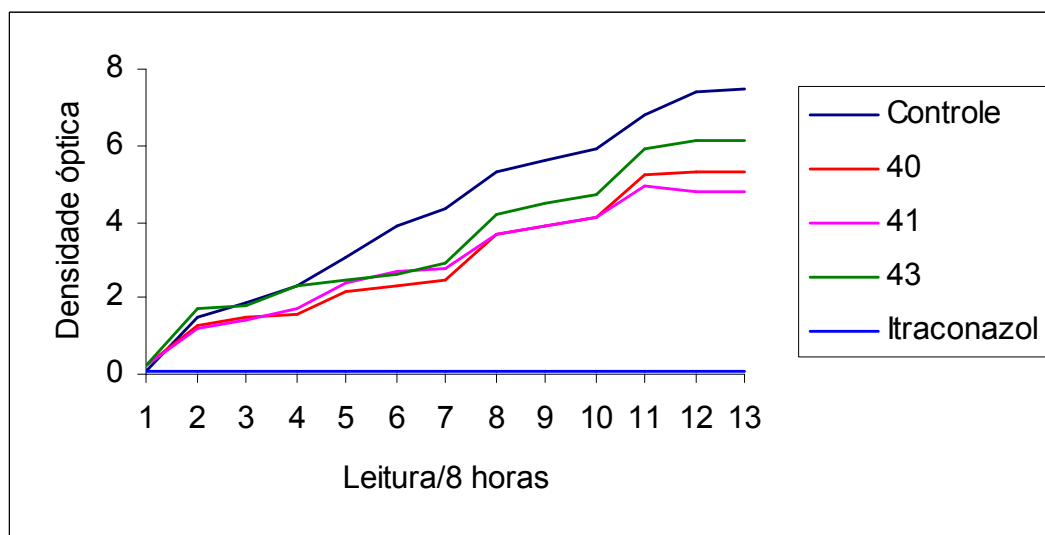


Figura 10 – Efeito das substâncias **40** (87 mM), **41** (87 mM), **43** (56 mM) e Itraconazol (0,07 mM) sobre o crescimento de *Candida albicans* ATCC 10231.

As ATCCs de *Candida albicans* utilizadas apresentaram-se sensíveis às 14 substâncias testadas. Em nosso estudo, a maior frequência de inibição para a *C. albicans* ATCC 11006 foi observada para as substâncias **6a, 15, 29, 30, 31, 37, 38, 39, 40, 41 e 43**. Para a *C. albicans* ATCC 10231 as substâncias que apresentaram maior inibição foram **6a, 15, 30, 39, 40 e 41**.

A análise dos resultados da ação das substâncias frente às diferentes ATCCs de *Candida* sp. (ATCC 11006 e ATCC 10231), revelou diferenças entre os dois ensaios, sendo que os melhores resultados foram observados para *C. albicans* ATCC 11006.

Estes resultados se mostram muito relevantes, uma vez que, segundo Sant'Ana e colaboradores (2002), *C. albicans* apresenta baixa susceptibilidade aos antifúngicos convencionais. E de acordo com o trabalho de Fernandes e colaboradores (2005), o extrato de *Hymenaea courbaril* não foi ativo contra *C. albicans*. No entanto, neste trabalho, como foram usadas substâncias puras, uma hipótese aceitável para a diferença desses resultados, seria a de que os princípios ativos estariam diluídos ou sofreriam efeito antagonista entre as substâncias presentes na mistura do extrato.

3.1.2. Ensaio de inibição do crescimento em meio líquido com *Cryptococcus neoformans*

Neste experimento foram testadas as substâncias isoladas de *H. stigonocarpa* na avaliação da atividade citotóxica contra *C. neoformans* ATCC 56990. Foram obtidas as seguintes curvas de crescimento representadas nas figuras a seguir (**Figuras 11 – 15**).

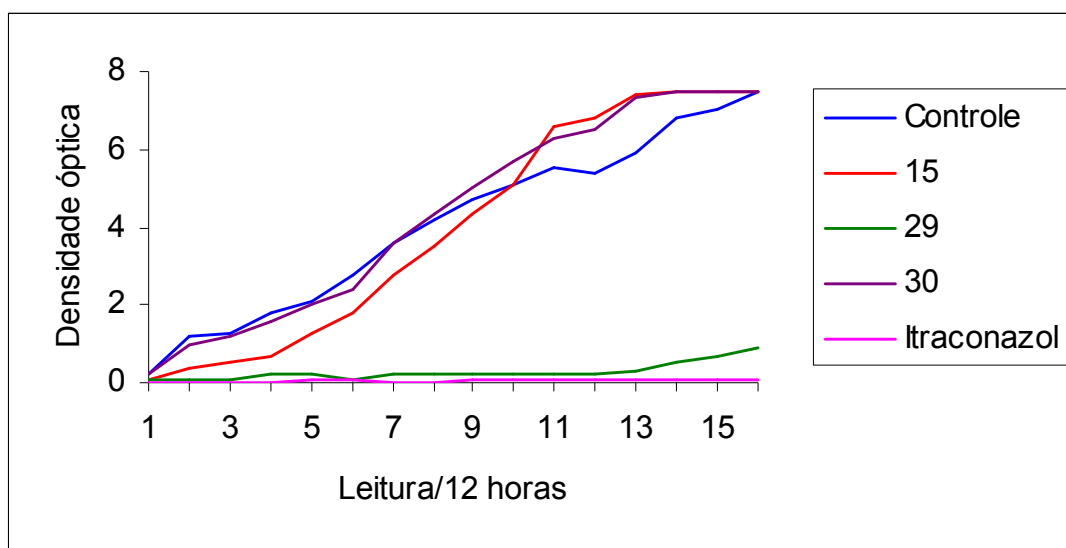


Figura 11 – Efeito das substâncias **15** (122 mM), **29** (114 mM), **30** (114 mM) e Itraconazol (0,07 mM) sobre o crescimento de *Cryptococcus neoformans* ATCC 56990.

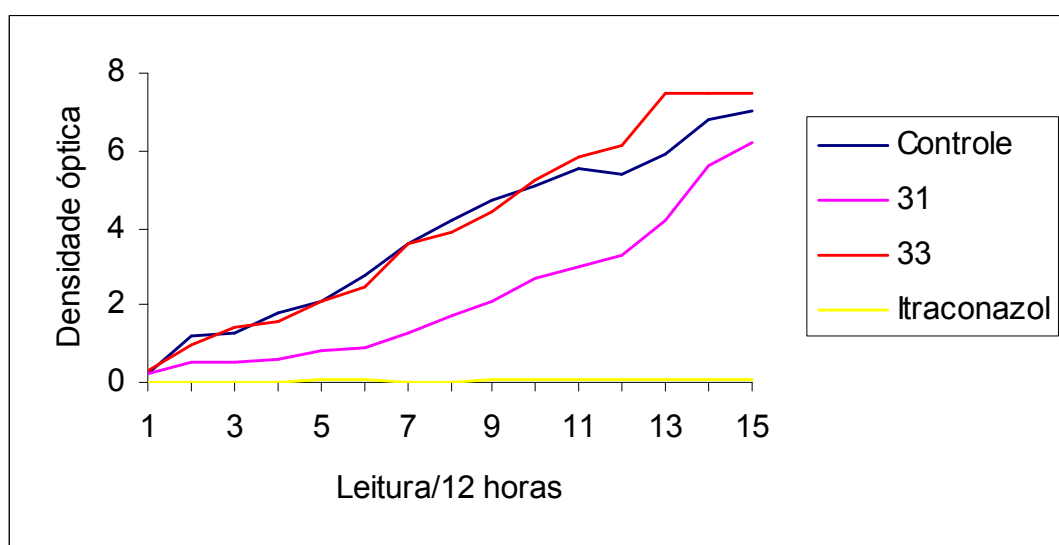


Figura 12 – Efeito das substâncias **31** (87 mM), **33** (87 mM) e Itraconazol (0,07 mM) sobre o crescimento de *Cryptococcus neoformans* ATCC 56990.

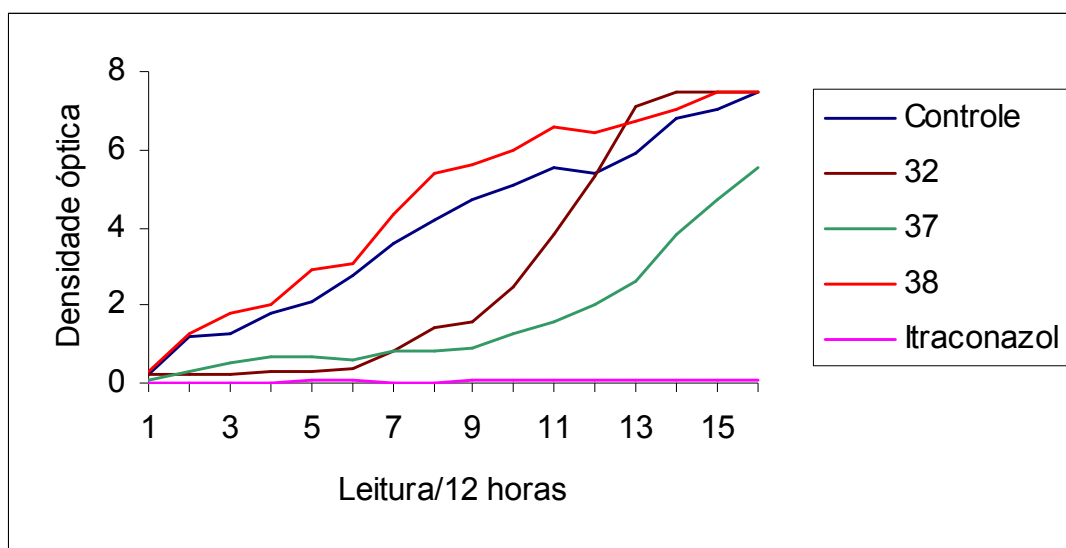


Figura 13 – Efeito das substâncias **32** (86 mM), **37** (79 mM), **38** (79 mM) e Itraconazol (0,07 mM) sobre o crescimento de *Cryptococcus neoformans* ATCC 56990.

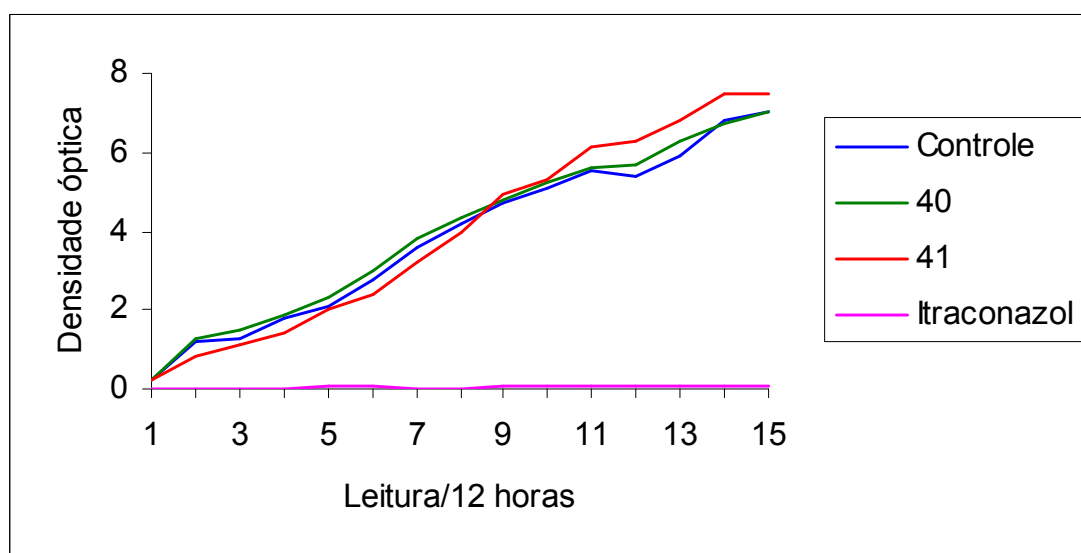


Figura 14 – Efeito das substâncias **40** (87 mM), **41** (87 mM) e Itraconazol (0,07 mM) sobre o crescimento de *Cryptococcus neoformans* ATCC 56990.

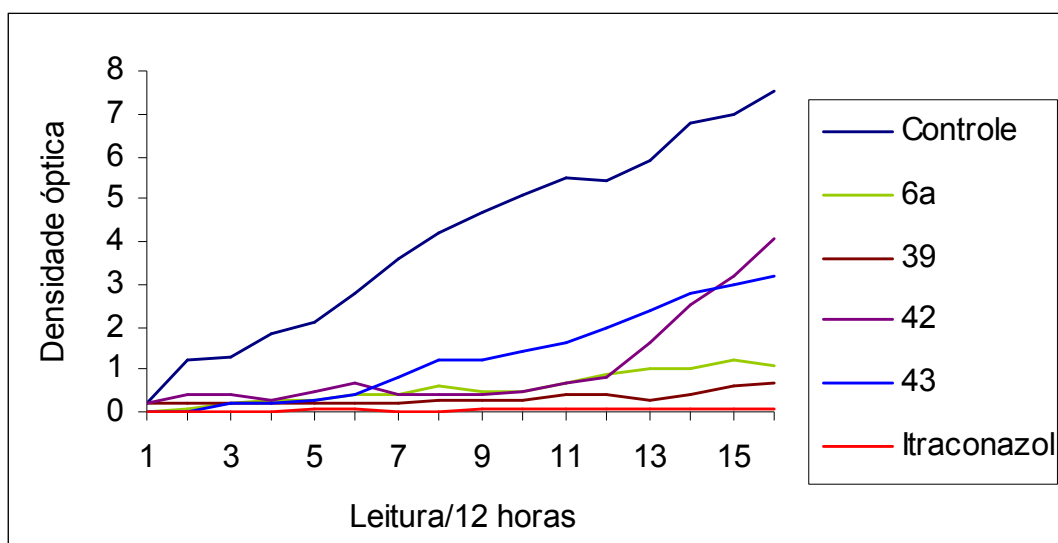


Figura 15 – Efeito das substâncias **6a** (79 mM), **39** (79 mM), **42** (56 mM), **43** (56 mM) e Itraconazol (0,07 mM) sobre o crescimento de *Cryptococcus neoformans* ATCC 56990.

Observou-se que o álcool caurênico **31** e **37** causou pequena inibição no crescimento de *C. neoformans*. As substâncias **6a**, **39**, **42** e **43** se mostraram muito ativos e apenas o sesquiterpeno óxido de cariofileno **29** apresentou a maior porcentagem de inibição. Este resultado já era esperado visto que diversos trabalhos da literatura já comprovam a atividade antimicrobiana deste sesquiterpeno (HUBBEL *et alii*, 2003; POTZERNHEIM *et alii*, 2006).

Após uma semana de incubação em meio sólido a 37 °C, as alíquotas coletadas dos tratamentos após os testes, foram avaliadas quanto ao grau de inibição das células leveduriformes de *C. neoformans*. Quanto à atividade fungicida e/ou fungistática das substâncias, os resultados estão expostos na **Tabela 2**.

Tabela 2 – Avaliação das células de *C. neoformans* pós-tratadas com as substâncias testadas.

Substâncias	Crescimento em Placa	Presença de Alteração	Observações
Controle (-)	+	Não	
Itraconazol	-	-	
DCM	+	Não	
6a	+/-	Sim	Diminuição da produção de cápsula
15	+	Não	
29	+/-	Sim	Células menores
30	+	Sim	Diminuição da produção de cápsula
31	+/-	Sim	Poucas células para visualização
32	+/-	Sim	Morfologia alterada
33	-	-	
37	+	Sim	Diminuição da produção de cápsula
38	+	Não	
39	+/-	Sim	Diminuição da produção de cápsula
40	+	Sim	Morfologia alterada
41	+	Sim	Morfologia alterada
42	+/-	Sim	Morfologia alterada
43	+/-	Sim	Morfologia alterada

Das substâncias testadas, foi constatada atividade fungistática de seis substâncias: **6a**, **29**, **31**, **32**, **37**, **39** e **42** e atividade fungicida de duas substâncias: **31** e **33**. Naqueles fungistáticos, observaram-se alterações intracelulares, além de diminuição da cápsula fúngica, por microscopia óptica, que deverão ser confirmadas em trabalhos futuros com microscopia eletrônica.

3.1.3. Ensaio de inibição do crescimento em meio líquido com *Staphylococcus aureus*

As substâncias também foram submetidas a ensaios com bactérias, cujo crescimento é bem mais rápido quando comparado com o crescimento das leveduras. Por este motivo, as leituras foram realizadas de hora em hora.

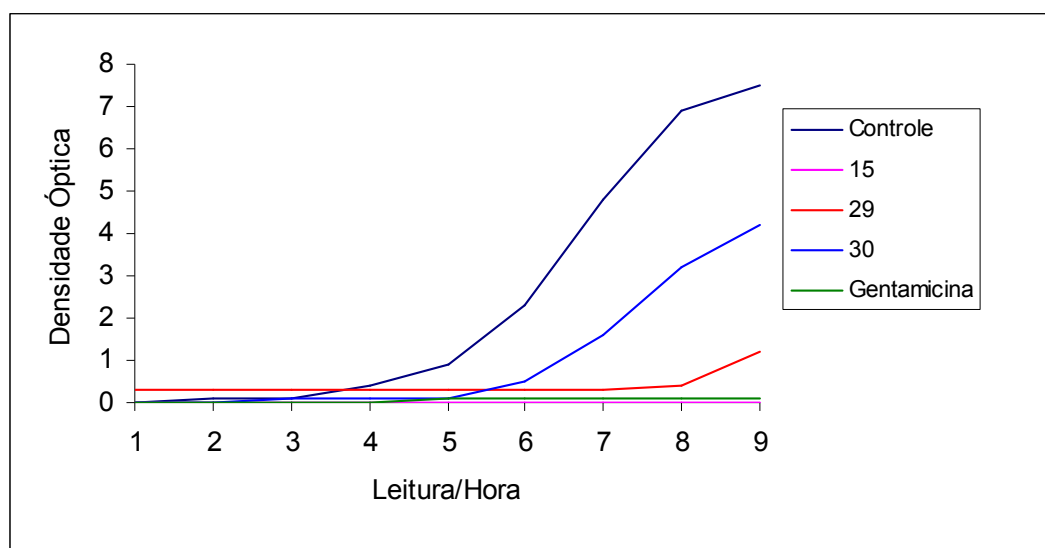


Figura 16 – Efeito das substâncias **15** (122 mM), **29** (114 mM), **30** (114 mM) e Gentamicina (21 mM) sobre o crescimento de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

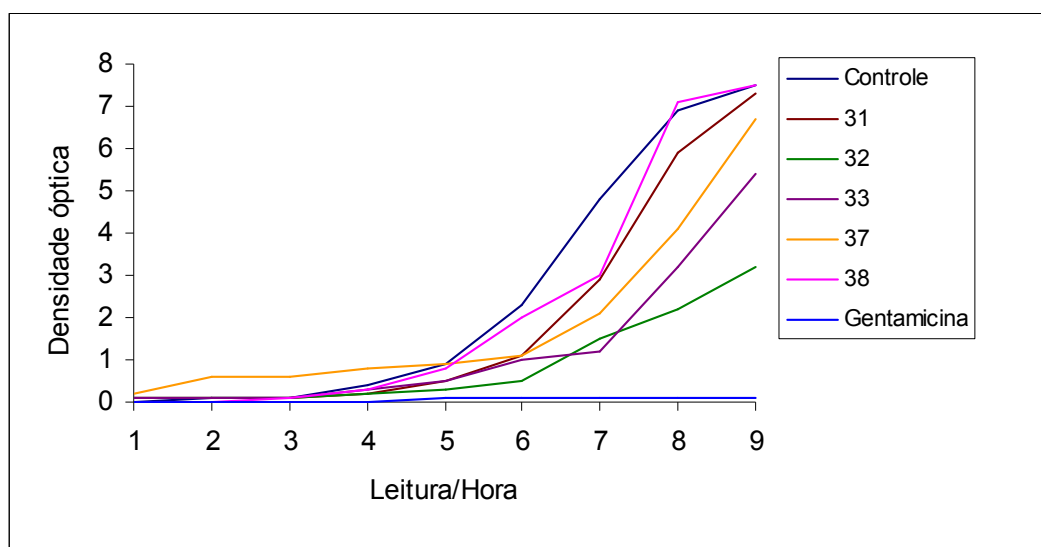


Figura 17 – Efeito das substâncias **31** (87 mM), **32** (86 mM), **33** (87 mM), **37** (79 mM), **38** (79 mM) e Gentamicina (21 mM) sobre o crescimento de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

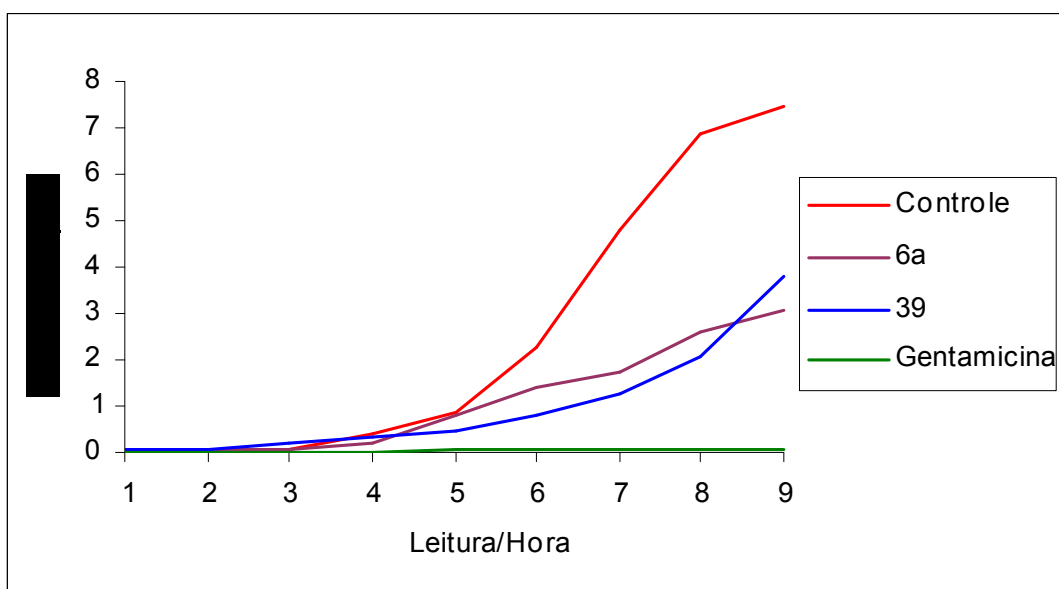


Figura 18 – Efeito das substâncias **6a** (79 mM), **39** (79 mM) e Gentamicina (21 mM) sobre o crescimento de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

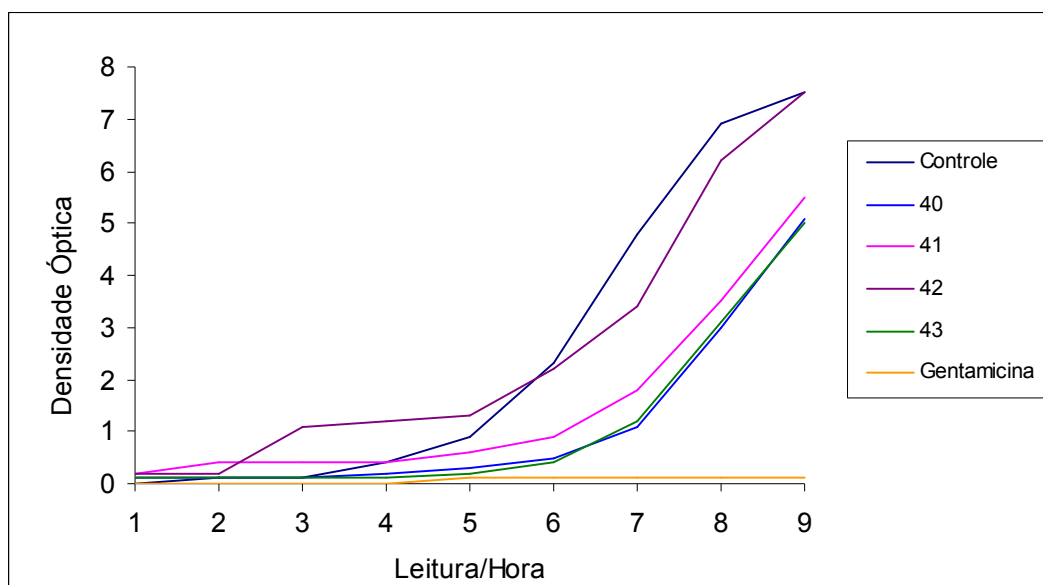


Figura 19 – Efeito das substâncias **40** (87 mM), **41** (87 mM), **42** (56 mM), **43** (56 mM) e Gentamicina (21 mM) sobre o crescimento de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

Como mostrado nas **Figuras 16, 17, 18 e 19** quase todas as substâncias testadas apresentaram controle do desenvolvimento do *Staphylococcus aureus*, quando comparadas com o controle, em todas as avaliações realizadas. Os maiores níveis de controle do *S. aureus* foram obtidos com as substâncias **6a, 15, 29, 30, 32, 39, 40, 41 e 43** com destaque para as substâncias **15 e 29** que apresentaram atividades similares ao bactericida comercial Gentamicina.

3.1.4. Ensaios de inibição do crescimento em meio líquido com *Escherichia coli*

Quando submetidas aos ensaios com *E. coli*, as substâncias isoladas de *Hymenaea* sp. apresentaram os resultados que podem ser visualizados nas **Figuras 20, 21, 22 e 23**. Nestas figuras, verifica-se que os sesquiterpenos α -copaeno **15**, óxido de cariofileno **29** e espatulenol **30** apresentaram atividade inibitória semelhante ao antibiótico Gentamicina nas concentrações testadas. Também pode ser observada a inibição bastante expressiva causada pelos alcoóis diterpênicos **40** e **41**. O caureno **31** e o tosilato **42** também se mostraram ativos, enquanto as substâncias **6a**, **32**, **33**, **39** e **43** apresentaram apenas pequena toxicidade.

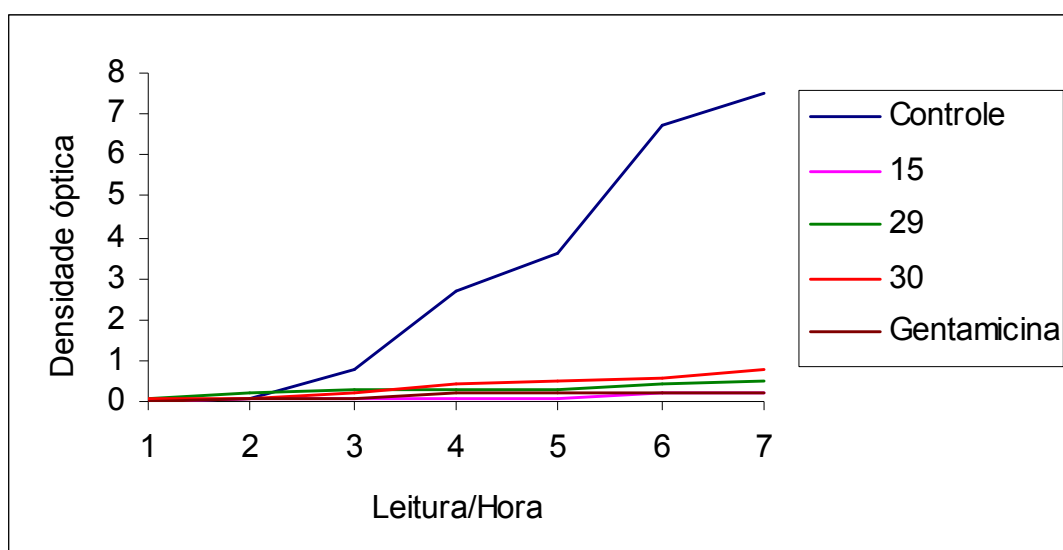


Figura 20 – Efeito das substâncias **15** (122 mM), **29** (114 mM), **30** (114 mM) e Gentamicina (21 mM) sobre o crescimento de *Escherichia coli* ATCC 33922.

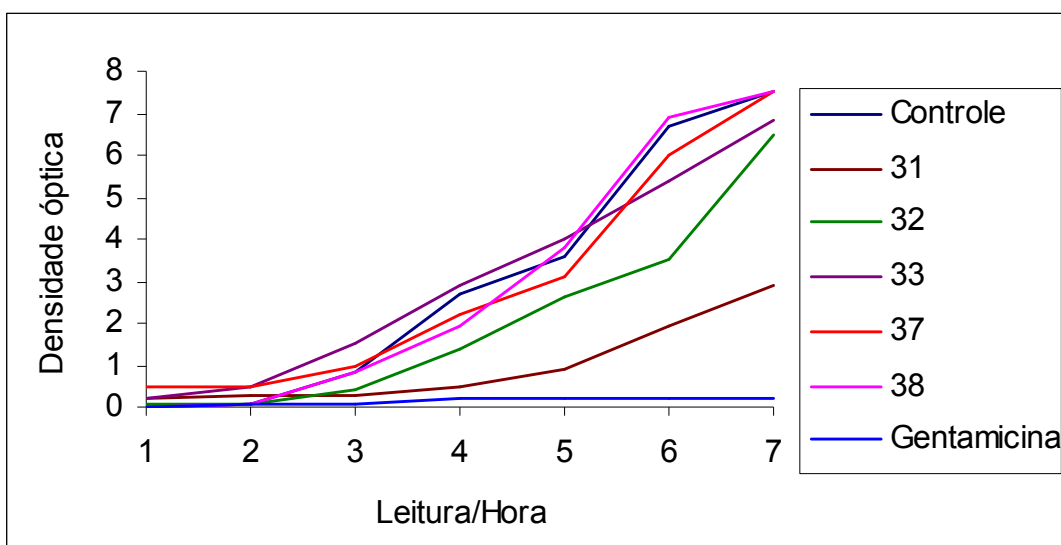


Figura 21 – Efeito das substâncias **31** (87 mM), **32** (86 mM), **33** (87 mM), **37** (79 mM), **38** (79 mM) e Gentamicina (21 mM) sobre o crescimento de *Escherichia coli* ATCC 33922.

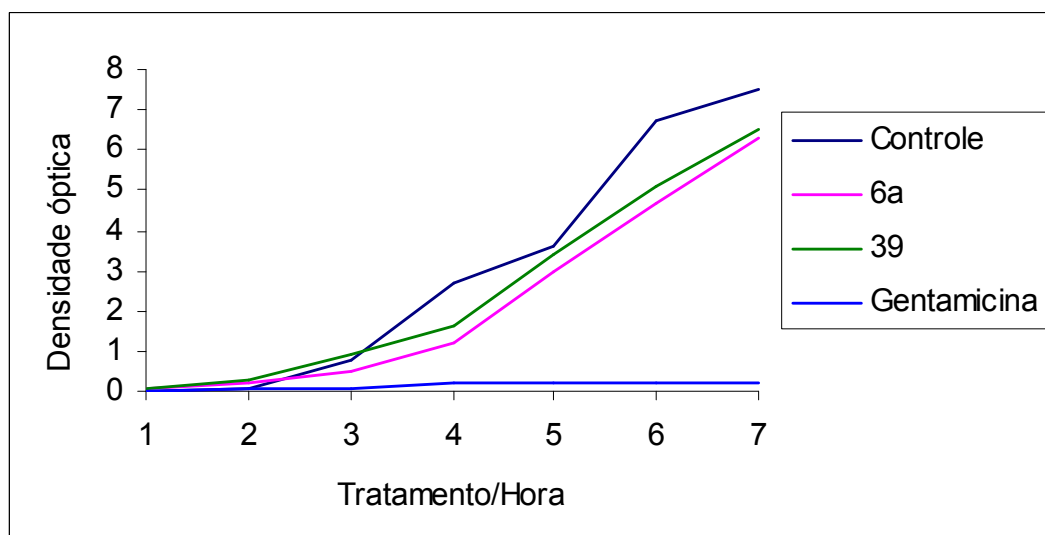


Figura 22 – Efeito das substâncias **6a** (79 mM), **39** (79 mM) e Gentamicina (21 mM) sobre o crescimento de *Escherichia coli* ATCC 33922.

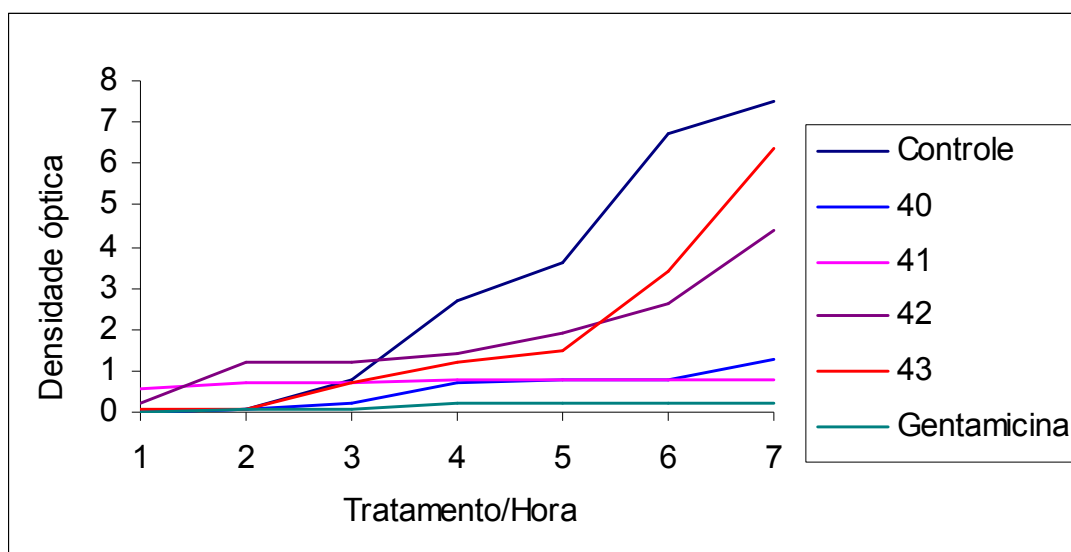


Figura 23 – Efeito das substâncias **40** (87 mM), **41** (87 mM), **42** (56 mM), **43** (56 mM) e Gentamicina (21 mM) sobre o crescimento de *Escherichia coli* ATCC 33922.

Resultados semelhantes aos de *C. albicans* são observados com *E. coli*. No trabalho de Novais e colaboradores (2003) o extrato de *H. stigonocarpa* se mostrou inativo contra a bactéria *E. coli*. Este resultado difere dos resultados obtidos com as substâncias puras isoladas de *H. stigonocarpa* deste trabalho que apresentaram efeito de inibição contra a bactéria. Novamente a explicação poderia ser a diluição dos princípios ativos no extrato da planta.

Como pode ser observado, todas as substâncias testadas apresentaram atividade antimicrobiana em maior ou menor quantidade contra fungos ou bactérias. Sem dúvidas, as substâncias **15**, **29**, **30**, **40** e **41** são os mais promissores, seguidos de **6a**, **31**, **39**, **42** e **43**. Em posteriores trabalhos, deverão ser investigadas as atividades de inibição destas substâncias em concentrações decrescentes para a determinação da concentração inibitória mínima (CIM) e também avaliar possíveis alterações ultraestruturais que estas substâncias possivelmente causam.

3.2. Atividade frente a células tumorais humanas

Além da atividade antitumoral de terpenos comprovada em pesquisas, já existem trabalhos que apresentam resultados de terpenos com atividade anti-inflamatória. Um exemplo seria a pesquisa desenvolvida por Jayaprakasam e colaboradores (2007) em que foi verificado que diterpenos isolados de *Hymenaea courbaril* inibiram a cicloxigenase COX-2, uma enzima envolvida na síntese de prostaglandinas.

As substâncias isoladas do epicarpo de *Hymenaea stigonocarpa* com esqueleto caurânico (**Figura 24**) foram submetidas às avaliações do efeito na viabilidade celular, da indução de apoptose em células tumorais, do índice da desidrogenase láctica (LDH) liberada pelas células e à avaliação colorimétrica da concentração de monóxido de nitrogênio liberado pelas células Raw 264.7 estimuladas com LPS.

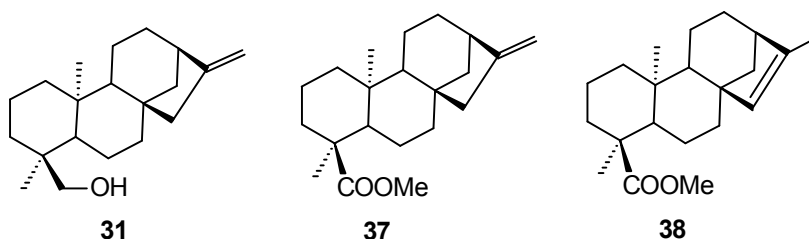


Figura 24 - Substâncias isoladas do epicarpo de *Hymenaea stigonocarpa* submetidas aos ensaios biológicos com células tumorais.

3.2.1. Avaliação do efeito das substâncias 31, 37 e 38 na viabilidade celular

O experimento para avaliação do efeito citotóxico das substâncias foi realizado através do microensaio colorimétrico com *3(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide* (MTT).

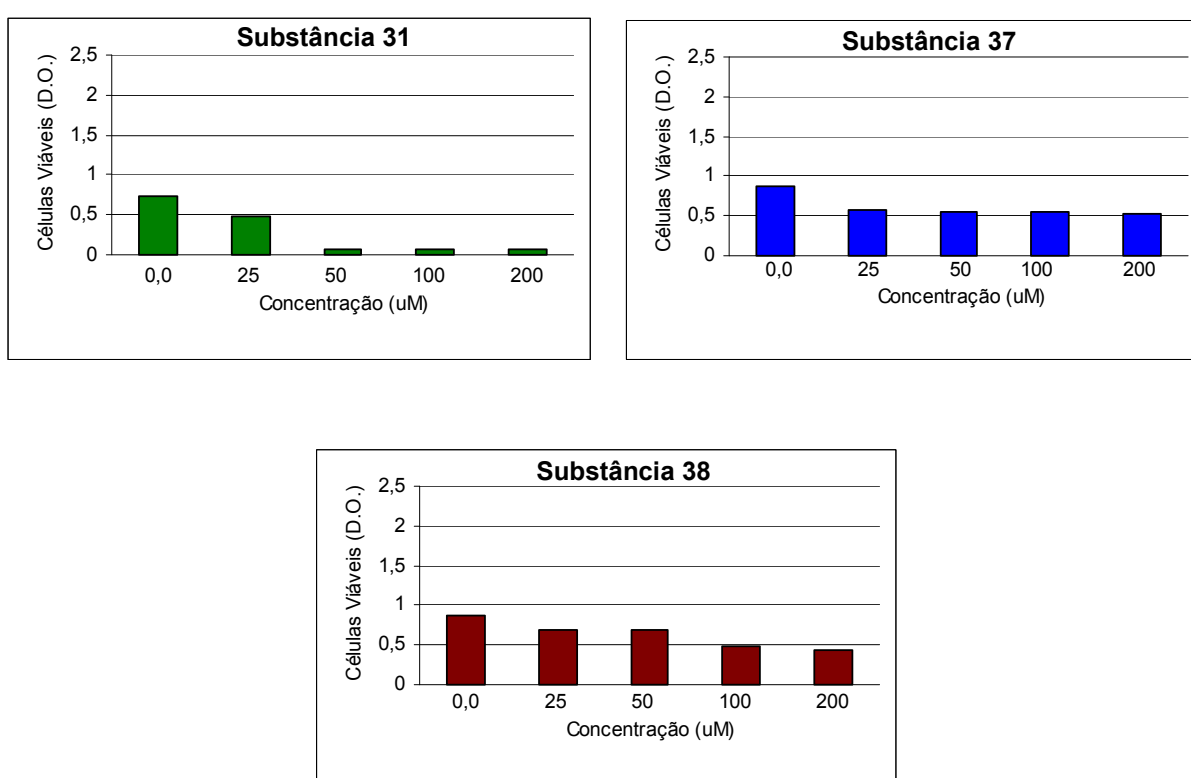


Figura 25 – Efeito citotóxico das substâncias **31**, **37** e **38** em diferentes concentrações frente às células U937 após 24 horas de incubação. A avaliação foi realizada utilizando o microensaio colorimétrico com MTT.

As substâncias testadas apresentaram atividades distintas na redução da viabilidade das linhagens tumorais. Dentre estas substâncias, o álcool **31** foi o mais eficaz no tempo de 24 horas, como pode ser observado observando-se a **Figura 25**. A substância **31** foi capaz de inibir expressivamente o crescimento da linhagem U937 nas concentrações de 50 µM, 100 µM e 200 µM e para a linhagem H460 nas concentrações

de 100 μM e 200 μM (**Figura 27**). Pode ser visto também que essas linhagens mostraram resistência frente aos caurenos **37** e **38** (**Figuras 25 e 26**).

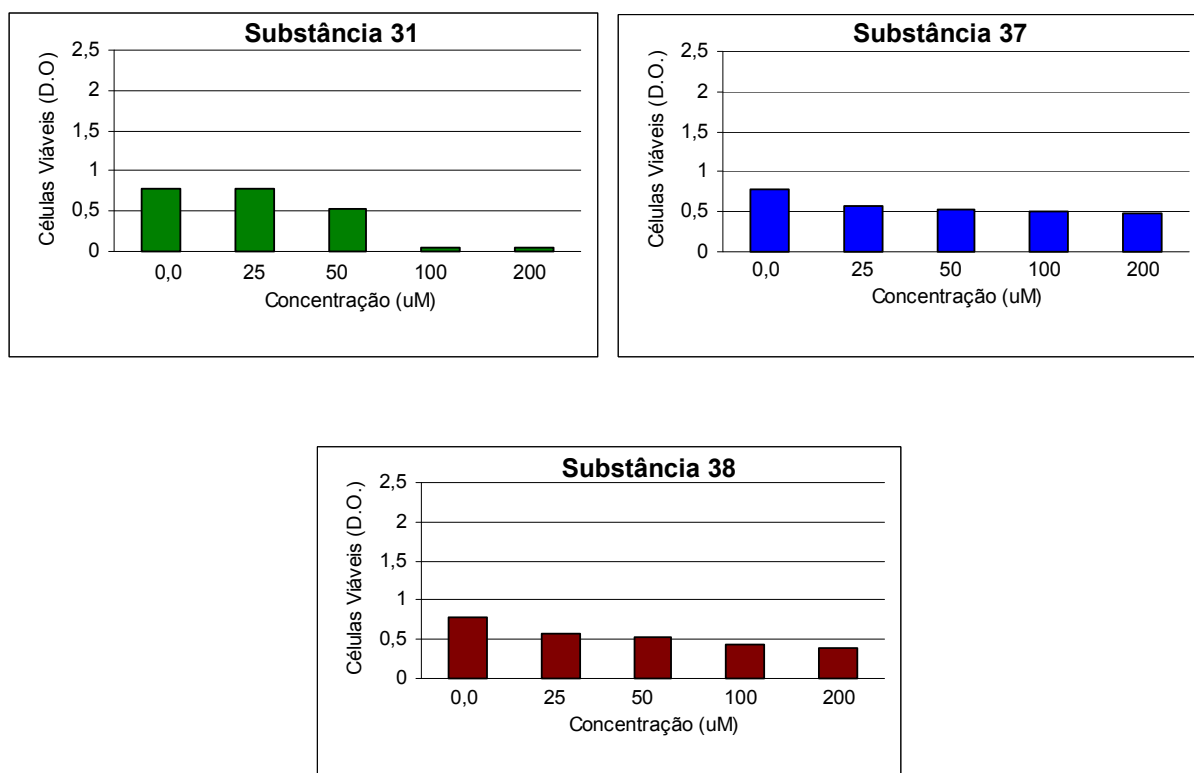


Figura 26 – Efeito citotóxico das substâncias **31**, **37** e **38** em diferentes concentrações frente às células H460 após 24 horas de incubação. A avaliação foi realizada utilizando o microensaio colorimétrico com MTT.

Os resultados obtidos com as células Raw 264.7 quando submetidas ao efeito das substâncias **31**, **37** e **38** são apresentados na **Figura 27**.

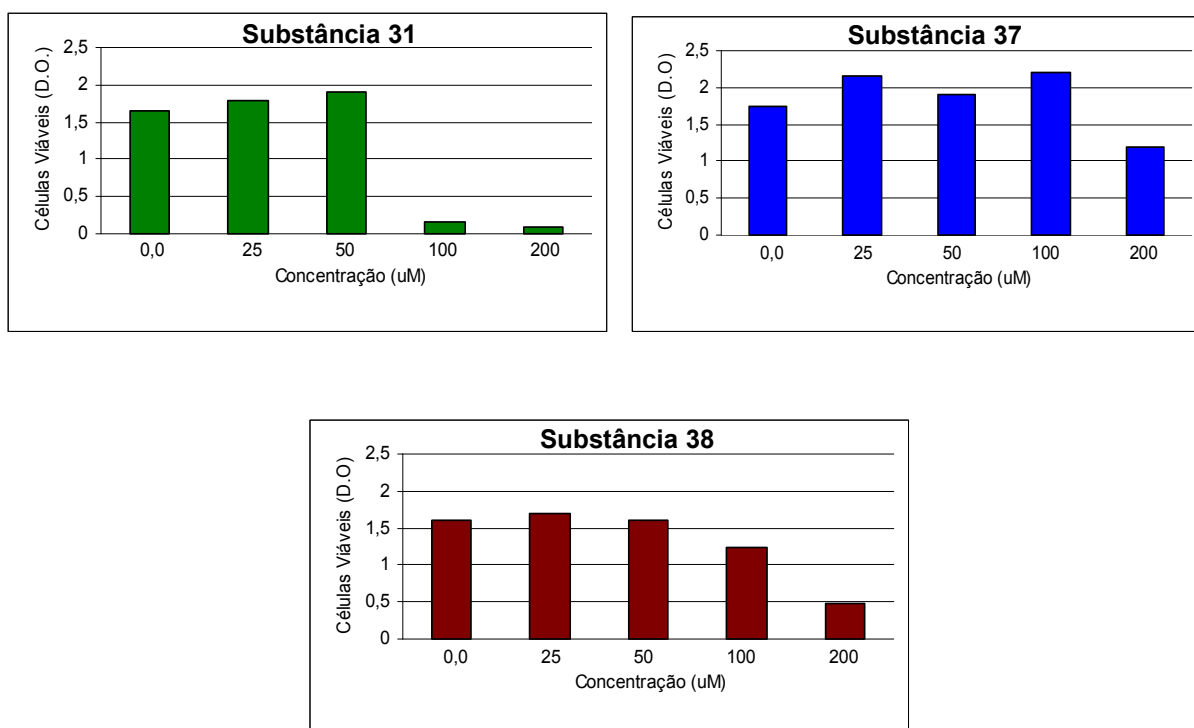


Figura 27 – Efeito citotóxico das substâncias **31**, **37** e **38** em diferentes concentrações frente às células Raw 264.7 após 24 horas de incubação. A avaliação foi realizada utilizando o microensaio colorimétrico com MTT.

A linhagem Raw 264.7 foi a menos resistente às substâncias **37** e **38** com redução da viabilidade na concentração de 200 µM. Nesta concentração, a substância **37** causou uma pequena redução, mas para a substância **38** a inibição da viabilidade foi bastante expressiva. A substância **31** apresentou atividade similar (**Figura 31**) àquela verificada com as células H460 (**Figura 26**): inibição muito eficaz nas concentrações de 100 µM e 200 µM.

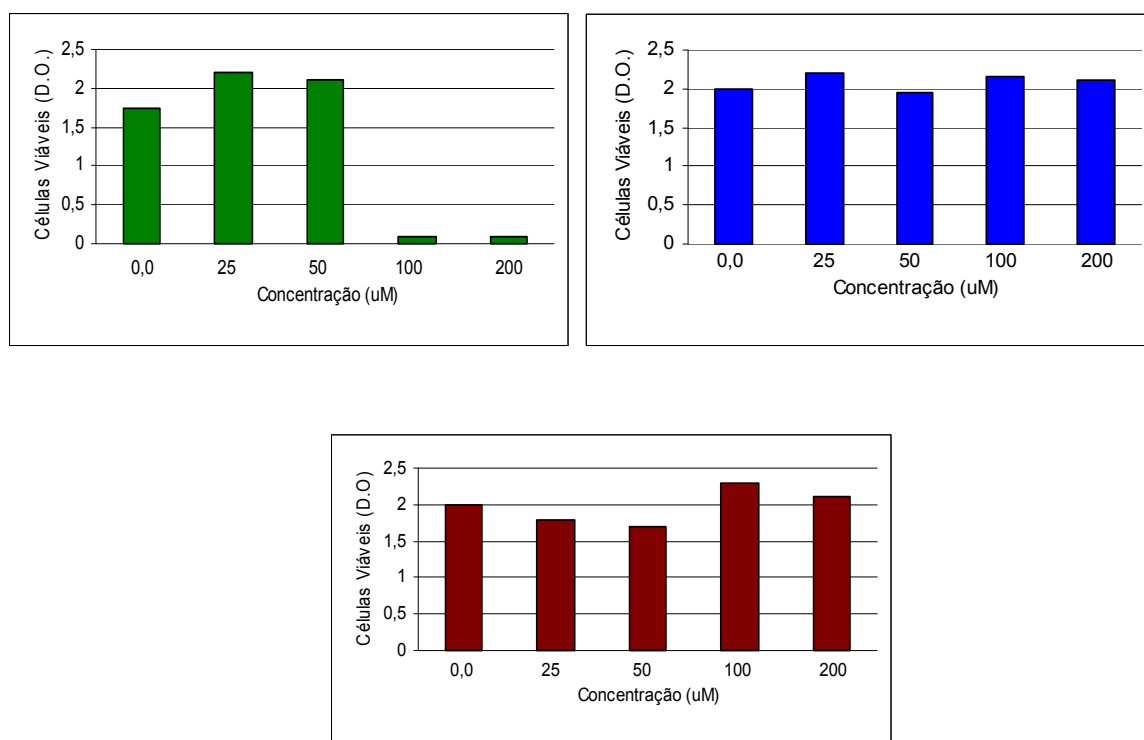


Figura 28 – Efeito citotóxico das substâncias **31**, **37** e **38** em diferentes concentrações frente às células Colo-205 após 24 horas de incubação. A avaliação foi realizada utilizando o microensaio colorimétrico com MTT.

