

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E TECNOLOGIA
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA

Programa de Pós Graduação em Química

**Estudo Fitoquímico de *Hancornia speciosa*
Gomes: Isolamento, Determinação
Estrutural e Atividade Biológica**

SÃO CRISTOVÃO - SERGIPE
SETEMBRO/ 2008

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

**Estudo Fitoquímico de *Hancornia speciosa*
Gomes: Isolamento, Determinação
Estrutural e Atividade Biológica**

TAÍS SANTOS SAMPAIO

Dissertação de Mestrado
apresentado ao Núcleo de
Pós-Graduação em Química
da Universidade Federal de
Sergipe como um dos
requisitos para obtenção do
título de Mestre em Química

Orientador: Prof. Dr. Paulo Cesar de Lima Nogueira

**São Cristóvão
2008**

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA CENTRAL
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE

S192e Sampaio, Taís Santos
Estudo fitoquímico de *Hancornia speciosa* Gomes: isolamento, determinação estrutural e atividade biológica / Taís Santos Sampaio. – São Cristóvão, 2008.
Vii, 146 f. ; il.

Dissertação (Mestrado em Química) – Departamento de Química, Núcleo de Pós-Graduação em Química, Centro de Ciências Exatas e Tecnologia, Universidade Federal de Sergipe, 2008.

Orientador: Prof. Dr. Paulo Cesar de Lima Nogueira.

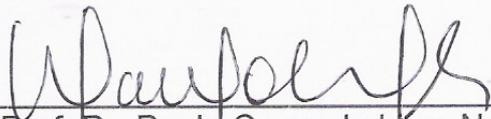
1. Química orgânica. 2. Produtos naturais. 3. Atividade biológica. 4. Compostos voláteis. 5. *Hancornia speciosa* Gomes, Apocynaceae – Fitoquímico – Reações químicas. 5. Triterpenos – Mangabeira. I. Título.

CDU 544.41:634.441

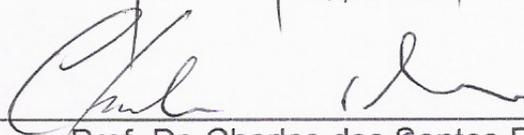
**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
NÚCLEO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

FOLHA DE APROVAÇÃO

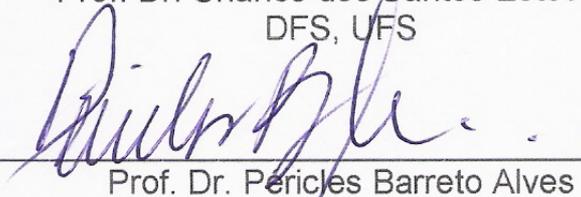
Membros da Comissão Julgadora de Dissertação de Mestrado de Taís Santos Sampaio apresentada ao Núcleo de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal de Sergipe, em 12/09/2008.



Prof. Dr. Paulo Cesar de Lima Nogueira
DQI, UFS



Prof. Dr. Charles dos Santos Estevam
DFS, UFS



Prof. Dr. Pericles Barreto Alves
DQI, UFS

É maravilhoso ter braços perfeitos quando há tantos mutilados!
Meus olhos perfeitos quando há tantos sem luz.
Minha voz que voltou a cantar, quando tantas emudeceram!
Minhas mãos que trabalham, quando tantas mendigam!
É maravilhoso voltar para casa quando tantos não têm para onde ir!
É maravilhoso amar, viver, sorrir, sonhar! Quando há tantos que
choram, odeiam, resolvem-se em pesadelos e morrem antes de nascer.
É maravilhoso ter um Deus para orar, quando há tantos que não têm
o consolo de uma crença.
É maravilhoso, sobretudo, ter tão pouco a pedir e tanto para oferecer
e agradecer.
Enfim, é maravilhoso estar viva para compartilhar esse momento com
vocês!

(Autor desconhecido)

Tudo é o olhar

Não sou uma pessoa de sucesso!

Estarei mentindo dizendo que

...consegui chegar lá. Que sou o máximo!

Tenho certeza que

...hoje é outro tempo.

Sinto dentro de mim que

...não sou capaz.

Não poderia dizer jamais que

...posso um grande potencial.

Sinto cada vez mais que

...sou um fracasso!

E jamais usarei a frase

...sou um bom profissional!

Sinto, mas tenho que dizer a verdade

É tarde demais

Clarice Lispector

*Ao Senhor Deus, o autor da minha Fé!
Por ter mim concedido o dom da vida. Por todo o seu amor
que é infinito e por tudo o que eu sou e serei.
Dedico este trabalho.*

AGRADECIMENTOS

Nenhuma obra é fruto do trabalho individual. Por isso sou reconhecida aos co-autores que dela participaram, pois sem o seu concurso este trabalho não se tornaria realidade. Desejo expressar meus agradecimentos.

A todos que oraram por mim e torceram pela minha recuperação, especialmente aos meus amigos (as): Ellen, Wódia, Flávio, Tati, Augusto, Raquel, Monalisa, Edson, Alexandre e Breno da igreja Assembléia de Deus.

A meus pais, Maria Zilda (“Mulher de Fé”) e Paulo Leite, pela vida, amor, carinho e constante força. Obrigado por terem acreditado em meus sonhos!

A meus irmãos (ães): Zilquênia, Érika Monique e Lucas Fernandes pelo carinho, união, compreensão e constante torcida.

A meus avós maternos Antônio Félix e Maria Luzinete e a meus avós paternos José Leite (*in memorian*) e Leonice (*in memorian*) com todo amor.

A minha bisavó Josefa, a senhora é um exemplo para nossas vidas.

Aos meus sobrinhos Victor Gabriel e Vinícius Miguel (***meus pequenos “anjos”***), meu cunhado Eduardo e a todos os meus tios e tias, principalmente a *Genival, Móises, Marise, Zenaide, Gilvanda, Geralda e José Antônio* pelo carinho amizade e constante torcida.

Aos meus primos e primas, principalmente a Jussara (“sarinha”) pelo carinho, amizade e constante torcida.

Um agradecimento especial a minha tia por consideração Aldeni, por todo apoio e amizade!

A toda a equipe técnica do Hospital João Alves Filho, principalmente ao Dr. Adriano Caldas (meu cirurgião torácico). Vocês foram um canal de cura para mim.

Ao Dr. José Albérico de Lira, chefe da Unidade de Terapia Intensiva- UTI, do Hospital João Alves Filho. E a toda a equipe de enfermeiros, técnicos e auxiliares de enfermagem que durante os meus intermináveis dias naquele hospital foram os meus “anjos da madrugada”. Obrigado por tudo!

Ao corpo de psicologia e psiquiatria do Hospital João Filho, por todo apoio profissional e pela amizade e a todos os fisioterapeutas que em conjunto colaboraram na minha reabilitação. Nunca esquecerei de vocês!

A Universidade Federal de Sergipe (UFS) através do Departamento de Química (DQI) pela oportunidade de realização deste trabalho.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes) pela concessão da bolsa de estudos.

A Prof. Dra. Valéria Regina de Souza Moraes (DQI/UFS) pela colaboração na elucidação das estruturas das substâncias isoladas e por toda a amizade

que é sem medida. A senhora é uma grande mulher, uma grande profissional e futuramente uma maravilhosa mamãe!

Ao prof. Dr. Paulo Cesar de Lima Nogueira pela acertada orientação, dedicação, apoio e amizade, além do seu carinho constante durante o decorrer deste trabalho. Obrigado por ter ficado ao meu lado durante todo a minha enfermidade e por ter segurado a minha mão quando eu mais precisei.

Ao corpo docente do Departamento de Química (UFS) pelos ensinamentos transmitidos e por todo apoio incondicional, principalmente aos professores (as): Samísia, Eliane, Ledjane, Haroldo, Eunice, Sandro, Iara, Eduardo, Nivan, Geraldo, Elizabete e Marcionilo, vocês são meus amados “mestres” e minha grande família!

Ao Departamento da Química da Universidade Federal de São Carlos, pela colaboração com o prof. Dr. Antônio Gilberto Ferreira (“giba”) e suas alunas Gláucia B. Alcântara e Katyuscya V. Leão, pela aquisição dos espectros de Ressonância magnética Nuclear.

A Profa. Dra. Anita Jocelyne Marsaioli (IQ-UNICAMP) pelas facilidades na obtenção dos espectros de Ressonância Magnética Nuclear.

Aos professores Dr. Glaucius Oliva e Dr. H. Thiemann, e ao técnico Eli F. Pimenta do Laboratório de Cristalografia de Proteínas e Biologia Estrutural do Instituto de Física de São Carlos (USP), pela realização dos ensaios bioquímicos frente às enzimas GAPDH e APRT.

Ao Prof. Dr. Humberto Reis Matos do Departamento de Fisiologia da Universidade Federal de Sergipe (UFS) pelos testes de atividade antioxidante.

Aos professores Dr. Luís Eduardo Almeida, Dra. Iara de Fátima Gimenez e a estagiária Aline dos Santos do Departamento de Química da Universidade Federal de Sergipe (DQI-UFS), pela colaboração na aquisição dos espectros de infravermelho.

Aos colegas de graduação e pós graduação, em especial a Kennedy, Jackeline (jack), Vanessa (nessa), Cristiane (cris), Moacir (moa) Pedro Henrique (PH), Tatiana (tati), Márcia, Marcelo (zohio) e Eumar pelo companheirismo, convívio agradável e amizade. Tanta falta vocês me fazem!

Ao Laboratório METABIO (***Laboratório de pesquisa na Busca de Metabólitos Secundários Bioativos***) pela oportunidade de execução deste trabalho.

A todos os alunos e professores que compõe o grupo Metabio, principalmente aos alunos (as): Emanuelle, Kelly, Patrícia, Fabíola, Larissa, Adriana, Rafael e Rodrigo.

A todos os amigos e funcionários da Universidade Federal de Sergipe, em especial aos técnicos de laboratório: Ismael, Ednalva (nalvinha), Jane e Elisa pela amizade e pelo apoio moral e técnico.

CURRICULUM VITAE

(2005-2008)

1. Dados Pessoais

Nome: Taís Santos Sampaio

Nome em citações bibliográficas: Sampaio, T. S

Naturalidade: Aracaju-SE

Data de Nascimento: 12/09/1981

2. Formação Acadêmica/Titulação:

Nível Superior

Curso: Química Licenciatura, Universidade Federal de Sergipe, UFS.

Ano de Conclusão: 2004

3. Área de Atuação

Química Orgânica, Química de Produtos Naturais.

4. Formação Complementar:

2005 - 2005 Curso de curta duração em Análise Térmica Teoria e Laboratório. Universidade Federal de Sergipe, UFS, São Cristóvão, Brasil

2005 - 2005 Curso de curta duração em Automação Em Química Analítica.

- Universidade Federal de Sergipe, UFS, São Cristóvão, Brasil
- 2005 - 2005** Curso de curta duração em Química Supramolecular Uma Visão Interdisciplinar. Universidade Federal de Sergipe, UFS, São Cristóvão, Brasil
- 2005 - 2005** Curso de curta duração em Bioeletroquímica. Universidade Federal de Sergipe, UFS, São Cristóvão, Brasil
- 2006 - 2006** Curso de curta duração em Vidros Propriedades e Aplicações. Universidade Federal de Sergipe, UFS, São Cristóvão, Brasil
- 2006 - 2006** Inglês Básico. Centro de Língua Inglesa, CLI, Brasil
- 2006 - 2006** Curso de curta duração em Métodos na Pesquisa de Infoquímicos relacionados a Insetos-Praga. Universidade Federal de Sergipe, UFS, São Cristóvão, Brasil
- 2006 - 2006** Extensão universitária em Estratégias Em Química Medicinal, Planejamento, Síntese e Avaliação Biológica. Universidade Federal de Sergipe, UFS, São Cristóvão, Brasil
- 2008 - 2008** Curso de curta duração em RMN: Princípios Básicos de elucidação Estrutural. Universidade Federal de Sergipe, UFS, São Cristóvão, Brasil

5. Estágio docente (Bolsa/CAPES): Professor de Química Orgânica. Carga horária: 60 horas/aula.

Ano de atuação: 2006

6. Professor Substituto de Química Geral e Orgânica: Nível de Graduação

Disciplinas ministradas: Química Orgânica I Química Orgânica II Química Orgânica Experimental I Química Orgânica Experimental II Química I

Tempo de atuação: 2006-2008

7. Produção Científica

7.1 Trabalhos em Eventos:

7.1.1 SAMPAIO, Taís Santos, MORAES, Valéria Regina de Souza, NOGUEIRA, Paulo Cesar de Lima. Triterpenos do látex dos frutos de *Hancornia speciosa* (Apocynaceae). **Livro de resumos da 28a Reunião da Sociedade Brasileira de Química**. 2005. v. 1, p. PN 122. Poços de Caldas-MG.

7.1.2 SAMPAIO, Taís Santos, SANTOS, Jeferson Machado, CARDOSO, Alisson de Melo, SIMÕES, Rodrigo Almeida, FREITAS, Florêncio Porto, ESTEVAM, Charles dos S, NOGUEIRA, Paulo Cesar de Lima, MATOS, Humberto Reis. Efeito antioxidante e antiinflamatória do látex do fruto da mangaba (*Hancornia speciosa*). **Livro de Resumos da 28a Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química**, 2005, v. 1, p. QB 016. Poços de Caldas- MG.

7.1.3 SAMPAIO, Taís Santos, RESENDE, Cristiane Xavier, COSTA, Elizabete Lustosa. A reciclagem do lixo no ensino de transformações da matéria- relato de uma vivência em Prática de Ensino de Química. **Livro de resumos da 28a Reunião da Sociedade Brasileira de Química**. 2005. v. 1, p. ED 020. Poços de Caldas- MG.

7.1.4 SAMPAIO, Taís Santos, MORAES, Valéria Regina de Souza, ALVES, Péricles Barreto, NOGUEIRA, Paulo Cesar de Lima. Éster 3-β- O- acil lupeol do látex dos frutos de *Hancornia speciosa* Gomes. **Livro de resumos 29a Reunião da Sociedade Brasileira de Química**. 2006. v. 1, PN 340. Águas de Lindóia-SP.

7.1.5 SAMPAIO, Taís Santos; SANTOS, Emanuelle de Almeida; FEITOSA, José Gerson Rezende; RIBEIRO, Artur de Oliveira; NOGUEIRA, Paulo Cesar de Lima. Constituintes Voláteis das Folhas de *Hancornia speciosa* (Apocynaceae). **Livro de resumos da 29a Reunião da Sociedade Brasileira de Química**. 2006. v. 1, p. PN 005. Águas de Lindóia-SP.

7.1.6 SAMPAIO, Taís Santos, ANDRADE, Larissa Mascarenhas, ANDRADE, Moacir dos Santos, ALCÂNTARA, Gláucia B, FERREIRA, Antonio Gilberto, NOGUEIRA, Paulo Cesar de Lima, MACHADO, Samísia Maria Fernandes, ALVES, Péricles Barreto, MORAES, Valéria Regina de Souza. 4-Propilcumarina das folhas de *Kielmeyera rugosa* Choisy (Clusiaceae). **Livro de resumos da 29a Reunião da Sociedade Brasileira de Química**. 2006. v.1, p. PN 218. Águas de Lindóia-SP.

7.2. Artigos completos publicados em periódicos:

7.2.1 SAMPAIO, Taís Santos; NOGUEIRA, Paulo Cesar de Lima. Volatile components of mangaba fruit (*Hancornia speciosa* Gomes) at three stages of maturity. **Food Chemistry**. v.95, n. 4, p. 606 - 610, 2006.

7.2.2 SAMPAIO, Taís Santos; ANDRADE, Moacir dos Santos; NOGUEIRA, Paulo Cesar de Lima; RIBEIRO, Adauto de Souza; BITTRICH, Volker; AMARAL, Maria Do Carmo E. Volatile compounds of the leaves, flowers and fruits of *Kielmeyera rugosa* Choisy (Clusiaceae). **Flavour and Fragrance Journal**, v.22, n.1, p. 49 - 52 2007.

7.2.3 NOGUEIRA, Paulo Cesar de Lima; SAMPAIO, Taís Santos; ANDRADE, Moacir dos Santos; RIBEIRO, Adauto de Souza; BITTRICH, Volker; AMARAL, Maria Do Carmo E. Volatile Compound from Leaves and Flowers of *Garcinia macrophylla* (Clusiaceae). **Chemistry of Natural Compounds**. v. 43, n.2, p. 221-224, 2007.

SUMÁRIO

páginas

LISTA DE FIGURAS.....	I
LISTA DE TABELAS.....	II
LISTA DE ESQUEMAS.....	III
LISTA DE FLUXOGRAMAS.....	IV
LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS.....	V
RESUMO.....	VI
ABSTRACT.....	VII
1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1 PRODUTOS NATURAIS.....	1
1.1.1 Importância.....	1
1.1.2 Brasil: Biodiversidade	2
1.2 FAMÍLIA APOCYNACEAE.....	4
1.2.1 Ocorrência e Distribuição.....	4
1.2.2 Propriedades farmacológicas de algumas espécies da família Apocynaceae.....	4
1.3 <i>HANCORNIA SPECIOSA</i> GOMES (MANGABEIRA).....	6

1.3.1 Características Etnobotânicas.....	6
1.3.2 Propriedades Farmacológicas de <i>Hancornia speciosa</i> Gomes.....	9
1.3.3 Aspectos Nutricionais	9
1.3.4 Potencial Econômico.....	11
1.4 REVISÃO DA LITERATURA.....	12
2. Objetivo Geral.....	16
2.1 Objetivos específicos	16
PARTE I: ESTUDO DOS COMPONENTES VOLÁTEIS DAS FOLHAS E DOS FRUTOS DE <i>HANCORNIA SPECIOSA</i> GOMES	18
1. Óleo Essencial.....	18
2. Obtenção do Material Vegetal.....	19
3. Obtenção dos Compostos Voláteis.....	19
4. Análises dos Compostos Voláteis.....	20
5. Resultados e discussões	22
5.1 Análise dos compostos voláteis das folhas de <i>Hancornia speciosa</i> Gomes frescas como também variando-se o tempo de secagem à temperatura ambiente: 1,2, 5 e 10 dias	22
5.2 Análise dos componentes voláteis obtidos por hidrodestilação dos frutos de <i>Hancornia speciosa</i> Gomes nos três estádios de maturação: verde, "de vez" e maduro.....	26
PARTE II: ESTUDO FITOQUÍMICO DOS FRUTOS E DAS FOLHAS DE <i>HANCORNIA SPECIOSA</i> GOMES.....	34

1. IMPORTÂNCIA	34
1.1 Triterpenos: Biogênese	35
2. METODOLOGIA	39
2.1 MATERIAIS E MÉTODOS	39
2.1.1 Identificação Estrutural	39
2.1.2 Isolamento dos Metabólitos Secundários	40
3. MATERIAL VEGETAL	40
3.1 Coleta do material Vegetal	40
3.2 Partição Líquido-Líquido	41
4. OBTENÇÃO DOS EXTRATOS E ISOLAMENTO DAS SUBSTÂNCIAS .	42
4.1 Obtenção e purificação do extrato clorofórmio do látex dos frutos	42
4.2 Purificação da fração 19A proveniente da CC do ECLFr	43
4.3 Reação de transesterificação e identificação por CG-EM dos ésteres 3- β -O-acil lupeol (F1A)	44
4.4 Reação de transesterificação e identificação por CG-EM do éster diidroxilado 3- β -O-acil lupeol (F12A)	46
4.5 Obtenção e Purificação do extrato metanólico dos frutos verdes e sem látex	47
4.6 Purificação em CC dos extratos PCFrV e PAEFrV utilizando-se a Sephadex LH-20®	48

4.7 Reação de Acetilação com anidrido acético-piridina do extrato metanólico dos frutos verdes e sem látex (EMFrV).....	50
4.8 Purificação do extrato metanólico acetilado dos frutos verdes e sem látex (EMAFrV).....	51
4.9 Obtenção e purificação do extrato metanólico dos frutos "de vez"	52
4.10 Obtenção e purificação do extrato metanólico dos frutos maduros e secos	55
4.11 Obtenção dos extratos hexânicos e metanólicos das folhas e dos ramos de <i>Hancornia speciosa</i> Gomes	58
4.12 Purificação do extrato hexânico das folhas (EHF)	59
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	60
5.1 Substâncias obtidas de <i>Hancornia speciosa</i> Gomes	60
5.2 Identificação Estrutural das substâncias 1, 2, 3, 4, 5, 6 e 7	62
5.3 Identificação Estrutural das substâncias 8,9 e 10.....	76
5.4 Identificação Estrutural da substância 11.....	87
5.5 Identificação da porção acila do éster diidroxilado do Lupeol da substância 11 por CG-EM	88
5.6 Identificação Estrutural da substância 12	96
PARTE III: TESTES BIOLÓGICOS.....	102
1.1 Importância	102
2. BIOENSAIO DE LETALIDADE COM ARTEMIA SALINA ("BRINE SHRIMP LETALITY TEST").....	103

2.1 Importância	103
2.2 Experimental.....	103
3. DOENÇA DE CHAGAS	104
3.1 A enzima alvo Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH).....	108
3.2 Ensaio bioquímico frente à enzima GAPDH de <i>Trypanosoma cruzi</i>	109
3.3 Atividade inibitória da enzima GAPDH de <i>Trypanosoma cruzi</i>	110
4. AS LEISHMANIOSES	111
4.1 Distribuição Geográfica.....	112
5. TIPOS DE LEISHMANIOSES	113
5.1 Leishmaniose Visceral.....	113
5.2 Leishmaniose muco-cutânea.....	114
5.3 Leishmaniose cutânea.....	115
5.4 Leishmaniose difusa	115
6. As enzimas alvo adenina-fosforribosil-transferase (APRT), hipoxantina-guanina-fosforribosil-transferase (HGPRT) e xantina-fosforribosil-transferase (XPRT).....	116
7. A enzima APRT (adenina-fosforribosil-transferase).....	118
8. Ensaio bioquímico frente à enzima APRT de <i>Leishmania tarentolae</i>	119
8.1 Atividade inibitória de APRT de <i>Leishmania tarentolae</i>	119

9. TESTE DE ATIVIDADE ANTIOXIDANTE	120
9.1 Importância	120
9.2 Determinações da lipoperoxidação através das substâncias reativas com o ácido tiobarbitúrico (TBARS)	121
9.3 Dosagem de proteínas (método de Bradford)	121
10. RESULTADOS E DISCUSSÕES	123
10.1 Bioensaio de Letalidade com <i>Artemia salina</i> ("Brine Shrimp Letality Test")	123
10.2 Ensaio Bioquímico frente às enzimas GAPDH de <i>T. cruzi</i> e APRT de <i>L. tarentolae</i>	125
10.3 Testes bioquímicos para avaliação da Atividade Antioxidante do Látex dos Frutos Verdes (ECLFr)	128
PARTE IV: CONSIDERAÇÕES FINAIS	131
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	133
ANEXO A	146

LISTA DE FIGURAS

páginas

Figura 1: Diferentes fontes de agentes terapêuticos.....	1
Figura 2: Estado de Sergipe.....	3
Figura 3: Foto do espécime estudado e detalhes de sua inflorescência.....	8
Figura 4: Frutos e Sementes de <i>Hancornia speciosa</i> Gomes.....	9
Figura 5: Principais compostos isolados em <i>Parahancornia amapa</i>	14
Figura 6: Compostos isolados em <i>Alstonia boonei</i>	15
Figura 7: Aparelhagem do tipo Clevenger.....	20
Figura 8: Principais compostos identificados na análise do óleo essencial das folhas de <i>Hancornia speciosa</i> Gomes variando-se o tempo de secagem à temperatura ambiente.....	23
Figura 9: Gráfico mostrando a variação da porcentagem relativa do Geraniol e do (<i>E</i>)-3-hexenol em relação ao tempo de secagem à temperatura ambiente das folhas de <i>Hancornia speciosa</i> Gomes.....	23
Figura 10: Cromatograma de íons totais (TIC) obtido por CG-EM (coluna DB-5 30m) dos voláteis das folhas de <i>Hancornia speciosa</i> Gomes variando-se o tempo de secagem à temperatura ambiente.....	24

Figura 11: Cromatograma de íons totais (TIC) obtido por CG-EM (coluna DB-5 30m) dos voláteis dos frutos de <i>Hancornia speciosa</i> Gomes nos 3 estádios de maturação: verde, “de vez” e maduro. O número sobre os picos corresponde aos números dos compostos na Tabela 5	27
Figura 12: Principais compostos identificados na análise do óleo essencial dos frutos verdes de <i>Hancornia speciosa</i> Gomes.....	28
Figura 13: Principais compostos identificados na análise do óleo essencial dos frutos “de vez” de <i>Hancornia speciosa</i> Gomes	28
Figura 14: Principais compostos identificados na análise do óleo essencial dos frutos maduros de <i>Hancornia speciosa</i> Gomes	29
Figura 15: Esqueletos triterpênicos frequentemente encontrados na natureza.....	38
Figura 16: Reação de metanólise ácida dos ésteres 3-β-O acil lupeol (F1A)	45
Figura 17: Reação de metanólise ácida do éster diidroxilado 3-β-O-acil lupeol	46
Figura 18: Estrutura parcial da Sephadex LH20	49
Figura 19: Espectro de absorção na região do infravermelho (IV) (pastilha de KBr) das substâncias 1, 2, 3, 4, 5, 6 e 7	71
Figura 20: Espectro de RMN ¹ H das substâncias 1, 2, 3, 4, 5, 6 e 7 (CDCl ₃ , 500 MHz)	72

Figura 21: Ampliação do espectro de RMN ^1H das substâncias 1, 2, 3, 4, 5, 6 e 7 (CDCl_3 , 500 MHz)	72
Figura 22: Ampliação do espectro de RMN ^1H das substâncias 1, 2, 3, 4, 5, 6 e 7 (CDCl_3 , 500 MHz)	73
Figura 23: Ampliação do espectro de RMN ^1H das substâncias 1, 2, 3, 4, 5, 6 e 7 (CDCl_3 , 500 MHz)	73
Figura 24: Espectro de RMN ^{13}C das substâncias 1, 2, 3, 4, 5, 6 e 7 (CDCl_3 ; 125,7 MHz)	74
Figura 25: Ampliação do espectro de RMN ^{13}C das substâncias 1, 2, 3, 4, 5, 6 e 7 (CDCl_3 ; 125,7 MHz)	74
Figura 26: Experimento <i>DEPT</i> 135° e 90° das substâncias 1, 2, 3, 4, 5, 6 e 7	75
Figura 27: Ampliação do experimento <i>DEPT</i> 135° e 90° das substâncias 1, 2, 3, 4, 5, 6 e	75
Figura 28: Mistura de ésteres 3- β -O-acil lupeol isolados do extrato clorofórmico do látex dos frutos verdes de <i>Hancornia speciosa</i> Gomes.....	64
Figura 29: Espectros de massas dos ésteres metílicos identificados por CG-EM	66
Figura 30: Cromatograma (CG-EM) dos ésteres metílicos obtidos após hidrólise da mistura de ésteres 3- β -O-acil do lupeol	66

Figura 31: Principais íons característicos utilizados na análise dos ésteres metílicos: m/z 74 e 87 e m/z 103	66
Figura 32: Ésteres 3- β -O-acil lupeol isolados do extrato clorofórmico do látex dos frutos verdes de <i>Hancornia speciosa</i> Gomes	68
Figura 33: Espectro de absorção na região do infravermelho (IV) (pastilha de KBr) das substâncias 8, 9 e 10	82
Figura 34: Espectro de RMN ^1H das substâncias 8, 9 e 10 (CDCl_3 , 500 MHz)	83
Figura 35: Ampliação do espectro de RMN ^1H das substâncias 8, 9 e 10 (CDCl_3 , 500 MHz)	83
Figura 36: Ampliação do espectro de RMN ^1H das substâncias 8, 9 e 10 (CDCl_3 , 500 MHz)	84
Figura 37: Ampliação do espectro de RMN ^1H das substâncias 8, 9 e 10 (CDCl_3 , 500 MHz)	84
Figura 38: Espectro de RMN ^{13}C das substâncias 8, 9 e 10 (CDCl_3 ; 125,7 MHz)	85
Figura 39: Ampliação do espectro de RMN ^{13}C das substâncias 8, 9 e 10 (CDCl_3 ; 125,7 MHz)	85
Figura 40: Ampliação do espectro de RMN ^{13}C das substâncias 8, 9 e 10 (CDCl_3 ; 125,7 MHz)	86
Figura 41: Experimento <i>DEPT</i> 135° e 90° das substâncias 8, 9 e 10	86

Figura 42: Mistura de triterpenos pentacíclicos isolados do látex dos frutos verdes de <i>Hancornia speciosa</i> Gomes	78
Figura 43: Espectro de absorção na região do infravermelho (IV) (pastilha de KBr) da substância 11.....	92
Figura 44: Espectro de RMN ¹ H da substância 11 (<i>CD</i> ₃ <i>COCD</i> ₃ , 300 MHz) 93	
Figura 45: Ampliação do espectro de RMN ¹ H da substância 11 (<i>CD</i> ₃ <i>COCD</i> ₃ , 300 MHz).....	93
Figura 46: Ampliação do espectro de RMN ¹ H da substância 11 (<i>CD</i> ₃ <i>COCD</i> ₃ , 300 MHz).....	94
Figura 47: Ampliação do espectro de RMN ¹ H da substância 11 (<i>CD</i> ₃ <i>COCD</i> ₃ , 300 MHz).....	94
Figura 48: Espectro de RMN ¹³ C da substância 11 (<i>CD</i> ₃ <i>COCD</i> ₃ , 75 MHz). 95	
Figura 49: Ampliação do espectro de RMN ¹³ C da substância 11 (<i>CD</i> ₃ <i>COCD</i> ₃ , 75 MHz).....	95
Figura 50: Éster diidroxilado 3-β-O-acil lupeol isolado do látex dos frutos verdes de <i>Hancornia speciosa</i> Gomes	88
Figura 51: Espectro de massas obtido por CG-EM do éster diidroxilado....	89
Figura 52: Mecanismo de formação da δ-lactona α,β-insaturada (11 a')	90
Figura 53: 3-β-O-3',5'-diidroxicosanoato de lupeolífla	90

Figura 54: Espectro de RMN ^1H da substância 12 (CDCl_3 , 400 MHz)	99
Figura 55: Ampliação do espectro de RMN ^1H da substância 12 (CDCl_3 , 400 MHz)	99
Figura 56: Ampliação do espectro de RMN ^1H da substância 12 (CDCl_3 , 400 MHz)	100
Figura 57: Espectro de RMN ^{13}C da substância 12 (CDCl_3 , 100 MHz)	100
Figura 58: Sacarose peracetilada (12).....	97
Figura 59: Distribuição geográfica de ocorrências da Doença de Chagas	105
Figura 60: Ilustração representando o ciclo da doença de Chagas	105
Figura 61: Inseto triatomine (<i>Triatoma infestans</i>), vista dorsal e posição de alimentação.....	107
Figura 62: Inseto triatominae (<i>Triatoma infestans</i>) após sugar sangue de um indivíduo	107
Figura 63: Estrutura dos fármacos benzonidazol e nifurtimox.....	107
Figura 64: Estrutura cristalina da enzima glicolítica GAPDH de <i>T. cruzi</i> , a qual é composta de 4 monômeros expressos nas cores verde, azul, amarelo ouro e vermelho. A estrutura natural apresenta moléculas de NAD em todos os monômeros	109
Figura 65: <i>Lutzomyia longipalpis</i>	111

Figura 66: Distribuição geográfica de ocorrências das Leishmanioses.....	112
Figura 67: Ciclo de transmissão da leishmaniose	114
Figura 68: Estruturas das Glucantime e Pentostam.....	117
Figura 69: Estrutura da Anfatericina B	117
Figura 70: Estrutura da Miltefosina	118
Figura 71: Estrutura cristalográfica da enzima glicolítica da APRT de <i>L. tarentolae</i>	118

LISTA DE TABELAS

páginas

Tabela 1: Algumas espécies de Apocynaceae e seus usos “populares”	5
Tabela 2: Composição química da mangaba em 100 g de polpa [17].....	10
Tabela 3: Rendimentos dos óleos essenciais obtidos das folhas de <i>Hancornia speciosa</i> Gomes.....	22
Tabela 4: Composição percentual relativa dos principais componentes encontrados nos óleos essenciais das folhas de <i>Hancornia speciosa</i> Gomes variando-se o tempo de secagem à temperatura ambiente: frescas, 1, 2, 5 e 10 dias (à 25°C)	25
Tabela 5: Composição percentual relativa dos voláteis dos frutos de <i>Hancornia speciosa</i> Gomes nos três estádios de maturação: verde, “de vez”, e maduro.....	29
Tabela 7: Identificação dos ésteres metílicos (F1A) a partir dos dados de CG-EM após hidrólise da mistura de ésteres 3-β-O- acil lupeol.....	67
Tabela 6: Dados de RMN ¹ H (CDCl ₃ , 500 MHz) e ¹³ C (CDCl ₃ , 125,7 MHz) das substâncias 1, 2, 3, 4, 5, 6 e 7 (F1A)	69
Tabela 8: Dados de RMN ¹ H (CDCl ₃ , 500 MHz) e ¹³ C (CDCl ₃ , 125,7 MHz) da substância 8 na mistura de triterpenos (F4A)	79

Tabela 9: Dados de RMN ^1H (CDCl_3 , 500 MHz) e ^{13}C (CDCl_3 , 125,7 MHz) da substância 9 na mistura de triterpenos (F4A)	80
Tabela 10: Dados de RMN ^1H (CDCl_3 , 500 MHz) e ^{13}C (CDCl_3 , 125,7 MHz) da substância 10 na mistura de triterpenos (F4A)	81
Tabela 11: Dados de RMN ^1H (CD_3COCD_3 , 300 MHz) e ^{13}C (CD_3COCD_3 , 75 MHz) da substância 11 (F12A)	90
Tabela 12: Dados de RMN ^1H (CDCl_3 , 400 MHz) e ^{13}C (CDCl_3 , 100 MHz) da substância 12.....	98
Tabela 13: Valores obtidos de larvas mortas (num total de 30) nos testes com extratos e frações obtidos de <i>Hancornia speciosa</i> Gomes	124
Tabela 14: Efeito dos extratos e frações na atividade de GAPDH de <i>Trypanosoma cruzi</i> (100 $\mu\text{g/mL}$)	127
Tabela 15: Efeito dos extratos e frações na atividade de APRT de <i>Leishmania tarentolae</i> (50 $\mu\text{g/mL}$)	128
Tabela 16: Efeito do pré-tratamento do látex dos frutos verdes de <i>Hancornia speciosa</i> nas concentrações de TBARS em fígado de ratos depois do tratamento com CCl_4 (24 h).....	129

LISTA DE ESQUEMAS

páginas

Esquema 1: Formação do esqualeno a partir da condensação de duas unidades de FPP 35

Esquema 2: Formação do Lupeol, β -amirina e da α -amirina através do cátion damarenilo.....37

LISTA DE FLUXOGRAMAS

páginas

Fluxograma 1: Procedimento para obtenção dos extratos particionados do frutos nos três estádios de maturação: verde e sem látex, “de vez” e maduro	41
Fluxograma 2: Preparação do extrato clorofórmio dos frutos verdes de <i>Hancornia speciosa</i> Gomes	43
Fluxograma 3: Processo de purificação da fração 19A da CC do ECLFr de <i>Hancornia speciosa</i> Gomes	44
Fluxograma 4: Preparação do extrato metanólico dos frutos verdes e sem látex (EMFrV) de <i>Hancornia speciosa</i> Gomes	48
Fluxograma 5: Purificação em CC dos extratos PCFrV e PAEFrV de <i>Hancornia speciosa</i> Gomes utilizando-se a Sephadex LH20®	50
Fluxograma 6: Reação de Acetilação com anidrido acético-piridina do extrato metanólico dos frutos verdes e sem látex (EMFrV) de <i>Hancornia speciosa</i> Gomes	51
Fluxograma 7: Purificação do extrato metanólico acetilado dos frutos verdes e sem látex (EMAFrV) de <i>Hancornia speciosa</i> Gomes	52
Fluxograma 8: Obtenção e purificação do extrato metanólico dos frutos “de vez” de <i>Hancornia speciosa</i> Gomes	54

Fluxograma 9: Obtenção e purificação do extrato metanólico dos frutos maduros e secos de <i>Hancornia speciosa</i> Gomes.....	57
Fluxograma 10: Obtenção dos extratos hexânicos e metanólicos das folhas e dos ramos de <i>Hancornia speciosa</i> Gomes	58
Fluxograma 11: Purificação do extrato hexânico das folhas (EHF) de <i>Hancornia speciosa</i> Gomes.....	60
Fluxograma 12: Procedimento para diluição da amostra no teste com <i>Artemia salina</i>	104

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

AMP	Adenosina 5'-monofosfato
APRT	Adenina fosforribosiltransferase
CC	Cromatografia em Coluna
CCDC	Cromatografia em Camada Delgada Comparativa
CCP	Cromatografia em Camada Preparativa
CDCl₃	Clorofórmio deuterado
(CD₃)₂CO	Acetona deuterada
CHCl₃	Clorofórmio
CG-EM	Cromatografia gasosa acoplada a espectrômetro de massas
<i>d</i>	dubleto
<i>dd</i>	duplo dubleto
δ	Deslocamento químico em partes por milhão

DEPT “Distortionless Enhancement by Polarization Transfer”

(Experimento de RMN ^{13}C utilizando transferência de polarização)

DMSO Dimetilsulfóxido

ECLFr Extrato clorofórmio do látex dos frutos de *Hancornia speciosa* Gomes

EDTA Ácido Etileno Diamino Tetra Acético

EM Espectro de massas

EMFrV Extrato metanólico dos frutos verdes de *Hancornia speciosa* Gomes

EMAFrV Extrato metanólico acetilado dos frutos verdes de *Hancornia speciosa* Gomes

EMFr_{DN} Extrato metanólico dos frutos “de vez” de *Hancornia speciosa* Gomes

EMFr_M Extrato metanólico dos frutos maduros de *Hancornia speciosa* Gomes

EMF Extrato metanólico das folhas de *Hancornia speciosa* Gomes

EMR	Extrato metanólico dos ramos de <i>Hancornia speciosa</i>
Gomes	
EHF	Extrato hexânico das folhas de <i>Hancornia speciosa</i>
Gomes	
EHR	Extrato hexânico dos ramos de <i>Hancornia speciosa</i>
Gomes	
eV	Eletron volts
GAPDH	Gliceraldeído-3-fosfato-desidrogenase
Hz	Hertz
HCl	ácido clorídrico
I_R	Índice de retenção
J	Constante de acoplamento
M⁺	Íon molecular
m/z	Razão massa/carga
m	multiplete
MeOH	Metanol

NaCl	cloreto de sódio
NAD	Dinucleótido de nicotinamida e adenina
NADH	Dinucleótido de nicotinamida e adenina na forma reduzida
PHFrV	Partição hexânica dos frutos verdes de <i>Hancornia speciosa</i> Gomes
PCFrV	Partição clorofórmio dos frutos verdes de <i>Hancornia speciosa</i> Gomes
PAEFrV	Partição acetato de etila dos frutos verdes de <i>Hancornia speciosa</i> Gomes
PHFr_{DV}	Partição hexânica dos frutos “de vez” de <i>Hancornia speciosa</i> Gomes
PCFr_{DV}	Partição Clorofórmio dos frutos “de vez” de <i>Hancornia speciosa</i> Gomes
PAEFr_{DV}	Partição Acetato de etila dos frutos “de vez” de <i>Hancornia speciosa</i> Gomes
PHFr_M	Partição hexano dos frutos maduros de <i>Hancornia speciosa</i> Gomes

PCFr_M	Partição clorofórmio dos frutos maduros de <i>Hancornia speciosa</i> Gomes
PAEFr_M	Partição acetato de etila dos frutos maduros
PSHFr_{D/V}	Partição solúvel em hexano dos frutos “de vez” de <i>Hancornia speciosa</i> Gomes
<i>p.f.</i>	Ponto de fusão
ppm	Partes por milhão
RMN ¹H	Ressonância Magnética Nuclear de hidrogênio
RMN ¹³C	Ressonância magnética Nuclear de carbono treze
s	Singleto
<i>s/</i>	Singleto largo
SDS	Dodecil sulfato de sódio
<i>t</i>	Tripleto
TBA	Ácido tiobarbitúrico
TBARS	Substâncias reativas com o ácido tiobarbitúrico
TCA	Ácido tricloroacético

<i>td</i>	Triplo dubleto
TMS	Tetrametilsilano
<i>t_R</i>	Tempo de Retenção
TIC	Cromatograma de Íons Totais

RESUMO

Neste trabalho apresentamos os resultados sobre o estudo fitoquímico da mangabeira, *Hancornia speciosa* Gomes (Apocynaceae). Na primeira parte do trabalho foi investigada a composição química dos voláteis das folhas e dos frutos variando-se o tempo de secagem e o estágio de maturação, respectivamente. As análises através de CG-EM dos óleos essenciais das folhas nos permitiu observar que há mudanças significativas na percentagem relativa dos constituintes majoritários quando se varia o tempo de secagem. Desta forma, foi possível verificar um decréscimo nas percentagens dos álcoois como (*E*)-3-hexenol (68,6% nas folhas frescas; 13,3% após 10 dias de secagem); enquanto houve um aumento significativo no percentual dos monoterpenos oxigenados como geraniol (2,4% nas folhas frescas; 54,7% após 10 dias de secagem). Já nas análises da composição química dos voláteis dos frutos nos três estádios de maturação (*verde*, “*de vez*” e *maduro*), foi possível verificar uma clara diferenciação na proporção dos componentes principais, de acordo com o estágio de maturação. Assim, o aroma dos frutos verdes possui um teor maior de monoterpenos oxigenados como o óxido de *cis*-linalool, óxido de *trans*-linalool e linalool, enquanto a proporção de ésteres, álcoois, aldeídos e cetonas são menores. Por outro lado, na composição química dos voláteis dos frutos maduros, observamos um predomínio de ésteres, álcoois, aldeídos e cetonas, enquanto a proporção de monoterpenos oxigenados foi bastante reduzida. Já na composição dos voláteis dos frutos “*de vez*”, verificamos proporções intermediárias tanto dos ésteres, álcoois, aldeídos e cetonas quanto dos monoterpenos oxigenados como o óxido de *cis*-linalool, óxido de *trans*-linalool e linalool. Na segunda parte do trabalho, o estudo fitoquímico do látex dos frutos de *H. speciosa* nos permitiu o isolamento e identificação de 12 substâncias: 3- β -O-hexadecanoato de lupeóila, 3- β -O-3'-hidroxihexadecanoato de lupeóila, 3- β -O-9-octadecenoato de lupeóila, 3- β -O-octadecanoato de lupeóila, 3- β -O-3'-hidroxioctadecanoato de lupeóila, 3- β -O-3'-hidroxiicosanoato de lupeóila, 3- β -O-3'-hidroxidocosanoato de lupeóila, 3- β -O-3',5'-diidroxiiicosanoato de lupeóila, α -amina, β -amirina, lupeol e a sacarose na sua forma peracetilada. A determinação estrutural das substâncias foi baseada na análise dos dados espectrais de EM, IV e RMN (^1H , ^{13}C e DEPT). Por fim, na terceira parte do trabalho, foram realizados ensaios para verificação de atividade biológica com os extratos e frações isoladas das várias partes da planta estudada.

Palavras-chaves: Apocynaceae; *Hancornia speciosa*; compostos voláteis, triterpenos, atividade biológica.

ABSTRACT

This work deals with the phytochemical study of mangaba, *Hancornia speciosa* Gomes (Apocynaceae). The first chapter deals with the role of volatile compounds from leaves and fruits. The effect of drying time on the chemical compositions of volatile oils from leaves was investigated. Thus, it was possible to verify that there is a decrease in the abundance of alcohols such as (*E*)-3-hexenol (68.6% fresh leaves; 13.3% after 10 days of drying), while the percentage of oxygen-containing monoterpenes such as geraniol (2.4% fresh leaves; 54.7% after 10 days of drying) is increased. On the other hand, the effect of the stage of maturity on the volatile components of mangaba fruit was investigated at three different stages. The volatile analyses showed an obvious difference, both in qualitative and relative abundance, of major components, according to stage of maturity. Thus, it became apparent that fruits at the initial stage (immature) present oxygen-containing monoterpenes, such as (*Z*)-linalool oxide, (*E*)-linalool oxide and linalool in a higher relative percentage, while esters, alcohols, aldehydes and ketones were detected at low percentages. Nonetheless, esters, alcohols, aldehydes and ketones predominated in the fruits at the final stage (mature) while the percentage of oxygen-containing monoterpenes was very much reduced. Finally, the volatile profile of the fruits at the intermediate stage showed esters, alcohols, aldehydes and ketones like those found in mature fruits, but at an intermediate percentage. In the same way, there was an intermediate percentage of oxygen-containing monoterpenes as was also observed in higher amounts in immature fruits. The second chapter deals with isolation and structure elucidation of twelve compounds from the latex of fruits of *H. speciosa*: 3- β -O-hexadecanoyl lupeol, 3- β -O-(3'-hydroxyhexadecanoyl) lupeol, 3- β -O-(9-octadecenoyl) lupeol, 3- β -O-octadecanoyl lupeol, 3- β -O-(3'-hydroxyoctadecanoyl) lupeol, 3- β -O-(3'-hydroxyeicosanoyl) lupeol, 3- β -O-(3'-hydroxydocosanoyl) lupeol, 3- β -O-(3',5'-dihydroxyeicosanoyl) lupeol, α -amyrin, β -amyrin, lupeol and sucrose octaacetate. For structure elucidation of these natural compounds IR, EM and NMR techniques (^1H , ^{13}C , DEPT) were used. Finally, in the last chapter the extracts and some fractions of *H. speciosa* were screened for their biological activities in vitro.

Key words: Apocynaceae; *Hancornia speciosa*; volatile compounds, triterpenes, biological activity.

1. INTRODUÇÃO

1.1 PRODUTOS NATURAIS

1.1.1 Importância

A utilização de plantas com fins medicinais para tratamento, cura e prevenção de doenças é uma das mais antigas formas de prática medicinal da humanidade, representando, durante séculos, a única fonte de agentes terapêuticos para o homem ^[1].

No início do século XIX, com o desenvolvimento da química farmacêutica, as plantas passaram a representar a primeira fonte de substâncias para o desenvolvimento de medicamentos. Atualmente, apesar do grande desenvolvimento da síntese orgânica e de novos processos biotecnológicos, 25% dos medicamentos prescritos nos países industrializados são originários de plantas e 120 compostos de origem natural, obtidos a partir de cerca de 90 espécies de plantas estão em uso corrente. Portanto, o reino vegetal é responsável pela maior parcela da diversidade química conhecida e registrada na literatura segundo HOSTETTMANN *et al.*, 2003 (**Figura 1**).

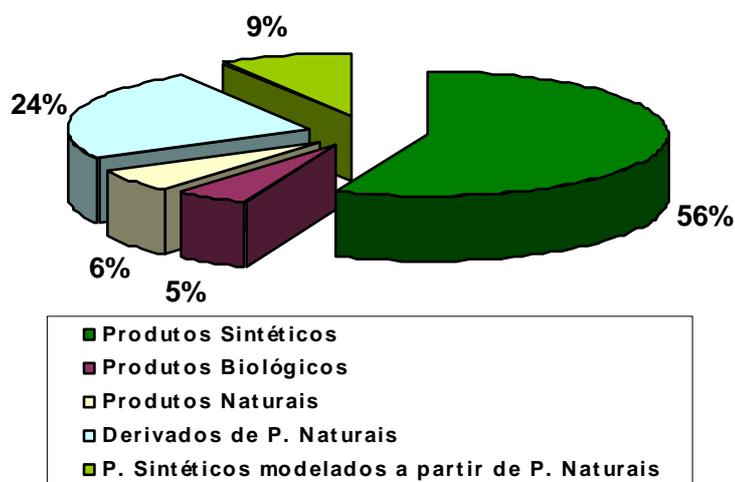


Figura 1: Diferentes fontes de agentes terapêuticos ^[2]

No início da década de 1990, a Organização Mundial de Saúde (**OMS**) divulgou que 65-80% da população dos países em desenvolvimento dependiam das plantas medicinais, como única forma de acesso aos cuidados básicos de saúde. Sendo assim, os produtos naturais vêm recuperando espaço e importância na indústria farmacêutica como fonte inspiradora de novas moléculas biotivas ^[3].

Alguns fatores que contribuíram para esse interesse foram: a falta de acesso de uma parcela significativa da população mundial aos tratamentos farmacológicos convencionais, o uso da medicina popular e a consciência ecológica, além do uso incorreto de drogas sintéticas e seus efeitos colaterais.

1.1.2 Brasil: Biodiversidade

O Brasil é considerado o país com maior biodiversidade no planeta, com ca. 55.000 espécies nativas distribuídas nos seis biomas (22% de todas as angiospermas do planeta). O estado de Sergipe (**Figura 2**) é caracterizado não só por vegetação típica de caatinga, mas também por remanescentes de mata atlântica (incluindo os mangues e as restingas), com muitos elementos do cerrado do Brasil Central e vegetação de campos rupestres ainda pouco explicada. Nestes ambientes, encontram-se plantas de reconhecida atividade biológica pela população local, bem como espécies de ocorrência endêmica, algumas ainda desconhecidas pela ciência, tanto do ponto de vista botânico, químico, farmacológico e econômico ^[4].



Figura 2: Estado de Sergipe

Esses aspectos, aliado à degradação dos ecossistemas, estimulam pesquisas em produtos naturais e tornam urgente o estabelecimento de programas para promover o levantamento desta riqueza nativa, na busca de contribuir, efetivamente, para o desenvolvimento auto-sustentável da região, oferecendo ao Estado uma alternativa de elevado potencial econômico.

Nos últimos anos, o número de alimentos que possuem benefícios potenciais para a saúde tem apresentado um acelerado crescimento em todo o mundo. Pesquisas recentes têm confirmado o que naturalistas acreditam há muito tempo: existem ingredientes específicos nos alimentos que apresentam importantes atividades biológicas no organismo, além do aspecto nutricional.

As frutas são largamente conhecidas pela sua importância alimentar. Elas são excelentes fontes de nutrientes, principalmente vitaminas e sais minerais. Além destes nutrientes, muitas frutas apresentam substâncias com ação medicinal, e seu uso como medicamento é um hábito utilizado pela humanidade há mais de 5.000 anos ^[5]. Algumas destas frutas já apresentam confirmação científica de seus efeitos terapêuticos, outras estão em fase de pesquisa e existem ainda, aquelas que, apesar de não haver comprovação

científica, nem estar em fase de pesquisa, através do conhecimento popular, são amplamente utilizadas pelas populações ^[5].

