



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ**  
**CENTRO DE CIÊNCIAS DA**  
**NATUREZA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**



**Jaelson dos Santos Silva**

**CONTRIBUIÇÃO AO CONHECIMENTO QUÍMICO E BIOLÓGICO DAS FOLHAS DE**  
*Combretum mellifluum* Eichler.

**Dissertação de Mestrado**

**TERESINA - PI**

**2018**



**Jaelson dos Santos Silva**

**CONTRIBUIÇÃO AO CONHECIMENTO QUÍMICO E BIOLÓGICO DAS FOLHAS DE**  
*Combretum mellifluum* Eichler.

Dissertação submetida à coordenação do Programa de Pós-Graduação em Química, da Universidade Federal do Piauí como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Química.

Orientadora: Profa. Dra. Mariana Helena Chaves

**TERESINA - PI**

**2018**

FICHA CATALOGRÁFICA  
Universidade Federal do Piauí  
Biblioteca Comunitária Jornalista Carlos Castello Branco  
Serviço de Processamento Técnico

S586c Silva, Jaelson dos Santos.  
Contribuição ao conhecimento químico e biológico das  
folhas de *Combretum mellifluum* Eichler. / Jaelson dos  
Santos Silva. - 2018.  
167. f.: il.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do  
Piauí, Programa de Pós-Graduação em Química, Teresina,  
2018.

“Orientação: Profª. Dra. Mariana Helena Chaves”.

1. *Combretum mellifluum* Eichler (Cobretaceae) -  
Análise química e biológica. 2. Atividade Antileishmania.  
3. Triterpenoides. 4. Esteróides. 5. Atividade antioxidante.  
I. Título.

CDD: 547

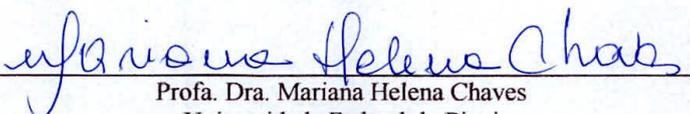
**Jaelson dos Santos Silva**

**CONTRIBUIÇÃO AO CONHECIMENTO QUÍMICO E BIOLÓGICO DAS FOLHAS  
DE *Combretum mellifluum* Eichler.**

Dissertação submetida à coordenação do Programa de Pós-Graduação em Química, da Universidade Federal do Piauí como parte dos requisitos para a obtenção do grau de Mestre em Química – Área: Química Orgânica.

Data da Aprovação: 21/12/2018

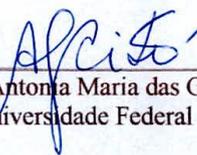
**BANCA EXAMINADORA**



Prof.ª. Dra. Mariana Helena Chaves  
Universidade Federal do Piauí  
(Orientadora e Presidente)



Prof. Dr. Everton Leandro de França Ferreira  
Universidade Federal do Vale do São Francisco



Prof. Dra. Antonia Maria das Graças Lopes Citó  
Universidade Federal do Piauí

**TERESINA – PI  
2018**



Dedico este trabalho a todos aqueles que acreditaram na realização deste sonho, especialmente os meus pais, Raimundo Dias da Silva Filho e Raimunda Nonata dos Santos Silva, irmãs Janaina dos Santos Silva e Joyce Elayne dos Santos Silva e à minha esposa Débora Rodrigues Fernandes Silva, pelo amor, carinho, compreensão que foram e sempre serão fundamentais em minha vida na busca dos meus objetivos.



Mas os que esperam no Senhor renovarão as forças,  
subirão com asas como águias; correrão, e não se  
cansarão; caminharão, e não se fatigarão.  
**Isaías 40:31**



## AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus por mais uma conquista e pela força que sempre tem me dado diante dos desafios. Sem Ele nada seria possível!!!!

Aos meus queridos e amados pais, Raimundo Dias da Silva Filho e Raimunda Nonata dos Santos Silva e irmãs Janaina dos Santos Silva e Joyce Elayne dos Santos Silva, pelos conselhos, compreensão, orações e amor que tanto contribuiu para continuar acreditando nos meus sonhos e não desistir.

À minha querida esposa Débora Rodrigues Fernandes Silva, que desde ao meu ingresso na universidade, sempre têm sido uma grande companheira, me dando apoio, sendo compreensiva e acreditando sempre na realização dos meus sonhos.

À Prof. Dra. Mariana Helena Chaves pela orientação, pelo conhecimento que não sei como mensurar e principalmente pela paciência e ter acreditado em mim mesmo que em muitos momentos até eu mesmo não estava acreditando.

Aos meus sogros, Francisco Gilderlan Fernandes e Noemia Rodrigues S. Fernandes que são presentes de Deus na minha vida e amigos de longa data com os quais tenho sido também presenteado por Deus.

À família LPN: Jéssica, Armênio, Buana, Elcilene, Adonias, Amanda, Luanda, Lildes, Renato, Marcinha, Evaldo, João Paulo, Lucivania, Leonardo, Joshua, os Rodrigues, Andréia, com quem fiz grandes amizades e fui muito bem acolhido.

Aos grandes parceiros(as) de mestrado e doutorado: Raiane, Lorena, Iara, Tiago, Ézio, Jardiel, Antônio Cavalcante, Ronaldo, Mikael, Maelson, Mateus, Ivan.

À Dra. Ruth Raquel Soares de Farias pela coleta das folhas de *Combretum mellifluum*.

À Profa. Dra. Maria Iracema Bezerra Loiola da Universidade Federal do Ceará- UFC, pela identificação botânica da espécie *Combretum mellifluum*.

À Profa. Dra. Antonia Maria das Graças Lopes Citó e ao Prof. Dr. Everton Leandro de França Ferreira por terem aceitado o convite de fazer parte da minha banca de dissertação e pela colaboração.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Química e pelos conhecimentos adquiridos, especialmente a Dra. Antonia Maria das Graças Lopes Citó, Dra. Mariana Helena Chaves, exemplos de grandes profissionais que ainda tem muito pra contribuir e com os quais tive o privilégio de ser aluno.

À Profa. Dra. Mônica Regina Silva de Araújo da Universidade da Integração

Internacional da Lusofonia Afro-Brasileira pelos ensinamentos e colaboração.

Às colegas Buana C. Almeida e Isabela Cristhina G. Costa e aos professores Dr. Alexandre Araújo de Souza e Dr. Gerardo Magela Vieira Júnior, pela amizade e grande ajuda na realização das análises de RMN.

À Profa. Dra. Chistiane M. Feitosa do Laboratório de Produtos Naturais e Neuroquímica Experimental (LAPNNEX-UFPI) pelas análises de inibição da acetilcolinesterase.

Ao Prof. Dr. Fernando Aécio de Amorim Carvalho e aos alunos Ingredy L. Dos Santos e Rodolfo Ritchelle L. dos Santos do Núcleo de Pesquisas em Plantas Mediciniais (NPPM-UFPI), pelas análises de atividade antileishmania.

Ao CNPq pela bolsa concedida.

Enfim, agradeço a todos que se fizeram presentes na qualificação e na defesa como também aqueles que de alguma maneira, direta ou indiretamente contribuíram para realização deste trabalho e estiveram comigo ao longo desta longa jornada. Posso ter ficado cansado, desanimado, preocupado mas nunca perdi as esperanças, pois o verdadeiro vencedor não é aquele que somente vence, é aquele também que nunca desiste. Muito obrigado!

## RESUMO

SILVA, J. S. (2018). **Contribuição ao conhecimento químico e biológico das folhas de *Combretum mellifluum* Eichler**. Teresina. 165p. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Química. Universidade Federal do Piauí.

*Combretum mellifluum* Eichler (Combretaceae) é uma espécie não endêmica do cerrado brasileiro, conhecida popularmente como cipó, cipó vermelho e sipaúba. O presente trabalho relata os constituintes químicos isolados e identificados no extrato etanólico (EEtOH) das folhas desta espécie. Adicionalmente, foi avaliado o potencial antioxidante, anticolinesterásico e antileishmania do extrato e frações. O extrato etanólico das folhas foi submetido à partição fornecendo as frações hexânica (FHex), acetato de etila (FAcOEt), aquosa (FAqu), precipitado (Fppt) e sobrenadante (FSbn). As frações FSbn e FHex foram submetidas a métodos cromatográficos clássicos em colunas de gel de sílica, C18 e Sephadex LH-20. O fracionamento de FSbn resultou no isolamento dos triterpenoides lup-20(29)-en-2 $\alpha$ ,3 $\beta$ -diol (**1**) e duas misturas epiméricas de quatro novos triterpenoides do tipo cicloartano **2a+2b** e **2a+2b+3a+3b**, elucidados como quadrangularato M de metila (**2a**), 24-epiquadrangularato M de metila (**2b**), 2 $\alpha$ ,3 $\beta$ ,24 $\beta$ -trihidroxi-cicloart-25-eno de metila (**3a**) e 2 $\alpha$ ,3 $\beta$ ,24 $\alpha$ -trihidroxi-cicloart-25-eno (**3b**). Os compostos obtidos a partir da fração FHex foram a lupenona (**4**) e uma mistura de seis esteroides, identificados como derivados sililados: colesterol (**5**), campesterol (**6**), estigmasterol (**7**),  $\Delta^{22}$ -estigmastenol (**8**), sitosterol (**9**) e sitostanol (**10**). As estruturas dos compostos isolados foram identificadas e/ou elucidadas por métodos espectroscópicos de RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  uni e bidimensionais, CG-EM, EMAR e comparação com dados relatados na literatura. O composto **1** está sendo relatado pela primeira vez na família Combretaceae e os epímeros **2a/2b** e **3a/3b** são inéditos na literatura. No ensaio de sequestro do radical DPPH as frações FAcOEt e FAqu apresentaram os maiores potenciais antioxidantes, com  $\text{CE}_{50}$  de  $89,54 \pm 3,74 \mu\text{g mL}^{-1}$  e  $107,57 \pm 5,31 \mu\text{g mL}^{-1}$ , respectivamente, correlacionando-se positivamente com o conteúdo de flavonoides totais ( $432,65 \pm 8,37$  e  $209,19 \pm 0,74 \text{ mg ER g}^{-1}$  de amostra). As frações FAcOEt, FSbn e EEtOH apresentaram indicativo de inibição da enzima acetilcolinesterase. EEtOH, FAqu, FHex, FSbn, **1** e **2a+2b** inibiram o crescimento de *Leishmania amazonensis*. A mistura dos compostos **2a+2b** apresentou percentual de inibição do crescimento de 95% e 100% nas concentrações de 400 e 800  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , respectivamente, com  $\text{CI}_{50}$  de  $83,07 \mu\text{g mL}^{-1}$ . Os resultados obtidos contribuem para o conhecimento da composição química e do potencial biológico da espécie *C. mellifluum*.

**Palavras-chave:** *Combretum mellifluum*. Triterpenoides. Esteroides. Atividade antioxidante. Atividade acetilcolinesterase. Atividade antileishmania.



## ABSTRACT

SILVA, J. S. (2018). **Contribution to the chemical and biological knowledge of the leaves of *Combretum mellifluum* Eichler.** Teresina. 165p. Dissertation (Masters) – Postgraduate Program in Chemistry Chemistry. Federal University of Piauí.

*Combretum mellifluum* Eichler (Combretaceae) is a non-endemic species of Brazilian Cerrado, commonly known as cipó, red cipó and sipaúba. This study reports the isolated and identified chemicals constituents of ethanolic extract (EEtOH) from this plant's leaves. In addition, it was evaluated the antioxidant, anticholinesterase and antileishmanial potential of the extract and fractions. The ethanolic extract from the leaves was submitted to partition providing hexane fraction (FHex), ethyl acetate fraction (FACoEt), aqueous fraction (FAqu), precipitate fraction (Fppt) and supernatant (FSbn). The fractions FSbn and FHex were submitted to classical chromatographic methods in silica gel column, C18 and Sephadex LH-20. The FSbn fractioning resulted in isolation of triterpenoid lup-20(29)-en-2 $\alpha$ ,3 $\beta$ -diol (**1**) and two epimeric mixtures of four new cycloartane triterpenoids Methyl quadrangularate and Methyl 24-epiquadrangularate (**2a+2b**) and 2 $\alpha$ ,3 $\beta$ ,24 $\beta$ -trihidroxí-cycloart-25-ene of methyl and 2 $\alpha$ ,3 $\beta$ ,24 $\alpha$ -trihidroxí-cycloart-25-ene (**3a+3b**). The obtained compounds from the FHex fraction were lupenone (**4**) and a mixture of six steroids, identified as silanated derived: cholesterol (**5**), campesterol (**6**), stigmasterol (**7**),  $\Delta^{22}$ -stigmastenol (**8**), sitosterol (**9**) and sitostanol (**10**). The structures of the isolated compounds were identified and/or elucidated by spectroscopic methods of RMN  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  single and two-dimensional, CG-EM, HRESI-MS, and comparison with data reported in literature. The compound **1** is being reported for the first time in Combretaceae family. In the DPPH radical scavenging assay, the FACoEt and FAqu fractions presented the greatest antioxidant potentials, with  $\text{CE}_{50}$  of  $89,54 \pm 3,74 \mu\text{g mL}^{-1}$  and  $107,57 \pm 5,31 \mu\text{g mL}^{-1}$ , respectively, positively correlating with the content of total flavonoids ( $432,65 \pm 8,37$  and  $209,19 \pm 0,74 \text{ mg RE g}^{-1}$  of sample). The FACoEt, FSbn and EEtOH fractions presented indication of acetylcholinesterase enzyme inhibition. The inhibitors EEtOH, FAqu, FHex, FSbn, **1** and **2a+2b** suppressed *Leishmania amazonensis* development. The mixture of compounds **2a+2b** were efficient in inhibiting the *Leishmania amazonensis* growth percentage of 95% and 100% on concentrations of 400 and 800  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , respectively, with  $\text{CI}_{50}$  of  $83,07 \mu\text{g mL}^{-1}$ . The obtained results contribute for the knowledge of chemical composition and biological potential of *C. mellifluum* species.

**Keywords:** *Combretum mellifluum*. Triterpenoids. Steroids. Antioxidant activity. Acetylcholinesterase activity. Antileishmania activity.



## LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1 - Estrutura química de medicamentos obtidos a base de produtos naturais	29
Figura 3.1 - Alguns esqueletos básicos dos triterpenoides .....	36
Figura 3.2 – Rota biossintética dos triterpenoides .....	37
Figura 3.3 – Fórmulas estruturais dos triterpenoides com esqueleto cicloartano isolados em espécies do gênero <i>Combretum</i> .....	45
Figura 3.4 – Fotos da espécie <i>Combretum mellifluum</i> Eichler .....	50
Figura 3.5 – Constituintes químicos das raízes e frutos de <i>Combretum mellifluum</i> Eichler .....	52
Figura 5.1 – Cromatogramas das frações de partição do EEtOH das folhas de <i>C. mellifluum</i> .....	71
Figura 5.2 – Espectro de RMN <sup>1</sup> H para o composto <b>1</b> (CDCl <sub>3</sub> , 600 MHz) .....	76
Figura 5.3 – Expansão (0,65-1,95 ppm) do espectro de RMN <sup>1</sup> H para o compostos <b>1</b> (CDCl <sub>3</sub> , 600 MHz) .....	77
Figura 5.4 – Expansão (2,0 -3,9 ppm) do espectro de RMN <sup>1</sup> H para o compostos <b>1</b> CDCl <sub>3</sub> , 600 MHz) .....	78
Figura 5.5 – Expansão (3,40-3,88 ppm) do espectro de RMN <sup>1</sup> H para o composto <b>1</b> (CDCl <sub>3</sub> , 600 MHz) .....	79
Figura 5.6 – Espectro de RMN de <sup>13</sup> C para o composto <b>1</b> (CDCl <sub>3</sub> , 150 MHz .....	80
Figura 5.7 – Expansão (14-58 ppm) do espectro de RMN <sup>13</sup> C para o composto <b>1</b> (CDCl <sub>3</sub> , 150 MHz) .....	81
Figura 5.8 – Espectro de RMN de DEPT 135° para o composto <b>1</b> (CDCl <sub>3</sub> , 150 MHz) .....	82
Figura 5.9 – Mapa de contornos do gHSQC para o composto <b>1</b> (CDCl <sub>3</sub> ,600 MHz) .....	83
Figura 5.10 – Expansão do gHSQC para o composto <b>1</b> (CDCl <sub>3</sub> ,600 MHz) .....	84
Figura 5.11 – Expansão do gHSQC para o composto <b>1</b> (CDCl <sub>3</sub> ,600 MHz) .....	84
Figura 5.12 – Expansão do gHSQC para o composto <b>1</b> (CDCl <sub>3</sub> ,600 MHz) .....	85
Figura 5.13 – Expansão do gHSQC para o composto <b>1</b> (CDCl <sub>3</sub> ,600 MHz) .....	85
Figura 5.14 – Mapas de contorno do gHMBC para o composto <b>1</b> (CDCl <sub>3</sub> ,600 MHz) .....	86
Figura 5.15 – Expansão do gHMBC para o composto <b>1</b> (CDCl <sub>3</sub> , 600 MHz) .....	87
Figura 5.16 – Expansão do gHMBC para o composto <b>1</b> (CDCl <sub>3</sub> , 600 MHz) .....	87
Figura 5.17 – Expansão do gHMBC para o composto <b>1</b> (CDCl <sub>3</sub> , 600 MHz) .....	88
Figura 5.18 – Expansão do gHMBC para o composto <b>1</b> (CDCl <sub>3</sub> , 600 MHz) .....	88
Figura 5.19 – Principais correlações observadas no mapa de contorno gHMBC.....	90
Figura 5.20 – Espectro de RMN de <sup>1</sup> H para os compostos <b>2a+2b</b> (CDCl <sub>3</sub> , 600 MHz) .....	94
Figura 5.21 – Expansão (0,45-1,9 ppm) do espectro de RMN de <sup>1</sup> H para os compostos <b>2a+2b</b> (CDCl <sub>3</sub> , 600 MHz) .....	95
Figura 5.22 – Expansão (2,3-5,1 ppm) do espectro de RMN de <sup>1</sup> H para os compostos de <b>2a+2b</b> (CDCl <sub>3</sub> , 600 MHz) .....	96

Figura 5.23 – Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ para os compostos <b>2a+2b</b> ( $\text{CDCl}_3$ , 150 MHz) .....	97
Figura 5.24 – Expansão (7-39 ppm) do espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ para os compostos <b>2a+2b</b> ( $\text{CDCl}_3$ , 150 MHz) .....	98
Figura 5.25 – Expansão (75-150 ppm) do espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ para os compostos <b>2a+2b</b> ( $\text{CDCl}_3$ , 150 MHz) .....	99
Figura 5.26 – Espectro de RMN de DEPT $135^\circ$ para os compostos <b>2a+2b</b> ( $\text{CDCl}_3$ , 150 MHz) .....	100
Figura 5.27 – Expansão (7-40 ppm) do espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ – DEPT $135^\circ$ para os compostos <b>2a+2b</b> ( $\text{CDCl}_3$ , 150 MHz) .....	101
Figura 5.28 – Expansão (40-120 ppm) do espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ – DEPT $135^\circ$ para os compostos <b>2a+2b</b> ( $\text{CDCl}_3$ , 150 MHz) .....	102
Figura 5.29 – Espectro de massas dos compostos <b>2a+2b</b> – $[\text{M}+\text{Na}]^+$ .....	103
Figura 5.30 – Mapa de contornos do gHSQC para os compostos <b>2a+2b</b> ( $\text{CDCl}_3$ , 600 MHz) .....	104
Figura 5.31 – Expansão do gHSQC para os compostos <b>2a+2b</b> ( $\text{CDCl}_3$ , 600 MHz) ....	105
Figura 5.32 – Mapas de contorno do gHMBC para os compostos <b>2a+2b</b> ( $\text{CDCl}_3$ , 600 MHz) .....	106
Figura 5.33 – Expansão do gHMBC para os compostos <b>2a+2b</b> ( $\text{CDCl}_3$ , 600 MHz) .....	107
Figura 5.34 – Expansão do gHMBC para os compostos <b>2a+2b</b> ( $\text{CDCl}_3$ , 600 MHz) .....	108
Figura 5.35 – Expansão do gHMBC para os compostos <b>2a+2b</b> ( $\text{CDCl}_3$ , 600 MHz) .....	109
Figura 5.36 – Expansão do gHMBC para os compostos <b>2a+2b</b> ( $\text{CDCl}_3$ , 600 MHz) .....	109
Figura 5.37 – Expansão do gHMBC para os compostos <b>2a+2b</b> ( $\text{CDCl}_3$ , 600 MHz) .....	110
Figura 5.38 – Expansão do gHMBC para os compostos <b>2a+2b</b> ( $\text{CDCl}_3$ , 600 MHz) .....	110
Figura 5.39 – Principais correlações observadas no mapa de contorno gHMBC .....	112
Figura 5.40 – Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ para os compostos <b>2a+2b/3a+3b</b> ( $\text{CDCl}_3$ , 100 MHz) .....	116
Figura 5.41 – Expansão (8-57 ppm) do espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ para os compostos <b>2a+2b/3a+3b</b> ( $\text{CDCl}_3$ , 100 MHz) .....	117
Figura 5.42 – Espectro de RMN de DEPT $135^\circ$ para os compostos <b>2a+2b/3a+3b</b> ( $\text{CDCl}_3$ , 100 MHz) .....	118
Figura 5.43 – Espectro de RMN de DEPT $90^\circ$ para os compostos <b>2a+2b/3a+3b</b> ( $\text{CDCl}_3$ , 100 MHz) .....	119
Figura 5.44 – Espectro de RMN de $^1\text{H}$ para os compostos <b>2a+2b/3a+3b</b> ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz) .....	120
Figura 5.45 – Expansão (0,2-2,4 ppm) do espectro de RMN de $^1\text{H}$ para os compostos <b>2a+2b/3a+3b</b> ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz) .....	121

Figura 5.46 – Expansão (2,4-5,3 ppm) do espectro de RMN de $^1\text{H}$ para os compostos <b>2a+2b/3a+3b</b> ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz) .....	122
Figura 5.47 – Mapa de contornos do gHSQC para os compostos <b>2a+2b/3a+3b</b> ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz) .....	123
Figura 5.48 – Expansão do gHSQC para os compostos <b>2a+2b/3a+3b</b> ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz) .....	124
Figura 5.49 – Expansão do gHSQC para os compostos <b>2a+2b/3a+3b</b> ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz) .....	124
Figura 5.50 – Expansão do gHSQC para os compostos <b>2a+2b/3a+3b</b> ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz) .....	125
Figura 5.51 – Expansão do gHSQC para os compostos <b>2a+2b/3a+3b</b> ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz) .....	125
Figura 5.52 – Mapas de contorno do gHMBC para os compostos <b>2a+2b/3a+3b</b> ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz) .....	126
Figura 5.53 – Expansão do gHMBC para os compostos <b>2a+2b/3a+3b</b> ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz) .....	127
Figura 5.54 – Expansão do gHMBC para os compostos <b>2a+2b/3a+3b</b> ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz) .....	127
Figura 5.55 – Expansão do gHMBC para os compostos <b>2a+2b/3a+3b</b> ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz) .....	128
Figura 5.56 – Expansão do gHMBC para os compostos <b>2a+2b/3a+3b</b> ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz) .....	128
Figura 5.57 – Expansão do gHMBC para os compostos <b>2a+2b/3a+3b</b> ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz) .....	129
Figura 5.58 – Expansão do gHMBC para os compostos <b>2a+2b/3a+3b</b> ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz) .....	129
Figura 5.59 – Espectro de massas dos compostos <b>2a+2b/3a+3b</b> – $[\text{M}+\text{Na}]^+$ .....	130
Figura 5.60 – Espectro de RMN $^1\text{H}$ para o composto <b>4</b> ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz) .....	134
Figura 5.61 – Expansão (0,65-1,95 ppm) do espectro de RMN $^1\text{H}$ para o composto <b>4</b> ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz) .....	135
Figura 5.62 – Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ para o composto <b>4</b> ( $\text{CDCl}_3$ , 100 MHz) .....	136
Figura 5.63 – Expansão (10-58 ppm) do espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ para o composto <b>4</b> ( $\text{CDCl}_3$ , 100 MHz) .....	137
Figura 5.64 – Espectro de RMN de DEPT $135^\circ$ para o composto <b>4</b> ( $\text{CDCl}_3$ , 100 MHz) .....	138
Figura 5.65 – Expansão (15-60 ppm) do espectro de RMN $^{13}\text{C}$ – DEPT $135^\circ$ para o composto <b>4</b> ( $\text{CDCl}_3$ , 100 MHz) .....	139
Figura 5.66 – Espectro de RMN de $^1\text{H}$ para os compostos <b>7+9</b> ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz) ...	142
Figura 5.67 – Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ para os compostos <b>7+9</b> ( $\text{CDCl}_3$ , 100 MHz) .....	143
Figura 5.68 – Espectro de RMN de DEPT $135^\circ$ para os compostos <b>7+9</b> ( $\text{CDCl}_3$ , 100 MHz) .....	144
Figura 5.69 – Representação da reação de siliilação .....	145

Figura 5.70 – Cromatograma (A) de íons totais e expansão (B) dos derivados sililados dos esteroides <b>5-10</b> .....	145
Figura 5.71 – Espectro de Massas do derivado sililado de <b>5</b> (colesterolTMS) – M <sup>+</sup> 458 .....	147
Figura 5.72 – Espectro de Massas do derivado sililado de <b>6</b> (campesterolTMS) – M <sup>+</sup> 472 .....	147
Figura 5.73 – Espectro de Massas do derivado sililado de <b>7</b> (stigmasterolTMS) – M <sup>+</sup> 484 .....	147
Figura 5.74 – Espectro de Massas do derivado sililado de <b>8</b> ( $\Delta^{22}$ -estigmasterolTMS) – M <sup>+</sup> 486 .....	148
Figura 5.75 – Espectro de Massas do derivado sililado de <b>9</b> (sitosterolTMS) – M <sup>+</sup> 486 .....	148
Figura 5.76 – Espectro de Massas do derivado sililado de <b>10</b> (sitostanolTMS) – M <sup>+</sup> 488 .....	148
Figura 5.77 - Estabilização do radical livre DPPH por uma espécie antioxidante AH .....	150
Figura 5.78 – Percentual de atividade antioxidante do extrato etanólico e frações das folhas de <i>C. mellifluum</i> . Controle positivos: rutina e BHT. Tempo de reação com DPPH: 30 min; F.AcOEt, F.Hex, F.Aqu e F. Sbn: frações acetato de etila, hexânica, aquosa e sobrenadante, respectivamente; E.EtOH: extrato etanólico .....	151
Figura 5.79 – Reação de redução do com o molibidênio presente no reagente de Folin-Ciocalteau pelo ácido gálico .....	152
Figura 5.80 – Complexos formados entre o flavonoide e o cloreto de alumínio .....	153
Figura 5.81 – Reação da atividade enzimática da acetilcolinesterase (AchE) .....	155
Figura 5.82 – Cromatoplaça do ensaio de atividade anticolinesterásica da fração hexânica ( <b>1</b> ), AcOEt ( <b>2</b> ), aquoso ( <b>3</b> ), frações sobrenadante ( <b>4</b> ) e extrato etanólico ( <b>5</b> ) das folhas de <i>C. mellifluum</i> e do padrão cafeína ( <b>P</b> ) .....	156
Figura 5.83 – Efeito do extrato etanólico, frações e compostos isolados de <i>C. mellifluum</i> frente a <i>L.amazonensis</i> na forma promastigota.....	158

## LISTA DE TABELAS

Tabela 3.1 – Classificação dos terpenos segundo o número de unidades isoprênicas	35
Tabela 4.1 – Frações obtidas e reunidas no fracionamento em gel de sílica da fração Sbn-M das folhas de <i>C. mellifluum</i> .....	58
Tabela 4.2 – Agrupamento das frações provenientes do fracionamento em coluna de Sephadex LH-20 do grupo S10.....	59
Tabela 4.3 – Frações obtidas no fracionamento cromatográfico em coluna de gel de sílica da do subgrupo S10-15.....	59
Tabela 4.4 – Agrupamento das frações provenientes do fracionamento em coluna de Sephadex LH-20 do grupo S12.....	60
Tabela 4.5 - Frações obtidas no fracionamento cromatográfico em coluna de gel de sílica da do subgrupo FH12-19 .....	60
Tabela 4.6 – Agrupamento das frações provenientes do fracionamento em coluna de Sephadex LH-20 do grupo S14.....	61
Tabela 4.7 – Frações obtidas e reunidas do fracionamento em coluna de gel de sílica da fração hexânica (FH) das folhas de <i>C. mellifluumm</i> .....	63
Tabela 4.8 – Agrupamento das frações provenientes do fracionamento em coluna de Sephadex LH-20 do grupo FH19 .....	64
Tabela 4.9 - Frações obtidas no fracionamento cromatográfico em coluna de gel de sílica da do subgrupo FH19-9 .....	64
Tabela 4.10 – Agrupamento das frações provenientes do fracionamento em coluna de Sephadex LH-20 do grupo FH37 .....	65
Tabela 4.11 – Agrupamento das frações provenientes do fracionamento em coluna gel de sílica do grupo FH37-10 .....	65
Tabela 5.1 – Dados de RMN do composto <b>1</b> (600 e 150 MHz, $\delta$ em ppm, $J$ em Hz $\text{CDCl}_3$ ) .....	75
Tabela 5.2 – Dados de RMN de $^{13}\text{C}$ dos compostos <b>2a+2b</b> (600 MHz e 150 MHz, $\text{CDCl}_3$ ).....	92
Tabela 5.3 – Deslocamentos químicos de RMN de $^{13}\text{C}$ dos compostos <b>2a+2b</b> (150 MHz, $\text{CDCl}_3$ ).....	93
Tabela 5.4 – Dados de RMN de $^{13}\text{C}$ do composto <b>3a+3b</b> (150 MHz, $\text{CDCl}_3$ ).....	114
Tabela 5.5 – Dados de RMN de $^{13}\text{C}$ do composto <b>3a+3b</b> (150 MHz, $\text{CDCl}_3$ ).....	115

Tabela 5.6 – Dados de RMN de $^{13}\text{C}$ do composto <b>4</b> (100 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) .....	133
Tabela 5.7 – Dados de RMN $^{13}\text{C}$ de <b>7</b> e <b>9</b> ( $\text{CDCl}_3$ , 100 MHz) .....	141
Tabela 5.8 – Esteroides ( <b>5–10</b> ) identificado na fração FH37-10-3 das folhas de <i>Combretum mellifluum</i> .....	146
Tabela 5.9 – Teores de fenóis totais (FT), flavonoides totais (FLAT) e concentração eficiente média ( $\text{CE}_{50}$ ) do extrato etanólico e das frações das folhas de <i>C. mellifluum</i> .....	154
Tabela 5.10 – Atividade antileishmania do extrato etanólico, frações e compostos isolados de <i>C. mellifluum</i> frente a <i>L.amazonensis</i> .....	157

## LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 4.1 – Extração líquido-líquido do extrato etanólico das folhas de <i>Combretum mellifluum</i> .....	56
Esquema 4.2 – Fracionamento cromatográfico da fração sobrenadante (FSbn) em coluna C18 das folhas de <i>Combretum mellifluum</i> .....	57
Esquema 4.3 – Fracionamento cromatográfico da fração Sbn-M das folhas de <i>Combretum mellifluum</i> .....	62
Esquema 4.4 – Fracionamento cromatográfico dos grupos FH19 e FH37 provenientes da fração hexânica das folhas de <i>Combretum mellifluum</i> .....	67



## LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

- $\lambda$ - comprimento de onda
- $\delta_H$  - deslocamento químico do hidrogênio
- $\delta_C$  - deslocamento químico do carbono-13
- %AA - porcentagem de atividade antioxidante
- Abs - absorbância
- AcOEt - acetato de etila
- Ach - neurotransmissor acetilcolina
- AchE - enzima acetilcolinesterase
- ANOVA - análise de variância
- Ara - Arabinose
- ATCI - iodeto de acetiltiocolina
- BHT- butilhidroxitolueno
- CCD - cromatografia em camada delgada
- CCDC - camada delgada comparativa
- CE<sub>50</sub> - concentração eficiente necessária para reduzir a concentração inicial em 50%
- DEPT - *Distortionless enhancement by polarization transfer*
- DPPH - radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazila
- DP - desvio padrão
- DTNB - ácido 5,5'-ditiobis-(2-nitrobenzóico) - reagente de Ellman
- FT - Fenóis Totais
- FLAT - flavonoides totais
- ER - equivalente de rutina
- EAG - equivalente de ácido gálico
- EEtOH – extrato etanólico de *C. mellifluum*
- FHex - fração hexânica de *C. mellifluum*
- FAqu - fração aquosa de *C. mellifluum*
- FAcOEt - fração acetato de etila de *C. mellifluum*
- FSbn – fração sobrenadante de *C. mellifluum*
- Fppt – precipitado
- Glc - glicose
- HSQC - *Heteronuclear Single-Quantum Correlation*
- HMBC - *Heteronuclear Multiple-Bond Correlation*
- *J* - constante de acoplamento
- MeOH - metanol
- MTT - [brometo de 3-(4,5-dimetiltiozol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio] (sal de tetrazólio)
- nt - não testada
- RMN <sup>1</sup>H - Ressonância Magnética Nuclear de hidrogênio
- RMN <sup>13</sup>C - Ressonância Magnética Nuclear de carbono-13
- TMS - tetrametilsilano
- t<sub>R</sub> - tempo de retenção
- Xil - xilose



## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	29
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	32
<b>2.1 Objetivo geral</b> .....	32
<b>2.2 Objetivos específicos</b> .....	32
<b>3 REVISÃO DA LITERATURA</b> .....	33
<b>3.1 Família Combretaceae</b> .....	33
<b>3.2 Gênero <i>Combretum</i></b> .....	34
<b>3.3 Triterpenoides</b> .....	35
<b>3.4 Revisão bibliográfica dos triterpenoides com esqueleto cicloartano do gênero <i>Combretum</i> e suas atividades biológicas</b> .....	38
<b>3.5 <i>Combretum mellifluum</i></b> .....	51
<b>4 PARTE EXPERIMENTAL</b> .....	53
<b>4.1 Reagentes e solventes</b> .....	53
<b>4.2 Equipamentos</b> .....	53
<b>4.2.1 Espectroscopia e Absorção molecular</b> .....	54
<b>4.2.2 Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN)</b> .....	54
<b>4.2.3 Cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa (CG-EM)</b> ....	54
<b>4.2.4 Espectrometria de massas de massas de alta resolução (EMAR)</b> .....	54
<b>4.3 Material vegetal</b> .....	55
<b>4.4 Preparação dos extratos e extração líquido-líquido</b> .....	55
<b>4.5 Cromatografia em camada delgada comparativa (CCDC) dos extratos e dos extratos e frações</b> .....	55
<b>4.6 Fracionamento cromatográfico da fração sobrenadante (Sbn)</b> .....	57
<b>4.6.1 Fracionamento cromatográfico da fração Sbn-M em coluna gel de sílica</b> .....	57
<b>4.6.1.1 Fracionamento do grupo S10</b> .....	58
<b>4.6.1.2 Fracionamento do grupo S12</b> .....	60
<b>4.6.1.3 Fracionamento do grupo S14</b> .....	61
<b>4.7 Fracionamento cromatográfico da fração hexânica das folhas de <i>C. mellifluum</i></b> .....	63
<b>4.7.2 Fracionamento do grupo FH19</b> .....	63
<b>4.7.3 Fracionamento do grupo FH37</b> .....	65
<b>4.7.4 Filtração da FH37-10 em gel de sílica</b> .....	65

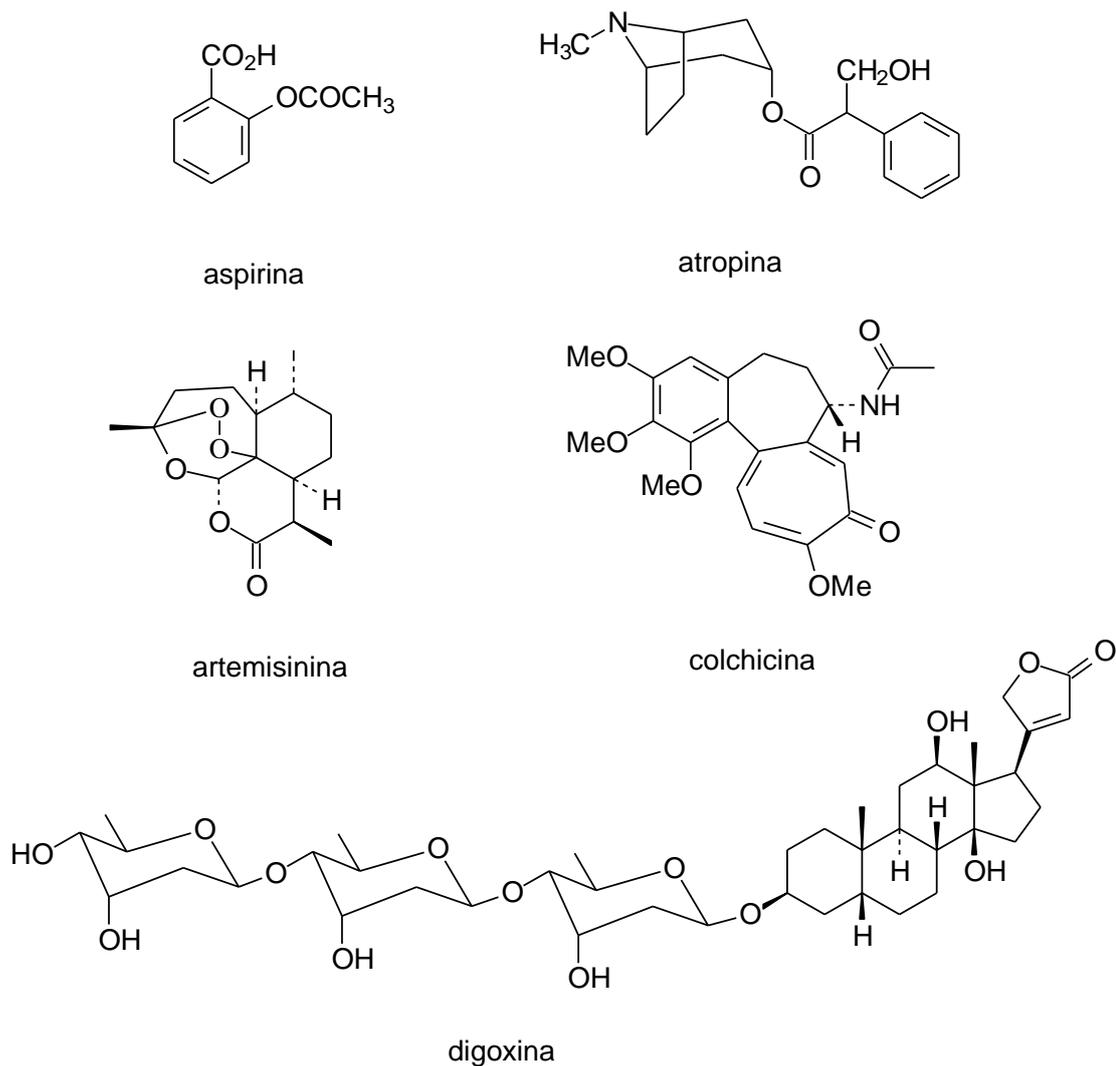
4.7.4.1 Derivatização com BSTFA e análise de CG-EM da subfração FH37-10-3 .....	66
4.8 Avaliação do potencial biológico do extrato e frações de <i>C. mellifluum</i> .....	68
4.8.1 Atividade antioxidante .....	68
4.8.2 Determinação do teor de Fenóis Totais (FT) .....	68
4.8.3 Determinação do teor de Flavonoides Totais (FLAT) .....	69
4.8.4 Avaliação da atividade anticolinesterásica .....	69
4.8.5 Avaliação da atividade antileishmania .....	70
4.9 Análise estatística .....	70
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	71
5.1 Perfil químico das frações de <i>C. mellifluum</i> .....	71
5.1.1 Cromatografia em camada delgada analítica (CCDA) .....	71
5.2 Fórmulas estruturais dos compostos isolados e identificados na fração hexânica e sobrenadante das folhas de <i>C. mellifluum</i> .....	72
5.3 Identificação estrutural dos compostos isolados de <i>C. mellifluum</i> .....	73
5.3.1 Elucidação estrutural do composto 1.....	73
5.3.2 Elucidação estrutural do composto 2a+2b.....	89
5.3.3 Elucidação estrutural do composto 2a+2b/3a+3b .....	111
5.3.4 Elucidação estrutural do composto 4.....	131
5.3.5 Elucidação estrutural dos composto 5-10.....	140
5.4 Avaliação do potencial biológica do extrato e frações de <i>C. mellifluum</i> .....	149
5.4.1 Atividade antioxidante.....	149
5.4.2 Determinação dos teores de fenóis e flavonoides totais .....	151
5.4.3 Atividade anticolinesterásica.....	154
5.4.4 Atividade leishmanicida.....	156
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS .....	159
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	160

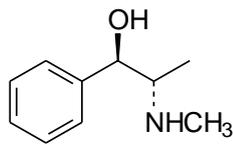
## 1 INTRODUÇÃO

O uso de plantas, para fins medicinais, é uma das práticas mais antigas da humanidade e ainda hoje têm sido usadas e comercializadas em todo o mundo. Além de seu consumo popular para tratar e curar diversas doenças, os produtos derivados de plantas desempenham papéis importantes como fonte de agentes terapêuticos importantes contra vários tipos de doenças (UJOWUNDU et al., 2015).

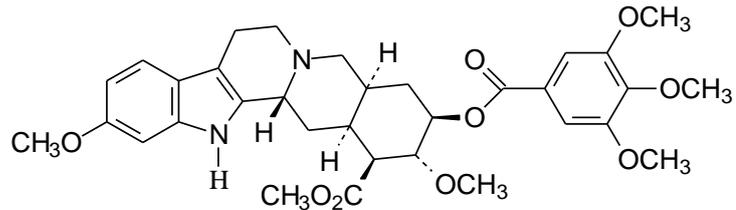
O uso de plantas medicinais é uma terapia alternativa que tem despertado o interesse de pesquisadores e indústrias farmacêuticas devido a crescente descoberta de medicamentos a base de produtos naturais. A aspirina, atropina, artemisinina, colchicina, digoxina, efedrina, reserpina, taxol, tubocurarina, vincristina e vimblastina (Figura 1.1) são exemplos importantes da contribuição das plantas medicinais na indústria farmacêutica.

Figura 1.1 – Estrutura química de medicamentos obtidos a base de produtos naturais

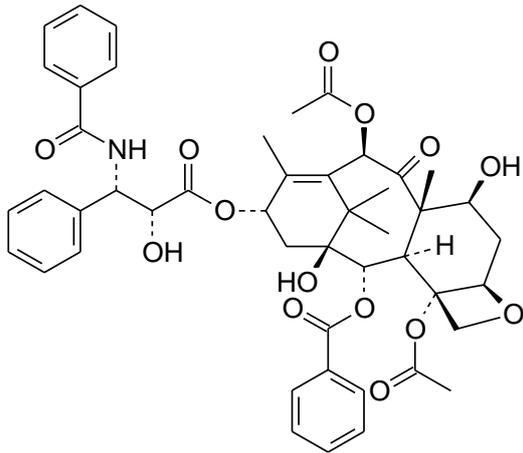




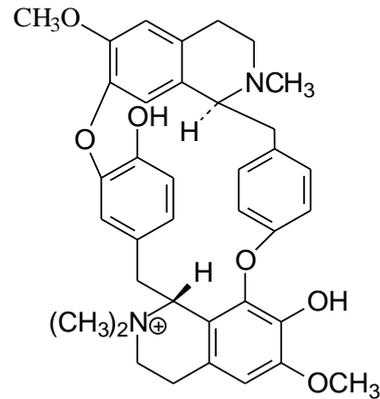
efedrina



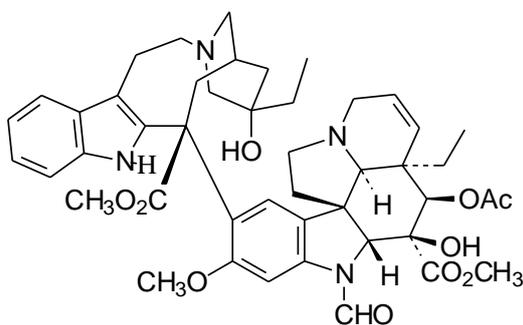
reserpina



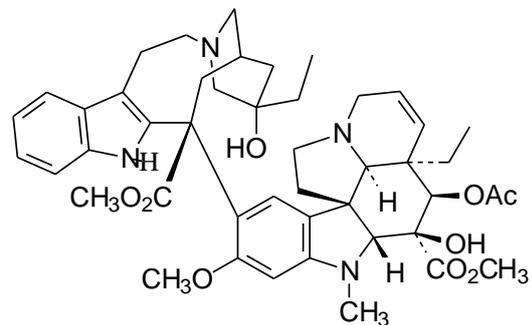
taxol



tubocurarina



vincristina



vinblastina

As plantas medicinais são fontes mais ricas para obtenção de medicamentos populares e modernos, nutracêuticos, suplementos alimentares, intermediários farmacêuticos e material de partida para obtenção de drogas sintéticas (KOMAPE et al., 2014; UJOWUNDU et al., 2015).

*Combretum* é um gênero pertencente a família Combretaceae, constituído por 370 espécies, ricas em metabólitos secundários e com inúmeras atividades biológicas já relatadas (DAWE et al., 2013; ROY et al., 2014; MAPFUNDE et al 2016; LIMA et al., 2012).

A espécie *Combretum mellifluum* é um arbusto que ocorre na região Norte (Acre, Pará, Tocantins), Nordeste (Bahia, Ceará, Maranhão, Piauí), Centro-oeste (Goiás, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul) e Sudeste (Minas Gerais) (FORZZA et al., 2010; FARIAS e CASTRO,

2004). As folhas desta espécie possuem indicação popular no tratamento de dores de cabeça, dores no estômago e tosse (NASCIMENTO e CONCEIÇÃO, 2011).

Neste contexto, as folhas da espécie *C. mellifluum* foram selecionadas para realização da documentação química e biológica em virtude da escassez de estudos com esta espécie e objetivando contribuir para o conhecimento do potencial de plantas medicinais da família Combretaceae.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo Geral

Isolar, identificar e/ou elucidar estruturas de constituintes químicos das folhas de *Combretum mellifluum* Eichler e avaliar o potencial biológico do extrato EtOH e frações das folhas, a fim de agregar valor aos biomas cerrado e caatinga.

### 2.2 Objetivos Específicos

- Coletar folhas de *C. mellifluum* e preparar o extrato etanólico
- Fracionar o extrato etanólico por meio de extração líquido-líquido
- Investigar a atividade antioxidante do extrato e frações, por meio do ensaio com o DPPH
- Determinar os teores de fenóis e flavonoides totais do extrato e frações
- Isolar constituintes químicos da fração hexânica e do sobrenadante oriundos da partição do extrato etanólico
- Identificar e/ou elucidar estruturas dos constituintes químicos isolados
- Investigar as atividades inibidora da acetilcolinesterase e antileishmania do extrato, frações e compostos isolados

### 3 REVISÃO DA LITERATURA

#### 3.1 Família Combretaceae

A família Combretaceae, pertencente à ordem Myrtales, compreende aproximadamente 600 espécies e 20 gêneros, distribuídas nas zonas tropicais e subtropicais, principalmente na África e na Índia (LIMA et al., 2012). No Brasil, esta família é constituída por 5 gêneros, 79 espécies (27 endêmicas) e cinco variedades (3 endêmicas) (FORZZA et al., 2010).

Em estudos realizados por Tan et al., (2002), a família Combretaceae é distribuída em duas subfamílias denominadas de Strephonematoideae e Combretoideae. O representante da subfamília Strephonematoideae possui apenas o gênero *Strephonema* Hook.f., com três espécies cuja ocorrência se dá exclusivamente na África. Em contrapartida, a subfamília Combretoideae possui um número mais abrangente de espécies e distribuição, com duas tribos, Luguncularieae e Combreteae com quatro e doze gêneros, respectivamente, sendo os gêneros *Combretum* e *Terminalia*, pertencente a tribo Combreteae, encontrados em grande parte dos continentes (LOIOLA et al., 2009; SOARES NETO et al., 2014).

Cerca de 200 espécies lenhosas pertencentes à família Combretaceae, possuem um importante valor econômico, sendo utilizadas como matéria-prima nas indústrias madeireira, farmacêutica e de couro (TAN et al., 2002). Além disso, algumas espécies são amplamente utilizadas na indústria têxtil, bem como no tratamento tradicional de muitas doenças (SORE et al., 2012). Na região de Burkina Faso (África), por exemplo, duas espécies pertencentes à família Combretaceae (*Anogeissus leiocarpus* (DC) Guill. e Perr. e *Combretum glutinosum* Perr. ex DC) são comumente usadas, entre elas, a *A. leiocarpus*, de uso mais frequente, é uma árvore considerada sagrada, utilizada para tingir tecidos e couro, bem como, na medicina tradicional para o tratamento de anorexia, constipação, malária, furúnculos e várias formas de úlceras (SORE et al., 2012).

As espécies pertencentes à família Combretaceae são amplamente comercializadas no mercado de medicina tradicional na África Meridional. Plantas desta família são também usadas para fins medicinais no resto da África e Ásia com várias indicações medicinais. Muitas destas indicações estão relacionadas ao tratamento de infecções (ELOFF et al., 2008).

Várias espécies de gêneros na família Combretaceae, como *Combretum*, *Anogeissus* e *Terminalia* podem ser ocasionalmente confundidas com algumas espécies frequentemente utilizadas medicinalmente, incluindo do próprio gênero *Combretum*, para as quais existem altas demandas de mercado nas grandes cidades. A caracterização farmacognóstica, portanto,

deve ajudar a evitar adulteração de medicamentos oriundas destas espécies (SORE et al., 2012).

A família Combretaceae é rica em compostos pertencentes à classe dos triterpenoides, bem como de compostos biossinteticamente relacionados, como os esteroides (BANSKOTA et al., 2000). Há também a ocorrência de flavonoides, fenatrenos, lignana, bifenila, taninos e alcaloides (KATERERE et al., 2003; ADNYANA et al., 2001; CIRLA e MANN, 2003; LETCHER e NHAMO, 1971; ELOFF et al., 2008; JOSSANG et al., 1994).

### 3.2 O gênero *Combretum*

O gênero *Combretum* Loefl., pertencente à família Combretaceae e subfamília Combretoideae, é constituído por cerca de 370 espécies, distribuídas nas regiões tropicais e subtropicais (LIMA et al., 2012). Este gênero, juntamente com o *Terminalia*, são os maiores representantes pertencentes da família. Apresentam, em geral, hábito arbóreo, arbustivo, arbustivo escandente até trepador (FARIAS et al., 2015; SOARES NETO et al., 2014). No Brasil, o gênero *Combretum*, é formado por 24 espécies (5 endêmicas), 3 variedades (1 endêmica) (FORZZA et al., 2010).

No Nordeste, especificamente no estado do Piauí, a família Combretaceae está entre as cinco mais bem representadas em número de espécies (FARIAS, et al., 2014). No estudo publicado por Farias e Castro (2004) sobre o levantamento de famílias e espécies amostradas na área do Complexo Vegetacional de Campo Maior, a família Combretaceae é representada por seis espécies, sendo uma do gênero *Terminalia* e *Buchenavia* e quatro do gênero *Combretum*. Em contrapartida, Barros e Castro (2006), em um trabalho de geocompartimentação correspondente ao mesmo Complexo, relatou sete espécies, diferenciando-se de Farias e Castro (2004) por apresentar uma espécie a mais de *Terminalia*.

As espécies do gênero *Combretum*, têm despertado interesse nas últimas décadas devido o isolamento de alguns compostos com atividades bastante significativas em modelos anticancerígenos e anti-infecciosos, tornando-se um grupo muito importante para a pesquisa de compostos bioativos (GOSSAN et al., 2016). Plantas deste gênero são empregadas tradicionalmente no tratamento de dores de cabeça, dores no corpo, distúrbios abdominais, febre, úlceras gástricas, diarreia, dor de garganta, sífilis, pneumonia, câncer, diabetes, conjuntivite, picadas de cobra e escorpião, infertilidade e malária (MAPFUNDE et al., 2016; KATERERE et al., 2012; DAWE et al., 2013).

Estudos farmacológicos têm comprovado diversas atividades biológicas, tais como imunoestimulante, antimalárica, hipoglicêmica, antibacteriana, antifúngica,

antitripanossômica, antidiabética, anti-inflamatória, moluscicida, antitumoral, antiviral, cardiovascular, citotóxica, analgésico, hepatoprotetora e gastrointestinal (DAWE et al., 2013; LIMA et al., 2012). Estudos fitoquímicos da casca do caule, semente e folhas de plantas do gênero *Combretum* têm demonstrado a ocorrência de muitas classes de metabólitos secundários incluindo triterpenos e flavanoides (KATERERE et al., 2003), bifenila (ADNYANA et al, 2001), fenantrenos (CIRLA e MANN, 2003), lignanas (LETCHER e NHAMO, 1971), alcaloides (ELOFF et al., 2008) e taninos (JOSSANG et al., 1994), sendo os triterpenos os mais frequentes do gênero *Combretum*.

### 3.3 Triterpenoides

Os triterpenoides são compostos muito difundidos na natureza, principalmente no reino vegetal e pertencem a uma classe de substâncias químicas conhecidas como terpenoides (terpenos). Os terpenoides são metabólitos secundários que abrange uma grande e estruturalmente diversificada família de produtos naturais derivados a partir de unidades de isopreno ( $C_5H_8$ ) (DEWICK, 2009). Estas estruturas típicas contêm esqueletos de carbono representados por  $(C_5)_n$ , e são classificadas como: hemiterpenoides ( $C_5$ ), monoterpenoides ( $C_{10}$ ), sesquiterpenoides ( $C_{15}$ ), diterpenoides ( $C_{20}$ ), sesterterpenoides ( $C_{25}$ ), triterpenoides ( $C_{30}$ ) e tetraterpenoides ( $C_{40}$ ) conforme a Tabela 3.1:

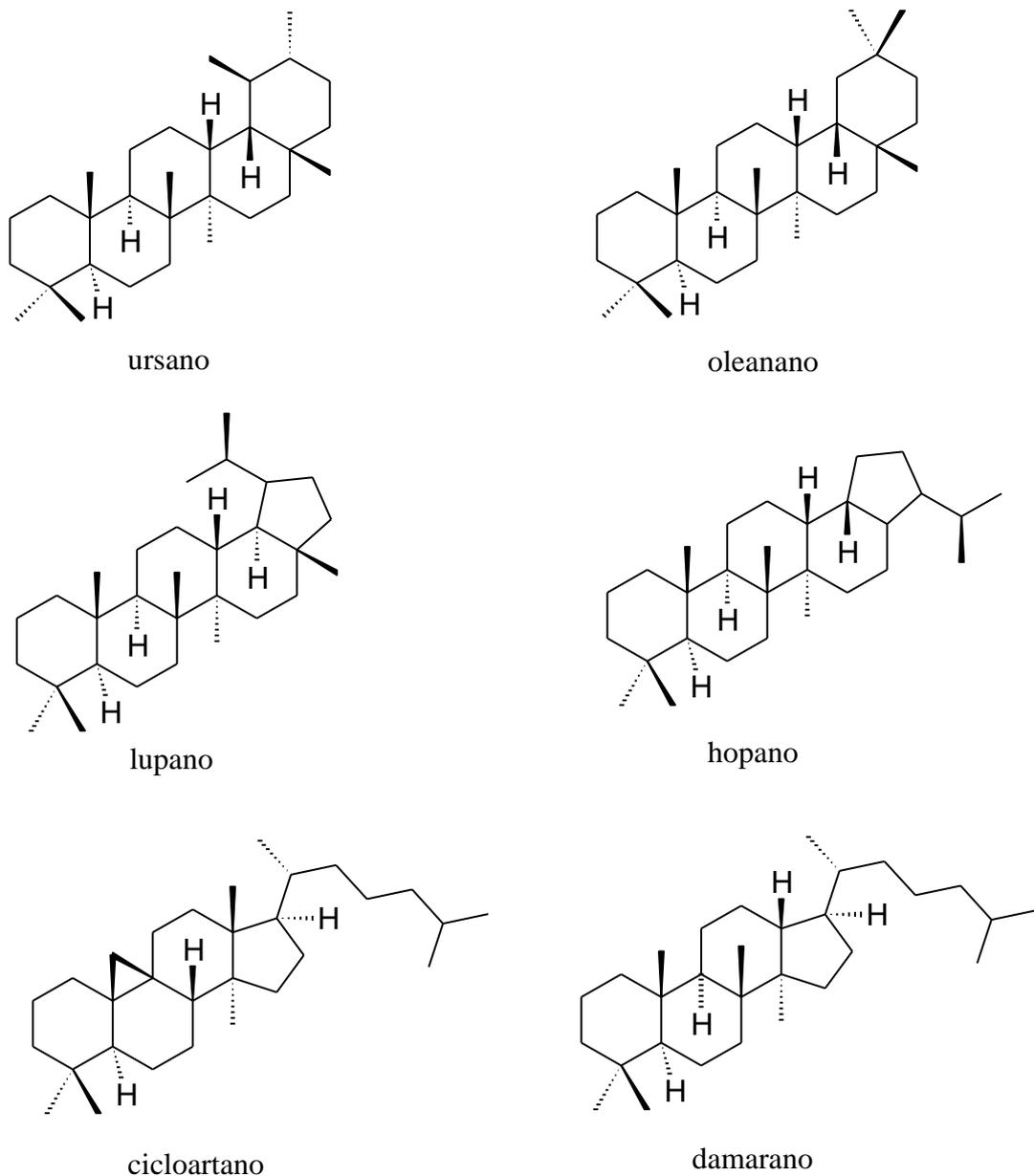
Tabela 3.1 – Classificação dos terpenos segundo o número de unidades isoprênicas

Nome	Fórmula molecular	Nº de unidades
Hemiterpenoides	$C_5H_8$	1
Monoterpenoides	$C_{10}H_{16}$	2
Sesquiterpenoides	$C_{15}H_{24}$	3
Diterpenoides	$C_{20}H_{32}$	4
Sesterterpenoides	$C_{25}H_{40}$	5
Triterpenoides	$C_{30}H_{48}$	6
Tetraterpenoides	$C_{40}H_{64}$	8
Politerpenoides	$C_{5n}H_{8n}$	n

Os trierpenoides são moléculas constituídas por trinta átomos de carbono e seis unidades de isopreno, derivados do esqualeno. Estruturalmente, os triterpenoides podem ser dividido em lineares, tetracíclico (comuns em animais) e pentacíclico (comum em vegetais)

(CANO-FLORES, 2013). Alguns dos esqueletos de carbono podem conter cinco anéis de seis membros (ursanos e oleananos) ou quatro anéis de seis membros e um de cinco (lupanos e hopanos) ou três anéis de seis membros e um de cinco (cicloartano e damarano) conforme a Figura 3.1 (PATOČKA, 2003; DEWICK, 2009).

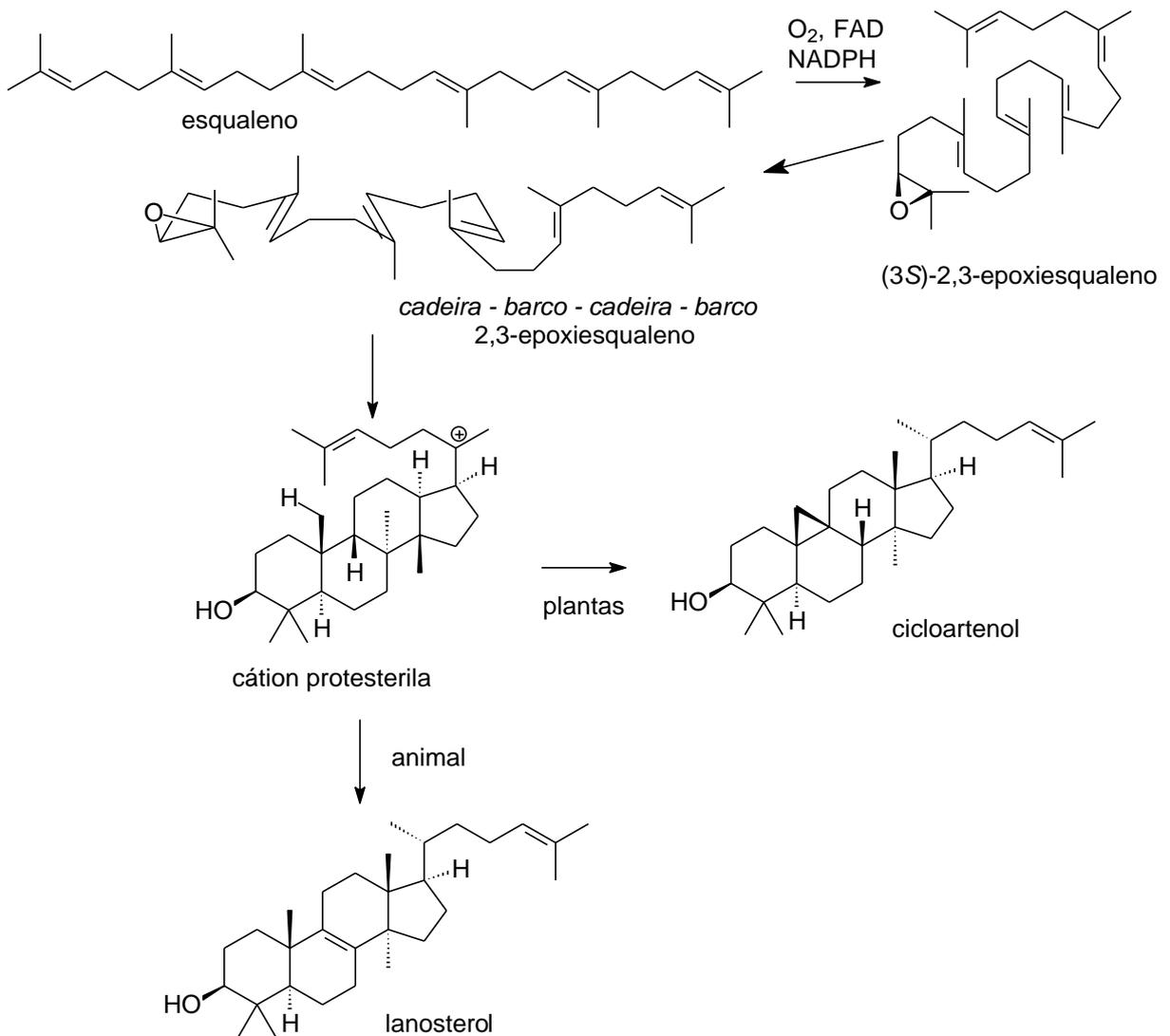
Figura 3.1 – Alguns esqueletos básicos dos triterpenoides



Biossinteticamente, os triterpenoides são formados a partir da ciclização e oxidação do esqualeno o qual é catalisado pela esqualeno epoxidase juntamente com os cofatores FAD e NADPH gerando o intermediário 2,3-oxidosqualeno. Em seguida, as estruturas triterpênicas

policíclicas são formadas por meio de uma série de ciclizações seguidas de uma sequência de migrações combinadas de rearranjos de Wagner-Meerwein dos grupos hidreto e metila (Figura 3.2) (DEWICK, 2009).

