

UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ORGÂNICA E INORGÂNICA

**CONTRIBUIÇÃO AO ESTUDO QUÍMICO DE PLANTAS DO
NORDESTE BRASILEIRO**

***Protium heptaphyllum* March.
e
Protium tenuifolium Engl.**

Paulo Nogueira Bandeira

TESE DE DOUTORADO

Fortaleza-Ceará

2002

Esta Tese foi aprovada como parte dos requisitos necessários a obtenção do Grau de Doutor em Química Orgânica, outorgado pela Universidade Federal do Ceará, em cuja Biblioteca de Ciências e Tecnologia/UFC encontra-se à disposição dos interessados.

Paulo Nogueira Bandeira

DISSERTAÇÃO APROVADA EM: 03/10/2002

EXAMINADORES:

Profa. Dra. Telma Leda Gomes de Lemos (orientadora)
Universidade Federal do Ceará - UFC

Prof. Dr. Francisco José Queiroz Monte
Universidade Federal do Ceará - UFC

Profa. Dra. Mary Anne Sousa Lima
Universidade Federal do Ceará - UFC

Profa. Dra. Leda Mathias
Universidade Estadual do Norte Fluminense

Prof. Dr. Carlos Alberto Montanari
Universidade Federal de Minas Gerais

UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ORGÂNICA E INORGÂNICA

CONTRIBUIÇÃO AO ESTUDO QUÍMICO DE PLANTAS DO NORDESTE BRASILEIRO

Protium heptaphyllum March.
e
Protium tenuifolium Engl.

Paulo Nogueira Bandeira

Tese apresentada à coordenação de
Pós- Graduação em Química Orgânica
como requisito parcial para obtenção
do título de Doutor

Orientadora: Profª. Dra. **Telma Leda Gomes de Lemos**

Fortaleza-Ceará
2002

À Deus:

Pela vida e por este momento

Aos meus pais:

José D. Bandeira e Maria C. Bandeira
Por tudo que fizeram por mim

À minha esposa:

Melânia V. Portela pelo amor e paciência

Aos meus filhos:

Alan P. Bandeira e Daniel P. Bandeira
Pelo amor e carinho

AGRADECIMENTOS

* À Profa. Dra. Telma Leda Gomes de Lemos pela atenção, dedicação, competência, qualidades humanas e pela confiança em mim depositada ao aceitar-me como orientando na realização deste trabalho.

* À profa. Dra. Otilia Deusdênia Loiola Pessoa e ao Prof. Dr. Manuel Andrade Neto por cederem partes dos seus tempos na realização da coleta das plantas para estudo.

* À todo corpo docente do curso de Pós-Graduação em Química Orgânica, que de forma direta ou indireta fizeram parte deste trabalho, em especial aos profs: Edilberto Rocha Silveira, Yvone Brígido Memória Pouliquen e Francisco José Queiroz Monte pela cooperação e amizade.

* Ao Prof. Dr. Raimundo Braz Filho (UENF), pela valiosa colaboração na análise e elucidação estrutural das substâncias isoladas.

* À profa. Dra. Nádia Aciole Pinto Nogueira da Faculdade de Farmácia da UFC, pela orientação na realização dos testes biológicos.

* À Profa. Dra. Glaucia Socorro de Barros Viana e o bolsista Gislei Frota Aragão do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da UFC pela realização dos testes farmacológicos.

* À bolsista Maria Usileyd Dayana de Sousa Lins pela grande e valiosa colaboração no estudo de isolamento das substâncias e pela realização dos testes biológicos.

* Ao aluno de Pós-Graduação Daniel Esdras de Andrade Uchoa, pelo grande empenho na obtenção dos espectros

* Aos Colegas do curso, em especial Sônia, Galberto, Jane Eire, Rose Jane, Davina e Mazé pela amizade e alegre convivência no período do curso.

* Ao Prof. Ms. Gervásio Dantas Bandeira pelo incentivo e apoio à minha vida de estudante e profissional.

* Ao meu irmão Moacir Dantas Bandeira pela valiosa colaboração na confecção da tese e da apresentação.

* À Universidade Estadual Vale do Acaraú, pela liberação das minhas atividades acadêmicas no decorrer do curso.

* À todos os funcionários do curso, com os quais tive ótimo convívio e pude contar com suas colaborações.

* À FUNCAP, CNPq e CAPES, pela concessão dos recursos financeiros.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS -----	xi
LISTA DE TABELAS -----	xvi
LISTA DE QUADROS -----	xviii
LISTA DE FLUXOGRAMAS -----	xviii
LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS -----	xix
RESUMO -----	xxiii
ABSTRACT -----	xxv
CAPÍTULO 1 • INTRODUÇÃO -----	1
CAPÍTULO 2 • CONSIDERAÇÕES BOTÂNICAS -----	6
2.1. Considerações botânicas sobre a família Burseraceae -----	6
2.2. Considerações botânicas sobre a espécie <i>Protium heptaphyllum</i> -----	7
2.3. Considerações botânicas sobre a espécie <i>Protium tenuifolium</i> -----	7
2.4. Uso na medicina popular e aspectos farmacológicos da espécie <i>Protium heptaphyllum</i> e <i>Protium tenuifolium</i> -----	8
CAPÍTULO 3 • PESQUISA BIBLIOGRÁFICA -----	11
3.1. Pesquisa bibliográfica dos constituintes químicos do gênero <i>Protium</i> com registro na literatura -----	11
3.2. Pesquisa bibliográfica dos constituintes químicos voláteis do gênero <i>Protium</i> com registro na literatura-----	17
3.3. Pesquisa bibliográfica sobre atividade farmacológica de α - amirina e β -amirina com registro na literatura-----	24
CAPÍTULO 4 • DETERMINAÇÃO ESTRUTURAL-----	26
4.1. Determinação estrutural dos constituintes químicos fixos isolados de <i>Protium heptaphyllum</i> -----	26
4.1.1. Determinação estrutural de PHPR-1 (25)-----	26
4.1.2. Determinação estrutural de PHPR-2a (5) e PHPR-2b (6)-----	36

4.1.3. Determinação estrutural de PHPR-3 (7) -----	45
4.1.4. Determinação estrutural de PHPL-1 (17)-----	52
4.1.5. Determinação estrutural de PHPFM-1 (26)-----	58
4.1.6. Determinação estrutural de PHPFV-1 (27)-----	68
4.1.7. Determinação estrutural de PHPF-1 (28)-----	77
4.2. Determinação estrutural dos constituintes químicos fixos isolados de <i>Protium tenuifolium</i> -----	82
4.2.1. Determinação estrutural de PTF-1 (29)-----	82
4.2.2. Determinação estrutural de PTF-2 (30)-----	89
4.2.3. Determinação estrutural de PTC-1 (31)-----	97
4.3. Determinação estrutural dos derivados reacionais preparados a partir da mistura binária de α -amirina[PHPR-2a (5) e β -amirina PHPR-2b (6)]-----	102
4.3.1. Determinação estrutural de FPHPR-2a (32) e FPHPR-2b (33)-----	103
4.3.2. Determinação estrutural de AMPHPR-2a (34) e AMPHPR-2b (35)-----	106
4.3.3. Determinação estrutural de APHPR-2a (36) e APHPR-2b (37)-----	109
4.3.4. Determinação estrutural de BPHPR-2a (38) e BPHPR-2b (39)-----	112
4.3.5. Determinação estrutural de CPHPR-2a (40) e CPHPR-2b (41)-----	115
CAPÍTULO 5 • ESTUDO DOS ÓLEOS ESSENCIAIS -----	120
5.1. Determinação da composição química dos constituintes voláteis de <i>Protium heptaphyllum</i> e <i>Protium tenuifolium</i> -----	120
5.1.1. Constituintes químicos voláteis dos óleos essenciais da resina, frutos verdes, frutos maduros, folhas e cascas da espécie <i>Protium heptaphyllum</i> -----	121
5.1.2. Constituintes químicos voláteis do óleo essencial dos frutos de <i>Protium tenuifolium</i> -----	126
CAPÍTULO 6 • AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE FARMACOLÓGICA DOS ÓLEOS ESSENCIAIS E DOS CONSTITUINTES ISOLADOS -----	133

6.1. Atividade antimicrobiana dos óleos essenciais, dos extratos e substâncias isoladas de <i>Protium heptaphyllum</i> e óleo essencial e extratos de <i>Protium tenuifolium</i> -----	133
6.1.1. Considerações gerais -----	133
6.2. Atividade antimicrobiana frente aos microorganismos: <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Salmonella cholerae-suis</i> e a levedura <i>Candida albicans</i> -----	134
6.3. Teste de inibição da atividade de acetilcolinesterase (Ache) -----	138
6.4. Avaliação da atividade antiinflamatória da mistura [α -amirina PHPR-2a (5) e β - amirina PHPR-2b (6)] -----	139
6.4.1. Contorção induzida por ácido acético -----	140
6.4.2. Edema de pata induzido por carragenina -----	141
CAPÍTULO 7 • DETERMINAÇÃO QUANTITATIVA -----	143
7.1. Quantificação da mistura binária de [PHPR-2a (5) e PHPR-2b (6)] na resina de <i>Protium heptaphyllum</i> , por CLAE-----	143
7.1.1. Análise quantitativa -----	143
CAPÍTULO 8 • PARTE EXPERIMENTAL -----	147
8.1. Material botânico: Coleta e Identificação -----	147
8.2. Métodos cromatográficos-----	147
8.3. Métodos físicos -----	148
8.3.1. Espectroscopia na região do infravermelho. (IV) -----	148
8.3.2. Espectroscopia de ressonância magnética nuclear de hidrogênio (^1H) e de carbono-13 (^{13}C) -----	148
8.3.3. Espectrometria de massas (EM) -----	149
8.3.4. Rotação ótica – específica -----	149
8.3.5. Ponto de fusão (p.f) -----	150
8.4. Constituintes voláteis de <i>Protium heptaphyllum</i> e <i>Protium Tenuifolium</i> ---	150
8.4.1. Obtenção dos óleos essenciais -----	150
8.5. Isolamento dos constituintes químicos fixos de <i>Protium heptaphyllum</i> ----	153

8.5.1. Obtenção do hidrolato da resina de <i>Protium heptaphyllum</i> e obtenção do composto PHPR-1 -----	153
8.5.2. Tratamento cromatográfico da resina de <i>Protium heptaphyllum</i> -----	155
8.5.3. Tratamento cromatográfico do eluato RFC e obtenção da mistura binária [PHPR-2a e PHPR-2b] e PHPR-3 -----	155
8.5.4. Obtenção do extrato etanólico do lenho de <i>Protium heptaphyllum</i> --	158
8.5.5. Tratamento cromatográfico de EEL e obtenção do composto PHPL-1-----	158
8.5.6. Obtenção do hidrolato do fruto maduro de <i>Protium heptaphyllum</i> --	160
8.5.7. Tratamento cromatográfico da fração AcOEt e obtenção do do composto PHPFM-1 -----	160
8.5.8. Obtenção do hidrolato do fruto verde de <i>Protium heptaphyllum</i> -----	163
8.5.9. Tratamento cromatográfico da fração acetato e obtenção de PHPFV-1 -----	163
8.5.10. Obtenção do extrato etanólico das folhas de <i>Protium heptaphyllum</i>	165
8.5.11. Tratamento cromatográfico de EEF e obtenção do composto PHPF-1 -----	165
8.6. Isolamento dos constituintes fixos de <i>Protium tenuifolium</i> -----	168
8.6.1. Obtenção do extrato etanólico das folhas de <i>Protium tenuifolium</i> ---	168
8.6.2. Tratamento cromatográfico de EEFP-----	168
8.6.3. Tratamento cromatográfico de EEFMPT e obtenção do composto PTF-1-----	169
8.6.4. Tratamento cromatográfico de EEFAPT e obtenção do composto PTF-2-----	169
8.6.5. Obtenção do extrato etanólico das cascas de <i>Protium tenuifolium</i> ---	171
8.6.6. Tratamento cromatográfico de EECPT e obtenção do composto PTC-1-----	171
8.7. Obtenção de derivados -----	173
8.7.1. Obtenção do formiato de α,β -amirina [FPHPR-2a (32) e FPHPR-2b (33)]-----	173
8.7.2. Obtenção de α,β -amirinona [AMPHPR-2a (34) e AMPHPR-2b (35)]-----	173

8.7.3. Obtenção de acetato de α,β -amirina [AHP-2a (36) e AHP-2b (37)]	174
8.7.4. Obtenção de benzoato de α,β -amirina [BHP-2a (38) e BHP-2b (39)]	174
8.7.5. Obtenção de cinamoila de α,β -amirina [CHP-2a (40) e CHP-2b (41)]	174
8.7.5.1. Preparação do cloreto de cinamoila	174
8.7.5.2. Obtenção de [CHP-2a (40) e CHP-2b (41)]	175
8.8. Avaliação da atividade farmacológica	176
8.8.1. Avaliação da atividade antimicrobiana	176
8.8.2. Medida de inibição da atividade de acetilcolinesterase (AChE)	177
8.8.3. Avaliação da atividade antiinflamatória	177
8.9. Análise quantitativa da mistura binária de [α -Amirina e β - Amirina] na resina de <i>Protium heptaphyllum</i>	178
8.9.1. Obtenção da curva padrão de calibração (método do padrão externo)	178
CAPÍTULO 9 • CONCLUSÕES	179
CAPÍTULO 10 • CONSTANTES FÍSICAS, DADOS ESPECTROSCÓPICOS E ESPECTROMÉTRICOS	180
10.1. P-1 (25) : p-menth-3-eno-1,2,8-triol	180
10.2. [P-2a (5) e P-2b (6)] : 3 β -hidroxiolean-12-eno (α -amirina) e 3 β - hidroxiolean-12-eno(β -amirina)	181
10.3. P-3 (7) : 3 β ,16 β -diidroxiolean-12-eno (breina)	182
10.4. P-1 (17) : 6-metoxi-7-hidroxycumarina (escopoletina)	183
10.5. PFM-1 (26) : Quercetina-3-O-raminosil	184
10.6. PPFV-1 (27) : 3,3',4',5,7-pentahidroxiflavonol [(-)- epicatequina]	185
10.7. PPF-1 (28) : 3,5,7,3',4'-OH-flavonol (quercetina)	186
10.8. PTF-1 (29) : 1-O-etilglicose	187
10.9. PTF – 2 (30) : Campferol-3-O-raminosil	188
10.10. PTC-1 (31) : glicosídeo do β -sitosterol	189

10.11. Derivados [FPHPR-2a (32) e FPHPR-2b (33)]: formiato de α -amirina e formiato de β -amirina -----	190
10.12. Derivados [AMPHPR-2a (34) e AMPHPR-2b (35)]: 12-ursen-3-ona (α -amirinona) e 12-oleanen-3-ona (β -amirinona)-----	191
10.13. Derivados [APHPR-2a (36) e APHPR-2b (37)]: acetato de α -amirina e acetato de β -amirina-----	192
10.14. Derivados [BPHPR-2a (38) e BPHPR-2b (39)]: benzoato de α -amirina e benzoato de β -amirina-----	193
10.15. Derivados [CPHPR-2a (40) e CPHPR-2b (41)]: cinamato de α -amirina e cinamato de β -amirina-----	194
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS -----	195

LISTA DE FIGURAS

Fig. 01 - Fotografia da espécie <i>P. heptaphyllum</i> March	09
Fig. 02 - <i>P. heptaphyllum</i> March, fotografia ilustrando folhas e frutos	09
Fig. 03 - <i>P. tenuifolium</i> Engl. Fotografia ilustrando folhas e frutos	10
Fig. 04 - <i>P. heptaphyllum</i> , fotografia ilustrando a obtenção e coleta da resina	10
Fig. 05 - Espectro de absorção na região do infravermelho de PHPR-1	30
Fig. 06 - Espectro de RMN ^{13}C -BB de PHPR-1	30
Fig. 07 - Espectro de RMN ^{13}C – DEPT 135° de PHPR-1	31
Fig. 08 - Espectro de RMN ^1H de PHPR-1	31
Fig. 09 - Mapa de correlação homonuclear $^1\text{H} \times ^1\text{H}$ – COSY de PHPR-1	32
Fig. 10 - Mapa de correlação heteronuclear $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ a uma ligação (HMQC) de PHPR-1	32
Fig. 11 - Mapa de correlação heteronuclear $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ a mais uma ligação (HMBC) de PHPR-1	33
Fig. 12 - Espectro de RMN de correlação homonuclear por interações dipolares (NOE) de PHPR-1	33
Fig. 13 - Espectro de massas de PHPR-1	34
Fig. 14 - Espectro de absorção na região do infravermelho de PHPR-2a e PHPR-2b	41
Fig. 15 - Espectro de RMN ^{13}C -BB de PHPR-2a e PHPR-2b	41
Fig. 16 - Espectro de RMN ^{13}C – DEPT 135° de PHPR-2a e PHPR-2b	42
Fig. 17 - Espectro de RMN ^1H de PHPR-2a e PHPR-2b	42
Fig. 18 - Mapa de correlação homonuclear $^1\text{H} \times ^1\text{H}$ – COSY de PHPR-2a e PHPR-2b	43
Fig. 19 - Mapa de correlação heteronuclear $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ a uma ligação (HMQC) de PHPR-2a e PHPR-2b	43
Fig. 20 - Mapa de correlação heteronuclear $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ a mais de uma ligação (HMBC) de PHPR-2a e PHPR-2b	44
Fig. 21 - Espectro de RMN ^{13}C -BB de PHPR-3	49
Fig. 22 - Espectro de RMN ^1H de PHPR-3	49
Fig. 23 - Espectro de RMN ^{13}C – DEPT 135° de PHPR-3	50
Fig. 24 - Mapa de correlação homonuclear $^1\text{H} \times ^1\text{H}$ – COSY de PHPR-3	50

Fig. 25 - Mapa de correlação heteronuclear $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ a uma ligação (HMQC) de PHPR-3 -----	51
Fig. 26 - Mapa de correlação heteronuclear $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ a mais de uma ligação (HMBC) de PHPR-3 -----	51
Fig. 27 - Espectro de absorção na região do infravermelho de PHPL-1 -----	55
Fig. 28 - Espectro de RMN ^{13}C -BB de PHPL-1 -----	55
Fig. 29 - Espectro de RMN ^{13}C - DEPT 135° de PHPL-1 -----	56
Fig. 30 - Espectro de RMN ^1H de PHPL-1 -----	56
Fig. 31 - Mapa de correlação heteronuclear $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ a uma ligação (HMQC) de PHPL-1-----	57
Fig. 32 - Mapa de correlação heteronuclear $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ a mais de uma ligação (HMBC) de PHPL-1 -----	57
Fig. 33 - Espectro de absorção na região do infravermelho de PHPFM-1 -----	62
Fig. 34 - Espectro de RMN ^{13}C -BB de PHPFM-1 -----	62
Fig. 35 - Espectro de RMN ^{13}C - DEPT 135° de PHPFM-1 -----	63
Fig. 36 - Espectro de RMN ^1H de PHPFM-1 -----	63
Fig. 37 - Mapa de correlação homonuclear $^1\text{H} \times ^1\text{H}$ - COSY de PHPFM-1-----	64
Fig. 38 - Mapa de correlação heteronuclear $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ a uma ligação (HMQC) de PHPFM-1-----	64
Fig. 39 - Mapa de correlação heteronuclear $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ a uma ligação (HMQC) de PHPFM-1 -----	65
Fig. 40 - Mapa de correlação heteronuclear $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ a mais de uma ligação (HMBC) de PHPFM-1-----	65
Fig. 41 - Mapa de correlação heteronuclear $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ a mais de uma ligação (HMBC) de PHPFM-1 -----	66
Fig. 42 - Mapa de correlação heteronuclear $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ a mais de uma ligação (HMBC) de PHPFM-1-----	66
Fig. 43- Mapa de correlação heteronuclear $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ a mais de uma ligação (HMBC) de PHPFM-1-----	67
Fig. 44 - Espectro de absorção na região do infravermelho de PHPFV-1-----	72
Fig. 45 - Espectro de RMN ^{13}C -BB de PHPFV-1-----	72
Fig. 46 - Espectro de RMN ^{13}C - DEPT 135° de PHPFV-1-----	73

Fig. 47 - Espectro de RMN ^1H de PHPFV-1-----	73
Fig. 48 - Mapa de correlação homonuclear $^1\text{H} \times ^1\text{H}$ – COSY de PHPFV-1 -----	74
Fig. 49 - Mapa de correlação heteronuclear $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ a uma ligação (HMQC) de PHPFV-1-----	74
Fig. 50 - Mapa de correlação heteronuclear $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ a mais de uma ligação (HMBC) de PHPFV-1 -----	75
Fig. 51 - Mapa de correlação heteronuclear $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ a mais de uma ligação (HMBC) de PHPFV-1-----	75
Fig. 52 - Mapa de correlação heteronuclear $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ a mais de uma ligação (HMBC) de PHPFV-1-----	76
Fig. 53 - Mapa de correlação heteronuclear $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ a mais de uma ligação (HMBC) de PHPFV-1-----	76
Fig. 54 - Espectro de absorção na região do infravermelho de PHPF-1 -----	80
Fig. 55 - Espectro de RMN ^{13}C -BB de PHPF-1 -----	80
Fig. 56 - Espectro de RMN ^{13}C – DEPT 135° de PHPF-1 -----	81
Fig. 57 - Espectro de RMN ^1H de PHPF-1 -----	81
Fig. 58 - Espectro de absorção na região do infravermelho de PTF-1-----	85
Fig. 59 - Espectro de RMN ^{13}C -BB de PTF-1-----	85
Fig. 60 - Espectro de RMN ^{13}C – DEPT 135° de PTF-1-----	86
Fig. 61 - Espectro de RMN ^1H de PTF-1-----	86
Fig. 62 - Mapa de correlação homonuclear $^1\text{H} \times ^1\text{H}$ – COSY de PFF-1-----	87
Fig. 63 - Mapa de correlação heteronuclear $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ a uma ligação (HMQC) de PTF-1-----	87
Fig. 64 - Mapa de correlação heteronuclear $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ a mais de uma ligação (HMBC) de PTF-1-----	88
Fig. 65 - Espectro de absorção na região do infravermelho de PTF-2-----	93
Fig. 66 - Espectro de RMN ^{13}C -BB de PTF-2-----	93
Fig. 67 - Espectro de RMN ^{13}C – DEPT 135° de PTF-2-----	94
Fig. 68 - Espectro de RMN ^1H de PTF-2 -----	94
Fig. 69 - Mapa de correlação homonuclear $^1\text{H} \times ^1\text{H}$ – COSY de PFF-2-----	95
Fig. 70 - Mapa de correlação heteronuclear $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ a uma ligação (HMQC) de PTF-2-----	95

Fig. 71 - Mapa de correlação heteronuclear $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ a mais de uma ligação (HMBC) de PTF-2-----	96
Fig. 72 - Espectro de absorção na região do infravermelho de PTC-1 -----	100
Fig. 73 - Espectro de RMN ^{13}C -BB de PTC-1 -----	100
Fig. 74 - Espectro de RMN ^{13}C – DEPT 135° de PTC-1 -----	101
Fig. 75 - Espectro de RMN ^1H de PTC-1 -----	101
Fig. 76 - Esquema reacional de obtenção dos derivados-----	102
Fig. 77 - Espectro de absorção na região do infravermelho de FPHPR-2a e FPHPR-2b---	104
Fig. 78 - Espectro de RMN ^{13}C -BB de FPHPR-2a e FPHPR-2b-----	104
Fig. 79 - Espectro de RMN ^{13}C – DEPT 135° de FPHPR-2a e FPHPR-2b-----	105
Fig. 80 - Espectro de RMN ^1H de FPHPR-2a e FPHPR-2b-----	105
Fig. 81 - Espectro de absorção na região do infravermelho de AMPHPR-2 ^a e AMPHPR-2b-----	107
Fig. 82 - Espectro de RMN ^{13}C -BB de AMPHPR-2a e AMPHPR-2b-----	107
Fig. 83 - Espectro de RMN ^{13}C – DEPT 135° de AMPHPR-2a e AMPHPR-2b-----	108
Fig. 84 - Espectro de RMN ^1H de AMPHPR-2a e AMPHPR-2b -----	108
Fig. 85 - Espectro de absorção na região do infravermelho de APHPR-2a e APHPR-2b--	110
Fig. 86 - Espectro de RMN ^{13}C -BB de APHPR-2a e APHPR-2b-----	110
Fig. 87 - Espectro de RMN ^{13}C – DEPT 135° de APHPR-2a e APHPR-2b-----	111
Fig. 88 - Espectro de RMN ^1H de APHPR-2a e APHPR-2b-----	111
Fig. 89 - Espectro de absorção na região do infravermelho de BPHPR-2a e BPHPR-2b--	113
Fig. 90 - Espectro de RMN ^{13}C -BB de BPHPR-2a e BPHPR-2b-----	113
Fig. 91 - Espectro de RMN ^{13}C – DEPT 135° de BPHPR-2a e BPHPR-2b -----	114
Fig. 92 - Espectro de RMN ^1H de BPHPR-2a e BPHPR-2b -----	114
Fig. 93 - Espectro de absorção na região do infravermelho de CPHPR-2a e CPHPR-2b--	116
Fig. 94 - Espectro de RMN ^{13}C -BB de CPHPR-2a e CPHPR-2b -----	116
Fig. 95 - Espectro de RMN ^{13}C – DEPT 135° de CPHPR-2a e CPHPR-2b-----	117
Fig. 96 - Espectro de RMN ^1H de CPHPR-2a e CPHPR-2b -----	117
Fig. 97 - Cromatograma do óleo essencial da resina de <i>Protium heptaphyllum</i> -----	122
Fig. 98 - Cromatograma do óleo essencial dos frutos verdes de <i>Protium heptaphyllum</i> ----	122
Fig. 99 - Cromatograma do óleo essencial dos frutos maduros de <i>Protium heptaphyllum</i> ----	123
Fig. 100 - Cromatograma do óleo essencial das folhas de <i>Protium heptaphyllum</i> -----	123

Fig. 101 - Cromatograma do óleo essencial das cascas de <i>Protium heptaphyllum</i> -----	124
Fig. 102 - Cromatograma do óleo essencial dos frutos de <i>Protium tenuifolium</i> -----	124
Fig. 103 - Espectro de massas do α -turjeno -----	127
Fig. 104 - Espectro de massas do α -pineno -----	127
Fig. 105 - Espectro de massas do sabineno -----	127
Fig. 106 - Espectro de massas do β -pineno -----	127
Fig. 107 - Espectro de massas do β -mirceno -----	128
Fig. 108 - Espectro de massas do δ -3-careno -----	128
Fig. 109 - Espectro de massas do α -felandreno -----	128
Fig. 110 - Espectro de massas do β -felandreno -----	128
Fig. 111 - Espectro de massas do p-cimeno -----	129
Fig. 112 - Espectro de massas do limoneno -----	129
Fig. 113 - Espectro de massas do (Z)- β -ocimeno -----	129
Fig. 114 - Espectro de massas do (E)- β -ocimeno -----	129
Fig. 115 - Espectro de massas do terpinoleno -----	130
Fig. 116 - Espectro de massas do terpinen-4-ol -----	130
Fig. 117 - Espectro de massas α -copaeno -----	130
Fig. 118 - Espectro de massas do β -cariofileno -----	130
Fig. 119 - Espectro de massas do α -humuleno -----	131
Fig. 120 - Espectro de massas do β -selineno -----	131
Fig. 121 - Espectro de massas do biciclogermacreno -----	131
Fig. 122 - Espectro de massas do δ -cadineno -----	131
Fig. 123 - Espectro de massas do germacreno B -----	132
Fig. 124 - Espectro de massas do espatulenol -----	132
Fig. 125 - Espectro de massas do óxido de cariofileno -----	132
Fig. 126 - Espectro de massas do furanodieno -----	132
Fig. 127 - Curva de calibração da mistura binária [PHPR-2a e PHPR-2b] -----	145
Fig. 128 - Cromatograma da resina de <i>Protium heptaphyllum</i> -----	146
Fig. 129 - Cromatograma da resina de <i>Protium heptaphyllum</i> após adição da mistura de α -amirina e β -amirina -----	146

LISTA DE TABELAS

Tabela 01 - Constituintes fixos isolados de espécie do gênero <i>Protium</i> com registro na literatura -----	12
Tabela 02 - Constituintes químicos voláteis identificados no gênero <i>Protium</i> com registro na literatura -----	19
Tabela 03 - Atividade farmacológica de α -amirina e β -amirina com registro na Literatura -----	25
Tabela 04 - Dados de RMN ^1H e ^{13}C e correlações $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ [HMQC – $^1J_{\text{CH}}$ e HMBC – $^nJ_{\text{CH}}$ ($n = 2$ e $n = 3$)] de PHPR-1 em CD_3OD -----	29
Tabela 05 - Dados de RMN ^1H e ^{13}C de [PHPR-2a e PHPR-2b] em CDCl_3 -----	39
Tabela 06 - Correlações de $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ [HMBC – $^nJ_{\text{CH}}$ ($n = 2$ e $n = 3$) de PHPR-2 ^a E PHPR-2b em CDCl_3 -----	40
Tabela 07 - Dados de RMN ^1H e ^{13}C e correlações $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ [HMQC – $^1J_{\text{CH}}$ e HMBC – $^nJ_{\text{CH}}$ ($n = 2$ e $n = 3$)] de PHPR-3 em CDCl_3 -----	48
Tabela 08 - Dados de RMN ^1H e ^{13}C e correlações de $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ [HMQC – $^1J_{\text{CH}}$ e HMBC – $^nJ_{\text{CH}}$ ($n = 2$ e $n = 3$)] de PHPL-1 em DMSO -----	54
Tabela 09 - Dados de RMN ^1H e ^{13}C e correlações $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ [HMQC – $^1J_{\text{CH}}$ e HMBC – $^nJ_{\text{CH}}$ ($n = 2$ e $n = 3$)] de PHPFM-1 em CD_3OD -----	61
Tabela 10 - Dados de ^1H e ^{13}C e correlações $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ [HMQC – $^1J_{\text{CH}}$ e HMBC – $^nJ_{\text{CH}}$ ($n = 2$ e $n = 3$)] de PHPFV-1 em CD_3OD -----	71
Tabela 11 - Dados de RMN ^1H e ^{13}C e correlações $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ [HMQC – $^1J_{\text{CH}}$ e HMBC – $^nJ_{\text{CH}}$ ($n = 2$ e $n = 3$)] de PHPF-1 em $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$ -----	79
Tabela 12 - Dados de RMN ^1H e ^{13}C e correlações $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ [HMQC – $^1J_{\text{CH}}$ e HMBC – $^nJ_{\text{CH}}$ ($n = 2$ e $n = 3$)] de PTF-1 em CD_3OD -----	84
Tabela 13 - Dados de RMN ^1H e ^{13}C e correlações $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ [HMQC – $^1J_{\text{CH}}$ e HMBC – $^nJ_{\text{CH}}$ ($n = 2$ e $n = 3$)] de PTF-2 em CD_3OD -----	92
Tabela 14 - Dados de RMN ^{13}C de PTC-2 comparados com aqueles registrados na literatura para o β -sitosterol glicosilado -----	99
Tabela 15 - Dados de RMN ^{13}C dos derivados reacionais -----	118
Tabela 16 - Constituintes voláteis da espécie <i>Protium heptaphyllum</i> -----	125

Tabela 17 - Constituintes voláteis da espécie <i>Protium tenuifolium</i> -----	126
Tabela 18 - Atividade antimicrobiana do óleo essencial dos frutos de <i>Protium</i> <i>Tenuifolium</i> -----	135
Tabela 19 - Atividade antimicrobiana do óleo essencial da resina de <i>Protium</i> <i>heptaphyllum</i> -----	136
Tabela 20 - Atividade antimicrobiana do óleo essencial dos frutos maduros de <i>Protium heptaphyllum</i> -----	136
Tabela 21 - Atividade antimicrobiana dos óleos essenciais dos frutos de <i>Protium</i> <i>Tenuifolium</i> , resina e frutos maduros de <i>Protium heptaphyllum</i> -----	137
Tabela 22 - Teste de inibição de acetilcolinesterase (Ache) -----	139
Tabela 23 - Efeitos da mistura isomérica de α,β -amirina em contorções de Camundongos induzido por ácido acético -----	141
Tabela 24 - Efeito antidematogênico da mistura isométrica de α,β -amirina no edema de pata induzido por carragenina -----	142
Tabela 25 - Equação de regressão linear e coeficiente de correlação -----	144
Tabela 26 - Frações eluídas na CC do resíduo do hidrolato -----	153
Tabela 27 - Coluna filtrante da resina fresca -----	155
Tabela 28 - Frações eluídas na CC do eluato RFC -----	156
Tabela 29 - Coluna filtrante de EEL -----	158
Tabela 30 - Frações eluídas na CC da fração AcOEt do hidrolato do fruto maduro -----	160
Tabela 31 - Frações eluídas na CC das frações (81 – 100) -----	161
Tabela 32 - Frações eluídas na CC da fração AcOEt do hidrolato do fruto verde -----	163
Tabela 33 - Coluna filtrante do EEF -----	165
Tabela 34 - Frações eluídas na CC do eluato EEFA -----	166
Tabela 35 - Coluna filtrante do EEFPT -----	168
Tabela 36 - Frações eluídas na CC do eluato EEFMPT -----	169
Tabela 37 - Coluna filtrante do EECPT -----	171

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Estruturas dos constituintes químicos isolados de <i>Protium</i> <i>heptaphyllum</i> -----	3
Quadro 2 - Estruturas dos constituintes químicos isolados de <i>Protium</i> <i>tenuifolium</i> -----	4
Quadro 3 - Estruturas dos derivados preparados a partir da mistura binária de α -amirina e β -amirina -----	5
Quadro 4 - Estruturas dos constituintes fixos isolados de espécie do gênero <i>Protium</i> com registro na literatura -----	13
Quadro 5 - Possíveis caminhos de fragmentação para PHPR-1 no espectrômetro de massa -----	35

LISTA DE FLUXOGRAMAS

Fluxograma 1 - Método de extração do óleo essencial do material botânico de <i>Protium heptaphyllum</i> e <i>Protium tenuifolium</i> -----	152
Fluxograma 2 - Obtenção do composto PHPR-1 -----	154
Fluxograma 3 - Obtenção da mistura binária [PHPR-2a e PHPR-2b] e PHPR-3 -----	157
Fluxograma 4 - Obtenção do extrato etanólico do lenho e obtenção do composto PHPL-1 -----	159
Fluxograma 5 - Obtenção do composto PHPFM-1 -----	162
Fluxograma 6 - Obtenção do composto PHPFV-1 -----	164
Fluxograma 7 - Obtenção do extrato etanólico das folhas e obtenção do Composto PHPF-1 -----	167
Fluxograma 8 - Obtenção do extrato etanólico das folhas de <i>Protium</i> <i>tenuifolium</i> e obtenção dos compostos PTF – 1 e PTF – 2 -----	170
Fluxograma 9 - Obtenção do extrato etanólico da casca e obtenção do Composto PTC-1 -----	172

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

CC	Cromatografia em coluna
OCD	Cromatografia em camada delgada
OGL/EM	Cromatografia gás-líquido acoplada a espectrometria de massa
EM	Espectrometria de massas
IE	Impacto eletrônico
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
IDH	Índice de deficiência de hidrogênio
mm	milímetro
mg	miligrama
mL	mililitro
g	grama
kg	kilograma
μL	microlitro
nm	nanômetro
λ	comprimento de onda
d_i	diâmetro interno
RMN ^1H	Ressonância magnética nuclear de hidrogênio
RMN ^{13}C	Ressonância magnética nuclear de carbono-13
BB	Broad Band
NOE	Nuclear overhauser effect
COSY	Coarrelated Spectroscopy (RMN de correlação homonuclear de hidrogênio \times hidrogênio ($^1\text{H} \times ^1\text{H}$) bidimensional
DEPT	Distortionless enhancement by polarization transfer (RMN ^{13}C)
HMBC	Heteronuclear multiple band correlation ($^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$)
HMQC	Heteronuclear multiple quantum coherence
IK	Índice de Kolvats
TR	Tempo de retenção
UV-VIS	Ultravioleta-Visível
IV	Infravermelho
J	Constante de acoplamento

PF	Ponto de fusão
ppm	Parte por milhão
PM	Peso molecular
FM	Fórmula molecular
PP	<i>Protium paraense</i>
PUF	<i>Protium unifoliatum</i>
PHP	<i>Protium heptaphyllum</i>
PSS	<i>Protium subserratum</i>
PS	<i>Protium strumosum</i>
PG	<i>Protium grandifolium</i>
PL	<i>Protium lewellyni</i>
PHT	<i>Protium hebetatum</i>
PA	<i>Protium altsoni</i>
PN	<i>Protium nitidifolium</i>
PSP	<i>Protium spruceanum</i>
PPR	<i>Protium paniculatum</i> var <i>riedelianum</i>
PPN	<i>Protium paniculatum</i> var <i>nova</i>
PT	<i>Protium tenuifolium</i>
PHPR	Resina de <i>Protium heptaphyllum</i>
RFH	Fração hexânica da resina de <i>P. heptaphyllum</i>
RFC	Fração clorofôrmica da resina de <i>P. heptaphyllum</i>
RFA	Fração acetato de etila da resina de <i>P. heptaphyllum</i>
RFM	Fração metanólica da resina de <i>P. heptaphyllum</i>
EEL	Extrato etanólico do lenho de <i>P. heptaphyllum</i>
PHPL	Lenho de <i>P. heptaphyllum</i>
EELH	Fração hexânica do extrato etanólico do lenho de <i>P. heptaphyllum</i>
EELC	Fração clorofôrmica do extrato etanólico do lenho de <i>P. heptaphyllum</i>
EELA	Fração acetato de etila do extrato etanólico do lenho de <i>P. heptaphyllum</i>
EELM	Fração metanólica do extrato etanólico do lenho de <i>P. heptaphyllum</i>
PHPFM	Fruto maduro de <i>P. heptaphyllum</i>
PHPFV	Fruto verde de <i>P. heptaphyllum</i>
EEF	Extrato etanólico das folhas de <i>P. heptaphyllum</i>
PHPF	Folhas de <i>P. heptaphyllum</i>

EEFH	Fração hexânico do extrato das folhas de <i>P. heptaphyllum</i>
EEFC	Fração Clorofórmica do extrato das folhas de <i>P. heptaphyllum</i>
EEFA	Fração acetato de etila do extrato das folhas de <i>P. heptaphyllum</i>
EEFM	Fração metanólica do extrato das folhas de <i>P. heptaphyllum</i>
PTF	Folhas de <i>P. tenuifolium</i>
EEFPT	Extrato etanólico das folhas de <i>P. tenuifolium</i>
EEFHPT	Fração hexânica do extrato etanólico das folhas de <i>P. tenuifolium</i>
EEFCPT	Fração clorofórmica do extrato etanólico das folhas de <i>P. tenuifolium</i>
EEFAPT	Fração acetato de etila do extrato etanólico das folhas de <i>P. tenuifolium</i>
EEFMPT	Fração metanólica do extrato etanólico das folhas de <i>P. tenuifolium</i>
PTC	Casca de <i>P. tenuifolium</i>
EECPT	Extrato etanólico da casca de <i>P. tenuifolium</i>
EECHPT	Fração hexânica do extrato etanólico da casca de <i>P. tenuifolium</i>
EECCPT	Fração clorofórmica do extrato etanólico da casca de <i>P. tenuifolium</i>
EECAPT	Fração acetato de etila do extrato etanólico da casca de <i>P. tenuifolium</i>
EECMPT	Fração metanólica do extrato etanólico da casca de <i>P. tenuifolium</i>
FPHPR	Formiato de α,β -amirina da resina de <i>P. heptaphyllum</i>
AMPHPR	α,β -amirinona da resina de <i>P. heptaphyllum</i>
APHPR	Acetato de α,β -amirina da resina de <i>P. heptaphyllum</i>
BPHPR	Benzoato de α,β -amirina da resina de <i>P. heptaphyllum</i>
CPHPR	Cinamoila de α,β -amirina da resina de <i>P. heptaphyllum</i>
AchE	Acetilcolinesterase
ACTI	Iodeto de acetilcolina
IND	Indometacina
ip	intraperitoneal
vo	via oral
PHPR-OE	Óleo essencial da resina de <i>P. heptaphyllum</i>
PHPFV-OE	Óleo essencial dos frutos verdes de <i>P. heptaphyllum</i>
PHPFM-OE	Óleo essencial dos frutos maduros de <i>P. heptaphyllum</i>
PHPF-OE	Óleo essencial das folhas de <i>P. heptaphyllum</i>
PHPC-OE	Óleo essencial das cascas de <i>P. heptaphyllum</i>
PTF-OE	Óleo essencial dos frutos de <i>P. tenuifolium</i>

RESUMO

Este trabalho relata o estudo fitoquímico das espécies: *Protium heptaphyllum* Macbr, conhecida popularmente no Brasil como almecegueira, breu-branco-verdadeiro (Amazônia), almecegueira cheirosa, almecegueira de cheiro, almecegueiro vermelho e almecegueiro bravo e *Protium tenuifolium* Engl popularmente conhecida como: breu-terra, copal, copá, chutra.

A análise cromatográfica da resina de *Protium heptaphyllum* levou ao isolamento das seguintes substâncias: p-ment-3-eno-1,2,8-triol (**25**), a mistura [3 β -hidroxiursano-12-eno (**5**) e 3 β -hidroxioleano-12-eno (**6**) e ursano-12-eno-3 β ,16 β -diol (**7**). Do extrato etanólico do lenho foi isolada a cumarina 6-metoxi-7-hidroxycumarina (**17**). Do hidrolato dos frutos maduros e verdes foram isolados um flavonóide: quercetina-3-O-ramnosil (**26**) e uma catequina: (-)-epicatequina (**27**) respectivamente. Já do extrato etanólico das folhas foi isolado o flavonóide quercetina (**28**). As substâncias **26**, **27** e **28** estão sendo relatadas pela primeira vez neste gênero. Já o composto (**25**) está sendo reportado pela primeira vez como um produto natural, existindo registro na literatura somente de sua forma acetilada.

Sucessivos fracionamentos utilizando cromatografia em coluna, cromatografia de exclusão e cromatografia flash do extrato etanólico das folhas de *Protium tenuifolium* resultou no isolamento de duas substâncias: 1-O-etilglicose (**29**) e o flavonóide denominado Campferol-3-O-ramnosil (**30**). Do extrato etanólico das cascas isolou-se o glicosídeo do β -sitosterol (**31**)

Os óleos essenciais obtidos de diferentes partes das duas espécies foram caracterizados por CG-MS e avaliadas suas atividades anti-microbianas contra bactérias e fungos, observando-se significativa atividade. Foram realizados testes de inibição da ação de acetilcolinesterase.

A mistura de α,β -amirina foi avaliada quanto a sua atividade antiinflamatória e antinociceptiva, apresentando uma potente atividade antiinflamatória.

Em virtude da atividade apresentada pela mistura de α,β -amirina, alguns derivados foram preparados, através da utilização de reações clássicas, como formilação, acetilação, oxidação e esterificação, com objetivo de avaliar as possíveis atividades dos derivados obtidos. Fez-se também a determinação quantitativa da mistura de α,β -amirina presente na resina, usando-se cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).

A determinação estrutural dos compostos e derivados foi estabelecida com base na análise espectroscópica e espectrométrica como: infravermelho, espectrometria de massa, RMN ^1H e ^{13}C , NOE irradiado e técnicas bidimensionais (COSY, HMQC e HMBC) em comparação com dados de compostos análogos com registro na literatura.

ABSTRACT

This work describes the phytochemistry analysis of *Protium heptaphyllum* March (Burseraceae) popularly known in Brazil as “almecegueira”, “breu-branco verdadeiro” (Amazônia), “almecegueira cheirosa”, “almecegueira de cheiro”, “almecegueiro vermelho” , “almecegueiro bravo” and *Protium tenuifolium* Engl. (Burseraceae) popularly known as “breu-terra”, “copal”, “copá” and “chutra”.

Chromatographic analysis of the resin of *Protium heptaphyllum* led to the isolation of the following substances: monoterpene; p-menth-3-ene-1,2,8-triol (**25**), triterpenes: [3 β -hidroxy-urs-12-ene (**5**) e 3 β -hidroxy-olean-12-ene (**6**)] and the 3 β ,16 β -dihidroxy-urs-12-ene (**7**). From the ethanol extract of trunks was isolated a cumarin 6-methoxy-7-hidroxicumarin (**17**), from hydrolate of mature and green fruits were isolated; a flavonoid: quercetin-3-O-rhamnosyl (**26**) and a catequin: (-)-epicatequin (**27**) and from ethanol extract of leaves a flavonoid quercetin (**28**). Substances **26**, **27** and **28** are being reported for the first time in this genus, where as compound (**25**) are being reported for the first time as natural product.

Successive fractionations were used by column in chromatography , exclusion of chromatography and flash chromatography of the ethanol extract of leaves of *Protium tenuifolium* allowed isolation of: 1-O-ethylglucose (**29**) and the flavonoid kaempferol-3-O-rhamnosyl (**30**) and from the ethanol extract of barks β - sitosterol glucosideo (**31**).

Essential oils obtained from different plant parts of the two species were characterized by CG-MS and evaluated for their antimicrobial activities against several bacteria and fungi and showed significant antimicrobial activities. Were realized test for inhibition of acetylcolinesterase.

The mixture of α,β -amyrin was examined for their anti-inflammatory and antinociceptive activities and present a potent anti-inflammatory activity.

In virtue of activities presented by α,β -amirin, some derivatives were prepared, through classic reactions, such as: formilation, acetylation, oxidation and sterefication, with objective of evaluated possible activities. It was done also quantitative determination of the mixture of α,β -amyrin present in the resin, by High performance liquid chromatography (HPLC).

Structural determination of the compounds and derivatives was stablished by analysis spectroscopic and spectrometric as: IV, MS, ^1H and ^{13}C , NMR including 2D NMR techniques, and comparison with literature date.



CAPÍTULO

1

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

O gênero *Protium* é o mais representativo da família Burseraceae com cerca de 136 espécies.

Protium heptaphyllum March é uma árvore de grande porte (10 – 20 m) com ocorrência em todo o Brasil em terrenos arenosos, tanto úmidos quanto secos, fornecendo excelente madeira para a construção civil.¹ Popularmente é conhecida como almecegueira, breu-branco-verdadeiro (Amazônia), almecegueira cheirosa, almecegueira de cheiro, almecegueira vermelha e almecegueiro bravo.² Esta planta caracteriza-se pela grande produção de resina oleosa, rica em constituintes triterpênicos da série oleano, ursano e ufano.³

Protium tenuifolium Engl é também uma árvore de grande porte (20 – 30 m) com ocorrência no Norte de América do Norte e América Central⁴. Fornece excelente madeira para a construção civil e utensílios domésticos, e também é produtora de resina oleosa.

Estas observações induziram a seleção destas espécies visando como meta principal deste trabalho o isolamento e identificação de metabólitos secundários fixos, e a análise dos constituintes voláteis das espécies e possíveis avaliações farmacológicas.

Pesquisa bibliográfica realizada no *Chemical Abstract* mostrou dois trabalhos relatando a composição química dos óleos essenciais da resina e um trabalho sobre óleos essenciais das folhas e caule de *Protium heptaphyllum*.^{5, 6 e 7} No tocante aos estudos farmacológicos, a literatura registra somente dois trabalhos envolvendo óleos essenciais da resina, folhas e frutos.^{7 e 8} Resultados observados na pesquisa bibliográfica mostram diferentes tipos de substâncias isoladas nas espécies de *Protium* (*opacum*, *tenuifolium*, *unifoliolatum*, *heptaphyllum*, *crenatum*, *paniculatum* e *kleinii*) conforme pode ser visto na (Tab. 01, Pág. 12).

Os estudos fitoquímicos de *Protium heptaphyllum* e *Protium tenuifolium*, ainda considerados muito pequenos, aliados ao grande uso na terapêutica popular como tônico, antiinflamatório, antiséptico, etc, nos influenciaram na escolha destas espécies com vista a acrescentar conhecimentos químicos dos constituintes fixos e voláteis e conhecimentos de atividades farmacológicas.

O estudo fitoquímico destas duas espécies relata neste trabalho o isolamento e identificação de oito substâncias da espécie *Protium heptaphyllum*: sendo um monoterpreno: p-ment-3-eno-1,2,8 triol (25); três triterpenos: [α -amirina (5) e β -amirina (6)] como mistura

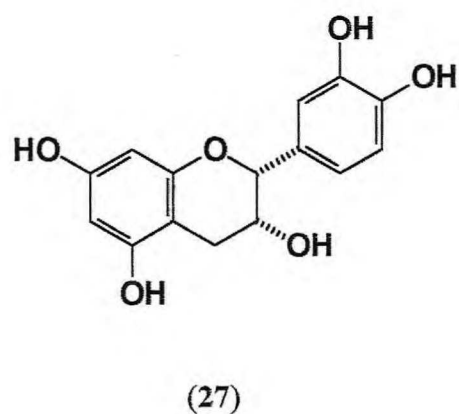
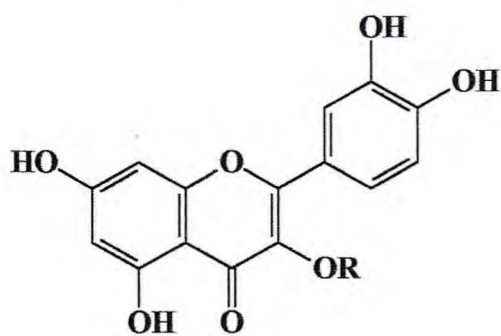
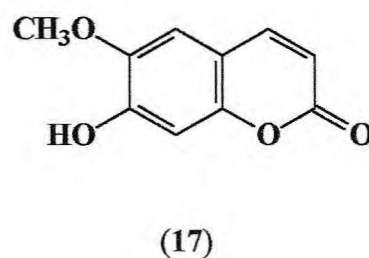
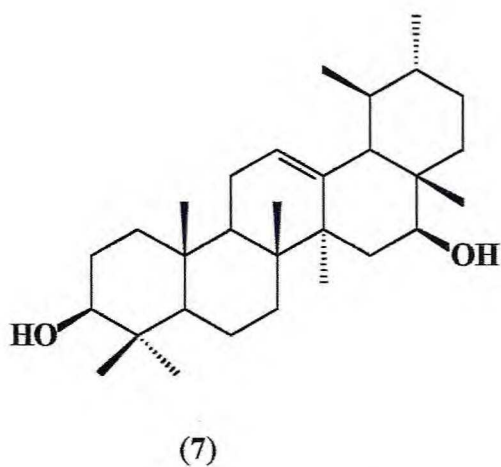
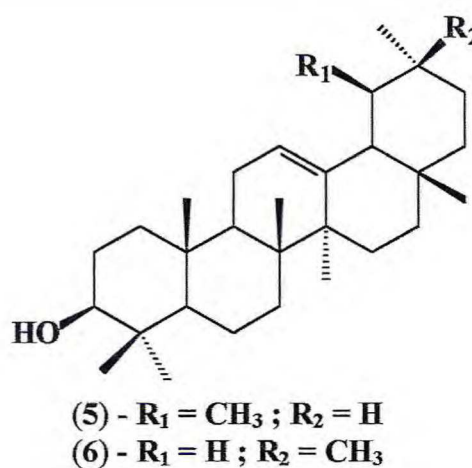
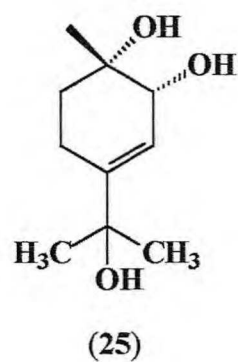
binária e Breina (7); uma cumarina: escopoletina (17); dois flavonóides: quercetina (28) e quercetina-3-O-ramnosil (26) e uma catequina (27), em acordo com Quadro 01, Pág. 3. Foram realizados também estudos relacionados à identificação dos constituintes voláteis dos óleos essenciais da resina, frutos verdes, frutos maduros, folhas e cascas.

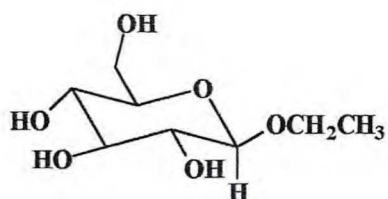
Da espécie *Protium tenuifolium* isolou-se as substâncias: 1-O-etilglicose (29), Campferol-3-O-ramnosil (30) e β -sitosterol glicolizado (31) conforme Quadro 02, Pág. 4. Os constituintes voláteis dos óleos essenciais dos frutos foram identificados por CG-MS.

A quantidade significativa obtida da mistura dos triterpenos [α -amirina (5) e β -amirina (6)], aliada a atividade farmacológica apresentada, nos motivou a preparação de uma série de derivados a partir de transformações envolvendo a função oxigenada no C-3. As reações planejadas foram à formação de uma cetona e quatro ésteres: [FPHPR-2a (32) e FPHPR-2b (33)], [AMPHPR-2a (33) e AMPHPR-2b (35)], [APHPR-2a (36) e APHPR-2b (37)], [BPHPR-2a (38) e BPHPR-2b (39)] e [CPHPR-2a (40) e CPHPR-2b (41)] conforme Quadro 03, Pág. 5. Também foi realizada a análise quantitativa por cromatografia líquida de alta eficiência, da mistura [α -amirina (5) e β -amirina (6)] presente em quantidade na resina de *Protium heptaphyllum*, observando-se a proporção de 3 % destes constituintes.

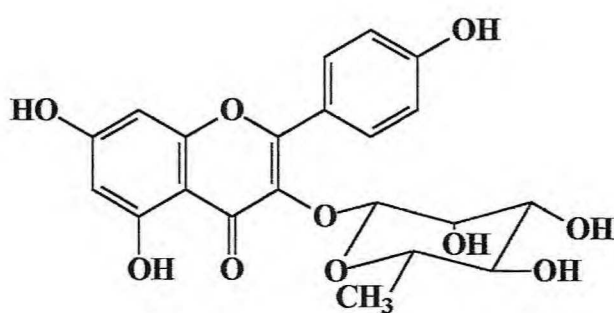
Diferentes técnicas foram utilizadas na caracterização dos constituintes fixos e voláteis, entre estas: Espectrometria de massas, Espectroscopia infravermelho, Espectroscopia de RMN ^1H e ^{13}C envolvendo técnicas bidimensionais como $^1\text{H} \times ^1\text{H}$ – COSY, HMQC ($^1\text{J}_{\text{CH}}$) e HMBC ($^n\text{J}_{\text{CH}}$, $n = 2$ e 3) com detecção no canal de hidrogênio e cromatografia gasosa acoplada a Espectrometria de massa.

Este trabalho está constituído dos seguintes capítulos: Capítulo 01 – Introdução. Capítulo 02 – Considerações botânicas. Capítulo 03 – Pesquisa bibliográfico dos constituintes fixos isolados no gênero, constituintes voláteis identificados no gênero e atividade farmacológica de α -amirina e β -amirina. Capítulo 04 – Determinação estrutural. Capítulo 05 – Estudo dos óleos essenciais. Capítulo 06 – Avaliação da atividade Farmacológica dos óleos essenciais e dos constituintes isolados. Capítulo 07 – Determinação quantitativa por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) da mistura [α -amirina e β -amirina] na resina. Capítulo 08 – Parte experimental. Capítulo 09 – Conclusões e Capítulo 10 – Constantes físicas, Dados espectrométricos e espectroscópicos.

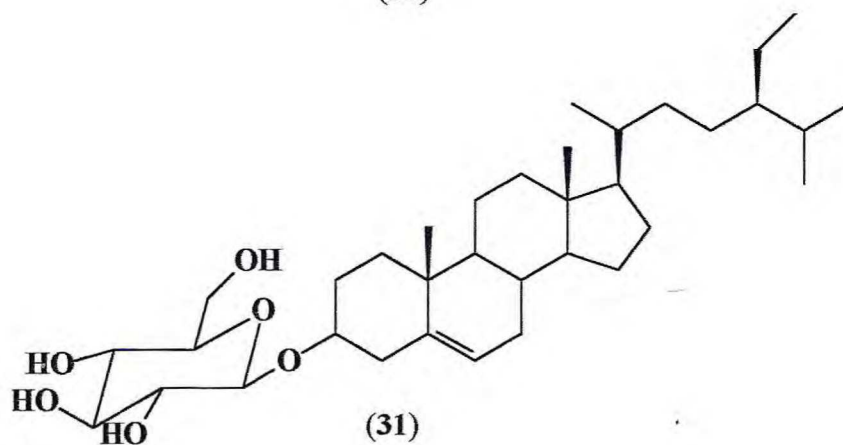
Quadro 01 - Estruturas dos constituintes químicos isolados de *Protium heptaphyllum*

Quadro 02 - Estruturas dos constituintes químicos isolados de *Protium tenuifolium*

(29)

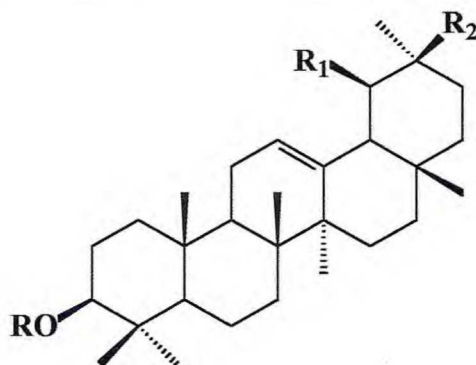


(30)



(31)

Quadro 03 - Estruturas dos derivados preparados a partir da mistura binária de [α -amirina(5) e β -amirina (6)]

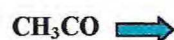


R =



(32) $R_1 = \text{CH}_3$; $R_2 = \text{H}$

(33) $R_1 = \text{H}$; $R_2 = \text{CH}_3$



(36) $R_1 = \text{CH}_3$; $R_2 = \text{H}$

(37) $R_1 = \text{H}$; $R_2 = \text{CH}_3$



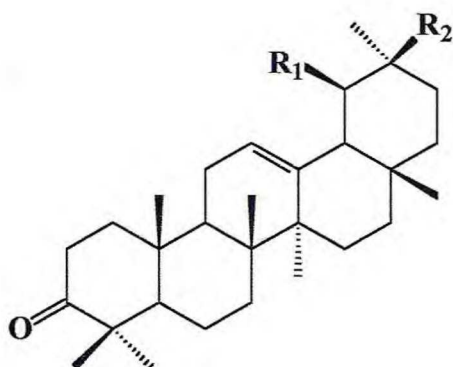
(38) $R_1 = \text{CH}_3$; $R_2 = \text{H}$

(39) $R_1 = \text{H}$; $R_2 = \text{CH}_3$



(40) $R_1 = \text{CH}_3$; $R_2 = \text{H}$

(41) $R_1 = \text{H}$; $R_2 = \text{CH}_3$



(34) $R_1 = \text{CH}_3$; $R_2 = \text{H}$

(35) $R_1 = \text{H}$; $R_2 = \text{CH}_3$



CAPÍTULO

2

CONSIDERAÇÕES BOTÂNICAS

2. CONSIDERAÇÕES BOTÂNICAS

2.1. Considerações botânicas sobre a família Burseraceae

A família Burseraceae pertencente a ordem Rutales, bastante rica em espécies distribuídas em 16 gêneros sendo encontrada nas regiões tropicais e subtropicais. As mais de 800 espécies conhecidas são bastante dispersas ocorrendo na América do Sul, América do Norte, África Tropical, Ásia Tropical e nas Antilhas.³

São árvores de pequeno porte ou arbustos, mas algumas espécies podem atingir o dossel da floresta. A presença de resina aromática é encontrada em quase todas as partes da planta, com cheiro lembrando incenso ou terpenos (breu). Suas folhas são alternas e compostas, geralmente imparipinadas. Os folíolos muitas vezes têm puvínulo (*protium*). As inflorescências podem ocorrer como racemos, panículas ou pseudo-espigas. As flores são unissexuadas e muito pequenas, de cor creme, amareladas ou esverdeadas, raramente avermelhadas. As flores tem de 3 a 5 sépalas, normalmente unidas, e 3 a 5 pétalas, livres ou unidas. Os frutos são drupáceos, às vezes capsulares, muitas vezes oblíquos. O pirênio está envolto por polpa de cor branca que se destaca devido à cor vistosa das válvulas ou columela ou devido à cor preta do pirênio⁴.

A família é subdividida em três tribos, segundo Engler: Protieae, Boswellieae e Canarieae. A tribo Protieae por sua vez, está distribuída em quatro gêneros: *Garuga*, *Crepidospermum*, *Tetragastris* e *Protium*.⁹ Este último gênero é o mais representativo, com cerca de 136 espécies¹⁰.

As espécies em estudo apresentam a seguinte classificação botânica:

Classe : Magnoliatae

Sub-Classe : Rosidae

Ordem : Ratales

Família : Burseraceae

Tribo : Protieae

Gênero : Protium

Espécie : Heptaphyllum

Espécie : Tenuifolium

2.2. Considerações botânicas sobre a espécie *Protium heptaphyllum*

Protium heptaphyllum (*Amyris ambrosiaca* Willd., *Icica guanensis* T. e Pl., *I. heptaphylla* Aubl., *I. surenamensis* Miq., *I. Tacahamaca* HBK., *P. aromatum* Engl.). Conhecida popularmente como almecegueira, breu-branco-verdadeiro (Amazônia), almecegueira cheirosa, almecegueira-de-cheiro, almecegueira vermelha e almecegueiro-bravo com ocorrência em todo o Brasil, vegetando de preferência em terrenos arenosos, tanto secos quanto úmidos. Também pode ser encontrada no Suriname, Colômbia, Venezuela, Argentina e na Índia. É uma árvore bastante alta chegando a apresentar até 20 metros de altura (Fig. 1, Pág. 9), casca cinzenta, pouco espessa, folhas pinnadas, com 2-3 jugos ou raras vezes 4 jugos; possuindo de 5 a 9 folíolos oblongos, comumente 7 (daí o nome da espécie) inteiros, glabros, de 10cm de comprimentos e 5cm de largura (Fig. 2, Pág. 9); flores verdes amareladas, pequenas, porém abundantíssimas e dispostas em panículas; fruto com drupa vermelha, de forma ovóide, contendo polpa resinosa e amarela, envolvendo uma semente, raras vezes mais, chegando até quatro². Esta espécie fornece madeira moderadamente pesada (densidade $0,77\text{g/cm}^3$), compacta, dócil ao cepilho, bastante elástica e de grande durabilidade em lugares secos, sendo de qualidade excelente para a construção civil¹.

2.3. Considerações botânicas sobre a espécie *Protium tenuifolium*

Conhecida popularmente como breu-terra, copal, copá, chutra, é uma árvore que alcança de 20 a 30 metros de altura. O tronco tem raízes tubulares pequenas na base. A sua casca é de cor marron. O corte em qualquer parte da planta produz um exudado resinoso e transparente com odor de trementina. As folhas são imparipinadas e alternadas, com 5 a 9 folíolos opostos. Os folíolos são de forma oblongo-elípticas, com apice acuminado, bordas inteiras e base arredondada. O fruto é uma capsula com 4 a 5 lóbulos, verde, tornando-se roxo quando maduro, contem 1 a 5 sementes cobertas com polpa branca (Fig. 3, Pág. 10). É encontrada no Norte da América do Sul e América Central.⁴

2.4. Uso na medicina popular e aspectos farmacológicos da espécies *Protium heptaphyllum* e *Protium tenuifolium*

A espécie *Protium heptaphyllum*, assim como as demais espécies da família Burseraceae é produtora de resina oleosa conhecida como breu branco, goma-limão, etc. A resina oleosa é obtida pela lesão do tronco, causada pelo ataque de insetos, secretada de forma espontânea ou pela ação do homem (Fig. 4, Pág. 10). Apresenta-se com consistência variável e não possui composição simples¹¹. Sua utilização é amplamente difundida, sendo usada na medicina popular, como tônico, estimulante, doenças de pele, antiséptico, antitumoral, desinfetante, cicatrizante e no tratamento de úlceras.^{12,3,10} É também utilizada na indústria de verniz, tinta, na calafetação de embarcações e em rituais religiosos (incenso). A casca e as folhas desta espécie são muito reputadas contra as úlceras gangrenosas e as inflamações em geral².

Na espécie *Protium tenuifolium*, a sua resina tem uso na medicina popular, no tratamento de resfriados, asma, dores de cabeça, tosses e cicatrização de ferimentos. A sua madeira é utilizada na carpintaria, pisos e utensílios domésticos.

Embora sejam muitos os usos terapêuticos atribuídos à espécie *Protium heptaphyllum* na medicina popular, poucos são os estudos farmacológicos com registros na literatura. Destacando-se somente a atividade cercarecida dos óleos essenciais das folhas e dos frutos⁸. Estudos farmacológicos recentes provando o uso do óleo essencial da resina e das folhas como anti-inflamatório, antinociceptivo e anti-neoplásico⁷.



Figura 1 - Fotografia da espécie *P.heptaphyllum* March



Figura 2 - *P. heptaphyllum* March, fotografia ilustrando folhas e frutos.



Figura 3 - *P. tenuifolium* Engl. fotografia ilustrando folhas e frutos.



Figura 4 - *P. heptaphyllum*, fotografia ilustrando a obtenção e coleta da resina.



CAPÍTULO

3

PESQUISA BIBLIOGRÁFICA

3. PESQUISA BIBLIOGRÁFICA

3.1. Pesquisa bibliográfica dos constituintes químicos do gênero *Protium* com registro na literatura

Pesquisa bibliográfica realizada no *Chemical Abstracts*, *Webofscience.fapesp.br* registra apenas sete espécies do gênero *Protium* estudadas, cujos metabólitos secundários identificados pertencem as seguintes classes de compostos: terpenos, cumarinas, lignanas e esteróides.

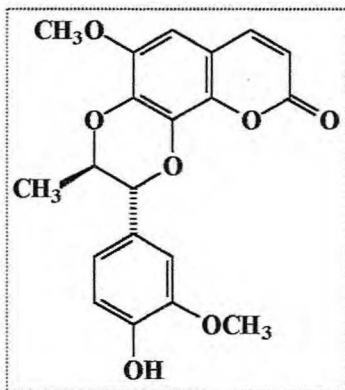
Na Tab. 01, Pág. 12, encontram-se os resultados desta pesquisa, mostrando as espécies estudadas e seus respectivos constituintes isolados e identificados. As estruturas estão representadas no Quadro 04, Pág. 13.

Vale ressaltar que apesar das espécies do gênero *Protium* já serem conhecidas há bastante tempo, poucos estudos fitoquímicos tem sido realizado com esse gênero, o que justifica a importância do seu estudo.

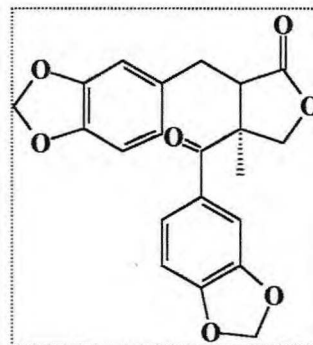
Tabela 01 - Constituintes fixos isolados de espécies do gênero *Protium* com registros na literatura

Substâncias	Espécies	Estrutura	Ref.
1,2 : 7,8-6-metoxicumarina (propacina)	<i>opacum</i>	1	13, 18
(+)-(2S,3S)-2-(3'',4''-metilenodioxil-benzil)-3-(3',4'-metilenodioxiacetofenona-butirolactona	<i>tenuifolium</i>	2	14
(-)-para-benzolactona (cubebina)		3	14
9-(1,3-benzodioxol-5-il)-4,5,6,7-tetrametoxinafto[2,3-C]-furano-1(3H)-ona	<i>unifoliolatum</i>	4	15
3β-hidroxiursano-12-eno (α-amirina)		5	16
3β-hidroxioleano-12-eno (β-amirina)		6	16, 20
ursano-12-eno-3β,16β-diol (breína)		7	16, 21
oleano-12-eno-3β,16β-diol (maniladiol)		8	16
ursano-9(11):12-dieno-3β-ol		9	16
oleano-9(11):12-dieno-3β-ol		10	16
Ácido 3α-hidroxi-tirucalla-7,24-dieno-21-óico		11	16, 19
Ácido 3α-hidroxi-tirucalla-8,24-dieno-21-óico		12	16
3β,24-diidroxiursano-12-eno		13	17
3-oxo-20S-hidroxitaxastano	<i>heptaphyllum</i>	14	17
3β,20S-diidroxitaxastano		15	17
Éter etílico do ácido p-cumárico		16	18
6-metoxi-7-hidroxycumarina		17	18
7,8-dihidroxi-6-metoxi-2H-1-benzopirano-2-ona		18	18
cleomiscosina A		19	18
β-sitosterol		20	18,20
3-O-β-D-glicopiranosil-β-sitosterol		21	18
Lupeol		22	18
Estigmasterol		23	18, 20
Ácido 3, 3',4 -di-O-metilelágico	<i>paniculatum</i>	24	20

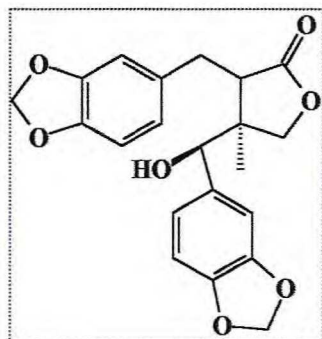
Quadro 04 - Estruturas dos constituintes fixos isolados de espécies do gênero *Protium* com registros na literatura



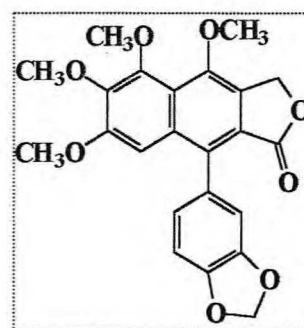
(1)



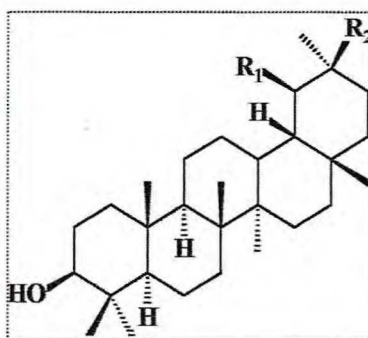
(2)



(3)

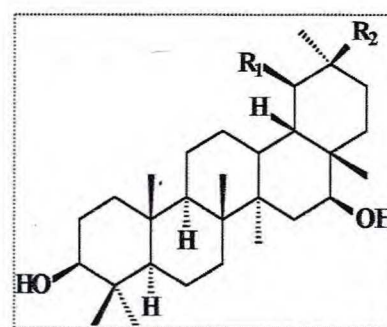


(4)



(5) $R_1 = \text{CH}_3$; $R_2 = \text{H}$

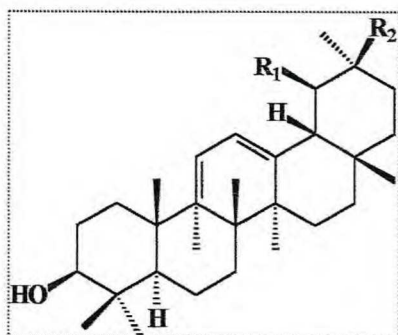
(6) $R_1 = \text{H}$; $R_2 = \text{CH}_3$



(7) $R_1 = \text{CH}_3$; $R_2 = \text{H}$

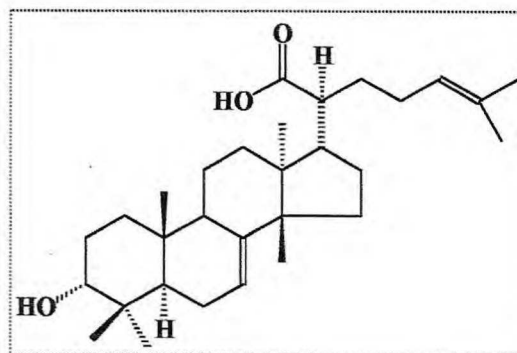
(8) $R_1 = \text{H}$; $R_2 = \text{CH}_3$

Continuação do quadro 04

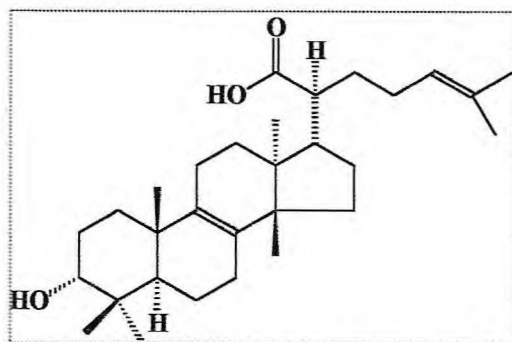


(9) $R_1 = CH_3$; $R_2 = H$

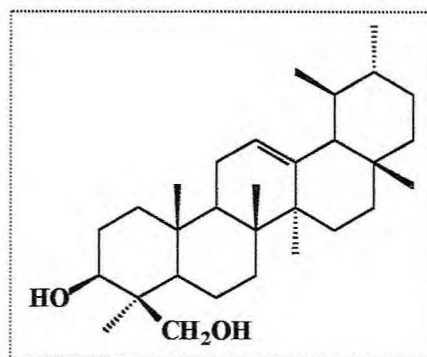
(10) $R_1 = H$; $R_2 = CH_3$



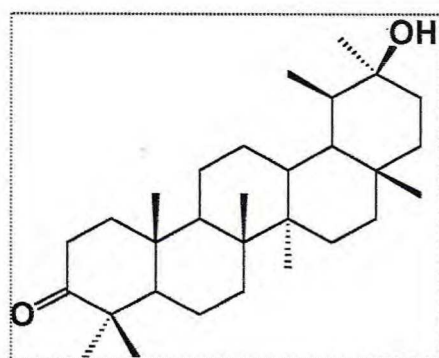
(11)



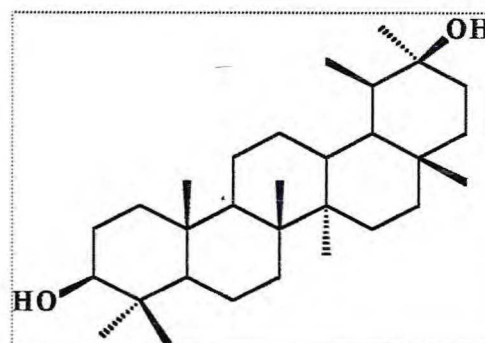
(12)



(13)

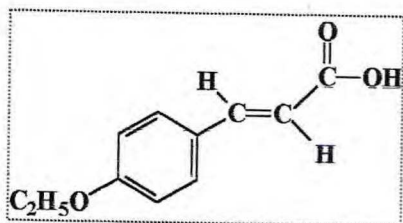


(14)

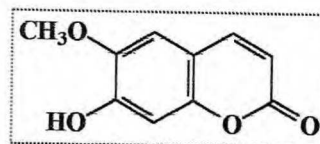


(15)

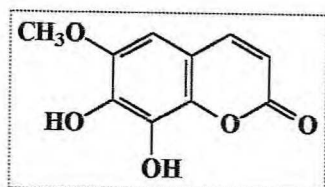
Continuação do quadro 04



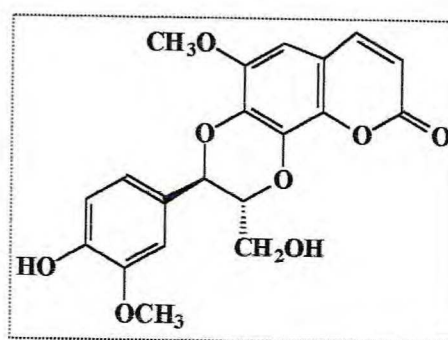
(16)



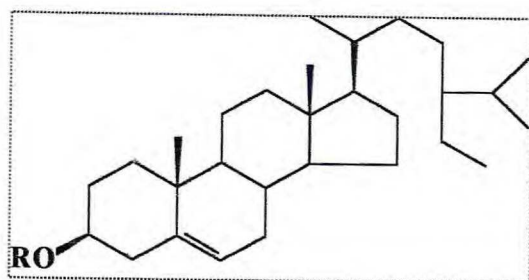
(17)



(18)

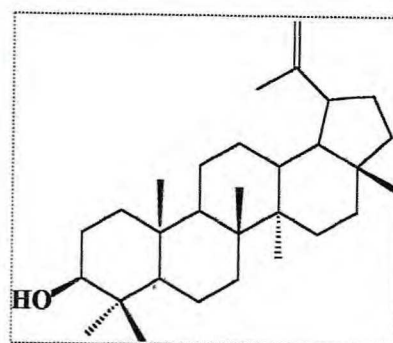


(19)



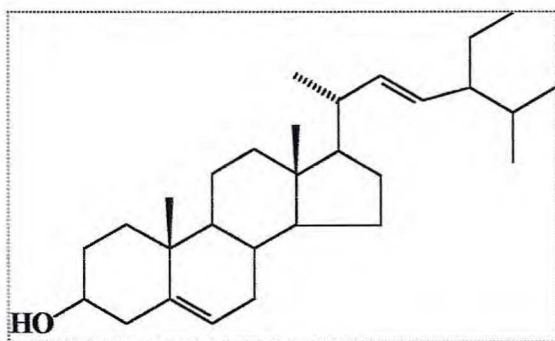
(20) R = H

(21) R = glucose

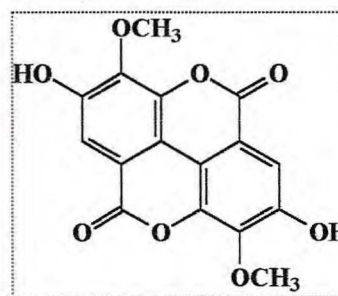


(22)

Continuação do quadro 04



(23)



(24)

3.2. Pesquisa bibliográfica dos constituintes químicos voláteis do gênero *Protium* com registro na literatura

Óleo essencial é o termo usado para definir uma mistura complexa de substâncias voláteis, lipofílicas, geralmente odoríferas e líquidas.²²

A sua principal característica é a volatilidade, diferindo-se dos óleos fixos, mistura de substâncias lipídicas, obtidas normalmente de semente. Uma outra característica importante é o aroma, sendo, por isso, chamado de essência.

Seus constituintes variam desde hidrocarbonetos terpênicos, álcoois simples e terpênicos, aldeídos, cetonas, fenóis, ésteres, éteres, óxidos, peróxidos, furanos, ácidos orgânicos, lactonas, cumarinas, até compostos com enxofre. Na mistura, tais compostos apresentam-se em diferentes concentrações. Numa determinada espécie a concentração de cada um dos constituintes do óleo volátil pode variar com o desenvolvimento da planta, com o local, com a hora de coleta, etc. O ambiente no qual a planta se desenvolve e o tipo de cultivo também influem sobre a composição química dos óleos essenciais. Fatores como a temperatura, a umidade relativa, a duração total de exposição ao sol e o regime de ventos exercem uma influência direta, junto as espécies que possuem estruturas histológicas de estocagem na superfície.

Muitas substâncias isoladas de óleo essencial apresentam atividade farmacológica. É importante não confundir as atividades farmacológicas de uma droga vegetal rica em óleos essenciais com as atividades farmacológicas do óleo isolado da mesma. Também deve-se levar em consideração que, se é possível estabelecer a atividade farmacológica de uma substância isolada, o mesmo não é tão fácil para um óleo volátil que, além de ser uma mistura complexa, pode ter sua composição química alterada por vários fatores.

