



UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA

CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE



DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PRODUTOS NATURAIS E SINTÉTICOS
BIOATIVOS

Augusto Lopes Souto

**Constituintes químicos de *Combretum fruticosum* (Loefl.)
Stuntz (Combretaceae).**

Orientador: Prof. Dr. José Maria Barbosa Filho

Co-orientador: Prof. Dr. Josean Fachine Tavares

João Pessoa - Paraíba

2011

Augusto Lopes Souto

**Constituintes químicos de *Combretum fruticosum* (Loefl.)
Stuntz (Combretaceae).**

Dissertação apresentada ao programa de Pós-graduação em produtos Naturais e Sintéticos Bioativos do Centro de Ciências da Saúde, da Universidade Federal da Paraíba, em cumprimento às exigências para a obtenção do título de Mestre em produtos Naturais e Sintéticos Bioativos.

Área de Concentração: Farmacoquímica

Orientador : Prof. Dr. José Maria Barbosa Filho

Co-orientador : Prof. Dr. Josean Fachine Tavares

João Pessoa – PB

2011

S728c Souto, Augusto Lopes.

Constituintes químicos de *Combretum fruticosum* (Loefl.) Stuntz (Combretaceae) / Augusto Lopes Souto. -- João Pessoa : [s.n.], 2011.

151f. : il.

Orientador : José Maria Barbosa Filho.

Co-orientador : Josean Fachine Tavares.

Dissertação (Mestrado) – UFPB/CCS.

1. Produtos naturais. 2. Combretaceae. 3. *Combretum fruticosum*. 4. Triterpenos. 5. Farmacoquímica.

UFPB/BC

CDU: 547.9(043)

Augusto Lopes Souto

**Constituintes químicos de *Combretum fruticosum* (Loefl.) Stuntz
(Combretaceae)**

Dissertação apresentada ao programa de Pós-graduação em produtos Naturais e Sintéticos Bioativos do Centro de Ciências da Saúde, da Universidade Federal da Paraíba, em cumprimento às exigências para a obtenção do título de Mestre em produtos Naturais e Sintéticos Bioativos.

Área de Concentração: Farmacoquímica

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof. Dr. Josean Fechine Tavares
Universidade Federal da Paraíba – Co-orientador

Prof. Dr. João Xavier de Araújo Júnior
Universidade Federal de Alagoas – Examinador externo

Prof. Dr. Luis Cezar Rodrigues
Universidade Federal da Paraíba – Examinador interno

Dedicatória

Aos meus pais, Múcio Antônio Sobreira Souto e Maria do Socorro Márcia Lopes Souto pelo incentivo aos estudos e por sempre acreditarem em mim.

Aos meus irmãos Cecília e Marcelo pelo companheirismo e apoio constante.

Agradecimentos

A Deus por ter me concedido o milagre da vida.

Ao Prof. Dr. José Maria Barbosa Filho pela orientação, incentivo e colaboração e confiança depositado em mim.

Ao prof. Dr. Josean Fachine Tavares pela orientação, apoio e ensinamentos passados durante o trabalho.

Ao professor Dr. Marcelo Sobral da Silva pelo apoio, colaboração e por ter me direcionado ao Doutorado .

A minha namorada Andréa, pelo apoio, carinho e compreensão.

Ao amigo João Carlos por ter realizados os ensaios de citotoxicidade das substâncias isoladas neste trabalho

Ao Prof. Iberê pela colaboração nos ensaios de atividade antimicrobiana do extrato etanólico bruto da planta estudada neste trabalho.

Ao técnico M. Sc. Vicente Carlos pela colaboração e obtenção dos espectros.

Ao técnico Raimundo Nonato pelo apoio técnico incondicional e indispensável à realização deste trabalho.

Ao Técnico Wellington pela obtenção dos espectros de Infravermelho

A todos os funcionários do LTF que juntos nos proporcionam um ambiente agradável de trabalho.

Aos amigos e colegas de laboratório Steno, Paula, Camila, Lázaro, Roosevelt, Marcelo, Isis, Helane e Viviane pelo apoio mútuo nesses dois anos de laboratório.

A todos os amigos e familiares que direta ou indiretamente contribuíram, os meus sinceros agradecimentos.

Lista de abreviaturas, Siglas e Símbolos

APT	Attached Proton Test
CC	Cromatografia em coluna
CCDA	Cromatografia em Camada Delgada Analítica
CCDP	Cromatografia em Camada Delgada Preparativa
EEB	Extrato Etanólico Bruto
HMBC	Heteronuclear Multiple Bond Correlation
HMQC	Heteronuclear Multiple Quantum Coherence
Hz	Hertz
MHz	Megahertz
<i>J</i>	Constante de acoplamento
δ	Deslocamento químico
<i>s</i>	singleto
<i>sl</i>	singleto largo
<i>d</i>	dubleto
<i>dd</i>	duplo dubleto
<i>dt</i>	duplo tripleto
<i>t</i>	tripleto
MeOH	Metanol
EtOH	Etanol
CH ₂ Cl ₂	Diclorometano
AcOEt	Acetato de etila
R _f	Fator de retenção
RMN ¹ H	Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio
RMN ¹³ C	Resonância Magnética Nuclear de Carbono-13
ESI	Electrospray Ionization
q.s.p	Quantidade suficiente para

Lista de Quadros

Quadro 1. Constituintes químicos isolados de espécies do gênero <i>Combretum</i>	26
Quadro 2. Terpenos isolados de espécies do gênero <i>Combretum</i> : série ursano.....	28
Quadro 3. Terpenos isolados de espécies do gênero <i>Combretum</i> : série oleanano.....	32
Quadro 4. Terpenos isolados de espécies do gênero <i>Combretum</i> : série lupano.....	44
Quadro 5. Terpenos isolados de espécies do gênero <i>Combretum</i> : série cicloartano.....	46
Quadro 6. Terpenos isolados de espécies do gênero <i>Combretum</i> : série outros.....	60
Quadro 7. Esteróides isolados do gênero <i>Combretum</i>	64
Quadro 8. Eluentes utilizados e frações obtidas no fracionamento cromatográfico da fase hexânica do extrato etanólico bruto de <i>Combretum fruticosum</i> (Loefl.) Stuntz.....	71
Quadro 9. Eluentes utilizados e frações obtidas no fracionamento cromatográfico da fase CH ₂ Cl ₂ do extrato etanólico bruto de <i>Combretum fruticosum</i> (Loefl.) Stuntz.....	74
Quadro 10. Eluentes utilizados e frações obtidas no fracionamento cromatográfico da fase AcOEt do extrato etanólico bruto de <i>Combretum fruticosum</i> (Loefl.) Stuntz.....	77
Quadro 11. Avaliação da atividade antimicrobiana do extrato etanólico bruto de <i>Combretum fruticosum</i> através do método de difusão em agar.....	137

Lista de Tabelas

Tabela 1. Dados de RMN de de ^1H (200 MHz) e ^{13}C (50 MHz) de CF1 em CDCl_3 , comparados com os dados de RMN de ^{13}C da literatura (δ em ppm e J em Hz).	85
Tabela 2. Dados de RMN de de ^1H (500 MHz) e ^{13}C (125 MHz) de CF2 em CDCl_3 , comparados com os dados de RMN de ^{13}C da literatura (δ em ppm e J em Hz).	91
Tabela 3. Dados de RMN de ^1H (200 MHz) e ^{13}C (50 MHz) de CF3 em CDCl_3 , comparados com os dados de RMN de ^{13}C da literatura (δ em ppm e J em Hz).	100
Tabela 4. Dados de RMN de ^1H (500 MHz) e ^{13}C (125 MHz) e correlações entre sinais de ^1H e ^{13}C de CF4 em CDCl_3 , comparados com os dados de RMN de ^{13}C da literatura (δ em ppm e J em Hz).	108
Tabela 5. Dados de RMN de de ^1H (500 MHz) e ^{13}C (125 MHz) de CF5 em CDCl_3 , comparados com os dados de RMN de ^{13}C da literatura (δ em ppm e J em Hz).	123
Tabela 6. Dados de RMN de de ^1H (500 MHz) e ^{13}C (125 MHz) de CF6 em CDCl_3 , comparados com os dados de RMN de ^{13}C da literatura (δ em ppm e J em Hz).	130

Lista de Figuras

Figura 1. Mapa de distribuição da família Combretaceae (Missouri Botanical Garden)	23
Figura 2. Mapa de distribuição do gênero <i>Combretum</i> (Missouri Botanical Garden)	25
Figura 3. Fotos de <i>Combretum fruticosum</i> (Loefl.) Stuntz	66
Figura 4. Obtenção e particionamento do EEB das partes aéreas de <i>Combretum fruticosum</i> (Loefl.) Stuntz	70
Figura 5. Fracionamento da fase hexânica do extrato etanólico bruto de <i>Combretum fruticosum</i> (Loefl.) Stuntz	72
Figura 6. Fracionamento da fase diclorometano do extrato etanólico bruto de <i>Combretum fruticosum</i> (Loefl.) Stuntz	75
Figura 7. Fracionamento da fase diclorometano do extrato etanólico bruto de <i>Combretum fruticosum</i> (Loefl.) Stuntz	76
Figura 8. Fracionamento da fase AcOEt do extrato etanólico bruto de <i>Combretum fruticosum</i> (Loefl.) Stuntz.....	78
Figura 9. Reação de redução do MTT ([brometo de (3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difenil tetrazólio)] a formazan.....	82
Figura 10. Deslocamentos químicos da α -amirina e β -amirina.....	83
Figura 11. Espectro de RMN de ^{13}C de CF1 (CDCl_3 , 50 MHz)	87
Figura 12. Expansão do espectro de RMN ^{13}C de CF1 na região de 145 a 55 ppm (CDCl_3 , 50 MHz)	87
Figura 13. Expansão do espectro de RMN ^{13}C de CF1 na região de 47 a 15 ppm (CDCl_3 , 50 MHz)	88
Figura 14. Espectro de RMN de ^1H de CF1 (CDCl_3 , 200 MHz)	88

Figura 15. Expansão do espectro de RMN ^1H de CF1 na região de 1,8 a 0,7 ppm (CDCl ₃ , 200 MHz)	89
Figura 16. Espectro na região do infravermelho de CF2 (Pastilha de KBr)	94
Figura 17. Espectro de RMN de ^{13}C de CF1 (CDCl ₃ , 125 MHz)	94
Figura 18. Expansão do espectro de RMN ^{13}C de CF2 na região de 180 a 46 ppm (CDCl ₃ , 125 MHz)	95
Figura 19. Expansão do espectro de RMN ^{13}C de CF2 na região de 42 a 146 ppm (CDCl ₃ , 125 MHz)	95
Figura 20. Espectro de RMN de ^1H de CF2 (CDCl ₃ , 500 MHz)	96
Figura 21. Expansão do espectro de RMN ^1H de CF2 na região de 4,7 a 1,9 ppm (CDCl ₃ , 500 MHz)	96
Figura 22. Expansão do espectro de RMN ^1H de CF2 na região de 1,7 a 0,7 ppm (CDCl ₃ , 500 MHz)	97
Figura 23. Deslocamentos químicos de carbonos em esqueletos esteroidais com duplas ligações diferentes	98
Figura 24. Deslocamentos químicos dos carbonos em estruturas na forma 24R/ β e 24S/ α	99
Figura 25. Espectro de RMN de ^{13}C de CF3 (CDCl ₃ , 50 MHz)	102
Figura 26. Expansão do espectro de RMN ^{13}C de CF3 na região de 140 a 43 ppm (CDCl ₃ , 50 MHz)	102
Figura 27. Expansão do espectro de RMN ^{13}C de CF3 na região de 140 a 43 ppm (CDCl ₃ , 50 MHz)	103
Figura 28. Espectro de RMN de ^1H de CF3 (CDCl ₃ , 200 MHz)	103
Figura 29. Expansão do espectro de RMN ^1H de CF3 na região de 5,2 a 3,4 ppm (CDCl ₃ , 200 MHz)	104

Figura 30. Expansão do espectro de RMN ^1H de CF_3 na região de 0,5 a 2,0 ppm (CDCl_3 , 200 MHz)	104
Figura 31. Comparação dos deslocamentos químicos das substâncias CF_3 e CF_4	106
Figura 32. Espectro de RMN de ^{13}C de CF_4 (CDCl_3 , 125 MHz)	110
Figura 33. Expansão do espectro de RMN ^{13}C de CF_4 na região de 173 a 45 ppm (CDCl_3 , 125 MHz)	110
Figura 34. Expansão do espectro de RMN ^{13}C de CF_4 na região de 72 a 45 ppm (CDCl_3 , 125 MHz)	111
Figura 35. Expansão do espectro de RMN ^{13}C de CF_4 na região de 43 a 11 ppm (CDCl_3 , 125 MHz)	111
Figura 36. Expansão do espectro de RMN ^{13}C de CF_4 na região de 43 a 31 ppm (CDCl_3 , 125 MHz)	112
Figura 37. Expansão do espectro de RMN ^{13}C de CF_4 na região de 29 a 24 ppm (CDCl_3 , 125 MHz)	112
Figura 38. Expansão do espectro de RMN ^{13}C de CF_4 na região de 22 a 12 ppm (CDCl_3 , 125 MHz)	113
Figura 39. Espectro de RMN de ^1H de CF_4 (CDCl_3 , 500 MHz)	113
Figura 40. Expansão do espectro de RMN ^1H de CF_4 na região de 5,2 a 4,5 ppm (CDCl_3 , 500 MHz)	114
Figura 41. Expansão do espectro de RMN ^1H de CF_4 na região de 4,2 a 3,4 ppm (CDCl_3 , 500 MHz)	114
Figura 42. Expansão do espectro de RMN ^1H de CF_4 na região de 2,3 a 0,5 ppm (CDCl_3 , 500 MHz)	115
Figura 43. Expansão do espectro de RMN ^1H de CF_4 na região de 0,5 a 1,0 ppm (CDCl_3 , 500 MHz)	115

Figura 44. Espectro de correlação $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ – HMQC de CF ₄ (500 e 125 MHz, CDCl ₃)	116
Figura 45. Expansão do espectro de correlação $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ – HMQC de CF ₄ (500 e 125 MHz, CDCl ₃)	116
Figura 46. Expansão do espectro de correlação $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ – HMQC de CF ₄ (500 e 125 MHz, CDCl ₃)	117
Figura 47. Expansão do espectro de correlação $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ – HMQC de CF ₄ (500 e 125 MHz, CDCl ₃)	117
Figura 48. Espectro de correlação $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ – HMBC de CF ₄ (500 e 125 MHz, CDCl ₃)	118
Figura 49. Expansão do espectro de correlação $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ – HMBC de CF ₄ (500 e 125 MHz, CDCl ₃)	118
Figura 50. Expansão do espectro de correlação $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ – HMBC de CF ₄ (500 e 125 MHz, CDCl ₃)	119
Figura 51. Espectro de massas de CF ₄ (ESI – MH ⁺), MS1	119
Figura 52. Espectro de massas de CF ₄ (ESI – MH ⁺), MS2	120
Figura 53. Espectro de massas de CF ₄ (ESI – MH ⁺), MS3	120
Figura 54. Proposta de fragmentações de CF ₄	107
Figura 55. Espectro de RMN ^{13}C de CF ₅ (CDCl ₃ , 125 MHz)	124
Figura 56. Expansão do espectro de RMN ^{13}C de CF ₅ na região de 191 a 88 ppm (CDCl ₃ , 125 MHz)	124
Figura 57. Expansão do espectro de RMN ^{13}C de CF ₅ na região de 61 a 11 ppm (CDCl ₃ , 125 MHz)	125
Figura 58. Expansão do espectro de RMN ^{13}C de CF ₅ na região de 39 a 22 ppm (CDCl ₃ , 125 MHz)	125
Figura 59. Espectro de RMN de ^1H de CF ₅ (CDCl ₃ , 500 MHz)	126
Figura 60. Expansão do espectro de RMN ^1H de CF ₅ na região de 9,6 a 6,1 ppm (CDCl ₃ , 500 MHz)	126
Figura 61. Expansão do espectro de RMN ^1H de CF ₅ na região de 5,4 a 2,8 ppm (CDCl ₃ , 500 MHz)	127

Figura 62. Expansão do espectro de RMN ^1H de CF5 na região de 3,7 a 3,2 ppm (CDCl ₃ , 500 MHz)	127
Figura 63. Expansão do espectro de RMN ^1H de CF5 na região de 2,9 a 1,7 ppm (CDCl ₃ , 500 MHz)	128
Figura 64. Expansão do espectro de RMN ^1H de CF5 na região de 1,7 a 0,7 ppm (CDCl ₃ , 500 MHz)	128
Figura 65. Espectro de RMN de ^1H de CF6 (CDCl ₃ , 500 MHz)	132
Figura 66. Expansão do espectro de RMN ^1H de CF6 na região de 7,6 a 4,6 ppm (CDCl ₃ , 500 MHz)	132
Figura 67. Expansão do espectro de RMN ^1H de CF6 na região de 7,6 a 6,2 ppm (CDCl ₃ , 500 MHz)	133
Figura 68. Expansão do espectro de RMN ^1H de CF6 na região de 1,15 a 0,7 pp... (CDCl ₃ , 500 MHz)	133
Figura 69. Expansão do espectro de RMN ^1H de CF6 na região de 0,5 a 0,3 ppm (CDCl ₃ , 500 MHz)	134
Figura 70. Expansão do espectro de RMN ^{13}C de CF6 na região de 167 a 129 ppm (CDCl ₃ , 125 MHz)	134
Figura 71. Expansão do espectro de RMN ^{13}C de CF6 na região de 127 a 80 ppm (CDCl ₃ , 125 MHz)	135
Figura 72. Expansão do espectro de RMN ^{13}C de CF6 na região de 127 a 80 ppm (CDCl ₃ , 125 MHz)	135
Figura 73. Expansão do espectro de RMN ^{13}C de CF6 na região de 52 a 31 ppm (CDCl ₃ , 125 MHz)	136
Figura 74. Expansão do espectro de RMN ^{13}C de CF6 na região de 29 a 14 ppm (CDCl ₃ , 125 MHz)	136

Resumo

A espécie *Combretum fruticosum* (Loefl.) Stuntz, pertence a família Combretaceae e é conhecida popularmente por “pente de macaco” ou “mofumbo”; é uma planta neotropical, que ocorre desde o México até a Argentina. O presente trabalho descreve o isolamento e identificação estrutural de alguns constituintes químicos das partes aéreas de *Combretum fruticosum* (Loefl.) Stuntz, com o objetivo de ampliar o conhecimento quimiotaxonômico do gênero *Combretum*, bem como da família Combretaceae; além de realizar estudos biológicos com as substâncias isoladas desta espécie. O estudo fitoquímico das partes aéreas de *Combretum fruticosum* (Loefl.) Stuntz levou ao isolamento das substâncias α -amirina e β -amirina (CF1), ácido betulínico (CF2), α -espinasterol (CF3), espinasterol glicosilado acetilado (CF4), 13²-hidroxi-(13²-S)-feoftina A (CF5) e o 24-metileno cicloartanil p-hidroxicinamato (CF6). Todos relatados pela primeira vez no gênero com exceção de CF2. Estes compostos foram identificados através da análise de dados obtidos por métodos como Infravermelho, RMN de ¹H e ¹³C uni e bidimensionais, além de comparação com valores da literatura. No estudo biológico de *Combretum fruticosum* (Loefl.) Stuntz, realizou-se a avaliação da atividade antimicrobiana do extrato etanólico bruto através do ensaio de difusão em Agar frente as bactérias e fungos: *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Candida parapsilosis*, *Candida albicans*, *Candida krusei* e *Candida glabrata*, onde demonstrou-se atividade antimicrobiana contra o fungo *Candida krusei* e contra as bactérias *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* e *Enterococcus faecalis*. Além deste ensaio, também foi realizada a avaliação da atividade antitumoral *in vitro* das substâncias CF1, CF2, CF3 e CF4 frente as células da linhagem Sarcoma 180 e K562, onde observou-se ausência de atividade citotóxica em concentrações até 200 μ g/mL.

Palavras-chave: Combretaceae, *Combretum fruticosum*, triterpenos

Abstract

The species *Combretum fruticosum* (Loefl.) Stuntz belongs to the Combretaceae family and is popularly known as "pente de macaco" or "mufumbo", it's a neotropical plant, which can be found from Mexico until Argentina. This work describes the isolation and structural identification of a few chemical constituents of *Combretum fruticosum* (Loefl.) Stuntz aerial parts, with the objective of increasing the chemotaxonomic knowledge of the genus *Combretum*, as well as the family Combretaceae, besides doing biological studies with the isolated substances from this species. The phytochemical study of the *Combretum fruticosum* (Loefl.) Stuntz aerial parts led to the isolation of the compounds α -amyrin and β -amyrin (CF1), betulinic acid (CF2), α -spinasterol (CF3), spinasterol glycoside acetate (CF4), 13²-hydroxy-(13²-S)-phaeophytin-a (CF5) and 24-methylene cycloartanyl p-hydroxycinnamate (CF6). All of them reported for the first time on the genus, except for CF2. These compounds were identified by analysis of data obtained from spectroscopic methods such as infrared and NMR of ¹H and ¹³C, with the aid of two dimensional techniques, besides comparison with literature data. On the biological study of *Combretum fruticosum* (Loefl.) Stuntz an evaluation of the antimicrobial activity from its crude extract has been made by the essay on agar diffusion against the bacteria and fungi *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Candida parapsilosis*, *Candida albicans*, *Candida krusei* and *Candida glabrata*, which demonstrated antimicrobial activity against the fungus *Candida krusei* and the bacteria *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* and *Enterococcus faecalis*. Besides this essay, the evaluation of antitumoral activity *in vitro* with the substances CF1, CF2, CF3 and CF4 against Sarcoma 180 and K562 cells has been made, which did not show any citotoxic activity on concentrations until 200 μ g/mL.

Keywords: Combretaceae, *Combretum fruticosum*, triterpenes

Sumário

1.Introdução	18
2.Objetivos	22
2.1 Objetivo geral.....	22
2.2 Objetivos específicos	22
3. Fundamentação Teórica	23
3.1 Considerações sobre a família Combretaceae.....	23
3.2 Considerações sobre o gênero <i>Combretum</i>	25
3.2.1 Revisão bibliográfica do gênero <i>Combretum</i> (esteróides e terpenos).....	28
3.3 Considerações sobre a espécie <i>Combretum fruticosum</i> (Loefl.) Stuntz	65
4.Parte experimental	67
4.1 Materiais e métodos.....	67
4.1.1 Métodos cromatográficos	67
4.1.1.1 Cromatografia em Coluna (CC)	67
4.1.1.2 Cromatografia em Camada Delgada (CCD).....	67
4.1.2 Métodos espectrométricos	68
4.1.2.1 Ressonância Magnética Nuclear.....	68
4.1.2.2 Espectrometria de Massas.....	68
4.1.2.3 Infravermelho.....	68
4.1.3 Ponto de fusão.....	69
4.2 Estudo fitoquímico de <i>Combretum fruticosum</i> (Loefl.) Stuntz (Combretaceae).....	69
4.2.1 Coleta do material vegetal.....	69
4.2.2 Preparação do material vegetal de <i>Combretum fruticosum</i> (Loefl.) Stuntz	69

4.2.3	Obtenção do extrato etanólico bruto (EEB) das partes aéreas de <i>Combretum fruticosum</i> (Loefl.) Stuntz.....	69
4.2.4	Partição do extrato etanólico bruto (EEB) de <i>Combretum fruticosum</i> (Loefl.) Stuntz	70
4.2.5	Fracionamento cromatográfico da fase hexânica de <i>Combretum fruticosum</i> (Loefl.) Stuntz	71
4.2.6	Fracionamento cromatográfico da fase diclorometano de <i>Combretum fruticosum</i> (Loefl.) Stuntz	73
4.2.7	Fracionamento cromatográfico da fase AcOEt de <i>Combretum fruticosum</i> (Loefl.) Stuntz	77
4.3	Ensaio Biológicos.....	79
4.3.1	Avaliação da Atividade Antibacteriana e Antifúngica do EEB de <i>combretum fruticosum</i> (Loefl.) Stuntz.....	79
4.3.1.1	Microorganismos utilizados.....	79
4.3.1.2	Preparo dos meios de cultura	79
4.3.1.3	Preparo do inóculo contendo os microorganismos.....	80
4.3.1.4	Ensaio antimicrobiano <i>in vitro</i>	80
4.3.2	Avaliação da atividade antitumoral <i>in vitro</i> das substâncias CF1, CF2, CF3 e CF4	80
5	Resultados e discussão	83
5.1	Determinação estrutural de CF1	83
5.2	Determinação estrutural de CF2	90
5.3	Determinação estrutural de CF3.....	98
5.4	Determinação estrutural de CF4.....	105
5.5	Determinação estrutural de CF5.....	121
5.6	Determinação estrutural de CF6.....	129
5.7	Resultados do ensaios biológicos.....	137
5.7.1	Avaliação da atividade antimicrobiana do extrato etanólico bruto das partes aéreas de <i>Combretum fruticosum</i> (Loefl.) Stuntz	137
5.7.2	Avaliação da atividade antitumoral <i>in vitro</i> das substâncias CF1, CF2, CF e CF4.....	138
6	Conclusões	139

1 Introdução

Substâncias químicas derivadas de animais, plantas e microorganismos têm sido utilizadas para tratar doenças desde o início da medicina (KOEHN & CARTER, 2005). A terapêutica moderna, composta por medicamentos com ações específicas sobre receptores, enzimas e canais iônicos, não teria sido possível sem a contribuição dos produtos naturais, notadamente das plantas superiores, das toxinas animais e dos microorganismos (CALIXTO, 2003).

Duzentos anos atrás, um farmacêutico de apenas 21 anos, chamado Friedrich Sertürner, isolou das sementes da papoula, *Papaver somniferum*, o primeiro composto puro farmacologicamente ativo chamado morfina. Este fato deu início a uma nova era, onde substâncias oriundas de produtos naturais podiam ser purificadas, estudadas e administradas em doses precisas. (LI & VEDERAS, 2009).

A investigação de produtos naturais como fonte de novas terapias chegou ao seu auge na indústria farmacêutica ocidental no período de 1970 - 1980, o que resultou em um cenário farmacêutico maciçamente influenciado por moléculas não sintéticas (KOEHN & CARTER, 2005).

Perto de 1990, cerca de 80% das drogas eram provenientes de produtos naturais ou análogos inspirados neles. Antibióticos (ex: penicilina, tetraciclina, eritromicina), antiparasitários (ex: avermectina), antimaláricos (ex: quinina, artemisinina), agentes controladores de lipídios (ex: lovastatina e análogos), imunossupressores (ex: ciclosporina, rapamicina) e drogas anticancerígenas (ex: taxol, doxorubicina) revolucionaram a medicina. A expectativa de vida em boa parte do mundo, aumentou de cerca de 40 anos no começo do século XX para mais de 77 anos hoje (LI & VEDERAS, 2009).

Apesar da expansão da química medicinal sintética na década de 90 ter causado uma queda na proporção de novas substâncias baseadas em produtos naturais para em torno de 50 % (LI & VEDERAS, 2009), quando se trata das drogas anticancerígenas e dos antibióticos, por exemplo, esse percentual ainda chega a 70% (CALIXTO, 2003).

Para ter uma noção do impacto desses medicamentos no mercado mundial, um terço dos medicamentos mais prescritos e vendidos no mundo foram desenvolvidos a partir de produtos naturais e somente as estatinas foram responsáveis por um mercado de 19 bilhões em 2002 (CALIXTO, 2003).

Com tal sucesso, pode-se pensar que nesses últimos anos, a identificação de novos metabólitos a partir de organismos vivos seria o cerne dos esforços das indústrias, visando novas descobertas farmacêuticas. Contudo, muitas indústrias farmacêuticas têm eliminado sua pesquisa na área de produtos naturais na última década. Apesar de mais de 100 substâncias baseadas em produtos naturais estarem em estudos clínicos, isto representa uma queda de cerca de 30% relacionado ao período 2001-2008. (LI & VEDERAS, 2009).

Ao mesmo tempo, fatores como os avanços na biologia molecular, biologia celular, genômica (o que aumentou o número de alvos moleculares, diminuindo o tempo de descoberta de moléculas líderes), o desenvolvimento da química combinatória, e a diminuição do interesse das grandes companhias farmacêuticas em relação a terapia de doenças infecciosas (área tradicional dos produtos naturais) induziu as indústrias a se concentrarem na química sintética (KOEHN & CARTER, 2005).

Além disso, produção de novos medicamentos envolve elevados investimentos atrelados a um enorme risco. Somente para exemplificar, as estatísticas mostram que de cada 30 mil compostos sintetizados pelas indústrias, 20 mil (67%) entram nos estudos pré-clínicos; desses, 200 (0,67%) atingem a fase clínica I; 40 (0,13%) passam para a fase clínica II; e 12 (0,04%) chegam a fase clínica III. Apenas 8 deles (0,027%) são aprovados e em geral um (0,003%) consegue obter mercado satisfatório (CALIXTO, 2003).

Contudo, expectativas não realizadas pelas estratégias atuais da P&D, estão levando as indústrias farmacêuticas a um novo interesse pelos produtos naturais como fonte de diversidade química e de moléculas protótipo (KOEHN & CARTER, 2005).

É reconhecido que estruturas de produtos naturais têm as características de possuir alta diversidade química, especificidade bioquímica e outras propriedades moleculares que as fazem favoráveis a se tornarem estruturas protótipos quando se trata de descoberta de novos fármacos (KOEHN & CARTER, 2005).

Treze fármacos derivados de produtos naturais foram aprovados nos Estados Unidos entre 2005 e 2007, sendo 5 deles, representando os primeiros derivados de novas classes (LI & VEDERAS, 2009).

Os produtos naturais considerados interessantes derivam do fenômeno da biodiversidade. A consequência da interação da grande variedade de organismos entre eles e com o meio ambiente resultou na evolução de diversas moléculas naturais complexas produzidas por estes organismos, o que possibilitou sua sobrevivência e competitividade. Existem literalmente milhões de estruturas químicas naturais resultantes da química combinatória realizada pela mãe natureza, fornecendo uma diversidade química inimaginável, com estruturas complexas com diversos grupos funcionais, moléculas ideais para interagir especificamente com alvos biológicos (MCCHESENEY *et al*, 2007).

A natureza tem “feito” química combinatória por um longo período de tempo, não apenas uma década ou duas, e tem selecionado produtos desta quimioteca que possuem uma grande vantagem biológica (MCCHESENEY *et al*, 2007).

O Brasil possui a maior biodiversidade do mundo, estimada em cerca de 20 % do número total de espécies do planeta. Esse imenso patrimônio genético, já escasso nos países desenvolvidos, tem na atualidade valor econômico-estratégico inestimável em várias atividades, mas é no campo do desenvolvimento de novos medicamentos onde reside sua maior potencialidade (CALIXTO, 2003).

Dispomos, portanto, de um esplêndido acervo natural de vegetais nos ambientes aquáticos e terrestres; um potencial químico adormecido, inteiramente desproporcional ao esforço relativamente pequeno das pesquisas desenvolvidas para seu conhecimento e utilização (BRAZ-FILHO, 2009).

Estima-se a existência de cerca de 250 000 espécies de plantas superiores, onde apenas 5 a 10 % destas espécies foram investigadas, restando uma fonte natural de inúmeros organismos vivos contendo significativo número de substâncias inéditas e forte potencial de produtos naturais bioativos, incluindo-se fontes de matérias-primas para o desenvolvimento de novos fármacos (BRAZ FILHO, 2009).

Diante do exposto, evidenciou-se a importância e a necessidade do estudo das plantas medicinais, afim de obter novas moléculas bioativas. Portanto, tomou-se como objetivo de estudo, a espécie *Combretum fruticosum*, que pertence a família Combretaceae. Esta espécie já possui atividade farmacológica comprovada como: inibição da enzima 5-lipoxigenase (BRAGA *et al*, 2000) e inibição da enzima

conversora de angiotensina (BRAGA *et al*, 2007) . Existem também relatos de uso etnomedicinal de espécies do gênero *Combretum* contra doenças como: infecções bacterianas, úlceras gástricas, câncer, doenças venéreas, verminose, conjuntivite, dismenorréia, febre amarela, gripe, tuberculose etc (ELLOF *et al*, 2008).

Visto isso, ressalta-se a importância do estudo desta espécie, pois, mesmo possuindo estudo farmacológico e relatos de uso etnomedicinal do gênero, não existe nenhuma descrição detalhada no que diz respeito à identificação e elucidação estrutural de moléculas bioativas de *Combretum fruticosum*.

2 Objetivos:

2.1 Objetivo geral:

- Contribuir para o estudo quimiotaxonômico do gênero *Combretum* através do estudo fitoquímico da espécie *Combretum fruticosum*.

2.2 Objetivos específicos:

- Analisar fitoquimicamente o extrato etanólico das partes aéreas da espécie *Combretum fruticosum*.
- Identificar e ou elucidar a estrutura dos constituintes desta espécie, através de técnicas espectroscópicas.
- Avaliar a atividade antimicrobiana e antifúngica do extrato etanólico da espécie em estudo.
- Avaliar a atividade citotóxica das substâncias isoladas frente as células tumorais das linhagens sarcoma 180 e K562.

3 Fundamentação Teórica:

3.1 Considerações sobre a família Combretaceae

Combretaceae é uma família constituída por cerca de 20 gêneros e 600 espécies (PIETROVSKI *et al*, 2006), distribuídas em regiões tropicais e subtropicais do globo (TAN *et al*, 2002), com centros de diversidade na África e Ásia. As espécies desta família ocorrem em áreas que vão desde florestas úmidas e mangues até regiões semi-áridas. Diversificada, ela é representada por árvores de até 50m, cipós, arbustos e subarbustos (STACE, 2004).

Os três maiores gêneros desta família são : *Combretum*, *Terminalia* e *Quisqualis* (ELOFF *et al*, 2008). Os outros gênero são : *Anogeissus*, *Buchenavia*, *Bucida*, *Calopyxis*, *Conocarpus*, *Dansiea*, *Getonia*, *Guiera*, *Laguncularia*, *Lumnitzera*, *Macropteranthes*, *Meiostemon*, *Pteleopsis* , *Ramatuela*, *Strephonema*, *Terminaliopsis* e *Thiloa* (BRUMMITT, 1992)



Figura 1 : Mapa de distribuição da família Combretaceae (Missouri Botanical Garden)

Atualmente no Brasil, estima-se a ocorrência de 78 espécies, subordinadas a 6 gêneros (MARQUETE & VALENTE, 2006), já na Paraíba, foram

catalogadas 11 espécies pertencentes a 5 gêneros, são elas: *Buchenavia tetraphylla* (Aubl.) R. A. Howard, *Combretum duarteanum* Cambess., *C. fruticosum* (Loefl.) Stuntz, *C. glaucocarpum* Mart., *C. hilarianum* D. Dietr., *C. lanceolatum* Eichler, *C. laxum* Jacq., *C. leprosum* Mart, *C. pisonioides* Taub., *Conocarpus erectus* L. e *Laguncularia racemosa* (L.) C.F. Gaertn. (LOIOLA *et al* 2009).

Espécies de Combretaceae, não se destacam pelo valor econômico; poucas são cultivadas como ornamentais (*Quisqualis indica* L. e *Terminalia catappa*, por exemplo) (LOIOLA *et al*, 2009). Algumas são referidas pelo seu emprego na medicina popular africana, principalmente as do gênero *Combretum* e *Terminalia* (ELOFF *et al* 2008), e apenas as sementes dos frutos de *Terminalia catappa* (casatanhola ou amêndoa indiana) são empregadas como alimento na Índia (STACE, 2004).

No que se refere às suas características anatômicas e morfológicas, LOIOLA *et al* (2009), descrevem-nas da seguinte maneira:

Folhas – opostas, alternadas, espiraladas ou verticiladas, simples, pecioladas, sem estípulas; lâmina membranácea, cartácea, subcoriácea ou coriácea, inteira, penínérvea, elíptica, obelíptica, ovada, obovada, oblanceolada, lanceolada ou oblonga, glabrescente a cinéropubescente, com ou sem tricomas glandulares ou escamosos, peltados ou subsésseis, às vezes com nectários extraflorais.

Flores – 4-5-meras, actinomorfas ou raramente zigomorfas, epíginas ou raramente semiepíginas, monoclamídeas ou diclamídeas. Hipanto envolvendo o ovário, expandido para a parte superior. Lobos do cálice 4-5, simétricos, dispostos no ápice do hipanto superior, livres ou soldadas. Pétalas 4-5, quando presentes, ternissépalas, alvo-esverdeadas, amarelas ou avermelhadas, actinomorfas, livres; prefloração valvar ou imbricada. Disco nectarífero geralmente na base do hipanto superior. Ovário ínfero, unilocular; 2-6 óvulos, apicais, com placentação pêndula; estilete cilíndrico, geralmente filiforme sobre o disco nectarífero; estigma unctiforme, inconspícuo

Fruto – geralmente indeiscente, seco ou suculento, drupóide, nucóide ou betulídeo, 2-5 alas papiráceas a coriáceas, enrugadas; semente 1, endosperma ausente, embrião axial, ereto, cotilédones 2 (3), às vezes fusionados, variadamente plicados ou convolutos.

3.2 Considerações sobre o gênero *Combretum*

O gênero *Combretum* encontra-se inserido na família Combretaceae, é considerado o seu maior representante, pois ele é constituído por cerca de 370 espécies. Há diversos relatos do uso de suas espécies na medicina popular africana contra várias enfermidades (PIETROVSKI *et al*, 2006), como exemplo, ANGEH *et al* (2007) podem citar: dores abdominais, diarreia, dor nas costas, dor de cabeça, dor de ouvido, tosse, gripe, conjuntivite, dismenorréia, febre, doenças de pele, infertilidade feminina, ancilostomose, lepra, pneumonia, sífilis, picada de cobra e escorpião e fraqueza generalizada.

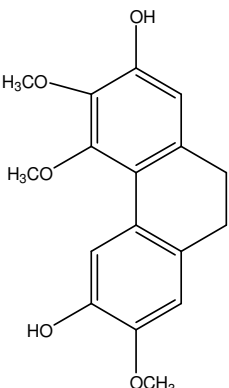
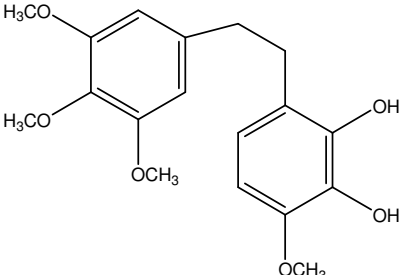
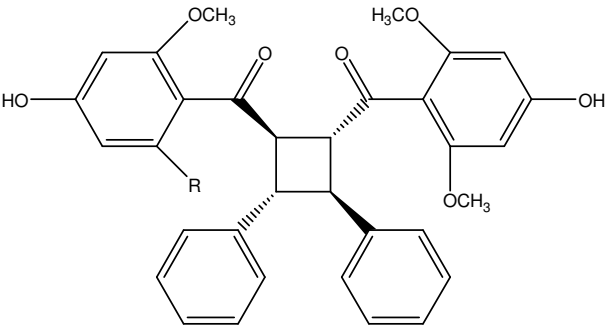
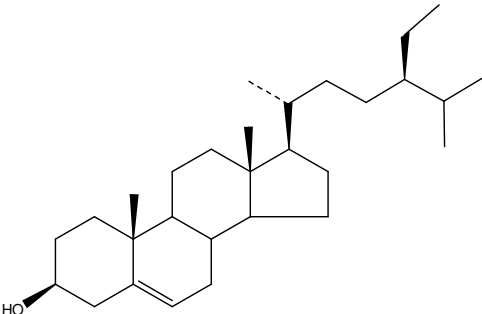


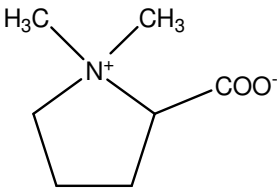
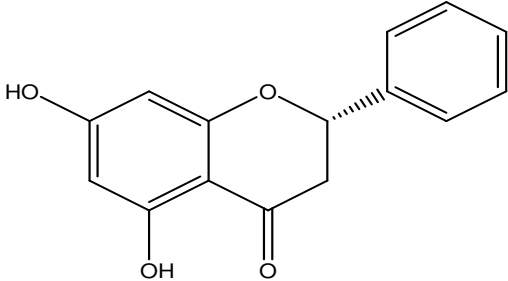
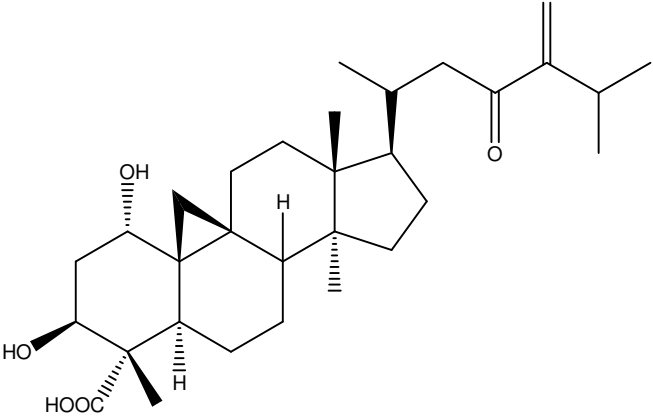
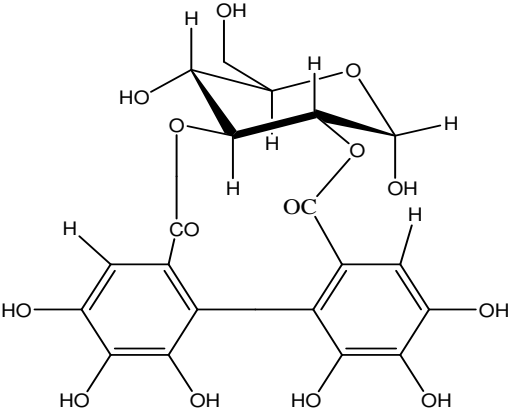
Figura 2 : Mapa de distribuição do gênero *Combretum* (Missouri Botanical Garden)

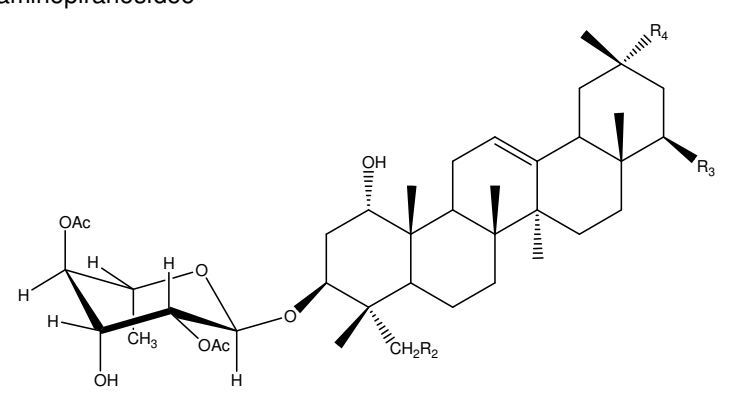
Foi demonstrando também que muitos extratos ou princípios ativos isolados de espécies do gênero *Combretum* possuem atividades biológicas de amplo espectro, como por exemplo: atividade bactericida, antiprotzoária, anticâncer, citotóxica, analgésica, antiinflamatória, hepatoprotetora e antiviral (PIETROVSKI *et al*, 2006).

Em relação aos constituintes químicos já isolados do gênero, podem ser citados: estilbenos, fenantrenos, flavonóides, taninos, ciclobutanos, saponinas, alcalóides, terpenos e esteróides (ELOFF *et al*, 2008). (Quadro 1)

Quadro 1: Constituintes químicos isolados de espécies do gênero *Combretum*

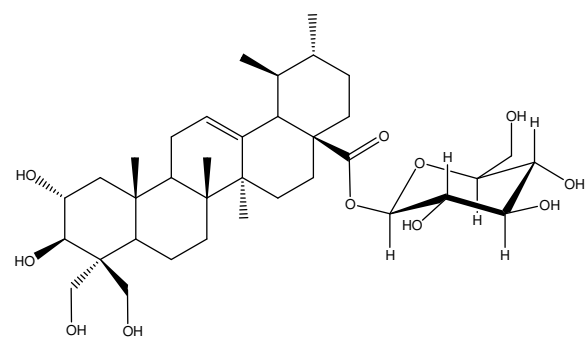
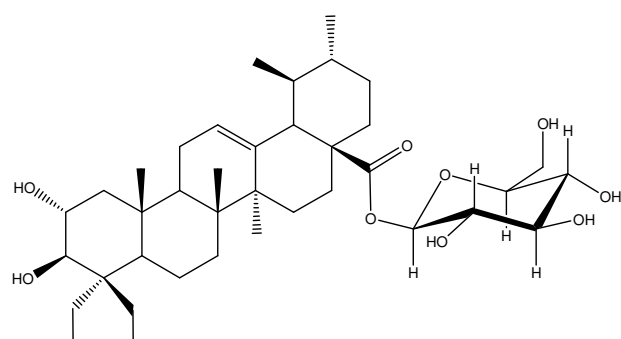
<p>2,6-dihidroxi-3,4,7-dimetoxi-9,10-dihidrofenantreno</p> 	<p><i>C.apiculatum</i></p>	<p>LETCHER & NHAMO, 1971</p>
<p>Combrestatina B-1</p> 	<p><i>C.kraussi</i></p>	<p>BROOKES, 1999</p>
<p>Rel-(1α,2β)-Di-(2,6-dimetoxi-4-hidroxi)-benzoi-rel-(3α,4β)-difenilciclobutano</p>  <p>R=OCH3</p>	<p><i>C.albopunctatum</i></p>	<p>KATERERE et al, 2004</p>
<p>β-sitosterol</p> 	<p><i>C.kraussi</i> <i>C.quadrangulare</i></p>	<p>BROOKES, 1999 BANSKOTA et al, 2000a</p>

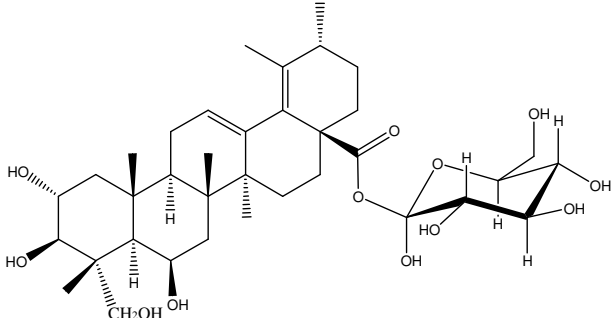
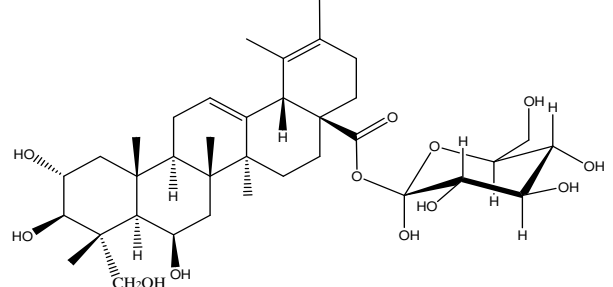
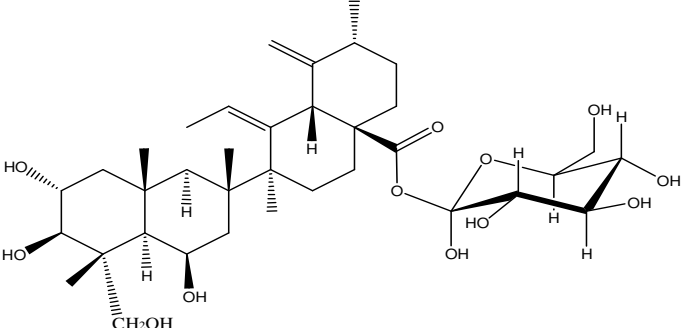
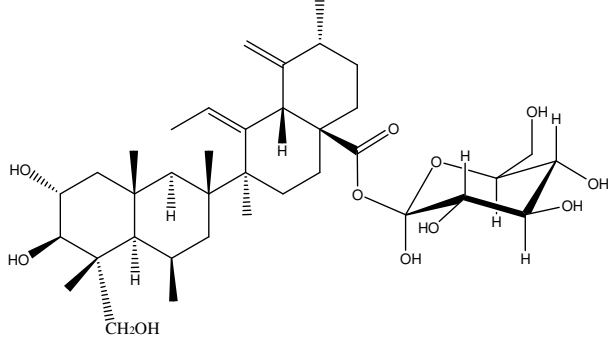
<p>Estaquidrina</p> 	<p><i>C. micranthum</i></p>	<p>BASSENE et al, 1986</p>
<p>5,7-dihidroxi-flavanona</p> 	<p><i>C.albopunctatum</i></p>	<p>KATERERE et al, 2004</p>
<p>Acido Jéssico</p> 	<p><i>C.elaeagnoides</i></p>	<p>OSBORNE & PEGEL, 1984</p>
<p>2,3-(S)-hexahidroxidifenol-D-glicose</p> 	<p><i>C.glutinsum</i></p>	<p>JOSSANG et al, 1994</p>

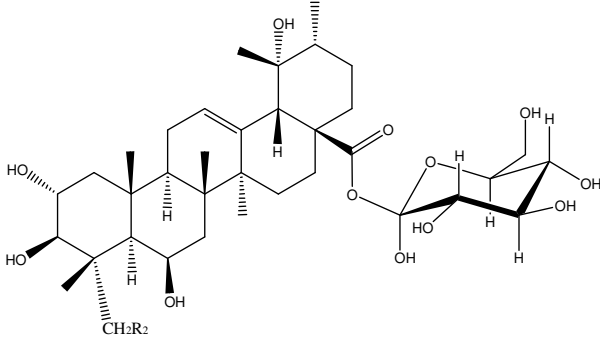
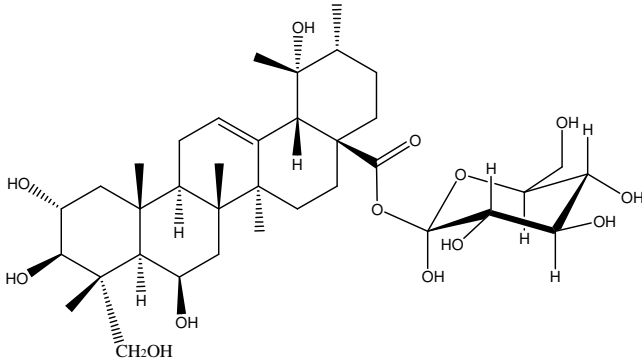
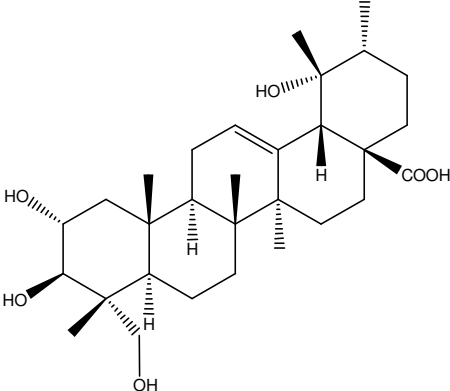
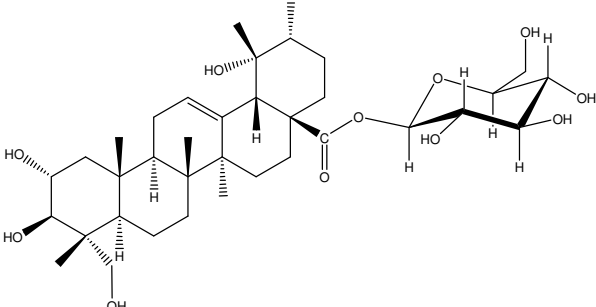
<p>Ácido 1α,23-dihidroxi-12-oleanen-29-oico 3β-O- 2,4-diacetil-L-raminopiranosídeo</p>  <p>R2= OH, R3= H, R4= COOH</p>	<p><i>C.imberbe</i></p>	<p>ANGEH et al, 2007a</p>
--	-------------------------	---------------------------

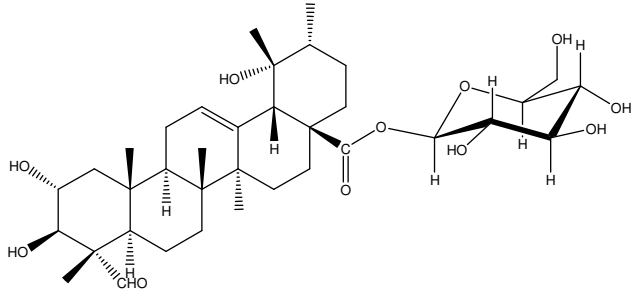
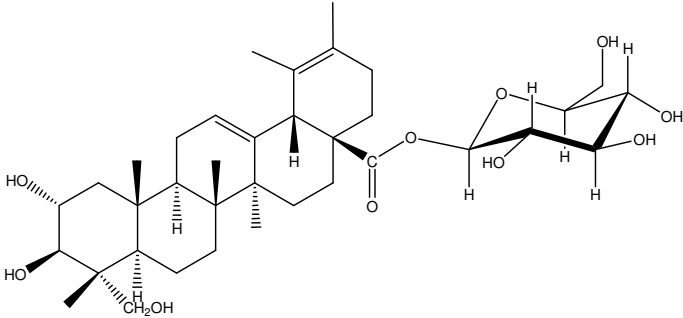
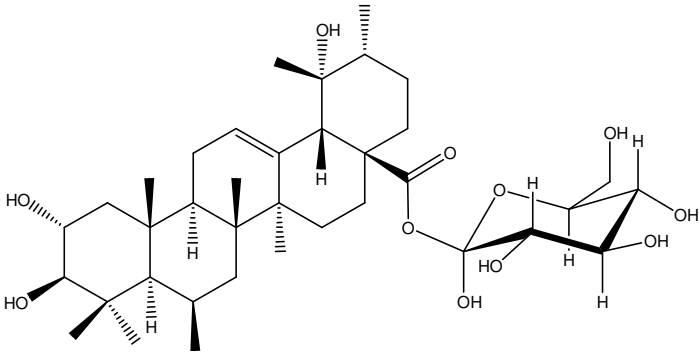
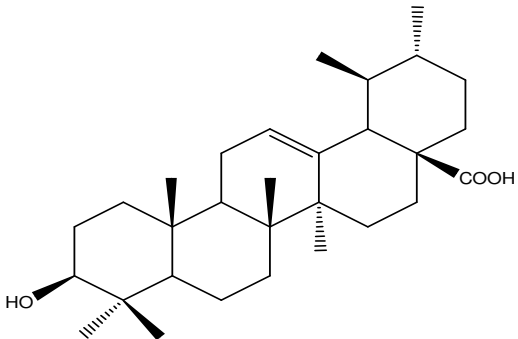
3.2.1 Revisão bibliográfica do gênero *Combretum* (esteróides e terpenos)

Quadro 2: Terpenos isolados de espécies do gênero *Combretum*: série ursano

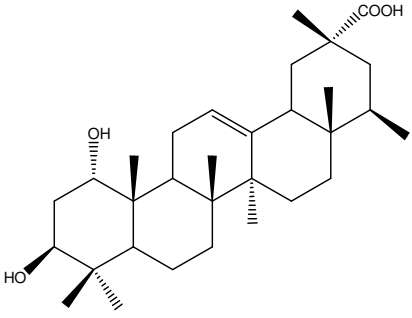
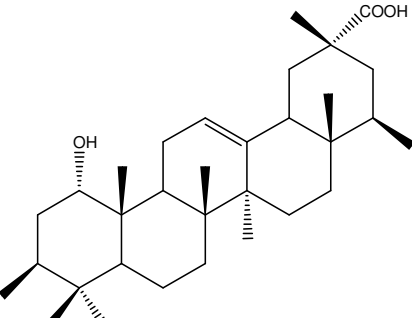
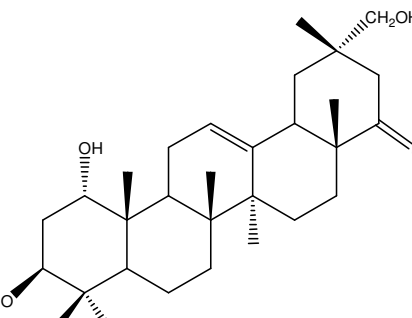
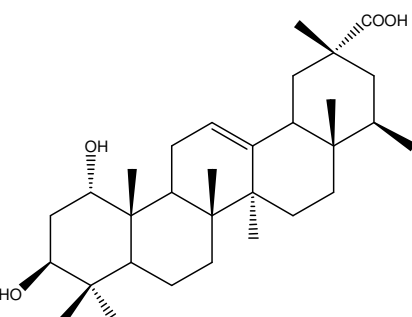
<p>β-D-glicopiranosil 2α,3β,23,24-tetrahidroxiurs-12-en-28-oato</p> 	<p><i>C.laxum</i></p>	<p>BISOLI et al, 2008</p>
<p>Quadransídeo IV</p> 	<p><i>C.laxum</i> <i>C.quadrangulare</i></p>	<p>BISOLI et al, 2008 ADNYANA et al, 2000a</p>