Figura 3.2 – Rota biossintética dos triterpenoides



Estudos fitoquímicos de espécies do gênero de *Combretum* mostraram que os triterpenoides simples e glicosídeos de triterpenoides são os principais constituintes do gênero. Dawe et al., (2013) relataram a ocorrência de 135 compostos pertencentes aos triterpenoides de esqueletos cicloartano, ursano, oleanano e damarano e seus respectivos glicosídeos foram identificados em plantas do gênero *Combretum*. Entretanto, uma revisão bibliográfica foi realizada até 2018 e verificou-se que este número foi alterado para 147

compostos. Estudos comprovam que o triterpenoide apresentam várias atividades biológicas que inclui propriedades antibacterianas, antivirais, antifúngicas, antioxidantes e anti-inflamatórias, bem como propriedades anticancerígenas e quimiopreventivas (CHUDZIK et al., 2015).

### **3.4 Revisão bibliográfica dos triterpenoides com esqueleto cicloartano do gênero *Combretum* e suas atividades biológicas**

Os resultados obtidos na revisão do gênero *Combretum* mostraram um total de 147 triterpenoides isolados de 28 espécies, sendo 61 com esqueleto cicloartano, relatados em: *C. molle*, *C. petrophilum*, *C. edwardsii*, *C. elaeagnoides*, *C. leprosum*, *C. quadrangulare*, *C. fragrans*, *C. erythrophyllum*, *C. moggi* e *C. collinum*. A espécie *C. quadrangulare* apresentou o maior número, com 42 triterpenoides. Para as espécies *C. erythrophyllum* e *C. elaeagnoides* foram relatados sete e três triterpenoides, respectivamente, enquanto que nas espécies *C. edwardsii*, *C. collinum* foram relatados três em cada, e para *C. moggi* apenas um.

Até o momento não foram relatados na literatura registros da ocorrência de triterpenoides com esqueleto cicloartano para as espécies *C. nelsonii*, *C. yannanense*, *C. bracteatum*, *C. laxum*, *C. imberbe*, *C. padoides*, *C. sundaicum*, *C. zeyheri*, *C. vendae*, *C. coccineum*, *C. rotundifolium*, *C. micranthum*, *C. apiculatum*, *C. lanceolatum*, *C. griffithii*, *C. psidioides*, *C. cafrum*, *C. hereroense*, *C. woodii*, *C. kraussi*, *C. glutinosum*, *C. albopunctatum*, *C. bracteatum*.

Os triterpenoides de *Combretum* foram isolados principalmente a partir de partes da planta, tais como: cascas do caule, galhos, folhas, sementes e frutos. Entretanto foi relatado o isolamento de triterpenoides, com esqueleto cicloartano, apenas nas folhas.

O ácido mólico (**1**) foi isolado das folhas das espécies *C. molle*, *C. petrophilum*, *C. leprosum*, *C. moggi*, *C. collinum*, *C. edwardsii* e *C. quadrangulare* (PEGEL e ROGERS, 1985; ROGERS e COOMBES, 2001; ROGERS, 1989; FACUNDO et al., 1993; ROGERS e COOMBES, 1999; ROGERS e COOMBES, 2001). Também foi obtido das folhas de *C. molle* e *C. petrophilum* os triterpenoides: ácido mólico 3 $\beta$ -D-glicosídeo (**2**) e ácido mólico 3 $\beta$ -D-xilósido (**4**) (PEGEL e ROGERS 1985; ROGERS e COOMBES 2001). O ácido mólico 3 $\alpha$ -L-arabinóico (**3**) foi obtido de três espécies: *C. molle*, *C. edwardsii* e *C. petrophilum* (PEGEL e ROGERS, 1985; ROGERS e COOMBES, 2001; ROGERS, 1989).

Os triterpenoides ácido mólico (**1**), ácido mólico 3 $\alpha$ -L-arabinóico (**3**) e ácido mólico 3 $\beta$ -D-xilósido (**4**) exibiram efeito antiproliferativo, responsáveis pelas atividades de indução

citotóxica e apoptótica frente a células HeLa (câncer de colo do útero) e Ca Ski (câncer cervical) (IBRAHIM et al., 2018; WONG et al., 2012; WONG e ABDUL KADIR, 2012). Ojewole, (2008) realizou um estudo que aborda os efeitos analgésico e anti-inflamatório do ácido mólico 3 $\beta$ -D-glicosídeo (**2**) obtido do extrato das folhas de *C. molle*. Os resultados deste estudo em animais de laboratório indicaram que o ácido mólico 3 $\beta$ -D-glicosídeo possui efeitos analgésico e anti-inflamatório.

Diversos triterpenoides com esqueleto cicloartano foram isolados na espécie *C. quadrangulare*. Um estudo com as folhas revelaram 42 compostos: Ácido 1 $\alpha$ ,3 $\beta$  dihidroxi-cicloart-24-eno-30-carboxílico (**6**), Éster metílico do ácido 1 $\alpha$ ,3 $\beta$  dihidroxi-cicloart-24-eno-30-carboxílico (**7**), ácido quadrangulárico E-H (**33, 10, 14, 17**), ácido quadrangulárico J-M (**11, 18, 19, 13**), quadrangularato de metila A-C, D, I, N, O e P (**23-25, 29, 15, 31, 27, 41**), ácido 24-epiquadrangulárico M, G, L (**12, 16, 20**), ácido norquadrangulárico A-C (**20, 37, 38**), 24-epiquadrangularato de metila C (**26**), quadrangularol A e B (**30, 32**), ácido 23-desoxojessico (**34**), 23-desoxojessato de metila (**37**), ácido 7-hidroxi 23-desoxojessico (**21**), ácido 1-*O*-acetil-23-desoxojessico (**35**), Ácido 4 $\beta$ ,14 $\alpha$ -dimetil-5 $\alpha$ -ergosta-9 $\beta$ ,19-ciclo-24(31)-en-3 $\beta$ -hidroxi-4 $\alpha$ -carboxílico (**36**), combretanona A-G (**46, 47, 52, 48, 49, 50 e 53**) e ácido combrético A-B (**54-51**) (BANSKOTA et al., 2000a; BANSKOTA et al., 2000b; GANZERA et al., 1997; TOUME et al., 2011).

Entre os compostos isolados por Banskota et al. (1998), que apresentaram forte citotoxicidade diante de células de carcinoma do cólon 26-L5 foram o quadrangularato de metila B, C e D (**24, 25 e 29**). Os demais compostos como o quadrangularato de metila A (**23**), ácido 23-desoxojessico (**34**), ácido 4 $\beta$ ,14 $\alpha$ -dimetil-5 $\alpha$ -ergosta-9 $\beta$ ,19-ciclo-24(31)-en-3 $\beta$ -hidroxi-4 $\alpha$ -carboxílico (**36**) ácido quadrangulárico E (**33**), ácido 1-*O*-acetil-23-desoxojessico (**35**) e ácido 7-hidroxi 23-desoxojessico (**21**) apresentaram moderada atividade de proliferação de células tumorais.

Em outro estudo com extrato MeOH de folhas de *C. quadrangulare* mostrou efeito hepatoprotetor significativo. Dentre os compostos que apresentaram esta atividade, quadrangularato de metila A, I e N (**23, 15, 31**), quadrangularol B (**32**) e ácido norquadrangulárico B (**42**) mostraram inibição potente na morte celular induzida por TNF- $\alpha$ . Em contrapartida, não houve relato de atividade hepatoprotetora: Ácido 1 $\alpha$ , 3 $\beta$  dihidroxi-cicloart-24-eno-30-carboxílico (**5**), Éster metílico do ácido 1 $\alpha$ , 3 $\beta$  dihidroxi-cicloart-24-eno-30-carboxílico (**6**), ácido quadrangulárico E-H (**33, 10, 14, 17**), ácido quadrangulárico J-M (**11, 18, 19, 13**), quadrangularato de metila B, C, O, P (**24, 25, 27, 41**), ácido 24-epiquadrangulárico M, G, L (**12, 16, 20**), ácido trisnorquadrangulárico A (**22**), ácido

norquadrangularárico C (**43**), 24-epiquadrangularato de metila C (**26**), quadrangularol A (**30**), ácido 7-hidroxi 23-desoxojessico (**21**), ácido 1-*O*-acetil-23-desoxojessico (**35**), Ácido 4 $\beta$ , 14 $\alpha$ -dimetil-5 $\alpha$ -ergosta-9 $\beta$ ,19-ciclo-24(31)-en-3 $\beta$ -hidroxi-4 $\alpha$ -carboxílico (**36**) (BANSKOTA et al., 2000a).

Em um estudo realizado por Toume et al. (2011) foi investigada a atividade inibidora da resistência a TRAIL (ligante indutor de apoptose relacionado ao fator de necrose tumoral - TNF) por meio de uma triagem dos compostos obtidos a partir do extrato metanólico das folhas de *C. quadrangulare*. Nesta triagem, dezessete compostos foram identificados e avaliados, sendo destes, nove triterpenoides com esqueleto cicloartano, as combretanonas A-G (**46**, **47**, **52**, **48**, **49**, **50** e **53**) e os ácidos combréticos A e B (**54** e **51**). Os compostos combretanona G (**48**) e ácido combrético B (**51**) apresentaram um aumento da expressão de DR5, desencadeando não apenas a apoptose em células sensíveis a TRAIL, como também proporcionou a ativação de vias de sobrevivência em células tumorais que resistem à indução de morte celular por exposição ao TRAIL.

O ácido jéssico (**38**) e o 3-oxo-cicloart-1,11,24-trien-23,21-olideo (**55**) foram identificados nas espécies *C. eleagnoides* e *C. erythrophyllum*, respectivamente (BANSKOTA et al., 2000; ROGERS, 1998). Estudo com o extrato de diclorometano das folhas de *C. leprosum* possibilitou o isolamento de dois triterpenoides, o 4 $\alpha$ -carboxi-3 $\beta$ , 16 $\alpha$ -dihidroxicicloart-24-eno (**44**) e 4 $\alpha$ -carboxi-1 $\alpha$ ,3 $\beta$ -dihidroxi-25-hidroperoxi-*trans*-ciclo-23(24)-eno (**45**) (FACUNDO et al., 2008). Em investigação fitoquímica da espécie *Markhamia lutea*, o qual resultou no isolamento de seis novos triterpenoides, um deles, o 4 $\alpha$ -carboxi-1 $\alpha$ ,3 $\beta$ -dihidroxi-25-hidroperoxi-*trans*-ciclo-23(24)-eno (**45**) ou musambina B, apresentou potente atividade antitripanossoma com EC<sub>50</sub> de 1,9  $\mu\text{g ml}^{-1}$ , além de apresentar baixa citotoxicidade, com seu índice de seletividade relativamente bom (SI>25) (LACROIX et al., 2009)

No presente trabalho foi realizada uma revisão bibliográfica dos triterpenoides com esqueleto cicloartano do gênero *Combretum*. O Quadro 3.1 apresenta o nome e as espécies das quais foram isolados os triterpenoides de *Combretum* e a Figura 3.3 apresenta as fórmulas estruturais dos respectivos compostos.

Quadro 3.1 – Triterpenoides com esqueleto cicloartano isolados no gênero *Combretum*

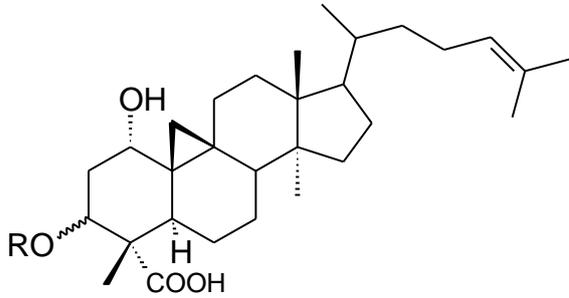
No	Nome do composto	Fonte botânica	Referência
	<b>Triterpenoide com esqueleto cicloartano</b>		
1	ácido mólico	<i>C. molle</i> <i>C. petrophilum</i> <i>C. leprosum</i> <i>C. moggi</i> <i>C. collinum</i> <i>C. edwardsii</i> <i>C. quadrangulare</i>	PEGEL e ROGERS, 1985 ROGERS e COOMBES, 2001 FACUNDO et al., 1993 ROGERS e COOMBES, 1999 ROGERS e COOMBES, 1999 ROGERS e COOMBES, 1999 ROGERS e COOMBES, 2001
2	ácido mólico 3 $\beta$ -D-glicosídeo	<i>C. molle</i> <i>C. petrophilum</i> <i>C. collinum</i> <i>C. edwardsii</i>	PEGEL e ROGERS, 1985 ROGERS e COOMBES, 2001 ROGERS e COOMBES, 1999 ROGERS, 1989
3	ácido mólico 3 $\alpha$ -L-arabinóico	<i>C. molle</i> <i>C. petrophilum</i> <i>C. edwardsii</i>	PEGEL e ROGERS, 1985 ROGERS e COOMBES, 2001 ROGERS, 1989
4	ácido mólico 3 $\beta$ -D-xilósido	<i>C. molle</i> <i>C. petrophilum</i> <i>C. collinum</i> <i>C. edwardsii</i>	PEGEL e ROGERS, 1985 ROGERS e COOMBES, 2001 ROGERS e COOMBES, 1999 ROGERS, 1989

5	ácido mólico 3 $\beta$ -D-4-O-acetilxilopiranosideo	<i>C. collinum</i>	ROGERS e COOMBES, 1999
6	ácido 1 $\alpha$ ,3 $\beta$ dihidroxi-cicloart-24-eno-30-carboxílico	<i>C. quadrangulare</i>	GANZERA et al., 1998
7	éster metílico do ácido 1 $\alpha$ ,3 $\beta$ dihidroxi-cicloart-24-eno-30-carboxílico	<i>C. quadrangulare</i>	GANZERA et al., 1998
8	combretina A	<i>C. fragrans</i>	DAWE et al., 2016
9	combretina B	<i>C. fragrans</i>	DAWE et al., 2016
10	ácido quadrangulárico F	<i>C. quadrangulare</i>	BANSKOTA et al., 2000a
11	ácido quadrangulárico J	<i>C. quadrangulare</i>	BANSKOTA et al., 2000a
12	ácido 24-epiquadrangulárico G	<i>C. quadrangulare</i>	BANSKOTA et al., 2000a
13	ácido quadrangulárico M	<i>C. quadrangulare</i>	BANSKOTA et al., 2000a
14	ácido quadrangulárico G	<i>C. quadrangulare</i>	BANSKOTA et al., 2000a
15	quadrangularato de metila I	<i>C. quadrangulare</i>	BANSKOTA et al., 2000a
16	ácido 24-epiquadrangulárico M	<i>C. quadrangulare</i>	BANSKOTA et al., 2000a
17	ácido quadrangulárico H	<i>C. quadrangulare</i>	BANSKOTA et al., 2000a
18	ácido quadrangulárico K	<i>C. quadrangulare</i>	BANSKOTA et al., 2000a
19	ácido quadrangulárico L	<i>C. quadrangulare</i>	BANSKOTA et al., 2000a
20	ácido 24-epiquadrangulárico L	<i>C. quadrangulare</i>	BANSKOTA et al., 2000a
21	ácido 7-hidroxi 23-desoxojessico	<i>C. quadrangulare</i>	BANSKOTA et al., 2000a
22	ácido trisnorquadrangulárico A	<i>C. quadrangulare</i>	BANSKOTA et al., 2000a
23	quadrangularato de metila A	<i>C. quadrangulare</i>	BANSKOTA et al., 2000b
24	quadrangularato de metila B	<i>C. quadrangulare</i>	BANSKOTA et al., 2000b
25	quadrangularato de metila C	<i>C. quadrangulare</i>	BANSKOTA et al., 2000b

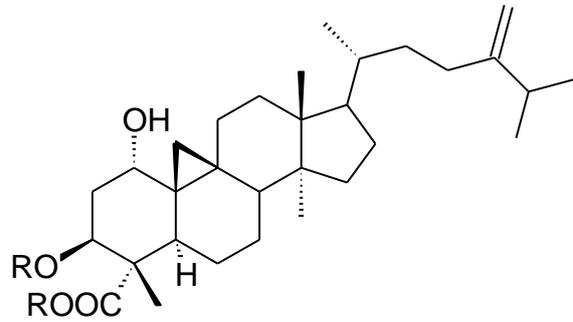
26	24-epiquadrangularato de metila C	<i>C. quadrangulare</i>	BANSKOTA et al., 2000b
27	quadrangularato de metila O	<i>C. quadrangulare</i>	BANSKOTA et al., 2000b
28	1 $\alpha$ ,11 $\alpha$ -Óxido-jessato de metila	<i>C. elaeagnoides</i>	OSBORNE e PEGEL, 1985
29	quadrangularato de metila D	<i>C. quadrangulare</i>	BANSKOTA et al., 2000b
30	quadrangularol A	<i>C. quadrangulare</i>	BANSKOTA et al., 2000b
31	quadrangularato de metila N	<i>C. quadrangulare</i>	BANSKOTA et al., 2000b
32	quadrangularol B	<i>C. quadrangulare</i>	BANSKOTA et al., 2000b
33	ácido quadrangulárico E	<i>C. quadrangulare</i>	BANSKOTA et al., 2000b
34	ácido 23-desoxojessico	<i>C. quadrangulare</i>	BANSKOTA et al., 2000b
35	ácido 1-O-acetil-23-desoxojessico	<i>C. quadrangulare</i>	BANSKOTA et al., 2000b
36	ácido 4 $\beta$ ,14 $\alpha$ -dimetil-5 $\alpha$ -ergosta-9 $\beta$ ,19-ciclo-24(31)-en-3 $\beta$ -hidroxi-4 $\alpha$ -carboxílico	<i>C. quadrangulare</i>	BANSKOTA et al., 2000b
37	23-desoxojessato de metila	<i>C. quadrangulare</i>	BANSKOTA et al., 2000b
38	ácido jéssico	<i>C. elaeagnoides</i>	OSBONE e PEGEL et al., 1984
39	ácido jessico 3 $\alpha$ -L-arabinopiranosideo	<i>C. elaeagnoides</i>	OSBONE e PEGEL et al., 1984
40	jessato de metila	<i>C. elaeagnoides</i>	OSBONE e PEGEL et al., 1984
41	quadrangularato de metila P	<i>C. quadrangulare</i>	BANSKOTA et al., 2000b
42	ácido norquadrangulárico B	<i>C. quadrangulare</i>	BANSKOTA et al., 2000b
43	ácido norquadrangulárico C	<i>C. quadrangulare</i>	BANSKOTA et al., 2000b
44	4 $\alpha$ -carboxi-3 $\beta$ ,16 $\alpha$ -dihidroxicicloart-24-eno	<i>C. leprosum</i>	FACUNDO et al., 2008
45	4 $\alpha$ -carboxi-1 $\alpha$ ,3 $\beta$ -dihidroxi-25-hidroperoxi- <i>trans</i> -ciclo-23(24)-eno	<i>C. leprosum</i>	FACUNDO et al., 2008

46	combretanona A	<i>C. quadrangulare</i>	TOUME et al., 2011
47	combretanona B	<i>C. quadrangulare</i>	TOUME et al., 2011
48	combretanona D	<i>C. quadrangulare</i>	TOUME et al., 2011
49	combretanona E	<i>C. quadrangulare</i>	TOUME et al., 2011
50	combretanona F	<i>C. quadrangulare</i>	TOUME et al., 2011
51	ácido combrético B	<i>C. quadrangulare</i>	TOUME et al., 2011
52	combretanona C	<i>C. quadrangulare</i>	TOUME et al., 2011
53	combretanona G	<i>C. quadrangulare</i>	TOUME et al., 2011
54	ácido combrético A	<i>C. quadrangulare</i>	TOUME et al., 2011
55	3-oxo-cicloart-1,11,24-trien-23,21-olideo	<i>C. erythrophyllum</i>	ROGERS, 1998
56	3-oxo-cycloart-1,11,25(26)-trien-24(R), 21-olideo	<i>C. erythrophyllum</i>	ROGERS, 1998
57	Ácido 24(R/S)-hidroxi-3-oxo-cicloart-1,11,25(26)- trien-21-oico	<i>C. erythrophyllum</i>	ROGERS, 1998
58	ácido eritrofilico	<i>C. erythrophyllum</i>	ROGERS, 1998
59	21-acetoxi-3-oxo-cicloart-1,11,24-trieno	<i>C. erythrophyllum</i>	ROGERS, 1998
60	ácido 12 $\beta$ -hidroxi-3-oxo-cicloart-1,24-dien-21-oico	<i>C. erythrophyllum</i>	ROGERS, 1998
61	ácido 12 $\beta$ , 24 (S)-dihydroxy-3-oxo-cycloart-1,25(26)-diene-21-oico	<i>C. erythrophyllum</i>	ROGERS, 1998

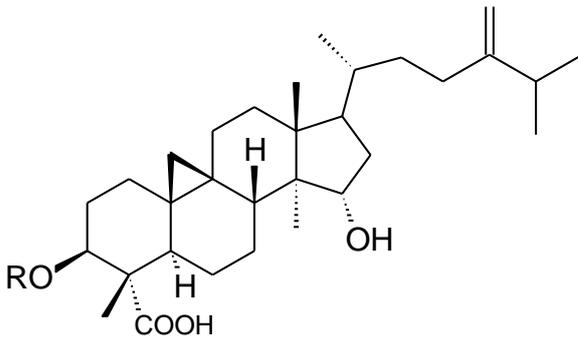
Figura 3.3 – Fórmulas estruturais dos triterpenoides com esqueleto cicloartano isolados em espécies do gênero *Combretum*



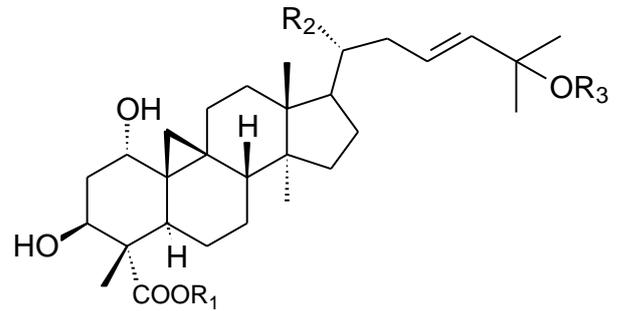
- 1: R = H  
 2: R = 3 $\beta$ -D-Glc  
 3: R = 3 $\alpha$ -L-Ara  
 4: R = 3 $\beta$ -D-Xil  
 5: R = 3 $\beta$ -D-4-Acetilxil



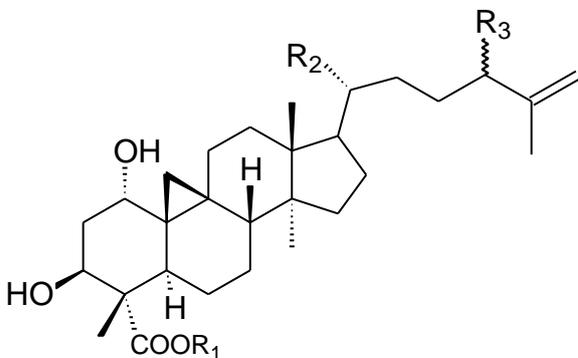
- 6: R = H  
 7: R = CH<sub>3</sub>



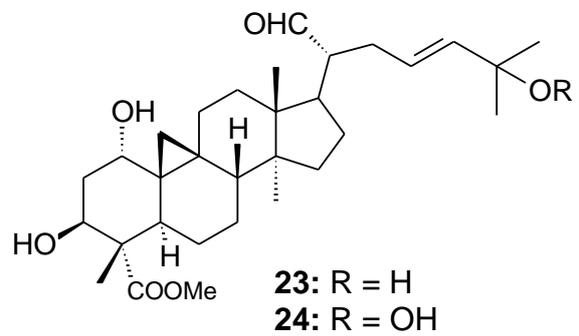
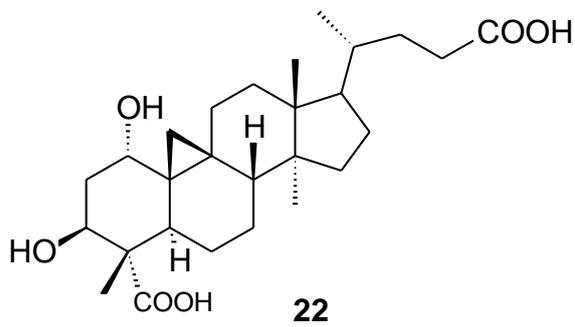
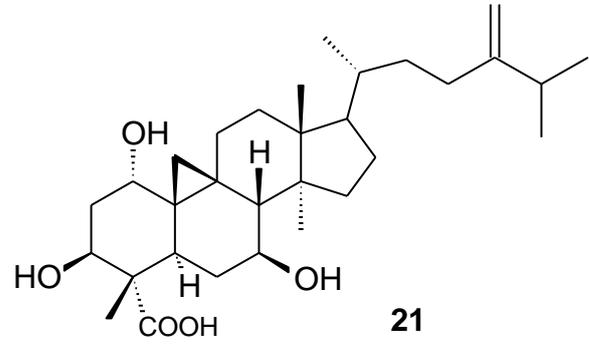
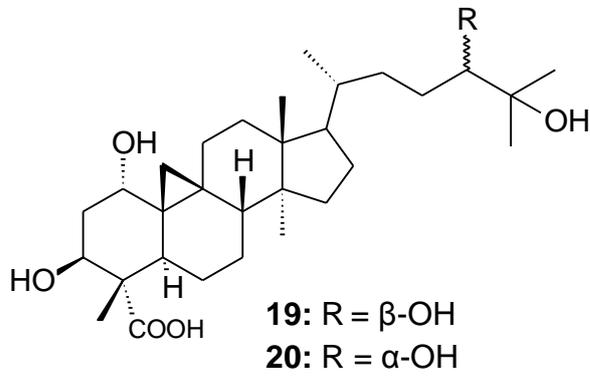
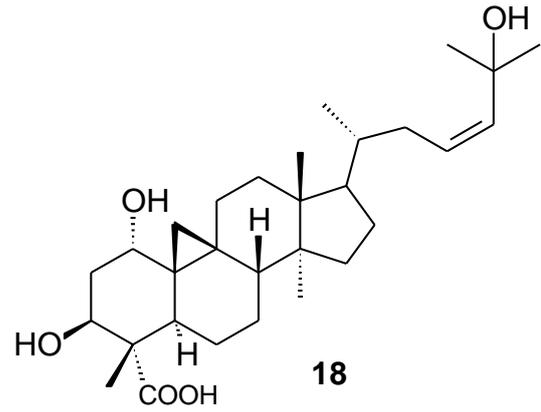
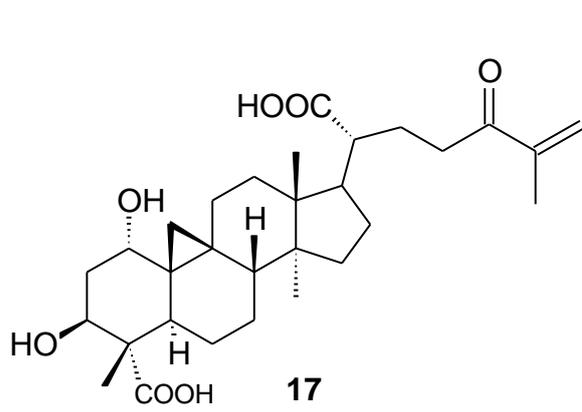
- 8: R = H  
 9: R =  $\beta$ -D-Xil

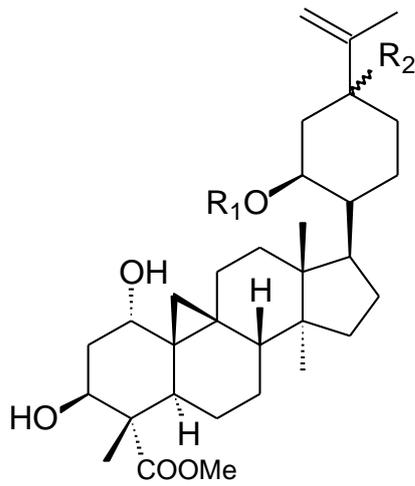


- 10: R<sub>1</sub> = CH<sub>3</sub>, R<sub>2</sub> = COOH, R<sub>3</sub> = OH  
 11: R<sub>1</sub> = H, R<sub>2</sub> = R<sub>3</sub> = CH<sub>3</sub>



- 12: R<sub>1</sub> = CH<sub>3</sub>, R<sub>2</sub> = COOH, R<sub>3</sub> =  $\beta$ -OH  
 13: R<sub>1</sub> = H, R<sub>2</sub> = CH<sub>3</sub>, R<sub>3</sub> =  $\beta$ -OH  
 14: R<sub>1</sub> = CH<sub>3</sub>, R<sub>2</sub> = COOH, R<sub>3</sub> =  $\alpha$ -OH  
 15: R<sub>1</sub> = CH<sub>3</sub>, R<sub>2</sub> = CH<sub>2</sub>OH, R<sub>3</sub> =  $\alpha$ -OH  
 16: R<sub>1</sub> = H, R<sub>2</sub> = CH<sub>3</sub>, R<sub>3</sub> =  $\alpha$ -OH

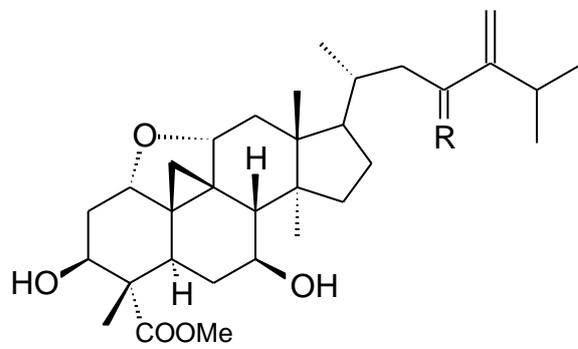




**25:**  $R_1 = \text{CH}_3$ ,  $R_2 = \beta\text{-OH}$

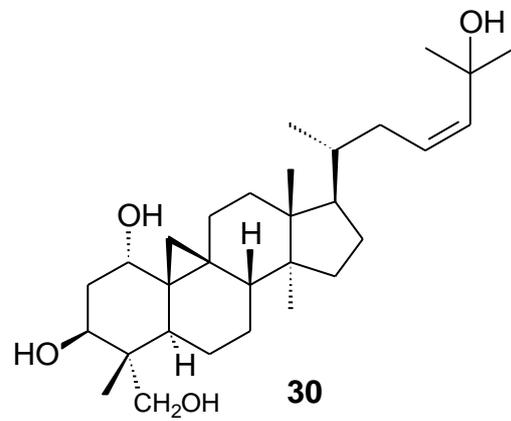
**26:**  $R_1 = \text{CH}_3$ ,  $R_2 = \alpha\text{-OH}$

**27:**  $R_1 = \text{H}$ ,  $R_2 = \beta\text{-OH}$

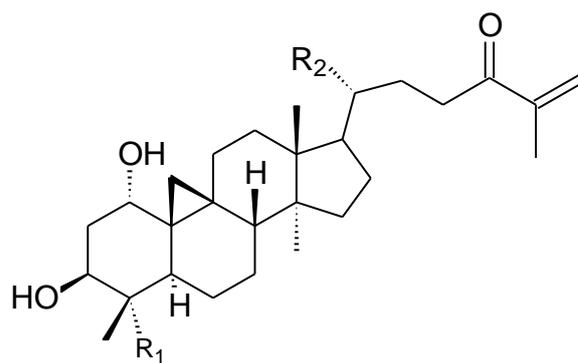


**28:**  $R = \text{O}$

**29:**  $R = \text{H}_2$

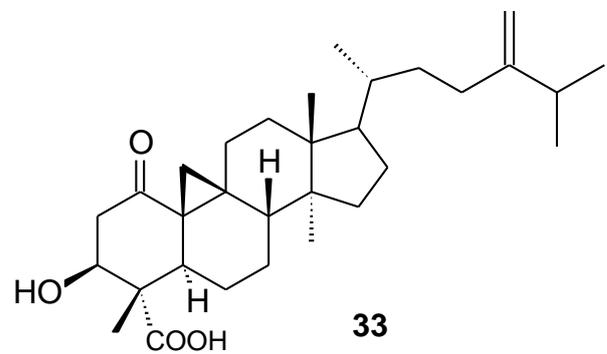


**30**

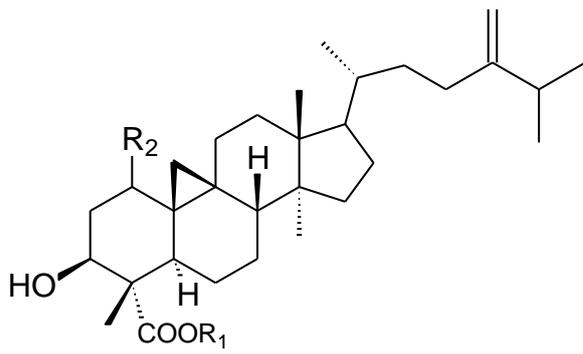


**31:**  $R_1 = \text{COOMe}$ ,  $R_2 = \text{CHO}$

**32:**  $R_1 = \text{CH}_2\text{OH}$ ,  $R_2 = \text{CH}_3$



**33**

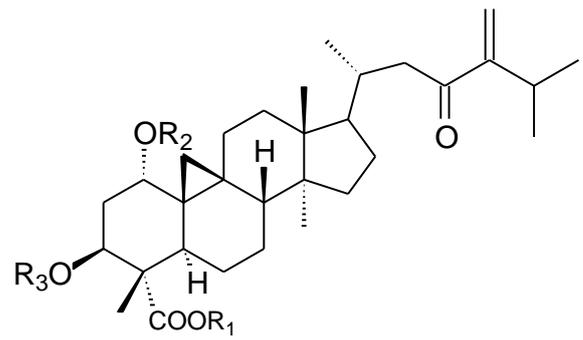


**34:**  $R_1 = R_2 = H$ ,  $R_2 = \alpha\text{-OH}$

**35:**  $R_1 = H$ ,  $R_2 = \alpha\text{-OAc}$

**36:**  $R_1 = R_2 = H$

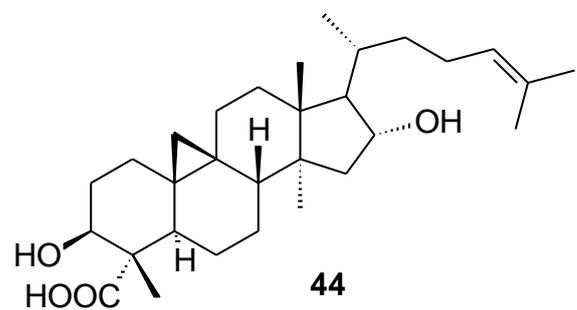
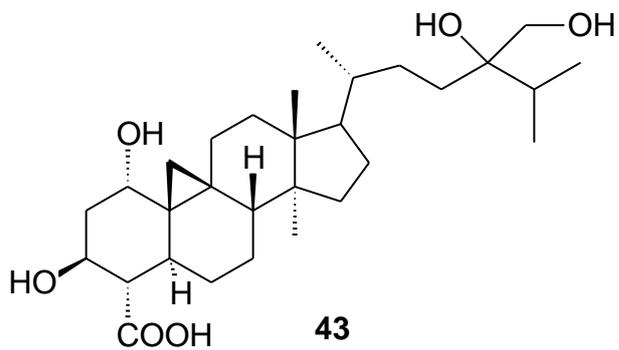
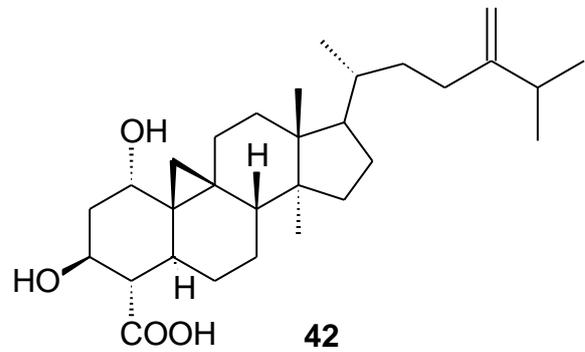
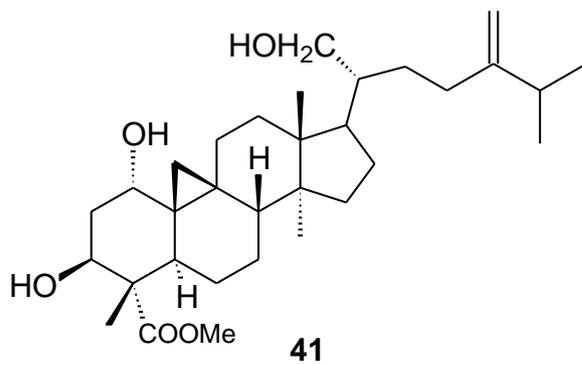
**37:**  $R_1 = \text{CH}_3$ ,  $R_2 = \alpha\text{-OH}$

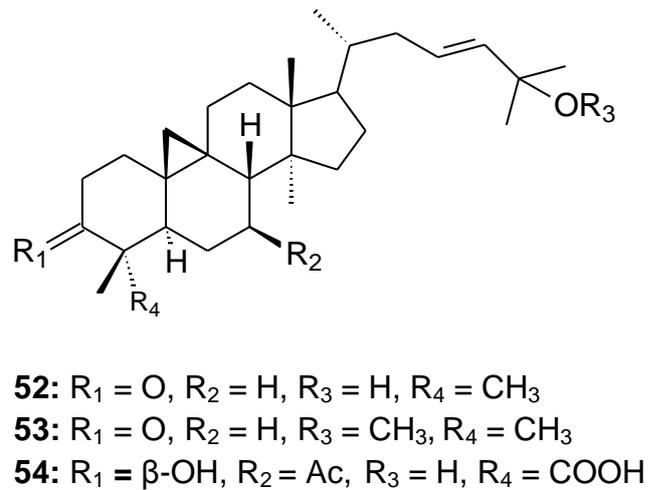
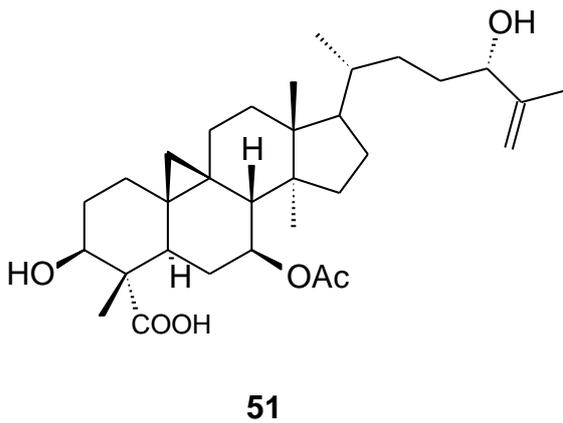
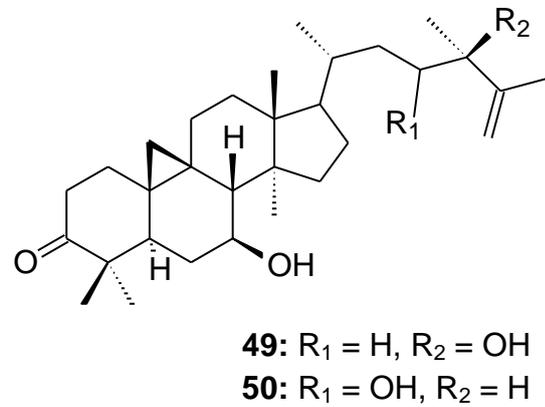
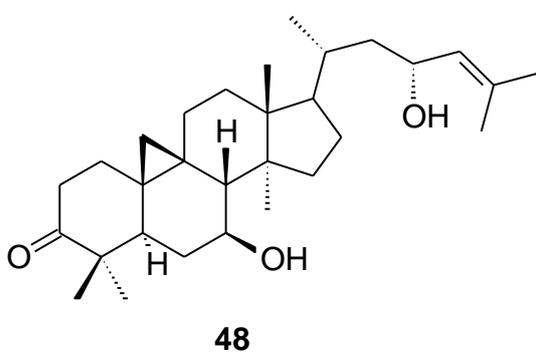
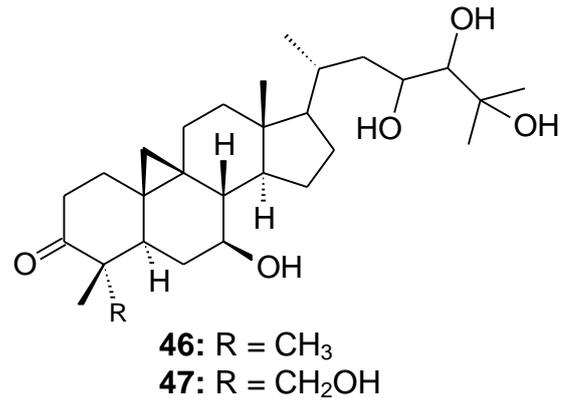
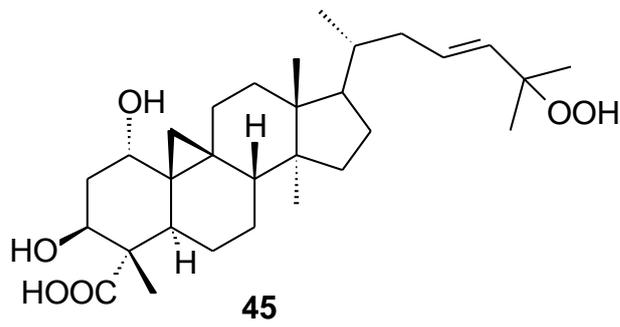


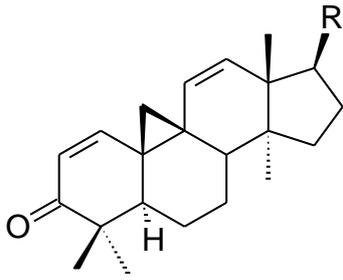
**38:**  $R_1 = R_2 = R_3 = H$

**39:**  $R_1 = R_2 = H$ ,  $R_3 = 3\alpha\text{-L-Ara}$

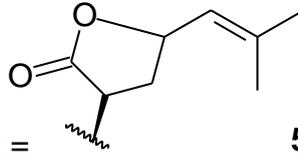
**40:**  $R_1 = \text{CH}_3$ ,  $R_2 = R_3 = H$



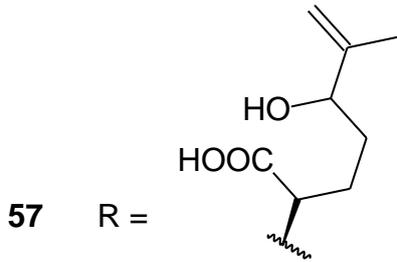
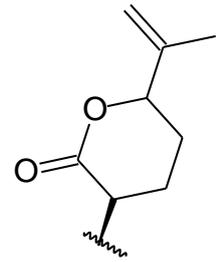




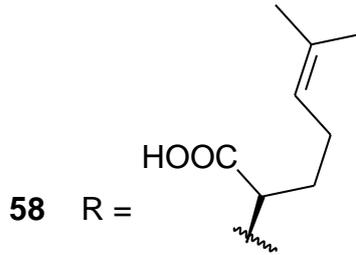
55 R =



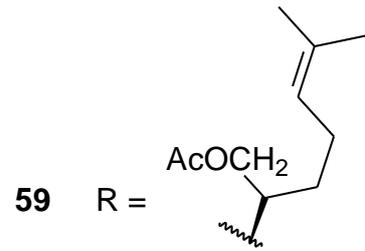
56 R =



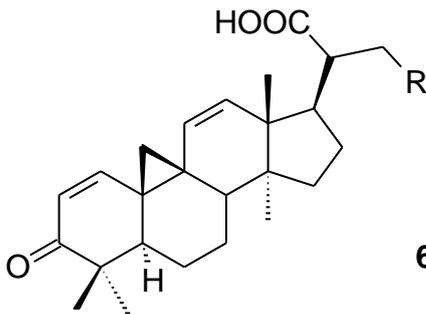
57 R =



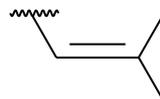
58 R =



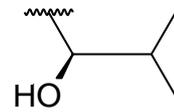
59 R =



60 R =



61 R =



### 3.5 *Combretum mellifluum*

A espécie *Combretum mellifluum* (Figura 3.4), conhecida vulgarmente como cipó, cipó vermelho e sipaúba é um arbusto não endêmico que ocorre na região Norte (Acre, Pará, Tocantins), Nordeste (Bahia, Ceará, Maranhão, Piauí), Centro-oeste (Goiás, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul) e Sudeste (Minas Gerais) (FORZZA et al., 2010; FARIAS e CASTRO, 2004).

Figura 3.4 – Fotos da espécie *Combretum mellifluum* Eichler

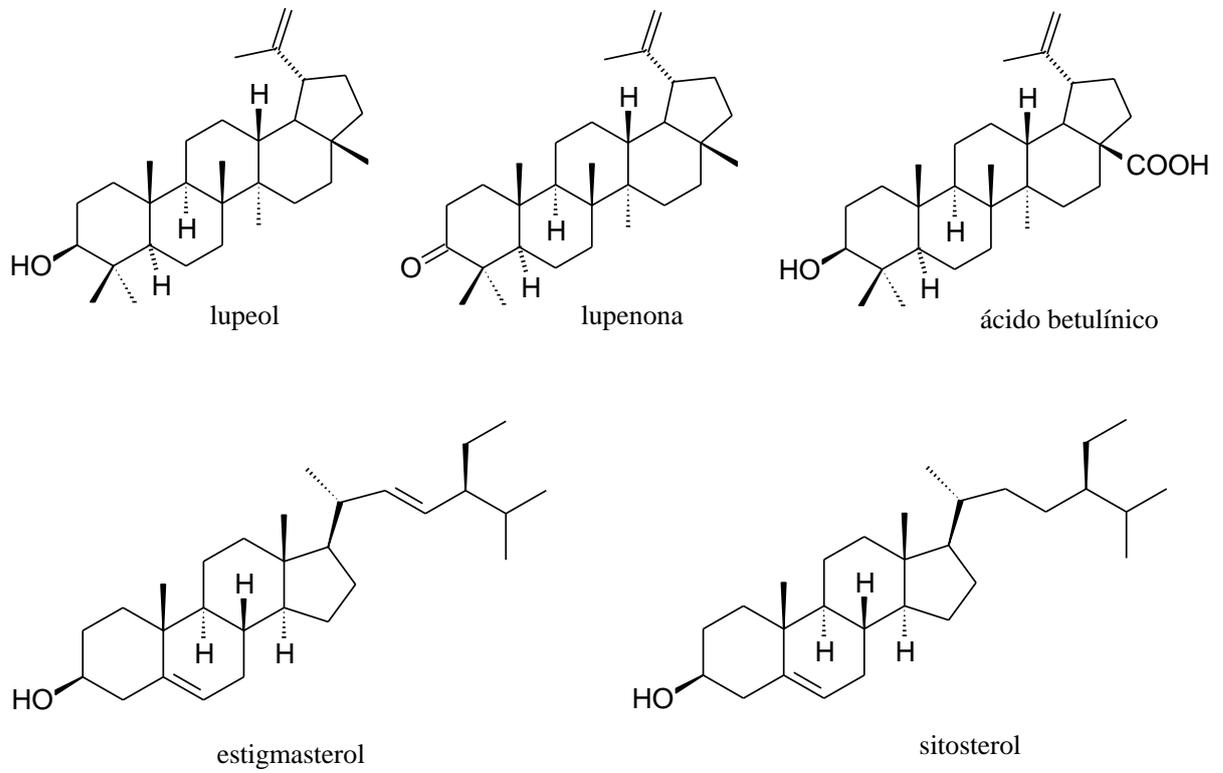


Fonte: Ruth R. S. Farias.

Segundo artigo publicado por Nascimento e Conceição (2011) que aborda o levantamento etnobotânico de plantas medicinais da comunidade Quilombola Olho D'água do Raposo, localizada no primeiro distrito de Caxias/Maranhão, as folhas da espécie *Combretum mellifluum* possui indicação no tratamento de dores de cabeça, dores no estômago e tosse.

A espécie *Combretum mellifluum* Eichler (Figura 3.4) quando pesquisada em banco de dados de periódicos *online*, tais como: *Science Direct*, *Web of Science*, *Pubmed* e *ScinFider*, bem como em plataformas de patentes como a *European Patente Office* (EPO), *World Intellectual Property Organization* (WIPO), *United States Patent and Trademark Office* (USPTO), *Derwent Innovations Index*® (DII), *Banco Latinoamericano de Patentes* (LATIPAT) e *Instituto Nacional de Propriedade Intelectual* (INPI), foi verificado que não há trabalhos fitoquímicos e farmacológicos publicados referente a esta espécie (FARIAS et al., 2015).

Entretanto, já foi relatado o isolamento de sitosterol, estigmasterol e lupenona do extrato hexânico das raízes, bem como lupeol e ácido betulínico do extrato hexânico dos frutos, conforme demonstrado na Figura 3.5 (ROCHA et al. 2002).

Figura 3.5 – Constituintes químicos das raízes e frutos de *Combretum mellifluum* Eichler

## 4 PARTE EXPERIMENTAL

### 4.1 Reagentes e solventes

Os solventes utilizados na extração, partição, fracionamento em cromatografia em coluna, como etanol, *n*-hexano, acetato de etila e metanol foram de grau analítico (Synth). Na avaliação da atividade antioxidante foram utilizados o reagente Folin-Ciocalteu e piridina (Merck), radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazila (DPPH), rutina (PVP) e cloreto de alumínio (Fluka analytical), ácido acético glacial (Vetec) e carbonato de sódio (Synth). As medidas de absorção molecular foram feitas usando espectrofotômetro UV-Vis Lambda 25 da PerkinElmer.

Os fracionamentos cromatográficos em coluna foram realizados utilizando gel de sílica (0,060–0,200 mm) da Acros Organics, Sephadex LH-20 da Sigma e coluna Stracta (C18, 10 g). As placas para cromatografia em camada delgada (CCD) foram preparadas com gel de sílica da Macherey-Nagel. As placas para CCD foram preparadas por aplicação manual da suspensão de gel de sílica 60 G (Fluka) em água destilada (1:2, m/v) sobre lâminas de vidro (9,5 x 5,9 cm) e ativação a 110 °C por 1h em estufa.

As cromatoplasmas foram reveladas com solução de sulfato cérico preparada a partir de 2,1 g de  $\text{Ce}(\text{SO}_4)_2 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  dissolvido em 15 mL de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  concentrado e adicionado a 800 mL de água destilada. Após serem borrifadas com a solução de sulfato cérico as cromatoplasmas foram aquecidas em placa de aquecimento da Fisaton (509T 0-350 °C) à temperatura de 100 °C por 5 minutos.

### 4.2 Equipamentos

O extrato e as frações foram concentradas em rotoevaporador (Laborota 4000 Heidolph), sob pressão reduzida com auxílio de bomba de vácuo (PRIMAR 34). A secagem do extrato foi feita em liofilizador constituído de Micro Modulyo Edwards acoplado a uma bomba de pressão reduzida a alta performance valPump VLP80 Salvant.

O ultrassom, modelo Cleaner Thournton da Marconi, foi usado para auxiliar na dissolução do extrato e das frações. O extrato e as frações foram armazenados em refrigerador da Brastemp, modelo Zyrium Frostfree 430. As massas das amostras foram obtidas em balanças modelos KN 4000 da Knwaagen (precisão $\pm$ 0,0001 kg) e 210A da Bel Mark (precisão $\pm$ 0,0001 g).

#### 4.2.1 Espectroscopia e Absorção molecular

As medidas de absorção molecular dos ensaios de avaliação do potencial antioxidante e obtenção dos perfis na região do UV-Vis do extrato e frações das folhas de *C. mellifluum* foram realizadas em espectrofotômetro UV-Vis Lambda 25 da PerkinElmer, utilizando cubetas de quartzo e de vidro com 1,0 cm de caminho óptico.

#### 4.2.2 Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

A identificação dos compostos isolados das folhas de *C. mellifluum* foi feita pela análise dos espectros de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) obtidos em espectrômetro Varian INOVA-modelo 400, operando a 400 MHz para o  $^1\text{H}$  e 100 MHz para o  $^{13}\text{C}$ , e espectrômetro Varian INOVA-modelo 600, operando a 600 MHz para o  $^1\text{H}$  e 150 MHz para o  $^{13}\text{C}$ , ambas utilizando-se clorofórmio deuterado ( $\text{CDCl}_3$ ) como solvente e TMS como referência interna.

#### 4.2.3 Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa (CG-EM)

A análise de CG-EM foi realizada em cromatógrafo GC-2010 Plus/QP2010 SE da Shimadzu equipado com coluna capilar SLB<sup>TM</sup>-5ms (Supelco, 30 m x 0,25 mm x 0,25  $\mu\text{m}$ ) e hélio como de gás de arraste. O espectrômetro de massas utilizado foi com ionização por elétrons a 70 eV, analisador quadrupolar, operando na faixa de 40 a 680 Da com injeção de 1,0  $\mu\text{L}$  de cada amostra.

#### 4.2.4 Espectrometria de massas de massas de alta resolução (EMAR)

Os espectros de massas de alta resolução foram adquiridos em um espectrômetro de massas microTOF-QII (Bruker) com fonte de ionização eletrospray no modo positivo ESI (+). As amostras foram solubilizadas em MeOH/Tolueno (4:1, v/v).

### 4.3 Material vegetal

As folhas da espécie *Combretum mellifluum* Eichler foram coletadas em fevereiro de 2012, no município de Campo Maior- PI, nas seguintes coordenadas geográficas: S 04° 46' 08,8'' e W 42° 17' 45,6'', altitude 90 m. A espécie foi identificada e a exsicata depositadas no Herbário Graziela Barroso da Universidade Federal do Piauí-UFPI, Teresina, Piauí, Brasil, com o número TEPB 28192. A identificação das espécies foi realizada pela taxonomista Maria Iracema Bezerra Loiola da Universidade Federal do Ceará- UFC.

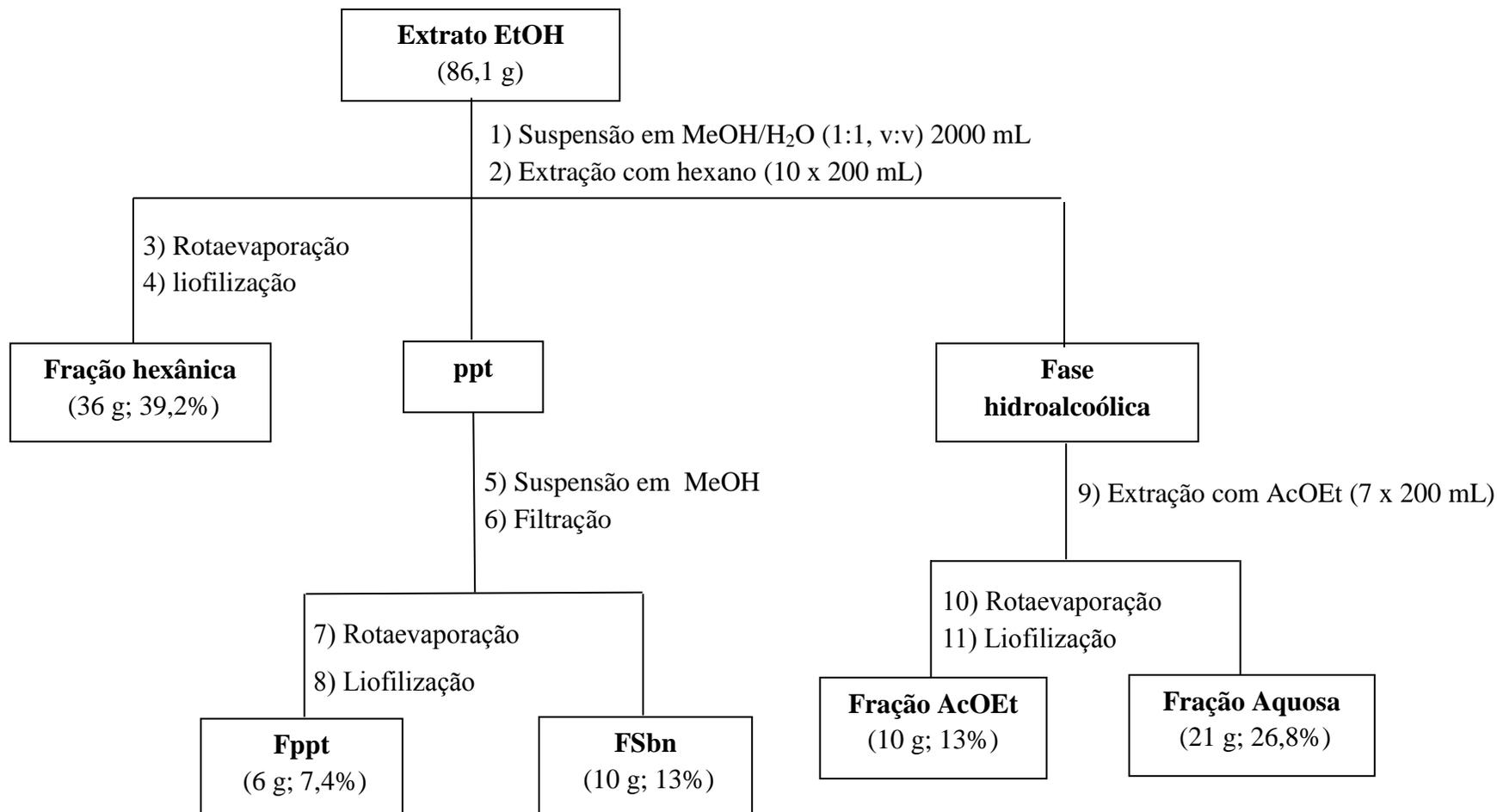
### 4.4 Preparação dos extratos e extração líquido-líquido

As folhas de *C. mellifluum* foram moídas (1164 g) e submetidas à extração exaustiva por maceração com etanol 99,5%. O extrato etanólico (86,1 g) foi suspenso em 2 L de MeOH/H<sub>2</sub>O (1:1, v:v) e submetido a extração líquido-líquido utilizando hexano (10 x 200 mL), após a extração, o solvente foi removido em evaporador rotativo resultando na fração hexânica (35,8g; 39,2%). Na etapa de extração com hexano houve formação de um precipitado (Fppt) o qual foi suspenso em MeOH e filtrado fornecendo o precipitado (Fppt) (5,7 g; 7,4%) e o sobrenadante (FSbn) (10,1 g; 13,1 %).

A fração hidroalcoólica, após extração com hexano, foi submetida à extração com acetato de etila (7 x 200 mL) resultando, após remoção do solvente e liofilização, nas frações acetato de etila (10 g; 13%) e aquosa (20,7 g; 26,8%). As frações obtidas da extração líquido-líquido (esquema 4.1) foram armazenadas sob refrigeração.

### 4.5 Cromatografia em camada delgada comparativa (CCDC) dos extratos e frações

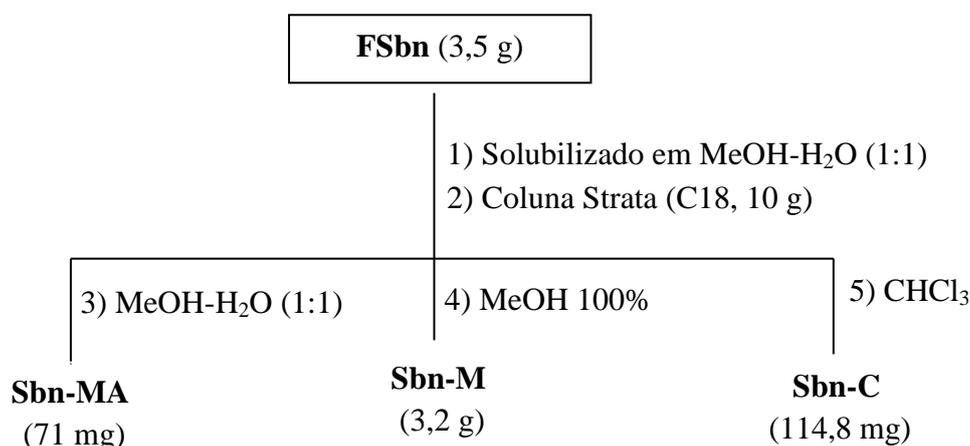
Os extratos e frações das folhas de *C. mellifluum* foram dissolvidos em MeOH (10 mg mL<sup>-1</sup>) e analisados por CCDC. Alíquotas de 50 µL das soluções foram aplicadas nas placas cromatográficas e as substâncias eluídas em três sistemas de solventes: hexano/AcOEt (8:2), CHCl<sub>3</sub>/MeOH (9:1) e CHCl<sub>3</sub>/MeOH/H<sub>2</sub>O (65:30:5). A revelação das cromatoplasmas foi feita por pulverização com solução de sulfato cérico.

Esquema 4.1 – Extração líquido-líquido do extrato etanólico das folhas de *Combretum mellifluum*

#### 4.6 Fracionamento cromatográfico da fração sobrenadante (FSbn)

O sobrenadante obtido a partir da lavagem do precipitado formado durante a extração líquido-líquido com hexano foi dividido em sete alíquotas de 500 mg. Todas as sete alíquotas foram solubilizadas MeOH-H<sub>2</sub>O (1:1) e aplicadas em coluna Stracta (C18, 10 g), previamente equilibrada com MeOH-H<sub>2</sub>O (1:1), e eluída com MeOH-H<sub>2</sub>O (1:1), MeOH, e CHCl<sub>3</sub> obtendo Sbn-MA, Sbn-M e Sbn-C, respectivamente, conforme o esquema 4.2. A análise destas frações por CCD utilizando CHCl<sub>3</sub>/MeOH/H<sub>2</sub>O (65:30:5) mostrou manchas amarelas na fração Sbn-MA e manchas roxas na fração Sbn-M.

