

**PROSPECÇÃO QUÍMICA E BIOLÓGICA DO ESTRATO ARBÓREO DA MATA
DO BOM JESUS (CAMPOS DOS GOYTACAZES): UMA CONTRIBUIÇÃO AO
ESTUDO DA ESPÉCIE *Parapiptadenia pterosperma* (benth.) Brenan
(FABACEAE)**

ROBERTA FERREIRA NAGIPE DA SILVA

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE DARCY RIBEIRO

CENTRO DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA

CAMPOS DOS GOYTACAZES - RJ

FEVEREIRO-2011

**PROSPECÇÃO QUÍMICA E BIOLÓGICA DO ESTRATO ARBÓREO DA MATA
DO BOM JESUS (CAMPOS DOS GOYTACAZES): UMA CONTRIBUIÇÃO AO
ESTUDO DA ESPÉCIE *Parapiptadenia pterosperma* (Benth) Brenan
(FABACEAE)**

ROBERTA FERREIRA NAGIPE DA SILVA

**Dissertação de Mestrado
apresentada ao curso de Pós-
Graduação de Ciências Naturais do
Centro de Ciências e Tecnologia
da Universidade Estadual do Norte
Fluminense, como parte das
exigências para obtenção do título
de Mestre em Ciências Naturais.**

Orientadora: Leda Mathias

CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ

Fevereiro-2011

**PROSPECÇÃO QUÍMICA E BIOLÓGICA DO ESTRATO ARBÓREO DA MATA
DO BOM JESUS (CAMPOS DOS GOYTACAZES): UMA CONTRIBUIÇÃO AO
ESTUDO DA ESPÉCIE *Parapiptadenia pterosperma* (Benth.) Brenan
(FABACEAE)**

ROBERTA FERREIRA NAGIPE DA SILVA

**Dissertação de Mestrado
apresentada ao curso de Pós-
Graduação de Ciências Naturais do
Centro de Ciências e Tecnologia
da Universidade Estadual do Norte
Fluminense, como parte das
exigências para obtenção do título
de Mestre em Ciências Naturais.**

COMISSÃO EXAMINADORA:

Prof^a. Leda Mathias (Doutora em Química de Produtos Naturais) - UENF

Prof^a. Ana Brígida Soares (Doutora em Ciências Naturais) - IFES

Prof. Carlos Roberto Ribeiro Matos (Doutor em Química Orgânica) - UENF

Prof. Edmilson José Maria (Doutor em Química Orgânica) - UENF

Talvez não tenhamos conseguido fazer o melhor, mas lutamos para que o melhor fosse feito. Não somos o que deveríamos ser, não somos o que iremos ser, mas graças a Deus não somos o que éramos.

Martin Luther King

Dedico este trabalho a minha família e em especial aos meus pais, as pessoas mais importantes da minha vida e os meus grandes incentivadores.

AGRADECIMENTOS

A Deus pelo dom da vida e por me dar paciência e sabedoria para a condução deste trabalho.

Aos meus pais, Paulo e Maria pelo amor incondicional, incentivo e apoio. Por me ensinarem a ser persistente e a ser fiel aos princípios que me foram passados. Aos meus irmãos, Lorrant e Maíra por todo carinho e compreensão.

Ao Leandro, meu namorado, por seu companheirismo e pelas palavras de incentivo nos momentos mais difíceis.

A Universidade Estadual do Norte Fluminense e ao Programa de Pós-graduação em Ciências da Natureza.

A professora Leda Mathias pelos valiosos ensinamentos, que contribuíram para o meu conhecimento.

Ao professor Carlos Matos pela preciosa contribuição.

Ao professor Raimundo Braz pela colaboração.

A técnica Maristela pela gentileza e atenção.

A amiga Elaine pelas altas dicas.

Aos amigos que compõe o grupo de pesquisas de produtos naturais e que tornam nossa rotina mais prazerosa, em especial aos meus grandes amigos Fernanda e Rennê, por todo apoio e companheirismo.

Ao CNPQ pelo auxílio financeiro.

Enfim agradeço a todos que de alguma forma estiveram presente e que me auxiliaram a concluir esta etapa.

RESUMO:

SILVA, Roberta Ferreira Nagipe da; Universidade Estadual do Norte Fluminense – Darcy Ribeiro; fevereiro de 2011; Prospecção Química e Biológica do estrato arbóreo da Mata do Bom Jesus (Campos dos Goytacazes) : Uma contribuição ao estudo da espécie *Parapiptadenia pterospema* Benth (Fabaceae); Orientadora: Leda Mathias.

O Bioma Mata Atlântica possui uma grande variedade de espécies vegetais ricas em substâncias químicas de interesse, estas encontradas em diferentes teores em folhas, frutos, caules, raízes e sementes.

No presente trabalho foi realizada uma prospecção química e biológica da espécie *Parapiptadenia pterosperma* (Fabaceae) conhecida popularmente como monjolo branco.

O estudo fitoquímico dos extratos do caule de um espécime de *P.p* coletada na mata do Bom Jesus, Campos dos Goytacazes (RJ) em abril de 2008, conduziu ao isolamento e a identificação de diferentes metabólitos especiais. Do extrato hexânico foram identificados: dois terpenenóides, friedelina e lupeol, três esteróides: campesterol, estigmasterol, sitosterol, um álcool, Eicosan-1-ol e uma cetona, 6,10,14-trimetilpentadecan-2-ona. Do extrato em clorofórmio foram identificados os triterpenos: epifriedelanol e quantidades adicionais de friedelina. Do extrato metanólico foram identificados: epifriedelanol e os derivados acetilados da amirina, lupeol, campesterol, sitosterol e estigmasterol.

A determinação estrutural das substâncias foi realizada através de técnicas de RMN ¹H e ¹³C a uma e duas dimensões, infravermelho (IV), espectrometria de massas (EM), bem como por comparação com dados descritos na literatura.

Concomitante à investigação fitoquímica foi realizado um ensaio biológico para verificar a citotoxicidade dos extratos frente às larvas de *A.salina* Leach, a atividade foi observada significativamente no extrato metanólico e hidrometanólico.

ABSTRACT:

SILVA, Roberta Ferreira Nagipe da; Universidade Estadual do Norte Fluminense – Darcy Ribeiro; agosto de 2010; Prospecção Química e Biológica do estrato arbóreo da Mata do Bom Jesus (Campos dos Goytacazes) : Uma contribuição ao estudo da espécie *Parapiptadenia pterospema* Benth (Fabaceae); Orientadora: Leda Mathias.

The Atlantic Forest biome has a wide variety of plant species rich in chemicals of interest, they found at different levels in leaves, fruits, stems, roots and seeds.

In the present study aims to exploit the chemical and biological species *Parapiptadenia pterosperma* (Fabaceae) popularly known as monjolo branco.

The phytochemical study of extracts of stems of a specimen collected in the forest *P. p* of Bom Jesus Campos (RJ) in April 2008 led to the isolation and identification of different metabolites special. The hexane extract were identified: two terpenenóides, friedelin and lupeol, three steroids: campesterol, stigmasterol, sitosterol, an alcohol, Eicosan-1-ol and a ketone, 6,10,14-trimetilpentadecan-2-one of the chloroform extract were identified triterpenes: epifriedelanol and additional quantities of friedelin. The methanol extract were identified: epifriedelanol and acetylated derivatives of amyirin, lupeol, campesterol, sitosterol and stigmasterol.

Structure determination of compounds was performed by techniques of ¹H and ¹³C one and two dimensions, infrared (IR), mass spectrometry (MS) and compared with previously reported data.

Concomitant with the phytochemical investigation was conducted a bioassay to determine the cytotoxicity of the extracts against the larvae of *A. salina* Leach, activity was observed significantly in the methanol extract and hydromethanolic.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Mapa com a localização da Mata do Bom Jesus.....	3
Figura 2: Distribuição de espécies vegetais encontradas na Mata do Bom Jesus.....	3
Figura 3: Fotografia da espécie <i>Parapiptadenia pterosperma</i>	9
Figura 4: Principais grupos de metabólitos especiais.....	10
Figura 5: Triterpenos de esqueleto lanostano isolados do fungo <i>Fomitopsis pinicola</i> com atividade inibitória para COx-2.....	12
Figura 6. Ácido oleanólico e seus derivados.....	12
Figura 7: Estrutura do esqueleto lupano e do glicocorticóide.....	13
Figura 8: Biossíntese de terpenóides.....	14
Figura 9: Fluxograma resumido dos extratos oriundos do caule de <i>P. pterosperma</i>	30
Figura 10: Fluxograma resumido das amostras oriundas do fracionamento do extrato hexânico do caule de <i>P. pterosperma</i>	34
Figura 11: Fluxograma resumido das amostras oriundas do fracionamento do extrato em clorofórmio do caule de <i>P. pterosperma</i>	35
Figura 12: Fluxograma resumido das amostras oriundas do fracionamento do extrato metanólico do caule de <i>P. pterosperma</i>	38
Figura 13: Fluxograma resumido de uma alíquota acetilada do extrato metanólico do caule de <i>P. pterosperma</i>	38
Figura 14: Avaliação da atividade citotóxica frente às larvas de <i>A.salina</i>	41
Figura 15: Teste de Liebermann-Buchard.....	44
Figura 16: Mecanismo proposto para a reação de Liebermann-Burchard.....	44
Figura 17: Teste de Salkowski.....	45
Figura 18. Espectro de absorção molecular obtido na região do infravermelho para PP-01.....	46

Figura 19. Fragmentograma de massas da substância PP-01 (70 eV).....	47
Figura 20. Provável mecanismo de fragmentação de PP-01.....	48
Figura 21. Espectro de RMN de ^1H obtido para PP-01 (400 MHz, CDCl_3).....	48
Figura 22: Ampliação do espectro de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) de PP-01 na região de δ_{H} 0,72 a 1,17 ppm.....	49
Figura 23. Ampliação do espectro de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) de PP-01 na região de δ_{H} 2,20 a 2,45 ppm.....	49
Figura 24. Ampliação do espectro de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) de PP-01 na região de δ_{H} 1,25 a 1,76 ppm.....	50
Figura 25. Espectro de RMN de ^{13}C obtido para PP-01 (100 MHz, CDCl_3).....	51
Figura 26. Ampliação do espectro de RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) de PP-01 na região de δ_{C} 14,7 a 42,8 ppm.....	52
Figura 27. Espectro de correlação heteronuclear $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ (HMQC) da substância PP-01.....	52
Figura 28. Ampliação do espectro de correlação heteronuclear $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ (HMQC) da substância PP-01 na região de 0 a 3,0 ppm.....	53
Figura 29. Espectro de correlação heteronuclear $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ (HMBC) da substância PP-01.....	53
Figura 30. Ampliação do espectro de correlação heteronuclear $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ (HMBC) da substância PP-01 na região de 0 a 3,0 ppm.....	54
Figura 31. Estrutura da friedelina (PP-01).....	56
Figura 32: Espectro de absorção molecular obtido na região do infravermelho para PP02a-e.....	57
Figura 33: Cromatograma de gás da fração PP-02 do extrato hexânico de <i>P. pterosperma</i>	58
Figura 34: Fragmentograma de massas de PP-02a.....	58
Figura 35: Fragmentograma de massas de PP-02b.....	59
Figura 36: Fragmentograma de massas de PP02-c.....	59
Figura 37: Fragmentograma de massas da substância PP-02d.....	60

Figura 38: Provável fragmentação de PP02-d.....	61
Figura 39: Fragmentograma de massas de PP-02e.....	62
Figura 40: Espectro de RMN de ^1H obtido para PP-02a-e (400 MHz, CDCl_3).....	63
Figura 41: Ampliação do espectro de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) de PP-02a-e na região de δ_{H} 0,76 a 1,68 ppm.....	63
Figura 42: Ampliação do espectro de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) de PP-02a-e na região de δ_{H} 3,64 a 7,27 ppm.....	64
Figura 43: Espectro de RMN de ^{13}C obtido para PP-02a-e (100 MHz, CDCl_3).....	65
Figura 44: Ampliação do espectro de RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) de PP-02a-e na região de δ_{C} 14,19 a 29,94 ppm.....	65
Figura 45: Ampliação do espectro de RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) de PP-02a-e na região de δ_{C} 32,01 a 63,2 ppm.....	66
Figura 46: Estrutura do Lupeol (PP02-d).....	68
Figura 47: Espectro de absorção molecular obtido na região do infravermelho para PP03a-c.....	70
Figura 48: Cromatograma de gás da fração PP-03a-c do extrato hexânico de <i>P. pterosperma</i>	71
Figura 49: Fragmentograma de massas de PP03-b.....	71
Figura 50: Fragmentograma de massas de PP03-c.....	72
Figura 51: Provável fragmentação de PP03a-c.....	73
Figura 52: Espectro de RMN de ^1H obtido para PP03a-c (400 MHz, CDCl_3).....	75
Figura 53: Ampliação do espectro de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) de PP03a-c na região de δ_{H} 4,98 a 5,36 ppm.....	75
Figura 54: Ampliação do espectro de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) de PP03a-c na região de δ_{H} 0,68 a 1,65 ppm.....	76
Figura 55: Ampliação do espectro de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) de PP03a-c na região de δ_{H} 1,43 a 5,34 ppm.....	76
Figura 56: Espectro de RMN de ^{13}C obtido para PP03a-c (100 MHz, CDCl_3).....	77

Figura 57: Ampliação do espectro de RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) de PP03a-c na região de δ_{C} 1,94 a 71,91 ppm.....	77
Figura 58: Espectro de absorção molecular obtido na região do infravermelho para PP-04a e PP-04b.....	80
Figura 59: Cromatograma de gás da fração PP-04a-b do extrato em clorofórmio de <i>P. pterosperma</i>	81
Figura 60: Fragmentograma de massas de PP04-a.....	81
Figura 61: Fragmentograma de massas de PP04-b.....	82
Figura 62: Espectro de RMN de ^1H obtido para PP-04a e PP-04b (400 MHz, CDCl_3).....	82
Figura 63: Ampliação do espectro de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) de PP-04a e PP-04b na região de δ_{H} 0,72 a 1,56 ppm.....	83
Figura 64: Espectro de RMN de ^{13}C obtido para PP-04a e PP-04b (100 MHz, CDCl_3).....	83
Figura 65: Ampliação do espectro de RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) de PP-04a e PP-04b na região de δ_{C} 37,19 a 61,44 ppm.....	84
Figura 66: Ampliação do espectro de RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) de PP-04a e PP-04b na região de δ_{C} 11,71 a 41,81 ppm.....	84
Figura 67: Ampliação do espectro de RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) de PP-04a e PP-04b na região de δ_{C} 29,45 a 36,17 ppm.....	85
Figura 68: Espectro de absorção molecular obtido na região do infravermelho para PP-05.....	88
Figura 69: Cromatograma de gás da fração PP-05 do extrato metanólico de <i>P. pterosperma</i>	89
Figura 70: Fragmentograma de massas de PP-05.....	89
Figura 71: Provável fragmentação de PP-05.....	90
Figura 72: Espectro de RMN de ^1H obtido para PP-05 (400 MHz, CDCl_3).....	90
Figura 73: Ampliação do espectro de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) de PP-05 na região de δ_{H} 3,69 a 3,74 ppm.....	91

Figura 74: Ampliação do espectro de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) de PP-05 na região de δ_{H} 1,12 a 1,60 ppm.....	91
Figura 75: Ampliação do espectro de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) de PP-05 na região de δ_{C} 0,85 a 1,26ppm.....	92
Figura 76: Espectro de RMN de ^{13}C obtido para PP-05 (100 MHz, CDCl_3).....	93
Figura 77: Ampliação do espectro de RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) de PP-05 na região de δ_{C} 11,70 a 72,85 ppm.....	94
Figura 78: Ampliação do espectro de RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) de PP-05 na região de δ_{C} 11,70 a 42,91 ppm.....	94
Figura 79: Ampliação do espectro de RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) de PP-05 na região de δ_{C} 28,25 a 42,91 ppm.....	95
Figura 80: Ampliação do espectro de RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) de PP-05 na região de δ_{C} 28,25 a 11,70 ppm.....	95
Figura 81. Espectro de correlação heteronuclear $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ (HMQC) da substância PP-05.....	96
Figura 82: Ampliação do espectro de HMQC da substância PP-05 na região de 0,5 a 4,7 ppm.....	96
Figura 83: Espectro de correlação heteronuclear $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ (HMBC) da substância PP-05.....	97
Figura 84: Ampliação do espectro de correlação heteronuclear $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ (HMBC) da substância PP-05 na região de 0,8- 1,6 ppm.....	97
Figura 85: Estrutura do epifriedelanol (PP-05).....	98
Figura 86: Espectro de absorção molecular obtido na região do infravermelho para PP06a-e.....	100
Figura 87: Cromatograma de gás da fração PP-06a-e do extrato metanólico de <i>P. pterosperma</i>	101
Figura 88: Proposta de fragmentação de PP-06d através de mecanismo envolvendo a reação de retro Diels-Alder.....	102
Figura 89: Fragmentograma de massas de PP06-a.....	103

Figura 90: Fragmentograma de massas de PP06-b.....	104
Figura 91: Fragmentograma de massas de PP06-c.....	104
Figura 92: Fragmentograma de massas de PP-06d.....	105
Figura 93: Fragmentograma de massas de PP-06e.....	105
Figura 94: Espectro de RMN de ^1H obtido para PP06a-e (400 MHz, CDCl_3).....	106
Figura 95: Ampliação do espectro de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) de PP06a-e na região de δ_{H} 0,67 a 4,68 ppm.....	106
Figura 96: Ampliação do espectro de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) de PP06a-e na região de δ_{H} 4,45 a 4,68 ppm.....	107
Figura 97: Ampliação do espectro de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) de PP06a-e na região de δ_{H} 3,47 a 3,66 ppm.....	107
Figura 98: Ampliação do espectro de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) de PP06a-e na região de δ_{H} 0,67 a 2,38 ppm.....	108
Figura 99: Ampliação do espectro de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) de PP06a-e na região de δ_{H} 0,67 a 1,68 ppm.....	108
Figura 100: Espectro de RMN de ^{13}C obtido para PP06a-e (100 MHz, CDCl_3).....	109
Figura 101: Ampliação do espectro de RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) de PP06a-e na região de δ_{C} 34,30 a 56,79 ppm.....	110
Figura 102: Ampliação do espectro de RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) de PP06a-e na região de δ_{C} 40,95 a 11,94 ppm.....	110
Figura 103: Ampliação do espectro de RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) de PP06a-e na região de δ_{C} 55,49 a 11,94 ppm.....	111

LISTA DE TABELAS

Tabela 01: Constituintes químicos isolados de espécie <i>Parapiptadenia rigida</i> , com registro na literatura.....	6
Tabela 02: Classificação botânica proposta para <i>Parapiptadenia pterosperma</i>	8
Tabela 03: Fracionamento do extrato hexânico do caule de <i>Parapiptadenia pterosperma</i> (HPP) através de cromatografia em coluna aberta de sílica gel.....	33
Tabela 04: Fracionamento do extrato em clorofórmio do caule de <i>Parapiptadenia pterosperma</i> (CPP) através de cromatografia em coluna aberta de sílica gel.....	35
Tabela 05: Fracionamento do extrato em clorofórmio do caule de <i>Parapiptadenia pterosperma</i> (MPP) através de cromatografia em coluna aberta de sílica gel.....	37
Tabela 06: Testes químicos.....	43
Tabela 07: Dados dos espectros de RMN de ^1H , HMQC ($^1J_{\text{CH}}$, $^1\text{H}-^{13}\text{C}$) e HMBC ($^{2,3}J_{\text{CH}}$) obtido para a substância PP-01, comparados com dados da literatura para a friedelina.....	55
Tabela 08. Atribuição do espectro de RMN ^{13}C obtido para PP-02a-e.....	67
Tabela 09: Principais picos observados no espectro de massas da fração PP-02 do extrato hexânico de <i>P. pterosperma</i>	68
Tabela 10: Atribuição do espectro de RMN ^{13}C obtido para PP03a-c.....	78
Tabela 11: Principais picos observados no espectro de massas da fração PP-03 do extrato hexânico de <i>P. pterosperma</i>	79
Tabela 12: Atribuição do espectro de RMN ^{13}C obtido para PP-04a-b.....	86
Tabela 13: Principais picos observados no espectro de massas da fração PP-04 do extrato hexânico de <i>P. pterosperma</i>	87
Tabela 14: Atribuição dos espectros de RMN de ^1H , HMQC ($^1J_{\text{CH}}$, $^1\text{H}-^{13}\text{C}$) e HMBC ($^{2,3}J_{\text{CH}}$) obtido para a substância PP-05.....	98
Tabela 15: Atribuição do espectro de RMN ^{13}C obtido para PP06a-e.....	112

Tabela 16: Principais picos observados no espectro de massas da fração PP-02 do extrato hexânico de <i>P. pterosperma</i>	113
Tabela 17: Valores obtidos a partir do teste de letalidade frente às larvas de <i>A.salina</i>	115

LISTA DE QUADROS

Quadro 01: Estrutura química dos constituintes químicos isolados da espécie <i>Parapiptadenia rigida</i> , com registro na literatura.....	7
Quadro 02: Estrutura química dos constituintes de PP-02.....	69
Quadro 03: Estrutura química dos constituintes de PP-03.....	79
Quadro 04: Estruturas químicas dos constituintes de PP-04.....	87
Quadro 05: Estruturas químicas dos constituintes da fração PP-06.....	114

LISTA DE ABREVIATURAS e SIGLAS

δ -Deslocamento químico em ppm

CC/flash- Cromatografia em coluna de sílica tipo flash

CCDA- Cromatografia em camada delgada analítica

CCDP- Cromatografia em camada delgada preparativa

CDCl₃-Clorofórmio deuterado

CD₃OD- Metanol deuterado

CI₅₀- Concentração inibitória a 50%

COSY- *Correlation Spectroscopy* (espectroscopia de correlação)

COX-2- Ciclo-oxigenase 2

D₂O- Óxido de deutério

DCM- Diclorometano

DEPT- *Distortionless Enhancement by Polarization Transfer* (Intensificação do sinal sem distorção por transferência de polarização)

DMAPP- Dimetilalil difosfato

DMSO-d₆-Dimetilsulfóxido deuterado

DMSO-Dimetilsulfóxido

DPR- Desvio padrão relativo

dtn- Determinações

EtOAc-Acetato de etila

EtOH- Etanol

FPP- Farnesil difosfato

GGPP-Geranigeranil difosfato

GPP- geranil difosfato

HMBC- *Heteronuclear Multiple Bond Correlation* (Correlação heteronuclear em ligações múltiplas)

HMQC- *Heteronuclear Multiple Quantum Coherence* (Coerência heteronuclear em múltiplo quantum)

Hx- Hexano

IPP- Isopentenil difosfato

IV- Infravermelho

J - Constante de acoplamento escalar

MEP- Metileritrol-3-fosfato

MeOH- Metanol

RDA- retro-Diels-Alder

RMN- Ressonância magnética nuclear

TR- Tempo de retenção

UV- Ultra-violeta

SUMÁRIO

RESUMO

ABSTRACT

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE TABELAS

LISTA DE QUADROS

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Capítulo 01:

Introdução	1
1.1. O Bioma Mata Atlântica.....	1
1.2. A Família Fabaceae.....	4
1.2.1. A subfamília Mimosoideae.....	5
1.2.2. O gênero <i>Parapiptadenia</i>	5
1.2.3. A espécie <i>Parapiptadenia pterosperma</i>	8
2. Metabolismo secundário.....	10
2.1. Terpenóides.....	11
2.2. Biossíntese de terpenóides.....	13
3. Atividade Biológica.....	15
3.1. Atividade Citotóxica.....	16
3.2. Referência Bibliográfica.....	18
Capítulo 02: Objetivos	26
2.1. Objetivos gerais.....	26
2.2. Objetivos específicos	26
Capítulo 03: Parte Experimental	27
3.1. Equipamentos utilizados.....	27
3.2. Reagentes utilizados.....	28
3.3. Material de consumo utilizado.....	28
3.4 Solução Reveladora Empregada nos Processos Cromatográficos em Camada Delgada.....	29
3.4.4. Solução de Vanilina Sulfúrica.....	29
3.5. Levantamento Bibliográfico	29

3.6. Material vegetal.....	29
3.7.Preparação dos Extratos Brutos do Caule de <i>Parapiptadenia pterosperma</i>	29
3.8. Testes genéricos para a identificação de triterpenos e esteróides.....	31
3.8.1. Avaliação dos Testes genéricos para a identificação de triterpenos e esteróides	31
3.9. Fracionamento do Extrato Hexânico (HPP).....	31
3.10.Fracionamento do extrato em clorofórmio (CPP).....	35
3.11. Fracionamento do extrato em metanol (MPP).....	36
3.12. Métodos espectrométricos.....	39
3.12.1.Infravermelho.....	39
3.12.2.Ressonância Magnética Nuclear.....	39
3.13.Caracterização Físico-química.....	39
3.13.1. Ponto de fusão.....	39
3.14. Avaliação da atividade citotóxica.....	39
3.16. Referência Bibliográfica.....	42
Capítulo 04. Resultados e discussão.....	43
4.1.Análises Cromatográficas.....	43
4.2. Resultados e discussões dos testes químicos para identificação de triterpenos e esteróides.....	43
4.3. Identificação estrutural das substâncias isoladas do caule de <i>P. pterosperma</i>	45
4.3.1. Identificação da fração 41-50 do extrato hexânico (PP-01).....	45
4.3.2. Identificação da fração 16-24 do extrato hexânico (PP-02).....	56
4.3.3. Identificação da fração 104-117 do extrato hexânico (PP-03).....	69
4.3.4. Identificação da fração 1-3 do extrato em clorofórmio (PP-04).....	79
4.3.5. Identificação da fração 10-14 do extrato metanólico (PP-05).....	87
4.3.6. Identificação da fração 8-13 do extrato metanólico (PP-06).....	99

4.4. Resultados e Discussões da avaliação da atividade citotóxica frente às larvas de A.salina.....	115
4.5. Referência Bibliográfica.....	117
Capítulo 05: Conclusão.....	119

1. INTRODUÇÃO

1.1 O Bioma Mata Atlântica

A Mata Atlântica é considerada a segunda maior formação florestal brasileira. Na sua formação original cobria cerca de 1,1 milhões de Km², o equivalente a aproximadamente 12% da superfície do território brasileiro. Estendendo-se por mais de 3300 Km na costa leste, desde o Rio Grande do Norte até o Rio Grande do Sul (Morelato, 2000; Oliveira-Filho & Fontes, 2000).

Essa formação vegetacional apresenta diferentes definições, sendo atualmente a mais aceita aquela que a classifica como Domínio Tropical Atlântico, que inclui não somente as matas de encosta e de planícies costeiras litorâneas, como também o conjunto de formações vegetais associadas, ampliando o limite de sua distribuição em algumas regiões para cerca de 700 Km em direção ao interior do Brasil. Segundo RADAMBRASIL (1983), uma das formações da Mata Atlântica é a Floresta Ombrófila Densa, que se caracteriza por apresentar elevadas temperaturas, alto índice de precipitação bem distribuído durante o ano, praticamente sem períodos de seca. De acordo com a hierarquia topográfica que reflete fisionomias diferentes de acordo com as variações ecotípicas das faixas altimétricas, resultantes de ambientes também distintos, este tipo de formação foi dividido em quatro tipos florestais principais: Floresta de baixada (até 50 m), Floresta submontana (50-500 m), Floresta Montana (500-1500 m) e Floresta alto Montana (acima de 1500 m) (Radambrasil, 1983)

A Mata Atlântica é detentora de alta biodiversidade relativa à flora fanerogâmica (Giulietti e Forero, 1990). Entretanto devido ao grande desmatamento efetuado pela prática agropecuária ou madeireira, seus remanescentes encontram-se restritos a manchas florestais reduzidas e fragmentadas, algumas vezes isoladas e circundadas por extensas matrizes antrópicas (Fundação SOS Mata Atlântica, 2002). Este processo de redução e isolamento da vegetação afeta a estrutura e os processos das comunidades vegetais, ocasionando perda da biodiversidade. Por conta da intensa ação de degradação e a perda de habitat, a elevada diversidade e ao elevado grau de

endemismo, a Mata Atlântica é considerada um dos *hotspots* de biodiversidade (Meyers *et al.*, 1982), que são 34 áreas espalhadas pelo globo terrestre consideradas prioritárias para a conservação (Mittermeier *et al.*, 2005).

Antes do intenso desmatamento a maior parte da região norte do estado do Rio de Janeiro era coberta pela floresta Ombrófila de Terras Baixas - até 250 metros, sendo que hoje se encontra reduzido a menos de 7% de sua cobertura (Veloso *et al.*, 1991). Neste contexto, o pouco do que resta desta vegetação encontra-se altamente fragmentada e representada por manchas florestais com áreas, em geral, inferiores a 100 ha e que estão localizadas na sua grande maioria em propriedades privadas (Veloso *et al.*, 1991).

O município de Campos dos Goytacazes, localizado no extremo norte do Rio de Janeiro, apresenta fitofisionomias diversificadas, englobando florestas de baixadas estacionais semidecíduais, ombrófila e restinga (Fundação SOS Mata Atlântica, 2002). Atualmente esta região encontra-se com menos de 3% de sua cobertura florestal original devido ao intenso desmatamento iniciado no século XIX para implemento de monocultura de cana-de-açúcar (Fundação SOS Mata Atlântica, 2002). Este remanescente encontra-se a mercê de pressões antrópicas diversas, tais como queimadas, cortes seletivos de madeira, caça entre outras. Mesmo diante destas adversidades, grande parte deste fragmento, apesar do tamanho e isolamento, ainda apresenta elevada diversidade de espécies arbóreas (Pagano *et al.*, 1987).

Dentre os fragmentos de Mata Atlântica encontrados no município de Campos dos Goytacazes, pode-se citar a Mata do Bom Jesus, com uma área de 35 ha (Figura 1, p.3). Esta região está caracterizada como um fragmento de floresta aluvial situada nas proximidades do rio Paraíba do Sul. Até o início dos anos 80 a mata pertencia a uma fazenda, posteriormente foi cedida a Santa Casa de Misericórdia de Campos dos Goytacazes para a extração seletiva de madeira utilizada na fabricação de caixões. Nos anos 90 esta atividade foi abandonada, porém a mata continua sendo alvo de extração seletiva de madeira caça e queimada. Este fragmento está imerso em uma matriz antrópica formado por extensos canaviais, pastagem e algumas áreas de regeneração florestal (capoeiras) em suas bordas (Carvalho *et al.*, 2006).

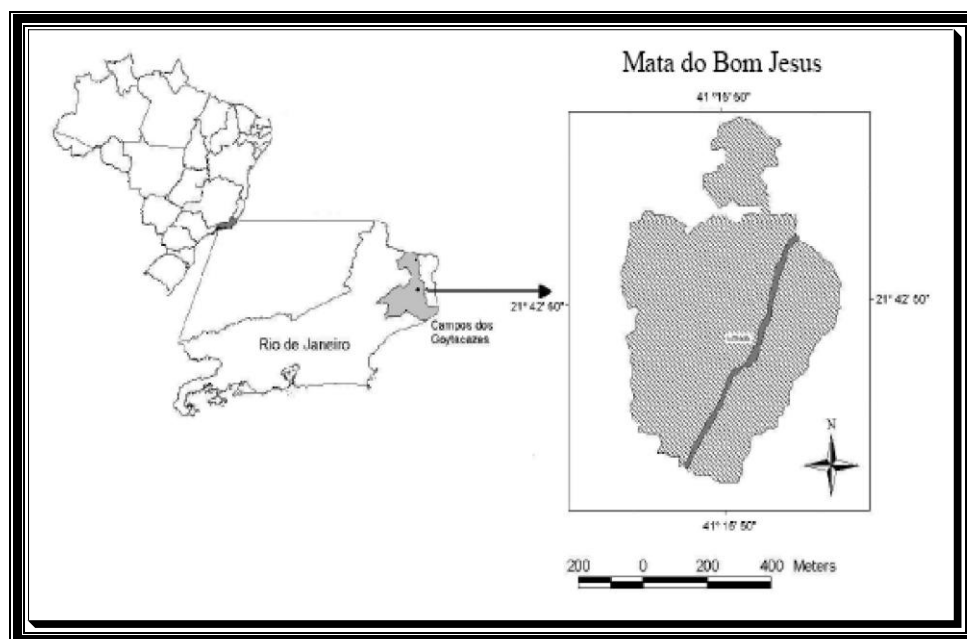


Figura 1. Mapa com a localização da Mata do Bom Jesus.

Estudos realizados por Carvalho *et. al.* (2006) nesta região permitiu a identificação de 336 indivíduos distribuídos em 105 espécies pertencentes a 91 gêneros e 35 famílias, onde aquelas que apresentaram maior riqueza de espécies foram **Fabaceae** (10 espécies), Myrtaceae (10 espécies), Mimosaceae (7 espécies), Euphorbiaceae (7 espécies), Lauraceae (6 espécies), Rubiaceae (6 espécies), Anacardiaceae (5 espécies) e Caesalpinaceae (1 espécie) (Figura 2).

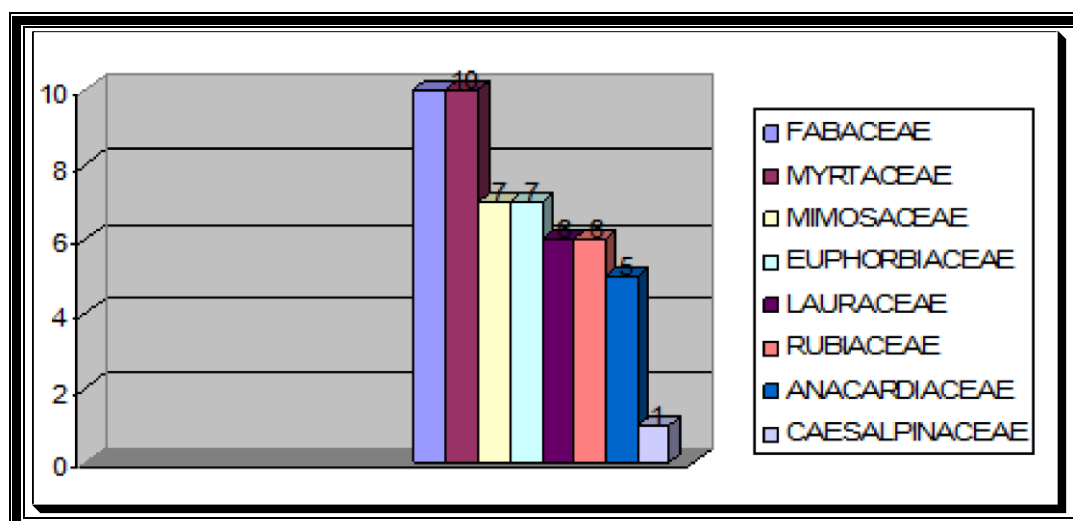


Figura 2. Distribuição de espécies vegetais encontradas na Mata do Bom Jesus.

1.2 A Família Fabaceae

A flora brasileira é considerada uma das mais ricas do globo e a família Fabaceae é apontada como uma das mais representativas nas formações florestais neotropicais (Gentry, 1982). No domínio tropical Atlântico, esta família destaca-se entre os elementos mais importantes do estrato arbóreo (Leitão-Filho, 1982; Peixoto e Gentry, 1990; Lima, 2000; Oliveira-Filho *et al.*, 1994).

A família Fabaceae pertence à ordem Fabales (Sensu Croquist, 1988) e constitui uma das maiores e mais importante família botânica, devido ao grande número de espécies vegetais. Essa família também tem grande importância econômica pelo fato de produzirem madeiras úteis, produtos alimentares, medicinais e ornamentais.

Para a família Fabaceae é descrito aproximadamente 642 gêneros e 18.000 espécies, sendo considerada a terceira maior família de angiospermas. Apresenta hábitos variados que vão desde árvores gigantes até diminutas ervas e habitam os mais variados ambientes, em diferentes latitudes e altitudes (Joly, 2002). Possui ampla distribuição nas regiões temperadas e tropicais do globo (Barroso, 1978).

Outra característica encontrada nesta família é a capacidade que muitas espécies possuem de converter o nitrogênio da atmosfera em substâncias nitrogenadas utilizados pelas plantas, por meio de uma relação simbiótica com bactérias do gênero *Rhizobium* (Souza & Castro, 2008).

No Brasil, a família está representada por aproximadamente 188 gêneros e 2.100 espécies, distribuídas em quase todas as formações vegetacionais (Barroso *et al.*, 1991). Encontra-se dividida em três subfamílias: **Mimosoideae**, **Caesalpinoideae** e **Papilionoideae** (Evans, 2002).

1.2.1 A subfamília Mimosoideae

A subfamília Mimosoideae compreende quatro tribos, 78 gêneros e aproximadamente 3.270 espécies (Lewis & Schire, 2005) distribuídas nas regiões tropicais, subtropicais e cálido-temperadas (Polhill & Raven, 1981). São plantas subarbustivas, arbustivas, ou arbóreas (Joly, 2002). Quase dois terços das espécies conhecidas estão subordinados a três gêneros: *Acacia*, *Mimosa* e *Inga* (Elias, 1974).

1.2.2 O gênero *Parapiptadenia*

Segundo o levantamento bibliográfico realizado até o presente momento, o gênero *Parapiptadenia* está representado por seis espécies:

- *Parapiptadenia blanchetii*,
- *Parapiptadenia excelsa*,
- *Parapiptadenia ilheusana*,
- ***Parapiptadenia pterosperma***,
- *Parapiptadenia rígida*
- *Parapiptadenia zehntner*. (www.plantsystematic.org).

A química do gênero *Parapiptadenia* é composta por diferentes classes de substâncias e, devido à aplicação industrial, os primeiros relatos que envolvem o gênero foram dirigidos na determinação de conteúdos de taninos (Zelada & Coni, 1995). O primeiro relato da presença de taninos dentro do gênero *Parapiptadenia* foi verificado na espécie *Parapiptadenia rigida*. (Primo, 1945).

Espécies do gênero também são utilizadas na a recuperação de áreas degradadas (Souto, 1984) e para a restauração florestal em áreas de preservação permanente (Durigan & Nogueira, 1990). São árvores de madeira muito pesada, elástica e bastante durável, o que as torna próprias para construções rurais e para a carpintaria (Reitz *et al.*, 1988).

Em 2008 foi realizada uma pesquisa no *Chemical Abstracts*, *Web of Science*, *Scirus* e etc, onde foi registrada apenas uma espécie do gênero *Parapiptadenia* estudada fitoquimicamente, a espécie *Parapiptadenia rígida*.

P. rígida apresenta uma vasta aplicação na medicina popular e na indústria farmacológica, atuando no combate a disenterias, raquitismo, reumatismo, hemorragias, afecções bronco-pulmonares, sinusite e asma, assim como na cura de inchaço das pernas. A goma resinosa que exsuda da sua casca, pode ser utilizada como expectorante (Carvalho, 2003). A espécie *P. rígida* também apresenta atividade contra cepas de *Staphylococcus aureus*, *S. epidermidis*, *Bacillus subtilis* e *Micrococcus luteus* (Magalhães, 1997; Coelho *et al.* 2004).

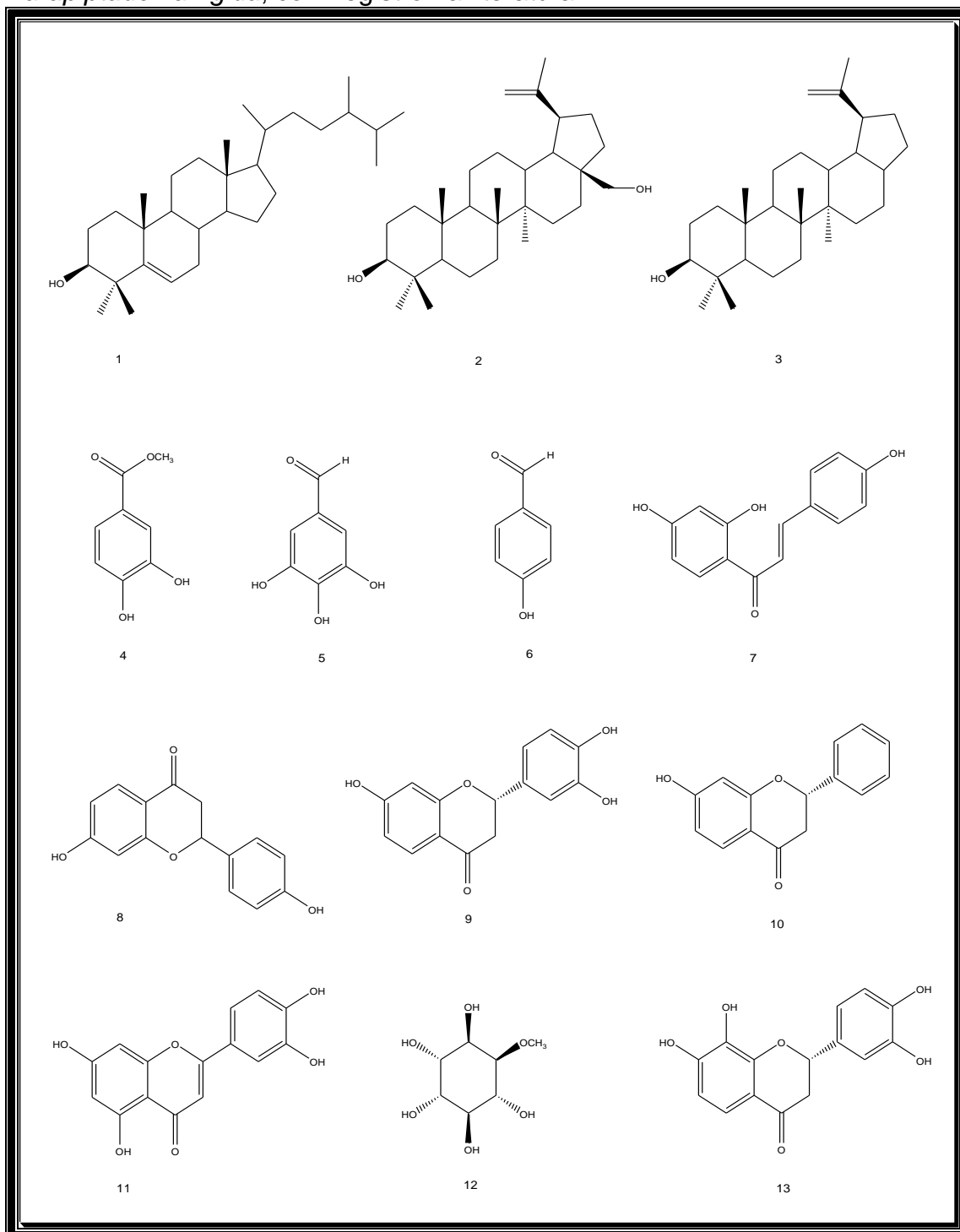
Os principais metabólitos especiais encontrados nesta espécie pertencem às seguintes classes: terpenóides, ésteres, chalconas, flavonóides e ciclitóis (Tabela 1, p. 6; Quadro 1, p. 7).

Tabela 01. Constituintes químicos isolados de espécie *Parapiptadenia rígida*, com registro na literatura.

Substância	Estrutura	Referência
Sitosterol	01	Gomes <i>et al.</i> ,2002
Betulina	02	Gomes <i>et al.</i> ,2002
Lupeol	03	Gomes <i>et al.</i> ,2002
3,4-diidroxibenzoato de metila	04	Gomes <i>et al.</i> ,2002
4-hidroxi-3,5-dimetilbenzaldeído	05	Gomes <i>et al.</i> ,2002; Gomes <i>et al.</i> ,2003
<i>p</i> -hidroxibenzaldeído	06	Gomes <i>et al.</i> ,2002
Isoliquiritigenina	07	Gomes <i>et al.</i> ,2002 Gomes <i>et al.</i> , 2003
Liquiritigenina	08	Gomes <i>et al.</i> 2003
Triidroxiflavona	09	Gomes <i>et al.</i> 2002 Gomes <i>et al.</i> 2003
Diidroxiflavanona	10	Gomes <i>et al.</i> 2002 Gomes <i>et al.</i> 2003
Tetraidroxiflavanona	11	Gomes <i>et al.</i> ,2002

		Gomes <i>et al.</i> ,2003
L-2-O-metilchiroinositol	12	Gomes <i>et al.</i> 2002
7,8,3',4'-tetraidroxiflavanona	13	Alves <i>et al.</i> 2003.

Quadro 1. Estrutura química dos constituintes químicos isolados da espécie *Parapiptadenia rigida*, com registro na literatura.



1.2.3 A espécie *Parapiptadenia pterosperma* (Benth.) Brenan

A espécie *Parapiptadenia pterosperma* Benth., sinônimo *Piptadenia pterosperma*, pertence a ordem Fabales, família Fabaceae, tribo Mimosoideae e subfamília Mimosoideae (Lorenzi, 1998; www.specieswikimedia.org). Popularmente é conhecida como monjolo branco, angico vermelho, angico pedra e angico de flor roxa (Lorenzi, 1998; www.qbif.org, www.dannemann.com, www.tropmad.com.br).

P. pterosperma distribui-se principalmente pelo sudeste brasileiro, nos estados do Rio de Janeiro, Espírito Santo, Minas Gerais e também no nordeste do país, no estado da Bahia (Lorenzi, 1998; www.ildis.org/LegumeWeb). É uma árvore de grande porte variando de 12 a 15 metros de altura. Possuem folhas pinadas, folíolos muito pequenos, floração em pequenos cachos pendentes de coloração marrom escuro (Figura 3, p.9). Seu fruto apresenta-se como vagem e suas sementes possuem pequena asa, o que diferencia esta espécie de outras similares (Lorenzi, 1998; www.arvoresdobrasil.com.br).

A Tabela 2 apresenta a classificação botânica e demais características atribuídas a essa espécie.

Tabela 2. Classificação botânica proposta para *Parapiptadenia pterosperma* (Zipcodezoo.com).

<i>Parapiptadenia pterosperma</i>	
Classe:	Angiosperma
Subclasse:	Dicotiledônea
Ordem:	Fabales
Família:	Fabaceae
Subfamília:	Mimosoideae
Tribo:	Mimoseae
Gênero:	<i>Parapiptadenia</i>
Espécie:	<i>Parapiptadenia pterosperma</i> (Benth.) Brenan

Sinonímia científica:	<i>Piptadenia pterosperma</i>
Nomes populares:	monjolo branco, angico vermelho, angico pedra e canafístula preta.
Características:	Árvores de grande porte com cerca de 12 a 15 m de altura. Possuem folhas pinadas, folíolos muito pequenos, floração em pequenos cachos pendentes de coloração marrom escuro, fruto em forma de vagens, sementes aladas
Habitat:	Regiões Sul a Leste do Brasil

Fontes: (Lorenzi, 1998; www.gbif.org; www.dannemann.com; www.tropmad.com.br).



Figura 3. Fotografia da espécie *Parapiptadenia pterosperma* (www.dannemann.com)

2 METABOLISMO SECUNDÁRIO.

Plantas e microorganismos sintetizam uma imensa variedade de metabólitos que são geralmente classificados em dois grupos baseados em suas funções. (Bode, 2004) Os metabólitos primários são essenciais ao crescimento e desenvolvimento e utilizados universalmente enquanto que os metabólitos secundários (especiais) são extremamente diversos e varáveis. (Gershenzon *et al.*, 2000). Uma das principais funções atribuídas a essas substâncias são os mecanismos de defesa das plantas. Assim, os metabólitos especiais agem como defesa contra herbívoros, ataque de patógenos, competição entre plantas e atração de organismos benéficos como polinizadores, dispersores de sementes e microorganismos simbiotes. Possui também ação protetora em relação a mudanças de temperatura, conteúdo de água, níveis de luz, exposição aos raios ultravioleta (UV) e deficiência de nutrientes minerais. Sendo assim estes metabólitos atuam desempenhando o papel de garantir a sobrevivência do organismo no habitat natural. Os metabólitos secundários dividem-se em três grandes grupos: terpenóides, substâncias fenólicas e alcalóides (Figura 4.) (Peres, 2004).

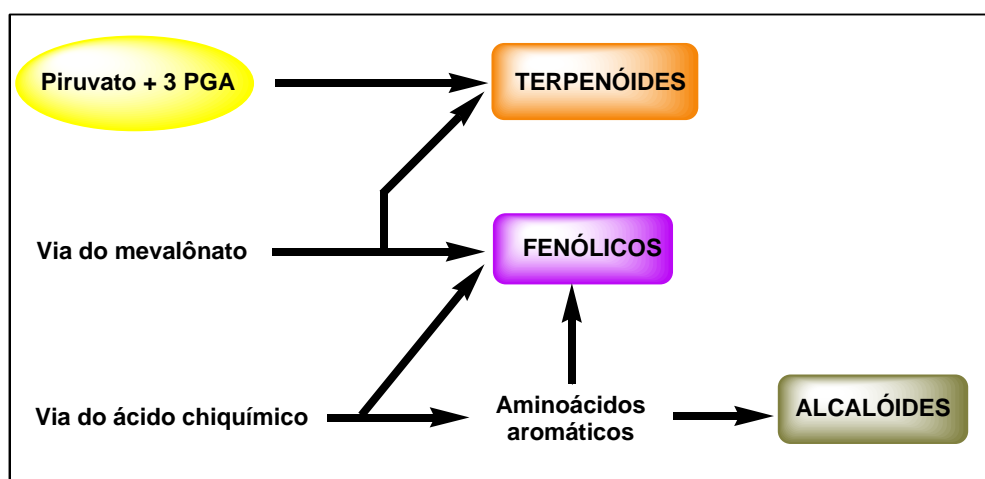


Figura 4. Principais grupos de metabólitos especiais (Peres, 2004).

2.1 Terpenóides

Os terpenóides constituem a maior classe de metabólitos especiais, caracterizados principalmente como substâncias de defesa contra herbívoros e patógenos (Rodriguez *et al.*, 2002). Além disso, atuam na atração de polinizadores, na dispersão de sementes por animais e também como aleloquímicos, que influenciam na competição entre espécies de plantas (Kleinig, 1989).

Os terpenóides são encontrados principalmente em plantas superiores, porém é possível encontrá-los em plantas inferiores, fungos, animais e procariontes (Kleinig, 1989). Podem se apresentar de forma livre, no entanto muitos são encontrados como glicosídeos, ésteres de ácidos orgânicos, até mesmo combinados com proteínas (Geissman & Crout., 1961).

A classificação destas substâncias está de acordo com o número de unidades de isopreno (monômero com cinco átomos de carbonos) que os constitui, sendo assim: monoterpenos (C_{10}); sesquiterpenos (C_{15}); diterpenos (C_{20}); sesterpenos (C_{25}); triterpenos (C_{30}) e tetraterpenos (C_{40}) (Deans & Waterman, 1993).

A volatilidade de algumas substâncias deste grupo faz com que sejam facilmente perceptíveis nos aromas de plantas. A mistura de monoterpenos e sesquiterpenos voláteis é chamada de óleo essencial e geralmente possuem ação repelente sobre herbívoros e podem servir como atraentes de inimigos naturais de fitófagos (Deans & Waterman, 1993; Waterman, 1993). Industrialmente podem ser utilizados como antioxidantes, fragrâncias ou aromatizante de alimentos (Deans & Waterman, 1993).