Novamente observa-se a inibição da viabilidade celular causada pelo diterpeno **31**, agora sobre as células Colo-205 (**Figura 28**). As substâncias **37** e **38** não apresentaram atividade citotóxica frente a linhagem Colo-205.

A linhagem U937 mostrou-se a menos resistente à substância **31** quando comparada às demais. Uma provável explicação para essa diferença é que essas células são de origem linfóide, diferente de tumores sólidos como pulmão, H460 e de cólon de útero, Colo-205. O que justificaria mais estudos dessa substância, frente a células de origem leucêmica.

3.2.2. Avaliação do efeito das substâncias 31, 37 e 38 na viabilidade celular por LDH

A LDH é uma enzima citosólica que é normalmente encontrada no interior das células saudáveis e nunca em seu exterior. Entretanto, quando há indução de danos celulares por agentes químicos, pode ocorrer aumento da permeabilidade da membrana celular, tornando-a menos seletiva, permitindo que grandes moléculas intracelulares, como a LDH e outros constituintes celulares, tornem-se aptos a sair do interior da célula (EDINGER *et alii*, 2004).

A elevação dos níveis de LDH ocorre em neoplasias (proliferações celulares anormais), hipóxia (estado de baixo teor de oxigênio nos tecidos), cardiopatias (anormalidades na estrutura e na função cardiocirculatória), anemia hemolítica (quebra anormal das hemácias), anemia megaloblástica (anemia na qual a medula óssea produz glóbulos brancos e vermelhos gigantes e imaturos), inflamações, entre outras (CLEMEDSON *et alii*, 1996).

A medida de liberação de enzimas citoplasmáticas pelas células em cultura expostas a agentes tóxicos representa um método sensível para se acessar a citotoxicidade e danos na membrana plasmática (CLEMEDSON *et alii*, 1996).

Com a intenção de avaliar a citotoxicidade das substâncias e confirmar os resultados dos testes de viabilidade por MTT, foi feito um ensaio para mensurar a enzima LDH presente no sobrenadante de células tratadas com as três substâncias no tempo de 24 horas. A enzima LDH liberada pelas células tumorais (U937, H460, Colo-205, Raw 264.7) foi avaliada em espectrofotômetro após 24 horas de tratamento com as substâncias em diferentes concentrações (25 μM , 50 μM , 100 μM e 200 μM). As células foram plaqueadas com as substâncias, com os controles negativos (0,0 μM), e com Triton (Sigma) na concentração de 10 mM como controle positivo.

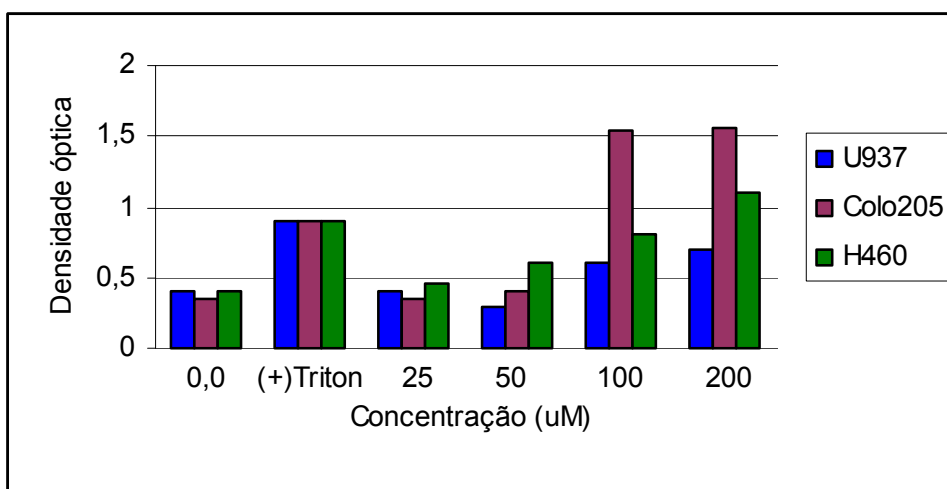


Figura 29 - Avaliação da liberação de desidrogenase láctica (LDH) em células U937, Colo-205 e H460. As células foram tratadas com diferentes concentrações da substância **31** e com o controle positivo (Triton) na concentração de $10 \mu\text{M}$ durante 24 horas. A quantidade de LDH liberada foi avaliada através da utilização do kit DOLES.

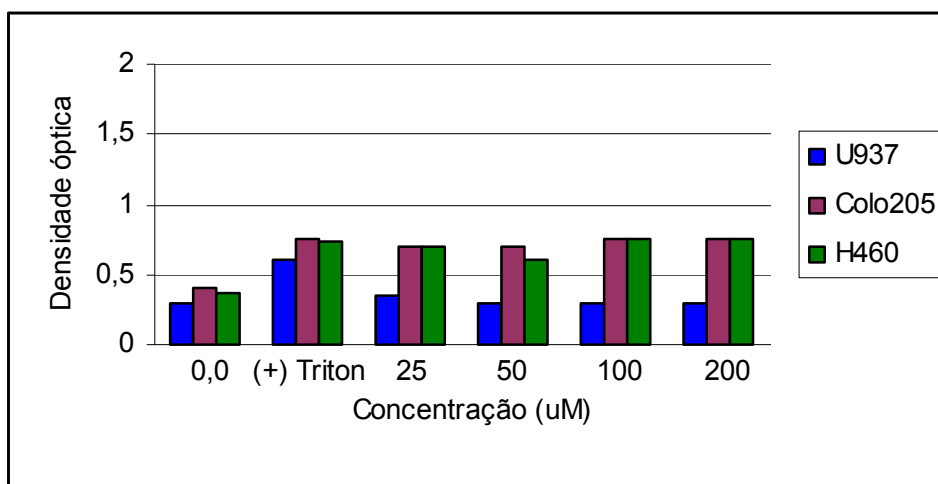


Figura 30 - Avaliação da liberação de desidrogenase láctica (LDH) em células U937, Colo-205 e H460. As células foram tratadas com diferentes concentrações da substância **37** e com o controle positivo (Triton) na concentração de $10 \mu\text{M}$ durante 24 horas. A quantidade de LDH liberada foi avaliada através da utilização do kit DOLES.

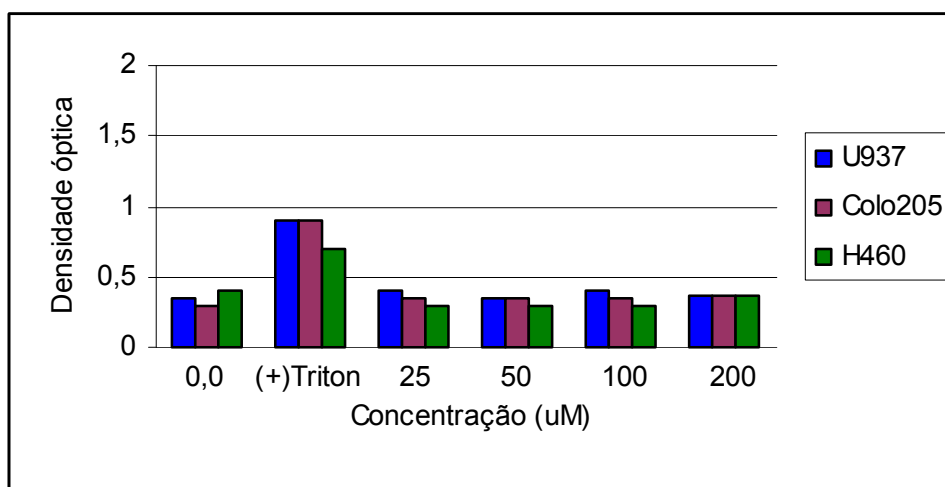


Figura 31 - Avaliação da liberação de desidrogenase láctica (LDH) em células U937, Colo-205 e H460. As células foram tratadas com diferentes concentrações da substância **38** e com o controle positivo (Triton) na concentração de 10 μM durante 24 horas. A quantidade de LDH liberada foi avaliada através da utilização do kit DOLES.

Na **Figura 29** pode-se observar que a substância **31** foi capaz de induzir a liberação de LDH em todas as células testadas: U937, Colo-205 e H460. Nas concentrações de 100 μM e 200 μM , o diterpeno **31** foi capaz de induzir a liberação de LDH mais que o próprio controle positivo para as células Colo-205. O mesmo acontece com as células H460 na concentração de 200 μM .

Os caurenos **37** e **38** foram menos ativos que o **31**, corroborando com os dados observados no ensaio de viabilidade celular (**Figuras 30 e 31**). No entanto, o caureno **37** causou liberação de LDH em quantidades bem próximas ao Triton para as células Colo-205 e H460.

3.2.3. Avaliação da indução de apoptose em células tumorais mediada pelas substâncias 31, 37 e 38

A morte celular programada ou apoptose é a principal forma de morte celular e é central para diversos processos biológicos. A apoptose pode ser ativada em resposta a estímulos específicos ou a várias formas de injúria ou estresse celular (HANNUN, 1996). A maioria das drogas com diferentes estruturas e especificidades induz mudanças morfológicas características associadas com apoptose, e acredita-se que vias apoptóticas contribuem para ação citotóxica da maioria das drogas quimioterapêuticas (LOWE & LIN, 2000). Diferente da apoptose, a morte celular por necrose se processa como uma resposta a estímulos agressivos externos, como a exposição a tóxicos. A necrose induz a liberação de citocinas provocando resposta inflamatória no local, fato que difere da morte por apoptose (ZIEGLER & GROSCURTH, 2004).

A taxa de apoptose e necrose induzida pelas três substâncias foi analisada utilizando a microscopia de fluorescência, pelo método de coloração de células com os corantes de DNA, laranja de acridina e brometo de etídio. Laranja de acridina, um corante vital, entra nas células através da membrana intacta e interage com o DNA pelo intercalamento de bases ou interações eletrostáticas. Quando ligada ao DNA se torna espectralmente similar à fluoresceína, com um máximo de excitação em 502 nm e máximo de emissão em 525 nm, resultando em uma coloração verde. O brometo de etídio, ao contrário, é capaz de penetrar apenas em células com membrana rompida e deixa o núcleo com uma coloração alaranjada (KOSMIDER *et alii*, 2004). Os parâmetros para discriminação das células estão descritos no item **4.2.5.** de acordo com Coligan e colaboradores (1994).

Após a incubação com as diferentes substâncias, as células foram coradas, levadas ao microscópio de fluorescência e discriminadas em normais, apoptóticas e necróticas. Foram adotados padrões convencionais com relação à morfologia e coloração das células como pode ser visualizado pela **Figura 32** (COLIGAN *et alii*, 1994). Foi contado

o número de 300 células por amostra para os três tempos determinados (12, 24 e 36 horas).

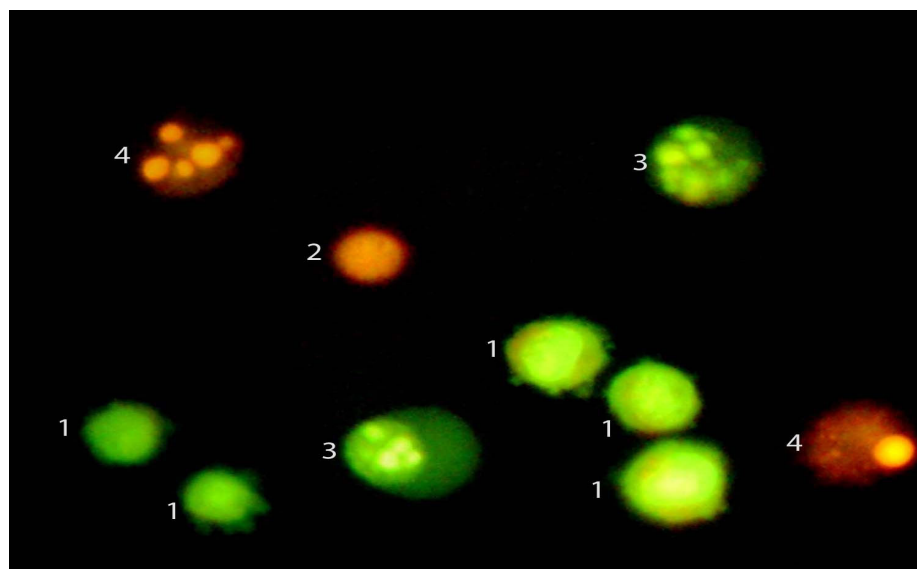


Figura 32 – Microscopia de Fluorescência de células U937 evidenciando as características para classificação das células como mencionadas acima em: 1 – Normais, 2 – Necrose, 3 – Apoptose Primária e 4 – Apoptose-necrose (necrose secundária). As fotos foram feitas após 12 horas de incubação das células com a substância **31** na concentração de 50 μ M.

- Células vivas: possuem morfologia do núcleo intacta, DNA corado por laranja de acridina (cor verde).
- Células apoptóticas: condensação da cromatina e fragmentação do núcleo, DNA corado por laranja de acridina (cor verde), que reflete a membrana plasmática intacta e não permeável ao brometo de etídio.
- Células necróticas-primárias: morfologia do núcleo necrótico, corado por brometo de etídio (cor vermelha).

- Células necróticas-secundárias: condensação da cromatina e fragmentação do núcleo, DNA corado por brometo de etídio (cor vermelha) e laranja de acridina, que demonstra a permeabilização necrótica da membrana plasmática que permite a entrada do brometo de etídio.
- A porcentagem de cada população celular – células normais, apoptóticas e necróticas – em relação ao total foi calculada. Foi considerado para o cálculo da porcentagem de apoptose as células apoptóticas e as necróticas secundárias, também chamadas de apoptose-necrose.

Devido à indução de apoptose ser o resultado de diferentes mecanismos de ação de várias drogas antineoplásicas, como exemplo o taxol (BLAGOSKLONNY *et alii*, 1995) e a cisplatina (GONZALEZ *et alii*, 2001), a análise de indução de apoptose é usada como um método de triagem de substâncias com ação antitumoral.

As figuras a seguir representam a porcentagem de apoptose induzida pelas substâncias **31**, **37** e **38** em três linhagens de células tumorais humanas (U937, H460, Colo-205) após 12, 24 e 36 horas.

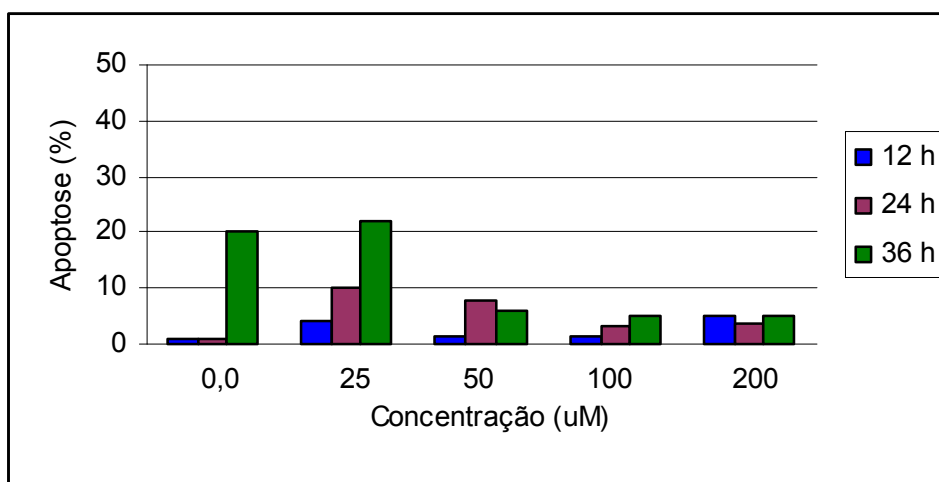


Figura 33 – Porcentagem de apoptose induzida pela substância 37 em diferentes concentrações na linhagem de células tumorais humanas Colo-205 determinada por microscopia de fluorescência em 12, 24 e 36 horas.

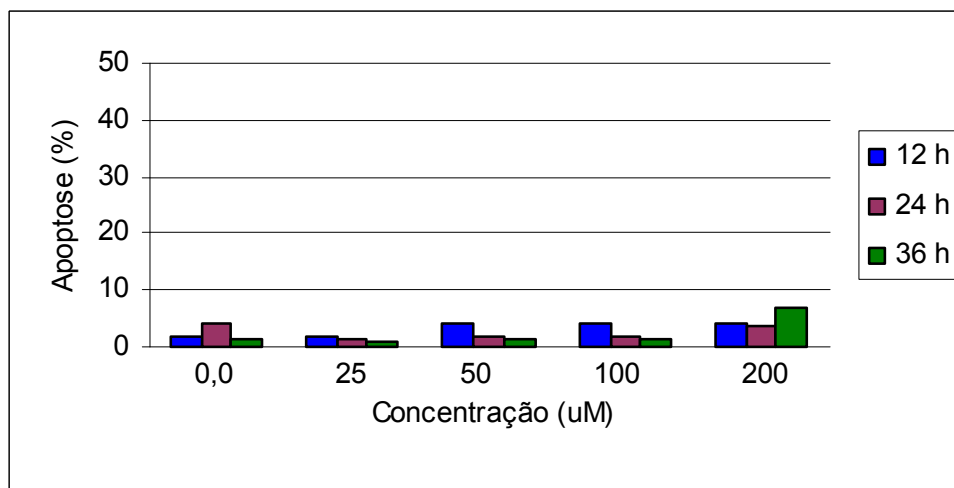


Figura 34 – Porcentagem de apoptose induzida pela substância 37 em diferentes concentrações na linhagem de células tumorais humanas U937 determinada por microscopia de fluorescência em 12, 24 e 36 horas.

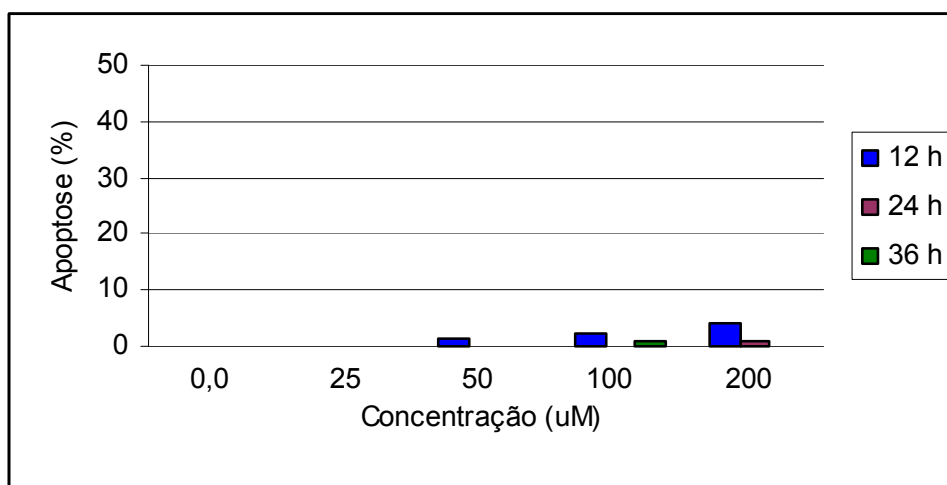


Figura 35 – Porcentagem de apoptose induzida pela substância **37** em diferentes concentrações na linhagem de células tumorais humanas H460 determinada por microscopia de fluorescência em 12, 24 e 36 horas.

As **Figuras 33, 34 e 35** representam a porcentagem de apoptose induzida pelo caureno **37** em células tumorais U937, Colo-205 e H460. Observa-se uma discrepância em relação ao controle negativo que será revista nos próximos experimentos. Mas, de forma geral, verifica-se através dos gráficos que a substância **37** não foi capaz de induzir apoptose em nenhuma das linhagens de células tumorais quando comparada com o grupo controle.

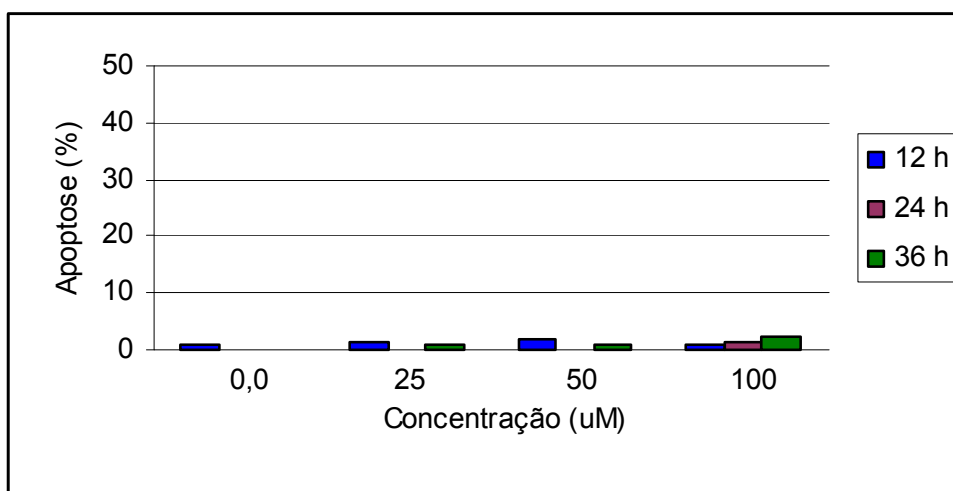


Figura 36 – Porcentagem de apoptose induzida pela substância 38 em diferentes concentrações na linhagem de células tumorais humanas Colo-205 determinada por microscopia de fluorescência em 12, 24 e 36 horas.

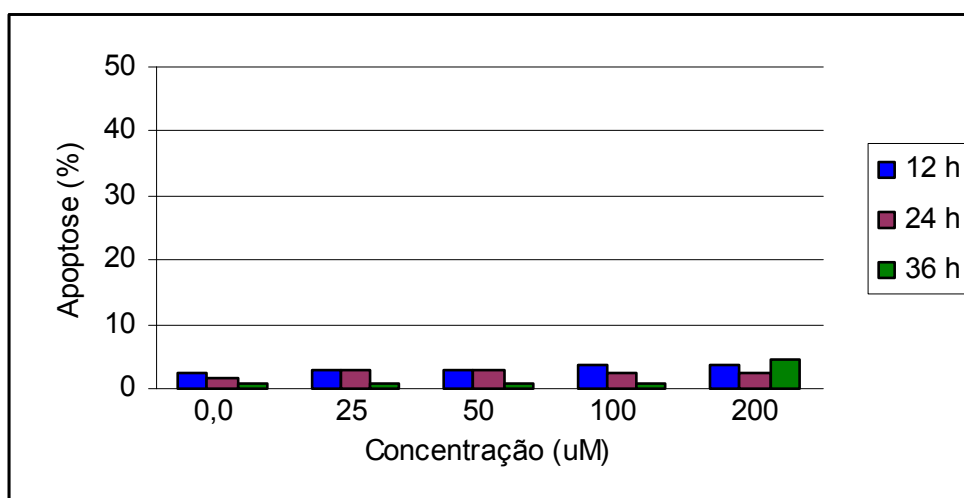


Figura 37 – Porcentagem de apoptose induzida pela substância 38 em diferentes concentrações na linhagem de células tumorais humanas U937 determinada por microscopia de fluorescência em 12, 24 e 36 horas.

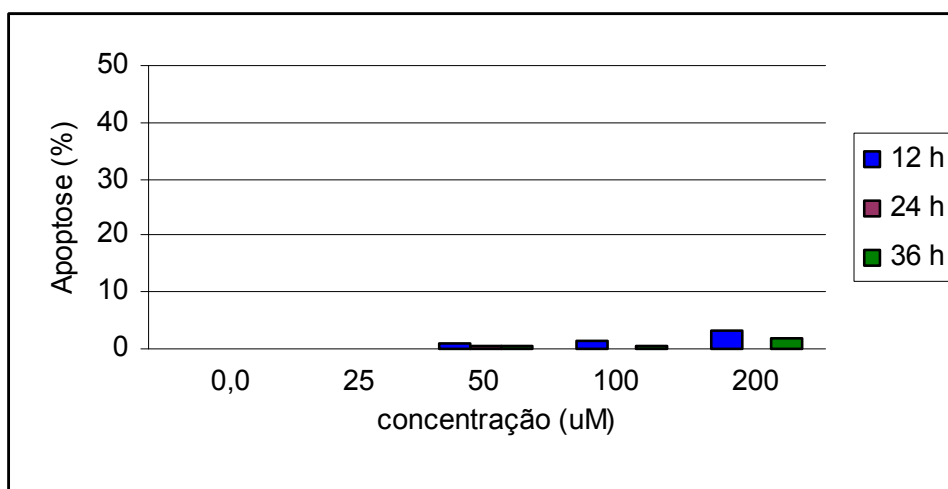


Figura 38 – Porcentagem de apoptose induzida pela substância **38** em diferentes concentrações na linhagem de células tumorais humanas H460 determinada por microscopia de fluorescência em 12, 24 e 36 horas.

Resultados semelhantes aos da substância **37** são observados para o caureno **38**. Observa-se pelas **Figuras 36, 37 e 38** que praticamente não ocorreu indução de apoptose em nenhuma das linhagens de células tumorais quando comparado com o grupo controle.

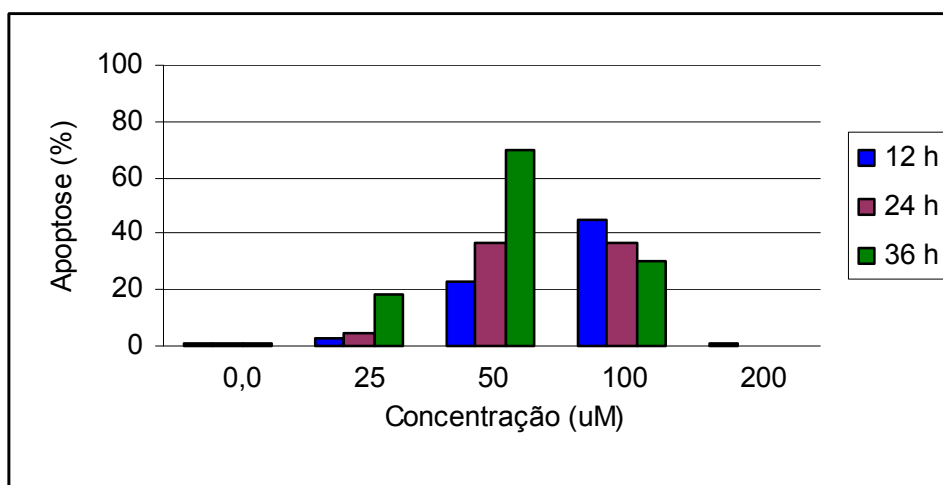


Figura 39 – Porcentagem de apoptose induzida pela substância 31 em diferentes concentrações na linhagem de células tumorais humanas Colo-205 determinada por microscopia de fluorescência em 12, 24 e 36 horas.

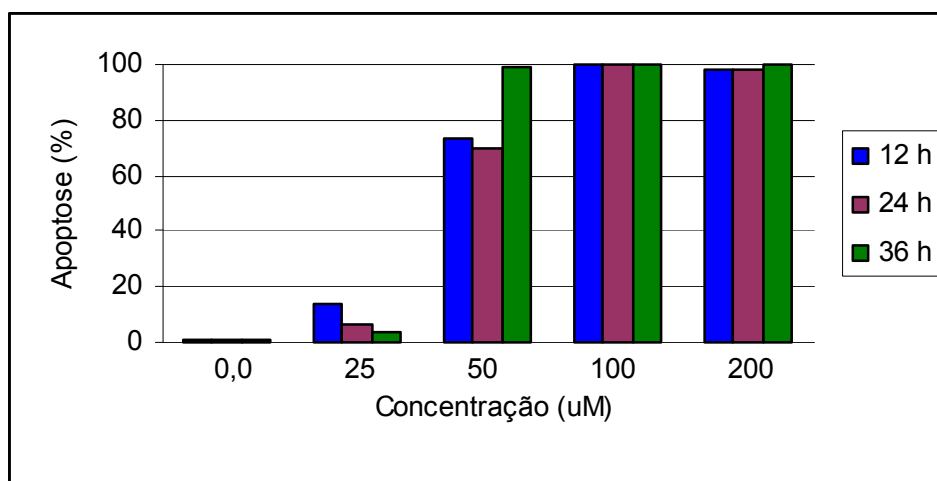


Figura 40 – Porcentagem de apoptose induzida pela substância 31 em diferentes concentrações na linhagem de células tumorais humanas U937 determinada por microscopia de fluorescência em 12, 24 e 36 horas.

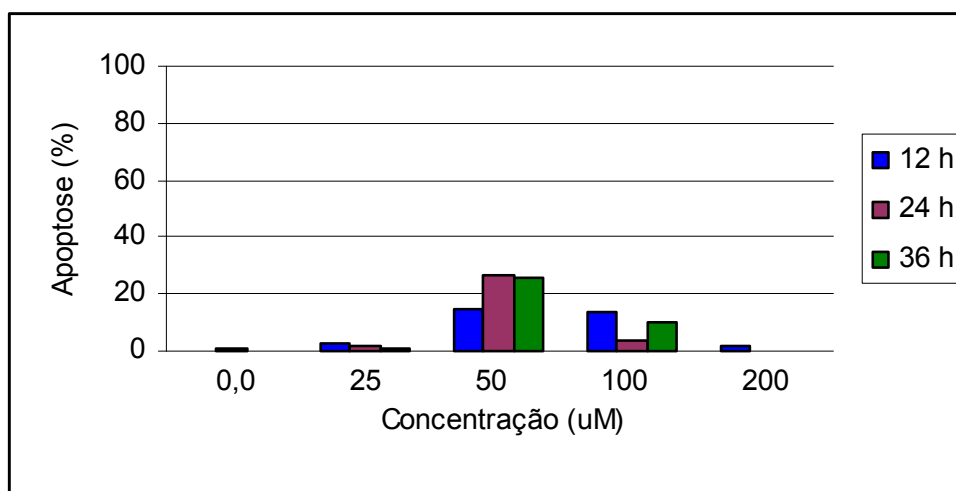


Figura 41 – Porcentagem de apoptose induzida pela substância **31** em diferentes concentrações na linhagem de células tumorais humanas H460 determinada por microscopia de fluorescência em 12, 24 e 36 horas.

Com resultados bastante diferenciados das substâncias **37** e **38**, o álcool **31** apresentou atividade de indução de apoptose muito eficiente, como pode ser observado nas **Figuras 39, 40** e **41**. Ele foi capaz de induzir altas taxas de apoptose na linhagem leucêmica colo-205. A substância **31** induziu 70% de apoptose na concentração de 50 μM após 36 horas (**Figura 39**). Contudo, em maiores concentrações, a substância apresentou elevada atividade citotóxica, induzindo 50% de necrose na concentração de 100 μM no tempo de 24 horas. Já na concentração de 200 μM a substância induziu 100% de necrose em todos os intervalos de tempo avaliados (24, 36 e 48 horas).

Para a linhagem U937, após 12 horas de incubação a substância foi capaz de induzir 75% de morte celular programada na concentração de 50 μM , chegando a 100% após 36 horas de tratamento. E nas concentrações de 100 μM e 200 μM , a indução de apoptose foi de 100% em todas as avaliações como pode ser verificado na **Figura 40**.

Na **Figura 41** também pode ser observado que a substância **31** induziu quase 100% de necrose nas concentrações de 100 μM e 200 μM para a linhagem pulmonar H460. O

percentual de apoptose para esta linhagem foi expressivo na concentração de 50 μM em todos os tempos testados e na concentração de 100 μM em 12 horas.

Como para as células tumorais H460 e Colo-205, os resultados de indução de apoptose obtidos do tratamento com o álcool **31** apresentaram uma alta porcentagem de necrose, optou-se por avaliar estes tratamentos em função da porcentagem de necrose. Os dados que relacionam as diferentes concentrações da substância (0,0 μM , 25 μM , 50 μM , 100 μM e 200 μM) e porcentagem de necrose por elas induzida estão relacionadas nos gráficos a seguir (**Figuras 42 e 43**).

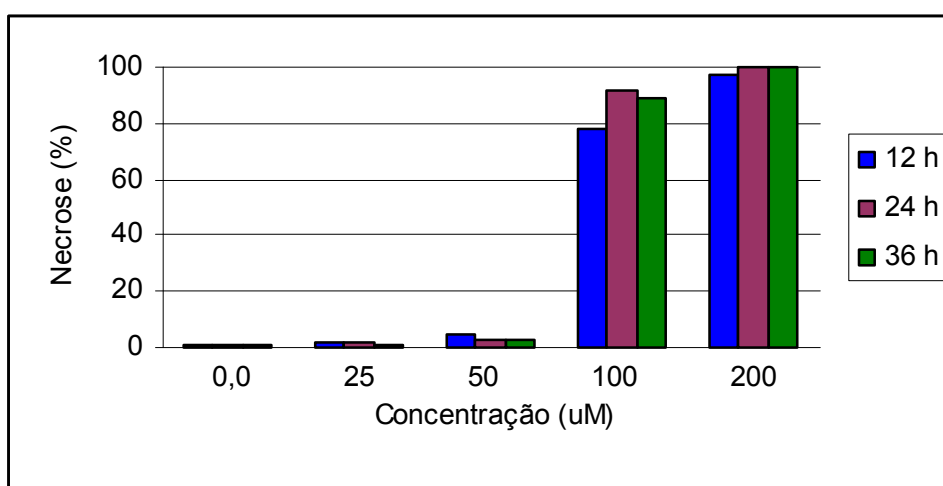


Figura 42 – Porcentagem de necrose induzida pela substância **31** em diferentes concentrações na linhagem de células tumorais humanas H460 determinada por microscopia eletrônica em 12, 24 e 36 horas.

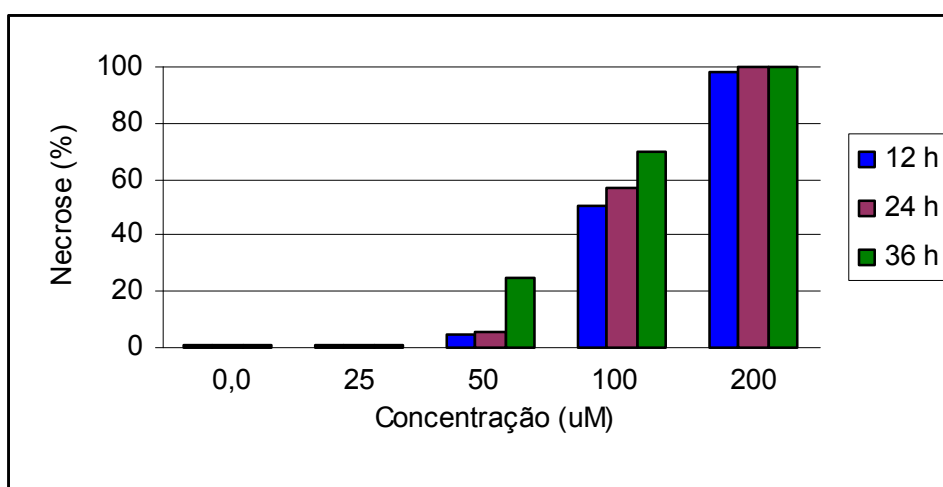


Figura 43 – Porcentagem de necrose induzida pela substância **31** em diferentes concentrações na linhagem de células tumorais humanas Colo-205 determinada por microscopia eletrônica em 12, 24 e 36 horas.

Os resultados observados nas **Figuras 42** e **43** estão de acordo com aqueles obtidos na indução de apoptose (**Figuras 39** e **41**). Nas concentrações de 100 µM e 200 µM, a substância **31** se mostrou tóxica para as células H460 e Colo-205.

De uma forma geral, vale ressaltar que esta substância por induzir altas taxas de necrose nas células H460 e colo-205, não possui um efeito desejável, uma vez que na morte celular por necrose ocorre o extravasamento do conteúdo celular gerando uma resposta inflamatória (ZIEGLER & GROSCURTH, 2004). Para definir o mecanismo pelo qual a substância **31** induz apoptose na linhagem U937 são necessários mais estudos, inclusive para verificar o tipo de via apoptótica induzida por ele.

3.2.4. Cálculo de dose efetiva 50% das substâncias (IC₅₀)

Para efeito de uma melhor comparação da atividade das substâncias frente às diferentes células testadas foi realizado o cálculo de dose efetiva 50% (concentração da substância capaz de induzir morte em 50% das células tratadas). A IC₅₀ foi determinada

utilizando o programa GraphPad Prism versão 4.0 através da curva de regressão não linear, a partir dos dados apresentados nas **Figuras 41 - 51**.

Analisando os dados da **Tabela 3** observa-se, em geral, que a substância **31** possui o menor valor de IC₅₀ para a célula U937, onde 33,7 μ M é capaz de induzir morte em 50% das células após 36 horas. Pela tabela percebe-se também que as substâncias **37** e **38** não são ativas frente a todas as linhagens tumorais testadas.

Tabela 3 – IC₅₀ das substâncias frente às células testadas.

Substância 31 (μM)			
Linhagem Celular	12 horas	24 horas	36 horas
U937	39,1	42,3	33,7
H460	78,27	75,0	75,0
Colo-205	112,5	94,0	75,0

Substância 37 (μM)			
Linhagem Celular	12 horas	24 horas	36 horas
U937	> 200	> 200	> 200
H460	> 200	> 200	> 200
Colo-205	> 200	> 200	> 200

Substância 38 (μM)			
Linhagem Celular	12 horas	24 horas	36 horas
U937	> 200	> 200	> 200
H460	> 200	> 200	> 200
Colo-205	> 200	> 200	> 200

3.3. Atividade anti-inflamatória

3.3.1. Avaliação colorimétrica da concentração de monóxido de nitrogênio liberado pelas células Raw 264.7 estimuladas com LPS

O monóxido de nitrogênio (NO) é uma espécie radicalar que exerce importantes funções no sistema imunológico, como controle de doenças infecciosas, auto-imunes, tumores e doenças degenerativas crônicas (BOGDAN, 2001). A quantidade de NO produzido pela NO sintase induzida (iNOS) em resposta a estimulação de citocinas pró inflamatórias, radicais livres e lipopolissacarídeos (LPSs) pode ser um crítico indicador da patogênese nas doenças inflamatórias (VANE *et alii*, 1994; SZABO & THIEMERMANN, 1995), e o encontro de vias que interfiram na iNOS/NO pode ser benéfica para o tratamento de sepse e doenças relacionadas à inflamação (BLANTZ & MUNGER, 2002; MACMICKING *et alii*, 1997). Desta forma, agentes que inibem a superprodução de NO derivado da iNOS em macrófagos ativados podem possuir atividade anti-inflamatória (OK-HWA *et alii*, 2008).

Chegando à conclusão de que as substâncias **37** e **38** não apresentaram ou apresentaram pouca atividade citotóxica frente às células tumorais testadas, inclusive para a linhagem murina Raw 264.7, e tendo em vista que alguns diterpenos do tipo caurano foram descritos por Ghisalberti (1997) e Aquila e colaboradores (2009) como apresentando efeito anti-inflamatório, a investigação da ação anti-inflamatória destas substâncias foi proposta.

Buscando então, avaliar a potencial atividade anti-inflamatória das substâncias com esqueleto caurânico isolados de *Hymenaea stigonocarpa*, três substâncias (**31**, **37** e **38**) foram submetidas aos ensaios de avaliação da produção de monóxido de nitrogênio (NO). Como método inicial para a análise da atividade anti-inflamatória, a linhagem de macrófago murina Raw-264.7 foi estimulada com o lipopolissacarídeo LPS, para produzir NO, e em seguida foi incubada com as diferentes concentrações das substâncias **31**, **37** e **38** (25 μ M, 50 μ M, 100 μ M, 200 μ M) e analisadas no tempo de 24,

36 e 48 horas. Como controle positivo foi utilizado cultura de macrófagos não tratados (MO) e como controle negativo foram usados macrófagos estimulados com lipopolissacarídeo não tratados (MO + LPS).

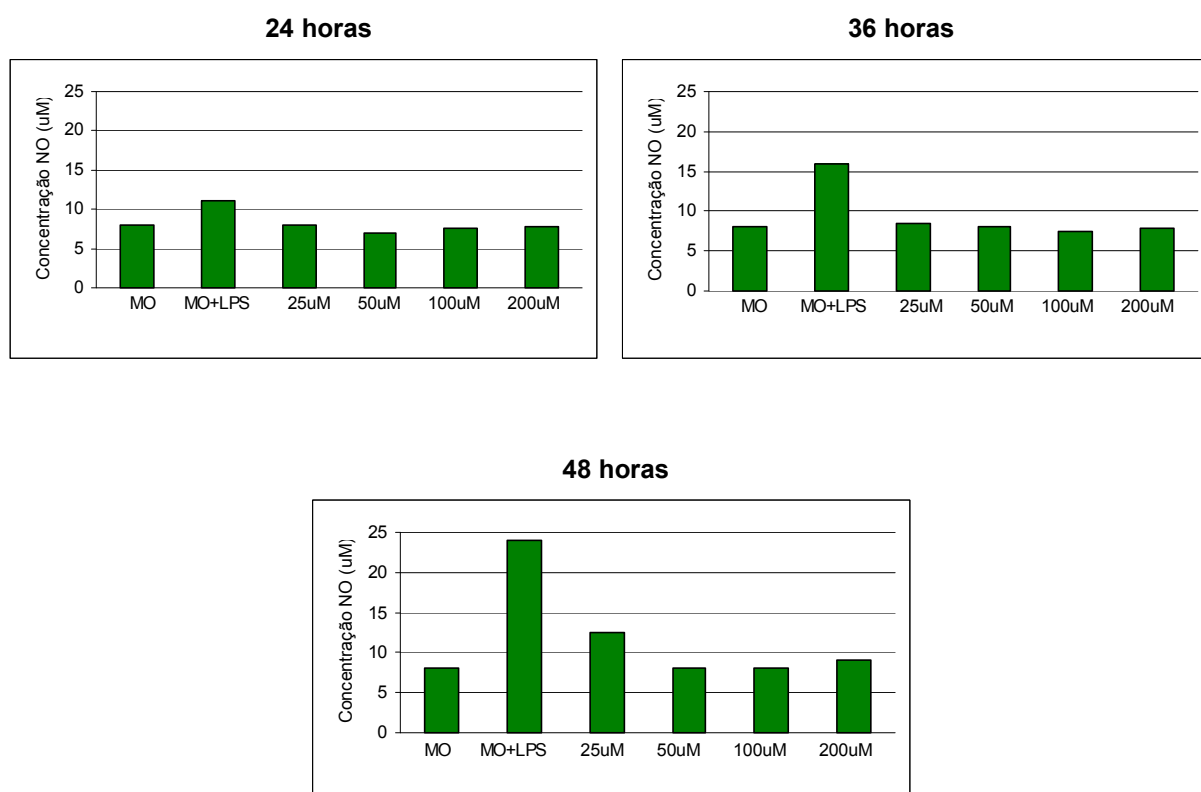


Figura 44 - Avaliação da inibição de monóxido de nitrogênio (NO) pela substância **31** em diferentes concentrações, pelo controle positivo (MO) e pelo controle negativo (MO + LPS) em células Raw 264.7 estimuladas com lipopolissacarídeos (LPS), durante 24, 36 e 48 horas após o tratamento.

O LPS é um componente de membrana de bactérias gram-negativas. É uma endotoxina que causa uma forte resposta do sistema imunitário em animais normais. Quando o LPS fica em contato com o macrófago (MO + LPS) estimula a produção de monóxido de nitrogênio, funcionando como um controle negativo.

Na **Figura 44** observa-se que a substância **31** foi capaz de inibir a produção de NO pelos macrófagos Raw 264.7 estimulados com LPS nos tempos de 24, 36 e 48 horas. Quando comparados os resultados obtidos para a substância aos do controle (Raw 264.7 + LPS) pode se observar que todas as concentrações testadas foram capazes de inibir a produção de NO.

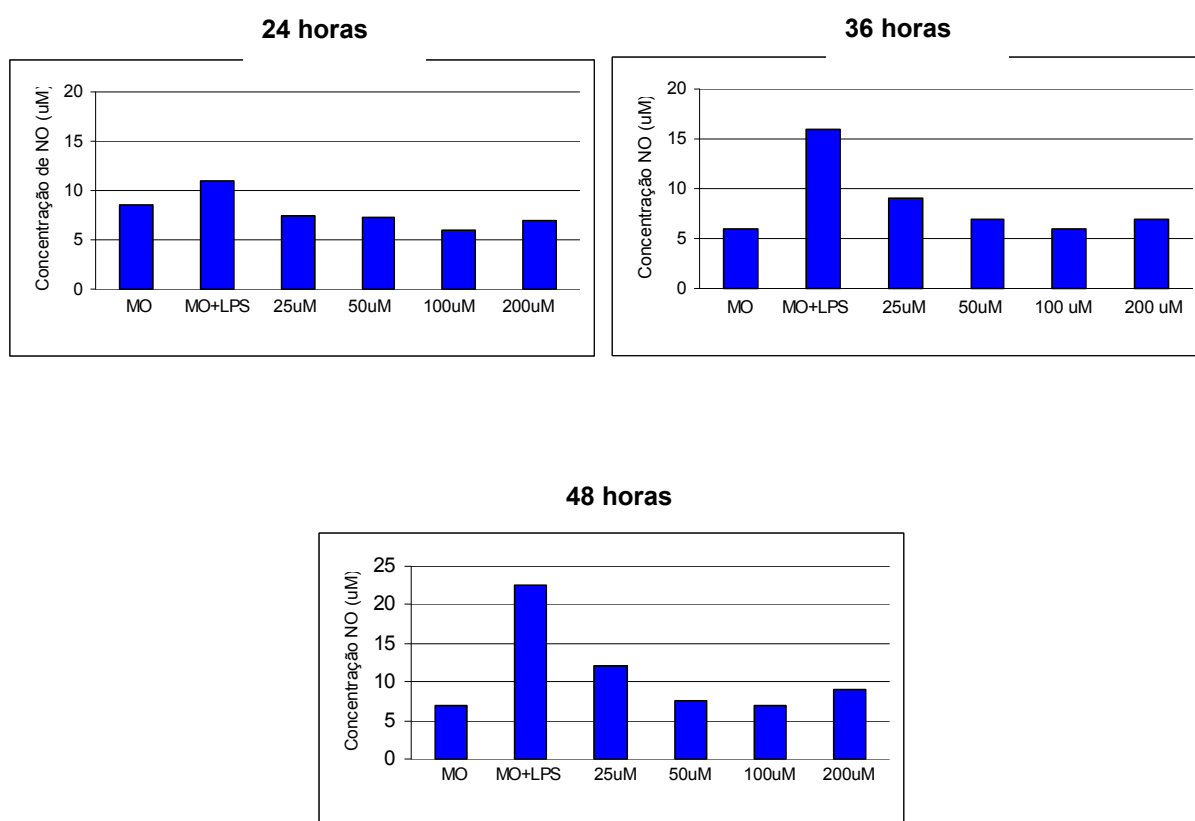


Figura 45 - Avaliação da inibição de monóxido de nitrogênio (NO) pela substância **37** em diferentes concentrações, pelo controle positivo (MO) e pelo controle negativo (MO + LPS) em células Raw 264.7 estimuladas com lipopolissacarídeos (LPS), durante 24, 36 e 48 horas após o tratamento.

Verifica-se para a substância **37** efeito semelhante ao álcool **31** na inibição da produção de monóxido de nitrogênio. Esta também inibiu a produção de NO pelos macrófagos Raw 264.7 estimulados com LPS nos tempos de 24, 36 e 48 horas em todas as concentrações testadas (**Figura 45**).

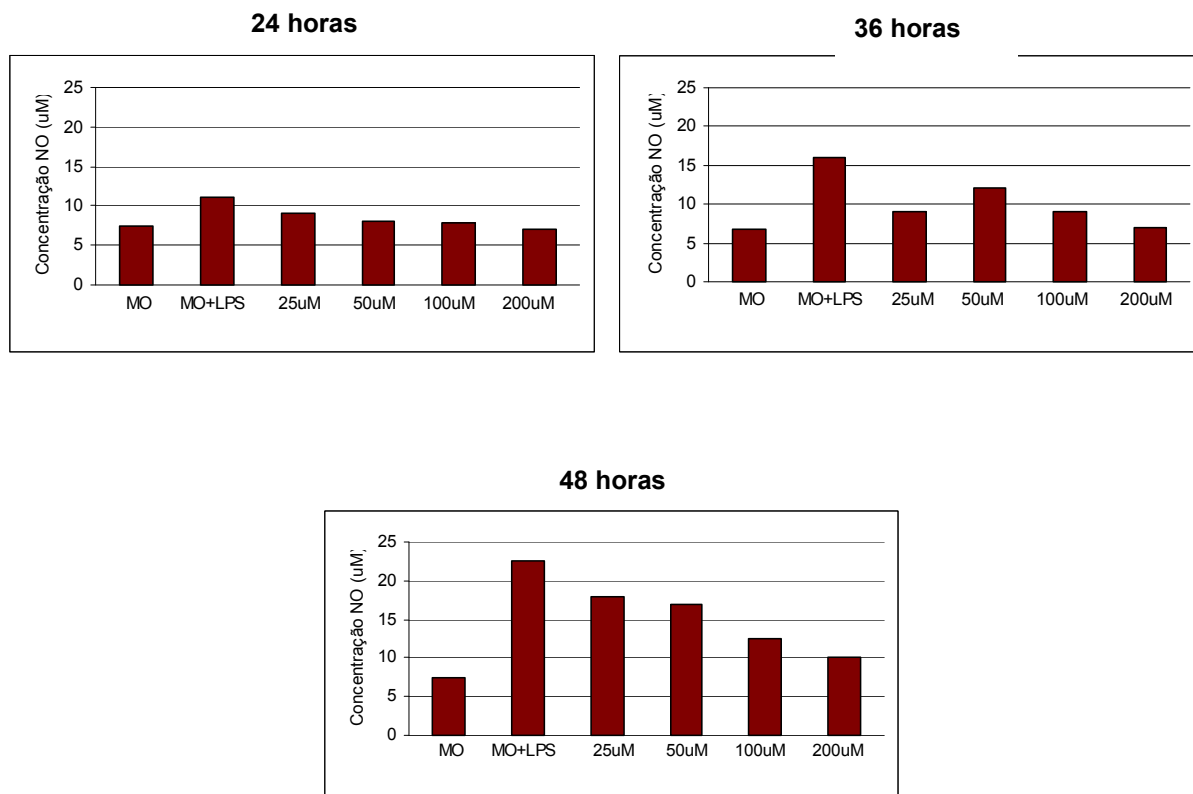


Figura 46 - Avaliação da inibição de monóxido de nitrogênio (NO) pela substância **38** em diferentes concentrações, pelo controle positivo (MO) e pelo controle negativo (MO + LPS) em células Raw 264.7 estimuladas com lipopolissacarídeos (LPS), durante 24, 36 e 48 horas após o tratamento.

