

**ESTUDO FITOQUÍMICO DA *Ampelozizyphus amazonicus*
(RHAMNACEAE)**

QUEITILANE DE SOUZA SALES

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE DARCY

RIBEIRO

CAMPOS DOS GOYTACAZES-RJ

MARÇO - 2013

**ESTUDO FITOQUÍMICO DA *Ampelozizyphus amazonicus*
(RHAMNACEAE)**

QUEITILANE DE SOUZA SALES

“Monografia apresentada ao Centro de Ciências e Tecnologia da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como parte das exigências para obtenção do título de Licenciatura em Química.”

Orientador: Prof. Dr. Rodrigo Rodrigues de Oliveira

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE DARCY
RIBEIRO
CAMPOS DOS GOYTACAZES-RJ
MARÇO – 2013**

ESTUDO FITOQUÍMICO DA *Ampelozizyphus amazonicus*
(RHAMNACEAE)

QUEITILANE DE SOUZA SALES

“Monografia apresentada ao Centro de Ciências e Tecnologia da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como parte das exigências para obtenção do título de Licenciatura em Química.”

Aprovada em Março de 2013.

Comissão examinadora:

Prof^a Maria Raquel Garcia Vega (D. Sc., Ciências) – UENF

Adriana Lima de Sousa (M. Sc., Ciências Naturais) – UENF

Prof^o: Rodrigo Rodrigues de Oliveira (D. Sc., Química Orgânica) – UENF
(Orientador)

AGRADECIMENTOS

Primeiramente quero agradecer a DEUS, pelo dom da vida e por ter me proporcionado todas as coisas que alcancei até hoje e que espero alcançar futuramente.

Aos meus pais pelo apoio que sempre me deram.

Ao Professor Rodrigo Rodrigues de Oliveira por me orientar durante todo tempo no laboratório para realizar essa pesquisa e construir este trabalho, e a pela sua amizade.

Aos amigos de laboratório, Adriana, Fernanda Neves, Fernanda Tavares, Diego, Amaro, Isabela, Lara, Virgínia e Stephanea pela amizade que construímos ao longo de todo esse tempo, a motivação, a ajuda oferecida quando necessária, e pela paciência que tem comigo.

Aos colegas e amigos de turma da graduação por todo apoio e carinho oferecidos durante esses quase 4 anos e meio, principalmente a Rosana e a Helen.

Aos amigos do coração e da vida que sempre me motivaram e me proporcionaram muita alegria.

A todos que de alguma forma me ajudaram a construir este trabalho, o meu muito obrigado!

Este trabalho foi desenvolvido no laboratório de Química de Produtos Naturais, no Centro de Ciências e Tecnologia da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, sob orientação do Prof. Rodrigo Rodrigues de Oliveira.

SALES, Q. S. Estudo Fitoquímico da *Ampelozizyphus amazonicus* (Rhamnaceae). Campos dos Goytacazes, CCT-UENF, 2013.
Total de páginas: 105
Monografia: Licenciatura em Química.
Palavras chave: Rhamnaceae, *Ampelozizyphus amazonicus*, triterpenóides, fitoesteróides.

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE DARCY
RIBEIRO
CAMPOS DOS GOYTACAZES-RJ
MARÇO - 2013**

RESUMO

SALES, Queitilane Souza; Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Março de 2013; Estudo Químico da *Ampelozizyphus amazonicus* (Rhamnaceae); Prof^o Orientador Rodrigo Rodrigues de Oliveira.

O gênero *Ampelozizyphus*, pertence à família Rhamnaceae, é formado por duas espécies, sendo a espécie *Ampelozizyphus guaquirensis* encontrada somente na Venezuela e a outra *Ampelozizyphus amazonicus*, com uma maior abrangência territorial, é encontrada na Amazônia brasileira, venezuelana, colombiana e peruana, expandindo-se até o Equador. No Brasil essa espécie pode ser encontrada nos estados do Amazonas, Pará e Rondônia. A composição química desse gênero é caracterizada pela ocorrência de triterpenos, fitoesteróides e saponinas. A espécie *Ampelozizyphus amazonicus* exibe atividades farmacológicas, tais como, antimalárica e antitumoral, além de ter atividade citotóxica contra a cepa Y do *Trypanosoma cruzi* em ratos (Swiss albino), efeito diurético e antidiurético. Dessa forma, a fim de contribuir com o estudo químico do gênero *Ampelozizyphus*, a espécie *A. amazonicus* foi coletado na Reserva Florestal Adolpho Ducke, pertencente ao Instituto Nacional de Pesquisa da Amazônia (INPA). Em seguida o material botânico foi triturado e enviado para ser analisado na Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (UENF). Esse material vegetal foi submetido à extração em diclorometano e em metanol. Procedimentos cromatográficos e testes de prospecção química realizados com o extrato diclorometânico permitiram a identificação de um triterpeno e dois fitoesteróides. Todas as substâncias isoladas foram elucidadas por RMN unidimensional e bidimensional e por fragmentação pela espectrometria de massas.

Palavras-chave: Rhamnaceae, *Ampelozizyphus amazonicus*, triterpenóides, fitoesteróides.

ABSTRACT

SALES, Queitilane Souza; Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Março de 2013; Estudo Químico da *Ampelozizyphus amazonicus* (Rhamnaceae); Prof^o Orientador Rodrigo Rodrigues de Oliveira.

The genus *Ampelozizyphus*, belongs to the family Rhamnaceae, it consists of two species, being the specie *Ampelozizyphus guaquirensis* only found in Venezuela, and *Ampelozizyphus amazonicus*, with greater territorial coverage, is distributed in the Brazilian Amazon, Venezuelan, Colombian and Peruvian, expanding to Ecuador. In Brazil this specie is found in the Amazonas states, Para and Rondonia. The chemical composition of genus *Ampelozizyphus* has shown the occurrence of triterpene, phytosteroids and saponins. The species *Ampelozizyphus amazonicus* exhibit pharmacological activities, such as antimalarial, antitumor, besides having cytotoxic activity against the Y strain of *Trypanosoma cruzi* in mice (Swiss albino), diuretic and antidiuretic effect. In order to contribute with the chemical study of *Ampelozizyphus*, the specie *Ampelozizyphus amazonicus* was collected in the Adolpho Ducke Forest Reserve, part of the National Institute of Amazon Research (INPA). Then the plant material was dried and sent to be analyzed at the State University of North Fluminense Darcy Ribeiro (UENF). The plant material was subjected to extraction with dichloromethane and methanol. Chromatographic procedures performed with dichloromethane extract afforded isolation of a triterpene and two phytosteroids. All isolated compounds were elucidated by NMR one-dimensional and two-dimensional and fragmentation by mass spectrometry.

Key-words: Rhamnaceae, *Ampelozizyphus amazonicus*, triterpenoids, phytosteroids.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Distribuição geográfica da família Rhamnaceae (MISSOURI BOTANICAL GARDEM, 2012).....	26
Figura 2. Fotos da espécie <i>Zizyphus joazeiro</i> e da espécie <i>Condalia buxifolia</i> da família Rhamnaceae (SOUZA & LORENZI, 2005).....	28
Figura 3. Distribuição da <i>Ampelozizyphus guaquirensis</i> no Norte da Venezuela (MEIER & BERRY, 2008).....	30
Figura 4. Partes da <i>Ampelozizyphus guaquirensis</i> (MEIER & BERRY, 2008).....	30
Figura 5. Distribuição da espécie <i>Ampelozizyphus amazonicus</i> no Brasil (LIMA, 2012).....	31
Figura 6. Partes da <i>Ampelozizyphus amazonicus</i> (LIMA, 2006).....	32
Figura 7. Resultado observado do teste para identificação de esteróides e triterpenóides.....	53
Figura 8. Resultado observado do teste para identificação de saponinas.....	54
Figura 9. Fotografia da CCDA da fração AAD3-1 revelada com vanilina sulfurada.....	57
Figura 10. Proposta da fragmentação do triterpeno AAD 3-1 (lupeol).....	72
Figura 11. Fotografia da CCDA da fração AAD 4-2-2-1 e AAD 4-2-2-1-1 revelada com vanilina sulfurada.....	73

Figura 12. Proposta da fragmentação do esteróide **AAD 4-2-2-1**
(estigmasterol)..... 97

Figura 13. Proposta da fragmentação do esteróide **AAD 4-2-2-1-1** (β -
sitosterol)..... 98

LISTA DE QUADROS

Quadro 1. (A) Brazilina, (B) brazileína, (C) morina, primeiros corantes isolados no Brasil.....	23
Quadro 2. (A) Cinchonina, (B) quinina, substâncias isoladas da <i>Cinchona</i>	24
Quadro 3. Estrutura dos triterpenos isolados da espécie <i>Ampelozizyphus amazonicus</i>	36
Quadro 3. Estrutura dos triterpenos isolados da espécie <i>Ampelozizyphus amazonicus</i> (Continuação).....	37
Quadro 4. Estrutura dos esteróides isolados da espécie <i>Ampelozizyphus amazonicus</i>	38
Quadro 5. (1) Linalol, (2) Colforsina e (3) Ácido betulínico.....	41
Quadro 6. Estrutura base dos triterpenóides (esqualeno) e dos esteróides.....	53

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1. Biossíntese dos terpenos (DEWICK, 2008).....	39
Esquema 2. Fluxograma geral do trabalho realizado.....	46
Esquema 3. Análise cromatográfica do extrato em diclorometano.....	49

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Gênero da família Rhamnaceae (RICHARDSON et al., 2000).....	25
Tabela 2. Classificação em tribos dos gêneros da família Rhamnaceae (RICHARDSON, 2000).....	26
Tabela 3. Distribuição da família Rhamnaceae no Brasil (FORZZA, 2010).....	27
Tabela 4. Classificação do gênero <i>Ampelozizyphus</i>	29
Tabela 5. Uso etnofarmacológico da <i>Ampelozizyphus amazonicus</i>	33
Tabela 6. Atividades biológicas de extratos ou substâncias isoladas da espécie <i>Ampelozizyphus amazonicus</i>	34
Tabela 7. Substâncias isoladas da espécie.....	35
Tabela 8. Resultado do teste de esteróides e triterpenóides.....	52
Tabela 9. Sinais identificados no espectro de RMN ¹³ C – AAD 3-1	58
Tabela 10. Dados do RMN ¹ H (500 MHz) e RMN ¹³ C (125 MHz) em CDCl ₃ e as correlações observadas no espectro de HMQC e HMBC da substância AAD 3-1 comparados com valores de referência do Mo-1 (ZANON, 2006).....	59
Tabela 11. Sinais identificados no espectro de RMN ¹³ C - AAD 4-2-2-1 e AAD 4-2-2-1-1	75
Tabela 12. Dados de RMN ¹ H (400 MHz) e de RMN ¹³ C (100 MHz) em CDCl ₃ , deslocamentos químicos δ (ppm) das substâncias AAD4-2-2-1 e AAD4-2-2-1-1 comparados com valores de referência do modelo Mo-1 e Mo-2 (Rodrigues,	

F.,2009), respectivamente..... 76

LISTA DE ESPECTROS

Espectro 1. Espectro de RMN ^{13}C (125 MHz) em CDCl_3 do triterpeno AAD 3-1	61
Espectro 2. Ampliação da região de δ 10-56 do espectro de RMN ^{13}C (125 MHz) em CDCl_3 do triterpeno AAD 3-1	62
Espectro 3. Ampliação da região de δ 65-170 do espectro de RMN ^{13}C (125 MHz) em CDCl_3 do triterpeno AAD 3-1	63
Espectro 4. Espectro de RMN ^1H (500 MHz) em CDCl_3 do triterpeno AAD 3-1 ...	64
Espectro 5. Ampliação da região de δ 0 – 2,8 do espectro de RMN ^1H (500 MHz) em CDCl_3 do triterpeno AAD 3-1	65
Espectro 6. Ampliação da região de δ 2,8 – 7,8 do espectro de RMN ^1H (500 MHz) em CDCl_3 do triterpeno AAD 3-1	66
Espectro 7. Mapa de correlação heteronuclear HMQC em CDCl_3 do triterpeno AAD 3-1	67
Espectro 8. Ampliação do mapa de correlação heteronuclear HMQC em CDCl_3 do triterpeno AAD 3-1	68
Espectro 9. Mapa de correlação heteronuclear HMBC em CDCl_3 do triterpeno AAD 3-1	69
Espectro 10. Ampliação do mapa de correlação heteronuclear HMBC em CDCl_3 do triterpeno AAD 3-1	70

Espectro 11. Espectro de massas do triterpeno AAD 3-1 (lupeol).....	72
Espectro 12. Espectro de RMN ^{13}C (100 MHz) em CDCl_3 da mistura de esteróides AAD 4-2-2-1 e AAD 4-2-2-1-1	78
Espectro 13. Ampliação da região δ 12 – 32 do espectro de RMN ^{13}C (100 MHz) em CDCl_3 da mistura de esteróides AAD 4-2-2-1 e AAD 4-2-2-1-1	79
Espectro 14. Ampliação da região de δ 30 – 58 do espectro de RMN ^{13}C (100 MHz) em CDCl_3 da mistura de esteróides AAD 4-2-2-1 e AAD 4-2-2-1-1	80
Espectro 15. Ampliação da região de δ 50 – 150 do espectro de RMN ^{13}C (100 MHz) em CDCl_3 da mistura de esteróides AAD 4-2-2-1 e AAD 4-2-2-1-1	81
Espectro 16. Espectro de RMN ^1H (400 MHz) em CDCl_3 da mistura de esteróides AAD 4-2-2-1 e AAD 4-2-2-1-1	82
Espectro 17. Ampliação da região de δ 0,4 – 1,7 do espectro de RMN ^1H (400 MHz) em da mistura de esteróides AAD 4-2-2-1 e AAD 4-2-2-1-1	83
Espectro 18. Ampliação da região de δ 1,3 – 2,5 do espectro de RMN ^1H (400 MHz) em da mistura de esteróides AAD 4-2-2-1 e AAD 4-2-2-1-1	84
Espectro 19. Ampliação da região de δ 3,2 – 5,7 do espectro de RMN ^1H (400 MHz) em da mistura de esteróides AAD 4-2-2-1 e AAD 4-2-2-1-1	85
Espectro 20. Mapa de correlação heteronuclear HMQC em CDCl_3 da mistura de esteróides AAD 4-2-2-1 e AAD 4-2-2-1-1	86
Espectro 21. Ampliação do mapa de correlação heteronuclear HMQC em CDCl_3 da mistura de esteróides AAD 4-2-2-1 e AAD 4-2-2-1-1	87

Espectro 22. Ampliação do mapa de correlação heteronuclear HMQC em CDCl ₃ da mistura de esteróides AAD 4-2-2-1 e AAD 4-2-2-1-1	88
Espectro 23. Ampliação do mapa de correlação heteronuclear HMQC em CDCl ₃ da mistura de esteróides AAD 4-2-2-1 e AAD 4-2-2-1-1	89
Espectro 24. Mapa de correlação heteronuclear HMBC em CDCl ₃ da mistura de esteróides AAD 4-2-2-1 e AAD 4-2-2-1-1	90
Espectro 25. Ampliação do mapa de correlação heteronuclear HMBC em CDCl ₃ da mistura de esteróides AAD 4-2-2-1 e AAD 4-2-2-1-1	91
Espectro 26. Ampliação do mapa de correlação heteronuclear HMBC em CDCl ₃ da mistura de esteróides AAD 4-2-2-1 e AAD 4-2-2-1-1	92
Espectro 27. Ampliação do mapa de correlação heteronuclear HMBC em CDCl ₃ da mistura de esteróides AAD 4-2-2-1 e AAD 4-2-2-1-1	93
Espectro 28. Ampliação do mapa de correlação heteronuclear HMBC em CDCl ₃ da mistura de esteróides AAD 4-2-2-1 e AAD 4-2-2-1-1	94
Espectro 29. Espectro de massas do esteróide AAD 4-2-2-1 (estigmasterol).....	96
Espectro 30. Espectro de massas do esteróide AAD 4-2-2-1-1 (β -sitosterol).....	97

LISTA DE CROMATOGRAMAS

Cromatograma 1. Cromatograma da substância AAD 3-1 (lupeol).....	71
Cromatograma 2. Cromatograma de massas da mistura de fitoesteróides AAD 4-2-2-1 (estigmasterol) e AAD 4-2-2-1-1 (β -sitosterol).....	96

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

a. C.	Antes de Cristo
CC	Coluna aberta
CCDA	Cromatografia em Camada Delgada Analítica
CDCl_3	Clorofórmio deuterado
CG/EM	Cromatógrafo Gasoso acoplada à Espectrometria de Massas
cm	Centímetro
conc.	Concentração
g	Gramas
HIV	“Human immunodeficiency vírus”
HMBC	“Heteronuclear Multiple Bond correlation”
HMQC	“Heteronuclear Multiple Quantum correlation”
Hz	Hertz
J	Constante de acoplamento
kPa	Quilopascal
MHz	Megahertz
Min.	Minutos
mL	Mililitro
mm	Milímetro
Mo	Modelo
m/z	Relação massa/carga
nm	Nanômetros
PIP	Pirofosfato isopentenila
PP	Pirofostato
PPF	Pirofosfato farnesila
PPG	Pirofosfato geranila
PPGG	Pirofostato de geranilgeranila
ppm	Parte por milhão
RMN ^{13}C	Ressonância magnética nuclear de carbono-13
RMN ^1H	Ressonância magnética nuclear de hidrogênio
UV	Ultra violeta
V	Volts

μL	Microlitros
λ	Comprimento de onda
α	Alfa
β	Beta
δ	Deslocamento químico em partes por milhão

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	22
1.1 FAMÍLIA RHAMNACEAE.....	25
1.1.1 Classificação botânica	25
1.1.2 Distribuição geográfica	26
1.1.3 Importância econômica	28
1.1.4 Importância biológica e farmacológica	28
1.1.5 Gênero <i>Ampelozizyphus</i>	29
1.1.5.1 <i>A espécie Ampelozizyphus guaquirensis</i>	29
1.1.5.2 <i>A espécie Ampelozizyphus amazonicus</i>	31
2 OBJETIVOS	42
2.1 OBJETIVO GERAL.....	42
2.2 Objetivo específico	42
3 MATERIAS E MÉTODO	43
3.1 MATERIAIS, VIDRARIAS, REAGENTES E EQUIPAMENTOS DO ENSAIO FITOQUÍMICO.....	43
3.1.1 Regentes e solventes	43
3.1.2 Solução utilizada como Revelador para Cromatografia de Camada Delgada Analítica (CCDA)	43
3.1.3 Equipamentos	43
3.1.4 Vidrarias e materiais	44
3.2 COLETA E PREPARO DO MATERIAL BOTÂNICO.....	45
3.2.1 Fluxograma geral dos procedimentos cromatográficos realizados com os extratos	46
3.2.2 Obtenção do extrato em diclorometano por extração contínua em aquecimento pelo extrator de Soxhlet	46
3.2.3 Obtenção do extrato por maceração estática à frio	47
3.3 ANÁLISE CROMATOGRÁFICA DOS EXTRATOS.....	47
3.3.1 Testes realizados com os extratos	47
3.3.1.1 <i>Teste para esteróides e triterpenóides (Lieberman-Burcahrd)</i>	47

3.3.1.2 <i>Teste para saponinas</i>	47
3.3.2 Análise cromatográfica do extrato em diclorometano (AAD)	49
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	52
4.1 RENDIMENTO DOS EXTRATOS.....	52
4.2 TESTES REALIZADOS COM OS EXTRATOS.....	52
4.2.1 Teste para esteróides e triterpenóides	52
4.2.2 Teste para saponinas	54
4.3 CONSTITUINTES QUÍMICOS ISOLADOS DA <i>AMPELOZIZYPHUS</i> <i>AMAZONICUS</i>	55
4.3.1 Atividade biológica das substâncias isoladas	55
4.3.2 Identificação dos triterpenos pentacíclicos	56
4.3.3 Determinação estrutural do triterpeno pentacíclico AAD 3-1	56
4.3.3.1 <i>Análise dos espectros de RMN ¹³C da amostra AAD 3-1</i>	57
4.3.3.2 <i>Análise dos espectros de RMN ¹H da amostra AAD 3-1</i>	58
4.3.3.3 <i>Análise dos dados obtidos por CG/EM da amostra AAD 3-</i> <i>1</i>	71
4.3.4 Identificação dos fitoesteróides	73
4.3.5 Determinação estrutural dos esteróides AAD4-2-2-1 e AAD4-2-2- 1-1	73
4.3.5.1 <i>Análise dos espectros de RMN ¹³C da mistura de AAD 4-2-2-1 e</i> <i>AAD 4-2-2-1-1</i>	74
4.3.5.2 <i>Análise dos espectros de RMN ¹H da amostra AAD 4-2-2-1 e AAD</i> <i>4-2-2-1-1</i>	75
4.3.5.3 <i>Análise dos dados obtidos por CG/EM da mistura de substâncias</i> <i>AAD 4-2-2-1 e AAD 4-2-2-1-1</i>	95
5 CONCLUSÃO	99
REFERÊNCIAS	100

1 INTRODUÇÃO

A utilização dos produtos naturais pela humanidade foi algo que surgiu há milênios atrás, com o intuito de aliviar as dores e curar as doenças (VEIGA JUNIOR; PINTO; MACIEL, 2005 e VIEGAS JUNIOR; BOLZANI; BARREIRO, 2006). O emprego terapêutico das plantas foi observado em várias culturas ao redor do mundo, como na egípcia, greco-romana e chinesa. Essas culturas descreveram em suas coleções inúmeras espécies vegetais correlacionando o uso medicinal, através do processo de observação e experimentação (LOPES et al., 2010).

Desde 2.300 a.C., os egípcios, assírios e hebreus cultivavam diversas ervas medicinais, além de trazer tantas outras de suas expedições. Com o emprego dessas plantas, essas culturas elaboravam medicamentos como: purgantes, vermífugos e diuréticos, Além de empregá-las como especiarias para cozinha e como líquidos ou gomas utilizadas no embalsamento de múmias (VIEGAS JUNIOR; BOLZANI; BARREIRO, 2006).

Outra cultura que merece destaque é a medicina chinesa, conhecida desde 2.500 anos a. C., que até hoje utiliza e estuda vários preparos medicinais com plantas, a fim de alcançar o entendimento de sua farmacologia, além de identificar os seus princípios ativos (LOPES et al., 2010).

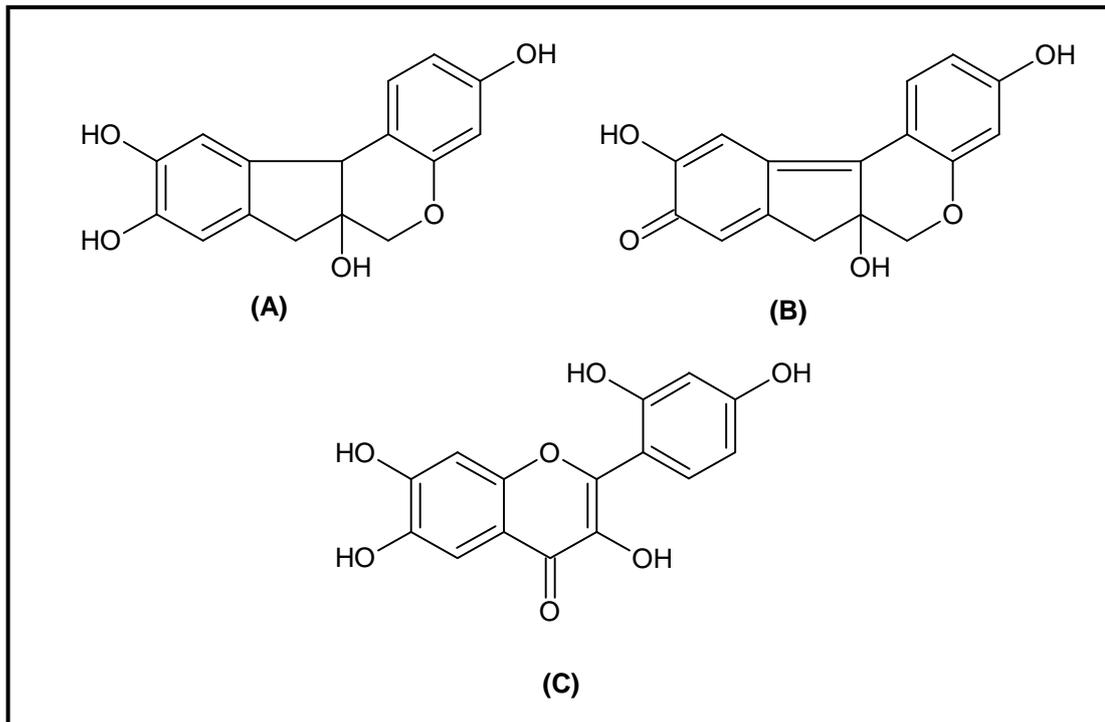
As informações sobre o uso de plantas medicinais foi sendo transmitida de geração em geração, primeiramente pela tradição oral, pois no início não havia a escrita e, com o surgimento da escrita essas informações passaram a ser compiladas e guardadas como um tesouro (LOPES et al., 2010).

O Brasil por possuir uma enorme biodiversidade apresenta também uma grande tradição no uso de produtos naturais (PIZZIOLO et al., 2011). Pinto e colaboradores (2002) declara que o uso de plantas medicinais no Brasil começou com os indígenas e quando os primeiros médicos portugueses chegaram a nossas terras, diante da escassez dos remédios que usavam na Europa, se viram na necessidade de utilizar os remédios indígenas nos tratamentos, percebendo assim a importância e diversidade da flora brasileira.

O comércio de especiarias se destacou em nosso território, somado a extração do corante vermelho do pau-brasil (*Cesalpinia echinata*) que foi utilizado por séculos como: tinta de escrever e para tingir roupas no período da Idade Média. Esse corante se chamava **brazilina** (Quadro 1) que era um derivado catecólico que

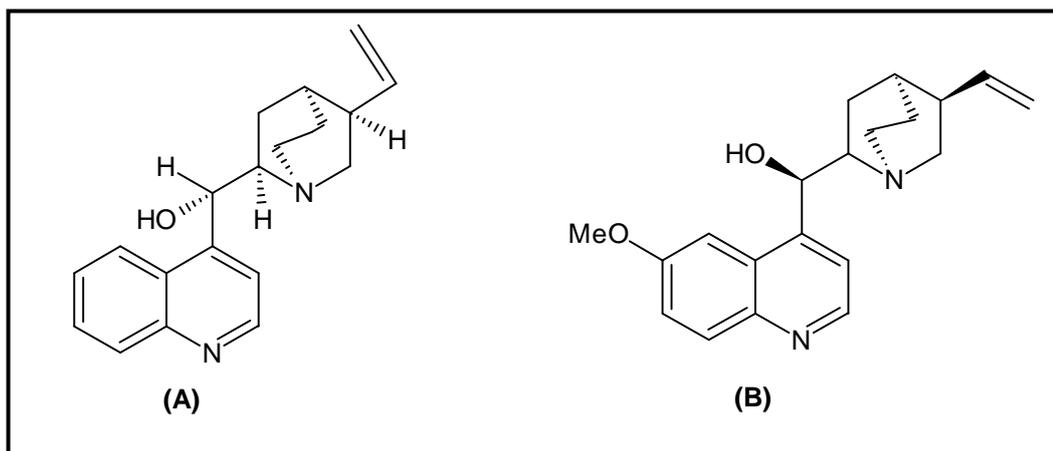
se oxidava com facilidade à **brazileína** (Quadro 1) sendo um fenoldienônico identificado como corante (VIEGAS JUNIOR; BOLZANI; BARREIRO, 2006). Exportado durante mais de dois séculos e foi um dos motivos para os portugueses colonizarem o Brasil (PINTO et al. 2002).

Outro corante que teve destaque no Brasil e junto com a brazilina exportada para Europa foi a **morina** (Quadro 1), que é extraída da *Chlorophors tinctoria* (VIEGAS JUNIOR; BOLZANI; BARREIRO, 2006).



Quadro 1. (A) Brazilina, (B) brazileína, (C) morina, primeiros corantes isolados no Brasil.

A partir do decreto assinado por D. João VI em 1808, os estudos que seguiram a cerca da flora e fauna brasileira propiciou o isolamento de outras substâncias importantes, a **cinchonina** e a **quinina** (Quadro 2) da casca de quina-rosa (*Cinchona*), para história da química medicinal (PINTO et al. 2002).



Quadro 2. (A) Cinchonina, (B) quinina, substâncias isoladas da *Cinchona*.

O isolamento de substâncias e a determinação estrutural de tais compostos orgânicos produzidos pelo metabolismo secundário de organismos vivos possuem uma grande importância para o desenvolvimento científico da Química dos Produtos Naturais, contribuindo assim para as pesquisas científicas e tecnológicas do País (BRAZ FILHO, 2010).

Dentro desse contexto o Brasil se destaca no panorama internacional como a principal fonte de matéria prima para o surgimento e o desenvolvimento de novos fármacos, pois detém a maior parte da biodiversidade mundial (BRAZ FILHO, 2010).

Estima-se que apenas 5-15% das espécies da flora brasileira foram estudadas e, com isso, ainda se tem inúmeras espécies vegetais que não apresentam pesquisas na área da botânica, da química e farmacologia e que possam ser utilizadas como matéria-prima para desenvolver novos fármacos (BRAZ FILHO, 2010).

Uma das famílias presentes na flora brasileira é a família Rhamnaceae apesar de apresentar espécies de importância econômica e terapêutica possui poucos estudos quanto a composição química e o potencial biológico de suas espécies. A espécie *Ampelozizyphus amazonicus* desta família apresenta em sua composição química substâncias triterpenoídicas em abundância (BRANDÃO, et al., 1992, 1993; ROSAS et al., 2007). Esse fato estimulou o estudo químico dessa espécie, a fim de isolar substâncias e alimentar um banco de substâncias que serão utilizadas em testes biológicos e em síntese.

1.1 FAMÍLIA RHAMNACEAE

1.1.1 Classificação botânica

Atualmente, a família Rhamnaceae pertence a ordem Rosales (SOUZA & LORENZI, 2005; BREMER et al., 2009), ficando ao lado das famílias Barbeyaceae, Elaeagnaceae, Rosaceae, Ulmaceae, Moraceae, Cannabaceae, Dirachmaceae e Urticaceae. Porém, por muitos anos foi posicionada na ordem Rhamnales de acordo com alguns autores como Cronquist (1988), que analisou as características comuns florais da família Rhamnaceae, Joly (1991), Barroso et al. (1991).

Essa família foi descrita pela primeira vez em 1810, pelo naturalista Robert Brown que publicou o primeiro livro, *Prodromus florae Novae Hollandiae et Insulae van-Diemen* (KELLERMANN, 2004).

No Brasil essa família foi estudada pela primeira vez por Reissek em 1861, sob o nome de “Rhamneae”, ele disponibilizou uma monografia abrangendo as tribos, gêneros e espécies com ocorrência no Brasil. (LIMA & GIULIETTI, 2008).

A família Rhamnaceae é constituída de 52 gêneros (Tabela 1) e 900 espécies. Richardson e colaboradores (2000) distribuiu os gêneros em tribos por análise molecular das árvores dessa família, em conjunto com a análise filogenética de dados morfológicos da mesma, organizando os 52 gêneros em onze tribos, sendo esta a classificação mais atual da família (Tabela 2) (SOUZA & LORENZI, 2005).

Tabela 1. Gêneros da família Rhamnaceae (RICHARDSON et al., 2000).

<i>Adolphia</i>	<i>Colletia</i>	<i>Hybosperma</i>	<i>Pomaderris</i>	<i>Smythea</i>
<i>Alphitonia</i>	<i>Colubrina</i>	<i>Karwinskia</i>	<i>Reissekia</i>	<i>Spyridium</i>
<i>Alvimiantha</i>	<i>Condalia</i>	<i>Kentrothamnus</i>	<i>Retanilla</i>	<i>Talguenea</i>
<i>Ampelozizyphus</i>	<i>Crumenaria</i>	<i>Krugiodendron</i>	<i>Reynosia</i>	<i>Trevoa</i>
<i>Auerodendron</i>	<i>Cryptandra</i>	<i>Lasiodiscus</i>	<i>Rhamnella</i>	<i>Trymalium</i>
<i>Bathiorhamnus</i>	<i>Discaria</i>	<i>Maesopsis</i>	<i>Rhamnidium</i>	<i>Ventilago</i>
<i>Berchemia</i>	<i>Doerpfeldia</i>	<i>Nesiota</i>	<i>Rhamnus</i>	<i>Ziziphus</i>
<i>Berchemiella</i>	<i>Emmenosperma</i>	<i>Noltea</i>	<i>Sageretia</i>	
<i>Blackallia</i>	<i>Gouania</i>	<i>Paliurus</i>	<i>Schistocarpha</i>	
<i>Ceanothus</i>	<i>Helinus</i>	<i>Phyllica</i>	<i>Scutia</i>	
<i>Chaydaia</i>	<i>Hovenia</i>	<i>Pleuranthodes</i>	<i>Siegfriedia</i>	

Tabela 2. Classificação em tribos dos gêneros da família Rhamnaceae (RICHARDSON, 2000).