Estudos têm demonstrado a importância farmacológica dessa classe de substâncias. Os triterpenos de esqueleto lanostano, por exemplo, (Figura 5, p.12) isolados de *Fomitopsis pinicola* possuem ação antiinflamatória e são de grande interesse farmacológico, uma vez que apresentam atividade inibitória seletiva para a enzima COX-2 (Yoshikawa *et al.*, 2005). Já os triterpenos de núcleo oleaneno, ácidos uncárico A e B (Figura 6, p.12), isolados a partir das folhas de *Uncaria rhynchophylla* apresentam atividade citotóxica para diversas cepas de células tumorais (A-549, HCT-15, MCF-7) (Lee *et al.*, 2000).

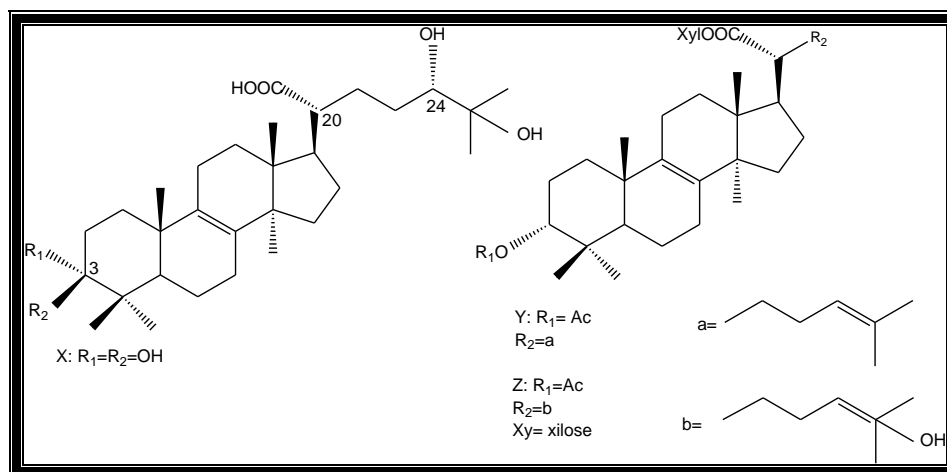


Figura 5. Triterpenos de esqueleto lanostano isolados do fungo *Fomitopsis pinicola* com atividade inibitória para COX-2.

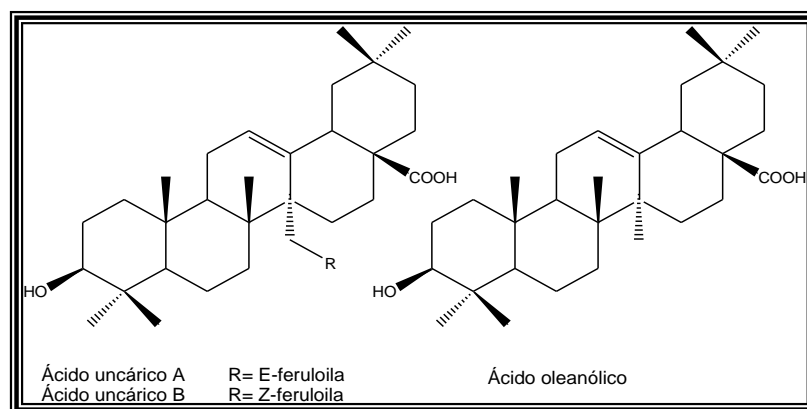


Figura 6. Ácido oleanólico e seus derivados

Muitos derivados do ácido oleanólico (Figura 6) têm sido relatados na literatura (Heitzman *et al.*, 2005; Mahato e Kundu, 1994), porém somente alguns destes derivados revelam uma potencial atividade biológica (Lee *et al.*, 2000). Estudos recentes revelam algumas destas atividades, tais como atividades antiúlcera, antiinflamatória, anti hipertriglicêmica, antihipertriglicêmica, anti-HIV e um grande potencial de atividade nos tratamentos da artrite e reumatismo apresentados para essa substância na sua forma livre (Heitzman *et al.*, 2005; Safayhi e Sailer, 1997).

A literatura mostra que existe uma relação entre estrutura dos triterpenos e a atividade antiinflamatória apresentada por estes. Tais como a presença dos grupos carboxilas em C-28 e C-30 (Recio, 1995; Recio, 1995a) e nos

esqueletos lupanos a carboxila em C-27 (Mendes, 2004), além disto, nos lupanos a presença de um anel de cinco membros pode fazer com que estes se liguem a receptores glicocorticóides devido à semelhança estrutural com os esteróides (Figura 7) (Mendes, 2004).

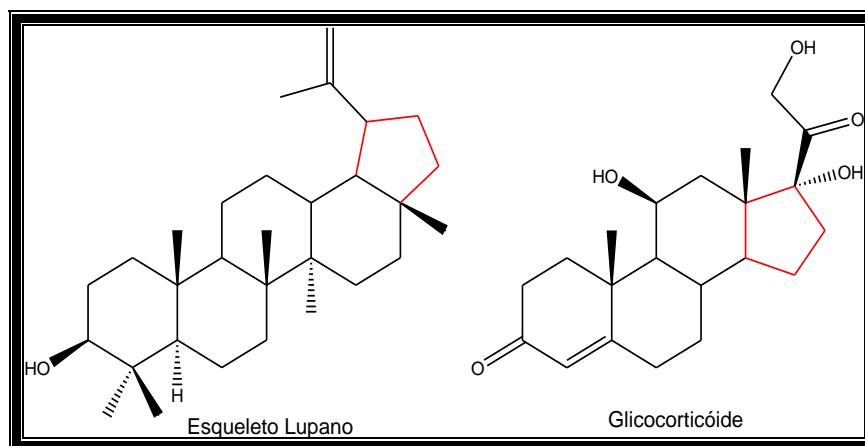


Figura 7. Estrutura do esqueleto lupano e do glicocorticóide

2.2. Biossíntese de terpenóides

Os terpenóides são biosintetizados a partir de metabólitos primários por no mínimo duas rotas diferentes, como mostra a Figura abaixo:

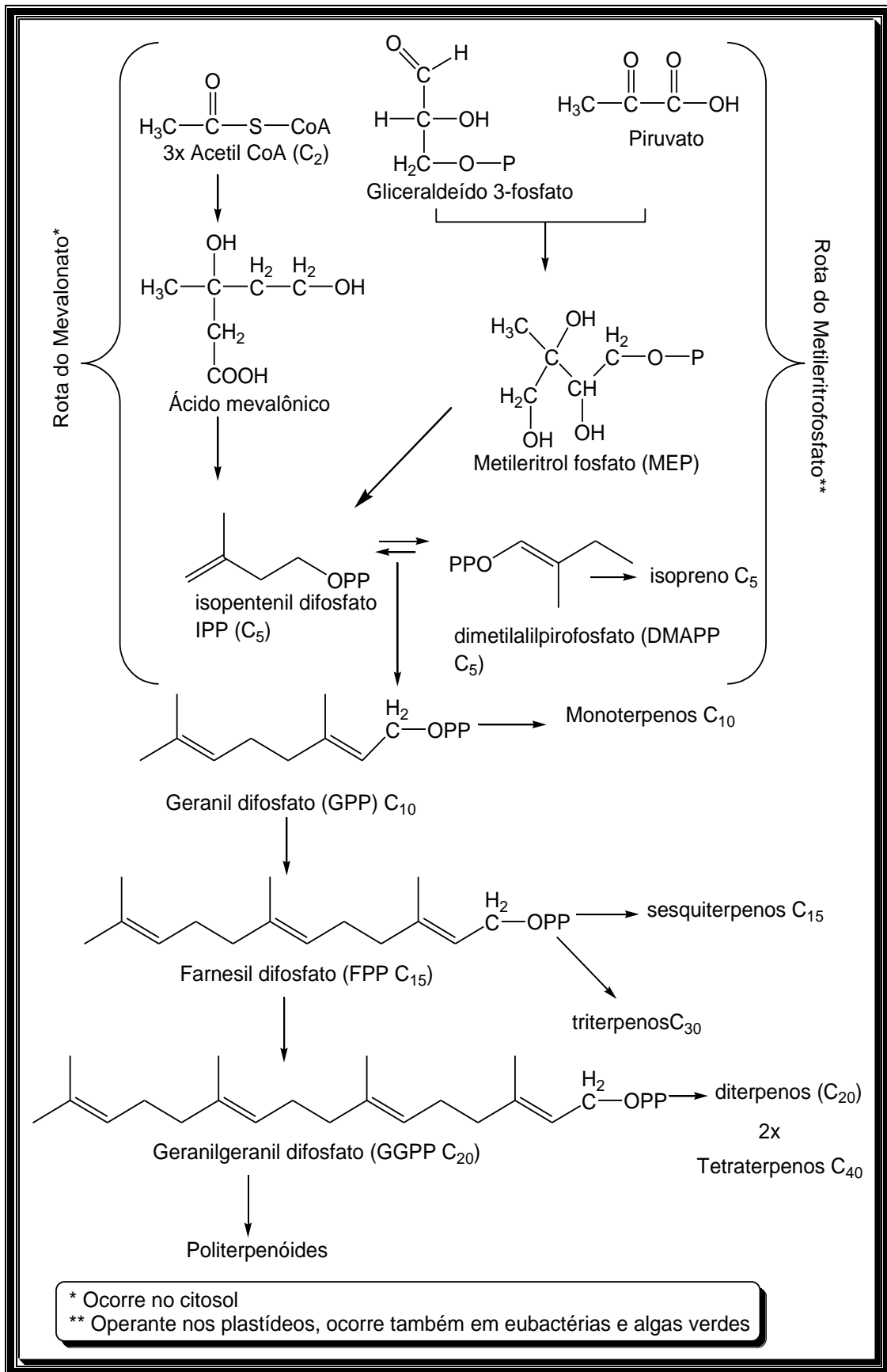


Figura 8: Biossíntese de terpenóides
 Fonte: Taiz & Zeiger, 2004.

Na rota do ácido mevalônico, três moléculas de acetil CoA são ligadas, a partir de uma série de etapas da rota, para formar o ácido mevalônico. Esse importante intermediário de seis carbonos é então pirofosforilado, descarboxilado e desidratado para produzir o isopentenil difosfato (IPP), que é a unidade básica na formação de terpenos (Taiz & Zeiger, 2004) (Figura 8, p.14).

O IPP também pode ser formado a partir de intermediário da glicose ou do ciclo de redução fotossintética do carbono, através de um conjunto de reações denominado de rota do metileritrol-3-fosfato (MEP), que ocorre nos cloroplastos e outros plastídeos. O gliceraldeído-3-fosfato e dois átomos de carbono derivados do piruvato se combinam para formar um intermediário que é convertido em IPP (Taiz & Zeiger, 2004) (Figura 8, p.14).

O isopentenil difosfato e seu isômero, o dimetilalil difosfato (DMAPP) se unem para formar moléculas maiores. Inicialmente o IPP e o DMAPP reagem e formam o geranyl difosfato (GPP), uma molécula de 10 carbonos, a partir da qual são formados os monoterpênicos. O GPP pode então ligar-se a outra molécula de IPP, formando a substância de 15 carbonos, farnesil difosfato (FPP), precursor da maioria dos sesquiterpênicos. A adição de outra molécula de IPP forma o geranylgeranyl difosfato (GGPP), substância de 20 carbonos precursor dos diterpênicos. Finalmente, FPP e GGPP podem dimerizar para formar triterpênicos (C-30) e tetraterpênicos (C-40), respectivamente (Taiz & Zeiger, 2004) (Figura 8, p.14).

3. ATIVIDADE BIOLÓGICA

Dentre as atividades biológicas e/ou farmacológicas, tais como: alelopática, antiparasitária e apresentadas pelos metabólitos especiais, há um grande estímulo para a descoberta de novas substâncias que apresentem atividades antioxidante, antifúngica e antibacteriana. A descoberta de substâncias com tais atividades, constitui uma necessidade urgente devido ao aumento da incidência de doenças infecciosas e degenerativas e a alta capacidade dos microrganismos de desenvolverem resistência aos medicamentos usados clinicamente. Além disto, a identificação de metabólitos especiais em diferentes espécies de plantas tem contribuído de forma

significativa para o desenvolvimento de diversas áreas de estudo tais como, classificação sistemática de plantas, quimiosistemática, ecologia, farmacologia e etc. (Da Costa *et al.*, 1995).

3.1 Atividade Citotóxica

A família Fabaceae é conhecida por apresentar várias substâncias bioativas. Então, objetivando a identificação das substâncias bioativas possivelmente presentes na espécie *P. pterosperma* foi introduzido neste trabalho à investigação da atividade citotóxica dos extratos brutos do caule de um espécime de *P. pterosperma* através de um ensaio simples e de baixo custo para determinar a DL₅₀ das amostras analisadas.

O bioensaio que utiliza camarão de água salgada (*A. salina*) foi proposto por McLaughlin e é caracterizado como um ensaio simples para determinar a DL₅₀ (µg/mL) para substâncias puras e extratos (McLaughlin *et al.*, 1995).

A. salina é um crustáceo da classe Anostracea, de água salgada que é utilizado como alimento vivo para peixes, sendo seus ovos facilmente encontrados em lojas de aquaristas. Possui quatro estágios de desenvolvimento (ovo, náuplio, metanáuplio e adulto) e alguns mecanismos de adaptação que as tornam cosmopolitas, como a osmorregulação, a presença de pigmentos respiratórios como a hemoglobina e a disponibilidade de alternativas reprodutivas que facilitam a dispersão e a perpetuação dessa espécie (Siqueira *et al.*, 1998). A praticidade e simplicidade que envolve o bioensaio favorecem sua utilização sistemática dentro de um laboratório de fitoquímica. A técnica tem a vantagem de apresentar baixo custo, rapidez e não exigir técnicas assépticas. (Meyer *et al.*, 1982).

O teste baseia-se no princípio da toxicidade que as substâncias bioativas apresentam em altas doses. Deste modo, a mortalidade *in vivo* de organismo de maior simplicidade na escala zoológica pode indicar a bioatividade de novas substâncias. Na literatura há vários trabalhos que tentam relacionar a toxicidade sobre as larvas de *A. salina* com atividades, tais como: antifúngica, viruscida, antimicrobiana, parasiticida e tripanossomocida (Siqueira *et al.*, 1998; Dolabela, 1997; Brasileiro *et al.*, 2006; Niño *et al.*, 2006; Magalhães *et al.*, 2007).

A literatura também mostra a correlação existente entre a toxicidade sobre o crustáceo e a citotoxicidade para células cancerosas do tipo P-388. (Yunes *et al.*, 2001).

3.2 REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

Alves, N.I. Gomes.M., Carvalho,M., Carvalho, A.G. (2003). Deslocamentos químicos de H e C de 5-H flavanona e 5-H flavonol isolados de leguminosae. *Revista Universidade Rural*, série Ciências exatas e da terra. V, 22, n-1-2 p.81-87.

Barroso, GM. (1978). *Sistemática de Angiosperma do Brasil*, EDUSP, vol 1, 2 p. 84 e 86.

Barroso, G. M., Peixoto, A. L., Costa, C.G., Ichaso, C. L. F., Guimarães, E.F. & Lima, H. C. (1991). Leguminosae. *In: Sistemática de angiospermas do Brasil*. (2).Universidade Federal de Viçosa, Viçosa. p.15-100.

Bergman, M., Varshavsky, L., Gottlieb, E.H., Grossman, S. (2001). The antioxidant activity of aqueous spinach extract: chemical identification of active fractions. *Phytochemistry*. (58): 143-152.

Bode, H.B & Miller, R. (2000) Possibility of bacterial recruitment of plant genes associated with the biosynthesis of secondary metabolites. *Plant Physiology*

Brasileiro, B. G., Pizziolo, V. R., Raslan, D. S., Jamal, C. M., Silveira, D. (2006). Antimicrobial and cytotoxic activities screening of some Brazilian medicinal plants used in Governador Valadares district. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*. 42: 195-202.

Carvalho, F. A., Braga, J. M. A., Gomes, J. M. L., Souza, J. S. (2006). Comunidade Arbórea de uma Floresta de Baixada Aluvial no Município de Campos dos Goytacazes-RJ. *Cerne*12 (2): 157-166.

Coelho de Souza.G, Haas, A.P.S, Poser, G.L.V; Elisabetsky, E. (2004). Farmácias comunitárias do município de Maquine RS. Uma avaliação etnofarmacológica. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*.

Chun, S.S., Vatem, D.A. Lin, Y.T. Shetty.K. (2005). *Process Biochemistry* (40): 809.

Deans, S.G., Waterman,. P.G. (1993). Biological activity of volatile oils. In: Hay, R.K.M., Waterman, P.G. Volatile oil crops: their biology, biochemistry and production. *Essex: Longman Group*.p.97-109.

Dolabela, M. F. (1997). *Triagem in vitro para atividade antitumoral e anti Trypanossoma cruzi de extratos vegetais, produtos naturais e substâncias sintéticas*. Minas Gerais, 130p. Dissertação de Mestrado, Departamento de Fisiologia e Farmacologia, ICB, Universidade Federal de Minas Gerais.

Durigan, G.; Nogueira, J.C.B. (1990). Recomposição de matas ciliares. São Paulo: Instituto Florestal, (IF. Série Registros, 4),14p.

Elias, T. S. (1974). The genera of Mimosoideae (Leguminosae) in the southeastern United States. *Journal Arnold Arboretum* 55(1): 67-118.

Evans,W.C. (2002) . *Trease and evans: Pharmacognosy*.15 ed. Edinburgh: editora W.B Saunderj.

Fundação SOS Mata Atlântica (2002). Atlas da evolução dos remanescentes florestais e ecossistemas associados no domínio da Mata Atlântica no período 1995-2000. São Paulo: SOS Mata Atlântica/INPE/ISA.

Geissman, T.A., Crout, D.H.G. (1969). Organic chemistry of secondary plant metabolism. San Francisco: Freeman, Cooper e Company. p.592.

Gentry, A. H. (1982). Neotropical floristic diversity: phytogeographical connections between Central and South América, Pleistocene climatic fluctuations, or an accident of the and an orogeny. *Annals Missouri Botanical Gardens* (69): 557- 593.

Gershenzon, J., Mc Cankey, M.E., Croteau, R.B. (2000). Regulation of monoterpene accumulation in leaves of peppermint. *Plant Physiology*, (122): 205-214.

Giulietti, A. M., Forero, H. (1990). Diversidade taxonômica e padrões de distribuição das angiospermas brasileiras. *Acta Botanica Brasílica* (4): 3-9.

Heitzman, M.E., Neto C.C., Winiariz, E., Vaisberg, A.J., Hammond, G.B. (2005). Ethnobotany, phytochemistry and pharmacology of *Uncaria* (Rubiaceae). *Phytochemistry*, v.66, p. 5-29.

Joly, A. B. (2002). *Botânica: Introdução à taxonomia vegetal*. Biblioteca Universitária. p. 371-382

Kleinig, H. (1989). The role of plastids in isoprenoids biosynthesis. *Annu. Rev. Plant Physiology. Plant Molecular Biology* (40). 39-59.

Lee, J.S., Kim, B.Y., Lee, H.S., Ahn, J.S., Chang, Y.S. (2000). Inhibition of phospholipase Cg1 and cancer cell proliferation by triterpene esters from *Uncaria rhyncophylla*, *Journal of natural products*, v.63, p. 753-756.

Leitão-Filho, H. F. (1982). Aspectos taxonômicos das florestas do estado de São Paulo. *Silvicultura em São Paulo* 16A(1): 197-206.

Lewis, G.P., Schire, B (2005) .Mackinder.B & Lack,.M.: Legumes of the world. *Royal Botanic Gardens.Kew*.

Lima, H. C. (2000). Leguminosas arbóreas da Mata Atlântica. Uma análise da riqueza, padrões de distribuição geográfica e similaridades florísticas em remanescentes florestais do estado do Rio de Janeiro. Tese de Doutorado. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, p.151.

Lorenzi, H. (1998). *Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil*. Nova Odene: Plantarum, II. p. 177.

Mendes, C.L.A. (2004). Triterpenóides e suas actividades antiinflamatórias. Departamento de Química, Faculdade de Ciências e Tecnologias da Universidade Nova de Lisboa, Portugal.

Magalhães, R.G. (1997). Plantas medicinais na região do Alto Uruguai, R.S. Conhecimentos de João Martins Fiúza, Sarampião. M.Sc. Thesis. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, p. 413.

Magalhães, A. F., Tozzi, A. M. G. A., Santos, C. C., Serrano, D. R., Zanotti-Magalhães, E. M., Magalhães, E. G., Magalhães, L. A. (2007). Saponins from *Swartzia langsdorffii*: biological activities. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 98: 713-718.

Mahato, S.B., Kundu, A.P. (1994). C-13 NMR-spectra of pentacyclic triterpenoids- A compilation and some salient features. *Phytochemistry*, v.37, p. 1517-1557.

McLaughlin, J. L. Colman-Saizarbitoria, T. e Anderso J.E. (1995). Tres bioensayos Simples para Químicos de Productos Naturales. *Revista de la Sociedad Venezolana de Química*, p.18,13-18.

Meyer, B.N., Ferrigni, N.R., Putnam, J.F., Jacobsen, L.B., Nichols, D.E., McLaughlin, J.L. (1982). Brine Shrimp a Convenient Genera Bioassay for Active Plant Constituents. *Planta Medica*, 45,31.

Morellato, L.P.C., Talora, D.C., Takahasi, A., Bencke, C.C., Romera, E.C. & Zipparro, V.B. (2000). Phenology of Atlantic Rain Forest trees: a comparative study. *Biotropica* 32: 811-823.

Niño, J., Narváez, D. M., Mosquera, O. M., Correa, Y. M. (2006). Antibacterial, antifungal and cytotoxic activities of eight Asteraceae and two Rubiaceae plants from colombian biodiversity. *Brazilian Journal of Microbiology* 37: 566-570.

Niinemets, U., Reichstein, M., Staudt, N., Seufert, G., Tenhunen, J.D. (2002). Stomatal constraints may affect emission of oxygenated monoterpenoids from the foliage of *Pinus pinea*. *Journal of Plant physiology* .(130): 1371-1385.

Peres, L. E. P. (2004) Metabolismo secundário. Piracicaba – São Paulo: Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz. ESALQ/ SP, . p. 01 - 26.

Peixoto, A. L. & Gentry, A. (1990). Diversidade e composição florística na mata de tabuleiro na Reserva Florestal de Linhares.

Polhill, R. M. & Raven, P. H. (1981). Advances in Legume Systematics. *Royal Botanic Gardens, Kew*, 1049.

Oliveira-Filho, A. T.; Almeida, R. J.; Melo, J.M & Gavilanes, M. L. (1994). Estrutura fitossociológica e variáveis ambientais em um trecho de mata ciliar do córrego dos Vilas Boas, Reserva Biológica do Poço Bonito, Lavras (MG). *Revista Brasileira de Botânica* 17(1): 67-85.

Oliveira-Filho, A.T. & Fontes, M.A. (2000). Patterns of floristic differentiation among Atlantic Forest in Southeastern Brazil and the influence of climate. *Biotropica* 32(4b): 793-809.

Radambrasil. (1983). Rio de Janeiro/ Vitória; Geologia, Geomorfologia, Pedologia, Vegetação e uso Potencial da Terra- SF. 23/24. Projeto RADAMBRASIL, Rio de Janeiro.

Reccio, M.C., Giner, R.M., Mañez, S., Rios, J.L. (1995). Requirement for the anti-inflammatory Activity of Natural Triterpenoids. *Planta Medica*, v.61, p. 182-185.

Reitz, R.; Klein, R. M.; Reis, A. (1988). Projeto madeira do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, Herbário Barbosa Rodrigues - H.B.R.; Superintendência do desenvolvimento da Região Sul - SUDESUL; Secretaria da Agricultura e Abastecimento - DRNR, p. 525.

Rodriguez – Concepción, M & Boronat. (2002). A Elucidation of the nethylerythritol phosphate partway of isoprenoid biosynthesis in bacteria and plastids. A metabolic milestone achieved through genomics. *Plant physiology*. (130):1079-1089.

Safayhi, H., Sailer, E.R. (1997). Anti-inflammatory Actions of Pentacyclic Triterpenes. *Planta Medica*. V. 63, p.487-493.

Siqueira, M.J., Bomm, D.M., Pereira, G.F.N., Garcez, S.W., Boaventura, D.A. M. (1998). Estudo fitoquímico de *Unonopsis lindmanii*-Annonaceae, biomonitorado pelo ensaio de toxicidade sobre a *Artemia salina* Leach. *Química Nova*. 21(5).

Souto, J.J.P. (1984). Deserto, uma ameaça? Estudos dos núcleos de desertificação na fronteira sudoeste do Rio Grande do Sul. Porto Alegre: Secretaria da Agricultura - *Departamento de Recursos Naturais Renováveis*, 169p.

Souza & Vinícius Castro. (2008). *Botânica sistemática: guia ilustrado para identificação das famílias fanerógamas nativas e exóticas no Brasil*. 2 ed- Nova Odessa: Instituto Plantarum. p. 381.

Taiz, L & Zeiger, F. (2004). Plant Physiology Redwood City: *The Benjamin/Cumming Publishing*.565.

Veloso, H. P., Rangel Filho, A. L. R., Lima, J. C. A. (1991). *Classificação da vegetação brasileira adaptada a um sistema universal*. Rio de Janeiro: IBGE, 124 p.

www.arvoresdobrasil.com.br (acessado em 23 de fevereiro de 2010).

www.dannemann.com (acessado em 15 de junho de 2009)

www.gbif.org (acessado em 15 de junho de 2009)

www.ildis.org/LegumeWeb, (acessado em 21 de junho de 2009).

www.plantsystematics.org, (acessado em: 21 de junho de 2009).

www.specieswikimedia.org, (acessado em 15 de maio de 2009).

www.tropmad.com.br, (acessado em 20 de março de 2009)

www.zipcode.com (acessado em 15 de junho de 2009)

Yunes, R.S., Calixto, J.B. (2001). Plantas Medicinais sob a Ótica da Química Medicinal Moderna. UNOESC, SC- Chapecó, ARGOS Editora Universitária, p. 320.

Zelada, F., Coni, H. (1995). Contribution to the study of *Piptadenia Cebil*. Tese,. *Universidad Nacional de la Plata*. Buenos Aires. p.72.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

O principal objetivo desta dissertação visou o conhecimento da química de espécime (*P. pterosperma*) do estrato arbóreo da região norte - noroeste Fluminense, através do estudo fitoquímico e avaliação da atividade citotóxica, frente às larvas de *Artemia salina*.

2.2. Objetivos Específicos

- Isolar os constituintes químicos dos extratos brutos do caule de *P. pterosperma* através de técnicas cromatográficas clássicas;
- Purificar os constituintes isolados através de cromatografia e/ou recristalização;
- Identificar os constituintes isolados através de técnicas espectrométricas (espectrometria na região do infravermelho, ressonância magnética nuclear e cromatografia gasosa acoplada ao espectrômetro de massa);
- Avaliar a atividade citotóxica dos extratos brutos de *P. pterosperma* frente às larvas de *Artemia salina*.

3. PARTE EXPERIMENTAL

3.1 Equipamentos Utilizados

- Aparelho de ponto de fusão MQAPF - 301, Microquímica.
- Balança analítica GEHAKA.
- Balança, Triple beam balance – OHAUS.
- Câmara escura UV, Cienlab.
- Cromatógrafo acoplado ao espectrômetro de massas CG/EM- QP5050, Shimadzu.
- Espectrofotômetro, IV affinity-1, Simadzu.
- Espectrofotômetro, Perkin Elmer, modelo FT-IR 1600.
- Espectrômetro de RMN, Jeol Eclipse.
- Estufa, Med clave.
- Evaporador rotativo, FISATOM.
- Luz ultravioleta portátil, Mineral lamp, modelo UVGL-25
- Micropipetas multicanal (8 canais), volume ajustável 0,25-10 mL, 5-100 mL e 20-250 mL, Gilson.
- Micropipetas, volume ajustável de 0,5-2 mL, 5-50 mL e 20-200 mL, Transferpette-Brand.
- Micropipetas, volume ajustável de 25-100 mL e 200 mL -1 mL, Oxford.
- Minivortex, biomix, modelo QL 901
- Moinho de facas tipo Willey
- Placa de aquecimento, Corning.
- Soprador serigráfico, Sternel, modelo HL 500.
- Ultra-som, Unique, modelo USC 1450.

3.2 Reagentes utilizados

- Acetato de etila P.A., Vetex, Synth.
- Acetona P.A., Synth.
- Ácido acético glacial P.A., Vetec.
- Ácido sulfúrico P.A., Isofar.
- Anisaldeído, Vetec.
- Carbonato de cálcio, Vetec.
- Cloreto de alumínio, Vetec.
- Cloreto de cálcio, Vetec.
- Cloreto de magnésio, Vetec.
- Cloreto de sódio, Vetec, Reagen.
- Clorofórmio deuterado, Cambridge Isotope.
- Clorofórmio P.A., Synth.
- Diclorometano P.A., Synth.
- Dimetilsulfóxido (DMSO), Vetec.
- Etanol P.A., Synth.
- Hexano P.A., Synth.
- Metanol deuterado, Cambridge Isotope.
- *n*-Butanol P.A., Synth.
- Sulfato de sódio anidro P.A., Vetec.

3.3. Material de Consumo utilizado

- Cromatofolhas de sílica gel 60, Merck.
- Papel de filtro qualitativo, porosidade 3 micras, Nalgon.
- Papel de pH Universalindikator pH 0-14, Merck.
- Pipetas de Pasteur, vidro.
- Ponteiras, 0,2-10 mL, VWR.
- Sílica gel 60G F₂₅₄ para CCDP, Merck.
- Sílica gel 60G F₂₅₄ para CCDA, Merck.
- Sílica gel para coluna, 70-230 mm, Merck.
- Sílica gel para coluna, 0,063- 0,200 mm, Merck.
- Tubos de ressonância, 5 mm, Wilmad-Lab-Glass.

3.4 Solução reveladora Empregada nos Processos Cromatográficos em Camada Delgada.

3.4.4 Solução de Vanilina Sulfúrica

Foi preparada uma solução de vanilina sulfúrica a partir da adição de 3,0 gramas de vanilina em 135 mL de água destilada juntamente com 135 mL de álcool etílico e 30 mL de ácido sulfúrico.

3.5 Levantamento Bibliográfico

Realizado através de pesquisa bibliográfica de periódicos em bibliotecas e em sítios disponíveis na INTERNET, tais como *Chemical abstracts*, *Web of Science*, *Scirus* e etc.

3.6 Material Vegetal

O caule de *Parapiptadenia pterosperma* foi coletado no Parque Taquaruçú (Mata do Bom Jesus), localizado no município de Campos dos Goytacazes, RJ, em maio de 2008.

Inicialmente foi realizada a triagem do material coletado, quando foi separado folhas e caule. O material vegetal (caule) foi diretamente submetido à secagem a temperatura ambiente durante 7 dias.

3.7 Preparação dos Extratos Brutos do Caule de *Parapiptadenia pterosperma*

O material vegetal seco (1498,4 g) foi pulverizado em moinho de facas tipo Willey e submetido à maceração exaustiva com hexano, clorofórmio, metanol e metanol/água (8:2).

Os extratos foram concentrados em evaporador rotatório, a aproximadamente 50 °C, sob pressão reduzida, até obtenção de um resíduo. Os extratos brutos obtidos foram transferidos para frasco previamente pesado e mantido em capela de exaustão, por no mínimo, 48 h, com exceção do extrato

metanol/água que foi reduzido com auxílio da adição de butanol. Esse procedimento forneceu 117,3 g de extrato hexânico, 100,0g de extrato em clorofórmio, 100 g de extrato em metanol e 32,0 g de extrato em metanol/água (8:2).

Todos os fracionamentos cromatográficos foram monitorados por cromatografia em camada delgada analítica de sílica gel (CCDA), utilizando-se diversos eluentes. Apresenta-se na Figura 9 o fluxograma resumido da obtenção dos extratos. Os cromatogramas foram observados sob luz visível e ultravioleta (254 e 365 nm) após revelação com a solução reveladora descrita no item 3.4.4. As frações foram reunidas de acordo com seus perfis, sendo concentradas em evaporador rotatório a 40-60°C e transferidas para frascos previamente tarados e mantidas em capela de exaustão, para eliminação do solvente remanescente.

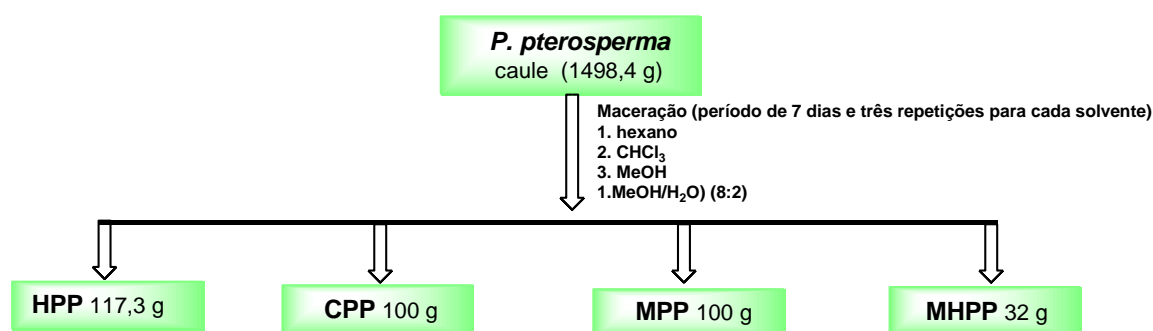


Figura 9: Fluxograma resumido dos extratos oriundos do caule de *P. pterosperma*.

Legenda:

HPP = Extrato hexânico de *P. pterosperma*;

CPP = Extrato em clorofórmio de *P. pterosperma*;

MPP = Extrato metanólico de *P. pterosperma*;

MHPP = Extrato hidrometanólico de *P. pterosperma*

3.8 TESTES GENÉRICOS PARA IDENTIFICAÇÃO DE TRITERPENOS E ESTERÓIDES.

3.8.1 Avaliação dos testes genéricos para identificação de triterpenos e esteróides.

Para determinar a presença dos metabólitos especiais foram utilizados diferentes técnicas, tais como:

- ✓ Reação de Liebermann Burchard (triterpenos e esteróides)

Uma alíquota de 5,0 mg dos extratos brutos secos foram resuspendidos em 5,0 mL de clorofórmio, em seguida adicionou-se carvão ativo e prosseguiu-se com uma filtração, logo após foram adicionadas gotas do reagente de Liebermann Burchard (2 mL de anidrido acético mais duas gotas de ácido sulfúrico). A coloração verde persistente indica a presença de triterpenos e esteróides (Costa, 1982).

- ✓ Reação de Salkowski

Uma alíquota de 5,0 mg dos extratos brutos secos foram resuspendidos em 5,0 mL de clorofórmio, em seguida adicionou-se carvão ativo e prosseguiu-se com uma filtração, logo após foram adicionadas gotas de ácido sulfúrico concentrado. A coloração verde persistente indica a presença de triterpenos e a coloração mutável indica a presença de esteróides (Costa, 1982).

3.9. Fracionamento do Extrato Hexânico (HPP)

O extrato hexânico (117,3g) foi submetido ao fracionamento preliminar utilizando cromatografia em coluna de gel de sílica (malha 0,063 a 0,200 mm), empregando-se como série eluotrópica *n*-hexano (Hx), éter de petróleo (Ep), diclorometano (DCM), acetato de etila (EtOAc) (1:1) e metanol (MeOH), ou seja, em gradiente crescente de polaridade. Após este procedimento obtiveram-se cinco frações que foram concentradas sob pressão reduzida em evaporador rotativo.

A fração de diclorometano (2,0 g) foi fracionada através de cromatografia tipo *flash* em coluna de gel de sílica (malha 0,05 a 0,063 mm), utilizando como sistema de solvente éter de petróleo e acetato de etila (95:5). Após este procedimento foram obtidas 263 frações. Após análise por CCDA, as frações que apresentaram o mesmo Rf foram reunidas.

As frações de 1- 40 não foram trabalhadas por apresentarem grande quantidade de material graxo.

A subfração obtida da união das frações 41- 50 (65,02 mg) foi acrescentado hexano. Este procedimento gerou duas frações, uma solúvel em hexano (sobrenadante) e outra insolúvel (precipitado). Através de CCDA verificou-se que esta quando revelada com vanilina sulfúrica, apresentava-se como uma única mancha. Tratando-se da substância (PP - 01).

A parte solúvel em hexano apresentou material graxo e, portanto não foi trabalhada.

A subfração obtida da reunião das frações 51- 65 (93,50 mg) foi fracionada através de cromatografia CC/*flash*, utilizando como eluente diclorometano e hexano (1:1). Após este procedimento foram obtidas 114 frações. Após análise por CCDA, as frações que apresentaram o mesmo Rf foram reunidas.

Foram reunidas as frações 84 - 162 (326,01 mg) dentre estas, algumas apresentaram material cristalino (frações 104 -117), que foi separado da água mãe através de filtração em papel de filtro.

A água mãe foi submetida à CC/*flash* utilizando como eluente éter de petróleo e acetato de etila (95:5). Após este procedimento foram obtidas 26 frações. A subfração obtida da reunião das frações 15-26 (80,20 mg) foi submetida ao mesmo procedimento anterior fornecendo 89 frações. A subfração obtida da união entre as frações 27-35 (59,11 mg) foi fracionada utilizando-se CC/*flash*, obtendo-se 45 frações. A subfração obtida da união entre as frações 17-34 (40,21 mg) foi fracionada utilizando-se CC/*flash* obtendo-se 24 frações. A subfração obtida da reunião entre as frações 16-24 (20,05 mg) foi fracionada utilizando-se cromatografia preparativa (CCDP), o sistema de solvente utilizado

foi éter de petróleo e acetato de etila (9:1). Este processo resultou na mistura de substâncias PP-02a, PP-02b, PP-02c e PP-02d (27,34 mg).

Os cristais da fração anterior foram solubilizados em diclorometano e fracionados utilizando-se CC/flash, o sistema de solvente empregado foi éter de petróleo e acetato de etila (9:1), resultando na mistura de substâncias PP-03a, PP-03b e PP-03c.

Na Figura 10, p.34 apresenta-se o fluxograma resumido das amostras oriundas do fracionamento do extrato hexânico do caule de *P. pterosperma* e na Tabela 3 listados os grupos de frações cromatográficas, massas obtidas e seus respectivos códigos.

Tabela 3. Fracionamento do extrato hexânico do caule de *P. pterosperma* (HPP) através de cromatografia em coluna aberta de sílica gel.

Fração	Massa	Código
41 - 50	65,02 mg	PP-01
16 - 24	27,34 mg	PP - 02a, PP - 02b, PP - 02c e PP - 02d
104 -117	33,11 mg	PP - 03a, PP - 03b e PP - 03c

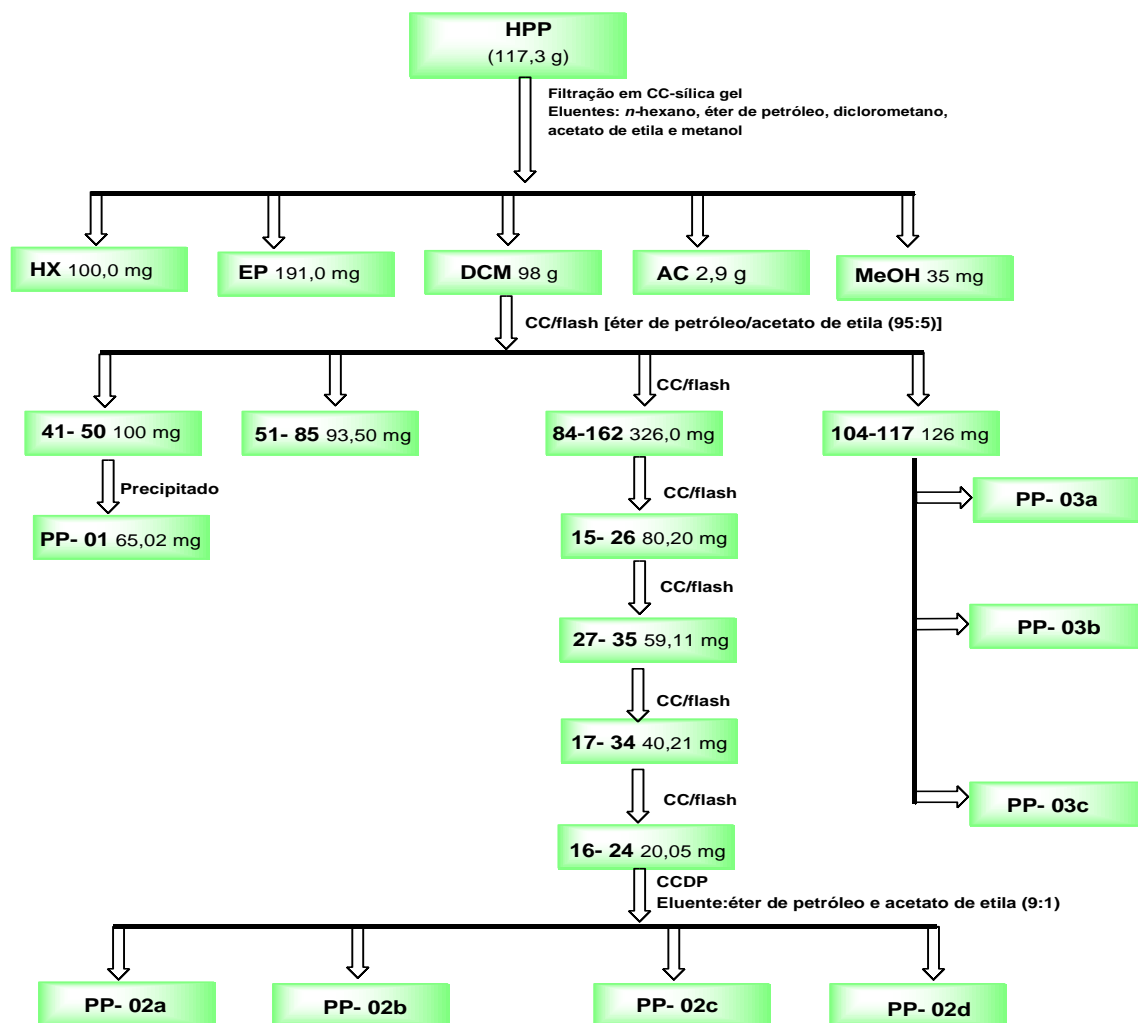


Figura 10. Fluxograma resumido das amostras oriundas do fracionamento do extrato hexânico do caule de *P. pterosperma*.

Legenda:

HPP = Extrato hexânico de *P. pterosperma*;

HX = Fração em hexano de *P. pterosperma*;

EP = Fração em éter de petróleo de *P. pterosperma*;

DCM = Fração em diclorometano de *P. pterosperma*;

AC = Fração em acetato de etila de *P. pterosperma*;

MeOH = Fração em metanol de *P. pterosperma*

3.10. Fracionamento do extrato em clorofórmio (CPP)

Uma alíquota do extrato em clorofórmio (10,0 g) foi submetido a fracionamento preliminar em coluna CC utilizando como eluente éter de petróleo (Ep), diclorometano (DCM), acetato de etila (EtOAc) e metanol (MeOH) em gradiente crescente de polaridade. Após este procedimento obtiveram-se quatro frações que foram concentradas sob pressão reduzida em evaporador rotativo.

A fração em acetato de etila (1,5 g) foi fracionada em CC/flash, utilizando como eluente clorofórmio e acetato de etila (90:10). Após este procedimento foram obtidas 75 frações. Após análise por CCDA, as frações que apresentaram o mesmo Rf foram reunidas. A subfração 1 – 3 (5,5 mg) resultou na mistura de substâncias PP-04a e PP-04b.

Na Figura 11 apresenta-se o fluxograma resumido das amostras oriundas do fracionamento do extrato em clorofórmio do caule de *P. pterosperma*.

Tabela 04. Fracionamento do extrato em clorofórmio do caule de *P. pterosperma* (CPP) através de cromatografia em coluna.

Fração	Massa	Código
1-3	5,50 mg	PP-04a, PP-04b.

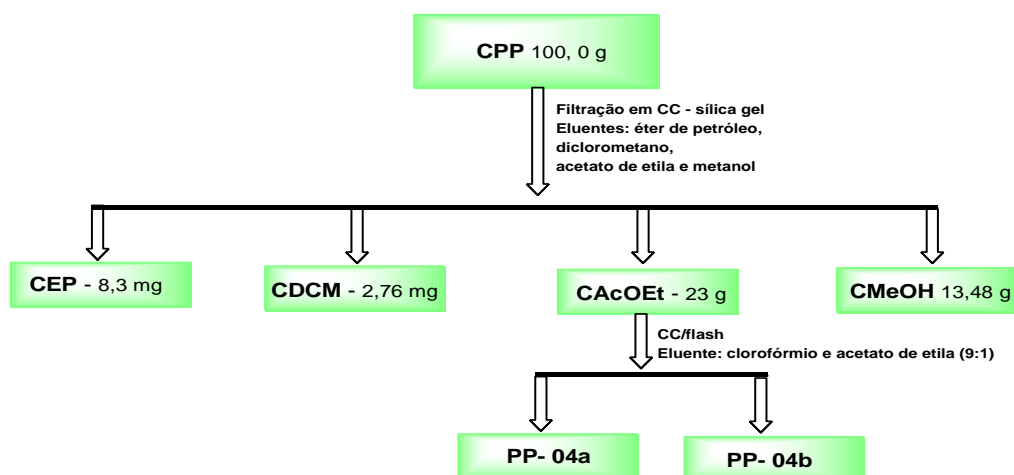


Figura 11: Fluxograma resumido das amostras oriundas do fracionamento do extrato em clorofórmio do caule de *P. pterosperma*.

Legenda:

*Frações não estudadas

CPP = Extrato em clorofórmio de *P. pterosperma*

CEP = Fração em éter de petróleo de *P. pterosperma*

CDCM = Fração em diclorometano de *P. pterosperma*

CAcOEt = Fração em acetato de etila de *P. pterosperma*

CMEOH = Fração em metanol de *P. pterosperma*

3.11. Fracionamento do extrato em metanol (MPP)

O extrato em metanol (100,0 g) foi submetido ao fracionamento preliminar em CC, utilizando como eluente clorofórmio, acetato de etila e *n*-butanol, em gradiente crescente de polaridade. Após este procedimento obtiveram-se três frações (fração eluída com CHCl₃, AcOEt e BuOH) que foram concentradas sob pressão reduzida em evaporador rotativo.

Da fração eluída com AcOEt foi retirada uma alíquota de 100,00 mg que foi então submetida a fracionamento em coluna de sílica, utilizando-se como eluente hexano e clorofórmio (3:7). Este procedimento resultou em 56 frações. Após análise por CCDA, as frações que apresentaram o mesmo R_f foram reunidas.

A subfração obtida da reunião entre as frações 10 -14, quando revelada com vanilina sulfúrica, apresentava-se como uma única mancha que recebeu o código (PP - 05).

Outra alíquota (5,00 g) foi dissolvida em pequena quantidade de metanol. Em seguida adicionou-se acetato de etila (quantidade suficiente para formação de precipitado). O precipitado (A1) foi separado do sobrenadante através de filtração em papel de filtro. Ao sobrenadante adicionou-se éter de petróleo até formação de novo precipitado que foi separado do sobrenadante através de filtração em papel de filtro e codificado de A2. O sobrenadante resultante deste procedimento recebeu o código A3.

O solvente do sobrenadante A3 foi eliminado sob vácuo em evaporador rotatório e o resíduo resultante (70,00 mg) foi acetilado, utilizando piridina e anidrido acético [9:1 (5 mL)]. A solução foi aquecida a aproximadamente 50°C e em seguida mantida em repouso à temperatura ambiente durante 24 horas. Após este período adicionou-se água gelada (5 mL) e procedeu-se a extração utilizando-se 3 porções de 10 mL de acetato de etila. A fase orgânica foi seca com sulfato de sódio anidro e o solvente eliminado sob vácuo em evaporador rotatório. O resíduo (produto) foi deixado em dessecador até peso constante (356,0 mg).

O produto foi submetido cromatografia em coluna, utilizando-se como eluente diclorometano e hexano (8:2). Após este procedimento foram obtidas 116 frações. A subfração obtida da reunião entre as frações 1 - 8 (58,47 mg) foi fracionada utilizando CC/flash e como eluente utilizou-se diclorometano e hexano (8:2). Após este procedimento foram obtidas 42 frações. A subfração obtida da reunião entre as frações 8 -13 quando reveladas com vanilina sulfúrica se apresentou com coloração arroxeadada, tratando-se da mistura de substâncias (PP-06a, PP-06b, PP-06c, PP-06d e PP-06e). Ofluxograma resumido desse procedimento encontra-se na Figura 12, p. 38 e 13, p. 38.

Tabela 5. Fracionamento do extrato em clorofórmio do caule de *Parapiptadenia pterosperma* (MPP) através de cromatografia em coluna.

Fração	Massa	Código
10-14	15,80 mg	PP-05
8-13	12,23 mg	PP - 06a, PP - 06b, PP - 06c, PP - 06d e PP-06e

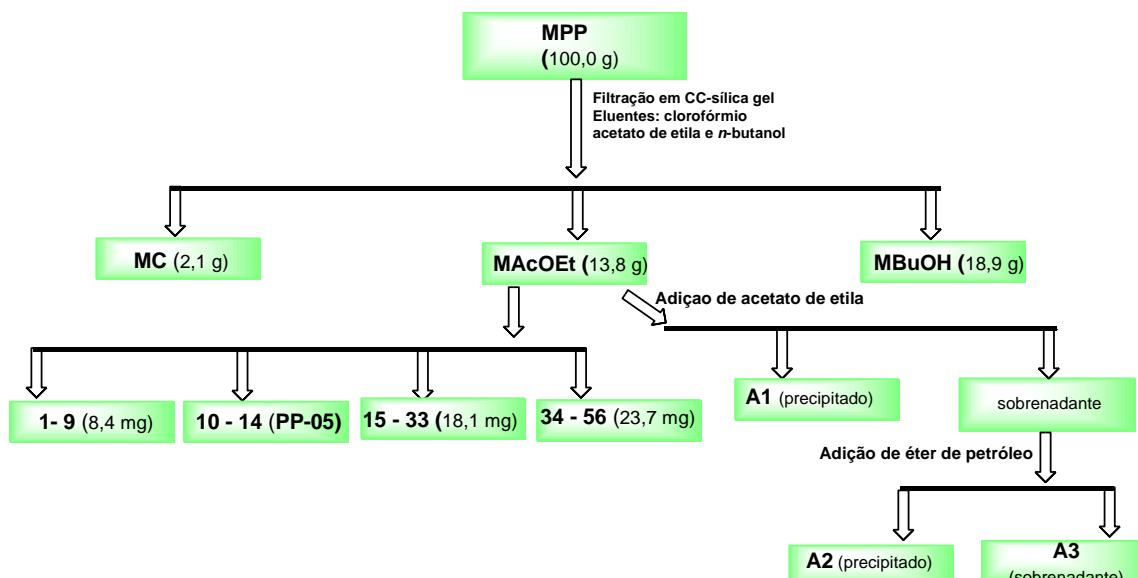


Figura 12: Fluxograma resumido das amostras oriundas do fracionamento do extrato metanólico do caule de *P. pterosperma*.

Legenda:

MPP = Extrato metanólico de *P. pterosperma*;

MC = Fração em clorofórmio de *P. pterosperma*;

MOAcEt = Fração em acetato de etila de *P. pterosperma*;

MBUOH = Fração em butanol de *P. pterosperma*.