Um estudo sobre a composição química dos frutos e do látex de algumas espécies abundantes na região Nordeste, vem de encontro aos objetivos de conhecer o potencial deste recurso natural renovável para futuros programas de exploração auto-sustentável da diversidade biológica das plantas dos estados, uma vez que os resultados de pesquisas nesta área podem ter aplicação nas indústrias de alimentos, fármacos, perfumes e cosméticos.

1.2 FAMÍLIA APOCYNACEAE

1.2.1 Ocorrência e Distribuição

A família Apocynaceae (**Subfamília: Willughbeceae**) é constituída de ca. 415 gêneros e 4555 espécies, ocorrendo principalmente em climas tropicais e temperados. No Brasil ela esta representada em cerca de 41 gêneros e 376 espécies ^[6], onde as plantas pertencentes a esta família caracterizam-se principalmente pela produção de látex ^[6].

1.2.2 Propriedades farmacológicas de algumas espécies da família Apocynaceae

As plantas pertencentes à família Apocynaceae são conhecidas, principalmente pelo seu potencial medicamentoso ^[7], sendo caracterizada pela presença de alcalóides em várias espécies; e algumas delas com ampla utilização na medicina tradicional ^[8]. Alguns exemplos de espécies de Apocynaceae conhecidas e seus usos “populares” ^[9-14] são mostrados na **Tabela 1:**

Tabela 1: Algumas espécies de Apocynaceae e seus usos “populares”

Espécie	Atividade Farmacológica	Referência
<i>Adenium arabicum</i>	Dores nas articulações, Ferimentos e Infecções cutâneas	8
<i>Carissa edulis</i>	Antiescorbútica, Adstringente e Antitérmica	8
<i>Catharanthus roseus</i>	Digestiva, Hipotensiva, Laxante, Sedativa, Analgésica, Diabetes e Anticâncerígena	8
<i>Nerium oleander</i>	Infecções cutâneas	8
<i>Rhazya stricta decne</i>	Antibacteriana e Antitérmica	8
<i>Holarrhena pubescens</i>	Antibacteriana	8
<i>Kopsia griffithii</i>	Antileishamanicida	9
<i>Aspidosperma ramiflorum</i>	Antileishamanicida	10
<i>Alstonia sclolaris</i>	Anti-plasmódica	11
<i>Voacanga africana</i>	Antiulcerogênica	12
<i>Picralima nitida</i>	Antimicrobiana	13
<i>Himatanthus sucuuba</i>	Antiinflamatória e Analgésica	14

1.3 HANCORNIA SPECIOSA GOMES (MANGABEIRA)

1.3.1 Características Etnobotânicas ^[15-17]

A *Hancornia speciosa* Gomes (Apocynaceae) conhecida popularmente como “*mangabeira*” é uma planta perenifólia de clima tropical, ocorrendo, sobretudo, em áreas de vegetação aberta, com temperatura média ideal entre 24 e 26°C. Os solos nos quais se desenvolve são pobres e arenosos, predominantes na região do Cerrado e Tabuleiros Costeiros. Apresenta frutos aromáticos, saborosos e nutritivos, com ampla aceitação de mercado, tanto para o consumo *in natura*, quanto para a indústria. Apesar disso, pelo fato da cultura continuar sendo mantida no hábitat natural, sua exploração é feita de modo extrativista, sendo quase inexistentes as áreas onde se pratica o cultivo sob o uso de técnicas agrícolas. Sua distribuição ocorre nas regiões Centro-Oeste, Sudeste, Norte e Nordeste, onde o estado de Sergipe é um de seus maiores produtores nacionais ^[15].

Hancornia speciosa Gomes é classificada da seguinte forma:

Família: Apocynaceae

Subfamília: Willughbecae

Grupo: Eudicotiledoneas

Ordem: Gentianales

Gênero: *Hancornia*

Espécie: *speciosa*

A *Hancornia speciosa* Gomes é uma planta arbórea de porte médio, possuindo de 2 a 10 m de altura, podendo chegar a até 15 m, dotada de copa irregular, tronco tortuoso, bastante ramificado e áspero; ramos lisos e avermelhados, exsudando látex em toda a sua extensão ^[15, 16]. A casca da árvore é escura e fendilhada; suas folhas são opostas, simples, pecioladas, inteiras, oblongas, agudas, coriáceas, brilhantes e glabras; sua inflorescência possui de 1 a 7 flores perfumadas e de coloração branca (**Figura 3**). Seus frutos (**Figura 4**) do tipo baga são elipsóides ou arredondados, com 2,0 a 6,0 cm de comprimento, exocarpo amarelo, com

Estudo Fitoquímico de *Hancornia speciosa* Gomes

manchas avermelhadas, polpa carnosu-viscosa, ácida, bastante doce com aroma bastante agradável e cheios de suco leitoso quando verdes, contendo geralmente de 2 a 15 sementes discóides, com 7 a 8 mm de diâmetro, castanho claras, delgadas e rugosas^[15-17].



Figura 3: Foto do espécime estudado e detalhes de sua inflorescência



Figura 4: Frutos e Sementes de *Hancornia speciosa* Gomes

1.3.2 Propriedades Farmacológicas de *Hancornia speciosa* Gomes

Algumas partes da planta têm aplicação na medicina popular, como o suco leitoso do fruto e o látex que são usados como medicamento caseiro para tratamento de *tuberculose, úlcera, dermatose, verrugas, hematomas, inflamações diversas, diarreia e herpes*. O chá das folhas é usado para amenizar *cólicas menstruais* ^[16] e no combate a *gripe*. A casca da árvore possui propriedades *adstringentes*, cura *doenças internas* protege os *pulmões, fígado* e também serve para tratamentos de *perda de peso*; o decocto da raiz é usado no tratamento de *luxações e hipertensão*. A árvore é ainda, *melifera e ornamental* ^[17].

1.3.3 Aspectos Nutricionais ^[16,17]

A mangaba, o fruto de *Hancornia speciosa* Gomes (mangabeira), é constituído de polpa (77%), casca (11%) e semente (12%). No entanto, apenas a polpa assume posição de destaque no aspecto comercial, por apresentar um bom valor nutritivo, com teor protéico (0,7 g/100 g de polpa) superior ao da maioria das espécies frutíferas ^[16].

Estudo Fitoquímico de *Hancornia speciosa* Gomes

O fruto é rico em diversos elementos e, em sua composição, encontramos as vitaminas A, B₁, B₂ e C, além de ferro, fósforo e cálcio (**Tabela 2**). O elevado teor de ferro (28 mg/100 g de polpa) no fruto faz com que a mangaba seja uma das frutas mais ricas neste nutriente, além de ser uma fonte de ácido ascórbico (*vitamina C*). Daí a importância atribuída a ela na cura de algumas doenças e, em particular, contra a gripe^[17].

O valor energético, em cada 100 g de fruta, é de 43 calorias. Altos conteúdos de sólidos solúveis totais associados à elevada acidez, além do paladar exótico, conferem à mangaba um sabor muito apreciado pelos consumidores.

Tabela 2: Composição química da mangaba em 100 g de polpa^[17]

Metabólitos primários	Quantidade
Glicídios	10,50 g
Proteínas	0,700 g
Lipídios	0,300 g
Cálcio	41,00 mg
Fósforo	18,00 mg
Ferro	2,800 mg
Vitamina A	30,00 mg
Cálcio	41,00 mg
Fósforo	18,00 mg
Vitamina B ₁	40,00 mg
Vitamina B ₂	40,00 mg
Vitamina C	33,00 mg
Niacina	0,500 mg

1.3.4 Potencial Econômico

A mangabeira é uma planta tipicamente tropical, nativa do Brasil, que possui grande potencial para exploração econômica, apesar dos poucos estudos realizados^[18,19].

O potencial para o aproveitamento da mangaba é bastante variado, entretanto, apenas os frutos apresentam um valor comercial significativo. No Nordeste, é uma das mais requisitadas produtoras de matéria-prima para a indústria entre as frutas nativas dessa região, devido ao excelente aroma e sabor dos seus frutos, sendo utilizada, sobretudo, para a fabricação de sucos e polpas congeladas.

Além dessas formas de utilização, o fruto da mangabeira é consumido *in natura* e utilizado para a fabricação de doces, compotas, geléias, licores, xaropes, vinhos e vinagres. Por apresentar propriedades de agregação e retenção de sabor, a mangaba é particularmente usada na fabricação de sorvetes sendo esse processamento feito por pequenas empresas^[20] e também por uma grande empresa produtora de sorvetes da região Nordeste; constituindo desta forma, um potencial econômico para o estado de Sergipe.

Os frutos comercializados são, em sua grande maioria, provenientes de atividade extrativista, onde inúmeras famílias têm na colheita e comercialização da mangaba uma importante fonte de renda durante parte do ano. Esse fato vem se tornando bastante preocupante devido à crescente devastação da vegetação nativa, resultado principalmente de desmatamento e especulação imobiliária, que causa a diminuição da quantidade de plantas com o decorrer do tempo^[21].

O mercado para esta fruta encontra-se, principalmente, nas regiões Norte e Nordeste do Brasil. Em Sergipe, a mangaba é uma das frutas mais abundantes e procuradas nas feiras livres, atingindo preço superior ao da uva e de outras frutas nobres. Os frutos são delicados e de paladar saboroso, sendo consumidos diretamente ao natural e, atualmente, já ocorre a comercialização em supermercados, em bandejas de isopor revestidas com filme de PVC com capacidade para 500g^[22].

Uma das principais preocupações dos produtores de frutas da região Nordeste do Brasil é a agregação de valor às fruteiras regionais, que são

geralmente produzidas em regime extrativista. Todavia, atraem cada vez mais interesse e cujo potencial de mercado cresce a cada dia devido à busca de diversificação da oferta. Em virtude da necessidade de um maior conhecimento sobre a mangabeira, alguns estudos estão sendo iniciados por grupos de pesquisa buscando a qualidade e conservação pós-colheita de mangaba, objetivando complementar as pesquisas realizadas sobre técnicas de propagação e cultivo, de modo que, uma vez implantados os pomares, os produtores estejam prontos a colocar os frutos no mercado em condições competitivas de qualidade e vida útil ^[22].

Apesar dos vários estudos fitoquímicos existentes sobre Apocynaceae, poucos estão relacionados com a composição química dos frutos e do látex ^[16], sendo este trabalho o primeiro relato sobre o isolamento de metabólitos secundários em *Hancornia speciosa* Gomes.

Portanto, acreditamos que o conhecimento químico e bioquímico dos metabólitos presentes na mangabeira (**látex dos frutos, frutos, folhas e ramos**) e seu emprego como medicamento poderia ser uma alternativa para agregar valor ao produto e melhorar a renda dos produtores da região.

1.4 Revisão da literatura

Em nosso levantamento bibliográfico sobre *Hancornia speciosa* Gomes, encontramos apenas um estudo fitoquímico publicado por nós [23], que trata da análise dos componentes voláteis dos frutos de *Hancornia speciosa* Gomes através da hidrodestilação mostrando que os componentes principais variam de acordo com o estágio de maturação. Sobre esta espécie também são conhecidos os dados sobre a composição de metabólitos primários ^[24,25] e recentemente saiu um trabalho relatando a atividade antimicrobial de *Hancornia speciosa* Gomes ^[26].

Com relação à química do látex desta espécie, apenas foram encontrados trabalhos sobre seu aproveitamento como borracha ^[27-36]. Vários foram os trabalhos encontrados que tratavam do isolamento e identificação de metabólitos secundários de várias partes das plantas dos

outros gêneros desta família; destacando-se os estudos fitoquímicos sobre a *Parahancornia amapa* (Apocynaceae) [37,38].

A *Hancornia* é um gênero de uma única espécie, no entanto a *parahancornia* é a espécie quimiotaxonomicamente mais próxima dela. A *Parahancornia amapa* ocorre na região amazônica, especialmente no estado do Amapá, onde a árvore é conhecida como “amapa” ou “amapazeiro”, sendo suas cascas e látex utilizados na medicina popular como **tônico** e **anti-sífilis**. Sobrinho *et al.*, 1991 e Carvalho *et al.*, 2001 identificaram vários triterpenos a partir da casca, do látex e das raízes desta espécie, semelhantes aos que foram isolados em nosso trabalho, tais como: lupeol (**1**), ésteres 3- β -O-acil lupeol (**3**, **4**, **4A**, **5**, **5A**, **5B**), β -amirina (**6**), α -amirina (**8**), e seus derivados acetilados (**2**, **7**, **9**), β -sitosterol (**10**), estigmasterol (**11**) e β -sitosterona (**12**) [37, 38] (**Figura 5**).

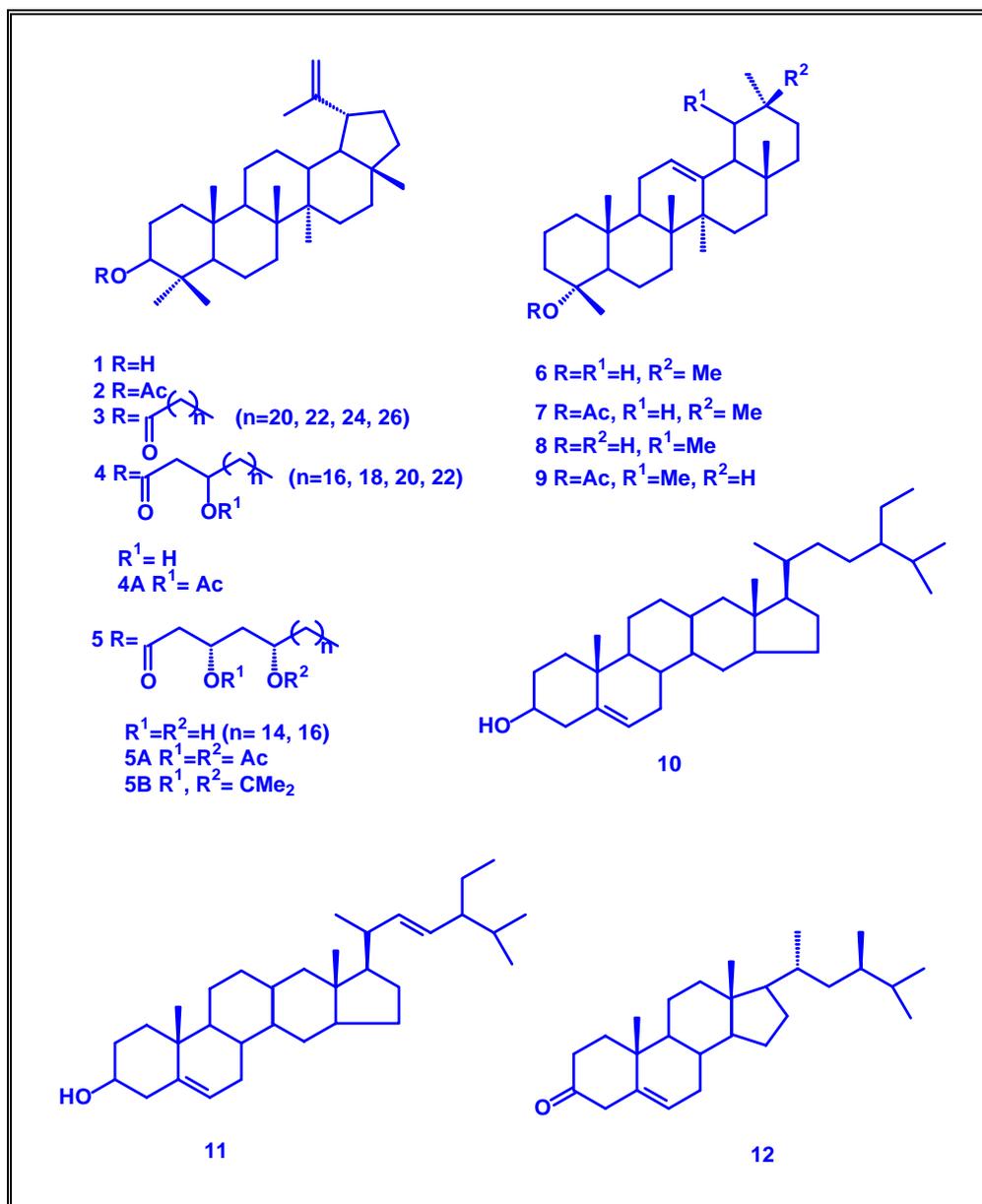


Figura 5: Principais compostos isolados em *Parahancornia amapa* [37, 38]

Os triterpenos pentacíclicos isolados em nosso trabalho são comumente encontrados em uma variedade de produtos naturais, porém apresentam um vasto espectro de atividades biológicas, destacando-se as atividades analgésicas e as antiinflamatórias [39,40].

O lupeol é um triterpeno comum em muitos frutos e plantas medicinais e que pode apresentar as mais variadas atividades biológicas como: **antiinflamatória**, **antitumoral**, **antimicrobial**, **gastroprotetora** e **antiplasmódica** [41-45].

As amirinas, por sua vez, apresentam atividade **antiturbeculose**, **antiinflamatória**, **antifúngica**, **analgésica**, **antimicrobial**, dentre muitas outras atividades [46-51]. É importante mencionar que a literatura descreve dentre as várias atividades biológicas apresentadas por triterpenóides, principalmente a atividade antiinflamatória associada a **α -amirina**, **β -amirina**, **lupeol e seus ésteres**, como no caso dos triterpenos previamente isolados das cascas do caule de *Alstonia boonei*, a citar: o lupeol (**13**), palmitato de 3-lupeloíla (**14**) e linoleato de 3-lupeloíla (**15**) (Apocynaceae), onde se comprovou a presença de atividade **antiartrítica** [52] (**Figura 6**).

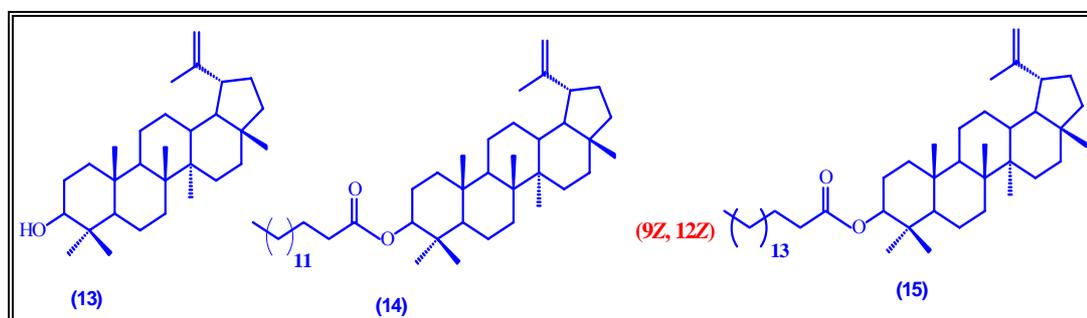


Figura 6: Compostos isolados em *Alstonia boonei* [52]

Em um outro trabalho, o lupeol (**13**) e o seu éster linoleato de lupeloíla (**15**) são citados, como sendo os responsáveis pelas atividades: **antiinflamatória**, **antinoceptiva**, **antipirética** e **ulcerogênica** [53] (**Figura 6**). No trabalho em questão tais compostos foram comparados com o fármaco indometacina (NSAID), usado no tratamento contra artrite, como controle, mostrando que os mesmos possuem efeito similar ao que é produzido por esta droga.

Em relação ao estudo do látex, foi encontrado um trabalho que trata do estudo químico e biológico do látex de *Himatanthus sucuba* (apocynaceae), de onde foram isolados alguns triterpenos: acetato de lupeloíla, α -amirina e cinnamatos do lupeol, sendo estes últimos os que apresentaram atividade antiinflamatória [16].

Também foi avaliado o potencial anti-ulcerogênico do extrato metanólico das cascas de *Voacanga africana* (apocynaceae) *in vivo* em vários tipos de úlceras induzidas [13]. O extrato metanólico testado ofereceu

significante citoproteção (40-63%) na mucosa estomacal (proteção gastroprotetora) dos ratos experimentados. Alguns outros trabalhos sobre *Hancornia speciosa* tratavam de estudos a respeito da germinação e propagação dessa planta ^[54-56].

2. OBJETIVO GERAL

- ✚ Gerar conhecimento químico e bioquímico dos metabólitos presentes na mangabeira (látex dos frutos verdes, frutos e folhas).

2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ✚ Estudo dos componentes voláteis das folhas e frutos de *Hancornia speciosa* Gomes;
- ✚ Estudo fitoquímico do látex dos frutos, dos frutos em diferentes estádios de maturação, das folhas e ramos de *Hancornia speciosa* Gomes;
- ✚ Investigação da atividade biológica dos extratos, das frações e das substâncias isoladas de *Hancornia speciosa* Gomes;

Parte I: Estudo dos Componentes Voláteis das Folhas e dos Frutos de *Hancornia speciosa* Gomes.

Parte I: Estudo dos Componentes Voláteis das Folhas e dos Frutos de *Hancornia speciosa* Gomes

1. ÓLEO ESSENCIAL

Óleos essenciais de plantas são constituídos por moléculas orgânicas voláteis de aproximadamente 300 daltons e, em geral, compreendem misturas de várias classes de produtos naturais, principalmente terpenóides (especificamente monoterpenos-C₁₀ e sesquiterpenos-C₁₅, embora diterpenos-C₂₀ possam também estar presentes). De acordo com a família a qual pertencem, as diversas espécies de plantas acumulam esses elementos voláteis em órgãos anatômicos específicos, os quais estão associados a várias funções necessárias á sobrevivência do vegetal em seu ecossistema, exercendo um papel fundamental na defesa contra microrganismos e predadores, e também na atração de insetos e outros agentes polinizadores ^[57].

As investigações das propriedades antimicrobianas, seu modo de ação e potencial uso dos óleos voláteis de plantas tiveram o ímpeto recentemente recuperado. Os estudos da avaliação da atividade biológica dos óleos essenciais de algumas espécies de plantas revelaram que algumas delas exibem atividades interessantes tais como inseticida, antibacteriana, antifúngica, antituberculose, espasmolítica e antiplasmódica. Sem dúvida que os óleos essenciais encontram sua maior aplicação como agentes antimicrobianos, e os estudos nesta área mostram, claramente, seu potencial em procedimentos médicos e aplicações nas indústrias de cosmético, alimentação e farmacêutica ^[57].

Numa analogia ao papel dos terpenóides nas plantas, as pesquisas de óleos essenciais como agentes repelentes de insetos vem revelando o potencial destes compostos nesta área. Além disso, são relativamente poucos os dados publicados para outros tipos de testes, sendo que alguns estudos têm se concentrado exclusivamente em um óleo.

Neste trabalho, estudamos a composição química dos compostos voláteis das folhas e dos frutos de *Hancornia speciosa* Gomes (**a mangabeira**).

2. Obtenção do Material Vegetal

As folhas de *Hancornia speciosa* Gomes estudadas foram coletadas às 11 horas da manhã no mês de novembro de 2005 em pomares na região de Abais - Município de Estância- SE como também de um espécime no Conjunto Augusto Franco, Aracaju-SE.

Os frutos de *Hancornia speciosa* Gomes foram coletados às 10 horas da manhã entre os meses de março e abril de 2003 em pomares na região de Abais - Município de Estância- SE, como também adquiridos no mercado municipal de Aracaju-SE.

3. Obtenção dos Compostos Voláteis

Os compostos voláteis das folhas de *Hancornia speciosa* Gomes (**214,1 g**) foram obtidos tanto com as folhas frescas como também variando-se o tempo de secagem à temperatura ambiente: **1, 2, 5 e 10** dias. Os compostos voláteis dos frutos de *Hancornia speciosa* Gomes (**500 g**) foram obtidos em seus três estádios de maturação: verdes, “de vez” e maduros.

O método de extração utilizado foi a técnica de hidrodestilação, utilizando aparelhagem do tipo Clevenger (**Figura 7**). Nesta técnica, o frasco contendo o material (folhas ou frutos) triturado foi inicialmente preenchido com água (**1L**) e depois aquecido até a temperatura de ebulição da mesma por cerca de 3 horas. Desta forma, que os compostos voláteis arrastados pelo vapor foram posteriormente condensados com a água, e os compostos voláteis foram extraídos da água com diclorometano (CH_2Cl_2).

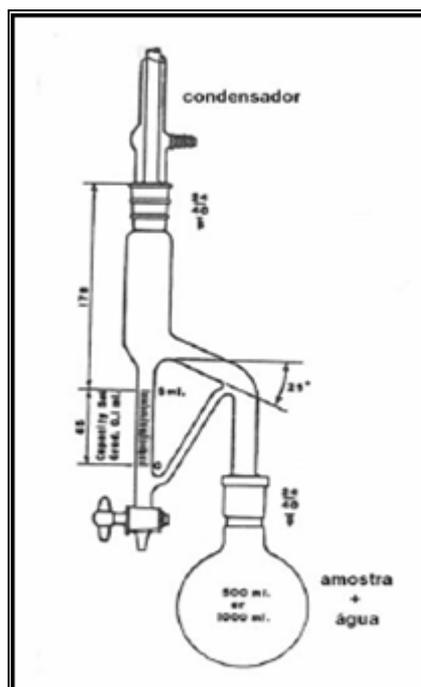


Figura 7: Aparelhagem do tipo Clevenger

A fase orgânica foi seca com Na_2SO_4 anidro e o solvente foi concentrado em fluxo de N_2 e mantido sob refrigeração até análise por CG-EM.

4. Análises dos Compostos Voláteis

As análises dos compostos voláteis foram realizadas através de CG-EM empregando-se um Cromatógrafo Shimadzu modelo QP5050A, equipado com uma coluna capilar de sílica fundida J&W Scientific DB-5 (30 m de comprimento x 0,25 mm de diâmetro interno x 0,25 mm de espessura do filme). Hélio foi usado como gás de arraste ($1,2 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$). O volume injetado das amostras, adequadamente diluídas foi $1,5 \mu\text{L}$ e as condições empregadas foram: 40°C , $4^\circ \text{C}\cdot\text{min}^{-1}$, 220°C para a análise dos compostos voláteis das folhas e 40°C por 2 min, aumentando até 220°C a $4^\circ\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$, então aquecida até 280°C a $20^\circ\text{C}/\text{min}$ para a análise dos compostos voláteis dos frutos. As temperaturas do injetor e detector foram 250°C e 280°C ,

respectivamente. O espectrômetro de massas operou com velocidade de 0,84 scans.seg⁻¹ na faixa de m/z 40-550.

Os índices de retenção foram obtidos co-injetando a amostra do óleo com uma mistura de C₁₀-C₂₄ de hidrocarboneto linear; índice de retenção de 700 à 999 foram obtidos por extrapolação. A percentagem de cada componente foi determinada pela área do componente dividida pela área total de todos os componentes presentes na mistura.

A identificação dos compostos foi feita com base nos índices de retenção ^[58] e na comparação computadorizada dos espectros de massas adquiridos com aqueles armazenados no banco de dados de espectros de massas do sistema CG-EM (NIST107 e NIST21) e com outros espectros de massas da literatura ^[59].

$$IR = 100i \times \frac{Tr_{\chi} - Tr_{HA}}{Tr_{HP} - Tr_{HA}} + 100N$$

onde:

Tr_{χ} = Tempo de retenção do composto problema

Tr_{HA} = Tempo de retenção do Hidrocarboneto anterior

Tr_{HP} = Tempo de retenção do hidrocarboneto posterior

N = Número de carbonos do hidrocarboneto posterior

i = Diferença entre o número de carbono dos hidrocarbonetos anterior e posterior

5. RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1 Análise dos compostos voláteis das folhas de *Hancornia speciosa* Gomes frescas como também variando-se o tempo de secagem à temperatura ambiente: 1, 2, 5 e 10 dias

A análise dos compostos voláteis das folhas variando-se o tempo de secagem à temperatura ambiente nos permitiu verificar que há variações tanto no rendimento quanto na composição química dos componentes (Tabelas 3 e 4) (Figuras 8 e 9). Desta forma, foi possível verificar um decréscimo nas percentagens dos álcoois como (*E*)-3-hexenol (68,6% nas folhas frescas para 13,3% após 10 dias de secagem); enquanto houve um aumento significativo no percentual dos monoterpenos oxigenados como geraniol (2,4% nas folhas frescas para 54,7% após 10 dias de secagem à temperatura ambiente) (Figura 10).

Tabela 3: Rendimentos dos óleos essenciais obtidos das folhas de *Hancornia speciosa* Gomes

Folhas	Rendimento médio (%)
Frescas	0,1413
1 ^a dia de secagem	0,2913
2 ^a dia de secagem	0,3440
5 ^a dia de secagem	0,7811
10 ^a dia de secagem	0,6205

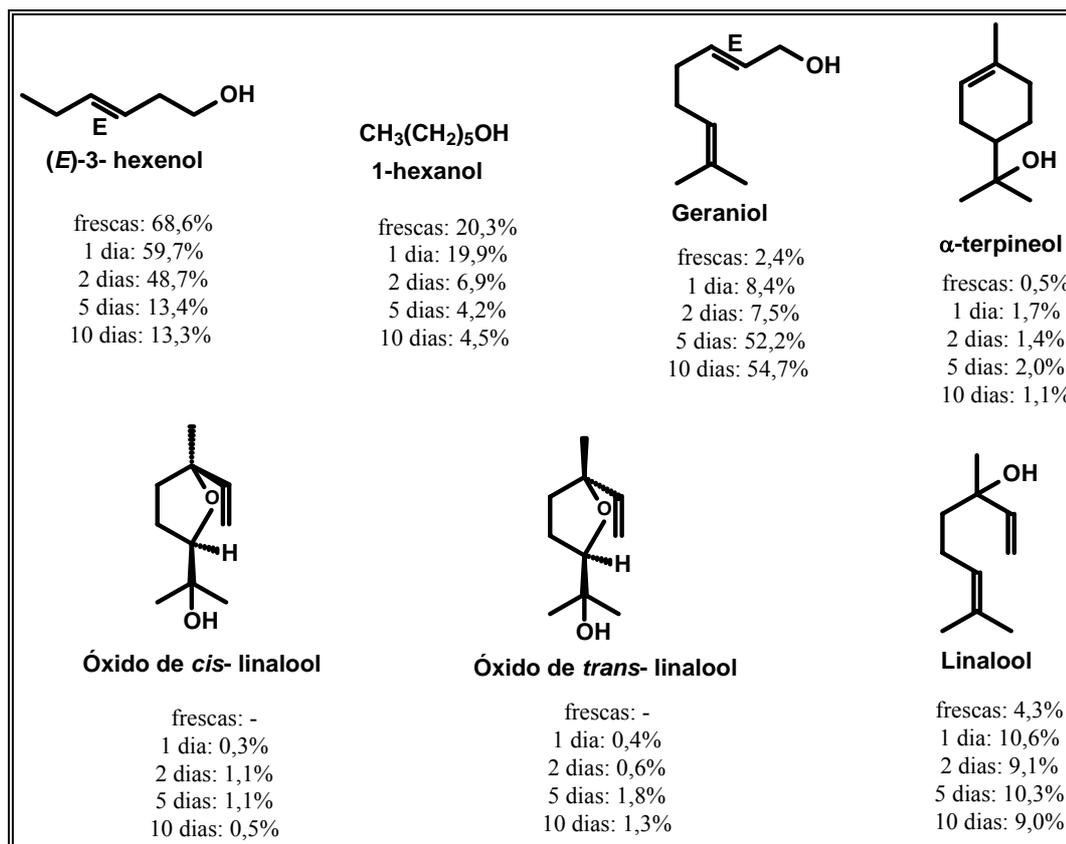


Figura 8: Principais compostos identificados na análise do óleo essencial das folhas de *Hancornia speciosa* Gomes variando-se o tempo de secagem à temperatura ambiente

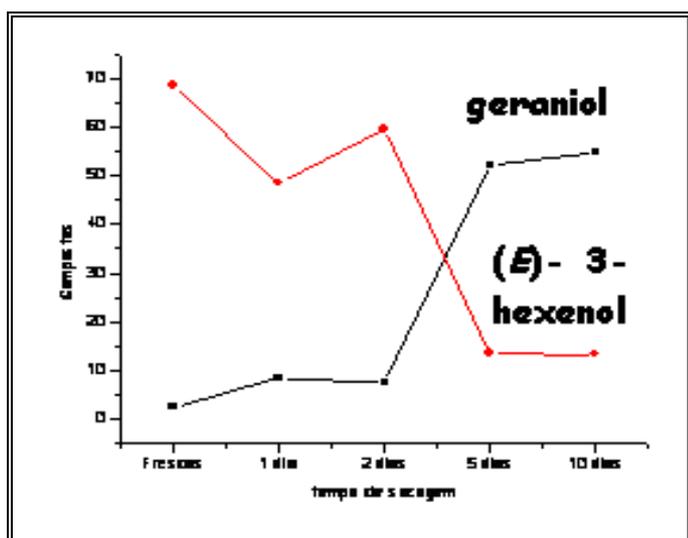


Figura 9: Gráfico mostrando a variação da percentagem relativa do Geraniol e do (E)-3-hexenol em relação ao tempo de secagem à temperatura ambiente das folhas de *Hancornia speciosa* Gomes

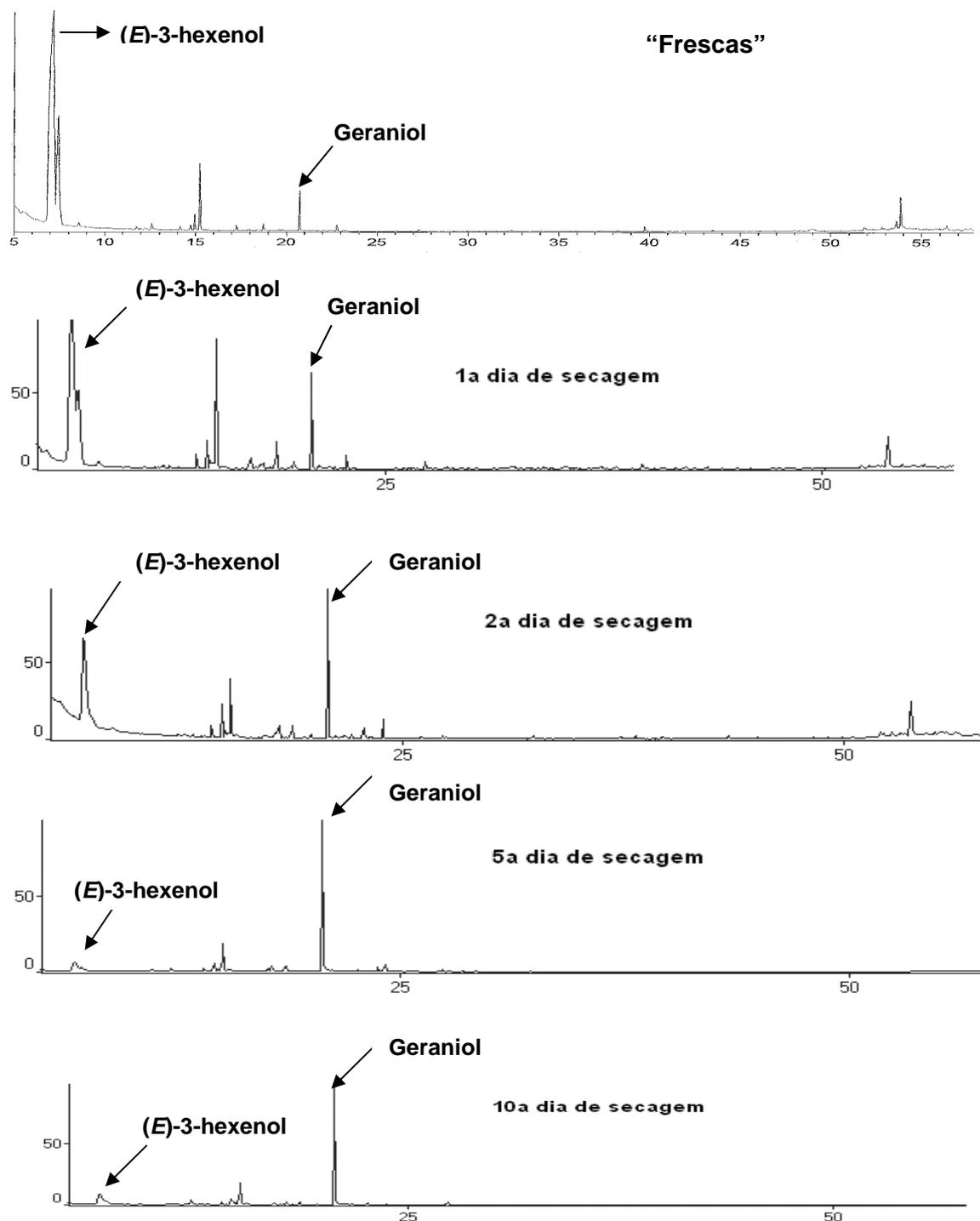


Figura 10: Cromatograma de íons totais (TIC) obtido por CG-EM (coluna DB-5 30m) dos voláteis das folhas de *Hancornia speciosa* Gomes variando-se o tempo de secagem à temperatura ambiente

Estudo Fitoquímico de *Hancornia speciosa* Gomes

Tabela 4: Composição percentual relativa dos principais componentes encontrados nos óleos essenciais das folhas de *Hancornia speciosa* Gomes variando-se o tempo de secagem à temperatura ambiente: frescas, 1, 2, 5 e 10 dias (à 25°C)

	Compostos	IR ^{calc}	IR ^{liter}	Área do pico (%)				
				frescas	1dia	2dias	5dias	10dias
1	furfural	834	836	-	-	-	-	0,8
2	(<i>E</i>)-3-hexenol	851	854	68,6	59,7	48,5	13,4	13,3
3	(<i>E</i>)-2-hexen-1-ol	857	855	*	-	-	-	-
4	1-hexanol	864	871	20,3	19,9	6,9	4,2	4,5
5	(2 <i>E</i> ,4 <i>E</i>)-hexadienal	892	910	0,6	0,7	0,9	-	-
6	NI	989	-	-	-	-	1,1	-
7	(3 <i>Z</i>)-acetato de hexenila	1004	1005	0,3	tr	-	-	-
8	NI	1016	-	0,3	0,2	-	-	-
9	NI	1018	-	tr	0,2	-	-	-
10	NI	1019	-	-	-	-	1,3	2,4
11	2-etil-1-hexanol	1026	-	0,5	0,3	-	-	-
12	fenilacetaldéido	1040	1042	tr	tr	-	-	-
13	óxido de <i>trans</i> -linalool (furanóide)	1069	1073	0,3	1,3	1,0	1,4	1,4
14	óxido de <i>cis</i> -linalool (furanóide)	1084	1087	0,4	2,4	2,5	3,2	2,3
15	NI	1090	-	1,1	0,8	0,5	-	-
16	2- nonanona	1092	1090	-	-	-	0,61	0,9
17	linalool	1098	1097	4,3	10,6	9,1	10,3	9,0
18	NI	1101	-	-	0,3	-	-	-
19	isovalerato de isopentila	1111	1103	-	0,2	-	0,5	1,0
20	(2 <i>E</i> ,6 <i>Z</i>)-nonadienal	1150	1155	-	0,3	-	-	0,5
21	NI	1162	-	-	0,2	-	-	-
22	óxido de <i>cis</i> -linalool (piranóide)	1167	1174	-	0,3	1,1	1,1	0,5
23	óxido de <i>trans</i> -linalool (piranóide)	1172	1177	-	0,4	0,6	1,8	1,3
24	salicilato de metila	1188	1192	-	tr	-	-	0,6
25	α -terpienol	1193	1189	0,5	1,7	1,4	2,0	1,1
26	geraniol	1250	1253	2,4	8,4	7,5	52,2	54,7
27	(2 <i>E</i>)-decenal	1259	1264	tr	0,2	tr	-	-
28	acetato de isomentila	1306	1306	-	-	-	0,8	0,6
29	eugenol	1350	1359	-	-	-	2,3	tr
30	NI	1435	--	tr	0,5	-	-	-
31	(<i>E</i>)-isoeugenol	1445	1451	-	-	-	0,7	1,1
TOTAL				99,2	97,8	92,2	98,3	96,6

*Composto co-eluído com o 1-hexanol (4); IR calc= Índice de retenção calculado; IR lit= índice de retenção da literatura; NI= Composto não identificado; tr= traços (valores menores que 0,1%)

5.2 Análise dos componentes voláteis obtidos por hidrodestilação dos frutos de *Hancornia speciosa* Gomes nos três estádios de maturação: verde, "de vez" e maduro

A análise dos componentes voláteis dos frutos "verdes", nos permitiu a identificação de 32 compostos, sendo 9 os componentes principais (52,6% do total do óleo) (**Tabela 5**) (**Figura 11 e 12**), são eles: 1-octen-3-ol (2,8%), óxido de *cis*-linalool (9,1%), óxido de *trans*-linalool (6,3%), linalool (16,1%), benzenoetanol (4,5%), α -terpinol (5,5%), geraniol (3,1%), tetradecanal (2,5%) e octadecanal (2,7%); enquanto na análise dos componentes voláteis dos frutos "de vez", foi possível a identificação de 30 compostos, sendo 15 os componentes principais (75,7% do total do óleo) (**Tabela 5**) (**Figura 11 e 13**). São eles: propanoato de etila (4,1%), acetato de n-propila (11,1%), composto não identificado (IR=742; 6,8%), furfural (18,6%), 1-hexanol (2,4%), acetato de 2-metilpropila (2,5%), acetato de 3-metil-3-buten-1-ol (5,4%), (*Z*)-3-hexenol (3,2%), acetato de (*Z*)-3-hexen-1-ol (2,9%), acetato de hexila (3,3%), óxido *cis*-linalool (3,9%), óxido de *trans*-linalool (2,4%), linalool (3,8%), benzenoetanol (2,8%) e α -terpineol (2,5%).

Já na análise dos componentes voláteis dos frutos "maduros", foram identificados 34 compostos, sendo 7 os componentes majoritários (78,5% do total do óleo) (**Tabela 5**) (**Figura 11 e 14**), são eles: pentanal (9,1%), 2,4,5-trimetil-1,3-dioxolano (6,8%), 3-metil-1-butanol (5,2%), 3-metil-3-buten-1-ol (12,1%), furfural (8,3%), acetato de 3-metil-1-butanol (8,8%) e acetato de 3-metil-3-buten-1-ol (28,2%).

Estudo Fitoquímico de *Hancornia speciosa* Gomes

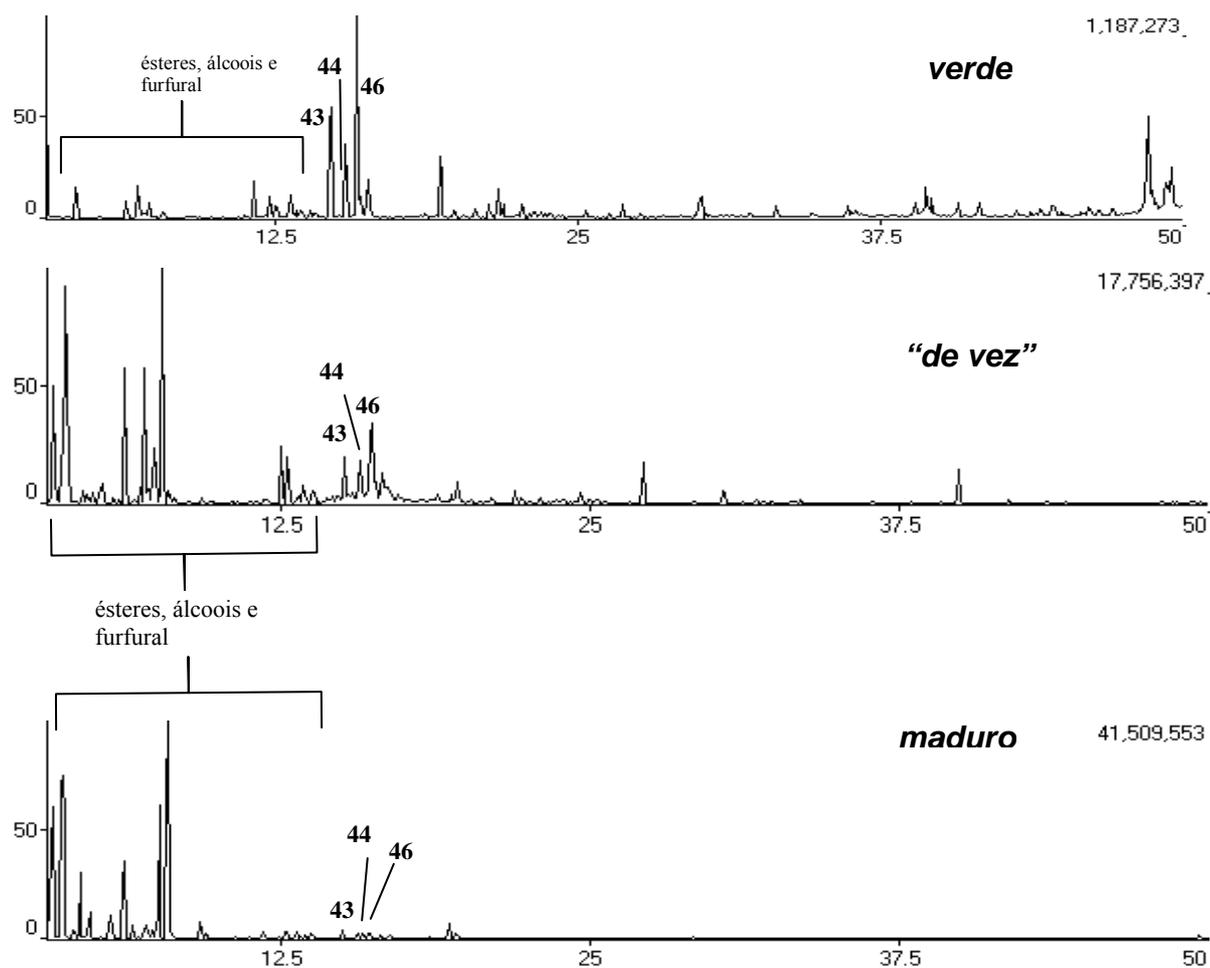


Figura 11: Cromatograma de íons totais (TIC) obtido por CG-EM (coluna DB-5 30m) dos voláteis dos frutos de *Hancornia speciosa* Gomes nos 3 estádios de maturação: verde, "de vez" e maduro. O número sobre os picos corresponde aos números dos compostos na Tabela 5

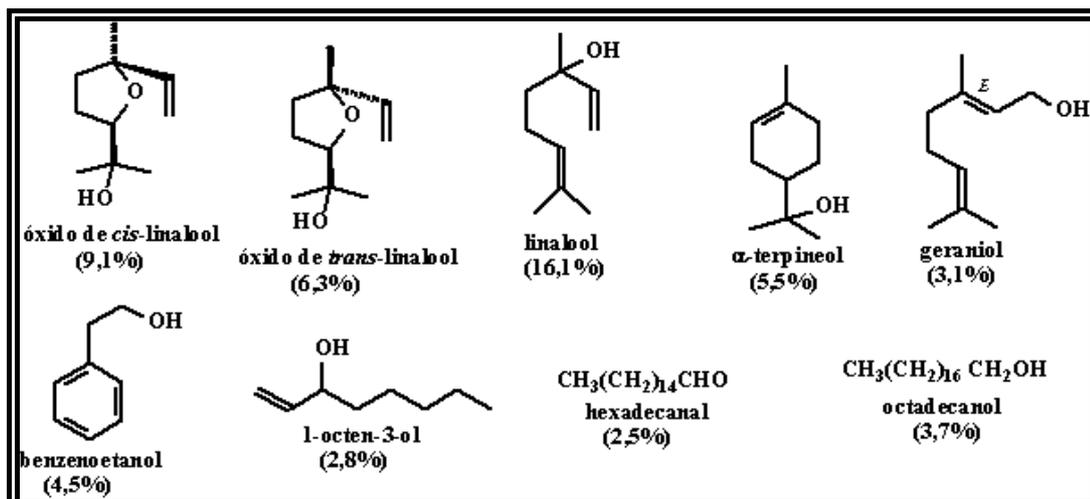


Figura 12: Principais compostos identificados na análise do óleo essencial dos frutos verdes de *Hancornia speciosa* Gomes

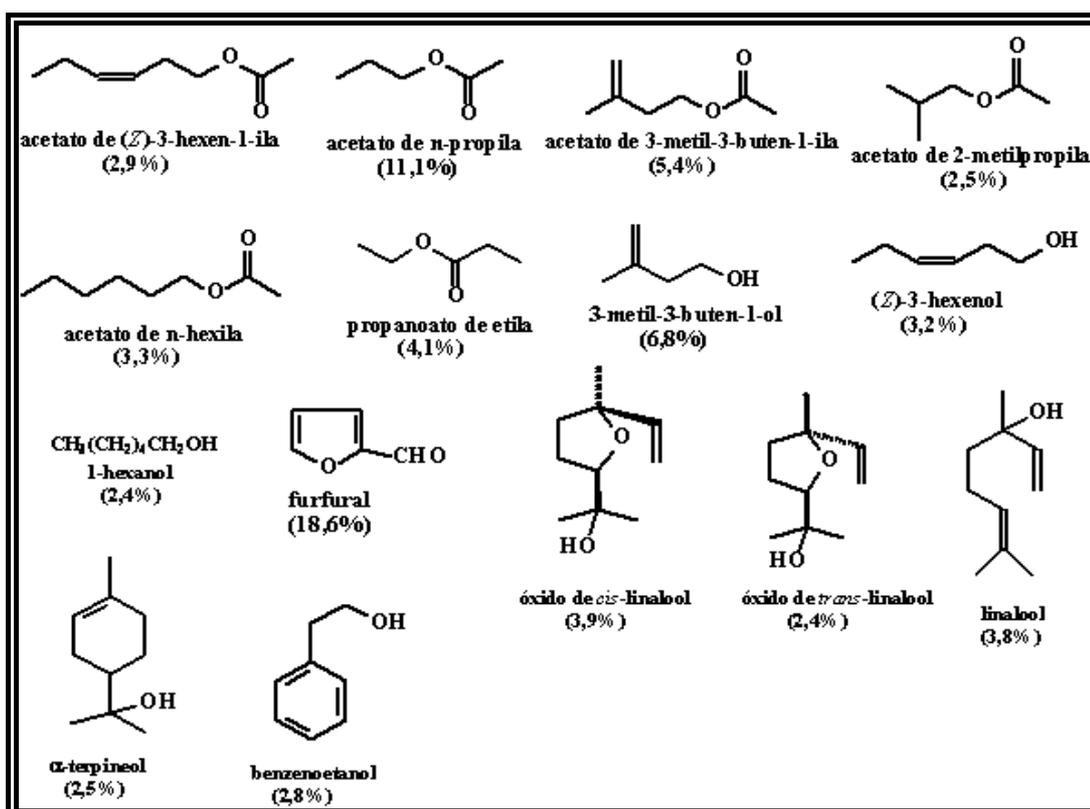


Figura 13: Principais compostos identificados na análise do óleo essencial dos frutos "de vez" de *Hancornia speciosa* Gomes

Estudo Fitoquímico de *Hancornia speciosa* Gomes

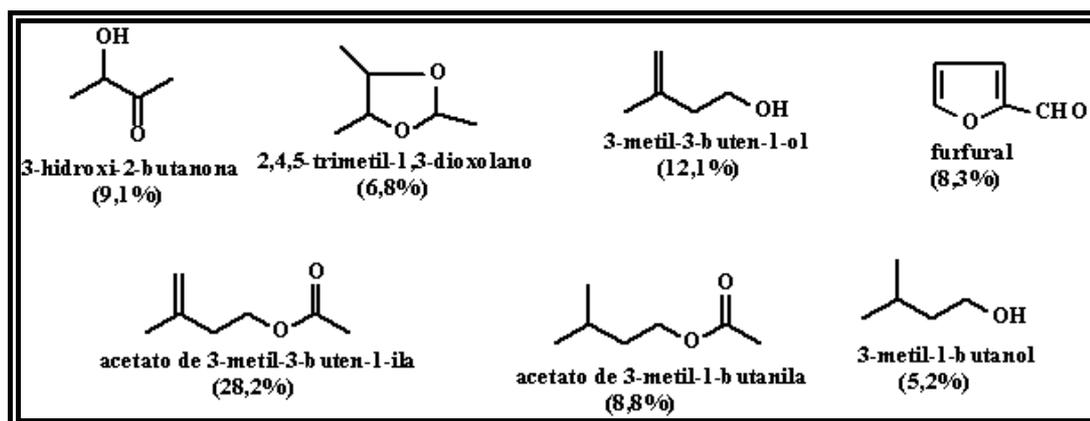


Figura 14: Principais compostos identificados na análise do óleo essencial dos frutos maduros de *Hancornia speciosa* Gomes

Tabela 5: Composição percentual relativa dos voláteis dos frutos de *Hancornia speciosa* Gomes nos três estádios de maturação: verde, “de vez”, e maduro

Compostos	IR calc.*	IR lit.*	%		
			“Verdes”	“De vez”	“Maduros”
1 3-hidroxi-2-butanona	721	697	-	1,6	9,1
2 Propanoato de etila	726	714	-	4,1	-
3 Acetato de n-propila	728	-	-	11,1	-
4 2,4,5-trimetil-1,3-dioxolano	745	-	-	-	6,8
5 3-metil-3-buten-1-ol	746	-	-	6,8	12,1
6 3-metil-1-butanol	747	734	-	1,2	5,2
7 NI	759	-	-	--	0,4
8 NI	776	-	-	0,4	-
9 Acetato de 2-metilpropila	786	-	-	2,5	-
10 3-Penten-2-ol	789	-	-	tr	-
11 3-metil-2-butenal	796	-	-	2,0	1,3
12 Hexenal	801	800	-	1,3	-
13 Acetato de n-butila	802	812	-	-	1,2
14 Furfural	834	830	-	18,6	8,3
15 2-propil furano	845	--	-	-	0,4
16 (E)-2-Hexenal	850	854	-	0,6	--
17 (Z)-3-hexenol	855	857	2,1	3,2	0,3
18 1-Hexanol	867	867	1,7	2,4	0,3
19 Acetato de 3-metil-1-butanol	874	876	-	1,0	8,8

Estudo Fitoquímico de *Hancornia speciosa* Gomes

20	Acetato de 3-metil-3-buten-1-ol	881	883	-	5,4	28,2
21	Acetato de 3-metil-2-buten-1-ol	919	-	-	0,5	1,1
22	Isocitroneleno	926	921	-	0,4	0,4
23	5-metil- furfural	964	962	-	-	0,2
24	NI	926	-	-	0,4	-
25	2-Octanona	984	-	-	-	0,1
26	1-Octen- 3-ol	985	-	2,8	-	0,4
27	Acetato de (Z)-3-hexen-1-ol	1007	1006	1,8	2,9	0,2
28	Acetato de n-hexila	1014	1008	1,1	3,3	0,5
29	Acetato de 2-hexen-1-ol	1016	-	-	0,6	-
30	1,4-Ciclohex-2-enediona	1024	-	-	1,4	0,5
31	2-etil-1-hexanol	1028	-	1,5	-	-
32	Álcool benzílico	1030	1032	-	-	0,2
33	NI	1035	-	0,8	-	-
34	Fenilacetaldeído	1040	1043	0,6	0,9	0,4
35	NI	1049	-	0,5	-	-
36	Óxido de (Z)-linalool	1070	1074	9,1	3,9	0,6
37	Óxido de (E)-linalool	1086	1088	6,3	2,4	0,4
38	Benzoato de metila	1092	1091	-	-	0,4
39	Linalool	1097	1098	16,1	3,8	0,4
40	Nonanal	1101	1098	-	0,8	-
41	Butanoato de (Z)-2-Hexenila	1103	-	1,9	-	-
42	2- Feniletanol	1109	1110	4,5	2,8	0,2
43	NI	1120	-	-	-	0,3
44	Acetato de benzila	1162	1163	-	-	0,2
45	Benzoato de etila	1169	1170	-	-	tr
46	NI	1183	-	-	0,9	1,2
47	α -Terpineol	1190	1189	5,5	2,5	0,5
48	Salicilato de metila	1192	1190	-	0,8	0,3
49	n-Decanal	1204	1204	0,7	-	-
50	Nerol	1227	1228	1,0	-	-
51	3-fenoxi-1-propanol	1244	-	1,7	-	-
52	Geraniol	1254	1255	3,1	0,8	-
53	(E)-2-decenal	1260	1261	1,4	0,7	-
54	NI	1280	-	-	0,5	-
55	NI	1281	-	1,8	-	-
56	NI	1308	-	-	0,4	-
57	Vinilguaiacol	1312	-	0,6	-	-
58	(E, E)-2,4-decadienal	1315	1314	0,7	0,6	-
59	Eugenol	1357	1356	0,7	tr	-
60	2-Undecenal	1363	-	-	0,4	-
61	(E)- β -damascenona	1386	1380	0,5	tr	-
62	Tetradecano	1400	1400	1,2	-	-

Estudo Fitoquímico de *Hancornia speciosa* Gomes

63	β -Cariofileno	1422	1418	0,5	-	-
64	γ -Decalactona	1465	1463	-	-	0,1
65	NI	1496	-	1,0	-	-
66	Pentadecano	1500	1500	1,6	-	-
67	Nerolidol	1563	1564	0,7	-	-
68	Hexadecano	1600	1600	1,1	-	-
69	NI	1649	-	0,5	-	-
70	Heptadecano	1700	1700	1,0	-	-
71	NI	1707	-	0,5	-	-
72	NI	1712	-	0,6	-	-
73	Octadecano	1800	1800	1,1	-	-
74	Hexadacanal	1811	-	2,5	-	-
75	Miristato de isopropila	1816	-	1,7	1,6	-
76	NI	1858	-	1,6	-	-
77	NI	1923	-	0,7	-	-
78	NI	1937	-	0,6	-	-
79	2-metil-2-dodecanol	2061	-	1,4	-	-
80	Octadecanol	2081	2082	2,7	-	-
Total				89,5	95,1	91,0

IR lit= índice de retenção da literatura ; NI= Composto não identificado

Nesta etapa do trabalho foi possível verificar, pela primeira vez, a composição química dos voláteis das folhas de *Hancornia speciosa* Gomes, variando-se o tempo de secagem à temperatura ambiente (**1, 2, 5 e 10** dias) como também com as mesmas frescas.

