



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE SANTA CRUZ – UESC
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

**CONSTITUINTES QUÍMICOS ISOLADOS DAS FOLHAS DE *Pouteria*
macahensis T. D. Penn (SAPOTACEAE)**

RÂNDILLA REGIS CORDEIRO DOS SANTOS

Ilhéus
2017

RÂNDILLA REGIS CORDEIRO DOS SANTOS

CONSTITUINTES QUÍMICOS ISOLADOS DAS FOLHAS DE *Pouteria macahensis* T. D. Penn (SAPOTACEAE)

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Estadual de Santa Cruz - UESC, como requisito para obtenção do título de Mestre em Química. Área de concentração: Recursos Naturais e Tecnologia; Linha de pesquisa: Química dos Produtos Naturais

Orientadora: Prof. Dr.^a Rosilene Aparecida de Oliveira

Coorientador: Prof. Dr. Fernando Faustino de Oliveira

Ilhéus
2017

S237 Santos, Rândilla Regis Cordeiro dos.
Constituintes químicos isolados das folhas de *Pouteria macahensis* T. D. Penn (sapotaceae) / Rândilla Regis Cordeiro dos Santos. - Ilhéus : UESC, 2017.
126f. : il.
Orientadora : Rosilene Aparecida de Oliveira.
Coorientadora : Fernando Faustino de Oliveira.
Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual de Santa Cruz. Programa de Pós-graduação em Química.
Inclui referências.

Sapotaceae – Mata atlântica – Bahia (Região Sul). 2.
Química vegetal. 3. Fitoquímica. 4. Mata atlântica. I. Oliveira, Rosilene Aparecida de. II. ,Oliveira Fernando Faustino de. III.
Título.

CDD – 583.674

RÂNDILLA REGIS CORDEIRO DOS SANTOS

CONSTITUINTES QUÍMICOS ISOLADOS DAS FOLHAS DE
Pouteria macahensis T.D. Penn (SAPOTACEAE)

Ilhéus-BA, Ilhéus, 06 de março de 2017.

COMISSÃO EXAMINADORA:



Prof(a). Dra. Rositene Aparecida de Oliveira
Doutora em Química - UFMG
Universidade Estadual de Santa Cruz - UESC
Orientador(a)



Prof(a). Dra. Julieta Rangel de Oliveira (UESC)
Doutora em Ciências - USP
Universidade Estadual de Santa Cruz - UESC



Prof(a). Dra. Lucienir Pains Duarte (UFMG)
Doutora em Química - UFMG
Universidade Federal de Minas Gerais - UFMG

*Dedico este trabalho a paiinho e mainha,
que por muitas vezes compreenderam minha ausência. E
por abraçarem meus sonhos como se fossem seus.*

AGRADECIMENTOS

A Deus pelo dom da vida, proteção e inspiração.

A pai e mãe pelo amor incondicional, dedicação, confiança e ensinamentos. Se hoje realizo mais um sonho, sem dúvida devo a vocês.

Aos meus irmãos, em especial a minha linda irmã Ramona, pela motivação, união e amizade.

A meu cunhado e companheiro de profissão Ademir pelo carinho, resenhas e ensinamentos.

A Janclei pessoa linda, alma nobre, amigo e professor. Obrigada pelo carinho, confiança e incentivo, e por sempre estar disponível para me ajudar.

Aos meus amigos da UESB e da UESC em especial, as minhas colegas do mestrado: Ohana e Milana por termos formado uma linda amizade.

Aos parceiros de Forró, foi muito bom dividir momentos com vocês.

Aos companheiros de laboratório LPPNS: Gabriel, Iago, Hemerson, Luhyris, Thiago, Rafaela, Wellington e Manoel. Obrigada pelas trocas de informações, ensinamentos, apoio e pelas muitas risadas.

À professora Rosilene Aparecida de Oliveira pelo apoio, orientação, profissionalismo e estímulo. E ao meu co-orientador Fernando Faustino de Oliveira pelo conhecimento e contribuição na realização do trabalho.

A todos os professores que já me transmitem conhecimento desde minha educação primária até a conclusão desse trabalho, muito obrigada.

À professora Simone Andrade Gualberto pela amizade, profissionalismo e incentivo.

À Dr.^a Ivana Silva Lula pela aquisição dos espectros de Ressonância Magnética Nuclear de Alta Resolução (LAREMAR), na Universidade Federal de Minas Gerais, e ao Grupo de Pesquisa Bioma e LBF pela aquisição dos espectros no Infravermelho, na UESC.

À Professora Aline Oliveira Conceição pelo apoio na realização dos testes microbianos.

Aos Amigos de fora do meio acadêmico, que de forma indireta contribuíram muito para a execução desse trabalho.

A UESC e ao PPGQUIM pela viabilização da pesquisa, e a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Bahia - FABESB pela bolsa concedida.

A todos que direta ou indiretamente participaram desse trabalho, deixo o meu muito obrigado.

Sintaxe À Vontade

(O Teatro Mágico)

*Todo sujeito é livre para conjugar o verbo que quiser
todo verbo é livre para ser direto ou indireto
nenhum predicado será prejudicado
nem tampouco a frase, nem a crase nem a vírgula e ponto final!
afinal, a má gramática da vida nos põe entre pausas, entre vírgulas
e estar entre vírgulas é apostrofo
e eu apostrofo o apostrofo que vou cativar a todos
sendo apenas um sujeito simples
um sujeito e sua oração
sua pressa e sua prece*

*Que a regência da paz sirva a todos nós... cegos ou não
que enxerguemos o fato
de termos acessórios para nossa oração
separados ou adjuntos, nominais ou não
façamos parte do contexto da crônica
e de todas as capas de edição especial
sejamos também o anúncio da contra-capas
mas ser a capa e ser contra-capas
é a beleza da contradição
é negar a si mesmo
e negar a si mesmo*

*É muitas vezes, encontrar-se com Deus
com o teu Deus
Sem horas e sem dores
Que nesse encontro que acontece agora
cada um possa se encontrar no outro
até porque...*

*Tem horas que a gente se pergunta...
por que é que não se junta
tudo numa coisa só?*

RESUMO

Pouteria macahensis é uma espécie endêmica da Mata Atlântica cujo perfil químico e biológico ainda não foram estudados. Esse gênero caracteriza-se por produzir triterpenos. As folhas foram coletadas em Itacaré, Bahia (Brasil), posteriormente secas em estufa, trituradas e submetidas à extração exaustiva com hexano, seguida de etanol. O extrato etanólico foi submetido ao fracionamento cromatográfico, eluído com os solventes hexano, CHCl₃, AcOEt e EtOH puros e em misturas fornecendo quinze grupos. Através de técnicas de purificação (coluna, CCDP e recristalização), foram trabalhados sete grupos, levando ao isolamento de onze substâncias das quais oito foram elucidadas, além de misturas de substâncias alifáticas e misturas de derivados de ácidos graxos. A identificação estrutural das substâncias foi feita por técnicas espectroscópicas de IV, RMN de ¹H e ¹³C uni e bidimensional (DEPT-135, HSQC e HMBC) e comparação com dados da literatura, além de ponto de fusão. Sete das substâncias identificadas em *P. macahensis* apresentaram esqueleto carbônico do tipo pentacíclico, pertencentes a classe dos triterpenos, sendo dois friedelanos (3β-hidroxi-friedelano “PmF-4” e 3-oxi-friedelano “PmF-4.2”) e dois oleanos esterificados (mistura de behenato e erucicato de eritrodionila “PmF-4.3”, e palmitoleicoato de eritrodionila “PmF-4.4”), três lupanos esterificado (mistura de behenato, erucicato e palmitoleicoato de ácido betulínico “PmF-6.1”) e um esteroide (β-sitosterol em mistura “PmF-6”). Também foi isolado um composto aromático (ácido gálico “PmF-14.1”) todos descritos pela primeira vez para a espécie. Esses triterpenos esterificados com ácidos carboxílicos de cadeia longa estão sendo relatados pela primeira vez no gênero. A atividade antioxidante do extrato etanólico de *P. macahensis* mostrou-se ativo frente ao radical livre DPPH com potencial maior que o padrão ácido ascórbico. O extrato etanólico e as substâncias isoladas não inibiram o crescimento dos microorganismos *Escherichia coli*, *Enterococcus aerogenes*, *Streptococcus mutans*, *Bacillus subtilis* e *Cândida albicans*. Este trabalho corrobora com a constituição química de outras espécies do gênero e contribui para o conhecimento químico de *P. macahensis*, uma espécie endêmica da Mata Atlântica, um bioma ameaçado, tendo em vista a sua redução ao longo dos anos.

Palavras-chave: *Pouteria macanhensis*, triterpenos, atividade antioxidante

ABSTRACT

Pouteria macahensis is an endemic species of the Atlantic Forest with chemical and biological profile has not yet been studied. This genus is characterized by producing triterpenes. The leaves were collected in Itacaré, Bahia (Brazil), then dried in an oven, crushed and submitted to exhaustive extraction with hexane, followed by ethanol. The ethanolic extract was submitted to the chromatographic fractionation, eluted with solvents hexane, CHCl₃, AcOEt and EtOH pure and in mixtures providing fifteen groups. Through purification techniques (column, PTLC and recrystallization), seven groups were studied, leading to the isolation of eleven substances, of which eight were elucidated, as well as mixtures of aliphatic substances and mixtures of fatty acid derivatives. The structural identification of the substances were made by spectroscopic techniques of IR, NMR, ¹H and ¹³C one and two-dimensional (DEPT-135, HSQC and HMBC) and comparison with literature data, in addition to melting point. Seven of the substances identified in *P. macahensis* showed a pentacyclic carbon skeleton belonging to the class of triterpenes, two friedelanes (3 β -hydroxy-friedelane "PmF-4" and 3-oxy-friedelane "PmF-4.2") and two esterified oleanes (mixture of behenate and erythrodiol erucate "PmF-4.3", and erythrodiol palmitoleicoate "PmF-4.4), three esterified lupane (mixture of behenate, erucate and palmitoleicoate of betulinic acid "PmF-6.1 ") and two steroids (mixture of β -sitosterol "PmF-6"). An aromatic compound (gallic acid "PmF-14.1") was also isolated, all described for the first time for the species. These esterified triterpenes with long chain carboxylic acids are being reported for the first time in the genus. The ethanolic extract of *P. macahensis* was active free radical DPPH with a potential higher than the standard ascorbic acid. The ethanolic extract and the isolated substances did not inhibit growth against the microorganisms *Escherichia coli*, *Enterococcus aerogenes*, *Streptococcus mutans*, *Bacillus subtilis* and *Candida albicans*. This work corroborates to be chemical composition of other species of the genus and contributes to the chemical knowledge of *P. macahensis*, an endemic species of the Atlantic Forest, a threatened biome, with a view to its reduction over the years.

Keywords: *P. macahensis*, triterpenes, antioxidant activity.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Distribuição dos biomas brasileiros.....	19
Figura 2: Distribuição dos remanescentes florestais do Bioma da Mata Atlântica.....	20
Figura 3: Distribuição do gênero <i>Pouteria</i> no mundo (1), no Brasil (2) e distribuição da família Sapotaceae no Brasil (3).....	22
Figura 4: Distribuição da espécie <i>P. macahensis</i> no Brasil (1) e na Bahia(2).	24
Figura 5: Compostos isolados de <i>P. torta</i> (LOPES, 2005).	25
Figura 6: Compostos isolados de <i>P. gardinrii</i> (SILVA, 2007).	26
Figura 7: Compostos isolados de isolados de <i>P. ramiflora</i> (RODRIGUES, 2015).	26
Figura 8: Compostos isolados de <i>P. obovata</i>	27
Figura 9: Compostos isolados de <i>P. venosa</i> (MONTENEGRO, 2006).	27
Figura 10: Estrutura do Isopreno (23) e geranyl-pirofosfato (24) dimetilalil-pirofosfato (25).	28
Figura 11: Esquema de formação geral dos terpenos (DEWICK, 2002).	29
Figura 12: Ciclização do esqualeno (DEWICK, 2002).....	30
Figura 13: Fluxograma do procedimento experimental para obtenção dos extratos orgânicos das folhas de <i>P. macahensis</i>	36
Figura 14: Fluxograma do fracionamento do extrato etanólico bruto de <i>P. macahensis</i>	40
Figura 15: Fluxograma da purificação da fração PmF-4 do extrato etanólico de <i>P. macahensis</i>	42
Figura 16: Fluxograma da purificação da fração PmF-5 do extrato etanólico de <i>P. macahensis</i>	43
Figura 17: Fluxograma da purificação da fração PmF-6 do extrato etanólico de <i>P. macahensis</i>	44
Figura 18: Fluxograma do fracionamento da fração PmF-14 do extrato etanólico de <i>P. macahensis</i>	45
Figura 19: Fluxograma da purificação da fração GS (53) do extrato etanólico de <i>P. macahensis</i>	46
Figura 20: Fluxograma da purificação da fração GS (57-60) obtido do grupo PmF-14 do extrato etanólico de <i>P. macahensis</i>	46
Figura 21: Fotos de <i>P. macahensis</i>	48
Figura 22: Estrutura do Radical 2,2-difenil-1-picrilidrazila (DPPH·), na forma de radical (à esquerda) e na forma reduzida (MOLYNEUX, 2004).	50
Figura 23: Comparação das curvas analíticas obtidas pelo método da captura de radicais livres DPPH para o cálculo do valor de CE ₅₀ de <i>P. macahensis</i> (A) e do padrão ácido ascórbico (B).	51
Figura 24: Reação geral de transesterificação.	54
Figura 25: Espectro na região do IV de PmF-2 (KBr), região de 4000-600 cm ⁻¹	55
Figura 26: Correlações observadas no Noe para o 3α e 3β-friedelinol (SALAZAR <i>et al.</i> , 2000).	57
Figura 27: Espectro na região do IV de PmF-4 (KBr), região de 4000-600 cm ⁻¹	59
Figura 28: Espectro de RMN de ¹ H (400 MHz) de PmF-4 em CDCl ₃ e piridina-d ₅	60

Figura 29: Ampliação (0,50- 4,6000 ppm) do espectro de RMN de ^1H (400 MHz) em CDCl_3 e piridina-d5 de PmF-4. A- ampliação da região (0,70-1,34 ppm).	61
Figura 30: Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz) de PmF-4 em CDCl_3 e piridina-d5.	62
Figura 31: Ampliação (0-80 ppm) DEPT-135 (100 MHz) de PmF-4 em CDCl_3 e piridina-d5.	63
Figura 32: Correlação de H-C observadas no mapa de contornos HSQC (400 MHz, CDCl_3 /piridina-d5) de PmF-4.	64
Figura 33: Correlação de H-C observadas no mapa de contornos HMBC (400 MHz, CDCl_3 /piridina-d5) de PmF-4.	65
Figura 34: Espectro na região do IV de PmF-4.2 (KBr), região de 4000 a 400 cm^{-1}	68
Figura 35: Espectro de RMN de ^1H (400 MHz) de PmF-4.2 em CDCl_3 e piridina-d5.	69
Figura 36: Ampliação (0,50- 2,50 ppm) do espectro de RMN de ^1H (400 MHz) de PmF-4.2 em CDCl_3 e piridina-d5. A – ampliação (0,7 – 1,34 ppm).	70
Figura 37: Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz) de PmF-4.2 em CDCl_3 e piridina-d5.	71
Figura 38: Ampliação (0-74 ppm) do espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz) em CDCl_3 e d-5 de PmF-4.2. A- ampliação de (28-43 ppm).	72
Figura 39: Espectro DEPT-135 (100 MHz) em CDCl_3 e piridina-d5 de PmF-4.2.	73
Figura 41: Espectro na região no IV do eritrodiol (KBr).	76
Figura 40: Reação de transesterificação.	76
Figura 42: Espectro de RMN de ^1H do eritrodiol em CDCl_3	77
Figura 43: Espectros de RMN de ^{13}C e DEPT-135 do eritrodiol em CHCl_3	78
Figura 44: Estrutura do eritrodiol (A) e (B) do eritrodiol esterificado.	78
Figura 45: Espectro na região do IV de PmF-4.3 (KBr), região de 4000 a 450 cm^{-1}	81
Figura 46: Espectro de RMN de ^1H (400 MHz) de PmF-4.3 em CDCl_3	82
Figura 47: Ampliação (0,4-6 ppm) do espectro de RMN de ^1H (400 MHz) de PmF-4.3 em CDCl_3	83
Figura 48: Expansões do espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz) de PmF-4.3 em CDCl_3 . A - ampliação de (3,0-1,0 ppm); B - ampliação de (5,5-3.0 ppm).	84
Figura 49: Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz) de PmF-4.3 em CDCl_3 . A - ampliação de (14-48 ppm).	85
Figura 50: Espectro DEPT-135 (100 MHz) de PmF-4.3 em CDCl_3 . A- ampliação (21-30 ppm).	86
Figura 51: Correlação de H-C observadas no mapa de contornos HSQC (400 MHz, CDCl_3) de PmF-4.3.	87
Figura 52: Principais correlações de H-C observadas no mapa de contornos HMBC (400 MHz, CDCl_3) de PmF-4.3.	88
Figura 53: Correlações de H-C observadas no mapa de contornos HMBC (400 MHz, CDCl_3) de PmF-4.3.	89
Figura 54: Espectro na região do IV do ácido betulínico (KBr), região 4000 a 500 cm^{-1}	93
Figura 55: Espectro na região do IV de PmF-6.1(KBr), região de 4000 a 400 cm^{-1}	94
Figura 56: Espectro de RMN de ^1H (400 MHz) de PmF-6.1 em CDCl_3	95

Figura 57: Ampliação (0,50- 4,5,00 ppm) do espectro de RMN de ^1H (400 MHz) em CDCl_3 de PmF-6.1. A- ampliação (4,40-4,80 ppm) B- ampliação (2,8 a 3,1 ppm) C- ampliação (1,90 – 2,40).....	96
Figura 58: Espectro de RMN de ^1H (100 MHz) de PmF-6.1 em CDCl_3 . A - ampliação de (12-57).....	97
Figura 59: Espectro de DEPT-135 (100 MHz) de PmF-6.1 em CDCl_3 . A - ampliação de (14-40 ppm).....	98
Figura 60: Principais correlações de H-C observadas no mapa de contornos HSQC (400 MHz, CHCl_3) de PmF-6.1.	99
Figura 61: Principais correlações de H-C observadas no mapa de contornos HSQC (400 MHz, CHCl_3) de PmF-6.1.	100
Figura 62: Ampliação do mapa de contornos HMBC (400 MHz, CHCl_3) de PmF-6.1.	101
Figura 63: Ampliações do mapa de contornos HMBC (400 MHz, CHCl_3) de PmF-6.1.....	102
Figura 64: Ampliações do mapa de contornos HMBC (400 MHz, CHCl_3) de PmF-6.1.....	103
Figura 65: Espectro na região do IV de PmF-6 (KBr), região de 4000 a 600 cm^{-1}	106
Figura 66: Espectro de RMN de ^1H (400 MHz) de PmF-6 em CDCl_3	107
Figura 67: Ampliação (0,60 - 5,3 ppm) do espectro de RMN de ^1H (400 MHz) em CDCl_3 de PmF-6.	108
Figura 68: Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) de PmF-6. A- ampliação de (17 a 43 ppm) e B- ampliação de (20 a 32 ppm).	109
Figura 69: Espectro DEPT-135 (100 MHz) de PmF-6 em CDCl_3 . A- ampliação (13-40 ppm)	110
Figura 70: Comparação do espectro de ^1H (400 MHz) de PmF-6 e PmF-6.1 em CHCl_3	111
Figura 71: Espectro na região do IV de PmF-14.1 (KBr).	114
Figura 72: Espectro de RMN de ^1H (400 MHz) de PmF-14.1 em CDCl_3 e piridina-d5.	115
Figura 73: Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz) de PmF-14.1 em CDCl_3 e piridina-d5.	116
Figura 74: Ampliação do mapa de contornos HMBC (CHCl_3 e piridina-d5) de PmF-14.1.	117

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Sapotaceae encontradas na região Nordeste.....	23
Tabela 2: Prospecção fitoquímica do extrato etanólico das folhas de <i>P. macahensis</i> (MATOS, 2009).....	37
Tabela 3: Resultados das reações indicativas dos principais classes de metabólitos secundários do extrato etanólico de <i>P. macahensis</i>	49
Tabela 4: Percentagem de captura de radical livre DPPH obtidos d extrato de <i>P. macahensis</i> e do ácido ascórbico.	51
Tabela 5: Atividade antioxidante em Pouterias (CASTRO et al., (2006).	53
Tabela 6: Composição dos ésteres de ácidos graxos encontrados na fração PmF-2.....	54
Tabela 7: Comparação dos dados de RMN de ¹³ C de PmF-4 com os dados da literatura para 3β-hidroxifriedelano (SALAZAR <i>et al.</i> , 2000).....	58
Tabela 8: Comparação dos dados de RMN de ¹³ C de PmF-4.2 com os dados da literatura para friedelina (SILVA, 2007).	67
Tabela 9: Comparação dos dados de RMN de ¹³ C de PmF-4.3 e PmF-4.4 com os dados da literatura para 3β-dodecanoil-28-hidroxil-olean-12-eno (WANG, <i>et al.</i> , 2009).	79
Tabela 10: Comparação dos dados de RMN de ¹³ C de PmF-6.1 com os dados da literatura para o ácido betulínico (PENG, <i>et al.</i> , 1998).....	93
Tabela 11: Comparação dos dados de ¹³ C de PmF-6 com dados da literatura para β-sitosterol e ácido betulínico (CHATURVEDULA e PRAKASH, 2005).....	105
Tabela 12: Comparação dos dados de RMN de ¹³ C de PmF-14.1 com os dados da literatura para o ácido gálico (DINI, 2011).....	113

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

AAO – Atividade antioxidante
Abs – Absorbância
AcOEt – Acetato de etila
BHI– Brain heart infusion
CCD – Cromatografia em camada delgada
CCP – Cromatografia em camada preparativa
CE₅₀ – Concentração efetiva
CG – Cromatografia à gás
CHCl₃ – Clorofórmio
CH₂Cl₂ – Diclorometano
d – Duplete
dd – Duplete duplo
DCM – Diclorometano
DPPH– *2,2-dyphenyl-1-picrilhydrazyl*
DEPT – *Distortionless enhancement by polarisation transfer*
DMSO – Dimetilsufoxido
DMAPP –Dimetil-alil-fosfato
EtOH – Etanol
FAME – Éster metílico de ácidos graxos
FID – Detector por Ionização de Chama
GPP – Geranyl-pirofosfato
Hex. – Hexano
HMBC – *Heteronuclear multiple bond correlation*
HSQC – *Heteronuclear multiple quantum coherence*
HZ – Hertz
IAA – Índice de atividade antioxidante
IPP – Isopentenil-difosfato
IV – Infravermelho
J – Constante de acoplamento
m- Multiplete
MeOH – Metanol
PmF – *Pouteria macahensis* folha
ppm – Partes por milhão
RMN ¹H – Ressonância magnética nuclear de hidrogênio 1
RMN ¹³C – Ressonância magnética nuclear de carbono 13
s – Simpleto
SRL – Percentual de radicais livres
TMS – Tetrametilsilano
δ – Deslocamento químico
β – Beta

SUMÁRIO

RESUMO	viii
ABSTRACT	ix
LISTA DE FIGURAS	x
LISTA DE TABELAS	xiii
LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS	xiv
1. INTRODUÇÃO	17
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	19
2.1. Mata Atlântica: importante fonte de produtos naturais de espécies vegetais.....	19
2.2. O gênero <i>Pouteria</i> (Sapotaceae)	21
2.3. Estudo químico e atividades biológicas de espécies de <i>Pouteria</i>	24
2.4. Breves considerações sobre triterpenos	28
2.4.1. Formação dos Triterpenos.....	28
2.4.2. Triterpenos esterificados	30
3. OBJETIVOS	32
4. METODOLOGIA	33
4.1. Reagentes e equipamentos	33
4.1.1. Procedimentos gerais	33
4.2. Coleta e identificação do material vegetal	36
4.3. Preparação dos extratos das folhas de <i>Pouteria macahensis</i>	36
4.3.1. Prospecção de constituintes químicos do extrato etanólico de <i>Pouteria macahensis</i>	36
4.3.2. Atividade Biológica de <i>Pouteria macahensis</i>	37
a. Atividade antioxidante do extrato etanólico de <i>Pouteria macahensis</i>	38
b. Atividade antimicrobiana do extrato etanólico e compostos isolados de <i>Pouteria macahensis</i>	38
4.4. Isolamento de constituintes químicos do extrato etanólico de <i>Pouteria macahensis</i>	40
4.4.1. Estudos dos Grupos PmF-1, PmF-2 e PmF-3	41
4.4.2. Estudo do Grupo PmF-4	41
4.4.3. Estudo do Grupo PmF-5	42
4.4.4. Estudo do Grupo PmF-6	43
4.4.5. Estudo do Grupo PmF-14	44
4.4.6 Demais Grupos.....	47
5. RESULTADOS	48

5.1. Material Vegetal.....	48
5.2. Prospecção Fitoquímica	48
5.3. Análise da capacidade antioxidante pelo método DPPH	50
5.4. Identificação das substâncias presentes no extrato etanólico de <i>P. macahensis</i>	53
5.4.1. Composição química dos óleos fixos.....	53
5.4.2. Determinação estrutural de PmF-4: 3 β -hidroxifriedelano (friedelinol).....	55
5.4.3. Determinação estrutural de PmF-4.2: 3-oxofriedelano (friedelina).....	66
5.4.4. Determinação estrutural de PmF-4.3: mistura de behenato e erucicato de eritrodilila, e PmF-4.4 palmitoleicoato de eritrodilila.....	74
5.4.5. Determinação estrutural de PmF-6.1: mistura de behenato, erucicato e palmitoleicoato do ácido betulínico	90
5.4.6. Determinação estrutural de PmF-6: mistura rica em β -sitosterol	104
5.4.7. Determinação estrutural de PmF-14.1: ácido gálico.....	112
5.4.8. Demais Grupos.....	118
5.4.9. Atividade Antimicrobiana.....	118
6. CONCLUSÕES	119
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	120

1. INTRODUÇÃO

Espécies da família Sapotaceae podem ser uma importante fonte de substâncias potencialmente ativas. Algumas espécies são usadas na medicina popular para o tratamento de queimaduras, reumatismo, erupções cutâneas e como analgésicas (MONTENEGRO *et al.*, 2002; MONTENEGRO *et al.*, 2006). Dentre as substâncias já relatadas para espécie desta família podemos citar os triterpenos e flavonoides.

Dentro da família Sapotaceae encontra-se o gênero *Pouteria* de ocorrência restrita em áreas da Mata Atlântica (PENNINGTON, 1991). Espécies de *Pouteria* são utilizadas na medicina popular para tratamento de febre, inflamação, erupções na pele, úlceras, diabetes, diarreia, náuseas, vômitos, dores nas costas, e para estimular a lactação. Porém, para fins científicos e avaliação da eficácia e efeitos terapêuticos de extratos ou substâncias isoladas os trabalhos científicos ainda são poucos. (SOUZA *et al.*, 2012).

Espécies de *Pouteria* são mais encontradas nos estados de Alagoas, Bahia, Espírito Santo e Rio de Janeiro. Porém, sua ocorrência na Bahia é cada vez mais escassa, pois o desmatamento ao longo dos anos dificultou a expansão de sua vegetação. Há ausência de estudos químicos e biológicos sobre esse gênero.

Os triterpenos são uma classe de metabólitos secundários bastante diversificada e possui funções importantes no reino vegetal e para saúde humana. São candidatos a novos medicamentos, devido às atividades biológicas que apresentam (SILVA *et al.*, 2014). Segundo Melo (2010) apresentam atividade tais como: antimicrobiana, cardioprotetora, gastroprotetora, anti-inflamatória e antitumoral.

Huyke e colaboradores (2006) em estudos realizados na Alemanha para triterpenos pentacíclicos relatam sua ação no tratamento de queratose actínica (lesão causada na pele pelo sol, caracterizada por áreas avermelhadas, ou acastanhadas com superfície áspera). Alguns triterpenos pentacíclicos são princípios ativos de medicamentos comerciais, tais como betulina (80%), ácido betulínico (3%), ácido oleanólico (1%), lupeol (2%), e eritrodiol (1%). Estudos com o triterpeno friedelina indicaram sua atividade antiproliferativa, pro-apoptótica, anti-inflamatória, analgésica e antipirética (MARTUCCIELLO *et al.*, 2010; ANTONISAMY, *et al.*, 2011).

Os flavonoides são do ponto de vista farmacêutico, os compostos fenólicos mais importantes, pois apresentam propriedades farmacológicas e protetoras para a saúde, alguns regulam o sistema imune e as respostas inflamatórias, além de apresentarem atividade antioxidantes, anticancerígenos, antivirais e protetores do fígado (PEREIRA, *et al*, 2012). Pesquisas têm apontado que as isoflavonas genisteína e a daidzeína, presentes na soja possuem atividade preventiva contra o câncer. Populações que consomem soja e seus derivados têm apresentando incidência menor para certos tipos de câncer como: cólon, mama e próstata, principalmente quando comparados a populações que não ingerem esses alimentos (RIGOTTI, 2011; PEREIRA *et al*, 2012).

Dentro desse enorme e diverso universo de compostos presentes nas espécies vegetais, aliado a disponibilidade de indivíduos de *Pouteria macahensis* na Região Sul da Bahia, nesse trabalho é apresentado o estudo químico das folhas dessa espécie buscando contribuir para seu conhecimento químico da espécie bem como buscar a bio-atividade de compostos isolados.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Mata Atlântica: importante fonte de produtos naturais de espécies vegetais

A química de produtos naturais no Brasil é de interesse de muitos pesquisadores; desde a vinda da Corte real para o Brasil, em 1808, com o estabelecimento das rotas marítimas para o início das primeiras expedições científicas, os europeus descobriram a grande diversidade da fauna e flora brasileira (PINTO *et al.*, 2002).

No país encontram-se como biomas principais: Floresta Amazônia, Cerrado, Mata Atlântica, Pantanal e Caatinga (Figura 1) (ALMEIDA, 2011). O Cerrado e a Mata Atlântica são biomas considerados com grande risco de extinção (PINTO *et al.*, 2002). O cerrado ocupa 21% do território nacional sendo considerado o segundo maior, apenas superado em área pela Amazônia. Em sua elevada biodiversidade são encontradas plantas herbáceas, arbustivas, arbóreas e cipós somando mais de 7.000 espécies (KLINK e MACHADO, 2005). O bioma Mata Atlântica é distribuído desde o Rio Grande do Sul até o Nordeste, abrangendo 17 estados. O bioma é reconhecido internacionalmente pela sua rica biodiversidade e pela grande quantidade de espécies de plantas endêmicas, detém os dois maiores recordes de diversidade botânica para plantas lenhosas. Quanto ao endemismo das plantas vasculares, 50% são endêmicas, ou seja, não ocorre em nenhum outro lugar do planeta (LIPORACCI, 2014).



Figura1: Distribuição dos biomas brasileiros.

<http://www.ibge.gov.br/home/presidencia/noticias/21052004biomashtml.shtm>

Apesar do bioma Mata Atlântica está entre os mais ricos de biodiversidade do mundo, é o ecossistema mais ameaçado do país, como também, uma das florestas tropicais mais castigadas devido ao histórico de exploração econômica (Figura 2). Devido à destruição de sua área ao longo dos anos, hoje está entre os 25 *hotspot* (área prioritária para conservação, com alta biodiversidade de espécies endêmicas de plantas e sofre ameaça de extinção de sua vegetação) mundiais em biodiversidade (SAYRE, 2003; TABARELLI *et al.*, 2005; LIPORACCI, 2014).

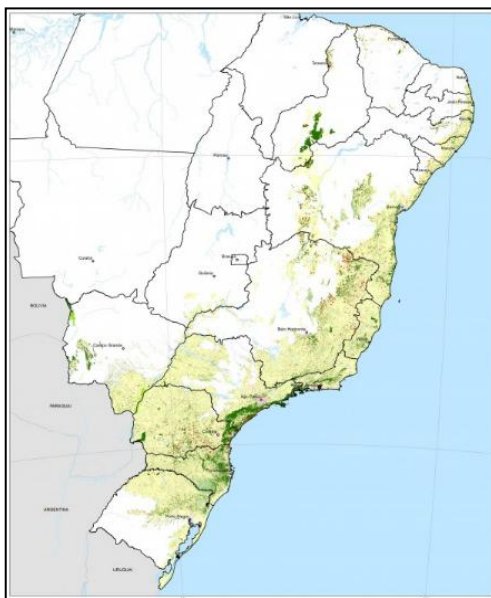


Figura 2: Distribuição dos remanescentes florestais do Bioma da Mata Atlântica 2013-2014.

- | | |
|--|---|
| ■ Remanescente florestal | ■ Desmatamento 2013-2014 |
| ■ Área natural não florestal | ■ Área urbana |
| ■ Mangue | ■ Lei 11.428/06 da Mata Atlântica |
| ■ Restinga | |

Fonte: <https://www.sosma.org.br/projeto/atlas-da-mata-atlantica/>.

A região Nordeste do Brasil possui área de Mata Atlântica, que apesar do elevado desmatamento sofrido, encontra-se em sua maior parte na região sul da Bahia, na qual faz parte do corredor central (Bahia e Espírito Santo). Muitas espécies de plantas foram identificadas neste corredor. A riqueza dessa biodiversidade foi constatada por cientistas que registraram 476 espécies de plantas em apenas um hectare na Estação Biológica de Santa Lúcia (Espírito Santo) e 454 espécies na Cerra do Conduru (Sul da Bahia), configurando como um dos mais importantes para a efetivação do Corredor Central, em virtude da sua elevada riqueza de espécies, endemismo e ameaça (PRADO, *et al.*, 2003; GIULIETTI, *et al.*, 2005).

Muitas pesquisas já comprovaram a importância de estudos com produtos naturais na flora brasileira, visto que, extratos de plantas apresentam variadas atividades biológicas. Já

foram relatadas antifúngica, antiofídica, antimalárica, antimicrobiana, e prevenção de câncer (MARQUES, 2011). Também já foram relatadas atividades para compostos isolados de espécies vegetais das classes: xantonas, com atividade antiprotozoária; cumarinas, com atividade quimioprotetora contra o câncer; diterpenos, com atividade anticâncer, além de dois biflavonoides, como agentes inibidores de tipo isomerase (MARQUES, 2011).

Tais atividades são significativas e mostram a importância dos estudos com as espécies vegetais. Importante lembrar que muitas espécies vegetais estão ameaçadas de extinção e assim podemos perder valiosas informações que podem melhorar a qualidade de vida do homem. Nesse cenário, vale ressaltar a importância e a necessidade de investimentos em pesquisas com produtos naturais buscando conhecimentos acerca dos metabólitos secundários produzidos pelo eficiente laboratório das espécies vegetais.

Dessa forma, visto que o Brasil possui uma situação bastante privilegiada em relação à possibilidade de desenvolvimento de produtos naturais de origem vegetal, faz-se necessário, explorar a riqueza de nossa flora sem, contudo, extinguí-la.

2.2. O gênero *Pouteria* (Sapotaceae)

Dentre as diversas famílias de plantas estudadas para fins medicinais no mundo, encontra-se a família Sapotaceae, (RODRIGUES, 2015). Pennington, (1991) sugeriu a divisão das Sapotaceae em cinco diferentes tribos (Mimusopeae, Isonandreae, Sideroxyloae, Chrysophylleae e Omphalocarpeae). Porém estudos de caracteres morfológicos e moleculares mais recentes apresentados por Swenson *et al.*, (2005) sugerem uma nova classificação para família, onde a mesma foi subdividida em três subfamílias: Sarcospermatoidae (*Sarcosperma*), Sapotoideae e Chrysophylloideae. Esta última é o maior agrupamento dentre as espécies, contendo 25 gêneros. Atualmente, a família Sapotaceae incluem 58 gêneros e cerca de 1250 espécies encontradas em regiões tropicais e subtropicais como arbustos e árvores, as folhas são espirais arranjadas ou alternadas, Figura 3 (1), (PENNINGTON, 1991; QUEIROZ *et al.*, 2016).

Na família Sapotaceae os gêneros mais estudados, considerando os relatos etnofarmacológicos, são: *Pouteria*, *Mimusops*, *Manilkara*, *Gambeya*, *Argania*, *Ormosia*, *Sideroxylum*, *Calocarpum*, *Butyrospermum*, *Madhuka*, *Planchonella* e *Chrysophyllum* (MARQUI, 2007). Muitas espécies são de interesse econômico devido a produção de madeira,

látex, matéria-prima da especiaria canistel e substâncias utilizadas para a produção de fármacos (SANTANA *et al.*, 2008), além de frutos comestíveis como: *Chrysophyllum* (*Chrysophyllum gnocarpum* = aguaiá), *Manilkara* (*Manilkara zapota* = sapoti) *Mimusopse* (*Mimusops ezeyheri* = balata) e *Pouteria* (*Pouteria torta* = guapeva) (MA *et al.*, 2004).

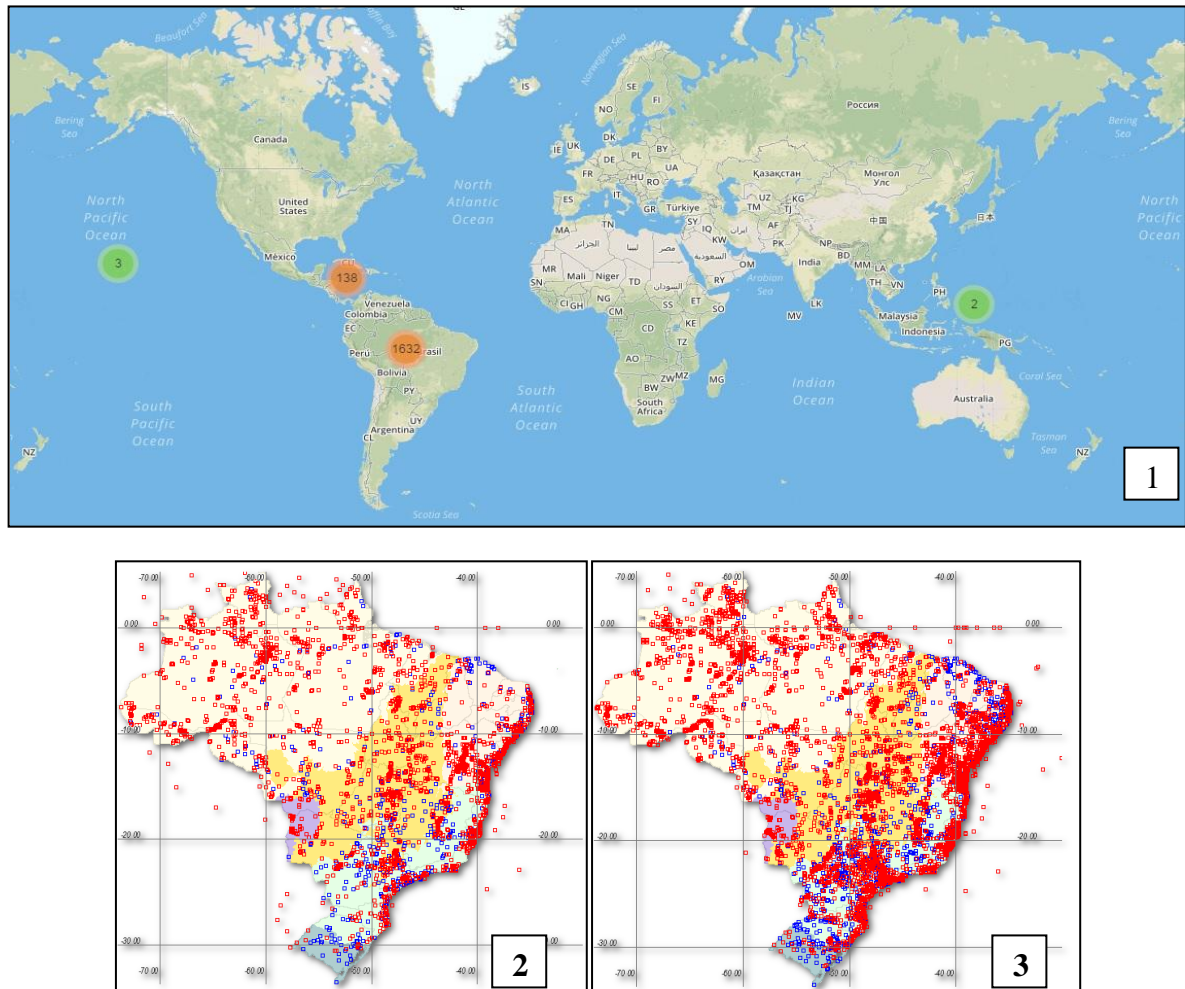


Figura 3: Distribuição do gênero *Pouteria* no mundo (1), no Brasil (2) e distribuição da família Sapotaceae no Brasil (3).

- coordenadas originais
- coordenadas por município

Fonte: <http://inct.splink.org.br> http://sweetgum.nybg.org/science/vh/map.php?DarFamily%7CAltFamilyLocal_tab=Sapotaceae&DetGenusLocal_tab=Pouteria&LimitPerPage=40

No Brasil, encontram-se 12 gêneros e 232 espécies, aproximadamente 70 espécies são encontradas na Região Nordeste, Figura 3 (2 e 3). Desses o gênero *Pouteria*, de ocorrência maior na América do Sul, principalmente em regiões de floresta úmida, é composto por 122 espécies, das quais 50 são endêmicas da Mata Atlântica e estão distribuídas pela Amazônia (principalmente na região costeira) e frequentemente ocorrendo na Bahia, Espírito Santo, Rio de Janeiro e São Paulo (Tabela 1) (PENNINGTON, 1991; QUEIROZ *et al.*, 2016).

Tabela 1: Sapotaceae encontradas na região Nordeste.