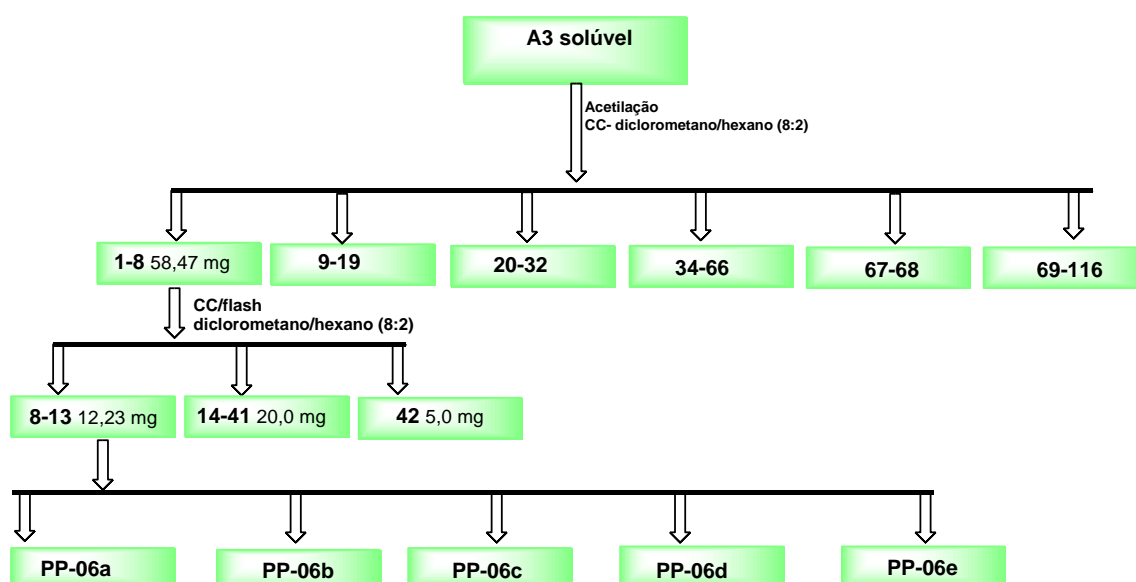


Figura 13: Fluxograma resumido de uma alíquota (produto acetilado) do extrato metanólico do caule de *P. pterosperma*.

3.12. MÉTODOS ESPECTROMÉTRICOS

3.12.1. infravermelho

Os espectros no infravermelho foram obtidos em espectrofotômetro Shimadzu, à temperatura de 25 °C. Os espectros foram adquiridos diretamente, sem emprego de diluição em brometo de potássio (KBr).

3.12.2 Ressonância Magnética Nuclear

Os espectros de RMN de ^1H de ^{13}C foram obtidos no equipamento Jeol Eclipse, a 25 °C, empregando as sondas TXI 5mm, para detecção de ^1H e ^{13}C (400 e 100 MHz), respectivamente. Utilizou-se tetrametilsilano (TMS) como referência interna, para ambos os núcleos.

3.13. CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA

3.13.1. Ponto de fusão

As faixas de fusão foram determinadas em aparelho de ponto de fusão MQAPF-301 Microquímica, e não foram corrigidas.

3.14. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE CITOTÓXICA

O teste de citotoxicidade frente às larvas de *Artemia salina* foi realizado segundo a metodologia proposta por McLaughlin (1982).

Utilizou-se para o bioensaio 50,0 mg de amostra dos extratos brutos, bem como das frações. As amostras foram solubilizadas na mistura de solvente composta por água e DMSO [3:2 (5mL)] e diluídas nas seguintes concentrações: 50, 100, 200, 300 e 500 ppm. Os testes foram realizados em quadruplicata.

Os ovos do microcrustáceo foram colocados em água do mar artificial pelo período de 48 horas na presença de luz artificial para que fossem eclodidos. Após a eclosão dos ovos foram retiradas 15 larvas, que então foram adicionadas aos tubos de ensaio. Com a adição da amostra e das larvas completou-se o volume dos tubos para 5 mL com água do mar artificial. Após um período de 24 horas em presença de luz realizou-se a contagem dos indivíduos mortos e vivos.

Os dados obtidos (porcentagem de mortos e vivos) foram analisados pelo programa Finney Probit, desenvolvido por McLaughlin para análise estatística e determinação dos valores de DL_{50} , a qual é a dose necessária para matar 50% dos indivíduos testados.

Valores de $DL_{50} \leq 1000$ são considerados ativos para extratos.

No teste em branco foram utilizados 50 $\mu\text{g/mL}$ de água: DMSO (3:2).

No controle positivo utilizou-se o oxidante dicromato de potássio ($\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$), comparado com a massa e as concentrações da amostra analisada, na qual se tem a morte de todos os indivíduos.

Para o preparo da água do mar artificial foram utilizados os seguintes sais, nas seguintes proporções para que se tenha 1L da solução; NaCl (24 g), $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (1,5g), KBr (0,1g), KCl (0,7g), Na_2SO_4 (4,0g), NaHCO_3 (0,2g) e $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (11g).

Para a eclosão dos microcrustáceos utilizou-se um microaquário (14X75 cm) dividido ao meio por uma peneira.

Os testes foram realizados em quadruplicata.

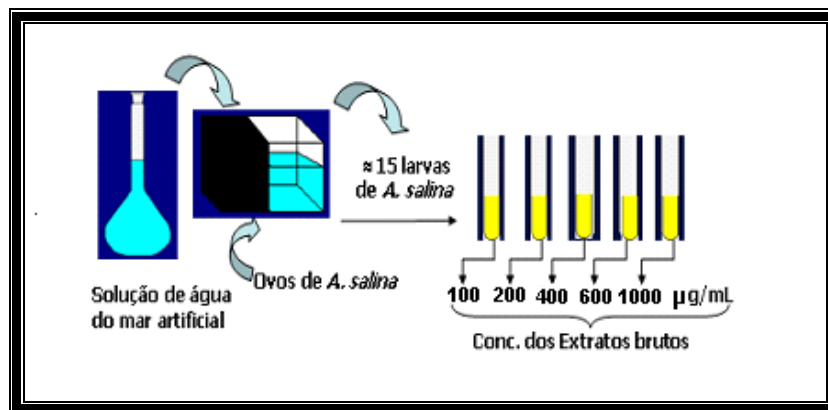


Figura 14: Avaliação da atividade citotóxica frente às larvas de *A. salina*.

3.15. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Costa, A. F. (1982). *Farmacognosia* III v. 2. ed. Lisboa, Fundação Calouste Gulbenkian.

McLaughlin, J. L. Colman-Saizarbitoria, T. e Anderso J. E. (1982). Tres bioensayos Simples para Químicos de Productos Naturales. *Revista de la Sociedad Venezolana de Química*, p.18, 13-18

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Análises Cromatográficas

O extrato hexânico, clorofórmico e metanólico do caule de *P. pterosperma* e as frações provenientes do fracionamento preliminar destes extratos foram submetidas a testes químicos para avaliação do perfil químico de metabólitos especiais e letalidade frente às larvas de *A. salina*. Estas frações (item 3.9; 3.10 e 3.11) apresentaram-se ativas, em diferentes ensaios, sendo re-fractionadas.

4.2. Resultados e discussões dos testes químicos para identificação de triterpenos e esteróides.

Os extratos brutos foram submetidos aos testes químicos para a identificação de triterpenos e esteróides.

Os resultados estão expressos na tabela abaixo:

Tabela 6: Testes químicos

Reativos	Hexano	Clorofórmio	Metanol
Liebermann-Buchard	+	+	+/-
Salkowski	+	+	-

Legenda:

(+) – Considerados positivos;

(+/-) – Considerado fracamente positivo;

(-) – Considerado negativo.

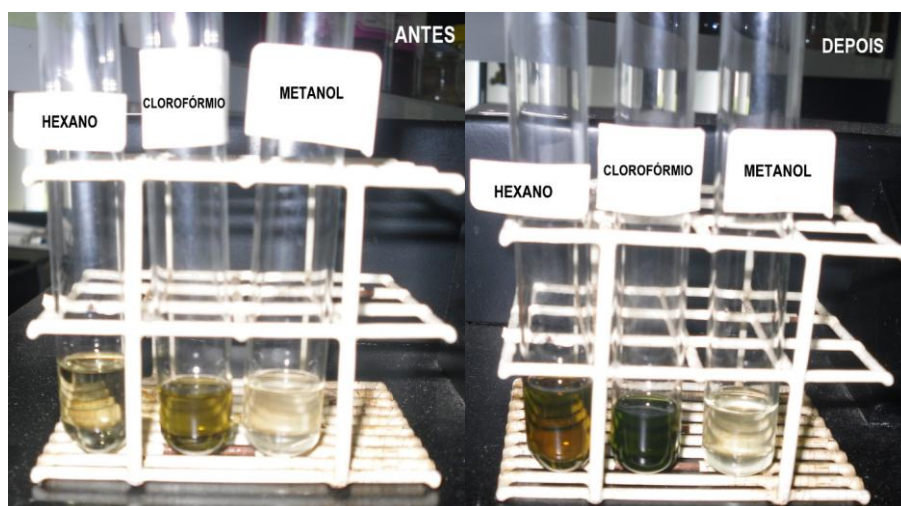


Figura 15: Teste de Liebermann-Buchard

A reação de Liebermann-Burchard permite a identificação do núcleo esteroidal da amostra, através do mecanismo demonstrado abaixo. Quando o reagente é adicionado à amostra ocorre uma mudança de coloração da mesma, tornando-a esverdeada, isto acontece devido a formação de um derivado sulfônico.

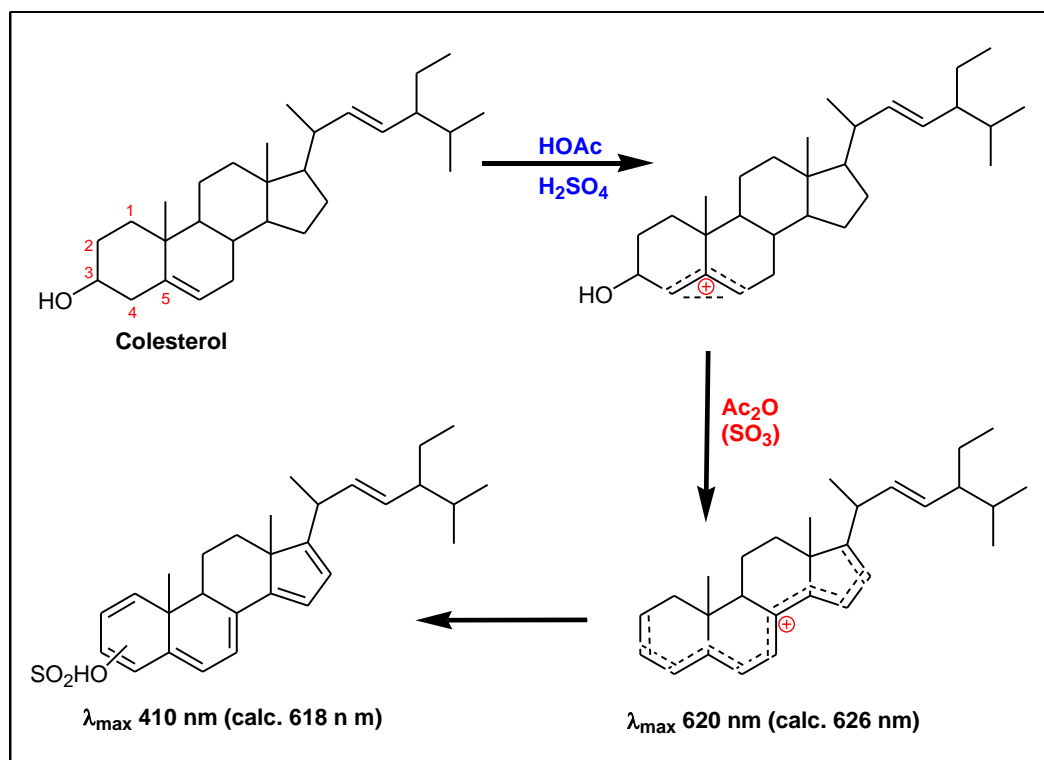


Figura 16: Mecanismo proposto para a reação de Liebermann-Burchard

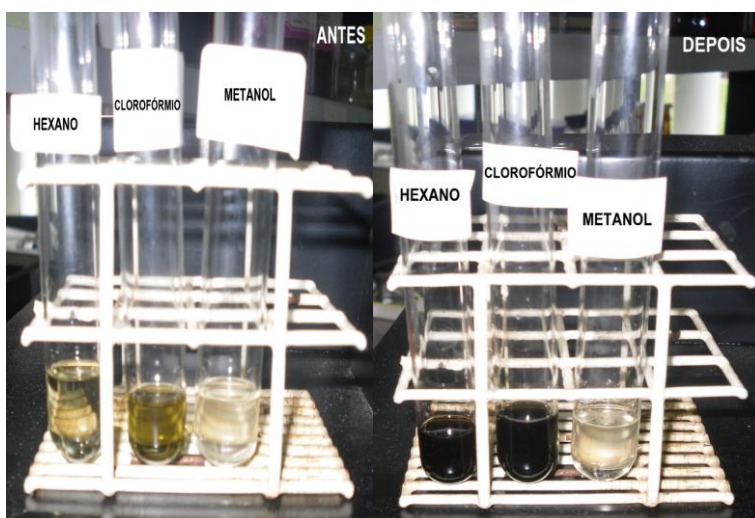


Figura 17: Teste de Salkowski.

4.3 IDENTIFICAÇÃO DOS CONSTITUÍNTES QUÍMICOS DO CAULE DE *P. pterosperma*

4.3.1. Identificação da fração 41-50 do extrato hexânico (PP-01).

A substância PP-01 foi obtida da fração 41-50 do extrato hexânico, por eluição (Éter de petróleo/ AcOEt na proporção 9:1, respectivamente) utilizando como método de separação cromatografia em camada delgada preparativa (CCDP) (item 3.9). PP-01 apresentou-se como um sólido branco cristalino, com faixa de fusão 255,2 - 255,7°C.

A análise do sólido através de CCDA (item 3.9), eluente Éter de petróleo/ AcOEt (9:1), sugeriu, tratar-se de uma substância triterpenoídica, em função da mancha de coloração arroxeadada, obtida após revelação com solução de vanilina sulfúrica, seguido de aquecimento. (Wagner *et al.*, 1983; Mills *et al.*, 2003). Quantidades adicionais da substância PP-01 também foram encontradas nas frações 41-50 do extrato hexânico e nas frações 1-3 do extrato clorofórmico. Assim, a solubilidade de PP-01 foi determinada em CH₂Cl₂.

A análise do espectro de PP-01 na região do infravermelho evidenciou sua natureza alifática, pela presença de bandas de intensidade em 2966,52 - 2866,22 e bandas de intensidade 1458,18-1384,89 cm⁻¹ atribuídas ao estiramento e à deformação C-H de carbono alifático (metílicos, metilênicos e metínicos) respectivamente, além disso, observou-se uma banda intensa de

absorção condizente com a presença de grupo carbonílico de cetona em anéis de seis membros em $1712,79\text{ cm}^{-1}$ (Silverstein *et al.*, 2005; Pavia *et al.*, 2001). Na Figura 18 apresenta-se o espectro na região do infravermelho de PP-01.

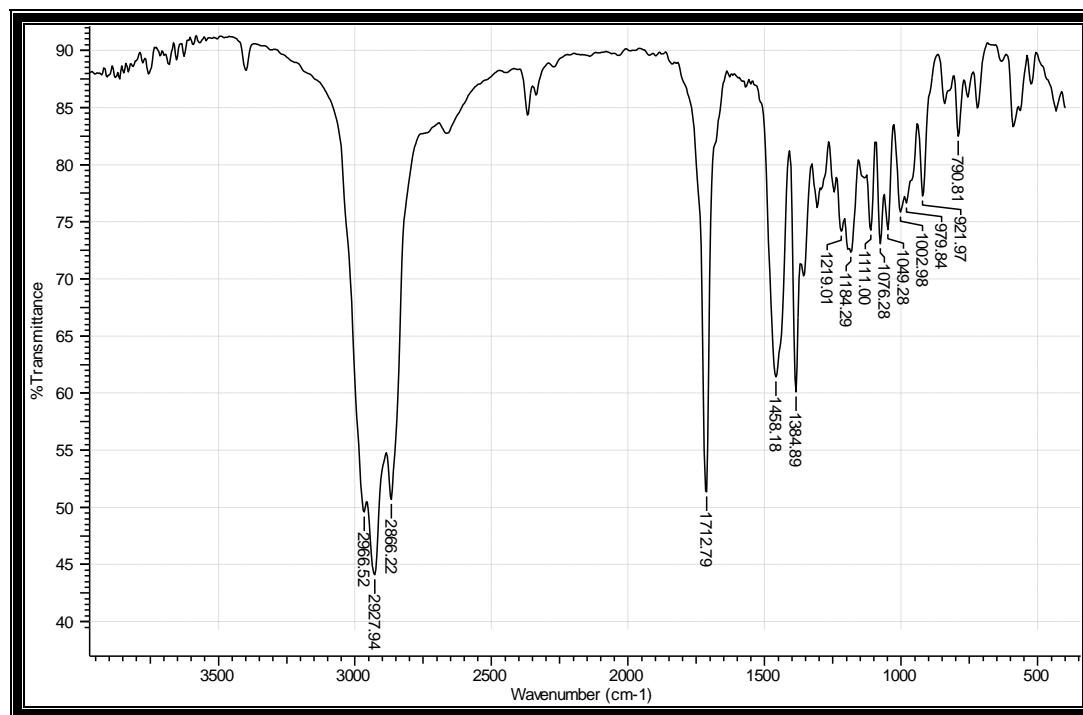


Figura 18. Espectro de absorção molecular obtido na região do infravermelho para PP - 01.

O espectro de massas de baixa resolução, obtido por inserção via CG, apresentou t_R em 26,28 min e pico do íon molecular em m/z 426 [M^+], além dos picos a m/z 411 [$M^+ - (CH_3)$], m/z 302 [$M^+ - (C_9H_{16})$] e m/z 273. A Figura 20, p. 48 apresenta a provável fragmentação de PP-01.

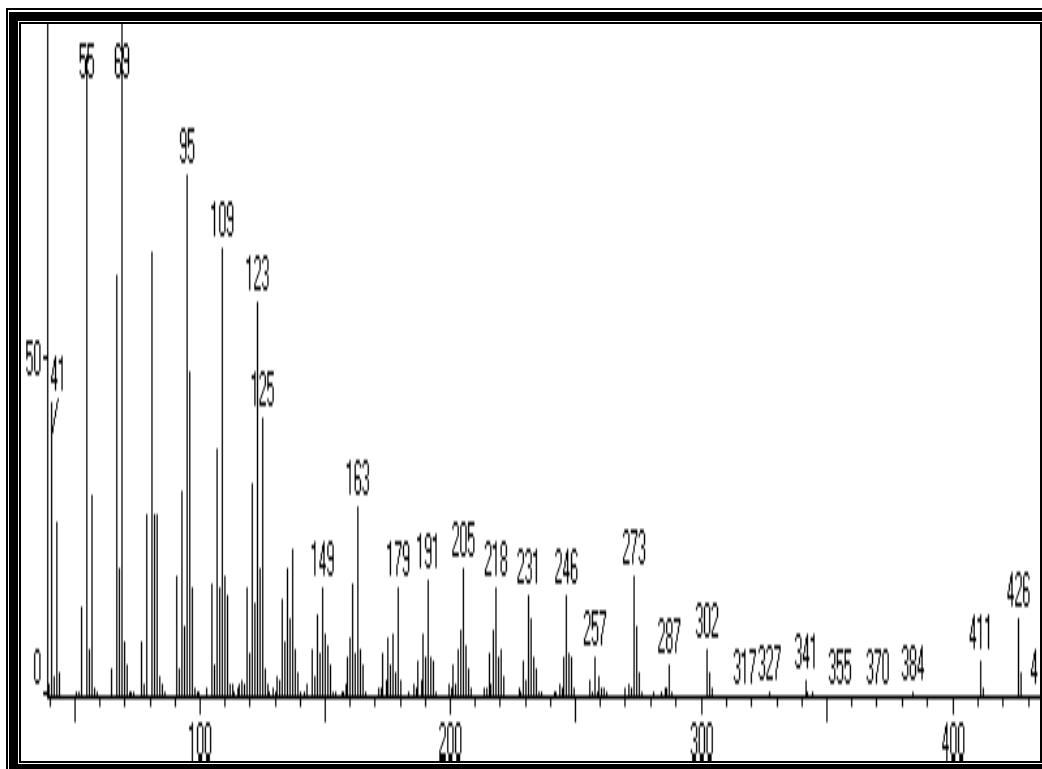


Figura 19. Fragmentograma de massas da substância PP-01 (70 eV)

O espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) da substância PP-01 (Figuras 21-24, p.48-50) apresentou 8 sinais entre 0,70 e 1,2 ppm indicando a presença de oito grupos metílicos na molécula a 0,72; 0,86; 0,88; 0,95; 0,99; 1,0; 1,04; 1,17 ppm (Figura 22, p.49), referentes aos hidrogênios dos carbonos C-24, C-25 e C-29, C-30, C-26, C-27, e C-28 respectivamente. O espectro ainda apresentou sinais múltiplos entre 2,20 - 2,45 ppm (Figura 23, p.49), indicando a presença de três hidrogênios ligados α a carbonila, juntamente com sinais entre 1,25 - 1,76 ppm (Figura 24, p.50), que confirmam a presença de hidrogênios ligados a carbonos sp^3 (metilênicos e metínicos) na molécula.

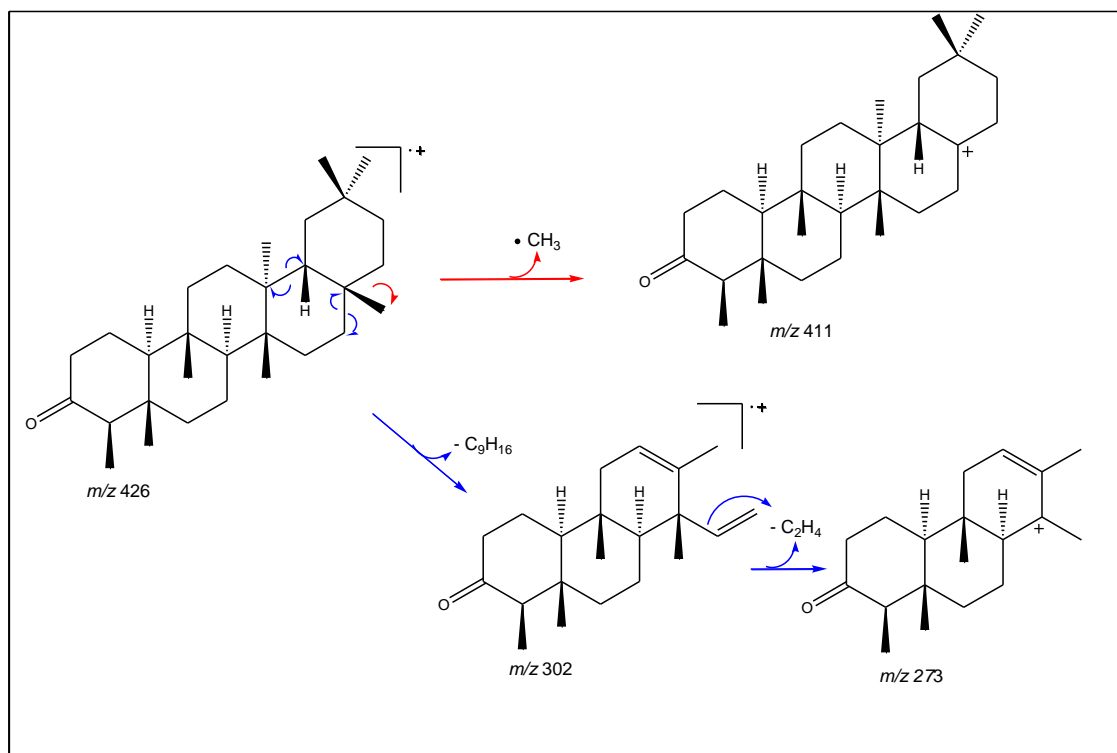


Figura 20: Provável mecanismo de fragmentação de massas de PP-01.

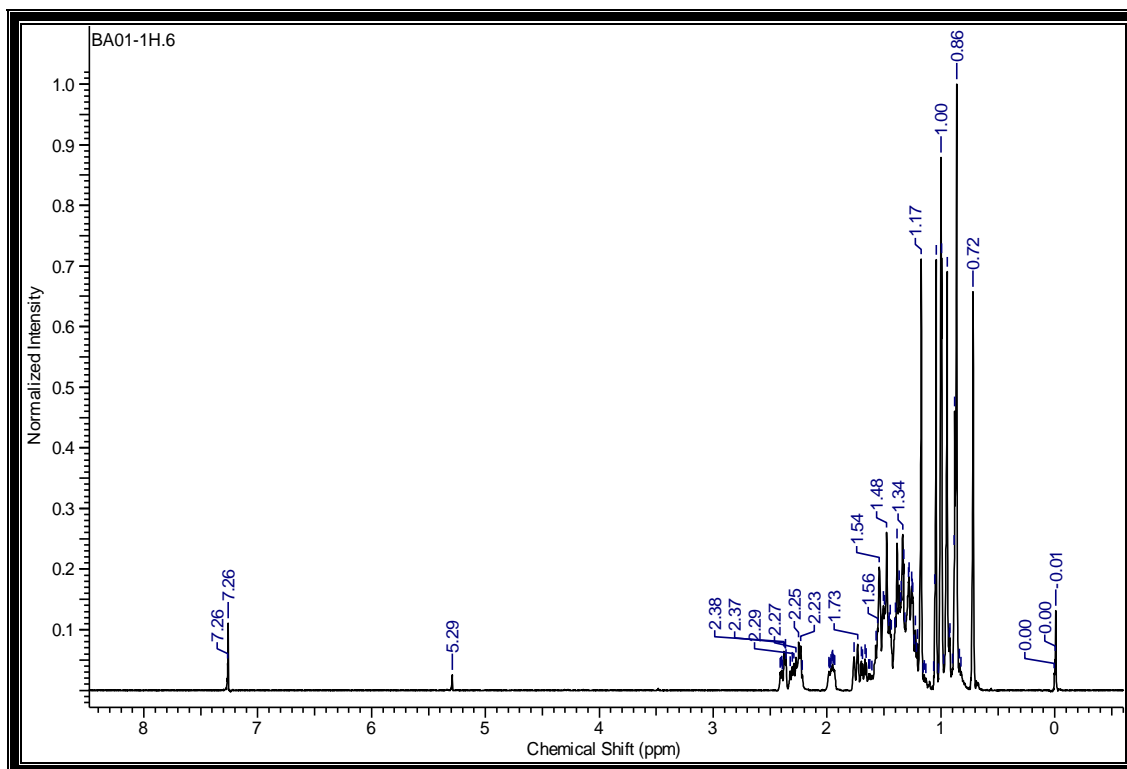


Figura 21. Espectro de RMN de ¹H obtido para PP-01 (400 MHz, CDCl₃).

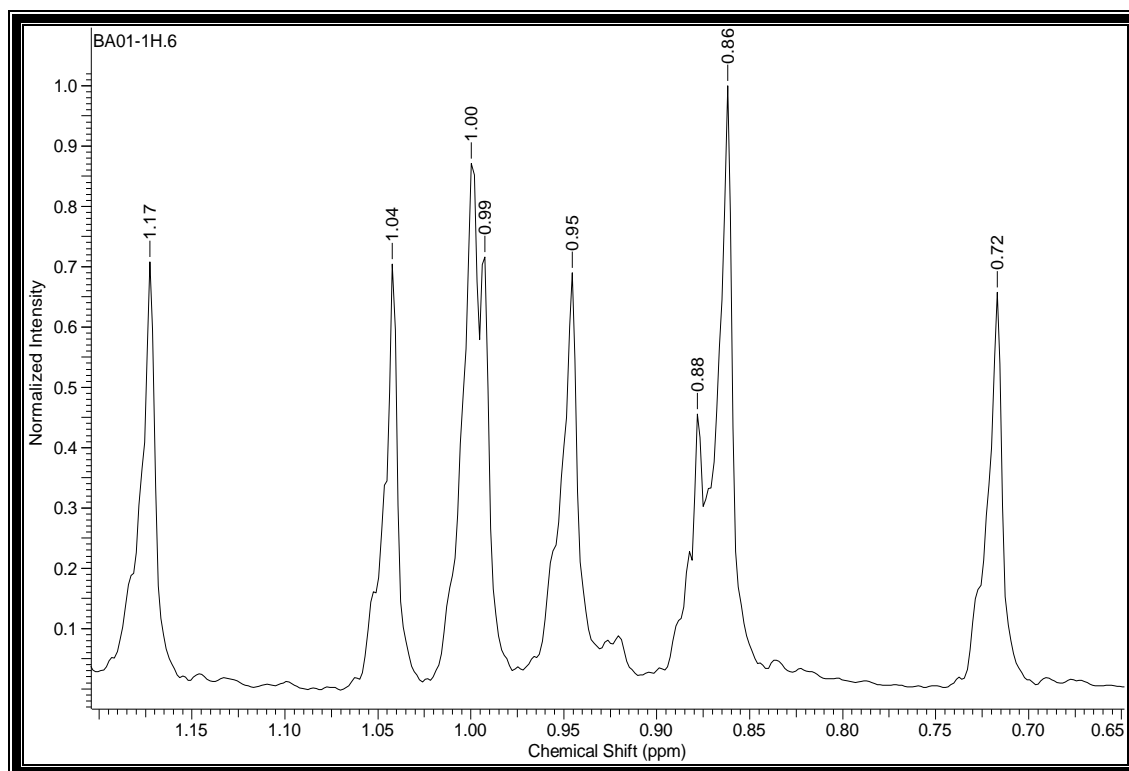


Figura 22: Ampliação do espectro de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) de PP-01 na região de δ_{H} 0,72 a 1,17 ppm.

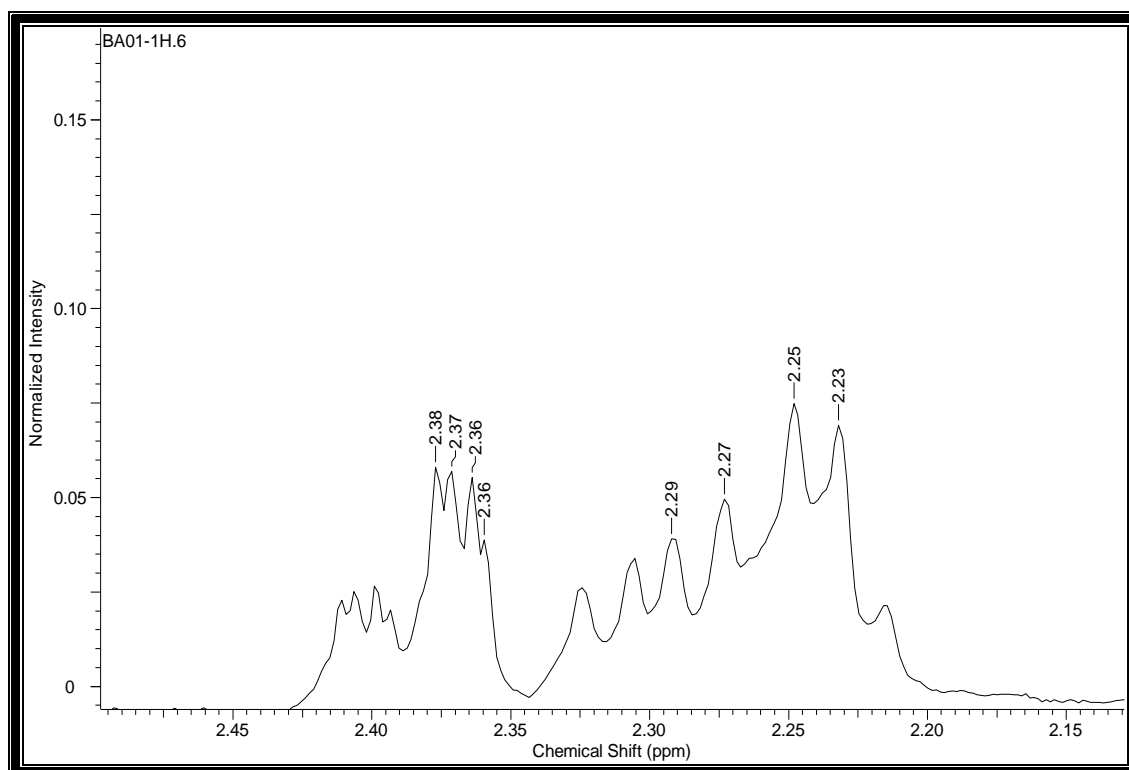


Figura 23. Ampliação do espectro de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) de PP-01 na região de δ_{H} 2,20 a 2,45 ppm.

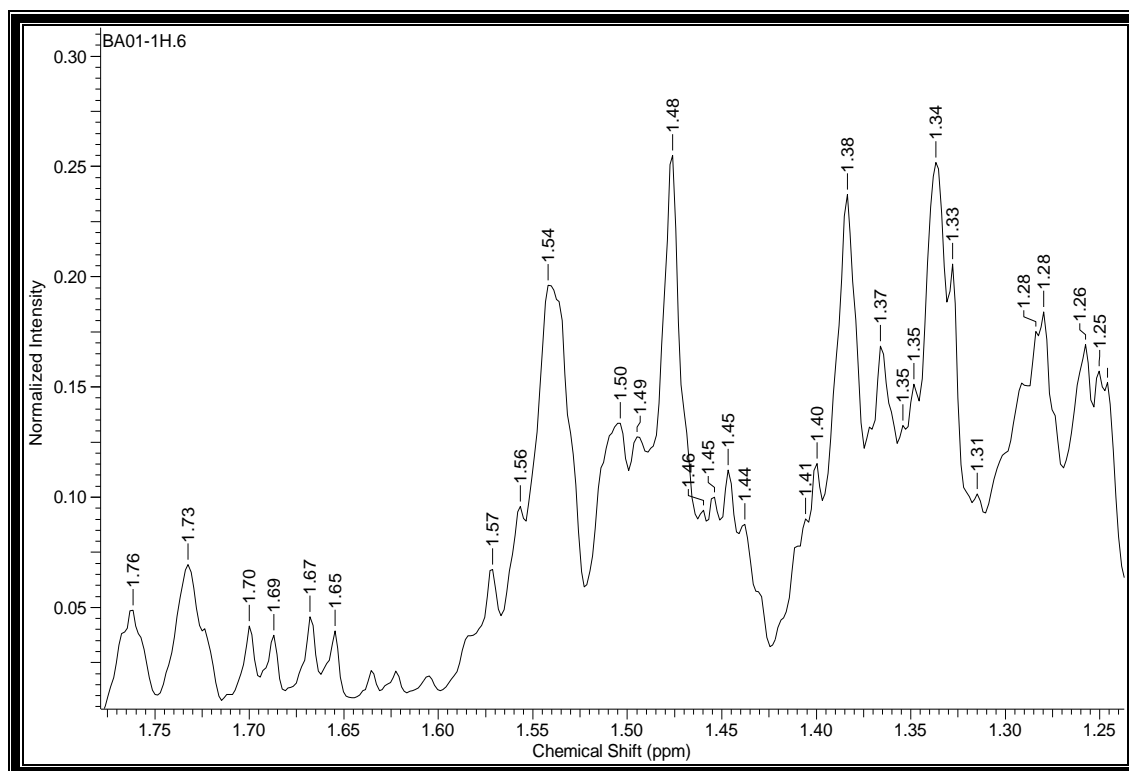


Figura 24. Ampliação do espectro de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) de PP-01 na região de δ_{H} 1,25 a 1,76 ppm.

O espectro de RMN de ^{13}C desacoplado de ^1H (75 MHz, CDCl_3) obtido para PP-01 (Tabela 07, p.55; Figuras 25-26, p.51-52) apresentou sinais que permitiram identificar um total de trinta átomos de carbonos, confirmando seu caráter triterpênico. A concentração de sinais na região abaixo de 70 ppm caracteriza a presença de carbonos sp^3 . Sendo quatro terciários (CH), onze secundários (CH_2), oito primários (CH_3) e sete não hidrogenados. Ao grupo carbonílico de cetona em anel de seis membros foi atribuído o sinal a 213,3 ppm (C-3). A metila em C-23 aparece a 6,9 ppm evidenciando proteção devido a efeito γ -gauche da carbonila. Os sinais dos carbonos C-2, C-4, C-5 e C-24 aparecem a 41,6; 58,3; 42,8 e 14,6 ppm respectivamente. Os valores assinalados estão de acordo com a presença de um triterpeno pentacíclico de esqueleto friedelano. A atribuição dos sinais baseou-se na comparação com dados relatados para triterpenos (Akihisa *et al.*, 1992; Olea e Roque, 1990; Mahato e Kundu, 1994).

A localização das metilas pode ser comprovada pela correlação J_{CH} entre δ_{H} 0,87 e δ_{C} 6,9 (C-23), δ_{H} 0,72 e δ_{C} 14,7 (C-24), δ_{H} 0,86 e δ_{C} 18,0 (C-25), δ_{H} 1,05 e δ_{C} 18,6 (C-26), δ_{H} 1,0 e δ_{C} 20,2 (C-27), δ_{H} 1,17 e δ_{C} 32,1 (C-28), δ_{H} 0,99 e

δ_C 31,8 (C-29), δ_H 0,95 e δ_C 35,1 (C-30), apresentadas no espectro de correlação heteronuclear HMQC (Figuras 27 - 28, p.52-53).

As mesmas podem ainda ser confirmadas através das correlações a longa distância entre o átomo de carbono C-4 em δ_C 58,3 com hidrogênios em δ_H 0,72 (3H-24), o átomo de carbono C-6 em δ_C 41,3 com hidrogênios em δ_H 0,72 (3H-24), o átomo de carbono C-8 em δ_C 53,1 com hidrogênios em δ_H 0,86 (3H-25) e δ_H 1,05 (3H-26), o átomo de carbono C-29 em δ_C 31,8 com hidrogênios em δ_H 0,95 (3H-30) e o átomo de carbono C-30 em δ_C 35,1 com hidrogênios em δ_H 0,99 (3H-29) apresentadas no espectro de HMBC (Figuras 29-30, p.53-54).

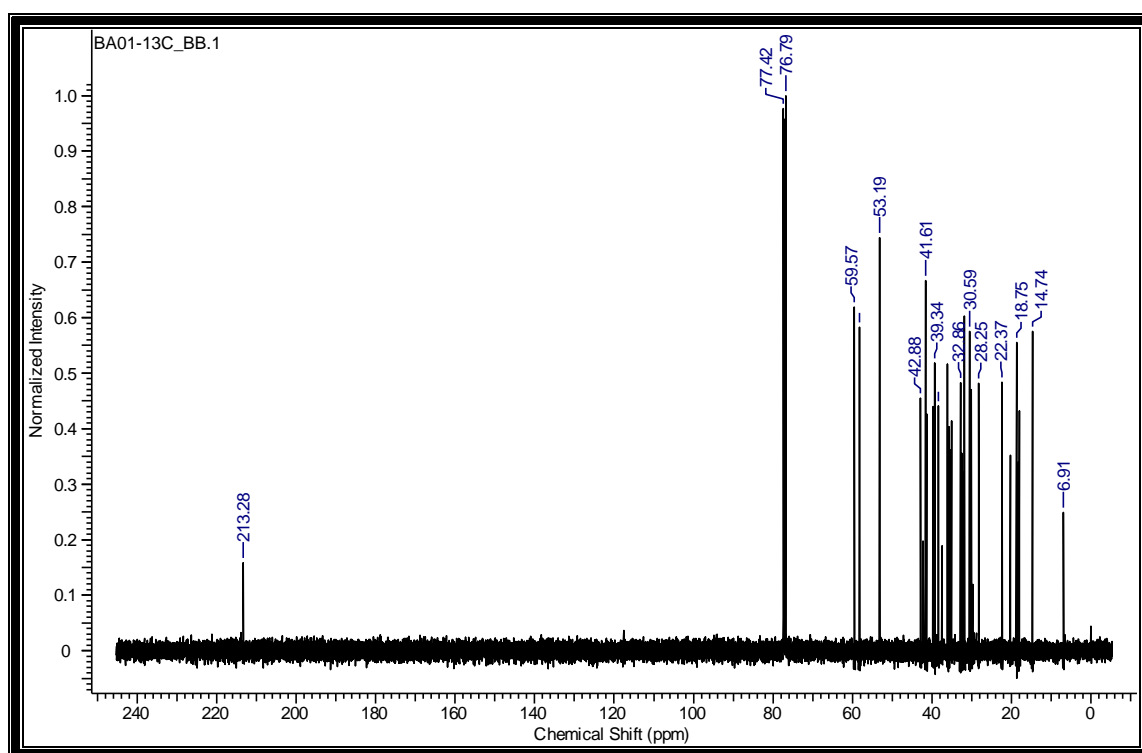


Figura 25. Espectro de RMN de ^{13}C obtido para PP-01 (100 MHz, CDCl_3).

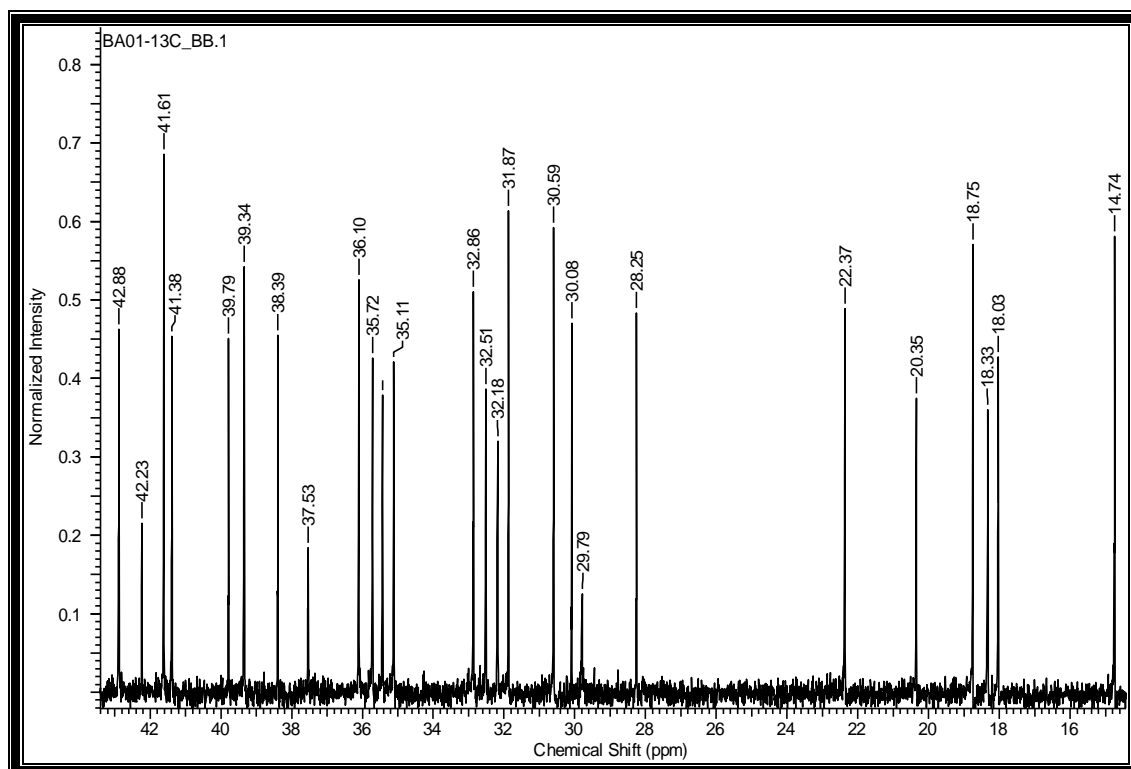


Figura 26. Ampliação do espectro de RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) de PP-01 na região de δ_{C} 14,7 a 42,8 ppm.

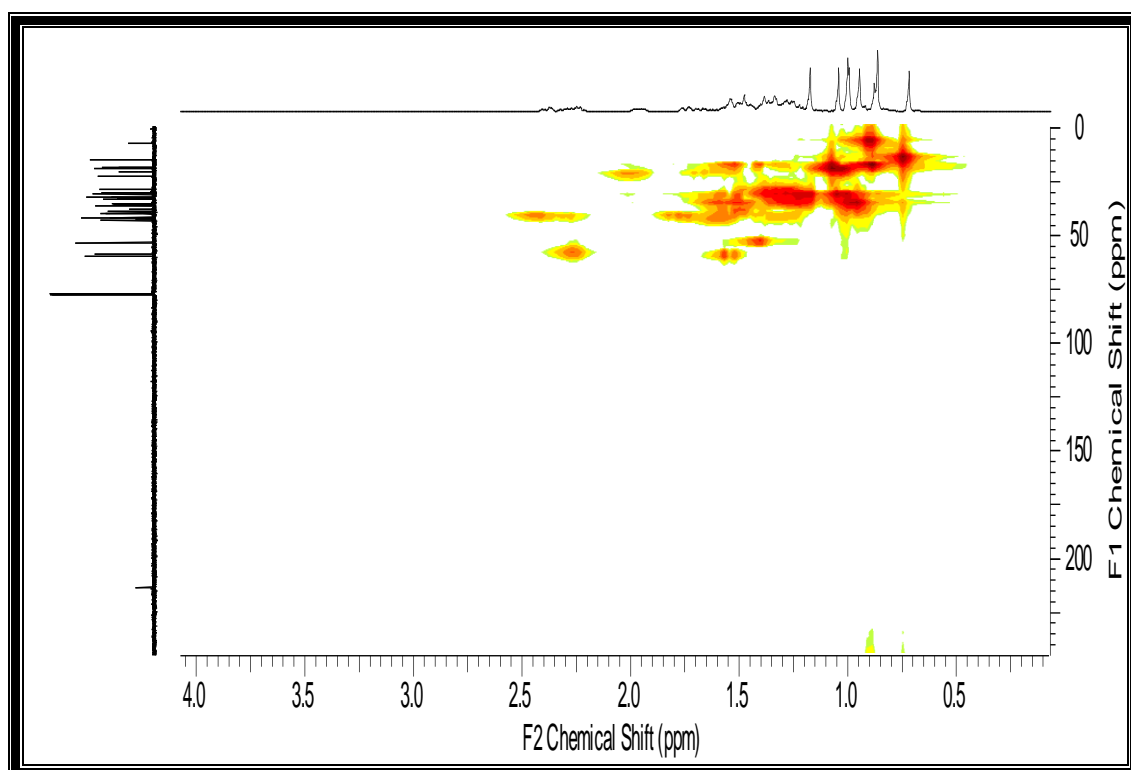


Figura 27. Espectro de correlação heteronuclear $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ (HMQC) da substância PP-01.

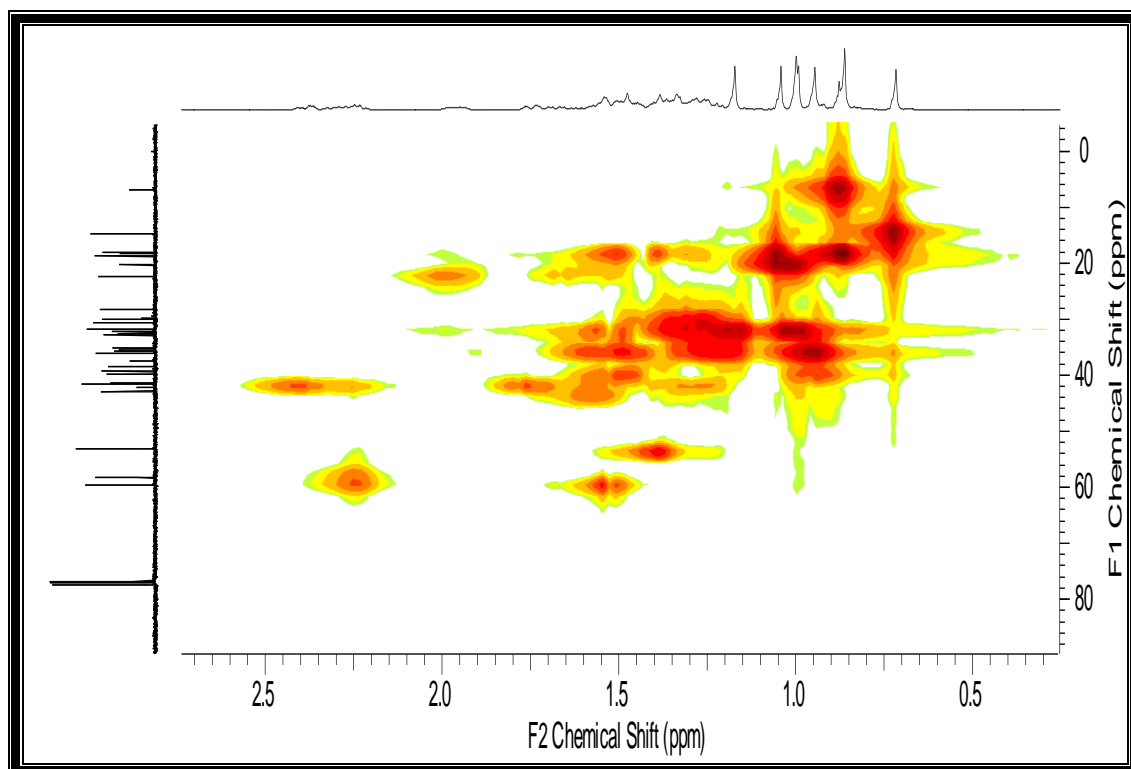


Figura 28. Ampliação do espectro de correlação heteronuclear $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ (HMQC) da substância PP-01 na região de 0 a 3,0 ppm.

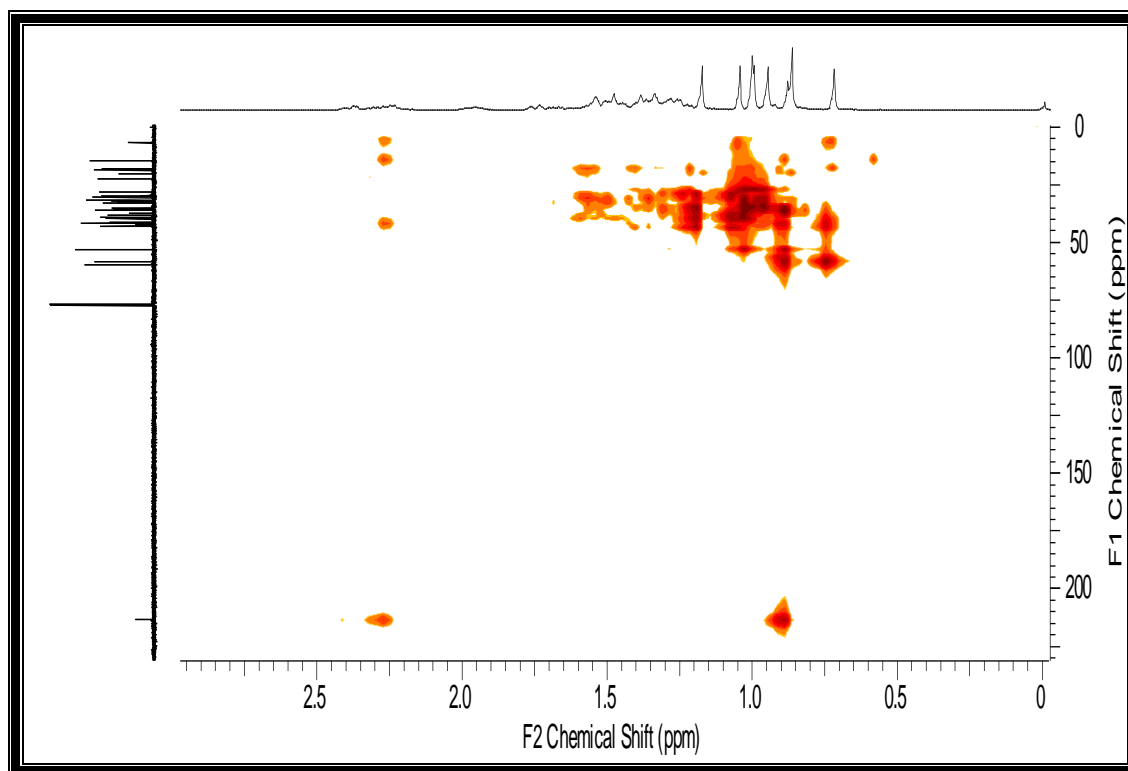


Figura 29. Espectro de correlação heteronuclear $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ (HMQC) da substância PP-01.