<i>Tribus</i>	<i>Gêneros</i>
Ampelozizyphaeae J. F. Richardson	<i>Ampelozizyphus</i>
Bathiorhamneae J. F. Richardson	<i>Bathiorhamnus</i>
Colletieae Reiss. ex Endl	<i>Adolphia, Colletia, Discaria, Kentrothamnus, Retanilla, Trevoa</i>
Doerpfeldieae J. F. Richardson	<i>Doerpfeldia</i>
Genera	<i>Ceanothus, Emmenosperma, Schistocarpeae, Alphitonia, Colubrina, Lasiodiscus</i>
Gouanieae Reiss. ex Endl	<i>Alvimiantha, Crumenaria, Gouania, Helinus, Pleuranthodes, Reissekia</i>
Maesopsidaeae Weberb	<i>Maesopsis</i>
Paliureae Reiss. ex Endl	<i>Paliurus, Ziziphus, Hovenia</i>
Phyliceae Reiss. ex Endl	<i>Nesiota, Noltea, Phylica</i>
Pomaderreae Reiss. ex Endl	<i>Blackallia, Cryptandra, Pomaderris, Siegfriedia, Spyridium, Trymalium</i>
Rhamneae Hook. f.	<i>Auredendron, Berchemia, Berchemiella, Condalia, Karwinskia, Krugiodendron, Reynosia, Rhamnella, Rhamnidium, Rhamnus, Sageretia, Scutia</i>
Ventilagineae Hook. f.	<i>Smythea Ventilago</i>

1.1.2 Distribuição geográfica

A família possui distribuição cosmopolita sendo encontrada nas regiões temperadas, subtropicais e tropicais (Figura 1). No Brasil ocorrem 14 gêneros e cerca de 50 espécies (Tabela 3) (BARROSO et al., 1991, SOUZA & LORENZI, 2005).

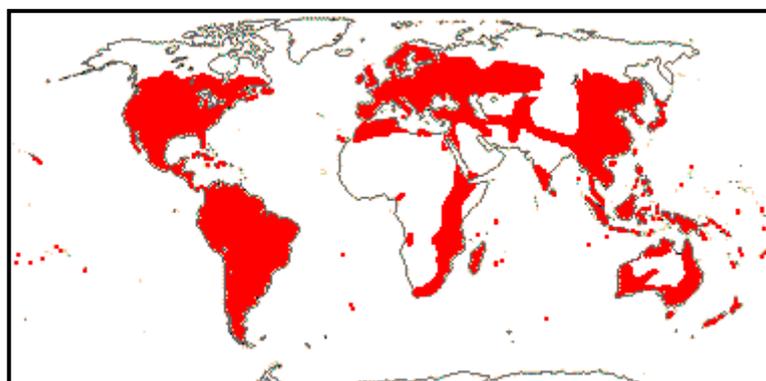


Figura 1. Distribuição geográfica da família Rhamnaceae (MISSOURI BOTANICAL GARDEM, 2012).

Tabela 3. Distribuição da família Rhamnaceae no Brasil (FORZZA, 2010).

Gêneros	Distribuição geográfica
<i>Alvimiantha</i>	Bahia, Pernambuco, Paraíba
<i>Ampelozizyphus</i>	Amazonas, Pará, Rondônia
<i>Colletia</i>	Rio Grande do Sul, Santa Catarina, Paraná
<i>Colubrina</i>	Piauí, Ceará, Pernambuco, Paraíba Bahia, Acre, Rondônia, Roraima, Pará, Maranhão, Mato Grosso, Distrito Federal, Minas Gerais, São Paulo, Rio de Janeiro, Paraná, Santa Catarina, Rio Grande do Sul, Amazonas
<i>Condalia</i>	Rio de Janeiro, Santa Catarina, Rio Grande do Sul
<i>Crumenaria,</i>	Mato Grosso, Goiás, Distrito Federal, Minas Gerais, São Paulo, Piauí, Rio Grande do Norte, Paraíba, Pernambuco, Bahia, Alagoas, Paraná
<i>Discaria</i>	Rio Grande do Sul, Santa Catarina, Paraná
<i>Gouania</i>	Em todo Brasil
<i>Hovenia</i>	São Paulo, Santa Catarina, Rio Grande do Sul, Paraná
<i>Reissekia</i>	Piauí, Paraíba, Bahia, Minas Gerais, Espírito Santo, São Paulo, Rio de Janeiro, Paraná
<i>Rhamnidium</i>	Acre, Maranhão, Pernambuco, Bahia, Mato Grosso, Goiás, Distrito Federal, Mato Grosso do Sul, Minas Gerais, Espírito Santo, São Paulo, Rio de Janeiro Santa Catarina, Paraná, Rio Grande do Sul, Ceará, Rio Grande do Norte, Paraíba
<i>Rhamnus</i>	Bahia, Goiás, Distrito Federal, Minas Gerais, São Paulo, Paraná, Santa Catarina, Rio Grande do Sul, Roraima
<i>Scutia</i>	Espírito Santo, São Paulo, Rio de Janeiro, Paraná, Santa Catarina, Rio Grande do Sul
<i>Zizyphus</i>	Pará, Amazonas, Acre, Maranhão, Piauí Ceará, Rio Grande do Norte, Paraíba, Pernambuco, Bahia, Alagoas, Sergipe, Espírito Santo, Rio de Janeiro, Mato Grosso do Sul, Roraima, Mato Grosso

1.1.3 Importância econômica

A Importância econômica da família Rhamnaceae concentra-se em algumas espécies como: *Condalia hookeri*, *C. microphylla*, *C. buxifolia* (Figura 2), *Rhammus caroliniana*, *Zizyphus jujuba*, *Z. joazeiro* (Figura 2), que produzem frutos ou sementes comestíveis. Outro fato econômico de grande relevância é a fabricação de corantes pelas espécies *Rhammus tinctoria*, *R. dahurica* (SOUZA & LORENZI, 2005).

Além do emprego alimentício e industrial, várias espécies são comumente usadas na lavagem de tecidos *Discaria chacaye*, *D. trinervis*, *Reissekia smilacina* e *Zizyphus joazeiro*, preparação de bebidas fermentadas *Rhammus inebrians*, *Condalia buxifolia*, forragem para gado *Discaria chacaye*, *D. trinervis* e *Condalia buxifolia*, alimentação de animais *Zizyphus joazeiro*, ornamentação, na marcenaria *Colubrina glandulosa* (SOUZA & LORENZI, 2005).

1.1.4 Importância biológica e farmacológica

As espécies *Discaria americana*, *Gouania ulmifolia*, *Scutia buxifolia*, *Reissekia smilacina* dessa família têm importância farmacêutico-medicinal sendo usadas no tratamento de doenças infecciosas e em distúrbios gastrointestinais. Além desse emprego medicinal há relatos das espécies *Rhammus inebrians*, *Discaria americana*, *Scutia buxifolia* com uso diurético, hipotensiva (OLIVEIRA et al., 2011).



Figura 2. Fotos da espécie *Zizyphus joazeiro* e da espécie *Condalia buxifolia* da família Rhamnaceae (SOUZA & LORENZI, 2005).

1.1.5 Gênero *Ampelozizyphus*

O gênero *Ampelozizyphus* está classificado taxonomicamente na família Rhamnaceae sendo posicionado de acordo com a tabela abaixo (Tabela 4).

Tabela 4. Classificação do gênero *Ampelozizyphus*.

Reino	Plantae
Divisão	Magnoliophyta
Classe	Magnoliopsida
Ordem	Rosales
Família	Rhamnaceae
Gênero	<i>Ampelozizyphus</i>

Ampelozizyphus é um gênero que originalmente foi descrito pelo naturalista Adolfo Ducke em 1935, que o incluiu o gênero na tribo Zizyphaeae (FREIRA & AZEVEDO, 2010). Posteriormente, Suessenguth em 1953, considerando a morfologia do fruto desse gênero, o transferiu para a tribo Rhamneae (LIMA, 2006).

Richardson e colaboradores (2000), estudando a filogenia da família Rhamnaceae, com base em sequenciamento molecular, propuseram a inclusão de uma nova tribo para esta família, a tribo Ampelozizyphaeae, posicionando melhor o gênero.

Este gênero é constituído de duas espécies *Ampelozizyphus guaquirensis* e *Ampelozizyphus amazonicus*.

1.1.5.1 A espécie *Ampelozizyphus guaquirensis*

Ampelozizyphus guaquirensis é uma espécie endêmica da Venezuela. É encontrada na parte central da Cordilheira da Costa (Yaracuy, Carabobo, e estado de Miranda), de frente para o vale do Rio Yaracy (Figura 5), em altitudes entre 300-600 metros. Essa espécie cresce nas encostas mais baixas da montanha e ao longo dos rios. Esta espécie provavelmente tem uma distribuição mais ampla em florestas úmidas, parte central da Cordilheira da Costa, é uma área mal explorada botanicamente (Figura 3) (MEIER & BERRY, 2008).



Figura 3. Distribuição da *Ampelozizyphus guaquirensis* no Norte da Venezuela (MEIER & BERRY, 2008).

A. guaquirensis é uma árvore de porte pequeno 5-10 metro de altura, ramos jovens com pelos acastanhados. Floresce em julho e agosto, durante a época das chuvas. Os frutos de natureza capsular, são colhidos durante a estação seca de novembro a abril (Figura 4) (MEIER & BERRY, 2008).

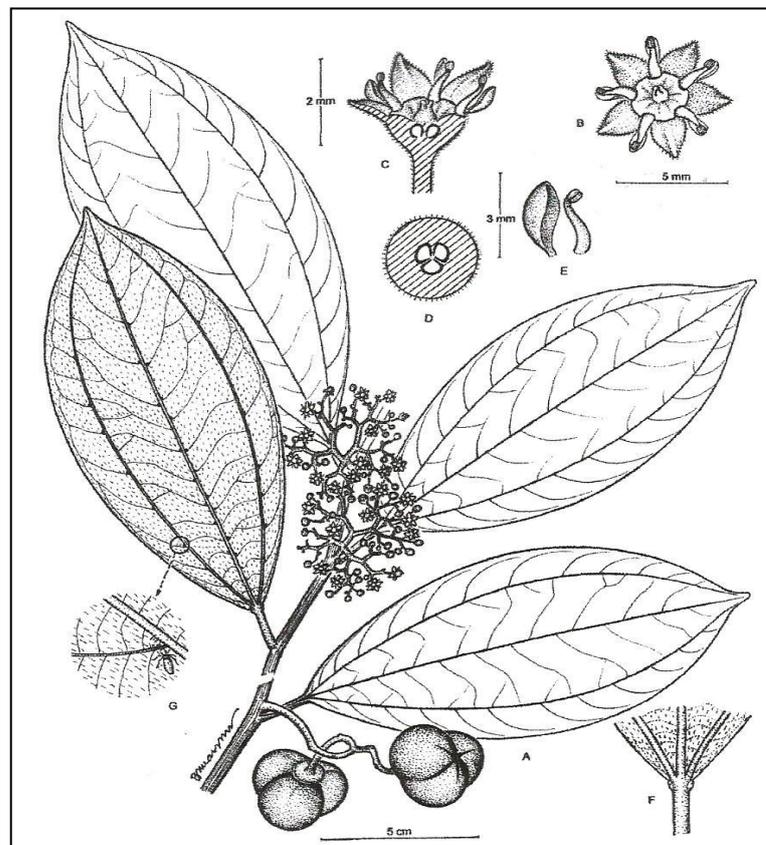


Figura 4. Partes da *Ampelozizyphus guaquirensis* (MEIER & BERRY, 2008).

1.1.5.2 A espécie *Ampelozizyphus amazonicus*

Lima (2006) declara que a espécie *Ampelozizyphus amazonicus* é endêmica da América do Sul, com distribuição na Amazônia brasileira, venezuelana, colombiana e peruana, expandindo-se até o Equador. No Brasil é encontrada nos estados do Amazonas, Pará e Rondônia, sendo encontrada em florestas de terra firme (Figura 5).



Figura 5. Distribuição da espécie *Ampelozizyphus amazonicus* no Brasil (LIMA, 2012).

Esta espécie se diferencia da *Ampelozizyphus guaquirensis* por suas características botânicas. Suas sementes são ovaladas, castanhas, brilhantes, 1,2-1,3 x 1 cm (Figura 6). Frutifica de novembro a fevereiro (LIMA, 2006).

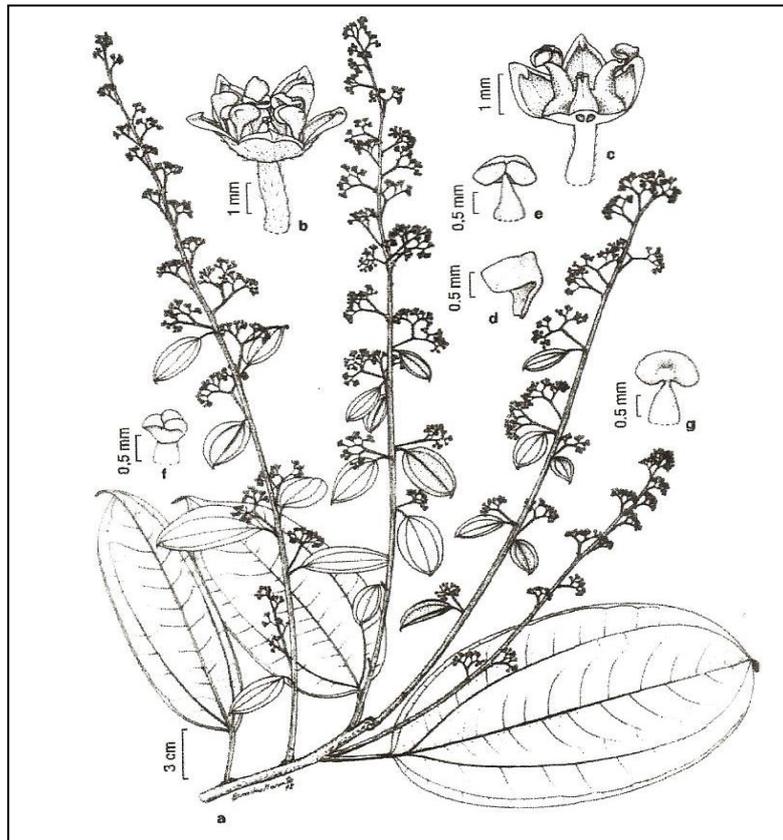


Figura 6. Partes da *Ampelozizyphus amazonicus* (LIMA, 2006).

Esta espécie é popularmente conhecida como cervejeira, cervejinha-de-índio, cerveja-do-mato, cervejinha, saracura-mirá, saracura, curupira-mirá, cerveja de índio esse nome foi dado por ser uma bebida espumante que é feita pelos índios batendo-se na água (KRETTLI et al., 2001; LIMA, 2006; OLIVEIRA et al., 2011).

Estudos etnofarmacológico mostram que a espécie *Ampelozizyphus amazonicus* é utilizada por comunidades quilombolas, no Brasil, para fins medicinais como: antimalárico, anemia, depurativo do sangue, diabetes, tônico para os nervos, combate a fadiga, memória, afrodisíaco, falta de apetite, doenças do fígado, dores estomacais, purgativo, inflamação de próstata, rins, indisposição, intoxicação, picada de cobra, contra aftas, erupções cutâneas, vírus da herpes simples, reumatismo, prisão de ventre (BRANDÃO et al., 1992; OLIVEIRA et al., 2011; RODRIGUES; ALMEIDA; PIRES, 2010).

É atribuída a espécie *Ampelozizyphus amazonicus* amplo uso etnofarmacológico para tratamentos de doenças (Tabela 5).

Tabela 5. Uso etnofarmacológico da *Ampelozizyphus amazonicus*.

Parte da planta	Forma de uso	Conhecimento etnofarmacológico	Referência
Casca	Decocção, infusão, chá	Enxaqueca, mazela do corpo, deputa o sangue, fortifica, malária, processo inflamatório, afrodisíaco (em infusão com álcool), picada de cobra, malária (porém efeito mais fraco se utilizando a raiz).	BRANDÃO et al., 1992; OLIVEIRA et al., 2011; SCUDELLER; VEIGA, ARAÚJO-JORGE, 2009; RODRIGUES, 2006.
Folha	Pó, extrato, chá, sumo	Cicatrizante (aplicando a espuma no local), extrato em metanol apresenta atividade o vírus da herpes simples, malária (porém efeito mais fraco se utilizando a raiz), baque	BRANDÃO et al., 1992; LOPEZ; HUDSON; TOWERS, 2001; OLIVEIRA et al., 2011, SCUDELLER; VEIGA; ARAÚJO-JORGE, 2009.
Raízes	Infusão, seiva, extrato	Depurativa, processo inflamatório, reumatismo, malária	RODRIGUES, 2006; RODIRGUES; ALMEIDA; PIRES; 2010
Lenho (sem a casca)	Chá	Malária (porém efeito mais fraco se utilizando a raiz)	OLIVEIRA et al., 2011
Cipó	Chá	Malária (porém efeito mais fraco se utilizando a raiz)	OLIVEIRA et al., 2011
Ramo	Chá	Malária	KRETTLI et al., 2001

Além disso, a espécie *Ampelozizyphus amazonicus* tem demonstrado promissora no estudo de atividades biológicas e farmacológicas (Tabela 6).

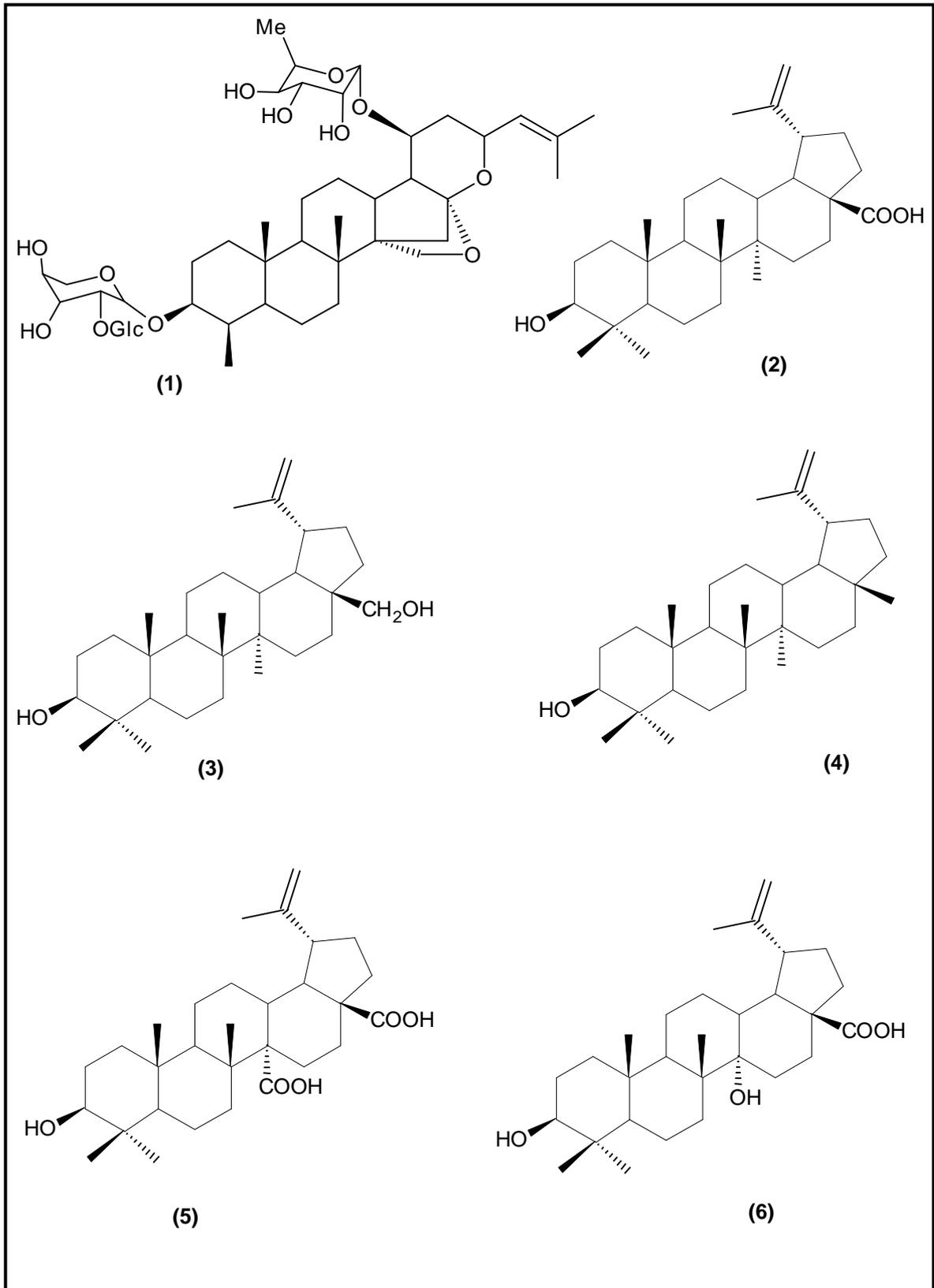
Tabela 6. Atividades biológicas de extratos ou substâncias isoladas da espécie *Ampelozizyphus amazonicus*.

Extratos	Substâncias isoladas	Atividade	Referências
Extrato em Acetato de etila das folhas	Ácido 3 β -hidroxilup-20(29)-ene-27,28-diólico Ácido 2 α ,3 β -dihidroxilup-20(29)-ene-27,28-diólico	Citotóxica contra células tumorais humanas de adenocarcinoma (SKBR-3) e melanona.utilização contra agentes quimioprolifáticos do <i>Trypanosoma cruzi</i>	ROSAS et al., 2007
Extrato etanólico, metanólico das folhas		Atividade citotóxica contra a cepa Y do <i>Trypanosoma cruzi</i> em ratos (Swiss albino)	
Aquoso do caule			
Extrato etanólico bruto das raízes		Efeito diurético nos ratos (Wistar)	DINIZ et al.,2009
Extrato etanólico bruto das raízes	Mistura de saponinas proveniente do extrato	Efeito antidiurético nos ratos (Wistar)	
Extrato etanólico das raízes		Dificulta o desenvolvimento do esporozoítio do mosquito <i>Plasmodium berghei</i>	ANDRADE-NETO et al., 2008
Extrato etanólico bruto das raízes		Ativo contra os esporozoítio do mosquito <i>Plasmodium gallinaceum</i>	KRETTLI et al., 2001

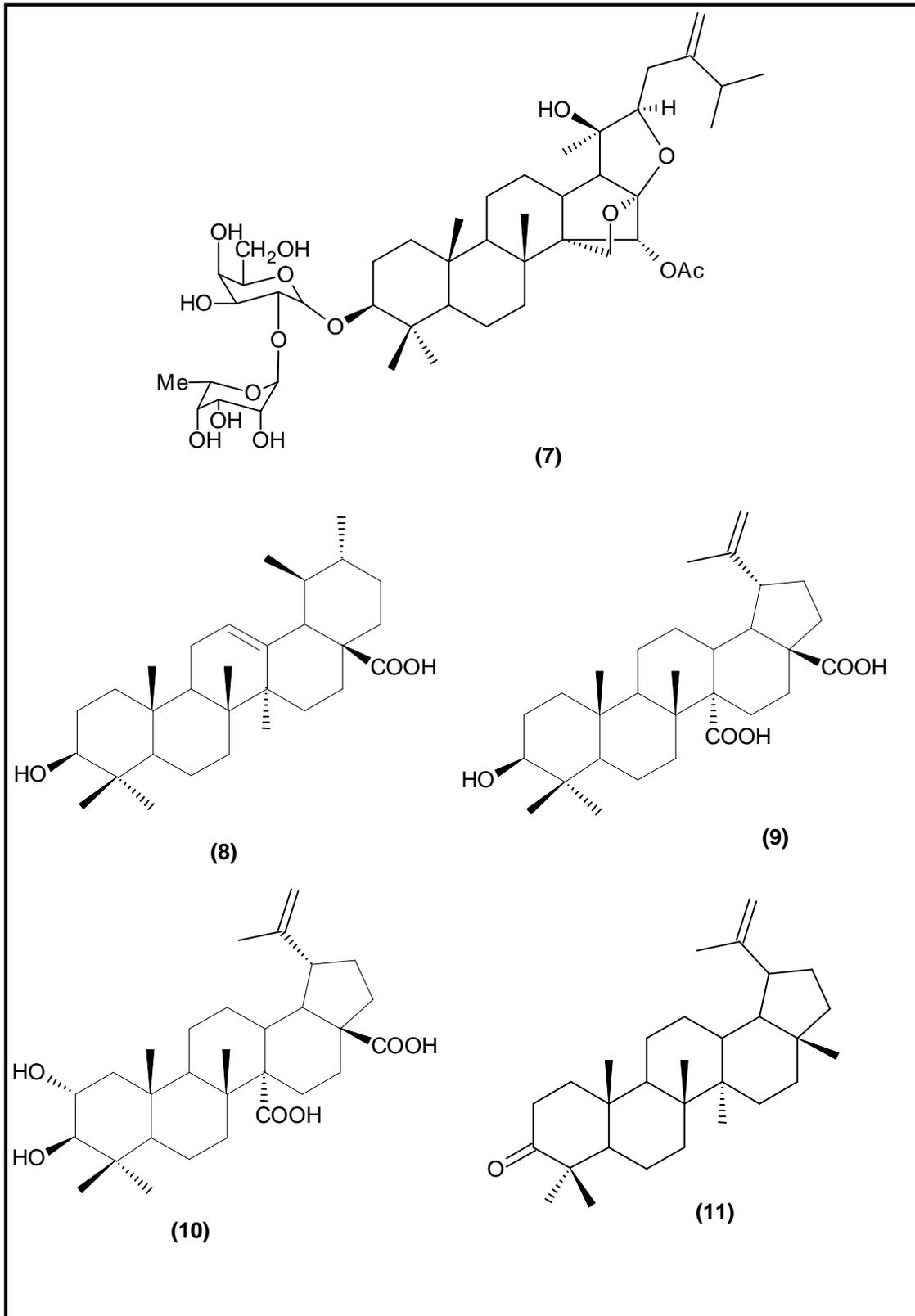
Com relação ao perfil químico da espécie *A. amazonicus* tem como característica a produção de triterpeno, saponinas triterpenoídicas e fitoesteróides (Tabela 7 e Quadro 3 e 4).

Tabela 7. Substâncias isoladas da espécie.

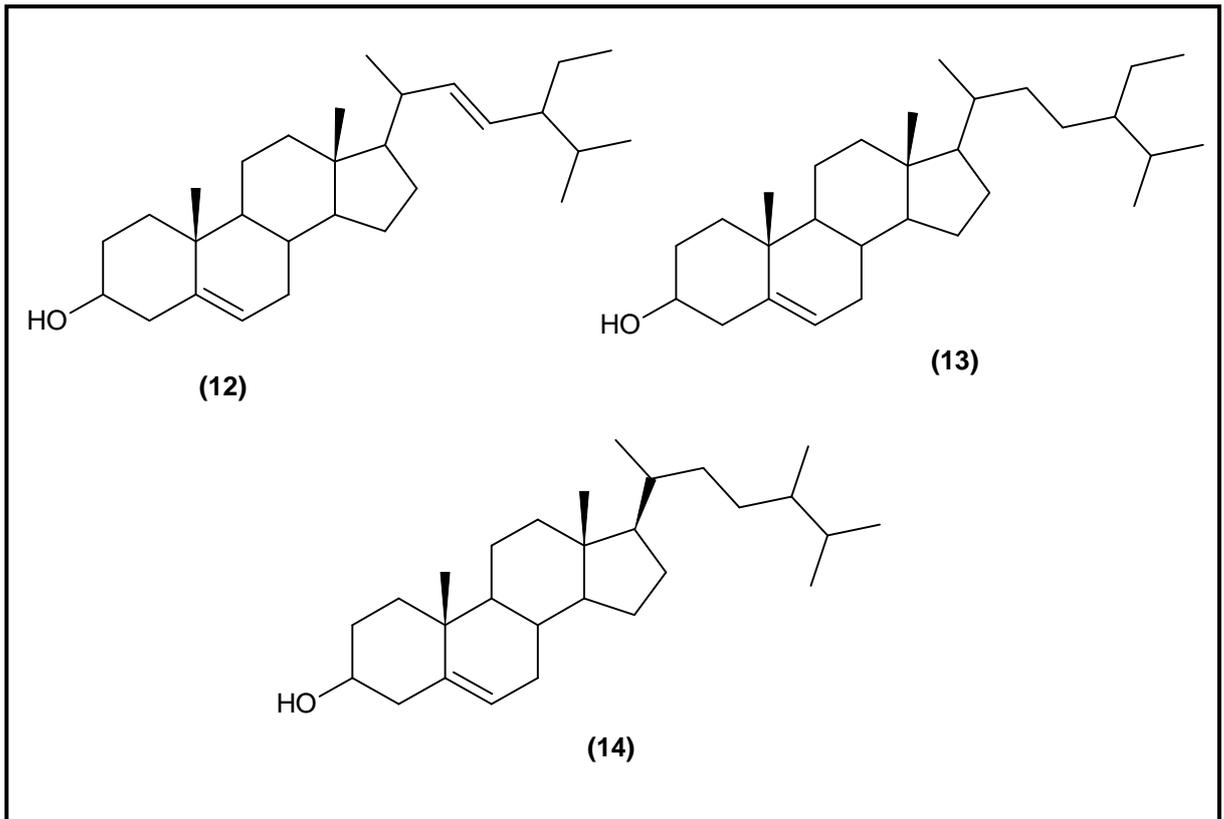
Parte da planta	Extratos ou frações	Substâncias	Referências
Raiz	Extrato em etanol	3-O-[β -D-glicopiranosil (1->2) α -L-arabinopiranosil]-20-O- α -L-ramnopiranosil-jujubogenina (1)	BRANDÃO et al., 1992
	Extrato em clorofórmio e acetato de etila	Ácido betulínico (2)	
	Extrato em clorofórmio Fração em n-butanol	Betulina (3)	
	Extrato clorofórmio	Lupeol (4)	
	Extrato em clorofórmio	Ácido Melalêucico (5)	
	Extrato em clorofórmio	Ácido 3 β ,27 α -diidroxilup-20(29)-em-28 β -óico (6)	
Raiz	Extrato em etanol	Ampelozigenina-15 α -O-acetil-3-O- α -L-ramnopiranosil-(1->2)- β -D-glicopiranosídeo (7)	BRANDÃO et al., 1993
Raiz	Fração em n-butanol	Ácido ursólico (8)	ROSAS et al., 2007
	Extrato em acetato de etila	Ácido 3 β -hidroxilup-20(29)-en-27,28-dióico (9)	
	Extrato em acetato de etila	Ácido 2 α ,3 β -diidroxilup-20(29)-en-27,28-dióico (10)	
	Fração em n-butanol	Lupenona (11)	
	Extrato em clorofórmio	Estigmasterol (12)	
	Extrato em clorofórmio	Sitosterol (13)	
	Extrato em clorofórmio	Campesterol (14)	



Quadro 3. Estrutura dos triterpenos isolados da espécie *Ampelozizyphus amazonicus*.



Quadro 3. Estrutura dos triterpenos isolados da espécie *Ampelozizyphus amazonicus*. (Continuação)



Quadro 4. Estrutura do esteróides isolados da espécie *Ampelozizyphus amazonicus*.

Considerando a abundância da classe de terpenos e esteróides na espécie em estudo é necessário destacar a rica diversidade estrutural e as inúmeras atividades biológicas e farmacológicas presentes nestas classes.