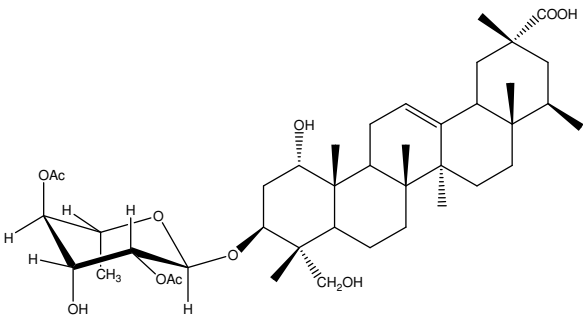
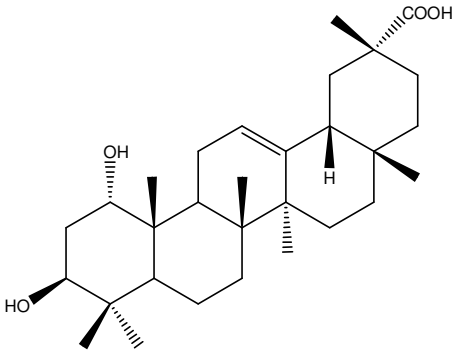
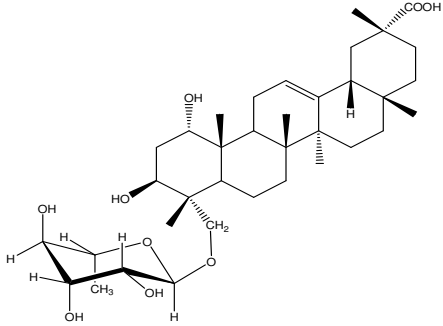
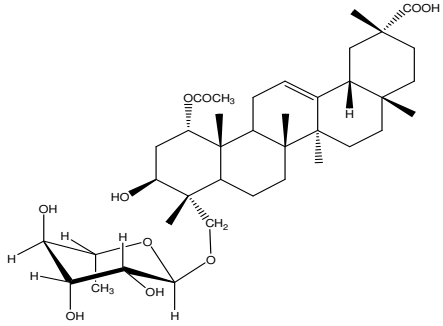
<p>Quadranosídeo V</p> 	<p><i>C. quadrangulare</i></p>	<p>ADNYANA <i>et al</i>, 2000a</p>
<p>Quadranosídeo VI</p> 	<p><i>C. quadrangulare</i></p>	<p>ADNYANA <i>et al</i>, 2000b</p>
<p>Quadranosídeo VII</p> 	<p><i>C. quadrangulare</i></p>	<p>ADNYANA <i>et al</i>, 2000b</p>
<p>Quadranosídeo VIII</p> 	<p><i>C. quadrangulare</i></p>	<p>ADNYANA <i>et al</i>, 2000b</p>

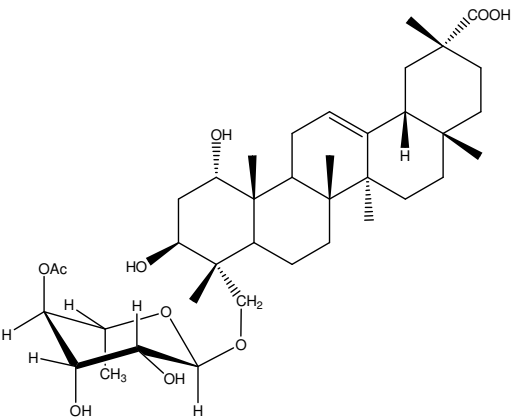
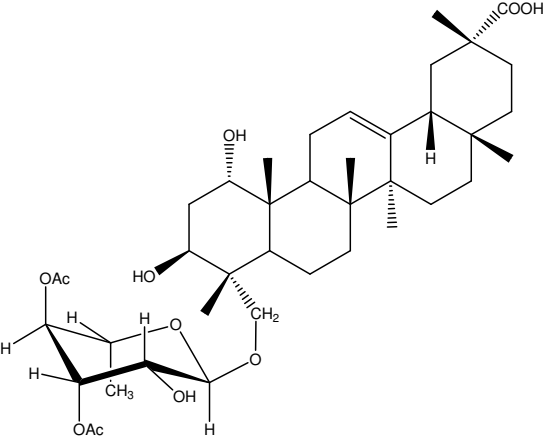
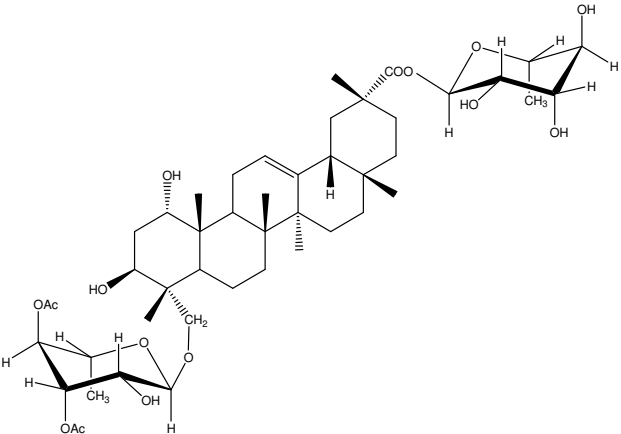
<p>Quadranosídeo IX</p>  <p>R2=O-galoil</p>	<p><i>C. quadrangulare</i></p>	<p>ADNYANA <i>et al</i>, 2000b</p>
<p>Ácido 28-O-β-D-glicopiranosil-6β,23-diidroxitormêntico</p> 	<p><i>C. quadrangulare</i></p>	<p>ADNYANA <i>et al</i>, 2000b</p>
<p>Ácido 19-α-hidroxiasiático</p> 	<p><i>C. quadrangulare</i></p>	<p>ADNYANA <i>et al</i>, 2000a</p>
<p>Nigaiquigosídeo</p> 	<p><i>C. quadrangulare</i></p>	<p>ADNYANA <i>et al</i>, 2000a</p>

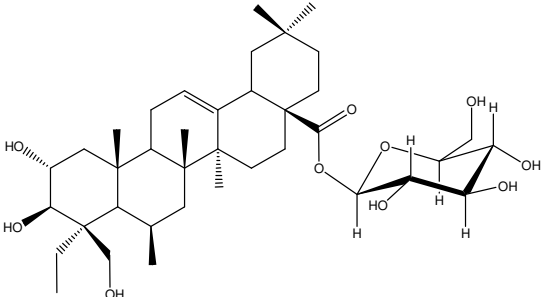
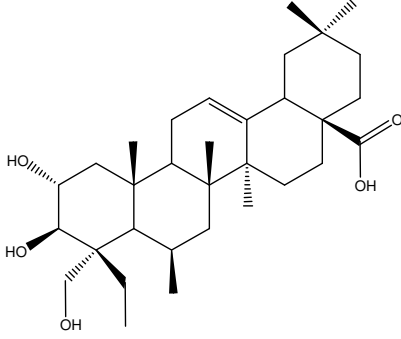
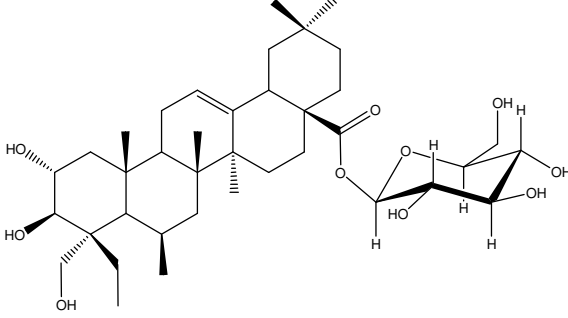
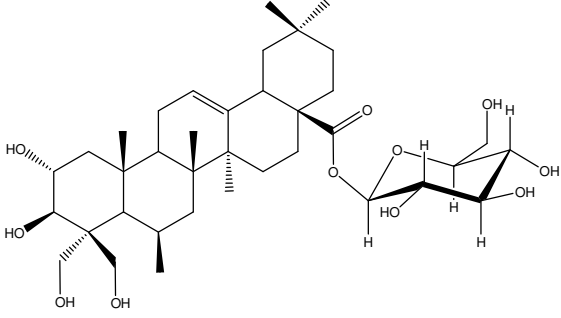
<p>Pinfaensina</p> 	<p><i>C. quadrangulare</i></p>	<p>ADNYANA <i>et al</i>, 2000a</p>
<p>Ácido 2α,3β,23-trihidroxiurs-12,19-dien-28-óico β - D-glicopiranosil éster</p> 	<p><i>C. quadrangulare</i></p>	<p>ADNYANA <i>et al</i>, 2000a</p>
<p>Rosamutina</p> 	<p><i>C. quadrangulare</i></p>	<p>ADNYANA <i>et al</i>, 2000b</p>
<p>Ácido Ursólico</p> 	<p><i>C. zeyheri</i></p>	<p>BREYTENBACH & MALAN, 1989</p>

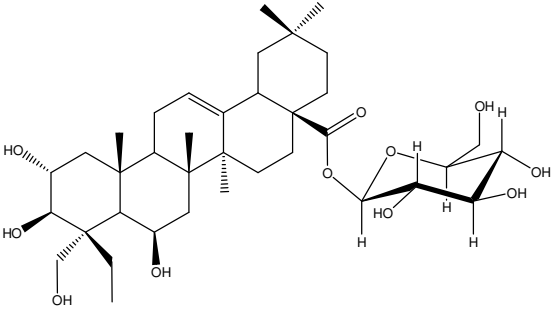
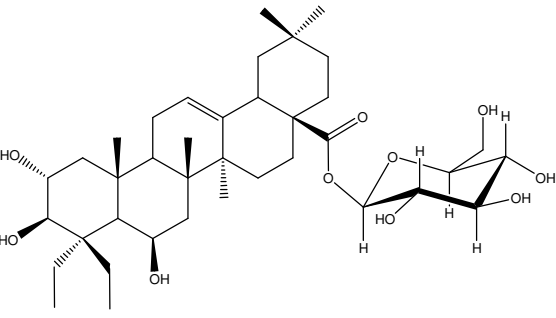
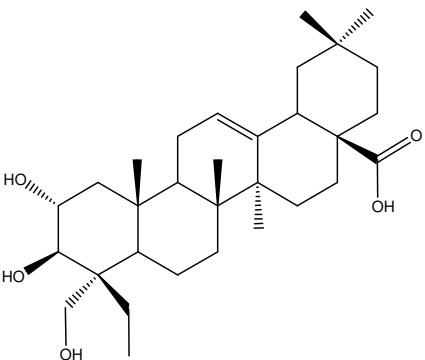
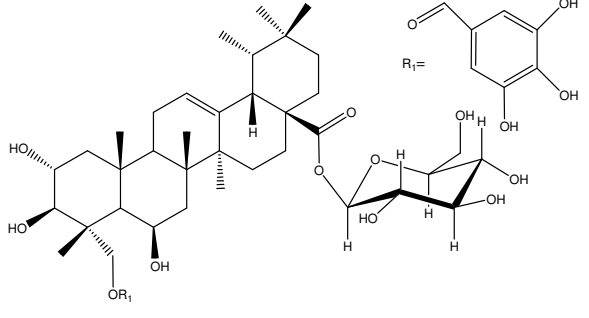
Quadro 3: Terpenos isolados de espécies do gênero *Combretum*: série oleanano

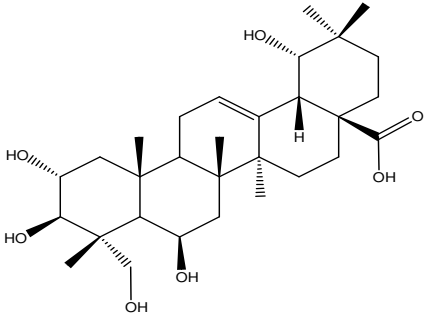
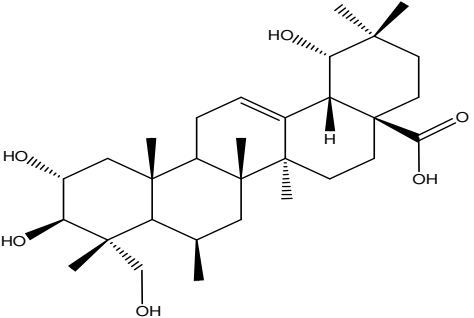
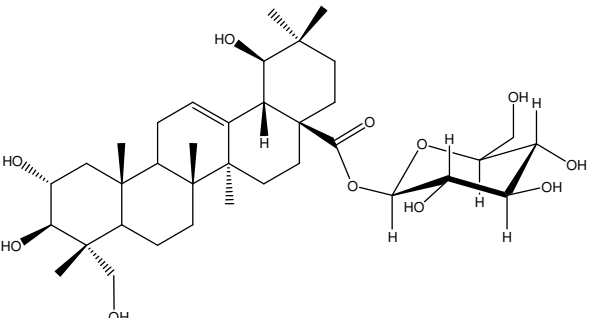
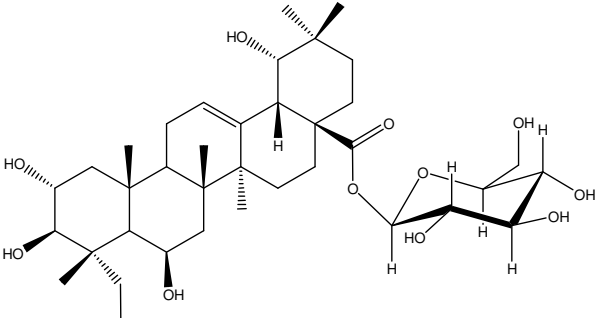
<p>Ácido 1α,3β-dihidroxi-12-oleanen-29-óico</p>  <p>The structure shows a pentacyclic oleanane skeleton with a double bond between C12 and C13. It features a hydroxyl group at C1 (dashed), a hydroxyl group at C3 (wedged), and a carboxylic acid group at C29 (dashed). Methyl groups are present at C4, C14, and C19.</p>	<p><i>C.imberbe</i></p>	<p>ANGEH <i>et al</i>, 2007a</p>
<p>Ácido 1-hidroxi-12-olean-30-óico</p>  <p>The structure shows a pentacyclic oleanane skeleton with a double bond between C12 and C13. It features a hydroxyl group at C1 (dashed) and a carboxylic acid group at C30 (dashed). Methyl groups are present at C4, C14, and C19.</p>	<p><i>C.imberbe</i></p>	<p>ANGEH <i>et al</i>, 2007a</p>
<p>3,30-dihidroxi-12-oleanen-22-ona</p>  <p>The structure shows a pentacyclic oleanane skeleton with a double bond between C12 and C13. It features hydroxyl groups at C3 (wedged) and C30 (dashed), and a primary hydroxyl group at C22 (wedged). Methyl groups are present at C4, C14, and C19.</p>	<p><i>C.imberbe</i></p>	<p>ANGEH <i>et al</i>, 2007a</p>
<p>Ácido 1,3,24-trihidroxi-12-olean-29-óico</p>  <p>The structure shows a pentacyclic oleanane skeleton with a double bond between C12 and C13. It features hydroxyl groups at C1 (dashed), C3 (wedged), and C24 (wedged), and a carboxylic acid group at C29 (dashed). Methyl groups are present at C4, C14, and C19.</p>	<p><i>C.imberbe</i></p>	<p>ANGEH <i>et al</i>, 2007a</p>

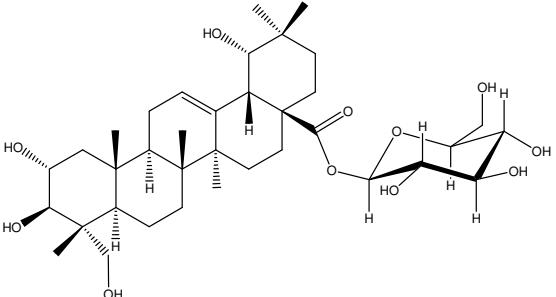
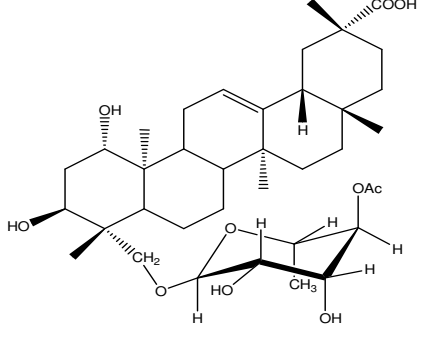
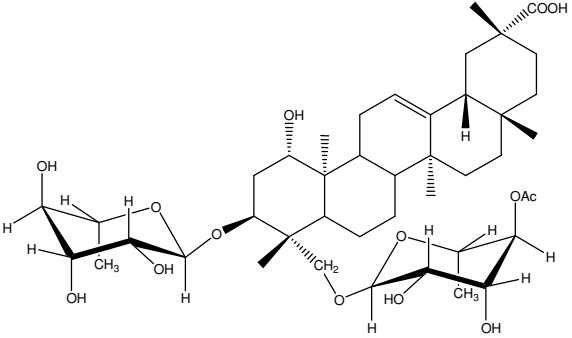
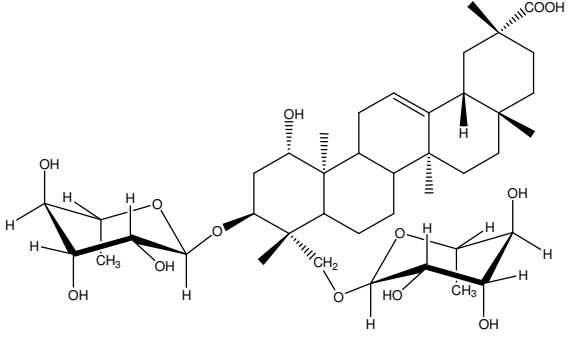
<p>Ácido 1α,23-dihidroxi-12-oleanen-29-oico 3β-O-2,4-diacetil-L-raminopiranosídeo</p> 	<p><i>C.imberbe</i></p>	<p>ANGEH <i>et al</i>, 2007a</p>
<p>Ácido imbérbico</p> 	<p><i>C.imberbe</i></p> <p><i>C.imberbe</i></p>	<p>ROGERS, 1988</p> <p>KATERERE <i>et al</i>, 2003</p>
<p>Ácido 23-hidroxiimbérbico 23-O-α-L-raminopiranosídeo</p> 	<p><i>C.imberbe</i></p>	<p>ROGERS, 1988</p>
<p>Ácido 23-hidroxiimbérbico 23-O-α-L-raminopiranosídeo 1-acetato</p> 	<p><i>C.imberbe</i></p>	<p>ROGERS, 1988</p>

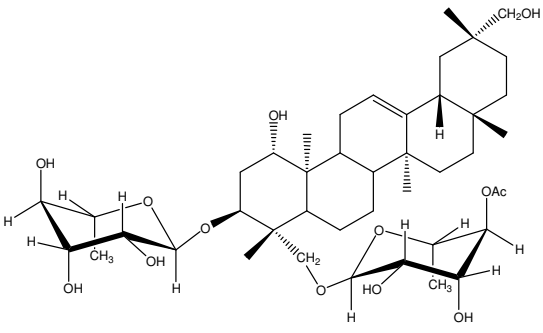
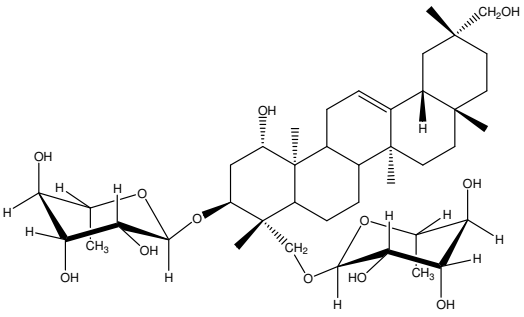
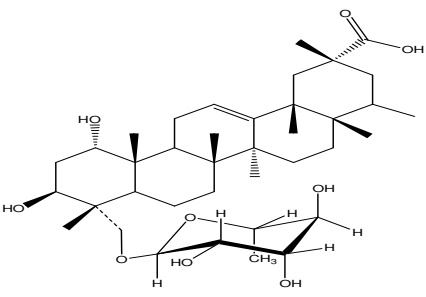
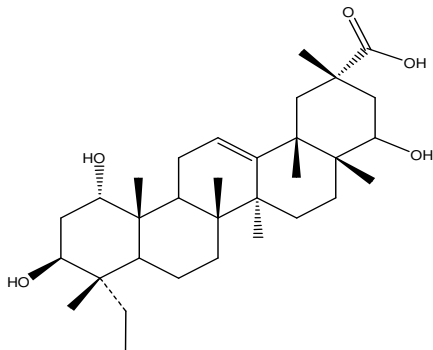
<p>1α,3,β,23-trihidroxi-olean-12-en-29-oato-23-O-α-L-4-acetilraminopiranosídeo</p> 	<p><i>C.imberbe</i></p>	<p>KATERERE <i>et al</i>, 2003</p>
<p>1α,3,β-trihidroxi-olean-12-en-29-oato-23-O-α-L-3,4-acetilraminopiranosídeo</p>  <p style="text-align: right;">R1=H</p>	<p><i>C.imberbe</i></p>	<p>KATERERE <i>et al</i>, 2003</p>
<p>1α,3,β,23-trihidroxi-olean-12-en-29-oato-23-O-α-L-3,4-acetil-29-diraminopiranosídeo</p> 	<p><i>C.imberbe</i></p>	<p>KATERERE <i>et al</i>, 2003</p>

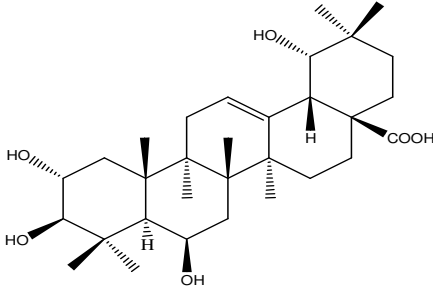
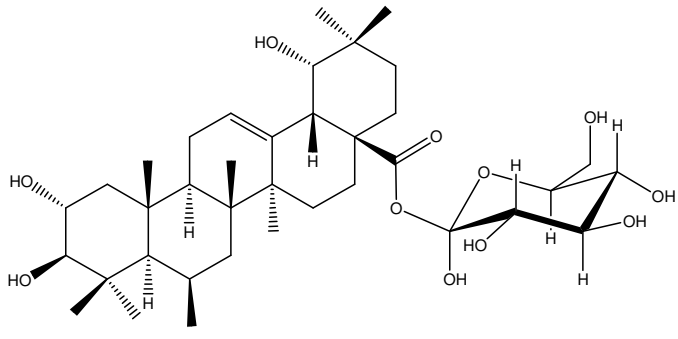
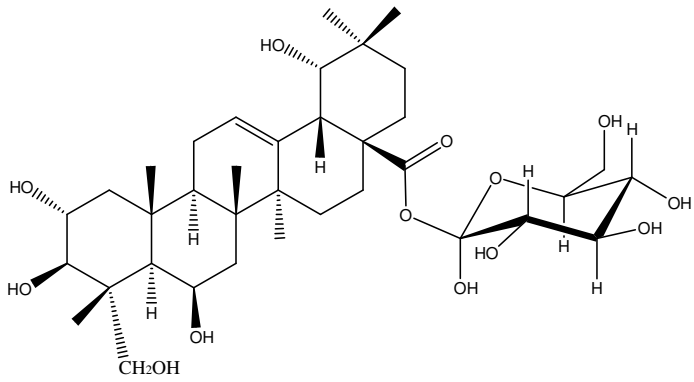
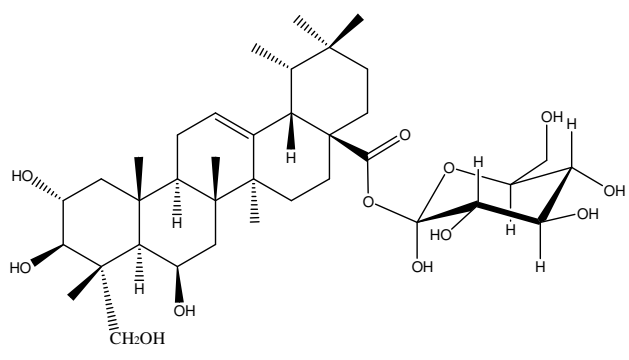
<p>β-D-glicopiranosil 2α,3β,24-trihidroxiolean-12-en-28-oato</p>  <p>R=H,R1=OH,R2=H</p>	<p><i>C.laxum</i></p>	<p>BISOLI <i>et al</i>, 2008</p>
<p>Ácido Arjunólico</p> 	<p><i>C.laxum</i></p> <p><i>C.leprosum</i></p> <p><i>C. leprosum</i></p> <p><i>C.nelsonii</i></p>	<p>BISOLI <i>et al</i>, 2008</p> <p>FACUNDO <i>et al</i>, 2008</p> <p>FACUNDO <i>et al</i>, 1993</p> <p>MASOKO <i>et al</i>, 2008</p>
<p>Arjunglicosídeo II</p> 	<p><i>C.laxum</i></p> <p><i>C. quadrangulare</i></p>	<p>BISOLI <i>et al</i>, 2008</p> <p>ADNYANA <i>et al</i>, 2000b</p>
<p>Belericosídeo</p> 	<p><i>C.laxum</i></p>	<p>BISOLI <i>et al</i>, 2008</p>

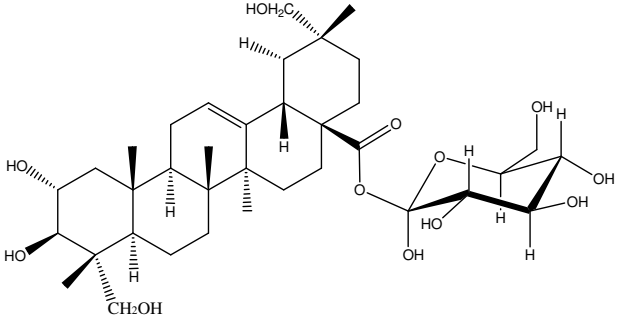
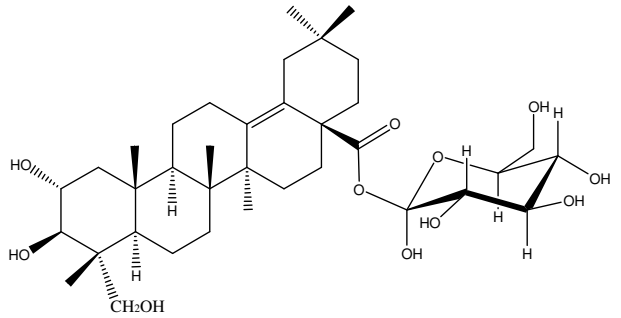
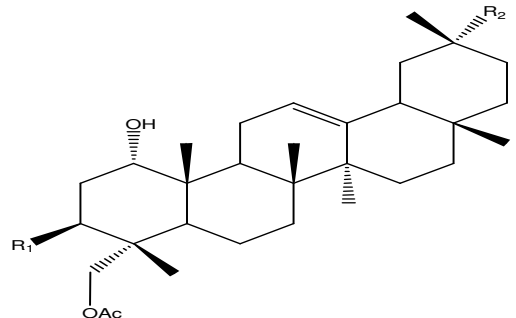
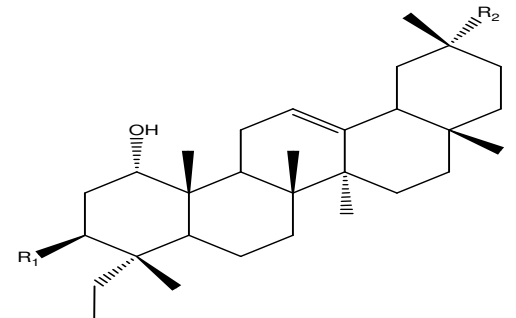
<p>Quebulosídeo</p> 	<p><i>C.laxum</i></p>	<p>BISOLI <i>et al</i>, 2008</p>
<p>β-D-glicopiranosil 2α,3β,6β-trihidroiolean-12-en-28-oato</p> 	<p><i>C.laxum</i></p>	<p>BISOLI <i>et al</i>, 2008</p>
<p>Ácido asiático</p> 	<p><i>C.laxum</i> <i>C.nelsonii</i></p>	<p>BISOLI <i>et al</i>, 2008 MASOKO <i>et al</i>, 2008</p>
<p>β-D-glicopiranosil 2α,3β,6β-trihidroxi-23-galoilolean-12-en-oato</p> 	<p><i>C.molle</i></p>	<p>PONOU <i>et al</i>, 2008</p>

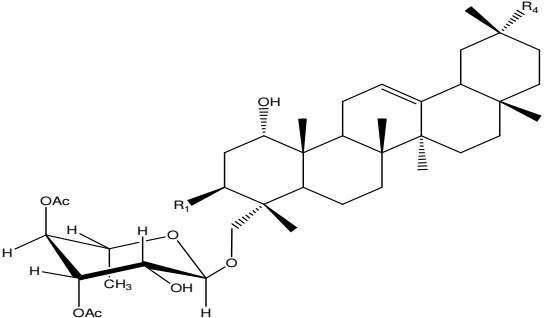
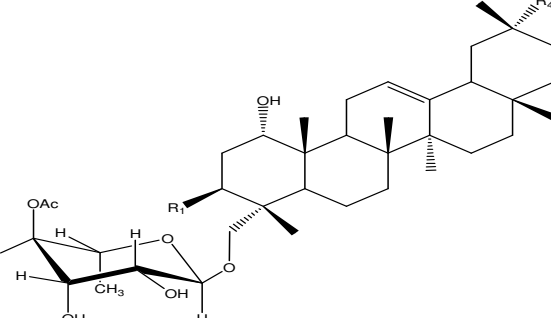
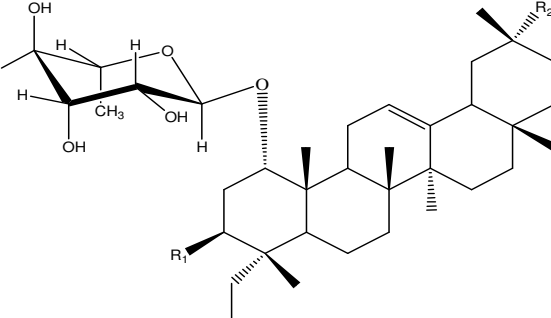
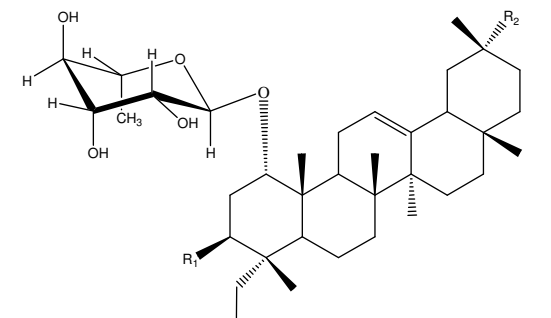
<p>Combregenina</p> 	<p><i>C.molle</i></p> <p><i>C.nigricans</i></p>	<p>PONOU <i>et al</i> 2008</p> <p>JOSSANG <i>et al</i>, 1996</p>
<p>Arjungenina</p> 	<p><i>C.molle</i></p> <p><i>C.nigricans</i></p> <p><i>C.quadrangulare</i></p>	<p>PONOU <i>et al</i> 2008</p> <p>JOSSANG <i>et al</i>, 1996</p> <p>ADNYANA <i>et al</i>, 2000a</p>
<p>Arjunglicosídeo I</p> 	<p><i>C.molle</i></p> <p><i>C.molle</i></p> <p><i>C. molle</i></p> <p><i>C.nigricans</i></p> <p><i>C. quadrangulare</i></p>	<p>ASRES <i>et al</i>, 2001</p> <p>PONOU <i>et al</i>, 2008</p> <p>PANZINI <i>et al</i>, 1993</p> <p>JOSSANG <i>et al</i>, 1996</p> <p>ADNYANA <i>et al</i>, 2000a</p>
<p>Combreglicosídeo</p>  <p>R1=H, R2=R3=OH</p>	<p><i>C.molle</i></p> <p><i>C.nigricans</i></p>	<p>PONOU <i>et al</i> 2008</p> <p>JOSSANG <i>et al</i>, 1996</p>

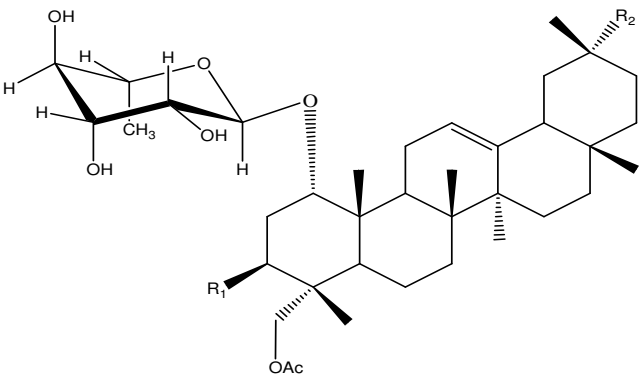
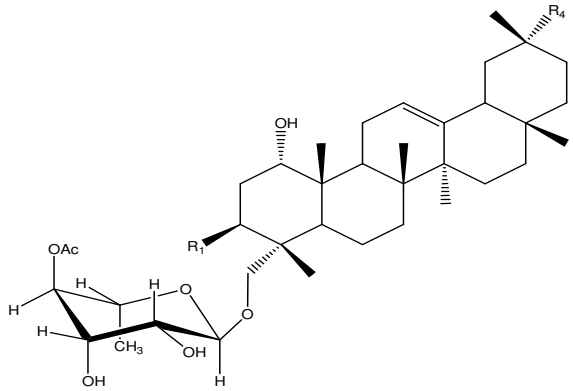
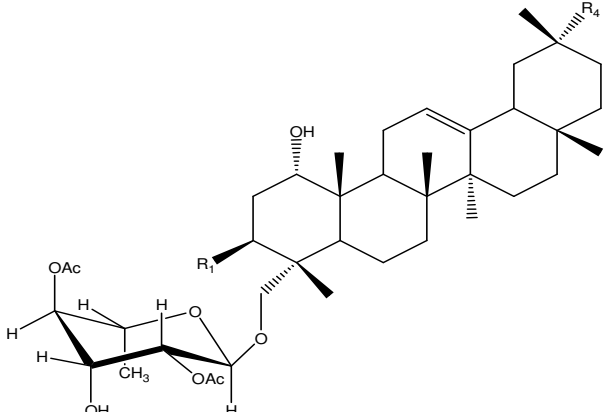
<p>Sericosídeo</p> 	<p><i>C.molle</i></p>	<p>ASRES <i>et al</i>, 2001</p>
<p>Ácido 23-hidroxiimbérbico 23-O-α-L-4-acetilramnopiranosídeo</p> 	<p><i>C.padoides</i></p> <p><i>C. padoides</i></p>	<p>ROGERS, 1989b</p> <p>PANZINI <i>et al</i>, 1993</p>
<p>Ácido 23-hidroxiimbérbico 3-O-α-L-ramnopiranosil-23-O-α-L-4-acetilramnopiranosídeo</p> 	<p><i>C.padoides</i></p> <p><i>C. padoides</i></p>	<p>ROGERS, 1989b</p> <p>PANZINI <i>et al</i>, 1993</p>
<p>Ácido 23-hidroxiimbérbico 3-O-α-L-ramnopiranosil-23-O-α-L-ramnosídeo</p> 	<p><i>C.padoides</i></p> <p><i>C. padoides</i></p>	<p>ROGERS, 1989b</p> <p>PANZINI <i>et al</i>, 1993</p>

<p>1α,3β,23,29-tetrahidroxiolean-12-eno 3-O-α-L-ramnopiranosil-23-O-α-L-4-acetilramnopiranosídeo</p> 	<p><i>C.padoides</i></p>	<p>ROGERS, 1989b</p>
<p>1α,3β,23,29-tetrahidroxiolean-12-eno 3-O-α-L-ramnopiranosil-23-O-α-L-ramnopiranosídeo</p> 	<p><i>C.padoides</i></p>	<p>ROGERS, 1989b</p>
<p>Ácido 1α,23β-dihidroxi-12-oleanen-29-oico-23β-O-α-L-4-acetilramnopiranosídeo</p> 	<p><i>C.padoides</i></p>	<p>ANGEH <i>et al</i>, 2007b</p>
<p>Ácido 1,22-dihidroxi-12-oleanen-30-óico</p> 	<p><i>C.padoides</i></p>	<p>ANGEH <i>et al</i>, 2007b</p>

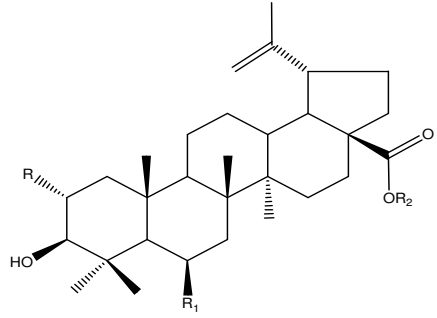
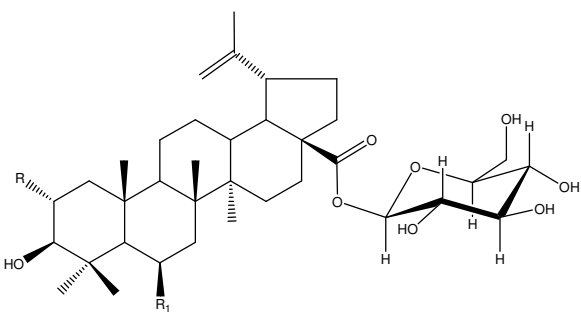
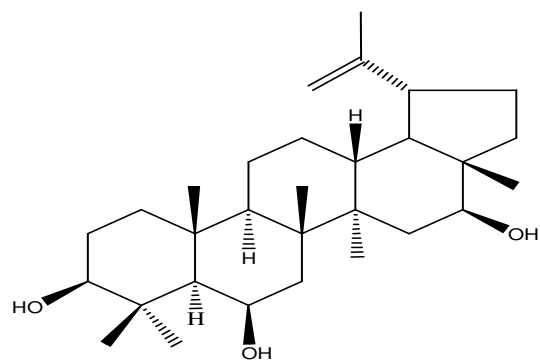
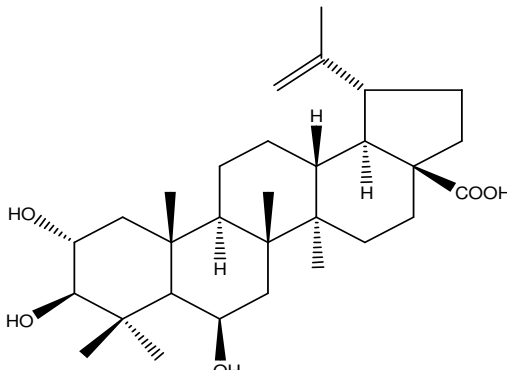
<p>Ácido 6β-hidroxiarjúnico</p> 	<p><i>C. quadrangulare</i></p>	<p>ADNYANA <i>et al</i>, 2001</p>
<p>Arjunetina</p> 	<p><i>C. quadrangulare</i> <i>C. molle</i></p>	<p>ADNYANA <i>et al</i>, 2000b PANZINI <i>et al</i>, 1993</p>
<p>Combreglicosídeo</p> 	<p><i>C. quadrangulare</i></p>	<p>ADNYANA <i>et al</i>, 2000b</p>
<p>Quebulosídeo II</p> 	<p><i>C. quadrangulare</i></p>	<p>ADNYANA <i>et al</i>, 2000b</p>

<p>Quadranosideo III</p> 	<p><i>C. quadrangulare</i></p>	<p>ADNYANA <i>et al</i>, 2000a</p>
<p>Quadranosideo X</p> 	<p><i>C. quadrangulare</i></p>	<p>ADNYANA <i>et al</i>, 2000b</p>
<p>Ácido 23-acetoxi-3β-acetilimbérbico</p>  <p>R1 = OAc, R2 = COOH</p>	<p><i>C. sundaicum</i></p>	<p>LITAUDON <i>et al</i>, 2009</p>
<p>Ácido 23-Acetoxiimbérbico 29-metil éster</p>  <p>R1 = OH, R2 = COOCH₃</p>	<p><i>C. sundaicum</i></p>	<p>LITAUDON <i>et al</i>, 2009</p>

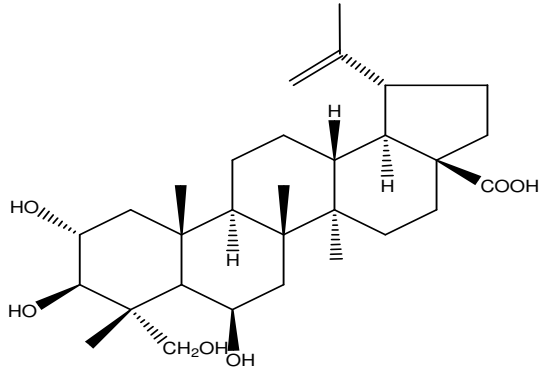
<p>Ácido 23-O-[α-L-(3',4'-Diacetilramnopiranosil)]-3β-acetilimbérbico</p>  <p>R1=OAc, R4=COOH</p>	<p><i>C.sundaicum</i></p>	<p>LITAUDON <i>et al</i>, 2009</p>
<p>Ácido 23-O-[α-L-(4'-Acetilramnopiranosil)]-3β-acetilimbérbico</p>  <p>R1=OAc, R4=COOH</p>	<p><i>C.sundaicum</i></p>	<p>LITAUDON <i>et al</i>, 2009</p>
<p>Ácido 1-O-[α-L-(Ramnopiranosil)]-23-acetoxi-3β-acetilimbérbico</p>  <p>R1= OAc, R2= COOH</p>	<p><i>C.sundaicum</i></p>	<p>LITAUDON <i>et al</i>, 2009</p>
<p>Ácido 1-O-[α-L-(Ramnopiranosil)]-23-acetoxiimbérbico 29-metil éster</p>  <p>R1= OH, R2= COOCH3</p>	<p><i>C.sundaicum</i></p>	<p>LITAUDON <i>et al</i>, 2009</p>

<p>Ácido 1-O-[α-L-(Ramnopiranosil)-23-acetoxi-3β-acetilimbérico 29-metil éster</p>  <p>R1= OAc, R2= COOCH₃</p>	<p><i>C.sundaicum</i></p>	<p>LITAUDON <i>et al</i>, 2009</p>
<p>Acido 23-O-[α-L-(4'-Acetilramnopiranosil)-3β-acetilimbérico 29-metil éster</p>  <p>R1=OAc, R4=COOCH₃</p>	<p><i>C.sundaicum</i></p>	<p>LITAUDON <i>et al</i>, 2009</p>
<p>Acido 23-O-[α-L-(2',4'-Diacetilramnopiranosil)] imbérico</p>  <p>R1=OH, R4=COOH</p>	<p><i>C.sundaicum</i></p>	<p>LITAUDON <i>et al</i>, 2009</p>

Quadro 4: Terpenos isolados de espécies do gênero *Combretum*: série lupano

<p>Ácido Betulínico</p>  <p>R=H, R1=H, R2=H</p>	<p><i>C.laxum</i></p> <p><i>C.quadrangulare</i></p>	<p>BISOLI <i>et al</i>, 2008</p> <p>BANSKOTA <i>et al</i>,2000a</p>
<p>Quadranosídeo I</p>  <p>R=OH, R1=OH</p>	<p><i>C.laxum</i></p> <p><i>C. quadrangulare</i></p>	<p>BISOLI <i>et al</i>, 2008</p> <p>ADNYANA <i>et al</i>, 2000a</p>
<p>3β,6β,16β-trihidroxi-lup-20(29)-eno</p> 	<p><i>C. leprosum</i> MART</p> <p><i>C. leprosum</i></p>	<p>FACUNDO <i>et al</i>, 2008</p> <p>FACUNDO <i>et al</i>, 1993</p>
<p>Ácido 2α,6β-dihidroxibetulínico</p> 	<p><i>C.quadrangulare</i></p>	<p>ADNYANA <i>et al</i>, 2001</p>

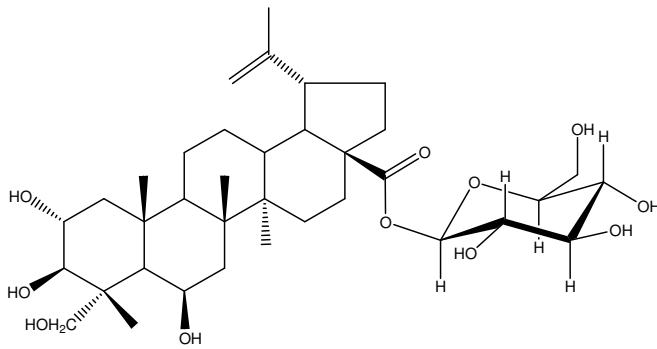
Ácido 6β-hidroxiiovênico



C. quadrangulare

ADNYANA *et al*, 2001

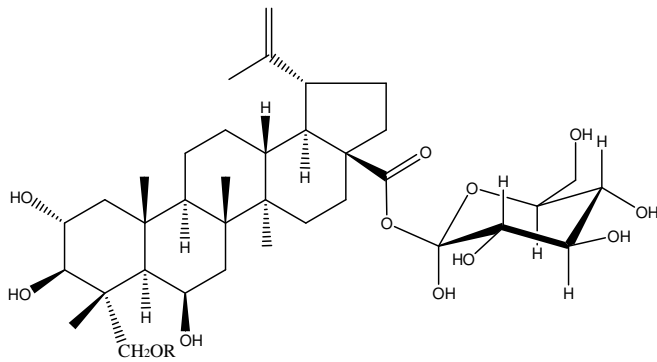
Quadranosídeo II



C. quadrangulare

ADNYANA *et al*, 2000a

Quadranosídeo XI

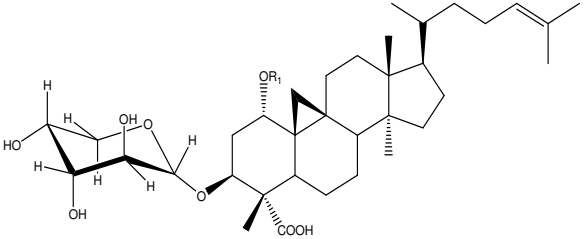
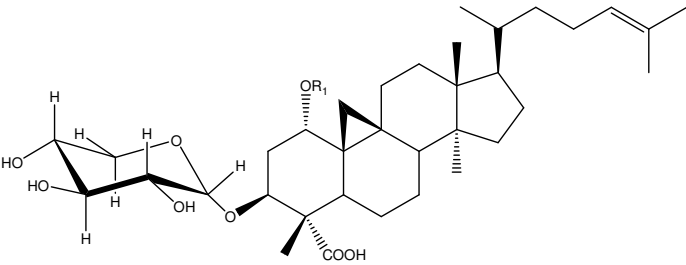
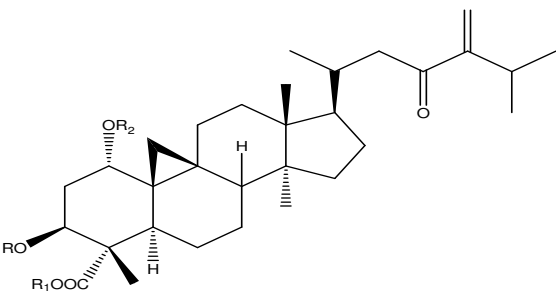
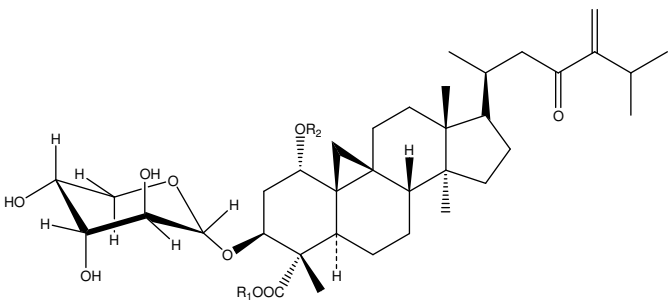


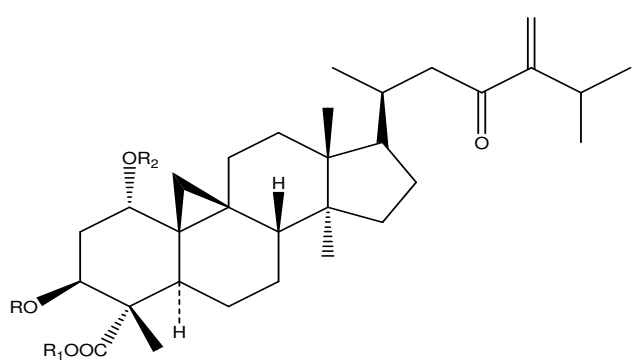
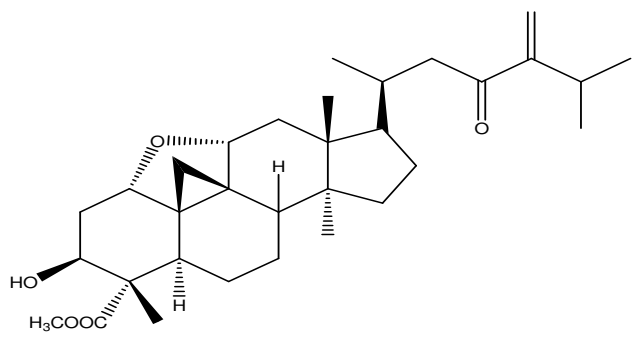
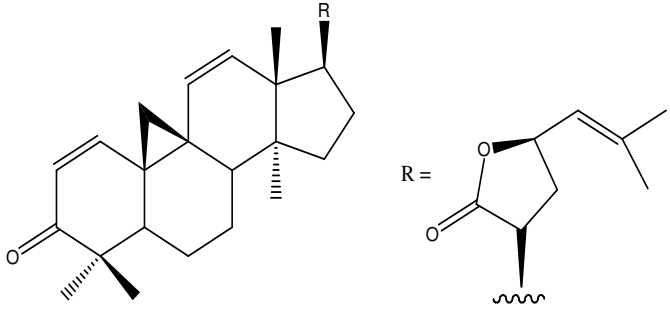
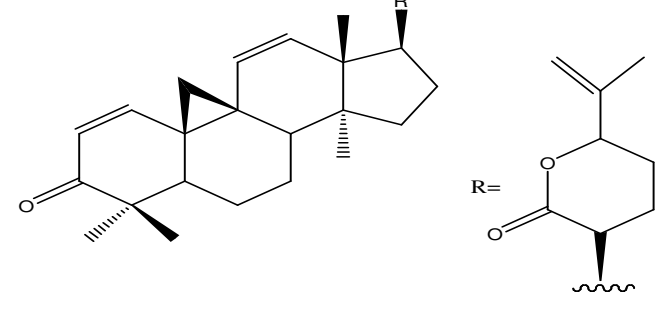
R= galoil

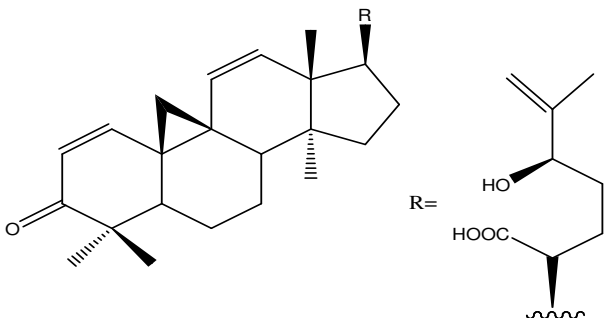
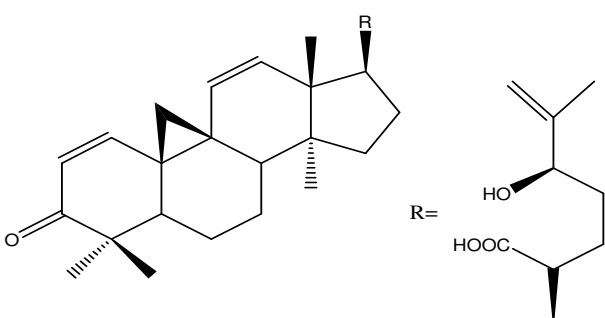
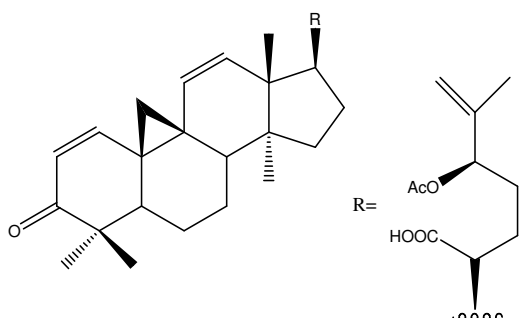
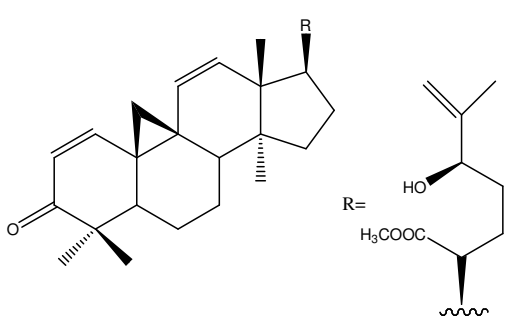
C. quadrangulare

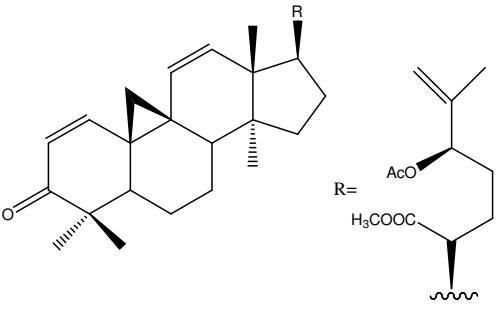
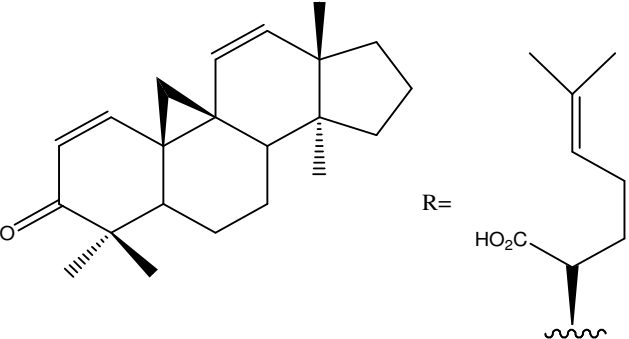
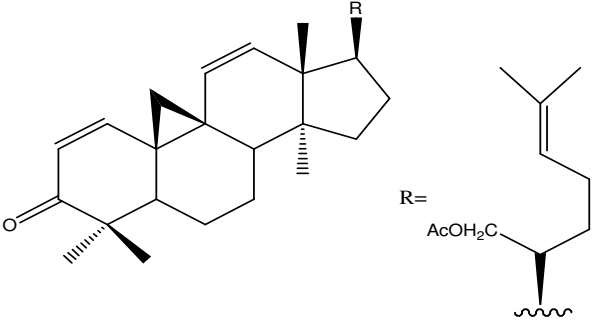
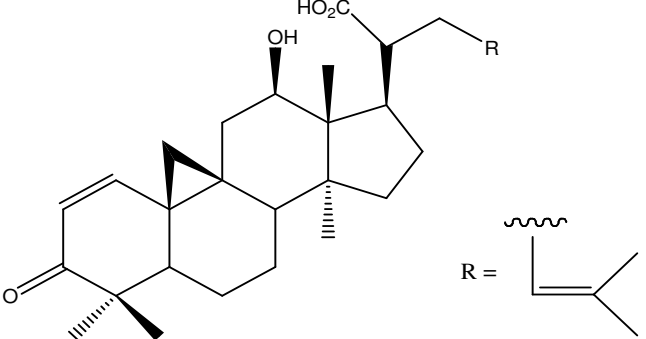
ADNYANA *et al*, 2000b

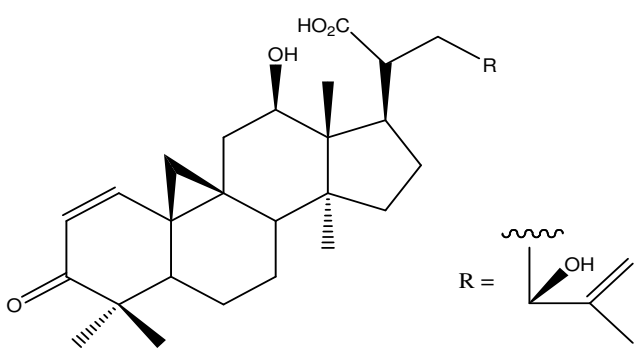
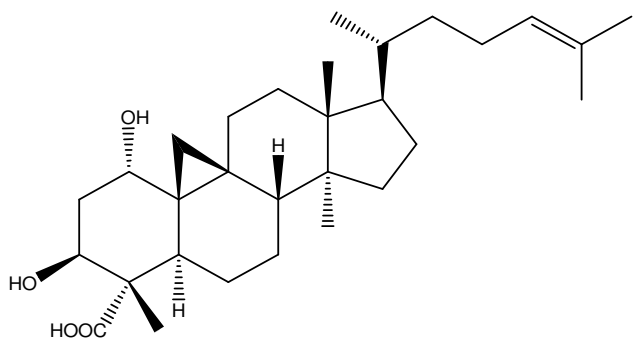
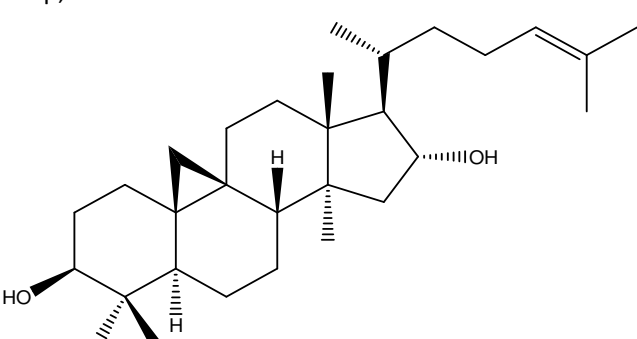
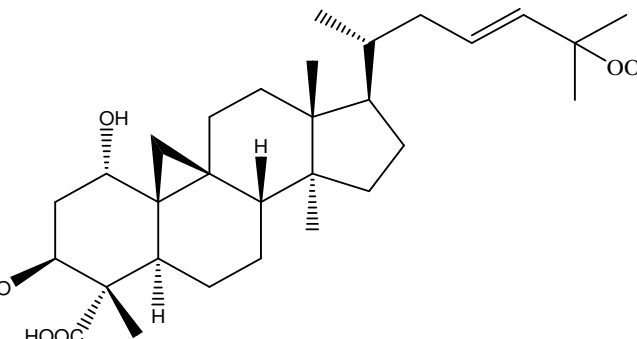
Quadro 5 : Terpenos isolados de espécies do gênero *Combretum*: série cicloartano