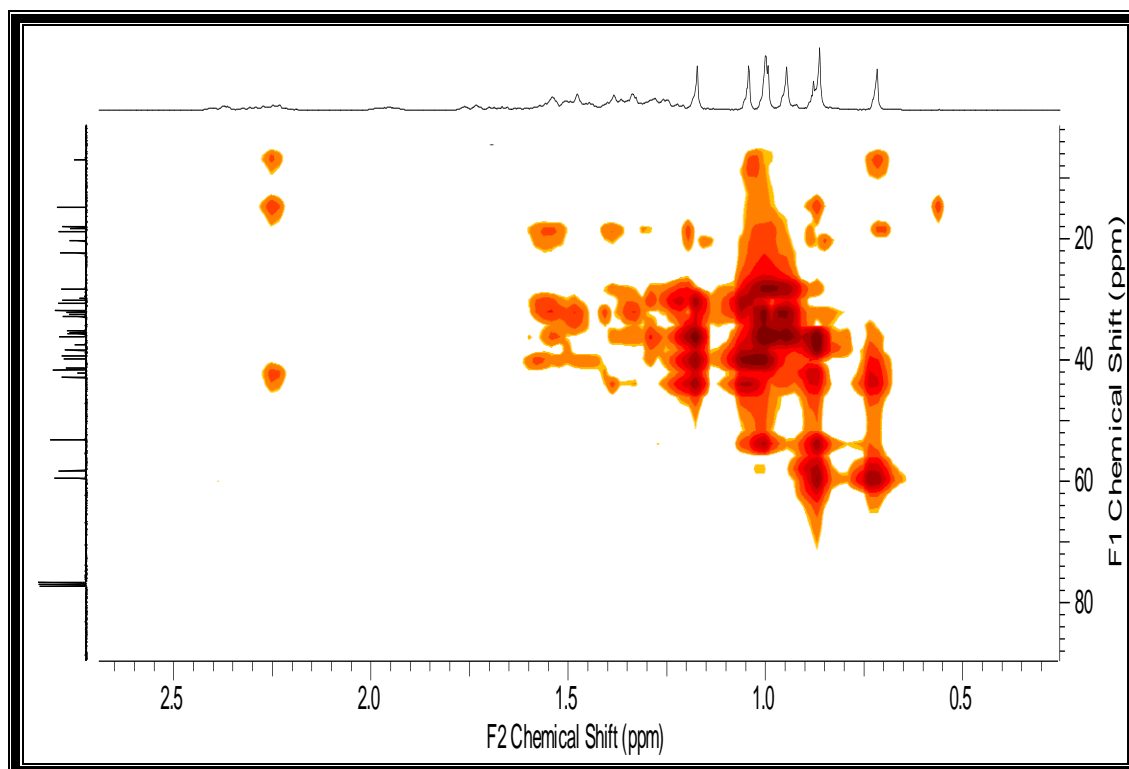


Figura 30. Ampliação do espectro de correlação heteronuclear $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ (HMBC) da substância PP-01 na região de 0 a 3,0 ppm.

Tabela 07. Dados dos espectros de RMN de ^1H , HMQC ($^1J_{\text{CH}}$, $^1\text{H}-^{13}\text{C}$) e HMBC ($^{2,3}J_{\text{CH}}$) obtido para a substância PP-01.

Atribuição	HMQC		HMBC		Literatura*	
	C	δ_{H}	δ_{C}	$^2J_{\text{CH}}$	$^3J_{\text{CH}}$	δ_{H}
1	1,95	22,3	H-10	-	1,94	22,3
2	2,36	41,6	-	-	2,36	41,6
3	-	-	-	-	-	213,2
4	2,23	58,3	-	3H-24	2,24	58,3
5	-	-	-	-	-	42,8
6	2,37	41,3	-	3H-24	-	41,3
7	-	-	-	-	-	18,3
8	1,38	53,1	-	3H-25, 3H-26	1,38	53,1
9	-	-	-	-	-	37,5
10	1,55	59,5	-	H-2, H-6, 3H-24	1,53	59,5
11	-	-	-	-	-	35,4
12	-	-	-	-	-	32,5
13	-	-	-	-	-	38,3
14	-	-	-	-	-	39,7
15	-	-	-	-	-	30,5
16	-	-	-	-	-	36,1
17	-	-	-	-	-	30,0
18	-	-	-	-	1,54	42,8
19	-	-	-	-	-	35,4
20	-	-	-	-	-	28,5
21	-	-	-	-	-	32,8
22	-	-	-	-	-	39,3
23	0,87	6,9	H-4	-	0,87	6,9
24	0,72	14,7	-	H-4	0,71	14,6
25	0,86	18,0	-	H-8	0,85	18,0
26	1,05	18,66	-	H-8	0,99	18,7
27	1,0	20,2	-	-	1,03	20,3
28	1,17	32,1	-	-	1,16	32,1
29	0,99	31,8	-	3H-30	0,94	31,8
30	0,95	35,1	-	3H-29	0,99	35,1

*Fonte: Mahato e Kundu, 1994.

O conjunto dos dados acima sugere para a substância PP - 01 a estrutura do triterpeno friedelan-3-ona (PP - 01) também conhecido como friedelina.

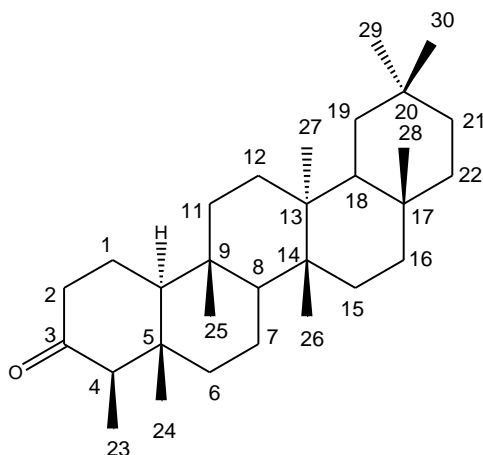


Figura 31: Estrutura da friedelina (PP-01)

Friedelina (Figura 31) já foi isolada anteriormente de algumas espécies da família Fabaceae, do gênero *Caesalpinia*, como por exemplo, da espécie: *Caesalpinia bonduc* (Ageta *et al.*, 1995). Segundo estudos feitos por Alonso (1998) e Cordeiro (1999) a friedelina possui atividade antiúlcero-gênica, sendo eficiente no tratamento de gastrites e úlceras.

4.3.2 Identificação da fração 16-24 do extrato hexânico (PP-02).

A fração 16-24 (PP-02) foi obtida do extrato hexânico, por eluição (Éter de petróleo/ AcOEt na proporção 9:1, respectivamente) utilizando como método de separação cromatografia preparativa (item 3.9).

A análise do sólido através der CCDA de sílica gel (item 3.9), eluentes, Éter de petróleo/ AcOEt 9:1, quando revelada com vanilina sulfúrica seguida de aquecimento, apresentou-se como uma mancha de coloração arroxeada, que a através da análise dos espectros obtidos no cromatógrafo à gás acoplado ao espectrômetro de massa (CG/EM) (Figura 33, p.58) mostrou tratar-se de uma mistura de cinco substâncias que foram codificadas de PP - 02a a PP - 02e. A solubilidade da mistura foi determinada em CH_2Cl_2 .

A análise do espectro da mistura na região do infravermelho evidenciou a presença de uma banda em $3385,22 \text{ cm}^{-1}$ relativa ao grupo OH, sua natureza

alifática foi demonstrada pela presença de bandas de intensidade em 2922,28 - 2848,98 e 1462,11 - 1379,16 cm^{-1} , atribuídas ao estiramento e à deformação C-H de carbono alifático (metílicos, metilênicos e metínicos) respectivamente, além disso observou-se uma banda intensa a 1710,93 cm^{-1} referente ao grupo carbonílico de cetona (em anéis de seis membros) (Silverstein *et al.*, 2005; Pavia *et al.*, 2001). Na Figura 32 apresenta-se o espectro na região do infravermelho de PP-02a-e.

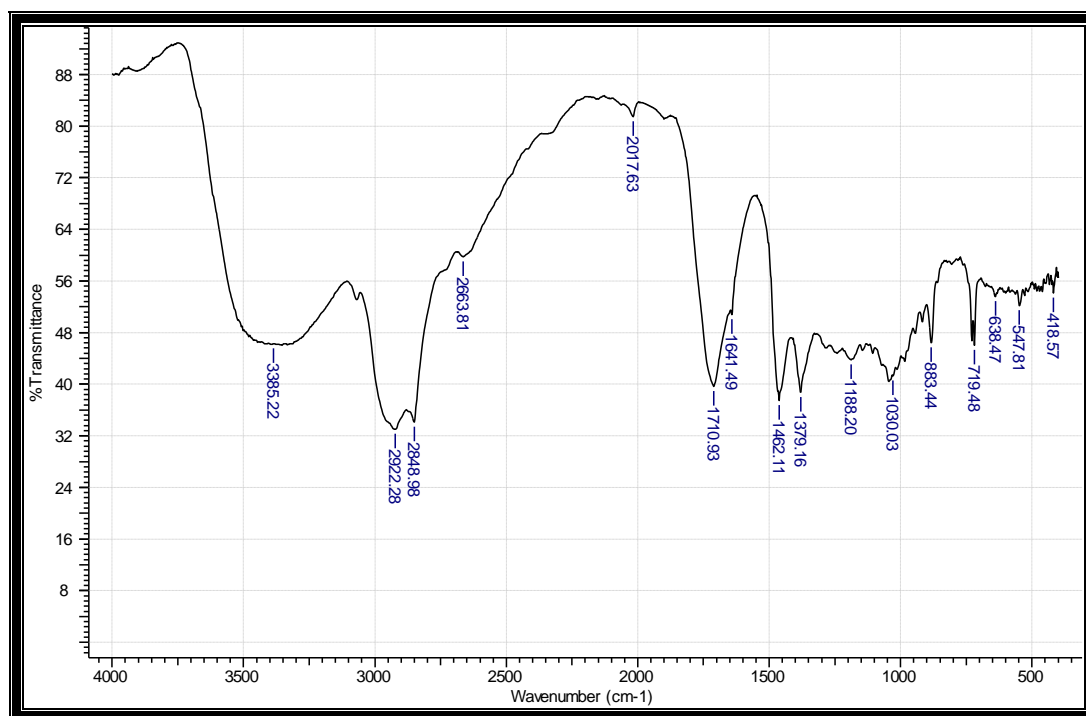


Figura 32: Espectro de absorção molecular obtido na região do infravermelho para PP02a-e.

O cromatograma de gás (Figura 33, p.58), apresentou 5 picos, evidenciando a presença de uma mistura de 5 substâncias majoritárias. Segundo comparação com a biblioteca (NIST) de dados do espectrômetro de massa, os índices de similaridade sugerem que a substância PP - 02a ($t_R = 8,06$ min) trata-se da 6,10,14-trimetilpentadecan-2-ona; PP-02b ($t_R = 14,67$ min) do eicosan-1-ol; PP-02c ($t_R = 17,30$ min) do uncosanoato de metila (Figuras, 34-35, p.58-59; Tabela 09, p.68).

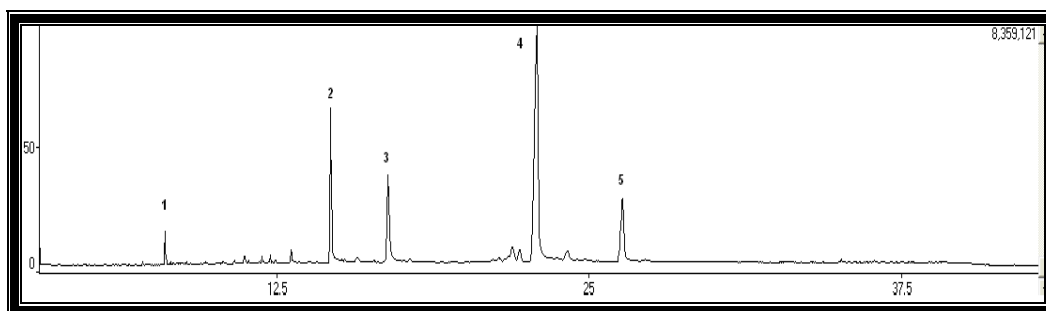


Figura 33: Cromatograma de gás da fração PP-02 do extrato hexânico de *P. pterosperma*

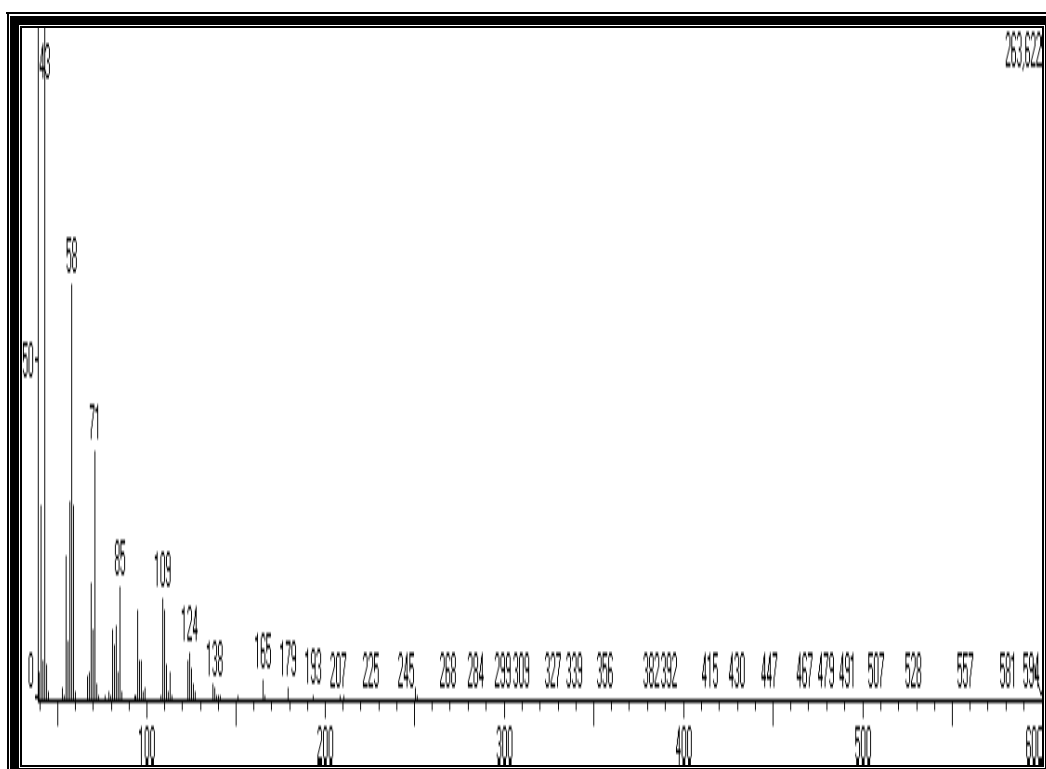


Figura 34: Fragmentograma de massas de PP-02a.

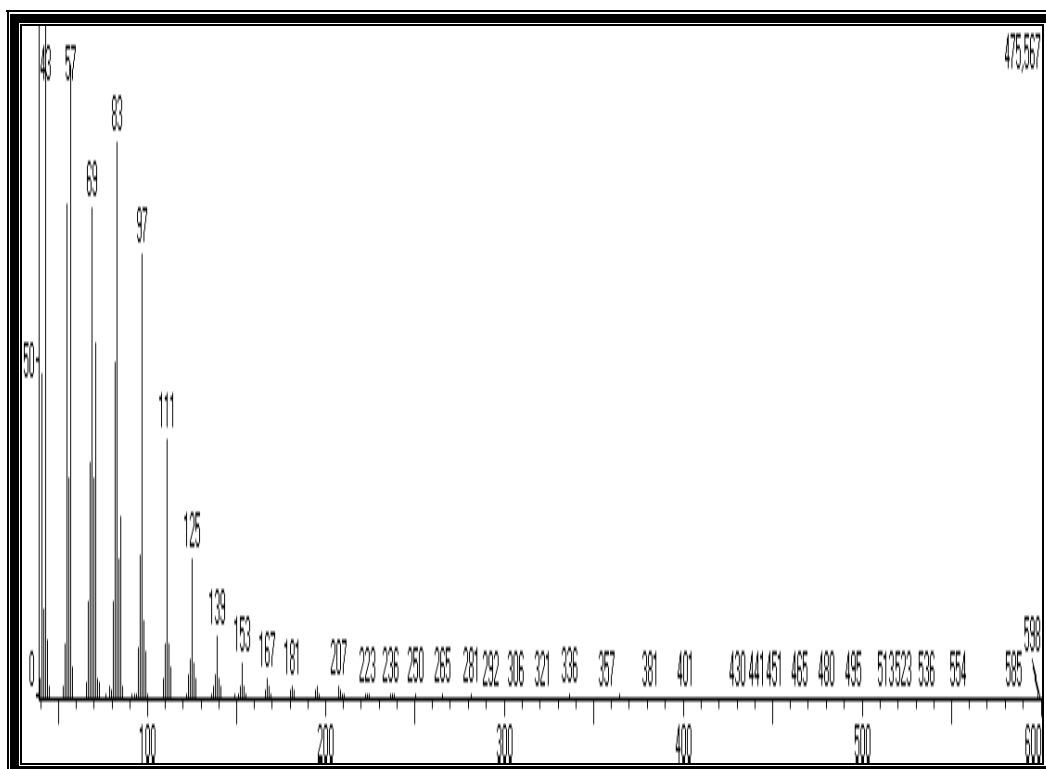


Figura 35: Fragmentograma de massas de PP-02b.

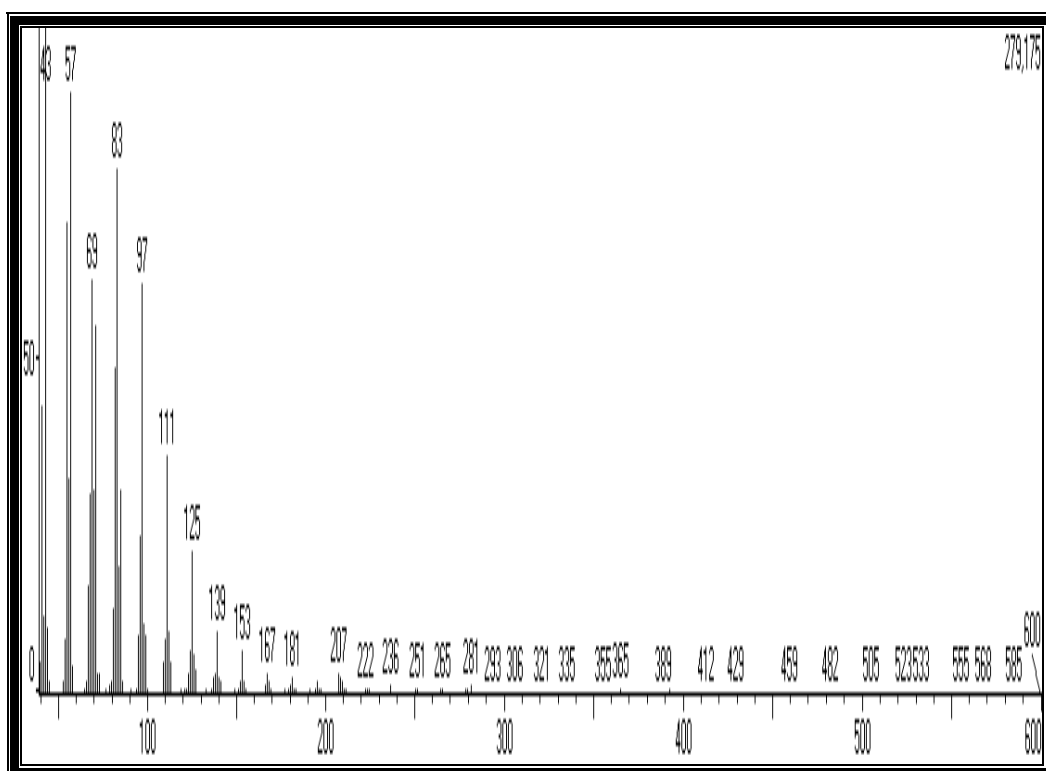


Figura 36: Fragmentograma de massas de PP02-c.

A substância PP - 02d ($t_R = 22,92$ min) apresentou pico do íon molecular em m/z 426 $[M^+]$, além dos picos a m/z 411 $[M^+ - (CH_3)]$, m/z 218 $[M^+ - (C_{14}H_{23}OH)]$, m/z 207 $[M^+ - (C_{16}H_{26})]$ e m/z 189 u.m.a característicos de

esqueleto lupano (Figura 37) e segundo análise dos dados obtidos do espectro na região do IV (Figura 32, p.57), espectro de massa (Figura 37), RMN ^1H (Figuras 40-42, p. 63) e ^{13}C (Figura 43-45, p. 65-66) mostrou tratar-se do triterpeno lupeol.

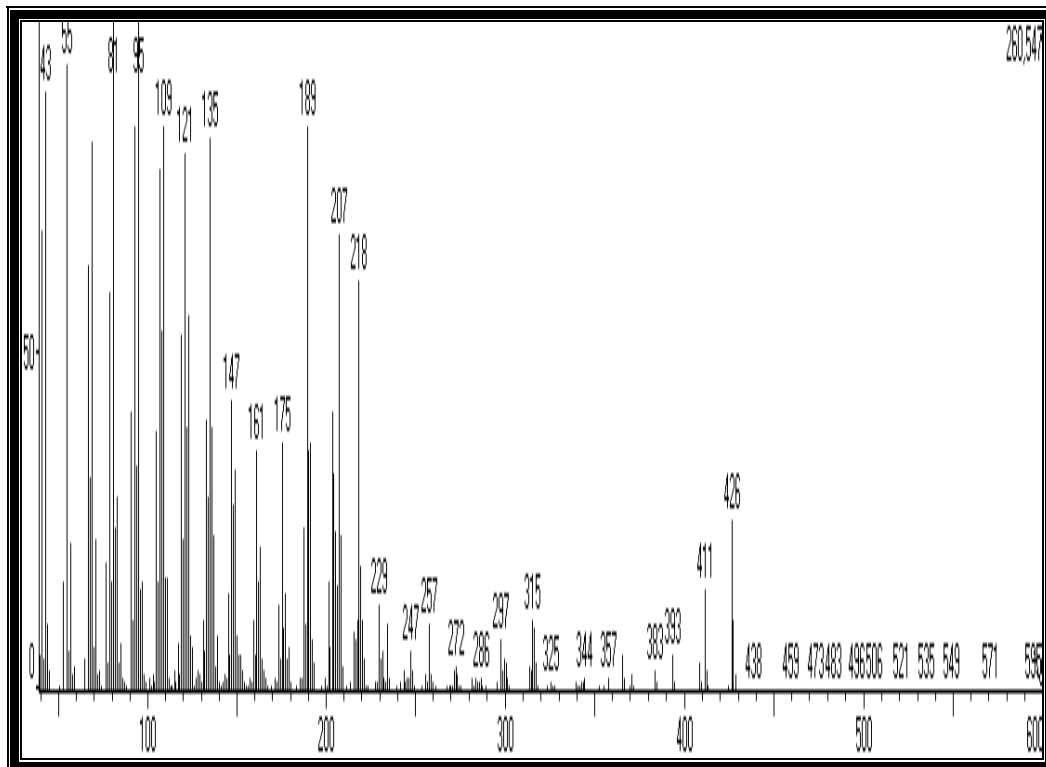


Figura 37: Fragmentograma de massas da substância PP-02d

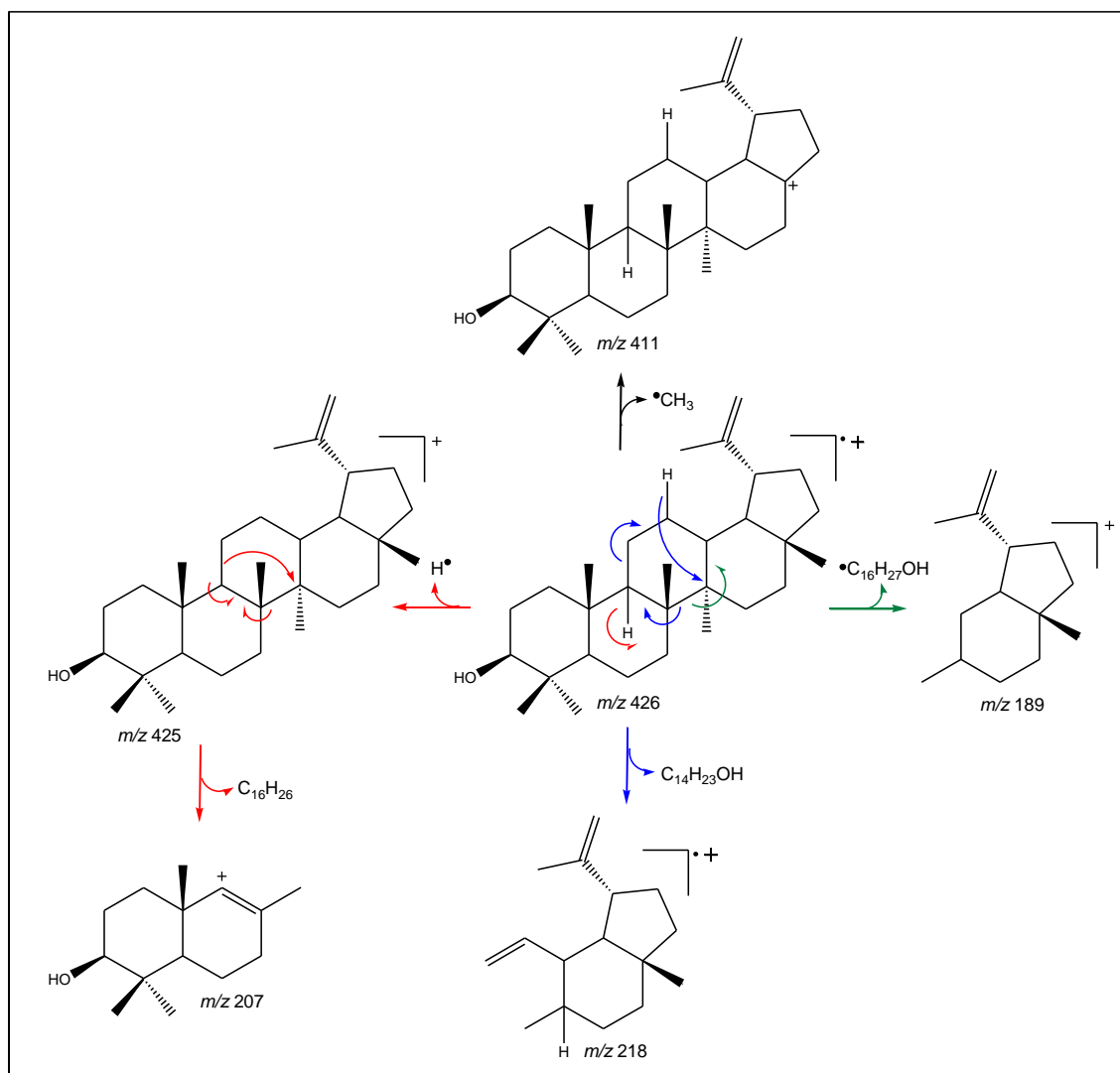


Figura 38. Provável fragmentação de PP02-d.

A substância PP – 02e ($T_R = 26,35$ min), apresentou pico do íon molecular a m/z 426 u.m.a e segundo análise dos dados obtidos do espectro na região do IV (Figura 32, p. 57), espectro de massa (Figura 39, p. 62.), RMN 1H (Figura 40-42, p. 63-64) e ^{13}C (Figura 43-45, p. 65-66) mostrou tratar-se de quantidades adicionais de PP-01.

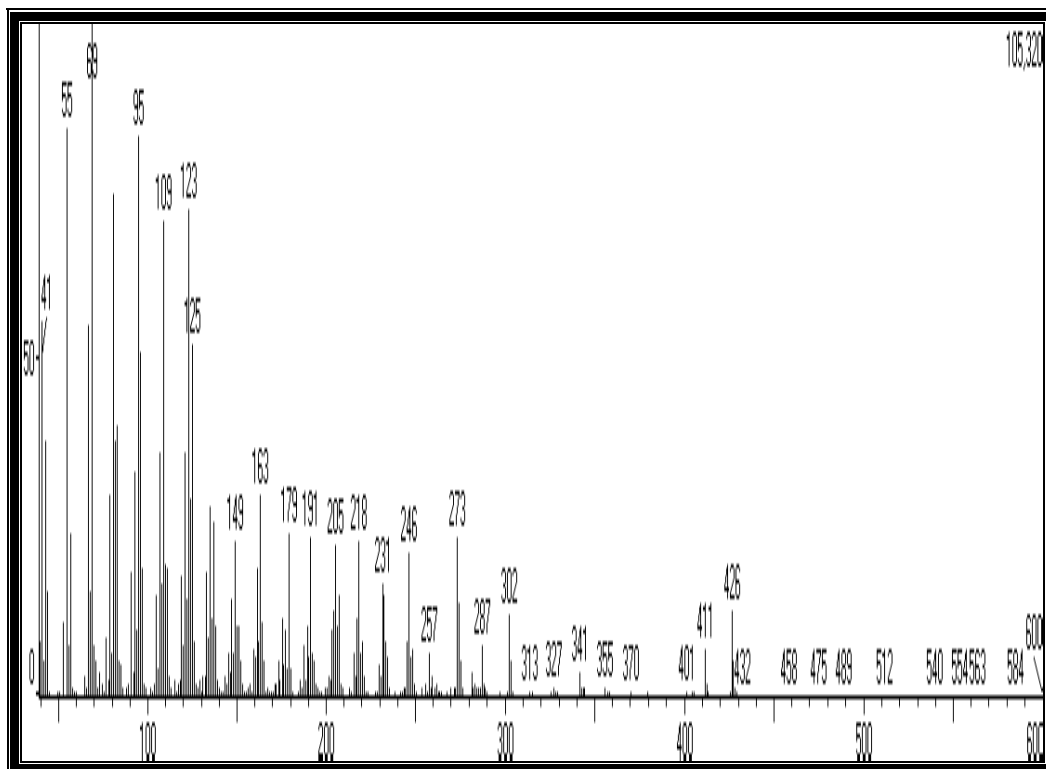


Figura 39. Fragmentograma de massas de PP-02e.

O espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) da fração (Figuras 40-42, p.63-64), confirmou tratar-se de uma mistura de substâncias, uma vez que se pôde observar a presença de diversos sinais entre 0,75 e 1,25 ppm que indicam a presença de vários grupos metílicos na molécula, além de um intenso em 1,25 ppm indicativo da presença de vários grupos CH_2 . O espectro ainda apresentou um sinal em 3,64 ppm característico de hidrogênio em carbono ligado a átomo de oxigênio, indicando a presença de um grupo hidroxila. Também foi observado um sinal duplo em δ_{H} 4,64 ppm atribuído a presença de hidrogênio olefínico.

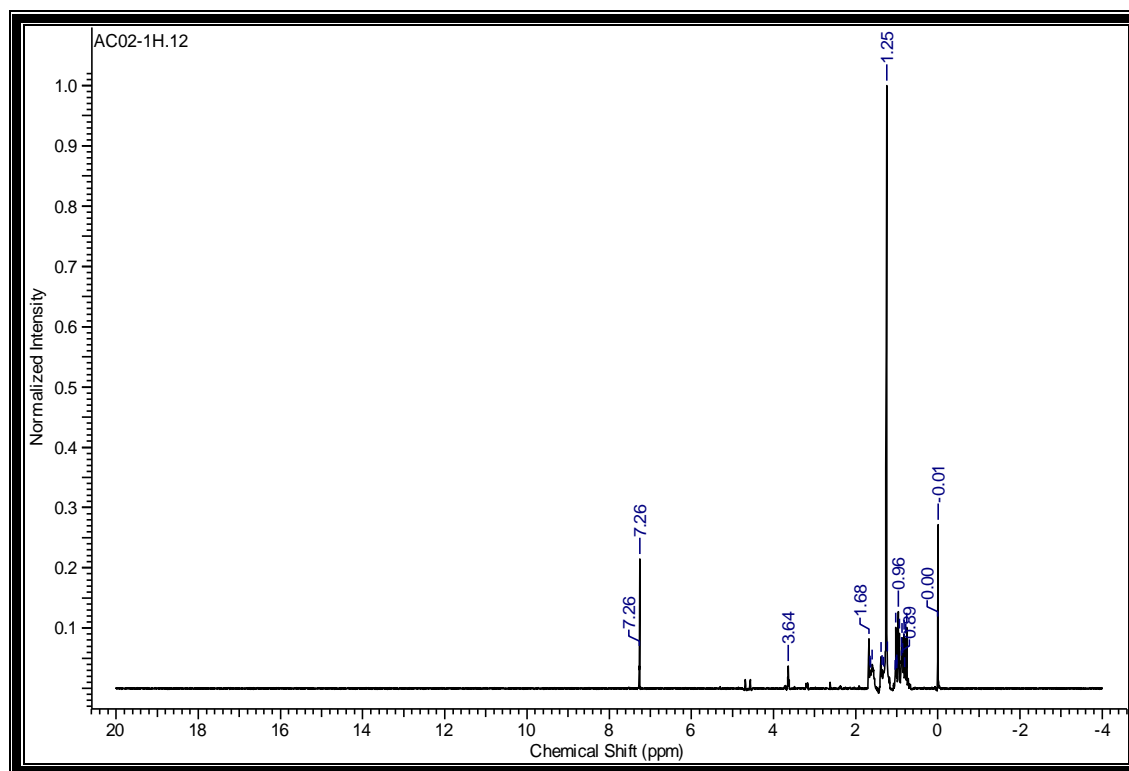


Figura 40. Espectro de RMN de ^1H obtido para PP-02a-e (400 MHz, CDCl_3).

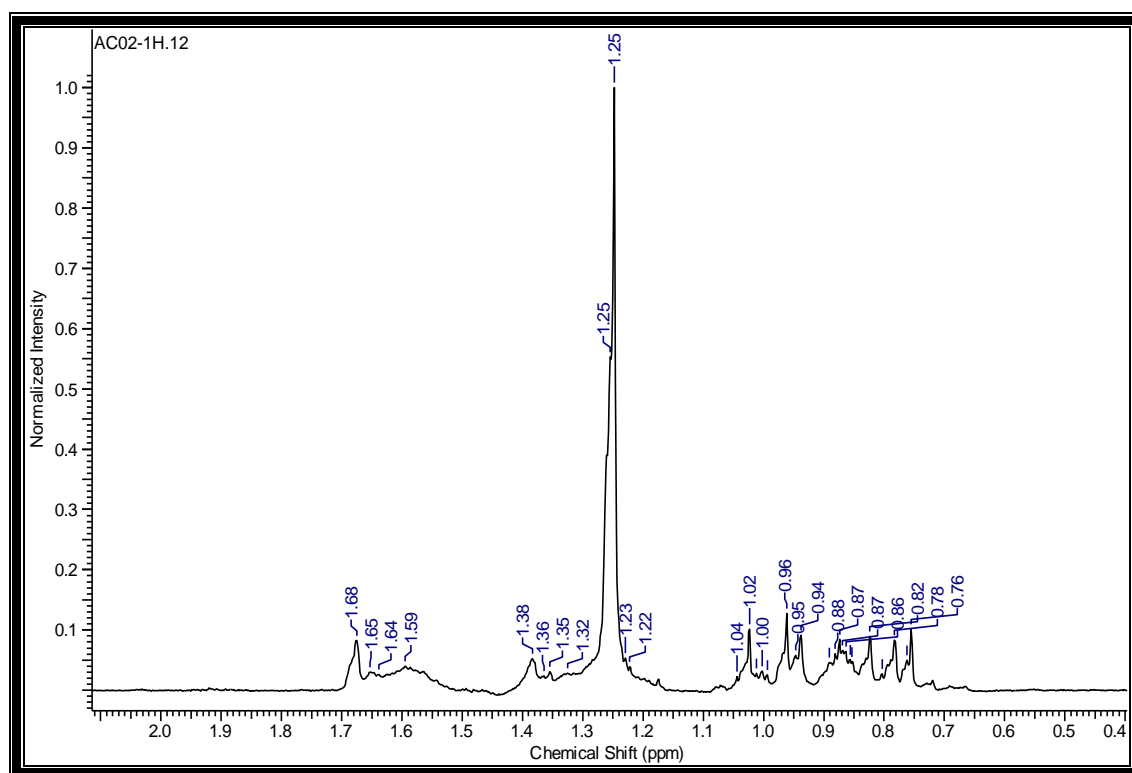


Figura 41. Ampliação do espectro de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) de PP-02a-e na região de δ_{H} 0,76 a 1,68 ppm.

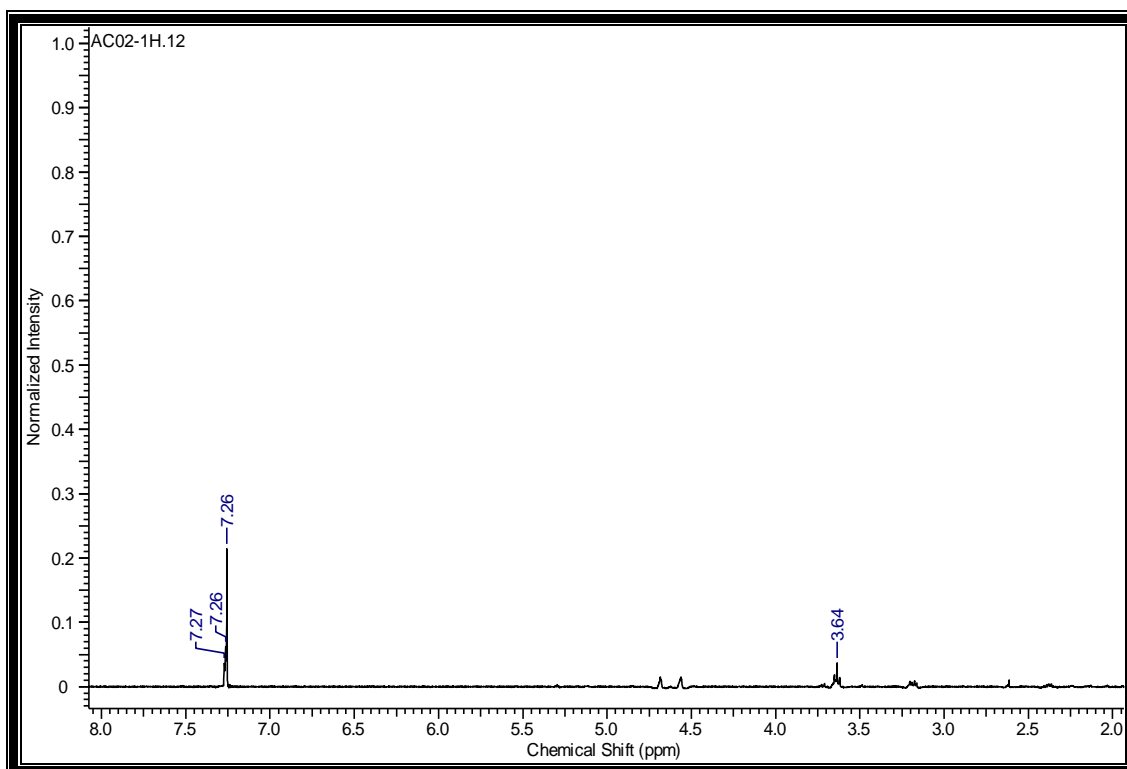


Figura 42. Ampliação do espectro de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) de PP-02a-e na região de δ_{H} 3,64 a 7,27 ppm.

O espectro de RMN de ^{13}C desacoplado de ^1H (75 MHz, CDCl_3) obtido para PP-02 (Figuras 43-45, p. 65-66 e Tabela 08, p.67) evidenciou a presença de uma dupla ligação nos átomos de carbono C-20 e C-29 através dos deslocamentos químicos relativos aos carbonos em 151,07 ppm (C-20) e 109,4 ppm (C-29), compatíveis com os triterpenos da série lupano (Ahmad e Rahman, 1994). Além disto, foi observado um sinal em 79,1ppm (C-3) que indica a presença de um carbono oxigenado. O conjunto destes dados juntamente com aqueles dos demais espectros permitiu propor a estrutura do lupeol para a substância PP02-d. Estes dados corroboram com os encontrados na literatura.

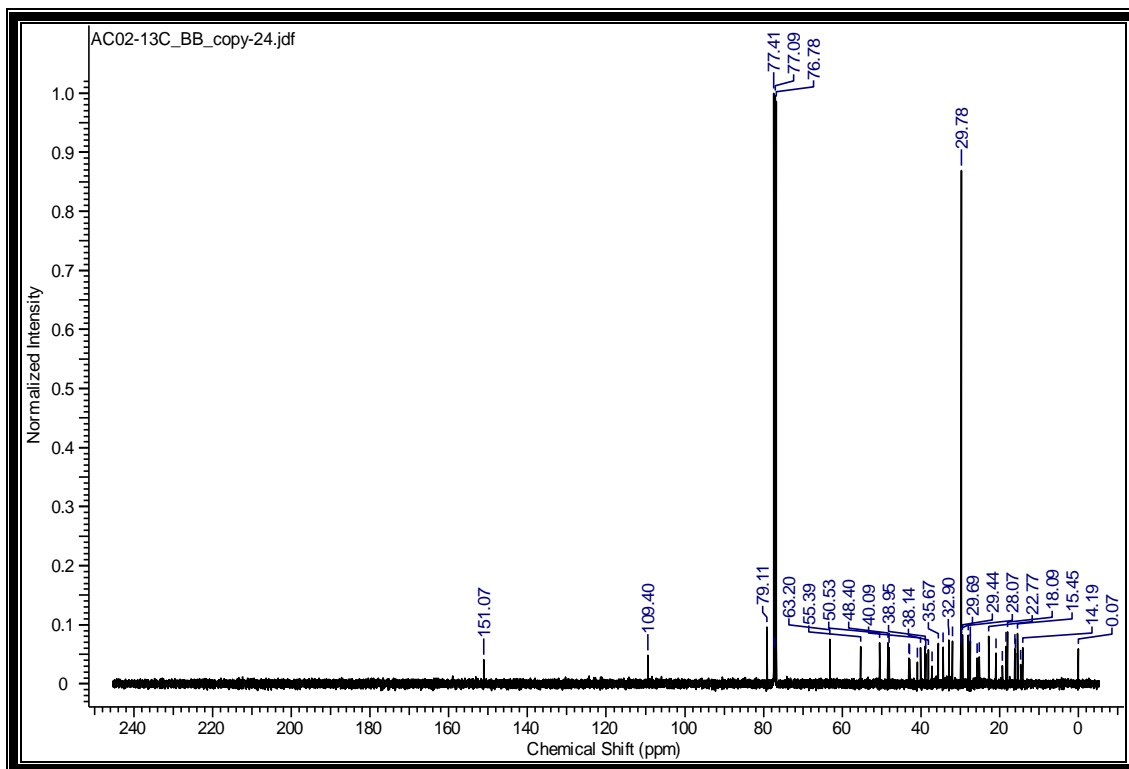


Figura 43. Espectro de RMN de ^{13}C obtido para PP-02a-e (100 MHz, CDCl_3).

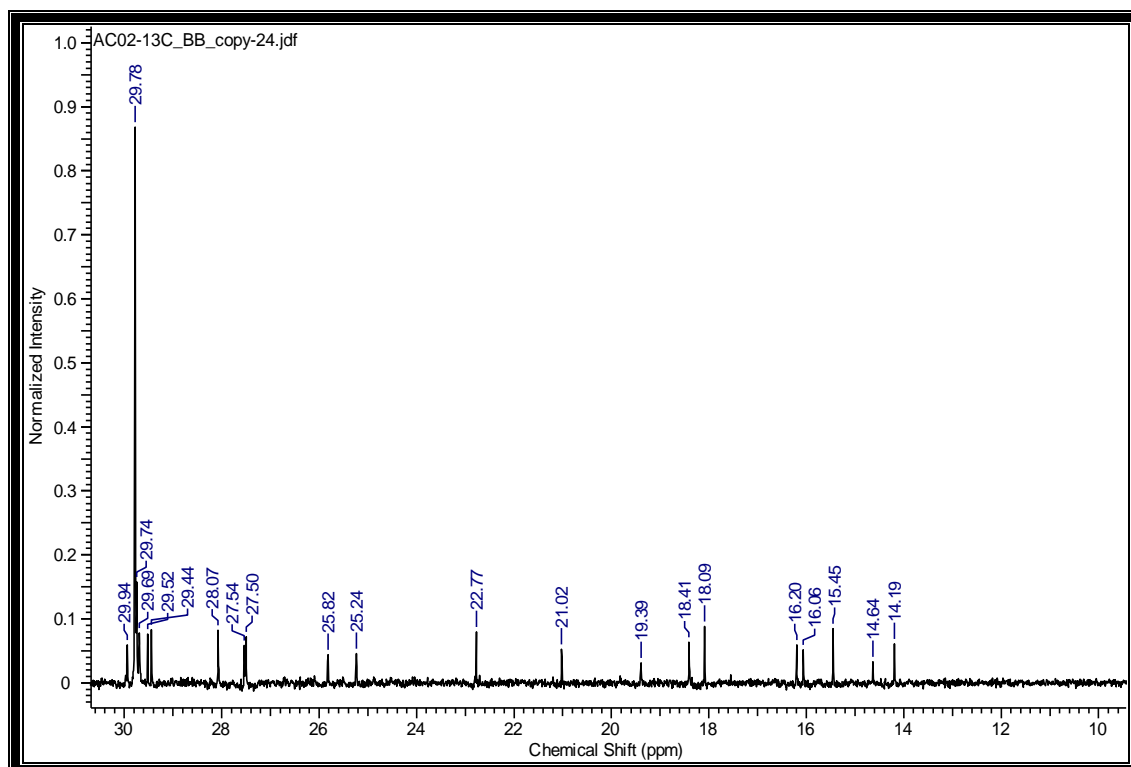


Figura 44. Ampliação do espectro de RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) de PP-02a-e na região de δ_{C} 14,19 a 29,94 ppm.

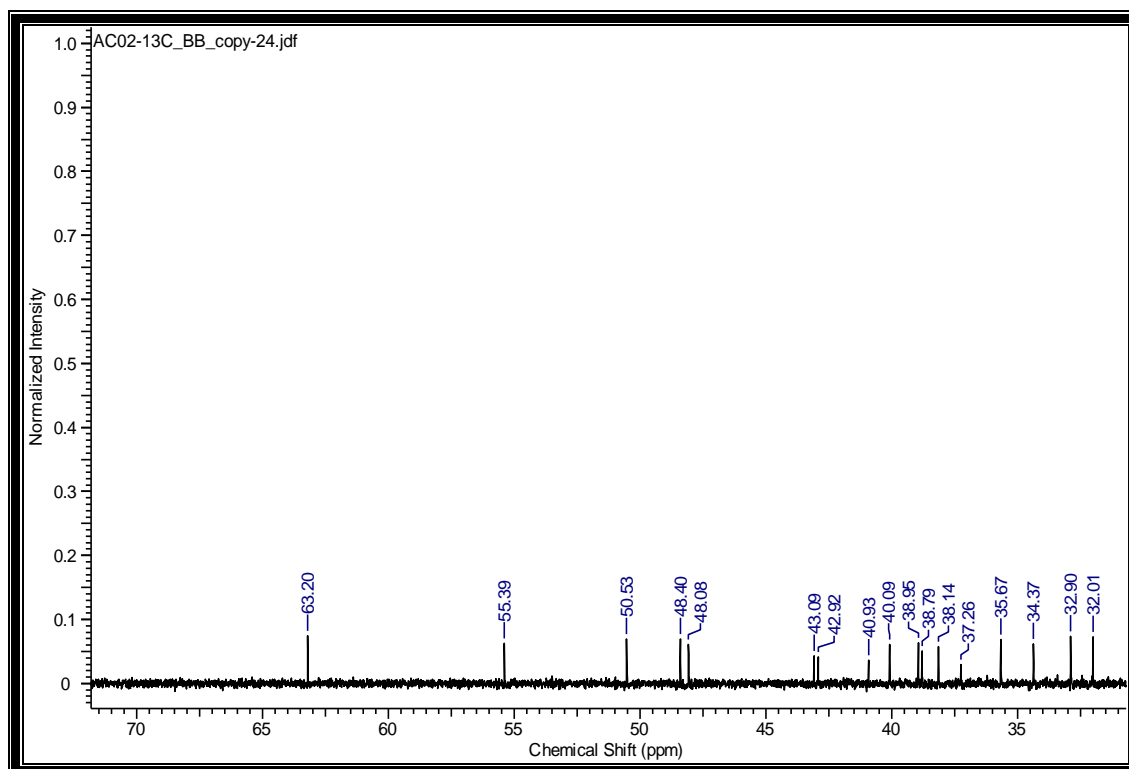


Figura 45. Ampliação do espectro de RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) de PP-02a-e na região de δ_{C} 32,01 a 63,2 ppm.

Tabela 08. Atribuição do espectro de RMN ^{13}C obtido para PP-02a-e

Atribuição	PP-02d*	Lupeol**	PP-02e*	Friedelina***
	δ_c (ppm)	δ_c (ppm)	δ_c (ppm)	δ_c (ppm)
1	38,9	38,6	22,3	22,7
2	27,5	27,3	41,6	41,8
3	79,1	78,9	213,2	213,0
4	38,8	38,8	58,3	58,2
5	55,3	55,2	42,8	42,8
6	18,4	18,2	41,3	41,2
7	34,37	34,2	18,3	18,3
8	40,9	40,7	53,1	53,2
9	50,5	50,3	37,5	37,8
10	37,2	37,1	59,5	59,5
11	21	20,9	35,4	35,2
12	25,3	25,0	32,5	32,4
13	38,1	38,0	38,3	38,2
14	43	42,7	39,7	39,7
15	27,6	27,4	30,5	30,6
16	35,6	35,5	36,1	36,1
17	43,1	42,9	30,0	30,0
18	48,4	48,2	42,8	42,9
19	48	47,9	35,4	35,3
20	151	150,8	28,5	28,2
21	29,9	29,8	32,8	32,9
22	40	39,9	39,3	39,3
23	28	27,9	6,9	6,8
24	15,5	15,3	14,6	14,6
25	16,1	16,1	18,0	18,2
26	16	15,9	18,7	18,6
27	14,6	14,5	20,3	20,1
28	18	17,9	32,1	32,1
29	109,4	109,3	31,8	31,8
30	19,4	19,2	35,1	35,0

*PP-02c-d- Mistura de lupeol e fridelina = dados obtidos no presente trabalho (100 MHz, CDCl_3).