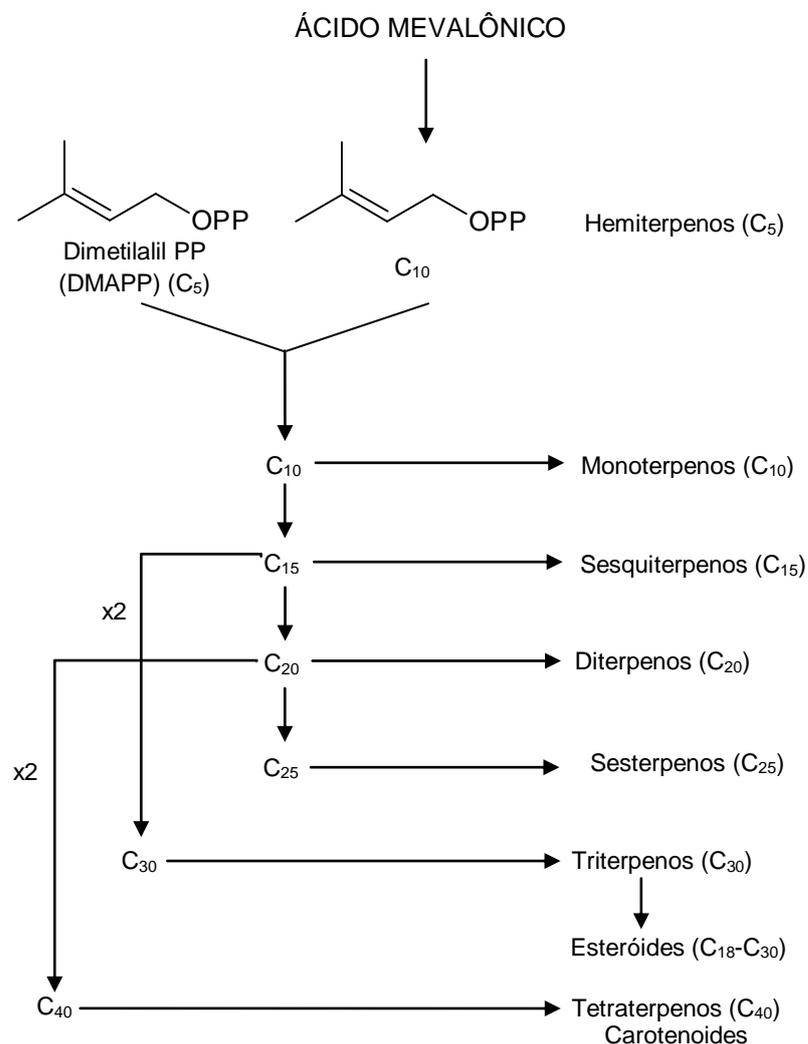
Os terpenóides formam uma variedade de substâncias naturais, que são gerados de unidades do isopreno ou pirofosfato isopentenila (PIP). Esta unidade isoprênica que pode ser originada do ácido mevalônico que é formado pela via do acetato/mevalonato (Esquema 1) (SIMÕES et al., 1999; DEWICK, 2008).

O melavonato é obtido pela condensação aldólica de uma unidade de acetoacetil-CoA com uma molécula de acetil-CoA. Após essa condensação, ocorre uma hidrólise originando a 3-hidróxi-3-metilglutaril-CoA que, posteriormente, é reduzida a mevalonato. O melavalonato é então convertido em PIP ou isopreno, que é a unidade básica dos terpenos e esteróides (SIMÕES et al., 1999) (Esquema 1).

A polimerização do mevalonato vai originar moléculas de cadeias carbonadas crescentes de cinco em cinco átomos de carbono. A junção de duas moléculas de IPPs forma o pirofosfato geranila (PPG), a partir do qual formam-se os monoterpenos. Ao adicionar mais uma molécula de PIP vai gerar o pirofosfato

farnesila (PPF), precursor dos sesquiterpenos (C_{15}). A adição de um PIP a um PPF vai originar o pirofostato de geranylgeranila (PPGG), que é o precursor dos diterpenos (C_{20}). A junção entre duas moléculas de PPFs (C_{15}) dá origem ao esqualeno, o precursor da maioria dos triterpenos e esteróides (SIMÕES et al., 1999 e DEWICK, 2008).

Os triterpenos são formados pela ciclização do esqualeno, enquanto que os esteróides são formados a partir do pirofosfato de isopentenila. O triterpenóide esqualeno é um intermediário na biossíntese dos esteróides (Esquema 1). (SIMÕES et al., 1999).



Esquema 1. Biossíntese dos terpenos (DEWICK, 2008).

Essa classe de substâncias possui importância comercial tanto na área farmacêutica quanto na área de alimentos e agronomia. Por apresentarem atividade biológica tem despertado o interesse de pesquisadores de várias áreas da ciência que veem nestas substâncias moléculas úteis ao homem, com exemplo a atividade

antimicrobiana e atividade anticancerígena (SIMÕES et al., 1999; BARREIRO & BOLZANI, 2009).

Os monoterpenos são os principais responsáveis pelas fragrâncias e aromas dos vegetais. Essas substâncias também têm sido relatadas em estudos científicos como potenciais antimutagênicos na proteção aos raios UV-indutores de mutação, e na proliferação e modulação de células ósseas. Entre os monoterpenóides que merecem destaque por suas atividades biológicas, está o composto linalol (Quadro 5) apresenta atividade anticépticas, com atuação no sistema glutamatérgico (PASSOS et al., 2009).

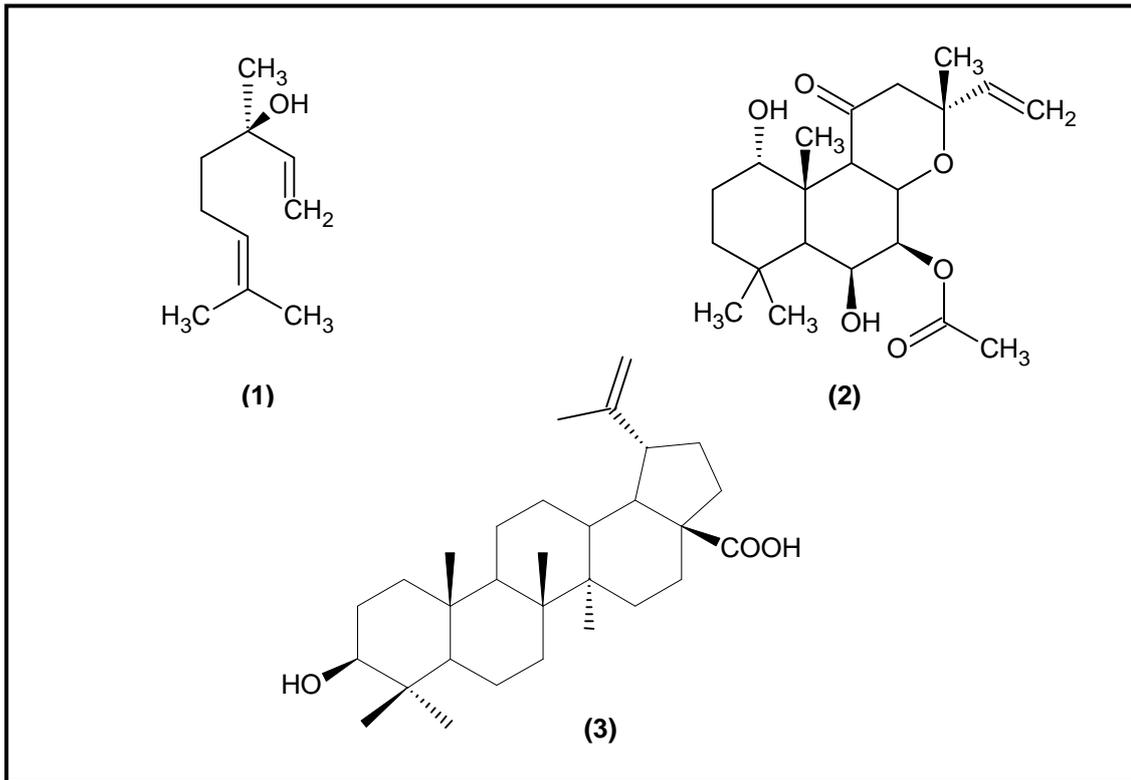
Os sesquiterpenos apresentam características analgésicas e atividades depressoras do sistema nervoso central, como é o caso do ácido valerênico e da artemisinina. Dentre os diterpenos que se destacam esta a colforsina (Quadro 5), isolada da planta indiana *Coleus forskohlii*, com acentuada atividade inotrópica e vasodilatadora (BARRIERO & BOLZANI, 2009).

Os triterpenóides podem ser divididos em duas classes principais: os compostos tetracíclicos e os pentacíclicos. A maioria dos triterpenóides é constituída por álcoois que pode combinar-se com açúcares para formar glicosídeos, como é o caso das saponinas. Os triterpenóides livres muitas vezes são componentes das resinas, látex ou da cutícula das plantas (ROBBERS; SPEEDIE; TYLER, 1997).

Ecologicamente os triterpenóides são importantes, pode-se destacar as cucurbitacinas que são triterpenos altamente oxigenados e tem despertado interesse pela sua toxicidade e seu amplo aspecto de atividades biológicas como, antitumoral, anti-inflamatória, antifertilizante (VALENTE, 2004).

Outro triterpenóide importante são os quassinóides que também possuem alto padrão de oxigenação. Apresenta atividade antitumoral, antimalárica, fitotóxica, inseticida, antiparasitária, anti-HIV (ALMEIDA, 2007).

A importância dos triterpenóides esta em suas atividades anti-inflamatória, bactericida, fungicida, antiviral, analgésicos, cardiovasculares e antitumorais. Destacam-se entre os triterpenos o ácido betulínico (Quadro 5) com atividade anti-neoplásica, antiviral, inflamatória, anti-HIV (CASSELS, 2011).



Quadro 5. (1) Linalol, (2) Colforsina e (3) Ácido betulínico.

Os fitoesteróides constituem uma classe de compostos naturais com ampla distribuição na natureza. Os primeiros fitoesteróides isolados da natureza foram os álcoois, encontrados nas frações lipídicas de muitos tecidos (ROBBERS; SPEEDIE; TYLER, 1997).

Esses compostos apresentam ampla atividade biológica como desenvolvimento e controle do sistema reprodutor humano, ecdise de insetos, indução da produção sexual em fungos aquáticos. Possuem também aplicações terapêuticas, funcionam como cardiotônicos, precursores da vitamina D, anticoncepcionais orais, agentes anti-inflamatórios e agentes anabolizantes (ROBBERS; SPEEDIE; TYLER, 1997).

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Contribuir para o estudo da flora amazônica brasileira.

2.2 OBJETIVO ESPECÍFICO

Especificamente, este trabalho objetivou a: 1) Preparação dos extratos vegetais; 2) Aplicação de testes qualitativos para verificar a presença de metabólitos especiais nos extratos obtidos; 3) Aprendizado do uso de técnicas cromatográficas para isolamento e purificação de substâncias orgânicas; 4) Identificação das estruturas químicas por diferentes métodos espectroscópicos.

3 MATERIAIS E MÉTODO

3.1 MATERIAIS, VIDRARIAS, REAGENTES E EQUIPAMENTOS DO ENSAIO FITOQUÍMICO

3.1.1 Regentes e solventes

- Acetato de etila P.A. (LabSynth);
- Hexano P.A. (LabSynth);
- Butanol P.A. (LabSynth);
- Metanol P.A. (LabSynth);
- Clorofórmio P.A. (LabSynth);
- Diclorometano P.A. (LabSynth);
- Ácido sulfúrico P.A. (LabSynth);
- Álcool etílico (LabSynth);
- Água destilada;
- Metanol deuterado, Cambridge Isotope Laboratories, INC;
- Clorofórmio deuterado, Cambridge Isotope Laboratories, INC;
- DMSO deuterado, Cambridge Isotope Laboratories, INC;
- Vanilina (Vetec);
- Sílica gel 60 (0,063–0,200 mm), Merck Darmstadt (Para a cromatografia em coluna).

3.1.2 Solução utilizada como Revelador para Cromatografia de Camada Delgada (CCD)

- **Solução de Vanilina Sulfurada:** Foram solubilizados 3 g de vanilina em uma solução contendo 135 mL de H₂O destilada e 135 mL de álcool etílico e 30 mL de H₂SO₄ (conc.). Esta solução foi estocada em frasco âmbar.

3.1.3 Equipamentos

- Espectrômetro de Massas, Modelo CG/EM–QP–5050, SHIMADZU;
Condições de análise:
 - Temperatura do injetor: 280 °C;
 - Temperatura da interface: 280 °C;

- Fluxo da coluna: 1,3 mL/min.;
 - Fluxo total: 17,3 mL/min.;
 - Temperatura inicial da coluna: 100 °C – 20 °C/min.;
 - Temperatura final da coluna: 280 °C;
 - Coluna DB-5, 30 metros;
 - Pressão: 110 kPa.
-
- Espectrômetro de Ressonância Magnética, Modelo Elipse (400 MHz para ^1H e 100 MHz para ^{13}C), Jeol;
 - Espectrômetro de Ressonância Magnética, Modelo Varian (400 MHz para ^1H e 100 MHz para ^{13}C);
 - Evaporador Rotativo Modelo MA 120/V, Marconi;
 - Câmara com Lâmpada Ultravioleta (254 nm e 365 nm), Adamo;
 - Balança Analítica Modelo AY 220, Shimadzu;
 - Balança Semi-analítica AY 220, Bioprecisa;
 - Ultrassom Kondortech;
 - Estufa de secagem modelo MA 033/3, Marconi;
 - Placa de aquecimento Modelo 752 A, Fisatom;
 - Pipetador Automático 100-1000 μL , Maxipette Micropipette;
 - Pipetador Automático 10-100 μL , Maxipette Micropipette;
 - Liofilizador Modelo 113, Thermo **Savant**. (acoplado a bomba VLP 200);
 - Manta de aquecimento Fisatom.

3.1.4 Vidrarias e materiais

- Colunas cromatográficas de vidro (comprimentos e diâmetros variados);
- Extrator de Soxhlet;
- Erlenmeyer;
- Bécher;
- Funil de separação;
- Funil com haste longa;
- Pipetas volumétricas e graduadas;
- Ponteiras;
- Balão de fundo redondo;

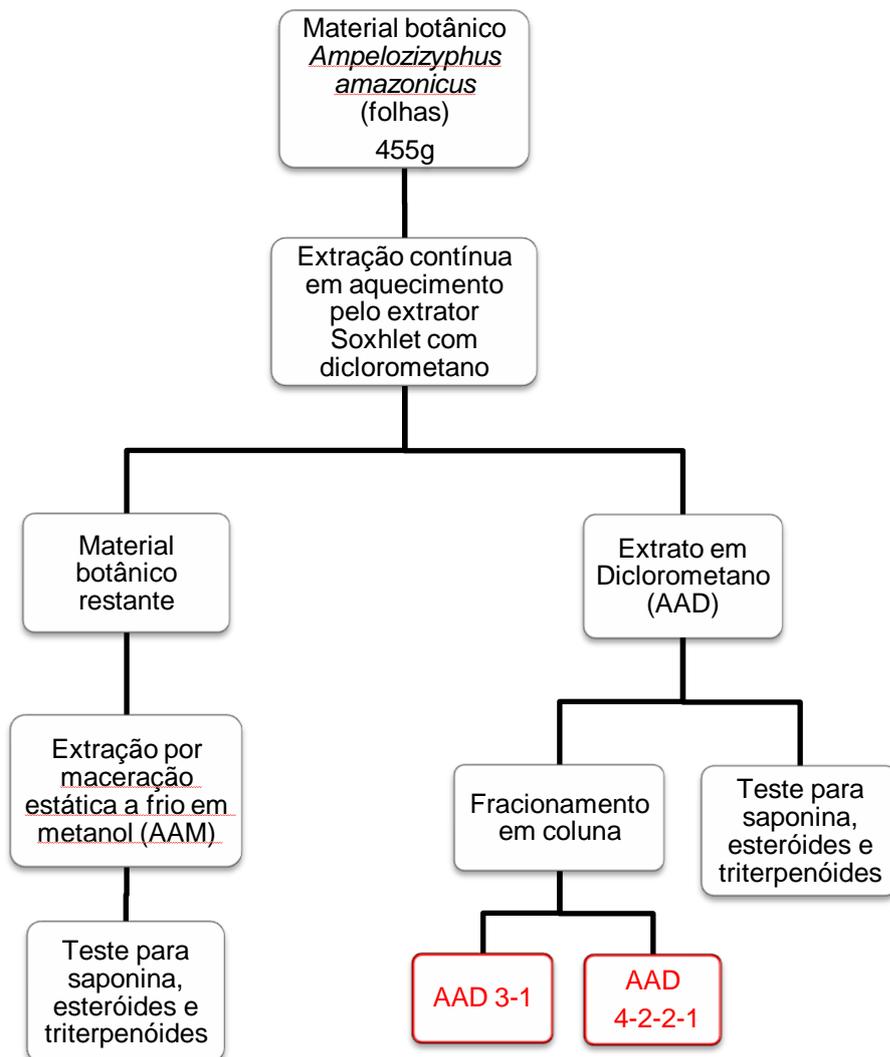
- Pera de sucção;
- Papel de filtro;
- Cromatofolhas de Alumínio 20x20 cm com gel de sílica 60 F254 Merck;
- Tubo de RMN, Wilmad/Labglass.

3.2 COLETA E PREPARO DO MATERIAL BOTÂNICO

As folhas da planta *Ampelozizyphus amazonicus* foram coletadas na Reserva Florestal Adolpho Ducke, pelo Prof. Dr. Anderson Cavalcante Guimarães da Universidade Federal do Amazonas. Essa reserva pertence ao Instituto Nacional de Pesquisa da Amazônia (INPA), localizado na cidade de Manaus, no estado do Amazonas.

Em seguida o material botânico foi triturado e enviado para ser analisado no laboratório de Produtos Naturais da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro.

3.2.1 Fluxograma geral dos procedimentos cromatográficos realizados com os extratos



Esquema 2. Fluxograma geral do trabalho realizado.

3.2.2 Obtenção do extrato em diclorometano por extração contínua em aquecimento pelo extrator de Soxhlet

As folhas trituradas e com massa definida (455 g) foram submetidas à extração por Soxhlet com diclorometano, o extrato obtido foi filtrado e o solvente evaporado sob pressão reduzida em evaporador rotativo até que todo solvente fosse eliminado para assim ser obtido o extrato concentrado em diclorometano (Esquema

2).

3.2.3 Obtenção do extrato por maceração estática à frio

Após a extração em Soxhlet o material botânico restante daquela extração foi levado à maceração estática a frio com metanol. Em seguida, foi filtrado e o solvente evaporado sob pressão reduzida em evaporador rotativo, até que todo solvente fosse eliminado, para assim ser obtido o extrato concentrado em metanol (Esquema 2).

3.3 ANÁLISE CROMATOGRÁFICA DOS EXTRATOS

3.3.1 Testes realizados com os extratos

Após realizar a extração, cada extrato foi submetido a testes para verificar a presença de triterpenóides, esteróides e saponinas conforme o método desenvolvido por Lieberman-Burcahrd (MATOS, 1997).

3.3.1.1 Teste para esteróides e triterpenóides (Lieberman-Burcahrd)

Aproximadamente 3,5 mg dos extratos brutos em metanol (AAM) e diclorometano (AAD), foram colocadas em tubos de ensaio separados e foram solubilizados em 1 mL de clorofórmio, tendo o cuidado de triturar bem o resíduo com o solvente, em seguida filtrou-se a solução clorofórmica gota a gota em um pequeno funil fechado com uma bolinha de algodão, coberta com alguns decigramas de Na₂SO₄ anidro, para um outro tubo de ensaio bem seco. Adicionou-se 2 mL de anidrido acético a cada extrato filtrado, agitou-se cada tubo suavemente e pelas paredes destes, adicionou-se 3 gotas de ácido sulfúrico concentrado. Tornou-se agitar suavemente e observando, se haveria desenvolvimento de cores.

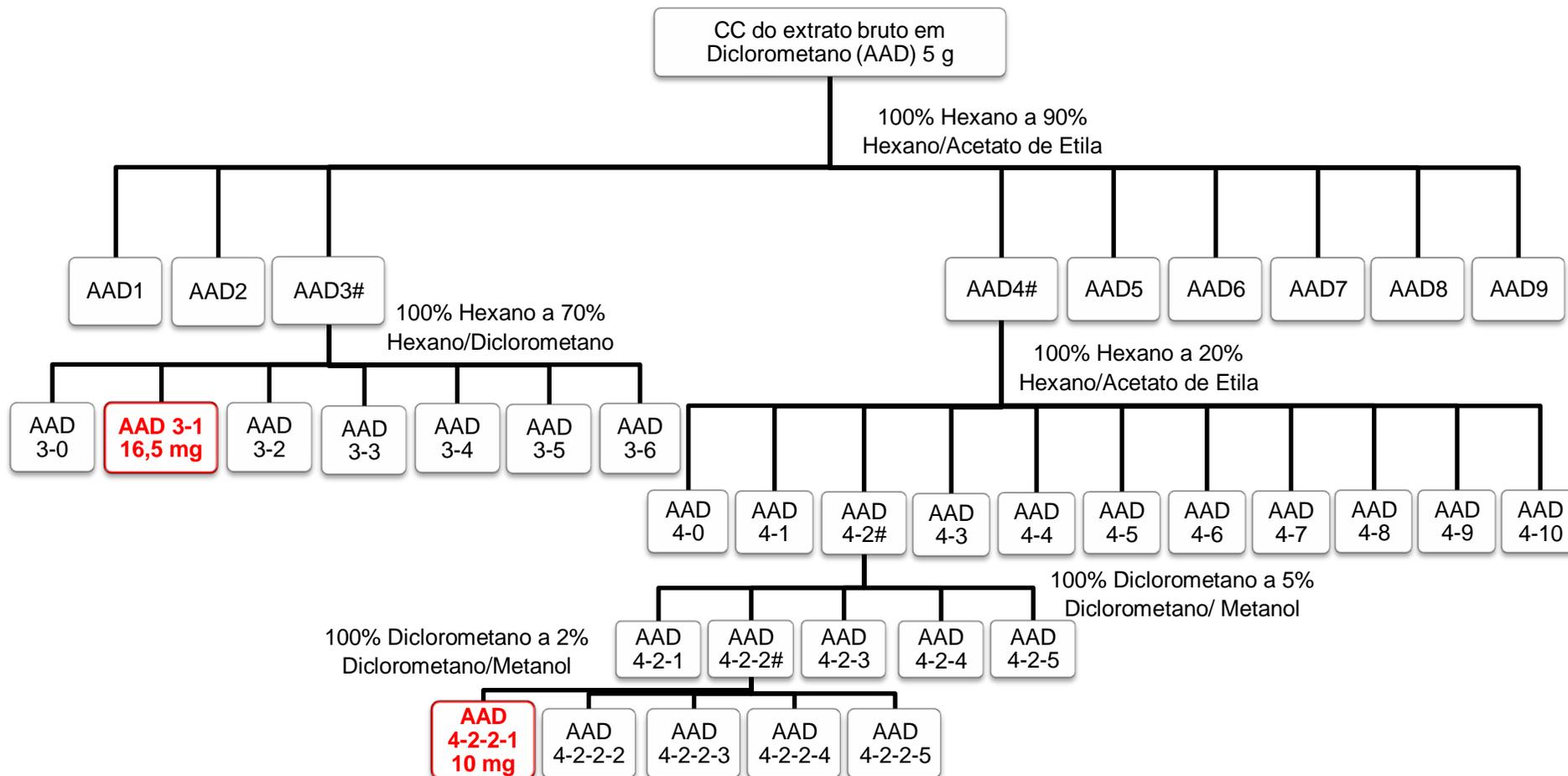
- Coloração azul seguida de verde, indicou a presença de esteróides/triterpenóides respectivamente.

3.3.1.2 Teste para saponinas

Pegou-se o resíduo insolúvel de todos os extratos trabalhados anteriormente, colocou-se em tubos de ensaio separados e adicionou-se 5 mL de água destilada e filtrou-se a solução para um outro tubo de ensaio. Agitou-se os tubos com as soluções, fortemente, por dois a três minutos e observou-se a formação de espuma.

- *Espuma persistente e abundante (colarinho) indicou a presença de saponina (heterósides saponínicos).*

3.3.2 Análise cromatográfica do extrato em diclorometano (AAD)



Esquema 3. Análise cromatográfica do extrato em diclorometano.

O extrato em diclorometano (5g) foi submetido à análise por cromatografia em camada fina a fim de avaliar o melhor sistema de eluição cromatográfica para a separação das substâncias presentes no extrato. Em seguida, após essa avaliação anterior, esse extrato foi submetido à cromatografia de adsorção em coluna aberta (CC) (Esquema 3).

Na CC a fase estacionária foi constituída de sílica gel 60 (0,063-0,200mm) enquanto a fase móvel foi formada por uma mistura binária, de polaridade crescente contendo: hexano e acetato de etila. As concentrações foram variando gradativamente de 100% de hexano até 100% de acetato de etila.

As frações obtidas foram analisadas qualitativamente por cromatografia em camada delgada analítica (CCDA) e agrupadas pela semelhança e valor do Fator de Retenção (RF). As placas de CCDA foram visualizadas pela irradiação ultravioleta (λ 254 nm e λ 365 nm) e reveladas com uma solução de vanilina sulfúrica em presença de aquecimento.

A separação do extrato em diclorometano resultou em 115 frações que foram reunidas em 10 frações.

A partir da análise qualitativa em CCDA, a fração 11 a 18, recodificada como AAD 3, contendo 105 mg, foi submetida a uma purificação em CC utilizando sílica gel como fase estacionária e como fase móvel mistura binária de polaridade crescente contendo hexano e diclorometano. As concentrações foram variando gradativamente de 100% a 30% de hexano. Esta purificação resultou em 188 frações que foram agrupadas em 7 frações das quais a fração **AAD 3-1**, com 16,5 mg foi submetida a análise espectroscópicas de Ressonância Magnética Nuclear de ^1H e ^{13}C e por espectrometria de Massas.

A partir da análise qualitativa em CCDA, a fração 19-30, recodificada como AAD 4 foi submetida a purificações. A primeira purificação foi feita em uma CC utilizando como eluente uma mistura binária de polaridade crescente contendo hexano e acetato de etila. A partir da análise qualitativa em CCDA a fração 35 a 65, recodificada como AAD 4-2, foi encaminhada a uma nova purificação na qual utilizou como eluente a mistura binária contendo diclorometano e metanol com a concentração variando de 100% a 95% diclorometano. As frações obtidas desse fracionamento foram analisadas e agrupadas, sendo a fração 3 a 33, AAD 4-2-2, submetida a uma nova purificação (Esquema 3).

Dessa purificação obteve-se a fração **AAD 4-2-2-1**, com 10 mg, que foi

submetida a análise espectroscópicas de Ressonância Magnética Nuclear de ^1H e ^{13}C e por espectrometria de Massas.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 RENDIMENTO DOS EXTRATOS

A partir do material vegetal seco e moído (455 g) foram obtidos 14 g (rendimento de 3,07%) do extrato em diclorometano através da aparelhagem de Soxhlet. O mesmo material botânico foi levado à maceração estática à frio com o solvente metanol obtendo o extrato metanólico 21,6 g (rendimento de 4,74%).

O método de extração contínua realizada com aquecimento pelo extrator Soxhlet permite a obtenção do extrato de forma rápida gerando uma economia de solvente. Foi escolhido o solvente diclorometano devido ao seu baixo ponto de ebulição e devido a sua afinidade com compostos de polaridade intermediária com triterpenóides e esteróides.

Enquanto a extração por maceração estática à frio apesar de acontecer de forma mais demorada e gerar um gasto de solvente maior, esta técnica permite a separação de compostos de polaridade maior como, as saponinas triterpênicas.

Dessa forma, esses dois métodos de extração possibilitaram a separação dos triterpeno e esteroides (agliconas) das saponinas triterpenoídicas encontradas nas folhas de *Ampelozizyphus amazonicus*.

4.2 TESTES REALIZADOS COM OS EXTRATOS

4.2.1 Teste para esteróides e triterpenóides

Para a identificação de triterpenos e esteróides foi empregada à reação de Liebermann-Burchard com anidrido acético e ácido sulfúrico (MATOS, 1997). Onde pretendia-se investigar se na espécie estudada havia a presença de triterpenos e esteróides conforme a literatura sinalizava.

A fitoprospecção da espécie *Ampelozizyphus amazonicus* indicou no extrato diclorometânico (AAD), a presença de esteróides e/ou triterpenóides (Tabela 8 e Figura 7).

Tabela 8. Resultado do teste de esteróides e triterpenóides.

Identificação dos tubos de ensaio	Extratos analisados	Resultado
Tubo I	Extrato em diclorometano	Positivo
Tubo II	Extrato em metanol	Negativo

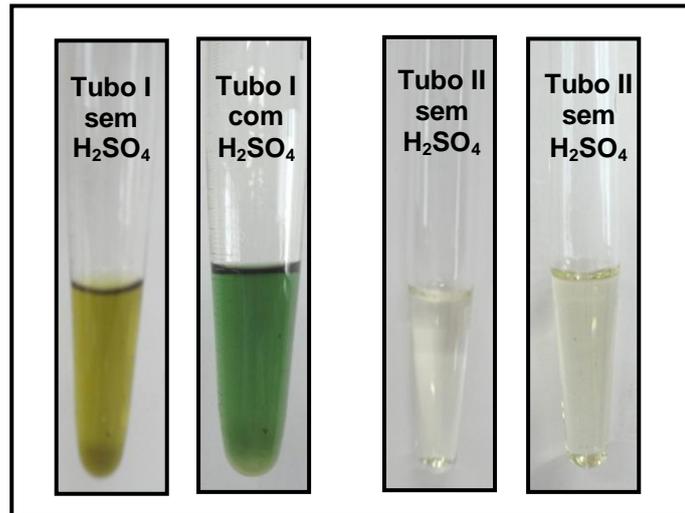
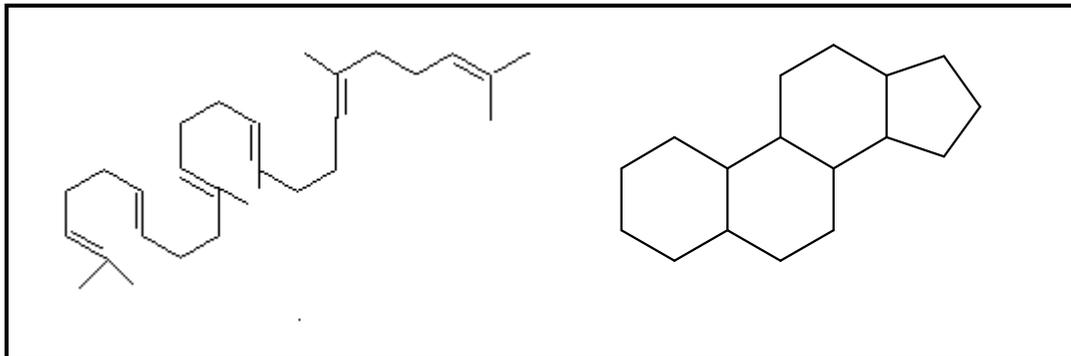


Figura 7. Resultado observado do teste para identificação de esteróides e triterpenóides.

Como é possível observar na figura 7, ocorreu a sucessão de cores do azul seguida de verde como a metodologia afirma, logo, a reação foi positiva para o extrato em diclorometano e negativa para o extrato em metanol.

De acordo com a estrutura base dos triterpenóides e esteróides (Quadro 6) é possível afirmar que eles possuem características estruturais que os conferem baixa polaridade, por isso justifica-se a presença na fração mais apolar, diclorometânica, da espécie em estudo.



Quadro 6. Estrutura base dos triterpenóides (esqualeno) e dos esteróides.

O resultado da análise qualitativa corrobora com os trabalhos de Rosas e colaboradores (2007) e Brandão e colaboradores (1992 e 1993), confirmando a presença de esteróides e/ou triterpenóides na espécie *Ampelozizyphus amazonicus*.

4.2.2 Teste para saponinas

A fitoprospecção da espécie *Ampelozizyphus amazonicus* indicou no extrato metanólico (AAM) (Tubo I), a presença de saponinas com a formação de espuma persistente e abundante. Já para o extrato em diclorometano (Tubo II) não foi observada a formação de espuma (Figura 8).

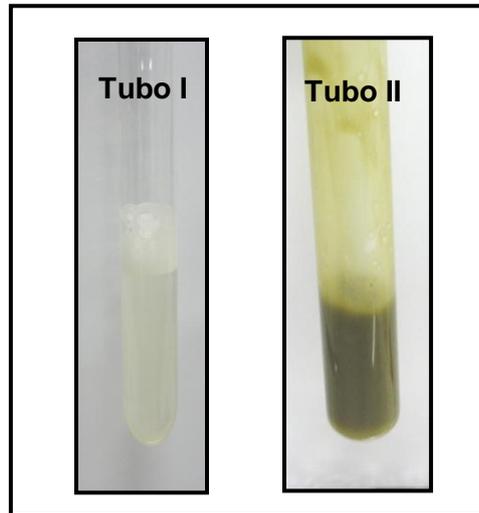


Figura 8. Resultado observado do teste para identificação de saponinas.

A propriedade das saponinas de formarem espuma ocorre devido a uma diminuição da tensão superficial da água, através da presença de unidades hidrofílicas e hidrofóbicas na molécula que forma a estrutura dos saponósidos (SANTOS, F. et al., 2011).