Algumas propriedades farmacológicas, entretanto, estão relativamente bem estabelecidas e podem servir de exemplo. Ação cumiativa (anestesia sobre a cárdia), ação antiespasmódica(relaxação da musculatura lisa intestinal), ação estimulante, ação cardiovascular (aumento do ritmo cardíaco e da pressão arterial), ação irritante, ação secretolítica, ação anestésica local, ação antiinflamatória e ação antiséptica.²²

O gênero *Protium* de um modo geral é pouco estudado, apenas treze espécies foram objeto de estudo científico envolvendo composição química dos óleos essenciais de acordo

com os registros da literatura. Na Tab. 02, Pág. 19, encontra-se um resumo desses estudos no que diz respeito aos constituintes voláteis identificados das seguintes espécies: *P. paraense* (PP)²³, *P. unifoliatum* (PUF)²⁴, *P. heptaphyllum* (PHP)^{5, 6, 7, 25}, *P. subserratum* (PSS)²⁶, *P. strumosum* (PS)^{7, 27}, *P. grandifolium* (PG)⁷, *P. lewellyni* (PL)⁷ e *P. hebtatum* (PHT)^{7, 27}, *P. altsoni* (PA)²⁷, *P. nitidifolium* (PN)²⁷, *P. spruceanum* (PSP)²⁷, *P. paniculatum var riedelianum* (PPR)²⁷ e *P. paniculatum var nova* (PPN)²⁷.

Tabela 02 - Constituintes químicos voláteis identificados no gênero *Protium* com registro na literatura

Compostos	PP	PUF	PHP				PSS	PS		PG	PL	PHT		PA	PN	PSP	PPR	PPN
	ca	fo	r	c	fo	fr	r	r	fo	fo	fo	r	fo	r	r	r	r	r
3-hexeno-1-ol											X							
(E) -2-hexenal											X							
(E) -salveno			X															
n-hexenol													X					
α -tujeno			X				X							X		X	X	
α -pineno	X	X	X	X	X	X		X			X	X		X	X	X		
canfeno					X													
sabineno			X		X		X							X	X			
β -pineno	X		X				X											
p- menta-3-eno																	X	
mirreno			X	X	X	X												
p-menta-4(8)-eno			X															
δ -2-careno			X			X												
α -felandreno	X		X	X	X		X					X		X		X	X	X
o-metil anisol			X															
α -terpineno			X									X						X
p-cimeno	X		X	X	X		X	X	X	X		X	X	X	X	X	X	X
p-menta-1-eno														X	X	X	X	
o-cimeno								X										
limoneno		X	X	X	X	X			X	X	X		X					
β -felandreno			X				X	X				X		X	X	X	X	X

r = resina; c = caule; ca = casca; fo = folha; fr = fruto

Os constituintes encontram-se em ordem crescente de I.K

Continuação da Tabela 02

Compostos	PP	PUF	PHP				PSS	PS		PG	PL	PHT		PA	PN	PSP	PPR	PPN
	ca	fo	r	c	fo	fr	r	r	fo	fo	fo	r	fo	r	r	r	r	r
1,8-cineole			X											X				X
(Z)- β -ocimeno					X													
(E)- β -ocimeno			X		X													
γ -terpineno			X	X	X										X			
p-cimeno								X		X								
α -terpinoleno		X	X	X	X			X	X		X							
linalol			X				X		X				X					
trans-sabineno hidrato			X															
α -p-dimetilestireno			X															
p-menta-1,5,8-trieno			X															
p-menta-1,3-trieno			X															
4,8-dimetil-1,3,7-nonatrieno										X								
canfora			X				X											
terpineno-4-ol			X		X		X		X						X			
diidroterpineol							X											
p-cimeno-8-ol			X					X					X					
n-hexil butirato											X							
metil salicilato										X								
α -terpineol			X				X	X		X								
cuminaldeído			X															
2,5-dimetoxibenzeno			X															

r = resina; c = caule; ca = casca; fo = folha; fr = fruto

Os constituintes encontram-se em ordem crescente de I.K

Continuação da Tabela 02

Compostos	PP	PUF	PHP				PSS	PS		PG	PL	PHT		PA	PN	PSP	PPR	PPN
	ca	fo	r	c	fo	fr	r	r	fo	fo	fo	r	fo	r	r	r	r	r
2,5-dimetoxitolueno			X															
piperitona			X				X											
3,5-dimetoxitolueno			X															
timol			X						X									
δ -elemeno			X	X	X				X	X								
α -cubebeno			X						X	X	X							
α -ylangeno			X						X		X							
isoledeno			X															
α -copaeno		X	X	X	X		X		X	X	X		X					
β -borbuneno			X						X									
β -cubebeno		X	X		X													
eremofileno		X																
β -bisaboleno		X																
β -elemeno			X	X	X		X		X	X	X							
cipereno			X															
metil eugenol			X															
2,3,5-trimetoxitolueno			X															
α -gurjuneno			X								X							
β -cariofileno			X		X		X		X	X	X		X					
γ -elemeno			X	X	X				X	X								

r = resina; c = caule; ca = casca; fo = folha; fr = fruto

Os constituintes encontram-se em ordem crescente de I.K

Continuação da Tabela 02

Compostos	PP	PUF	PHP				PSS	PS		PG	PL	PHT		PA	PN	PSP	PPR	PPN
	ca	fo	r	c	fo	fr	r	r	fo	fo	fo	r	fo	r	r	r	r	r
α -trans-bergamopteno											X							
tujopseno							X											
α -guaiano										X								
aromadrendeno			X										X					
α -humuleno		X	X	X	X		X		X	X			X					
viridifloreno			X															
farnesceno							X											
γ -muuroleno					X				X	X	X		X					
germacreno D			X				X		X	X	X		X					
α -amorfeno			X															
δ -selineno													X					
β -selineno			X		X				X	X	X		X					
zingibereno										X								
valenceno			X							X	X							
α -selineno			X						X		X							
α -muuroleno			X		X													
biciclogermacreno					X													
α -farneseno					X													
germacreno a				X														
miristicina			X															

r = resina; c = caule; ca = casca; fo = folha; fr = fruto

Os constituintes encontram-se em ordem crescente de I.K

Continuação da Tabela 02

Compostos	PP	PUF	PHP				PSS	PS		PG	PL	PHT		PA	PN	PSP	PPR	PPN
	ca	fo	r	c	fo	fr	r	r	fo	fo	fo	r	fo	r	r	r	r	r
cadina-1,4-dieno			X															
cis-calameleno			X															
δ -cadineno		X	X	X	X													
α -calacoreno			X															
Elemicina			X															
germacreno B			X	X	X													
óxido de cariofileno			X		X													
Espatulanol			X															
Globulol			X															
1,2,3,4-tetrametoxi-5 (2-propenil)benzeno			X															
humuleno epóxido					X													
Tetradecanal					X													
furanodieno			X															
dilapiol			X	X	X													
aloaromadendreno			X				X		X	X	X		X					
α -muurolol			X															
β -eudesmol				X														
atractilona			X															
apiol			X															

r = resina; c = caule; ca = casca; fo = folha; fr = fruto

Os constituintes encontram-se em ordem crescente de I.K

3.3. Pesquisa bibliográfica sobre atividade farmacológica de α -amirina e β -amirina com registro na literatura

Triterpenóides são metabólitos secundários não-esteroidais presentes na flora terrestre, marinha e fauna, constituindo-se nos componentes majoritários em algumas plantas usadas na medicina tradicional, com ocorrência na forma livre, bem como na forma de éter, ésteres e glicosídeos. Triterpenóides são isopentenóides compostos de trinta átomos de carbono, com esqueleto acíclico do tipo mo, di, tri, tetra ou pentacíclico. Os triterpenóides pentacíclicos são os constituintes dominantes desta classe, e têm sido amplamente investigados, dos quais fazem parte os compostos α e β - amirina²⁸.

Algumas plantas contém grandes quantidades de triterpenóides em seu látex e resinas cujas funções fisiológicas destes compostos é geralmente creditada à sua defesa química contra patógenos e herbívoros.²⁹

A sua grande ocorrência e diversidade estrutural tem atraído a atenção quanto a evolução de suas atividades biológicas, como um agente antitumor, anticâncer, antiinflamatório, antiviral e antibacterial. Por exemplo, Ling et al.³⁰ estudaram a relação entre a estrutura química e atividade anticâncer de alguns triterpenóides pentacíclicos e tetracíclicos. Embora as aplicações destes metabólitos secundários com sucesso como agente terapêutico sejam ainda limitadas, uma extensiva exploração das atividades nesta área tem ocorrido nos últimos anos.³¹

Com relação aos triterpenóides: α -amirina e β -amirina, a literatura registra alguns trabalhos quanto as suas atividades farmacológicas, como mostra a Tab. 03 Pág. 25.

Tabela 03 - Atividade farmacológica de α -amirina e β -amirina com registro na literatura.

ATIVIDADE	COMPOSTOS		REFERÊNCIAS
	α -AMIRINA	β -MIRINA	
Citotóxica	X		32
Antiartrose	X	X	33, 39
Antiinflamatório	X	X	34, 35, 36, 37
Estimulante capilar	X		38
Antiproteolítico		X	40
Antilipoxigenase		X	41
Antimicrobiana		X	42

4. DETERMINAÇÃO ESTRUTURAL

4.1. Determinação estrutural dos constituintes químicos fixos isolados de *Protium heptaphyllum*

O estudo fitoquímico da espécie *Protium heptaphyllum* após sucessivas cromatografias nos conduziu ao isolamento das seguintes substâncias: na resina PHPR-1 (25), [PHPR-2a (5) e PHPR-2b (6)] como uma mistura binária e PHPR-3 (7); no extrato etanólico do lenho PHPL-1 (17); no hidrolato do fruto maduro PHPFM-1 (26); no hidrolato do fruto verde PHPFV-1 (27) e no extrato etanólico das folhas PHPF-1 (28).

4.1.1. Determinação estrutural de PHPR-1 (25)

O tratamento cromatográfico do resíduo proveniente do hidrolato da resina forneceu por eluição com AcOEt / metanol (4 : 1) item 8.5.1, Pág. 153 uma substância que apresentou-se como um sólido branco amorfo, solúvel em metanol, com faixa de fusão 137 – 137,8°C e rotação ótica específica $[\alpha]_D^{20} = +2^\circ$ (c, 0,2 em CH₃OH).

O espectro de absorção na região do infravermelho (Fig. 5, Pág. 30) exibiu bandas em 3293 cm⁻¹ correspondente a vibração de deformação axial de O-H, em 3217 cm⁻¹ característica de vibração de deformação axial de C-H em carbono sp², em 2928 cm⁻¹ típica de vibração de deformação axial de C-H em carbono sp³, em 1458 cm⁻¹ relacionada a vibração de deformação angular no plano de C-H de olefinas, em 1135 cm⁻¹ correspondente a vibração de deformação axial de C-O, além de bandas relativas a deformações angulares fora do plano de C-H em 982 , 960 , 711 cm⁻¹ de olefinas ⁴³.

O espectro de RMN ¹³C (Fig. 6, Pág. 30) totalmente desacoplado (BB = Broad Band) revelou nove linhas espectrais. O sinal de maior intensidade referente aos valores em δ_c 29,2 e 20,1 corresponde à presença de dois átomos de carbonos. A comparação do espectro de RMN ¹³C (BB) com o espectro de RMN ¹³C-DEPT (Distortioless Enhancement by Polarization Transfer, $\theta = 135^\circ$, onde os sinais de CH₂ encontram-se em fase oposta aos sinais de CH e CH₃ (Fig. 7, Pág. 31) permitiu identificar duas linhas espectrais

correspondentes a dois átomos de carbonos metilênicos em δ_C 24,2 e 34,8 , duas linhas espectrais na região de carbonos metílicos, duas linhas espectrais correspondentes a átomos de carbonos metínicos, sendo uma em δ_C 122,4 típica de C-sp² e a outra em δ_C 74,9 de C-sp³ indicativo de carbono oxigenado, três linhas espectrais de carbonos não-hidrogenados, sendo uma em δ_C 147,1 de C-sp² e duas em δ_C 72,6 e 73,0 de C-sp³ oxigenados.

O espectro de RMN ¹H (Fig. 8, Pág. 31) revelou um sinal em δ_H 1,14 (s) e outro em δ_H 1,27 (s) típicos de hidrogênios metílicos, um conjunto de sinais referentes a hidrogênios metilênicos em δ_H 1,70 e 1,60 (2H, m) e δ_H 2,21 e 2,10 (2H, m) e ainda dois sinais sendo um em δ_H 5,58 (1H, m) condizente com hidrogênio de C-sp² e outro em δ_H 3,90 (1H, m) característico de hidrogênio de carbono carbinólico.

O conjunto de dados apresentados até aqui, nos permitiu postular para PHPR-1, de acordo com os dados mostrados na Tab. 4, Pág. 29, a fórmula molecular C₁₀H₁₈O₃ com IDH = 2, o que sugere a presença de um monoterpeneo contendo três grupos hidroxilas.

As absorções em δ_C 147,1 e 122,4 são compatíveis com a presença de uma ligação dupla trissubstituída no esqueleto carbônico, o que está em acordo com o espectro de RMN ¹H que registrou a presença de um hidrogênio olefínico em δ_H 5,58.

A confirmação adicional das atribuições relativas aos deslocamentos químicos e da elucidação da estrutura baseou-se no mapa de correlação homonuclear ¹H × ¹H – COSY (Fig. 9, Pág. 32) que revelou um acoplamento alílico entre o hidrogênio em δ_H 5,58 e os hidrogênios em δ_H 2,21 e 2,10 e um acoplamento homoalílico entre o hidrogênio em δ_H 3,90 e os hidrogênios em δ_H 2,21 e 2,10, sendo estes acoplamento uma confirmação da presença de uma ligação dupla trissubstituída.

No mapa de correlação heteronuclear (HMQC) a uma ligação com detecção no canal de hidrogênio (Fig. 10, Pág. 32) foi possível associar de forma clara as absorções do hidrogênio em δ_H 5,58 (1H, m) ao carbono em δ_C 122,4 e o hidrogênio em δ_H 3,90 (1H, m) ao carbono em δ_C 74,9, além de permitir associar os hidrogênios metilênicos e os hidrogênios metílicos aos seus respectivos átomos de carbono.

O mapa de correlação heteronuclear a longa distância HMBC (ⁿJ_{CH} n = 2, 3) (Fig. 11, Pág. 33) com detecção no canal de hidrogênio nos auxiliou quanto as atribuições de deslocamentos dos átomos de carbonos, principalmente dos não-hidrogenados.

Como exemplo observou-se os acoplamentos entre os carbonos não-hidrogenados C-4 e C-8 com os hidrogênios metílicos H-9 e H-10, revelou também o acoplamento entre o carbono não-hidrogenado C-1 com os hidrogênios H-2, H-3 e 3H-7, além de outros acoplamentos conforme dados da Tab. 4, Pág. 29.

A geometria *cis* observada nas hidroxilas localizadas no C-1 e C-2 foi determinada através do experimento NOE (NUCLEAR OVERHAUSER EFFECT), onde observou-se aumento na intensidade dos sinais dos hidrogênios 3H-7 (δ_H 1,14), H $_{\beta}$ -6 (δ_H 1,60) e H-3 (δ_H 5,58) em consequência da interação com o H-2 (δ_H 3,90) irradiado, como podemos observar na (Fig. 12, Pág. 33).

O espectro de massas obtido a 70eV (Fig. 13, Pág. 34) apresentou o pico correspondente ao íon molecular em m/z 186 daltons ($M^{+\bullet}$), justificando a fórmula molecular ($C_{10}H_{18}O_3$). Os caminhos possíveis de fragmentação do composto (PHPR-1) no espectrômetro de massas encontram-se no (Quadro 5, Pág. 35).

Os dados apresentados para a substância PHPR-1 nos levaram a concluir que a mesma tratar-se de um monoterpene triidroxilado, *p*-ment-3-eno-1,2,8-triol, confirmado através da comparação dos dados de RMN ^{13}C com a sua forma acetilada no C-2 com registro na literatura⁴⁴ (Tab. 4, Pág. 29). Este composto está sendo isolado e identificado pela primeira vez como produto natural.

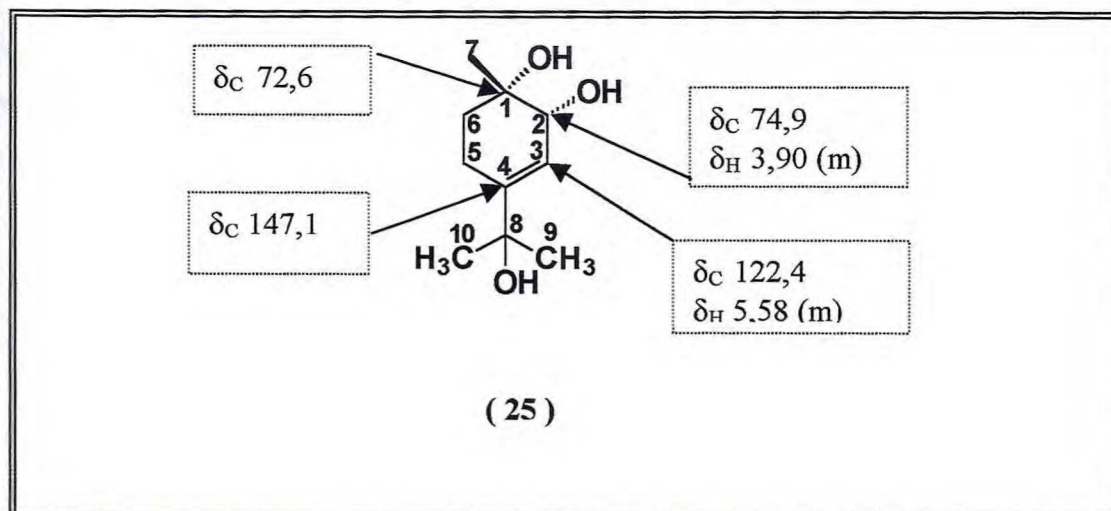


Tabela 4 - Dados de RMN ^1H e ^{13}C e correlações $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ [HMQC – $^1\text{J}_{\text{CH}}$ e HMBC – $^n\text{J}_{\text{CH}}$ ($n = 2$ e $n = 3$)] de PHPR-1 (25) em CD_3OD

$^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ – HMQC – $^1\text{J}_{\text{CH}}$			$^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ – HMBC- $^n\text{J}_{\text{CH}}$ ($n = 2$ e 3)		Ref. 44
C	δ_{C}	$\delta_{\text{H}}, \text{J}(\text{Hz})$	$^2\text{J}_{\text{CH}}$	$^3\text{J}_{\text{CH}}$	
1	72,6	-	H-2; 3H-7	H-3	69,0
2	74,9	3,90(m)	-	2H-6; 3H-7	74,7
3	122,4	5,58(m)	-	2H-5	122,4
4	147,1	-	H-3; 2H-5	2H-6; 3H-9; 3H-10	149,0
5	24,2	2,21(m); 2,10(m)	2H-6	H-3	25,4
6	34,8	1,70(m); 1,60(m)	2H-5	3H-7	32,2
7	21,5	1,14(s)	-	2H-6	22,4
8	73,0	-	3H-9; 3H-10	H-3; 2H-5	72,7
9	29,1	1,27(s)	-	-	28,8
10	29,2	1,27(s)	-	-	28,8

Figura 05 - Espectro de absorção na região do infravermelho (KBr) de PHPR-1

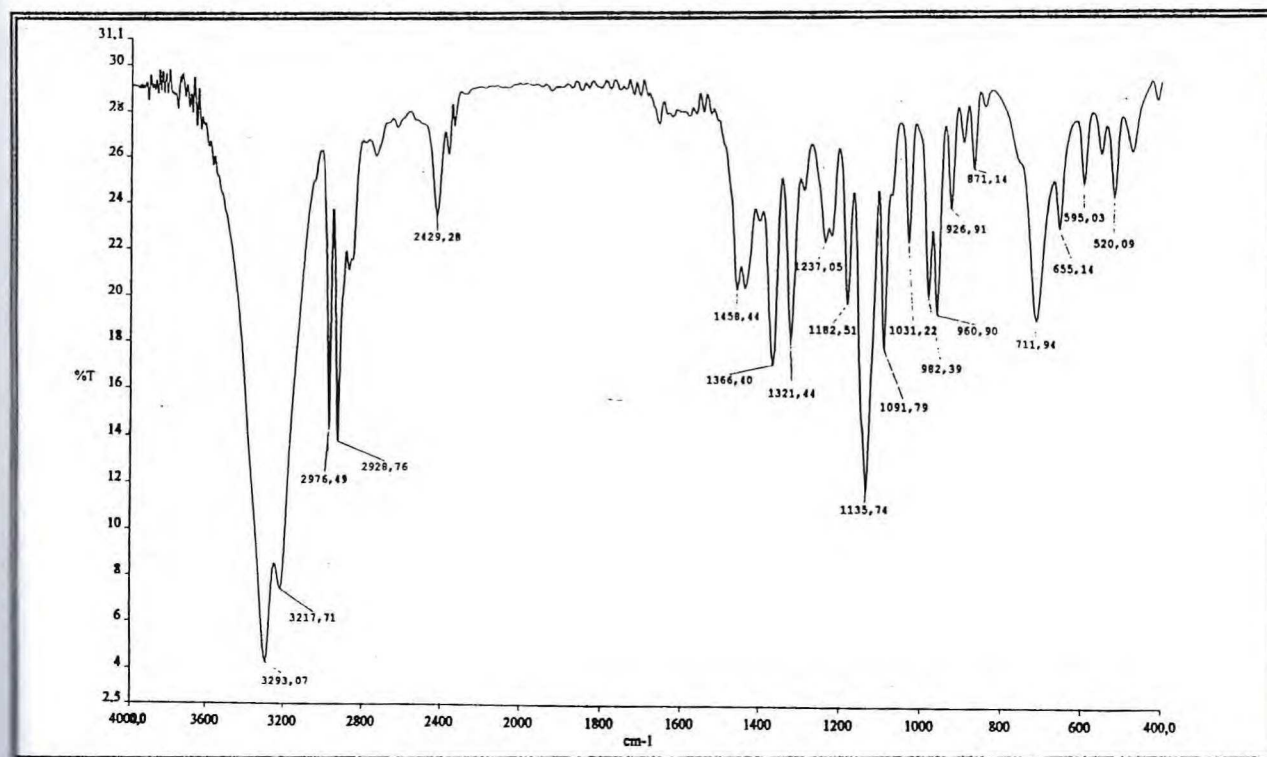
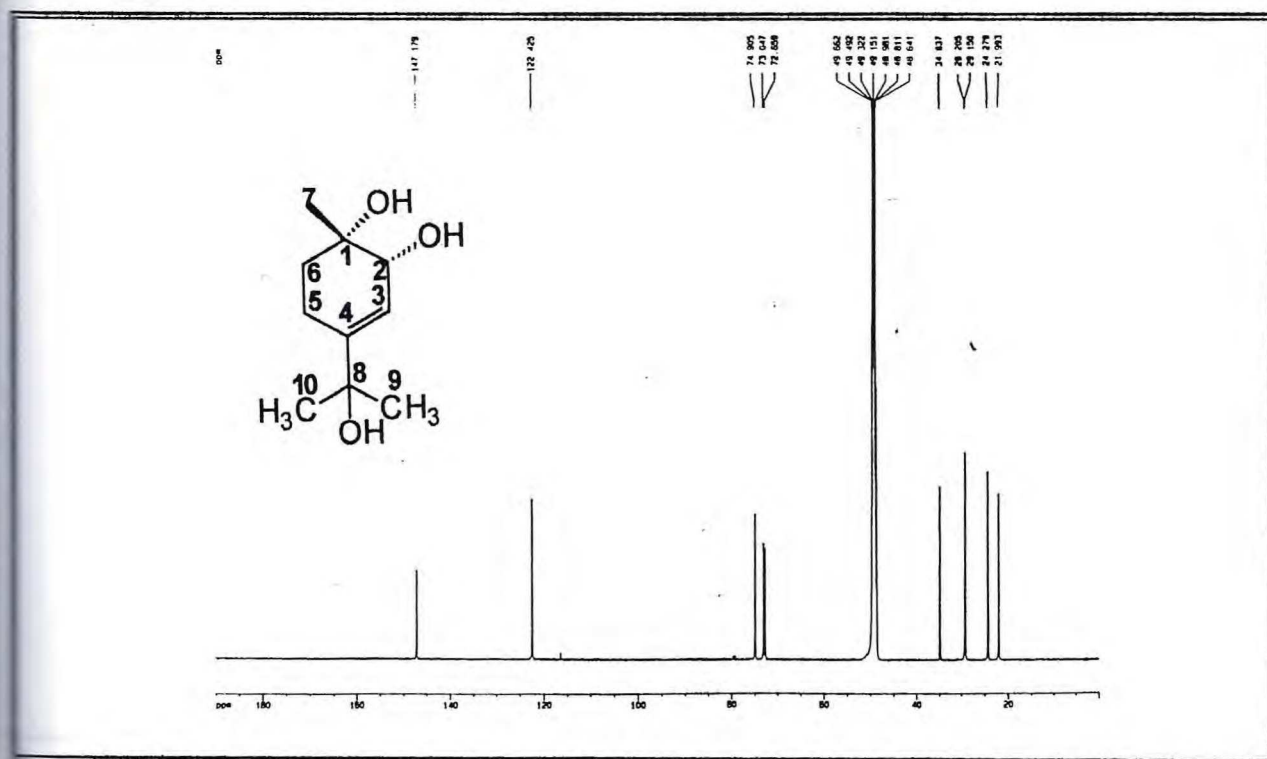
Figura 06 - Espectro de RMN ¹³C – BB (125 MHz, CD₃OD) de PHPR-1

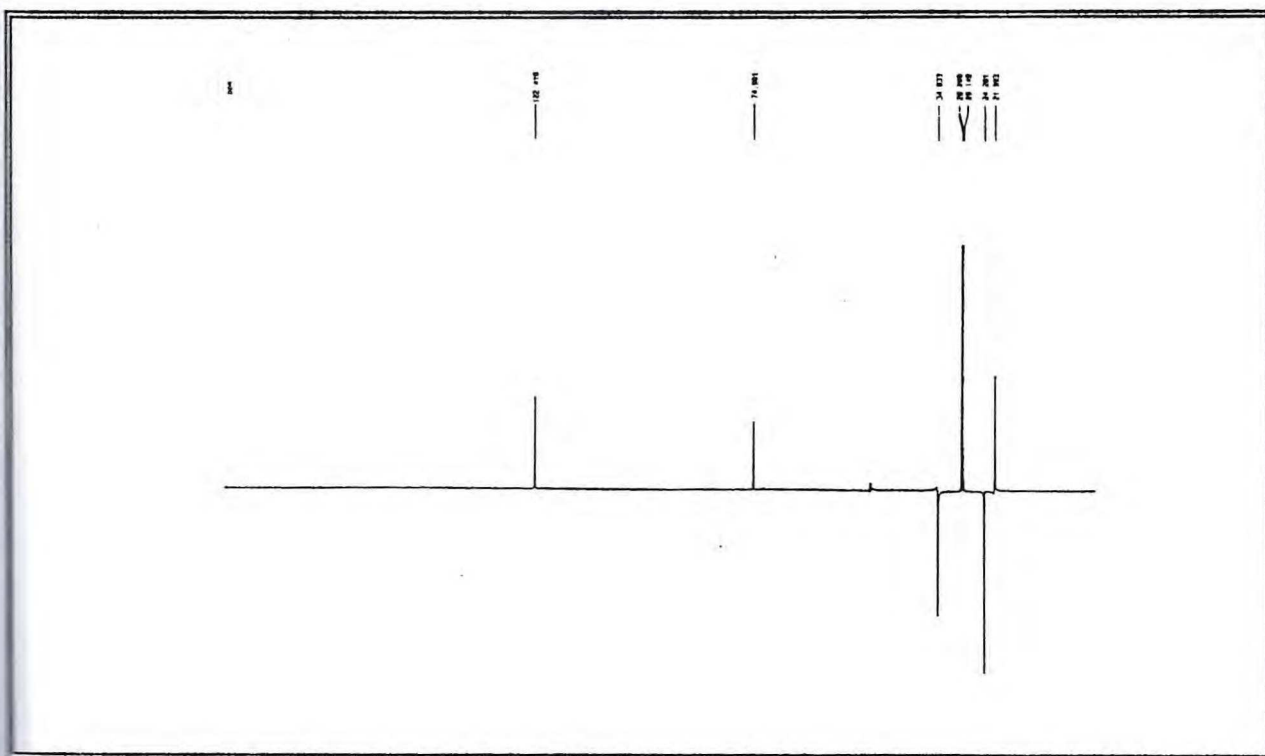
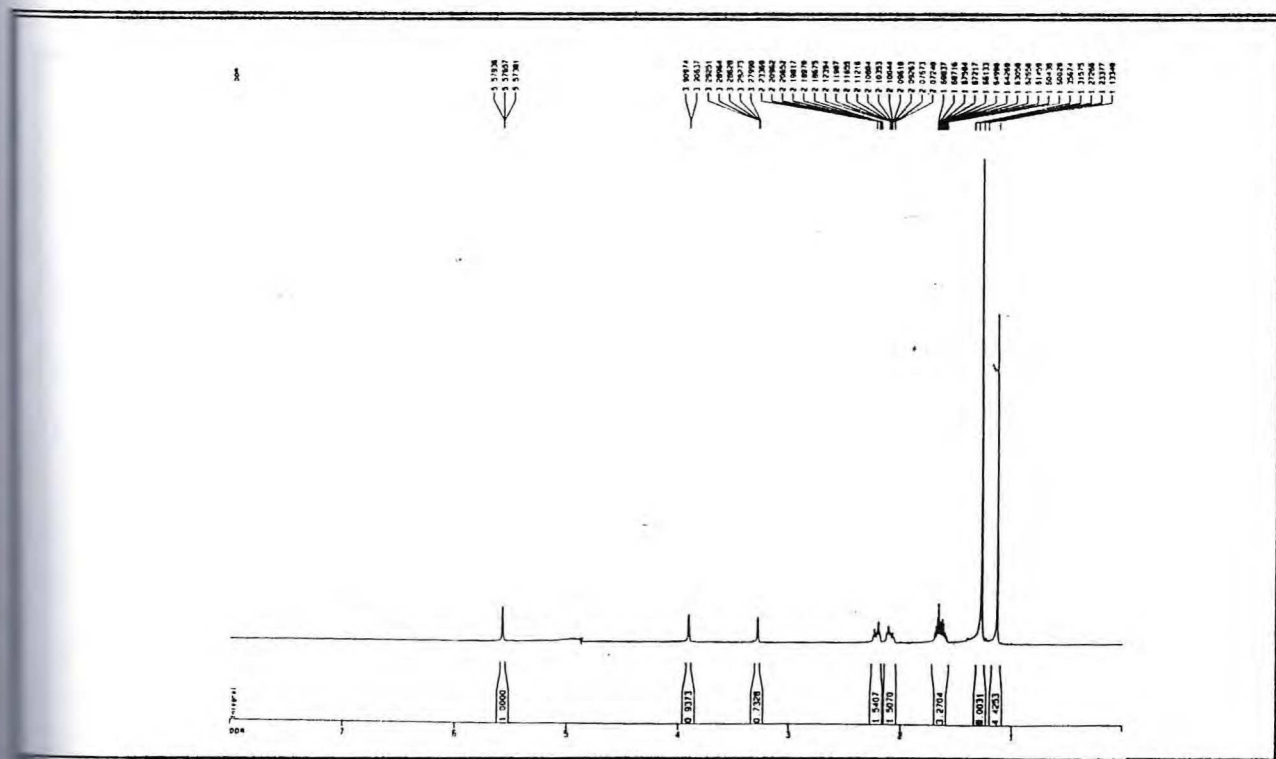
Figura 07 - Espectro de RMN ^{13}C – DEPT -135° (125 HHZ, CD_3OD) de PHPR-1Figura 08 - Espectro de RMN ^1H (500 MHz, CD_3OD) de PHPR-1

Figura 09 - Mapa de correlação homonuclear $^1\text{H} \times ^1\text{H}$ – COSY (300 MHz, CD_3OD) de PHPR-1

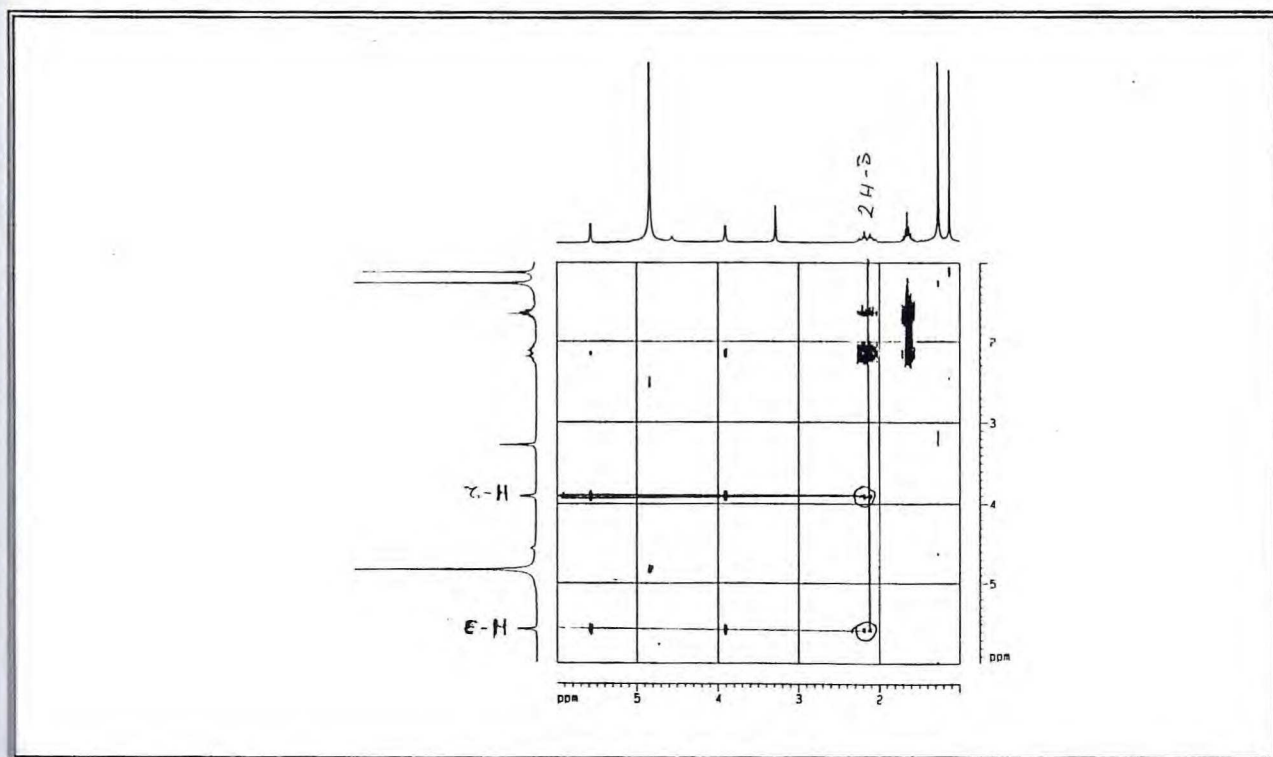


Figura 10 - Mapa de correlação heteronuclear $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ a uma ligação – HMQC (75 MHz, CD_3OD) de PHPR-1

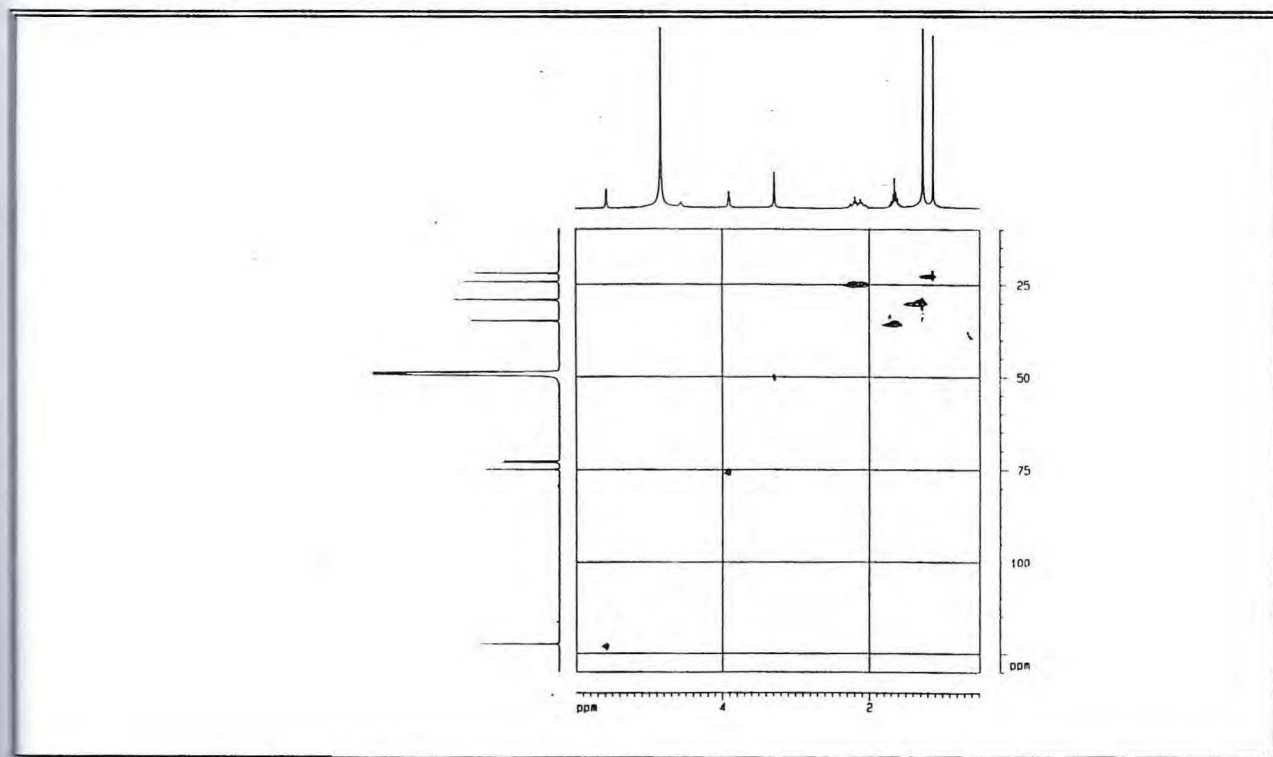


Figura 11 - Mapa de correlação heteronuclear $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ à mais de uma ligação - HMBC (75 MHz, CD_3OD) de PHPR-1

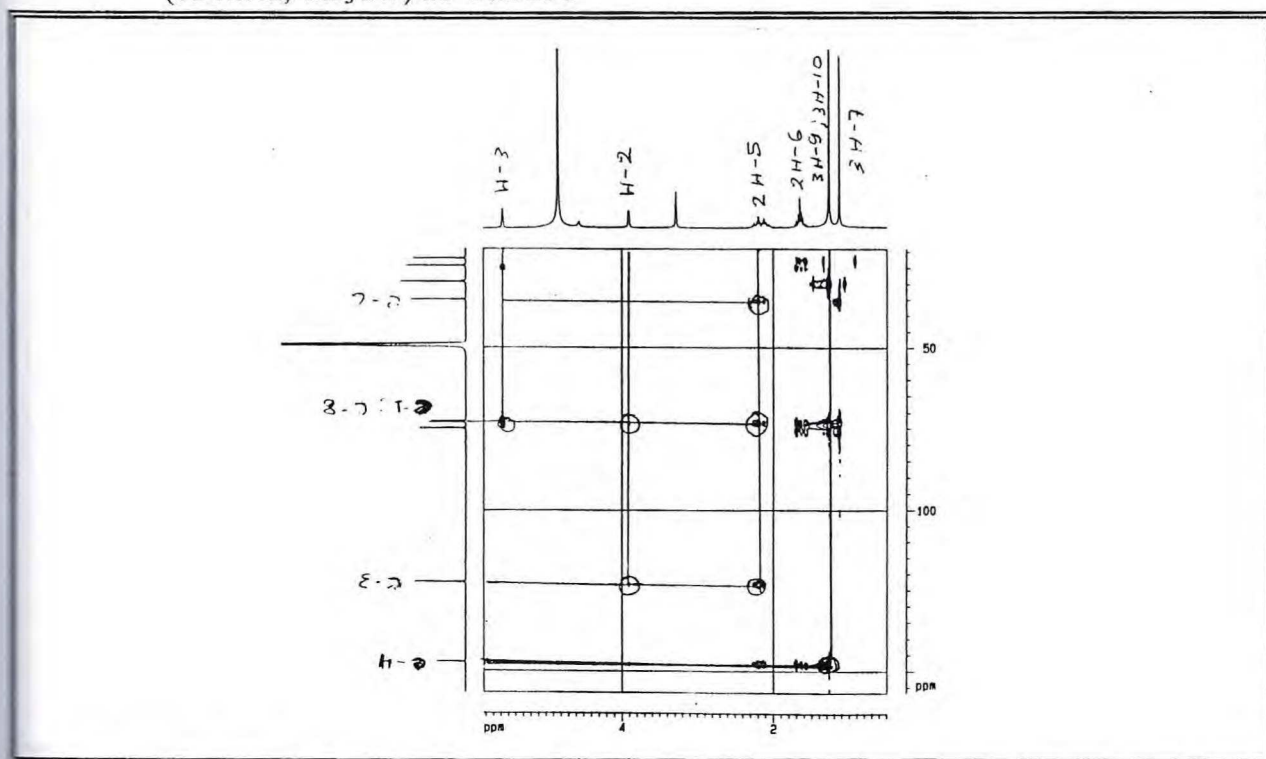


Figura 12 - Espectro de RMN de correlação homonuclear por interações dipolares (NOE) (300 MHz, CD_3OD) de PHPR-1

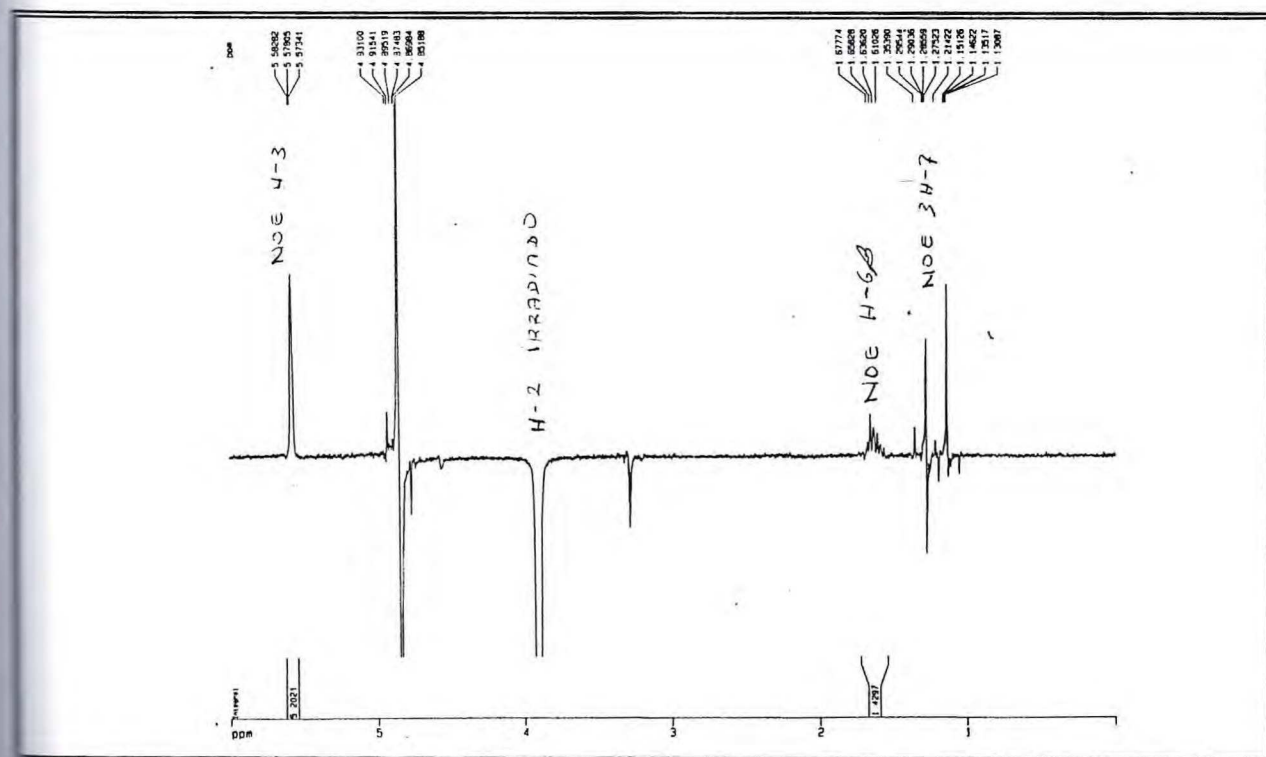
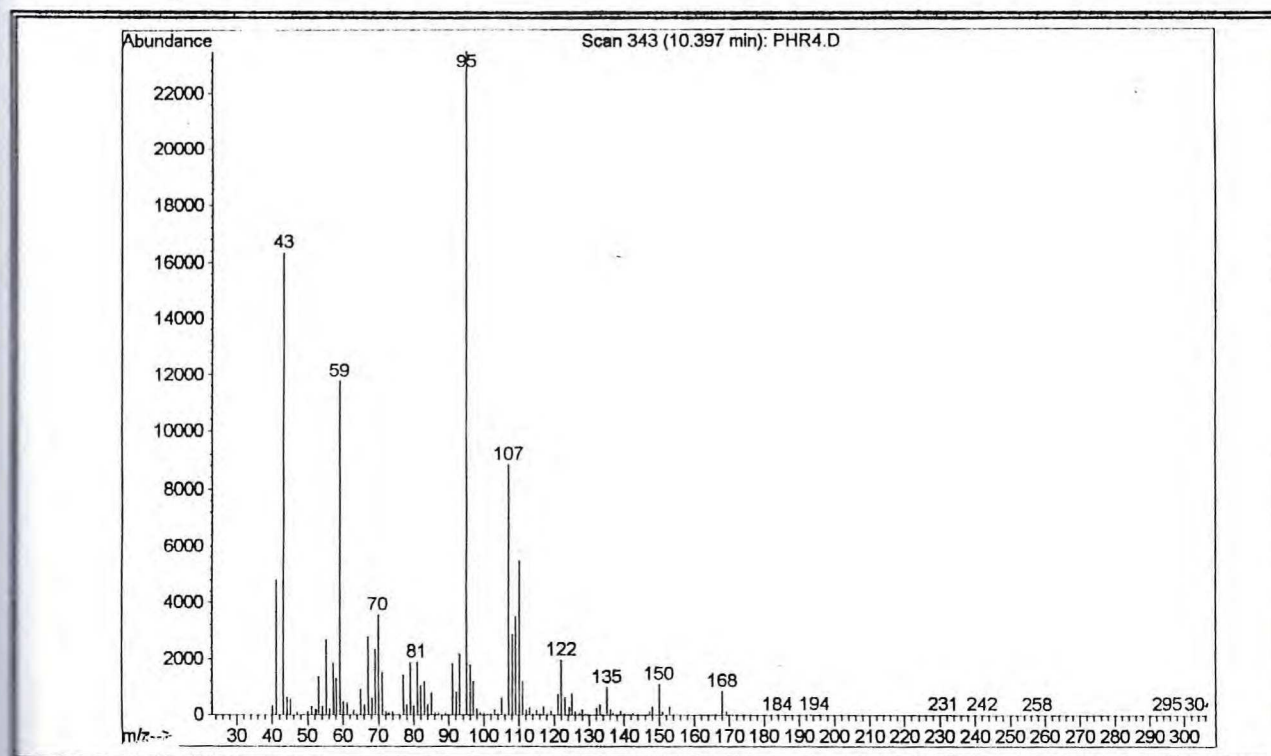


Figura 13 - Espectro de massas de PHPR-1



4.1.2. Determinação estrutural de [PHPR-2a (5) e PPHPR-2b (6)]

O tratamento cromatográfico da fração clorofórmica (5,2 g) da resina forneceu por eluição com AcOEt / Hex (1 : 1) item 8.5.3, Pág. 155, uma mistura binária de substâncias, amorfa, branca, solúvel em clorofórmio, com faixa de fusão 179,5 – 181,0°C, codificada de [PHPR-2a e PPHPR-2b].

O espectro de absorção na região do infravermelho da mistura binária [PPHPR-2a e PPHPR-2b] (Fig. 14, Pág. 41) exibiu bandas em 3307 cm^{-1} correspondente a vibrações de deformação axial de O-H, em 1460 cm^{-1} característica de vibrações de deformação angular de C-H em ciclohexano, em 1383 cm^{-1} típica de vibrações de deformação angular de C-H de grupo metilas e em 1035 cm^{-1} correspondente a vibrações de deformação axial de C-O⁴³.

O número de linhas espectrais revelado pelo espectro de RMN ¹³C totalmente desacoplado (BB = Broad Band) (Fig. 15, Pág. 41), com auxílio do espectro de RMN ¹³C-DEPT (Distortioless Enhancement by Polarization Transfer, $\theta = 135^\circ$ (Fig. 16, Pág. 42), foi possível observar a presença de dezenove grupos metilênicos, doze grupos metínicos, dezesseis grupos metilas e treze átomos de carbonos não-hidrogenados, sugerindo uma mistura triterpênica.

Os triterpenos pertencentes as séries urs-12-eno e oleano-12-eno podem ser distinguidos pela posição dos deslocamentos químicos dos C-12 e C-13, onde na série ursano, C-12 é desprotegido algo em torno de 2 ppm e o C-13 é protegido algo em torno de 5 ppm com relação aos C-12 e C-13 da série oleano. Esta diferença é atribuída a metila em posição equatorial no C-19. Outro carbono que mostra grande diferença na sua posição na escala de deslocamento químico entre as duas séries é o C-18, cuja posição na série oleano está mais protegido algo em torno de 11,5 ppm, devido ao efeito protetor da metila axial no C-20 que apresenta uma disposição γ gauche em relação ao C-18²⁸.

Observando-se o espectro de RMN ¹³C, conforme dados na Tab. 5, Pág. 39, as posições na escala de deslocamento químico relativas a quatro linhas espectrais na região característica de carbono olefínico, conclui tratar-se de uma mistura binária de triterpenos pertencentes as séries urs-12-eno e oleano-12-eno, o que também é confirmada pelos valores de deslocamento químico no C-18. A linha espectral em δ_C 79,1 é característica de carbono

carbinólico, a sua alta intensidade sugere que a mesma pode ser atribuída a dois átomos de carbonos reforçando a proposição de uma mistura binária de triterpenos.

O espectro de RMN ^1H (Fig. 17, Pág. 42) mostrou um conjunto de sinais na região de δ_{H} 0,8 a 2,0 revelando o caráter triterpênico da mistura, já referendada no espectro de RMN ^{13}C . Revelou também através da integração, que o sinal em δ_{H} 3,23 (dd, $J = 10,4$ Hz e $5,0$ Hz) corresponde a um átomo de hidrogênio ligado a carbono carbinólico. Mostrou ainda por meio do valor da integração, a presença de um átomo de hidrogênio olefinico. O conjunto de dados apresentados até aqui permitem concluir que a mistura [PHPR-2a e PHPR-2b] é constituída das substâncias triterpênicas identificadas como α -amirina e β -amirina, pertencentes as séries ursano e oleano respectivamente, Pág. 38.

O mapa de correlação homonuclear $^1\text{H} \times ^1\text{H} - \text{COSY}$ (Fig. 18, Pág. 43) evidenciou de forma clara os acoplamentos entre o hidrogênio metínico H-12 em δ_{H} 5,10 (1H, t, $J = 3,6$ Hz) de C-sp² com os hidrogênios metilênicos 2H-11, o acoplamento entre o hidrogênio metínico H-9 em δ_{H} 1,57 (1H) de C-sp³ com os hidrogênios metilênicos 2H-11, revelou também os acoplamentos axial-axial com $J = 10,4$ Hz e equatorial-axial com $J = 5,0$ Hz entre os hidrogênios metilênicos 2H-2 e o hidrogênio metínico H-3, cujas constantes de acoplamentos são compatíveis com um anel ciclo hexânico apresentando o hidrogênio no C-3 na posição axial e a hidroxila na posição equatorial, em acordo com a estrutura dos compostos α -amirina e β -amirina.

O mapa de correlação heteronuclear HMQC ($^1\text{J}_{\text{CH}}$) (Fig. 19, Pág. 43) com detecção no canal de hidrogênio permitiu associar as absorções dos hidrogênios olefinicos e dos hidrogênios do carbono carbinólico, além de outros conforme Tab. 5, Pag. 39. Já o mapa de correlação heteronuclear a longa distância HMBC ($^n\text{J}_{\text{CH}}$, $n = 2$ e $n = 3$) (Fig. 20, Pág. 44) nos auxiliou nas atribuições dos deslocamentos químicos, revelando além de outros o acoplamento entre os C-23, C-24 e C-4 com o H-3, conforme Tab. 6, Pág. 40. Os dados apresentados para a PHPR-2a e PHPR-2b levaram a proposição de que a mistura é constituída das substâncias α -amirina e β -amirina com registro na literatura da espécie em estudo¹⁶.

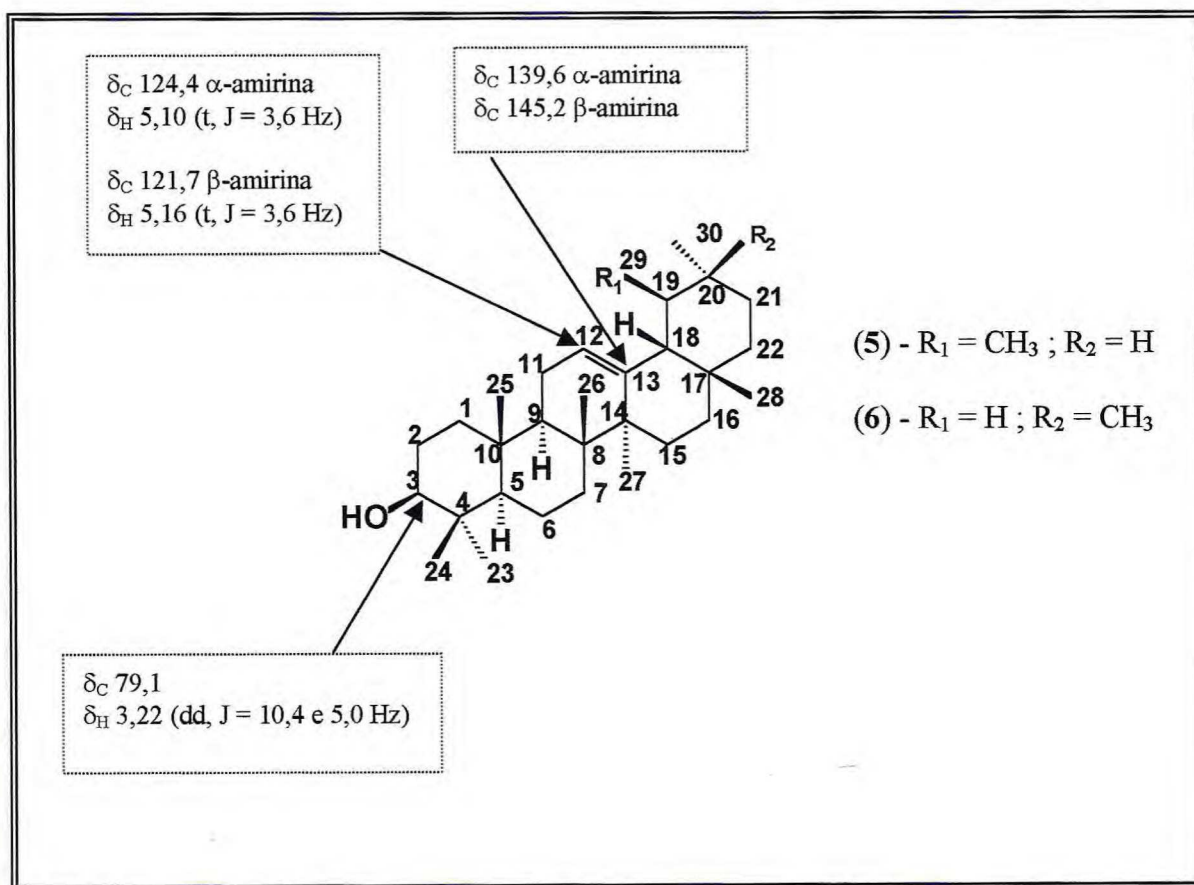


Tabela 5 - Dados de RMN ^1H e ^{13}C de [P H P R - 2 a (5) e P H P R - 2 b (6)] em CDCl_3
 $^1\text{H} \times ^{13}\text{C} - \text{HMQC} - ^1\text{J}_{\text{CH}}$

PHPR-2a			PHPR-2b			Ref. 28	
C	δ_{C}	$\delta_{\text{H}}, \text{J(Hz)}$	δ_{C}	$\delta_{\text{H}}, \text{J(Hz)}$			
1CH ₂	38,8	1,66 ; 1,00	38,6	1,06 ; 1,05		38,7	38,7
2CH ₂	27,3	-	27,3	-		27,2	27,3
3CH	79,1	3,22(dd, J=10,4 e 5,0)	79,1	3,23(dd, J=10,4 e 5,0)		79,3	79,0
4C	38,8	-	38,8	-		38,7	38,8
5CH	55,2	-	55,2	-		55,2	55,3
6CH ₂	18,4	1,60 ; 1,30	18,4	1,60 ; 1,30		18,3	18,5
7CH ₂	32,9	-	32,6	-		32,9	32,8
8C	40,0	-	39,8	-		40,0	38,8
9CH	47,7	1,57	47,6	1,53		47,7	47,7
10C	36,9	-	36,9	-		36,9	37,6
11CH ₂	23,4	-	23,5	-		23,3	23,6
12CH	124,4	5,10(t, J=3,6)	121,7	5,16(t, J=3,6)		124,3	121,8
13C	139,6	-	145,2	-		139,3	145,1
14C	42,1	-	41,7	-		42,0	41,8
15CH ₂	28,1	-	26,1	-		28,7	26,2
16CH ₂	26,6	-	26,9	-		26,6	27,0
17C	33,8	-	32,5	-		37,7	32,5
18CH	59,1	1,32	47,2	1,95		58,9	47,4
19	39,7	1,32	46,8	1,70 ; 1,03		39,6	46,9
20	39,6	0,92	31,1	-		39,6	31,1
21CH ₂	31,3	-	34,7	-		31,2	34,8
22CH ₂	41,5	1,45 ; 1,29	37,1	-		41,5	37,2
23CH ₃	28,1	-	28,1	-		28,1	28,2
24CH ₃	15,6	-	15,5	-		15,6	15,5
25CH ₃	15,7	-	15,6	-		15,6	15,6
26CH ₃	16,9	-	16,8	-		16,8	16,9
27CH ₃	23,3	1,05(s)	26,0	1,12(s)		23,3	26,0
28CH ₃	28,8	0,78(s)	28,4	0,81(s)		28,1	28,4
29CH ₃	17,5	0,77(d)	33,4	-		17,4	33,3
30CH ₃	21,4	0,91(d, J = 6,1)	23,7			21,3	23,7

19CH e 20CH = α -amirina; 19CH₂ e 20C = β -amirina

Tabela 6 - Correlações de $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ [HMBC – $^n\text{J}_{\text{CH}}$ ($n=2$ e $n=3$) de PHPR-2a (5) e PHPR-2b (6) em CDCl_3

$^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ – HMBC – $^n\text{J}_{\text{CH}}$ ($n=2$ e 3)

PHPR-2a			PHPR-2b	
C	$^2\text{J}_{\text{CH}}$	$^3\text{J}_{\text{CH}}$	$^2\text{J}_{\text{CH}}$	$^3\text{J}_{\text{CH}}$
1	-	H-3	-	H-3
3	-	3H-23; 3H-24	-	3H-23; 3H-24
5	-	3H-23; 3H-24; 3H-25	-	3H-23; 3H-24; 3H-25
9	-	-	-	H-12
11	H-12	-	H-12	-
12	-	-	-	-
13	-	3H-27	-	3H-27
14	-	H-12	-	H-12
18	-	H-12	-	-
23	-	H-3	-	H-3
24	-	H-3	-	H-3

Figura 14 - Espectro de absorção na região do infravermelho (KBr) de [PHPR-2a e PHPR-2b]

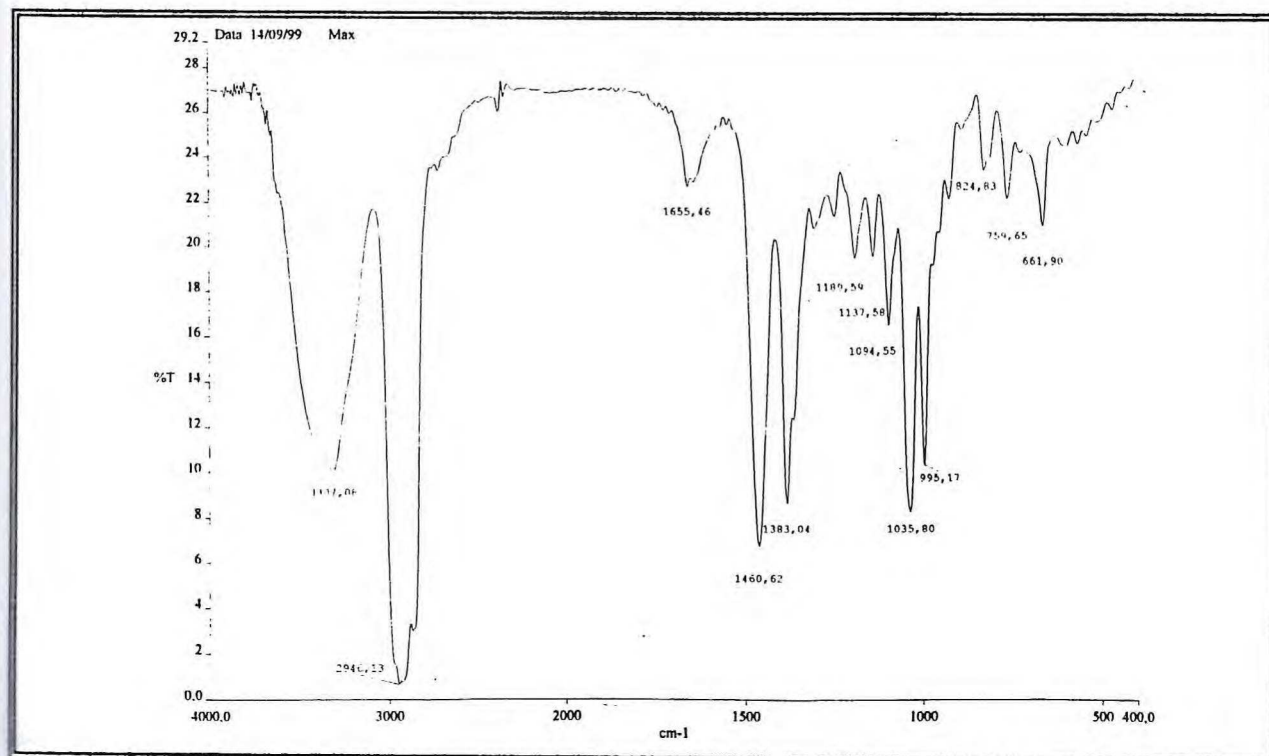
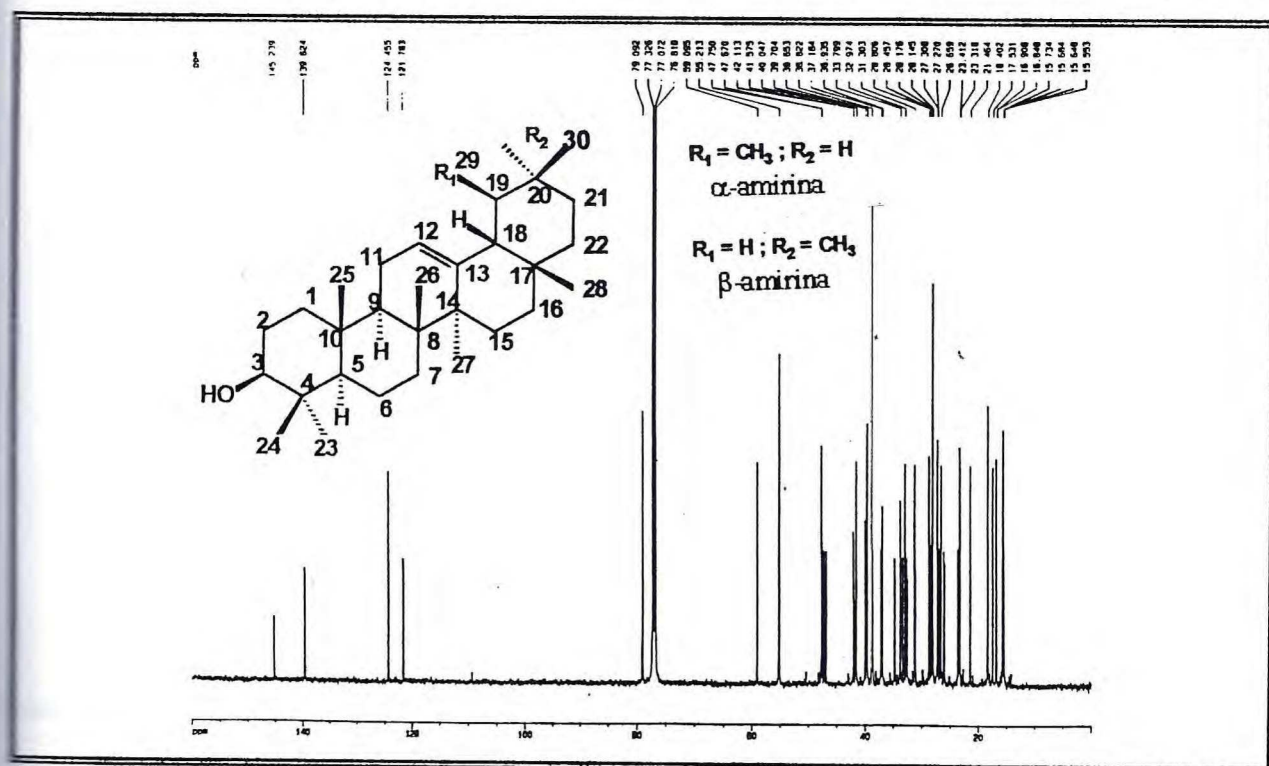
Figura 15 - Espectro de RMN ¹³C – BB (125 MHz, CDCl₃) de [PHPR-2a e PHPR-2b]

Figura 18 - Mapa de correlação homonuclear $^1\text{H} \times ^1\text{H}$ – COSY (300 MHz, CDCl_3) de [PHPR-2a e PHPR-2b]

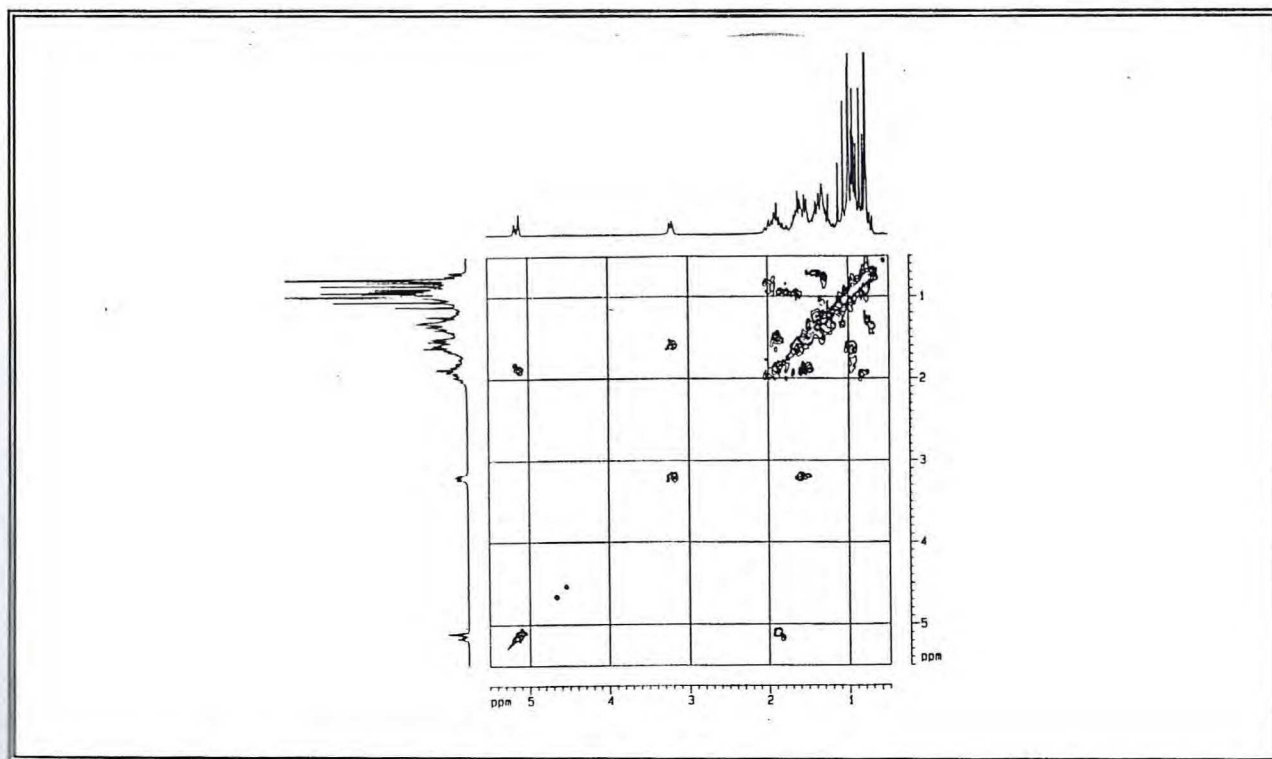


Figura 19 - Mapa de correlação heteronuclear $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ à uma ligação – HMQC (75 MHz, CDCl_3) de [PHPR-2a e PHPR-2b]

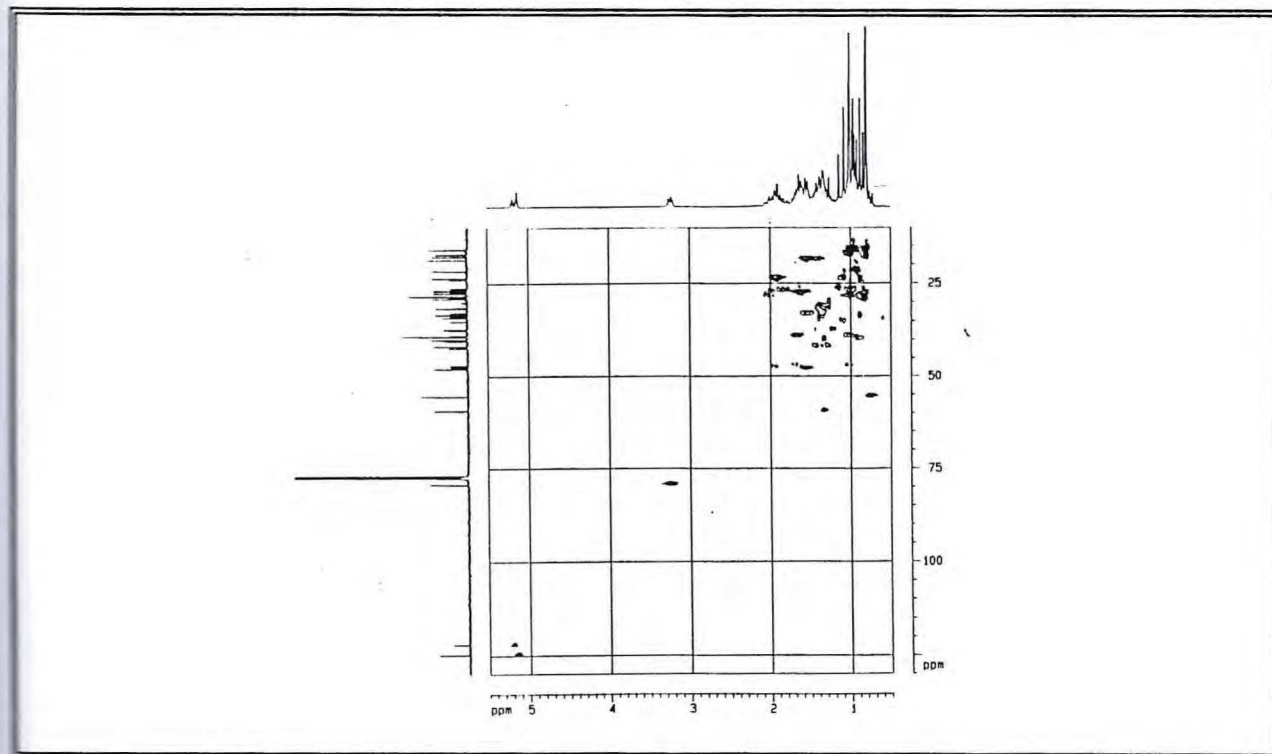
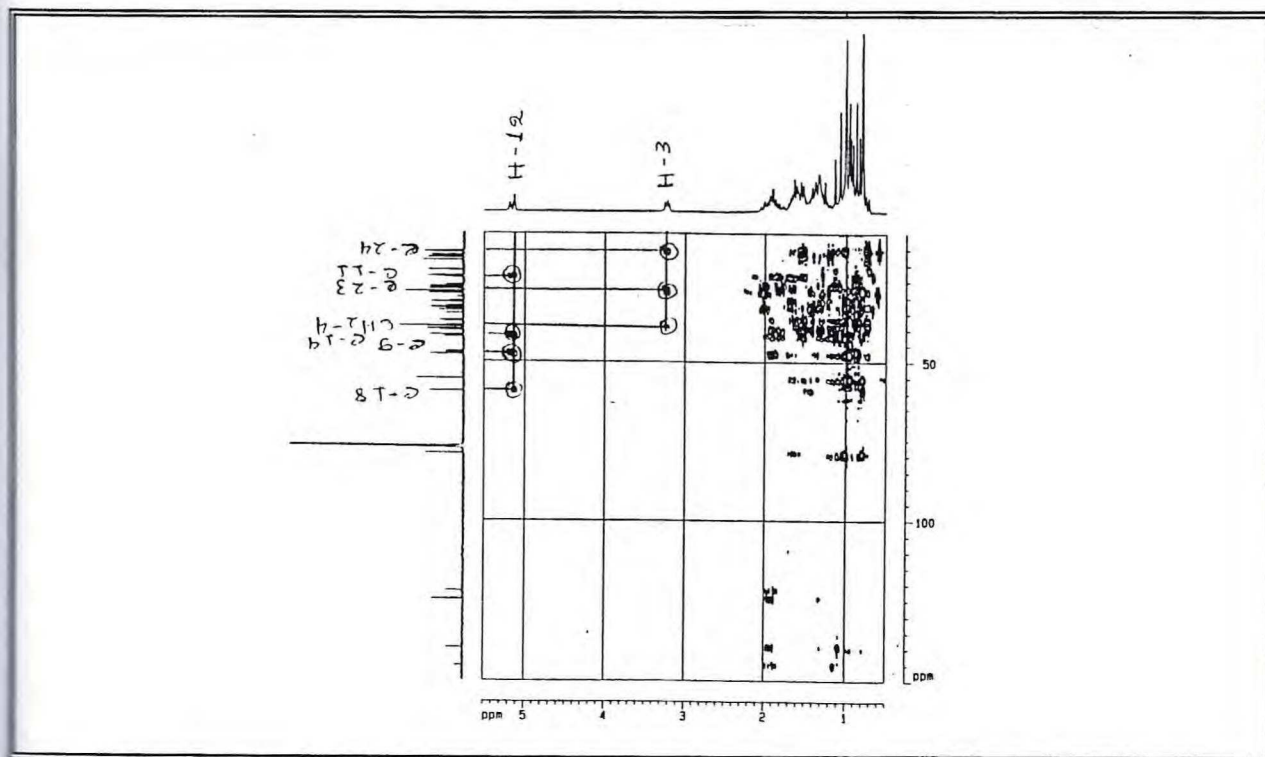


Figura 20 - Mapa de correlação heteronuclear $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ à mais de uma ligação – HMBC (75 MHz, CDCl_3) de [PHPR-2a e PHPR-2b]



4.1.3. Determinação estrutural de PHPR-3 (7)

O tratamento cromatográfico da fração clorofórmica da resina (5,2 g) forneceu por eluição com AcOEt / Hex. (1: 1) item 8.5.3, pág. 155, uma substância amorfa, branca, solúvel em clorofórmio, com faixa de fusão 217 - 219°C e rotação ótica específica $[\alpha]_D^{20} = + 61^\circ$ (c, 0,2 em CHCl_3).

O espectro de RMN ^{13}C totalmente desacoplado (BB = Broad Band) (Fig. 21, Pág. 49) mostrou trinta linhas espectrais, cuja maioria encontra-se na escala de deslocamento químico entre δ_{C} 15,6 e 40,0. Já o espectro de RMN ^1H (Fig. 22, Pág. 49) apresentou sete sinais simples na região de δ_{H} 0,74 a 2,00 o que revela o caráter triterpênico do composto.

Observou-se no espectro de RMN ^{13}C dois sinais característicos de C-sp^2 olefinico em δ_{C} 125,1 e 138,0 compatíveis com carbonos com dupla trissubstituída pertencentes a série urs-12-eno²⁸. Revelou ainda dois sinais característicos de CH carbinólicos com valores na escala de deslocamento químico em δ_{C} 79,0 e 67,1, que nos levou a postular para PHPR-3 a estrutura de um triterpeno pertencente a série ursano diidroxilado. O espectro de RMN ^{13}C – DEPT (Fig. 23, Pág. 50) associado ao espectro de RMN ^{13}C revelou oito sinais correspondentes a carbonos metilênicos, oito sinais de carbonos metínicos, sendo um δ_{C} 125,1 típico de C-sp^2 , dois sinais de carbonos carbinólicos (C-sp^3) em δ_{C} 79,0 e 67,1, oito sinais de carbonos metílicos, seis sinais referentes a carbonos não-hidrogenados, dentre os quais um sinal em δ_{C} 138,0 de C-sp^2 .

O espectro de RMN ^1H (Fig. 22, Pág. 49) mostrou ainda um sinal em δ_{H} 3,20 (1H, dd, $J = 11,3\text{Hz}$ e $5,0\text{Hz}$) cujos valores das constantes de acoplamento são compatíveis com acoplamento axial-axial e equatorial-axial respectivamente, típico de um sistema ciclohexânico. Um sinal em δ_{H} 4,20 (1H, dd, $J = 11,4\text{ Hz}$ e $5,1\text{ Hz}$), cujos valores de J expressam o acoplamento axial-axial e equatorial-axial respectivamente, característicos de um sistema ciclohexânico. As absorções em δ_{C} 125,1 e 138,0 são compatíveis com o esqueleto ursano em acordo com o espectro de RMN ^1H que registrou a presença de hidrogênio olefinico em δ_{H} 5,17 δ (t, $J = 3,6\text{ Hz}$) e com o mapa de correlação homonuclear $^1\text{H} \times ^1\text{H}$ – COSY (Fig. 24, Pág. 50), que revelou os acoplamentos entre H-12 (olefinico) e 2H-11 (metilênicos) .