Espécies de Pouteria encontradas no Nordeste por Alves Araújo (2013)	
Espécie	Estado
<i>P. bangii</i> (Rusby) T. D. Penn	Alagoas, Ceará, Paraíba, Pernambuco, Rio Grande do Norte e Sergipe
<i>P. caimito</i> (Ruiz e Pav.) Radlk	Ceará, Paraíba, Pernambuco, Rio Grande do Norte e Sergipe
<i>P. ciliatano</i>	Ceará e Pernambuco
<i>P. durlandii</i> (Standl.) Baehni	Alagoas, Paraíba e Pernambuco
<i>P. egrégia</i>	Pernambuco
<i>P. furcata</i> T. D. Penn., <i>P. plicata</i> T. D. Penn,	Piauí
<i>P. procera</i> (Mart.) Radlk	
<i>P. gallifruca</i> Cronq.	Alagoas, Pernambuco e Sergipe
<i>P. gardneri</i> (Mart. e Miq.) Baehni	Alagoas, Ceará, Paraíba, Pernambuco e Sergipe
<i>P. gardneriana</i> (A. DC.) Radlk	Alagoas, Pernambuco e Rio Grande do Norte
<i>P. glomerata</i> (Miq.) Radlk	Alagoas, Ceará, Pernambuco e Sergipe
<i>P. macahensis</i> T. D. Penn.	Alagoas, Pernambuco e Sergipe
<i>P. macrophylla</i> (Lam.) Eyma	Ceará
<i>P. nordestinensis</i>	Alagoas, Ceará, Paraíba, Pernambuco e Sergipe
<i>P. ramiflora</i> (Mart.) Radlk.	Ceará, Pernambuco, Piauí e Sergipe
<i>P. reticulata</i> (Engl.) Eyma	Alagoas, Ceará, Pernambuco, Piauí e Rio Grande do Norte
<i>P. venosa</i> (Mart.) Baehni T. D. Penn.	Alagoas, Paraíba, Pernambuco, Rio Grande do Norte e Sergipe.
Espécies de pouteria relatadas na Bahia por Queiroz et al., (2016)	
<i>P. andarahiensis</i> T.D.Penn	<i>P. subsessifolia</i> Cronquist.
<i>P. beaurepairei</i> (Glaz. & Raunk.) Baehni	<i>P. torta</i> (Mart.) Radlk
<i>P. bilocularis</i> (H.K.A.Winkl.) Baehni	<i>P. venosa</i> (Mart.) Baehni
<i>P. caimito</i> (Ruiz & Pav.) Radlk	<i>P. beaurepairei</i> (Glaz. & Raunk.) Baehni
<i>P. cuspidata</i> (A.DC.) Baehni	<i>P. cuspidata</i> (A.DC.) Baehni
<i>P. gardneri</i> (Mart. & Miq.) Baehni	<i>P. pachycalyx</i> T.D. Penn
<i>P. gardneriana</i> (A.DC.) Radlk	<i>P. bapeba</i> T.D. Penn
<i>P. glomerata</i> (Miq.) Radlk	<i>P. coelomatica</i> Rizzini
<i>P. ramiflora</i> (Mart.) Radlk	<i>P. macahensis</i> T.D. Penn
<i>P. reticulata</i> (Engl.) Eyma	<i>P. macrophylla</i> (Lam.) Eyma
<i>P. procera</i> (Mart.) K. Hammer	<i>P. peduncularis</i> (Mart. & Eichler) Baehni
<i>P. grandiflora</i> (A.DC. Baehni	<i>P. pachycalyx</i> T. D. Penn

No Brasil, já foram estudadas com fins científicos as *Pouterias*: *P. torta* coletada em Botucatu, (SP); *P. venosa* (Mart.) Baehni, coletada em Mucuri, (AL) e *P. macrophylla*, coletada em Belém, (PA), (PERFEITO *et al.*, 2005; MONTENEGRO *et al.*, 2002; SILVA *et al.*, 2012; COSTA *et al.*, 2014).

A espécie *P. macahensis*, sinônimo *Lucuma macahensis* Glaz, conhecida popularmente como “abiu-de-macaé” é uma árvore amplamente distribuídas entre as espécies endêmicas do domínio da Mata Atlântica no Brasil, associada às restingas e, por vezes, matas de tabuleiro (ALVES-ARAÚJO, 2012). Está distribuída nos estados de Alagoas, Bahia, Espírito Santo e Rio de Janeiro, com dois indivíduos registrados em área do Parque Estadual da Serra do Brigadeiro, MG e um indivíduo encontrado na Serra de Santa Clara, por último um indivíduo registrado em Serra Grande, Uruçuca, BA. Estudos sobre a espécie ao longo dos anos apontam redução dos indivíduos, estima-se que de 2001-2011, a população tenha reduzido a metade (CNCFLORA, 2011).

Não há relatos de uso medicinal para a espécie, sendo desprovida de estudos científicos para atividades farmacológicas e estudos químicos, Figura 4.

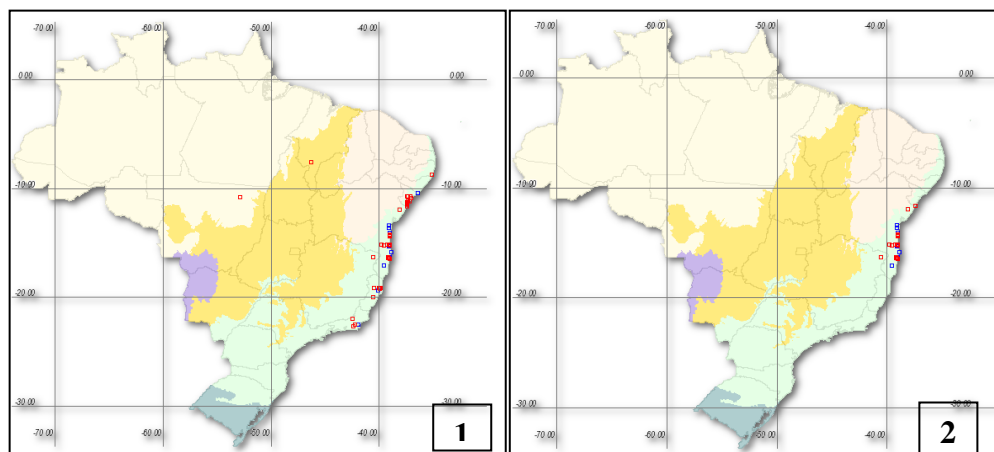


Figura 4: Distribuição da espécie *P. macahensis* no Brasil (1) e na Bahia (2).

■ coordenadas originais

■ coordenadas por município

Fonte <http://inct.splink.org.br>

2.3. Estudo químico e atividades biológicas de espécies de *Pouteria*

Devido à importância econômica de sua madeira, a ocorrência de indivíduos é restrita, principalmente em centros urbanos ou proximidades. Os indivíduos são encontrados em Matas em locais menos acessíveis. Como consequência da grande exploração, os estudos fitoquímicos de espécies de *Pouteria* são limitados. Assim investigar seu potencial químico e biológico torna este gênero bem atrativo, pois além da ameaça de extinção, algumas espécies são usadas na medicina popular, sem que haja comprovação científica.

Do ponto de vista químico encontra-se neste gênero com frequência maior a classe de triterpenos (MONTENEGRO *et al.*, 2006). Os triterpenos são comuns em vegetais e apresentam diversas estruturas químicas tendo relatos como atividade antimicrobiana, cardioprotetora, gastroprotetora, anti-inflamatória e antitumoral (MELO, 2010).

No estudo químico dos extratos hexânico e diclorometânico das flores e frutos de *P. torta* foram isolados compostos: misturas de ácidos graxos, compostos poli-isoprenoides, misturas de hidrocarbonetos e acetato de lupeol (1) (PERFEITO *et al.*, 2005). Lopes (2005) isolou do extrato etanólico das folhas uma mistura de α - e β -friedelinol (2 e 3) (Figura 5). Para esta mesma espécie Alves *et al.*, (2000) descreveram sua atividade antimicrobiana para o extrato metanólico das folhas contra *Cladosporium sphaerospermum*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Bacillus cereus* e *Pseudomonas aeruginosa*.

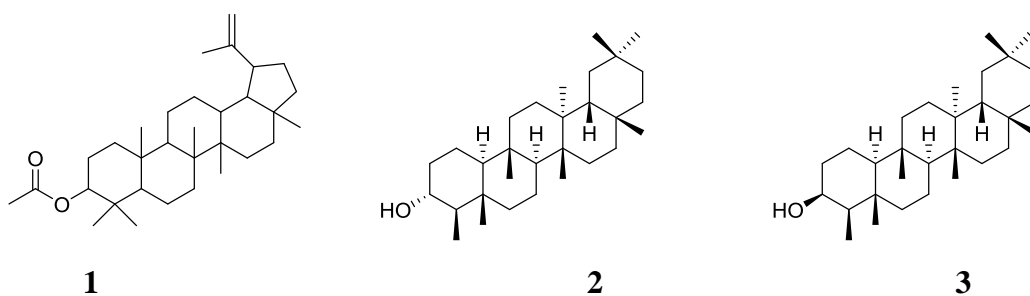
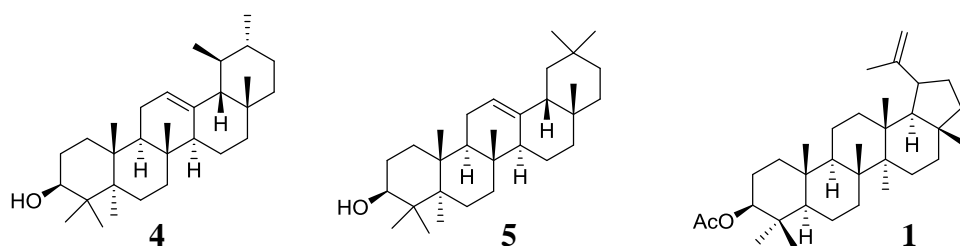


Figura 5: Compostos isolados de *P. torta* (LOPES, 2005).

Silva (2007) isolou dos extratos hexânico e metanólico de *P. gardenrii* mistura de hidrocarbonetos, os triterpenos α (4) e β amirina (5), acetato de lupeol (1), mistura de ésteres de cadeia longa, acetato de α -amirina (6), mistura de alcoóis de cadeia longa e mistura de ácido ursólico (7) e oleanólico (8) (Figura 6). Frente a *Artemia salina* as frações dos extratos aquoso e metanólico foram classificadas como tóxicas. Quanto à atividade bacteriana o extrato aquoso apresentou atividade para *Staphylococcus aureus*, nenhum dos outros extratos apresentaram atividades contra cepa de *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*.



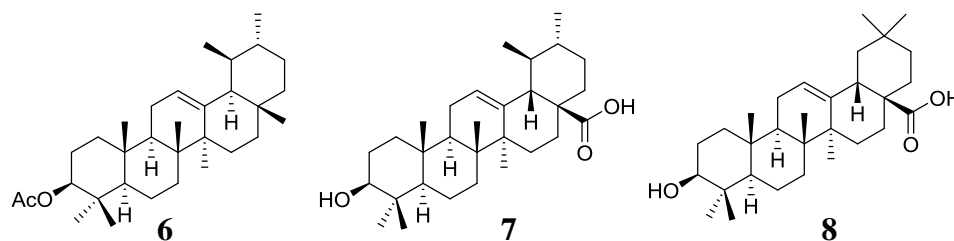


Figura 6: Compostos isolados de *P. gardinrii* (SILVA, 2007).

Os extratos brutos aquoso, hexânico e etanólico de *P. ramiflora* foram avaliados frente à atividade da enzima α -amilase. Os resultados mostraram que os extratos etanólico e aquoso foram os mais ativos e o hexânico pouco ativo. Do estudo fitoquímico dos extratos hexânico e aquoso foram isolados cinco compostos, três triterpenos: friedelina (**9**), *epi*-friedelanol (**3**) e taraxerol (**10**) (extrato hexânico) e o flavonoide miricitrina (**11**) (extrato aquoso) (Figura 7). O composto miricitrina apresentou inibição da α -amilase menor que 50% em relação ao padrão (RODRIGUES, 2015).

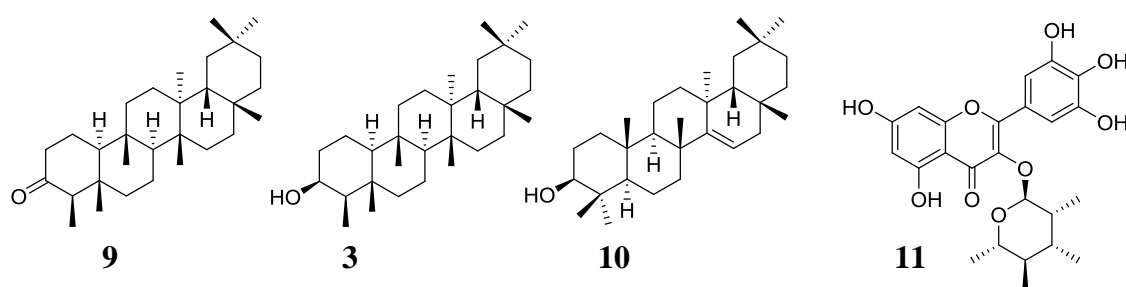
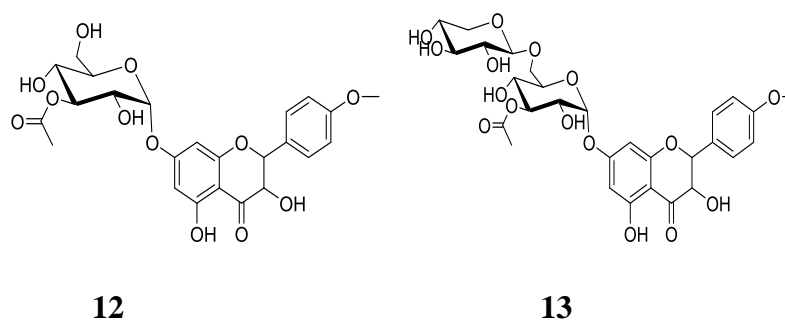


Figura 7: Compostos isolados de *P. ramiflora* (RODRIGUES, 2015).

Dini (2011) ao estudar a fração butanólica dos frutos de *P. obovata* (R. Br.) isolou três flavonoides glicosilados: 2*R*,3*R*-4-O-metil-diidrokaempferol-7-O-[3''-O-acetil]- β -D-glucopiranosídeo (**12**); 2*R*,3*R*-4'-O-metil-diidrokaempferol-7-O- β -D- β -L-xilopiranosil-(1''' \rightarrow 6'')-[3''-O-acetil]- β -D-glucopiranosídeo (**13**); 2*R*,3*R*-4'-O-metil-diidrokaempferol-3-O- β -D- β -L-xilopiranosil-(1''' \rightarrow 6'')-[3''-O-acetil]- β -Dglucopiranosídeo (**14**), além do ácido gálico (**15**) (Figura 8). Segundo o autor, o alto teor de fenóis e flavonóides, faz desta fruta em pó um excelente ingrediente para preparações de alimentos nutracêuticos.



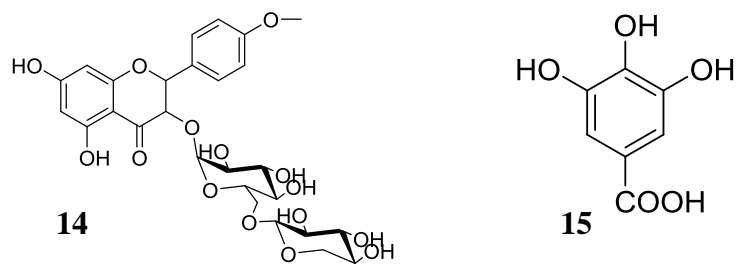


Figura 8: Compostos isolados de *P. obovata*.

Alguns dos extratos das folhas (CHCl_3), cascas do caule (DCM) e caule (Hex-AcOEt 1:1) de *P. venosa*, apresentaram atividades para ensaios larvicidas e/ou antiradicalar, e levaram ao isolamento de cinco substâncias: espinasterol (**16**) ácido ursólico (**7**), taraxerol (**10**), ácido $3\beta,19\alpha,23$ -trihidroxiurs-12-en-28-oico (**18**), ácido $2\alpha,3\alpha,19\alpha,23$ -tetraidroxiurs-12-en-28-óico (**19**) (Figura 9) (MONTENEGRO, *et al.*, 2006).

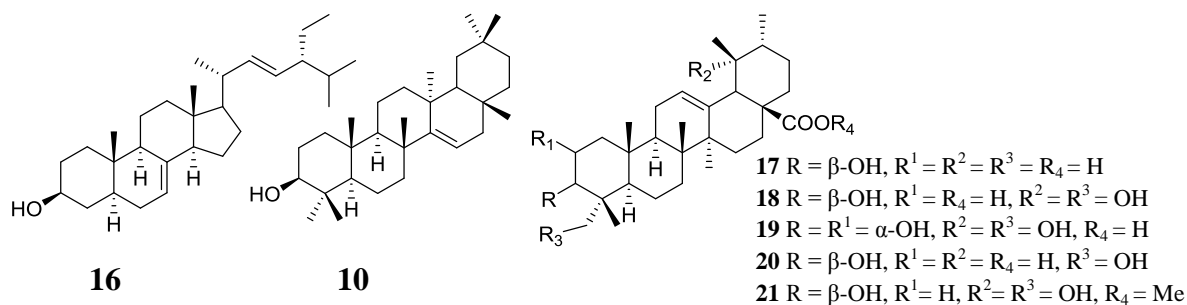


Figura 9: Compostos isolados de *P. venosa* (MONTENEGRO, 2006).

Os flavonóides miricetina-3-O- β -D-galactopiranosídeo, miricetina-3-O- α -L-arabinopiranosídeo, e miricetina-3-O- α -L-rhaminopiranosídeo foram isolados por HPLC, a partir do extrato hidroetanólico das folhas *P. torta*. O extrato foi submetido à avaliação da atividade mutagênica em *Salmonella typhimurium* e por teste do micronúcleo *in vivo*, sobre as células do sangue periférico de ratos suíços. Os resultados demonstram que o extrato hidroetanólico exibiu atividade mutagênica em ambos os ensaios, portanto alerta cautela na utilização da presente planta na medicina popular (COSTA *et al.*, 2014).

Ensaio antimicrobianos de extratos AcOEt de folhas e cascas do caule de *P. venosa* demonstraram potencial antibacteriano, frente as linhagens de bactérias Gram-positivas (*S. aureus*, *S. epidermidis* e *S. pneumoniae*) e Gram-negativas (*P. aeruginosa* e *P. mirabilis*). A fração mais promissora foi a fração AcOEt das cascas do caule, contra *S. aureus* e apresentou viabilidade celular, bastante promissora para ensaios pré-clínicos *in vivo* (SANTOS *et al.*, 2015).

A atividade antioxidante frente ao radical livre DPPH-2,2-difenil-1-picrilhidrazila em espécies de *Pouteria* foi investigada para as espécies: *P. campechiana* (extrato acetônico e hidroetanólico dos frutos); *P. caimito* (extrato aquoso dos frutos), *P. torta*, *P. caimito*, *P. ramiflora* (Mart.) Radlk (extrato etanólico das folhas); Todas demonstraram atividade antioxidante para neutralização de radicais livres. Essa atividade também foi avaliada em algumas frações de folhas, caule e casca do caule de *P. venosa*, em frações acetato de etila do extrato metanólico dos frutos de *P. sapota* e *P. viridis*, além de extratos metanólicos e acetônicos de frutos de *P. campechiana* e *P. sapota*. O extrato da casca do caule de *P. campechiana* mostrou-se ativo, porém com atividade menor comparada ao padrão de ácido ascórbico, hidroxitoluenobutilado (BHT) e α -tocoferol (SILVA *et al.*, 2008).

2.4. Breves considerações sobre triterpenos

2.4.1. Formação dos Triterpenos

Os triterpenóides pertencem à grande família dos terpenóides ou terpenos, bastante difundidos na natureza. Estes compostos são originados da via do mevalonato e da via da dioxixilulose-5- fosfato, todos derivados de unidades de isopreno C₅ que se ligam entre si, orientados em sentido inverso (*cabeça-cauda*) (DEWICK, 2002 e OLIVEIRA *et al.*, 2014).

Os terpenoides são uma classe diversificada, são originados de unidades bioquimicamente ativa dos isoprenos, através da condensação do isopentenil-difosfato - IPP (**22**) com o dimetil-alil-difosfato - DMAPP (**23**), conhecidos como hemiterpenos, formando o geranyl-pirosfosfato – GPP (**24**) (Figura 10).

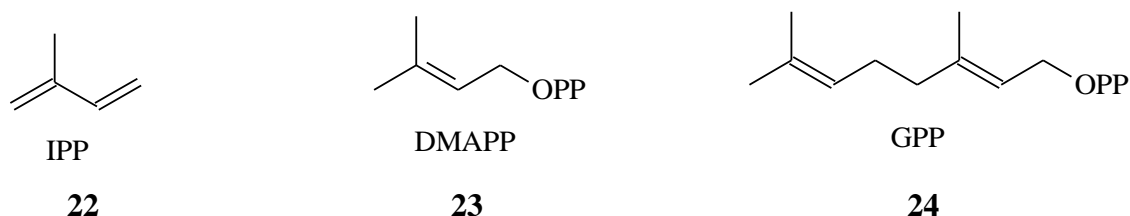


Figura 10: Estrutura do Isopreno (22) e geranyl-pirosfosfato (23) dimetilalil-pirosfosfato (24).

As ligações sucessivas de unidades de isopreno dão origem a principais classes de terpenos: monoterpenos (C₁₀), sesquiterpenos (C₁₅), diterpenos (C₂₀), sesterpenos (C₂₅), triterpenos (C₃₀) e tetraterpenos (C₄₀) (Figura 11) (DEWICK, 2002).

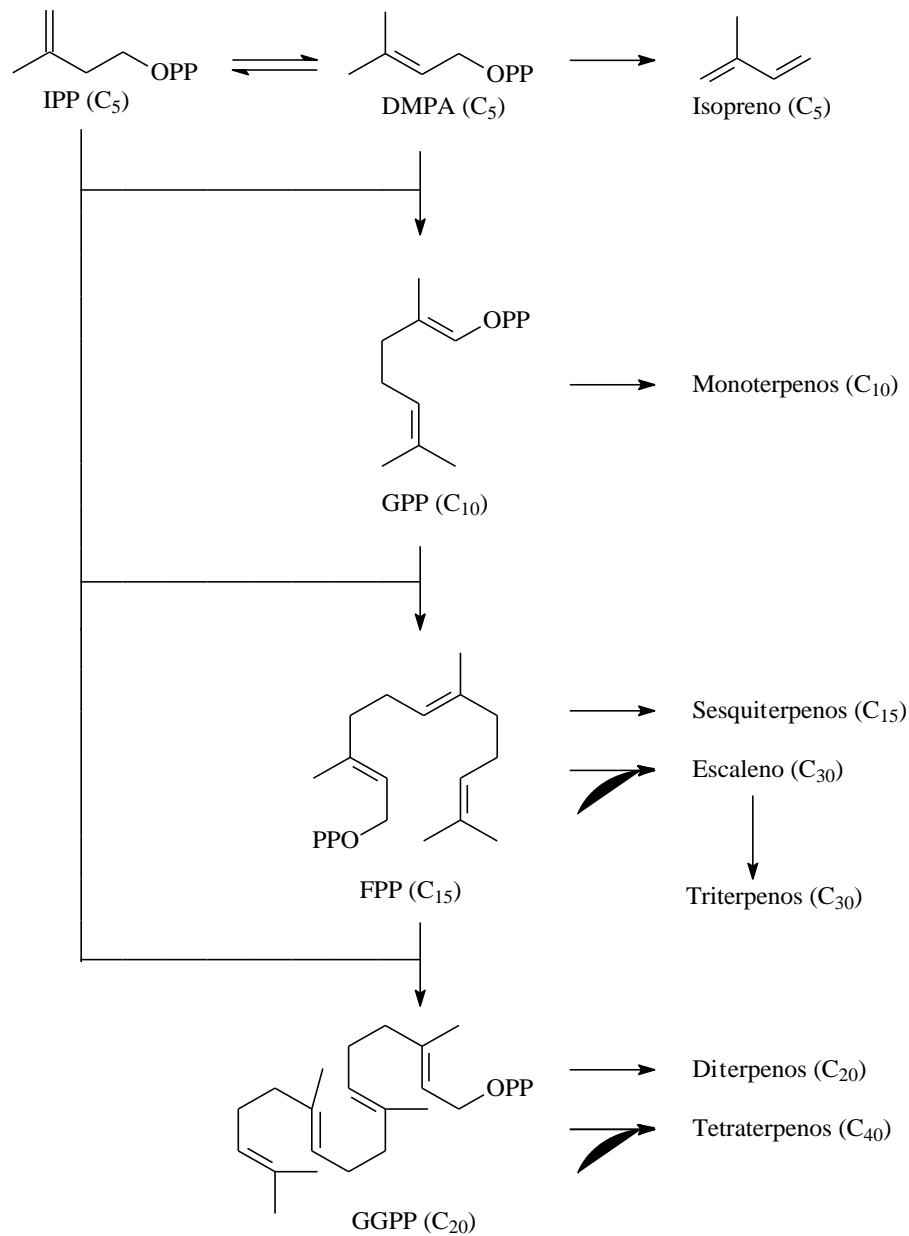


Figura 11: Esquema de formação geral dos terpenos (DEWICK, 2002).

Em especial os derivados triterpênicos (C₃₀) são formados de uma forma diferente. Eles derivam da união *cauda-cauda* de duas unidades de pirofosfato de farnesil por um processo complexo formando o esqualeno (precursor dos triterpenos e esteróides) (Figura 12) (DEWICK, 2002).

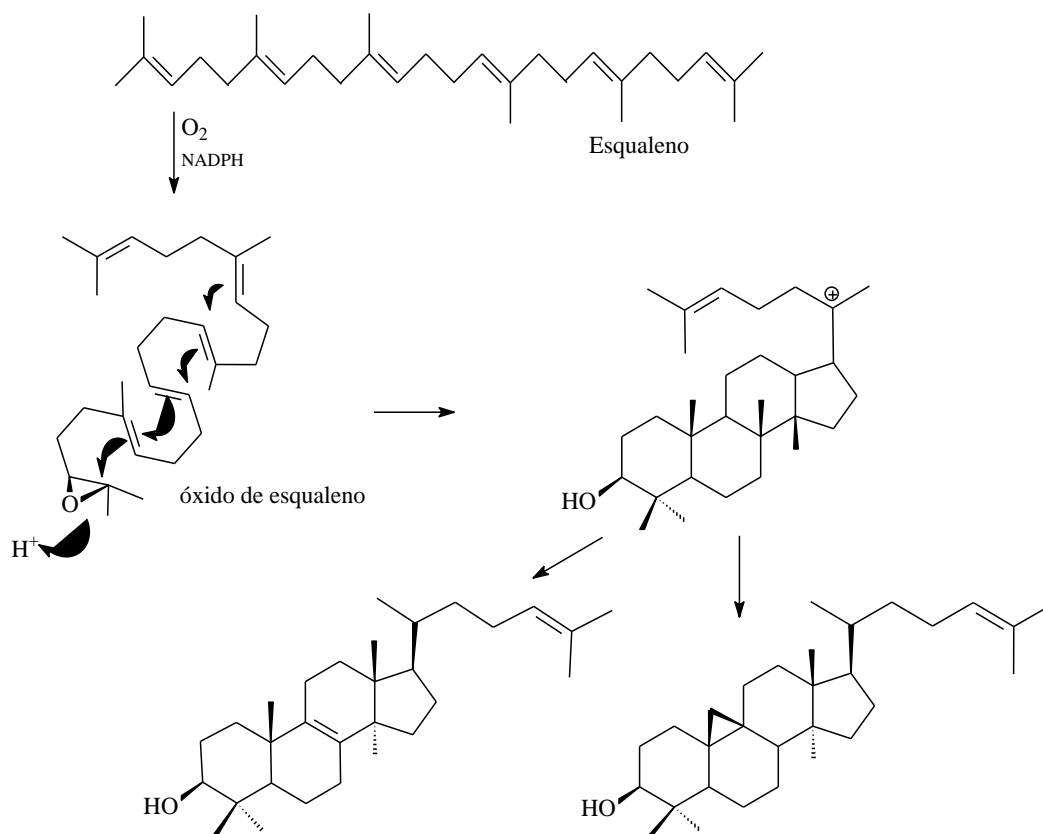


Figura 12: Ciclização do esqualeno (DEWICK, 2002).

Muitas são as propriedades biológicas potencializadas pelos triterpenoides como: anti-inflamatórios, antibacterianos, fungicidas, antivirais, analgésicos, cardiovasculares e antitumorais. A classe dos triterpenos destaca-se por possuir esqueleto pentacíclico, sendo de maior capacidade anti-cancerígenas, além de está presente na fabricação de perfumes e aromatizantes (MAHATO e KUNDU, 1994; ZWENGER *et al.*, 2008). Estes estão presentes em várias famílias de vegetais. Sendo os triterpenos ácidos oleanólico, betulínico e ursólico os de maiores ocorrência, além do lupeol, α e β -amirinas (ZWENGER *et al.*, 2008).

2.4.2. Triterpenos esterificados

Os triterpenos são compostos comumente isolados em fitoquímica. Em especial, os esterificados. Estes possuem um grupo éster na posição C-3 do núcleo triterpênico. E no gênero *Pouteria* poucos são os relatos para esse tipo de composto.

Apenas há relatos de estudos realizados por Ragasa *et al.* (2011) do extrato AcOEt das cascas do caule de *P. campechiana*, no qual foram isolados três triterpenos: o éster

metílico do ácido 3 β ,28-dihidroxi-olean-12-eno, uma mistura do éster metílico do ácido oleanólico, do éter metílico do ácido betulínico. Esses triterpenos foram submetidos a avaliação da atividade antimicrobiana, porém apresentaram pouca atividade frente às bactérias *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa* e para os fungos *Candida albicans* e *Trichophyton mentagrophytes*. Lopes (2005) isolou das folhas de *Pouteria torta* o triterpeno esterificado, palmitato de eritrodiol.

Nos gêneros da família Sapotaceae diversos são os ésteres de triterpenos isolados, configurando como marcadores quimiotaxonômicos desta família (MEDEIROS, 2008). Por exemplo, em estudo fitoquímico das folhas de *Pradosia huberi* (Ducke) foi isolado e identificados três ésteres de cadeia longa dos triterpenos ácido olenólico, ácido betulínico, além de uma mistura do éster graxo do ácido betulínico e o esteróide espinasterol (MEDEIROS, 2008).

No extrato dos frutos de *Gambeya africana* foram isolados ésteres do triterpeno eritrodiol: 3 β -octacosanoiloxi-12-oleanen-28-ol, 3 β -triacontanoiloxi-12-oleanen-28-ol, 3 β -triacontanoiloxi-12-oleanen-28-ol, 3 β -tetratriacontanoiloxi-12-oleanen-28-ol e 3 β -hexatriacontanoiloxi-12-oleanen-28-ol (WANDJI, 2002).

Dados da literatura relatam que não há estudo fitoquímico para a espécie *P. macahensis*, dessa forma nesse trabalho estudaremos a espécie com ênfase no isolamento de seus constituintes químicos.

3. OBJETIVOS

Isolar e identificar compostos presentes no extrato das folhas de *P. macahensis* de ocorrência na região Sul da Bahia.

Objetivos específicos:

- a. Obter extratos orgânicos das folhas de *P. macahensis* através da maceração com extração exaustiva, seguido de isolamento dos constituintes através de métodos fitoquímicos.
- b. Identificar os compostos isolados usando a espectroscopia no Infravermelho, espectrometria de massas e espectroscopia de ressonância magnética nuclear uni e bidimensional.
- c. Realizar testes antimicrobianos com os compostos isolados e identificados.

4. METODOLOGIA

4.1.Reagentes e equipamentos

Os solventes orgânicos utilizados nos procedimentos foram das marcas Vetec[®], Quimica Moderna[®], Neon[®], Dinâmica[®], Synth[®], e os reagentes DPPH, ácido ascórbico Sigma-Aldrich[®], todos de grau PA.

Para a trituração do material vegetal foi utilizado um moinho de facas da marca Marconi[®] MA-680 e para a secagem do material foi utilizada estufa com circulação e renovação de Ar SL-102 a 50 °C até observar massa constante.

Os pontos de fusão foram determinados usando o Ponto de Fusão Capilar Fisatom[®] 430 D, e não foram corrigidos.

Os espectros no ultravioleta foram obtidos no espectro UV-Vis Nova[®] 1600 UV.

Os espectros de absorção na região do infravermelho foram obtidos na faixa de 4000 – 400 cm⁻¹ usando espectrofotômetro Perkin Elmer[®] 400. As amostras foram homogeneizadas em brometo de potássio (KBr), da Universidade Estadual de Santa Cruz (UESC) em colaboração com o grupo Bioma.

Os espectros de RMN de ¹H e ¹³C uni e bidimensionais, bem como os experimentos de DEPT 135 foram obtidos no espectrômetro Bruker Avance[®] CRX400, na Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) operando com frequência de 400 MHz para ¹H e 100 MHz para ¹³C. Os deslocamentos químicos foram expressos em valores de δ (ppm), utilizando como referência interna tetrametilsilano (TMS, $\delta= 0,0$). Os solventes utilizados na dissolução das amostras para obtenção dos espectros de RMN foram clorofórmio deuterado (δ_H 7,27 e δ_C 77,00) e piridina deuterado (δ_H 7,22; 7,68 e 8,62 e δ_C 123,87; 135,91 e 150,35).

4.1.1. Procedimentos gerais

- a. Técnicas de cromatografia

Nas separações cromatográficas em coluna foram utilizadas sílica gel Merck® 60 (0,063 – 0,200 mm), segundo metodologias descritas por Collins *et al.*, (2006) e Pavia *et al.*, (2009). A sílica foi suspendida inicialmente com solvente utilizado como fase móvel e empacotada em coluna de vidro até total decantação da sílica. A amostra foi incorporada com quantidade suficiente de sílica e solvente e aplicada no topo da coluna, em seguida foi realizada a eluição com solventes de ordem crescente de polaridade.

Na cromatografia em camada delgada comparativa (CCD) e na cromatografia em camada delgada preparativa (CCDP) foram utilizados gel de sílica Vetec® 60-G. As cromatoplacas para CCD foram preparadas espalhando-se uma suspensão de sílica em água destilada sobre placas de vidro através de um espalhador mecânico, obtendo-se placas com espessuras de 0,25 mm (comparativas) e 0,50 mm (preparativas). Depois de secar ao ar livre, todas as cromatoplacas foram ativadas em estufas a 100 °C por um período de aproximadamente uma hora (COLLINS *et al.*, 2006; PAVIA *et al.*, 2009).

Como reveladores foram utilizados vapores de iodo e reagente de vanilina, preparado conforme a metodologia descrita por Picman *et al.* (1980). Primeiramente, dissolveu-se 3g de vanilina em etanol, em seguida foram adicionados 135 mL de água destilada e 30 mL de H₂SO₄ concentrado. A solução foi acondicionada em frasco âmbar e sob refrigeração.

b. Teste de Lieberman-Burchard

Para detectar a presença de esteroides e triterpenoides (Lieberman-Burchard) foi utilizada a metodologia descrita por Matos (2009), com adaptações. O material foi solubilizado em 1 mL de clorofórmio e em seguida adicionado 1 mL de anidrido acético. A mistura foi agitada suavemente e foram adicionados 3 gotas de ácido sulfúrico concentrado. O material foi novamente agitado e observado o aparecimento de cores. A coloração azul evanescente seguida de verde permanente indica a presença de esteroides livres, e a formação da cor parda até vermelha indica triterpenoides pentacíclicos livres.

c. Reações de transesterificação

✓ *Frações apolares*

O processo de transesterificação seguiu a metodologia do Instituto Adolfo Lutz (2008). 10 mg da fração foi solubilizado em 3 mL de hexano e foram adicionados 4 mL de solução de NaOH ($0,5 \text{ mol L}^{-1}$). A mistura reagente foi aquecida a ($65-70 \text{ }^\circ\text{C}$) por 5 minutos. Após resfriamento, foram adicionados 5 mL de solução transesterificante (NH_4Cl , MeOH e H_2SO_4) e o sistema foi novamente agitado e aquecido por 10 minutos. Após resfriada, foram adicionados 4 mL de solução saturada de NaCl e a fase hexânica foi separada. A solução hexânica foi seca e em seguida foi submetida à análise CG-FID, nas condições a seguir.

✓ *Triterpenos esterificados com ácidos graxos de cadeia longa*

Foram adicionados 5,5 mL de uma solução de NaOMe/MeOH ($0,5 \text{ mol L}^{-1}$) a 10 mg da amostra, a solução foi mantida sob refluxo durante 2 horas a 73°C . Foram então vertidos 2 mL de água ao sistema reacional seguido de duas extrações consecutivas com 3 mL de CH_2Cl_2 . A fase diclorometânica, contendo ésteres graxos foi seca e submetida à análise CG-FID. A fase aquosa foi neutralizada com HCl 10% até pH neutro e em seguida extraída com clorofórmio, 3 vezes. Essa fase foi seca com Na_2SO_4 anidro e concentrada fornecendo o triterpeno.

✓ *Análise cromatográfica dos ésteres de cadeia longa metilados*

A composição química foi avaliada através da cromatografia gasosa acoplada ao detector de ionização de chama (GC-FID) usando o cromatógrafo a gás Varian Saturnm 3800 equipado com coluna capilar de sílica fundida Carbowax (30m X 0,25mm) com fase estacionária Polietilenoglicol (0,25 μm de espessura de filme), tendo hélio 5.0 como gás arraste e fluxo de $1,0 \text{ mL min}^{-1}$ (10 psi). As temperaturas do injetor e detector foram de $220 \text{ }^\circ\text{C}$ e $240 \text{ }^\circ\text{C}$, respectivamente. Foi injetado $1,0 \mu\text{L}$ de solução da amostra em hexano no modo *split* (1:10). A temperatura inicial de $60 \text{ }^\circ\text{C}$, acrescida de $5 \text{ }^\circ\text{C min}^{-1}$ até $200 \text{ }^\circ\text{C}$, sendo mantida nessa temperatura por 5 minutos. Uma mistura de ácidos graxos metilados (FAME) variando de 8 a 22 carbonos certificada (Supelco – USA; catalogo 47801- Lot: LC00126) foi utilizado para identificar, por comparação dos tempos de retenção, a composição dos ésteres metílicos dos ácidos graxos presentes na amostra. A quantificação dos ésteres metílicos dos ácidos graxos foi obtida por integração eletrônica dos picos detectados no FID por normatização corrigidos pelo fator resposta conforme a metodologia do Instituto Adolfo Luftz (2008).

4.2. Coleta e identificação do material vegetal

As folhas de *Pouteria macahensis* foram coletadas as margens do rio de Contas, município de Itacaré - BA, Sul da Bahia, (coordenadas 4°15'53.0"S 38°59'59.6"W), campo arenoso, no dia 25 de setembro de 2015. A identificação taxonômica foi realizada pelo botânico Luis Alberto Matos e José Lima da Paixão, no herbário da Universidade Estadual de Santa Cruz (UESC), onde uma exsicata foi depositada, sob o número 21469.

4.3. Preparação dos extratos das folhas de *Pouteria macahensis*

As folhas de *P. macahensis*, foram secadas em estufa de ventilação forçada a 50°C durante 48 horas, resultando em 3100 g de material vegetal seco e moído em moinho de facas. Posteriormente, 2100 g foram submetidos à extração por maceração exaustiva seguida de concentração em evaporador rotatório para obtenção dos extratos brutos. Foram utilizados os solventes hexano e etanol, obtendo os respectivos extratos: hexânico (51,21g) e etanólico (169,43g), conforme Figura 13.

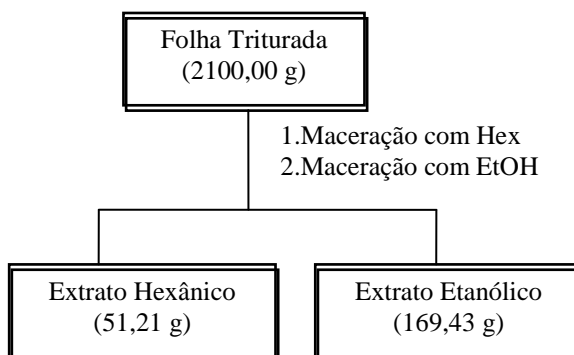


Figura 13: Fluxograma do procedimento experimental para obtenção dos extratos orgânicos das folhas de *P. macahensis*.

4.3.1. Prospecção de constituintes químicos do extrato etanólico de *Pouteria macahensis*

A caracterização das principais classes de substâncias presentes no extrato etanólico foi realizada através da metodologia descrita por Matos (2009), com adaptações. Inicialmente, 10 mg do extrato etanólico foram solubilizados em etanol. Em seguida, separaram sete

porções de 3-4 mL em tubos de ensaio numerados e realizaram-se os seguintes testes conforme indicado na Tabela 2.

Tabela 2: Prospecção fitoquímica do extrato etanólico das folhas de *P. macahensis* (MATOS, 2009).

Metabólitos Secundários	Reação de caracterização	Resultado indicativo dos testes
Fenóis e Taninos	Reação com solução alcoólica de FeCl ₃	Precipitado escuro de tonalidade azul indica a presença de taninos pirogálicos (taninos hidrosolúveis) e verde, a presença de taninos flobabênicos (taninos condensados ou catéquicos).
Antocianinas ¹ , antocianidinas ¹ e flavonoides ²	Reação em meio ácido (pH=3), básico (pH=8,5) e básico (pH=11)	Coloração ¹ = vermelho, lilás e azul purpura Coloração ² = vermelho, ----, vermelho alaranjado
Leucoantocianidinas ¹ , Catequinas e Flavonas	Reação em meio ácido com HCl (pH=1-3) e básico com NaOH (pH=11)	Coloração ¹ = vermelho pardo-amarelo Coloração ² = vermelho laranja
Flavonois, flavonoides, flavononóis e xantonas	Reação com Mg e HCl	Coloração = vermelho
Esteroides ¹ e triterpenoides ² (Lieberman-Burchard)	Reação com anidrido acético e H ₂ SO ₄	Coloração ¹ = azul evanescente seguida de verde permanente (esteroides livres) Coloração ² = parda até vermelha indica triterpenoides pentacíclicos livres.
Saponinas	Reação com adição de H ₂ O	Espuma persistente e abundante (colarinho) indica a presença de saponina (heterosídeos saponínicos).
Alcaloides	Reação com Reagente de Dragendorff	Precipitado floculoso, pesado em pelo menos dois tubos é indicativo de alcalóides.
Cumarinas	Reação com solução alcoólica mol L ⁻¹ de KOH e irradiação UV	Desenvolvimento de fluorescência azulada progressiva e forte, bem visível na metade não encoberta da mancha alcalinizada.

(1, 2) resultado indicativo para o metabólito sobrescrito com essa numeração.

4.3.2. Atividade Biológica de *Pouteria macahensis*

a. Atividade antioxidante do extrato etanólico de Pouteria macahensis

A capacidade da atividade antioxidante (AAO) pelo método DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazila) seguiu a metodologia proposta por Scherer e Godoy (2009), com adaptações. A análise foi realizada misturando-se 10 mg de extrato etanólico das folhas a 10 mL de metanol. Inicialmente, foi feita uma cinética para determinar o tempo de reação do extrato com DPPH. Para isso, foram preparadas amostras nas diferentes concentrações (1000,0; 500,0; 250,0; 125,0; 100,0; 50,0; 10,0 e 5,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$). Em seguida, foram transferidos uma alíquota de 0,1 mL, de cada amostra do extrato, para tubos de ensaio com 3,9 mL do radical DPPH 0,06 mmolL^{-1} e homogeneizado. A cada dez minutos foram feitas leituras em espectrofotômetro UV-VIS no comprimento de onda de 517 nm até observação de absorbância constante.