Esquema 4.2 – Fracionamento cromatográfico da fração sobrenadante (FSbn) em coluna C18 das folhas de *Combretum mellifluum*



##### 4.6.1 Fracionamento cromatográfico da fração Sbn-M em coluna gel de sílica

A fração Sbn-M (3,2 g) eluída em MeOH foi fracionada por cromatografia em coluna de gel de sílica (2,9 x 45 cm, 96 g), utilizando como eluente a mistura dos solventes CHCl<sub>3</sub>, CHCl<sub>3</sub>/MeOH e MeOH no modo gradiente de polaridade crescente, fornecendo 40 frações de 109 mL. Após remoção do solvente orgânico em evaporador rotativo e análise por CCDC, as frações foram reunidas em 10 grupos, de acordo com as cores observadas nas cromatoplasmas (reveladas com solução de sulfato cérico) e com os fatores de retenção (Tabela 4.1).

Tabela 4.1 – Frações obtidas e reunidas no fracionamento em gel de sílica da fração Sbn-M das folhas de *C. mellifluumm*

<b>Grupo</b>	<b>Frações reunidas</b>	<b>Eluente</b>	<b>Massa (mg)</b>	<b>Compostos Identificados</b>
S2	S2-3	CHCl <sub>3</sub> (100%)	20,3 mg	
S4	S4-6	CHCl <sub>3</sub> (100%)	88,6 mg	
S10	S10-11	CHCl <sub>3</sub> /MeOH (2,5%)	142,3 mg	<b>1</b>
S12	S12-13	CHCl <sub>3</sub> /MeOH (2,5%)	321,1 mg	<b>2a+2b/ 3a+3b</b>
S14	S14-16	CHCl <sub>3</sub> /MeOH (2,5%)	60,4 mg	<b>2a+2b</b>
S17	S17-18	CHCl <sub>3</sub> /MeOH (10%)	201,8 mg	
S19	S19-21	CHCl <sub>3</sub> /MeOH (10%)	957,3 mg	
S22	S22-25	CHCl <sub>3</sub> /MeOH (15%)	198,2 mg	
S28	S28-29	CHCl <sub>3</sub> /MeOH (20%)	191,1 mg	
S30	S30-40	CHCl <sub>3</sub> /MeOH (50%)	383,5 mg	
			Total = 2,6 g	

#### 4.6.1.1 Fracionamento do Grupo S10

O grupo S10 (frações 10-11; 142,3 mg) ao ser analisado por CCD, usando CHCl<sub>3</sub>/MeOH (9:1) como eluente e solução de sulfato cérico como revelador, apresentou mancha de coloração rosa e roxa porém com impurezas. Uma alíquota de 142,3 mg foi então submetida à cromatografia em coluna de Sephadex LH-20 utilizando como eluente hexano-CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (1:4), fornecendo 27 frações, as quais foram reunidas em 5 subgrupos (Tabela 4.2). Após análise por CCDC, usando como eluente CHCl<sub>3</sub>/MeOH (95:5) e revelador solução de sulfato cérico, o subgrupo S10-15 (40,9 mg) apresentou manchas de coloração rosa.

Tabela 4.2 – Agrupamento das frações provenientes do fracionamento em coluna de Sephadex LH-20 do grupo S10

Subgrupo	Frações recolhidas	Massa (mg)
S10-1	1-3	5,9
S10-4	4-9	10,6
S10-10	10-14	16,9
S10-15	15-20	40,9
S10-21	21-27	11,4

O subgrupo S10-15 (40,9 mg) foi então submetido à cromatografia em coluna de gel de sílica (1,7 x 14 cm), utilizando como eluente a mistura dos solventes hexano e AcOEt em ordem crescente de polaridade, fornecendo 40 frações e após a análise por CCDC foram reunidas em 5 subfrações, de acordo com as cores observadas nas cromatoplasmas (reveladas com solução de sulfato cérico).

Tabela 4.3 – Frações obtidas no fracionamento cromatográfico em coluna de gel de sílica da do subgrupo S10-15

Subgrupo	Frações recolhidas	Massa (mg)
S10-15-1	1-8	2,8
S10-15-9	9-29	6,4
S10-15-30	30-33	8,5
S10-15-34	34-36	18,4
S10-15-37	37-40	3,0

A subfração S10-15-30 (8,5 mg; sólido branco), foi analisado por CCDC usando hexano/AcOEt (7:3) como eluente e solução de sulfato cérico como revelador e originou uma única mancha de cor rósea. A análise desta subfração por RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ , incluindo experimentos 2D, e comparação com dados relatados na literatura revelou que se tratava do composto **1**. O resumo do fracionamento para obtenção do composto **1** é apresentado no Esquema 4.3.

#### 4.6.1.2 Fracionamento do Grupo S12

O grupo S12 (frações 12-13; 321,1 mg) ao ser analisado por CCD, usando  $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$  (9:1) como eluente e solução de sulfato cérico como revelador, apresentou mancha de coloração púrpura porém com impurezas. Uma alíquota de 187,4 mg foi então submetida à cromatografia em coluna de Sephadex LH-20 utilizando como eluente hexano- $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (1:4), fornecendo 47 frações, as quais foram reunidas em 6 subgrupos (Tabela 4.4).

Tabela 4.4 – Agrupamento das frações provenientes do fracionamento em coluna de Sephadex LH-20 do grupo S12

Subgrupo	Frações recolhidas	Massa (mg)
S12-1	1-4	11,3
S12-5	5-18	50,4
S12-19	19-27	30,9
S12-28	28-36	26,6
S12-37	37-43	24,5
S12-44	44-47	1,4

O subgrupo S12-19 (30,9 mg) foi então submetido à cromatografia em coluna de Sephadex LH-20 utilizando como eluente hexano- $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (1:4), fornecendo 30 frações e após a análise por CCDC foram reunidas em 3 subfrações, de acordo com as cores observadas nas cromatoplacas (reveladas com solução de sulfato cérico).

Tabela 4.5 – Frações obtidas no fracionamento cromatográfico em coluna de gel de sílica da do subgrupo FH12-19

Subgrupo	Frações recolhidas	Massa (mg)
FH12-19-1	1-5	2,1
FH12-19-6	6-11	17,5
FH12-19-12	12-27	10,1

A subfração S12-19-6 (17,5 mg), foi analisada por CCDC usando  $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$  (9:1) como eluente e solução de sulfato cérico como revelador e originou uma única mancha de cor púrpura. A análise desta subfração por RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ , incluindo experimentos 2D, e comparação com dados relatados na literatura revelou que se tratava dos compostos **2a+2b/3a+3b**. O resumo do fracionamento para obtenção destes compostos foi apresentado no Esquema 4.3.

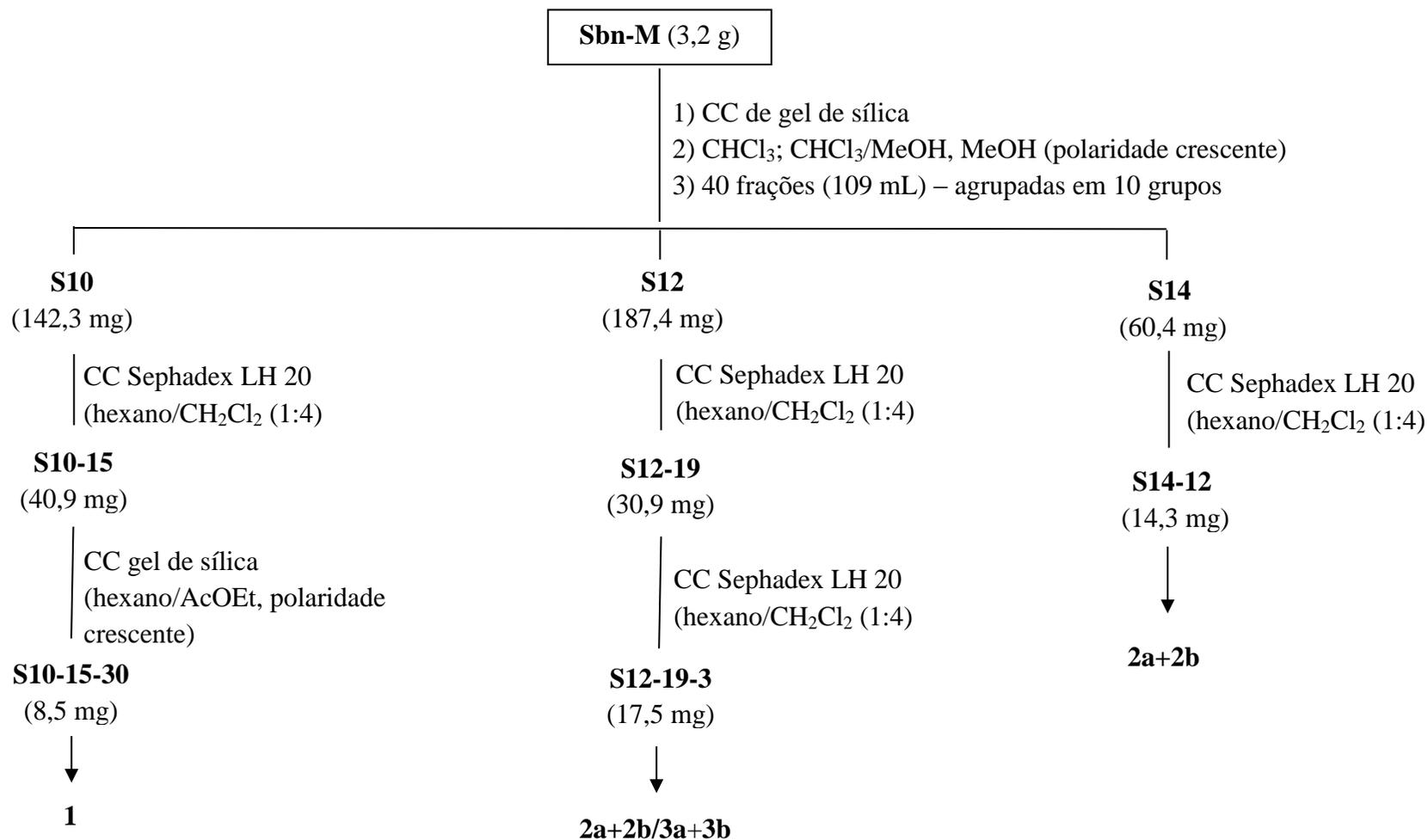
#### 4.6.1.3 Fracionamento do Grupo S14

O grupo S14 (frações 10-11; 60,4 mg) ao ser analisado por CCD, usando  $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$  (9:1) como eluente e solução de sulfato cérico como revelador, apresentou mancha de coloração roxa porém com impurezas. Uma alíquota de 60,4 mg foi então submetida à cromatografia em coluna de Sephadex LH-20 utilizando como eluente hexano- $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (1:4), fornecendo 33 frações, as quais foram reunidas em 6 subgrupos (Tabela 4.6).

Tabela 4.6 – Agrupamento das frações provenientes do fracionamento em coluna de Sephadex LH-20 do grupo S14

Subgrupo	Frações recolhidas	Massa (mg)
S14-1	1	2,3
S14-2	2-6	7,2
S14-7	7-11	13,2
S14-12	12-16	16,4
S14-17	17-21	6,4
S14-22	22-33	11,8

A subfração S14-12 (16,4 mg), foi analisado por CCDC usando  $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$  (9:1) como eluente e solução de sulfato cérico como revelador e originou uma única mancha de coloração roxo escuro. A análise desta subfração por RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ , incluindo experimentos 2D revelou que se tratava dos compostos **2a+2b**. O resumo do fracionamento para obtenção dos compostos **2a+2b** é apresentado no Esquema 4.3.

Esquema 4.3 – Fracionamento cromatográfico da fração Sbn-M das folhas de *Combretum mellifluum*

#### 4.7 Fracionamento cromatográfico da fração hexânica (FHex) das folhas de *C. mellifluum*

A fração hexânica (10 g) proveniente da partição do extrato etanólico das folhas de *C. mellifluum*, foi submetida ao fracionamento cromatográfico em coluna de gel de sílica (4,7 x 35 cm, 300 g). Utilizou-se como eluentes: hexano, hexano/AcOEt e MeOH no modo gradiente de polaridade crescente. Foram coletadas 70 frações, de 250 mL cada. O solvente foi removido em evaporador rotativo e as frações foram analisadas por cromatografia em camada delgada comparativa (CCDC), usando como revelador a solução de sulfato cérico  $Ce(SO_4)_2$ . Após a reunião, utilizando como critério o fator de retenção e a cor observada nos cromatoplas, foram obtidos 9 grupos conforme mostrado na Tabela 2.

Tabela 4.7 – Frações obtidas e reunidas do fracionamento em coluna de gel de sílica da fração hexânica (FHex) das folhas de *C. mellifluum*

Grupo	Frações reunidas	Eluente	Massa (mg)	Compostos Identificados
FH1	FH1 – F18	hexano (100%)	814,7	
FH19	FH19- FH20	hexano/AcOEt (95:5)	1687,9	<b>4</b>
FH21	FH21- FH36	hexano/AcOEt (95:5)	937,6	
FH37	FH37 – FH42	hexano/AcOEt (95:5)	592,5	<b>5-10</b>
FH43	FH43 – FH49	hexano/AcOEt (95:5)	1158,1	
FH50	FH50 – FH55	hexano/AcOEt (8:2)	603,7	
FH56	FH56 – FH59	hexano/AcOEt (6:4)	971,5	
FH60	FH60 – FH64	hexano/AcOEt (1:1)	818,6	
FH70	FH65 - FH70	AcOEt (100%)	1715,6	
			Total = 9,3 g	

##### 4.7.2 Fracionamento do Grupo FH19

O grupo FH19 (200 mg) ao ser analisado por CCD, usando hexano/AcOEt (85:15) como eluente e solução de sulfato cérico como revelador, apresentou uma coloração alaranjada, porém com impurezas. Uma alíquota de 200 mg foi então submetida à cromatografia em coluna de Sephadex LH-20 utilizando como eluente hexano/ $CH_2Cl_2$  (1:4), fornecendo 21 frações, as quais foram reunidas em 5 subgrupos (Tabela 4.6). Após análise por

CCDC, usando como eluente hexano/AcOEt (85:15) e revelador a solução de sulfato cérico, o subgrupo S19-9 (38,6 mg) apresentou manchas de coloração alaranjada, porém com impurezas.

Tabela 4.8 – Agrupamento das frações provenientes do fracionamento em coluna de Sephadex LH-20 do grupo FH19

Subgrupo	Frações recolhidas	Massa (mg)
FH19-1	1-6	124,6
FH19-6	7-8	25,5
FH19-9	9-12	38,6
FH19-13	13	0,4
FH19-14	14-21	2,4

O grupo FH19-9 (38,6 mg), foi dissolvido em CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 100%, filtrado em gel de sílica com CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 100% e AcOEt 100%. Dessa filtração foram coletadas 20 frações que foram reunidas em 3 grupos, após análise por CCDC utilizando como eluente hexano/AcOEt (85:15) e como revelador, solução de Ce(SO<sub>4</sub>)<sub>2</sub> apresentando a coloração alaranjada com menos impurezas.

Tabela 4.9 – Frações obtidas no fracionamento cromatográfico em coluna de gel de sílica da do subgrupo FH19-9

Subgrupo	Frações recolhidas	Massa (mg)
FH19-9-4	4-6	21,7
FH19-9-7	7-12	2,6
FH19-9-12	13-20	0,6

A subfração S19-9-4 (18,6 mg), foi analisado por CCDC usando hexano/AcOEt (8:2) como eluente e solução de sulfato cérico como revelador e originou uma única mancha de coloração alaranjada. A análise desta subfração por RMN <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C, em comparação com dados relatados na literatura e revelou que se tratava do composto **4**. O resumo do fracionamento para obtenção do composto **3** é apresentado no Esquema 4.4.

### 4.7.3 Fracionamento do Grupo FH37

O grupo FH37 (592,5 mg) ao ser analisado por CCD, usando hexano/AcOEt (85:15) como eluente e solução de sulfato cérico como revelador, apresentou uma mancha de coloração azul com mudança de coloração para o roxo intenso, porém ainda com impurezas. Esta amostra foi dividida em duas alíquotas e submetidas à cromatografia em coluna de Sephadex LH-20 utilizando como eluente hexano/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (1:4). As frações resultantes dos dois fracionamentos foram reunidas em 5 subgrupos (Tabela 4.8). Após análise por CCDC, usando como eluente hexano/AcOEt (85:15) e revelador a solução de sulfato cérico, o subgrupo FH37-10 (31,2 mg) apresentou manchas de coloração azul com mudança de coloração para roxo.

Tabela 4.10 – Agrupamento das frações provenientes do fracionamento em coluna de Sephadex LH-20 do grupo FH37

Subgrupo	Frações recolhidas	Massa (mg)
FH37-1	1-9	81
FH37-10	10-14	49,1
FH37-17	15-17	14,5
FH37-13	18-19	8,8
FH37-14	20-30	13,9

### 4.7.4 Filtração da FH37-10 em gel de sílica

O grupo FH37-10 (49,1 mg), foi dissolvido em CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 100%, filtrado em gel de sílica com CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>100%. Após análise por CCD utilizando como eluente hexano/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (8:2) e como revelador, solução de Ce(SO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>, as 19 frações foram coletadas e reunidas em 3 grupos.

Tabela 4.11 – Agrupamento das frações provenientes do fracionamento em coluna gel de sílica do grupo FH37-10

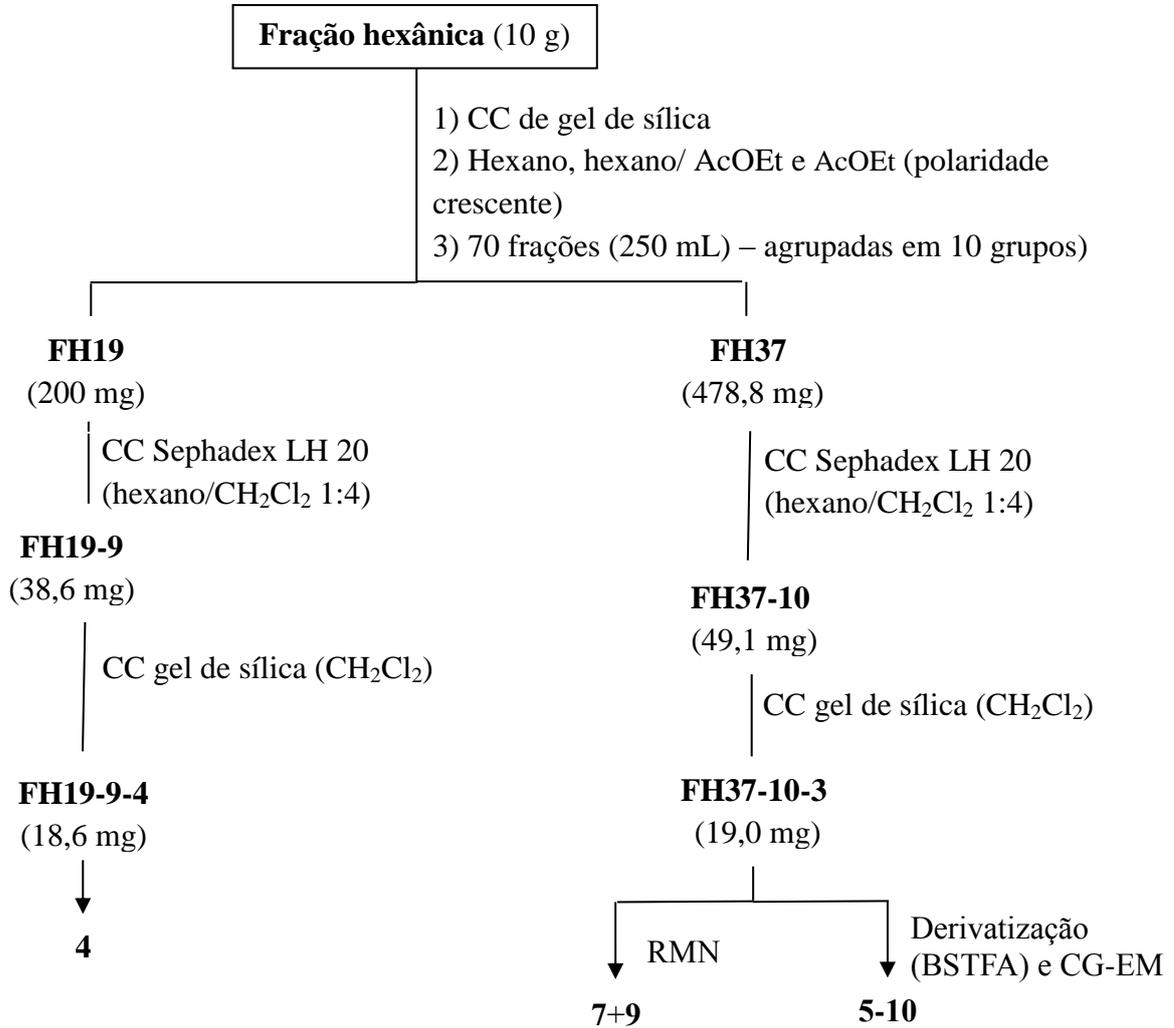
Subgrupo	Frações recolhidas	Massa (mg)
FH37-10-1	1-2	1,1
FH37-10-3	3-5	19,0
FH37-10-6	6-19	7,8

O grupo FH37-10-3 (19 mg) correspondente a mancha de coloração azul, que muda para uma coloração roxo intenso, foi analisado por RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  em comparação com os dados da literatura permitindo a identificação da mistura dos compostos **7** e **10**. Este grupo foi submetido a uma derivatização por meio de uma reação de sililação com *N,O*-Bis(trimetilsilil)trifluoroacetamida (BSTFA) (PRYTZYK et al., 2003) e analisado por CG-EM.

#### 4.7.4.1 Derivatização com BSTFA e análise de CG-EM da subfração FH37-10-3

A derivatização com BSTFA foi feita de acordo com Prytzyk et al. (2003) com modificações. Uma alíquota de 3,0 mg da subfração FH37-10-3 foi dissolvida em 3,0 mL de  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  obtendo uma solução de concentração  $1,0 \text{ mg mL}^{-1}$ , posteriormente foi retirada um alíquota de 1,0 mL dessa solução e transferida para um frasco de 2,0 mL, o solvente foi evaporado, em seguida foi adicionado 250  $\mu\text{L}$  de piridina tratada e 50  $\mu\text{L}$  de BSTFA. O frasco foi devidamente fechado e submetido aquecimento, entre 40 a 50  $^\circ\text{C}$ , durante 1 hora. Após o término da reação, foi adicionado 1,0 mL de acetato de etila e os derivados sililados foram analisados por CG-EM, temperatura do injetor: 300  $^\circ\text{C}$ , temperatura da interface: 310  $^\circ\text{C}$  e injeção de 1  $\mu\text{L}$  no modo *split* (10:1). Programação do forno: Temperatura inicial 130  $^\circ\text{C}$  permanecendo por 2 min, taxa de aquecimento de 15  $^\circ\text{C min}^{-1}$  até 315  $^\circ\text{C}$  permanecendo por 30 min. e o fluxo de gás hélio constante a 1  $\text{mL min}^{-1}$ . O espectrômetro de massas foi com analisador quadrupolar, temperatura da fonte de íons a 260  $^\circ\text{C}$ , ionização por elétrons a 70 eV, operando na faixa de 40 a 680 Da, corte de solvente em 5 min, com tempo total de análise de 44,33 min. A identificação dos compostos foi realizada com base na análise dos espectros de massas e comparada com os dados da biblioteca NIST08. Este procedimento permitiu a identificação de sete compostos (**5-10**).

Esquema 4.4 – Fracionamento cromatográfico dos grupos FH19 e FH37 provenientes da fração hexânica das folhas de *Combretum mellifluum*



## 4.8 Avaliação do potencial biológico do extrato e frações de *C. mellifluum*

### 4.8.1 Atividade antioxidante

A avaliação quantitativa da atividade antioxidante das frações e do extrato de *C. mellifluum* foi realizada pelo método baseado no sequestro do radical livre DPPH, cujas medidas de absorvâncias foram realizadas em triplicata no comprimento de onda de 516 nm. A solução estoque de DPPH em metanol (50 mL) é preparada na concentração de  $40 \mu\text{g mL}^{-1}$ , mantida sob refrigeração e protegida da luz (SOUSA et al., 2007).

As soluções das frações e do extrato foram preparadas dissolvendo-se 12,5 mg de cada amostra em metanol, obtendo-se uma solução de  $250 \mu\text{g mL}^{-1}$  que foi diluída nas concentrações de 200, 150, 100, 50 e  $25 \mu\text{g mL}^{-1}$ . As medidas das absorvâncias das misturas reacionais (0,3 mL de solução das amostras nas concentrações de 25, 50, 100, 150, 200 e  $250 \mu\text{g mL}^{-1}$ , com 2,7 mL da solução de DPPH, na concentração de  $40 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) foram feitas em triplicata a 516 nm, monitoradas até 30 minutos de reação. A mistura de metanol (2,7 mL) e solução metanólica das amostras (0,3 mL) foi utilizada como branco.

O percentual de atividade antioxidante (%AA) das frações e dos extratos foi determinado por meio da equação,  $\%AA = \{[Abs_{DPPH} - (Abs_{amostra} - Abs_{branco})] \times 100\} / Abs_{DPPH}$ , onde a  $Abs_{DPPH}$ , é a absorvância inicial da solução metanólica de DPPH;  $Abs_{amostra}$  é a absorvância da mistura reacional (DPPH + amostra) e  $Abs_{branco}$  é a absorvância do branco (MeOH + amostra).

Os resultados são expressos pelo valor de  $CE_{50}$ , que indica a concentração eficiente em  $\mu\text{g mL}^{-1}$  da amostra capaz de reduzir em 50% a concentração do radical livre DPPH, após 30 minutos de reação (SOUSA et al., 2007).

### 4.8.2 Determinação do teor de Fenóis Totais (FT)

O conteúdo de fenóis totais das frações e do extrato de *C. mellifluum* foi determinado pelo método de Folin-Ciocalteu como descrito por Sousa et al. (2007), sendo as análises realizadas em triplicatas e protegidas da luz.

As amostras (10 mg) foram dissolvidas em metanol e transferidas para balões volumétricos de 10 mL e completado os volumes com metanol. Uma alíquota de 100  $\mu\text{L}$  da solução metanólica de cada amostra ( $1000 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) foi transferida para um balão volumétrico de 10 mL e adicionados 500  $\mu\text{L}$  do reagente Folin-Ciocalteu ( $1000 \mu\text{g mL}^{-1}$ ), 5,0 mL de água

destilada e agitou-se por um minuto. Adicionou-se 2,0 mL da solução de carbonato de sódio 15% (m/v) e agitou-se por 30 segundos. O balão volumétrico foi completado com água destilada. Após duas horas de reação, fez-se a leitura da absorvâncias no comprimento de onda de 750 nm em espectrofotômetro UV-Vis. Para o branco realizou-se o mesmo procedimento substituindo-se a solução da amostra por 100 µL de metanol.

O conteúdo de FT foi expresso em miligramas de equivalente de ácido gálico por grama de extrato (mg EAG g<sup>-1</sup>) obtido a partir da curva analítica construída com padrão de ácido gálico (0,1-2,5 µg mL<sup>-1</sup>, R=0,999).

#### **4.8.3 Determinação do teor de Flavonoides Totais (FLAT)**

O teor de flavonoides totais das frações e do extrato de *C. mellifluum* foi determinado por espectrofotometria de absorção molecular utilizando solução metanólica de AlCl<sub>3</sub>, (SOBRINHO et al., 2010; FERREIRA et al., 2014).

Foram preparadas soluções metanólicas de piridina (20%), cloreto de alumínio (50 µg mL<sup>-1</sup>) e das amostras (10 µg mL<sup>-1</sup>). Uma alíquota de 300 µL da solução metanólica de amostra foi transferida para um balão volumétrico de 10 mL e adicionados 240 µL de ácido acético glacial, 4,0 mL de solução de piridina em metanol 20% (v/v), 1,0 mL da solução metanólica de cloreto de alumínio e completou-se o volume com água destilada. Após 30 min de reação a leitura da absorbância foi feita no comprimento de onda de 420 nm em espectrofotômetro UV-Vis. Para o branco realizou-se o mesmo procedimento substituindo-se a solução de amostra por 300 µL de metanol.

O conteúdo de FLAT foi expresso em miligramas de equivalente de rutina por grama de extrato (mg ER g<sup>-1</sup>) obtido a partir da curva analítica (3,0-21,0 µg mL<sup>-1</sup>, R=0,999). As análises foram realizadas em triplicatas.

#### **4.8.4 Avaliação da atividade anticolinesterásica**

As amostras contendo a frações e extrato das folhas de *C. mellifluum* foram utilizadas na análise qualitativa de inibição da enzima acetilcolinesterase (AChE) de acordo com Ellman et al. (1961) modificado por Rhee (2001). Inicialmente cada amostra do extrato e das frações foram dissolvidas em metanol ou outro solvente orgânico que seja solúvel para uma concentração de 1 mg mL<sup>-1</sup>, em seguida foram aplicadas alíquotas de 1,5-2,5 µL de cada

amostra em CCD, usando a cafeína na concentração de  $10,0 \text{ mg mL}^{-1}$  como controle positivo, e eluída em clorofórmio-metanol (9:1).

Após a eluição da placa, a atividade inibitória foi avaliada utilizando o revelador baseado no método de Ellman. A placa foi borrifada com 1 mM DTNB [ácido 5,5'-ditiobis-(2-nitrobenzóico)] e 1 mM ATCI (Iodeto de acetiltiocolina) em tampão A (50 mM Tris -HCl, pH 8) até a saturação do reagente. Depois de seca (após 3-5min) a placa foi pulverizada com a enzima AchE ( $5 \text{ units mL}^{-1}$ ) em solução tampão. Após 5 min, o teste de inibição da enzima acetilcolinesterase é avaliado pela presença de manchas brancas sob fundo amarelo característico de substância inibidora. Estas atividades foram realizadas no Laboratório de Produtos Naturais e Neuroquímica Experimental (LAPNNEX-UFPI) sob a supervisão do Profa. Dra. Chistiane Mendes Feitosa.

#### 4.8.5 Avaliação da atividade antileishmania

As formas de promastigotas de *Leishmania major* em fase logarítmica de crescimento foram distribuídas em placas de cultivo celular ( $1 \times 10^6$  por poço). As alíquotas do extrato etanólico (EEtOH), as frações hexânica (FHex), acetato de etila (FAcOEt), aquosa (FAqu), sobrenadante (FSbn) e os compostos **1** e **2a+2b**, de *C. mellifluum* foram adicionadas aos poços em diluições seriadas, variando de 800 a  $6,25 \mu\text{g mL}^{-1}$ . As placas foram incubadas em estufa de demanda biológica (BOD) à temperatura de  $26 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$  e após 48h, os parasitas foram corados com resazurina (1mM) e realizado a leitura em espectrofotômetro para obtenção da densidade ótica a 550 nm. O controle positivo consistiu de  $2 \mu\text{g mL}^{-1}$  de anfotericina B diluído em meio Schneider's a 0,2% de DMSO e considerado como 100% de viabilidade das leishmanias (SOARES et al., 2007; VALADARES et al., 2011).

#### 4.9 Análise estatística

Os resultados obtidos na determinação dos teores de fenóis, flavonoides totais e atividade antioxidante, foram apresentados como a média de três repetições ( $n=3$ ) $\pm$ desvio padrão da média (DP). As diferenças encontradas foram consideradas estatisticamente significativas quando  $p < 0,05$ , aplicando-se ANOVA e comparações múltiplas pelo teste de Tukey. O tratamento dos dados do potencial antioxidante foi realizado usando o programa *Microcal Origin 8.0*. Os experimentos de atividade antileishmania foi analisado usando o programa *GraphPad Prism*.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Perfil químico das frações das folhas de *C. mellifluum*

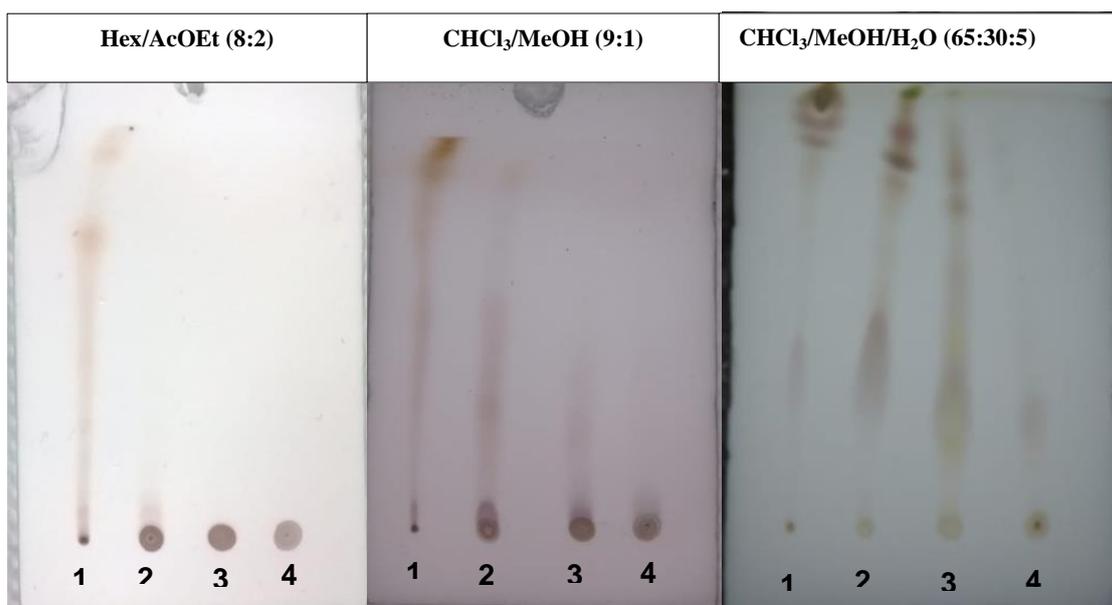
#### 5.1.1 Cromatografia em camada delgada analítica (CCDA)

As cromatoplasas do extrato etanólico e frações hexânica, acetato de etila, aquoso e sobrenadante das folhas de *C. mellifluum* reveladas com solução de sulfato cérico são mostradas na Figura 5.1

A análise em CCDA da fração hexânica permitiu detectar a presença de substâncias de natureza isoprênicas como esteroides e terpenoides, utilizando o sistema de solvente hexano/AcOEt (8:2), que foi evidenciado pela presença de manchas roxa e alaranjadas. A fração sobrenadante (FSbn) das folhas de *C. mellifluum* quando eluída em  $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$  (9:1), também apresentou substâncias de natureza isoprênica, sugerindo que a extração prévia das folhas com hexano não foi suficiente para extrair todas as substâncias menos polares como os isoprenóides e outros materiais graxos (CHAVES, 1997).

Após a extração líquido-líquido do extrato etanólico foi possível observar por meio da análise em CCDA, que as frações AcOEt e aquosa, quando eluída em  $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$  (65:30:5), apresentou manchas amarelas características de compostos pertencente à classe dos flavonoides (CHAVES, 1997; WAGNER; BLADT, 1996).

Figura 5.1 – Cromatogramas das frações de partição do EEtOH das folhas de *C. mellifluum*

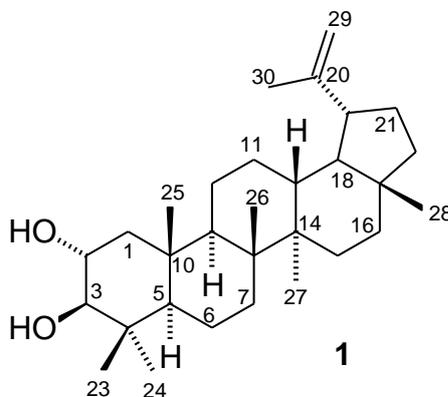


1: FHex, 2: FSbn, 3: FAcOEt, 4: FAqu; Revelador: solução de  $\text{Ce}(\text{SO}_4)_2$



### 5.3 Identificação estrutural dos compostos isolados de *C. mellifluum*

#### 5.3.1 Elucidação estrutural do composto 1



O composto **1**, correspondente a fração S10-15-30 (8,5 mg), é proveniente do sobrenadante obtido a partir do precipitado formado durante a extração com hexano que após sucessivos fracionamentos foi isolado. A análise por cromatografia em camada delgada de gel de sílica, eluída em hexano-acetato de etila (7:3) e revelada em solução de sulfato cérico resultou uma única mancha rosa. Sua estrutura foi identificada por meio da análise dos espectros de RMN uni e bidimensionais em comparação com os dados da literatura (RUNGSIMAKAN e ROWAN 2014).

O espectro de RMN  $^1\text{H}$  (Figuras 5.2-5.5) apresentou um perfil característico de um composto com esqueleto lupano pela presença de dois dupletos em  $\delta$  4,57 e 4,69 ( $J = 2,1$  Hz) característicos de hidrogênios em ligação dupla *gem*-dissubstituída (H-29a e H-29b) e pelo simpleto em  $\delta$  1,67 atribuído aos hidrogênios metílicos em carbono olefínico, além de seis simpletos em  $\delta$  0,78; 0,90; 0,94; 1,02; 1,01 e 1,67 que foram atribuídos a hidrogênios dos grupos metila ligados a carbonos saturados e quaternários (ALBUQUERQUE et al., 2007). O duplete em  $\delta$  2,98 (1H,  $J_{ax-ax} = 9,5$  Hz) foi atribuído a H-3 ligado a carbono com configuração  $3\beta\text{-OH}$  e sugeriu um grupo  $2\alpha\text{-OH}$ , evidenciado pelo sinal em  $\delta$  3,67 (1H, ddd) com  $J_{ax-ax} = 11,3$  Hz devido ao acoplamento entre H- $2_{ax}$  e H- $1_{ax}$ ;  $J_{ax-ax} = 9,5$  Hz do acoplamento entre H- $2_{ax}$  e H- $3_{ax}$  e  $J_{ax-eq} = 4,6$  Hz do acoplamento entre H- $2_{ax}$  e H- $1_{eq}$ .

A análise conjunta dos espectros de RMN  $^{13}\text{C}$  e DEPT 135° (Figuras 5.6 e 5.8) permitiu verificar a presença de sete sinais de carbonos metílicos ( $\text{CH}_3$ ), dez metilênicos ( $\text{CH}_2$ ), sete metínicos ( $\text{CH}$ ) e seis de carbonos quaternários. Os dados de RMN unidimensionais sugeriu uma fórmula molecular  $\text{C}_{30}\text{H}_{50}\text{O}_2$  com IDH igual a 6, sendo uma referente a ligação dupla e cinco correspondente a cinco ciclos. A presença de triterpenoide com esqueleto lupano foi confirmada pelo espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  (Figuras 5.6) que apresentou

dois sinais em  $\delta$  109,5 e 151,1 atribuídos aos carbonos olefínicos C-29 e C-20, respectivamente, juntamente com o sinal em  $\delta$  19,4 referente ao carbono metílico do grupo isoprenila. Os dois sinais em  $\delta$  69,4 e 84,0 confirmaram a ocorrência dos carbonos oximetínicos C-3 e C-2. A análise até aqui realizada permitiu identificar o composto **1** como o triterpenoide lup-20(29)-en-2 $\alpha$ ,3 $\beta$ -diol ou simplesmente 2 $\alpha$ -hidroxi-lupeol.

As correlações observadas nos mapas de contorno gHMQC e gHMBC (Figuras 5.9, 5.14 e Tabela 5.1) confirmaram a estrutura do composto **1**. Os dados espectrais se encontram em total concordância com os relatados por Rungsimakan e Rowan (2014), em um estudo com as raízes e folhas da espécie *Salvia viridis* L. cvar. Jeans azul.

Este é o primeiro relato de isolamento do 2 $\alpha$ -hidroxi-lupeol na família Combretaceae sendo reportados pela primeira vez no gênero *Combretum*. Estudos relatados por Choudhary et al. (2013) comprovam que o 2 $\alpha$ -hidroxi-lupeol apresenta atividade antiprolifertiva significativa frente a linhagens de células de câncer de próstata (PC-3).

Tabela 5.1 Dados de RMN do composto **1** (600 e 150 MHz,  $\delta$  em ppm,  $J$  em Hz CDCl<sub>3</sub>)

C/H	$\delta_C$	Mult	$\delta_H$	HMBC		$\delta_C$ do 2 $\alpha$ -hidroxi-lupeol
				$^2J_{CH}$	$^3J_{CH}$	
1	46,8	CH <sub>2</sub>	0,83; 2,04	H-2	H-3 e H-5	46,7
2	69,4	CH	3,67 (ddd $J$ 11,3; 9,5 e 4,6 Hz)	H-1 e H-3		69,3
3	84,0	CH	2,98 (d, $J$ 9,5 Hz)	H-2	H-1, H-5 e H-24	83,9
4	38,6	C		H-3		38,6
5	55,6	CH		H-6	H-1, H-23, H-24 e H-25	55,4
6	18,4	CH <sub>2</sub>				18,3
7	34,3	CH <sub>2</sub>	1,39 (s)		H-26	34,2
8	41,0	C		H-26		40,9
9	50,5	CH			H-25 e H-26	50,4
10	39,3	C		H-9	H-6	39,2
11	21,1	CH <sub>2</sub>		H-9		21,0
12	25,1	CH <sub>2</sub>				25,0
13	38,1	CH				38,0
14	43,0	C			H-18	42,9
15	27,5	CH <sub>2</sub>			H-27	27,4
16	35,7	CH <sub>2</sub>			H-28	35,6
17	43,1	C		H-18		43,0
18	48,4	CH		H-19	H-28	48,3
19	48,1	CH	2,04 (dd, $J$ 12,4 e 4,6 Hz)		H-29	48,0
20	151,0	C		H-19 e H-30	H-18	150,9
21	29,9	CH <sub>2</sub>				29,8
22	40,1	CH <sub>2</sub>		H-21		40,0
23	28,6	CH <sub>3</sub>	1,01 (s)			28,5
24	16,6	CH <sub>3</sub>				16,5
25	17,5	CH <sub>3</sub>	0,90 (s)	H-24 e H-27		17,4
26	16,1	CH <sub>3</sub>	1,02 (s)			16,0
27	14,6	CH <sub>3</sub>	0,94 (s)			14,5
28	18,1	CH <sub>3</sub>	0,78 (s)		H-22	18,0
29	109,5	CH <sub>2</sub>	4,57 e 4,69 (d, $J$ 2,1 Hz)		H-19 e H-30	109,4
30	19,4	CH <sub>3</sub>	1,67 (s)		H-30	19,3

<sup>a</sup> Dados obtidos em CDCl<sub>3</sub>, relatados por Rungsimakan e Rowan, (2014).

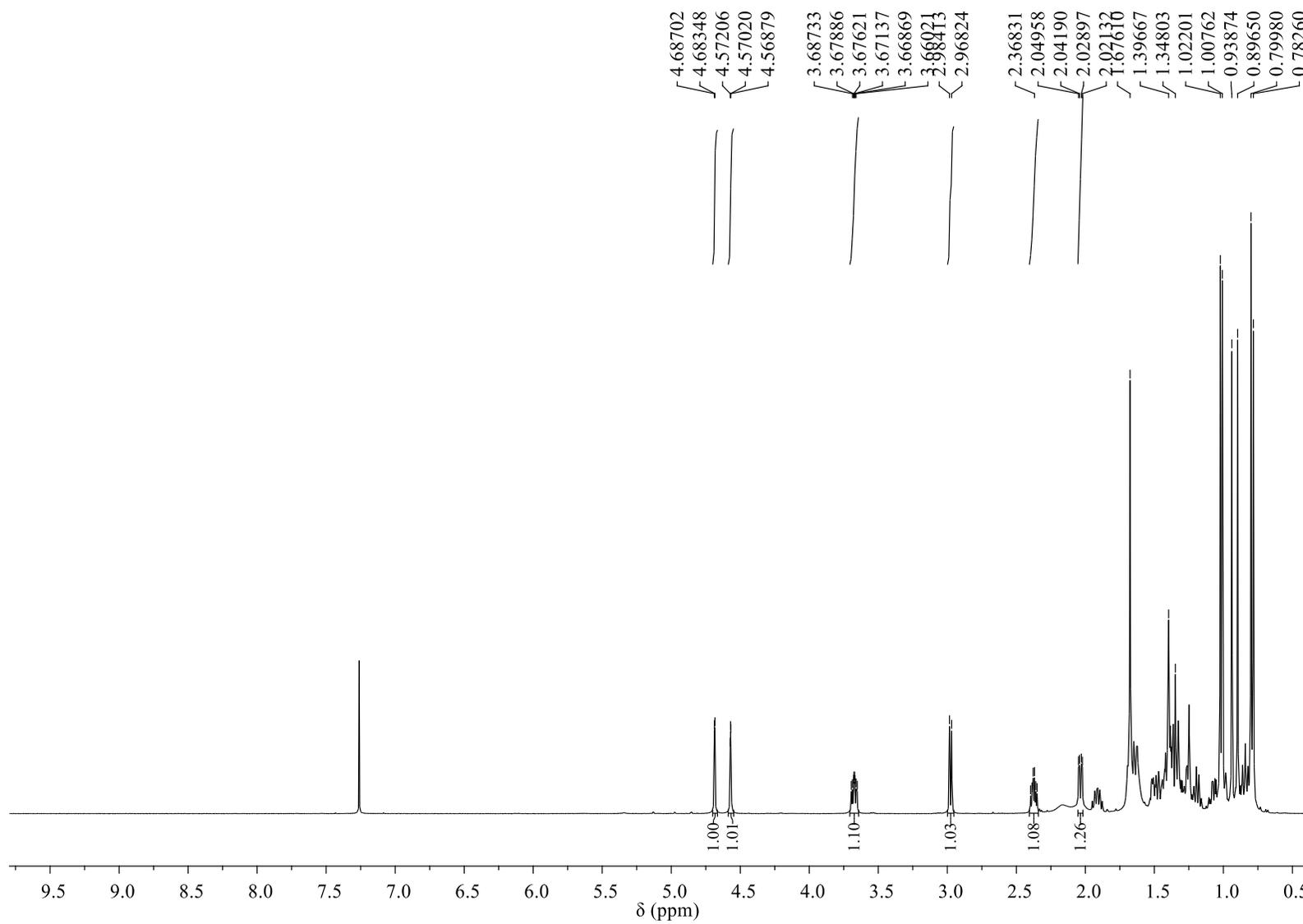
Figura 5.2 – Espectro de RMN  $^1\text{H}$  para o composto **1** ( $\text{CDCl}_3$ , 600 MHz)

Figura 5.3 – Expansão (0,65-1,95 ppm) do espectro de RMN  $^1\text{H}$  para o compostos **1** ( $\text{CDCl}_3$ , 600 MHz)

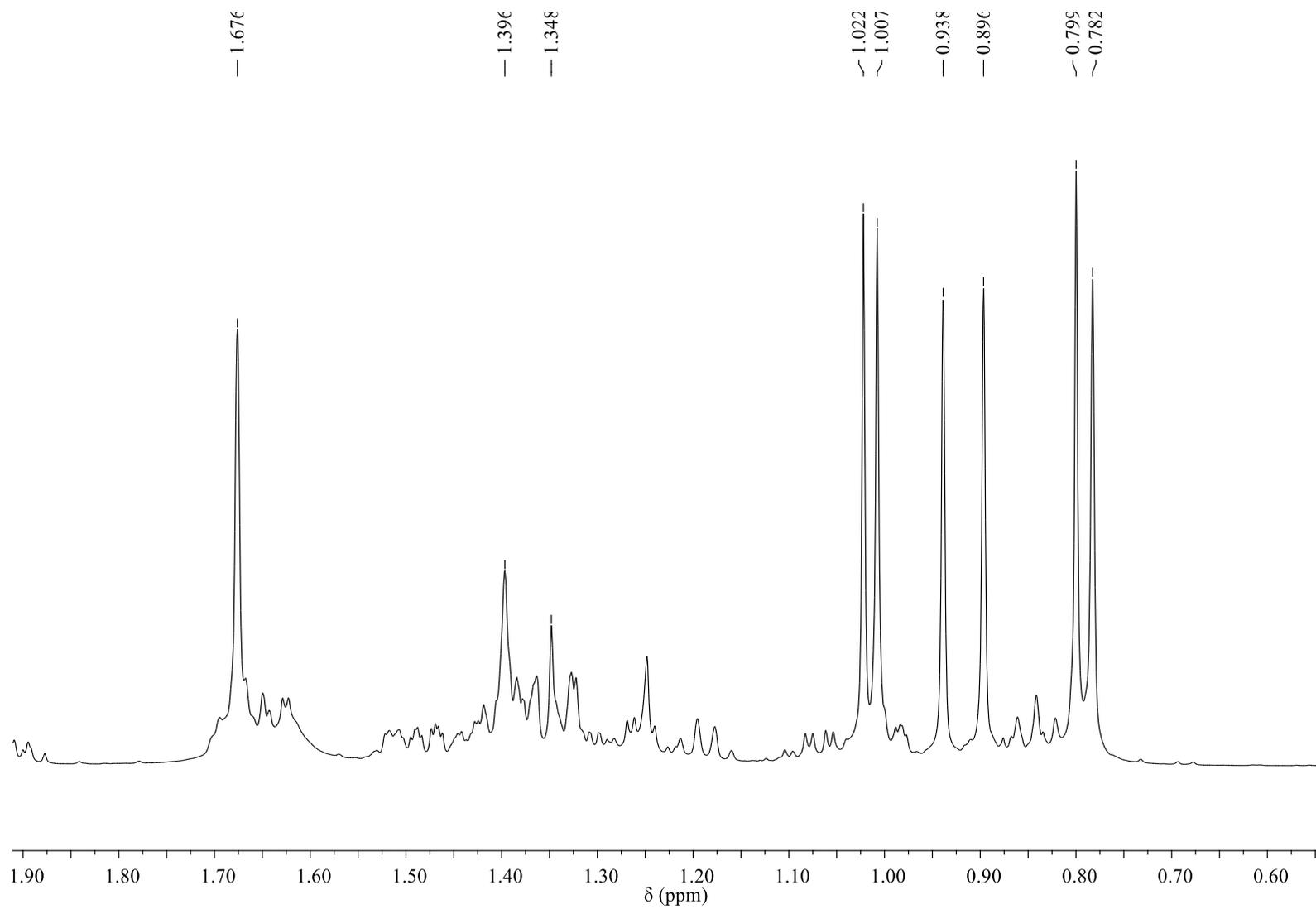


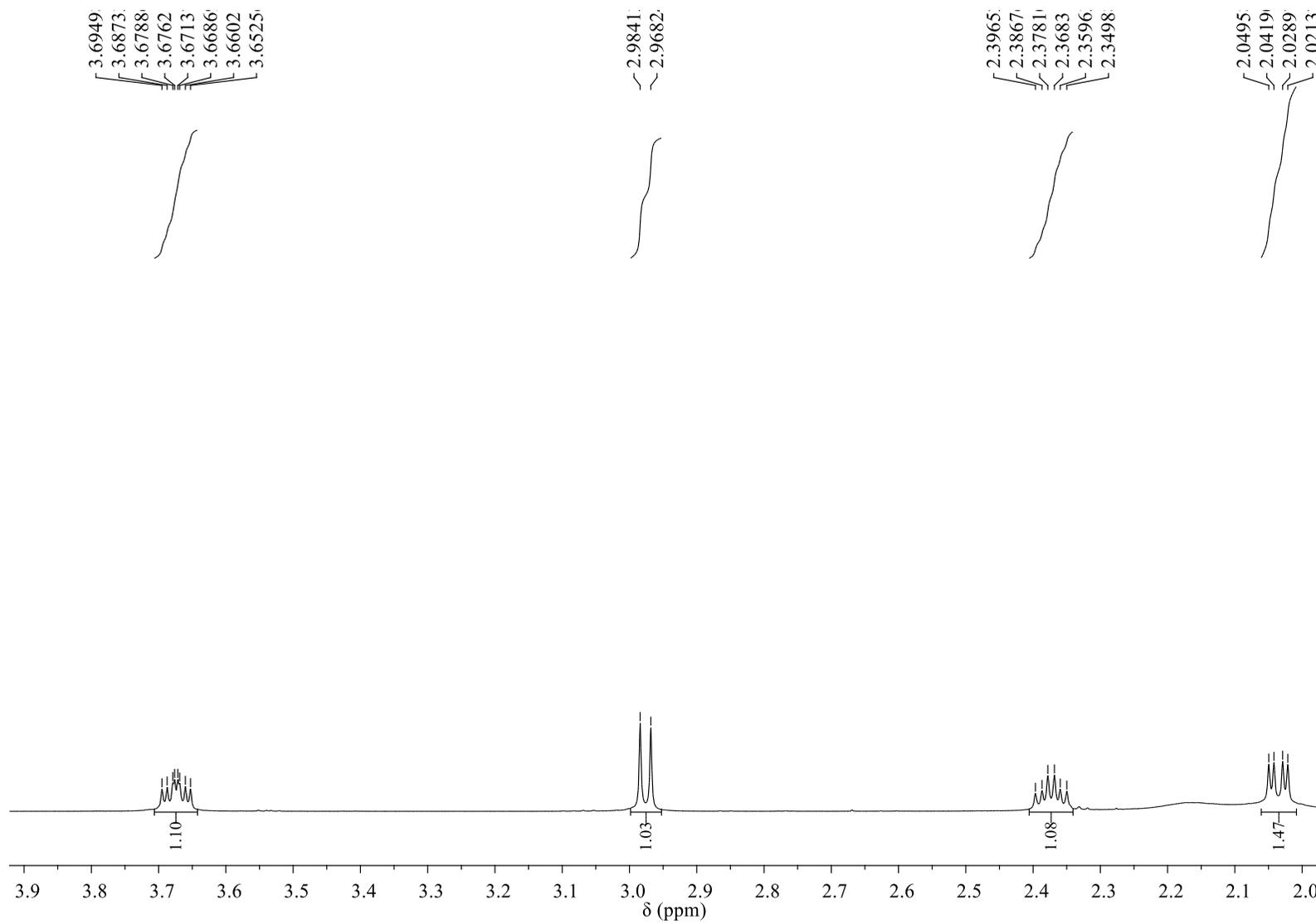
Figura 5.4 – Expansão (2,0 -3,9 ppm) do espectro de RMN  $^1\text{H}$  para os compostos **1**  $\text{CDCl}_3$ , 600 MHz)

Figura 5.5 – Expansão (3,40-3,88 ppm) do espectro de RMN  $^1\text{H}$  para os compostos **1** ( $\text{CDCl}_3$ , 600 MHz)

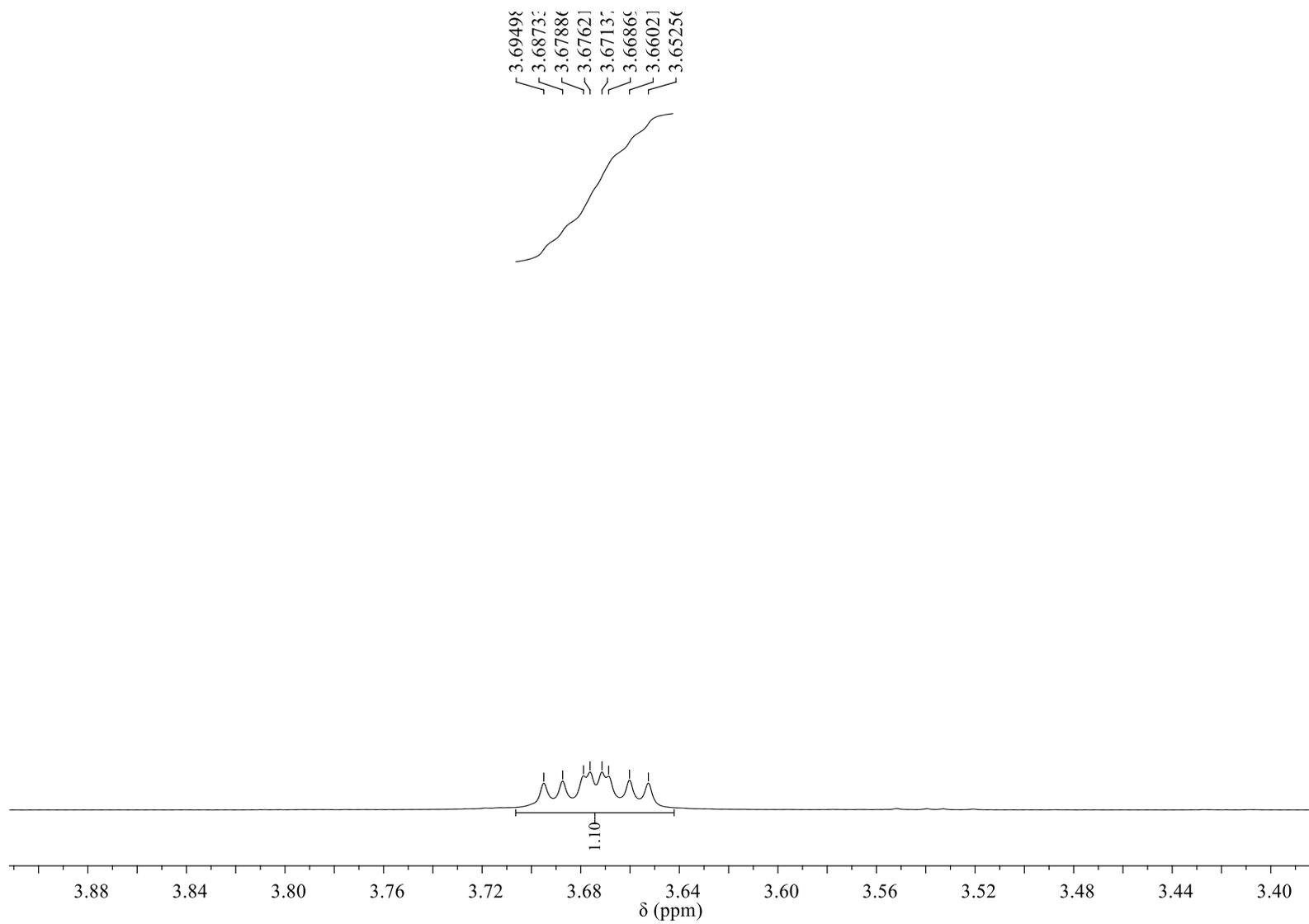


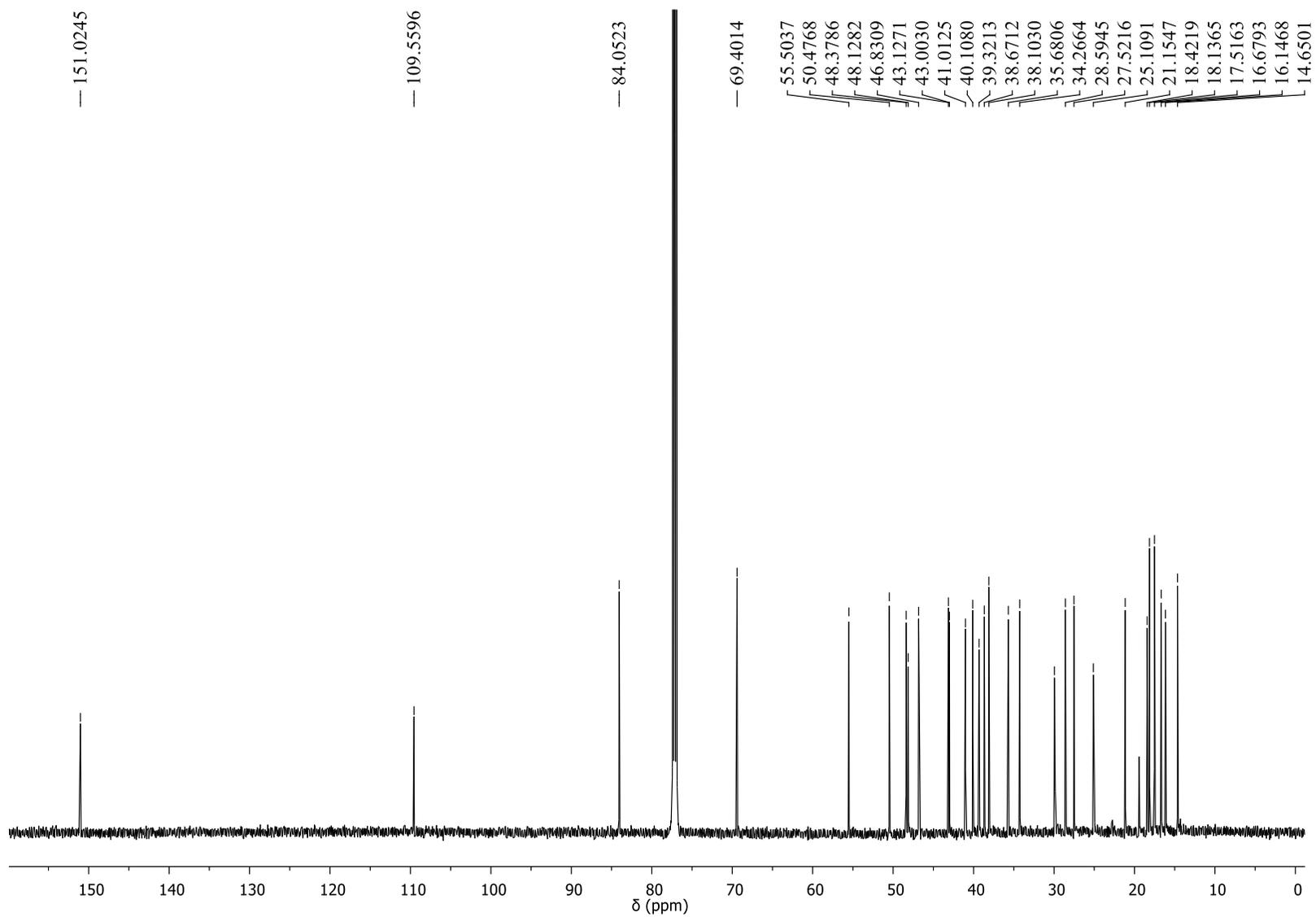
Figura 5.6 – Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  para o composto **1** ( $\text{CDCl}_3$ , 150 MHz)