Sendo assim, verificamos um decréscimo nas percentagens dos álcoois como (*E*)-3-hexenol (68,6% nas folhas frescas para 13,3% após 10 dias de secagem); enquanto houve um aumento significativo no percentual dos monoterpenos oxigenados como geraniol (2,4% nas folhas frescas para 54,7% após 10 dias de secagem).

Já na análise da composição química dos voláteis dos frutos de *H. speciosa* Gomes nos três estádios de maturação (**verde, “de vez” e maduro**), verificamos que a composição química dos voláteis dos frutos verdes e maduros quando comparados com a composição química dos frutos “de vez”, mostram claramente uma diferenciação na proporção dos componentes principais, de acordo com o estágio de maturação.

Desta forma, o aroma dos frutos verdes possui um teor maior de monoterpenos oxigenados como o óxido de *cis*-linalool, óxido de *trans*-linalool e linalool; enquanto a proporção dos ésteres, álcoois e do furfural é

bastante reduzida.

Já na composição química dos voláteis dos frutos maduros, observamos que ésteres como acetato de 3-metil-3-buten-1-ila, álcoois [tais como 3-metil-1-butanol, 3-metil-3-buten-1-ol e o furfural] são predominantes, enquanto a proporção de monoterpenos oxigenados (óxido de *cis*-linalool, óxido de *trans*-linalool e linalool) foi bastante reduzida.

Por fim, na composição dos voláteis dos frutos “de vez”, verifica-se proporções intermediárias tanto na região dos ésteres, álcoois e do furfural quanto do óxido de *cis*- linalool, óxido de *trans*- linalool e linalool.

Parte II: Estudo fitoquímico do látex dos frutos verdes, dos frutos nos três estádios de maturação (verdes, “de vez” e maduros), das folhas e ramos de *Hancornia speciosa* Gomes.

**Parte II: Estudo Fitoquímico dos frutos e das folhas de
Hancornia speciosa Gomes**

1. IMPORTÂNCIA

O uso de plantas no tratamento e na cura de enfermidades é tão antigo quanto a civilização humana, sendo o estudo fitoquímico de plantas medicinais, muitas das vezes, o único recurso terapêutico de muitas comunidades e grupos étnicos. Ainda hoje nas regiões mais pobres do país e até mesmo nas grandes cidades brasileiras, plantas medicinais são comercializadas em feiras livres, mercados populares e encontrados em quintais de residências^[60].

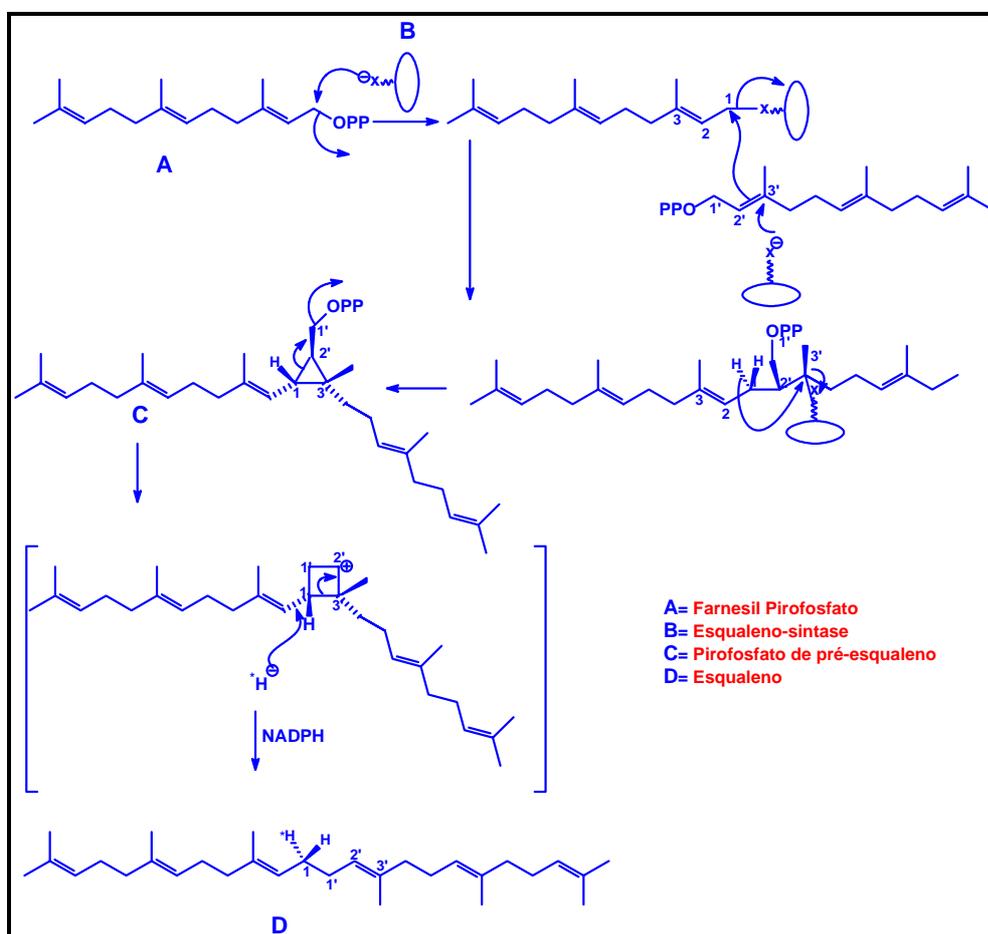
Em nosso trabalho, apresentamos o isolamento de triterpenos do látex dos frutos, frutos maduros e folhas de *Hancornia speciosa* Gomes.

A classe dos triterpenos apresenta inúmeras propriedades medicinais, com grandes potencialidades em atividades biológicas, tais como: *antiinflamatórios, bacterianos, fungicídicos, antivirais, analgésicos, cardiovasculares, antitumorais, antimicrobianos*, etc^[60]. Devido a sua grande diversidade o seu estudo tem sido de grande interesse na tentativa de novas e reais aplicabilidades em diversas áreas.

Desta forma, acreditamos que o conhecimento químico e bioquímico de *Hancornia speciosa* Gomes, (*látex dos frutos, frutos, folhas e ramos*) e seu emprego como medicamento poderia ser uma forma de agregar valor ao produto e melhorar a renda dos produtores da região.

1.1 Triterpenos: Biogênese ^[61,62]

A cadeia carbonada precursora dos triterpenos é o esqualeno, um composto que foi isolado pela primeira vez do fígado de tubarão (*Squalus sp.*), e posteriormente encontrado também no fígado de ratos, em fungos e óleos de sementes de Amaranáceas (ex. *Amaranthus cruentus*). A cadeia de 30 carbonos do esqualeno é formada a partir da condensação (cauda-cauda) de duas unidades de farnesil pirofosfato (FPP) e envolve a enzima esqualeno-sintase (**Esquema 1**).



Esquema 1: Formação do esqualeno a partir da condensação de duas unidades de FPP [61]

A condensação requer a remoção de dois grupos fosfato e a adição de um hidreto proveniente de NADPH na posição C-1. Um intermediário

desse processo é o pirofosfato de pré-esqualeno, também isolado do fígado de rato cuja formação é representada como um ataque da ligação dupla (C-2'-C-3') de uma molécula de FPP e posterior formação de um cátion terciário, seguida da perda de um hidrogênio e formação do anel do ciclopropano, originando o pirofosfato de pré-esqualeno (**Esquema 1**).

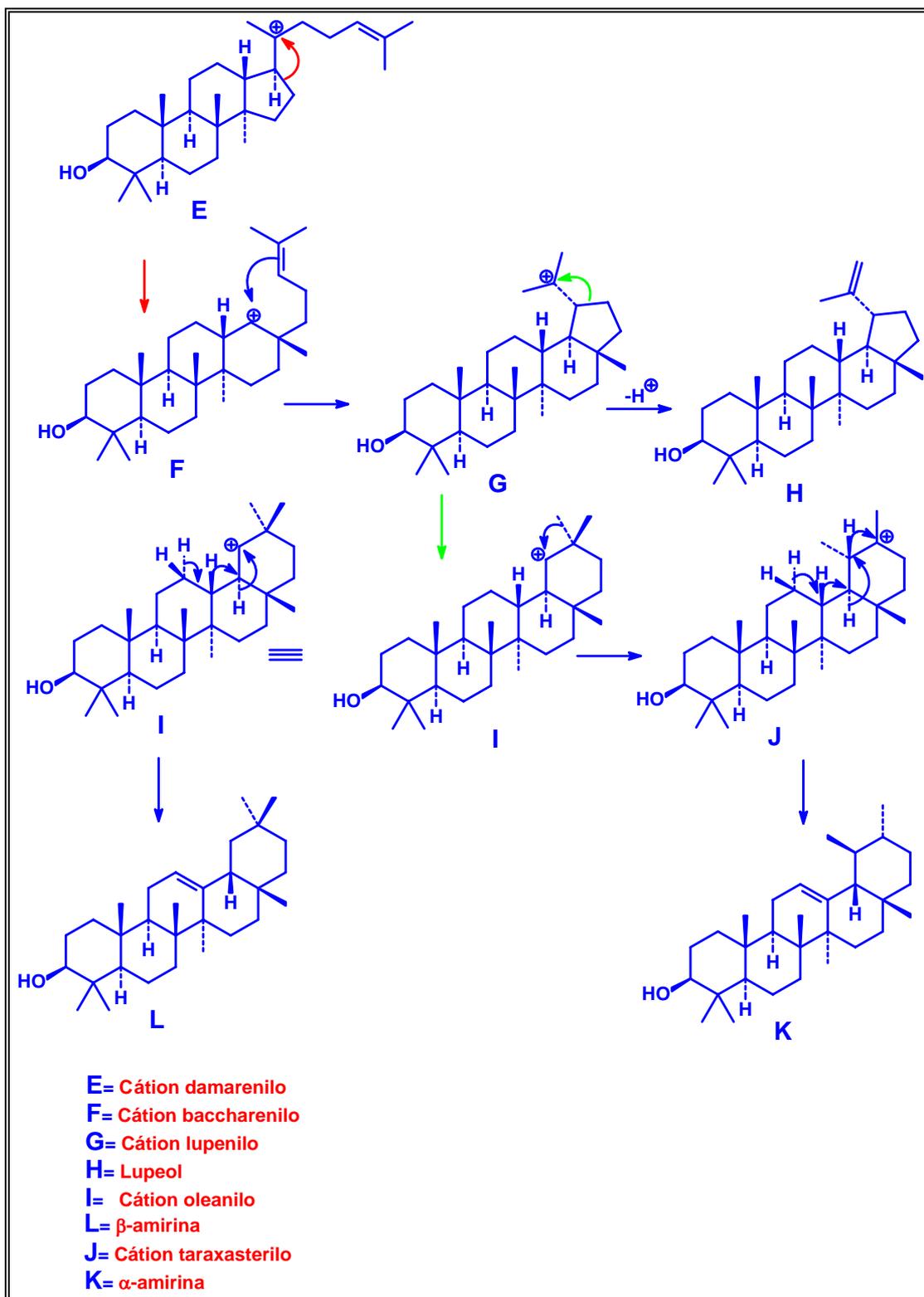
Um intermediário, cátion ciclobutano, é formado a partir da perda de um difosfato do pré-esqualeno gerando assim um cátion primário desfavorável, que via rearranjo de Wagner-Meerwin causa a expansão do anel e gera um carbocátion secundário. Finalmente, rompe-se a ligação entre C-1 e C-3' e um hidrogênio vindo NADPH é adicionado em C-1 finalizando-se assim, a formação do esqualeno (**Esquema 1**).

A ciclização do esqualeno ocorre a partir do intermediário 2,3-epóxido de esqualeno, um produto de oxidação enzimática catalizada por uma flavoproteína e requer O₂ e NADPH como cofatores. O epoxiesqualeno é convenientemente posicionado e adsorvido na superfície da enzima, assumindo diferentes conformações.

Os sistemas pentacíclicos de anéis são formados a partir da ciclização da ligação dupla, fornecendo um anel não muito comum de cinco membros e um cátion lupenilo terciário (**Esquema 2**). A perda de um hidrogênio do cátion lupenilo fornece o **Lupeol** (**Esquema 2**), encontrado em lupin (*Lupinus luteus*; Leguminosae), apesar de um anel de cinco membros não ter uma alta tendência para ser formado, como é evidenciado em uma totalidade de exemplos naturais encontrados.

A expansão do anel do cátion lupenilo por migração de ligação fornece o cátion oleanilo, que através de migrações de hidretos e perda de um hidrogênio fornece a **β -amirina** (**Esquema 2**).

A formação da **α -amirina** isomérica (**Esquema 2**) envolve primeiramente a migração de uma metila do cátion oleanilo para formar o cátion taraxasterilo, pela migração de três hidretos e perda de um hidrogênio (**Esquema 2**).



Esquema 2: Formação do Lupeol, β-amirina e da α-amirina através do cátion damarenilo [62]

Muitos dos esqueletos dos triterpenos pentacíclicos, tais como o lupeol, a α -amirina e a β -amirina (**Figura 15**) encontram-se na natureza na forma de saponinas, resultantes de reações de glicosilação.

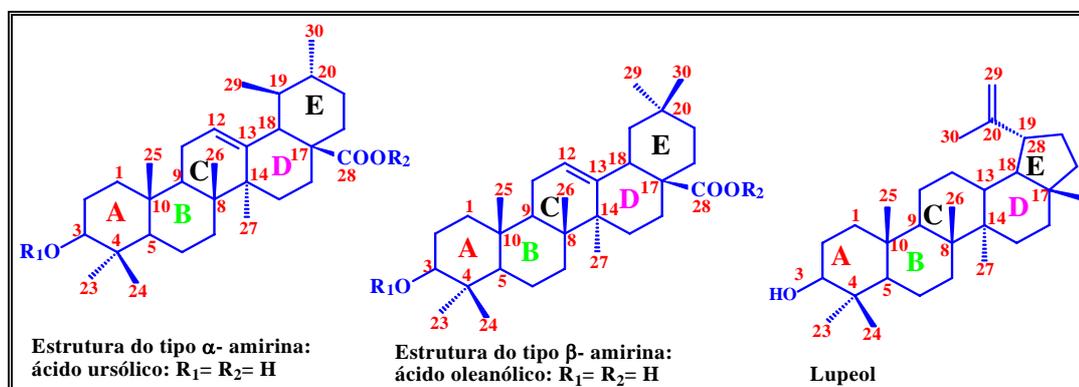


Figura 15: Esqueletos triterpênicos frequentemente encontrados na natureza

O triterpeno do tipo β -amirina, conhecido também como **oleanano**, apresenta duas metilas em C-20. O triterpeno do tipo α -amirina ou **ursano** apresenta uma metila em C-20 e outra em C-19. Nesses compostos, a estereoquímica entre os anéis A/B, B/C e C/D é do tipo **trans**, e entre D/E é do tipo **cis** (**Figura 15**).

O triterpeno do tipo lupeol difere, daqueles citados acima, na estereoquímica entre os anéis D/E, que é do tipo **trans**. Além disso, o quinto anel (E) possui cinco carbonos, não sendo hexagonal como nas outras estruturas triterpênicas (**Figura 15**).

2. METODOLOGIA

2.1 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1.1 Identificação Estrutural

A identificação estrutural dos compostos isolados foi realizada através do uso da técnica de Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio e Carbono-13 unidimensionais, Infravermelho e por comparação com dados da literatura.

Os espectros de RMN ^1H e ^{13}C (totalmente desacoplado e DEPT) unidimensionais foram obtidos em um espectrômetro BRUKER, modelo ARX200 e DRX400 de 4,7 e 9,4 Tesla (200 e 400 MHz para frequência do hidrogênio), pertencente ao Departamento de Química da UFSCar, ou em um espectrômetro INOVA 500 (VARIAN) com campo de 11 Tesla, pertencente ao Instituto de Química da UNICAMP. Os experimentos foram realizados a temperatura ambiente, sendo as amostras solubilizadas em clorofórmio (CDCl_3) e acetona (CD_3COCD_3) deuterados, utilizando como referência interna o tetrametilsilano (TMS). Os deslocamentos químicos (δ) são indicados em ppm e as constantes de acoplamento (J) em Hertz (Hz).

Os espectros no infravermelho foram obtidos em um espectrofotômetro Perkin-Elmer, Spectrum BX com transformada de Fourier, em pastilhas de KBr.

Os pontos de fusão (p.f) foram determinados em um aparelho digital da Microquímica (MQAPF-301). Os valores obtidos em graus centígrados, não foram corrigidos.

2.1.2 Isolamento dos Metabólitos Secundários

Para fracionar os extratos e purificar as substâncias foram utilizadas colunas cromatográficas em sílica gel 60 (0,040-0,063 mm, 70-230 mesh ASTM) Merk. Na maior parte das vezes optou-se por um sistema de eluição gradiente de polaridade, mediante a utilização de hexano, acetato de etila finalizando sempre com metanol. Alternativamente, para purificação dos extratos mais polares, foram utilizadas colunas empacotadas com Sephadex LH-20 da marca Sigma.

As frações obtidas das colunas foram analisadas por Cromatografia em Camada Delgada Comparativa (CCDC) empregando-se cromatofolhas de alumínio (20x20 cm) recobertas com sílica gel com indicador de fluorescência em UV₂₅₄ e 366nm, da marca Macherey-Nagel e Merk (Darmstadt). Para purificação de algumas substâncias foi utilizada a técnica de Cromatografia em Camada Delgada Preparativa (CCDP), preparadas com sílica gel P/ UV₂₅₄ e 366nm Macherey-Nagel ou sílica gel 60 F₂₅₄ Merk.

A revelação das substâncias presentes nas placas cromatográficas foi feita por irradiação em lâmpada de UV₂₅₄ e 366nm seguida da imersão da mesma numa solução de *p*-anisaldeído (álcool etílico absoluto, ácido sulfúrico, *p*-anisaldeído e ácido acético na proporção de 90:5:5:1 em volumes, respectivamente) e subsequente aquecimento a 300°C, com pistola aquecedora.

3. MATERIAL VEGETAL

3.1 Coleta do material Vegetal

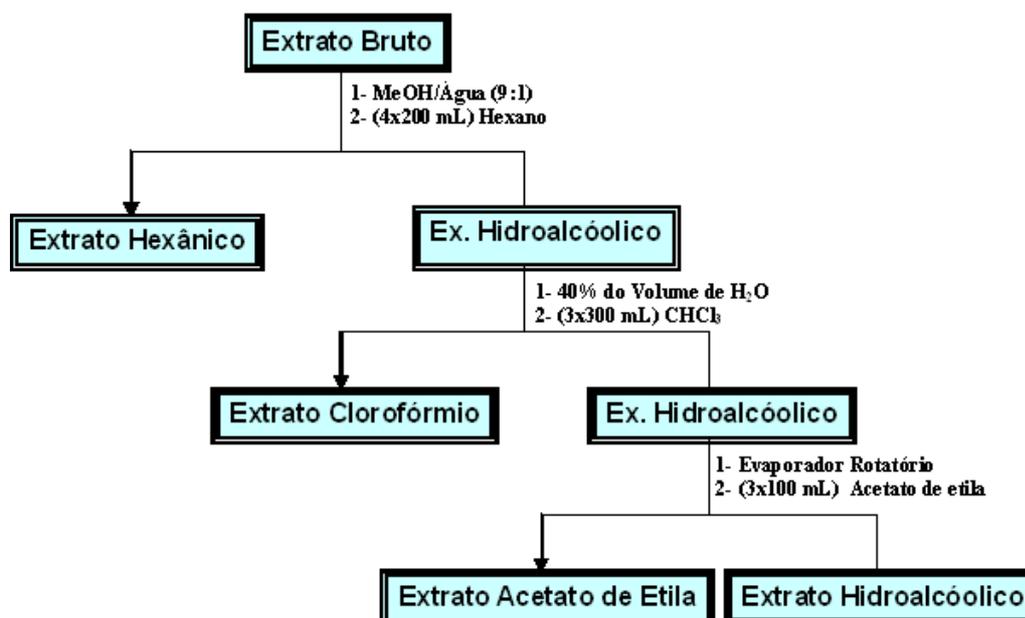
As folhas de *Hancornia speciosa* Gomes estudadas foram coletadas às 11 horas da manhã no mês de novembro de 2005 em pomares na região de Abais - Município de Estância- SE como também de um espécime no Conjunto Augusto Franco, Aracaju-SE.

Os frutos de *Hancornia speciosa* Gomes foram coletados às 10 horas da manhã entre os meses de março e abril de 2003 em pomares na região de Abais - Município de Estância- SE, como também adquiridos no mercado municipal de Aracaju-SE.

A extração dos frutos nos três estádios de maturação: verdes e sem látex (5,0 kg), “de vez” (2,0 Kg) e maduros e secos em estufa (2,3 Kg) foram realizados com os frutos cortados, ficando submersos em metanol durante 30 dias. Os extratos obtidos foram concentrados em evaporador rotatório, resultando assim nos respectivos extratos brutos: frutos verdes e sem látex (304,5 g), frutos “de vez” (184,5 g) e frutos (97,8 g).

3.2 Partição Líquido-Líquido

Do extrato bruto metanólico foram obtidos três novos extratos de polaridade distintas (partição hexânica, partição clorofórmica e partição acetato de etila) (*Fluxograma 1*).



Fluxograma 1: Procedimento para obtenção dos extratos particionados do frutos nos três estádios de maturação: verde e sem látex, “ de vez” e maduro

4. OBTENÇÃO DOS EXTRATOS E ISOLAMENTO DAS SUBSTÂNCIAS

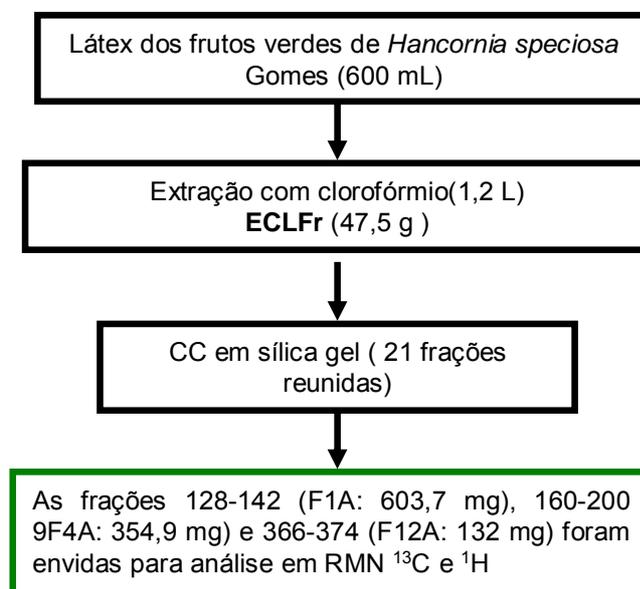
4.1 Obtenção e purificação do extrato clorofórmio do látex dos frutos

Os metabólitos secundários do látex dos frutos verdes de *Hancornia speciosa* (600 mL de látex) foram extraídos com CHCl_3 (3 x 400 mL). A parte orgânica foi separada da fase aquosa, seca com Na_2SO_4 anidro sendo posteriormente concentrada em evaporador rotatório, obtendo-se 47,48 g do extrato do látex (**ECLFr**).

Parte do extrato do látex dos frutos verdes de *Hancornia speciosa* (2,5 g) foi purificado utilizando-se cromatografia em coluna de sílica gel (116,32 g), a pressão ambiente. A eluição da coluna iniciou-se com 100% de hexano, aumentando-se a polaridade do eluente pela adição de acetato de etila e finalizando-se com metanol. Foram coletadas 584 frações num volume de 5 mL, posteriormente reunidas em 21 grupos, com base nos seus respectivos valores de RFs, quando analisadas por CCDC (*Cromatografia em Camada Delgada Comparativa*). É importante mencionar que estão representadas apenas as amostras reunidas, por isso a falta de sequência relativa aos seus números de frações.

Desta forma, foram obtidas as frações: 128-142 (F1A; 603,7 mg), 144-154 (F2A; 36,7 mg), 156-159 (F3A; 2,0 mg), 160-200 (F4A; 354,9 mg), 283-298 (F5A; 3,0 mg), 300-310 (F6A; 9,0 mg), 312-322 (F7A; 3,0 mg), 324-334 (F8A; 13,0 mg), 336-346 (F9A; 15,0 mg), 347-357 (F10A; 20,0 mg), 358-365 (F11A; 108,0 mg), 366-374 (F12A; 132,0 mg), 376-386 (F13A; 65,0 mg), 388-394 (F14A, 21,0 mg), 396-404 (F15A, 11,0 mg), 405-440 (F16A; 19,0 mg), 442-450 (F17A; 6,0 mg), 452-474 (F18A; 8,0 mg), 476-534 (F19A; 30,0 mg), 535-547 (F20A; 5,0 mg), 548-584 (F21A; 22,0 mg). As frações F1A, F4A e F12A por se apresentarem puras quando analisadas por CCDC foram enviadas para análise de RMN ^1H e ^{13}C . Das amostras F1A, F4A e F12A

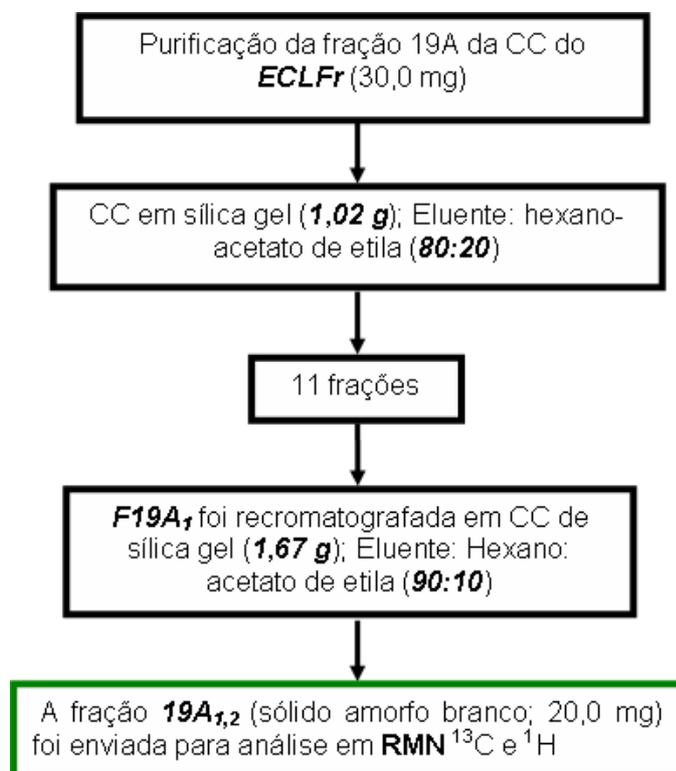
foram retirados os pontos de fusão (*p.f.*), apresentando respectivamente: **55,1-55,9°C** (*sólido branco amorfo*); **112,6-114,5°C** (*sólido branco cristalino*) e **83-85°C** (*sólido branco cristalino*) (**Fluxograma 2**).



Fluxograma 2: Preparação do extrato clorofórmio dos frutos verdes de *Hancornia speciosa* Gomes

4.2 Purificação da fração 19A proveniente da CC do ECLFr

A fração *F19A* (30,0 mg), foi recromatografada em CC de sílica gel (1,02 g) através de uma eluição binário utilizando como eluente hexano-acetato de etila (80:20), fornecendo 11 frações. A fração *F19A*₁ foi recromatografada em coluna de sílica gel (1,67 g) através de uma eluição binário utilizando como eluente hexano-acetato de etila (90:10), fornecendo a fração ***F19A*_{1,2}** (*sólido amorfo branco*; 20,0 mg) que foi enviada para análise em RMN ¹H e ¹³C (**Fluxograma 3**).



Fluxograma 3: Processo de purificação da fração 19A da CC do ECLFr de *Hancornia speciosa* Gomes

4.3 Reação de transesterificação e identificação por **CG-EM** dos ésteres 3- β -O-acil lupeol (**F1A**) ^[37,38]

Parte da mistura contendo os ésteres 3- β -O-acil lupeol (**F1A**; 50,0 mg) foi aquecida à 60°C sob agitação em 10% HCl/MeOH (3 mL) por 8 h (**Figura 16**). Após resfriamento, a solução foi extraída com CH₂Cl₂. A fase orgânica foi lavada inicialmente com solução NaHCO₃ 10% e depois com H₂O, seca com Na₂SO₄ anidro e concentrada em evaporador rotatório fornecendo lupeol e uma mistura de ésteres metílicos os quais foram analisados por CG-EM.

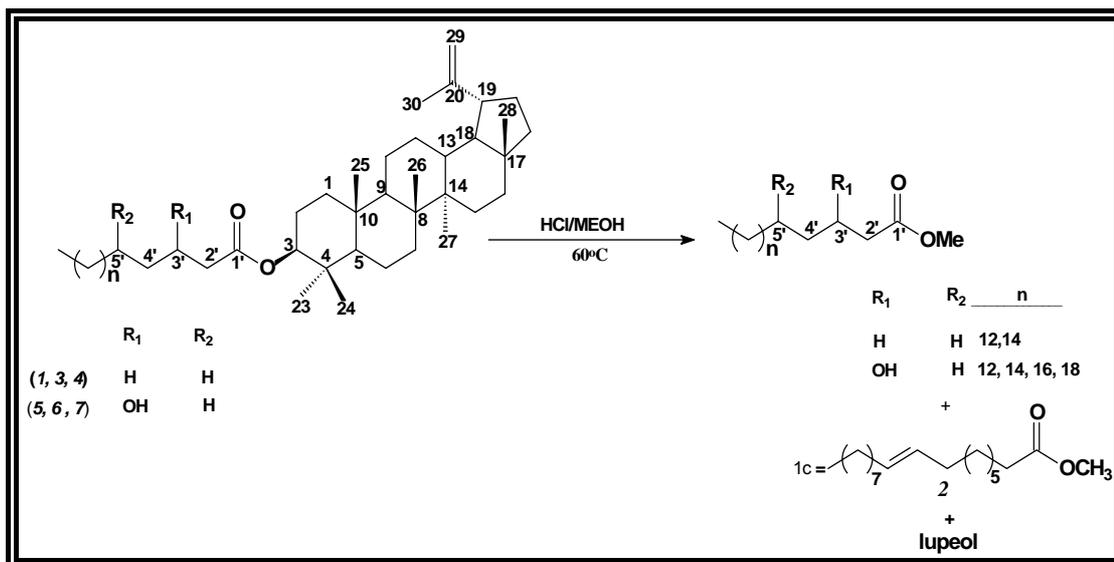


Figura 16: Reação de metanólise ácida dos ésteres 3-β-O acil lupeol (*F1A*)

Os ésteres 3-β-O-acil lupeol foram identificados através de CG-EM empregando-se um cromatógrafo Shimadzu modelo QP5050A, equipado com coluna capilar de sílica fundida SPB-1701 (30 m x 0,25 mm de diâmetro interno x 0,25 μm de espessura do filme) e gerenciado pelo software Class 5000. O volume injetado das amostras, adequadamente diluídas, foi 1,5 μL. as condições empregadas foram: 100°C (3 min), 20°C.min⁻¹, 270°C (15 min). As temperaturas do injetor e detector foram 250°C e 280°C, respectivamente. Usando como gás de arraste o hélio (1,2 mL.min⁻¹). O espectrômetro de massas operou com velocidade de 0,84 scans.sec⁻¹ na faixa de *m/z* 40-700.

A identificação dos compostos foi feita com base na comparação computadorizada dos espectros de massas adquiridos com aqueles armazenados no banco de dados de espectro de massas do sistema CG-EM (NIST107 e NIST21) e com outros espectros de massas da literatura [37,38].

4.4 Reação de transesterificação e identificação por CG-EM do éster diidroxilado 3-β-O-acil lupeol (F12A) [63]

Parte da mistura contendo o éster diidroxilado 3-β-O-acil lupeol (F12A; 50,0 mg), foi aquecida a 50°C sob agitação em uma mistura de H₂SO₄/MeOH (1 molar; 3,0 mL) por 3 h (Figura 17). Após resfriamento, a solução foi extraída com hexano (3x 3 mL). A fase orgânica foi lavada inicialmente com solução de NaOH 1 molar em 50% de etanol (2x 3 mL) e depois com H₂O (3x 3 mL), seca com Na₂SO₄ anidro e concentrada em evaporador rotatório, fornecendo o lupeol e uma δ-lactona α,β-insaturada (11a'; 40,0 mg). Esta mistura foi purificada através de uma CC de sílica gel (4,0 g) eluída com hexano-acetato de etila em ordem crescente de polaridade, sendo posteriormente analisada por CG-EM.

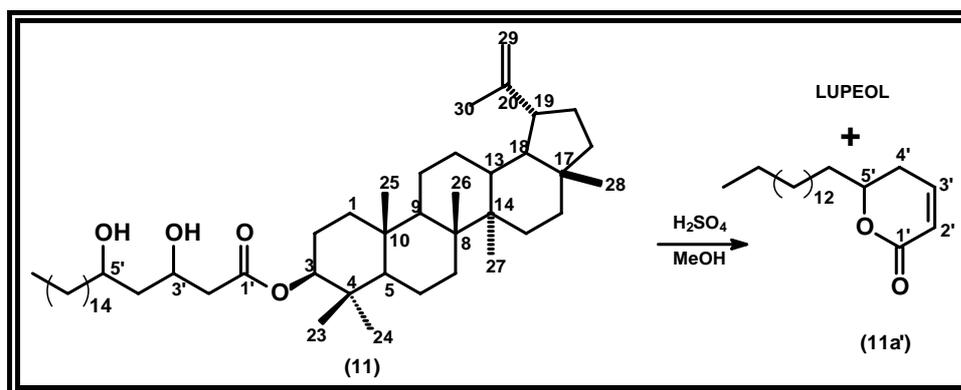


Figura 17: Reação de metanólise ácida do éster diidroxilado 3-β-O-acil lupeol

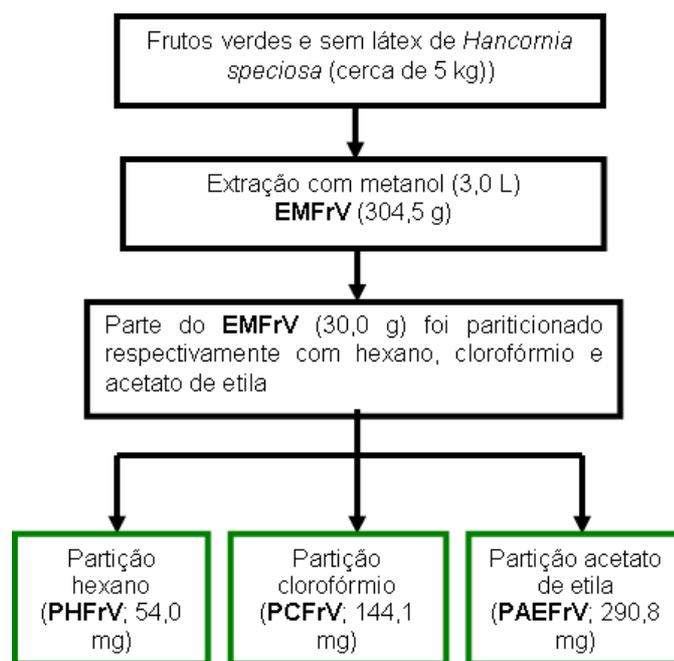
O éster diidroxilado 3-β-O-acil lupeol foi identificado através de CG-EM empregando-se um cromatógrafo Shimadzu modelo QP5050A, equipado com coluna capilar de sílica fundida SPB-1701 (30 m x 0,25 mm de diâmetro interno x 0,25 μm de espessura do filme) e gerenciado pelo software Class 5000. o volume injetado das amostras, adequadamente diluídas foi 1,2 μL. As condições empregadas de: 100°C (3 min), 15°C.min⁻¹, 270°C (10 min). As temperaturas do injetor e detector foram 250°C e 280°C, respectivamente. E

o gás de arraste foi o hélio ($1,2 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$). O espectrômetro de massas operou com velocidade de $0,5 \text{ scans}\cdot\text{seg}^{-1}$ na faixa de m/z 40-600.

A identificação dos compostos foi feita com base na comparação computadorizada dos espectros de massas adquiridos com aqueles armazenados no banco de dados de espectro de massas do sistema CG-EM (NIST107 e NIST21) e com outros espectros de massas da literatura ^[37,38].

4.5 Obtenção e Purificação do extrato metanólico dos frutos verdes e sem látex

O extrato metanólico dos frutos verdes sem látex de *Hancornia*, *Speciosa* Gomes foi preparado a partir dos frutos cortados sem látex (5 kg), deixando os frutos submersos em MeOH (3,0 L). Após filtração, a fase orgânica foi concentrada em evaporador rotatório, obtendo-se 304,5 g do extrato (**EMFrV**). Parte do extrato metanólico dos frutos sem látex da mangaba (**EMFrV**, 30,0 g) foi particionado com hexano, clorofórmio e acetato de etila, obtendo-se as seguintes quantidades de extratos particionados, respectivamente: 54,0 mg (**PHFrV**), 144,1 mg (**PCFrV**) e 290,8 mg (**PAEFrV**), obtendo-se 0,18%, 0,48% e 0,97% de rendimentos respectivamente (**Fluxograma 4**).



Fluxograma 4: Preparação do extrato metanólico dos frutos verdes e sem látex (EMFrV) de *Hancornia speciosa* Gomes

4.6 Purificação em CC dos extratos PCFrV e PAEFrV utilizando-se a Sephadex LH-20®

A Sephadex LH20 é um polímero bastante utilizado na separação de moléculas como esteróides, terpenos, lipídios, produtos naturais [64-66] e até moléculas de alto peso molecular como peptídeos (acima de 35 resíduos de aminoácidos). A sephadex LH20® contém em sua matriz, unidades de polissacarídeos hidrofílicas e lipofílicas naturais (**Figura 18**), sendo caracterizada por ser uma cromatografia seletiva.

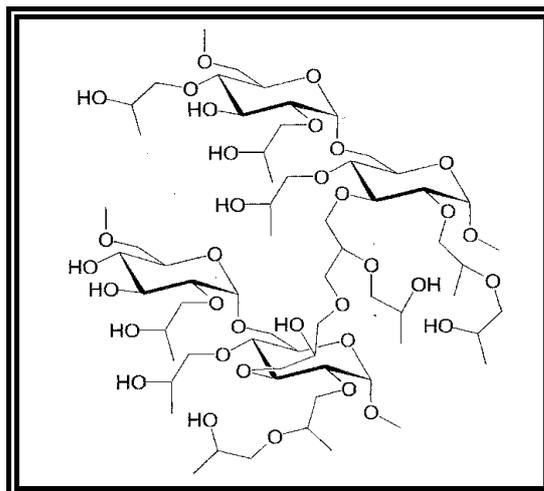
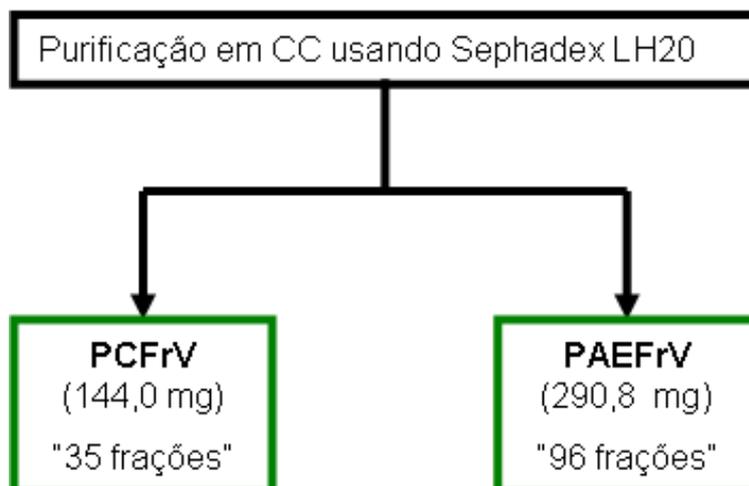


Figura 18: Estrutura parcial da Sephadex LH20

A eluição é prescrita baseando-se na estrutura química da amostra. Esta técnica apresenta a vantagem de se reaproveitar o material, tendo como única desvantagem, o fato de ser um polímero de elevado custo. Seu processo de separação inicia-se separando os componentes mais pesados (maiores) até os mais leves (menores), isto é, as moléculas menores (apolares e/ou pouco polares) entram nos poros existentes na matriz da sephadex e as substâncias maiores passam livremente por ela ^[67].

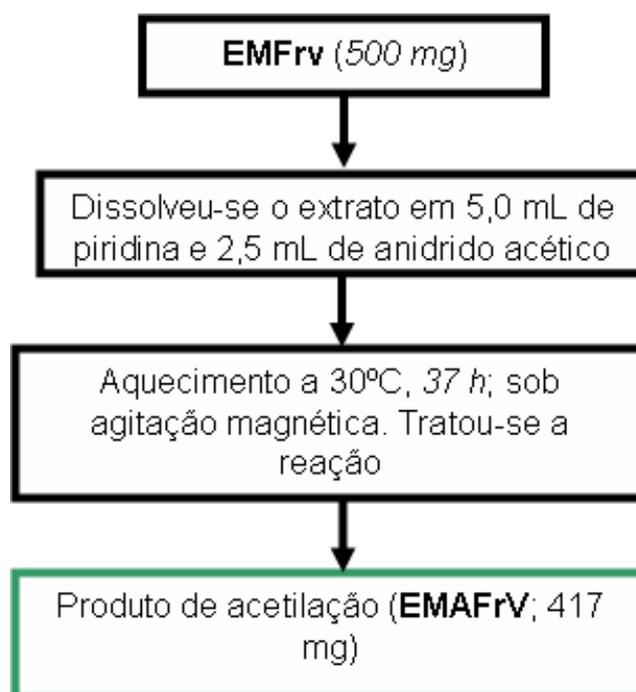
Os extratos da partição clorofórmio, **PCFrV** (144,1 mg), e da partição acetato de etila, **PAEFrV** (290,8 mg), foram submetidas separadamente à purificação utilizando-se uma coluna empacotada com Sephadex LH-20[®], a pressão ambiente, eluída de forma isocrática com metanol (MeOH). Foram obtidas 35 e 96 frações, respectivamente num volume de 5 mL (**Fluxograma 5**).



Fluxograma 5: Purificação em CC dos extratos PCFrV e PAEFrV de *Hancornia speciosa* Gomes utilizando-se a Sephadex LH20[®]

4.7 Reação de Acetilação com anidrido acético-piridina do extrato metanólico dos frutos verdes e sem látex (EMFrV)

O extrato metanólico dos frutos verdes de *Hancornia speciosa* Gomes **EMFrV** (500 mg) foi dissolvido em 5,0 mL de piridina e 2,5 mL de anidrido acético, sob agitação magnética à temperatura ambiente por 37 h. O produto da acetilação (417,0 mg, **EMAFrV**) foi obtido após tratamento da reação ^[68] (**Fluxograma 6**).