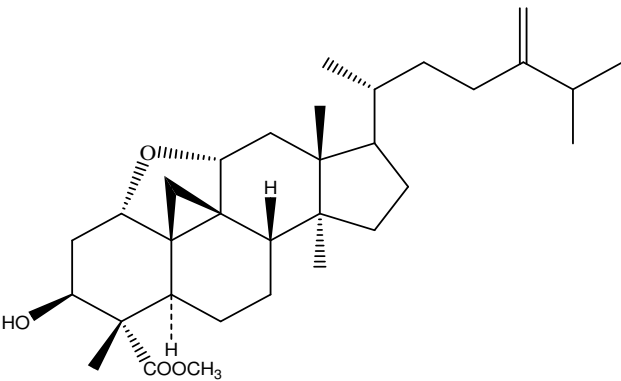
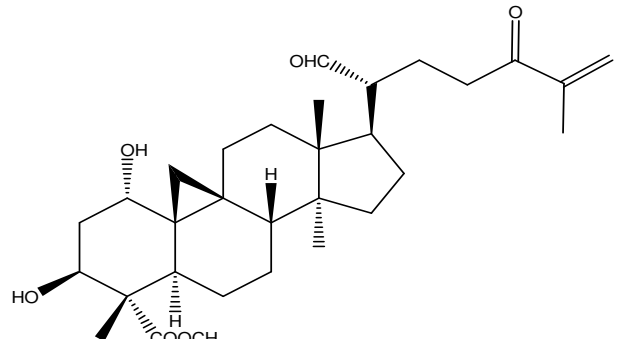
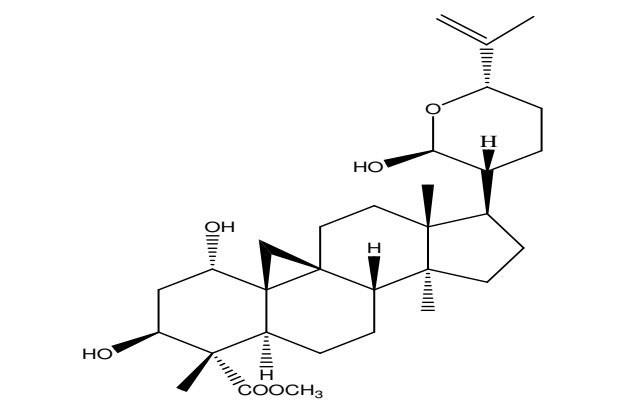
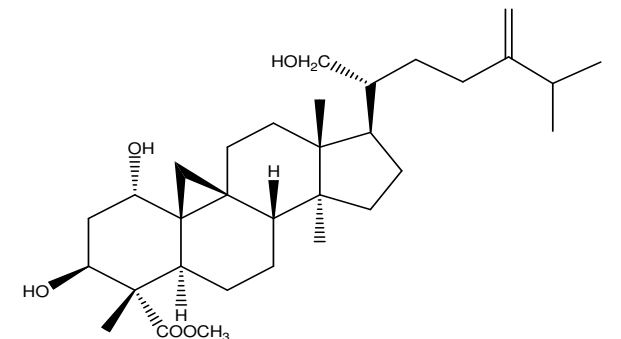
<p>Ácido mólico 3-O-α-L-arabinopiranosídeo</p>  <p style="text-align: right;">$R_1 = H$</p>	<p><i>C.edwardsii</i></p> <p><i>C.collinum</i></p>	<p>ROGERS, 1989a</p> <p>ROGERS & COOMBES, 1999</p>
<p>Ácido mólico 3-O-β-D-xilopiranosídeo</p>  <p style="text-align: right;">$R_1 = H$</p>	<p><i>C.edwardsii</i></p> <p><i>C. molle</i></p> <p><i>C. molle</i></p>	<p>ROGERS, 1989a</p> <p>ROGERS & THEVAN, 1986</p> <p>PANZINI et al, 1993</p>
<p>Ácido Jéssico</p>  <p style="text-align: right;">$R=R_1=R_2= H$</p>	<p><i>C.elaeagnoides</i></p>	<p>OSBORNE & PEGEL, 1984</p>
<p>Ácido Jéssico α-L-arabinopiranosídeo</p>  <p style="text-align: right;">$R_1=R_2= H$</p>	<p><i>C.elaeagnoides</i></p>	<p>OSBORNE & PEGEL, 1984</p>

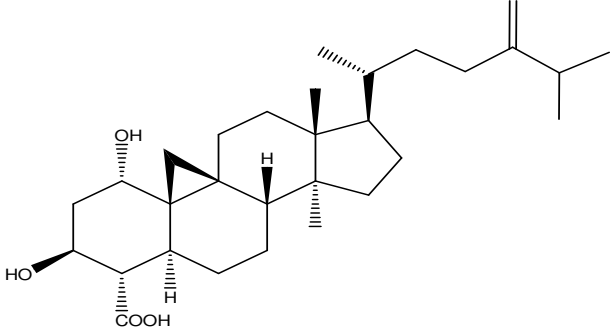
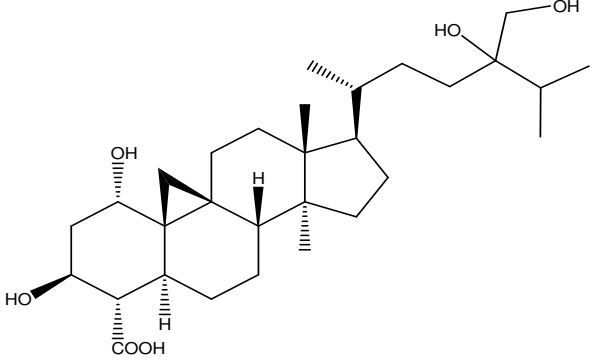
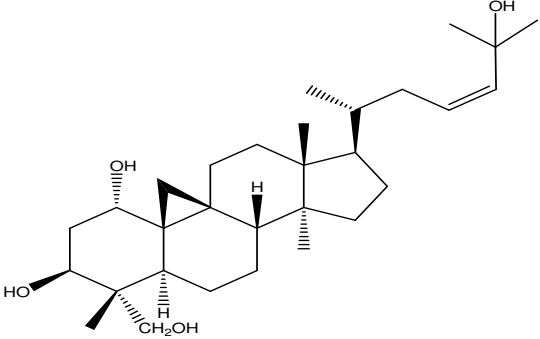
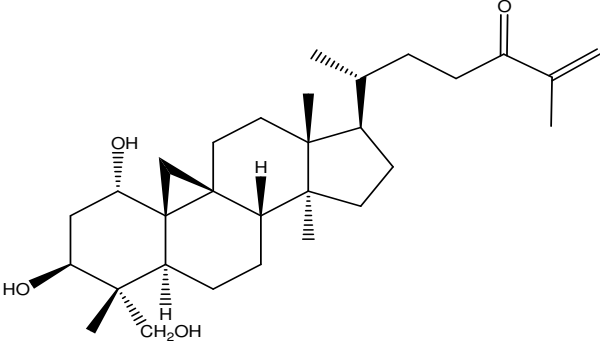
<p>Metil jessato</p>  <p>R=R2= H, R1= CH3</p>	<p><i>C. elaeagnoides</i></p>	<p>OSBORNE & PEGEL, 1984</p>
<p>Óxido 1α,11α - metiljessato</p> 	<p><i>C. elaeagnoides</i></p>	<p>OSBORNE & PEGEL, 1985</p>
<p>3-oxo-cicloart-1,11,24-trien-23,21-olídio</p> 	<p><i>C. erythrophyllum</i></p>	<p>ROGERS, 1998</p>
<p>3-oxo-cicloart-1,11,25(26)-trien-24(R),21-olídio</p> 	<p><i>C. erythrophyllum</i></p>	<p>ROGERS, 1998</p>

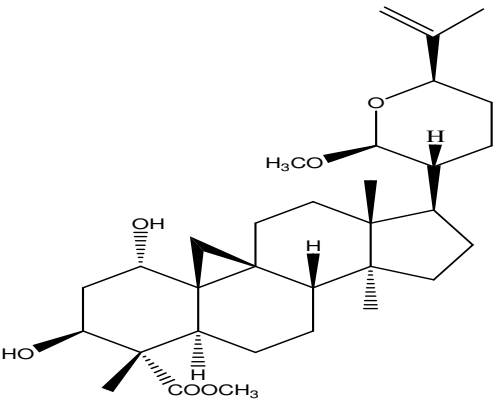
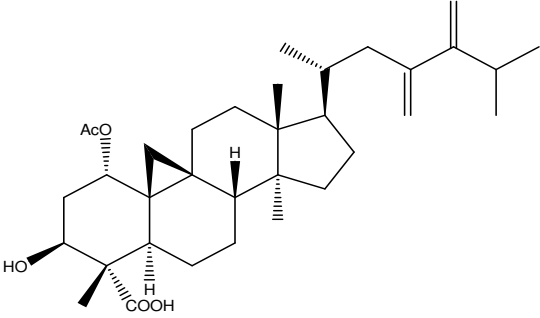
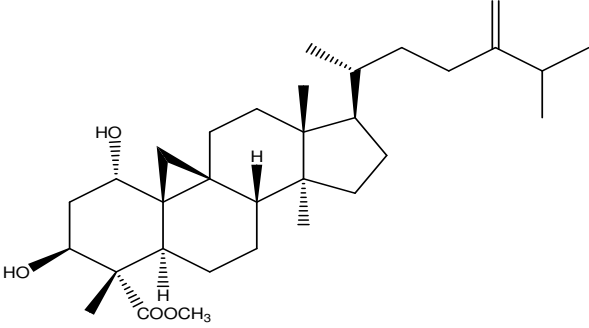
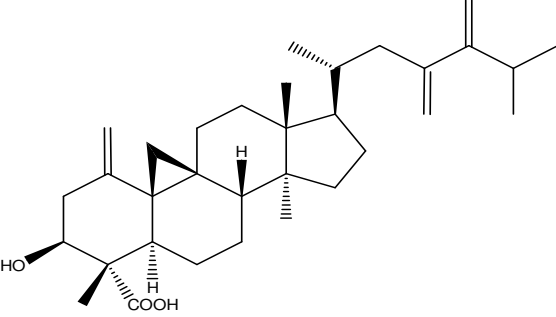
<p>Ácido 24(R/S)-hidroxi-3-oxo-cicloart-1,11,25(26)-trien-21-óico</p> 	<p><i>C.erythrophyllum</i></p>	<p>ROGERS, 1998</p>
<p>Ácido 24(R/S)-hidroxi-3-oxo-cicloart-1,11,25(26)-trien-21-óico</p> 	<p><i>C.erythrophyllum</i></p>	<p>ROGERS, 1998</p>
<p>Ácido 24(R/S)-acetoxi-3-oxo-cicloart-1,11,25(26)-trien-21-óico</p> 	<p><i>C.erythrophyllum</i></p>	<p>ROGERS, 1998</p>
<p>Metil-24(R/S)-hidroxi-3-oxo-cicloart-1,11,25(26)-trien-21-oato</p> 	<p><i>C.erythrophyllum</i></p>	<p>ROGERS, 1998</p>

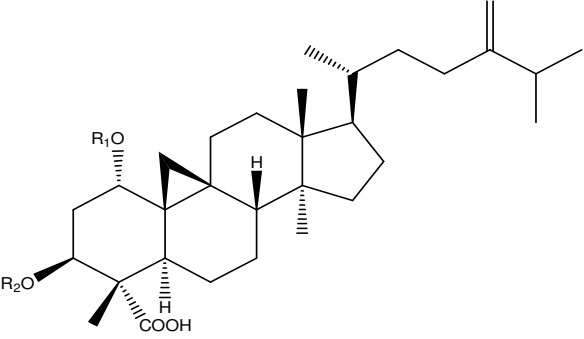
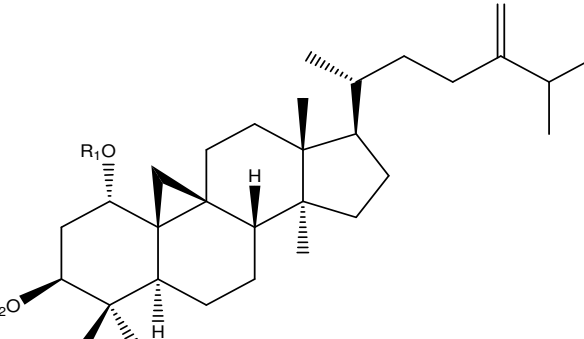
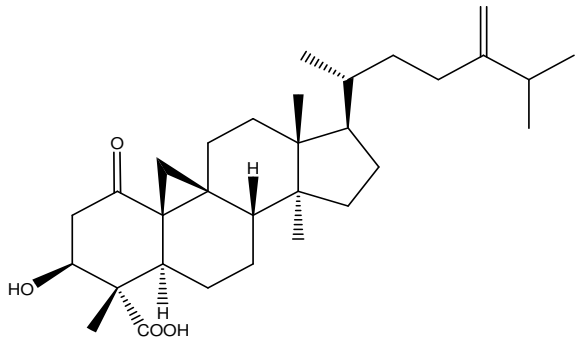
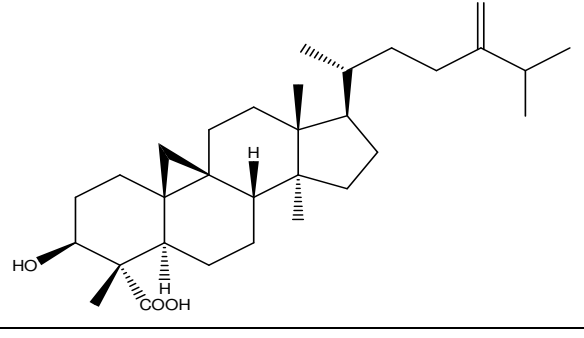
<p>Metil-24(R/S)-acetoxi-3-oxo-cicloart-1,11,25(26)-trien-21-oato</p> 	<p><i>C.erythrophyllum</i></p>	<p>ROGERS, 1998</p>
<p>Ácido eritrofilico</p> 	<p><i>C.erythrophyllum</i></p>	<p>ROGERS, 1998</p>
<p>21-acetoxi-3-oxo-cicloart-1,11,24-trieno</p> 	<p><i>C.erythrophyllum</i></p>	<p>ROGERS, 1998</p>
<p>Ácido 12β-hidroxi-3-oxo-cicloart-1,24-dien-21-óico</p> 	<p><i>C.erythrophyllum</i></p>	<p>ROGERS, 1998</p>

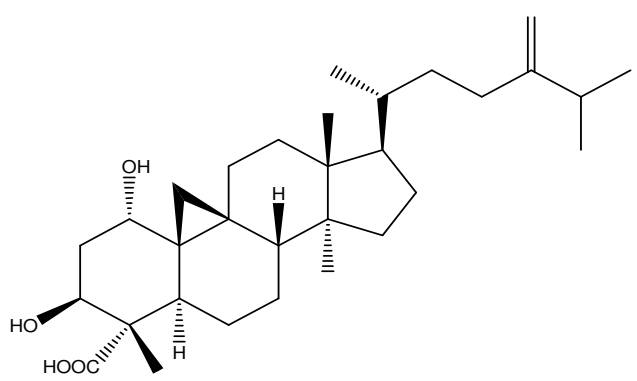
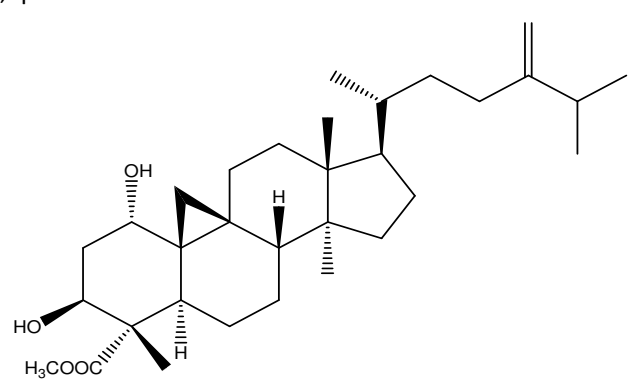
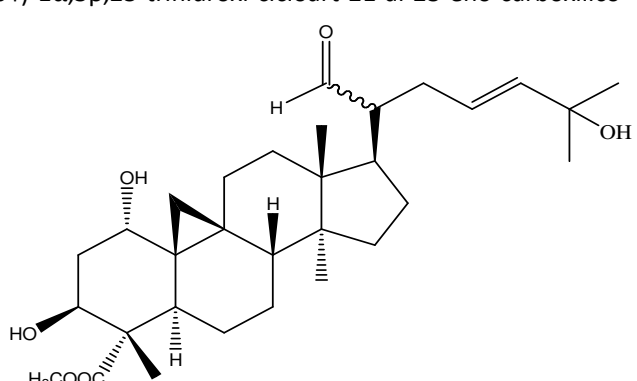
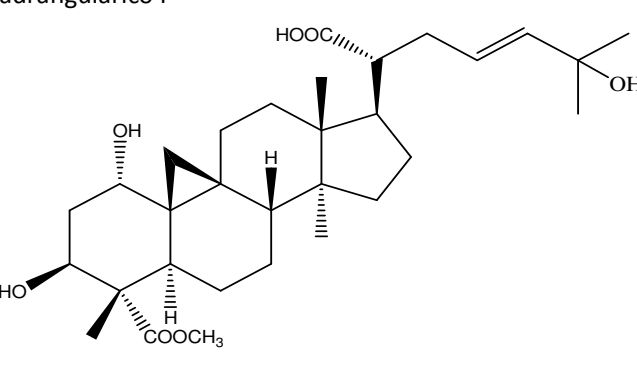
<p>Ácido 12β,24(S)-dihidroxi-3-oxo-cicloart-1,25(26)-dien-21-óico</p> 	<p><i>C. erythrophyllum</i></p>	<p>ROGERS, 1998</p>
<p>Ácido Mólico</p> 	<p><i>C. leprosum</i> MART <i>C. leprosum</i> <i>C. edwardsii</i> <i>C. collinum</i></p>	<p>FACUNDO et al 2008 FACUNDO et al 1993 ROGERS, 1989a ROGERS & COOMBES, 1999</p>
<p>4α-carboxi-3β,16α-dihidroxi-24-cicloarteno</p> 	<p><i>C. leprosum</i> MART</p>	<p>FACUNDO et al 2008</p>
<p>4α-carboxi-1α,3β-dihidroxi-25-hidroperoxi-trans-23(24)-cicloarteno</p> 	<p><i>C. leprosum</i> MART</p>	<p>FACUNDO et al 2008</p>

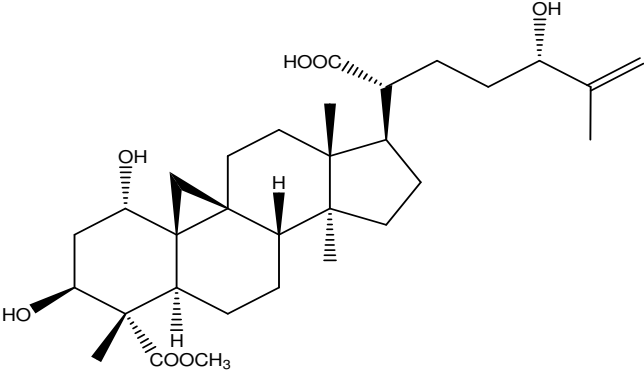
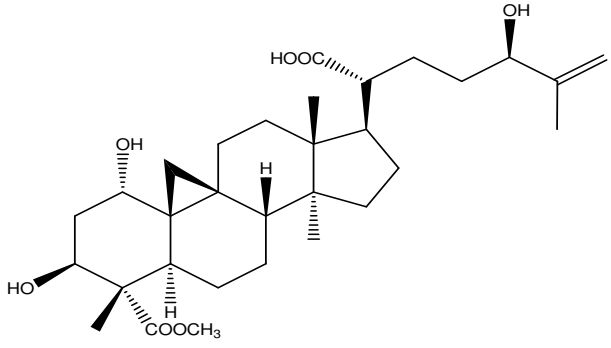
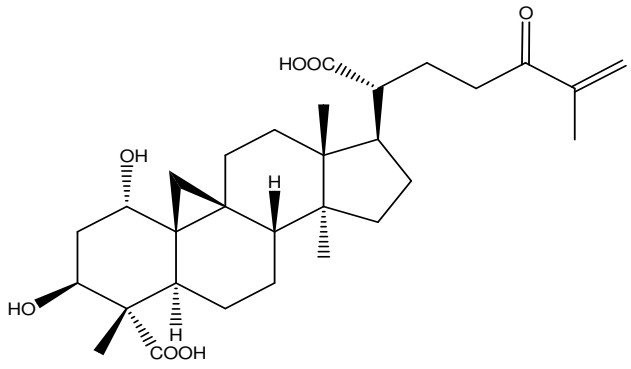
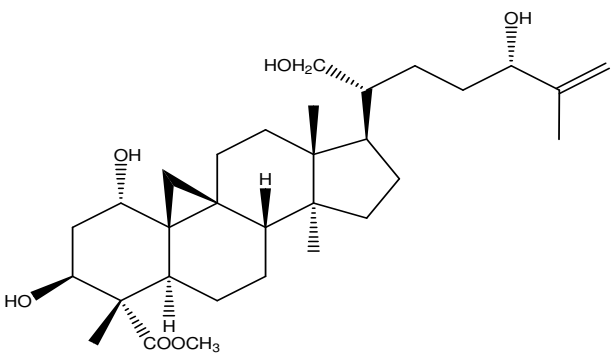
<p>Metil quadrangularato D</p> 	<p><i>C. quadrangulare</i></p> <p><i>C. quadrangulare</i></p>	<p>BANSKOTA et al, 1998</p> <p>BANSKOTA et al, 2000a</p>
<p>Metil quadrangularato N</p> 	<p><i>C. quadrangulare</i></p>	<p>BANSKOTA et al, 2000a</p>
<p>Metil quadrangularato O</p> 	<p><i>C. quadrangulare</i></p>	<p>BANSKOTA et al, 2000a</p>
<p>Metil quadrangularato P</p> 	<p><i>C. quadrangulare</i></p>	<p>BANSKOTA et al, 2000a</p>

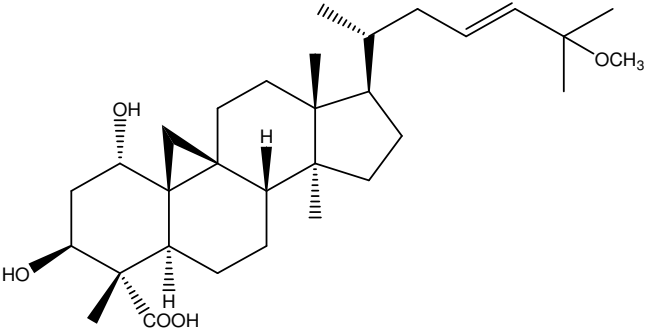
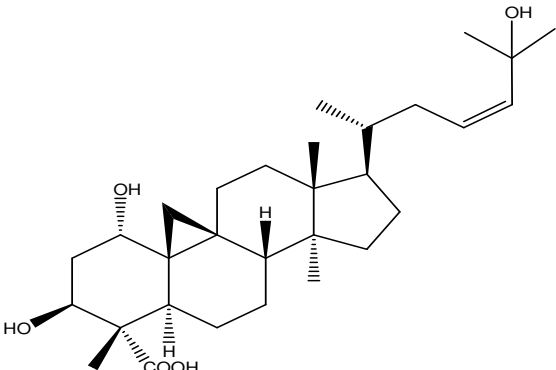
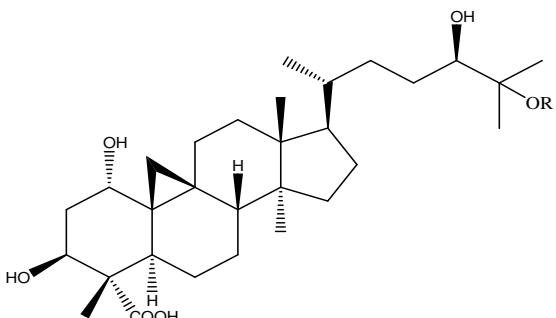
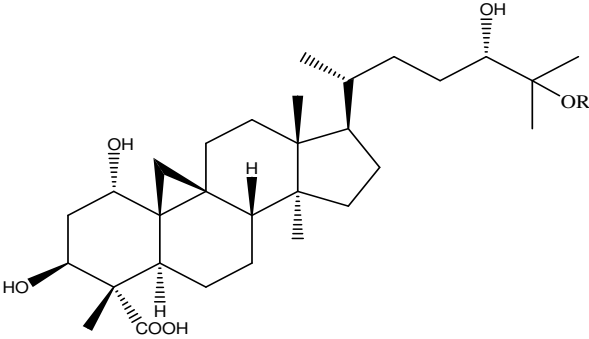
<p>Ácido norquadrangulárico B</p> 	<p><i>C.quadrangulare</i></p>	<p>BANSKOTA et al, 2000a</p>
<p>Ácido norquadrangulárico C</p> 	<p><i>C.quadrangulare</i></p>	<p>BANSKOTA et al, 2000a</p>
<p>Quadrangularol A</p> 	<p><i>C.quadrangulare</i></p>	<p>BANSKOTA et al, 2000a</p>
<p>Quadrangularol B</p> 	<p><i>C.quadrangulare</i></p>	<p>BANSKOTA et al, 2000a</p>

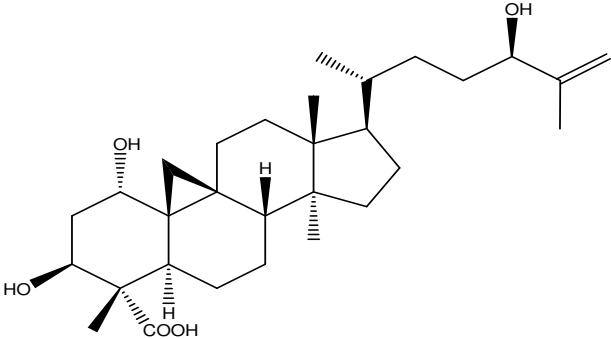
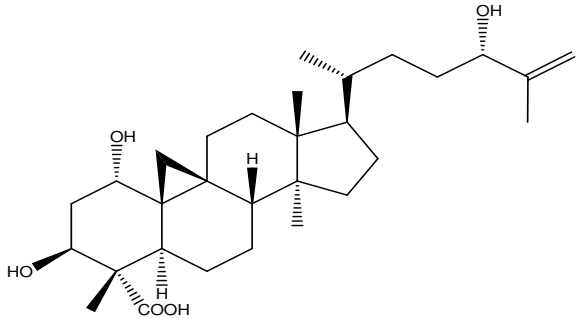
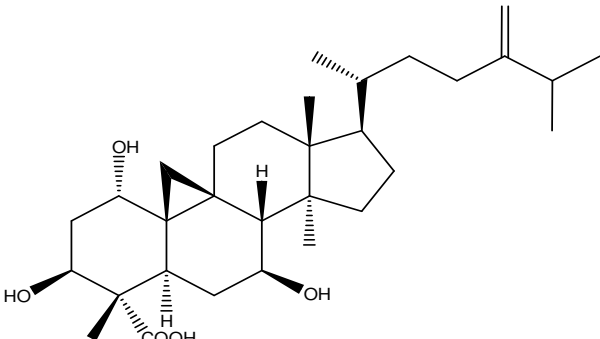
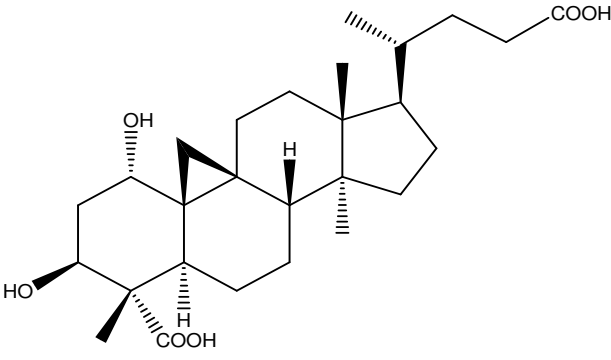
<p>Metil 24-epiquadrangularato C</p> 	<p><i>C.quadrangulare</i></p>	<p>BANSKOTA et al, 2000a</p>
<p>Ácido 1-O-acetil-23-deoxojéssico</p> 	<p><i>C.quadrangulare</i></p>	<p>BANSKOTA et al, 2000a</p>
<p>Metil 23-deoxojessato</p> 	<p><i>C.quadrangulare</i></p>	<p>BANSKOTA et al, 2000a</p>
<p>Ácido 4β,14α-dimetil-5α-ergosta-9-β,19-ciclo-24(31)-en-3β-hidroxi-4α-carboxílico</p> 	<p><i>C.quadrangulare</i></p>	<p>BANSKOTA et al, 2000a</p>

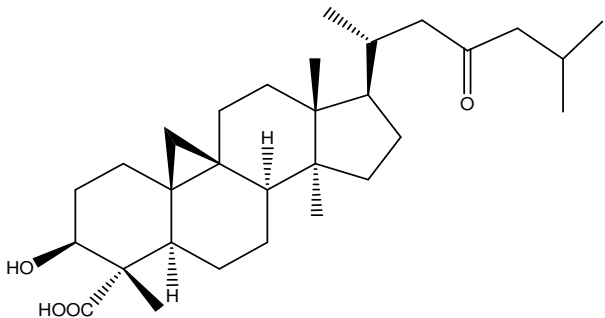
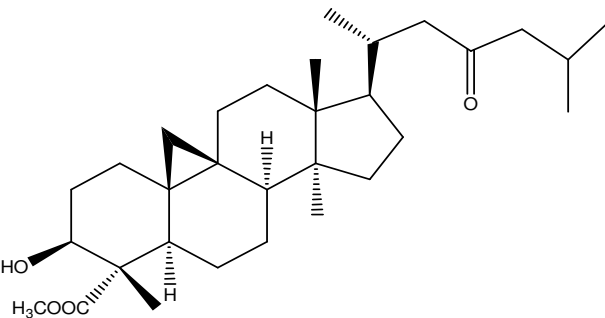
<p>Ácido 23-deoxojésico</p>  <p>R1=R2=H</p>	<p><i>C. quadrangulare</i></p> <p><i>C. quadrangulare</i></p>	<p>BANSKOTA et al, 1998</p> <p>BANSKOTA et al, 2000a</p>
<p>Ácido metil O¹-acetil-23-deoxojésico</p>  <p>R1=Ac, R2=H</p>	<p><i>C. quadrangulare</i></p>	<p>BANSKOTA et al, 1998</p>
<p>Ácido Quadrangulárico E</p> 	<p><i>C. quadrangulare</i></p> <p><i>C. quadrangulare</i></p>	<p>BANSKOTA et al, 1998</p> <p>BANSKOTQA et al, 2000a</p>
<p>Ácido 4β,14α-dimetil-5α-ergosta-9β,19-ciclo-24(241)-en-3β-hidroxi-4α-carboxílico</p> 	<p><i>C. quadrangulare</i></p>	<p>BANSKOTA et al, 1998</p>

<p>Ácido 1α,3β-dihidroxi-cicloart-24-eno-30-carboxílico</p> 	<p><i>C.quadrangulare</i></p>	<p>GANZERA et al, 1998</p>
<p>Ácido 1α,3β-dihidroxi-cicloart-24-eno-30-carboxílico metil éster</p> 	<p><i>C.quadrangulare</i></p>	<p>GANZERA et al, 1998</p>
<p>Ácido (20c)-1α,3β,25-trihidroxi-cicloart-21-al-23-eno-carboxílico</p> 	<p><i>C.quadrangulare</i></p>	<p>GANZERA et al, 1998</p>
<p>Ácido quadrangulárico F</p> 	<p><i>C.quadrangulare</i></p>	<p>BANSKOTA et al, 2000b</p>

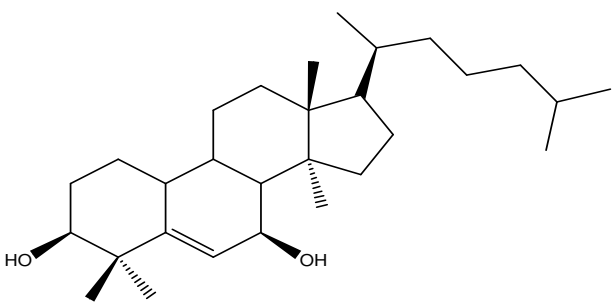
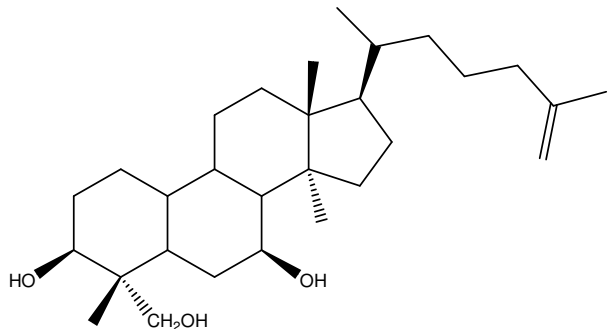
<p>Ácido quadrangulárico G</p> 	<p><i>C.quadrangulare</i></p>	<p>BANSKOTA et al, 2000b</p>
<p>Ácido 24-epiquadrangulárico G</p> 	<p><i>C.quadrangulare</i></p>	<p>BANSKOTA et al, 2000b</p>
<p>Ácido quadrangulárico H</p> 	<p><i>C.quadrangulare</i></p>	<p>BANSKOTA et al, 2000b</p>
<p>Metil quadrangularato I</p> 	<p><i>C.quadrangulare</i></p>	<p>BANSKOTA et al, 2000b</p>

<p>Ácido quadrangulárico J</p> 	<p><i>C. quadrangulare</i></p>	<p>BANSKOTA et al, 2000b</p>
<p>Ácido quadrangulárico K</p> 	<p><i>C. quadrangulare</i></p>	<p>BANSKOTA et al, 2000b</p>
<p>Ácido quadrangulárico L</p> 	<p><i>C. quadrangulare</i></p>	<p>BANSKOTA et al, 2000b</p>
<p>Ácido 24-epiquadrangulárico L</p> 	<p><i>C. quadrangulare</i></p>	<p>BANSKOTA et al, 2000b</p>

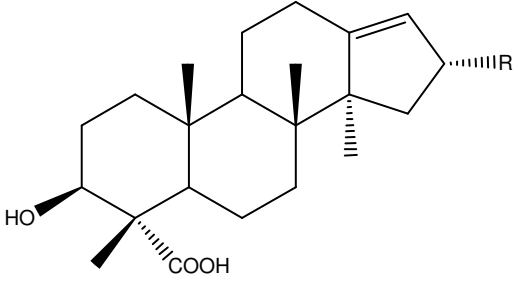
<p>Ácido quadrangulárico M</p> 	<p><i>C.quadrangulare</i></p>	<p>BANSKOTA et al, 2000b</p>
<p>Ácido 24-epiquadrangulárico M</p> 	<p><i>C.quadrangulare</i></p>	<p>BANSKOTA et al, 2000b</p>
<p>Ácido 7β-hidroxi-23-deoxojéssico</p> 	<p><i>C.quadrangulare</i></p>	<p>BANSKOTA et al, 2000b</p>
<p>Ácido Norquadrangulárico A</p> 	<p><i>C.quadrangulare</i></p>	<p>BANSKOTA et al, 2000b</p>

<p>Ácido gardenólico</p> 	<p><i>C. woodii</i></p>	<p>COOMBES & ROGERS, 2002</p>
<p>Metil gardenolato A</p> 	<p><i>C. woodii</i></p>	<p>COOMBES & ROGERS, 2002</p>

Quadro 6: Terpenos isolados de espécies do gênero *Combretum*: série outros

<p>Combreteno A</p> 	<p><i>C.molle</i></p>	<p>AHMED et al, 2004</p>
<p>Combreteno B</p> 	<p><i>C.molle</i></p>	<p>AHMED et al, 2004</p>

Ácido (16R)-16-O- α -L-arabinofuranosil-3 β -hidroximansubin-13-en-28-óico

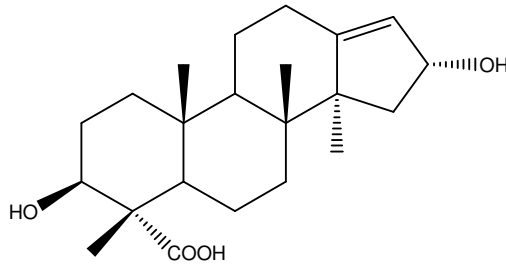


R=arabinose

C.rotundifolium

ROGERS, 1995

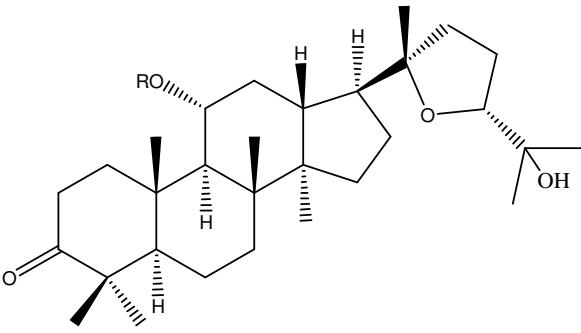
Ácido 3 β ,16 α -dihidroxi-13(17)-mansubinen-28-óico



C.coccineum

CHOWDHURY & ISLAM, 2004

11 α -acetoxi-20,24-epoxi-25-hidroxi-damar-3-ona

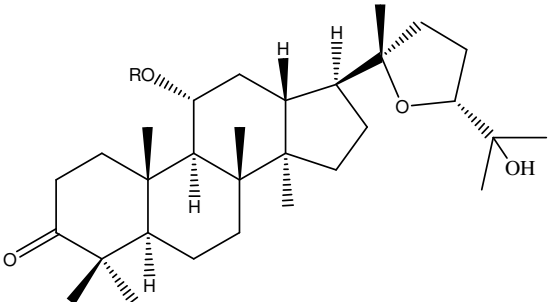


R= Ac

C.nigricans

SIMON et al, 2003

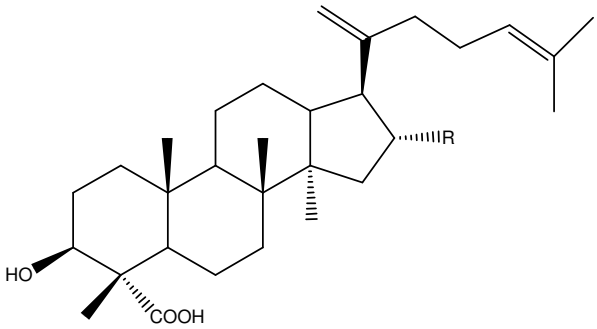
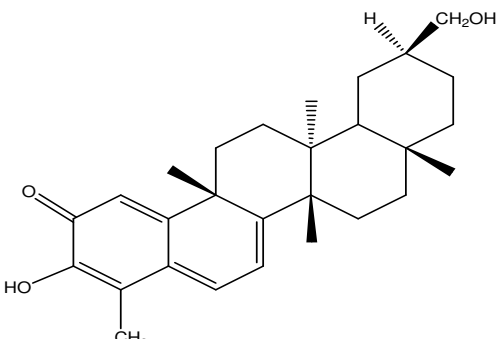
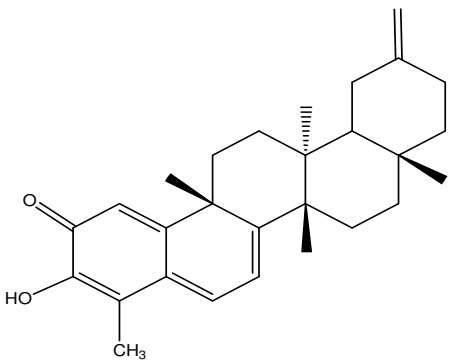
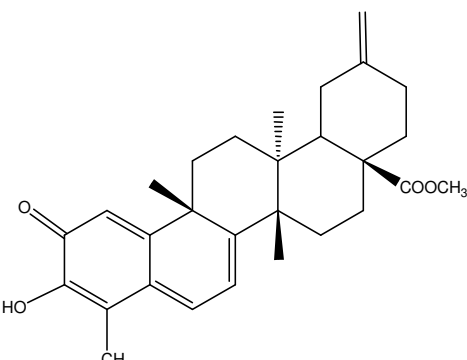
20,24-epoxi-11 α 25-dihidroxi-damar-3-ona



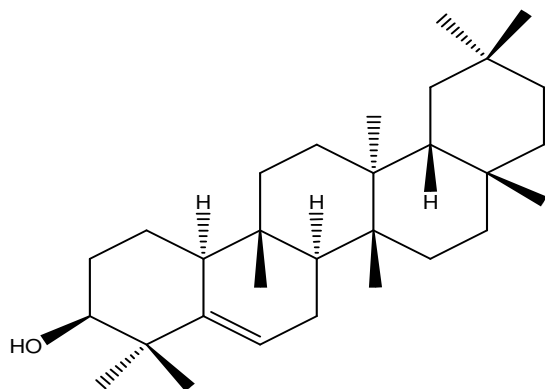
R=H

C.nigricans

SIMON et al, 2003

<p>Ácido rotundifólico</p>  <p>R = Arabinose</p>	<p><i>C.rotundifolium</i></p>	<p>ROGERS, 1995</p>
<p>20-epi-isoiguesterinol</p> 	<p><i>C.laurifolium Mart</i></p>	<p>KOEPKE et al, 2009</p>
<p>Isoiguesterina</p> 	<p><i>C.laurifolium Mart</i></p>	<p>KOEPKE et al, 2009</p>
<p>Nor-isoiguesterina</p> 	<p><i>C.laurifolium Mart</i></p>	<p>KOEPKE et al, 2009</p>

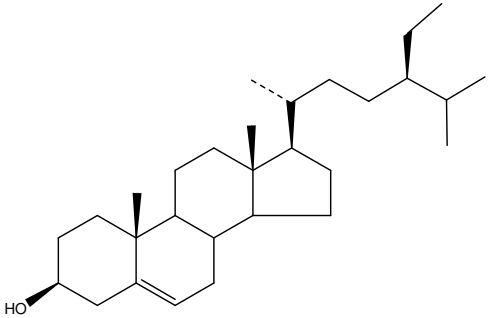
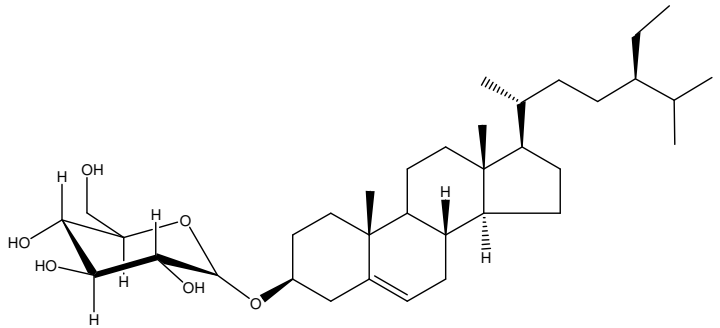
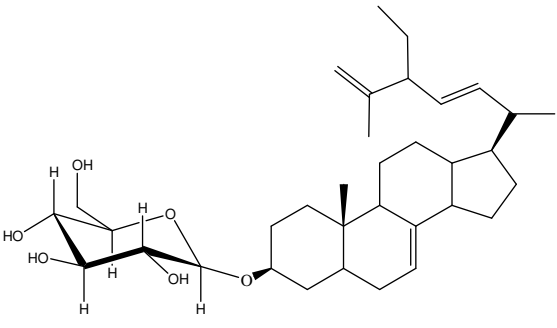
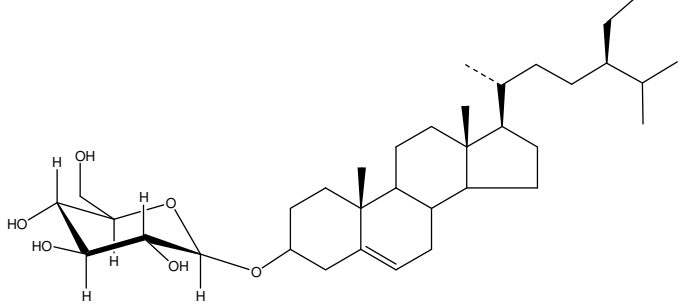
D :B-friedoolean-5-en-3-ol



C. woodii

COOMBES &
ROGERS, 2002

Quadro 7 : Esteróides isolados do gênero *Combretum*

<p>β-sitosterol</p> 	<p><i>C.kraussi</i></p> <p><i>C.quadrangulare</i></p>	<p>BROOKES, 1999</p> <p>BANSKOTA <i>et al</i>, 2000a</p>
<p>?-D-glicopiranosídeo-(3β)-stigmast-5-en-3-il</p> 	<p><i>C. leprosum</i> MART</p>	<p>FACUNDO <i>et al</i> 2008</p>
<p>24-etilcolesta-7,22,25-trien-O-β-D-glicopiranosídeo</p> 	<p><i>C.padoides</i></p>	<p>ANGEH <i>et al</i>, 2007b</p>
<p>β-Sitosterol glicosilado</p> 	<p><i>C. quadrangulare</i></p>	<p>ADNYANA <i>et al</i>, 2000a</p>

3.3 Considerações sobre a espécie *Combretum fruticosum* (Loefl.) Stuntz

Combretum fruticosum (Loefl.) Stuntz (FIGURA 3), conhecida popularmente por “pente-de-macaco” ou “mofumbo”, é uma espécie neotropical, com ampla distribuição, ocorrendo desde o México até a Argentina, incluindo as Antilhas. Embora habite preferencialmente os ambientes de florestas úmidas, esta espécie é encontrada em todas as regiões brasileiras, compondo os mais variados tipos de vegetação, em praticamente todos os estados. Na Paraíba, *Combretum fruticosum* é encontrada em remanescentes de Floresta Atlântica e em áreas de Caatinga (LOIOLA *et al*, 2009).

Representada por arbustos e lianas de até 3 m de altura, com caule e ramos castanho-avermelhados e indumento lepidoto-ferrugíneo revestindo o caule, ramos, folhas, botões e frutos, *C. fruticosum* é caracterizada anatômica e morfológicamente por LOIOLA *et al* (2009) da seguinte forma:

Folhas – opostas, pecioladas; pecíolo 7-10 mm comprimento.; lâmina 8,5-12,5×3,9-7,5 cm, coriácea, glabra, estreito-elíptica a elíptica, base aguda, ápice acuminado a arredondado, discolor; face adaxial verde mais escuro, face abaxial verde-clara; nervuras mais proeminentes na face inferior.

Flores – subsésseis, com 22-28 mm comprimento., esverdeadas a avermelhadas; bractéola 1, com 1-2 mm comprimento., estreitoespatulada; hipanto inferior 2-3×0,4-0,5 mm, fusiforme a 4- anguloso; hipanto superior 6-7×4-4,5 mm, infundibuliforme-campanulado; lobos do cálice 4, 1-2×1,5-2 mm, deltóides, avermelhados; pétalas 4, 1-1,5×0,4-0,5 mm, elípticas, menores que os lobos do cálice, amarelas. Estames 8, exsertos; filetes do verticilo interno 12-13 mm, filetes do verticilo externo 13-14 mm; anteras 0,4-0,5×0,4-0,5 mm, elípticas, alaranjadas a avermelhadas. Disco nectarífero conspícuo, em forma de anel contínuo, margem livre e densamente vilosa; estilete 1,3-1,4 cm comprimento.

Fruto – 4- alado, 1,34-1,9×1,1-1,4 mm, elipsóide, com apículo na porção superior da região central, avermelhado quando jovem, alas 4-6 mm larg., delgadas, secas, transversalmente estriadas; pedicelo frutífero 1,5-3 mm comprimento. Semente 1, 15-18×3,5-4 mm, estreito-elipsóide, sulcada longitudinalmente, testa coriácea, enrugada, castanho claro, cotilédones foliáceos

De acordo com levantamento de dados realizados no Chemical Abstracts e NAPRALERT (banco de dados sobre plantas do ponto de vista químico e biológico), constatou-se que a referida espécie possui apenas dois estudos farmacológicos relacionados a atividade inibidora do extrato $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ (1:1) de folhas e caule frente a enzima 5-lipoxigenase (BRAGA *et al*, 2000), e atividade inibidora do extrato etanólico de folhas e caule frente a enzima conversora de angiotensina (BRAGA *et al*, 2007). Já em relação ao estudo fitoquímico, verificou-se apenas o relato do isolamento de uma saponina com estrutura não determinada pelos autores (CAVALCANTI *et al*, 1983)



FIGURA 3.; Fotos de *Combretum fruticosum* (Loefl.) Stuntz (<http://www.eol.org/pages/60927>)

4 Parte Experimental

4.1 Materiais e métodos

4.1.1 Métodos cromatográficos

4.1.1.1 Cromatografia em Coluna (CC)

Na Cromatografia em Coluna (CC), foi utilizada como fase estacionária, sílica gel 60, Art. 7734 da Merck, de partículas com dimensões entre 0,063-0,200 mm e sílica flash F60 da TEDIA, possuindo partículas com dimensões entre 40-63 µm. Como suporte, foram utilizadas colunas de vidro cilíndricas, cujas dimensões variaram de acordo com a quantidade de amostra a ser cromatografada.

Como fase móvel, foi utilizado hexano, acetato de etila (AcOEt) e metanol (MeOH), puros ou em misturas binárias, sempre em gradiente crescente de polaridade.

4.1.1.2 Cromatografia em Camada Delgada (CCD)

Na Cromatografia em Camada Delgada Analítica (CCDA) e Preparativa (CCDP) foi utilizada como fase fixa, sílica gel 60 PF₂₅₄ da Merck (Art. 7749) e como suporte, placas de vidro de diversas dimensões (20x20 cm, 10x20 cm e 5x10 cm). As cromatoplasmas foram confeccionadas através da distribuição desta sílica (na forma de suspensão com água destilada; proporção 1:2) sobre as placas de vidro com a ajuda de um espalhador mecânico do tipo "quick fit". As cromatoplasmas obtidas foram secas ao ar livre e ativadas em estufa a 110 °C por 2 horas.

As revelações das substâncias nas CCDA se deram por exposição das placas a lâmpadas de radiação ultravioleta (equipamento TECNAL, modelo TE-540) em dois comprimentos de onda (254 e 366 nm). Também foi utilizado como revelador, câmara saturada com vapores de iodo.

O grau de pureza das substâncias foi evidenciado por Cromatografia em Camada Delgada Analítica (CCDA), determinando-se a pureza quando observada uma única mancha após a eluição, em pelo menos 3 tipos de sistemas de solventes diferentes.

Para eluição das cromatoplasmas foram utilizados os eluentes hexano, AcOEt e MeOH, puros ou em misturas binárias. Nos casos de recristalizações de substâncias, foram utilizados solventes de grau analítico.

4.1.2 Métodos espectrométricos

4.1.2.1 Ressonância Magnética Nuclear

Os espectros de Ressonância Magnética Nuclear de ^1H (RMN ^1H) e Ressonância Magnética Nuclear de ^{13}C (RMN ^{13}C) foram obtidos em espectrômetros da Varian Mercury e Varian System, operando na frequência de 200 MHz para ^1H e a 50 MHz para ^{13}C e a 500 MHz para ^1H e 125 MHz para ^{13}C , respectivamente. As amostras submetidas à análise por RMN foram preparadas dissolvendo-se pequena quantidade das mesmas em solventes deuterados da CIL, referenciados pelos picos característicos pertencentes as frações não deuteradas com sinais em $\delta_{\text{H}} = 7,24$ e $\delta_{\text{C}} = 77,0$. Os deslocamentos químicos (δ) foram expressos em partes por milhão (ppm) e as constantes de acoplamento (J) em Hz. As multiplicidades dos sinais em RMN ^1H foram indicadas segundo a convenção: s (singleto), sl (singleto largo), d (dubleto), dd (duplo dubleto), dt (duplo tripleto) t (tripleto), e m (multiplete).

4.1.2.2 Espectrometria de Massas

O espectro de massas das fragmentações de CF₃ e CF₄, foram obtidos em modo de íons positivo pela técnica de Ionização por Eletrospray através do espectrômetro de massas (Ion Trap-Amazonx-Bruker).

4.1.2.3 Infravermelho

Os dados espectrais na região do infravermelho foram obtidos em espectrofotômetro da marca SHIMADZU, modelo IRPrestig 21, utilizando-se de 1 a 3 mg de amostra em pastilhas de KBr, com frequência medida em cm^{-1} .

4.1.3 Ponto de fusão

Para determinar o ponto de fusão utilizou-se o aparelho para ponto de fusão digital (Microquímica, modelo MQAPF-302), com bloco de platina em microscópio óptico tipo “Kofler” (Reichert, modelo R3279), com variação de temperatura de 0-350 °C. A substância foi determinada pura quando a diferença entre o ponto de fusão final e o ponto de fusão inicial não fosse maior que 3 °C.

4.2 Estudo Fitoquímico de *Combretum fruticosum* (Loefl.) Stuntz (Combretaceae)

4.2.1 Coleta do Material Vegetal

O material botânico (partes aéreas) foi coletado em setembro de 2009 na floresta atlântica do município de Santa Rita, estado da Paraíba, e identificado pela Prof^a Dra. Maria de Fátima Agra, botânica do Laboratório de Tecnologia Farmacêutica da Universidade Federal da Paraíba (LTF/UFPB). Uma exsicata desta espécie encontra-se catalogada no Herbário Prof. Lauro Pires Xavier (JPB) do Centro de Ciências Exatas e da Natureza – UFPB sob o código “AGRA 146”.

4.2.2 Preparação do Material Vegetal de *Combretum fruticosum* (Loefl.) Stuntz

As partes aéreas de *Combretum fruticosum* (Loefl.) Stuntz foram secas em estufa com ar circulante à temperatura média de 45°C durante 3 dias. Após a secagem, o material foi submetido a um processo de pulverização em moinho mecânico, resultando em 2,1 Kg de pó seco e triturado.

4.2.3 Obtenção do Extrato Etanólico Bruto (EEB) das partes aéreas de *Combretum fruticosum* (Loefl.) Stuntz

O material vegetal seco e pulverizado foi submetido a maceração exaustiva com etanol (EtOH) a 95%, por 3 dias, seguido de filtração da solução extrativa obtida e concentração da mesma em evaporador rotativo sob pressão reduzida e temperatura controlada (40°C). Este mesmo procedimento foi realizado 5 vezes a fim de se obter o melhor rendimento possível, resultando em um Extrato Etanólico Bruto de 584,2 g, o que representa um rendimento de 27,8% em relação ao peso seco da planta.

4.2.4 Partição do Extrato Etanólico Bruto (EEB) de *Combretum fruticosum* (Loefl.) Stuntz

Uma alíquota de 200 g do EEB de *Combretum fruticosum* (Loefl.) Stuntz foi particionada em coluna filtrante sob vácuo, utilizando como fase estacionária, sílica gel 60 da Merk (Art. 7734) e como fase móvel, hexano, diclorometano (CH_2Cl_2), AcOEt e AcOEt/MeOH (7:3). A filtração foi realizada, utilizando-se os solventes puros ou em misturas binárias, até que toda a coloração desaparecesse das soluções, as quais foram concentradas em evaporador rotativo, resultando em 4 fases: fase hexânica (11,3g), fase diclorometano (9,4g), fase AcOEt (8,0g) e a fase AcOEt/MeOH (25,2g) (Figura 4)

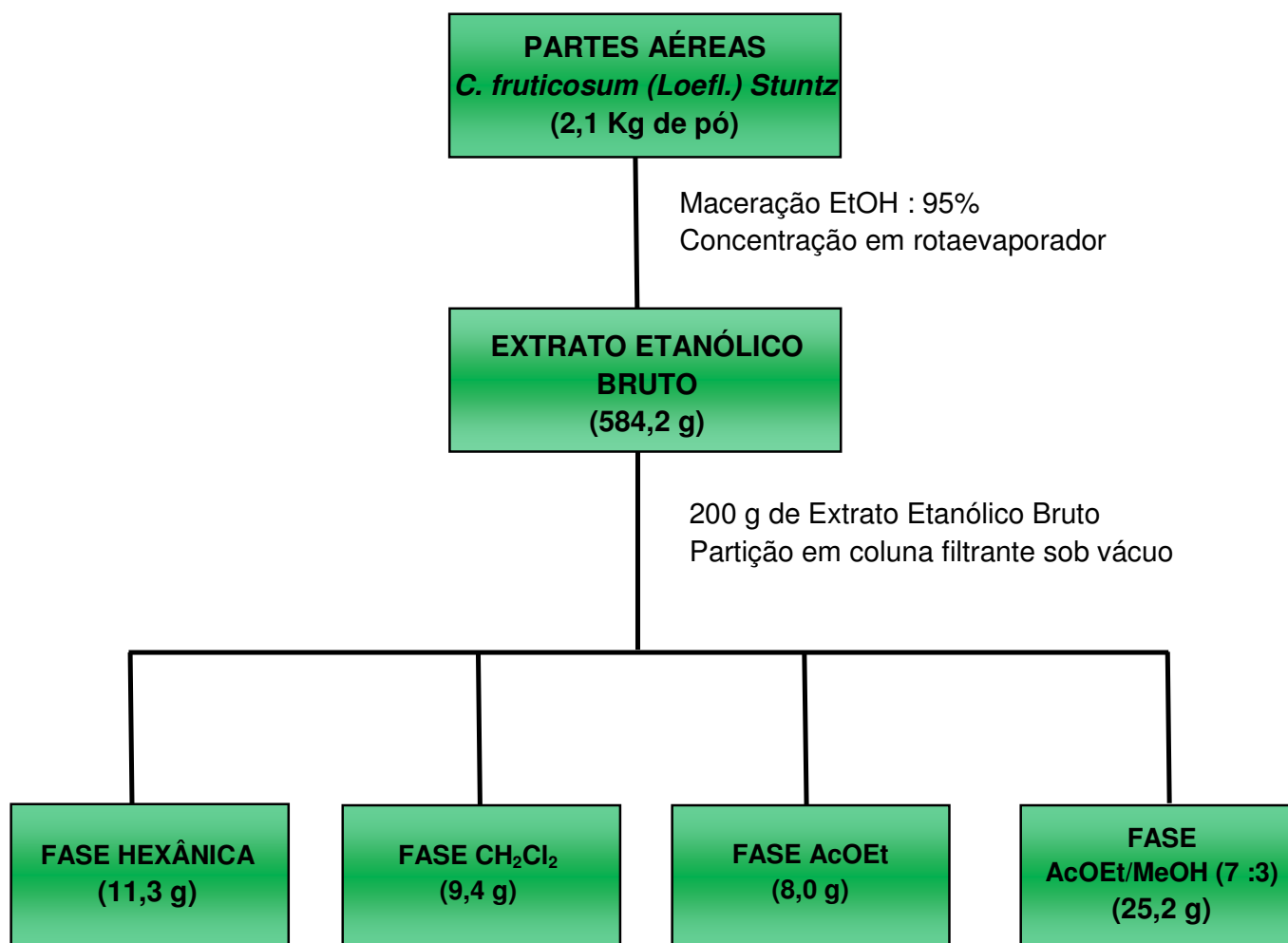


Figura 4: Obtenção e particionamento do EEB das partes aéreas de *Combretum fruticosum* (Loefl.) Stuntz .