O éster **38** apresentou efeito de inibição da produção de NO menor que as demais substâncias (**31** e **37**) principalmente nas concentrações de 25 µM e 50 µM. Contudo, nas concentrações de 100 µM e 200 µM observa-se inibição em relação ao controle negativo (MO + LPS), principalmente 48 horas após o tratamento (**Figura 46**).

Como pôde ser observado nos resultados apresentados, a substância **31** inibiu a produção de NO pelas células Raw 264.7 estimuladas com LPS (**Figura 44**). Porém nos testes de citotoxicidade foi verificado que a linhagem Raw 264.7 apresentou viabilidade reduzida na presença desta substância (**Figura 27**), o que inviabiliza a sua utilização como um anti-inflamatório.

As substâncias **37** e **38** exibiram atividade de inibição da produção de NO em 24, 36 e 48 horas, indicando um provável efeito anti-inflamatório (**Figura 45**). É importante considerar que estes resultados informam sobre um parâmetro, dentre muitos envolvidos no processo inflamatório como um todo. Por outro lado este estudo preliminar *in vitro* é necessário para subseqüentes estudos *in vivo*.

4. CONCLUSÕES

Das 14 substâncias avaliadas, nove delas apresentaram atividade superior contra *Candida albicans* ATCC 11006 e apenas três (**15**, **30** e **41**) se mostraram ativas contra *Candida albicans* ATCC 10231. Quanto à levedura *Cryptococcus* sp., as substâncias **6a**, **29**, **39**, **42** e **43** demonstraram considerável atividade enquanto as substâncias **31** e **37** causaram apenas moderada inibição.

Os ensaios realizados com as bactérias *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*, demonstraram pronunciada atividade das substâncias **15** e **29** contra a primeira e das substâncias **15**, **29**, **30**, **31**, **40** e **41** contra a última.

Os diterpenos caur-16-en-18-ol (**31**), caur-15-en-18-oato de metila (**37**) e caur-16-en-18-oato de metila (**38**) foram testados quanto à sua atividade antitumoral e citotóxica *in vitro* com as linhagens celulares U937, H460, Colo-205 e Raw 264.7.

A substância **31** foi a mais ativa frente às células tumorais testadas, sendo citotóxica para todas as linhagens tumorais, induzindo elevada taxa de apoptose nas células U937 e necrose nas células Colo-205 e H460. As substâncias **37** e **38** não apresentaram ou apresentaram baixa citotoxicidade, e não foram capazes de induzir apoptose nas linhagens tumorais testadas.

As substâncias **37** e **38** possuem efeito inibidor real da produção de monóxido nitrogênio frente à linhagem Raw-264.7 estimulada com LPS, sugerindo ação anti-inflamatória.

5. MATERIAL E MÉTODOS

5.1. Avaliação da atividade antimicrobiana das substâncias isoladas e derivatizadas do epicarpo de *Hymenaea stigonocarpa*

As substâncias isoladas das frações ácida e neutra do epicarpo de *Hymenaea stigonocarpa* e as derivatizadas (**Figura 1**) foram submetidas a ensaios biológicos com a colaboração do Prof. Dr. Olney Vieira-da-Motta do Laboratório de Sanidade Animal do Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias (CCTA) da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (UENF) com o auxílio da mestranda Luciana S. Mathias.

Foram realizados ensaios de toxicidade contra os fungos *Candida albicans* e *Cryptococcus neoformans* e contra as bactérias *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*.

5.1.1. Ensaios de inibição do crescimento em meio líquido com os fungos *Candida albicans* e *Cryptococcus neoformans*

Para os ensaios, *in vitro*, foram utilizadas células *Candida albicans* e *Cryptococcus neoformans* por ensaios previamente realizados no LSA (SAMUELS *et alii*, 2005; GONÇALVES *et alii*, 2007; AMARAL *et alii*, 2007; NETO, 2007; VIEIRA-DA-MOTTA *et alii*, 2008).

As células foram cultivadas em caldo Sabouraud dextrose (Acumedia, EUA) em tubos de ensaio na sua forma leveduriforme, em cultivos a 37 °C durante uma semana. Para testar a atividade dos produtos os ensaios obedeceram às mesmas abordagens realizadas em trabalhos anteriores (VIEIRA-DA-MOTTA *et alii*, 2008).

Uma solução de inóculo foi preparada adicionando-se células fúngicas a uma solução salina, com densidade óptica igual a 0,5 na escala McFarland (equivalente a 10^6 células por mL), seguindo leitura a ser realizada pelo fotômetro Densimat (bioMérieux, França) com leitura no feixe de 550 nm. Com o auxílio de uma micropipeta, foi distribuído um volume de 1800 μ L de caldo Sabouraud (Acumedia, EUA) em ampolas de vidro e em seguida 100 μ L de inóculo e 100 μ L de solução de cada substância testada. São chamados de “controles negativos” os ensaios em que as alíquotas de 100 μ L são apenas do solvente dimetilsulfóxido (DMSO) e como “controles positivos” ensaios com as alíquotas do antifúngico itraconazol. Todos os ensaios foram realizados em triplicata.

Após estes procedimentos, os tubos foram levados à estufa de incubação a 37 °C e leituras periódicas (8 em 8 horas para *C. albicans* e 12 em 12 horas para *C. neoformans*) de densidade óptica foram realizadas (**Figura 2**). A última leitura foi realizada quando o controle atingiu a capacidade máxima de leitura do fotômetro (igual a 7,5 da escala MacFarland). Os cultivos então foram avaliados por fotometria e curvas de crescimento foram feitas por análise dos resultados dos testes (ARAÚJO *et alii*, 2004).

Para avaliar o possível efeito fungicida ou fungistático das moléculas testadas contra o fungo *Cryptococcus neoformans* foi realizado o plaqueamento de uma alíquota do cultivo após o tratamento em meio líquido para ver se havia crescimento. Em meio sólido, ágar Sabouraud, as leveduras e os esporos de *C. neoformans* pós-tratados foram testados por meio de difusão em ágar, segundo Hufford e colaboradores (1975). As alíquotas foram cultivadas e incubadas a 37 °C por até uma semana com a finalidade de observar o grau de inibição das substâncias.

5.1.2. Ensaio de inibição do crescimento em meio líquido com as bactérias *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*

Para os ensaios, *in vitro*, foram utilizadas células *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* por ensaios previamente realizados no LSA (SAMUELS *et alii*, 2005; GONÇALVES *et alii*, 2007; AMARAL *et alii*, 2007; NETO, 2007; VIEIRA-DA-MOTTA *et alii*, 2008).

As células foram reativadas em caldo BHI e cultivadas em ágar Mueller Hinton (Acumedia, EUA) em tubos de ensaio na sua forma leveduriforme, em cultivos a 37 °C durante uma semana. Para testar a atividade dos produtos os ensaios obedeceram às mesmas abordagens realizadas em trabalhos anteriores (VIEIRA-DA-MOTTA *et alii*, 2008).

Uma solução de inóculo foi preparada adicionando-se células bacterianas a uma solução salina, com densidade óptica igual a 0,5 na escala McFarland (equivalente a 10^6 células por mL), seguindo leitura a ser realizada pelo fotômetro Densimat (bioMérieux, França) com leitura no feixe de 550 nm. Com o auxílio de uma micropipeta, foi distribuído um volume de 1800 μ L de caldo BHI (Acumedia, EUA) em ampolas de vidro e em seguida 100 μ L de inóculo e 100 μ L de solução de cada substância testada. São chamados de “controles negativos” os ensaios em que as alíquotas de 100 μ L são apenas do solvente DMSO e como “controles positivos” ensaios com as alíquotas do antibacteriano Gentamicina. Todos os ensaios foram realizados em triplicata.

Após estes procedimentos, os tubos foram levados à estufa de incubação a 37 °C e leituras periódicas (hora em hora) de densidade óptica foram realizadas (**Figura 2**). A última leitura foi realizada quando o controle atingiu a capacidade máxima de leitura do fotômetro (igual a 7,5 da escala MacFarland). Os cultivos então foram avaliados por fotometria e curvas de crescimento foram feitas por análise dos resultados dos testes (ARAÚJO *et alii*, 2004).

5.2. Avaliação da atividade das substâncias isoladas e derivatizadas do epicarpo de *Hymenaea stigonocarpa* frente a células tumorais humanas

Os ensaios biológicos foram realizados com as substâncias representadas na **Figura 24**, sob a orientação do Prof. Dr. Milton Masahiko Kanashiro, no Laboratório de Biologia do Reconhecer pertencente ao Centro de Ciências Biológicas (CBB), da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (UENF) com a ajuda da aluna Thaís Riguete Brasil.

5.2.1. Cultura da linhagem de célula de origem tumoral

As células U937, (leucemia de origem linfóide), Colo-205 (adenocarcinoma de colo de útero), e Raw 264.7 (macrófago murino) foram cultivadas em meio D-MEM F12 (Gibco, BRL) e a célula H460 (câncer de pulmão) em RPMI suplementados com 20 $\mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$ de gentamicina (Gibco, BRL) e 10% de soro fetal bovino (Gibco, BRL). As culturas foram replicadas a cada dois dias e mantidas em estufa (Forma Scientific Inc., modelo 3159) a 37 °C, com 5% de CO₂ e umidade controlada.

5.2.2. Avaliação *in vitro* da atividade biológica das substâncias frente às células tumorais

As células U937, Colo-205, H460 e Raw 264.7 foram plaqueadas em volume de 100 μL /poço (1×10^6 cels. mL^{-1} e 2×10^5 cels. mL^{-1} para Raw) em placas de 96 poços, tratadas com as drogas nas concentrações finais de 25 μM , 50 μM , 100 μM e 200 μM . As células foram mantidas em estufa a 37 °C, com 5% de CO₂ e umidade controlada. No tempo de 24 horas as células foram avaliadas quanto a inibição de crescimento com *3(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide* (MTT) e quanto ao índice da enzima desidrogenase láctica liberada. Após 12, 24 e 36 horas foram avaliadas quanto à taxa de apoptose e necrose por microscopia de fluorescência, e em 24, 36 e 48 horas

para a linhagem celular Raw 264.7 quanto a inibição de monóxido de nitrogênio (NO) após serem estimuladas com lipopolissacarídeos (LPS). Como controles negativos todas as células foram incubadas com meio DMEM F12 (Gibco, BRL) suplementado com $20 \mu\text{g.mL}^{-1}$ de gentamicina (Gibco, BRL) e 10% de soro fetal bovino (Gibco, BRL). Para as substâncias **37** e **38** as células foram incubadas com metanol (SIGMA®) e para a substância **31** com DMSO (SIGMA®) na concentração de $200 \mu\text{M}$.

5.2.3. Avaliação do efeito citotóxico das substâncias frente às células tumorais

Após tratamento como no item anterior a viabilidade celular foi determinada através do microensaio colorimétrico utilizando MTT. As células foram incubadas por 24 horas com as substâncias e após o tempo determinado foram adicionados $10 \mu\text{L}$ de MTT (Sigma, 5 mg.mL^{-1}) para cada $100 \mu\text{L}$ de cultivo. As placas foram mantidas na estufa por quatro horas. Após esse período foram retirados $150 \mu\text{L}$ do sobrenadante de cada poço e depois adicionados $100 \mu\text{L}$ de uma solução de HCl com isopropanol, homogeneizando bem até a completa dissolução dos cristais de sal formados. A placa de 96 poços foi lida em espectrofotômetro (MULTISKAN-EX) utilizando o comprimento de onda de 570 nm . Os resultados foram analisados através da absorbância de cada poço e os experimentos realizados em triplicatas.

5.2.4. Avaliação do índice da desidrogenase láctica (LDH) liberada pelas células após incubação com as substâncias

Para avaliar a liberação da LDH em células tumorais após tratamento com as substâncias foi utilizado o KIT DOLES de mensuração de desidrogenase láctica (LDH). As células foram plaqueadas com as substâncias, com os controles negativos, e com Triton (Sigma) na concentração de 10 mM como controle positivo por 24 horas. Após o tempo de incubação $50 \mu\text{L}$ do sobrenadante foram transferidos para outra placa onde foram adicionados $100 \mu\text{L}$ da solução A ($250 \mu\text{L}$ de alúmen férrico + $400 \mu\text{L}$ de

substrato) e incubadas em estufa por três minutos. Posteriormente foram adicionados 100 μL da solução B (225 μL de FMS/NAD + 4275 μL de água destilada) e incubadas em estufa por 7 minutos. A placa de 96 poços foi lida em espectrofotômetro (MULTISKAN-EX) em comprimento de onda igual a 492 nm.

5.2.5. Avaliação da apoptose por microscopia de fluorescência

As células cultivadas com as substâncias conforme os tempos e concentrações indicados (12, 24 e 36 horas) foram coradas com uma solução de 10 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ laranja de acridina (Sigma) e 10 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ de brometo de etídio (Sigma). Após a montagem em lâmina e lamínulas, as células foram levadas ao microscópio de fluorescência (Axioplan – Carl Zeiss) e contadas aproximadamente 300 células em vários campos escolhidos aleatoriamente, discriminando-se as células apoptóticas, necróticas e normais. Foram feitas duplicatas para cada condição e os experimentos repetidos pelo menos duas vezes. Para a avaliação foram adotados padrões convencionais com relação à morfologia e coloração das células como pode ser visualizado pela **Figura 32** (COLIGAN *et alii*, 1994).

5.3. Atividade anti-inflamatória

5.3.1. Avaliação colorimétrica da concentração de monóxido de nitrogênio liberado pelas células Raw 264.7 estimuladas com LPS

As células Raw 264.7 foram postas a aderir em placas de 96 poços, na densidade de 2×10^5 por poço, volume final de 100 μL de D-MEM F12 (Gibco, BRL), e permaneceram por 24 horas, a 37 °C, com 5% de CO_2 e umidade controlada. Após esse período, as substâncias foram adicionadas nas diferentes concentrações juntamente com o lipopolissacarídeo (LPS) na concentração de $1\mu\text{g.mL}^{-1}$. Após 24, 36 e 48 horas de ativação, o sobrenadante foi retirado e o nitrito acumulado quantificado através da

técnica de Griess. A produção de monóxido de nitrogênio (NO) foi estimada pela quantificação do metabólito estável, o nitrito (NO_2^-). Um volume de 50 μL do sobrenadante era retirado e a ele adicionado igual volume (50 μL) do reagente de Griess [25 μL da solução A (sulfanilamida 1% p/v, em H_3PO_4 5%) e 25 μL de solução B (alfanaftiletilenodiamina 0,1% v/v, em água)]. A absorbância a 540 nm foi medida em espectrofotômetro (MULTISKAN-EX). A concentração de nitrito no sobrenadante foi calculada a partir de uma curva padrão com concentrações conhecidas de NaNO_2 . O controle positivo utilizado foi uma cultura de macrófagos não tratados (MO) e o controle negativo foram os macrófagos estimulados com lipopolissacarídeo não tratados (MO + LPS) na concentração de 200 μM .

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBERT, B; BRAY, D; LEWIS, J; RAFF, M; ROBERTS, K; WATSON, J. D. (1997) *Biologia Molecular da Célula*. 3 ed. Porto Alegre/RS: Editora Artes Médicas, 757p.

ALBERT, B.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; RAFF, M; ROBERTS, K.; WALTER, P. (2002) *Molecular biology of the cell*. 4 ed. New York: Garland Publishing .1463p.

AMARAL, K. A. S., CARLOS, L. A., VIEIRA, I. J. C., MATHIAS, L., BRÁS-FILHO, R., VIEIRA-DA-MOTTA, O. (2007) Efeito antimicrobiano de extrato metanólico de *Rauvolfia grandiflora* Mart. ex A. DC sobre estirpes patogênicas de *Staphylococcus spp.* *Revista Universidade Rural, Série Ciências da Vida*, 27:182-184.

AQUILA, S.; WENG, Z. Y.; ZENG, Y. Q., SUN, H-D., RIOS, J. L. (2009) Inhibition of NF- κ B activation and iNOS induction by *ent*-kaurane diterpenoids in LPS-stimulated RAW264.7 Murine Macrophages. *Journal of natural products* 72(7):1269-1272.

ARAÚJO, R., RODRIGUES, A.G., PINA VAZ, C. (2004) A fast, practical and reproducible procedure for the standardization of the cell density of an *Aspergillus* suspension. *Journal of Medical Microbioly* 53:783–786.

ARRHENIUS, S. P.; LANGENHEIM, J. H. (1983) Inhibitory effects of *Hymenaea* and *Copaifera* leaf resins on the leaf fungus, *Pestalotia subcuticularis*. *Biochemical Systematics Ecology* 11(4):361-366.

BARROS, T., MOTA, C., ALMEIDA, C. (2007) Distribuição de leveduras do gênero *Candida* em pacientes da Unidade Intensiva de um Hospital Público de Salvador, Bahia. *Anais do 5º Congresso Brasileiro de Micologia*, Recife.

- BEATTY, J. A., BARRS, V. R., SWINNEY, G. R., MARTIN, P. A., MALIK, R. (2000) Peripheral vestibular disease associated with *Cryptococcosis* in three cats. *Journal of Feline Medicine and Surgery* 2: 29-34.
- BLAGOSKLONNY, M. V.; SCHULTE, T. W.; NGUYEN, N.; MIMNAUGH, E. G.; TREPPEL, J.; NECKERS, L. (1995) Taxol Induction of p21^{WAF1} and p53 Requires c-raf-1. *Cancer Research* 55:4623-4626.
- BLANTZ, R. C., MUNGER, K. (2002) Role of nitric oxide in inflammatory conditions. *Nephron* 90:373–378.
- BOGDAN, C. (2001) Nitric oxide and the immune response. *Nature Immunology* 2:906-916.
- BOSE, A. J., REESE, J. J., ORY, G., JANBON, T. L. (2003) A yeast under cover: the capsule of *Cryptococcus neoformans*. *Eukaryot Cell* 2(4):655–663.
- BRENTANI, M. M.; COELHO, F. R. G.; KOWALSKI, L. P. (2003) *Bases da Oncologia*. 2 ed. São Paulo: Lemar; Editora Marina e Tecmedd Editora, p.71.
- BRUMMER, E. (1998) Human defenses against *Cryptococcus neoformans*: An update. *Mycopathologia* 143:121–125.
- BUTLER, M. S. (2004). The role of natural product chemistry in drug discovery. *Journal of Natural Products* 67:2141–2153.
- CARVALHO, C. E.; BEREZIN, E. N.; PISTELLI, I. V.; MÍMICA, L.; CARDOSO, M. R. A. (2005) Monitoramento microbiológico sequencial da secreção traqueal em pacientes intubados internados em unidade de terapia intensiva pediátrica. *Journal of Pediatrics* 81:29-33.
- CARVALHO, J. E. (2001) Fitoterápicos: alimentos ou medicamentos? In: *Ciência de Alimentos – avanços e perspectivas*. Campinas. SP, 2001.
- CASADEVALL, A., ROSAS A. L., NOSANCHUK, J. D. (2000) Melanin and virulence in *Cryptococcus neoformans*. *Current Opinion in Microbiology* 3:354-358.
- CASSETTARI, V. C.; STRABELLI, T.; MEDEIROS, E. A. S. (2005) *Staphylococcus aureus* bacteremia: what is the impact of oxacillin resistance on mortality ? *Brazilian Journal of Infectious Diseases* 9:70-6.
- CLEFF, M. B.; SILVA, G. M.; MEINERZ, A. R.; MADRID, I. M.; FONSECA, A. O.; NASCENTE, P. S.; MEIRELES, M. C. A.; MELLO, J. R. B. (2007) Infecção cutânea em cão por *Candida albicans*. *Veterinária e Zootecnia* 12(2):164-168.

CLEMEDSON, C.; MCFARLANE-ABDULLA, E.; ANDERSSON, M. *et alii* (1996) MEIC evaluation of acute systemic toxicity .1. Methodology of 68 in vitro toxicity assays used to test the first 30 reference chemicals. *ATLA* 24:251-272

COLIGAN, J. E.; KRUISBECK, A. M.; MARGULIES, D. H.; SHEVCH E. M.; STROBER, W. (1994) *Current protocols in immunology*. New York: Greene Pub. Associates and Wiley-Interscience of Health, 920p.

COOPER, G. M. (1993) *The Cancer Book: a guide to understanding the causes, prevention, and treatment of cancer*. Boston: Jones and Bartlett Publishers, p.16.

CORDELL, G. A.; Colvard, M. D.; (2005) *Journal of Ethnopharmacology* 100:5-14.

COTTER, G. T. (2009) Apoptosis and cancer: the genesis of a research Field. *Nature reviews/cancer* 9(7):253-264.

COTRAN, R. S., KUMAR, V., COLLINS, T. (2000) *Patologia Estrutural e Funcional*. 6 ed. Guanabara: Rio de Janeiro, 1251p.

CROCCO, E. I.; MIMICA, L. M. J.; MURAMATU, L. H.; GARCIA, C.; SOUZA, V. M.; RUIZ, L. R. B.; ZAITZ, C. (2004) Identificação de espécies de *Candida* e susceptibilidade antifúngica in vitro: estudo de 100 pacientes com candidíases superficiais. *Anais Brasileiros de Dermatologia* 79(6):689-697.

DIRKS, P. B.; RUTKA, J. T. (1997) Current concepts in neuro-oncology: The cell cycle-a review. *Neurosurgery* 40:1000-1015.

DEVRIESE, L. A. (1990) *Staphylococci* in healthy and diseased animals. *Journal of Applied Bacteriology* (Symposium Supplement) 19:71S-80S.

EDINGER, A. L., THOMPSON, C. B. (2004) Death by design: apoptosis, necrosis and autophagy. *Current Opinion in Cell Biology* 16:663-669.

EUZEBY, J. P. *List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature - Genus Staphylococcus*; Disponível em <<http://www.bacterio.cict.fr/s/staphylococcus.html>>. Acesso em 20 de janeiro de 2010.

FATOPE, M. O.; AUDU, O. T.; TAKEDA, Y.; ZENG, L.; SHI, G.; SHIMADA, H.; MCLAUGHLIN, J. L. (1996) Bioactive *ent*-Kaurene Diterpenoids from *Annona senegalensis* *Journal of Natural Products* 59:301-303.

FRANCO, B. D. G. M. (1983) Frequência de isolamento e propriedades de *Escherichia coli*. Enteropatogênica em alimentos. (Tese de doutorado). USP (Faculdade de Ciências Farmacêuticas). São Paulo, 82p.

FELDMESSER, M., KRESS, Y., CASADEVALL, A. (2001) Dynamic changes in the morphology of *Cryptococcus neoformans* during murine pulmonary infection. *Microbiology*, 147:2355–2365.

FERNANDES, T. T.; SANTOS, A. T. F. DOS; PIMENTA, F. C. (2005) Atividade antimicrobiana das plantas *Plathymenia reticulata*, *Hymenaea courbaril* e *Guazuma ulmifolia*. *Revista de Patologia Tropical* 34(2):113-122.

FERREIRO L., MOREIRA JR. J. P. R., APPELT C. E., BERG V., OLIVEIRA I. A., MUSCHNER A. C., REISCHAK D., CHERMETTE, R. (2002) Associações entre o isolamento da *Candida albicans* com a infecção pelo vírus da leucemia felina, tratamentos com corticóides ou antimicrobianos em gatos. *Acta Scientiae Veterinariae* 30:179-183.

GEBHARDT, R. (2000) In vitro screening of plant extracts and phytopharmaceuticals: novel. *Planta Medica* 66:99-105.

GE, X.; YE, G.; LI, P.; TANG, W-J.; GAO, J-L.; ZHAO, W-M. (2008) Cytotoxic diterpenoids and sesquiterpenoids from *Pteris multifida*. *Journal of Natural Products* 71(2):227–231.

GHISALBERTI, E. L. (1997) The biological activity of naturally occurring kaurane diterpenes. *Fitoterapia* 68:303-325.

GONÇALVES, D. S. (2007) *Desenvolvimento de anticorpos contra o fungo Candida albicans e sua susceptibilidade a metabólitos secundários e anticorpos anti-Bukholderia spp.* Dissertação de Mestrado. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. Campos dos Goytacazes-RJ.

GONZALEZ, V. M.; FUERTES, M. A.; ALONSO, C.; PEREZ, J. M. (2001) Is cisplatin-induced cell death always produced by apoptosis? *Molecular Pharmacology* 59(4):657-663.

GULLUCE, M.; ASLAN, A.; SOKMEN, M.; SAHIN, F.; ADIGUZEL, A.; AGAR, G.; SOKMEN, A. (2006) *Phytomedicine* 13:515-518.

GUERRA, M. P.; NODARI, R. O. (2003) Biodiversidade: aspectos biológicos, geográficos, legais e éticos. In: Simões, C. M. O. *et alii Farmacognosia: da planta ao medicamento*. 5 ed. Porto Alegre: Editora UFRGS/Editora UFSC, p.13-18.

HANNUN, Y. A. (1996) Functions of ceramide in coordinating cellular responses to stress. *Science* 13:1855–1859.

HUBBEL, S. P.; WIEMER, D. F.; ADEJARE, A. (2003) An antifungal terpenoid defends a neotropical tree (*Hymenaea*) against attack by fungus-growing ants (*Atta*). *Oecologia* 60(3):321-327.

LANGENHEIM, J. H.; STUBBLEBINE, W. H. (1983) Variation in leaf resin composition between parent tree and progeny in *Hymenaea*: implications for herbivory in humid tropics. *Biochemical Systematics Ecology* 11(2):97-106.

LANGENHEIM, J. H.; STUBBLEBINE, W. H.; FOSTER, C. E.; NASCIMENTO, J. C. (1977) Estudos comparativos da variabilidade na composição da resina da folha entre árvore parental e progênie de espécies selecionadas de *Hymenaea*. *Acta Amazonica* 7(3):335-354.

LANGFELDER, K., STREIBEL, M., JAHN, B., HAASE, G., BRAKHAGEA, A.A. (2003) Biosynthesis of fungal melanins and their importance for human pathogenic fungi. *Fungal Genetics and Biology* 38:143–158.

LEE, Y-T; LANGENHEIM, J. H. (1975) A Systematics revision of the genus *Hymenaea*. University of California. *Publications in Botany* 69:1-109.

LOWE, S. W.; LIN, A. W. (2000) Apoptosis in cancer. *Carcinogenesis* 21(3):485-495.

MACHADO, T. B.; PINTO, A. V.; PINTO, M. C. F. R.; LEAL, I. C. R.; SILVA, M. G.; AMARAL, A. C. F.; KUSTER, R. M.; SANTOS, K. R. N. (2003) In vitro activity of Brazilian medicinal plants, naturally occurring naphthoquinones and their analogues, against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *International Journal of Antimicrobial Agents* 21(3):279-284.

MACMICKING, J.; XIE, Q. W.; NATHAN, C. (1997) Nitric oxide and macrophage function. *Annual Review of Immunology* 15:323–350.

MALIK, R.; WIGNEY, D. I.; MUIR, D. B.; LOVE, D. N. (1997) Asymptomatic carriage of *Cryptococcus neoformans* in the nasal cavity of dogs and cats. *Journal of Medical and Veterinary Mycology* 35:25-31.

MAPARA, M.; SYKES, M. (2004) Tolerance and cancer: mechanisms of tumor evasion and strategies for breaking tolerance. *Journal of Clinical Oncology* 22:1136-1151.

MARTIN, S. S., LANGENHEIM, J. H. (1972) Sesquiterpenes in leaf pocket resin of *Hymenaea courbaril*. *Phytochemistry* 11(10):3049-3051.

MITCHELL, T. G.; PERFECT, J. R. (1995) Cryptococcosis in the era of AIDS - 100 years after the discovery of *Cryptococcus neoformans*. *Clinical Microbiology Reviews* 8:515-548.

MITCHELL, D. H., SORRELL, T. C.; ALLWORTH, A. M.; HEATH, C. H.; MCGREGOR, A. R.; PAPANAOU, K.; RICHARDS, M. J.; GOTTLIEB, T. (1995) Cryptococcal disease of the CNS in immunocompetent hosts: influence of cryptococcal variety on clinical manifestations and outcome. *Clinical Infectious Diseases* 20:611-616.

MORALES, A.; PÉREZ, P.; MENDOZA, R.; COMPAGNONE, R.; SUAREZ, A. I.; ARVELO, F.; RAMIREZ, J. L.; CASTRO, I. G. (2005) Cytotoxic and proapoptotic activity of ent-16 β -17 α -dihydroxykaurane on human mammary carcinoma cell line MCF-7. *Cancer Letters* 218:109–116.

MURRAY, P. R. (ed.) (2004) *Microbiologia médica* 4. ed Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 762p.

NETO, J. M. (2007) *Atividade inibitória de moléculas sintéticas e subprodutos bacterianos sobre o fungo Sporothrix schenkii* (Hektoen & Perkins in 1900) Monografia de conclusão de curso de Medicina Veterinária, Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Campos dos Goytacazes.

NEWMAN, D. J., CRAGG, G. M., SNADER, K. M. (2003) Natural products as a source of new drugs over the period 1981-2002. *Journal of Natural Products* 66:1002-1037.

NOVAIS, T. S.; COSTA, J. F. O.; DAVID, J. M.; QUEIROZ, L. P.; FRANÇA, F.; GIULIETTI, A. M.; SOARES, M. B. P.; SANTOS, R. R. (2003) Atividade antibacteriana em alguns extratos de vegetais do semi-árido brasileiro. *Revista Brasileira de Farmacognosia* 14(1):05-08.

OK-HWA, K.; HEE-SUNG, C.; JANG-GI, C. *et alii* (2008) Ent-pimara-8(14),15-dien-19-oic acid isolated from the roots of *Aralia cordata* inhibits induction of inflammatory mediators by blocking NF-KB activation and mitogen-activated protein kinase pathways. *European Journal of Pharmacology* 601:179-185.

PASSONI, L. F. C., WANKE, B., NISHIKAWA, M.M., LAZERA, M.S. (1998) *Cryptococcus neoformans* isolated from human dwellings in Rio de Janeiro, Brazil: an analysis of domestic environment of AIDS patients with and without cryptococcosis. *Medical Mycology* 36(5):305-311.

PASSONI, L. F. C. (1999) Wood, animals and human beings as reservoir for human *Cryptococcus neoformans* infection. *Revista Iberoamericana de Micologia* 16(6):77-81.

PEACHY, P. R.; GUBBINS, P. O.; MARTIN, R. E. (1998) The association between cryptococcal variety and immunocompetent and immunocompromised hosts. *Pharmacotherapy* 18:255–264.

PEREIRA, E. M.; MACHADO, T. B.; LEAL, I. C. R. *et alii* (2006) *Tabebuia avellanedae* naphthoquinones: activity against methicillin-resistant staphylococcal strains, cytotoxic activity and *in vivo* dermal irritability analysis. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials* 5(5):1-7.

PERLROTH, J., CHOI, B., SPELLBERG, B. (2007) Nosocomial fungal infections: epidemiology, diagnosis, and treatment. *Medical Mycology* 45:321-346.

POTZERNHEIM, M. C. L.; BIZZO, H. R.; VIEIRA, R. F. (2006) Análise dos óleos essenciais de três espécies de *Piper* coletadas na região do Distrito Federal (Cerrado) e comparação com óleos de plantas procedentes da região de Paraty, RJ (Mata Atlântica). *Revista Brasileira de Farmacognosia* 16(2):246-251.

REX, J. H., WALSH, T. J., SOBEL, J. D. *et alii* (2000) Practice Guidelines for the treatment of candidiasis. *The Journal of Infectious Diseases* 30:662-678.

REX, J. H.; PFALLER, M. A.; WALSH, T. J. *et alii* (2001) Antifungal susceptibility testing: practical aspects and current challenges. *Clinical Microbiology Reviews* 14:643-658.

RIPPON, J. W. (1988) *Medical mycology. In: The pathogenic fungi and pathogenic actinomycetes*. New York: WB Saunders, 582-609.

ROCHETTE, F., ENGELEN, M., VANDEN BOSSCHE, H. (2003) Antifungal agents of use in animal health – practical applications. *Journal of Veterinary Pharmacology Therapeutics* 26:31-53.

ROCHA, A. B., LOPES, R. M., SCHWARTS, G. (2001) Natural products in anticancer therapy. *Current Opinion in Pharmacology* 1(4):364-369.

SAMUELS, R. I.; SANTOS, A.V.; VIEIRA-DA-MOTTA, O., SILVA, L.G., DEUS, M.F., SILVA, M.J.R. (2005) *Antimicrobial proteins secreted by Burkholderia cepacia*. In: XXXIV Sbbq, Águas de Lindóia, SP. Sbbq, v. 29. p. F8.

SANT'ANA, P. L.; MILAN, E. P.; MARTINEZ, R. *ET alii* (2002) Multicenter brazilian study oral *Candida* species isolated from aids patients. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 97(2):253-257.

SCHECHTER, M.; MARANGONI, D. V. (1998) *Doenças infecciosas: conduta, diagnóstico e terapêutica*. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan.

SCHLEIFER, K. H.; KROPPESTEDT, R. M. (1990) Chemical and molecular classification of staphylococci. *Journal of Natural Products Symp. Suppl.* 19:9S-24S.

SIKKEMA, J.; DE BONT, J. A.; POOLMAN, B. (1995) Mechanisms of membrane toxicity of hydrocarbons. *Microbiological Reviews* 59(2):201-222.

SIQUEIRA, A.K., RIBEIRO, M.G.; SALERNO, T.; TAKAHIRA, R.K.; LOPES, M.D.; PRESTES, N.C.; SILVA, A. V. (2008) Sensitivity profile and multiresistance in *Escherichia coli* strains isolated from urinary tract infection, pyometra and feces of dogs. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia* 60(5):1263-1266.

SOMPAYRAC, L. (2004) *How cancer works*. Boston: Jones and Bartlett Publishers, 110p.

SUBHASHINI, J., MAHIPAL, S. V. K., REDDANNA, P. (2005) Anti-proliferative and apoptotic effects of celecoxib on human chronic myeloid leukemia in vitro. *Cancer Letters* 224:31-43.

SZABÓ, C., THIEMERMANN, C. (1995) Regulation of the expression of the inducible isoform of nitric oxide synthase. *Advances in Pharmacology* 34:113–153.

TANAKA, N.; Ooba, N.; DUAN, H.; TAKAISHI, Y.; NAKANISHI, Y.; BASTOW, K.; LEE, K. (2004) Kaurane and abietane diterpenoids from *Tripterygium doianum* (Celastraceae). *Phytochemistry* 65:2071–2076.

VANE, J.R., MITCHELL, J.A.; APPLETON, I.; TOMLINSON, A.; BISHOP-BAILEY, D.; CROXTALL, J.; WILLOUGHBY, D.A. (1994) Inducible isoforms of cyclooxygenase and nitric-oxide synthase in inflammation. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 91:2046–2050.

VIEIRA-DA-MOTTA, O., SILVA, M. J. R., DEUS, M. F., SAMUELS, R. I., MATHIAS, L., ALMEIDA, J. C. A., GUIMARÃES, E. V., MORAES NETO, A. H. A. (2008) Atividade *in vitro* dos metabólitos secundários de *Burkholderia* sp. (Burkholder 1950) sobre a levedura *Malassezia pachydermatis*. *Ciência Animal Brasileira* 9: 410-417.

VILLARROEL, E.; NAVARRO, P.; RAMOS, R. *et alii* (2002) *Escherichia coli* identificadas em pacientes com infecciones urinarias: sensibilidade antimicrobiana. *Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología* 22:1-6.

WANI, M. C., TAYLOR, H. L., WALL, M. E., COGGIN, P., MCFHAIL, A. T. (1971) Plant antitumor agents :VI. The isolation and Structure of Taxol, a novel antileukemic and antitumor agent from taxus bravifolia. *Journal of the American Chemical Society* 93:2325-2327.

WATTENBERG, L. W. (1985) Chemoprevention of cancer. *Cancer Research* 45:1-8.

WEINBERG, R. A. (2008) *A Biologia do Câncer*. 1ª ed. Porto Alegre: Editora Artmed.

WICKES, B. L.; MAYORGA, M. E.; EDMAN, U.; EDMAN, J. C. (1996) Dimorphism and haploid fruiting in *Cryptococcus neoformans*: association with the a-mating type. *Proceeding of the National Academy of Science* 93(4):7327-7331.

WOERDENBAG, H. J.; LUTKE, L. R.; BOS, R. *et alii* (1996) Isolation of two cytotoxic diterpenes from the Fern *Pteris multifida*. *Verlag der Zeitschrift für Naturforschung* 51:635-638.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. *Are the number of cancer cases increasing or decreasing in the world?* Disponível em: <<http://www.who.int/features/qa/15/en/index.html>>. Acesso em 22 de janeiro de 2010.

ZIEGLER, U.; GROSCURTH, P. (2004) Morphological Features of Cell Death. *News Physiological Sciences*. 19:124-128.

ZUGER, A., LOUIE, E., HOLZMAN, R. S., SIMBERKOFF, M. S.; RAHAL, J. J. (1986) Cryptococcal disease in patients with the acquired immunodeficiency syndrome. *Annals of Internal Medicine* 104:234-240.

APÊNDICE

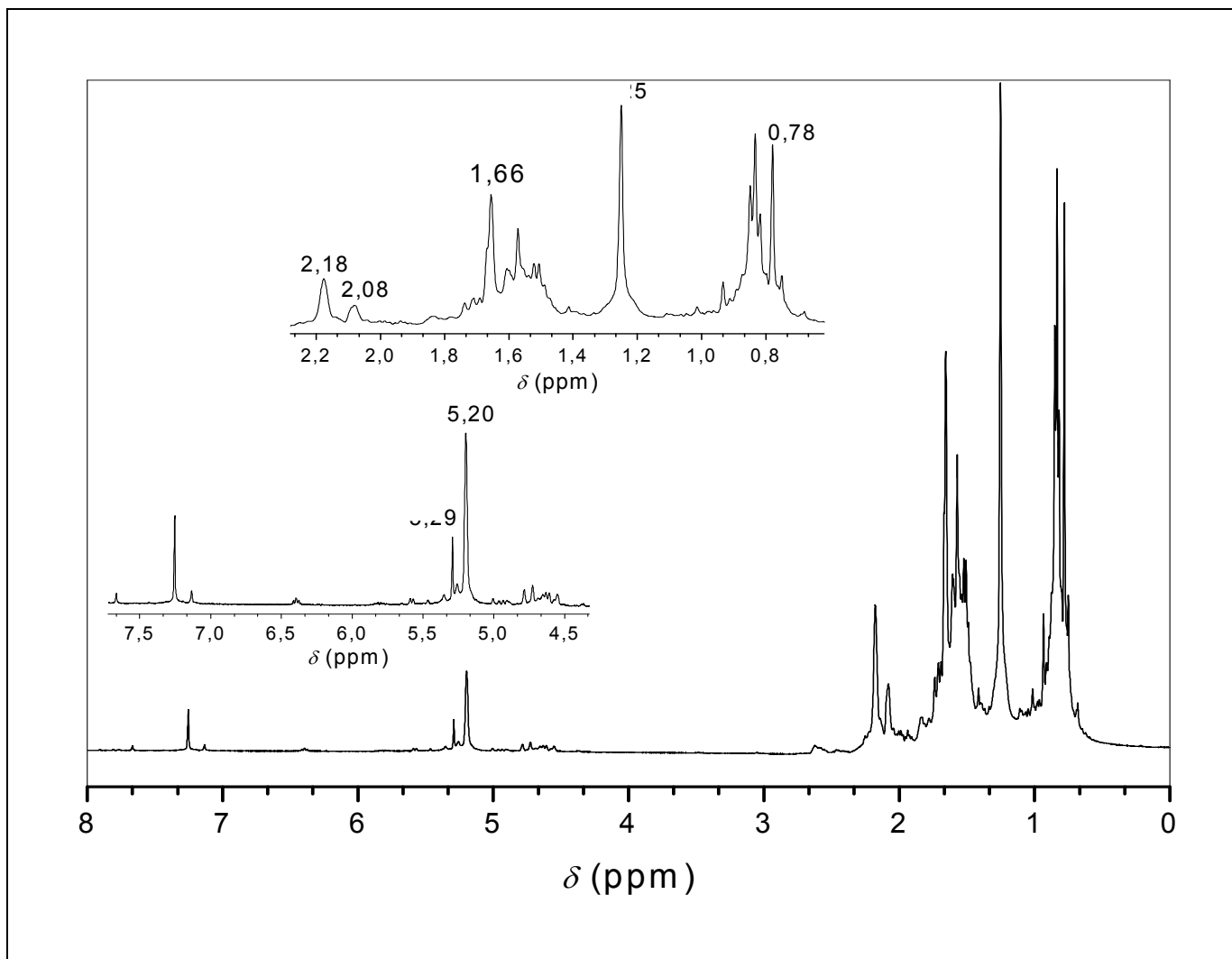


FIGURA 1A – Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) do α -copaeno (**15**).

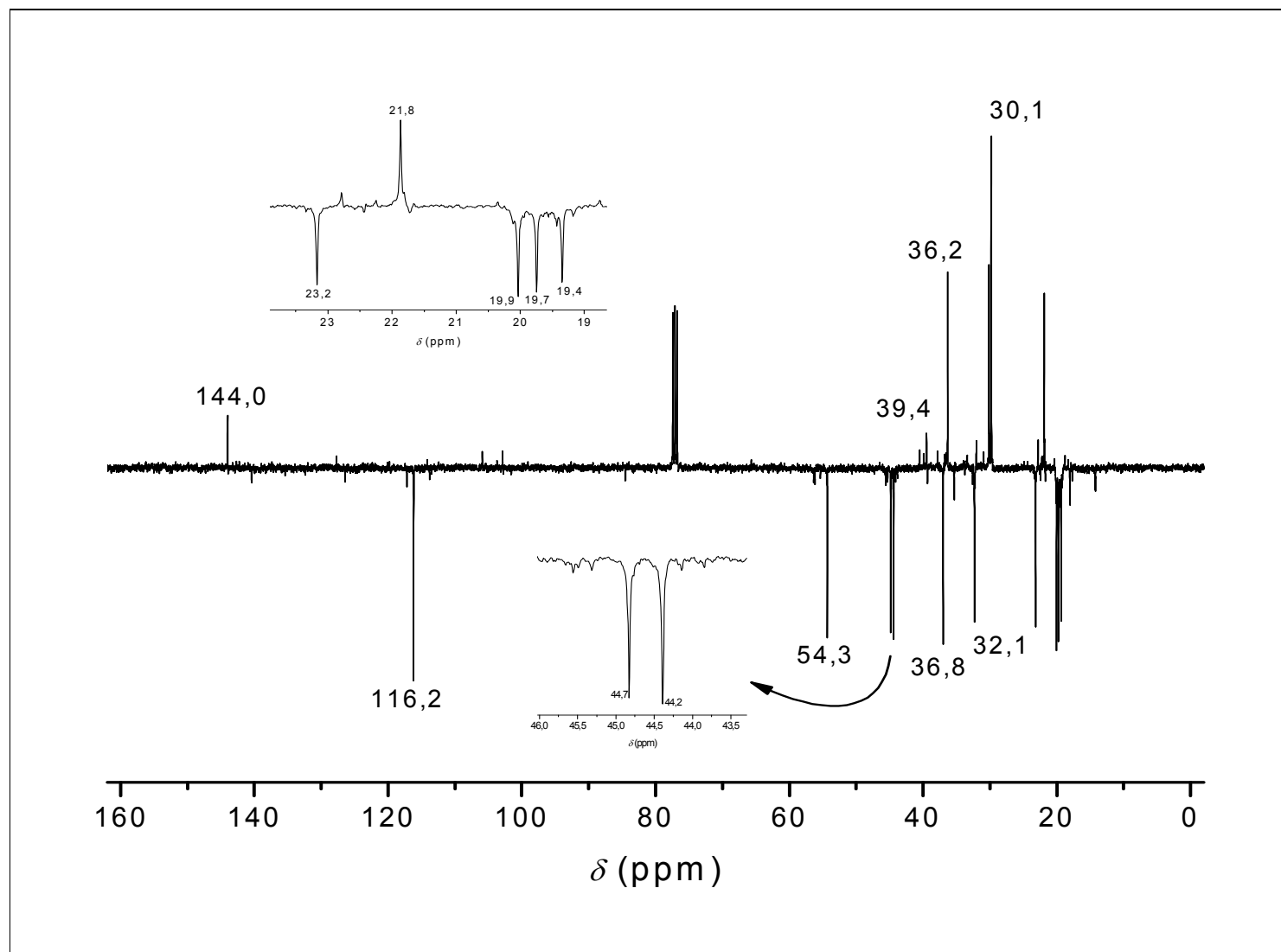


FIGURA 2A - Espectro de RMN de ^{13}C obtido pela técnica APT (100 MHz, CDCl_3) do α -copaeno (15).

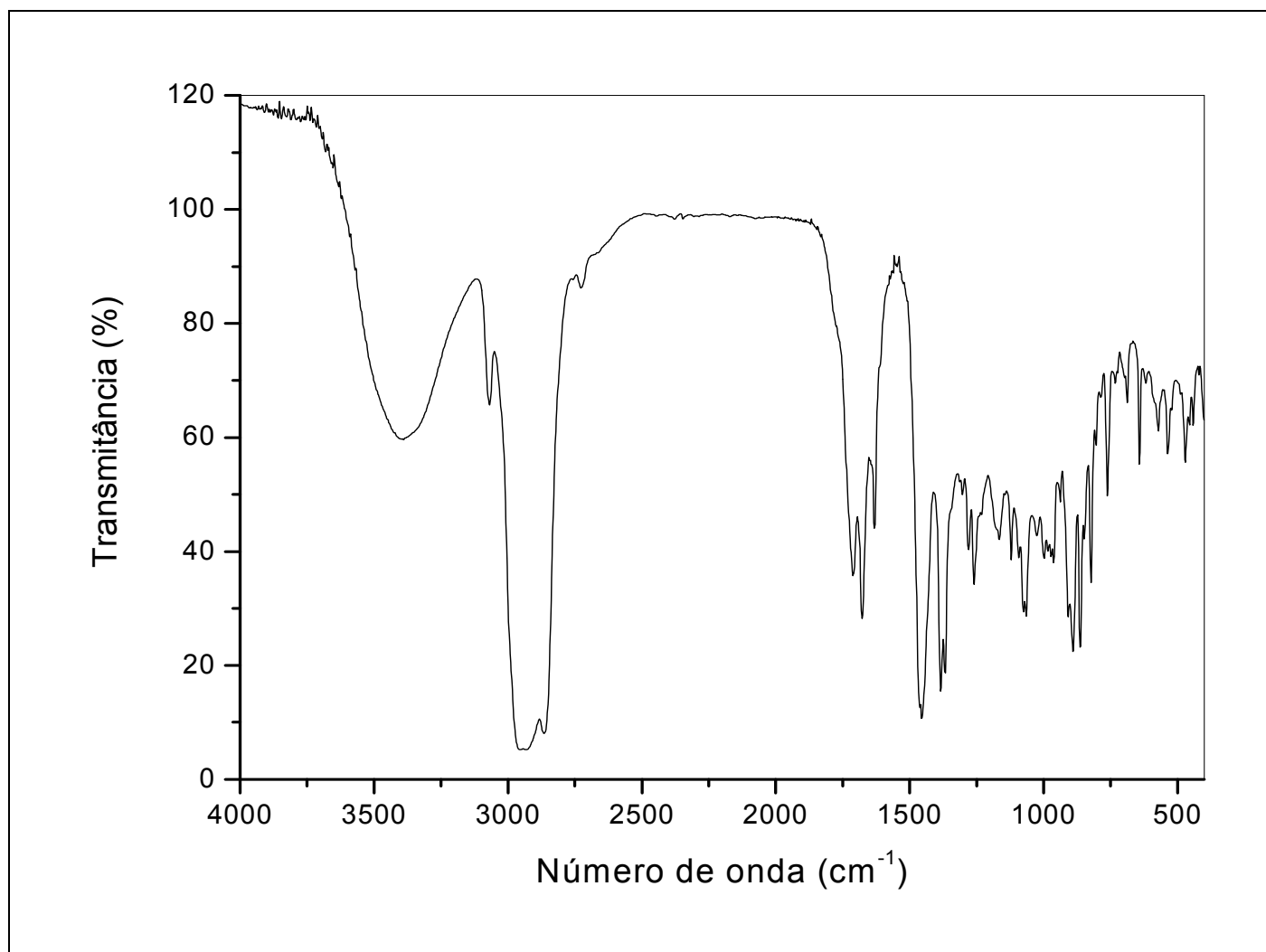


FIGURA 3A - Espectro no infravermelho (NaCl) do óxido de cariofileno (**29**).