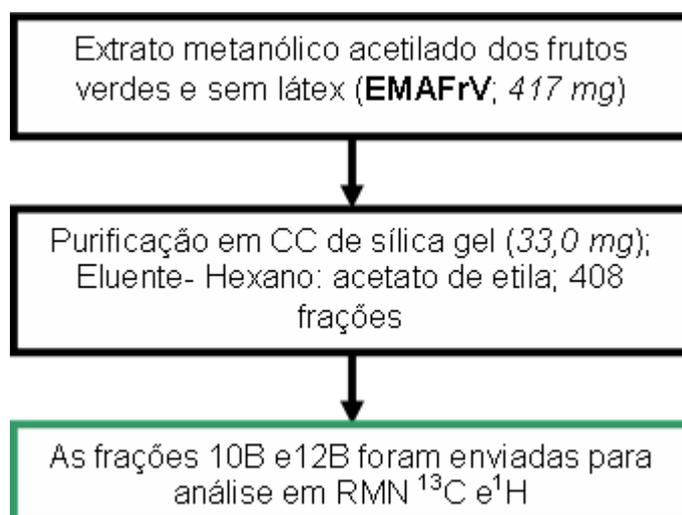


Fluxograma 6: Reação de Acetilação com anidrido acético-piridina do extrato metanólico dos frutos verdes e sem látex (EMFrV) de *Hancornia speciosa* Gomes

4.8 Purificação do extrato metanólico acetilado dos frutos verdes e sem látex (EMAFrV)

O **EMAFrV** (417,0 mg) foi purificado utilizando-se cromatografia em coluna de sílica gel (33,0 g), a pressão ambiente. A eluição da coluna iniciou-se com 100% de hexano, aumentando-se a polaridade do eluente pela adição de acetato de etila e finalizando-se com metanol. Foram coletadas 408 frações num volume de 5 mL, posteriormente reunidas em 14 grupos, com base nos seus respectivos valores de RFs, quando analisadas por CCDC (*Cromatografia em Camada Delgada Comparativa*). É importante mencionar que estão representadas apenas as amostras reunidas, por isso a falta de sequência relativa aos seus números de frações.

Desta forma, foram obtidas as frações: 122-134 (F1B; 3,3 mg), 156-176 (F2B; 6,0 mg), 178-200 (F3B; 7,8 mg), 201-218 (F4B; 5,8 mg), 219-252 (F5B; 60,5 mg), 253-280 (F6B; 19,3 mg), 282-292 (F7B; 7,1 mg), 293-304 (F8B; 30,3 mg), 305-314 (F9B; 22,0 mg), 315-320 (F10B; 13,7 mg), 321-323 (F11B; 3,3 mg), 324-346 (F12B; 30,6 mg), 347-370 (F13B; 12,7 mg) e 372-408 (F14B; 52,6 mg). As frações *F10B* (óleo amarelo) e *F12B* (óleo amarelo) foram enviadas para análise de RMN ^1H e ^{13}C (**Fluxograma 7**).



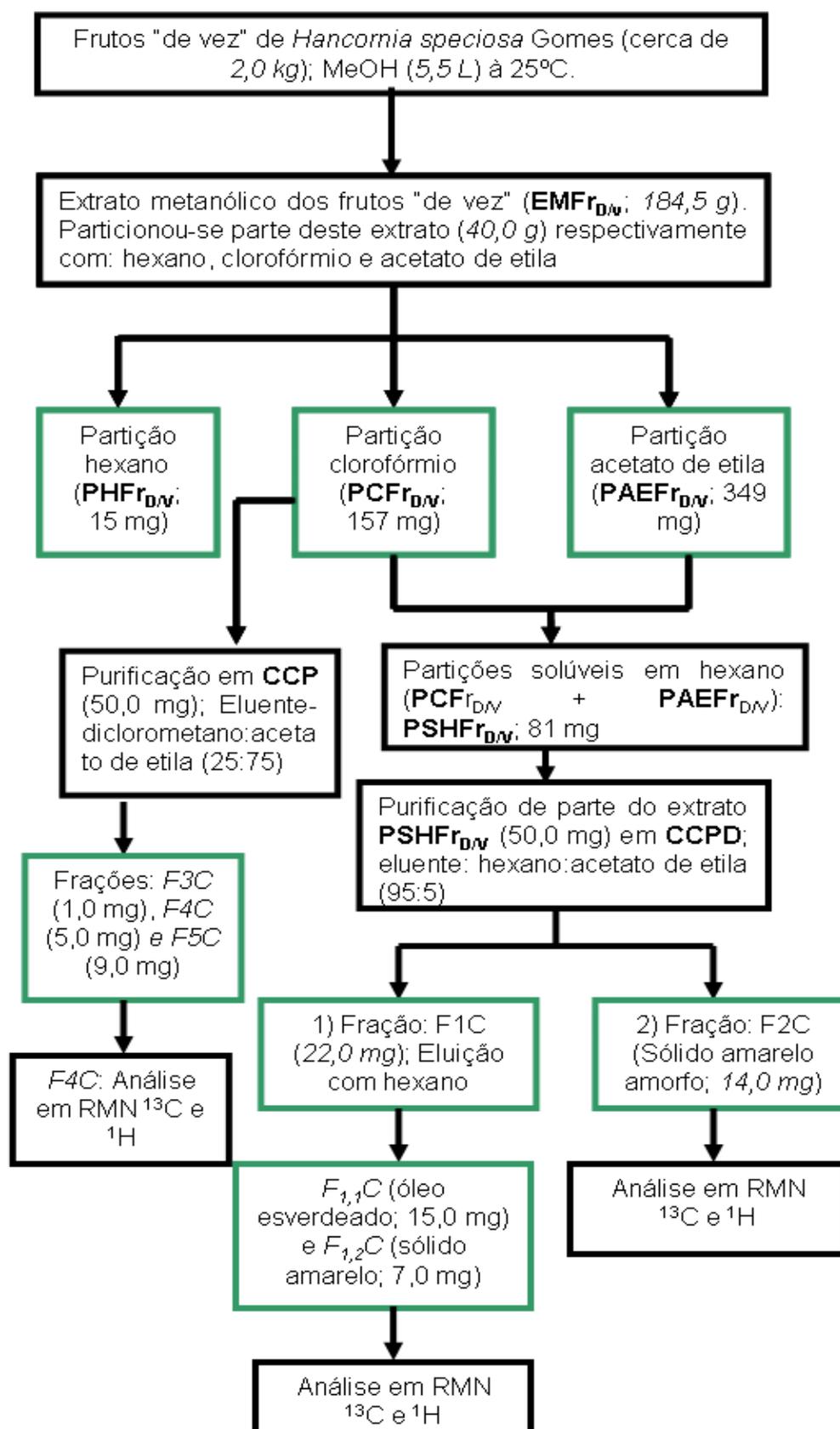
Fluxograma 7: Purificação do extrato metanólico acetilado dos frutos verdes e sem látex (EMAFrV) de *Hancornia speciosa* Gomes

4.9 Obtenção e purificação do extrato metanólico dos frutos “de vez”

Os frutos “de vez” de *Hancornia speciosa* Gomes foram coletados em pomares numa área de restinga na região de Abais- Município de Estância-SE. Os frutos (cerca de 2,0 kg) foram cortados e deixados submersos em MeOH (5,5 L) à temperatura ambiente. Após filtração, a fase orgânica foi parcialmente concentrada em evaporador rotatório, obtendo-se 184,5 g de extrato (EMFr_{DM}). Parte do extrato metanólico (40 g) foi particionado com

hexano, clorofórmio e acetato de etila. Obtendo-se assim, os extratos: hexânico (**PHFr_{DIV}**, 15 mg), clorofórmio (**PCFr_{DIV}**, 157 mg) e acetato de etila (**PAEFr_{DIV}**, 349 mg) com rendimentos de 0,037%, 0,393% e 0,873% respectivamente. As partições clorofórmio e acetato de etila foram subsequentemente solubilizados em hexano separadamente, e as partições solúveis em hexano (**PSHFr_{DIV}**): 68 mg e 13 mg, respectivamente foram reunidas por similaridades apresentadas em CCDC.

Cerca de 50 mg do extrato solúvel em hexano (**PSHFr_{DIV}**) foi purificado usando CCDP (*Cromatografia em Camada Delgada Preparativa*), usando como eluente hexano- acetato de etila (95:5), fornecendo duas frações: F1C (22,0 mg), isolada na forma de uma mistura que após eluição com hexano forneceu duas novas frações, a *F_{1,1}C* (óleo-esverdeado; 15,0 mg) e *F_{1,2}C* (sólido amarelo; 7,0 mg) e um composto puro, a F2C (*Sólido amarelo amorfo*, 14,0 mg). As frações *F_{1,1}C*, *F_{1,2}C* e F2C foram enviadas para análise de RMN ¹H e ¹³C. Da partição clorofórmio **PCFr_{DIV}**, foram retirados 50 mg para purificação em CCDP, usando como eluente diclorometano-acetato de etila (25:75), fornecendo duas substâncias puras [F3C (1,0 mg), F4C (5,0 mg) e uma mistura [F5C (9,0 mg)]. A fração F4C foi enviada para análise de RMN ¹H e ¹³C (**Fluxograma 8**).



Fluxograma 8: Obtenção e purificação do extrato metanólico dos frutos “de vez” de *Hancornia speciosa* Gomes

4.10 Obtenção e purificação do extrato metanólico dos frutos maduros e secos

Os frutos maduros (2,3 kg) de *Hancornia speciosa* Gomes foram adquiridos no mercado municipal de Aracaju e refrigerados durante 48 h. Após este período, os frutos foram cortados e secos em estufa apropriada (72h, 45°C), moídos e deixados submersos em MeOH (2,0 L) à temperatura ambiente. Após filtração, a fase orgânica foi parcialmente concentrada em evaporador rotatório, obtendo-se 97,8 g de extrato (**EMFr_M**). Parte do **EMFr_M** (21,45 g) foi particionado com hexano, clorofórmio e acetato de etila. Obtendo-se os extratos: hexânico (**PHFr_M**, 9,83 g), clorofórmio (**PCFr_M**; 1,08 g) e acetato de etila (**PAEFr_M**; 230 mg) com rendimentos de 45,83%, 5,03% e 1,07% respectivamente.

Parte do extrato da partição hexânica dos frutos maduros e secos, **PHFr_M**, (2,5 g) foi purificado utilizando-se cromatografia em coluna de sílica gel (52,12 g), a pressão ambiente. A eluição da coluna iniciou-se com 100% de hexano, aumentando-se a polaridade do eluente pela adição de acetato de etila e finalizando-se com metanol. Foram coletadas 673 num volume de 5 mL, posteriormente reunidas em 48 grupos, com base nos seus respectivos valores de RFs, quando analisadas por CCDC.

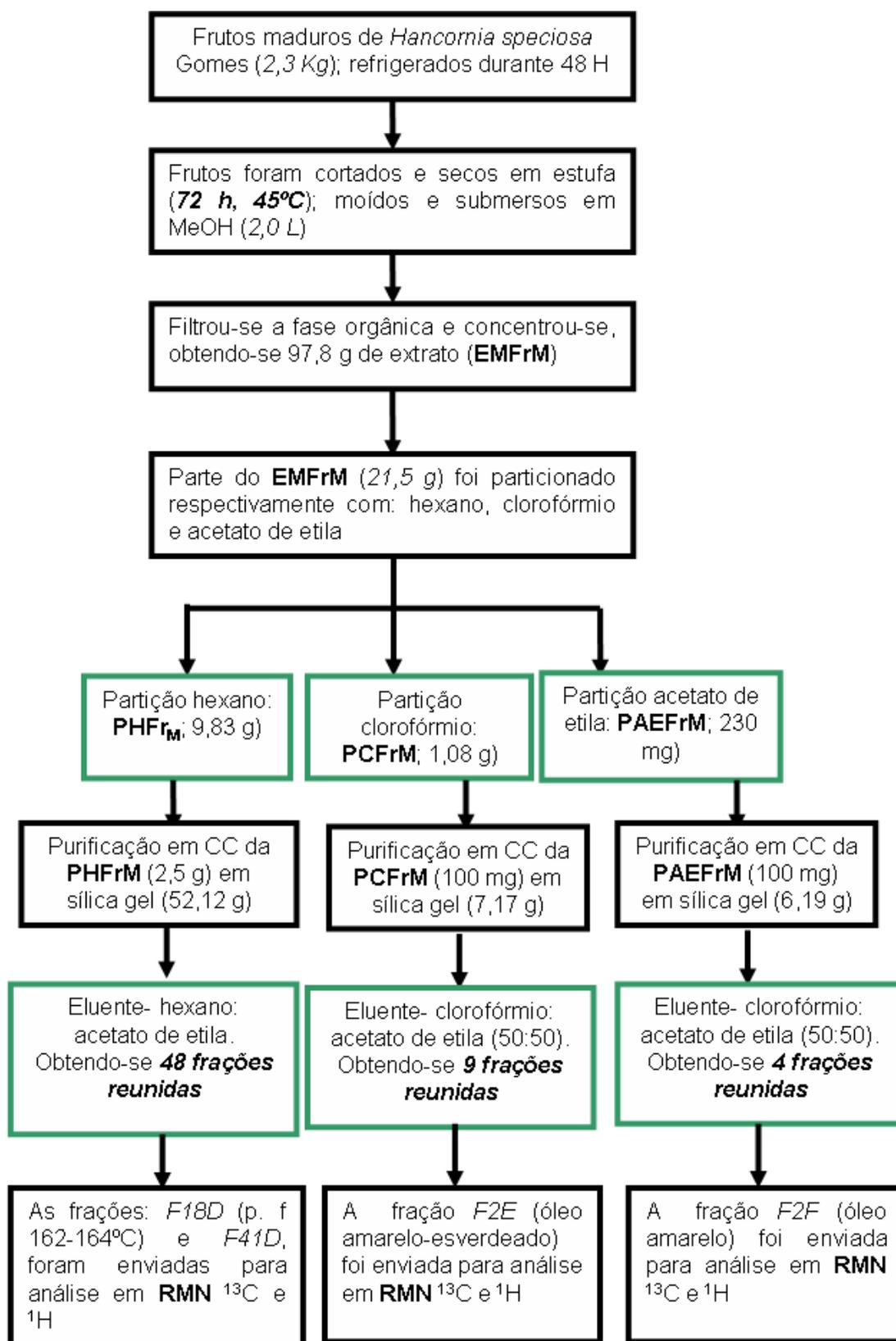
Desta forma, foram reunidas as frações: 1-10 (F1D; 13,8 mg), 11-18 (F2D; 24,4 mg), 19-54 (F3D; 19,2 mg), 55-62 (F4D; 28,5 mg), 63-66 (F5D; 27,2 mg), 67-73 (F6D; 40,0 mg), 74-77 (F7D; 18,8 mg), 78-86 (F8D; 18,2 mg), 87-98 (F9D; 17,6), 100-130 (F10D; 12,4 mg), 131-157 (F11D; 13,6 mg), 158-168 (F12D; 24,9 mg), 169-195 (F13D; 55,9 mg), 196-210 (F14D; 24,4 mg), 211-226 (F15D; 45,0 mg), 227-240 (F16D; 131,3 mg), 241-248 (F17D; 71,4 mg), 249-277 (F18D; 126,9 mg), 278-296 (F19D; 27,2 mg), 297-318 (F20D; 0,5 mg), 319-325 (F21D; 5,1 mg), 326-332 (F22D; 1,8 mg), 333-348 (F23D; 3,0 mg), 349-360 (F24D; 3,0 mg), 361-370 (F25D; 4,0 mg), 371-378 (F26D; 7,0 mg), 379-400 (F27D; 13,0 mg), 401-416 (F28D; 4,4 mg), 417-431 (F29D; 2,4 mg), 432-440 (F30D; 3,5 mg), 441-449 (F31D; 22,3 mg), 450-454 (F32D; 18,8 mg), 455-464 (F33D; 25,6 mg), 465-478 (F34D; 28,3 mg), 479-

492 (F35D; 24,8 mg), 493-504 (F36D; 1,9 mg), 505-513 (F37D; 1,0 mg), 514-528 (F38D; 1,0 mg), 529-542 (F39D; 1,0 mg), 543-560 (F40D; 2,0 mg), 564-580 (F41D; 8,0 mg), 581-585 (F42D; 1,0 mg), 586-600 (F43D; 1,0 mg), 601-612 (F44D; 1,0 mg), 613-616 (F45D; 1,0 mg), 617-625 (F46D; 3,0 mg), 626-659 (F47D; 25,0 mg) e 660-673 (F48D; 3,0 mg). Da fração F18D foi retirado o ponto de fusão: 162-164°C. As frações F18D e F41D foram enviadas para análise em RMN ^1H e ^{13}C .

A purificação dos componentes **PCFr_M** (100 mg) foi realizada utilizando-se CC de sílica gel (7,17 g) com clorofórmio-acetato de etila em eluição binária (50:50), finalizando-se a mesma com acetato de etila (100%) e por último, metanol (100%). As frações foram reunidas de acordo com a similaridade observada por CCDC. Desta forma foram reunidas 9 frações: 1-3 (F1E; 2,0 mg), 7-9 (F2E; 10,0 mg), 11-15 (F3E; 3,9 mg), 16-22 (F4E; 3,5 mg), 23-40 (F5E; 11,2 mg), 41-49 (F6E; 3,8 mg), 50-55 (F7E; 3,3 mg), 56-61 (F8E; 4,3 mg) e 63-66 (F9E; 13,8 mg). A fração *F2E* (óleo amarelo-esverdeado) foi enviada para análise em RMN ^1H e ^{13}C .

A purificação dos componentes **PAEFr_M** (100 mg) foi realizada utilizando-se CC de sílica gel (6,19 g) com clorofórmio-acetato de etila em eluição binária (50:50), finalizando-se a mesma com acetato de etila (100%) e por último, metanol (100%). As frações foram reunidas de acordo com a similaridade observada por CCDC. Desta forma foram reunidas 4 frações: 1-4 (F1F; 4,6 mg), 5-6 (F2F; 11,0 mg), 7-8 (F3F; 1,7 mg) e 15-30 (F4F; 14,2 mg). A fração *F2F* (óleo amarelo) foi enviada para análise em RMN ^1H e ^{13}C (**Fluxograma 9**).

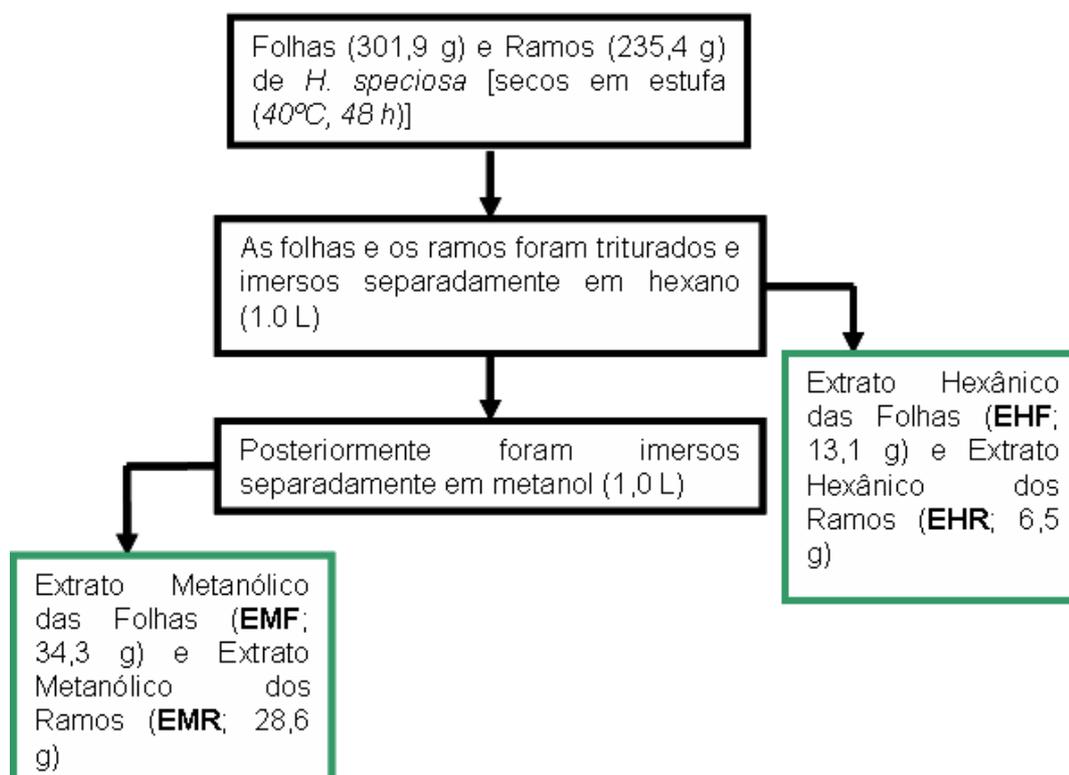
Estudo Fitoquímico de *Hancornia speciosa* Gomes



Fluxograma 9: Obtenção e purificação do extrato metanólico dos frutos maduros e secos de *Hancornia speciosa* Gomes

4.11 Obtenção dos extratos hexânicos e metanólicos das folhas e dos ramos de *Hancornia speciosa* Gomes

As folhas e os ramos secos em estufa (40°C, 48 h) foram triturados e imersos em solventes apropriados, inicialmente em hexano [folhas (301,9 g) em 1,0 L de hexano; ramos (235,4 g) em 1,0 L de hexano] e posteriormente com metanol (1,0 L), obtendo-se assim dois extratos hexânicos: um das folhas (**EHF**; 13,1 g) e outro dos ramos (**EHR**; 6,5 g) e dois extratos metanólicos um das folhas (**EMF**; 34,3 g) e outro dos ramos (**EMR**; 28,6 g) (*Fluxograma 10*).

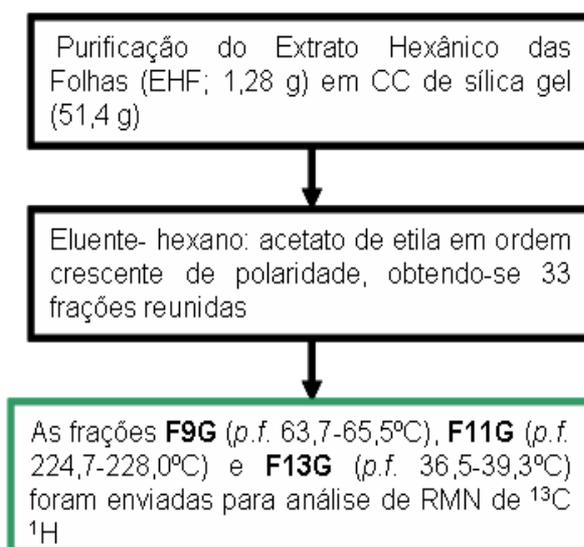


Fluxograma 10: Obtenção dos extratos hexânicos e metanólicos das folhas e dos ramos de *Hancornia speciosa* Gomes

4.12 Purificação do extrato hexânico das folhas (EHF)

Parte do extrato hexânico das folhas de *Hancornia speciosa* Gomes (1,28 g) foi purificado utilizando-se cromatografia em coluna de sílica gel (51,4 g), a pressão ambiente. A eluição da coluna iniciou-se com 100% de hexano, aumentando-se a polaridade do eluente pela adição de acetato de etila e finalizando-se com metanol. Foram coletadas 669 frações num volume de 5 mL, posteriormente reunidas em 31 grupos, com base nos seus respectivos valores de RFs, quando analisadas por CCDC. É importante mencionar que estão representadas apenas as amostras reunidas, por isso a falta de sequência relativa aos seus números de frações.

Desta forma foram reunidas 31 frações: 30-102 (F1G; 19,0 mg); 103-112 (F2G; 1,0 mg); 113-140 (F3G; 1,7 mg); 139-164 (F4G; 0,5 mg); 165-184 (F5G; 0,7 mg); 185-200 (F6G; 0,3 mg); 201-216 (F8G; 1,1mg); 222-225 (F9G; 70,1mg); 240-255 (F10G; 13,0mg); 258-273 (F11G; 13,8 mg); 276-294 (F12G; 11,6 mg); 300-315 (F13G; 37,3mg); 316-333 (F14G; 78,8 mg); 334-355 (F15G; 128,6 mg); 356-374 (F16G; 17,9mg); 375-383 (F17G; 4,5 mg); 385-409 (F18G; 18,4 mg); 410-425 (F19G; 28,8 mg); 426-450 (F20G; 27,4 mg); 451-460 (F21G; 7,0 mg); 461-476 (F22G; 9,0 mg); 477-498 (F23G; 32,8 mg); 499-545 (F24G; 25,2 mg); 546-549 (F25G; 1,2 mg); 550-566 (F26G; 26,9 mg); 567-585 (F27G; 12,4mg); 586-601 (F28G; 8,5 mg); 602-619 (F29G; 26,8 mg); 620-660 (F30G; 18,8 mg); 661-669 (F31G; 26,0 mg). Finalizou-se a coluna com 100% de acetato de etila: 670 (F32G; 58,2 mg) e em seguida com 100% de metanol: 671 (F33G; 163,9 mg). As frações F9G (*p.f.* 63,7-65,5°C), F11G (*p.f.* 224,7-228,0°C) e F13G (*p.f.* 36,5-39,3°C) foram enviadas para análise de RMN de ^1H e ^{13}C (**Fluxograma 11**).



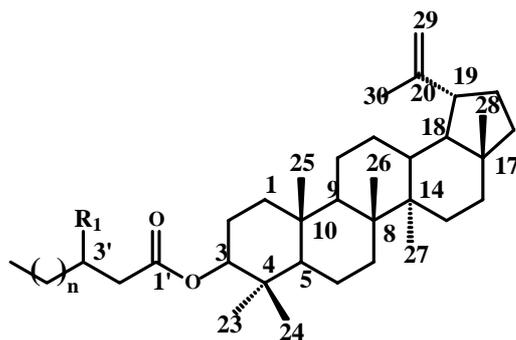
Fluxograma 11: Purificação do extrato hexânico das folhas (EHF) de *Hancornia speciosa* Gomes

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 SUBSTÂNCIAS OBTIDAS DE *HANCORNIA SPECIOSA* GOMES

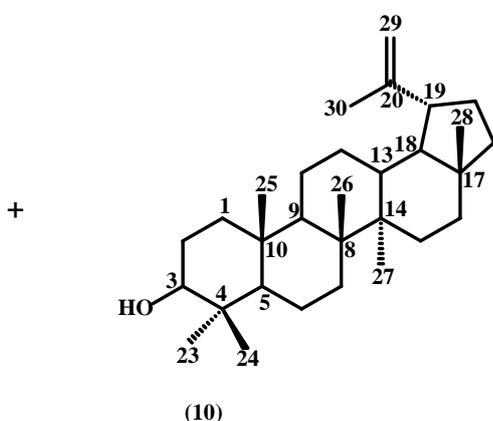
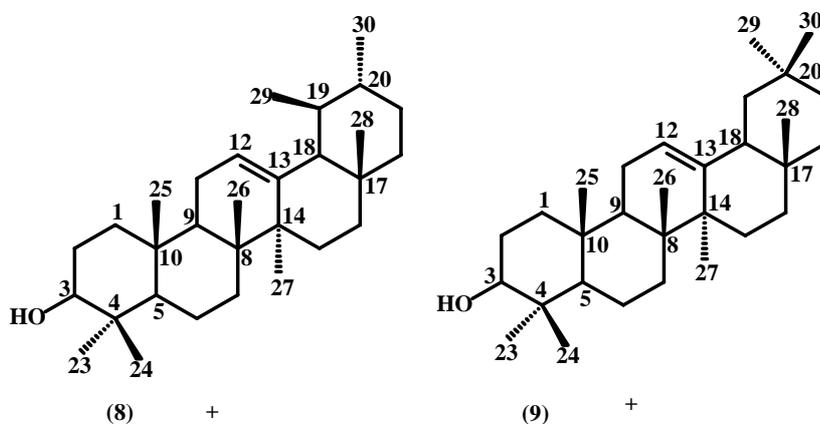
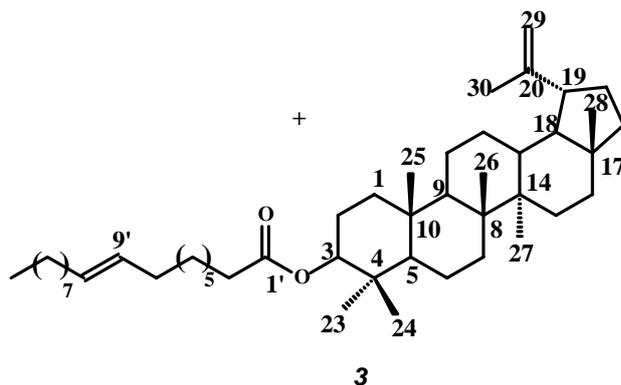
O estudo químico do extrato clorofórmico do látex dos frutos verdes, das partições hexânicas dos frutos maduros e secos e das folhas permitiu o isolamento das seguintes substâncias:

Estudo Fitoquímico de *Hancornia speciosa* Gomes

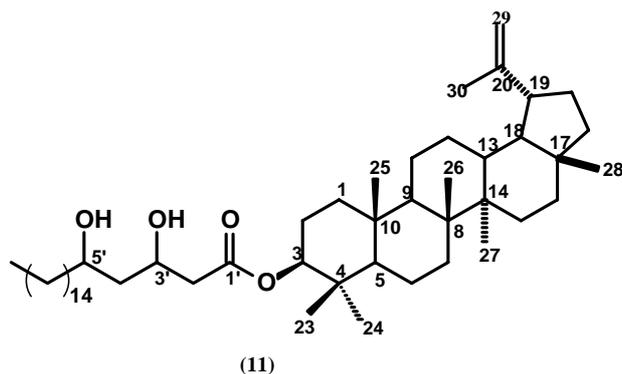


$R_1=H$ $n=12$ (1), 14 (4)
 $R_1=OH$ $n=12$ (2), 14 (5), 16 (6), 18 (7)

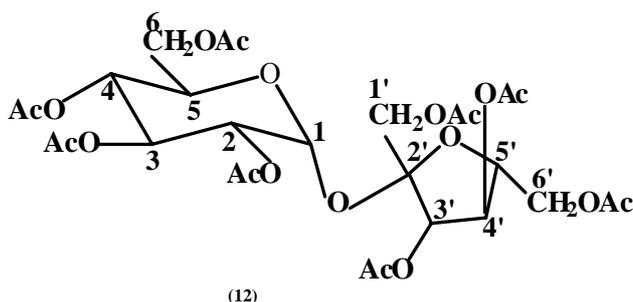
Fração **F1A** (603,7 mg) e **F13G** (37,3 mg) *pf* (55,1-55,9 °C), sólido branco amorfo, isoladas respectivamente do extrato clorofórmico do látex dos frutos (**ECLFr**) e da partição hexânica das folhas (**EHF**)



Fração **F4A*** (354,9 mg) e **F18**D** (126,9 mg) *pf* (112,6-114,5* e 162-164** °C), sólido branco cristalino, isoladas respectivamente do extrato clorofórmico do látex dos frutos (**ECLFr**) e da partição hexânica dos frutos maduros e secos (**PHFrM**)



Fração **F12A** (132,0 mg) *pf* (83-85 °C), sólido branco cristalino, isolada do extrato clorofórmico do látex dos frutos (**ECLFr**)



Fração **F12B** (30,6 mg), óleo amarelo, isolada do extrato metanólico acetilado dos frutos verdes e sem látex (**EMFrV**)

5.2 Identificação Estrutural das substâncias 1, 2, 3, 4, 5, 6 e 7

As substâncias 1, 4, 3, 4, 5, 6 e 7 foram obtidas como uma mistura isoladas através do fracionamento do extrato clorofórmico do látex dos frutos verdes (**ELFr**) de *Hancornia speciosa* Gomes como um sólido branco amorfo (F1A; 603,7 mg). A identificação foi baseada na análise dos dados espectrais de **RMN 1D** (^1H , ^{13}C , **DEPT 135**), **CG-EM, IV** e comparação com dados da literatura.

No espectro de absorção na região do infravermelho (**IV**) (**Figura 19**), destacaram-se as bandas referentes à: O-H ν 3486 cm^{-1} ; $-\text{CH}_3$ ν 2930 cm^{-1} ; $-\text{CH}_2$ ν 2854 cm^{-1} ; carbonila de éster em ν 1726 cm^{-1} ; C=C ν 1708 cm^{-1} e $(\text{CH}_2)_n$ ν 718 cm^{-1} .

A análise dos sinais no espectro de RMN ^1H (**Tabela 6, Figura 20 e 21**) mostrou a presença de sete singletos referentes às metilas de esqueleto

do tipo lupânico em δ 0,85; 1,03; 0,84; 0,88; 0,94; 0,79 ppm, correspondentes às metilas angulares em C-23, C-24, C-25, C-26, C-27, C-28, respectivamente, e uma metila em δ 1,68 ppm (**Figura 22**), correspondendo à metila vinílica em C-30. A presença de um multipletto em δ 2,52-2,32 ppm (**Figura 23**) referente ao hidrogênio do C-19. A presença de um multipletto em δ 4,57-4,52 ppm (**Figura 23**), indica a presença de diferentes grupos acila ligados ao átomo de carbono carbinólico em C-3. Os hidrogênios da posição C-29 (dupla terminal) foram evidenciados pela presença de um multipletto em δ 4,57-4,52 ppm referente ao H-29a, e um dubleto em δ 4,69 ppm (1H, $J = 2,0$ Hz) referente ao H-29b (**Figura 23**). Além destes sinais foi observado, um singleto largo em δ 1,25 ppm (**Figura 22**) relativo aos hidrogênios metilênicos da porção acila ligada ao carbono carbinólico em C-3.

Em relação ao espectro de RMN ^{13}C totalmente desacoplado (**Tabela 6 e Figura 24**) e DEPT (90° e 135°) (**Tabela 6 e Figura 26**), foi observado sinais característicos de esqueletos do tipo lupânico em δ 81,4; 48,0; 150,9 e 109,4 ppm, referentes aos carbonos: C-3, C-19, C-20 e C-29 respectivamente. Além destes valores que caracterizam o esqueleto do Lupeol, valores em δ 172, 9 ppm, referente ao carbono C-1', característico de uma carbonila do tipo éster e em δ 68,2 ppm (**Figura 25**), relativo ao carbono C-3', contendo um grupo hidroxila, mostrando que ésteres hidroxilados estão também presentes na fração **1A**.

Finalmente, baseado nestes dados experimentais e comparando-os com os da literatura ^[37,38], concluímos que se tratava de uma mistura de ésteres 3- β -O-acil lupeol (**Figura 28**).

Os grupos acila nos ésteres foram identificados também através de análise por CG-EM dos ésteres metílicos preparados pela reação de transesterificação em HCl/MeOH do produto natural (**Figura 16**). Os espectros de massas (**Figura 29, Anexo A**) dos 7 principais picos observados no cromatograma (**Figura 30**) foram analisados a partir dos íons característicos: m/z 74 e 87 e m/z 103 (**Figura 31**) usados para caracterizar as porções acila (**Tabela 7**). Na ausência do íon molecular para ésteres

derivados de ácidos graxos contendo um grupo hidroxila em C-3' utilizou-se o íon [M-18] correspondente a perda de uma molécula de água.

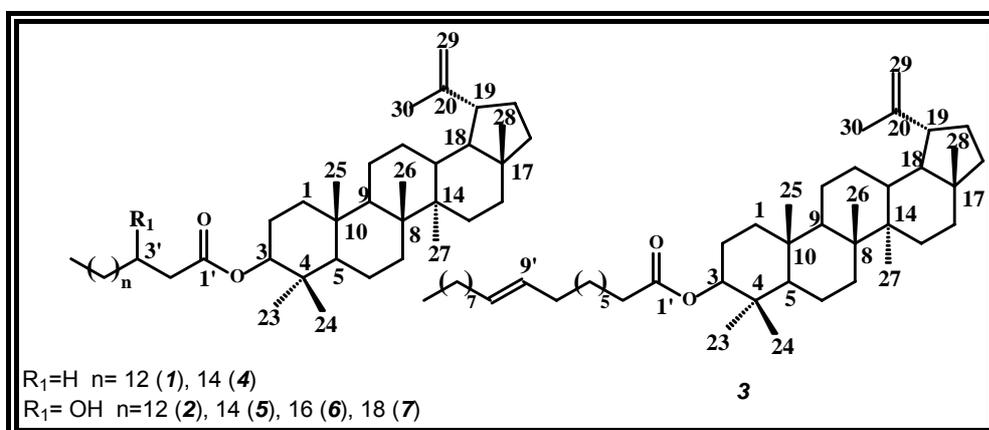
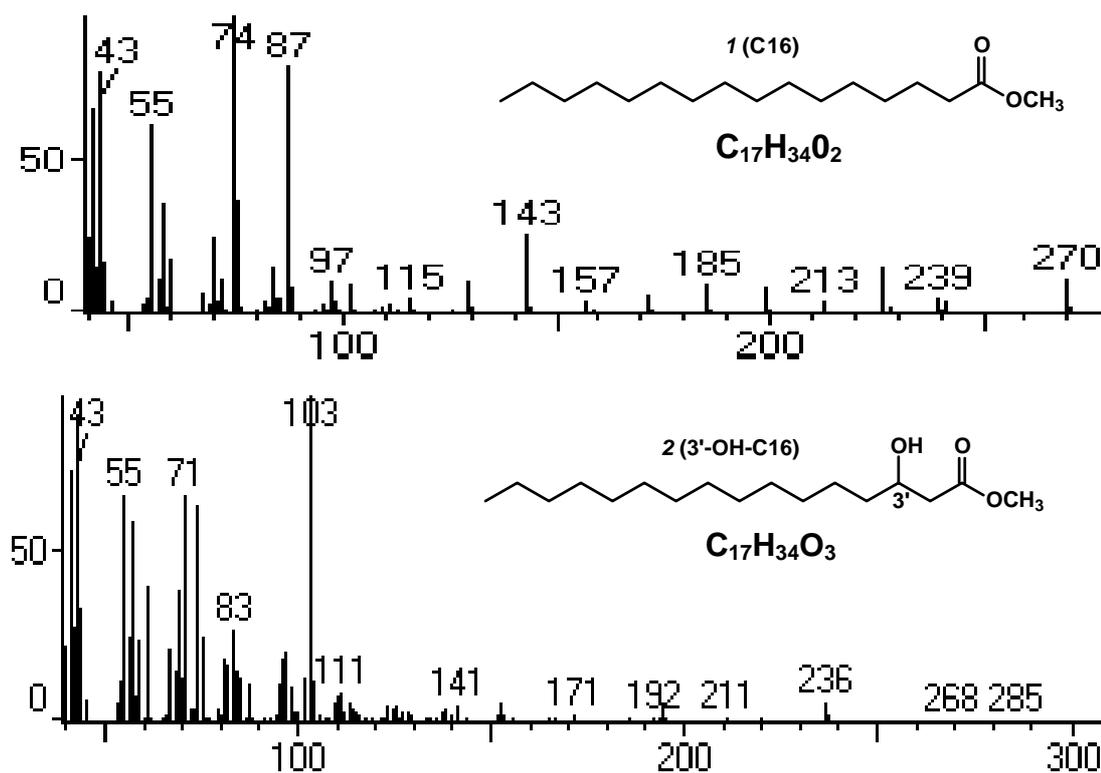
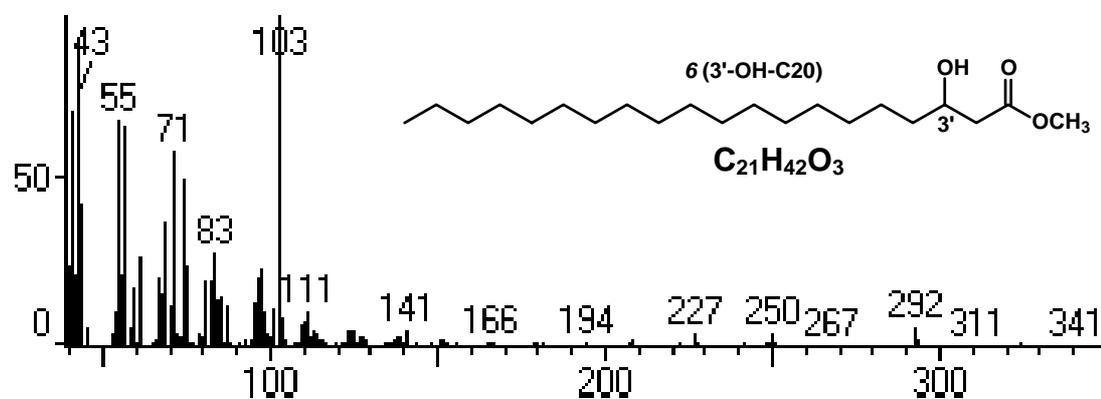
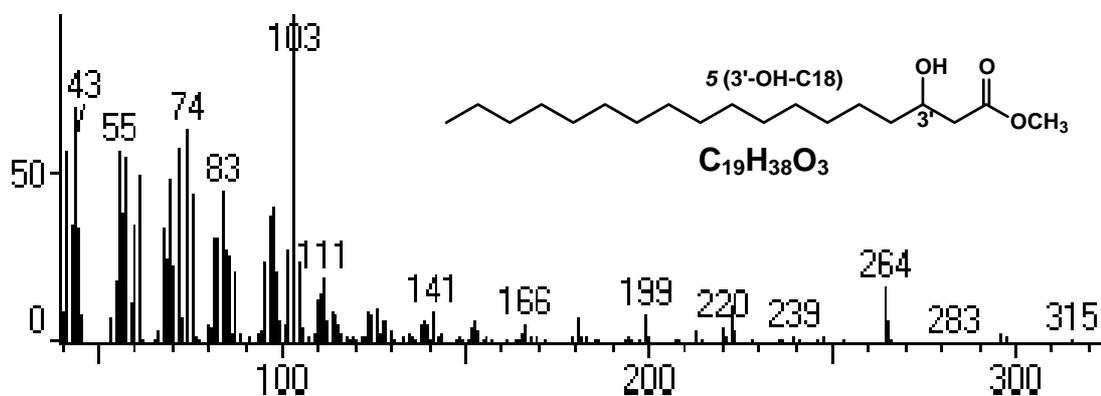
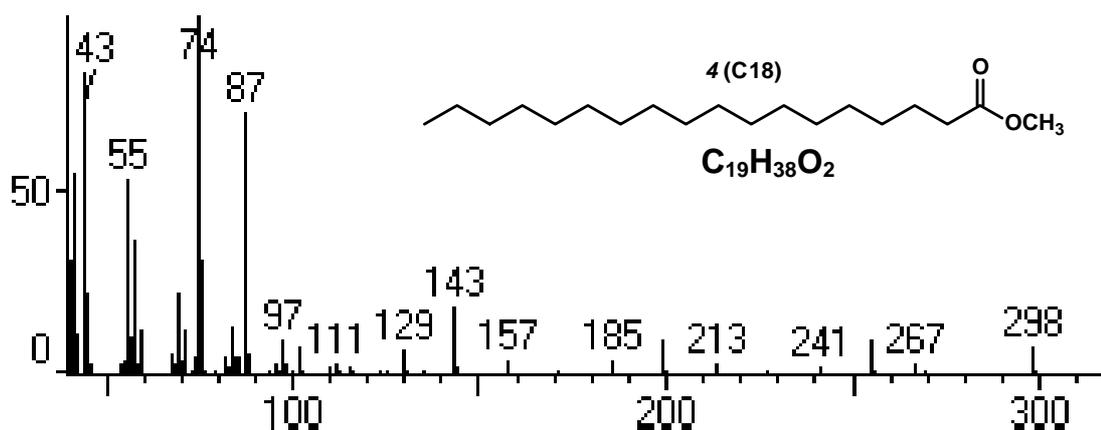
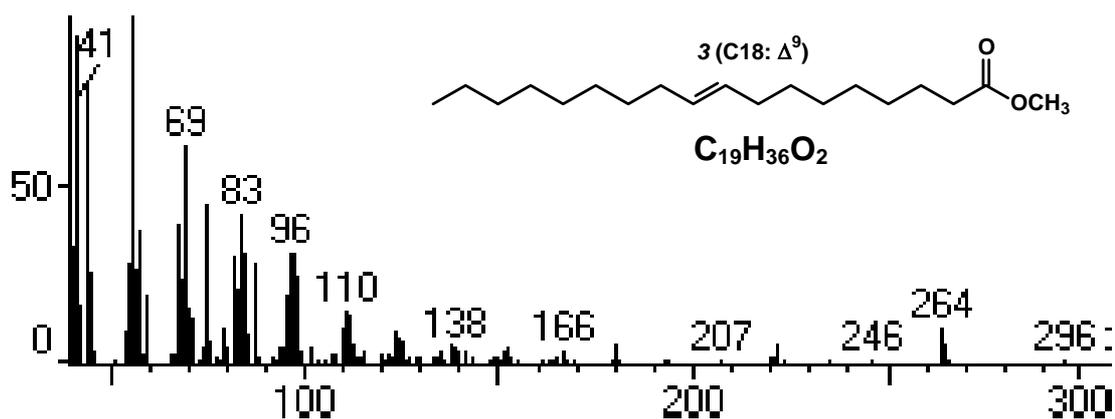


Figura 28: Mistura de ésteres 3-β-O-acil lupeol isolados do extrato clorofórmico do látex dos frutos verdes de *Hancornia speciosa* Gomes



Estudo Fitoquímico de *Hancornia speciosa* Gomes



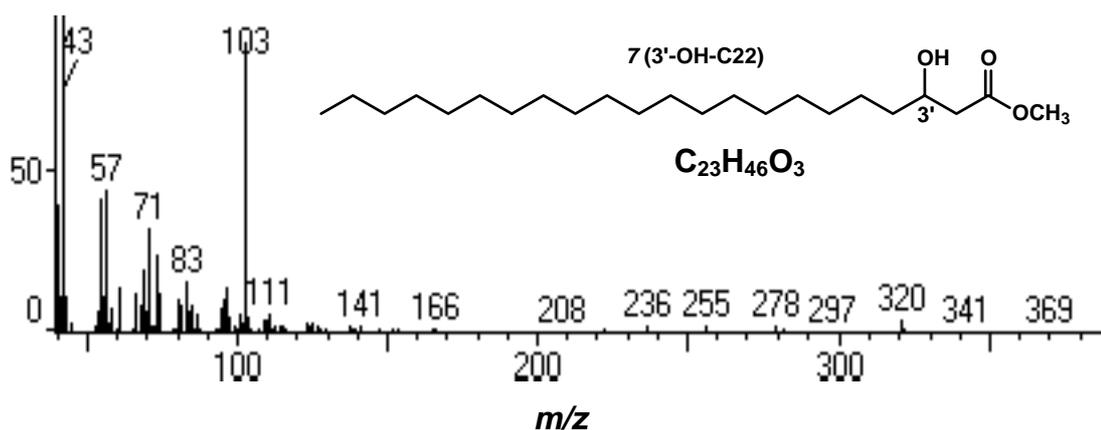


Figura 29: Espectros de massas dos ésteres metílicos identificados por CG-EM

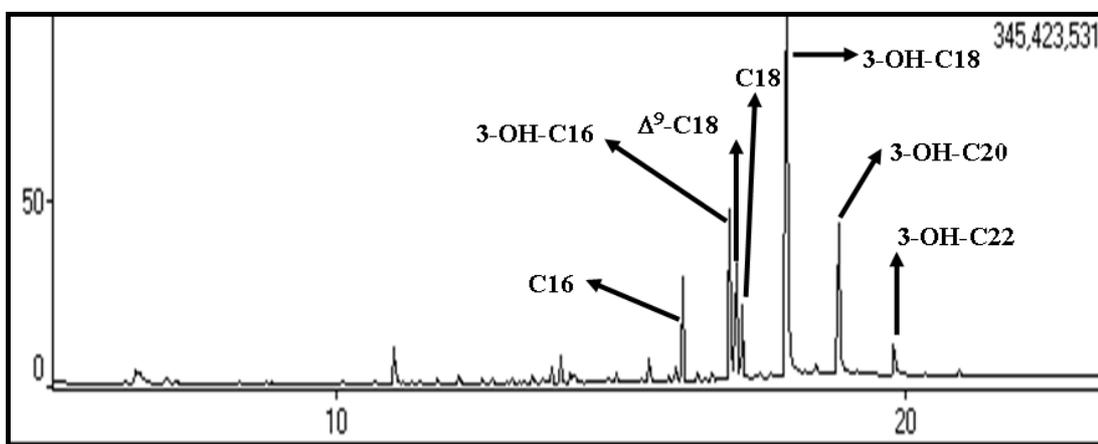


Figura 30: Cromatograma (CG-EM) dos ésteres metílicos obtidos após hidrólise da mistura de ésteres 3-β-O-acil do lupeol

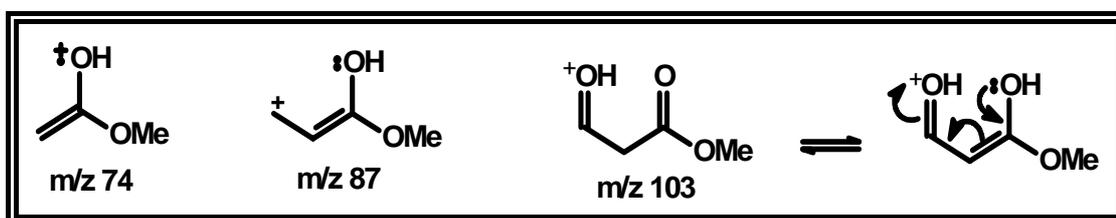


Figura 31: Principais íons característicos utilizados na análise dos ésteres metílicos: m/z 74 e 87 e m/z 103

Tabela 7: Identificação dos ésteres metílicos (*F1A*) a partir dos dados de CG-EM após hidrólise da mistura de ésteres 3- β -O- acil lupeol

Composto	CG		EM (M^+)	
	Tempo de retenção (min)	Abundância relativa (%)	<i>m/z</i>	Intensidade relativa (%)
1 (C16)	16,080	7,82	270	11,43
2 (3'-OH-C16)	16,907	11,80	286	0,08
3 (C18: Δ^9)	17,027	10,92	296	1,87
4 (C18)	17,133	5,00	298	7,36
5 (3'-OH-C18)	17,920	28,54	314	0,28
6 (3'-OH-C20)	18,827	14,16	342	0,03
7 (3'-OH-C22)	19,800	2,27	370	0,04

Com base nos dados espectrais (RMN 1H e ^{13}C) e na reação de transesterificação com posterior análise por CG-EM obtidos na determinação estrutural do ésteres do triterpeno lupeol presentes na mistura, sugerimos as estruturas destes compostos como sendo: 3- β -O-hexadecanoato de lupeóila (**1**), 3- β -O-3'-hidroxihexadecanoato de lupeóila (**2**), 3- β -O-9-octadecenoato de lupeóila(**3**), 3- β -O-octadecanoato de lupeóila (**4**), 3- β -O-3'-hidroxioctadecanoato de lupeóila (**5**) 3- β -O-3'-hidroxiicosanoato de lupeóila (**6**) e 3- β -O-3'- hidroxidocosanoato de lupeóila (**7**) (**Figura 32**).