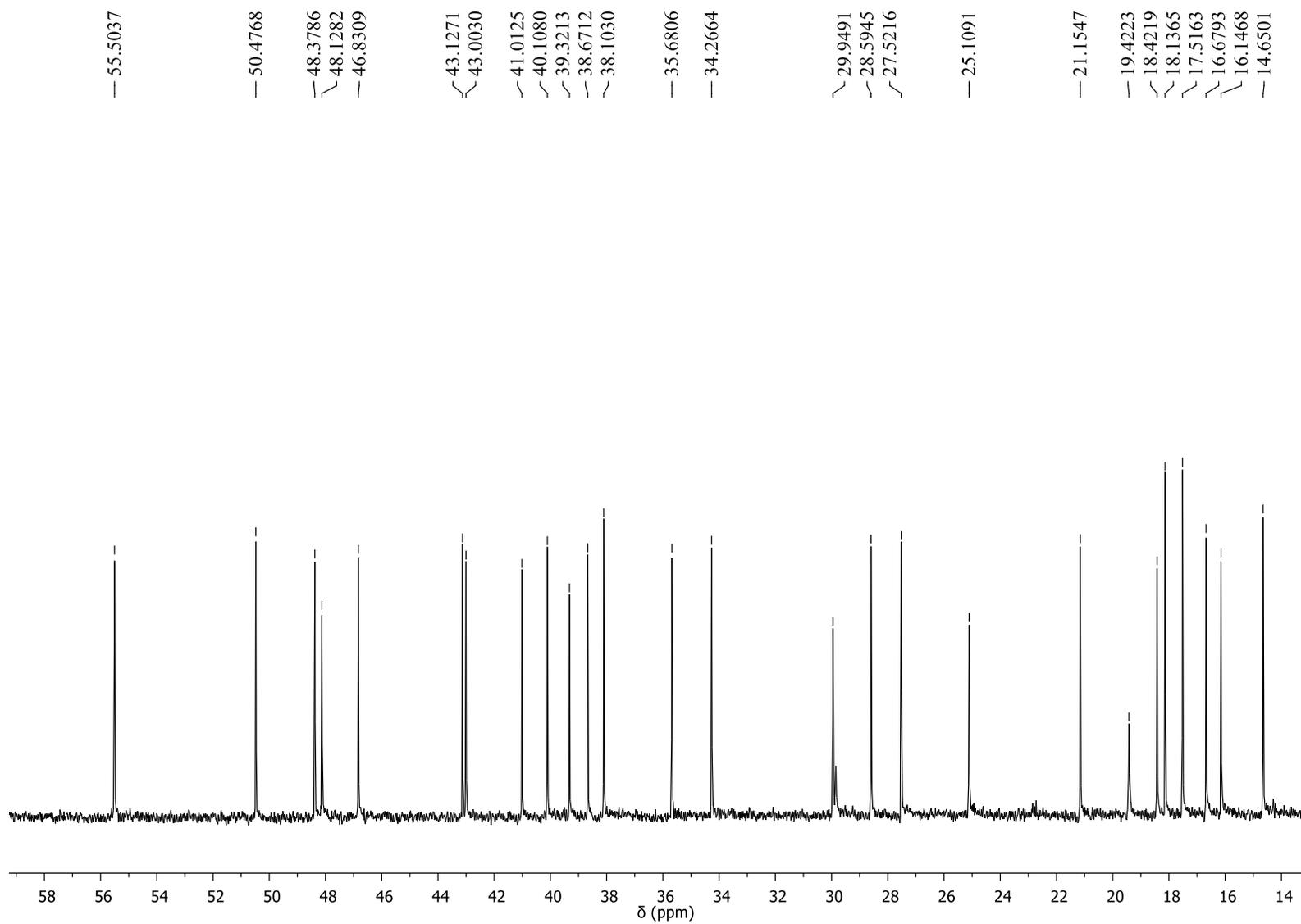
Figura 5.7 – Expansão (14-58 ppm) do espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  para o composto **1** ( $\text{CDCl}_3$ , 150 MHz)

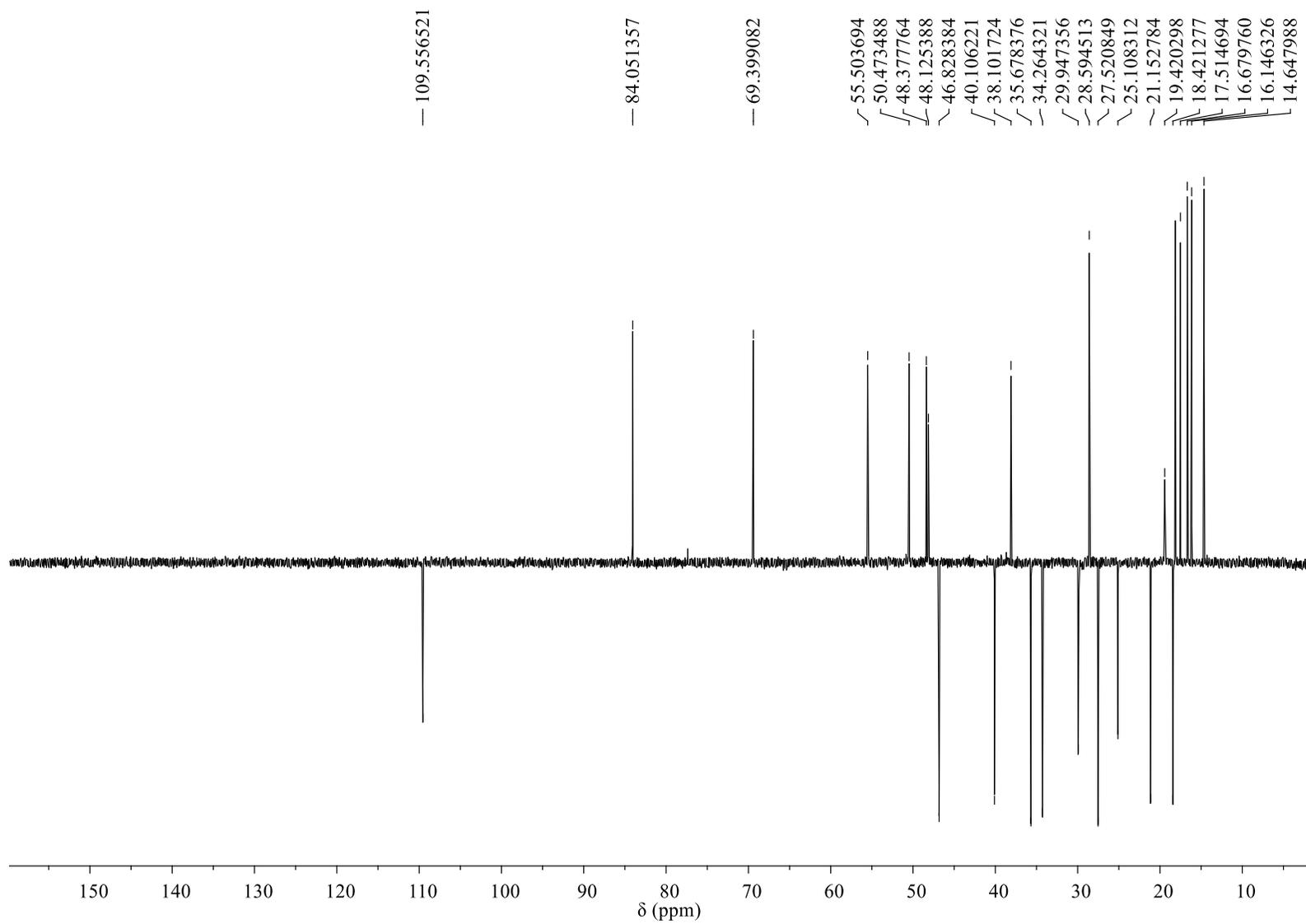
Figura 5.8 – Espectro de RMN de DEPT 135° para o composto **1** (CDCl<sub>3</sub>, 150 MHz)

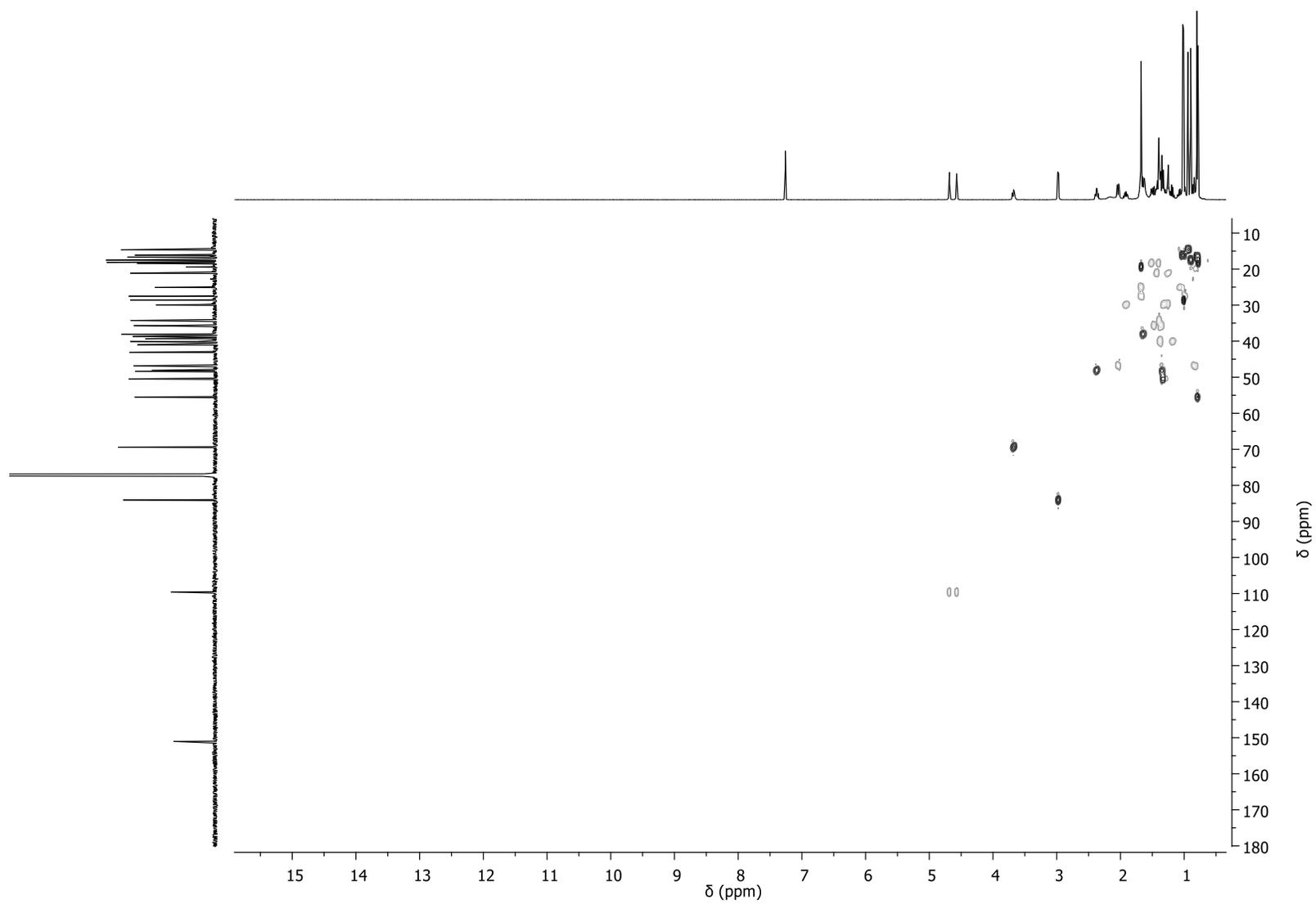
Figura 5.9 – Mapa de contornos do gHSQC para o composto **1** (CDCl<sub>3</sub>, 600 MHz)

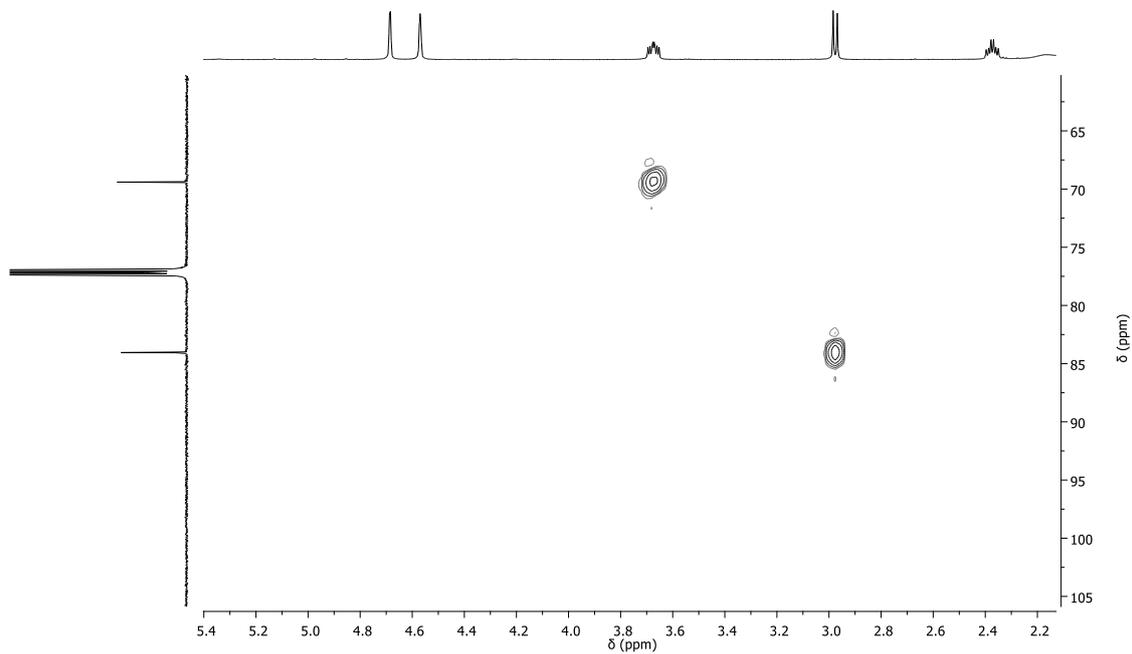
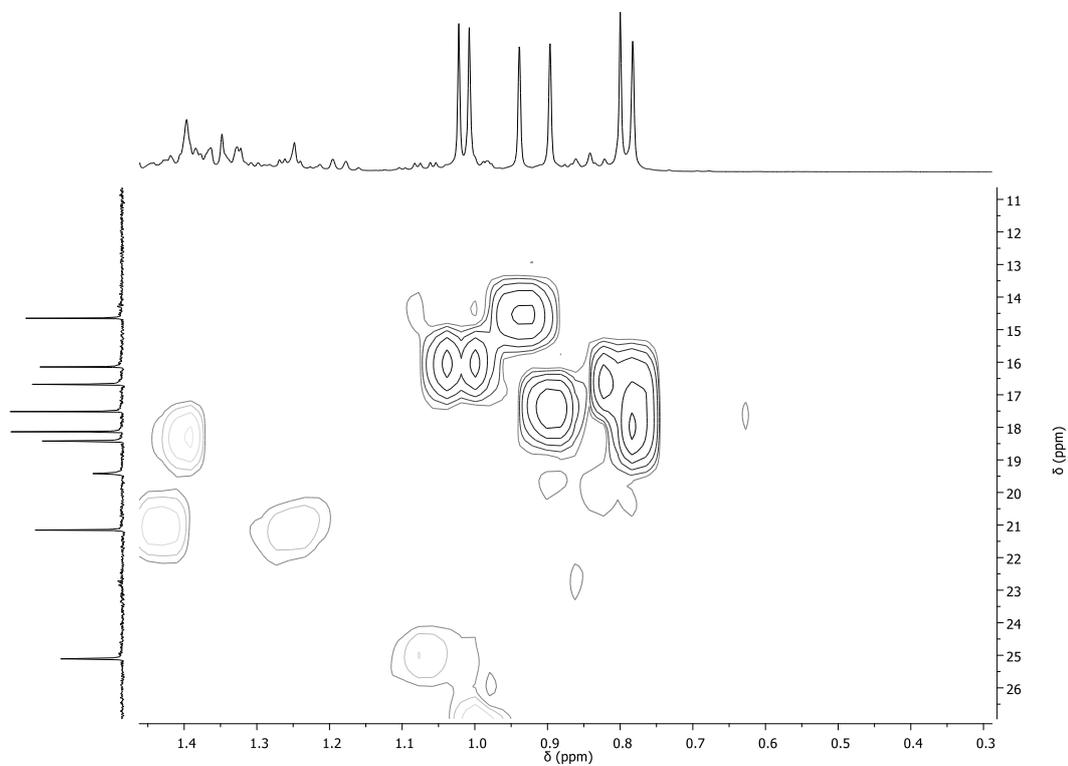
Figura 5.10 – Expansão do gHSQC para o composto **1** (CDCl<sub>3</sub>, 600 MHz)Figura 5.11 – Expansão do gHSQC para o composto **1** (CDCl<sub>3</sub>, 600 MHz)

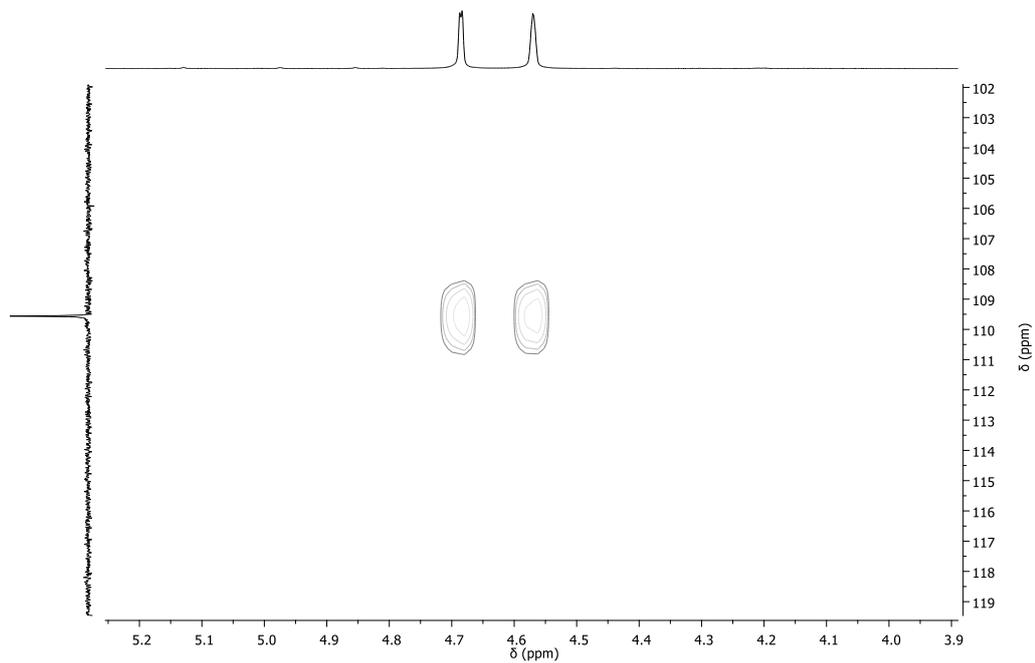
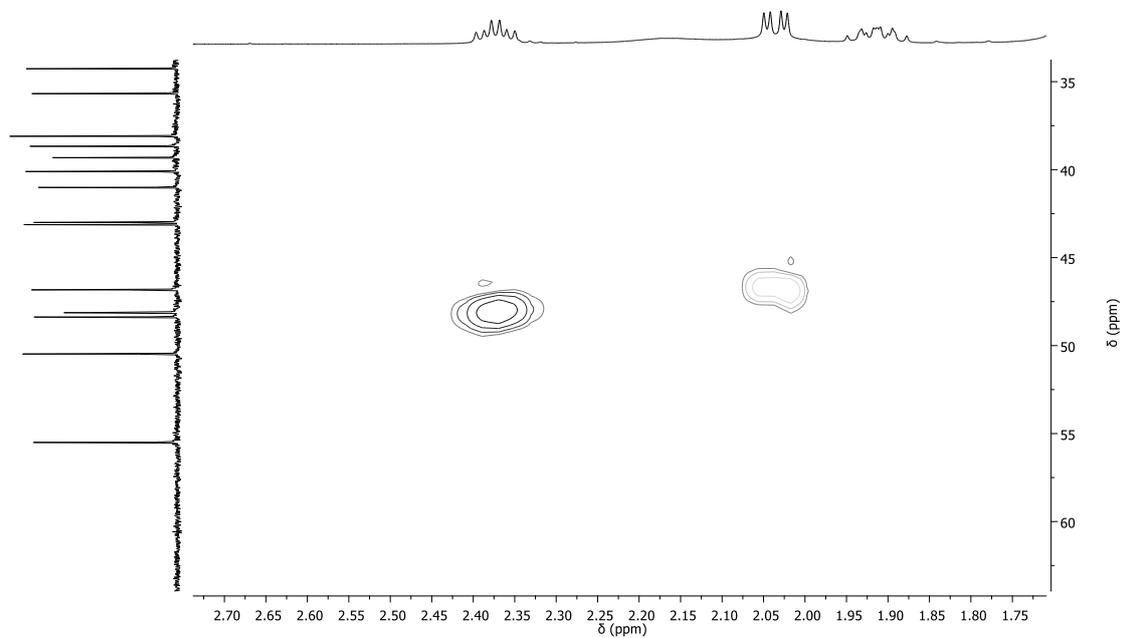
Figura 5.12 – Expansão do gHSQC para o composto **1** (CDCl<sub>3</sub>, 600 MHz)Figura 5.13 – Expansão do gHSQC para o composto **1** (CDCl<sub>3</sub>, 600 MHz)



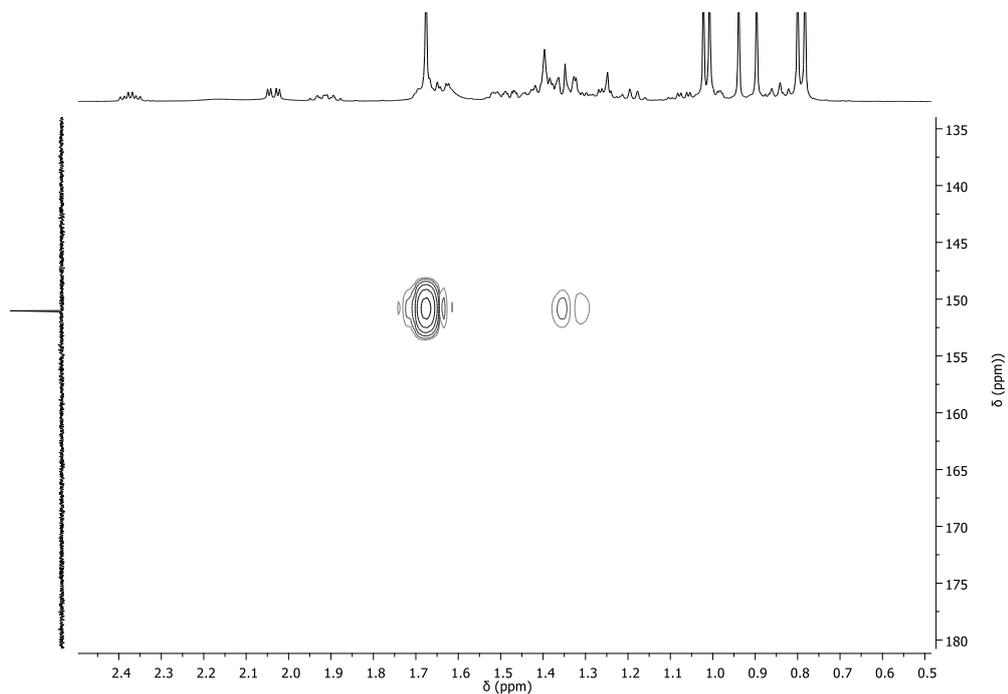
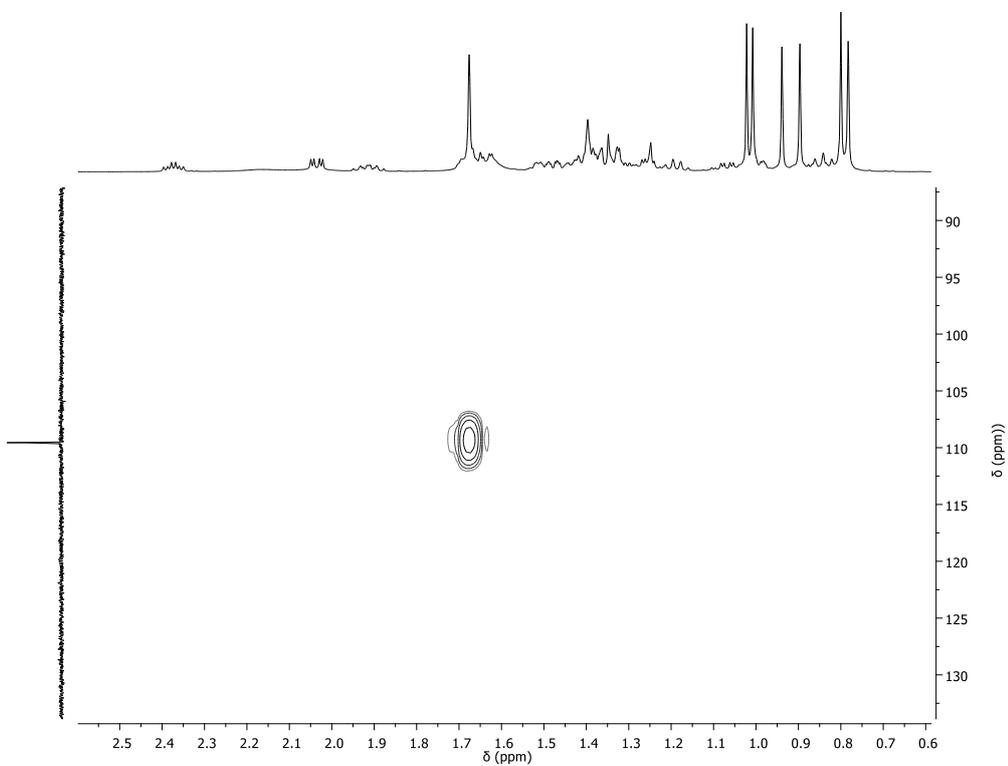
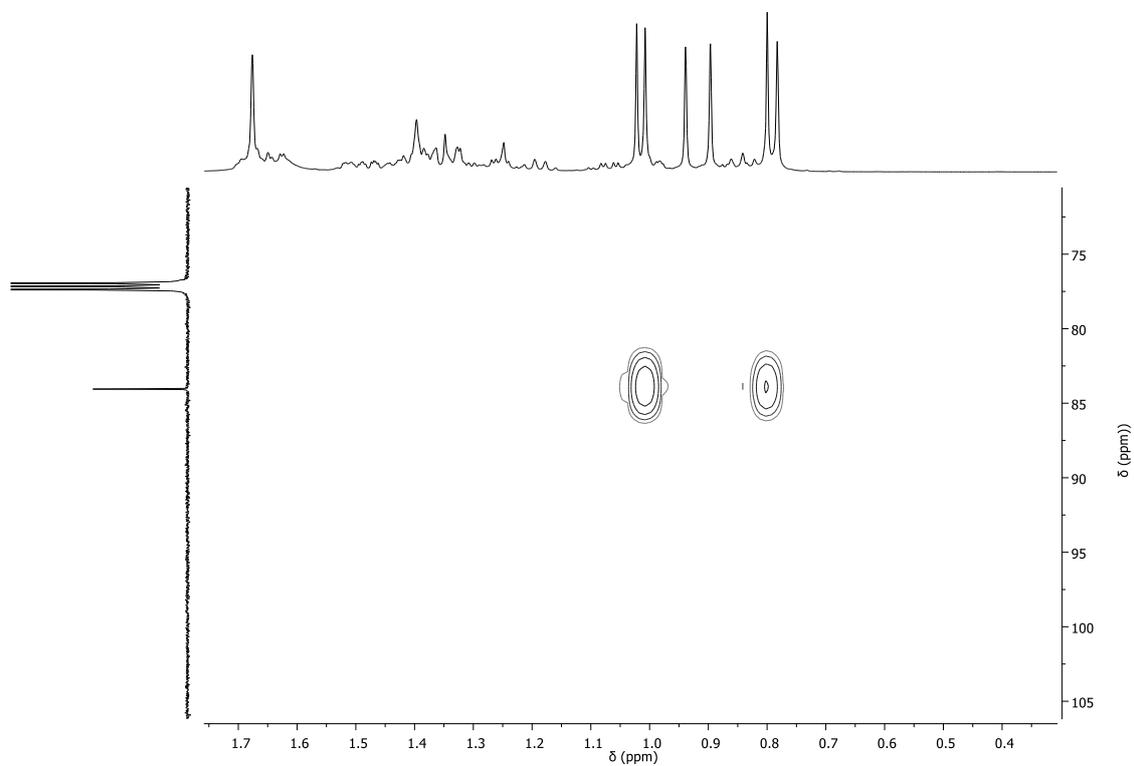
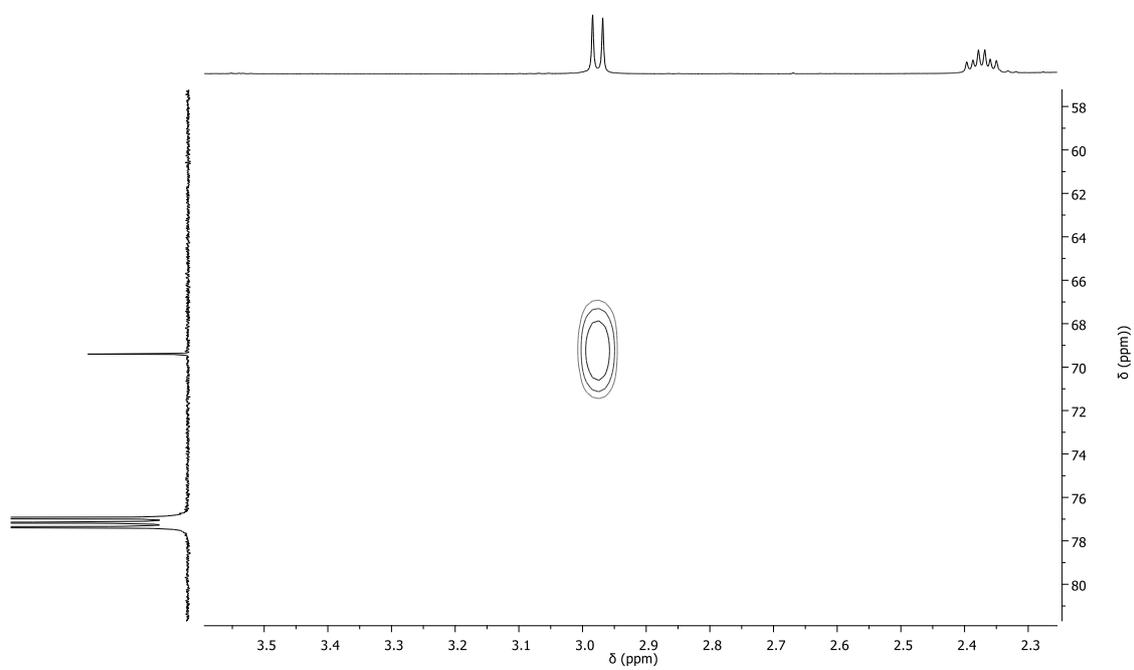
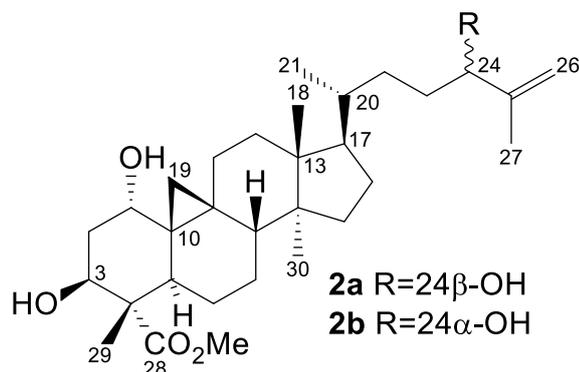
Figura 5.15 – Expansão do gHMBC para o composto **1** (CDCl<sub>3</sub>, 600 MHz)Figura 5.16 – Expansão do gHMBC para o composto **1** (CDCl<sub>3</sub>, 600 MHz)

Figura 5.17 – Expansão do gHMBC para o composto **1** (CDCl<sub>3</sub>, 600 MHz)Figura 5.18 – Expansão do gHMBC para o composto **1** (CDCl<sub>3</sub>, 600 MHz)

### 5.3.2 Elucidação estrutural dos compostos 2a+2b



Os compostos **2a+2b** correspondente a fração S14-12 (14,3 mg), são provenientes do sobrenadante obtido a partir do precipitado formado durante a extração com hexano, que após sucessivos fracionamentos foram isolados. A análise por cromatografia em camada delgada de gel de sílica, eluída em clorofórmio-MeOH (9:1) e revelada em solução de sulfato cérico resultou uma única mancha púrpura. Sua estrutura foi identificada por meio da análise dos espectros de RMN uni e bidimensionais em comparação com os dados da literatura (BANSKOTA et. al., 2000a).

O espectro de RMN  $^1\text{H}$  em  $\text{CDCl}_3$  (Figuras 5.20-5.22) apresentou dois dupletos em  $\delta$  0,51 e em  $\delta$  0,75 ( $J= 4,6$  Hz), indicativos de ocorrência de uma ponte metilênica formando um anel ciclopropânico característico de compostos com esqueleto cicloartano (BANSKOTA et al., 2000a). Uma ligação dupla *gem*-dissubstituída foi sugerida pelos sinais em  $\delta$  4,83 e 4,93/4,92. Os sinais em  $\delta$  3,59 (tl;  $J= 2,6$  Hz; H-1), 4,56 (dd;  $J=12,2$  e 4,5 Hz; H-3) e 4,02 (t;  $J= 6,4$  Hz; H-24) são de hidrogênios de grupos metínicos ligados à hidroxila com configuração 1 $\alpha$ -OH, 3 $\beta$ -OH, 24 $\beta$ /24 $\alpha$ -OH (BANSKOTA et al., 2000a) e o simpleto em  $\delta$  3,72 é referente aos hidrogênios do grupo metoxila. A estereoquímica de C-1 e C-3 dos compostos **2a+2b** foi determinada pela análise das constantes de acoplamento. A falta de uma constante de acoplamento diaxial de H-1 com H-2 $_{ax}$  indicou que a hidroxila do C-1 encontra-se em posição axial ( $\alpha$ ). O sinal de H-3 foi observado como um duplo duplete e devido ao acoplamento diaxial ( $J=12,2$  Hz) e axial-equatorial ( $J=4,5$  Hz) indicou que H-3 encontra-se em axial ( $\alpha$ ) e a hidroxila em equatorial ( $\beta$ ).

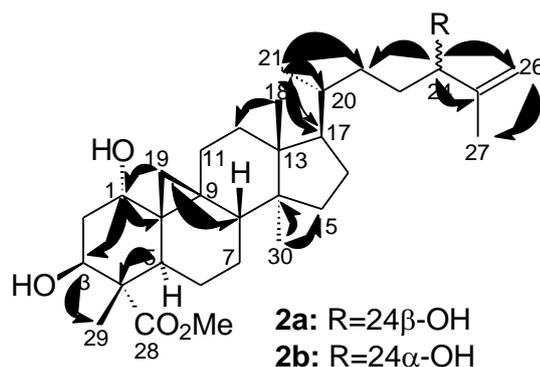
O espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  (Figuras 5.23-5.25) em uma análise conjunta com o DEPT 135° (Figuras 5.25-5.28) evidenciou a presença de 31 sinais mais intensos, sendo

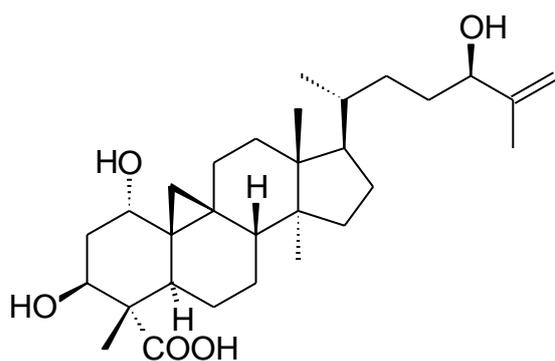
seis referentes à  $\text{CH}_3$ , onze a  $\text{CH}_2$ , sete a  $\text{CH}$  e sete a carbono quaternário. Os sinais em  $\delta$  70,6; 73,2 e 76,5/76,9 são atribuídos aos carbonos oximetínicos (C-3, C-1 e C-24 $\beta$ /24 $\alpha$ ) (BANSKOTA et al., 2000a). Os sinais em  $\delta$  111,1/111,6 e 147,6/147,9 são referentes aos carbonos olefínicos (C-26 e C-25). A presença do grupo éster foi confirmada pelos sinais em  $\delta$  52,1 de carbono metoxílico, e em  $\delta$  177,3, de carbono carbonílico. Os sinais duplicados para H-26b ( $\delta$  4,93/4,92, sl), C-24 ( $\delta$  76,5/76,9), C-25 ( $\delta$  147,6/147,9), C-26 ( $\delta$  111,1/111,6) e C-27 (17,7/17,3) sugeriu a mistura epimérica 24 $\beta$ -OH/24 $\alpha$ -OH de triterpenoides (BANSKOTA et al., 2000a).

Os dados de RMN evidenciaram uma fórmula molecular  $\text{C}_{31}\text{H}_{50}\text{O}_5$  condizente com o pico da molécula cationizada com  $m/z$  525,3564  $[\text{M}+\text{Na}]^+$  do espectro de massas (Figura 5.29).

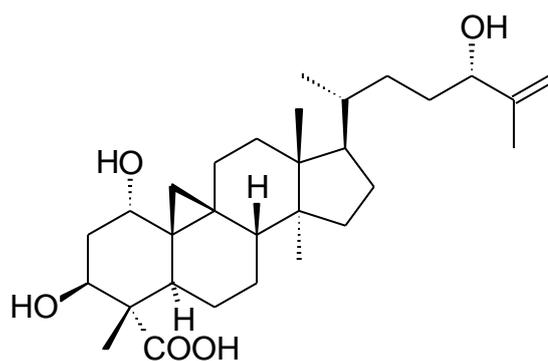
Nos mapas de contornos gHSQC e gHMBC foram observadas as correlações carbono-hidrogênio ( $^1J$  e  $^2J/\beta J$ ) que permitiram realizar as atribuições dos deslocamentos químicos (Tabela 5.4). A análise do mapa de contornos gHMBC (Figuras 5.19, Tabela 5.4) confirmou a localização dos grupos funcionais pela correlação de H-1 ( $\delta$  3,59) com C-3 ( $\delta$  70,6), C-5 ( $\delta$  37,3) e C-10 ( $\delta$  29,6), de H-3 ( $\delta$  4,56) com C-28 ( $\delta$  177,3) e C-29 ( $\delta$  8,52), de H-19 ( $\delta$  0,45 e 0,68) com C-1 ( $\delta$  73,2), C-8 ( $\delta$  48,0) e C-11 ( $\delta$  26,5), de H-24 ( $\delta$  4,02) com C-25 ( $\delta$  147,6/147,9), C-26 ( $\delta$  111,1/111,6), C-27 ( $\delta$  17,7/17,3) e C-22 (31,6); mostrou também, entre outras, a correlação do duplete atribuído a H-21 ( $\delta$  0,82) com C-20 ( $\delta$  36,0), C-17 ( $\delta$  52,3) e C-22 ( $\delta$  31,6). Finalmente a comparação dos dados de RMN  $^{13}\text{C}$  observados com os relatados por Banskota et al., (2000a) para os ácidos quadrangulárico M (**13**) e 24-epiquadrangulárico M (**16**) (Tabela 5.5) permitiu a caracterização estrutural da mistura epimérica dos ésteres triterpenóides Quadrangularato M de metila e 24-epiquadrangularato M de metila (**2a+2b**) não descritos anteriormente na literatura.

Figura 5.19 – Principais correlações observadas no mapa de contorno gHMBC





13



16

Triterpenoides tipo cicloartano têm sido isolados de plantas da família Combretaceae (BANSKOTA et al., 2000a; BANSKOTA et al., 2000b), incluindo os ácidos quadrangulárico M e 24-epiquadrangulárico M obtidos de *Combretum quadrangulare* (BANSKOTA et al., 2000a).

Tabela 5.2 – Dados de RMN de  $^{13}\text{C}$  dos compostos **2a+2b** (600 MHz e 150 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )

C/H	$\delta_{\text{C}}$	Mult	$\delta_{\text{H}}$	gHMBC $^n J_{\text{CH}}$	
				$^2 J_{\text{CH}}$	$^3 J_{\text{CH}}$
1	73,2	CH	3,59 (t, $J$ 2,6 Hz)	H-2	H-19
2	36,1	$\text{CH}_2$	1,96		
3	70,6	CH	4,56 (dd, $J$ 12,3 e 4,6 Hz)		H-1 e H-29
4	55,0	C		H-5 e H-29	H-2
5	37,3	CH	2,54 (dd, $J$ 12,5 e 4,3 Hz)		H-1 e H-29
6	22,9	$\text{CH}_2$		H-5	
7	28,1	$\text{CH}_2$	1,84		
8	48,0	CH	1,46		H-19
9	21,0	C		H-11 e H-19	
10	29,6	C		H-1	H-2
11	26,2	$\text{CH}_2$	2,13	H-12	H-19
12	32,9	$\text{CH}_2$		H-11	H-18
13	45,3	C		H-18	H-12
14	48,9	C		H-8 e H-30	H-12
15	35,7	$\text{CH}_2$			H-30
16	25,5	$\text{CH}_2$			
17	52,3	CH			H-18 e H-21
18	18,4	$\text{CH}_3$	0,94 (s)		H-12
19	29,8	$\text{CH}_2$	0,51 e 0,75 (d, $J$ 4,6 Hz)		H-5, H-8 e H-11
20	36,0	CH		H-21	
21	18,3	$\text{CH}_3$	0,88 (d, $J$ 6,5 Hz)		
22	31,6	$\text{CH}_2$			H-21 e H-24
23	35,8	$\text{CH}_2$			
24	76,5/ 76,9	CH	4,02 (t, $J$ 6,4 Hz)		H-26a/H-26b e H-27
25	147,6/ 147,9	C		H-24 e H-27	
26	111,1/ 111,6	$\text{CH}_2$	4,83(sl), 4,93/4,92 (sl)		H-24 e H-27
27	17,3/ 17,7	$\text{CH}_3$	1,72 (s)		H-24 e H-26a/H-26b
28	177,3	C			H-3, H-28 e 28-OMe
29	8,52	$\text{CH}_3$	1,12 (s)		H-3 e H-5
30	19,5	$\text{CH}_3$	0,92 (s)		H-8
28-OMe	52,1	$\text{CH}_3$	3,72 (s)		

Tabela 5.3 – Deslocamentos químicos de RMN de  $^{13}\text{C}$  dos compostos **2a+2b** (150 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )

<b>C</b>	<b>2a</b>	<b>2b</b>	<b>13<sup>a</sup></b>	<b>16<sup>a</sup></b>
1	73,2	73,2	72,5	72,5
2	36,1	36,1	38,8	38,8
3	70,6	70,6	70,7	70,7
4	55,0	55,0	55,7	55,7
5	37,3	37,3	37,7	37,7
6	22,9	22,9	23,4	23,4
7	28,1	28,1	28,4	28,4
8	48,0	48,0	48,2	48,2
9	21,0	21,0	20,8	20,8
10	29,6	29,6	30,3	30,3
11	26,2	26,2	26,2	26,2
12	32,9	32,9	33,3	33,3
13	45,3	45,3	45,5	45,5
14	48,9	48,9	49,1	49,1
15	35,7	35,7	36,3	36,3
16	25,5	25,5	25,9	25,9
17	52,3	52,3	52,6	52,6
18	18,4	18,4	18,4	18,4
19	29,8	29,8	29,8	29,8
20	36,0	36,0	36,4	36,4
21	18,3	18,3	18,7	18,7
22	31,6	31,6	32,7	32,7
23	35,8	35,8	35,9	35,9
24	76,5	76,9	75,6	76,1
25	147,6	147,9	149,6	149,6
26	111,1	111,6	110,0	110,4
27	17,3	17,7	18,2	17,7
28	177,3	177,3	180,0	180,0
29	8,52	8,52	9,8	9,8
30	19,5	19,5	19,5	19,5
28-OMe	52,1	52,1	-	-

<sup>a</sup> Dados obtidos em  $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ , relatados por Banskota et al. (2000a)

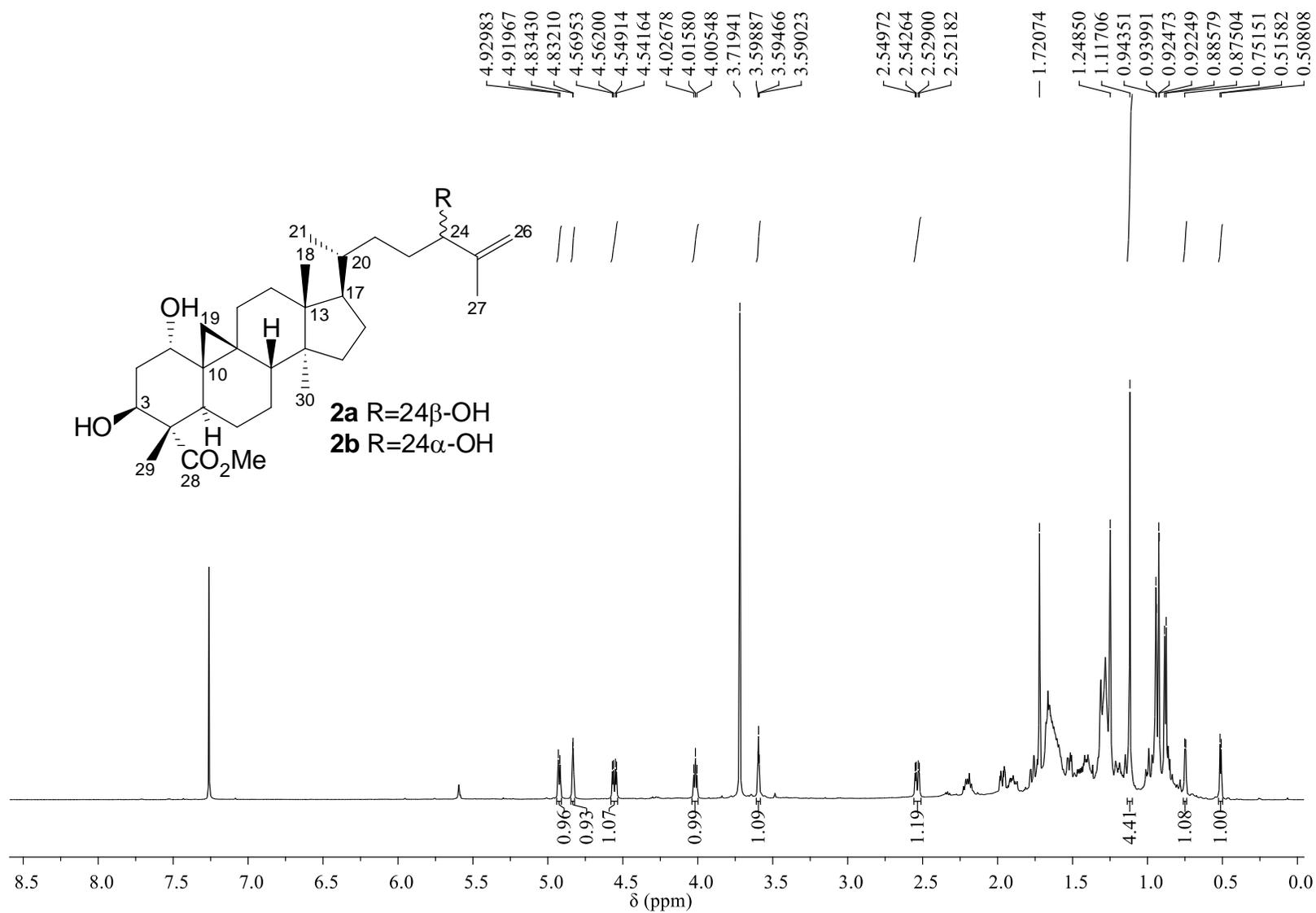
Figura 5.20 – Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  para os compostos **2a+2b** ( $\text{CDCl}_3$ , 600 MHz)

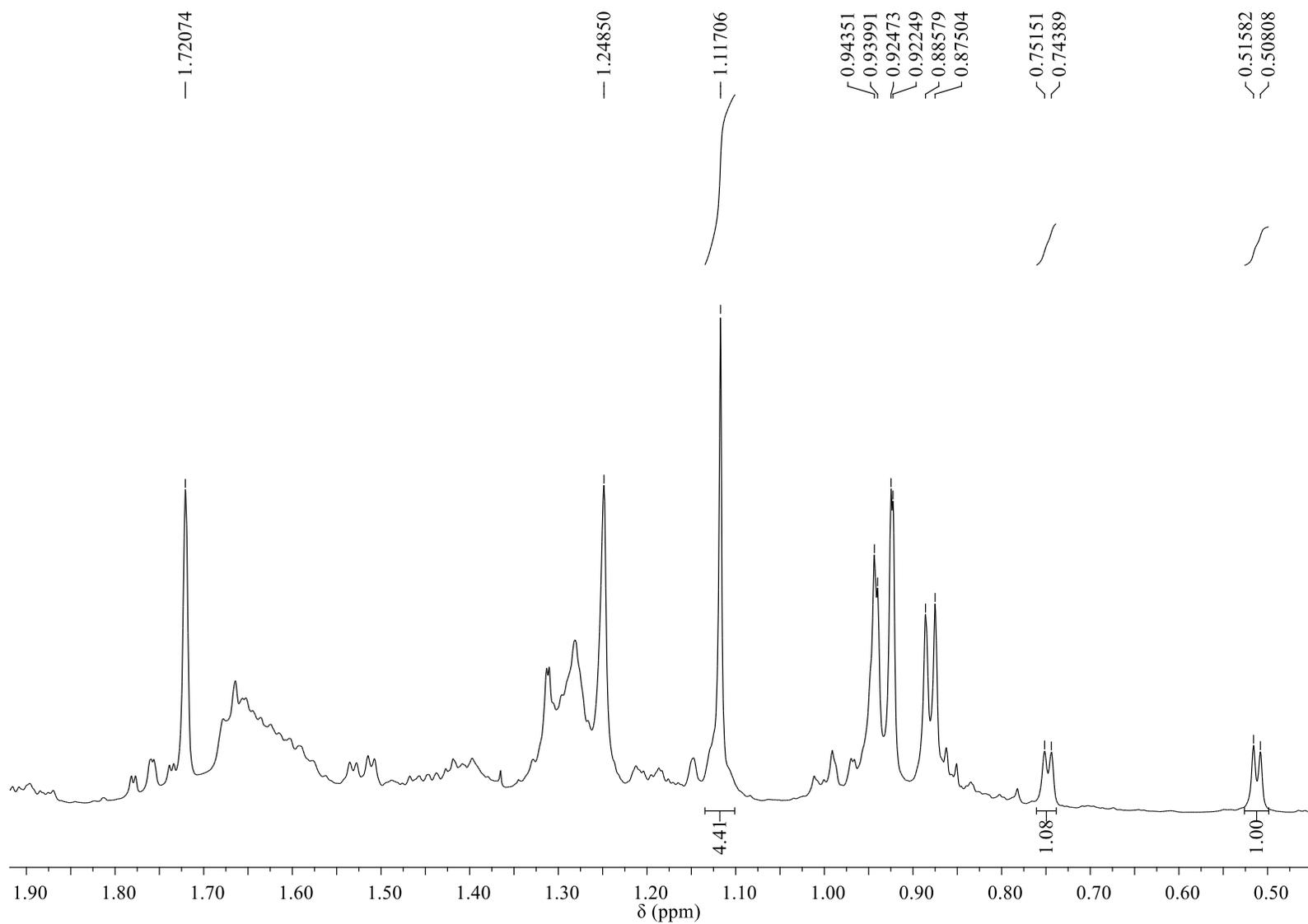
Figura 5.21 – Expansão (0,45-1,9 ppm) do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  para os compostos **2a+2b** ( $\text{CDCl}_3$ , 600 MHz)

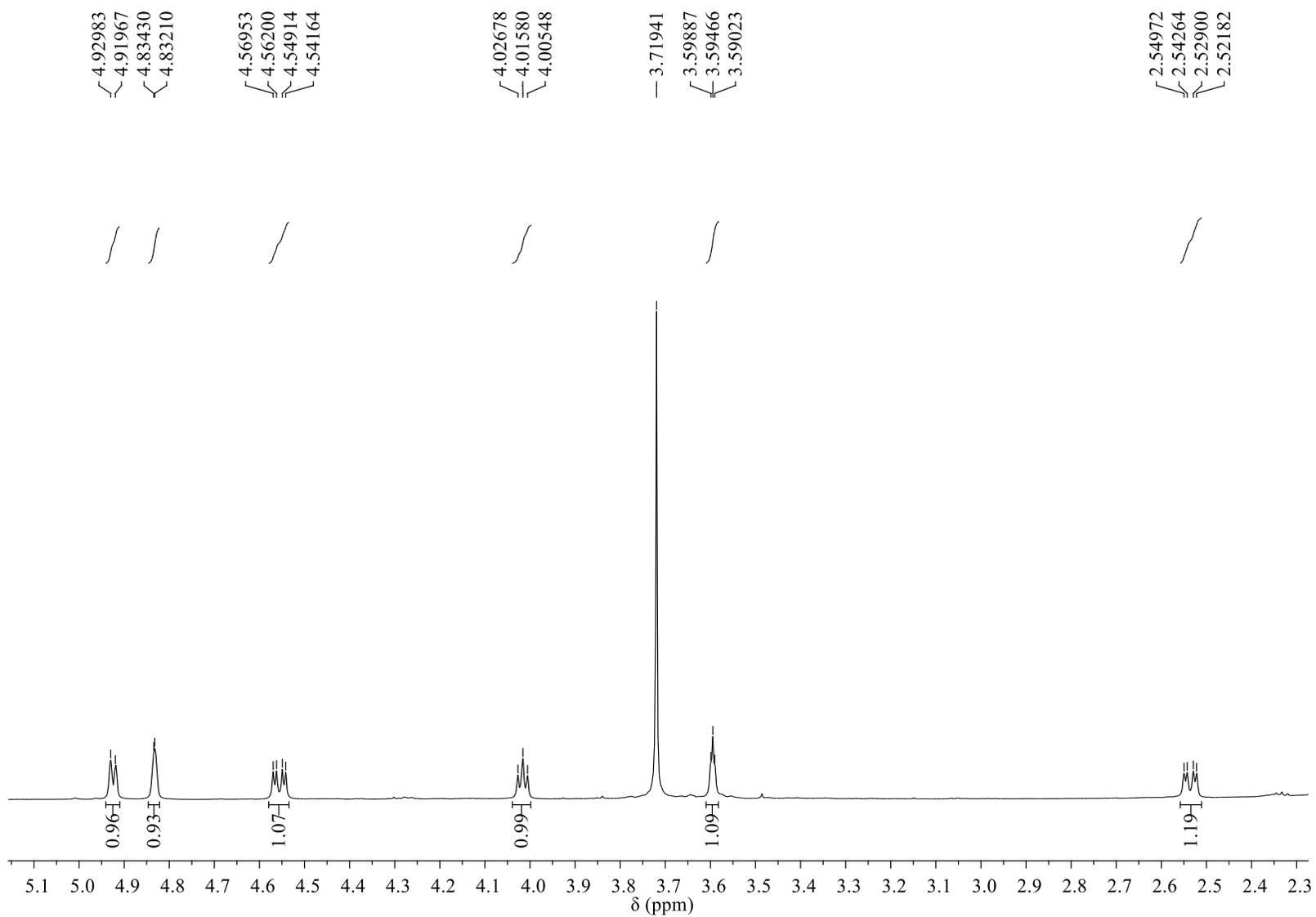
Figura 5.22 – Expansão (2,3-5,1 ppm) do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  para os compostos de **2a+2b** ( $\text{CDCl}_3$ , 600 MHz)

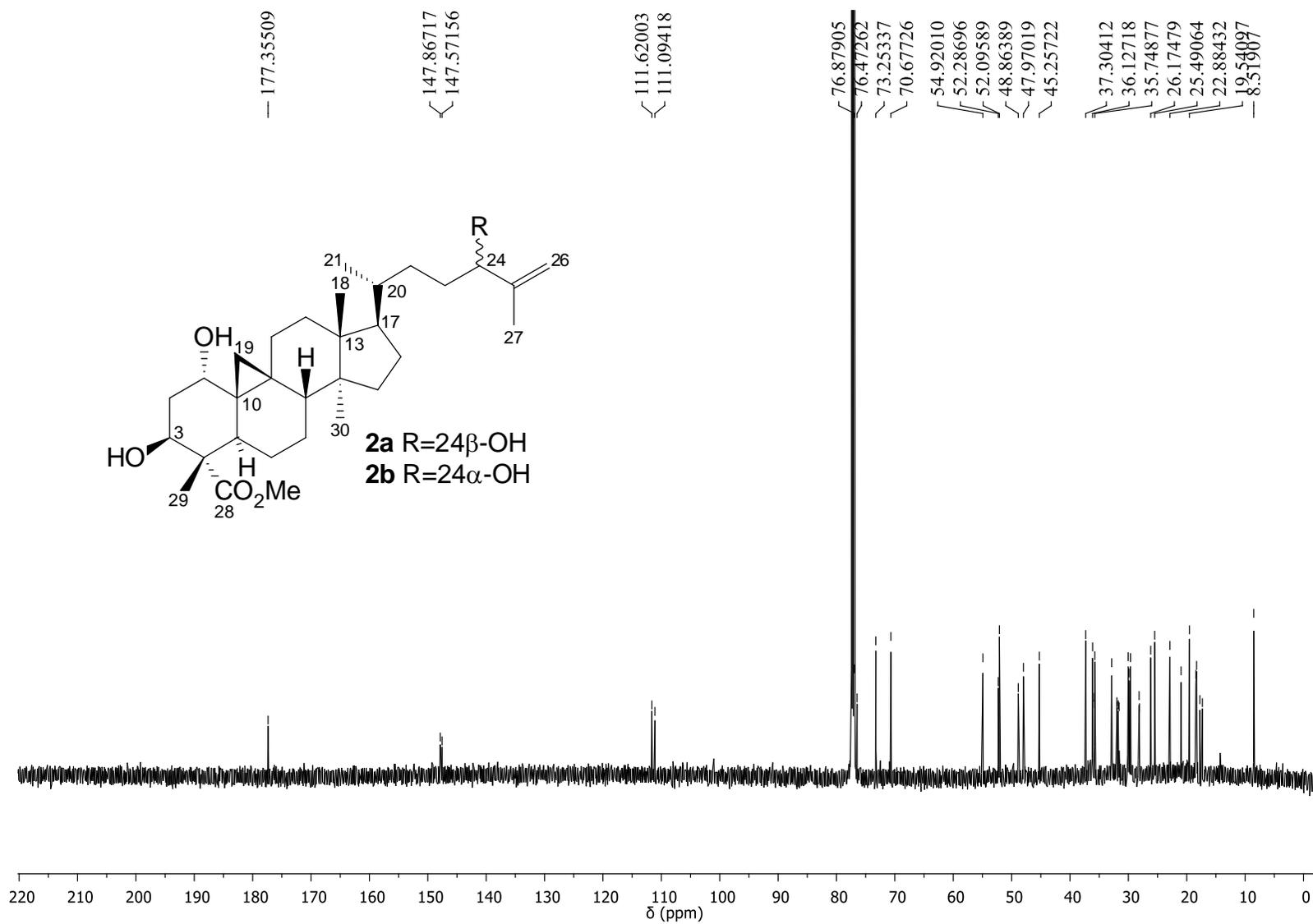
Figura 5.23 – Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  para os compostos **2a+2b** ( $\text{CDCl}_3$ , 150 MHz)

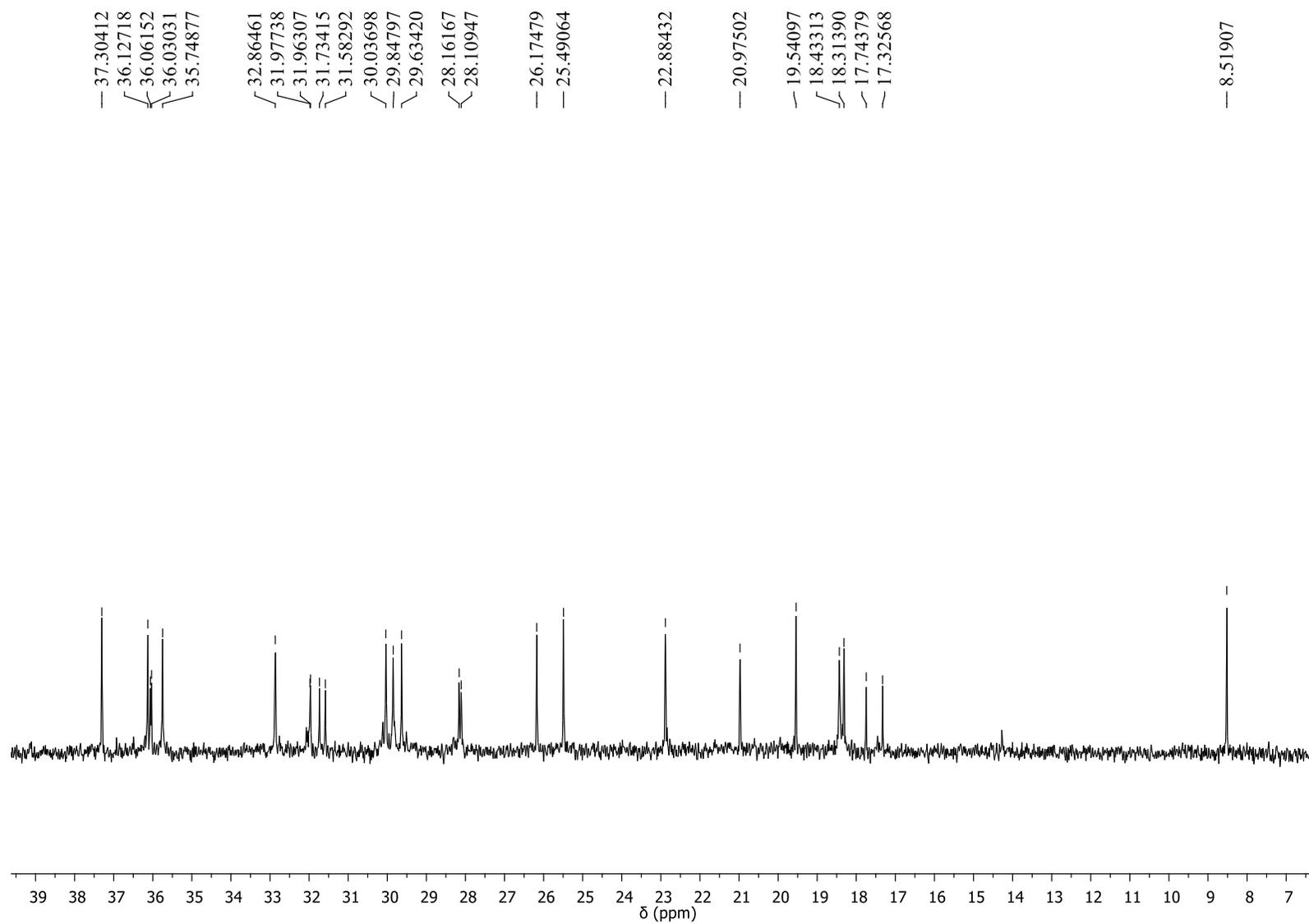
Figura 5.24 – Expansão (7-39 ppm) do espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  para os compostos **2a+2b** ( $\text{CDCl}_3$ , 150 MHz)