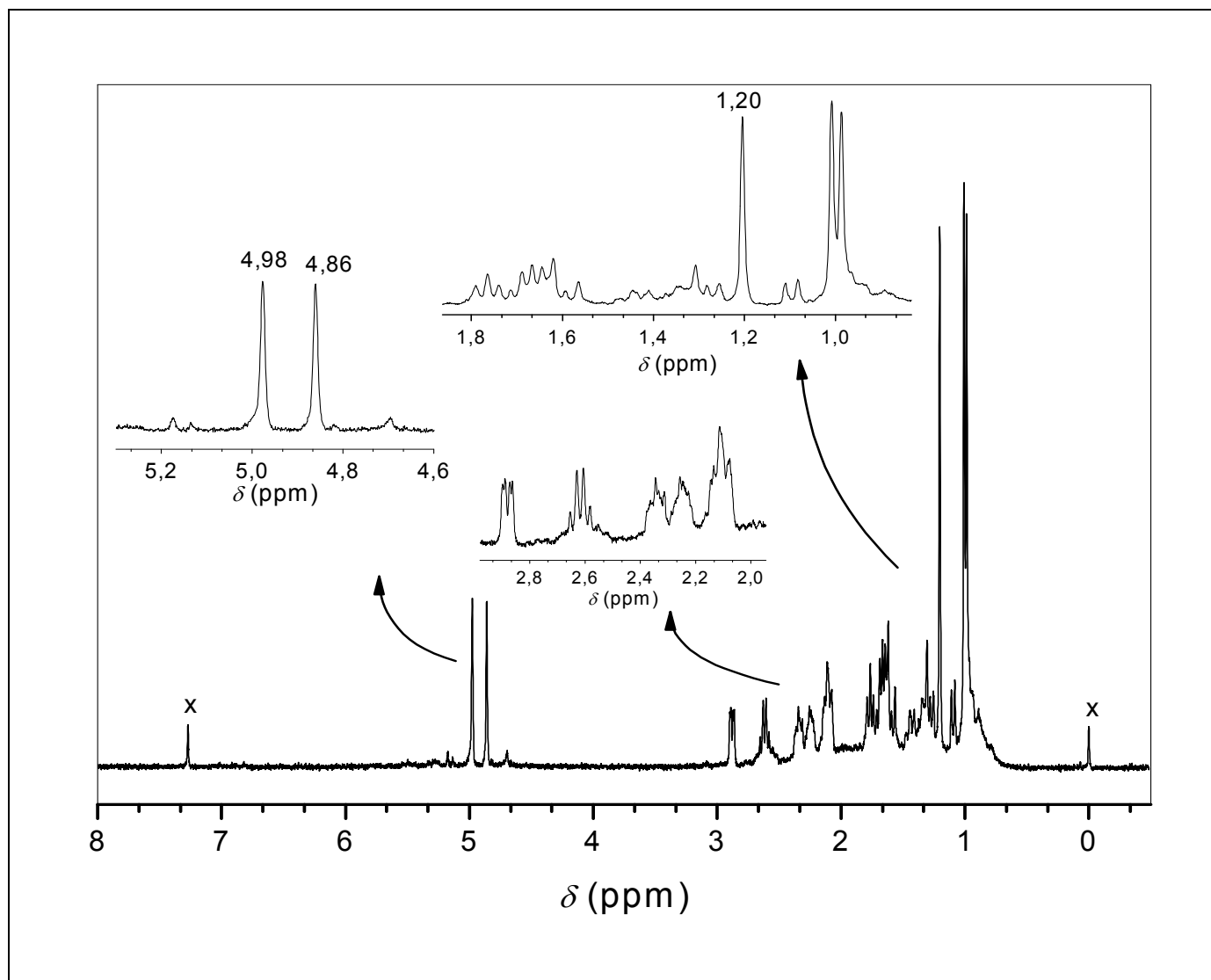


FIGURA 4A – Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) do óxido de cariofileno (**29**).

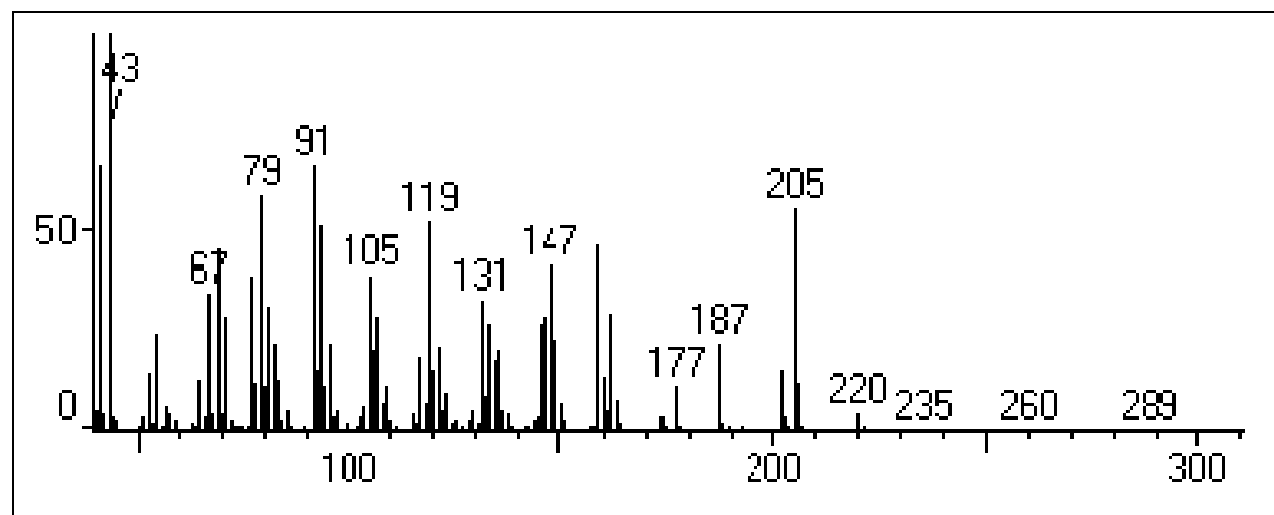


FIGURA 5A – Espectro de massas do spatulenol (**30**).

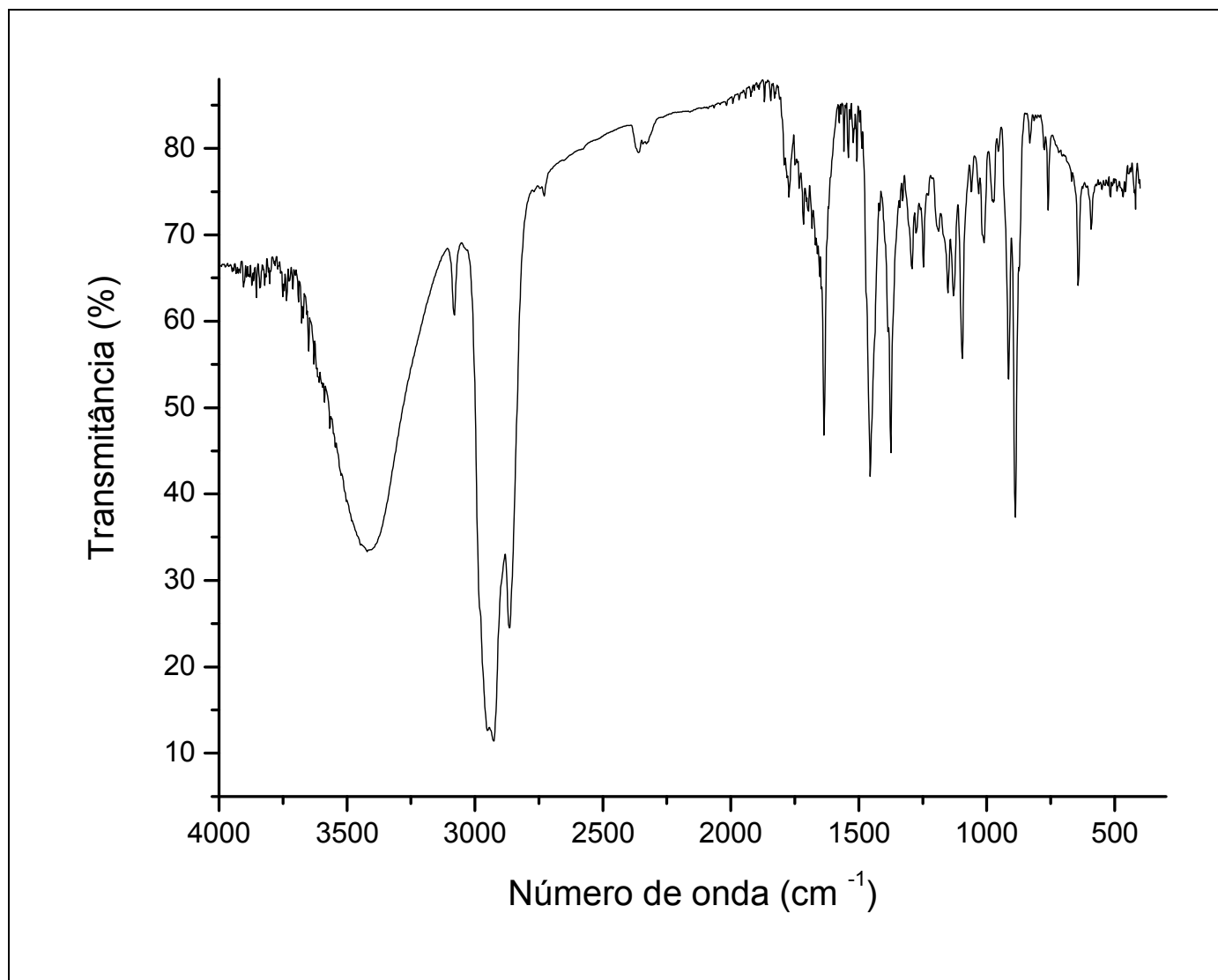


FIGURA 6A - Espectro no infravermelho (NaCl) do espatulenol (**30**).

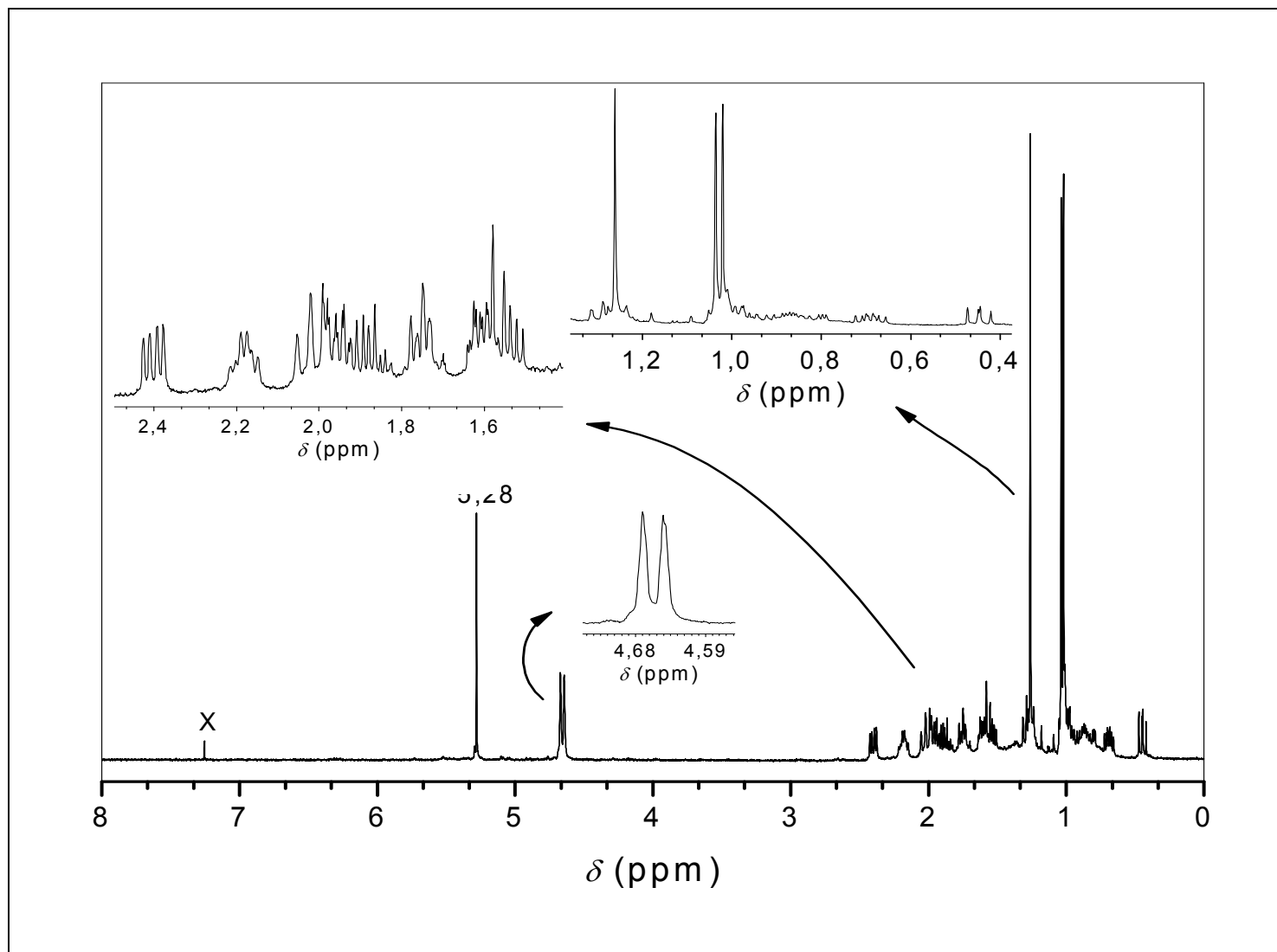


FIGURA 7A – Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) do spatulenol (**30**).

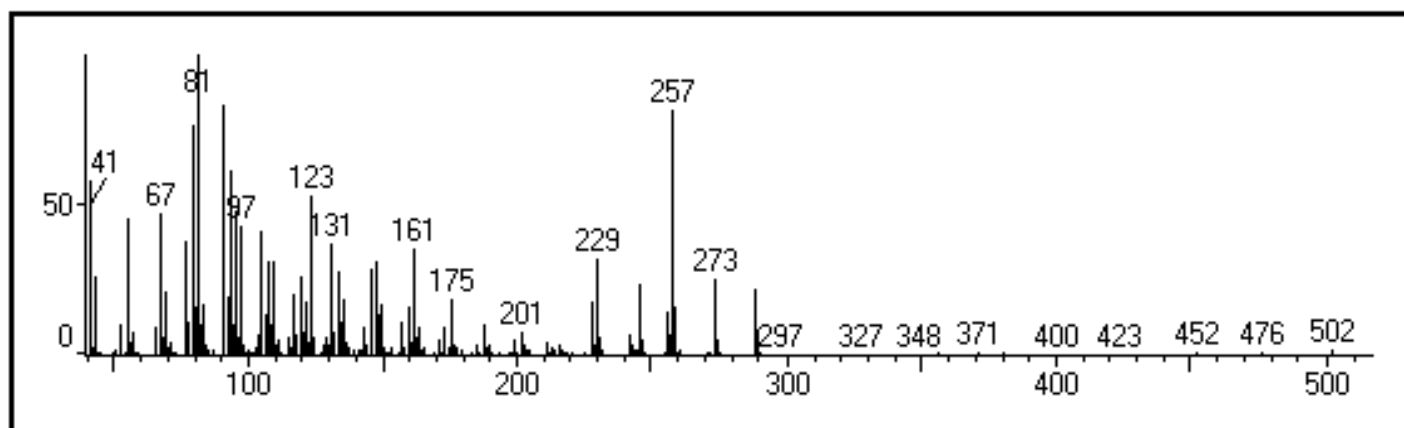


FIGURA 8A – Espectro de massas do álcool do caur-16-en-18-ol (**31**).

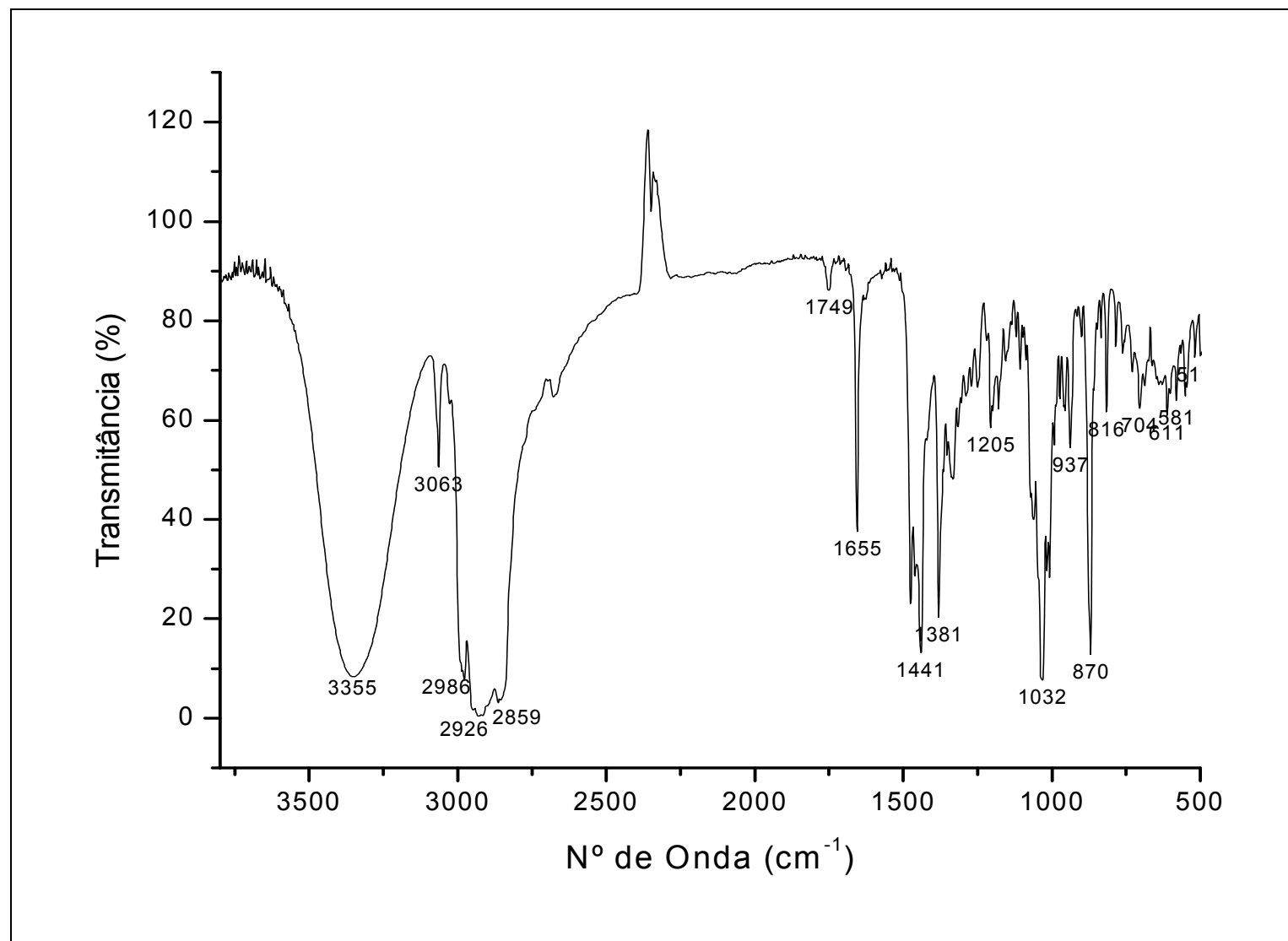


FIGURA 9A - Espectro no infravermelho (NaCl) do álcool do caur-16-en-18-ol (**31**).

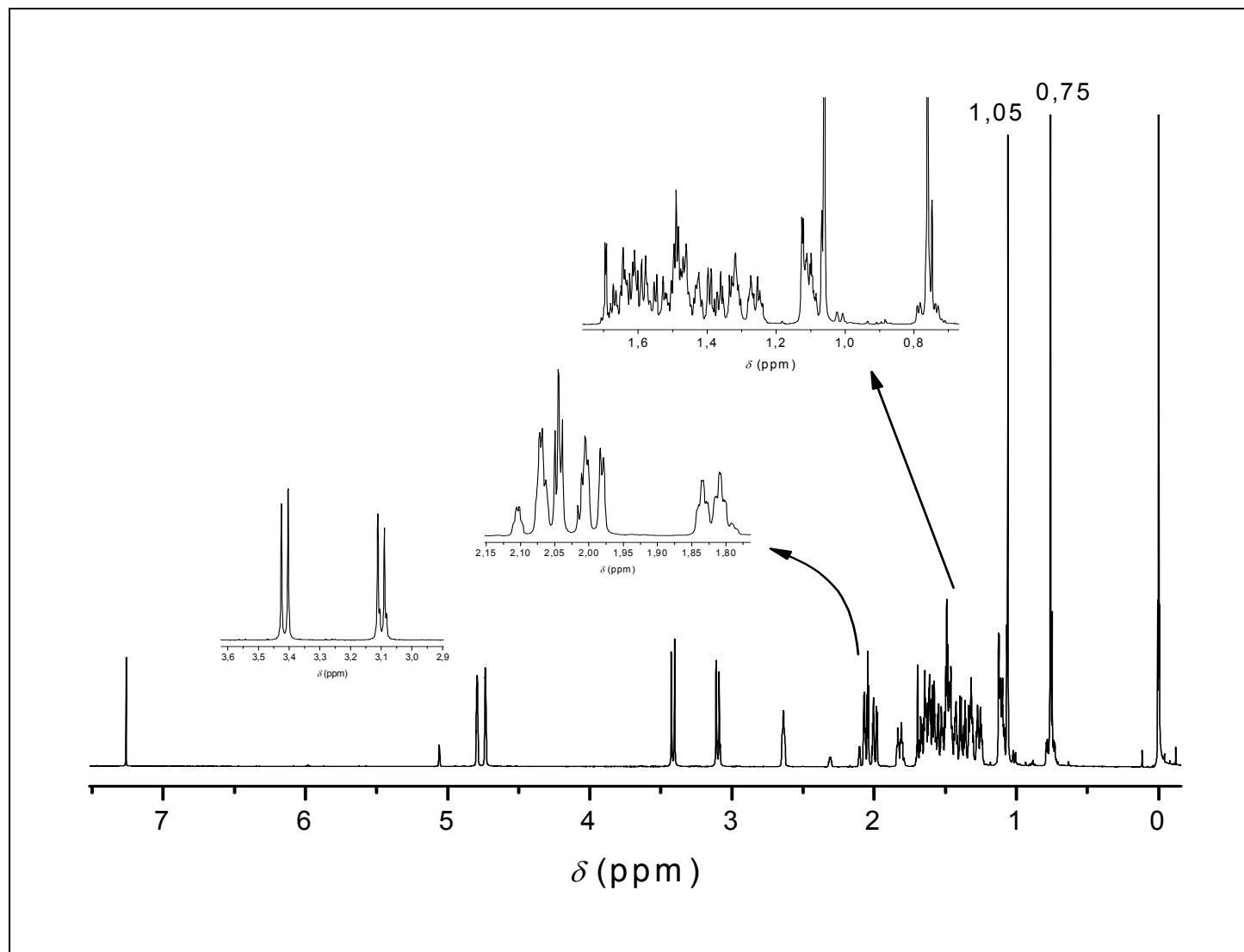


FIGURA 10A – Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) do caur-16-en-18-ol (**31**).

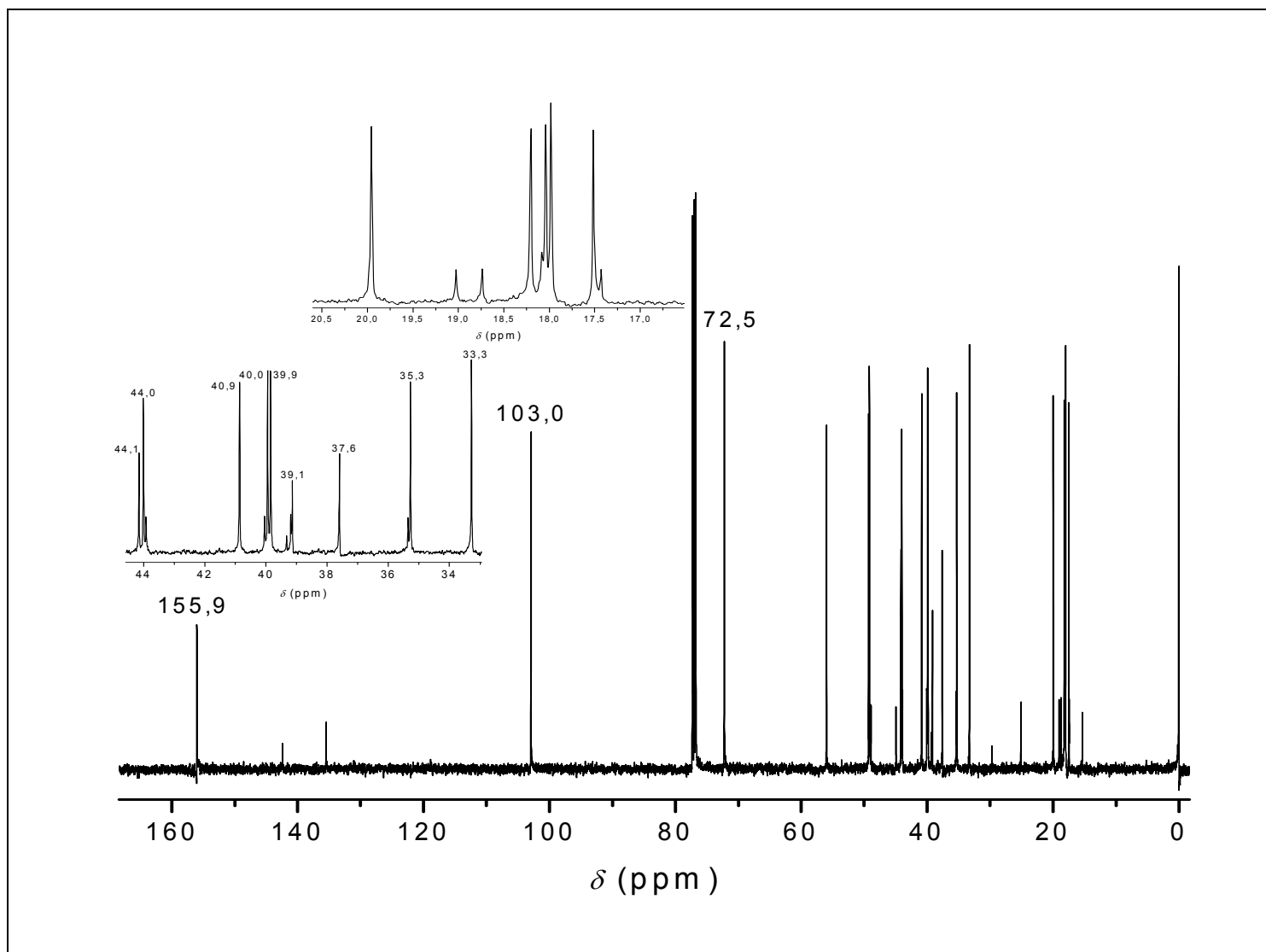


FIGURA 11A - Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) do álcool do caur-16-en-18-ol (31).

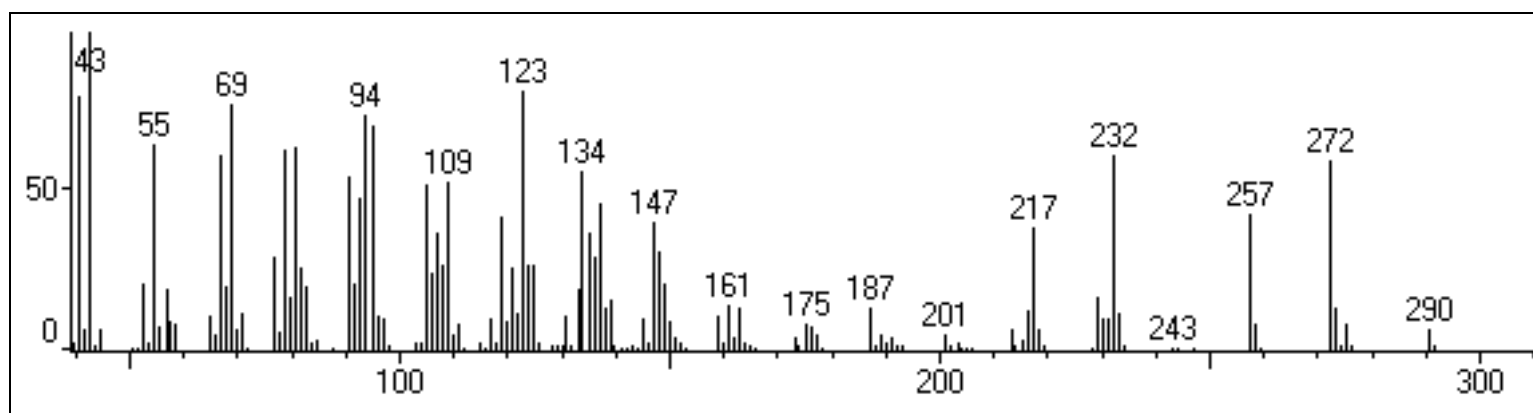


FIGURA 12A – Espectro de massas do cauran-16 α -ol (**32**).

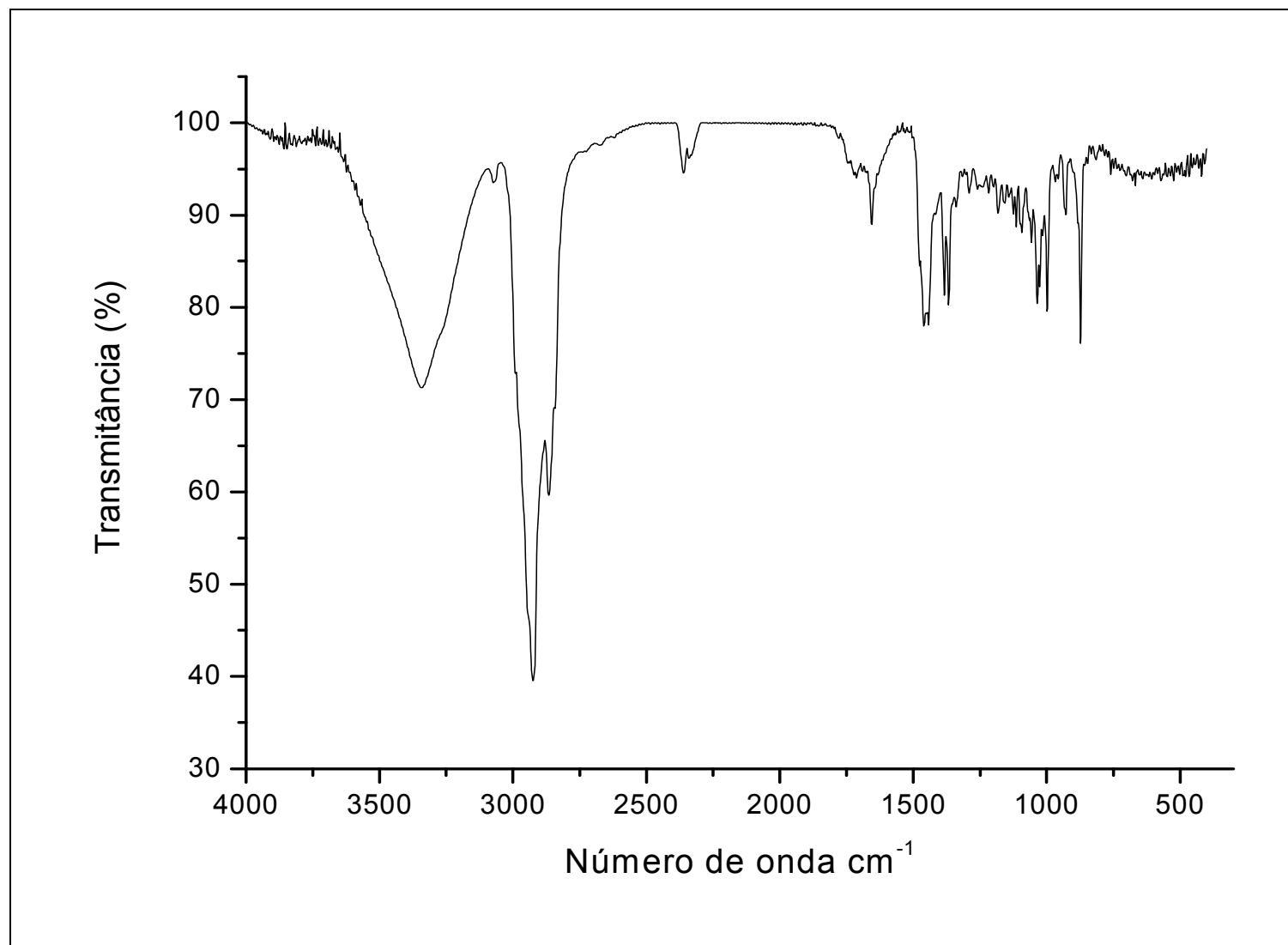


FIGURA 13A - Espectro no infravermelho (NaCl) do cauran-16 α -ol (**32**).

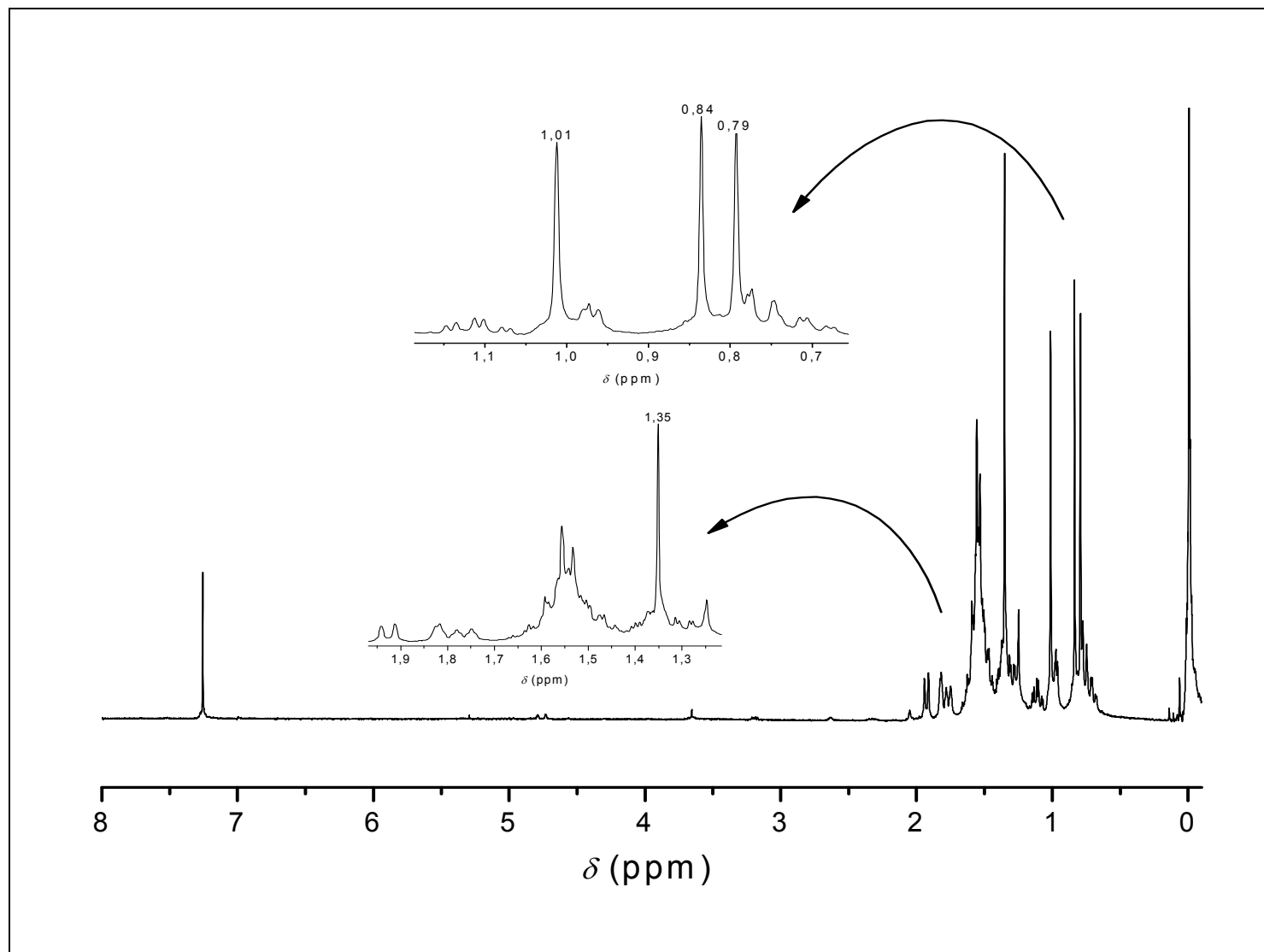


FIGURA 14A – Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) do cauran-16 α -ol (**32**).

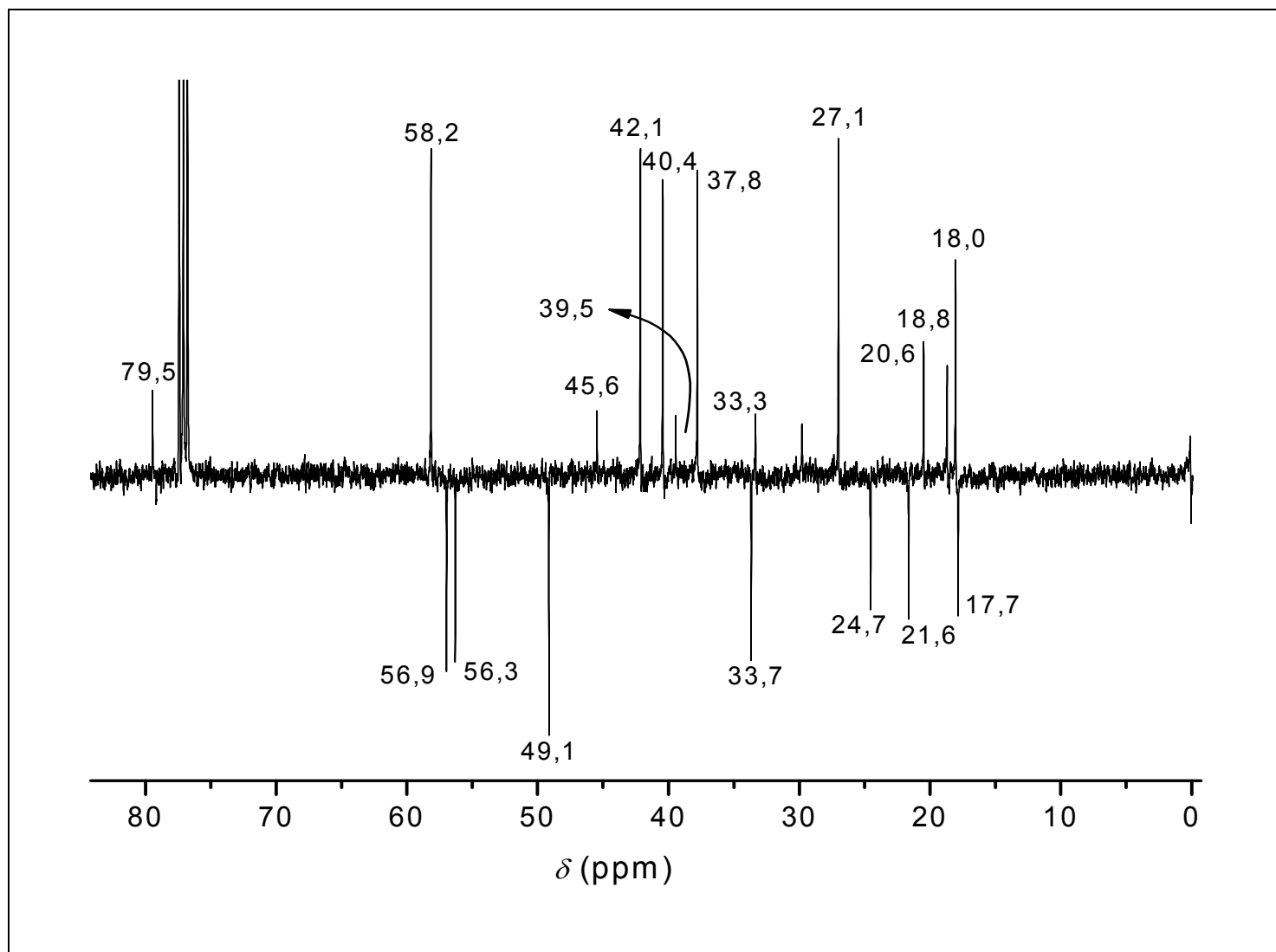


FIGURA 15A - Espectro de RMN de ^{13}C obtido pela técnica APT (100 MHz, CDCl_3) do cauran-16 α -ol (**32**).

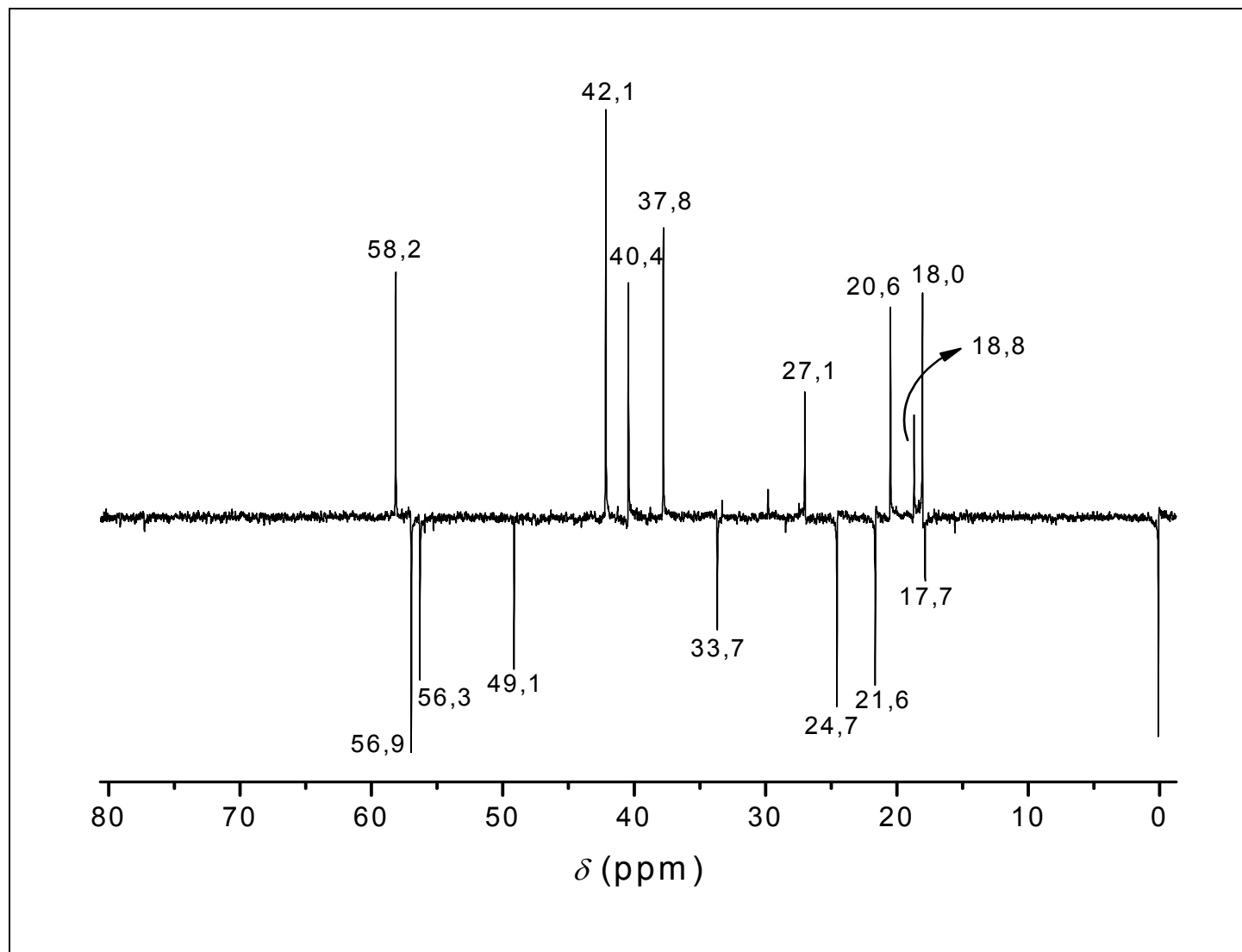


FIGURA 16A - Espectro de RMN de ^{13}C obtido pela técnica DEPT 135 (100 MHz, CDCl_3) do cauran-16 α -ol (**32**).

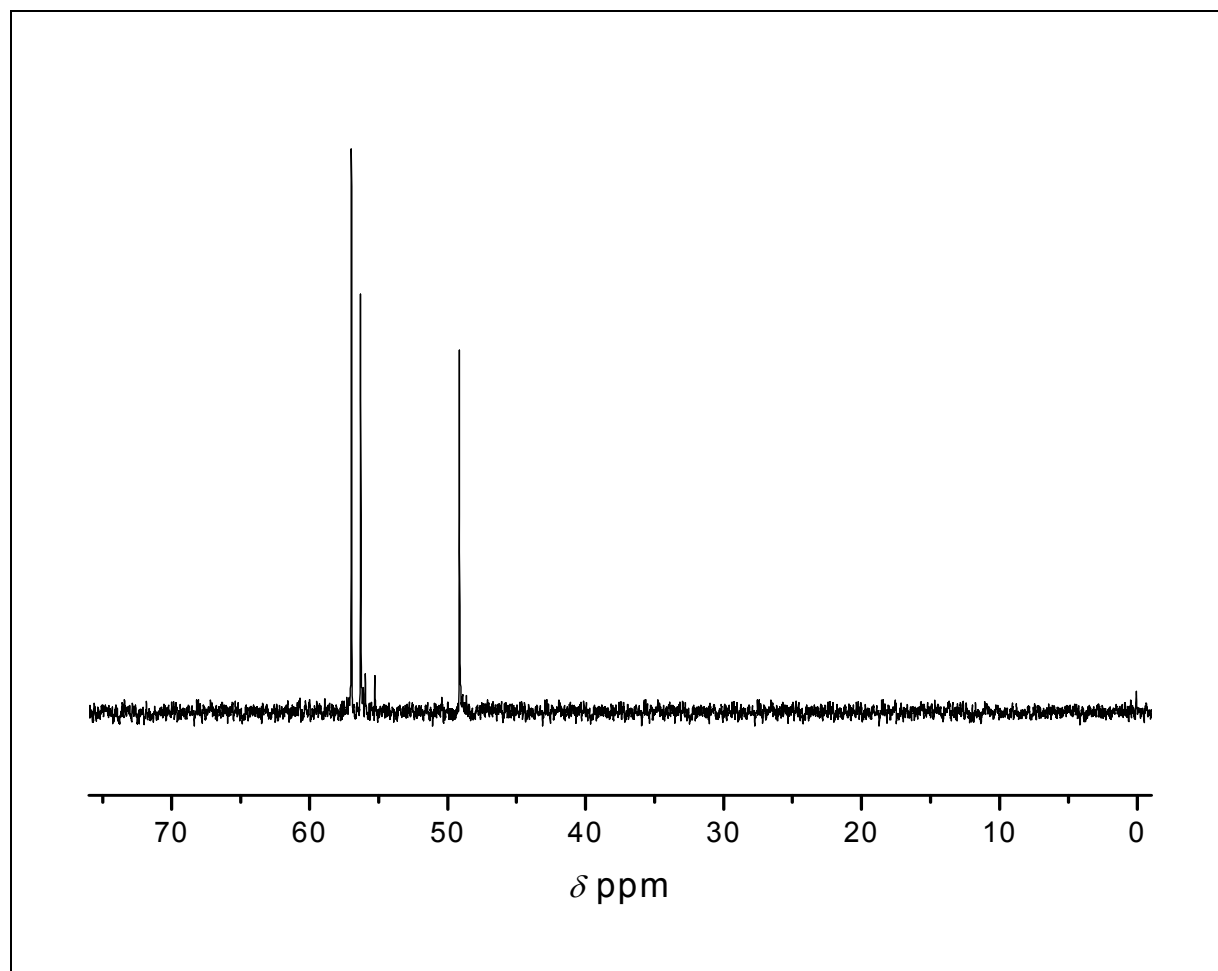


FIGURA 17A - Espectro de RMN de ^{13}C obtido pela técnica DEPT 90 (100 MHz, CDCl_3) do cauran-16 α -ol (**32**).