Estabelecido o tempo de reação, o teste de AAO foi realizado com o extrato nas concentrações variando de 42,0 a 2,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$, com seis pontos equidistantes, todos em triplicata. Também foi feita a leitura da solução do branco, composta de todos os reagentes, menos as soluções do extrato. Para teste comparativo foi realizado o mesmo experimento com padrão de ácido ascórbico nas concentrações 135,0 a 45,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$, com sete pontos equidistantes, observando-se a resposta da linearidade da curva analítica de DPPH.

A neutralização do radical foi calculada seguindo a Equação 1, onde Abs_0 é a absorbância do branco e Abs_1 é a amostra ou padrão, nas diferentes concentrações. O CE_{50} (concentração proporcional a 50% de inibição) foi calculado graficamente usando uma curva analítica na faixa linear traçando a concentração do extrato pelo efeito de inibição correspondente. A atividade antioxidante foi expressa como Índice de Atividade Antioxidante (IAA) Equação 2, resultando em uma massa constante para cada composto, independente da concentração de DPPH e amostra utilizada.

$$\text{Equação 1: } I\% = \frac{Abs_0 - Abs_1}{Abs_0} \times 100$$

$$\text{Equação 2: } IAA = \frac{m_{DPPH} \mu\text{g mL}^{-1}}{CE_{50} \mu\text{g mL}^{-1}}$$

b. Atividade antimicrobiana do extrato etanólico e compostos isolados de Pouteria macahensis

Atividades antifúngica e antibacteriana foram realizadas utilizando, respectivamente, as técnicas microdiluição em caldo e difusão em ágar. Os micro-organismos estudados foram *C. albicans* (ATCC14057), gentilmente cedida por Dr. Sydney Hartz Alves do Laboratório de Micologia (LAPEME) da Universidade Federal de Santa Maria, RS e *Bacillus subtilis*, *Enterococcus aerogenes* (ATCC 13048), *Streptococcus smutans* (ATCC 25175) e *Escherichia coli* EPEC INCQS 00182 (CDC 086H35) obtidos a partir da coleção de micro-organismos de referência em vigilância sanitária – CMRVS, FIOCRUZ-INCQ, Rio de Janeiro, RJ.

Para a determinação da concentração inibitória mínima (MIC), inicialmente, os extratos foram solubilizados a uma concentração inicial de 1 mg mL⁻¹ em uma solução estéril composta de DMSO (10%): Tween 80 (1%). Em seguida, realizou-se diluição a 0,5, 0,25 e 0,125 mg mL⁻¹ em meio RPMI 1640 (Life Technology), as quais foram utilizadas no teste. O preparo dos micro-organismos se deu a partir da turvação da amostra de levedura em frascos de vidro estéreis contendo 4 mL de NaCl a 0,9 %. Posteriormente, a amostra foi diluída em 0,9 mL de NaCl e 0,1 mL de solução turvada com levedura. A solução final foi homogeneizada para contagem de células em câmara de Neubauer e obtenção final de 2.5 x 10³ UFC/mL. Controles consistiram em: 1) diluições do solvente semelhantes às diluições dos extratos; 2) a maior concentração dos extratos aliada a solução de NaCl 0,9 %; 3) tratamentos contendo RPMI puro; 4) RPMI e solução de turvação com levedura; 5) RPMI e clorexidina 1%; 6) clorexidina a 1% e 7) inóculo. Os tratamentos foram distribuídos em microplacas de 96 poços em triplicata a um volume final de 200 µL.

As microplacas foram incubadas a 36±1 °C por 48 horas. Após leitura da turbidez dos orifícios, 10 µL de uma replicada foram distribuídos em placas de Petri contendo 20 mL de ágar Sabouraud Dextrose com ceftriaxona (0,1 mg mL⁻¹), considerando o grau de turvação dos tratamentos. Por fim, as placas de Petri foram armazenadas a 36±1 °C e após 24 h, observou-se o crescimento das leveduras ou ausência dele. Os experimentos foram repetidos por 3 vezes.

Para a difusão em ágar, os inóculos bacterianos foram produzidos a partir da semeadura em 4 mL de caldo *Brainheart infusion* (BHI), padronizados a 0,5 na escala Mac Farland e incubados em estufa a 37 °C por 24 horas. Com o auxílio de swab estéril, as bactérias foram semeadas em ágar e, após secagem, foram feitos orifícios de 6 mm de diâmetro para a introdução de 50 µL dos diferentes tratamentos. As amostras avaliadas foram

extrato PMF, friedelina, ácido gálico, ácido betulínico, eritrodiol e friedelinol. Após 24 h, o diâmetro dos halos de inibição foram medidos em mm. Controles consistiram de ceftriaxona (0,1 mg mL⁻¹) e solvente (DMSO/Tween 80).

4.4. Isolamento de constituintes químicos do extrato etanólico de *Pouteria macahensis*

Parte do extrato etanólico (80,00 g) foi fracionado através de uma coluna cromatográfica de vidro, empacotada com sílica gel 60 (1600 g) e eluída com hexano. Em seguida, foram utilizados a mistura de Hex/CHCl₃ (1:1) (v/v), CHCl₃ puro, AcOEt puro, AcOEt /EtOH 1:1, e por último EtOH, obtendo-se 34 frações de aproximadamente 2000 mL cada.

As frações foram concentradas em evaporador rotatório e depois procedeu-se a análise por cromatografia em camada delgada comparativa (CCD), usando como reveladores vapores de I₂ e vanilina. As frações que apresentaram perfil cromatográfico semelhante entre si foram agrupadas, obtendo-se 14 grupos de frações denominadas como “PmF”, como mostrado na Figura 14.

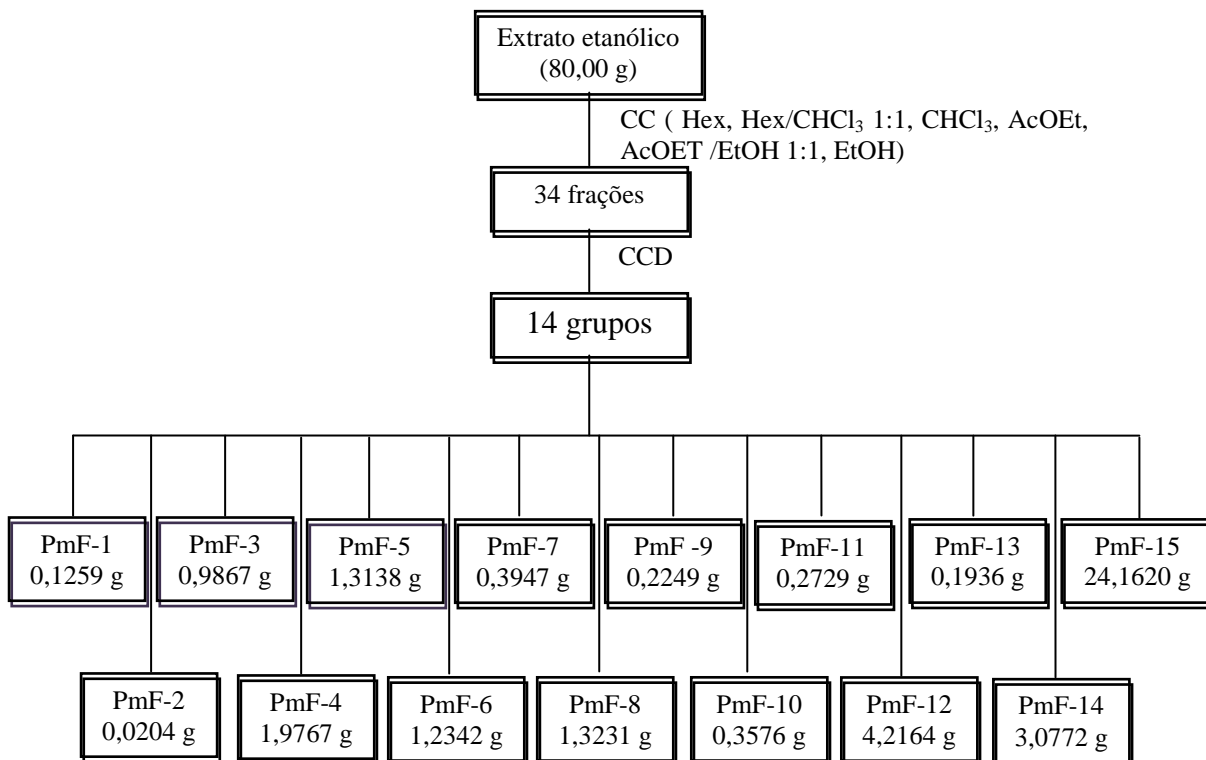


Figura 14: Fluxograma do fracionamento do extrato etanólico bruto de *P. macahensis*.

4.4.1. Estudos dos Grupos PmF-1, PmF-2 e PmF-3

Os grupos PmF-1 ($m = 0,1259$), PmF-2 ($m = 0,0204$ g) e PmF-3 ($m = 0,9867$) mostraram como óleos de coloração alaranjada. A análise desses óleos no IV indicou bandas de absorção características de material graxo esterificado. Posteriormente os óleos foram transesterificados e suas composições químicas foram estabelecidas através da análise CG-FID (procedimento página 35 e 36).

4.4.2. Estudo do Grupo PmF-4

O grupo **PmF-4** (1,9767 g) apresentou-se como material oleoso, de cor amarela alaranjada, misturado a um sólido branco. Esta fração foi lavada com acetona levando ao isolamento de um sólido. Posteriormente, esse foi recristalizado em acetona levando a um sólido branco amorfo, denominado **PmF-4** ($m=0,5151$ g). O filtrado, denominado A, foi submetido à evaporação do solvente resultando em uma massa de 1,4598 g. Foi novamente lavado com acetona levando a outro sólido branco. Esse foi submetido à recristalização com etanol, levando ao isolamento de um sólido, amorfo denominado de **PmF-4.1** ($m = 0,0031$ g) e o filtrado B.

O filtrado B (1,4567 g), foi cromatografado em coluna de sílica gel 60 e eluída com os solventes: Hex; Hex/ CHCl_3 (8:2); Hex/ CHCl_3 1:1; Hex/ CHCl_3 (2:8) e CHCl_3 . Foram obtidas 21 frações de aproximadamente 30 mL cada, as quais após análise por CCD, resultaram no agrupamento das frações 1 a 4; 6 a 11; 12 a 16 e 17 a 21. O grupo G (1-4) ($m = 0,0183$ g) foi lavado com acetona, levando a um sólido que após a recristalização em metanol, forneceu um sólido branco, amorfo denominado **PmF-4.2** ($m=0,0030$ g). O grupo (G-6-11; $m=0,1820$ g) foi submetido ao procedimento anterior permitindo o isolamento de um outro sólido, denominado **PmF-4.3** ($m=0,0215$ g) e do filtrado X. O filtrado C (0,1503 g) foi submetido à cromatografia preparativa, com o eluente $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{CHCl}_3$ 8:2, permitindo o isolamento de um sólido branco, amorfo denominado **PmF-4.4** ($m=0,0267$ g). Os processos usados na purificação da fração **PmF-4** estão apresentados na figura 15.

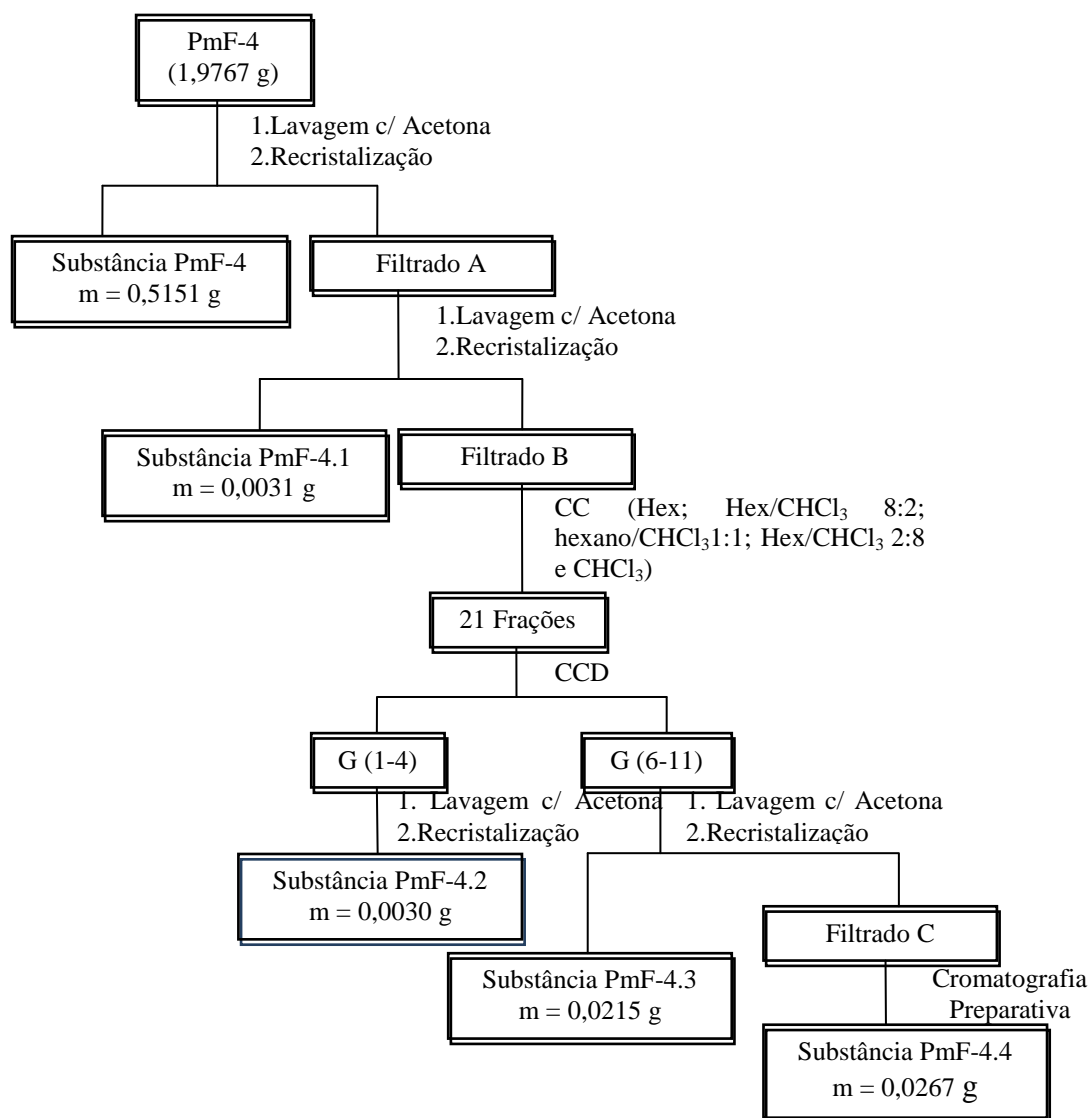


Figura 15: Fluxograma da purificação da fração PmF-4 do extrato etanólico de *P. macahensis*.

4.4.3. Estudo do Grupo PmF-5

O grupo **PmF-5** (1,3138 g) apresentou-se como um sólido em meio a um óleo de coloração amarela alaranjada. Foi lavado com acetona, levando ao isolamento de sólido branco. Posteriormente, o sólido foi recrystalizado com etanol resultando em um sólido branco amorfo, que foi denominado **PmF-5** (m = 0,0252 g), conforme apresentado na Figura 16.

O filtrado A (1,2886 g), foi cromatografado em coluna de sílica gel 60 e eluída com os solventes: Hex; Hex/CHCl₃ (9:1); Hex/CHCl₃ 7:3; Hex/CHCl₃ (1:1) e CHCl₃/AcOEt (8:2) e CHCl₃/AcOEt (1:1). Foram obtidas 39 frações de aproximadamente 35 mL cada, as quais

após análise por CCD, resultaram no agrupamento das frações 1 a 9; 10 a 14; 15 a 16 e 17 a 39. O grupo G (15-16, m = 0,1541 g) foi lavado com acetona, levando a um sólido que após a recristalização em metanol, forneceu um sólido branco em meio a graxa denominado **PmF-5.1** (m=0,1541 g). Este foi submetido a dois outros processos de purificação: cromatografia preparativa (0,0100 g) e coluna Sephadex (0,0300 g) eluído com os solventes CHCl₃/MeOH (1:1). Nenhum dos processos cromatográficos permitiu sua purificação permanecendo duas manchas na cromatografia em CCD. O grupo G (17-39) apresentou-se rico em PmF-5.1.

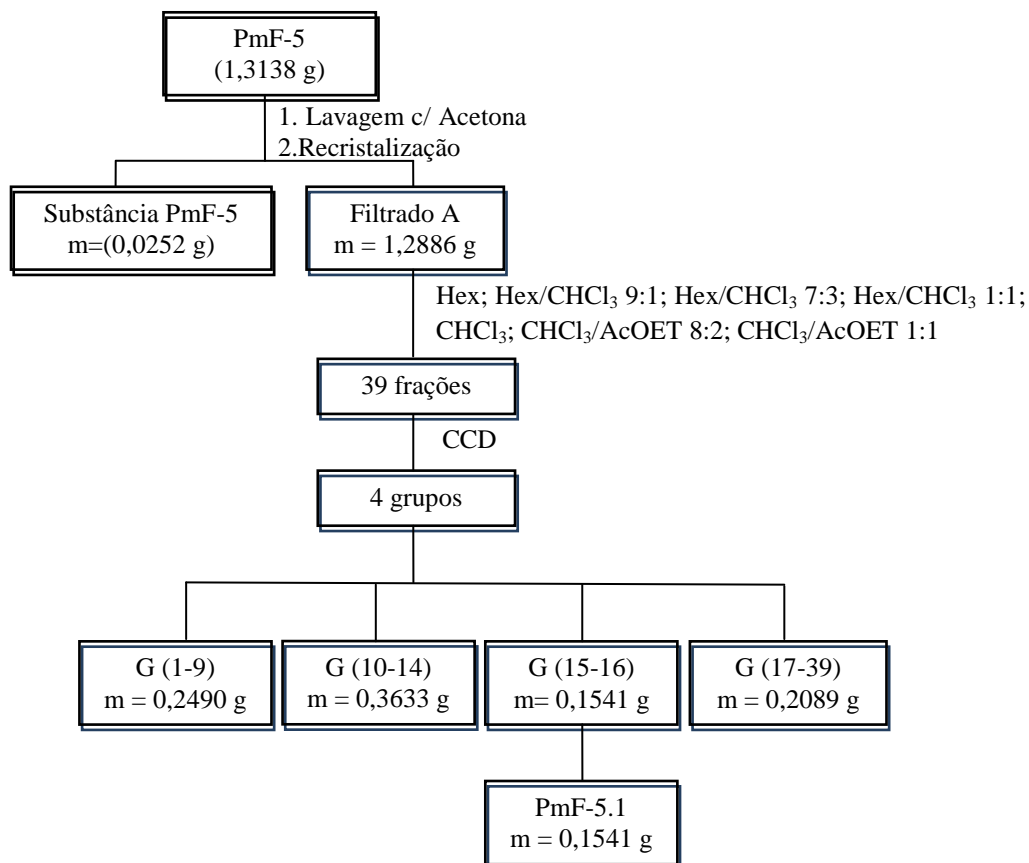


Figura 16: Fluxograma da purificação da fração PmF-5 do extrato etanólico de *P. macahensis*.

4.4.4. Estudo do Grupo PmF-6

O Grupo **PmF-6** (m = 1,2342 g) apresentou-se como um sólido branco em meio a um óleo de coloração amarelo. Este foi lavado com acetona, resultando em um sólido e um filtrado B. O sólido posteriormente, foi recristalizado em metanol, levando a um sólido branco amorfo, denominado **PmF-6.1** (m = 0,0291g). O filtrado B (m = 1,2048) foi submetido à cromatografia em coluna, empacotada com gel de sílica 60 e eluída com os solventes Hex/CHCl₃ (9:1), Hex/CHCl₃ (7:3), Hex/CHCl₃ (1:1), CHCl₃, CHCl₃/AcOEt (7:3) e

CHCl₃/AcOEt (1:1). Foram obtidas 16 frações de 15 mL cada. Estas frações foram reunidas em 5 grupos, conforme apresentado na Figura 17. Sendo que o grupo G (13), resultou no isolamento de um sólido branco, amorfo denominado de **PmF-6** (m = 0,0231 g).

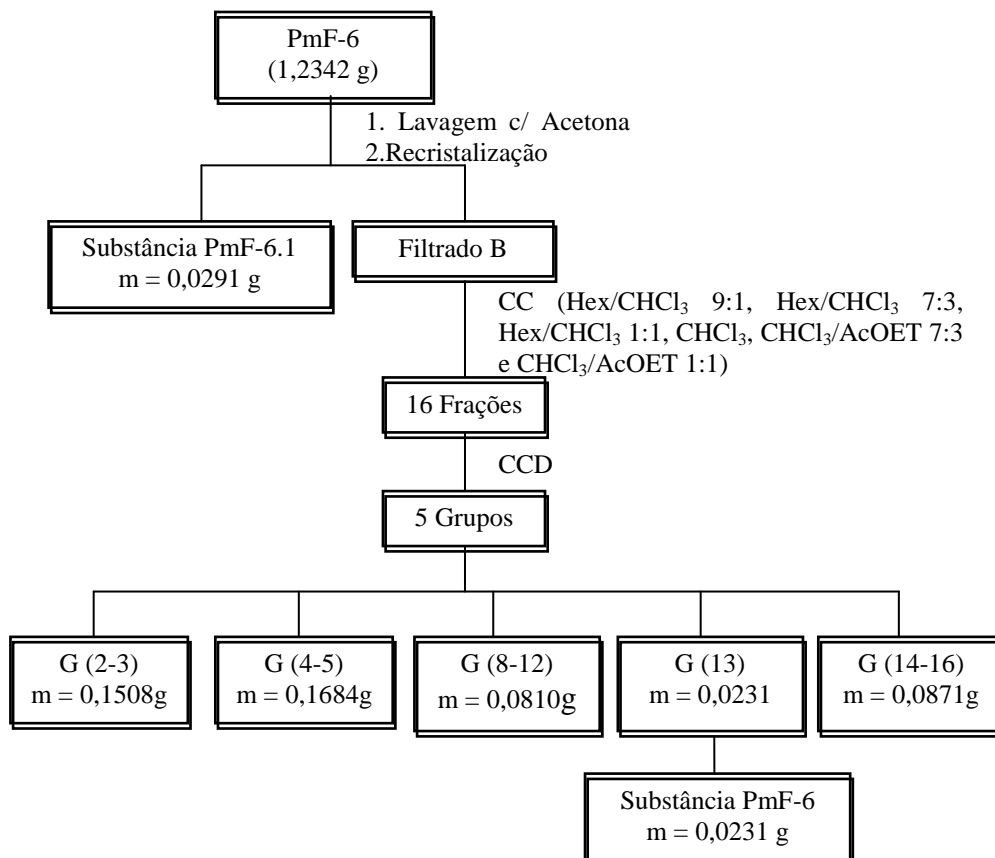


Figura 17: Fluxograma da purificação da fração PmF-6 do extrato etanólico de *P. macahensis*.

4.4.5. Estudo do Grupo PmF-14

O grupo **PmF-14** (3,0772 g) apresentou-se como fração de coloração verde, contendo cristais. Esta foi submetida à coluna cromatográfica, sílica gel 60 e eluída com os solventes Hex/CHCl₃ (3:7), CHCl₃, CHCl₃/MeOH (9:1), MeOH e MeOH /EtOH (8:2). Foram obtidas 60 frações de 50 mL cada. As frações foram analisadas por cromatografia em camada delgada e as com perfis cromatográficos próximos foram agrupadas, obtendo 13 grupos. Conforme o esquema apresentado na Figura 18.

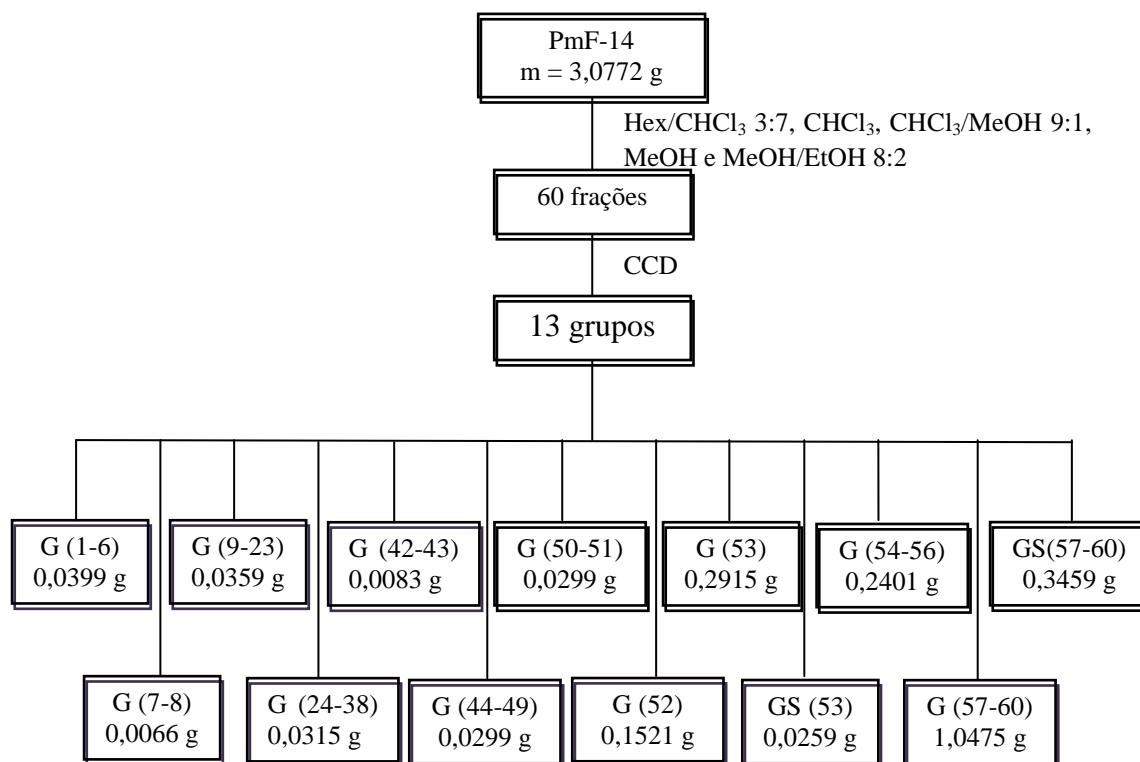


Figura 18: Fluxograma do fracionamento da fração PmF-14 do extrato etanólico de *P. macahensis*.

Ao coletar a fração 53 da coluna (Figura 18), foi observada a separação de fases (metanólica e clorofórmica). A fase metanólica, após separação e concentração, apresentou-se como um sólido em meio à cera de coloração verde, sendo denominado grupo GS (53). Deste grupo 0,0100 g foi submetido a purificação em coluna de Sephadex, utilizando como eluente EtOH, sendo obtidos 14 frações de 2 mL cada. O agrupamento por similaridade em CCD resultou em 3 grupos. Desses grupos, o GGS (9-14), $m = (0,0039 \text{ g})$ levou ao isolamento de um sólido claro, denominado **PmF-14.2**, como observado no esquema apresentado na Figura 19.

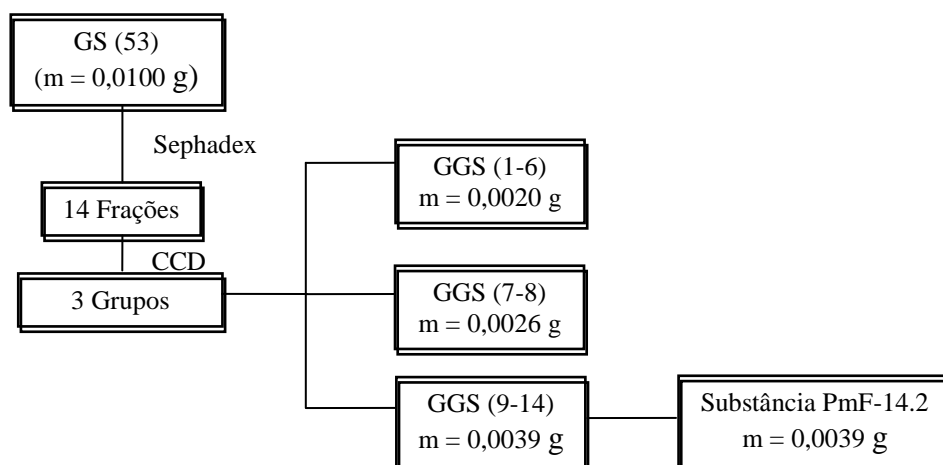


Figura 19: Fluxograma da purificação da fração GS (53) do extrato etanólico de *P. macahensis*.

As demais, frações que apresentaram pouca massa ou apenas apresentaram material de natureza graxa, não foram estudadas.

Ao coletar as frações 57-60 da coluna (Figura 18), também foi observada a separação entre as fases, metanólica e clorofórmica. A fase metanólica foi separada e após concentração levou ao grupo GS (57-60). Seu estudo foi feito através de coluna cromatográfica, empacotada com sílica gel 60 e eluída com os solventes CHCl₃/EtOH/Hex 4:3:3, CHCl₃/EtOH 8:2, CHCl₃/EtOH 6:4, CHCl₃/EtOH 1:1, CHCl₃/EtOH 3:7, EtOH puro, obtendo-se 46 frações de 30 mL cada. Posteriormente, essas foram estudadas e agrupadas por cromatografia em camada delgada, obtendo-se 7 grupos, conforme apresentado na Figura 20. Ao grupo GG (5-11) (m = 0,0436 g) foi adicionado hexano e acetona, obtendo-se duas fases. Após separação, a fase acetônica levou ao isolamento de um sólido de coloração amarelo palha, denominado **PmF-14.1** (m=0,0294 g).

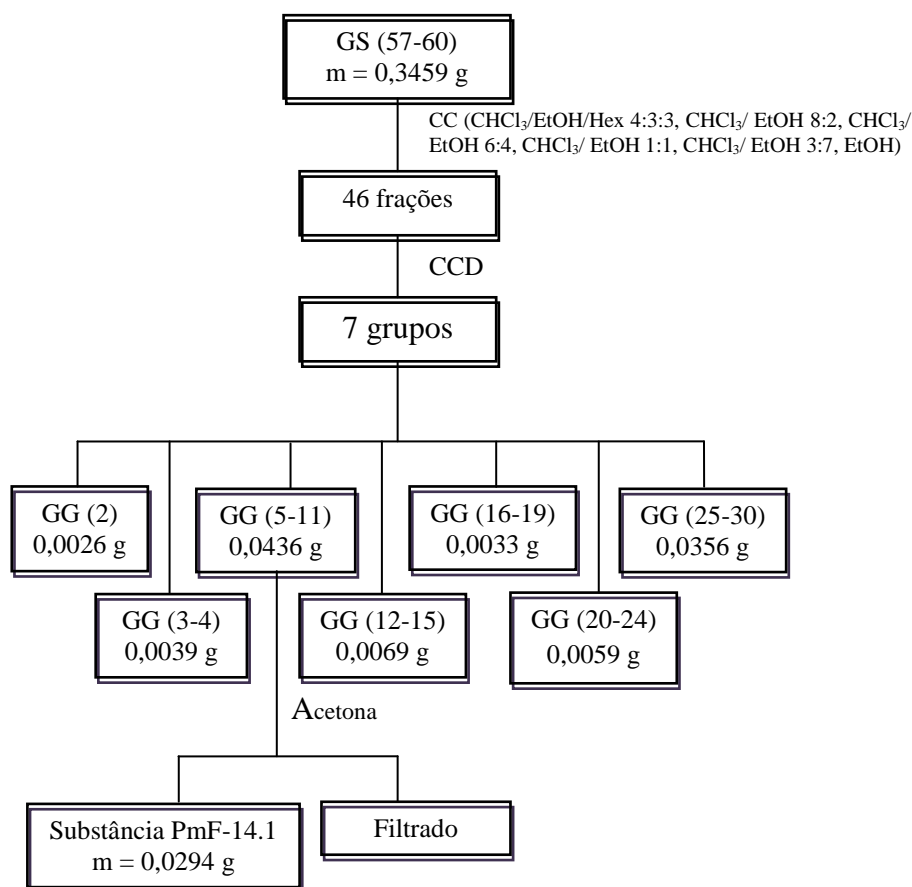


Figura 20: Fluxograma da purificação da fração GS (57-60) obtido do grupo PmF-14 do extrato etanólico de *P. macahensis*.

4.4.6 Demais Grupos

O grupo **PmF-7** foi trabalhado através de lavagem com acetona, foi obtido um sólido, branco amorfo, a análise por CCD apresentou três manchas, necessitando de maior purificação.

PmF-8 e **PmF-12** de característica polar, encontra-se em etapa de purificação.

O grupo **PmF-13** foi purificado e por apresentar pouca massa e bastante resina verde, não foi possível o isolamento.

A amostra **PmF-14.2** de pouca massa, após purificação apresentou-se como um sólido branco em meio a resina verde. A análise em CCD apresentou duas manchas, não sendo possível sua purificação.

5. RESULTADOS

5.1. Material Vegetal

As folhas de *P. macahensis* foram coletadas as margens do rio de Contas, município de Itacaré - BA, sul da Bahia em campo arenoso, *P. macahensis* apresentou-se como uma árvore grande com mais de dez metros de altura (Figura 21). As folhas foram secas e trituradas e submetidas à extração sucessivas por maceração utilizando os solventes hexano e etanol. O extrato etanólico foi submetido ao fracionamento através de técnicas fitoquímicas para obtenção de seus compostos.



Figura 21: Fotos de *P. macahensis*. Fonte: Foto da autora

5.2. Prospecção Fitoquímica

De acordo com Matos (2009) o conhecimento da composição química do extrato através de testes químicos qualitativos rápidos e de baixo custo, auxilia a identificação das classes de metabólitos secundários que estão presentes nos extratos, possibilitando uma escolha adequada do melhor método para sua extração e de bioensaios aos quais possam ser

submetidos. Nesse estudo, essas informações preliminares sobre a composição química da espécie foi de fundamental importância, pois na literatura não foram encontrados estudos químicos referente à espécie *P. macahensis*.

Os principais metabólitos detectados utilizando testes de prospecção fitoquímica, segundo Matos (2009), presente no extrato etanólico das folhas de *P. macahensis* encontram-se listados na Tabela 3.

Tabela 3: Resultados das reações indicativas das principais classes de metabólitos secundários do extrato etanólico de *P. macahensis*.

Classe de Metabólito Secundário	Resultado
Fenóis e taninos	+
Antocianinas ¹ , antocianidinas ¹ e flavonoides ²	+ ²
Leucoantocianidinas ¹ , catequinas ¹ e flavonas ²	+ ²
Flavonois, flavononois e xantonas	-
Eesteroides ¹ e triterpenoides ² (Lieberman-Burchard)	+ ^{1,2}
Saponinas	+
Alcaloides	+
Cumarinas	-

(+) presença (-) ausência; (1, 2) resultado indicativo para o metabólito sobrescrito com a numeração.

A prospecção fitoquímica do extrato etanólico das folhas *P. macahensis* indicou a presença de fenóis e taninos; flavonoides; flavonas; esteróides, triterpenoides; saponinas e alcalóides.

Estudos realizados por Montenegro *et al.* (2006) com espécies da família Sapotaceae, revelou a ocorrência de flavonoides, terpenoides, compostos fenólicos e alcaloides em espécies desta família. Silva *et al.* (2007) destacam que os flavonoides e os terpenoides são os principais constituintes químicos mais evidenciados no gênero *Pouteria*, principalmente em extratos de folhas.

Em estudo de prospecção fitoquímica realizado por Oliveira e colaboradores (2014) com a espécie *P. ramiflora* as análises dos extratos aquosos e etanólicos, parte interna e

externa da casca do caule, mostraram a presença de compostos fenólicos e taninos nos quatro extratos. No extrato etanólico (casca interna e externa) foram detectados esteróides, triterpenos e antraquinonas. No extrato aquoso (casca interna e externa), foram encontrados saponinas, glicosídeos cardiotônicos e alcaloides. As cumarinas foram detectadas em todos os extratos, exceto no extrato etanólico da casca interna.

As classes fenóis e taninos; flavonoides; flavonas; esteroides, triterpenoides; saponinas e alcaloides detectados na planta em estudo corroboram com relatos na literatura para a família.

5.3. Análise da capacidade antioxidante pelo método DPPH

O método de sequestro de radicais livres baseia-se na descoloração do radical 2,2-difenil-1-picrilidrazila (DPPH·). O DPPH possui coloração violeta, mas quando é reduzido (tem seu elétron livre sequestrado pelo antioxidante) muda de cor, passando a ter uma coloração amarelada. Assim, a sequência da reação pode ser monitorada em espectrofotômetro pela diminuição da absorbância do DPPH, que tem sua absorbância máxima num comprimento de onda de 517 nm (SÁNCHEZ-MORENO *et al.*, 1998).

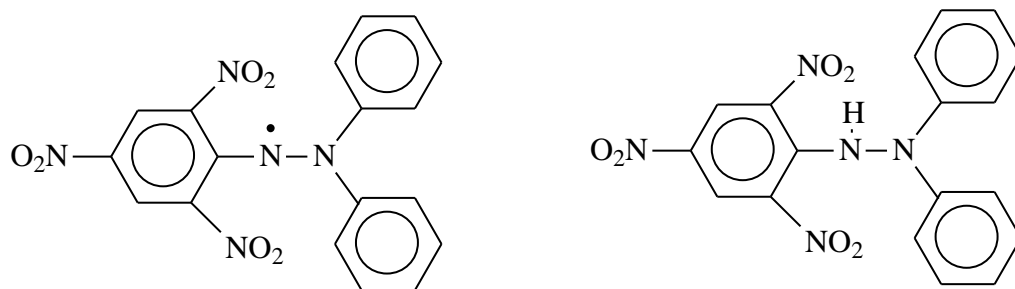


Figura 22: Estrutura do Radical 2,2-difenil-1-picrilidrazila (DPPH·), na forma de radical (à esquerda) e na forma reduzida (MOLYNEUX, 2004).

A tabela 4, mostra os resultados para a percentagem de captura de radical livre DPPH obtidos no extrato de *P. macahensis* e comparado com padrão de ácido ascórbico. A atividade antioxidante do extrato e do padrão foi calculada estabelecendo uma regressão linear (Figura 23) com base, nos dados apresentados na Tabela 4.

Tabela 4: Percentagem de captura de radical livre DPPH obtidos d extrato de *P. macahensis* e do ácido ascórbico.

Amostra	Concentração final ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	% de captura DPPH
Extrato etanólico	1,05	$91,1 \pm 1,37$
	0,85	$80,3 \pm 0,55$
	0,65	$65,8 \pm 1,11$
	0,45	$47,1 \pm 0,43$
	0,25	$32,0 \pm 0,26$
	0,05	$09,1 \pm 0,73$
Ácido ascórbico	3,37	$77,8 \pm 0,83$
	3,00	$72,1 \pm 1,40$
	2,62	$63,5 \pm 0,10$
	2,25	$53,1 \pm 0,08$
	1,87	$46,4 \pm 1,04$
	1,50	$36,3 \pm 0,26$
	1,12	$29,1 \pm 0,08$

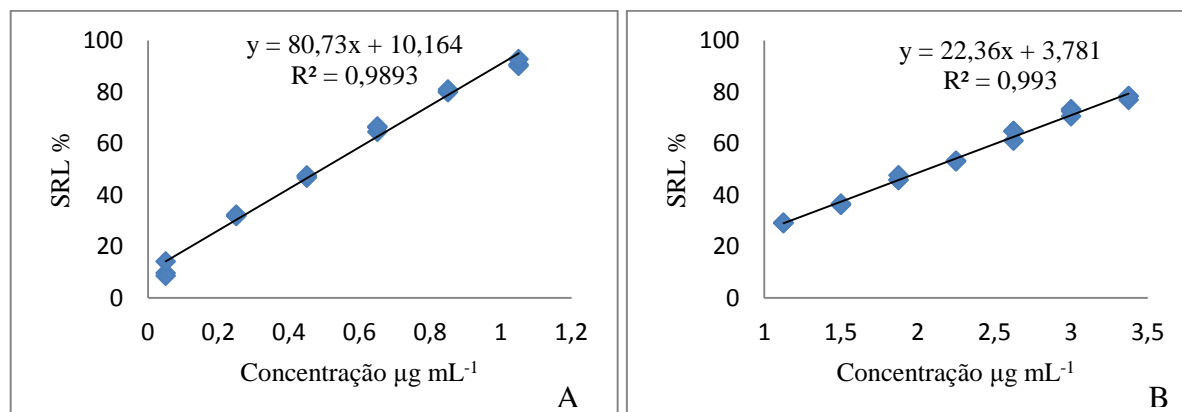


Figura 23: Comparação das curvas analíticas obtidas pelo método da captura de radicais livres DPPH para o cálculo do valor de CE_{50} de *P. macahensis* (A) e do padrão ácido ascórbico (B).

Os resultados mostram para o extrato etanólico de *P. macahensis* uma $CE_{50} = 0,49 \mu\text{g mL}^{-1}$ e Índice de Atividade Antioxidante – IAA de 47,94, e para o ácido ascórbico um $CE_{50} = 2,06 \mu\text{g mL}^{-1}$ e IAA=11,44. Segundo Scherer e Godoi (2009) pode-se categorizar a AAO de uma amostra vegetal como muito fraca de o IAA < 0,5; fraca IAA entre 0,5 e 1,0; moderada IAA entre 1,0 e 2,0; forte IAA entre 2,0 e 2,5 e muito forte IAA > 2,5. Portanto, o extrato etanólico apresentou um elevado potencial antioxidante, bem maior comparado ao padrão ácido ascórbico.

O alto potencial de redução do extrato etanólico de *P. macahensis*, superior ao antioxidante padrão de comparação, pode ser explicado pelo sinergismo existente no extrato, devido a variedade de compostos presentes. De acordo com Laguerre *et al.* (2007) a eficácia de qualquer substância que apresente atividade antioxidante pode ser melhorada, quando em

um sistema existem vários compostos que atuam por meio de diferentes mecanismos para alcançar o mesmo fim. Dessa forma, sinergismo pode ser definido como um fenômeno no qual uma mistura de dois ou mais compostos, quando adicionados em um mesmo sistema, resulta em um efeito mais pronunciado que aquele apresentado pelos compostos isolados. Os compostos que se destacam e apresentam atividade antioxidante são os compostos fenólicos (ácidos fenólicos, diterpenos fenólicos, isoflavonas, flavonóis, flavonoides e estilbenoides), ácidos orgânicos, fosfolipídeos, tiols, amino ácidos, tocóis derivativos e xantofilas. De acordo com a estrutura molecular, a atividade antioxidante de compostos naturais ou sintéticos pode exibir diferentes mecanismos de ação antioxidante. Extratos de plantas, por exemplo, podem conter mais de um composto antioxidante apresentando melhor atividade, quando comparado com uma substância isoladamente (ERKAN *et al.*, 2008; CAPITANI, 2009).