**Lupeol = dados relatados em Mahato & Kundu (1994)

***Friedelina = dados relatados em Aragão *et al.*(1990)

O conjunto dos dados acima sugere para a substância PP-02d a estrutura do triterpeno lupeol.

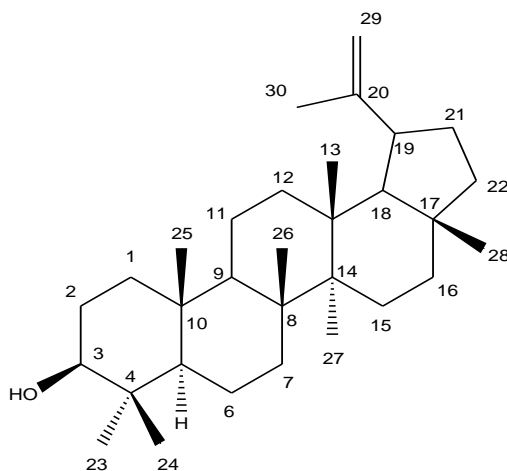


Figura 46. Estrutura do Lupeol (PP02 - d).

O triterpeno lupeol já foi isolado anteriormente de várias espécies da família Fabaceae.

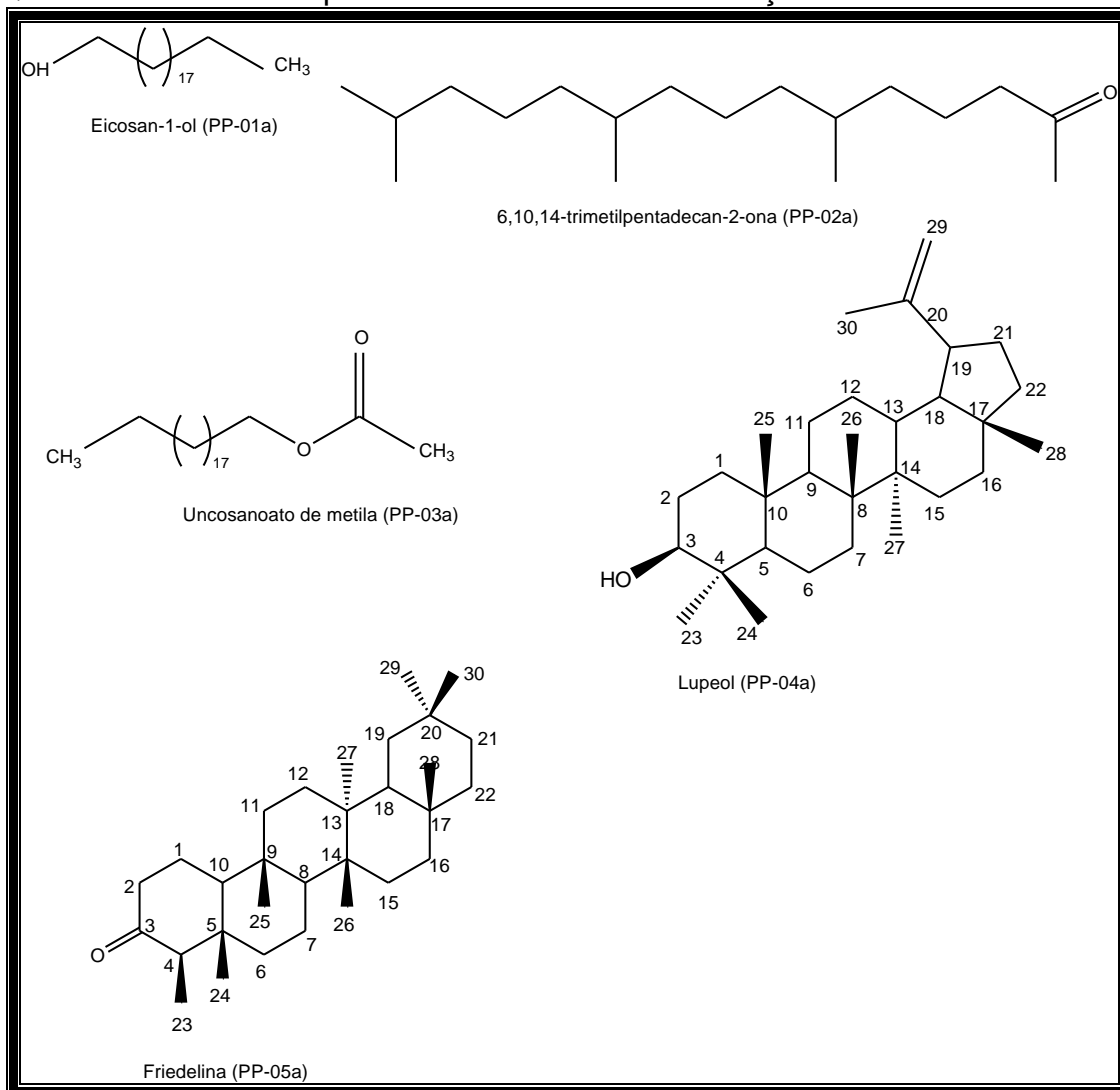
Estudos realizados por Vasconcelos e colaboradores em 2008, verificaram que o lupeol isolado de um espécime de *Diploptropis ferruginea*, atenua as alterações características das inflamações alérgicas das vias aéreas, uma vez que reduz os níveis das citocinas IL-4, IL-5 e IL-3 do tipo II.

Sendo assim, a mistura de substâncias PP-2a-e é composta pelas seguintes substâncias PP-02 (6,10,14-trimetilpentadecan-2-ona), PP-02b (eicosanol), PP-02c (uncosanoato de metila), PP-02d (lupeol) e PP-02e (friedelina) como mostra a tabela 09.

Tabela 09: Principais picos observados no espectro de massas da fração PP-02 do extrato hexânico de *P. pterosperma*

Pico*	t _R **	Substância	PM	% em área do pico
1	8,06	6,10,14-trimetilpentadecan-2-ona (PP - 02a)	268	1,2
2	14,68	Eicosan-1-ol (PP- 02b)	298	13,76
3	17,3	Uncosanoato de metila (PP - 02c)	340	12,67
4	22,92	Lupeol (PP - 02d)	426	59,14
5	26,35	Friedelina(PP - 02e)	426	14,43

*Pico: ver **Figura 33, p.58**; **tempo de retenção em minutos.

Quadro 02: Estrutura química dos constituintes da fração PP-02**4.3.2 Identificação da fração 104 - 117 do extrato hexânico (PP-03).**

A mistura foi obtida das frações 104 -117 do extrato hexânico por eluição (éter de petróleo/ AcOEt 9:1) em coluna fechada de gel de sílica (item 3.9). Apresentou-se como um sólido branco cristalino, com faixa de fusão de 158-168°C, demonstrando então não trata-se de uma substância pura.

A análise do sólido através de CCDA de sílica gel (item 3.9), eluentes, Éter de petróleo/ AcOEt 9:1, quando revelada com vanilina sulfúrica seguida de aquecimento, apresentou-se como uma mancha de coloração arroxeadada, que através da análise dos espectros obtidos no cromatógrafo à gás acoplado ao espectrômetro de massa (CG/EM) (Figura 48, p.71) mostrou tratar-se de uma

mistura de substâncias que foram codificadas de PP-03 a PP-03c. A solubilidade da mistura foi determinada em CH_2Cl_2 .

A análise do espectro da mistura na região do infravermelho evidenciou sua natureza alifática, pela presença de bandas de intensidade em 2954,95 - 2858,51 atribuídas ao estiramento C-H de carbono alifático (metílicos, metilênicos e metínicos), uma banda em 1095,57 cm^{-1} atribuída à deformação da ligação C-O e uma banda intensa de absorção condizente com a presença de grupo OH em 3348,42 cm^{-1} (Silverstein *et al.*, 2005; Pavia *et al.*, 2001). Na Figura 47 apresenta-se o espectro na região do infravermelho da mistura PP03a-c.

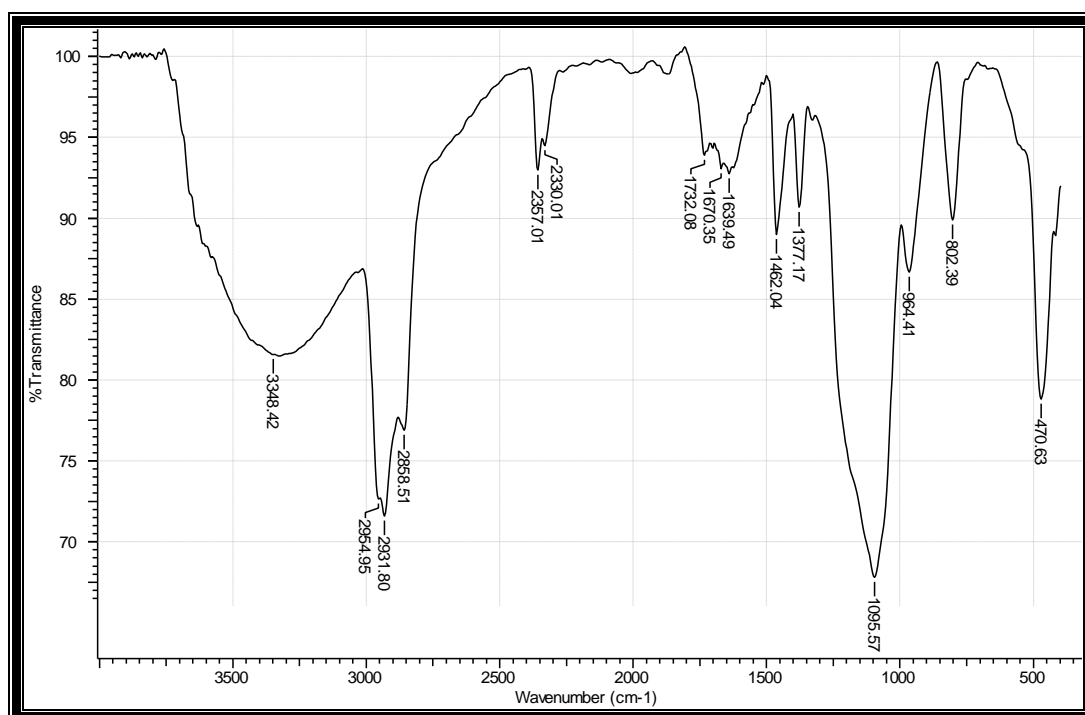


Figura 47. Espectro de absorção molecular obtido na região do infravermelho para PP03a-c.

O cromatograma de gás (Figura 48, p.71) apresentou 3 picos evidenciando a presença de uma mistura de 3 substâncias. Segundo comparação com a biblioteca (NIST) do espectrômetro de massa, os índices de similaridade sugerem que a substância PP - 03a ($t_{R1}=17,50$ min), $m/z=410$, trata-se do esteróide campesterol; PP-03b ($t_{R2}=18,20$ min), m/z 412; trata-se do esteróide estigmasterol e PP-03c ($t_{R3} =22,93$ min), m/z 414; trata-se do esteróide sitosterol. A Figura 51(p. 73) apresenta a provável fragmentação de PP03a-c.

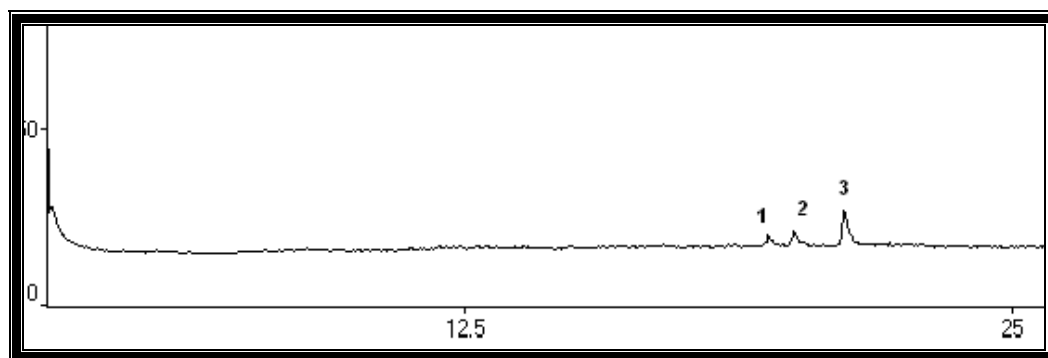


Figura 48: Cromatograma de gás da fração PP-03a-c do extrato hexânico de *P. pterosperma*.

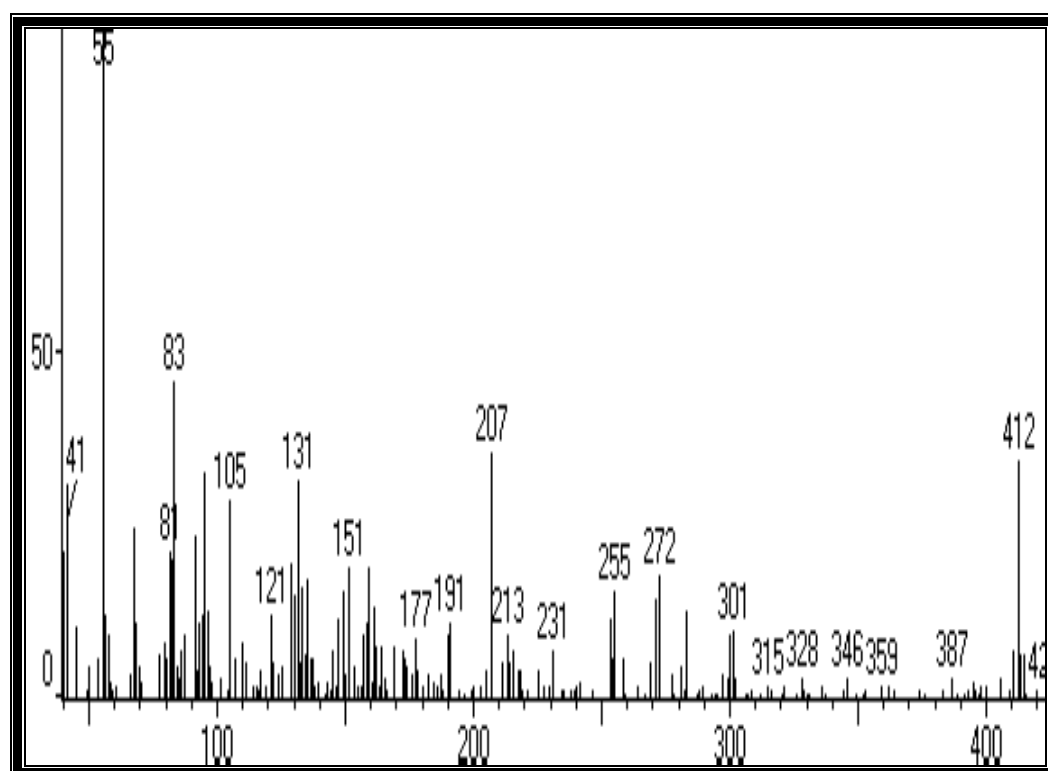


Figura 49: Fragmentograma de massas de PP03-b

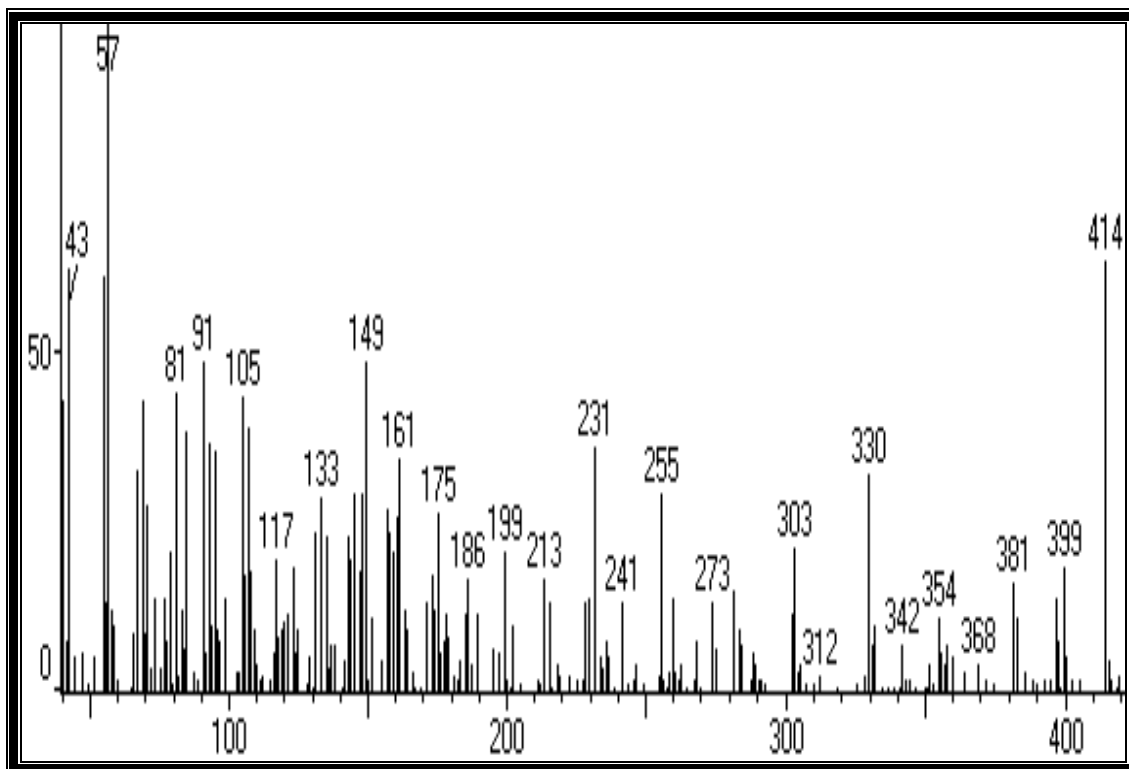


Figura 50: Fragmentograma de massas de PP03-c

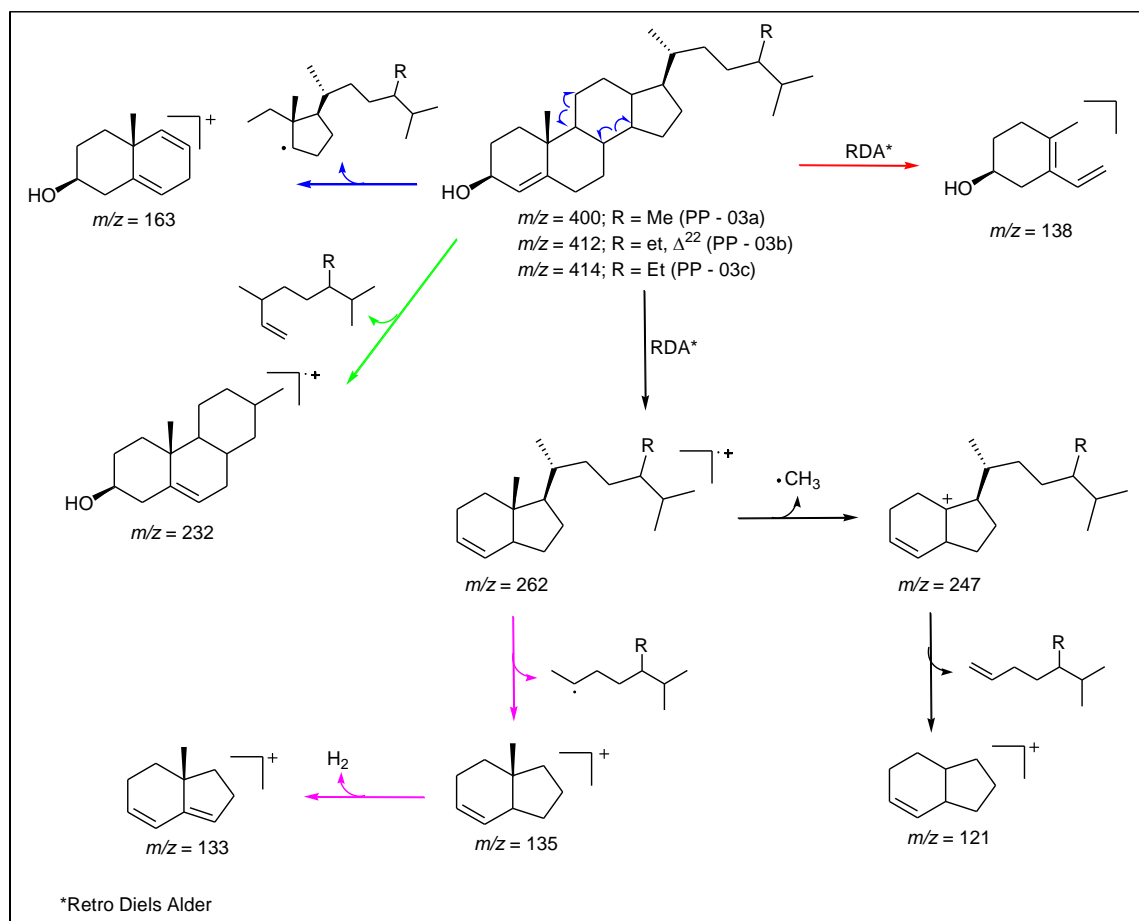


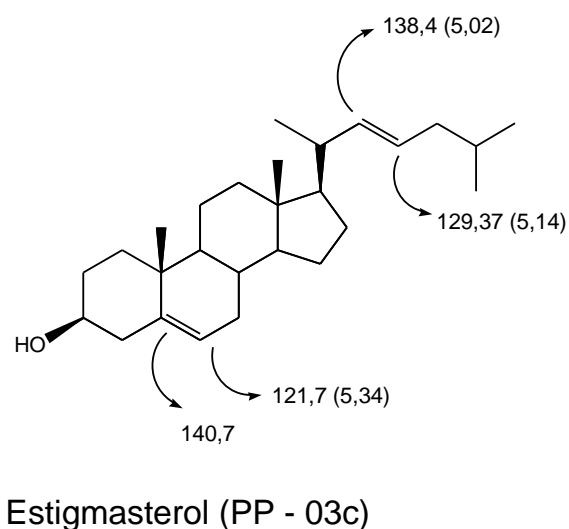
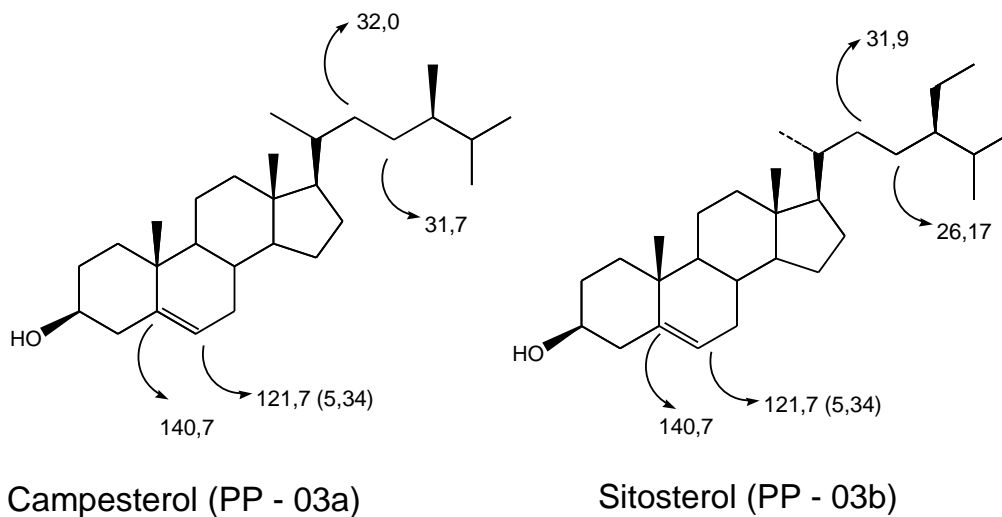
Figura 51. Provável fragmentação de PP03a - PP03c

O espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) da mistura PP03a-c (Figuras 52-55, p. 75-76), apresentou um grande acúmulo de sinais entre δ_{H} 0,68 e 2,28 ppm referentes à hidrogênios de grupos metílicos, metilênicos e metínicos do esqueleto esteroidal do campesterol, sitosterol e estigmasterol. O espectro ainda apresentou um sinal múltiplo entre δ_{H} 3,49 – 3,54 ppm, referente ao hidrogênio H-3 e ainda um sinal duplo em δ_{H} 5,34 ppm referente ao hidrogênio H-6.

Campesterol e sitosterol apresentam grande semelhança estrutural (com exceção de um grupo metilênico a menos no átomo de carbono C-28 da cadeia lateral), que implica em uma grande semelhança nos seus espectros de RMN ^1H , porém a identificação da presença do estigmasterol é possível observando-se as absorções dos hidrogênios olefínicos da cadeia lateral em δ_{H} 5,02 e 5,14.

O espectro de RMN de ^{13}C desacoplado de ^1H (75 MHz, CDCl_3) obtido para PP03a-c (Figura 56-57, p.77; Tabela 10, p.78) possibilitou distinguir o sitosterol e o estigmasterol pela presença de sinais em 121,8 e 140,8 ppm (C-6

e C-5) de ambas as estruturas e 129,37 e 138,4 ppm referentes aos carbonos, C-23 e C-22 presentes apenas na estrutura do estigmasterol. Os valores assinalados pelos espectros de RMN ^1H e RMN ^{13}C juntamente à comparação com dados constantes da literatura possibilitaram a atribuição dos sinais de cada esteróide de forma coerente.



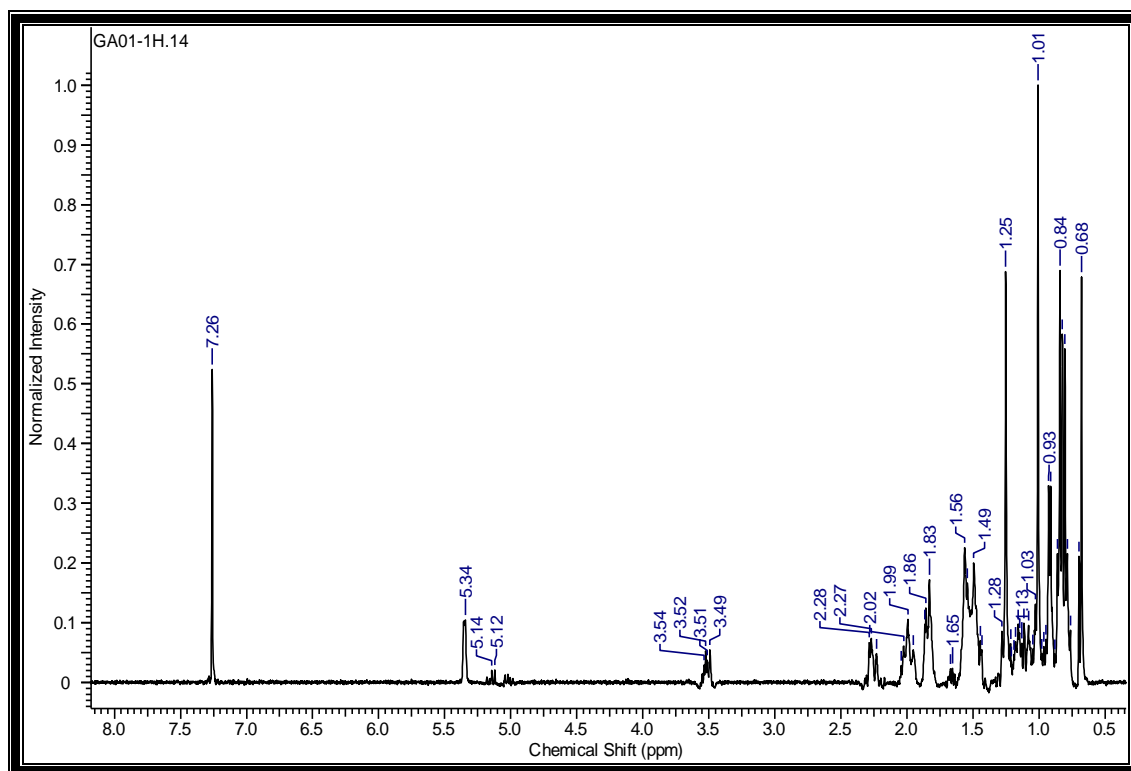


Figura 52. Espectro de RMN de ^1H obtido para PP03a-c (400 MHz, CDCl_3).

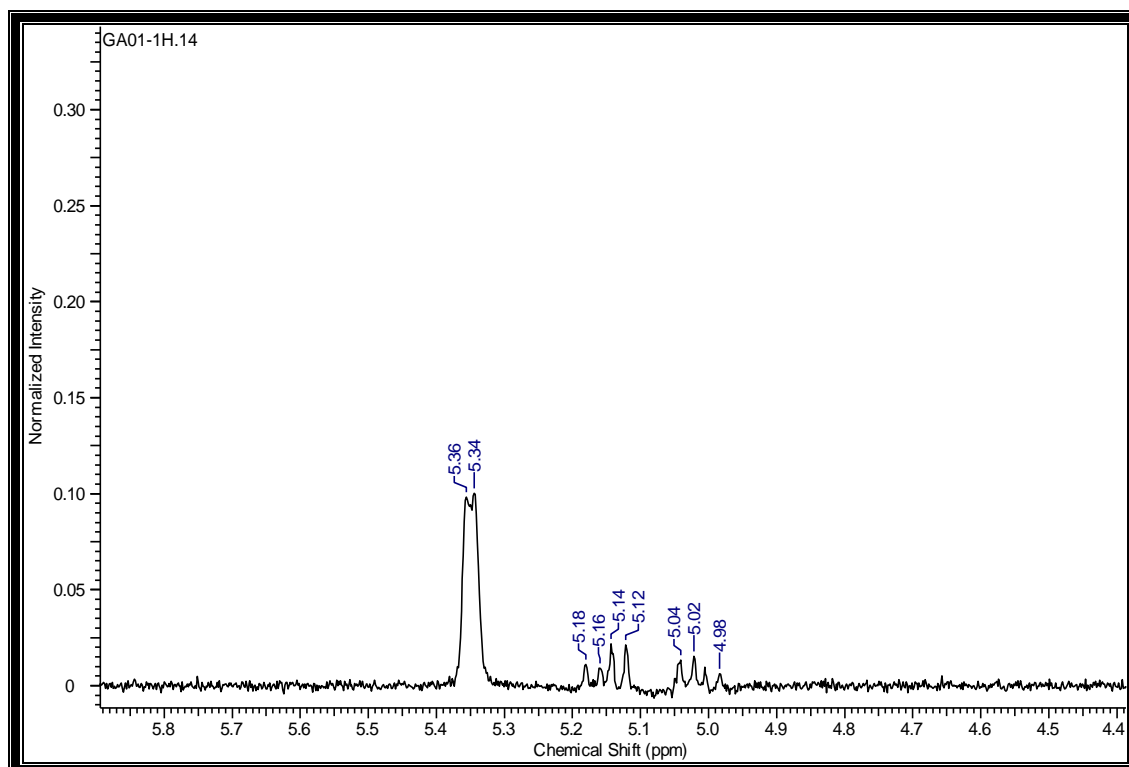


Figura 53: Ampliação do espectro de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) de PP03a-c na região de δ_{H} 4,98 a 5,36 ppm.

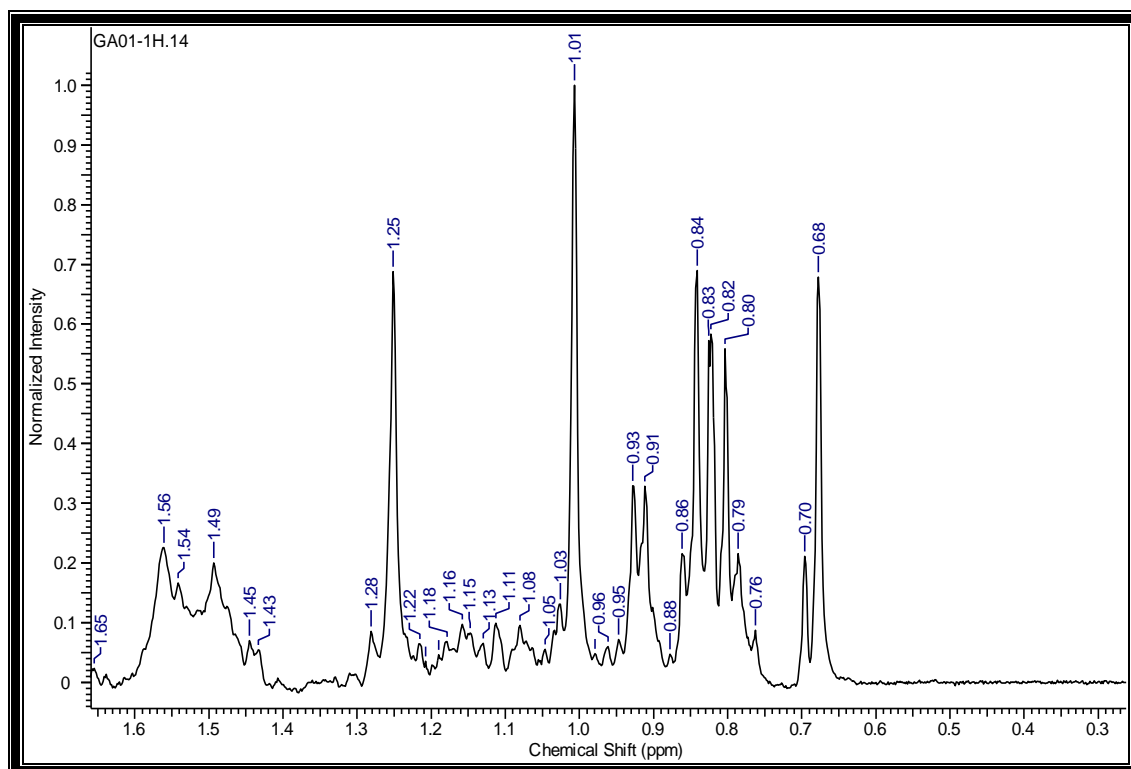


Figura 54: Ampliação do espectro de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) de PP03a-c na região de δ_{H} 0,68 a 1,65 ppm

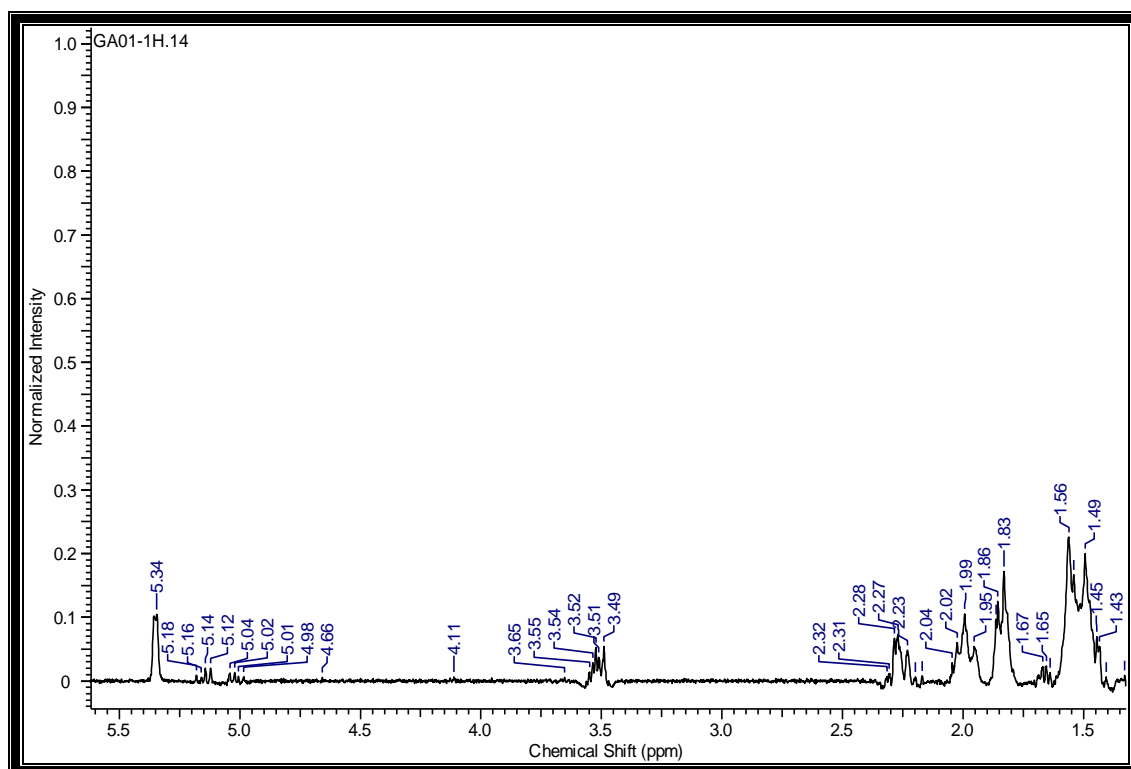


Figura: 55. Ampliação do espectro de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) de PP03a-c na região de δ_{H} 1,43 a 5,34 ppm.

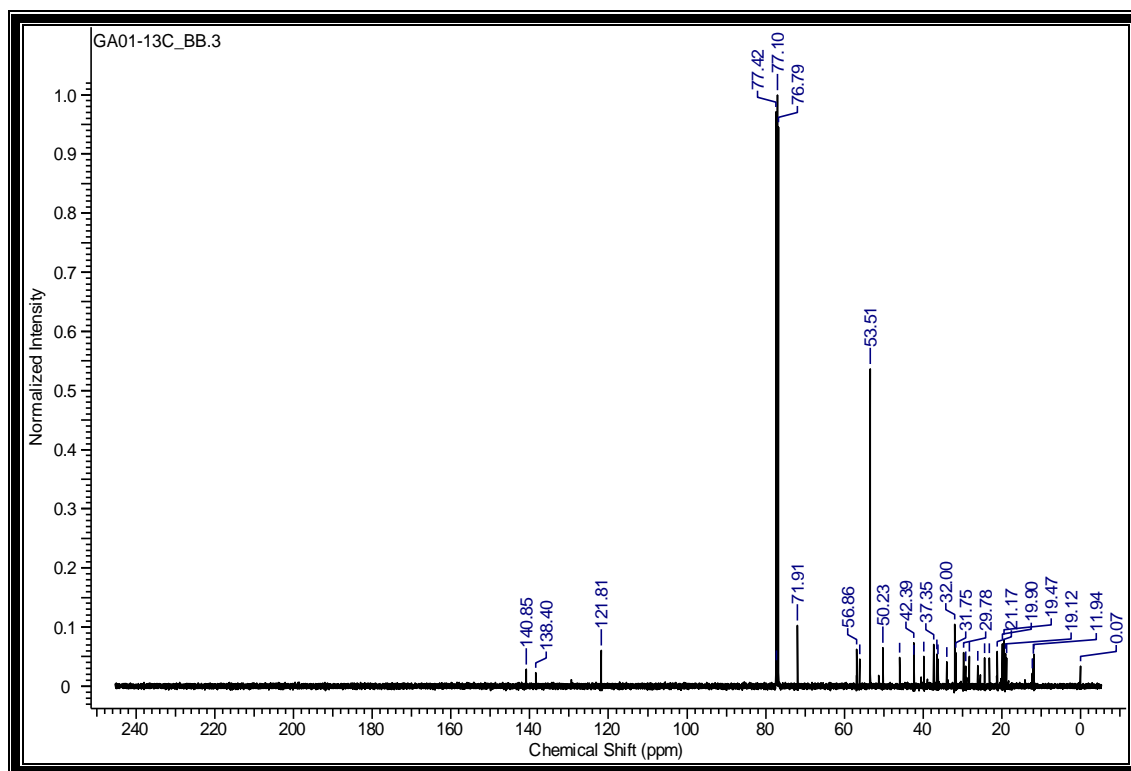


Figura 56. Espectro de RMN de ^{13}C obtido para PP03a-c (100 MHz, CDCl_3).

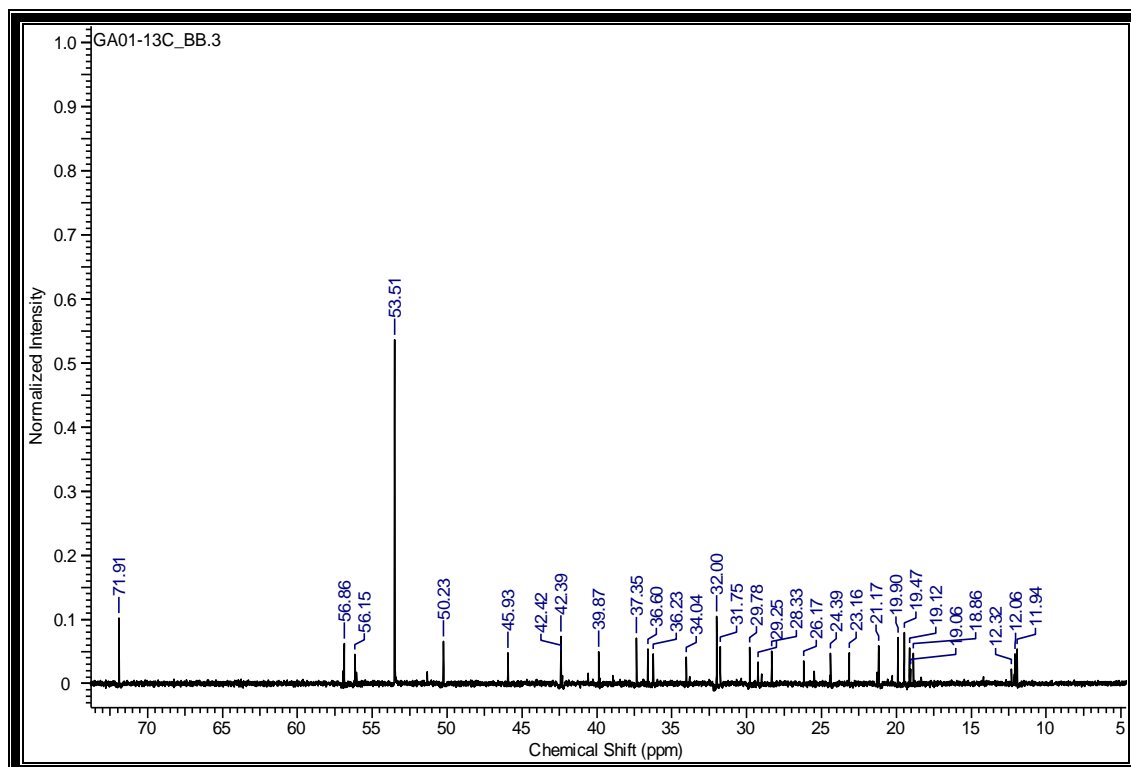


Figura 57. Ampliação do espectro de RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) de PP03a-c na região de δ_{C} 1,94 a 71,91 ppm.

Tabela 10. Atribuição do espectro de RMN ^{13}C obtido para PP03a-c

Atribuição	PP-03a*	Campesterol**	PP-03b*	Estigmasterol**	PP-03c*	Sitosterol**
	δ_c (ppm)	δ_c (ppm)	δ_c (ppm)	δ_c (ppm)	δ_c (ppm)	δ_c (ppm)
1	37,34	37,3	37,34	37,3	37,34	37,29
2	32,0	31,9	32,0	31,9	32,0	31,94
3	71,9	71,8	71,9	71,8	71,9	71,83
4	42,4	42,2	42,4	42,2	42,4	42,4
5	140,8	140,7	140,8	140,7	140,8	140,7
6	121,8	121,7	121,8	121,7	121,8	121,7
7	34,04	33,9	34,04	33,9	34,04	34,0
8	31,8	31,9	31,8	31,9	31,8	31,9
9	50,2	50,1	50,2	50,1	50,2	50,1
10	36,2	36,1	36,2	36,1	36,2	36,1
11	21,2	21,1	21,2	21,1	21,2	21,1
12	39,9	39,8	39,9	39,8	39,9	39,8
13	42,4	42,3	42,4	42,3	42,4	42,3
14	56,86	56,8	56,86	56,8	56,86	56,8
15	24,4	24,3	24,4	24,3	24,4	24,3
16	28,3	28,9	28,3	28,9	28,3	28,9
17	56,0	56,0	56,0	56,0	56,0	56,0
18	12,3	12,3	12,3	12,3	12,3	12,3
19	19,5	19,4	19,5	19,4	19,5	19,4
20	37,3	37,3	40,5	39,8	40,5	39,8
21	12,2	14,1	19,9	20,5	19,1	18,8
22	32,0	32,0	138,4	138,3	31,9	32,0
23	31,7	31,6	129,37	129,3	26,17	26,0
24	45,9	45,8	51,3	51,2	45,9	45,8
25	31,8	31,9	31,7	31,9	29,0	29,0
26	21,3	21,2	21,3	21,2	19,9	19,8
27	19,9	20,2	19,5	19,8	19,5	19,8
28	18,8	18,2	25,49	25,4	23,2	23,0

*PP-03a-c- Mistura de campesterol, estigmasterol e sitosterol = dados obtidos no presente trabalho (100 MHz, CDCl_3).

**Campesterol, estigmasterol e sitosterol = dados relatados em Seo *et al.*,(1994)

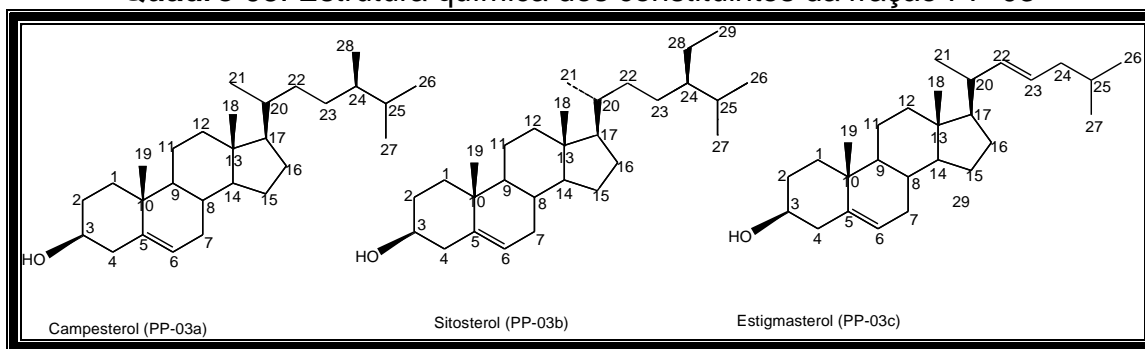
O conjunto dos dados acima sugere para a mistura PP03a-c as estruturas dos esteróides, campesterol, estigmasterol e sitosterol.

Os fitoesteróides (esteroídes de plantas) são frequentemente encontrados dentro do reino vegetal, sendo que os mais comuns dentro desta classe de substâncias são o estigmasterol e o sitosterol.

Tabela 11: Principais picos observados no espectro de massas da fração PP-03 do extrato hexânico de *P. pterosperma*

Pico*	t _R **	Substância	PM	% em área do pico
1	19,4	Campesterol (PP-03a)	400	20
2	20,0	Estigmasterol (PP-03b)	412	28
3	21,1	Sitosterol (PP-03c)	414	62

*Pico: ver **Figura 48, p. 68**; **tempo de retenção em minutos.

Quadro 03: Estrutura química dos constituintes da fração PP-03

4.3.4 Identificação da fração 1-3 do extrato em clorofórmio (PP-04)

A mistura foi obtida da fração 1-3 do extrato de clorofórmio partição com acetato de etila por eluição (clorofórmio e acetato de etila 9:1) em coluna tipo flash (item 3.10). Apresentou-se como um sólido branco cristalino, com faixa de fusão 269,1 - 271,1°C.

A análise do sólido através der CCDA de sílica gel (item 3.10), eluente clorofórmio, quando revelada com vanilina sulfúrica seguida de aquecimento, apresentou-se como uma mancha de coloração arroxeadas, que através da análise dos espectros obtidos no CG/EM (Figura 59, p. 81) mostrou tratar-se de uma mistura de substâncias. A solubilidade da mistura foi determinada em CH₂Cl₂.

A análise do espectro da mistura na região do infravermelho evidenciou sua natureza alifática, pela presença de bandas de intensidade em 2939,52 - 2866,22 atribuídas ao estiramento C-H de carbono alifático (metílicos, metilênicos e metínicos), observou-se também, bandas de intensidade em 3622,32 – 3479,58 cm^{-1} condizente com a presença de grupo OH e bandas de intensidade em 1708,93 relativa ao estiramento da ligação C=O (Silverstein *et al.*, 2005; Pavia *et al.*, 2001). Na Figura 58 apresenta-se o espectro na região do infravermelho da mistura PP04-a e PP04-b.

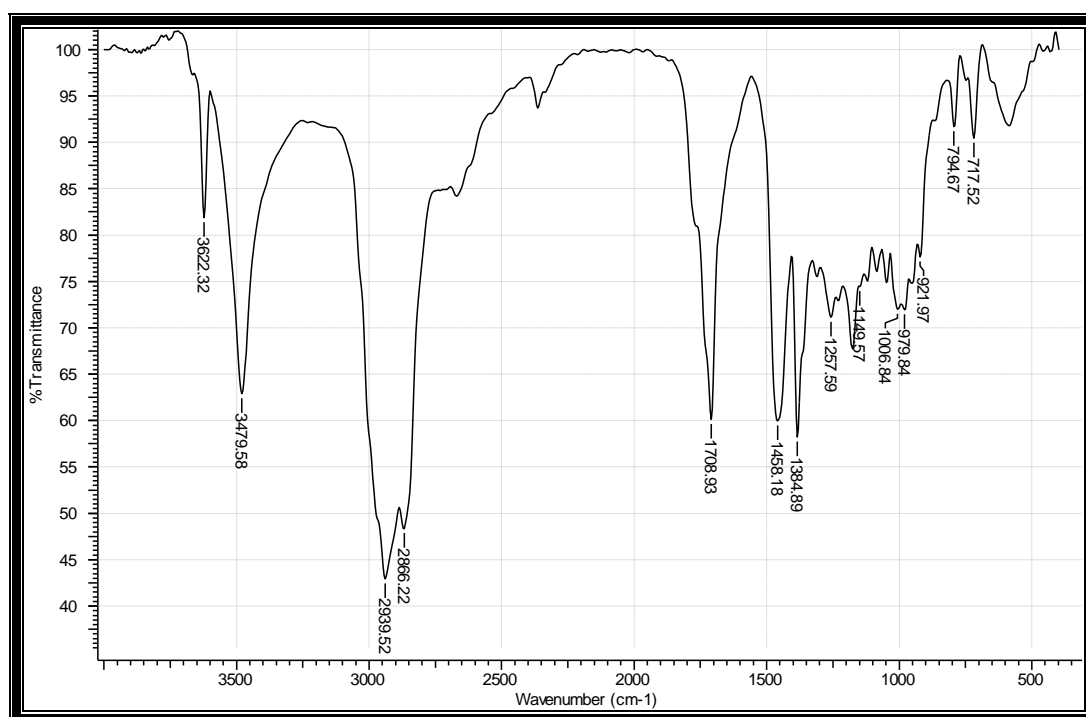


Figura 58. Espectro de absorção molecular obtido na região do infravermelho para PP-04a e PP-04b.