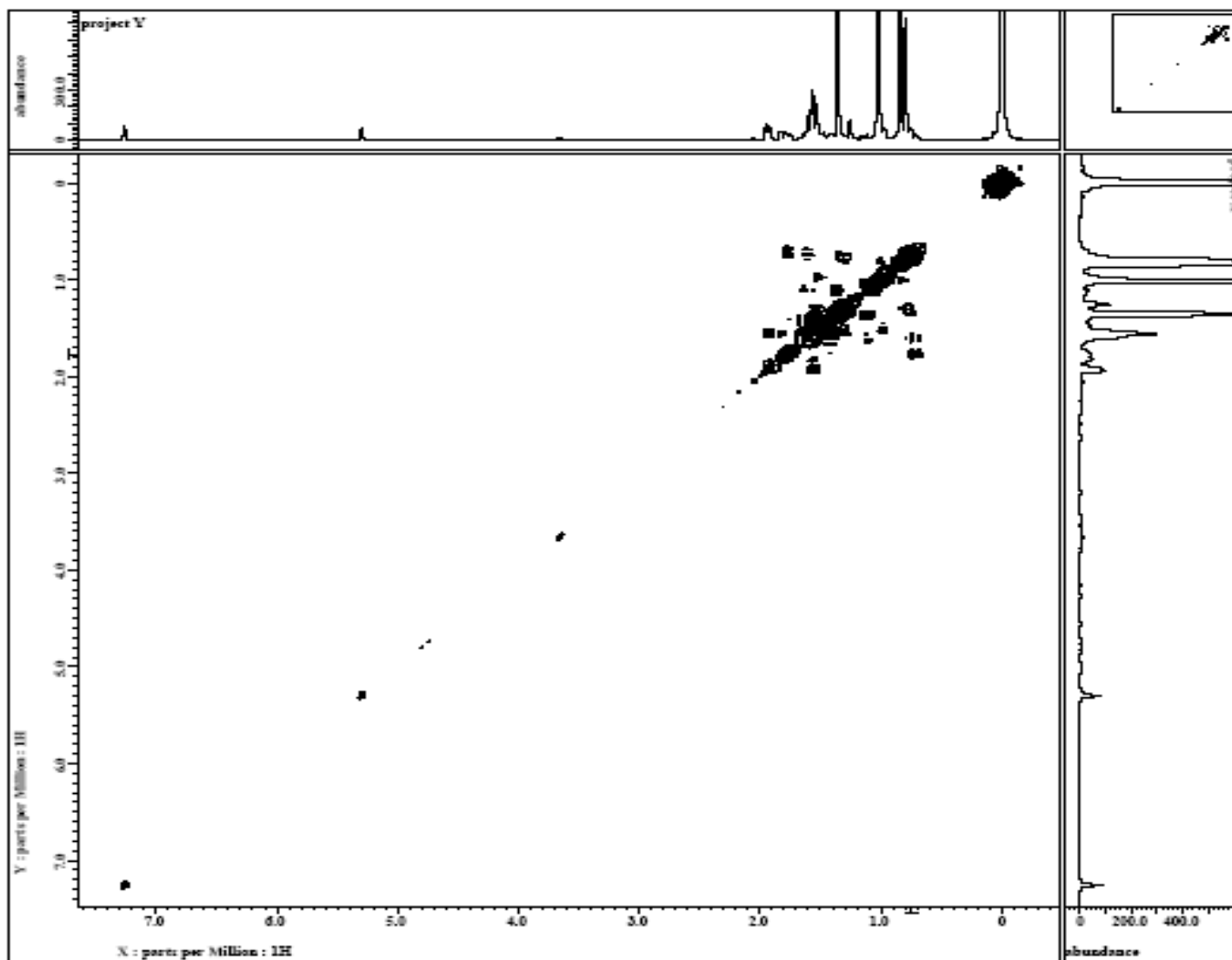


FIGURA 18A – Espectro de COSY (400 MHz, CDCl₃) do cauran-16 α -ol (32).

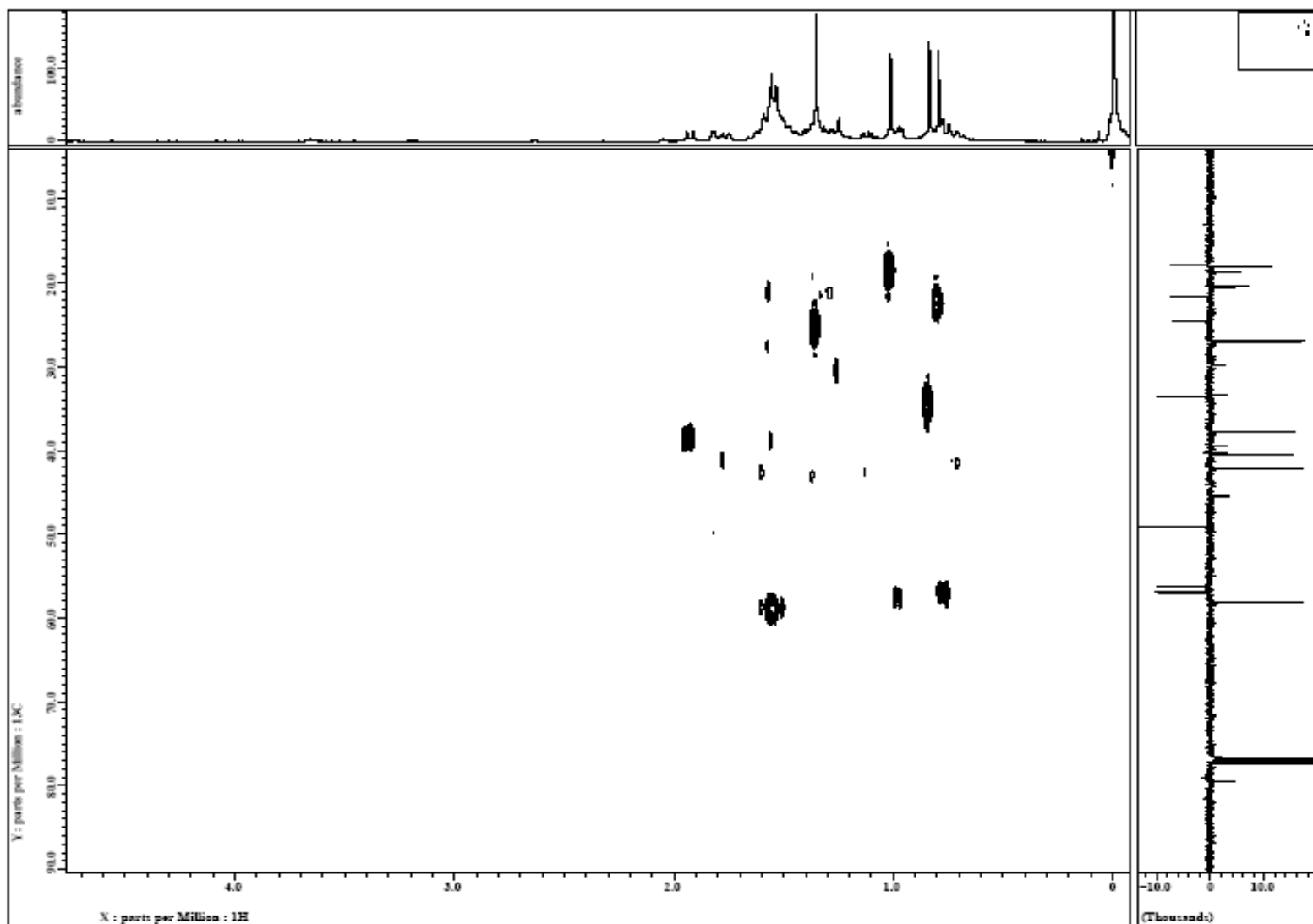


FIGURA 19A – Espectro de HMQC (^1H -400 MHz, ^{13}C -100 MHz, CDCl_3) do cauran-16 α -ol (**32**).

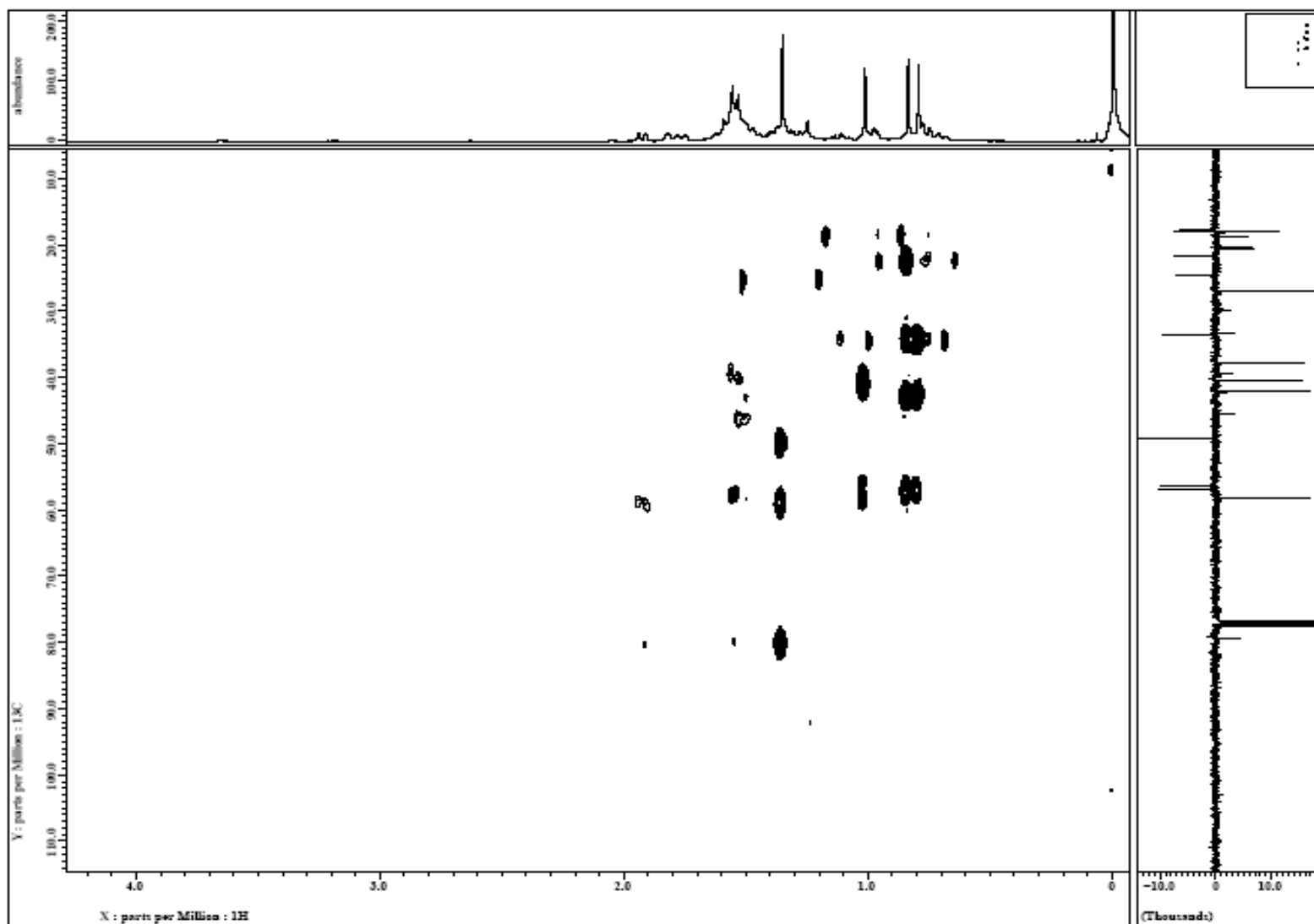


FIGURA 20A – Espectro de HMBC (^1H -400 MHz, ^{13}C -100 MHz, DMSO-d_6) do cauran-16 α -ol (**32**).

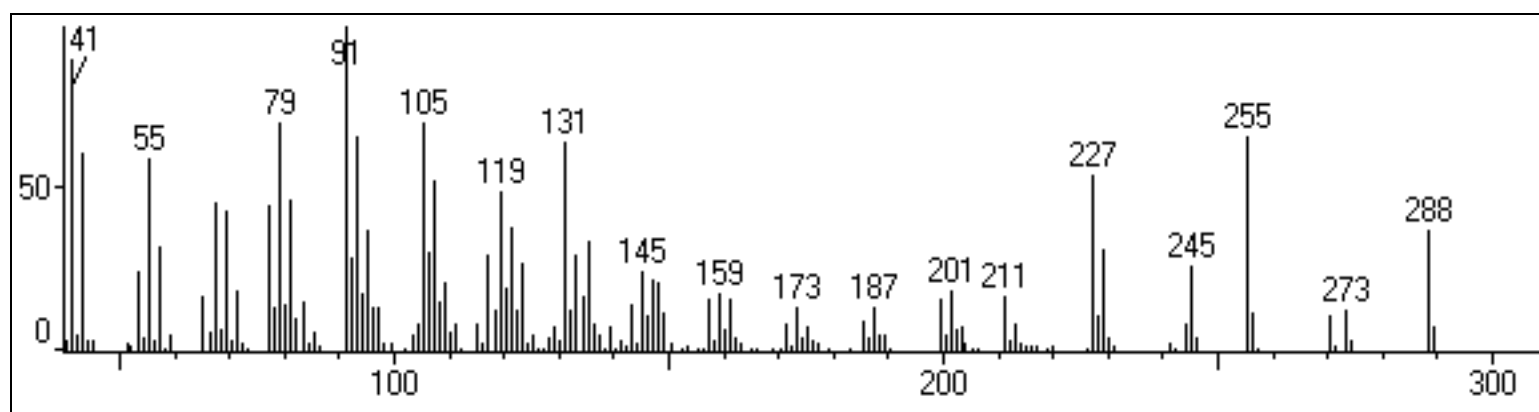


FIGURA 21A – Espectro de massas do caur-16-en-3 α -ol (**33**).

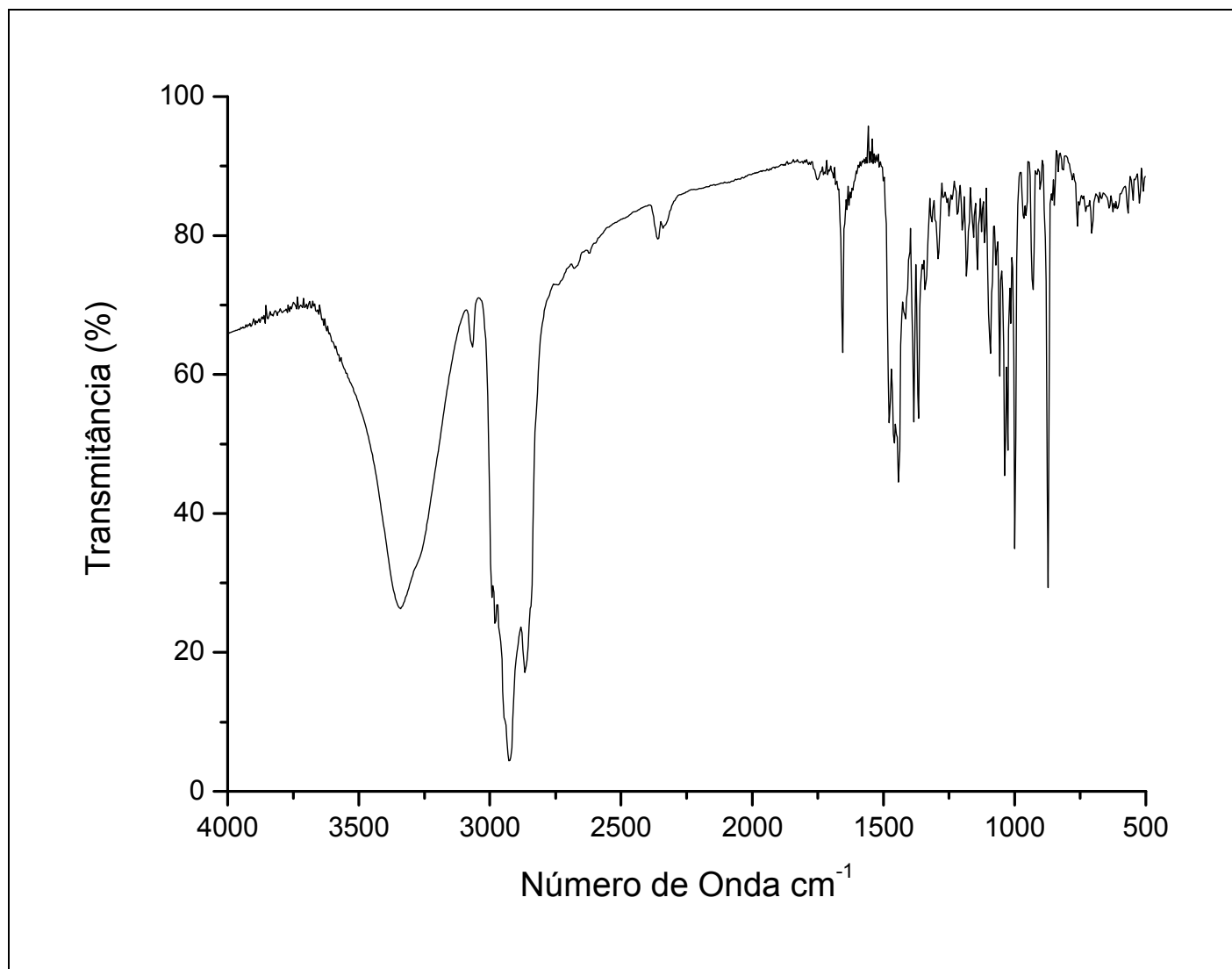


FIGURA 22A - Espectro no infravermelho (NaCl) do caur-16-en-3 α -ol (**33**).

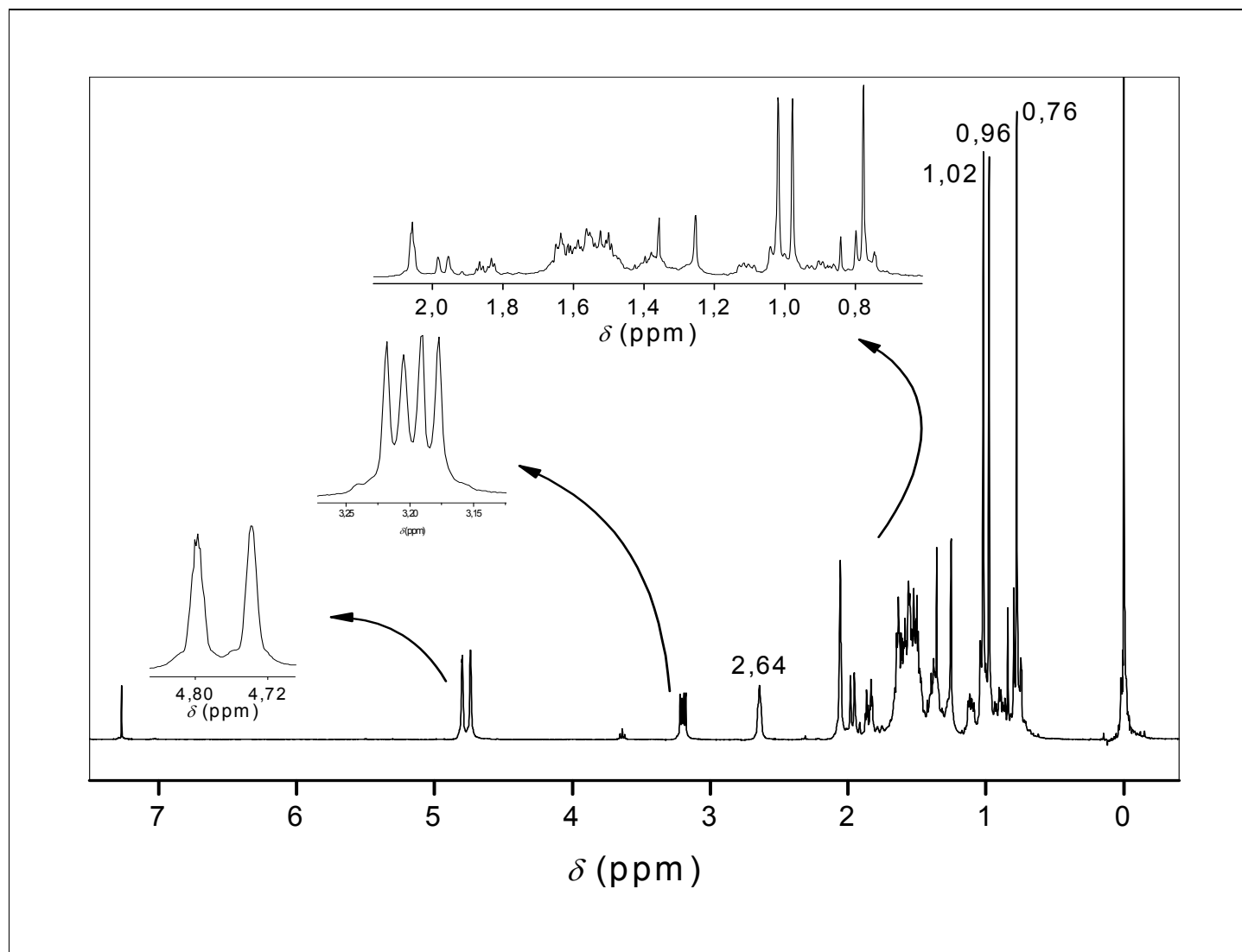


FIGURA 23A – Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) do caur-16-en-3 α -ol (**33**).

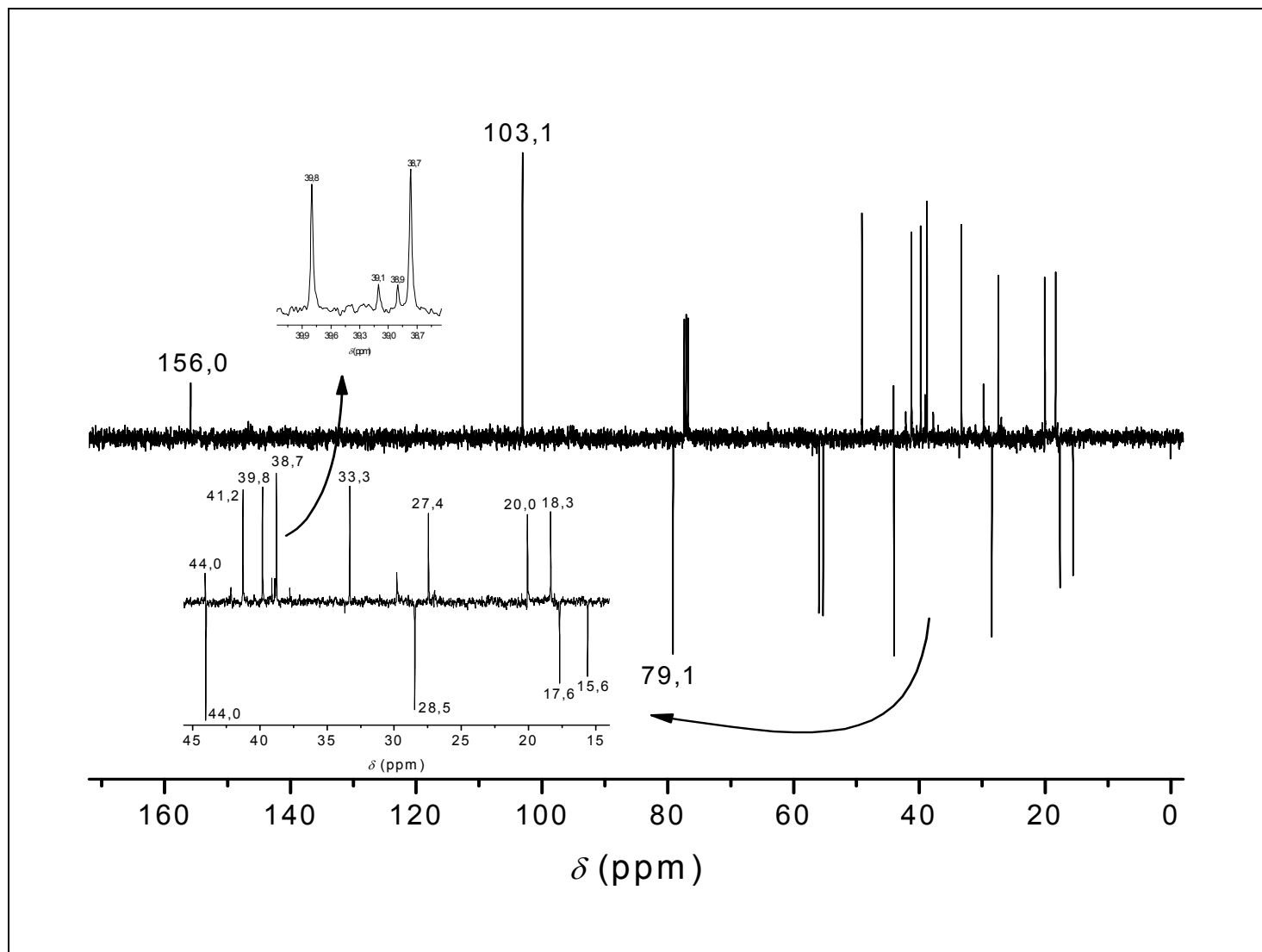


FIGURA 24A - Espectro de RMN de ^{13}C obtido pela técnica APT (100 MHz, CDCl_3) do caur-16-en-3 α -ol (**33**).

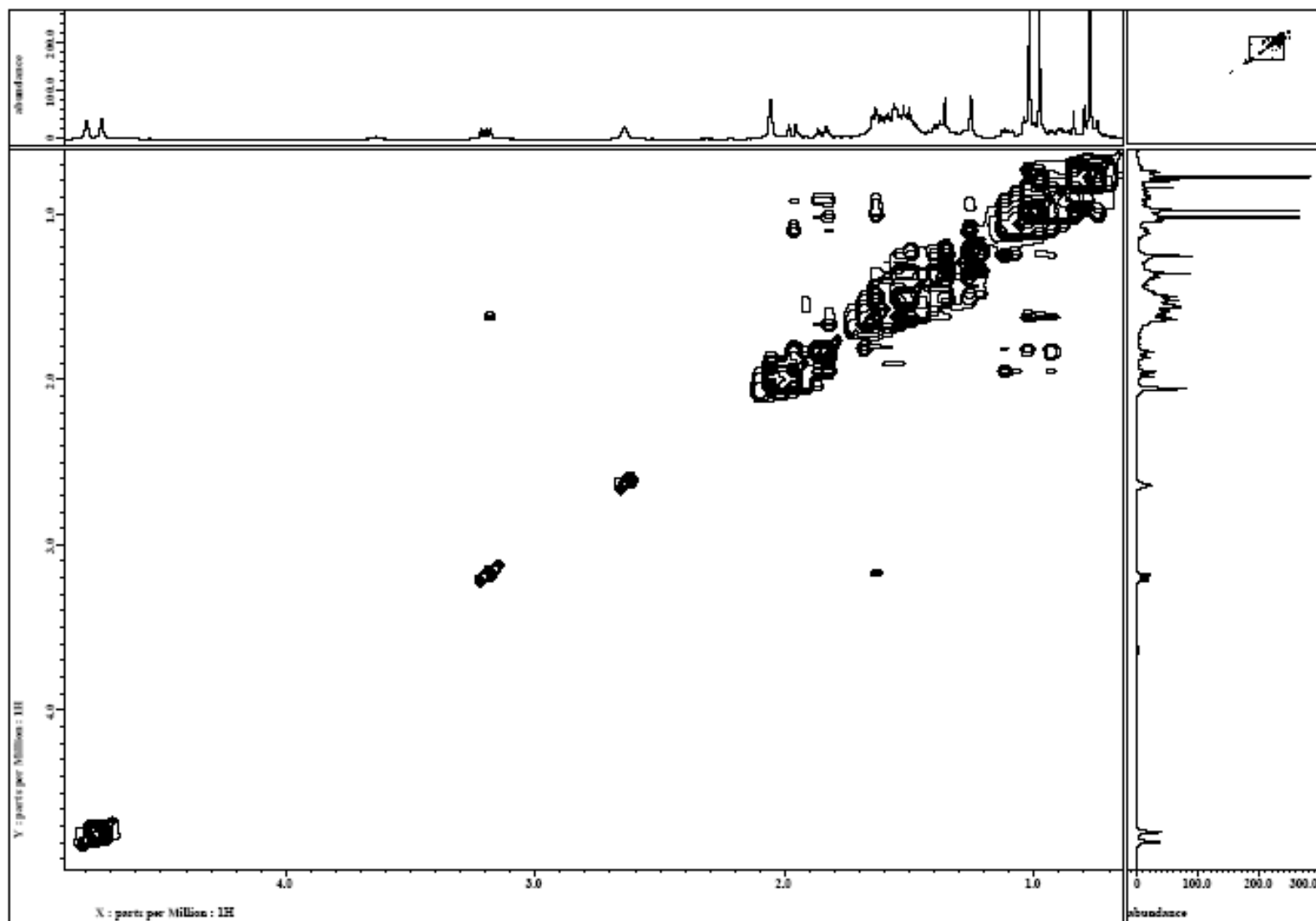


FIGURA 25A – Espectro de COSY (400 MHz, CDCl_3) do caur-16-en-3 α -ol (**33**).

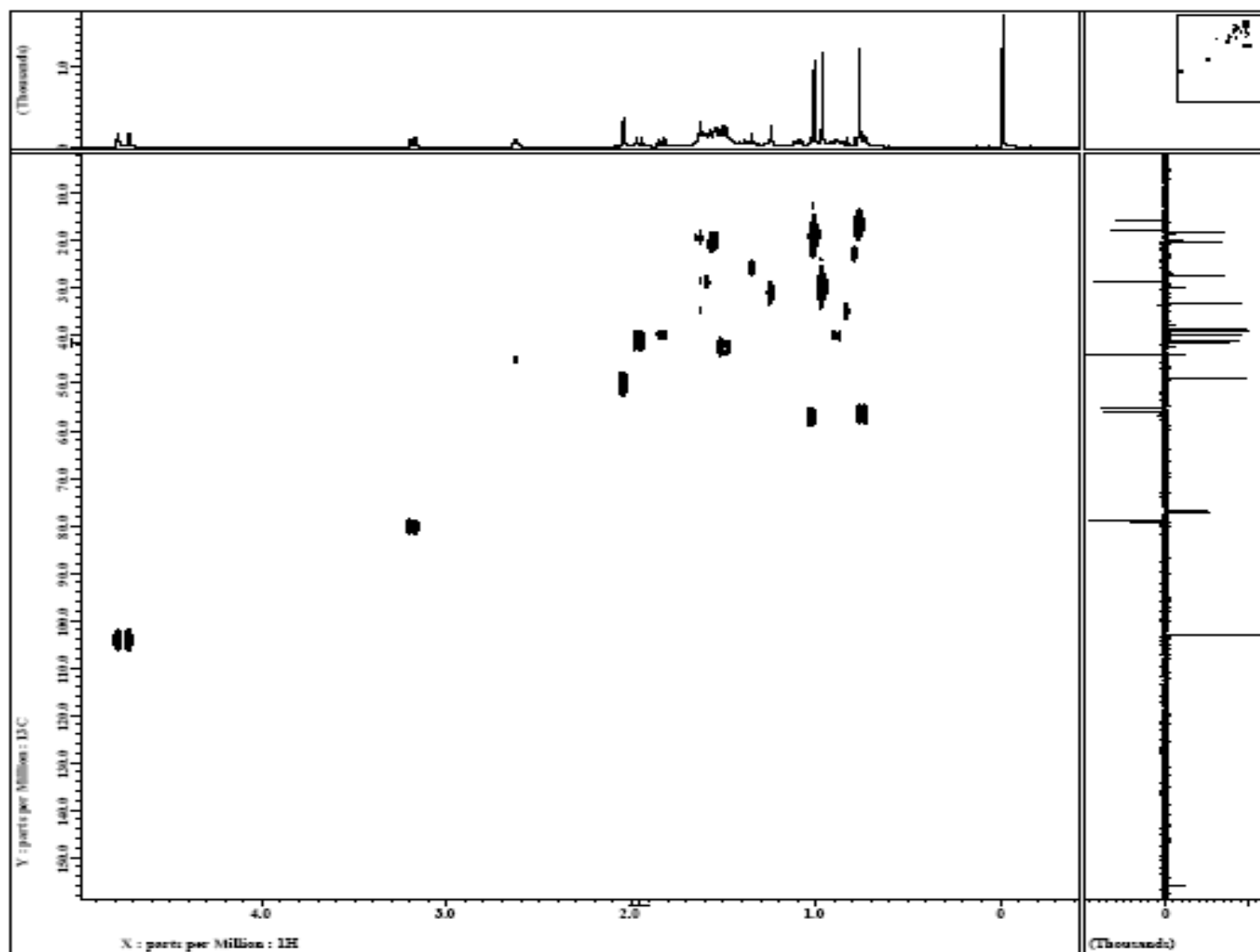


FIGURA 26A – Espectro de HMQC (^1H -400 MHz, ^{13}C -100 MHz, CDCl_3) do caur-16-en-3 α -ol (33).

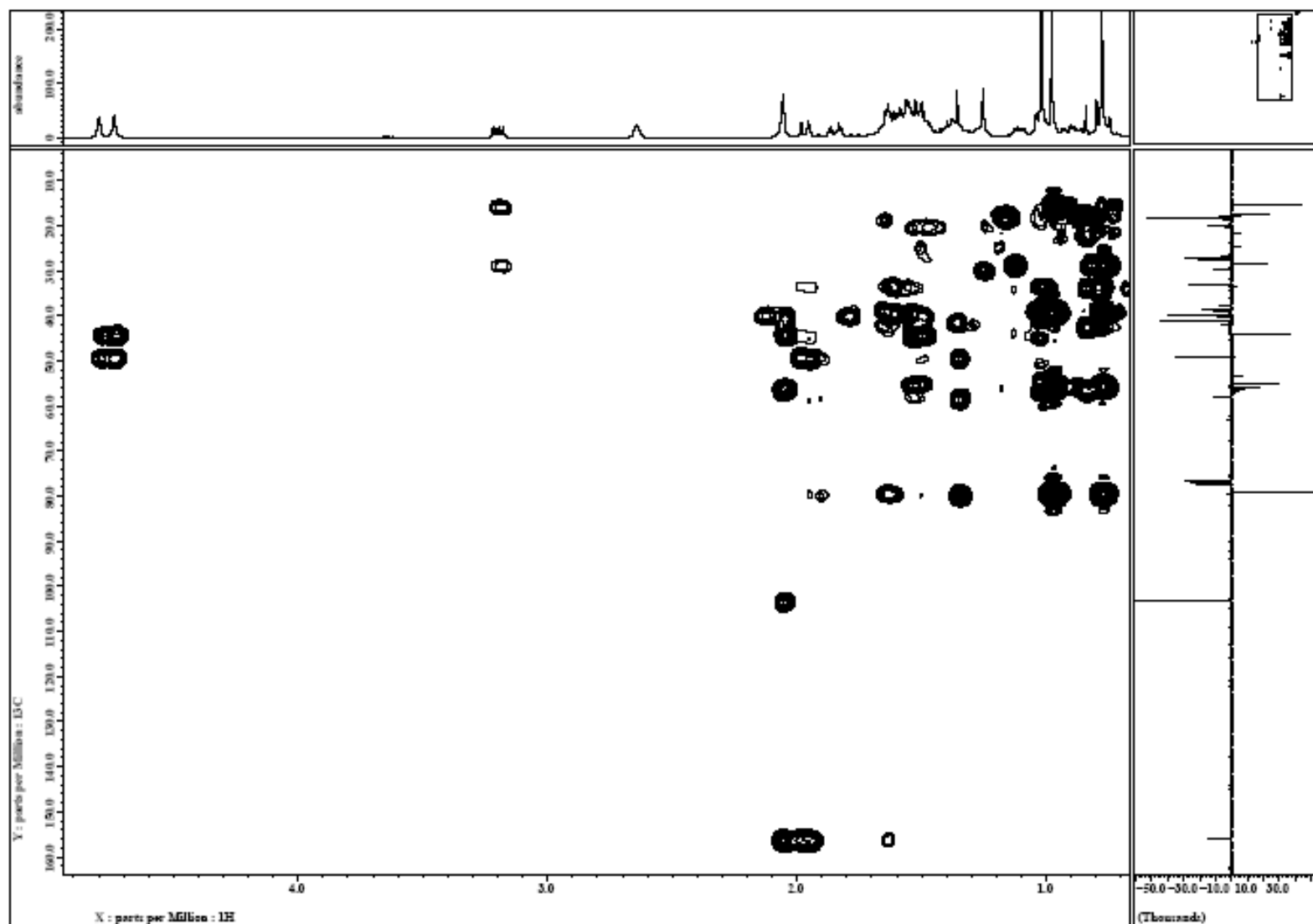


FIGURA 27A – Espectro de HMBC (^1H -400 MHz, ^{13}C -100 MHz, CDCl_3) do caur-16-en-3 α -ol (33).

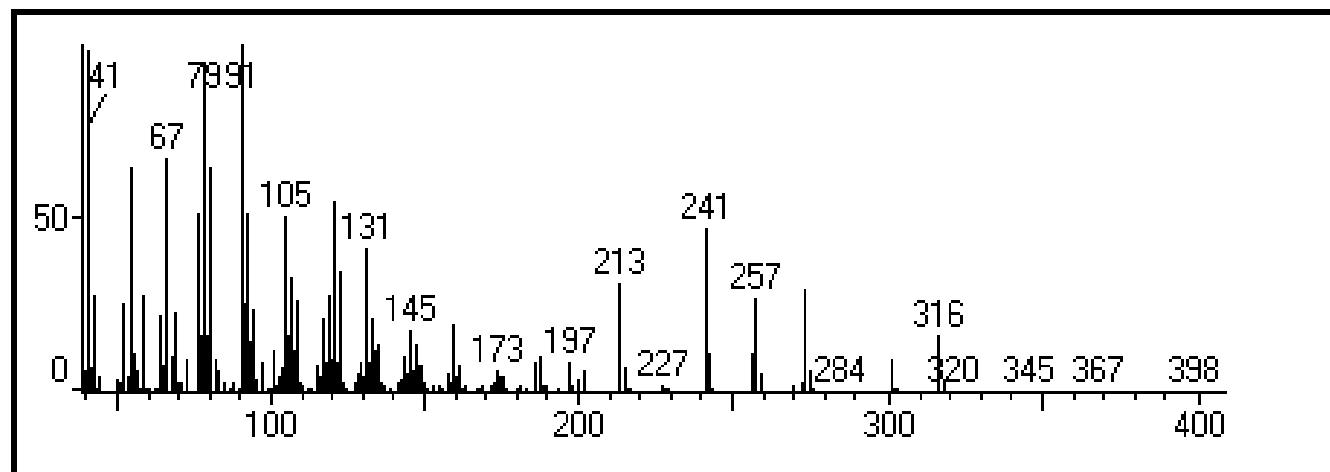


FIGURA 28A – Espectro de massas do álcool do caur-16-en-18-ato de metila (**37**).

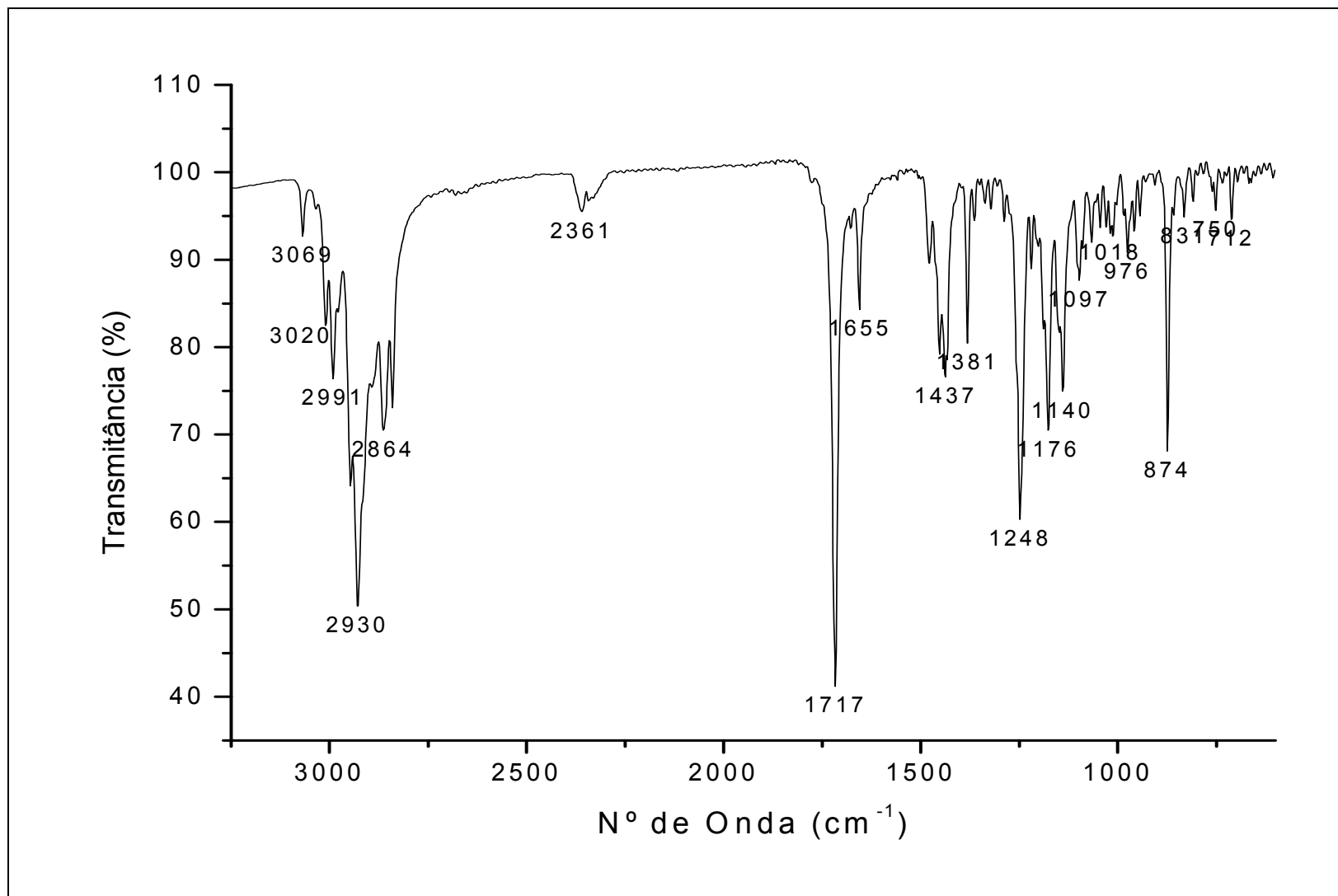


FIGURA 29A - Espectro no infravermelho (NaCl) do álcool do caur-16-en-18-ato de metila (**37**).

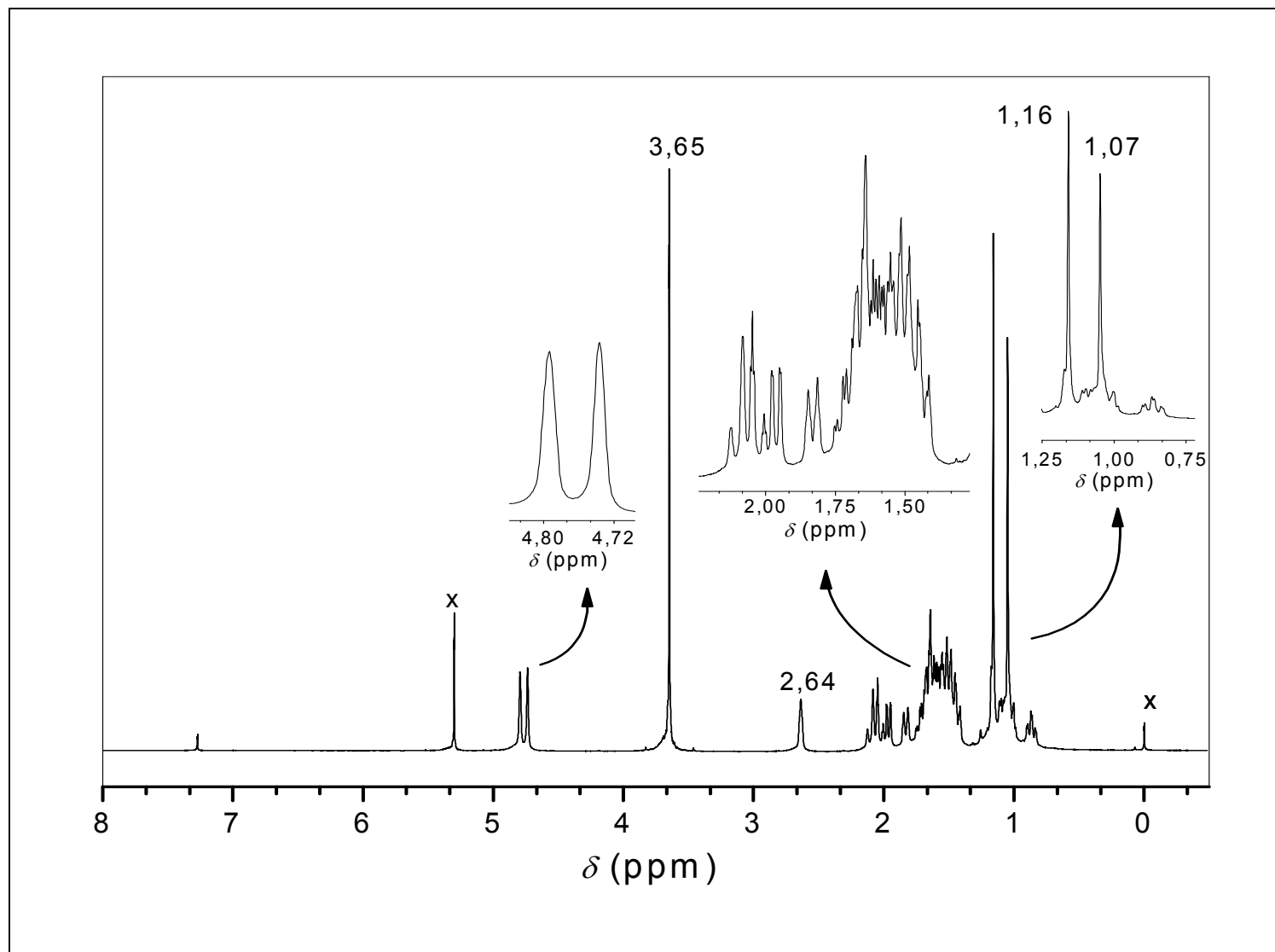


FIGURA 30A – Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) do álcool do caur-16-en-18-ato de metila (37).

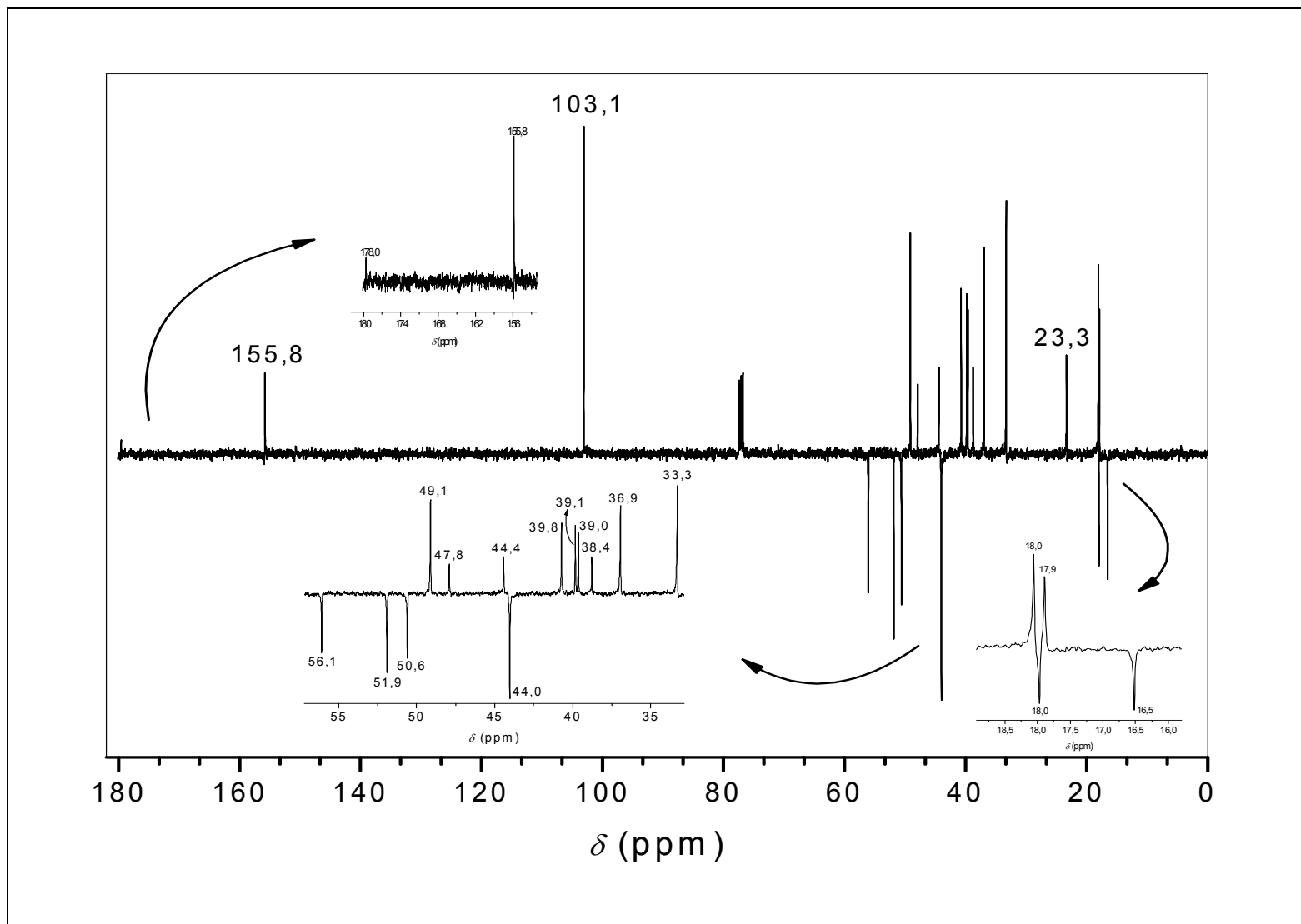


FIGURA 31A - Espectro de RMN de ^{13}C obtido pela técnica APT (100 MHz, CDCl_3) do caur-16-en-18-ato de metila (37).