Estudo realizado por Aseervatham *et al.*, (2014) indicou a atividade antioxidante pelo método DPPH do extrato do fruto de *P. campechiana* (Kunth) Baehni, coletada no distrito Kanyakumari, Índia. Foi utilizada uma curva analítica com cinco pontos equidistantes, a concentração de 250 $\mu\text{g mL}^{-1}$ apresentando 71,6% de inibição do radical DPPH e CE_{50} de 54 $\mu\text{g mL}^{-1}$, comparado com padrão de BHT 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Dando continuidade aos estudos, após o uso da técnica de HPLC foram isolados vários flavonoides, sendo atribuído a essas substâncias a atividade antioxidante.

Estudos realizados por Castro *et al.*, (2006) avaliaram a atividade antioxidante dos extratos brutos de folhas de *P. caimito*, *P. gardnerii*, *P. ramiflora* e *P. torta*, através do método DPPH, utilizando o BHT como padrão de comparação. Os extratos brutos obtidos apresentaram atividade antioxidante significativa, com a exceção dos extratos hexânicos. Ensaio preliminares indicam a presença, nos extratos mais polares, de compostos fenólicos, principalmente flavonóides. Considerando que essa classe de substância tem sido referida como potencialmente antioxidante, sua presença pode justificar os resultados obtidos (Tabela 5).

Tabela 5: Atividade antioxidante em Pouterias (CASTRO et al., (2006)).

Espécie	Extrato	CE ₅₀ µg mL ⁻¹
<i>P. caimito</i>	Hexânico	1570,0
	Etanólico	20,2
	Aquoso	72,9
<i>P. gardinerii</i>	Hexânico	181,0
	Etanólico	95,8
	Aquoso	46,5
<i>P. ramiflora</i>	Hexânico	291,0
	Etanólico	6,3
	Aquoso	37,5
<i>P. torta</i>	Hexânico	2000,0
	Etanólico	10,1
	Aquoso	5,9
BHT	-	15,0

5.4. Identificação das substâncias presentes no extrato etanólico de *P. macahensis*

5.4.1. Composição química dos óleos fixos

PmF-2 apresentou-se como material graxo conforme descrito na página 41. A análise do espectro no IV (Figura 25, Página 55) revelou banda de absorção forte em 2924 cm⁻¹, característico de estiramento assimétrico de ligação CH de grupos CH₂ alifáticos e em 2852 cm⁻¹, absorção média, característica de estiramento simétrico de ligação C-H de grupos CH₂ e CH₃ alifáticos. Em 1734 cm⁻¹ observou-se banda de estiramento forte característica de ligação C=O de éster, bem como, estiramento C-O em 1245-1010 cm⁻¹.

A mistura de ésteres foi caracterizado por reação de transesterificação (Figura 24). Esta, muito utilizada, consiste numa reação química de um éster com um álcool (metanol ou etanol) na presença de um catalisador ácido ou básico, formando ésteres como principais produtos (SILVA, 2005). Assim, os ésteres graxos de **PmF-2** foram caracterizados através da comparação dos tempos de retenção da fração transesterificada com padrão de ésteres metílicos de ácidos graxos, utilizando as condições descritas nas páginas 34 e 35.

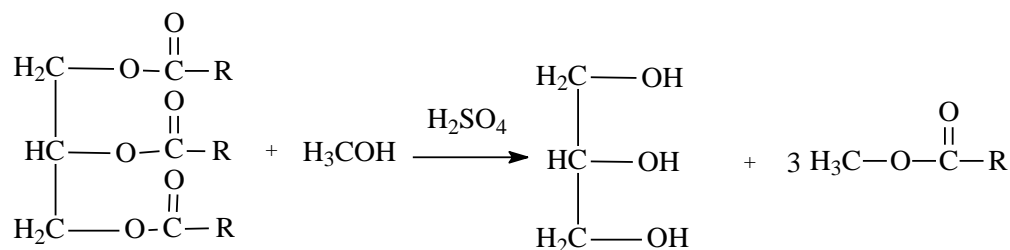


Figura 24: Reação geral de transesterificação.

Após análise por CG-FID e avaliação dos cromatogramas de acordo o T_R e números de carbono, pode-se observar que o tamanho da cadeia graxa exerce maior influência na ordem de eluição do que o número de insaturações na cadeia principal do composto, ou seja, quanto menor a cadeia menor será a retenção no cromatógrafo. Diante dos resultados apresentados na tabela 6 é possível inferir que a fração **PmF-2** é composta vários ésteres, sendo behênico (C22:0), erúcico (C22:1n9) e oléico (C18:1n9-c) os principais. A fração **PmF-2** contém derivados de ácidos graxos, conforme dados do espectro no IV e reação de transesterificação realizados. Silva (2007), isolou do extrato hexânico de *P. gardnerii* (Mart. & Miq.) Baehni uma mistura de ésteres de cadeia longa. Os espectros no IV das frações **PmF-1** e **PmF-3** não apresentaram banda de absorção forte na região característica de estiramento de C=O de derivados de ácidos carboxílicos. Portanto, são compostos de derivados alifáticos diferente da mistura de ácido graxos.

Tabela 6: Composição dos ésteres de ácidos graxos encontrados na fração PmF-2.

Padrões de ésteres metílicos de ácidos graxos de cadeia longa	Padrões		PmF-2	
	Números De Carbono	TR (min)	TR (min)	Área (%)
Ester metílico do ácido cáprico	C10:0	5.813		
Ester metílico do ácido láurico	C12:0	9.940		
Ester metílico do ácido tridecanoico	C13:0	14.231		
Ester metílico do ácido mirístico	C14:0	16.291		
Ester metílico do ácido miristoleico	C14:1n9-c	18.286		
Ester metílico do ácido pentadecanoico	C15:0	18.974	19.048	1,1
Ester metílico do ácido palmítico	C16:0	20.205		
Ester metílico do ácido palmitoléico	C16:1n9-c	22.080		
Ester metílico do ácido heptadecanoico	C17:0	22.498		
Ester metílico do ácido esteárico	C18:0	23.839	23.827	1,5
Ester metílico do ácido elaidico	C18:1n9-t	25.606	25.555	4,8
Ester metílico do ácido oléico	C18:1n9c	25.941	25.860	14,2
Ester metílico do ácido linoléico	C:18:2n6-c	26.651	26.606	5,6
Ester metílico do ácido arachidico	C20:0	27.655	27.657	3,0
Ester metílico do ácido cis-11-eicosenoico	C20:1	28.857	28.880	7,0

Ester metílico do ácido linolênico	C18:3n3	29.186	29.205	4,2
Ester metílico do ácido behênico	C22:0	33.721	33.884	30,4
Ester metílico do ácido erúcico	C22:1n9	34.323	34.474	25,3

Nota: coluna capilar de sílica fundida Carbowax (30m X 0,25mm), temperatura inicial a 60°C, acrescida de 5 °C min⁻¹. até 200 °C, sendo mantida nessa temperatura por 5 minutos. Mistura de ácidos graxos (FAME) variando de 8 a 22 carbono certificada (Supelco – USA; catalogo 47801- Lot: LC00126).

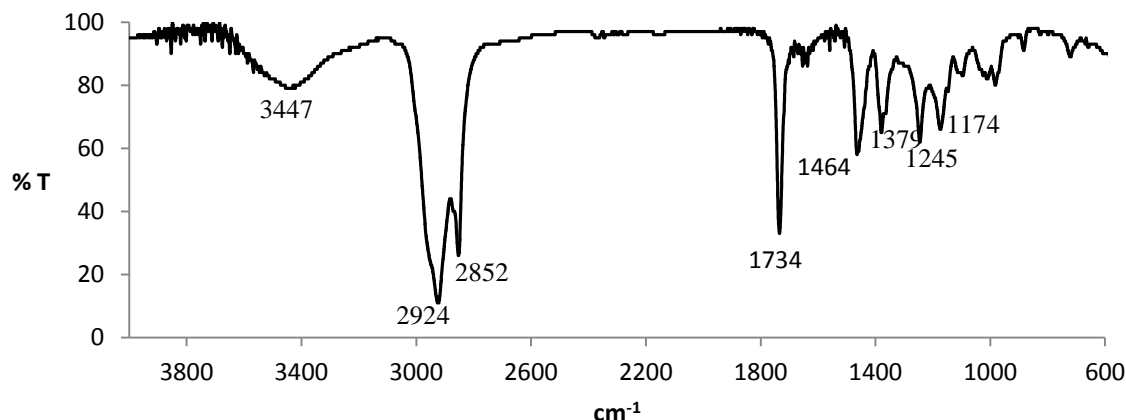
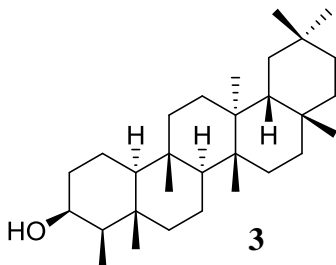


Figura 25: Espectro na região do IV de PmF-2 (KBr), região de 4000-600 cm⁻¹.

5.4.2. Determinação estrutural de PmF-4: 3β-hidroxifriedelano (friedelinol)



PmF-4 foi isolado por cromatografia em coluna da fração hexânica (PmF-4), oriunda do extrato etanólico de *P. macahensis*, e apresentou-se em grande quantidade, sendo purificado por recristalização em acetona, conforme descrição nas páginas 41 e 42. **PmF-4** apresentou-se com um sólido branco, amorfo ($m = 0,5151$ g), parcialmente solúvel em CHCl_3 e com faixa de fusão de 260 – 263 °C. O teste de Lieberman-Burchard desse sólido de resultado positivo para triterpeno pentacíclico. Sua determinação estrutural foi feita com base nas análises dos seus espectros no IV, RMN ^1H e ^{13}C , DEPT -135, HSQC, HMBC e em comparação com dados da literatura (Tabela 7, Página 58) (SALAZAR *et al.*, (2000).

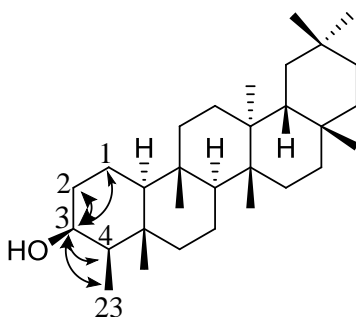
O espectro no infravermelho de **PmF-4** (Figura 27, Página 59) mostrou um padrão característico de triterpenos oxigenados, com absorção em 3478 cm⁻¹ característica de

estiramento de ligação OH de hidroxila, em 2930 cm^{-1} , absorção forte característico de estiramento assimétrico de ligação CH de grupos CH_2 alifáticos e em 2875 cm^{-1} , absorção média, característica de estiramento simétrico de ligação C-H de grupos CH_2 e CH_3 alifáticos. Apresentou ainda absorção média em 1463 e 1383 cm^{-1} característica de deformação angular no plano de ligação simples CH de compostos alifáticos (PAVIA *et al.*, 2012).

O espectro de RMN de ^1H de **PmF-4** (Figura 28 e 29, página 60 e 61) apresentou sinal de absorção típica de triterpenos com seis metilas em carbonos não hidrogenados e uma metila no carbono C-4, característicos de triterpenos friedelanos, esses de δ_{H} 1,17 a 0,79; sinal em δ_{H} 3,83 (1H, t, $J = 2,3\text{ Hz}$) para o hidrogênio do carbono C-3, característico de hidrogênio carbinólico e sinais correspondentes a hidrogênios metilênicos e metínicos entre δ_{H} 1,94 e 2,47. O duplete em δ_{H} 1,02 (H, d, $J = 7\text{ Hz}$) referente ao H-23, característico de esqueleto friedelano.

O espectro de RMN de ^{13}C juntamente com o DEPT-135 de **PmF-04** (Figura 30 e 31, Página 62 e 63) revelaram a presença de 30 sinais, dos quais oito foram atribuídos a carbonos metílicos (CH_3), onze metilênicos (CH_2), cinco metínicos (CH) e seis carbonos não hidrogenados (C). O sinal em δ_{C} 72,14, atribuído ao carbono metínico carbinólico juntamente com o sinal no espectro no IV em 3470 cm^{-1} , sugerem a presença do grupo hidroxila no C-3. Esses dados, comparados aos obtidos da literatura sugerem que o sólido **PmF-4** seja o 3β -hidroxifriedelano (Tabela 7). O experimento de HSQC foi utilizado para correlacionar H-C (Figura 32, Página 64). Esses dados sugerem um triterpeno da classe dos friedelanos, na Tabela 7 é apresentado os deslocamentos de ^{13}C para **PmF-4** comparado com os dados da literatura.

A análise das correlações observadas no espectro $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ HMBC (Figura 33, Página 65) entre os sinais δ_{H} 3,83 (1H, t, $J = 2,3$) e δ_{C} 15,85 (C-1), 37,85 (C-5), 49,30 (C-4) e 11,66 (C-23) permitiu confirmar a presença do grupo hidroxila no carbono C-3.



A configuração do carbono 3 foi definida por comparação dos dados de RMN de ^{13}C para as substâncias 3α e 3β -friedelinol relatada na literatura. Ao comparar o valor de deslocamento químico em δ_{C} 15,85 do C-1 com os valores de deslocamentos para este carbono, na literatura, δ_{C} 16,16 e 19,76 para β e α , respectivamente, foi observado que a hidroxila encontra-se na posição β . Esta possível de confirmar também pelos valores de deslocamentos dos carbonos vizinhos e a correlação em δ_{H} 3,83 (H-3) com o C-3, em que hidroxila influência à configuração. Experimentos realizados por Salazar *et al.* (2000) conformam a estereoquímica através do experimento de NOESY em que a o grupo OH na posição β (equatorial) o H-3 (δ_{C} 71,59) correlaciona com H-2 e H-4 e o H-23 e quando a OH esta na posição α o H-3 (axial); correlaciona com H-1 (ax), H-2 (eq), H-23 e H-24. A partir do mapa de contorno HSQC e HMBC observaram-se que os valores para os átomos de carbono C-1, C-2, C-4, C-10, C-23 e C-24 sofrem uma maior influência devido a posição da hidroxila no carbono 3, Figura 26.

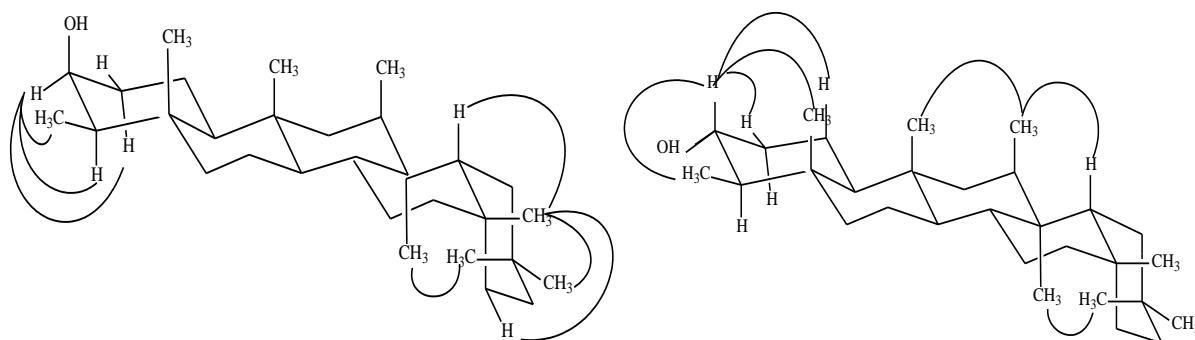


Figura 26: Correlações observadas no Noe para o 3α e 3β -friedelinol (SALAZAR *et al.*, 2000).

Os dados analisados, juntamente com a faixa de fusão, comparação direta com a amostra autêntica e os dados de RMN de ^{13}C da literatura (SALAZAR *et al.*, 2000), (Tabela 7, página 58) sugerem a substância **PmF-4** como sendo 3β -hidroxifriedelano. Esta substância também foi isolado das folhas *P. torta* (LOPES, *et al.*, 2005).

Tabela 7: Comparação dos dados de RMN de ^{13}C de PmF-4 com os dados da literatura para 3 β -hidroxifriedelano (SALAZAR *et al.*, 2000).

Posição	$^{13}\text{C}/$ DEPT	$\delta^{\text{C}*}$ (δ)	lit δ^{C}/β (δ)*	lit δ^{C}/α (δ)*
1	CH ₂	15,85	16,16	19,76
2	CH ₂	36,02	36,14	37,00
3	CH	72,14	71,59	71,11
4	CH	49,30	49,62	53,41
5	C	37,85	38,09	38,12
6	CH ₂	41,76	41,99	41,53
7	CH ₂	17,51	17,69	17,92
8	CH	53,14	53,27	53,00
9	C	37,05	37,18	37,05
10	CH	61,42	61,65	60,25
11	CH ₂	35,39	35,66	35,57
12	CH ₂	30,56	30,69	30,64
13	C	38,29	38,38	38,31
14	C	39,60	39,69	39,70
15	CH ₂	32,26	32,34	32,88
16	CH ₂	35,51	35,90	35,12
17	C	29,93	30,02	30,01
18	CH	42,79	42,88	42,88
19	CH ₂	35,26	35,36	35,36
20	C	28,06	28,17	28,16
21	CH ₂	32,77	32,88	32,88
22	CH ₂	39,18	39,28	39,27
23	CH ₃	11,66	12,09	10,22
24	CH ₃	16,33	16,58	14,63
25	CH ₃	18,17	18,35	18,17
26	CH ₃	20,00	20,13	20,18
27	CH ₃	18,53	18,69	18,68
28	CH ₃	32,00	32,12	32,13
29	CH ₃	34,90	35,02	35,02
30	CH ₃	31,71	31,85	31,86

* CDCl₃ e piridina-d₅.

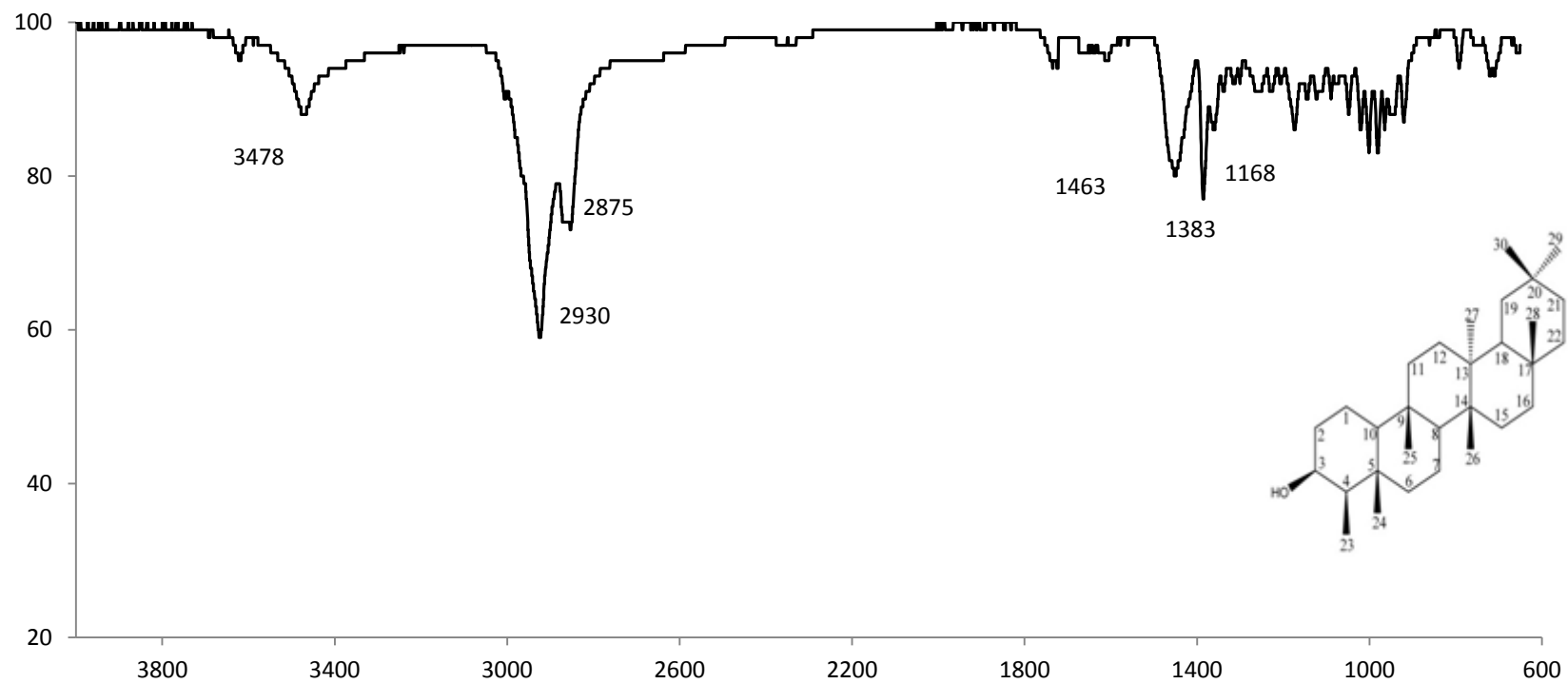
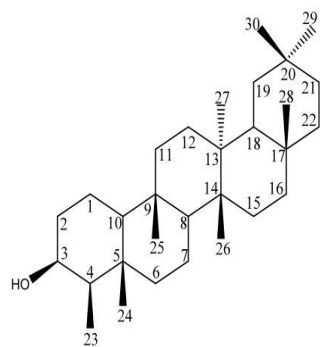
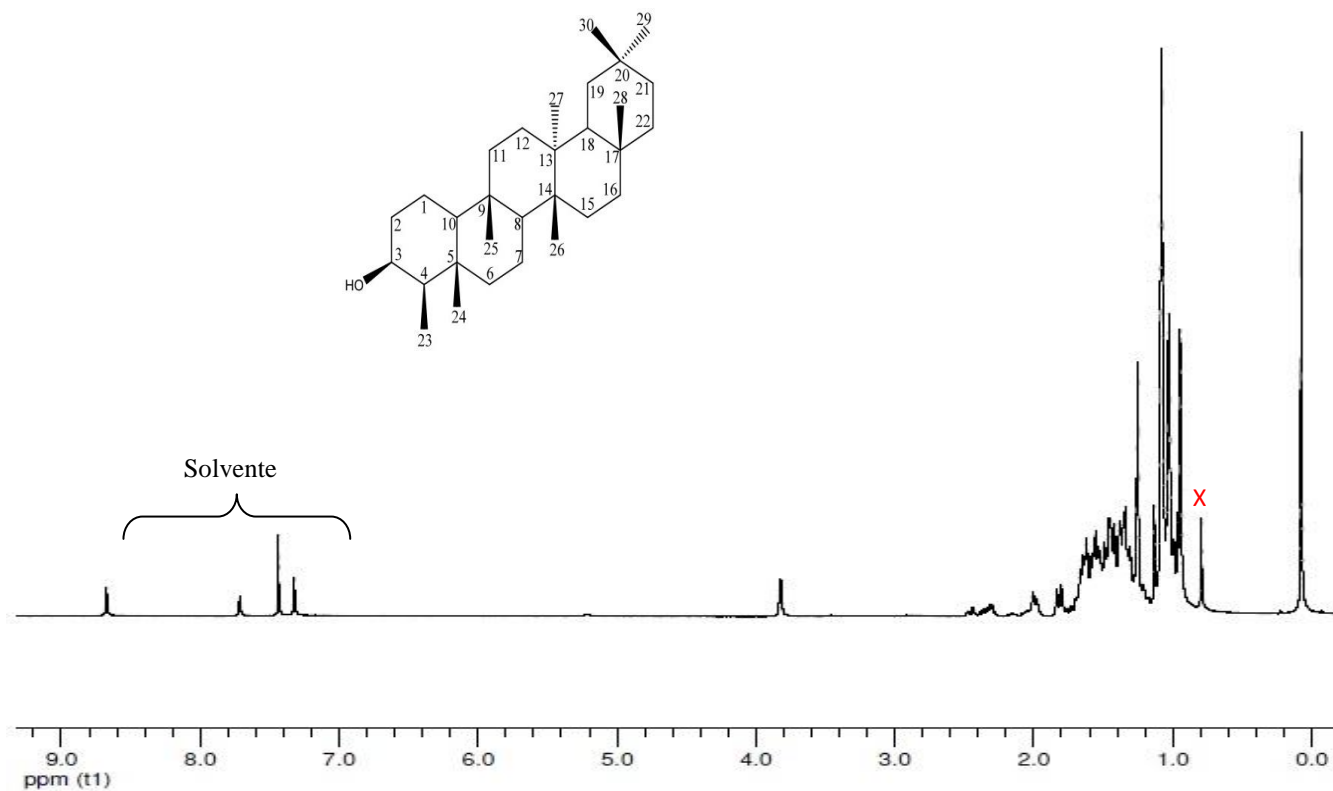


Figura 27: Espectro na região do IV de PmF-4 (KBr), região de 4000-600 cm⁻¹.



Date:	11 Aug 2016
Document's Title:	1f
Spectrum Title:	1
Frequency (MHz):	(f1) 400.180
Original Points Count:	(f1) 65536
Actual Points Count:	(f1) 65536
Acquisition Time (sec):	(f1) 8.1789
Spectral Width (ppm):	(f1) 20.023
Pulse Program:	Unknown

Figura 28:Espectro de RMN de ^1H (400 MHz) de PmF-4 em CDCl_3 e piridina-d5.

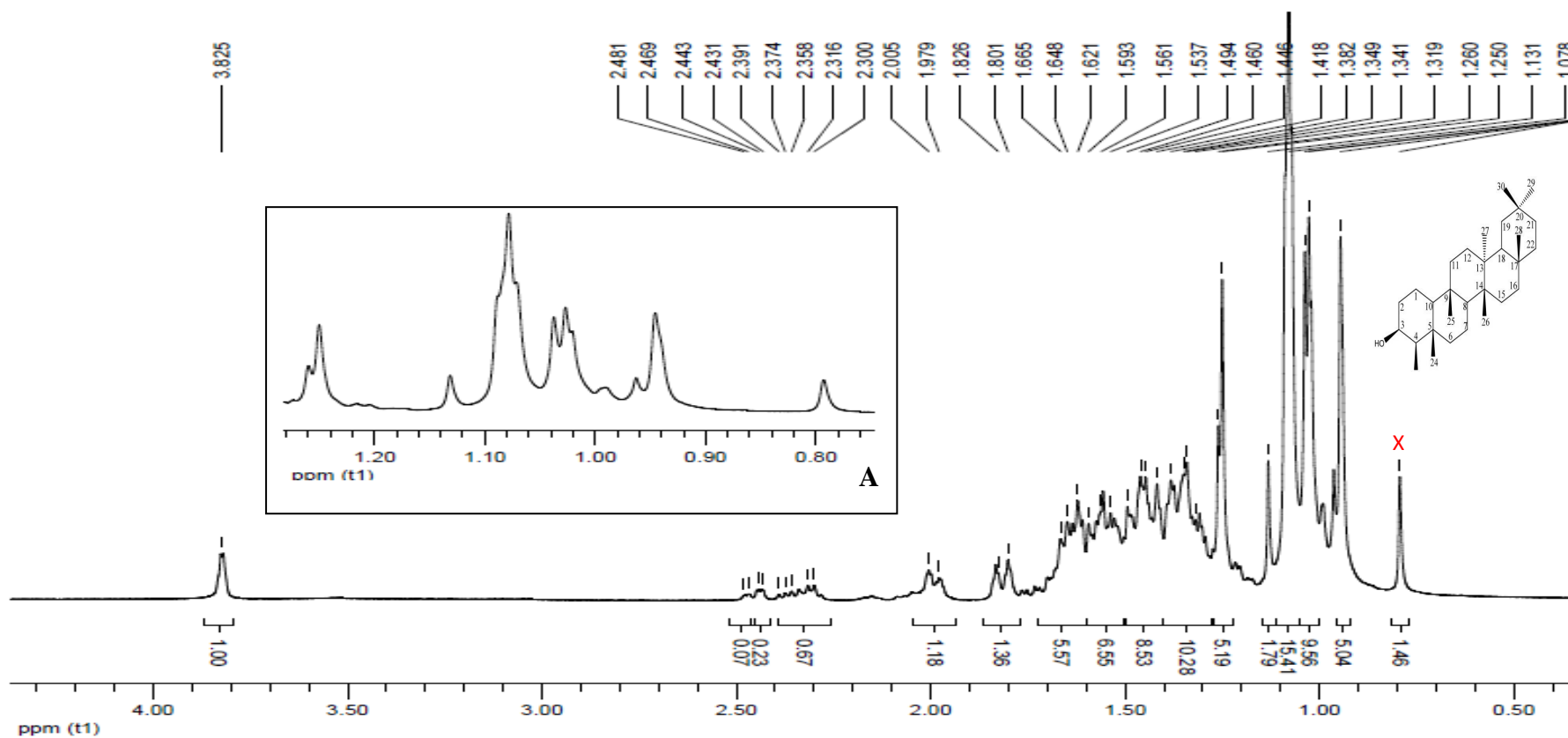


Figura 29:Ampliação (0,50- 4,6000 ppm) do espectro de RMN de ^1H (400 MHz) em CDCl_3 e piridina- d_5 de PmF-4. A- ampliação da região (0,70-1,34 ppm).

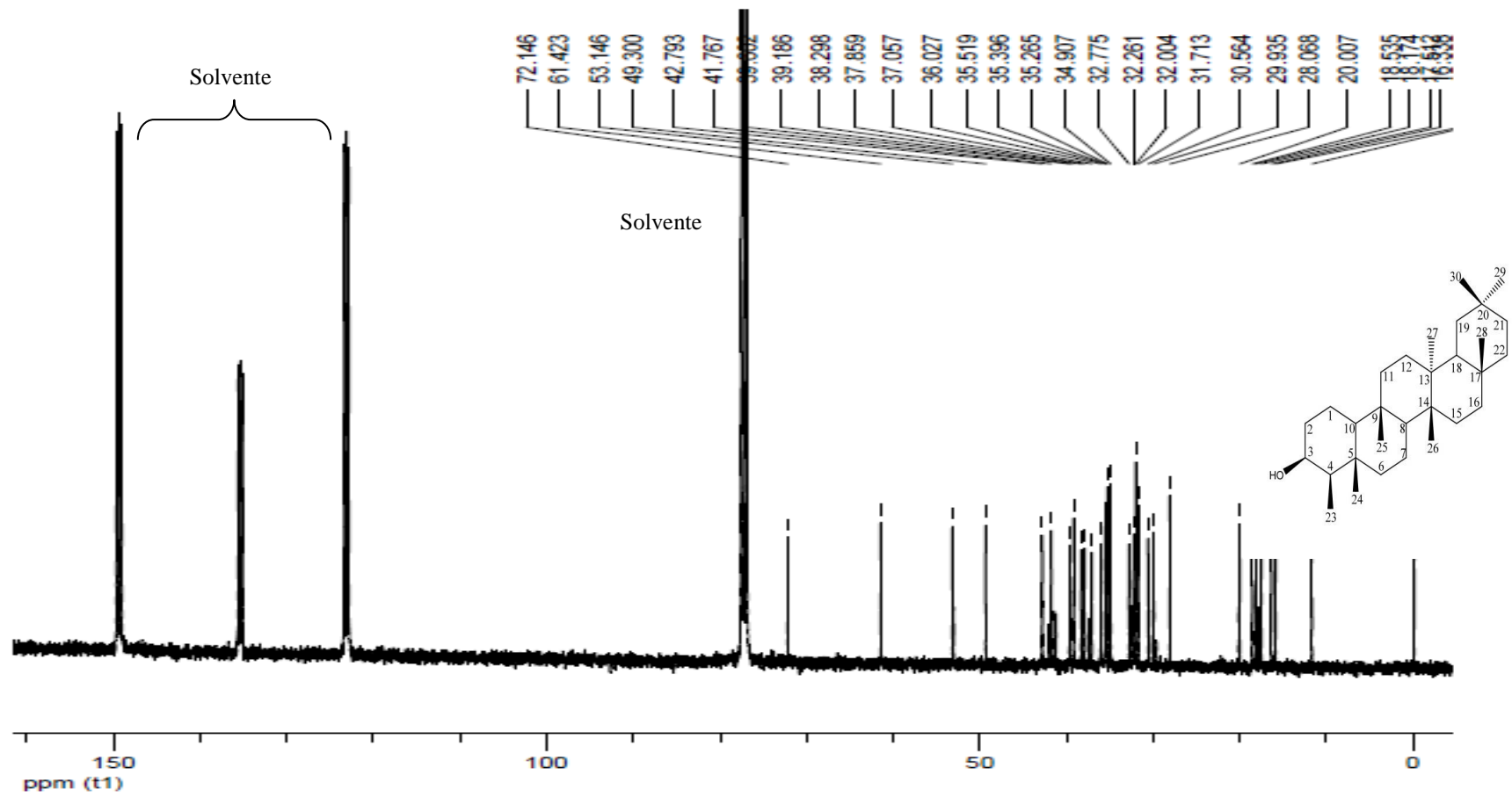


Figura 30: Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz) de PmF-4 em CDCl_3 e piridina- d_5 .

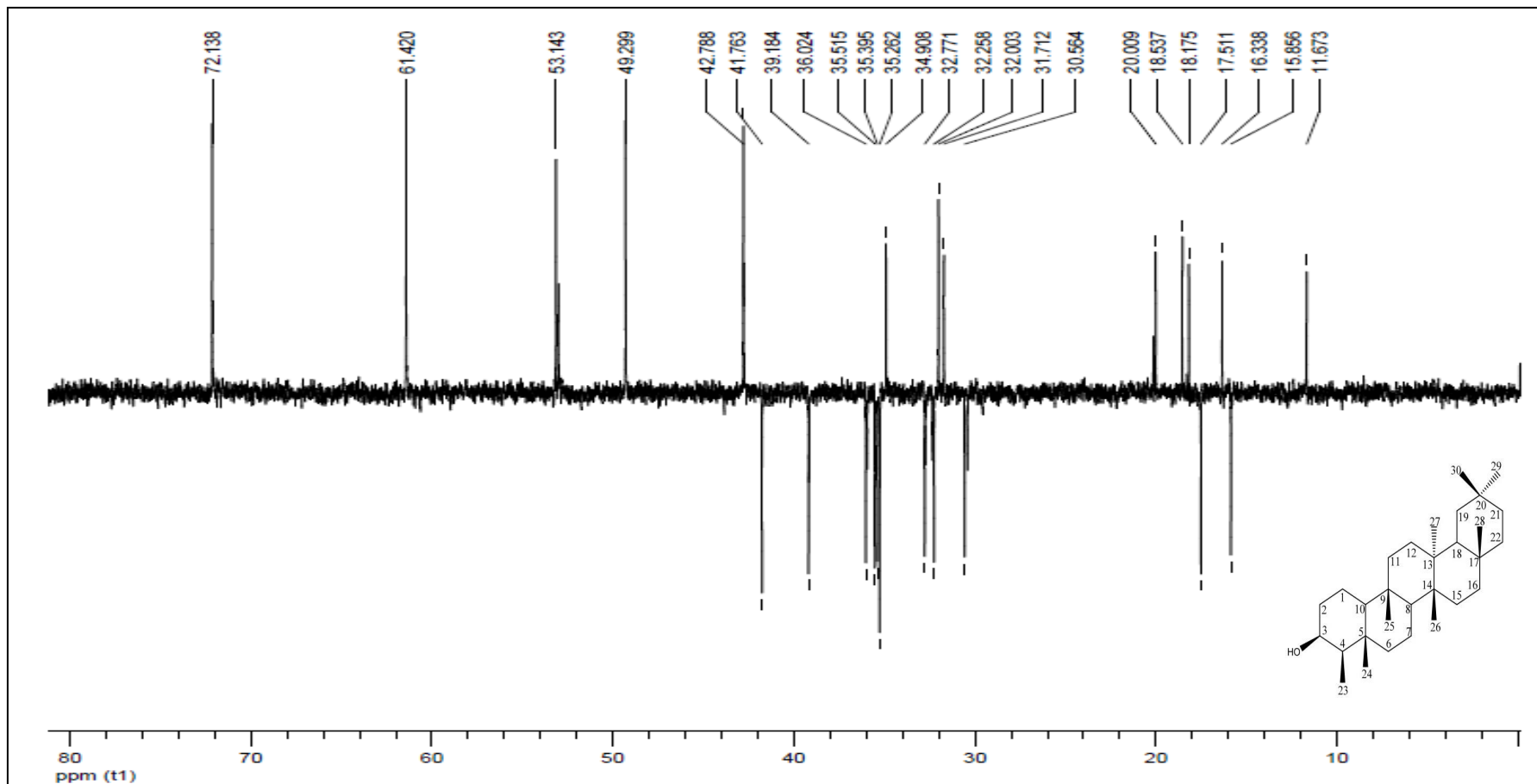


Figura 31:Ampliação (0-80 ppm) DEPT-135 (100 MHz) de PmF-4 em CDCl_3 e piridina- d_5 .

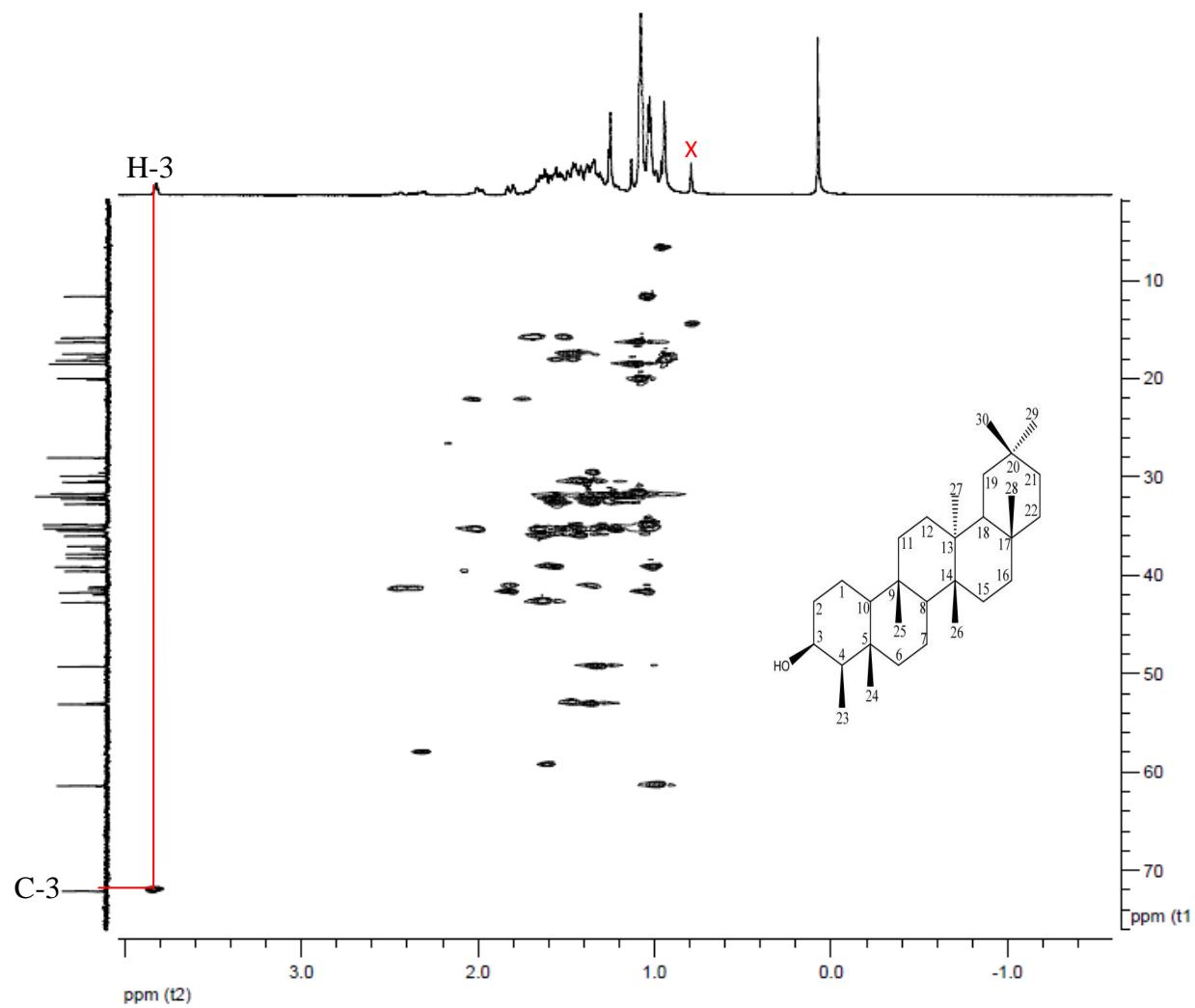


Figura 32:Correlação de H-C observadas no mapa de contornos HSQC (400 MHz, $\text{CDCl}_3/\text{piridina-d}_5$) de PmF-4.