O Cromatograma de gás apresentou dois picos evidenciando a presença de uma mistura de substâncias. Segundo comparação com a biblioteca (NIST) do espectrômetro de massa, os índices de similaridade sugerem que a substância PP - 04a ($t_{R1}=25,74$ min), $m/z=428$ [M⁺], trata-se do triterpeno epifriedelanol (Figura 60, p.81). A substância PP - 04b ($t_{R2}=26,35$ min), apresentou pico do íon molecular a m/z 426 u.m.a e segundo análise dos dados obtidos do espectro na região do IV (Figura 58) espectro de massa (Figura 61, p.82), RMN ^1H (Figura 62-63, p. 82-83) e ^{13}C (Figura 64-67, p. 83-85) mostrou tratar-se de quantidades adicionais de PP-01. A análise dos dados obtidos por

meio do espectro de ^1H e ^{13}C para a substância PP-04a, serão discutidos posteriormente, nos itens 4.3.5, p.85-88.

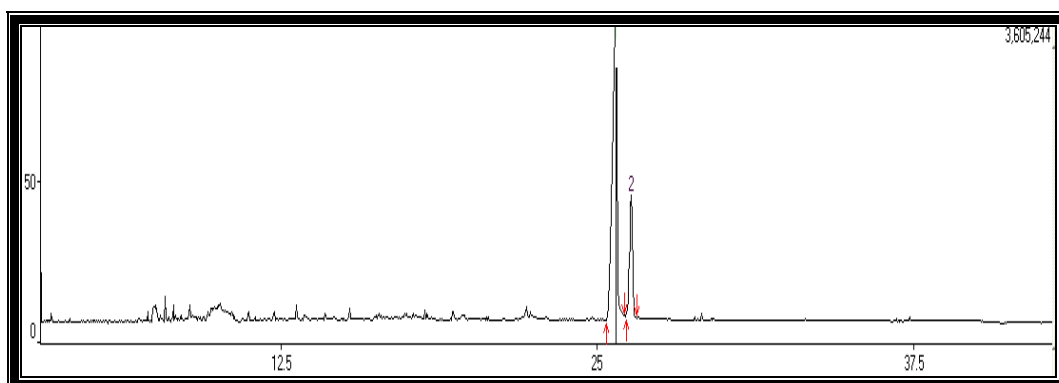


Figura 59: Cromatograma de gás da fração PP-04a-b do extrato em clorofórmio de *P. pterosperma*.

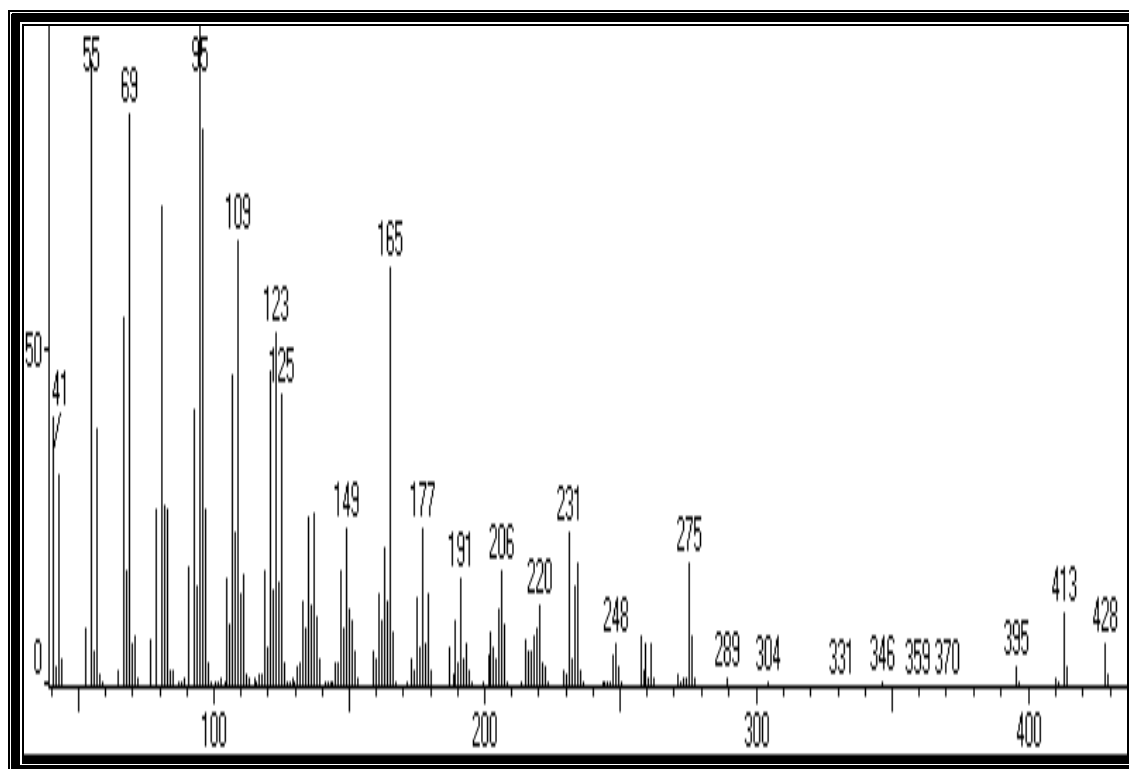


Figura 60. Fragmentograma de massas de PP04-a

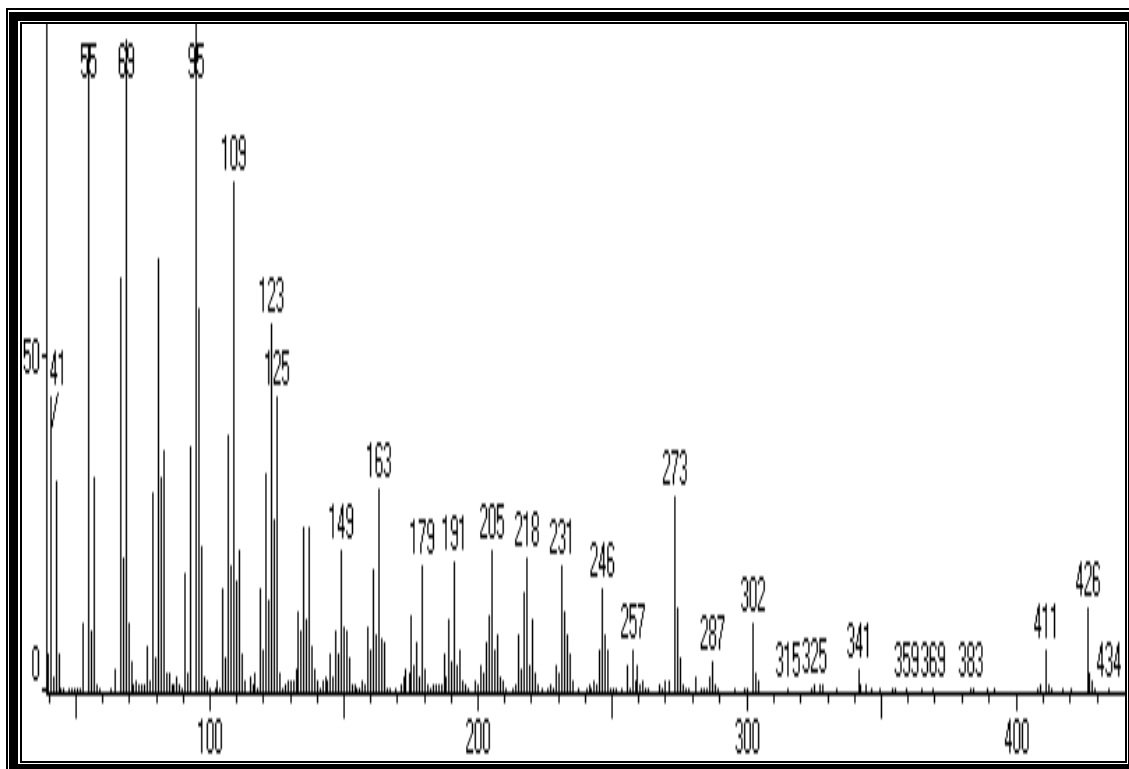


Figura 61. Fragmentograma de massas de PP04-b.

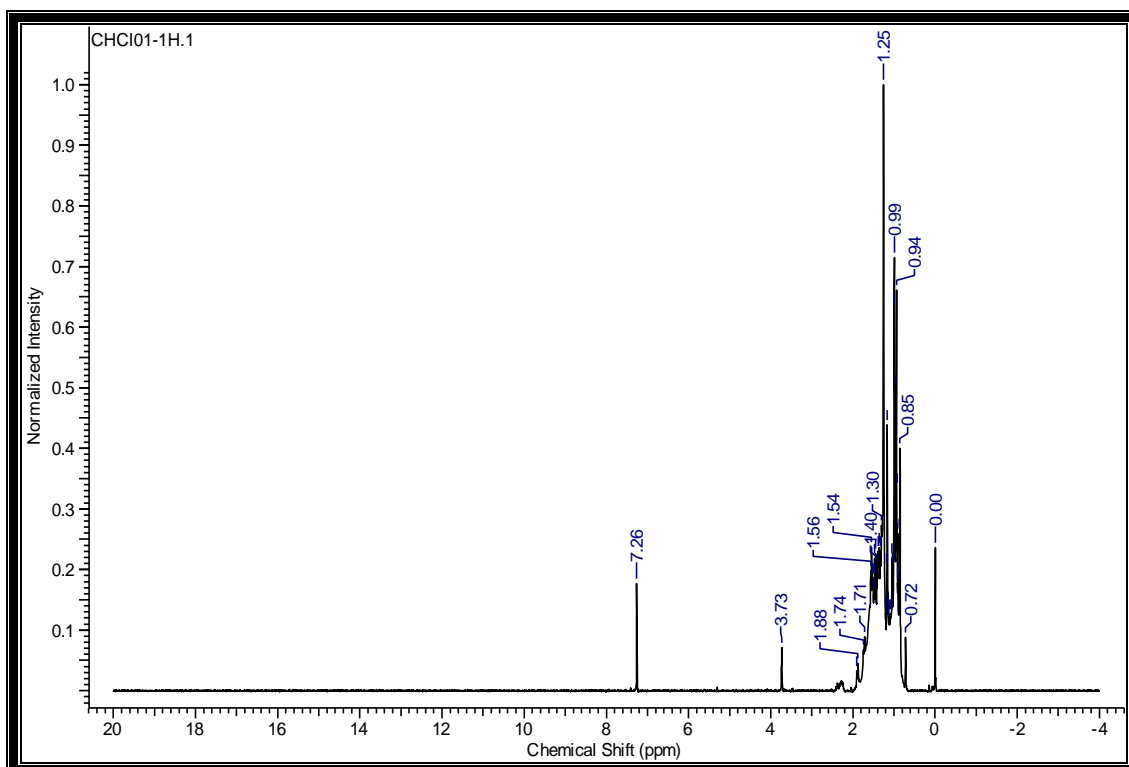


Figura 62. Espectro de RMN de ^1H obtido para PP-04a e PP-04b (400 MHz, CDCl_3).

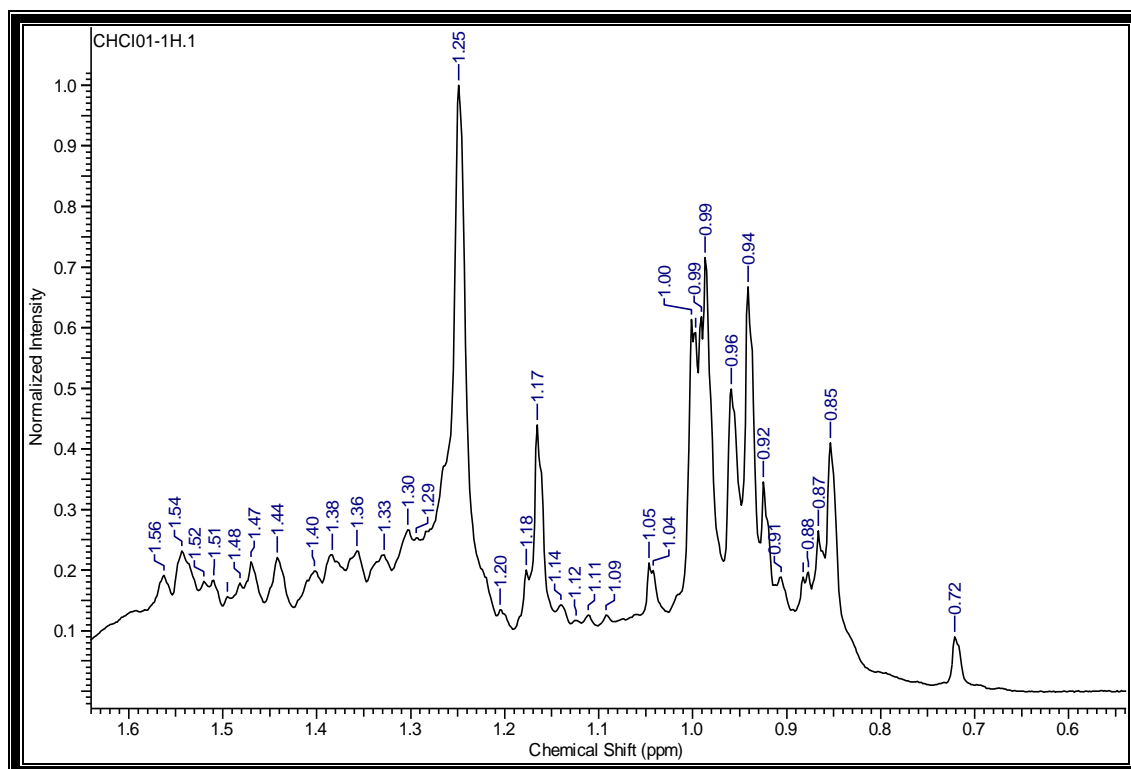


Figura 63. Ampliação do espectro de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) de PP-04a e PP-04b na região de δ_{H} 0,72 a 1,56 ppm.

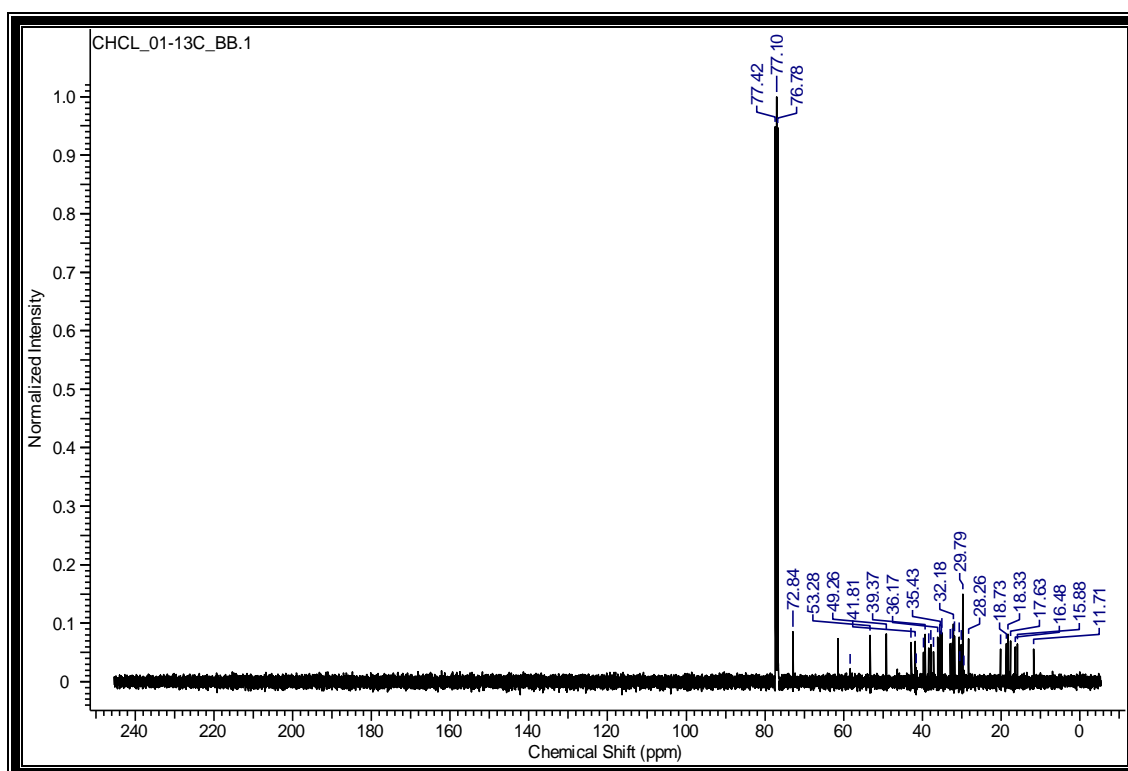


Figura 64. Espectro de RMN de ^{13}C obtido para PP-04a e PP-04b (100 MHz, CDCl_3).

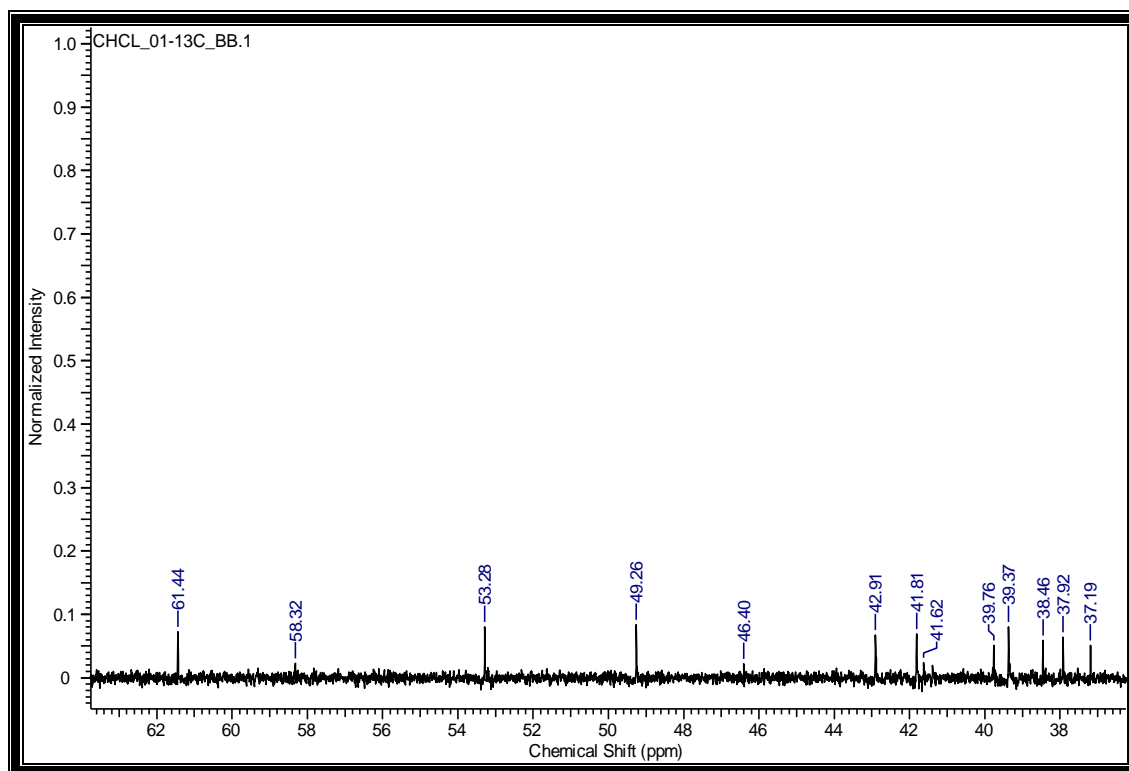


Figura 65. Ampliação do espectro de RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) de PP-04a e PP-04b na região de δ_{C} 37,19 a 61,44 ppm.

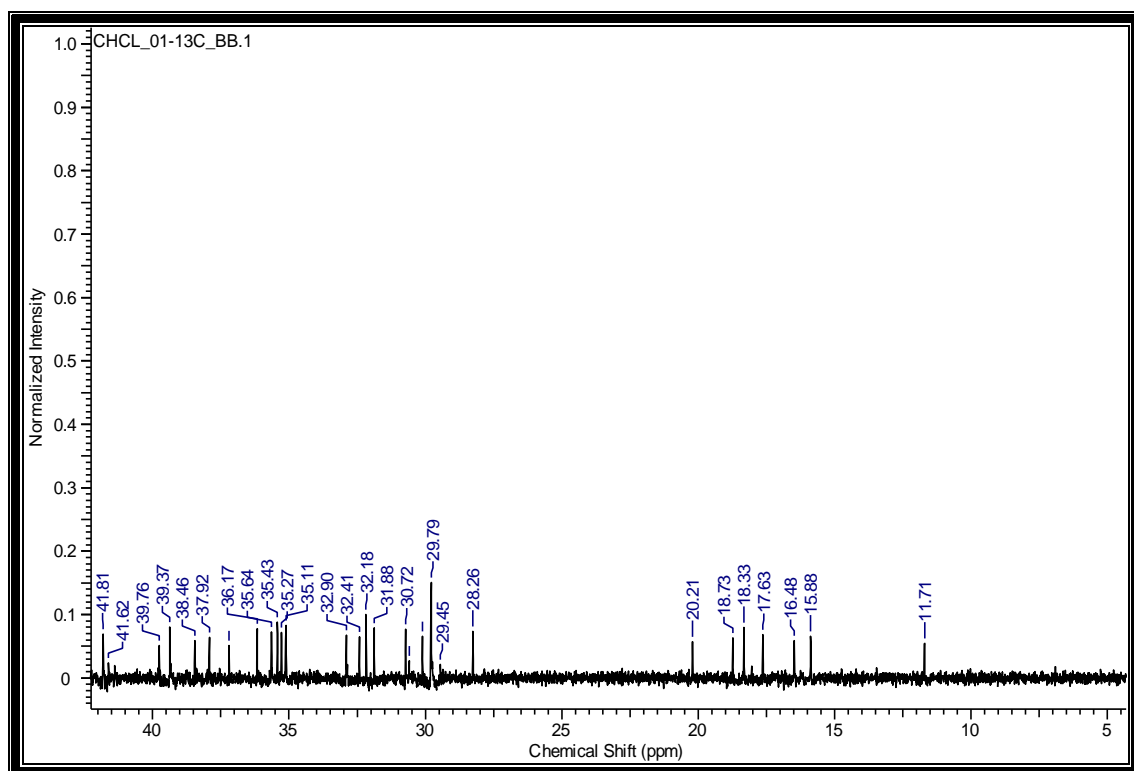


Figura 66. Ampliação do espectro de RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) de PP-04a e PP-04b na região de δ_{C} 11,71 a 41,81 ppm.

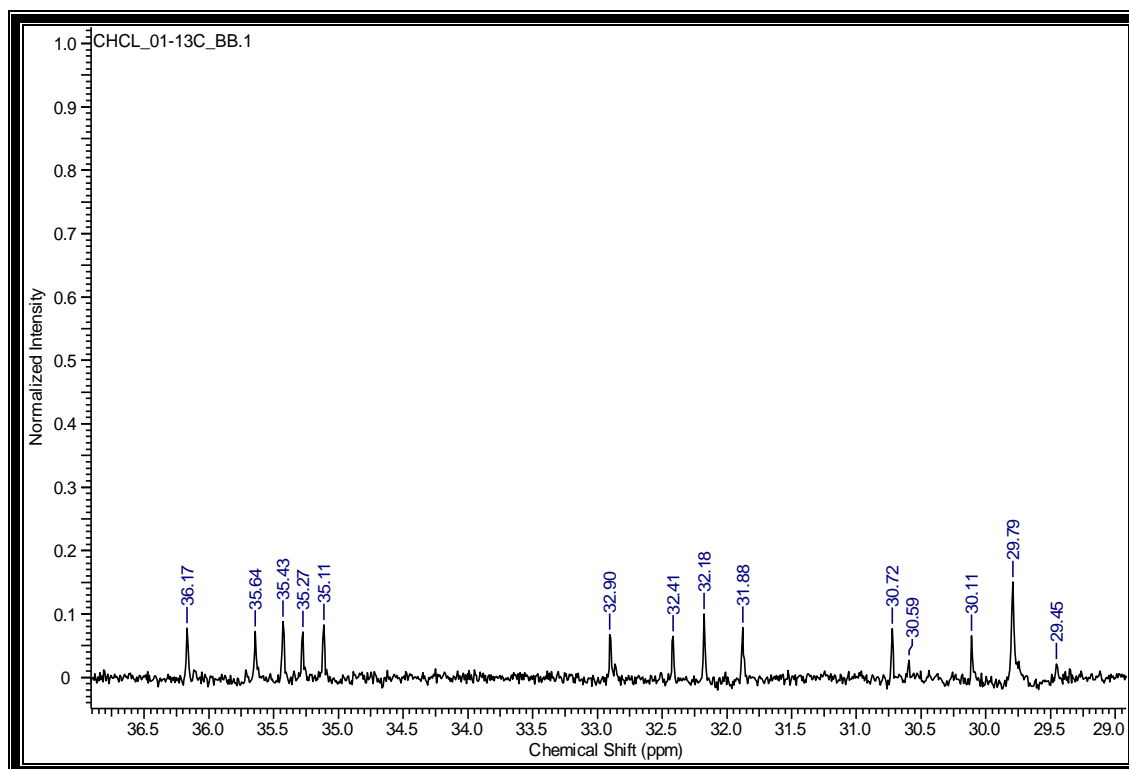


Figura 67. Ampliação do espectro de RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) de PP-04a e PP-04b na região de δ_{C} 29,45 a 36,17 ppm.

Tabela 12. Atribuição do espectro de RMN ^{13}C obtido para PP-04a-b

Atribuição	PP04-a	epifriedelanol**	PP04-b	Friedelina***
	epifriedelanol*			
	δ_c (ppm)	δ_c (ppm)	δ_c (ppm)	δ_c (ppm)
1	15,88	15,8	-	22,7
2	35,2	35,2	41,8	41,8
3	72,8	72,8	-	213,0
4	49,2	49,2	58,3	58,2
5	37,2	37,1	42,9	42,8
6	41,8	41,7	41,6	41,2
7	17,6	17,6	18,3	18,3
8	53,3	53,2	53,2	53,2
9	38,4	38,4	37,9	37,8
10	61,4	61,4	61,4	59,5
11	35,2	35,3	35,2	35,2
12	30,6	30,6	32,9	32,4
13	37,9	37,8	38,4	38,2
14	39,7	39,7	39,7	39,7
15	32,4	32,3	30,6	30,6
16	36,1	36,1	36,1	36,1
17	30,1	30,0	30,1	30,0
18	42,9	42,8	42,9	42,9
19	35,6	35,6	35,4	35,3
20	29,4	28,2	29,4	28,2
21	32,1	32,8	32,9	32,9
22	39,3	39,3	39,3	39,3
23	11,7	11,6	-	6,8
24	16,4	16,4	15,8	14,6
25	18,3	18,2	18,3	18,2
26	18,7	18,6	18,7	18,6
27	20,2	20,1	20,2	20,1
28	31,8	31,8	32,1	32,1
29	35,1	35	31,8	31,8
30	32,2	32,1	35,1	35,0

*PP-04-a-b = Mistura de epifriedelanol e fridolina = dados obtidos no presente trabalho (100 MHz, CDCl_3).

**Epifriedelanol = dados relatados em Kiem et al., (2004)

***Friedelina = dados relatados em Aragão et al.(1990)

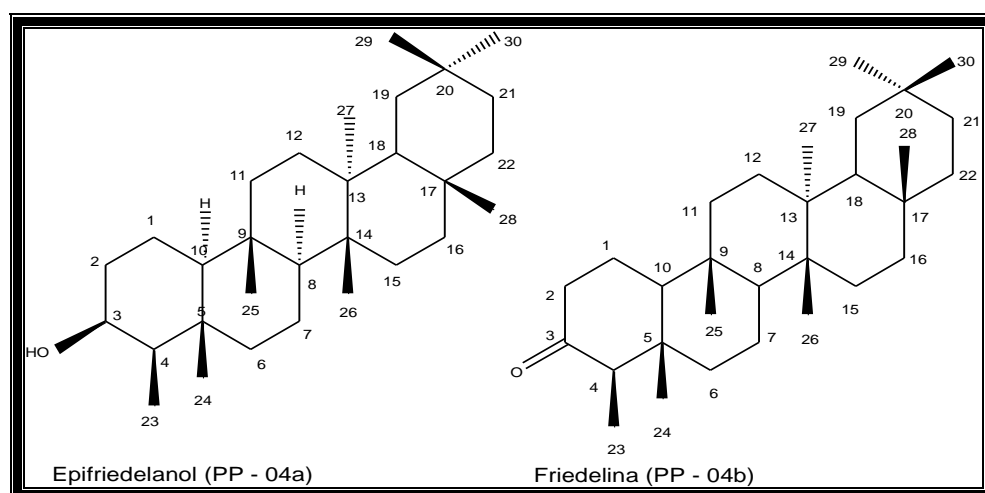
O conjunto dos dados acima sugere para a substância PP-04a a estrutura do triterpeno epifriedelanol e para PP-04b a estrutura do triterpeno friedelina, já isolada em frações anteriores.

Tabela 13: Principais picos observados no espectro de massas da fração PP-04 do extrato hexânico de *P. pterosperma*

Pico*	t _R **	Substância	PM	% em área do pico
1	25,74	Epifriedelanol (PP - 04a)	426	77,81
2	26,32	Friedelina (PP - 04b)	426	22,19

*Pico: ver **Figura 59, p. 81**; **tempo de retenção em minutos.

Quadro 04: Estruturas químicas dos constituintes da fração PP-04



4.3.5. Identificação da fração 10-14 do extrato metanólico (PP-05).

A substância PP-05 foi obtida das frações 10-14 do extrato metanólico (item 3.11). PP-05 apresentou-se como um sólido branco cristalino, com faixa de fusão 215,3 - 219°C.

A análise do sólido através de CCDA de sílica gel (item 3.11), eluente clorofórmio, sugeriu tratar-se de uma substância triterpenoídica, em função da presença de uma única mancha de coloração arroxeada que através da análise dos espectros obtidos no CG/EM (Figura 69, p. 89) mostrou tratar-se de uma substância pura. A sua solubilidade foi determinada em CH_2Cl_2 .

A análise do espectro na região do infravermelho evidenciou sua natureza alifática pela presença de bandas de intensidade em 2920,23 -2850,79 e 1708,93-1465,90 cm^{-1} relativas ao estiramento e à deformação C-H de carbonos alifáticos (metílicos, metilênicos e metínicos) respectivamente. Verificou-se também bandas de intensidade em 3622,32 – 3475,73 cm^{-1} condizente com a presença de grupo OH (Silverstein *et al.*, 2005; Pavia *et al.*, 2001). Na Figura 68 apresenta-se o espectro na região do infravermelho da substância PP-05.

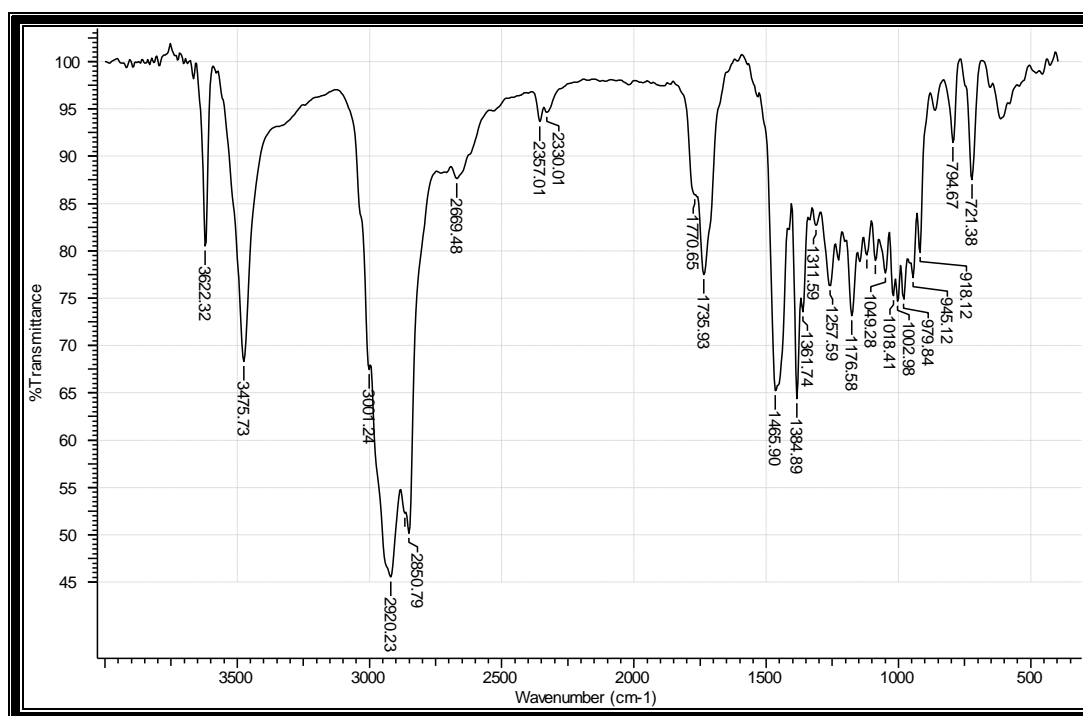


Figura 68: Espectro de absorção molecular obtido na região do infravermelho para PP-05.

O espectro de massas de baixa resolução, obtido por inserção via CG, apresentou um único pico (Figura 69, p.89). Segundo comparação com a biblioteca (NIST) do espectrômetro de massa, os índices de similaridade sugerem que a substância PP-05 t_R em 25,63 min, pico do íon molecular m/z 428 [M^+], além dos picos em m/z 413 [M^+ - (CH_3)], m/z 275 [M^+ - ($\text{C}_{11}\text{H}_{21}$)] e m/z

231 u.m.a trata-se do triterpeno epifriedelanol. A figura 71 (p. 90) apresenta a provável fragmentação de PP-05

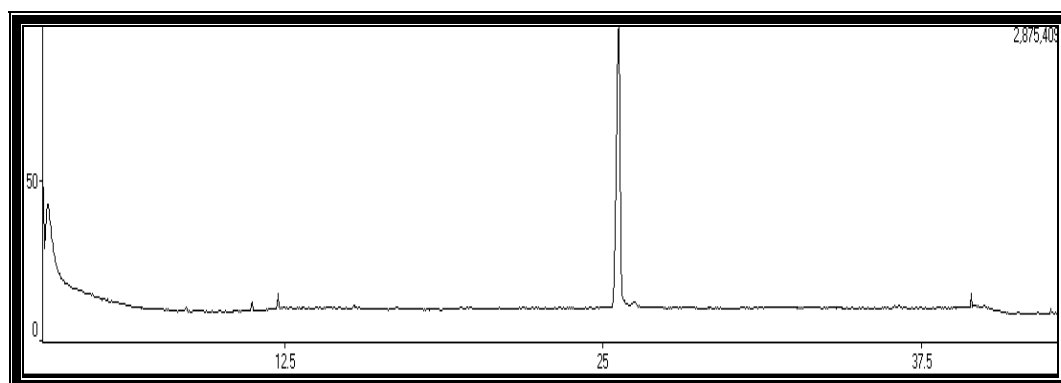


Figura 69: Cromatograma de gás da fração PP-05 do extrato metanólico de *P. pterosperma*.

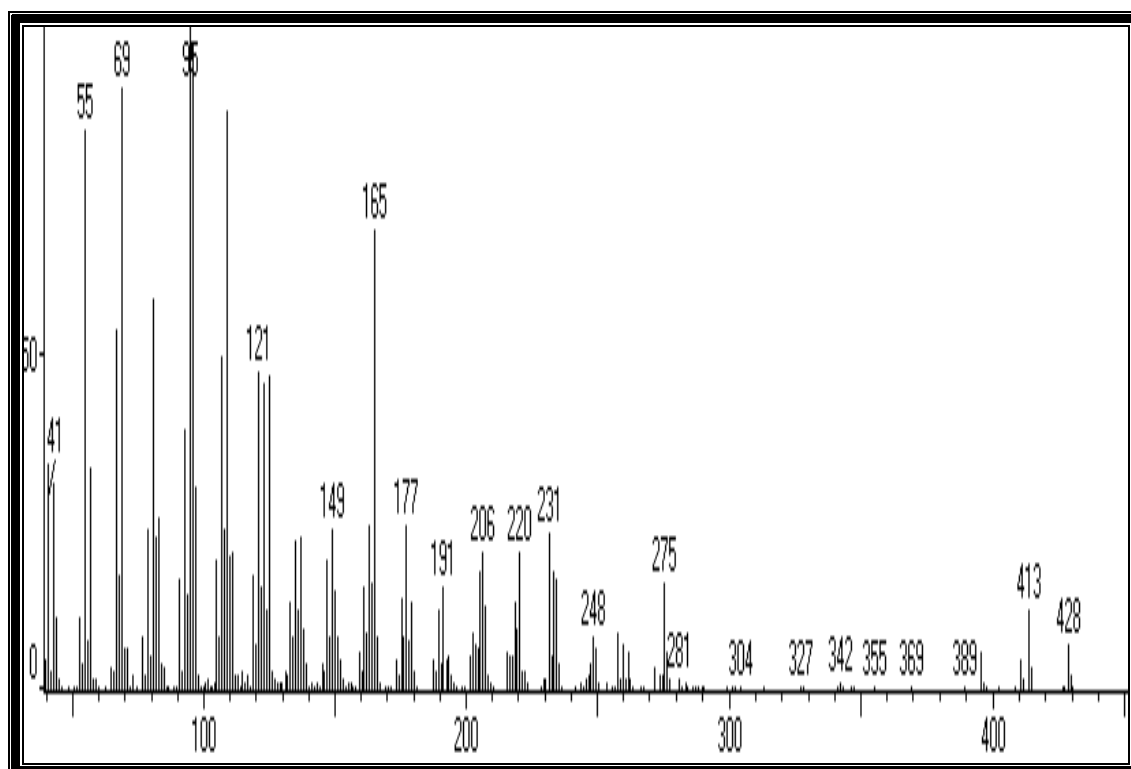


Figura 70: Fragmentograma de massas de PP-05.

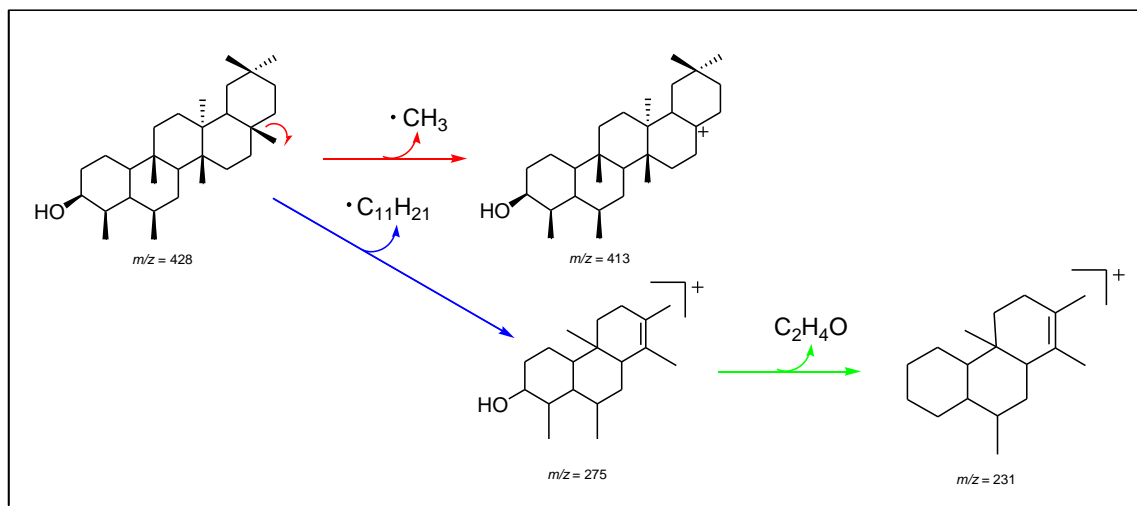


Figura 71. Provável fragmentação de PP-05.

O espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) da amostra PP - 05 (Figuras 72-75, p.90-92), apresentou diversos sinais entre 0,85 e 1,74 ppm que indicam a presença de vários grupos metílicos na molécula. O espectro ainda apresentou um sinal múltiplo em 3,74 ppm referente ao H-3.

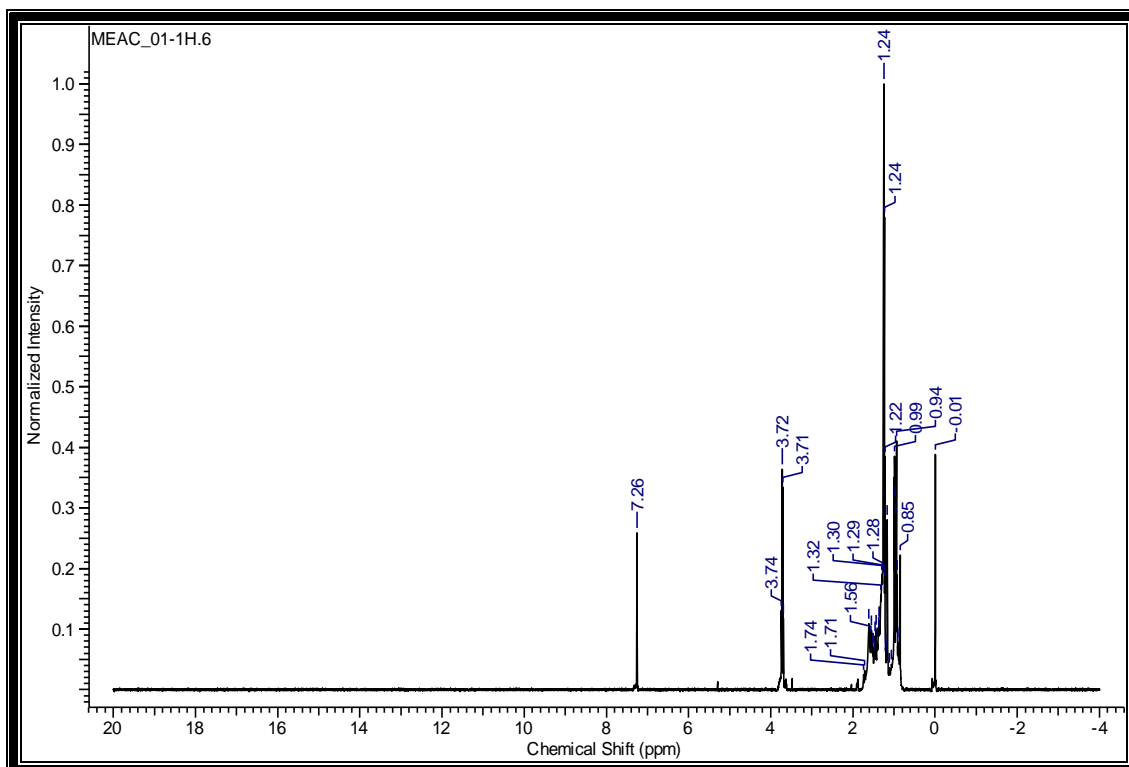


Figura 72. Espectro de RMN de ^1H obtido para PP-05 (400 MHz, CDCl_3).

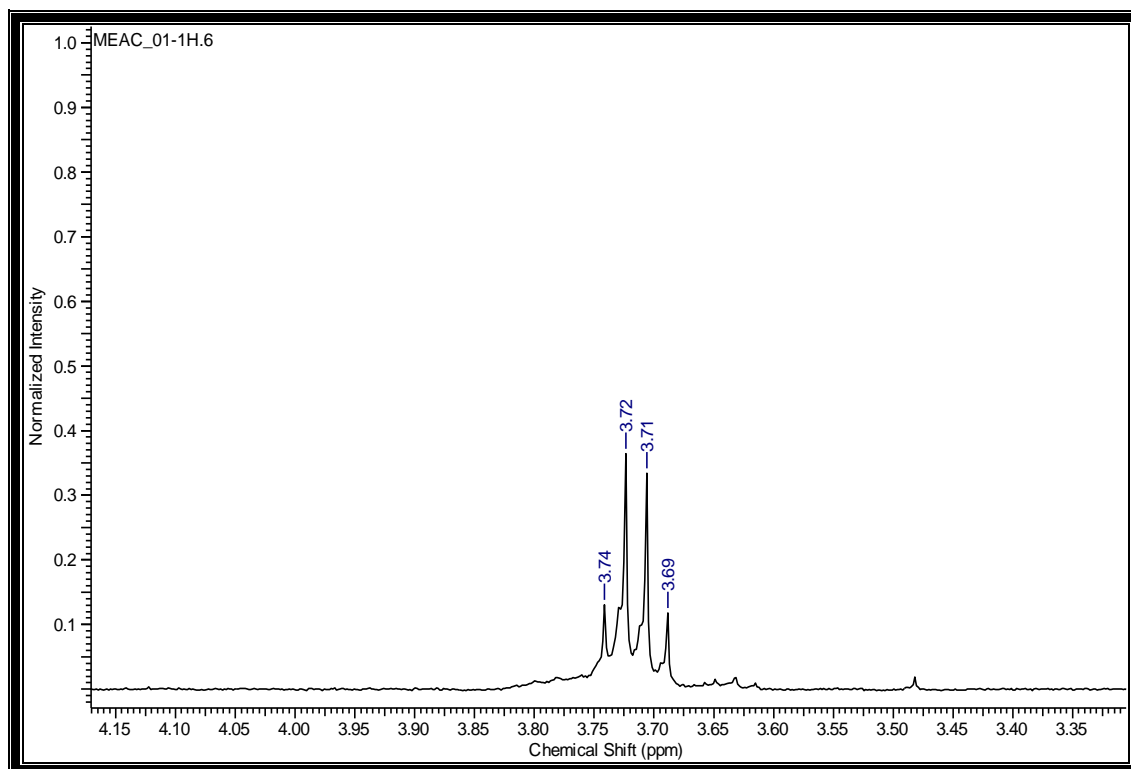


Figura 73. Ampliação do espectro de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) de PP-05 na região de δ_{H} 3,69 a 3,74 ppm.

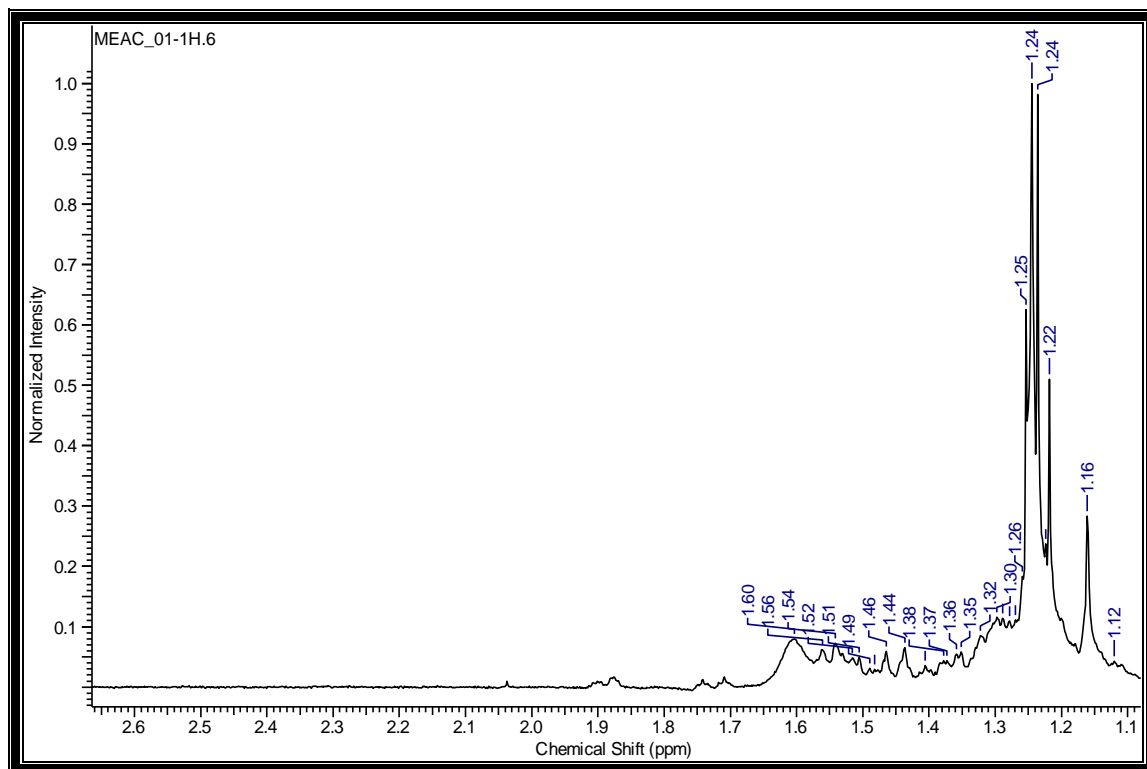


Figura 74. Ampliação do espectro de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) de PP-05 na região de δ_{H} 1,12 a 1,60 ppm.

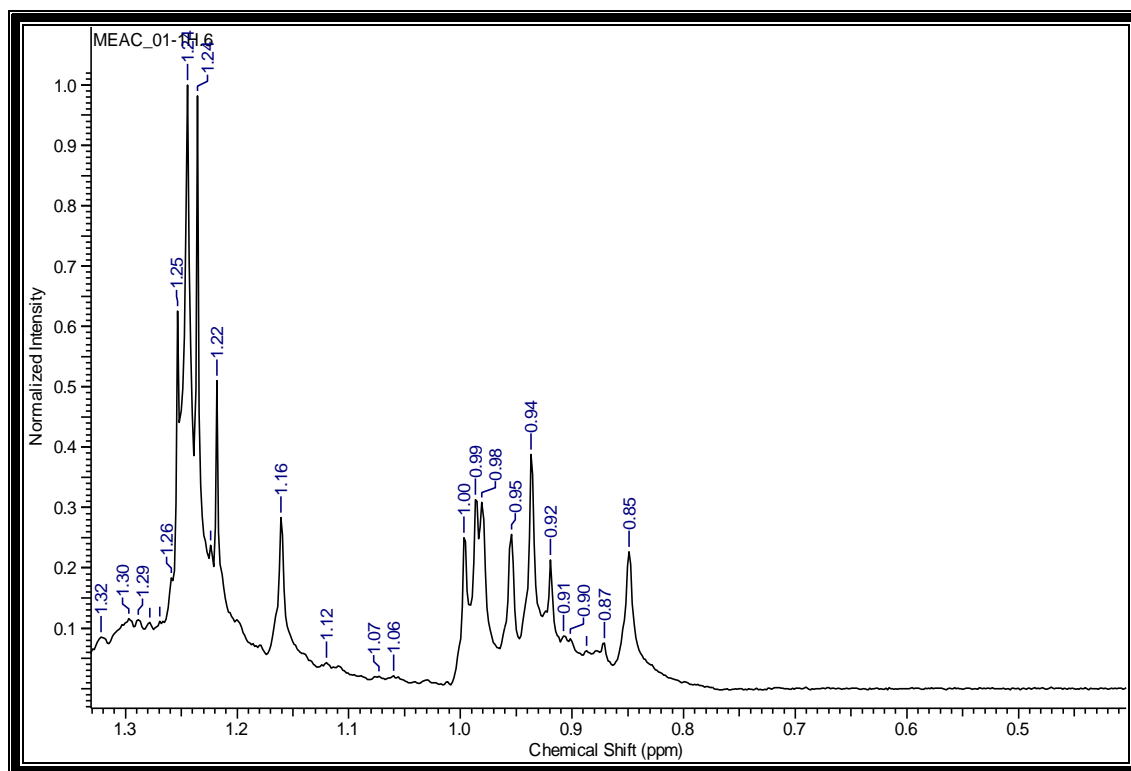


Figura 75. Ampliação do espectro de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) de PP-05 na região de δ_{C} 0,85 a 1,26 ppm.