Através do mapa de correlação heteronuclear HMQC ($^1J_{\text{CH}}$) (Fig. 25, Pág. 51) foi possível confirmar as atribuições de deslocamentos químicos, permitindo associar de forma

convincente importantes absorções de hidrogênios olefinico em δ_H 5,17 (t, $J = 3,6$ Hz), hidrogênio de carbono carbinólico em δ_H 3,20 (dd, $J = 11,3$ Hz e $5,17$ Hz) e δ_H 4,20 (dd, $J = 11,4$ Hz e $5,1$ Hz) com os átomos de carbono em δ_C 125,1 , 79,0 e 67,1 respectivamente, bem como dos hidrogênios em δ_H 1,49 (H-9), 0,71 (H-5, d, $J = 11,9$ Hz e 1,50 (H-18) com os átomos de carbono em δ_C 46,8 , 55,2 e 60,7 respectivamente, mostrado na Tab. 7, Pág. 48.

O mapa de correlação a longa distância HMBC ($^nJ_{CH}$, $n=2$ e $n=3$) (Fig. 26, Pág. 51) nos auxiliou nas atribuições dos deslocamentos químicos dos átomos de carbono, principalmente aos não-hidrogenados, revelando de forma clara o acoplamento entre o carbono não-hidrogenado (C-14) e o carbono hidrogenado (C-18) com H-12, além de outros acoplamentos, conforme pode ser visto na Tab. 7, Pág. 48. Esta substância já foi estudada nesta espécie¹⁶.

Embora não tenhamos apresentado estudo de absorção na região do infravermelho, como um dado adicional na identificação, a literatura registra absorções referentes ao composto em 3333 cm^{-1} característica de vibração de deformação axial de OH, 2941 cm^{-1} referente a deformação axial de C-H, 1036 cm^{-1} típica de vibração de deformação axial de C-O, além de absorções em 1000 e 675 cm^{-1} .⁴⁶

O conjunto de dados expostos até aqui, segundo a Tab. 7, Pág. 48, comparados aos dados de RMN registrados na literatura⁴⁵, permitem concluir que o composto PHPR-3 é um triterpeno da série ursano identificado como $3\beta,16\beta$ -diidroxí-urs-12-eno (breina) Pág. 47.

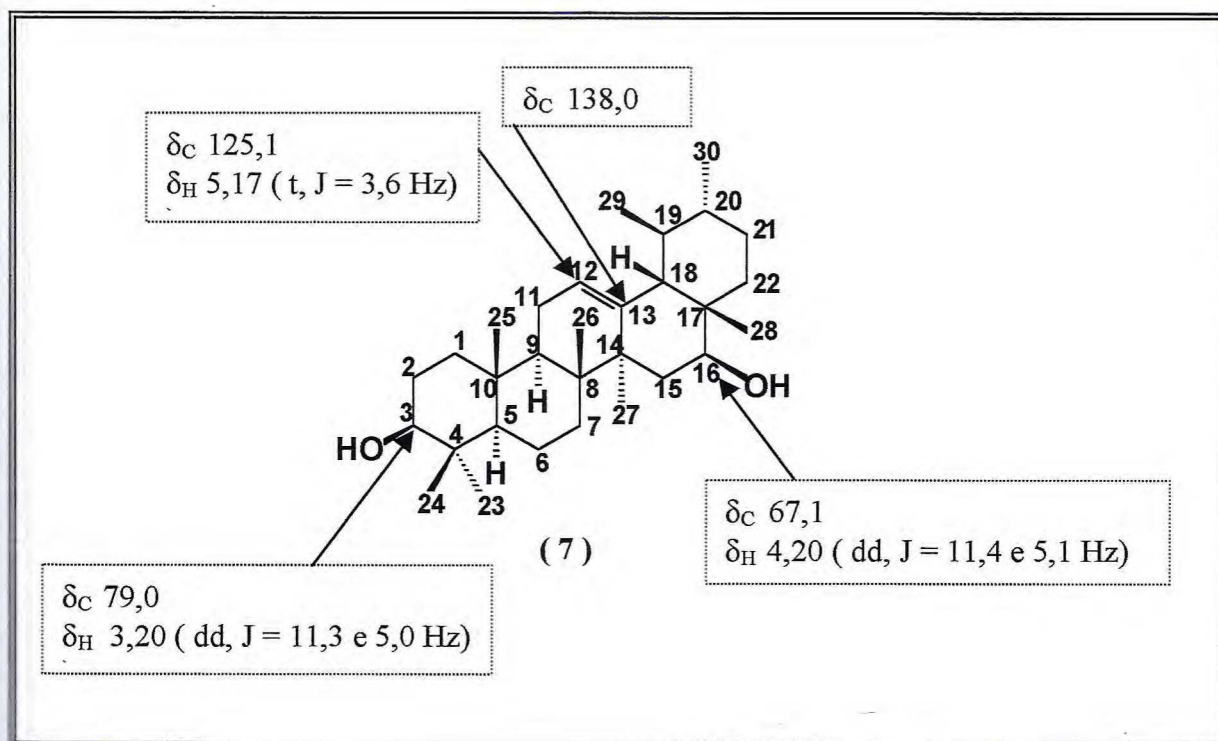


Tabela 7 - Dados de RMN ^1H e ^{13}C e correlações $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ [HMQC – $^1\text{J}_{\text{CH}}$ e HMBC – $^n\text{J}_{\text{CH}}$ ($n=2$ e $n=3$)] de PHPR-3 (7) em CDCl_3

$^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ – HMQC – $^1\text{J}_{\text{CH}}$			$^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ – HMBC – $^n\text{J}_{\text{CH}}$ ($n=2$ e 3)		Ref. 45
C	δ_c	δ_h J (Hz)	$^2\text{J}_{\text{CH}}$	$^3\text{J}_{\text{CH}}$	
1CH ₂	38,8	1,63 ; 0,98	-	3H-25	38,7
2CH ₂	27,1	1,60 ; 1,20	-	-	27,2
3CH	79,0	3,20(dd, J = 11,3 e 5,0)	-	3H-23; 3H-24	78,9
4C	38,8	-	3H-23; 3H-24; H-5	2H-6	38,7
5CH	55,2	071(d, J = 11,9)	-	3H-23; 3H-24; 3H-25	55,6
6CH ₂	18,3	1,52 ; 1,32	-	-	18,9
7CH ₂	32,9	1,52 ; 1,35	-	3H-26	32,8
8C	40,0	-	3H-26	3H-27	40,1
9CH	46,8	1,49	-	3H-25; 3H-26	46,9
10C	36,8	-	3H-25	-	36,1
11CH ₂	23,4	1,90	-	-	23,4
12CH	125,1	5,17(t, J = 3,6)	2H-11	H-18	125,0
13C	138,0	-	-	3H-27; H-16; H-15b	137,5
14C	40,0	-	3H-27; H-15b	H-12; 3H-26; H-18	44,0
15CH ₂	35,9	1,70 ; 1,30	-	3H-27	35,9
16CH	67,1	4,20(dd, J = 11,4 e 5,1)	2H-15	3H-28; H-18	67,0
17C	47,0	-	-	-	38,5
18CH	60,7	1,50	-	3H-28; 3H-29; H-12	60,6
19CH	39,5	1,32	-	-	39,5
20CH	39,5	1,32	-	-	39,4
21CH ₂	30,5	1,42 ; 1,24	-	-	30,5
22CH ₂	35,2	1,99 ; 1,05	-	3H-28	35,1
23CH ₃	28,1	0,98(s)	-	H-3; 3H-24	28,0
24CH ₃	17,6	0,77(s)	-	H-3; 3H-23	15,5
25CH ₃	15,6	0,91(s)	-	H-5	15,6
26CH ₃	16,9	1,00(s)	-	-	16,8
27CH ₃	24,5	1,13(s)	-	-	24,5
28CH ₃	21,9	0,75(s)	-	H-16	21,9
29CH ₃	15,7	0,76(d, J = 6,0)	-	-	17,6
30CH ₃	21,4	0,92	-	-	21,3

Figura 23 - Espectro de RMN ^{13}C – DEPT - 135° (125 MHz, CDCl_3) de PHPR-3

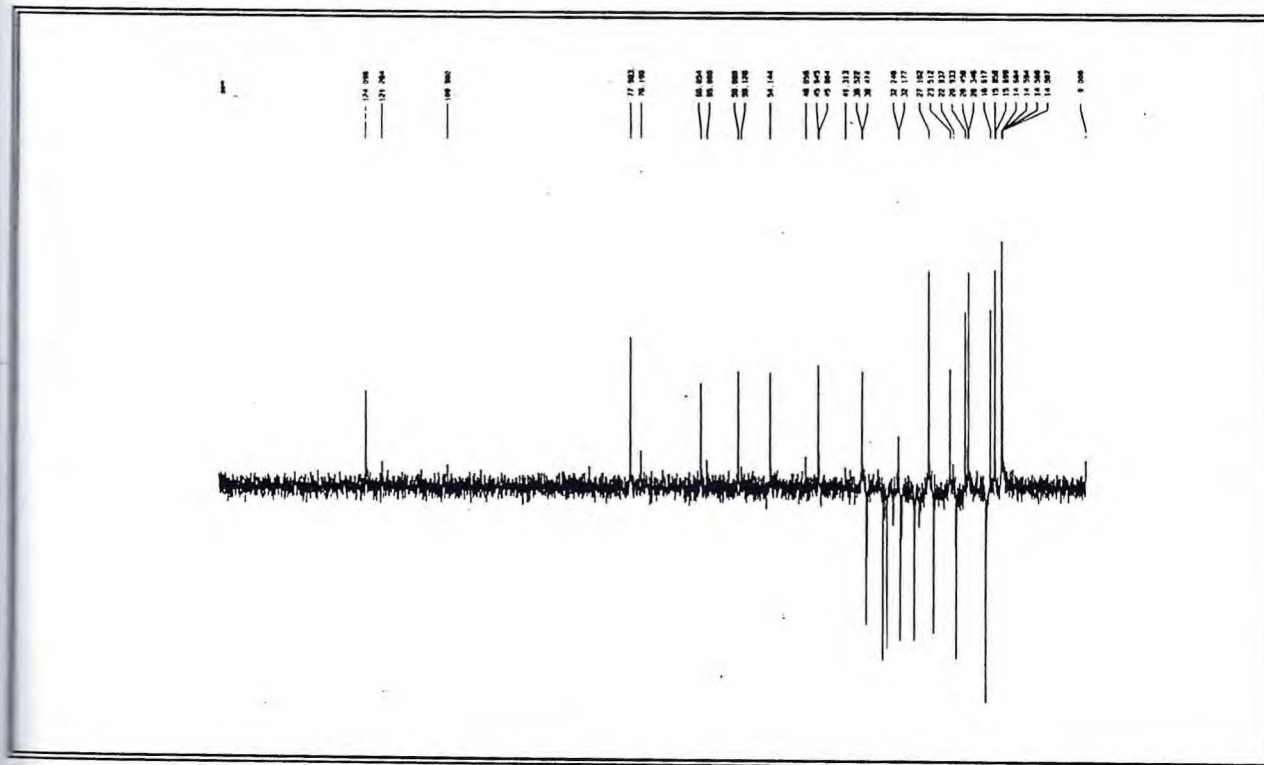


Figura 24 - Mapa de correlação homonuclear $^1\text{H} \times ^1\text{H}$ – COSY (300 MHz, CDCl_3) de PHPR-3

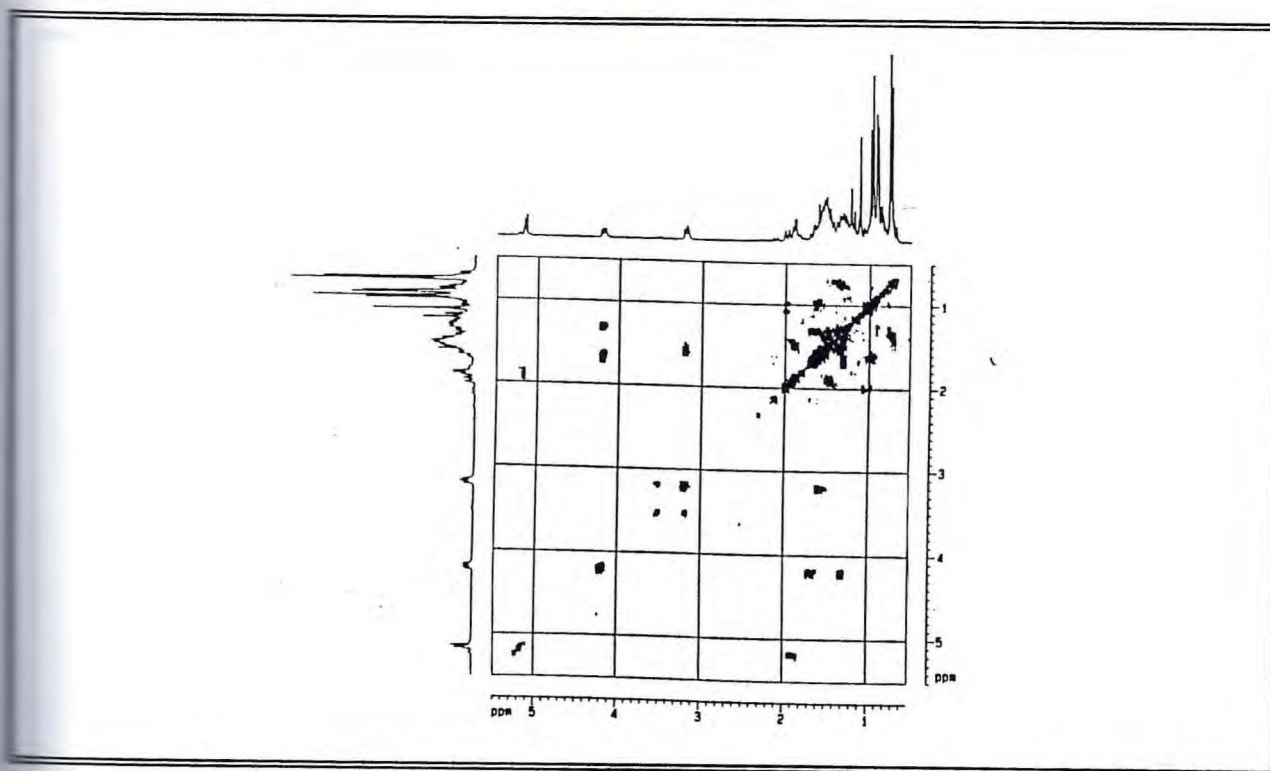


Figura 25 - Mapa de correlação heteronuclear $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ à uma ligação – HMQC (75 MHz, CDCl_3) de PHPR-3

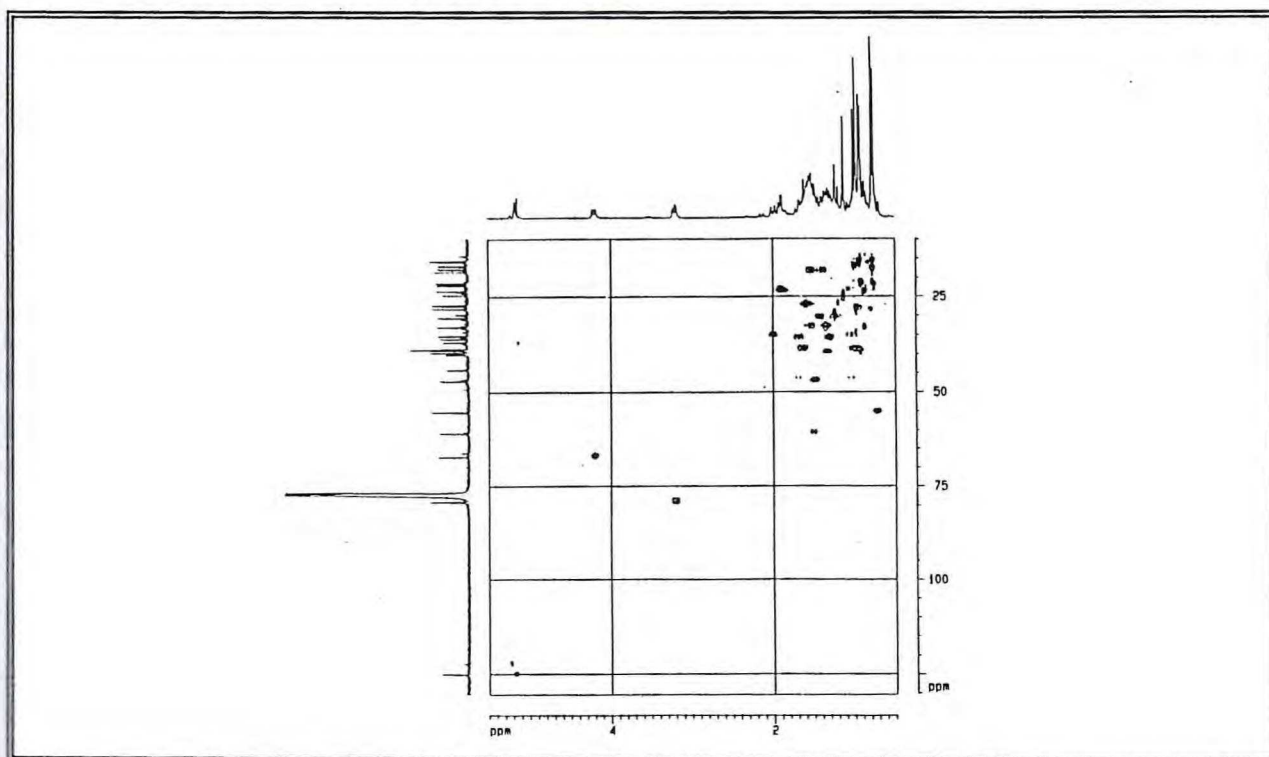
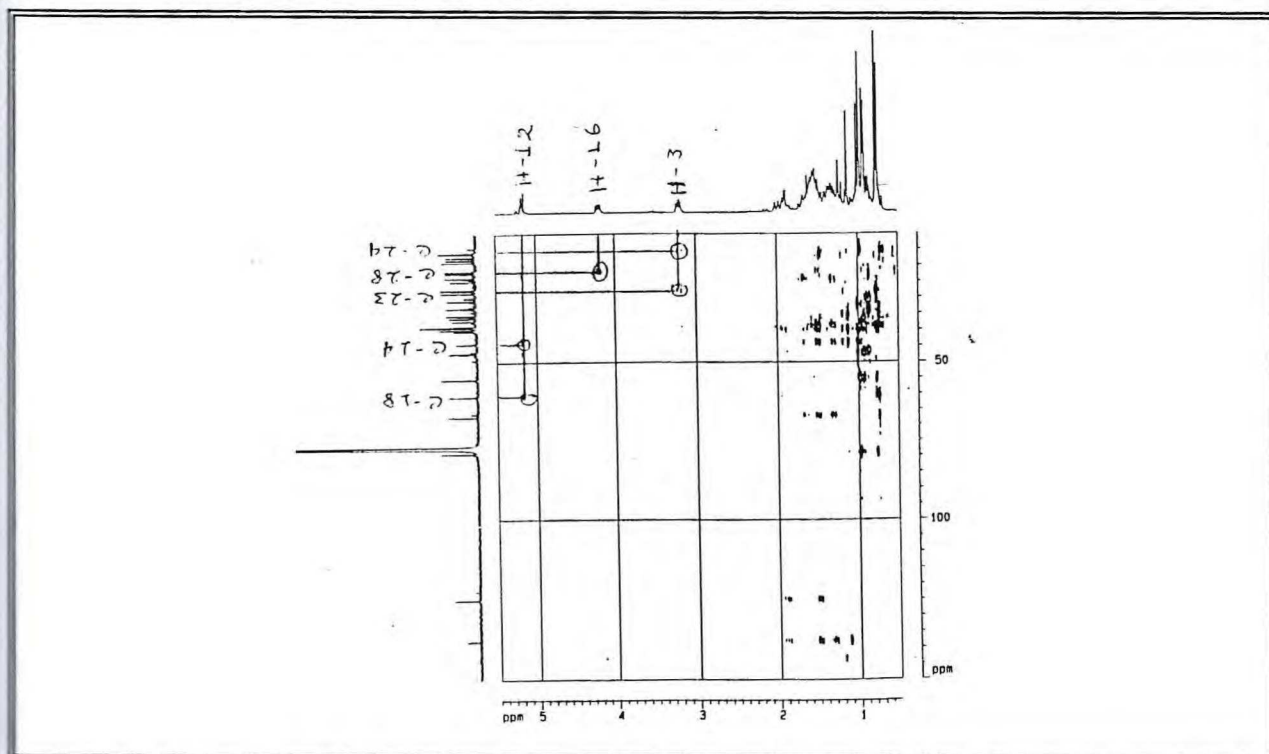


Figura 26 - Mapa de correlação heteronuclear $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ à mais de uma ligação – HMBC (75 MHz, CDCl_3) de PHPR-3



4.1.4. Determinação estrutural de PHPL-1 (17)

O tratamento cromatográfico do extrato etanólico do lenho (item 8.5.5, Pág. 158) forneceu por precipitação na fração clorofórmica uma substância verde claro, solúvel em DMSO com faixa de fusão 205 – 205,5°C.

O espectro de absorção na região do infravermelho (Fig. 27, Pág. 55) apresentou uma banda em 3338 cm^{-1} correspondente a vibração de deformação axial de O-H. revelou bandas intensas referentes as vibrações de deformação axial de C=O em 1704 cm^{-1} e de C-O em 1291 cm^{-1} , confirmando a existência de carbonila lactônica, bandas em 1608, 1565 e 1510 cm^{-1} correspondentes a vibrações de deformação axial e em 922 e 862 cm^{-1} de deformações angulares compatíveis com a presença de anel aromático.

O espectro de RMN ^{13}C totalmente desacoplado (BB = Broad and) (Fig. 28, Pág. 55) apresentou dez linhas espectrais, uma em δ_{C} 160,5 referente a um grupamento carbonila C=O, uma linha espectral em δ_{C} 55,9 indicando a presença do grupo metoxila que de acordo com o valor da absorção observada é indicativo de metoxila ligada a anel aromático. As linhas espectrais localizadas entre δ_{C} 102,7 - 151,0 num total de oito são referentes a C- sp^2 de esqueleto aromático e olefínico. O espectro de RMN ^{13}C – DEPT (Distortioless Enhancement by Polarization Transfer, $\theta = 135^\circ$) (Fig. 29, Pág. 56) revelou a presença de quatro sinais de carbonos metínicos, sendo dois atribuídos a carbonos aromáticos em δ_{C} 109,6 e 102,6 e dois sinais de carbonos olefínicos em δ_{C} 111,6 e 144,3, um sinal em δ_{C} 55,9 de metoxila ligada a núcleo benzênico e cinco sinais de carbonos não-hidrogenados, sendo um de carbono carbonílico em δ_{C} 160,9.

O espectro de RMN ^1H (Fig. 30, Pág. 56) mostrou quatro sinais na região de hidrogênio olefínicos e/ou aromáticos. Os sinais em δ_{H} 6,17 (1H, d, $J = 8,76$ Hz) e δ_{H} 7,85 (1H, d, $J = 8,85$ Hz) podem ser atribuídos a hidrogênios cis em carbonos alfa e beta insaturados de anel lactônico, semelhantes a hidrogênios de dupla cis de cumarinas.

Pelas considerações até então tecidas e conforme dados (Tab. 8, Pág. 54), pode-se inferir a existência de uma cumarina com dois grupos substituintes (OH e OCH_3) no anel aromático. O mapa de correlação heteronuclear HMQC (Fig. 31, Pág. 57) permitiu associar de forma clara as absorções dos hidrogênios aromáticos em δ_{H} 7,16 (1H, s) e δ_{H} 6,74 (1H, s) e dos hidrogênios olefínicos em δ_{H} 6,17 (1H, d $J = 8,7$ Hz) e δ_{H} 7,85 (1H,

d, $J = 8,8$ Hz) aos carbonos em δ_C 109,6, 102,7, 111,62 e 144,3 respectivamente. O mapa de correlação heteronuclear a longa distância $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ – HMBC ($^nJ_{\text{CH}}$, $n = 2$ e $n = 3$) (Fig. 32, Pág. 57) nos auxiliou nas atribuições dos deslocamentos químico especialmente dos carbonos não-hidrogenados. Os carbonos não-hidrogenados e oxigenados (C-6) e (C-7) acoplam com (H-5 e H-8) confirmando a posição dos substituintes nestes carbonos. Observou-se também de forma clara o acoplamento entre o carbono não-hidrogenado e oxigenado (C-6) com os hidrogênios metílicos (δ_H 3,78), confirmando a posição da metoxila no anel benzênico. A Tab. 8, Pág. 54 mostra a correlação total de dados obtidos nos espectros de HMQC e HMBC.

Comparação dos dados físicos e espectroscópicos com dados análogos da literatura⁴⁷, permitiu-nos deferir PHPL-1 como sendo uma cumarina que foi identificada como 6-metoxi-7-hidrocumarina, conhecida como escopoletina já isolada na espécie em estudo¹⁸.

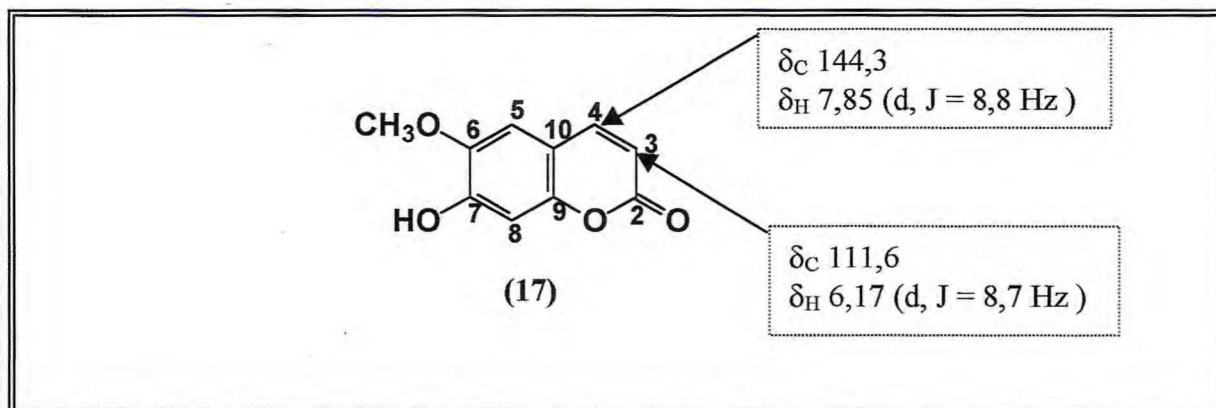


Tabela 8 - Dados de RMN ^1H e ^{13}C e correlações de $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ [HMQC – $^1\text{J}_{\text{CH}}$ e HMBC – $^n\text{J}_{\text{CH}}$ ($n=2$ e $n=3$)] de PHPL-1 (17) em DMSO

$^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ – HMQC – $^1\text{J}_{\text{CH}}$			$^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ – HMBC – $^n\text{J}_{\text{CH}}$ ($n=2$ e $n=3$)		
C	δ_{C}	δ_{H} , J(Hz)	$^2\text{J}_{\text{CH}}$	$^3\text{J}_{\text{CH}}$	Ref. 47
2	160,5	-	H-3	H-4	162,7
3	111,6	6,17 (d, J = 8,76)	-	-	111,6
4	144,3	7,85 (d, J = 8,85)	-	H-5	143,9
5	109,6	7,16 (s)	-	H-4	110,5
6	145,1	-	H-5	H-8 ; 3H	145,2
7	151,0	-	H-8	H-5	151,2
8	102,7	6,74 (s)	-	-	102,9
9	149,4	-	H-8	H-4 ; H-5	149,6
10	110,4	-	H-5; H-4	H-3; H-8	109,1
CH ₃ O	55,9	3,78 (s)	-	-	56,0

Figura 27 - Espectro de absorção na região do infravermelho (KBr) de PHPL-1

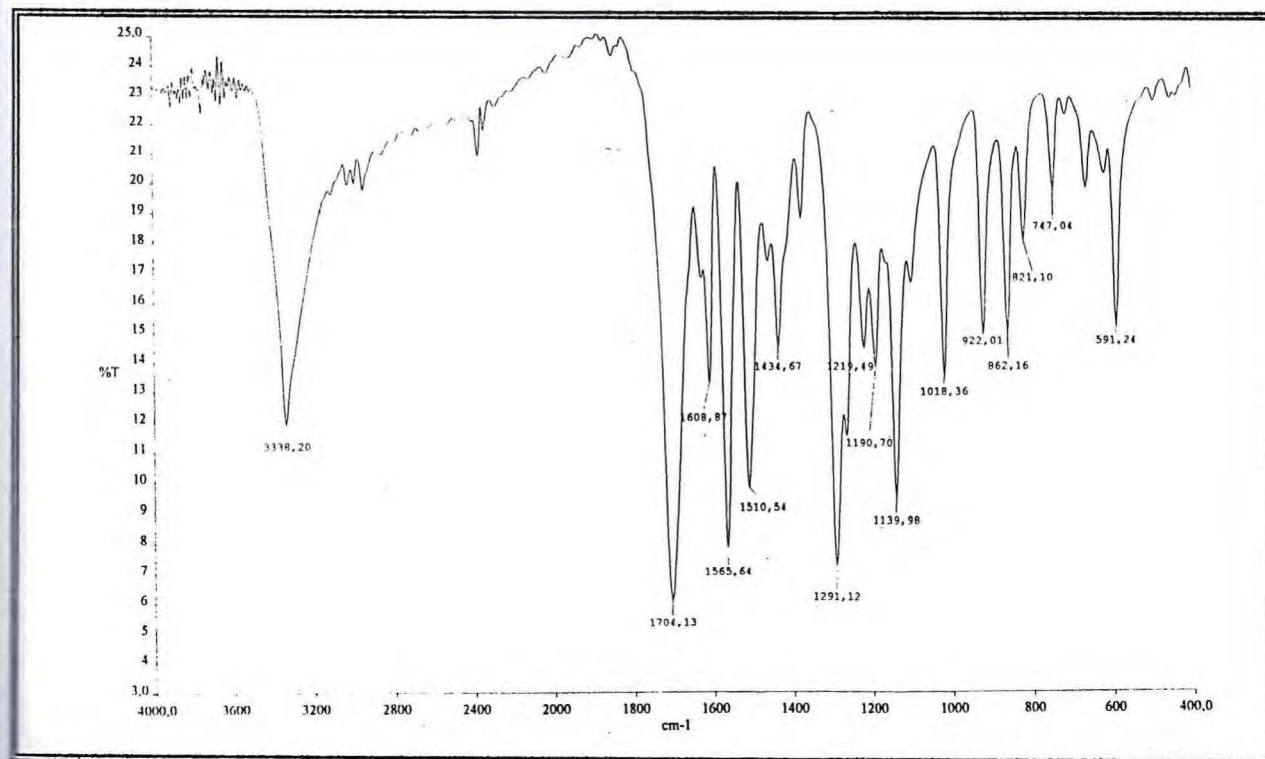
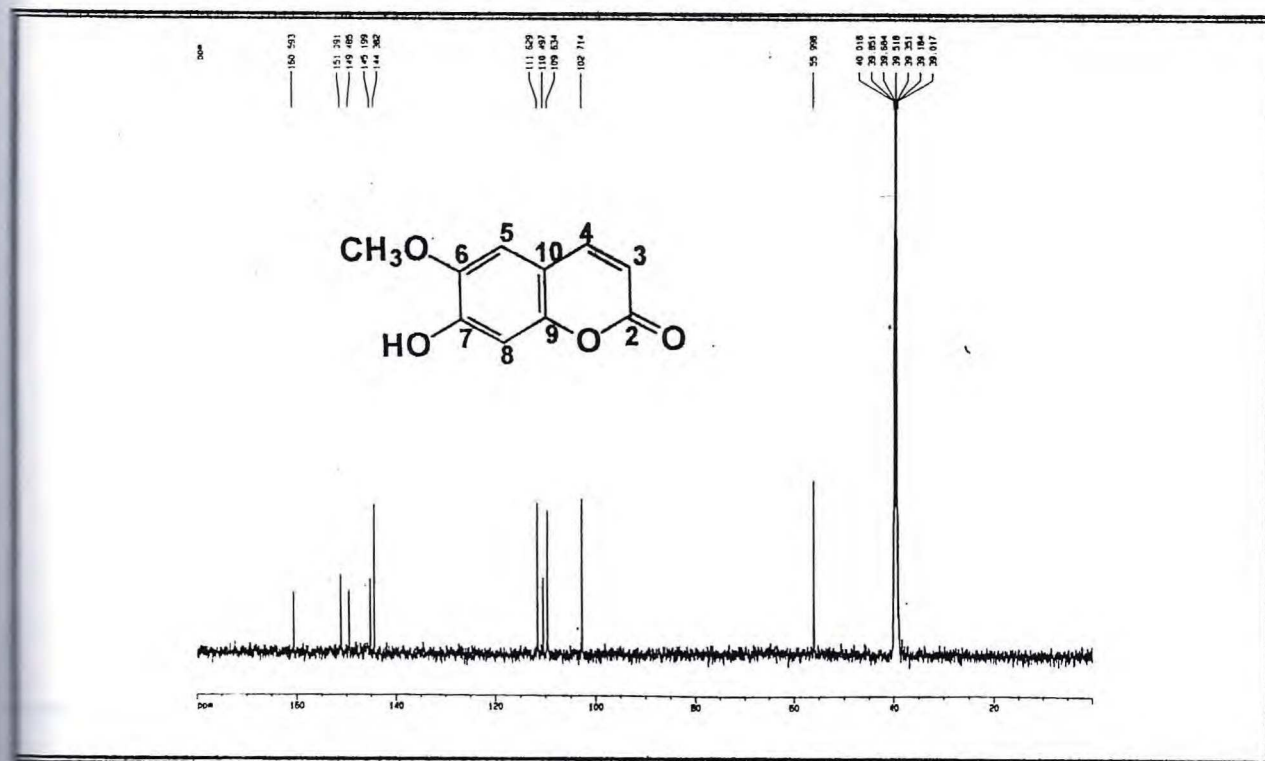
Figura 28 - Espectro de RMN ^{13}C – BB 9 125 MHz, DMSO) de PHPL-1

Figura 29 - Espectro de RMN ^{13}C – DEPT - 135° (125 MHz, DMSO) de PHPL-1

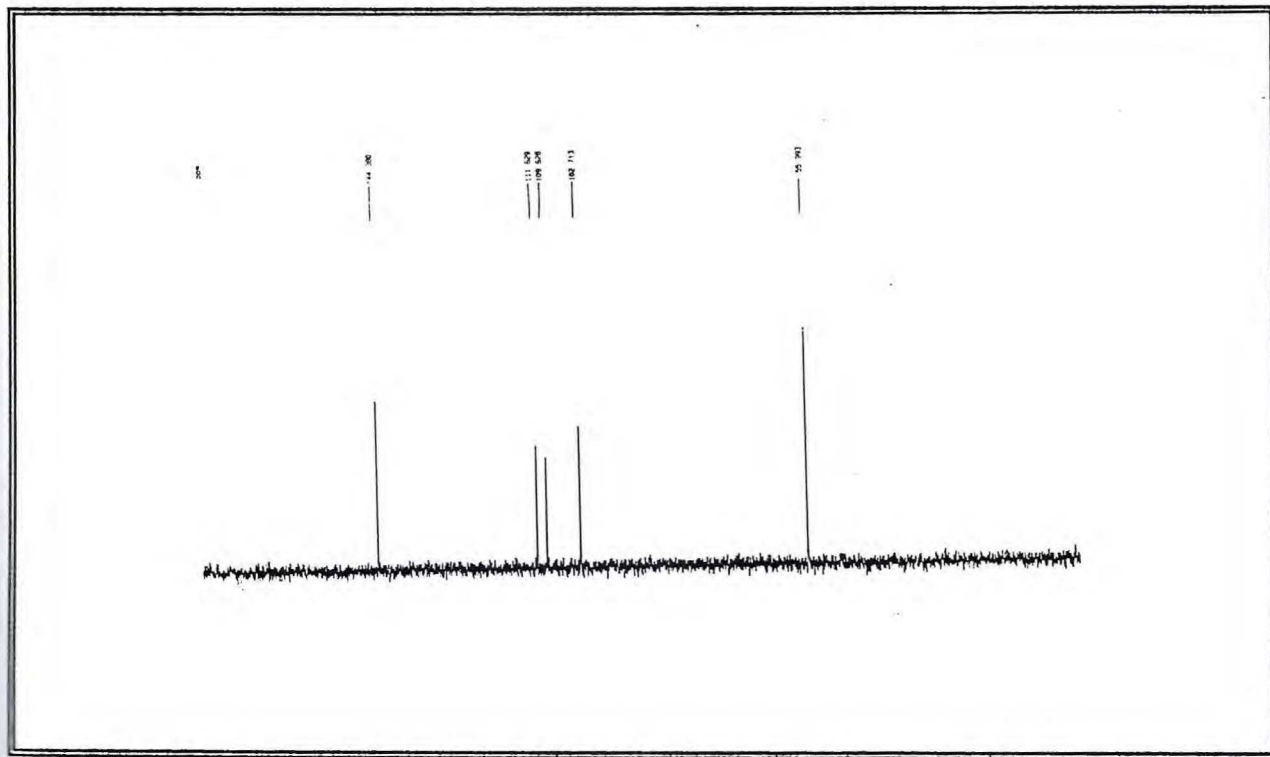


Figura 30 - Espectro de RMN ^1H (500 MHz, DMSO) de PHPL-1

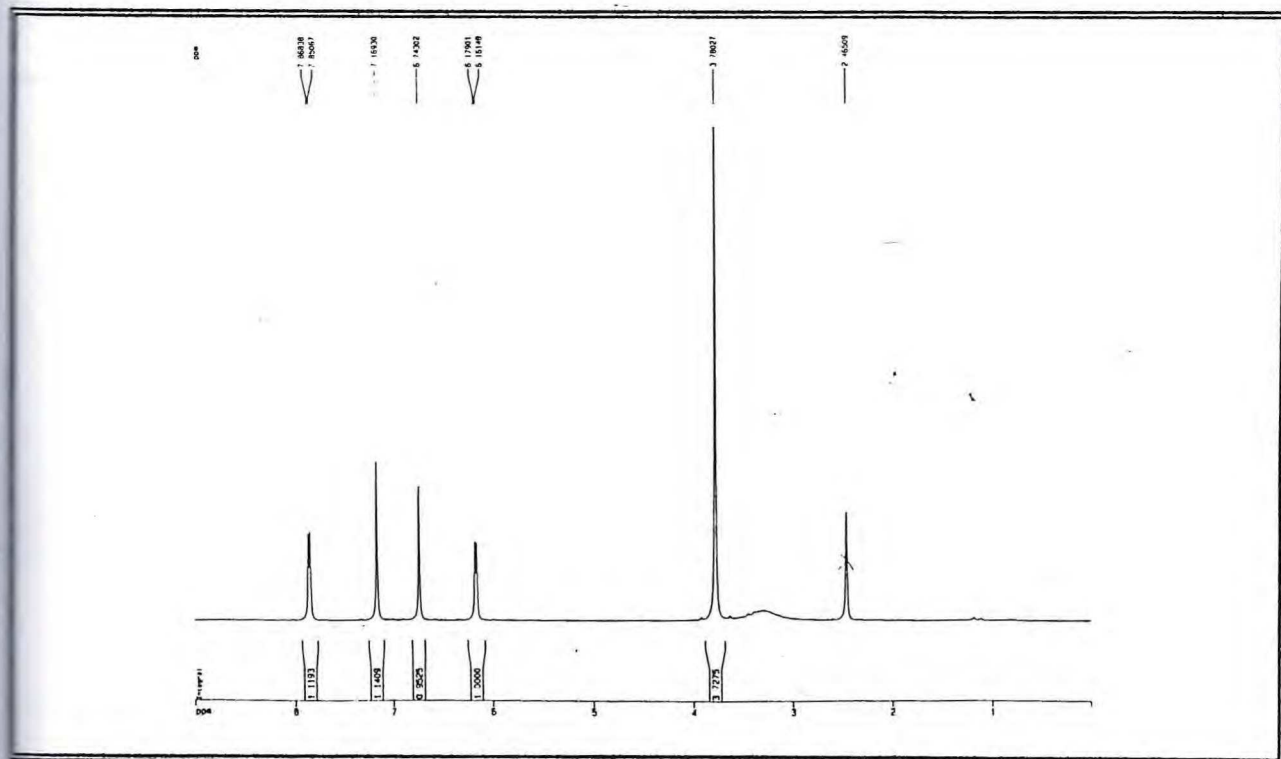


Figura 31 - Mapa de correlação heteronuclear $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ à uma ligação – HMQC (75 MHz, DMSO) de PHPL-1

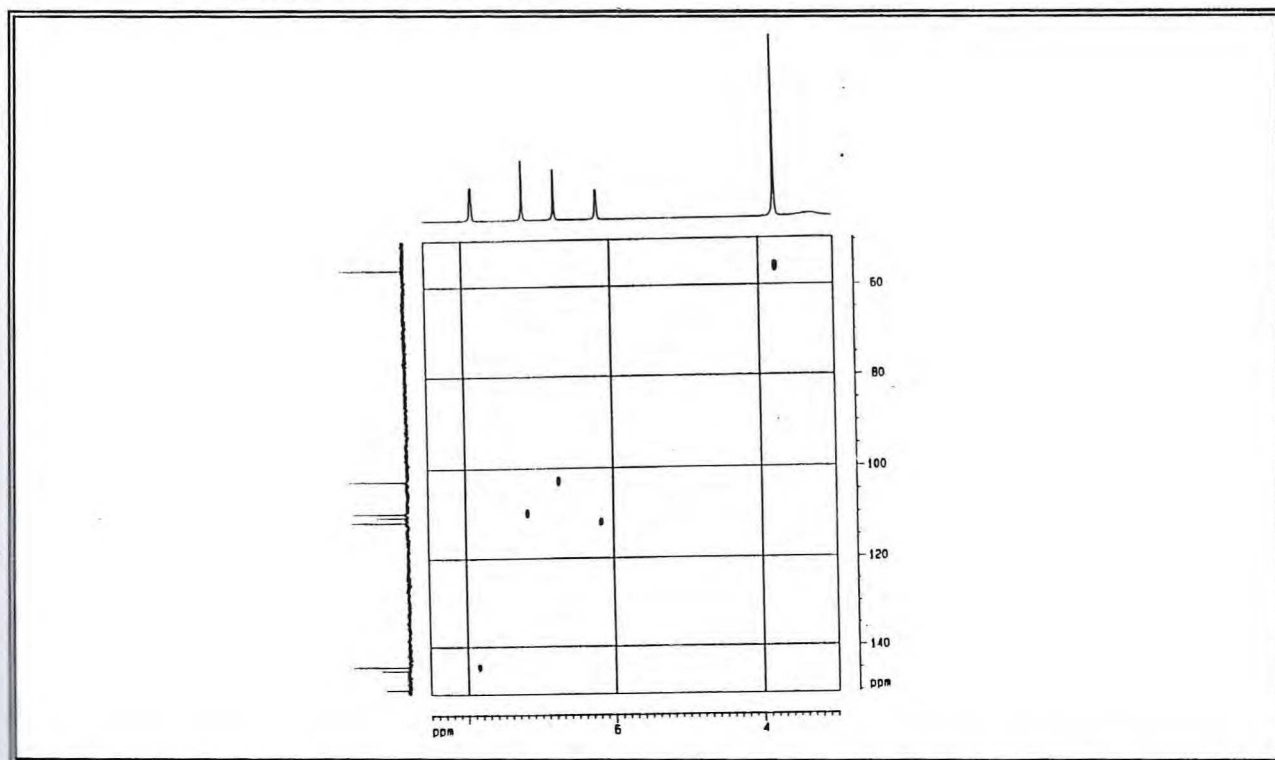
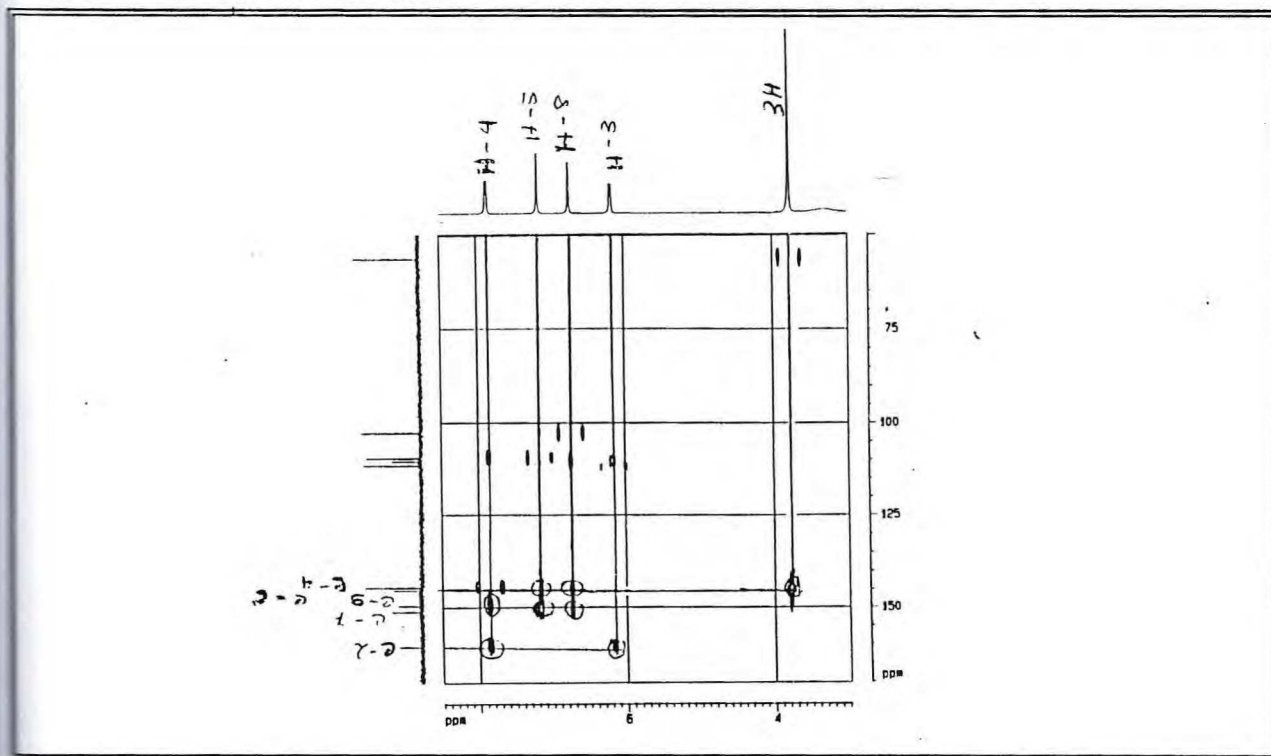


Figura 32 - Mapa de correlação heteronuclear $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ à mais de uma ligação – HMBC (75 MHz, DMSO) de PHPL-1



4.1.5. Determinação estrutural de PHPFM-1 (26)

O tratamento cromatográfico da fração acetato (1,5 g) proveniente do hidrolato dos frutos maduros (item 8.5.7, Pág. 160) forneceu por eluição com clorofórmio / metanol (4 : 1) um sólido amorfo, amarelo, solúvel em metanol, com faixa de fusão 247 - 248°C e rotação óptica específica $[\alpha]_D^{20} = -56^\circ$ (c, 0,2 em CH₃OH).

O espectro de absorção na região do infravermelho (Fig. 33, Pág. 62) apresentou uma banda em 3428 cm⁻¹ relacionada à vibração de deformação axial de O-H, uma banda em 1651cm⁻¹ correlacionada a deformação axial de carbonila C=O. Vibrações envolvendo estiramento C=C de anel aromático em 1428 e 1606 cm⁻¹, e ainda uma absorção referente a vibração de deformação axial de C-O em 1118 cm⁻¹.

O espectro de RMN ¹³C – BB (Broad Band) totalmente desacoplado (Fig. 34, Pág. 62) revelou vinte e uma linhas espectrais, cuja multiplicidade dos carbonos foi definida por comparação com o espectro de RMN ¹³C – DEPT 135° (Fig. 35, Pág. 63), sendo dez sinais de carbonos metínicos (CH) dos quais cinco encontram-se na região de C-sp³ que de acordo com os valores de deslocamento químico de ¹³C⁴³, sugere a presença de uma unidade de açúcar na molécula, e cinco na região de C-sp². Um sinal de carbono metílico e dez sinais referentes a carbonos não-hidrogenados, onde o sinal em δ_C 179,8 típico de carbonila conjugada, e ainda sinais de carbonos insaturados em δ_C 159,4 e 136,3 permitem sugerir que PHPFM-1 apresente uma possível estrutura básica do tipo C₆-C₃-C₆ típica de compostos flavonoídicos.⁴⁸

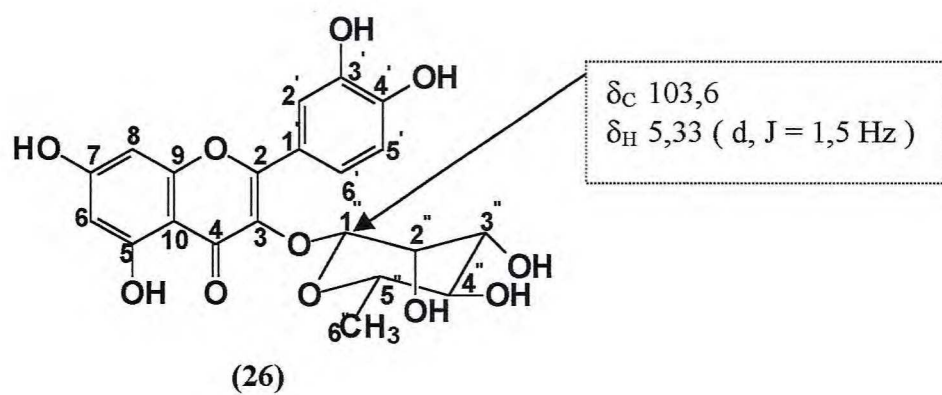
O espectro de RMN ¹H (Fig. 36, Pág. 63) mostrou sinais referentes a dubletos em δ_H 6,18 (1H, d, J = 2,1 Hz); δ_H 6,35 (1H, d, J = 2,1 Hz); δ_H 7,31 (1H, d, J = 1,9 Hz); δ_H 6,88 (1H, d, J = 8,50 Hz) e duplo dubleto em δ_H 7,28 (1H, dd, J = 1,9 Hz e 8,50 Hz), cujos valores de J caracterizam acoplamentos do tipo orto e meta de sistema aromático. Revelou também sinais relacionados as absorções de hidrogênios da unidade de açúcar, inclusive a de um hidrogênio anomérico em δ_H 5,33 (1H, d, J = 1,5 Hz) confirmado no espectro de RMN ¹³C pela absorção em δ_C 103,6, e ainda outras cinco absorções entre δ_C 72,0 e 73,4. A presença de uma metila em δ_C 17,8 associada ao valor do carbono anomérico em δ_C 103,6 sugere que a unidade glicosídica seja a da ramnose.

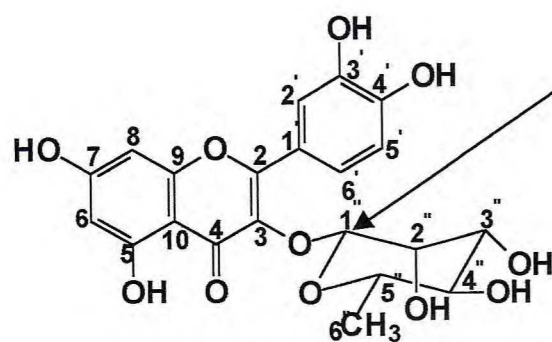
O mapa de correlação homonuclear ¹H × ¹H – COSY evidenciou

os acoplamentos entre os hidrogênios de natureza aromática, bem como os hidrogênios pertencentes a unidade de açúcar conforme Fig. 37, Pág. 64.

Baseando-se nos dados até então discutidos e analisados pode-se aferir que PHPFM-1 trata-se de um composto flavônico contendo a ramnose como uma unidade de açúcar. Comparação dos dados de RMN ^{13}C com valores da literatura⁴⁹ mostrados na Tab. 9, Pág. 61 podemos assegurar que se trata do composto quercetina-3-O-raminosil Pág. 60. De acordo com o valor da constante de acoplamento ($J = 1,5 \text{ Hz}$) para o hidrogênio ligado ao carbono anomérico, vê-se que este encontra-se em posição axial, consequentemente a ramnose encontra-se α -posicionada.

Através do mapa de correlação heteronuclear HMQC- $^1\text{J}_{\text{CH}}$ (Figs. 38 e 39, Págs. 64 e 65) respectivamente foi estabelecida a associação dos hidrogênios aos átomos de carbonos correspondentes. A análise detalhada do mapa de correlação heteronuclear a longa distância HMBC - $^n\text{J}_{\text{CH}}$ $n = 2$ e $n = 3$ (Figs. 40 e 41, Págs. 65 e 66) e (Figs. 42 e 43, Págs. 66 e 67), tornou possível assinalar inequivocamente as correlações a mais de uma ligação. O acoplamento observado entre o carbono não-hidrogenado oxigenado (C-3) com o hidrogênio H-1'' (1H, d, $J = 1,5 \text{ Hz}$), confirma a posição da unidade de açúcar (ramnose) no esqueleto flavonoídico. Os resultados das correlações encontram-se na Tab. 9, Pág. 61. Mesmo tratando-se de uma substância conhecida este é o primeiro relato deste composto nesta espécie.





δ_C 103,6
 δ_H 5,33 (d, J = 1,5 Hz)

(26)

Tabela 9 - Dados de RMN ^1H e ^{13}C e correlações $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ [HMQC – $^1\text{J}_{\text{CH}}$ e HMBC – $^n\text{J}_{\text{CH}}$ ($n = 2$ e $n = 3$)] de PHPFM-1 (**26**) em CD_3OD

$^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ – HMQC – $^1\text{J}_{\text{CH}}$			$^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ – HMBC – $^n\text{J}_{\text{CH}}$		
C	δ_{C}	δ_{H} , J(Hz)	$^2\text{J}_{\text{CH}}$	$^3\text{J}_{\text{CH}}$	Ref. 49
2C	159,4	-	-	H-2 ; H-6	157,0
3C	136,3	-	-	H-1''	134,4
4C	179,8	-	-	-	177,7
5C	163,3	-	H-6	-	161,2
6CH	99,9	6,18(d, J = 2,1)	-	H-8	98,6
7C	166,0	-	H-8; H-6	-	164,0
8CH	94,8	6,35(d, J = 2,1)	-	H-6	93,5
9C	158,6	-	H-8	-	156,4
10C	106,0	-	-	H-8; H-6	104,2
1'C	123,1	-	-	H-5'	121,0
2'CH	117,0	7,31(d, J = 1,9)	-	H-6'	115,4
3'C	146,5	-	H-2'	H-5'	145,1
4'C	149,9	-	H-5'	H-2'; H-6'	148,3
5'CH	116,5	6,88(d, J = 8,5)	-	-	115,8
6'CH	123,0	7,28(dd, J = 1,9 e 8,5)	-	H-2'	121,0
1''CH	103,6	5,33(d, J = 1,5)	-	-	101,9
2''CH	72,0	4,19(dd, J = 1,5 e 3,0)	H-1''	H-4''	70,0
3''CH	72,3	3,72(dd, J = 3,0 e 9,4)	H-2''; H-4''	H-1'	70,6
4''CH	73,4	3,32(d, J = 9,4)	H-3''; H-5''	3H-6''	71,5
5''CH	72,1	3,40(dq, J = 6,0 e 9,4)	H-4''	-	70,1
6''CH ₃	17,8	0,92(d, J = 6,0)	H-5''	H-4''	17,3

Figura 33 - Espectro de absorção na região do infravermelho (KBr) de PHPFM-1

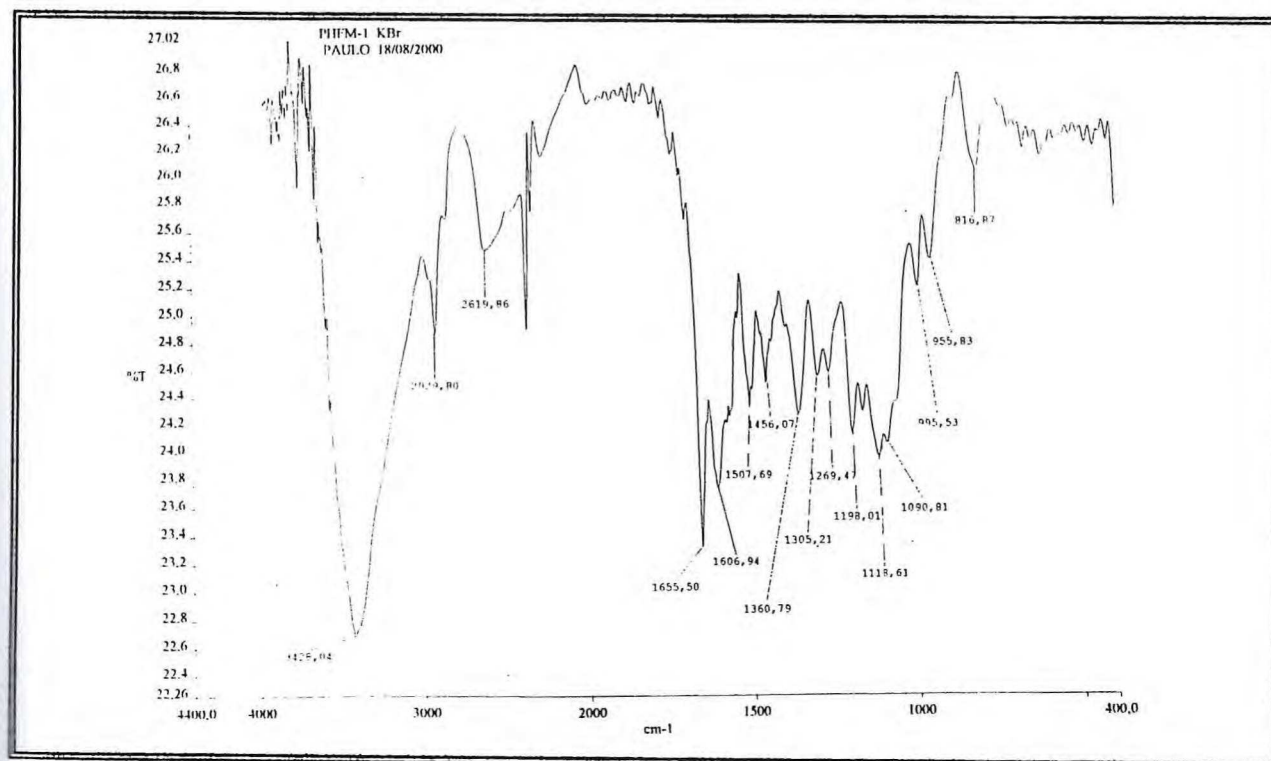
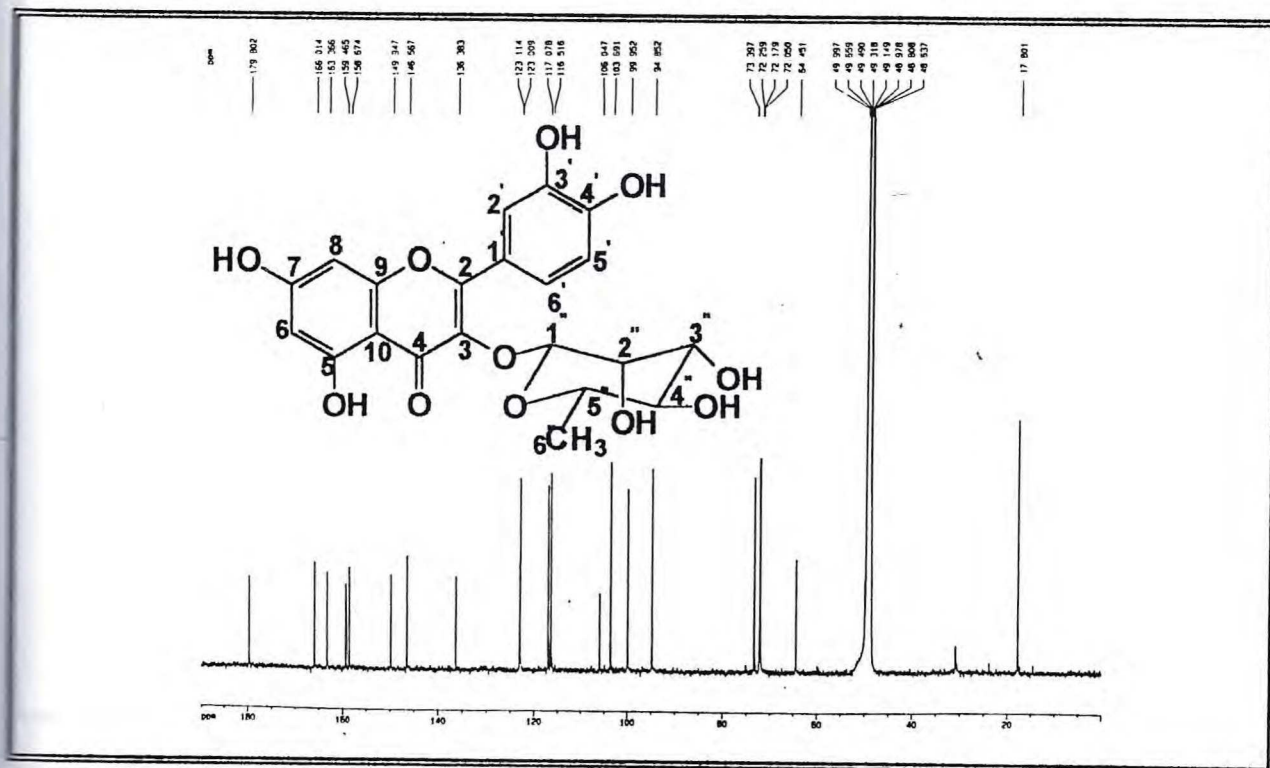
Figura 34 - Espectro de RMN ^{13}C – BB (125 MHz, CD_3OD) de PHPFM-1

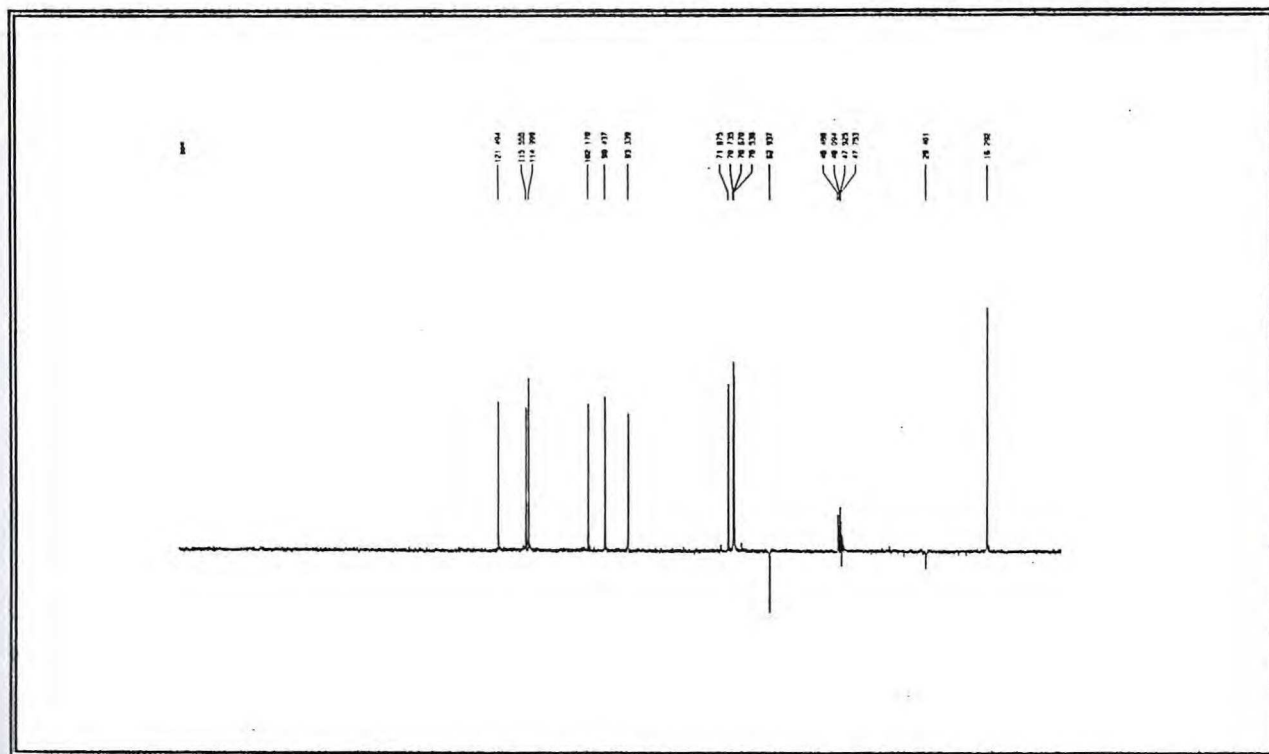
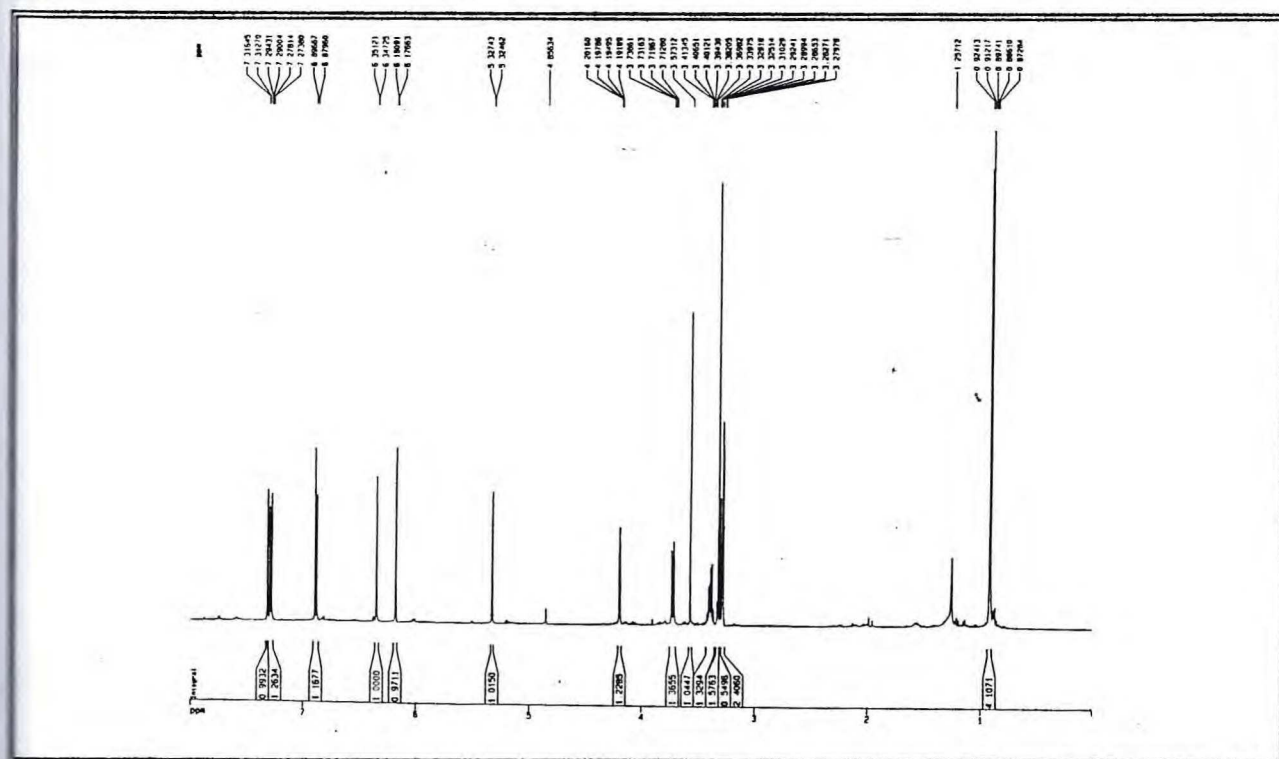
Figura 35 - Espectro de RMN ^{13}C – DEPT - 135° (125 MHz, CD_3OD) de PHPFM-1Figura 36 - Espectro de RMN ^1H (500 MHz, CD_3OD) de PHPFM-1

Figura 37 - Mapa de correlação homonuclear $^1\text{H} \times ^1\text{H}$ – COSY (300 MHz, CD_3OD) de PHPFM-1

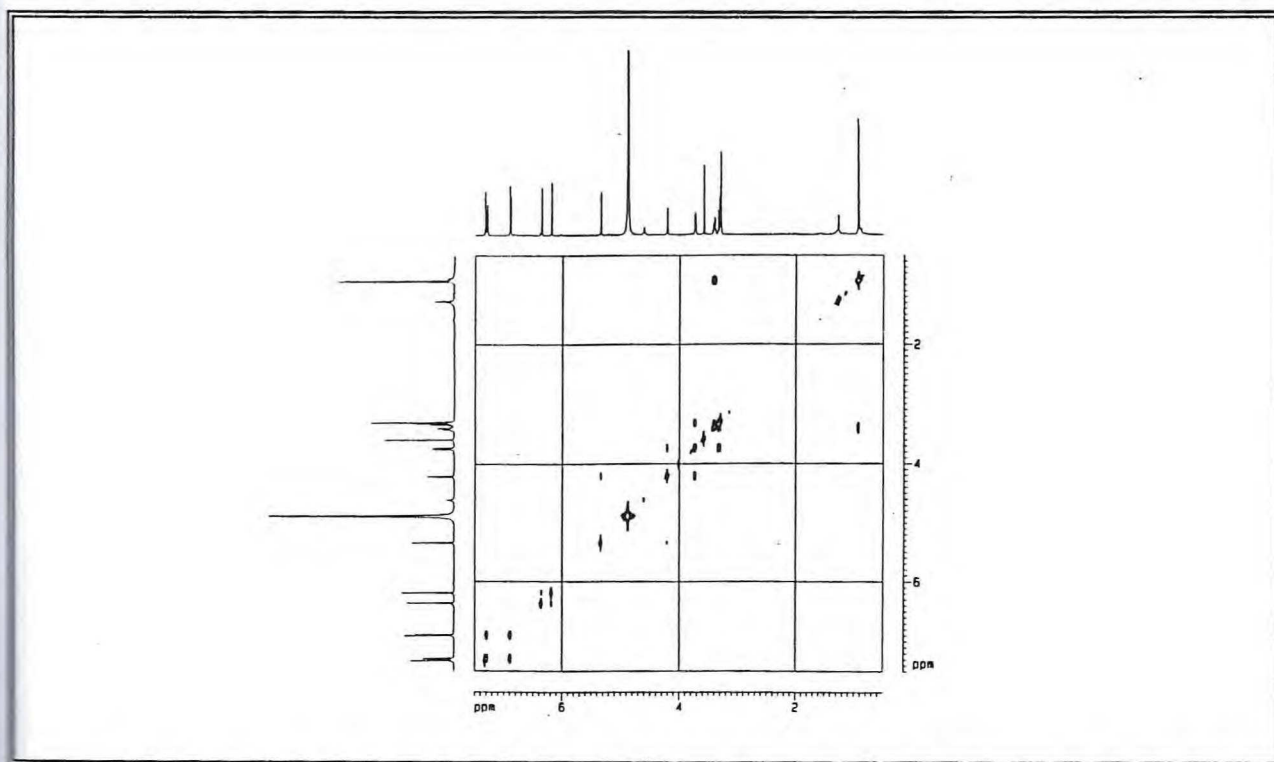


Figura 38 - Mapa de correlação heteronuclear $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ à uma ligação – HMQC (75 MHz, CD_3OD) de PHPFM-1

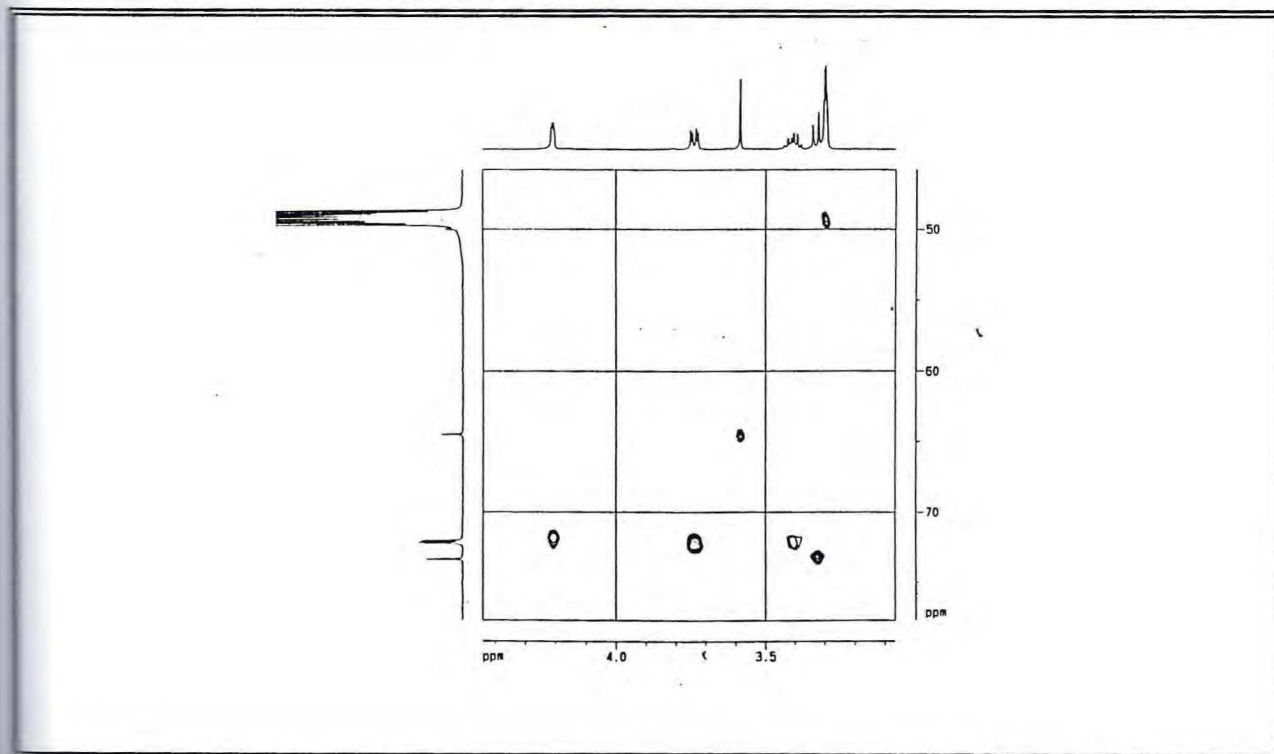


Figura 39 - Mapa de correlação heteronuclear $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ à uma ligação – HMQC (75 MHz, CD_3OD) de PHPFM-1

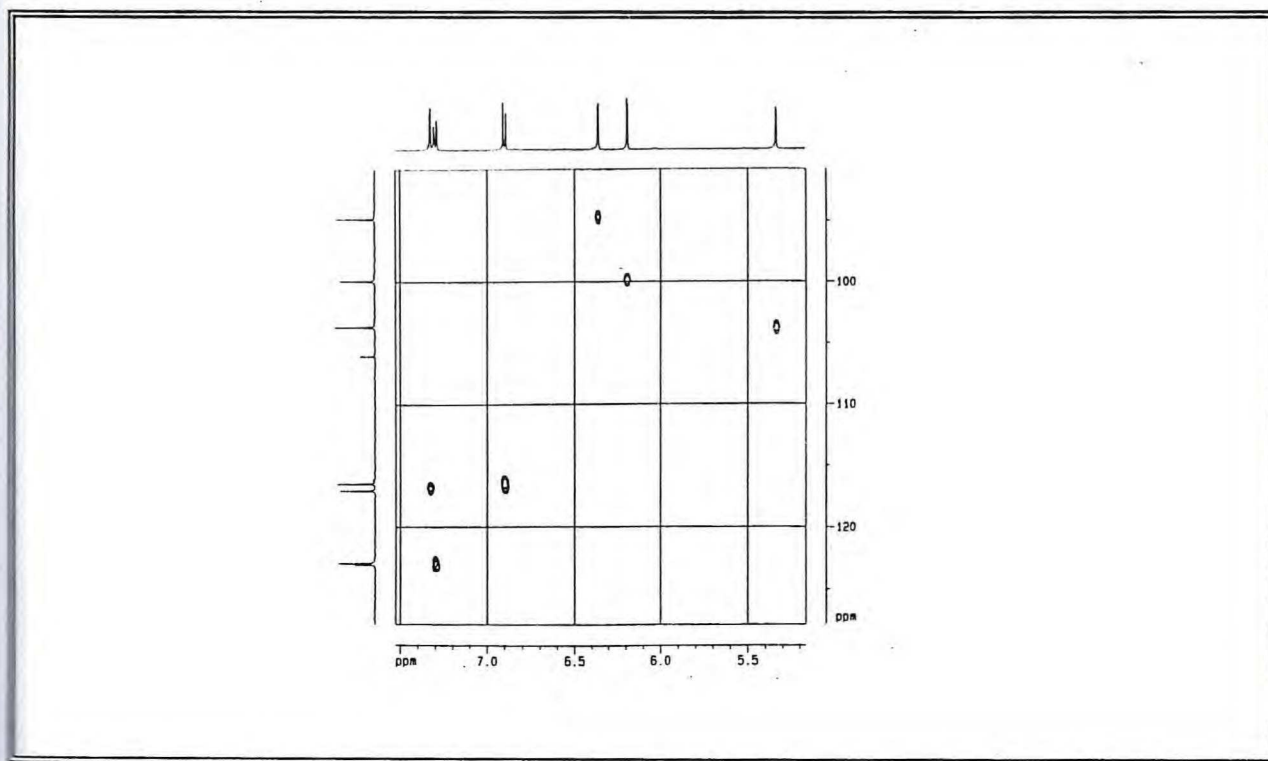


Figura 40 - Mapa de correlação heteronuclear $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ à mais de uma ligação – HMBC (75 MHz, CD_3OD) de PHPFM-1