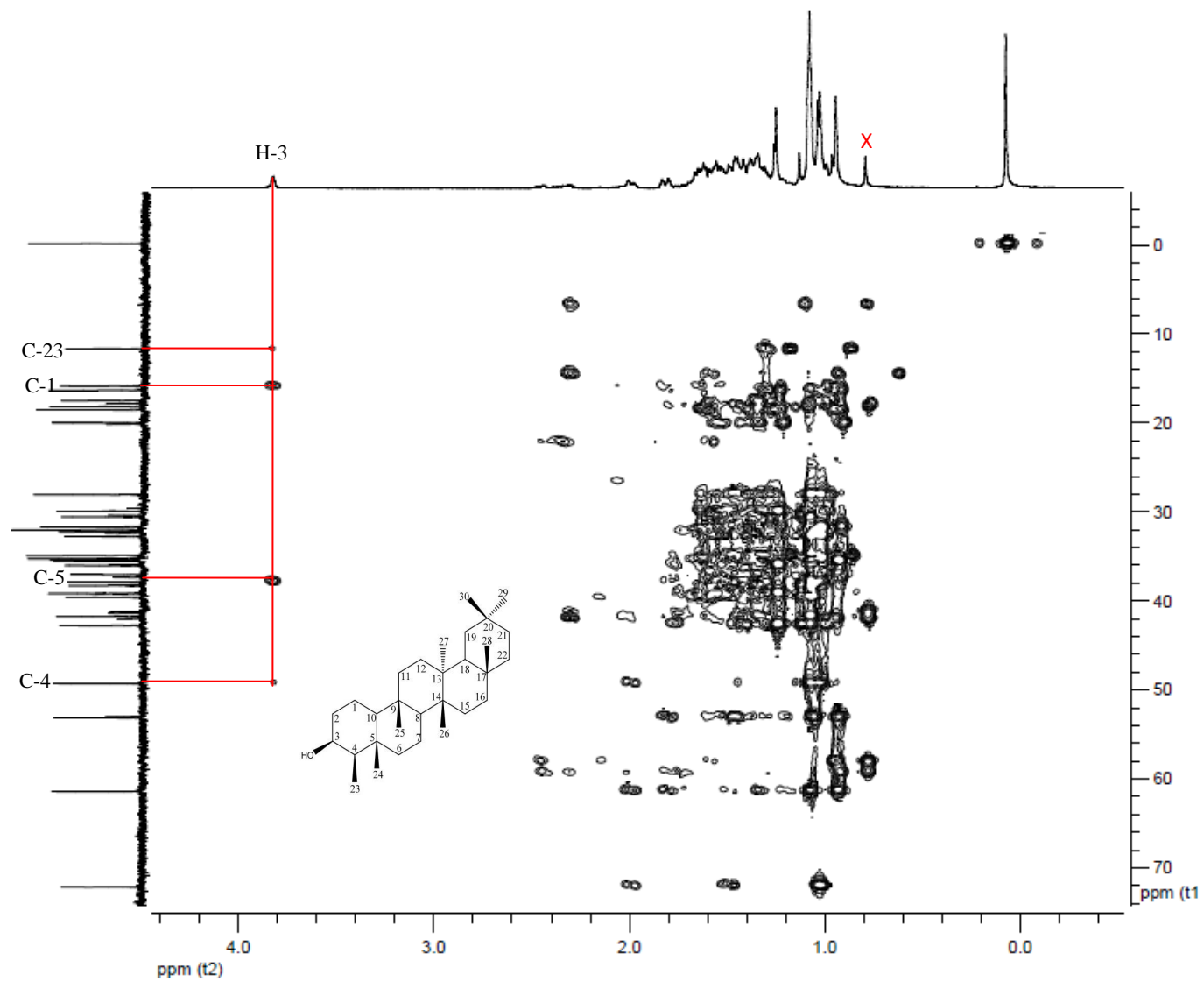
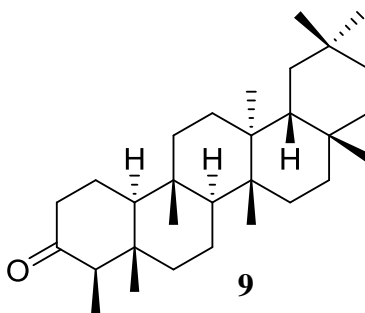


Figura 33: Correlação de H-C observadas no mapa de contornos HMBC (400 MHz, $\text{CDCl}_3/\text{pidridina-d}_5$) de PmF-4.

5.4.3. Determinação estrutural de PmF-4.2: 3-oxofriedelano (friedelina)



PmF-4.2 foi isolado por cromatografia em coluna e recristalizado em MeOH, como descrito na metodologia da página 41 e 42. Apresentou-se como um sólido branco, amorfo, solúvel em CHCl_3 ($m = 0,0030$ g) e com faixa de fusão de 256-260 °C. O teste de Lieberman-Burchard foi positivo para triterpeno pentacíclico.

O espectro no infravermelho de **PmF-4.2** (Figura 34, Página 68), apresentou bandas de absorção intensa em 2924 e média em 2850 cm^{-1} , atribuídas a deformações axiais de C-H de grupos CH_2 e CH_3 de alifáticos, respectivamente. Em 1733 cm^{-1} foi observada absorção forte característica de deformação axial de grupo C=O de cetona alifática. E as bandas de absorção média, em 1465 e 1383 cm^{-1} relacionados à deformação angular de ligação C-H de compostos alifáticos.

O espectro de RMN de ^1H de **PmF-4.2** (Figura 35 e 36, Página 69 e 70) apresentou 8 simpletos entre δ_{H} 1,18 a 0,78 indicando a presença de grupos metílicos. Destes o sinal largo em δ_{H} 0,88, foi atribuído ao hidrogênio metílico do C-23, característico de esqueleto friedelano (VIEIRA-FILHO, 2002). Sinais correspondentes a hidrogênios metilênicos e metínicos foram observados entre δ_{H} 1,93 e 2,46.

A análise do espectro de RMN de ^{13}C com auxílio do experimento de DEPT-135 (Figuras 37-39, página 71-73) de **PmF-4.2** revelaram a presença de 30 sinais de carbonos, sendo que esses dados juntamente com o sinal em δ_{C} 212,83 permitiu sugerir que o composto PmF-4.2 tratava-se de um triterpeno com grupo carbonila, contendo oito metilas (CH_3), onze metilenos (CH_2), quatro metínicos (CH) e sete carbonos não hidrogenados (C) (Tabela 8, Página 62).

Os dados analisados, juntamente com a faixa de fusão, comparação direta com a amostra autêntica e os dados de RMN de ^{13}C da literatura (SILVA, 2007), (Tabela 8, Página

67) permitem sugerir a substância **PmF-4.2** como sendo 3-oxo-friedelano. Essa substância já foi isolada das folhas de *P. ramiflora* (RODRIGUES, 2015).

Tabela 8: Comparação dos dados de RMN de ^{13}C de PmF-4.2 com os dados da literatura para friedelina (SILVA, 2007).

Posição	$^{13}\text{C}/$ DEPT	$\delta^{\text{C}*}$ (δ)	lit $\delta^{\text{C}}/$ (δ)
1	CH ₂	22,17	22,28
2	CH ₂	41,40	41,53
3	C	212,8	213,17
4	CH	58,10	58,24
5	C	42,78	42,14
6	CH ₂	41,19	41,30
7	CH ₂	17,50	18,24
8	CH	53,14	53,12
9	C	37,05	37,45
10	CH	59,37	59,50
11	CH ₂	35,38	35,64
12	CH ₂	30,56	30,50
13	C	39,60	39,71
14	C	38,29	38,31
15	CH ₂	32,76	32,78
16	CH ₂	35,02	36,01
17	C	29,93	29,99
18	CH	41,76	42,81
19	CH ₂	35,26	35,35
20	C	28,07	28,18
21	CH ₂	32,25	32,44
22	CH ₂	39,18	39,24
23	CH ₃	06,70	06,81
24	CH ₃	14,53	14,65
25	CH ₃	17,82	17,94
26	CH ₃	20,01	20,25
27	CH ₃	18,53	18,65
28	CH ₃	32,00	32,09
29	CH ₃	31,69	31,77
30	CH ₃	34,91	35,01

*CDCl₃ e piridina-d₅, a literatura CDCl₃.

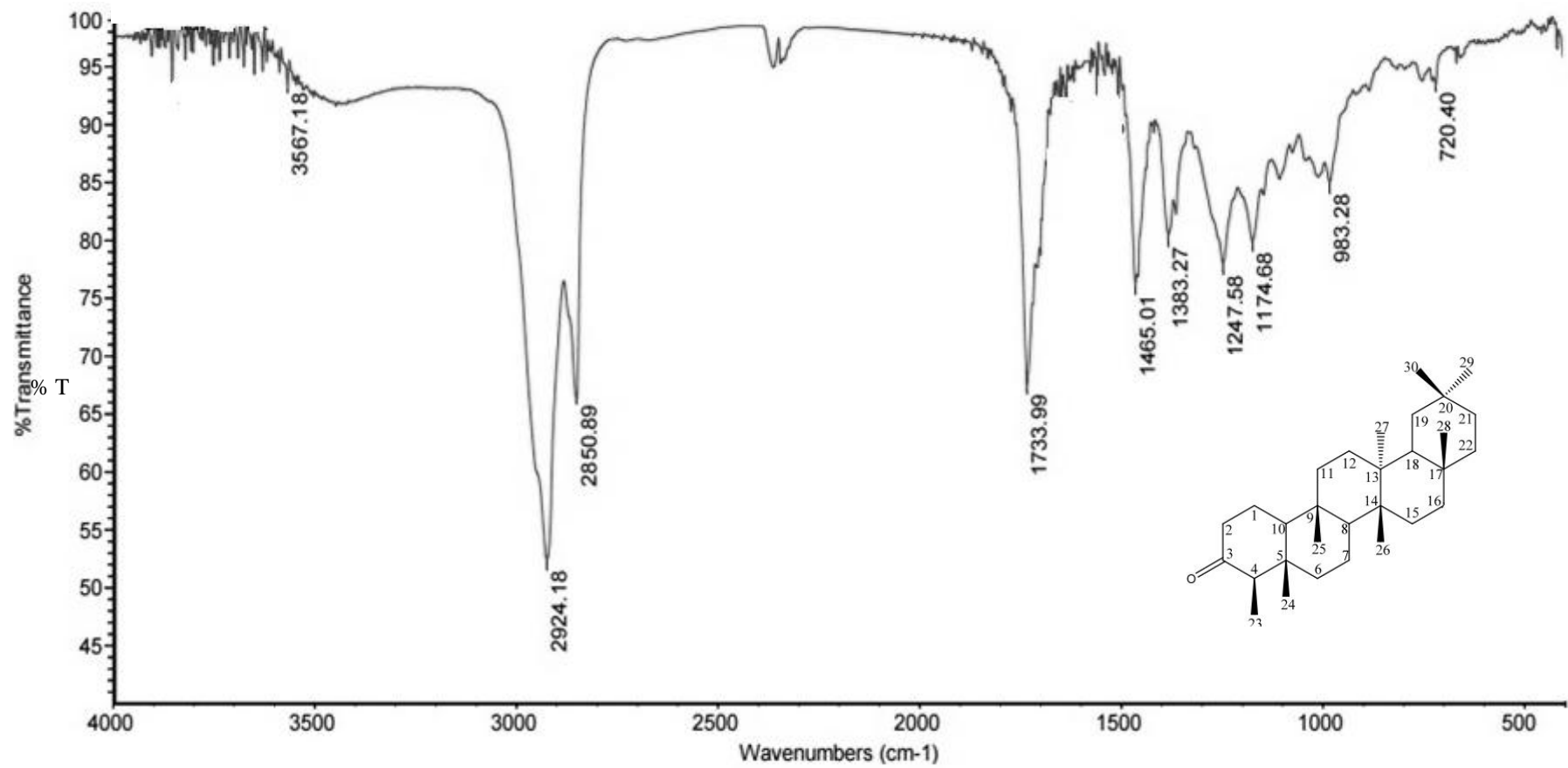
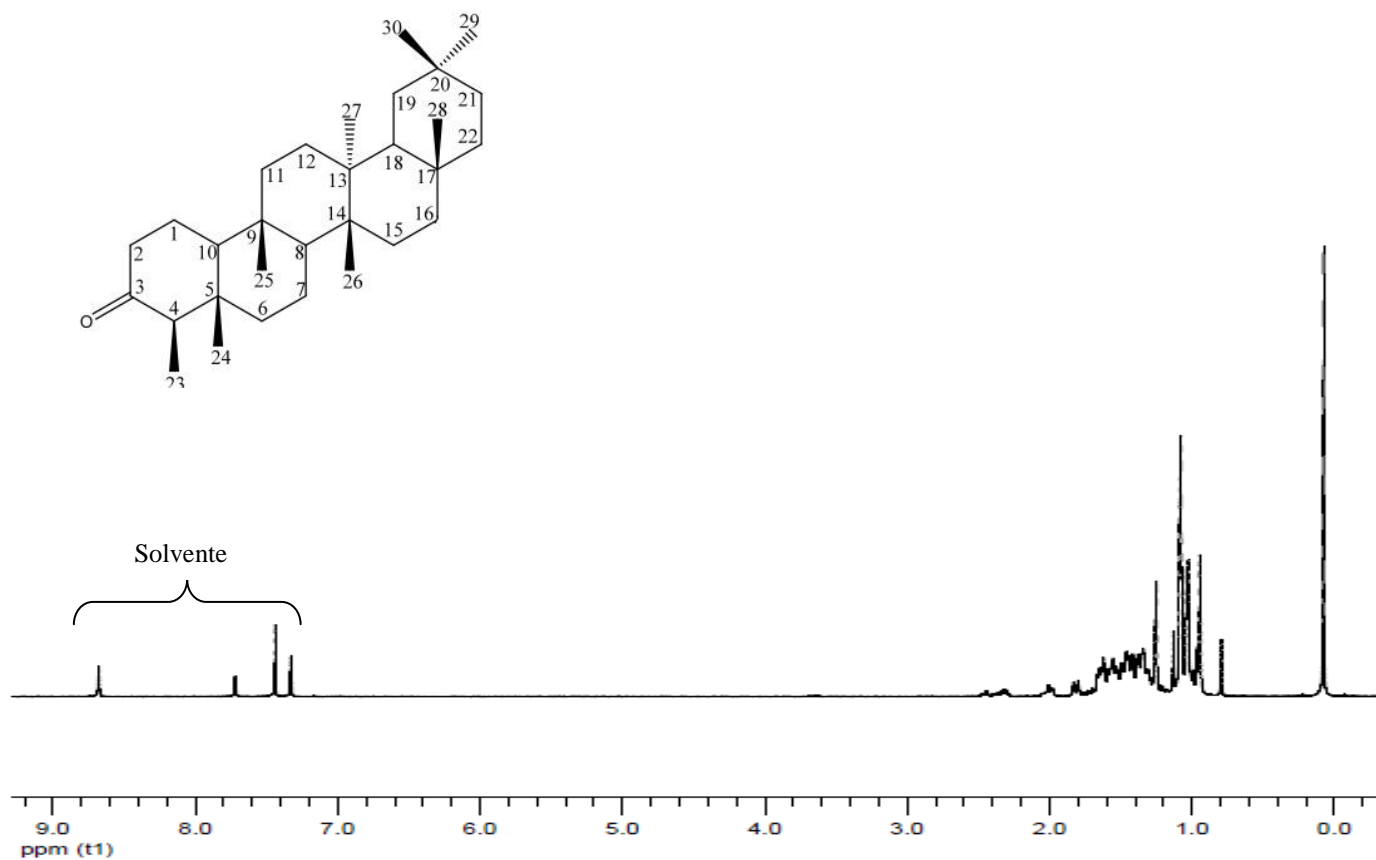


Figura 34: Espectro na região do IV de PmF-4.2 (KBr), região de 4000 a 400 cm⁻¹.



Date:
 11 Aug 2016
 Document's Title:
 PmF-4.2 H expansão

 Spectrum Title:
 PmF-4.2 H

 Frequency (MHz):
 (f1) 400.180
 Original Points Count:
 (f1) 65536
 Actual Points Count:
 (f1) 65536
 Acquisition Time (sec):
 (f1) 8.1789
 Spectral Width (ppm):
 (f1) 20.023
 Pulse Program:
 Unknown

Figura 35:Espectro de RMN de ¹H (400 MHz) de PmF-4.2 em CDCl₃ e piridina-d₅.

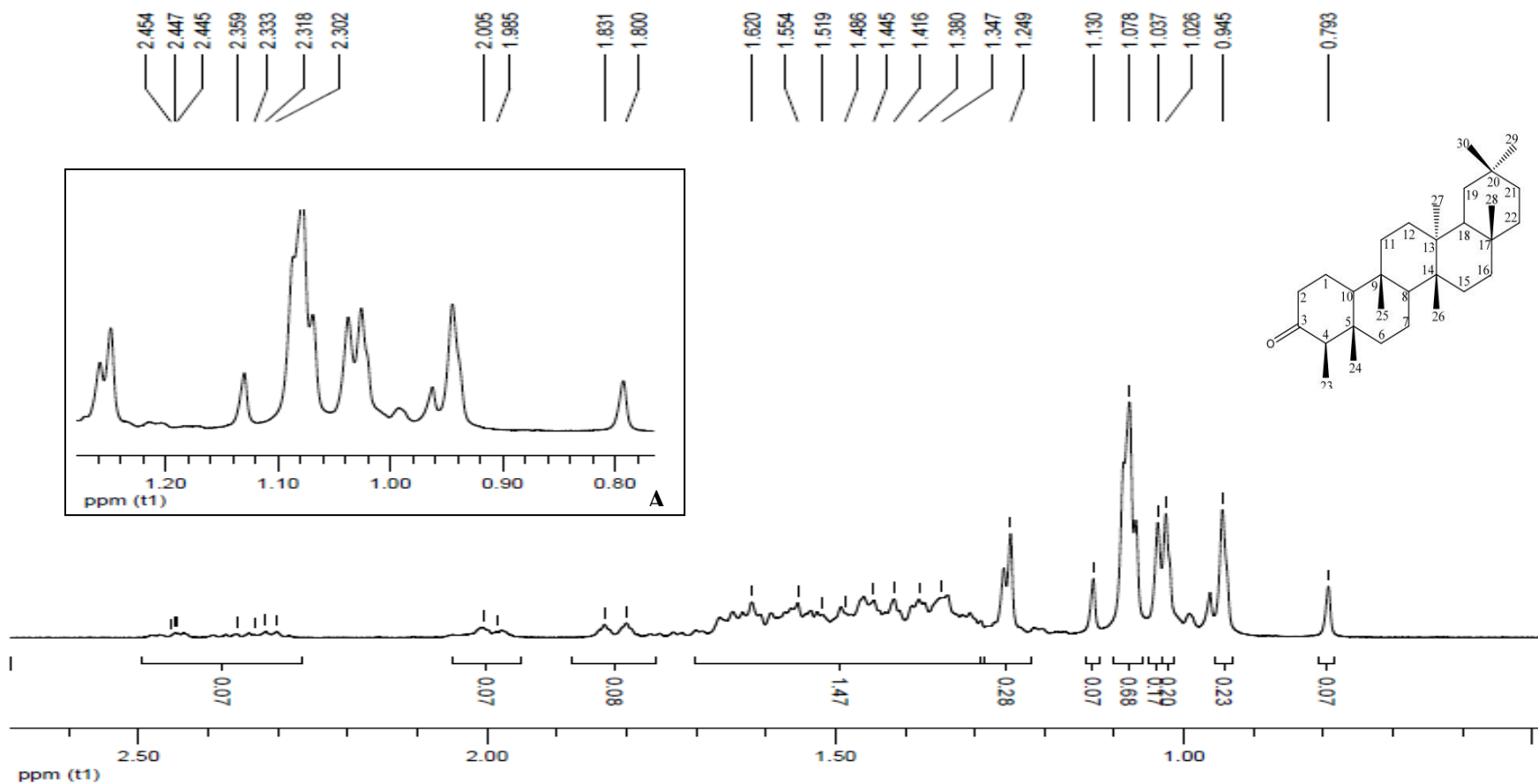


Figura 36:Ampliação (0,50- 2,50 ppm) do espectro de RMN de ¹H (400 MHz) de PmF-4.2 em CDCl₃ e piridina-d₅. A – ampliação (0,7 – 1,34 ppm).

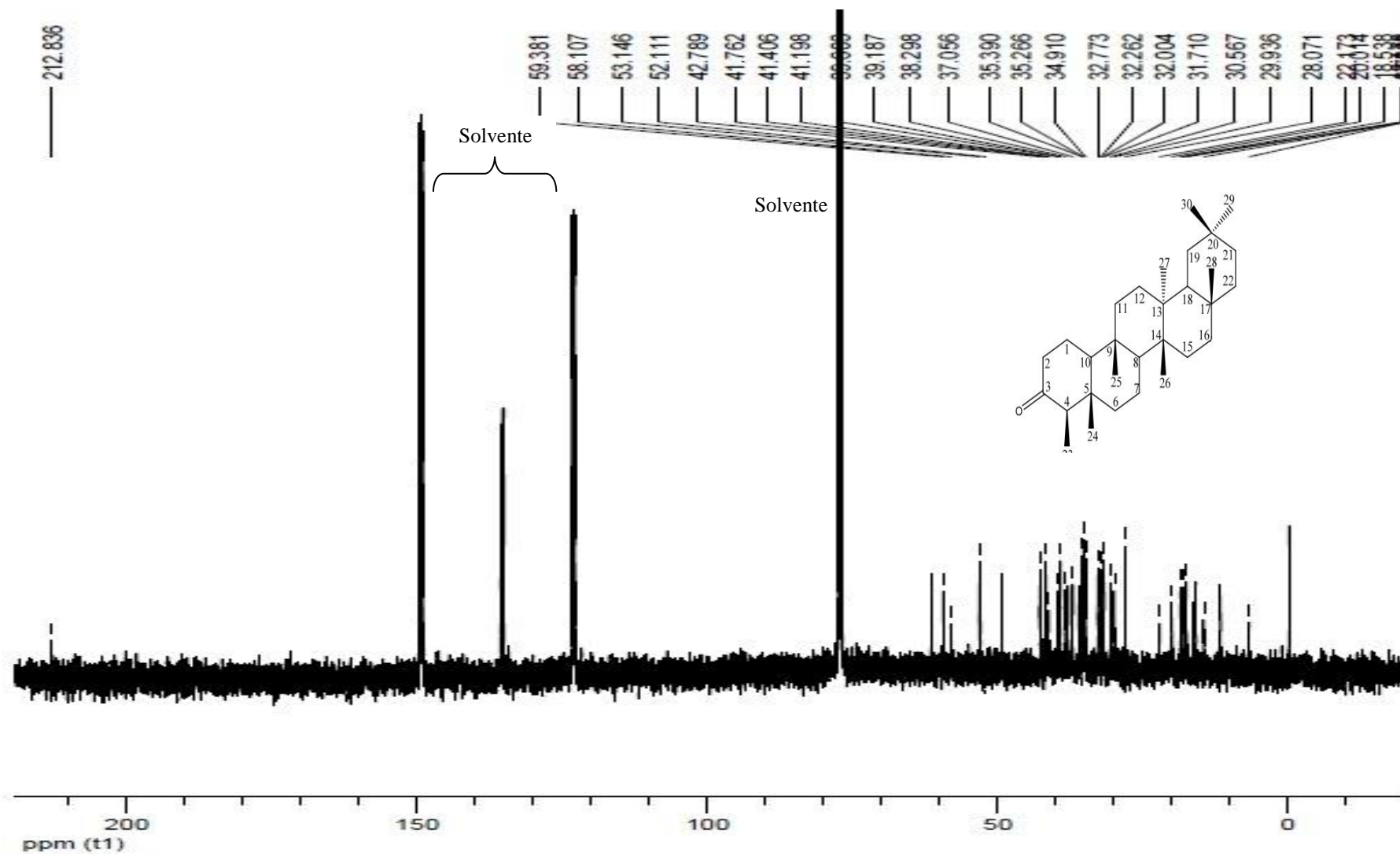


Figura 37: Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz) de PmF-4.2 em CDCl_3 e piridina- d_5 .

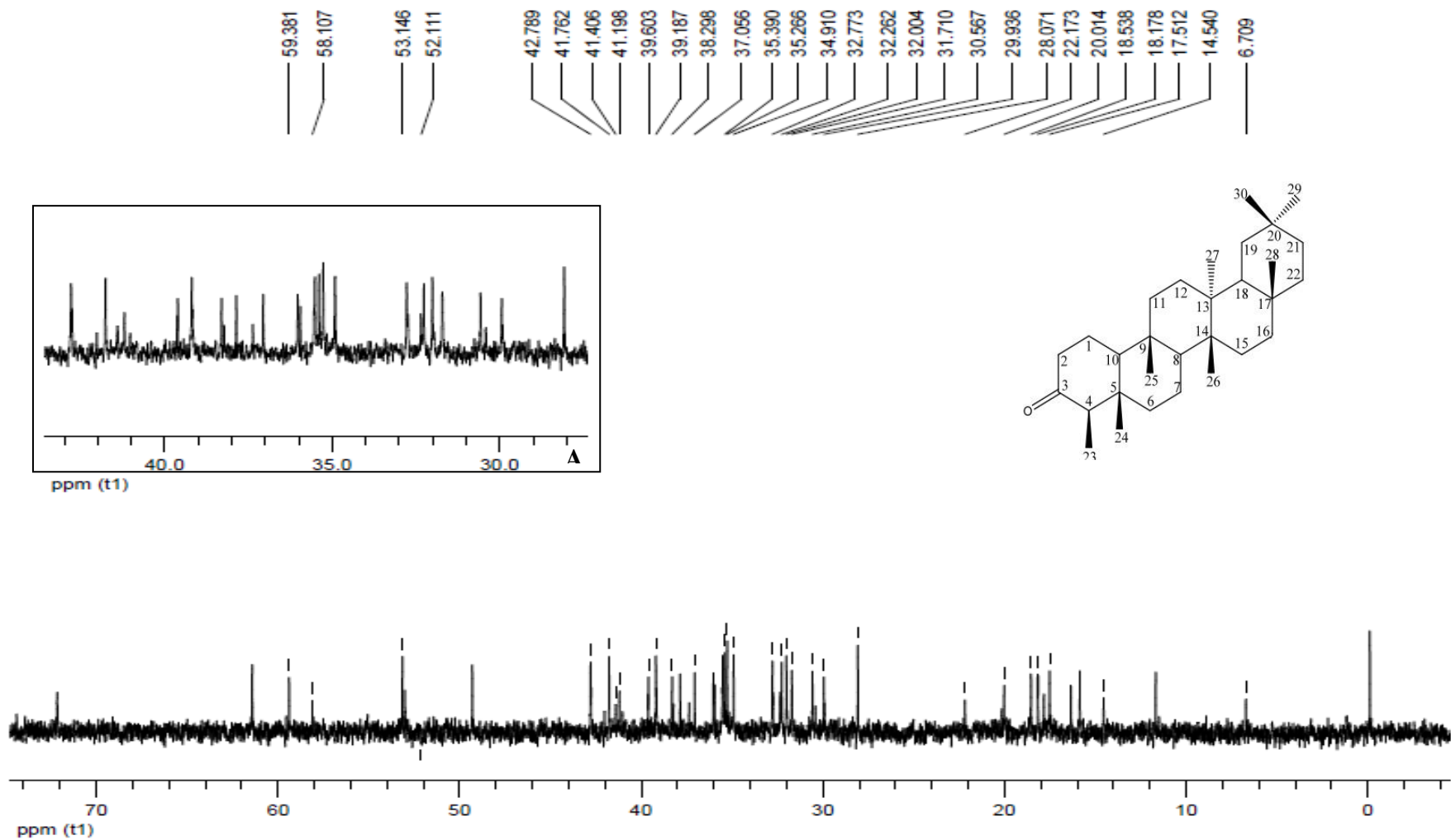


Figura 38: Ampliação (0-74 ppm) do espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz) em CDCl_3 e d-5 de PmF-4.2. A- ampliação de (28-43 ppm).

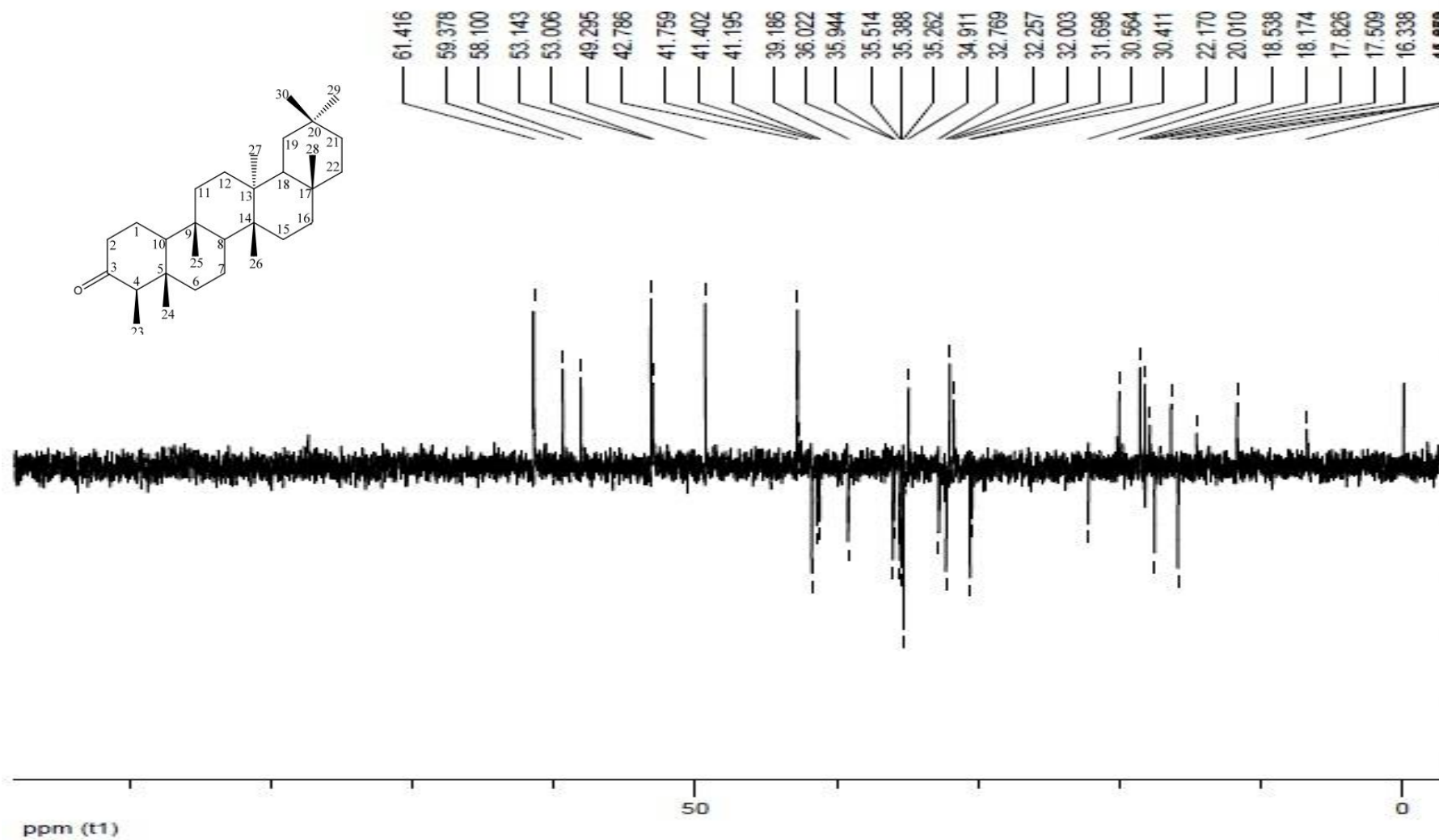
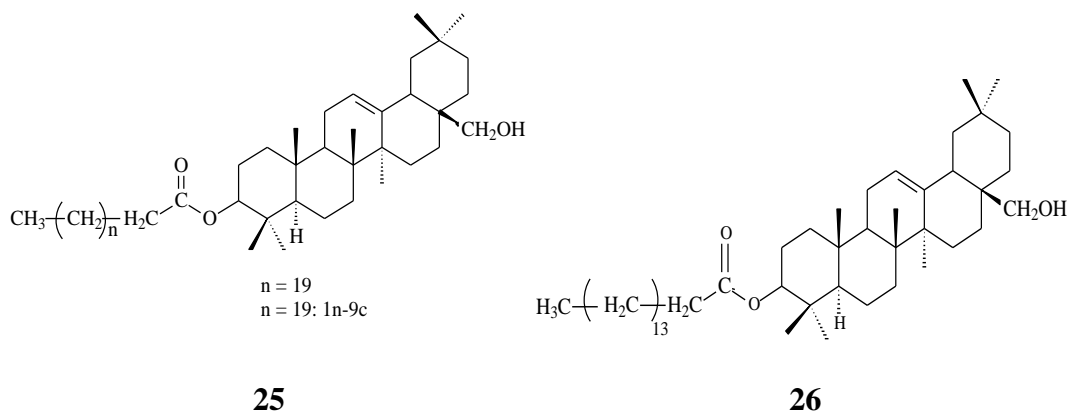


Figura 39:Espectro DEPT-135 (100 MHz) em CDCl_3 e piridina- d_5 de PmF-4.2.

5.4.4. Determinação estrutural de PmF-4.3: mistura de behenato e erucicato de eritrodilila, e PmF-4.4 palmitoleicoato de eritrodilila



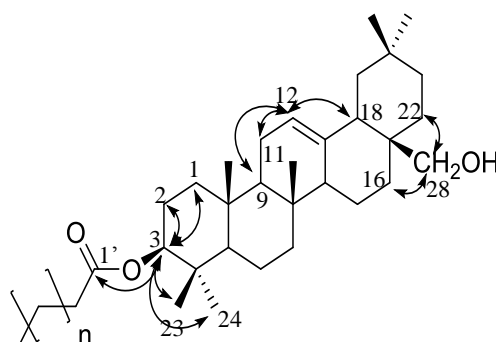
PmF-4.3 foi isolado por cromatografia em coluna e recristalizado em acetona, como descrito na metodologia, (página 41 e 42). Apresentou-se como um sólido branco, amorfo, solúvel em CHCl_3 ($m=0,0215$ g) e com faixa de fusão de $118-121^\circ\text{C}$. O teste de Liebermann-Burchard foi positivo para triterpeno pentacíclico.

O espectro no infravermelho de **PmF-4.3** (Figura 45, Página 81) apresentou as bandas de absorção intensa e média em 3474 cm^{-1} , característica de estiramento de ligação OH de hidroxila; 2952 cm^{-1} característico de estiramento assimétrico de ligação CH de grupos CH_2 alifáticos; 2863 cm^{-1} característica de estiramento simétrico de ligação C-H de grupos CH_2 e CH_3 alifáticos, 1735 cm^{-1} atribuída a estiramento C=O de éster alifático, 1465 cm^{-1} e 1384 cm^{-1} características de deformação angular no plano de ligação simples CH de compostos alifáticos e $1298-1015\text{ cm}^{-1}$ referente a estiramento C-O.

O espectro de RMN de ^1H de **PmF-4.3** (Figura 46-48, página 82-84) apresentou sinais entre $\delta_{\text{H}} 0,8$ e $\delta_{\text{H}} 1,3$ característicos de grupos metílicos (CH_3) em estruturas de triterpenos, sinal simples e intenso presente em $\delta_{\text{H}} 1,26$ característico de hidrogênio metilênico (CH_2) de H-C de cadeia longa e o tripleto definido em $\delta_{\text{H}} 2,28$ (2H , $J = 6,4$ Hz) equivalente ao hidrogênio H-2' de éster graxo de triterpeno (WANG *et al.*, 2009). O sinal em $\delta_{\text{H}} 4,51$ (1H , dd, $J_1 = 7,5$ e $J_2 = 8,4$ Hz) foi atribuído ao H-3, hidrogênio oximetínico, sugerindo que PmF-4.3 encontra-se esterificado no C-3. A presença de dois dupletos definidos em $\delta_{\text{H}} 3,21$ (1H , d, $J = 10,8$ Hz) e $\delta_{\text{H}} 3,53$ (1H , d, $J = 10,8$ Hz) de hidrogênio oximetilênico acoplados e um tripleto definido em $\delta_{\text{H}} 5,17$ (1H , t, $J = 3,06$ Hz), sugere a presença do esqueleto eritrodilol, um triterpeno oleanano.

O espectro de RMN de ^{13}C (Figura 49 e 50, Página 85 e 86) de **PmF-4.3** apresentou 30 sinais de átomos de carbono do esqueleto triterpênico, além de sinais de carbono alifático do éster. Apresentando sinais em δ_{C} 122,31 e δ_{C} 144,22 característicos de carbono olefínico, referentes ao C-12 e C-13, respectivamente para triterpenos com esqueleto olean-12-eno. O sinal em δ_{C} 69,71 referente a carbono oximetilênico C-28, reforça a proposta do eritrodíol (MAHATO, 1997). O sinal em δ_{C} 173,67 reforça a proposta da esterificação, uma vez que é característico de carbono carbonílico de éster (C-1'), além de sinal em δ_{C} 80,55 referente ao carbono oximetínico (C-3). Os carbonos metilênicos foram observadas em δ_{C} 34,68 (CH_2 , C-2') e δ_{C} 29,69 (CH_2n) (WANG, *et al.*, 2009), (Tabela 9, Página 79-80). Além desses, foi observado no RMN de ^1H um sinal simples e intenso em δ_{H} 1,26, que foi atribuído a hidrogênio metilênico de éster de cadeia longa, um tripleto em δ_{H} 2,28 referente ao H-2' de éster graxo de triterpeno. O experimento de HSQC foi utilizado para correlacionar o hidrogênio aos seis respectivos carbonos (Figura 51, Página 87).

As correlações observadas no espectro $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ HMBC (Figura 52 e 53, Página 88 e 89) permitiram confirmar a ligação dupla C-12 / C-13, pela correlação do sinal em δ_{H} 5,19 (1H, t, H-12) com os sinais de δ_{C} 47,52 (C-9), 23,54 (C-11), 42,36 (C-18). O grupo oximetilênico C-28 também foi confirmado por correlação HMBC entre δ_{H} 3,53, 3,21 (1H, d, H-28) e δ_{C} 22,03 (C-16) e 31,04 (C-22), correlação de sinal em δ_{H} 4,51 (1H, d, $J=8,4$, H-3) e δ_{C} 38,28 (C-1), 23,60 (C-2), 28,05 (C-23), 15,56 (C-24) e 173,67 (C-1') confirma a esterificação do C-3. Os deslocamentos químicos citados são compatíveis com os valores reportados por WANG, *et al.*, 2009. Esses dados indicam que **PmF-4.3** é o eritrodíol esterificado com ácido graxo de cadeia longa.



A fim de identificar a cadeia longa do éster derivado do ácido graxo, **PmF-4.3** foi submetido à reação de transesterificação na presença de MeONa, conforme metodologia (página 35), fornecendo o éster metílico e o eritrodíol livre. A análise CG-FID forneceu dois sinais no $t_{\text{R}1}$ 33,721 min e $t_{\text{R}2}$ 34,721, que ao serem comparados com padrões de FAME

(seguindo as mesmas condições cromatográficas) sugerem tratar-se dos ésteres metílicos do ácido behênico (C22:0) e éster metílico do ácido erúico (C22-1n9).

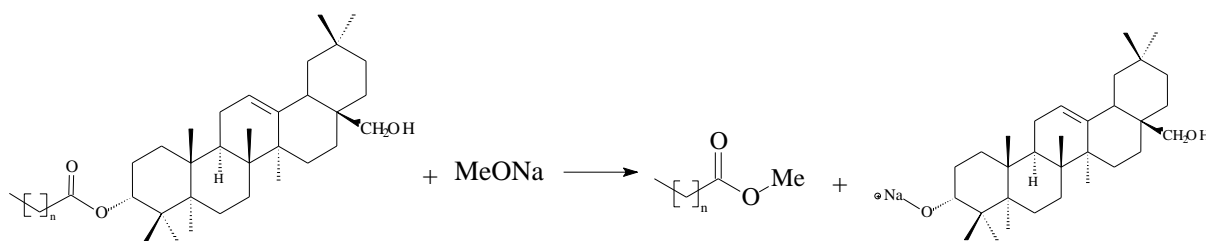


Figura 40: Reação de transesterificação.

Os dados analisados, juntamente com a faixa de fusão e os dados de RMN de ^{13}C da literatura (WANG, *et al.*, 2009), (tabela 9, página 79-80) permitiram identificar o sólido isolado **PmF-4.3** como uma mistura de derivados de ésteres do eritrodíol: behenato e erucicato de eritrodionila.

Eritrodíol

Após neutralização da fase aquosa, seguida de extração com CH_2Cl_2 , foi isolado um sólido branco de ponto de fusão $128\text{ }^\circ\text{C}$. O experimento de RMN desse sólido apresentou diferenças, quando comparado aos triterpenos esterificados (**PmF-4.3**).

O espectro no IV apresentou bandas de absorções intensa e média em: 3447 cm^{-1} característica de estiramento de ligação OH de hidroxila; 2922 cm^{-1} característico de estiramento assimétrico de ligação CH de grupos CH_2 alifáticos; 2863 cm^{-1} característica de estiramento simétrico de ligação C-H de grupos CH_2 e CH_3 alifáticos, ausência da absorção em 1735 cm^{-1} atribuída a estiramento C=O de éster alifático, 1437 cm^{-1} característica de deformação angular no plano de ligação simples CH de compostos alifáticos.

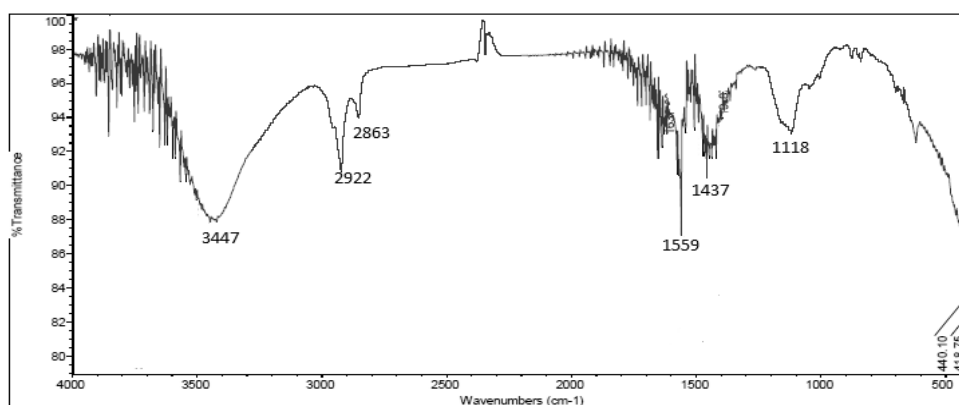


Figura 41: Espectro na região no IV do eritrodíol (KBr).

O espectro de RMN de ^1H do eritrodiol (Figura 42, página 727) apresentou sinal entre δ_{H} 0,8 e δ_{H} 1,3 característicos de grupos metílicos (CH_3) em estruturas de triterpenos. Apresenta contaminação em δ_{H} 1,26 característico de hidrogênio metilênico (CH_2) de material graxo de cadeia longa e ausência do tripleto definido em δ_{H} 2,28 (2H , $J = 6,4$ Hz) equivalente ao hidrogênio H-2' de éster graxo de triterpeno. Neste espectro observa-se ainda a presença de dois dupletos definidos em δ_{H} 3,21 (2H , d, $J = 10,8$ Hz) e δ_{H} 3,54 (1H , d, $J = 10,8$ Hz) de hidrogênio oximetilênico referente ao H-28. O sinal do H-3 coaleceu com um dos hidrogênios do C-28, comprovado pela integração do sinal em δ_{H} 3,21 (2H). O tripleto definido em δ_{H} 5,17 (1H , $J = 2,07$ Hz) é característico de hidrogênio olefínico H-12. O sinal em δ_{H} 4,5 (1H , d, $J = 8,3$ Hz) equivalente ao H-3, sugerindo que o grupo éster foi substituído por um grupo hidroxila.