4.2.5 Fracionamento cromatográfico da fase hexânica de *Combretum fruticosum* (Loefl.) Stuntz

Uma alíquota de 7g da fase hexânica de *Combretum fruticosum* (Loefl.) Stuntz foi cromatografada em coluna, utilizando-se como fase estacionária, 210g de sílica gel 60 da Merck (Art.7734) e como eluentes, hexano e acetato de etila, puros ou em misturas binárias, obedecendo a um gradiente crescente de polaridade. Neste processo, obteve-se um total de 74 frações, que foram coletadas a cada 125 mL e concentradas em evaporador rotativo. As frações foram monitoradas por CCDA e reunidas de acordo com a semelhança dos seus Fatores de Retenção (Rfs), originando 24 grupos (Quadro 8).

O grupo 12 - 13 apresentou-se sob a forma de cristais brancos após sucessivas recristalizações com acetona. A substância recristalizada foi encaminhada para a obtenção dos espectros de RMN de ^1H e ^{13}C , que recebeu posteriormente o código de CF1.

O grupo 20 – 22 apresentou-se sob a forma de um pó branco amorfo após sucessivas recristalizações com metanol. A substância recebeu o código de CF3 (Figura 5).

Quadro 8: Eluentes utilizados e frações obtidas no fracionamento cromatográfico da fase hexânica do extrato etanólico bruto de *Combretum fruticosum* (Loefl.) Stuntz

ELUENTES	PROPORÇÃO	FRAÇÕES OBTIDAS	FRAÇÕES REUNIDAS
Hexano	100	1 - 7	1,2,3,4,5,6,7
Hexano:AcOEt	90:10	8 - 27	8,9,10,11,12-13, 14,15-19,20-22, 23-24,25
Hexano:AcOEt	85:15	28 - 52	26-32, 33-37, 38-46, 47-53
Hexano:AcOEt	80:20	53 - 59	54 - 59
Hexano:AcOEt	70:30	60 - 68	60 - 67
Hexano:AcOEt	30:70	69 - 71	68 - 74
AcOEt	100	72 - 74	

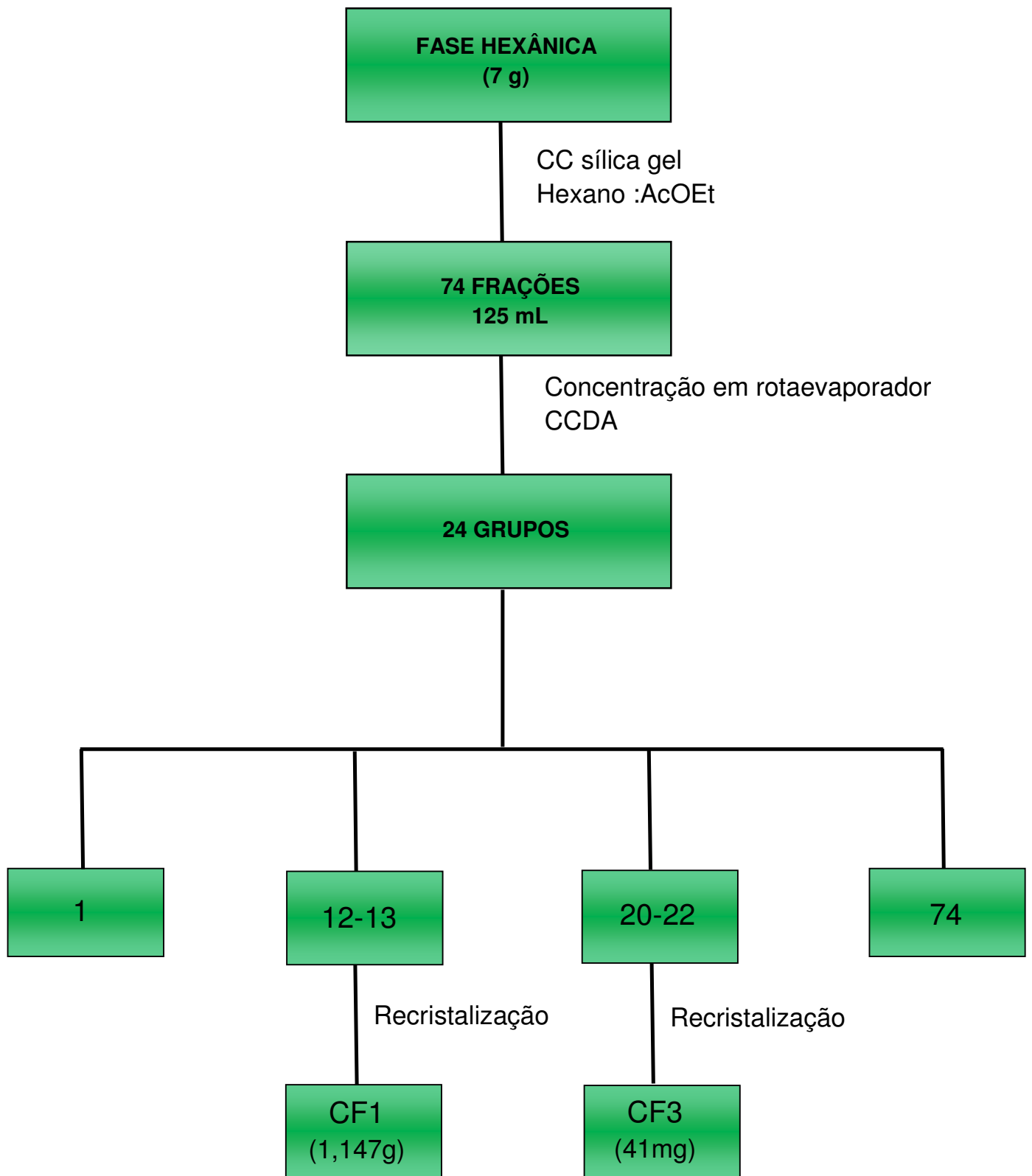


Figura 5 : Fracionamento da fase hexânica do extrato etanólico bruto de *Combretum fruticosum* (Loefl.) Stuntz

4.2.6 Fracionamento cromatográfico da fase diclorometano de *Combretum fruticosum* (Loefl.) Stuntz

Uma alíquota de 8g da fase CH₂Cl₂ de *Combretum fruticosum* (Loefl.) Stuntz foi cromatografada em coluna, utilizando-se como fase estacionária, 240g de sílica gel 60 da Merck (Art.7734) e como eluentes, hexano, acetato de etila e metanol, puros ou em misturas binárias, obedecendo a um gradiente crescente de polaridade. Neste processo, obteve-se um total de 233 frações, que foram coletadas a cada 125 mL e concentradas em evaporador rotativo. As frações foram monitoradas por CCDA e reunidas de acordo com a semelhança dos seus Fatores de Retenção (Rfs), originando 37 grupos (Quadro 9, pág.73).

O grupo 8 - 12 apresentou-se sob a forma de cristais brancos após sucessivas recristalizações com acetona. A substância recristalizada recebeu o código de CF1.

O grupo 15 – 20 apresentou-se sob a forma de um pó branco amorfo após sucessivas recristalizações com metanol. A substância recristalizada foi encaminhada para a obtenção dos espectros de RMN de ¹H e ¹³C, que recebeu posteriormente o código de CF3. Já o sobrenadante do grupo 15 – 20 foi submetido a uma cromatografia em coluna de sílica gel, utilizando hexano e AcOEt como eluentes. Esta cromatografia resultou em 52 frações, as quais foram reunidas segundo seus Rfs, originando 7 grupos. Dentre eles, o grupo 8 – 15 foi submetido a uma CCDP utilizando como sistema de eluição hexano:AcOEt 20% onde após filtração das bandas obtidas, uma de suas frações apresentou-se sob a forma de um pó branco amorfo o qual foi encaminhado para a obtenção dos espectros de RMN de ¹H e ¹³C, recebendo o código de CF6 (Figura 7).

Os grupos 40 – 45 e 46 – 51 apresentaram-se sob a forma de um pó branco amorfo após sucessivas recristalizações com clorofórmio. De acordo com a análise dos precipitados dos dois grupos por CCDA, decidiu-se reuni-los e encaminhar a substância para a obtenção dos espectros de RMN de ¹H e ¹³C, que recebeu posteriormente o código de CF2 (Figura 6).

O grupo 60 – 67 foi submetido a uma CCDP, onde utilizou-se o sistema CH₂Cl₂:MeOH 0,5% como eluente. Após a eluição da placa e filtração das bandas obtidas, encaminhou-se uma das frações para a obtenção dos espectros de RMN de ¹H e ¹³C, que recebeu posteriormente o código de CF5 (Figura 7).

Quadro 9: Eluentes utilizados e frações obtidas no fracionamento cromatográfico da fase CH₂Cl₂ do extrato etanólico bruto de *Combretum fruticosum* (Loefl.) Stuntz

ELUENTES	PROPORÇÃO	FRAÇÕES OBTIDAS	FRAÇÕES REUNIDAS
Hexano	100	1 - 5	1,2,3,4,5
Hexano:AcOEt	90:10	6 - 55	6,7,8-12,13-14, 15-20,21-26,27-35, 36-39,40-45, 46-51,52-53
Hexano:AcOEt	85:15	56 - 139	54-59,60-64, 65-67,68-71, 72-82,83-99, 100-115,116-119, 120-140
Hexano:AcOEt	80:20	140 - 174	141-152,153- 163,164-168, 169-178
Hexano:AcOEt	70:30	175 - 188	179-185
Hexano:AcOEt	50:50	189 - 208	186-192, 193-199, 200-205, 206-209
Hexano:AcOEt	30:70	209 - 217	210-212, 213-220
AcOEt	100	218 - 224	221 - 233
AcOEt:MeOH	95:5	225 - 229	
AcOEt:MeOH	90:10	230 - 233	

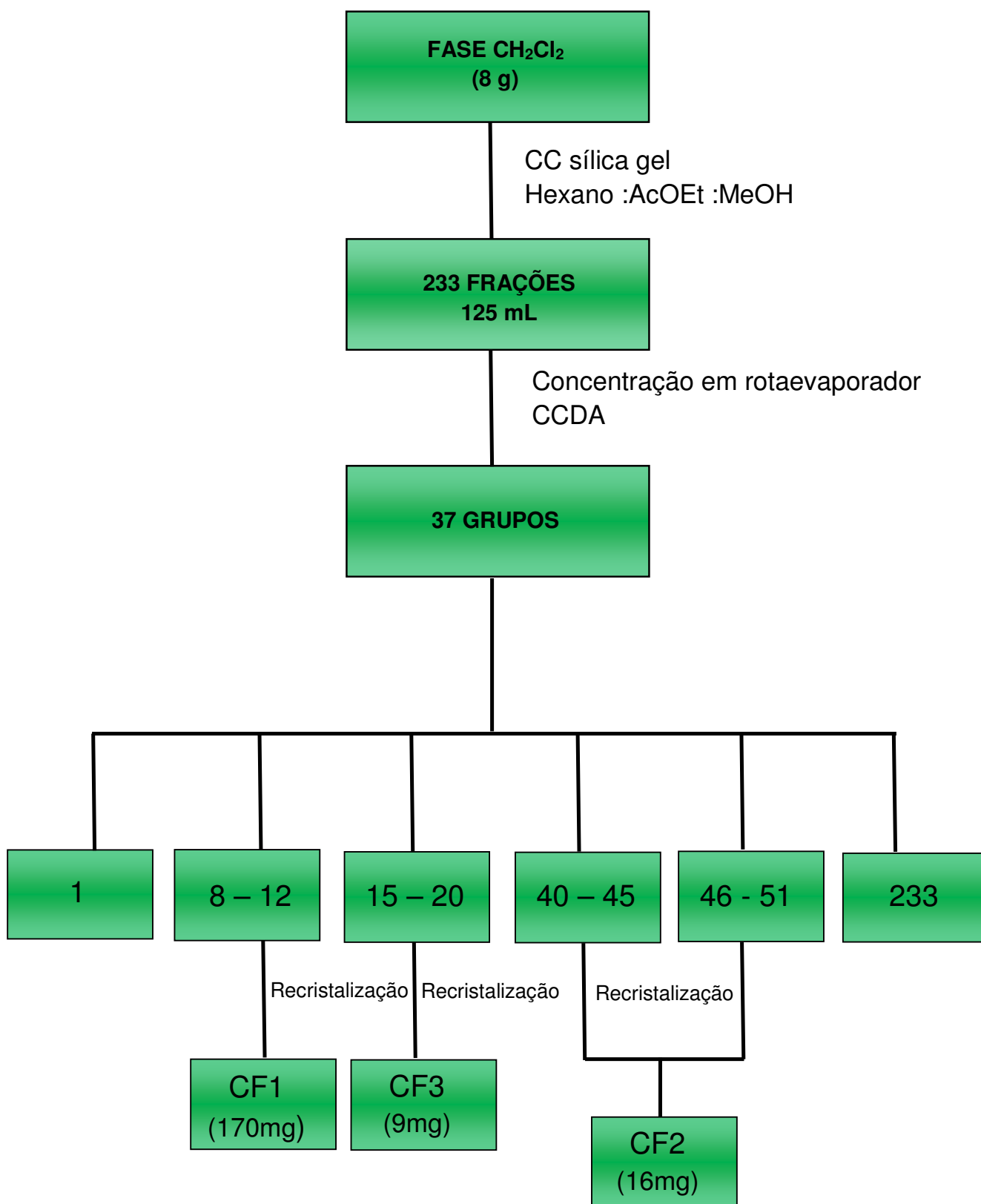


Figura 6 : Fracionamento da fase diclorometano do extrato etanólico bruto de *Combretum fruticosum* (Loefl.) Stuntz

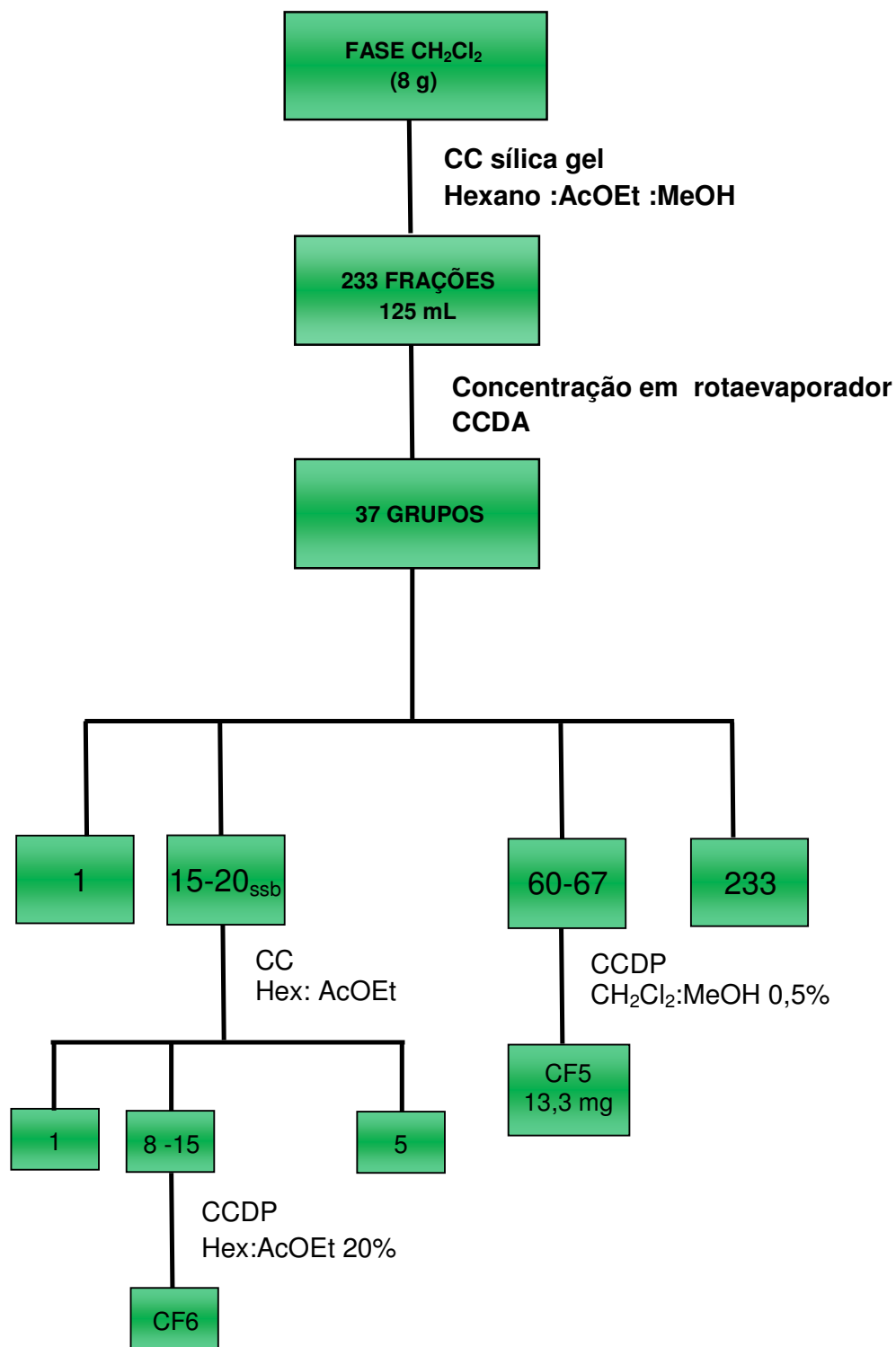


Figura 7 : Fracionamento da fase diclorometano do extrato etanólico bruto de *Combretum fruticosum* (Loefl.) Stuntz

4.2.7 Fracionamento cromatográfico da fase AcOEt de *Combretum fruticosum* (Loefl.) Stuntz

Uma alíquota de 6,5g da fase AcOEt de *Combretum fruticosum* (Loefl.) Stuntz foi submetida a uma acetilação com piridina e anidrido acético (proporção 2:1 para cada 200 mg de amostra), em temperatura ambiente, sob agitação constante por 48 horas . Em seguida, a fase acetilada foi cromatografada em coluna, utilizando-se como fase estacionária, 190g de sílica gel G60 da Merck (Art.7734) e como eluentes, hexano , AcOEt e MeOH, puros ou em misturas binárias,obedecendo a um gradiente crescente de polaridade. Neste processo, obteve-se um total de 101 frações, que foram coletadas a cada 125 mL e concentradas em evaporador rotativo. As frações foram monitoradas por CCDA e reunidas de acordo com a semelhança dos seus Rfs, originando 25 grupos (Quadro 10).

O grupo 6 – 8 apresentou-se sob a forma de um pó branco amorfo após sucessivas recristalizações com éter. A substância recristalizada foi encaminhada para a obtenção dos espectros de RMN de ^1H e ^{13}C , que recebeu posteriormente o código de CF4 (Figura 8).

ELUENTES	PROPORÇÃO	FRAÇÕES OBTIDAS	FRAÇÕES REUNIDAS
Hexano	95:5	1 - 5	1,2-3,4,5
Hexano:AcOEt	90:10	6 - 10	6-8,9-10
Hexano:AcOEt	80:20	11 - 20	11,12-13,14-19,
Hexano:AcOEt	70:30	21 - 29	21-24,25-27,28-30
Hexano:AcOEt	50:50	30 - 44	31-32,33-36,37,38, 39-40,41-44
Hexano:AcOEt	30:70	45 - 55	45-51,52-55
AcOEt	100	56 - 69	56-62,63-69
AcOEt:MeOH	95:5	70 - 77	70-77
AcOEt:MeOH	90:10	78 - 84	78-94
AcOEt:MeOH	85:15	85 - 90	
AcOEt:MeOH	70:30	90 - 98	
AcOEt:MeOH	60:40	99 - 101	95-101

Quadro 10: Eluentes utilizados e frações obtidas no fracionamento cromatográfico da fase AcOEt do extrato etanólico bruto de *Combretum fruticosum* (Loefl.) Stuntz

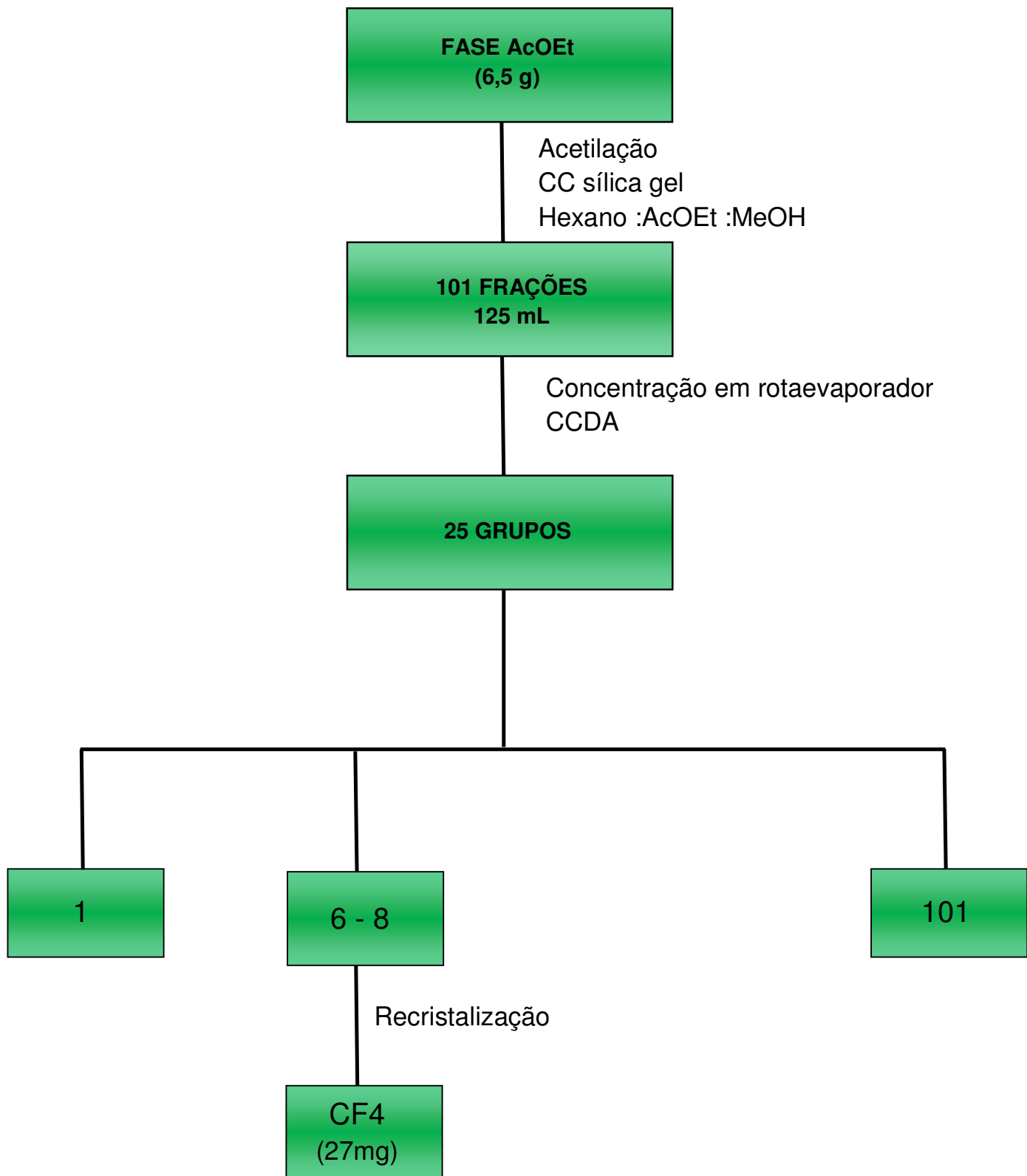


Figura 8 : Fracionamento da fase AcOEt do extrato etanólico bruto de *Combretum fruticosum* (Loefl.) Stuntz

4.3 Ensaios Biológicos

4.3.1 Avaliação da Atividade Antibacteriana e Antifúngica do EEB de *Combretum fruticosum* (Loefl.) Stuntz

Para avaliar a atividade antibacteriana do EEB das partes aéreas de *Combretum fruticosum* (Loefl.) Stuntz foram utilizadas cepas da American Type Culture Collection (ATCC), empregando o método de difusão em Agar Müeller-Hinton e Sabouraud.

4.3.1.1 Microorganismos utilizados

Para os ensaios, foram selecionadas as seguintes bactérias e fungos leveduriformes ATCC: *Staphylococcus aureus* 25923, *Enterococcus faecalis* 29212, *Klebsiella pneumoniae* 13833, *Pseudomonas aeruginosa* 27853, *Escherichia coli* 25922, *Candida parapsilosis* 40058, *Candida albicans* 10231, *Candida krusei* 6258 e *Candida glabrata* 90030.

4.3.1.2 Preparo dos meios de cultura

Os meios de cultura utilizados foram o Agar Müeller-Hinton (AMH), e o Agar Sabouroud Dextrose (ASD):

- **Agar Müeller-Hinton** - Meio sólido preconizado para o teste de susceptibilidade antibacteriana, que apresenta boa reprodutibilidade nos testes e suporta o crescimento da maioria dos microorganismos. Seu preparo consistiu em diluir o meio em pó (38g), sob agitação manual com o auxílio de um bastão de vidro, em q.s.p 1 litro de água destilada. Após completa dissolução, distribuiu o líquido em erlenmeyers vedados com rolhas de algodão e gaze protegias com papel alumínio. A seguir esterilizou-se em autoclave a 121 °C por 15 minutos e o pH final foi ajustado para $7,3 \pm 0,1$ a 25 °C. Posteriormente distribuiu-se cerca de 25 ml do líquido em cada placa de petri a uma temperatura de 45 °C (NCCLS, 2003) .
- **Agar Sabouraud** – Meio sólido utilizado para a propagação de fungos patogênicos e leveduras. Seu preparo consistiu em diluir o meio (65g), sob agitação manual com o auxílio de um bastão de vidro, em q.s.p 1 litro de água

destilada. Após completa dissolução, distribuiu-se o líquido em erlenmeyers vedados com rolhas de algodão e gaze protegias com papel alumínio. A seguir esterilizou-se em autoclave a 121 °C por 15 minutos e o pH final foi ajustado para $5,6 \pm 0,2$ a 25 °C. Posteriormente distribuiu-se cerca de 25 ml do líquido em cada placa de petri a uma temperatura de 45°C .

4.3.1.3 Preparo do Inóculo contendo os microorganismos

Em um tubo de ensaio contendo cultivo recente, preparou-se o inóculo a partir de uma suspensão de cada microorganismo em solução salina tamponada. A concentração do inóculo foi ajustada de modo a se obter $1,5 \times 10^6$ UFC/mL. Para tanto, comparou-se a turbidez da suspensão com o tubo 5 da escala de McFarland. Após o ajuste, o inóculo foi distribuído em placas de Petri, previamente preparadas com meio de cultivo com o auxílio de um chumaço de algodão estéril. As superfícies de cada placa de AMH e ASD foram inoculadas, esfregando-se o chumaço em toda a superfície do Agar.

4.3.1.4 Ensaio antimicrobiano *in vitro*

As amostras testes foram colocadas em discos estéreis de papel de filtro com a concentração de 1000 µg/disco e para controle positivo, foram utilizados discos padronizados para antibiograma (cloranfenicol 30 µg/disco e fluconazol 25µg/disco).

Os discos foram levemente pressionados contra a superfície do meio de cultivo para garantir o contato total com os microorganismos, deixando-os em temperatura ambiente por 1 hora, para ocorrer a difusão dos extratos em Agar. Após esse período, as placas foram invertidas, incubadas a 35 °C e após 18h, foram verificados os halos de inibição de crescimento, com o auxílio de um paquímetro. Este ensaio foi realizado em duplicata.

4.3.2 Avaliação da atividade antitumoral *in vitro* das substâncias CF1, CF2 , CF3 e CF4

Esta avaliação foi realizada em parceria com João Carlos Lima Rodrigues Pita, doutorando do Laboratório de Toxicologia do LTF, onde foram realizados dois ensaios; no primeiro, as substâncias CF1, CF2 , CF3 e CF4 foram

testadas frente às células da linhagem Sarcoma 180 e no segundo, apenas a CF1 e CF4 foi analisada frente a linhagem leucêmica K562, visto que as outras já haviam sido estudadas frente esta linhagem.

Para o ensaio antitumoral *in vitro*, células da linhagem sarcoma 180, mantidas na cavidade peritoneal de camundongos Swiss foram retiradas após 10 dias de implantação e as células da linhagem K562 foram mantidas em meio de cultura. Posteriormente, células do Sarcoma 180 foram transferidas para um tubo Falcon (BD/Labware®) (15 mL) com 10 mL de solução tampão fosfato (PBS) e em seguida, centrifugadas (1.000 rpm por 10 minutos). O sobrenadante foi desprezado e as células foram ressuspensas em meio RPMI-1640 (Nutricell®) suplementado com 25 mM HEPES, 2 mM L-glutamina, 100 UI/mL de penicilina, 100 µg/mL de estreptomicina (Sigma-Aldrich®) e 10 % de soro fetal bovino (Nutricell®).

Foi retirada uma alíquota de 10 µL das linhagens para avaliar a viabilidade celular com 10 µL de azul de tripan (Sigma-Aldrich®) (0,4 %) em câmara de Neubauer. As células da linhagem Sarcoma 180 (2×10^5 células/poço) e K562 ($3 \cdot 10^5$ células/mL) foram semeadas em placas de 96 poços (BD/Labware®), e incubadas com diferentes concentrações de CF1, CF2, CF3, CF4 e apenas CF1 e CF4, para as respectivas linhagens, em estufa a 37 °C e atmosfera com 5% de CO₂. As placas contendo células do Sarcoma 180 e leucêmicas K562 foram incubadas por 24 e 72 h, respectivamente. Os produtos testados foram inicialmente solubilizados em dimetilsulfóxido (DMSO) (Mallinckrodt CHEMICALS®) e em seguida, inseridos em meio RPMI-1640 suplementado. A concentração final de DMSO nos meios em teste e no controle foi de 0,5 %. Para avaliar a citotoxicidade das substâncias mencionadas acima foi realizado o ensaio de redução de MTT.

O MTT é um corante amarelo, que é reduzido por células que mantêm a integridade mitocondrial para um composto azul (formazan), insolúvel em solução aquosa (Figura 9). Uma vez solubilizado, a quantidade de formazan pode ser determinada espectroscopicamente (MOSMANN, 1983; DENIZOT & LANG, 1986). Dessa forma, a redução do sal tetrazólio MTT a formazan é muito utilizada em ensaios de avaliação de sobrevivência e proliferação celular, uma vez que somente as células viáveis reduzem o MTT a formazan, portanto a quantidade de formazan produzido é proporcional ao número de células viáveis presentes (MOSMANN, 1983; DENIZOT & LANG, 1986).

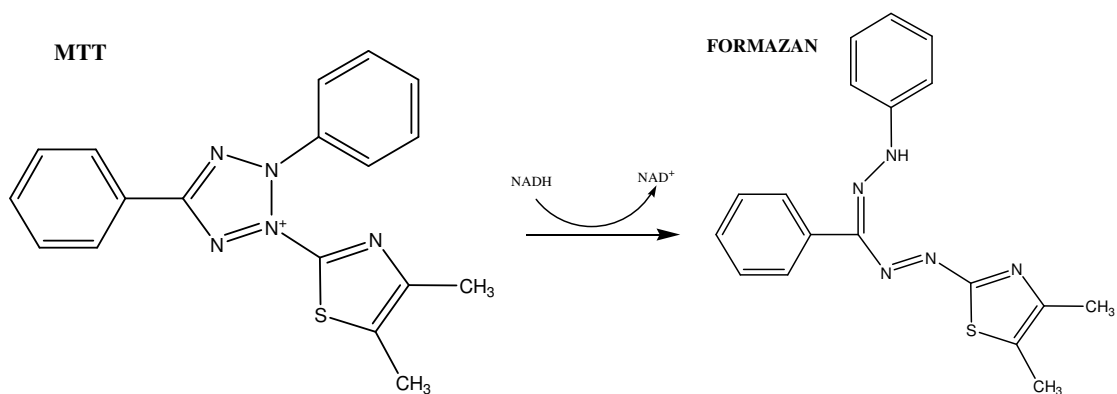


Figura 9 : Reação de redução do MTT ([brometo de (3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difenil tetrazólio)] a formazan (MOSMANN, 1983).

O ensaio de redução do sal de tetrazólio foi realizado como descrito por Melo et al. (2003). Na placa de 96 poços com as células sob 24 h (sarcoma180) ou 72 h (K562) de tratamento foram adicionados 10 μ L de MTT (5 mg/mL) em cada poço. Após incubação por 4 h em estufa (37 $^{\circ}$ C e 5 % CO_2), os sobrenadantes dos 96 poços foram cuidadosamente removidos, e em seguida, foram adicionados 100 μ L de etanol em cada poço para solubilizar o formazan produzido. As placas foram agitadas por 10 minutos e a absorbância foi lida por um espectrofotômetro (Leitor de Elisa BIO-RAD modelo 550 Microplate Reader) no comprimento de onda de 595 nm para assim calcular a CI_{50} através da determinação da percentagem de células viáveis utilizando a seguinte fórmula:

$$\% \text{ viabilidade celular} = \frac{[(\text{DO}_{\text{célula tratadas}} - \text{DO}_{\text{branco}})]}{[(\text{DO}_{\text{controle negativo}} - \text{DO}_{\text{branco}})]} \times 100$$

Onde:

$\text{DO}_{\text{Células tratadas}}$ = Densidade óptica dos poços com o produto teste

$\text{DO}_{\text{Controle negativo}}$ = Densidade óptica dos poços do controle negativo

$\text{DO}_{\text{Branco}}$ = Densidade óptica dos poços contendo apenas o meio de cultura

5 Resultados e Discussão

5.1 Determinação estrutural de CF1

O espectro de RMN ^{13}C -APT (50 MHz, CDCl_3) de CF1 e suas expansões (Figuras 11,12 e 13, pág. 86 e 87) apresentou um conjunto de sinais compatíveis com uma mistura de duas substâncias. Através da detecção de sinais de carbonos olefínicos localizados na região entre δ_c 120 – 140 , pode-se perceber que se tratava de uma mistura de dois triterpenos pentacíclicos $^{12}\Delta$ da série ursano e oleanano. Os sinais em δ_c 121,66 e 145,13 corroboraram respectivamente com os carbonos C-12 e C-13 do triterpeno da serie oleanano, enquanto que os sinais em δ_c 124,35 e δ_c 139,52 demonstraram ser compatíveis com os carbonos C-12 e C-13 da série ursano. Segundo MAHATO & KUNDU (1994), triterpenos do tipo urs-12-eno possuem o C-12 desblindado em ~ 2 ppm e o C-13 blindado em ~ 5 ppm em comparação com o deslocamento químico dos mesmos carbonos dos triterpenos do tipo olean-12-eno. Esta diferença pode ser explicada devido a presença da metila em posição equatorial ligada ao carbono 19 β , a qual, por estar perto da ligação dupla, exerce um efeito γ -gauche e efeito δ sobre os carbonos 12 e 13 respectivamente. Outro sinal bastante diagnóstico para diferenciar os triterpenos dessas duas séries, é o deslocamento químico do carbono 18 da série oleanano, o qual é blindado em $\sim 11,5$ ppm em relação ao C-18 da série ursano, isto ocorre devido ao efeito γ -gauche exercido pela metila em posição axial ligada ao carbono 20 β (Figura 10). Além destes sinais também foi detectada uma absorção em δ_c 78,97 condizente com carbono oximetínico em C-3.

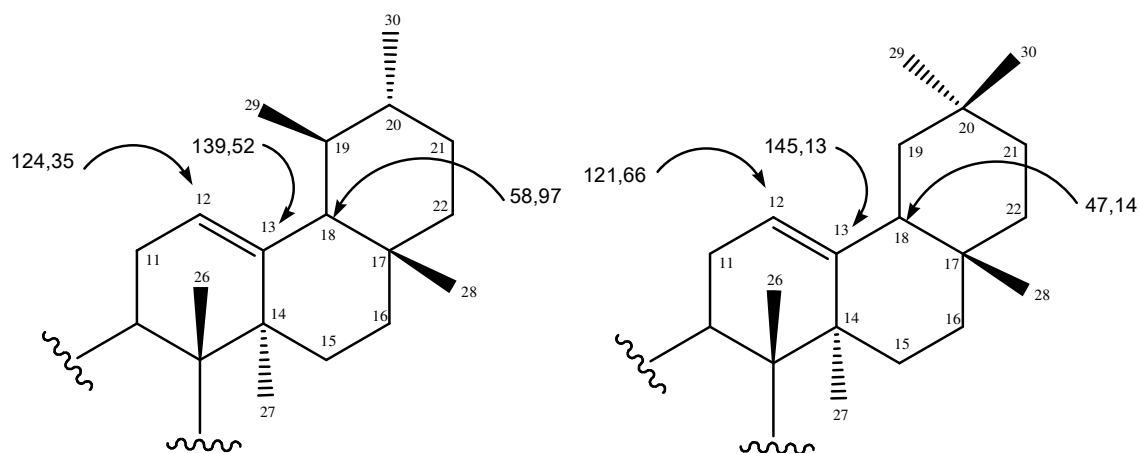


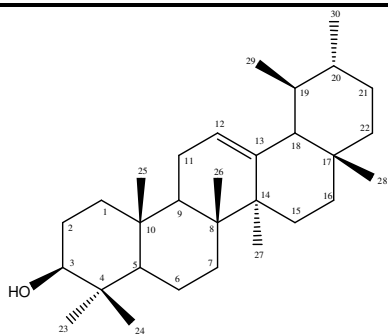
Figura 10: Deslocamentos químicos da α -amirina e β -amirina

O espectro de RMN ^1H (200 MHz, CDCl_3) (Figuras 14 e 15, pág.87 e 88) de CF1 evidenciou um envelope de sinais na região entre 0,7 e 2 ppm, típicos de hidrogênios metílicos, metínicos e metilênicos de triterpenos pentacíclicos. O multiplete em ~5,15 ppm, foi atribuído ao hidrogênio olefínico H-12, corroborando com a sugestão feita anteriormente no espectro de RMN ^{13}C para uma dupla ligação entre os carbonos C-12 e C-13, assim como o multiplete em $\sim \delta_{\text{H}} 3,20$, foi atribuído ao hidrogênio oximetínico (H-3), corroborando com a absorção do carbono 3 em $\delta_{\text{C}} 78,97$.

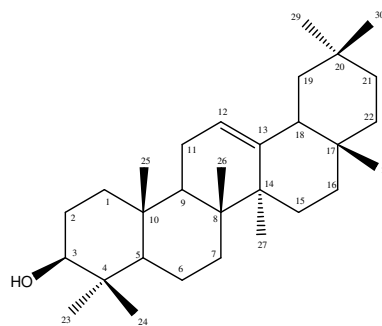
Estes dados em conjunto com os valores de RMN ^{13}C descritos na literatura (MAHATO & KUNDU, 1994; CARVALHO *et al*, 1998) (Tabela 1), permitiram identificar CF1 como sendo uma mistura de triterpenos denominados urs-12-en-3 β -ol e olean-12-en-3 β -ol, mais conhecidos como α -amirina e β -amirina respectivamente. Estes composto estão sendo relatados pela primeira vez no gênero.

Tabela 1: Dados de RMN de ^1H (200MHz) e ^{13}C (50MHz) de CF1 em CDCl_3 , comparados com os dados de RMN de ^{13}C da literatura (δ em ppm e J em Hz).

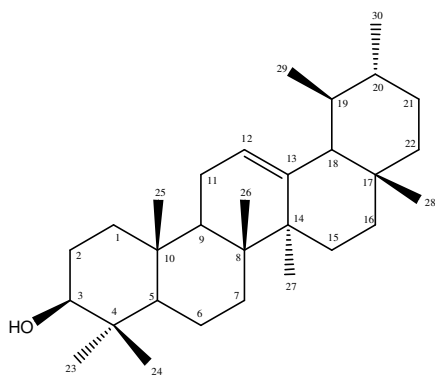
CF1				α -amirina ^a	β -amirina ^b
	δ_{C} (α -amirina)	δ_{C} (β -amirina)	δ_{H}	δ_{C}	δ_{C}
C		C			
4	38,52	4	38,52	38,7	38,7
8	39,93	8	39,93	40,0	39,9
10	36,87	10	36,87	36,9	36,9
13	139,52	13	145,13	139,3	145,2
14	42,00	14	42,00	42,0	41,7
17	33,69	17	33,69	33,7	33,7
		20	31,04		31,1
CH		CH			
3	78,97	3	78,97	78,3	79,6
5	55,10	5	55,10	55,2	55,1
9	47,64	9	47,64	47,7	47,7
12	124,35	12	121,66	124,3	121,6
18	58,97	18	47,14	58,9	47,6
19	39,60			39,6	
20	39,65			39,6	
			3,20 (1H, <i>m</i>)		
			5,15 (1H, <i>m</i>)		
CH₂		CH₂			
1	38,72	1	38,72	38,7	38,7
2	27,20	2	27,20	27,2	27,2
6	18,31	6	18,31	18,3	18,3
7	32,87	7	32,57	32,9	32,8
11	23,31	11	23,47	23,3	23,6
15	28,04	15	26,09	28,7	26,1
16	26,56	16	26,87	26,6	26,9
		19	46,75		46,7
21	31,20	21	34,67	31,2	34,7
22	41,48	22	37,09	41,5	37,1
CH₃		CH₃			
23	28,09	23	28,37	28,1	28,4
24	15,65	24	15,65	15,6	15,6
25	15,65	25	15,65	15,6	15,7
26	16,81	26	16,81	16,8	16,9
27	23,22	27	25,96	23,3	26,1
28	28,72	28	28,72	28,1	28,8
29	17,45	29	33,26	17,4	33,4
30	21,39	30	23,66	21,3	23,6



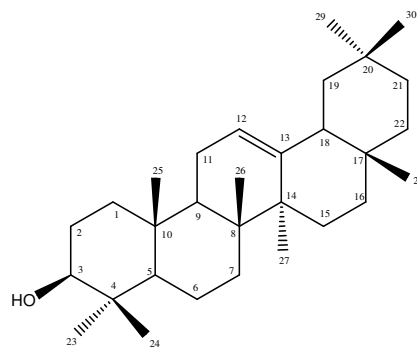
α -amirina



β -amirina



urs-12-en-3β-ol



olean-12-en-3β-ol

Foram relatadas diversas atividades farmacológicas dessas substâncias em suas formas puras ou na forma de mistura; a saber:

α-amirina

Ação antiinflamatória tópica em edema de orelha de camundongos induzido por TPA (MEDEIROS *et al*, 2007)

β-amirina

Atividade antimicrobiana contra as bactérias *Escherichia.coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae* e os fungos *Fusarium oxysporum*, *Penicillium chrysogenum* e *Aspergillus niger* (SHARMA *et al*, 2010), inibição do crescimento de células tumorais da linhagem NTUB1 (câncer de bexiga) (LIN *et al*, 2010) e atividade antiinflamatória em células RAW 264.7 (SHIH *et al*, 2010).

α-amirina e β-amirina

Inibição de colite induzida por TNBS em camundongos (VITOR *et al*, 2009), efeito ansiolítico e antidepressivo (ARAGÃO *et al*, 2006), efeito antiinflamatório contra modelo de periodontite aguda em ratos (PINTO *et al*, 2008), inibição da pancreatite aguda induzida por L-arginina (MELO *et al*, 2010) e atividade antinociceptiva em edema de bexiga de camundongo induzido por CPM (LIMA-JUNIOR *et al*, 2007).

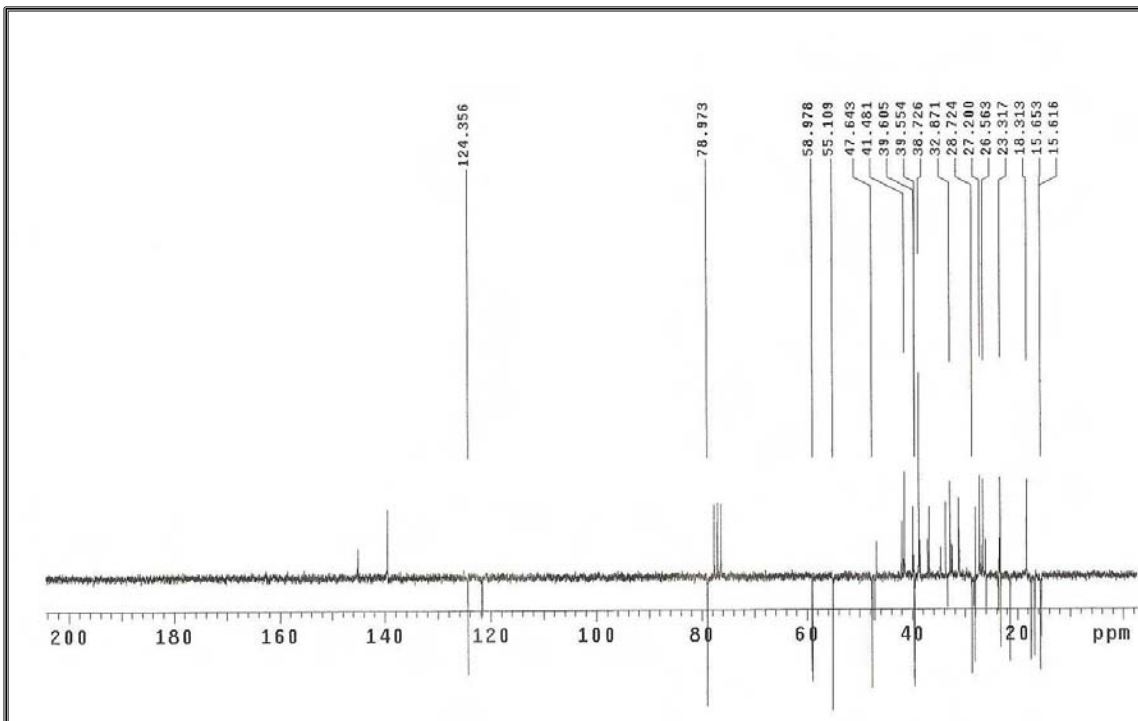


Figura 11: Espectro de RMN de ^{13}C de CF1 (CDCl_3 , 50 MHz)

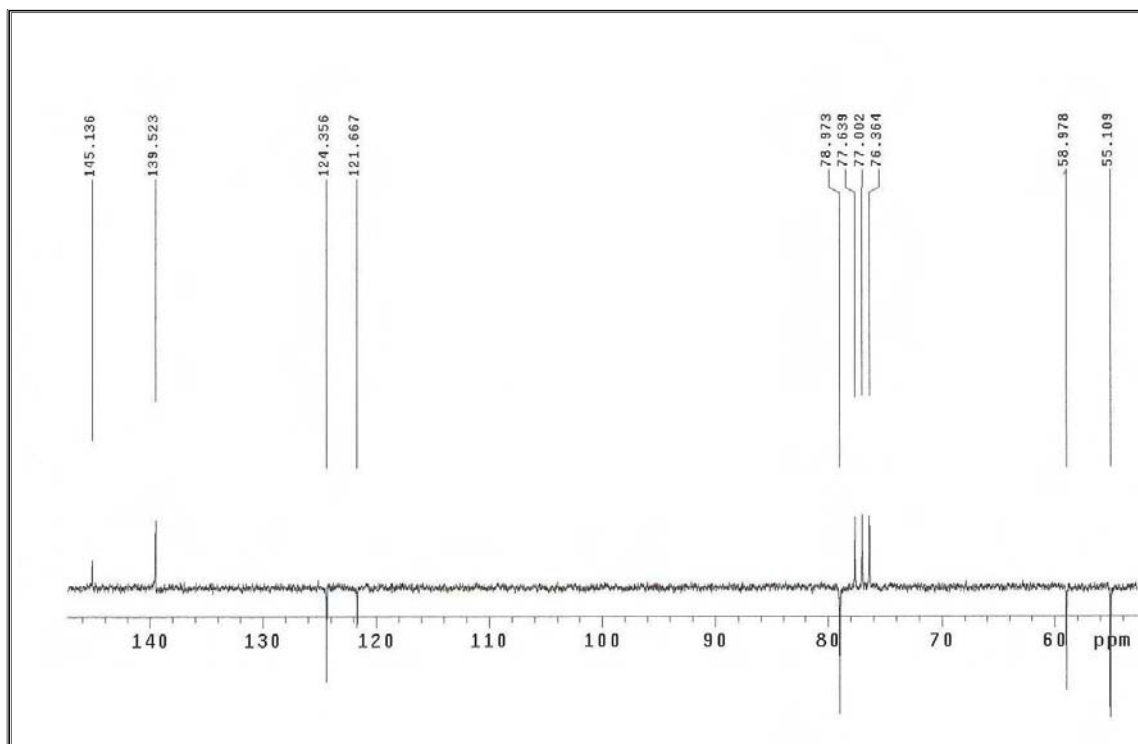


Figura 12 : Expansão do espectro de RMN ^{13}C de CF1 na região de 145 a 55 ppm (CDCl_3 , 50 MHz)

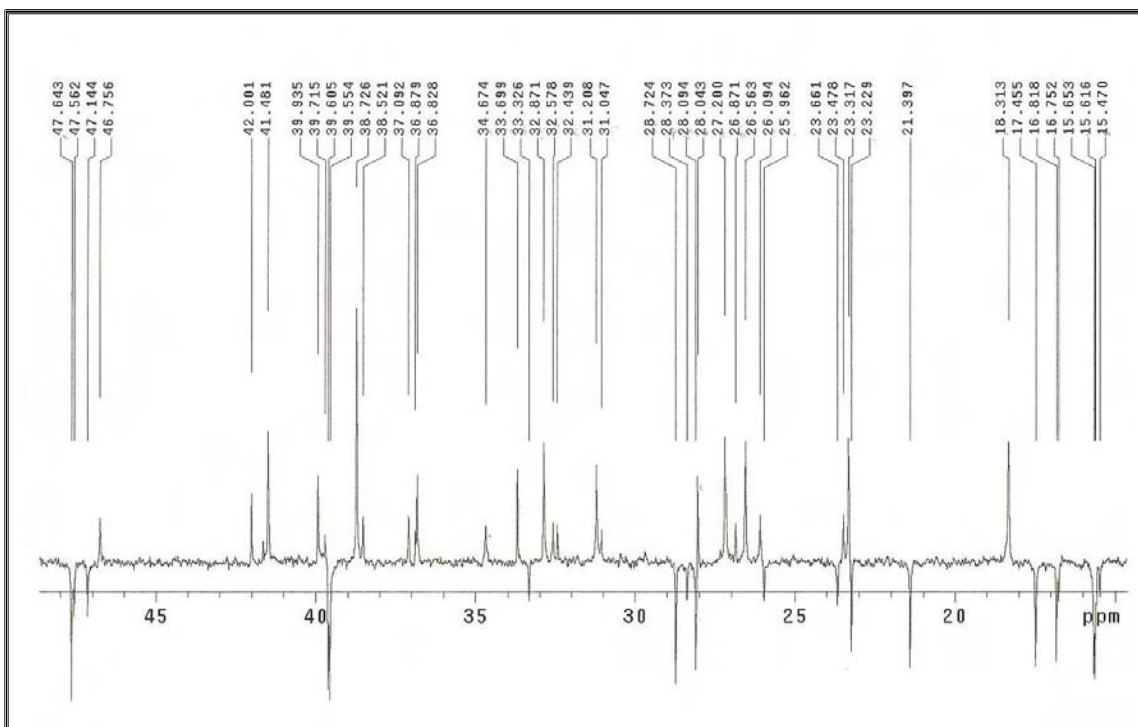


Figura 13: Expansão do espectro de RMN ^{13}C de CF1 na região de 47 a 15 ppm (CDCl_3 , 50 MHz)

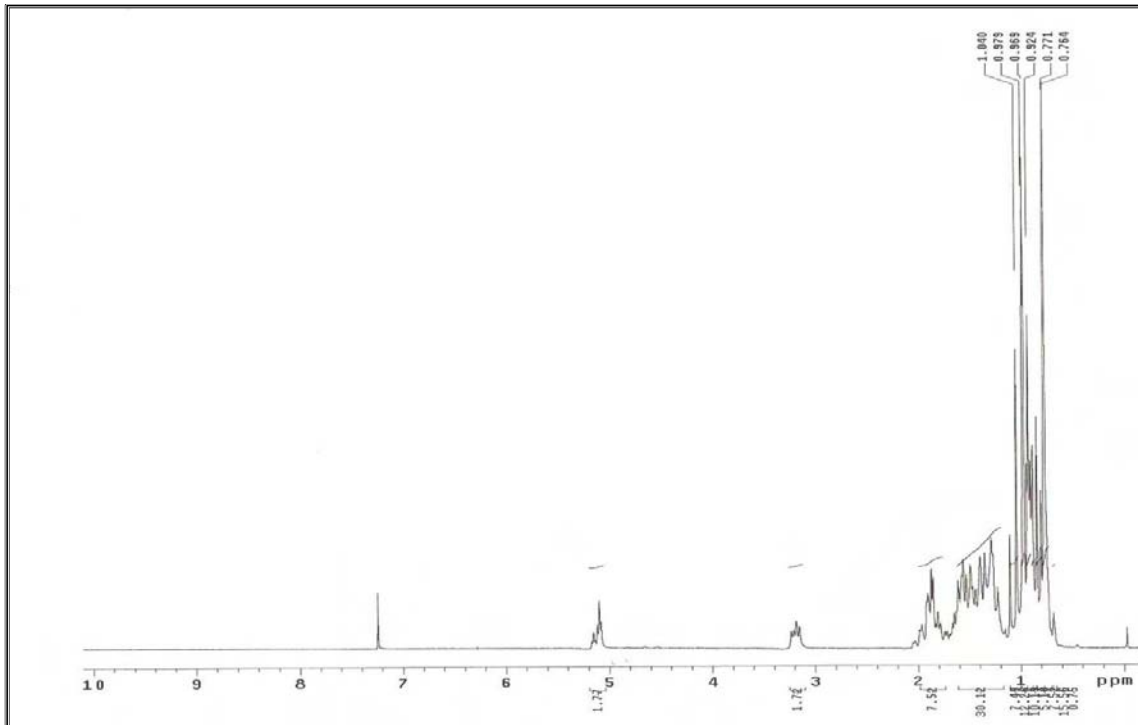


Figura 14: Espectro de RMN de ^1H de CF1 (CDCl_3 , 200 MHz)

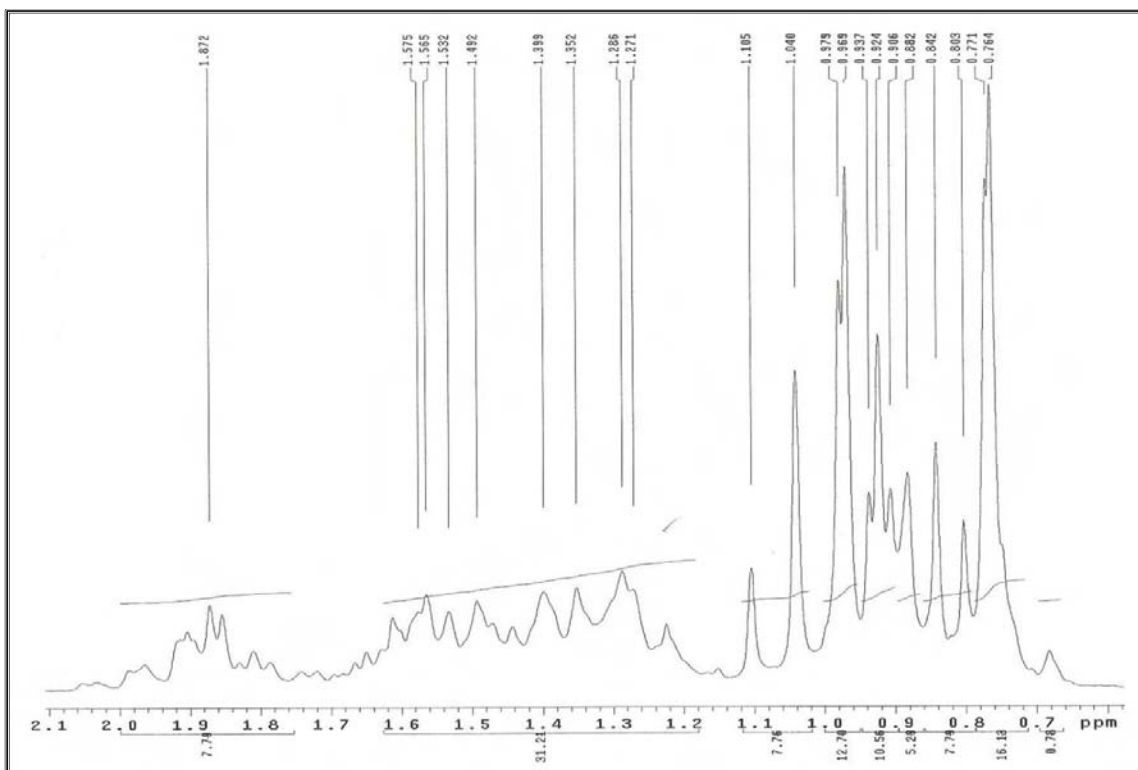


Figura 15: Expansão do espectro de RMN ^1H de CF1 na região de 1,8 a 0,7 ppm (CDCl_3 , 200 MHz)

5.2 Determinação estrutural de CF2

A substância codificada como CF2, foi isolada na forma de um pó branco amorfo, solúvel em clorofórmio, com rendimento de 0,008% em relação ao extrato etanólico bruto utilizado (200g).