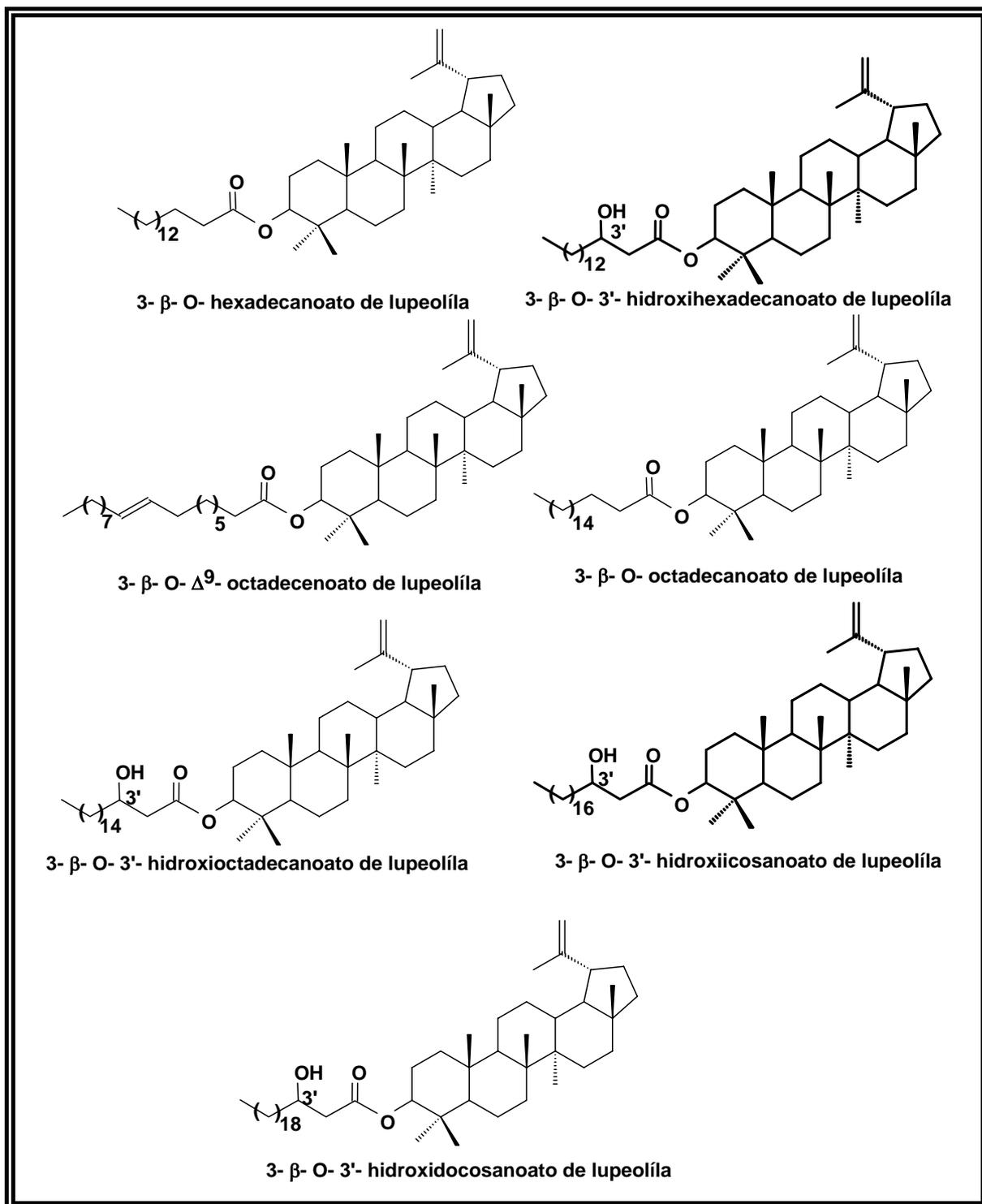


Figura 32: Ésteres 3-β-O-acil lupeol isolados do extrato clorofórmico do látex dos frutos verdes de *Hancornia speciosa* Gomes

A fração 13G obtida a partir da coluna cromatográfica do purificação do extrato hexânico das folhas (EHF) de *Hancornia speciosa*, foi identificada como sendo também uma mistura de ésteres 3-β-O-acil lupeol (**Figura 28**). A identificação foi baseada na análise dos dados espectrais (RMN ¹H, ¹³C, DEPT e IV) e comparação com dados da literatura [37,38]. Devido a pequena quantidade isolada (37,3 mg) e a impossibilidade de se resolar estas substâncias, os grupos acila nos ésteres não puderam ser identificados através de análise por CG-EM dos ésteres metílicos preparados pela reação de transesterificação em HCl/MeOH.

Tabela 6: Dados de RMN ¹H (CDCl₃, 500 MHz) e ¹³C (CDCl₃, 125,7 MHz) das substâncias 1, 2, 3, 4, 5, 6 e 7 (F1A)

Carbono	δ _C (ppm)	δ _H (ppm)*,1	DEPT
1	38,3	--	CH ₂
2	23,7	--	CH ₂
3	81,4 [#]	4,57-4,52 (m)	CH
4	37,8	--	C _O
5	55,4	--	CH
6	18,2	--	CH ₂
7	34,2	--	CH ₂
8	40,8	--	C _O
9	50,3	--	CH
10	37,7	--	C _O
11	20,9	--	CH ₂
12	25,1	--	CH ₂
13	38,0	--	CH
14	42,8	--	C _O
15	27,4	--	CH ₂
16	35,5	--	CH ₂
17	43,0	--	C _O
18	48,3	--	CH
19	48,0	2,52-2,32 (m)	CH
20	150,9 [#]	--	C _O
21	29,8	--	CH ₂
22	40,0	--	CH ₂
23	28,0	0,85 (s)	CH ₃
24	15,9	1,03 (s)	CH ₃
25	16,1	0,84 (s)	CH ₃

Estudo Fitoquímico de *Hancornia speciosa* Gomes

26	16,6	0,88 (s)	CH ₃
27	14,5	0,94 (s)	CH ₃
28	18,0	0,79 (s)	CH ₃
29a	109,4 [#]	4,57-4,52 (m)	CH ₂
29b	109,4 [#]	4,69 (d, J= 2,0)	CH ₂
30	19,3	1,68 (s)	CH ₃
1'	172,9 [#]	--	C _o
2'	41,6	2,34-2,29 (m)	CH ₂
3'	68,2 [#]	1,25 (sl)	CH
4'	36,5	1,25 (sl)	CH ₂
5'	25,5	1,25 (sl)	CH ₂
6'	29,7-29,4	1,25 (sl)	CH ₂
7'	29,7-29,4	1,25 (sl)	CH ₂
8'-17'	29,7-29,4	1,25 (sl)	CH ₂
18'	31,9	1,25 (sl)	CH ₂
19'	22,7	1,25 (sl)	CH ₂
20'	14,1	0,92 (sl)	CH ₃

¹ Os valores em parênteses representam a multiplicidade e as constantes de acoplamento em Hz, respectivamente.

* Os espaços em branco correspondem aos sinais que não puderam ser identificados no espectro, por apresentarem deslocamentos químicos de hidrogênio muito próximos.

[#] Valores de deslocamentos químicos característicos que permitiram a identificação das substâncias 1, 2, 3, 4, 5, 6 e 7.

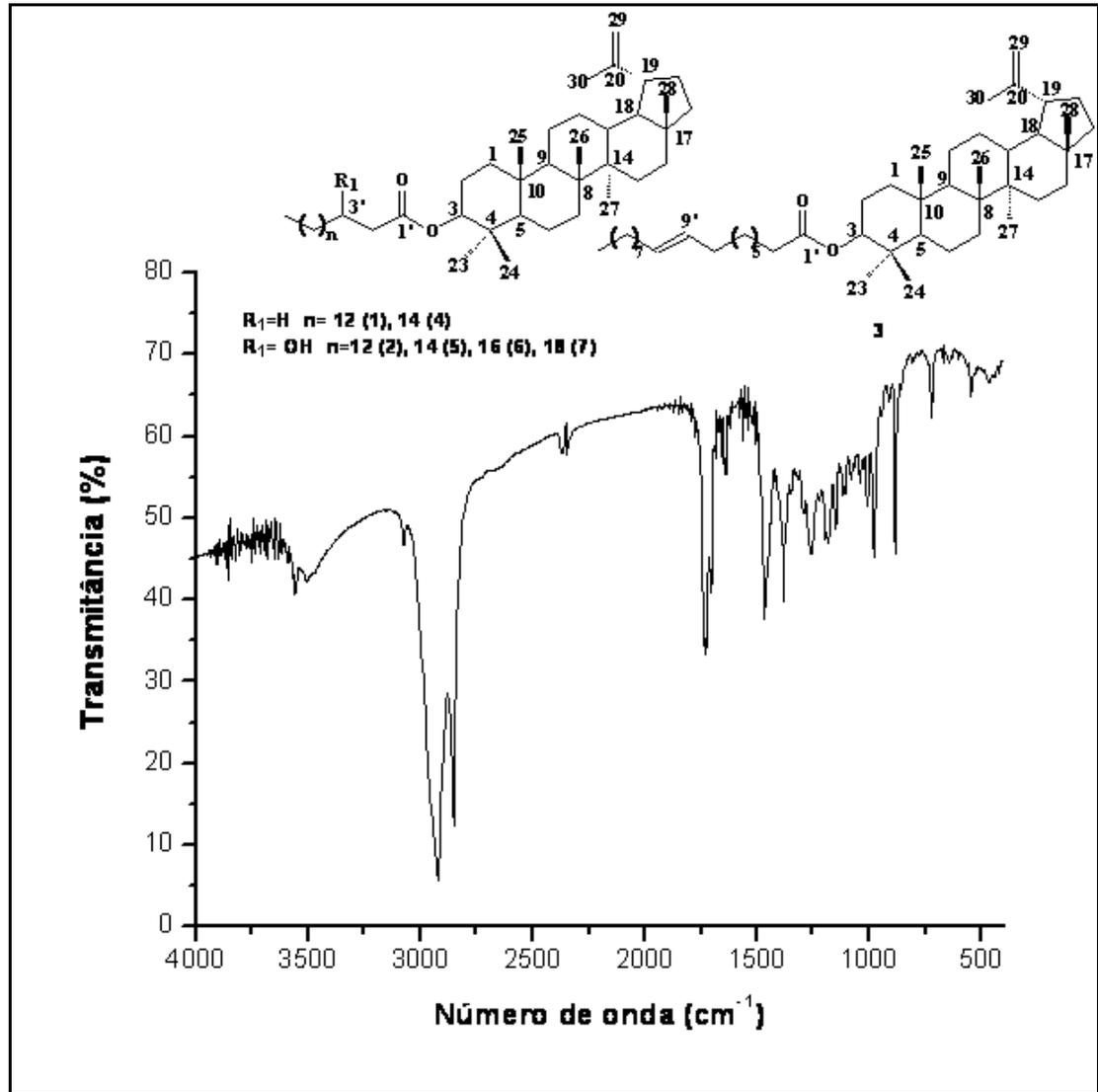


Figura 19: Espectro de absorção na região do infravermelho (IV) (pastilha de KBr) das substâncias 1, 2, 3, 4, 5, 6 e 7

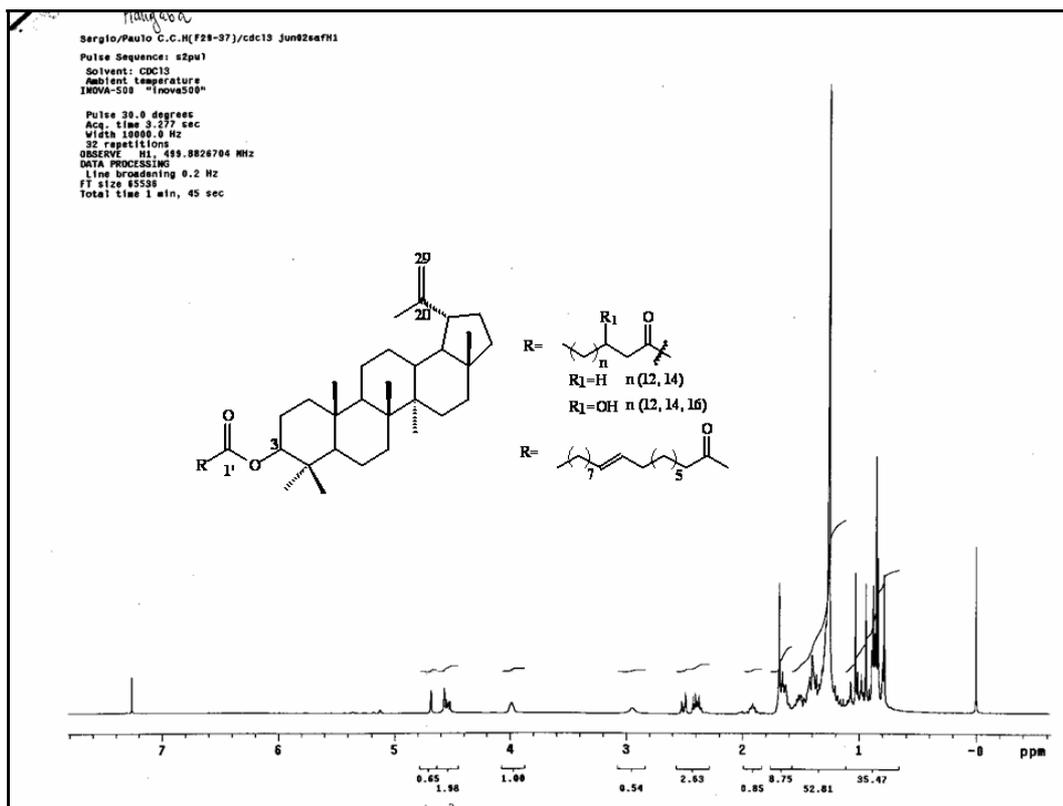


Figura 20: Espectro de RMN ¹H das substâncias 1, 2, 3, 4, 5, 6 e 7 (CDCl₃, 500 MHz)

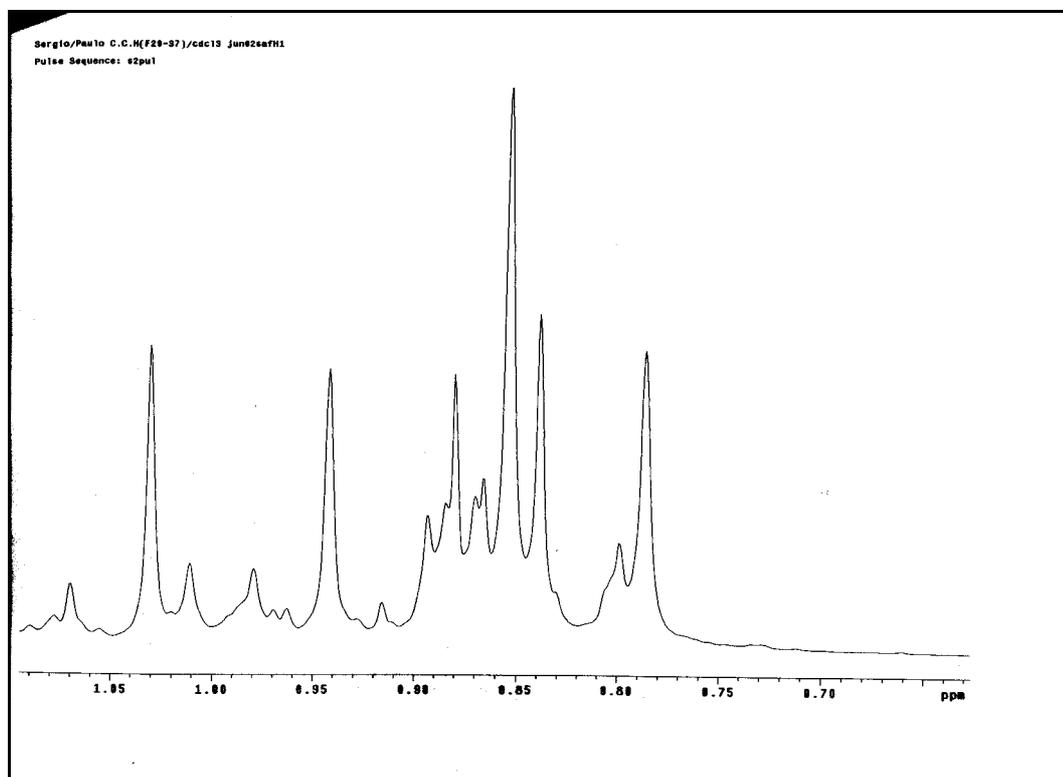


Figura 21: Ampliação do espectro de RMN ¹H das substâncias 1, 2, 3, 4, 5, 6 e 7 (CDCl₃, 500 MHz)

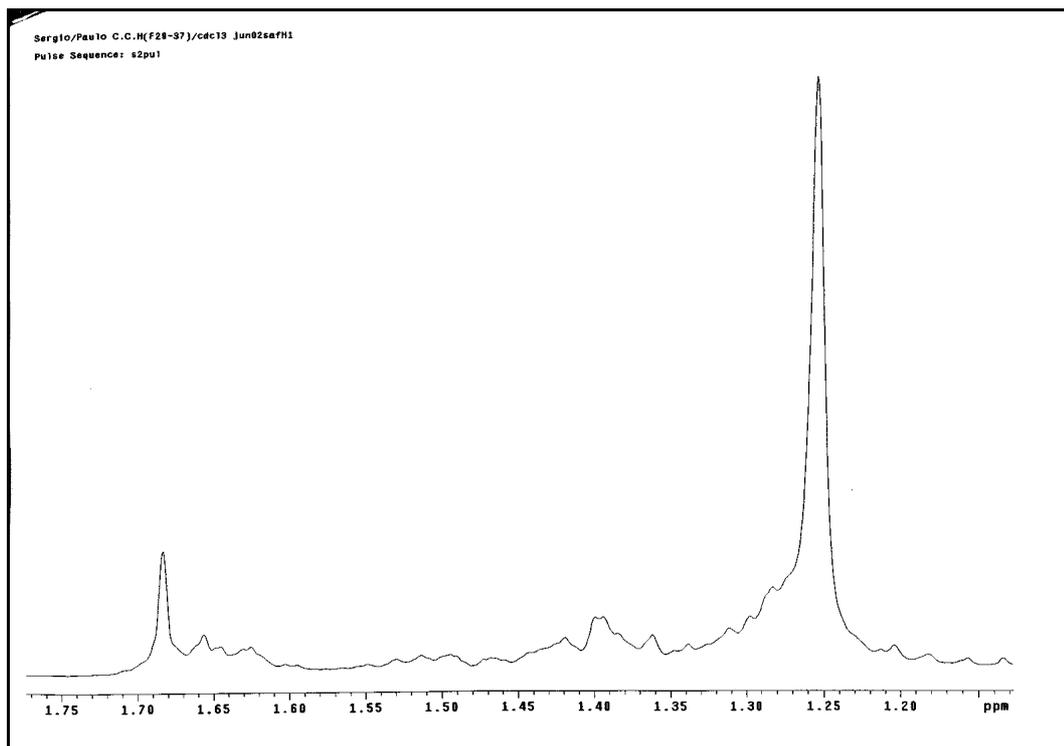


Figura 22: Ampliação do espectro de RMN ^1H das substâncias 1, 2, 3, 4, 5, 6 e 7 (CDCl_3 , 500 MHz)

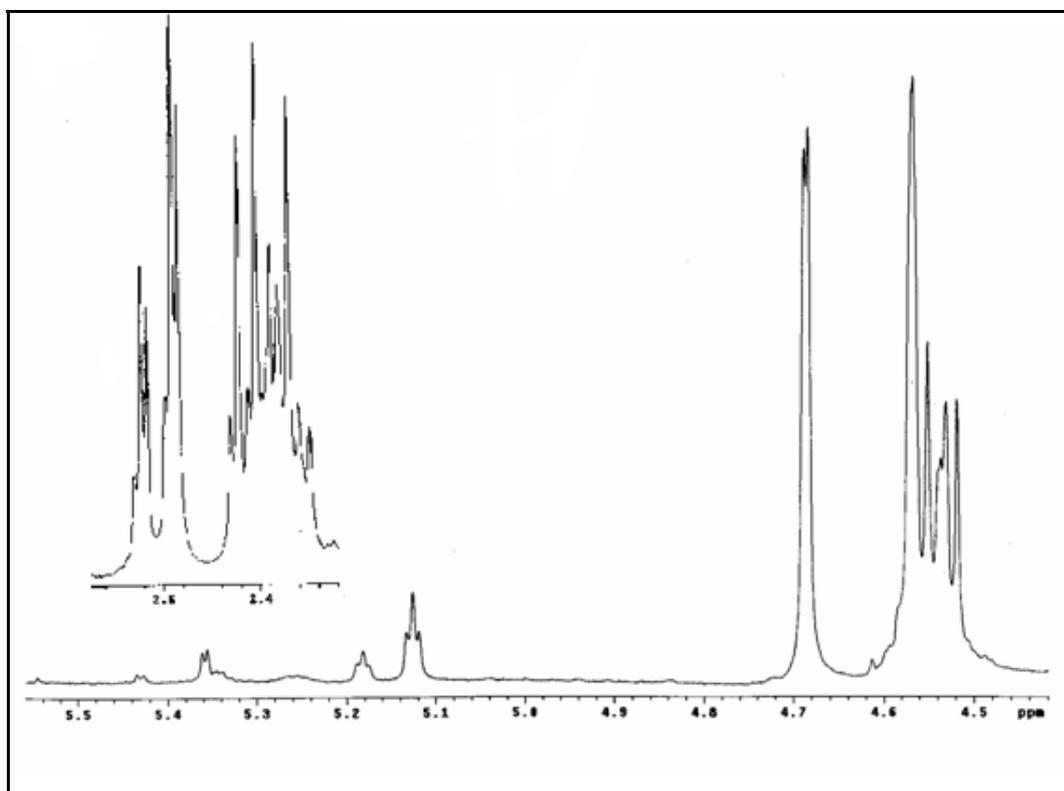


Figura 23: Ampliação do espectro de RMN ^1H das substâncias 1, 2, 3, 4, 5, 6 e 7 (CDCl_3 , 500 MHz)

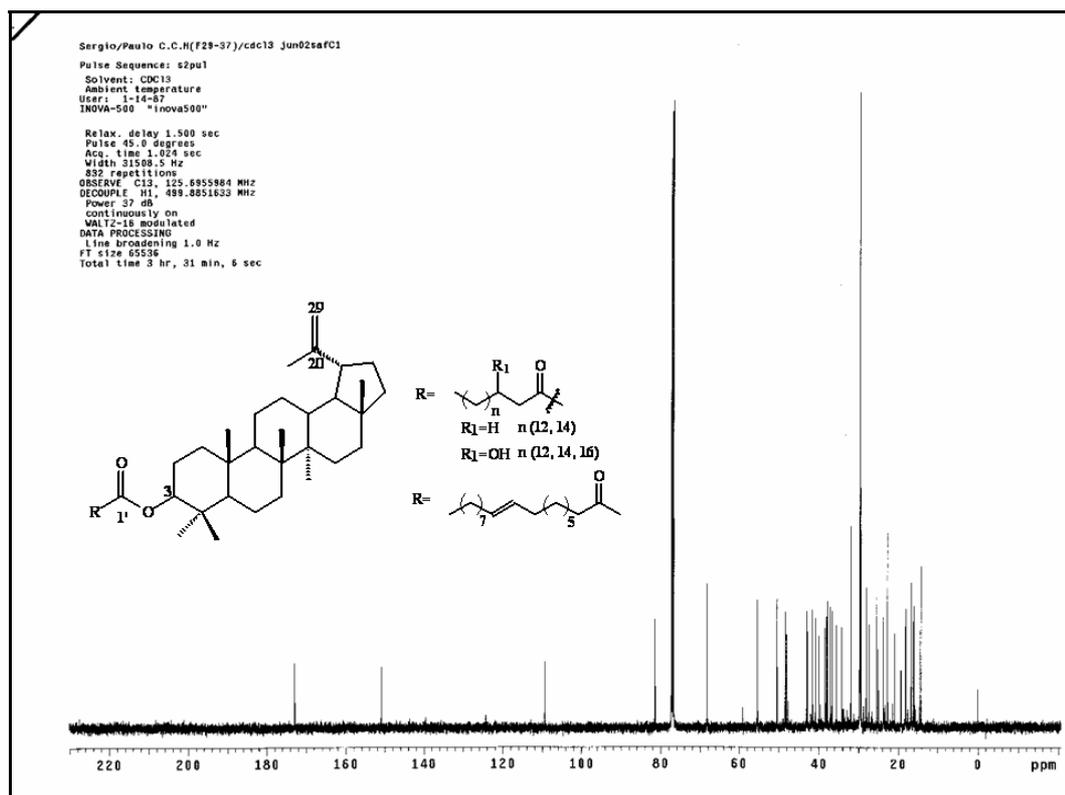


Figura 24: Espectro de RMN ^{13}C das substâncias 1, 2, 3, 4, 5, 6 e 7 (CDCl_3 ; 125,7 MHz)

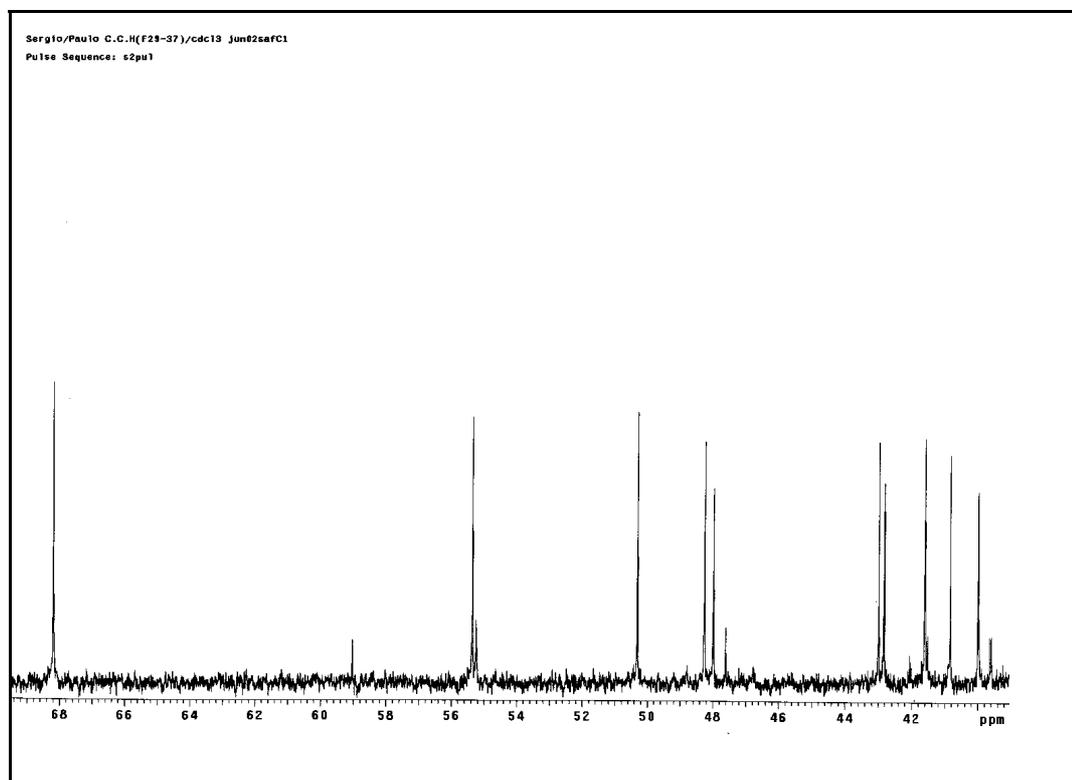


Figura 25: Ampliação do espectro de RMN ^{13}C das substâncias 1, 2, 3, 4, 5, 6 e 7 (CDCl_3 ; 125,7 MHz)

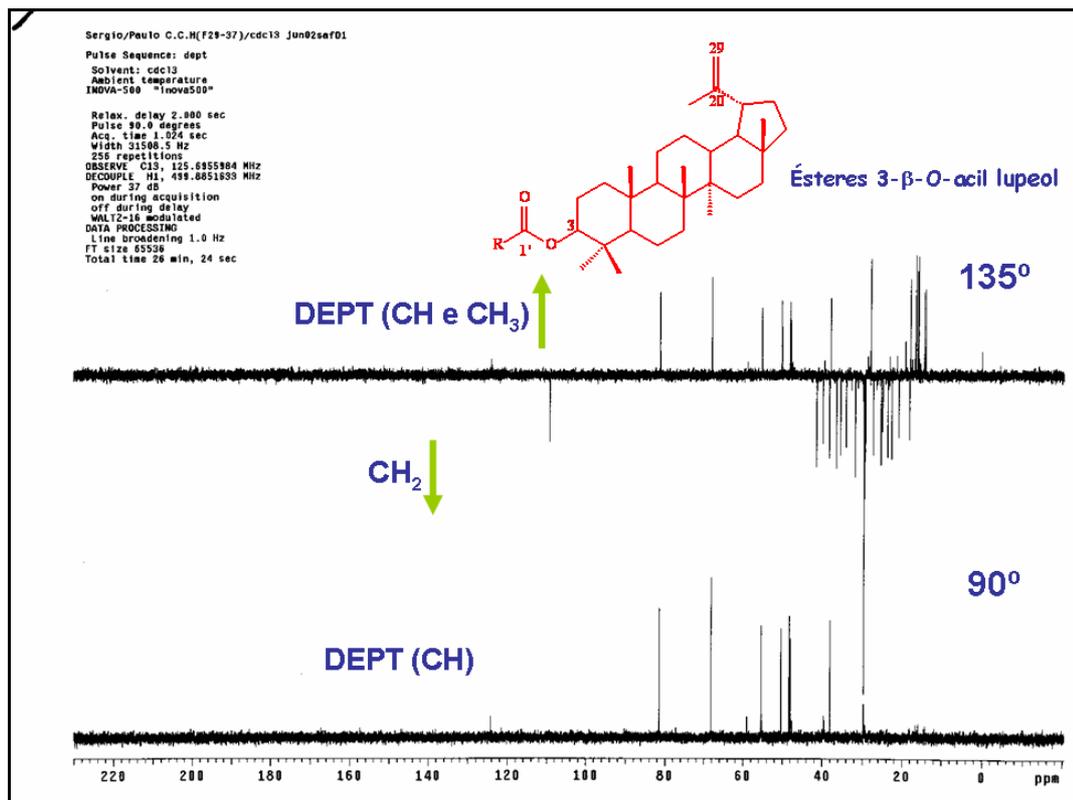


Figura 26: Experimento *DEPT* 135° e 90° das substâncias 1, 2, 3, 4, 5, 6 e 7

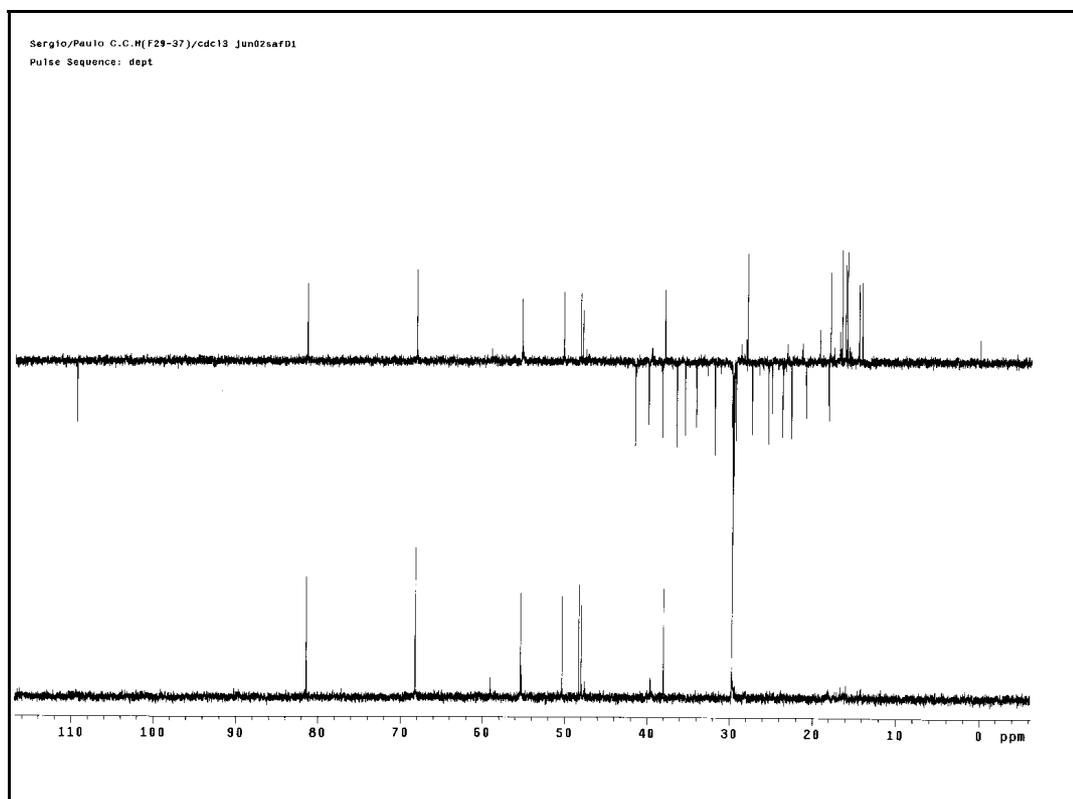


Figura 27: Ampliação do experimento *DEPT* 135° e 90° das substâncias 1, 2, 3, 4, 5, 6 e 7

5.3 Identificação Estrutural das substâncias 8,9 e 10

As substâncias 8, 9 e 10 foram obtidas como uma mistura isolada através do fracionamento do extrato clorofórmico do látex dos frutos verdes de *Hancornia speciosa* Gomes, sendo obtida como um sólido cristalino branco (F4A; 354,9 mg). A identificação foi baseada na análise dos dados espectrais de RMN 1D (^1H , ^{13}C , DEPT 135), IV e comparação com dados da literatura.

No espectro de absorção na região do infravermelho (IV) (Figura 33), destacaram-se as bandas referentes à: O-H ν 3410 cm^{-1} ; $-\text{CH}_3$ ν 2936 cm^{-1} ; $-\text{CH}_2$ ν 2876 cm^{-1} e sinais em ν 1704 e 1652 cm^{-1} referentes à presença de ligação dupla.

A grande incidência de sinais na região entre δ 1,54 e 0,73 ppm referente ao deslocamento químico de hidrogênios do tipo olefínicos e carbinólicos (Tabelas 8 e 9; Figuras 34 e 35), indicou a presença de uma mistura de triterpenos.

Triterpenos são facilmente encontrados na natureza e quando se utilizam as técnicas cromatográficas usuais, raramente consegue-se o isolamento destes triterpenos puros, sendo estes, portanto, obtidos quase sempre na forma de misturas de difícil resolução. A literatura ainda relata que misturas triterpênicas desta classe são frequentemente tidas como substâncias puras sendo seu fracionamento considerado inviável [69].

Continuando a análise dos dados de hidrogênio do espectro de RMN ^1H (Tabela 8 e 9; Figura 34), observou-se dois tripletos de hidrogênios vinílicos centrados em δ 5,19 ppm (1H, $J= 3,50$ Hz) e 5,13 ppm (1H, $J= 3,50$ Hz) integrando para um hidrogênio (C-12) (Figura 36), além dos sinais dos hidrogênios carbinólicos (C-3) em 3,25-318 ppm (1H, m) (Figura 37).

Em relação à análise dos dados de carbonos do espectro de RMN ^{13}C (Tabela 8 e 9; Figura 38) e DEPT (90° e 135°) (Tabela 8 e 9; Figura 41), foi observado sinais em δ 124,4; 139,5; 39,6; 39,6 e 17,4 ppm, referentes aos carbonos C-12, C-13, C-19, C-20 e C-29 respectivamente para a α -amirina (8) e sinais em δ 121,7; 145,2; 46,8; 31,1 e 33,3 ppm, referentes aos

carbonos C-12, C-13 C-19, C-20 e C-29 respectivamente para a β - amirina (**9**) (**Figuras 39 e 40**).

No caso do lupeol (**10**), que é um triterpeno pertencente à classe dos lupanos. A análise dos sinais do espectro de RMN ^1H (**Tabela 10 e Figura 34**) mostrou a presença de sete singletos, seis deles referentes às metilas de esqueleto lupânico em δ 0,77; 0,84; 0,97; 1,02; 0,95; 0,80 ppm (**Figura 35**), correspondentes às metilas angulares em C-23, C-24, C-25, C-26, C-27, C-28, respectivamente, e uma em δ 1,69 ppm (**Figura 35**) correspondendo à metila vinílica em C-30. A presença de um multipletto em δ 3,25-3,18 ppm (**Figura 37**), refere-se ao hidrogênio carbinólico em C-3. A presença de um triplo dubleto em δ 2,38 ppm referente ao hidrogênio do C-19 (**Figura 37**). Os hidrogênios da posição C-29 (dupla terminal) foram evidenciados pela presença de um duplo dubleto em δ 4,57 ppm (1H, $J= 2,5$ e 1,0 Hz) referente ao H-29a, e um dubleto em δ 4,69 ppm (1H, $J= 2,5$ Hz) referente ao H-29b (**Figura 36**).

Em relação ao espectro de RMN ^{13}C totalmente desacoplado (**Tabela 10 e Figura 38**) e DEPT (90° e 135°) (**Tabela 10 e Figura 41**), foi observado sinais em δ 78,9; 47,9; 150,9 e 109,3 ppm referentes aos carbonos C-3, C-19, C-20 e C-29 respectivamente, comprovando com mais precisão a presença deste triterpeno nesta mistura. Sendo assim, a elucidação estrutural para a fração **4A** indicou a presença de uma mistura de triterpenos contendo α -, β -amirina (**8 e 9**, respectivamente) e Lupeol (**10**) (**Figura 42**) [70-72].

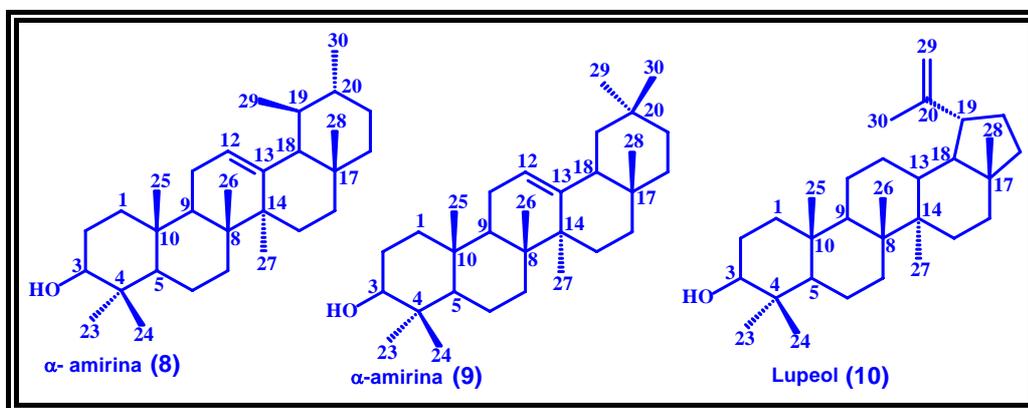


Figura 42: Mistura de triterpenos pentacíclicos isolados do látex dos frutos verdes de *Hancornia speciosa* Gomes

A fração *18D* obtida a partir da coluna cromatográfica de purificação da partição hexânica dos frutos maduros e secos (**PHFrM**) de *Hancornia speciosa* Gomes, foi identificada também como sendo uma mistura de triterpenos pentacíclicos: α -amirina (**8**), β -amirina (**9**) e lupeol (**10**) (**Figura 42**). A identificação foi baseada na análise dos dados espectrais (**RMN ^1H , ^{13}C , DEPT 90° e 135° e IV**) e comparação com dados da literatura ^[70-72].

Tabela 8: Dados de RMN ^1H (CDCl_3 , 500 MHz) e ^{13}C (CDCl_3 , 125,7 MHz) da substância 8 na mistura de triterpenos (F4A)

Carbono	δ_{C} (ppm)	δ_{H} (ppm)*, ¹	DEPT
1	38,7	--	CH ₂
2	27,2	--	CH ₂
3	79,0 [#]	3,25-318 (m)	CH
4	38,8	--	C _O
5	55,1	--	CH
6	18,3	--	CH ₂
7	32,9	--	CH ₂
8	39,7	--	C _O
9	47,7	--	CH
10	36,8	--	C _O
11	23,3	--	CH ₂
12	124,4 [#]	5,13 (t, J= 3,50)	CH
13	139,5 [#]	--	C _O
14	42,0	--	C _O
15	28,1	--	CH ₂
16	26,5	--	CH ₂
17	33,7	--	C _O
18	59,0	--	CH
19	39,6 [#]	--	CH
20	39,6 [#]	--	CH
21	31,2	--	CH ₂
22	41,5	--	CH ₂
23	28,1	--	CH ₃
24	15,6	--	CH ₃
25	15,6	--	CH ₃
26	16,8	--	CH ₃
27	23,3	--	CH ₃
28	28,7	--	CH ₃
29	17,4 [#]	--	CH ₃
30	21,4	--	CH ₃

¹ Os valores em parênteses representam a multiplicidade e as constantes de acoplamento em Hz, respectivamente.

* Os espaços em branco correspondem aos sinais que não puderam ser identificados no espectro, por apresentarem deslocamentos químicos de hidrogênio muito próximos.

[#] Valores de deslocamentos químicos característicos que permitiram a identificação da substância 8.

Estudo Fitoquímico de *Hancornia speciosa* Gomes

Tabela 9: Dados de RMN ^1H (CDCl_3 , 500 MHz) e ^{13}C (CDCl_3 , 125,7 MHz) da substância 9 na mistura de triterpenos (F4A)

Carbono	δ_{C} (ppm)	δ_{H} (ppm) ^{*,1}	DEPT
1	38,7	--	CH ₂
2	27,2	--	CH ₂
3	79,0 [#]	3,25-318 (m)	CH
4	38,9	--	C _O
5	55,1	--	CH
6	18,3	--	CH ₂
7	32,6	--	CH ₂
8	38,9	--	C _O
9	47,6	--	CH
10	36,9	--	C _O
11	23,5	--	CH ₂
12	121,7 [#]	5,19 (t, J= 3,50)	CH
13	145,2 [#]	--	C _O
14	41,7	--	C _O
15	26,1	--	CH ₂
16	26,9	--	CH ₂
17	32,5	--	C _O
18	47,2	--	CH
19	46,8 [#]	--	CH ₂
20	31,1 [#]	--	C _O
21	34,7	--	CH ₂
22	37,1	--	CH ₂
23	28,1	--	CH ₃
24	15,6	--	CH ₃
25	15,5	--	CH ₃
26	16,8	--	CH ₃
27	25,9	--	CH ₃
28	28,4	--	CH ₃
29	33,3	--	CH ₃
30	23,6	--	CH ₃

¹ Os valores em parênteses representam a multiplicidade e as constantes de acoplamento em Hz, respectivamente.

* Os espaços em branco correspondem aos sinais que não puderam ser identificados no espectro, por apresentarem deslocamentos químicos de hidrogênio muito próximos.

[#] Valores de deslocamentos químicos característicos que permitiram a identificação da substância 9.

Estudo Fitoquímico de *Hancornia speciosa* Gomes

Tabela 10: Dados de RMN ^1H (CDCl_3 , 500 MHz) e ^{13}C (CDCl_3 , 125,7 MHz) da substância 10 na mistura de triterpenos (F4A)

Carbono	δ_{C} (ppm)	δ_{H} (ppm)*, ¹	DEPT
1	38,7	--	CH ₂
2	27,4	--	CH ₂
3	78,9 [#]		CH
		3,25-3,18 (m)	
4	38,8	--	C ₀
5	55,3	--	CH
6	18,3	--	CH ₂
7	34,2	--	CH ₂
8	40,8	--	C ₀
9	50,4	--	CH
10	37,1	--	C ₀
11	20,8	--	CH ₂
12	25,1	--	CH ₂
13	38,0	--	CH
14	42,8	--	C ₀
15	27,4	--	CH ₂
16	35,5	--	CH ₂
17	42,9	--	C ₀
18	48,2	--	CH
19	47,9	2,38 (td, J= 11,0 e 5,5)	CH
20	150,9 [#]	--	C ₀
21	29,8	--	CH ₂
22	39,9	--	CH ₂
23	27,9	0,77 (s)	CH ₃
24	15,3	0,84 (s)	CH ₃
25	16,1	0,97 (s)	CH ₃
26	15,9	1,02 (s)	CH ₃
27	14,5	0,95 (s)	CH ₃
28	17,9	0,80 (s)	CH ₃
29a	109,3 [#]	4,57 (dd, J= 2,5 e 1,0)	CH ₂
29b	109,3 [#]	4,69 (d, J=2,5)	CH ₂
30	19,3	1,69 (s)	CH ₃

¹ Os valores em parênteses representam a multiplicidade e as constantes de acoplamento em Hz, respectivamente.

* Os espaços em branco correspondem aos sinais que não puderam ser identificados no espectro, por apresentarem deslocamentos químicos de hidrogênio muito próximos.

[#] Valores de deslocamentos químicos característicos que permitiram a identificação da substância 10.