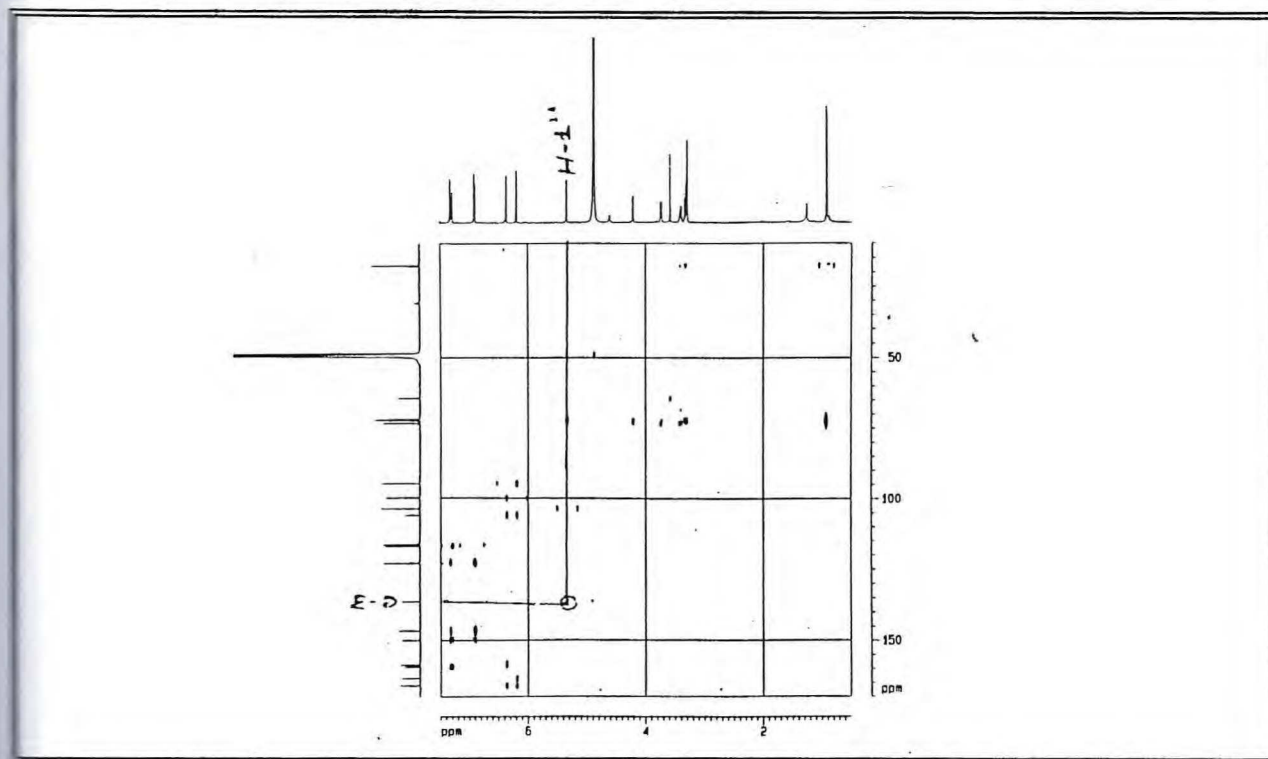


Figura 41 - Mapa de correlação heteronuclear $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ à mais de uma ligação – HMBC (75 MHz, CD_3OD) de PHPFM-1

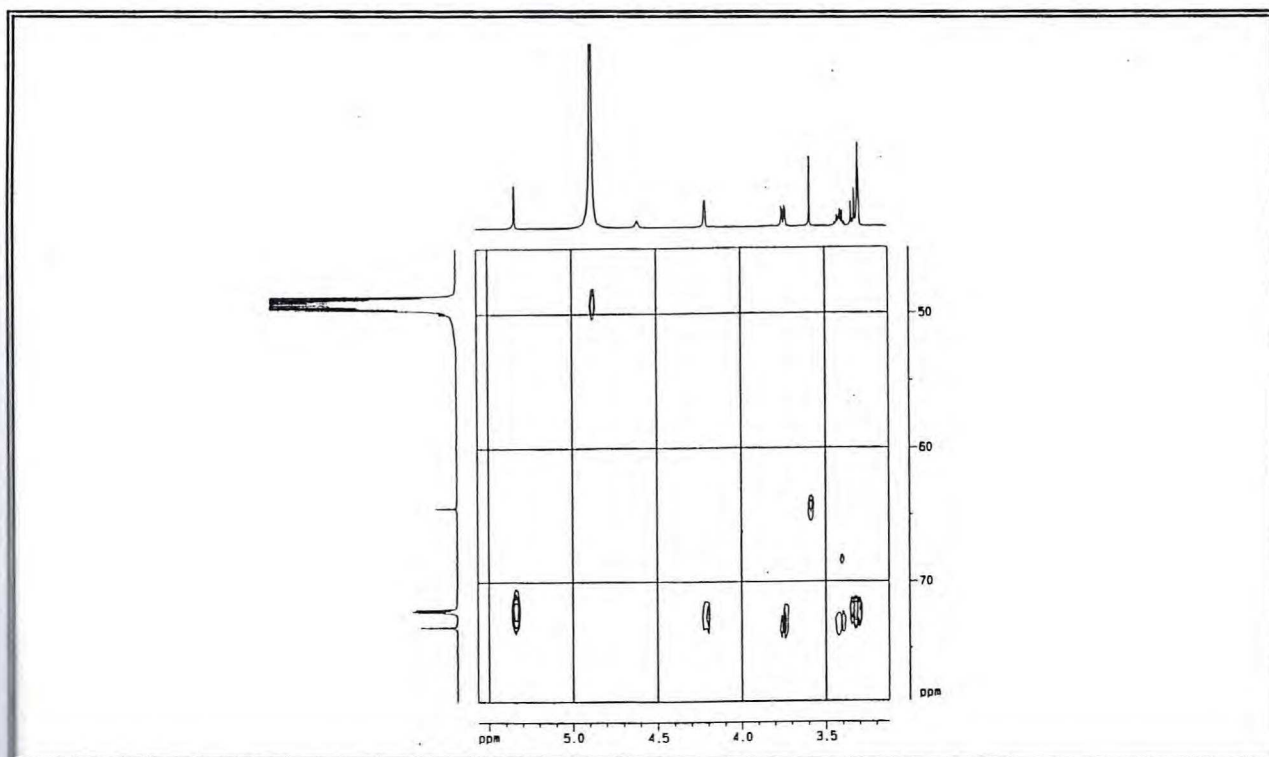


Figura 42 - Mapa de correlação heteronuclear $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ à mais de uma ligação – HMBC (75 MHz, CD_3OD) de PHPFM-1

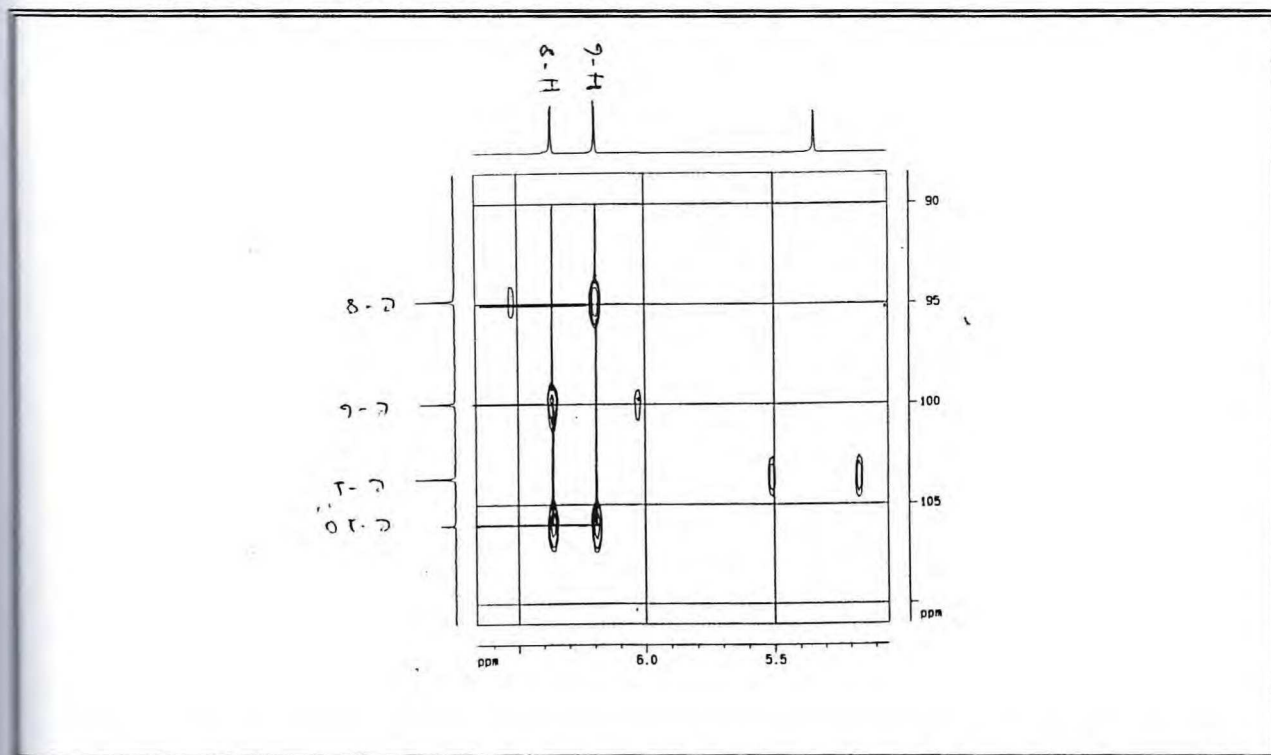
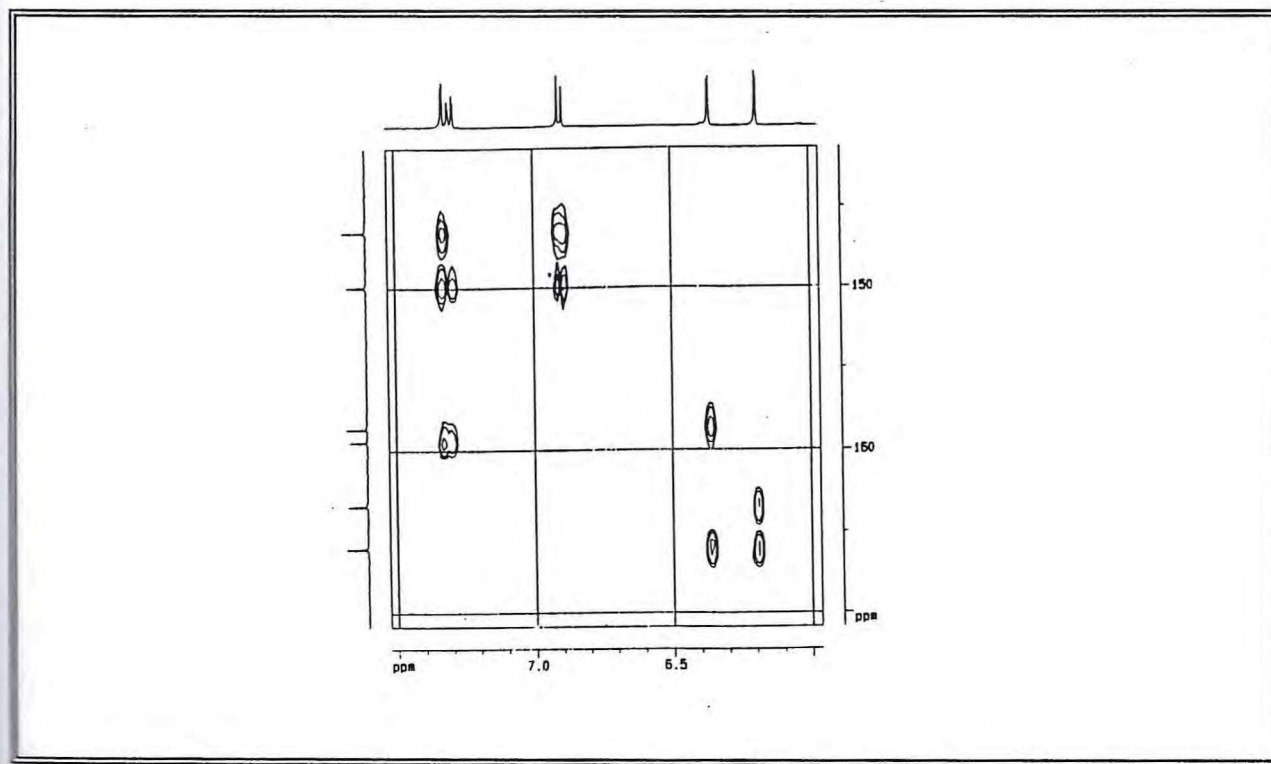


Figura 43 - Mapa de correlação heteronuclear $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ à mais de uma ligação – HMBC (75 MHz, CD_3OD) de PHPFM-1



4.1.6. Determinação estrutural de PHPFV-1 (27)

O tratamento cromatográfico em sílica gel da fração acetato proveniente do hidrolato do fruto verde (80 mg) (item 8.5.9, Pág. 163), forneceu por eluição com acetato / hexano (4 : 1) um sólido cristalino, amarelo, solúvel em metanol, com faixa de fusão 229 - 230°C e rotação ótica específica $[\alpha]_D^{20} = + 61^\circ$ (c, 0,2 em CH₃OH).

O espectro de absorção na região do infravermelho (Fig. 44, Pág.72) mostrou uma banda em 3456 cm⁻¹ de vibrações de deformação axial de grupo OH, bandas de anel aromático em 1622 e 1522 cm⁻¹ de deformações axiais e deformações angulares em 863 , 797 e 625 cm⁻¹ ; ainda uma banda de vibração de deformação axial em 1260,6 cm⁻¹ de C-O-C.

O espectro de RMN ¹³C – BB (Broad Band) totalmente desacoplado (Fig. 45, Pág. 72) apresentou quinze linhas espectrais: doze das quais encontram-se na região δ_C 96,0 a 158,1 características de carbonos aromáticos, duas em δ_C 79,9 e 67,6 de carbonos-sp³ oxigenados e um sinal em δ_C 29,3 de C-sp³. A comparação dos espectros de RMN ¹³C e DEPT, $\theta = 135^\circ$ (Fig. 46, Pág. 73) revelou o padrão de hidrogenação dos carbonos: sendo sete carbonos metínicos (CH) que de acordo com os valores dos deslocamentos químicos, cinco são C-sp² característicos de anel aromático e dois de C-sp³ oxigenados. Revelou ainda um carbono metilênico (CH₂) e sete carbonos não-hidrogenados típicos de carbonos aromáticos. O sinal em δ_C 67,6 (CH) presente no espectro de RMN ¹³C – BB foi atribuído a carbono carbinólico, cuja análise do espectro de RMN ¹H (Fig. 47, Pág. 73) revelou por integração, que o sinal em δ_H 4,14 δ (s) corresponde a um átomo de hidrogênio, sendo então uma hidroxila de álcool secundário. Um outro sinal em δ_C 79,9 característico de C-sp³ ligado a átomo de oxigênio também foi detectado. O sinal em δ_C 29,3 presente no espectro de DEPT, $\theta = 135^\circ$ com fase invertida foi atribuído a um carbono metilênico.

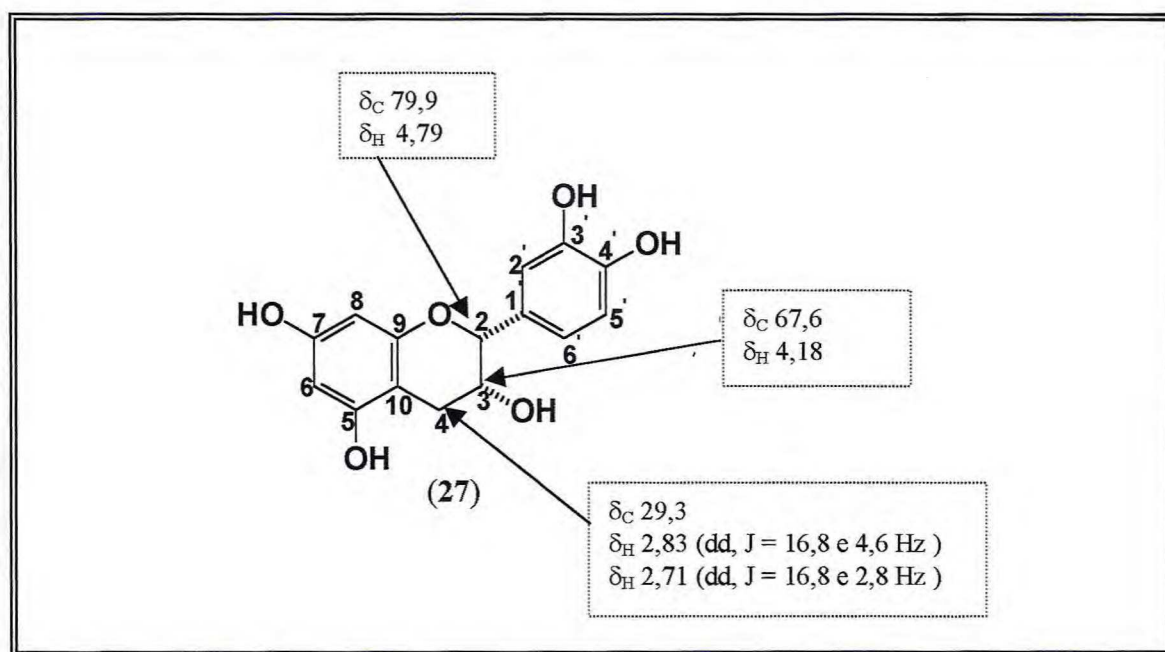
O espectro de RMN ¹H (Fig. 47, Pág. 73) revelou sinais em δ_H 5,89 (1H, d, J = 2,2 Hz), δ_H 5,92 (1H, d, J = 2,2 Hz), δ_H 6,25 (1H, d, J = 1,9 Hz), δ_H 6,73 (1H, d, J = 8,1 Hz) e δ_H 6,77 (1H, dd, J = 8,1 Hz e 1,9 Hz) típicos de sistema aromático, cujos valores de J representam acoplamentos de natureza orto e meta. Um sinal em δ_H 4,79 (s) e um outro em δ_H 4,14 (s), além de sinais em δ_H 2,83 (dd, J = 16,8 e 4,6 Hz) e δ_H 2,71 (dd, J = 16,8 e 2,8 Hz) de 2H-4.

Com os dados de integração do espectro de RMN ^1H e análise do espectro de RMN ^{13}C e DEPT, $\theta = 135^\circ$ foi possível propor para PHPFV-1 a fórmula molecular $\text{C}_{15}\text{H}_{14}\text{O}_6$, com IDH = 9.

O mapa de correlação homonuclear $^1\text{H} \times ^1\text{H}$ – COSY (Fig. 48, Pag. 74) revelou de forma clara os acoplamentos entre os hidrogênios (H-3) em $\delta_{\text{H}} 4,14 \delta$ (s) com os hidrogênios (H-2) em $\delta_{\text{H}} 4,79$ e (2H-4) em $\delta_{\text{H}} 2,83$ (dd, $J = 16,8 \text{ Hz}$ e $4,6 \text{ Hz}$) e $\delta_{\text{H}} 2,71$ (dd, $J = 16,8 \text{ Hz}$ e $2,8 \text{ Hz}$).

O mapa de correlação heteronuclear HMQC - $^1J_{\text{CH}}$ (Fig. 49, Pag. 74) permitiu associar as absorções dos hidrogênios metilênicos em $\delta_{\text{H}} 2,83$ (dd, $J = 16,8 \text{ Hz}$ e $4,6 \text{ Hz}$) e $2,71 \delta$ (dd, $J = 16,8 \text{ Hz}$ e $2,8 \text{ Hz}$) ao carbono localizado em $\delta_{\text{C}} 29,3$, bem como os hidrogênios em $\delta_{\text{H}} 4,79$ (s) e $\delta_{\text{H}} 4,14 \delta$ (s) aos carbonos em $\delta_{\text{C}} 79,9$, $67,6$ respectivamente. Associou-se ainda os hidrogênios aromáticos com valores em $\delta_{\text{H}} 5,89$ (d, $J = 2,2 \text{ Hz}$), $\delta_{\text{H}} 5,92$ (d, $J = 2,2 \text{ Hz}$), $\delta_{\text{H}} 6,95$ (d, $J = 1,9 \text{ Hz}$), $\delta_{\text{H}} 6,73$ (d, $J = 8,1 \text{ Hz}$) e $\delta_{\text{H}} 6,77$ (dd, $J = 8,1 \text{ Hz}$ e $1,9 \text{ Hz}$) aos carbonos em $\delta_{\text{C}} 96,5$, $96,0$, $115,4$, $116,0$ e $119,5$ respectivamente, confirmando as atribuições de deslocamentos químicos, conforme Tab. 10, Pág. 71.

Já o mapa de correlação heteronuclear a longa distância HMBC - $^nJ_{\text{CH}}$ ($n=2$ e $n=3$) (Figs. 50 e 51, Pág. 75) e (Figs. 52 e 53, Pág. 76) auxiliou nas atribuições de deslocamentos químicos, em especial aos carbonos não-hidrogenados oxigenados. Revelou os acoplamentos a duas e três ligações de (H-2) com C-3 e C-4, (H-3) com C-2 e C-4 e (2H-4) com C-2, C-3 e C-5. A distinção entre sinais referentes aos carbonos aromáticos também foi estabelecida conforme dados da Tab. 10, Pág. 71. A análise e comparação dos dados de ^{13}C (Tab. 10, Pág. 71)⁴⁹ e dados físicos (ponto de fusão e rotação ótica específica) com valores da literatura confirmam a estrutura da (-)-epicatequina para PHPFV-1 (Pag. 70), relatada pela primeira vez neste gênero.



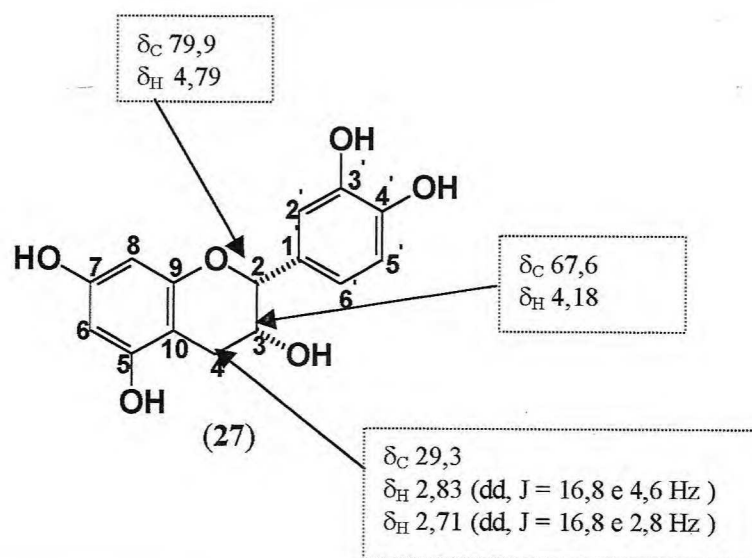


Tabela 10 - Dados de ^1H e ^{13}C e correlações $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ [HMQC – $^1\text{J}_{\text{CH}}$ e HMBC – $^n\text{J}_{\text{CH}}$ ($n = 2$ e $n = 3$)] de PHPFV-1 (**27**) em CD_3OD

$^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ – HMQC $^1\text{J}_{\text{CH}}$			$^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ – HMBC $^n\text{J}_{\text{CH}}$		Ref. 49
C	δ_{C}	$\delta_{\text{H}}, \text{J (Hz)}$	$^2\text{J}_{\text{CH}}$	$^3\text{J}_{\text{CH}}$	
2CH	79,9	4,79(s)	H-3	H-6 ; 2H-4	78,1
3CH	67,6	4,18(s)	2H-4; H-2	H-2	65,1
4CH ₂	29,3	2,83(dd,J=16,8 e 4,6)	H-3	H-2	28,0
	-	2,71(dd,J=16,8 e 2,8)			
5C	157,7	-	H-6	2H-4	156,4
6CH	96,5	5,89(d, J = 2,2)	-	H-8	95,6
7C	157,5	-	H-6; H-8	-	156,3
8CH	96,0	5,92(d, J = 2,2)	-	H-6	94,5
9C	158,1	-	H-8	2H-4	155,7
10C	100,2	-	-	-	98,8
1'C	132,4	-	H-2'; H-6'	H-5'; H-3	130,7
2'CH	115,4	6,95(d, J = 1,9)	-	H-6'; H-2	118,1
3'C	146,0	-	H-2'	H-5'	144,4
4'C	145,9	-	H-5'	H-2'	144,5
5'CH	116,0	6,73(d, J = 8,1)	H-6'	-	115,0
6'CH	119,5	6,77(dd,J = 8,1 e 1,9)	H-5'	H-2'	118,1

Figura 44 - Espectro de absorção na região do infravermelho (KBr) de PHPFV-1

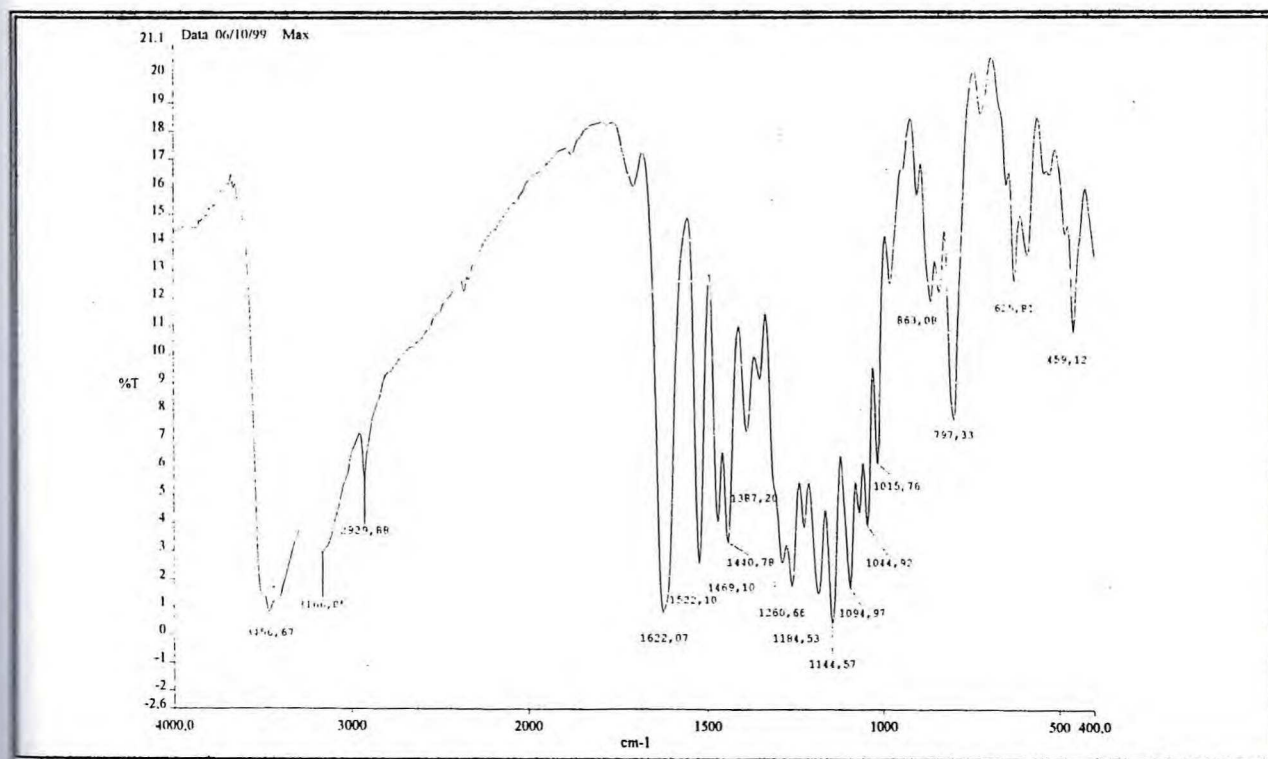
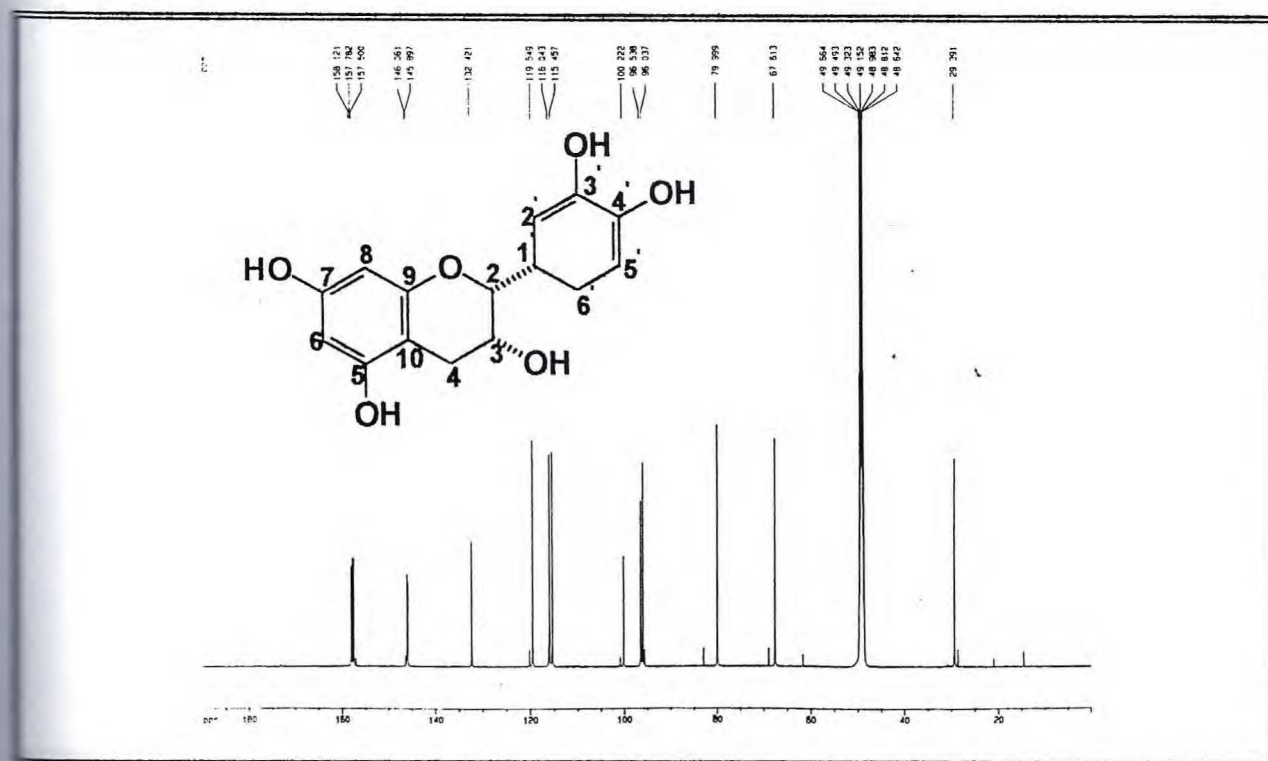
Figura 45 - Espectro de RMN ¹³C – BB (125 MHz, CD₃OD) de PHPFV-1

Figura 46 - Espectro de RMN ^{13}C – DEPT - 135° (125 MHz, CD_3OD) de PHPFV-1

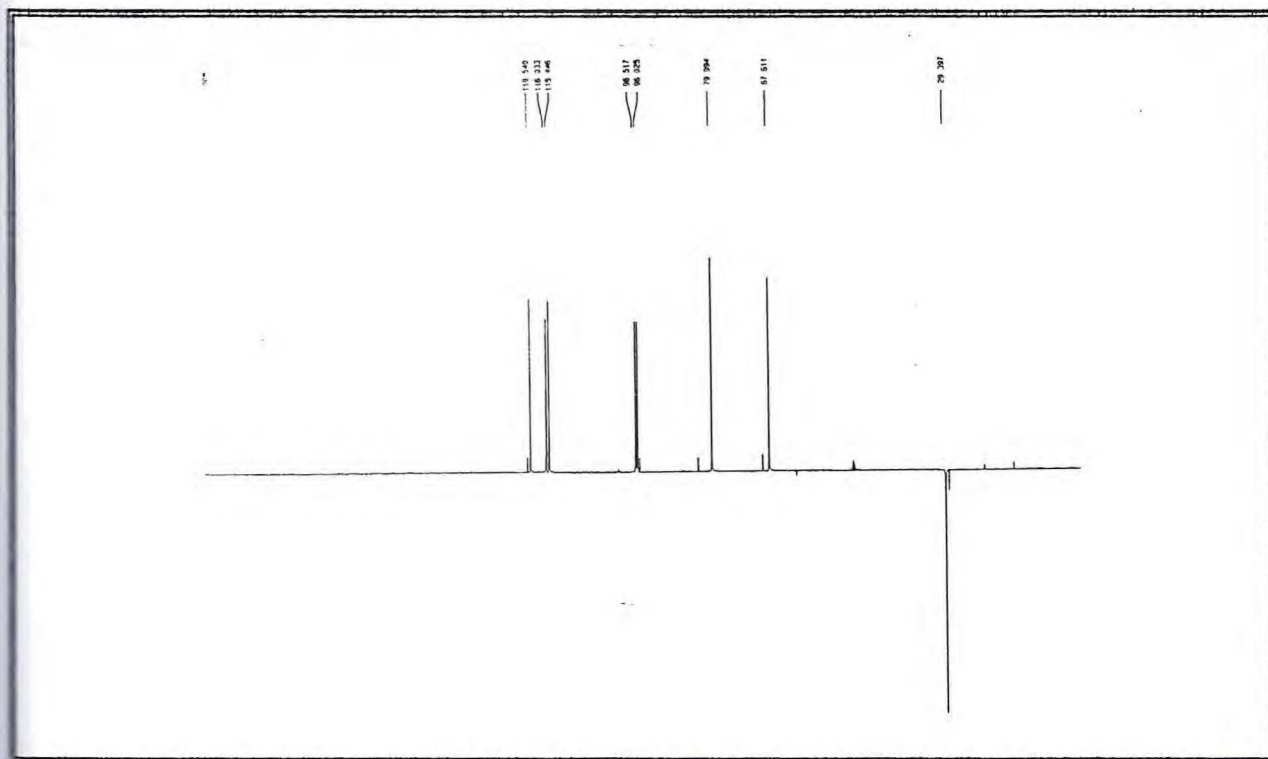


Figura 47 - Espectro de RMN ^1H (500 MHz, CD_3OD) de PHPFV-1

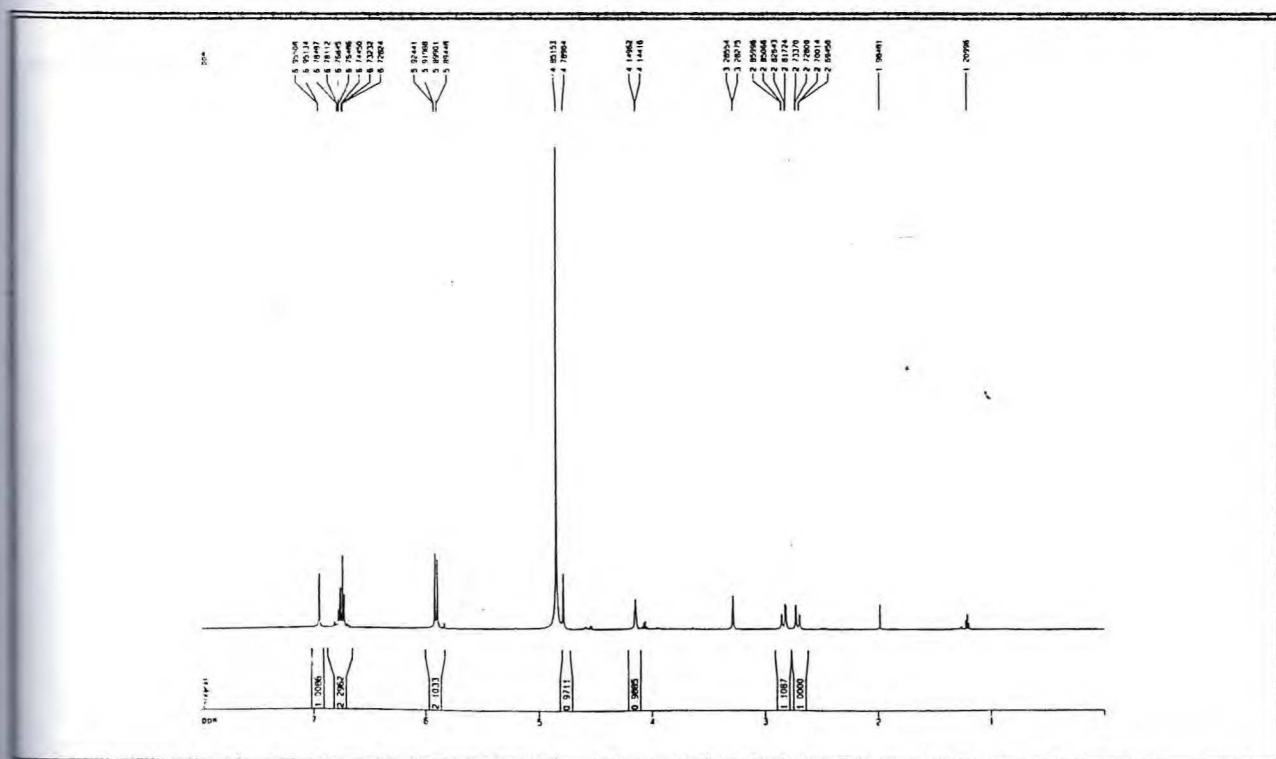


Figura 48 - Mapa de correlação homonuclear $^1\text{H} \times ^1\text{H}$ – COSY (300 MHz, CD_3OD) de PHPFV-1

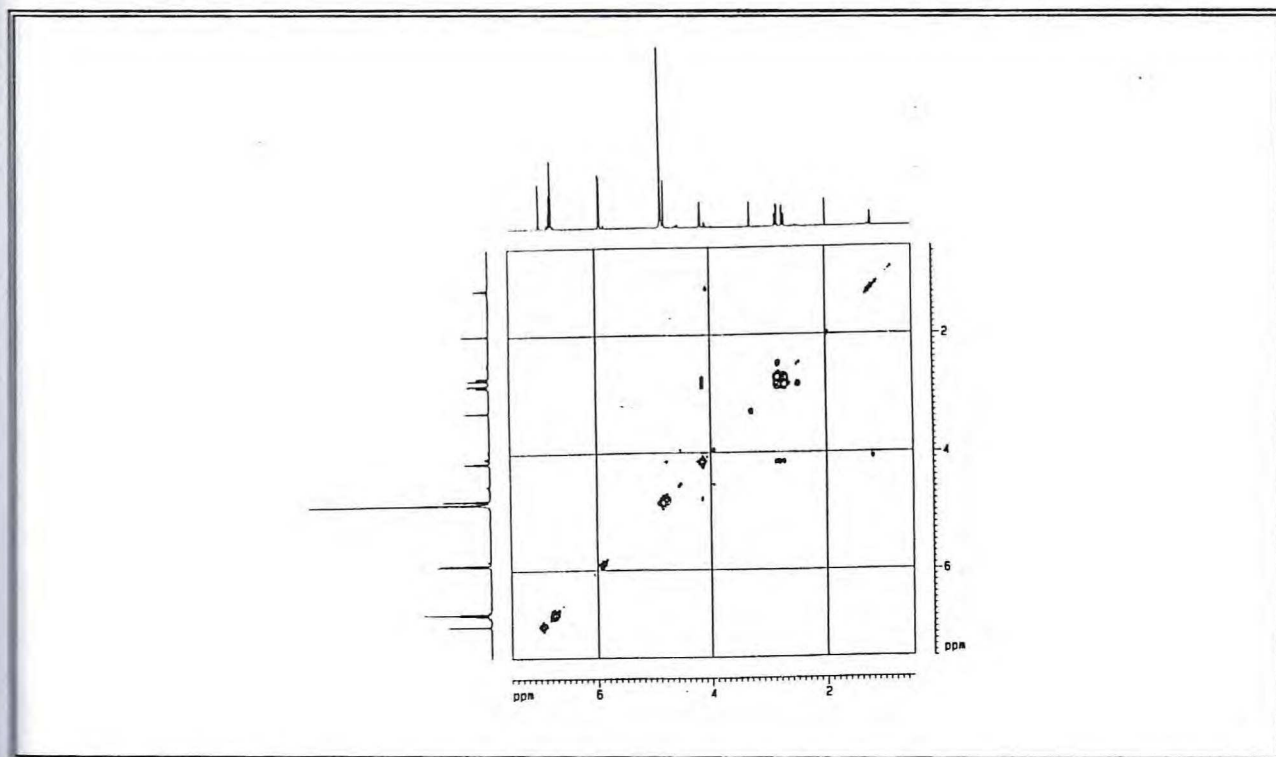


Figura 49 - Mapa de correlação heteronuclear $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ à uma ligação – HMQC (75 MHz, CD_3OD) de PHPFV-1

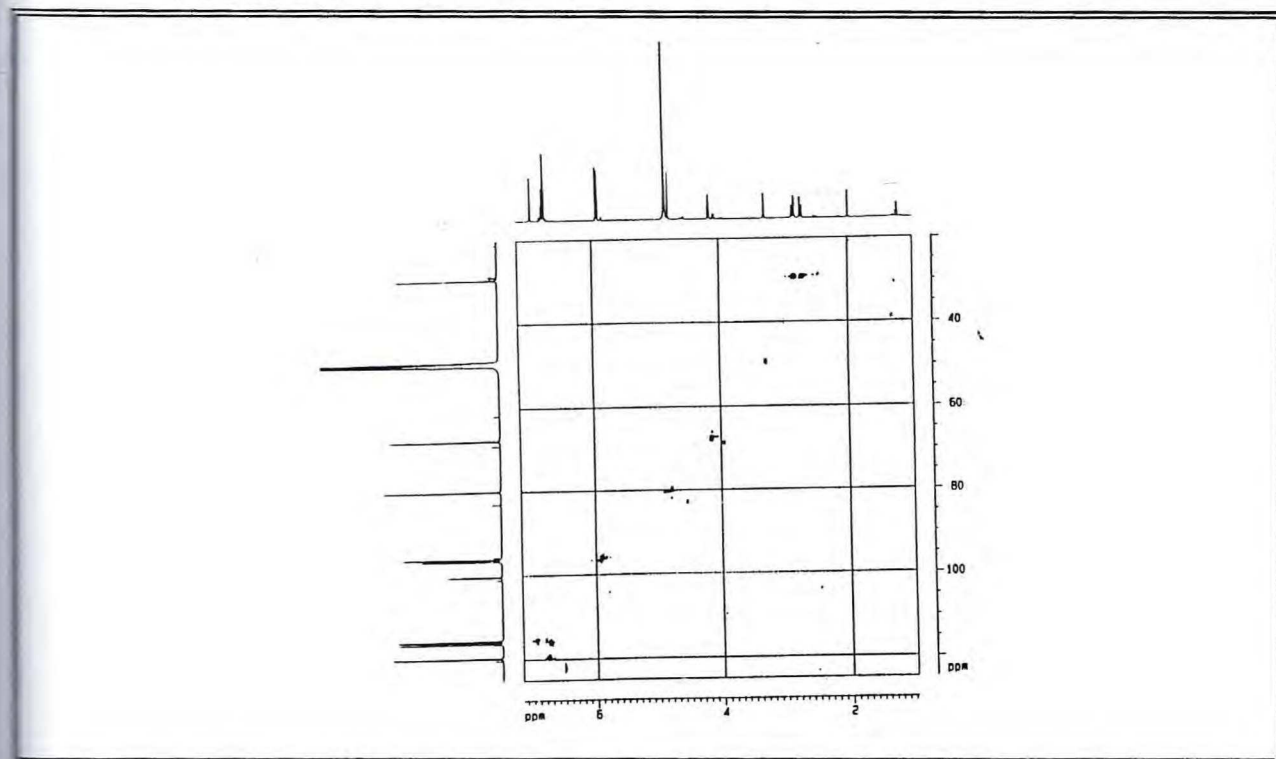


Figura 50 – Mapa de correlação heteronuclear $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ à mais de uma ligação HMBC (75 MHz, CD_3OD) de PHPFV-1

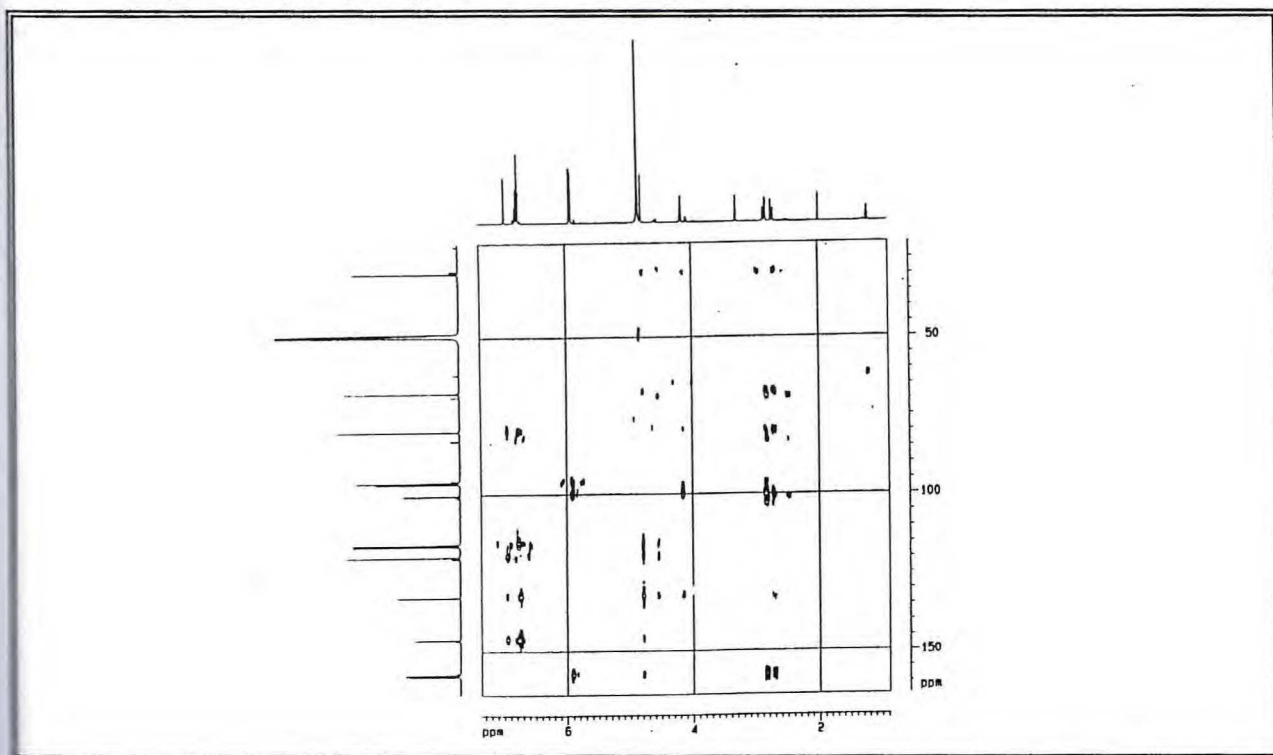


Figura 51 – Mapa de correlação heteronuclear $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ à mais de uma ligação – HMBC (75 MHz, CD_3OD) de PHPFV-1

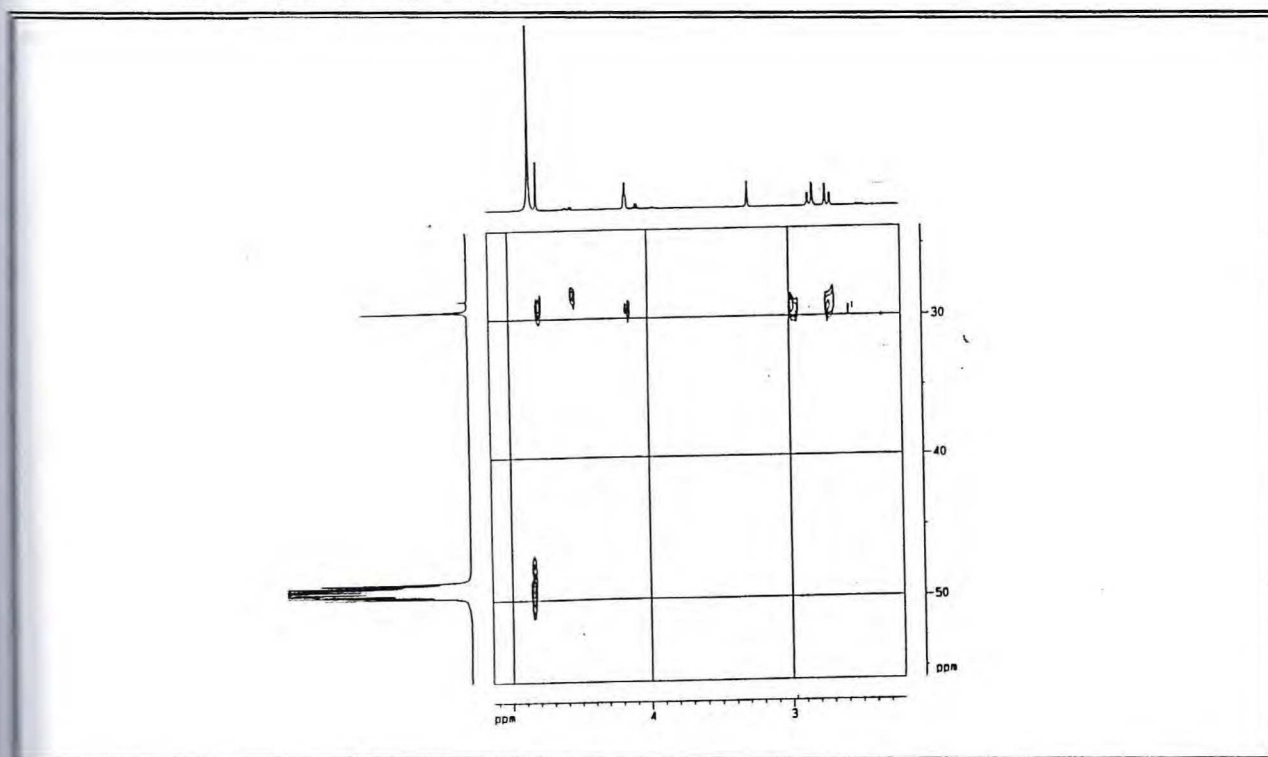


Figura 52 - Mapa de correlação heteronuclear $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ à mais de uma ligação – HMBC (75 MHz, CD_3OD) de PHPFV-1

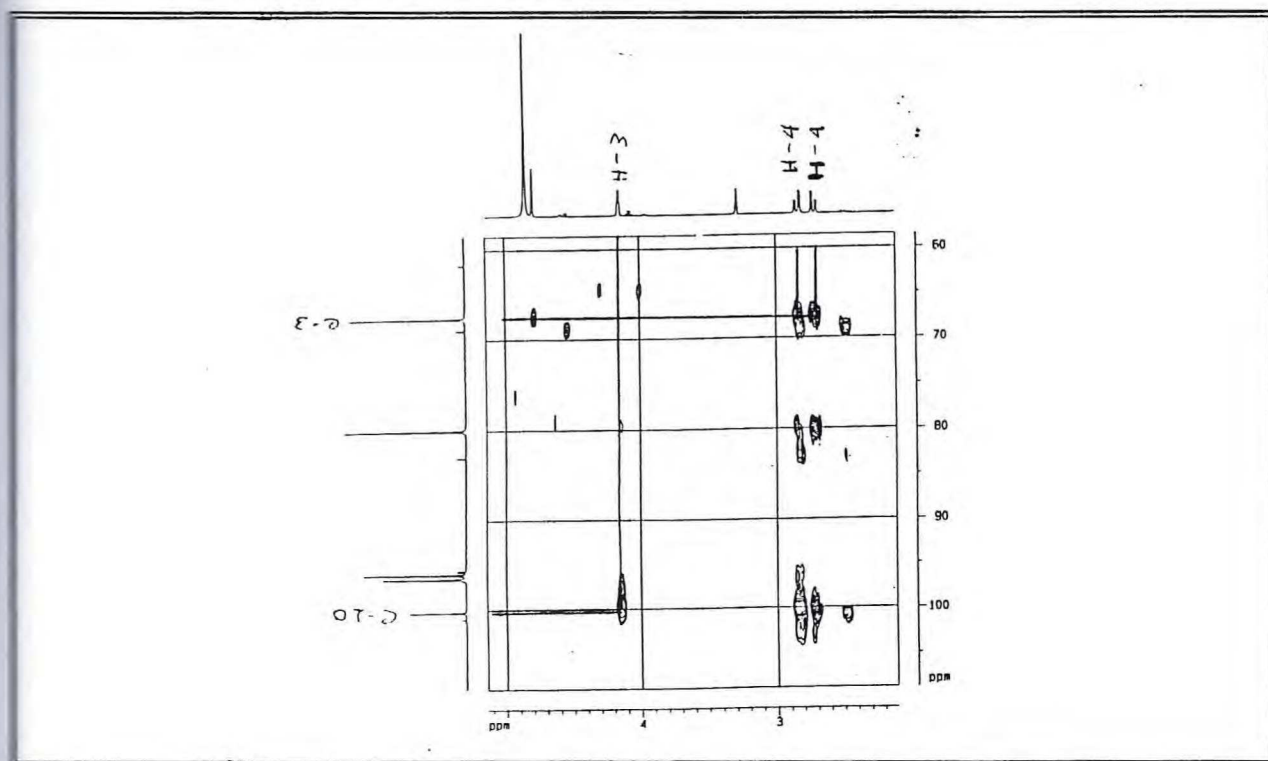
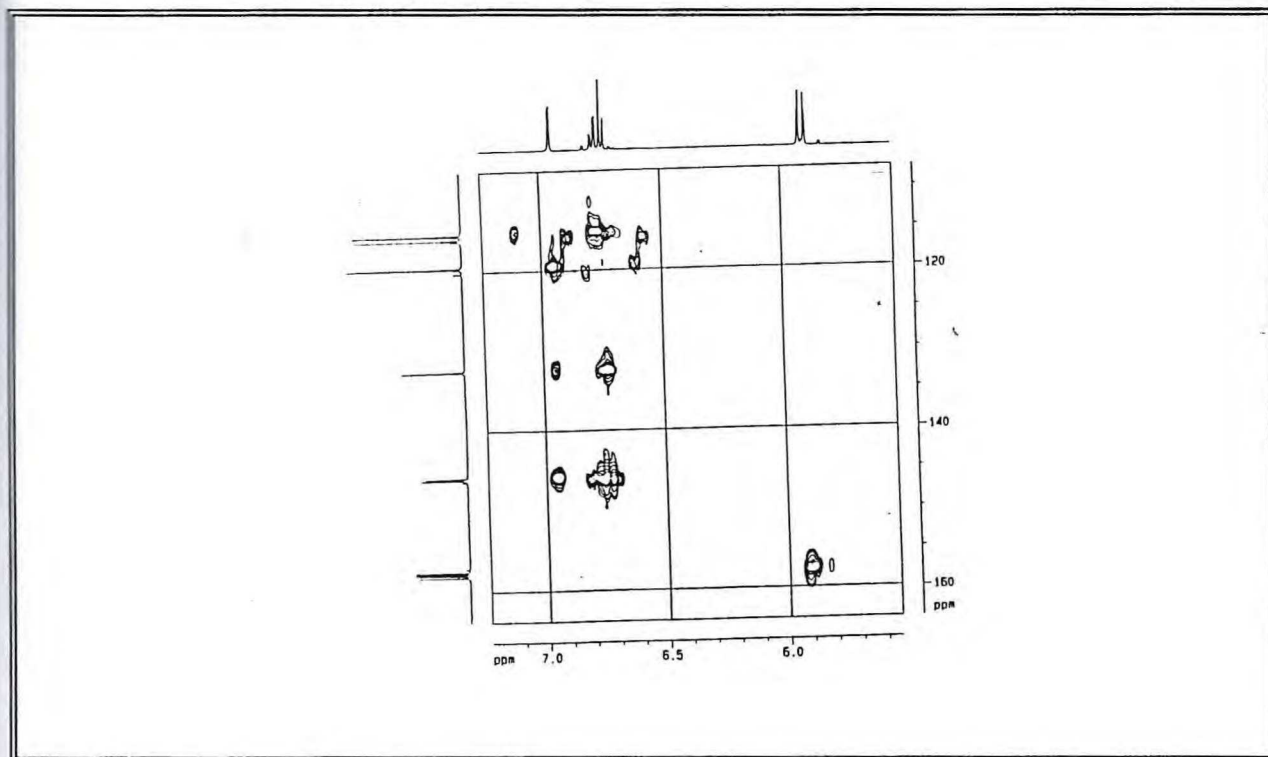


Figura 53 - Mapa de correlação heteronuclear $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ à mais de uma ligação – HMBC (75 MHz, CD_3OD) de PHPFV-1



4.1.7. Determinação estrutural de PHPF-1 (28)

O tratamento cromatográfico em sílica gel da fração AcOEt (2,8g) EEFA proveniente do extrato etanólico das folhas, forneceu por eluição em acetato (ítem. 8.5.11, Pág. 165) um sólido amorfo, amarelo, solúvel em acetona, com faixa de fusão 232 – 234°C, codificado de PHPF-1.

O espectro de absorção na região do infravermelho (Fig. 54, Pág. 80), apresentou uma banda em 3402 cm^{-1} característica de vibração de deformação axial de O-H, uma banda em 1662 cm^{-1} referente a carbonila C=O, revelou ainda bandas em 1611, 1521, 1460 e 826 cm^{-1} indicativo da presença de anel aromático e uma banda em $1168,2\text{ cm}^{-1}$ típica de vibração com deformação axial de C-O.

O espectro de RMN ^{13}C – BB (Broad Band) totalmente desacoplado (Fig. 55, Pág. 80) mostrou um total de quinze linhas espectrais, sendo que uma em δ_{C} 176,5 foi associada a presença de carbonila conjugada, e as quatorze linhas restantes foram relacionadas a carbonos sp^2 . O estudo comparativo dos espectros de RMN ^{13}C – BB e RMN ^{13}C – DEPT, $\theta = 135^\circ$ (Fig. 56, Pág. 81) revelou a presença de cinco carbonos metínicos (CH) e dez carbonos não-hidrogenados, incluindo o carbono carbonílico. Dentre estes, sete são oxigenados com valores de deslocamentos químicos em δ_{C} 164,9 , 162,1 , 148,3 , 145,8 e 136,7, associados de acordo com regras empíricas para deslocamento químico de ^{13}C , bem como com padrões com registros na literatura⁴³.

De acordo com os dados obtidos foi possível atribuir para PHPF-1 a fórmula molecular $\text{C}_{15}\text{H}_{10}\text{O}_7$ apresentando um índice de deficiência de hidrogênio (IDH) igual a onze, justificado pela presença de ligações duplas carbono-carbono, uma ligação dupla carbono-oxigênio e de três anéis. Estes dados sugerem que PHPF-1 é um flavonóide.

O espectro de RMN ^1H (Fig. 57, Pág. 81) revelou a presença de sinais de hidrogênios aromáticos com valores na escala de deslocamento químico em δ_{H} 6,50 (1H, d, $J = 1,9\text{ Hz}$), δ_{H} 6,23 (1H, d $J = 1,9\text{ Hz}$), δ_{H} 7,79 1H, d, $J = 2,1\text{ Hz}$) e δ_{H} 6,96 δ (1H, d, $J = 8,6\text{ Hz}$) e um duplo dubleto posicionado em δ_{H} 7,67 (1H, dd, $J = 8,6\text{ Hz}$ e $2,1\text{ Hz}$), além do sinal em δ 12,15 δ (s) referente a hidroxila quelada conforme valores mostrados na Tab. 11, Pág. 79. O acoplamento de dois hidrogênios meta posicionados sugeriu a presença de um anel dissustituído nas posições 5 e 7, em acordo com a presença da hidroxila quelada. No anel C,

o padrão de desdobramento de dois hidrogênios *orto*, sendo um deles com acoplamento *orto* e *meta*, leva a supor que existem também dois grupos hidroxilas no anel e que estes estão *orto* posicionados. De acordo com o padrão de acoplamento revelado pelo espectro de RMN ^1H , confirma-se o caráter heptaoxygenado já revelado pelo espectro de RMN ^{13}C , já que cinco das substituições foram atribuídas a presença de hidroxilas e as outras duas a um éter cíclico.

Os valores de deslocamentos químicos de ^{13}C de PHPF-1 mostram-se semelhantes àqueles registrados para PHPFM-1, exceto as absorções referentes a unidade de açúcar, ausentes neste caso.

Fundamentado nos dados discutidos, juntamente com a presença de um sinal em δ_{C} 136,7 que representa o carbono quaternário idêntico ao C-3 da quercetina registrado na literatura⁵⁰, conforme Tab. 11, Pág. 79, foi proposto para PHPF-1 a estrutura compatível com a quercetina, Pág. 79 a qual está sendo relatada pela primeira vez neste gênero.

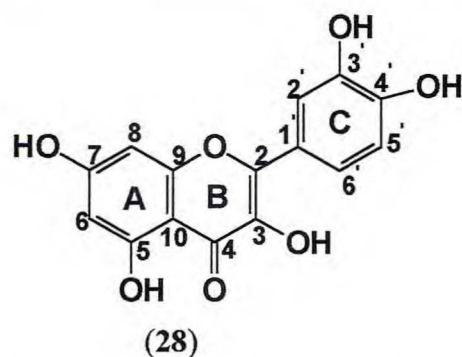


Tabela 11 - Dados de RMN ^1H e ^{13}C e correlações $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ [HMQC – $^1\text{J}_{\text{CH}}$ e HMBC – $^n\text{J}_{\text{CH}}$ ($n = 2$ e $n = 3$)] de PHPF-1 (**28**) em (CD_3) $_2\text{CO}$)

$^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ - HMQC – $^1\text{J}_{\text{CH}}$			
C	δ_{C}	δ_{H} , J (Hz)	Ref. 50
2	146,9	-	146,9
3	136,7	-	135,5
4	176,5	-	175,8
5	162,1	-	160,7
6	99,1	6,23 (d, J = 1,9)	98,2
7	164,9	-	163,9
8	94,5	6,50 (d, J = 1,9)	93,3
9	157,8	-	156,2
10	104,1	-	103,1
1'	123,8	-	122,1
2'	115,7	7,79 (d, J = 2,1)	115,3
3'	145,8	-	145,0
4'	148,3	-	147,6
5'	116,2	6,96 (d, J = 8,6)	115,6
6'	121,5	7,67 (dd, J = 8,6 e 2,1)	120,0
HO-5	-	12,15 (s)	

Figura 54 - Espectro de absorção na região do infravermelho (KBr) de PHPF-1

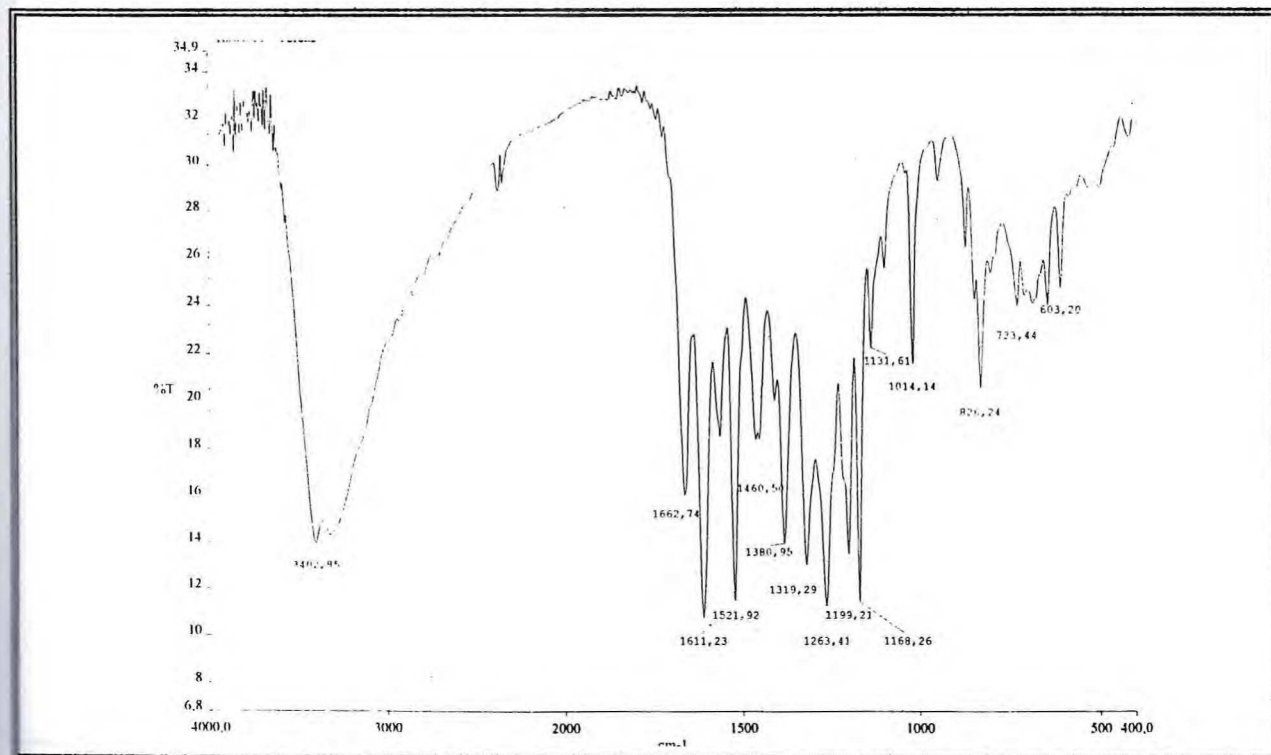
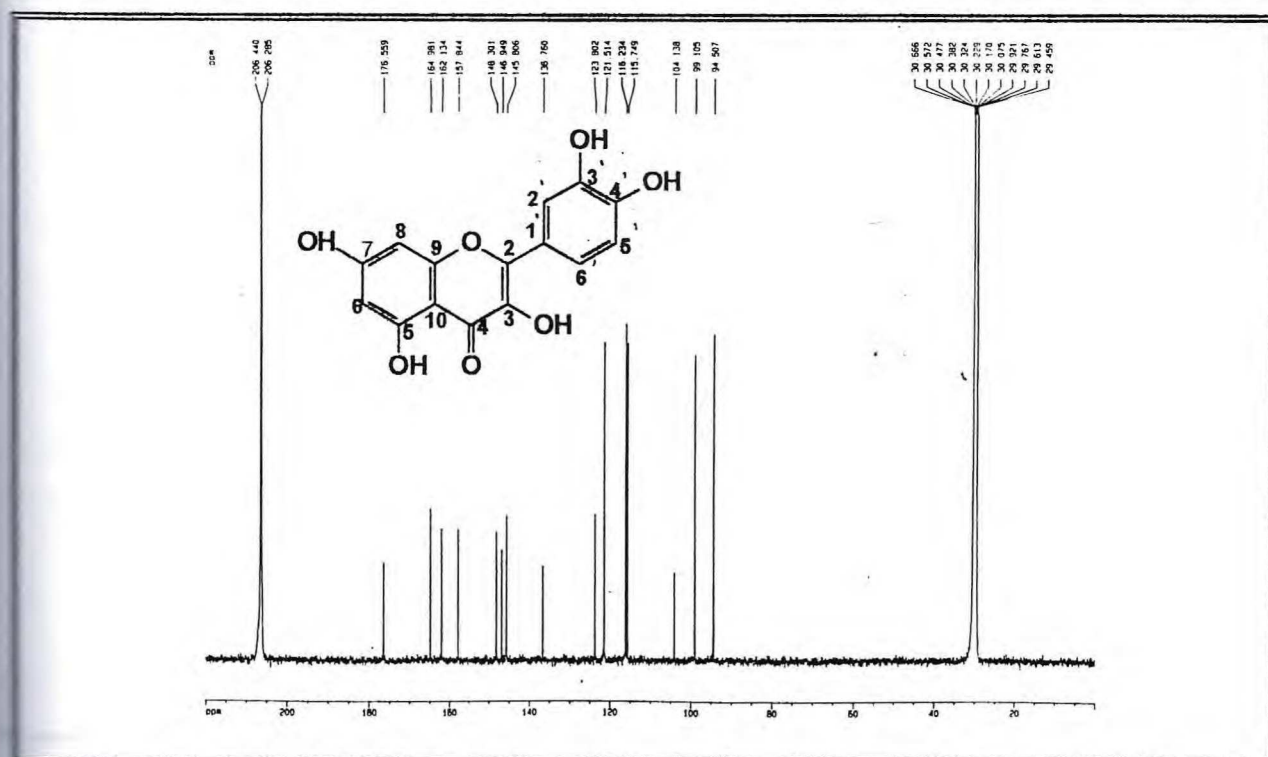
Figura 55 - Espectro de RMN ^{13}C – BB (125 MHz, CD_3COCD_3) de PHPF-1

Figura 56 - Espectro de RMN ^{13}C – DEPT - 135° (125 MHz, CD_3COCD_3) de PHPF-1

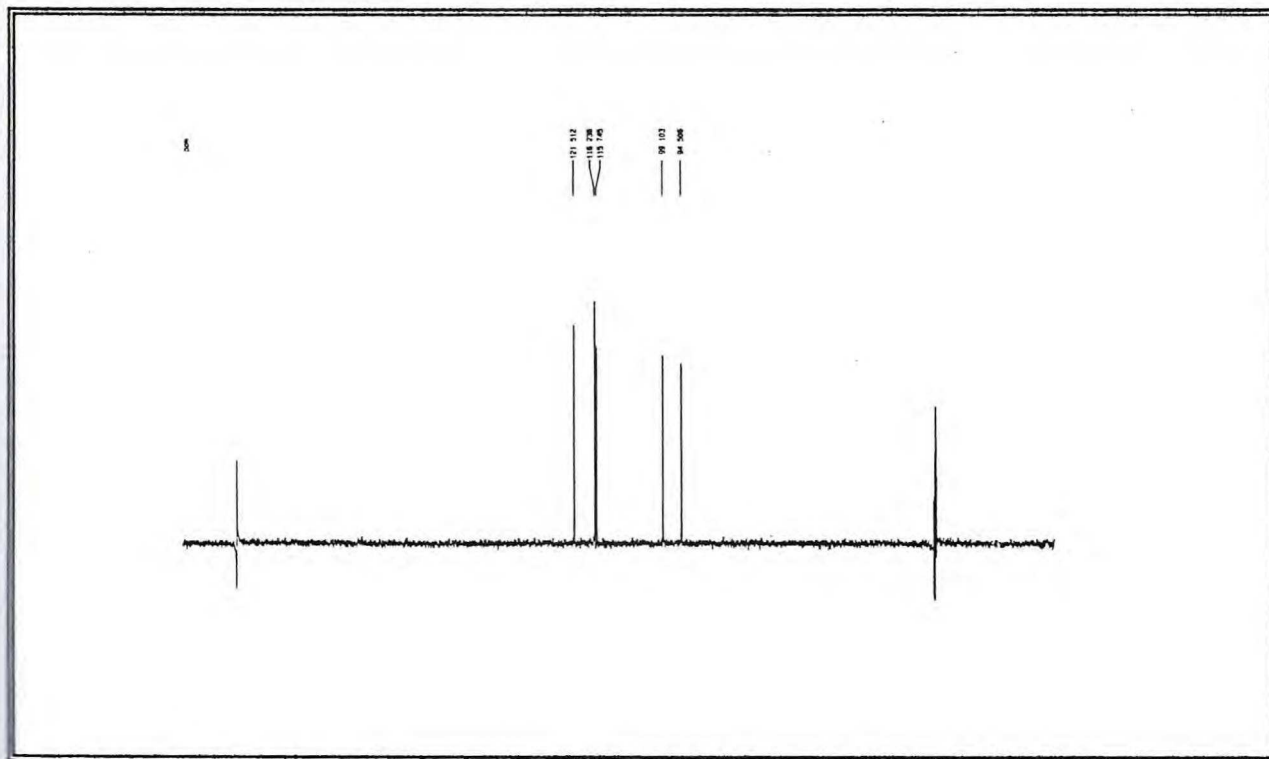
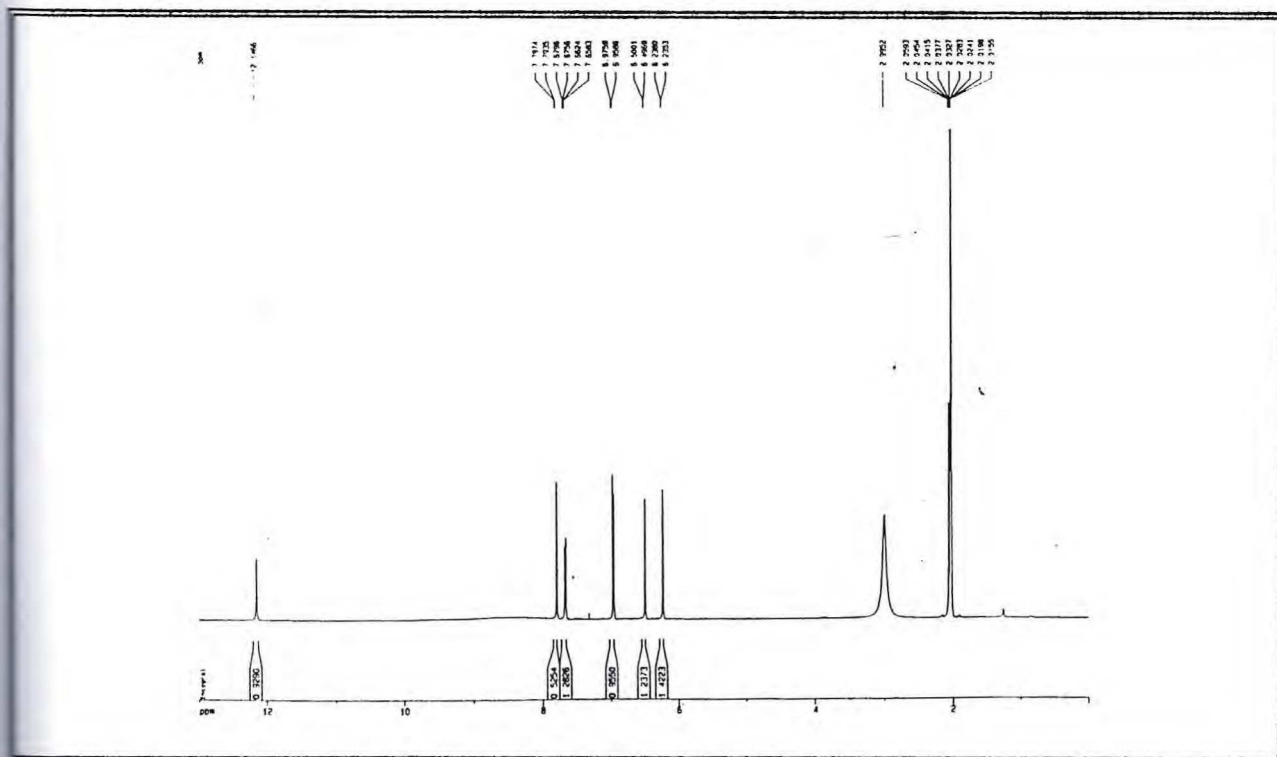


Figura 57 - Espectro de RMN ^1H (125 MHz, CD_3COCD_3) de PHPF-1



4.2. Determinação estrutural dos constituintes químicos fixos isolados de *Protium tenuifolium*

O estudo fitoquímico da espécie *Protium tenuifolium* nos levou ao isolamento das seguintes substâncias: na resina, α -amirina e β -amirina como uma mistura binária, já isolada na resina de *Protium heptaphyllum* (item 8.5.3, Pág. 155) e codificada de [PHPR-2a e PHPR-2b]. A identificação comprovando a existência da mesma mistura foi estabelecida através da comparação em CCD e dados de (IV) e RMN ^1H e ^{13}C . Do extrato etanólico das folhas PTF-1 (**29**), PTF-2 (**30**) e PTF-3, sendo esta última já isolada do hidrolato do fruto maduro de *Protium heptaphyllum* (item 8.5.7, Pág 160) codificada de PHPFM-1. Análise comparativa em CCD e dados de (IV) e RMN ^1H e ^{13}C nos revelaram ser a mesma substância. Do extrato etanólico das cascas foi obtido PTC-1 (**31**).

4.2.1. Determinação estrutural de PTF-1 (**29**)

A substância codificada de PTF-1 isolada da fração metanólica das folhas (3,0 g) por meio de sucessivas cromatografias em coluna de sílica gel e coluna flash (item 8.6.3, Pág. 169), apresentou-se como um material viscoso, amarelo claro, solúvel em metanol, com rotação óptica específica $[\alpha]_D^{20} = -36^\circ$ (c, 0,2 em CH_3OH).

O espectro de absorção na região do infravermelho (Fig. 58, Pág. 85) apresentou uma banda larga e intensa em 3505 cm^{-1} referente a vibração de deformação axial de OH, bandas em 1076 e 1038 cm^{-1} de deformação axial de C-O.

O espectro de RMN ^{13}C -BB totalmente desacoplado (Broad Band) de PTF-1 (Fig. 59, Pág. 85), registrou um total de oito linhas espectrais. Sete linhas na região de C- sp^3 ligados a átomos de oxigênio em acordo com a escala de deslocamento químico⁴³, sendo dois carbonos metilênicos e cinco carbonos metínicos, e ainda um carbono metílico em δ_{C} 15,7. Esta análise tornou-se possível após a comparação dos dados obtidos a partir dos espectros de DEPT 135° (Fig. 60, Pág. 86) com o espectro de RMN ^{13}C – BB.

O espectro de RMN ^1H (Fig. 61, Pág. 86) registrou um dubleto em δ_{H} 4,28 (1H, d,

= 7,77 Hz) de hidrogênio anomérico, o qual é confirmado pelo espectro de RMN ^{13}C através da absorção em δ_{C} 104,1. Um duplo dubleto em δ_{H} 3,18 (1H, dd, $J = 8,23$ e $8,65$ Hz), um tripleto em δ_{H} 3,36 (1H, t, $J = 8,58$ Hz). Mostrou ainda outro tripleto em δ_{H} 3,30 (1H, t, $J = 10,86$ Hz), um multiplete em δ_{H} 3,28 (1H, m), dois duplos dubletos em 3,88 (1H, dd, $J = 12,37$ e $2,04$ Hz) e 3,68 (1H, dd, $J = 11,87$ e $5,45$ Hz) que podem ser atribuídos aos hidrogênios de um grupo metilênico de uma unidade de glicose, dois duplos quartetos em 3,63 (1H, dq, $J = 9,54$ e $7,08$ Hz) e 3,97 (1H, dq, $J = 9,55$ e $6,88$ Hz) referentes aos hidrogênios do C-7, além de um duplo dubleto em δ_{H} 1,24 referente a hidrogênio metílico.

Os dados apresentados pelos espectros de RMN ^{13}C e RMN ^1H , conforme Tab. 12, Pág. 84, em conjunto com o espectro de RMN ^{13}C DEPT-135° são condizentes com o composto 1-O-etilglicose de fórmula molecular $\text{C}_8\text{H}_{16}\text{O}_6$, que pode ser considerado um artefato de glicose.

A total confirmação da estrutura foi estabelecida através da comparação de dados de ^{13}C com dados da literatura⁵¹ (Tab. 12, Pág. 84), bem como com a análise dos dados do mapa de correlação homonuclear $^1\text{H} \times ^1\text{H}$ – COSY (Fig. 62, Pág. 87) que mostrou acoplamentos entre os hidrogênios H-7 (δ_{H} 3,97) e H-8 (δ_{H} 1,24) e entre o hidrogênio anomérico H-1 (δ_{H} 4,28) e H-2 (δ_{H} 3,18) de forma clara e convincente.