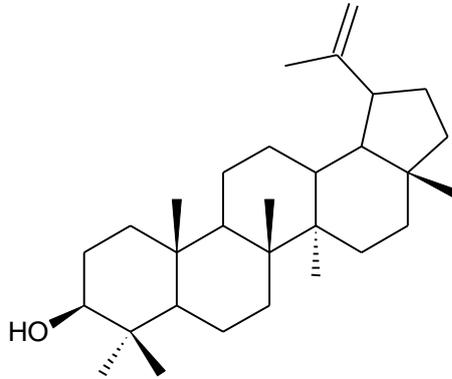
Segundo Costa (2002), as saponinas são heterósidos formados por constituintes aglicónicos de natureza esteróide ou triterpénica, que são conhecidos por sapogeninas. Essas são ligadas a longas cadeias glicídicas.

Essas substâncias têm uma elevada massa molecular e geralmente são obtidas em misturas complexas devido à presença concomitante de estruturas com um número variado de açúcares ou também pela presença de diversas agliconas (SIMÕES et al., 1999).

O resultado da análise qualitativa corrobora com os trabalhos de Brandão e colaboradores (1992 e 1993), confirmando a presença de saponinas na espécie *Ampelozizyphus amazonicus*.

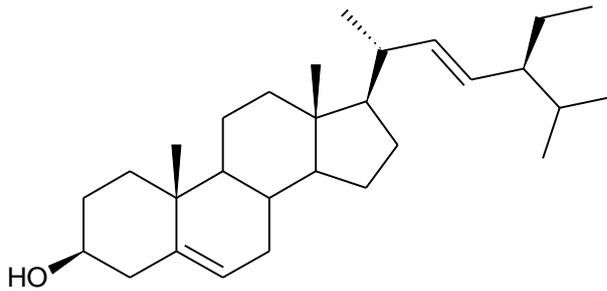
4.3 CONSTITUINTES QUÍMICOS ISOLADOS DA *AMPELOZIZYPHUS AMAZONICUS*

Triterpeno pentacíclico isolado da *Ampelozizyphus amazonicus*.

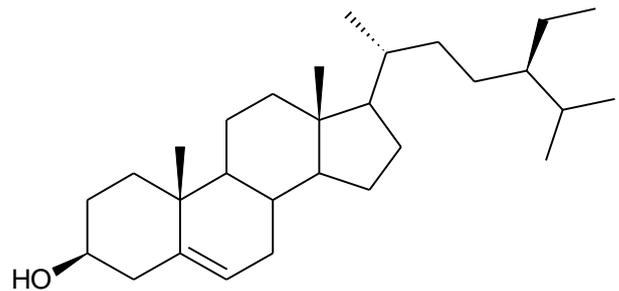


AAD 3-1

Fitoesteróides isolados da *Ampelozizyphus amazonicus*.



AAD4-2-2-1



AAD4-2-2-1-1

4.3.1 Atividade biológica das substâncias isoladas

As substâncias isoladas apresentam importantes atividades biológicas, o lupeol segundo a literatura possui atividade anti-inflamatória, antitumoral, anti-artrítica, antimalárica, antineoplásica (ZHANG, 2012). Enquanto substância estigmasterol tem apresentado atividade anti-oxidante, antidiabética, efeito hipoglicêmico, atividade inseticida, antitumoral (KAUR, et al., 2011). E por último o β -sitosterol apresenta atividade anti-inflamatória, antimicrobiana, antibacteriana e antifúngica (OVESNA; VACHALKOVA; HORVATHOVA, 2004)

4.3.2 Identificação dos triterpenos pentacíclicos

Os triterpenos não são formados, apenas, por uma extensão da cadeia através da simples adição de unidades de PIP. Além disso, a formação dos triterpenos passa pela formação de um intermediário, o esqualeno. Esse, então, é formado por duas moléculas de PPF, unidas através de uma condensação cauda-cauda. Com isso, o esqualeno sofre ciclizações originando os triterpenos pentacíclicos (Dewick, 2008).

Segundo Brandão e colaboradores (1992 e 1993) e Rosas e colaboradores (2007) na espécie analisada já foram encontrados as seguintes substâncias triterpênicas 3-O-[β -D-glicopiranosil (1->2) α -L-arabinopiranosil]-20-O- α -L-ramnopiranosil-jujubogenina (Quadro 3, capítulo 1, p. 36), ácido betulínico (Quadro 3, capítulo 1, p. 36), betulina (Quadro 3, capítulo 1, p. 36), lupeol (Quadro 3, capítulo 1, p. 36), ácido melalêucico (Quadro 3, capítulo 1, p. 36), ácido 3 β ,27 α -diidroxilup-20(29)-em-28 β -óico (Quadro 3, capítulo,1 p. 36), ampelozigenina-15 α -O-acetil-3-O- α -L-ramnopiranosil-(1->2)- β -D-glicopiranosídeo (Quadro 3, capítulo 1, p. 37), ácido ursólico (Quadro 3, capítulo 1, p. 37), ácido3 β -hidroxilup-20(29)-en-27,28-dióico (Quadro 3, capítulo 1, p. 37), Ácido 2 α ,3 β -diidroxilup-20(29)-en-27,28-dióico (Quadro 3, capítulo 1, p. 37) e lupenona (Quadro 3, capítulo 1, p. 37).

4.3.3 Determinação estrutural do triterpeno pentacíclico AAD 3-1

A partir da análise cromatográfica do extrato diclorometânico das folhas da *Ampelozizyphus amazonicus* foram isoladas 16,5 mg de uma substância cristalina branca que foi codificado como **AAD 3-1**. Na análise qualitativa por CCDA o composto **AAD 3-1**, apresentou-se como uma mancha única, de coloração violeta após revelação em vanilina sulfúrica e aquecimento (Figura 9). Essa substância foi submetida à espectrometria de RMN ^1H , RMN ^{13}C e espectrometria de massas.



Figura 9. Fotografia da CCDA da fração **AAD3-1** revelada com vanilina sulfurada.

4.3.3.1 Análise dos espectros de RMN ^{13}C da amostra AAD 3-1

Através dos espectros de RMN ^{13}C (Espectro 1, p. 61) foram atribuídos os deslocamentos químicos (Tabela 9, p. 58), que permitiu o assinalamento dos átomos de carbono que compõem a estrutura. O espectro RMN ^{13}C totalmente desacoplado indicou a presença de trinta átomos de carbono. Sendo atribuídos sete sinais para grupos metílicos (CH_3) em δ_{C} 27.96 (CH_3 -23), 15.34 (CH_3 -24), 16.08 (CH_3 -25), 15.95 (CH_3 -26), 14.52 (CH_3 -27), 17.97 (CH_3 -28) e 19.28 (CH_3 -30) onze sinais para grupos metilênicos (CH_2) em δ_{C} 38.68 (CH_2 -1), 27.42 (CH_2 -2), 18.29 (CH_2 -6), 34.25 (CH_2 -7), 20.90 (CH_2 -11), 25.11 (CH_2 -12), 27.37 (CH_2 -15), 35.55 (CH_2 -16), 29.82 (CH_2 -21), 39.97 (CH_2 -22) e 109,28 (CH_2 -29), sete sinais para grupos metínicos (CH) em δ_{C} 78.97 (CH -3), 55.27 (CH -5), 50.41 (CH -9), 38.02 (CH -13), 42.80 (CH -14), 48.27 (CH -18) e 47.95 (CH -19), e cinco sinais para átomos de carbono quaternário em δ_{C} 38.82 (C-4), 40.80 (C-8), 37.14 (C-10), 42.97 (C-17) e 150.91 (C-20) (Tabela 10, p. 59).

Entre esses sinais, dois bem deslocados são característicos de uma ligação dupla do grupamento isopropenil, presente em esqueletos lupenos (δ_{C} 109.28 e 150.91 ppm) (Espectro 3, p. 63). Os deslocamentos químicos do grupamento isopropenil 19.28, 150.91 e 109.28 ppm foram atribuídos aos átomos de carbono nas posições C-30, C-20 e C-29, respectivamente (BHATTACHARYA & BARROS, 1986; AGUIAR, R. M.; DAVID, J. P.; DAVID, J. M., 2005, ROSAS et al.; 2007).

O espectro ^{13}C apresentou apenas um sinal característico de carbono carbinólico, em δ_{C} 78,97 ppm (Espectro 3, p. 63). Este deslocamento é compatível com a presença de hidroxila livre que, por razões de ordem biossintética, foi atribuída ao C-3. Dados da literatura mostram um valor de 75 ppm quando a

hidroxila está em posição 3- α o deslocamento de C-3 (OLEA & ROQUE, 1990), porém este valor não foi observado no espectro. No entanto, o deslocamento observado foi de δ_c 78,97 ppm que é compatível com a hidroxila na posição β (OLEA & ROQUE, 1990). Os deslocamentos dos prótons e carbonos vizinhos a esta hidroxila comprovam esta informação. Os valores de deslocamento para C-1 (38.68 ppm) e C-5 (55.27 ppm) (Espectro 2, p.62) indicam que a hidroxila está no mesmo plano e assim interage com esses carbonos deslocando-os para frequência alta. Se essa hidroxila estivesse na posição oposta, os deslocamentos seriam de 34 ppm para C-1 e 49.5 ppm para C-5, não sofrendo esse efeito de desblindagem (CARVALHO, et al., 1998).

4.3.3.2 Análise dos espectros de RMN 1H da amostra AAD 3-1

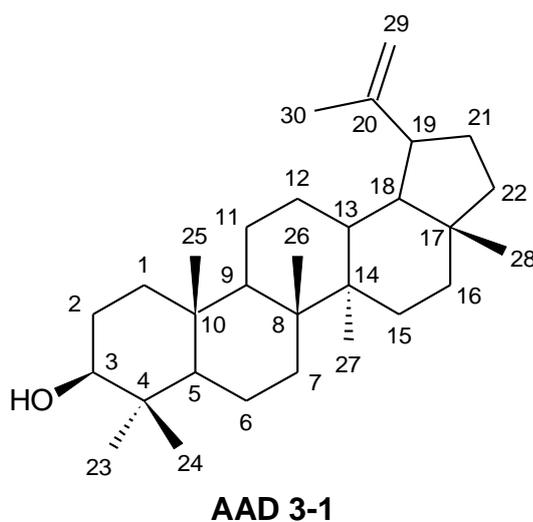
O espectro de RMN 1H (Espectro 4, p. 64) apresentam sete metilas na forma de sinpleto. Os deslocamentos para essas metilas foram: δ_H 0,75 (H-28), 0,77 (H-25), 0,81 (H-24), 0,93 (H-23), 0,95 (H-27), 1,01 (H-26), e 1,67 (H-30) ppm (Espectro 5, p. 65) (Tabela 10, p. 59).

Os sinais que aparecem como sinpleto em δ_H 4,55 e 4,67 ppm ($J=60\text{Hz}$) representam os dois prótons geminais olefínicos. Aparecem em frequência alta, pois estão ligados ao carbono que faz dupla ligação e assim sofrem forte efeito de anisotropia. Estes sinais somados ao deslocamento do sinal de metila em δ_H 1,67 ppm, são característicos de prótons pertencentes a um grupamento isopropenil, confirmando esse grupamento que é característico do esqueleto lupeno (Tabela 10, p. 59) (AGUIAR, R. M.; DAVID, J. P.; DAVID, J. M., 2005).

O correto assinalamento dos outros sinais da estrutura foram feitos pelo mapa de correlação heteronuclear HMQC (1J) e HMBC (^{2-3}J).

Tabela 9. Sinais identificados no espectro de RMN ^{13}C – AAD 3-1.

Sinais						
150,91	76,66	42,97	38,68	29,82	25,11	15,95
109,28	55,27	42,80	38,02	29,66	19,28	15,34
78,97	50,41	40,80	37,14	27,96	18,29	14,52
77,30	48,27	39,97	35,55	27,42	17,97	
76,98	47,95	38,82	34,25	27,37	16,08	

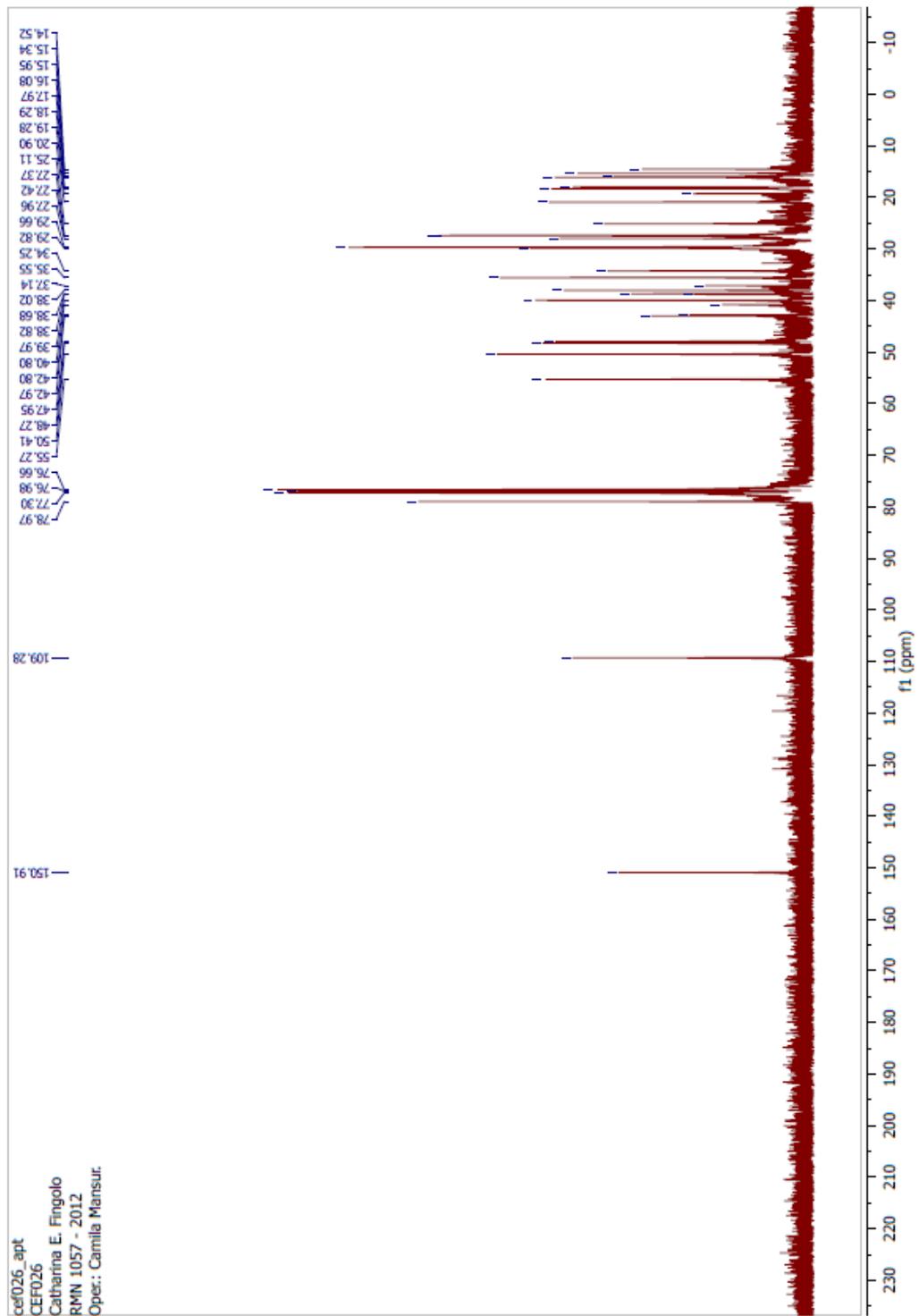


Os dados espectrais do composto triterpênico estão de acordo com os dados de RMN ^{13}C e ^1H descritos na literatura para o lupeol (3β -hidroxi-lupa-20(29)-eno).

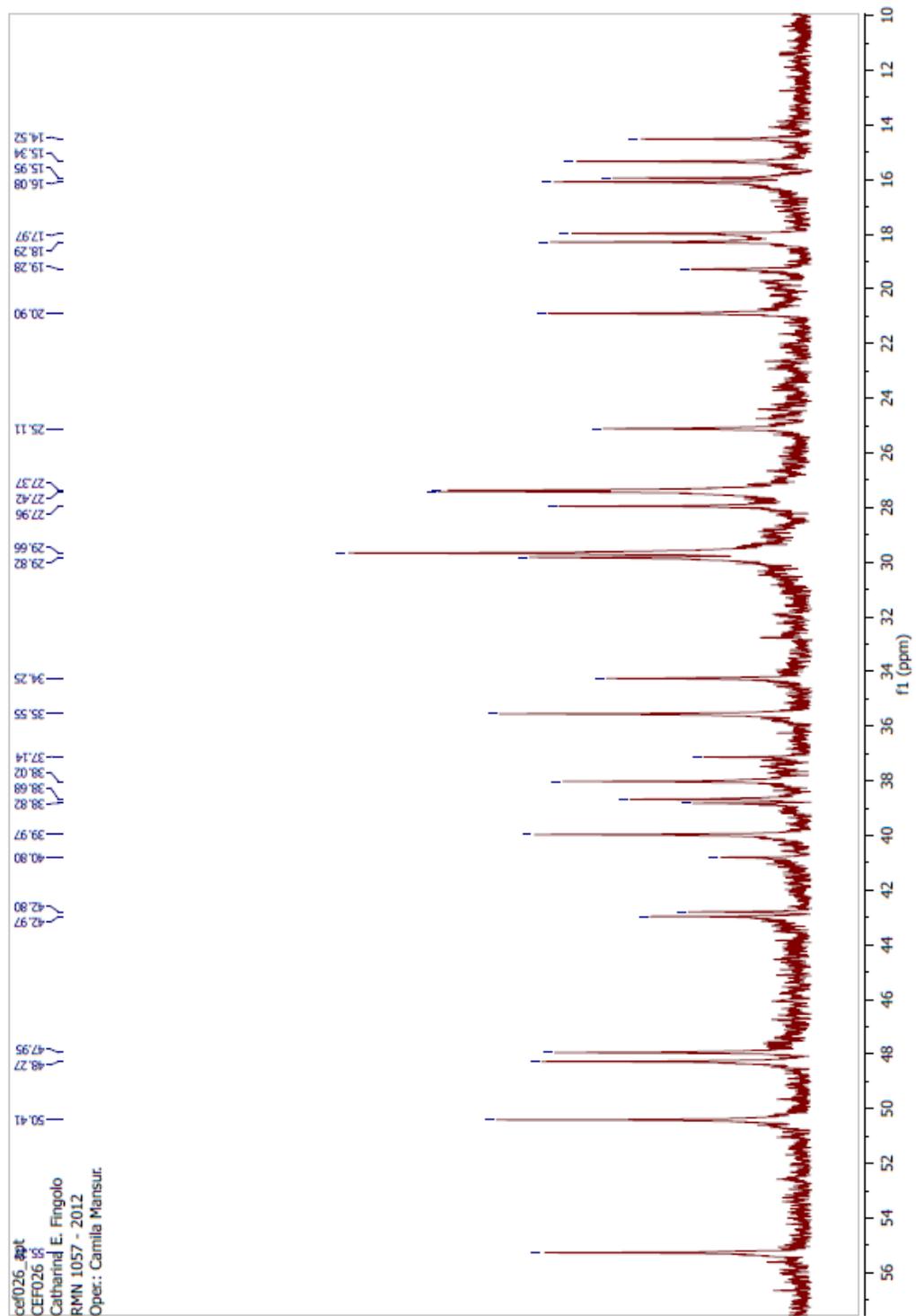
Tabela 10. Dados do RMN ^1H (500 MHz) e RMN ^{13}C (125 MHz) em CDCl_3 e as correlações observadas no espectro de HMQC e HMBC da substância **AAD 3-1** comparados com valores de referência do **Mo-1** (ZANON, 2006).

	AAD3-1	HMQC	HMBC	Mo-1
	δ_c	δ_H	^{2-3}J	δ_c
C				
4	38,82	-	-	38,73
8	40,80	-	-	40,86
10	37,14	-	-	37,19
17	42,97	-	-	43,00
20	150,91	-	-	150,90
CH				
3	78,97	3,18 (q; J=15Hz)	-	79,01
5	55,27	0,65 (sl)	-	55,35
9	50,41	1,24 (s)	-	50,47
13	38,02	1,67 (s)	C20; C29 e C19	38,08
14	42,80	-	-	42,84
18	48,27	1,34 (d)	-	48,33
19	47,95	2,37 (sl)	-	47,98
CH₂				
1	38,68	1,67 (s)	C20; C29 e C19	38,86
2	27,42	0,95 (m)	C9 e C26	25,18
6	18,29	1,25 (s)	-	18,33
7	34,25	1,37 (d)	-	34,31
11	20,90	0,81 (s)	-	20,95

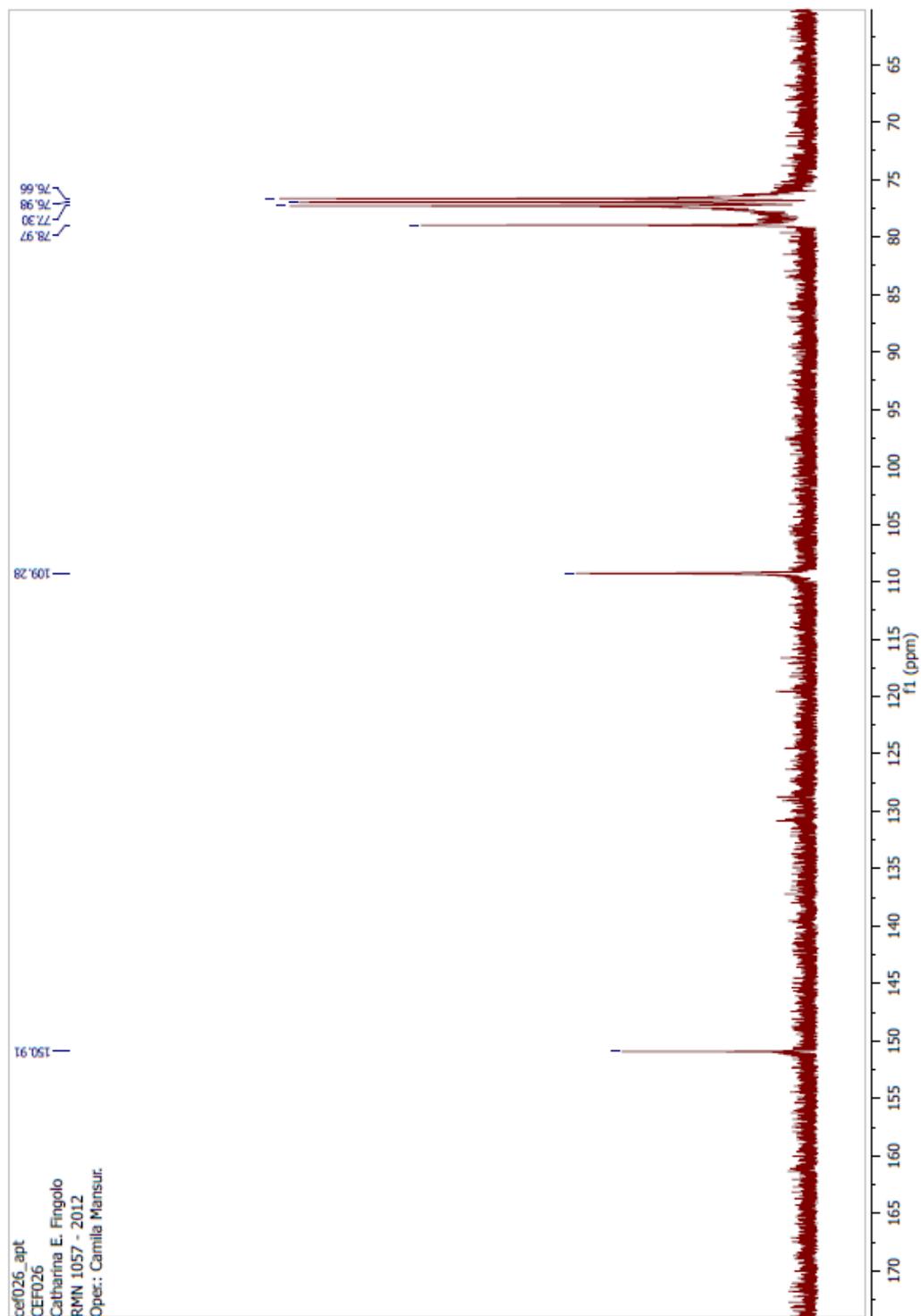
12	25,11	-	-	27,43
15	27,37	-	-	27,46
16	35,55	0,86 (t)	-	35,60
21	29,82	1,24 (s)	-	29,87
22	39,97	1,37 (d)	-	40,01
29	109,28	4,55-4,67 (s; J=60Hz)	C19 e C30	109,31
CH₃				
23	27,96	0,93 (s)	-	27,99
24	15,34	0,81 (s)	-	16,11
25	16,08	0,77 (s; J=10Hz)	-	15,99
26	15,95	1,01 (s)	-	15,36
27	14,52	0,95 (t)	-	14,56
28	17,97	0,75 (s; J=10Hz)	-	18,00
30	19,28	1,67 (s)		19,31



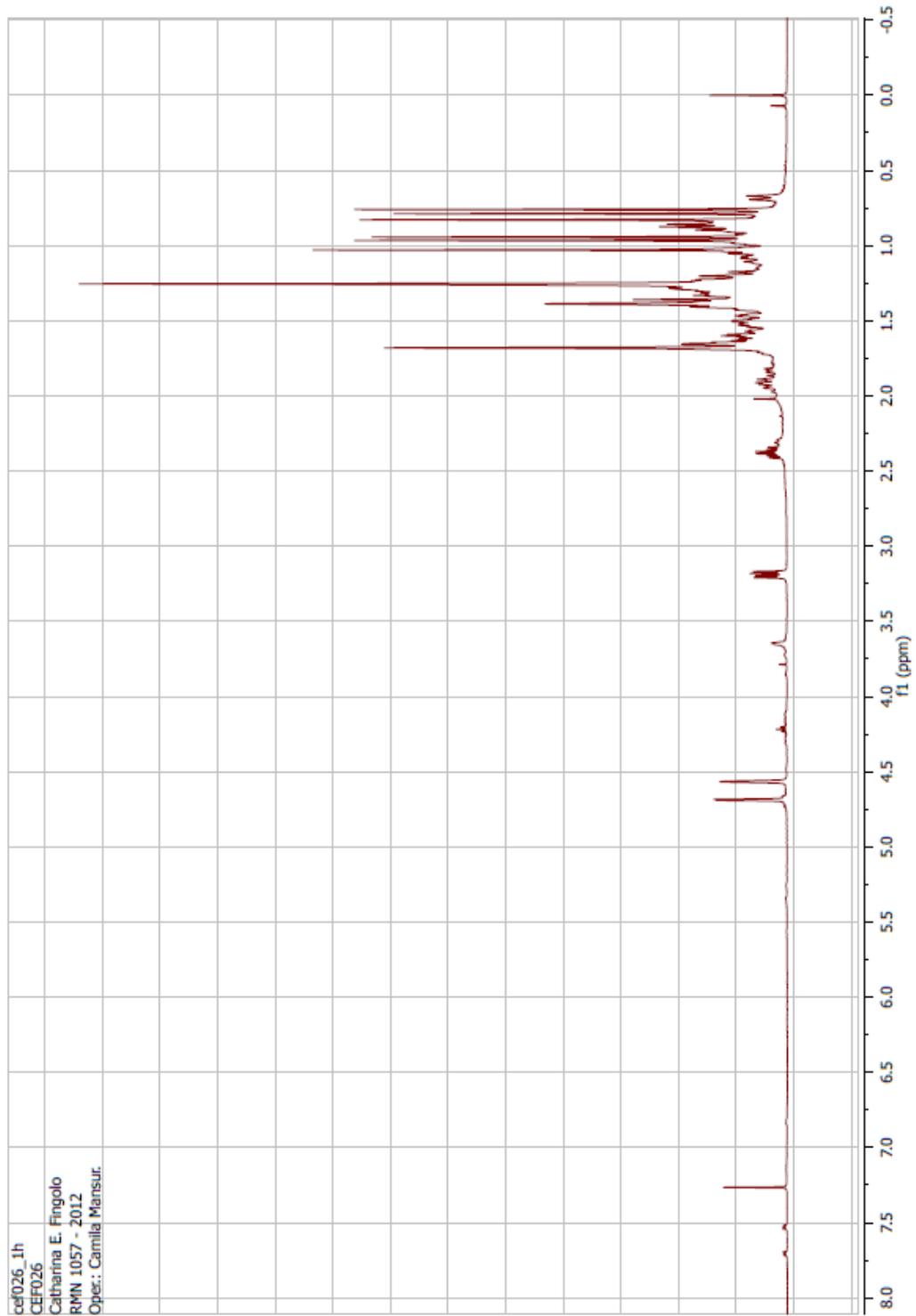
Espectro 1. Espectro de RMN ^{13}C (125 MHz) em CDCl_3 do triterpeno **AAD 3-1**.



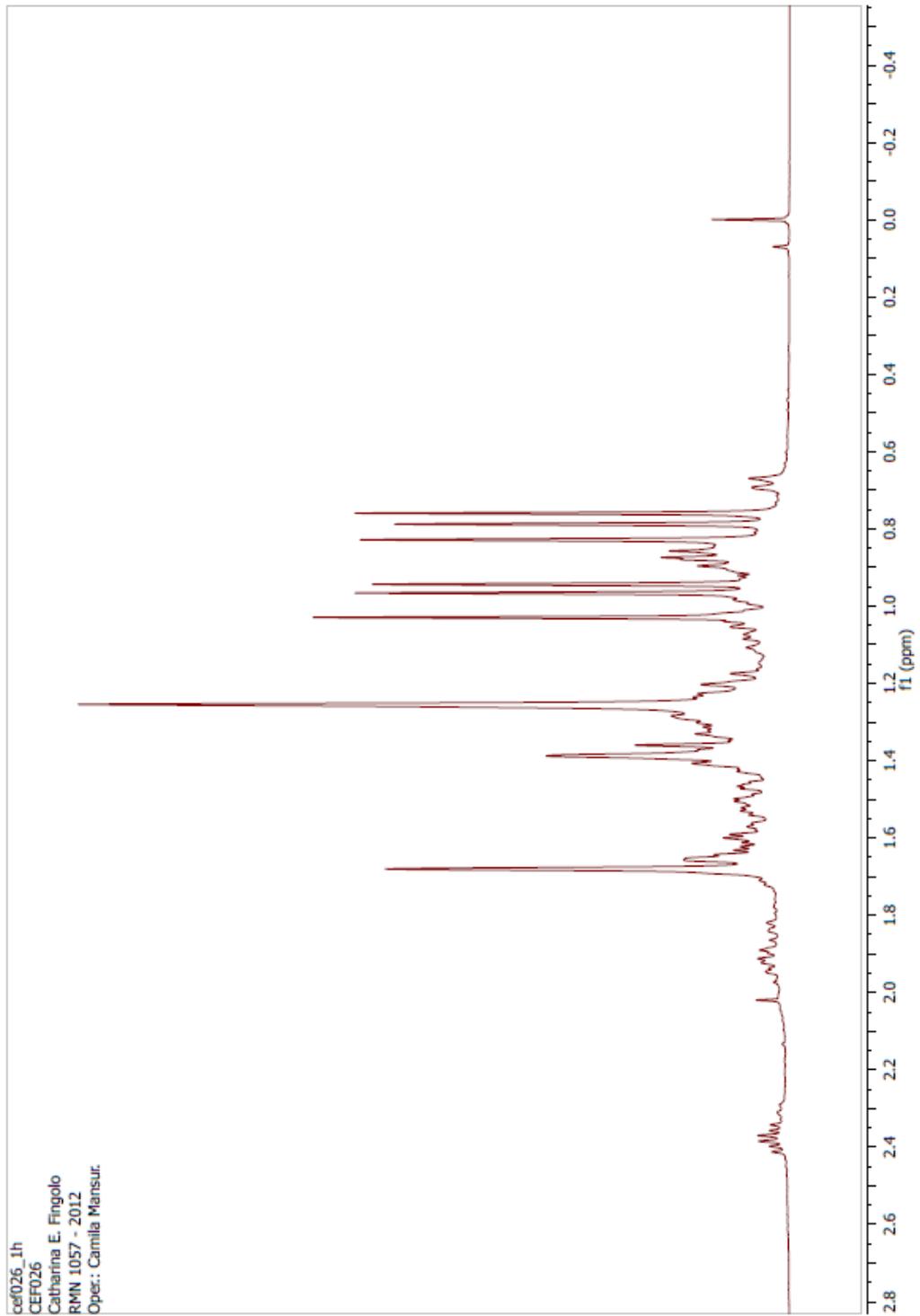
Espectro 2. Ampliação da região de δ 10-56 do espectro de RMN ¹³C (125 MHz) em CDCl₃ do triterpeno **AAD 3-1**.