Figura 5.25 – Expansão (75-150 ppm) do espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  para os compostos **2a+2b** ( $\text{CDCl}_3$ , 150 MHz)

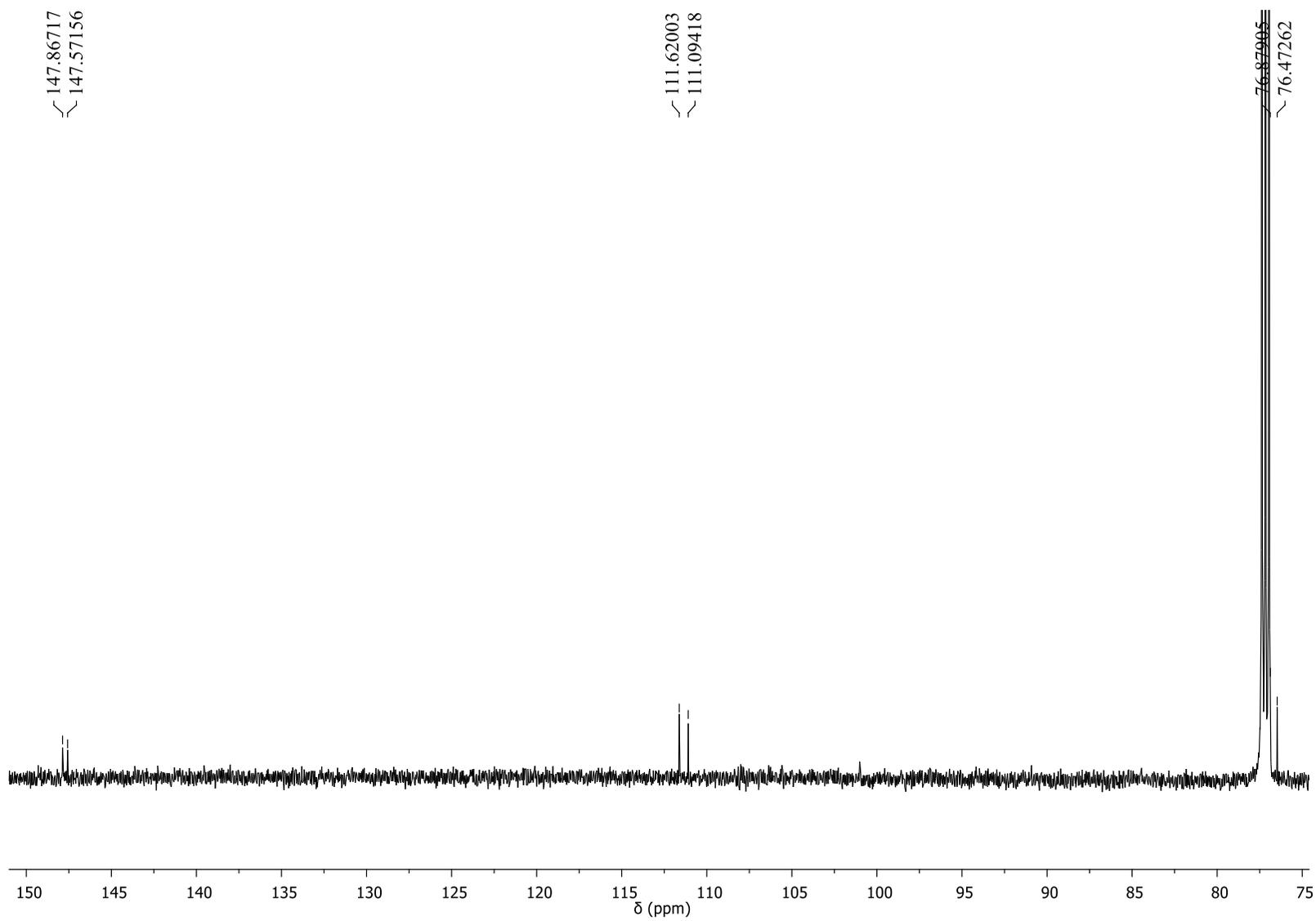


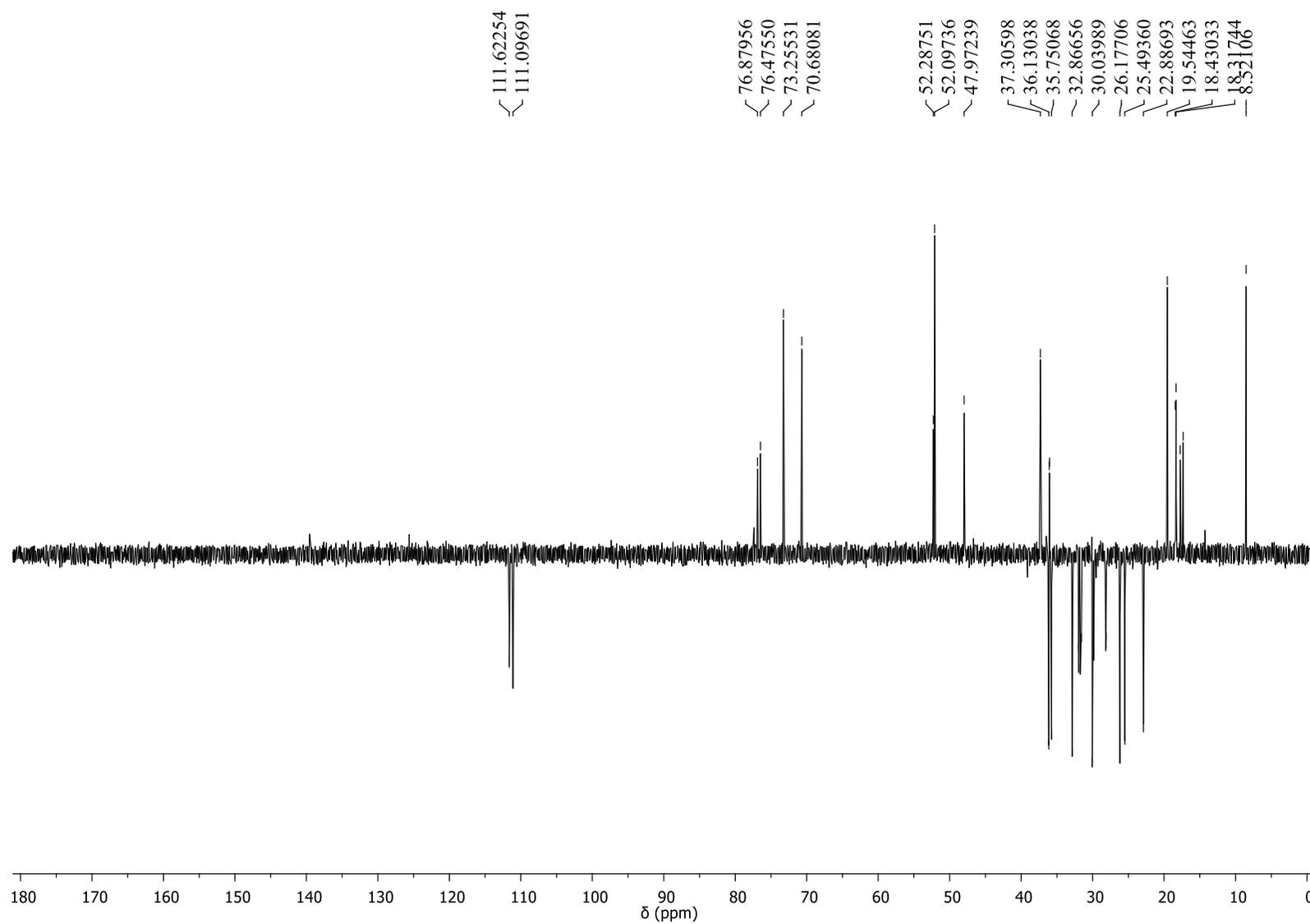
Figura 5.26 – Espectro de RMN de DEPT 135° para os compostos **2a+2b** (CDCl<sub>3</sub>, 150 MHz)

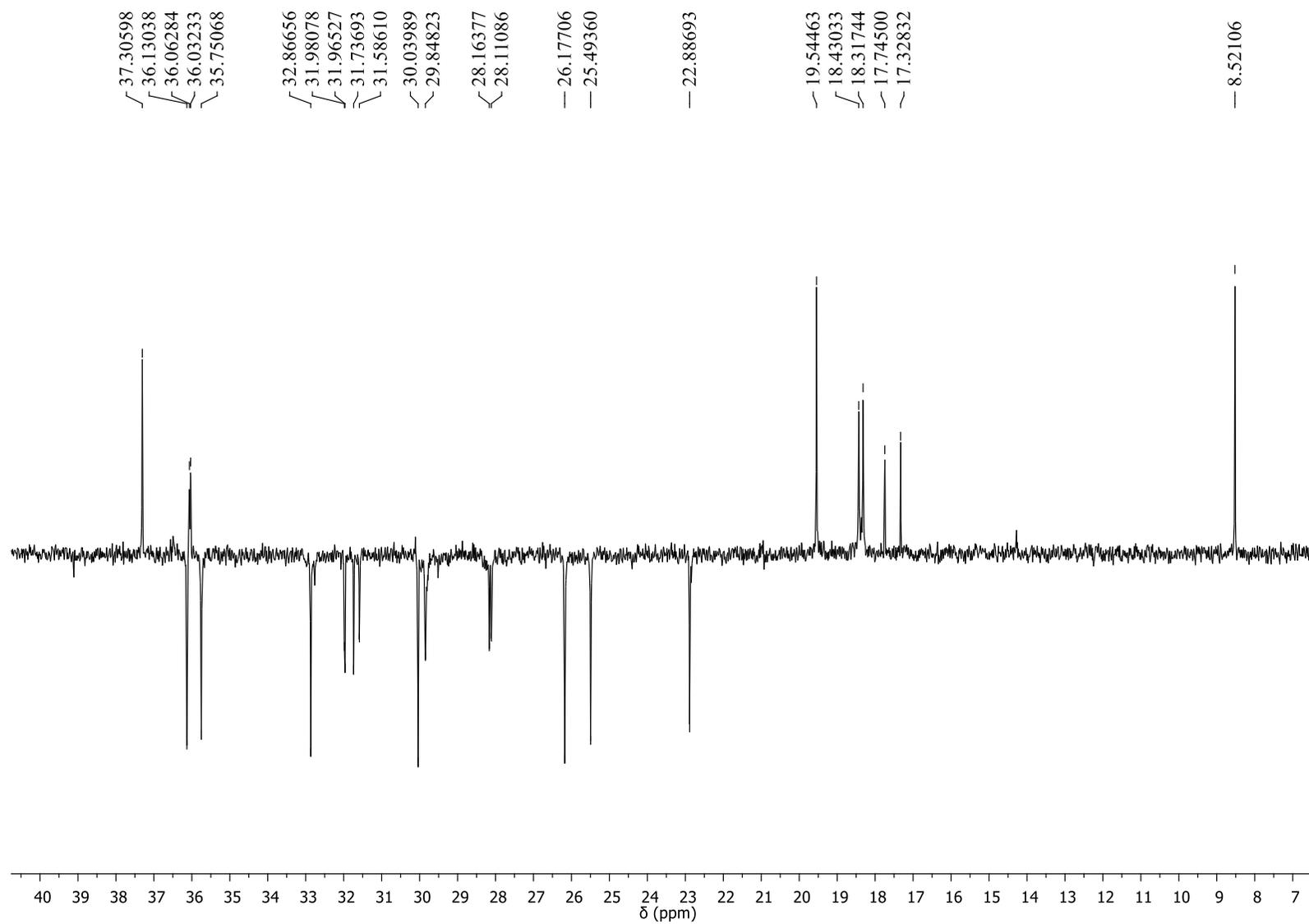
Figura 5.27 – Expansão (7-40 ppm) do espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  – DEPT  $135^\circ$  para os compostos **2a+2b** ( $\text{CDCl}_3$ , 150 MHz)

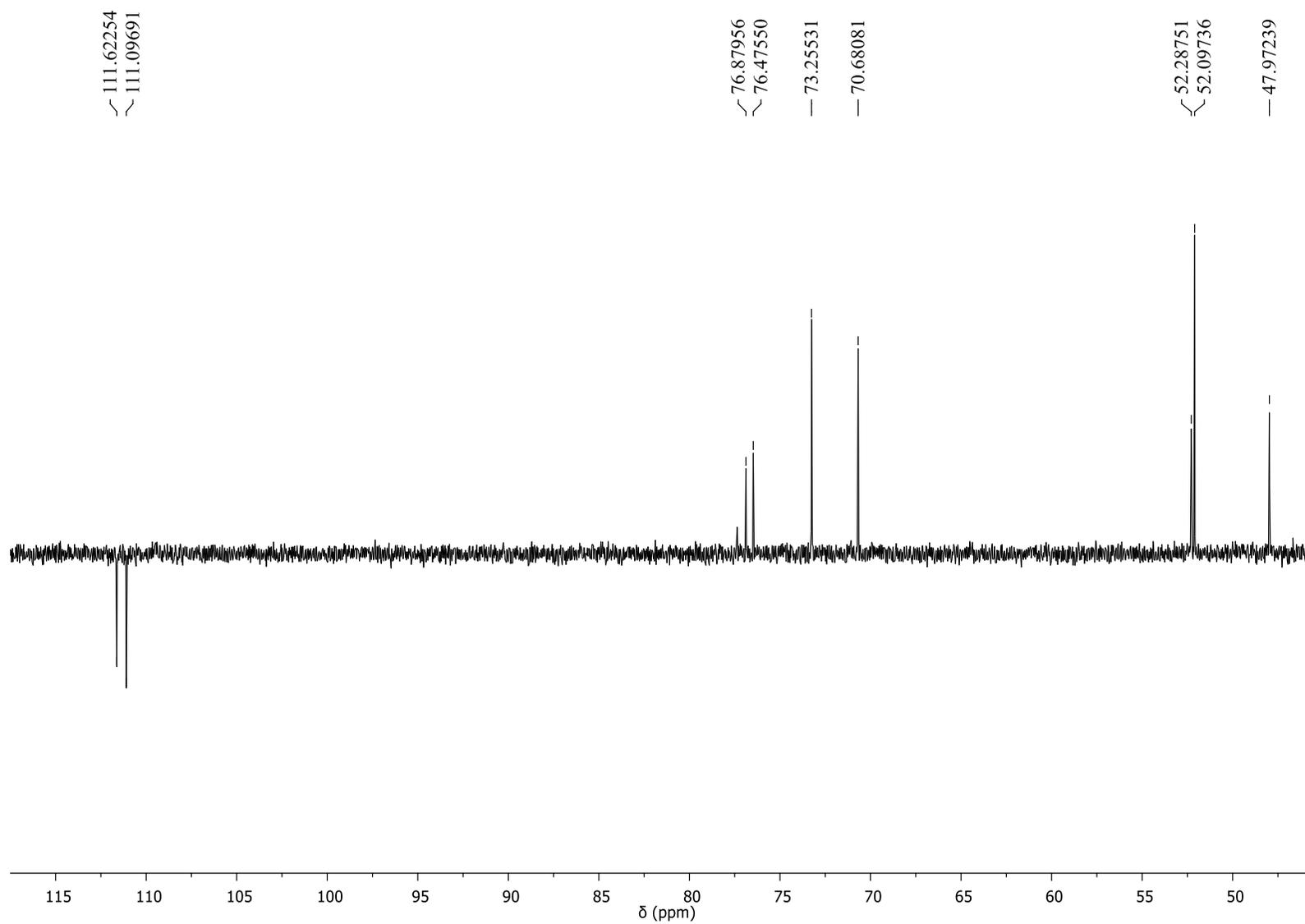
Figura 5.28 – Expansão (40-120 ppm) do espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  – DEPT 135° para os compostos **2a+2b** ( $\text{CDCl}_3$ , 150 MHz)

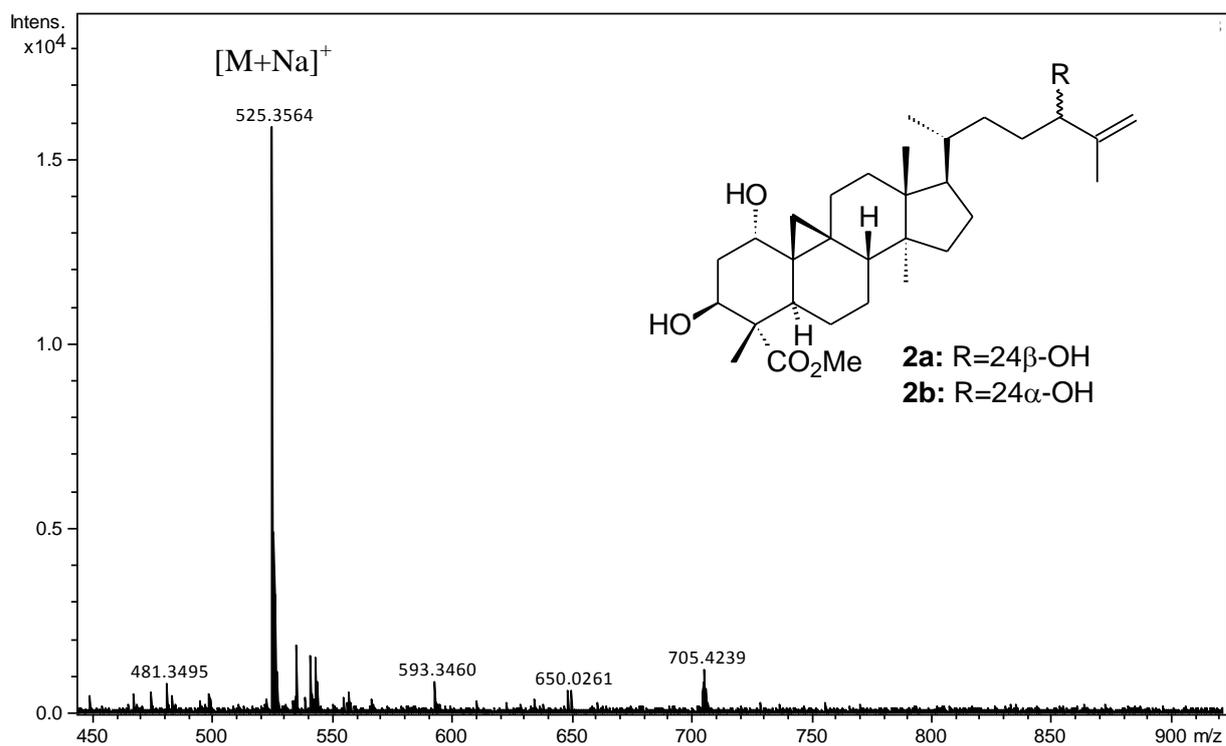
Figura 5.29 – Espectro de massas dos compostos **2a+2b** –  $[M+Na]^+$ .

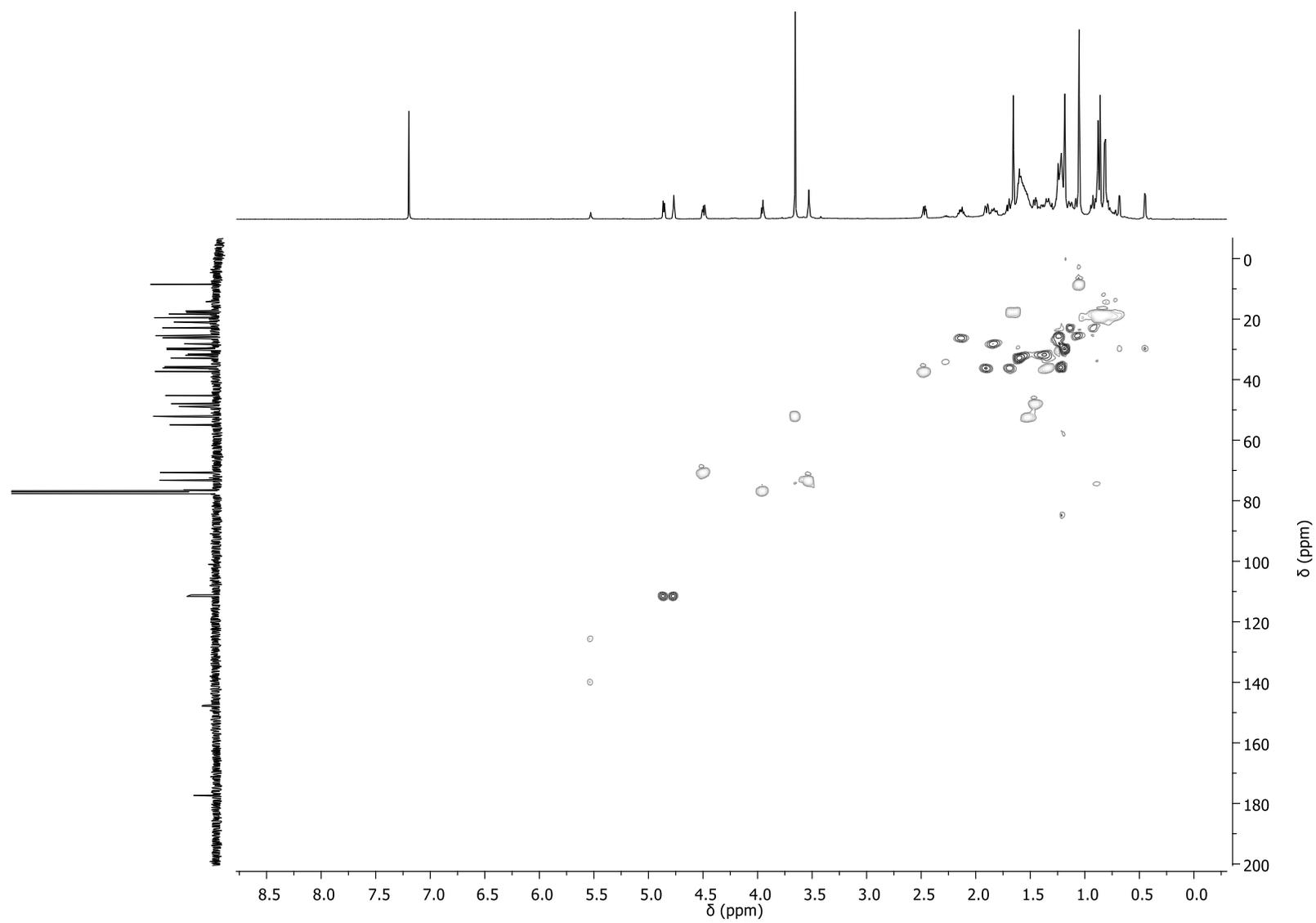
Figura 5.30 – Mapa de contornos do gHSQC para os compostos **2a+2b** (CDCl<sub>3</sub>, 600 MHz)

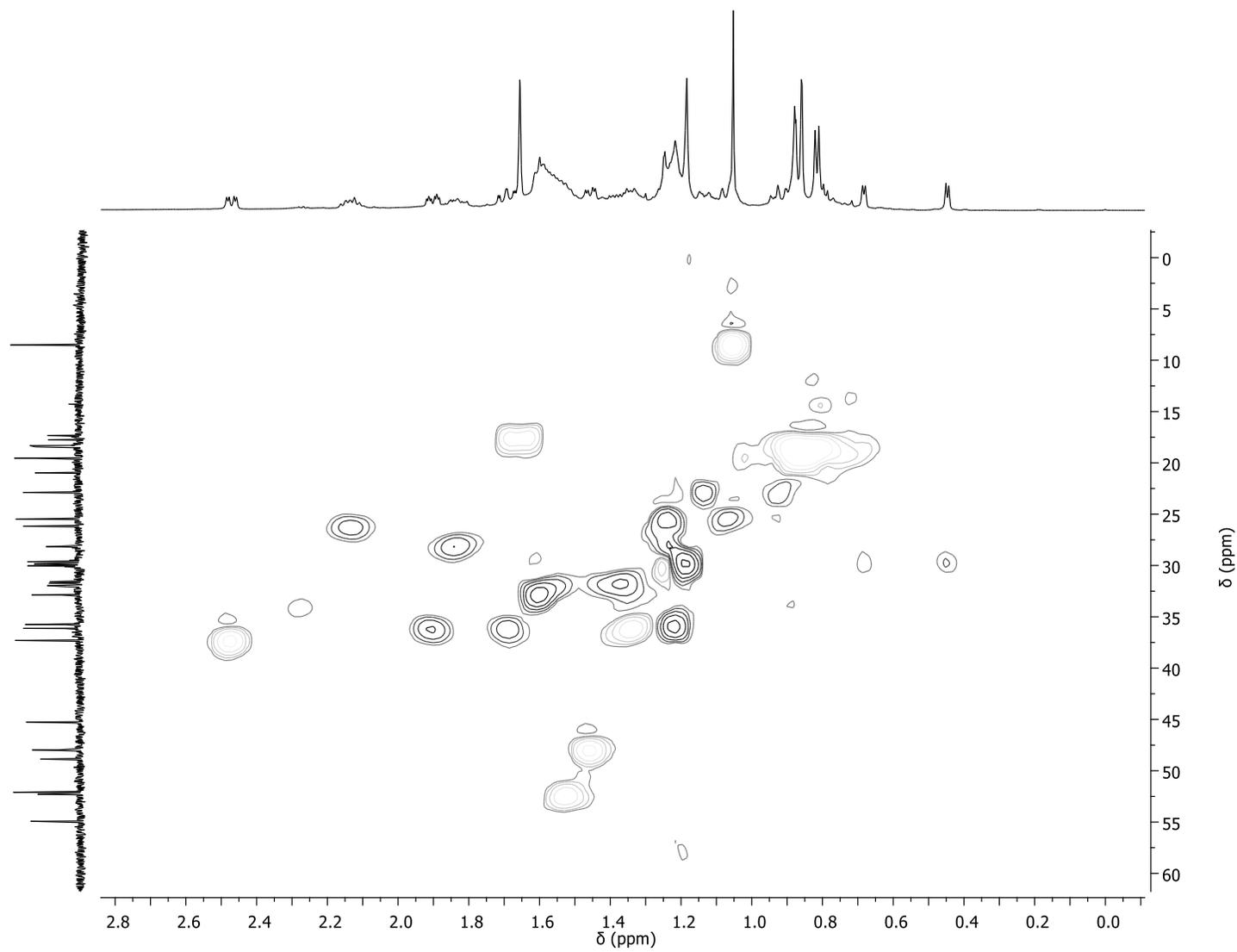
Figura 5.31 – Expansão do gHSQC para os compostos **2a+2b** (CDCl<sub>3</sub>, 600 MHz)

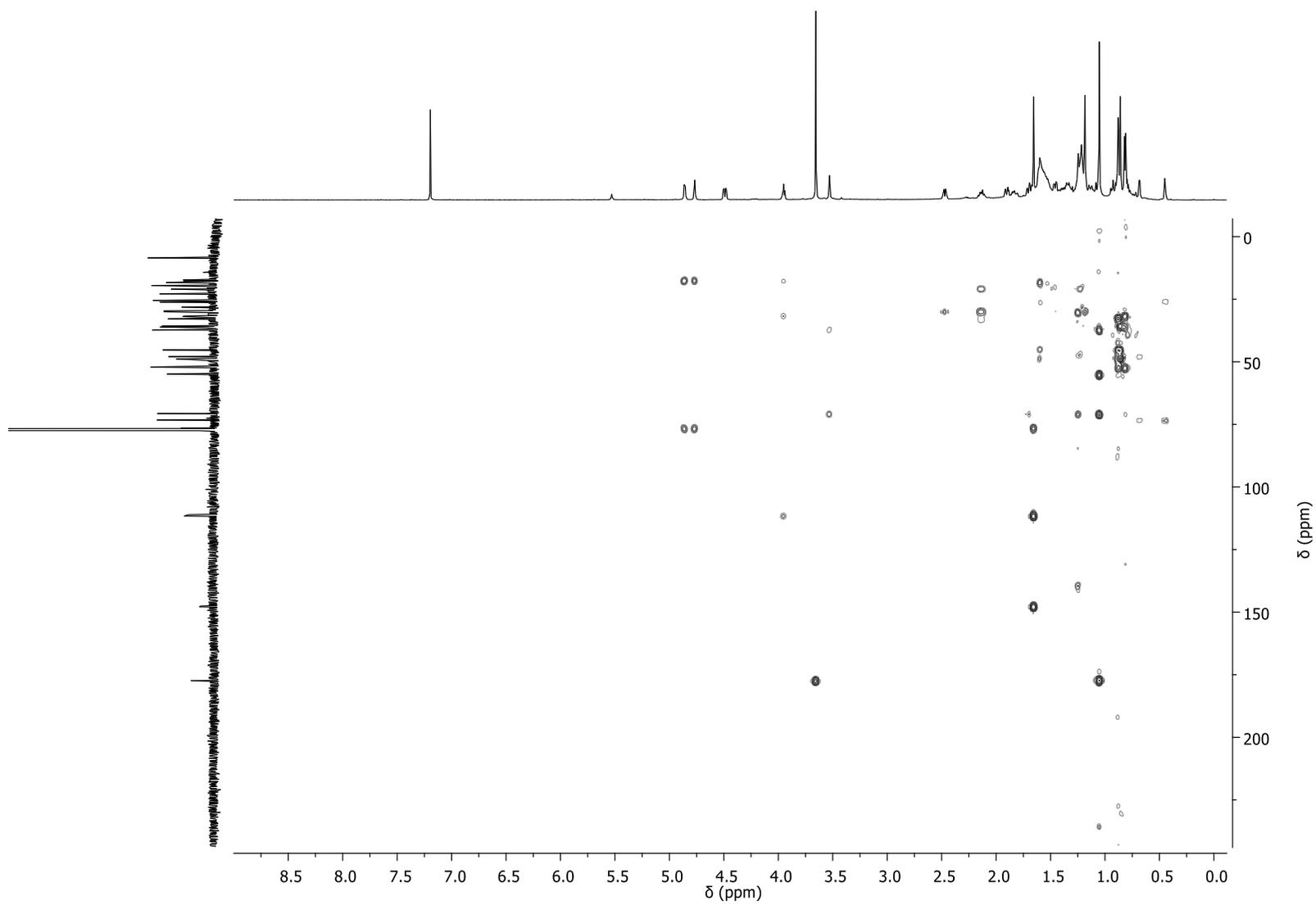
Figura 5.32 – Mapas de contorno do gHMBC para os compostos **2a+2b** (CDCl<sub>3</sub>, 600 MHz)

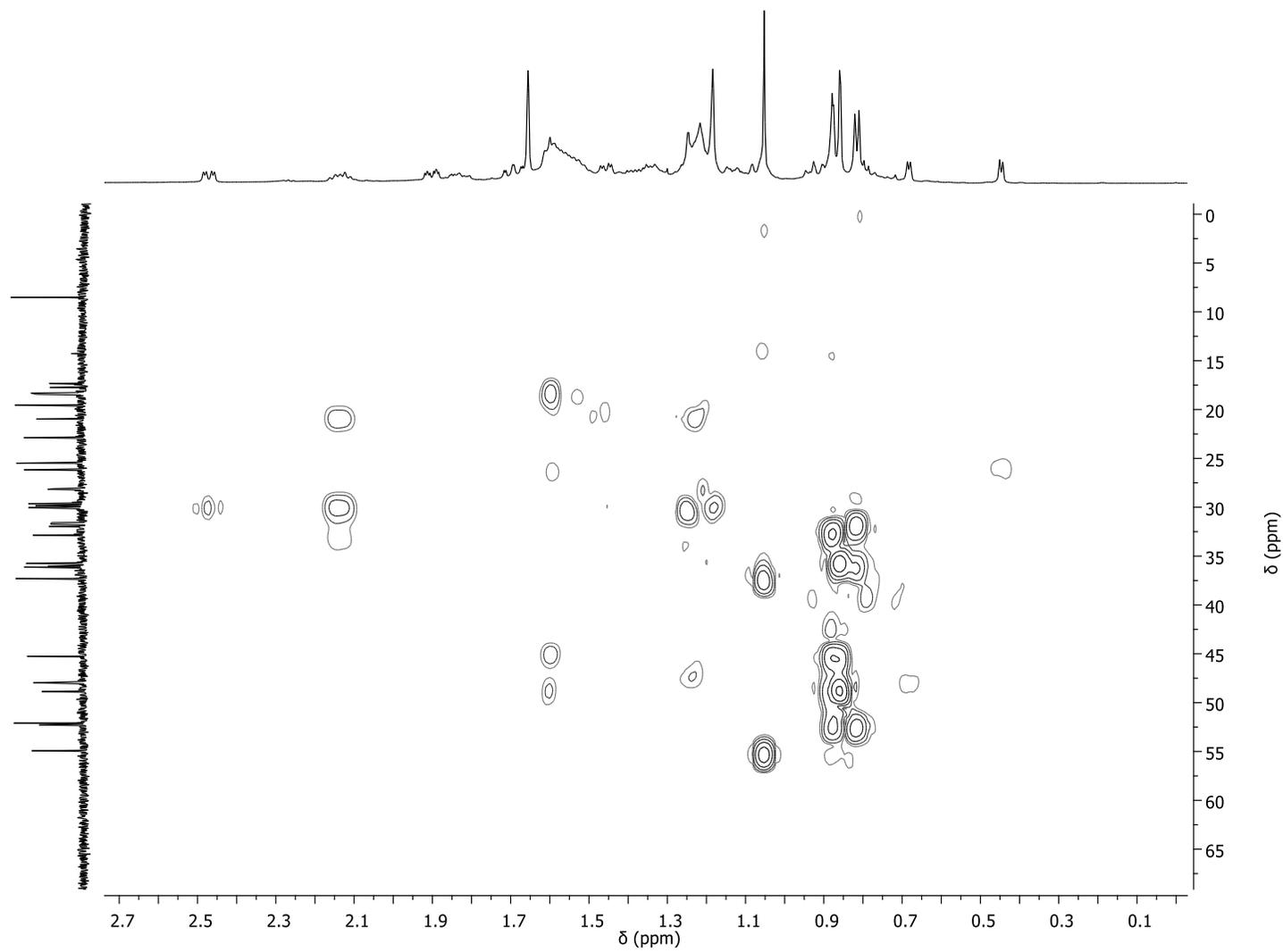
Figura 5.33 – Expansão do gHMBC para os compostos **2a+2b** (CDCl<sub>3</sub>, 600 MHz)

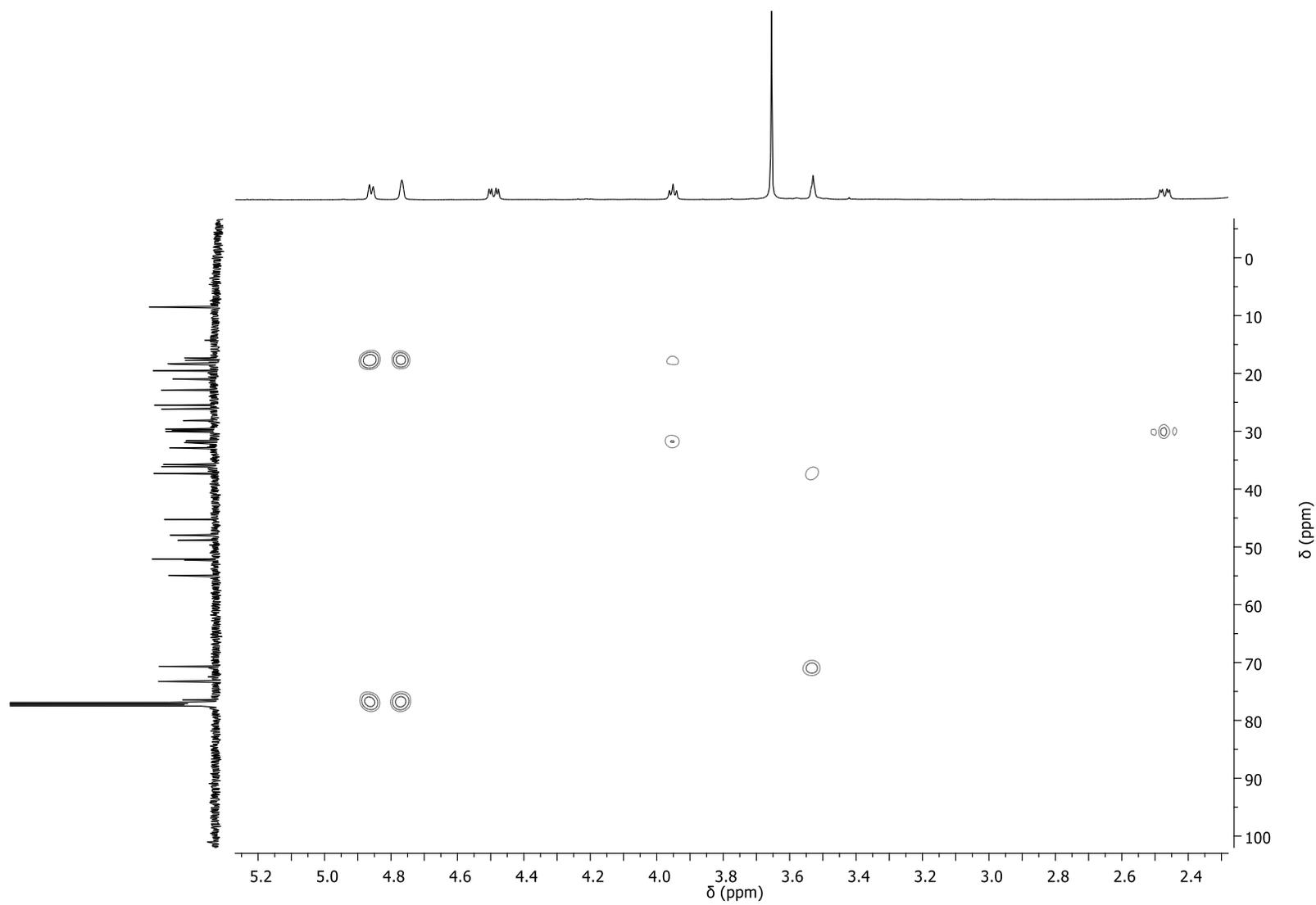
Figura 5.34 – Expansão do gHMBC para os compostos **2a+2b** (CDCl<sub>3</sub>, 600 MHz)

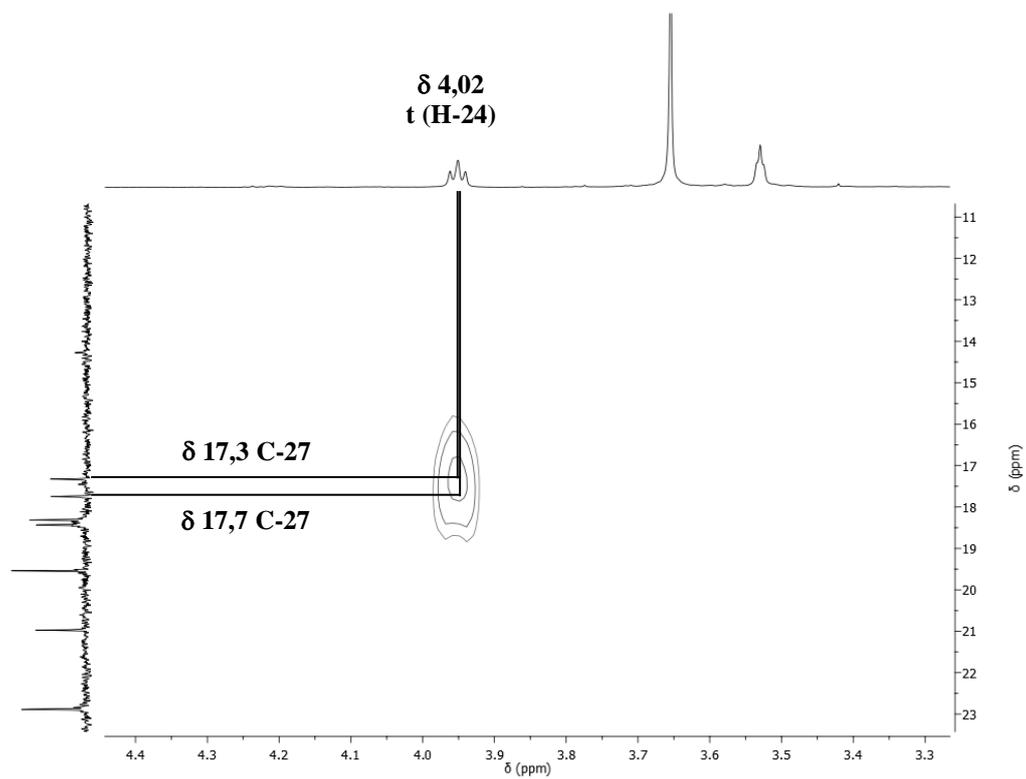
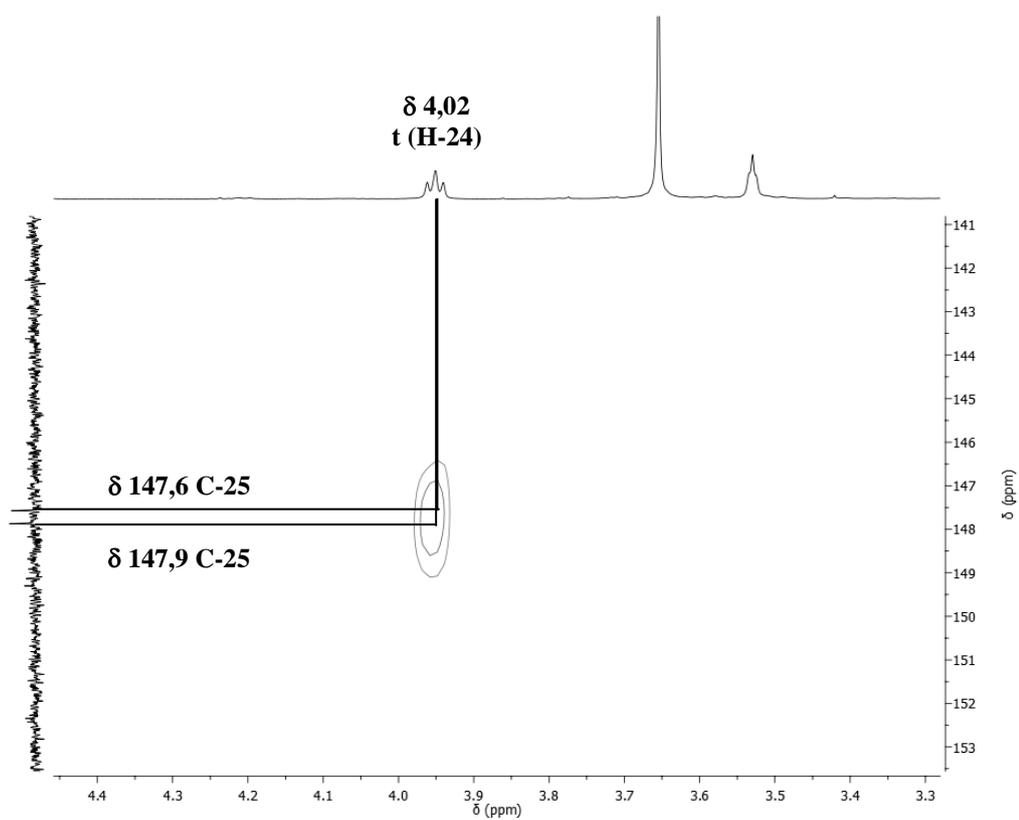
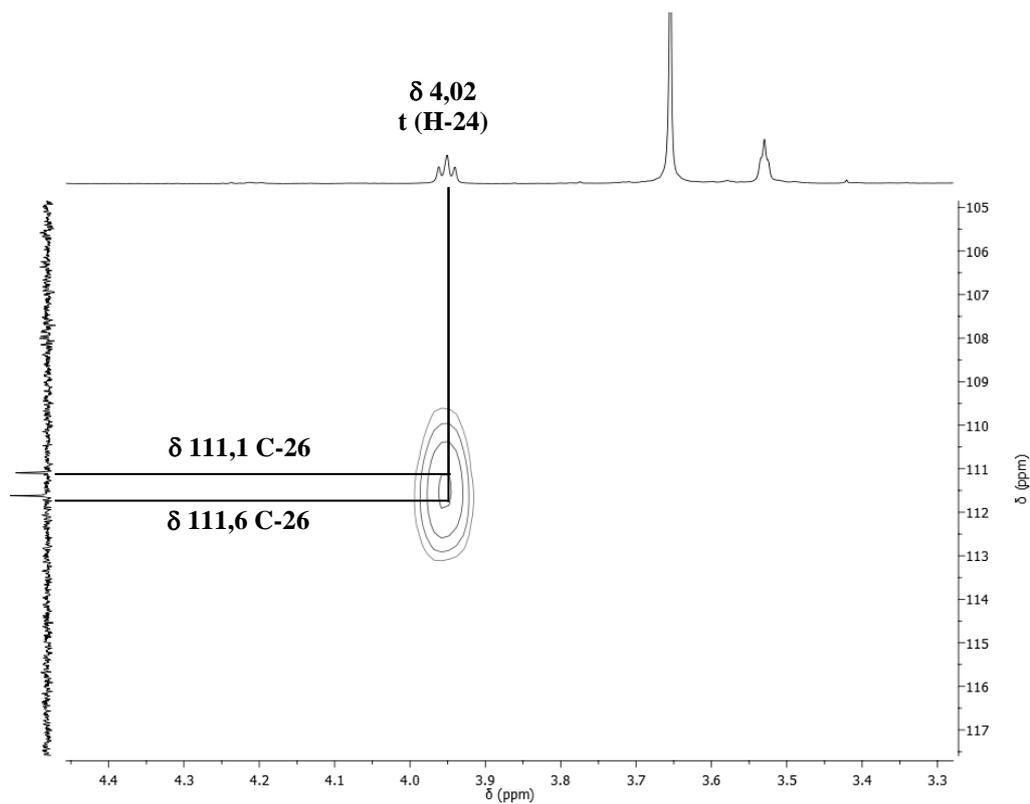
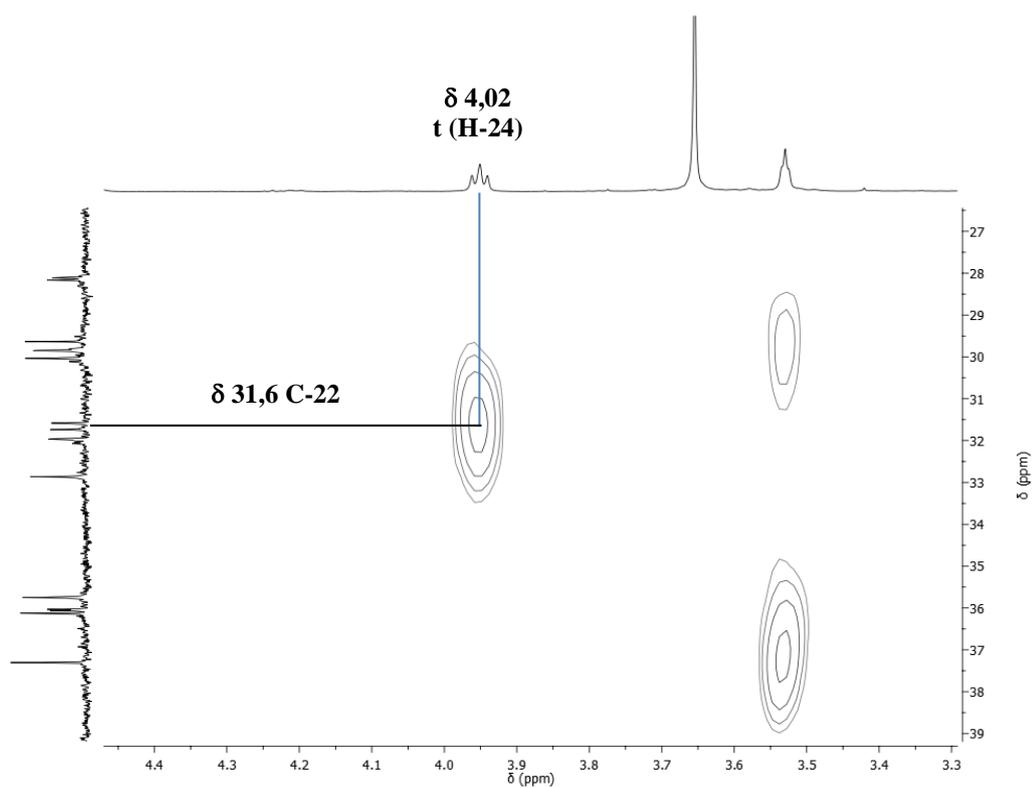
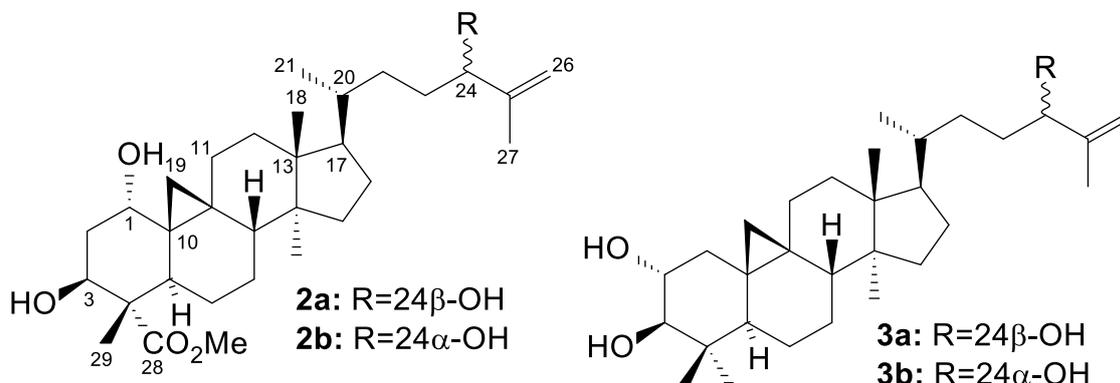
Figura 5.35 – Expansão do gHMBC para os compostos **2a+2b** (CDCl<sub>3</sub>, 600 MHz)Figura 5.36 – Expansão do gHMBC para os compostos **2a+2b** (CDCl<sub>3</sub>, 600 MHz)

Figura 5.37 – Expansão do gHMBC para os compostos **2a+2b** (CDCl<sub>3</sub>, 600 MHz)Figura 5.38 – Expansão do gHMBC para os compostos **2a+2b** (CDCl<sub>3</sub>, 600 MHz)

### 5.3.3 Elucidação estrutural dos compostos 2a+2b/3a+3b



A mistura dos compostos **2a+2b/3a+3b** (17,5 mg), correspondente a fração S12-19-6, é proveniente do sobrenadante (FSbn) obtido a partir do precipitado formado durante a partição do extrato etanólico com hexano e, após sucessivos fracionamentos, foi obtida (Esquemas 4.1 a 4.3). A análise por cromatografia em camada delgada de gel de sílica, eluída em clorofórmio-MeOH (9:1) e revelada com solução de sulfato cérico resultou em uma única mancha púrpura. As estruturas destes compostos foram elucidadas por meio da análise dos espectros de RMN uni e bidimensionais em comparação com os dados da literatura (BANSKOTA et. al., 2000a; THANG et al., 2013).

A análise do espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  (Figuras 5.40-5.41), em conjunto com os espectros de DEPT 90° e 135° (Figuras 5.42-5.43) permitiu identificar os triterpenoides **2a+2b**, elucidados anteriormente na fração S14-12 (página 88), pela presença dos sinais em  $\delta$  73,2 (C-1); 70,6 (C-3) e 76,5/76,4 (C-24), atribuídos aos carbonos oximetínicos, em  $\delta$  177,4 e  $\delta$  52,1 referentes a carbonila de ésteres e metoxila, respectivamente. A mistura epimérica destes compostos foi confirmada pelos sinais duplicados de carbonos olefínicos em  $\delta$  111,1/111,5 (C-26) e 147,9/147,6 (C-25) e do carbono metílico em  $\delta$  17,4/17,7 (C-27).

No espectro de RMN  $^1\text{H}$  (Figuras 5.44-5.46) os sinais em  $\delta$  3,59 (tl,  $J= 3,1$  Hz, H-1),  $\delta$  4,55 (dd,  $J= 12,3$  e 4,6 Hz, H-3) e  $\delta$  4,01 (t,  $J= 6,7$  Hz, H-24) foram atribuídos aos compostos **2a+2b**, assim como os dois dupletos em  $\delta$  0,50 ( $J= 4,8$  Hz) e em  $\delta$  0,74 ( $J= 4,8$  Hz), indicativos de ocorrência de uma ponte metilênica formando um anel ciclopropânico característico de compostos com esqueleto cicloartano. Adicionalmente, o espectro de RMN  $^1\text{H}$  também apresentou sinais de uma ligação dupla *gem*-

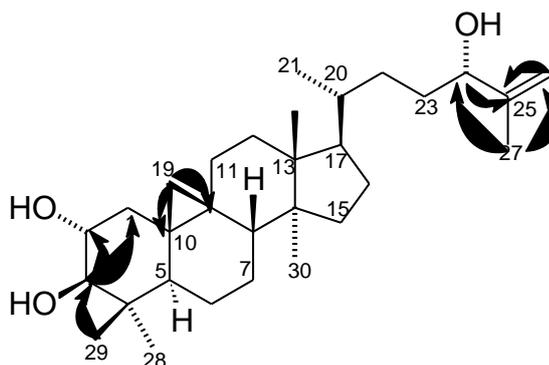
dissubstituída evidenciada pelos sinais em  $\delta$  4,83 (d,  $J= 1,5$  Hz, H-26a) e 4,93/4,92 (sl, H-26b) para os dois epímeros e o simpleto em  $\delta$  3,71 atribuído ao hidrogênio do grupo metoxila.

O espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  (Figura 5.40 e 5.41), além dos sinais atribuídos aos compostos **2a+2b**, apresentou adicionalmente sinais em  $\delta$  71,5 (C-2) e 83,8 (C-3), atribuídos a carbonos oximetínicos e sugeriu a presença da mistura dos compostos **3a+3b** com a mesma cadeia lateral dos triterpenoides **2a+2b**. A mistura epimérica de **3a+3b** foi confirmada pelo espectro de RMN  $^1\text{H}$  (Figura 5.44-5.46), que apresentou dois dupletos de menor intensidade em  $\delta$  0,45 ( $J= 4,6$  Hz) e em  $\delta$  0,61 ( $J= 4,9$  Hz), indicativos de anel ciclopropânico, característico de compostos com esqueleto cicloartano (THANG et. al., 2013), como também pelos sinais em  $\delta$  3,05 (d,  $J_{ax-ax}= 9,4$  Hz, H-3) e em  $\delta$  3,59 (m, H-2), atribuídos aos hidrogênios oximetínicos. Neste espectro, o sinal de H-2 ficou sobreposto ao de H-1 ( $\delta$  3,59; tl,  $J= 3,1$  Hz) dos compostos **2a+2b**, entretanto, no mapa de contornos gHSQC (Figura 5.48), este sinal mostrou uma correlação com o sinal em 71,5 atribuído a C-2 para **3a+3b**. O mapa de contornos gHSQC (Figuras 5.48 à 5.52) mostrou ainda, entre outras, as correlações de H-3 ( $\delta$  3,05) com C-3 ( $\delta$  83,8), de H-24 ( $\delta$  4,01) com C-24 ( $\delta$  76,5), de H-26 ( $\delta$  4,83 e  $\delta$  4,92) com C-26 ( $\delta$  111,5) e H-29 ( $\delta$  0,83) com C-29 ( $\delta$  15,3).

O mapa de contornos gHMBC (Figuras 5.53 à 5.59, Tabela 5.4) mostrou as correlações de H-3 ( $\delta$  3,05) com C-1 ( $\delta$  25,9), C-2 ( $\delta$  71,5) e C-29 ( $\delta$  15,3), de H-29 ( $\delta$  0,83) com C-3 ( $\delta$  70,6), C-4 ( $\delta$  40,5) e C-5 ( $\delta$  47,3), de H-24 ( $\delta$  4,01) com C-23 ( $\delta$  31,8), C-25 ( $\delta$  147,5), C-26 ( $\delta$  111,5) e C-27 ( $\delta$  17,3) e dos dois dupletos atribuídos ao H-19 ( $\delta$  0,45 e 0,61) com C-8 ( $\delta$  26,8), C-9 ( $\delta$  25,3), C-10 ( $\delta$  19,6) e C-11 ( $\delta$  40,0).

A Figura 5.39 mostra as principais correlações observadas no mapa de contornos gHMBC as quais mostram a conectividade dos carbonos da estrutura.

Figura 5.39 – Principais correlações observadas no mapa de contorno gHMBC.



A análise dos deslocamentos químicos de RMN  $^{13}\text{C}$  (C-1 a C-16, C-18, C-19, C-28 e C-29) dos compostos **3a+3b** (Tabela 5.5) em comparação com os relatados por Thang et. al., (2013) para o composto **62**, isolado da espécie *Annona reticulata* (Annonaceae) corroboraram com a estrutura proposta.

O espectro de massas de alta resolução (Figura 5.59) apresentou dois picos de moléculas cationizadas com  $m/z$  525,3658  $[\text{M}+\text{Na}]^+$  e 481,3657  $[\text{M}+\text{Na}]^+$  os quais são condizentes com as fórmulas moleculares  $\text{C}_{31}\text{H}_{50}\text{O}_5$ , referentes aos compostos Quadrangularato M de metila (**2a**) e 24-epiquadrangularato M de metila (**2b**), e  $\text{C}_{30}\text{H}_{50}\text{O}_3$ , atribuída aos triterpenoides  $2\alpha,3\beta,24\beta$ -trihidroxi-cicloart-25-eno (**3a**) e  $2\alpha,3\beta,24\alpha$ -trihidroxi-cicloart-25-eno (**3b**), respectivamente, ambos inéditos na literatura.