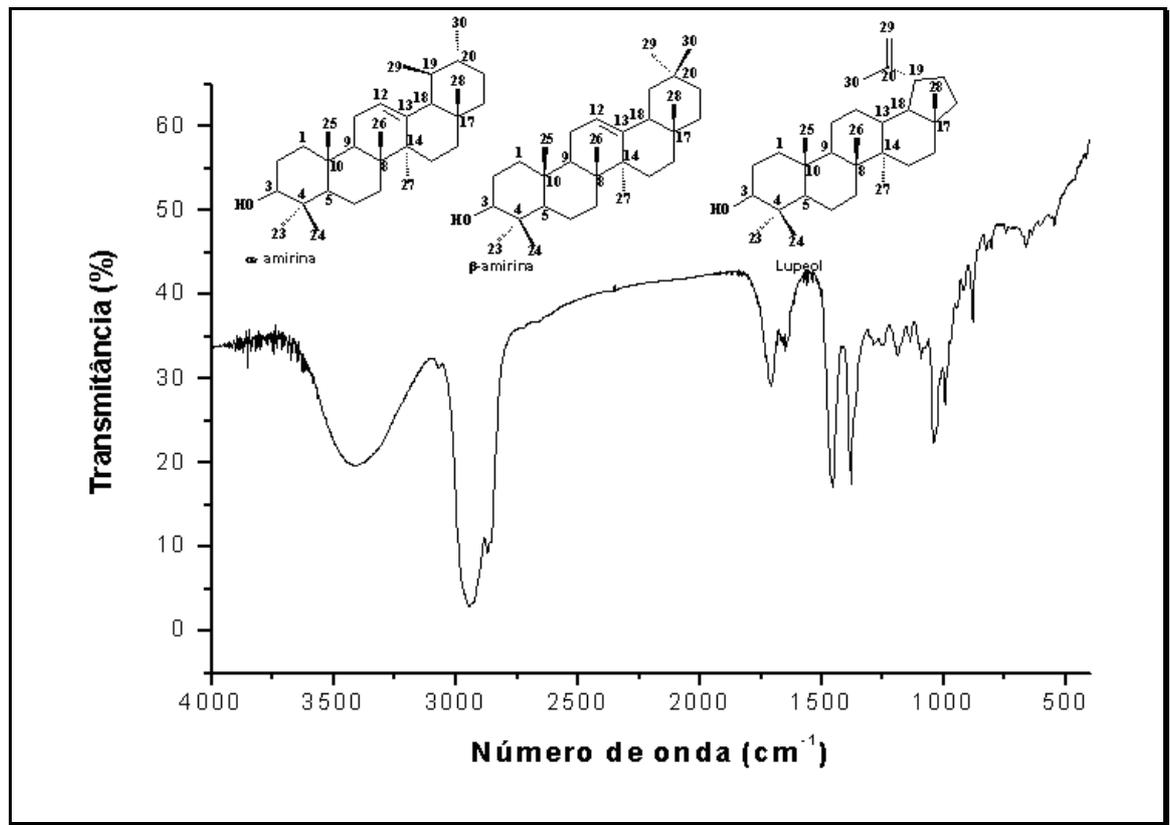


Figura 33: Espectro de absorção na região do infravermelho (IV) (pastilha de KBr) das substâncias 8, 9 e 10

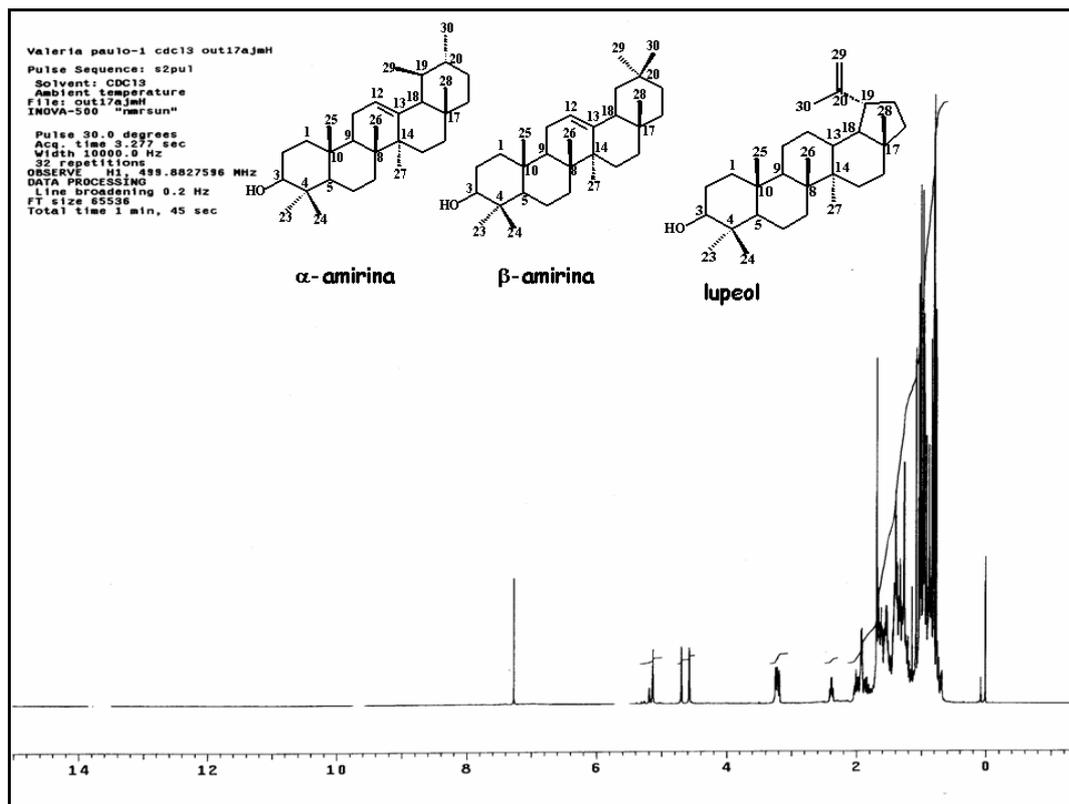


Figura 34: Espectro de RMN ^1H das substâncias 8, 9 e 10 (CDCl_3 , 500 MHz)

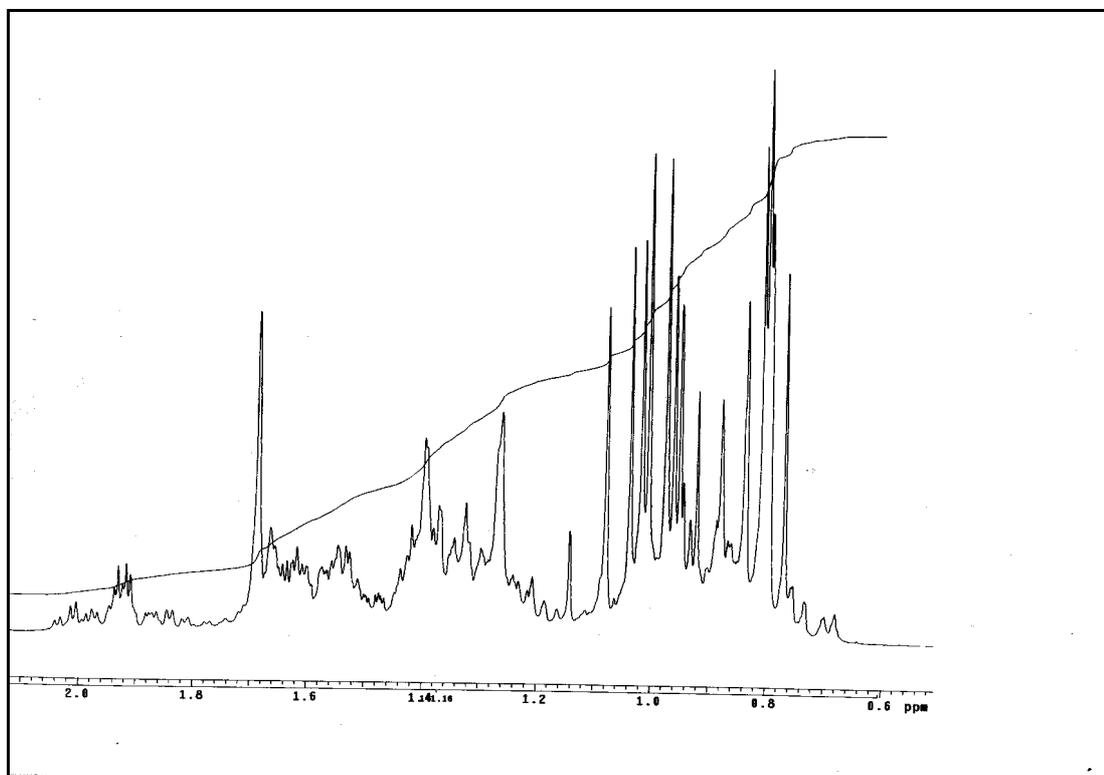


Figura 35: Ampliação do espectro de RMN ^1H das substâncias 8, 9 e 10 (CDCl_3 , 500 MHz)

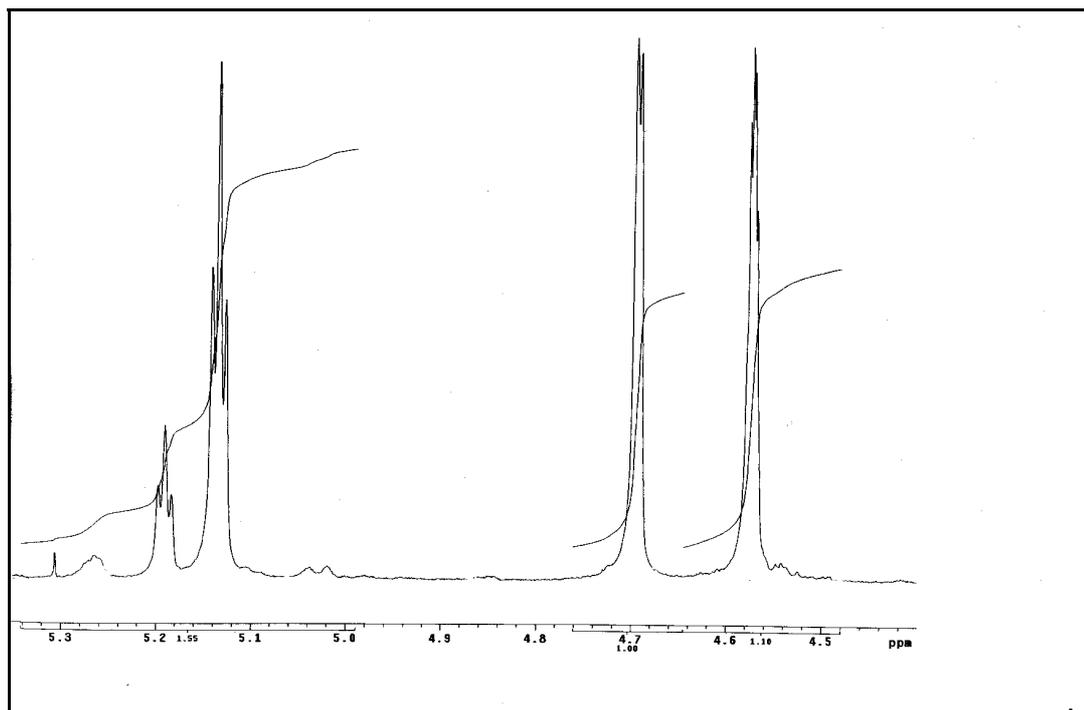


Figura 36: Ampliação do espectro de RMN ¹H das substâncias 8, 9 e 10
(CDCl₃, 500 MHz)

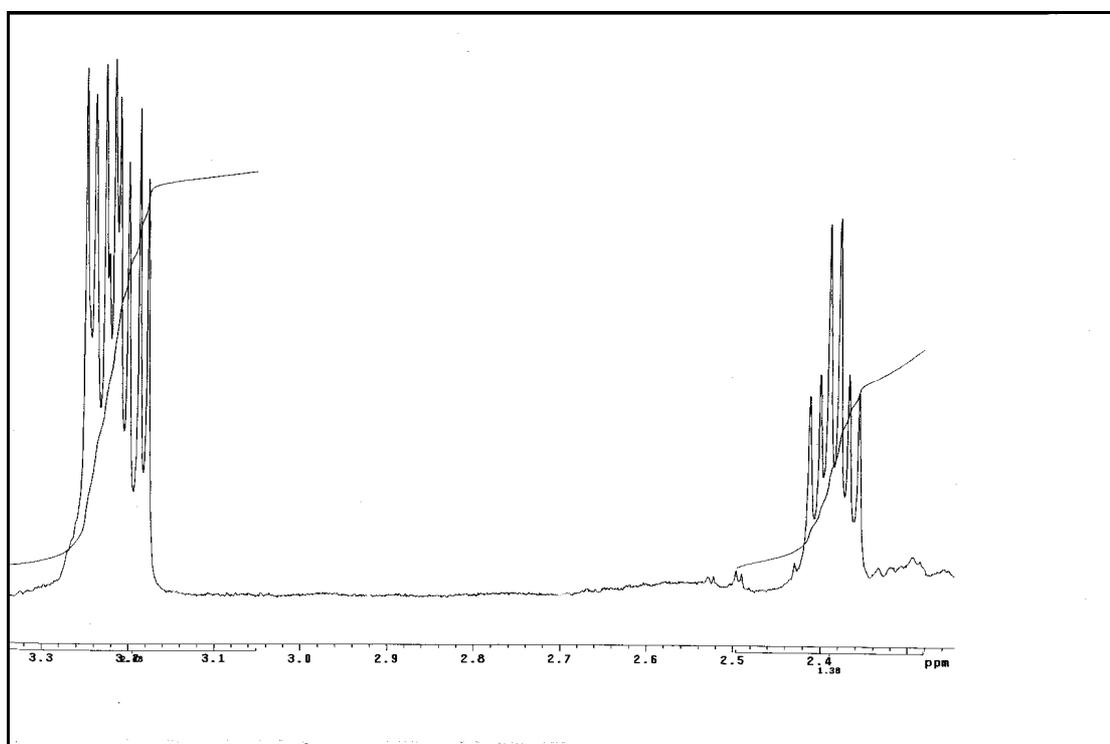


Figura 37: Ampliação do espectro de RMN ¹H das substâncias 8, 9 e 10
(CDCl₃, 500 MHz)

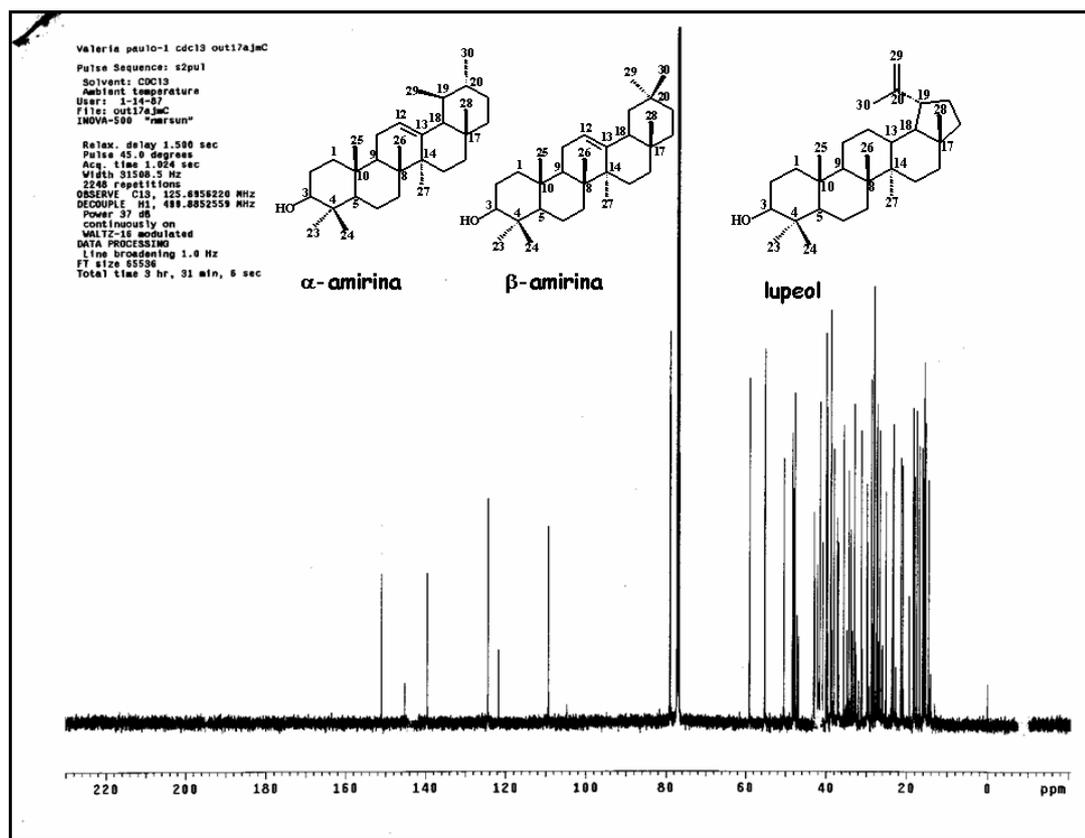


Figura 38: Espectro de RMN ^{13}C das substâncias 8, 9 e 10 (CDCl_3 ; 125,7 MHz)

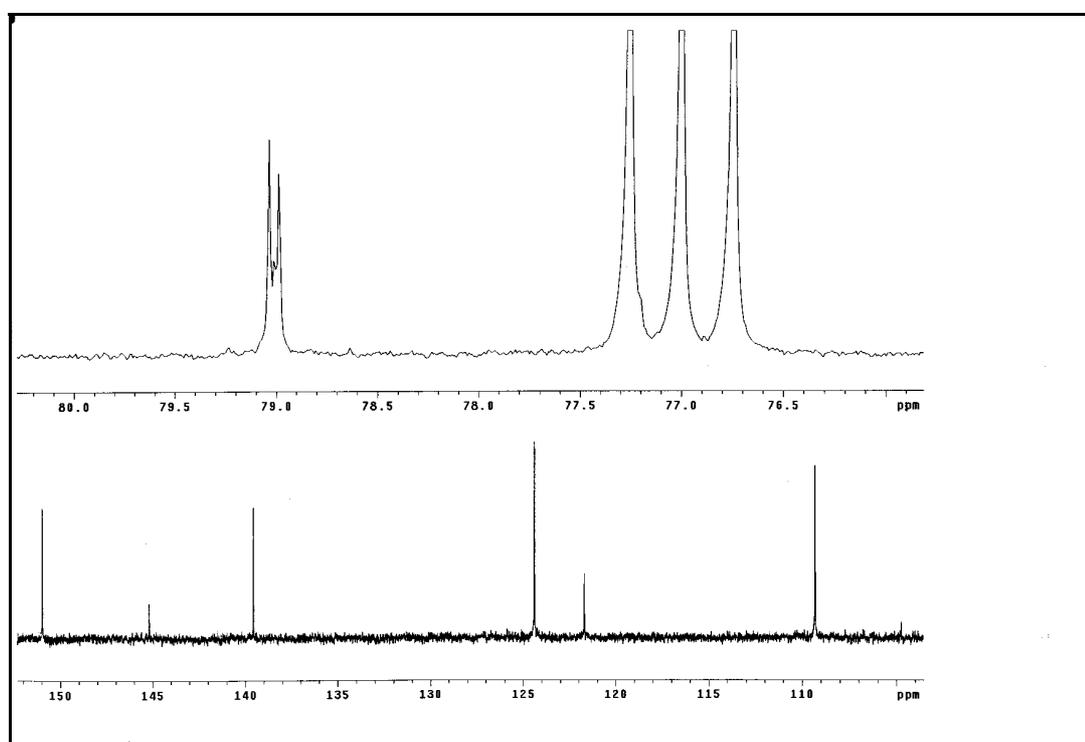


Figura 39: Ampliação do espectro de RMN ^{13}C das substâncias 8, 9 e 10 (CDCl_3 ; 125,7 MHz)

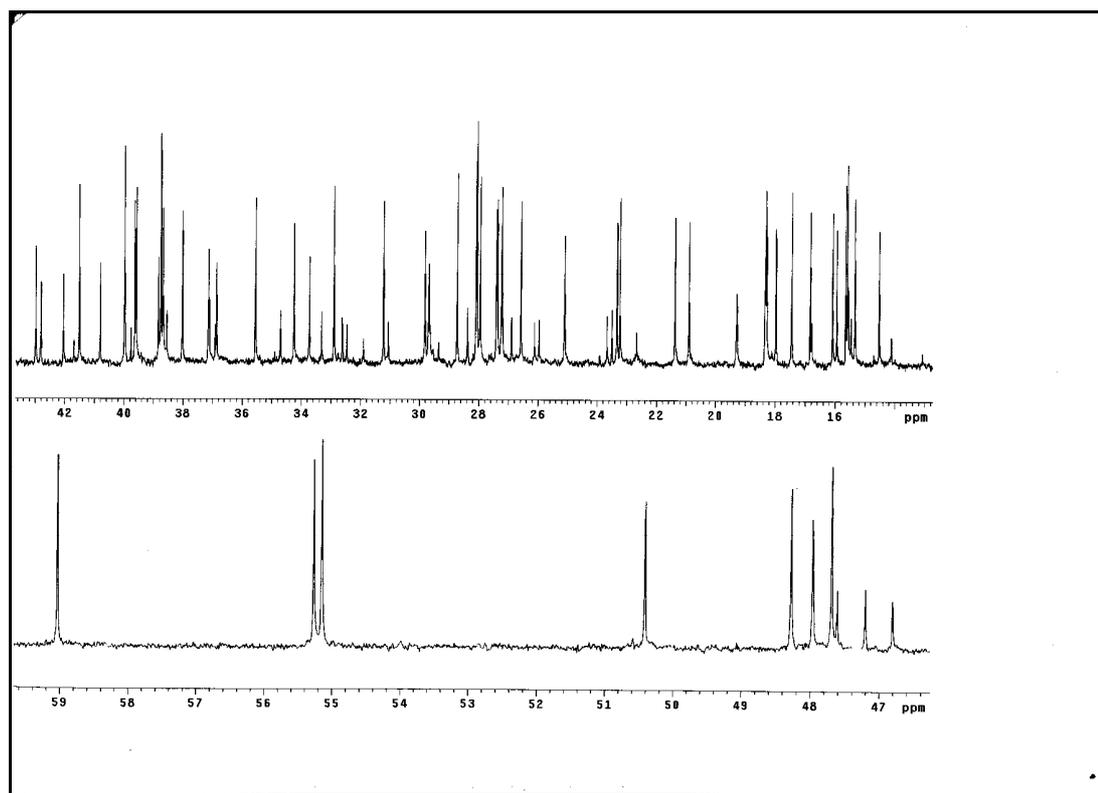


Figura 40: Ampliação do espectro de RMN ^{13}C das substâncias 8, 9 e 10
(CDCl_3 ; 125,7 MHz)

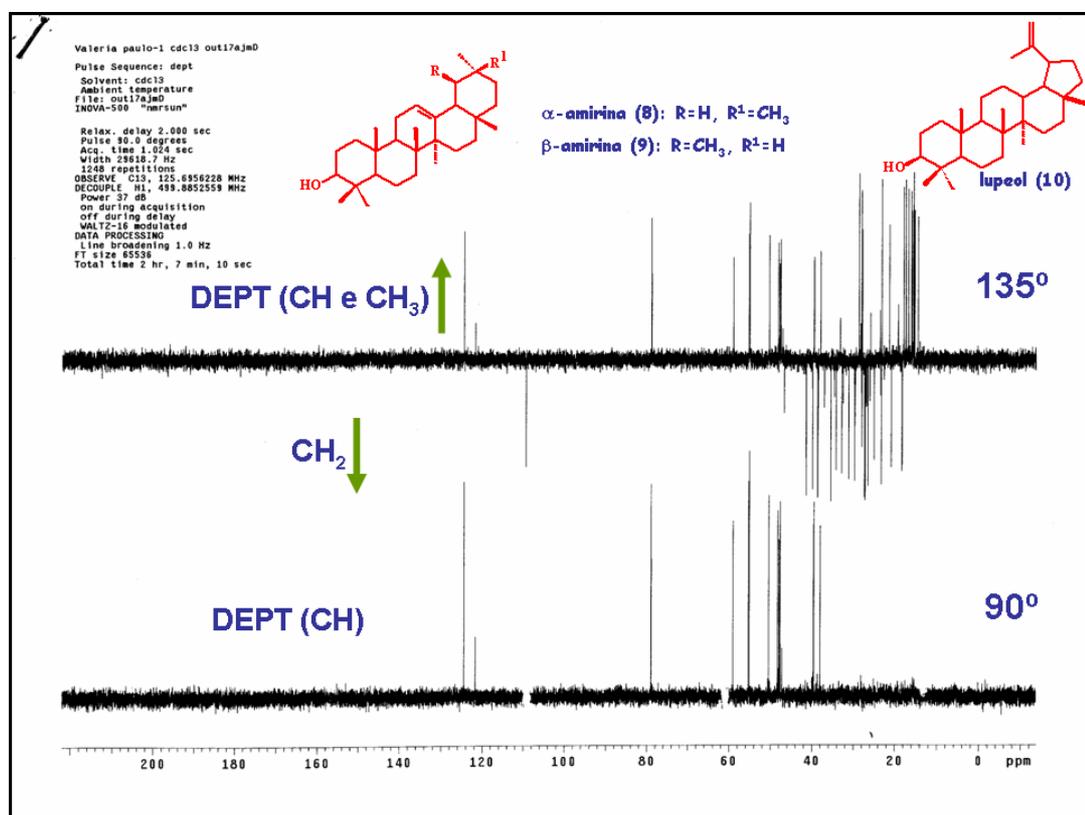


Figura 41: Experimento DEPT 135° e 90° das substâncias 8, 9 e 10

5.4 Identificação Estrutural da substância 11

A substância 11 foi isolada através do fracionamento do extrato do látex dos frutos verdes de *Hancornia speciosa* e obtido como um sólido branco cristalino (F12A; 132 mg). A identificação foi baseada na análise dos dados espectrais de RMN 1D (^1H e ^{13}C), IV e comparação com dados da literatura.

No espectro de absorção na região do infravermelho (IV) (Figura 43), destacaram-se as bandas referentes à: O-H ν 3472 cm^{-1} ; $-\text{CH}_3$ ν 2926 cm^{-1} ; $-\text{CH}_2$ ν 2854 cm^{-1} ; carbonila de éster em ν 1720 cm^{-1} e C=C ν 1700 cm^{-1} .

A análise dos sinais no espectro de RMN ^1H (Tabela 11 e Figura 44) mostrou a presença de sete singletos, seis referentes às metilas do esqueleto lupânico em δ 0,73; 0,84; 1,00; 1,03; 0,94 e 0,78 ppm (Figura 45), correspondentes às metilas angulares em C-23, C-24, C-25, C-26, C-27 e C-28, respectivamente, e uma em δ 1,67 ppm (Figura 45), correspondendo à metila vinílica em C-30. A presença de um multipletos em δ 4,47-4,52 ppm, referente ao acoplamento do hidrogênio carbinólico da posição C-3 com os hidrogênios da posição C-2, além de indicar a presença de uma porção acila ligada em C-3 (Figura 46). Os hidrogênios da posição C-29 (dupla terminal) foram evidenciados pela presença de um singleto largo em δ 4,54 ppm referente ao H-29a, e um dubleto em δ 4,67 ppm (1H, $J= 2,4$ Hz) referente ao H-29b (Anexo C, Fig. 21, Pág. 84). Um singleto largo em δ 1,25 ppm (Figura 46), caracteriza a presença de hidrogênios de carbonos do tipo metilênicos referente à porção acila ligada ao carbono carbinólico em C-3. Um dubleto em δ 2,44 ppm ($J= 5,4$ Hz) (Figura 47) é relativo a um acoplamento do tipo geminal dos hidrogênios em C-2'. Por fim, foram observados dois multipletos: um em δ 4,26-4,16 ppm, referente ao hidrogênio hidroxílico em C-3' e outro em δ 3,81 ppm, referente ao hidrogênio hidroxílico da posição C-5' (Figura 46).

Em relação ao espectro de RMN ^{13}C totalmente desacoplado (Tabela 11 e Figura 48), foi observado sinais característicos do esqueleto do lupeol

em δ 81,9; 48,5; 151,7 e 109,6 ppm referentes aos carbonos C-3, C-19, C-20 e C-29, respectivamente. A presença dos sinais em δ (ppm) 42,7; 43,0; 69,9; 72,7 e 172,7 foram atribuídos aos carbonos C-2', C-4', C-3', C-5' e C-1', respectivamente, sendo compatíveis com a presença dos dois grupos hidroxilas na porção acila do éster do lupeol.

Finalmente, baseado nestes dados experimentais e comparando-os com os da literatura ^[37,38], concluímos que se tratava do éster diidroxilado 3- β -O-acil lupeol (**Figura 50**).

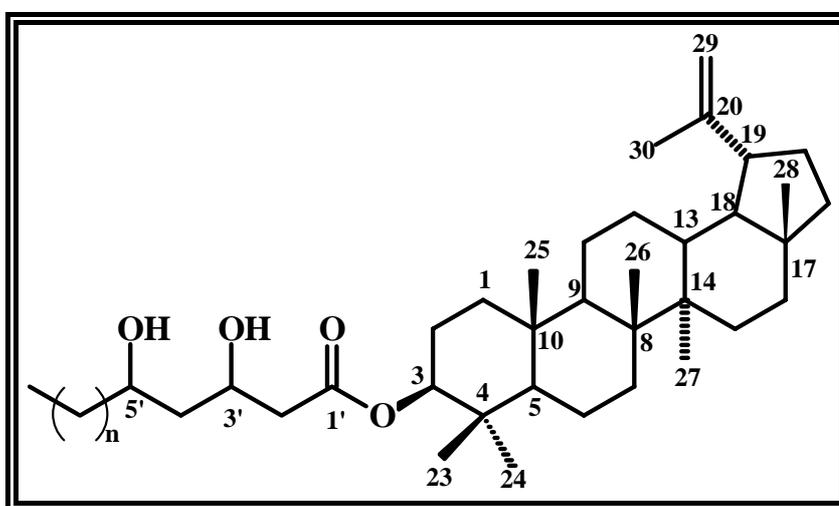


Figura 50: Éster diidroxilado 3- β -O-acil lupeol isolado do látex dos frutos verdes de *Hancornia speciosa* Gomes

5.5 Identificação da porção acila do éster diidroxilado do Lupeol da substância **11** por CG-EM

Para a identificação da porção acila foi feita uma reação de transesterificação do produto natural, utilizando H_2SO_4 em MeOH, sendo o produto da reação obtido analisado através de CG-EM. A análise do espectro de massas da substância **11**, revelou a presença do pico base m/z 97 e do pico do íon molecular m/z 308 (M^+) (**Figura 51, Anexo A**), sendo consistente com a estrutura da δ -lactona α,β -insaturada [**11a**] (**Figura 17**).

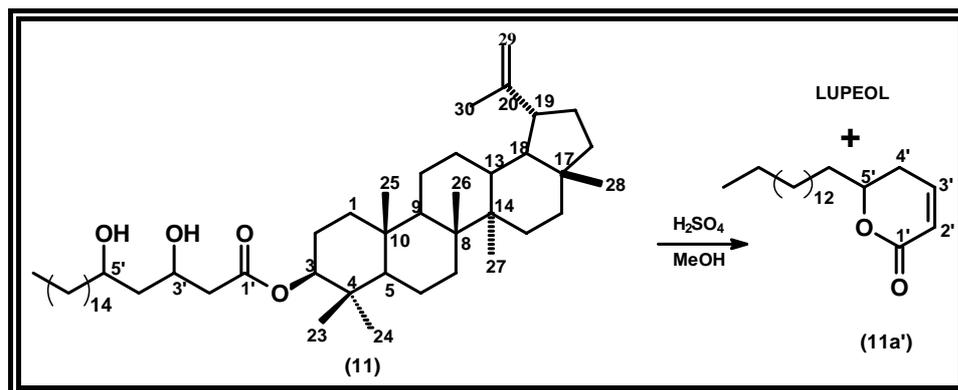


Figura 17: Reação de metanólise ácida do éster dihidroxilado 3- β -O-acil lupeol

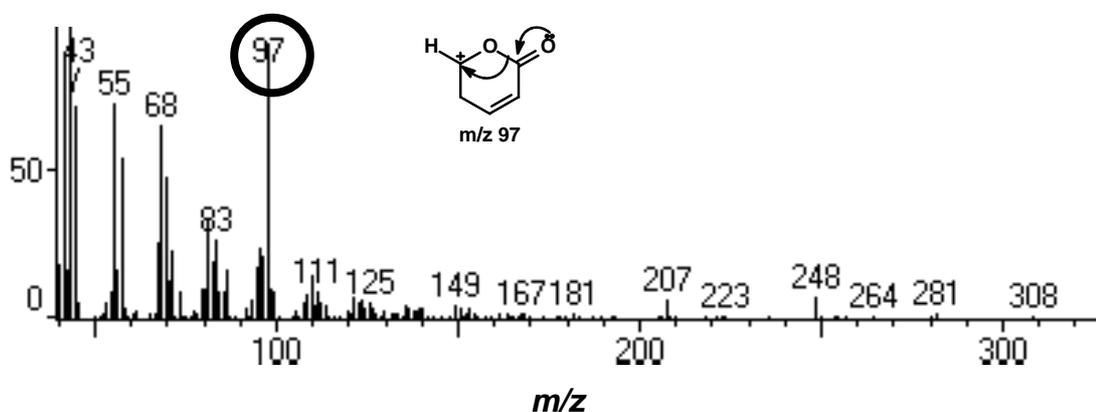


Figura 51: Espectro de massas obtido por CG-EM do éster dihidroxilado

A formação desta δ -lactona α,β -insaturada (**11a'**) após metanólise ácida do produto natural pode ser racionalizada pelo ataque do grupo hidroxila localizado em C-5' ao átomo de carbono da carbonila (C-1') do grupo carboxila protonado, seguido pela desidratação catalisada por ácido da hidroxila em C-3' (**Figura 52**). Desta forma, com os dados obtidos podemos sugerir a estrutura da substância **11** como sendo o 3- β -O-3',5'-diidroxiiicosanoato de lupeolila (**Figura 53**).

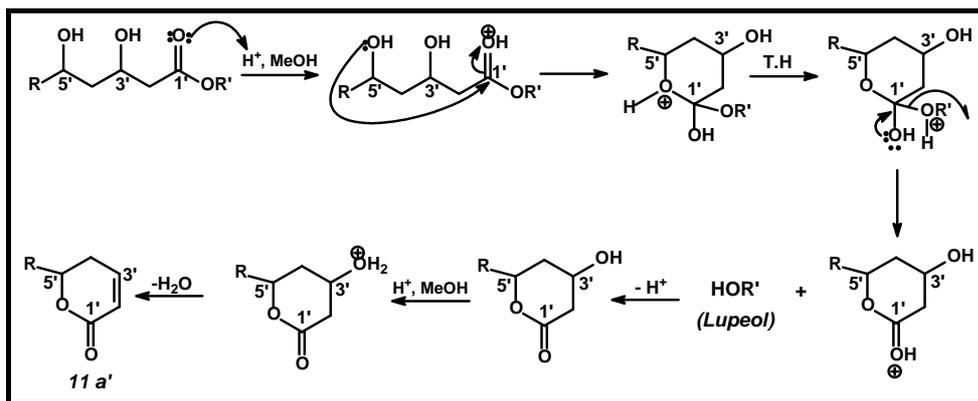


Figura 52: Mecanismo de formação da δ -lactona α,β -insaturada (11 a')

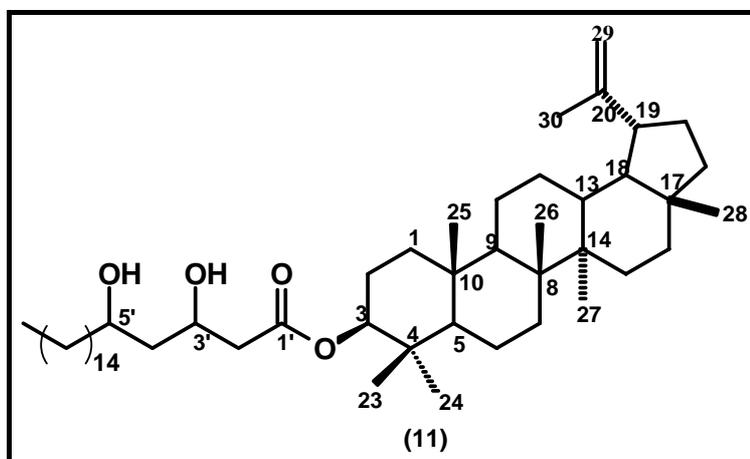


Figura 53: 3- β -O-3',5'-dihidroxiicosanoato de lupeolíla

Tabela 11: Dados de RMN ^1H (CD_3COCD_3 , 300 MHz) e ^{13}C (CD_3COCD_3 , 75 MHz) da substância 11 (F12A)

Carbono	δ_{C} (ppm)	δ_{H} (ppm)*, ¹	DEPT
1	38,9	--	CH ₂
2	24,3	--	CH ₂
3	81,9 [#]	4,47-4,52 (m)	CH
4	38,3	--	C _O
5	55,8	--	CH
6	18,7	--	CH ₂
7	34,7	--	CH ₂
8	41,4	--	C _O
9	50,8	--	CH
10	37,6	--	C _O
11	21,5	--	CH ₂
12	25,7	--	CH ₂
13	38,6	--	CH

Estudo Fitoquímico de *Hancornia speciosa* Gomes

14	41,4	--	C _o
15	28,0	--	CH ₂
16	36,1	--	CH ₂
17	43,5	--	C _o
18	48,8	--	CH
19	48,5	2,45-2,34 (m)	CH
20	151,7 [#]	--	C _o
21	32,5	--	CH ₂
22	40,5	--	CH ₂
23	28,3	0,73 (s)	CH ₃
24	15,3	0,84 (s)	CH ₃
25	16,5	1,00 (s)	CH ₃
26	16,9	1,03 (s)	CH ₃
27	14,8	0,94 (s)	CH ₃
28	18,3	0,78 (s)	CH ₃
29a	109,6 [#]	4,54 (sl)	CH ₂
29b	109,6 [#]	4,67 (d, J= 2,4)	CH ₂
30	19,5	1,67 (s)	CH ₃
1'	172,7 [#]	--	C _o
2'	42,7	2,44 (d, J= 5,4)	CH ₂
3'	69,9 [#]	4,26-4,16 (m)	CH
4'	43,0	1,40-136 (m)	CH ₂
5'	72,7 [#]	3,81 (m)	CH
6'	38,5	1,25 (sl)	CH ₂
7'	25,9	1,25 (sl)	CH ₂
8'-17'	29,9- 30,2	1,25 (sl)	CH ₂
18'	30,3	1,25 (sl)	CH ₂
19'	23,2	1,25 (sl)	CH ₂
20'	14,4	1,40-136 (m)	CH ₃

¹ os valores em parênteses representam a multiplicidade e as constantes de acoplamento em Hz, respectivamente.

* Os espaços em branco correspondem aos sinais que não puderam ser identificados no espectro, por apresentarem deslocamentos químicos de hidrogênio muito próximos.

[#] Valores de deslocamentos químicos característicos que permitiram a identificação da substância 11.

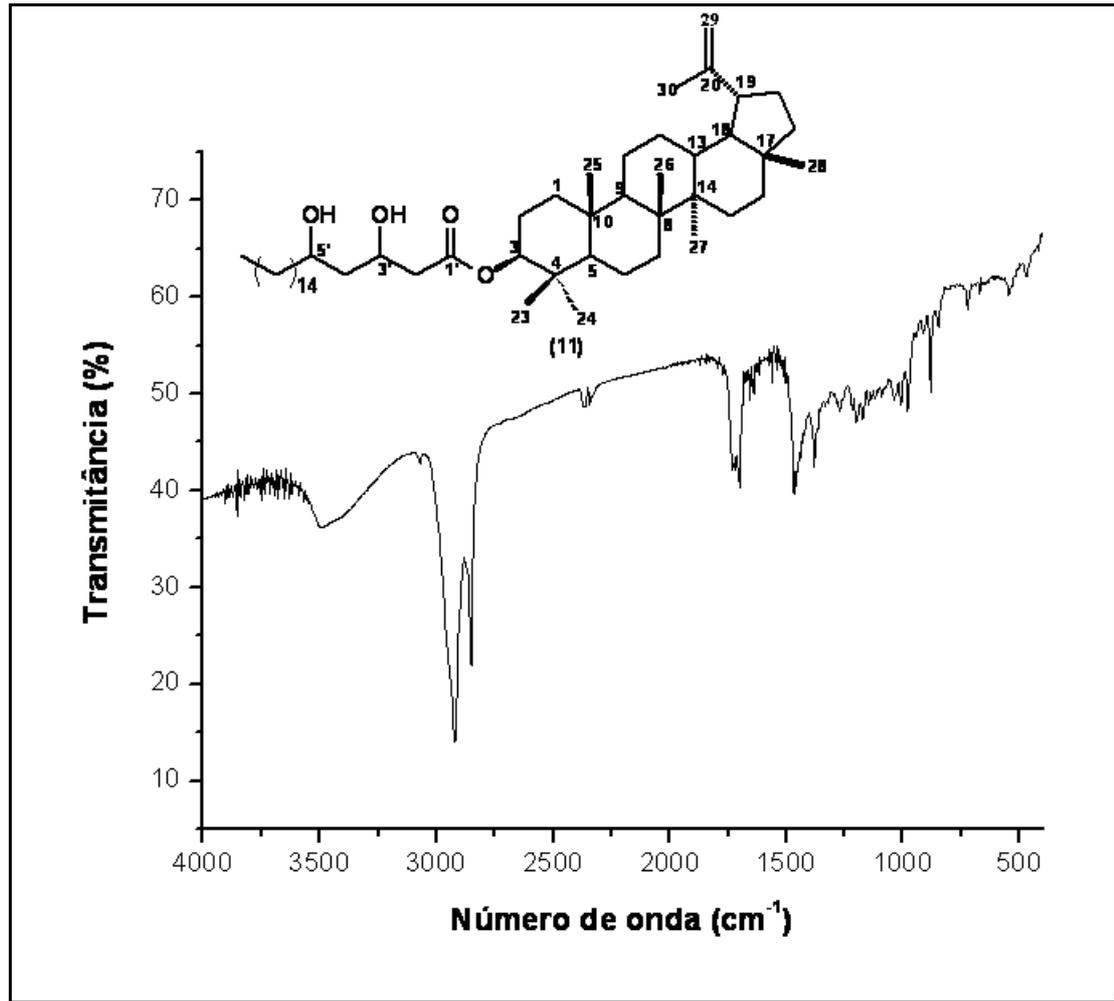


Figura 43: Espectro de absorção na região do infravermelho (IV) (pastilha de KBr) da substância 11

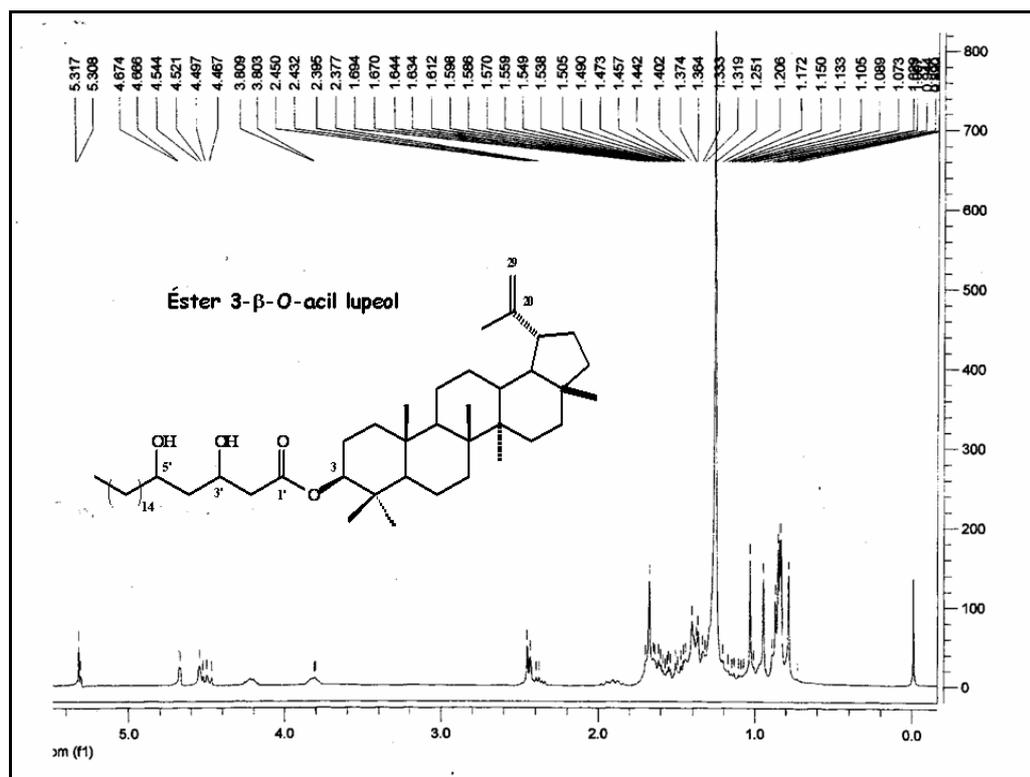


Figura 44: Espectro de RMN ^1H da substância 11 (CD_3COCD_3 , 300 MHz)

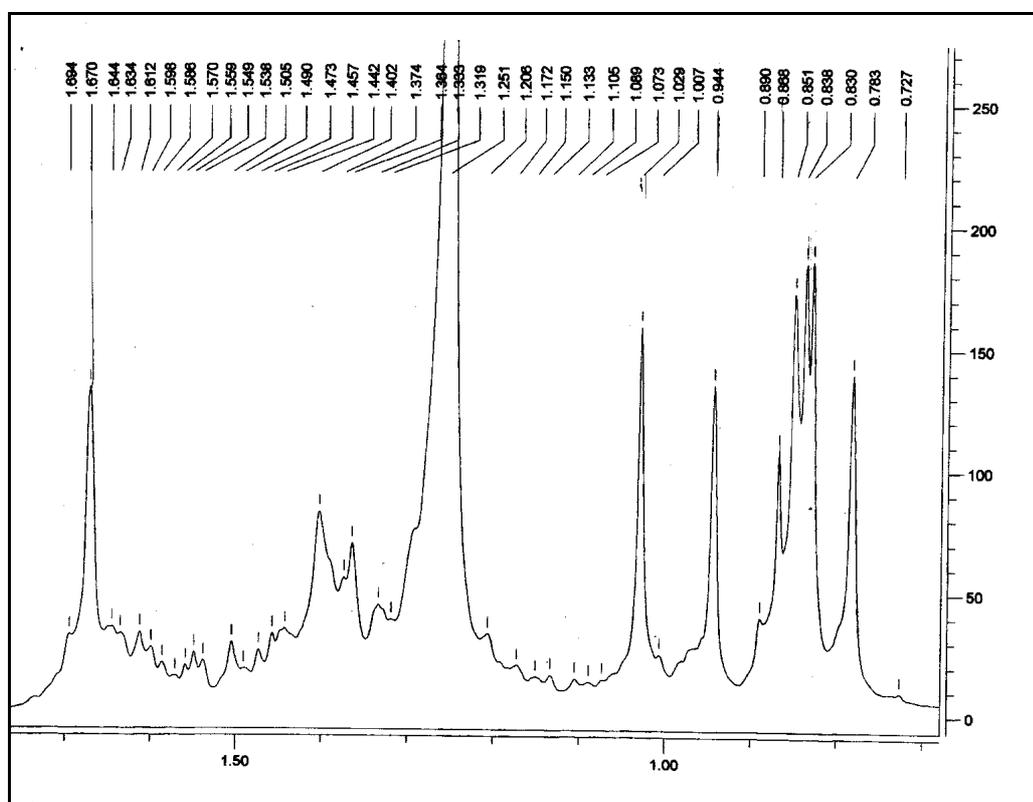


Figura 45: Ampliação do espectro de RMN ^1H da substância 11 (CD_3COCD_3 , 300 MHz)

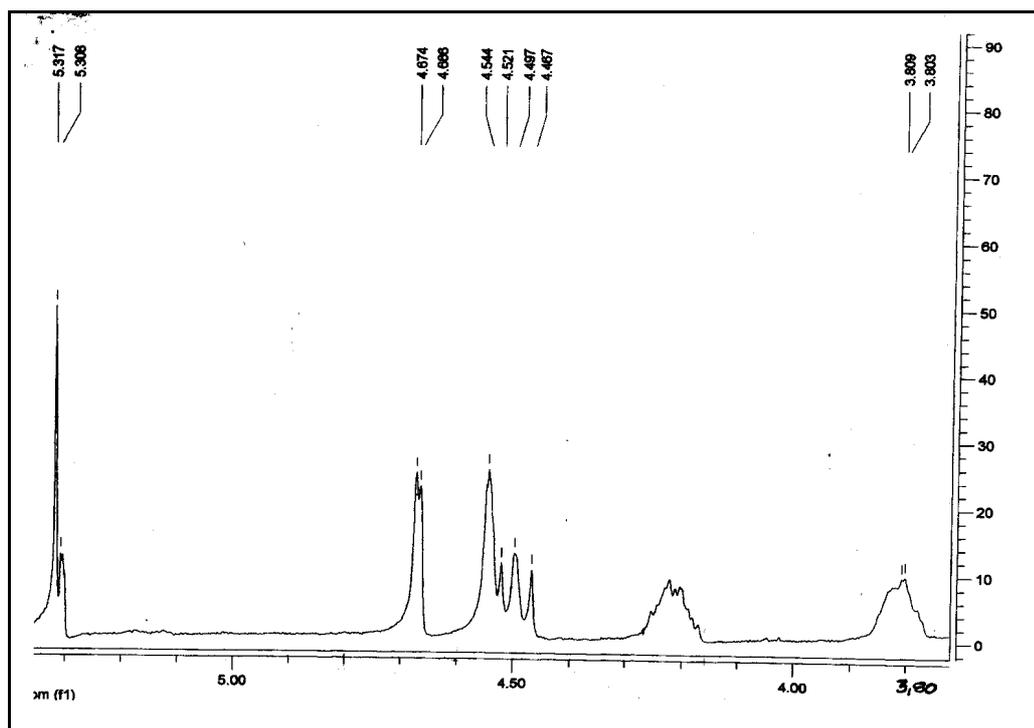


Figura 46: Ampliação do espectro de RMN ^1H da substância 11
(CD_3COCD_3 , 300 MHz)

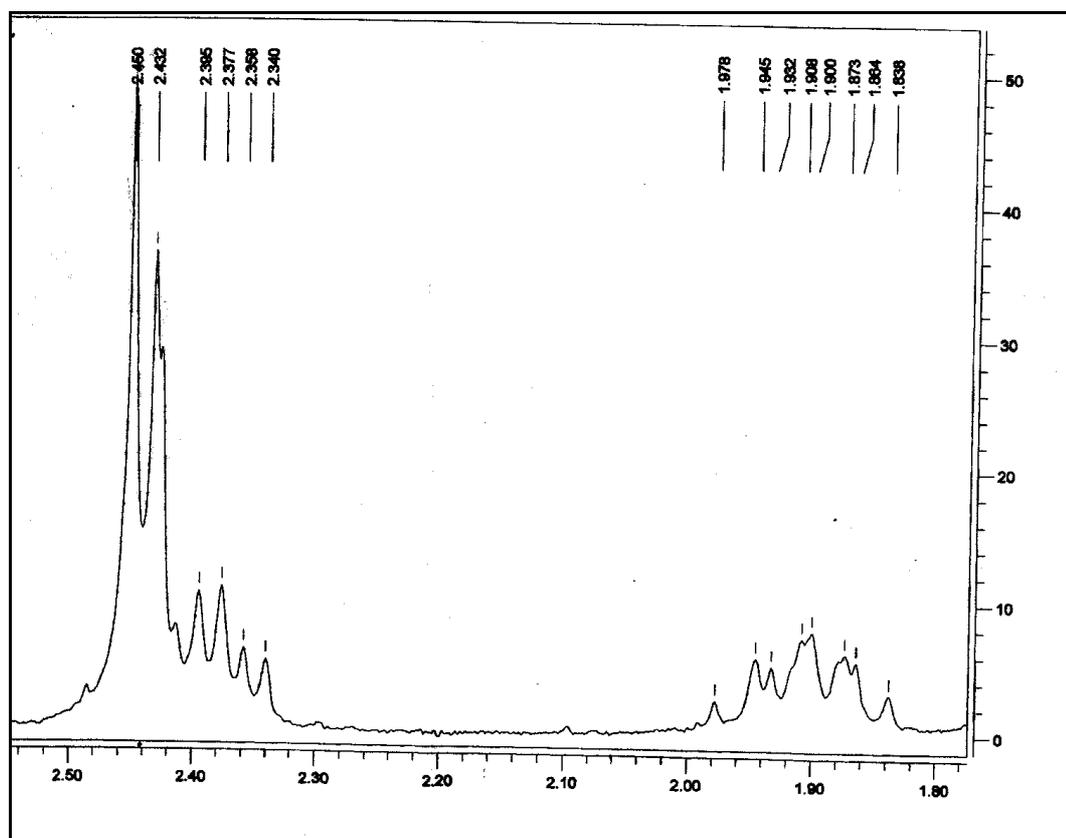


Figura 47: Ampliação do espectro de RMN ^1H da substância 11
(CD_3COCD_3 , 300 MHz)

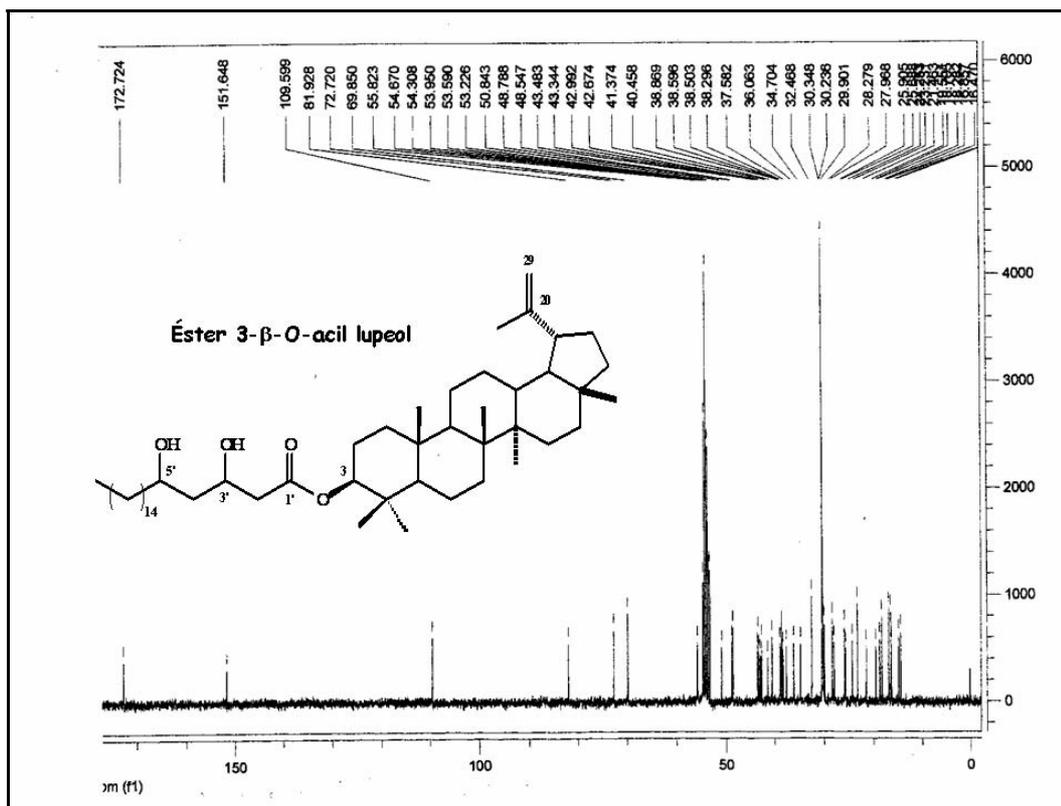


Figura 48: Espectro de RMN ^{13}C da substância 11 (CD_3COCD_3 , 75 MHz)

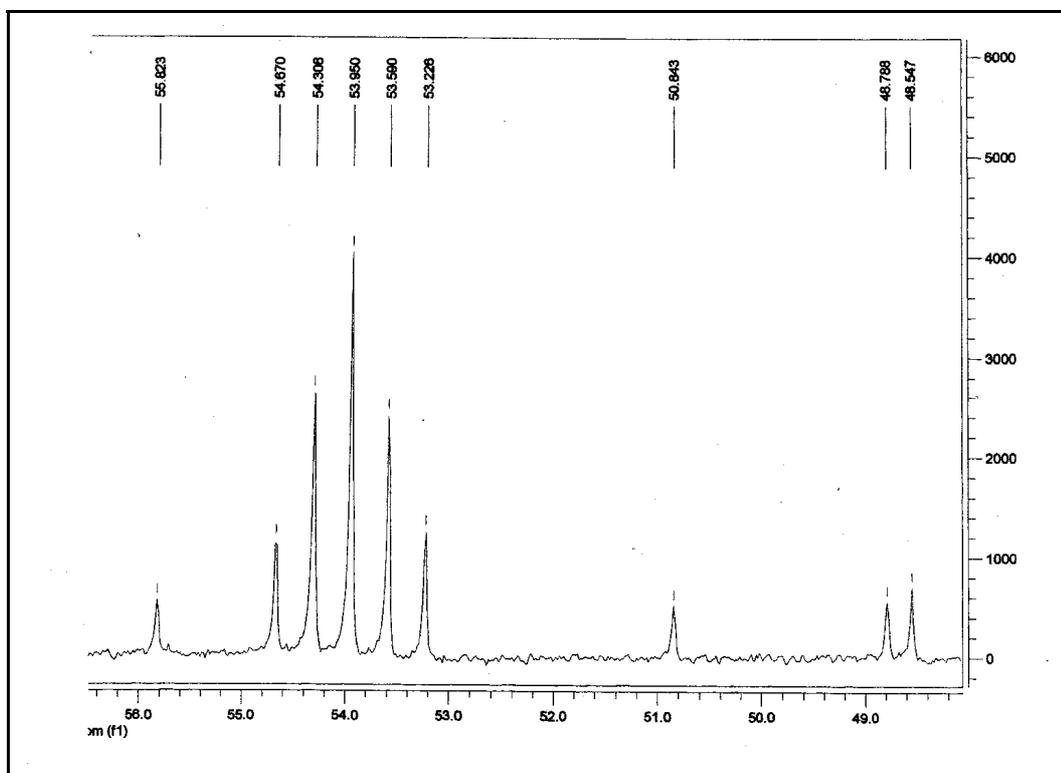


Figura 49: Ampliação do espectro de RMN ^{13}C da substância 11 (CD_3COCD_3 , 75 MHz)

5.6 Identificação Estrutural da substância 12

A substância 12 foi isolada através do fracionamento do extrato metanólico acetilado dos frutos verdes e sem látex (**EMAfrV**) de *Hancornia speciosa* Gomes e obtido como um óleo amarelo (*F12B*; 30,6 mg). A identificação foi baseada na análise dos dados espectrais de RMN 1D (^1H e ^{13}C) e comparação com dados da literatura.