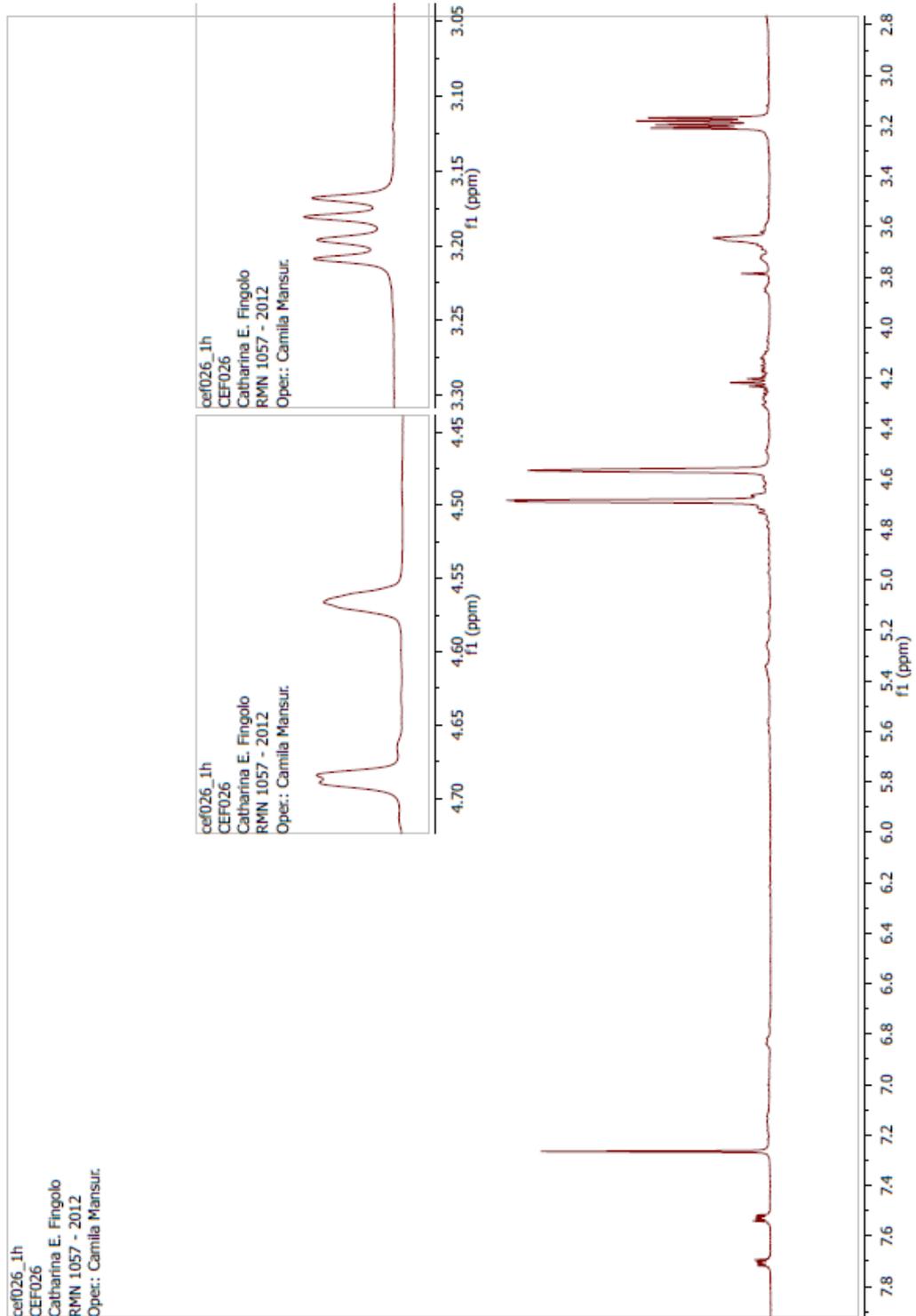
Espectro 3. Ampliação da região de δ 65-170 do espectro de RMN ^{13}C (125 MHz) em CDCl_3 do triterpeno **AAD 3-1**.



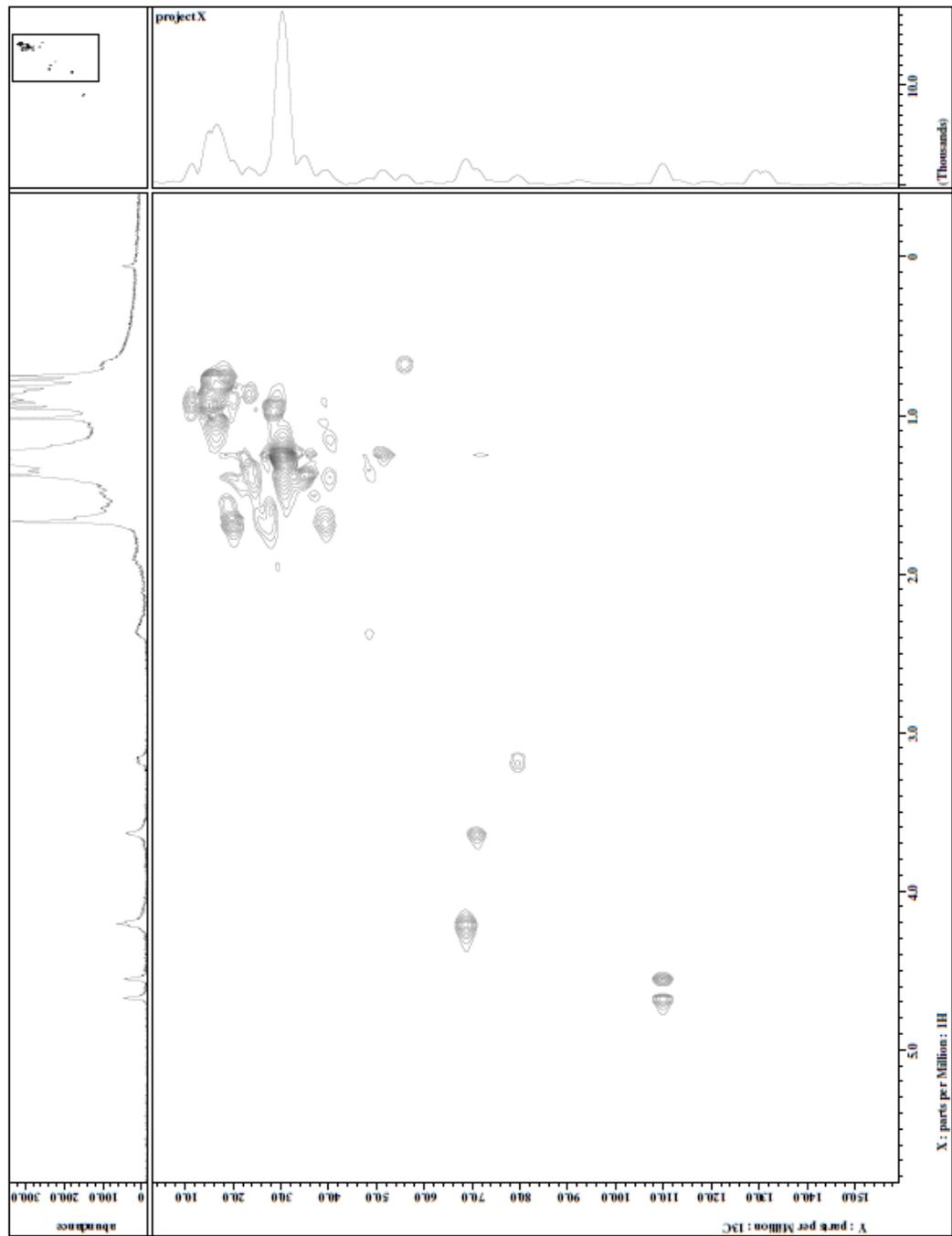
Espectro 4. Espectro de RMN ^1H (500 MHz) em CDCl_3 do triterpene **AAD 3-1**.



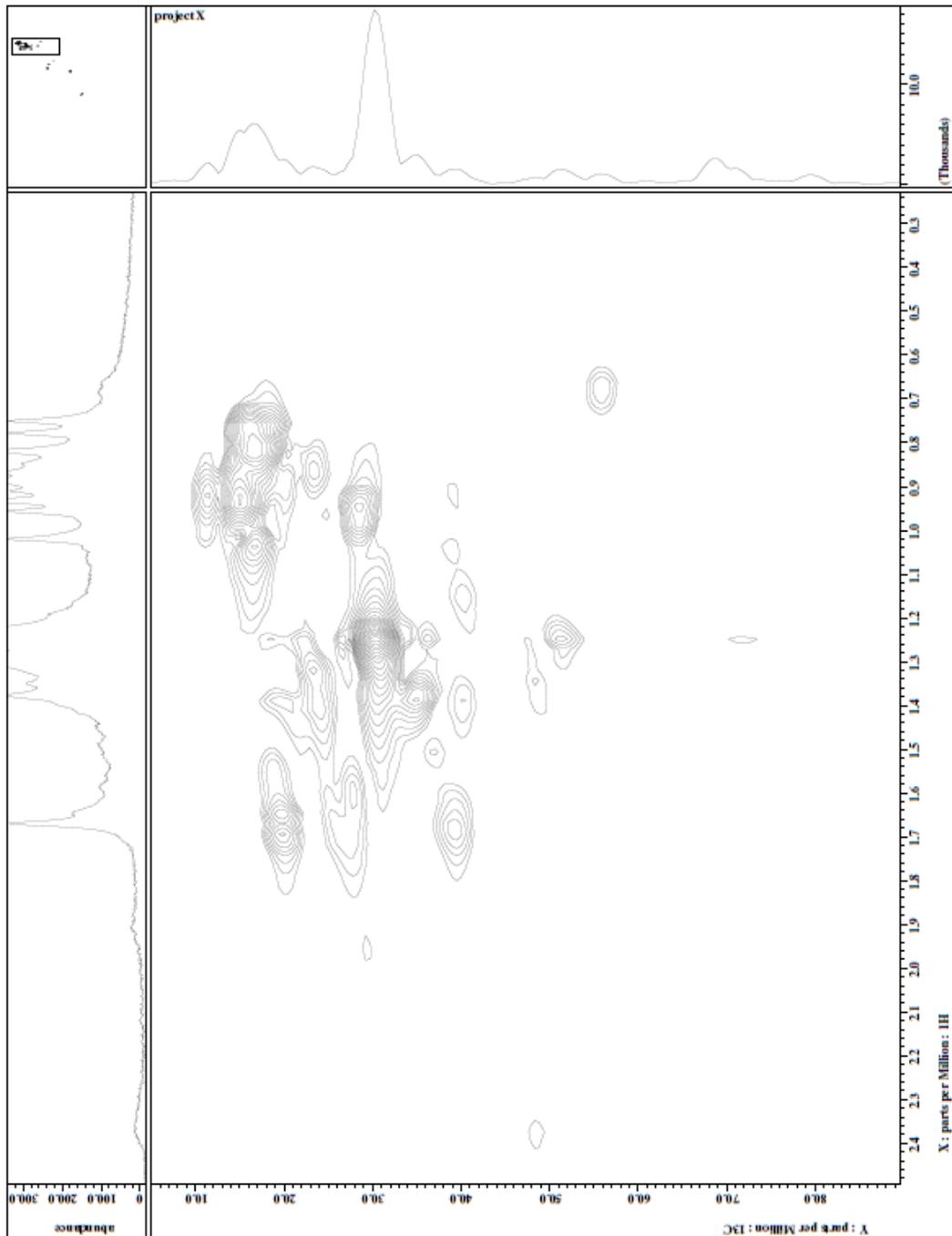
Espectro 5. Ampliação da região de δ 0 – 2,8 do espectro de RMN ^1H (500 MHz) em CDCl_3 do triterpene **AAD 3-1**.



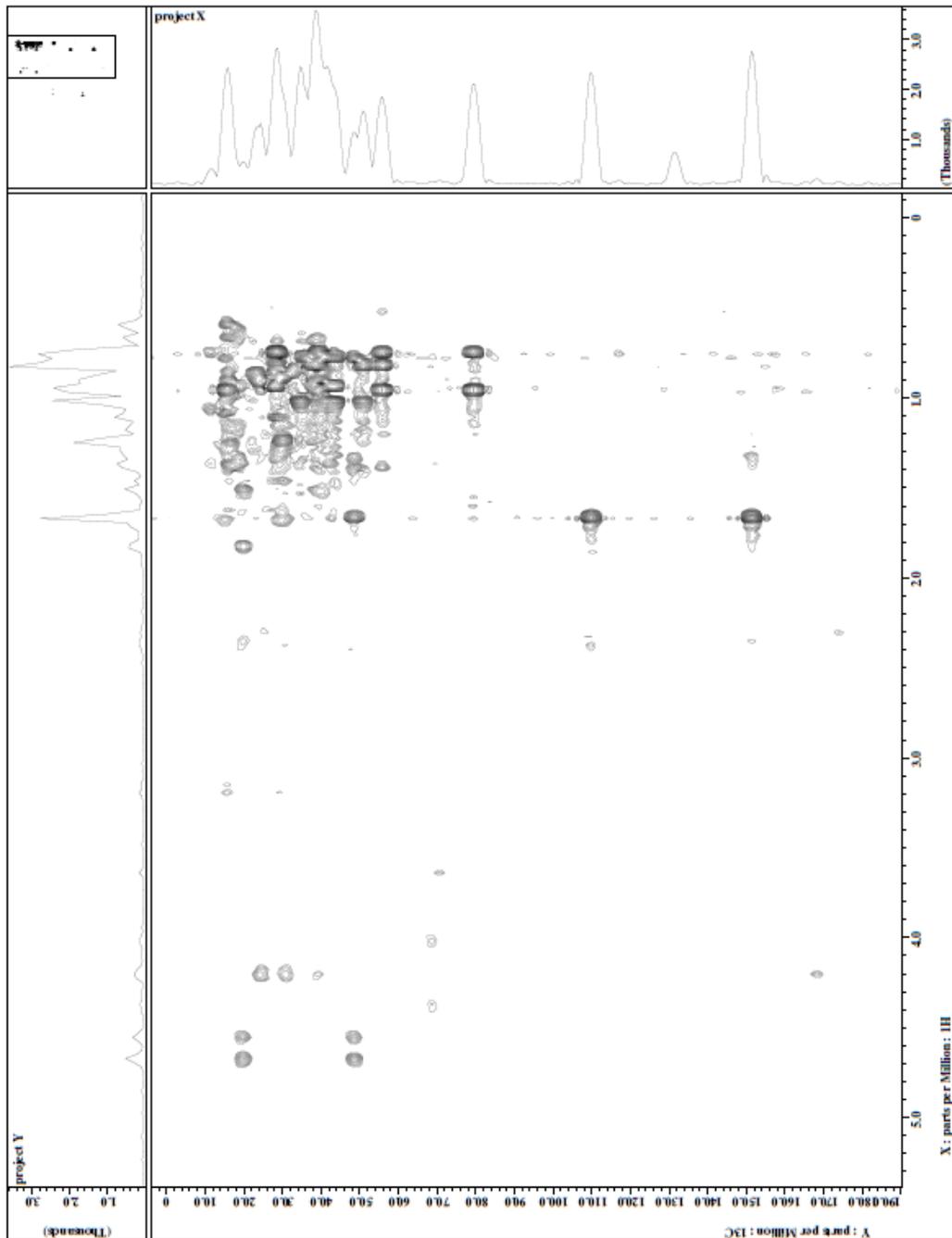
Espectro 6. Ampliação da região de δ 2,8 – 7,8 do espectro de RMN ^1H (500 MHz) em CDCl_3 do triterpeno **AAD 3-1**.



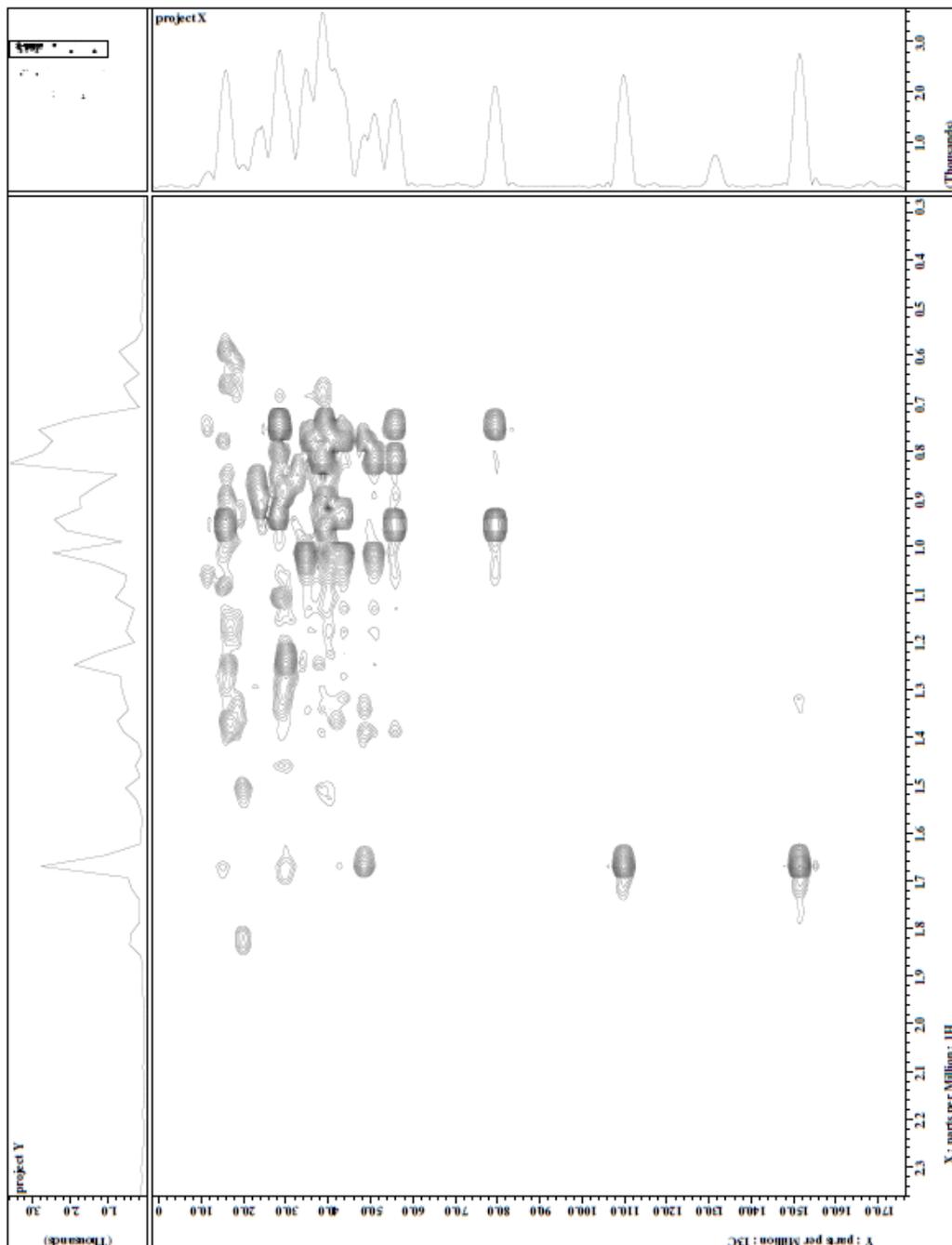
Espectro 7. Mapa de correlação heteronuclear HMQC em CDCl_3 do triterpeno **AAD 3-1**.



Espectro 8. Ampliação do mapa de correlação heteronuclear HMQC em CDCl_3 do triterpeno **AAD 3-1**.



Espectro 9. Mapa de correlação heteronuclear HMBC em CDCl_3 do triterpeno **AAD 3-1**.



Espectro 10. Ampliação do mapa de correlação heteronuclear HMBC em CDCl_3 do triterpeno **AAD 3-1**.

4.3.3.3 Análise de dados obtidos por CG/EM da amostra AAD 3-1

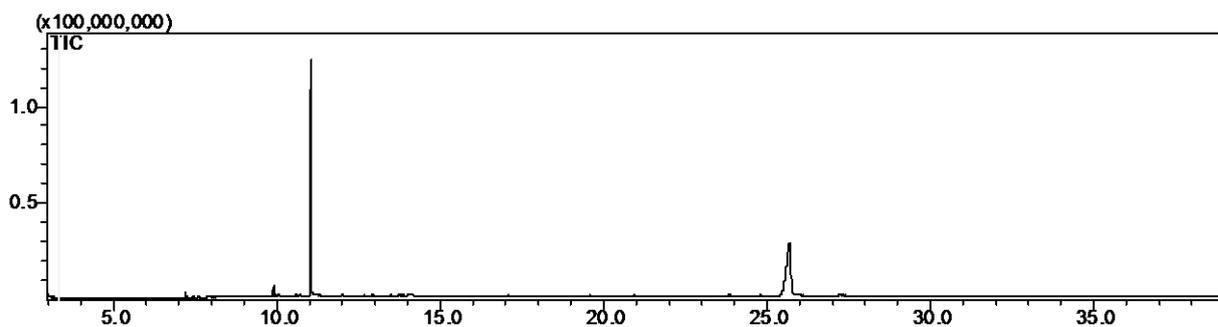
No cromatograma obtido pela análise de CG-EM foi possível observar um sinal principal com tempo de retenção de 25,50 minutos (Cromatograma 1, p. 71).

O espectro de massas por impacto eletrônico (Espectro 11, p. 72) da substância analisada mostrou um sinal em m/z 426 daltons, que é coerente com o íon molecular da substância **AAD 3-1** (lupeol). Outros sinais oriundos da fragmentação do anel C são característicos de triterpenos pentacíclicos, destacando os de maior intensidade como: m/z 218; 207 e 189 daltons (Figura 10, p. 72). Os sinais com m/z 189 e 207 daltons, são característicos do esqueleto lupeno.

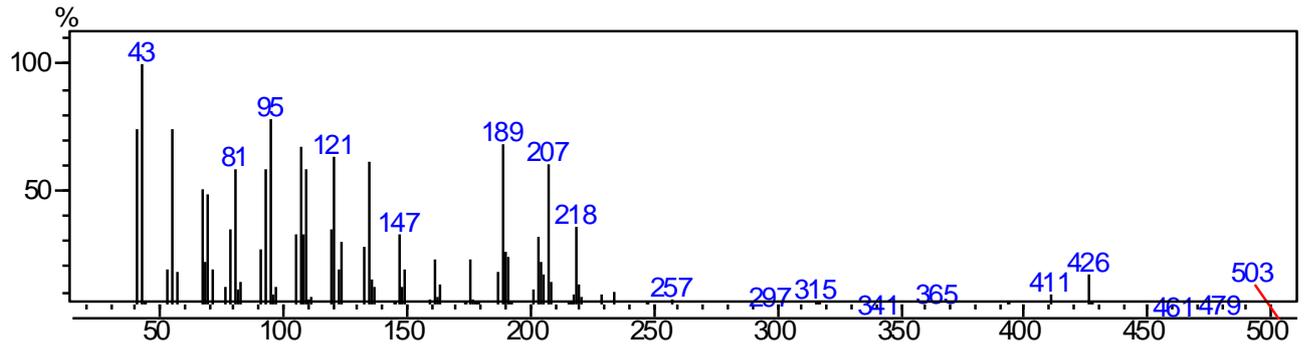
Com base nos dados espectrais foi possível propor para a substância **AAD 3-1** a fórmula molecular $C_{30}H_{50}O$. Com isso, calculou-se o índice de deficiência de hidrogênio (IDH), o qual informou o grau de insaturações presentes no composto, que foi igual a seis. Como os espectros de RMN indicaram apenas uma insaturação, conclui-se que o composto apresenta cinco ciclos. Portanto, a partir da análise dos dados é possível afirmar que o composto (**ADD3-1**) isolado do extrato diclorometânico é o lupeol (3 α -hidroxi-lupa-20(29)-eno).

$$\text{IDH} = n^{\circ} \text{ de átomos de carbono} - (n^{\circ} \text{ átomos de hidrogênio} / 2) + 1$$

$$\text{IDH} = 30 - (50/2) + 1 = 6$$



Cromatograma 1. Cromatograma da substância **AAD 3-1** (lupeol).



Espectro 11. Espectro de massas do triterpeno **AAD 3-1** (lupeol).

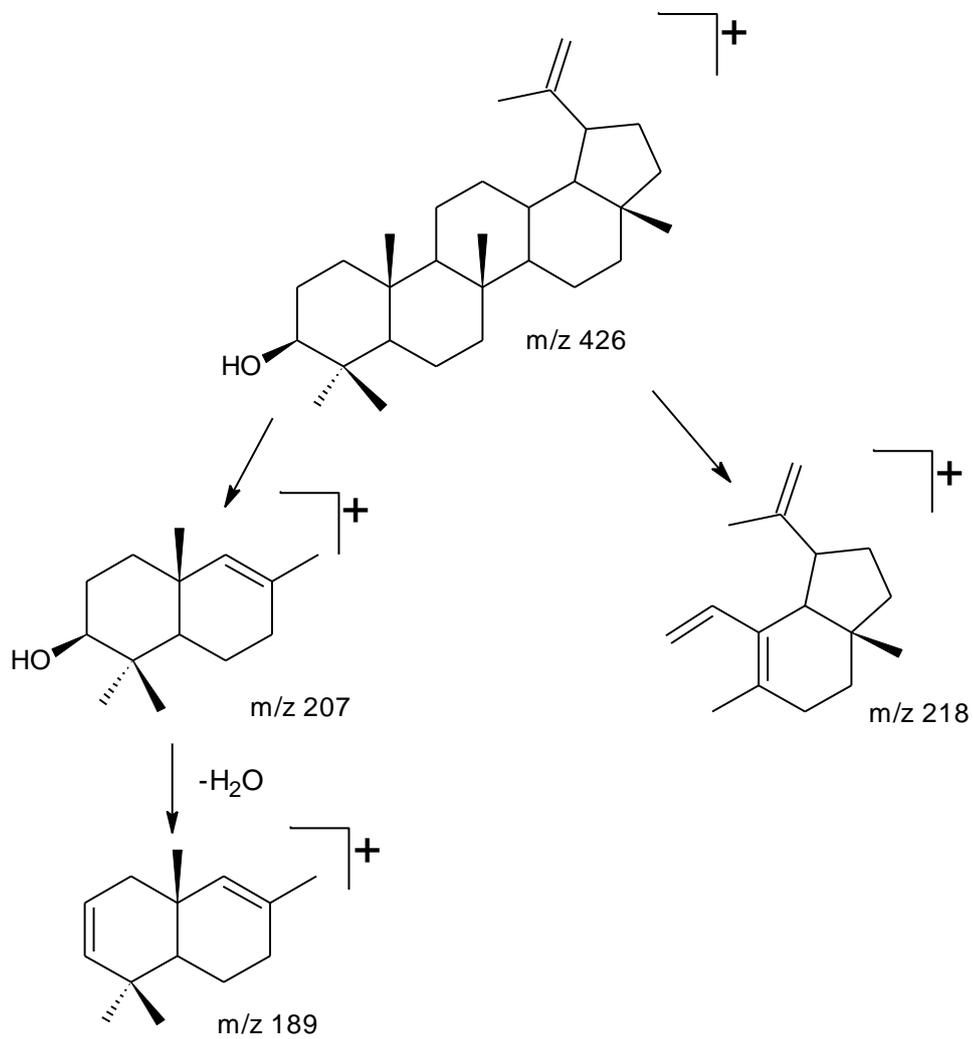


Figura 10. Proposta da fragmentação do triterpeno **AAD 3-1** (lupeol).

4.3.4 Identificação dos fitoesteróides

Os esteróides são bastante disseminados em todo o reino vegetal tendo a função de manter a integridade estrutural das membranas celulares das plantas e estimular o crescimento das mesmas (ROBBERS; SPEEDIE; TYLER, 1997).

O β -sitosterol, é o exemplo mais comum de substância desta classe, geralmente é identificado em mistura com outro esteroide por apresentarem estruturas muito semelhantes, dificultando assim a sua separação dos mesmos.

Muito semelhante ao β -sitosterol é o estigmasterol sua diferença está na ligação dupla na posição 22, essa ligação possibilita que a sua conversão nos hormônios esteroidais do tipo pregnana seja mais rápida que a do β -sitosterol (ROBBERS; SPEEDIE; TYLER, 1997).

Segundo Rosas e colaboradores (2007) na espécie analisada já foram encontrados os seguintes fitoesteróides em seus extratos: estigmasterol (Quadro 4, capítulo 1, p. 38), sitosterol (Quadro 4, capítulo 1, p. 38) e campesterol (Quadro 4, capítulo 1, p. 38).

4.3.5 Determinação estrutural dos esteróides AAD4-2-2-1 e AAD4-2-2-1-1

A partir da análise cromatográfica do extrato diclorometânico das folhas da *Ampelozizyphus amazonicus* foram identificados em mistura 10 mg de um composto cristalino branco que foram codificados com **AAD 4-2-2-1** e **AAD 4-2-2-1-1**. Na análise qualitativa por CCD **AAD 4-2-2-1** e **AAD 4-2-2-1-1**, apresentaram-se como uma mancha única, de coloração violeta após revelação em vanilina sulfúrica e aquecimento (Figura 11). Essas substâncias foram submetidas a espectrometria de RMN ^1H , RMN ^{13}C e espectrometria de massas.



Figura 11. Fotografia da CCDA da fração **AAD 4-2-2-1** e **AAD 4-2-2-1-1** revelada com vanilina sulfurada.

4.3.5.1 Análise dos espectros de RMN ^{13}C da mistura de AAD 4-2-2-1 e AAD 4-2-2-1-1

Através dos espectros de RMN ^{13}C (Espectro 12, p. 78) foram atribuídos os deslocamentos químicos (Tabela 11, p. 75), que permitiu o assinalamento dos átomos de carbono que compõem as estruturas. O espectro de RMN ^{13}C totalmente desacoplado indicou a presença de vinte e nove átomos de carbono, sendo seis sinais para grupos metílicos (CH_3) em δ_{C} 12.06 (CH_3 -18), 19.47 (CH_3 -19), 18.86 (CH_3 -21), 19.11 (CH_3 -26), 19.06 (CH_3 -27), 11,94 (CH_3 -29), onze sinais para grupos metilénicos (CH_2) em δ_{C} 37.34 (CH_2 -1), 31.99 (CH_2 -2), 42.30 (CH_2 -4), 34.04 (CH_2 -7), 21.16 (CH_2 -11), 39.76 (CH_2 -12), 24.38 (CH_2 -15), 28.99 (CH_2 -16), 31.75 (CH_2 -22), 26.18 (CH_2 -23) e 23.15 (CH_2 -28), nove sinais para grupos metínicos (CH) em δ_{C} 71.90 (CH -3), 121.79 (CH -6), 31.75 (CH -8), 50.22 (CH -9), 56.85 (CH -14), 56.04 (CH -17), 42.39 (CH -20), 45.93 (CH -24) e 29.25 (CH -25) e três sinais para átomos de carbono quaternário em δ_{C} 140.84 (C-5), 36.59 (C-10) e 42.30 (C-13) (Tabela 12, p. 76).

Dos sinais no espectro de RMN ^{13}C para átomos de carbono quaternário dois possuem grupo metílico ligado a eles: C-10 (δ_{C} 36.59) e C-13 (δ_{C} 42.30) (Espectro 13, p. 79).

O espectro ^{13}C apresentou apenas um sinal característico de carbono carbinólico, em δ_{C} 71.90 (Espectro 15, p. 81). Este deslocamento é compatível com a hidroxila livre que, por razões de ordem biossintética, foi atribuída ao C-3.

Ainda no espectro de RMN ^{13}C (Espectro 15, p. 81) pode-se observar os sinais em δ_{C} 140.84, 138,39, 129,37 e 121.79 ppm, referentes aos carbonos C-5, C-22, C-23 e C-6, respectivamente, que sugere a ocorrência de duas insaturações. A insaturação entre os carbonos C-5 e C-6 é característica de esteróides, sendo idêntica em ambas as estruturas. A distinção entre as duas substâncias se revelou através da presença da insaturação entre C-22 e C-23 presente apenas no estigmasterol, essa insaturação é característica de cadeia lateral de esteróides (Tabela 12, p. 76).

4.3.5.2 Análise dos espectros de RMN ^1H da amostra AAD 4-2-2-1 e AAD 4-2-2-1-1

O espectro de RMN ^1H apresentam seis metilas na forma de simpleto. Os deslocamentos para essas metilas foram: δ_{H} 0,69 (H-18), 0,79 (H-27), 0,83 (H-29), 0,90 (H-26), 1,00 (H-19), e 1,02 (H-21) ppm (Espectro 17, p. 83) (Tabela 12, p. 76).

O sinal que aparece em δ_{H} 5,33 (H-6) (Espectro 20, p. 86) confirma a insaturação na estrutura, além de um multiplete em δ_{H} 3,52 (H-3), confirmando a presença de um grupo hidroxila nesta posição.