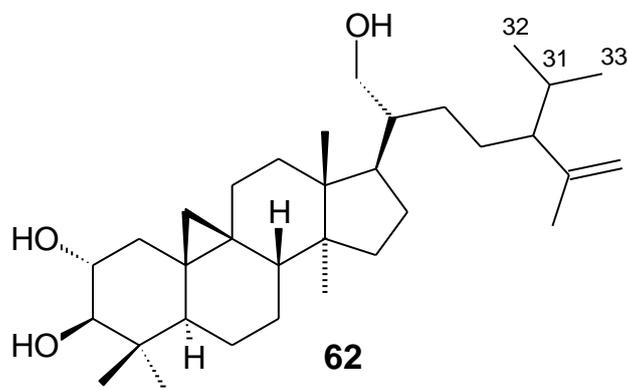


Tabela 5.4 – Dados de RMN de  $^{13}\text{C}$  do composto **3a+3b** (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )

C/H	$\delta_{\text{C}}$	Mult	$\delta_{\text{H}}$	gHMBC $^n J_{\text{CH}}$	
				$^2 J_{\text{CH}}$	$^3 J_{\text{CH}}$
1	25,9	$\text{CH}_2$			H-3
2	71,5	CH		H-2	
3	83,8	CH	3,05 (d, $J$ 9,4 Hz)		H-28 e H-29
4	40,5	C		H-29	
5	47,3	CH			H-29
6	20,9	$\text{CH}_2$			
7	26,1	$\text{CH}_2$			
8	47,9	CH			
9	25,3	C			
10	19,6	C			
11	40,0	$\text{CH}_2$			
12	35,6	$\text{CH}_2$			
13	45,4	C			
14	48,9	C			
15	31,8	$\text{CH}_2$			
16	26,8	$\text{CH}_2$			
17	52,3	CH			
18	18,4	$\text{CH}_3$			
19	29,9	$\text{CH}_2$	0,45 (d, $J$ 4,6 Hz) e 0,61 (d; $J$ 4,9 Hz)		
20	36,1	CH			
21	18,4	$\text{CH}_3$			
22	32,0	$\text{CH}_2$			H-24
23	35,8	$\text{CH}_2$			
24	76,5/77,3	CH	4,01 (t, $J$ 6,7 Hz)		H-26 e H-27
25	147,6/147,9	C		H-24 e H-27	
26	111,1/111,6	$\text{CH}_2$	4,83 (sl); 4,93/4,91 (sl)		H-24 e H-27
27	17,7/17,3	$\text{CH}_3$	1,71 (s)		H-24 e H-26
28	18,3	$\text{CH}_3$			
29	15,3	$\text{CH}_3$	0,83 (s)		
30	19,4	$\text{CH}_3$	0,98 (s)		

Tabela 5.5 – Dados de RMN de  $^{13}\text{C}$  do composto **3a+3b** (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )

<b>C</b>	<b>3a</b>	<b>3b</b>	<b>62<sup>a</sup></b>
1	<b>25,9</b>	<b>25,9</b>	<b>25,7</b>
2	<b>71,5</b>	<b>71,5</b>	<b>71,0</b>
3	<b>83,8</b>	<b>83,8</b>	<b>83,2</b>
4	<b>40,5</b>	<b>40,5</b>	<b>40,3</b>
5	<b>47,3</b>	<b>47,3</b>	<b>47,1</b>
6	<b>20,9</b>	<b>20,9</b>	<b>20,9</b>
7	<b>26,1</b>	<b>26,1</b>	<b>26,5</b>
8	<b>47,9</b>	<b>47,9</b>	<b>47,7</b>
9	<b>25,3</b>	<b>25,3</b>	<b>25,1</b>
10	<b>19,6</b>	<b>19,6</b>	<b>19,2</b>
11	<b>40,0</b>	<b>40,0</b>	<b>39,7</b>
12	<b>35,6</b>	<b>35,6</b>	<b>35,3</b>
13	<b>45,4</b>	<b>45,4</b>	<b>45,0</b>
14	<b>48,9</b>	<b>48,9</b>	<b>48,7</b>
15	<b>31,8</b>	<b>31,8</b>	<b>31,8</b>
16	<b>26,8</b>	<b>26,8</b>	<b>26,8</b>
17	52,3	52,3	<b>43,1</b>
18	18,4	18,4	19,3
19	29,9	29,9	29,7
20	36,1	36,1	46,2
21	18,4	18,4	62,8
22	32,0	32,0	27,7
23	35,8	35,8	23,3
24	77,3	76,5	55,4
25	147,6	147,9	147,4
26	111,1	111,6	111,9
27	17,7	17,3	19,0
28	<b>18,3</b>	<b>18,3</b>	<b>18,1</b>
29	<b>15,3</b>	<b>15,3</b>	<b>15,1</b>
30	19,4	19,4	25,7
31	-	-	30,2
32	-	-	21,3
33	-	-	20,7

<sup>a</sup>Dados obtidos em  $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ , relatados por Thang et al. (2013)

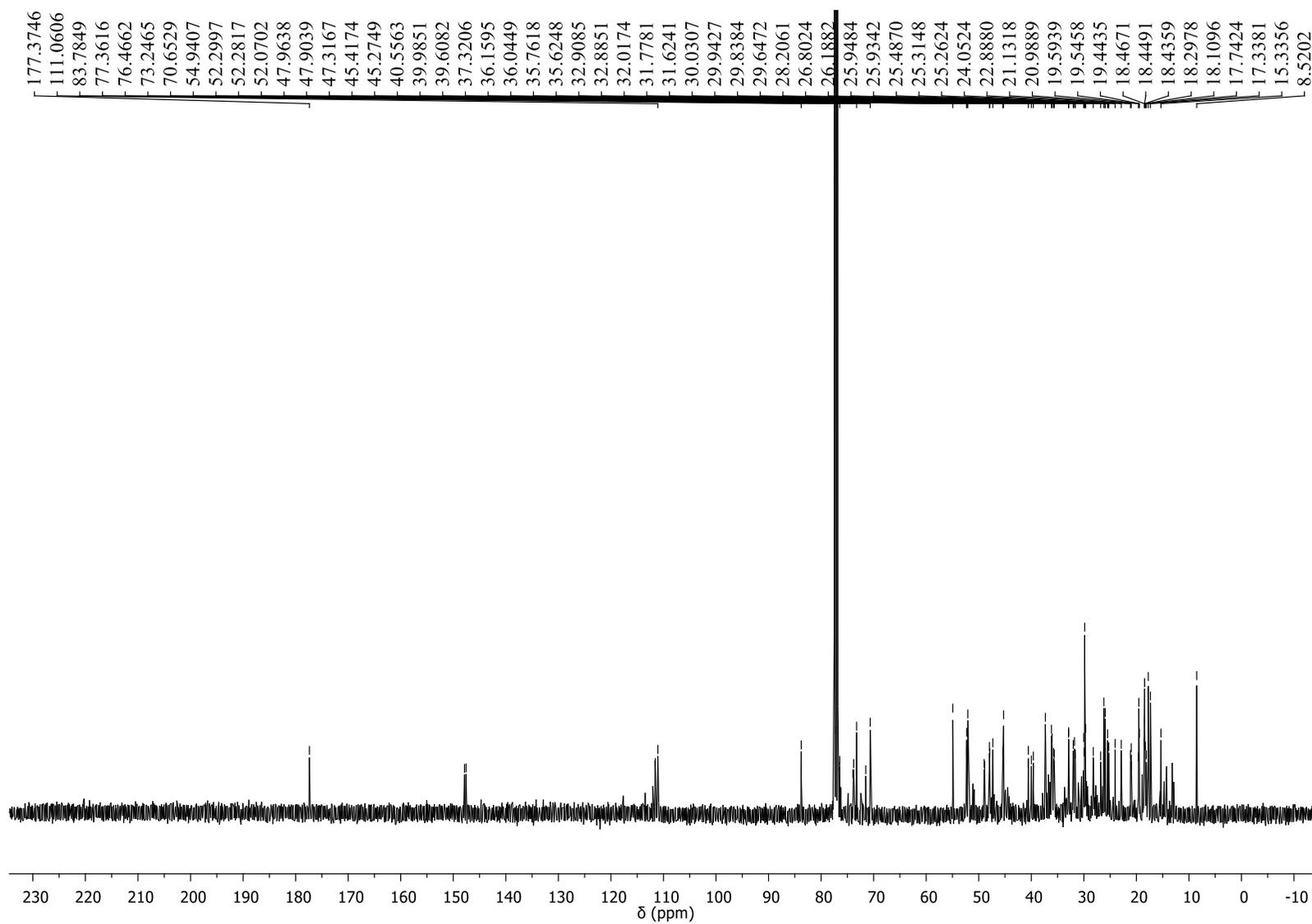
Figura 5.40 – Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  para os compostos **2a+2b/3a+3b** ( $\text{CDCl}_3$ , 100 MHz)

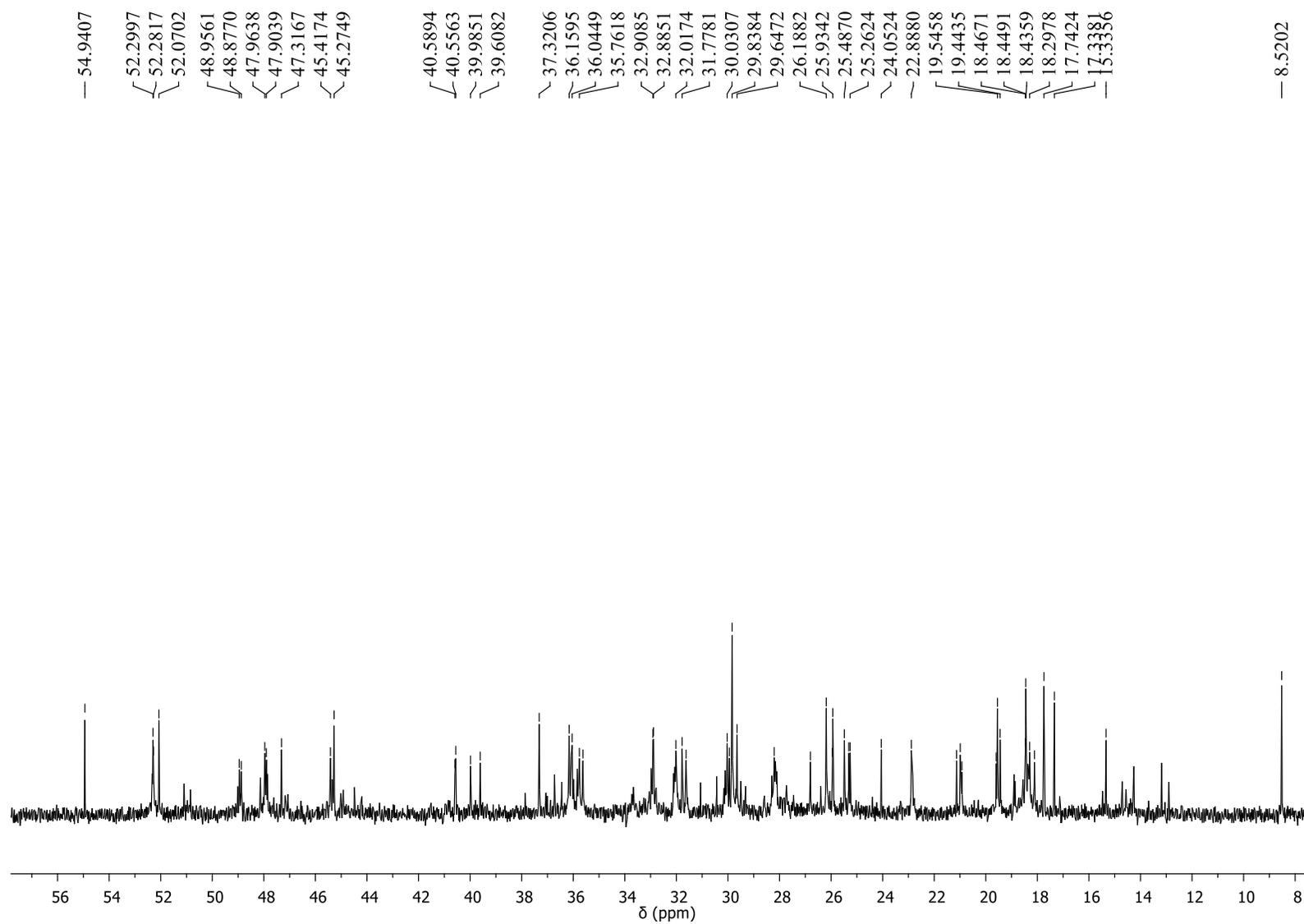
Figura 5.41 – Expansão (8-57 ppm) do espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  para os compostos **2a+2b/3a+3b** ( $\text{CDCl}_3$ , 100 MHz)

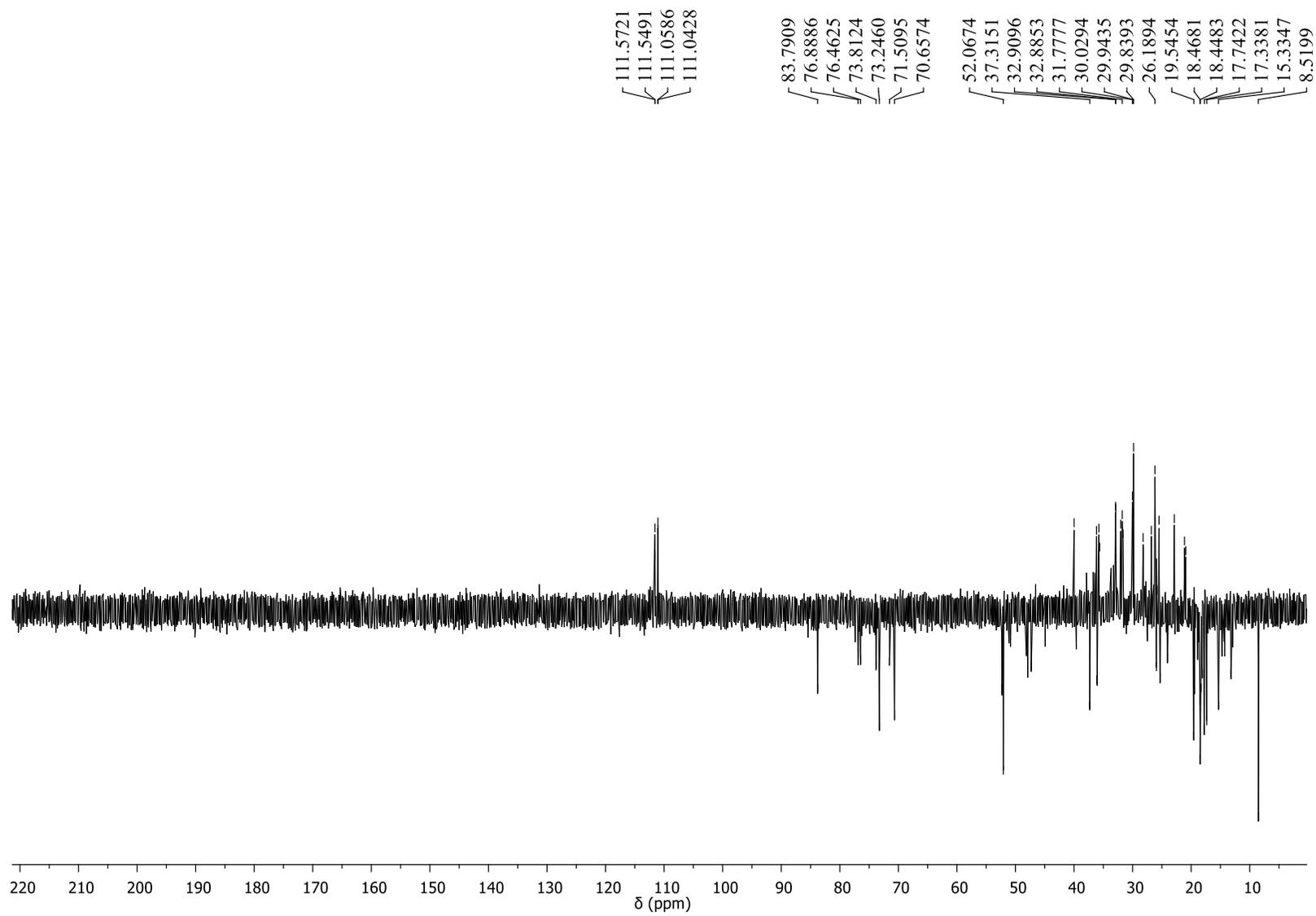
Figura 5.42 – Espectro de RMN de DEPT 135° para os compostos **2a+2b/3a+3b** (CDCl<sub>3</sub>, 150 MHz)

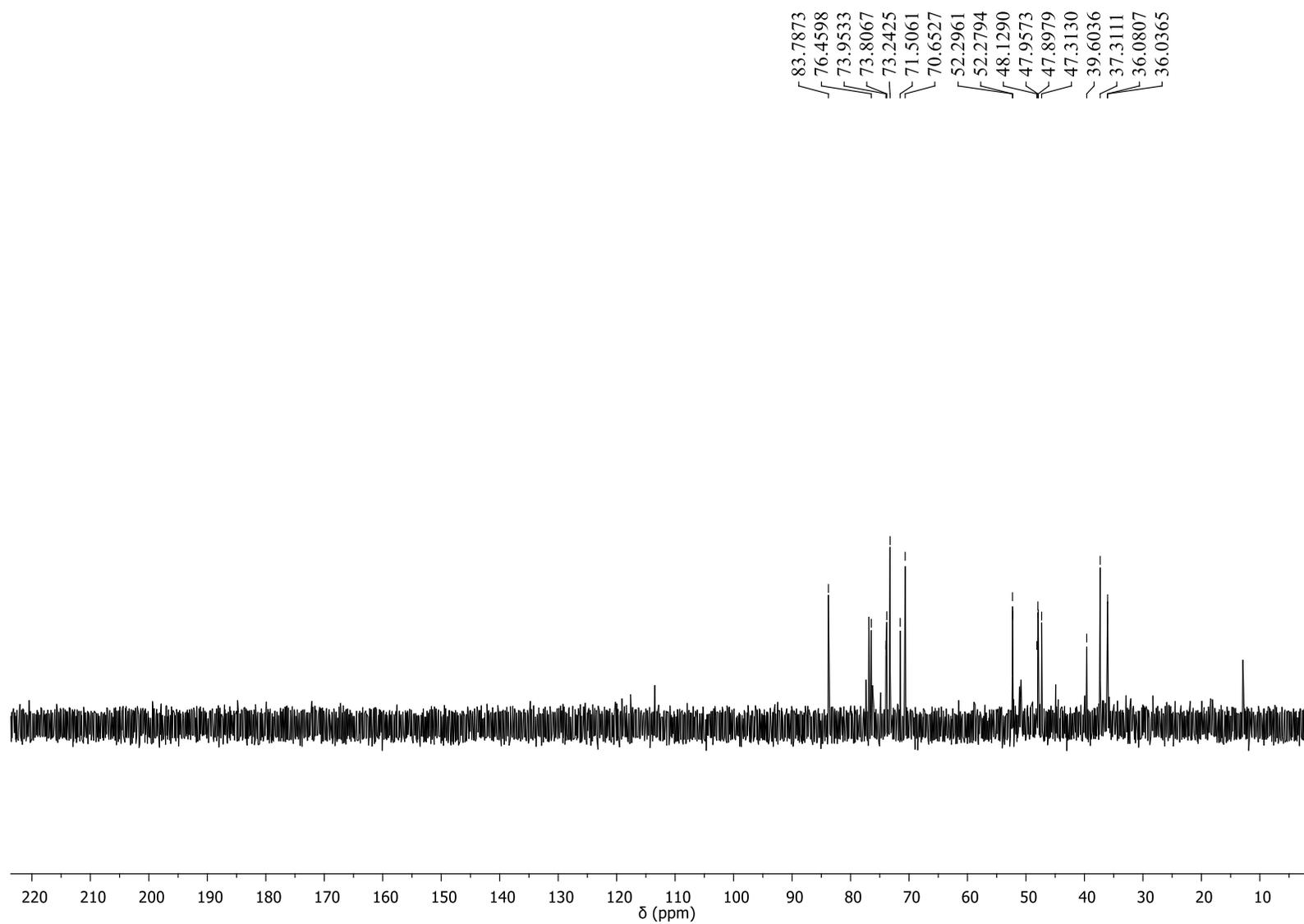
Figura 5.43 – Espectro de RMN de DEPT 90° para os compostos **2a+2b/3a+3b** (CDCl<sub>3</sub>, 100 MHz)

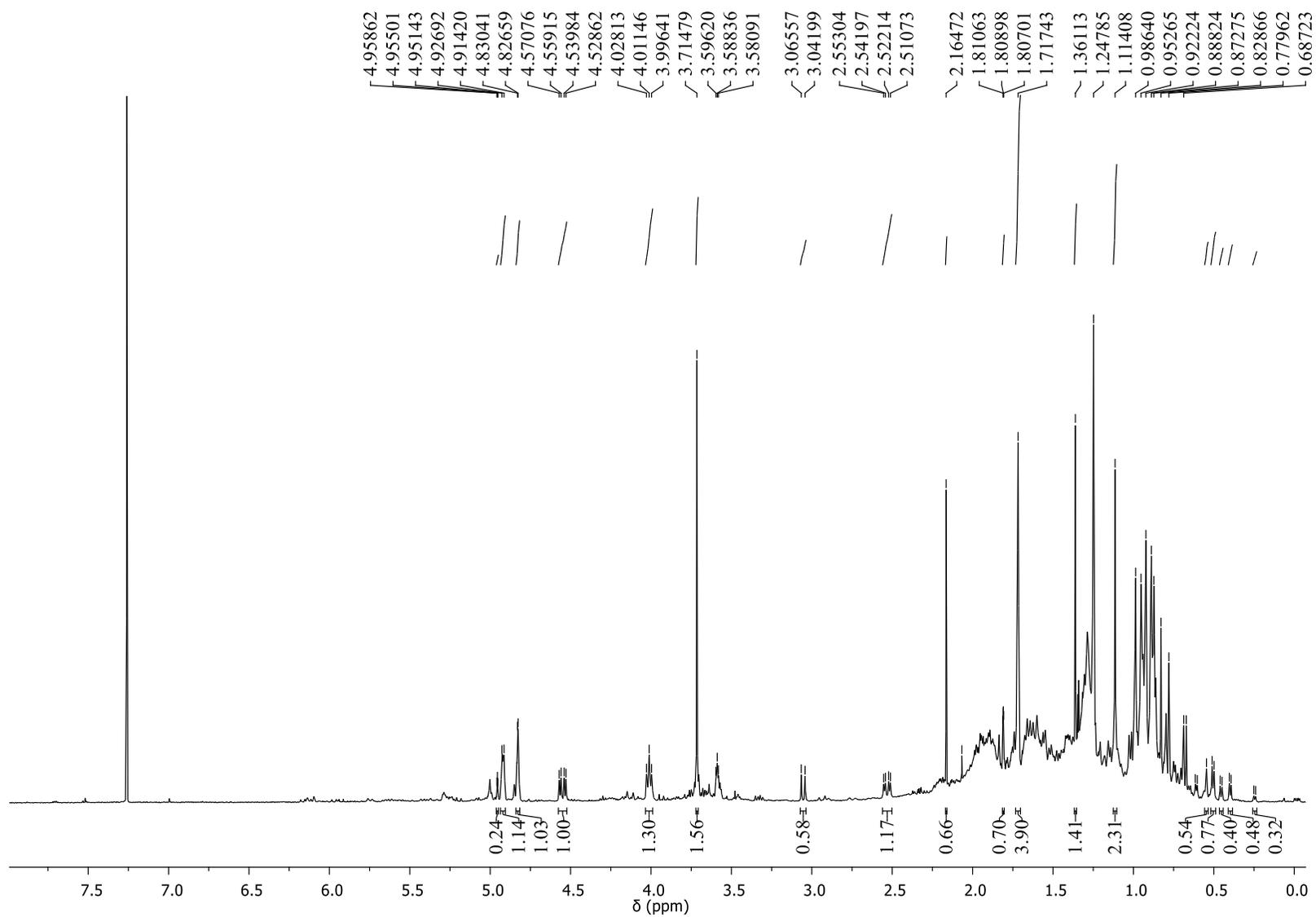
Figura 5.44 – Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  para os compostos **2a+2b/3a+3b** ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz)

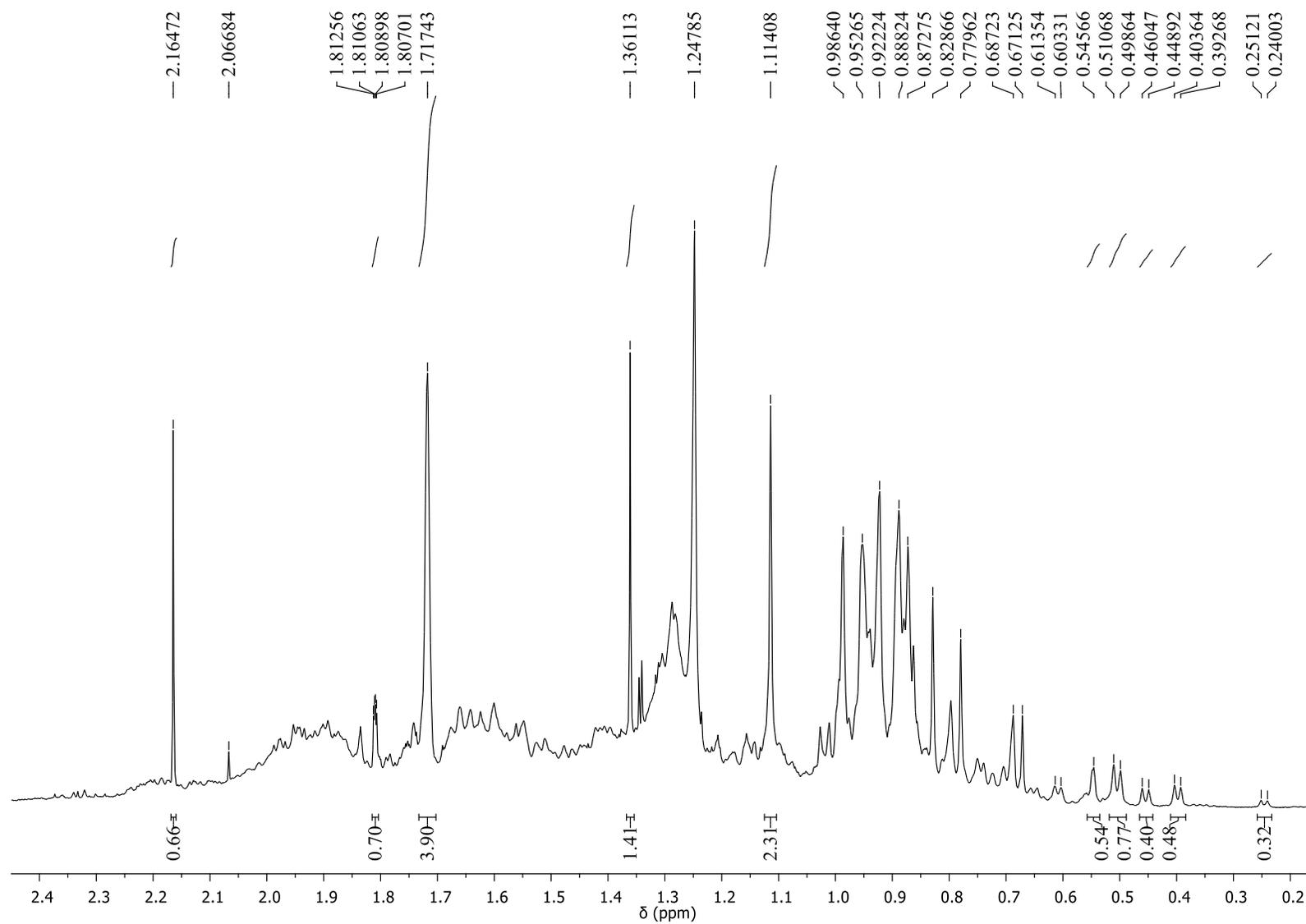
Figura 5.45 – Expansão (0,2-2,4 ppm) do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  para os compostos **2a+2b/3a+3b** ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz)

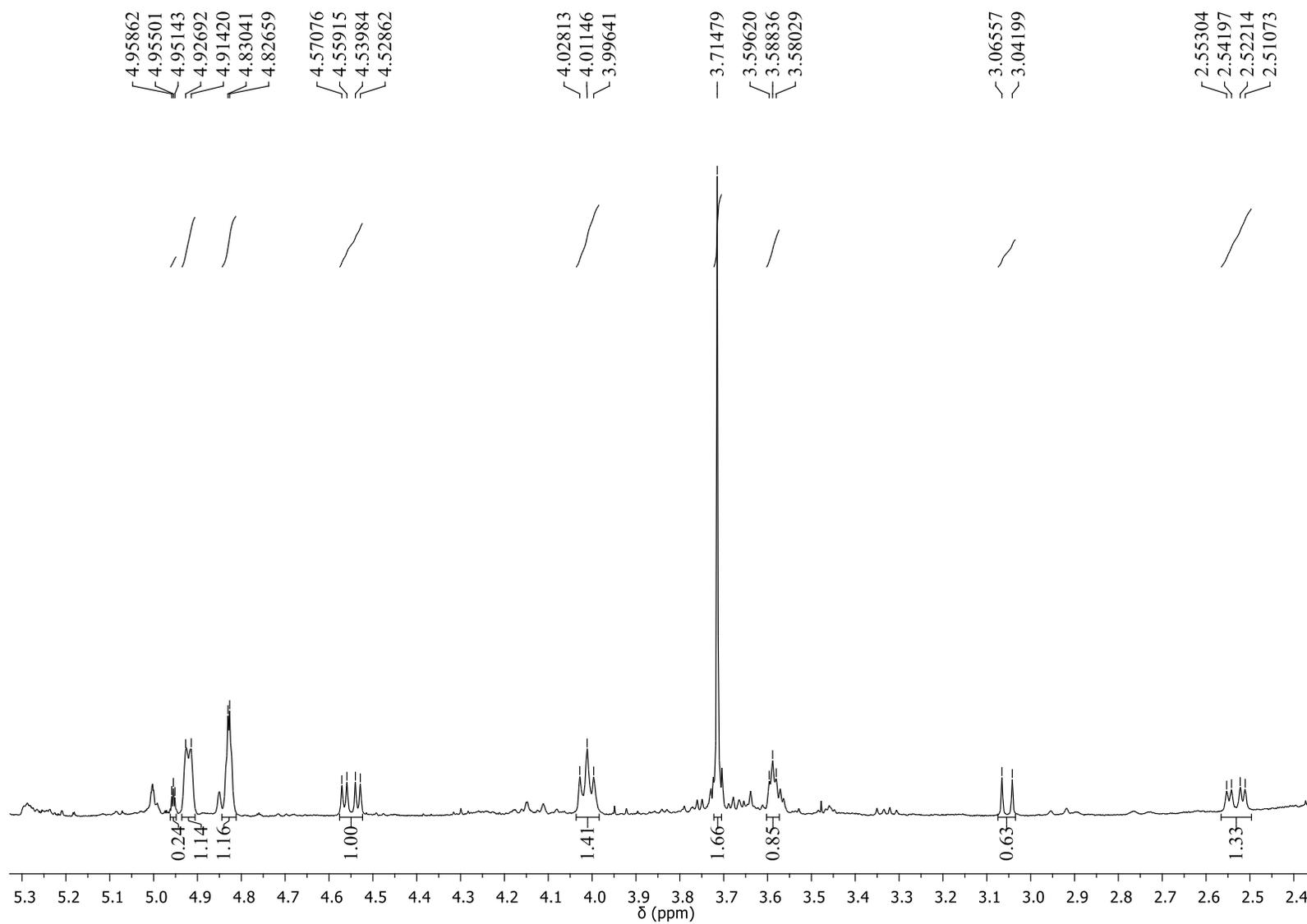
Figura 5.46 – Expansão (2,4-5,3 ppm) do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  para os compostos **2a+2b/3a+3b** ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz)

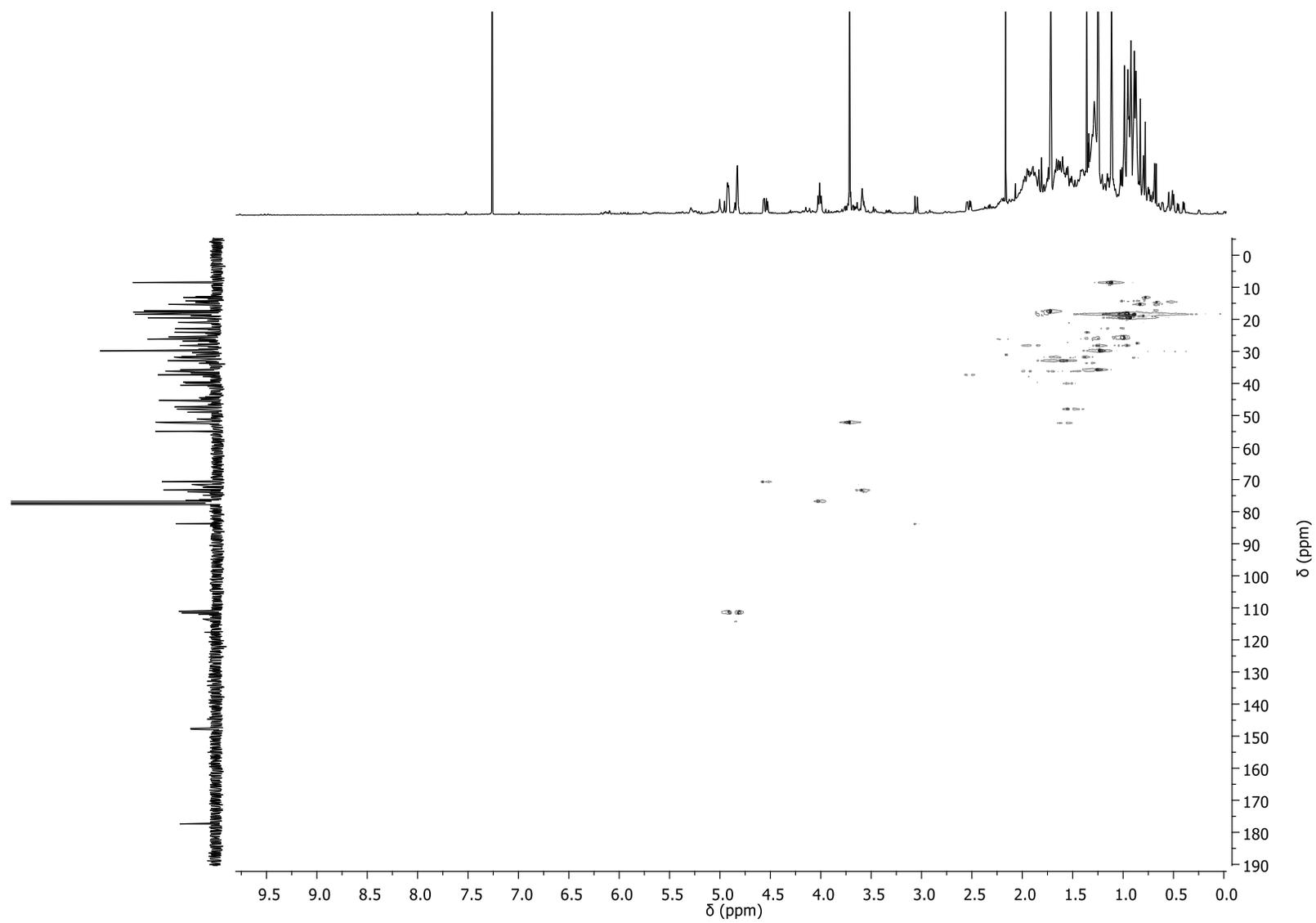
Figura 5.47 – Mapa de contornos do gHSQC para os compostos **2a+2b/3a+3b** (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz)

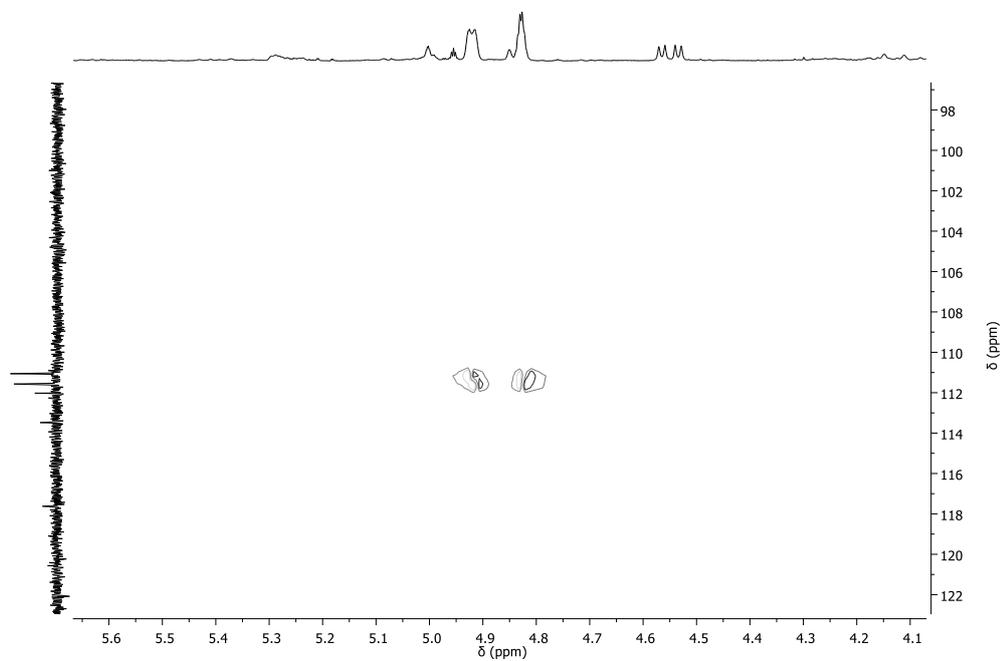
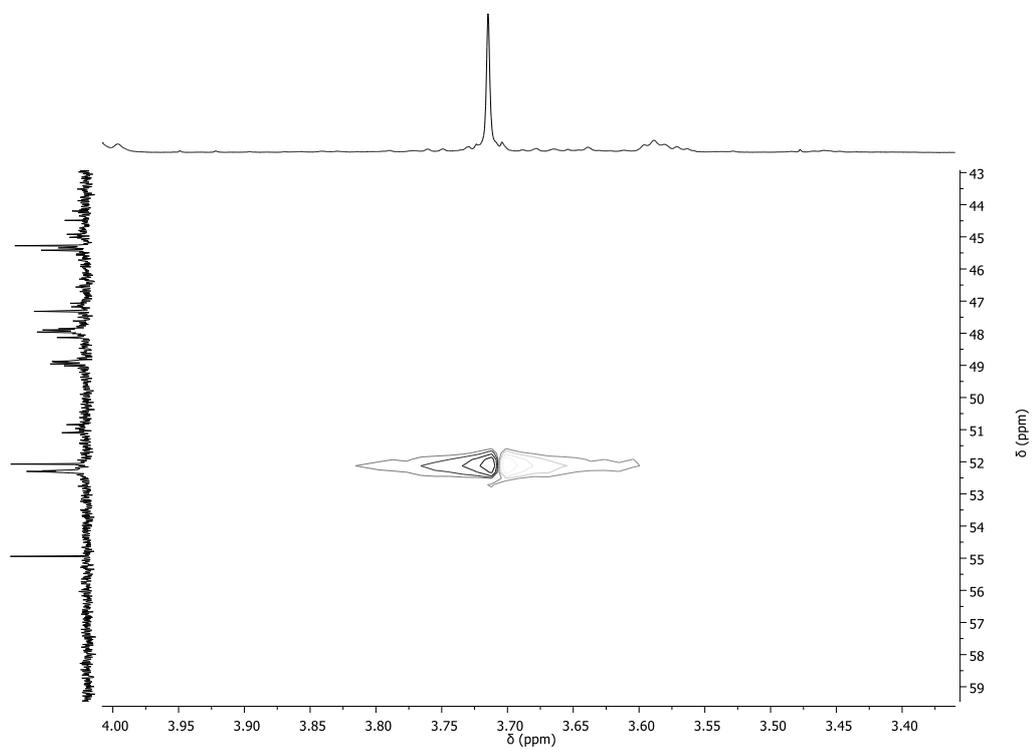
Figura 5.48 – Expansão do gHSQC para os compostos **2a+2b/3a+3b** (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz)Figura 5.49 – Expansão do gHSQC para os compostos **2a+2b/3a+3b** (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz)

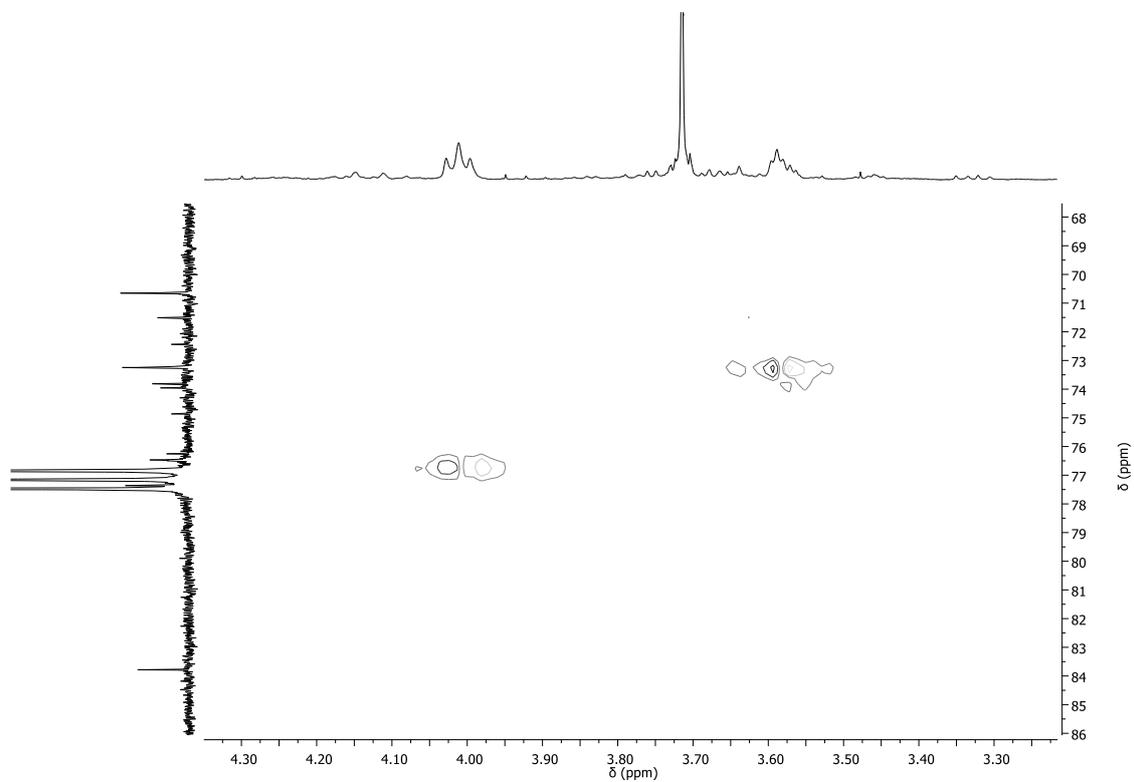
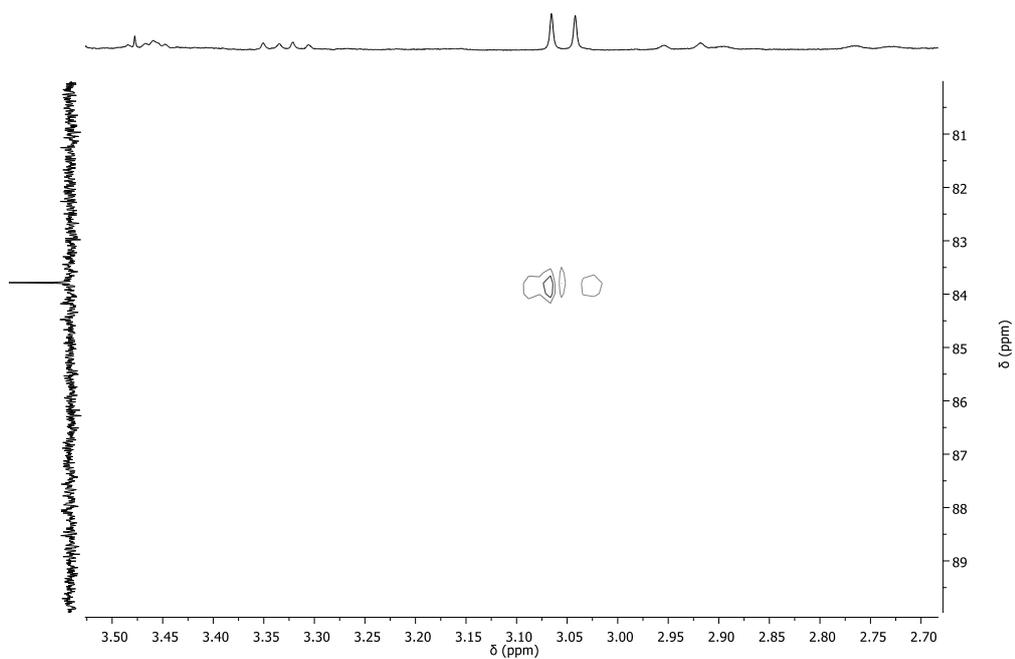
Figura 5.50 – Expansão do gHSQC para os compostos **2a+2b/3a+3b** (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz)Figura 5.51 – Expansão do gHSQC para os compostos **2a+2b/3a+3b** (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz)

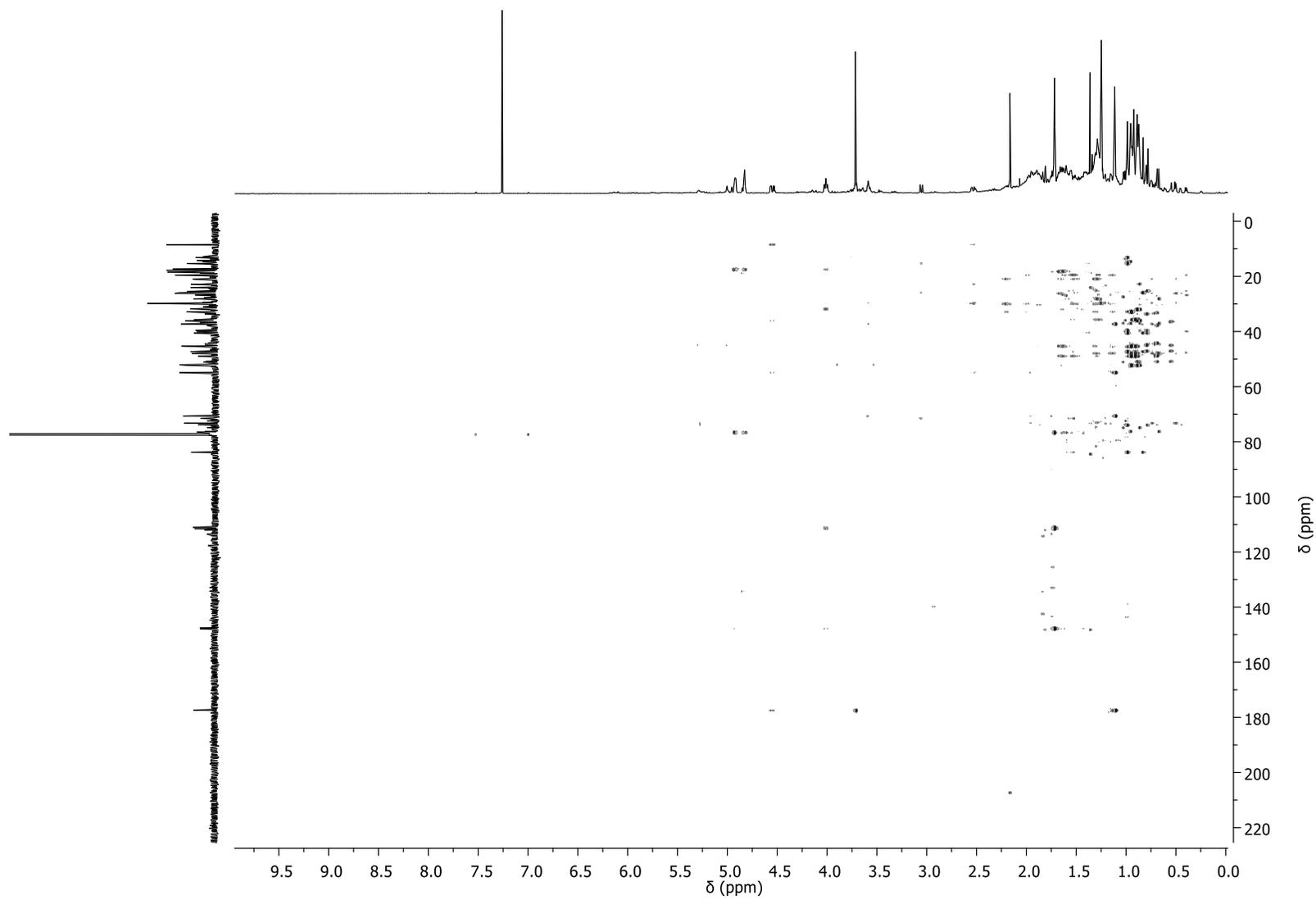
Figura 5.52 – Mapas de contorno do gHMBC para os compostos **2a+2b/3a+3b** (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz)

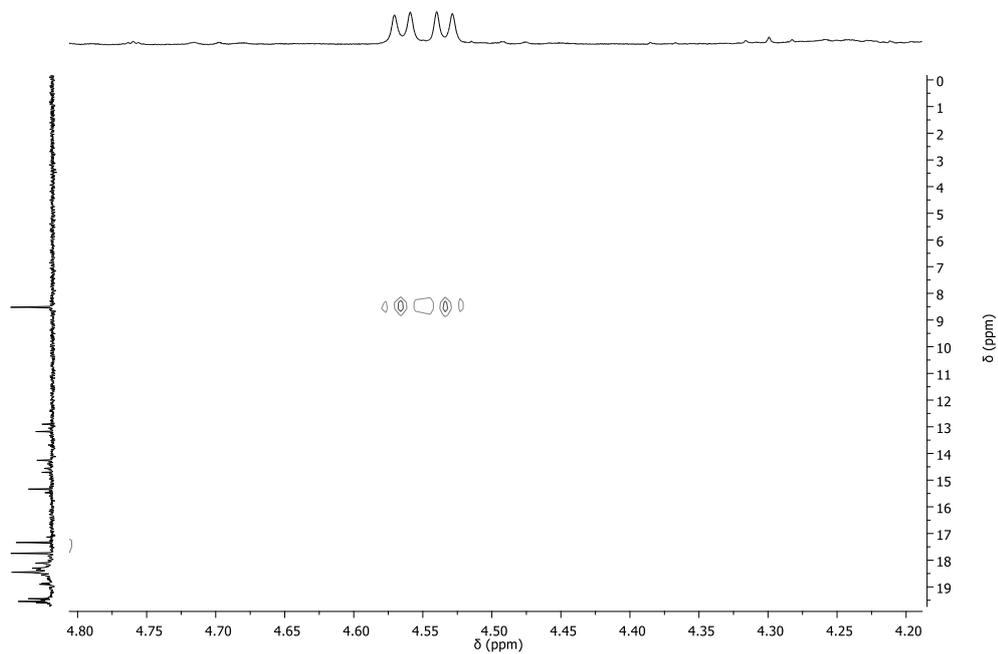
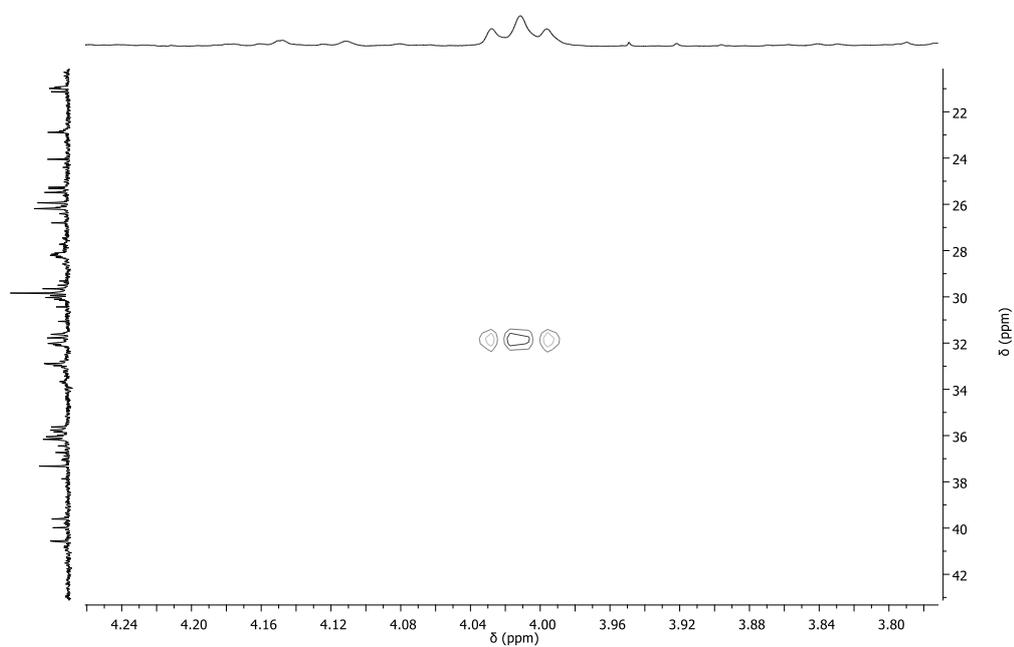
Figura 5.53 – Expansão do gHMBC para os compostos **2a+2b/3a+3b** (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz)Figura 5.54 – Expansão do gHMBC para os compostos **2a+2b/3a+3b** (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz)

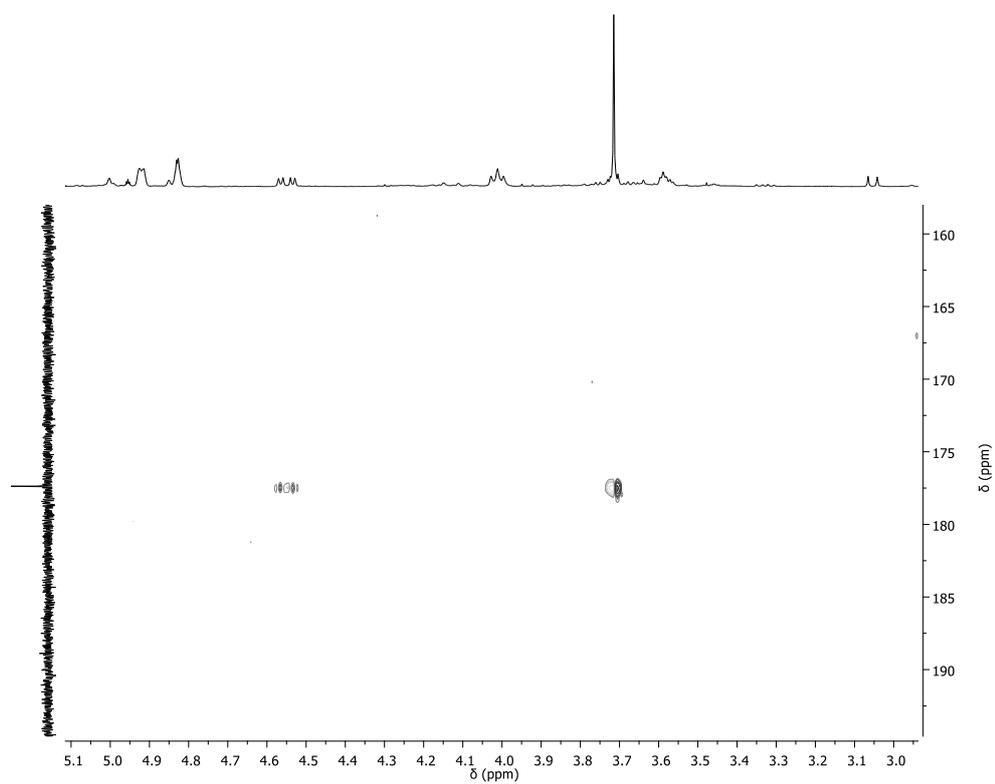
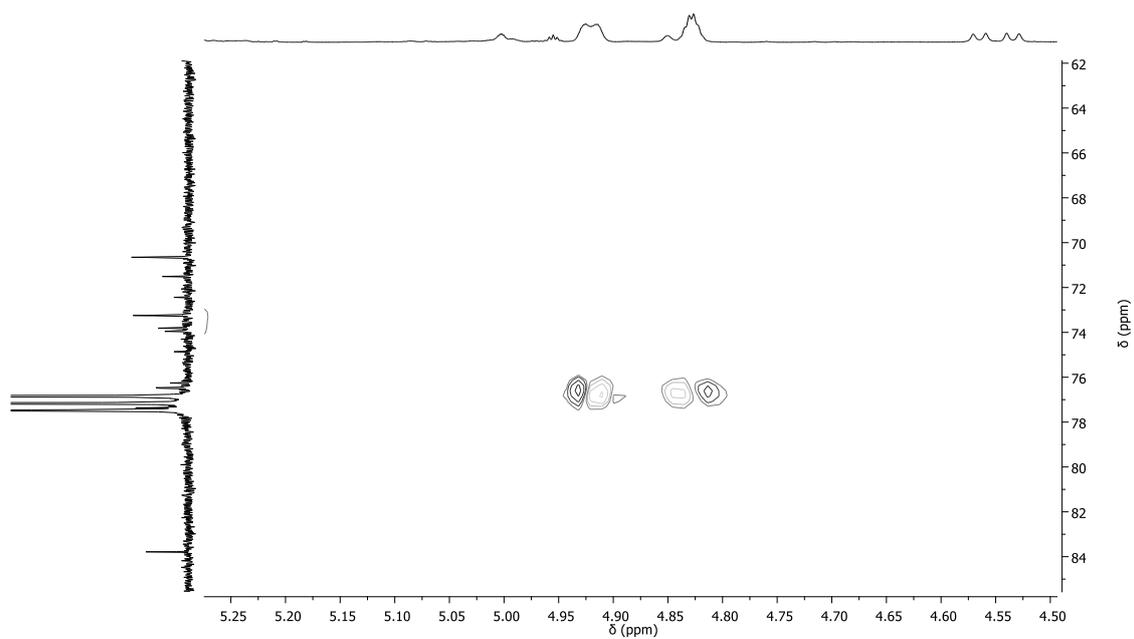
Figura 5.55 – Expansão do gHMBC para os compostos **2a+2b/3a+3b** (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz)Figura 5.56 – Expansão do gHMBC para os compostos **2a+2b/3a+3b** (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz)

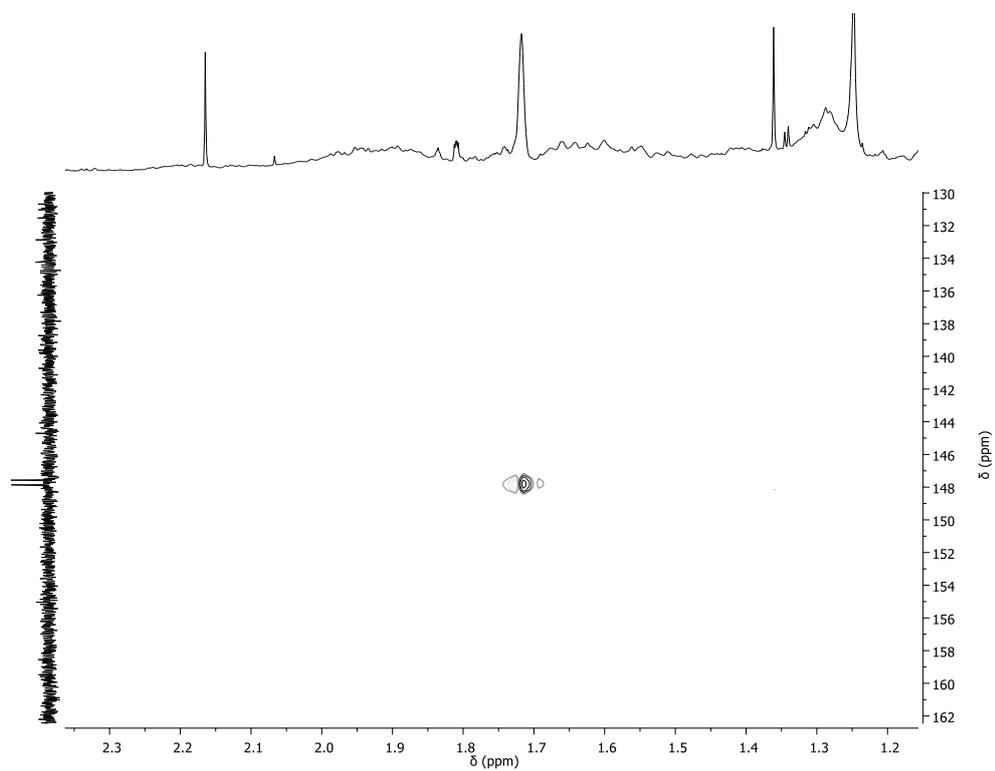
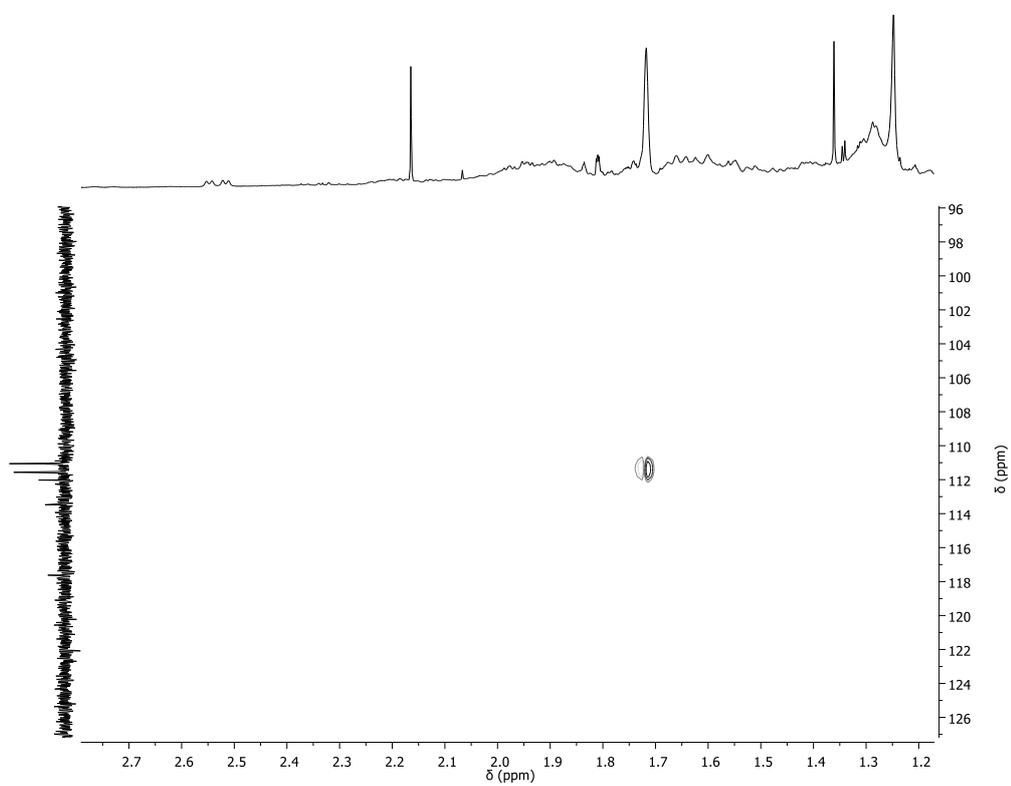
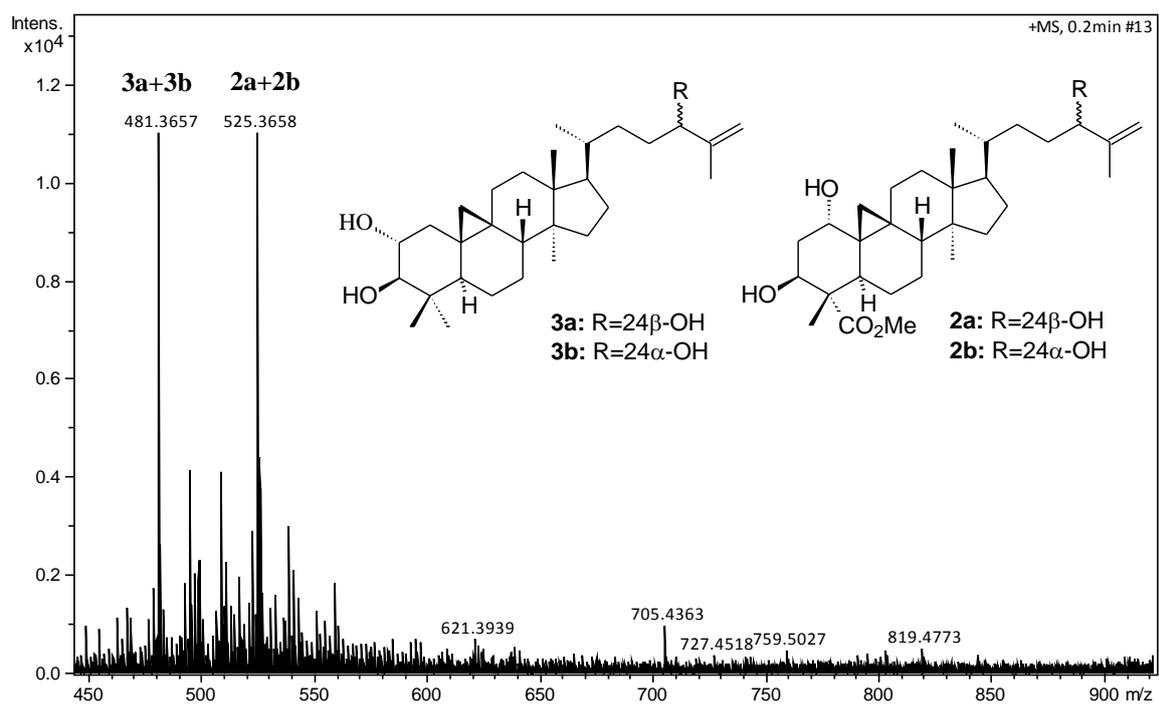
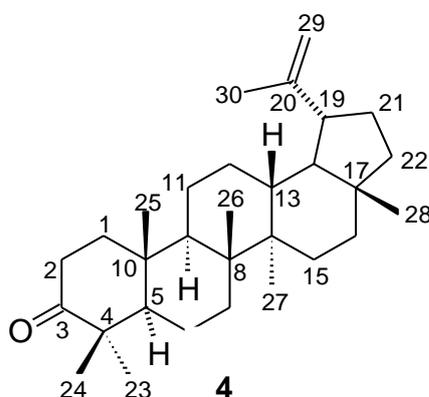
Figura 5.57 – Expansão do gHMBC para os compostos **2a+2b/3a+3b** (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz)Figura 5.58 – Expansão do gHMBC para os compostos **2a+2b/3a+3b** (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz)

Figura 5.59 – Espectro de massas dos compostos **2a+2b** e **3a+3b** –  $[M+Na]^+$ 

### 5.3.4 Elucidação estrutural do composto 4



O composto **4**, correspondente a fração FH19-9-4 (18,6 mg), é oriunda da fração hexânica das folhas de *C. mellifluum* após sucessivos fracionamentos (Esquema 4.4). A análise por cromatografia em camada delgada de gel de sílica, eluída em hexano-acetato de etila (8:2) e revelada em solução de sulfato cérico resultou uma única mancha alaranjada. Sua estrutura foi identificada por meio da análise dos espectros de RMN uni e bidimensionais em comparação com os dados da literatura (LUZ et al., 2010).