A análise dos sinais no espectro de RMN ^1H (**Tabela 12 e Figura 54**) mostrou a presença de um dubleto em δ 5,69 ppm (1H, $J^3 = 3,6$ Hz) (**Figura 55**) referente ao hidrogênio anomérico da porção glicose em C-1. Também foi observado um duplo dubleto em δ 4,86 ppm (1H, $J = 10,4$ e $3,6$ Hz) (**Figura 55**) referente ao hidrogênio da posição C-2 e um tripleto em δ 5,06 ppm (1H, $J = 10,0$ Hz) (**Figura 55**), referente ao hidrogênio da posição C-4, sendo que todos estes sinais mencionados estão relacionados à porção glicolítica da molécula.

Em relação aos outros sinais de hidrogênio do primeiro monossacarídeo, a glicose, multipletos em δ 4,30- 4,05 e 5,40- 5,29 ppm, com também os outros hidrogênios pertencentes ao segundo açúcar substituinte, a frutose, por terem deslocamentos químicos muito próximos, apareceram juntos num mesmo envelope de hidrogênios pertencentes a carbonos do tipo metínicos e metilênicos (**Figura 54**). Além destes, observou-se uma grande incidência de singletos na região de δ 2,18-2,02 ppm (**Figura 51**), relacionados à hidrogênios do tipo metílicos.

A análise do espectro de RMN ^{13}C totalmente desacoplado (**Tabela 12 e Figura 57**), nos permitiu identificar sinais entre δ 170,1-169,5 ppm, referentes às carbonilas das porções acetiladas do dissacarídeo em questão. Além destes sinais, foram identificados oito grupos de carbonos metínicos, dos quais cinco pertencem à porção glicose, em δ 89,9; 70,2; 69,6; 68,4 e 68,1 ppm, referentes aos carbonos: C-1, C-2, C-3, C-4 e C-5, respectivamente e, três pertencem ao anel correspondente à porção frutose, em δ 74,9; 75,6 e 79,1 ppm, referentes aos carbonos: C-3', C-4' e C-5',

respectivamente. Três grupos de carbonos metilênicos, dos quais um sinal em δ 61,7 ppm, refere-se ao C-6 do anel da glicose e dois pertencentes ao anel da frutose em δ 62,8 e 63,6 ppm, referentes aos carbonos: C-1' e C-6', respectivamente. Um carbono não oxigenado em δ 103,9 ppm, refere-se ao C-2'. Por fim, dois picos intensos são observados em δ 29,7 e 20,6 ppm, referentes às metilas, provenientes das hidroxilas do açúcar que foram acetiladas.

Finalmente, baseado nos dados experimentais e comparando-os com os da literatura ^[73,74], pudemos propor a estrutura da substância 12 como sendo a sacarose na sua forma peracetilada (**Figura 58**).

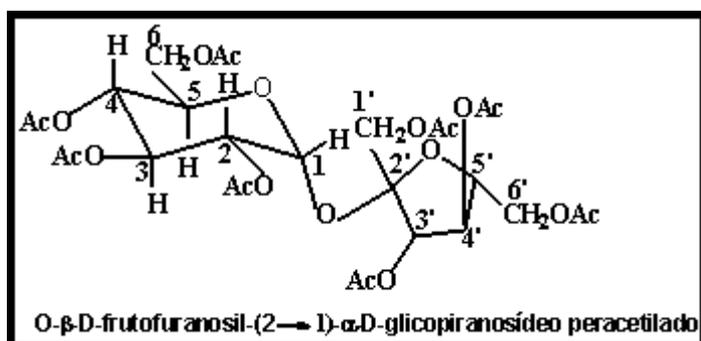


Figura 58: Sacarose peracetilada (12)

Estudo Fitoquímico de *Hancornia speciosa* Gomes

Tabela 12: Dados de RMN ^1H (CDCl_3 , 400 MHz) e ^{13}C (CDCl_3 , 100 MHz) da substância 12

Carbono	δ_{C} (ppm)	δ_{H} (ppm) ^{*,1}	$\delta_{\text{H}}(\text{CH}_3; \text{ppm})$ ^{*,1}	DEPT
1	89,9	5,69 (d, $J= 3,6$)	--	CH
2	70,2	4,86 (dd, $J= 10,4$ e 3,6)	2,10 (s)	CH
3	69,6	--	2,02 (s)	CH
4	68,4	5,06 (t, $J=10,0$)	2,05 (s)	CH
5	68,1	--	--	CH
6	61,7	--	2,10 (s)	CH ₂
1'	62,8	--	2,12 (s)	CH ₂
2'	103,9	--	--	C _O
3'	74,9	--	2,18 (s)	CH
4'	75,6	--	2,11 (s)	CH
5'	79,1	--	--	CH
6'	63,6	--	2,12 (s)	CH ₂
-CO-	170,1- 169,5	--	--	C _O
-COCH ₃	29,7 e 20,6	--	--	CH ₃

¹ os valores em parênteses representam a multiplicidade e as constantes de acoplamento em Hz, respectivamente.

* Os espaços em branco correspondem aos sinais que não puderam ser identificados no espectro, por apresentarem deslocamentos químicos de hidrogênio muito próximos.

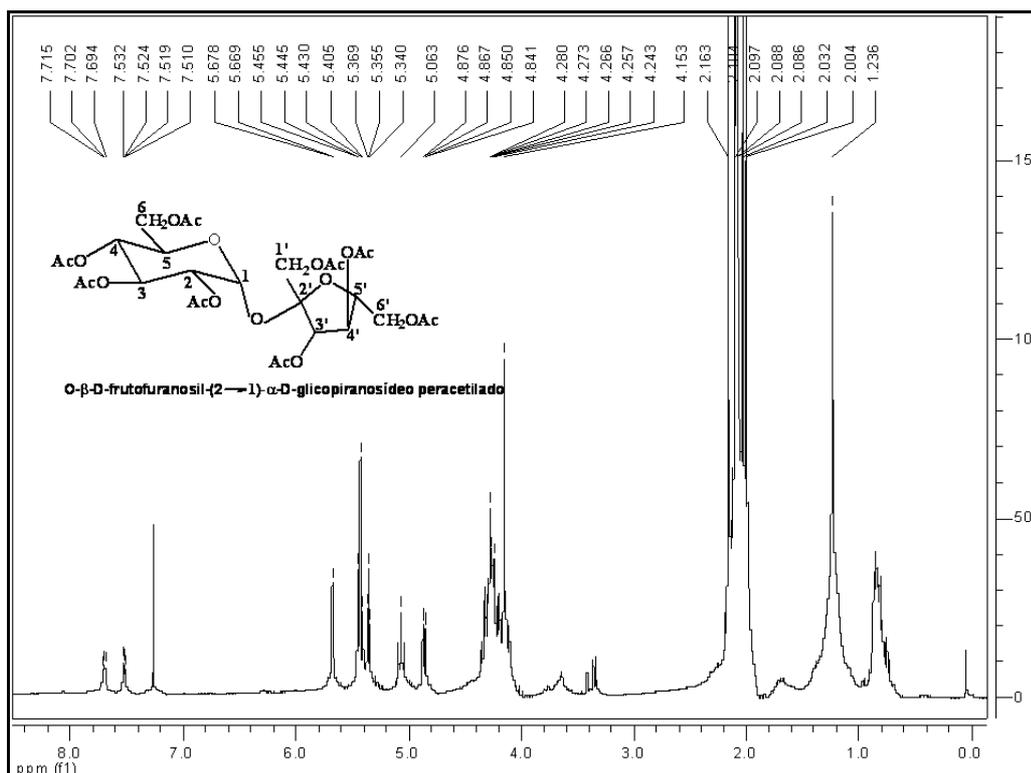


Figura 54: Espectro de RMN ^1H da substância 12 (CDCl_3 , 400 MHz)

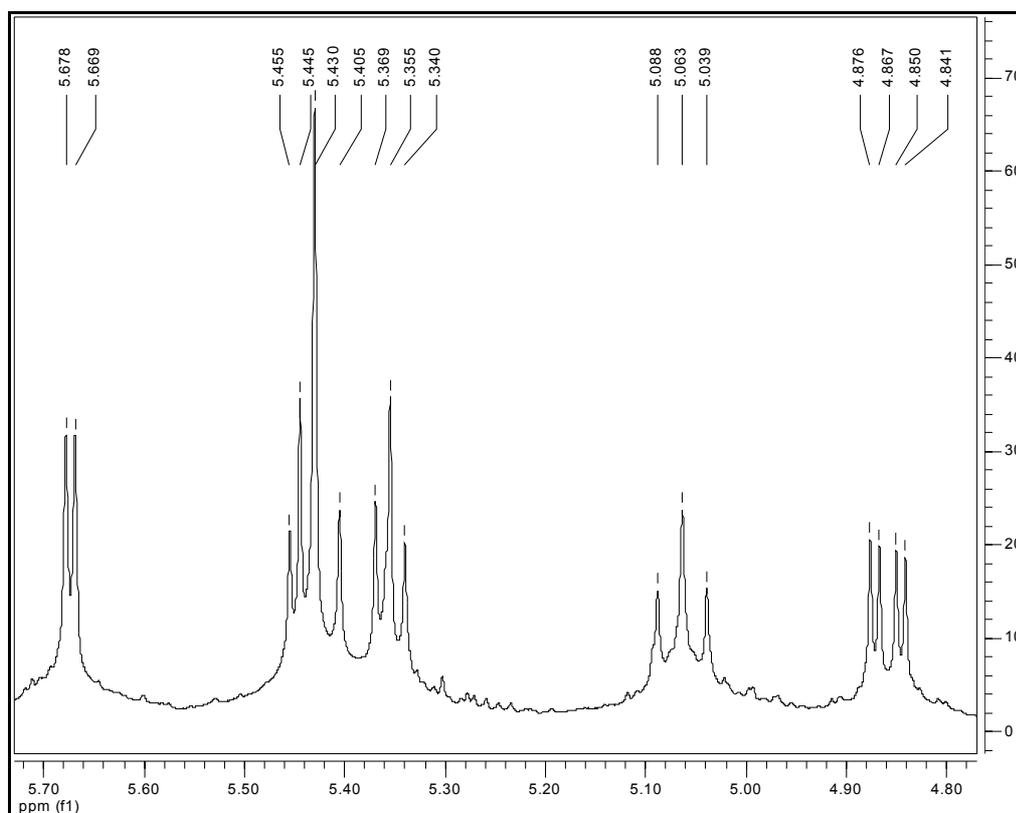


Figura 55: Ampliação do espectro de RMN ^1H da substância 12 (CDCl_3 , 400 MHz)

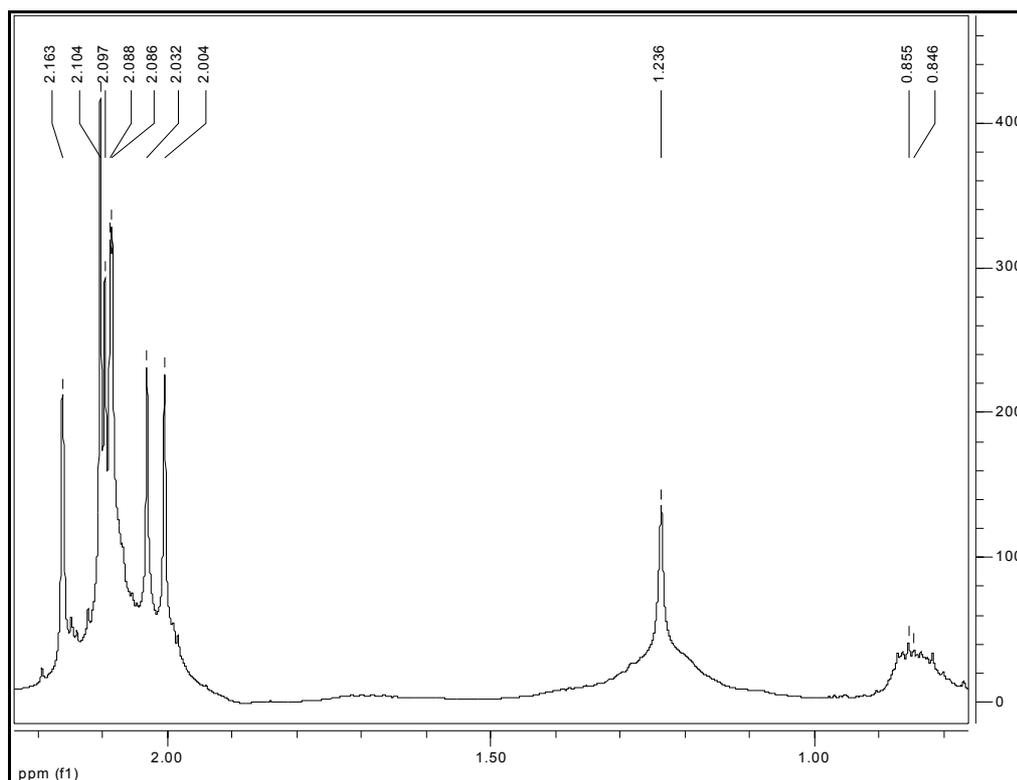


Figura 56: Ampliação do espectro de RMN ¹H da substância 12 (CDCl₃, 400 MHz)

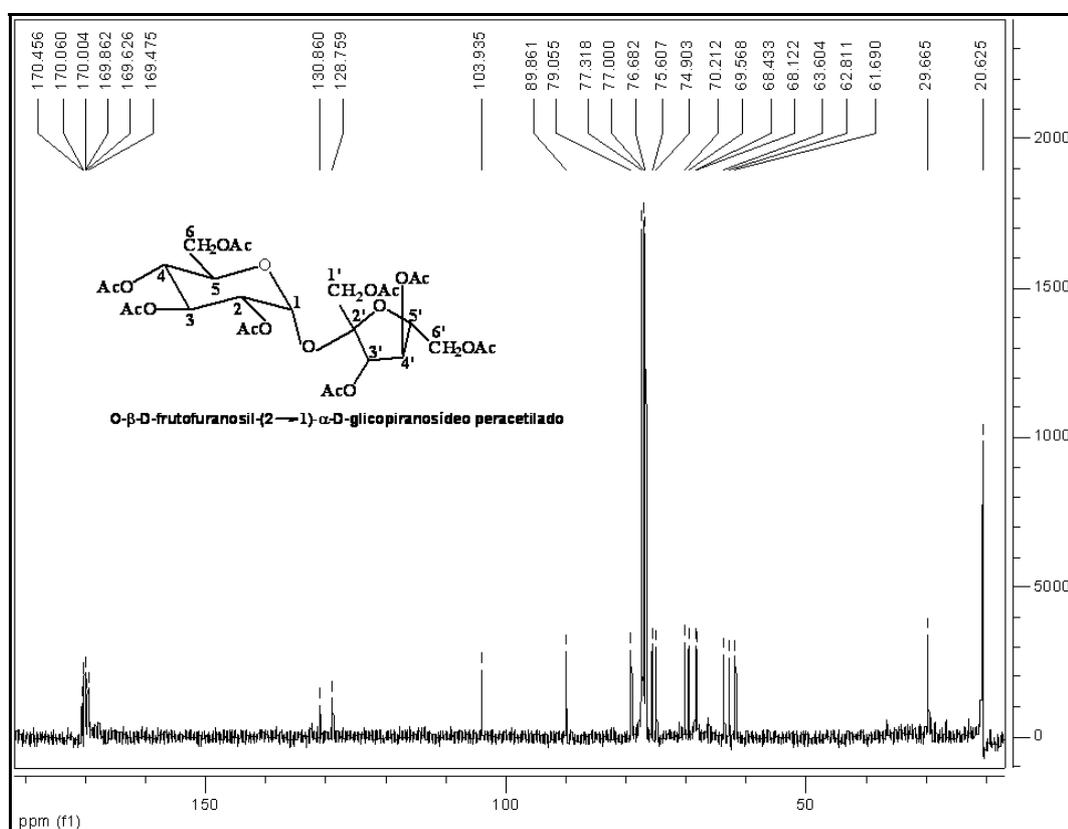


Figura 57: Espectro de RMN ¹³C da substância 12 (CDCl₃, 100 MHz)

PARTE III: Testes biológicos

PARTE III: TESTES BIOLÓGICOS

1.1 Importância

A elucidação dos componentes ativos presentes nas plantas, bem como seus mecanismos de ação, vem sendo um dos maiores desafios para a química farmacêutica, bioquímica e farmacologia ^[75]. As plantas contém inúmeros constituintes e nos seus extratos, quando testados, o princípio ativo pode estar em pequenas quantidades que não seja possível o isolamento ou em outros casos podem apresentar efeitos sinérgicos entre os diferentes princípios ativos devido a presença de compostos de classes ou estruturas diferentes contribuindo para a mesma atividade. No estudo da atividade biológica de extratos vegetais é importante a seleção de bioensaios para a detecção de efeito específico, sendo que estes devem ser simples, sensíveis e reprodutíveis ^[75].

Os bioensaios podem envolver organismos inferiores (*microorganismos e microcrustáceos*, entre outros), ensaios bioquímicos visando alvos moleculares (*enzimas e receptores*) e cultura de células animais ou humanas. Contudo, o teste adequado dependerá da doença alvo.

2. Bioensaio de Letalidade com *Artemia salina* (“Brine Shrimp Letality Test”)

2.1 Importância

Um dos ensaios biológicos mais simples de ser monitorado é a letalidade já que considera apenas um critério (*morto ou vivo*), além de apresentar resposta quantitativa e tratamento estatístico relativamente fáceis. Um teste geral para *screening* de toxicidade de compostos consiste no Teste de Letalidade com *Artemia salina*.

Os bioensaios são feitos com as larvas do crustáceo de *Artemia salina* ^[76] e tem sido usados tanto como indicador de toxicidade para compostos com atividade citotóxica, quanto para compostos com atividade inseticida.

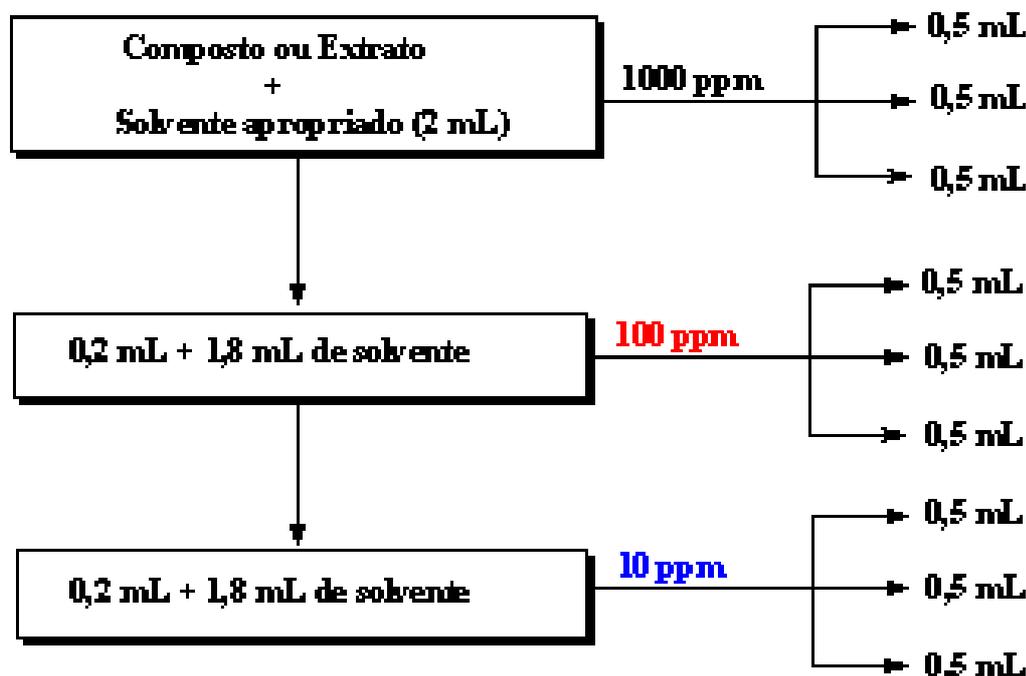
2.2 Experimental

O ensaio foi desenvolvido de acordo com a técnica proposta por McLaughlin ^[76], sendo que o resultado positivo indica atividade citotóxica e/ou inseticida.

Ovos de *Artemia salina* foram colocados para eclodir em solução de sal marinho (38,0 g/L), num pequeno recipiente coberto parcialmente, pois as larvas possuem fototropismo positivo (**são atraídas pela luz**). Este sistema foi deixado durante dois dias (48 h) para que os ovos se convertessem em larvas tipo nauplii.

Para estes experimentos foram utilizados 20,0 mg de cada um dos extratos e frações. As amostras foram preparadas em 03 (três) concentrações diferentes (1000 ppm, 100 ppm e 10 ppm), diluindo-se as amostras com solventes apropriados para solubilização de cada amostra, mantendo-se sempre o volume ajustado de 0,5 mL (**Fluxograma 12**)

Após a evaporação total do solvente, cada um dos nove frascos recebeu uma gota de dimetilsulfóxido (DMSO), cerca de 3,0 mL de solução de sal marinho (38,0 g/L), 10 larvas de *Artemia salina* e o volume ajustado para 5,0 mL. Os frascos foram deixados em repouso e descobertos e, após 24 horas procedeu-se a contagem do número de camarões sobreviventes. Os dados obtidos foram analisados em programa Probit, o qual foi obtido pelo Dr. McLaughlin, para análise estatística e assim determinar os valores de CL₅₀.



Fluxograma 12: Procedimento para diluição da amostra no teste com *Artemia salina*

3. DOENÇA DE CHAGAS^[77]

A Doença de Chagas, assim denominada em homenagem ao médico Dr. Carlos Chagas que a descreveu em 1909, é causada pelo protozoário *Trypanosoma cruzi*, transmitida ao homem e a outros animais habitualmente através das fezes do inseto *Triatoma infestans* (sub-Família: *Triatominae*), vulgarmente conhecido como "chupões", "fincões", "bicudos", "chupanças" e "barbeiro". Geograficamente, esta parasitose é exclusiva do Continente

Americano, estendendo-se desde o México até o sul da Argentina (**Figura 59**).

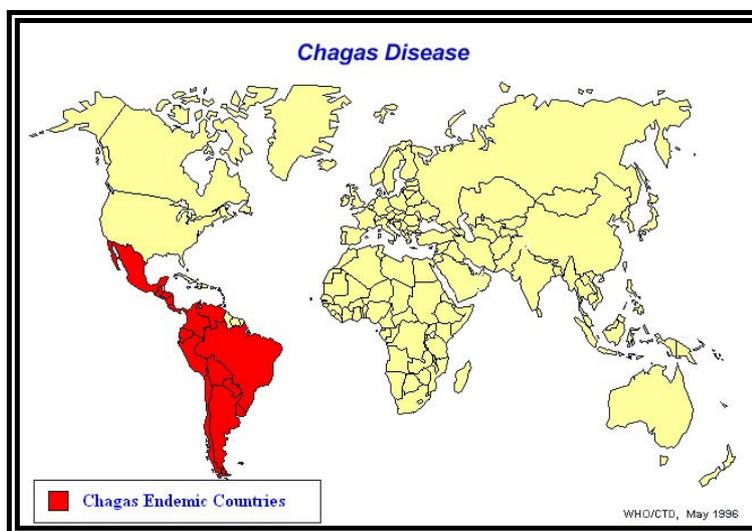


Figura 59: Distribuição geográfica de ocorrências da Doença de Chagas

Uma vez infectado, o indivíduo passa por duas etapas da doença: a fase aguda, que aparece logo após a infecção e a fase crônica, que aparece depois de um período silencioso, que pode perdurar por vários anos (**Figura 60**).

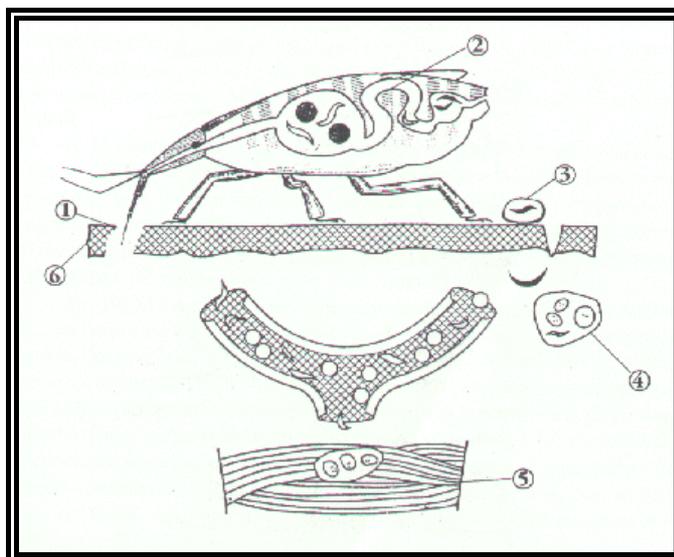


Figura 60: Ilustração representando o ciclo da doença de Chagas

1. O barbeiro pica uma pessoa infectada com o parasita. 2. No seu intestino os parasitas se reproduzem. 3. O barbeiro deposita as fezes na pele

da pessoa, que se infecta com o *T. cruzi* quando se coça. **4.** Os parasitas invadem primeiro as células da pele e em seguida a circulação sanguínea. **5.** Na fase assintomática da doença, os *T. cruzi* se concentram nas fibras musculares. **6.** O ciclo recomeça quando a pessoa é novamente picada.

As lesões da fase crônica afetam irreversivelmente órgãos internos, principalmente o coração, esôfago e colo, além do sistema nervoso periférico. Depois de um período assintomático de vários anos, 27% dos indivíduos infectados desenvolvem sintomas cardíacos, resultando nos casos de morte súbita; 6% desenvolvem problemas digestivos, principalmente a dilatação e alteração dos movimentos do esôfago (megaesôfago); e 3% apresentam comprometimento do sistema nervoso periférico.

O risco de infecção por Doença de Chagas está diretamente relacionado com o grau de pobreza, uma vez que o “barbeiro”, encontra um habitat favorável nas fendas das paredes e telhados de choupanas nas áreas rurais e nas favelas da periferia urbana.

Ao sugar o sangue do homem e de outros pequenos mamíferos, o barbeiro, tanto transmite a Doença de Chagas quanto a adquirem, caso o sangue já esteja contaminado (**Figuras 61 e 62**).

A migração de pessoas das zonas rurais para urbanas, que ocorreram na América Latina entre os anos de 1970 e 1980, modificaram os padrões epidemiológicos tradicionais da Doença de Chagas, transformando-a numa infecção urbana, que pode ser transmitida pela transfusão de sangue.

Os números de infecção sanguínea nos bancos de sangue de algumas cidades do continente americano variam entre 3,0 e 53,0%, mostrando que a permanência do *Tripanossoma cruzi* no sangue infectado é mais alta do que na infecção por HIV e hepatites B e C.



Figura 61: Inseto triatomine (*Triatoma infestans*), vista dorsal e posição de alimentação

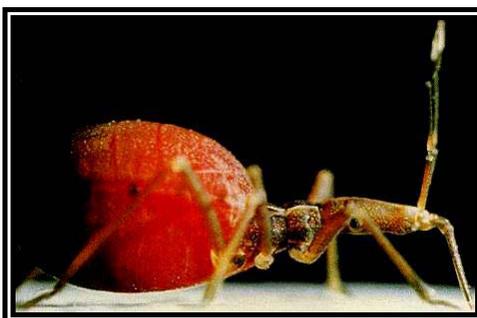


Figura 62: Inseto triatominae (*Triatoma infestans*) após sugar sangue de um indivíduo

A falta de um medicamento efetivo contra a doença na fase aguda e crônica justifica a busca de drogas mais eficazes e menos tóxicas que aquelas utilizadas atualmente, mesmo frente a inúmeras tentativas sem sucesso.

Em 1961, iniciou-se um período de tentativas de tratamento que resultou, principalmente, nos dois medicamentos atualmente utilizados, que atuam sobre todas as formas do parasita: o *nifurtimox* e o *benzonidazol* que apresentam baixa eficiência e fortes efeitos colaterais (Figura 63) ^[78].

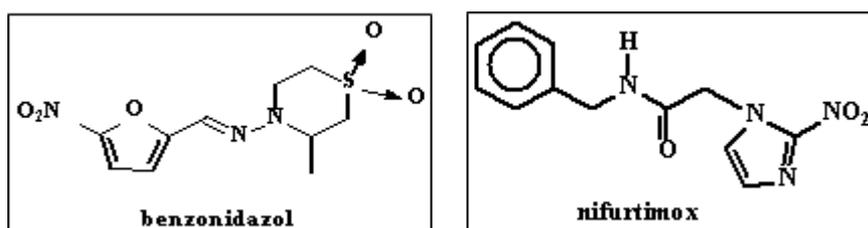


Figura 63: Estrutura dos fármacos benzonidazol e nifurtimox

Apesar destes medicamentos serem utilizados no combate a parasitose, sua capacidade curativa encontra-se ainda sob avaliação do xenodiagnóstico (critério parasitológico) e das provas sorodiagnósticas (critério sorológico).

Para se desenvolver drogas mais efetivas, menos tóxicas e com efeitos colaterais reduzidos, necessitamos conhecer totalmente os mecanismos metabólicos e o ciclo de vida do *Trypanosoma cruzi*, o qual se apresenta bastante complexo tanto no inseto quanto no hospedeiro mamífero, durante o qual se apresenta sob três formas: tripomastigotos, epimastigotos e amastigotos.

Tripomastigotos são formas flageladas responsáveis pela infecção e que estão presentes no meio circulante. As formas amastigotos são aflageladas, destituídas de movimento, encontrando-se agrupadas formando os chamados ninhos parasitários no interior dos tecidos. Epimastigotos são formas flageladas encontradas na interconversão das formas tripomastigotos e amastigotos.

Na forma sanguínea do hospedeiro mamífero o parasita apresenta uma característica muito particular, a presença da organela denominada glicossomo, onde ocorre a glicólise. Ela também não apresenta citocromos e a mitocôndria é muito reduzida, tornando assim, sua cadeia respiratória bastante suprimida. Desta forma, o protozoário fica totalmente dependente da via glicolítica como fonte de energia (**ATP**).

No interior do glicossomo, foram identificadas nove enzimas, destas, sete estão envolvidas na degradação da glicose (glicólise) e as outras duas na via do glicerol^[79,80].

3.1 A enzima alvo Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH)

Com o objetivo de desenvolver novas drogas para combater doenças causadas por parasitas dos gêneros *Trypanosoma* e *Leishmania* (várias espécies responsáveis pela Leishmaniose), as estruturas tridimensionais de

algumas de suas enzimas glicolíticas foram determinadas: Triosefosfato isomerase (TIM) de *T. brucei* [81], Gliceraldeído 3-fosfato Desidrogenase (GAPDH) de *T. brucei* [82] e de *L. mexicana* [83]. As informações obtidas sugerem que a GAPDH de *T. cruzi* (**Figura 64**) pode ser utilizada como um alvo interessante para o desenho de drogas contra a doença de Chagas.

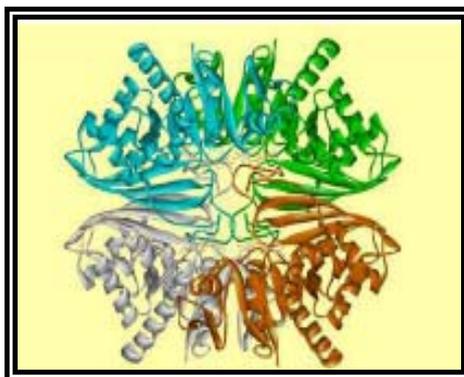


Figura 64: Estrutura cristalina da enzima glicolítica GAPDH de *T. cruzi*, a qual é composta de 4 monômeros expressos nas cores verde, azul, amarelo ouro e vermelho. A estrutura natural apresenta moléculas de NAD em todos os monômeros

3.2 Ensaio bioquímico frente à enzima GAPDH de *Trypanosoma cruzi* [84] †

A enzima glicolítica Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH) catalisa a conversão de gliceraldeído-3-fosfato em 1,3-difosfoglicerato, na presença de fosfato inorgânico e NAD⁺ como cofator; esta é uma enzima recombinante obtida em um sistema de expressão de *Escherichia coli*.

Os ensaios de atividade são feitos de acordo com uma modificação de um procedimento previamente descrito [85], pela medida espectrofotométrica de NADH formado em 30 segundos a 340 nm. A mistura reacional contém (volume final de 1,0 ml): 50 mM de tampão Tris-HCl pH 8,6

† Os testes bioquímicos são feitos em colaboração com o Laboratório de Cristalografia de Proteínas e Biologia Estrutural do Instituto de Física de São Carlos da Universidade de São Paulo (IFSCar-USP).

com 1 mM de EDTA e 1mM de β -mercaptoetanol, 30 mM de arseniato de sódio, 2,5 mM de NAD, 0,3 mM de G3P e 4-9 μ g de proteína.

Para testar a inibição da enzima são preparadas soluções de extratos brutos e/ou substâncias puras em DMSO (concentração de 1,0 mg/mL), que são adicionados ao meio reacional, fornecendo concentrações finais que variam entre 100, 50, 25 e 10 μ g/mL do material a ser testado. Ensaios controle são feitos na ausência das substâncias, mas com adição de igual volume de DMSO. Todas as medidas são feitas em triplicatas e considera-se o valor da média.

O resultado da reação enzimática, acompanhada por espectrofotometria a 340 nm, é obtido pela diferença de absorbância entre os tempos $t=30$ s e $t=0$ s. Com o valor desta diferença de absorbância, pode-se calcular a atividade específica da enzima.

Cálculos das atividades específicas: A atividade específica (U/mg) da enzima e do controle foi calculada usando a fórmula a seguir:

$$(U/mg) = \{(\Delta \text{ absorbância} / \Delta t) \times \text{volume da cela}\} / 6,22 \times \text{volume da enzima} \times [\text{enzima}]$$

Onde $\Delta t = 0,5$ minuto; volume da cela = 1,00 mL; $\epsilon_{\text{NADH}} = 6,22 (\mu\text{Mol}/\text{cm}^3)^{-1} \text{cm}^{-1}$; volume da enzima = 0,005 mL; [enzima] = concentração da enzima = 0,3 e 0,9 mg/mL.

3.3 Atividade inibitória da enzima GAPDH de *Trypanosoma cruzi*

A atividade inibitória foi obtida usando o meio reacional descrito acima, em um volume total de 1000 μ l. As absorbâncias foram lidas no comprimento de onda igual a 340 nm no intervalo de 30 segundos. Os extratos foram testados nas concentrações de 100 μ g/mL em 10% de DMSO usando 5 μ l de GAPDH na concentração de 0,30 mg/mL. Em cada caso foi

feita uma solução controle, usando somente 10% de DMSO no meio reacional, a qual foi considerado o controle positivo do teste. A atividade específica da enzima GAPDH de *T. cruzi* não é significativamente afetada pela adição de 10% de DMSO. Os dados são obtidos pela média de três repetições e os valores de porcentagem de inibição obtidos usando a seguinte fórmula:

$$\% \text{ de atividade inibitória} = \left\{ \frac{U/\text{mg controle} - U/\text{mg composto}}{U/\text{mg controle}} \right\} \times 100$$

4. AS LEISHMANIOSES

As Leishmanioses representam um grupo de zoonoses causadas por diversas espécies e subespécies de protozoários do gênero *Leishmania* Ross (família Trypanosomatidae), tendo como inseto vetor os chamados flebotomíneos (**Figura 65**)^[86].



Figura 65: *Lutzomyia longipalpis*

As leishmanioses são encontradas praticamente em todo o globo terrestre, com ampla distribuição em todos os continentes, principalmente nos países subdesenvolvidos, onde atinge proporções endêmicas, com cerca de 400 mil pessoas contaminadas anualmente. Os dados relacionados com a doença apontam o registro de casos em aproximadamente 90 países, com estimativas de 12 milhões de pessoas infectadas em todo o mundo constituindo, assim, um sério problema de saúde pública em crescente expansão^[86].

4.1 Distribuição Geográfica

De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), as leishmanioses são consideradas endêmicas em 88 países (**Figura 66**), dos quais 72 são países em desenvolvimento:

- 1) 90% de todos os casos de leishmanioses visceral ocorrem em Bangladesh, Brasil, Índia, Nepal e Sudan;
- 2) 90% dos casos de leishmanioses muco-cutâneas ocorrem na Bolívia, Brasil e Peru;
- 3) 90% dos casos de leishmanioses cutâneas ocorrem no Afeganistão, Brasil, Irã, Peru, Arábia Saudita e Síria.



Figura 66: Distribuição geográfica de ocorrências das Leishmanioses

As leishmanioses são conhecidas e caracterizadas por apresentar uma diversidade de sintomas clínicos: **visceral, muco-cutânea, cutânea e difusa** [87].

5. TIPOS DE LEISHMANIOSES

5.1 Leishmaniose Visceral

Calazar ou leishmaniose visceral é uma doença causada pelo protozoário da espécie *Leishmania donovani* Laveran. Epidemiologicamente trata-se de uma zoonose de canídeos, felídeos, roedores e marsupiais, sendo transmitido ao homem pelo inseto vetor pertencente à espécie *Lutzomyia longipalpis* (família: *Psychodidae*, subfamília: *Phlebotaminae*).

O flebótomo é um mosquito pequeno, cor de palha e grandes asas pilosas dirigidas para trás e para cima, conhecido popularmente por nomes como: *birigüi, mosquito palha, cangalhinha ou asa dura*.

A doença é transmitida pela fêmea do inseto vetor, onde esta, tornando-se infectada no momento em que suga o sangue de um animal contaminado, transmite o parasita através de sua saliva quando pica outro animal ou o homem, com o intuito de ingerir sangue para o desenvolvimento de seus ovos (**Figura 67**).

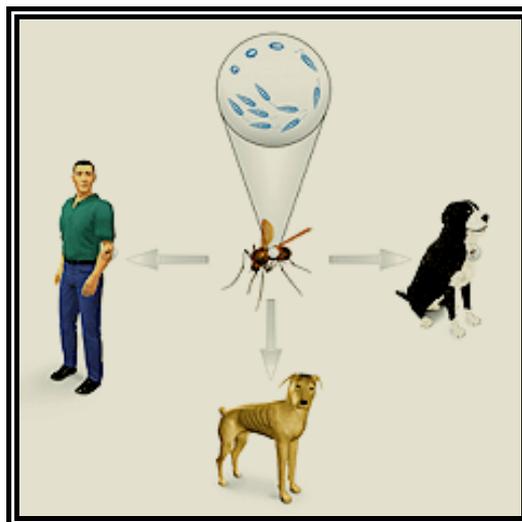


Figura 67: Ciclo de transmissão da leishmaniose

Caracteriza-se clinicamente, na maioria dos casos, por febre irregular de longa duração, emagrecimento, queda de pêlos, anemia, aumento do volume de certos órgãos, principalmente baço e fígado. Pode ocasionar também, sintomas hemorrágicos, aparecimento de tosse seca e sinais característicos de bronquite, ou ainda edemas nas faces e nos membros^[87].

Podemos observar, portanto, que se trata de uma doença grave que, quando não tratada de forma adequada, pode levar a morte.

5.2 Leishmaniose muco-cutânea

A leishmaniose muco-cutânea ou leishmaniose tegumentar Americana, é causada pelo protozoário da espécie *Leishmania brasiliensis* Viana, sendo também conhecida como espúndia ou úlcera de Bauru.

Apesar de ser considerada uma zoonose, a leishmaniose tegumentar americana acomete a cada ano milhares de indivíduos, deixando como saldo um vasto espectro de formas clínicas.

É uma moléstia infecciosa crônica, caracterizada pelo comprometimento cutâneo constante, bem como por lesões das mucosas, do nariz, boca, cavidade da garganta e cordas vocais, sendo transmitida, também, pela picada do inseto vetor fêmea de várias espécies do gênero *Lutzomyia*, que ao sugar o sangue do animal picado inocula as formas

Promastigotas.

No Brasil, não existem dados concretos para uma avaliação segura do número de pessoas atingidas, mas as estatísticas dos órgãos de saúde pública têm registrado anualmente cerca de 13000 novos casos da doença no Brasil.

Evidentemente, estes valores são inferiores aos números reais, pois considerando as deficiências no sistema de notificação compulsória de doenças transmissíveis e a assistência médica precária na maioria das zonas rurais, onde muitos doentes deixam que “*o mal se cure espontaneamente*”, impossibilitando seu registro.

5.3 Leishmaniose cutânea

A leishmaniose cutânea ou botão do oriente é causada pelo protozoário *Leishmania tropica* Wright, sendo caracterizada, principalmente, por uma lesão cutânea no local da picada do flebotomíneo pertencente à espécie *Phlebotomus papatasi*. Trata-se, portanto de uma doença benigna não encontrada, até o momento, no continente Americano.

5.4 Leishmaniose difusa

Um aspecto peculiar da leishmaniose tegumentar é a forma denominada difusa ou hansenóide, causada por parasitas do subgênero *Leishmania*, especialmente a *L. amazonensis*. Caracteriza-se pela presença de nódulos isolados ou agrupados, máculas, pápulas e placas infiltradas.

Como uma característica intrínseca, todos os protozoários do gênero *Leishmania* apresentam uma organela denominada glicossomo, fazendo deles dependentes da via glicolítica como fonte de energia. Essa via glicolítica é regida por várias enzimas, das quais destaca-se a GAPDH de *Leishmania* que tem um papel fundamental na glicólise.

6. As enzimas alvo adenina-fosforribosil-transferase (APRT), hipoxantina-guanina-fosforribosil-transferase (HGPRT) e xantina-fosforribosil-transferase (XPRT)

O grande número de drogas usadas atualmente para o tratamento das leishmanioses foi obtido através de resultados empíricos.

O uso de drogas potencialmente tóxicas (*mutagênicas e/ou carcinogênicas*), a necessidade de tratamentos prolongados, a administração de várias drogas e os efeitos colaterais indesejáveis, mostram que a quimioterapia ainda é bastante complicada, estando longe do ideal ^[88].

A biossíntese de purino nucleotídeo é catalizada pelas enzimas da família das fosforribosiltransferases (PRTases). A maioria dos organismos sintetiza adenina nucleotídeos pela via *de novo* e via *de recuperação*. Por outro lado, todos os protozoários parasitas examinados até o momento são estritamente auxotróficos na aquisição de purino nucleotídeo, devido à ausência do caminho biossintético *de novo*. Da mesma forma, protozoários Kinetoplastídeos do gênero *Leishmania* são inteiramente dependentes das fosforribosil-transferases (PRTases) no caminho reciclante de purino nucleotídeos pela *via de recuperação*, sendo elas: a adenina PRTase (**APRT**), hipoxantina-guanina PRTase (**HGPRT**) e xantina PRTase (**XPRT**) ^[89].

Assim, a maior promessa para o desenvolvimento racional de novas drogas antiparasitárias baseia-se na exploração dessas diferenças bioquímicas ou metabólicas fundamentais entre o parasita e o hospedeiro, na busca por substâncias inibidoras das enzimas APRT, HGPRT e XPRTases.

Entre os fármacos disponíveis para a doença, encontram-se os antimoniais pentavalentes, como o antimoniato de meglumina (Glucantime) e o estibogluconato de sódio (Pentostam) (**Figura 68**), que apresentam vários efeitos tóxicos renais e cardíacos. Uma segunda linha é empregada no tratamento de casos mais resistentes, como a Anfatericina B (**Figura 69**). Entretanto, características indesejáveis (toxicidade severa) destas

substâncias, aliadas ao aparecimento de forma resistente de *Leishmania*, têm aumentado a necessidade de novos fármacos mais eficazes e menos tóxicos.

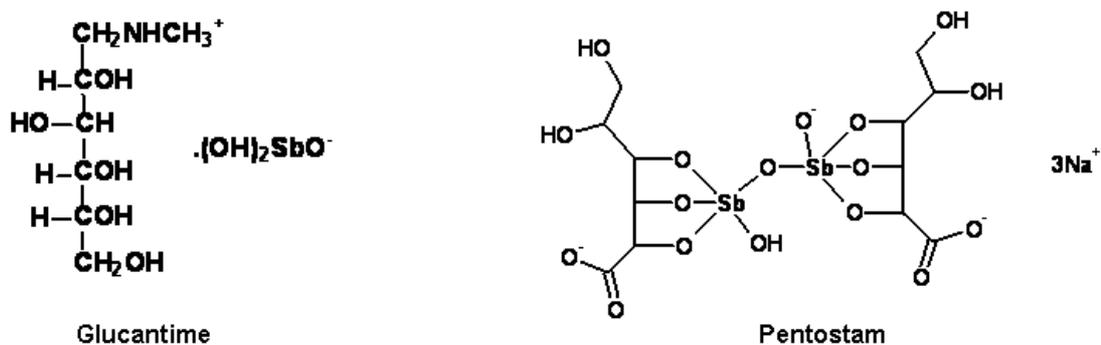


Figura 68: Estruturas das Glucantime e Pentostam

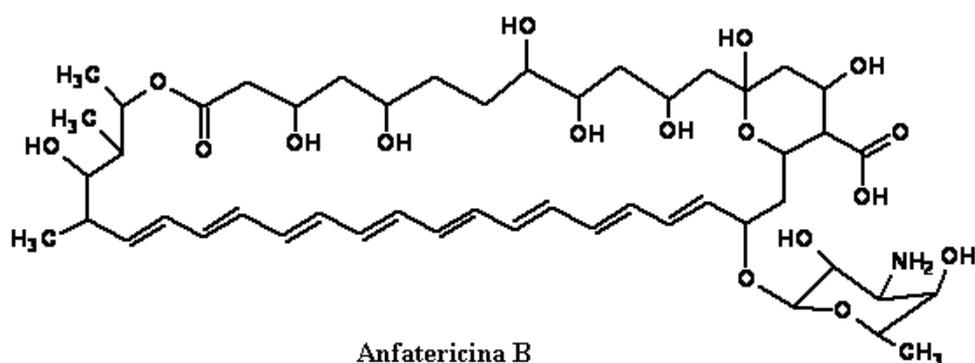
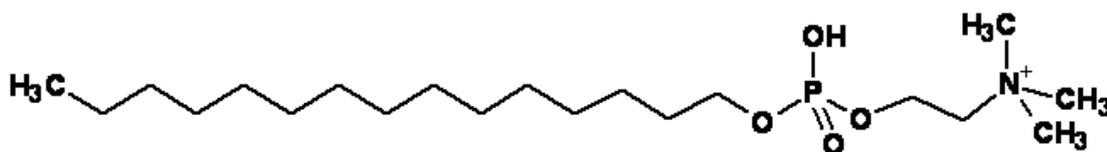


Figura 69: Estrutura da Anfatericina B

Uma outra droga promissora como futuro fármaco, podendo ser administrada via oral para o tratamento da doença, é a miltefosina (**Figura 70**). Entretanto, seu mecanismo de ação contra a *leishmania* ainda não é bem compreensível. Sabe-se, apenas, que esta droga é capaz de bloquear a síntese e alterar a composição da membrana do parasita e que apresenta poucos efeitos colaterais, sendo eles: vômito e diarreia.



Miltefosina

Figura 70: Estrutura da Miltefosina

7. A enzima APRT (adenina-fosforribosil-transferase)

A enzima Adenina fosforribosil-transferase (APRT) (**Figura 71**) catalisa a formação de Adenosina 5' monofostato (AMP), a partir dos substratos adenina e 5-fosforibose 1-pirofostato (PRPP) na presença de Magnésio como co-fator.

Os ensaios bioquímicos com as enzimas HGPRT e XPRT encontram-se, até o momento, em fase de desenvolvimento e adaptações.

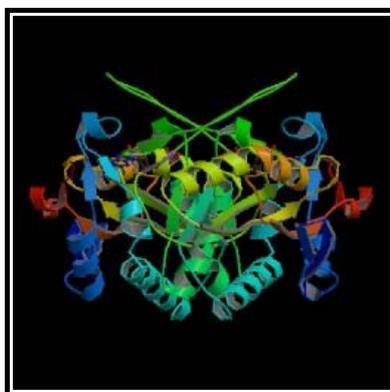


Figura 71: Estrutura cristalográfica da enzima glicolítica da APRT de *L. tarentolae*

8. Ensaio bioquímico frente à enzima APRT de *Leishmania tarentolae*^z

Os extratos e frações obtidos de *Hancornia speciosa*, também foram avaliados quanto à atividade inibidora da enzima APRT.