A presença do estigmasterol (**AAD 4-2-2-1**) foi notada no espectro de RMN ^1H da mistura (Espectro 18, p. 84), através da presença dos sinais em δ_{H} 5,03 (dd, J= 8 Hz H-23) e 5,17 (dd, J = 8 Hz, H-22), referentes a insaturação na cadeia lateral.

O correto assinalamento dos outros sinais da estrutura foram feitos pelo mapa de correlação heteronuclear HMQC (^1J) e HMBC (^{2-3}J).

Os dados espectrais da mistura dos esteroides **AAD 4-2-2-1** e **AAD 4-2-2-1-1** estão de acordo com os dados de RMN ^{13}C e RMN ^1H descritos na literatura para os fitoesteróides estigmasterol e β -sitosterol, respectivamente (Tabela 12, p. 76).

Tabela 11. Sinais identificados no espectro de RMN ^{13}C **AAD 4-2-2-1** e **AAD 4-2-2-1-1**.

Sinal								
140,84	76,76	56,04	42,30	36,59	29,25	24,44	19,89	12,32
138,39	71,90	51,32	40,56	36,22	28,99	24,38	19,47	12,13
129,37	56,95	50,22	39,86	34,04	28,32	23,15	19,11	12,06
121,79	56,85	45,93	39,76	31,99	26,18	21,29	19,06	11,94
77,08	56,14	42,39	37,34	31,75	25,48	21,16	18,86	

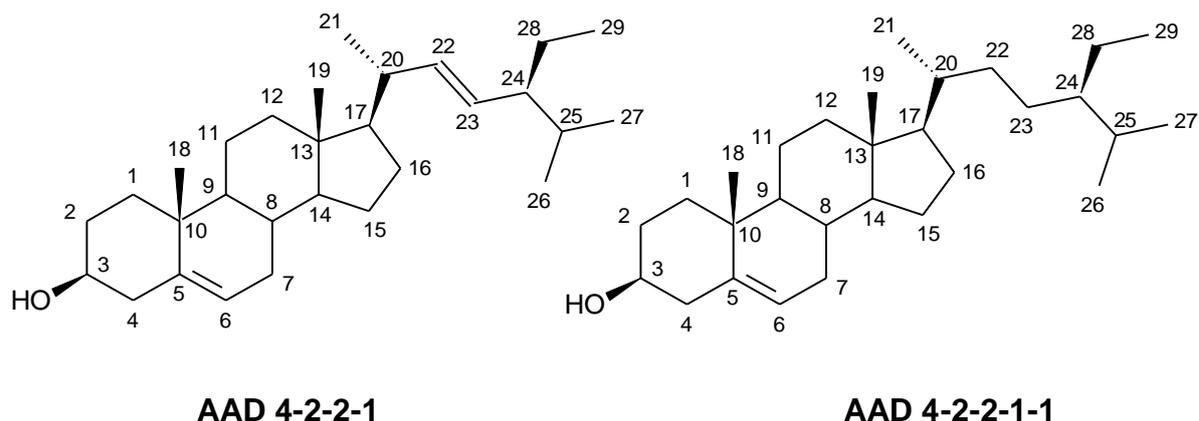
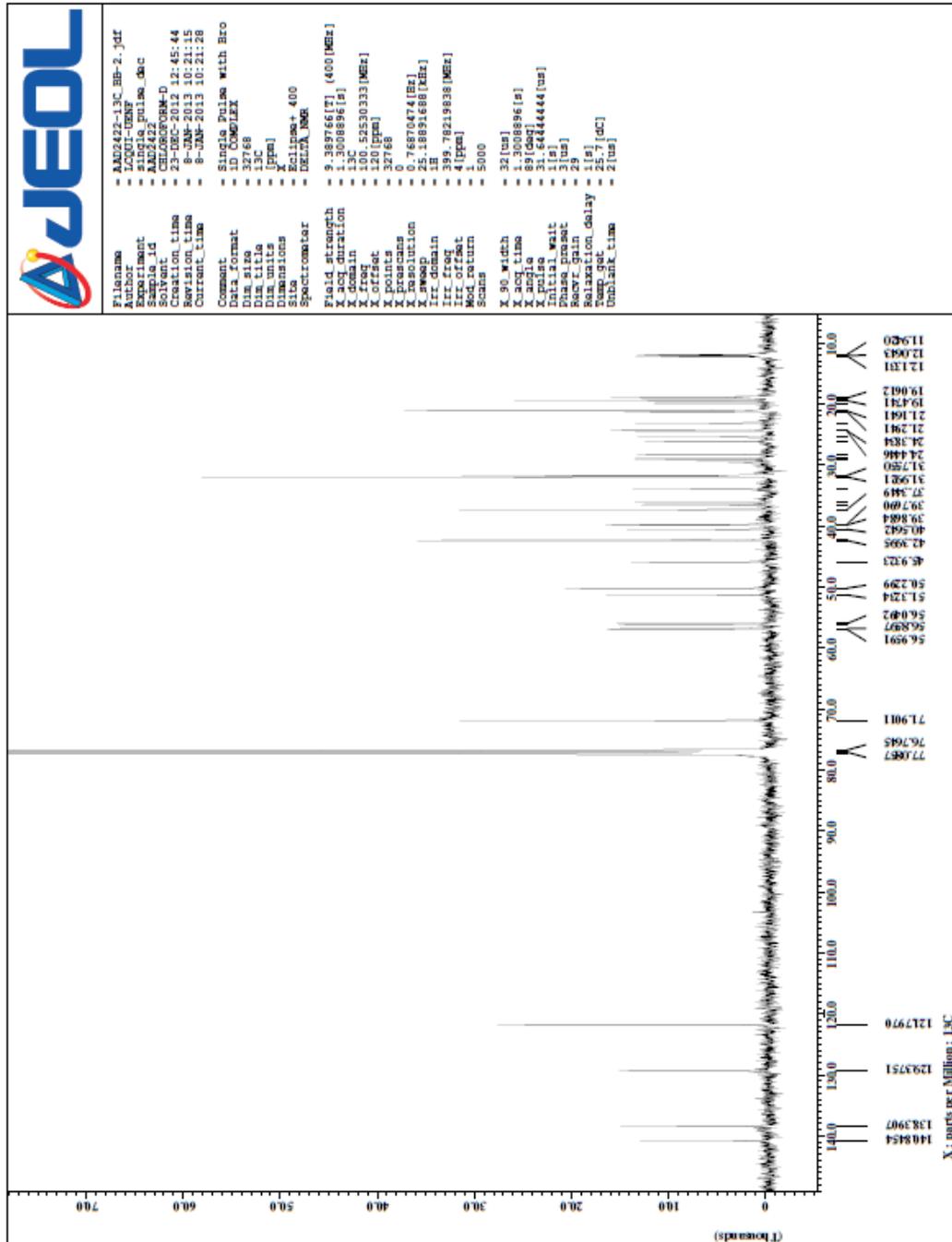


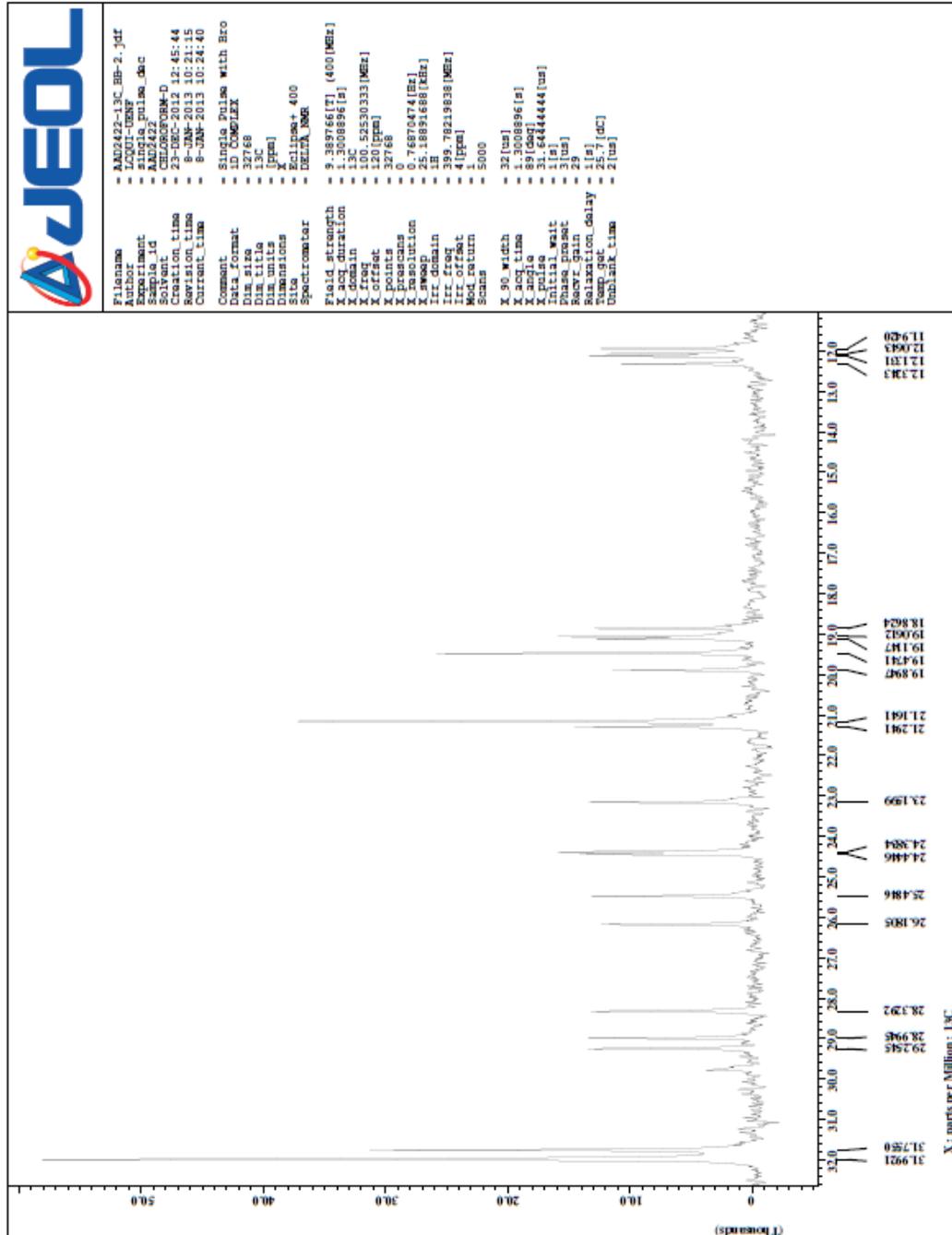
Tabela 12. Dados de RMN ^{13}C (100 MHz) e de RMN ^1H (400 MHz) em CDCl_3 , deslocamentos químicos δ (ppm) das substâncias **AAD4-2-2-1** e **AAD4-2-2-1-1** comparados com valores de referência do modelo **Mo-1** e **Mo-2** (RODRIGUES, V., 2009), respectivamente.

	AAD 4-2-2-1	HMQC	HMBC	Mo-1	AAD 4-2-2-1-1	HMQC	HMBC	Mo-2
	δ_c	δ_H	^{2-3}J	δ_c	δ_c	δ_H	^{2-3}J	δ_c
C								
5	140.8	-	-	140.7	140.8	-	-	140.7
10	36.59	-	-	36.49	36.59	-	-	36.49
13	42.30	-	-	42.29	42.30	-	-	42.29
CH								
3	71.90	3,52 (m)		71.80	71.90	3,52	-	71.80
6	121.7	5,33 (s)	C2 e C4	121.7	121.7	5,33	C2 e C4	121.7
8	31.75	1,24 (t)		31.85	31.75	1,24	-	31.85
9	50.22	-	-	50.12	50.22	-	-	50.12
14	56.85	1,10 (s)	C26	56.75	56.85	1,10	C26	56.75
17	56.04	1,15 (s)	-	56.04	56.04	1,15	-	56.04
20	42.30	1,82 (s)	-	42.76	42.39	1,82	-	42.76
24	45.93	-	-	45.83	45.93	-	-	45.83
25	29.25	1,66 (sl)	-	29.15	29.25	1,66	-	29.15
CH₂								
1	37.34	1,84 (s)	-	37.24	37.34	1,84	-	37.24
2	31.99	1,82 (s)	-	31.89	31.99	1,82	-	31.89
4	42.39	2,29 (m)	-	42.29	42.30	2,12	-	42.29
7	34.04	-	-	34.07	34.04	-	-	34.07
11	21.16	1,52 (m)	-	21.07	21.16	1,52	-	21.07
12	39.76	1,24 (t)	-	39.76	39.76	1,24	-	39.76
15	24.38	0,95 (sl)	-	24.29	24.38	0,95	-	24.29
16	28.99	1,53 (m)	-	28.80	28.99	1,53	-	28.80
22	138,39	5,17 (dd, J= 8Hz)	-	32.09	31,75	1,24	-	138.5
23	129,37	5,03 (dd, J=	-	26.27	26,18	1,20	-	129.4

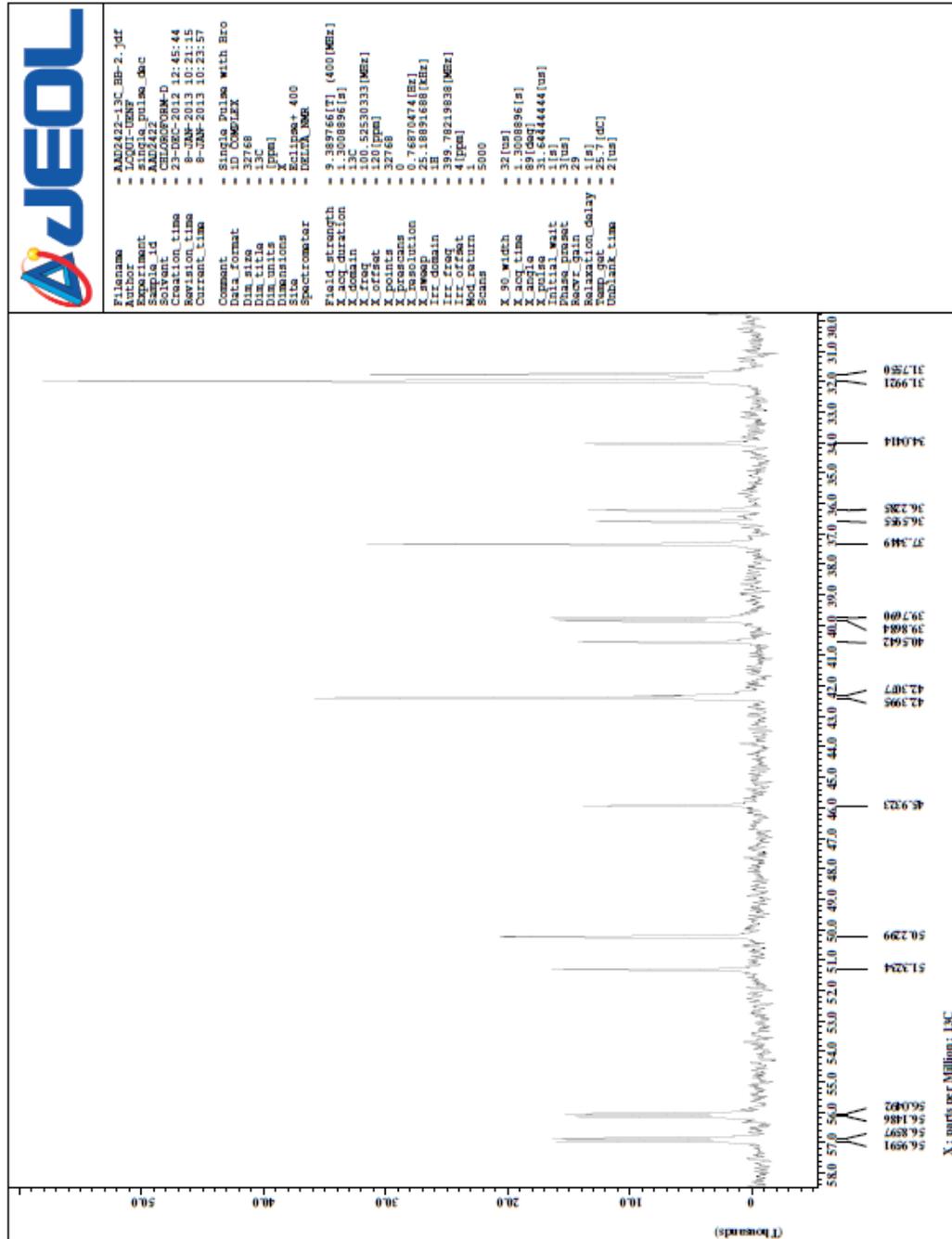
		8Hz)						
28	23.15	0,83 (s)	C25	23.26	23.15	0,83	C25	23.26
CH₃								
18	12.06	0,69 (s; J=8Hz)	-	12.05	12.06	0,69	-	12.05
19	19.47	1,00 (s)	C9	19.59	19.47	1,00	C9	19.59
21	18.86	1,02 (s)	C9 e C14	19.38	18.86	1,02	C9 e C14	19.38
26	19.11	0,90 (d)	-	20.00	19.11	0,90	-	20.00
27	19.06	0,79 (s)	-	20.00	19,06	0,79	-	20.00
29	11.84	0,83 (s)	-	11.84	11.84	0,83	-	11.84



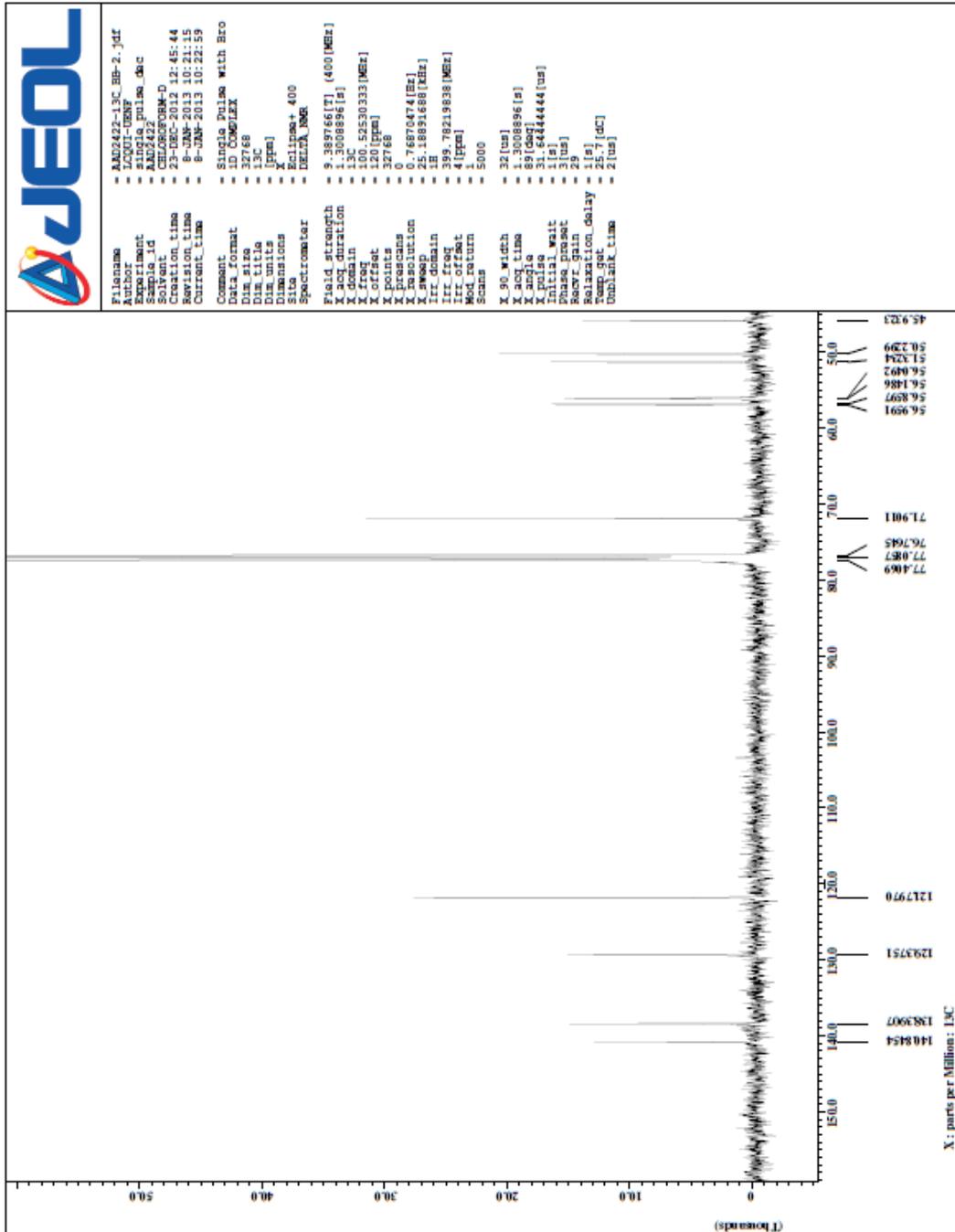
Espectro 12. Espectro de RMN ^{13}C (100 MHz) em CDCl_3 da mistura de esteróides **AAD 4-2-2-1** e **AAD 4-2-2-1-1**.



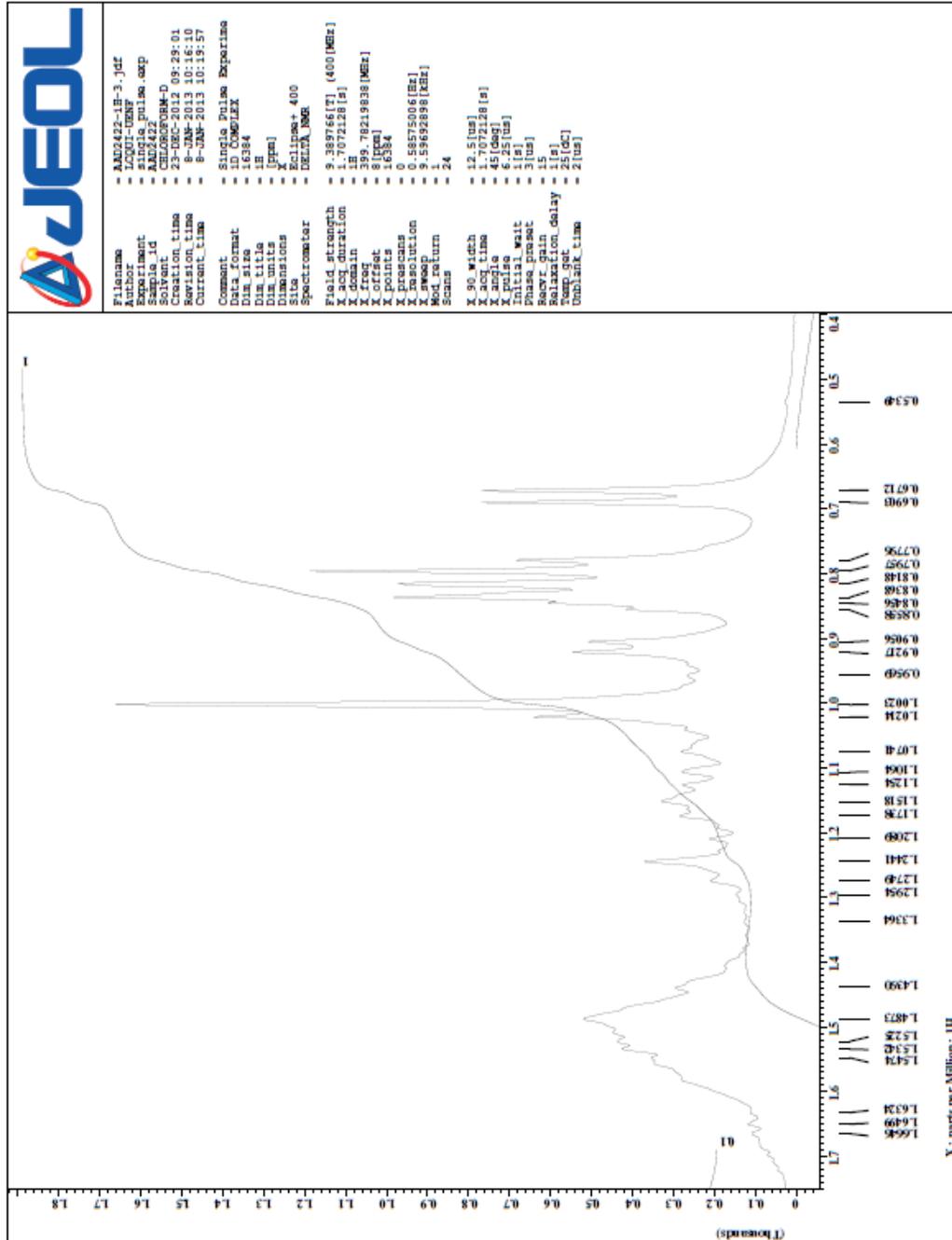
Espectro 13. Ampliação da região δ 12 – 32 do espectro de RMN ^{13}C (100 MHz) em CDCl_3 da mistura de esteróides **AAD 4-2-2-1** e **AAD 4-2-2-1-1**.



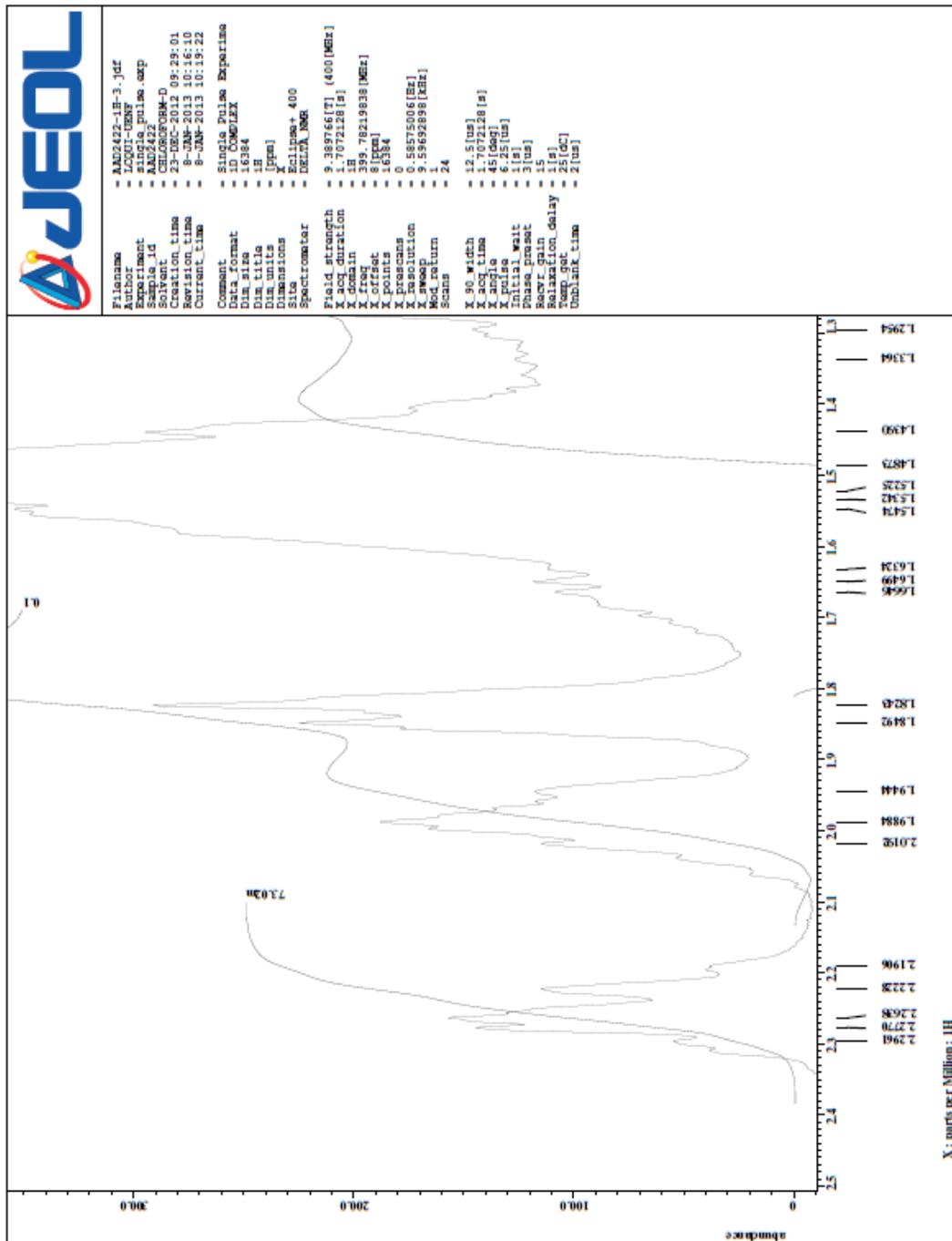
Espectro 14. Ampliação da região de δ 30 – 58 do espectro de RMN ^{13}C (100 MHz) em CDCl_3 da mistura de esteróides **AAD 4-2-2-1** e **AAD 4-2-2-1-1**.



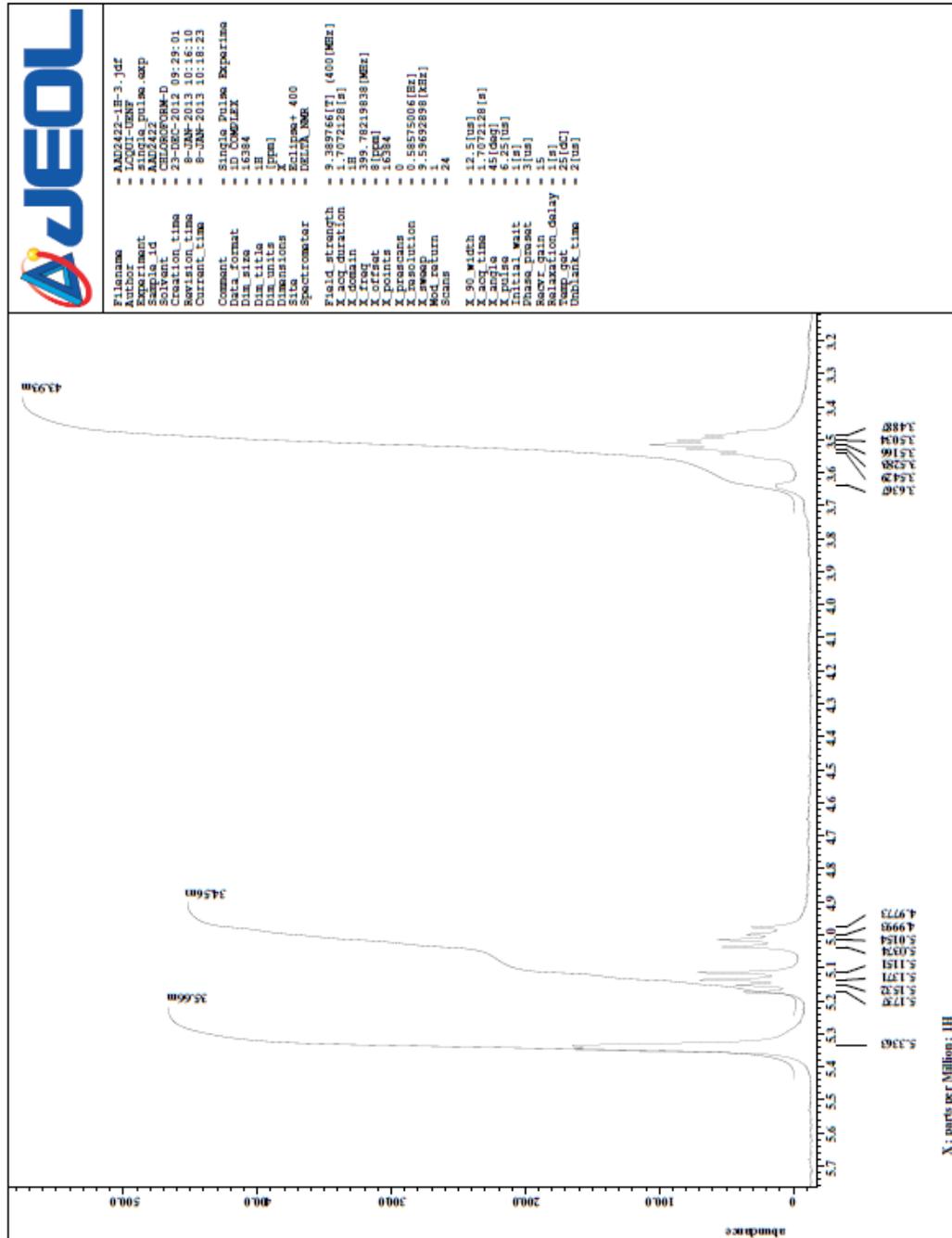
Espectro 15. Ampliação da região de δ 50 – 150 do espectro de RMN¹³C (100 MHz) em CDCl₃ da mistura de esteróides **AAD 4-2-2-1 e AAD 4-2-2-1-1**.