O espectro de RMN  $^1\text{H}$  (Figura 5.60-5.61) apresentou um perfil característico de um composto com esqueleto lupano pela presença de dois dupletos em  $\delta$  4,58 e 4,69 ( $J = 2,1$  Hz) característicos de hidrogênios em ligação dupla *gem*-dissubstituída (H-29a e H-29b) e pelo simpleto em  $\delta$  1,68 atribuído aos hidrogênios metílicos em carbono olefínico, além de simpletos em  $\delta$  0,80; 0,93; 0,96; 1,02 e 1,07 ( $2\text{CH}_3$ ) que foram atribuídos a hidrogênios de seis grupos metílicos ligados a carbonos saturados e quaternários (ALBUQUERQUE et al., 2007).

O espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  (Figura 5.62-5.63) apresentou 31 sinais, sendo um deles em  $\delta$  29,8 correspondente a carbonos de cadeia metilênica de graxa. A análise conjunta com os espectros de DEPT  $135^\circ$  (Figuras 5.64 e 5.65) permitiu verificar a presença de sete sinais de carbonos metílicos ( $\text{CH}_3$ ), onze metilênicos ( $\text{CH}_2$ ), sete metínicos ( $\text{CH}$ ) e seis de carbonos quaternários. Os dados de RMN unidimensionais sugeriu uma fórmula molecular  $\text{C}_{30}\text{H}_{49}\text{O}$  com IDH igual a 6, sendo uma referente a ligação dupla e cinco correspondente a cinco ciclos. A presença de triterpenoide com esqueleto lupano foi confirmada pelo espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  (Figura 5.62) que apresentou dois sinais em  $\delta$  109,5 e 151,0 atribuídos aos carbonos olefínicos C-29 e C-20, respectivamente, juntamente com o sinal em  $\delta$  19,5 referente ao carbono metílico do grupo isoprenila, além do sinal em  $\delta$  218,1, atribuído à carbonila em C-3. A

análise até aqui realizada permitiu identificar o composto **4** como o triterpenoide (3-oxolup-20(29)-eno) ou simplesmente lupenona (Tabela 5.6).

A lupenona (**4**) já foi relatada na família Combretaceae, inclusive em raízes de *C. mellifluum* (ROCHA et al., 2002). Na literatura há relatos de que este composto tem efeito alelopático inibitório da germinação de semente, crescimento do hipocótilo e da radícula de duas plantas daninhas (*Mimosa pudica* e *Senna obtusifolia*) (LUZ et al., 2010). Também já foi relatada, para a lupenona, a atividade inibitória de BACE1, uma enzima chave responsável pela doença de Alzheimer (KOIRALA et al., 2017).

Tabela 5.6 – Dados de RMN de  $^{13}\text{C}$  do composto **4** (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )

<b>C</b>	<b>4</b>	<b>Mult</b>	<b>Lupenona<sup>a</sup></b>
1	39,8	$\text{CH}_2$	39,6
2	34,3	$\text{CH}_2$	34,1
3	218,4	C	217,9
4	47,5	C	47,3
5	55,1	CH	55,0
6	19,8	$\text{CH}_2$	19,6
7	33,7	$\text{CH}_2$	33,6
8	40,9	C	40,9
9	49,9	CH	49,8
10	37,0	C	36,9
11	21,6	$\text{CH}_2$	21,5
12	25,3	$\text{CH}_2$	25,2
13	38,3	CH	38,2
14	43,0	C	42,9
15	27,6	$\text{CH}_2$	27,4
16	35,7	$\text{CH}_2$	35,6
17	43,1	C	42,9
18	48,4	CH	48,3
19	48,1	CH	47,9
20	151,0	C	150,7
21	30,0	$\text{CH}_2$	29,9
22	40,1	$\text{CH}_2$	40,0
23	26,8	$\text{CH}_3$	26,6
24	21,2	$\text{CH}_3$	21,0
25	15,9	$\text{CH}_3$	15,8
26	16,1	$\text{CH}_3$	15,9
27	14,6	$\text{CH}_3$	14,4
28	18,2	$\text{CH}_3$	18,0
29	109,5	$\text{CH}_2$	109,2
30	19,5	$\text{CH}_3$	19,3

<sup>a</sup>Dados obtidos em  $\text{CDCl}_3$ , relatados por Luz et al. (2014)

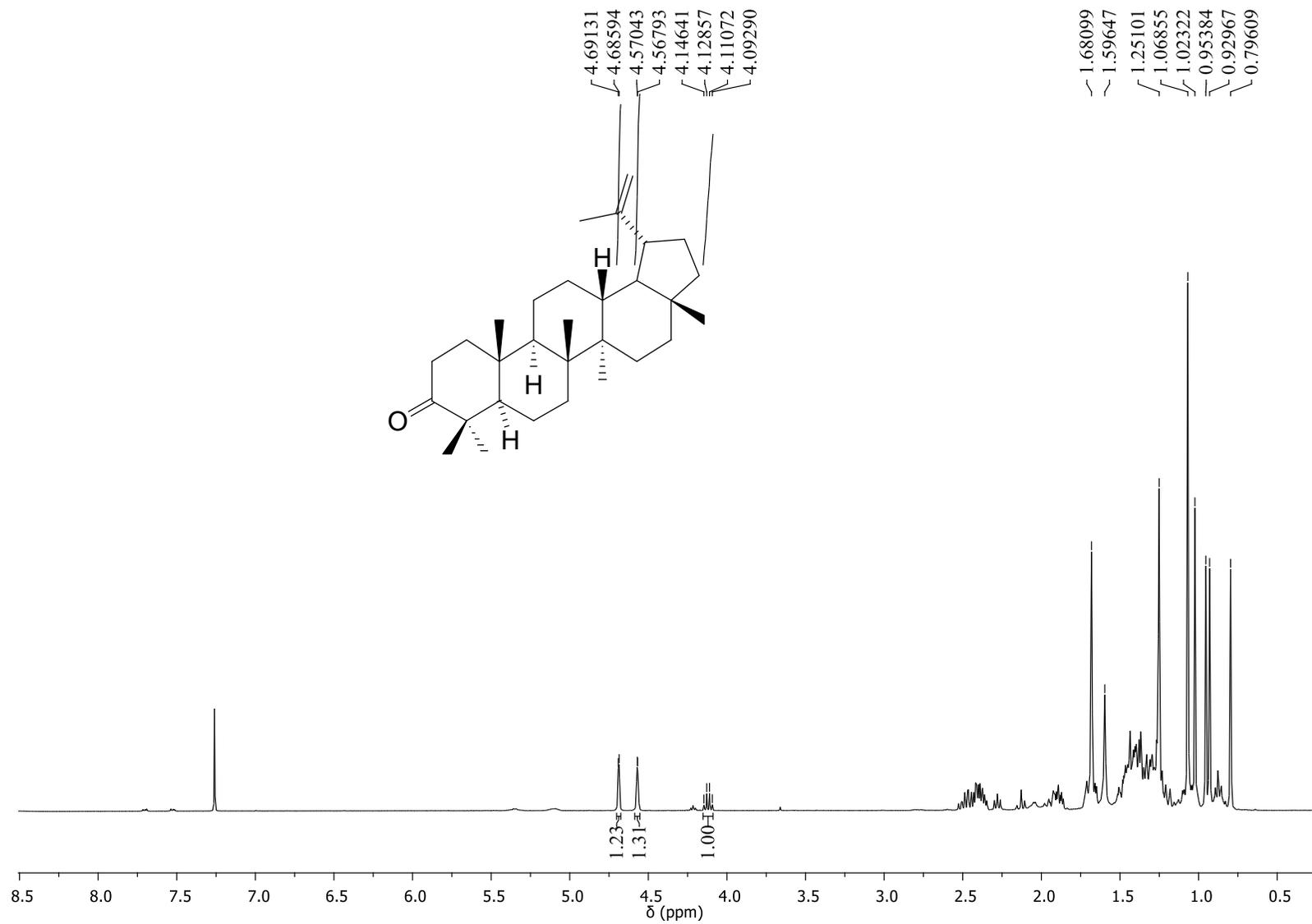
Figura 5.60 – Espectro de RMN  $^1\text{H}$  para o composto **4** ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz)

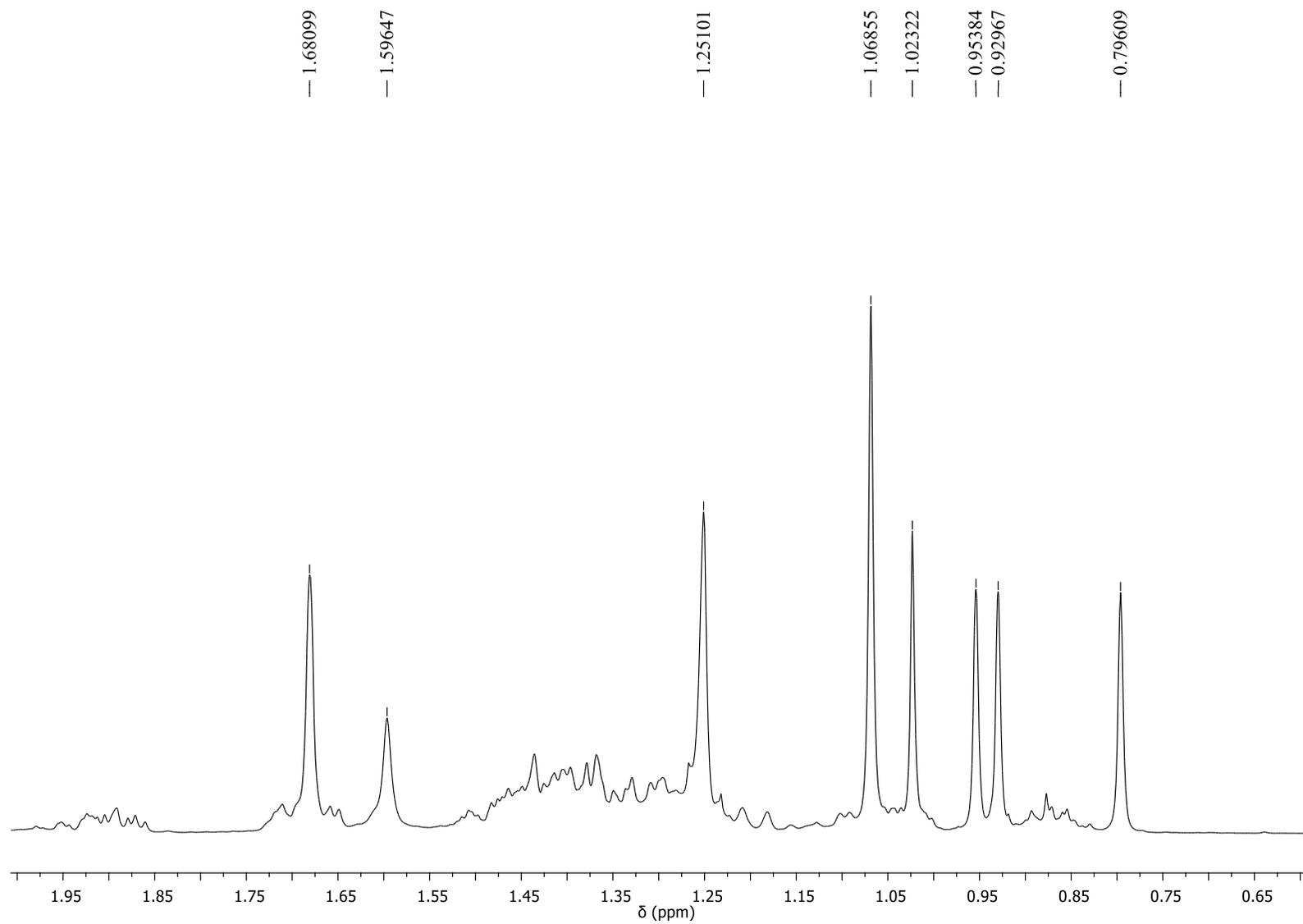
Figura 5.61 – Expansão (0,65-1,95 ppm) do espectro de RMN  $^1\text{H}$  para o composto **4** ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz)

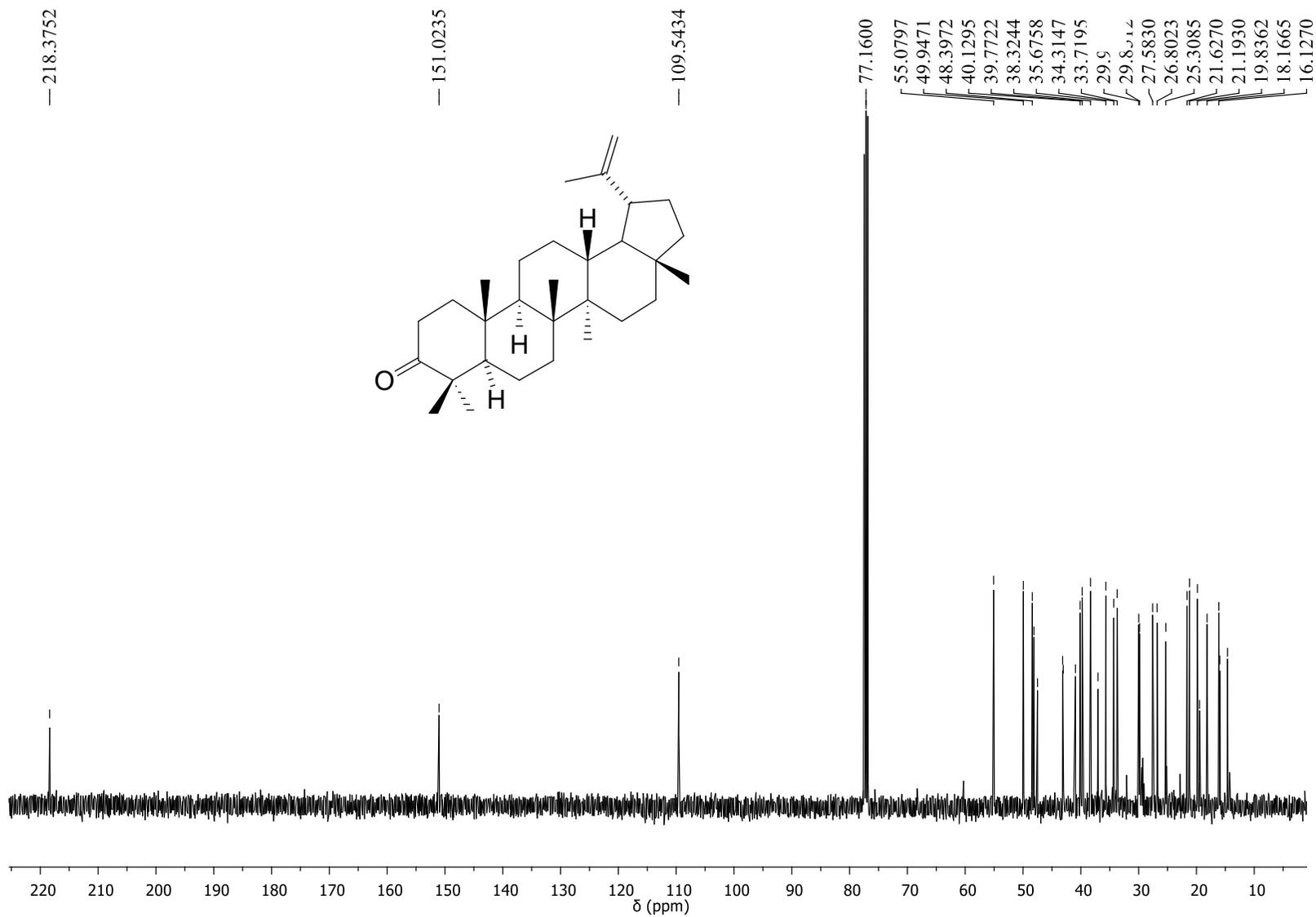
Figura 5.62 – Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  para o composto **4** ( $\text{CDCl}_3$ , 100 MHz)

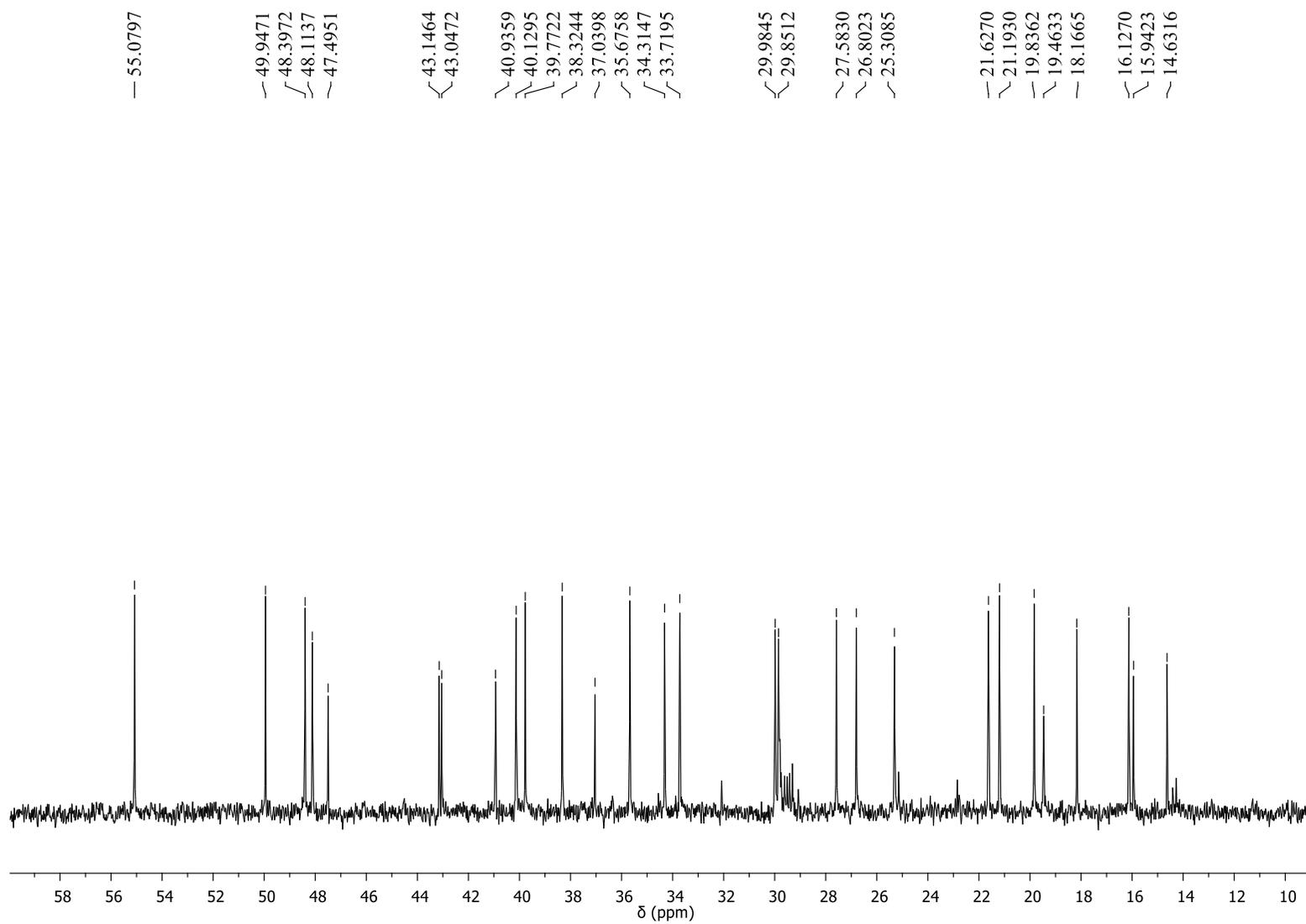
Figura 5.63 – Expansão (10-58 ppm) do espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  para o composto **4** ( $\text{CDCl}_3$ , 100 MHz)

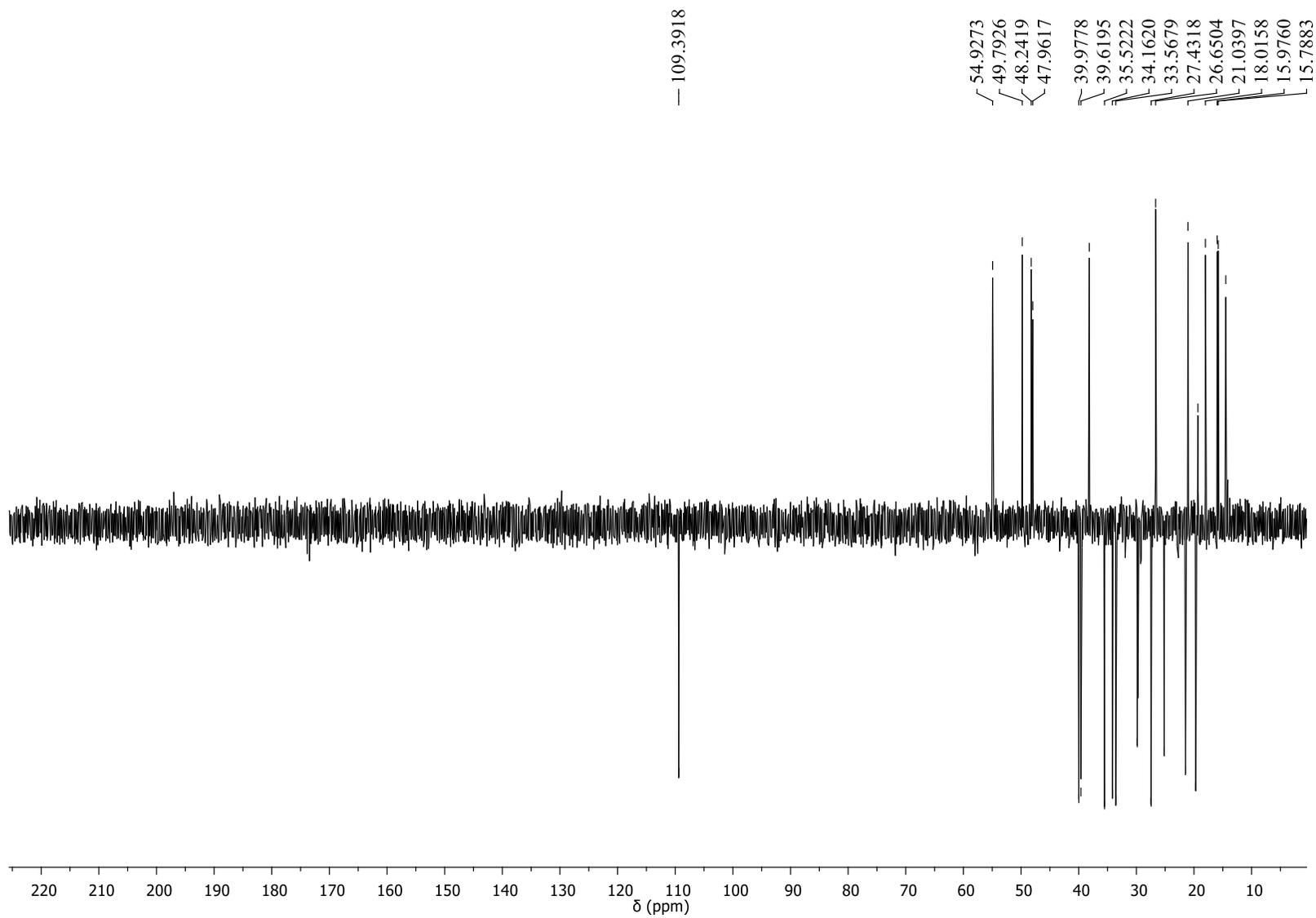
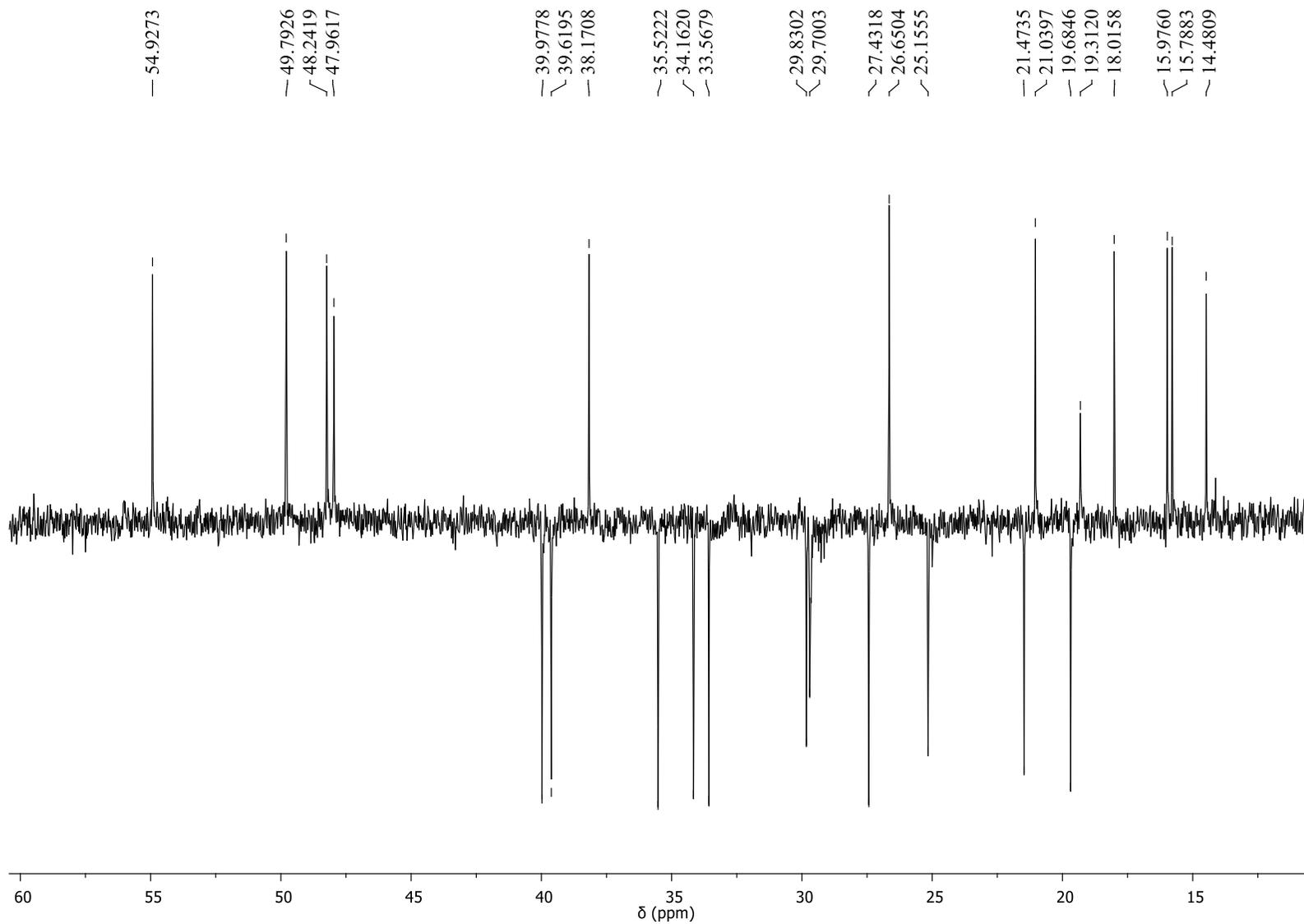
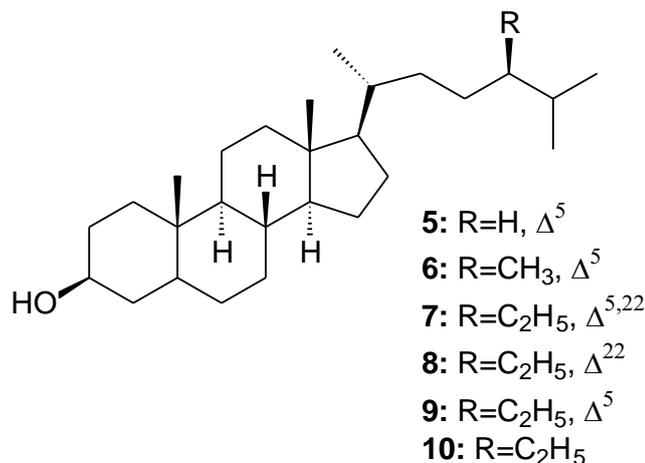
Figura 5.64 – Espectro de RMN de DEPT 135° para o composto **4** (CDCl<sub>3</sub>, 100 MHz)

Figura 5.65 – Expansão (15-60 ppm) do espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  – DEPT  $135^\circ$  para o composto **4** ( $\text{CDCl}_3$ , 100 MHz)

### 5.3.5 Elucidação estrutural dos compostos 5-10



A subfração FH37-10-3 (19,0 mg) foi obtida da fração hexânica das folhas de *C. mellifluum* submetida a sucessivos fracionamentos (Esquema 4.4). Esta subfração apresentou-se como um sólido amorfo e em CCD, quando revelada com sulfato cérico, mostrou uma mancha azul com mudança de coloração para roxo intenso. A análise dos espectros de RMN <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C permitiu a identificação dos esteroides **7** e **9**, enquanto a análise em CG-EM, além de confirmar a presença de **7** e **9**, resultou na identificação dos esteroides **5-10**.

O espectro RMN <sup>1</sup>H (Figura 5.66) apresentou perfil característico de esteroides  $\Delta^5$  evidenciado pela presença de dois simpletos em  $\delta$  0,67 (H-18) e 1,00 (H-19) correspondentes aos hidrogênios metílicos em carbono não hidrogenado (FERREIRA et al., 2012). O multiplete em  $\delta$  3,51 ( $J = 11,2$  e  $5,7$  Hz) foi atribuído aos hidrogênios oximetínicos em C-3 e o duplete em  $\delta$  5,34 ( $J = 5,2$  Hz) aos hidrogênios olefínicos H-6. Observou-se também dois duplos dupletos de menor intensidade em  $\delta$  5,01 e 5,15 ( $J = 15,2$  e  $8,6$  Hz) correspondentes aos hidrogênios olefínicos H-22 e H-23 da cadeia lateral do composto **7** indicando assim a presença de uma mistura.

O espectro de RMN <sup>13</sup>C (Figura 5.67) apresentou 36 sinais de maior intensidade. A presença de esteroides foi confirmada pelo sinal em  $\delta$  71,9 característico de carbono oximetínico C-3 e pelos sinais em 121,8 e 140,9 referentes aos carbonos olefínicos C-6 e C-5, respectivamente, enquanto os sinais de menor intensidade  $\delta$  em  $\delta$  129,4 e 138,4 foram atribuídos aos carbonos C-23 e C-22 da substância **7** (Tabela 5.7). Estes dados comparados com os relatados por Ferreira et al. (2014) permitiram identificar os esteroides estigmasterol (**7**) e sitosterol (**9**). O sitosterol e o estigmasterol já foram relatados na espécie *Combretum*

*leprosum* (DAWE et al., 2016), mas estão sendo descritos pela primeira vez na espécie *C. mellifluum*.

Tabela 5.7 – Dados de RMN  $^{13}\text{C}$  de **7** e **9** ( $\text{CDCl}_3$ , 100 MHz)

<b>C</b>	<b>9</b>	<b>Sitosterol*</b>	<b>7</b>	<b>Estigmasterol*</b>
1	37,4	37,4	37,4	37,4
2	31,8	31,8	31,8	31,8
3	72,0	71,9	72,0	71,9
4	42,5	42,4	42,5	42,4
5	140,9	140,9	140,9	140,9
6	121,9	121,9	121,9	121,9
7	32,1	32,0	32,1	32,0
8	32,1	32,0	32,1	32,0
9	50,3	50,3	50,3	50,3
10	36,7	36,6	36,7	36,6
11	21,2	21,2	21,2	21,2
12	39,9	39,9	39,9	39,9
13	42,5	42,5	42,5	42,5
14	56,9	56,9	56,9	56,9
15	24,5	24,4	24,5	24,4
16	28,4	28,4	28,4	28,4
17	56,2	56,2	56,2	56,2
18	12,1	12,0	12,1	12,0
19	19,6	19,5	19,6	19,5
20	36,3	36,3	36,9	36,9
21	18,9	18,9	21,3	21,2
22	34,1	34,0	138,4	138,5
23	26,2	26,2	129,4	129,4
24	46,0	45,9	50,3	50,3
25	29,3	29,3	31,8	31,8
26	20,0	19,9	21,3	21,2
27	19,2	19,2	18,9	18,9
28	22,9	22,8	25,6	25,5
29	12,0	12,0	12,2	12,2

\*Dados obtidos em  $\text{CDCl}_3$  e relatados por Ferreira et al. (2014)

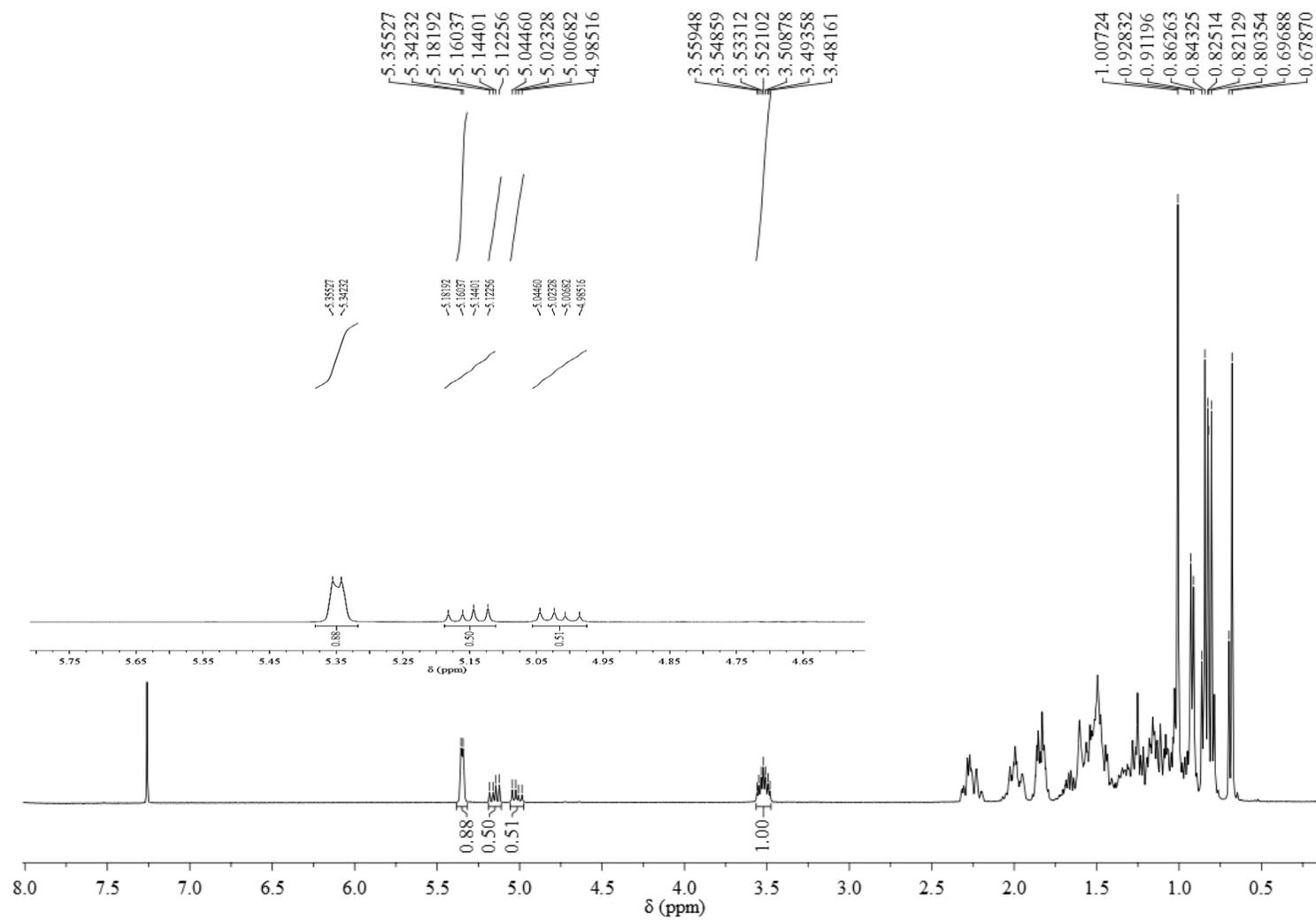
Figura 5.66 – Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  para os compostos **7+9** ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz)

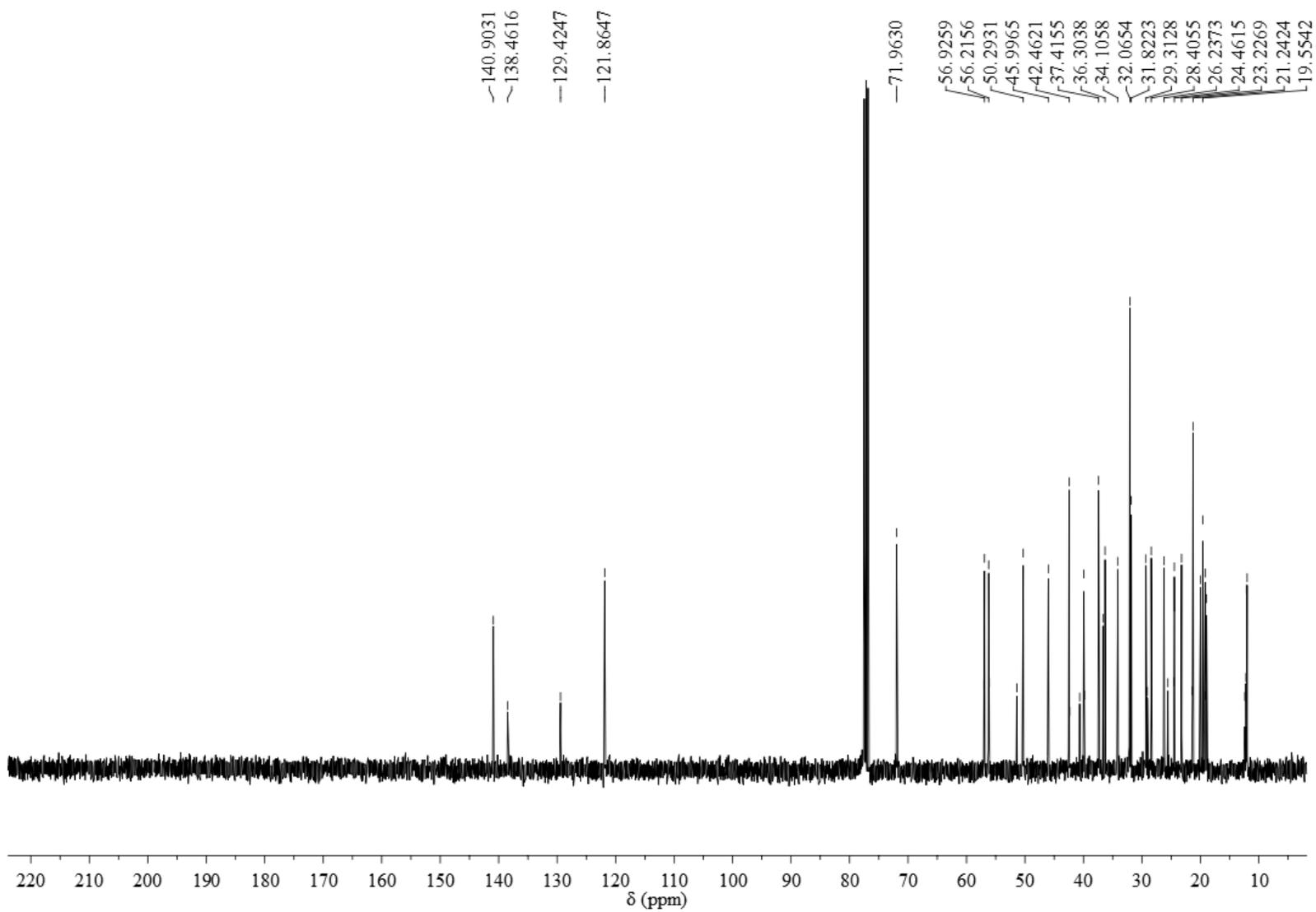
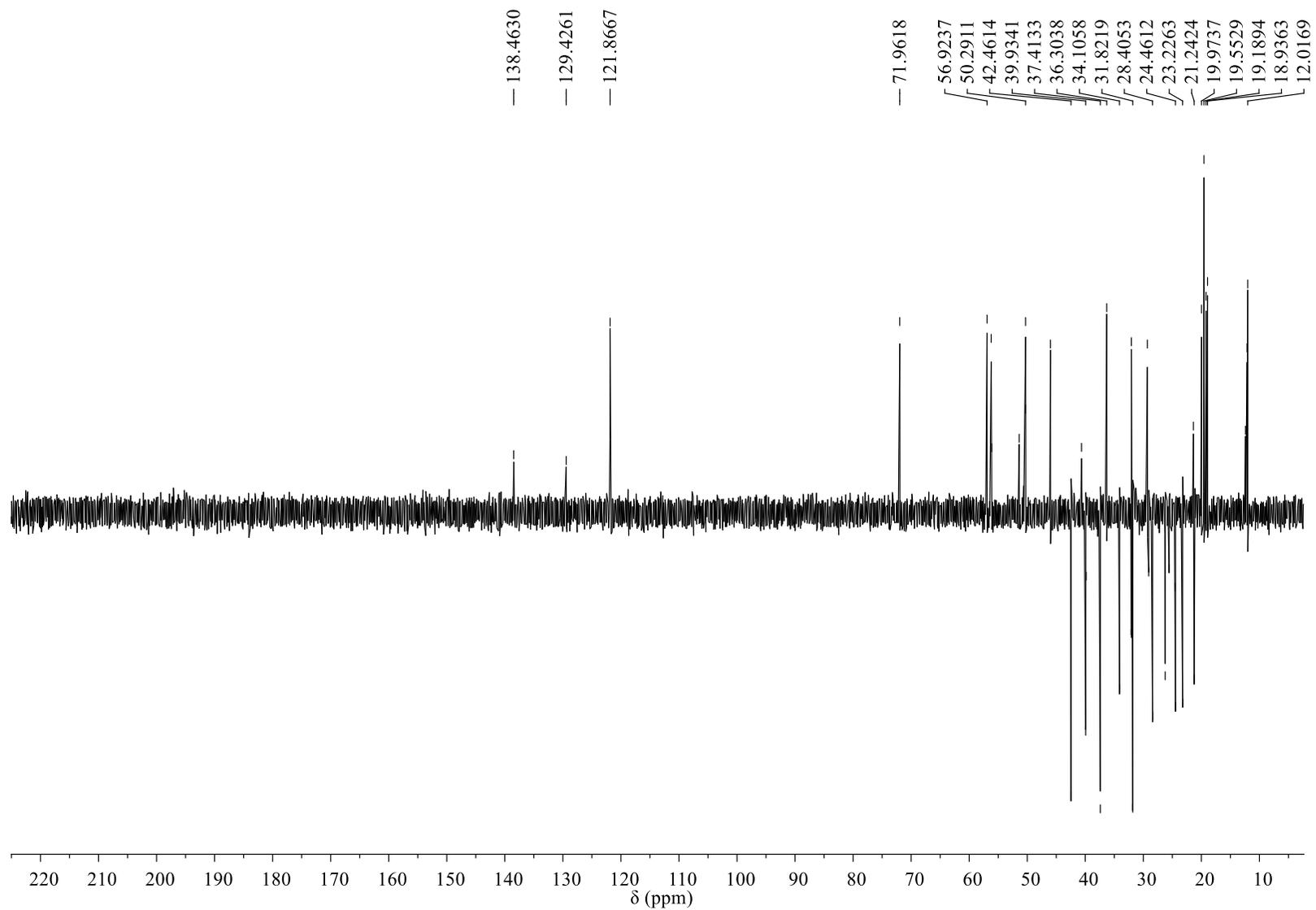
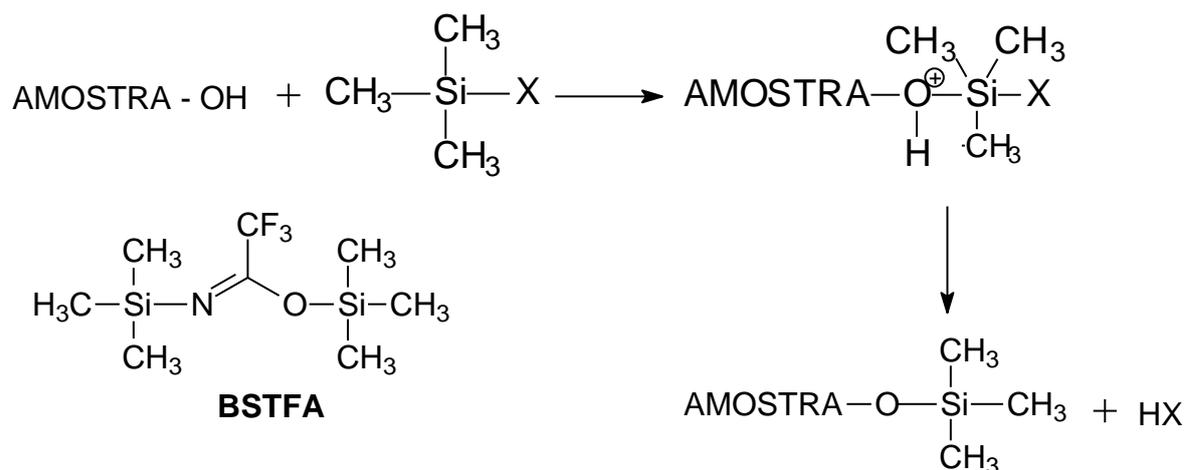
Figura 5.67 – Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  para os compostos **7+9** ( $\text{CDCl}_3$ , 100 MHz)

Figura 5.68 – Espectro de RMN de DEPT 135° para os compostos **7+9** (CDCl<sub>3</sub>, 100 MHz)

A subfração FH37-10-3, composta por esteroides, foi submetida a uma reação com *N,O*-bis(trimetilsilil)trifluoroacetamida (BSTFA), na qual ocorre substituição do hidrogênio da hidroxila do esteroide pelo trimetilsilano (TMS). Esta reação é um método de derivatização conhecida como reação de sililação e ela ocorre para melhorar a resolução da análise de CG-EM, pois os compostos se tornam mais voláteis (Figura 5.69).

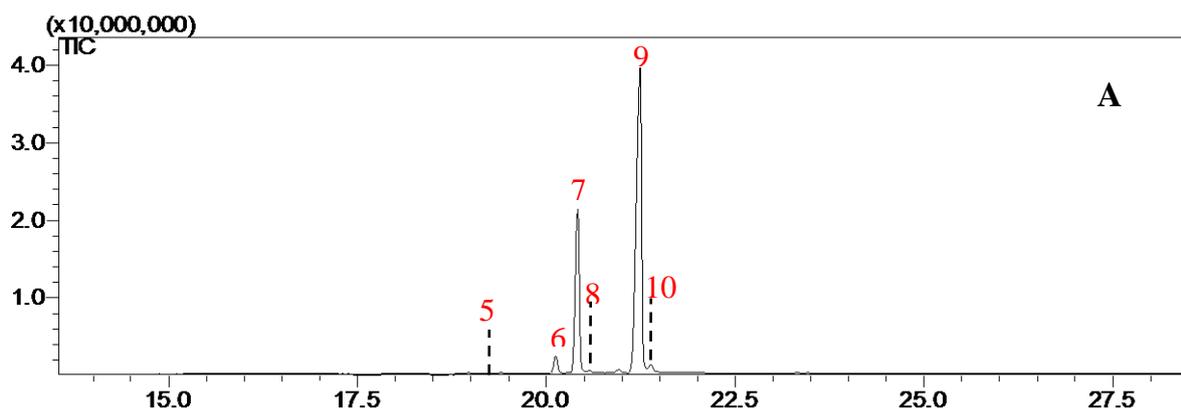
Figura 5.69 – Representação da reação de sililação



A partir do perfil cromatográfico fração sililada (Figura 5.70) pode-se identificar a presença de seis compostos (Tabela 5.8). As bandas com maior abundância relativa são do sitosterolTMS com 66,4% e do estigmasterolTMS com 17,5%. A maior abundância desses compostos explica a identificação somente do estigmasterol (7) e sitosterol (9) por RMN.

Os constituintes da mistura de esteroides são o colesterol (5), campesterol (6), estigmasterol (7),  $\Delta^{22}$ -estigmasterol (8), sitosterol (9) e sitostanol (10), os quais foram identificados como derivados sililados, conforme mostrado na (Tabela 5.8).

Figura 5.70 – Cromatograma (A) de íons totais e expansão (B) dos derivados sililados dos esteroides 5-10



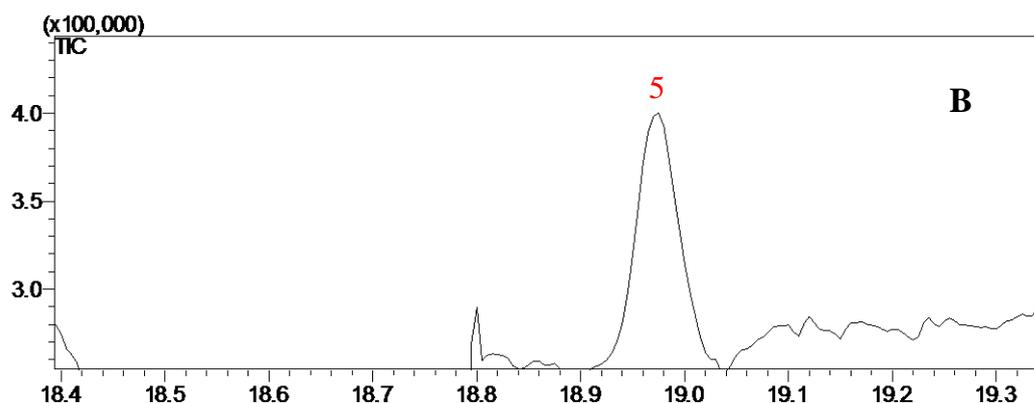


Tabela 5.8 – Esteroides (**5–10**) identificado na fração FH37-10-3 das folhas de *Combretum mellifluum*

Composto	Tr (min)	Similaridade (%)	Área (%)	M <sup>+</sup>
colesterolTMS ( <b>5</b> )	18,975	92	0,4	458
campesterolTMS ( <b>6</b> )	20,115	93	3,3	472
estigmasterolTMS ( <b>7</b> )	20,405	92	32,9	484
$\Delta^{22}$ - estigmastenolTMS ( <b>8</b> )	20,570	-	0,4	486
sitosterolTMS ( <b>9</b> )	21,225	90	61,4	486
sitostanolTMS ( <b>10</b> )	21,380	93	1,6	488

Os espectros de massas (Figuras 5.71 à 5.76) apresentam picos de íons moleculares com  $m/z$  458, 472, 484, 486, 486 e 488 atribuídos aos derivados siliados do colesterol (**5**), campesterol (**6**), estigmasterol (**7**),  $\Delta^{22}$ -estigmasterol (**8**), sitosterol (**9**) e sitostanol (**10**), respectivamente. O pico do íon molecular destes derivados siliados corresponde a M-1 de cada esteroide (M = 386, 400, 412, 414, 414 e 416) acrescido de 73 D referente à massa do TMS. Nestes espectros, são observados um fragmento com  $m/z$  129 nos esteróis  $\Delta^5$ , enquanto que nos esteróis sem ligação dupla em C-5 apresenta um fragmento com  $m/z$  215.

Figura 5.71 – Espectro de Massas do derivado sililado de **5** (colesterolTMS) –  $M^+$  458

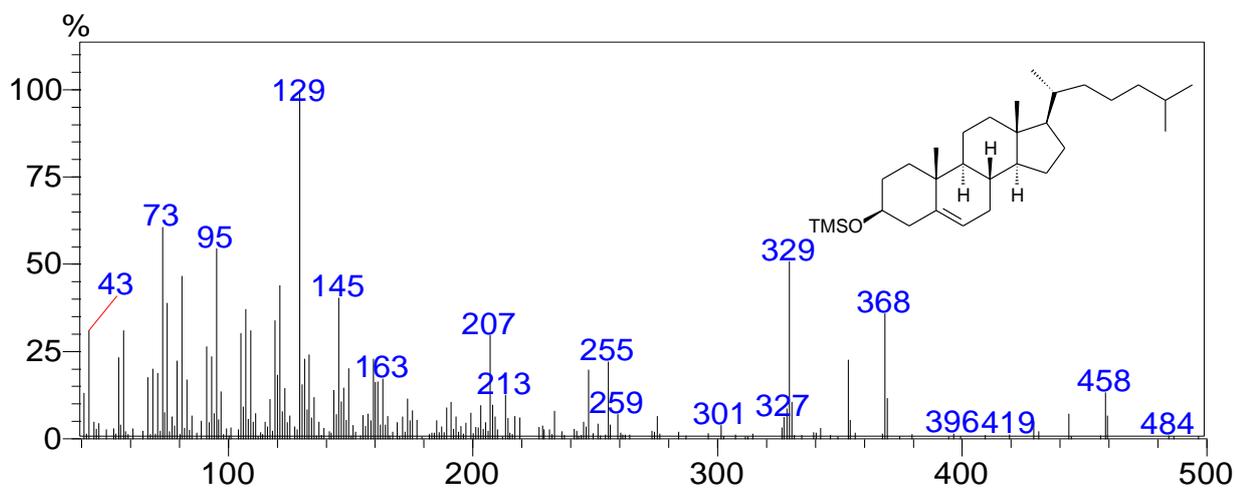


Figura 5.72 – Espectro de Massas do derivado sililado de **6** (campesterolTMS) –  $M^+$  472

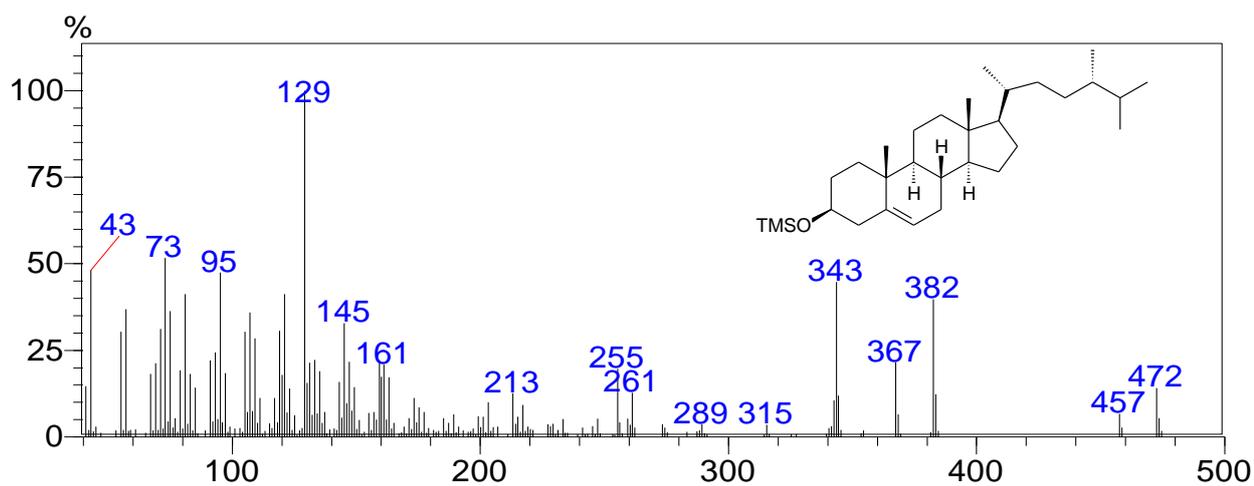


Figura 5.73 – Espectro de Massas do derivado sililado de **7** (estigmasterolTMS) –  $M^+$  484

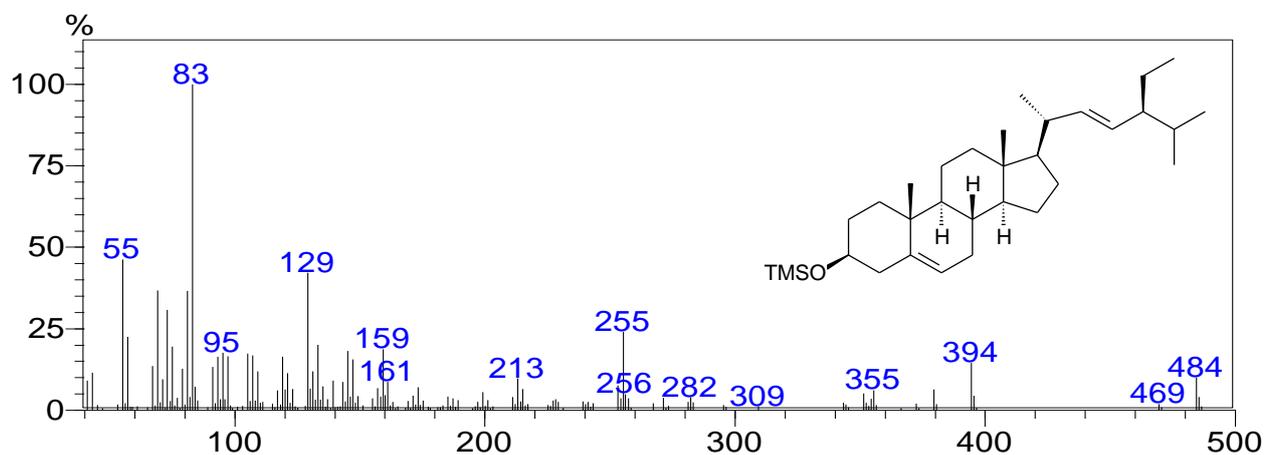


Figura 5.74 – Espectro de Massas do derivado sililado de **8** ( $\Delta^{22}$ - estigmastenolTMS) –  $M^{+\bullet}$

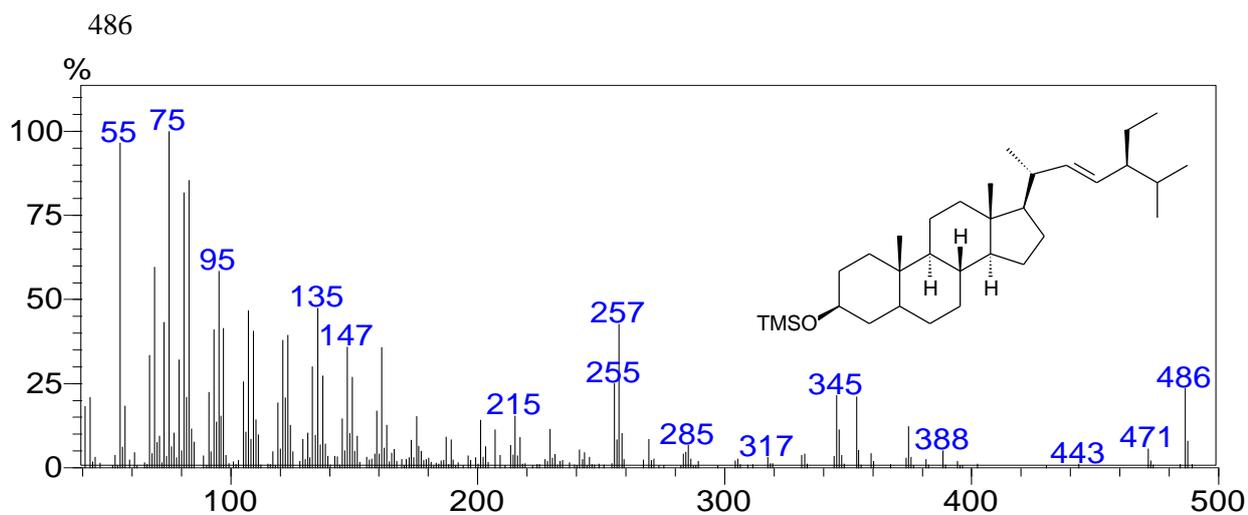


Figura 5.75 – Espectro de Massas do derivado sililado de **9** (sitosterolTMS) –  $M^{+\bullet}$  486

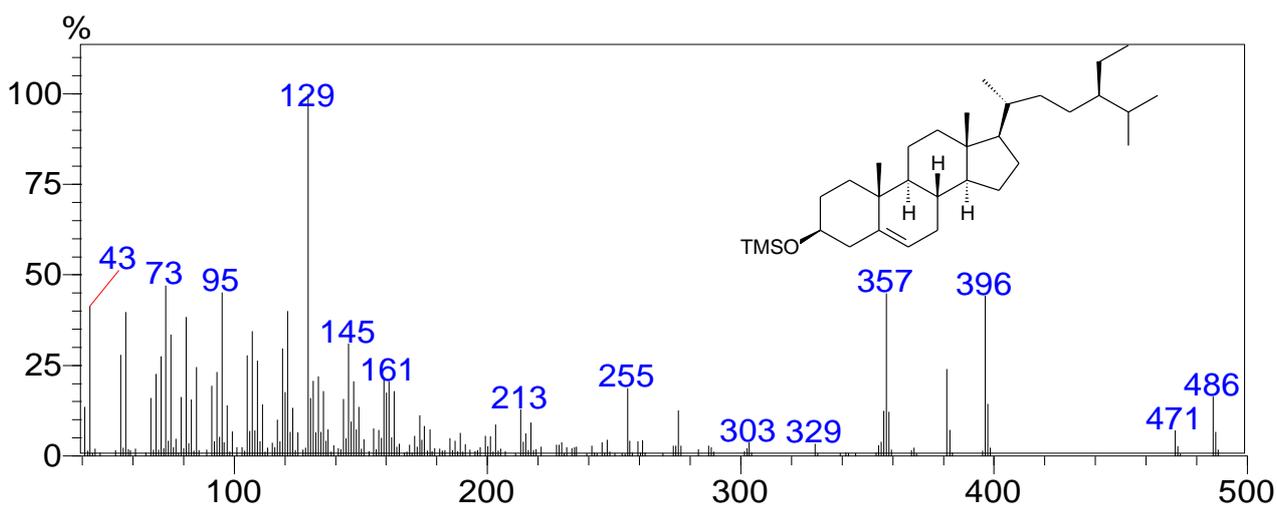
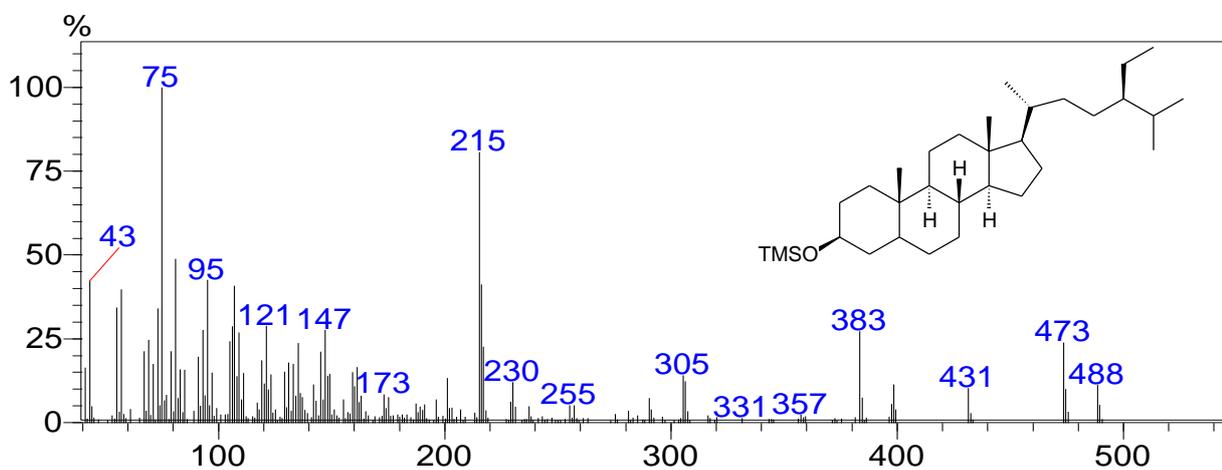


Figura 5.76 – Espectro de Massas do derivado sililado de **10** (sitostanolTMS) –  $M^{+\bullet}$  488



## 5.4 Avaliação do potencial biológico do extrato e frações de *C. mellifluum*

### 5.4.1 Atividade antioxidante

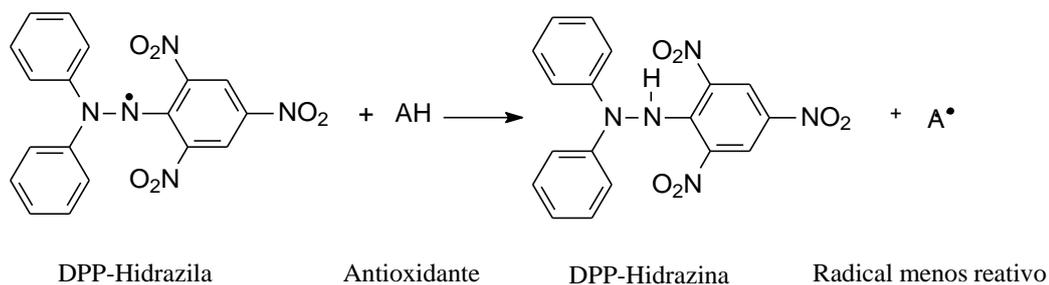
Os antioxidantes são substâncias capazes de estabilizar ou desativar os radicais livres, cujo excesso no organismo, pode provocar peroxidação de lipídios de membrana, agressão às proteínas dos tecidos, às enzimas, carboidratos e DNA, podendo causar danos às membranas, com perda da fluidez, causando o envelhecimento precoce e o surgimento de doenças degenerativas, como câncer, doenças cardiovasculares, catarata, disfunções cerebrais, diabetes, declínio do sistema imune, entre outras (SOUSA et al., 2007; ALVES e KUBOTA, 2013; SOUSA SÁ et al., 2012; SILVA e SIRASA, 2018). O excesso de radicais livres pode ser combatido por meio de uma dieta alimentar rica em produtos naturais como frutas, vegetais, grãos e seus derivados como chá e vinho (ALVES e KUBOTA, 2013).