O mapa de correlação heteronuclear a uma ligação HMQC (Fig. 63, Pág. 87) nos permitiu atribuir as absorções de todos os hidrogênios presentes aos seus respectivos átomos de carbonos, como podemos ver na Tab. 12, Pág. 84. Já o mapa de correlação heteronuclear a longa distância HMBC $^n\text{J}_{\text{CH}}$ ($n = 2$ e $n = 3$) (Fig. 64, Pág. 88) nos mostrou os acoplamentos entre o carbono anomérico (C-1) em δ_{C} 104,05 com H-2, 2H-7 além de outros, auxiliando nas atribuições dos deslocamentos químicos dos carbonos e especialmente aos não-hidrogenados. O acoplamento entre (C-1) em δ_{C} 104,05 com 2H-7 em δ_{H} 3,63 e 3,97, confirma a presença e a localização do grupo etil. A posição equatorial do grupo etil é justificada pelo valor da constante de acoplamento ($J_{\text{axil,axil}} = 7,77$ Hz) do hidrogênio anomérico em δ_{H} 4,28 com o H-2 em δ_{H} 3,18. As atribuições de HMBC encontram-se na Tab. 12, Pág. 84.

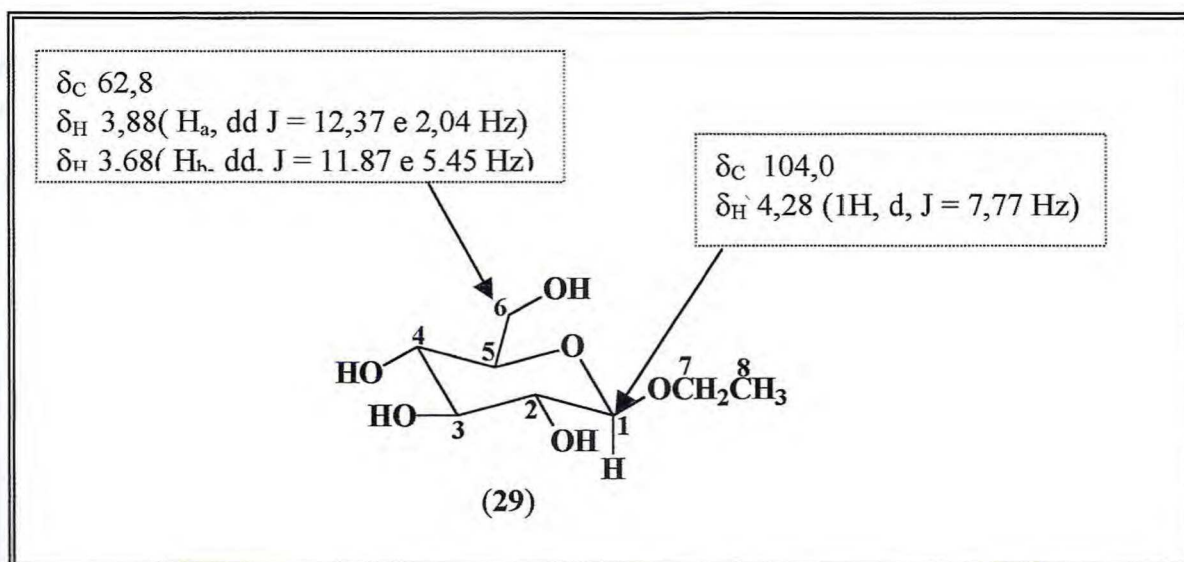


Tabela 12 - Dados de RMN 1H e ^{13}C e correlações $^1H \times ^{13}C$ [HMQC – $^1J_{CH}$ e HMBC – $^nJ_{CH}$ ($n = 2$ e $n = 3$)] de PTF-1 (29) em CD_3OD

$^1H \times ^{13}C$ – HMQC – $^1J_{CH}$			$^1H \times ^{13}C$ – HMBC – $^nJ_{CH}$ ($n = 2$ e 3)		
C	δ_C	δ_H , J(Hz)	$^2J_{CH}$	$^3J_{CH}$	Ref. 51
1	104,0	4,28 (1H, d, $J = 7,77$)	H-2	2H-7	103,9
2	75,1	3,18 (1H, dd, $J = 8,23$ e $8,65$)	-	H-4	74,7
3	78,1	3,36 (1H, t, $J = 8,58$)	H-2; H-4	H-1 : H-5	77,9
4	71,7	3,30 (1H, t, $J = 10,86$)	H-5; H-3	2H-6	71,4
5	77,9	3,28 (1H, m)	2H-6; H-4	H-1	77,7
6	62,8	3,88 (1H, dd, $J = 12,37$ e $2,04$) 3,68 (1H, dd, $J = 11,87$ e $5,45$)	H-5	-	62,6
7	66,2	3,63 (1H, dq, $J = 9,54$ e $7,08$) 3,97 (1H, dq, $J = 9,55$ e $6,88$)	3H-8	H-1	66,1
8	15,7	1,24 (3H, dd, $J = 6,90$)	2H-7	-	15,4

Figura 58 - Espectro de absorção na região do infravermelho (KBr) de PTF-1

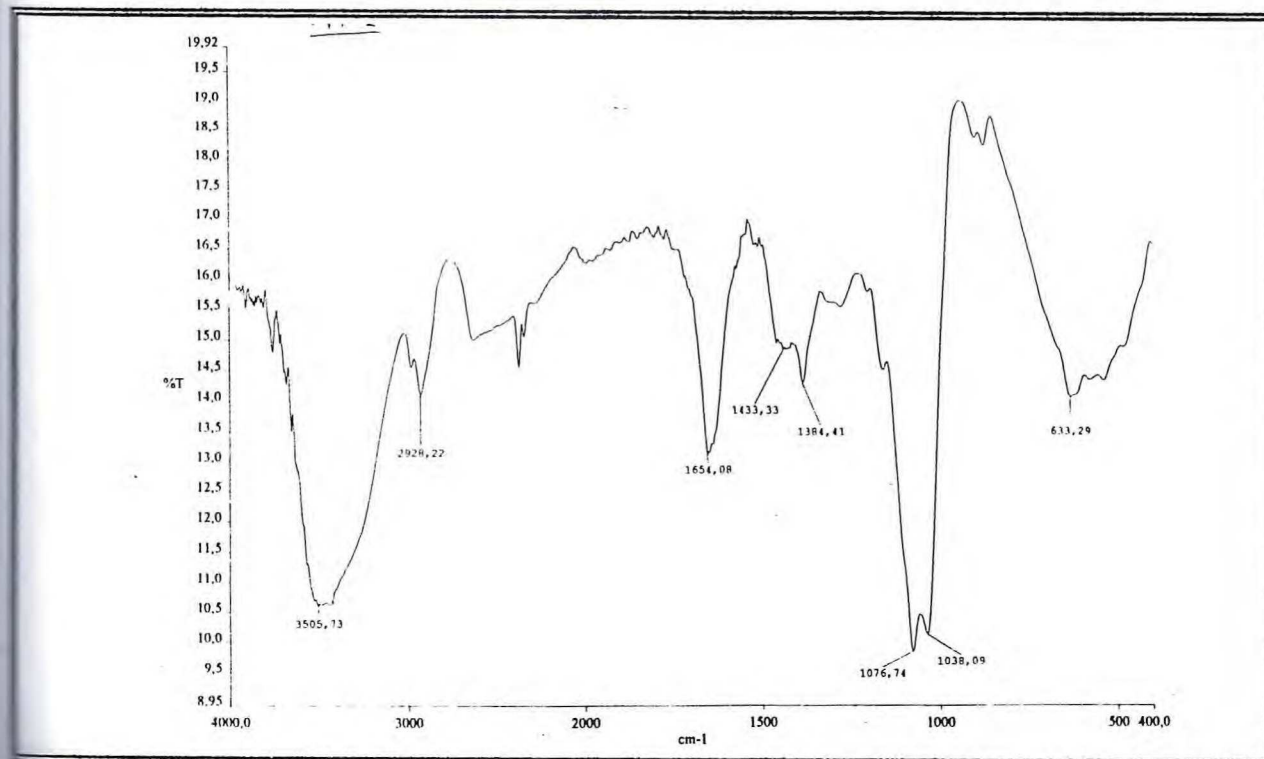
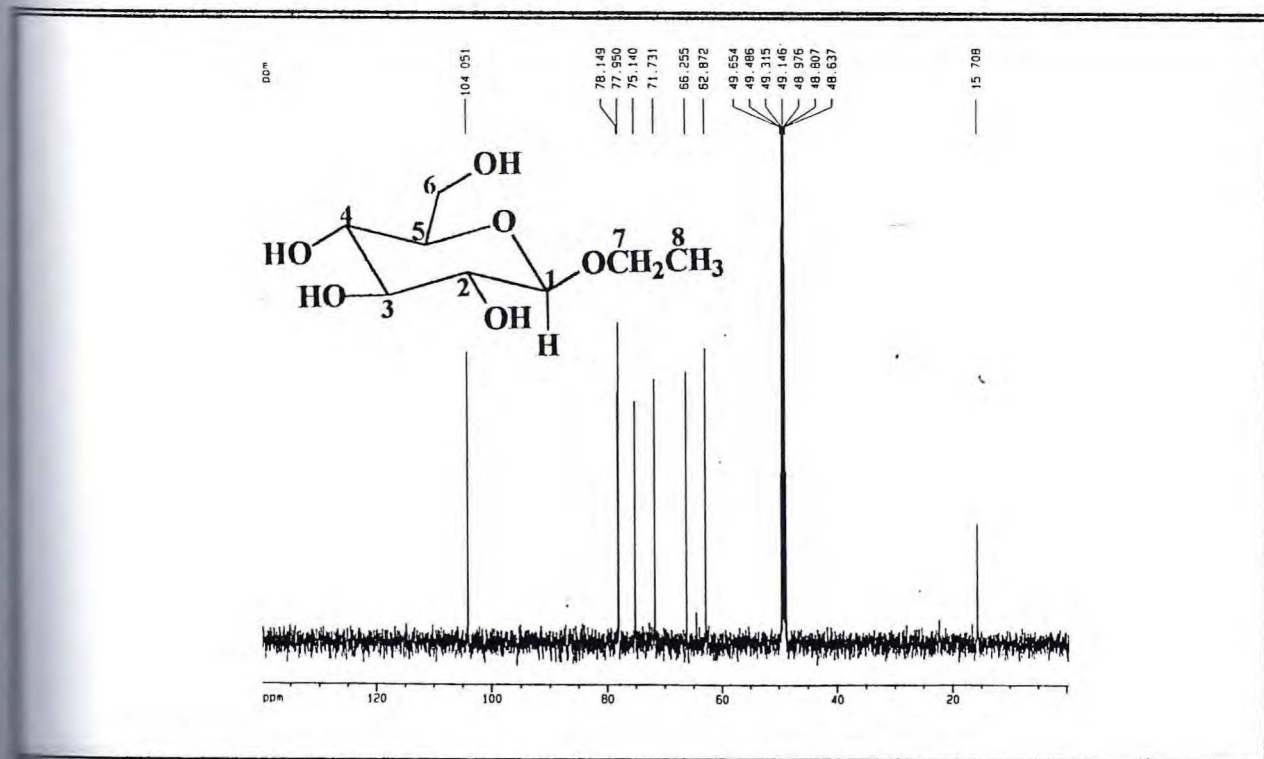
Figura 59 - Espectro de RMN ^{13}C – BB (125 MHz, CD_3OD) de PTF-1

Figura 62 - Mapa de correlação homonuclear $^1\text{H} \times ^1\text{H}$ – COSY (300 MHz, CD_3OD) de PTF-1

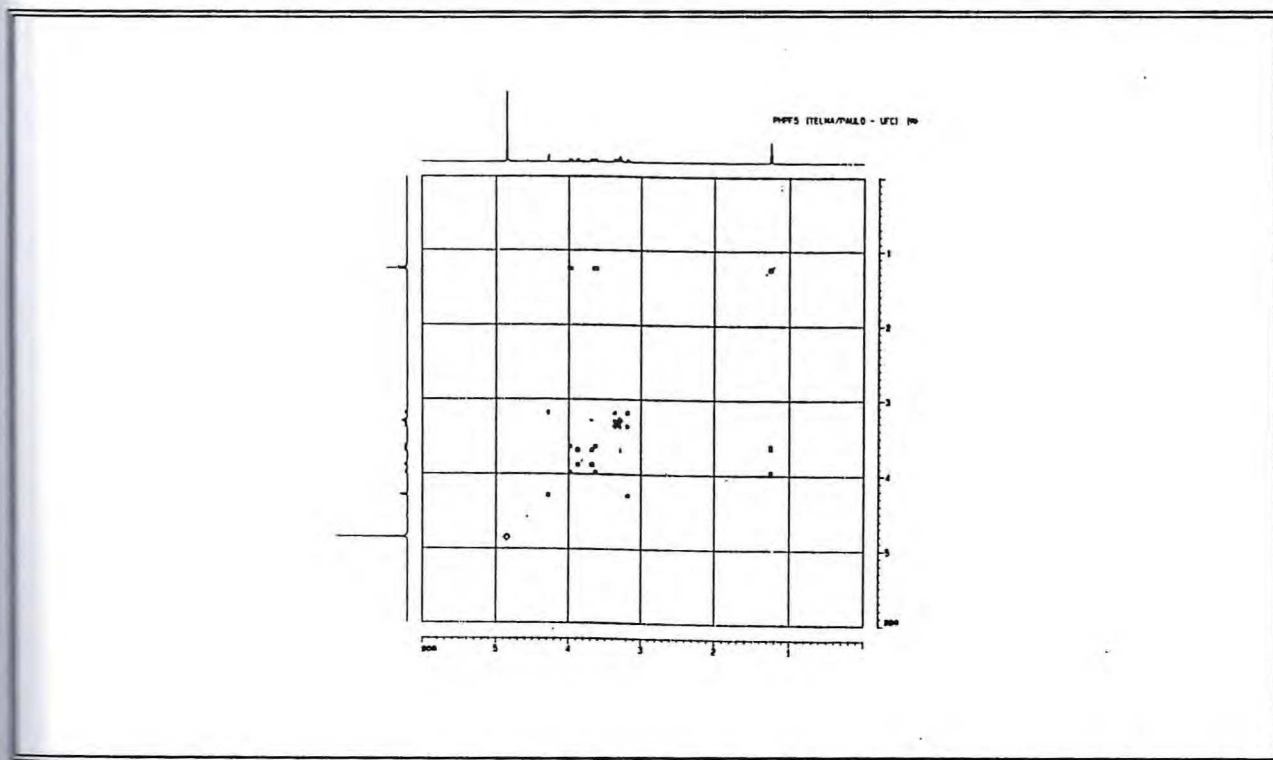


Figura 63 - Mapa de correlação heteronuclear $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ à uma ligação – HMQC (75 MHz, CD_3OD) de PTF-1

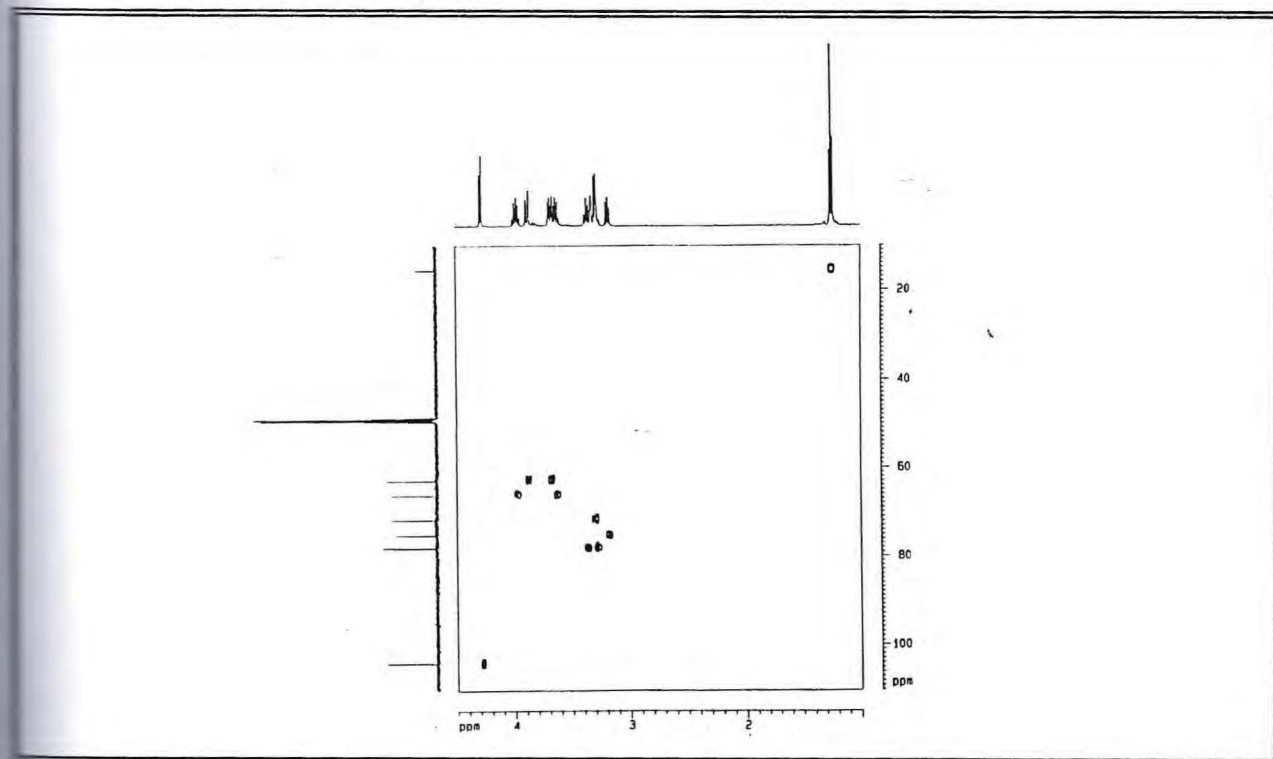
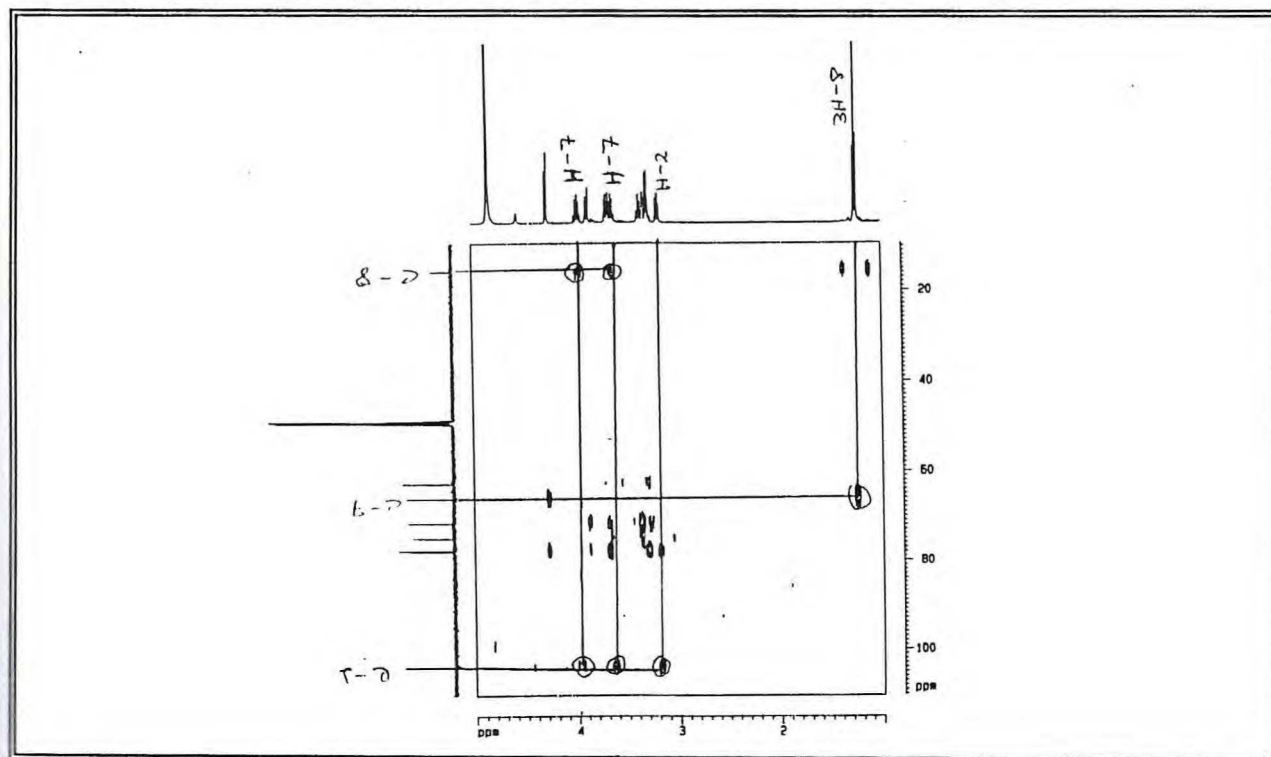


Figura 64 - Mapa de correlação heteronuclear $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ à mais de uma ligação - HMBC (75 MHz, CD_3OD) de PTF-1



4.2.2. Determinação estrutural de PTF-2 (30)

A fração AcOEt (0,7g) proveniente do extrato etanólico das folhas item 8.6.4. pág. 169, foi submetida à cromatografia em coluna sephadex, por eluição em metanol e posteriormente em coluna flash em sílica gel que forneceu por eluição em AcOEt : clorofórmio (5%) um sólido amorfo amarelo, solúvel em metanol, com faixa de fusão 172 - 174°C que foi codificado de PTF-2.

O seu espectro de absorção na região do infravermelho (Fig. 65, Pág. 93) apresentou uma banda intensa em 3412 cm^{-1} de vibração de deformação axial de O-H, uma banda em 1647 cm^{-1} característica de estiramento C=O de carbonila. Vibrações envolvendo estiramento C=C de anel aromático em 1509^1 e 1454 cm^{-1} , e ainda absorção referente a vibração de deformação axial de C-O em 1177 cm^{-1} .

O espectro de RMN ^{13}C – BB (Broad Band) totalmente desacoplado (Fig. 66, Pág. 93) revelou dezenove linhas espectrais. As intensidades relativamente altas das linhas espectrais com valores de δ_{C} 116,7 e 132,0 sugerem que cada linha spectral possa ser atribuída a dois átomos de carbono. A composição de cada átomo de carbono foi definida por comparação do espectro de RMN ^{13}C com o espectro DEPT 135° (Fig. 67, Pág. 94). A partir desta análise pôde-se identificar nove sinais de carbonos metínicos (CH) dos quais cinco alifáticos ligados a oxigênio que de acordo com suas posições na escala de deslocamento químico, sugere a presença de uma unidade de açúcar na molécula, e quatro sinais na região de C- sp^2 , sendo que dois sinais correspondem a quatro átomos de carbonos, justificado pelas altas intensidades, típicos de um anel aromático. A presença ainda de sinal de carbono metílico e nove sinais de carbonos não-hidrogenados, onde o sinal em δ_{C} 179,6 típico de carbonila conjugada, e ainda sinais na região em δ_{C} 159,31 e 136,30 nos levou a propor para PTF-2 uma possível estrutura básica do tipo $\text{C}_6\text{-C}_3\text{-C}_6$ típica de compostos flavonoídicos.⁴⁸

O espectro de RMN ^1H (Fig. 68, Pág. 94) mostrou sinais referentes a dubletos em δ_{H} 6,18 (1H, d, $J = 2\text{ Hz}$) e 6,35 (1H, d, $J = 1,9\text{ Hz}$) que de acordo com valores de J caracterizam acoplamentos do tipo meta em anel aromático. Revelou ainda sinais de alta intensidade de duplo dubletos em δ_{H} 6,94 (1H, dd, $J = 8,8$ e $2,8\text{ Hz}$), δ_{H} 7,77 (1H, dd, $J = 8,8$ e $2,8\text{ Hz}$), δ_{H} 6,94 (1H, dd, $J = 8,8$ e $2,8\text{ Hz}$) e δ_{H} 7,77 (1H, dd, $J = 8,8$ e $2,8\text{ Hz}$) de hidrogênios aromáticos em anel para-substituído. Mostrou também sinais relacionados as absorções de hidrogênios da unidade de açúcar, inclusive a de um hidrogênio anomérico em

δ_H 5,37 (1H, d, $J = 1,6$ Hz) confirmado no espectro de RMN ^{13}C através da absorção em δ_C 103,6, e ainda outras quatro absorções entre δ_C 72,0 e 73,4. A presença de uma metila em δ_C 17,7 associada ao valor do carbono anomérico em δ_C 103,6 sugere que a unidade de açúcar glicosídica seja a da ramnose também presente no composto PHPFM-1.

O seu mapa de correlação homonuclear $^1H \times ^1H$ – COSY evidenciou os acoplamentos entre hidrogênios aromáticos, bem como os hidrogênios pertencentes a unidade de açúcar como mostra a Fig. 69, Pág. 95.

De acordo com os dados até então analisados pode-se aferir que se trata de composto flavônico contendo uma unidade de açúcar. Comparação dos dados de RMN ^{13}C com valores da literatura⁴⁸ mostrados na Tabela 13, Pág. 92 possibilitou identificar o composto como sendo Campferol-3-O-ramnosil (Pág. 91). O valor da constante de acoplamento ($J = 1,6$ Hz) para o hidrogênio ligado ao carbono anomérico com o hidrogênio em C-2'', justifica a posição axial-equatorial entre eles, consequentemente a ramnose encontra-se α -posicionada.

Através do mapa de correlação heteronuclear HMQC – $^1J_{CH}$ (Fig. 70, Pág. 95) foi estabelecida a associação dos hidrogênios aos átomos de carbonos correspondentes. Já o mapa de correlação heteronuclear HMBC – $^nJ_{CH}$ $n = 2$ e $n = 3$ (Fig. 71, Pág. 96) auxiliou nas correlações a longa distância especialmente dos carbonos não-hidrogenados. A ligação da ramnose com o esqueleto flavônico foi definida pelo acoplamento observado entre o C-3 em δ_C 136,30 com o hidrogênio em δ_H 5,37 (1H, d, $J = 1,6$ Hz). Apesar de bem conhecida na literatura este composto está sendo relatado pela primeira vez neste gênero.

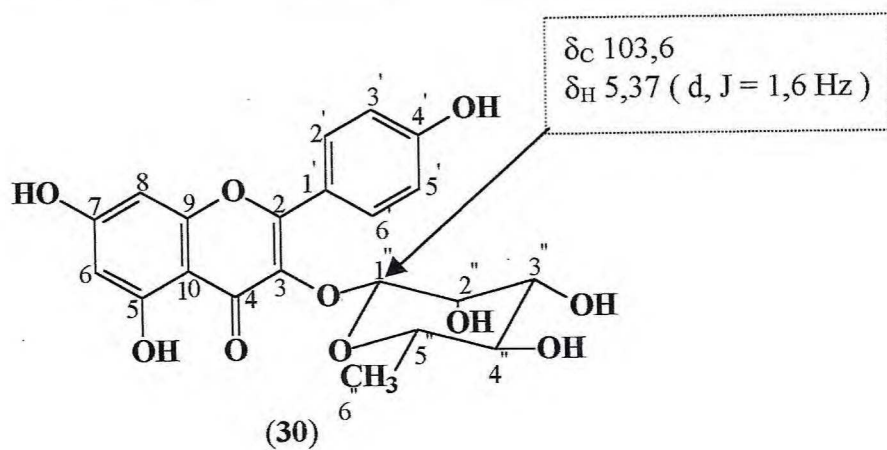


Tabela 13 - Dados de RMN ^1H e ^{13}C e correlações $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ [HMQC – $^1\text{J}_{\text{CH}}$ e HMBC – $^n\text{J}_{\text{CH}}$ ($n = 2$ e $n = 3$)] de PTF-2 (**30**) em CD_3OD

$^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ – HMQC – $^1\text{J}_{\text{CH}}$			$^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ – HMBC – $^n\text{J}_{\text{CH}}$ ($n = 2$ e 3)		
C	δ_{C}	δ_{H} , J(Hz)	$^2\text{J}_{\text{CH}}$	$^3\text{J}_{\text{CH}}$	Ref. 48
2C	159,3	-	-	H-2'; H-6'	158,8
3C	136,3	-	-	H-1''	135,9
4C	179,6	-	-	-	179,3
5C	164,0	-	-	-	163,3
6CH	100,3	6,18 (1H, d, J = 2)	-	-	99,6
7C	166,0	-	-	-	165,0
8CH	95,1	6,35 (1H, d, J = 1,9)	-	-	94,6
9C	158,8	-	-	-	158,1
10C	105,0	-	-	-	105,9
1'C	122,8	-	H-6'	H-3'	122,7
2'CH	132,0	7,77 (1H, dd, J = 8,8 e 2,8)	-	H-6'	131,7
3'CH	116,7	6,95 (1H, dd, J = 8,8 e 2,8)	H-2'	H-5'	116,4
4'C	161,7	-	H-3'; H-5'	H-2'; H-6'	160,4
5'CH	116,7	6,95 (1H, dd, J = 8,8 e 2,8)	H-6'	H-3'	116,4
6'CH	132,0	7,77 (1H, dd, J = 8,8 e 2,8)	-	H-2'	131,7
1''CH	103,6	5,37 (1H, d, J = 1,6)	-	-	102,5
2''CH	72,0	4,22 (1H, dd, J = 1,7 e 3,0)	H-1''; H-3''	-	71,6
3''CH	72,3	3,71 (1H, dd, J = 3,4 e 9,1)	H-2''	-	72,3
4''CH	73,4	3,33 (1H)	-	3H-6''	73,2
5''CH	72,1	3,30 (1H)	3H-6''	-	71,4
6''CH ₃	17,7	0,92 (3H, d, J = 5,7)	-	-	17,8

IR Spectrum (cm⁻¹ vs %T) showing characteristic absorption bands. Labeled peaks (cm⁻¹):

- 3412.25
- 1647.53
- 1509.67
- 1454.37
- 1365.89
- 1270.04
- 1211.05
- 1177.88
- 1089.40
- 967.74

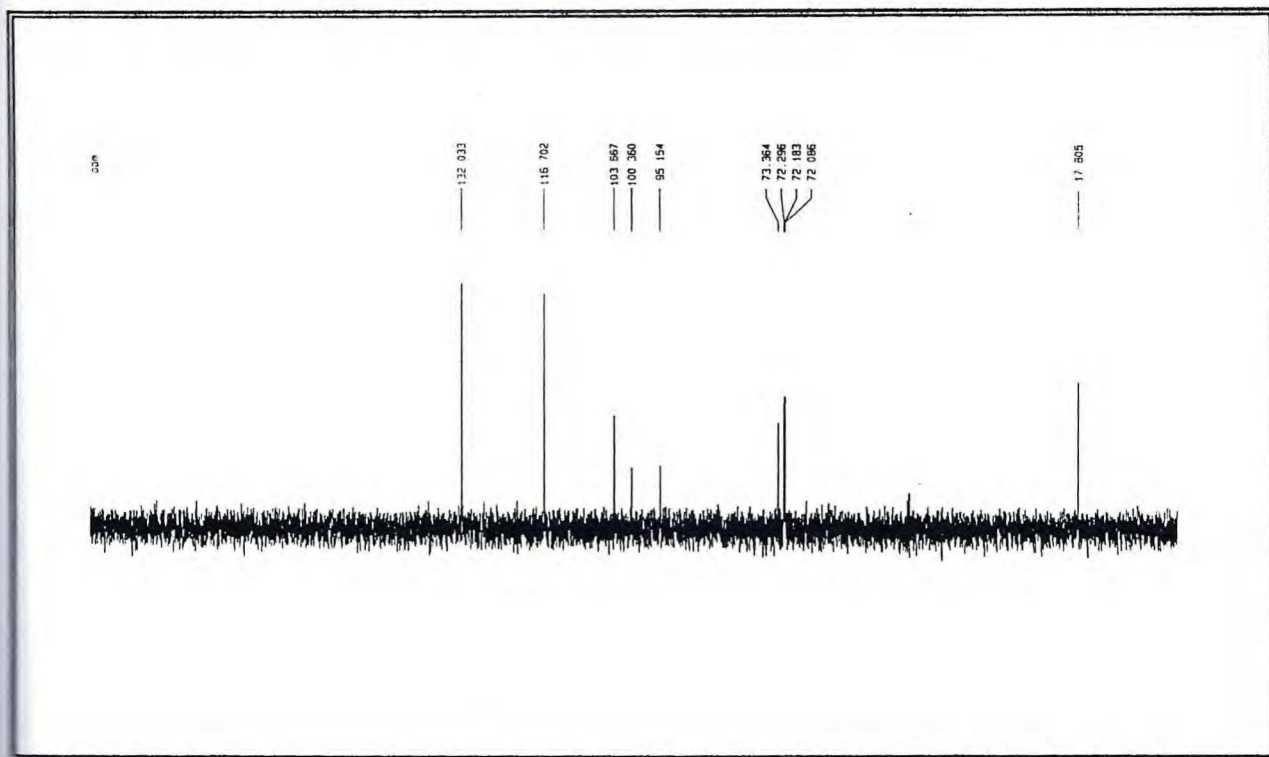
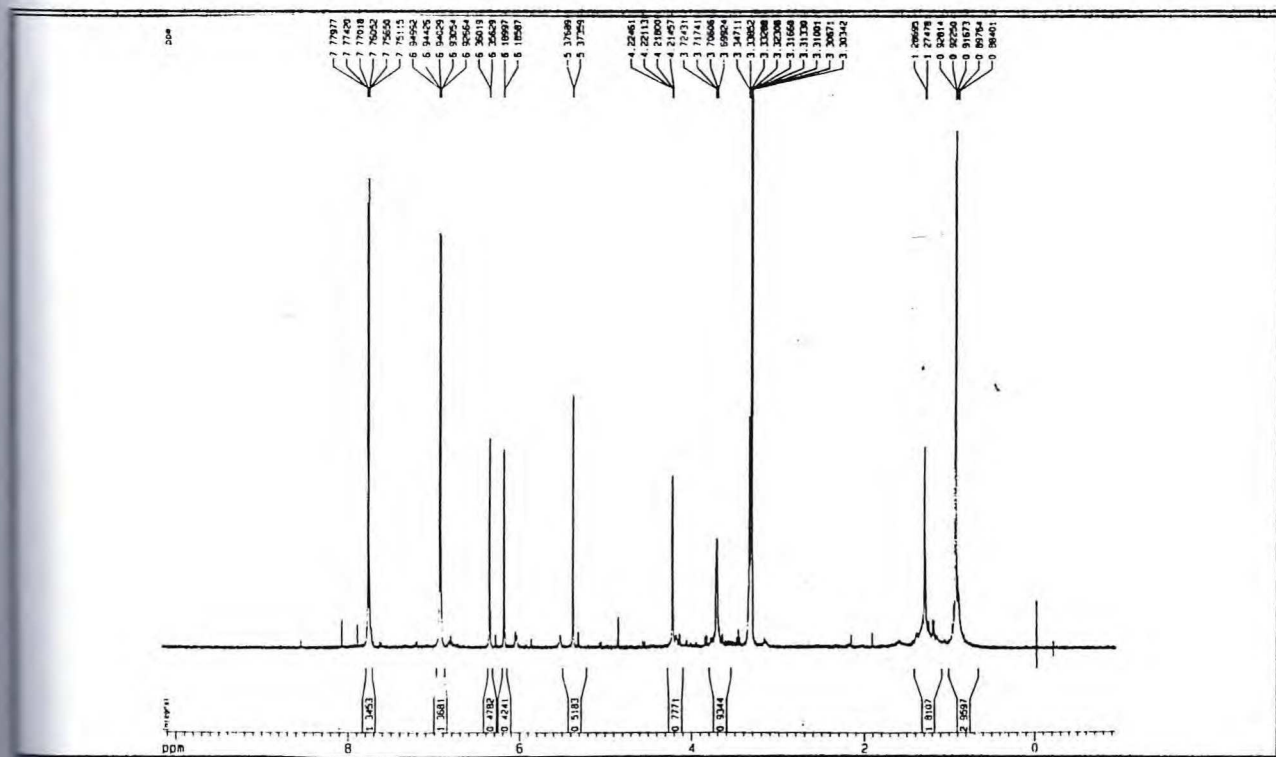
Figura 67 - Espectro de RMN ^{13}C – DEPT - 135° (125 MHz, CD_3OD) de PTF-2Figura 68 - Espectro de RMN ^1H (500 MHz, CD_3OD) de PTF-2

Figura 69 - Mapa de correlação homonuclear $^1\text{H} \times ^1\text{H}$ – COSY (300 MHz, CD_3OD) de PTF-2

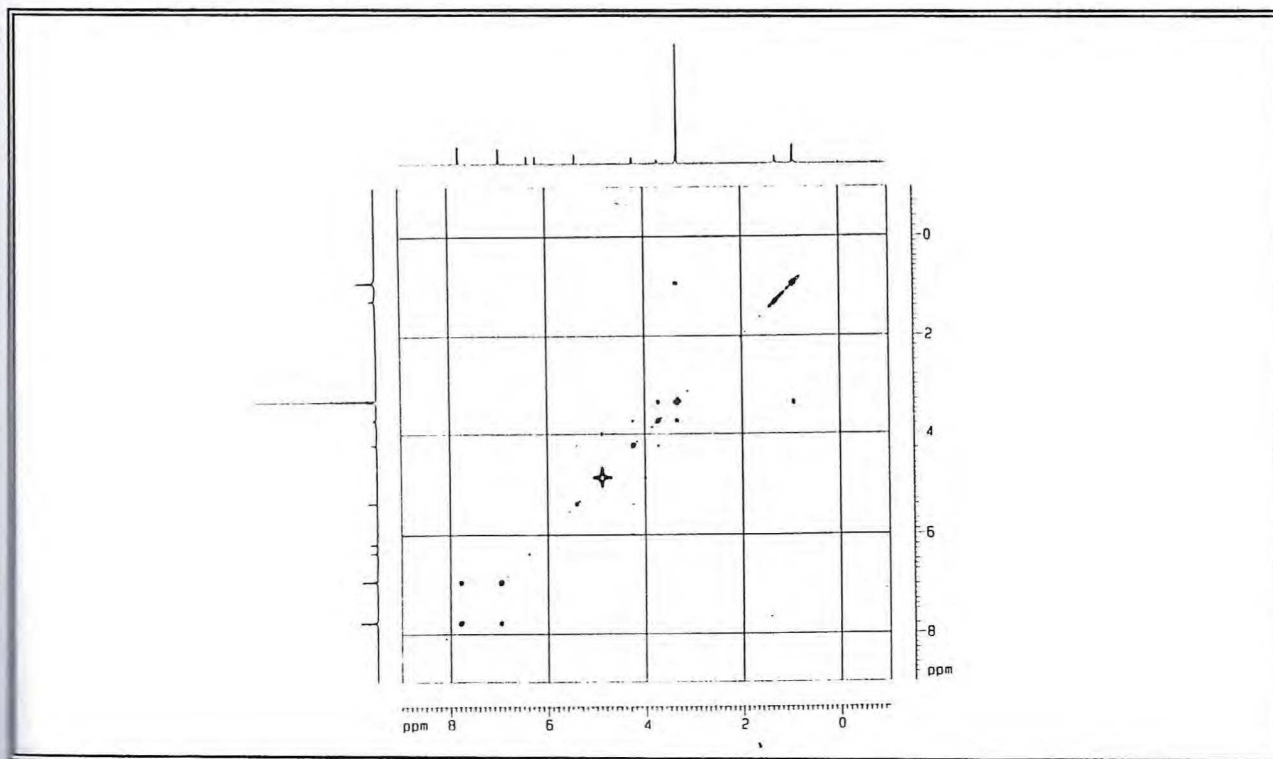


Figura 70 - Mapa de correlação heteronuclear $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ à uma ligação – HMQC (75 MHz, CD_3OD) de PTF-2

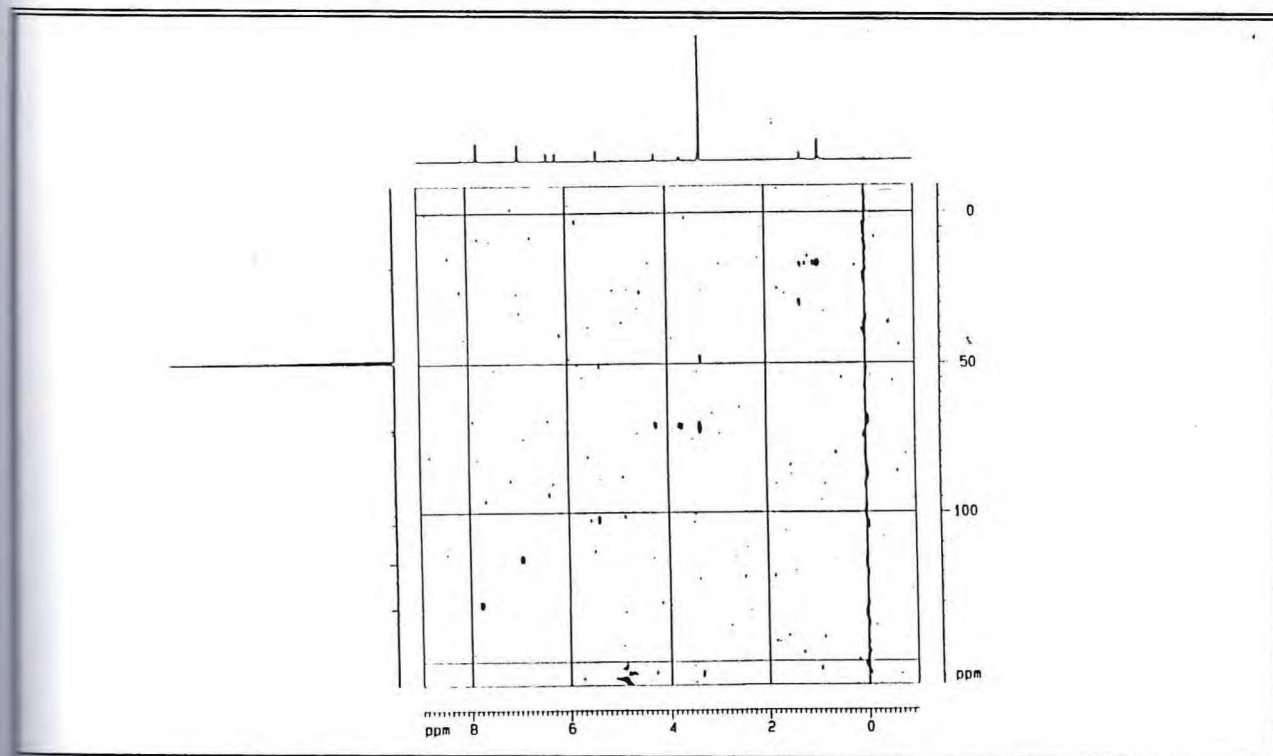
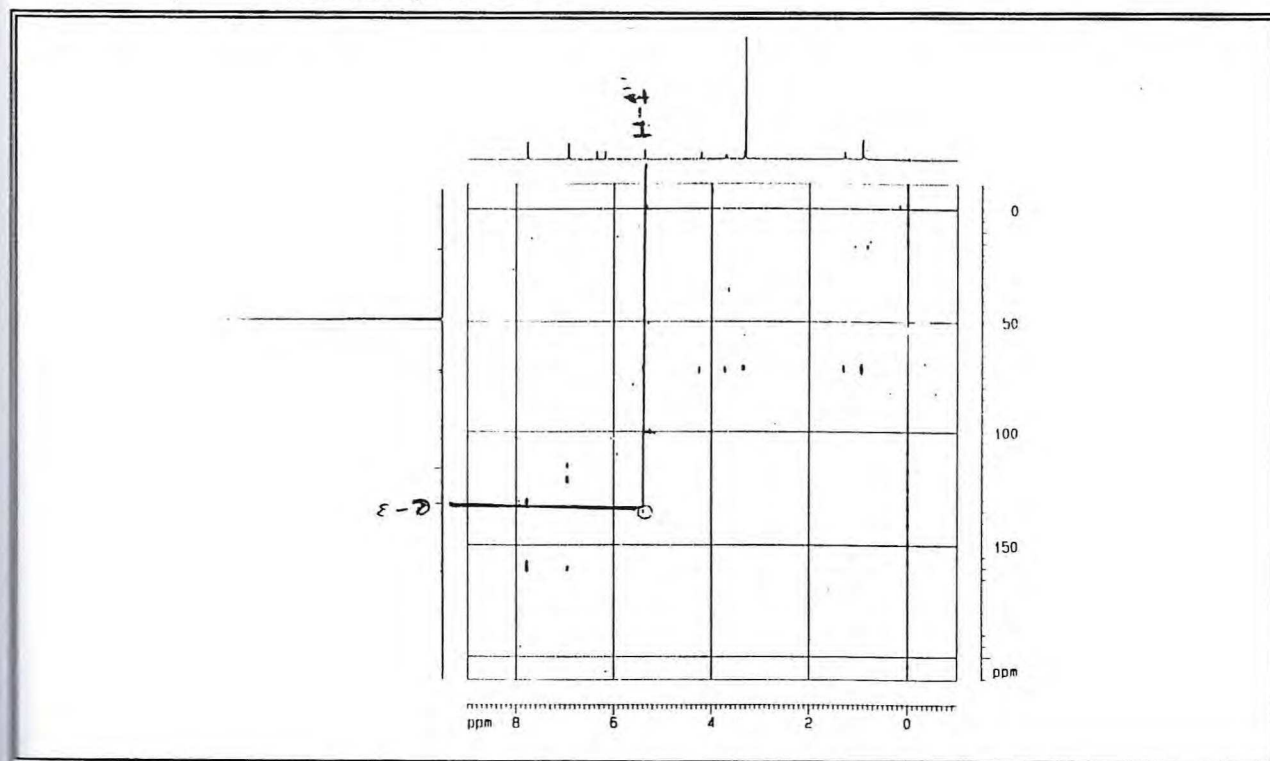


Figura 71 - Mapa de correlação heteronuclear $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ à mais de uma ligação – HMBC (75 MHz, CD_3OD) de PTF-2



4.2.3. Determinação estrutural de PTC-1 (31)

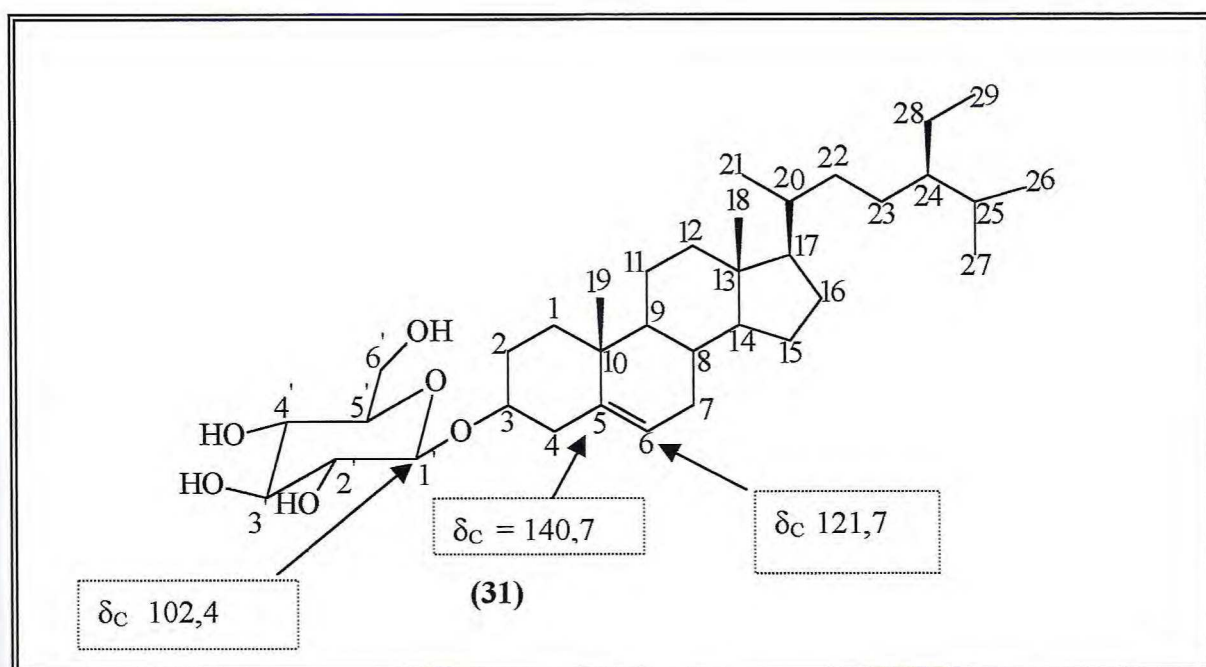
O composto codificado de PTC-1, foi obtido por precipitação na fração acetato de etila (3,5 g) do extrato EtOH da casca de *Protium tenuifolium* (item 8.6.6, Pág. 171) e apresentou-se como um sólido branco amorfo, solúvel em piridina e com faixa de fusão 290 - 292°C.

O espectro de absorção na região do infravermelho (Fig. 72, Pag. 100) revelou uma banda intensa e larga em 3440 cm^{-1} , associada à deformação axial de O-H , uma absorção forte em 2936 cm^{-1} de deformação axial de C-H alifático e absorções em 1067 e 1023 cm^{-1} características de deformação axial em C-O, relacionadas a álcoois e/ou éteres, compatíveis com triterpenos ou esteróides glicosilado.

Análise comparativa do composto em CCD com amostra padrão, nos permitiu uma identificação preliminar como sendo o glicosídeo do β -sitosterol, Pág. 98.

O espectro de RMN ^{13}C (Broad Band) totalmente desacoplado (Fig. 73, Pág. 100) apresentou trinta e cinco linhas espectrais, sendo seis de carbonos metílicos, doze de carbonos metilênicos, quatorze de carbonos metínicos (CH), dos quais seis encontram-se na região de carbonos alifáticos ligados a oxigênio e três de carbonos não-oxigenados. Esta associação foi possível após a comparação dos espectros de DEPT - 135° (Fig. 74, Pág. 101) e RMN ^{13}C -BB. O espectro de RMN ^1H registrou sinais referentes a unidade de glicose em , bem como sinais característicos de esqueleto terpênico (Fig. 75, Pag. 101).

A análise dos dados de ^{13}C comparados com dados de substâncias descritas na literatura⁵² confirmam que PTC-1 trata-se do glicosídeo do β -sitosterol. A (Tab.14, Pág. 99) mostra os deslocamento químicos de ^{13}C de PTC-1 em comparação com dados da literatura.



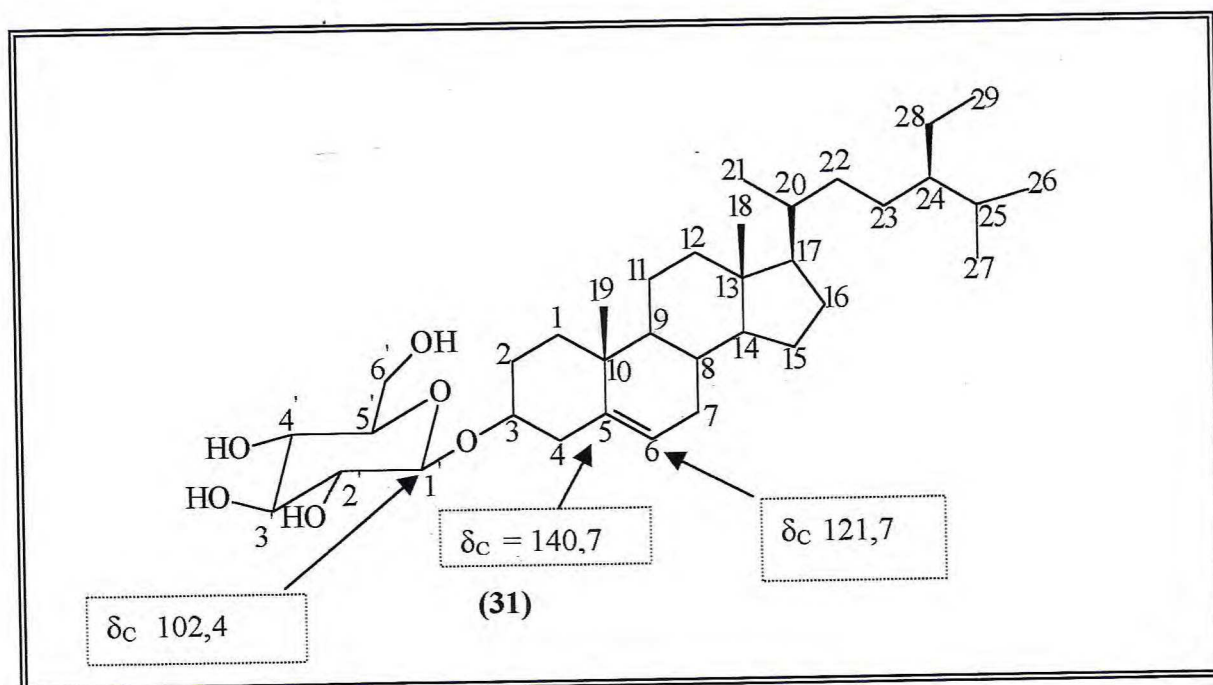
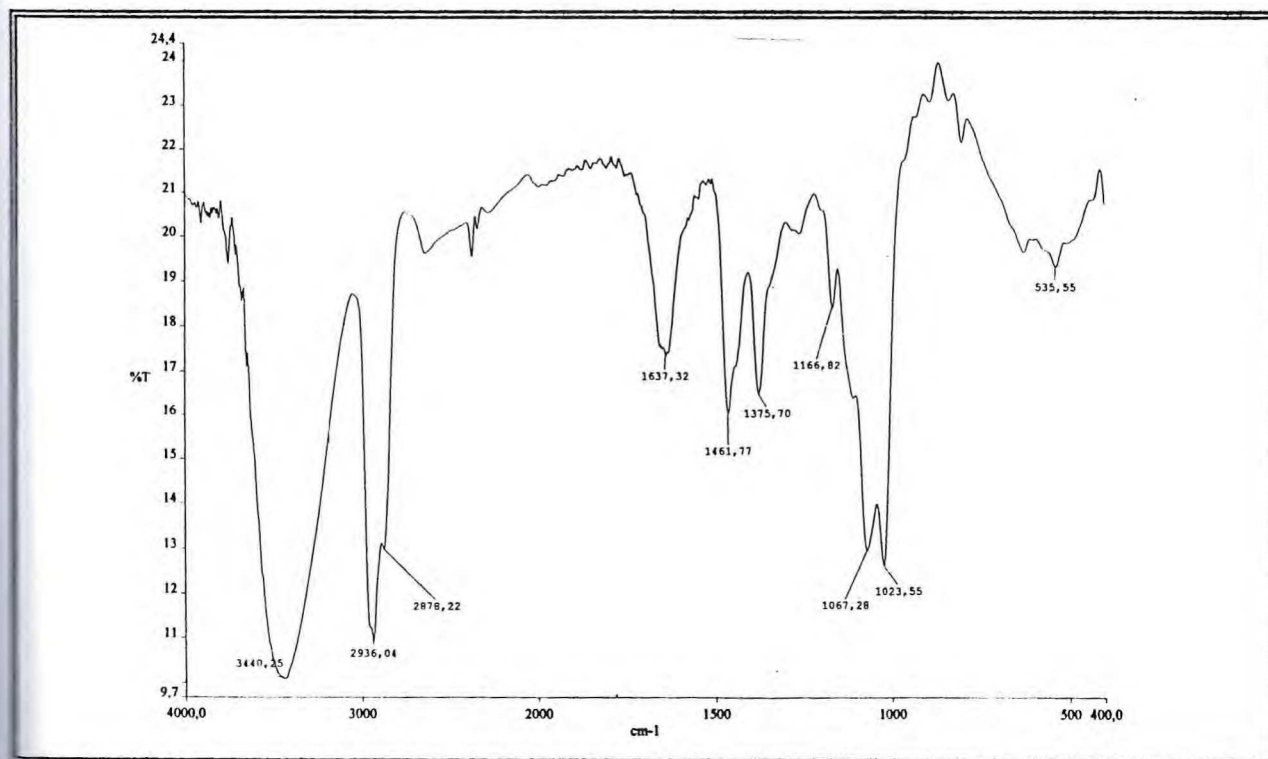
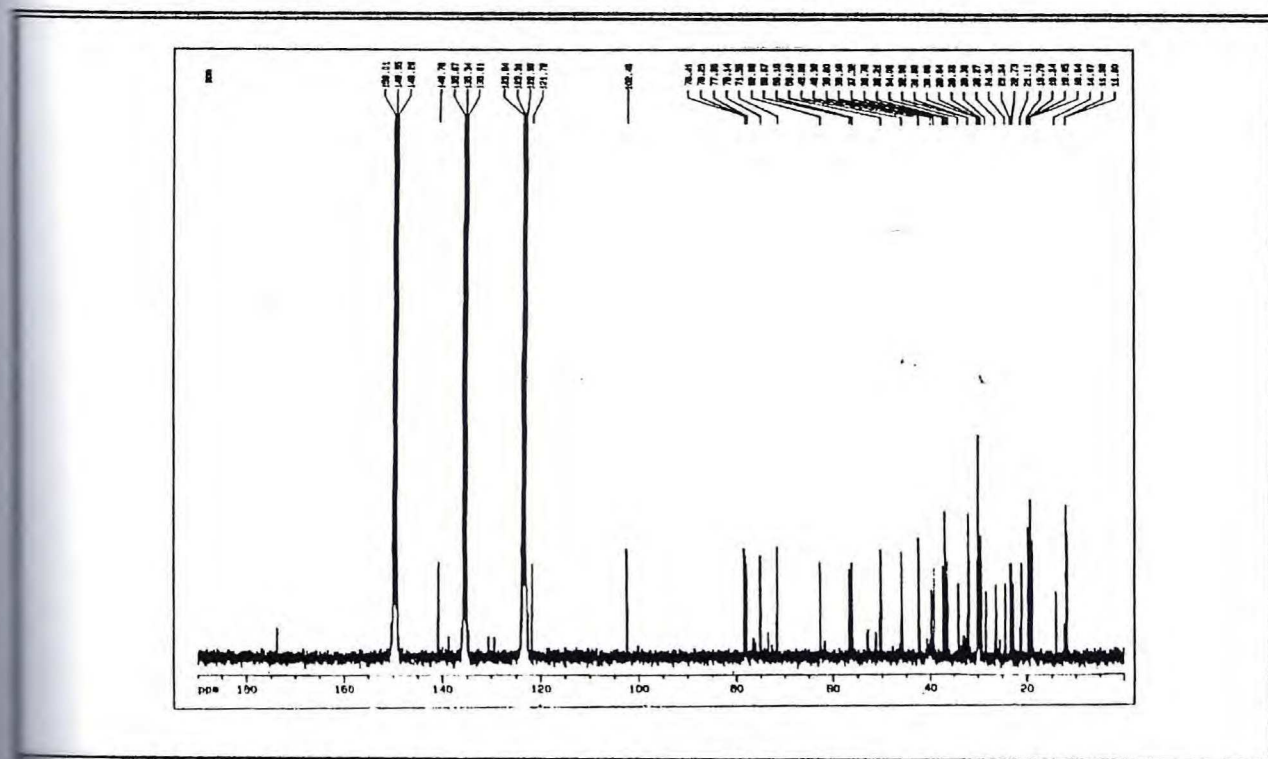


Tabela 14 - Dados de RMN ^{13}C de PTC-1 (31) comparados com aqueles registrados na literatura para o β -sitosterol glicosilado

C	δ_c (PTC-1)	Ref. 52
1CH ₂	37,3	37,3
2CH ₂	29,8	31,9
3CH	78,4	78,3
4CH ₂	39,2	39,8
5C	140,7	140,7
6CH	121,7	121,6
7CH ₂	32,0	30,0
8CH	31,9	32,0
9CH	50,2	50,1
10C	36,7	36,7
11CH ₂	21,1	21,1
12CH ₂	39,8	39,1
13C	42,3	42,3
14CH	56,7	56,1
15CH ₂	24,3	24,3
16CH ₂	28,3	28,3
17CH	56,1	56,6
18CH ₃	11,9	11,8
19CH ₃	19,2	19,0
20CH	36,2	36,2
21CH ₃	18,8	19,2
22CH ₂	34,0	34,0
23CH ₂	26,2	29,3
24CH	45,8	45,8
25CH	29,3	26,2
26CH ₃	19,8	18,8
27CH ₃	19,0	19,7
28CH ₂	23,2	23,5
29CH ₃	11,8	11,1
1'CH	102,4	102,3
2'CH	77,9	75,1
3'CH	78,2	77,9
4'CH	71,5	71,5
5'CH	75,1	78,2
6'CH ₂	62,6	62,2

Figura 72 - Espectro de absorção na região do infravermelho (KBr) de PTC-1

Figura 73 - Espectro de RMN ¹³C – BB (125 MHz, Piridina) de PTC-1

4.3. Determinação estrutural dos derivados reacionais preparados a partir da mistura binária de α -amirina [PHPR-2a (5)] e β -amirina [PHPR-2b (6)]

As atividades farmacológicas (analgésia e antiinflamatória) apresentada pela mistura binária de α -amirina e β -amirina, da resina de *Protium heptaphyllum* aliada ao seu isolamento de forma relativamente fácil estimularam a realização de algumas transformações químicas. A hidroxila de álcool secundário presente no anel do esqueleto triterpênico, foi usada como guia para realizar algumas reações clássicas, tais como: formilação, oxidação de Jones, acetilação e esterificação, dando origem, desta forma aos seguintes produtos reacionais: [FPHPR-2a (32) e FPHPR-2b (33)], [AMPHPR-2a (34) e AMPHPR-2b (35)], [APHPR-2a (36) e APHPR-2b (37)], [BPHPR-2a (38) e BPHPR-2b (39)] e [CPHPR-2a (40) e CPHPR-2b (41)] como misturas binárias, mostrados na Fig. 76, Pág. 102.

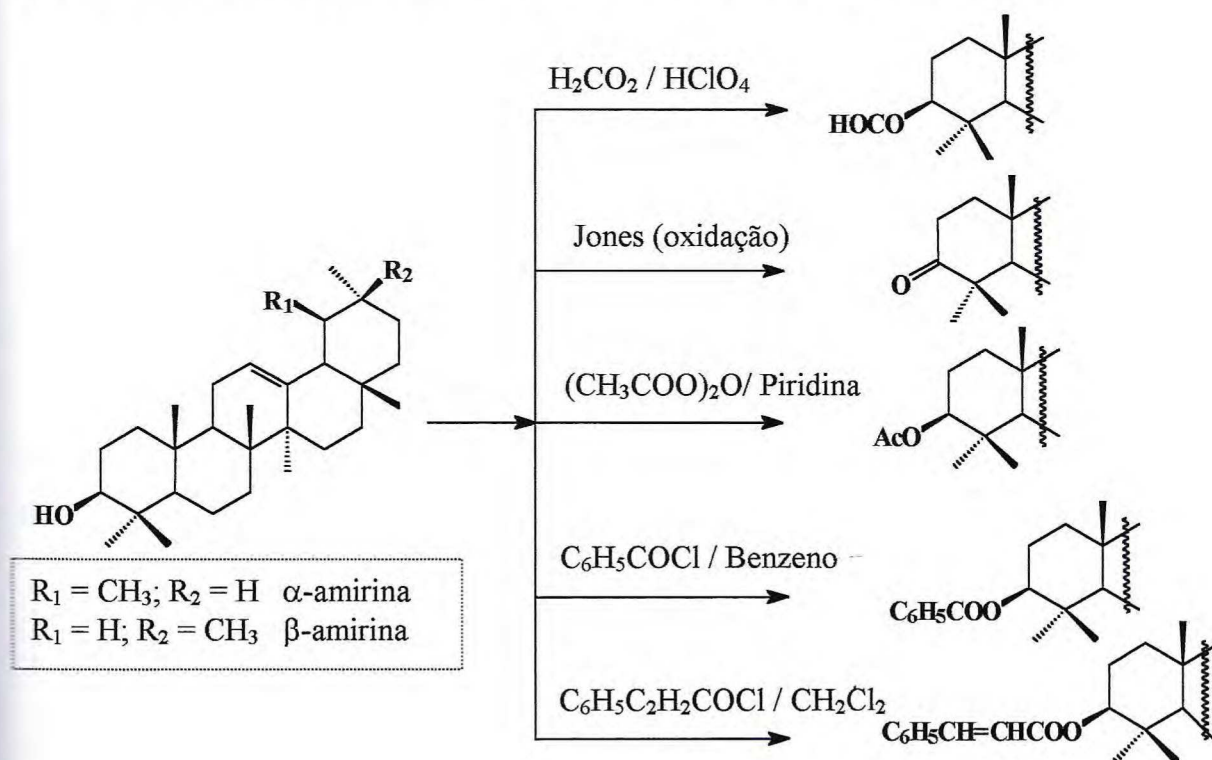


Figura 76 Esquema reacional de obtenção dos derivados

4.3.1. Determinação estrutural de [FPHPR-2a (32) e FPHPR-2b (33)]

A mistura binária de α -amirina e β -amirina foi submetida a reação de formilação em banho maria à 55°C, com agitação magnética (ítem 8.7.1, Pág. 173) fornecendo o derivado formilado com rendimento de 98 % que apresentou-se como um sólido branco, amorfo, com faixa de fusão 167 - 168°C, solúvel em clorofórmio e codificado de [FPHPR-2a e FPHPR-2b].

O espectro de absorção na região do infravermelho (Fig. 77, Pág. 104) apresentou uma banda forte em 1715 cm^{-1} , bem como ausência de banda na região de hidroxila sugerindo a formação do derivado desejado.

O espectro de RMN ^{13}C (Fig. 78, Pág. 104) revelou uma linha espectral em δ_{C} 161,3 referente a carbono carbonílico, além de uma desproteção no C-3 (δ_{C} 81,3) comparado com a posição de C-3 (δ_{C} 79,1) em α -amirina e β -amirina, que se justifica pela presença do grupo (HC=O) ligado ao átomo de oxigênio.

A análise comparativa entre os espectros de RMN ^{13}C e DEPT - 135° (Fig. 79, Pág. 105), permitiu identificar de forma clara a presença de um carbono carbonílico, reforçando a idéia de um novo composto.

Examinando os valores das absorções no espectro de RMN ^1H (Fig. 80, Pág. 105), observou-se uma linha espectral adicional em δ 8,12 característica de hidrogênio ligado a carbono carbonílico. Todas as atribuições dos sinais registrados no espectro de RMN ^{13}C são mostrados na Tab. 15, Pág. 118.

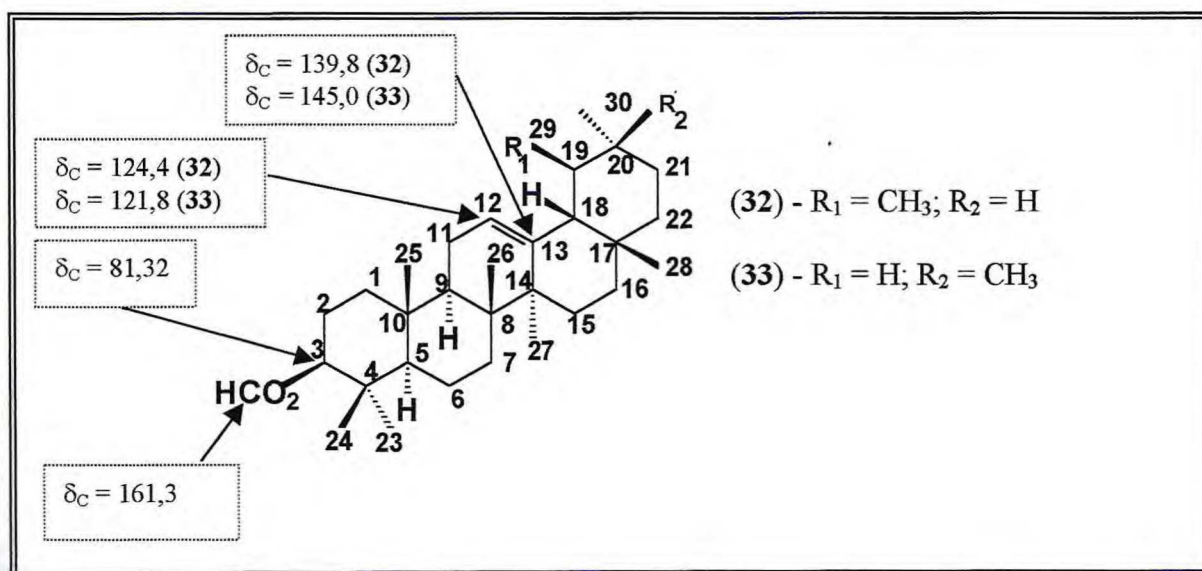


Figura 77 - Espectro de absorção na região do infravermelho (KBr) de [FPHPR-2a e FPHPR-2b]

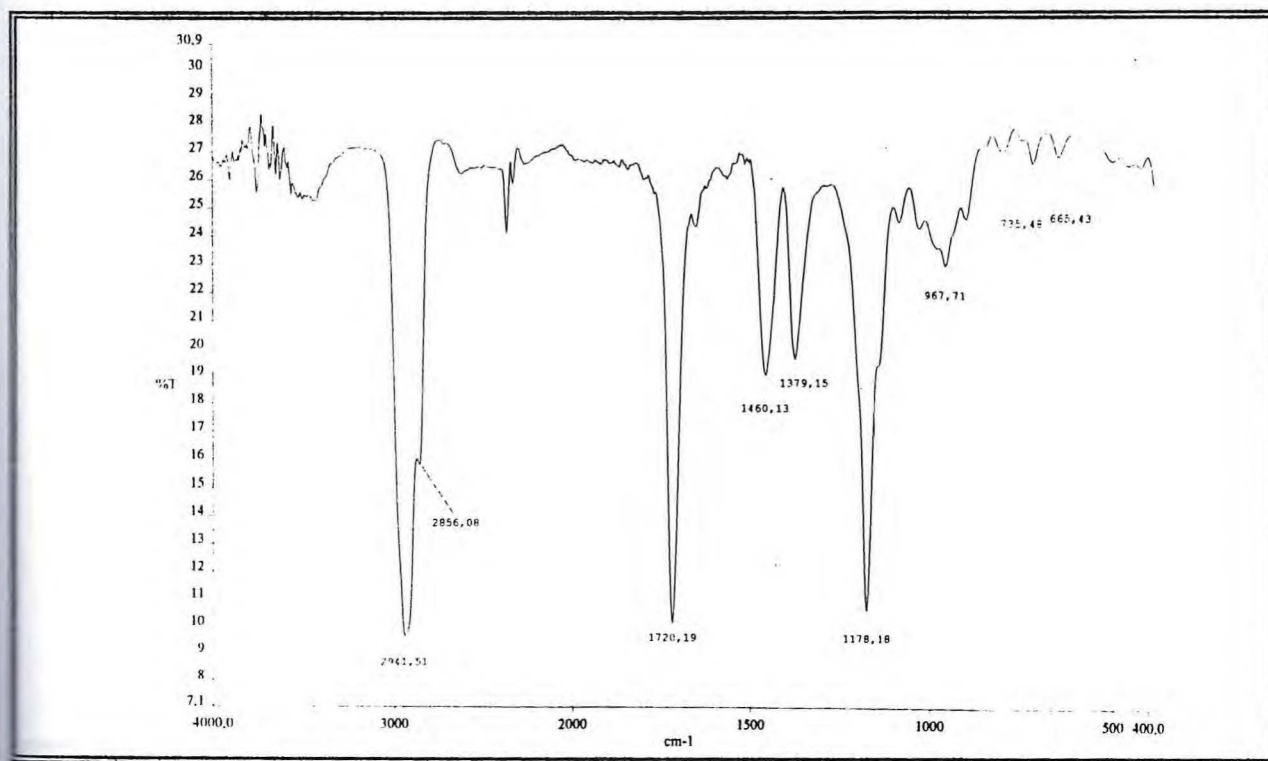
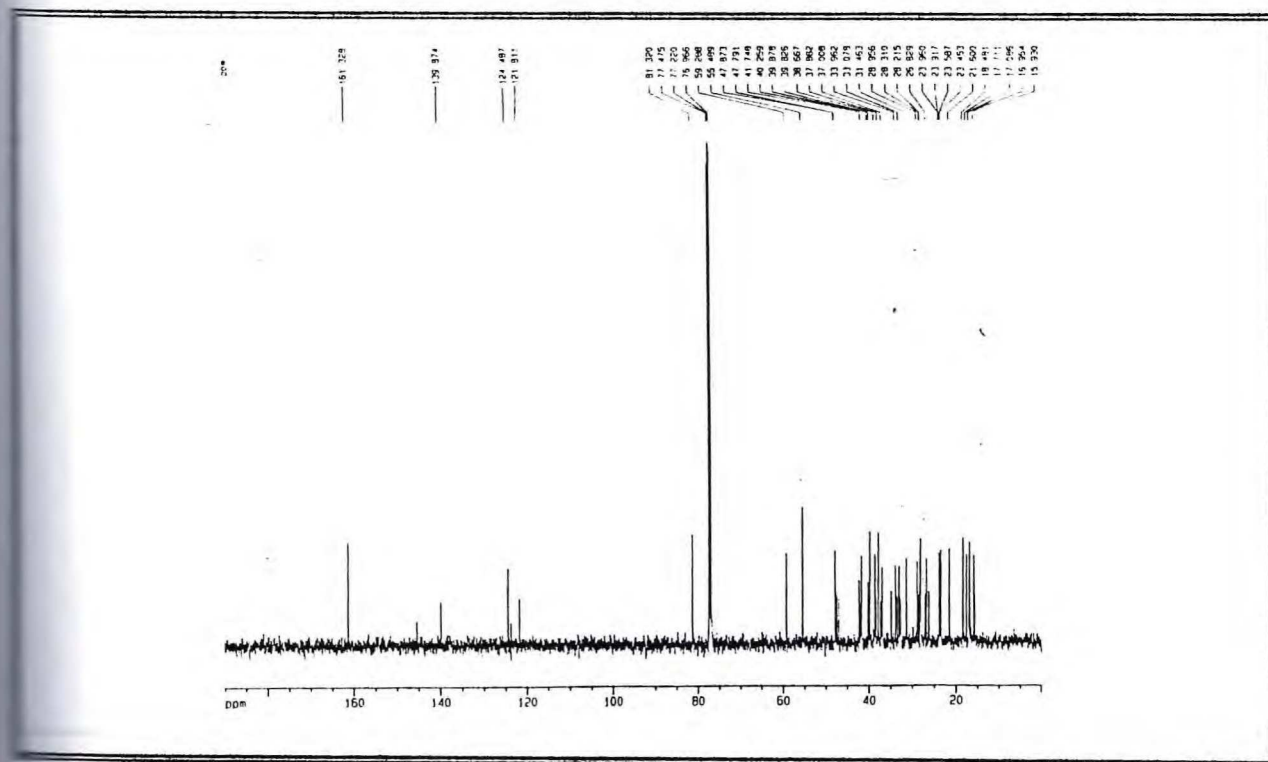


Figura 78 - Espectro de RMN ^{13}C – BB (125 MHz, CDCl_3) de [FPHPR-2a e FPHPR-2b]



4.3.2. Determinação estrutural de [AMPHPR-2a (34) e AMPHPR-2b (35)]

Fez-se reagir a mistura de α -amirina e β -amirina com o reagente de Jones (dicromato de potássio + ácido sulfúrico concentrado) em atmosfera de nitrogênio com agitação magnética e temperatura ambiente (30°C) (item 8.7.2, Pág. 173) obtendo-se o produto oxidado com rendimento de 60 % sob a forma de um sólido branco, amorfo, solúvel em clorofórmio, com faixa de fusão 145 – 147,5°C, condificado de [AMPHPR-2a e AMPHPR-2b]

O seu espectro de absorção na região do infravermelho (Fig. 81, Pág. 107) mostrou uma banda forte em 1705 cm^{-1} correspondente a vibração com deformação axial de (C=O), e ausência de banda na região de hidroxila confirmando a ocorrência da reação.

O espectro de RMN ^{13}C (Fig. 82, Pág. 107) mostrou uma linha espectral em δ_{C} 217,8 típica de carbonila cetônica, o que está em acordo com o produto formado. A análise comparativa dos espectros de RMN ^{13}C e DEPT - 135° (Fig. 83, Pág. 108), revelou de forma muito clara a presença da carbonila, em razão de sua ausência observada no espectro DEPT - 135°.

A análise do espectro de RMN ^1H (Fig. 84, Pág. 108) mostrou a ausência da linha espectral referente a H-3 em δ_{H} 3,22 presente na mistura inicial. As atribuições dos dados de ^{13}C são mostrados na Tab. 15, Pág. 118.