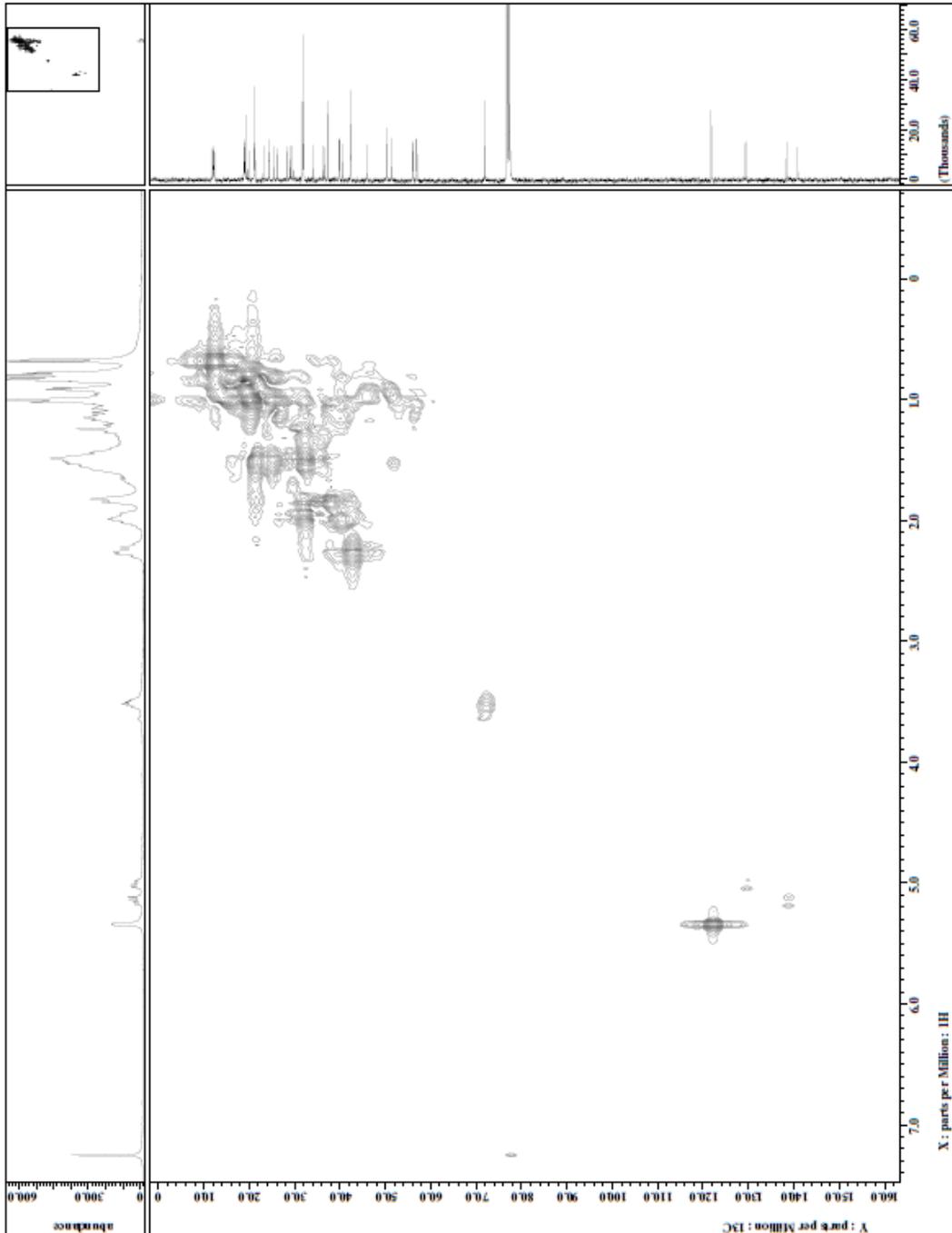
Espectro 17. Ampliação da região de δ 0,4 – 1,7 do espectro de RMN ^1H (400 MHz) em da mistura de esteróides **AAD 4-2-2-1** e **AAD 4-2-2-1-1**.



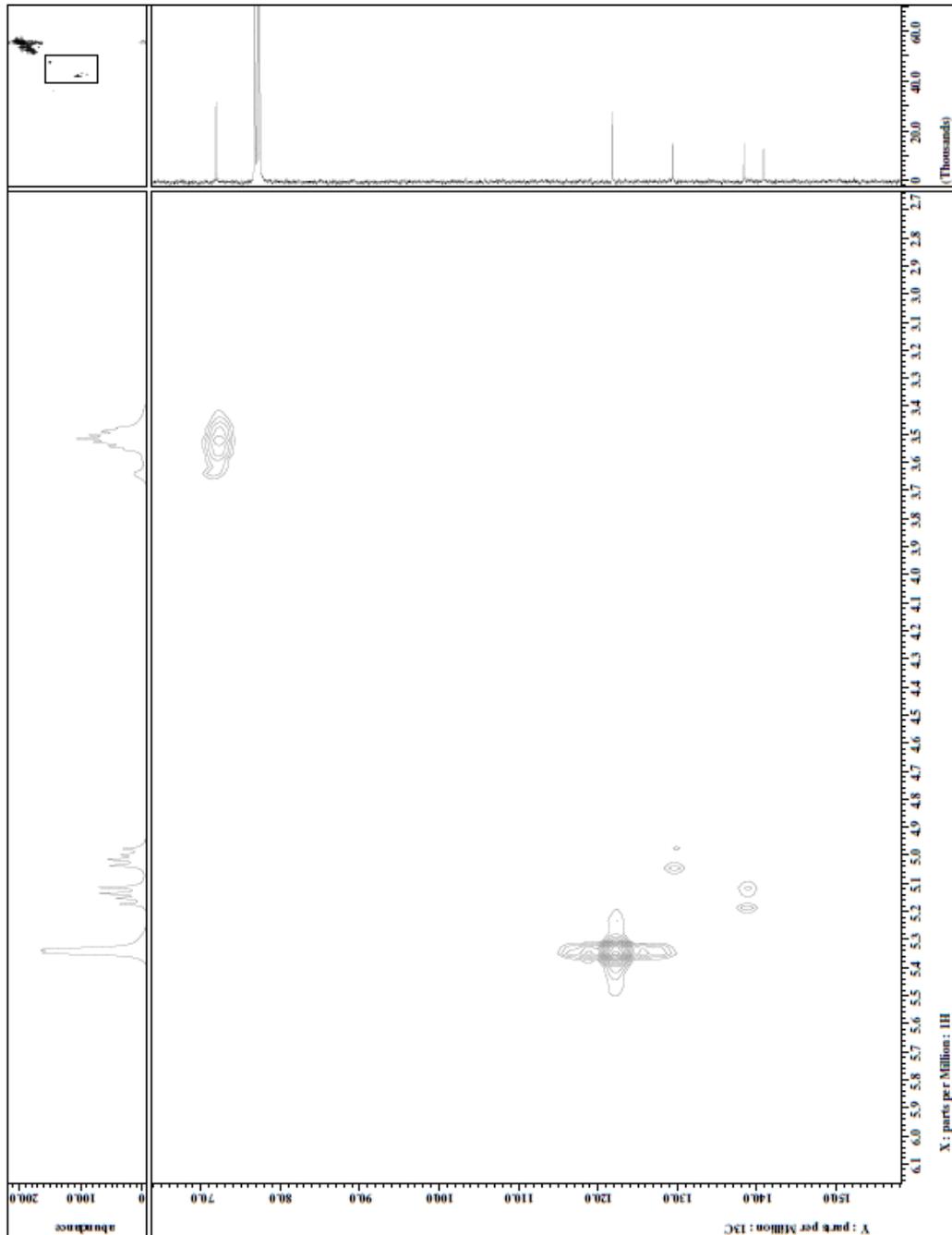
Espectro 18. Ampliação da região de δ 1,3 – 2,5 do espectro de RMN ^1H (400 MHz) em da mistura de esteróides **AAD 4-2-2-1** e **AAD 4-2-2-1-1**.



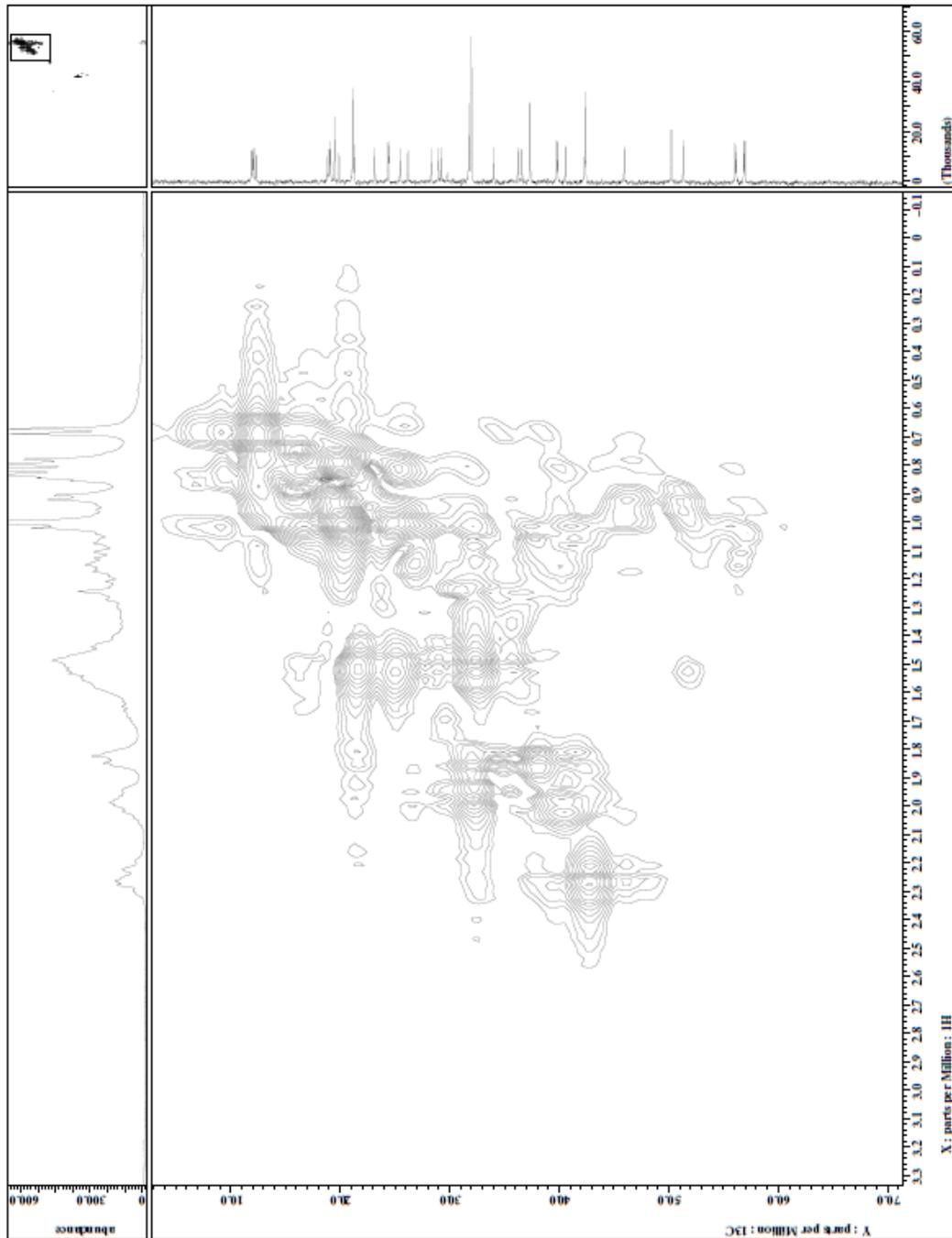
Espectro 19. Ampliação da região de δ 3,2 – 5,7 do espectro de RMN ^1H (400 MHz) em da mistura de esteróides **AAD 4-2-2-1** e **AAD 4-2-2-1-1**.



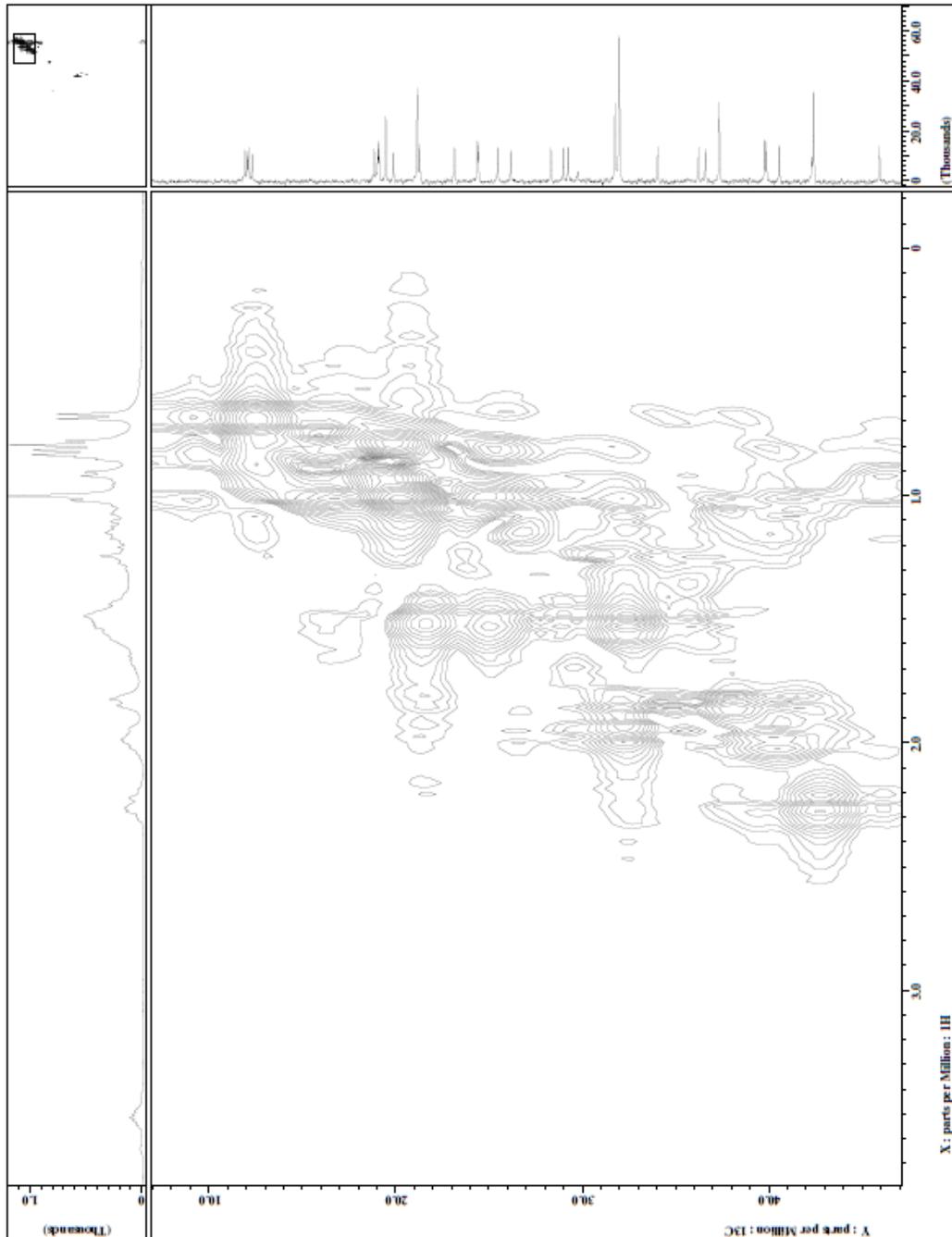
Espectro 20. Mapa de correlação heteronuclear HMQC em CDCl_3 da mistura de esteróides **AAD 4-2-2-1** e **AAD 4-2-2-1-1**.



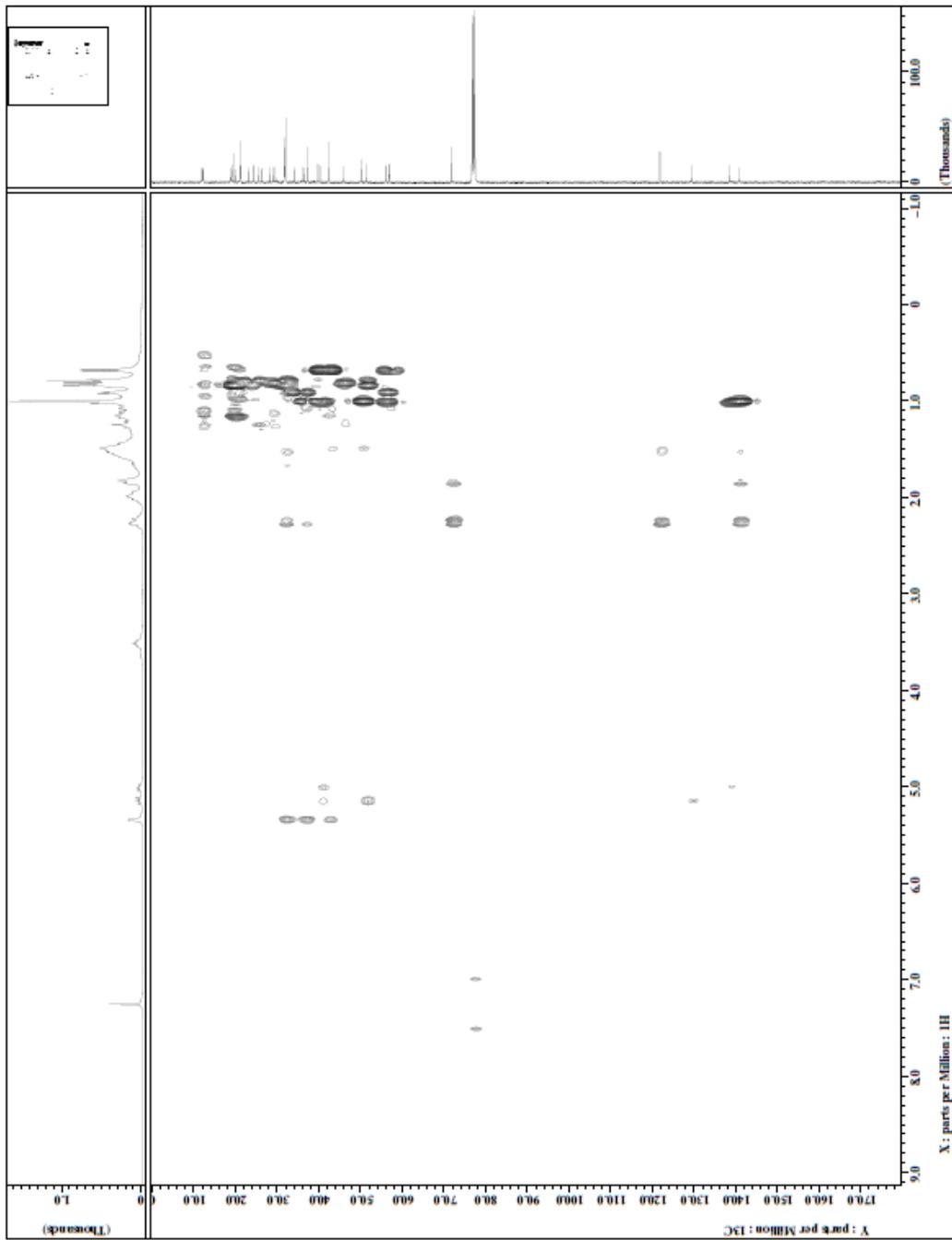
Espectro 21. Ampliação do mapa de correlação heteronuclear HMQC em CDCl_3 da mistura de esteróides **AAD 4-2-2-1** e **AAD 4-2-2-1-1**.



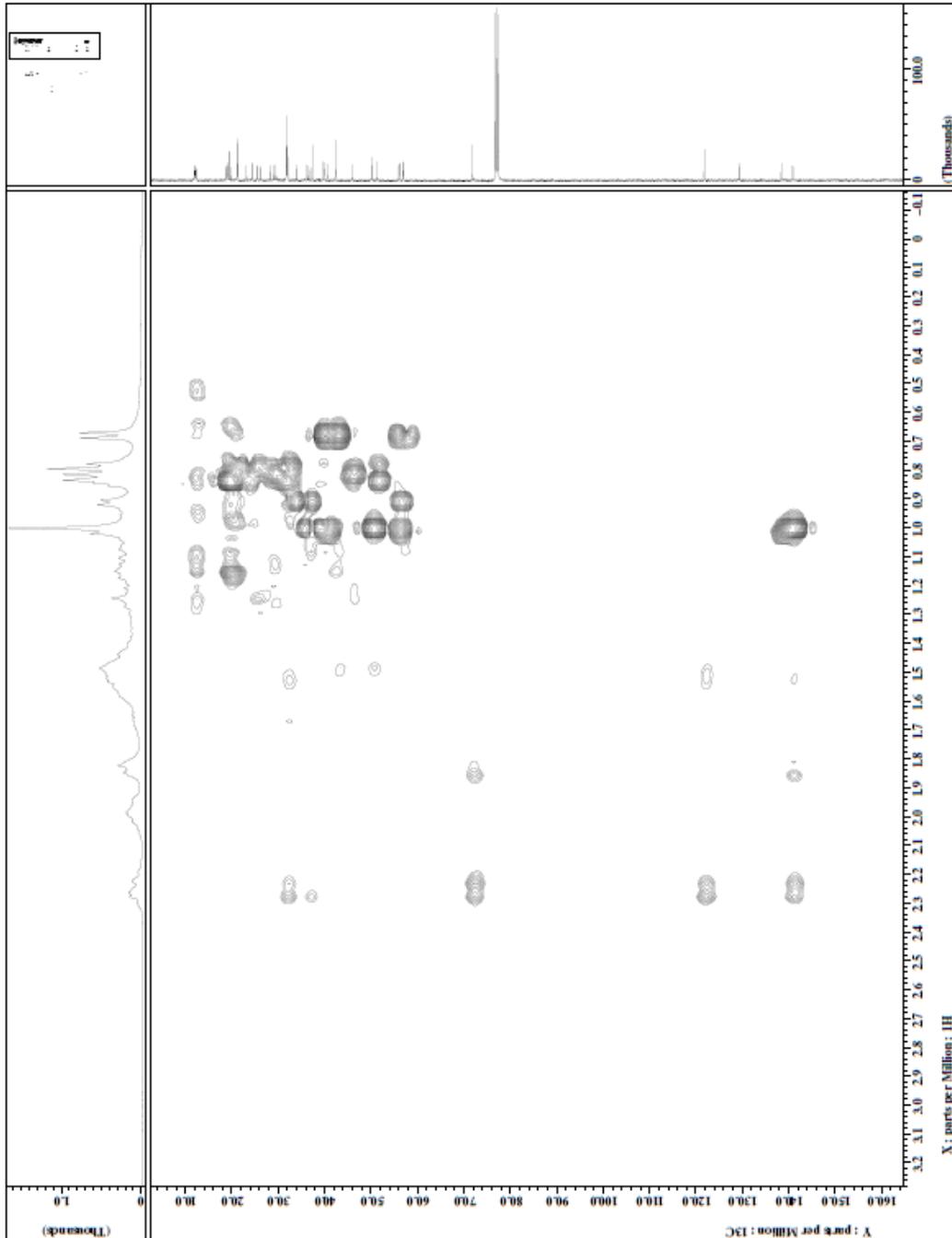
Espectro 22. Ampliação do mapa de correlação heteronuclear HMQC em CDCl_3 da mistura de esteróides **AAD 4-2-2-1** e **AAD 4-2-2-1-1**.



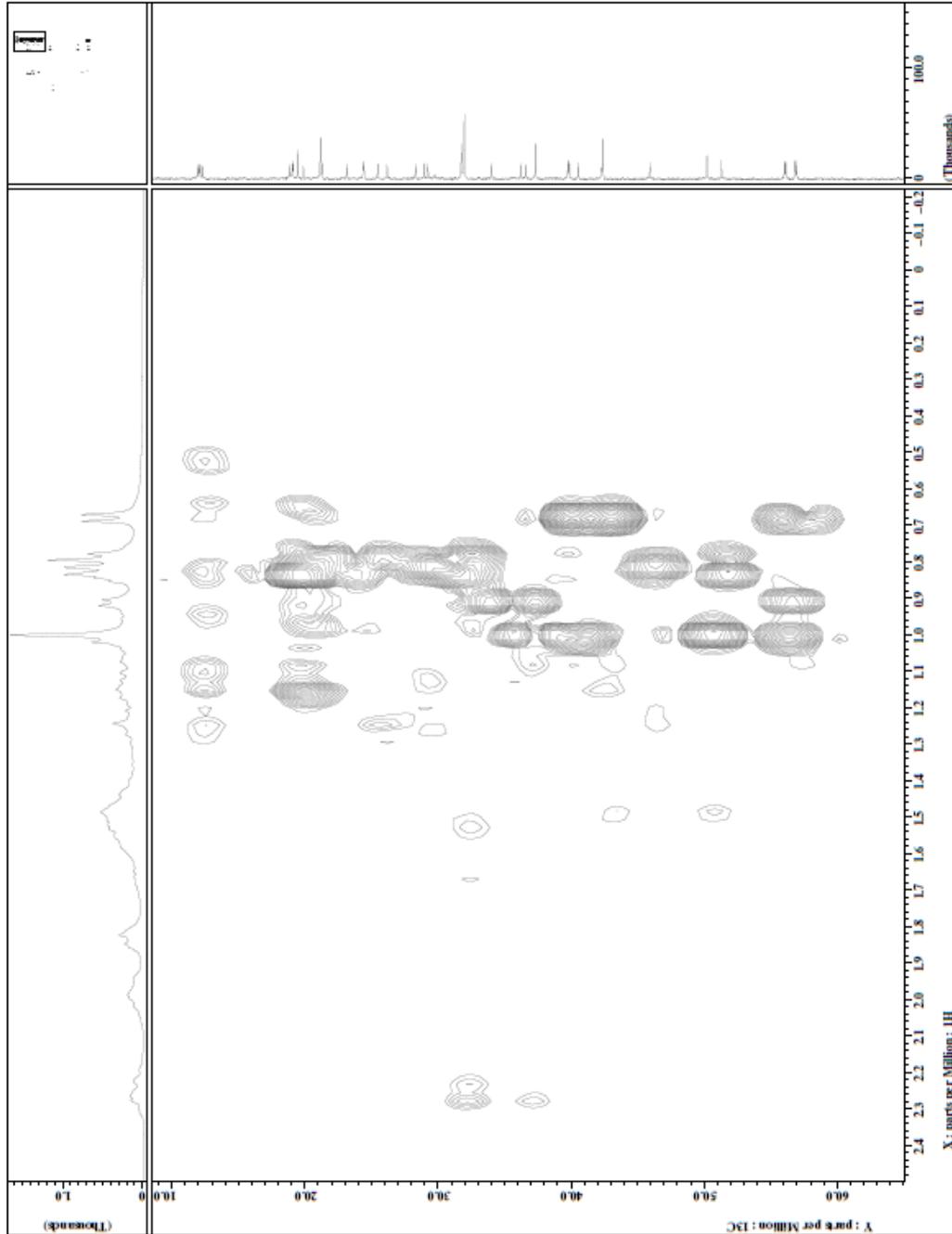
Espectro 23. Ampliação do mapa de correlação heteronuclear HMQC em CDCl_3 da mistura de esteróides **AAD 4-2-2-1** e **AAD 4-2-2-1-1**.



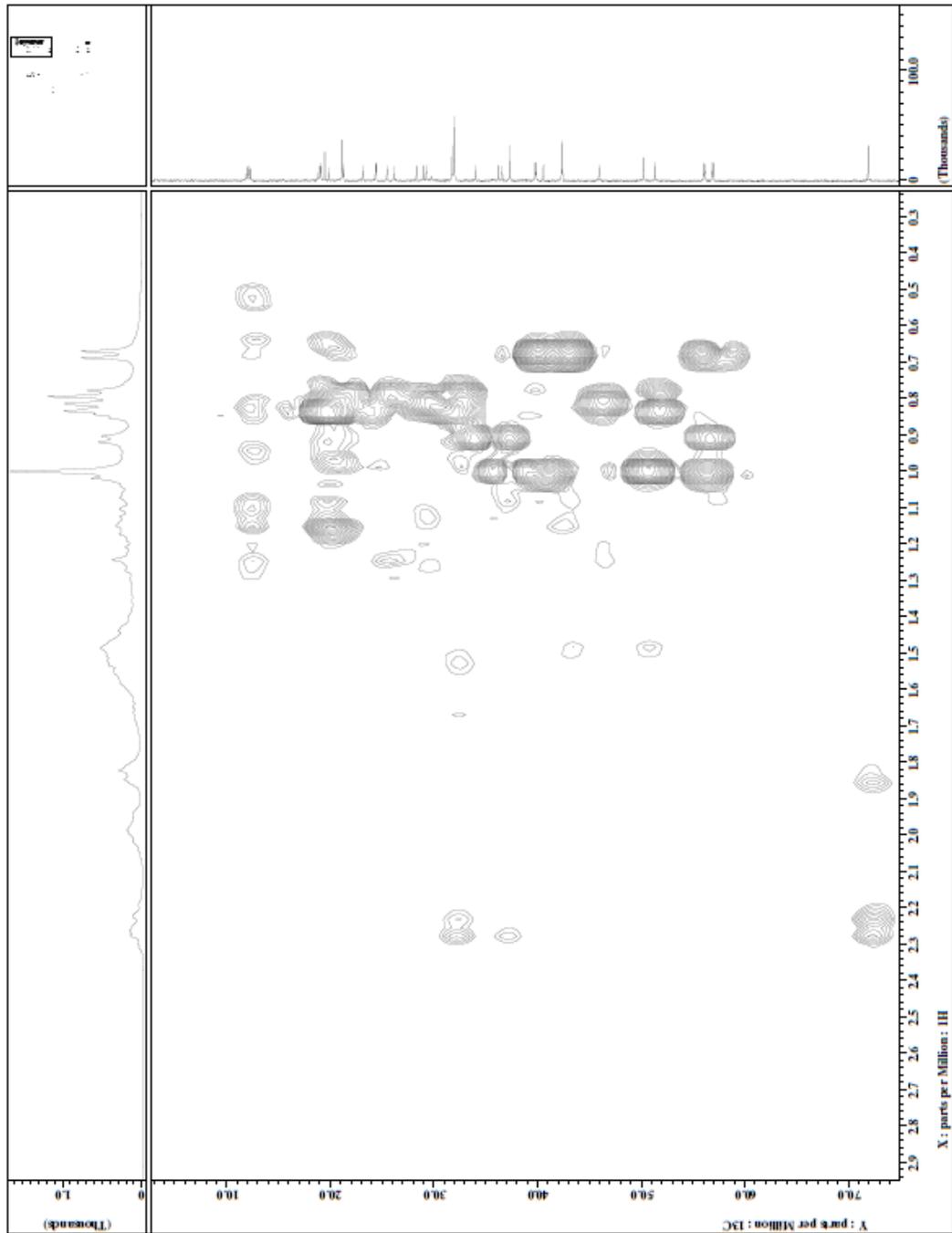
Espectro 24. Mapa de correlação heteronuclear HMBC em CDCl_3 da mistura de esteróides **AAD 4-2-2-1** e **AAD 4-2-2-1-1**.