O espectro de absorção na região do infravermelho, obtido em pastilhas de KBr, revelou uma absorção intensa típica de estiramento O-H em $\sim 3400\text{ cm}^{-1}$. Também foram observadas absorções de média intensidade em 1683 cm^{-1} e de baixa intensidade em 1236 cm^{-1} , típicas de estiramentos C=O e C-O respectivamente, sugerindo assim, a presença de um grupo ácido na substância (Figura 16, pág.93)

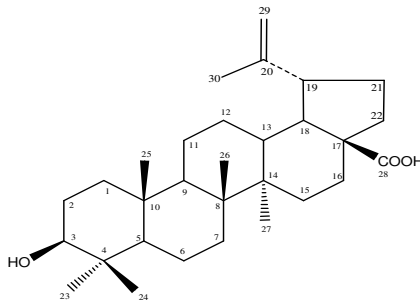
No espectro de RMN ^{13}C -APT (125 MHz, CDCl_3) (Figuras 17,18 e 19, pág. 93 e 94), observou-se a presença de 30 sinais, dos quais, 7 referentes a carbonos quaternários, 6 a carbonos metínicos, 11 a carbonos metilênicos e 6 a carbonos metílicos. Os sinais de carbonos olefínicos em δ_c 110,0 (C-29) e δ_c 150,4 (C-20), juntamente com o sinal em 19,4 (C-30) ppm, sugerem a presença de um grupo isopropenil, típico de triterpenos da série lupano (DAVID *et al* 2007; COSTA *et al*, 2010). Adicionalmente a esses sinais, pode-se observar o sinal em 79,0 ppm referente ao carbono oximetínico na posição 3β (COSTA *et al* 2010) e o sinal em 180,0 ppm, referente a carbonila de ácido, o que corrobora com o estiramento C=O em 1683 cm^{-1} e o estiramento O-H em $\sim 3400\text{ cm}^{-1}$ observados no espectro de absorção de infravermelho.

O espectro de RMN ^1H (200 MHz, CDCl_3) (Figuras 20,21 e 22, pág.95 e 96) apresentou 6 singletos condizentes com 6 metilas em 0,73; 0,80; 0,91; 0,94; 0,95 e 1,67 ppm, este último singleto em δ_H 1,67 é característico de metila ligada a carbono olefínico, que juntamente com os singletos largos em 4,59 ppm e 4,72 ppm referentes aos hidrogênios metilênicos (H-29_a e H-29_b), reforça a presença do grupo isopropenil na molécula (DAVID *et al*, 2007). Além destes sinais, também foram detectados um triplo dubleto em δ_H 2,98 (H-19, $J=10,5$ e $5,5$ Hz) e um multipletto em 2,26 ppm (H-13) (YILI *et al*, 2009). Também foi observado um duplo dubleto em δ_H 3,18 (H-3, $J =11,5$ e 5 Hz), característico de hidrogênio oximetínico em triterpenóides 3β -OH. Este sinal, juntamente com a absorção do carbono 3 em δ_c 79,0, confirma a estereoquímica desta hidroxila na posição beta (COSTA *et al*, 2010).

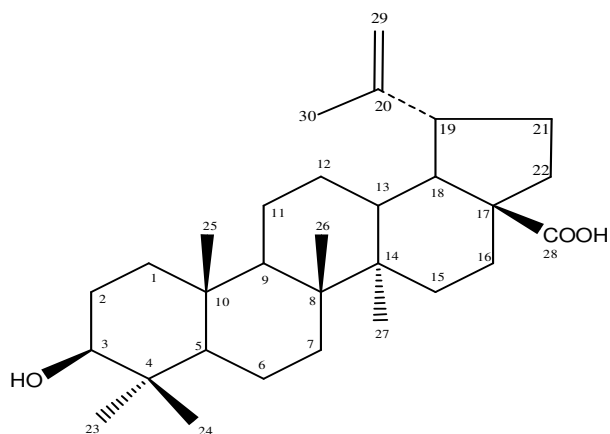
Tabela 2: Dados de RMN de ^1H (500MHz) e ^{13}C (125MHz) de CF2 em CDCl_3 , comparados com os dados de RMN de ^{13}C da literatura (δ em ppm e J em Hz).

	CF2		Ácido Betulínico ^a
	δ_{C}	δ_{H}	δ_{C}
C			
4	38,91		38,8
8	40,74		40,7
10	37,25		37,2
14	42,48		42,4
17	56,34		56,3
20	150,43		150,3
28	180,0		180,5
CH			
3	79,06	3,18 (1H, <i>dd</i> , $J=11,5$ e 5)	78,9
5	55,39		55,3
9	50,56		50,5
13	38,44	2,26 (1H, <i>m</i>)	38,4
18	46,93	1,59 (1H, <i>m</i>)	46,8
19	49,32	2,98 (1H, <i>td</i> , $J=10,5$ e $5,5$)	49,2
CH₂			
1	38,76		38,7
2	27,44	1,59 (2H, <i>m</i>)	27,4
6	18,32		18,3
7	34,37		34,3
11	20,90	1,25 (2H, <i>m</i>)	20,8
12	25,55	1,35 (2H, <i>m</i>)	25,5
15	30,60		30,5
16	32,20		32,1
21	29,74		29,7
22	37,07	1,97 (2H, <i>m</i>)	37,0
29	110,0	4,59 (H _a , <i>s</i>), 4,72 (H _b , <i>s</i>)	109,6
CH₃			
23	28,03	0,91 (3H, <i>s</i>)	27,9
24	15,37	0,73 (3H, <i>s</i>)	15,3
25	16,07	0,80 (3H, <i>s</i>)	16,0
26	16,16	0,94 (3H, <i>s</i>)	16,1
27	14,73	0,95 (3H, <i>s</i>)	14,7
30	19,42	1,67 (3H, <i>s</i>)	19,4

(a) MAHATO & KUNDU, 1994



Após analisar esses dados, e assinalar todos os carbonos de CF₂ com os da literatura (MAHATO & KUNDU, 1994) (Tabela 2), pode-se definir esta estrutura como sendo o ácido (3β)-3-Hidroxi-lup-20(29)-en-28-óico. Este composto é usualmente denominado de Ácido Betulínico , e está sendo relatado pela primeira vez na espécie.



(3 β)-3-Hidroxi-lup-20(29)-en-28-óico

O triterpeno ácido betulínico ocorre naturalmente em diversas plantas, e possui diversas atividades como inibição do vírus da hepatite B (Yao et al, 2009) e HIV-1 (THEO *et al*, 2009), atividade osteoblastogênica (LO *et al*, 2010), e principalmente atividade citotóxica frente a células tumorais das linhagens: HL-60 e K562 (leucemia) (FAUJAN et al, 2010; WU et al, 2010), SNU-C5/WT, SNU-C5/5FU-R e SNU-C5/OXT-R (câncer de colon) (JUNG et al, 2007), LNCaP (câncer de próstata) (Chintharlapalli, et al, 2007), EPG85-257 (carcinoma gástrico) , EPP85-181 (carcinoma pancreático) (DRAG et al, 2009), SKNSH, SHSY5Y, IMR-5, LAN-5, NBL-S, NBAS5, NBAS6, NBL-W, NBL-WR e MEL-2 (neuroblastoma) (Schmidt et al, 1997).

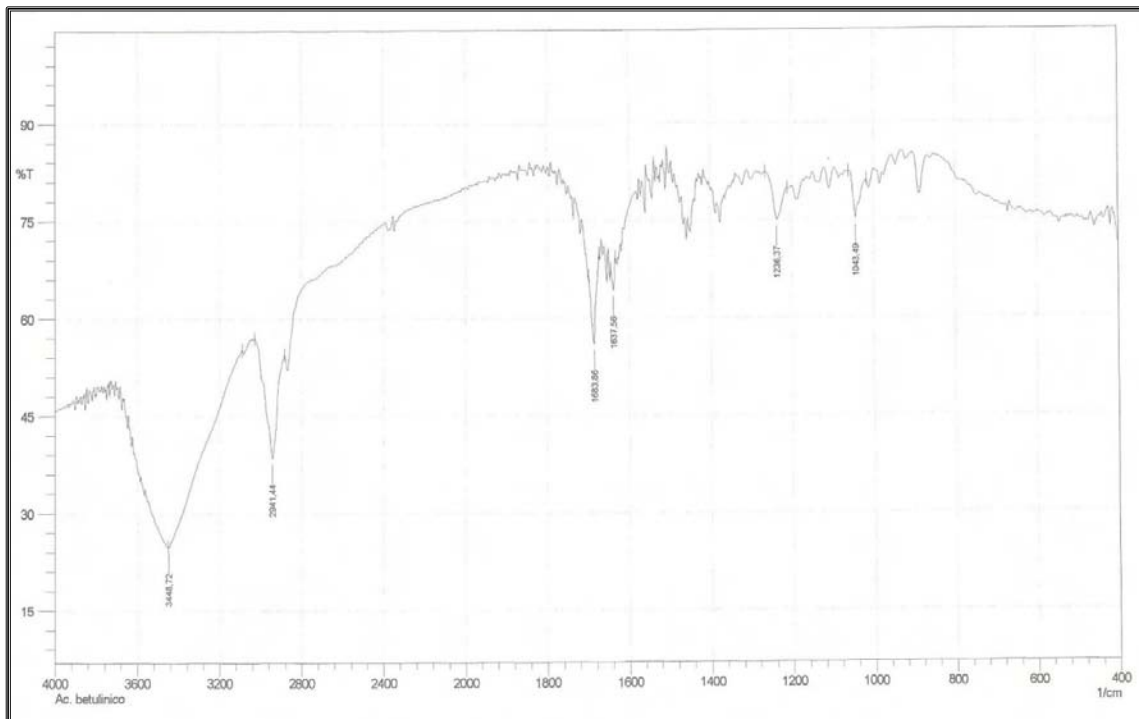


Figura 16: Espectro na região do infravermelho de CF2 (Pastilha de KBr)

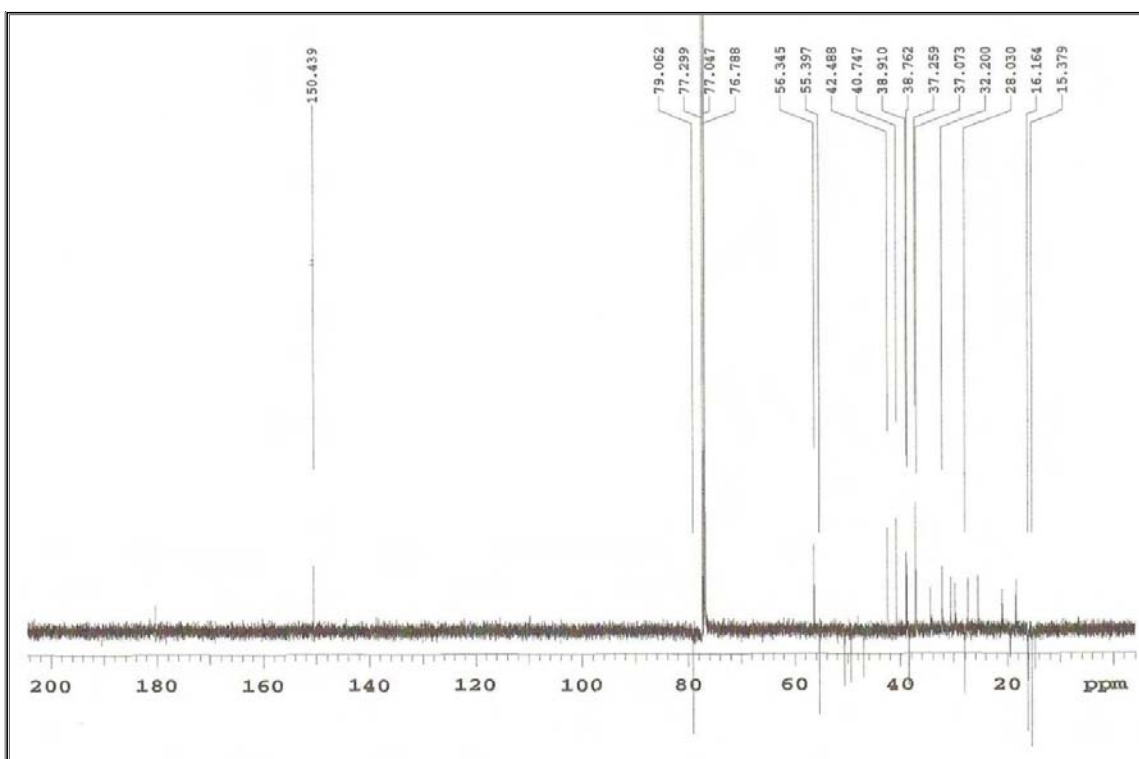


Figura 17: Espectro de RMN de ^{13}C de CF1 (CDCl_3 , 125 MHz)

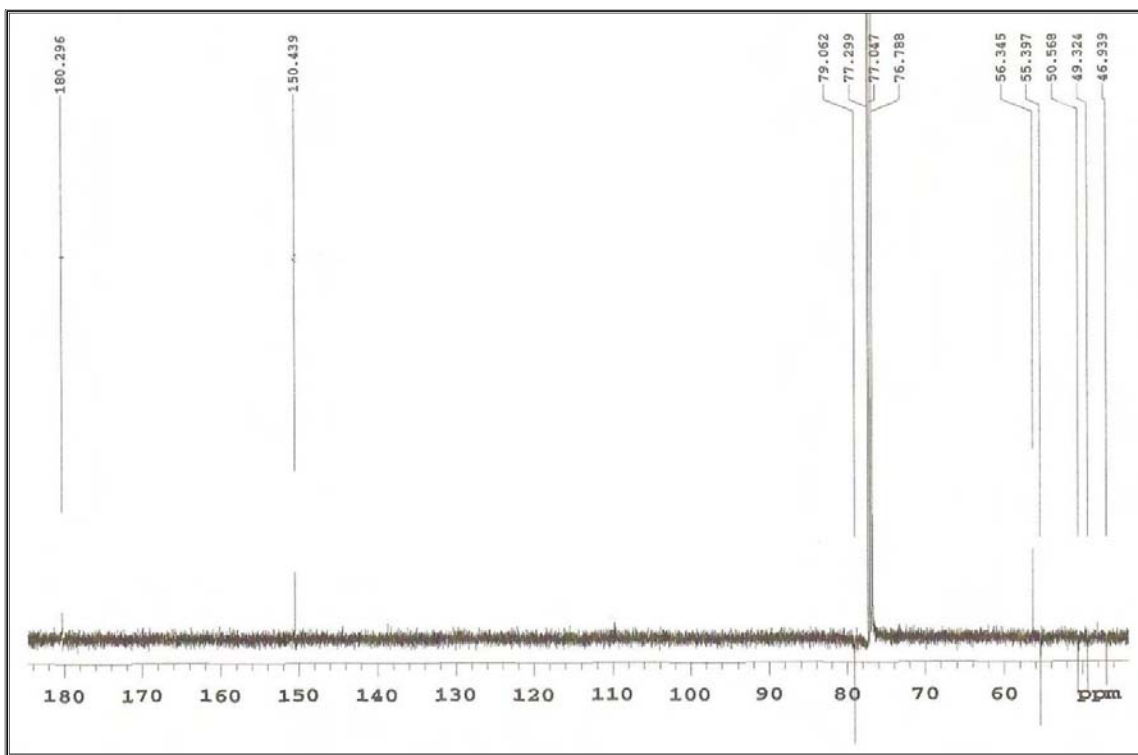


Figura 18: Expansão do espectro de RMN ^{13}C de CF_2 na região de 180 a 46 ppm (CDCl_3 , 125 MHz)

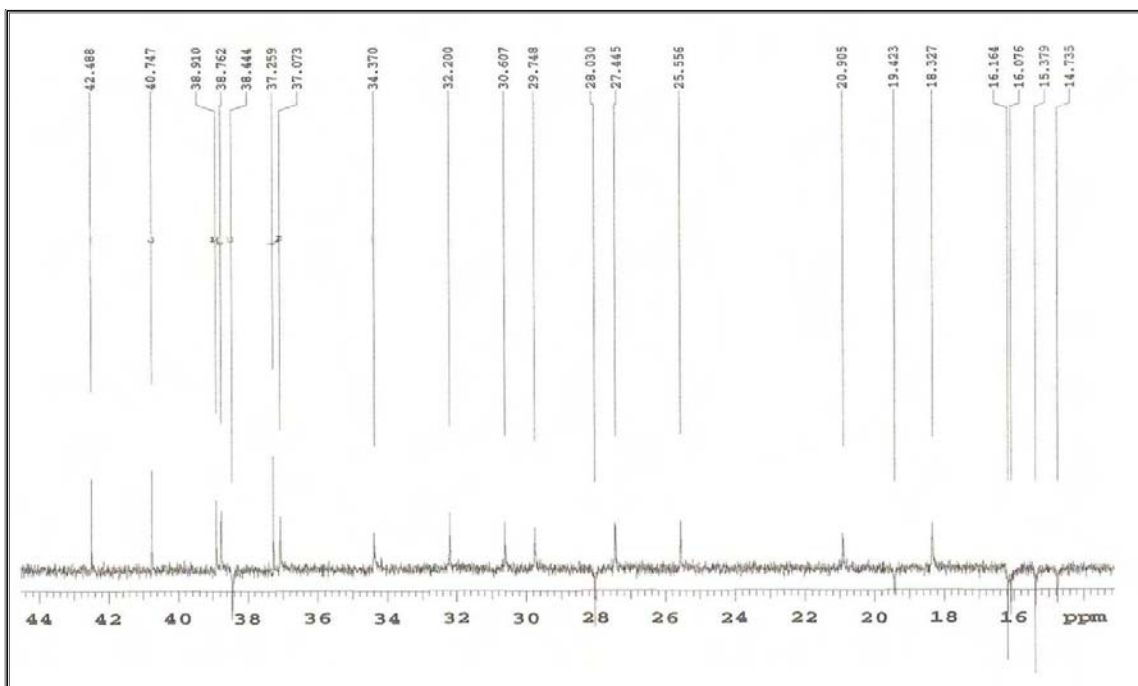


Figura 19: Expansão do espectro de RMN ^{13}C de CF_2 na região de 42 a 146 ppm (CDCl_3 , 125 MHz)

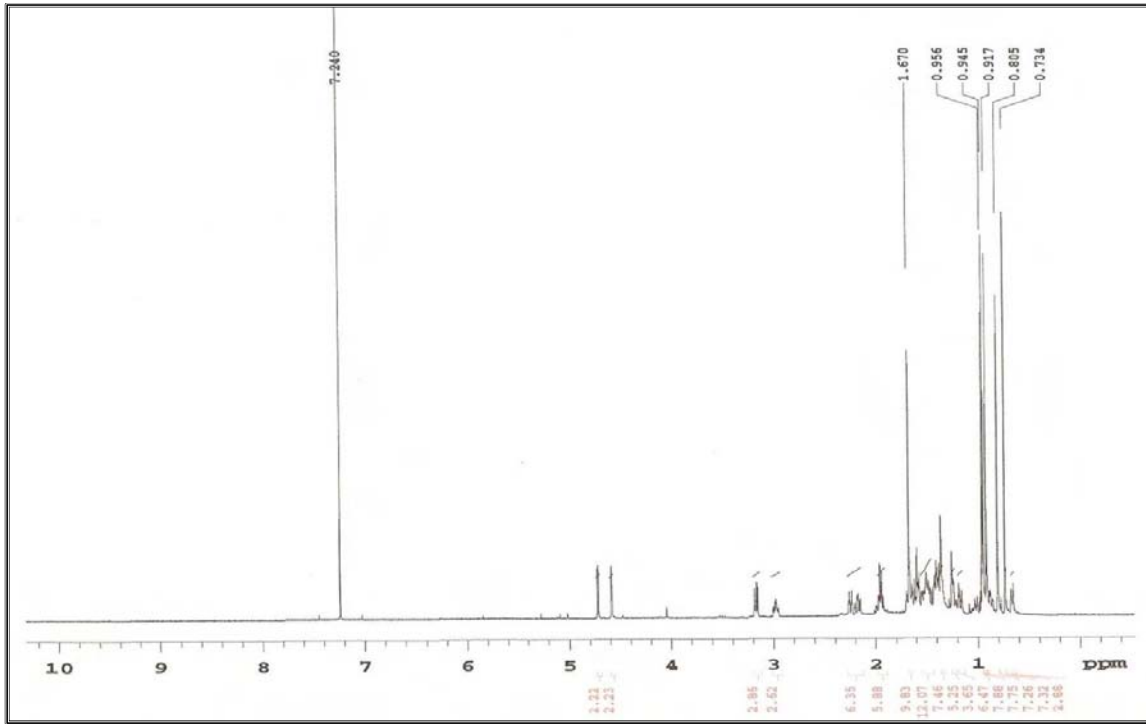


Figura 20: Espectro de RMN de ^1H de CF_2 (CDCl_3 , 500 MHz)

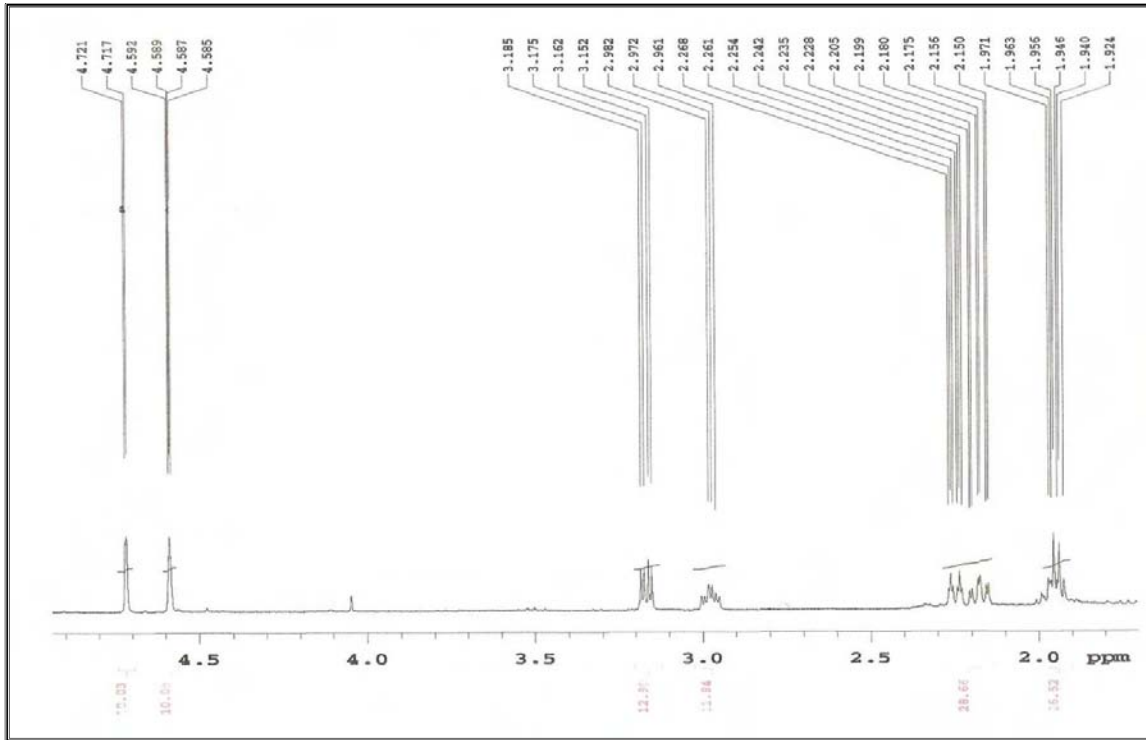


Figura 21: Expansão do espectro de RMN ^1H de CF_2 na região de 4,7 a 1,9 ppm (CDCl_3 , 500 MHz)

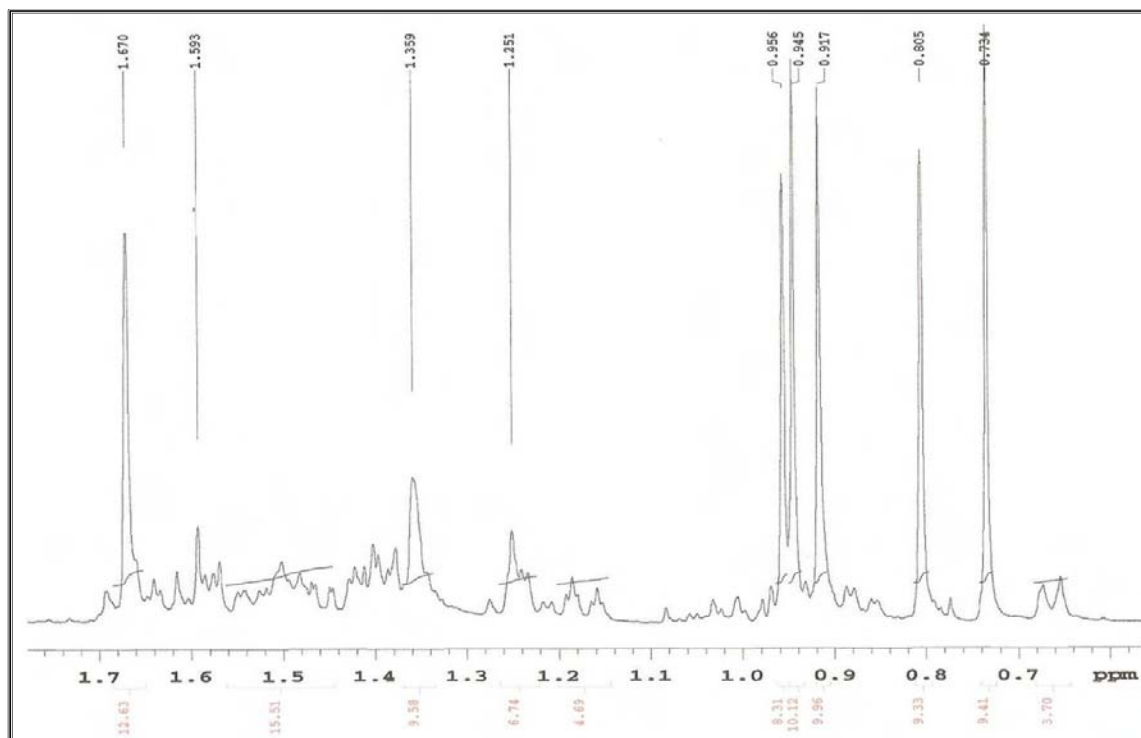


Figura 22: Expansão do espectro de RMN ^1H de CF_2 na região de 1,7 a 0,7 ppm (CDCl_3 , 500 MHz)

5.3 Determinação estrutural de CF3

A substância codificada como CF3, foi isolada na forma de um pó branco amorfo, solúvel em clorofórmio, com rendimento de 0,025% em relação ao extrato etanólico bruto (200g) e ponto de fusão 132 – 134 °C .

No espectro de RMN ^{13}C -APT (50 MHz, CDCl_3) (Figura 25, 26, 27, pág.101 e 102), observou-se a presença de 29 sinais, dos quais, 3 referentes a carbonos quaternários, 11 a carbonos metínicos, 9 a carbonos metilênicos e 6 a carbonos metílicos. Os sinais de carbonos olefínicos em 117,4, 129,4, 138,1 e 139,6 ppm sugerem a presença de duas ligações duplas. Estes sinais são característicos de compostos com esqueletos esteroidais ramificados, quando uma das insaturações está localizada entre C-7 e C-8 (δ_c 117,4 e δ_c 139,6) e outra entre C-22 e C-23 (δ_c 129,4 e δ_c 138,1) (ZANON *et al*, 2008). A presença de ligação dupla entre os carbonos 5 e 6 foi descartada, pois quando isso ocorre, os deslocamentos químicos são de 140,6 (C-5) e 121,4 (C-6) ppm. Nesta situação estrutural (Δ^5) o carbono 4 absorve em ~ 42 ppm, pois está desprotegido devido ao efeito eletronegativo exercido pela dupla ligação entre C-5 e C-6, e o carbono metílico 19, absorve em torno de 19 ppm, contudo em Δ^7 esteróides, o carbono 4 absorve perto de 38 ppm e o carbono 19 absorve em cerca de 13 ppm, devido ao efeito γ -gauche do hidrogênio pseudoaxial do carbono 6 (BRAZ FILHO *et al*, 1986). Observe a figura 23:

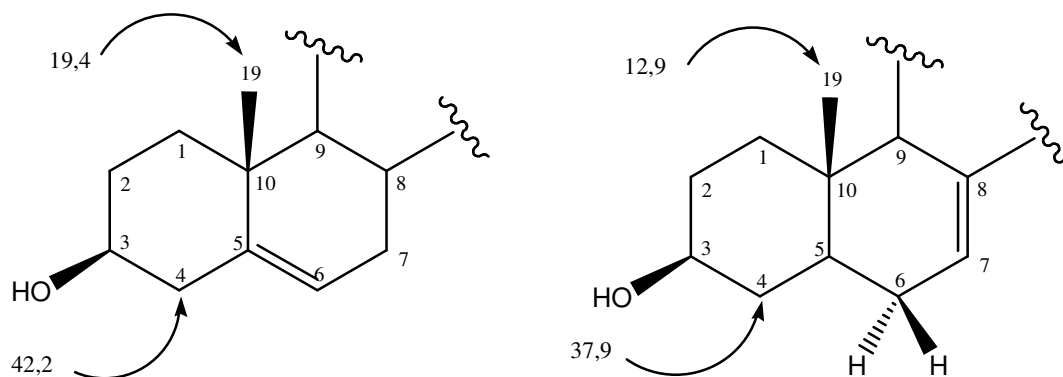


Figura 23 : Deslocamentos químicos de carbonos em esqueletos esteroidais com duplas ligações diferentes.

Através de comparações dos deslocamentos químicos de CF3 com valores da literatura (SOUZA *et al*, 2001), pode-se estabelecer a configuração 24S/α para o esteróide, de acordo com a figura 24:

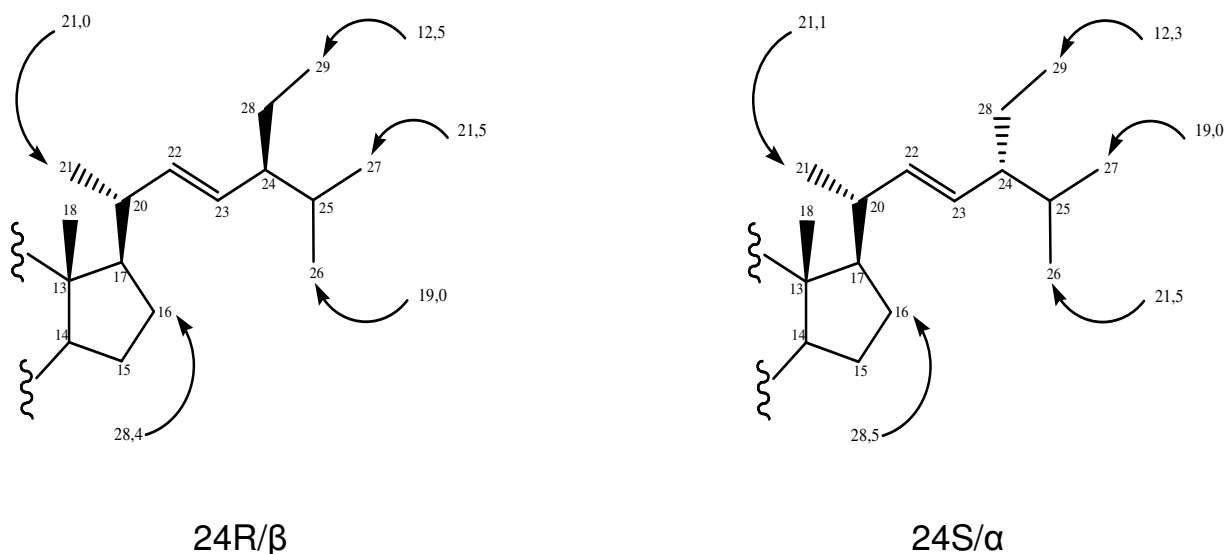


Figura 24: Deslocamentos químicos dos carbonos em estruturas na forma 24R/β e 24S/α

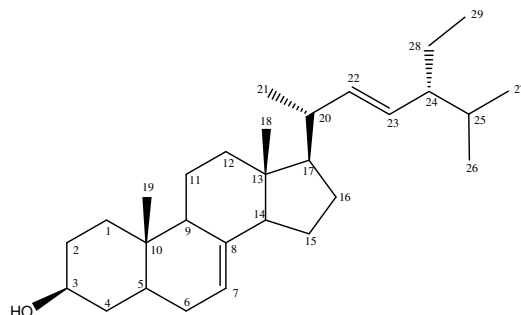
O espectro de RMN ^1H (200 MHz, CDCl_3) (Figuras 28 e 29, pág.102 e 103) apresentou um envelope de sinais entre 0,5 e 2,0 ppm, típico de hidrogênios metínicos, metílicos e metilênicos de esteróides. Adicionalmente a esses sinais, foram observados um singlete largo em δ_{H} 5,12, compatível com o hidrogênio olefínico (H-7), um multiplete em δ_{H} 3,57, compatível com hidrogênio oximetínico (H-3) (VILLASEÑOR *et al*, 1996) e o singlete em δ_{H} 0,52 (H-18) que confirma a localização da ligação dupla entre os carbonos 7 e 8 (BRAZ FILHO *et al*,1986).

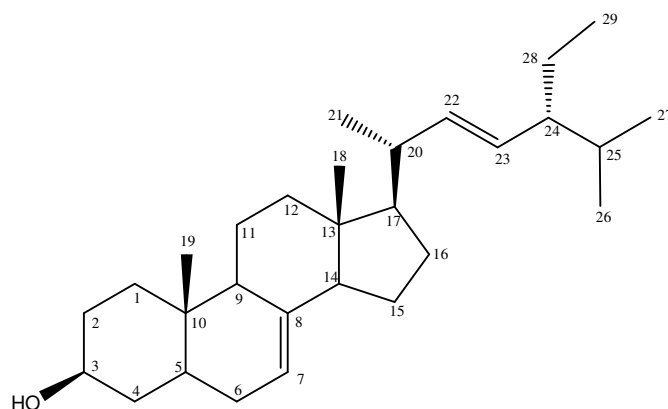
Após analisar esses dados, e assinalar todos os carbonos de CF3 com os da literatura (VILLASEÑOR *et al*, 1996) (Tabela 3), pode-se definir esta estrutura como sendo o 24α-etil-5α-colesta-7,*trans*-22-dien-3β-ol, este composto é usualmente denominado de espinasterol, está sendo relatado pela primeira vez no gênero *Combretum*.

Tabela 3: Dados de RMN de ^1H (200MHz) e ^{13}C (50MHz) de CF3 em CDCl_3 , comparados com os dados de RMN de ^{13}C da literatura (δ em ppm e J em Hz).

	CF3		Espinasterol ^a
	δ_{C}	δ_{H}	δ_{C}
C			
8	139,555		139,529
10	34,192		34,190
13	43,263		43,268
CH			
3	71,054	3,57 (1H, <i>m</i>)	71,035
5	40,230		40,229
7	117,449	5,12 (1H, <i>s</i>)	117,427
9	49,411		49,420
14	55,104		55,092
17	55,851		55,862
20	40,845		40,823
22	138,177	5,19 (1H, <i>m</i>)	138,151
23	129,399	5,19 (1H, <i>m</i>)	129,449
24	51,235		51,217
25	31,870		31,846
CH₂			
1	37,116		37,11
2	31,452		31,443
4	37,966		37,952
6	29,620		29,628
11	21,531		21,524
12	39,431		39,438
15	23,004		22,979
16	28,514		28,489
28	25,400		25,379
CH₃			
18	12,043	0,52 (3H, <i>s</i>)	12,032
19	13,047	0,77 (3H, <i>s</i>)	13,071
21	21,106	1,01 (3H, <i>d</i> , $J=6,8$)	21,082
26	21,370	0,916 (3H, <i>d</i> , $J=6,6$)	21,343
27	18,982	0,916 (3H, <i>d</i> , $J=6,6$)	18,974
29	12,255		12,229

(^a)VILLASEÑOR *et al*,1996





24 α -etil-5 α -colesta-7,*trans*-22-dien-3 β -ol

O esteróide espinasterol ocorre naturalmente em diversas plantas, e possui diversas atividades como inibição da DNA topoisomerase I e II (BYUN *et al*, 2007), inibição da proliferação de células glomerulares mesangiais (JEONG *et al*, 2004), ação antinociceptiva (FREITAS *et al*, 2009), citotoxicidade frente a células tumorais das linhagens: MCF-7 e MDA-MB-231 (câncer de mama), 2774 (câncer de ovário) e HeLa (câncer cervical) (JEON *et al*, 2005), atividade antiulcerogênica (KLEIN JUNIOR *et al*, 2010) e antigenotóxica (VILLASEÑOR *et al*, 1996).

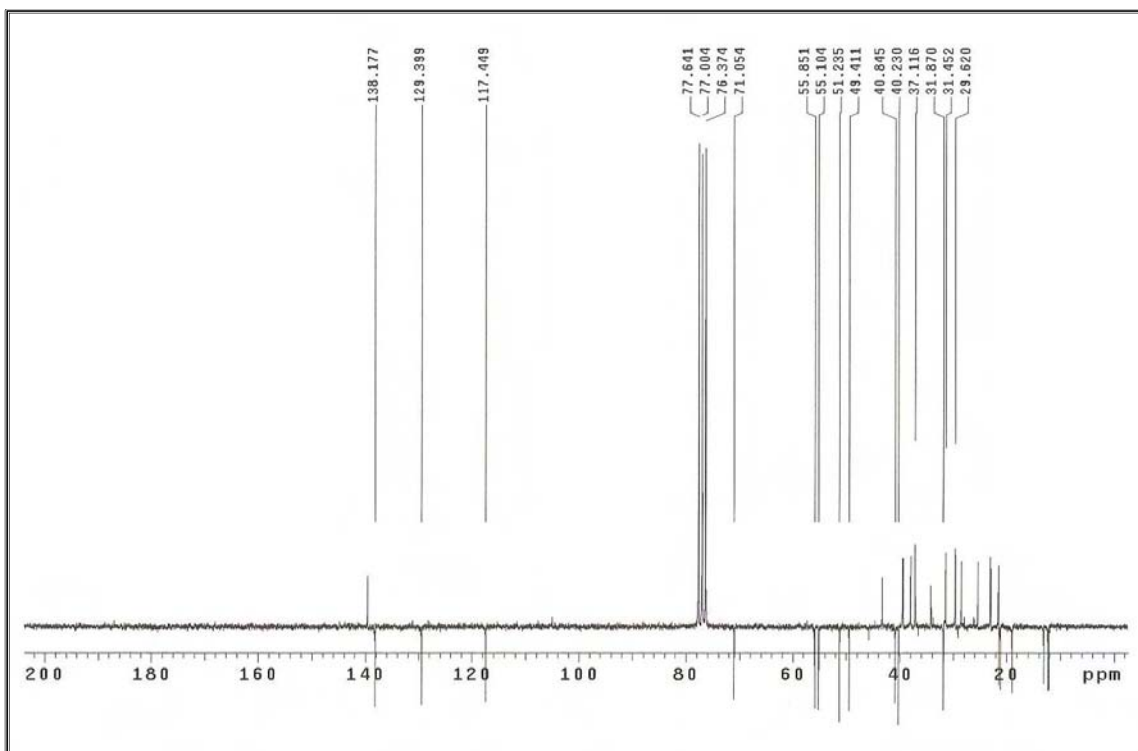


Figura 25: Espectro de RMN de ^{13}C de CF_3 (CDCl_3 , 50 MHz)

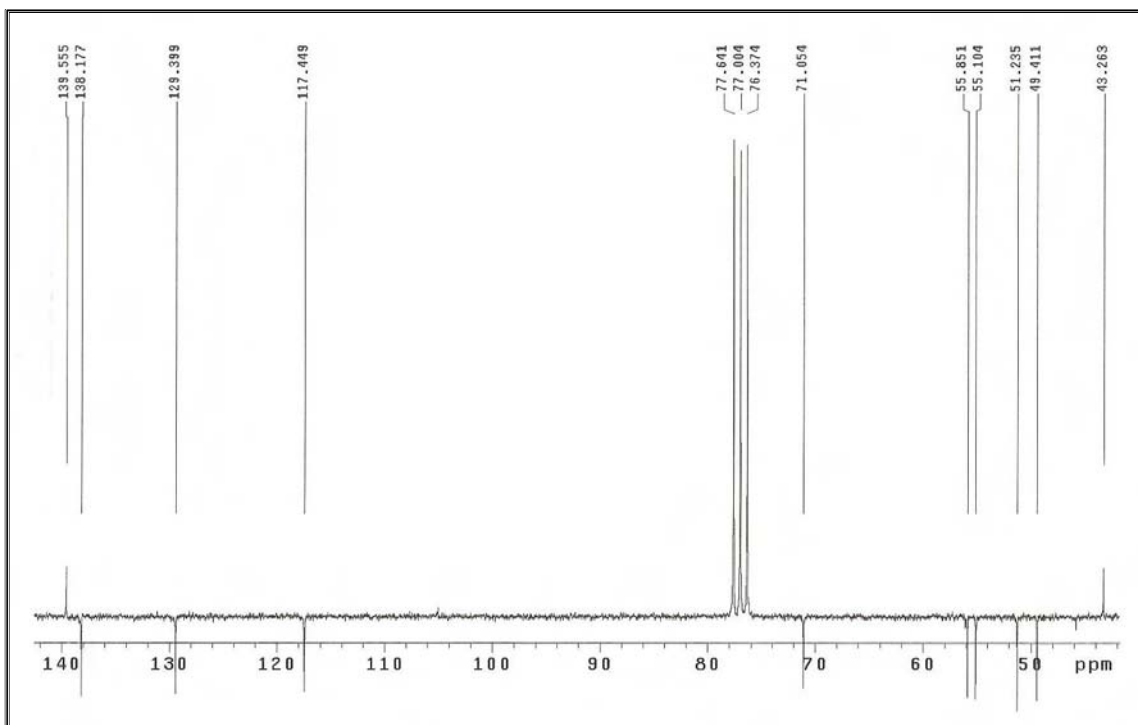


Figura 26: Expansão do espectro de RMN ^{13}C de CF_3 na região de 140 a 43 ppm (CDCl_3 , 50 MHz)

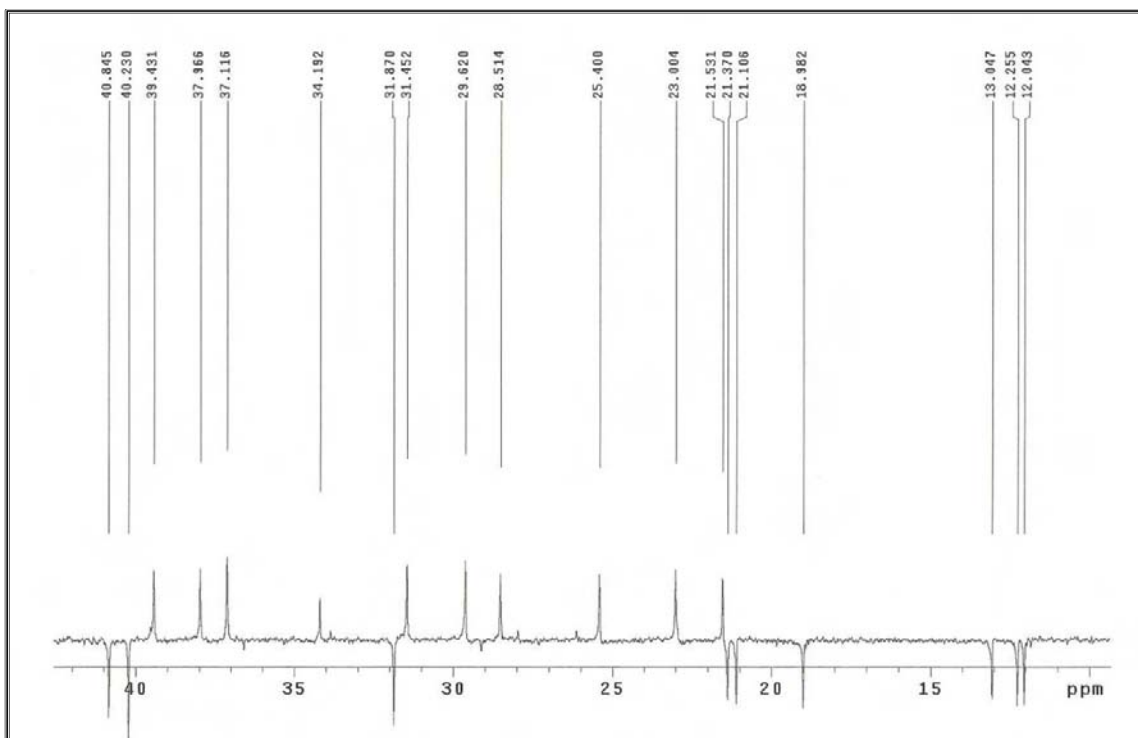


Figura 27: Expansão do espectro de RMN ^{13}C de CF_3 na região de 140 a 43 ppm (CDCl_3 , 50 MHz)

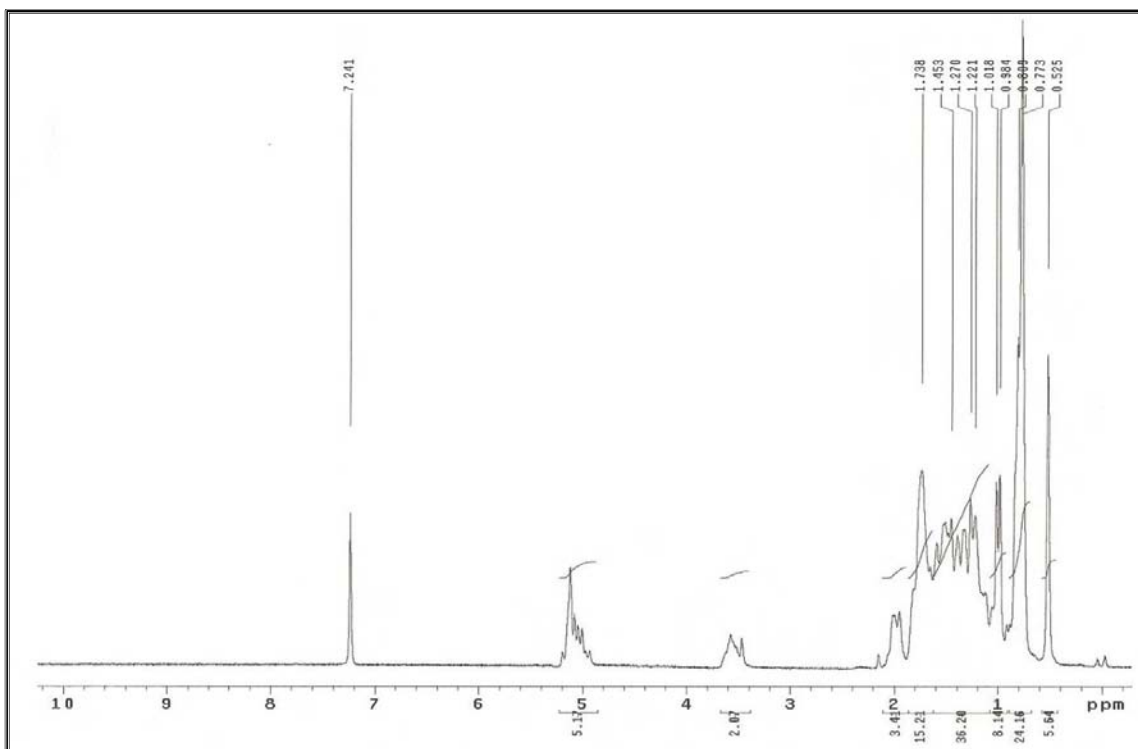


Figura 28: Espectro de RMN de ^1H de CF_3 (CDCl_3 , 200 MHz)

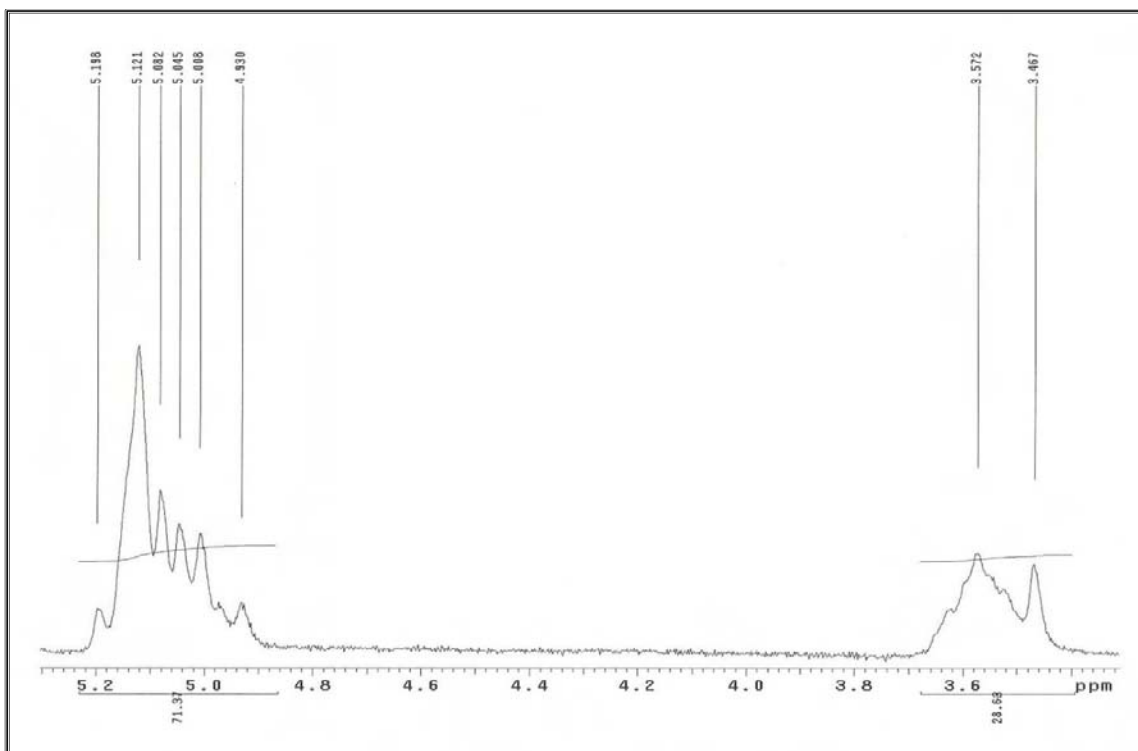


Figura 29: Expansão do espectro de RMN ^1H de CF_3 na região de 5,2 a 3,4 ppm (CDCl_3 , 200 MHz)

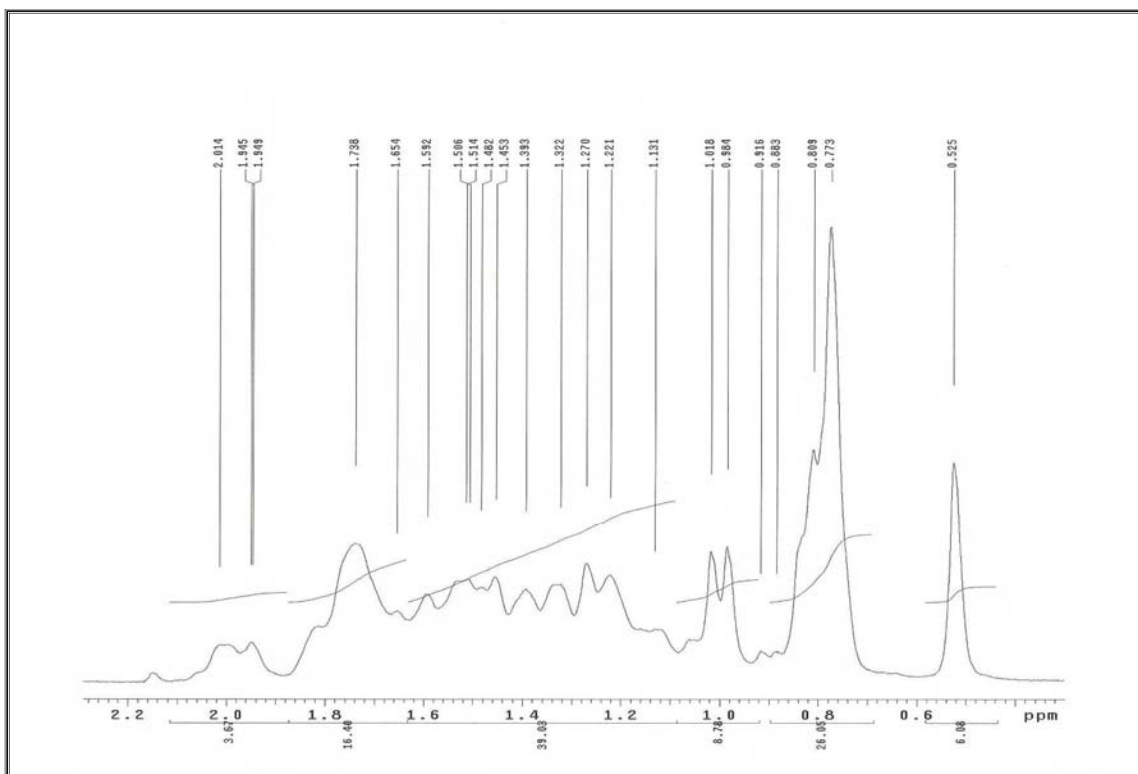


Figura 30: Expansão do espectro de RMN ^1H de CF_3 na região de 0,5 a 2,0 ppm (CDCl_3 , 200 MHz)

5.4 Determinação estrutural de CF4

Após acetilação da fase acetato de etila, foi isolada a substância codificada como CF4, sob a forma de um pó branco amorfo, solúvel em clorofórmio, com rendimento de 0,014% em relação ao seu extrato etanólico bruto (200g).

No espectro de RMN ^{13}C -APT (125 MHz, CDCl_3) (Figuras 31- 37, pág. 108-111), observou-se que o perfil de CF4 era bastante parecido com o de CF3. Ao comparar as absorções de ambos, percebeu-se que os sinais dos carbonos olefínicos de CF4 em 117,2, 129,4, 138,1 e 139,5 ppm corroboravam com os sinais de CF3, sugerindo assim, a presença de duas ligações duplas em compostos esteroidais ramificados, com as ligações duplas localizadas entre C-7 e C-8 (δ_c 117,2 e δ_c 139,5) e entre C-22 e C-23 (δ_c 129,4 e δ_c 138,1) (ZANON *et al*, 2008). Sinais adicionais também foram observados, como por exemplo, a absorção característica de carbono anomérico em δ_c 99,6, sugerindo a presença de apenas uma unidade osídica. A acetilação desta unidade foi confirmada pelas absorções entre 169 e 173 ppm, atribuídas aos carbonos carbonílicos dos grupos acetatos. Além do carbono anomérico mencionado acima, também foram observados sinais referentes aos carbonos C-5' (72,9 ppm), C-2' (71,71 ppm), C-3' (71,5 ppm), C-4' (68,7 ppm) e C-6' (62,1 ppm), sinais estes, característicos de carbonos pertencentes a unidades osídicas. Esta unidade osídica foi identificada como sendo a glicose acetilada após comparação dos dados espectrais de RMN ^{13}C -APT de CF4 com os dados de uma glicose acetilada (BRAZ FILHO *et al*, 1986).

Após análise dos dados espectrais restantes, pode-se localizar a hexapiranosose ligada ao átomo de oxigênio do carbono 3β da aglicona, pois é previsto a oxigenação deste carbono por razões biogenéticas (BRAZ-FILHO *et al*, 1986). Esta dedução apoiou-se nos efeitos da glicosilação da 3β -hidroxila sobre os deslocamentos químicos dos carbonos 2, 3 e 4, revelados por comparação do glicosídeo acetilado com a aglicona (Figura 30).

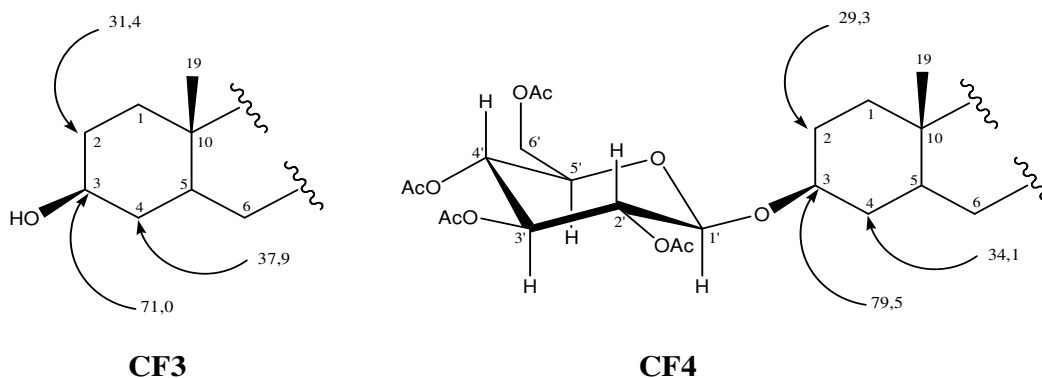


Figura 31: Comparação dos deslocamentos químicos das substâncias CF3 e CF4

O espectro de RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) (FIGURAS 38-42, pág.111-113) apresentou absorções entre 1,97 e 2,02 ppm, caracterizando a presença de grupos acetoxilas da unidade osídica; também foi observado um envelope de sinais entre 0,5 e 1,0 ppm, típico de hidrogênios metílicos de esteróides. Adicionalmente a esses sinais, foram observados um singleto largo em δ_{H} 5,12, compatível com o hidrogênio olefínico (H-7), dois duplo dubletos em δ_{H} 5,17 ($J= 9,5$ e 19 Hz) e δ_{H} 5,03 ($J=4$ e 9,5 Hz), referentes aos H-22 ou H-23 e um multiplete em δ_{H} 3,54, compatível com hidrogênio oximetínico (H-3). (VILLASEÑOR *et al*, 1996); os outros sinais podem ser vistos na tabela 4 .