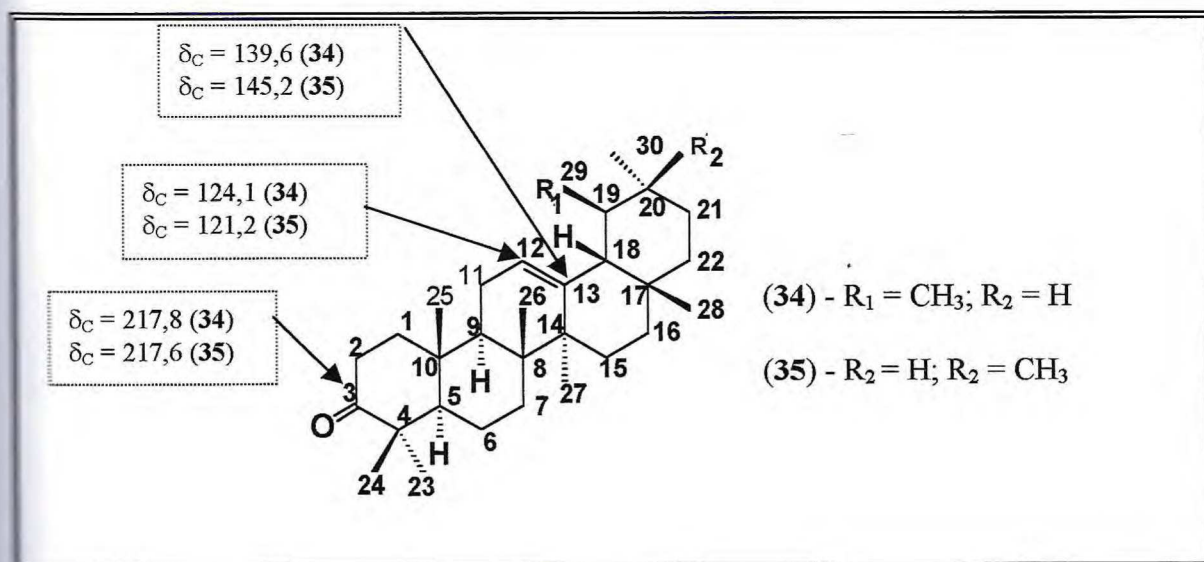


Figura 81 - Espectro de absorção na região do infravermelho (KBr) de [AMPHPR-2a e AMPHPR-2b]

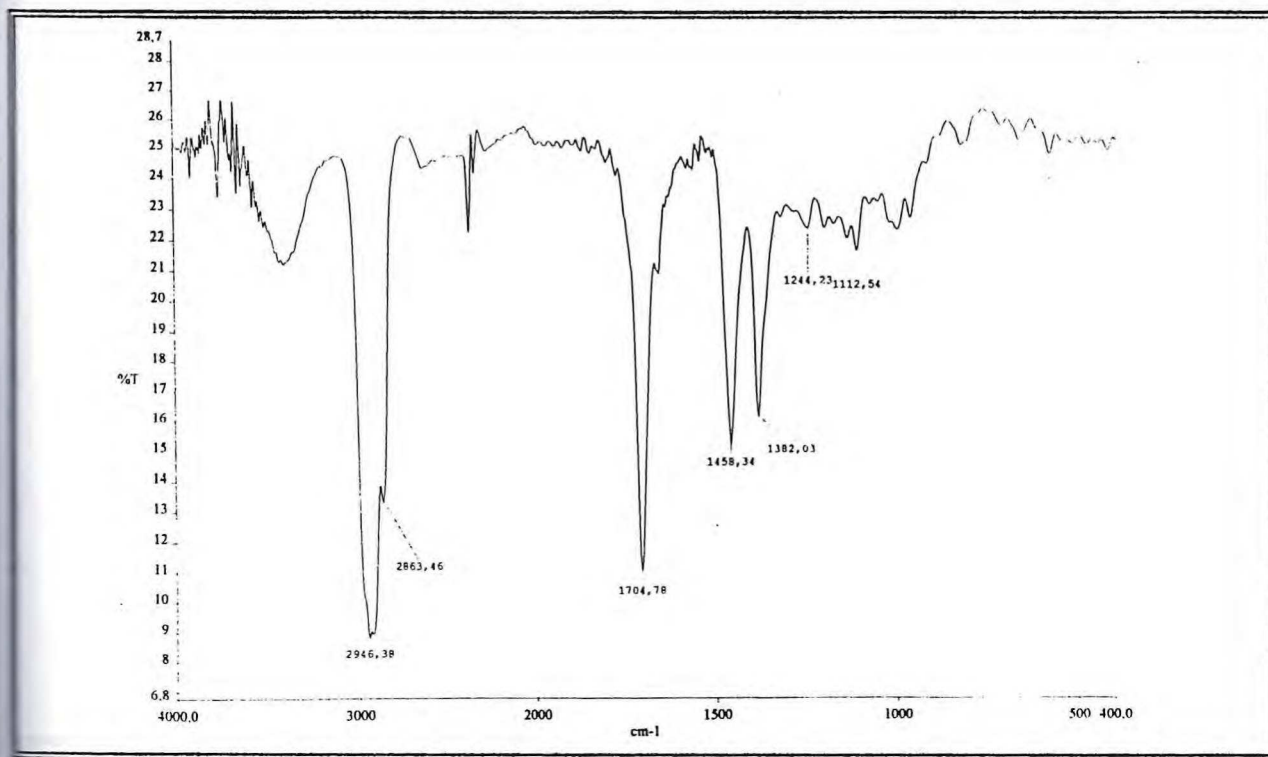


Figura 82 - Espectro de RMN ^{13}C – BB (125 MHz, CDCl_3) de [AMPHPR-2a e AMPHPR-2b]

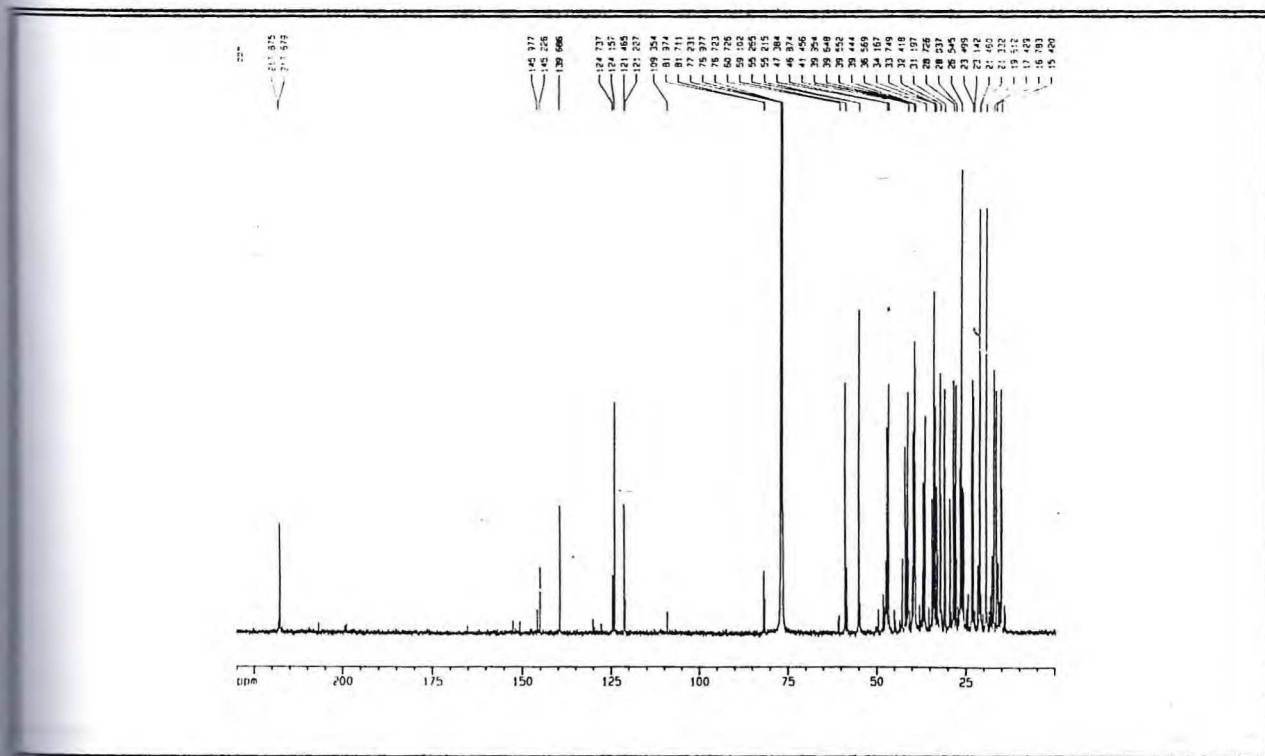


Figura 83 - Espectro de RMN ^{13}C – DEPT - 135° (125 MHz, CDCl_3) de [AMPHPR-2a e AMPHPR-2b]

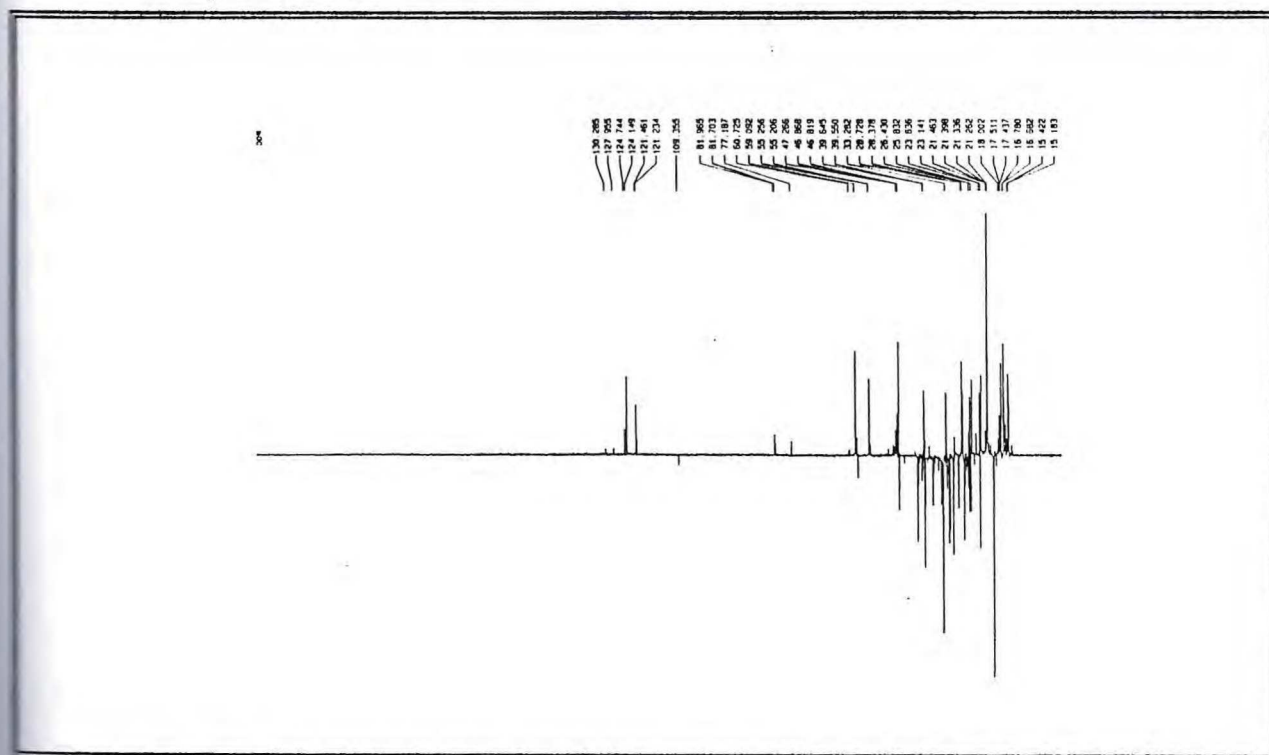
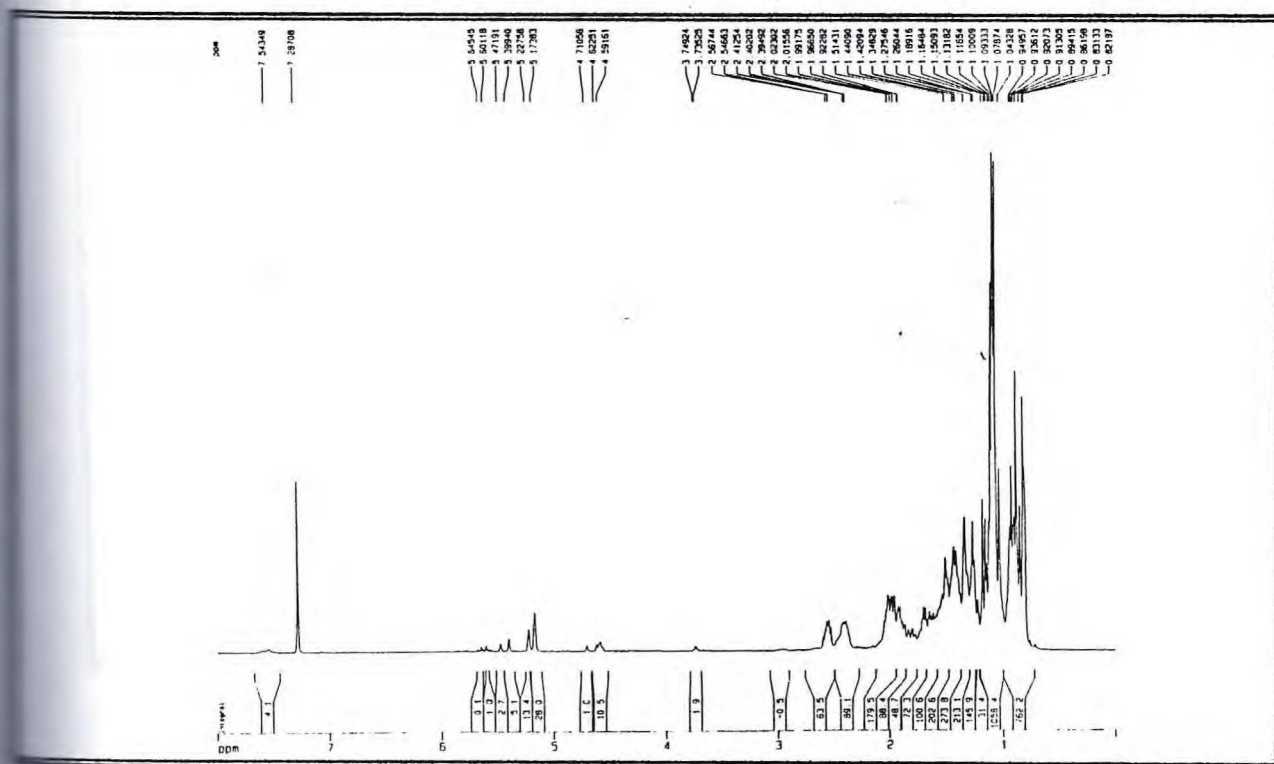


Figura 84 - Espectro de RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) de [AMPHPR-2a e AMPHPR-2b]



4.3.3. Determinação estrutural de [APHPR-2a (36) e APHPR-2b (37)]

A mistura foi também submetida a reação de acetilação em AC_2O / piridina usando procedimento usual para obtermos o derivado acetilado (item 8.7.3, Pág. 174) com rendimento de 86 %

A identificação do produto foi facilmente obtida com dados de IV pelo aparecimento de banda em 1735 cm^{-1} de deformação axial de $\text{C}=\text{O}$, mostrou também a ausência de banda na região de hidroxila (Fig. 85, Pág. 110).

O espectro de RMN ^{13}C (Fig. 86, Pág. 110), revelou uma linha espectral em δ_{C} 170,9 indicando a existência de carbonila no composto, confirmando os dados de (IV). Mostrou ainda uma linha espectral em δ_{C} 38,4 referente a metila característica de acetil. A análise comparativa do espectro de RMN ^{13}C com o espectro de RMN ^{13}C -DEPT 135° (Fig. 87, Pág. 111) confirma de forma clara a existência de carbono carbonílico.

Já no espectro de RMN ^1H (Fig. 88, Pág. 111) observou-se uma linha espectral (singlete) em δ_{H} 2,06, sugere que a mesma pode ser atribuída a dois grupos metilas. As atribuições dos dados de ^{13}C encontram-se na Tab. 15, Pág. 118.

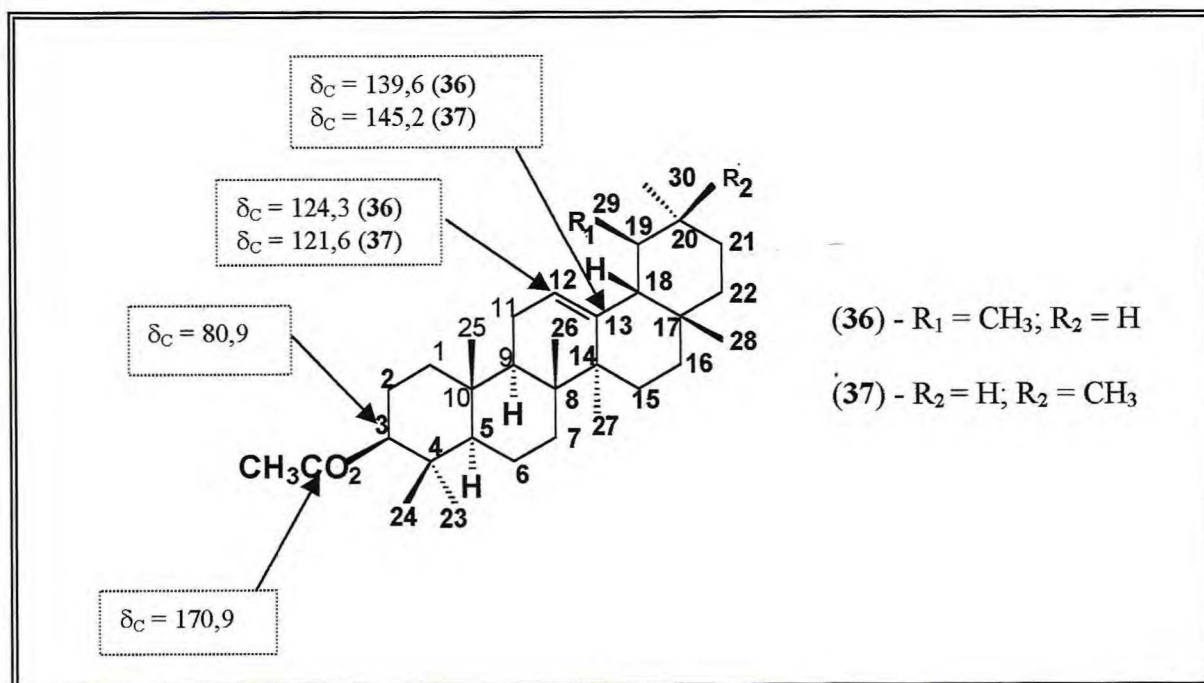


Figura 85 - Espectro de absorção na região do infravermelho (KBr) de [APHPR-2a e APHPR-2b]

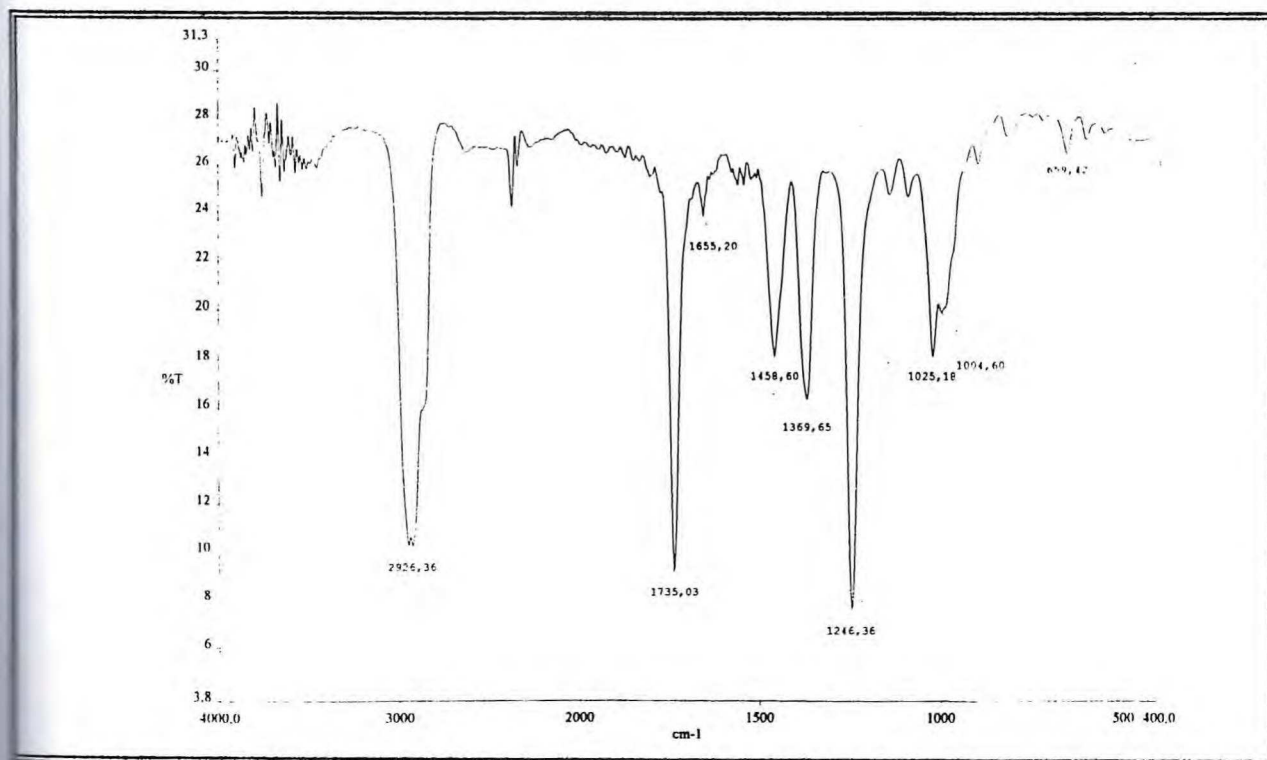
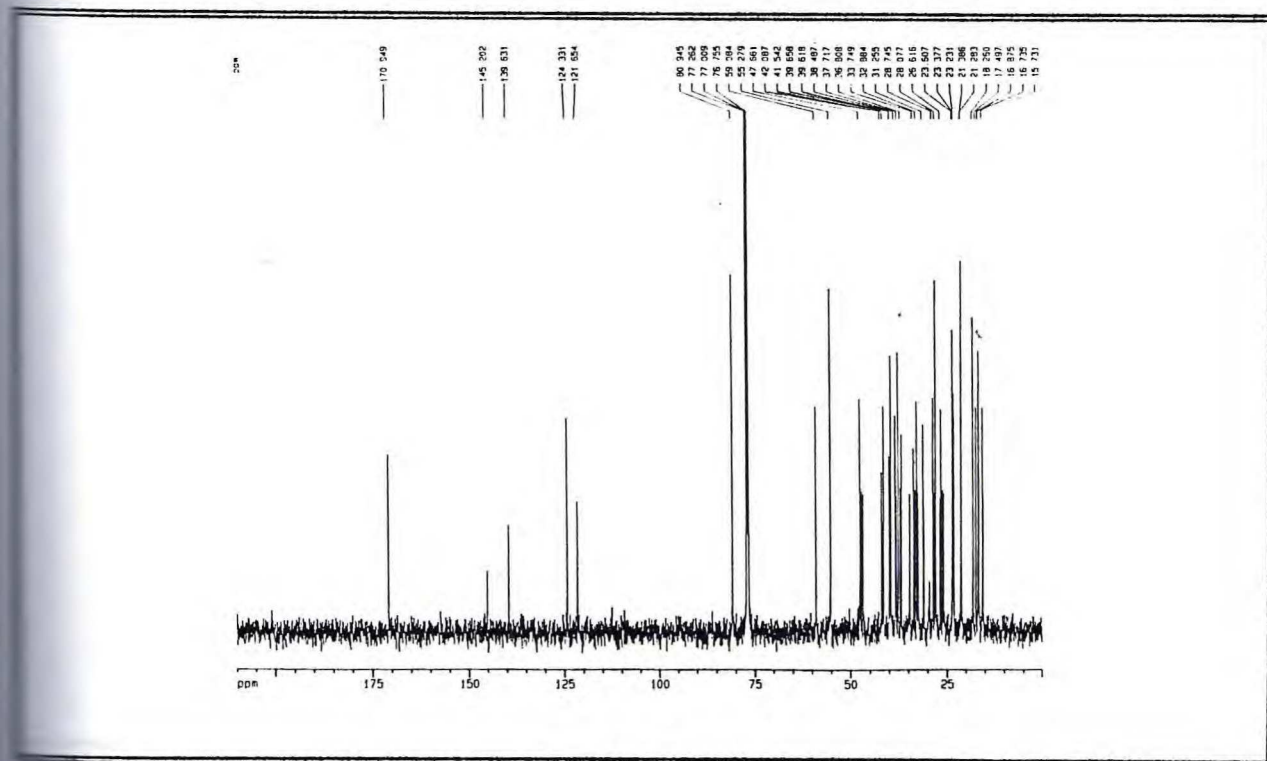


Figura 86 - Espectro de RMN ^{13}C – BB (125 MHz, CDCl_3) de [APHPR-2a e APHPR-2b]



4.3.4. Determinação estrutural de [BPHPR-2a (38) e BPHPR-2b (39)]

A mistura binária de α -amirina e β -amirina foi submetida a reação com cloreto de benzoila em banho maria a 55°C e sob agitação magnética por 7 horas (ítem 8.7.4, Pág. 174) obtendo-se o derivado com rendimento de 48 %. O sólido branco formado, mostrou por análise em CCD que continha outras substâncias. A mistura reacional foi cromatografada em gel de sílica. As frações (11 – 15) eluídas em hexano / clorofórmio (10 : 1), foram reunidas e forneceram um sólido branco, amorfo, solúvel em clorofórmio, com faixa de fusão 181,6 – 182,7°C, codificado de BPHPR-2a e BPHPR-2b.

O espectro de absorção na região do infravermelho (Fig. 89, Pág. 113) apresentou uma banda forte em 1720 cm^{-1} de vibração com deformação axial de C=O e total ausência de banda na região de hidroxila evidenciando a ocorrência da reação. Mostrou ainda bandas em 1603, 1584 e 1451 cm^{-1} de deformação axial de esqueleto aromático.

O espectro de RMN ^{13}C (Fig. 90, Pág. 113) revelou uma linha espectral em δ_{C} 167,0 referente a carbonila conjugada, mostrou linhas espectrais na região de C- sp^2 aromáticos. A comparação dos espectros de RMN ^{13}C e RMN ^{13}C – DEPT 135° (Fig. 91, Pág. 114) confirma a presença de carbono carbonílico e carbonos aromáticos. Já o espectro de RMN ^1H (Fig. 92, Pág. 114) apresentou linhas espectrais na região de hidrogênios aromáticos. Os dados referentes a ^{13}C encontram-se na Tab. 115, Pág. 118.

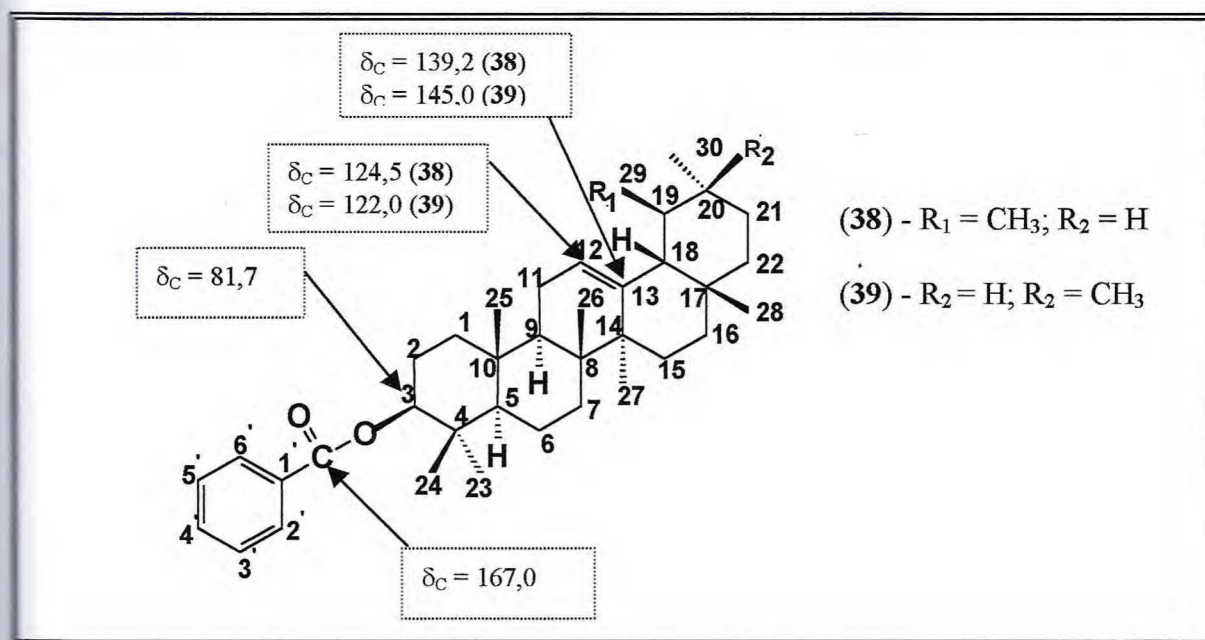


Figura 89 - Espectro de absorção na região do infravermelho (KBr) de [BPHPR-2a e BPHPR-2b]

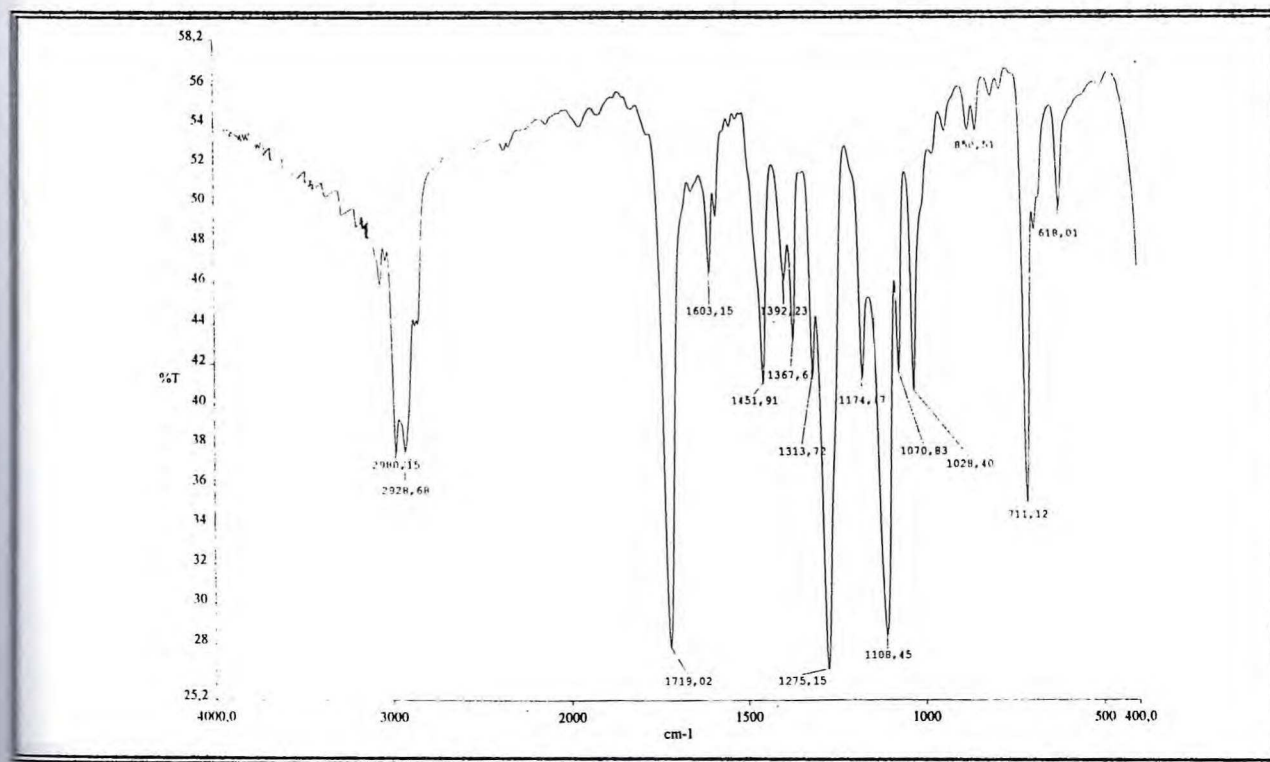
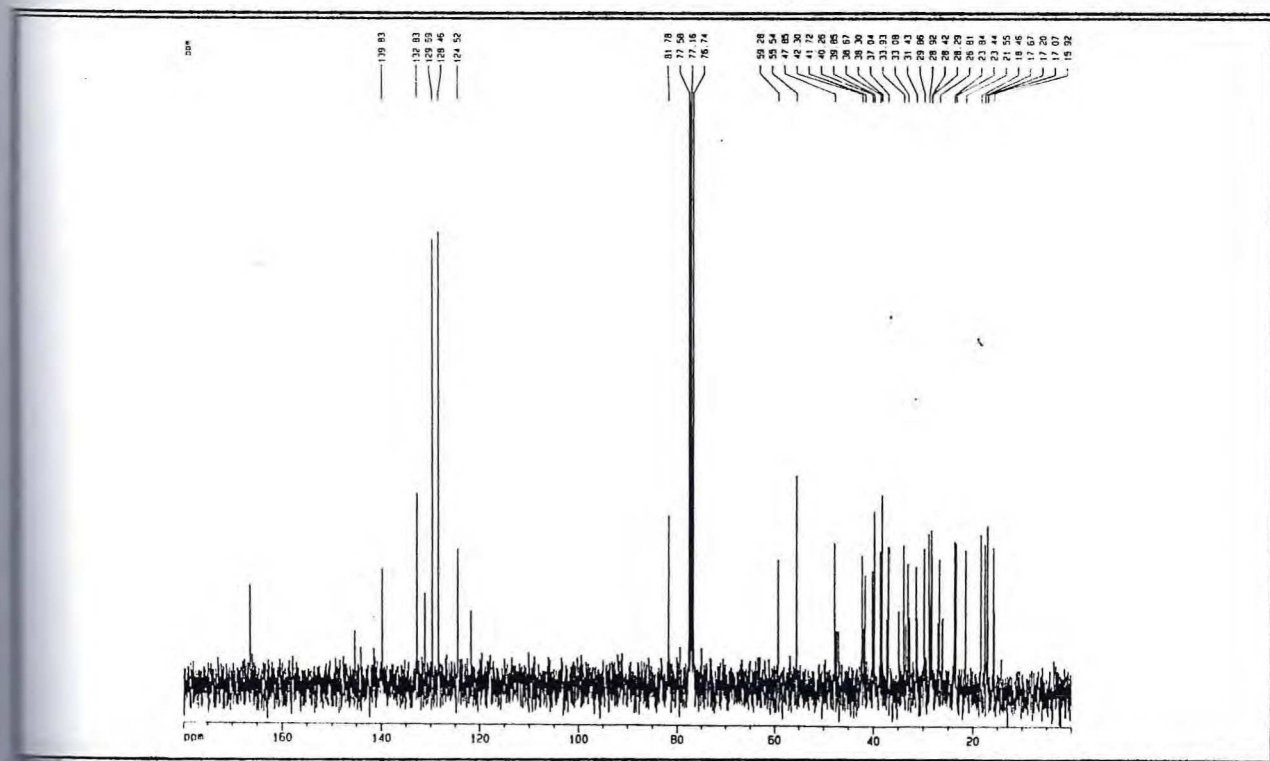


Figura 90 - Espectro de RMN ^{13}C – BB (125 MHz, CDCl_3) de [BPHPR-2a e BPHPR-2b]



[illegible]

4.3.5. Determinação estrutural de [CPHPR-2a (40) e CPHPR-2b (41)]

A mistura binária de α -amirina e β -amirina foi submetida a reação com cloreto de cinamoíla, previamente preparado (item 8.7.5.1 Pág 174), em banho maria a 55°C e sob agitação magnética por 7 horas (item 8.7.5.2, Pág. 175) obtendo-se o derivado com rendimento de 41 %. O sólido branco obtido mostrou por análise em CCD que continha outras substâncias. Fez-se o fracionamento em coluna contendo gel de sílica, visando a sua purificação. As frações (5 – 25) eluidas em hexano / clorofórmio (10 : 1), forneceram um sólido branco, amorfo, solúvel em clorofórmio, com faixa de fusão 178 – 179,6°C, codificado de CPHPR-2a e CPHPR-2b.

O espectro de absorção na região do infravermelho (Fig. 93, Pág. 116) mostrou uma banda intensa em 1711cm⁻¹ de vibração com deformação axial de C=O, bandas em 1638, e 1579 cm⁻¹ de esqueleto aromático, mostrou ainda a total ausência de banda na região de hidroxila evidenciando a ocorrência da reação desejada.

O espectro de RMN ¹³C (Fig. 94, Pág. 116) revelou uma linha espectral em δ_C 166,9 referente a carbonila conjugada. Mostrou doze linhas espectrais na região de carbonos olefinicos e/ou aromáticos, justificando os dados de (IV) quanto a ocorrência da reação e formação do produto desejado. A análise comparativa dos espectros de RMN ¹³C e RMN ¹³C – DEPT 135° (Fig. 95, Pág 117) confirmou a presença de carbono carbonílico e carbonos aromáticos e olefinicos. Já o espectro de RMN ¹H (Fig. 96, Pág. 117) revelou linhas espectrais de hidrogênios aromáticos, bem como hidrogênios olefinicos trans confirmado pelos valores das constantes de acoplamentos δ_H 6,38 (1H, d, J = 16,04 Hz) e δ_H 7,66 (1H, d, J = 16,01 Hz) indicativos que levam a confirmação do produto formado.

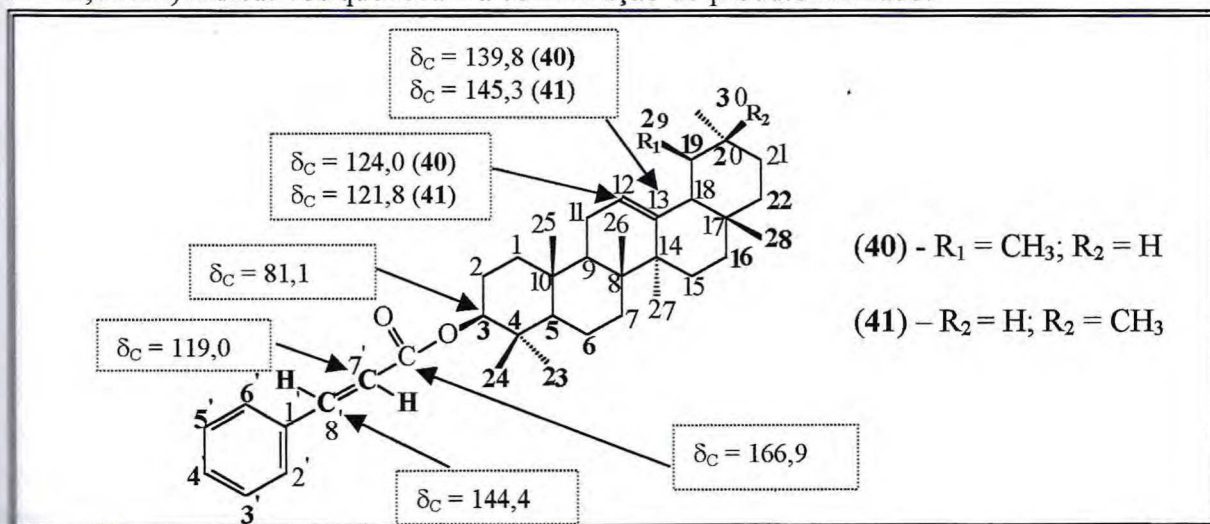


Figura 93 - Espectro de absorção na região do infravermelho (KBr) de [CPHPR-2a e CPHPR-2b]

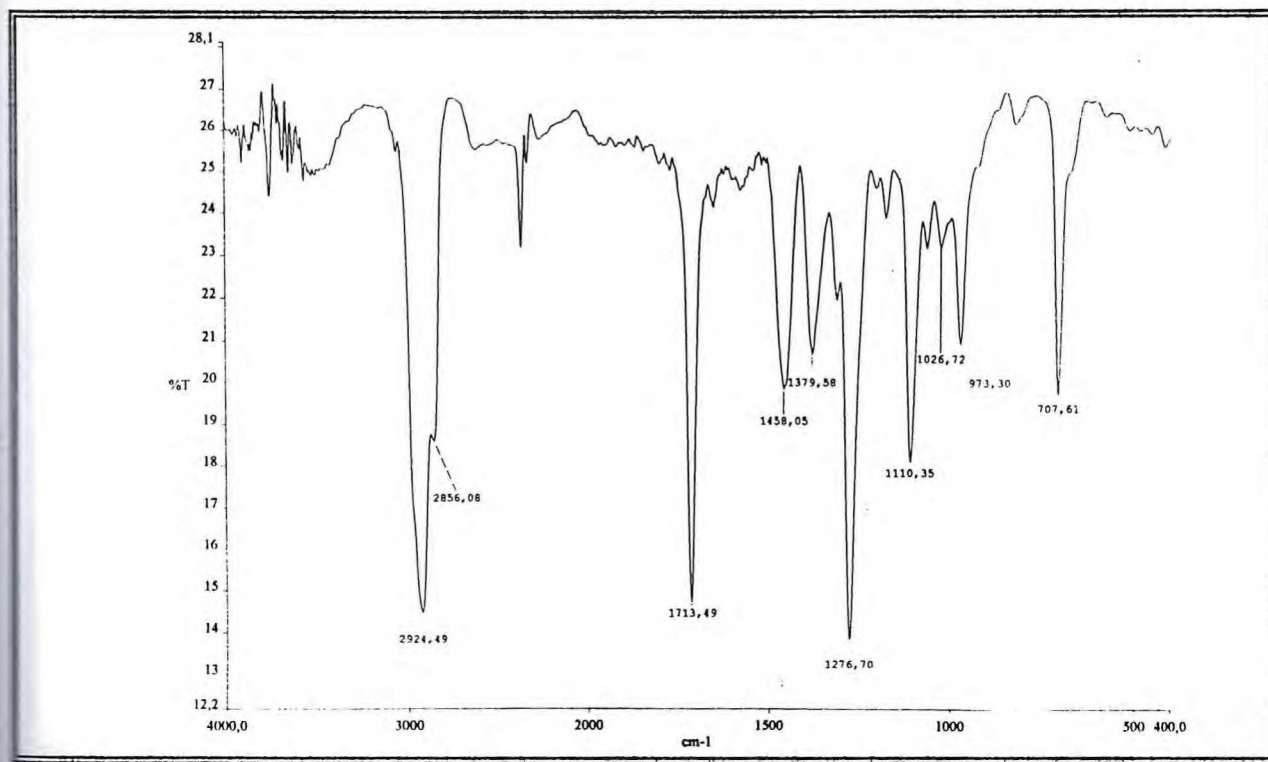


Figura 94 - Espectro de RMN ^{13}C – BB (125 MHz, CDCl_3) de [CPHPR-2a e CPHPR-2b]

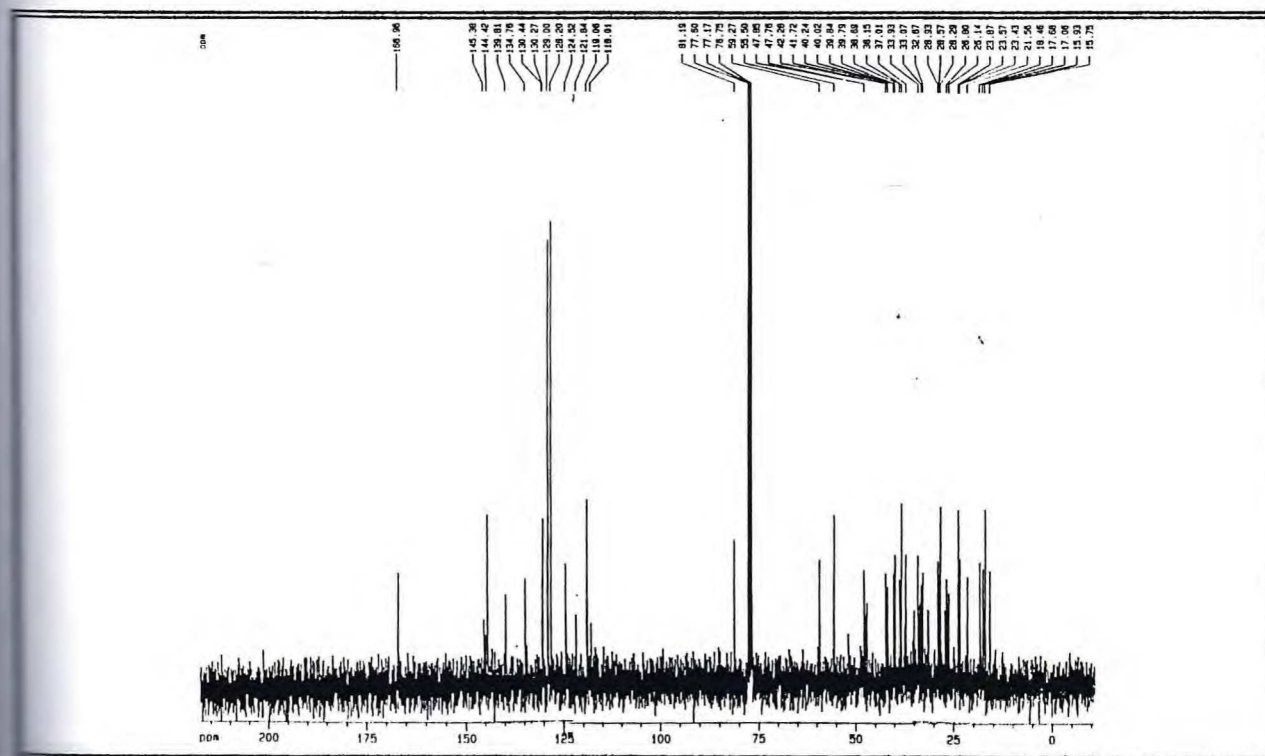


Tabela 15 - Dados de RMN ^{13}C dos derivados reacionais

δ_{C} (ppm)										
C	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1	38,6	38,4	39,32	39,2	38,4	38,2	38,6	38,3	38,4	38,1
2	27,1	27,1	-	-	26,6	26,6	28,2	28,2	28,5	28,2
3	81,3	81,3	217,8	217,6	80,9	80,9	81,7	81,7	81,1	81,1
4	37,8	37,8	-	-	37,7	37,7	38,3	38,3	38,4	38,1
5	55,4	55,4	55,2	55,2	55,2	55,2	55,5	55,5	55,5	55,5
6	18,4	18,4	19,6	19,6	18,2	18,2	18,4	18,4	18,4	18,4
7	32,7	32,9	32,4	32,4	32,8	32,6	33,0	33,0	33,0	33,8
8	40,2	40,0	39,3	39,3	40,0	38,4	40,2	38,6	40,2	38,6
9	47,8	47,7	47,3	47,1	47,6	47,5	47,8	47,6	47,8	47,7
10	37,0	37,0	36,5	36,6	36,8	36,8	36,9	36,9	37,0	37,0
11	23,5	23,7	23,4	23,6	23,3	23,6	23,4	23,4	23,5	23,7
12	124,4	121,8	124,1	121,2	124,3	121,6	124,5	122,0	124,0	121,8
13	139,8	145,0	139,6	145,2	139,6	145,2	139,2	145,0	139,8	145,3
14	42,3	41,9	42,1	41,8	42,0	41,7	42,2	41,7	42,2	41,9
15	28,1	26,3	26,5	26,0	28,0	26,1	28,4	26,9	28,2	26,3
16	26,8	26,8	26,4	26,8	26,6	26,9	26,8	27,0	26,7	27,1
17	33,9	32,5	34,2	32,1	33,7	32,9	35,0	33,0	33,9	32,6
18	59,2	47,4	60,7	46,8	59,0	47,1	59,2	47,2	59,2	47,4
19	39,8	47,0	39,4	46,7	39,6	46,8	39,8	46,8	40,0	46,9
20	39,8	32,2	39,2	35,0	39,6	31,0	39,6	31,4	39,7	31,2
21	31,4	34,9	31,2	34,6	31,2	34,7	31,4	34,7	31,4	34,9
22	41,7	37,3	41,4	37,0	41,5	37,1	41,7	37,0	41,7	37,3
23	28,1	28,2	-	-	28,0	28,0	28,4	28,9	28,2	28,5
24	15,9	15,75	16,6	15,1	15,5	15,5	17,1	15,9	15,7	15,7

1 = FPHPR-2a 2 = FPHPR-2b; 3 = AMPHPR-2a 4 = AMPHPR-2b; 5 = APHPR-2a 6 = APHPR-2b;
7 = BPHPR-2a 8 = BPHPR-2b; 9 = CPHPR-2a 10 = CPHPR-2b

Continuação da Tabela 15

δ_c (ppm)										
C	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
25	15,9	15,7	17,4	15,4	15,7	15,7	17,6	17,0	15,9	15,9
26	16,6	16,2	17,5	16,7	16,8	16,8	17,8	17,6	17,0	17,0
27	23,4	26,1	23,1	25,8	23,2	25,9	23,4	26,8	23,4	26,1
28	28,6	28,3	-	-	28,7	28,3	28,9	28,4	28,9	28,9
29	17,7	33,5	17,5	34,1	17,5	33,3	18,4	33,0	17,6	33,5
30	21,6	21,6	21,4	23,6	21,2	23,6	21,5	23,8	21,5	23,8
C=O	161,3	161,3			170,9	170,9	167,0	167,0	166,9	166,9
CH ₃					38,4	38,4				
1'							131,5	131,5	134,7	134,7
2'							129,6	129,6	129,0	129,0
3'							128,4	128,4	128,0	128,0
4'							132,8	132,8	130,2	130,2
5'							128,4	128,4	128,2	128,2
6'							129,6	129,6	129,0	129,0
7'									144,4	144,4
8'									119,0	119,0

1 = FPHPR-2a 2 = FPHPR-2b; 3 = AMPHPR-2a 4 = AMPHPR-2b; 5 = APHPR-2a 6 = APHPR-2b;
 7 = BPHPR-2a 8 = BPHPR-2b; 9 = CPHPR-2a 10 = CPHPR-2b



CAPÍTULO

5

ESTUDO DOS ÓLEOS ESSENCIAIS

5. ESTUDO DOS ÓLEOS ESSENCIAIS

5.1. Determinação da composição química dos constituintes voláteis de *Protium heptaphyllum* e *Protium tenuifolium*

A composição química do óleo essencial da espécie *Protium heptaphyllum* tem vários registros na literatura^{6, 7, 8}, alguns inclusive relatam propriedades farmacológicas, entre estas atividade antiinflamatória, antinociceptiva e atividade cercaricida^{8, 9}

Com o objetivo de determinar a composição química dos constituintes voláteis associado a possibilidade de obtenção de dados biológicos com atividade antimicrobiana de espécies de *Protium* existentes nos municípios cearenses (Crato e Ubajara) foram feitas extrações de seus respectivos óleos essenciais pelo processo de hidrodestilação em um aparelho doseador tipo Cleavenger modificado por Gottlieb⁵³, de acordo com a técnica descrita no item 8.4.1, Pág. 150. Da espécie *Protium heptaphyllum* foram obtidos os óleos essenciais da resina (11%), frutos verdes (3%), frutos maduros (1,5%), folhas (0,3%) e cascas (0,11%), enquanto que da espécie *Protium tenuifolium* foram dos frutos verdes (2,76%). Tabelas comparativas das análises destes óleos incluindo rendimento e identificação destes constituintes são mostrados nas Págs. 125 e 126.

A análise dos óleos essenciais foi feita por cromatografia gás-líquido acoplada a um espectrometro de massa (CGL/EM).

A identificação dos constituintes foi realizada por meio da interpretação dos espectros de massas, comparação com espectros de massas em um banco de dados (espectroteca) associada a determinação e correção dos índices de Kovats simulados⁵⁴ e por comparação com dados da literatura⁵⁵.

Os óleos essenciais obtidos da resina, frutos verdes, frutos maduros, folhas e cascas de *Protium heptaphyllum* foram codificados de: PHPR-OE, PHPFV-OE, PHPFM-OE, PHPF-OE e PHPC-OE respectivamente. Enquanto que o óleo essencial obtido dos fruto de *Protium tenuifolium* foi codificado de PTF-OE.

Os óleos essenciais obtidos das duas espécies de *Protium* foram submetidos a ensaios antimicrobianos num projeto de colaboração com a Faculdade - Farmácia – CCS sob a coordenação da Professora Nádia A. P. Nogueira, cuja metodologia consta do item 8.8.1, Pág. 176.

5.1.1. Constituintes químicos voláteis dos óleos essenciais da resina, frutos verdes, frutos maduros, folhas e cascas da espécie *Protium heptaphyllum*

Os componentes da amostra do óleo essencial da resina de *Protium heptaphyllum* (PHPR-OE) presentes no cromatograma (Fig. 97, Pág. 122), que tiveram seus espectros de massa registrados, tendo cerca de 85% de seus constituintes identificados encontram-se na Tab. 16, Pág. 125. Todos os constituintes identificados são monoterpenos, sendo os majoritários o terpinoleno (**13**) (29%), limoneno (**10**) (17%) e α -felandreno (**7**) (17%).

Os componentes presentes no óleo essencial dos frutos verdes de *Protium heptaphyllum* (PHPFV-OE) são mostrados no cromatograma (Fig. 98, Pág. 122 , que tiveram seus espectros de massas registrados,(92%) foram identificados e encontram-se descritos na Tab. 16, Pág. 125. Do total, cinco constituintes foram identificados, sendo todos monoterpenos, tendo como constituinte majoritário o α -pineno (**2**) (71%).

Os componentes da amostra do óleo essencial dos frutos maduros de *Protium heptaphyllum* (PHPFM-OE), presentes no cromatograma (Fig. 99, Pág. 123), quatro foram identificados, com seus espectros de massas registrados, representando 91% do total os quais encontram-se na Tab. 16, Pág. 125. Todos os componentes identificados são monoterpenos, sendo majoritário o sabineno (**3**) (49 %).

Dos componentes da amostra do óleo essencial das folhas de *Protium heptaphyllum* (PHPF-OF) presentes no cromatograma (Fig. 100, Pág. 123), dezesseis foram identificados com seus espectros de massas registrados, representando 80 % Tab. 16, Pág. 125. Do total de componentes identificados seis são monoterpenos, sendo majoritário β -mirceno (**5**) (19 %), dez são sesquiterpenos, sendo majoritário β -cariofileno (**16**) (18 %).

Dos componentes presentes no óleo essencial das cascas de *Protium heptaphyllum* (PHPC-OE), registrados no cromatograma (Fig. 101, Pág. 124), nove foram identificados com os seus espectros de massas registrados, representando apenas 47 %, que encontram-se na Tab.16, Pág. 125. Do total identificado cinco são monoterpenos, sendo o majoritários α -pineno (**2**) (10 %) e β -felandreno (**8**) (14%), quatro sesquiterpenos, tendo como majoritário o δ -cadineno (**20**) (5 %).

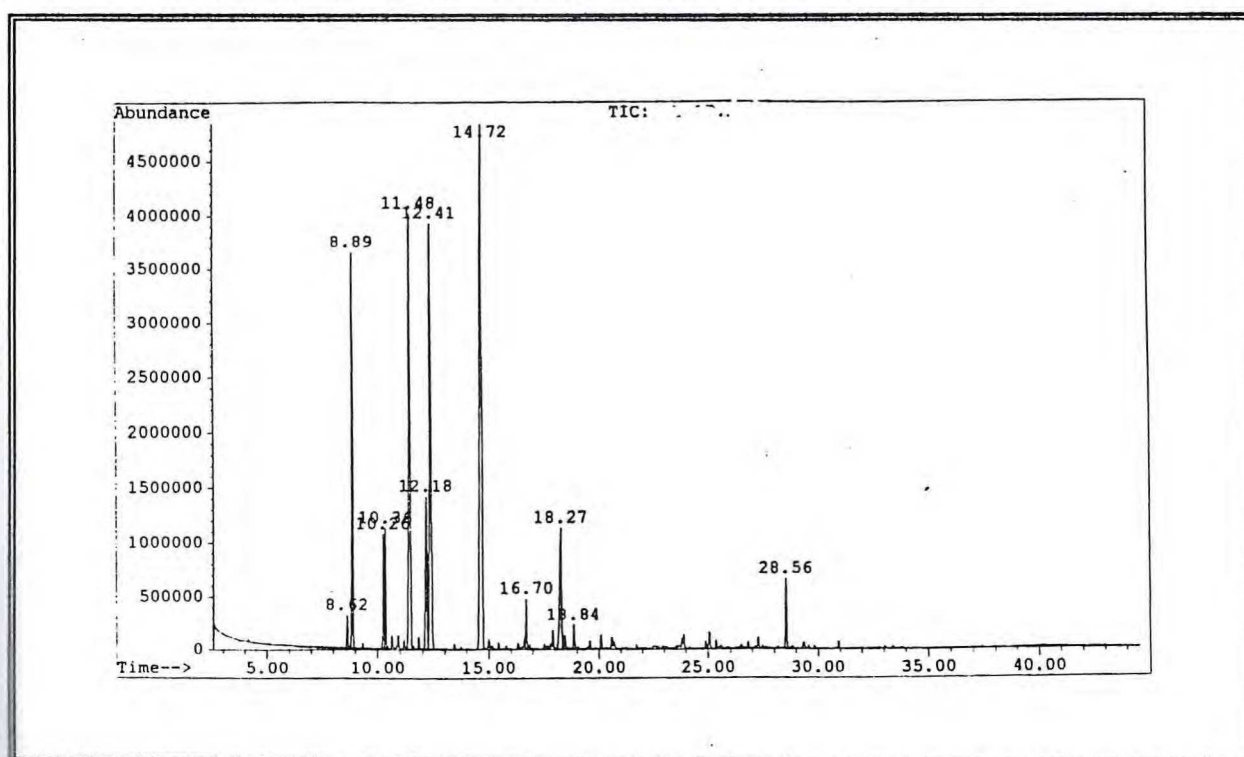
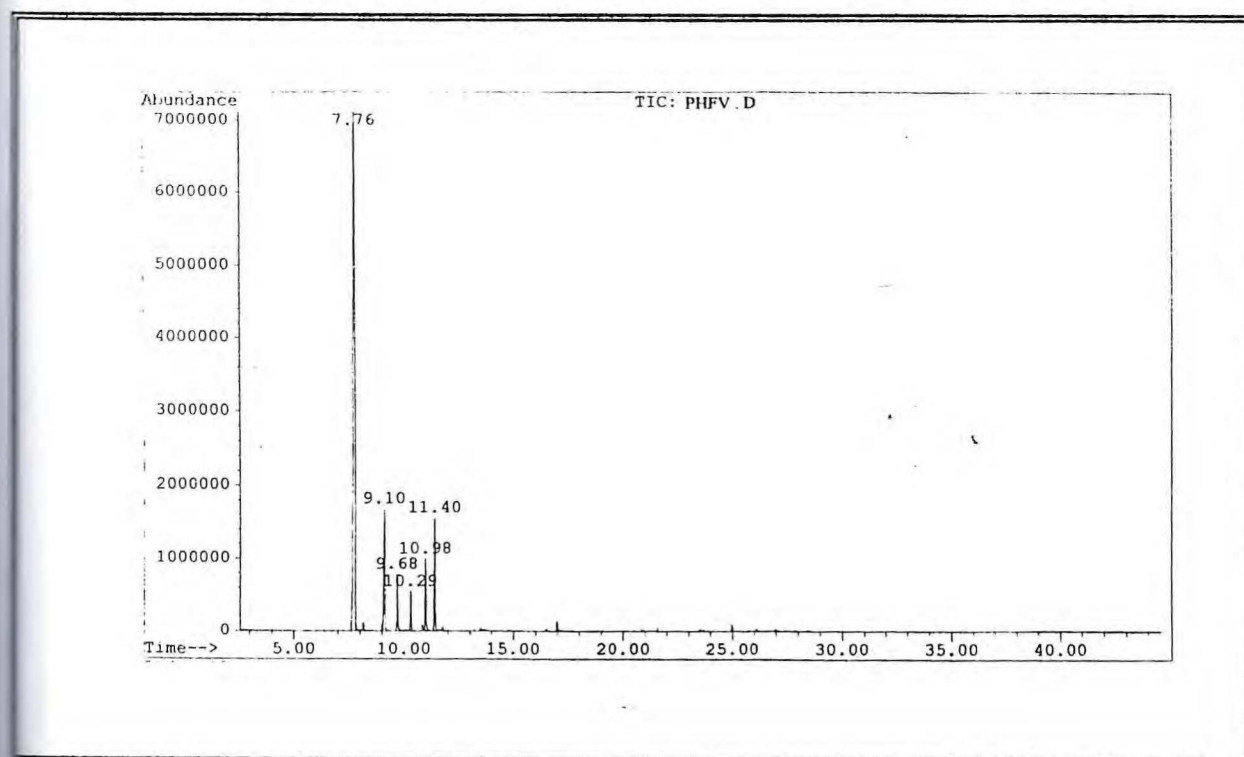
Figura 97 - Cromatograma do óleo essencial da resina de *Protium heptaphyllum*Figura 98 - Cromatograma do óleo essencial dos frutos verdes de *Protium heptaphyllum*

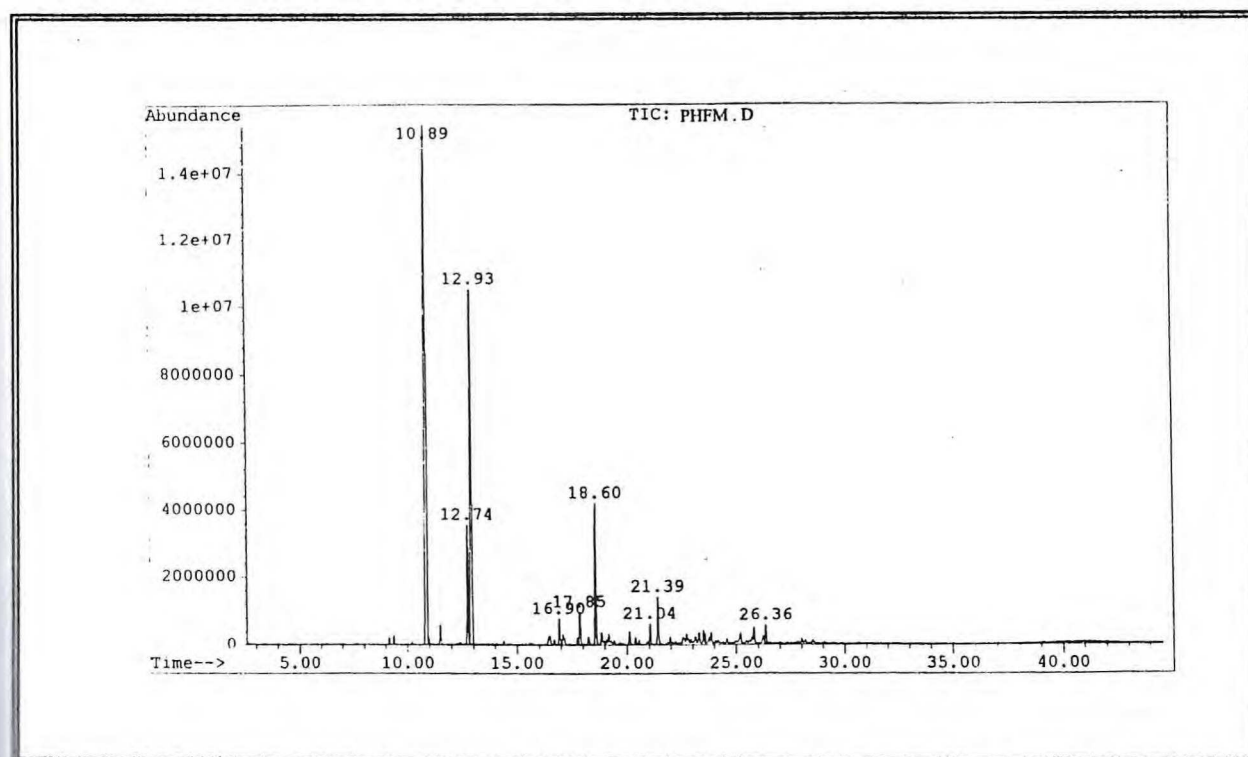
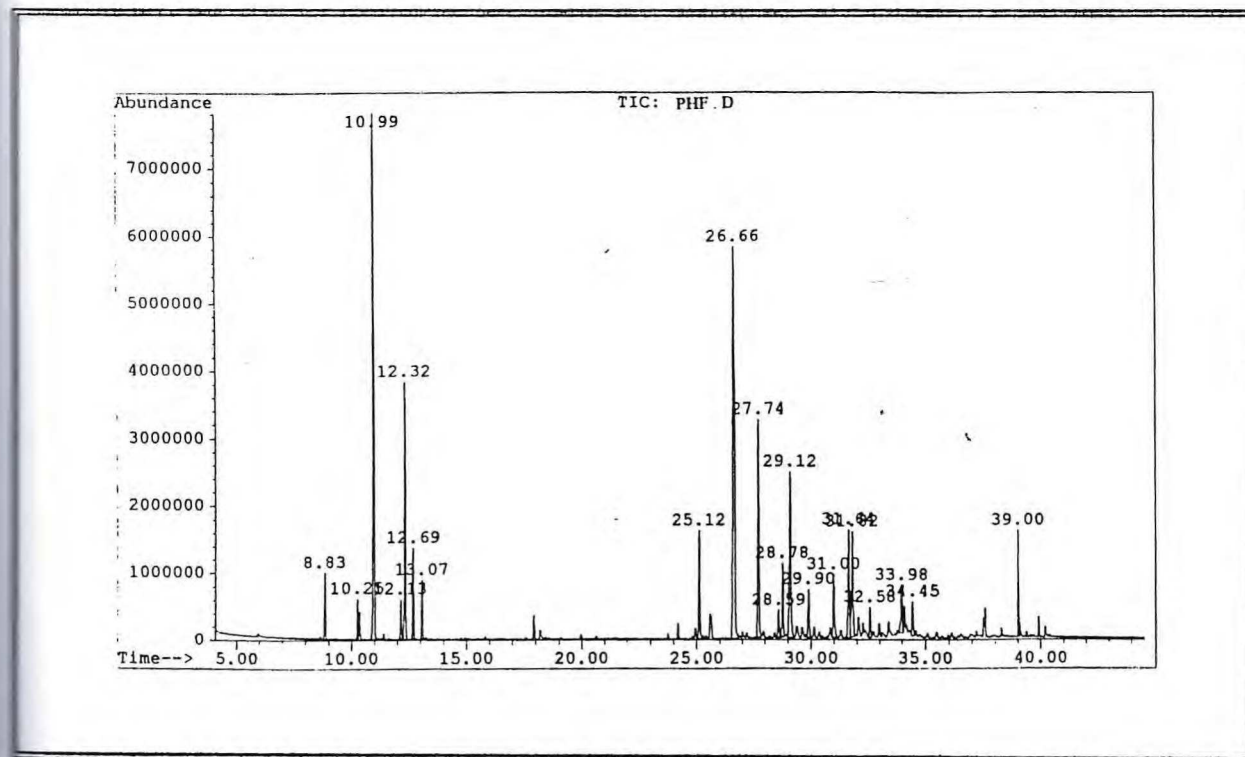
Figura 99 - Cromatograma do óleo essencial dos frutos maduros de *Protium heptaphyllum*Figura 100 - Cromatograma do óleo essencial das folhas de *Protium heptaphyllum*

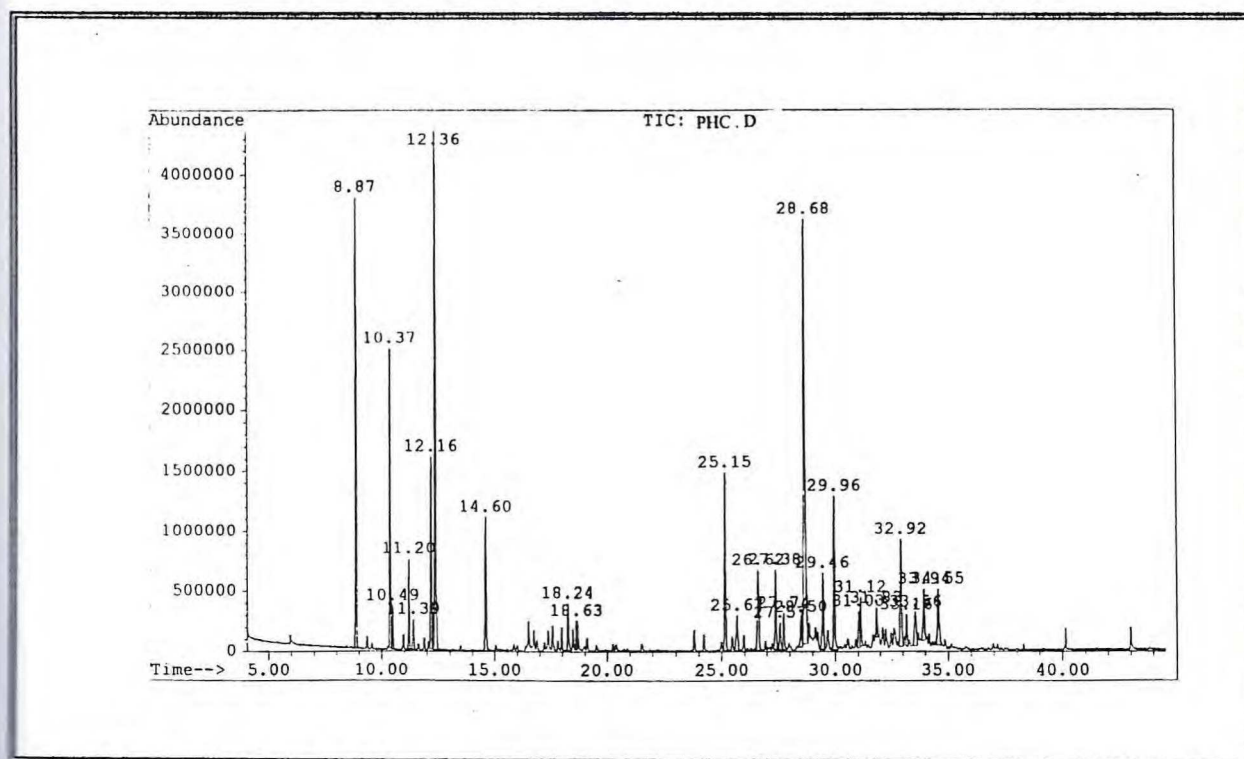
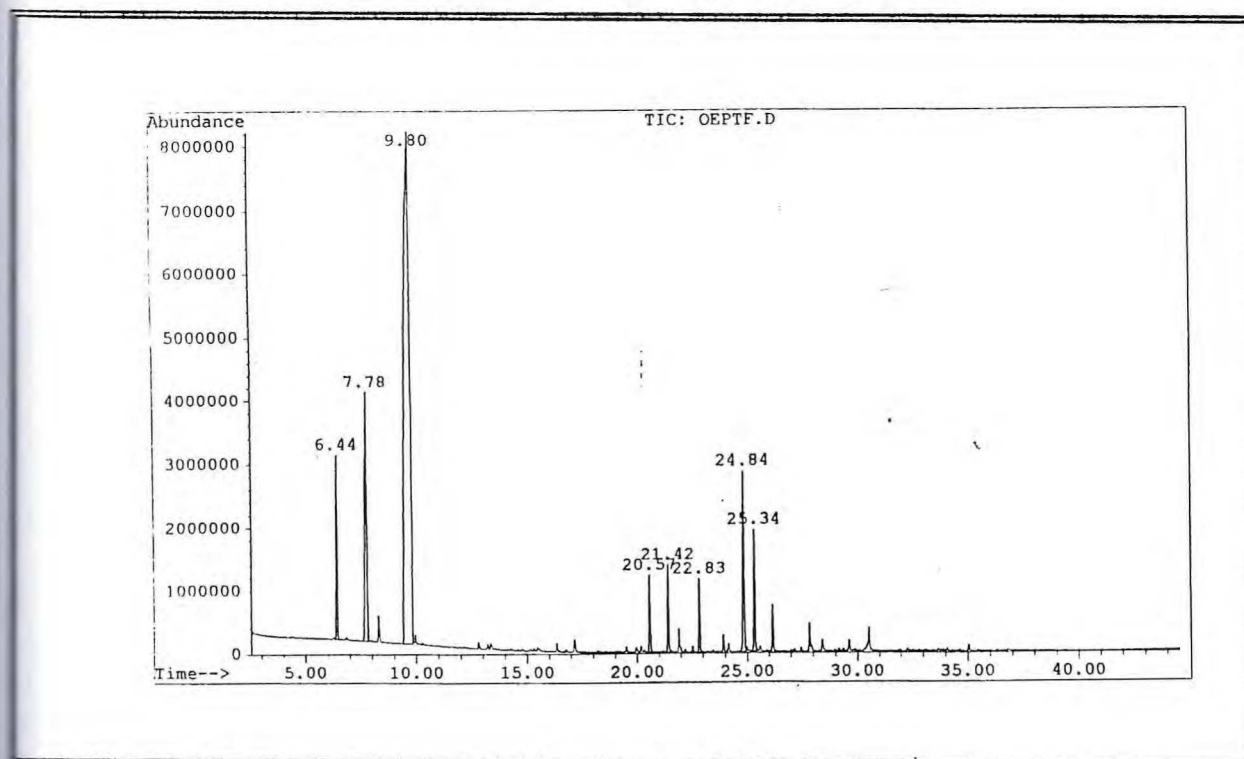
Figura 101 - Cromatograma do óleo essencial das cascas de *Protium heptaphyllum*Figura 102 - Cromatograma do óleo essencial dos frutos de *Protium tenuifolium*

Tabela 16 - Constituintes voláteis da espécie *Protium heptaphyllum*

SUBSTÂNCIAS	PERCENTAGEM					I.K	T.R
	1	2	3	4	5		
α -turjeno (1)	0,75	-	-	-	-	931	8,62
α -pineno (2)	10,50	71,00	-	1,69	10,00	939	7,76
sabineno (3)	2,90	-	49,00	1,03	6,92	976	10,26
β -pineno (4)	2,41	8,67	7,35	-	-	980	10,36
β -mirceno (5)	-	3,92	-	19,00	-	991	9,68
δ -3-careno(6)	-	2,70	-	-	-	1001	10,29
α -felandreno (7)	17,00	-	-	-	0,83	1005	11,48
β -felandreno (8)	-	-	-	-	14,00	1022	12,35
p-cimeno (9)	5,44	-	-	1,11	5,16	1028	12,13
limoneno (10)	17,00	5,71	25,91	-	-	1031	12,41
(Z)- β -ocimeno (11)	-	-	-	2,33	-	1040	12,68
(E)- β -ocimeno (12)	-	-	-	1,60	-	1050	13,07
terpinoleno (13)	29,00	-	-	-	-	1088	14,72
terpinen-4-ol (14)	-	-	8,74	-	-	1177	18,59
α -copaeno (15)	-	-	-	3,44	-	1376	25,12
β -cariofileno (16)	-	-	-	18,00	2,85	1418	26,66
α -humuleno (17)	-	-	-	8,00	1,09	1454	27,74
β -selineno (18)	-	-	-	2,50	-	1485	28,78
biciclogermacreno (19)	-	-	-	7,30	-	1494	29,12
δ -cadineno (20)	-	-	-	0,60	4,67	1524	29,90
germacreno B (21)	-	-	-	2,45	1,48	1556	30,99
espatulenol (22)	-	-	-	4,47	-	1576	31,64
óxido de cariofileno (23)	-	-	-	4,28	-	1581	31,81
furanodieno (24)	-	-	-	2,20	-	1672	33,98
	85%	92%	91%	80%	47%		

1 = PHPR-OE ; 2 = PHPFV-OE ; 3 = PHPFM-OE ; 4 = PHPF-OE ; 5 = PHPC-OE

I.K = Índice de Kovat T.R = Tempo de Retenção

5.1.2. Constituintes químicos voláteis do óleo essencial dos frutos de *Protium tenuifolium*

Os componentes da amostra do óleo essencial dos frutos de *Protium tenuifolium* (PTF-OE) presentes no cromatograma (Fig. 102, Pág. 124) quatro tiveram seus espectros de massas identificados, representando 85 % do total dos constituintes, sendo três monoterpenos, tendo como majoritário o limoneno (10) (67 %) e um sesquiterpeno β -cariofileno (16) (2 %).