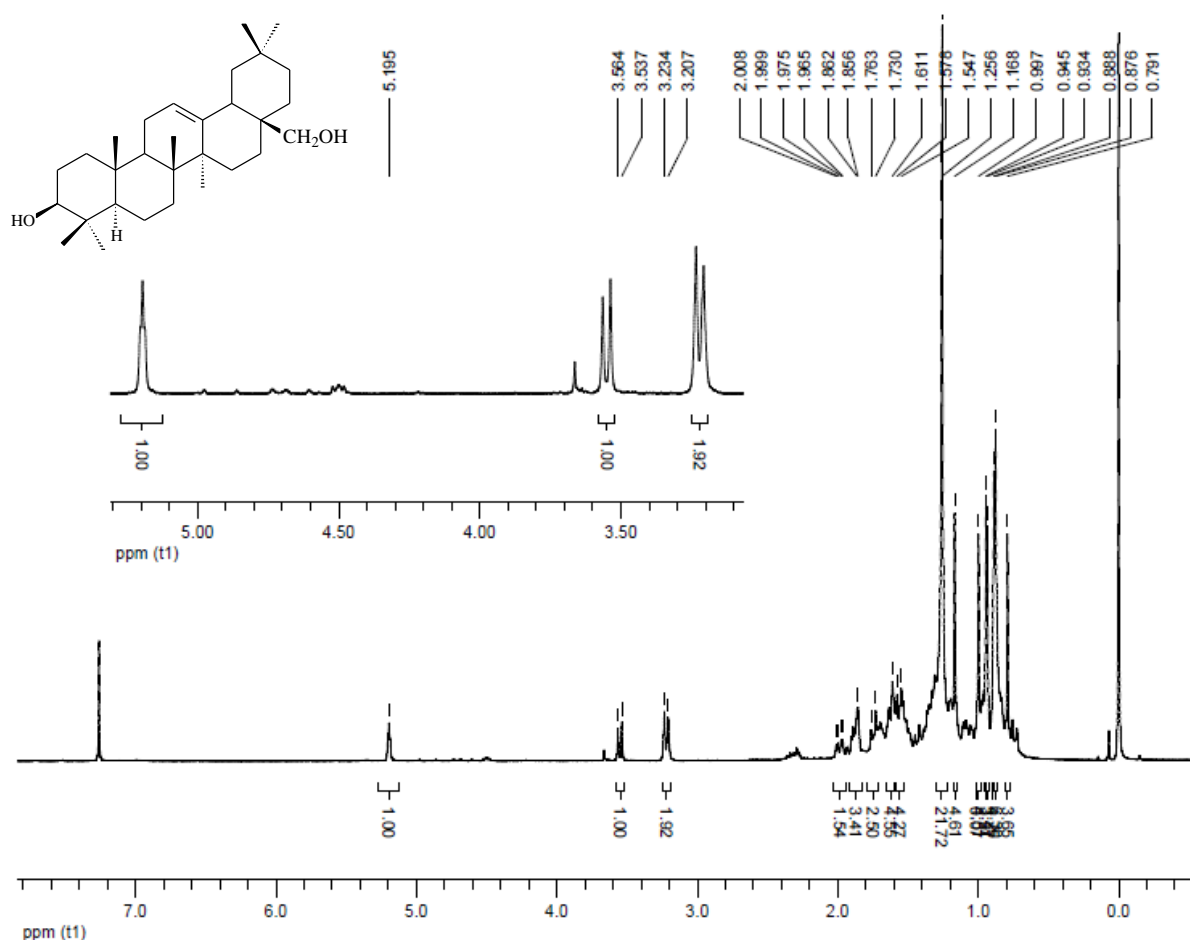


Figura 42: Espectro de RMN de ^1H do eritrodiol em CDCl_3 .

O espectro de RMN de ^{13}C (Figura 43 página 78) do eritrodiol apresentou 30 sinais de átomos de carbono. Os sinais em δ_{C} 122,31 e δ_{C} 144,22 característicos de carbono olefínico, referentes ao C-12 e C-13, respectivamente para triterpenos com esqueleto olean-12-eno. O

sinal em δ_C 69,71 referente a carbono oximetilênico C-28 correlacionou-se com os sinais em δ_H 3,54 e δ_H 3,21 no mapa de contorno HSQC confirmando a estrutura do eritrodio (MAHATO, 1997), (figura 44, A). A ausência do sinal de deslocamento em δ_C 173,67 juntamente com a presença do sinal em δ_C 80,55 referente ao (C-3) confirma a estrutura do composto proposto. O eritrodio já foi isolado na sua forma livre e esterificado com ácido palmítico das folhas de *P. Torta* por Lopes (2005).

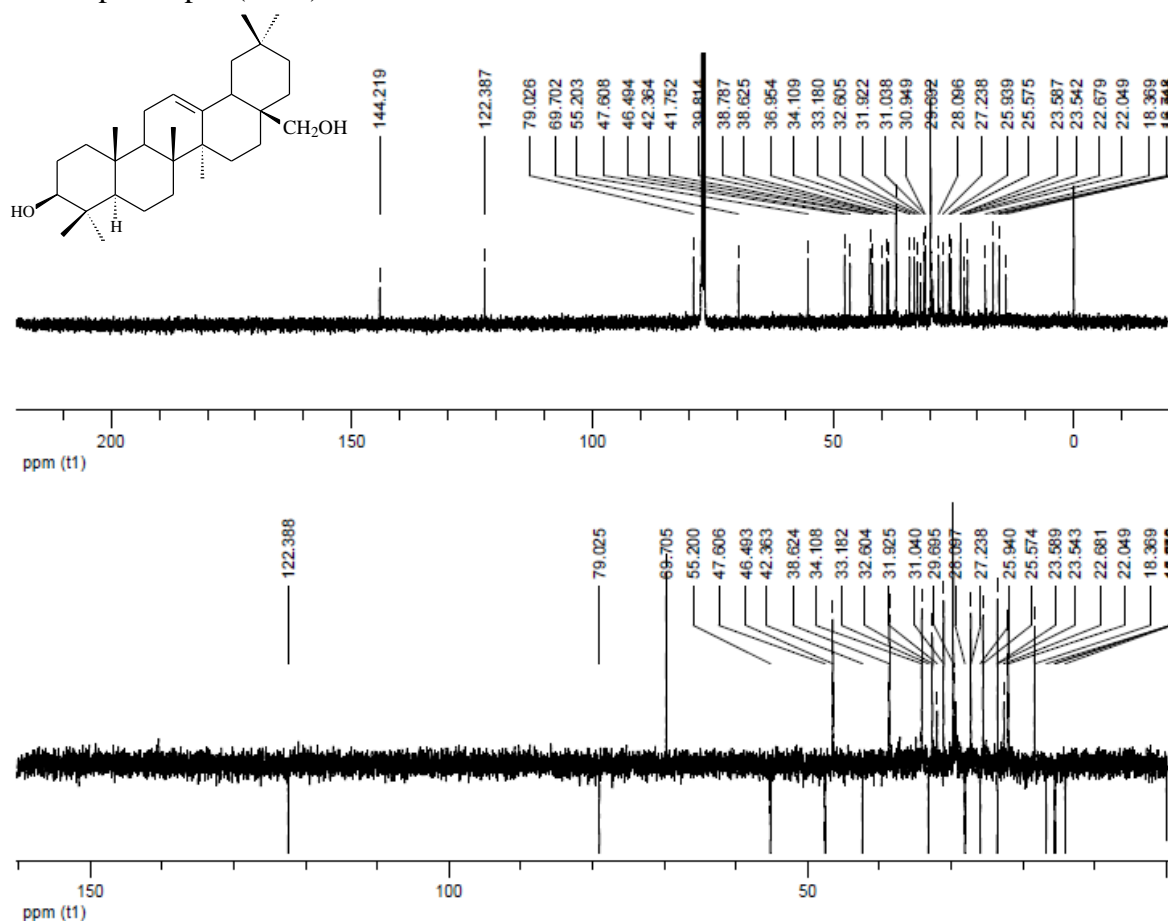


Figura 43: Espectros de RMN de ^{13}C e DEPT-135 do eritrodio em CHCl_3 .

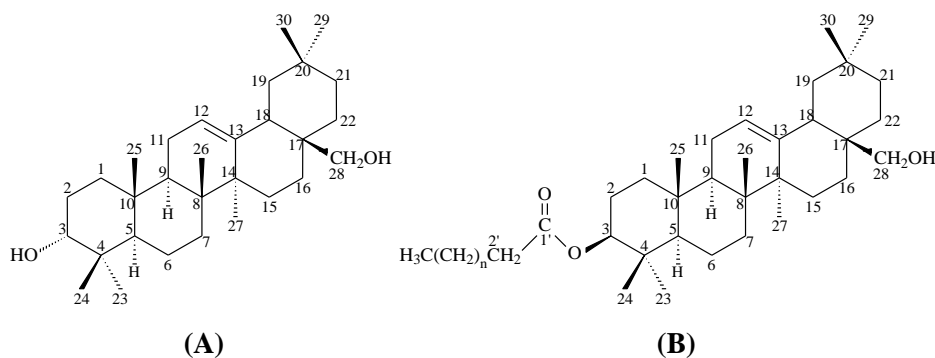


Figura 44: Estrutura do eritrodio (A) e (B) do eritrodio esterificado.

PmF-4.4: Palmitoleicoato de eritrodilila

PmF-4.4 foi isolado por cromatografia em coluna e recristalizado em acetona, como descrito na metodologia (página 41 e 42). Apresentou-se como um sólido branco, amorfo, solúvel em CHCl₃ (m=0,0267 g) e com faixa de fusão de 122-124 °C. O teste de Lieberman-Burchard foi positivo para triterpeno pentacíclico.

O espectro no infravermelho de **PmF-4.4**, apresentou bandas de absorção similares a **PmF-4.3**. Após análise dos espectros de RMN de ¹H, ¹³C (Tabela 9), DEPT-135, HSQC e HMBC verificou-se que tratava-se do triterpeno eritrodilol esterificado, semelhante a **PmF-4.3**. Para a identificação do éster derivado do ácido graxo na estrutura, o sólido foi submetido à reação de transesterificação, conforme metodologia para **PmF-4.3**. A análise CG-FID forneceu um sinal em t_R 21,203 min que comparados com padrões de FAME (Tabela 6, página 54 e 55) sugere tratar-se do éster metílico do ácido palmitoleico (C16-1n9).

As substâncias **PmF-4.3** e **PmF-4.4** nunca foram relatadas no gênero *Pouteria*. Ragasa et al. (2011) isolaram de *P. campechiana* um éster metílico do ácido 3β,28-dihidroxi-olean-12-eno, Lopes, (2015) isolou o palmitato de eritrodilila das folhas de *P. torta*.

Tabela 9: Comparação dos dados de RMN de ¹³C de PmF-4.3 e PmF-4.4 com os dados da literatura para 3β-dodecanoil-28-hidroxil-olean-12-eno (WANG, *et al.*, 2009).

Posição	¹³ C/ DEPT	¹³ C:	¹³ C:	lit ¹³ C/ (δ)*	Posição	¹³ C/ DEPT	¹³ C:	¹³ C:	lit ¹³ C/ (δ)*
		PmF-4.3 (δ)*	PmF-4.4 (δ)*				PmF-4.3 (δ)*	PmF-4.4 (δ)*	
1	CH ₂	38,28	38,24	38,2	23	CH ₃	28,91	28,04	28,0
2	CH ₂	23,81	23,53	23,5	24	CH ₃	15,56	15,58	15,6
3	CH	80,55	80,54	80,5	25	CH ₃	16,75	16,73	16,7
4	C	37,76	37,75	37,7	26	CH ₃	16,80	16,78	16,8
5	CH	55,27	55,22	55,2	27	CH ₃	25,90	25,92	25,9
6	CH ₂	18,25	18,23	18,2	28	CH ₂	69,71	69,75	69,8
7	CH ₂	32,54	32,49	32,5	29	CH ₃	33,17	33,20	34,1
8	C	39,82	39,79	39,8	30	CH ₃	23,58	23,46	23,6
9	CH	47,52	47,48	47,5	1'	C	173,67	173,76	173,7
10	C	36,84	36,81	36,8	2'	CH ₂	34,86/34,82	34,07	34,9
11	CH ₂	23,54	23,59	23,5	3'	CH ₂	25,18	25,20	25,2
12	CH	122,31	122,29	122,3	4'-7'	CH ₂	29,69	29,69	29,7
13	C	144,22	144,22	144,2	8'	CH ₂	29,69	29,69	29,7
14	C	41,74	41,71	41,7	9'	CH ₂	29,69	29,69	29,7
15	CH ₂	25,55	25,52	25,5	10'	CH ₂	29,69	29,69:11'-13'	31,9
16	CH ₂	22,03	21,96	22,0	11'	CH ₂	29,69	31,97-14'	22,7
17	C	36,95	36,94	36,9	12'	CH ₂	29,69	21,96-15'	CH ₃ /14,1

18	CH	42,36	42,34	42,3	13'-19'	CH ₂	29,69	CH ₃ /14,10-16'
19	CH ₂	46,47	46,40	46,4	20'	CH ₂	31,92	
20	C	30,94	30,97	31,0	21'	CH ₂	22,57/22,67	
21	CH ₂	34,10	34,07	34,1	22'	CH ₃	14,03/14,09	
22	CH ₂	31,04	31,04	31,0				

* CDCl₃.

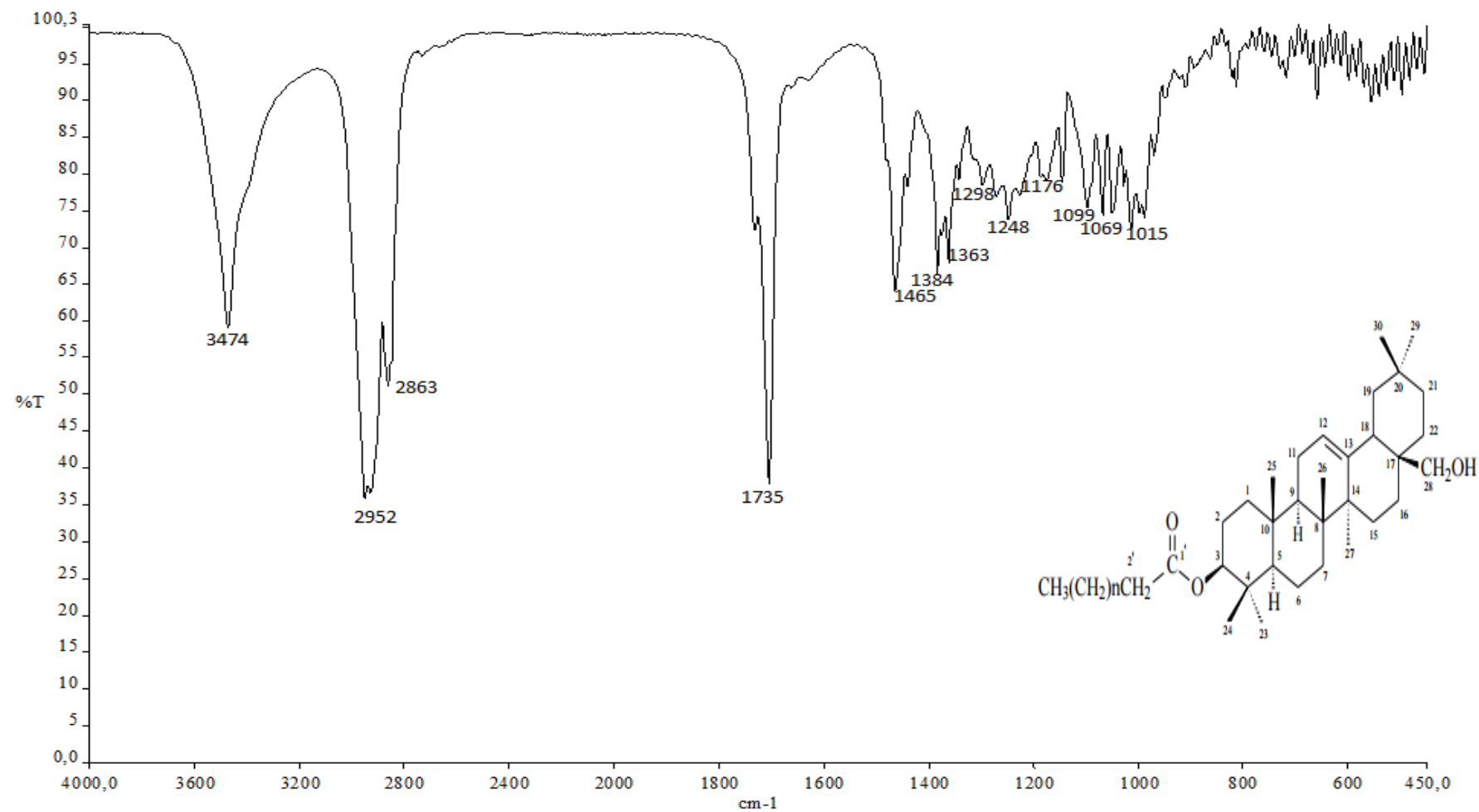
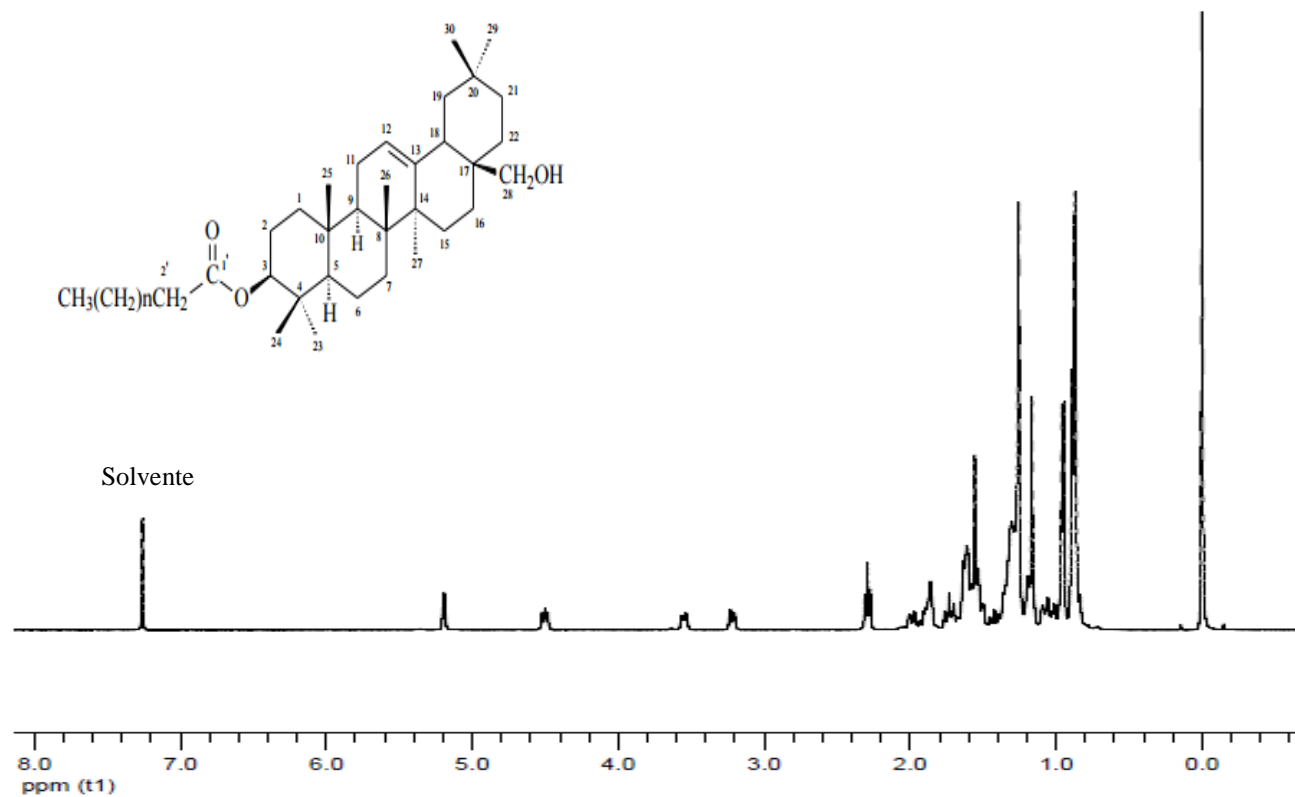


Figura 45:Espectro na região do IV de PmF-4.3 (KBr), região de 4000 a 450 cm⁻¹.



Date:
 12 Aug 2016
Document's Tide:
 1r
Spectrum Tide:
 PmF-4.3 H
Frequency (MHz):
 (f1) 400.180
Original Points Count:
 (f1) 65536
Actual Points Count:
 (f1) 65536
Acquisition Time (sec):
 (f1) 8.1789
Spectral Width (ppm):
 (f1) 20.023
Pulse Program:
 Unknown

Figura 46:Espectro de RMN de ¹H (400 MHz) de PmF-4.3 em CDCl₃.

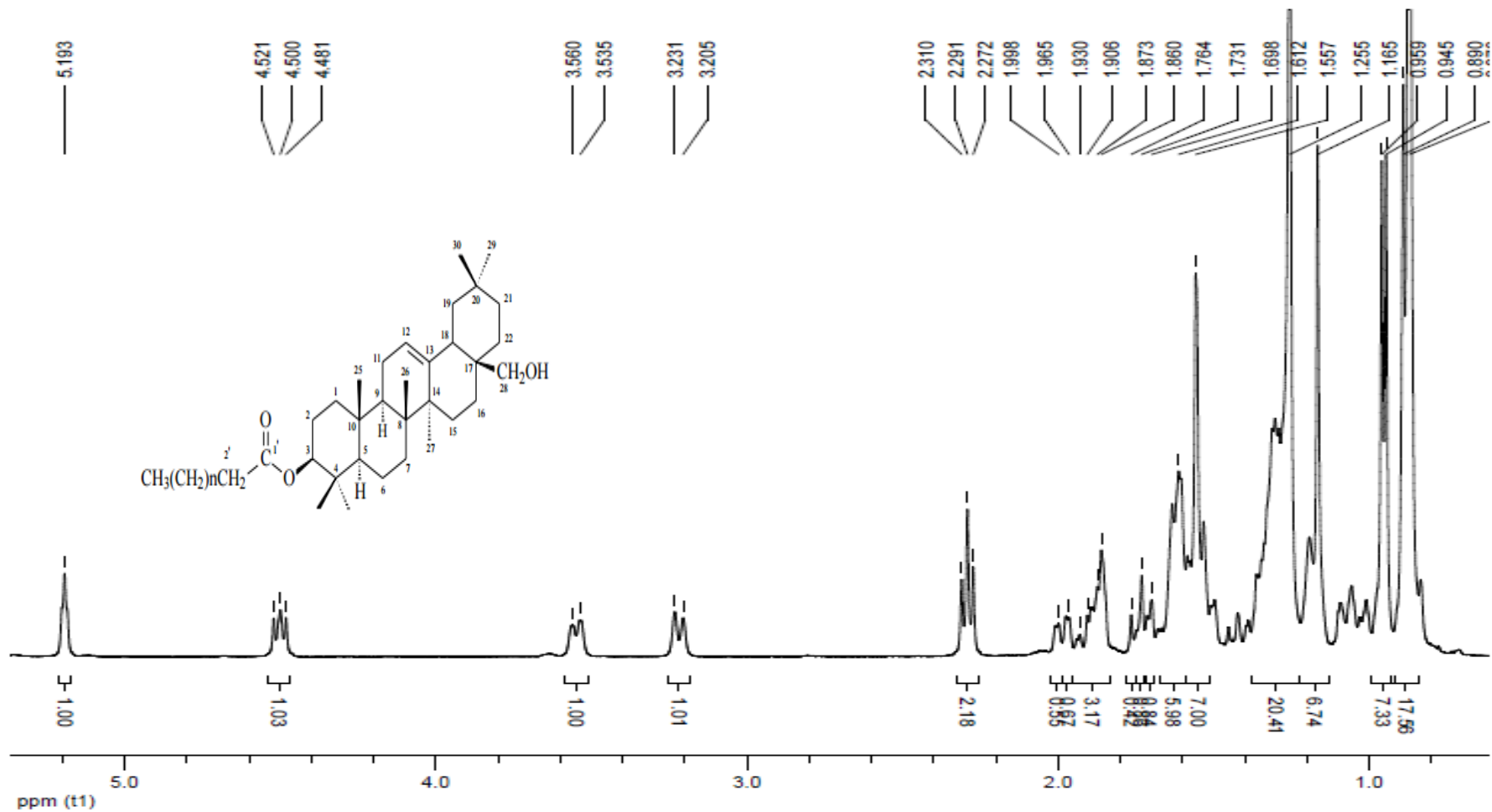


Figura 47: Ampliação (0,4-6 ppm) do espectro de RMN RMN de ^1H (400 MHz) de PmF-4.3 em CDCl_3 .

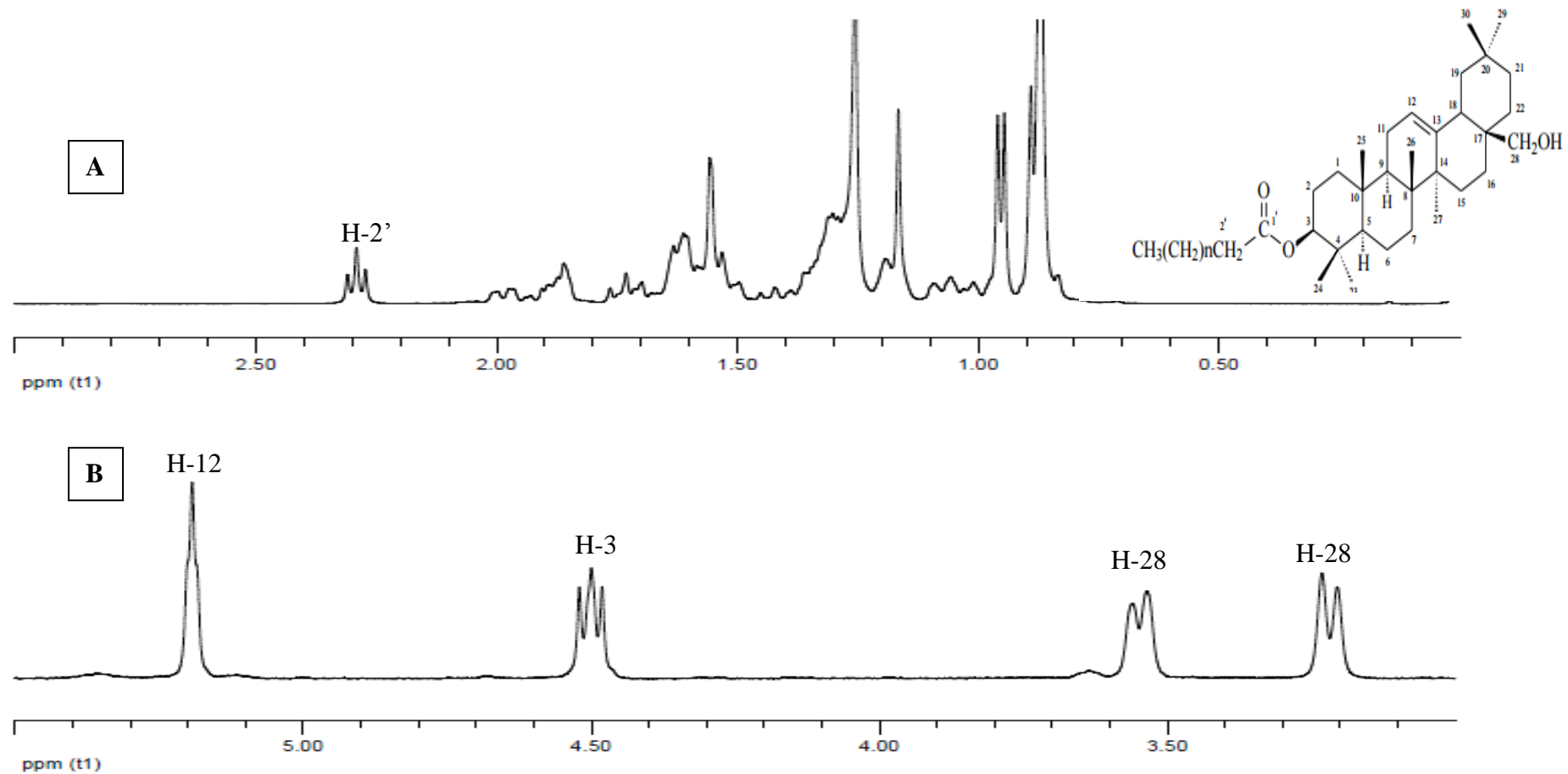


Figura 48: Expansões do espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz) de PmF-4.3 em CDCl_3 . A - ampliação de (3,0-1,0 ppm); B - ampliação de (5,5-3,0 ppm).

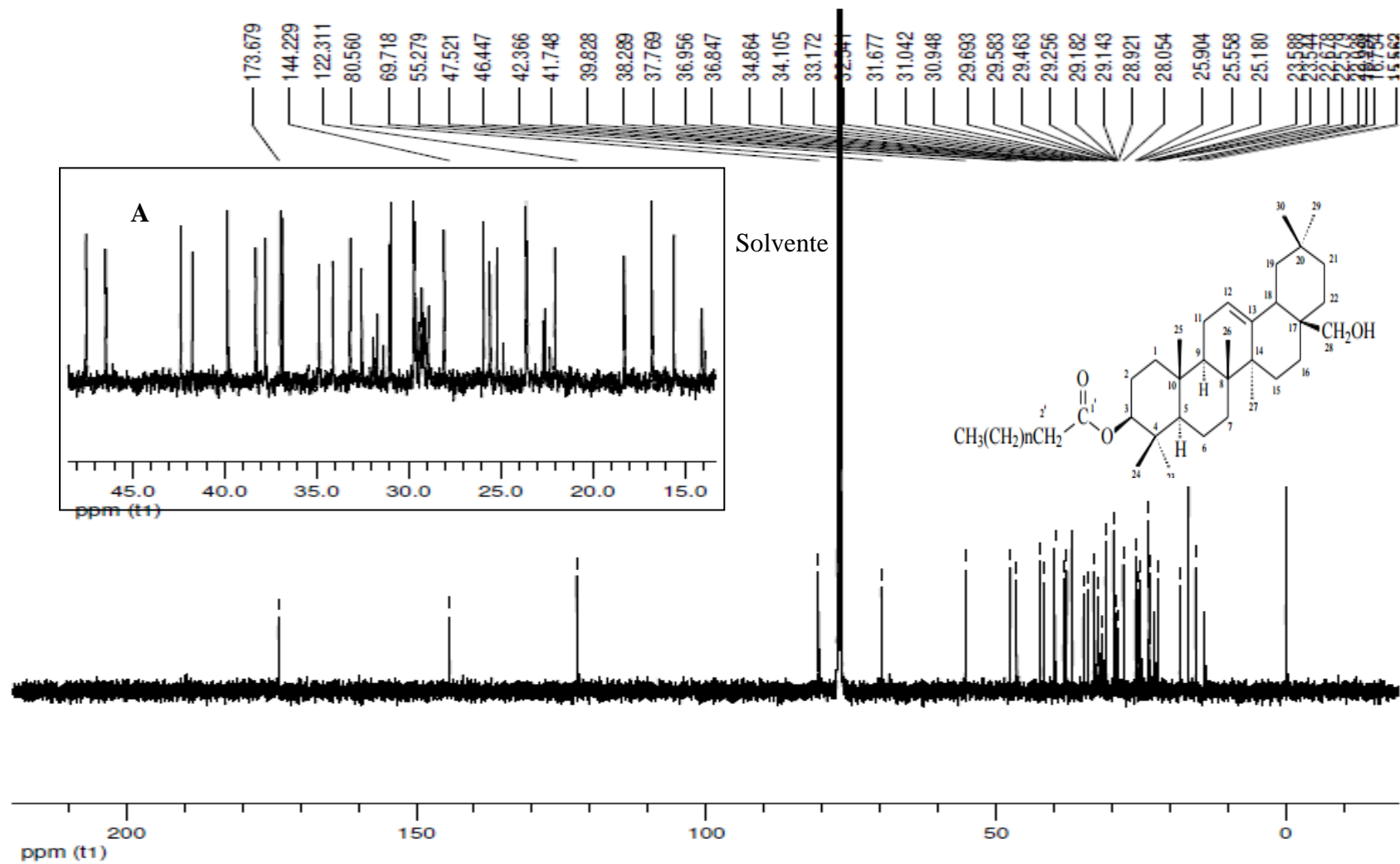


Figura 49: Espectro de RMN de ¹³C (100 MHz) de PmF-4.3 em CDCl₃. A - ampliação de (14-48 ppm).

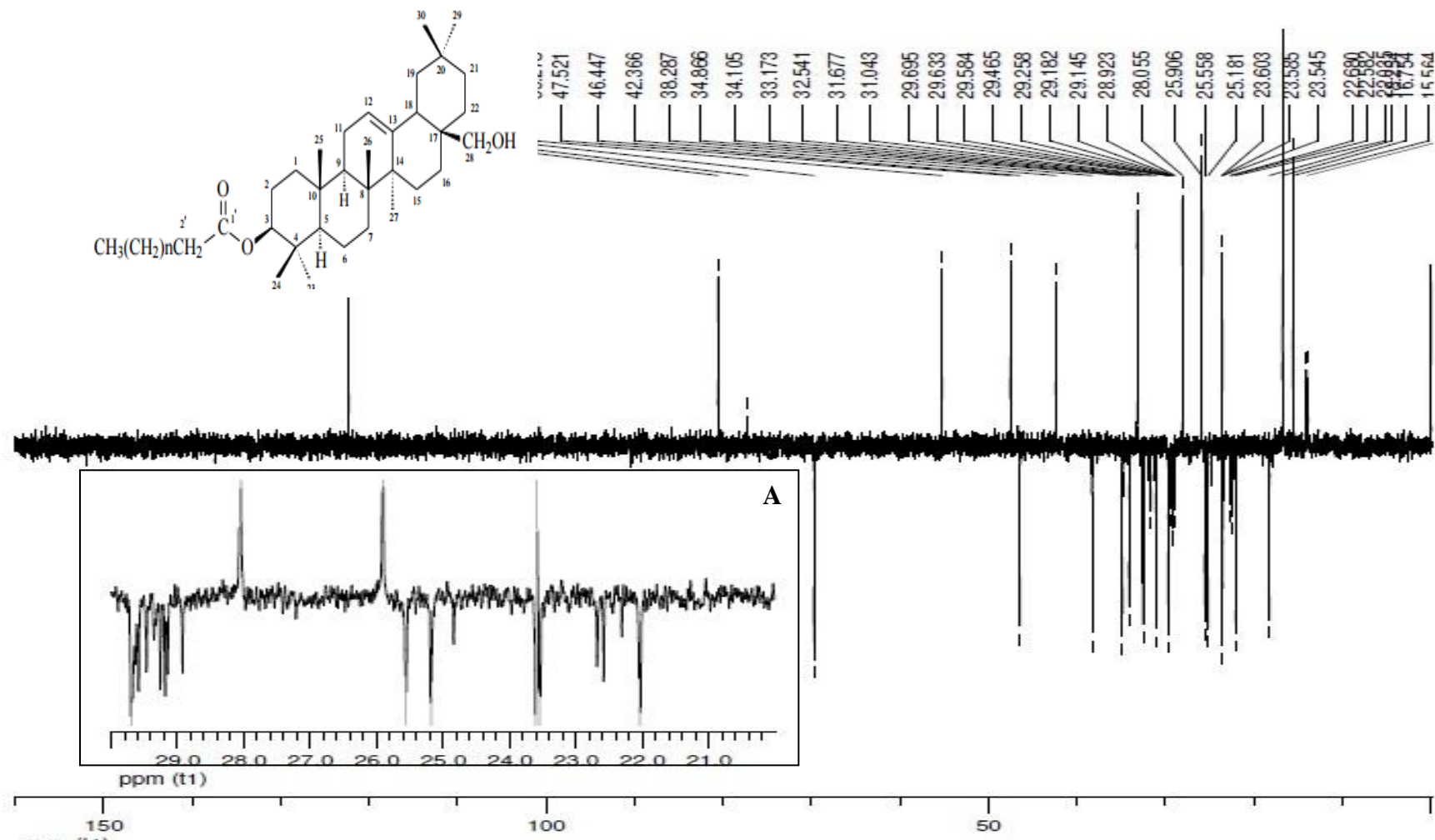


Figura 50: Espectro DEPT-135 (100 MHz) de PmF-4.3 em CDCl_3 . A- ampliação (21-30 ppm).

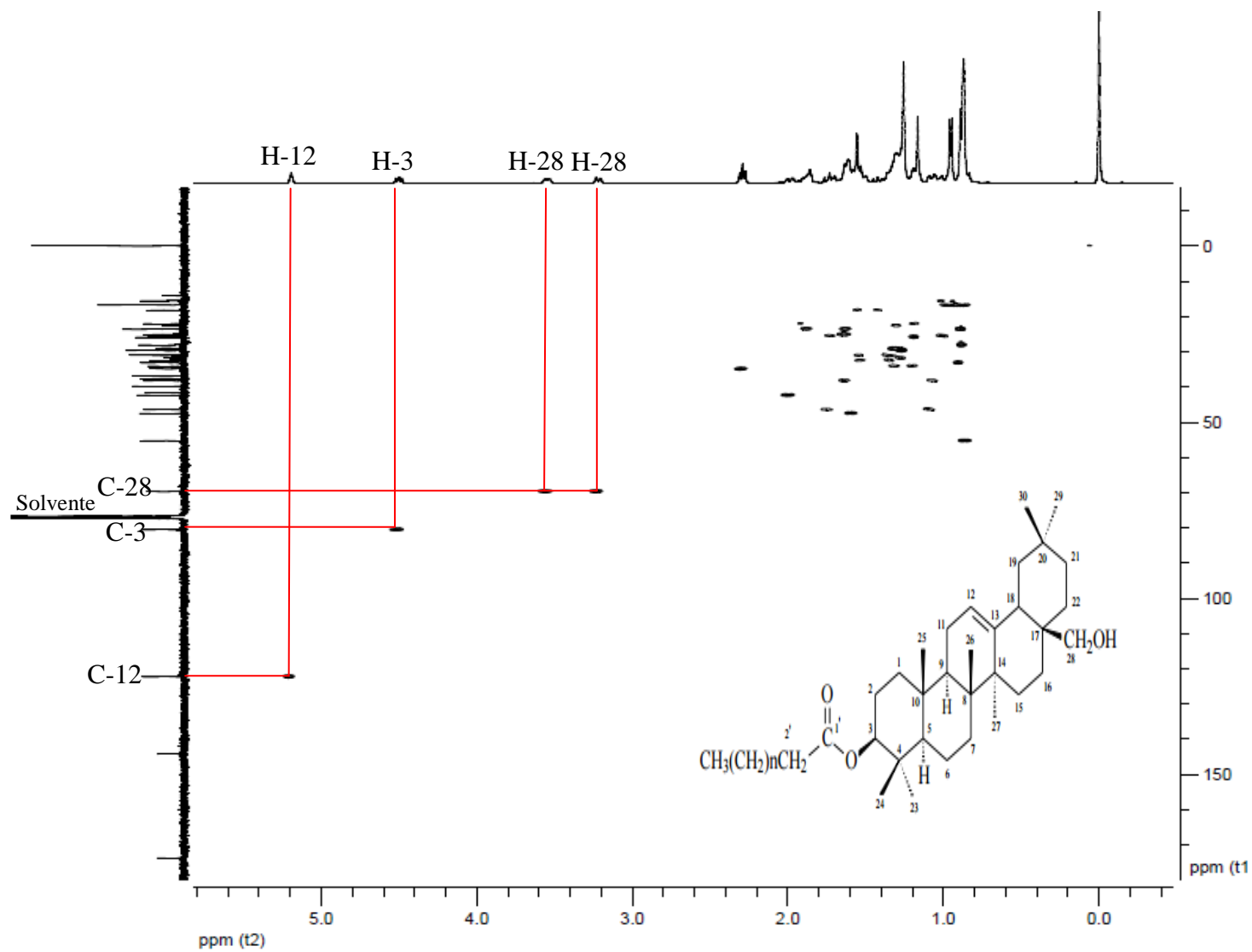


Figura 51: Correlação de H-C observadas no mapa de contornos HSQC (400 MHz, CDCl_3) de PmF-4.3.

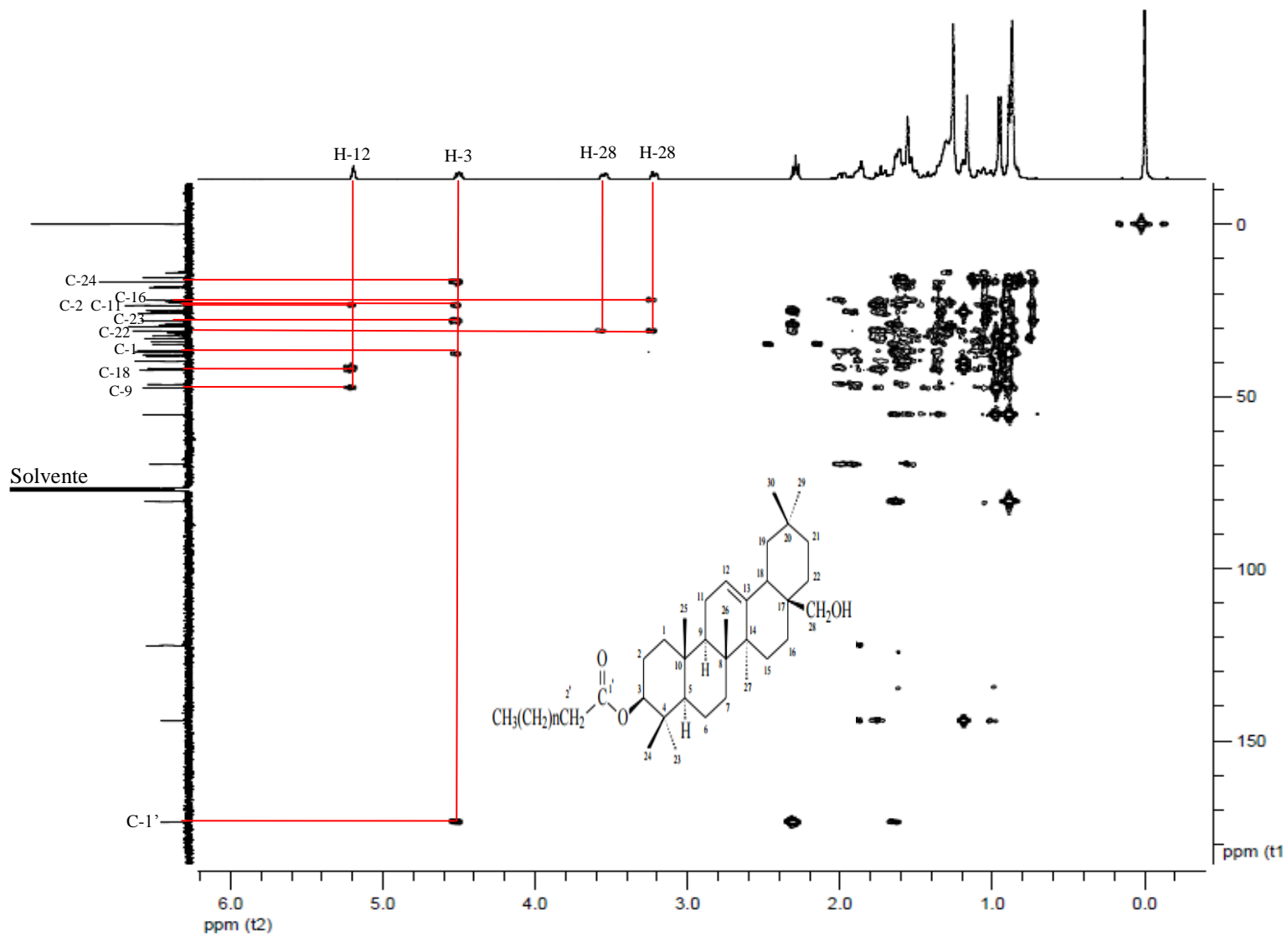


Figura 52: Principais correlações de H-C observadas no mapa de contornos HMBC (400 MHz, CDCl_3) de PmF-4.3.