Dentre as principais substâncias antioxidantes capazes de reduzir o estresse oxidativo destacam-se os compostos fenólicos que inclui, fenóis simples, ácidos fenólicos, cumarinas, flavonoides, estilbenos, taninos condensados e hidrolisáveis, lignanas e ligninas (SOUSA et al., 2007; OROIAN e ESCRICH, 2015).

Diversos métodos têm sido empregados na determinação da atividade antioxidante, dentre estes um dos mais utilizados é o método de sequestro de radicais livres DPPH<sup>\*</sup> (2,2-difenil-1-picrilidrazila) (DUARTE-ALMEIDA et al., 2006; RUFINO et al., 2007). Neste trabalho a atividade antiradicalar do extrato etanólico e frações hexânica (FHex), acetato de etila (FAcOEt), aquosa (FAqu) e sobrenadante (FSbn) das folhas de *C. mellifluum* foi determinada pelo método de sequestro do radical livre DPPH.

O DPPH é um radical estável, que apresenta coloração púrpura e, por ação de um antioxidante (AH) ou uma espécie radicalar (R<sup>•</sup>), é reduzido ao aceitar um elétron ou um radical hidrogênio formando um composto mais estável denominado difenil-picril-hidrazina de coloração amarela (Figura 5.77). Os resultados são expressos em CE<sub>50</sub> que indica a quantidade de antioxidante necessária para decrescer a concentração inicial de DPPH em 50%. Quanto maior o consumo de DPPH por uma amostra, menor será sua CE<sub>50</sub> e maior a sua atividade antioxidante ou anti radicalar (SOUSA et al., 2007; CARMONA-JIMÉNEZ, 2014).

Figura 5.77 – Estabilização do radical livre DPPH por uma espécie antioxidante AH



Fonte: Adaptado Oliveira et al. (2009).

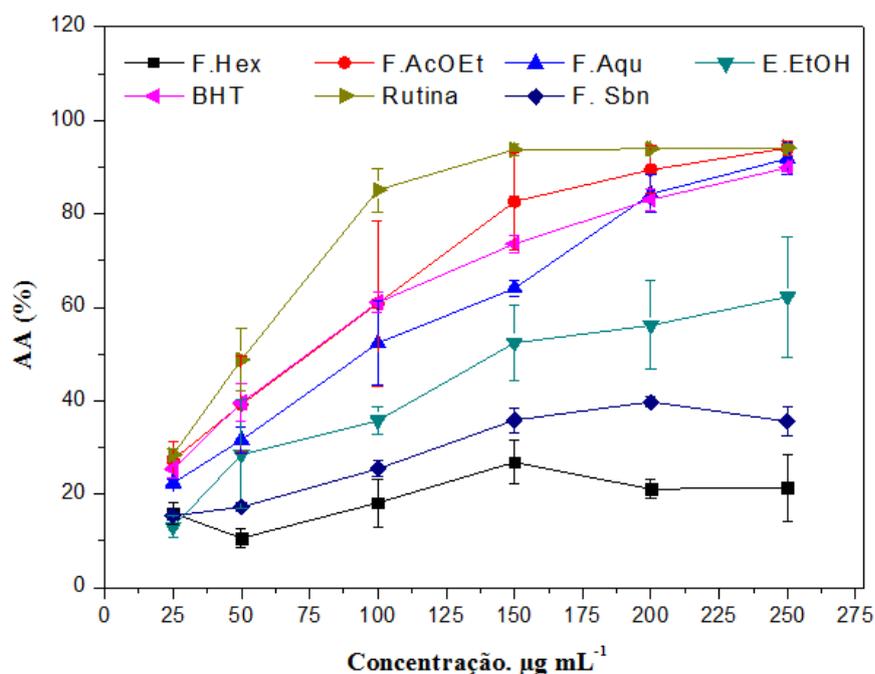
Os percentuais de atividade antioxidante (%AA e  $CE_{50}$ ) do extrato etanólico e frações hexânica (FHex), acetato de etila (FAcOEt), aquosa (FAqu) e sobrenadante (FSbn) de *C. mellifluum* e dos controles positivos (rutina e BHT) frente ao radical DPPH estão apresentados na Figura 5.78 e na Tabela 5.9. Os resultados mostram que as frações AcOEt e aquosa, quando comparadas aos controles positivos rutina e BHT (hidroxitolueno de butila), apresentaram atividade sequestradora do radical DPPH moderada, enquanto que as frações hexânica e sobrenadante (FSbn) foram as menos ativas.

Os maiores percentuais de atividade antioxidante (%AA) apresentados foram FAcOEt e FAqu com 94,1 e 91,8%, na concentração de  $250 \mu\text{g mL}^{-1}$  e  $CE_{50}$  de  $89,54 \pm 3,74$  e  $107,57 \pm 5,31 \mu\text{g mL}^{-1}$ , respectivamente, sendo superiores ao extrato etanólico (EEtOH, 62,2%,  $CE_{50}$   $140,60 \pm 9,21 \mu\text{g mL}^{-1}$ ). Os resultados mostraram que na extração líquido-líquido do extrato etanólico as substâncias antioxidantes ficaram concentradas na fração AcOEt.

Em contrapartida, as frações hexânica (FHex) e sobrenadante (FSbn) apresentaram os menores %AA (Figura 5.78), não sendo possível calcular a  $CE_{50}$  da fração hexânica, pois não houve redução em 50% do radical DPPH em nenhuma das concentrações testadas.

O potencial antioxidante do extrato etanólico das folhas e frações resultou na seguinte ordem: FAcOEt > FAqu > E.EtOH > FSbn > FHex. (Tabela 5.9).

Figura 5.78 – Percentual de atividade antioxidante do extrato etanólico e frações das folhas de *C. mellifluum*. Controle positivos: rutina e BHT. Tempo de reação com DPPH: 30 min; FAcOEt, FHex, FAqu e FSbn: frações acetato de etila, hexânica, aquosa e sobrenadante, respectivamente; E.EtOH: extrato etanólico



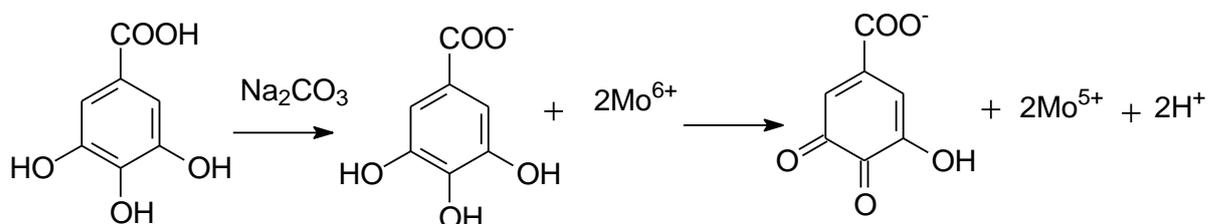
#### 5.4.2 Determinação dos teores de fenóis e flavonoides totais

Os compostos fenólicos, derivados do metabolismo secundário de plantas, protegem múltiplos organismos da oxidação e, portanto, estes compostos devem ser considerados os antioxidantes naturais. Os compostos fenólicos podem exercer ações que previnem o surgimento de diversas doenças, como doenças neurodegenerativas carcinogênicas, cardiovasculares e inflamatórias gerando grande benefício na melhoria da qualidade de vida por prevenir ou adiar o aparecimento de doenças não transmissíveis (GRANATO et al., 2018; ALAN, BRISTI e RAFIQUZZMAN et al., 2013).

A metodologia utilizada para a determinação do teor de fenóis totais baseia-se no método espectrofotométrico utilizando o reagente Folin-Ciocalteu o qual é composto por uma mistura dos ácidos fosfomolibdico e fosfotungstico que se encontram no estado de oxidação 6+ e apresentam coloração amarela. Na presença de agentes redutores, formam-se os complexos molibdênio-tungstênio azuis, nos quais os estados de oxidação dos metais encontram-se entre 5+ e 6+ (OLIVEIRA et al., 2009; ROVER e BROWN, 2013).

A presença de substâncias redutoras, além de possibilitar a mudança de coloração, ocasionada pela formação dos complexos molibdênio-tungstênio azul, possibilita também a determinação da concentração de substâncias redutoras. Conforme a Figura 5.79, o composto fenólico em meio básico ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ), reage com o reagente Folin-Ciocalteu iniciando a desprotonação formando o ânion, que posteriormente é oxidado e os metais molibdênio e tungstênio presentes no reagente são reduzidos. Neste processo, a cor do meio reacional passa de amarelo para azul permitindo a determinação da concentração das substâncias redutoras presentes no meio que podem ter ou não natureza fenólica (SOUSA et al., 2007).

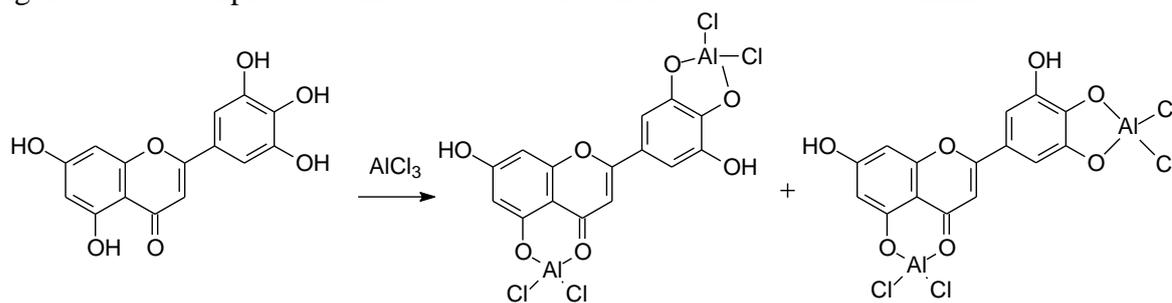
Figura 5.79 – Reação de redução do com o molibidênio presente no reagente de Folin-Ciocalteu pelo ácido gálico



Os flavonoides são substâncias antioxidantes devido não apenas à sua capacidade de eliminar radicais livres altamente reativos, mas também devido à capacidade de quelar íons de metais (JABEEN et al., 2017; PEIXOTO SOBRINHO et al., 2012). Além de propriedades antioxidantes, os flavonoides são agentes anticâncer, cardioprotetores, inibidores da neurodegeneração e anti-inflamatório (GRANATO et al., 2018; OROIAN e ESCRICHE, 2015).

O método utilizado para a determinação do teor flavonoides total baseia-se na complexação com o cloreto de alumínio (PEIXOTO SOBRINHO et al., 2012). A Figura 5.80 mostra como ocorre a formação do complexo flavonoide-Al.

Figura 5.80 – Complexos formados entre o flavonoide e o cloreto de alumínio



Fonte: Adaptada de Mabry; Markham; Thomas, 1970

Os resultados obtidos dos teores de fenóis totais (FT) foram expressos em miligramas de equivalente de ácido gálico por grama de amostra (mg EAG g<sup>-1</sup> de amostra), enquanto que os teores flavonoides totais (FLAT), foram expressos em miligramas de equivalente de rutina por grama de amostra (mg ER g<sup>-1</sup> de amostra), e juntamente com a concentração eficiente (CE<sub>50</sub>) do extrato e frações de *C. mellifluum* são mostrados na Tabela 5.9.

Os maiores teores de fenóis totais foram observados nas frações aquosa e AcOEt, com 557,30±5,77 e 331,40±1,22 EAG g<sup>-1</sup> de extrato, respectivamente. Embora a FAqu tenha apresentado maior teor de FT do que a FAcOEt, a atividade antioxidante é o inverso, sugerindo que os compostos fenólicos presentes na FAcOEt têm maior potencial antioxidante.

A fração AcOEt (432,65±8,37 mg ER g<sup>-1</sup> amostra) apresentou teor de flavonoides totais superiores à fração aquosa (209,19±0,74 mg ER g<sup>-1</sup> amostra). Essa informação é condizente com a maior atividade antioxidante observada, uma vez que flavonoides são geralmente antioxidantes potentes (TREML e SMEJKAL, 2016; CARVALHO et al., 2018).

Tabela 5.9 – Teores de fenóis totais (FT), flavonoides totais (FLAT) e concentração eficiente média (CE<sub>50</sub>) do extrato etanólico e das frações das folhas de *C. mellifluum*

Amostras	FT mg EAG g <sup>-1</sup> de amostra ± DP	FLAT mg ER g <sup>-1</sup> de amostra ± DP	CE <sub>50</sub> µg mL <sup>-1</sup> ± DP
E.EtOH	331,40±1,22	167,38±2,25	140,60±9,21
FHex	77,69±0,84	Nd	nd
FAcOEt	368,26±6,14	432,65±8,37	89,54 ±3,74
FAqu	557,30±5,77	209,19±0,74	107,57±5,31
FSbn			104,13±5,59
Rutina	-	-	47,08±4,65
BHT	-	-	69,34±5,53

EAG: equivalente de ácido gálico; ER: equivalente de rutina; DP: desvio padrão; nd: não determinado.

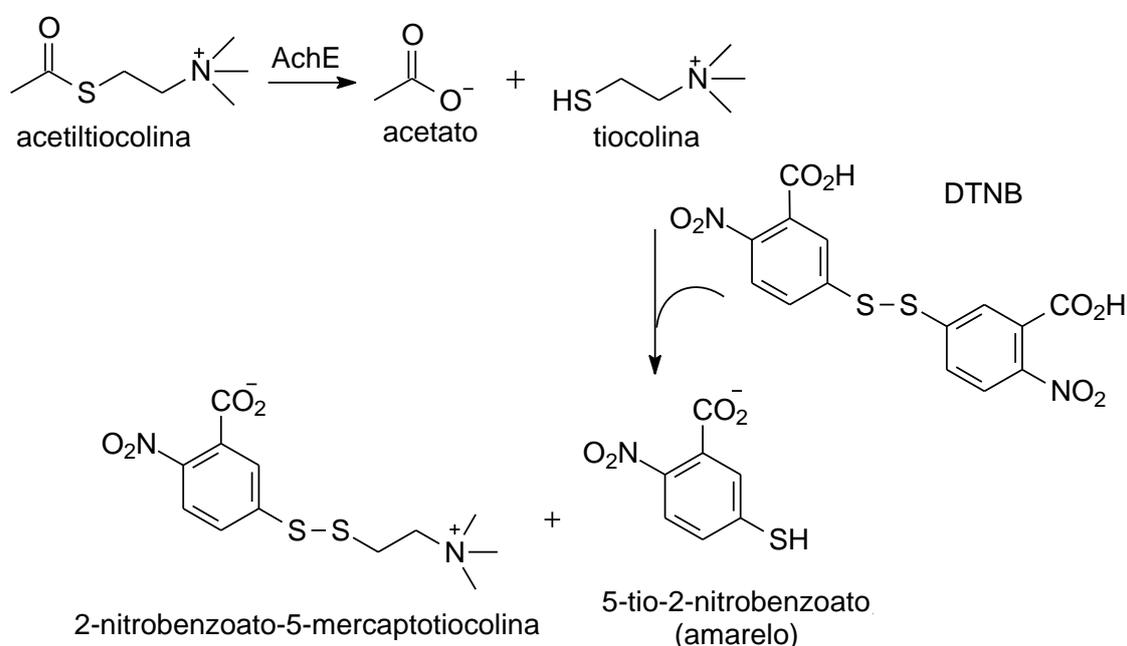
### 5.4.3 Atividade anticolinesterásica

A doença de Alzheimer (DA) atinge o sistema nervoso central e é caracterizado pela perda da memória comprometimento de múltiplas funções cognitivas e emocionais (ADAMS et al., 2007). Esta doença está relacionada com a diminuição da taxa de acetilcolina (ACh), neurotransmissor presente no sistema nervoso, responsável por diversas funções importantes no nosso organismo, como o aprendizado, controle motor, alerta e memória (MOTA et al., 2012).

Pacientes com DA apresentam melhora dos sentidos cognitivos, comportamentais e funcionais, quando tratados com inibidores de acetilcolinesterase (AChE) e estes inibidores permitem o aumento dos níveis de acetilcolina (ACh) presentes nas sinapses (CARVALHO et al., 2013). Nesse sentido, o uso de plantas para fins medicinais tem contribuído no tratamento de doenças relacionadas ao sistema nervoso central (SCN) bem como na busca por substâncias inibidoras de acetilcolinesterase.

O ensaio qualitativo de inibição da enzima AchE emprega o método de Ellman, o qual se baseia na coloração apresentada na cromatoplaça e utiliza como controle positivo a cafeína. O princípio deste método avalia a ação da enzima acetilcolinesterase (AchE) na hidrólise da acetiltiocolina, produzindo a tiocolina, que reage com DTNB (reagente de Ellman) formando o ânion 5-tio-2-nitrobenzoato de metila (coloração amarelada) e o 2-nitrobenzoato de metila-5-mercaptopiocolina (Figura 5.81). O teste de inibição é considerado positivo quando se observa, após revelação com o reagente de Ellman, a presença de manchas esbranquiçadas sob fundo amarelo região de eluição, pois indica que houve inibição da enzima.

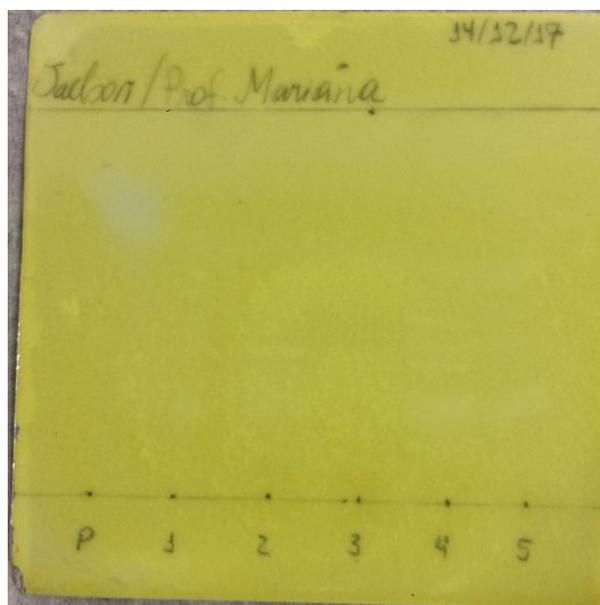
Figura 5.81 – Reação da atividade enzimática da acetilcolinesterase (AchE)



Fonte: Adaptada de RHEE et al., 2001

A atividade anticolinesterásica do extrato etanólico (E.EtOH) e frações hexânica (FHex), acetato de etila (FACOEt), aquosa (FAqu) e sobrenadante (FSbn) das folhas de *C. mellifluum* foi avaliada com base na coloração das cromatoplaças, utilizando a cafeína como controle positivo. Após a revelação com o reagente de Ellman, observou-se a presença de manchas brancas sob fundo amarelo nas regiões que continham FACOEt, FSbn e EEtOH, sendo este perfil indicativo de resultado positivo de inibição da enzima acetilcolinesterase. No entanto, este resultado não foi observado para FHex e FAqu, como mostra a Figura 5.82.

Figura 5.82 — Cromatoplaca do ensaio de atividade anticolinesterásica da fração hexânica (1), AcOEt (2), aquoso (3), frações sobrenadante (4) e extrato etanólico (5) das folhas de *C. mellifluum* e do padrão cafeína (P)



#### 5.5.4 Atividade antileishmania

A leishmaniose é uma doença crônica causada por protozoários pertencentes ao gênero *Leishmania* (Trypanosomatidae). Esta doença afeta a pele, mucosa e órgãos internos em humanos e animais (NESI-REISA et al., 2018). Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), é uma doença endêmica em 98 países e territórios, com uma estimativa de 350 milhões de pessoas com risco de infecção. Além disso, 12 milhões de pessoas estão infectadas e há a previsão de 45 milhões de novos casos e 20.000 a 30.000 mortes a cada ano (WHO, 2010). No continente americano, *L. chagasi* causa a leishmaniose visceral (LV), enquanto as espécies *L. braziliensis* e *L. amazonensis* são agentes etiológicos da leishmaniose cutânea (CL).

Os antimoniais pentavalentes são usados como medicamentos de primeira linha para o tratamento da LC. No entanto, eles podem causar efeitos colaterais graves e abandono do tratamento por pacientes. Desta forma, produtos naturais têm sido investigados como possíveis alternativas.

A atividade antileishmania na forma promastigota é avaliada considerando que é a responsável pelas manifestações clínicas da leishmaniose (NAKAMURA et al., 2006).

O extrato etanólico (EEtOH), as frações hexânica (FHex), acetato de etila (FAcOEt), aquosa (FAqu), sobrenadante (FSbn) e os compostos **1** e **2a+2b** foram investigados frente a promastigota de *L. amazonensis*. Todas as amostras inibiram o crescimento de *L. amazonensis*. O EEtOH, FAqu e os compostos **2a+2b** e **1** apresentaram percentuais de inibição de 100%, 100%, 100% e 47%, respectivamente, na concentração de 800 µg mL<sup>-1</sup>. As frações FHex e FSbn apresentaram 100% de inibição na concentração de 200 µg mL<sup>-1</sup> (Figura 5.83).

A Tabela 5.10 apresenta a concentração inibitória média (IC<sub>50</sub>) para as amostras testadas e permitiu verificar a seguinte ordem de atividade: FSbn>FHex>**2a+2b**> EEtOH> FAqu>**1**.

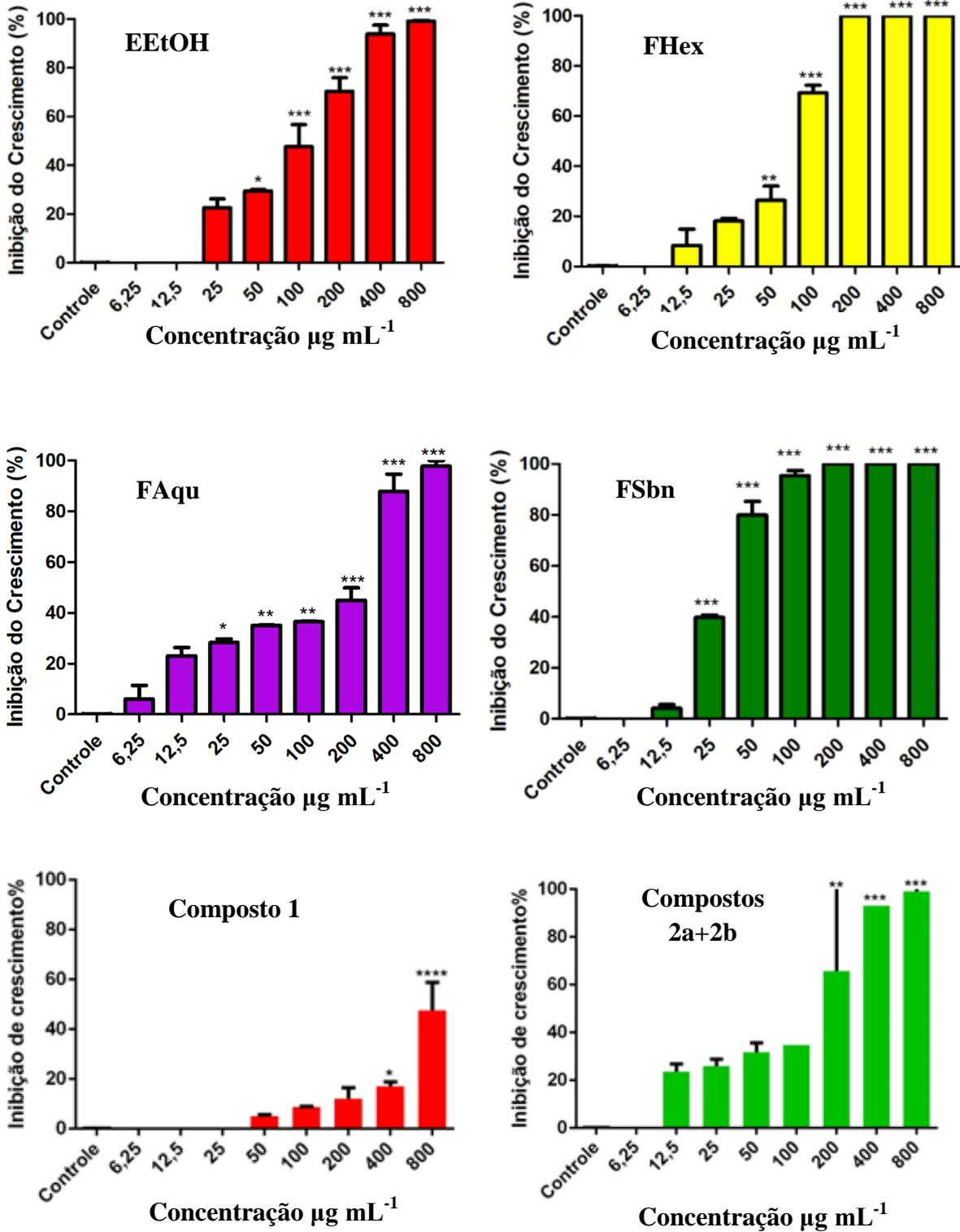
De acordo com Osorio et al. (2007), extratos são classificados como altamente ativos (CI<sub>50</sub><10 µg mL<sup>-1</sup>), ativo (10< CI<sub>50</sub><50 µg mL<sup>-1</sup>), moderadamente ativo (50<CI<sub>50</sub><100 µg mL<sup>-1</sup>) e não ativo (CI<sub>50</sub>>100 µg mL<sup>-1</sup>). Entre as amostras testadas de *C. mellifluum*, o EEtOH, FAqu, FHex e a mistura dos compostos **2a+2b** foram moderadamente ativas, enquanto, FSbn foi ativa. Estes resultados indicam que a espécie *C. mellifluum* apresenta potencial antileishmania.

Tabela 5.10 – Atividade antileishmania do extrato etanólico, frações e compostos isolados de *C. mellifluum* frente a *L. amazonensis*

Amostras	CI <sub>50</sub> µg mL <sup>-1</sup>
EEtOH	85,91
FHex	58,30
FAcOEt	nt
FAqu	94,65
FSbn	31,29
<b>1</b>	1138,78
<b>2a+2b</b>	83,07
Anfotericina B (controle positivo)	1,74

EEtOH: Extrato etanólico, FHex: fração hexânica FAcOEt: fração acetato de etila FAqu: fração aquosa FSbn: fração sobrenadante; nt: não testada

Figura 5.83 — Efeito do extrato etanólico, frações e compostos isolados de *C. mellifluum* frente a *L. amazonensis* na forma promastigota



## 6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O estudo fitoquímico das folhas de *C. mellifluum* possibilitou o isolamento e determinação estrutural de duas misturas epiméricas totalizando quatro novos triterpenoides de esqueleto cicloartano: quadrangularato M de metila (**2a**) e 24-epiquadrangularato M de metila (**2b**) e 2 $\alpha$ ,3 $\beta$ ,24 $\beta$ -trihidroxi-cicloart-25-eno de metila (**3a**) e 2 $\alpha$ ,3 $\beta$ ,24 $\alpha$ -trihidroxi-cicloart-25-eno (**3b**).

Adicionalmente, dois triterpenoides com esqueleto lupano já conhecidos, Lup-20(29)-en-2 $\alpha$ ,3 $\beta$ -diol (**1**) e Lupenona (**4**), foram isolados e identificados. O composto **1** está sendo relatado pela primeira vez na família Combretaceae. Adicionalmente foram identificados, como derivados sililados, seis esteroides: colesterol (**5**), campesterol (**6**), estigmasterol (**7**),  $\Delta^{22}$ -estigmasterol (**8**), sitosterol (**9**) e sitostanol (**10**) sendo o sitosterol o componente majoritário com abundância relativa de 66,4%.

Na avaliação do potencial antioxidante frente ao radical livre DPPH, as frações AcOEt (CE<sub>50</sub>= 216 $\pm$ 3,8  $\mu$ g mL<sup>-1</sup>) e aquosa (CE<sub>50</sub>= 216 $\pm$ 3,8  $\mu$ g mL<sup>-1</sup>) apresentaram os maiores potenciais antioxidantes correlacionando-se positivamente com o conteúdo de flavonoides totais (432,65 $\pm$ 8,37 e 209,19 $\pm$ 0,74 mg ER g<sup>-1</sup> de amostra).

As frações AcOEt, sobrenadante e o extrato EtOH apresentaram indicativo da inibição da enzima acetilcolinesterase no ensaio em cromatografia em camada delgada e revelação com reagente de Elman.

A atividade antileishmania frente a promastigota de *L. amazonensis* apresentou a seguinte ordem: FSbn>FHex>**2a+2b**> EEtOH> FAqu>**1**, sendo que EEtOH, FAqu, FHex e a mistura dos compostos **2a+2b** foram moderadamente ativas, enquanto, FSbn foi ativa. Desta forma a mistura dos compostos **2a+2b** contribui em parte para a atividade antileishmania do FSbn.

Os resultados obtidos no presente trabalho contribuíram para ampliar os conhecimentos sobre a composição química e demonstrar o potencial antioxidante e anticolinesterásico e antileishmania de *C. mellifluum*, bem como, estimular novos estudos sobre esta espécie.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADAMS, M.; GMUEDNER, F.; HAMBURGER, M. Plants traditionally used in age related brain disorders - A survey of ethnobotanical literature. **Jour. of Ethnopharm.**, v.113, p.363-81, 2007.
- ADNYANA, K.; TEZUKA, Y.; AWALE, S.; BANSKOTA, A. H.; TRAN, K. Q.; KADOTA, S. 1-O-galloyl-6-(4-hydroxyl-3,5-dimetoxy) banzoyl- $\beta$ -D-glucose, a new hepatoprotective constituents from *Combretum quadrangulare*. **Plant. medica**, v.67. n.4, p. 370-371, 2001.
- ALAN, M. N.; BRISTI, N. J.; RAFIQUZZAMAN, M. Review on in vivo and in vitro methods evaluation of antioxidante actiivity. **Saud. Pharm. Jour.** v. 21, p. 143-152, 2013.
- ALBUQUERQUE, I. L.; ALVES, L. A.; LEMOS, T. L. G.; MONTE, F. J. Q. Ácido canárico (3,4-seco derivado do lupano) em própolis de Ceará. *Quimica Nova*. v. 30, n. 4, p. 828-831, 2007
- ALVES, E.; KUBOTA, E. H. Conteúdo de fenólicos, flavonoides totais e atividade antioxidante de amostras de própolis comerciais. **Rev. Ciênc. Farm. Básica Apl.**, v. 34, p. 37-41, 2013.
- BANSKOTA, A. H.; TEZUKA, Y.; TRAN, K. Q.; TANAKA, K.; SAIKI, I.; KADOTA, S. Thirteen novel cycloartane-type triterpenes from *Combretum quadrangulare*. **J. Nat. Prod.**, v. 63, p. 57-64, 2000a.
- BANSKOTA, A. H.; TEZUKA, Y.; TRAN, K. Q.; TANAKA, K.; SAIKI, I.; KADOTA, S. Methyl Quadrangularates A-D and related triterpenes from *Combretum quadrangulare*. **Chem. Pharm. Bull.**, v. 48, p. 496-504, 2000b.
- BANSKOTA, A. H.; TEZUKA, Y.; ADNYANA, K.; XIONG, Q.; HASE, H.; TRAN, K. Q.; TANAKA, K.; SAIKI, I.; KADOTA, S. Hepatoprotective effect of *Combretum quadrangulare* and its constituents. **Biol. Pharm. Bull.**, v. 23, p. 456-460, 2000.
- BANSKOTA, A. H.; TEZUKA, Y.; PHUNG, L. K.; TRAN, K. Q.; SAIKI, I.; MIWA, Y.; TAGA, T.; KADOTA, S. Cytotoxic cycloartane-type triterpenes from *Combretum quadrangulare*. **Biorg. & Medic. Chem. Lett.**, v. 8, p. 3519-3524, 1998.
- BARROS, J. S.; CASTRO, A. A. J. F. Compartimentação geoambiental no Complexo de Campo Maior, PI: uma área de tensão ecológica. **Interações: Revista Internacional de Desenvolvimento Local**, v. 8, n.13, p. 119-130, 2006.
- CANO-FLORES, A. Biotransformación de triterpenos com diferentes microorganismos. **Ver. Mex. Cienc. Farm** v. 44, n. 2, p.7-16, 2013
- CARMONA-JIMÉNEZ, Y.; GARCÍA-MORENO, M. V.; IGARTUBURU, J. M.; BARROSO, C. G. Simplification of the DPPH assay for estimating the antioxidant activity of wine and wine by-products. **Food Chem.**, v. 165, p. 198-200, 2014.

- CARVALHO, A. A.; SANTOS, L. R.; FARIAS, R. R. S.; CHAVES, M. H.; FEITOSA, C. M.; VIEIRA JÚNIOR, G. M.; ARAÚJO, M. R. S.; FERREIRA, P. M. P.; PESSOA, C. Ó.; Phenolic derivatives and antioxidant activity of polar extracts from *Bauhinia pulchella*. **Quim. Nova**, v. 41, p. 405-411, 2018.
- CARVALHO, R. B. F. D.; ALMEIDA, A. A. C. D.; FREITAS, R. M. D.; LIMA, L. S.; DAVID, J. P.; DAVID, J. M.; FEITOSA, C. M. Composição química e atividade anticolinesterásica de uma fração ativa do extrato de folhas de *Citrus limon* (L.) Burm. **Quim. Nova**, v. 36, n. 9, p. 1375-1379, 2013.
- CHAVES, M. H. Análise de extratos de plantas por CCD: uma metodologia aplicada à disciplina “Química Orgânica”. **Quím. Nova**. v. 20, n. 5, 1997.
- CHOUDHARY, M. I.; HUSSAIN, A.; ADHIKARI, A.; MARASINI, B. P.; SATTAR, S. A.; WAHAB, A. T.; HUSSAIN, N.; AYATOLLAHI, S. A. M.; RAHMAN, A. Anticancer and  $\alpha$ -chymotrypsin inhibiting diterpenes and triterpenes from *Salvia leriifolia*. **Phytochemistry**, v. 6, p. 139-143, 2013.
- CHUDZIK, M.; KORZONEK-SZLACHETA, I.; KRÓL, W. Triterpenes as potencial cytotoxic compounds. **Molecules**, v. 20, p. 1610-1625, 2015.
- CIRLA, A.; MANN, J. Combretastatins: from natural products to drug Discovery. **Nat. Prod. Reports**, v.20, p.558-564, 2003.
- CONCEIÇÃO, G. M.; CASTRO, A. A. J. F.; Fitossociologia sw uma área de cerrado marginal, Parque Estadual do Mirador, Mirador, Maranhão. **Sci. Plena**. v. 5, p. 1-16, 2009.
- DAWE, A.; KAPCHE, D. D. W, F.; BANKEU, J. J. K.; FAWAI, Y.; ALI, M. S.; NGADJUI, B. T. Combretins A and B, new cycloartane-type triterpenes from *Combretum fragrans*. **Helv. Chim. Acta**, v. 99, p. 617-620, 2016.
- DAWE, A.; PIERRE, S.; TASLA, E. D.; HABTTEMARIAM, S. Phytochemical Constituents of *Combretum* Loefl. (Combretaceae). **Pharma. Crops**, v. 4, p. 38-59, 2013.
- DEWICK, P. M. **Medicinal Natural Products: a biosynthetic approach**. 2. ed. Wiley, 2009.
- DUARTE-ALMEIDA, J. M.; SANTOS, R. D.; GENOVESE, M. I.; LAJOLO, F. M. Avaliação da atividade antioxidante utilizando sistema  $\beta$ -caroteno/ácido linoléico e método de sequestro de radicais DPPH. **Ciencia Tecnol. Aliment.**, v. 26, n. 2, p. 446-452, 2006.
- ELLMAN, G. L.; COURTNEY, D. K.; ANDRES, V. J. R.; FEATHERSTONE, R. M. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. **Biochem. Pharmacol.**, v. 7, p. 88-95, 1961.
- ELOFF, J. N.; KATERERE, D. R.; MAC GAW, L. J. The biological activity and chemistry of the southern African *Combretaceae*. **J. Ethnopharmacol.** v. 119, p. 686- 699, 2008.

FACUNDO, V.A.; ANDRADE, C.H.S; EDILBERTO, R.S.; BRAZ-FILHO, R.; HUFFORD, C.D. Triterpenes and flavonoids from *Combretum leprosum*. **Phytochemistry**, v. 32, p. 411-415, 1993.

FACUNDO, V.A.; KATIUSCIA, A.R.; MOREIRA, L.S.; SANCHO, J.L.; TEIXEIRA, M.; GUERINO, S.R.; BRAZ-FILHO, R.; EDILBERTO, R.S. Two new cycloartanes from *Combretum leprosum* Mart. (Combretaceae). **Rev. Latinoamer. Quím**, v. 36, p. 76-82, 2008.

FARIAS, R. R. S.; PEREIRA, E. T. V.; CHAVES, M. H.; CASTO, A. A. J. F. Prospecção Científica e Tecnológica das espécies *Combretum duarceanum* Cambess e *Combretum mellifluum* Eichler. **Revista Geintec.**, v. 5, p. 1606-1616, 2015.

FARIAS, R. R. S.; CASTRO, A. A. J. F.; LOIOLA, M. I. B.; PEREIRA, E. T. V.; CHAVES, M. A.; Botânica (aspectos morfológicos) e distribuição geográfica de três espécies de Combretaceae nos cerrados do Piauí, nordeste do Brasil. **Publ. avulsas conserv. ecossistemas**. v. 31, p. 1-23, 2014.

FARIAS, R. R. S.; CASTRO, A.A.J.F. Fitossociologia de trechos da vegetação do Complexo de Campo Maior, Campo Maior, PI, Brasil. **Acta Botânica Bras**. v. 18, p. 949-963, 2004.

FERREIRA, E. L. F.; MASCARENHAS, T. S.; OLIVEIRA, J. P. C.; CHAVES, M. H.; ARAÚJO, B. Q.; CAVALHEIRO, A. J. Phytochemical investigation and antioxidant activity of extracts of *Lecythis pisonis* Camb. **J. Med. Plants Res.**, v. 8, p. 353- 360, 2014.

FERREIRA, E. L. F.; CHAVES, M. H.; VIERA JÚNIOR, J. M.; OLIVEIRA, J. P. C.; MORAES, M. O.; COSTA-LOTUFO, L. V.; PESSOA, C.; COSTA, A. M.; MILITÃO, C. G. C. Chemical constituents of *Lecythis pisonis* and cytotoxic activity. **Rev. bras. farmacogn.**, Curitiba , v. 22, n. 5, p. 1140-1144, 2012.

FORZZA, R. C.; LEITMAN, P. M.; COSTA, A.; CARVALHO, A. A. J.; PEIXOTO, A. L.; TELES, B. M. W.; BICUDO, C.; ZAPPI, D.; COSTA, D. P.; LLERAS, E.; MARTINELLI, G.; LIMA, H. C.; PADRO, J.; STEHMANN, J. R.; BAUMGRATZ, J. F. A.; PIRANI, J. R.; SYLVESTRE, L. S.; COSTA, L. M.; LOHMANN, L. G.; PAGANUCCI, L.; SILVEIRA, M.; NADRUZ, M.; MAMEDE, M. C. H.; BASTOS, M. N. C.; MORIM, M. P.; BARBOSA, M. R.; MENEZES, M.; HOPKINS, M.; SECCO, R.; CAVALCANTI, T.; SOUZA, V. C. Instituto de Pesquisas Jardim Botânico do Rio de Janeiro. **Catálogo de plantas e fungos do Brasil**, Rio de Janeiro., v, 2, p. 1630, 2010.

GANZERA, M.; ELLMERER-MÜLLER, E.P.; STUPPNER, H. Cycloartane triterpenes from *Combretum quadrangulare*. **Phytochemistry**, , v. 49, p. 835-838. 1997.

GOSSAN, D. P. A.; MAGID, A. A.; YAO-KOUASSI, P. A.; JOSSE, J.; GANGLOFF, S. C.; MORJANI, H.; VOUTQUENNE-NAZABADIOKO, L. Antibacterial and cytotoxic triterpenoids from the roots of *Combretum racemosum*. **Fitoterapia**. v. 110, p. 89-95, 2016.

GRANATO, D.; SHAHIDI, F.; WROLSTAD, R.; KILMARTIN, P.; MELTON, L. D.; HIDALGO, F. J.; MIYASHITA, K.; VAN CAMP, J.; ALASALVAR, C.; ISMAIL, A. B.; ELMORE, S.; BIRCH, G. G.; CHARALAMPOPOULOS, D.; ASTLEY, S. B.; PEGG, R.; ZHOU, P.; FINGLAS, P. Antioxidant activity, total phenolics and flavonoids contents: Should we ban in vitro screening methods? **Food Chem**. v. 264, p. 471-475, 2018.

IBRAHIM, M. B.; SOWEMIMO, A. A.; VENABLES, L.; KOORBANALLY, N. A.; AWOLOLA, G. V.; SOFIDIYA, M. O.; ODUKOYA, O. A.; KOEKEMOER, T.; VAN DER VENTER, M. Biological evaluation of phytoconstituents from *Markhamia tomerntosa* ethanolic leaf extract. **South Afr. Jour. of Botany**. v. 115, p. 31–36, 2018

JABEEN, E.; JANJUA, N. K.; AHMED, S.; MURTAZA, I.; ALI, T.; HAMEED, S. Radical scavenging propensity of  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{3+}$  complexes of flavonoids and *in-vivo* radical scavenging by  $\text{Fe}^{3+}$ -primuletin. **Spectrochimica Acta Part A: Mol. and Biom. Spec**, v. 171, p. 432-438, 2017.

JOSSANG, A.; POUSET, J. L.; BODO, B. Combreglutinin, a hydrolyzable tanin from *Combretum glutinosum*. **J. Nat. Prod.**, v. 57, p. 732–737, 1994.

KATERERE, D. R.; GRAY, A. I.; NASH, R. J.; WAIGH, R. D. Phytochemical and antimicrobial investigations of stilbenoids and flavonoids isolated from three species of Combretaceae. **Fitoterapia**. v. 83, p. 932-940, 2012.

KATERERE, D. R.; GRAY, A. I.; NASK, R. J.; WAICH, R. D. Antimicrobial activity of pentacyclic triterpenes isolated from African Combretaceae. **Phytochemistry**, v. 63, p.81-88, 2003.

KOIRALA, P.; SEONG, S. H.; JUNG, H. A.; JAE Sue Choi, J. S.; Comparative molecular docking studies of lupeol and lupenone isolated from *Pueraria lobata* that inhibits BACE1: Probable remedies for Alzheimer's disease. **Asian Pac. J. Trop. Biomed.**, v. 10, p. 1117–1122, 2017.

KOMAPE, N. P. M.; ADEROGBA, M.; BAGLA, V. P.; MASOKO, P.; ELLOF, J. N. Anti-bacterial and anti-oxidant activities of leaf extracts of *Combretum vendae* (Combretaceae) and the isolation of an anti-bacterial compound. **Afr. J. Tradit. Complement. Altern. Med**, v. 5, p. 73-77, 2014.

LACROIX, D.; PRADO, S.; DEVILLE, A.; KRIEF, S.; DUMONTET, V.; KASENENE, J.; MOURAY, E.; BORIES, C.; BODO, B. Hidroperoxy-cycloartane triterpenoids from the leaves of *Markhamia lutea*, a plant ingested by wild chimpanzees. **Phytochemistry**, v. 70, p. 1239-1245, 2009.

LETCHER, R. M.; NHAMO, L. R. M. Chemical constituents of the Combretaceae. Part I. Substitued phenanthrenes and 9,6-dehyderophenanthenes from the heartwood of *Combretum apiculatum*. **Jorn. of Chem. Society**, p. 3071-3076, 1971.

LIMA, G. R. M; SALES, I. R. P.; CALDAS FILHO, M. R. D.; JESUS, N. Z. T.; FALCÃO, H. S.; BARBOSA FILHO, J. M.; CABRAL, A. G. S.; SOUTO, A. L.; TAVARES, J. F.; BATISTA, L. M.; Bioactivities of the Genus *Combretum* (Combretaceae): A Review. **Molecules**, v. 17, p. 9142-9206, 2012.

LOIOLA, M. I.; ROCHA, E. A.; BARACHO, G. S.; AGRA, M. F.; Flora da Paraíba, Brasil: Combretaceae. **Acta bot. Bras**, v. 2, p. 330-342, 2009.

LUZ, S. M.; SOUSA FILHO, A. F. S.; GUILOHN, G. M. S. P.; VILHENA, K. S. S.; Atividade alelopática de substâncias químicas isoladas da *Acacia mangium* e suas variações em função do pH. **Planta daninha**. v. 28, p. 479-487, 2010.

MABRY, T. J.; MARKHAM, K. R.; THOMAS, M. B. **The systematic identification of flavonoids**. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 1970, 354p.

MAPFUNDE, S.; SITHOLE, S.; MUKANGANYAMA, S. In vitro toxicity determination of antifungal constituents from *Combretum zeyheri*. **BMC Complementary Altern. Med.**, v. 16, p. 1-11, 2016.

MOTA, W. M.; BARROS, M. L.; CUNHA, P. E. L.; SANTANA, M. V. A.; STEVAM, C. S.; LEOPOLDO, P. T. G.; FERNANDES, R. P. M. Evaluation of acetylcholinesterase inhibition by extracts from medicinal plants. **Rer. Bras. Plant. Med.**, v. 14, n. 4, p. 624-628, 2012.

NAKAMURA, C. V.; SANTOS, A. O.; VENDRAMETO, M. C.; LUIZE, P. S.; DIAS FILHO, B. P.; CORTEZ, D. A. G.; UEDA-NAKAMURA, T. Atividade antileishmaniana do extrato didroalcoólico e de frações obtidas de folhas de *Piper regnellii* (Miq.) C. DC. var. *pallescens* (C. DC.) Yunck. **Ver. Bras. De Farm.** p. 61-66, 2006.

NASCIMENTO, J. M.; CONCEIÇÃO, G. M. Plants medicinais e indicações terapêuticas da comunidade quilombola Olho d'água do Raposo, Caxias, Maranhão, Brasil. **BioFar**. v. 6, n. 2, p. 138-151, 2011.

NESI-REISA, V.; NAVASCONIB, T. R.; LERA-NOSONEB, D. S. S. L.; OLIVEIRA, E. L.; BARBOSA, P. M.; CAETANO, W.; SILVEIRA, T.G.V.; ARISTIDES, S. M. A.; HIOKA, N.; LONARDONI, M.V.C. Phototoxic effect of aluminium-chlorine and aluminium-hydroxide phthalocyanines on *Leishmania (l.) amazonensis*. **Phot. Therapy**. p. 239-245, 2018

OJEWOLE, J. A. O.; Analgesic and antiinflammatory effects of mollic acid glucoside, a 1 $\alpha$ -hidroxicycloartenoid saponin extractive from *Combretum molle* R. Br ex G. Don (Combretaceae) Leaf. **Phytother. Res.** v. 22, p. 30-35, 2008.

OLIVEIRA, A. C.; VALENTIM, I. B.; GOULART, M. O. F.; SILVA, C. A.; BECHARA, E. J. H.; TREVISAN, M. T. S. Fontes vegetais naturais de antioxidantes. **Quim. Nova**. v. 32, n. 3, p. 689-702, 2009.

OROIAN, M.; ESCRICH, I.; Antioxidants: Characterization, natural sources, extraction and analysis. **Food Res. Int.**, v. 74, p. 10-36, 2015.

OSBORNE, R.; PEGEL, K.H. Methyl jessate1 $\alpha$ , 1 $\alpha$ -oxide, a further novel triterpenoid ester from *Combretum elaeagnoides*. **South Afr J. of Chem**, v. 38, p. 83-86, 1985.

OSBORNE, R.; PEGEL, K.H. Jessic acid and related acid triterpenoids from *Combretum elaeagnoides*. **Phytochemistry**, v. 23, p. 635- 637. 1984.

OSORIO, E.; ARANGO, G. J.; JIMÉNEZ, N.; ALZATE, F.; RUIZ, G.; GUTIERREZ, D.; PACO, M. A.; GIMÉNEZ, A.; ROBLEDO, S. Antiprotozoal and cytotoxic activities in vitro of Colombian Annonaceae. **J. Ethnopharmacology**. p. 630-635, 2007.

PATOČKA, J. Biologically active pentacyclic triterpenes and their current medicine Signification; **J. of Appl Biom**, v. 1 p. 7-12, 2003.

PEGEL, K.H.; ROGERS, C.B. The characterisation of mollic acid 3 $\beta$ -D-xyloside and its genuine aglycone mollic acid, two novel 1 $\alpha$ -hydroxycycloartenoids from *Combretum molle*. **J. Chem. Soc., Perkin Trans.**, v. 1, p. 1711-1715, 1985.

PEIXOTO SOBRINHO, T. J. S.; GOMES, T. L. B.; CARDOSO, K. C. M.; ALBUQUERQUE, U. P.; AMORIM, E. L. C. Teor de flavonoides totais em produtos contendo pata-de-vaca (*Bauhinia* L.) comercializados em farmácias de Recife/PE. **Rev. Bras. Plant. Med.**, v. 14, n. 4, p. 586-591, 2012.

PRYTZYK, E.; DANTAS, A. P.; SALOMÃO, K.; PEREIRA, A. S.; BANKOVA, V. S.; DE CASTRO, S. L.; AQUINO NETO, F. R.; Flavonoids and trypanocidal activity of Bulgarian propolis. **J. Ethnopharmacology.**, v. 88, p. 189-193, 2003.

RHEE, I. K.; MEENT, M. V.; INGKANINAN, K.; VERPOORTE, R. Screening for acetylcholinesterase inhibitors from Amaryllidaceae using silica gel thin-layer chromatography in combination with bioactivity staining . **J. Chromatogr. A.**, v. 915, p. 217-223, 2001.

ROCHA, S. A. S.; PESSOA, O. D.; VIANA, F. A.; SILVEIRA, E. R.; *Resumos da 30<sup>a</sup>* Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, Poços de Caldas, Brasil, 2002.

ROGERS, C. B; COOMBES, P. H.; Mollic acid and its glycosides in the trichome secretions of *Combretum petrophilum*. **Biochem. Syst. Ecol.** v. 29, p. 329-330, 2001.

ROGERS, C. B; COOMBES, P. H.; Acidic triterpene glycosides in trichome secretions differentiate subspecies of *Combretum collinum* in South Africa. **Biochem. Syst. Ecol.** v. 27, p. 321-323, 1999.

ROGERS, C.B. Cycloartenoid dienone acids and lactones from *Combretum erythrophyllum*. **Phytochemistry**, v. 49, p. 2069-2076, 1998.

ROGERS, C.B. Isolation of the 1 $\alpha$  -hydroxycycloartenoid, mollic acid  $\alpha$  -l-arabinoside from *Combretum edwardsii* leaves. **Phytochemistry**, v. 28, p. 279-280, 1989.

ROVER, M. R.; BROWN, R. C. Quantification of total phenols in bio-oil using the Folin-Ciocalteu method. **J. Anal. Appl. Pyrolysis.** v. 104, p. 366-371, 2013.

ROY, S.; GORAI, D.; ACHARYA, R.; ROY, R.; *Combretum* (Combretaceae): Biological activity and phytochemistry. **Indo Am. J. Pharm. Res.**, v. 4, p. 5266-5299, 2014.

RUFINO, M. S. M.; ALVES, R. E.; BRITO, E. S.; MORAIS, S. M.; SAMPAIO, C. G.; PÉREZ-JIMÉNES, J.; SAURA-CALIXTO, F. D. Metodologia Científica: Determinação da Atividade Antioxidante Total em Frutas pela Captura do Radical Livre DPPH. **Comunicado Técnico 127**. Fortaleza, CE. Julho, 2007

RUNGSIMAKAN, S.; ROWAN, M. G.; Terpenoids, flavonoids and caffeic acid derivatives from *Salvia viridis* L. cvar. Blue Jeans. **Phytochemistry**, v. 108, p. 177–188, 2014.

SILVA, K. D. R. R.; SIRASA, M. S. F.; Antioxidant properties of selected fruit cultivars grown in Sri Lanka. **Food Chem.**, 238, p. 203-208, 2018.

SOARES NETO, R. L.; CORDEIRO, L. S.; LOIOLA, M. I. B. Flora do Ceará, Brasil: Combretaceae. **Rodriguésia**, v. 65, n. 3, p. 685-700, 2014.

SOARES, D. C.; PEREIRA, C. G.; MEIRELES, M. A.; SARAIVA, E. M. Leishmanicidal activity of a supercritical fluid fraction obtained from *Tabernaemontana catharinensis*. **Parasitol Int**, v. 56, n. 2, p. 135-9, 2007

SOBRINHO, T. J. S. P.; GOMES, T. L. B.; CARDOSO, K. C. M.; AMORIM, E. L. C. Otimização de metodologia analítica para o doseamento de flavonoides de *Bauhinia cheilantha* (Bongard) Steudel. **Quim. Nova**, v. 33, p. 288-291, 2010.

SORE, H. HILOU, A. SOMBLE. P. A. E. D.; COMPAORE, M.; MEDA, R.; MILLOGO, J.; NACOULMA, O. G. Phytochemistry and biological activities of extracts from two Combretaceae found in Burkina Faso: *Anogeissus leiocarpus* (DC) Guill. And Perr. and *Combretum glutinosum* Perr. Ex DC. **Univ. Jour, of Envir. Res. and Tech.** v. 5, p. 383-392, 2012

SOUSA, C. M. M.; SILVA, H. R.; VIEIRA JÚNIOR, G. M.; AYRES, M. C. C.; COSTA, C. L. S.; ARAÚJO, D. S.; CAVALCANTE, L. C. D.; BARROS, E. D. S.; ARAÚJO, P. B. M.; BRANDÃO, M. S.; CHAVES, M. H. Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. **Quim. Nova**, v. 30, p. 351-355, 2007.

SOUSA SÁ, A. P.; GUIMARÃES, A. L.; OLIVEIRA, A. P.; SIQUEIRA FILHO, J. A.; FONTANA A. P.; DAMASCENO, P. K. F.; BRANCO, C. R. C.; BRANCO, A.; ALMEIDA, J. R. G. S. Fenóis totais, flavonoides totais e atividade antioxidante de *Selaginella convoluta* (Arn.) Spring (Selaginellaceae). **Rev. Ciênc. Farm Básica Apli**, v. 4, p. 561-566, 2012.

TAN, F.X.; SHI, S.H.; ZHONG, Y.; GONG, X.; WANG, Y.G. Phylogenetic relationships of Combretoideae (Combretaceae) inferred from plastid, nuclear gene and spacer sequences. **Jour. of Plan. Res.** v. 115 p. 475-481, 2002.

THANG, T. D.; KUO, P. C.; HUANG, G. J.; HUNG, N. H.; HUANG, B. S.; YANG, M. L.; LUONG, N. X.; WU, T. S.; Cheminal constituents from the leaves of *Annona reticulata* and their inhibitory effects on NO production. **Molecules**, v. 18, p. 4477-4486, 2013.

TOUME, K.; NAKAZAWA, T.; OHTSUKI, T.; ARAI, M.A.; KOYANO, T.; KOWITHAYAKORN, T.; ISHIBASHI, M. Cycloartane triterpenes isolated from *Combretum quadrangulare* in a Screening Program for Death-Receptor expression enhancing activity. **J. Nat. Prod.**, v. 74, p. 249-255, 2011.

TREML, J.; SMEJKAL, K.; Flavonoids as potent scavengers of hydroxyl radicals. **Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.**, v. 15, p. 720-738, 2016.

UJOWUNDU, F. N.; UKOHA, A. L.; OJIAKO, A. O.; NWAOGUIKPE, R. N. Gas chromatographic characterization of the flavonoids, alkaloids, saponins, and tannins isolated from *C. dolichopentalum* leaves. **Jorn. of Chem. Pharm. Res**, p. 1094-1103, 2015.

VALADARES, D. G.; DUARTE, M. C.; OLIVEIRA, J. S.; CHÁVEZ-FUMAFALLI, M. A.; MARTINS, V. T.; COSTA, L. E.; LEITE, J. P.; SANTORO, M. M.; RÉGIS, W. C.; TAVARES, C. A.; COELHO, E. A. Leishmanicidal activity of the *Agaricus blazei* Murill in diferente *Leishmania* species. **Parasitol Int**, v. 60, n. 4, p. 357-63, 2011.

WAGNE, H.; BLADT, S. **Plant Drug Analysis - A Thin Layer Chromatography Atlas**. 2.ed. Berlim: Springer, 1996. 384 p.

WANG, L.Q.; WU, M.M.; LIU, J.P.; LI, Y.; HUA, Y.; WANG, Y.Y.; Li, X.Y.; CHEN, Y.G.; Wang, J.H. Five new diarylpropan-1-ols from *Combretum yunnanense*. **Planta Med.**, v. 77, p. 1841-1844, 2011.

WHO, Control of the leishmaniasis. world health organization Geneva, Tech. Rep. Ser. 949 p. 22–26, 2010.

WONG, Y.H.; ABDUL KADIR, H. Induction of mitochondria-mediated apoptosis in Ca Ski human cervical cancer cells triggered by mollic acid arabinoside isolated from *Leea indica*. **Evid. Based Complement. Alternat. Med.** p. 1–11, 2012.

WONG, Y.H.; ABDUL KADIR, H; LING, S.K. Bioassay-guided isolation of cytotoxic cycloartanriterpenoid glycosides from the traditionally used medicinal plant *Leea indica*. **Evid. Based Complement. Alternat. Med.** p. 1–11, 2012.