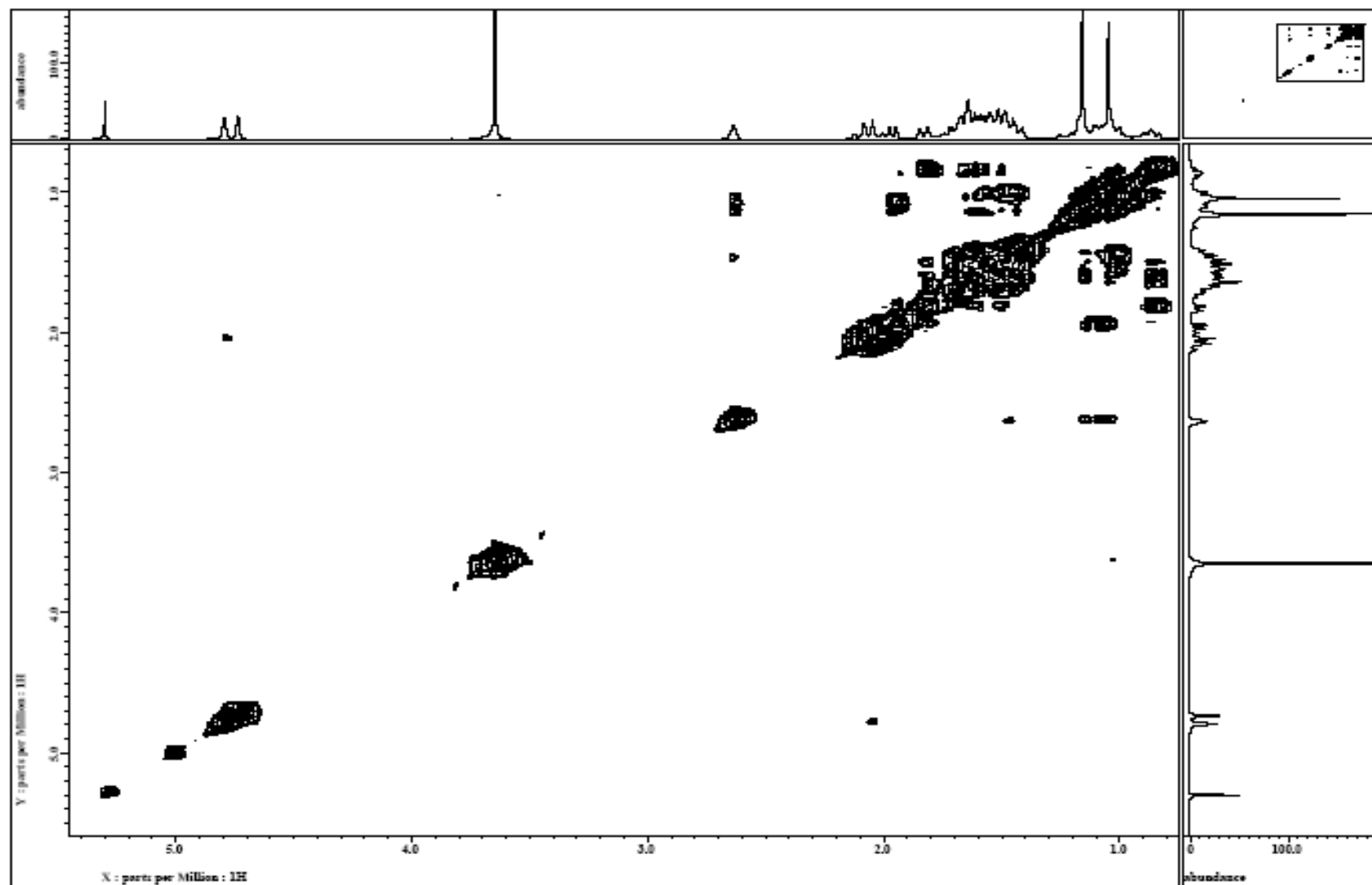


FIGURA 32A – Espectro de COSY (400 MHz, CDCl₃) do caur-16-en-18-ato de metila (**37**).

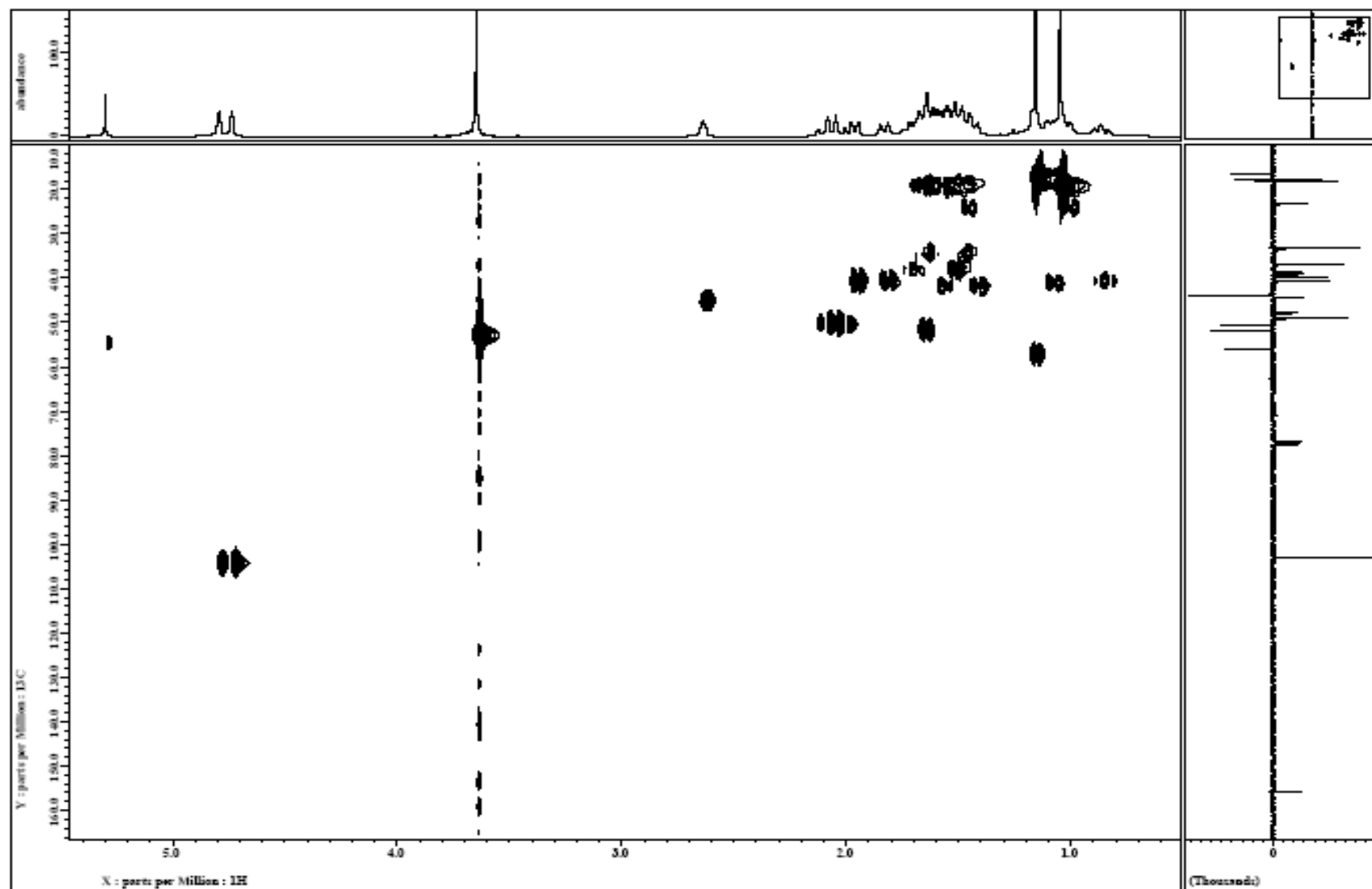


FIGURA 33A – Espectro de HMQC (¹H-400 MHz, ¹³C-100 MHz, CDCl₃) do caur-16-en-18-ato de metila (37).

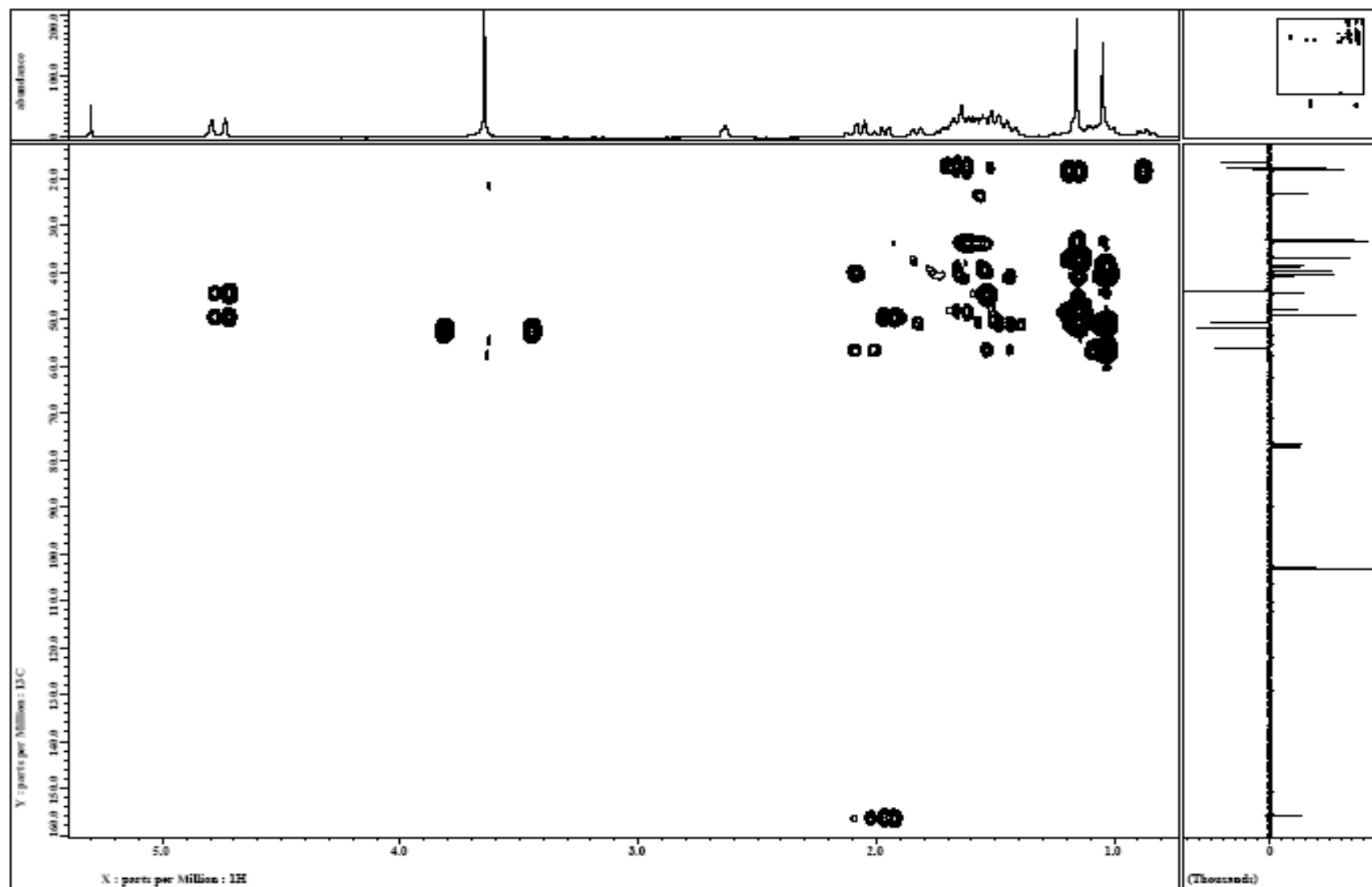


FIGURA 34A – Espectro de HMBC (¹H-400 MHz, ¹³C-100 MHz, CDCl₃) do caur-16-en-18-ato de metila (37).

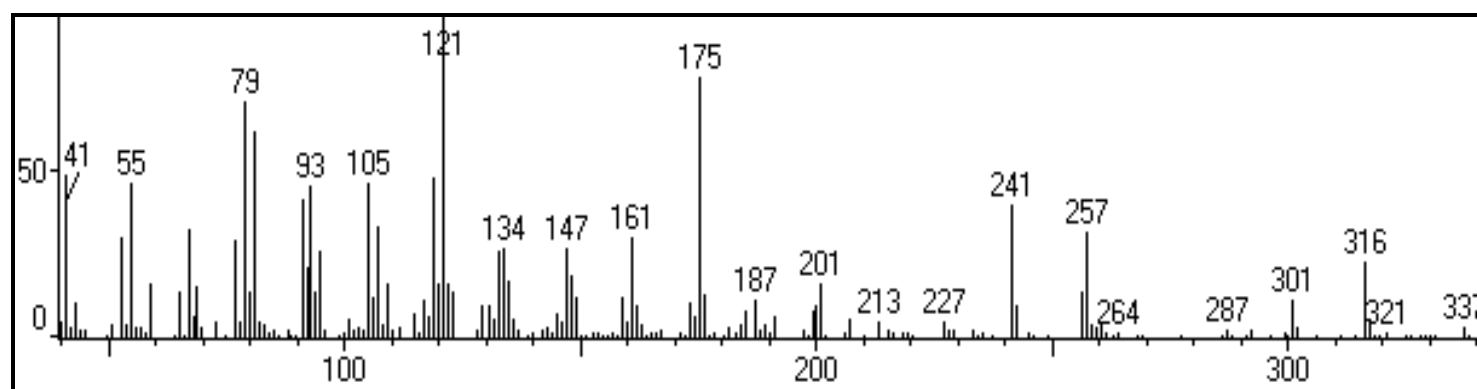


FIGURA 35A – Espectro de massas do ozato de metila (**6a**).

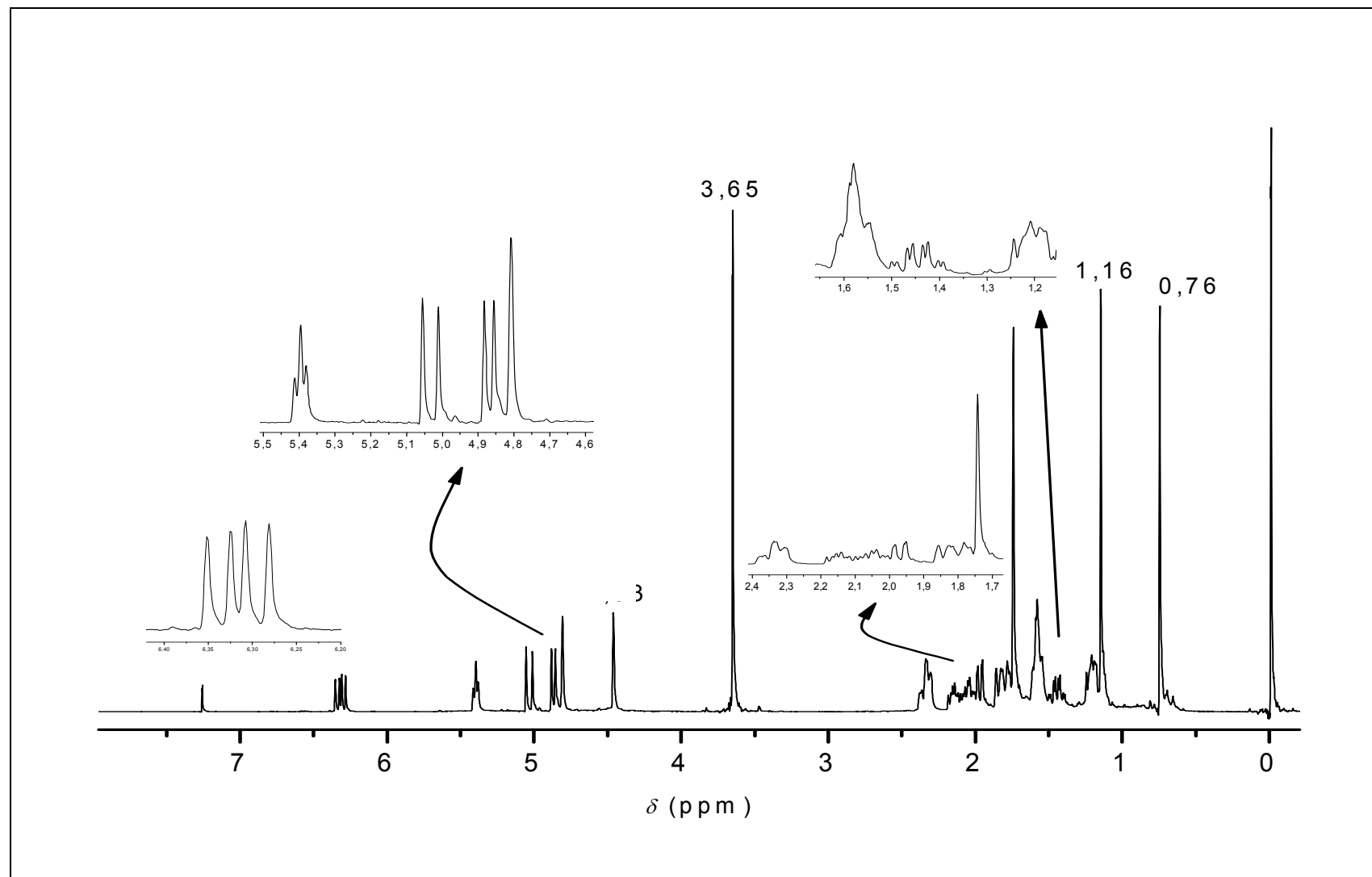


FIGURA 36A – Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) do ozato de metila (**6a**).

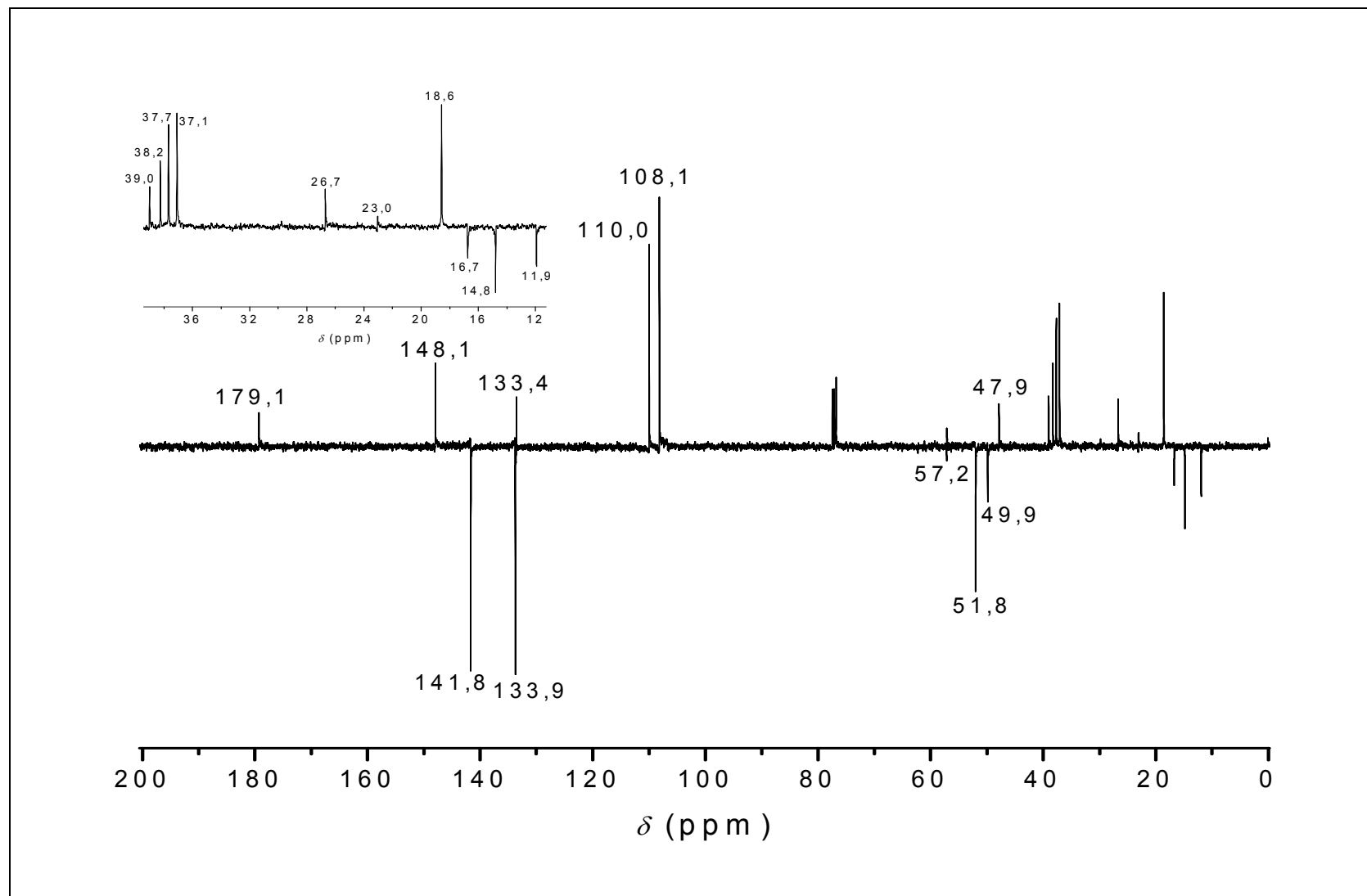


FIGURA 37A - Espectro de RMN de ^{13}C obtido pela técnica APT (100 MHz, CDCl_3) do ozato de metila (6a).

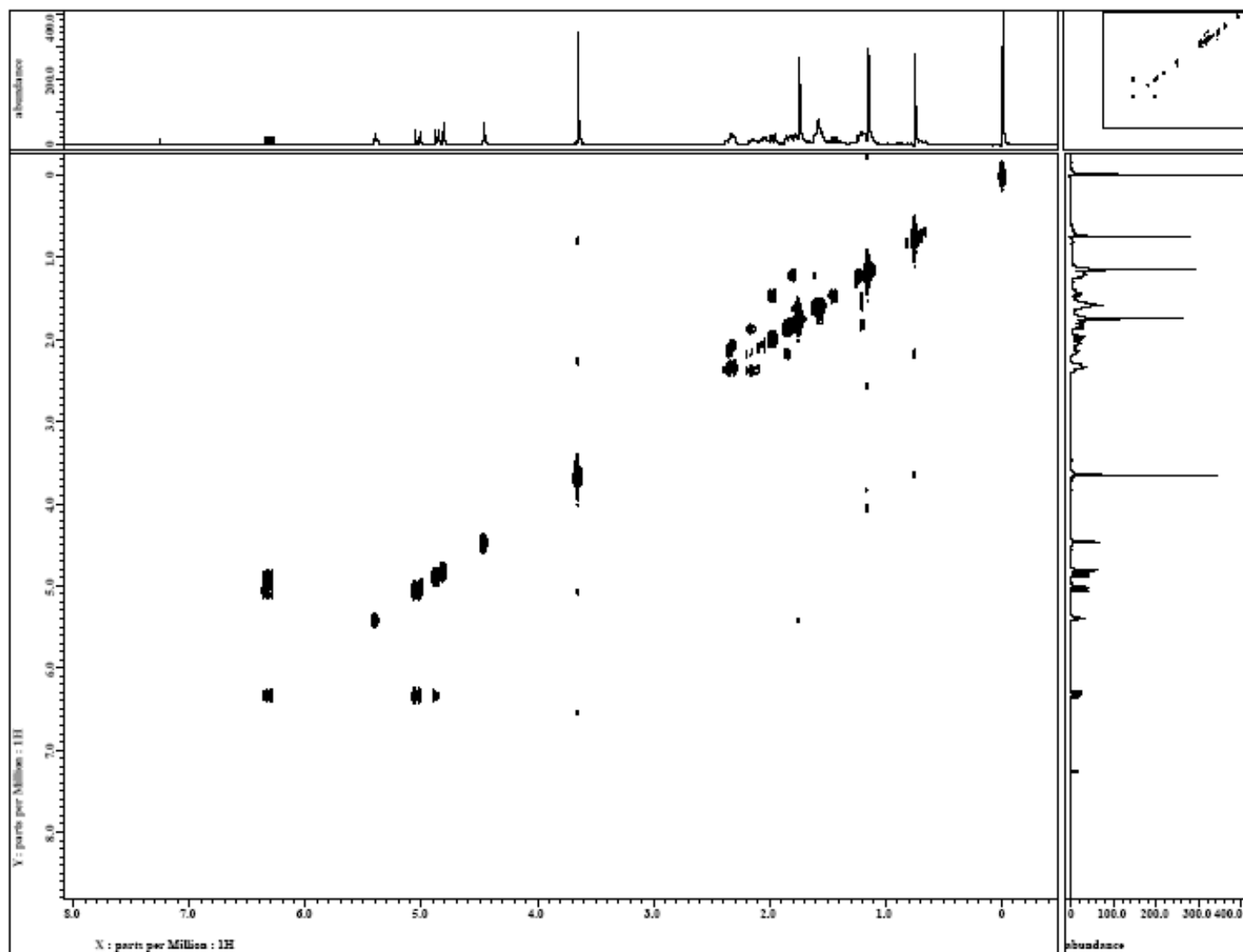


FIGURA 38A – Espectro de COSY (400 MHz, CDCl_3) do ozato de metila (6a).

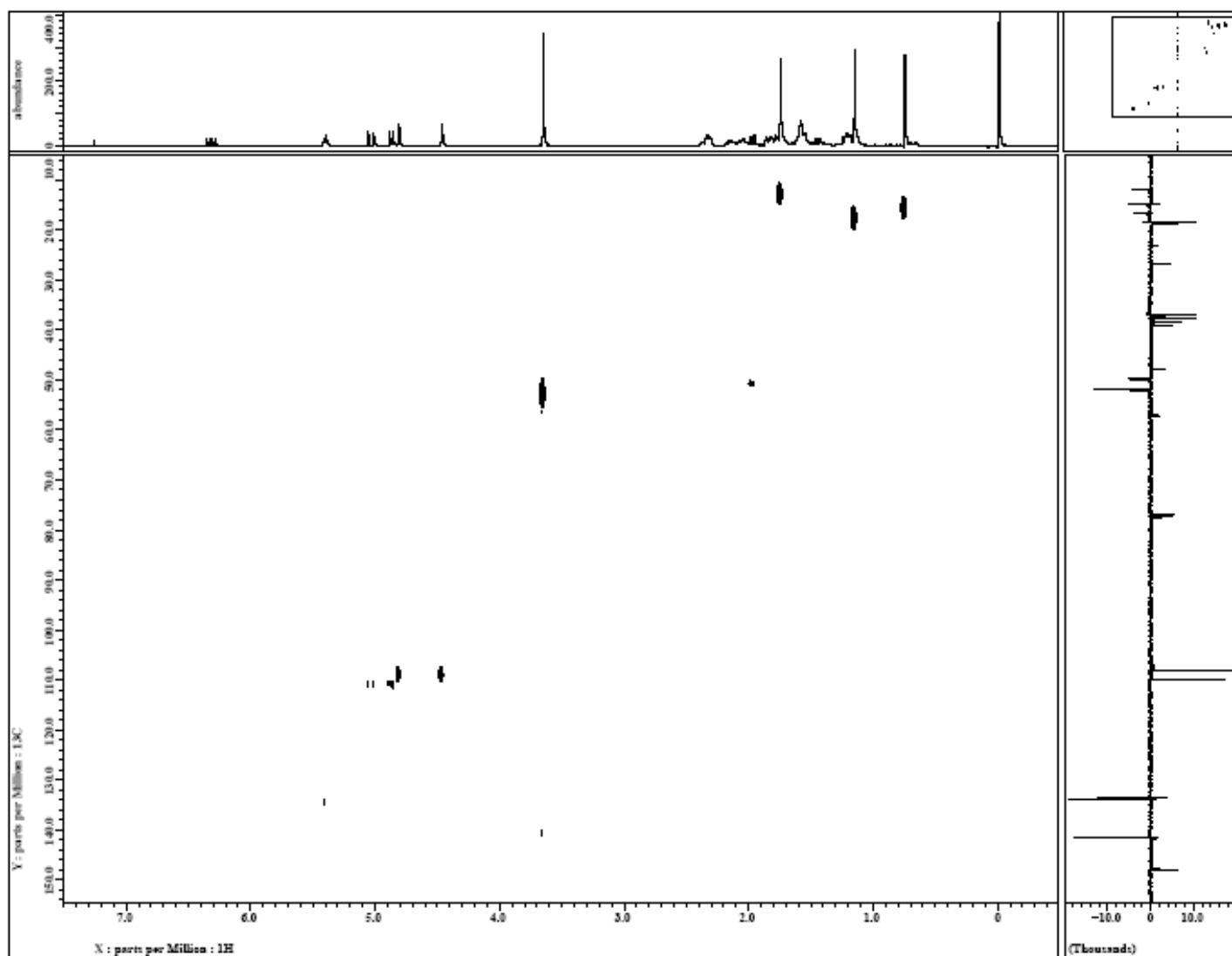


FIGURA 39A – Espectro de HMQC (^1H -400 MHz, ^{13}C -100 MHz, CDCl_3) do ozato de metila (**6a**).

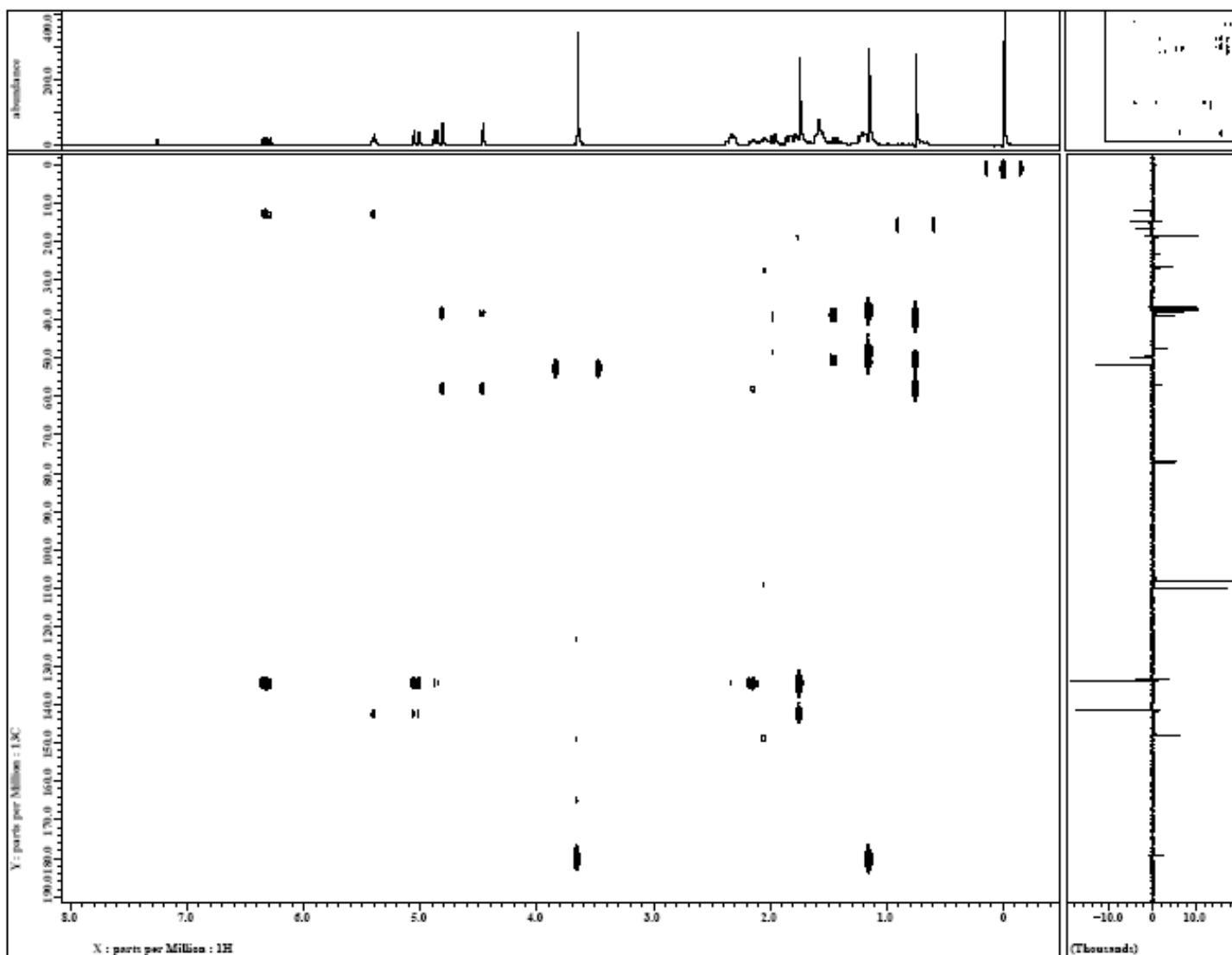


FIGURA 40A – Espectro de HMBC (^1H -400 MHz, ^{13}C -100 MHz, CDCl_3) do ozato de metila (6a).

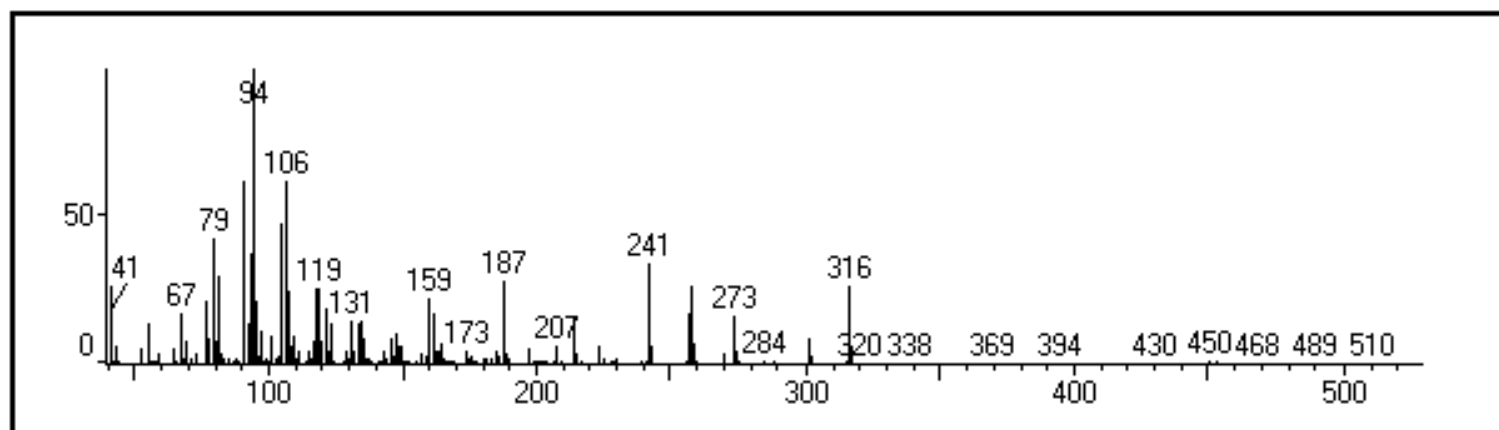


FIGURA 41A – Espectro de massas do caur-15-en-18-ato de metila (**38**).

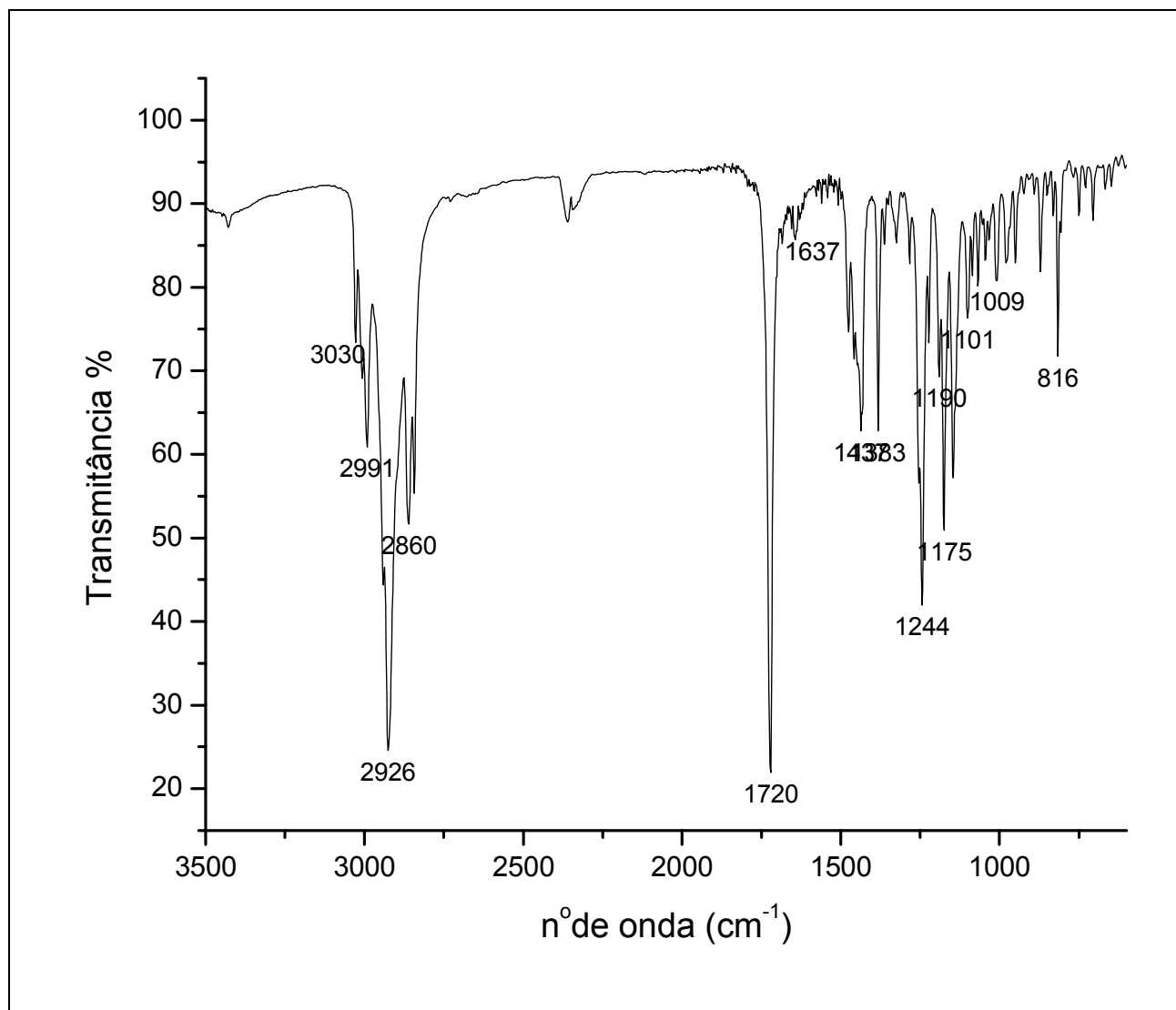


FIGURA 42A - Espectro no infravermelho (NaCl) do caur-15-en-18-ato de metila (**38**).

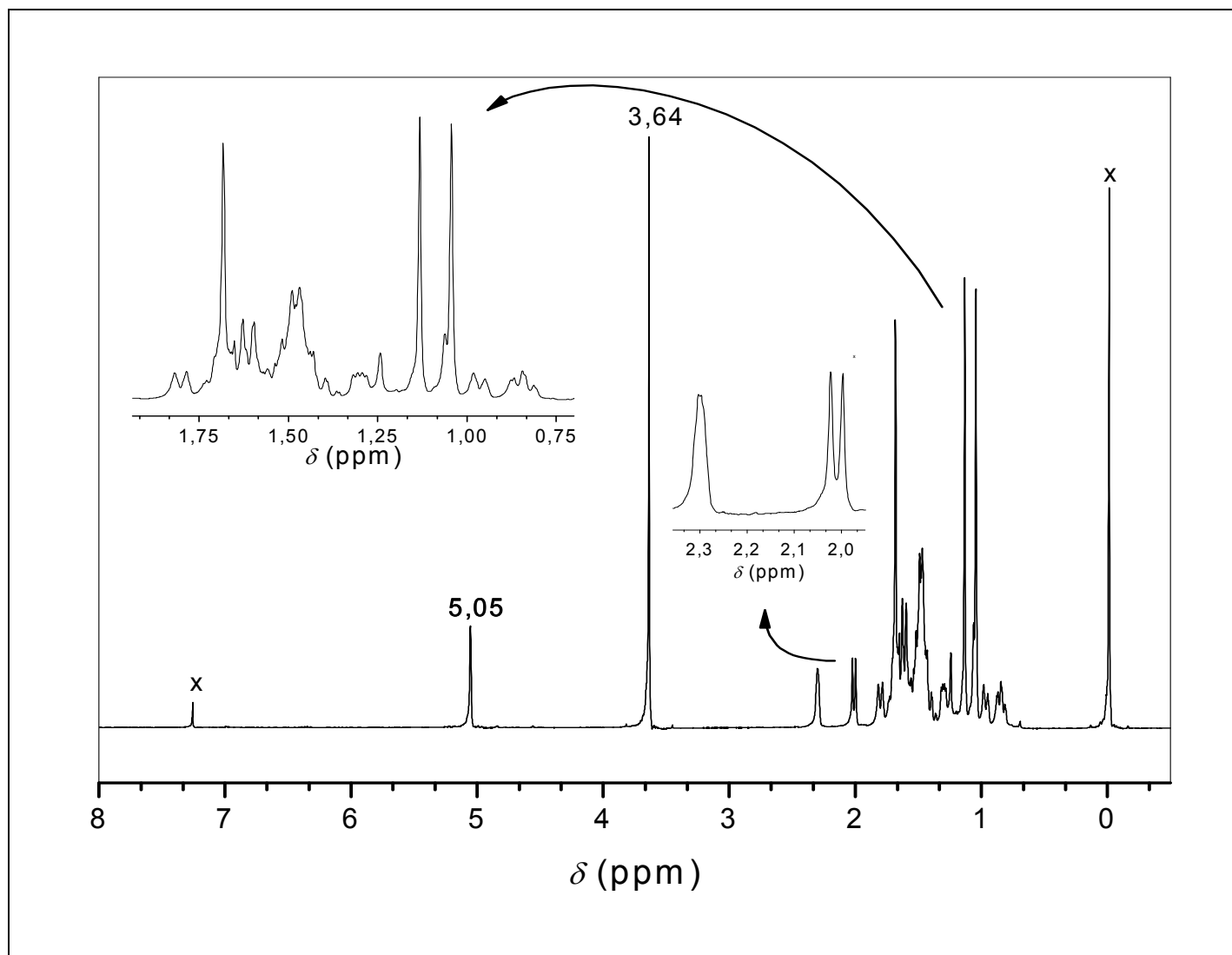


FIGURA 43A – Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) do caur-15-en-18-ato de metila (38).

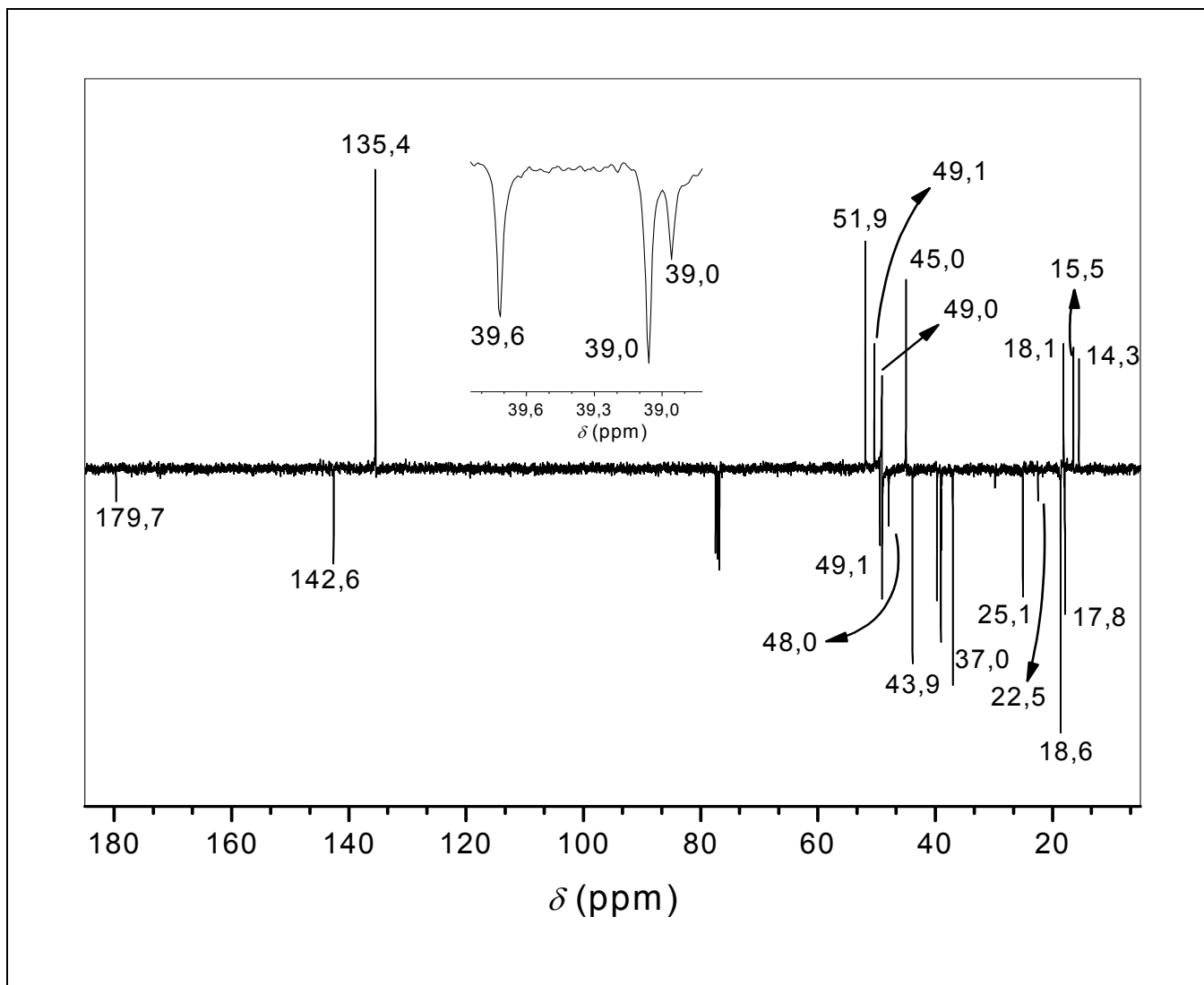


FIGURA 44A - Espectro de RMN de ^{13}C obtido pela técnica APT (100 MHz, CDCl_3) do caur-15-en-18-ato de metila (**38**).

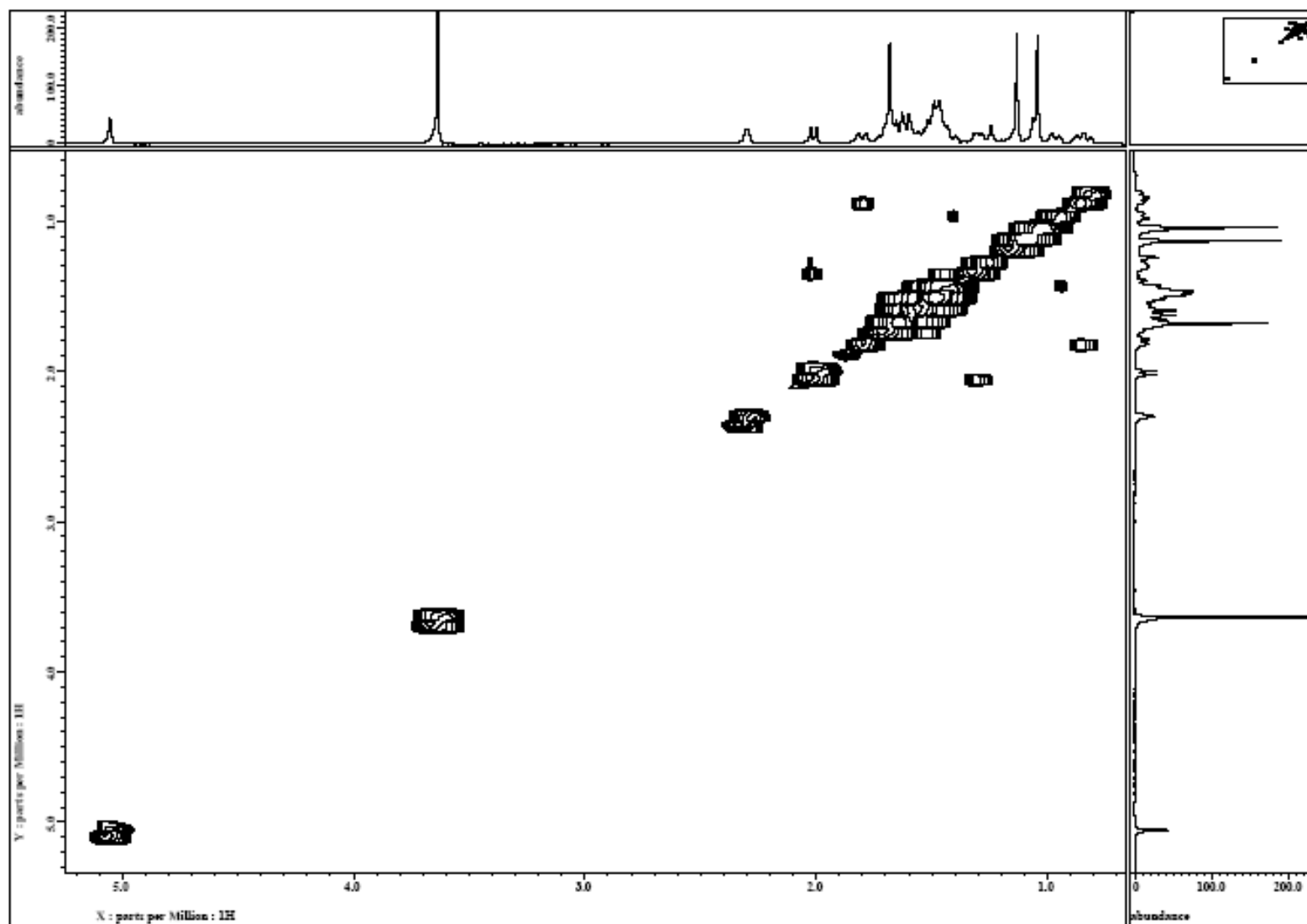


FIGURA 45A – Espectro de COSY (400 MHz, CDCl_3) do caur-15-en-18-ato de metila (**38**).