No espectro de correlação $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ – HMQC (500 e 125 MHz, CDCl_3) (Fig. 43-46, Pág.114 e 115) e suas expansões, pode-se verificar correlações diretas entre os prótons em 5,12 (*s*); 5,03 (*m*) e 5,17 (*m*) ppm com os carbonos em 117,25; 129,46 e 138,11 ppm, atribuindo-os a C-7, C-23 e C-22, respectivamente. Deslocamentos em δ_{H} 4,57 (*d*, $J= 8\text{Hz}$) e δ_{H} 3,54 (*m*) mostraram correlações com δ_{C} 99,65 e δ_{C} 79,58 ppm (Fig. 21, Pág 66) sendo atribuídos a C-1' e C-3. As demais correlações estão compiladas na Tabela 4.

No espectro de correlação $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ – HMBC (500 e 125 MHz, CDCl_3) e suas expansões (Fig. 47-49, Pág.116 e 117) foram observadas correlações do próton H-7 em δ_{H} 5,12 com os carbonos C-9 (δ_{C} 49,38) e C-5 (δ_{C} 40,19), assim como a correlação do H-22 em δ_{H} 5,17 com os carbonos C-20 (δ_{C} 40,78) e C-23 (δ_{C} 129,46) mostrando que as duplas estão localizadas entre os carbonos C-7 e C-8 e entre C-22 e C-23. Também foram observadas correlações do próton H-1' em δ_{H} 4,57, com o carbono C-3 em δ_{C} 79,58, mostrando que realmente o espinasterol encontrava-se glicosilado no C-3 da aglicona.

Também No espectro de massas de CF-4 (ESI – MH⁺) foi observado o íon 413 m/z correspondente a aglicona, portanto não sendo detectado o íon molecular (Figura 50 pág.117). O experimento MS2 (413.0) mostrou o pico em 301.0 (Figura 51, pág.118) e o experimento MS3 mostrou os picos em 189.0 e 171.0 (Figura 52, pág.118). A proposta de fragmentação destes íons encontra-se demonstrada na figura 53.

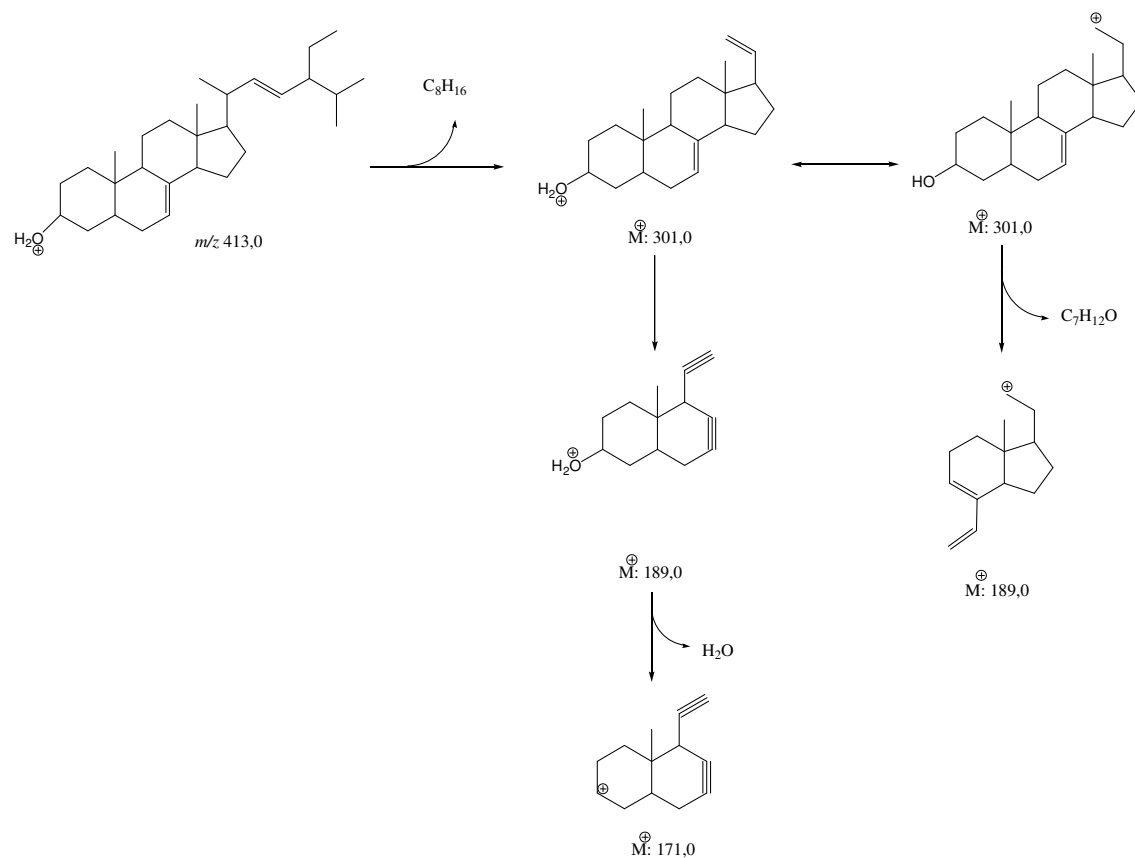
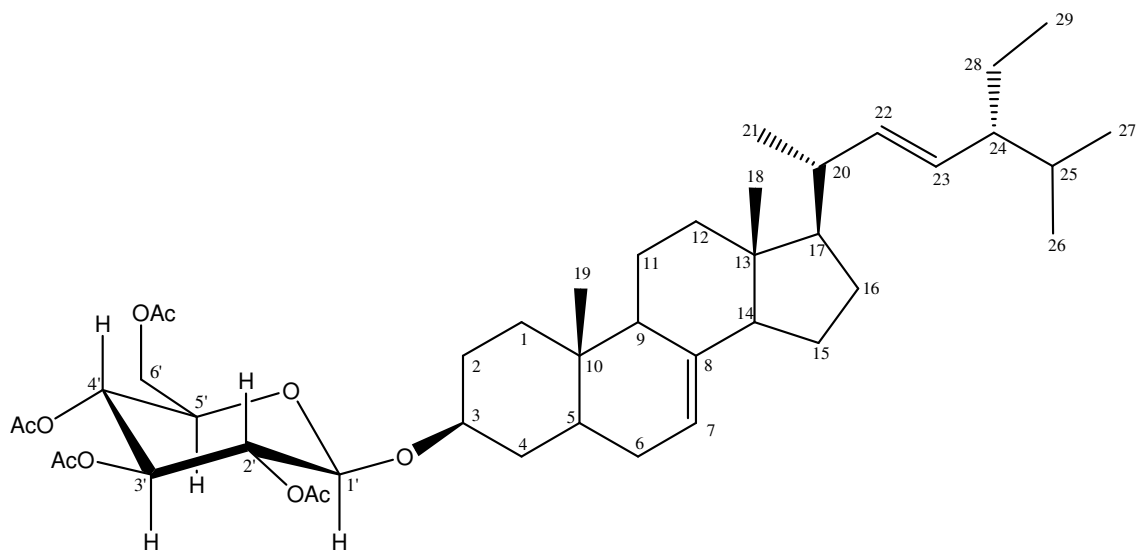


Figura 54: Proposta de fragmentações de CF4

Tabela 4: Dados de RMN de ^1H (500MHz) e ^{13}C (125MHz) e correlações entre sinais de ^1H e ^{13}C de CF4 em CDCl_3 , comparados com os dados de RMN de ^{13}C da literatura (δ em ppm e J em Hz).

CF4	HMQC		HMBC	3- β -O- β -D-glicopiranosil espinasterol acetilado ^a
	δ_{C}	δ_{H}	δ_{C}	δ_{C}
C				
8	139,56	-----		139,7
10	34,44	-----		34,4
13	43,26	-----		43,3
CH				
3	79,58	3,54 (1H, <i>m</i>)		79,7
5	40,19	-----		40,3
7	117,25	5,12 (1H, <i>sl</i>)	C-9;C-5	117,3
9	49,38	1,60 (1H, <i>m</i>)		49,5
14	55,09	1,80 (1H, <i>m</i>)		55,2
17	55,91	1,23 (1H, <i>m</i>)		56,0
20	40,78	2,02 (1H, <i>m</i>)		40,8
22	138,11	5,17 (1H, <i>m</i>)	C-20;C-23	138,2
23	129,46	5,03 (1H, <i>m</i>)	C-24;C-20;C-22	129,6
24	51,24	1,43 (1H, <i>m</i>)		51,3
25	31,85	1,22 (1H, <i>m</i>)		31,9
CH₂				
1	37,08	1,01 (1H, <i>m</i>), 1,82 (1H, <i>m</i>)		37,1
2	29,31	1,23 (2H, <i>m</i>)		29,3
4	34,10	2,30 (2H, <i>m</i>)		34,5
6	29,53	1,23 (2H, <i>m</i>)		29,7
11	21,50	1,0 (2H, <i>m</i>)		21,5
12	39,41	2,02 (2H, <i>m</i>)		39,5
15	22,67	1,30 (2H, <i>m</i>)		23,1
16	28,47	1,30 (2H, <i>m</i>)		28,6
28	24,82	1,63 (2H, <i>m</i>)		25,4
CH₃				
18	12,92	0,52 (3H, <i>s</i>)		12,1
19	12,94	0,75 (3H, <i>s</i>)		13,0
21	21,06	1,00 (3H, <i>d</i> , $J=6,5$)		21,1
26	21,36	0,86 (3H, <i>d</i> , $J=6,5$)		21,4
27	18,98	0,86 (3H, <i>d</i> , $J=6,5$)		19,0
29	12,21	0,79 (3H, <i>t</i> , $J=7,5$)		12,3
Glicose				
1'	99,65	4,57 (1H, <i>d</i> , $J=8\text{Hz}$)	C-3	99,7
2'	71,71	4,93 (1H, <i>dd</i> , $J=8$ e 10Hz)	C-3'; C-1'	71,7
3'	71,58	5,2 (1H, <i>m</i>)	C-2'; C-5'	71,7
4'	68,76	5,03 (1H, <i>m</i>)	C-2';C-3';C-5';C-6'	68,7
5'	72,95	5,18 (1H, <i>m</i>)		73,0
6'	62,10	4,20 (H6'a, <i>dd</i> , $J=5,5$ e $12,5\text{Hz}$)	C-5'	62,2
		4,10 (H6'b, <i>dd</i> , $J=7,5$ e $12,5\text{Hz}$)	C-4'	
OCOO- <u>C</u> H ₃	20,70;20,61 ; 20,59	1,97 – 2,02 (12H, <i>s</i>)		
<u>O</u> COO-CH ₃	173,57;170,33; 169,36 ; 169,28			

(a) BRAZ-FILHO *et al*, 1986



3-β-O-β-D-glicopiranosil espinasterol acetilado

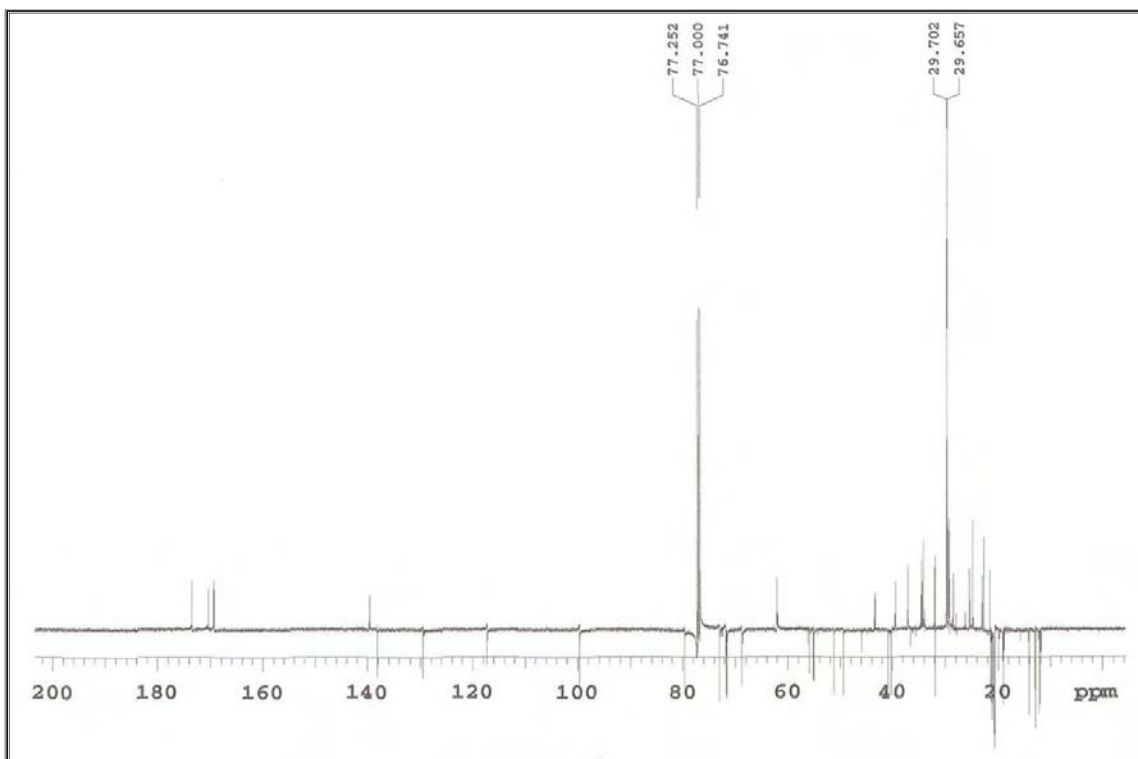


Figura 32: Espectro de RMN de ^{13}C de CF_4 (CDCl_3 , 125 MHz)

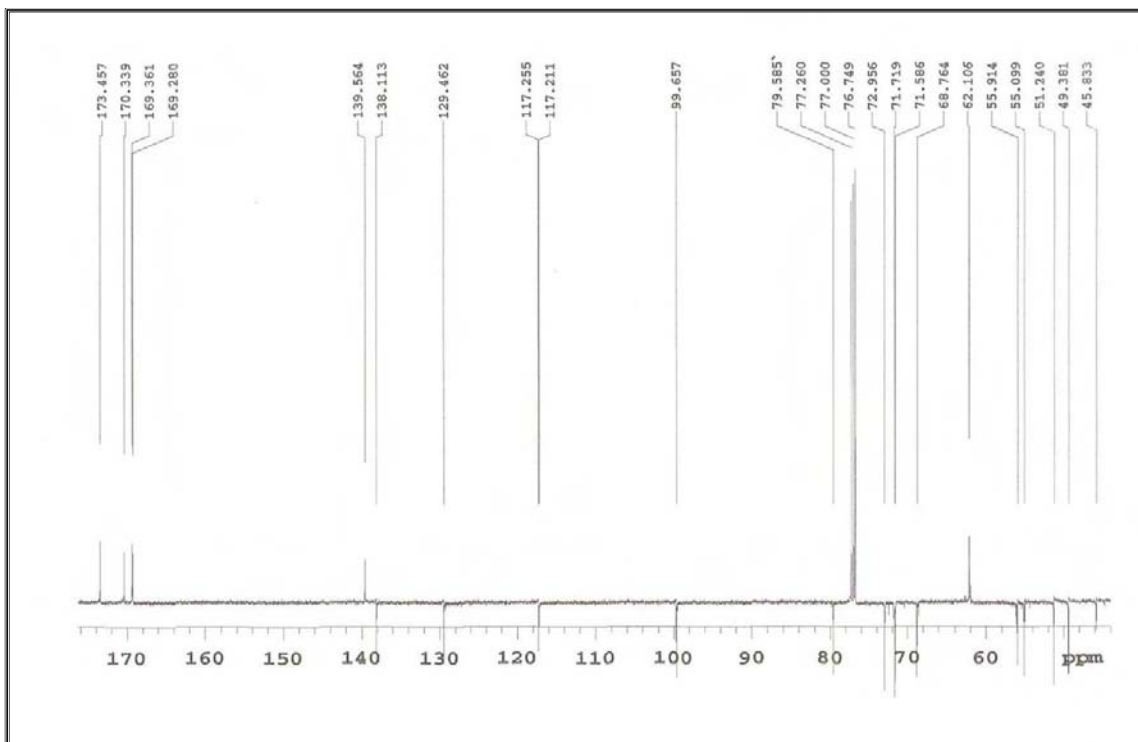


Figura 33: Expansão do espectro de RMN ^{13}C de CF_4 na região de 173 a 45 ppm (CDCl_3 , 125 MHz)

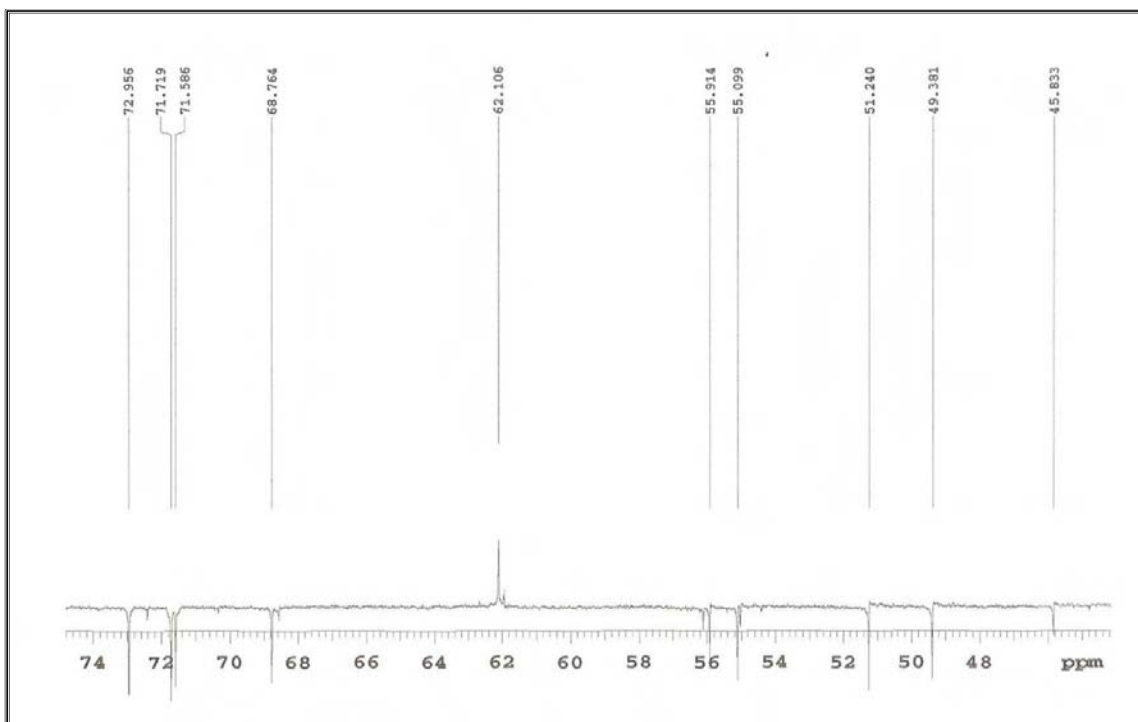


Figura 34: Expansão do espectro de RMN ^{13}C de CF_4 na região de 72 a 45 ppm (CDCl_3 , 125 MHz)

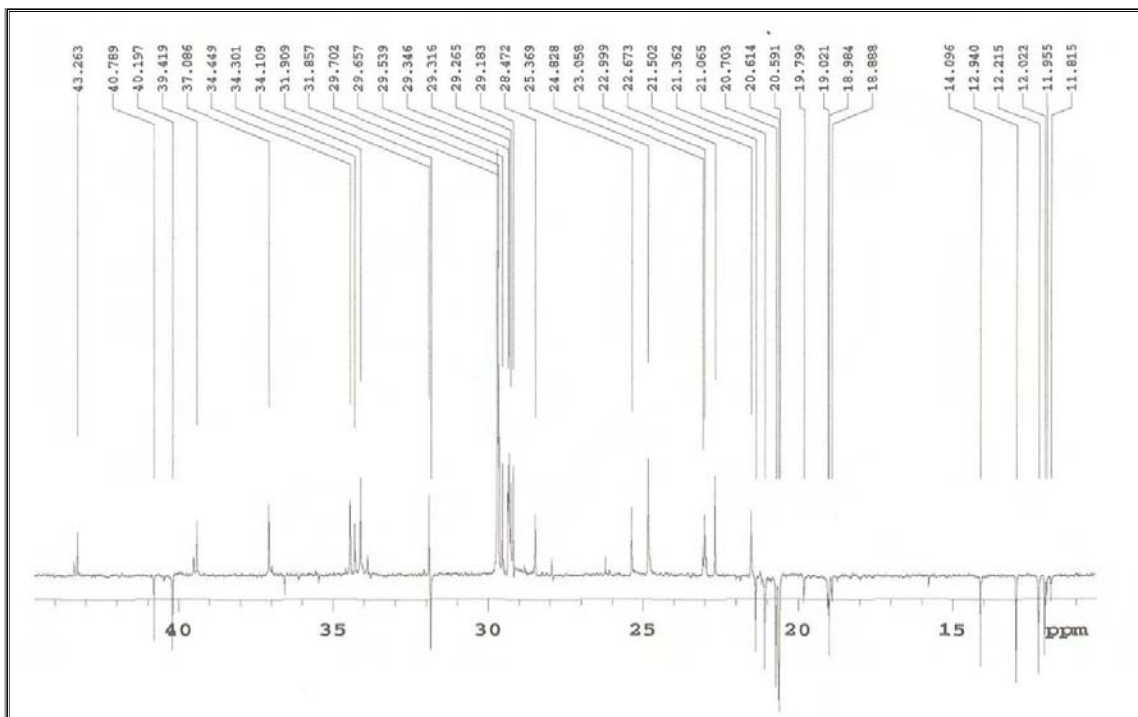


Figura 35: Expansão do espectro de RMN ^{13}C de CF_4 na região de 43 a 11 ppm (CDCl_3 , 125 MHz)

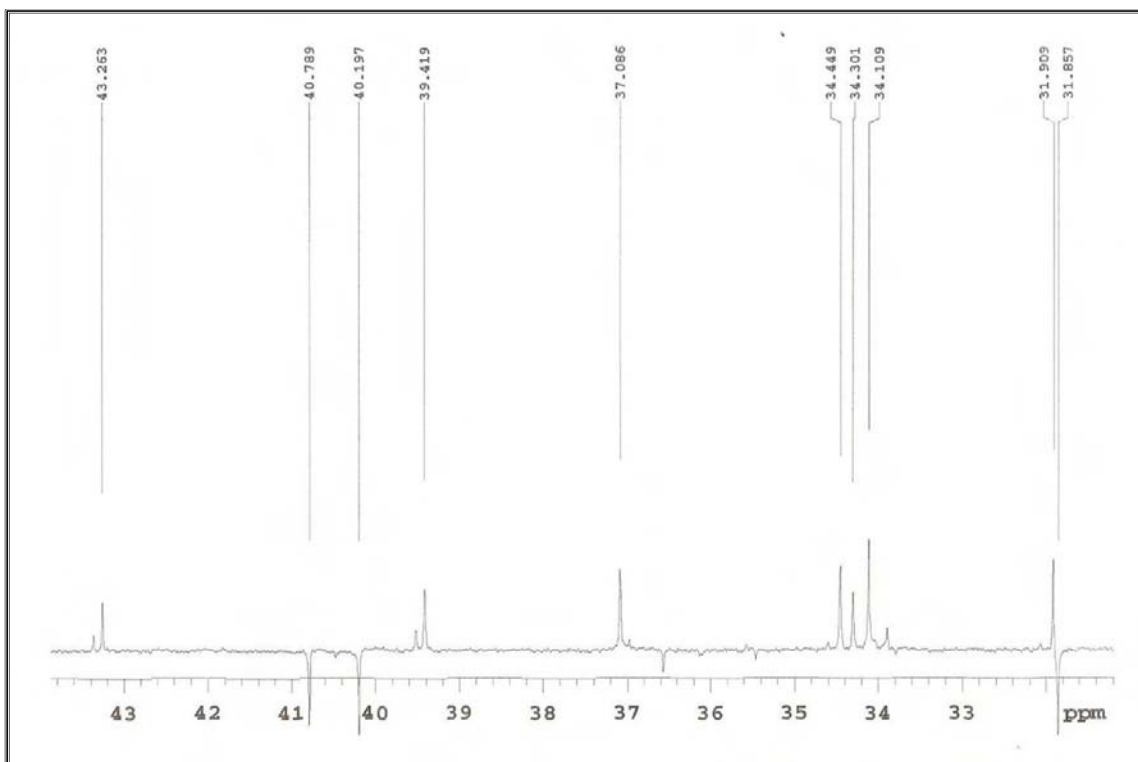


Figura 36: Expansão do espectro de RMN ^{13}C de CF_4 na região de 43 a 31 ppm (CDCl_3 , 125 MHz)

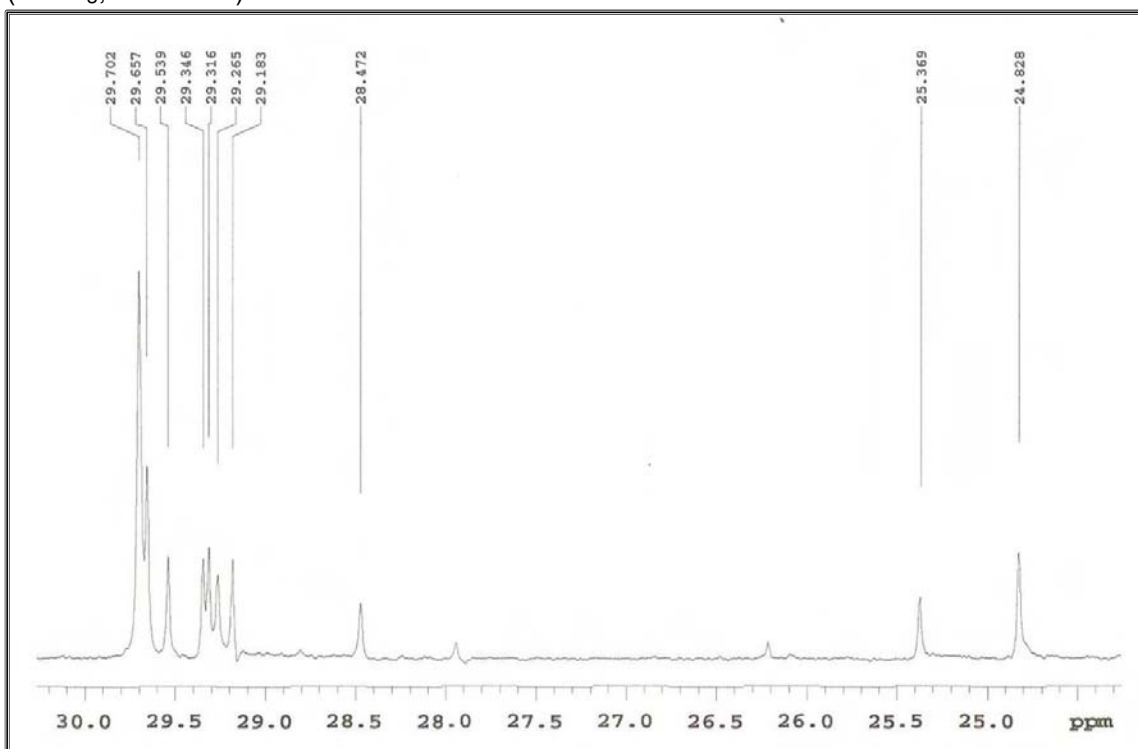


Figura 37: Expansão do espectro de RMN ^{13}C de CF_4 na região de 29 a 24 ppm (CDCl_3 , 125 MHz)

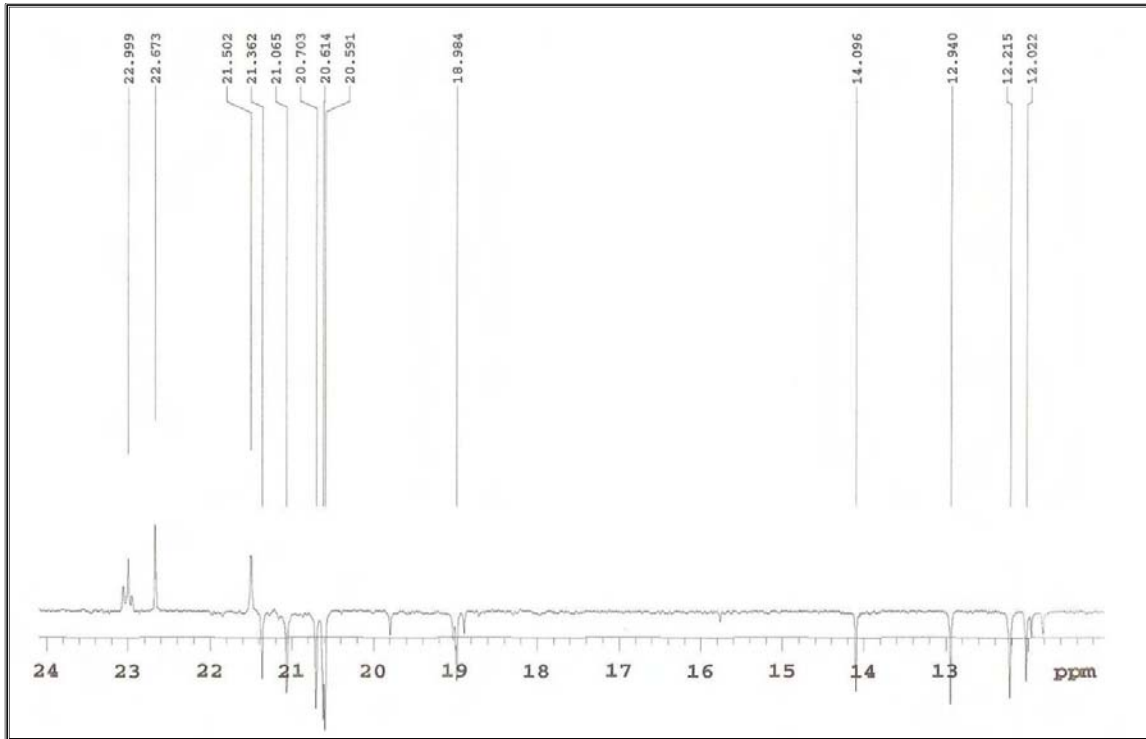


Figura 38: Expansão do espectro de RMN ^{13}C de CF_4 na região de 22 a 12 ppm (CDCl_3 , 125 MHz)

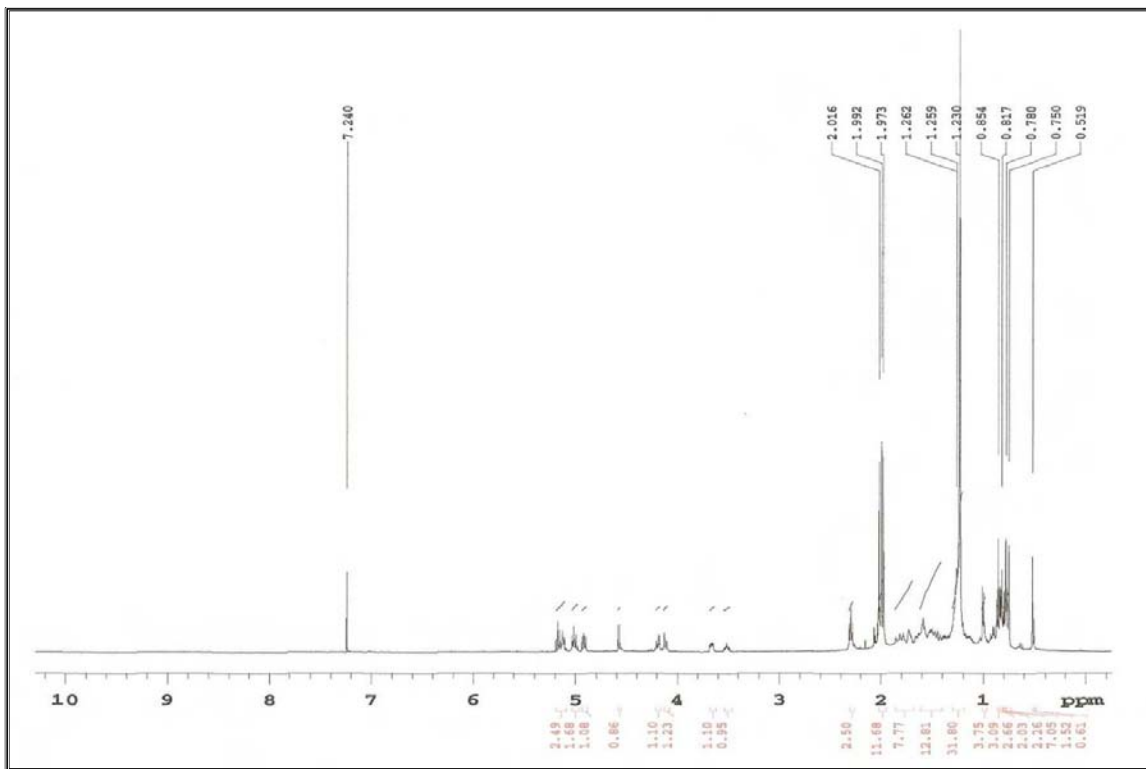


Figura 39: Espectro de RMN de ^1H de CF_4 (CDCl_3 , 500 MHz)

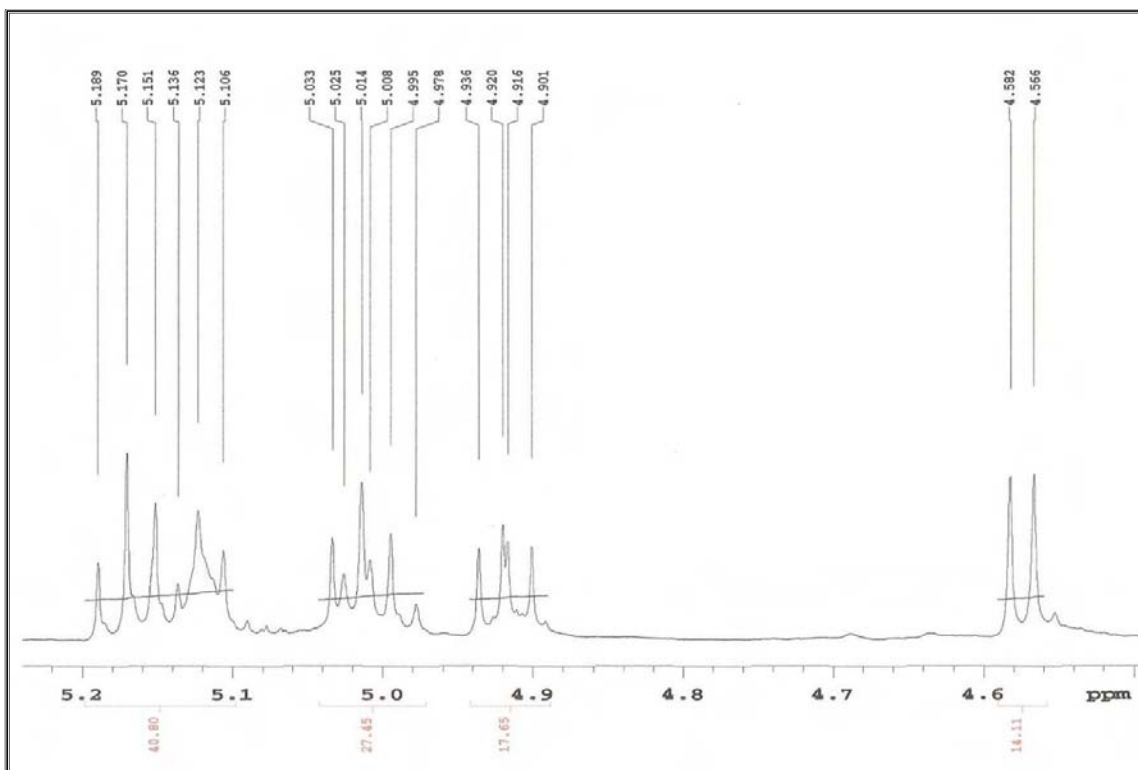


Figura 40: Expansão do espectro de RMN ^1H de CF_4 na região de 5,2 a 4,5 ppm (CDCl_3 , 500 MHz)

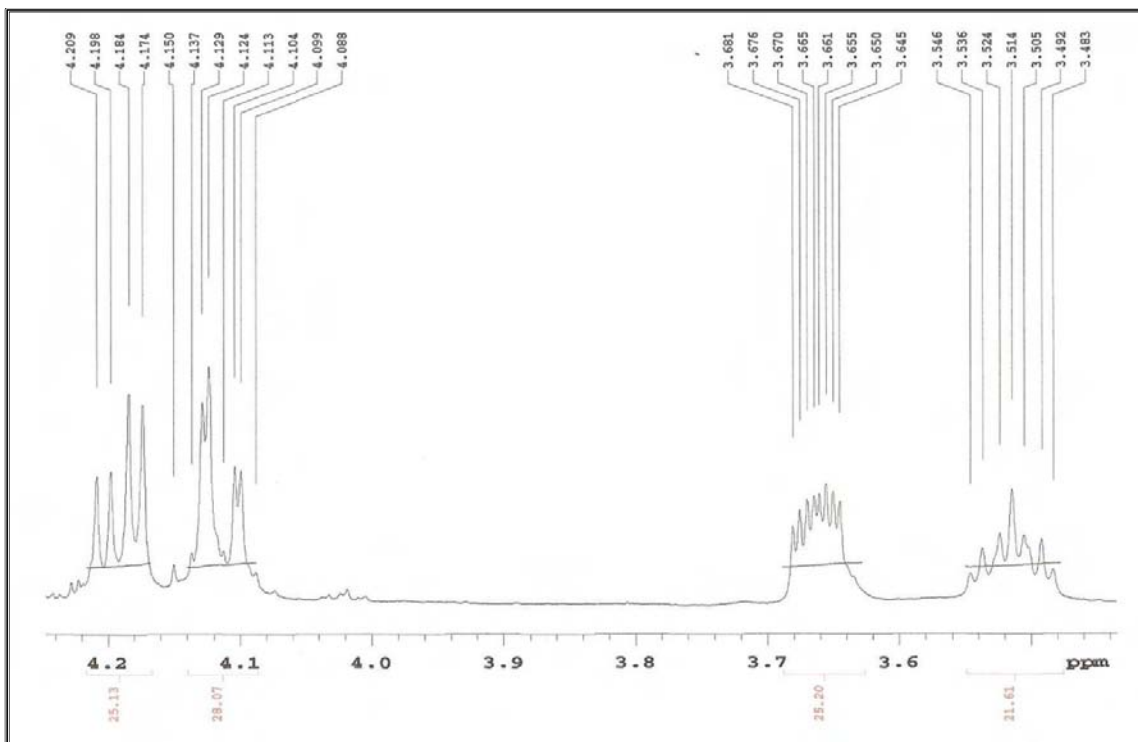


Figura 41: Expansão do espectro de RMN ^1H de CF_4 na região de 4,2 a 3,4 ppm (CDCl_3 , 500 MHz)

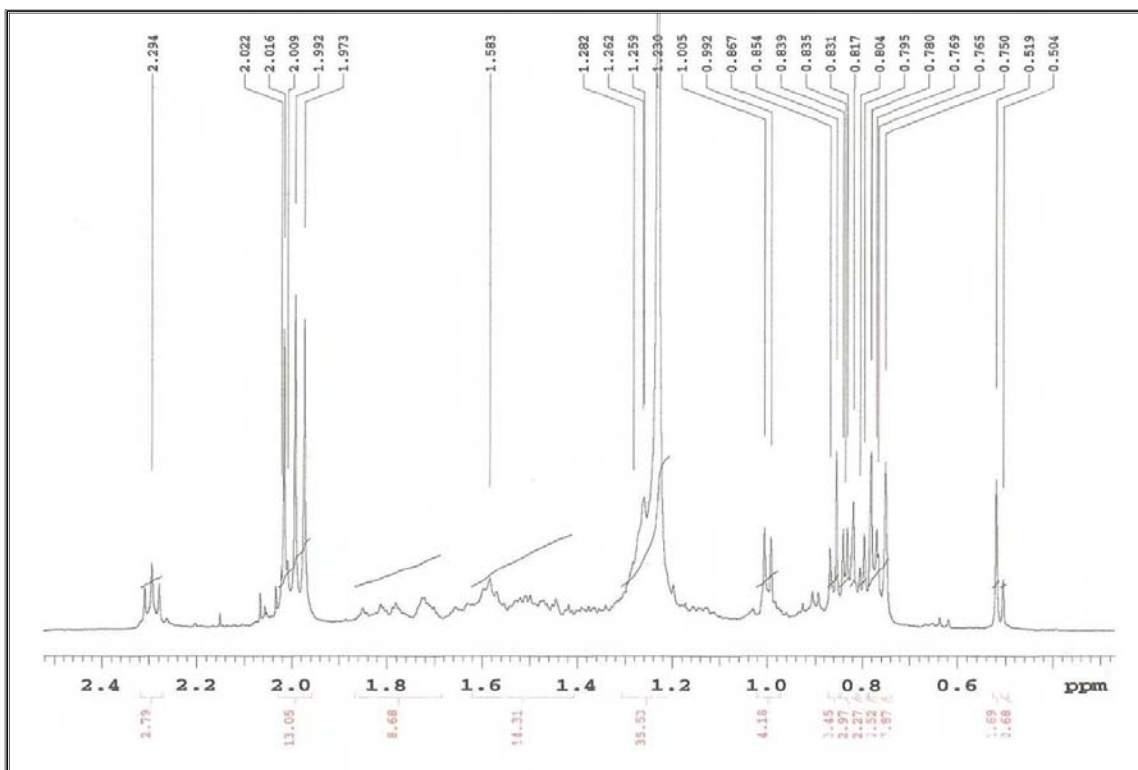


Figura 42: Expansão do espectro de RMN ^1H de CF_4 na região de 2,3 a 0,5 ppm (CDCl_3 , 500 MHz)

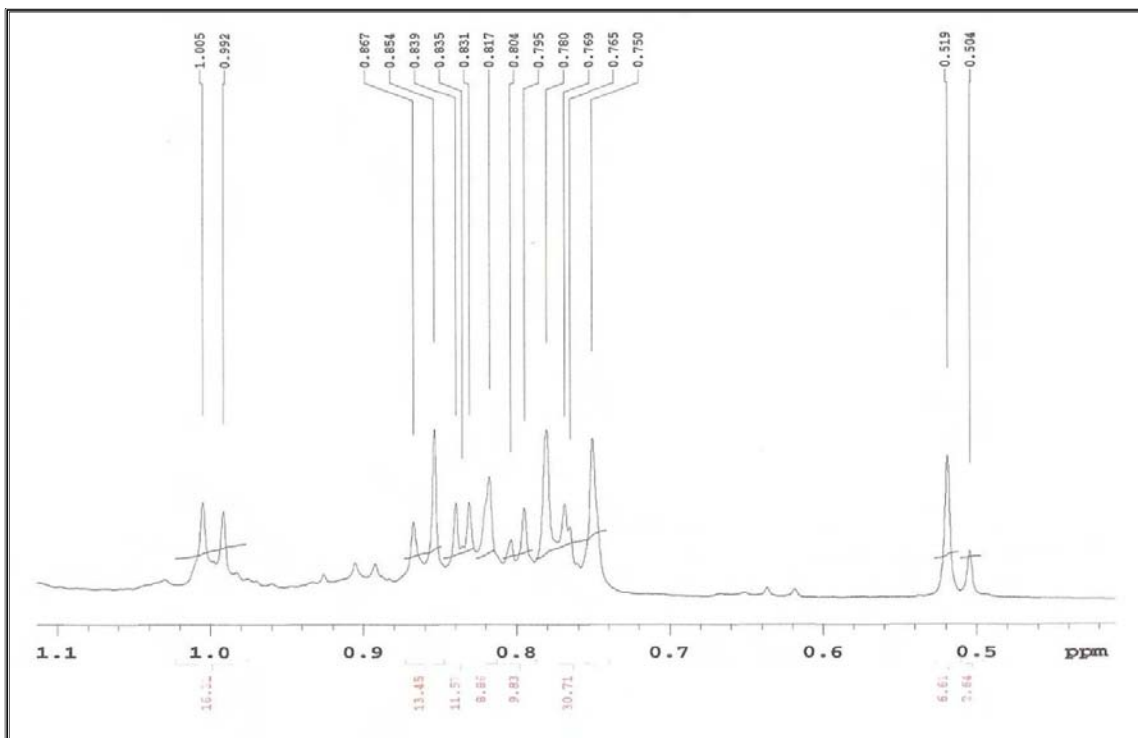


Figura 43: Expansão do espectro de RMN ^1H de CF_4 na região de 0,5 a 1,0 ppm (CDCl_3 , 500 MHz)

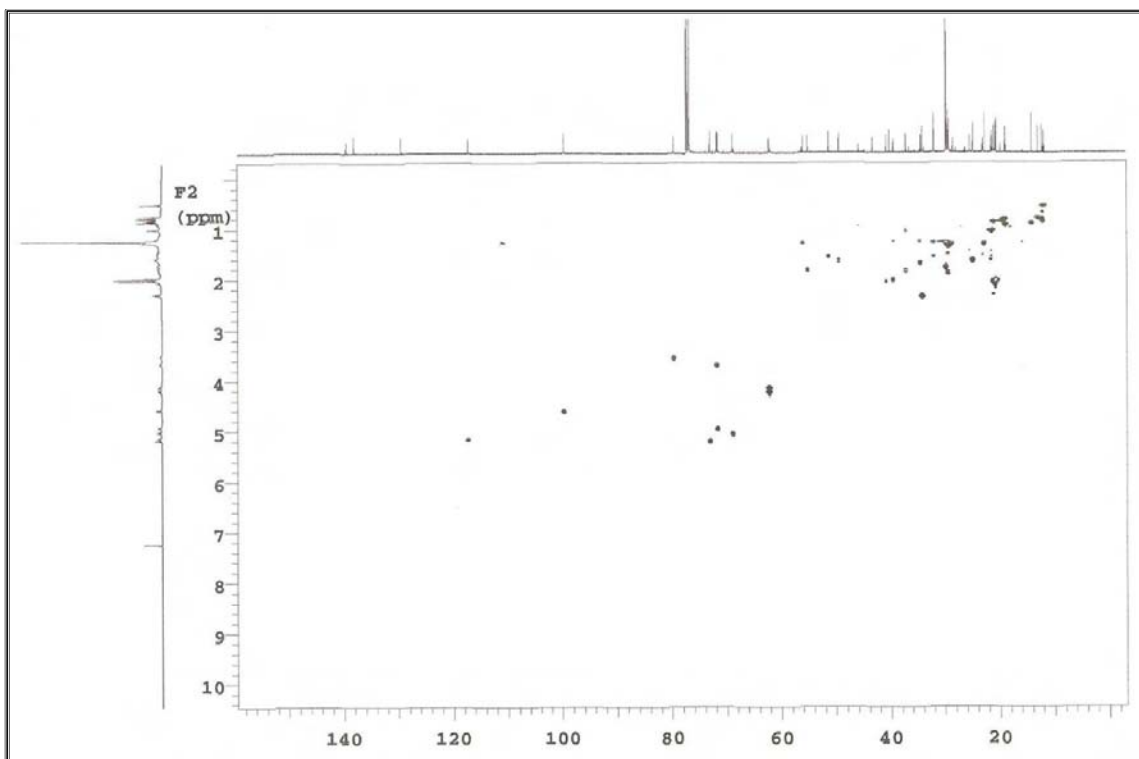


Figura 44: Espectro de correlação $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ – HMQC de CF_4 (500 e 125 MHz, CDCl_3)

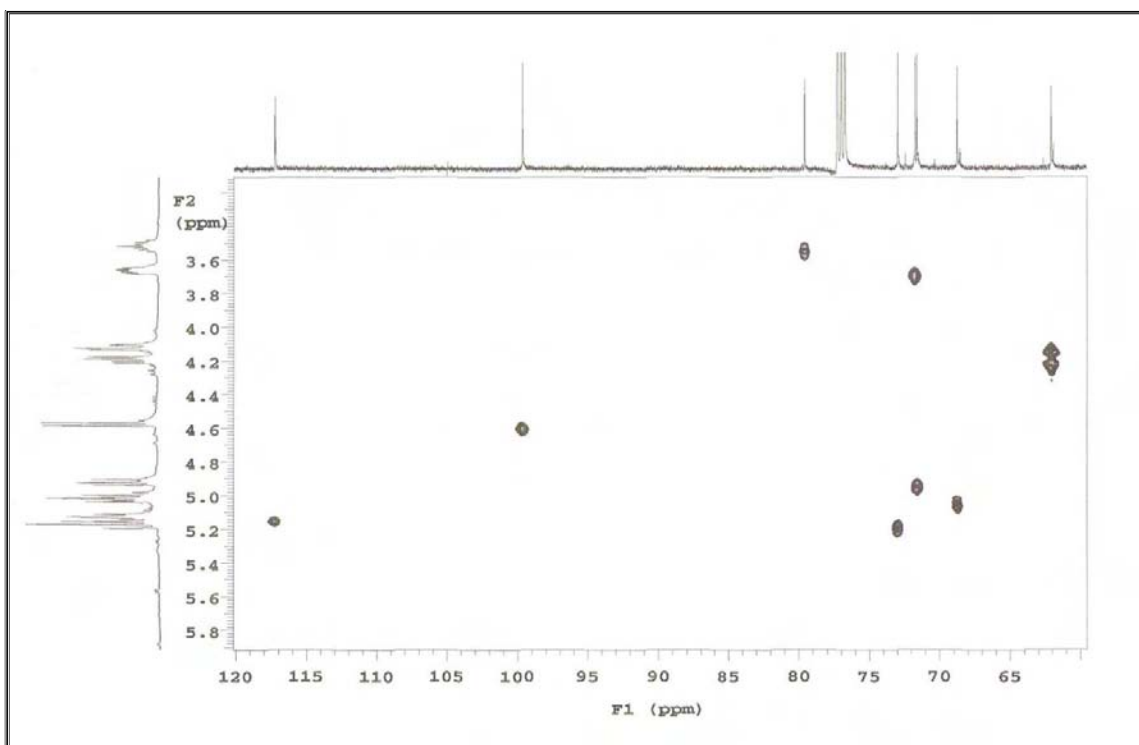


Figura 45: Expansão do espectro de correlação $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ – HMQC de CF_4 (500 e 125 MHz, CDCl_3)

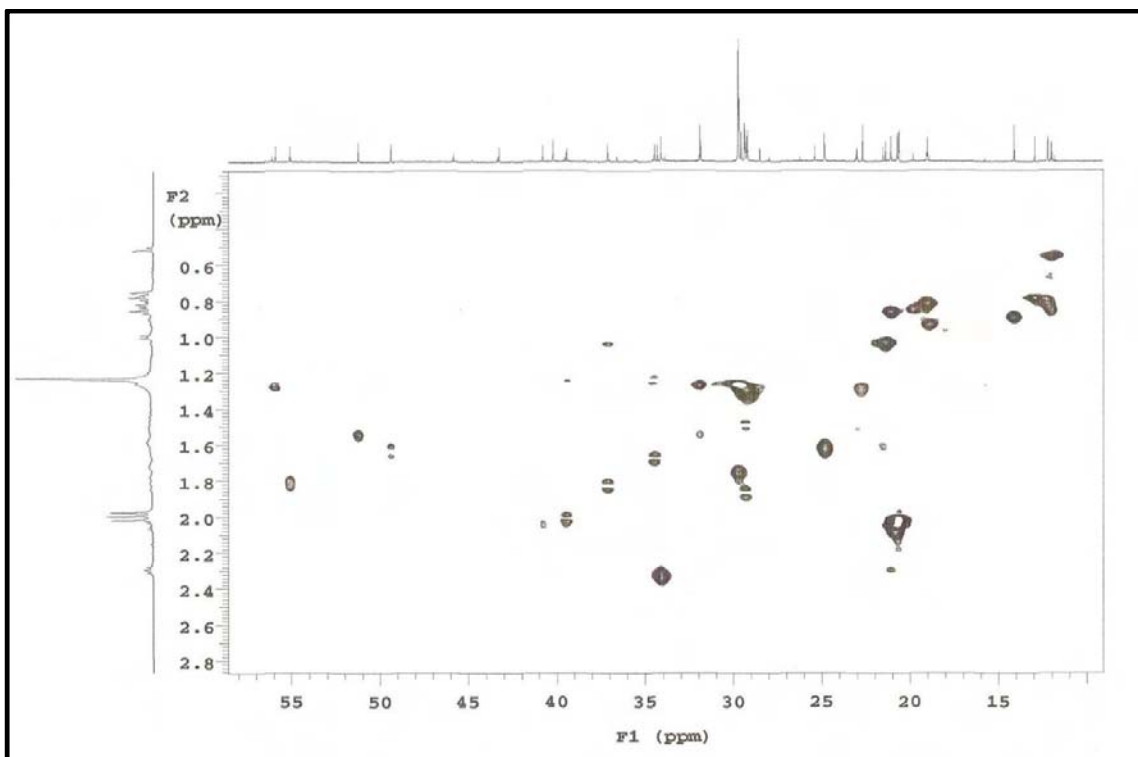


Figura 46: Expansão do espectro de correlação $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ – HMQC de CF4 (500 e 125 MHz, CDCl_3)

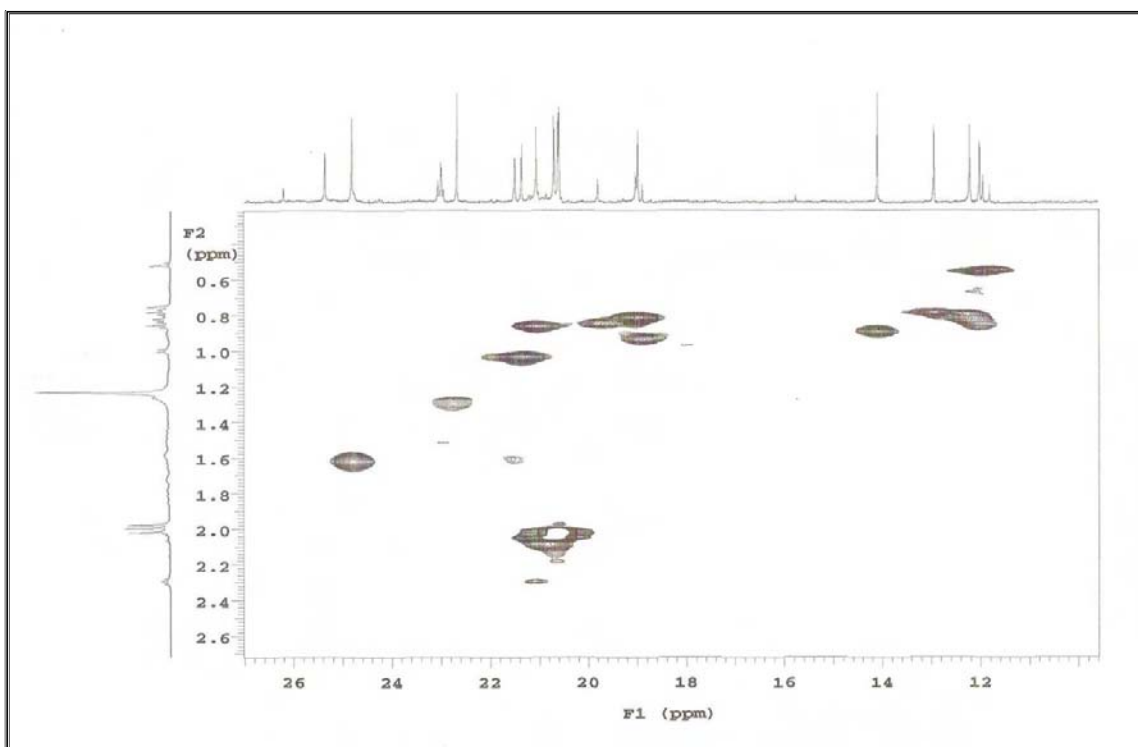


Figura 47: Expansão do espectro de correlação $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ – HMQC de CF4 (500 e 125 MHz, CDCl_3)