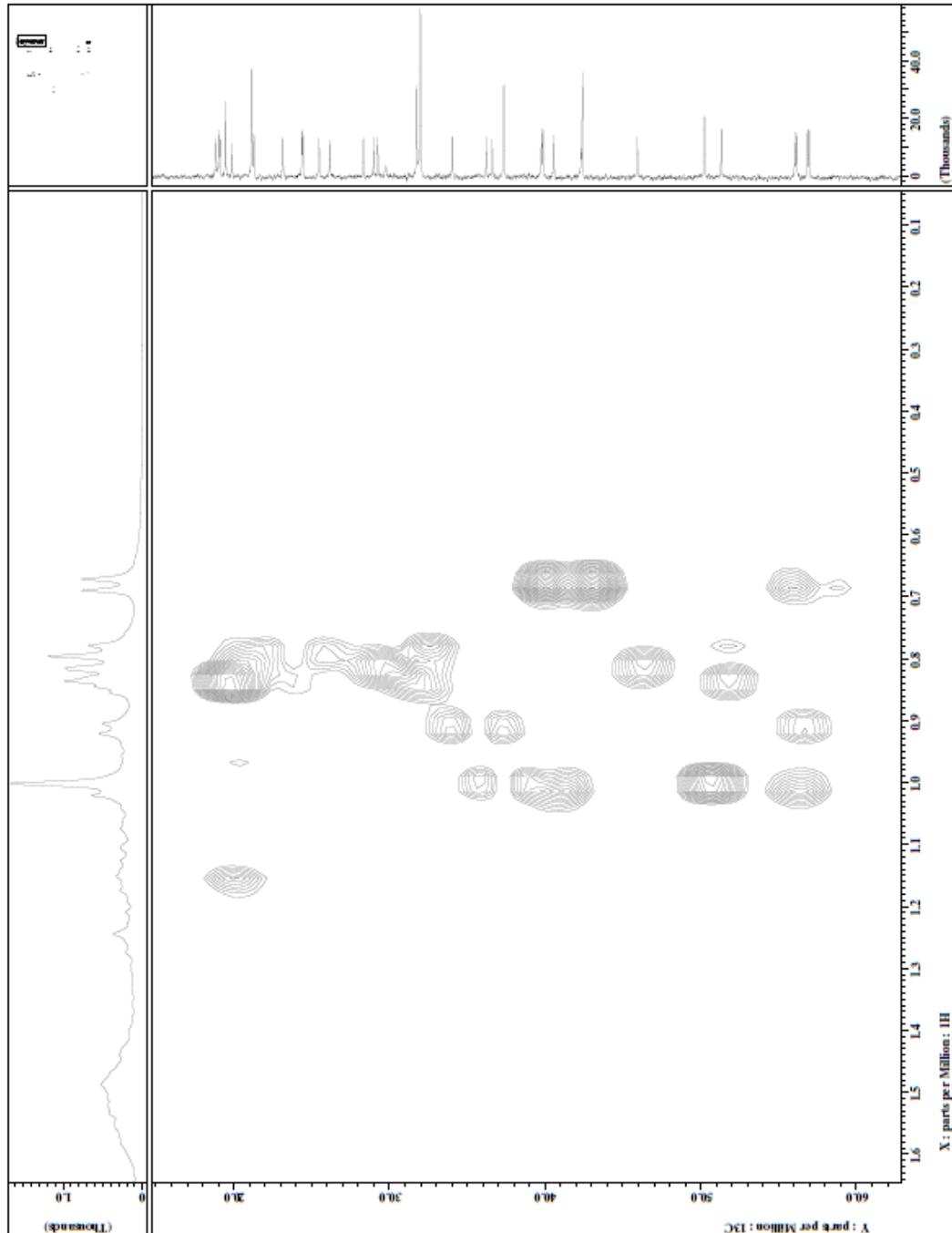
Espectro 25. Ampliação do mapa de correlação heteronuclear HMBC em CDCl_3 da mistura de esteróides **AAD 4-2-2-1** e **AAD 4-2-2-1-1**.



Espectro 26. Ampliação do mapa de correlação heteronuclear HMBC em CDCl_3 da mistura de esteróides **AAD 4-2-2-1** e **AAD 4-2-2-1-1**.



Espectro 27. Ampliação do mapa de correlação heteronuclear HMBC em CDCl_3 da mistura de esteróides **AAD 4-2-2-1** e **AAD 4-2-2-1-1**.



Espectro 28. Ampliação do mapa de correlação heteronuclear HMBC em CDCl_3 da mistura de esteróides **AAD 4-2-2-1** e **AAD 4-2-2-1-1**.

4.3.5.3 Análise dos dados obtidos por CG/EM da mistura de substâncias AAD 4-2-2-1 e AAD 4-2-2-1-1

No cromatograma obtido pela análise de CG/EM foi possível observar dois sinais, um referente ao estigmasterol com tempo de retenção de 22,50 minutos e o outro ao β -sitosterol com tempo de retenção de 23 minutos. O estigmasterol foi identificado juntamente com o esteroide β -sitosterol, sendo o estigmasterol majoritário em relação ao β -sitosterol, de acordo com a intensidade dos sinais apresentados no cromatograma (Cromatograma 2, p. 96).

O espectro de massas por impacto eletrônico (Espectro 29, p. 96) da substância **AAD 4-2-2-1** mostrou um sinal com m/z 412 daltons, que é coerente com o íon molecular do composto **AAD 4-2-2-1** (estigmasterol). Outros sinais oriundos da fragmentação dessa substância são característicos de fitoesteróides, destacando os de maior intensidade como: m/z 379; 351; 300; 271; 255 e 213 daltons (Figura 12, p. 97).

Com base nos dados espectrais foi possível propor para a substância **AAD 4-2-2-1** a fórmula molecular $C_{29}H_{48}O$ (estigmasterol). Com isso, calculou-se o índice de deficiência de hidrogênio, o qual informou o grau de insaturação presente na substância, que foi igual a seis. Como os espectros de RMN indicaram apenas duas insaturação, conclui-se que a substância apresenta quatro ciclos. Portanto, a partir da análise dos dados é possível afirmar que o composto (**AAD 4-2-2-1**) isolado do extrato diclorometânico, é o estigmasterol (24-etilcolestan-5,22-dieno-3 β -ol).

$$\text{IDH} = n^{\circ} \text{ de átomos de carbono} - (n^{\circ} \text{ átomos de hidrogênio} / 2) + 1$$

$$\text{IDH} = 29 - (48/2) + 1 = 6$$

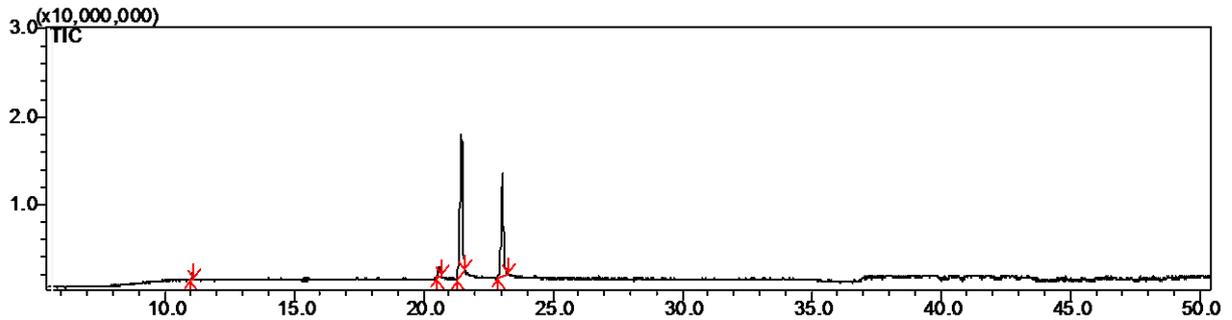
O espectro de massas por impacto eletrônico (Espectro 30, p. 97) da substância **AAD 4-2-2-1-1** mostrou um sinal com m/z 414 daltons, que é coerente o íon molecular do composto **AAD 4-2-2-1-1** (β -sitosterol). De acordo com outros sinais oriundos da fragmentação dessa substância, pode-se destacar os maior intensidade como: m/z 396; 329; 303; 255 e 213 daltons (Figura 13, p. 98).

Para o composto **AAD 4-2-2-1-1** foi possível sugerir a fórmula molecular $C_{29}H_{50}O$ (β -sitosterol). Para essa fórmula molecular tem-se um grau de insaturação igual a cinco. Como os espectros de RMN indicaram apenas a presença de uma insaturação, conclui-se que o composto apresenta quatro ciclos. Portanto, a partir da

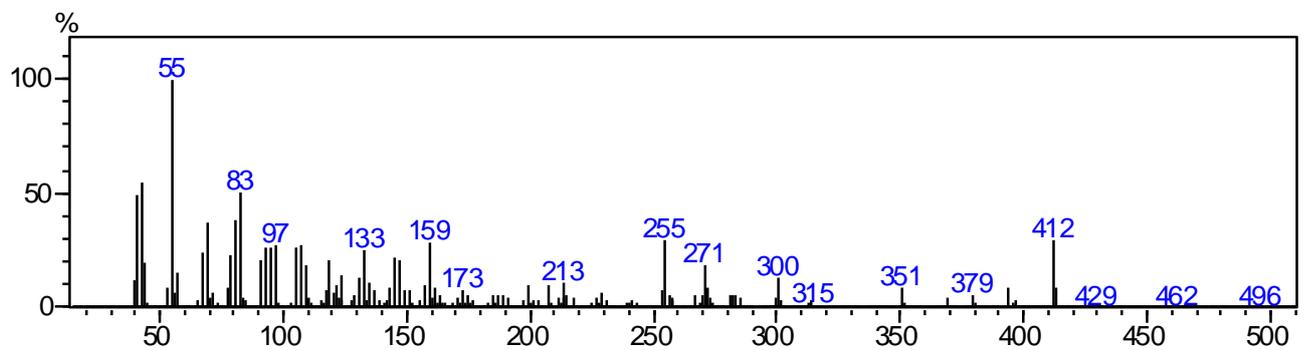
análise dos dados é possível afirmar que o composto (**AAD 4-2-2-1-1**) isolado do extrato diclorometânico, é o β -sitosterol (24-etilcolestano-5-eno-3 β -ol).

$$\text{IDH} = n^{\circ} \text{ de átomos de carbono} - (n^{\circ} \text{ átomos de hidrogênio} / 2) + 1$$

$$\text{IDH} = 29 - (50/2) + 1 = 5$$



Cromatograma 2. Cromatograma da mistura de fitoesteróides.



Espectro 29. Espectro de massas do esteróide **AAD 4-2-2-1** (estigmasterol).

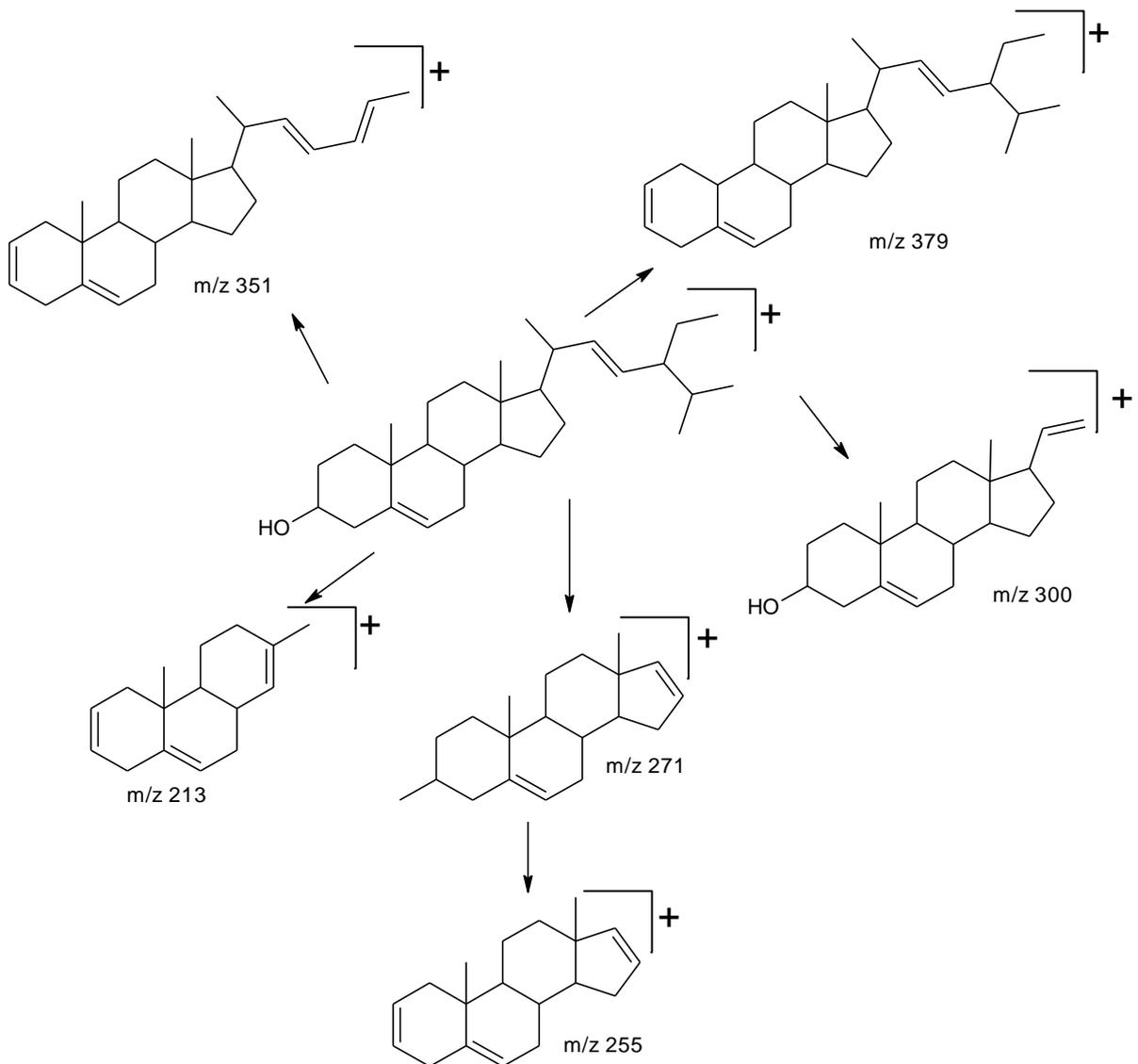
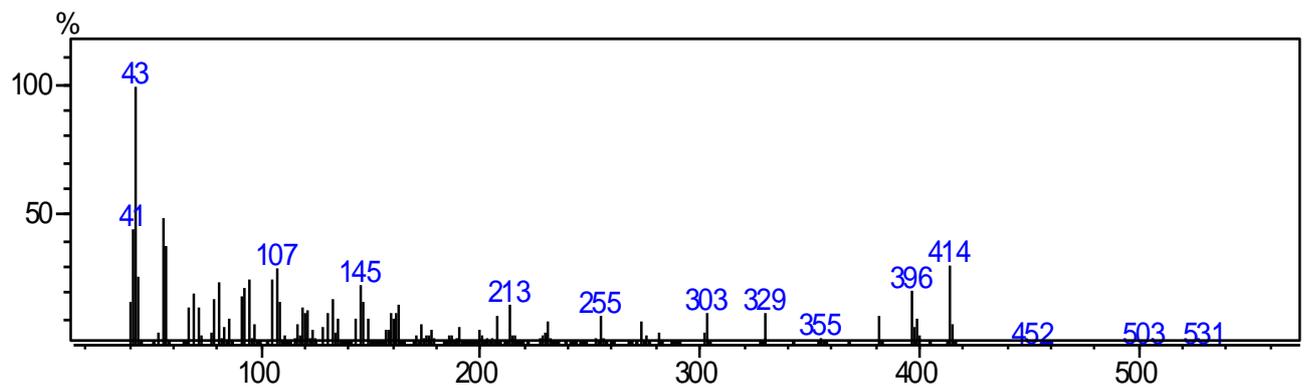


Figura 12. Proposta da fragmentação do esteróide **AAD 4-2-2-1** (estigmasterol).



Espectro 30. Espectro de massas do esteróide **AAD 4-2-2-1-1** (β -sitosterol).

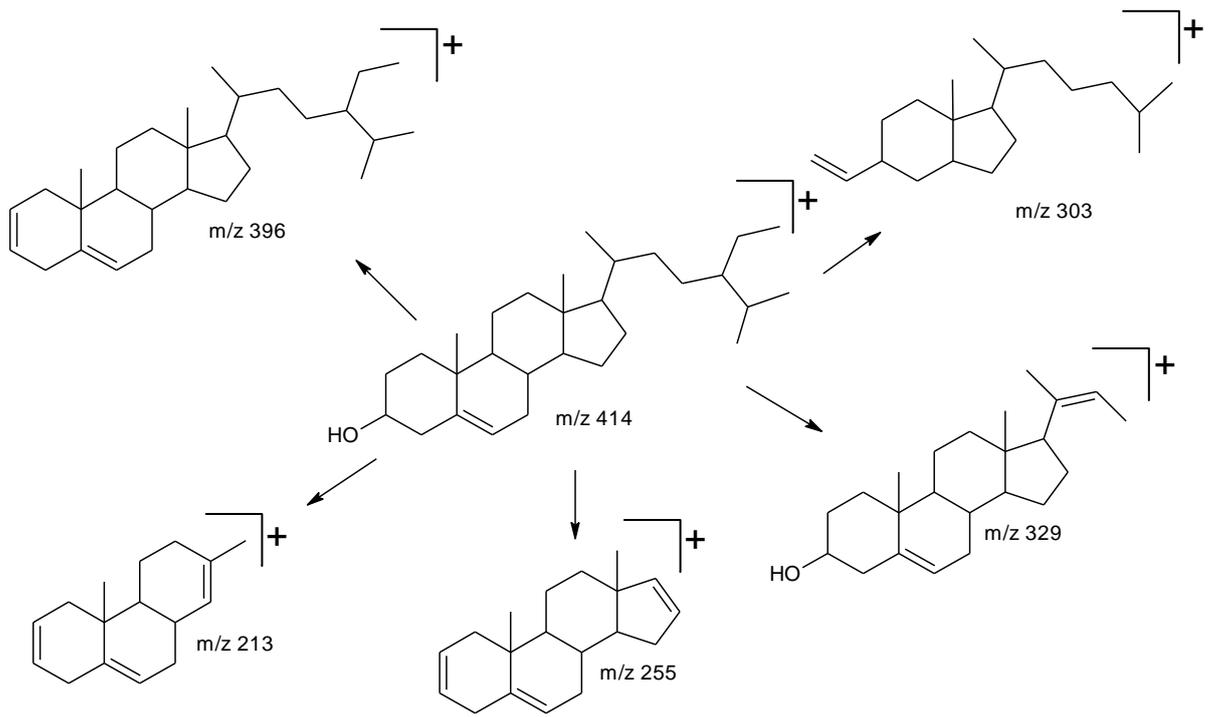


Figura 13. Proposta da fragmentação do esteróide AAD 4-2-2-1-1 (β -sitosterol).

5 CONCLUSÃO

O estudo fitoquímico da espécie *Ampelozizyphus amazonicus* mostrou, até presente momento, que esta é rica em metabólitos secundários provenientes da rota biossintética dos terpenos, como os triterpenóides e os esteróides.

Os testes realizados confirmaram a presença de triterpenos, esteróides e saponinas na espécie, confirmando o posicionamento quimiosistemático da espécie *Ampelozizyphus amazonicus* na família Rhamnaceae.

Do extrato em diclorometano das folhas foram isolados um triterpenóide (lupeol - AAD 3-1) e dois fitoesteróides (estigmasterol - AAD 4-2-2-1 e o β -sitosterol - AAD 4-2-2-1-1) que geralmente apresentam-se em mistura. Essas substâncias foram confirmadas a partir da análise em espectroscopia de RMN ^{13}C e ^1H uni e bidimensionais, e espectroscopia de massas.

A partir dos resultados obtidos ressalta-se a importância em prosseguir nos estudos da composição química da espécie *Ampelozizyphus amazonicus* e a realização de testes biológicos com os extratos obtidos em busca do conhecer o seu potencial bioativo.

REFERÊNCIAS

- AGUIAR, R. M.; DAVID, J. P.; DAVID, J. M. Unusual naphthoquinones, catechin and triterpene from *Byrsonima microphylla*. **Phytochemistry**, Europa, v. 66, p. 2388–2392, 2005.
- ALMEIDA, M. M. B.; ARRIAGA, A. M. C.; DOS SANTOS, A. K. L.; LEMOS, T. L. G.; BRAZ-FILHO, R.; VIEIRA, I. J. C. A ocorrência e atividade biológica de quassinóides da última década – Revisão. **Química Nova**, São Paulo, v. 30, n. 4, p. 935-951, 2007
- ANDRADE-NETO, V. F.; BARNDÃO, M. G. L.; NOGUEIRA, F.; ROSÁRIO, V. E.; KRETTLI, A. U. *Ampelozizyphus amazonicus* Ducke (Rhamnaceae), a medicinal plant used to prevent malaria in the Amazon Region, hampers the development of *Plasmodium berghei* sporozoites. **Internation journal for parasitology**, v. 38, p. 1505-1511, 2008.
- BARREIRO, E. J.; BOLZANI, V. S. Biodiversidade: fonte potencial para a descoberta de fármacos. **Química Nova**, São Paulo, v. 32, n. 3, pp. 679-688, 2009.
- BARROSO, G M.; PEIXOTO, A. L.; COSTA, C. G.; ICHASO, C. L. F.; GIMARÃES, E. F.; LIMA, H. C. **Sistemática de angiospermas do Brasil**. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa Imprensa Universitária, 1991, v. 2, 337p.
- BHATTACHARYYA, J.; BARROS, C. B. Triterpenoids of *cnidosculas urens*. **Phytochemistry**, Europa, v. 25, p. 274-276, 1986.
- BRANDÃO, M. G. L.; DUBOIS, M. A. L.; TEIXEIRA, M. A.; WAGNER, H. Triterpene saponins from the roots of *Ampelozizyphus amazonicus*. **Phytochemistry**, Europa, v. 32, p. 352-354, 1992.
- BRANDÃO, M. G. L.; DUBOIS, M. A. L.; TEIXEIRA, M. A.; WAGNER, H. Dammarane-type saponina from the roots of *Ampelozizyphus amazonicus*. **Phytochemistry**, Europa, v. 34, p. 1123-1127, 1993.
- BRAZ FILHO, R. Contribuição da fitoquímica para desenvolvimento de um país emergente – Assuntos Gerais. **Química Nova**, São Paulo, v. 33, n. 1, p. 229-239, 2010.
- BREMER, B.; BREMER, K. CHASE, M. W.; FAY, M. F.; REVEAL, J. L.; SOLTIS, D. E.; SOLTIS, P. S. STEVENS, P. F. An update of the Angiosperm Phylogeny Group

classification for the orders and families of flowering plants: APG III. **Botanical Journal of the Linnean Society**, Londres, v. 161, p. 105-121, 2009.

CARVALHO, M. G.; VELANDIA, J. R.; OLIVEIRA, L. F.; BEZERRA, F. B. Triterpenos isolados da *Eschweilera longipes* miers (Lecythidaceae). **Química Nova**, São Paulo, v. 21, n. 6, p. 740-743, 1998.

CASSELS, B. K.; ASECIO, M. Anti-HIV activity of natural triterpenoids and hemisynthetic derivatives 2004–2009. **Phytochem Rev**, v. 10, n. 545-564, 2011.

COSTA, A. F. **Farmacognosia**. 5. ed. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 2002, v. 2, 338p.

CRONQUIST, A. The evolution and classification of flowering plants. **The New York Botanical Garden**, Bronx, 2 ed, p. 1-7, 1988.

DEWICK, P. M. **Medicinal Natural Products: a biosynthetic approach**. 3rd ed. John Wiley & Sons 2008, 539p.

DINIZ, L. R. L.; SANTANA, C. P.; RIBEIRO, A. P. A. F.; PORTELLA, V. G.; PACHECO, L. F.; MEYER, N. B.; CÉSAR, I. C.; COSENZA, G. P.; BRANDÃO, M. G. L.; VIEIRA, M. A. R. Effect of triperpene saponins from roots of *Ampelozizyphus* Ducke on diuresis in rats. **Journal of ethnopharmacology**, v. 123, p. 275-279, 2009.

FORZZA, R. C.; BAUMGRATZ, J. F. A.; BICUDO, C. E. M.; CARVALHO, A. A. C. J.; COSTA, A.; COSTA, D. P.; HOPKINS, M.; LEITMAN, P. M.; LOHMANN, L. G.; MAIA, L. C.; MARTINELLI, G.; MENEZES, M.; MORIM, M. P.; COELHO, M. A. N.; PEIXOTO, A. L.; PIRANI, J. R.; PRADO, J.; QUEIROZ, L. P.; SOUZA, V. C.; STEHMANN, J. R.; SYLVESTRE, L. S.; WALTER, B. M. T.; ZAPPI, D. **Catálogo de plantas e fungos do Brasil**. Rio de Janeiro: Andrea Jakobsson Estúdio: Instituto de Pesquisas Jardim Botânico do Rio de Janeiro, 2010, v. 2, 1699p.

FREIRE, E. O. L.; AZEVEDO, R. A. Salva-guarda do acervo documental da Reserva Florestal Ducke – Manaus-AM: registros de uma experiência. **Ciência da informação**, Brasília, v. 39, n. 2, p. 101-114, 2010.

JOLY, A. B. **Botânica introdução à taxonomia vegetal**. 13. ed. São Paulo: Companhia editora nacional 1991, v. 4, 777p.

Kaur, N.; Chaudhary J.; Jain, A.; Kishore, L. Stigmasterol: a comprehensive review. **International journal of pharmaceutical sciences and research**, v. 2, n. 9, p. 2259-2265, 2011.

KELLERMANN, J. Robert Brown's contributions to Rhamnaceae Systematics. **Telopea**, Australia, v. 10, n. 2, p. 515-524, 2004.

KRETTLI, A. U.; ADRADE-NETO, V. F.; BRANDÃO, M. G. L.; FERRARI, W. M. S. The search for new antimalarial drugs from plants used to treat fever and malaria or plants randomly selected a review. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 96, n. 8, p. 1033-1042, 2001.

LIMA, R. B. Flora da reserve Ducke, Amazonas, Brasil: Rhamnaceae. **Rodriguésia**, Rio de Janeiro, v. 57, n. 2, p. 247-249, 2006.

LIMA, R.B. *Rhamnaceae in Lista de Espécies da Flora do Brasil*. Jardim Botânico do Rio de Janeiro, 2012. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/2012/FB079668>>. Acesso em: 03 ago. 2012.

LIMA, R. B.; GIULIETTI, A. M. Rhamnaceae no Semi-árido Brasileiro. In: QUEIROZ, L. P.; RAPIPI, A.; GIULIETTI, A. M. (Org.) **Rumo ao Amplo Conhecimento da Biodiversidade do Semi-árido Brasileiro**. 3ª seção Universidade Estadual de Feira de Santana, 2008, Cap. 13. Disponível em: <<http://www.uefs.br/ppbio/cd/portugues/capitulo13.htm>>. Acesso em: 03 ago. 2012.

LOPES, G. A. D.; FELICIANO, L. M.; DINIZ, R. E. S.; ALVES, M. J. Q. F. Plantas medicinais: indicação popular de uso no tratamento de hipertensão arterial sistêmica (HAS). **Revista Ciência em extensão**, v. 6, n. 2, p. 143-155, 2010.

LOPEZ, A. HUDSON, J. B.; TOWERS, G. H. N. Antiviral and antimicrobial activities of Colombian medicinal plants. **Journal of ethnopharmacology**, v. 77, p. 189-196, 2001.

MATOS, F. J. A. **Introdução à fitoquímica experimental**. 2. ed. Fortaleza/ Ceará: Ed. da UFC 1997, 139p.

MEIER, W.; BERRY, P. E. *Ampelozizyphus guaquirensis* (Rhamnaceae), a new tree species endemic to the Venezuelan Coastal Cordillera. **The New York Botanical Garden**, Bronx, v. 60, n. 2, p. 131-135, 2008.

MISSOURI BOTANICAL GARDEM – MBG. **Rhamnaceae**, 04 mai. 2012. Disponível em: <<http://www.mobot.org/mobot/research/apweb/orders/rosalesweb.htm#Rhamnaceae>>. Acesso em: 04 ago. 2012.

OLEA, R. S. G.; ROQUE, N. F. Análise de misturas de triterpenos por RMN de ¹³C. **Química Nova**, São Paulo, v. 13, n. 4, p. 278-281, 1990.

OLIVEIRA, D. R.; COSTA, A. L. M.; LEITÃO, G. G.; CASTRO, N. G.; SANTOS, J. P.; LEITÃO, S. G. Estudo etnofarmacognóstico da saracuramirá (*Ampelozizyphus amazonicus* Ducke), uma planta medicinal usada por comunidades quilombolas do município de Oriximiná-PA, Brasil. **Acta Amazonica**, Amazônia, v. 41, n. 3, p. 383-392, 2011.

Ovesna, Z.; Vachalkova, A.; Horvathova, K. Taraxasterol and β -sitosterol: new naturally compounds with chemoprotective/chemopreventive effects: minireview. **Neoplasma**, v. 51, p. 407-414, 2004.

PASSOS, C. S.; ARBO, M. D.; RATES, S. M. K.; POSER, G. L. Terpenóides com atividade sobre o Sistema Nervoso Central (SNC) – Revisão. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, Curitiba, v. 19, n. 1A, p. 140-149, 2009.

PINTO, A. C.; SILVA, D. H. S.; BOLZANI, V. S.; LOPES, N. P.; EPIFANIO, R. A. Produtos naturais: atualidades, desafios e perspectivas – PN. **Química Nova**, São Paulo, v. 25, n. 1, p. 45-61, 2002.

PIZZIOLO, V. R.; BRASILEIRO, B. G.; OLIVEIRA, T. T.; NAGEM, T. J. Plantas com possível atividade hipolipidêmica: uma revisão bibliográfica de livros editados no Brasil entre 1998 e 2008 – Revisão. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v. 13, n. 1, p. 98-109, 2011.

RICHARDSON, J. E.; FAY, M. F.; CRONK, Q. C. B.; BOWMAN, D.; CHASE, M. W. A phylogenetic analysis of Rhamnaceae using RBCL and TRNL-F plastid DNA sequences. **American Journal of Botany**, St. Louis, v. 89, n. 9, p. 1309-1324, 2000.

ROBBERS, J. E.; SPEEDIE, M. K.; TYLER, V. E. **Farmacognosia e farmacobiotecnologia**. São Paulo: Ed. Premier, 1997, 372p.

RODRIGUES, E. Plants and animals utilized as medicines in the Jaú National Park (JNP), Brazilian amazon. **Phytotherapy research**, v. 20, p. 378-391, 2006.

RODRIGUES, E.; ALMEIDA, J. M. D.; PIRES, J. M. Perfil farmacológico e fitoquímico de plantas indicadas pelos cablocos do parque Nacional do Jaú (AM) como potenciais analgésicos. Parte I. **Revista brasileira da farmacognosia**, Curitiba, v. 20, n. 6, p. 981-991, 2010.

RODRIGUES, V. F. **Constituintes químicos de *Trichilia quadrijuga* (Meliaceae)**. Campos dos Goytacazes, RJ. Dissertação de mestrado em Produção Vegetal, Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, 2009, 303f.

ROSAS, L. V.; CARDEIRO, M. S. C.; CAMPOS, F. R.; JANUÁRIO, A. H.; FRANÇA, S. C.; NOMIZO, A.; TOLDO, M. P. A.; ALBUQUERQUE, S.; PEREIRA, P. S.; *In vitro* evaluation of the cytotoxic and trypanocidal activities of *Ampelozizyphus amazonicus* (Rhamnaceae). **Brazilian journal of medical and biological research**, v. 40, n. 5, p. 663-670, 2007.

SANTOS, F. M.; SIMÕES, J. C.; SILVA, J. R. A.; BARTHUS, R. C.; POPPI, R. J.; AMARAL, A. C. F. Otimização das condições de extração de saponinas em *Ampelozizyphus amazonicus* usando planejamento experimental e metodologia de superfície de resposta – Nota Técnica. **Química Nova**, São Paulo, v. 34, n. 9, p. 1629-1633, 2011.

SCUDELLER, V. V.; VEIGA, J. B.; ARÚJO-JORGE, L. H. Etnoconhecimento de plantas de uso medicinal nas comunidades São João do Tupé e Central (Reserva de desenvolvimento sustentável do Tupé). In: SANTOS-SILVA, E. N.; SCUDELLER V. V. (Org.) **Diversidade biológica e sociocultural do baixo Rio Negro**, v. 2, Manaus: UED Edições, 2009, cap. 15, p.185-198.

SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia da planta ao medicamento**. Porto Alegre/Florianópolis: Ed. Universidade/UFRGS / Ed. da UFSC, 1999, 597p.

SOUZA, V. C.; LORENZI, H. **Botânica sistemática: guia ilustrado para identificação das famílias de Angiospermas da flora brasileira, baseado no APG II**. Nova Odessa, SP: Instituto Plantarum, 2005, 640p.

VALENTE, L. M. M. Curcubitacinas e suas principais características estruturais – Revisão. **Química Nova**, São Paulo, v. 27, n. 6, p. 944-948, 2004.

VEIGA Jr, V. F.; PINTO, A. C.; MACIEL, M. A. M. Plantas medicinais: cura segura? **Química Nova**, São Paulo, v. 28, n. 3, p. 519-528, 2005.

VIEGAS Jr, C.; BOLZANI, V. S.; BARREIRO, E. J. Os produtos naturais e a química medicinal moderna. **Química Nova**, São Paulo, v. 29, n. 2, p. 326-337, 2006.

ZANON, R. B. **Metabólitos secundários em *Vernonia tweedieana baker***. Santa Maria, RS. Dissertação de mestrado em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Santa Maria, 2006, 180f.

ZHANG, L.; ZHANG, Y. Anticancer effect of lupeol, a triterpene. **General Review Journal**, v. 39, p. 113 - 116, 2012.