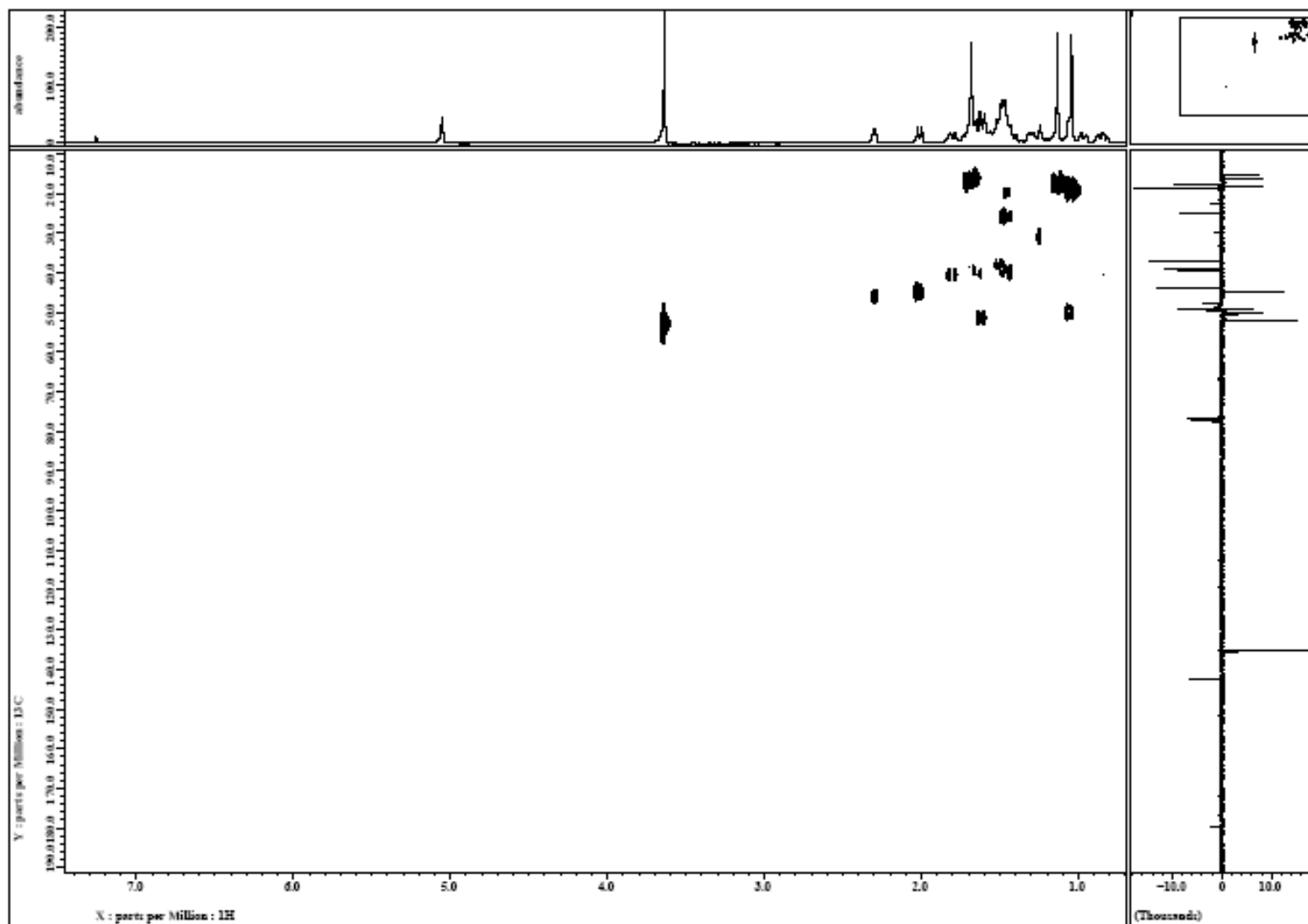


FIGURA 46A – Espectro de HMQC (^1H -400 MHz, ^{13}C -100 MHz, CDCl_3) do caur-15-en-18-ato de metila (38).

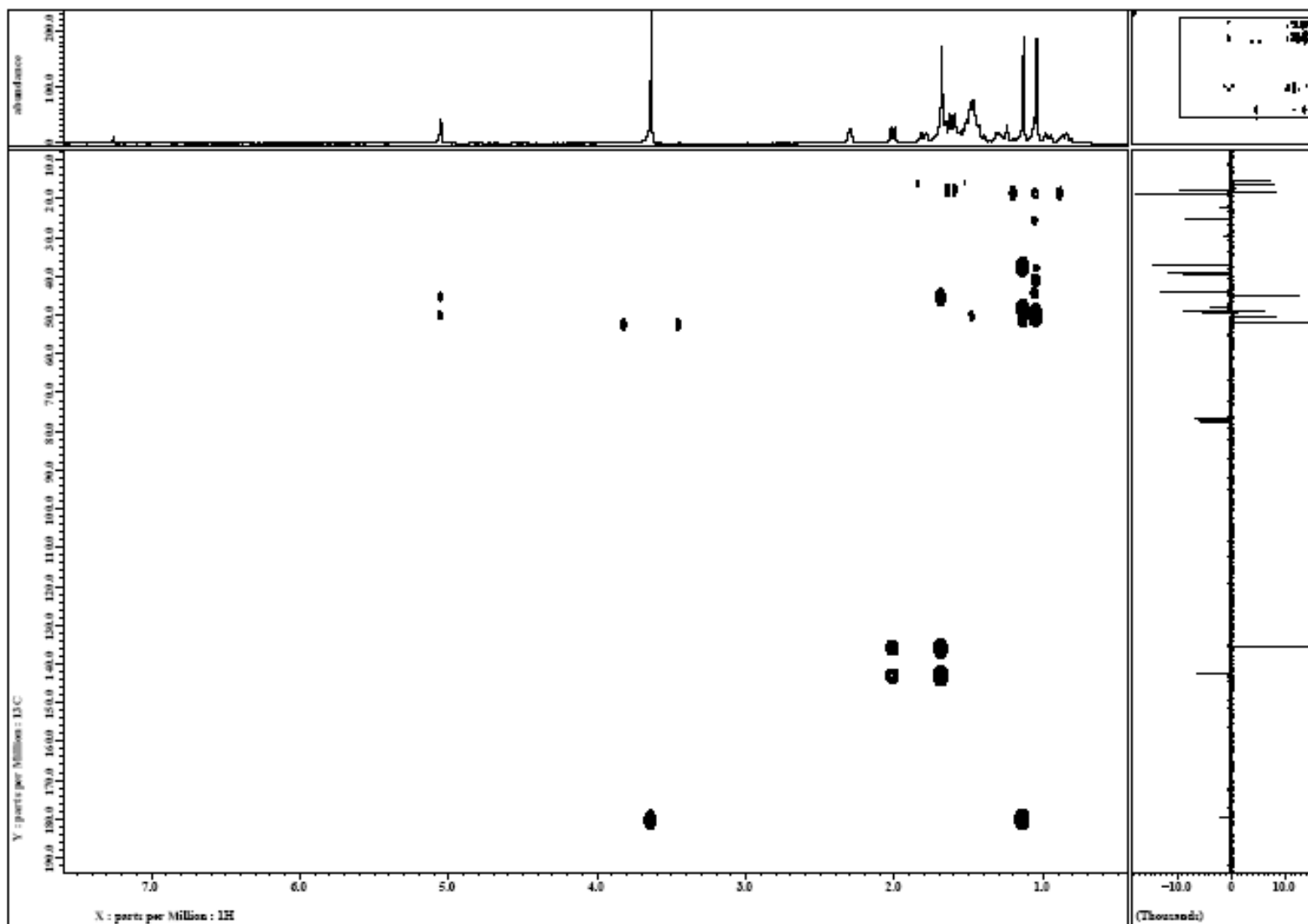


FIGURA 47A – Espectro de HMBC (^1H -400 MHz, ^{13}C -100 MHz, CDCl_3) do caur-15-en-18-ato de metila (38).

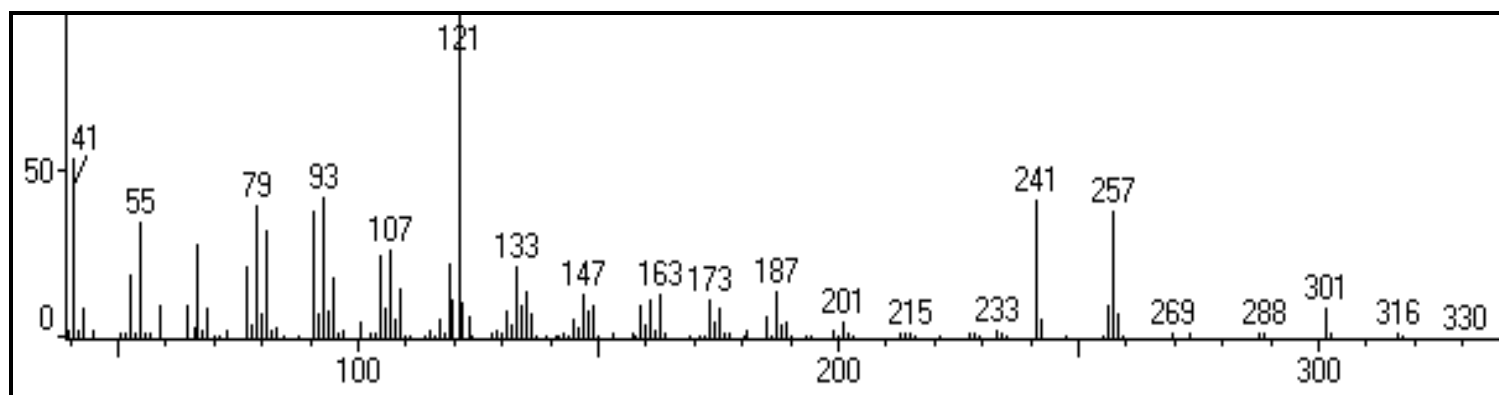


FIGURA 48A – Espectro de massas do isoozato de metila (**39**).

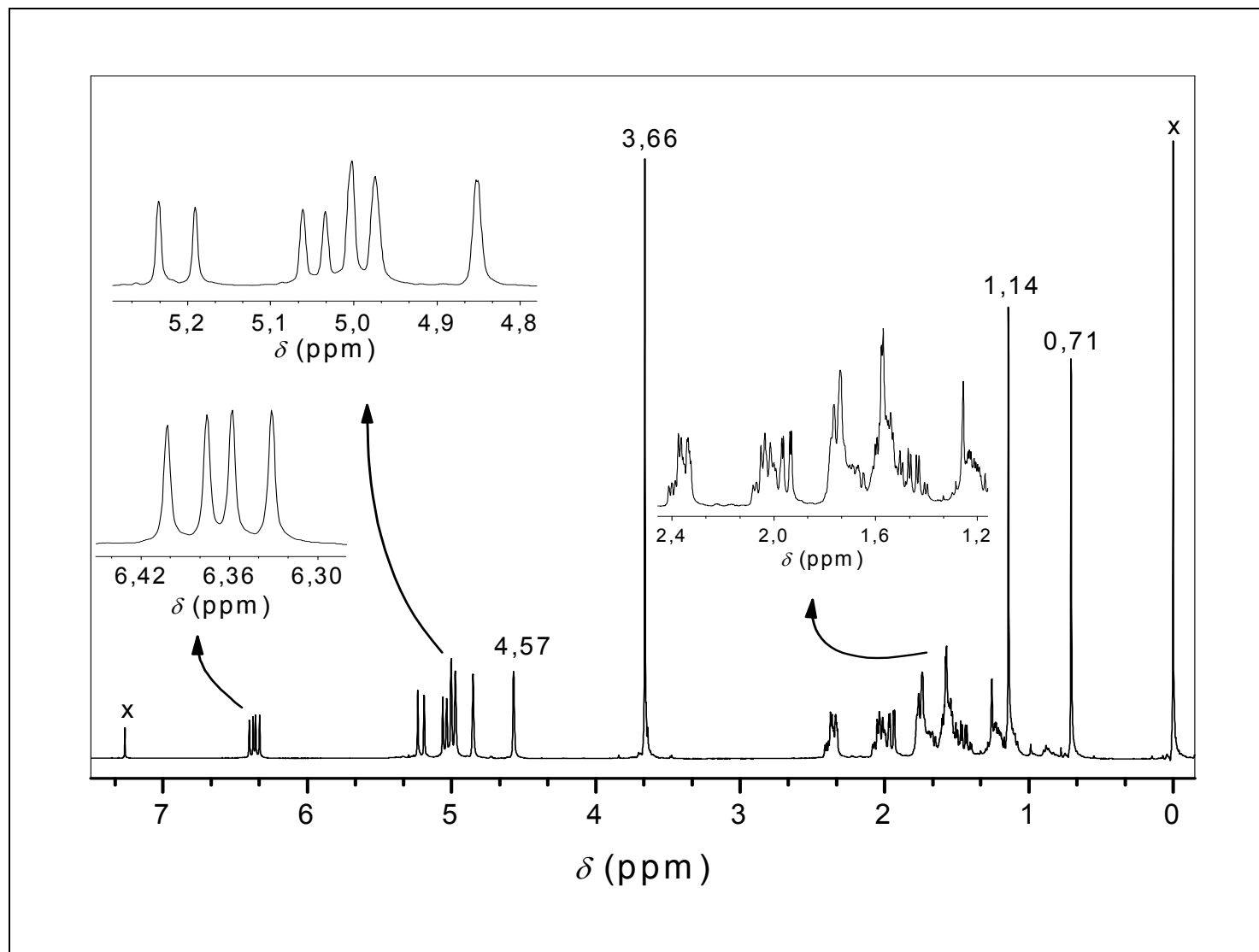


FIGURA 49A – Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) do isoozato de metila (39).

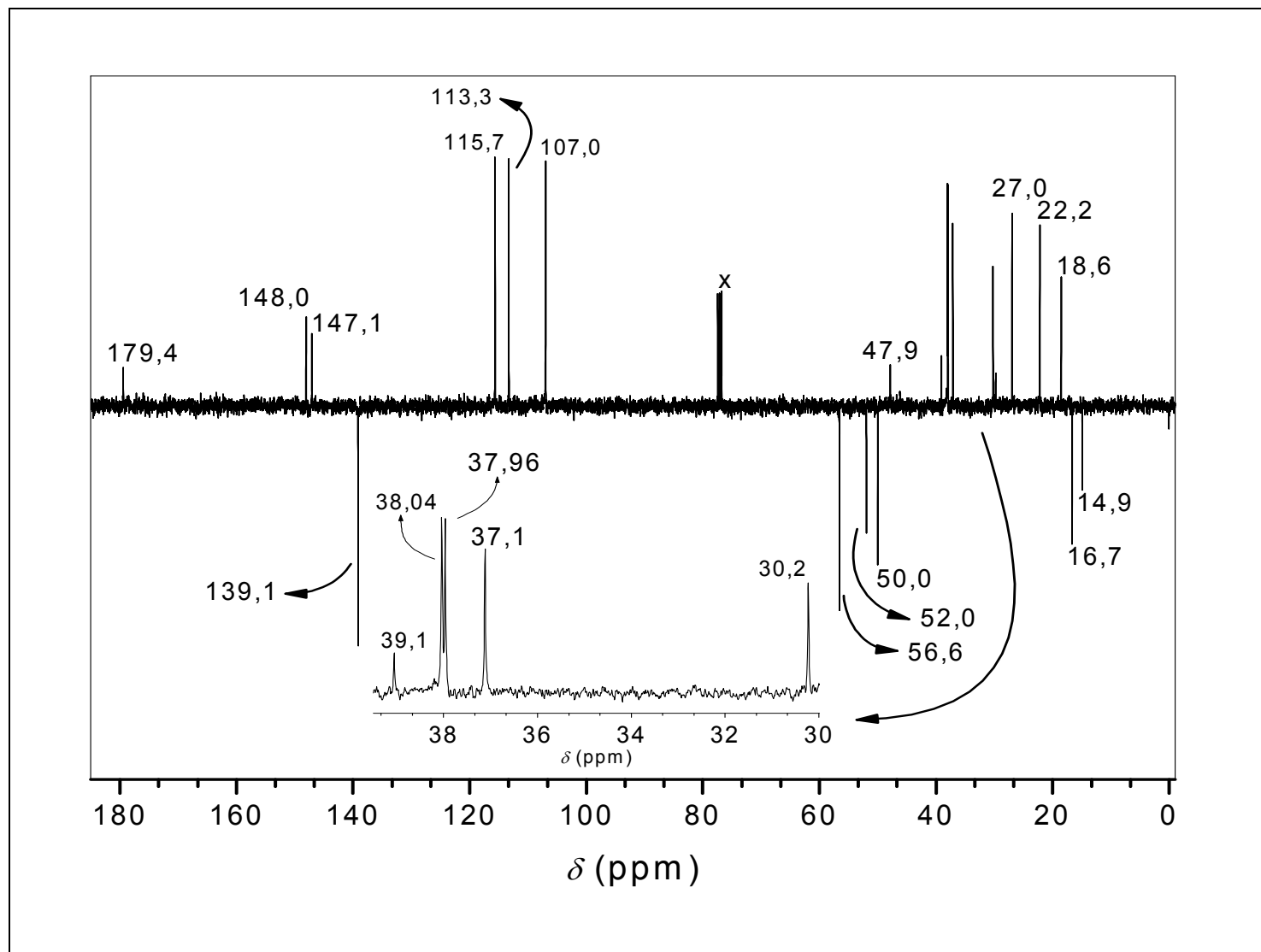


FIGURA 50A - Espectro de RMN de ^{13}C obtido pela técnica APT (100 MHz, CDCl_3) do isocianato de metila (39).

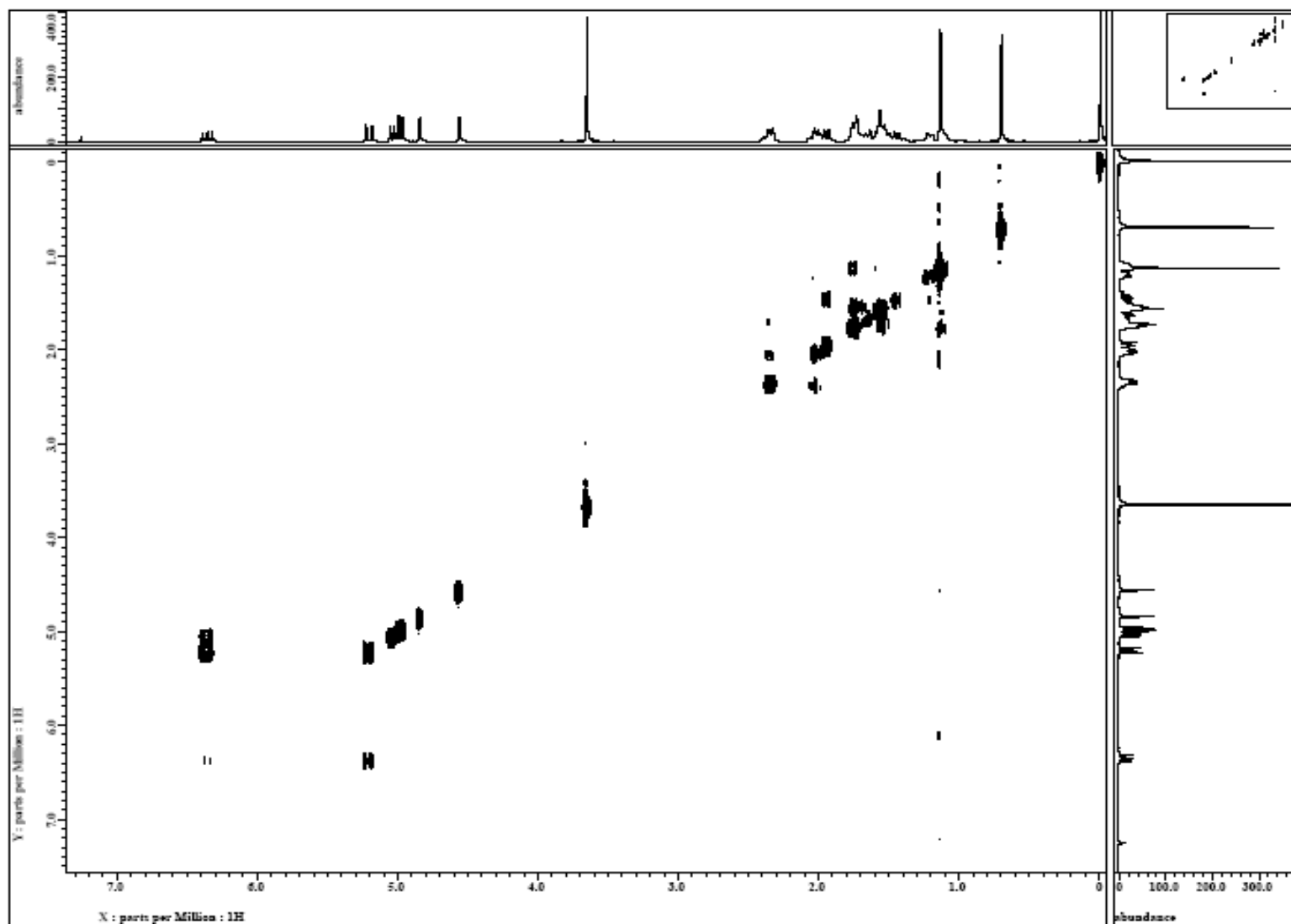


FIGURA 51A – Espectro de COSY (400 MHz, CDCl₃) do isozato de metila (39).

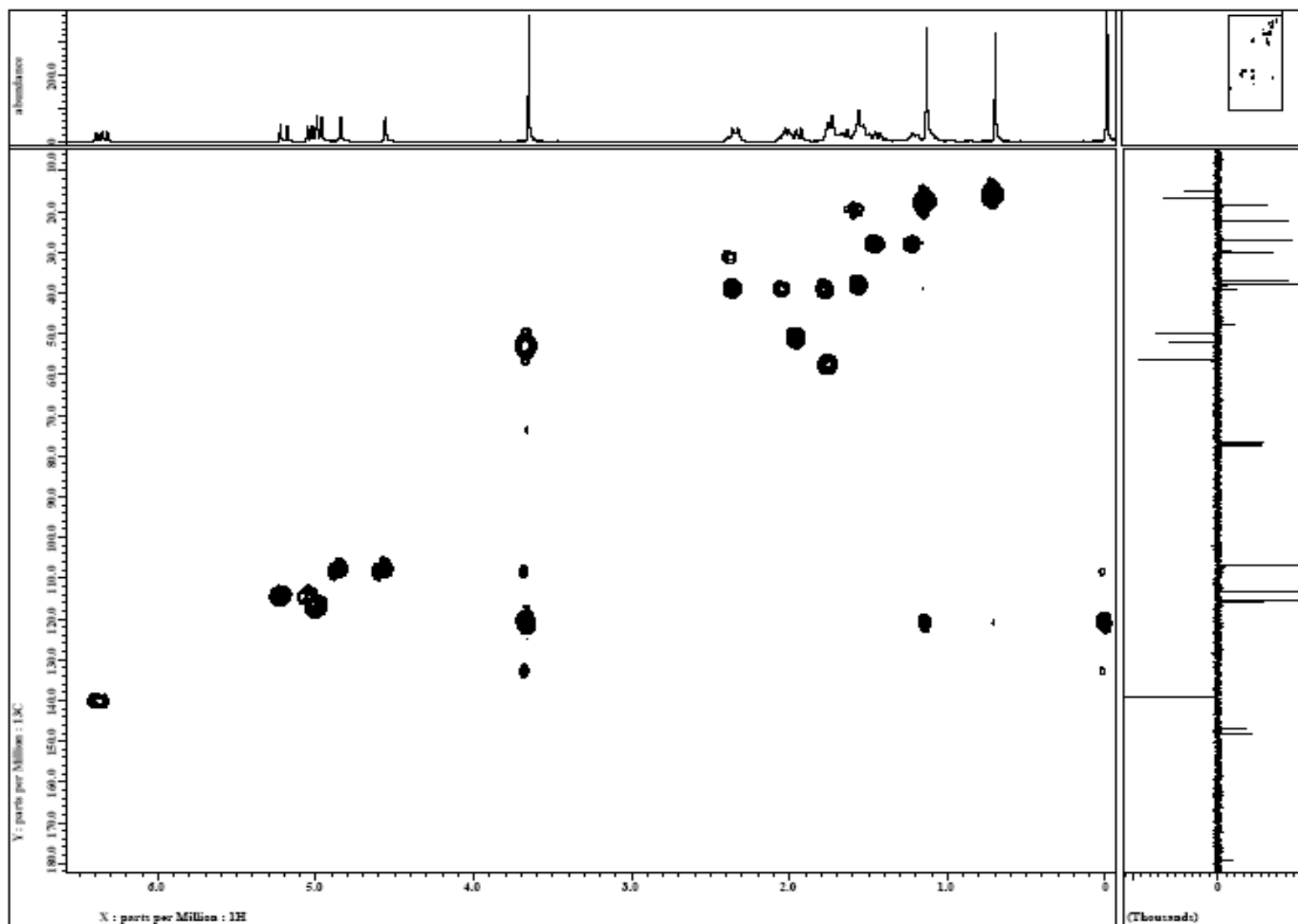


FIGURA 52A – Espectro de HMQC (^1H -400 MHz, ^{13}C -100 MHz, CDCl_3) do isoozato de metila (39).

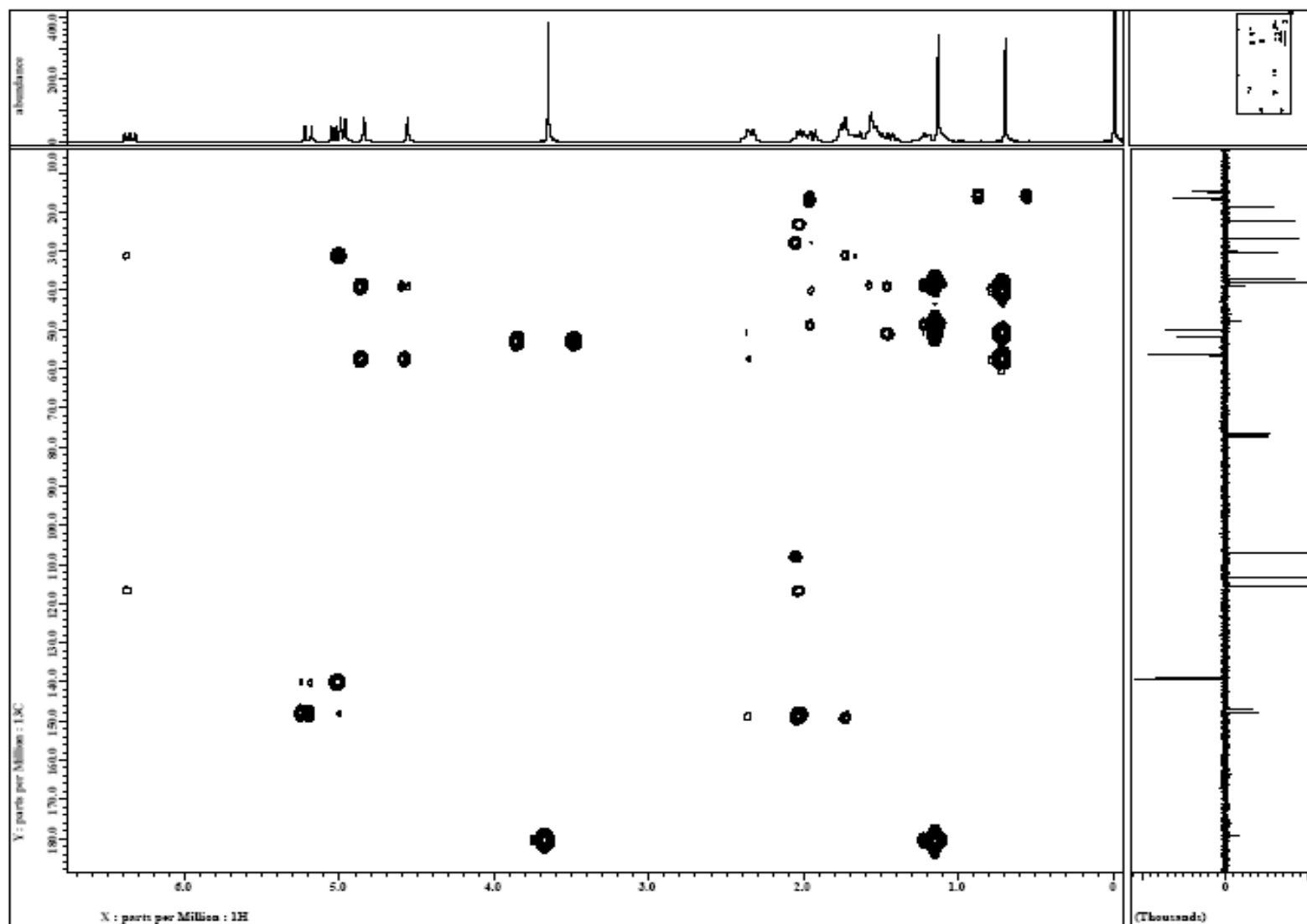


FIGURA 53A – Espectro de HMBC (^1H -400 MHz, ^{13}C -100 MHz, CDCl_3) do isoozato de metila (39).

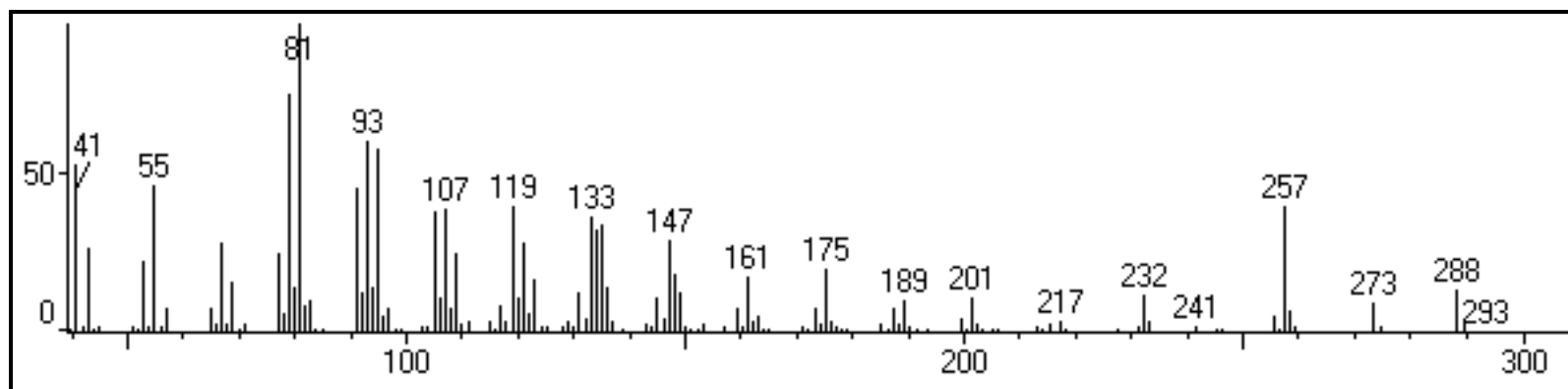


FIGURA 54A – Espectro de massas do álcool do ozato de metila (**40**).

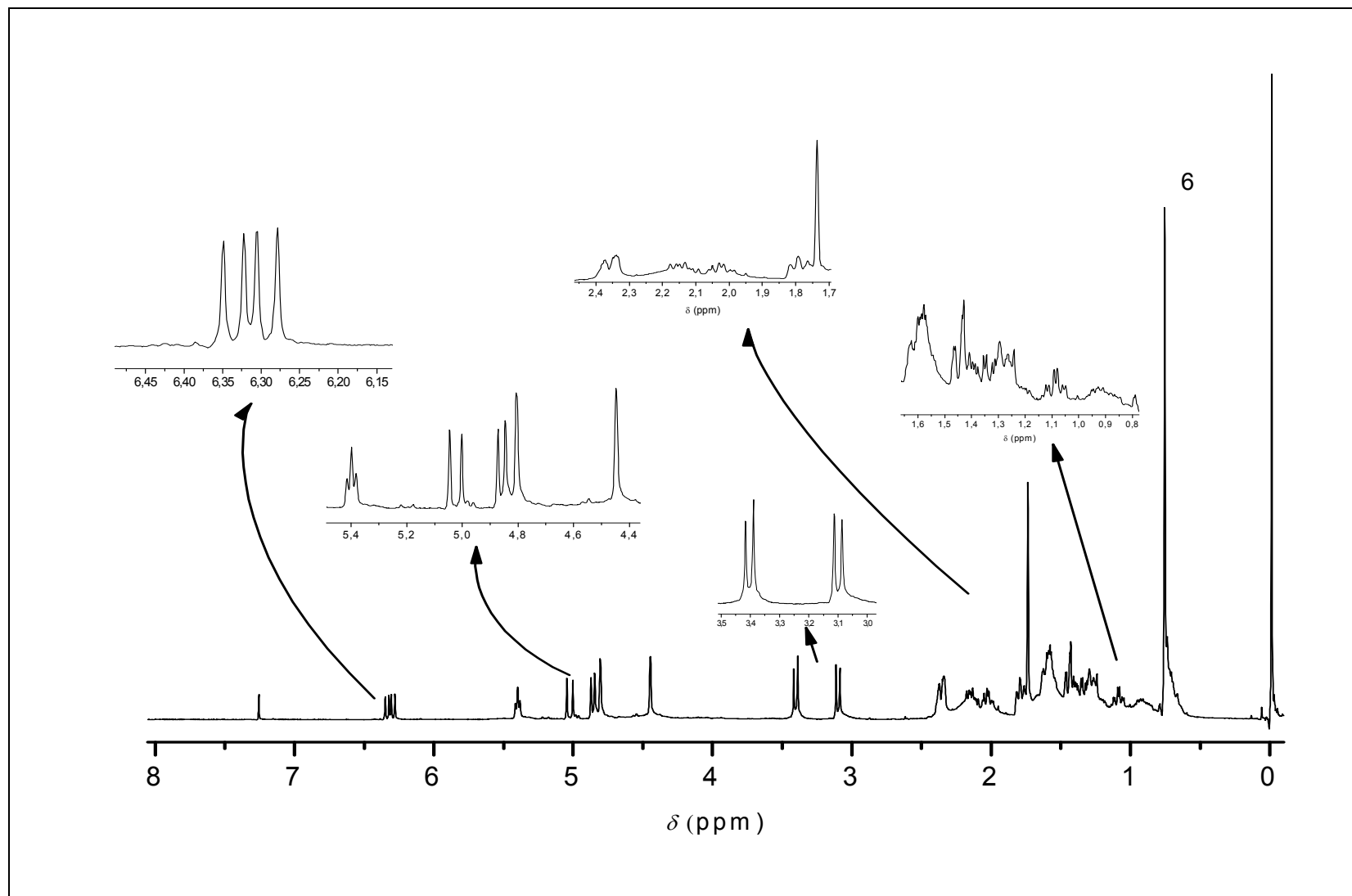


FIGURA 55A – Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) do álcool do ozato de metila (**40**).

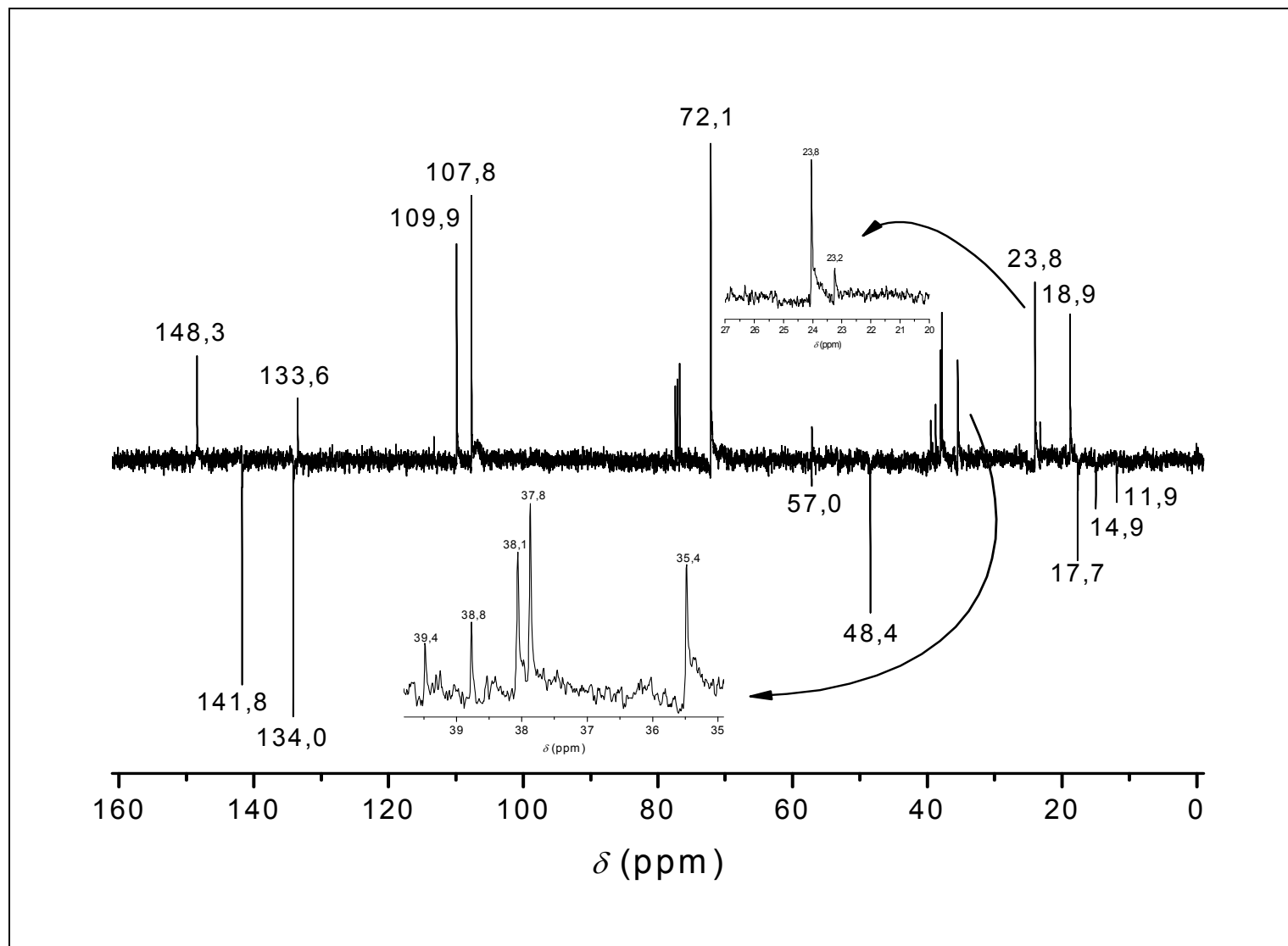


FIGURA 56A - Espectro de RMN de ^{13}C obtido pela técnica APT (100 MHz, CDCl_3) do álcool do ozato de metila (40).

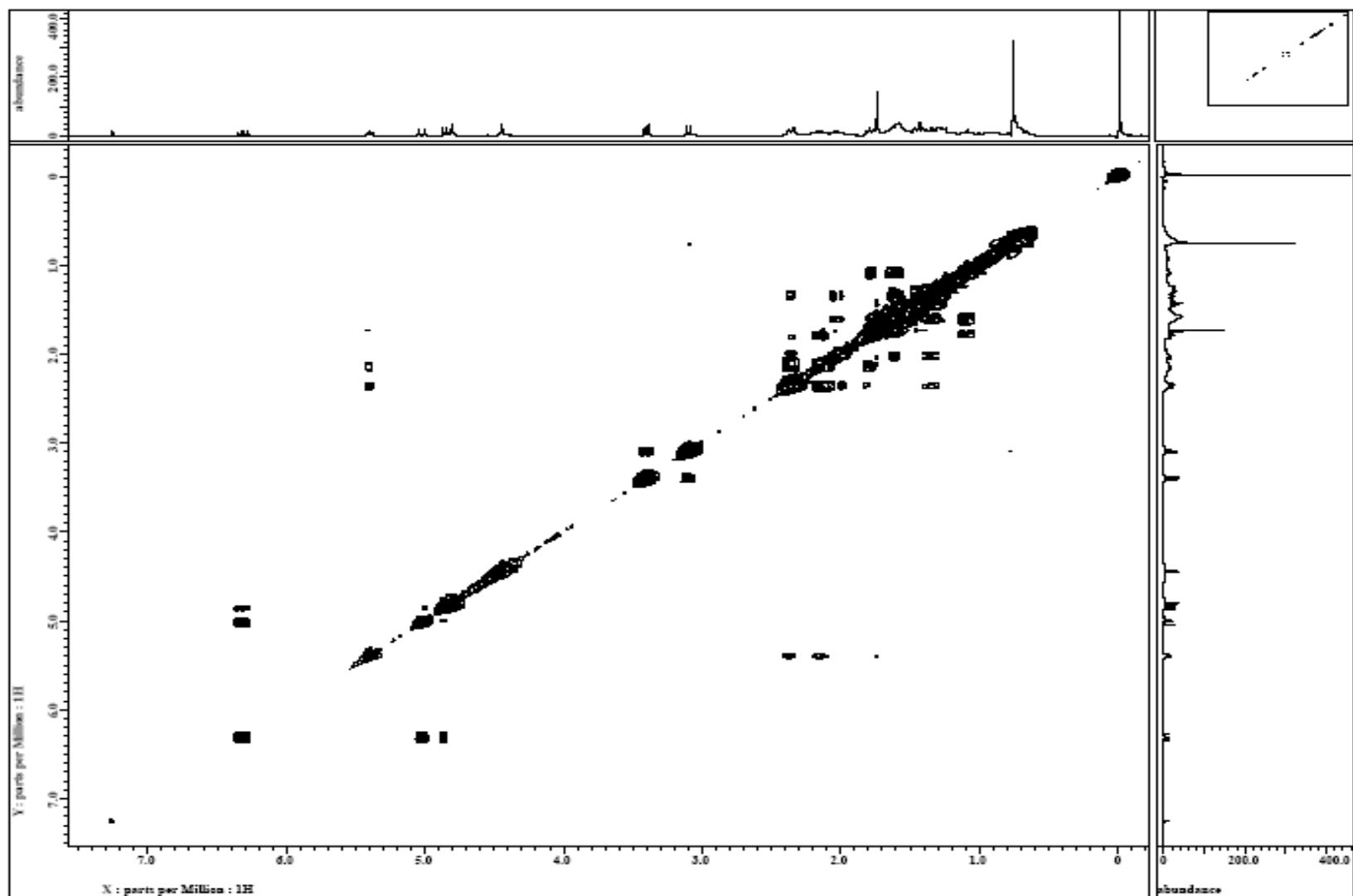


FIGURA 57A – Espectro de COSY (400 MHz, CDCl₃) do álcool do ozato de metila (40).

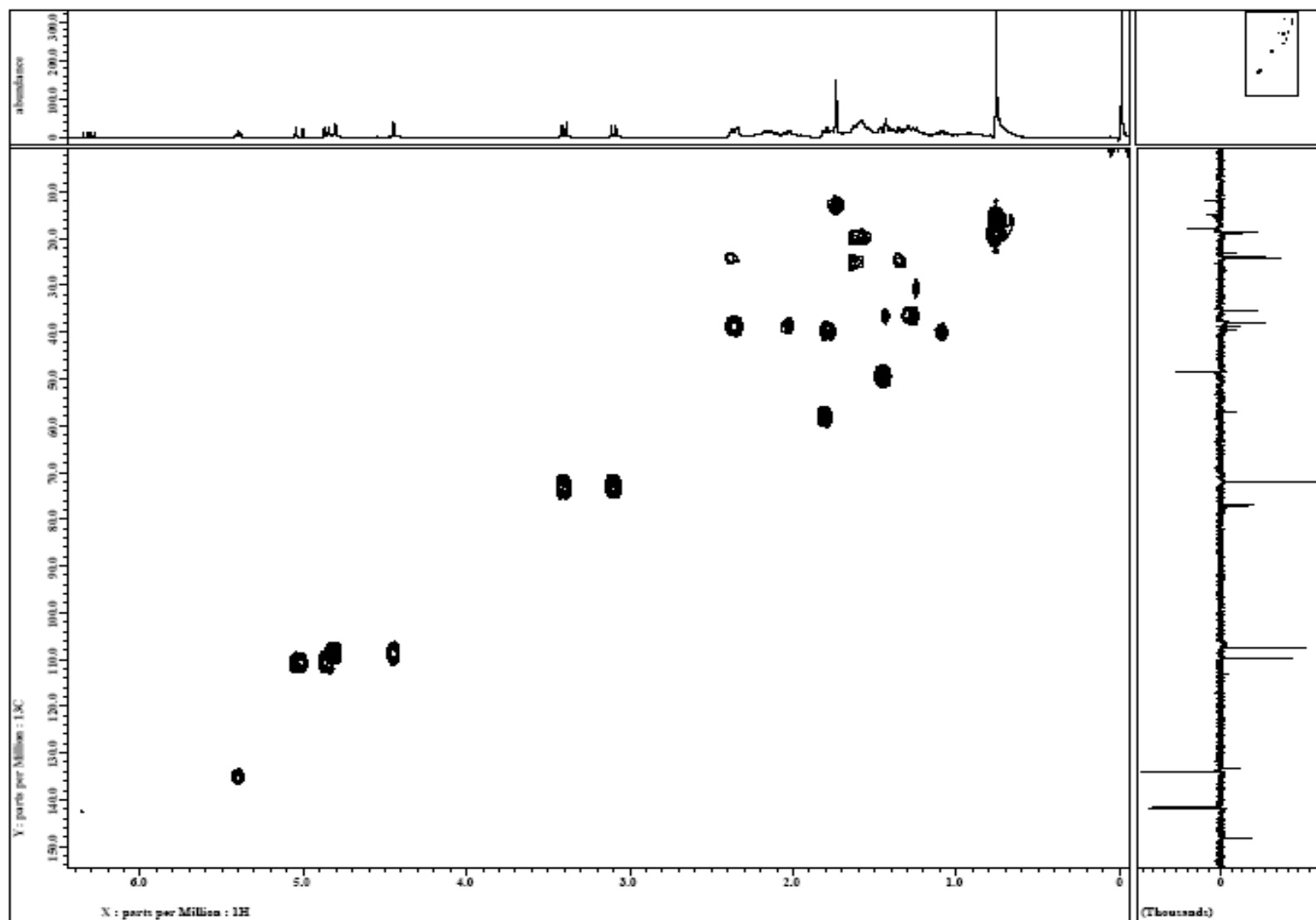


FIGURA 58A – Espectro de HMQC (^1H -400 MHz, ^{13}C -100 MHz, CDCl_3) do álcool do ozato de metila (40).

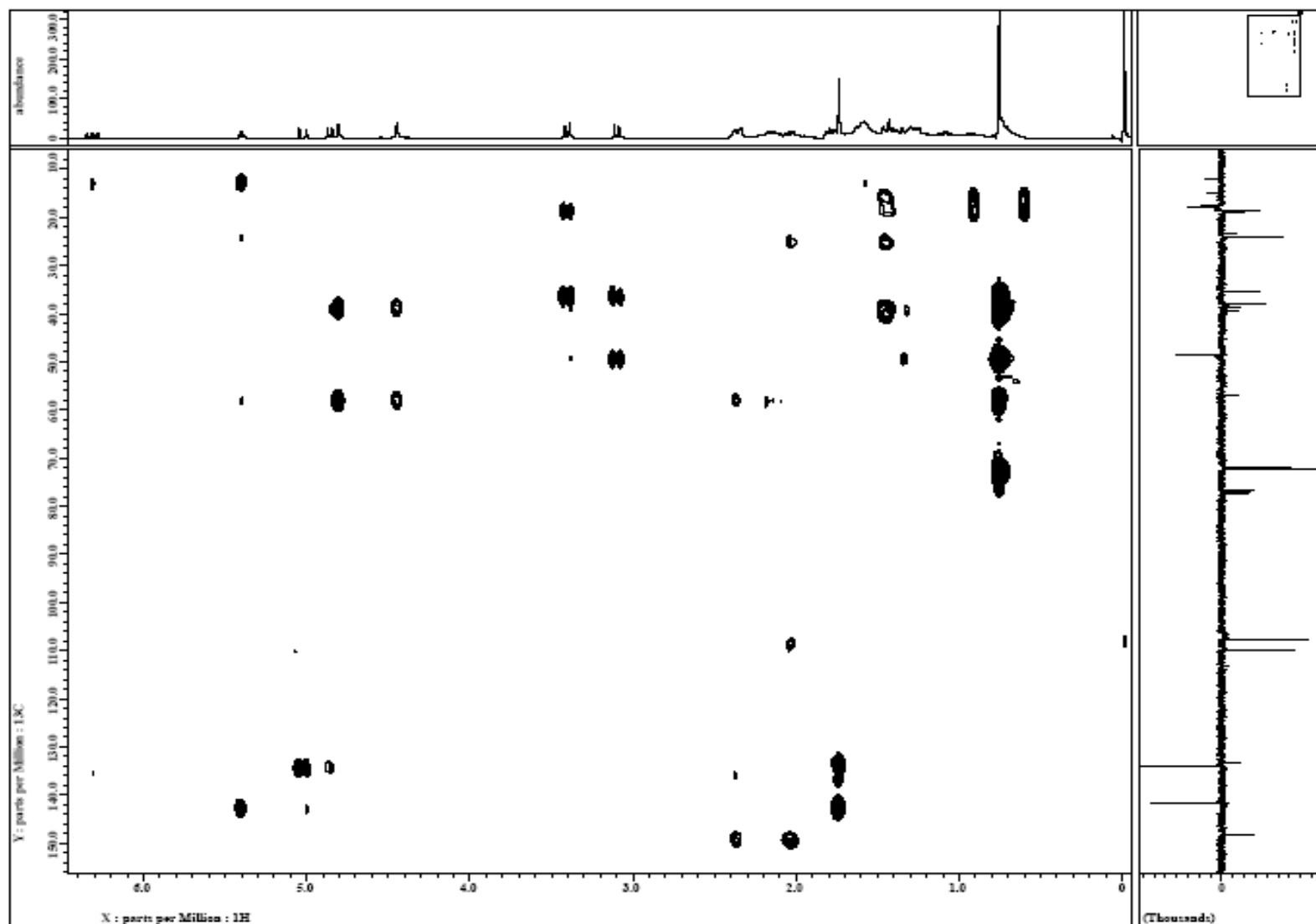


FIGURA 59A – Espectro de HMBC (¹H-400 MHz, ¹³C-100 MHz, CDCl₃) do álcool do ozato de metila (**40**).