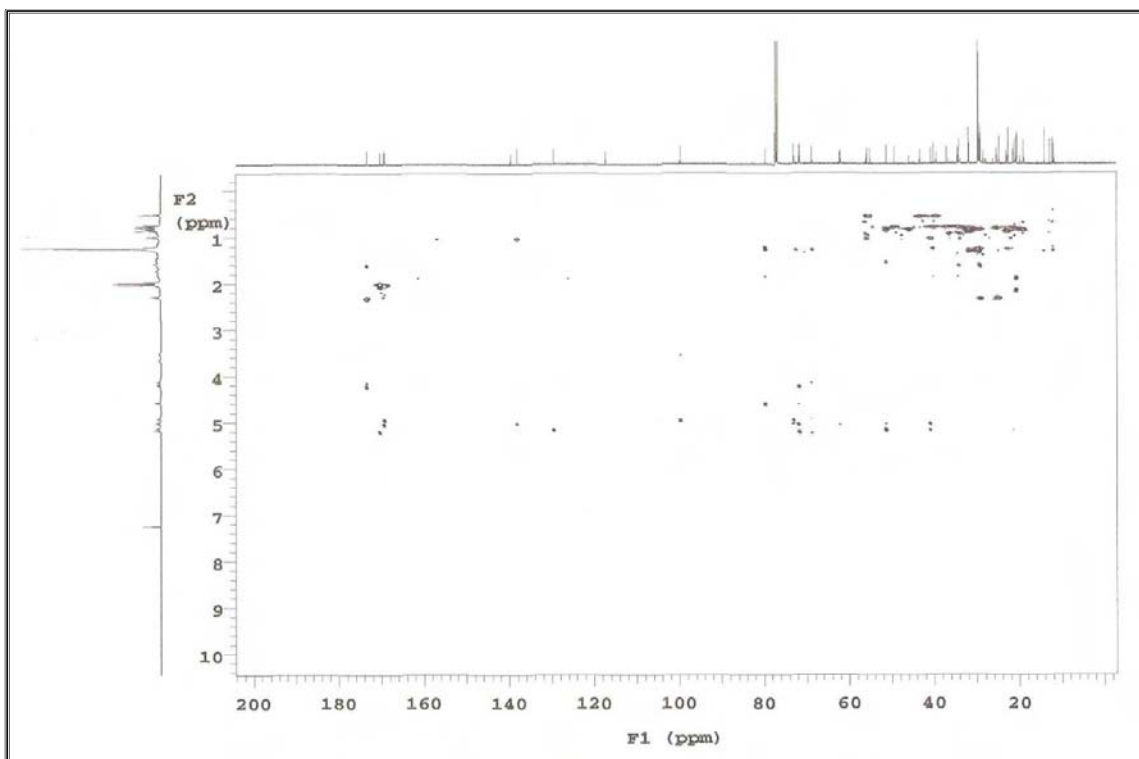


Figura 48: Espectro de correlação $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ – HMBC de CF_4 (500 e 125 MHz, CDCl_3)

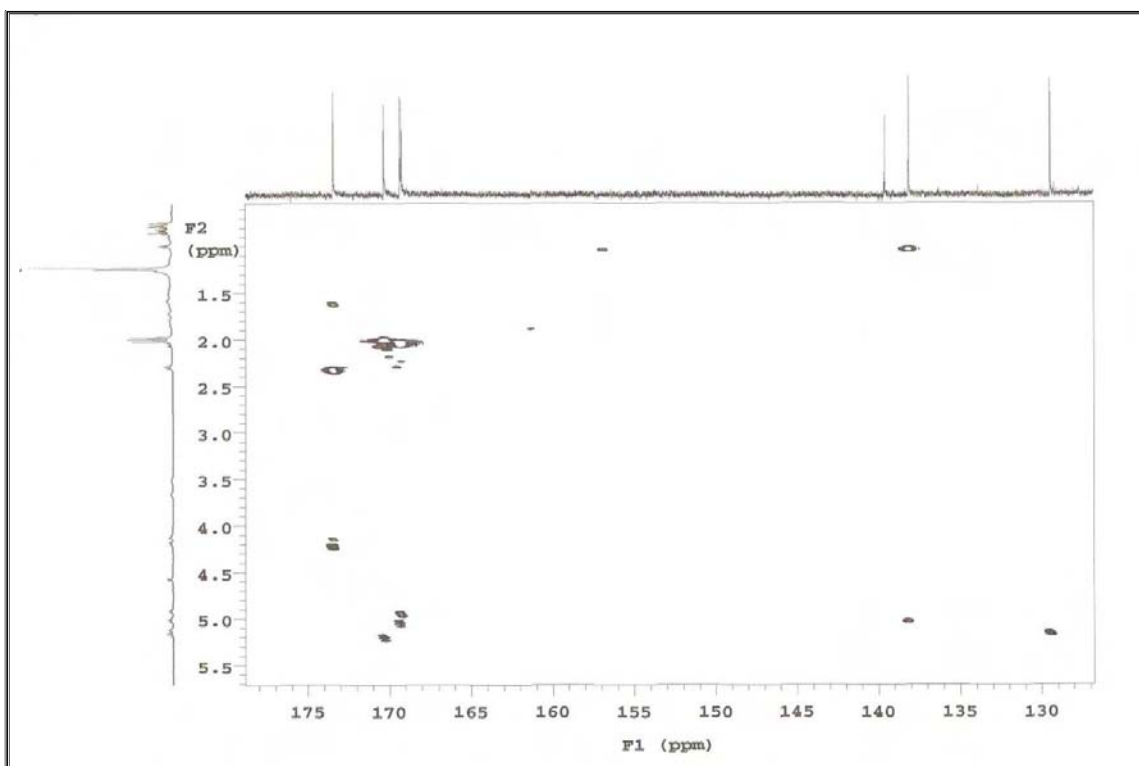


Figura 49: Expansão do espectro de correlação $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ – HMBC de CF_4 (500 e 125 MHz, CDCl_3)

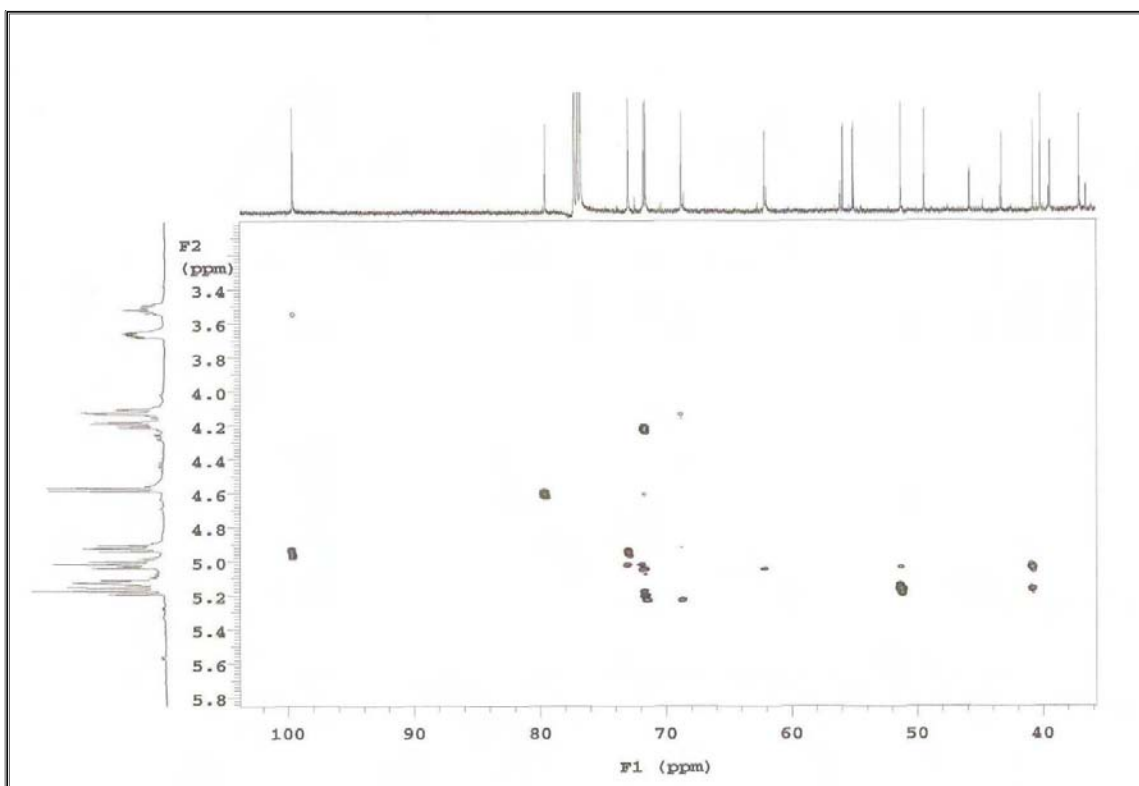


Figura 50: Expansão do espectro de correlação $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ – HMBC de CF_4 (500 e 125 MHz, CDCl_3)

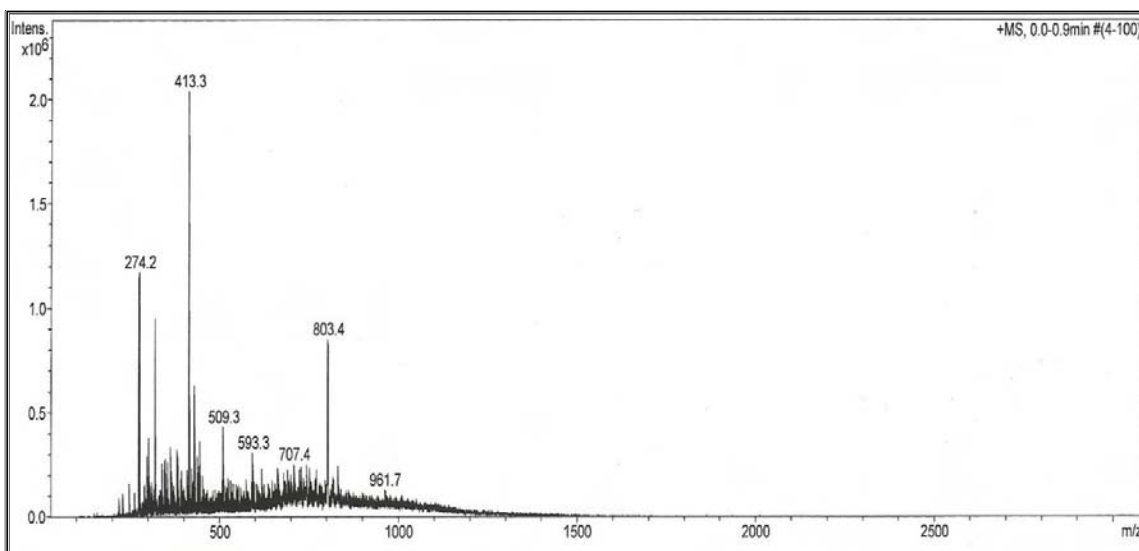


Figura 51: Espectro de massas de CF_4 (ESI – MH^+), MS1

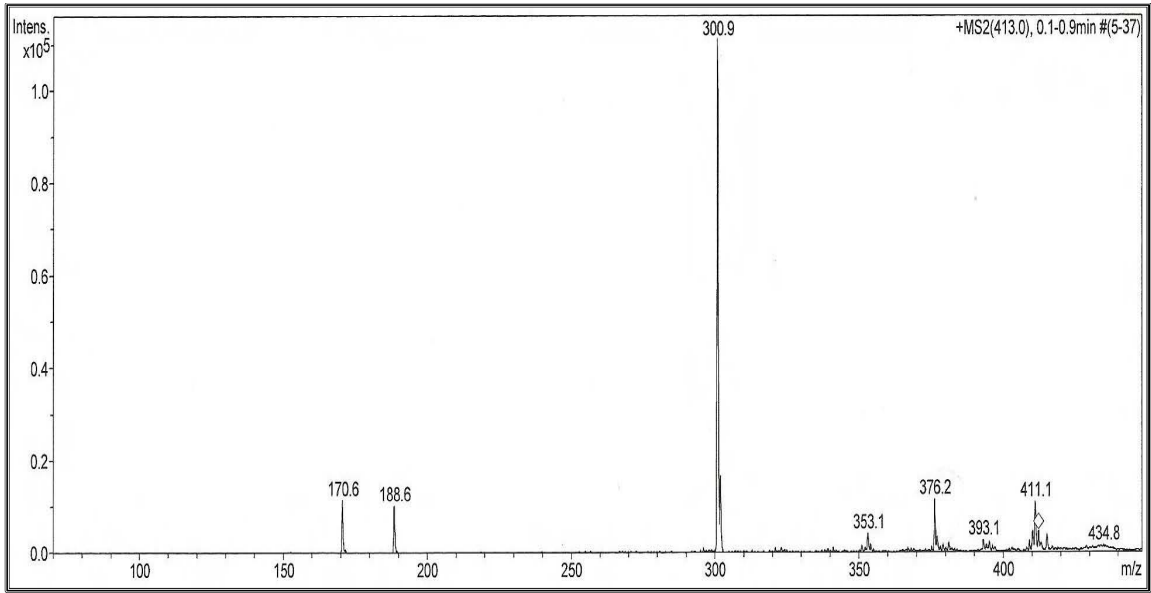


Figura 52 : Espectro de massas de CF₄ (ESI – MH⁺), MS2

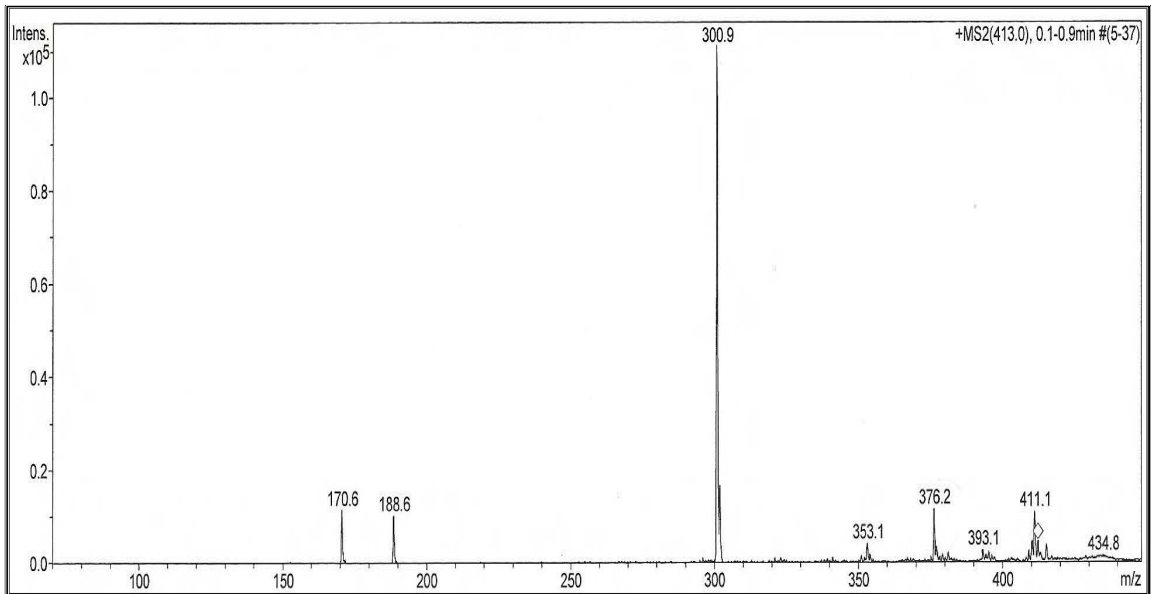


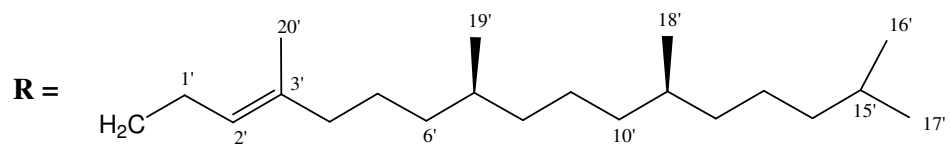
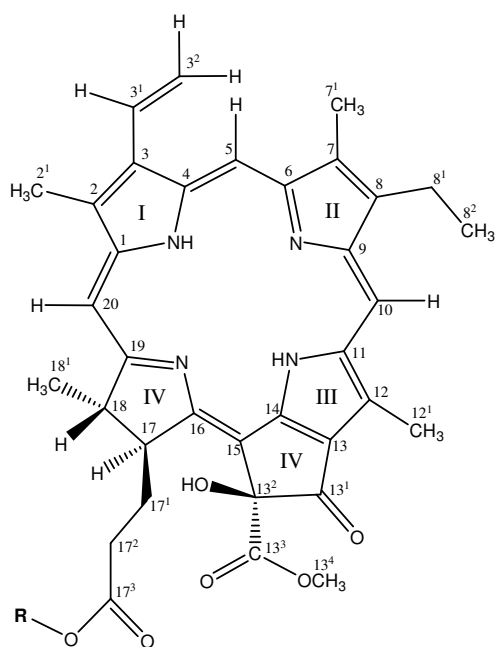
Figura 53: Espectro de massas de CF₄ (ESI – MH⁺), MS3

5.5 Determinação estrutural de CF5

O espectro de RMN ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) (Figuras 54-57, pág.122 e 123) de CF5 apresentou sinais característicos do grupo das feoftinas. Entre estes sinais, pode-se destacar as absorções típicas de carbonos carbonílicos em 191,98; 173,56 e 172,77 ppm atribuídos aos carbonos C-13¹, C-17³ e C-13³, respectivamente. Também foram observados sinais típicos de carbonos olefínicos ligados a nitrogênio em anel porfirínico: 172,45 (C-19), ~162 (C-16), ~149 (C-14), 145,21 (C-8), 142,72 (C-1), 137,83 (C-11) e 136,33 ppm (C-4) (JERZ *et al*, 2007). Foram observados ainda absorções típicas do grupo fitil éster em 142,04 (C-3'), 117,89 (C-2'), 61,54 (C-1') e 16,31 ppm (C-20') e uma absorção em 88,97 ppm, referente a carbono não hidrogenado oxigenado C-13².

O espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) (FIGURA 54) e suas expansões (Figuras 58-63, Pág. 124-126) revelaram um conjunto de absorções características do núcleo porfirínico de feoftinas, como por exemplo, os singletos em 9,60; 9,46 e 8,62 ppm, referentes aos hidrogênios olefínicos H-10, H-5 e H-20 respectivamente (JERZ *et al*, 2007). Observou-se ainda a absorção em 8,03 ppm (*dd*, $J=11,5$ e 18Hz) referente ao hidrogênio H-3¹, e os sinais em 6,30 (*d* $J=17,5\text{Hz}$) e 6,19 ppm (*d* $J=11,5$ Hz) atribuídos aos hidrogênios H-3². Adicionalmente a esses sinais, também foram observados três singletos em 3,71; 3,40 e 3,24 ppm, condizentes com as metilas olefínicas 12¹, 2¹ e 7¹ respectivamente (TOMAZ *et al*, 2008). Também foi observado um singleto em δ_{H} 3,59 característico do grupo metoxílico 13⁴, e dois sinais em 3,70 (*m*) e 1,69 ppm (*t*, $J=7,5\text{Hz}$), sugerindo a presença do grupo etil ligado ao carbono C-8 (TOMAZ *et al*, 2008).

Analisando os dados mencionados, pode-se dizer que o singleto em 3,24 ppm, característico de metila na posição 7¹, sugere a estrutura da feoftina A, e a ausência de um singleto em aproximadamente δ_{H} 6,20, característico do hidrogênio H-13², com a presença do sinal em δ_{C} 88,97, indica a presença de uma hidroxila ligada ao carbono C-13², permitindo propor a estrutura CF4 como sendo a 13²-hidroxi-(13²-S)-feoftina A, a qual foi confirmada ao comparar seus dados de RMN ^{13}C com os da literatura (Tabela 5, Pág. 121). Esta substância está sendo descrita pela primeira vez no gênero *Combretum*.



13²-hidroxi-(13²-S)-feoftina A

Tabela 5: Dados de RMN de de ^1H (500MHz) e ^{13}C (125MHz) de CF5 em CDCl_3 , comparados com os dados de RMN de ^{13}C da literatura (δ em ppm e J em Hz).

	CF5		^{13}C -hidroxi-(^{13}C -S)-feoftina A (a)
	δ_{C}	δ_{H}	δ_{C}
C			
1	142,72		142,8
2	131,78		132,6
2 ¹	12,11	3,40 (3H, s)	12,4
3	136,49		137,0
3 ¹	129,09	8,03 (1H, <i>dd</i> , $J=11,5$ e 18 Hz)	129,4
3 ²	122,88	6,18 (1H, <i>d</i> , $J=11,5$ Hz)	123,6
4	136,33	6,30 (1H, <i>d</i> , $J=17,5$ Hz)	136,3
5	97,98	9,46 (1H, s)	98,4
6	-----*		150,9
7	136,24		136,3
7 ¹	11,28	3,24 (3H, s)	11,6
8	145,21		145,3
8 ¹	19,51	3,70 (2H, <i>m</i>)	19,9
8 ²	17,43	1,69 (3H, <i>t</i> , $J=7,5$ Hz)	17,6
9	-----*		155,4
10	104,26	9,63 (1H, s)	104,7
11	137,83		138,4
12	129,09		129,4
12 ¹	12,28	3,71 (3H, s)	12,7
13	126,50		127,7
13 ¹	191,98		192,2
13 ²	88,97		89,4
13 ³	172,77		173,3
13 ⁴	53,39	3,59 (3H, s)	53,8
14	150,00		150,9
15	107,90		107,1
16	163,10		164,0
17	51,86		52,6
17 ¹	31,14		31,6
17 ²	31,59		32,0
17 ³	173,56		173,8
18	50,34		50,9
18 ¹	22,69		22,9
19	172,45		173,0
20	93,69	8,62 (1H, s)	95,0

(a) JERZ *et al*, 2007

*Sinais não detectados

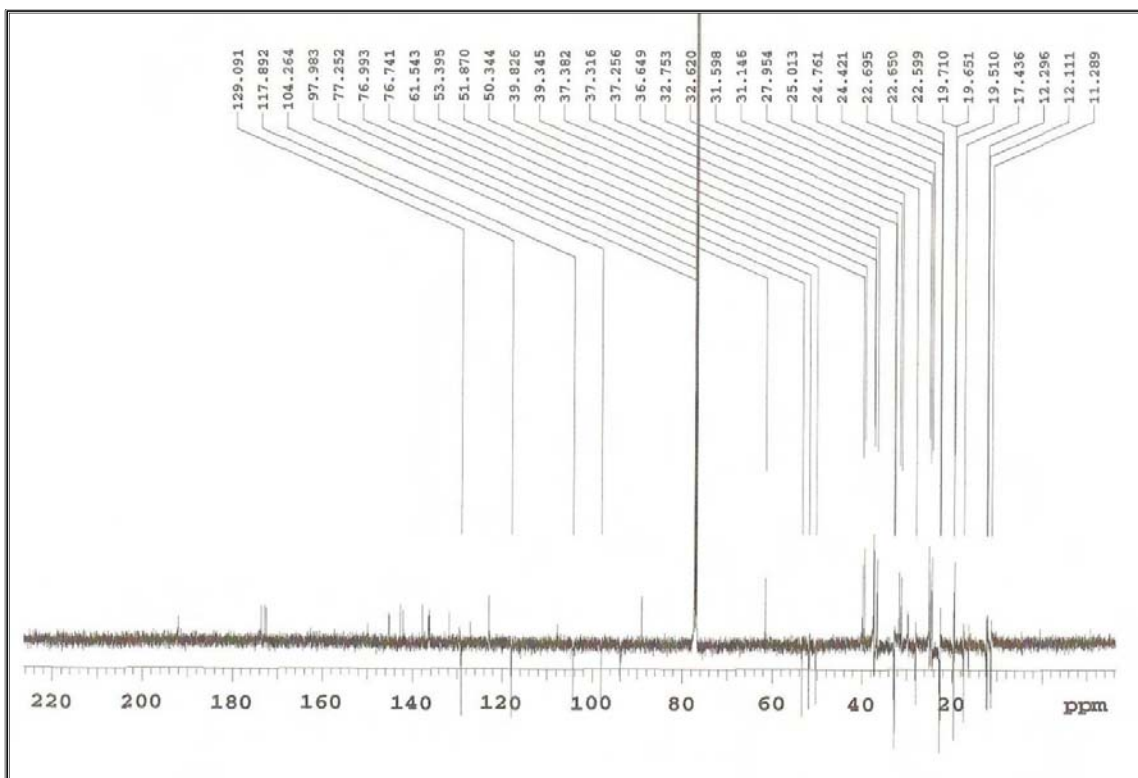


Figura 55: Espectro de RMN ^{13}C de CF_5 (CDCl_3 , 125 MHz)

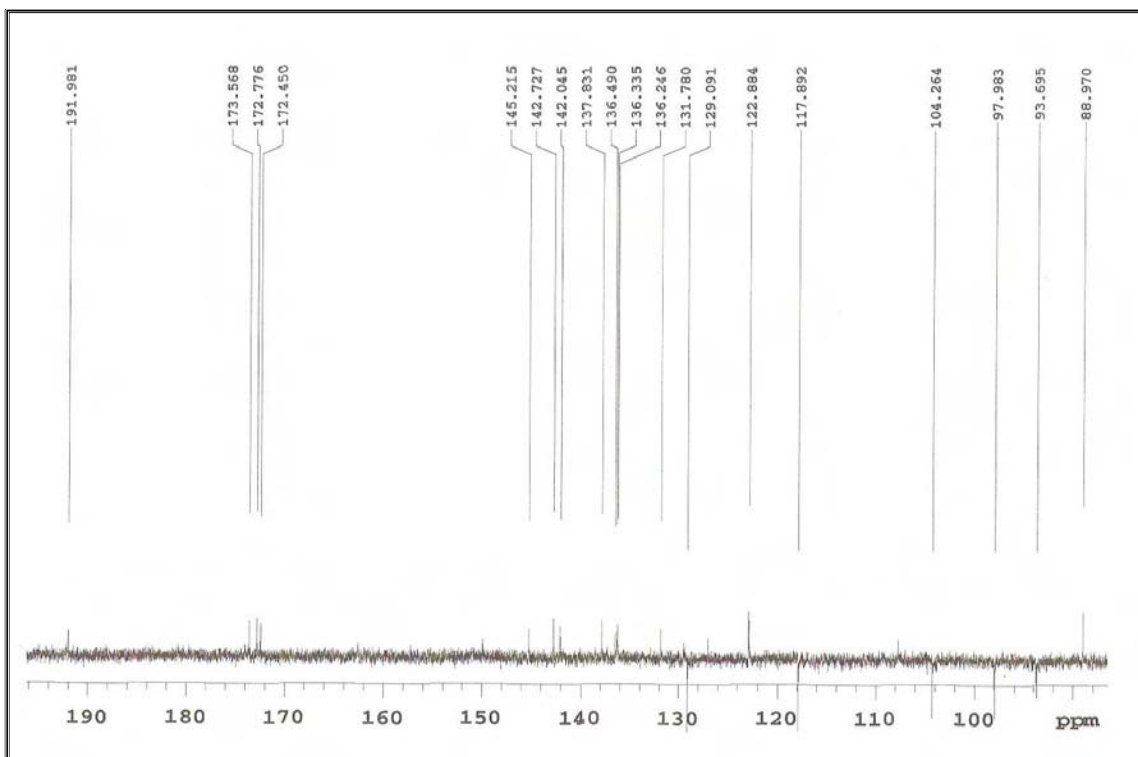


Figura 56: Expansão do espectro de RMN ^{13}C de CF_5 na região de 191 a 88 ppm (CDCl_3 , 125 MHz)

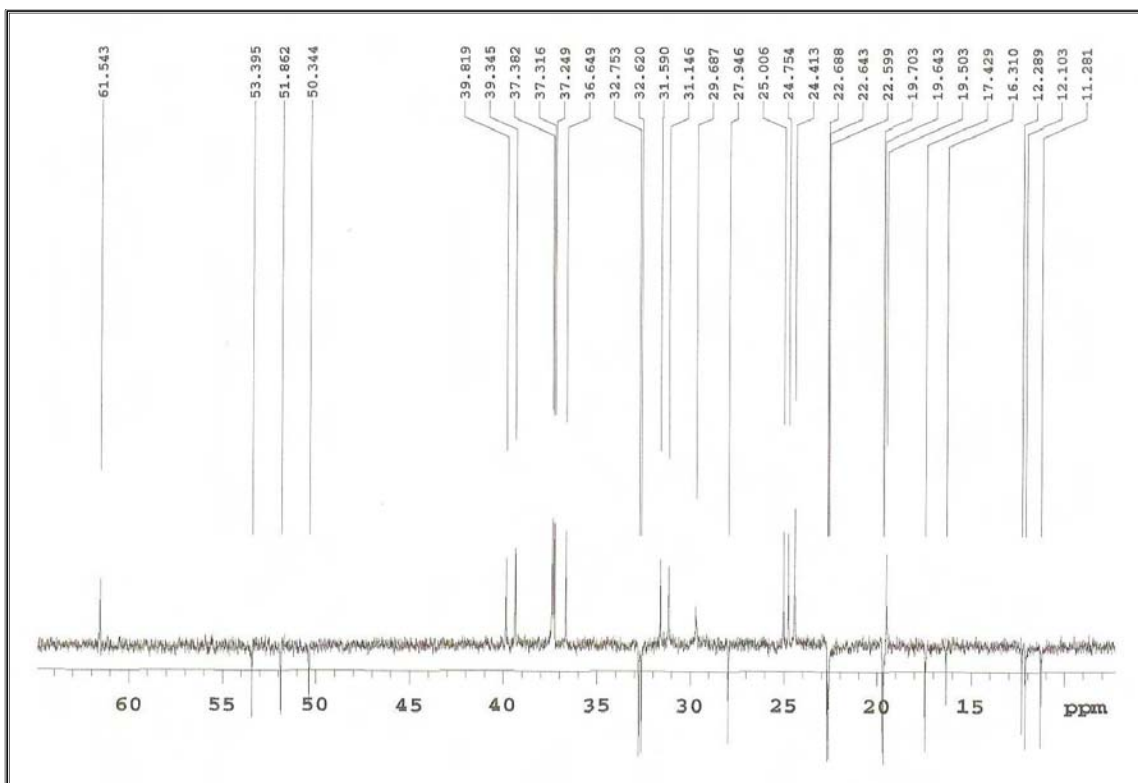


Figura 57: Expansão do espectro de RMN ^{13}C de CF5 na região de 61 a 11 ppm (CDCl_3 , 125 MHz)

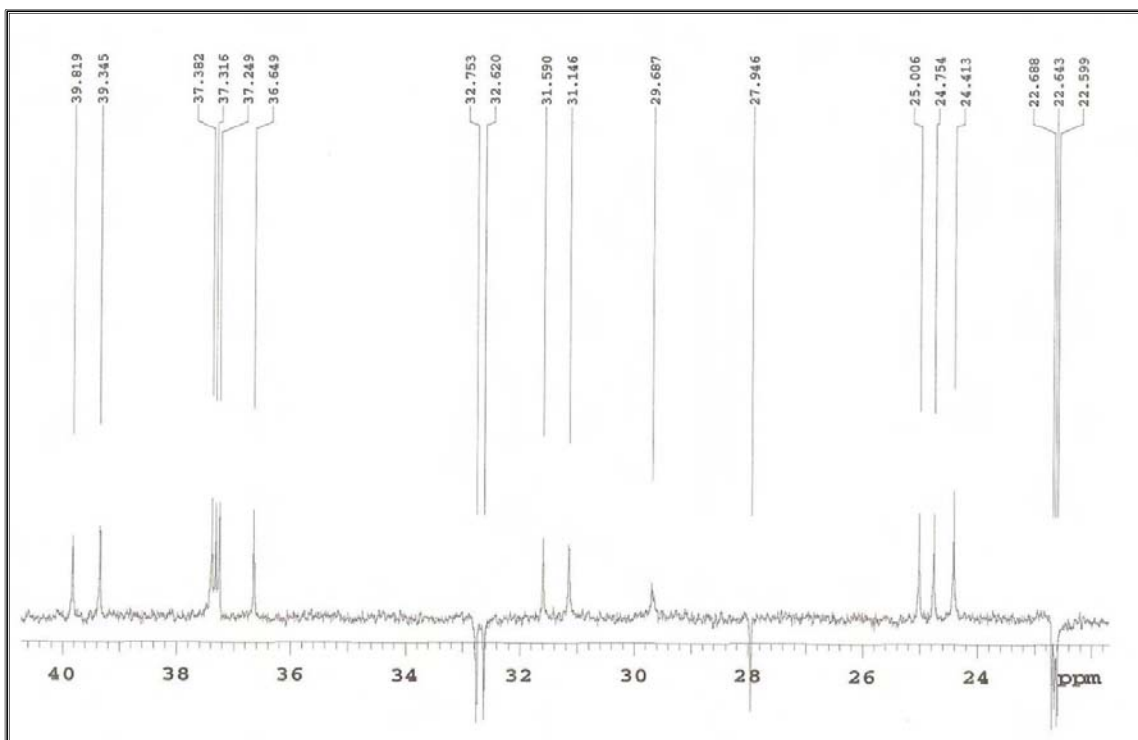


Figura 58: Expansão do espectro de RMN ^{13}C de CF5 na região de 39 a 22 ppm (CDCl_3 , 125 MHz)

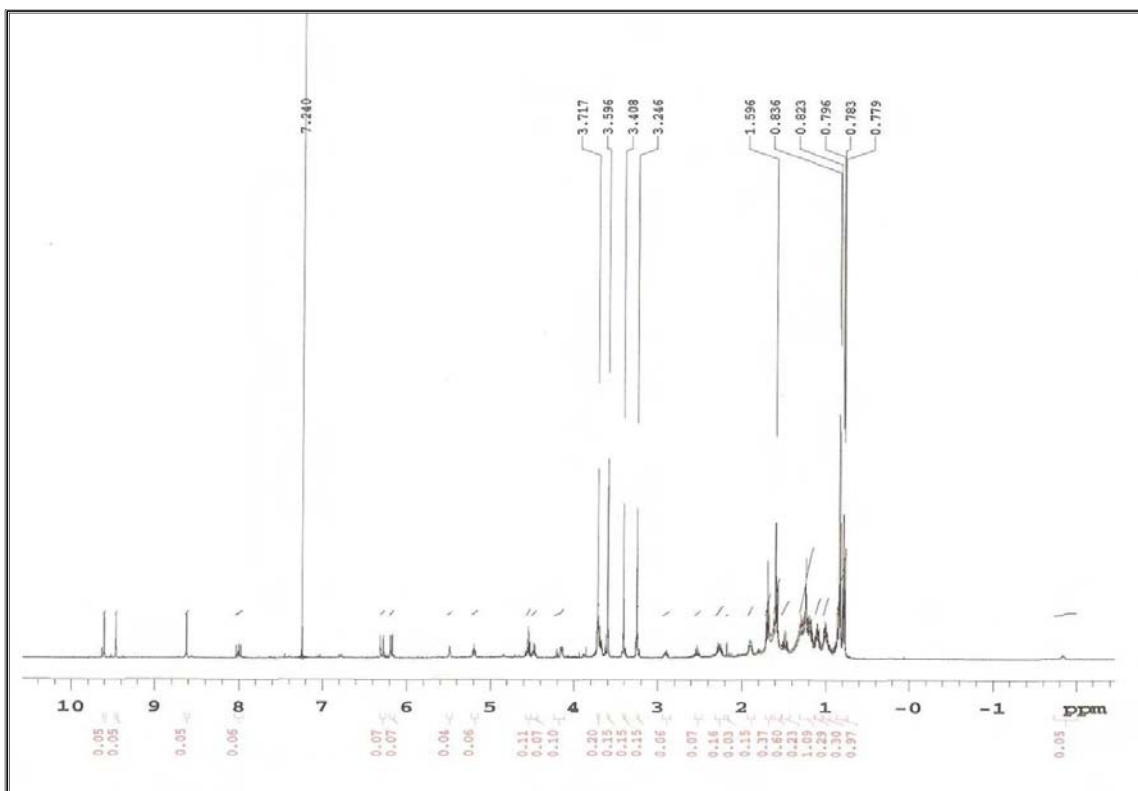


Figura 59: Espectro de RMN de ^1H de CF5 (CDCl_3 , 500 MHz)

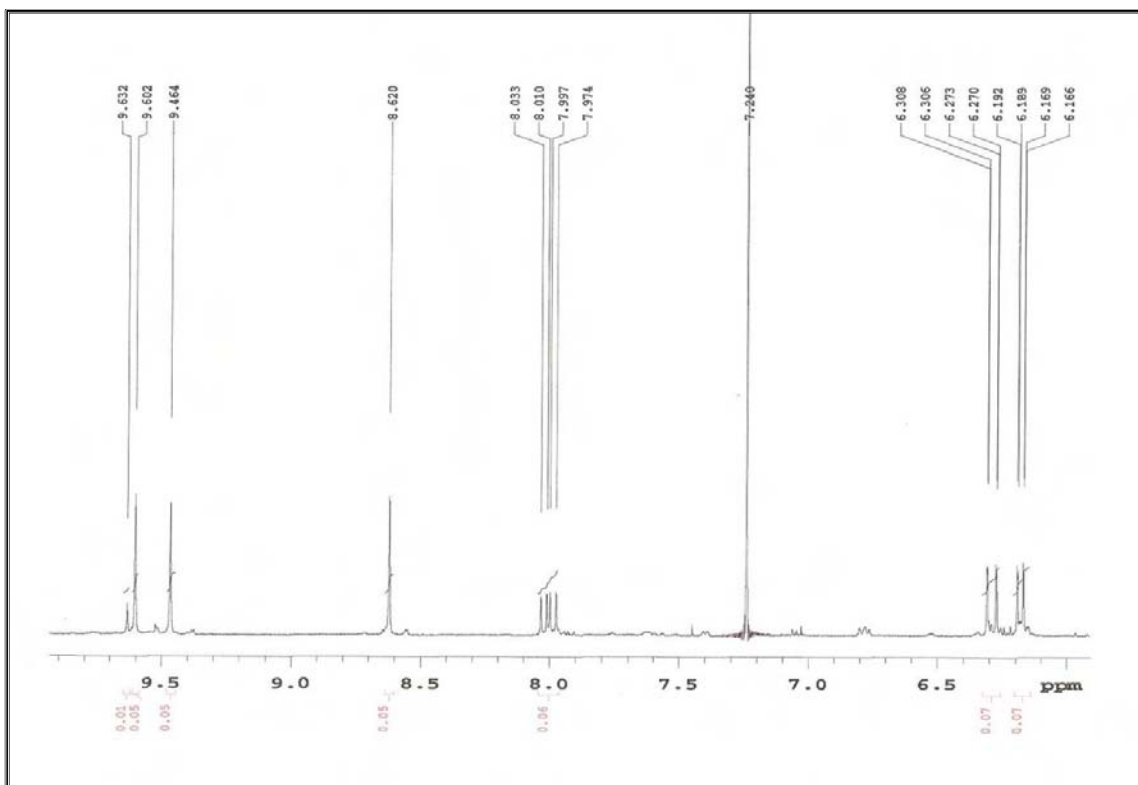


Figura 60: Expansão do espectro de RMN ^1H de CF5 na região de 9,6 a 6,1 ppm (CDCl_3 , 500 MHz)

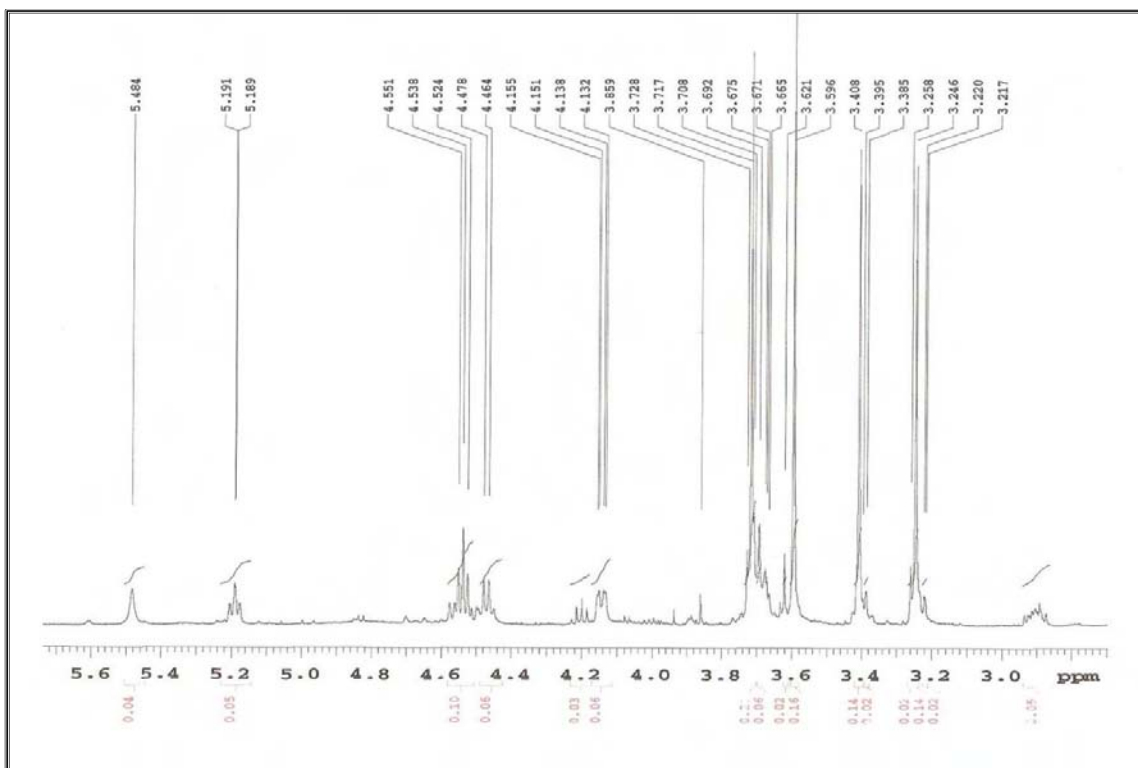


Figura 61: Expansão do espectro de RMN ^1H de CF5 na região de 5,4 a 2,8 ppm (CDCl₃, 500 MHz)

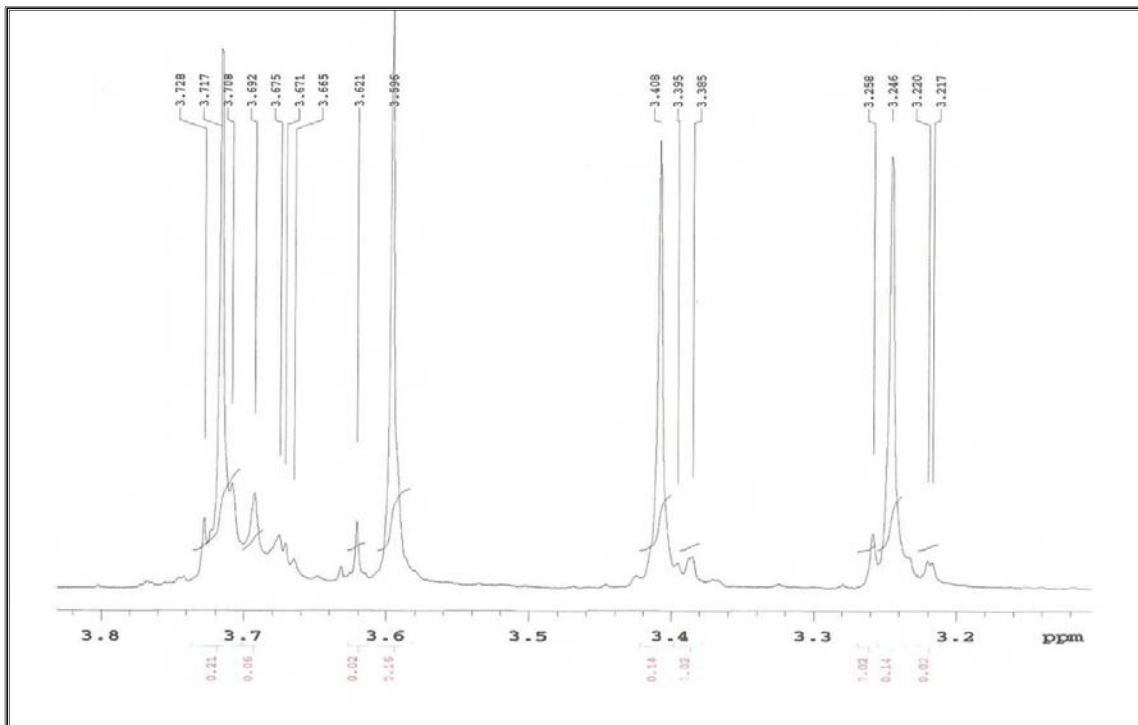


Figura 62: Expansão do espectro de RMN ^1H de CF5 na região de 3,7 a 3,2 ppm (CDCl₃, 500 MHz)

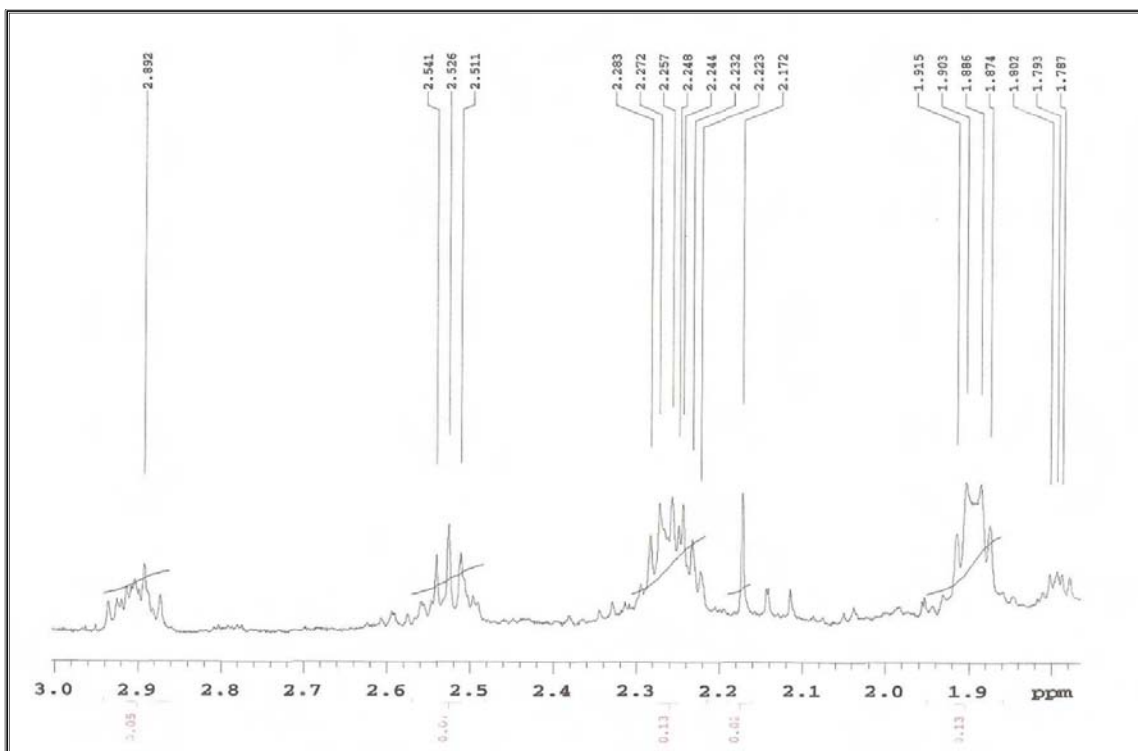


Figura 63: Expansão do espectro de RMN ^1H de CF5 na região de 2,9 a 1,7 ppm (CDCl_3 , 500 MHz)

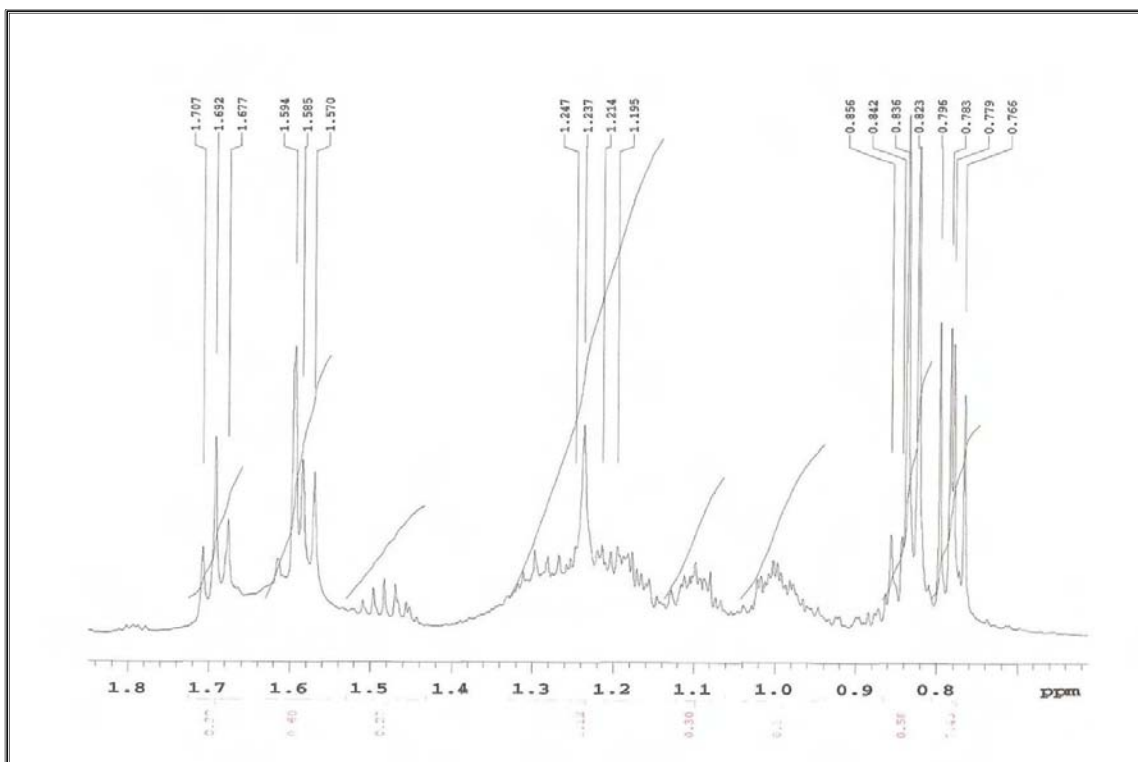


Figura 64: Expansão do espectro de RMN ^1H de CF5 na região de 1,7 a 0,7 ppm (CDCl_3 , 500 MHz)

5.6 Determinação Estrutural de CF6

O espectro de RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) e suas expansões (Figuras 64-68, pág.130-132) revelaram 6 sinais na região entre 0,8 e 1,02 ppm, referentes as metilas em 0,83 (3H, s, H-30), 0,89 (3H, d, $J = 3,5$ Hz, H-21), 0,92 (3H, s, H-28), 0,95 (6H, s, H-18 e H-29), 1,00 (3H, d, $J=2,5$ Hz, H-26) e 1,02 (3H, d, $J=2,5$ Hz) ppm. Além desses sinais, foram observados dois singletos largos em 4,70 e 4,64 ppm atribuídos aos hidrogênios olefínicos H-31 e H-31', porém, os sinais que puderam sugerir a estrutura CF6 como um triterpeno da série cicloartano foram os dois dubletos altamente protegidos em δ_{H} 0,59 ($J = 4$ hz) e δ_{H} 0,34 ($J = 4$ Hz), condizentes respectivamente com os prótons metilênicos H-19a e H-19b localizados no anel ciclopropano da molécula (WU, *et al*, 2010).

Adicionalmente a esses sinais característicos de um esqueleto do tipo cicloartano, pôde-se verificar dois dubletos em 7,60 e 6,30 ($J = \sim 16$ Hz) ppm, característicos de acoplamento do tipo *trans* entre hidrogênios olefínicos. Também se pôde observar dois dubletos em δ_{H} 7,42 (2H, $J = 8$ Hz, H-6'' e H-2'') e δ_{H} 6,82 (2H, $J = 8$ Hz, H-3'' e H-5'') representando quatro prótons aromáticos de um anel benzênico p-dissubstituído (MAJUMDER & PAL, 1985).

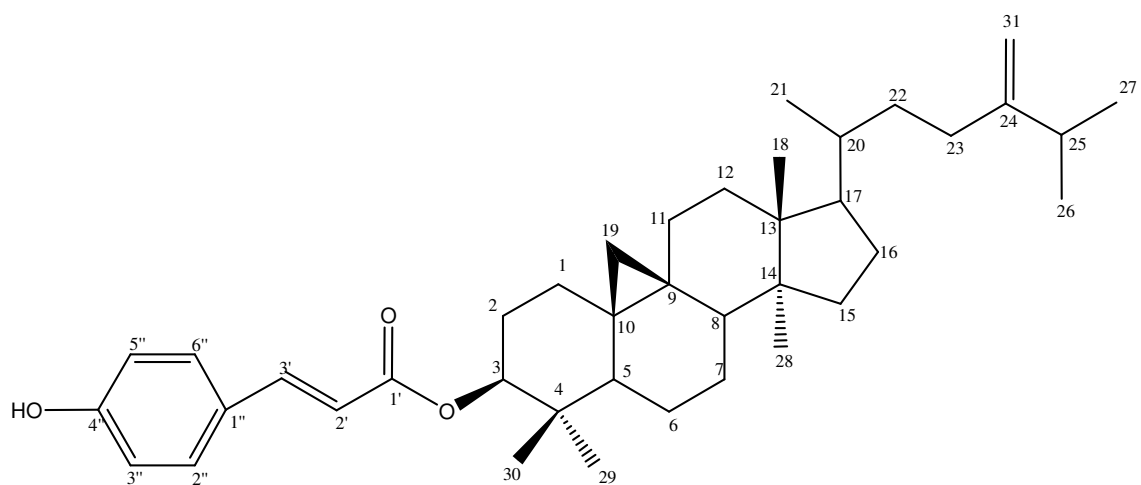
O espectro de RMN ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) (Figuras 69-73, pág.132-134) revelou sinais importantes em δ_{C} 80,66 (característico de carbono oximetínico esterificado (C-3)) e em δ_{C} 105,95 atribuído ao carbono olefínico C-31, o que corrobora com os hidrogênios H-31 e H-31', assim como o sinal em δ_{C} 167,31, típico de uma carbonila de éster conjugada (C-1') (MAJUMDER & PAL, 1985).

Desta maneira, após analisar esses dados, e assinalar todos os carbonos de CF6 com os da literatura (MAJUMDER & PAL, 1985). (Tabela 6) pôde-se definir esta estrutura como sendo um triterpeno da série cicloartano, esterificado com o ácido p-hidroxicinâmico na posição 3. Este triterpeno é denominado de 24-metileno cicloartanil p-hidroxicinamato ou folidotina, o qual está sendo relatado pela primeira vez no gênero *Combretum*.

Tabela 6: Dados de RMN de de ^1H (500MHz) e ^{13}C (125MHz) de CF6 em CDCl_3 , comparados com os dados de RMN de ^{13}C da literatura (δ em ppm e J em Hz).