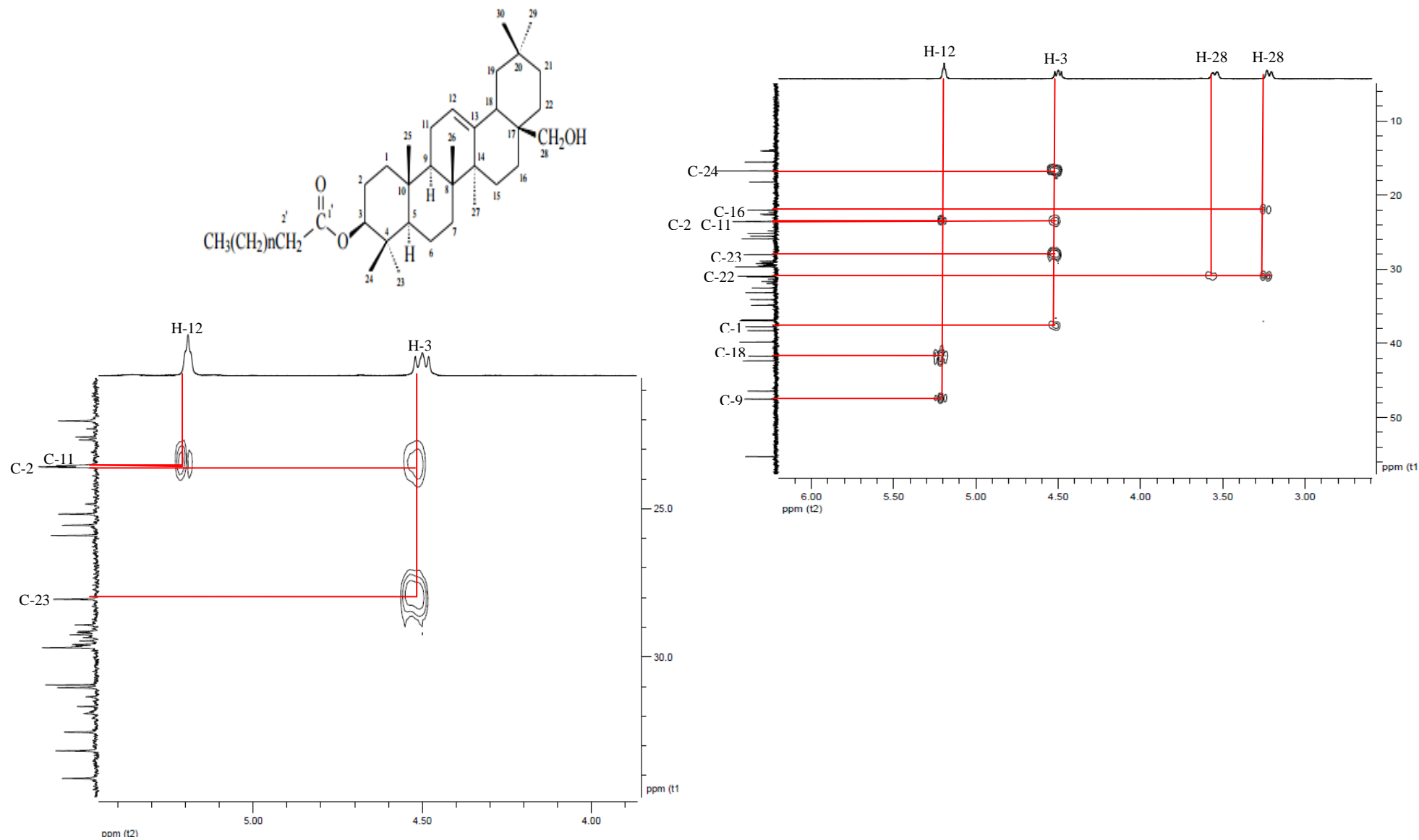
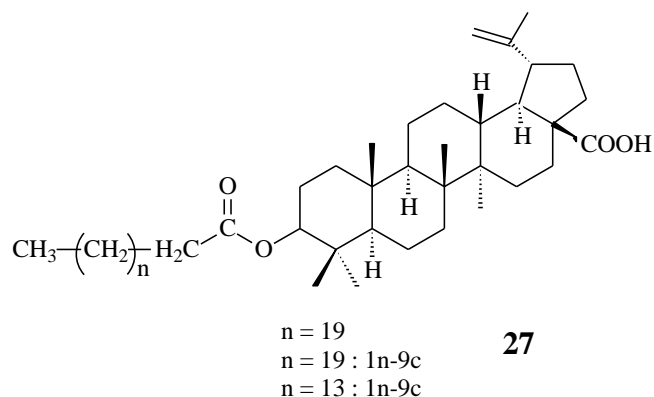


Figura 53: Correlações de H-C observadas no mapa de contornos HMBC (400 MHz, CDCl_3) de PmF-4.3.

5.4.5. Determinação estrutural de PmF-6.1: mistura de behenato, erucicato e palmitoleicoato de ácido betulínico



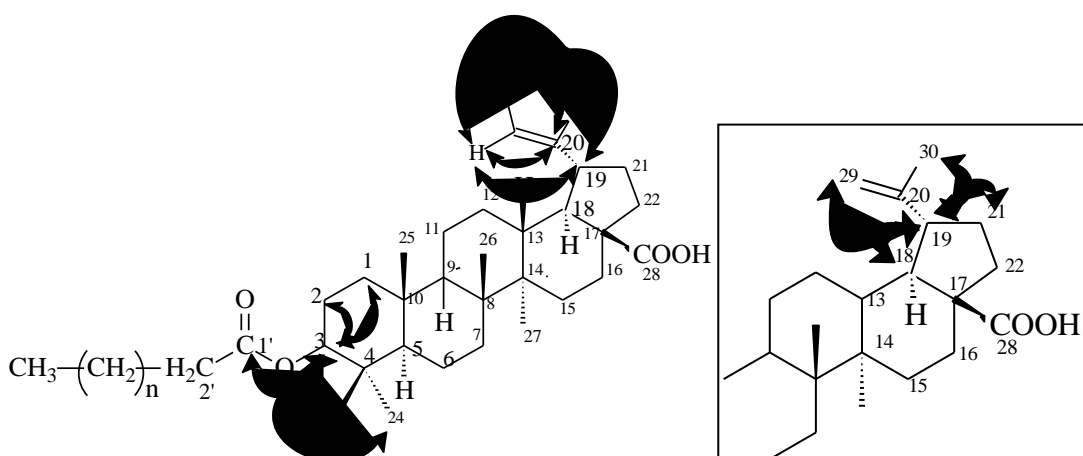
PmF-6.1 foi isolado por cromatografia em coluna da fração hexânica, oriunda do extrato etanólico de *P. macahensis*, sendo purificado por recristalização em metanol, conforme descrição na página 43 e 44. Foi obtido como um sólido branco, amorfo ($m = 0,0291$ g) solúvel em CHCl_3 e com faixa de fusão de $212-215^\circ\text{C}$.

O espectro no infravermelho de **PmF-6.1** (Figura 55, Página 94) mostrou absorção em 3421 cm^{-1} , característica de estiramento de ligação OH de hidroxila de grupo ácido, em 2920 cm^{-1} , absorção forte característica de estiramento assimétrico de ligação CH de grupos CH_2 alifáticos; 2850 cm^{-1} característico de estiramento simétrico de ligação C-H de grupos CH_2 e CH_3 alifáticos; 1700 e 1729 cm^{-1} estiramento de C=O de éster e ácido carboxílico. Apresentou ainda absorção média em 1458 e 1376 cm^{-1} característica de deformação angular no plano de ligação simples CH de compostos alifáticos.

O espectro de RMN de ^1H de **PmF-6.1** (Figura 56 e 57, Página 95 e 96) apresentou sinal entre $\delta_{\text{H}} 0,8$ e $\delta_{\text{H}} 1,7$ característicos de grupos metílicos (CH_3) em estruturas triterpênicas, sinal simples e intenso presente em $\delta_{\text{H}} 1,26$ característico de hidrogênio metilênico (CH_2) de H-C de cadeia longa, e um tripleto definido em $\delta_{\text{H}} 2,28$ (2H , $J = 7,5$ Hz) equivalente ao hidrogênio H-2' vizinho a C=O do éster do triterpeno. Além desses, foram observados um sinal simples e intenso em $\delta_{\text{H}} 1,24$, que foi atribuído a hidrogênio metilênico de ácidos graxos de cadeia longa. O sinal em $\delta_{\text{H}} 4,46$ (1H , dd, $J_1 = 5,8$ e $J_2 = 10,2$ Hz) foi atribuído ao H-3 de hidrogênio oximetínico, sugerindo composto com C-3 esterificado (WANG *et al.*, 2009). A presença de dois singletos largo definidos em $\delta_{\text{H}} 4,61$ e $\delta_{\text{H}} 4,73$ correspondentes aos hidrogênios da ligação dupla terminal no C-29, sugeriu um esqueleto do ácido betulínico esterificado.

O espectro de RMN de ^{13}C (Figura 58 e 59, Página 97 e 98) de **PmF-6.1** apresentou 30 sinais de átomos de carbono de esqueleto triterpênico, além de sinais de carbono de éster graxo. Os sinais em δ_{C} 109,70 e δ_{C} 150,22 são característicos de carbono olefínico, referentes ao C-29 e C-20. O sinal em δ_{C} 180,75 referente ao carbono de ácido carboxílico (C-28) reforça que o esqueleto da estrutura seja triterpeno pertencente a série dos lupanos, tratando-se do ácido betulínico (PENG *et al.*, 1998) (Tabela 10, Página 93). O sinal em δ_{C} 173,71 (C-1') confirma a presença da esterificação, juntamente com o sinal em δ_{C} 80,50 referente ao carbono oximetínico (C-3). Sinais de cadeia longa de éster foram observadas em δ_{C} 34,23 (CH_2 , C-2'), δ_{C} 14,62 (CH_3 -22'), δ_{C} 29,60 (CH_2 n) (WANG *et al.*, 2009). O experimento de HSQC foi utilizado para correlacionar os hidrogênios aos respectivos carbonos (Figura 60, Página 99).

As correlações observadas no espectro $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ HMBC (Figura 61-64, Página 100-103) confirmaram a ligação dupla terminal em C-29 / C-20, pelas correlações dos sinais em δ_{H} 4,73 e 4,61 (1H, s, H-29) com δ_{C} 30 (19,35), 20 (150,36) e 19 (46,93). Correlações do sinal em δ_{H} 4,46 (1H, dd, $J = 5,8$ Hz, H-3) com os sinais em δ_{C} 38,43 (C-1), 23,30 (C-2), 28,91 (C-23), 16,05 (C-24) e 173,71 (C-1') confirmam a esterificação no carbono C-3. Outras correlações foram observadas, com o sinal em δ_{H} 3,09 (1H, m, H-19) e δ_{C} 19,35 (C-30), 31,20 (C-21), 49,13 (C-18) e 109,70 (C-29). Os deslocamentos químicos foram compatíveis com os valores reportados por Peng *et al.*, 1998 (Tabela 10, Página 93). Esses dados sugerem que **PmF-6.1** seja o ácido betulínico esterificado com ácido graxo de cadeia longa.



A fim de identificar o éster graxo da estrutura, o sólido foi submetido à reação de transesterificação na presença de MeONa, conforme metodologia descrita (página 35). O cromatograma CG-FID dos ésteres metílicos forneceu sinais com t_{R} 21,137 e t_{R} 33,721 e

34.724 min, que ao ser comparado com padrões de FAME (seguindo as mesmas condições cromatográficas), Tabela 6, sugerem tratar-se do éster metílico do ácido behênico (C22:0), ácido eurúico (C-22:1n9) e ácido palmitoleico (C16:1n9c).

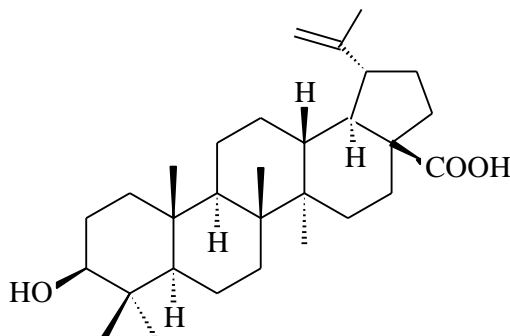
Os dados analisados, juntamente com a faixa de fusão e os dados de RMN de ^{13}C da literatura (PENG *et al.*, 1998 e WANG *et al.*, 2009), (Tabela 10, página 93) permitiram identificar o sólido isolado **PmF-6.1** como mistura de behenato, erucicato e paltitoleicoato do ácido betulínico.

PmF-6.1 nunca foi isolado no gênero. Ragasa *et al.* (2011) isolaram de *P. campechiana* uma mistura de sitosterol e éster metílico do ácido betulínico.

Determinação do ácido betulínico

Após neutralização da fase aquosa, seguida de extração com CH_2Cl_2 , foi obtido um sólido branco. O experimento de RMN desse sólido apresentou diferenças, quando comparado ao triterpeno esterificado (**PmF-6.1**).

Após comparação dos espectros no IV de **PmF-6.1** e do ácido betulínico, foi observado que o ácido betulínico (Figura 54, Página 93) apresentou bandas de absorções intensa e média em: 3421 cm^{-1} característico de estiramento de ligação OH de hidroxila; 2918 cm^{-1} característico de estiramento assimétrico de ligação CH de grupos CH_2 alifáticos; 2849 cm^{-1} característica de estiramento simétrico de ligação C-H de grupos CH_2 e CH_3 alifáticos, ausência da absorção em 1729 atribuída a estiramento C=O de éster alifático e presença da absorção em 1718 cm^{-1} atribuída a C=O de ácido carboxílico. Apresentou ainda absorção em 1437 e 1376 cm^{-1} característica de deformação angular no plano de ligação simples CH de compostos alifáticos, caracterizando o composto como ácido betulínico.



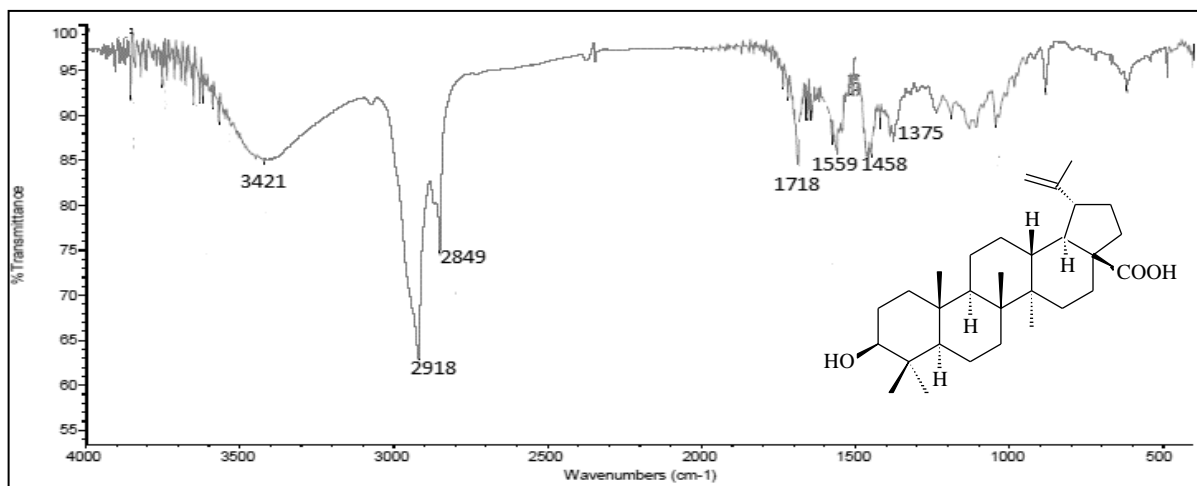


Figura 54: Espectro na região do IV do ácido betulínico (KBr), região 4000 a 500 cm^{-1} .

Tabela 10: Comparação dos dados de RMN de ^{13}C de PmF-6.1 com os dados da literatura para o ácido betulínico (PENG, *et al.*, 1998).

Posição	$^{13}\text{C}/$ DEPT	δ^{C} (δ)*	lit $\delta^{\text{C}}/$ (δ)*	Posição	$^{13}\text{C}/$ DEPT	δ^{C} (δ)*	lit $\delta^{\text{C}}/$ (δ)*
1	CH ₂	38,43	39,3	23	CH ₃	27,97	28,7
2	CH ₂	23,30	23,3	24	CH ₃	16,05	16,3
3	CH	80,61	78,1	25	CH ₃	16,16	16,4
4	C	38,41	39,5	26	CH ₃	16,53	16,4
5	CH	55,46	56,0	27	CH ₃	14,67	14,9
6	CH ₂	18,18	18,8	28	C	180,75	178,8
7	CH ₂	34,28	34,9	29	CH ₂	109,70	109,9
8	C	40,74	41,1	30	CH ₃	19,35	19,5
9	CH	50,44	51,0	1'	C	173,71	
10	C	37,15	37,5	2'	CH ₂	34,81/34,86	
11	CH ₂	20,88	21,2	3'	CH ₂	25,18	
12	CH ₂	25,48	26,1	4'-7'	CH ₂	29,69	
13	CH	38,35	38,6	8'	CH ₂	29,69	
14	C	42,45	42,9	9'	CH ₂	29,69	
15	CH ₂	30,58	30,3	10'	CH ₂	29,69	
16	CH ₂	32,17	32,9	11'	CH ₂	29,69	
17	C	56,34	56,6	12'	CH ₂	29,69	
18	CH	49,31	49,8	13'-19'	CH ₂	29,69	
19	CH	46,93	47,8	20'	CH ₂	31,92	
20	C	150,36	151,3	21'	CH ₂	22,57/22,67	
21	CH ₂	31,37	31,2	22'	CH ₃	13,88/14,02/14,08	
22	CH ₂	37,04	37,6				

* CDCl_3 .

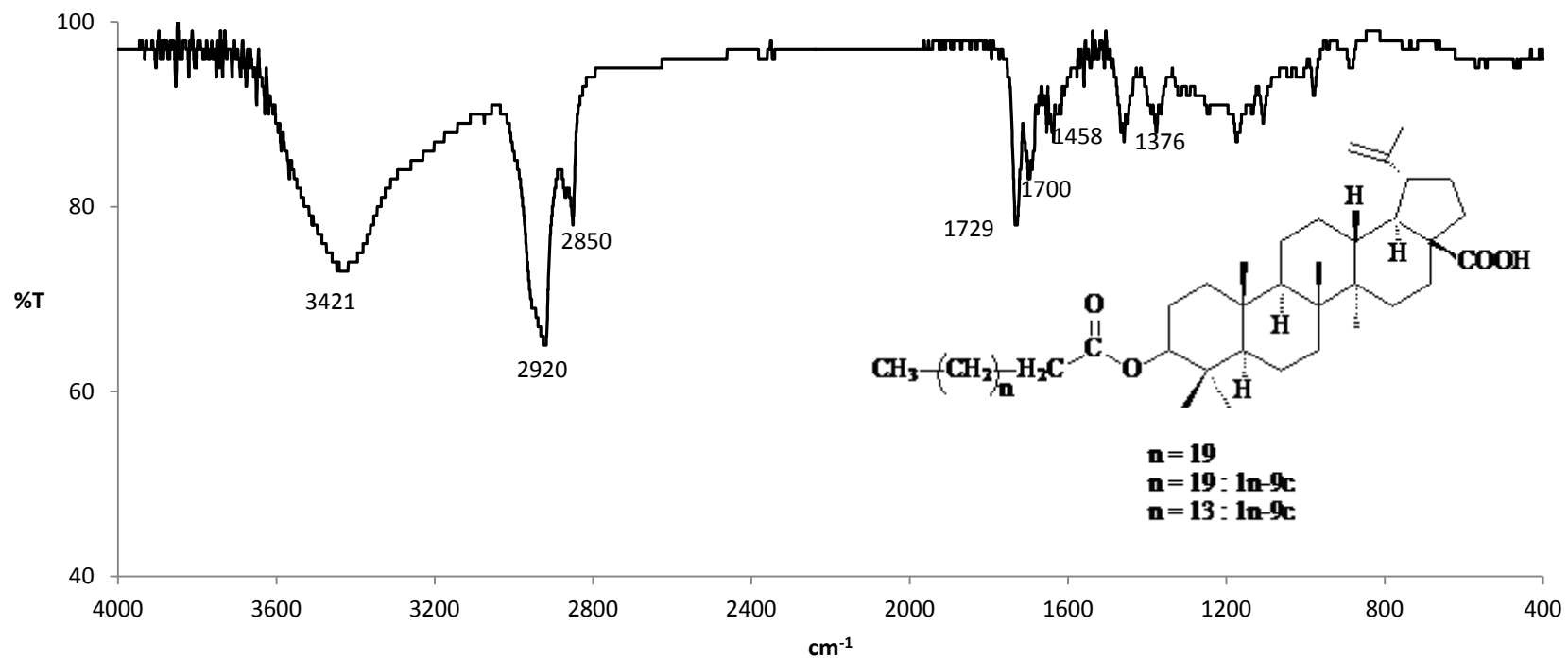
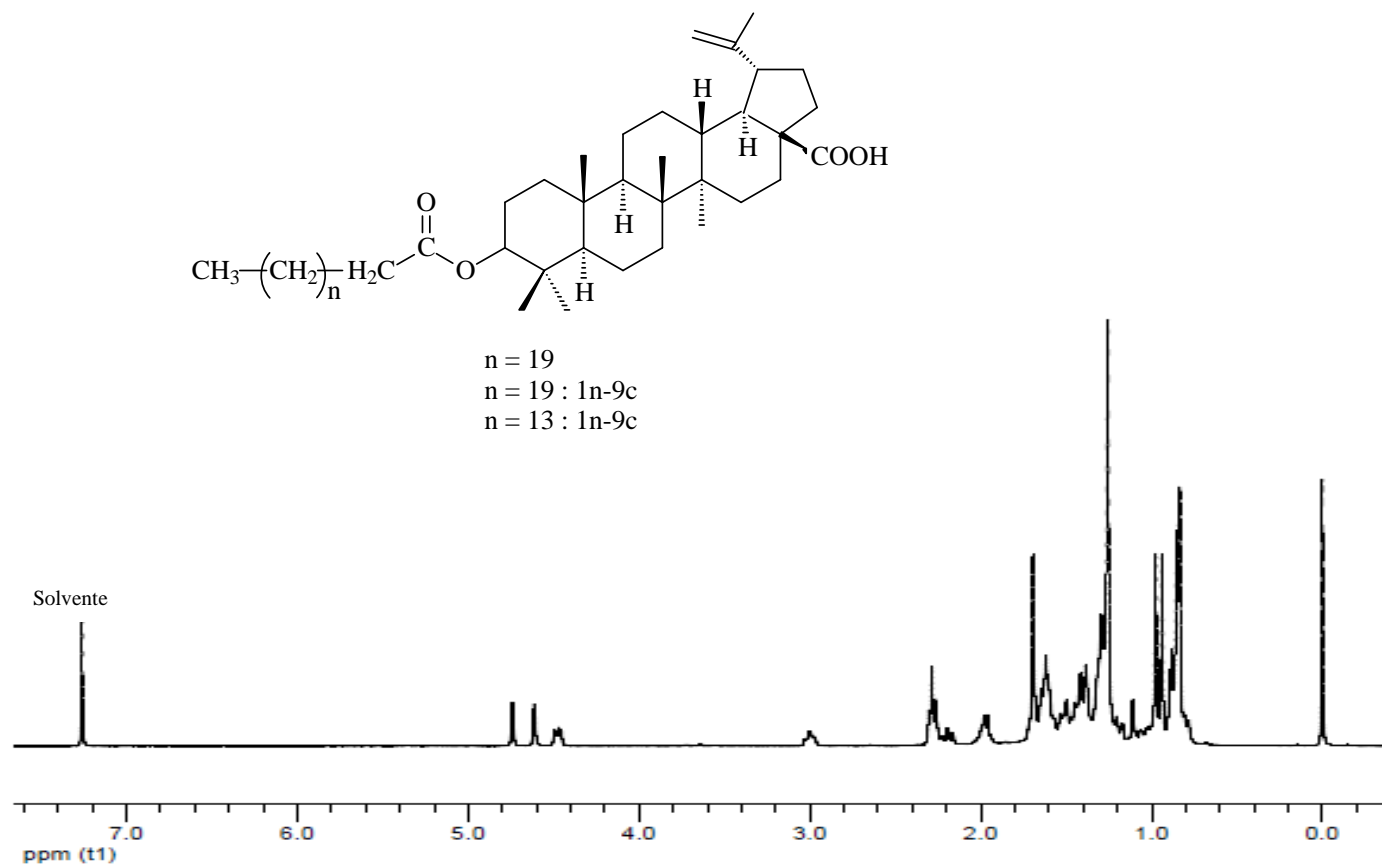


Figura 55: Espectro na região do IV de PmF-6.1(KBr), região de 4000 a 400 cm^{-1} .



Date:
 30 Jan 2017
 Document's Title:
 H

 Spectrum Title:
 PmF-6.1
 Frequency (MHz):
 (f1) 400.180
 Original Points Count:
 (f1) 65536
 Actual Points Count:
 (f1) 65536
 Acquisition Time (sec):
 (f1) 16.3840
 Spectral Width (ppm):
 (f1) 9.998
 Pulse Program:
 Unknown

Figura 56: Espectro de RMN de ^1H (400 MHz) de PmF-6.1 em CDCl_3 .

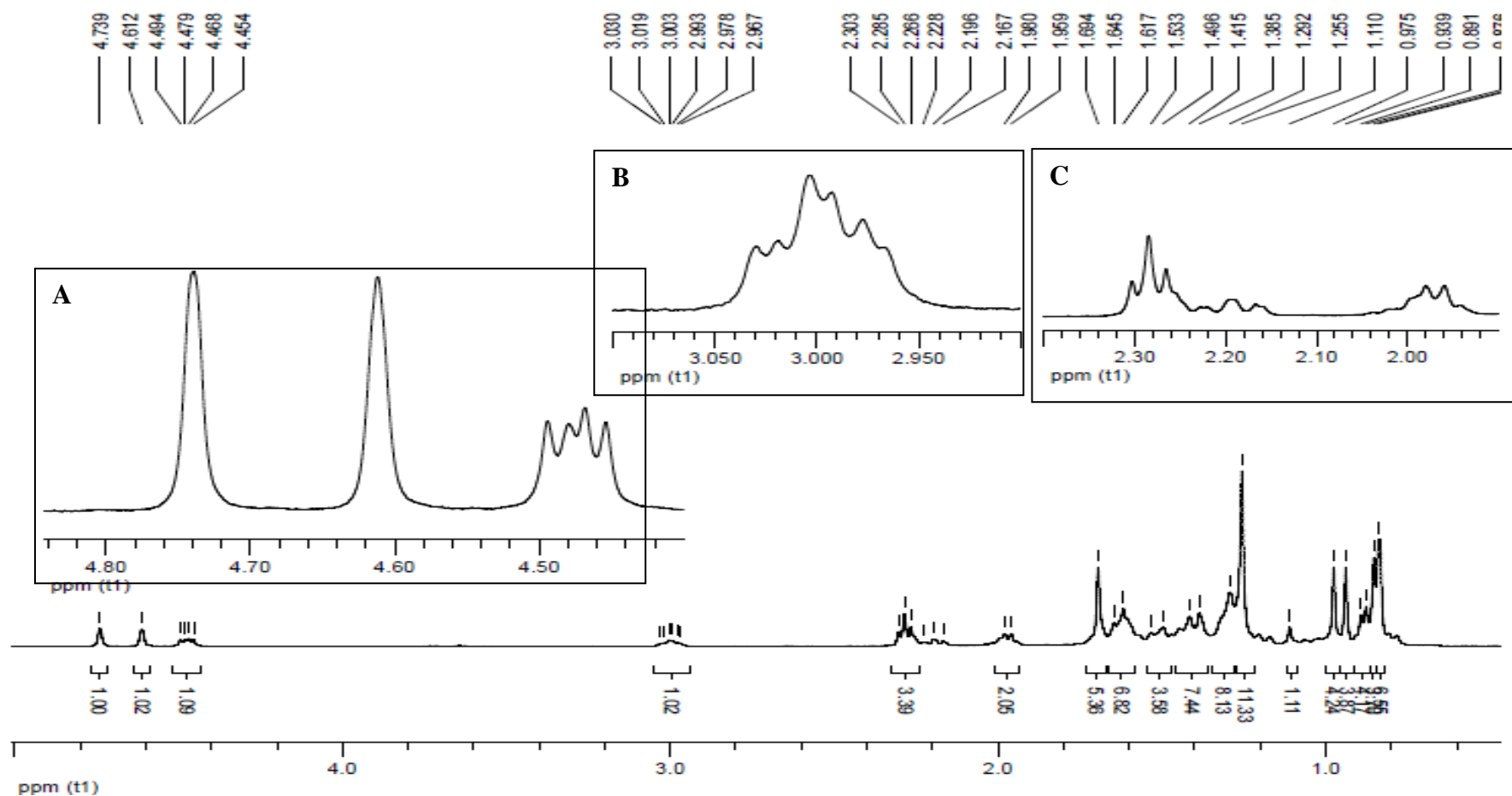


Figura 57: Ampliação (0,50- 4,5,00 ppm) do espectro de RMN de ^1H (400 MHz) em CDCl_3 de PmF-6.1. A- ampliação (4,40-4,80 ppm) B- ampliação (2,8 a 3,1 ppm) C- ampliação (1,90 – 2,40).

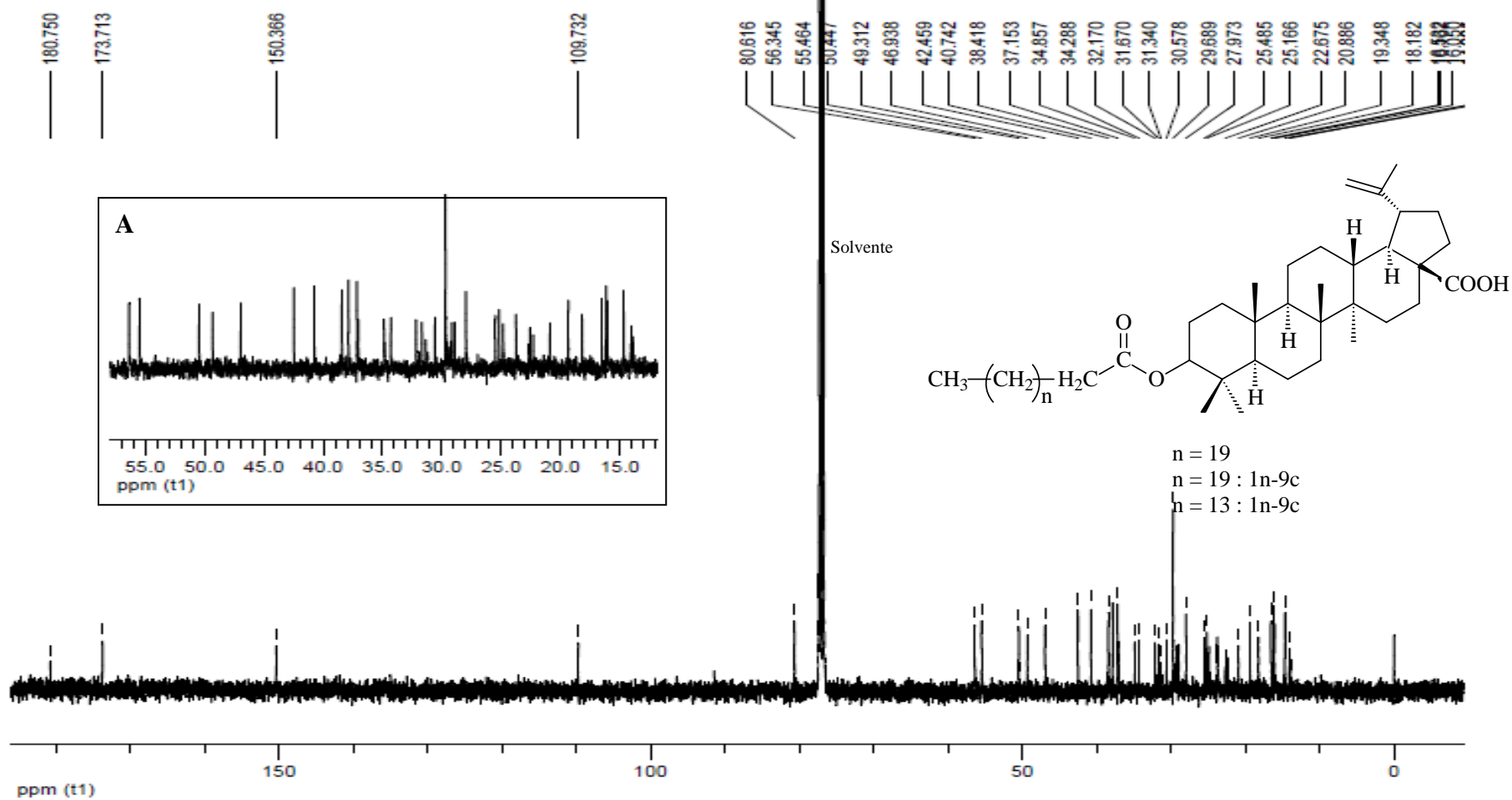


Figura 58: Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz) de PmF-6.1 em CDCl_3 . A - ampliação de (12-57).

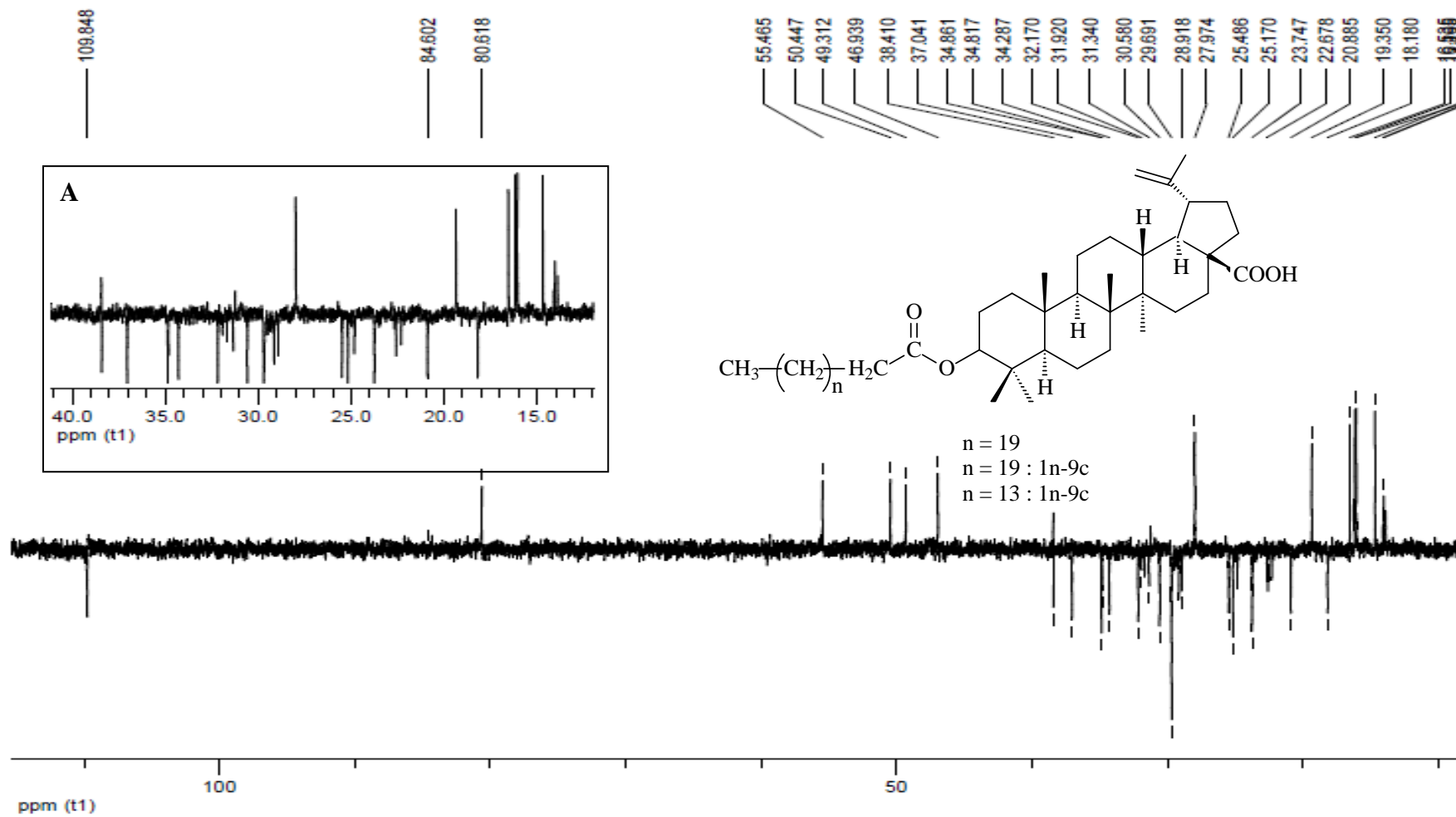


Figura 59: Espectro DEPT-135 (100 MHz) de PmF-6.1 em CDCl_3 . A - ampliação de (14-40 ppm).

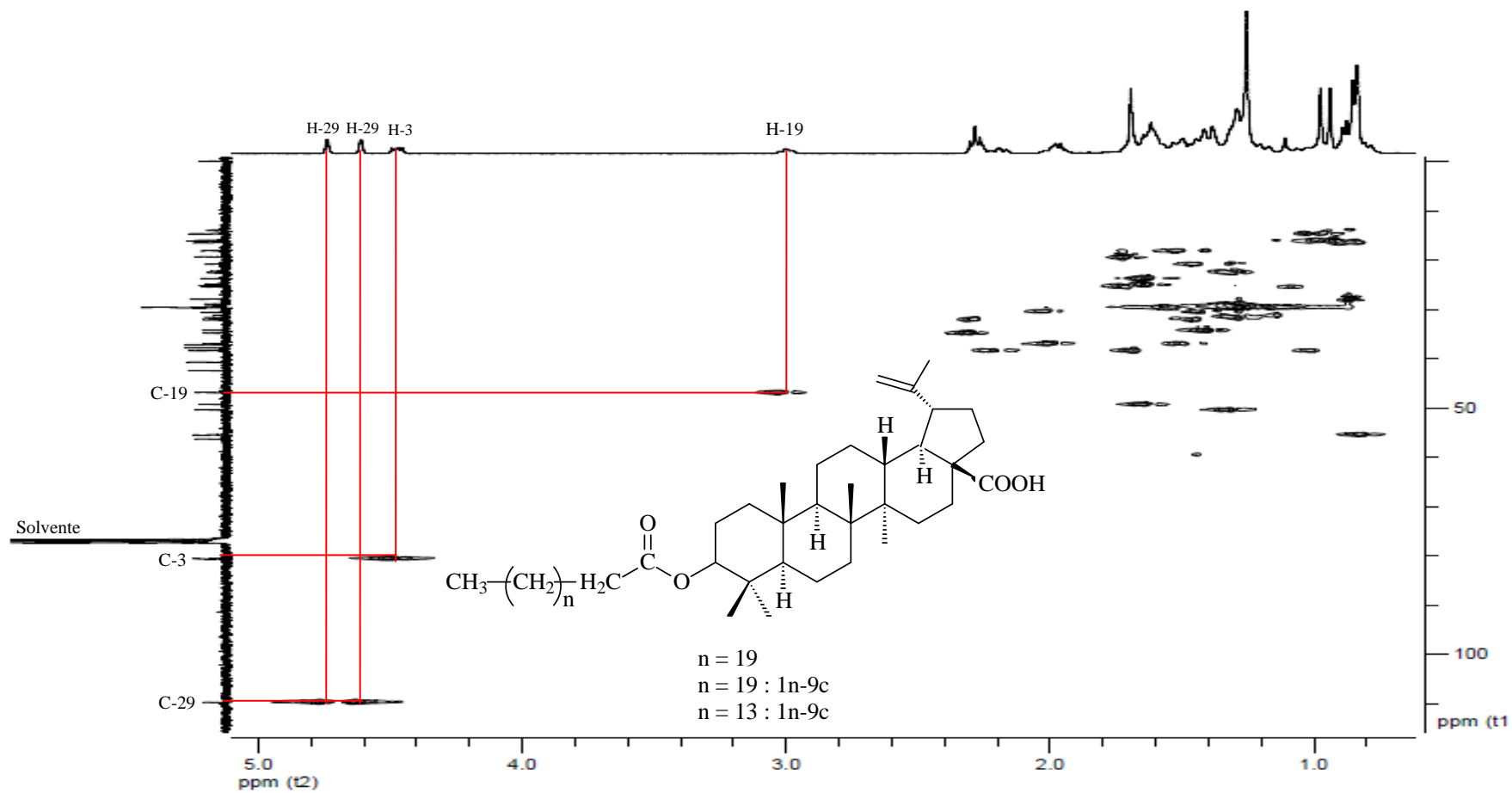


Figura 60: Principais correlações de H-C observadas no mapa de contornos HSQC (400 MHz, CHCl_3) de PmF-6.1.