O espectro de RMN de ^{13}C desacoplado de ^1H (75 MHz, CDCl_3) obtido para PP-05 (Tabela 14, p.95; Figuras 76-80, p.93-95) apresentou um sinal em 72,85 (C-3) indicando ser um carbono oxigenado. Os deslocamentos químicos dos carbonos adjacentes C-2, C-1 e C-4 e a metila C-23 foram atribuídos levando-se em consideração o efeito do grupo hidroxila no carbono o qual está ligado.

A localização das metilas pode ser comprovada pela correlação J_{CH} entre δ_{H} 0,95 e δ_{C} 11,70 (C-23), δ_{H} 0,92 e δ_{C} 16,47 (C-24), δ_{H} 0,85 e δ_{C} 18,33 (C-25), δ_{H} 1,0 e δ_{C} 18,73 (C-26), δ_{H} 0,95 e δ_{C} 20,2 (C-27), δ_{H} 0,96 e δ_{C} 31,87 (C-28), δ_{H} 0,92 e δ_{C} 35,0 (C-29), δ_{H} 1,16 e δ_{C} 32,17 (C-30), apresentadas no espectro de correlação heteronuclear HMQC (Figuras 81-82, p.96).

As mesmas podem ainda ser confirmadas através das correlações a longa distância entre o átomo de carbono C-4 em δ_{C} 49,25 com hidrogênios em δ_{H} 0,92 (3H-24), o átomo de carbono C-6 em δ_{C} 41,8 com hidrogênios em δ_{H} 0,92 (3H-24), o átomo de carbono C-8 em δ_{C} 53,28 com hidrogênios em δ_{H} 0,85 (3H-25) e δ_{H} 1,0 (3H-26), o átomo de carbono C-29 em δ_{C} 35,1 com hidrogênios

em δ_H 1,16 (3H-30) e o átomo de carbono C-30 em δ_C 32,17 com hidrogênios em δ_H 0,92 (3H-29) apresentadas no espectro de HMBC (Figuras 83-84, p.97).

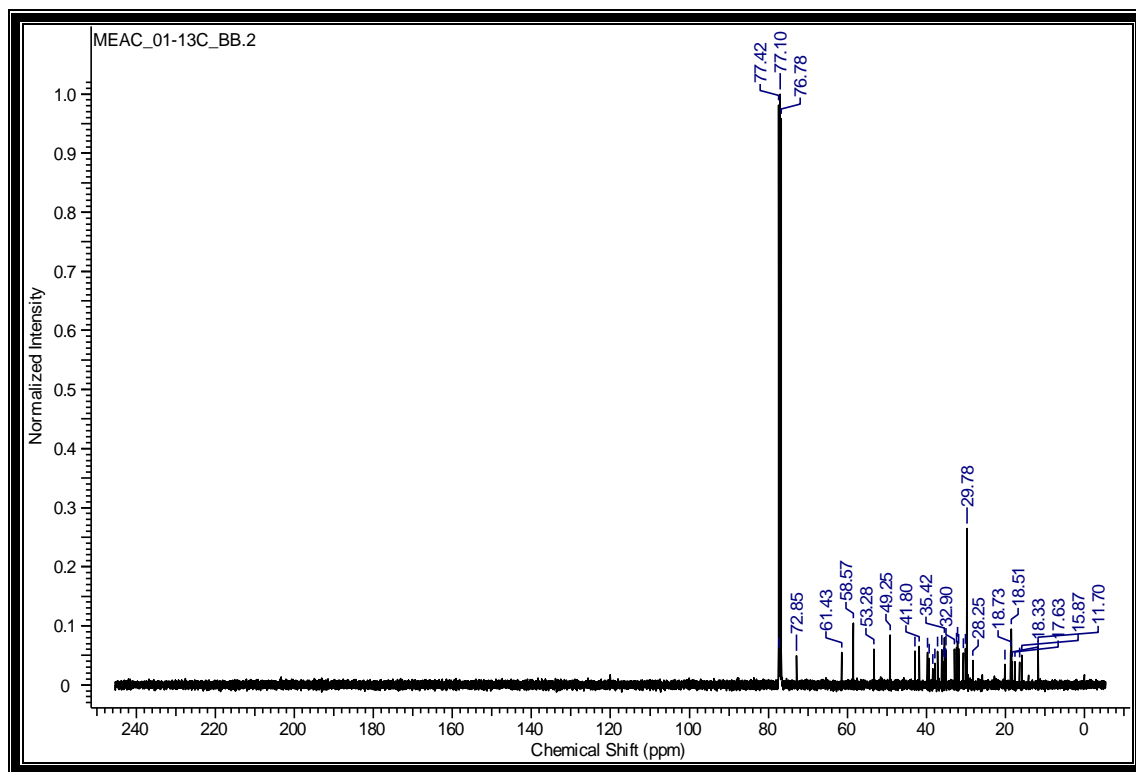


Figura 76. Espectro de RMN de ^{13}C obtido para PP-05 (100 MHz, CDCl_3).

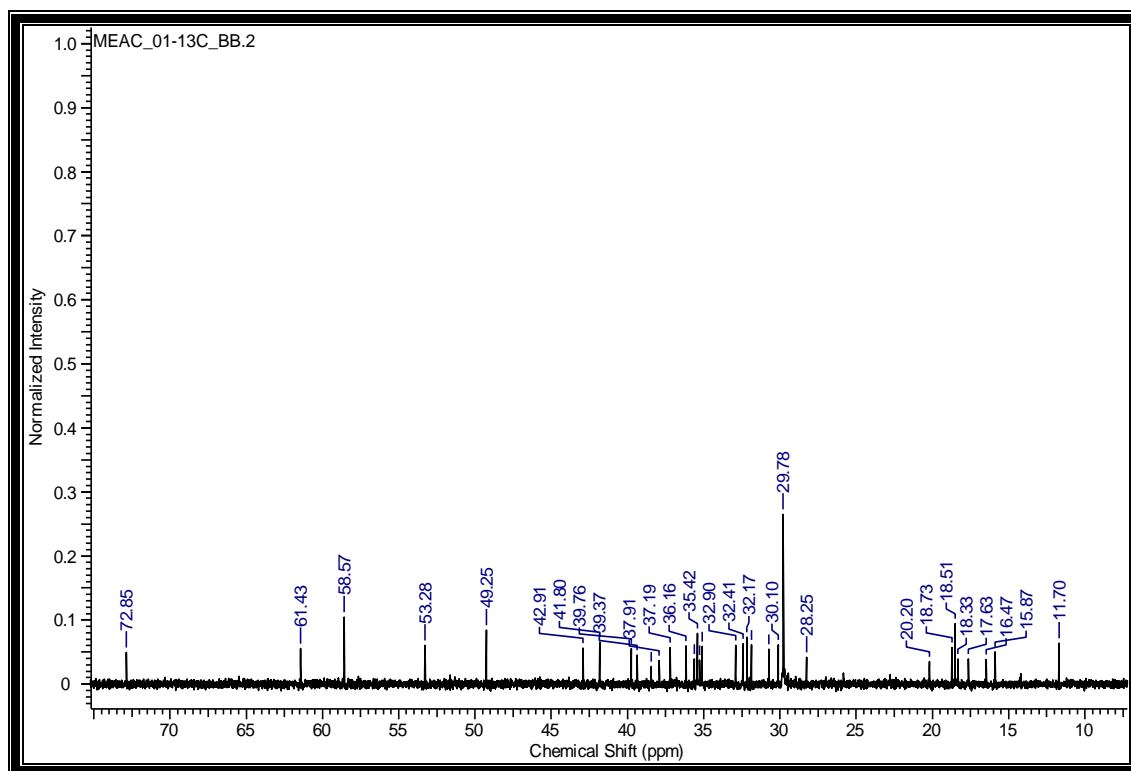


Figura 77. Ampliação do espectro de RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) de PP-05 na região de δ_{C} 11,70 a 72,85 ppm.

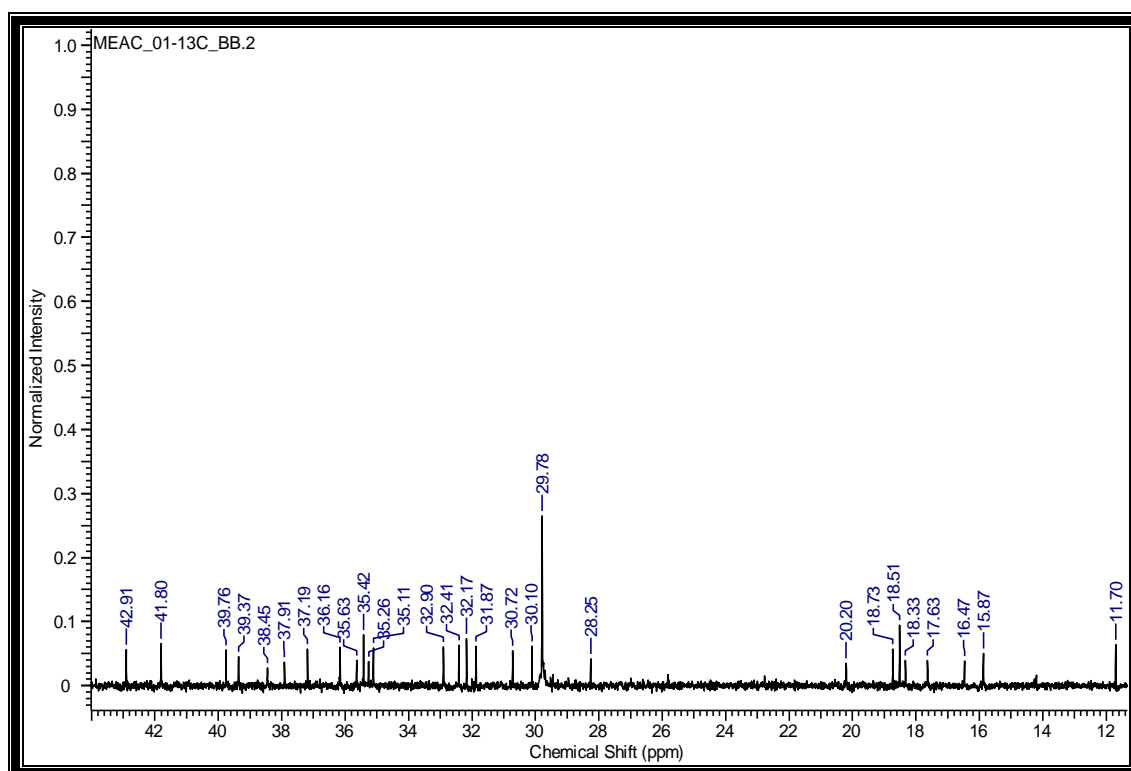


Figura 78. Ampliação do espectro de RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) de PP-05 na região de δ_{C} 11,70 a 42,91 ppm.

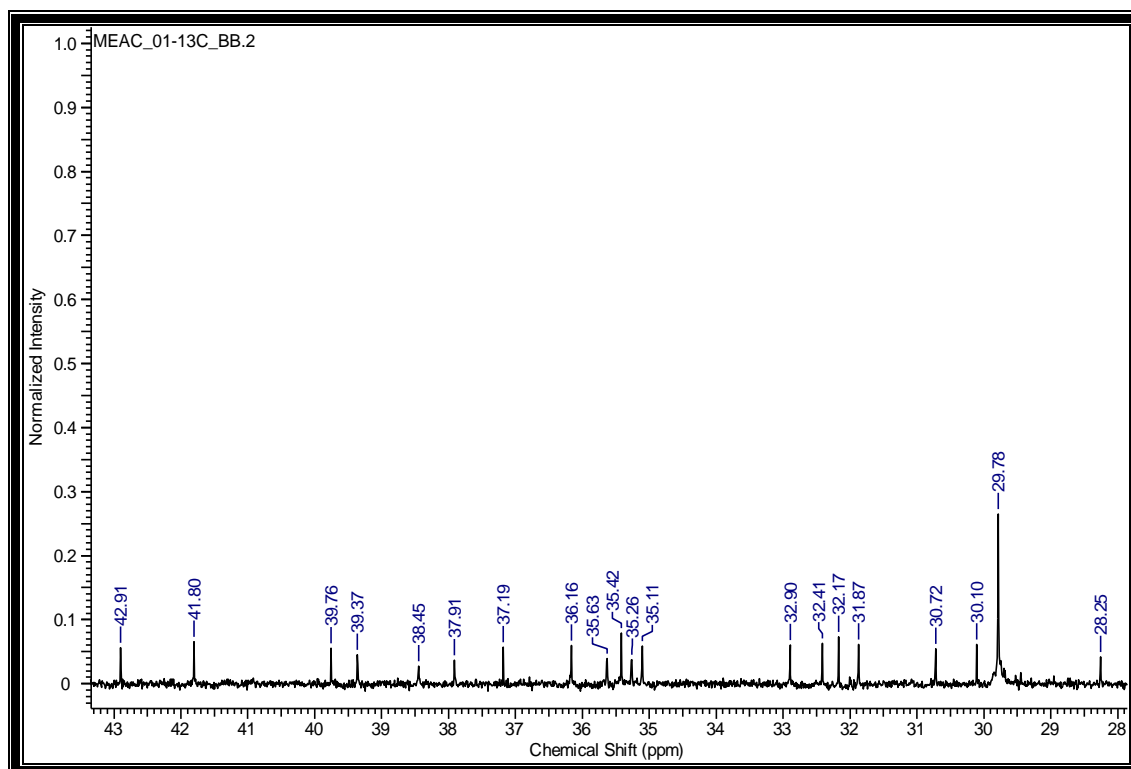


Figura 79. Ampliação do espectro de RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) de PP-05 na região de δ_{C} 28,25 a 42,91 ppm.

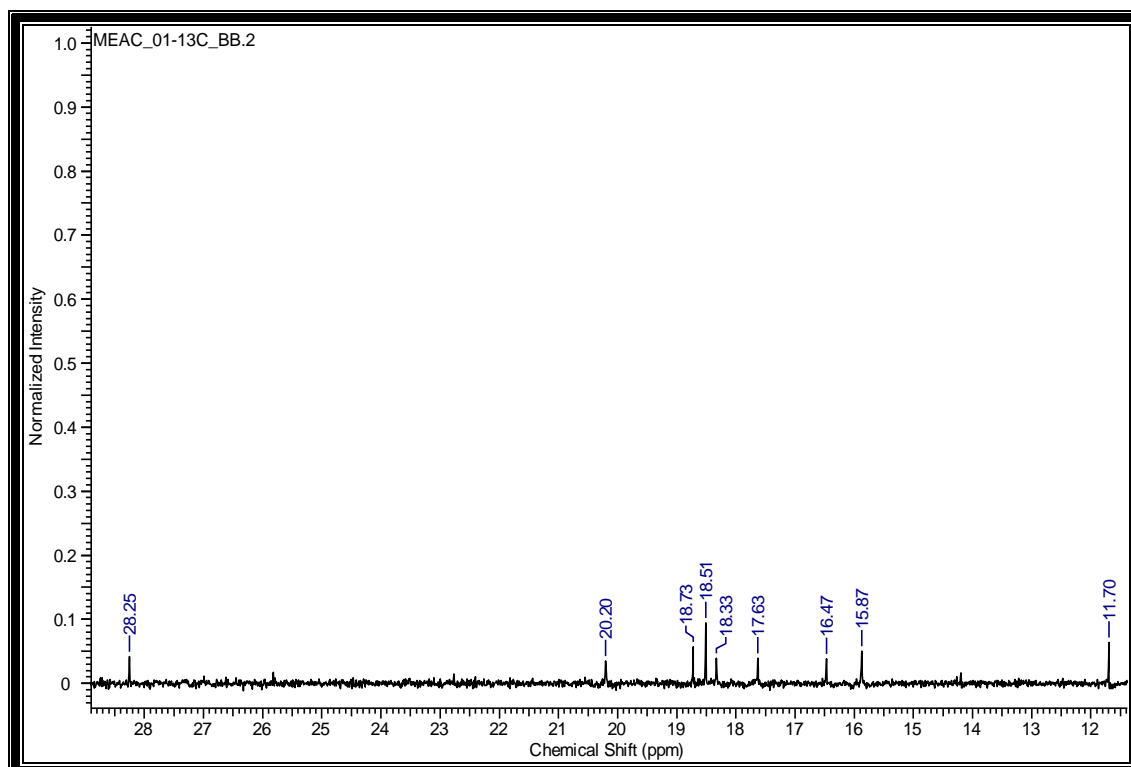


Figura 80. Ampliação do espectro de RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) de PP-05 na região de δ_{C} 28,25 a 11,70 ppm.

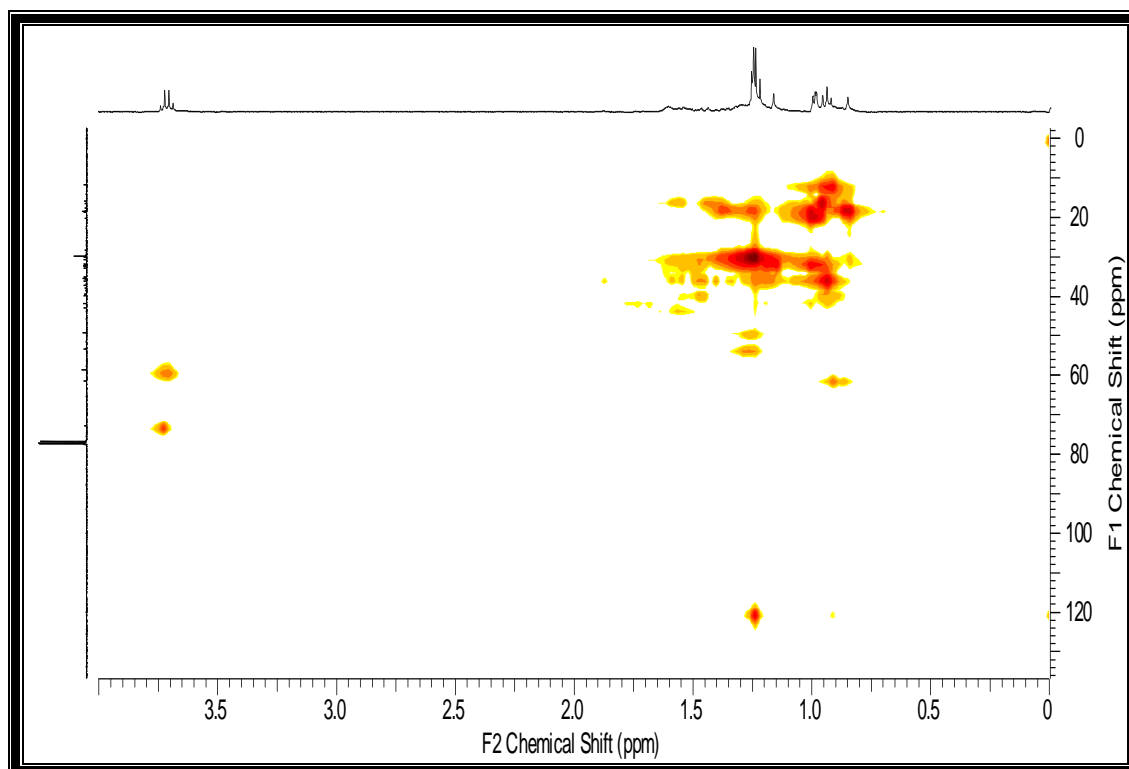


Figura 81. Espectro de correlação heteronuclear $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ (HMQC) da substância PP-05.

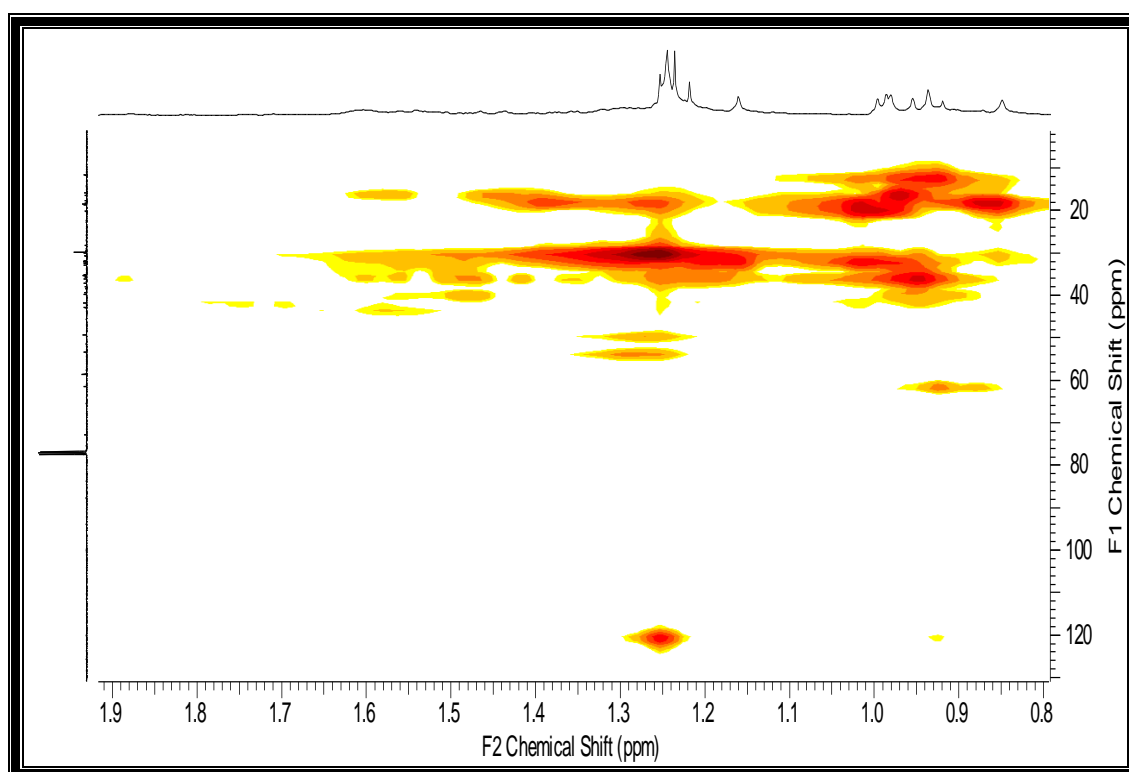


Figura 82. Ampliação do espectro de HMQC da substância PP-05 na região de 0,5 a 4,7 ppm.

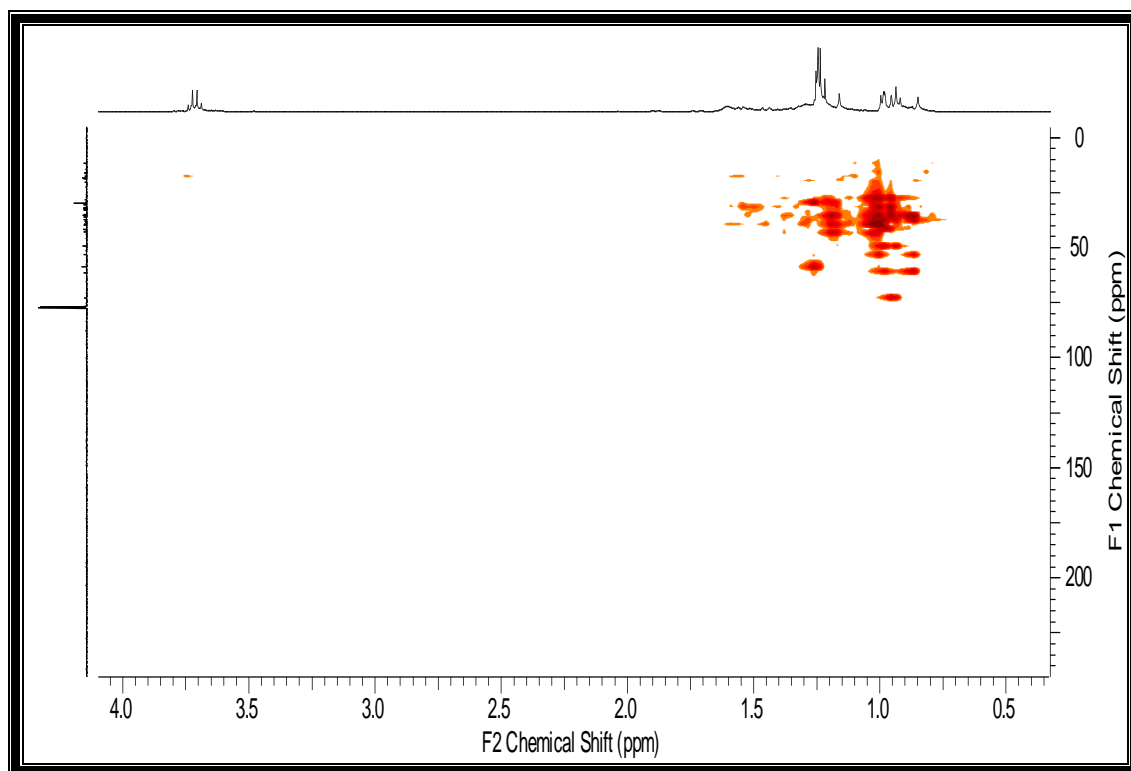


Figura 83. Espectro de correlação heteronuclear $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ (HMBC) da substância PP-05.

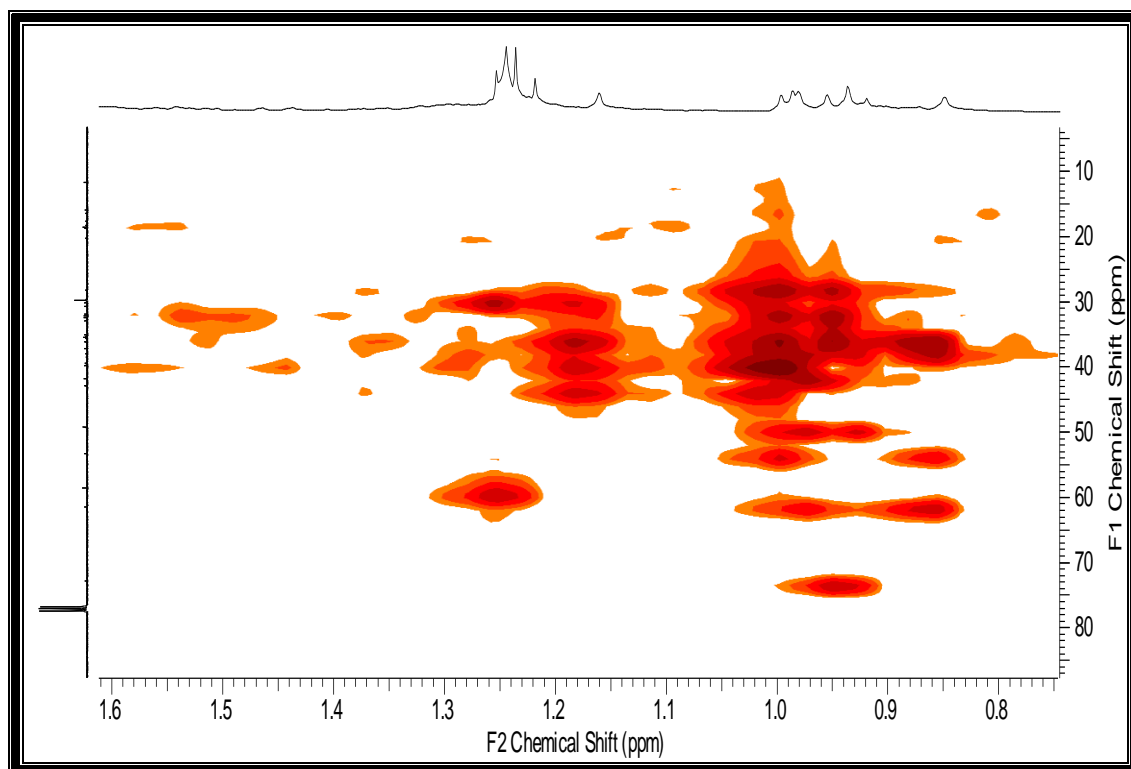


Figura 84. Ampliação do espectro de correlação heteronuclear $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ (HMBC) da substância PP-05 na região de 0,8- 1,6 ppm.

Tabela 14: Atribuição dos espectros de RMN de ^1H , HMQC ($^1J_{\text{CH}}$, $^1\text{H}-^{13}\text{C}$) e HMBC ($^{2,3}J_{\text{CH}}$) obtido para a substância PP-05.

Atribuição	HMQC		HMBC		Referência**	
	δ_{H}	δ_{C}	$^2J_{\text{CH}}$	$^3J_{\text{CH}}$	δ_{H}	δ_{C}
C						
1	1,4	15,8	H-10	-	-	15,8
2	1,6	35,2	-	-	-	35,2
3	3,7	72,8	-	3H-23	3,7	72,8
4	1,29	49,2	-	3H-23, 3H-24	-	49,2
5					-	37,1
6	1,94	41,8	-	-	-	41,7
7	1,35	17,6	H-8	-	-	17,6
8	1,24	53,2	-	-	-	53,2
9					-	38,4
10	0,87	61,4	-	3H-24	-	61,4
11	1,34	35,2	-	-	-	35,3
12	1,38	30,7	-	3H-27	-	30,6
13					-	37,8
14					-	39,7
15	1,26	32,4	-	3H-26	-	32,3
16	1,5	36,1	-	3H-28	-	36,1
17					-	30,0
18	1,5	42,9	-	-	-	42,8
19	1,26	35,6	-	3H-29	-	35,6
20					-	28,2
21	1,43	32,9	-	-	-	32,8
22	1,46	39,3	-	3H-28	-	39,3
23	0,95	11,7	-	-	0,91	11,6
24	0,92	16,4	-	-	0,94	16,4
25	0,85	18,3	-	-	0,83	18,2
26	1,0	18,5	-	-	0,98	18,6
27	0,95	20,2	-	-	0,95	20,1
28	0,96	31,8	2H-16	-	0,97	31,8
29	0,92	35,1	-	3H-30	0,92	35,0
30	1,16	31,8	-	3H-29	1,14	32,1

**Epifriedelanol = dados relatados em Kiem *et al.*, (2004)

O conjunto dos dados acima sugere para a substância PP-05 a estrutura do triterpeno epifriedelanol.

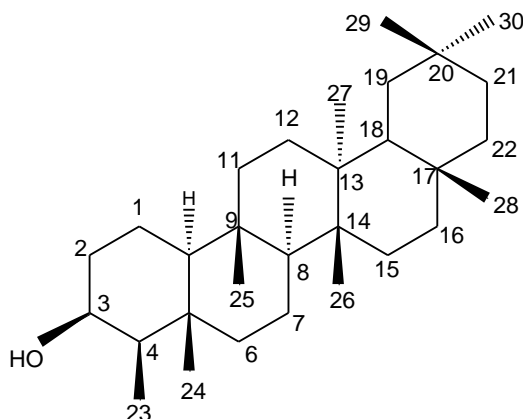


Figura 85. Estrutura do epifriedelanol (PP-05)

Na literatura encontram-se diversos estudos relatando a atividade biológica do epifriedelanol. Kundu e colaboradores (2000) verificaram que o triterpeno isolado da espécie *Vitis trifolia* (Ulmaceae) apresentou atividade antitumoral em um bioensaio realizado com discos de batata. Yang *et. al* (2010) verificaram que o mesmo isolado das raízes da espécie *Ulmus davidiana* (Ulmaceae) reduz a senescência em células humanas primárias, podendo então ser utilizado como suplemento alimentar, ou na formulação de cosméticos para reduzir o envelhecimento dos tecidos ou doenças associadas ao envelhecimento tecidual.

4.3.6 Identificação da fração 8-13 do extrato metanólico (PP-06)

A mistura foi obtida das frações 8-13 do extrato metanólico (item 3.11). PP-06 apresentou-se como um sólido amarelado, com faixa de fusão de 137,4-139,4°C. A análise do sólido através de CCDA de sílica gel (item 3.11), eluente clorofórmio, sugeriu tratar-se de uma substância triterpenoídica, em função da presença de uma única mancha de coloração arroxeadada que através da análise dos espectros obtidos no CG/EM (Figura 87, p. 101) mostrou tratar-se de uma mistura de substâncias. A solubilidade da mistura foi determinada CH_2Cl_2 .

A análise do espectro da mistura na região do infravermelho confirmou que a mistura estava acetilada devido à presença de uma banda intensa na região de $1732,8 \text{ cm}^{-1}$ referente à absorção do grupo $\text{C}=\text{O}$ dos ésteres.

Verificou-se também a presença de bandas de intensidade em 2943,37 - 2854,65 e 1678,07 - 1452,72, cm^{-1} atribuídas ao estiramento e à deformação de C-H de carbono alifático (CH_3 , CH_2 e CH) respectivamente. (Silverstein *et al.*, 2005; Pavia *et al.*, 2001). Na Figura 86 apresenta-se o espectro na região do infravermelho da mistura de substâncias PP-06a, PP-06b, PP-06c, PP-06d, PP-06e.

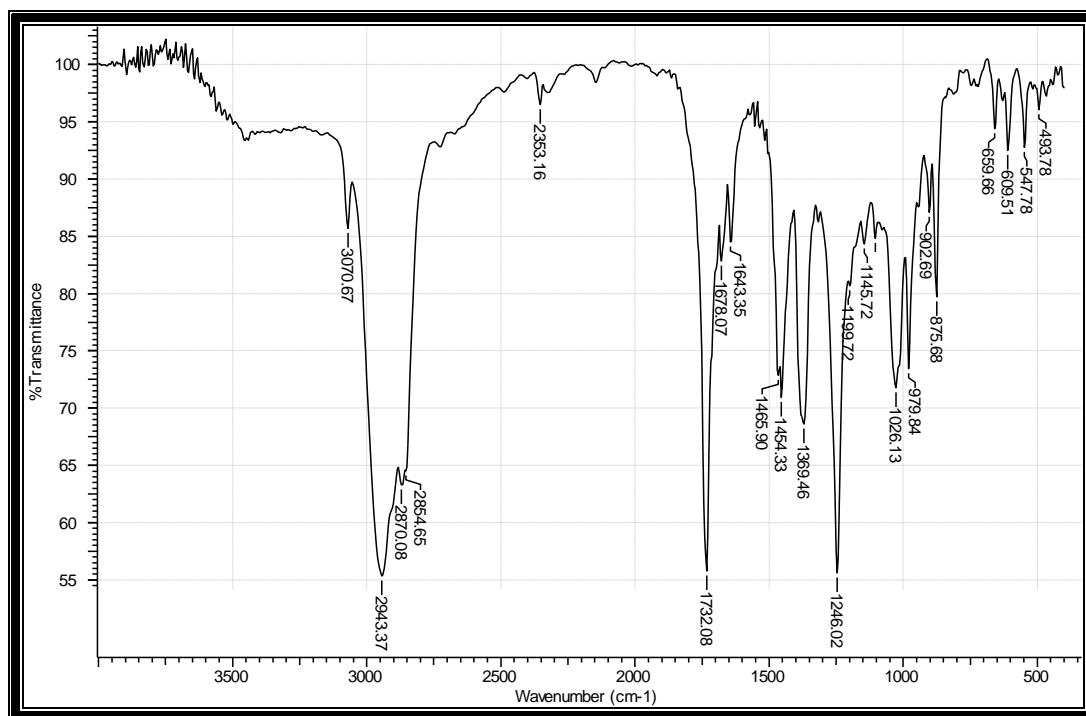


Figura 86. Espectro de absorção molecular obtido na região do infravermelho para PP06a-e.

O espectro de massas de baixa resolução, obtido por inserção via CG (Figuras 87, p.101), apresentou 5 picos principais evidenciando a presença de uma mistura de substâncias). Segundo comparação com a biblioteca (NIST) do espectrômetro de massa, os índices de similaridade sugerem que a substância PP- 06a (t_{R1} =21,8 min), trata-se do acetato de campesterol; PP- 06b (t_{R2} =22,58 min), trata-se do acetato de estigmasterol; PP- 06c (t_{R3} =24,16 min) trata-se do acetato de sitosterol; PP - 06d (t_{R4} =24,42 min) trata-se do acetato de amirina; PP-06e (t_{R5} =25,73 min), trata-se do acetato de lupeol.

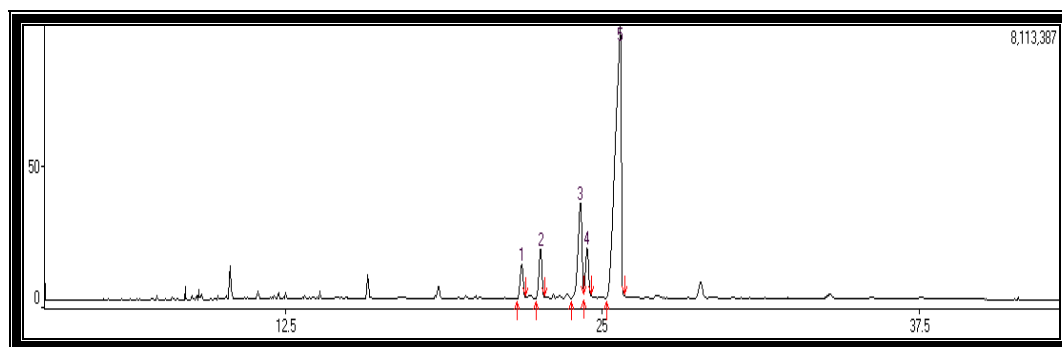
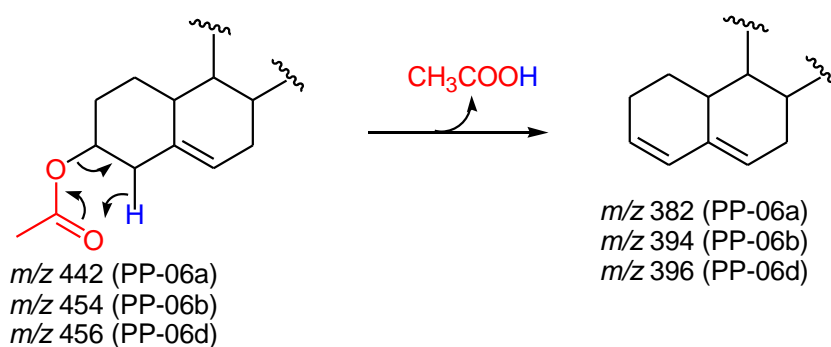


Figura 87: Cromatograma de gás da fração PP-06a-e do extrato metanólico de *P. pterosperma*.

Conforme pode ser visto nas Figuras 89 -91, p.103-104 os picos relativos aos íons moleculares de PP-06a, PP-06b e PP-06c não foram detectados. Este fato envolve a transferência de um hidreto para o oxigênio da carbonila (rearranjo de McLafferty) (Silverstein *et al.*, 2005) com perda de um fragmento neutro de m/z 60 (CH_3COOH) e formação de um fragmento estável como esquematizado abaixo.



Nas substâncias P-06d e PP-06e observam-se os picos dos íons moleculares a m/z 468, além dos fragmentos envolvendo a reação de Retro Diels-Alder (Silverstein *et al.*, 2005) (Figura 93).

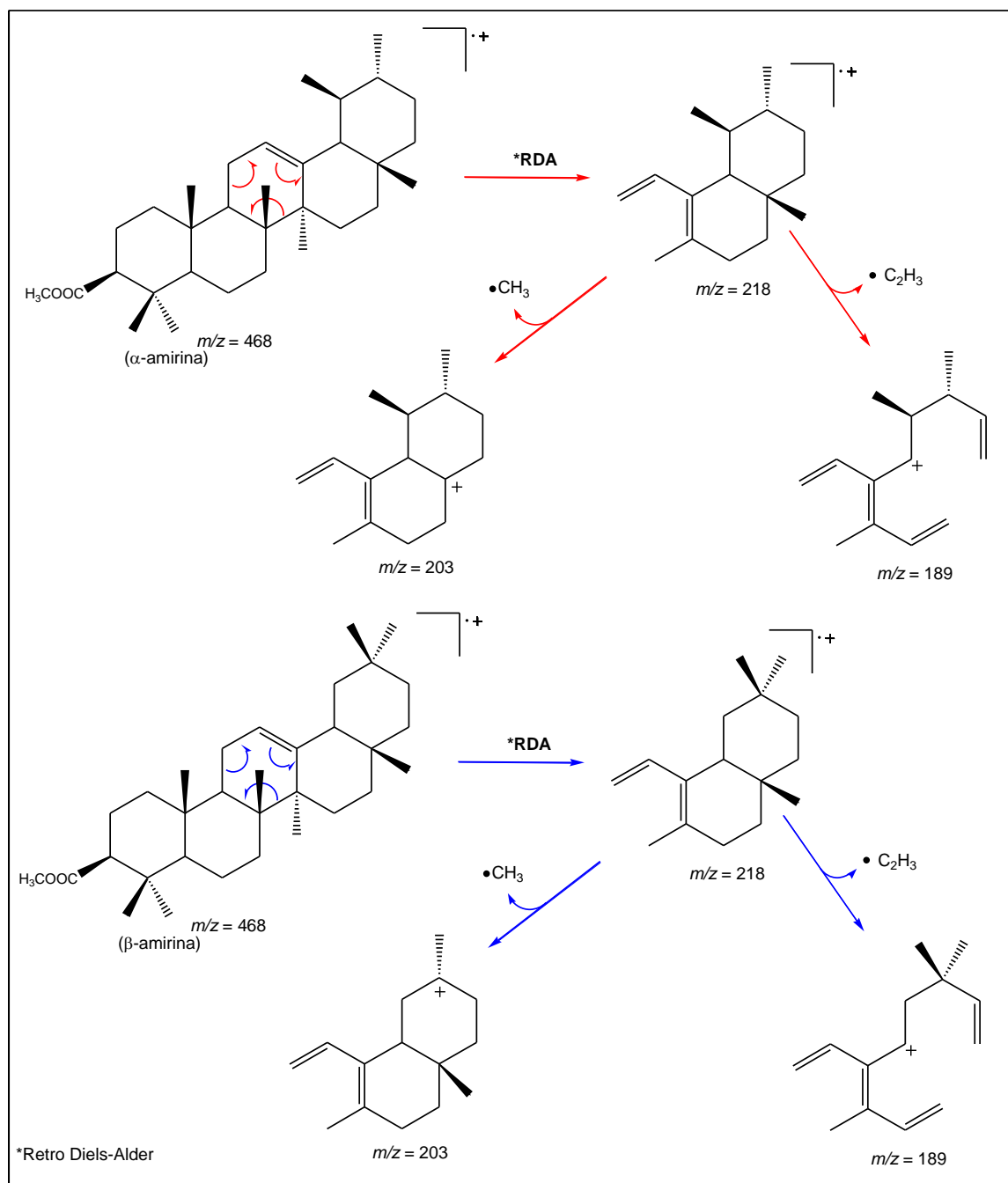


Figura 88. Proposta de fragmentação de PP-06d através de mecanismo envolvendo a reação de retro Diels-Alder.

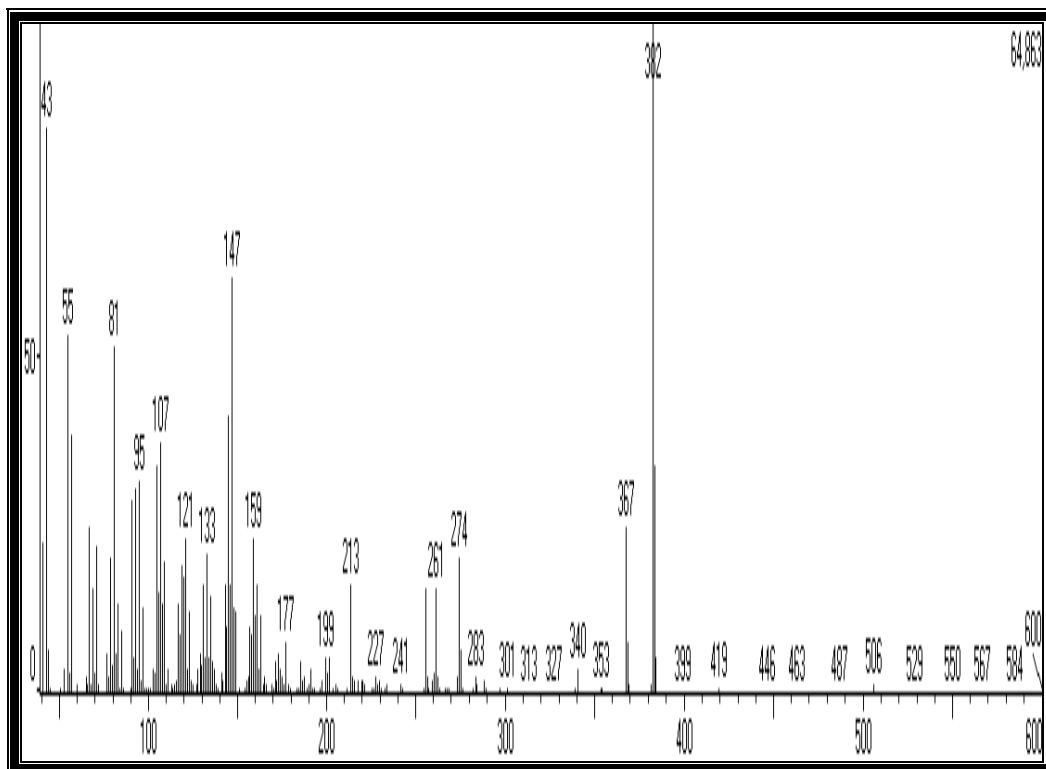


Figura 89: Fragmentograma de massas de PP06-a.

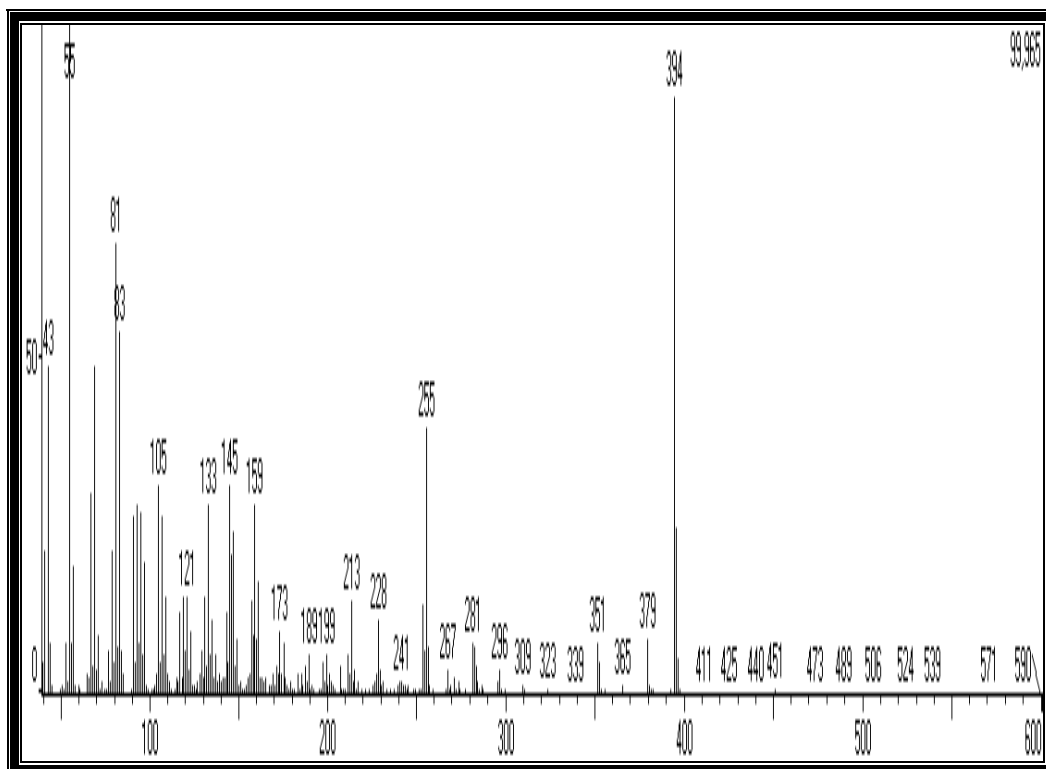


Figura 90: Fragmentograma de massas de PP06-b

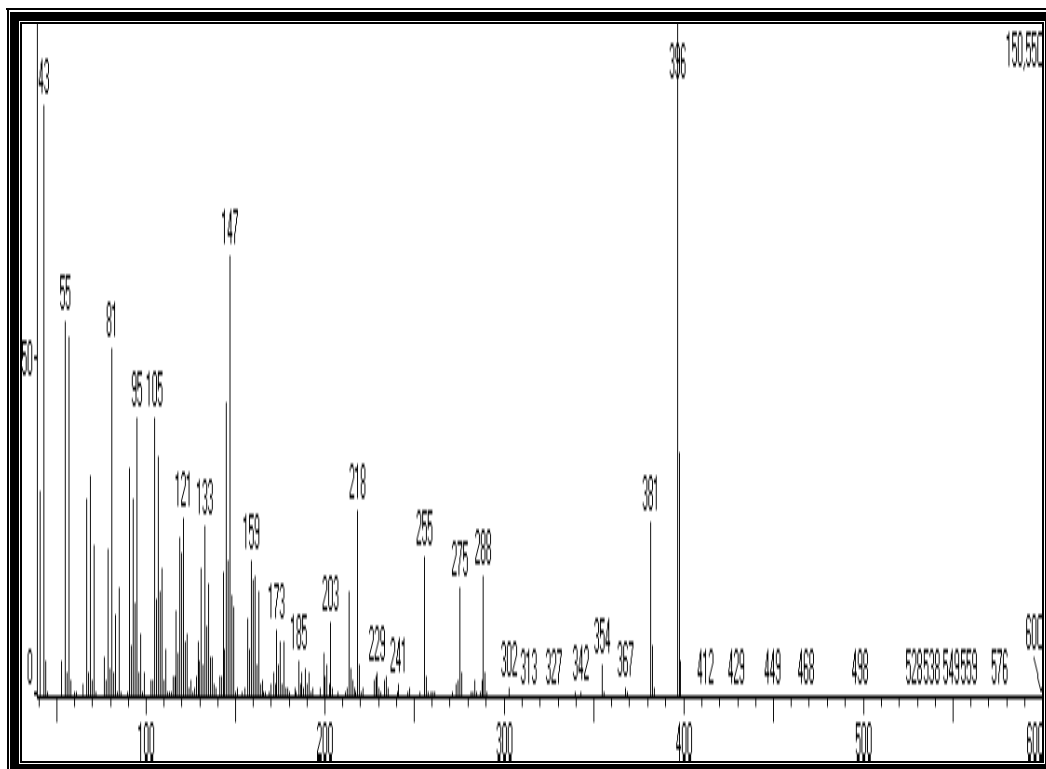


Figura 91: Fragmentograma de massas de PP06-c

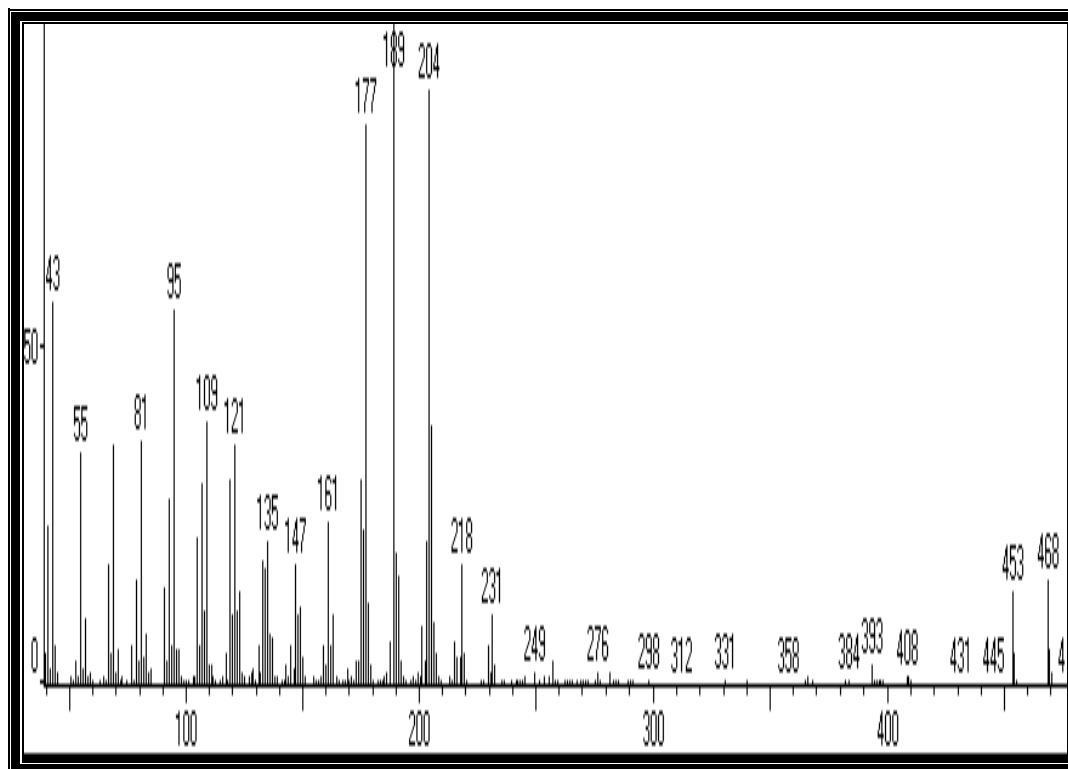


Figura 92: Fragmentograma de massas de PP-06d

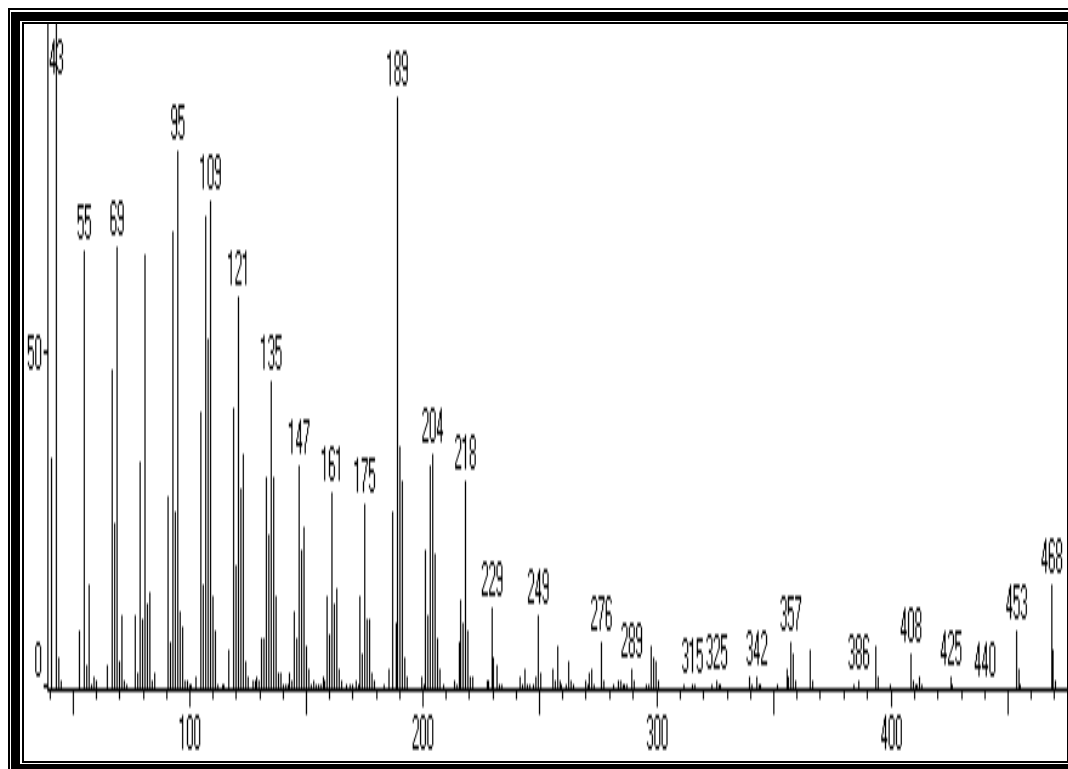


Figura 93: Fragmentograma de massas de PP-06e.

O espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) para a mistura de substâncias (Figuras 95 - 100, p. 108-111) apresentou vários sinais entre 0,69 e 1,68 ppm, correspondentes aos grupos metílicos das substâncias. Os sinais simples em 2,05, 2,04 e 2,03 ppm, correspondem a grupos metilas de acetato. Verificou-se a presença de um sinal duplo em 4,68 ppm relativo ao H do carbono C-3.

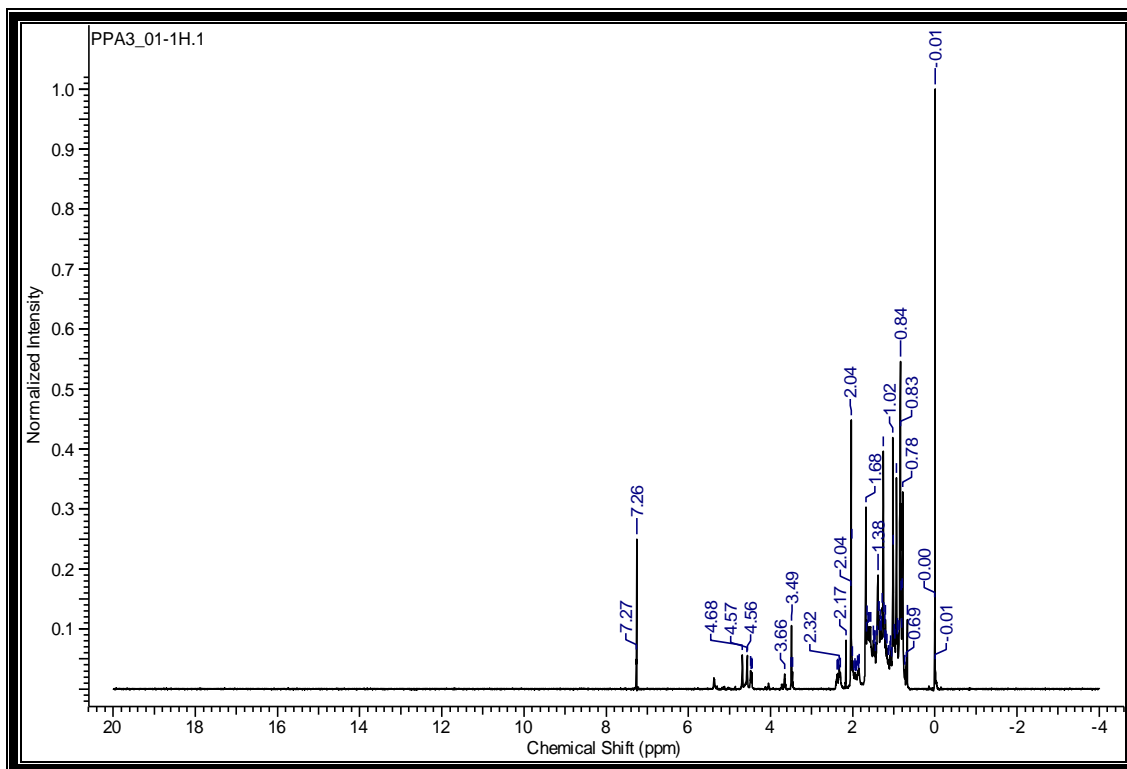


Figura 94. Espectro de RMN de ^1H obtido para PP06a-e (400 MHz, CDCl_3).

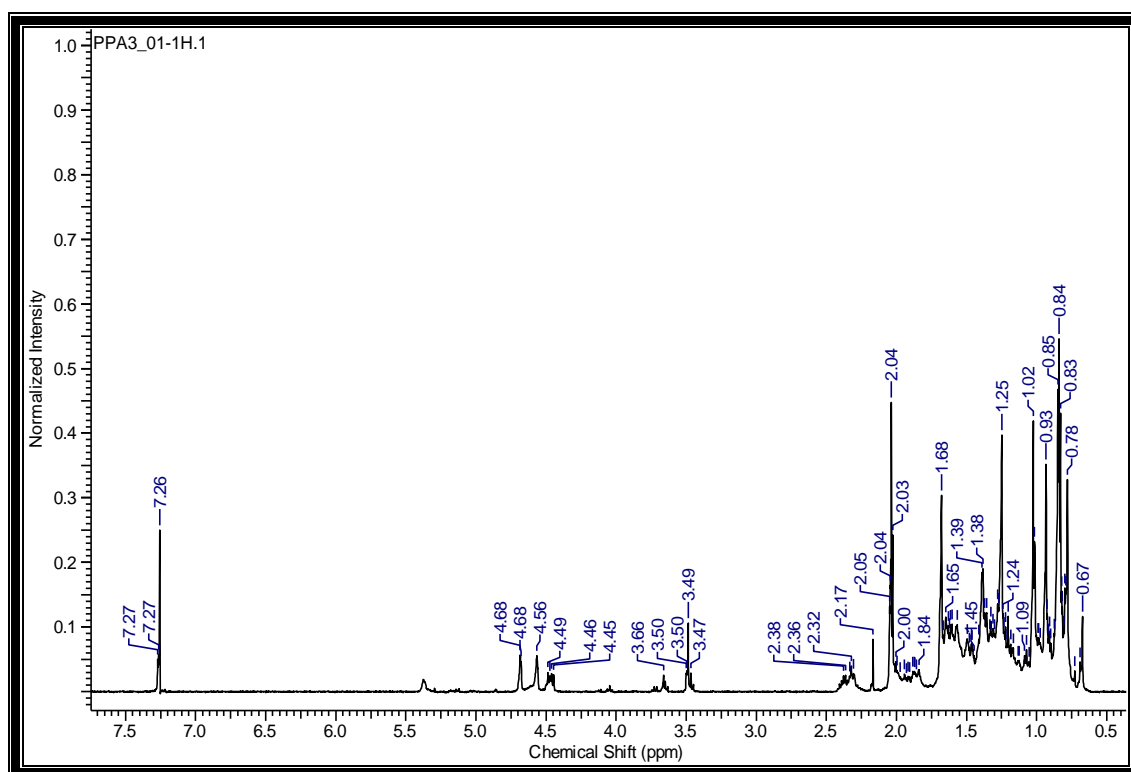


Figura 95. Ampliação do espectro de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) de PP06a-e na região de δ_{H} 0,67 a 4,68 ppm.

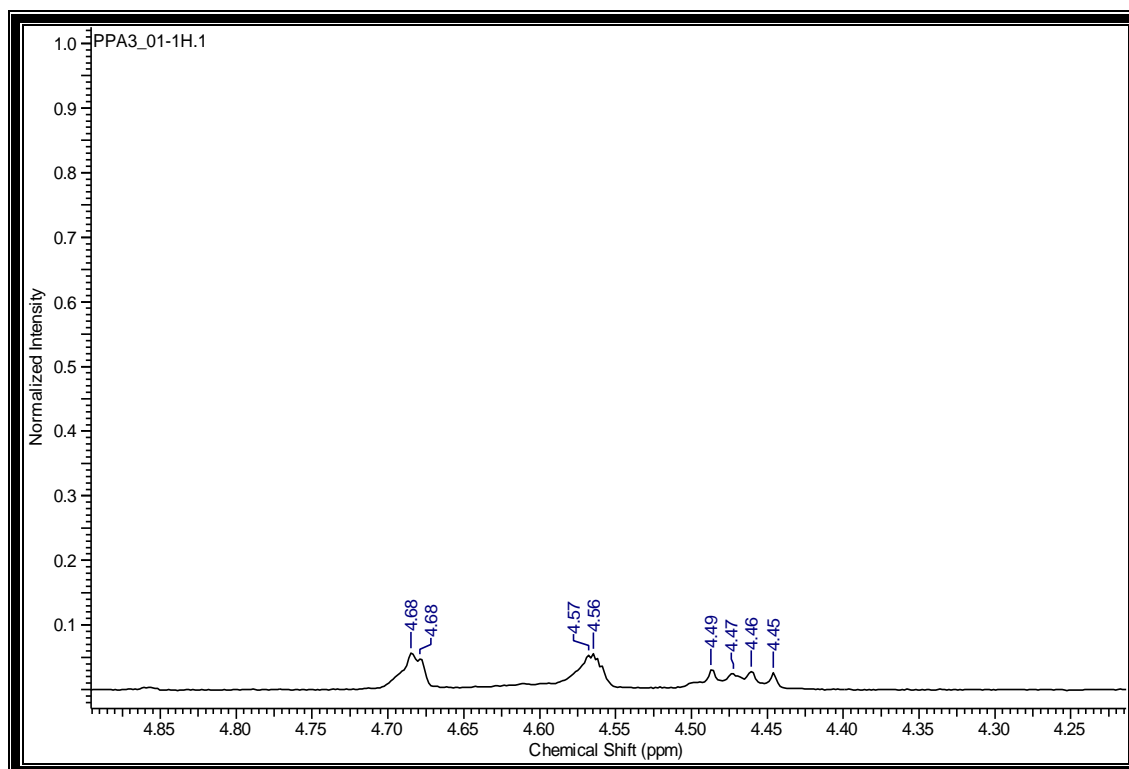


Figura 96. Ampliação do espectro de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) de PP-06a-e na região de δ_{H} 4,45 a 4,68 ppm.

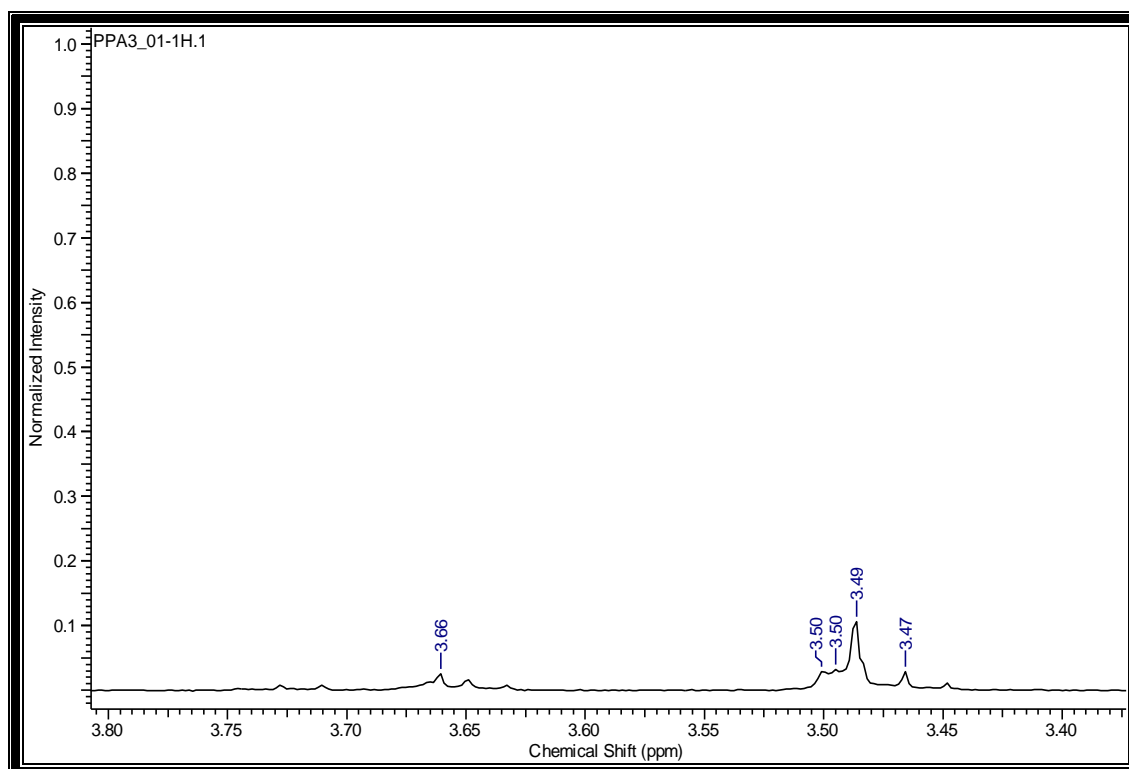


Figura 97. Ampliação do espectro de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) de PP06a-e na região de δ_{H} 3,47 a 3,66 ppm.

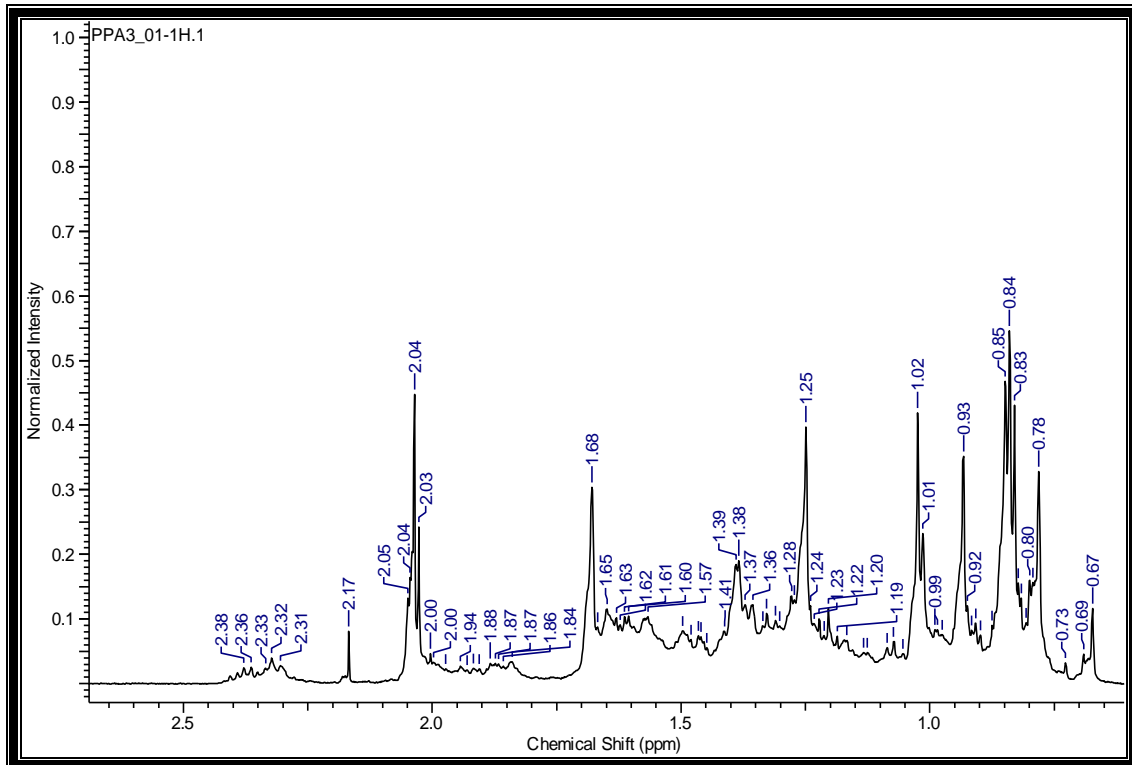


Figura 98. Ampliação do espectro de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) de PP06a-e na região de δ_{H} 0,67 a 2,38 ppm.

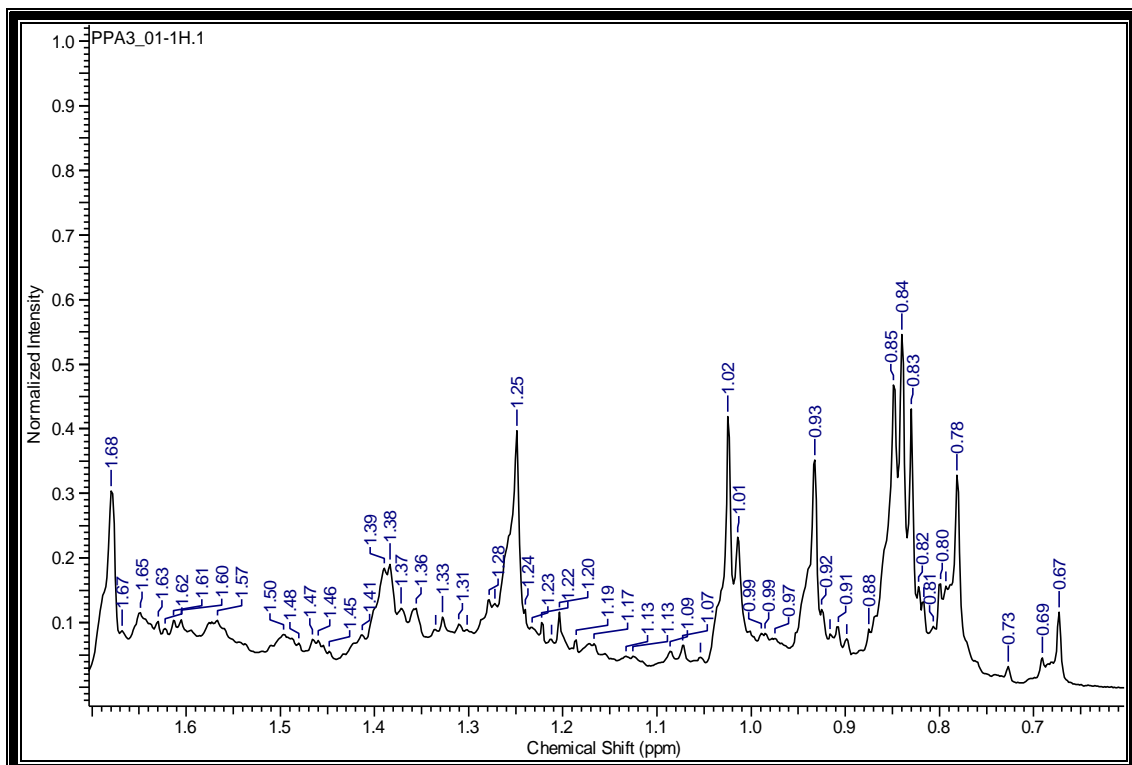


Figura 99. Ampliação do espectro de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) de PP06a-e na região de δ_{H} 0,67 a 1,68 ppm.

O espectro de RMN de ^{13}C desacoplado de ^1H (75 MHz, CDCl_3) obtido para a mistura PP-06a-e (Tabela 15, p.113; Figuras 100-103, p. 111-113) verifica-se um sinal em 171,1 ppm, relativo à carbonila do grupo acetato; um sinal em 151 ppm, relativo ao C-20 do acetato de lupeol. Os sinais em 21,4 (PP06-b e PP06-c); 25,2 (PP-06-d) e 21 ppm (PP06-e), foram atribuídos respectivamente ao CH_3 do grupamento acetato das substâncias presentes na mistura e os sinais em 74,0 (PP06-b e PP06-d); 75,3 (PP06-d) e 81,2 ppm (PP06-e) foram atribuídos ao carbono metínico CH-3 em que o grupamento acetato se encontra ligado.

Estas atribuições em conjunto com os dados encontrados na literatura, permitiram confirmar as estruturas das substâncias presentes na mistura.

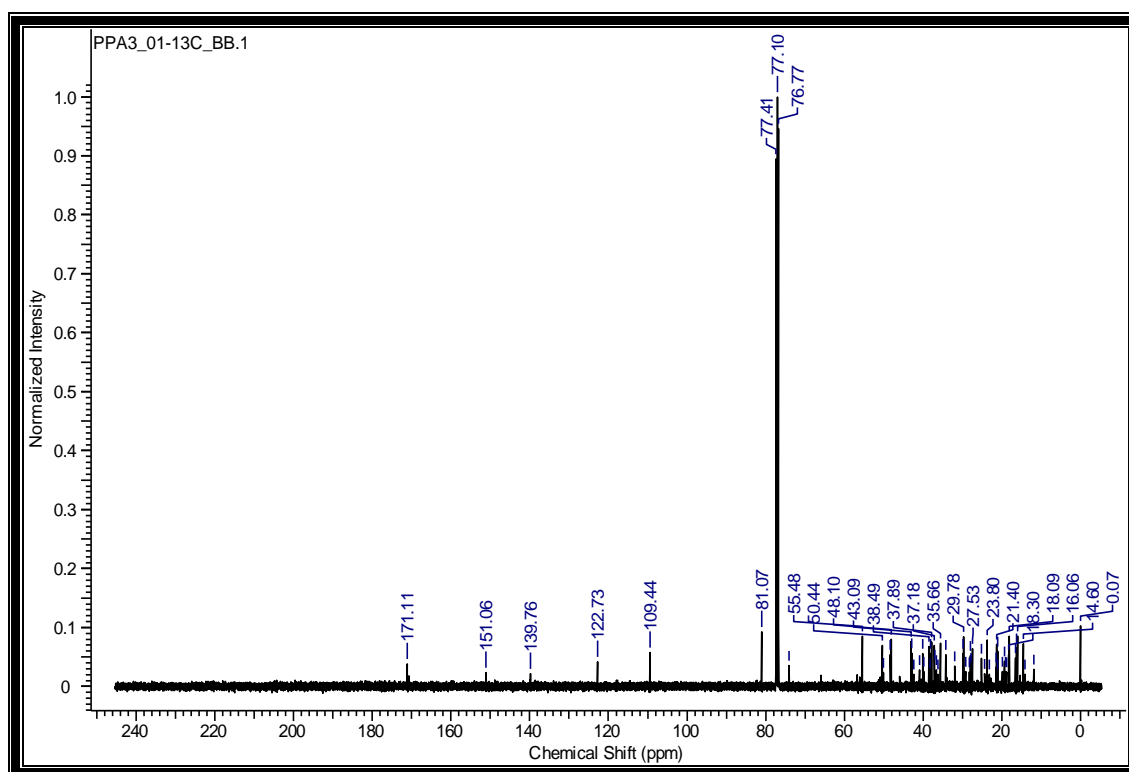


Figura 100. Espectro de RMN de ^{13}C obtido para PP06a-e (100 MHz, CDCl_3).

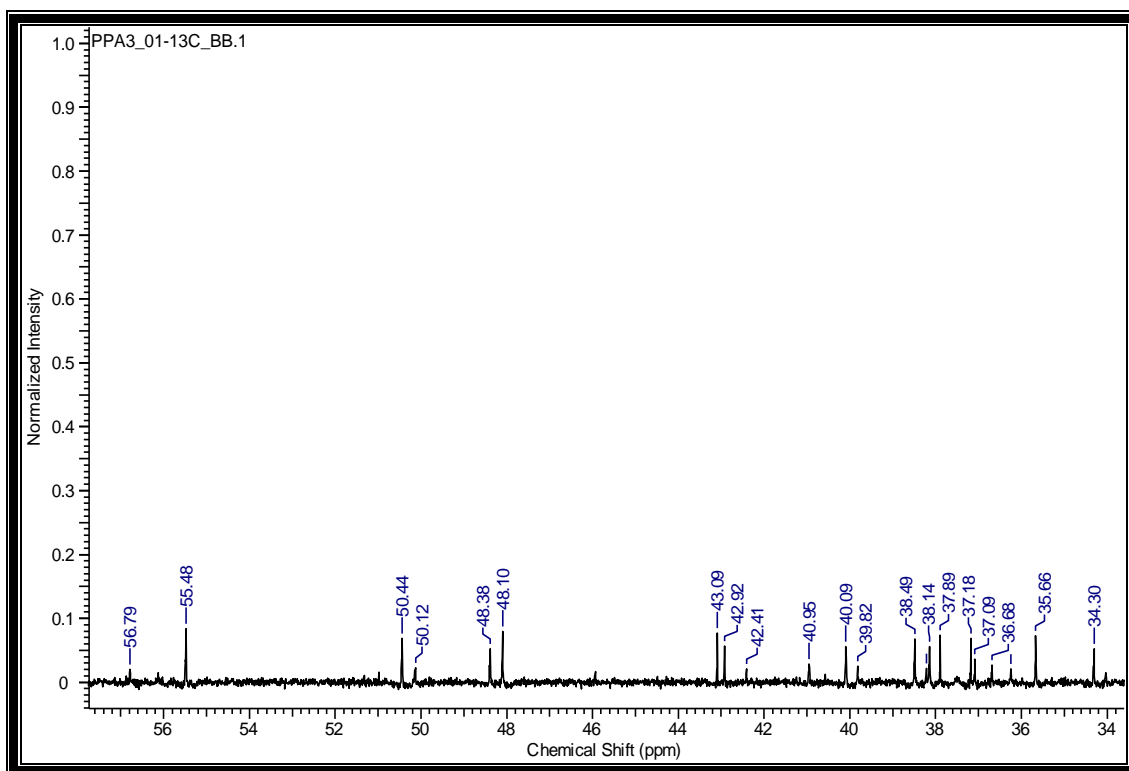


Figura 101. Ampliação do espectro de RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃) de PP06a-e na região de δ_C 34,30 a 56,79 ppm.

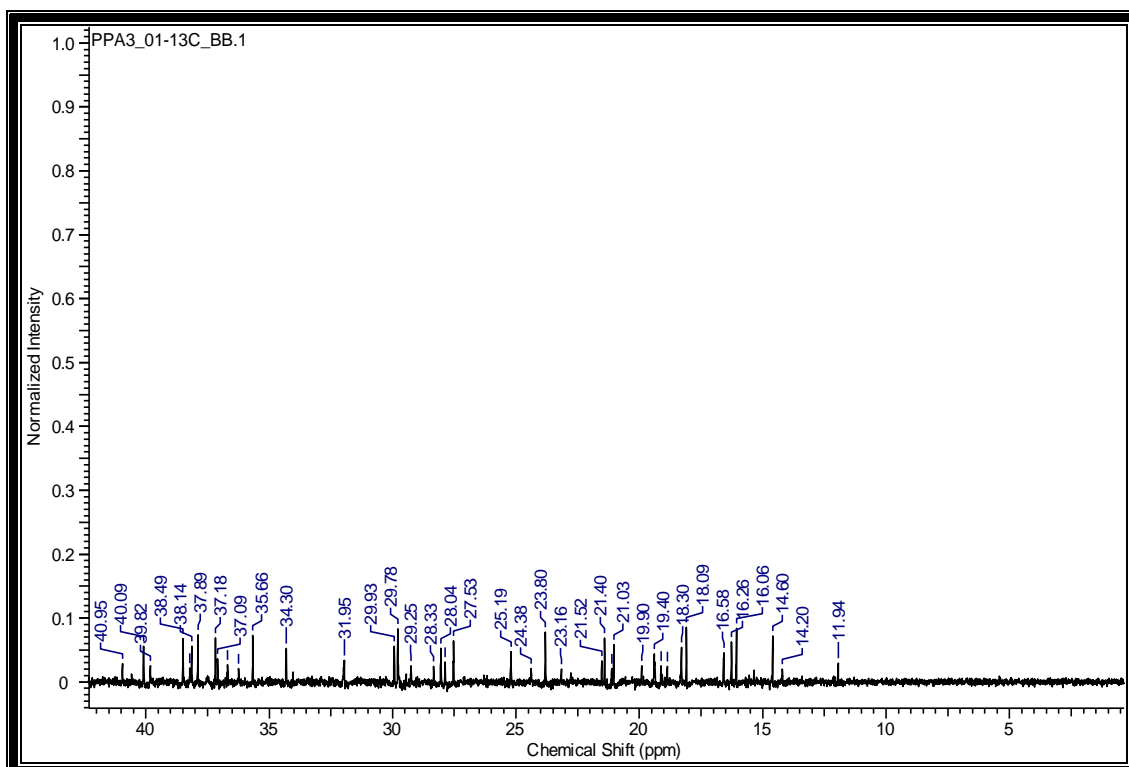


Figura 102. Ampliação do espectro de RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃) de PP06a-e na região de δ_C 40,95 a 11,94 ppm.

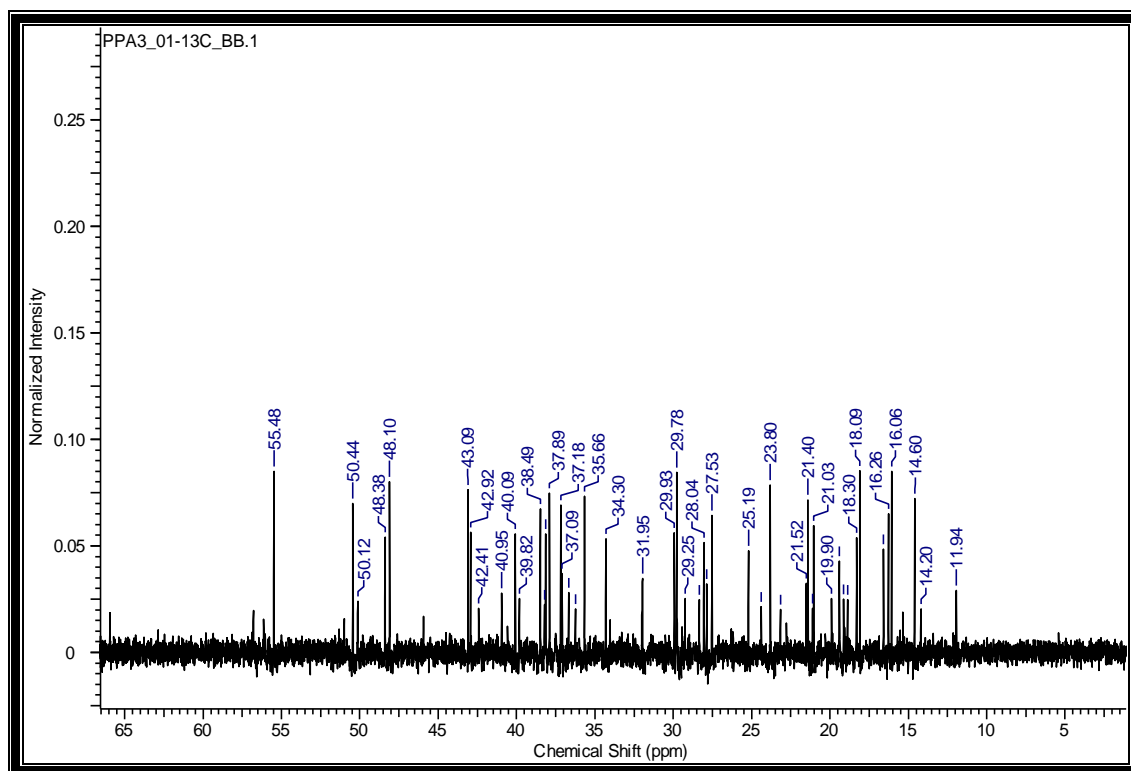


Figura 103. Ampliação do espectro de RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) de PP06a-e na região de δ_{C} 55,49 a 11,94 ppm.

Tabela 15. Atribuição do espectro de RMN ^{13}C obtido para PP06a-e.

Atribuição	PP06-a*	Acetato de Campesterol**	06-b*	Acetato de Estigmasterol	06-c*	Acetato de Sitosterol**	06-d*	Acetato de amirina**	06-e*	Acetato de lupeol**
	δ_c (ppm)	δ_c (ppm)	δ_c (ppm)	δ_c (ppm)	δ_c (ppm)	δ_c (ppm)	δ_c (ppm)	δ_c (ppm)	δ_c (ppm)	δ_c (ppm)
1	37,09	37,3	37,09	37,0	37,09	37,0	38,49	38,7	38,49	38,6
2	27,8	27,8	27,8	27,8	27,8	27,8	27,5	27,2	23,8	23,9
3		74,0		74,0		74,0		78,3	81,1	81,2
4	37,9	37,9	37,9	38,1	37,9	38,1	37,9	38,7	37,9	38
5	139,7	139,7	139,7	139,6	139,7	139,6	55,5	55,2	55,5	55,5
6	122,7	122,7	122,7	122,6	122,7	122,6	18,3	18,3	18,1	18,2
7	31,9	31,9	31,9	31,8	31,9	31,8	32	32,9	34,3	34,4
8	31,9	31,9	31,9	31,8	31,9	31,8	40,1	40,0	40,9	41
9	50,1	50,1	50,1	50,0	50,1	50,0	48	47,7	50,4	50,5
10	37,1	36,1	37,1	37,0	37,1	37,0	37,1	36,9	37,2	37,2
11	21,4	21,1	21,4	21,2	21,4	21,2	23,2	23,3	21	21,1
12	39,8	39,8	39,8	39,7	39,8	39,7	122,7	124,3	25,2	25,2
13	42,4	42,3	42,4	42,3	42,4	42,3	139,7	139,3	38,5	38,2
14	55,5	56,8	55,5	56,7	55,5	56,7	41,8	42	43	43
15	24,4	24,3	24,4	24,4	24,4	24,4	28	28,7	27,5	27,6
16	28	28,9	28	28,4	28	28,2	27,5	26,6	35,6	35,7
17	55,5	56,0	55,5	56,0	55,5	56,0	37,9	37,7	43	43
18	11,9	12,3	11,9	12,0	11,9	12,0	-	58,9	48,1	48,4
19	19,4	19,4	19,4	19,3	19,4	19,3	39,8	39,6	48,1	48,2
20	37,2	37,3	40,1	40,5	-	36,2	40,1	39,6	151,1	151,1
21	14,2	14,1	21,4	21,2	18,3	18,8	31,9	31,2	29,9	29,9
22	32,0	32,0	139	138,3	34,3	33,9	40,9	41,5	40,1	40,2
23	29,9	31,6	-	129,3	25,2	26,1	28	28,1	28	28,1
24	-	45,8	50,4	51,2	-	45,8	16	15,6	16,6	16,7
25	29,2	31,9	29,2	29,1	29,2	29,1	16	15,6	16,3	16,2
26	19,9	21,2	19,9	19,8	19,9	19,8	16,6	16,8	16,6	16,8
27	19,0	20,2	19	19,0	19	19,0	23,2	23,3	14,6	14,7
28	25,2	18,2	25,2	25,4	23,2	23,1	28	28,1	18,3	18,2
29	-	-	11,9	12,2	11,9	11,8	16,6	17,4	109,4	109,5
30	-	-	-	-	-	-	21,4	21,3	19,4	19,4
1'		-	171,1	170,5	171,1	170,5	171,1	170,9	171,1	171,2
2'		-	21,5	21,4	21,5	21,4	21,4	21,39	21	21,1

*PP-06a-e- Mistura de acetato de campesterol, acetato de estigmasterol, acetato de sitosterol, acetato de amirina e acetato de lupeol = dados obtidos no presente trabalho (100 MHz, CDCl_3).

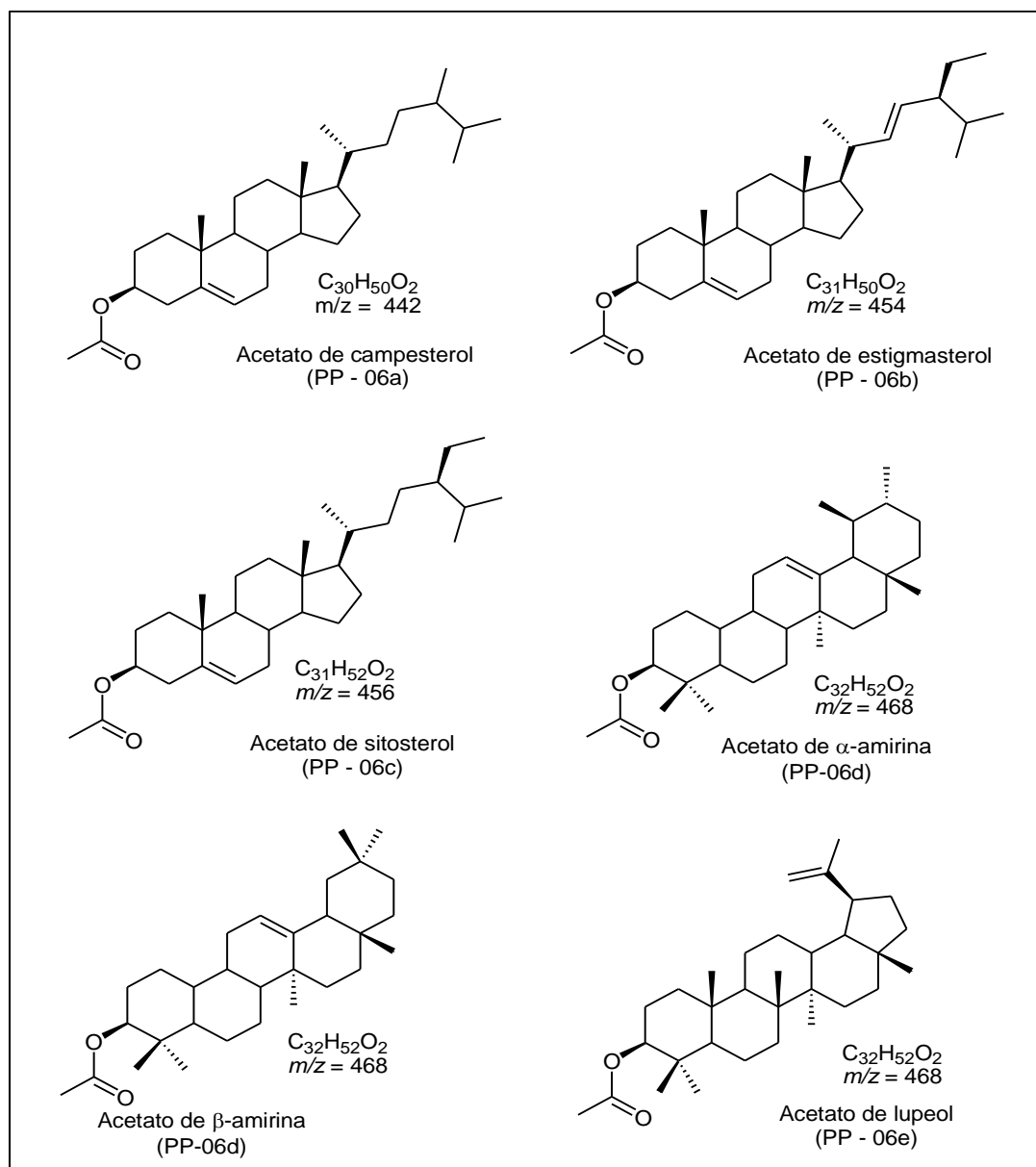
**Acetato de campesterol, acetato de estigmasterol, acetato de sitosterol, acetato de amirina e acetato de lupeol= dados relatados em Veloso *et al.*,(1998)

Tabela 16: Principais picos observados no espectro de massas da fração PP-06 do extrato metanólico de *P. pterosperma*

Pico*	t _R **	Substância	PM	% em área do pico
1	21,8	Acetato de campesterol (PP-06a)	268	3,9
2	22,5	Acetato de estigmasterol (PP-06b)	298	5,57
3	24,1	Acetato de sitosterol (PP-06c)	340	15,13
4	24,4	Acetato de amirina (PP-06d)	458	5,86
5	25,7	Acetato de lupeol (PP-06e)	458	69,46

*Pico: ver **Figura 87, p. 98**; **tempo de retenção em minutos.

O conjunto dos dados acima sugere para a mistura de substâncias PP06a-PP06e, as estruturas abaixo:

Quadro 05: Estruturas químicas dos constituintes da fração PP-06

4.4 RESULTADOS E DISCUSSÕES DA AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE CITOTÓXICA FRENTE ÀS LARVAS DE *A. salina*

O bioensaio de *A. salina* tem demonstrado eficiência na avaliação do potencial biológico dos extratos de plantas (Leite *et al.*, 2009). A literatura indica correlações entre a toxicidade geral para esse microcrustáceo e a citotoxicidade para linhagens de células humanas de tumores sólidos (McLaughlin *et al.*, 1998). Outras correlações já foram determinadas para atividades inseticidas (Meyer *et al.*, 1982) e antitripanossoma (Alves *et al.*, 2000). Assim os dados obtidos no bioensaio com *A. salina* revelam os extratos metanólicos e hidrometanólicos do caule de *P. pterosperma* como fontes promissoras de substâncias anticancerígenas, inseticidas e tripanomicidas, uma vez que estes apresentaram DL_{50} 191,5941 e 109,8776 $\mu\text{g}/\text{mL}$, isto é $\leq 1000 \mu\text{g}/\text{mL}$.

Dentre os extratos de baixa polaridade, o extrato hexânico não apresentou atividade, no entanto, o extrato diclorometânico apresentou-se ativo, o que está de acordo com a literatura, a qual relata atividade citotóxica para fitoesteróides e triterpenos (Gallota e Boaventura, 2005).

Tabela 17: Valores obtidos a partir do teste de letalidade frente às larvas de *A. salina*

Porcentagem de mortos após 24 horas			
Concentração ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	Extrato em CHCl_3	Extrato em MeOH	Extrato em MeOH/ H_2O
100	0%	6,45%	18,42%
200	6%	23%	22,2%
400	8,1%	60%	86,8%
600	2%	81%	100%
1000	11,4%	83,8%	100%
DL_{50}	18228,11	191,5941	109,8776
Intervalo de confiança a 95%	1,45904	138,3927-262,4281	86,74859-132,9603

Correlacionando os resultados do perfil fitoquímico e o bioensaio de *A. salina*, pode-se inferir que a presença de esteróides presentes nos extratos podem ser os responsáveis pela ação citotóxica frente às larvas de *A. salina*, uma vez que em estudos realizados por Padmaja *et al.* (2002) demonstrou que esta classe de metabólitos apresenta ação tóxica frente às larvas destes microcrustáceo.

4.8. REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

Alonso, J. R. (1998) Tratado de Fitomedicina – *Bases Clínicas y Farmacológicas*. Isis Ediciones. S.R.L. – Buenos Aires, Argentina, 1039p.

Alves, T.M.D., Silva, A.F., Brandão, M., Grandi, T.S.M., Smânia, E.F.A., Smânia, A. Zani, C.L. (2000). Biological screening of brasilian medicinal plants. *Memórias do Instituto. Oswaldo Cruz*. 95: 367-373

Aragão, P.C.A. (1990) Substâncias naturais isoladas de *Stigmaphyllon tomentosum* e *Birsonima variabilis*. *Química Nova*, 13:254-259.

Cordeiro, P. J. M.; Vilegas, J. H. Y.; Lanças, F.M. (1999). HRGC-MS analysis of terpenoids from *Maytenus ilicifolia* and *Maytenus aquifolium* (“espinheira santa”). *Journal of the Brazilian Chemical Society*, v. 10, n. 6,

Galotta, A.L.Q.A., Boaventura, M. A. D. (2005). Constituintes químicos da raiz e do talo da folha do açaí (*Euterpe precatória* MART., Arecaceae). *Química Nova*, 28:610-613.

Kundu, J.K., Rouf, A.S.S., Nazmul Houssain, M., Hasan, C.M., Rashid, M.A. (2000). Antitumor activity of epifriedelanol from *Vitis trifolia*. *Fitoterapia*, 71:577-579.

Leite, J.J.G., Brito., E.H.S., Cordeiro, R.S., Brilhante, R.S.N., Sidrim, J.J.C., Bertini, L.M., Moraes S.M de., Rocha., M.F.G. (2009). Chemical composition toxicity and larvicidal and antifungal activities of *Persea americana* (avocado) seed extracts. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 42: 110-113.

Mahato, S.H., Kundu, A.P. (1994). ¹³C NMR spectra of pentacyclic triterpenoids – a compilation and some salient features. *Phytochemistry*, 37(6): 1517-1575.

Meyer, B.N., Ferrigini., N.R. Putnam, J.E. Jacobsen., L.B., Nichols, D.E., MacLaughlin., J.L. (1982). Brine shrimp a convenient general bioassay for active plant constituents. *Planta Médica*, 45: 31-34.

- Muccino, R.R., Djerassi, C. (1974). Mass Spectrometry in Structural and Stereochemical Problems. CCXXXIX. Elucidation of the Ring D Cleavage in Lanostane. *Journal of the American Chemical Society*. 96:2. 546-560.
- Olea, R.S.G., Roque, N.F. (1990). Análise de misturas de triterpenos por RMN ¹³C. *Química Nova*, 13(4): 278-281.
- Ogunkoya, L. (1981). Application of mass spectrometry in structural problems in triterpenes. *Phytochemistry*, v. 20. p. 121-126.
- Padmaja, R., Arun, P.C., Prashanth, D., Deepak, M., Amit, A., Anjana, M. (2002). Brine shrimp lethality bioassay selected Indian medicinal plants. *Fitoterapia*, 73: 508-510.
- Silverstein, R.M., Bassler, G.C., Morrill, T.C. (2000). Identificação espectrométrica de compostos orgânicos. 6.ed.
- Vasconcelos JF, Teixeira MM, Barbosa-Filho JM, Lúcio ASSC, Almeida JRGS, Queiroz LP, Ribeiro-dos-Santos R, Soares MBP. (2008). The triterpenoid lupeol attenuates allergic airway inflammation in a murine model. *International Immunopharmacology* 8: 1216-1221.
- Velloso, C.R.X., (1998). Triterpenos isolados de *Parahancornia amapa* (Apocynaceae) e Diterpenos isolados de *Pinus carabaea var. bahamensis* Barr et Golf. *Tese de Mestrado*. Seropédica-RJ, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, 163 p.
- Yang.H.H., Son.J.K., Jung.B., Zheng.M., Kim.JR. (2010). Epifriedelanol from the Root Bark of *Ulmus davidiana* Inhibits Cellular Senescence in Human Primary Cells. *Planta Médica*.

5. CONCLUSÃO

O estudo fitoquímico do caule de *Parapiptadenia pterosperma* resultou na identificação dos seguintes metabólitos especiais. Do extrato hexânico foram identificados dois terpenóides: friedelina (PP-01) e lupeol (PP-03c) e três esteróides: sitosterol (PP-03c), estigmasterol (PP-03b) e campesterol (PP-03a), um álcool, eicosanol (PP-02a) e um éster, uncosanoato de metila (PP-02b).

Do extrato em clorofórmio foram identificados dois terpenóides, epifriedelanol (PP-04a) e friedelina (PP-04b).

O extrato metanólico resultou na identificação dos triterpenos: epifriedelanol (PP-05) e os derivados acetilados da amirina (PP-06d), lupeol (PP-06e), campesterol (PP-06a), sitosterol (PP-06c) e estigmasterol (PP-06b).

A revisão bibliográfica da espécie mostrou que a mesma não havia sido estudada fitoquimicamente até o momento. Desta forma o presente trabalho contribuiu para o conhecimento da composição química da espécie *P. pterosperma*, bem como ao incentivo de estudos biológicos mais específicos, uma vez que os extratos mais polares apresentaram atividade citotóxica frente as larvas de *Artemia salina*.

FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pela Biblioteca do CCT / UENF

18/2011

Silva, Roberta Ferreira Nagipe da

Prospecção química e biológica do estrato arbóreo da mata do Bom Jesus (Campos dos Goytacazes): uma contribuição ao estudo da espécie *Parapiptadenia pterosperma* (Benth.) Brenan (Fabaceae) / Roberta Ferreira Nagipe da Silva. – Campos dos Goytacazes, 2011.

119 f. : il.

Dissertação (Mestrado em Ciências Naturais) --Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. Centro de Ciência e Tecnologia. Laboratório de Ciências Químicas. Campos dos Goytacazes, 2011.

Orientadora: Leda Mathias.

Área de concentração: Química de Produtos Naturais.

1. *Parapiptadenia pterosperma* 2. Fabaceae 3. Fitoquímica 4. Atividade citotóxica. I. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. Centro de Ciência e Tecnologia. Laboratório de Ciências Químicas II. Título.

CDD 547