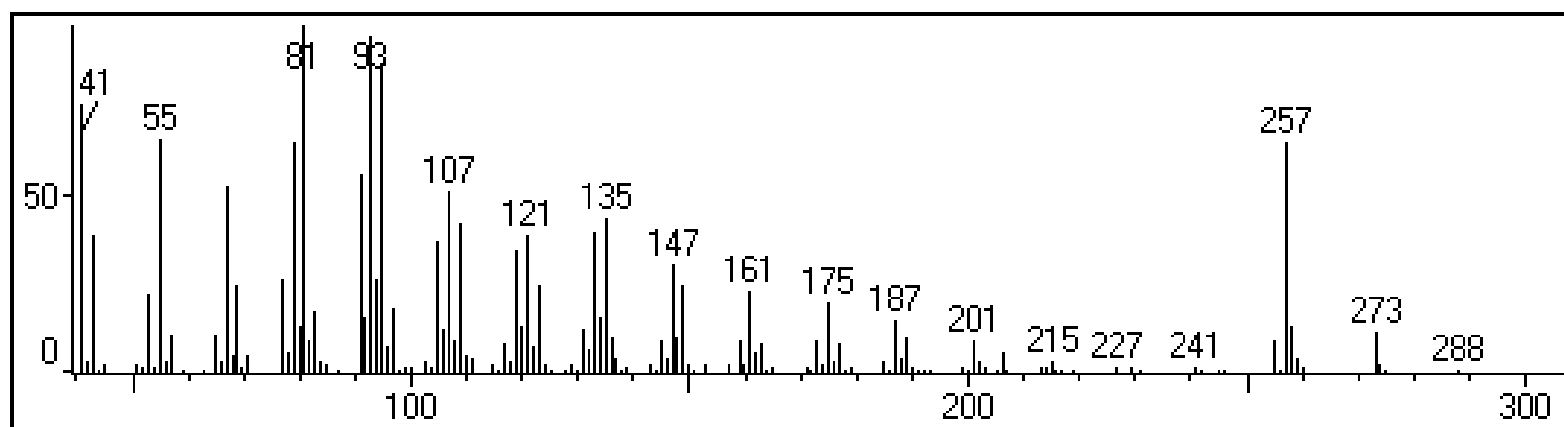


FIGURA 60A – Espectro de massas do álcool do isoozato de metila (41).

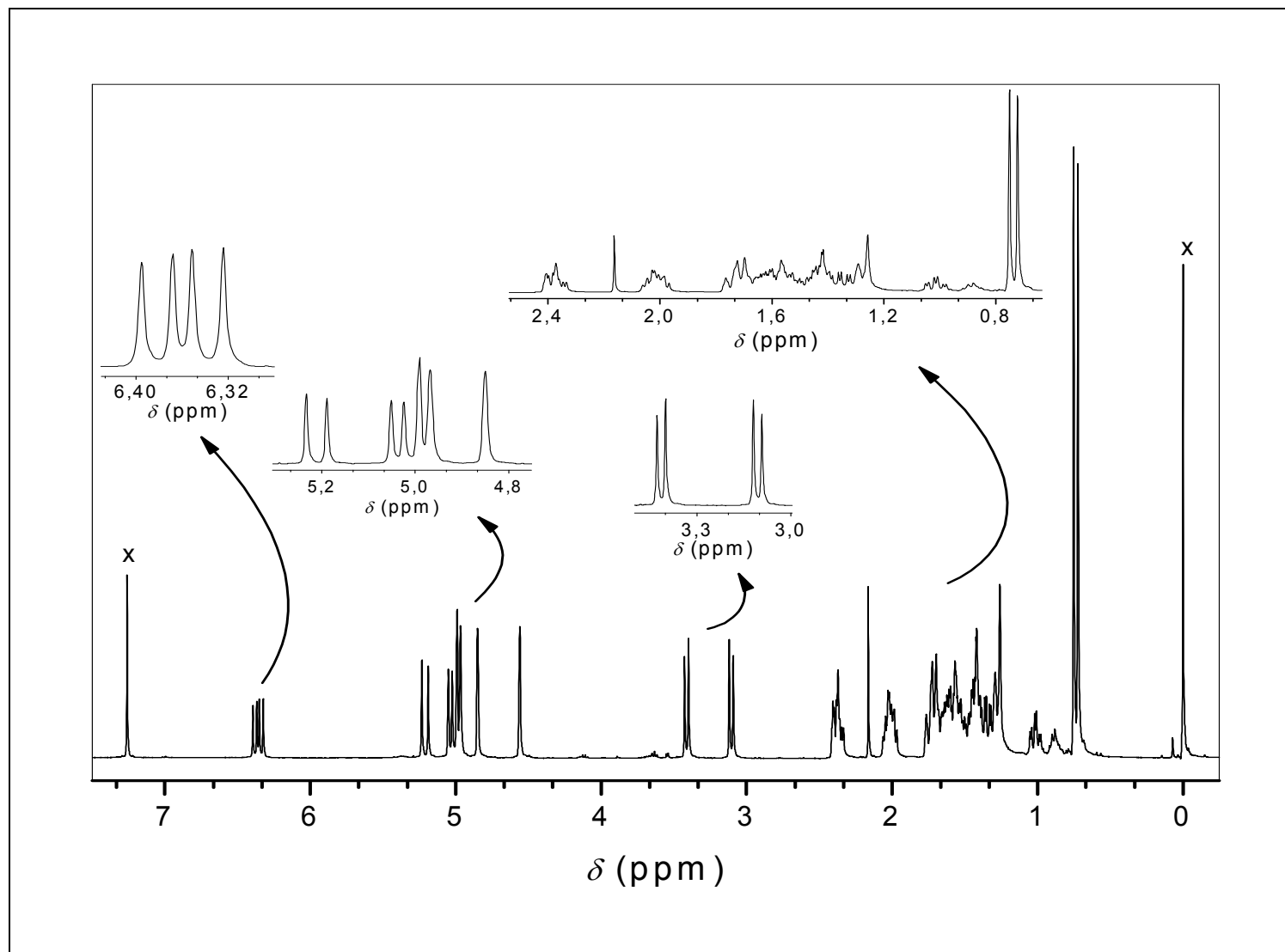


FIGURA 61A – Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) do álcool do isoozato de metila (41).

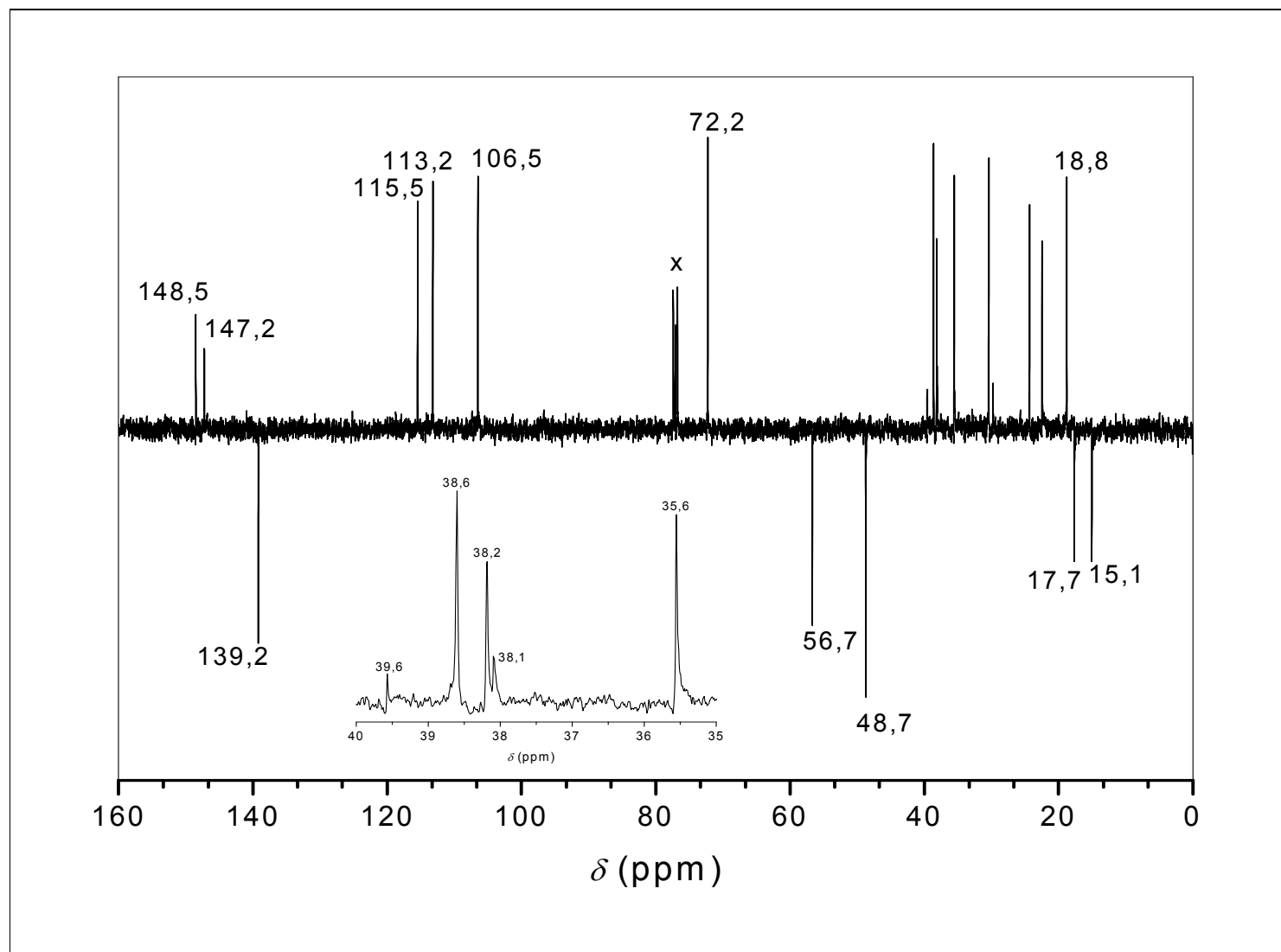


FIGURA 62A - Espectro de RMN de ^{13}C obtido pela técnica APT (100 MHz, CDCl_3) do álcool do isozato de metila (41).

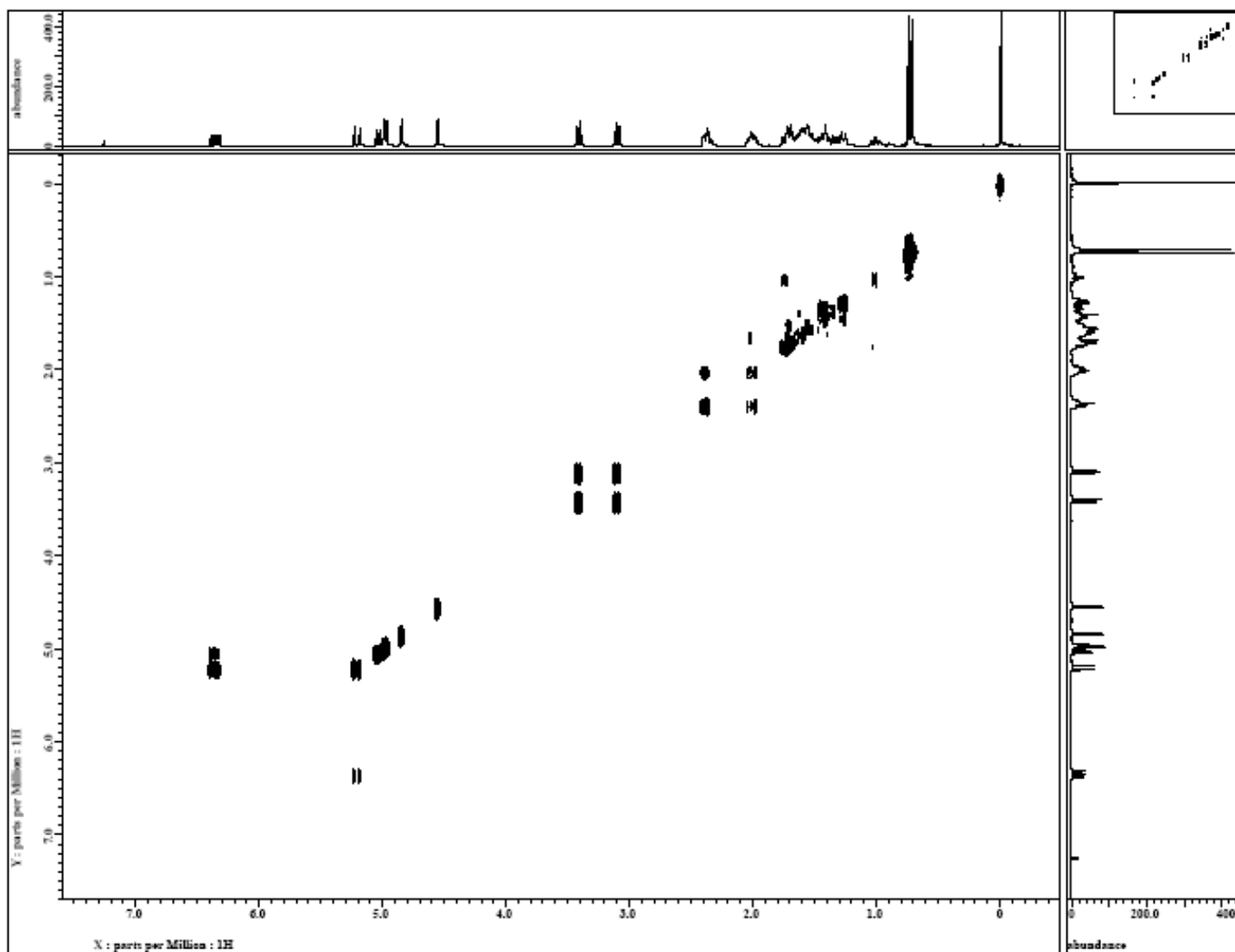


FIGURA 63A – Espectro de COSY (400 MHz, CDCl₃) do álcool do isoozato de metila (**41**).

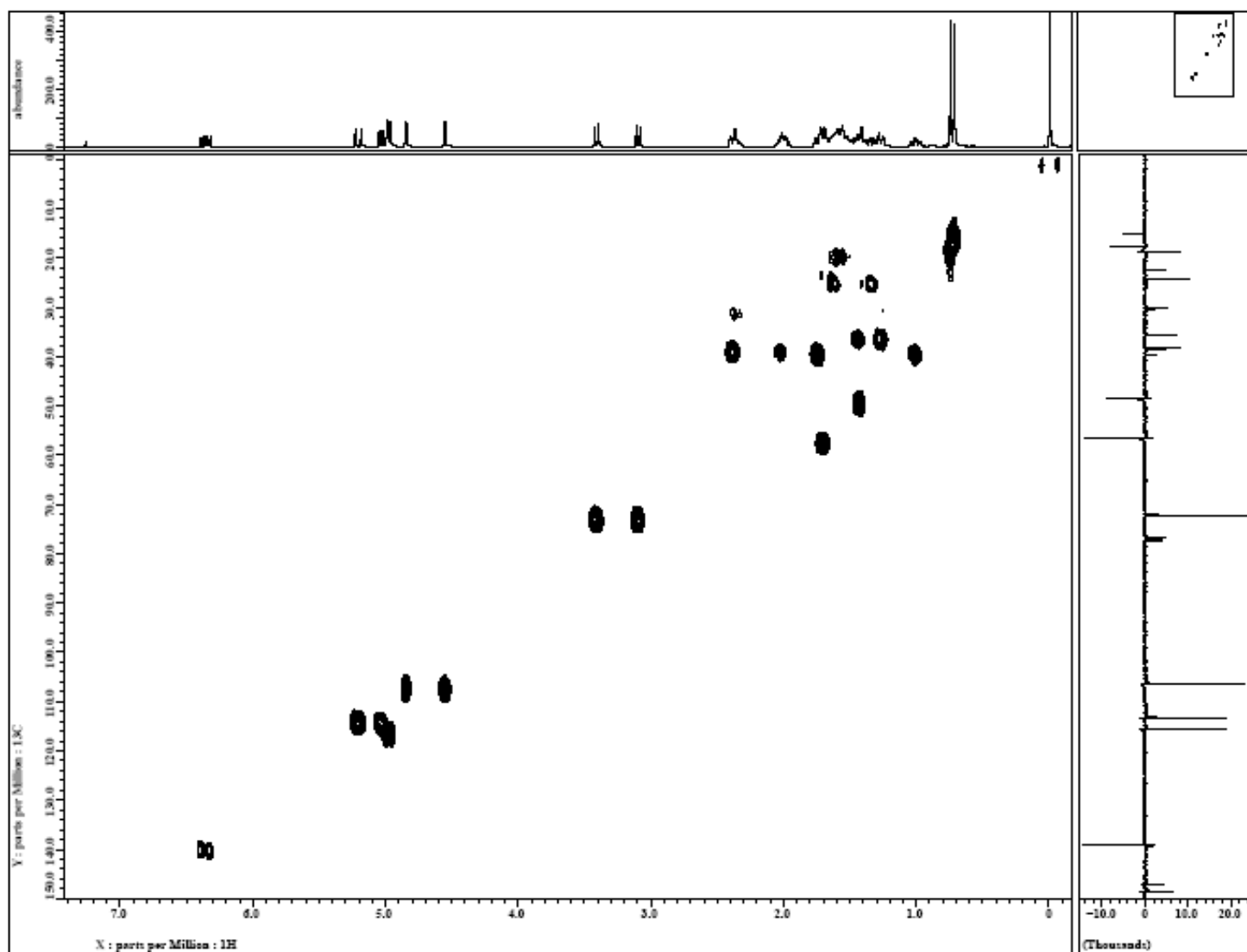


FIGURA 64A – Espectro de HMQC (^1H -400 MHz, ^{13}C -100 MHz, CDCl_3) do álcool do isoozato de metila (**41**).

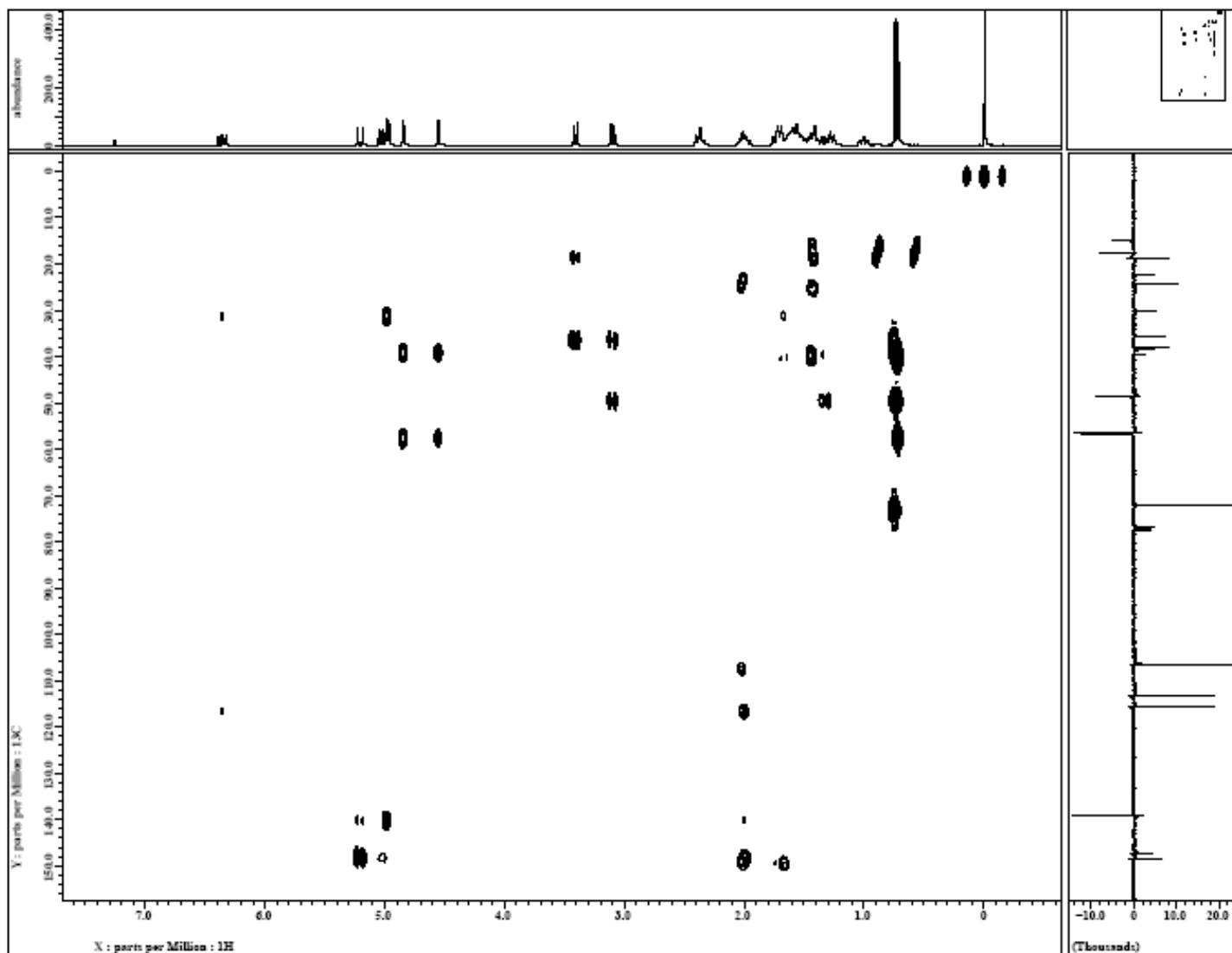


FIGURA 65A – Espectro de HMBC (^1H -400 MHz, ^{13}C -100 MHz, CDCl_3) do álcool do isoozato de metila (**41**).

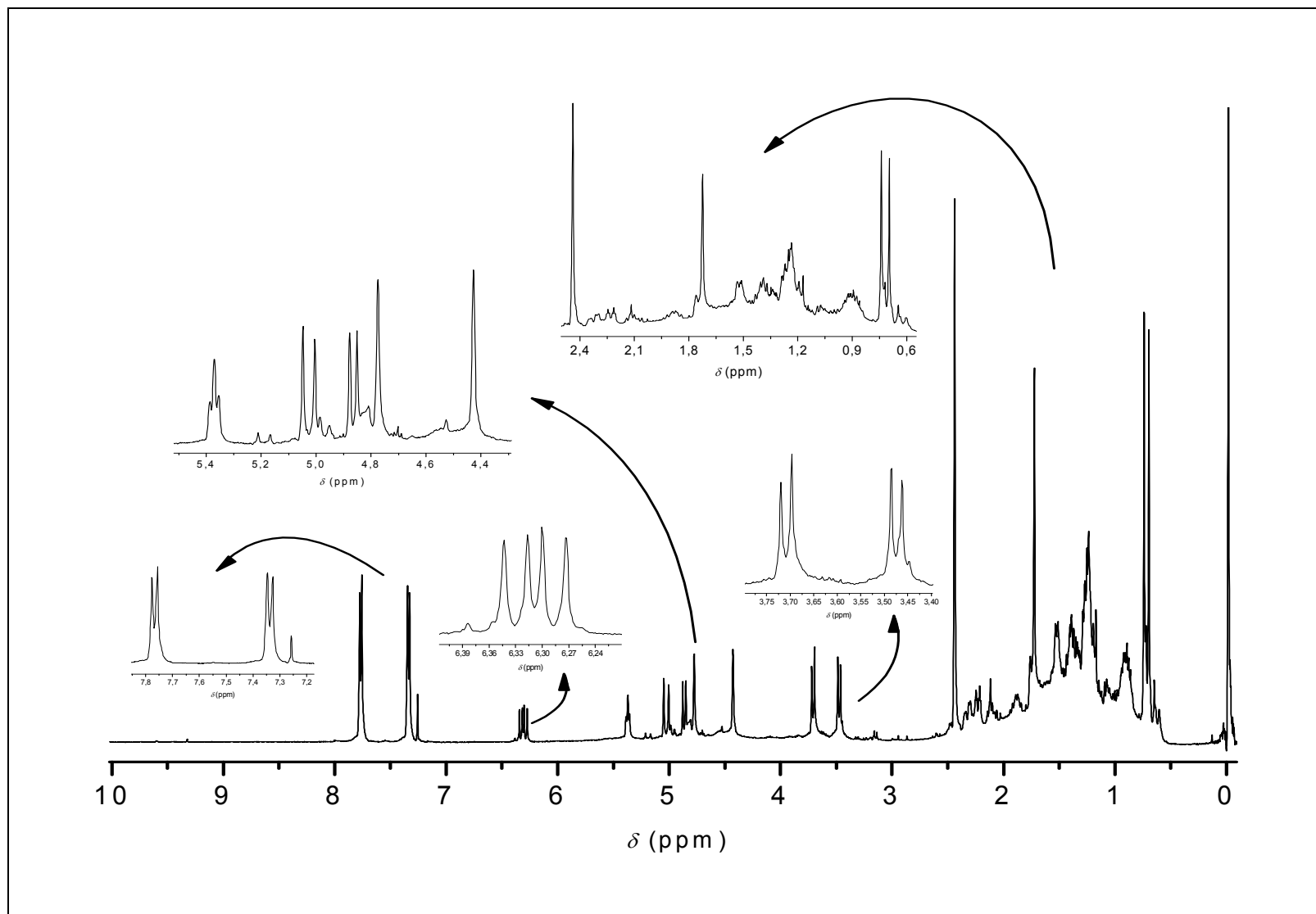


FIGURA 66A – Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) do tosilato do ozato de metila (42).

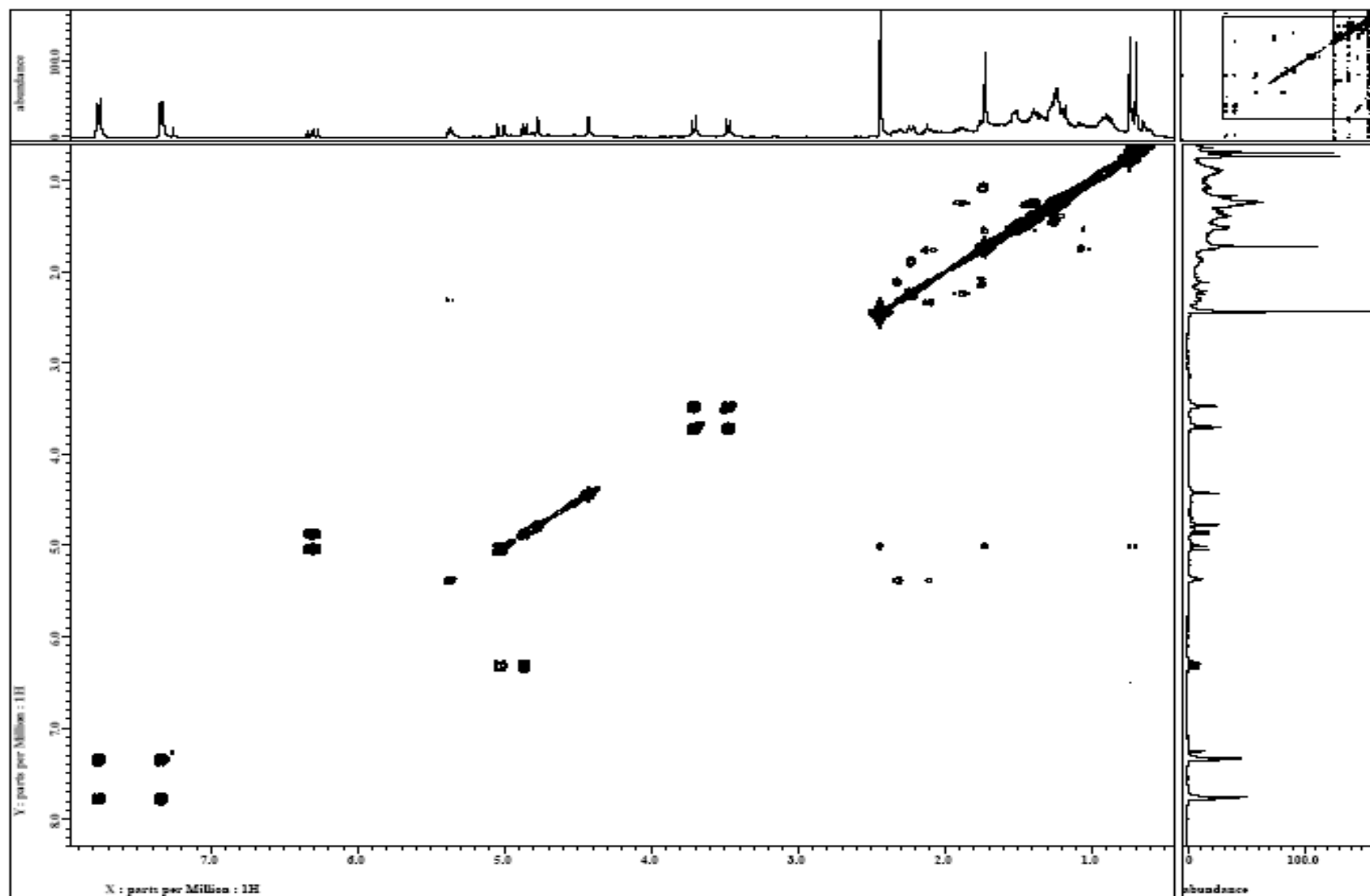


FIGURA 67A – Espectro de COSY (400 MHz, CDCl_3) do tosilato do ozato de metila (42).

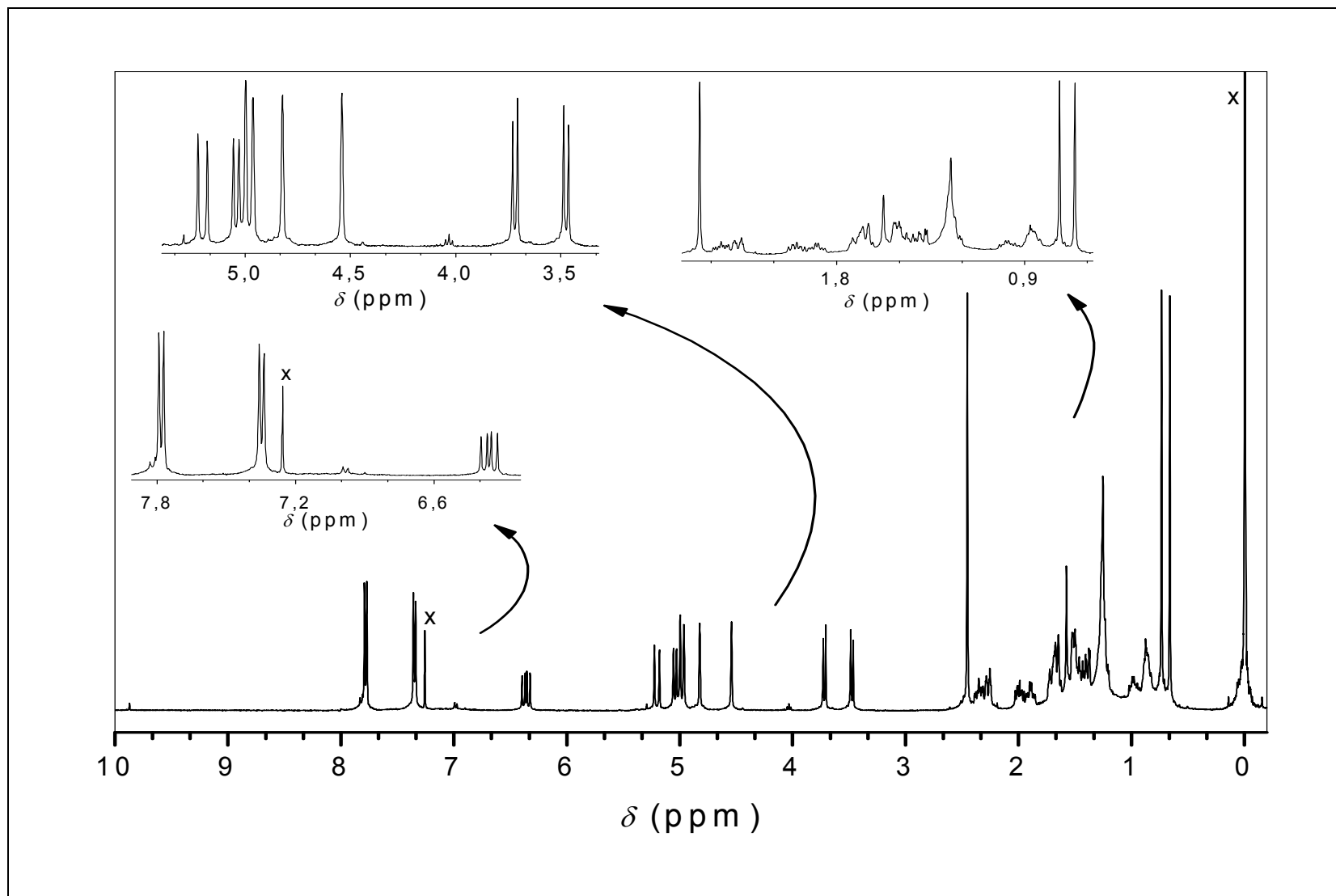


FIGURA 68A – Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) do tosilato do isocinato de metila (43).

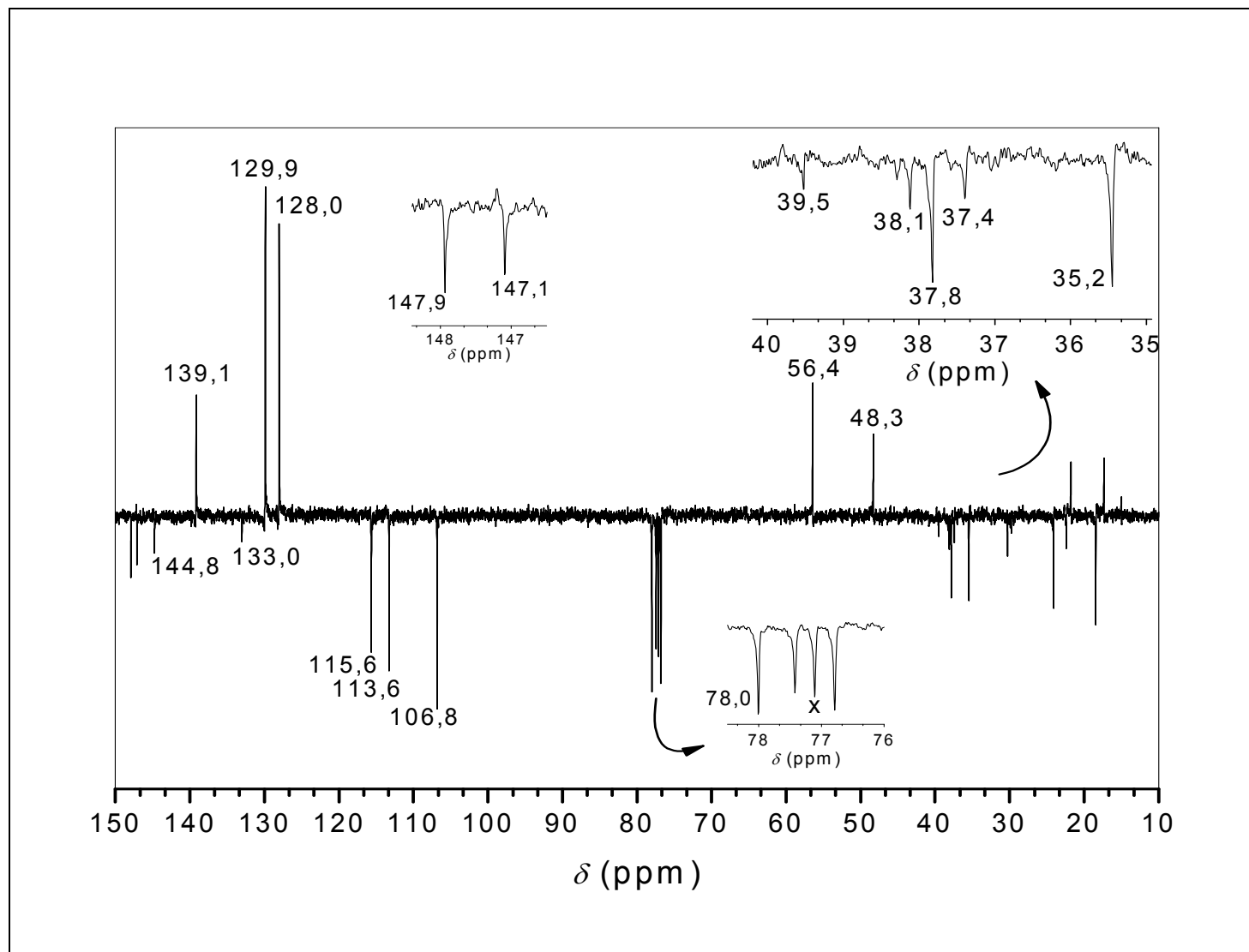


FIGURA 69A - Espectro de RMN de ^{13}C obtido pela técnica APT (100 MHz, CDCl_3) do tosilato do isozato de metila (**43**).

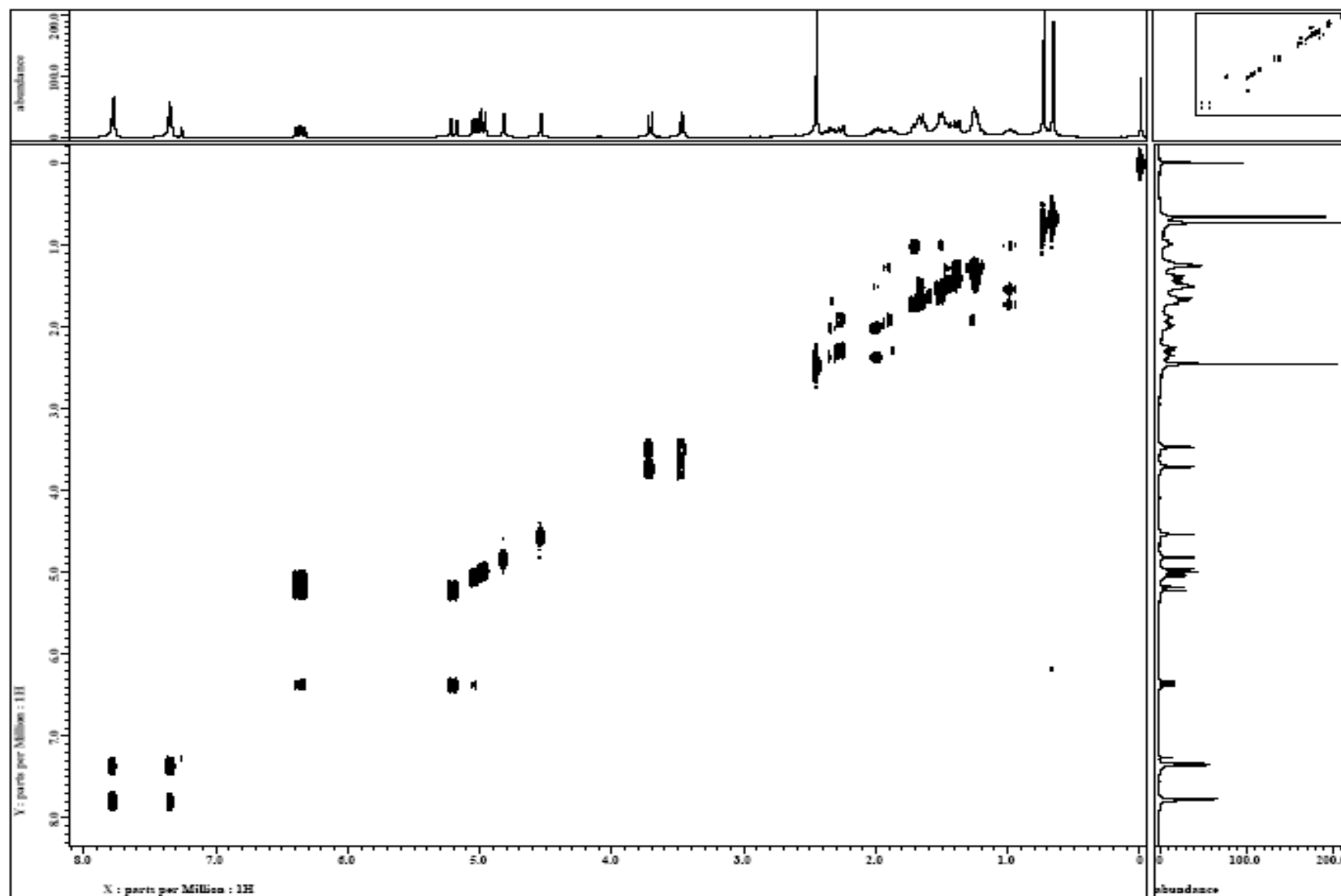


FIGURA 70A – Espectro de COSY (400 MHz, CDCl_3) do tosilatado isoozato de metila (**43**).

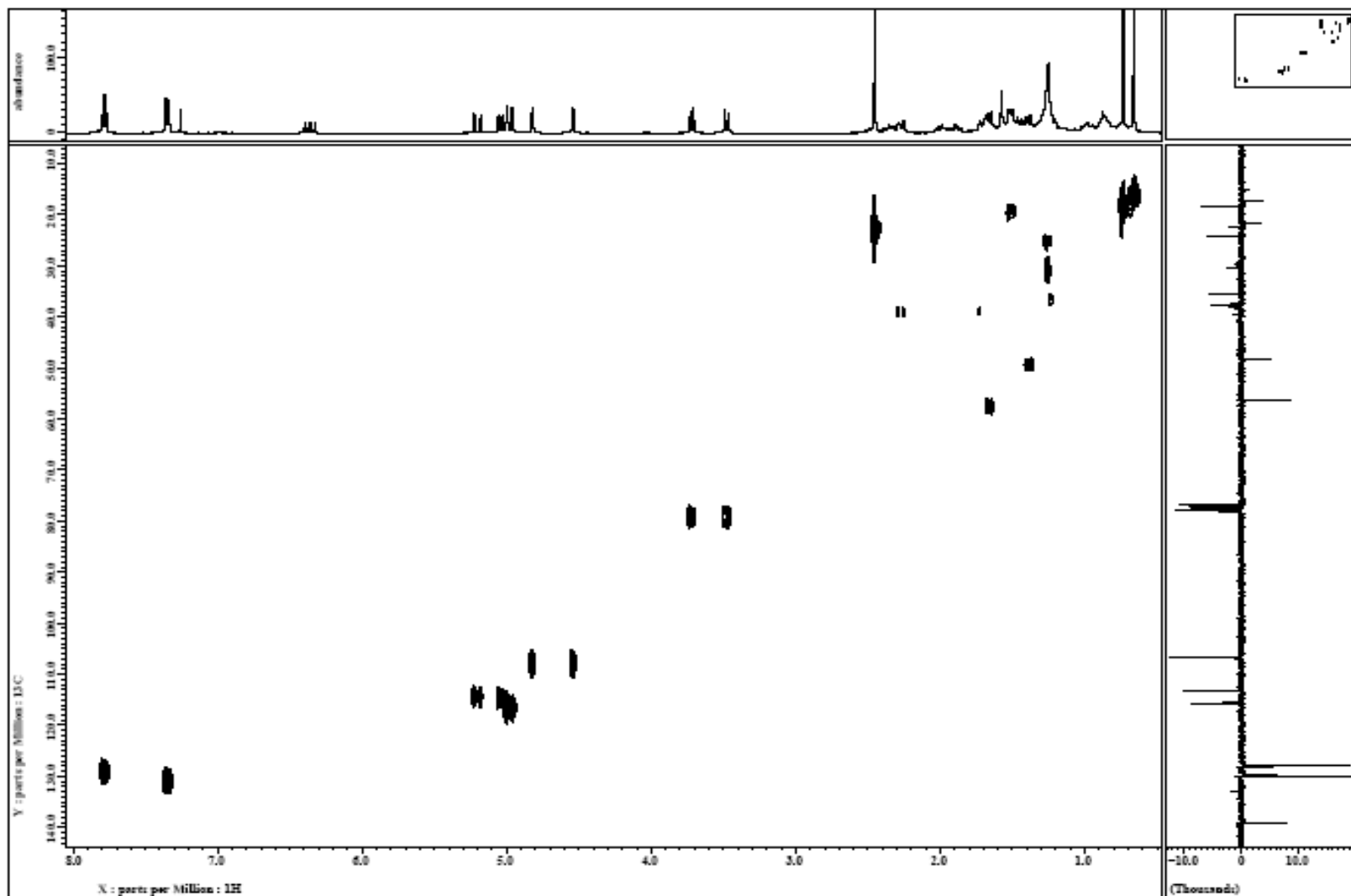


FIGURA 71A – Espectro de HMQC (^1H -400 MHz, ^{13}C -100 MHz, CDCl_3) do tosilato do isoozato de metila (43).

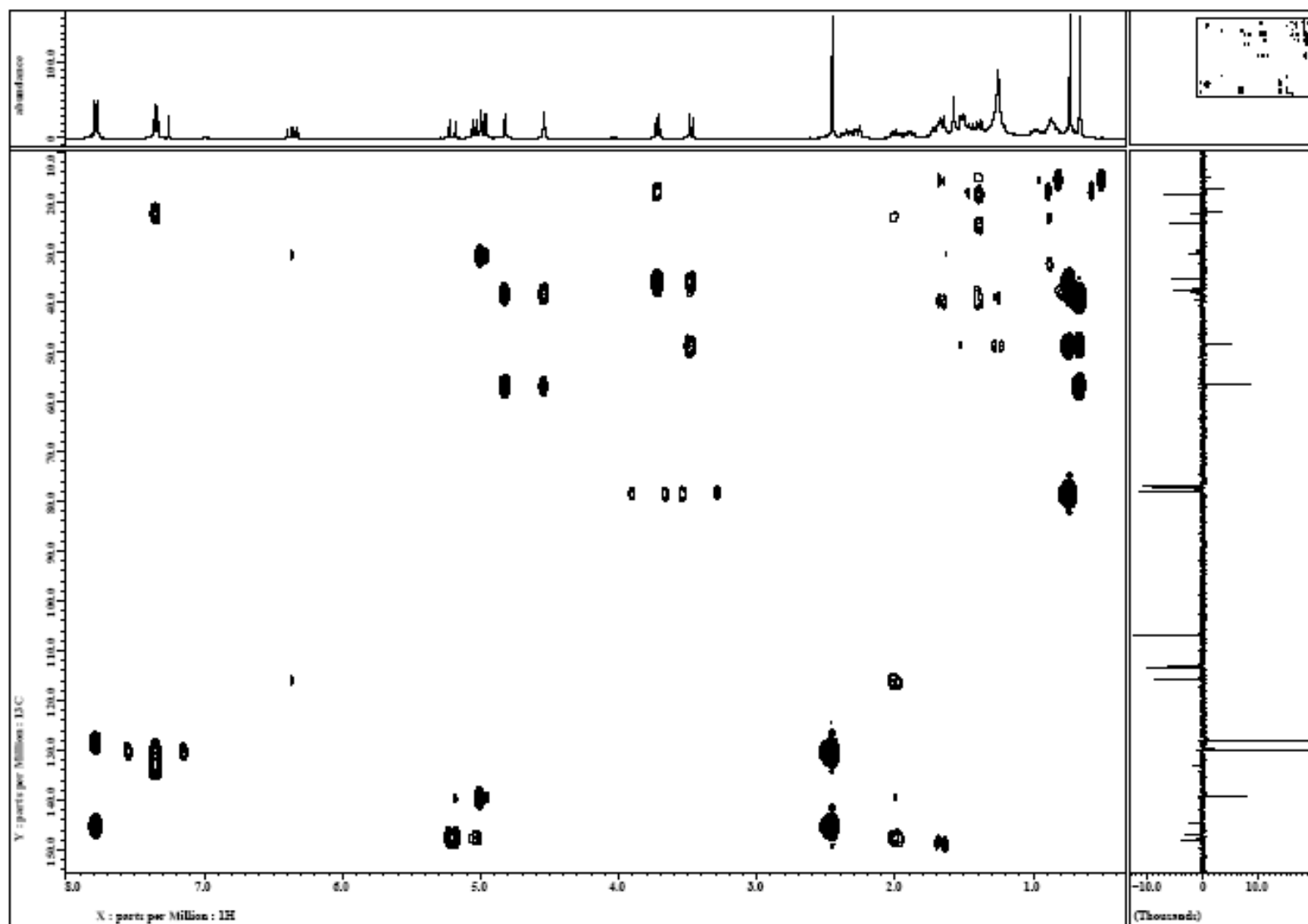


FIGURA 72A – Espectro de HMBC (^1H -400 MHz, ^{13}C -100 MHz, CDCl_3) do tosilato do isoozato de metila (43).