	CF2		24-metileno cicloartanil p-hidroxicinamato ^a
	δ_{C}	δ_{H}	δ_{C}
C			
4	39,71		39,86
9	20,16		20,31
10	26,01		26,16
13	45,32		45,47
14	48,83		48,99
24	156,91		157,10
CH			
3	80,66		80,77
5	47,85		48,01
8	47,21		47,37
17	52,25		52,40
20	36,12		36,28
25	33,88		33,97
CH₂			
1	31,64		31,80
2	26,93		27,09
6	20,93		21,09
7	28,13		28,30
11	25,82		25,99
12	32,88		33,03
15	35,53		35,69
16	26,52		26,67
19	29,78	0,59 (1H, <i>d</i> , $J=4\text{Hz}$) 0,34 (1H, <i>d</i> , $J=4\text{Hz}$)	29,94
22	35,01		35,16
23	31,33		31,48
31	105,95	4,70 (1H, <i>s</i>) 4,64 (1H, <i>s</i>)	106,10
CH₃			
18	19,30	0,95 (3H, <i>s</i>)	19,46
21	17,97	0,89 (3H, <i>d</i> , $J = 3,5$)	18,13
26	21,99	1,00 (3H, <i>d</i> , $J=2,5$)	22,15
27	21,87	1,02 (3H, <i>d</i> , $J=2,5$)	22,02
28	18,31	0,92 (3H, <i>s</i>)	18,46
29	15,31	0,95 (3H, <i>s</i>)	15,47
30	25,48	0,83 (3H, <i>s</i>)	25,64
Ác.Cinâmico			
1'	167,31		167,37
2'	116,36	6,30 (1H, <i>d</i> , $J = 16,5\text{Hz}$)	116,69
3'	143,98	7,60 (1H, <i>d</i> , $J = 16\text{Hz}$)	144,00
1''	127,37		127,72
2''	129,89	7,42 (1H, <i>d</i> , $J = 8\text{Hz}$)	130,06
3''	115,86	6,82 (1H, <i>d</i> , $J = 8\text{Hz}$)	115,98
4''	157,66		157,56
5''	115,86	6,82 (1H, <i>d</i> , $J = 8\text{Hz}$)	115,98
6''	129,89	7,42 (1H, <i>d</i> , $J = 8\text{Hz}$)	130,06

^a)MAJUMDER & PAL, 1985



24-metileno cicloartanil p-hidroxicinamato

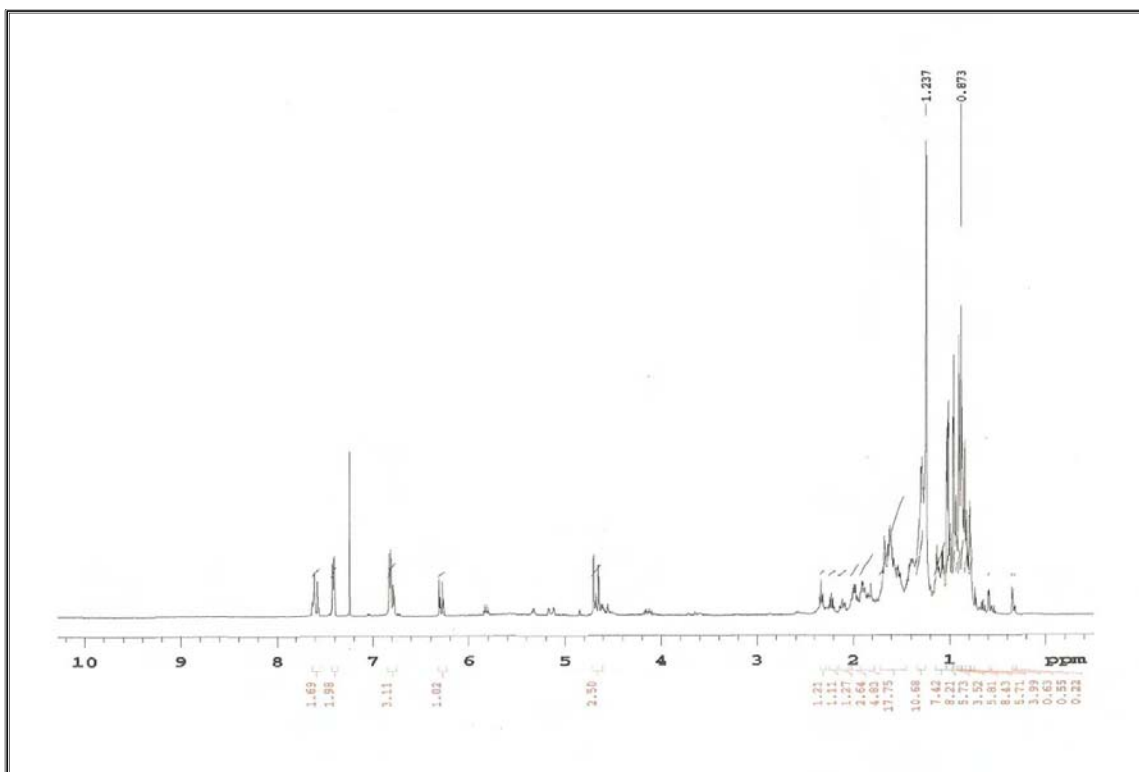


Figura 65 : Espectro de RMN de ^1H de CF6 (CDCl_3 , 500 MHz)

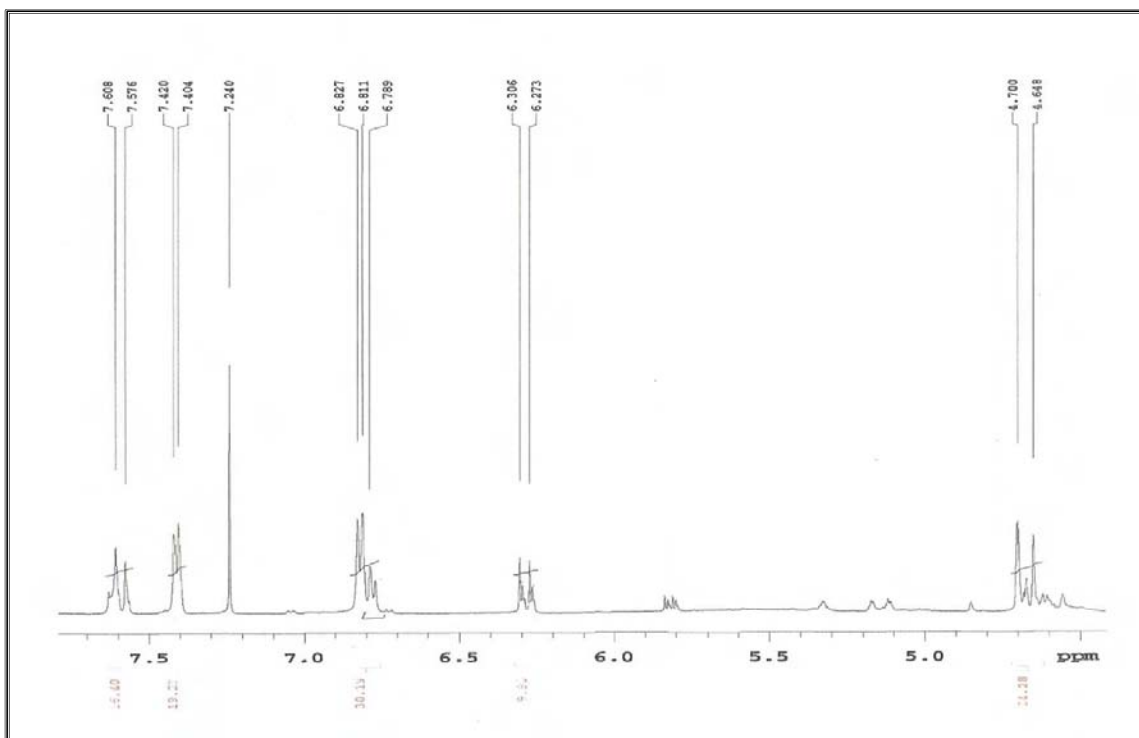


Figura 66: Expansão do espectro de RMN ^1H de CF6 na região de 7,6 a 4,6 ppm (CDCl_3 , 500 MHz)

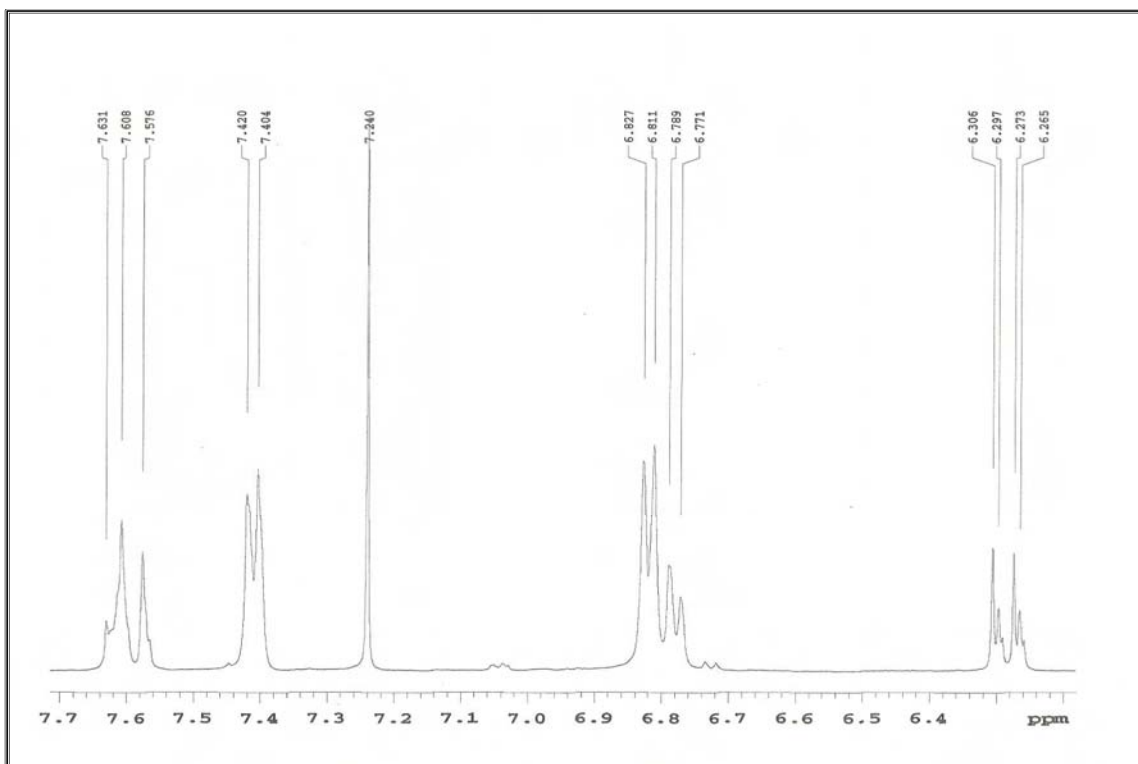


Figura 67: Expansão do espectro de RMN ^1H de CF6 na região de 7,6 a 6,2 ppm (CDCl₃, 500 MHz)

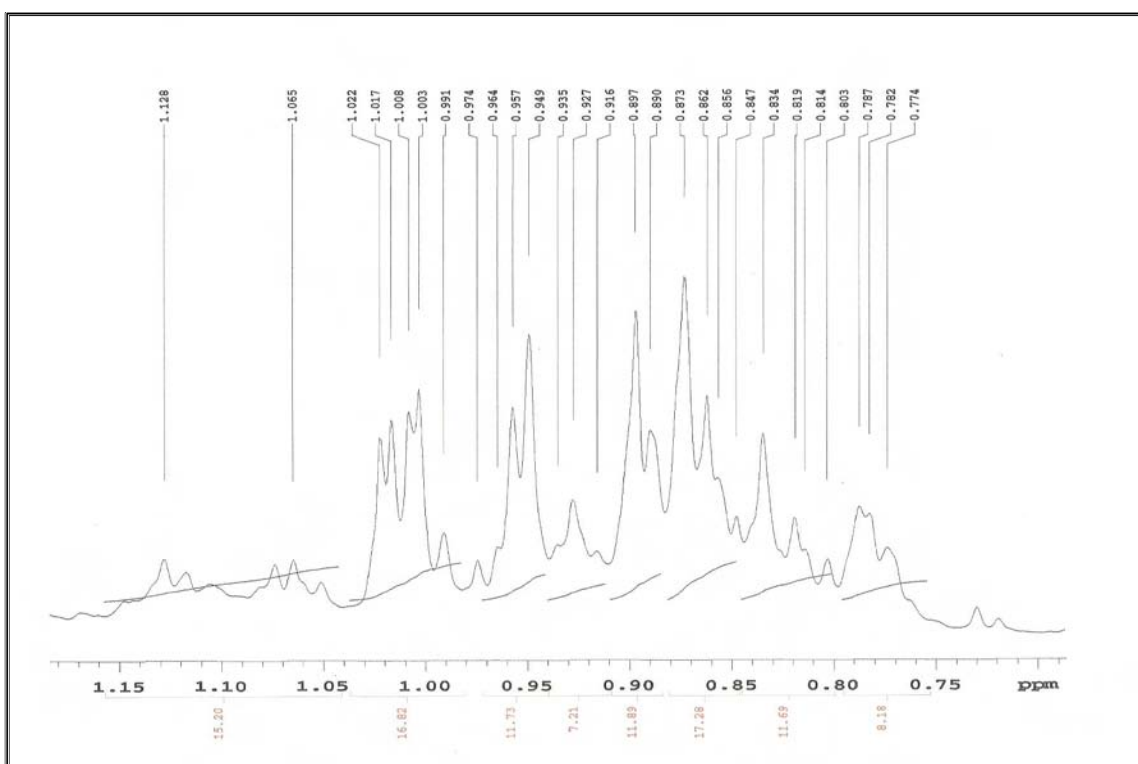


Figura 68: Expansão do espectro de RMN ^1H de CF6 na região de 1,15 a 0,7 ppm (CDCl₃, 500 MHz)

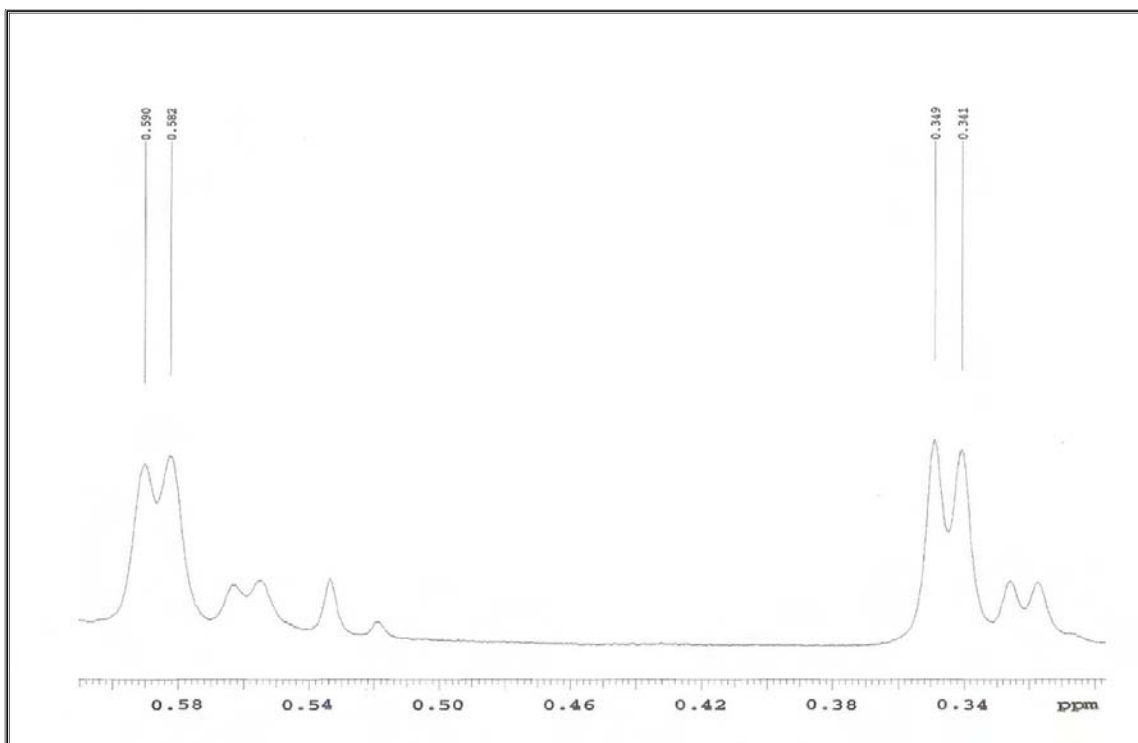


Figura 69: Expansão do espectro de RMN ^1H de CF6 na região de 0,5 a 0,3 ppm (CDCl₃, 500 MHz)

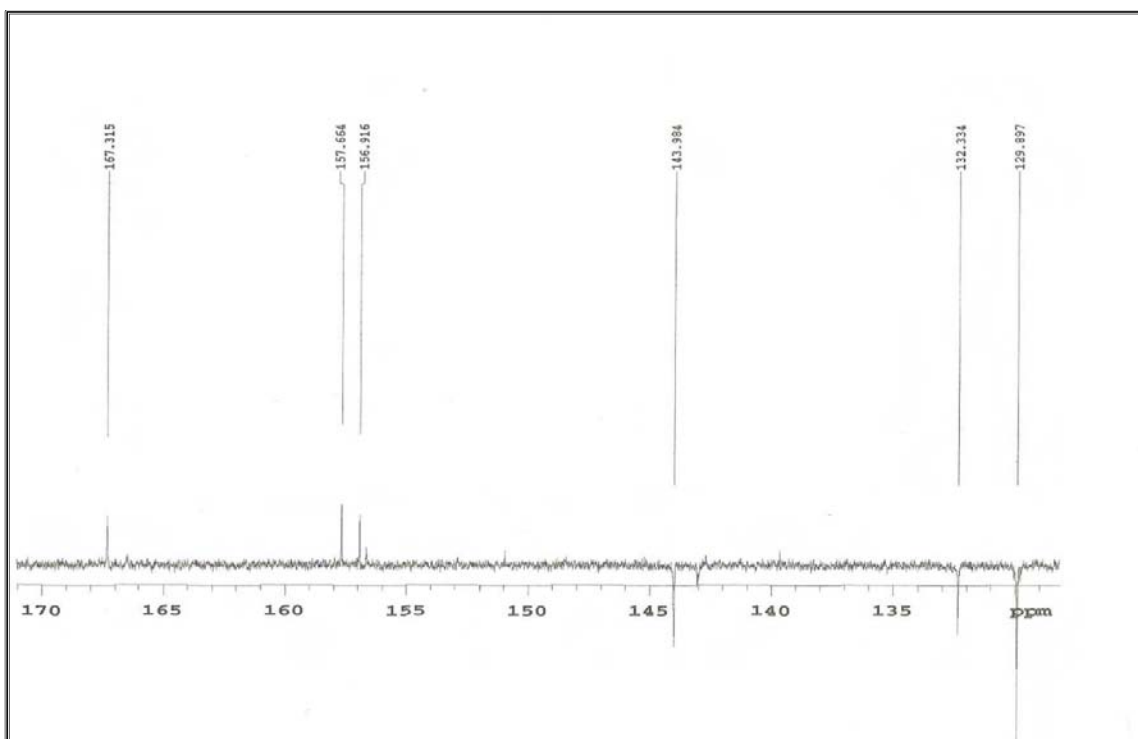


Figura 70: Expansão do espectro de RMN ^{13}C de CF6 na região de 167 a 129 ppm (CDCl₃, 125 MHz)

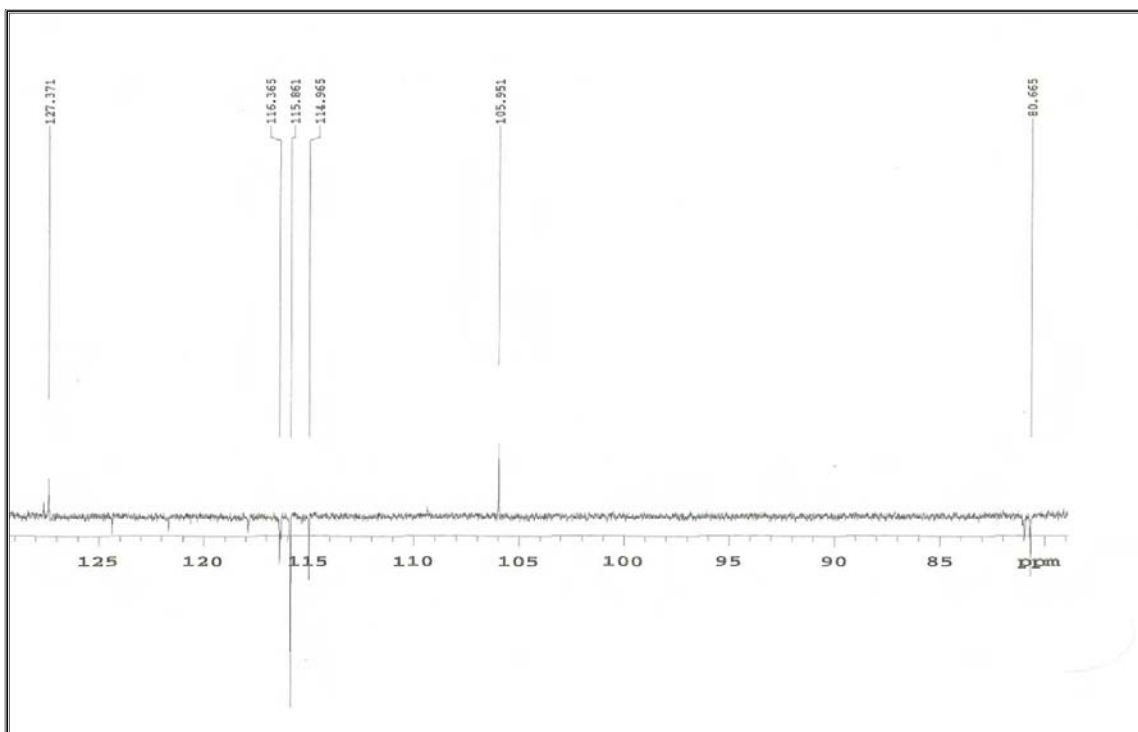


Figura 71: Expansão do espectro de RMN ^{13}C de CF6 na região de 127 a 80 ppm (CDCl₃, 125 MHz)

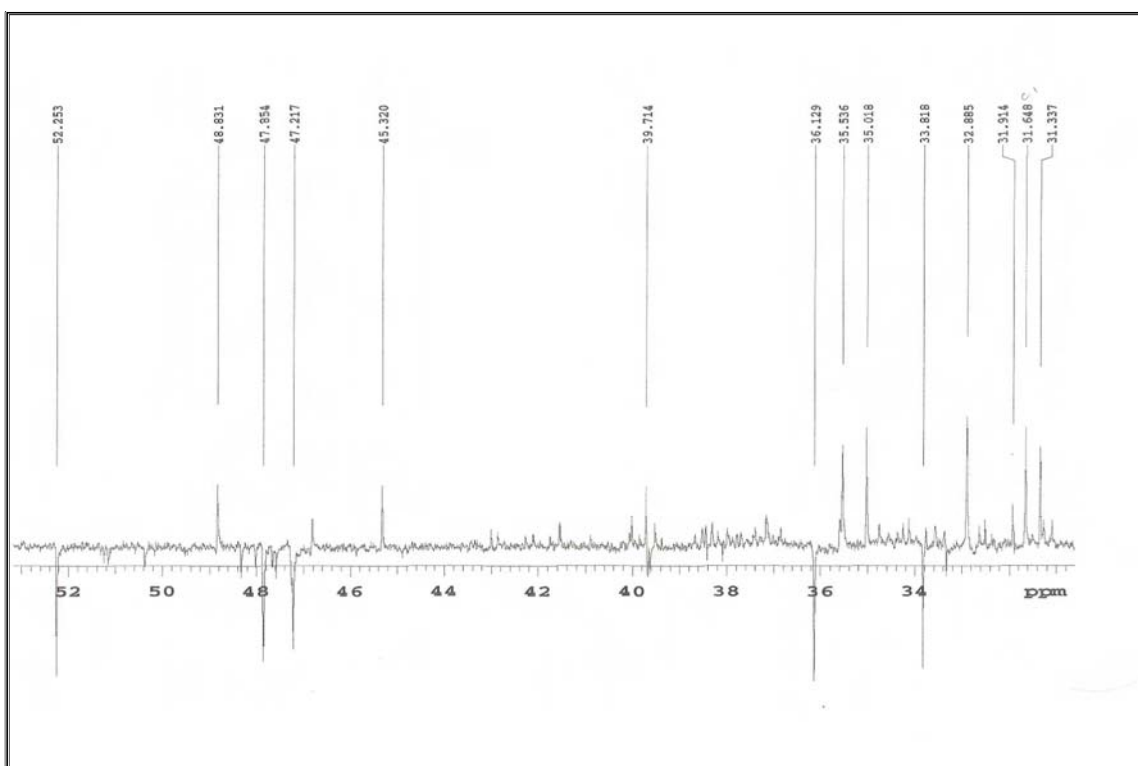


Figura 72: Expansão do espectro de RMN ^{13}C de CF6 na região de 127 a 80 ppm (CDCl₃, 125 MHz)

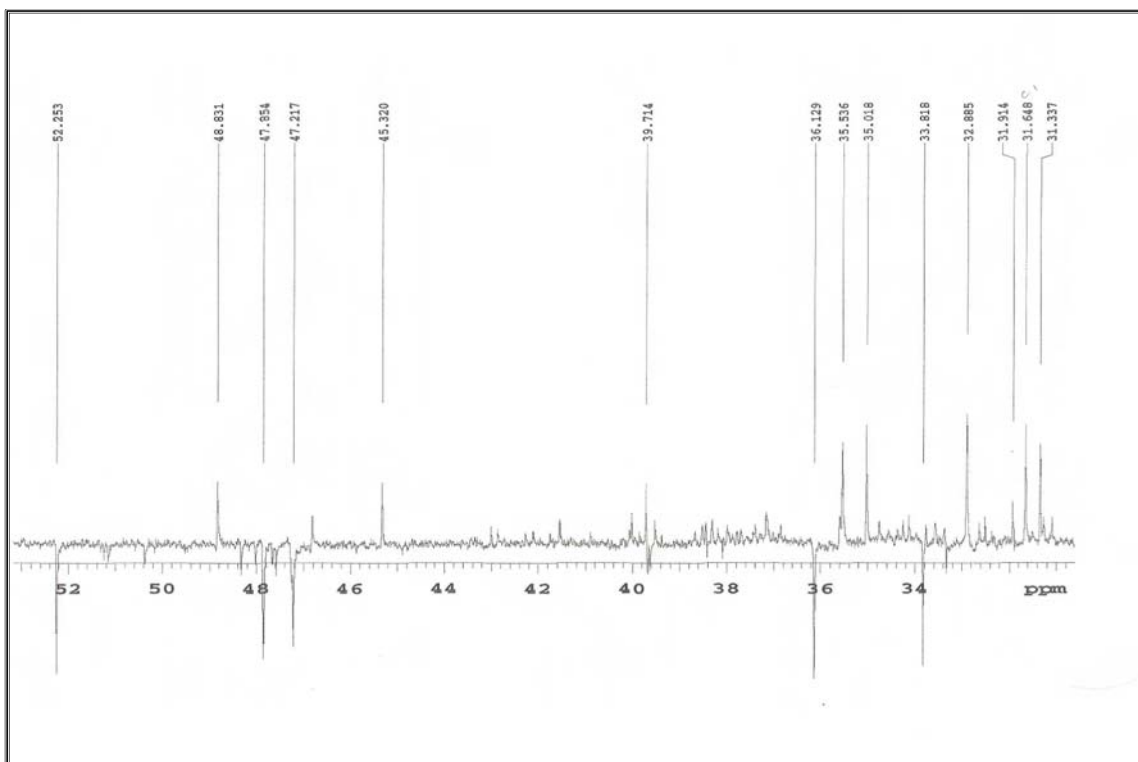


Figura 73: Expansão do espectro de RMN ^{13}C de CF_6 na região de 52 a 31 ppm (CDCl_3 , 125 MHz)

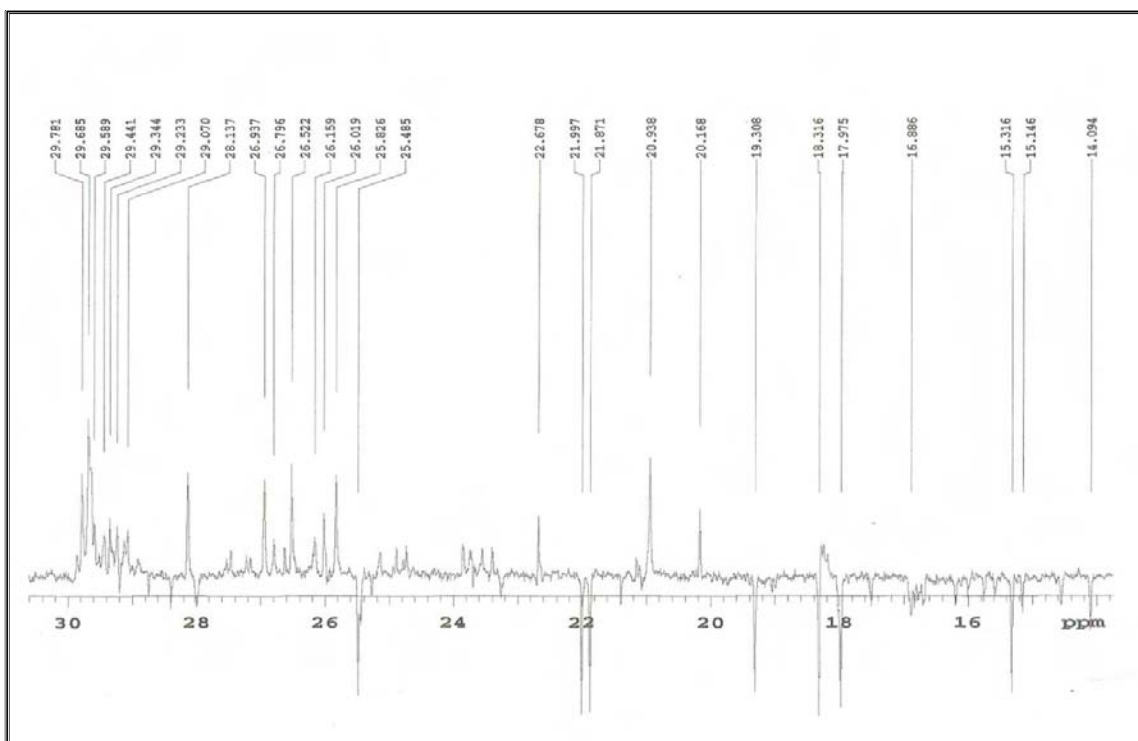


Figura 74: Expansão do espectro de RMN ^{13}C de CF_6 na região de 29 a 14 ppm (CDCl_3 , 125 MHz)

5.7 Resultados dos Ensaio Biológicos

5.7.1 Avaliação da atividade antimicrobiana do extrato etanólico bruto das partes aéreas de *Combretum fruticosum* (Loefl.) Stuntz.

Na avaliação da atividade antimicrobiana, utilizou-se o método de difusão em Agar frente às seguintes bactérias e fungos leveduriformes ATCC: *Staphylococcus aureus* 25923, *Enterococcus faecalis* 29212, *Klebsiella pneumoniae* 13833, *Pseudomonas aeruginosa* 27853, *Escherichia coli* 25922, *Candida parapsilosis* 40058, *Candida albicans* 10231, *Candida krusei* 6258 e *Candida glabrata* 90030.

Como pode ser visto no quadro 11, o EEB de *Combretum fruticosum* demonstrou atividade antimicrobiana frente a 3 bactérias e 1 fungo, podendo-se destacar a atividade do último, o qual provocou um halo de inibição muito parecido com o do controle positivo, cogitando-se a possibilidade de em um futuro próximo, estudar e identificar qual ou quais princípios ativos deste EEB são responsáveis por exercer essa atividade antifúngica tão pronunciada.

Quadro 11: Avaliação da atividade antimicrobiana do extrato etanólico bruto de <i>Combretum fruticosum</i> através do método de difusão em agar .		
Bactérias	<i>C.fruticosum</i> 000 µg/disco) (1	Cloranfenicol (30µg/disco)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	10 mm (± 0,1)	22 mm (± 0,1)
<i>Staphylococcus aureus</i>	11 mm (± 0,1)	26 mm (± 0,1)
<i>Enterococcus faecalis</i>	10 mm (± 0,1)	26 mm (± 0,1)
Fungos	<i>C.fruticosum</i> 000 µg/disco) (1	Fluconazol (25µg/disco)
<i>Candida krusei</i>	13 mm (± 0,1)	15 mm (± 0,1)

5.7.2 Avaliação da atividade antitumoral *in vitro* das substâncias CF1, CF2 , CF3 e CF4 .

Neste ensaio, as substâncias CF1, CF2 , CF3 e CF4 foram testadas frente às células da linhagem Sarcoma 180 e apenas a CF1 e CF4 foram analisadas frente a linhagem leucêmica K562, visto que já havia relato de ensaios de citotoxicidade frente as células da linhagem sarcoma 180 com as outras substâncias.

O ensaio foi realizado com as substâncias em concentrações variadas, chegando a até 200 µg/mL, onde observou-se ausência de atividade citotóxica frente as células tumorais da linhagem sarcoma 180 e K562.

6 Conclusões

- O presente trabalho atingiu o objetivo principal que se fundamentou na ampliação do conhecimento quimiotaxonômico do gênero *Combretum*, através do isolamento e identificação de diversos metabólitos secundários da espécie *Combretum fruticosum* (Loefl.) Stuntz.
- Através de métodos cromatográficos clássicos e técnicas espectroscópicas de infravermelho e RMN de ^1H e ^{13}C uni e bidimensionais, foi possível isolar e identificar 5 compostos em sua forma pura e dois sob a forma de uma mistura.
- O estudo fitoquímico das fases hexânica, diclorometano e AcOEt levou ao isolamento das substâncias α -amirina e β -amirina (CF1), ácido betulínico (CF2), α -espinasterol (CF3), espinasterol glicosilado acetilado (CF4), 13^2 -hidroxi-(13^2 -S)-feoftina A (CF5) e o 24-metileno cicloartanil p-hidroxicinamato (CF6). Dentre essas 7 substâncias isoladas, 6 estão sendo relatadas pela primeira vez no gênero.
- O ensaio antimicrobiano do extrato etanólico bruto das partes aéreas de *Combretum fruticosum* (Loefl.) Stuntz revelou atividade satisfatória contra o fungo *Candida krusei* e contra as bactérias *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* e *Enterococcus faecalis*.
- Apesar do ensaio de citotoxicidade *in vitro* frente as células das linhagens Sarcoma 180 e K562 revelarem nenhuma atividade, espera-se testar as substâncias isoladas desta espécie em linhagens diferentes em um futuro próximo.
- O isolamento de diversos metabólitos na espécie *Combretum fruticosum* (Loefl.) Stuntz demonstra quão rico é este gênero, gerando perspectivas promissoras para uma investigação fitoquímica mais aprofundada.

Referências

ADNYANA, I.K.; TEZUKA, Y.; AWALE, S.; BANSKOTA, A.H.; TRAN, K.Q.; KADOTA, S. Quadranosides VI – XI, six new triterpene glucosides from the seeds of *Combretum quadrangulare*. **Chemical & Pharmaceutical Bulletin**. v.48, n.8, p.1114 – 1120, 2000b

ADNYANA, I.K.; TEZUKA, Y.; BANSKOTA, A.H.; TRAN, K.Q.; KADOTA, S. Three new triterpenes from the seeds of *Combretum quadrangulare* and their hepatoprotective activity. **Journal of Natural Products**. v.64, p.360 – 363, 2001.

ADNYANA, I.K.; TEZUKA, Y.; BANSKOTA, A.H.; XIONG, Q.; TRAN, K.Q.; KADOTA, S. Quadranosides I – V, new triterpene glucosides from the seeds of *Combretum quadrangulare*. **Journal of Natural Products**. v.63, p.496 – 500, 2000a

AHMED, B.; AL-HOWIRINY, T.A.; PASSREITER, C.M.; MOSSA, J.S. Combretene-A and B: two new triterpenes from *Combretum molle*. **Pharmaceutical Biology**. v.42, n.2, p.109 – 113, 2004.

ANGEH, J.E.; HUANG, X.; SATTTLER, I.; SWAN, G.E.; DAHSE, H.; HÄRTL, A.; ELOFF, J.N. Antimicrobial and anti-inflammatory activity of four known and one new triterpenoid from *Combretum imberbe* (Combretaceae). **Journal of ethnopharmacology**. v.110, p.56 – 60, 2007a.

ANGEH, J.E.; HUANG, X.; SWAN, G.E.; MÖLLMAN, U.; SATTTLER, I.; ELOFF, J.N. Novel antibacterial triterpenoid from *Combretum padoides* (Combretaceae). **Arkivoc**. v.ix, p.113 – 120, 2007b.

ARAGÃO, G.F.; CARNEIRO, L.M.V.; JUNIOR, A.P.F.; VIEIRA, L.C.; BANDEIRA, P.N.; LEMOS, T.L.G.; VIANA, G.S.de B. A possible mechanism for anxiolytic and antidepressant effects of alpha- and beta-amyrin from *Protium heptaphyllum* (Aubl.) March. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, v.85, p.827 – 834, 2006.

ASRES, K. ; BUCAR, F. ; KNAUDER, E. ; YARDLEY, V. ; KENDRICK, H.; CROFT, S.L. *In vitro* Antiprotozoal activity of extract and compounds from the stem bark of *Combretum molle*. **Phytotherapy Research**. v.15, p.613 – 617, 2001.

BANSKOTA, A.H.; TEZUKA, Y.; TRAN, K.Q.; TANAKA, K.; SAIKI, I.; KADOTA, S. Methyl Quadrangularates A – D and related triterpenes from *Combretum quadrangulare*. **Chemical & Pharmaceutical Bulletin**. v.48, n.4, p. 496 – 504, 2000a

BANSKOTA, A.H.; TEZUKA, Y.; TRAN, K.Q.; TANAKA, K.; SAIKI, I.; KADOTA, S. Thirteen novel cycloartane-type triterpenes from *Combretum quadrangulare*. **Journal of Natural Products**. v.63, p.57 – 64, 2000b

BANSKOTA, A.H.; TEZUKA, Y.; PHUNG, L.K.; TRAN, K.Q.; SAIKI, I.; MIWA, Y.; TAGA, T.; KADOTA, S. Cytotoxic cycloartane-type triterpenes from *Combretum quadrangulare*. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**. v.8, p.3519 – 3524, 1998.

BASSÈNE, E.; OLSCHWANG, D.; POUSET, J. L. Plantes médicinales africaines. Les alcaloïdes du *Combretum micranthum* G. Don (Kinkeliba). **Annales Pharmaceutiques Françaises**. v.44, n.3, p.191 – 196, 1986.

BISOLI, E.; GARCEZ, W.S.; HAMERSKI, L.; TIEPPO, C. ; GARCEZ, F.R. Bioactive pentacyclic triterpenes from the stems of *Combretum laxum*. **Molecules**. v.13, p.2717 – 2728, 2008.

BRAGA, F.C.; SERRA, C.P.; VIANA JÚNIOR, N.S.; OLIVEIRA, A.B.; CÔRTEZ, .F.; LOMBARDI, J.A. Angiotensin-converting enzyme inhibition by Brazilian plants. **Fitoterapia**. v.78, p.353 – 358, 2007.

BRAGA, F.C.; WAGNER, H.; LOMBARDI, J.A.; OLIVEIRA, A.B. Screening Brazilian plant species for in vitro inhibition of 5- lipoxygenase. **Phytomedicine**. v.6, n.6, p.447 – 452, 2000.

BRAZ FILHO, R. Contribuição da fitoquímica para o desenvolvimento de um país emergente. **Química Nova**. v.33, n.1, p.229 – 239, 2010.

BRAZ FILHO, R. ; GOTTLIEB, H.E. ; MOURÃO, A.P.; MIRANDA, C.A.S. 3-β-O-D-glicopiranosilespinasterol, um novo glicosídeo esteroidal isolado de *Amarthospermum schomburghinana* (Miq.) Baehni. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**. v.58, n.3, p.363 – 368, 1986.

BREYTENBACH, J.C.; MALAN, S.F. Pharmacochemical properties od *Combretum zeyheri*. **South African Journal of Science**. v.85, p. 372 – 374, 1989.

BROOKES, K.B.; DOUDOUKINA, O.V.; KATSOULIS, L.C.; VEALE, J.H. Uteroactive constituents from *Combretum kraussii*. **South African Journal of Chemistry**. v.52, n.4, p.127 – 132, 1999.

BRUMMITT, R.K. **Vascular Plant Families and Genera**. Royal Botanic gardens, Kew, p.527, 1992.

BYUN, S.J.; FANG, Z.; JEONG, S.Y.; LEE, C.S.; SON, J.K.; WOO, M.H. α-amyrin triterpenoids and two known compounds with DNA topoisomerase I inhibitory activity and cytotoxicity from the spikes of *Prunella vulgaris* var. lilacina. **Natural Product Sciences**. v.13, n.4,p.359 – 364, 2007.

CALIXTO, J.B. Biodiversidade como fonte de medicamentos. **Ciência e Cultura**. v.55, n.3, p. 37 – 39, 2003.

CAVALCANTI, M.S.B.; BIEBER, L.W.; SILVA FILHO, A.A.; MARTINS, D.G.; ARAUJO, M.C.M. Saponina Isolada de *Combretum fruticosum* (Combretaceae). **Revista do Instituto de Antibióticos**,UFPE, Recife. v.21, n.1/2, p.21 – 25, 1983.

CHINTHARLAPALLI, S.; PAPINENI, S.; RAMAIAH, S.K. ; SAFE, S. Betulinic acid inhibits prostate cancer growth through inhibition of specificity protein transcription factors. **Cancer Research**. v.67, n.6, p. 2816 – 2823, 2007.

CHOWDHURY, R.; ISLAM, N. A hydroxylated mansumbinen-28-oic acid from *Combretum coccineum*. **Biochemical systematic and ecology**. v.32, p443 – 445, 2004.

COOMBES, P.H.; ROGERS, C.B. Methyl gardenolate A, a novel cycloartenoid ester from the leaves of *Combretum woodii* (Combretaceae). **Natural Product Letters**. v.16, n.5, p.301 – 304, 2002.

COSTA, D.A.; CHAVES, M.H.; SILVA, W.C.S.; COSTA, C.L.S. Constituintes químicos, fenóis totais e atividade antioxidante de *Stercula striata* St. Hil. Et Naudin. **Acta Amazonica**. v.40, n.1, p.207 – 212, 2010.

DAVID, J.P.; FERRARI, J.; DAVID, J.M.; GUIMARÃES, A.G.; LIMA, F.W.M.; SOUZA, G.L.S. New triterpene and antibacterial labdenoic acid derivatives from *moldehawera nutans*. **Journal of Brazilian Chemical Society**. v.18, n.8, p. 1585 – 1589, 2007.

DENIZOT, F.; LANG, R. Rapid colorimetric assay for cell growth and survival, modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability. **Journal of Immunological Methods**. v. 89, p. 271 – 277, 1986.

DRAG, M.; SUROWIAK, P.; DRAG-ZALESINSKA, M.; DIETEL, M.; LAGE, H.; OLEKSYSZYN, J. Comparision of the cytotoxic effects of birch bark extract, betulin and betulinic acid towards human gastric carcinoma and pancreatic carcinoma drug-sensitive and drug-resistant cell lines. **Molecules**. v.14, p. 1639 – 1651, 2009.

ELOFF, J.N.; MCGAW, L.J. The biological activity and chemistry of the southern African Combretaceae. **Journal of Ethnopharmacology**. V.119, p.686 – 699, 2008.

FACUNDO, V.A.; ANDRADE, C.H.S.; SILVEIRA, E.R.; BRAZ-FILHO, R.; HUFFORD, C.D. Triterpenes and flavonoids from *Combretum leprosum*. **Phytochemistry**. v.32, n.2, p.411 – 415, 1993.

FACUNDO, V.A.; RIOS, K.A.; MOREIRA, L.S.; MILITÃO, J.S.L.T.; STABELLI, R.G.; BRAZ-FILHO, R.; SILVEIRA, E.R. Two new cycloartanes from *Combretum leprosum* MART. (Combretaceae). **Revista latinoamericana de Química**. v.36, n.3, p.47 – 52, 2008.

FAUJAN, N. H.; ALITHEEN, N. B.; YEAP, S. K.; ALI, A. M.; MUHAJIR, A. H.; AHMAD, F. B. H. Cytotoxic effect of betulinic acid and betulinic acid acetate isolated from *Melaleuca cajuput* on human myeloid leukemia (HL-60) cell line. **African Journal of Biotechnology** v.9, n.38, p. 6387-6396, 2010.

FREITAS, C.S.; BAGGIO, C.H.; SANTOS, A.C.; MAYER, B.; TWARDOWSCHY, A.; LUIZ, A.P.; MARCON, R.; SOLDI, C.; PIZZOLATTI, M.G.; SANTOS, E.P.; MARQUES, M.C.A.; SANTOS, A.R.S. Antinociceptive properties of the hydroalcoholic extract, fractions and compounds obtained from the aerial parts of *Baccharis illinita* DC in mice. **Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology**. v.104, n.4, p.285 – 292, 2009

GANZERA, M.; ELLMERER-MÜLLER, E.P.; STUPPNER, H. Cycloartane triterpenes from *Combretum quadrangulare*. **Phytochemistry**. v.49, n.3, p.835 – 838, 1998.

JEON, G.C.; PARK, M.S.; YOON, D.Y.; SHIN, C.H.; SIN, H.S.; UM, S.J. Antitumor activity of spinasterol isolated from *Pueraria* roots. **Experimental and Molecular Medicine**. v.37, n.2, p.111 – 120, 2005.

JEONG, S.I.; KIM, K.J.; CHOI, M.K.; KEUM, K.S.; LEE, S.; AHN, S.H.; BACK, S.H.; SONG, J.H.; JU, Y.S.; CHOI, B.K.; JUNG, K.Y. α -spinasterol isolated from the root of *Phytolacca Americana* and its pharmacological property on diabetic nephropathy. **Planta Medica**. v.70, n.8, p.736 – 739, 2004.

JERZ, G.; ARREY, T. N.; WRAY, V.; DU, Q.; WINTERHALTER, P. Structural characterization of 13²-hydroxy-(13²-S)-phaeophytin-a from leaves and stems of *Amaranthus tricolor* isolated by high-speed countercurrent chromatography. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**. v.8, p.413-418, 2007.

JOSSANG, A.; POUSSET, J.L.; BODO, B. Combreglutinin, a hydrolyzable tannin from *Combretum glutinosum*. **Journal of natural Products**. v.57, n.6, p.732 – 737, 1994.

JOSSANG, A.; SEULEIMAN, M.; MAIDOU, E.; BODO, B. Pentacyclic triterpenes from *Combretum Nigricans*. **Phytochemistry**. v.41, n.2, p.591 – 596, 1996.

JUNG, G.R.; KIM, K.J.; CHOI, C.H.; LEE, T.B.; HAN, S.I.; HAN, H.K.; LIM, S.C. Effect of betulinic acid on anticancer drug-resistant colon cancer cells. **Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology**, v.101, p. 277–285, 2007.

KATERERE, D.R.; GRAY, A. I.; KENNEDY, A. R.; NASH, R. J.; WAIGH, R.D. Cyclobutanes from *Combretum albopunctatum*. **Phytochemistry**. v.65, p.433 – 438, 2004.

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

KLEIN JUNIOR, L.C.; GANDOLFI, R.B.; SANTIN, J.R.; LEMOS, M.; CECHINEL FILHO, V.; ANDRADE, S.F. Antiulcerogenic activity of extract, fractions, and some compounds obtained from *Polygala cyparissias* St. Hillaire & Moquin (Polygalaceae). **Naunyn Schmiedeberg's Archives of Pharmacology**. v.381, n.2, p.121 – 126, 2010.

KOEHN, F.E.; CARTER, G.T. The evolving role of natural products in drug discovery. **Nature**. v.4, p. 206 – 220, 2005.

KOEPKE, P.; SUBBIAH, V.; BUROW, M.E. *Combretum laurifolium* MART. Extract and methods of extracting and using such extract. **United States Patent**. n.US 2009/0074891 A1, 2009.

LETCHER, R. M.; NHAMO, L. R. M. Chemical constituents of the combretaceae. Part 1. Substituted phenantrenes and 9,10-dihydrophenantrenes from the heartwood of *Combretum apiculatum*. **Journal Of Chemical Society**. p.3070 – 3076, 1971.

LI, J.W.H.; VEDERAS, J.C. Drug discovery and natural products: end of an era or an endless frontier?. **Science**. V.325, p. 161 – 165, 2009

LIMA-JÚNIOR, R.C.P.; SOUSA, D.I.M.; BRITO, G.A.C.; CUNHA, G.M.; CHAVES, M.H.; RAO, V.S.N.; SANTOS, F.A. Modulation of acute visceral nociception and bladder inflammation by plant triterpene, α , β -amyrin in a mouse model of cystitis: role of tachykinin NK1-receptors, and K⁺ ATP channels. **Inflammation Research**. v.56, p.487 – 494, 2007.

LIN, K.W.; HUANG, A.M.; TU, H.Y.; LEE, L.Y.; WU, C.C.; HOUR, T.C.; YANG, S.C.; PU, Y.S.; LIN, C.N. Xanthine oxidase inhibitory triterpenoid and phloroglucinol from guttiferaceous plants inhibit growth and induced apoptosis in human NTUB1 cells through a ROS-dependent mechanism. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v.59, n.1, p. 407 – 414, 2010.

LITAUDON, M.; JOLLY, C.; LE CALLONEC, C.; CUONG, D.D.; RETAILLEAU, P.; NOSJEAN, O.; NGUYEN, V.H.; PFEIFFER, B.; BOUTIN, J.A.; GUÉRITTE, F. Cytotoxic pentacyclic triterpenoids from *Combretum sundaicum* and *Lantana camara* as inhibitors of Bcl-xL/BaKBH3 domain peptide interaction. **Journal of Natural Products**. v.72, p.1314 – 1320, 2009

LOIOLA, M.I.B.; ROCHA, E.A.; BARACHO, G.S.; AGRA, M.F. Flora da Paraíba, Brasil: Combretaceae. **Acta Botanica Brasilica**. v.23, n.2, p.330 – 342, 2009.

MAHATO, S.B.; KUNDU, A.P. ¹³C NMR Spectra of pentacyclic triterpenoids – a compilation and some salient features. **Phytochemistry**. v.37, n.6, p. 1517 – 1575, 1994.

MAJUMDER, P.L.; PAL, A. 24-methylene cycloartanol p-hydroxycinnamate from the orchid *Cirrhopetalum elatum*. **Phytochemistry**. v.24, n.9, p.2120 – 2122, 1985.

MARQUETE, N.F.S.; VALENTE, N.M. Flora da reserva Ducke, Amazonas, Brasil: Combretaceae. **Rodriguésia**. v.56, p.131 – 140, 2006.

MASOKO, P.; MDEE, L.K.; MAMPURU, L.J.; ELOFF, J.N. Biological activity of two related triterpenes isolated from *Combretum nelsonii* (Combretaceae) leaves. **Natural Product Research**. v.22, n.12, p.1074 – 1084, 2008.

MCCHESENEY, J.D.; VENKATARAMAN, S.K.; HENRI, J.T. Plant natural products: back to the future or into extinction?. **Phytochemistry**. V.68, p.2015 – 2022, 2007.

MEDEIROS, R.; OTUKI, M.F.; AVELLAR, M.C.W.; CALIXTO, J.B. Mechanisms underlying the inhibitory actions of the pentacyclic triterpene α -amyrin in the mouse skin inflammation induced by phorbol ester 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate. **Journal of Pharmacology**. v.559, p. 227 – 235, 2007.

MELO, C.M.; CARVALHO, K.M.M.B.; NEVES, J.C.S.; MORAIS, T.C.; RAO, V.S.; SANTOS, F.A.; BRITO, G.A. de C.; CHAVES, M.H. α, β -amyrin, a natural triterpenoid ameliorates L-arginine induced acute pancreatitis in rats. **World Journal of Gastroenterology**. v.16, n.34, p.4272 – 4280, 2010.

MOSMANN, T. Rapid calorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**. v.65, p. 55 – 63, 1983.

OJEWOLE, J.A.O.; Analgesic and antiinflammatory effects of mollic acid glucoside, a 1α -hydroxycycloartenoid saponin extractive from *Combretum molle* R. Br. Ex G. Don (Combretaceae) leaf. **Phytotherapy Research**. v.22, 30 – 35, 2008.

OSBORNE, R.; PEGEL, K.H. Jessic acid and related acid triterpenoids from *Combretum elaeagnoides*. **Phytochemistry**. v.23, n.3, p. 635 – 637, 1984.

OSBORNE, R.; PEGEL, K.H. Methyl jessate 1 α -,11 α -oxide, a further novel triterpenoid ester from *Combretum elaeagnoides*. **South African Journal of Chemistry**. v.38, n.3, p.83 – 86, 1985.

PANZINI, I.; PELZZONI, F.; VEROTTA, L. ; ROGERS, B.C. Constituents of the fruit of South African *Combretum* species: part 1. **South African Journal of Science**. v.89, p.324 – 328, 1993.

PEGEL, K.H.; ROGERS, C.B. Mollic acid 3- β -D-glucoside, a novel 1 α -hydroxycycloartane saponin from *Combretum molle* (Combretaceae). **Tetrahedron Letters**. n.47, p.4299 – 4302, 1976.

PIETROVSKI, E.F.; ROSA, K.A.; FACUNDO, V.A.; RIOS, K.; MARQUES, M.C.A.; SANTOS, A.R.S. Antinociceptive properties of the ethanolic extract and of the triterpene 3 β ,6 β ,16 β -trihydroxylup-20(29)-ene obtained from the flowers of *Combretum leprosum* in mice. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**. V.83, p.90 – 99, 2006.

PINTO, S.A.H.; PINTO, L.M.S.; CUNHA, G.M.A.; CHAVES, M.H.; SANTOS, F.A.; RAO, V.S. Anti-inflammatory effect of α , β -Amyrin, a pentacyclic triterpene from *Protium heptaphyllum* in rat model of acute periodontitis. **Inflammopharmacology**. v.16, p.48 – 52, 2008.

PONOU, B.K.; BARBONI, L.; TEPONNO, R.B.; MBIANTCHA, M.; NGUELEFACK, T.B.; PARK, H.J.; LEE, K.T.; TAPONDJOU, L.A. Polyhydroxyoleanane-type triterpenoids from *Combretum molle* and their anti-inflammatory activity. **Phytochemistry letters**. v.1, p.183 – 187, 2008.

ROGERS, C.B. Acidic dammarane arabinofuranosides from *Combretum rotundifolium*. **Phytochemistry**. v.40, n.3, p.833-836, 1995.

ROGERS, C.B. Cycloartenoid dienone acids and lactones from *Combretum erythrophyllum*. **Phytochemistry**. v.49, n.7, p.2069 – 2076, 1998.

ROGERS, C.B. Isolation of the 1 α -hydroxycycloartenoid mollic acid α -L-arabinoside from *Combretum edwardsii* leaves. **Phytochemistry**. v.28, n.1, p.279 – 281, 1989a

ROGERS, C.B. New mono- and bi-desmosidic triterpenoids isolated from *Combretum padoides* leaves. **Journal of Natural Products**. v.52, n.3, p.528 – 533, 1989b

ROGERS, C.B. Pentacyclic triterpenoid rhamnosides from *Combretum imberbe* leaves. **Phytochemistry**. v.27, n.10, p.3217 – 3220, 1988

ROGERS, C.B.; COOMBES, P.H. Acidic triterpene glycosides in trichome secretions differentiate subspecies of *Combretum collinum* in South Africa. **Biochemical Systematics and Ecology**. v.27, p.321 – 323, 1999.

ROGERS, C.B.; THEVAN, I. Identification of mollic acid α -L-arabinoside, a 1 α -hydroxycycloartenoid from *Combretum molle* leaves. **Phytochemistry**. v.25, n.7, p.1759 – 1761, 1986

SCHMIDT, M.L.; KUZMANOV, K.L.; LING-INDECK, L.; PEZZUTO, J.M. Betulinic acid induces apoptosis in human neuroblastoma cell lines. **European Journal of Cancer**. v.33, n.12, p. 2007 – 2010, 1997.

SHARMA, S.; SINGH, T.; VIJAYVERGIA, R. Antimicrobial properties of β -amyrin (Terpenoid). **Journal of Pharmacy Research**. v.3, n.8, p.1979 – 1980, 2010.

SHIH, M.F.; CHENG, Y.D.; SHEN, C.R.; CHERNG, J.Y. A molecular pharmacology study into the anti-inflammatory actions of *Euphorbia hirta* L. on the LPS-induced RAW 264.7 cells through selective iNOS protein inhibition. **Journal of Natural Medicines**. v.64, p. 330 – 335, 2010.

SIMON, G.; DEWELLE, J.; NACOUUMA, O.; GUISSOU, P. ; KISS, R. ; DALOZE, D. ; BRAEKMAN, J.C. Cytotoxic pentacyclic triterpenes from *Combretum nigricans*. **Fitoterapia**. v.74, p.339 – 344, 2003.

SOUZA, A.D.L.; ROCHA, A.F.I.; PINHEIRO, M.L.B.; ANDRADE, C.H.S.; GALOTTA, A.L.A.Q.; SANTOS, M.P.S.S. Constituintes químicos de *Gustavia augusta* L. (LECYTHIDACEAE). **Química Nova**. v.24, n.4, p.439 – 442, 2001.

STACE, C.A.; SMITH, N.; MORI, S.A.; HENDERSON, A.; STEVENSON, D.W.; HEALD, S.V. **Flowering plants of the neotropics**. United Kingdom, The New York Botanical Garden, Princeton University Press. P.110 – 111, 2004.

TAN, F.; SHI, S.; ZHONG, Y.; GONG, X.; WANG, Y. Phylogenetic relationship of Combretoidae (Combretaceae) inferred from plastid, nuclear gene and spacer sequences. **Journal of Plant Research**. V.115, p.475 – 481, 2002.

THEO, A.; MASEBE, T.; SUZUKI, Y.; KIKUCHI, H.; WADA, S.; OBI, C.L.; BESSONG, P.O.; USUZAWA, M.; OSHIMA, Y.; HATTORI, T. *Peltophorum africanum*, a traditional south african medicinal plant, contains an anti HIV-1 constituent, betulinic acid. **Tohoku Journal of Experimental Medicine**. v. 217, p.93 – 99, 2009.

TOMAZ, A. C. A.; NOGUEIRA, R. B. S. S.; PINTO, D. S.; AGRA, M. F.; SOUZA, M. F. V.; CUNHA, E. V. L. Chemical constituents from *Richardia grandiflora* (Cham & Schlttdl) Steud. (Rubiaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**. v.18, n.1, p.47 – 52, 2008.

VILLASEÑOR, I.M.; LEMON, P.; PALILEO, A. ; BREMMER, J.B. Antigenotoxic spinasterol from *Cucurbita maxima* flowers. **Environmental Mutagenesis**. v.360, p.89 – 93, 1996.

VITOR, C.E.; FIGUEIREDO, C.P.; HARA, D.B.; BENTO, A.F.; MAZZUCO, T.L.; CALIXTO, J.B. Therapeutic action and underlying mechanisms of a combination of two pentacyclic triterpenes, α - and β -amyrin, in a mouse model of colitis. **British Journal Of Pharmacology**. v.157, p. 1034 – 1044, 2009.

WU, Q. C. ; TANG, Y. P. ; DING, A. W.; YOU, F. Q.; DUAN, J. A. Diterpenes and triterpenes from the roots of *Euphorbia fischeriana*. **Chinese Journal of Natural Medicines**. v.8, n.2, p. 101 – 103, 2010.

WU, Q.; HE, J.; FANG, J.; HONG, M. Antitumor effect of betulinic acid on human acute leukemia K562 cells in vitro. **Journal of Huazhong University of Science and Technology**. v.30, n.4, p.453 – 457, 2010.

YAO, D.; LI, H.; GOU, Y.; ZHANG, H.; VLESSIDIS, A.G. ; ZHOU, H. ; EVMIRIDIS, N.P.; LIU, Z. Betulinic acid-mediated inhibitory effect on hepatitis B virus by suppression of manganese superoxide dismutase expression . **Federation Of European Biochemical Societies Journal**. v.276, p. 2599 – 2614, 2009.

YILI, A.; MUTALIPU; AISA, H.A.; ISAEV, M.I. Betulinic acid and sterols from *Astragalus altaicus*. **Chemistry of Natural Compounds**. v.45, n.4,p.592 – 594, 2009.

ZANON, R.B.; PEREIRA, D.F.; BOSCHETTI, T.K.; SANTOS, M.; ATHAYDE, M.L. Fitoconstituintes isolados da fração em diclorometano das folhas de *Vernonia tweediana* Baker. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. v.18, n.2, p.226 – 229, 2008.