Tabela 17 - Constituintes voláteis da espécie *Protium tenuifolium*

SUBSTÂNCIAS	PERCENTAGEM		
	6	I.K	T.R
α -pineno (2)	5,20	939	6,44
β -pineno (4)	10,55	980	7,78
limoneno (10)	67,17	1031	9,80
β -cariofileno (16)	2,08	1418	22,83
	85%		

6 = PTF-OE

I.K = Índice de Kovat T.R = Tempo de Retenção

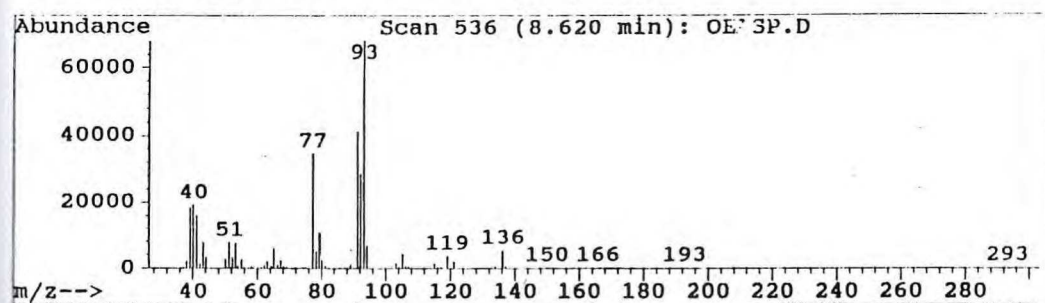
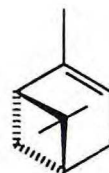
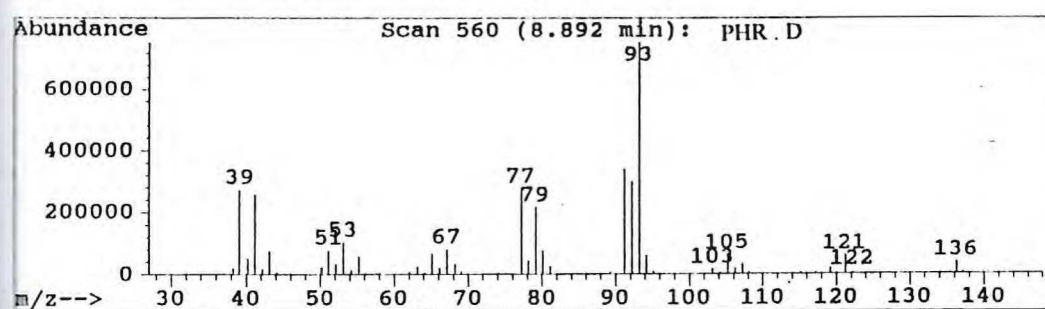
Figura 103 - Espectro de massas do α -turjeno (1)Figura 104 - Espectro de massas do α -pineno (2)

Figura 105 - Espectro de massas do sabineno (3)

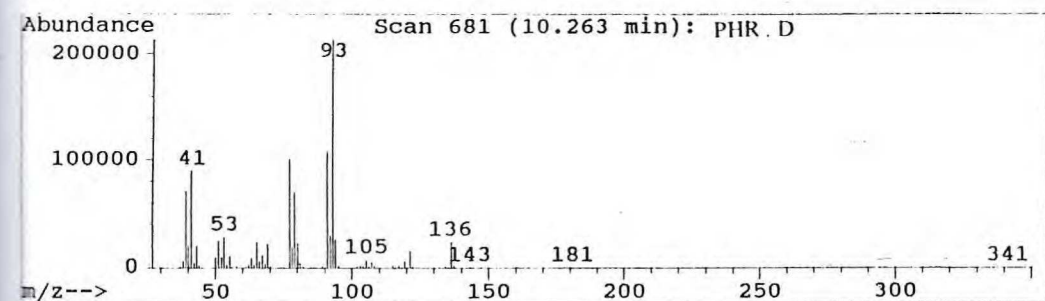
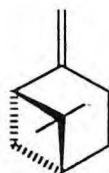
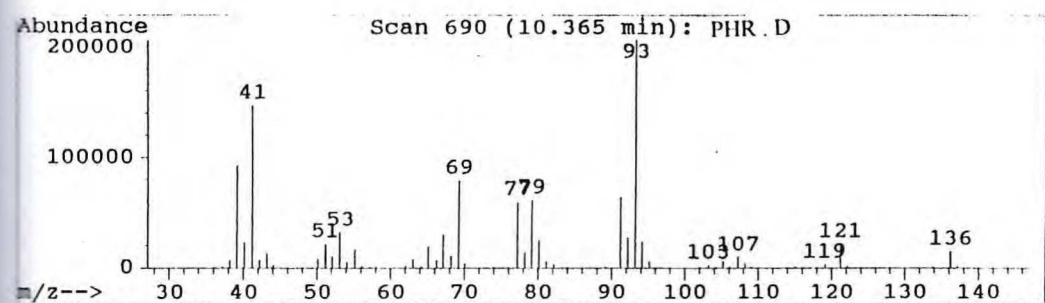
Figura 106 - Espectro de massas do β -pineno (4)

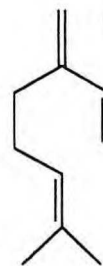
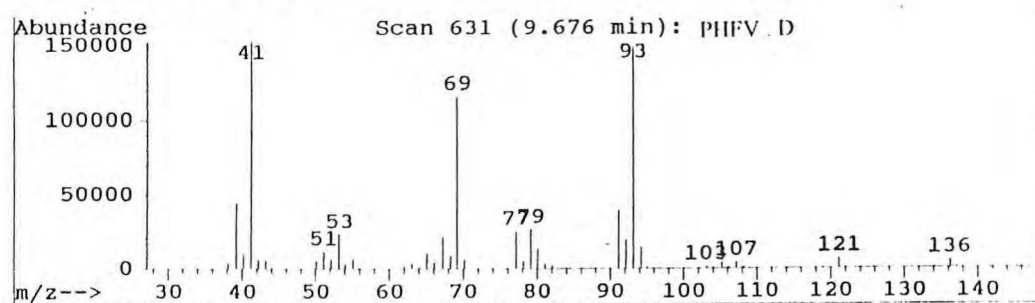
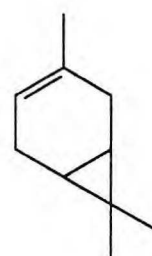
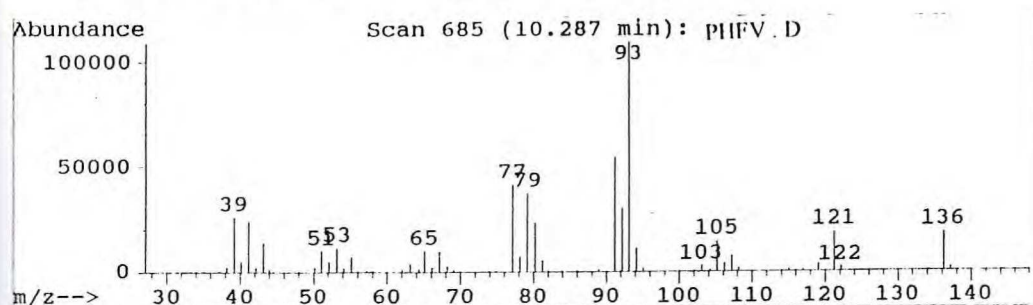
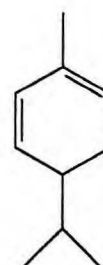
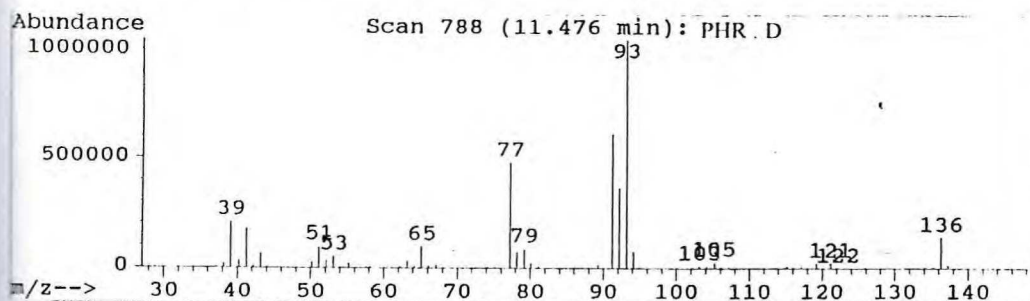
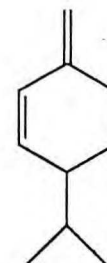
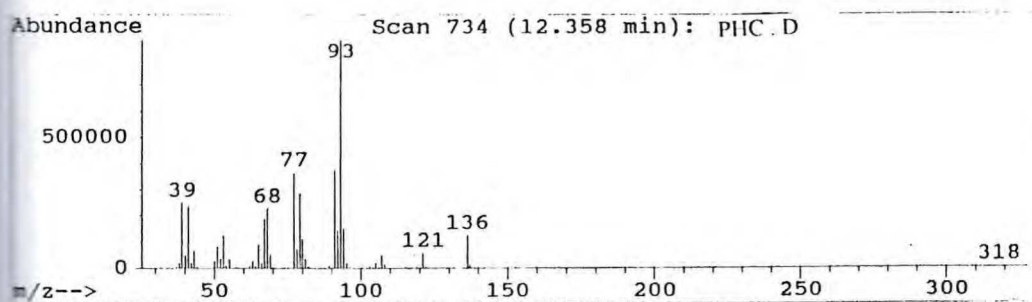
Figura 107 - Espectro de massas do β -mirceno (5)Figura 108 - Espectro de massas do δ -3-careno (6)Figura 109 - Espectro de massas do α -felandreno (7)Figura 110 - Espectro de massas do β -felandreno (8)

Figura 111 - Espectro de massas do p-cimeno (9)

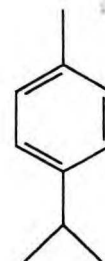
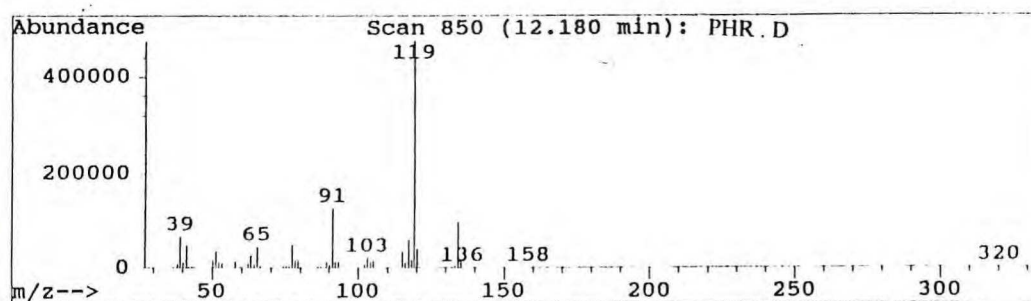


Figura 112 - Espectro de massas do limoneno (10)

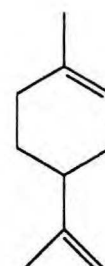
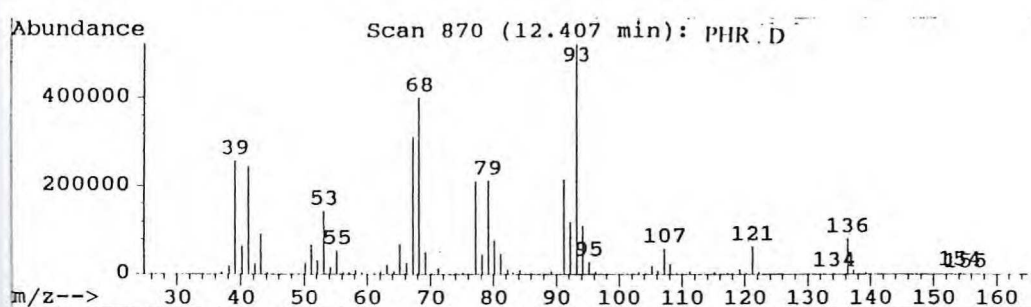
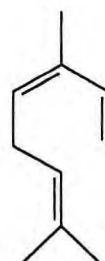
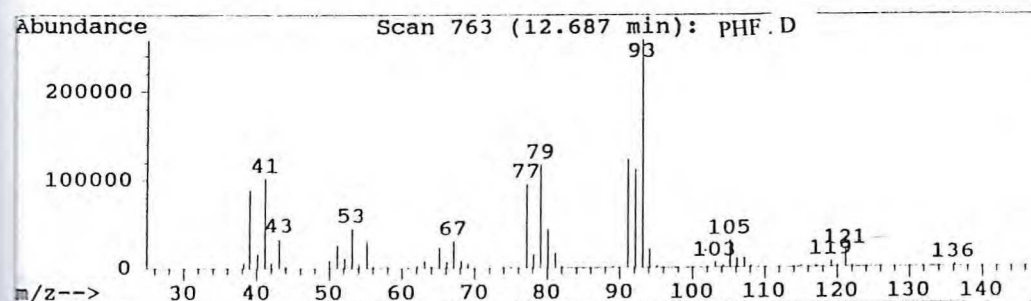
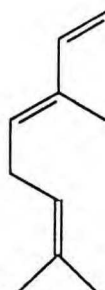
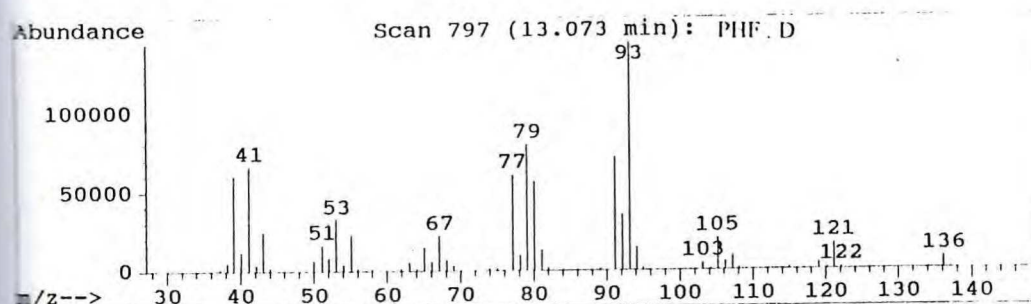
Figura 113 - Espectro de massas do (Z)- β -ocimeno (11)Figura 114 - Espectro de massas (E)- β -ocimeno (12)

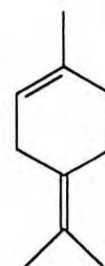
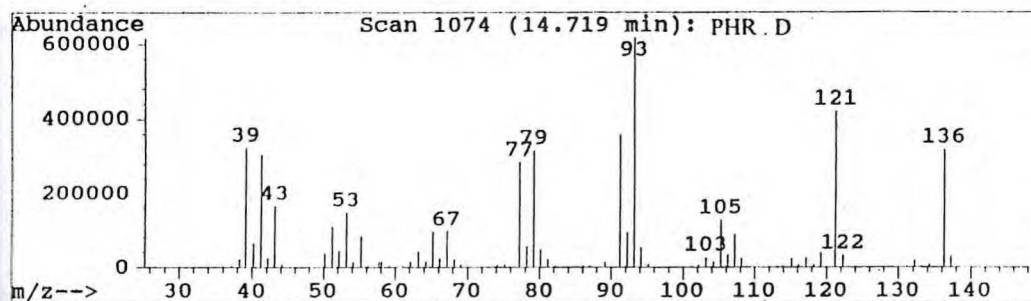
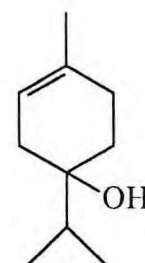
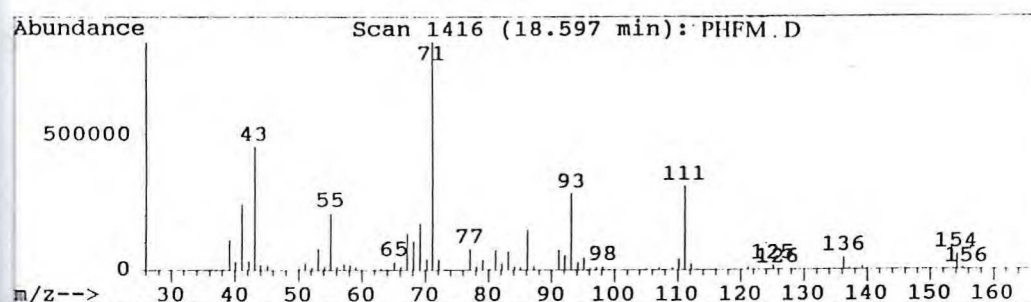
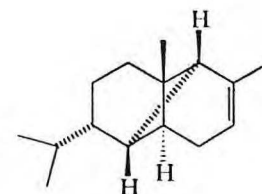
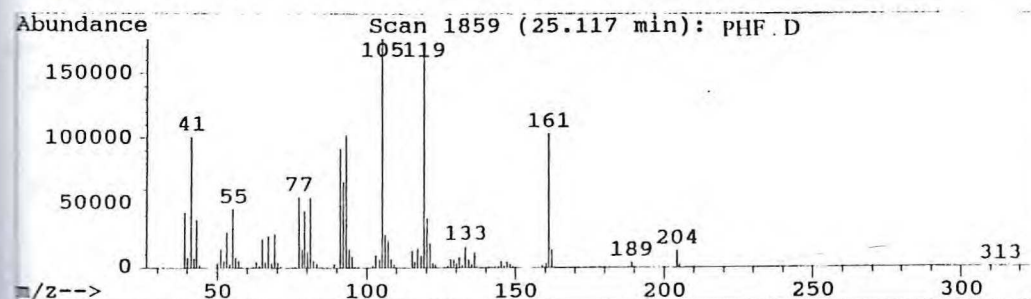
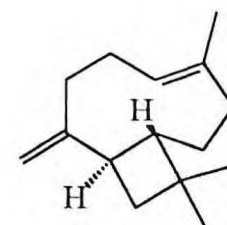
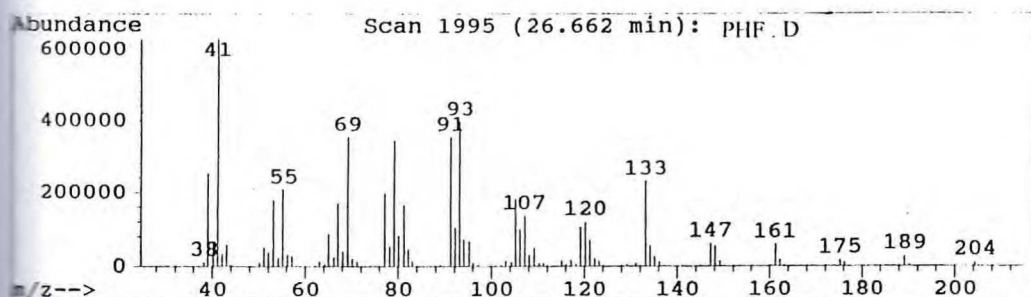
Figura 115 - Espectro de massas do terpinileno (13)**Figura 116 - Espectro de massas do terpinen-4-ol (14)****Figura 117 - Espectro de massas do α -copaeno (15)****Figura 118 - Espectro de massas do β -cariofileno (16)**

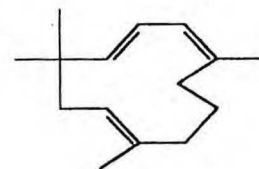
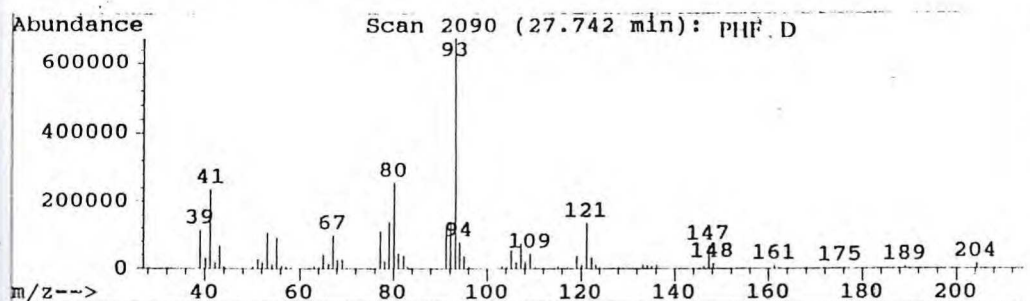
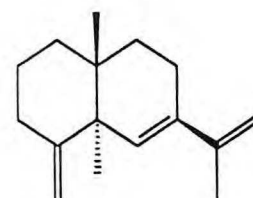
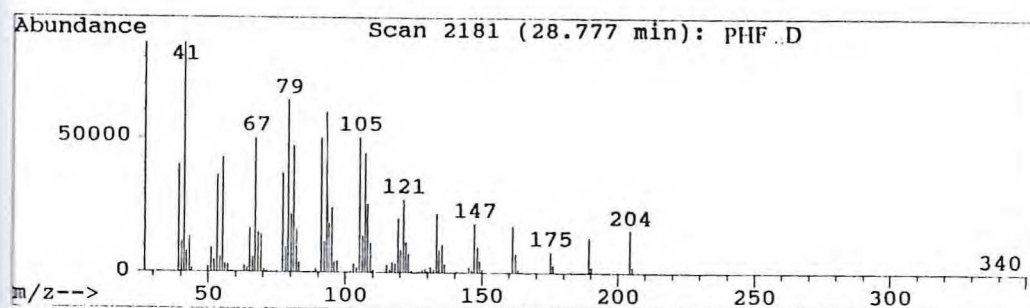
Figura 119 - Espectro de massas do α -humuleno(17)Figura 120 - Espectro de massas do β -selineno (18)

Figura 121 - Espectro de massas do biciclogermacreno (19)

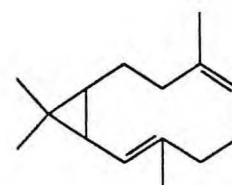
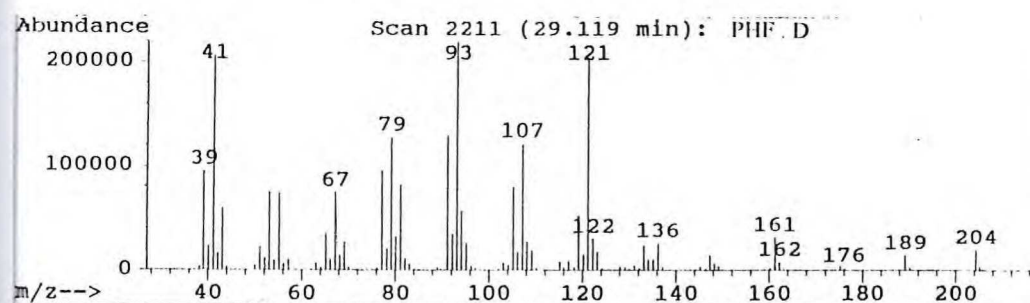
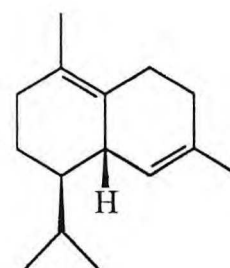
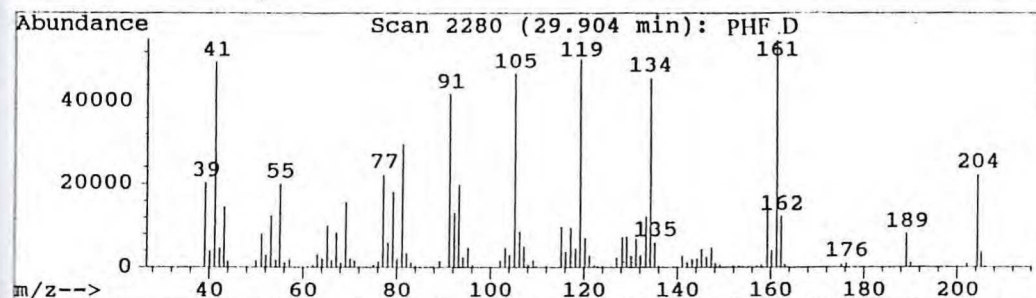
Figura 122 - Espectro de massas do δ -cadineno (20)

Figura 123 - Espectro de massas do germacreno B (21)

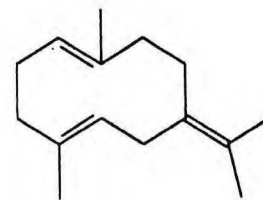
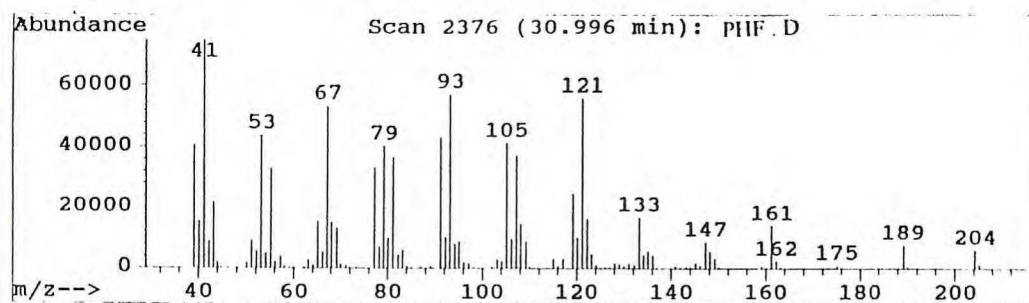


Figura 124 - Espectro de massas do espatulenol (22)

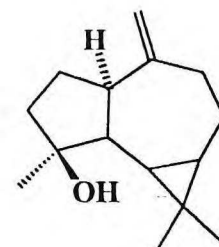
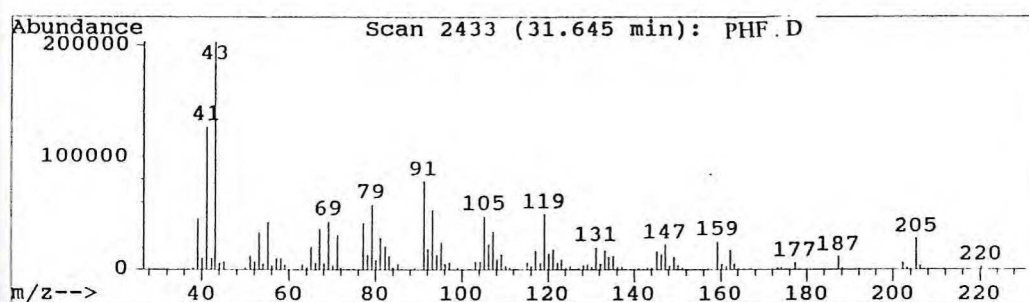


Figura 125 - Espectro de massas do oxido de cariofileno (23)

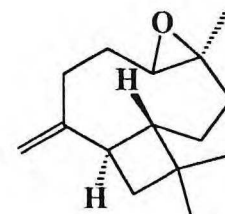
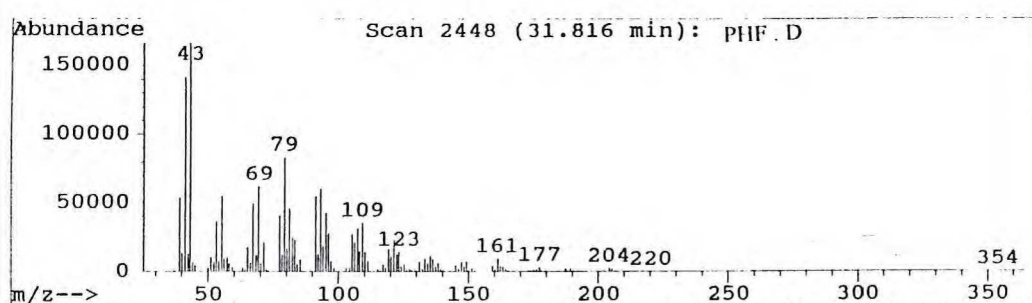
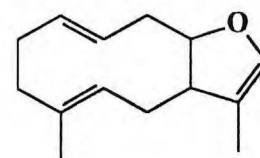
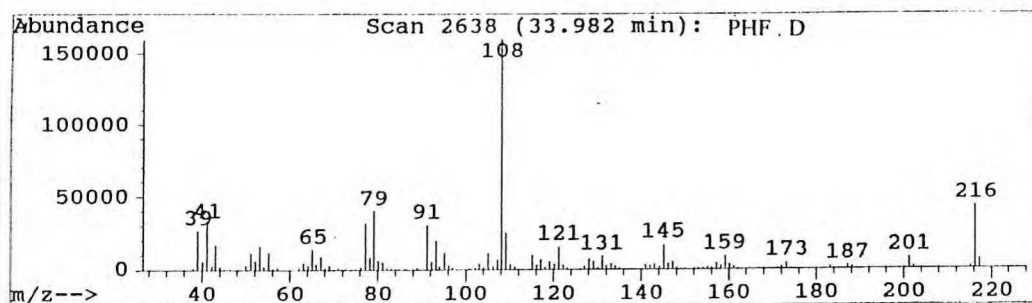


Figura 126 - Espectro de massas do furanodieno (24)





CAPÍTULO

6

ATIVIDADE FARMACOLÓGICA

6. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE FARMACOLÓGICA DOS ÓLEOS ESSENCIAIS E DOS CONSTITUINTES ISOLADOS

São muitos os usos terapêuticos atribuídos à espécie *Protium heptaphyllum* na medicina popular, destacando-se o uso da resina oleosa como analgésico, cicatrizante, tônico, desinfetante, tratamento de úlceras, estimulante, doenças de pele e tumores^{12, 3, 10}. As cascas e folhas são muito utilizadas contra as úlceras gangrenosas e inflamações em geral². Estudos farmacológicos recentes com o óleo essencial da resina comprovaram sua eficácia terapêutica, demonstrando atividade antiinflamatória, antineoplásica e antinociceptiva⁷. É comprovada também a atividade cercaricida dos óleos essenciais das folhas e dos frutos⁸. Fundamentado nestes dados e no uso popular da espécie, foram realizados diversos testes antimicrobianos com o óleo da resina, extratos e substâncias isoladas das espécies *Protium heptaphyllum* e *Protium tenuifolium* na tentativa de se obter compostos biologicamente ativos.

6.1. Atividade antimicrobiana dos óleos essenciais, dos extratos e substâncias isoladas de *Protium heptaphyllum* e óleos essenciais e extratos de *Protium tenuifolium*.

6.1.1. Considerações gerais

Os fatores ambientais que afetam as atividades dos microorganismos são agrupados em duas categorias: físicos e químicos⁵⁶.

O comportamento de um microorganismo em um determinado meio ambiente depende efetivamente de sua resposta a cada um dos fatores do ambiente, como no caso do meio de cultura mais a resina, os extratos e as substâncias testadas em diferentes doses.

Uma determinada substância química pode exercer efeito benéfico sobre o microorganismo atuando como nutriente, ou promover um efeito adverso, atuando como um composto antimicrobiano. O crescimento e a reprodução são os parâmetros de respostas mais observadas nos microorganismos. A inibição do crescimento ou a morte de um organismo ocorre quando ele se encontra em condições desfavoráveis. Um produto químico ou um fator ambiental pode impedir temporariamente sua reprodução (microbiostático) ou pode determinar a sua morte (microbiocida).

Os microorganismos se diferenciam muito entre si frente a uma determinada substância, de modo que esta pode servir como nutriente para um e ser tóxico para outro.

6.2. Atividade antimicrobiana frente aos microorganismos: *Estafilococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella cholerae-suis* e a levedura *Candida albicans*.

Os ensaios frente aos microorganismos foram realizados com resina bruta, óleo essencial da resina, óleo essencial dos frutos maduros e as substâncias PHPFM-1, PHPFV-1, PHPC-1, PHPF-1, a mistura binária de α -amirina [(PHPR-2a) e β -amirina (PHPR-2b)] de *Protium heptaphyllum*, a resina e o óleo essencial dos frutos verdes de *Protium tenuifolium*. Somente os óleos essenciais testados apresentaram atividade significativa.

Os valores médios dos diâmetros dos halos de inibição de crescimento microbiano em diferentes diluições das amostras variaram de 8 a 35 mm.

O microorganismo mais sensível aos óleos testados foi a levedura *Candida albicans* como podemos constatar na (Tab. 21, Pág. 137). A suscetibilidade dessa levedura a extratos vegetais foi constatada por muitos pesquisadores⁵⁷.

Entre as espécies de bactérias utilizadas *Pseudomonas aeruginosa* apresentou a menor suscetibilidade, sendo resistente ao óleo essencial dos frutos de *Protium tenuifolium* conforme (Tab. 18, Pág. 135). Estudos de atividades antimicrobianas presentes na literatura, realizados com o óleo essencial de *Ocimum gratissimum* L, constataram uma alta sensibilidade para todas as culturas testadas, exceto para *Pseudomonas aeruginosa*, que mostrou-se resistente.⁵⁸

As bactérias Gram (+) *Staphylococcus aureus* e Gram (-) *Escherichia coli*, conhecidas por apresentarem resistência a muitas drogas comercializadas e serem causas frequentes de infecções hospitalares, foram sensíveis aos óleos essenciais testados.

O óleo essencial dos frutos de *Protium tenuifolium*, embora não tenha inibido o crescimento de *Pseudomonas aeruginosa* e tenha mostrado a menor atividade frente a *Staphylococcus aureus*, inibiu fortemente o crescimento da *Escherichia coli*, *Salmonella cholerae-suis* bem como a levedura *Candida albicans* com valores de diluição muito

reduzido, cujo poder inibitório é mais eficaz do que o cetoconazol (Tab. 21, Pág. 137), droga conhecida por sua eficiência contra esse patógeno.

Os resultados apresentados principalmente pelo óleo essencial dos frutos de *Protium tenuifolium* sugerem a importância de tratar a sua capacidade de inibir cepas de *Candidas albicans* resistentes e de diferentes procedências.

Tabela 18 - Atividade antimicrobiana do óleo essencial dos frutos de *Protium tenuifolium*

		Microorganismos			
		<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>S. cholerae-suis</i>
PTF - OE	1/1	+++	+++	-	+++
	1/2	++	++	-	+++
	1/4	+	++	-	++
	1/8	-	++	-	-
	1/16	-	nd	-	-
Amicacina	30µg	-	++++	+++	++++
Tetraciclina	30µg	+++	-	-	-
Clorofórmio	25µL	-	-	-	-

nd = valores não determinados ; - resistência ; + 1 – 8 mm ; ++ 9 – 15 mm ; +++ 16 – 25 mm ; ++++ = > 25 mm

PTF – OE = Óleo essencial dos frutos de *Protium tenuifolium*

Tabela 19 - Atividade antimicrobiana do óleo essencial da resina de *Protium heptaphyllum*

		Microorganismos			
		<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>S. cholerae-suis</i>
PHPR - OE	1/1	++++	+++	++	+++
	1/2	+++	+++	++	+++
	1/4	++	+++	-	++
	1/8	++	+++	-	++
	1/16	nd	++	-	++
Amicacina	30µg	-	++++	+++	++++
Tetraciclina	30µg	+++	-	-	-
Clorofórmio	25µL	-	-	-	-

nd = valores não determinados ; - resistência ; + 1 – 8 mm ; ++ 9 – 15 mm ; +++ 16 – 25 mm ; ++++ = > 25 mm

PHPR – OE = óleo essencial da resina de *Protium heptaphyllum*

Tabela 20 - Atividade antimicrobiana do óleo essencial dos frutos maduros de *Protium Heptaphyllum*

		Microorganismos			
		<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>S. cholerae-suis</i>
PHPFM - OE	1/1	+++	+++	+++	+++
	1/2	+++	+++	-	+++
	1/4	++	++	-	++
	1/8	++	++	-	++
	1/16	nd	-	-	-
Amicacina	30µg	-	++++	+++	++++
Tetraciclina	30µg	+++	-	-	-
Clorofórmio	25µL	-	-	-	-

nd = valores não determinados ; - resistência ; + 1 – 8 mm ; ++ 9 – 15 mm ; +++ 16 – 25 mm ; ++++ = > 25 mm

PHPFM – OE = óleo essencial dos frutos maduros de *Protium heptaphyllum*

Tabela 21 - Atividade antimicrobiana dos óleos essenciais dos frutos de *Protium tenuifolium*, resina e frutos maduros de *Protium heptaphyllum*

		Microorganismo
		<i>Candida albicans</i>
PTF-OE	1/1	++++
	1/2	++++
	1/4	++++
	1/8	++
	1/16	+++
	1/32	+++
PHPR-OE	1/1	+++
	1/2	+++
	1/4	++
	1/8	++
	1/16	nd
PHPFM-OE	1/1	++++
	1/2	+++
	1/4	+++
	1/8	++
	1/16	++
	1/32	++
Cetoconazol	10µg	+
Clorofórmio	25µL	-

nd = valores não determinados ; - resistência ; + 1 – 8 mm ; ++ 9 – 15 mm ; +++ 16 – 25 mm ; ++++ = > 25 mm

PTF-OE = Óleo essencial dos frutos de *Protium tenuifolium*

PHPR-OE = Óleo essencial da resina de *Protium heptaphyllum*

PHPFM-OE = Óleo essencial dos frutos maduros de *Protium heptaphyllum*

6.3. Teste de inibição da atividade de acetilcolinesterase (Ache)

O mal de Alzheimer é uma doença degenerativa, que atinge o sistema nervoso, de causa não totalmente conhecida e caracteriza-se pela deterioração intelectual progressiva. Memória, percepção, orientação, etc são todos alterados na demência.

Embora não exista tratamento com cem por cento de eficácia, existem muitas tentativas com a finalidade de diminuir a velocidade de progressão da doença, onde uma das abordagens consiste no tratamento colinérgico da doença, que se baseia entre outras formas, no uso de inibidor de acetilcolinesterase (Ache).

Atualmente é muito abordado no tratamento, a inibição direta de acetilcolinesterase (Ache), onde muitas drogas são usadas para este fim, tais como: phisostigmina, tacrine, galantamine, dehidroevodiamine, as quais previnem a hidrólise da acetilcolina. Muitas destas drogas falham quanto a sua eficácia e mostram efeitos colinérgicos colaterais como hepatotoxicidade⁵⁹.

Pesquisas recentes apontam o uso de drogas provenientes de produtos naturais como um meio eficaz no tratamento da doença de Alzheimer.

Realizou-se testes inibitórios segundo metodologia desenvolvida por Rhee et al⁵⁹. O extrato etanólico do lenho (EEL), resina (PHPR) e a substância PHPFV-1 de *Protium heptaphyllum*, juntamente com o extrato etanólico das folhas (EEFPT) de *Protium tenuifolium* foram testados, cujo valores das concentrações capazes de inibir a atividade de acetilcolinesterase encontram-se na Tab. 22, Pág. 139.

Tabela 22 - Teste de inibição de acetilcolinesterase (Ache)

Amostras	Concentrações (mg / mL)
EEL	10
PHPR	0,5
PHPFV-1	10^{-3}
EEFPT	2,5

EEL = Extrato etanólico do lenho de *Protium heptaphyllum*

PHPR = Resina de *Protium heptaphyllum*

PHPFV-1 = catequina (26)

EEFPT = Extrato etanolico das folhas de *Protium tenuifolium*

Os resultados obtidos com os extratos mostram ser este um gênero promissor para fracionamentos e estudos, e a atividade inibitória apresentada pela substância codificada de PHPFV-1 (26) isolada do fruto verde de *Protium heptaphyllum* faz dela um forte candidato a inibidor da acetilcolinesterase (Ache). Os resultados obtidos fazem parte de um manuscrito aceito na Revista Química Nova.

6.4. Avaliação da atividade antiinflamatório da mistura α -amirina [PHPR-2a (5)] e β -amirina[PHPR-2b(6)]

A resposta inflamatória é uma forma de defesa do organismo contra lesões, constituindo-se numa reação local da microcirculação à injúria. A natureza do agente indutor da inflamação pode ser classificada em três grupos: fatores físicos (irradiação, calor, frio), fatores químicos (ácidos, alcalis, carragenina), infecções e imunidade (vírus, bactérias e parasitas).

Após o desenvolvimento da reação inicial, as mudanças que se seguem dependem da severidade, natureza e ação do agente nocivo. As características de cada resposta associada à inflamação estão associadas a diferentes medidores do processo de inflamação, e a observação

da variação de cada parâmetro pode não só fornecer informações sobre o processo genérico da inflamação, como também sobre a especificidade de atuação dos agentes antiinflamatórios⁹.

Levantamento bibliográfico exaustivo sobre atividades de triterpenos na literatura relatam a importância destes compostos como agentes antiinflamatório, antimicrobiana, etc^{29, 31}. Dentre os muitos triterpenos selecionados os triterpenos α e β -amirina mostram atividades diversas, cujo resultado constam na (Tab. 3, Pág.25). Outros estudos demonstram que α -amirina é um inibidor competitivo da tripsina e quimiotripsina bovina³⁴, agindo seletivamente em células eucarióticas³⁵.

A partir destes dados, foram realizados testes com a mistura de α e β -amirina de contorção induzida por ácido acético e edema de pata induzido por carragenina.

Estes ensaios foram realizados em colaboração com o Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Universidade Federal do Ceará sob orientação da Professora Glacia Socorro de Barros Viana.

6.4.1. Contorção induzida por ácido acético

Utilizou-se o método descrito por Koster et al⁶⁰. Injetou-se nos camundongos ácido acético 0,6% (10mL/Kg, i.p.) e, após 10 minutos o número de contorsões foi registrado em períodos de 20 minutos. Os camundongos foram tratados com uma mistura isomérica de α,β -amirina (5, 10 e 50 mg/Kg, i.p. e 10, 50 e 100 mg/Kg, v.o.) onde fora administrado 30 minutos e 1 hora, respectivamente, antes da administração do ácido acético. Houve uma significativa redução do número de contorções no grupo tratado com a mistura isomérica de α,β -amirina quando comparado com o controle, sendo então considerada positiva a resposta analgésica. Os valores encontram-se expressos na (Tab. 23, Pág. 141).

Tabela 23 - Efeitos da mistura isomérica de α,β -amirina em contorções de camundongos induzido por ácido acético

Grupo	Nº de Contorções (\pm Erro)	Inibição (%)
Controle, v.o. (12)	37,6 \pm 1,6	-
10 mg/Kg, v.o (10)	33,5 \pm 4,1	25,0
50 mg/Kg, v.o. (10)	24,0 \pm 3,7	36,0
100 mg/Kg, v.o. (08)	20,7 \pm 3,3	44,9
Controle, i.p. (12)	39,0 \pm 3,3	-
5 mg/Kg, i.p. (06)	29,8 \pm 4,7	23,6
10 mg/Kg, i.p. (08)	10,7 \pm 2,5	72,6
50 mg/Kg, i.p. (08)	4,0 \pm 1,7	89,7

v.o = via oral; i.p = intraperitoneal

Os valores em parentese representam o número de camundongos testados.

6.4.2. Edema de pata induzido por carragenina

Os camundongos machos foram divididos em grupos, injetou-se 0,1 mL de uma suspensão recentemente preparada de carragenina na região plantar da pata direita do camundongo, de acordo com o método de Winter et al⁶¹. A droga teste foi injetada 30 minutos (i.p.) e 1 hora (v.o.), antes do estímulo com a injeção. Os animais controle receberam a quantidade equivalente de solução aquosa de tween 0,5 %. O volume da pata foi medido por pletismômetro (Ugo, Basili, Italy) antes e depois de uma, duas, três e quatro horas da injeção de carragenina .

Os resultados apresentados na (Tab. 24, Pág. 142) demonstram que a mistura isométrica de α,β -amirina não reduziu significativamente o edema de pata após administração de 50 mg/Kg, v.o. quando comparado ao controle por igual período de tempo. Entretanto, inibições significantes foram observadas após duas, três e quatro horas da injeção de carragenina e pré-tratamento com a mistura isomérica de α,β -amirina nas doses de 25 e 50 mg/Kg, i.p.

Tabela 24 - Efeito antiedematogênico da mistura isomérica de α,β -amirina no edema de pata induzido por carragenina

Grupo	1ª hora	2ª hora	3ª hora	4ª hora
Controle,v.o.(08)	0,15 \pm 0,02	0,34 \pm 0,04	0,40 \pm 0,04	0,31 \pm 0,02
50mg/Kg,v.o. (08)	0,11 \pm 0,01 (26,6%)	0,28 \pm 0,02 (17,6%)	0,36 \pm 0,02 (10,0%)	0,25 \pm 0,01 (19,4%)
IND 10mg/Kg, v.o.(08)	0,17 \pm 0,02 -	0,23 \pm 0,02 (32,4%)	0,22 \pm 0,02 (45,0%)	0,23 \pm 0,02 (25,8%)
Controle, i.p. (08)	0,23 \pm 0,01	0,28 \pm 0,02	0,36 \pm 0,02	0,34 \pm 0,02
10 mg/Kg, i.p. (08)	0,20 \pm 0,02 (13,4%)	0,22 \pm 0,01 (21,4%)	0,22 \pm 0,01 (38,9%)	0,26 \pm 0,02 (23,5%)
25 mg/Kg, i.p. (08)	0,16 \pm 0,02 (30,4%)	0,18 \pm 0,02 (35,7%)	0,21 \pm 0,01 (41,7%)	0,21 \pm 0,02 (38,2%)
50 mg/Kg, i.p. (08)	0,13 \pm 0,01 (43,5%)	0,18 \pm 0,02 (35,7%)	0,17 \pm 0,01 (52,8%)	0,20 \pm 0,02 (41,2%)

v.o = via oral; i.p = intraperitoneal

IND = Indometacina

Os valores em parêntese representam o número de camundongos testados.



CAPÍTULO

7

DETERMINAÇÃO QUANTITATIVA

7. DETERMINAÇÃO QUANTITATIVA

7.1. Quantificação da mistura binária de [PHPR-2a (5) e PHPR-2b (6)] na resina de *Protium heptaphyllum*, por CLAE

A facilidade de obtenção de α,β -amirina da resina aliada aos resultados farmacológicos obtidos nos motivou a identificar o teor destas substâncias na resina.

Este estudo foi realizado por meio de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) em coluna de fase reversa, com eluição isocrática, comprimento de onda $\lambda = 220$ nm e detector ultravioleta, fazendo-se uso de uma curva padrão de calibração, obtida através da metodologia do padrão externo. A escolha do solvente selecionado foi feita após análise criteriosa de uma série de eluentes, tendo sido selecionado a mistura acetonitrila / água (6,5 : 3,5) como o melhor solvente. Após escolhido o solvente foram feitas várias injeções para determinar o fluxo ideal, sendo encontrado o valor 0,7mL/min. Para todas as medidas foram sempre feitas injeções de 20 μ l de concentrações conhecidas dos padrões e da resina. Os solventes utilizados foram filtrados em membranas especiais e em seguida desgaseificados.

7.1.1. Análise quantitativa

A análise de uma amostra com o objetivo de quantificar os seus constituintes por cromatografia líquida de alta eficiência, requer a elaboração inicial de uma curva de calibração, cujas amostras contenham concentrações conhecidas do constituinte objeto de determinação. Utilizou-se uma coluna de fase reversa (C-18) 250 \times 4,6 mm e acetonitrila / água (6,5 : 3,5) como fase móvel, fluxo de 0,7mL/min. e injeção de 20 μ l.

A quantificação da mistura binária foi realizada segundo o método do padrão externo⁶², onde obteve-se a curva de calibração por meio de injeção da solução padrão em concentração de 20, 40, 60, 80 e 120 ppm. Cada amostra na mesma concentração foi injetada três vezes e utilizou-se a média aritmética das áreas de cada pico para a elaboração da curva padrão de calibração.

A (Fig. 127, Pág. 145) registra o gráfico de calibração linear obtido por meio das áreas dos picos (Y) versus a concentração injetada em ppm (X), onde a equação de

regressão, tempo de retenção (T_r) e o coeficiente de correlação linear (r^2) encontram-se na (Tab. 25 Pág. 144), cujo valor próximo da unidade justifica a relação de linearidade da curva obtida.

Tabela 25 - Equação de regressão linear e coeficiente de correlação

Padrão externo	T_r (min)	$Y = a + bx$	r^2
PHPR-2a e PHPR-2b	9,93	$Y = 4655,4 + 4605,5X$	0,99829

A Fig. 128, Pág. 146 mostra o cromatograma da resina de *Protium heptaphyllum*. Para determinar o pico referente a mistura de α,β -amirina, uma amostra desta substância na concentração de 1000ppm (1mg/mL) foi adicionada à resina na concentração de 3000ppm (3mg/mL), filtrada e injetada sob as mesmas condições observando um aumento de intensidade no pico com t_R 9,61 identificado como a mistura de α,β -amirina Fig. 129, Pág. 146.

A quantificação da mistura binária foi feita tomando-se como base a área dos picos obtidos dos padrões externos, cujo resultado mostra uma relação linear evidenciada pelo coeficiente de correlação próximo a unidade. A determinação da concentração média obtida em 3 mg de resina de *Protium heptaphyllum* analisada revelou o teor de 3 % da mistura.

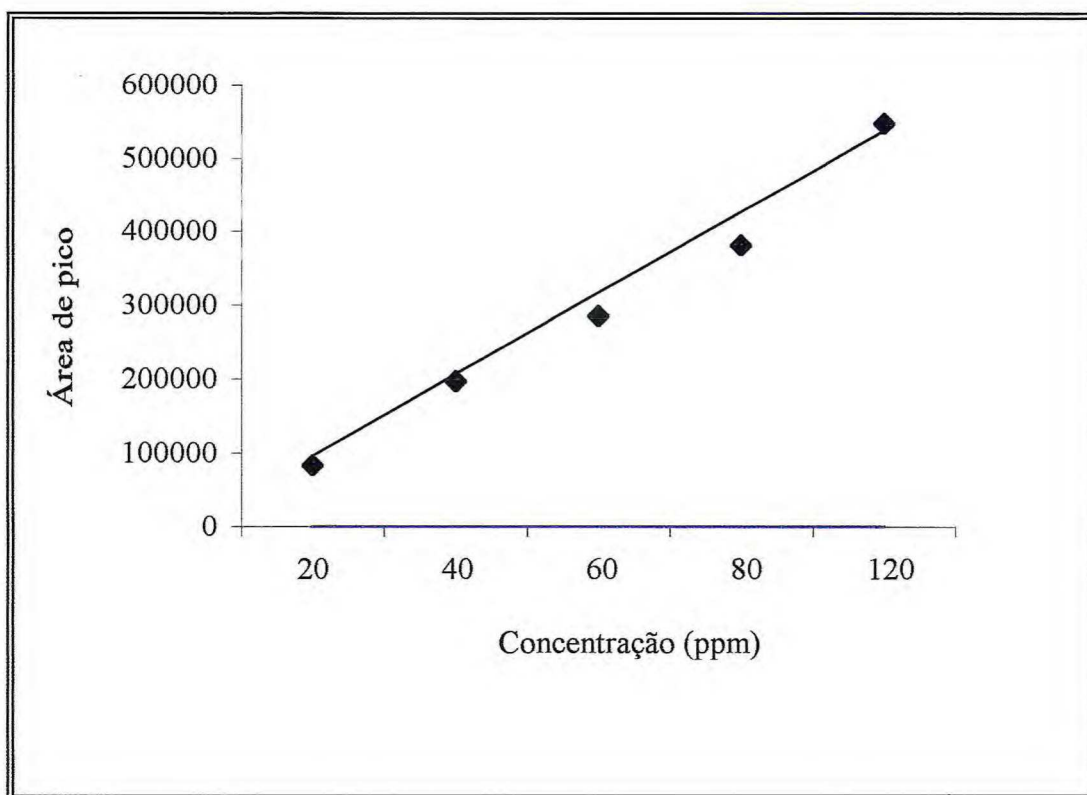


Figura 127 - Curva de calibração da mistura binária [PHPR - 2a (5) e PHPR - 2b (6)]

Figura 128 - Cromatograma da resina de *Protium heptaphyllum* (3000 ppm) em CLAE com fase reversa (C-18, Marca Labitron)

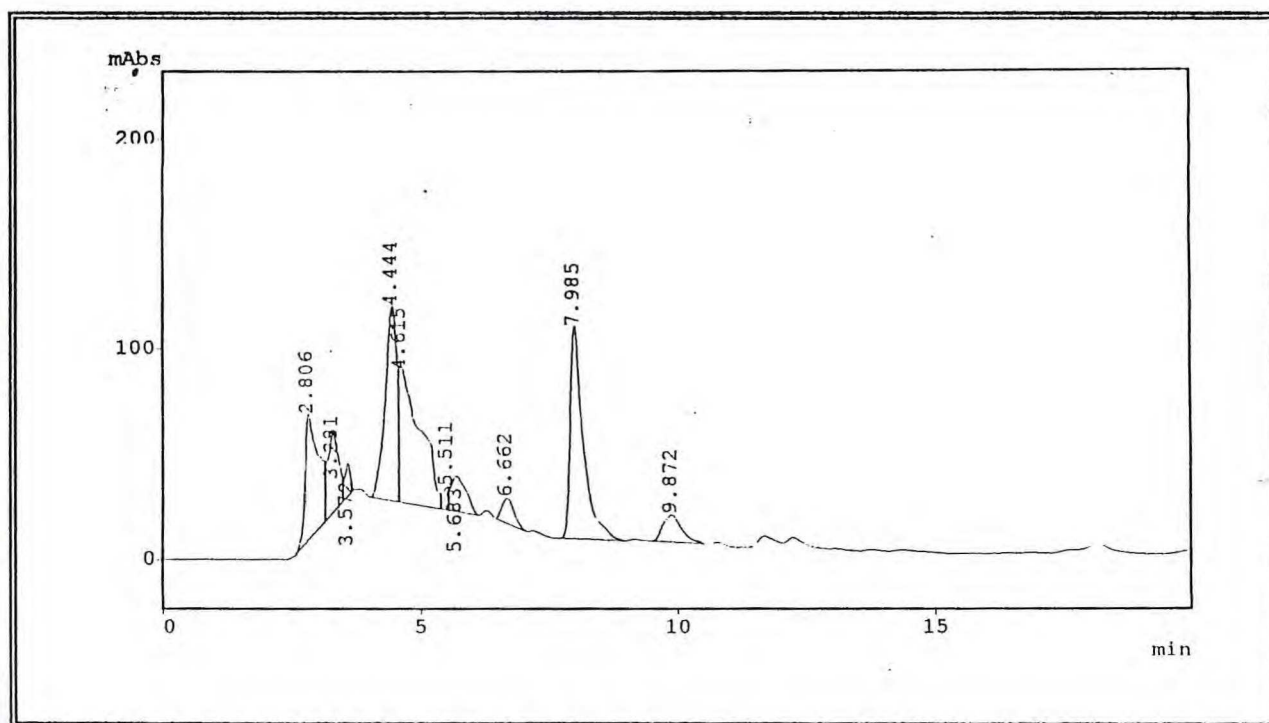
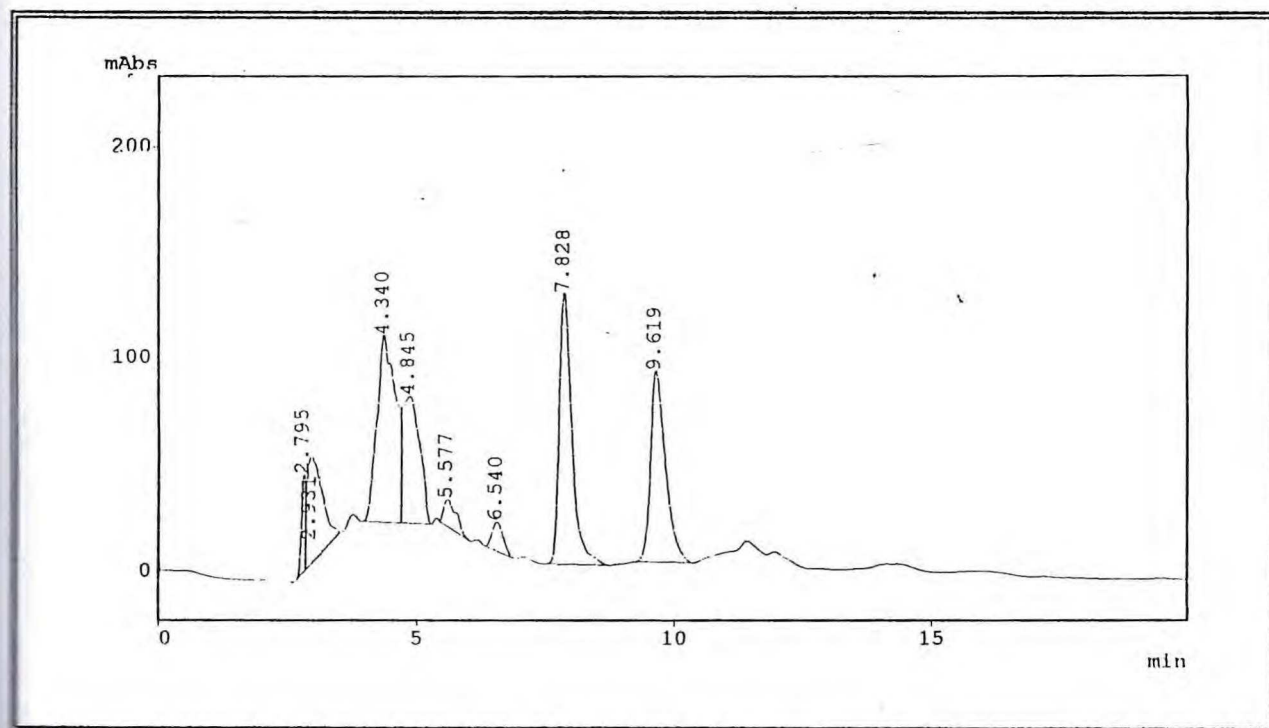


Figura 129 - Cromatograma da resina de *Protium heptaphyllum* (3000 ppm) após adição da mistura de α -amirina e β -amirina (1000 ppm) em CLAE com fase reversa (C-18, Marca Labitron)





CAPÍTULO

8

**PARTE
EXPERIMENTAL**

8. PARTE EXPERIMENTAL

8.1. Material botânico: Coleta e Identificação

A resina e as partes botânicas (caule, folhas e frutos de *Protium heptaphyllum* foram coletados nos meses de Setembro e Novembro respectivamente de 1998 na localidade da Chapada do Araripe-Crato-Ceará.

A resina e as partes botânicas (caule, folhas e frutos) de *Protium tenuifolium* foram coletados em Dezembro de 2000 na localidade Sítio Buriti-Ubajara-Ceará.

A identificação botânica foi realizada pelo professor Edson Paula Nunes do Departamento de Biologia da Universidade Federal do Ceará. Suas exsicatas encontram-se depositadas no herbário Prisco Bezerra, pertencente ao Departamento de Biologia, sob os números de registros 28509 e 30287 respectivamente.

8.2. Métodos cromatográficos

As cromatografias por absorção em colunas foram realizadas utilizando-se como fase fixa sílica gel 60S da Carlos Erba. Os parâmetros (comprimento e diâmetro) das colunas, variaram de acordo com as massas das amostras a serem cromatografadas.

As cromatografias em camada delgada (CCD) foram realizadas em cromatoplasas utilizando-se sílica gel 60G da Vetec.

As revelações das substâncias nas cromatoplasas analíticas foram feitas pela pulverização com solução de vanilina ($C_8H_8O_3$) e ácido perclórico ($HClO_4$) em etanol P.A, com posterior aquecimento em estufa a $100^\circ C$, por um período de 3 minutos aproximadamente.

Foram utilizados no desenvolvimento das colunas cromatograficas e na placas cromatográficas os seguintes eluentes (hexano, clorofórmio, acetato de etila e metanol), puros e em misturas binárias em ordem crescente de polaridade.

A análise quantitativa da mistura α e β - amirina por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) foi realizada num aparelho Shimadzu LC-10AD com detector UV-VIS

RID-10A e uma coluna analítica C₁₈ com dimensões (250 × 4,60mm d.i) da LABTRON.

A curva de calibração foi obtida usando-se o eluente CH₃CN : H₂O (6,5 : 3,5) com fluxo de 0,7mL/min, comprimento de onda $\lambda = 225\text{nm}$ e soluções padrões nas concentrações (20 – 120 ppm) , a temperatura ambiente.

8.3. Métodos físicos

8.3.1. Espectroscopia na região do infravermelho. (IV)

Os dados espectrais na região do infravermelho (IV) foram obtidos em um espectrômetro Perkin Elmer, modelo FT-IR Spectrum 1000 do Departamento de Química Orgânica e Inorgânica da Universidade Federal do Ceará. Utilizou-se pastilhas de Brometo de potássio (KBr) na análise das amostras sólidas e filme nas amostras líquidas.

8.3.2. Espectroscopia de ressonância magnética nuclear de prótio (¹H) e de carbono-13 (¹³C).

Os espectros de RMN (¹H e ¹³C) unidimensional e bidimensional foram obtidos em espectrômetros Bruker, modelo Avance DPX – 300 e modelo Avance DRX – 500, do Centro Nordestino de Aplicação e Uso da Ressonância Magnética Nuclear (CENAUREMN) da Universidade Federal do Ceará, operando na frequência do hidrogênio a 300 MHz e 500MHz, e na frequência do carbono a 75 MHz e 125 MHz respectivamente.

Os solventes utilizados para dissolução das amostras na obtenção dos espectros foram: clorofórmio deuterado (CDCl₃), dimetil-sulfoxido deuterado (DMSO-d₆), Piridina deuterada (C₅D₅N) e metanol deuterado (CD₃OD).

Os deslocamentos químicos (δ) são expressos em partes por milhão (ppm) e referenciados, no caso dos espectros de RMN de ¹H, pelos picos pertencentes as moléculas não deuteradas dos solventes deuterados utilizados: clorofórmio (δ 7,24), dimetil-sulfoxido (δ 2,49), piridina (δ 8,71 ; 7,55 e 7,19) e metanol (δ 4,78). Nos espectros de

carbono-13, os deslocamentos químicos (δ) foram referenciados pelos picos dos carbonos-13 dos solventes: clorofórmio (δ 77,0), dimetil-sulfóxido (δ 39,7), piridina (δ 123,5 ; 135,5 e 149,2 e metanol (δ 49,0).

As multiplicidades das bandas de absorção dos hidrogênios nos espectros de RMN ^1H foram indicadas segundo a convenção: s (singleto), sl (singleto largo), d (dubleto), dl (dubleto largo), dd (duplo dubleto), t (tripleto), q (quarteto) e m (multipeto).

Por meio da técnica DEPT com ângulos de nutação de 135° , CH e CH_3 com amplitudes em oposição aos CH_2 , determinou-se o padrão de hidrogenação dos carbonos em RMN ^{13}C , de acordo com a convenção: C (carbono não hidrogenado), CH (carbono metínico), CH_2 (carbono metilênico) e CH_3 (carbono metílico). Os carbonos não hidrogenados foram caracterizados pela subtração do espectro DEPT 135° do espectro BB.

8.3.3. Espectrometria de massa (EM)

Os espectros de massas dos óleos essenciais extraídos de *Protium heptaphyllum* e *Protium tenuifolium* foram obtidos no PADETEC da Universidade Federal do Ceará, em um Espectrômetro de massa Hewlett Parkard modelo HP-5971A , acoplado ao cromatografo gás-líquido modelo HP-5890A série II (CGL/EM), usando uma coluna capilar DB-5 – dimetilsiloxisano – com 30cm de comprimento, 0,25mm de diâmetro interno e 0,30mm de diâmetro externo, com gradiente de temperatura de $4^\circ\text{C}/\text{min}$ de 35 a 180°C e $20^\circ\text{C}/\text{min}$ de 180 a 280°C , e temperatura do injetor de 250°C .

O espectro de massa do composto p-ment-3-eno-1,2,8 triol (**25**) foi obtido na Universidade de Campinas – São Paulo, em um espectrômetro de massa , aparelho VG AUTOSPEC FYSONS INSTRUMENT.

8.3.4. Rotação ótica – específica

As rotações óticas específicas foram obtidas em um polarímetro da Perkim Elmer modelo 341 do Departamento de Química Orgânica e Inorgânica da Universidade Federal do

Ceará. As medidas foram realizadas em comprimento de onda de 589 nm, a 20°C e na concentração de 2mg/mL.

8.3.5. Ponto de fusão (p.f)

Os pontos de fusão foram determinados em um equipamento Mettler com placa aquecedora, modelo FP52 e unidade de controle FP5, do Departamento de Química Orgânica e Inorgânica da Universidade Federal do Ceará. As determinações foram realizadas a velocidade de aquecimento de 2°C/min.

8.4. Constituintes voláteis de *Protium heptaphyllum* e *Protium Tenuifolium*

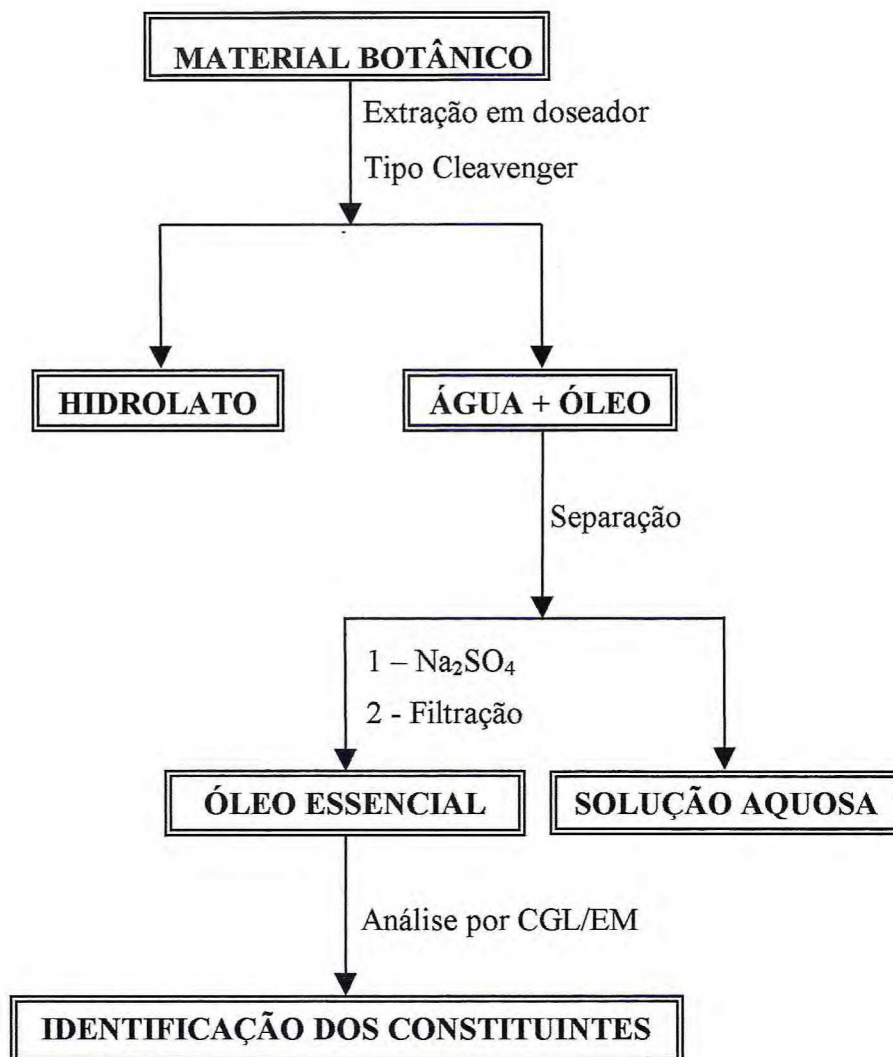
O estudo dos constituintes voláteis de *Protium heptaphyllum* foi realizado com os óleos essenciais obtidos da resina, frutos verdes, frutos maduros, folhas e casca, enquanto que o estudo dos constituintes voláteis de *Protium tenuifolium* foi realizado com o óleo essencial dos frutos.

8.4.1. Obtenção dos óleos essenciais

50,0g de resina de *Protium heptaphyllum* foi acondicionada em um balão com 1 litro de capacidade, juntamente com 600mL de água destilada e extraído pelo processo de hidrodestilação. A mistura (água + óleo) foi coletada em um aparelho tipo Cleavenger modificado por Gottili2b⁵³. Após a extração com vapor de água, por 2 horas aproximadamente, a mistura contida no doseador (óleo + água) foi separada usando-se um funil de separação. A fase orgânica foi devidamente seca com sulfato de sódio anidro e filtrada, obtendo-se 5,5 g de óleo (11 %). O óleo obtido foi analisado por cromatografia gás-liquído, acoplado a espectrometria de massa (CGL/EM) (Fluxograma 1, Pág. 152). As folhas (400,0g), frutos verdes (350,0g), frutos maduros (500,0g) e as cascas (550,0g) foram separados, e acondicionados individualmente em balões de 6 litros de capacidade juntamente com 2,5 litros de água destilada e extraídos por hidrodestilação, obtendo-se 2,1 g (0,27 %), 10,5g (3%),

7,5 g (1,50 %) e 0,6 g (0,11 %) respectivamente. Os óleos essenciais apresentaram cor amarelo-claro, exceto o óleo essencial das cascas de *Protium heptaphyllum* que apresentou uma cor verde-claro.

Os frutos (800,0g) de *Protium tenuifolium* foram acondicionados em balão de 6 litros de capacidade, contendo 2,5 litros de água destilada e extraído pelo processo de hidrodestilação, produzindo 22,0 g (2,76 %)..



Fluxograma 1 - Método de extração do óleo essencial do material botânico de *Protium heptaphyllum* e *Protium tenuifolium*

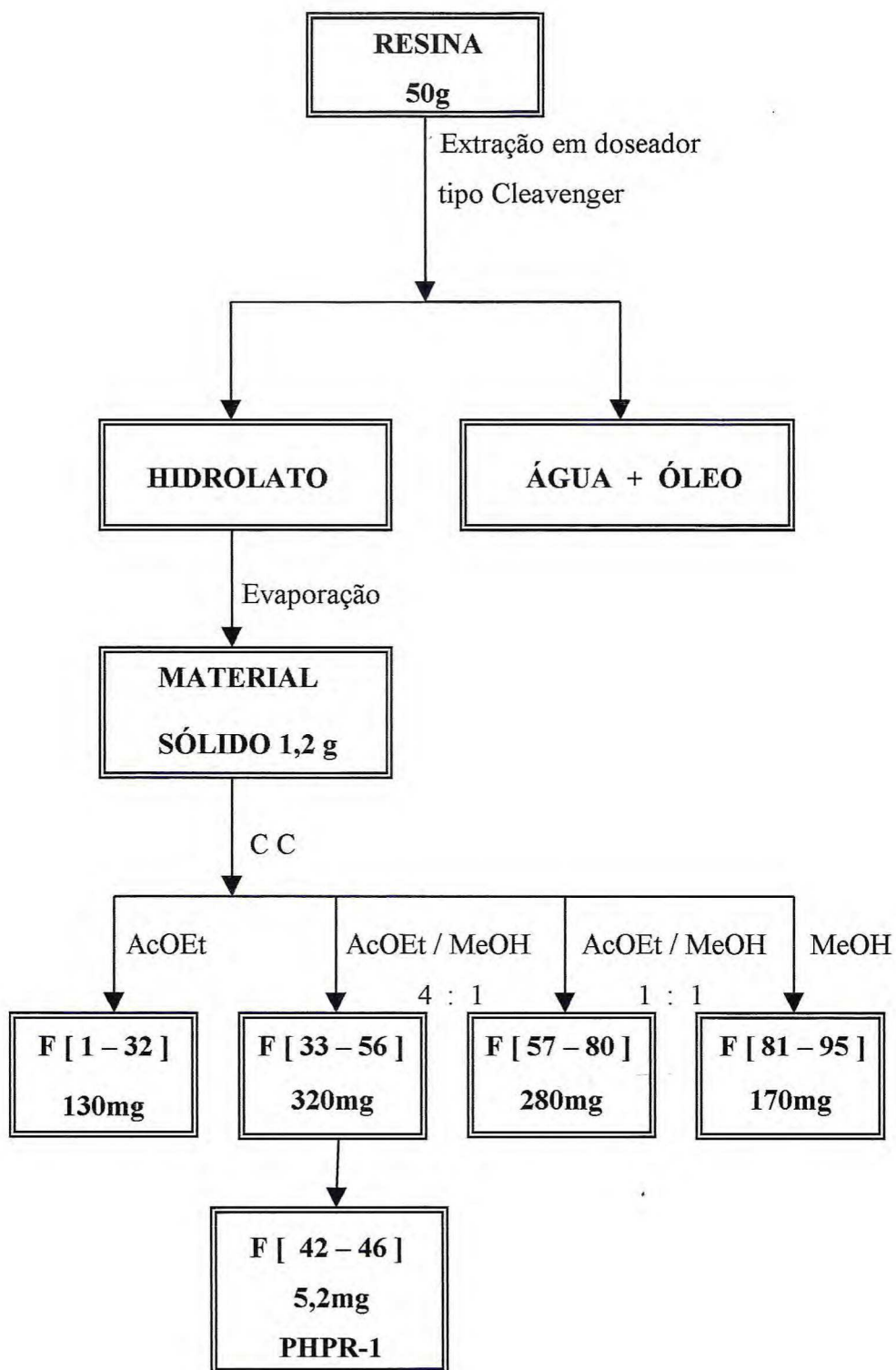
8.5. Isolamento dos constituintes químicos fixos de *Protium heptaphyllum*

8.5.1. Obtenção do hidrolato da resina de *Protium heptaphyllum* e obtenção do composto PHPR-1

A hidrodestilação de 50g de resina forneceu um hidrolato (600 mL) que após evaporação em banho maria obteve-se 1,2g de um pó branco, o qual foi adsorvido em sílica gel e acondicionado em uma coluna contendo sílica gel. Após eluição com AcOEt puro e misturas binárias de AcOEt / MeOH conforme (Tab. 26, Pág. 153) as frações (42 – 46) eluídas com AcOEt / MeOH (4 : 1) foram reunidas após análise por cromatografia em camada delgada (CCD) de sílica gel, fornecendo 5,2 mg de um sólido branco, o qual foi codificado de PHPR-1 Fluxograma. 2. Pág. 154).

Tabela 26 - Frações eluídas na CC do resíduo do hidrolato.

Eluente	Proporção	Frações
AcOEt	1	1 - 32
AcOEt / MeOH	4 : 1	33 - 56
AcOEt / MeOH	1 : 1	57 - 80
MeOH	1	81 - 95



Fluxograma 2 - Obtenção do composto PHPR-1 (25)

8.5.2. Tratamento cromatográfico da resina de *Protium heptaphyllum*;

20g de resina fresca foram adsorvidas em sílica gel e acondicionadas em uma coluna contendo sílica gel. A eluição foi feita com hexano, CHCl_3 , AcOEt e MeOH puros, resultando nos seguintes eluatos conforme Tab. 27, Pág. 155.

Tabela 27 Coluna filtrante da resina fresca

Eluente	Eluato	Peso (g)
Hexano	RFH	1,1
CHCl_3	RFC	5,2
AcOEt	RFA	2,7
MeOH	RFM	8,5
TOTAL		17,5

8.5.3. Tratamento cromatográfico do eluato RFC e obtenção da mistura binária [P H P R - 2 a e P H P R - 2 b] e P H P R - 3

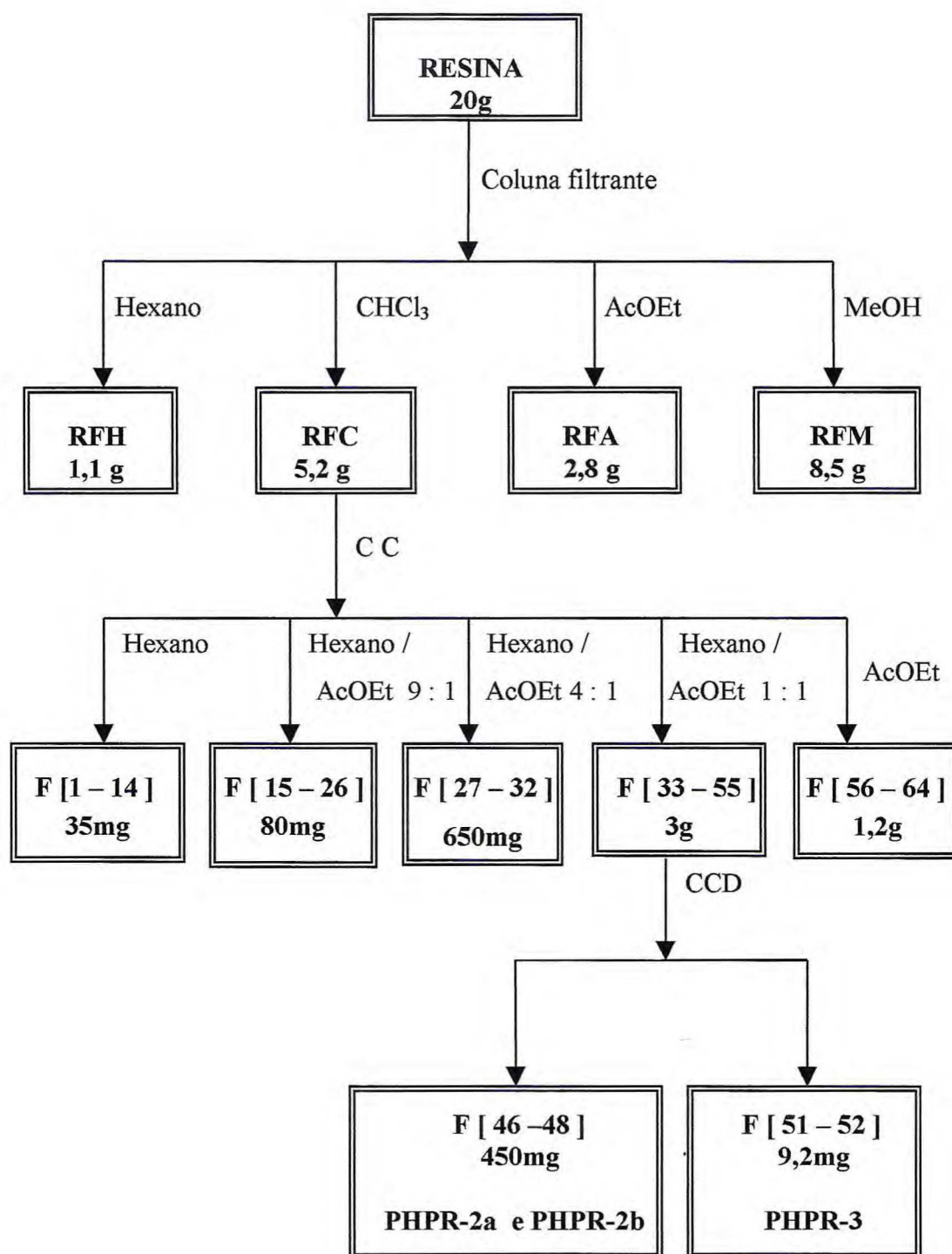
O eluato RFC (5,2 g) apresentou-se como um sólido de cor amarelo-claro. Este sólido foi adsorvido em sílica gel e empacotado em coluna contendo sílica gel, após eluição com hexano puro e mistura binária de hexano / AcOEt conforme Tab. 28, Pág. 156, as frações (46 – 48) foram reunidas após análise por cromatografia em camada delgada de sílica gel, fornecendo 450 mg de um sólido branco (Fluxograma 3, Pág. 157).

Tabela 28 - Frações eluídas na CC do eluato RFC

Eluente	Proporção	Frações
Hexano	1	1 - 14
Hexano/ AcOEt	9 : 1	15 - 26
Hexano/ AcOEt	4 : 1	27 - 32
Hexano/ AcOEt	1 : 1	33 - 55
AcOEt	1	56 - 64

As frações (51 – 52) obtidas do fracionamento do eluato RFC (Tab. 28, Pág. 156) foram reunidas após análise por cromatografia em camada delgada de sílica gel, fornecendo (9,2mg) de um sólido branco, o qual foi denominado de PHPR-3.

Os eluatos RFH, RFA e RFM resultantes da coluna filtrante da resina, foram individualmente submetidos a sucessivas cromatografias de coluna com solventes puros e misturas binárias AcOEt / MeOH em ordem crescente de polaridade, onde nenhum resultado, nestas misturas complexas de difícil separação, foi obtido.



Fluxograma 3 - Obtenção da mistura binária [PHPR-2a (5) e PHPR-2b (6)] e PHPR-3 (7)

8.5.4. Obtenção do extrato etanólico do lenho de *Protium heptaphyllum*

O caule de *Protium heptaphyllum* foi separado em lenho e casca. O lenho (2,5kg), foi seco a temperatura ambiente (30°C), triturado e submetido a extração a frio em etanol. A solução obtida foi destilada sob pressão reduzida a temperatura média de 60°C, resultando em um material sólido de cor vermelha (24g) o qual foi denominado de EEL (Fluxograma 4, Pág. 159).

8.5.5. Tratamento cromatografico de EEL e obtenção do composto PHPL-1

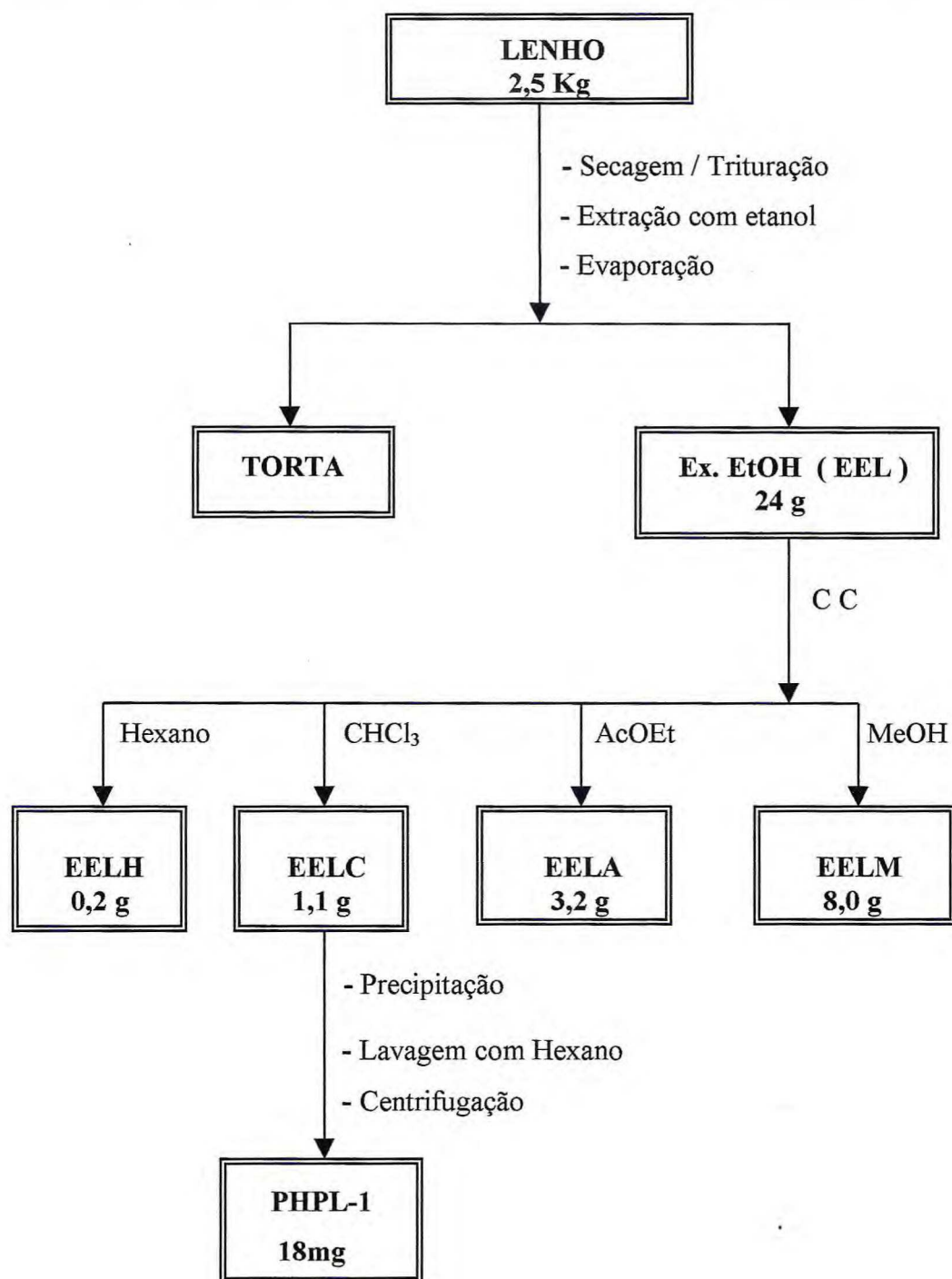
O extrato etanólico do lenho (EEL) de *Protium heptaphyllum* (24g) foi adsorvido em silica gel e acondicionado em uma coluna contendo silica gel. A eluição foi feita com hexano, CHCl₃, AcOEt e MeOH puros, conforme Tab. 29, Pág. 158.