Os resultados destes testes fornecem um suporte mais adequado para o desenho racional de novas drogas leishmanicidas e os ensaios de atividade são feitos pela medida espectrofotométrica de AMP formado em 60 segundos a 259 nm. A mistura reacional contém (volume final de 0,5 mL): 100 µM de Adenina, 560 µM de PRPP, 5 mM de MgCl₂, 100 mM de tampão Tris-HCl pH 7,4 e 7,5 µg de APRT. Para testar a inibição da enzima são utilizadas 475 µl da mistura reacional e 25 µl das soluções candidatas a possíveis inibidores, fazendo assim, com que a concentração final do extrato e/ou fração seja de 100 µg/ml. A atividade da enzima pura é 0,001168 mM de AMP formado por mg/min.

A atividade específica (U/mg) da enzima foi calculada usando a fórmula a seguir:

$$(U/mg) = \{(\Delta \text{absorbância}/\Delta t) \times \text{volume da cela}\} / 1,24 \times \text{volume da enzima} \times [\text{enzima}]$$

Onde $\Delta t = 1$ minuto; volume da cela = 1,00 mL; $\epsilon_{AMP} = 1,24 (\mu\text{Mol}/\text{cm}^3)^{-1} \text{cm}^{-1}$; volume da enzima = 0,005 mL; [enzima] = concentração da enzima = 0,9 mg/mL.

8.1 Atividade inibitória de APRT de *Leishmania tarentolae*

A atividade inibitória foi obtida usando o meio reacional descrito acima, em um volume total de 1000 µl. As absorbâncias foram lidas no

^z Os testes bioquímicos são feitos em colaboração com o Laboratório de Cristalografia de Proteínas e Biologia Estrutural do Instituto de Física de São Carlos da Universidade de São Paulo (IFSCar-USP).

comprimento de onda igual a 259 nm no intervalo de 60 segundos. Os extratos foram testados na concentração de 50 µg/mL em 10% de DMSO, usando 5 µl de APRT na concentração de 0,9 mg/mL. Em cada caso foi feita uma solução do branco, usando somente 10% de DMSO no meio reacional, o qual foi considerado o controle positivo do teste. A atividade específica da enzima APRT não é significativamente afetada pela adição de 10% de DMSO. Os dados são obtidos pela média de três repetições e os valores de porcentagem de inibição obtidos usando a seguinte fórmula:

$$\% \text{ de atividade inibitória} = \left\{ \frac{U/\text{mg controle} - U/\text{mg composto}}{U/\text{mg controle}} \right\} \times 100$$

9. TESTE DE ATIVIDADE ANTIOXIDANTE[§]

9.1 Importância

A hepatotoxicidade associada às drogas e toxinas tem recebido grande atenção nos últimos anos, particularmente após a constatação de que o acetaminofeno (*paracetamol*), uma droga largamente utilizada, inclusive sem prescrição médica, constitui-se a principal causa de insuficiência hepática aguda^[90]. As lesões hepáticas podem ocorrer por inalação, ingestão ou administração de vários agentes farmacológicos, químicos e também derivados de plantas^[90].

Os remédios populares de origem animal e vegetal têm sido utilizados por muito tempo para prevenir ou tratar doenças hepáticas, e em estudos recentes provaram ser benéficas^[91], sendo que um grande número de preparações baseadas em plantas medicinais encontra-se disponível no mercado^[90].

[§] Os testes bioquímicos para avaliação da atividade hepatoprotetora do látex dos frutos verdes de *Hancornia speciosa* foram feitos em colaboração com Prof. Dr. Humberto Reis Matos (Departamento de Fisiologia da Universidade Federal de Sergipe).

Em nossos levantamentos sobre as propriedades farmacológicas de *Hancornia speciosa* Gomes, citamos que o suco leitoso do fruto e o látex são usados como medicamento caseiro para o tratamento de várias doenças.

Dessa forma, fez-se necessário comprovar também o efeito antioxidante em pré-tratamento com o extrato clorofórmico do látex dos frutos verdes (ECLFr) de *Hancornia speciosa* Gomes e indução da lesão hepática com tetracloreto de carbono (CCl_4).

9.2 Determinações da lipoperoxidação através das substâncias reativas com o ácido tiobarbitúrico (TBARS) ^[92]

Adicionou-se em um tubo de ensaio 1,0 mL de homogenato preparado em tampão fosfato (pH= 7,4), KCl (1,15%), EDTA 7mM e HCl 0,6M; 50 μ L de EDTA; 100 μ L de SDS (dodecil sulfato de sódio); 50 μ L de BHT, estabilizante para cessar as reações oxidativas; 1,5 mL de tampão acetato de sódio e 1 mL de ATB (ácido tiobarbitúrico). A amostra foi levada a banho fervente durante 30 minutos e depois de esfriar extraiu-se com n-butanol. A absorvância foi lida em comprimento de onda de 532 nm. A concentração foi determinada usando o coeficiente de extinção molar de 156000. As concentrações destas substâncias foram relacionadas com a concentração de proteína plasmática determinada pelo método de Bradford. Os dados da absorvância foram obtidos através de um espectrofotômetro. Análise estatística foi feita usando o programa Student's t-test.

9.3 Dosagem de proteínas (método de Bradford)

Reagente para dosagem: 100 mg de azul brilhante de coomassie G-250 dissolvidos em 50 mL de etanol 95%. A essa solução foram adicionados 100 mL de ácido fosfórico 85% (p/v). A solução resultante foi diluída para o volume final de 1 litro. Solução A: 0,15 M NaCl. Solução B: 300 mM NaOH.

O método consiste na observação de que o azul brilhante de coomassie G-250 existe em duas cores diferentes: vermelho e azul. A forma vermelha é convertida para a forma azul após ligação à proteína. O complexo é formado rapidamente (2 min), permanece disperso em solução por um tempo relativamente longo (1 h) e tem um alto coeficiente de extinção, o que permite grande sensibilidade na dosagem das proteínas.

A curva-padrão para dosagem das proteínas foi construída utilizando-se albumina de soro bovino (10 a 100 μg de albumina em 100 μL de solução). As soluções de proteína foram preparadas na solução A. Aos tubos contendo 100 μL de solução de proteína foram adicionados 5 mL da solução para dosagem. Após agitação, a absorbância a 595 nm foi medida em cubetas de 3 mL contra o branco contendo 100 μL da solução A e 5 mL da solução para dosagem. A massa de proteína foi, então, plotada contra a absorbância correspondente, resultando na curva padrão para determinação do conteúdo de proteínas em amostras desconhecidas.

Para a dosagem de proteínas nas amostras, os precipitados foram ressuspensos em 400 μL da solução B. As soluções de proteínas foram preparadas juntando-se 20 μL de cada amostra com 80 μL da solução A. Às soluções resultantes foram adicionados 5 mL da solução para dosagem e a leitura da absorbância foi feita como descrito anteriormente.

10. RESULTADOS E DISCUSSÕES

10.1 Bioensaio de Letalidade com *Artemia salina* ("Brine Shrimp Letality Test")

O resultado positivo deste ensaio é um indicador de toxicidade para "pre-screening" de compostos com atividade citotóxica quanto para compostos com atividade inseticida.

Este ensaio apresenta uma correlação positiva com os ensaios sobre células 9kb (carcinoma nasofaríngeo humano, $p= 0,036$ e $kappa= 0,56$), onde os valores de CL_{50} para citotoxicidade são geralmente próximos à décima parte dos valores CL_{50} encontrados nos bioensaios com *Artemia salina*.

Após análise estatística dos dados com o auxílio do programa Probit, não foi possível obter valores de CL_{50} para a maioria das amostras testadas, uma vez que os resultados foram muito negativos ou não convergiam entre si, conforme tabela abaixo (**Tabela 13**) observamos um baixo grau de mortalidade das larvas para a maioria das amostras testadas.

Os bioensaios com *Artemia salina* foram feitos com os extratos e frações provenientes do látex dos frutos, frutos (nos três estádios de maturação), folhas e ramos.

Estudo Fitoquímico de *Hancornia speciosa* Gomes

Tabela 13: Valores obtidos de larvas mortas (num total de 30) nos testes com extratos e frações obtidos de *Hancornia speciosa* Gomes

Concentração (ppm)	Total de larvas mortas	CL ₅₀ (µg/mL)	Concentração (ppm)	Total de larvas mortas	CL ₅₀ (µg/mL)
EHF		Ativo 46,5865	F11A		INATIVO
1000	30		1000	2	
100	19		100	6	
10	11		10	8	
EMF		Inativo >1000	F12A		INATIVO
1000	10		1000	3	
100	8		100	3	
10	5		10	1	
EHR		Inativo >1000	F1A		INATIVO
1000	12		1000	0	
100	9		100	1	
10	10		10	1	
EMR		Ativo 3,2637	F10A		INATIVO
1000	14		1000	1	
100	18		100	4	
10	16		10	1	
ECLFr		INATIVO	EMFrV1		INATIVO
1000	0		1000	0	
100	1		100	1	
10	1		10	1	
F4A		INATIVO			
1000	3				
100	4				
10	0				

Os bioensaios feitos com os extratos e frações, mostraram que estes não apresentam compostos tóxicos para as larvas, exceto para os extratos metanólico dos ramos (**EMR**) e hexânico das folhas (**EHF**) que apresentaram atividade.

10.2 Ensaios Bioquímicos frente às enzimas GAPDH de *T. cruzi* e APRT de *L. tarentolae*

Os testes bioquímicos frente às enzimas GAPDH de *Trypanosoma cruzi* e APRT de *Leishmania tarentolae*, foram feitos com os extratos brutos (**EMFr_{V1}**; **PHFr_{V1}**; **PHFr_{V2}**; **PCFr_{V1}**; **PHFr_{D/V}**; **PAEFr_{D/V}**; **PCFr_{D/V}**; **SpHAEFr_{D/V}**; **PAEFr_M**; **PCFr_M**; **PHFr_M**; **EMFr_{D/V}**; **EMFr_{V1}**; **EMFr_{M1}**; **EMFr_{M2}**) como também com outros extratos disponíveis no nosso laboratório (**DAEFr** e **DCFr**, respectivamente: extrato do decocto acetato de etila e extrato do decocto clorofórmio dos frutos verdes e sem látex de *Hancornia speciosa* Gomes) e com as frações reunidas provenientes das CC de purificação dos extratos. (Tabela 14).

Pela análise dos resultados, destacamos os altos valores de inibição dos extratos metanólicos das folhas (**EMF**) e dos ramos (**EMR**) frente à enzima GAPDH de *T. cruzi*, **76,2%** e **93,7 %**, respectivamente e a atividade inibitória mediana das frações **F4D**, **F5D** e **F6D** (**40,0**; **43,0** e **30,8 %**), provenientes do extrato da partição hexânica dos frutos maduros de *H. speciosa* (**PHFrM**) (Tabela 14).

Destaca-se também a atividade mediana frente à enzima APRT de *Leishmania tarentolae* das frações isoladas do extrato hexânico das folhas (**EHF**) de *Hancornia speciosa* Gomes (**F13G**, **F14G**, **F15G**, **F16G**, **F19G** e **F20G**), principalmente a fração **F15G**, que apresentou uma alta percentagem inibitória significativa (**75,7 %**) frente a esta enzima (Tabela 15).

É interessante observar que as frações **F1A** e **F13G** referentes aos ésteres 3- β -O-acil lupeol apresentaram atividade inibitória mediana de **44,6%**

e 45,6% respectivamente frente à enzima APRT de *Leishmania tarentolae*, mostrando que estes ésteres apresentam um potencial mediano para atividade leishmanicida (**Tabela 15**). Além destas frações (**F1A e F13G**), é de suma importância relatar que os extratos mais ativos frente à enzima GAPDH de *Trypanosoma cruzi* foram as mais polares, a citar: o extrato metanólico das folhas (**EMF**) e dos ramos (**EMR**) de *Hancornia speciosa* (**Tabela 8**). Enquanto que frente à enzima APRT de *Leishmania tarentolae*, a fração mais ativa foi **F15G** proveniente do extrato hexânico das folhas de *H. speciosa* (**EHF**), um extrato apolar (**Tabela 15**).

É importante mencionar que as demais amostras enviadas para estes testes, turvaram quando em contato com o meio em que é feita a reação enzimática. Quando isso acontece, a medida correta através de sua absorvância no UV fica comprometida. Uma maneira de superar esse problema se dá através da diminuição da concentração das amostras e/ou efetuar a medida através de calorimetria. No entanto, esta técnica não está disponível no Laboratório de Cristalografia da USP. Vale ainda ressaltar que, mesmo diante de uma porcentagem de inibição mediana, não podemos concluir que haja ausência de qualquer substância ativa nos extratos, uma vez que eles são altamente complexos. Com o fracionamento dos demais extratos, posterior purificação e identificação dos componentes das frações, poderemos ter uma melhor resposta nestes bioensaios. Os testes com as outras frações reunidas e com os demais extratos que turvaram durante a realização dos experimentos, poderão ser repetidos em testes com concentrações menores.

Estudo Fitoquímico de *Hancornia speciosa* Gomes

Tabela 14: Efeito dos extratos e frações na atividade de GAPDH de *Trypanosoma cruzi* (100 µg/mL)

Extratos e Frações	% de atividade inibitória	Extratos e Frações	% de atividade inibitória
EMFrV1	8,7	PHFr _M	0,0
DAEFr	26,5	EMFr _{DV}	24,0
PHFrV1 ₁	35,0	EMFrV ₁	2,24
PHFrV1 ₂	26,7	EMFr _M 1	13,9
PCFrV1	31,2	EMFr _M 2	21,2
F1D	10,5	F1G	7,53
F2D	18,2	F10G	0,0
F3D	4,0	F11G	0,0
F4D	40,0	F12G	0,0
F5D	43,0	F13G	0,0
F6D	30,8	F14G	0,0
F7D	7,7	F15G	9,7
F11D	10,6	F16G	11,4
F13D	8,2	F18G	9,5
F14D	18,8	F19G	16,3
F15D	8,3	F20G	17,4
F16D	9,4	F21G	19,1
F17D	4,4	F22G	18,7
F18D	5,0	F23G	19,5
F19D	10,5	F24G	10,3
F20D	5,7	F26G	19,0
PHFr _{DV}	15,7	F27G	5,0
PAEFr _{DV}	0,19	F28G	16,7
PCFr _{DV}	11,8	F29G	16,3
SpHAEFr _{DV}	18,7	F30G	13,5
PAEFr _M	13,1	EMF	76,2
PCFr _M	9,24	EMR	93,7

Tabela 15: Efeito dos extratos e frações na atividade de APRT de *Leishmania tarentolae* (50 µg/mL)

Extratos e Frações	% de atividade inibitória	Extratos e Frações	% de atividade inibitória	Extratos e Frações	% de atividade inibitória
EMFrV1	14,8	F9G	11,8	F18G	13,8
ECLFr	35,2	F10G	29,3	F19G	51,3
F1A	44,6	F11G	23,0	F20G	53,6
DCFr	4,7	F12G	27,5	F21G	20,1
DAEFr	28,2	F13G	45,6	F22G	0,0
PHFrV ₁	28,4	F14G	44,2	F23G	0,8
PCFrV1	20,3	F15G	75,7	F24G	0,0
F1G	3,0	F16G	39,7	F26G	0,0
F27G	1,4	F30G	0,0	HER	21,1
F28G	0,0	F32G	0,0	F29G	0,0
EHF	47,2				

10.3 Testes bioquímicos para avaliação da Atividade Antioxidante do Látex dos Frutos Verdes (ECLFr)

Os testes bioquímicos avaliando a atividade antioxidante do látex dos frutos verdes de *Hancornia speciosa* estão apresentados abaixo (**Tabela 16**):

Grupo 1 (controle): ratos tratados com solução salina 0,9% + Tween 80 por 5 dias;

Grupo 2 (látex): pré-tratamento com 100 mg/Kg com látex dos frutos verdes de *H. speciosa*;

Grupo 3: látex dos frutos verdes de *H. speciosa* (100 mg/Kg, 4 dias) e com CCl₄ (1 mL/Kg por 24 h)

Grupo 4: animais tratados com solução salina (4 dias) e CCl₄ (1 mL/Kg por 24h).

Tabela 16: Efeito do pré-tratamento do látex dos frutos verdes de *Hancornia speciosa* nas concentrações de TBARS em fígado de ratos depois do tratamento com CCl₄ (24 h)

TBARS (mmol/mg de proteína)	
Grupo 1	7,4 ± 2,1
Grupo 2	8,8 ± 2,6
Grupo 3	9,4 ± 1,6
Grupo 4	23,0 ± 5,2

Sabe-se que a atividade antioxidante está associada à capacidade que uma substância tem de seqüestrar os radicais livres liberados em uma lesão hepática [90]. Através dos valores encontrados (**Tabela 16**), observa-se que o extrato clorofórmico do látex dos frutos de *Hancornia speciosa* Gomes ofereceu significativo efeito antioxidante para os animais do **grupo 3**, que foram tratados com o látex e depois expostos à substância oxidante tetracloreto de carbono (CCl₄).

Ao compararmos os animais dos **grupos 3 e 4** observamos um menor grau de oxidação lipídica para os animais do **grupo 3**, conseqüentemente menor dano foi causado ao fígado dos ratos experimentados. O que indica uma alta capacidade seqüestradora de radicais livres dos compostos presentes no extrato do látex dos frutos verdes de *Hancornia speciosa* Gomes.

Parte IV: Considerações Finais

Parte IV: Considerações Finais

A caracterização química dos voláteis de *Hancornia speciosa* Gomes representa o primeiro caso reportado e os nossos resultados mostraram que há diferenças tanto qualitativa quanto quantitativas na composição dos voláteis das folhas e frutos. Assim, o estudo dos componentes voláteis das folhas nos permitiu verificar que há mudanças na composição química e nas percentagens relativas dos componentes majoritários. Desta forma, foi possível verificar um decréscimo nas percentagens dos álcoois como (*E*)-3-hexenol (68,6% nas folhas frescas para 13,3% após 10 dias de secagem à temperatura ambiente); enquanto houve um aumento significativo no percentual dos monoterpenos oxigenados como geraniol (2,4% nas folhas frescas para 54,7% após 10 dias de secagem à temperatura ambiente).

Enquanto as análises dos componentes voláteis dos frutos mostraram que os componentes principais variam de acordo com o estágio de maturação ^[23]. Desta forma, há o predomínio de ésteres, álcoois e furfural nos frutos maduros; enquanto nos frutos verdes, os principais componentes são o óxido de *cis*-linalool, óxido de *trans*-linalool e linalool. Já na composição química dos voláteis dos frutos “de vez” há o predomínio tanto de ésteres, álcoois e furfural quanto de óxido de *cis*-linalool, óxido de *trans*-linalool e linalool.

O estudo fitoquímico de *Hancornia speciosa* Gomes é inédito na literatura, permitindo o isolamento de doze substâncias, sendo elas: 7 ésteres 3-β-O-acil lupeol (**1**, **2**, **3**, **4**, **5**, **6** e **7**), 3 triterpenos (**8**, **9**, e **10**), 1 éster diidroxilado 3-β-O-acil lupeol (**11**) e a sacarose na sua forma peracetilada (**12**).

Nos ensaios bioquímicos frente à enzima GAPDH de *T. cruzi* realizados com os extratos, partições e frações obtidos de *H. speciosa*, verificamos significativa atividade inibitória com os extratos mais polares (**EMF, 76,2%; EMR, 93,7%**) e atividade inibitória mediana das frações **F4D, F5D e F6D (40,0; 43,0 e 30,8 %)**, provenientes do extrato da partição hexânica dos frutos maduros de *H. speciosa* (**PHFrM**).

Nos ensaios bioquímicos frente à enzima APRT de *L. tarentolae* realizados com os extratos, partições e frações obtidos de *H. speciosa*, verificamos atividade mediana das frações isoladas do extrato hexânico das folhas (**EHF**) de *H. speciosa* (**F13G, F14G, F15G, F16G, F19G e F20G**), principalmente a fração **F15G**, que apresentou uma alta percentagem inibitória significativa (**75,7%**) da CC de purificação do extrato hexânico das folhas (**EHF**) e atividade inibitória mediana as frações **F1A e F13G** referentes aos ésteres 3- β -O-acil lupeol (**44,6% e 45,6%**, respectivamente), mostrando que estes ésteres apresentam um potencial mediano para atividade leishmanicida.

Os testes bioquímicos para avaliação da atividade antioxidante do látex dos frutos verdes de *Hancornia speciosa* Gomes apresentaram efeito hepatoprotetor significativo nos ratos experimentados.

Nos bioensaios de letalidade com *Artemia salina* realizados com os extratos, partições e frações obtidos de *Hancornia speciosa* Gomes, ficou evidente que a maioria destas amostras não são tóxicas às larvas, exceto pelos extratos hexânico das folhas (**EHF**) e metanólico dos ramos (**EMR**), que apresentaram resultados positivos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

[1]- BOLZANI, V.S.; JUNIOR, C. V. Os Produtos Naturais e a Química Medicinal Moderna. **Química Nova**. V.29, n.2, p. 326-337, 2006.

[2]- HOSTETTMANN, K.; QUEIROZ, E. F.; VIEIRA, P. C. Princípios ativos de plantas superiores. Série de textos da escola de verão em química- EdUFSCar: São Carlos, 2003.

[3]- PINTO, A. C.; JUNIOR, V. F. V. Plantas Medicinais: Cura Segura?. **Química Nova**, v. 28, n.3, p. 519-528, 2005.

[4]- DRUMOND, M.A.; KIILL, L.H.P.; LIMA, P.C.F.; de OLIVEIRA, M.C.; de OLIVEIRA, V.R.; de ALBUQUERQUE, S.G.; NASCIMENTO, C.E.S.; CAVALCANTI, J. 2000. Avaliação e identificação de ações prioritárias para a conservação, utilização sustentável e repartição de benefícios da biodiversidade do bioma Caatinga. Hipertexto disponível em http://www.biodiversitas.org/caatinga/relatórios/uso_sustentável.pdf.

[5]- CRAVEIRO, A. C.; CRAVEIRO, A. A. Alimentos Funcionais: A Nova Revolução. Editora Padetec- Universidade Federal do Ceará. Fortaleza-CE, 2003.

[6]- RAPINI, A. Sistemática: estudos em *Asclepiadoideae* (Apocynaceae) da Cadeia do Espinhaço de Minas Gerais. São Paulo, 2000. Tese de Doutorado. Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo.

[7]- RAHMAN, M. A.; MOSSA, J. S.; AL-SAID, M. S.; AL-YAHVA, M.A. Medicinal plant diversity in the flora of Saud Arabia 1: a report on seven plant families. **Fitoterapia**, v. 75, n.2, p. 149-161, 2004.

[8]- PHILLIPSON, J.D. Phytochemistry and medicinal plants. **Phytochemistry**, v. 56, p. 237-243, 2001.

[9]- KAM, T.S.; SIM, K.M.; T. KOYANO, T.; K. KOMIYAMA. Leishmanicidal alkaloids from *Kopsia griffithii*. **Phytochemistry**, v. 50, n.1, p. 75-79, 1999.

[10]- FERREIRA, L. C. P.; LONARDONI, M. V. C.; MACHADO, G. M. C.; LEON, L. L.; GOBBI, L.; PINTO, L. H. B.; OLIVEIRA, A. J. B. Anti-leishmanial activity of alkaloidal extract from *Aspidosperma ramiflorum*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.99, n.3, p.325-327, 2004.

[11]- KEAWPRADUB, N.; KIRBY, G. C.; STEELE, J. C. P.; HOUGHTON, P. J. Antiplasmodial activity of extracts and alkaloids of three *Alstonia* species from Thailand. **Planta Medica**, v. 65, n.8, p. 690-694, 1999.

[12]- TAN, P.V.; PENLAP, V. B.; NYASSE, B.; NGUEMO, J. D. B. Anti-ulcer actions of the bark methanol extract of *Voacanga africana* in different experimental ulcer models in rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 73, n.3, p. 423-428, 2000.

[13]- FAKEYE, T. O.; ITIOLA, O. A.; ODELOLA, H. A. Evaluation of the antimicrobial property of the stem bark of *Picralima nitida*. **Phytotherapy Research**, v. 14, n.5, p.368-370, 2000.

[14]- MIRANDA, A.L.P.; SILVA, J. R. A.; REZENDE, C. M.; NEVES, J. S.; PARRINI, S.C.; PINHEIRO, M. L. B.; CORDEIRO, M. C.; TAMBORINI, E.; PINTO, A. C. Anti-inflammatory and analgesic activities of the latex containing triterpenes from *Himatanthus sucuuba*. **Planta Medica**, v. 66, n. 3, p. 284-286, 2000.

[15]- frutasefloresexoticas.blogspot.com/2008/02/mangabeira.html. Acesso em 09/jun/2008.

[16]- JUNIOR, J. F. S. A Cultura da Mangaba. **Revista Brasileira de Fruticultura**. v.26, n.1, p 1-192, 2004.

[17]- SOUSA, C. S. Mangaba: Perspectivas e Potencialidades. **Bahia Agrícola**, v.7, n.1, p. 29-31, 2005.

[18]- LEMOS, R.P. Caracterização fenológica e teores de nutrientes da mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes). Paraíba, 1988. Projeto de Diplomação (Graduação em Agronomia)- Universidade Federal da Paraíba- UFPB.

[19]- FRANCO, C.F.O.; FILHO, J. C.; NETO, M. B.; ARAÚJO, I. A.; MATIAS, E. C.; MENINO, I. B.; LIMA, I. X.; MARINHO, S. J. O.; FONTINÉLLI, I. S. C. Mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes). EMEPA-Empresa Estadual de pesquisa Agropecuária da Paraíba S/A. Disponível em <http://www.emepa.org.br/mangaba.php>. Acesso em 27/out/03.

[20]- LEDERMAN, I.E.; SILVA JÚNIOR, J.F.; BEZERRA, J.E.F.; ESPÍNDOLA, A.C.M. Mangaba (*Hancornia speciosa* Gomes). Jaboticabal: FUNEP (Série Frutas Nativas, 2), São Paulo, 2000. 35p.

[21]- NETO, R. D. V. Cultura da mangabeira. Aracaju: Embrapa-CPATC, (Circular Técnica, 02), 1994. 16p.

[22]- ALVES, R. E., CARNELOSSI, M. A.G.; SILVA, S. M.; FIGUEIREDO, R. W. Colheita e pós-colheita de mangaba. In: SIMPÓSIO BRASILEIRO SOBRE A CULTURA DA MANGABA, 1., 2003, Aracaju,. Anais. Aracaju: Embrapa Tabuleiros Costeiros, 2003.

[23]- SAMPAIO, T. S.; NOGUEIRA, P. C. L. Volatile components of mangaba fruit (*Hancornia speciosa* Gomes) at three stages of maturity. **Food Chemistry**, V. 95, n. 4, p. 606-610, 2006.

[24]- DE FARIAS, L.V.; MAGALHÃES NETO, B. 1954. The determination of ascorbic acid in the fruits of mangabeira (*Hancornia speciosa*). **Revista de Química Industrial**, v. 23, p.154-156, 1954.

[25]- ARAÚJO, C.L.; BEZERRA, I. W. L.; DANTAS, I. C.; LIMA T. V. S.; OLIVEIRA, A. S.; MIRANDA, M. R. A.; LEITE, E. L.; SALES, M. P. Biological activity of proteins from pulps of tropical fruits. **Food Chemistry**, v.85, n.1, p.107-110, 2003.

[26]- COSTA, E.S.; HIRUMA-LIMA, C.A.; LIMA, E.O, et al. Antimicrobial activity of some medicinal plants of the Cerrado, Brazil. **Phytotherapy Research**, v.22, n.5, p. 705-707, 2008.

[27]- MARINHO, J.R.D.; TANAKA, Y. Structural characterisation of wild rubbers: protein and ester content. **Journal of Rubber Research**, v.3, n.4, p.193-199, 2000.

[28]- SCHERY, R.W. Maniçoba and mangabeira rubbers. **Econ. Botany**, v.3, p. 240-264, 1949.

[29]- BEKKEDAHL, N.; SAFFIOTI, W. Mangabeira latex and rubber. **Rubber Age**, v.60, p. 553-561, 1947.

[30]- OUTA, M. Physical-mechanical properties of vulcanized rubber containing different types of rubber. **Anais Assoc. Quim. Brasil**, v.6, p.203-206, 1947.

[31]- BEKKEDAHL, N.; SAFFIOTI, W. Mangabeira latex and rubber. **J. Research Natl. Bur. Standards**, v.38, p. 427-438, 1947.

[32]- GOTTLIEB, O.R.; MACHLINE, C. Mangabeira rubber. **Química**, v.1, p. 137-142, 1945.

[33]- PAULA, R.D.G. The latex and the rubber of mangabeira. **Anais Assoc. Quim. Brasil**, v.3, p.109-120, 1944.

[34]- GUIMARÃES, L.R.; CHAVES, J.M. The latex of mangabeira (*Hancornia speciosa* Gom.). **Anais Assoc. Quim. Brasil**, v.3, p. 95-109, 1944.

[35]- GUIMARÃES, L.R.; CHAVES, J.M.. Coagulation of latex of *Hancornia speciosa* Gom. **Revista Brasileira de Química**, v.18, p.130-132, 1944.

[36]- MANOEL, I. Mangabeira and maniçoba (rubbers): their specific gravity. **Revista de Química Industrial**, v.12, n. 135, p.14-16, 1943.

[37]- SOBRINHO, D.C.; HAUPTLI, M.B.; APPOLINÁRIO, E.V.; KOLLENZ, C.L.M.; CARVALHO, M.G.; BRAZ-FILHO, R. Triterpenoids isolated from *Parahancornia amapa*. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v.2, p.15-20, 1991.

[38]- CARVALHO, M.G.; VELLOSO, C.R.X; BRAZ-FILHO, R; COSTA, W.F. Acyl-lupeol esters from *Parahancornia amapa* (Apocynaceae). **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v.12, n.4, p. 556-559, 2001.

[39]- DELLALOGGIA, R.; TUBARO, A.; SOSA, S.; BECKER, H.; SAAR, S.; ISAAC, O . The role of triterpenoids in the topical anti-inflammatory activity of *Calendula-officinalis* flowers. **Planta Medica**, v.60, n.6, p.516-520, 1994.

[40]- HATA, K.; HORI, K.; TAKAHASHI, S. Differentiation and Apoptosis-Inducing activities by pentacyclic triterpenos on a mouse metanoma cell line. **Journal of Natural Products**, v.65, n.5, p.645-648, 2002.

[41]- FERNANDEZ, M. A.; HERAS, B.; GARCIA, M. D.; SAENZ, M.T.; VILLAR, A. New insights into the mechanism of action of the anti-inflammatory triterpene lupeol. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 53, n.11, p.1533-1539, 2001.

[42]- SALEEM, M.; ALAM, A.; ARIFIN, S.; SHAH, M. S.; AHMED, B.; SULTANA, S. Lupeol, a triterpene, inhibts early responses of tumor promotion induced by benzoyl peroxide in murine skin. **Pharmacological Research**, v. 43, n.2, p.127-134, 2001.

[43]- ALI, M.S.; AHMAD, V. U.; AZHAR, I.; USMANGHANI, K. Chemotropism and antimicrobial activity of *Tamarindus indica*. **Fitoterapia**, v. 69, n.1, p.43-46, 1998.

[44]- NAVARRETE, A.; TREJO- MIRANDA, I. J.; REYES-TREJO, L. Principles of root bark of *Hippocratea excelsa* (Hippocrataceae) with gastroprotective activity. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 79, n.3, p.383-388, 2002.

[45]- ALVES, T. M. D.; NAGEM, T. J.; CARVALHO, L. H.; KRETTLI, A. U.; ZANI, C. L. Antiplasmodial triterpene from *Vernonia brasiliiana*. **Planta Medica**, v. 63, n.6, p.554-555, 1997.

[46]- ULUBELEN, A.; TOPCU, G.; JOHANSSON, C. B. Norditerpenoids and diterpenoids from *salvia mulcaulis* with antiturbeculous activity. **Journal of Natural Products**, v. 60, n.12, p.1275-1280, 1997.

[47]- HIKAWCZUK, V. J.; SAAD, J. R.; GUARDIA, T.; JUAREZ, A. O.; GIORDANO, O. S. Anti-inflammatory activity of compounds isolated from

Cecropia pachystachya. **Anales de la Asociacion Química Argentina**, v. 83, n.3-6, p.167-170, 1998.

[48]- HASMEDA, M.; KWEIFIO-OKAI, G.; MACRIDES, T.; POLYA, G. M. Selective inhibition of eukaryote protein kinases by anti-inflammatory triterpenoids. **Planta Medica**, v. 65, n.1, p.14-18, 1999.

[49]- CHOUKSEY, B. K, SRIVASTAVA, S. K. New constituent from the roots of *Terminalia arjuna*: Antifungal agent. **Indian Journal of Chemistry Section B-Organic Chemistry Including Medicinal Chemistry**, v. 40, n.4, p. 354-356, 2001.

[50]- VILLASENOR, I. M.; CANLAS, A. P.; FAUSTINO, K. M.; PLANA, K. G. Evaluation of the bioactivity of triterpene mixture isolated from *Carmona retusa* (Vahl.) Masam leaves. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 92, n.1, p.53-56, 2004.

[51]- SINGH, B.; SINGH, S. Antimicrobial activity of terpenoids from *Trichodesma amplexicaule* roth. **Phytotherapy Research**, v.17, n. 7, p.814-816, 2003.

[52]- RAJIC, A.; KWEIFIO-OKAI, G.; MACRIDES, T.; SANDEMAN, R. M.; CHANDLER, D.S.; POLYA, G. M. Inhibition of serine proteases by anti-inflammatory triterpenoids. **Planta medica**, v.66, n.3, p.206-210, 2000.

[53]- GEETHAT, T.; VARALAKSHMI, P. Anti-inflammatory activity of lupeol and lupeol linoleate in rats. **Journal Ethnopharmacology**, v.76, p. 77-80, 2001.

[54]- PEREIRA-NETTO, A. B.; MCCOWN, B. H.; PHARIS, R. P. Inhibition of growth of microcultured *Hancornia speciosa* shoots by 3 β -hydroxylated gibberellins and one of their c-3 deoxy precursors. **Plant Cell Reports**, v.21, n.5, p. 491-496, 2003.

[55]- PEREIRA-NETTO, A. B. Effect of inhibitors of ethylene biosynthesis and signal transduction pathway on the multiplication of in vitro-grown *Hancornia speciosa*. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, v.66, n.1, p.1-7, 2001.

[56]- PEREIRA-NETTO, A.B. Thermally and chemical-induced changes in shoot morphology of *Hancornia speciosa*: physiological basis and use in micropropagation. **Diss. Abstr. Int. B**, v.57, n.7, p. 4236, 1996.

[57]- SIANI, A.C.; SAMPAIO, A.L.F.; DE SOUZA, M.C.; HENRIQUES, M.G.M.; RAMOS, M.F.S. Óleos essenciais. *Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento*, 2000. p. 38-43.

[58]- VAN DEN DOOL, H.; KRATZ, P.D.J. A generalization of the retention index system including linear temperature programmed gas-liquid partition chromatography. **Journal of Chromatography**, v.11, p.463-471,1963.

[59]- ADAMS, R.P. Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectroscopy. Allured Publishing: Illinois, USA. 1995.

[60]- PATOCKA, J. Biologically active pentacyclic triterpenes and their current medicine signification. **Journal of Applied Biomedicine**, v.1, n.1, p. 7-12, 2003.

[61]- LOBO, A. M; LOURENÇO, A. M. Biossíntese de Produtos Naturais. Coleção Ensino da Ciência e da Tecnologia. Editora IST Press (Instituto Superior Técnico, Lisboa- Portugal, 2007, p.136-141.

[62]- DEWICK, P. M. Medicinal Natural Products: A Biosynthetic Approach. Editora John Wiley& Sons Ltd, New York, 1998. p.194-200.

[63]- PARK, S. J.; PARK, C. W.; KIM, S. J.; KIM, J. K.; KIM, Y. R.; KIM, K. A.; PARK, J. O. K.; HA, Y. L. Methylation Methods for the Quantitative Analysis of Conjugated Linoleic Acid (CLA) Isomers in various Lipid Samples. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, n. 5, p.989-996, 2002.

[64]- BENINGER, C. W.; ABOU-ZAID, M. M.; KISTNER, A. L. E.; HALLETT, R. H.; IQBAL, M. J.; GRODZINSKI, B.; HALL, J. C. A flavonone and two phenolic acids from *Chrysanthemum morifolium* with phytotoxic and insect growth regulating activity. **Journal of chemical ecology**, v. 30, n. 3, p. 589-606, 2004.

[65]- SANCHEZ-RABANEDA, F.; SANCHEZ-RABANEDA, F.; JAUREGUI, O.; CASALS, I.; ANDRES-LACUEVA, C.; IZQUIERDO-PULIDO, M.; LAMUELA-RAVENTOS, R.M. Liquid chromatographic/electrospray ionization tandem mass spectrometric study of the composition of cocoa (*Theobroma cacao*). **Journal of mass spectrometry**, v. 38, n. 1, p. 35-42, 2003.

[66]- PENG, Z. K.; PENG, Z.K.; HAYASAKA, Y.; ILAND P.G.; SEFTON, M.; HOJ, P.; WATERS, E. J. Quantitative analysis of polymeric procyanidins (tannins) from grape (*Vitis vinifera*) seeds by reverse phase high performance liquid chromatography. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 49, n. 1, p. 26-31, 2001.

[67]- HANS, H. Preparative gel chromatography on sephadex LH-20: Chromatography methods. Heidelberg: Huthig, 1995.

[68]- MATOS, F. J. A. Introdução a Fitoquímica Experimental. Editora da Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 1988. 110 p.

[69]- MAIA, R. M. BARBOSA, P. R.; CRUZ, F. G.; ROQUE, N. F.; FASCIO, M. Triterpenos da resina de *Protium heptaphyllum* march (Bourseraceae):

caracterização em misturas binárias. **Química Nova**, v.23, n.5, p.623-626, 2000.

[70]- ARAGÃO, P.C.; TOLEDO, J.B.; MORAIS, A. A.; BRAZ-FILHO, R. Substâncias Naturais Isoladas de *Stigmaphyllon tormentosum* e *Byrsonima variabilis*. **Química Nova**, v.13, n.4, p. 254-259, 1990.

[71]- OLEA, R.S.G.; ROQUE, N.F. Análise de Misturas de Triterpenos por RMN de ^{13}C . **Química Nova**, v.13, n.4, p. 278-281, 1990.

[72]- MAHATO, S.B.; KUNDU, A .P. ^{13}C NMR spectra of pentacyclic triterpenoids-a compilation and some salient features. **Phytochemistry**, v.37, n.6, p.1517-1575, 1994.

[73]- DESCOTES, G.; MULLER, G.; MENTECH, J. Syntése et étude structurale de dithiocarbonates du saccharose. **Carbohydrate Research**, v.134, p. 313-320, 1984.

[74]- NISHIDA, T.; ENZELL, C.R.; MORRIS, G. A. Concerted Use of Homo- and Hetero- nuclear 2D NMR: ^{13}C and ^1H Assignment of Sucrose Octaacetate. **Magnetic Resonance in Chemistry**, v. 24, p. 179-182, 1986.

[75]- MACIEL, M.A.M.; PINTO, A.C.; VEIGA, V.F. Plantas medicinais: A necessidade de estudos multidisciplinares. **Química Nova**, v. 25, n.3, p. 429-438, 2002.

[76]- MCLAUGHLIN, J. L.; COLMAN-SAIZARBITORIA, T.; ANDERSON, J. E. Tres bioensayos simples para quimicos de productos naturales. **Revista de la Sociedad Venezolana de Quimica**, v. 18, n. 4, p.13-18, 1995.

[77]- Z. BRENER, Z. ANDRADE, M BARRAL-NETO. *Trypanosoma cruzi* e doença de Chagas. 2.^a Edição. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan Ed., 2000.

[78]- ROCHA, W. C. Busca de Substância Bioativas em Plantas Amazônicas: *Adiscanthus fusciflores* (Rutaceae), *Trichilia Pallida* e *T. rubra* (Meliaceae). São Carlos, 2005. Tese de Doutorado em Química, Universidade Federal de São Carlos-SP (UFSCar).

[79]- OPPERDOES, F. R.; BORST, P. Localization of nine glycolytic enzymes in a microbody-like organelle in *Trypanosoma brucei*: The glycosome. **FEBS Letters**, v. 80, p. 360-364, 1977.

[80]- CANNATA, J. B., VALLE, E., DOCAMPO, R., CAZULLO, J. J. Subcellular localization of phosphoenolpyruvate carboxykinase in the trypanosomatids *Trypanosoma cruzi* and *Crithidia fasciculata*. **Molecular & Biochemical Parasitology**, v. 6, n. 3, p. 151-160, 1982.

[81]- WIERENGA, R. K., SWINKELS, B., MICHELS, P. A. M., OSINGA, K., MISSET, O., VAN BEEUMEN, J., GIBSON, W. C., POSTMA, J. P. M., BORST, P., OPPERDOES, F. R., HOL, W. G. J. Common elements on the surface of glycolytic enzymes from *Trypanosoma brucei* may serve as topogenic signals for import into glycosomes. **Journal Embo**, v. 6, n.1, p. 215-221, 1987.

[82]- VELLIEUX, F. M. D., HAJDU, J., VERLINDE, C. L. M J., GROENDIJK, H., READ, R. J., GREENHOUGH, T. J., CAMPBELL, J. W., KALIK, K. H., LITTLECHILD, J. A., WATSON, H. C., HOL, W. G. J. Structure of Glycosomal Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase from *Trypanosoma brucei* Determined from Laue Data. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States**, v. 90, n. 6, p. 2355-2359, 1993.

[83]- KIM, H., FEIL, I. K., VERLINDE, C. L. M., PETRA, P. H., HOL, W. G. J. Crystal structure of glycosomal glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from *Leishmania mexicana*: implications for structure-based drug design and a new position for the inorganic phosphate binding site. **Journal of Biochemistry**, v. 34, n. 46, p. 14975-14986, 1995.

[84]- SOUZA, D.H.F.; GARRATT, A. P. U.; ARAÚJO, B. G.; W. D. P. JESUS.; MICHELS, P. A. M.; HANNAERT, V.; OLIVA, G. *Trypanosoma cruzi* glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase: structure, catalytic mechanism and targeted inhibitor design. **FEBS Letters**, v. 424, n. 3 p.131-135, 1998.

[85]- BARBOSA, V.M.; NAKANO, M. Muscle D-glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from *Anas sp.-1*. Purification and properties of the enzyme. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology**, v. 88, n.2, p. 563-568, 1987.

[86]- NEVES, D.P. Parasitologia Humana. Guanabara Koogan. Rio de Janeiro, 1979.

[87]- VERONESI, R. Doenças infecciosas e parasitárias. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 8ºed., 1991, p. 750-762.

[88]- JARDIM, A., BERGESON, S. E.; SHIH, S., CARTER, N., LUCAS, R.W., MERLIN, G., MYLER, P.J., STUART, K., ULLMAN, B. Xanthine Phosphoribosyltransferase from *Leishmania donovani*. Molecular Cloning, Biochemical Characterization, and Genetic Analysis. **Journal of Biological Chemistry**, v. 274, n. 48, p. 34403-34410,1999.

[89]- THIEMANN, O.H., ALFONZO, J.D., SIMPSON, L. Cloning and characterization of *Leishmania tarentolae* adenine phosphoribosyltransferase. **Molecular & Biochemistry Parasitology**, v. 95, n.1, p. 141-146, 1998.

[90]- PEREIRA, B.S. Avaliação das atividades gastroprotetora e hepatoprotetora dos extratos hexânico e etanólico das folhas de *Momordica charantia* L. em modelo experimental *in vivo*. Ceará, 2006. Dissertação de Mestrado, Universidade Estadual do Ceará- Fortaleza.

[91]- AKTAV, G.; DELIORMAN, D.; ERGUN, E.; ERGUN,F.; YESILADA, E.; CEVIK, C. Hepatoprotective effects of Turkish folk remedies on experimental liver injury. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 73, p. 121-129, 2000.

[92]- OHKAWA, H.; OHISHI, N.; YAGI, K. Assay for lipid peroxides in animal tissue by thiobarbituric acid reaction. **Analytical Biochemistry**, v. 95, n.2, p. 351-358, 1979.

ANEXO A

****Análise dos espectros de massas das substâncias 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 e 11**

Substância 1 (C16): C₁₇H₃₄O₂

[*m/z* (%): 270 (M⁺, 11,4), 241 (4,5), 157 (4), 143 (25,5), 130 (2,3), 129 (10), 115 (4,9), 111 (3), 109 (1,6), 227(15), 213 (3,8), 199 (8,5), 185 (9,5), 171 (6,3), 101 (9,4), 98 (4,3), 97 (9,9), 87 (80,1), 84 (5), 83 (14), 75 (37,1), 74 (100), 71 (11,2), 69 (24,3), 67 (6,1), 59 (17,7), 57 (34,3), 55 (59,7), 54 (4,6), 44 (6,2), 43 (76,7), 42 (14,4) e 41 (65,3)].

Substância 2 (3'-OH-C16): C₁₇H₃₄O₃

[*m/z* (%): 286 (M⁺, 0,1), 270 (0,1, M-18), 166 (1,5), 155 (1,3), 152 (5,4), 143 (1,5), 138 (3,7), 128 (2,7), 125 (4,5), 124 (4), 123 (4,8), 115 (2,7), 114 (4,3), 113 (5,6), 111 (8,7), 110 (7,3), 109 (5,8), 236 (5,5), 194 (5,7), 104 (12), 103 (100), 101 (13,5), 98 (10), 97 (20), 96 (18), 95 (10,9), 87 (11,4), 85 (11,9), 84 (14,7), 83 (26,2), 82 (16,5), 81 (17,6), 75 (24,5), 74 (63,3), 71 (64,7), 70 (12,7), 69 (37,6), 68 (14,7), 67 (20,3), 61 (39,6), 59 (23,6), 57 (55,5), 56 (23,8), 55 (63,7), 54 (11,7), 44 (19,3), 43 (85,8), 42 (27) e 41 (71)].

Substância 3 (C18: Δ⁹): C₁₉H₃₆O₂

[*m/z* (%): 296 (M⁺, 1,9), 264 (10,5), 166 (4), 152 (5,2), 138 (5,4), 137 (6), 125 (7,1), 124 (7,8), 123 (9,5), 115 (4,5), 112 (6,3), 111 (14,1), 110 (15), 109 (9,8), 222 (6,4), 180 (5,7), 108 (3,3), 101 (5,3), 98 (26), 97 (31,1), 96 (31,5), 95 (18,9), 94 (5), 87 (28,7), 85 (7,7), 84 (32,3), 83 (45,6), 82 (20,7), 81 (30,2), 80 (5,4), 79 (10,6), 74 (46,6), 71 (11,2), 70 (16,1), 69 (61,9), 68 (24,3), 67 (40,1), 59 (20,1), 57 (34,9), 56 (26,7), 55 (100), 54 (29), 53 (9,5), 44 (5,2), 43 (75), 42 (16,3) e 41 (91,4)].

Substância 4 (C18): C₁₉H₃₈O₂

[*m/z* (%): 298 (M⁺, 7,36), 157 (3,7), 143 (18,4), 129 (6,5), 255 (9,6), 213 (3,6), 199 (9,2), 185 (4,4), 101 (7,4), 97 (8,7), 88 (6), 87 (71,6), 83 (11,6), 75 (31,1),

74 (100), 71 (10,4), 69 (20,9), 67 (4,8), 59 (12,5), 57 (33,5), 56 (9,5), 55 (50,4), 54 (4), 43 (78), 42 (10,6) e 41 (51,1)].

Substância 5 (3'-OH-C18): C₁₉H₃₈O₃

[*m/z* (%): 314 (M⁺0,28), 296 (3,3, M-18), 265 (6,6), 264 (16,9), 180 (7,4), 166 (5,6), 152 (6,7), 141 (9,7), 138 (6,3), 128 (6,6), 125 (10), 124 (8,5), 115 (5,7), 114 (8,7), 113 (9,1), 112 (6,3), 222 (11,3), 220 (4,9), 199 (8,7), 111 (19,1), 110 (15), 109 (12,5), 104 (24,4), 103 (100), 101 (28), 98 (21,5), 97 (40), 96 (37,4), 95 (23,9), 87 (20,8), 85 (25,4), 84 (27,4), 83 (44,2), 82 (31,2), 81 (30,9), 75 (44,1), 74 (63), 71 (56,2), 70 (22,3), 69 (47,7), 68 (24,3), 67 (33,7), 61 (49,8), 59 (35), 58 (11,7), 57 (52,9), 56 (37,6), 55 (54,6), 54 (18,6), 53 (7,1), 45 (8,1), 44 (20,4), 43 (66,5), 42 (34,5) e 41 (54,2)]

Substância 6 (3'-OH-C20): C₂₁H₄₂O₃

[*m/z* (%): 342 (M⁺, 0,03), 324 (1,2, M-18), 292 (5,5), 138 (3,1), 127 (3,3), 125 (4,9), 123 (4,8), 113 (5,2), 111 (10,3), 110 (7,8), 250 (3,9), 109 (6,6), 104 (8,7), 103 (100), 101 (11,1), 98 (10,1), 97 (22,3), 96 (20,4), 95 (12,9), 87 (12), 85 (14,1), 84 (13,4), 83 (27), 82 (18,7), 81 (18,4), 75 (24,1), 74 (49,3), 71 (56,5), 70 (11,6), 69 (35,3), 68 (15,7), 67 (20), 61 (26,6), 59 (17), 57 (61,7), 56 (20,5), 55 (64,8), 54 (10,5), 44 (8,4), 43 (85,5), 42, (20,5) e 41 (67,9)].

Substância 7 (3'-OH-C22): C₂₃H₄₆O₃

[*m/z* (%): 370 (M⁺, 0,04), 352 (0,7, M-18), 320 (3,7), 138 (1,8), 127 (2,9), 123 (3,3), 113 (2,7), 111 (5,2), 110 (4,1), 109 (4), 278 (1,9), 255 (2,1), 104 (4,7), 103 (88), 101 (6,1), 98 (5,3), 97 (12,1), 96 (11,5), 95 (6,9), 87 (6,2), 85 (8,4), 84 (7,5), 83 (16,1), 82 (11,5), 81 (10,3), 75 (12), 74 (24,1), 71 (31,7), 69 (18,7), 67 (12,4), 61 (14,1), 57 (44,3), 56 (11,1), 55 (40,1), 54 (6,7), 45 (4), 44 (21,8), 43 (100), 42 (10,5) e 41 (39,7)]

Substância 11 (3', 5'-OH-C-20): C₂₀H₃₆O₂

[*m/z* (%): 308 (M⁺, 2,7), 248 (9,5, M-60), 97 (100), 96 (10,8), 95 (20,1), 94 (16), 86 (18,8), 83 (23,4), 82 (11,3), 81 (22,3), 69 (48,7), 68 (58,3), 67 (31,1), 57 (36), 55 (50,1) e 43 (72,4)].

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)