Tabela 29 Coluna filtrante de EEL

Eluente	Eluato	Peso(g)
Hexano	EELH	0,2
CHCl ₃	EELC	1,1
AcOEt	EELA	3,2
MeOH	EELM	8,0
TOTAL		12,5

No eluato (EELC) ocorreu a precipitação de um sólido, o qual foi lavado com hexano e centrifugado, sendo esta operação repetida três vezes, resultando em um sólido de cor verde claro (18mg) codificado PHPL-1

Os eluatos EELH, EELA e EELM, foram individualmente cromatografados em coluna de sílica gel , em solventes puros e misturas binárias de AcOEt / MeOH em grau crescente de polaridade. Nenhum resultado quanto ao isolamento de outros constituintes foi obtido.



Fluxograma 4 - Obtenção do extrato etanólico do lenho e obtenção do composto PHPL-1 (17)

8.5.6. Obtenção do hidrolato do fruto maduro de *Protium heptaphyllum*

500g de fruto maduro foram triturados e submetidos ao processo de hidrodestilação, fornecendo um hidrolato o qual foi submetido a partição com AcOEt. A fração AcOEt foi destilada a pressão reduzida à temperatura média de 60°C aproximadamente, fornecendo um material sólido amarelo (1,5g), que foi posteriormente cromatografado. A fração aquosa evaporada em banho maria forneceu (8 g) de um material sólido de cor amarela (Fluxograma 5, Pág. 162).

8.5.7. Tratamento cromatografico da fração AcOEt e obtenção do composto PHPFM-1

A fração AcOEt resultante da partição do hidrolato do fruto maduro (1,5g) foi adsorvido em sílica gel e acondicionado em uma coluna contendo sílica gel. Após eluição com hexano, CHCl_3 , AcOEt e AcOEt / MeOH (1:1) conforme Tab. 30, Pág. 160 as frações (81 – 100) foram reunidas, após análise em CCD, para posterior fracionamento.

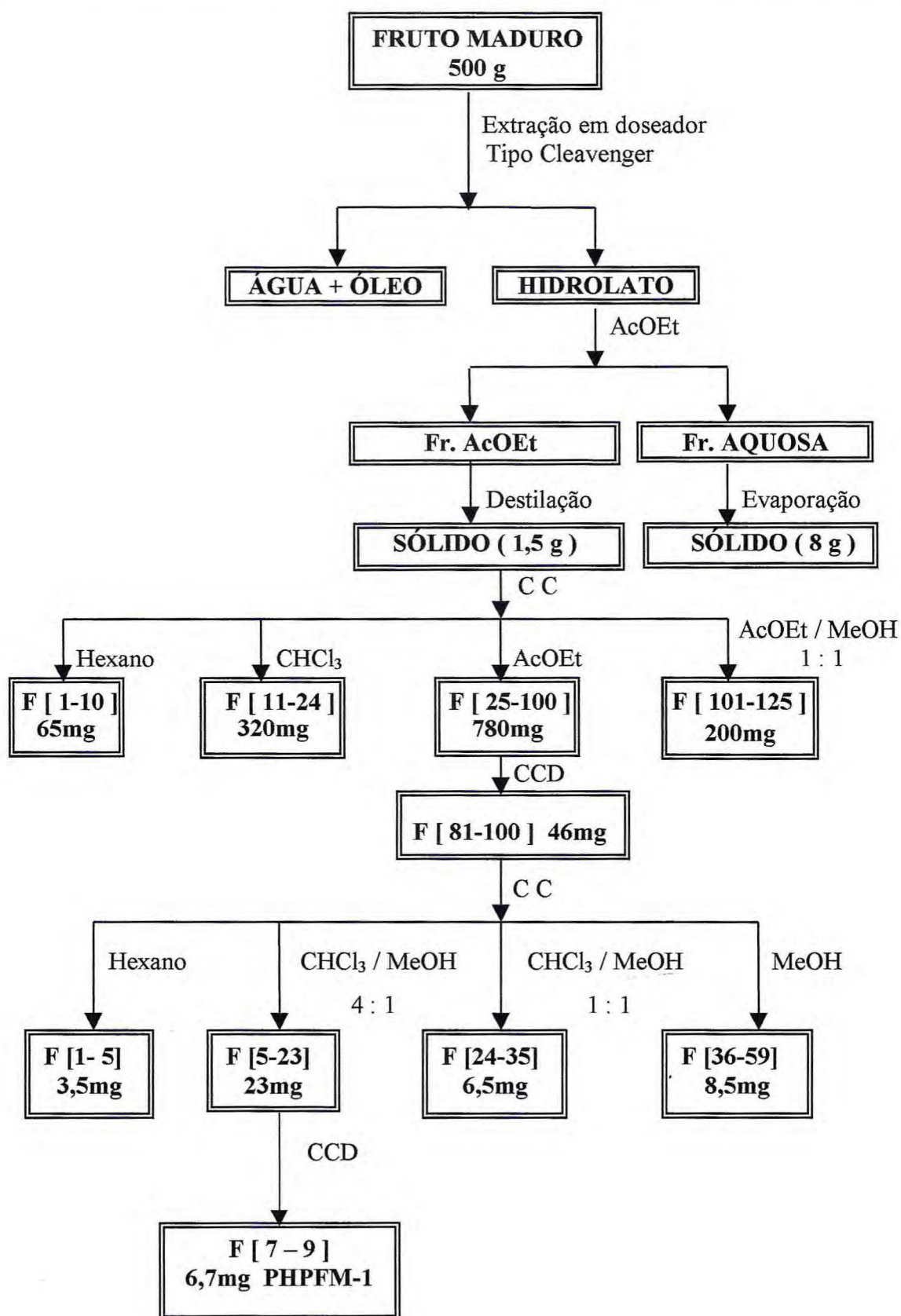
Tabela 30 Frações eluídas na CC da fração AcOEt do hidrolato do fruto maduro

Eluente	Proporções	Frações
Hexano	1	1 - 10
CHCl_3	1	11 - 24
AcOEt	1	25 - 100
AcOEt / MeOH	1 : 1	101 - 125

As frações (81 – 100) após reunidas e secas à temperatura ambiente (30°C) para resultou em um material sólido amarelo (46mg) o qual foi adsorvido em sílica gel e acondicionado em uma coluna contendo sílica gel. Após eluição com hexano puro e mistura binária de CHCl_3 / MeOH conforme Tab. 31, Pág. 161 as frações (7 – 9) foram reunidas após análise em CCD, fornecendo (6,7mg) de um sólido amarelo, o qual foi codificado de PHPFM-1.

Tabela 31 - Frações eluídas na CC das frações (81 – 100)

Eluente	Proporções	Frações
Hexano	1	1 – 5
CHCl ₃ / MeOH	4 : 1	6 – 23
CHCl ₃ / MeOH	1 : 1	24 – 35
MeOH	1	36 – 59



Fluxograma 5 - Obtenção do composto PHPFM-1 (26)

8.5.8. Obtenção do hidrolato do fruto verde de *Protium heptaphyllum*

350g de fruto verde foram triturados e submetidos ao processo de hidrodestilação, fornecendo um hidrolato (2,5 L) o qual foi submetido a partição com AcOEt. A fração AcOEt foi destilada a pressão reduzida, fornecendo um material sólido amarelo (0,08g), que foi posteriormente cromatografado. A fração aquosa evaporada em banho maria forneceu (3,0g) de um sólido de cor amarela (Fluxograma 6, Pág. 164).

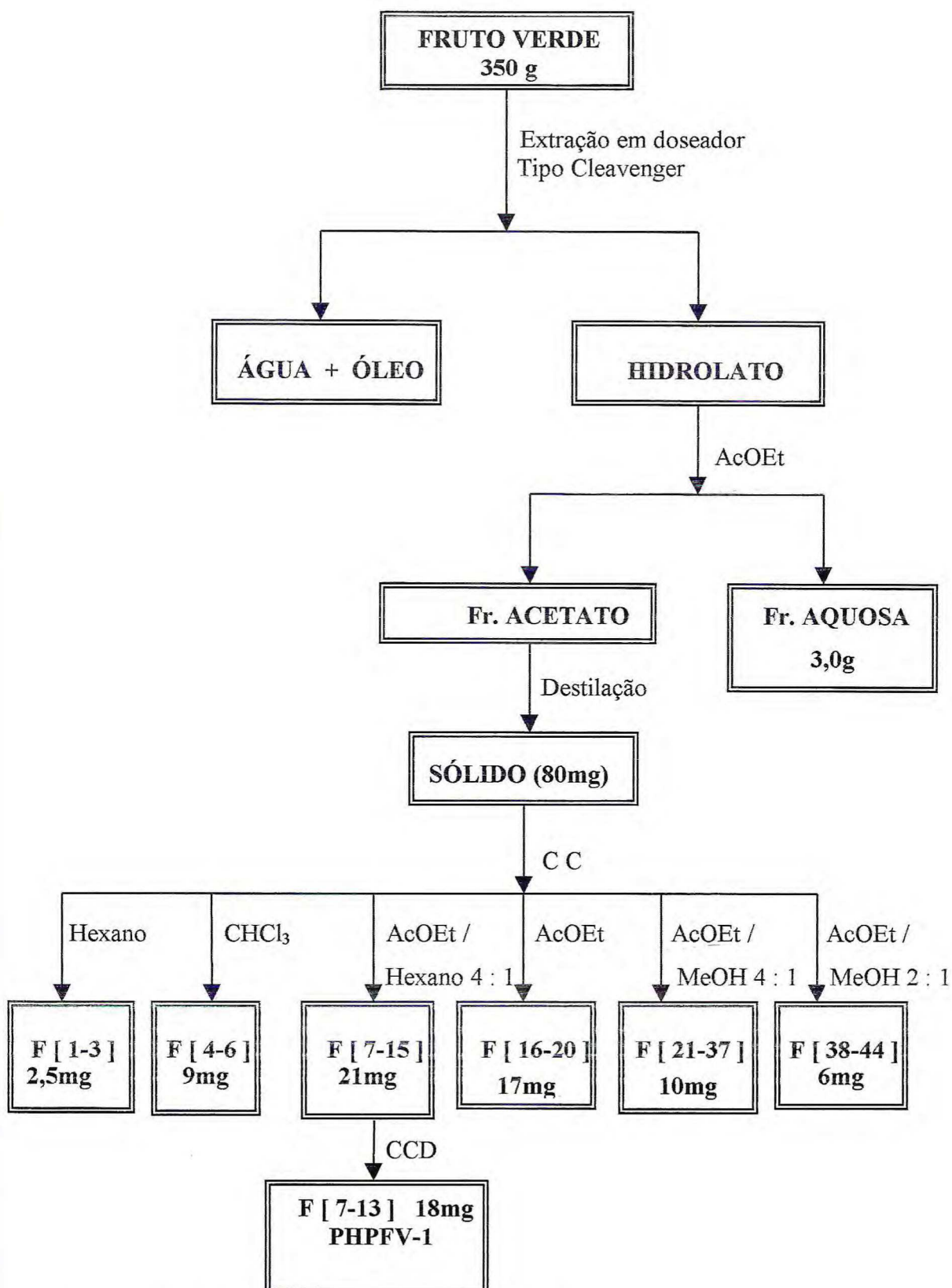
8.5.9. Tratamento cromatografico da fração acetato e obtenção de PHPFV-1

A fração AcOEt resultante da partição do hidrolato do fruto verde (80mg) foi adsorvido em sílica gel e acondicionado em uma coluna contendo sílica gel.

Após eluição com hexano, CHCl_3 P.A e mistura binária AcOEt / hexano, AcOEt P.A e mistura binária AcOEt / MeOH conforme Tab. 32, Pág. 163 as frações (7 – 13) foram reunidas, após análise em CCD, deixando-se a temperatura ambiente (30°C) para evaporação do solvente, obtendo-se(18mg) de um sólido amarelo codificado de PHPFV-1

Tabela 32 - Frações eluídas na CC da fração AcOEt do hidrolato do fruto verde.

Eluente	Proporções	Frações
Hexano	1	1 - 3
CHCl_3	1	4 - 6
AcOEt / Hexano	4 : 1	7 – 15
AcOEt	1	16 – 20
AcOEt / MeOH	4 : 1	21 – 37
AcOEt / MeI	2 : 1	38 – 44



Fluxograma 6 - Obtenção do composto PHPFV-1 (27)

8.5.10. Obtenção do extrato etanólico das folhas de *Protium heptaphyllum*

As folhas de *Protium heptaphyllum* foram separadas, secas à temperatura ambiente (30°C), trituradas (1,2 Kg) e submetidas a extração a frio em etanol. A solução obtida foi destilada sob pressão reduzida a temperatura média de 60°C, resultando em um material sólido de cor verde escuro (64 g) codificado de EEF (Fluxograma 7, Pág. 167).

8.5.11. Tratamento cromatografico de EEF e obtenção do composto PHPF-1

20g do extrato etanólico das folhas (EEF) foi adsorvido em sílica gel e acondicionado em coluna contendo sílica gel. A eluição foi feita com hexano, CHCl₃, AcOEt e MeOH puros, resultando nos seguintes eluatos conforme Tab. 33, Pág 165.

Tabela 33 - Coluna filtrante do EEF

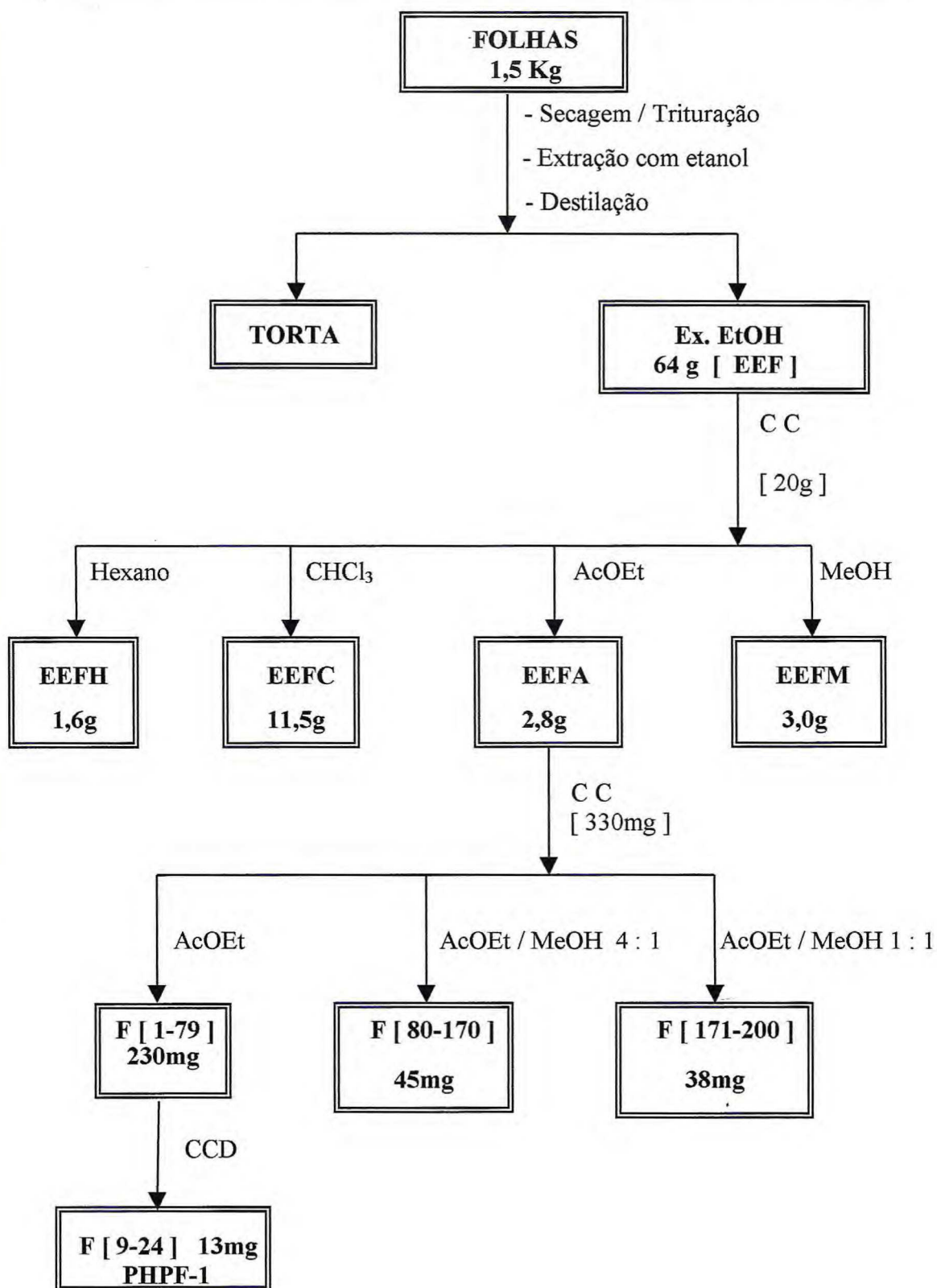
Eluente	Eluato	Peso (g)
Hexano	EEFH	1,6
CHCl ₃	EEFC	11,5
AcOEt	EEFA	2,8
MeOH	EEFM	3,0
	Total	18,9

O eluato EEFA apresentou-se como um sólido de cor amarelo-claro. 330mg deste eluato foram adsorvidos em sílica gel e acondicionados em coluna contendo sílica gel, após eluição com AcOEt puro e mistura binária AcOEt / MeOH conforme Tab. 34, Pág. 166 as frações (9 – 24) foram reunidas de acordo com a análise em cromatografia de camada delgada (CCD), evaporada à temperatura ambiente (30°C) fornecendo 13mg de um sólido amarelo codificado de PHPF1.

Tabela 34 - Frações eluídas na CC do eluato EEFA

Eluente	Proporção	Frações
AcOEt	1	1 - 79
AcOEt / MeOH	4 : 1	80 - 170
AcOEt / MeOH	1 : 1	171 - 200

Os eluatos EEFH, EEFC e EEFM resultantes da coluna filtrante do extrato etanólico das folhas foram cromatografados com solventes puros e misturas binárias em ordem crescente de polaridade, onde nenhum resultado com relação ao isolamento de outros constituintes presentes foi obtido.



Fluxograma 7 - Obtenção do extrato etanólico das folhas e obtenção do composto PHPF-1 [28]

8.6. Isolamento dos constituintes químicos fixos de *Protium tenuifolium*

8.6.1. Obtenção do extrato etanólico das folhas de *Protium tenuifolium*

As folhas de *Protium tenuifolium* foram separadas, secas à temperatura ambiente (30°C), trituradas (1,5 Kg) e submetidas a extração a frio em etanol. A solução obtida foi destilada sob pressão reduzida a temperatura média de 60°C, resultando em um material sólido de cor verde escuro (80g) denominado de EEFPT (Fluxograma 8, Pág. 173).

8.6.2. Tratamento cromatográfico de EEFPT

7g do extrato etanólico das folhas (EEFPT) foi adsorvido em sílica gel e acondicionado em coluna contendo sílica gel. A eluição foi feita com hexano, CHCl₃, AcOEt MeOH puros, conforme Tab. 35, Pág. 168.

Tabela 35 - Coluna filtrante do EEFPT

Eluente	Eluato	Peso (g)
Hexano	EEFHPT	0,2
CHCl ₃	EEFCPT	2,5
AcOEt	EEFAPT	0,7
MeOH	EEFMPT	2,9
	TOTAL	6,3

8.6.3. Tratamento cromatográfico de EEFMPT e obtenção do composto PTF-1

O eluato EEFMPT apresentou-se como, um sólido de cor amarelo-claro. 3,0 g deste eluato foram adsorvidos em sílica gel e acondicionados em coluna contendo sílica gel, após eluição com AcOEt, AcOEt / MeOH (9 : 1), conforme Tab. 36, Pág. 169.

Tabela 36 - Frações eluídas na CC do eluato EEFMPT

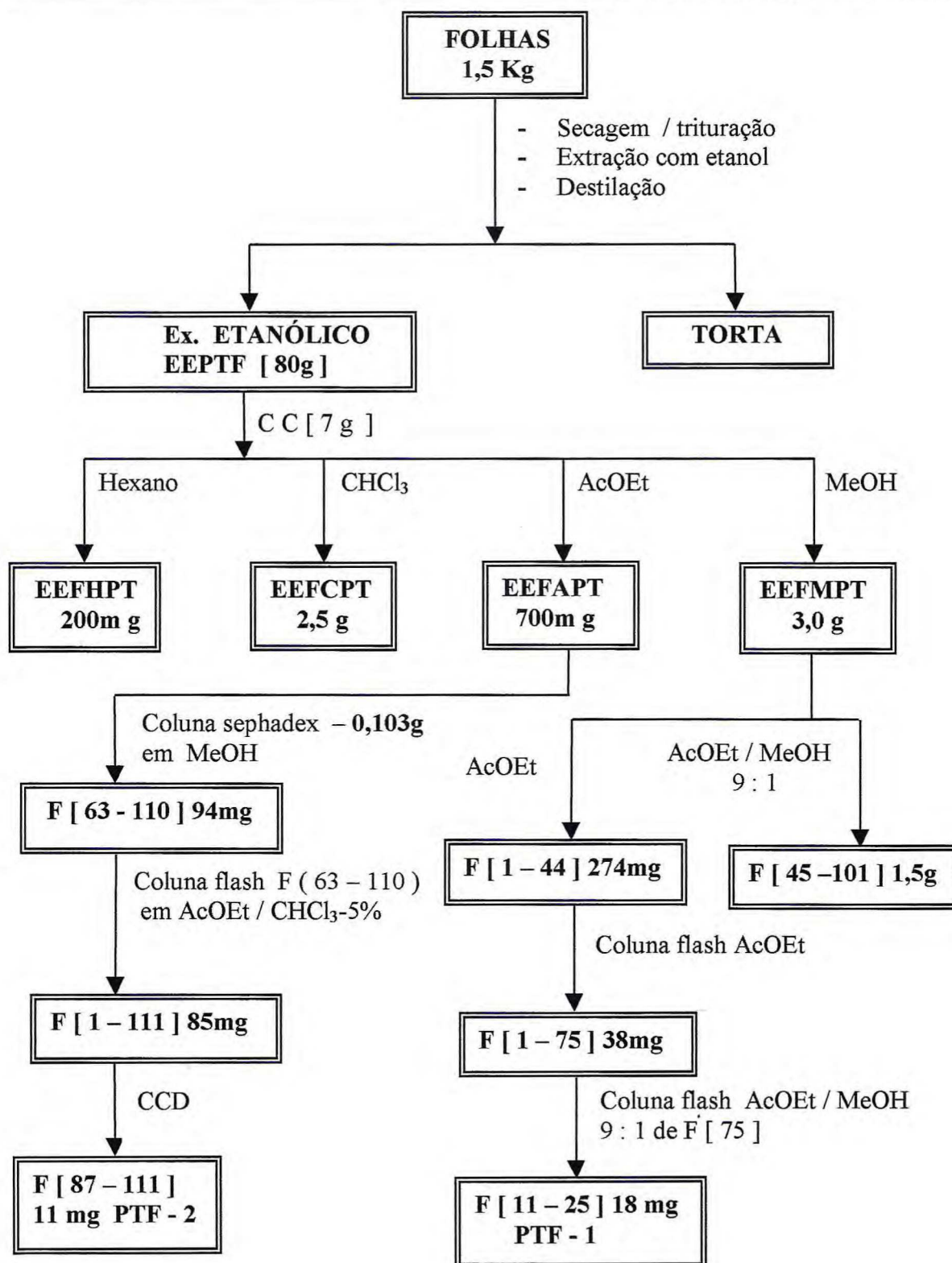
Eluente	Proporções	Frações
AcOEt	1	1 - 44
AcOEt / MeOH	9 : 1	45 - 101

As frações (1 – 44) foram reunidas de acordo com a análise em cromatografia de camada delgada (CCD), evaporada à temperatura ambiente (30°C) fornecendo 274 mg de um material sólido de cor amarela.

As frações (1 – 44) reunidas, foram submetidas a cromatografia em coluna flash eluídas com AcOEt sendo então coletadas frações de 1 – 75. De acordo com a análise em CCD a fração 75 foi recromatografada em coluna flash eluída com AcOEt / MeOH (9 : 1), sendo reunidas as frações 11 – 25 após análise em CCD resultando em 18 mg de um sólido codificado de PTF-1.

8.6.4. Tratamento cromatográfico de EEFAPT e obtenção do composto PTF-2

O eluato EEFAPT apresentou-se como um sólido amarelo (700 mg). 103,2 mg deste sólido foi submetido a cromatografia em coluna sephadex-LH20 e eluído em MeOH, as frações (63 – 110) foram reunidas após cromatografia em camada delgada (CCD) obtendo-se 94 mg de um sólido que foi recromatografado em coluna flash eluído em AcOEt / CHCl₃-5% . As frações (87 –111) foram reunidas após cromatografia em camada delgada (CCD) resultando em 11 mg de um sólido amarelo codificado de PTF-2.



Fluxograma 8 - Obtenção do extrato etanólico das folhas de *Protium tenuifolium* e obtenção dos compostos PTF - 1 (29) e PTF - 2 (30)

8.6.5. Obtenção do extrato etanólico das cascas de *Protium tenuifolium*

As cascas de *Protium tenuifolium* foram separadas, secas à temperatura ambiente (30°C), trituradas (1,2 Kg) e submetida a extração a frio em etanol. A solução obtida foi destilada sob pressão reduzida a temperatura média de 60° resultando em um sólido vermelho (15 g) denominado de EECPT (Fluxograma 9, Pág. 175).

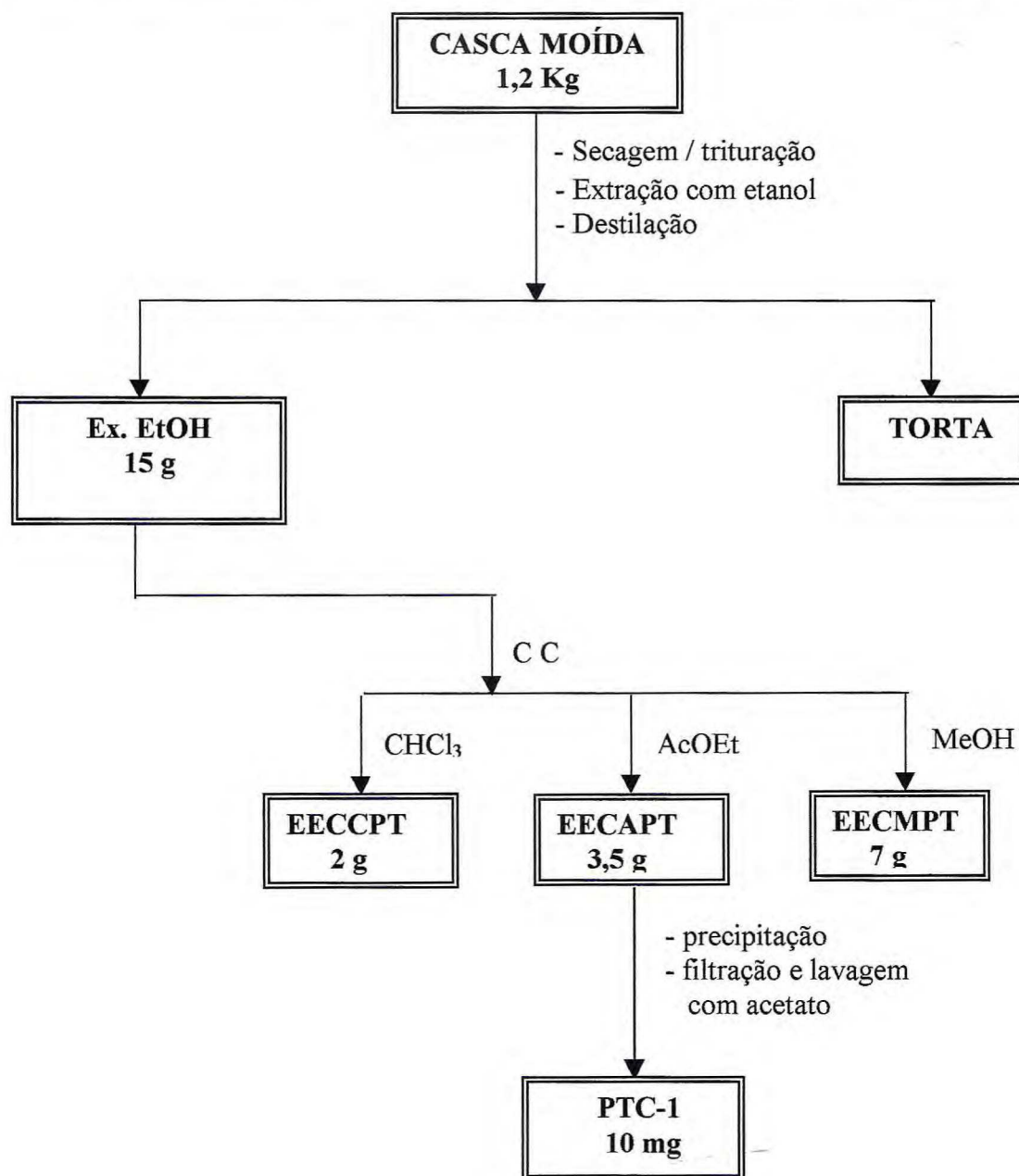
8.6.6. Tratamento cromatografico de EECPT e obtenção do composto PTC-1

O extrato etanólico (15 g) foi adsorvido em silica gel sendo a eluição realizada com CHCl_3 , AcOEt e MeOH puros, conforme Tab. 37, Pág. 171

Tabela 37 - Coluna filtrante do EECPT

Eluente	Eluato	Peso (g)
CHCl_3	EECCPT	2,0
AcOEt	EECAPT	3,5
MeOH	EECMPT	7,0
	Total	12,5

O composto codificado de PTC-1 resultou da precipitação da fração AcOEt (11mg) o qual foi filtrado e lavado em AcOEt e apresentou-se como um sólido branco.



Fluxograma 9 - Obtenção do extrato etanólico da casca e obtenção do composto PTC-1 (31)

8.7. Obtenção de derivados

A mistura binária de α,β -amirina [PHPR-2a e PHPR-2b], isolada nas frações (46 – 48) do eluato RFC (Tab. 28, Pág. 156) da coluna filtrante foi submetida à reações de: formilação, oxidação de Jones, acetilação e esterificações de acordo com os seguintes procedimentos:

8.7.1. Obtenção do formiato de α,β -amirina [FPHPR-2a (32) e FPHPR-2b (33)]

A um balão de 50mL conectado a um condensador de refluxo contendo tubo secante com CaCl_2 , adicionou-se 100mg (0,23 mmol) da mistura binária de α,β -amirina, 0,2mL (0,47mmol) de ácido fórmico (89,9 %) e 2 gotas de ácido perclórico (HClO_4). O sistema foi mantido em um banho de água à 55°C, com agitação magnética por 2 horas. O balão foi removido do banho e resfriado a temperatura ambiente (30°C), em seguida adicionou-se 2mL de anidrido acético e 30 mL de água com o sistema em agitação. Após a adição da água formou-se um precipitado, o qual foi filtrado à vacuo e lavado quatro vezes com pequenas porções de água, sendo então, seco sob vácuo em dessecador contendo sílica, obtendo-se 104,6 mg (98 %).

8.7.2. Obtenção de α,β -amirinona [AMPHPR-2a (34) e AMPHPR-2b (35)]

A um balão de 50mL conectado a um funil de adição adicionou-se 220mg (0,52 mmol) da mistura binária de α,β -amirina, 44mL de acetona, a esta solução adicionou-se 2,3mL do reagente de Jones (dicromato de potássio + ácido sulfurico concentrado) gota à gota sob agitação magnética por 5 minutos a temperatura ambiente (30°) em atmosfera de nitrogênio. Após a constatação da ocorrência da reação por meio de CCD, o produto formado foi extraído com três porções de 25mL de éter etílico em um funil de separação. A fase éterea foi lavada com água, separada em um funil de separação e tratada com sulfato de sódio anidro, rotoevaporada sob pressão reduzida, obtendo-se 119,4 mg (60 %).

8.7.3. Obtenção de acetato de α,β -amirina [APHPR-2a (36) e APHPR-2b (37)]

Em um balão de 50mL conectado a um condensador de refluxo contendo tubo secante com CaCl_2 adicionou-se 100mg (0,23 mmol) da mistura binária de α,β -amirina, 1mL de piridina e 2mL (2,1mmol) de anidrido acético. O sistema foi deixado a temperatura ambiente (30°) sob agitação magnética por 24 horas. Após a constatação da ocorrência da reação por meio de CCD, adicionou-se 20mL de uma solução aquosa saturada de sulfato de cobre e 30 mL de éter etílico, em um funil de separação fez-se a extração da fase orgânica, a qual foi tratada com sulfato de sódio anidro e evaporada em rotovapor sob pressão reduzida, obtendo-se 98,6 mg (86 %).

8.7.4. Obtenção de benzoato de $\alpha\beta$ -amirina [BPHPR-2a (38) e BPHPR-2b (39)]

A um balão de três bocas conectado a um condensador de refluxo contendo tubo secante com CaCl_2 , adicionou-se 100mg (0,23 mmol) da mistura binária de α,β -amirina, 0,15mL (1,3mmol) de cloreto de benzoíla e 10mL de benzeno. O sistema foi mantido a 55°C em banho de água por 7 horas sob agitação magnética. A análise em CCD mostrou presença de impurezas. A solução foi rotoevaporada, visando a purificação da substância, o produto bruto foi submetido a CC usando-se Hexano / CHCl_3 como solvente, obtendo-se 30 frações.

De acordo com a CCD as frações 11 – 15 foram reunidas, fornecendo 35mg (48 %).

8.7.5. Obtenção de cinamoil de α,β -amirina [CPHPR-2a (40)] e CPHPR-2b (41)]

8.7.5.1. Preparação do cloreto de cinamoila.

A um balão monotubulado, conectado a um condensador de refluxo contendo um tubo secante com CaCl_2 , adicionou-se 2,67g de ácido cinâmico (0,02mol), 4,5mL de cloreto de tionila, 10mL de benzeno absoluto e uma quantidade catalítica de cloreto de zinco. A mistura foi refluxada por 3 horas e o excesso de SOCl_2 foi removido rotoevaporando com duas porções de 10 mL de benzeno absoluto. O produto foi destilado, obtendo-se 2,80 g (93, 3 %).

8.7.5.2. Obtenção de CPHPR-2a (40) e CPHPR-2b (41)

A um balão de três bocas, conectado a um condensador de refluxo e tubo secante com CaCl_2 , adicionou-se 100mg (0,23mmol) da mistura binária de α,β -amirina, 195mg (1,2mmol) de cloreto de cinamoila e 10mL de diclorometano. O sistema foi mantido em um banho de água a 55°C por

7 hora sob agitação magnética. A análise por CCD mostrou que a solução continhas outras substâncias além da desejada. A solução foi rotoevaporada e cromatografada em CC usando-se Hexano / CHCl_3 como solvente, obtendo-se 32 frações. De acordo com a CCD as frações 5 – 25 foram reunidas, fornecendo 53 mg (41 %).

8.8. Avaliação da atividade farmacológica

8.8.1. Avaliação da atividade antimicrobiana

A atividade antimicrobiana foi realizada no laboratório de microbiologia do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem da Universidade Federal do Ceará. Utilizou-se a técnica de difusão em meio sólido de acordo com a Farmacopéia Brasileira⁶³.

Suspensões microbianas constituídas de cinco espécies de microorganismos: as bactérias *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538p), *Escherichia coli* (ATCC 1053C), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 15442) e *Salmonella cholerae-suis* (ATCC 10708) e a levedura *Candida albicans* (ATCC 10231), obtidas a partir de culturas em Caldo BHI com densidades ajustadas à turvação do tubo com 0,5 da escala de McFarland (10^{-8} UFC/mL) foram semeadas na superfície de ágar Muller-Hinton, com auxílio de “swab” estéril de modo a obter-se um crescimento uniforme e confluyente. Sobre o meio semeado foram feitos poços com diâmetro de 5mm. Nesses poços foram aplicados 25µL das diferentes concentrações da resina, dos óleos essenciais da resina, dos frutos verdes e dos frutos maduros e das substâncias isoladas de *Protium heptaphyllum* e *Protium tenuifolium*, bem como o controle negativo e positivo.

As placas permaneceram incubadas por 18-20 horas a 35°C , com a leitura dos halos de inibição feita com régua especial, através do fundo da placa, com iluminação contra um fundo escuro.

Para os óleos com significativa atividade antimicrobiana foi obtida a Concentração Inibitória Mínima (CIM), cujos resultados são mostrados nas Tabs.18 ,19, 20, 21 Págs.135, 136, 137 respectivamente.

8.8.2. Medida de inibição da atividade de acetilcolinesterase (AChE)

Os testes foram realizados no departamento de Química Orgânica e Inorgânica da Universidade Federal do Ceará, de acordo com a metodologia desenvolvida por Rhee et al⁵⁹.

A resina, os extratos etanólicos do caule e das folhas e as substâncias [(PHPR-2a e PHPR-2b), PHPFM-1, PHPFV-1, PHPF-1] isoladas de *Protium heptaphyllum*, juntamente com os extratos etanólicos do caule e das folhas de *Protium tenuifolium* foram dissolvidos em clorofórmio e feitas diluições até um fator de 1 µg/mL e aplicadas em uma placa cromatográfica de alumínio (5.0µL). Borrifou-se a placa com as soluções de 1 mM de Ácido 5,5' Ditiobis-[2-nitrobenzóico] (reagente de Ellman, DTNB) e iodeto de acetilcolina (ACTI) 1mM, após 3 minutos borrifou-se a enzima acetilcolinesterase (AChE) 3 U/mL, e após 10 minutos ocorreu o aparecimento de uma coloração amarela contrastando com a zona onde houve inibição da enzima.

8.8.3. Avaliação da atividade antiinflamatório

A avaliação da atividade antiinflamatória foi realizada no laboratório de neurofarmacologia do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Universidade Federal do Ceará.

As amostras para testes foram preparadas utilizando-se a mistura de α -amirina e β -amirina em 0,5% de tweem em forma de suspensão em água destilada, a qual foi sonicada por 5 minutos.

Foram utilizados neste trabalho camundongo de 20 a 30 g, macho, do biotério da Universidade Federal do Ceará, em temperatura ambiente, luz de 6:00 às 18:00 horas, com livre acesso a comida e água.

Fez-se uso dos seguintes reagentes: carragenina e indometacina do laboratório Sigma. Ácido acético e tweem 80 do laboratório Reagen.

8.9. Análise quantitativa da mistura binária de [α -Amirina e β - Amirina] na resina de *Protium heptaphyllum*

As determinações analíticas foram realizadas no Departamento de química Orgânica e Inorgânica da Universidade Federal do Ceará, num aparelho Shimadzu RID-10 A, equipado com detectores de índice de refração e ultravioleta, utilizando-se coluna Park – C18 (Labtron) (250 mm \times 4,6 mm D. I. ; 5 mm).

8.9.1. Obtenção da curva padrão de calibração (método do padrão externo)

A curva padrão foi obtida fazendo-se uso da fase móvel acetonitrila : água (6,5 : 3,5) com velocidade de fluxo igual a 0,7 mL/min, e operando em um comprimento de onda igual a 225 nm. As soluções padrões foram preparadas por diluição adequada, a partir de uma solução estoque de 1000 ppm, dentro da faixa de 20 - 120 ppm com variação constante na concentração. A curva padrão foi obtida após regressão linear dos dados plotando-se a área do pico de cada amostra padrão versus concentração, obtendo-se um coeficiente de correlação próximo da unidade.



CAPÍTULO

9

CONCLUSÕES

9. CONCLUSÕES

Através do levantamento bibliográfico realizado sobre os constituintes fixos do gênero *Protium heptaphyllum* e *Protium tenuifolium* foi constatado que não há uma classe de compostos dominante característica destas espécies, entretanto os triterpenos são os que mais aparecem, e que apesar do conhecimento e uso popular é ainda muito reduzido o número de trabalhos científicos, especialmente do *Protium tenuifolium* que apresenta apenas um trabalho com relato na literatura.

Embora os compostos: p-ment-3-eno-1,2,8-triol (**25**), quercetina-3-O-ramnosil (**26**), (-)-epicatequina (**27**) e quercetina (**28**) estejam sendo relatados pela primeira vez na espécie *Protium heptaphyllum*, vale ressaltar o isolamento da mistura binária de α -amirina (**5**) e β -amirina (**6**), já isolada na espécie, com comprovado efeito antiinflamatório, o que credência como prováveis constituintes responsáveis por esta atividade, atribuída a resina desta espécie pela medicina popular.

Os testes de inibição da atividade de acetilcolinesterase realizados com as substâncias isoladas e extratos etanólicos mostraram que o composto (-)-epicatequina (**27**) é bastante promissor, fazendo do *Protium heptaphyllum* um gênero de interesse para o fracionamento e estudo com esta finalidade.

A análise quantitativa realizada por CLAE da mistura α,β -amirina mostrou que estes constituintes, embora de fácil isolamento, não constituem componentes majoritários na composição da resina.

Quanto aos óleos essenciais da resina e frutos maduros de *Protium heptaphyllum* e frutos de *Protium tenuifolium*, estes apresentaram atividade antimicrobiana significativa, frente a bactérias e fungos nas cepas em que foram testados. A atividade frente a *Candida albicans* é digna de nota, e também de projeção para outros fungos pertinentes.

Os resultados farmacológicos dos testes realizados em camundongos com a mistura α -amirina e β -amirina sugerem que a mesma possui significativa atividade antiedermatogênica e antinociceptiva.



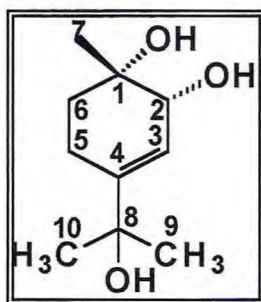
CAPÍTULO

10

CONSTANTES FÍSICAS

10. CONSTANTES FÍSICAS, DADOS ESPECTROSCÓPICOS E ESPECTROMÉTRICOS

10.1. PHPR-1 (25) : p-ment-3-eno-1,2,8-triol



F.M = $C_{10}H_{18}O_3$

P.M = 186 u.m.a

P.F = 137 – 137,8°C

Aspecto = sólido amorfo branco

Solubilidade = Metanol

$[\alpha]_D^{20} = + 2^\circ$ (c, 0,2 ; MeOH)

Espectroscopia na região do infravermelho (IV), KBr (cm^{-1}):

3293 , 3217 , 2976 , 2928 , 1458 , 1366 , 1321 , 1135 , 711

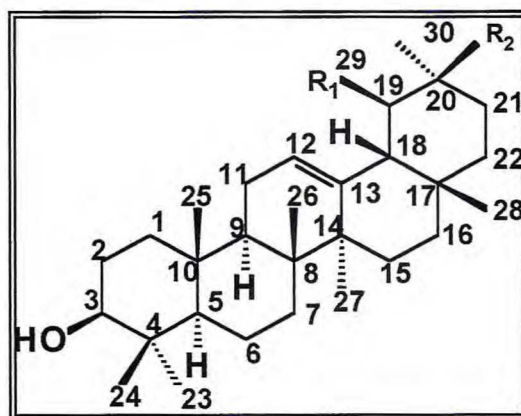
Espectometria de massas (70eV)

m/z : 95 (100%) , 59 (50%) , 43 (70%)

Espectroscopia de RMN 1H (500 MHz, CD_3OD): Tab. 4, Pág. 29

Espectroscopia de RMN ^{13}C (125 MHz, CD_3OD): Tab. 4, Pág. 29

10.2. [PHPR-2a (5) e PPHP-2b (6)]: 3β-hidroxiurs-12-eno(α-amirina) e 3β-hidroxiolean-12-eno(β-amirina) respectivamente.



(5) - $R_1 = CH_3$; $R_2 = H$

(6) - $R_1 = H$; $R_2 = CH_3$

F.M = $C_{30}H_{50}O$ (5) , (6)

P.M = 426 u.m.a

P.F = 179 -181°C

Aspecto = sólido amorfo branco

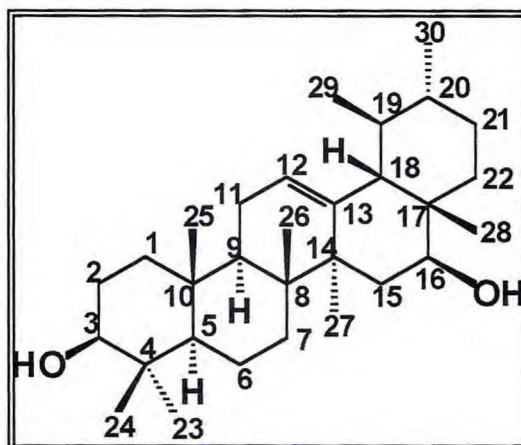
Solubilidade = clorofórmio

Espectroscopia na região do infravermelho (IV), KBr (cm^{-1}):

3307, 2946, 1460, 1383, 1035, 995

Espectroscopia de RMN 1H (500 MHz, $CDCl_3$): Tab. 5, Pág. 39

Espectroscopia de RMN ^{13}C (125 MHz, $CDCl_3$): Tab. 5, Pág. 39

10.3. PHPR-3 (7) : 3 β ,16 β -diidroxí-urs-12-eno (breína)F.M = C₃₀H₅₀O₂

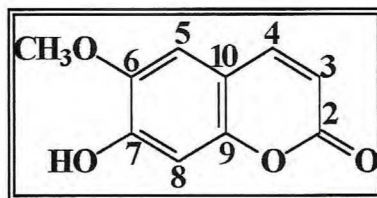
P.M = 442 u.m.a

P.F = 217 -219°C

Aspecto = sólido amorfo branco

Solubilidade = clorofórmio

 $[\alpha]_D^{20} = + 61^\circ (c, 0,2 ; CHCl_3)$ Espectroscopia de RMN ¹H (500 MHz , CDCl₃): Tab. 7, Pág. 48Espectroscopia de RMN ¹³C (125 MHz, CDCl₂): Tab. 7, Pág. 48

10.4. PHPL-1 (17) : 6-metoxi-7-hidroxycumarina (escopoletina)F.M = C₁₀H₈O₄

P.M = 192 u.m.a

P.F = 205 – 205,5°C

Aspecto = sólido amorfo amarelado

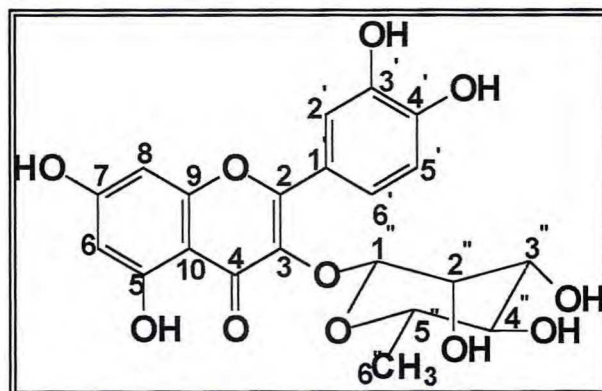
Solubilidade = Dimetilsulfóxido

Espectroscopia na região do infravermelho (IV), KBr (cm⁻¹):

3338, 1704, 1565, 1510, 1291, 1139, 1018, 591

Espectroscopia de RMN ¹H (500 MHz, DMSO): Tab. 8, Pág. 54**Espectroscopia de RMN ¹³C (125 MHz , DMSO):** Tab. 8, Pág. 54

10.5. PHPFM-1 (26) : quercetina-3-O-ramnosil

F.M = $C_{21}H_{20}O_{11}$

P.M = 448 u.m.a

P.F = 247 - 248°C

Aspecto = sólido cristalino amarelo

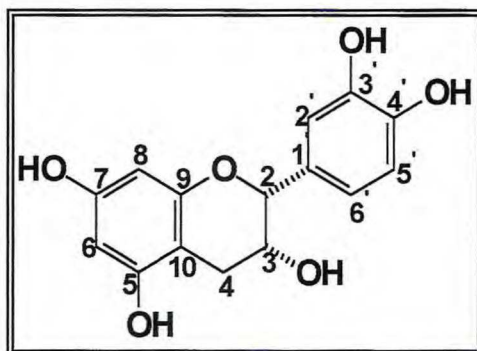
Solubilidade = metanol

 $[\alpha]_D^{20} = -56^\circ$ (c, 0,2 ; MeOH)**Espectroscopia na região do infravermelho (IV), KBr (cm^{-1}):**

3428, 1655, 1606, 1507, 1456, 1118, 1090, 816

Espectroscopia de RMN 1H (500 MHz, CD_3OD): Tab. 9, Pág. 61**Espectroscopia de RMN ^{13}C (125 MHz, CD_3OD):** Tab. 9, Pág. 61

10.6. PHPFV-1 (27) : 3,3',4',5,7-pentahidroxiflavanol [(-)- epicatequina]



F.M = $C_{15}H_{12}O_6$

P.M = 288 u.m.a

P.F = 229 - 230°C

Aspecto = sólido cristalino amarelo

Solubilidade = metanol

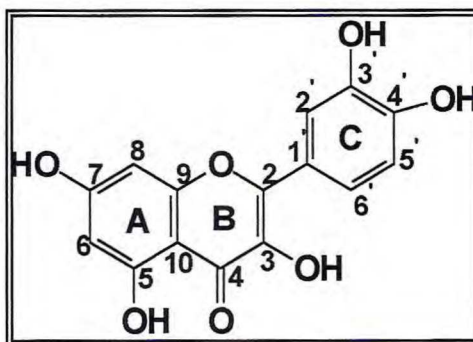
Espectroscopia na região do infravermelho (IV), KBr (cm^{-1}):

3456, 1622, 1522, 1469, 1144, 1094, 797

Espectroscopia de RMN 1H (500 MHz, CD_3OD): Tab. 10, Pág. 71

Espectroscopia de RMN ^{13}C (125 MHz, CD_3OD): Tab. 10, Pág. 71

10.7. PHPF-1 (28) : 3,5,7,3',4'-OH-flavonol (quercetina)

F.M = $C_{15}H_{10}O_7$

P.M = 302 u.m.a

P.F = 232 - 234°C

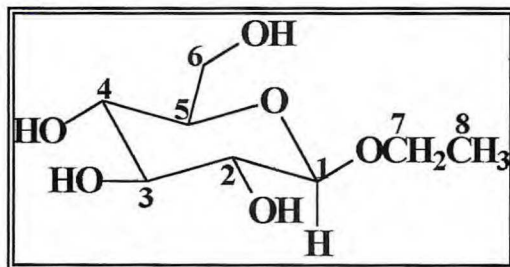
Aspecto = sólido cristalino amarelo laranja

Solubilidade = metanol

Espectroscopia na região do infravermelho (IV), KBr (cm^{-1}):

3423, 2921, 1658, 1610, 1519, 1166, 824

Espectroscopia de RMN 1H (500 MHz, CD_3OD): Tab. 11, Pág. 79**Espectroscopia de RMN ^{13}C (125 MHz, CD_3OD):** Tab. 11, Pág. 79

10.8. PTF-1 (29) : 1-O-etilglicose

F.M = $C_8H_{16}O_6$

P.M = 208 u.m.a

$[\alpha]_D^{20} = -36^\circ$ (c, 0,2 em MeOH)

Aspecto = material viscoso. amarelo claro

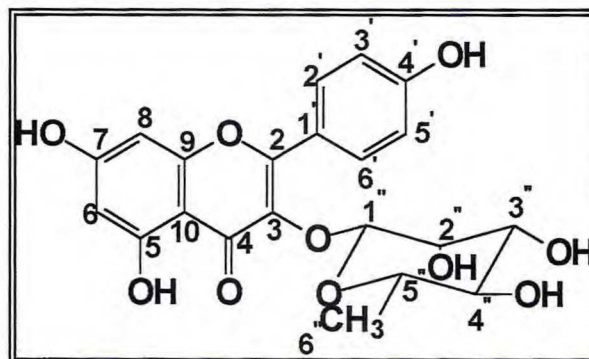
Solubilidade = metanol

Espectroscopia na região do infravermelho (IV), KBr (cm^{-1})

3505, 1654, 1076, 1038

Espectroscopia de RMN 1H (500 MHz, CD_3OD): Tab. 12, Pág. 84

Espectroscopia de RMN ^{13}C (125 MHz, CD_3OD): Tab. 12, Pág. 84

10.9. PTF – 2 (30) : Campferol-3-O-ramnosilF.M = $C_{21}H_{20}O_{10}$

P.M = 432 u.m.a

P.F = 172 - 174°C

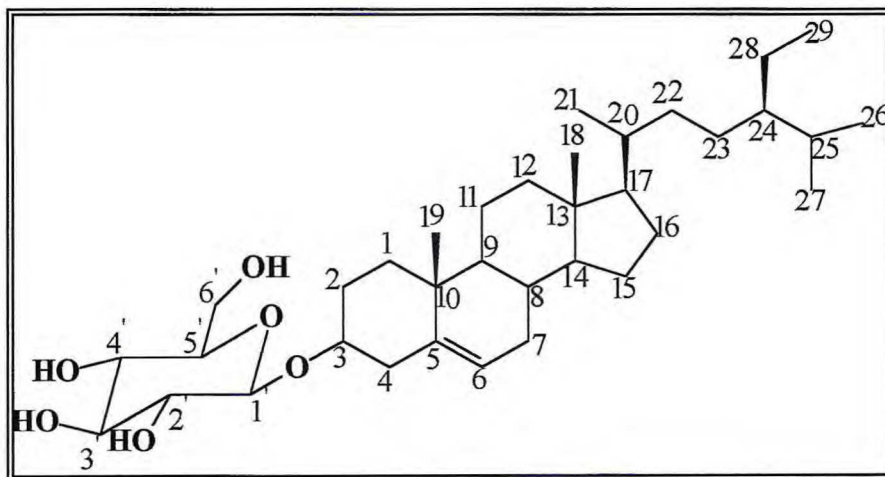
Aspecto = sólido amarelo amorfo

Solubilidade = metanol

Espectroscopia na região do infravermelho (IV), KBr (cm^{-1}):

3412, 1647, 1509, 1454, 1177, 1089, 967

Espectroscopia de RMN 1H (500 MHz, CD_3OD): Tab. 13, Pág. 92**Espectroscopia de RMN ^{13}C (125 MHz, CD_3OD) :** Tab. 13, Pág. 92

10.10. PTC-1 (31) : glicosídeo do β -sitosterol

F.M = $C_{35}H_{60}O_6$

P.M = 576 u.m.a

P.F = 290 - 292°C

Aspecto = sólido branco amorfo

Solubilidade = piridina

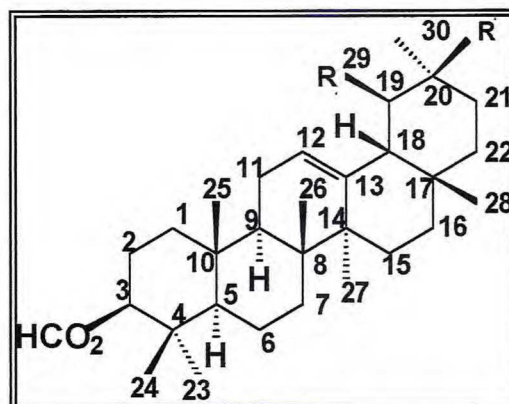
Espectroscopia na região do infravermelho (IV), KBr (cm^{-1}):

3440, 2936, 1637, 1461, 1375, 1067, 1023

Espectroscopia de RMN 1H (500 MHz, piridina): Fig. 75, Pág. 101

Espectroscopia de RMN ^{13}C (125 MHz, piridina): Tab. 14, Pág. 99

10.11. Derivados [FPHPR-2a (32) e FPHPR-2b (33)]: formiato de α -amirina e formiato de β -amirina



(32) - $R_1 = \text{CH}_3$; $R_2 = \text{H}$

(33) - $R_1 = \text{H}$; $R_2 = \text{CH}_3$

F.M = $\text{C}_{31}\text{H}_{50}\text{O}_2$ (32) , (33)

P.M = 454 u.m.a

P.F = 167 - 168°C

Aspecto = sólido amorfo branco

Solubilidade = clorofórmio

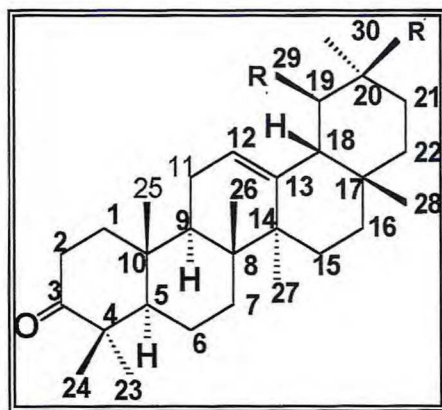
Espectroscopia na região do infravermelho (IV), KBr (cm^{-1}):

2933, 1718, 1460, 1377, 1177

Espectroscopia de RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3): Fig. 80, Pág. 105

Espectroscopia de RMN ^{13}C (125 MHz, CDCl_3): Tab. 15, Pág. 118

10.12. Derivados [AMPHPR-2a (34) e AMPHPR-2b (35)]: 12-ursen-3-ona (α -amirinona) e 12-oleanen-3-ona (β -amirinona)



(34) - $R_1 = \text{CH}_3$; $R_2 = \text{H}$

(35) - $R_1 = \text{H}$; $R_2 = \text{CH}_3$

F.M = $\text{C}_{30}\text{H}_{48}\text{O}$ (34) , (35)

P.M = 440 u.m.a

P.F = 145 – 147,5°C

Aspecto = sólido amorfo branco

Solubilidade = clorofórmio

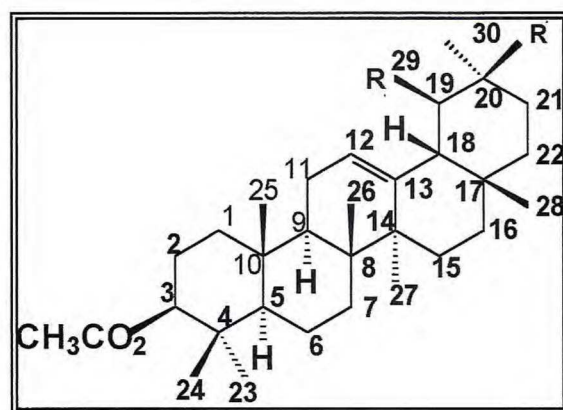
Espectroscopia na região do infravermelho (IV), KBr (cm^{-1}):

2947, 1705, 1459, 1382, 1000

Espectroscopia de RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3): Fig. 84, Pág. 108

Espectroscopia de RMN ^{13}C (125MHz, CDCl_3): Tab. 15, Pág. 118

10.13 Derivados [APHPR-2a (36) e APHPR-2b (37)]: acetato de α -amirina e acetato de β -amirina



(36) - $R_1 = \text{CH}_3$; $R_2 = \text{H}$

(37) - $R_1 = \text{H}$; $R_2 = \text{CH}_3$

F.M = $\text{C}_{32}\text{H}_{52}\text{O}_2$ (36) , (37)

P.M = 468 u.m.a

P.F = 192 – 193,5°C

Aspecto = sólido amorfo branco

Solubilidade = clorofórmio

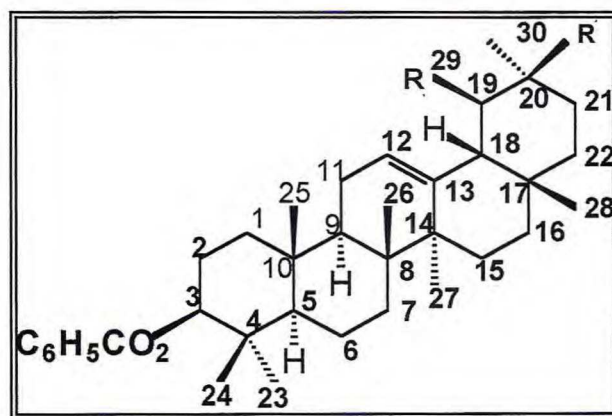
Espectroscopia na região do infravermelho (IV), KBr (cm^{-1}):

2949, 1735, 1654, 1370, 1247, 1025

Espectroscopia de RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3): Fig. 88, Pág. 111

Espectroscopia de RMN ^{13}C (125 MHz, CDCl_3): Tab. 15, Pág. 118

10.14. Derivados [BPHPR-2a (38) e BPHPR-2b (39)]: benzoato de α -amirina e benzoato de β -amirina)



(38) - $R_1 = \text{CH}_3$; $R_2 = \text{H}$

(39) - $R_1 = \text{H}$; $R_2 = \text{CH}_3$

F.M = $\text{C}_{37}\text{H}_{54}\text{O}_2$ (38) , (39)

P.M = 518 u.m.a

P.F = 181,6 – 182,7°C

Aspecto = sólido amorfo branco

Solubilidade = clorofórmio

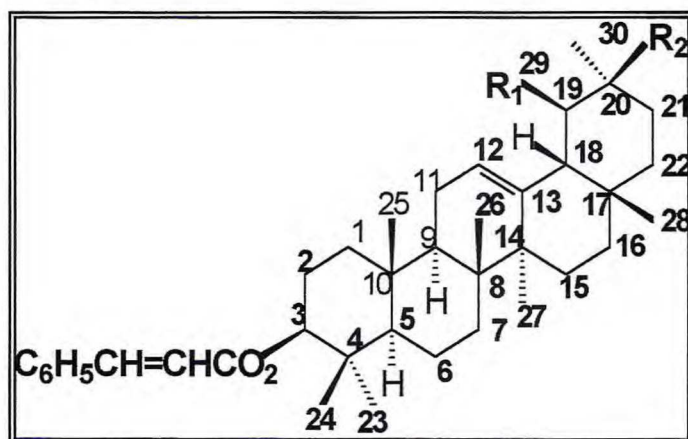
Espectroscopia na região do infravermelho (IV), KBr (cm^{-1}):

2924, 1714, 1452, 1380, 1277, 707

Espectroscopia de RMN ^1H (500 MHz , CDCl_3): Fig. 92, Pág. 114

Espectroscopia de RMN ^{13}C (125 MHz, CDCl_3): Tab. 15, Pág. 118

10.15. Derivados [CPHPR-2a (40) e CPHPR-2b (41)]: cinamato de α -amirina e cinamato de β -amirina



(40) - $R_1 = \text{CH}_3$; $R_2 = \text{H}$

(41) - $R_1 = \text{H}$; $R_2 = \text{CH}_3$

F.M = $\text{C}_{39}\text{H}_{56}\text{O}_2$ (40) , (41)

P.M = 543 u.m.a

P.F = $178 - 179,6^\circ\text{C}$

Aspecto = sólido amorfo branco

Solubilidade = clorofórmio

Epectroscopia na região do infravermelho (IV), KBr (cm^{-1}):

2947, 1711, 1453, 1376, 1173, 766

Espectroscopia de RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3): Fig. 96, Pág. 117

Espectroscopia de RMN ^{13}C (125 MHz, CDCl_3): Tab. 15, Pág. 118



REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

01. LORENZI, H., Árvores Brasileiras. Manual de identificação e Cultivo de Plantas Arbóreas Nativas do Brasil. 1ª ed. São Paulo: Ed. Plantarum LTDA, 1992, p. 76.
02. CORRÊA, M. P., Dicionário da plantas úteis do Brasil. Rio de Janeiro: Ministério da Agricultura, Instituto Brasileiro de Desenvolvimento Florestal, v. 1, 1984, P. 82
03. PERNET, R., Phytochimie des Burseracees. **Lloydia**, v. 35 (3), p. 280 – 287, 1972.
04. RIBEIRO, J.E.L., HOPKINS, M.J.G., VICENTINI, A., SOTHERS, C.A., COSTA, M.A.S., BRITO, J.M., SOUZA, M.A., MARTINS, L.H.P., LOHMANN, L.G., PEREIRA, E.C., SILVA, C.F., MESQUITA, M.R., PROCÓPIO, L.C., Flora da Reserva Ducke, 19ª edição, Inpa, 1999, p. 534 – 542.
05. ZOGHBI, M.G.B., MAIA, J.G.S. AND LUZ, A.I.R., Volatile Constituents from Leaves and Stems of *Protium heptaphyllum* (Aubl.) March. **J. Essent. Oil. Res.**, v. 7, p. 541 – 543, 1995.
06. SIANI, A.C., RAMOS, M.F.S., GUIMARÃES, A.C., SUSUNAGA, G.S. AND ZOGHBI, M.G.B., Volatile Constituents from Oleoresin of *Protium heptaphyllum* (Aubl.) March. **J. Essent. Oil. Res.**, v. 11, p. 72 –74, 1999.
07. SIANI, A.C., RAMOS, M.F.S., MENEZES-de-LIMA JR. O., SANTOS, R.R., FERREIRA, E.F., OARES, R.O.A., ROSAS, E.C., SUSUNAGA, G.S., GUIMARÃES, A.C., ZOGHBI, M.G.B. AND HENRIQUES, M.G.M.O., Evaluation of anti-inflammatory-related activity of essential oils from the leaves and resin of species of *Protium*. **J. Ethnopharmacol.**, v. 66, p. 57 – 69, 1999.
08. FRISCHKORN, C.G.B. AND FRISCHKORN, H.E., Cercaricidal Activity of Some Essential Oils of Plants from Brazil. **Naturwissenschaften**, v. 65, p. 480 – 483, 1978.
09. GUIMARÃES, A.C., “Estudo químico e biológico das folhas de *Protium strumosum* (DALY), *Protium grandifolium* (ENGL), *Protium llewelynii* (MACBR), *Protium hebetatum* (DALY) e *Protium altsonii* (SANDW).”, 1997, 98f, Tese (Mestrado em Química Orgânica), Universidade do Amazonas – UA, Manaus-AM.

10. SUSUNAGA, G.S., "Estudo químico e Biológico da resina produzida pela espécie de *Protium heptaphyllum* March (Burseraceae)", 1995, 163f, (Dissertação de Mestrado em Química Orgânica), Universidade do Amazonas - UA, Manaus - AM.
11. COSTA, A.F., Farmacognosia. 5ª Ed. Lisboa., Fundação Calouste Gulbenkian, 1994, p. 773 - 877
12. COSTA, A.F., Farmacognosia. 5ª Ed. Lisboa., Fundação Calouste Gulbenkian, 1975, p. 841 - 842.
13. ZOGHBI, M.G.B., ROQUE, N.F. ND GOTTLIEB, O.R., Propacin, A Coumarinolignoid from *Protium opacum*. **Phytochemistry**, v. 20, p. 180, 1981.
14. SIQUEIRA, J.B.G., ZOGHBI, M.G.B., CABRAL, J.A. AND FILHO, W.W., Lignans from *Protium tenuifolium*. **J. Nat. Prod.**, v. 58 (5), p. 730 - 732, 1995.
15. SIANI, A.C., ZOGHBI, M.G.B., WOLTER, E.L.A. AND VENCATO, I., 5-Methoxyjusticidin A, a New Arrynaphthalene Lignan from *Protium unifoliolatum*. **J. Nat. Prod.**, v. 61, p. 796 - 797, 1998.
16. MAIA, R.M., BARBOSA, P.R., CRUZ, F.G., ROQUE, N.F. E FASCIO, M., Triterpenos da resina de *Protium heptaphyllum* March (Burseraceae): Caracterização em misturas binárias. **Quím. nova**, v. 23 (5), p. 623 - 626, 2000.
17. SUSNAGA, G.S., SIANI, A.C., PIZZOLATTI, M.G., YUNES, R.A. AND MONACHE, F.D., Triterpenes from the resin of *Protium heptaphyllum*. **Fitoterapia**, v. 72, p. 709 - 711, 2001.
18. ALMEIDA, E.X., CONSERVA, Z.M. AND LEMOS, R.P.L., Coumarins, coumarinolignoids and terpenes from *Protium heptaphyllum*. **Biochem. System. and Ecol.**, 30, p. 685 - 687, 2001.
19. MORA, A.J., DELGADO, G., DELGADO, G.D., USUBILLAGA, A., KHOURI, N AND BAHSAS. A., 3 alpha hidroxytiruculla-7,24-dien- 21-oic acid, triterpene from *Prottium crenatum* Sandwith. **Acta Crystallographica Section C**, v. 57, p. 638 - 640, 2001.
20. ZOGHBI, M.G.B., SIQUEIRA, J.B.G., WOLTER, E. L.A. AND JUNIOR, O.L.P., Constituintes químicos de *Protium paniculatum* (Burseraceae). **Acta Amazônica**, v. 23 (2), p. 187 - 189, 1993.

21. OTUKI, M.F., LIMA, F.V., MALHEIROS, A., FILHO, V.C., MONACHE, F.D., YUNES, R.A. AND CALIXTO, J.B., Evolution of the anticocicepitve action caused by ether fraction and a triterpene isolated from resin of *Protium kleinii*. **Life Sciences**, v. 69, p. 2225 – 2236, 2001.
22. SIMÕES, C.M.O., SCHENKEL, E.P., GOSMANN, , G., MELLO, J.C.P., MENTZ, L.A., PETROVICK, P.R., *Farmacognosia: da planta ao medicamento*, 2ª ed., Ed. Da UFSC, 2000, p. 387.
23. GOTTLIB, O.R., KOKETSU, M., MAGALHÃES, M.F., MAIA, J.G.S., MENDES, P.H., ROCHA, A.I.R., SILVA, M.L. E WILBERG, V.C., Óleos essenciais da Amazônia VII. **Acta Amazônica**, v. 11 (1), p. 143 - 148, 1981.
24. ZOGHBI, M.G.B., CUNHA, E.V.L. AND FILHO, W.W., Essential oil of *Protium unifoliolatum* (Burseraceae). **Acta Amazônica**, v. 23 (1), p. 15 –16, 1993.
25. BANDEIRA, P.N., CAVALCANTI, M.F.S. AND LEMOS, T.L.G., Essential Oil Composition of Leaves, Fruits end Resin or *Protium heptaphyllum* (Aubl) March. **J. Essent. Oil. Res.**, v. 13, p. 33 – 34, 2001.
26. ZOGHBI, M.G.B., ANDRADE, E.H.A. AND SANTOS, A.S., Volatile Constituentes of the Resins from *Protium subserratum* (Engl.) and *Tetragastris panamensis* (Engl.) Kuntz. **J. Essent. Oil. Res.**, v. 10, p. 325 – 326, 1998.
27. RAMOS, M.F.S., SIANI, A.C., TAPPIN, M.R.R., GUIMARÃES, A.C. AND RIBEIRO, J.E.L.S., Essential oils from oleoresins of *Protium* spp. of the Amazon region. **Flavour Fragr. J.**, v. 150, p. 383-387, 2000.
28. MAHATO, S.B. AND KUNDU, A.P., ¹³C NMR Spectra of pentacyclitriterpenoids – A compilation and some salient features. **Phytochemistry**, v. 37 (6), p. 1517 – 1575, 1994.
29. MAHATO, S.B. AND SEN, S., Advances in triterpenoid research. **Phytochemistry**, v. 44 (7), P. 1185 – 1236, 1997.
30. LING, H.C., KING, M.L., CHEN, C.F., HSU, K.P., SU, M.H., AND LIN, M.H., Structure activity relationship of some triterpenols and their derivatives as anticancer agents. **Chin Med J.**, v. 29, p. 308 – 315, 1982.

31. MAHATO, S.B., NANDY, A.K. AND ROY, G., Triterpenoids. **Phytochemistry**, v. 31 (7), p. 2199 – 2249, 1992.
32. CORDERO, C.M., REYES, M., AYUSO, M.J. AND TORO, M.V., Cytotoxic Triterpenoids from *Erica andevalensis*. **J. of Biosciences**, v. 56, p. 45 – 48, 2001.
33. OKAI, G.K., DE MUNK, F., RUMBLE, B.A., MACRIDES, T.A. AND CROPLEY, M., Antiarthritic mechanisms of amyrin triterpenes. **Res. Commun Mol Pathol Pharmacol.**, v. 85 (1), p. 45 –55, 1994.
34. HASMEDA, M., OKAI, K., MACRIDES, G. AND POLYA, G.M., Selective inhibition of eukaryote protein kinases by anti-inflammatory triterpenoids. **Planta Med.**, v. 65 (1), p. 14 – 18, 1999.
35. RAJIC, A., OKAI, G.K., MACRIDES, G., SANDERMAN, R.M., CHANDLER, D.S. AND POLYA, G.M., Inhibition of serine proteases by anti-inflammatory triterpenoids. **Planta Med.**, v. 66 (3), p. 206 – 210, 2000.
36. AKIHISA, T., YASUKAWA, K., OINUMA, H., KASAHARA, H., YAMANOUCHI, S., TAKID, M., KUMAKI, K. AND TAMURA, T., Triterpene alcohols from the flowers of compositae and their anti-inflammatory effects. **Phytochemistry.**, v. 43 (6), p. 1255–1260, 1996.
37. GUPTA, M.B., BHAILA, T.N., GUPTA, G.P., MITRA, C.R. AND BHARGAVA, K.P., Anti-inflammatory activity of natural products (1) Triterpenoids. **European J. of Pharmacology**, v. 6, p. 67 –70, 1969.
38. KOTAKU, H., KAZUKO, H., HIDEYUKI, H., HIROKI, H., MARI, N. AND YURI, H., Air growth stimulants containing α -amyrin triterpenes or extracts of *Centella sp.* Or *Prunella sp.* **Jpn. Kokai Tokkyo Koho JP 07 10,722 [95 10,722]**
39. OKAI, G.K. AND CARROLL, A.C., Antiarthritic effect of *Alstonia boonei* triterpenes. **Recent. Adv. Toxinol Res.**, v. 3, p. 19 –28, 1992.
40. CHATURVERDI, A.K., PARMAR, S.S., BHATNAGAR, S.C., MISRA, G. AND NIGAM, S.K., Anticonvulsant and anti-inflammatory activity of natural plant constituents and Triterpenoids. **Res. Commun in Chem Pathol and Pharmacol.**, v. 9 p. 11 –22, 1974.

41. OKAI, G.K. AND MACRIDES, T.A., Antilipoxygenase activity of amyrin triterpenes. **Res. Commun in Chem Pathol and Pharmacol.**, v. 78, p. 367 – 372, 1992.
42. JAIN, S.C., SINGH, B. AND JAIN, R., Antimicrobial activity of triterpenoids from *Heliotropium ellipticum*. **Fitoterapia**, v. 72, p. 666 – 668, 2001.
43. SILVERSTEIN, R.M. AND WEBSTER, F.X., Identificação Espectrométrica de Compostos Orgânicos, 6ª Ed. Rio de Janeiro, Livros Técnicos e Científicos Editora S.A, 2000.
44. YAHARA, S., KATO, K. AND NOHARA, T., Studies on the Constituents of the Water Soluble Portion in Asiasari Radix. **Shoyakugaku Zasshi**, v. 44 (4), p. 331 – 334, 1990.
45. AMAI, M., WATANABE, N., SOMEYA, M., KONDOH, H., OMURAS, S., PEILING, Z., CHANG, R. AND MING, C. W., New Hepatoprotective Triterpenes from *Canarium album* **Planta Med.**, v. 55, p. 44 – 47, 1989.
46. SILVA, M., MUNDACA, J.M. AND SAMMES, P.G., Flavonoid and Triterpene constituents of *Baccharis rhomboidalis*. **Phytochemistry**, v. 10, p. 1942 – 1943, 1971.
47. POUCHERT, C.J. AND BEHNKE, J., The Aldrich of ^{13}C and ^1H FT-NMR Spectra., 1ª Ed., USA, v. II, 1993.
48. AGRAWAL, P.K., Carbon-13 NMR of Flavonoids., Amsterdam, Netherlands, Elsevier Science Publishers B.V, 1989.
49. MARKHAM, K.R AND TERNAL, B., ^{13}C NMR of Flavonoids – II Flavonoids other than favone and flavonol aglycones. **Tetrahedron**, v. 32, p. 2607 – 2612, 1976.
50. MARKHAM, K.R., TERNAL, B., STANLEY, R., GEIGER, H AND MABRY, T.J., CARBON – 13 NMR STUDIES OF FLAVONOID – III Naturally occurring flavonoid glycosides and their acylated derivatives. **Tetrahedron**, v. 34, p. 1389 – 1397, 1978.
51. MILITÃO, J.S.L.T., “Contribuição ao estudo químico de plantas do Nordeste *Thiola glaucocarpa* e *combretum Sp.*” 1990, 88f, Tese (Mestrado em Química orgânica), Universidade Federal do Ceará. Fortaleza-Ceará.

52. KUSTER, R.M., BERNARDO, R.R., DA SILVA, A.J.R., PARENTE, J.P AND MORS, W.B., Furocoumarins from the rhizomes of *Dorstenia brasilienses*. **Phytochemistry**, v. 23 (1), p. 221 – 223, 1994.
53. GOTTLIEB, O.R. AND MAGALHÃES, M.T., Modified destilation trap. **Chemist. Analyst.**, v. 49, p. 114, 1960.
54. ALENCAR, J.W., CRAVEIRO, A.A., MATOS, F.J.A AND MACHADO, M.I.L., Kovats indices simulation in essential oil analysis. **Quím. nova.**, v. 13 (4), p. 282 – 184, 1980.
55. ADAMS, R.P., Identification of Essential Oils by Ion Trap Mass Spectroscopy., San Diego, Academic Press Inc, 1989, p. 296.
56. ROSE, A.H., Microbiologia química, 1ª ed. Madrid: Editorial Alhambra, S.A, 1968, p. 353.
57. NASCIMENTO, G.G.F., LOCATELLI, J., FREITAS, P.C AND SILVA, G.L., Antibacterial activity of plant extracts and phytochemicals on antibiotic-resistant bacteria. **Braz. J. of Microbiology**, v. 31 (4), p. 247 – 256, 2000.
58. NAKAMURA, C.V., UEDA-NAKAMURA, T., DANDO, E., MELO, A.F.N., CORTEZ, D.A AND FILHO, B.P.D., Antibacterial activity of *Ocimum gratissimum* L. essential oil. **Men. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 94 (5), p. 675 – 678, 1999.
59. RHEE, I.K., MEENT, M.V., INKANINAN, K., AND VERPORTE, R., Screening for acetylcholinesterase inhibitors from Amaryllidaceae using silica gel thin-layer chromatography in combination with bioactivity staining. **J. Chromatog. A**, v. 915, p. 217 – 223, 2001.
60. KOSTER, R., ANDERSON, M., AND DE BEER, E.J., Acetic acid-induce analgesic screening. **Federation Proceedings**, v. 18, p. 412, 1959.
61. WINTER, C.A., TISLEY, E.A. AND NUSS, G.W., Carragenan-induced edema in hind paw of the rats as an assay for antiinflammatory drugs. **Proc. Soc. Exp. Biol. Med.**, v. 111, p. 544 – 554, 1962.
62. CIOLA, R., Fundamentos da cromatografia a liquido de alto desempenho – HPLC. 1ª ed. São Paulo: Editora Edgard Blucher LTDA, 1998.
63. FARMACOPÉIA BRASILEIRA, Parte 1, 4ª ed. São Paulo: Editora Ateneu LTDA, 1988.