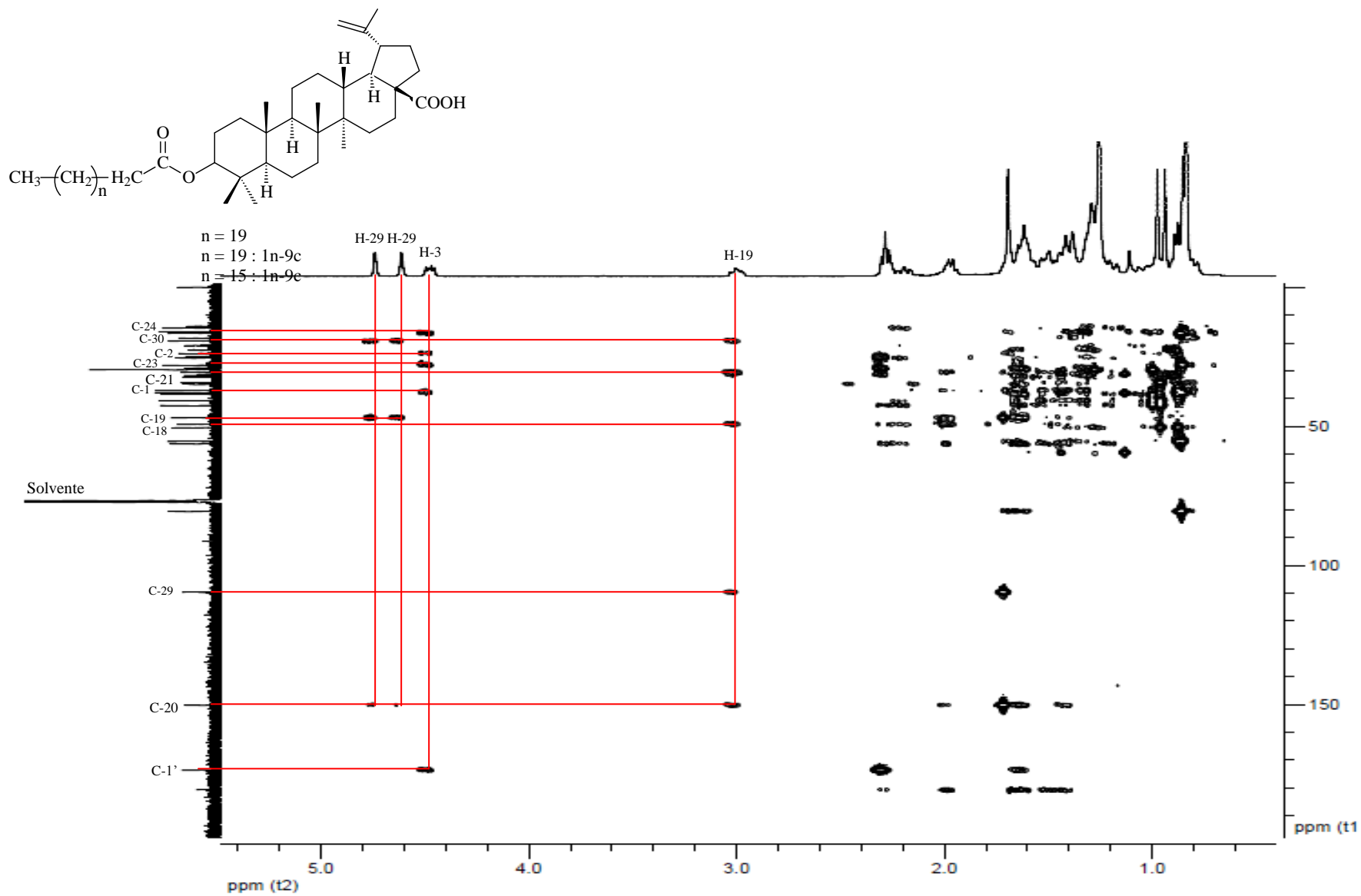


Figura 61: Principais correlações de H-C observadas no mapa de contornos HSQC (400 MHz, CHCl_3) de PmF-6.1.

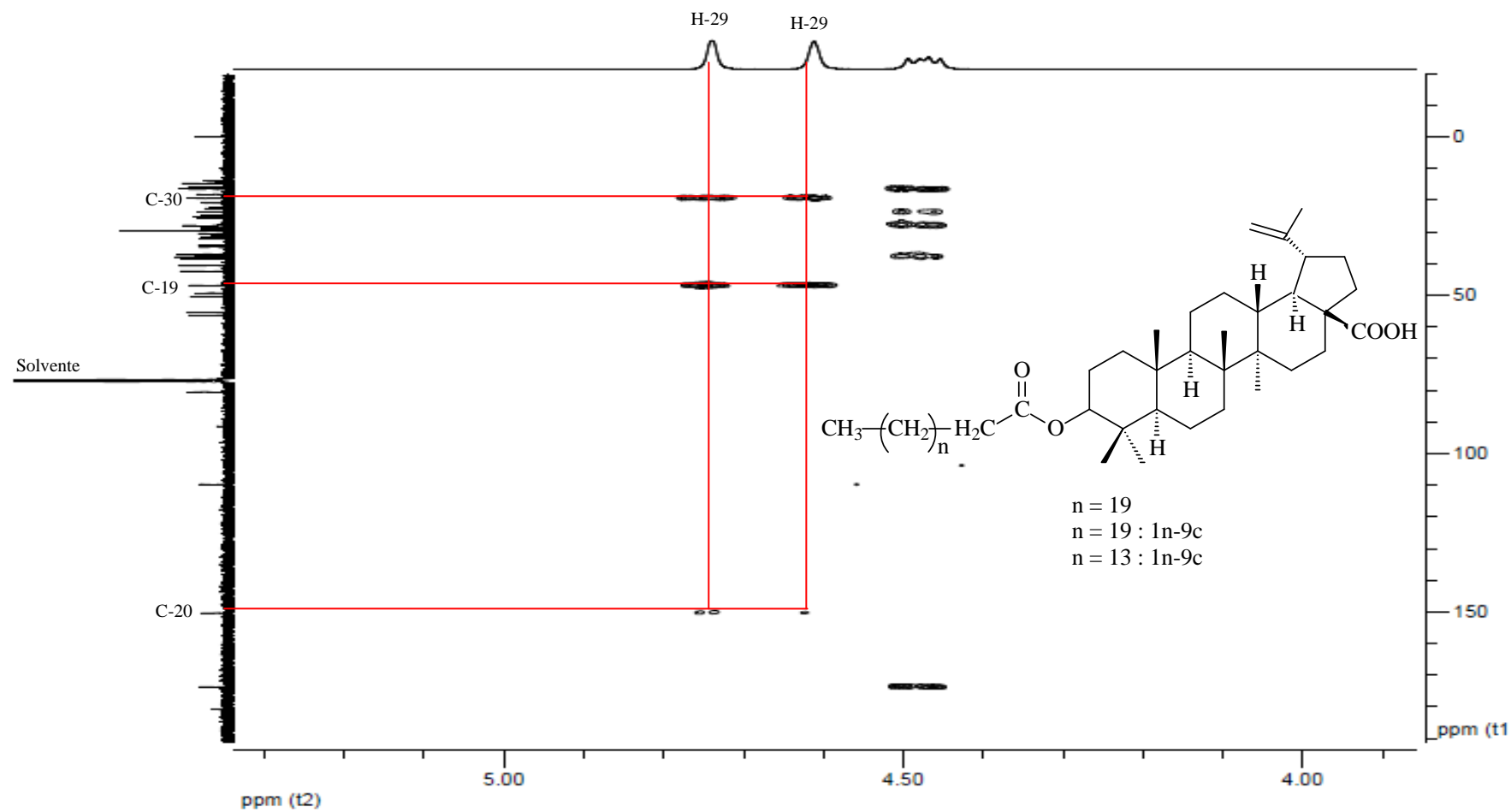


Figura 62:Ampliação do mapa de contornos HMBC (400 MHz, CHCl_3) de PmF-6.1.

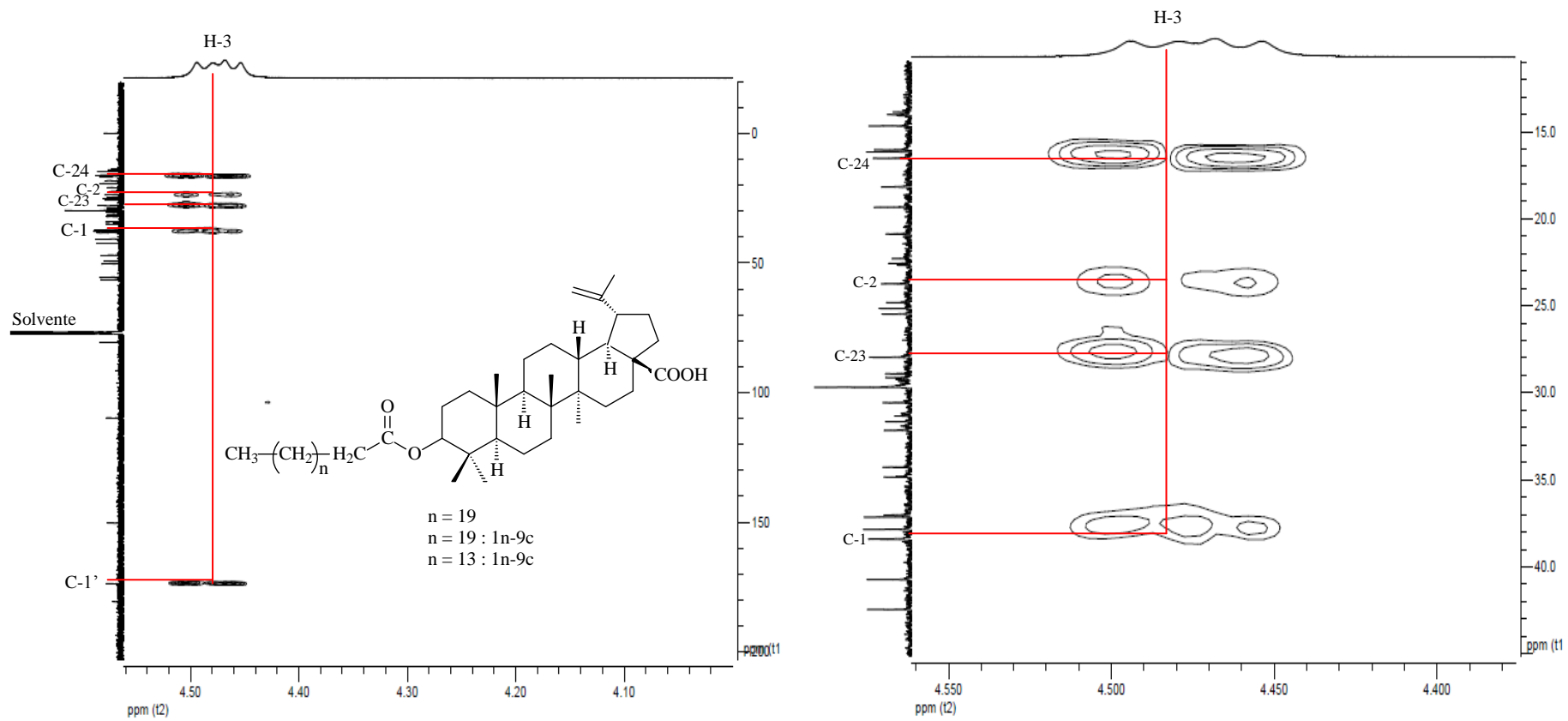


Figura 63: Ampliações do mapa de contornos HMBC (400 MHz, CHCl_3) de PmF-6.1.

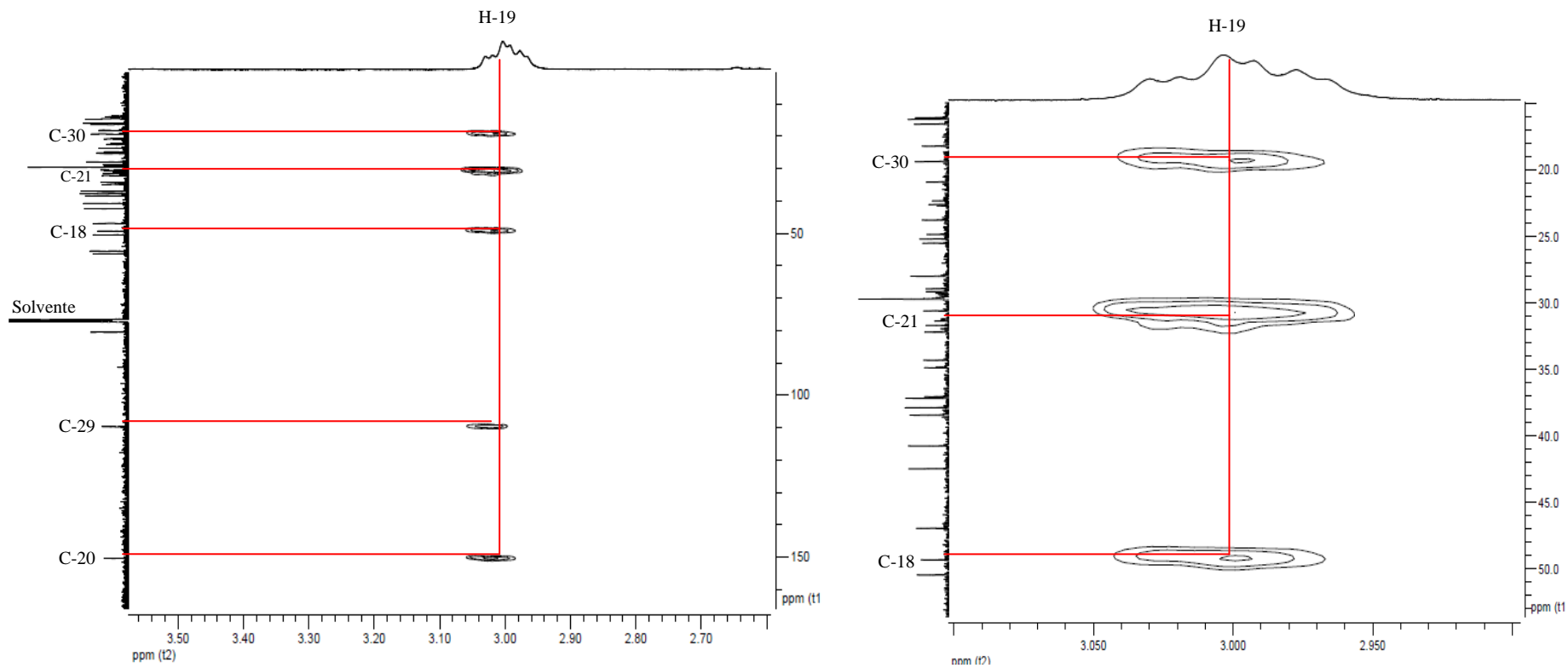
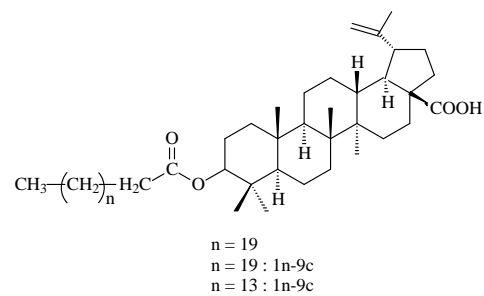
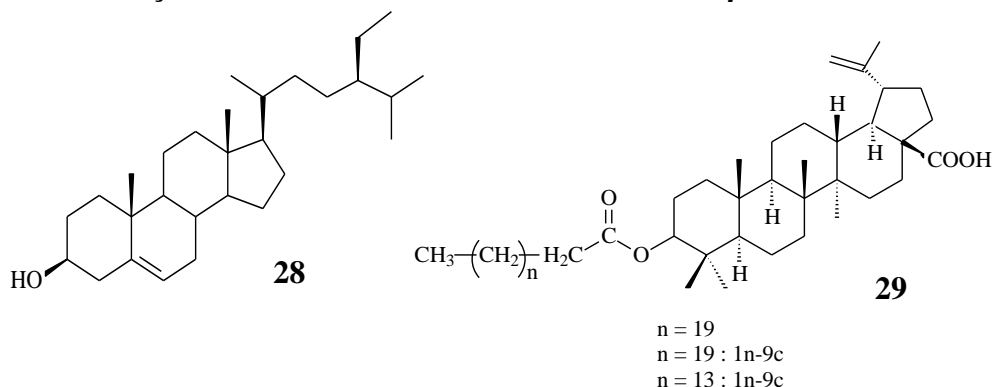


Figura 64: Ampliações do mapa de contornos HMBC (400 MHz, CHCl₃) de PmF-6.1.



5.4.6. Determinação estrutural de PmF-6: mistura rica em β -sitosterol



PmF-6 foi isolado por cromatografia em coluna da fração hexânica, oriunda do extrato etanólico de *P. macahensis*, sendo purificado por recristalização em acetona, conforme descrição na página 43 e 44. Foi obtido um sólido branco, amorfo ($m = 0,0231$ g) solúvel em CHCl_3 e com faixa de fusão de $181-184$ °C. O teste de Lieberman-Burchard foi positivo para esteróides.

O espectro no infravermelho de **PmF-6** (Figura 65, Página 106) mostrou bandas de absorção em 3437 cm^{-1} característica de estiramento de ligação OH de hidroxila, em 2940 cm^{-1} , absorção forte característica de estiramento assimétrico de ligação CH de grupos CH_2 alifáticos e em 2848 cm^{-1} , média, característica de estiramento simétrico de ligação C-H de grupos CH_2 e CH_3 alifáticos. Apresentou ainda bandas de absorção média em 1456 e 1374 cm^{-1} características de deformação angular no plano de ligação simples CH de compostos alifáticos e absorção média de carbonila em 1725 cm^{-1} .

O espectro de RMN de ^1H de **PmF-6** (Figura 66 e 68, Página 107 e 108) apresentou sinal entre $\delta_{\text{H}} 0,61$ e $\delta_{\text{H}} 2,37$ característicos de grupos metílicos, metilênicos e metínicos compatíveis para o esqueleto de esteroide e de triterpeno. Um multipletto em $\delta_{\text{H}} 3,52$ foi atribuído ao hidrogênio carbinólico H-3 do esteroide, o sinal e $\delta_{\text{H}} 5,35$ foi atribuído ao hidrogênio olefínico H-6 do esteroide. A presença de dois singletos largos definidos em $\delta_{\text{H}} 4,60$ e $\delta_{\text{H}} 4,73$ indicam a presença de hidrogênios de ligação dupla terminal em C-29 em esqueleto lupano, mais especificamente ao ácido betulínico. Os sinais em $\delta_{\text{H}} 4,47$ (1H, dd, $J_1 = 5,8$ $J_2 = 10,2$ Hz) atribuído ao H-3 de hidrogênio oximetínico e o multipletto em $\delta_{\text{H}} 3,09$ (1H, m, H-19) atribuído ao H-19 confirma a presença do ácido betulínico esterificado (Figura 70, Página 111).

O espectro de RMN de ^{13}C (Figura 68 e 69, Página 109 e 110) de **PmF-6** apresentou mais de 29 sinais. Seis metílicos, onze metilênicos, nove metínicos e dois C não hidrogenados

são referentes aos esteroides. O sinal em δ_C 80,61 foi atribuído ao carbono carbinólico C-3 do esteroide. O sinal em δ_C 173,27 refere-se ao carbono de éster e os vários sinais em δ_C 29,33 pertencem aos carbono metilênicos (CH_2) da cadeia alifática do ácido betulínico. Os dados analisados, juntamente com a faixa de fusão, comparação direta com a amostra autêntica de β -sitosterol e os dados de RMN de ^{13}C da literatura (CHATURVEDULA e PRAKASH, 2012), (Tabela 11, Página 99 e 100) permitiram identificar o sólido isolado **PmF-6** como uma mistura β -sitosterol e ácido betulínico esterificado. O β -sitosterol já foi isolado em mistura com um éster metílico do ácido betulínico das folhas de *P. campechiana* por Ragasa *et al.*, (2011).

Tabela 11: Comparação dos dados de ^{13}C de PmF-6 com dados da literatura para β -sitosterol (CHATURVEDULA e PRAKASH, 2012) e ácido betulínico (PENG, *et al.*, 1998)

Posição	$^{13}\text{C}/$ DEPT	δ_C^* β -sitosterol	Lit. δ_C (δ)* β -sitosterol	$^{13}\text{C}/$ DEPT	δ_C^* Ácido betulínico	Lit. δ_C (δ)*
						Ácido betulínico
1	CH_2	37,27	37,30	CH_2	38,43	39,3
2	CH_2	31,68	31,71	CH_2	23,30	23,3
3	CH	71,82	71,84	CH	77,20	78,1
4	CH_2	42,32	42,34	C	38,41	39,5
5	C	140,80	140,80	CH	55,46	56,0
6	CH	121,71	121,72	CH_2	18,18	18,8
7	CH_2	31,93	31,96	CH_2	34,05	34,9
8	CH	28,89	29,14	C	40,74	41,1
9	CH	50,17	50,20	CH	50,17	51,0
10	C	36,52	36,54	C	37,15	37,5
11	CH_2	21,09	21,12	CH_2	20,88	21,2
12	CH_2	39,80	39,82	CH_2	25,48	26,1
13	C	42,36	42,36	CH	36,15	38,6
14	CH	56,79	56,81	C	42,32	42,9
15	CH_2	24,30	24,33	CH_2	30,58	30,3
16	CH_2	28,24	28,25	CH_2	32,17	32,9
17	CH	56,10	56,12	C	56,34	56,6
18	CH_3	11,86	11,88	CH	49,31	49,8
19	CH_3	19,04	19,07	CH	46,90	47,8
20	CH	36,15	36,17	C	-	151,3
21	CH_3	18,78	18,81	CH_2	31,37	31,2
22	CH_2	33,98	33,90	CH_2	37,04	37,6
23	CH_2	26,14	26,18	CH_3	27,97	27,97
24	CH	45,88	45,91	CH_3	16,04	16,05
25	CH	29,20	29,20	CH_3	16,16	16,16
26	CH_3	19,80	19,82	CH_3	16,53	16,53
27	CH_3	19,39	19,41	CH_3	14,66	14,67
28	CH_2	23,10	23,12	C	-	180,75
29	CH_3	11,98	12,00	CH_2	109,72	109,70
30				CH_3	19,35	19,35
1'				C	173,27	173,71
2'				CH_2	34,22	34,81/34,86
3'				CH_2	25,18	25,18
4'				$(\text{CH}_2)_n$	29,25	29,69

* CDCl_3 .

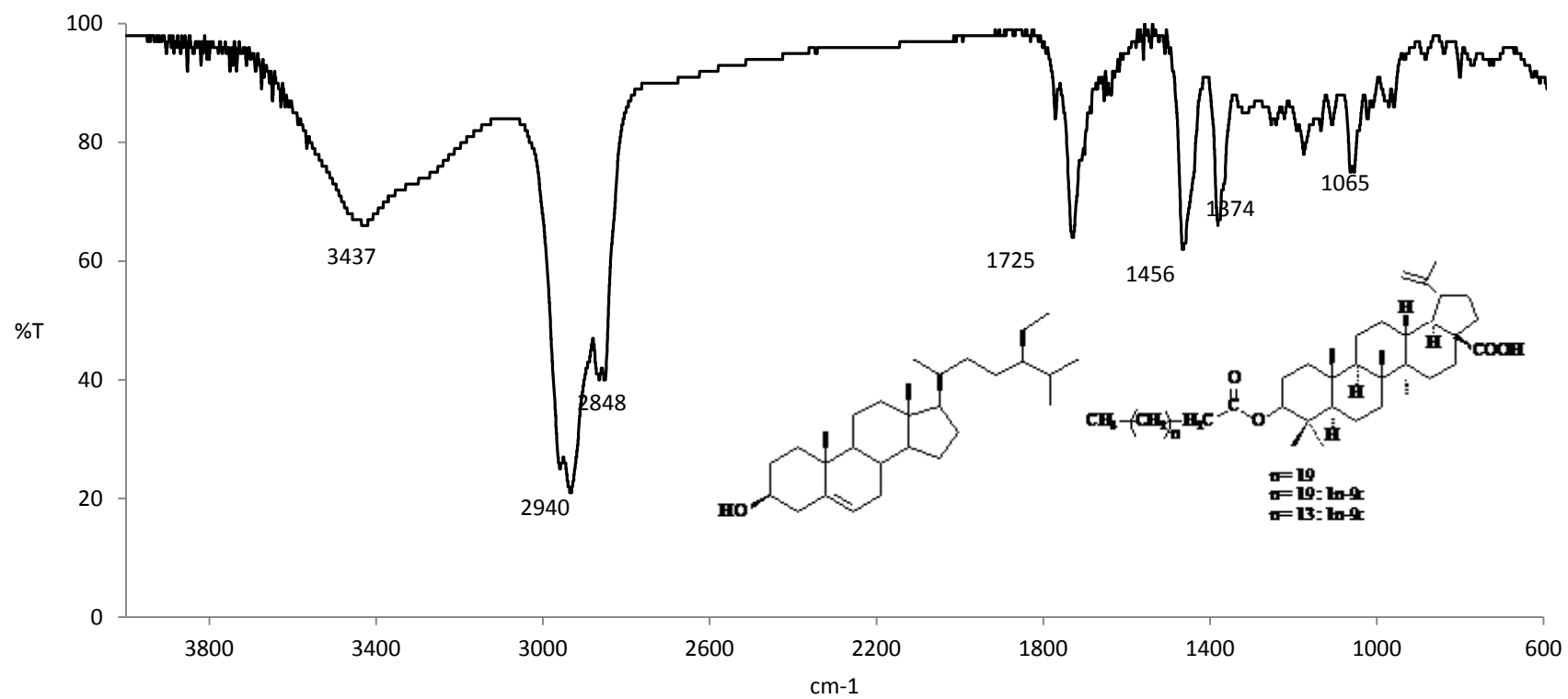
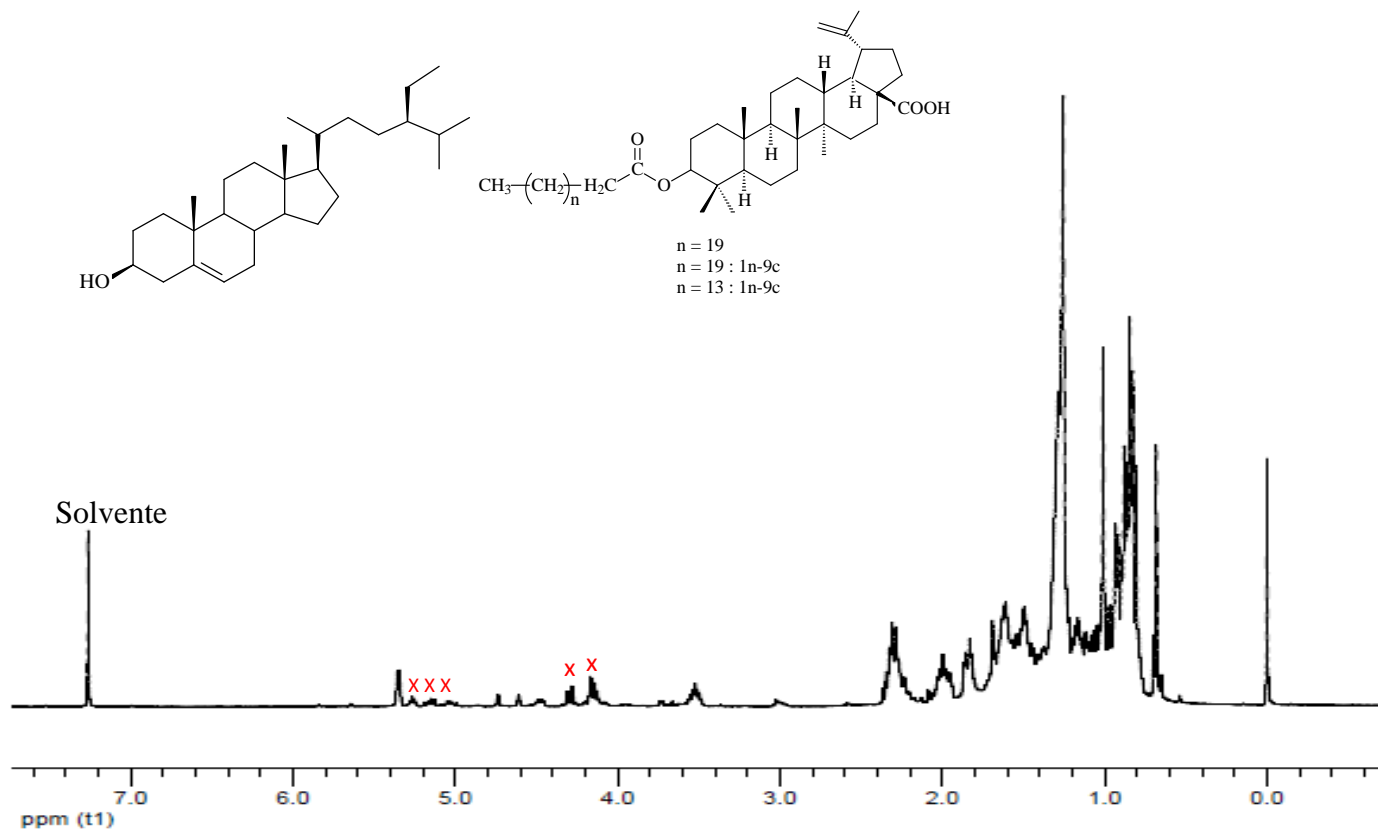


Figura 65:Espectro na região do IV de PmF-6 (KBr), região de 4000 a 600 cm⁻¹.



Date:
1 Feb 2017
Document's Title:
1r

Spectrum Title:
PmF-06
Frequency (MHz):
(f1) 400.180
Original Points Count:
(f1) 65536
Actual Points Count:
(f1) 65536
Acquisition Time (sec):
(f1) 8.1789
Spectral Width (ppm):
(f1) 20.023
Pulse Program:
Unknown

Figura 66: Espectro de RMN de ¹H (400 MHz) de PmF-6 em CDCl₃.

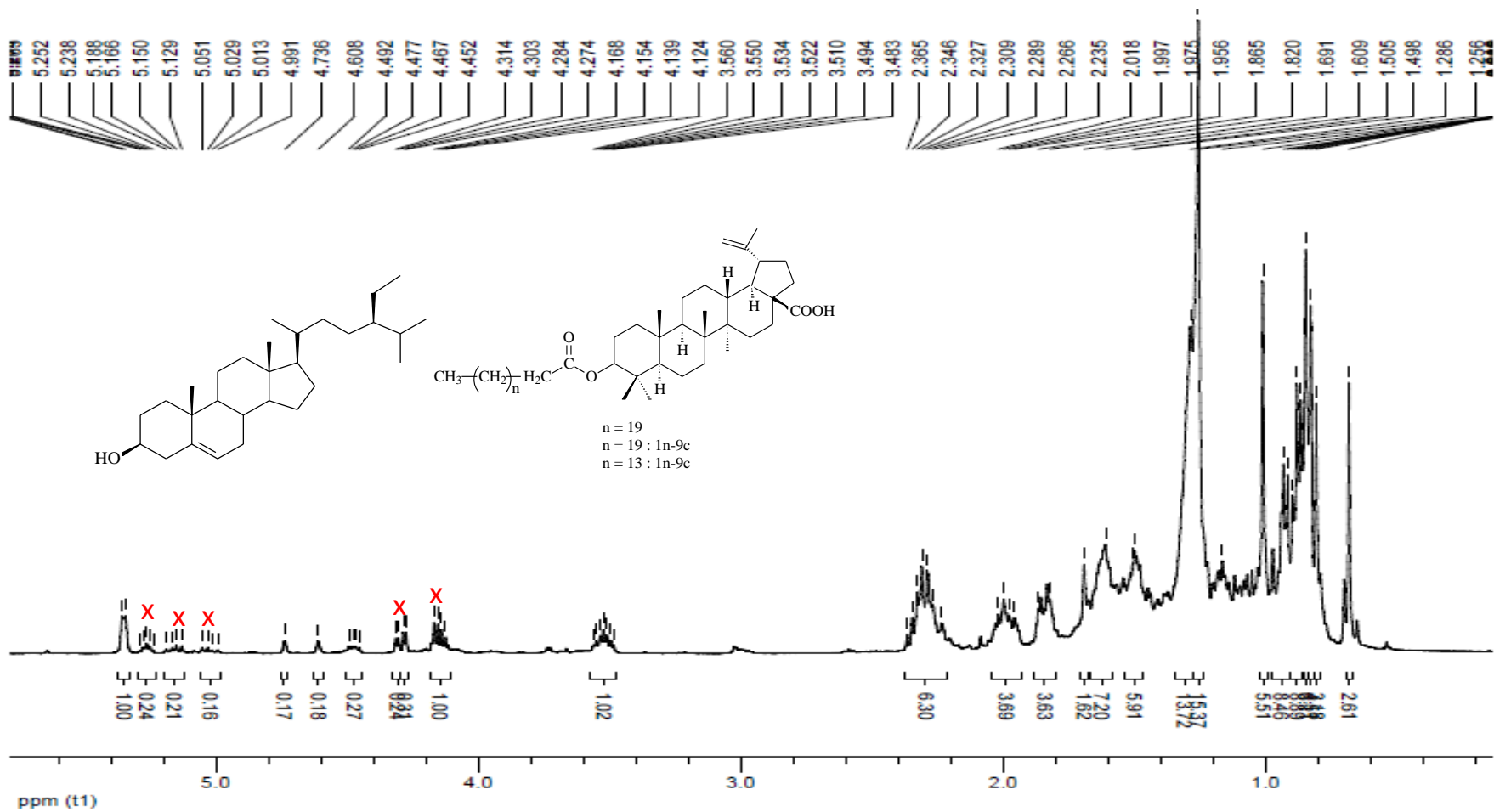


Figura 67: Ampliação (0,60 - 5,3 ppm) do espectro de RMN de ^1H (400 MHz) em CDCl_3 de PmF-6.

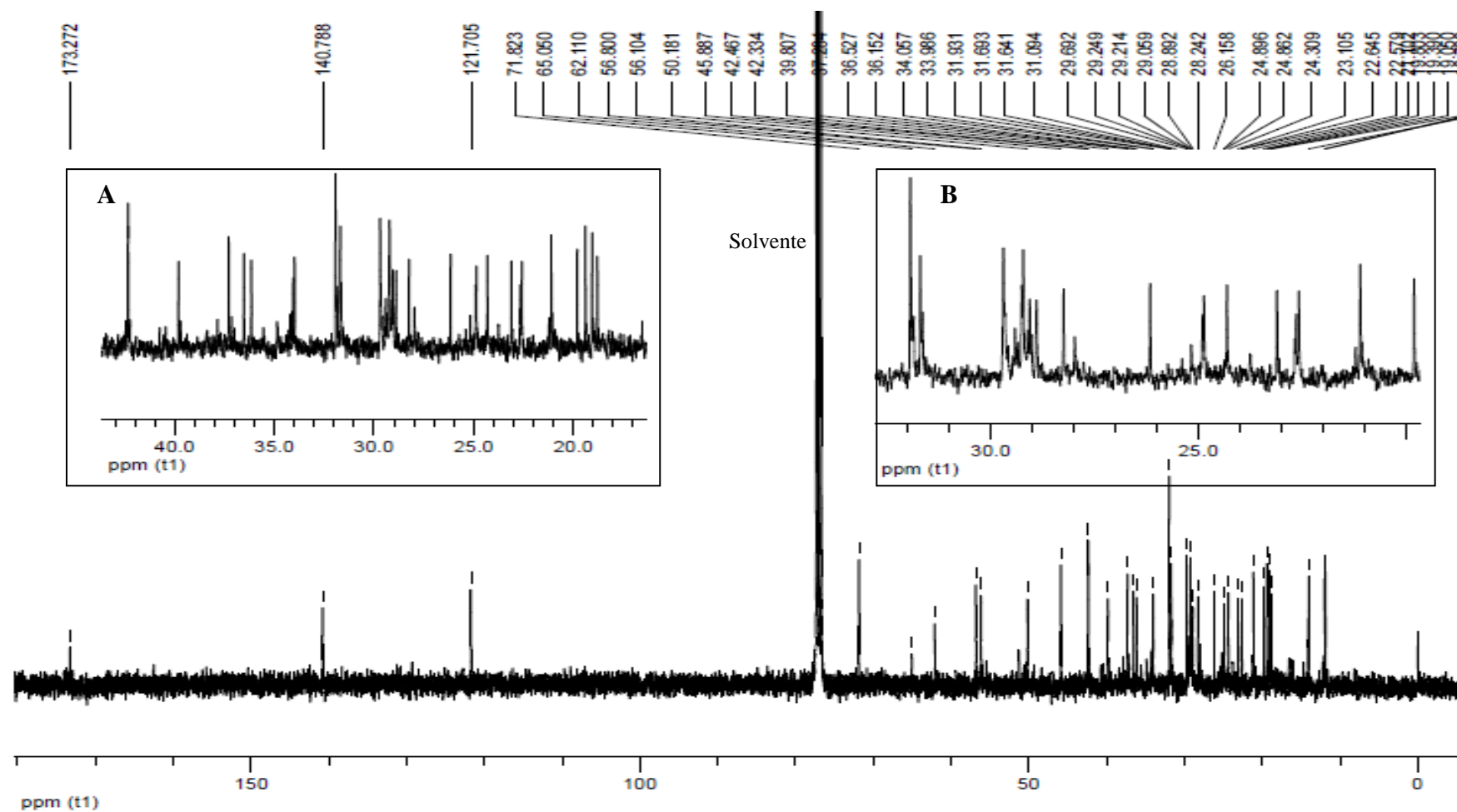


Figura 68: Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) de PmF-6. A- ampliação de (17 a 43 ppm) e B- ampliação de (20 a 32 ppm).

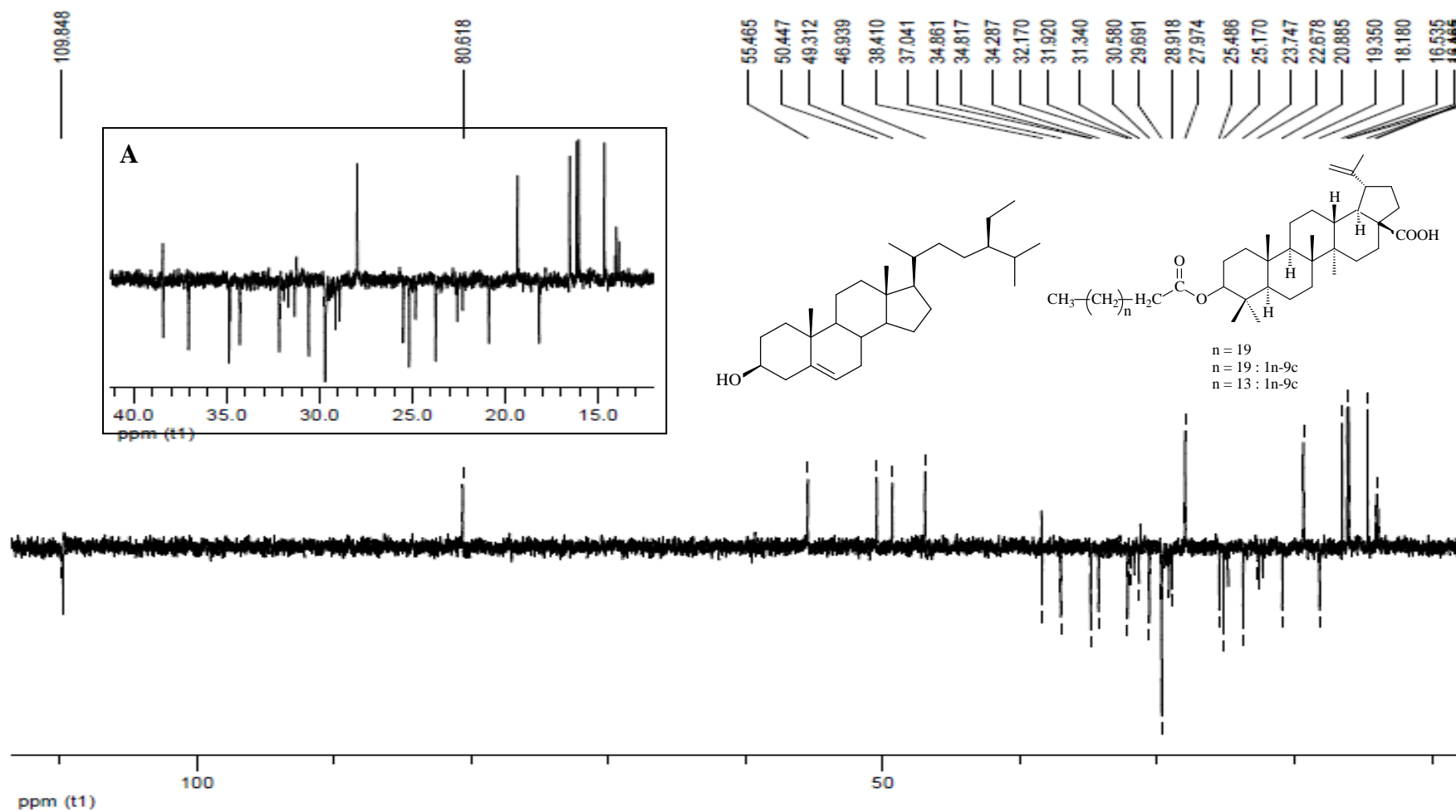
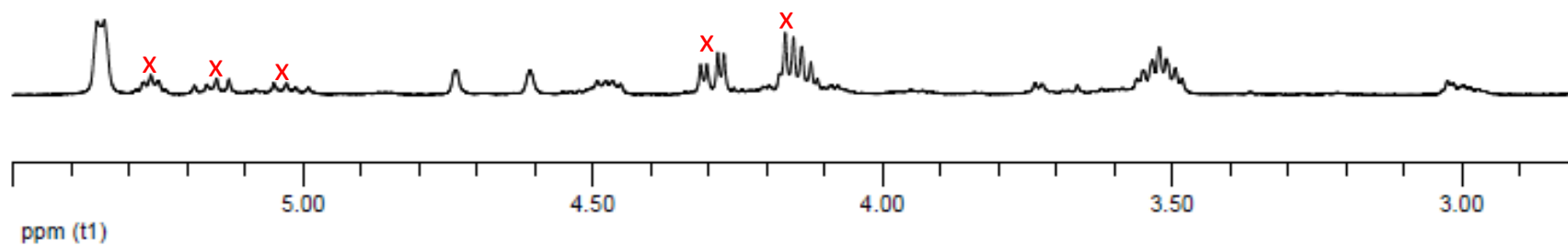


Figura 69: Espectro DEPT-135 (100 MHz) de PmF-6 em CDCl_3 . A- ampliação (13-40 ppm).

Mistura rica em β -sitosterol (**PmF-6**)



Ácido Betulínico esterificado (**PmF-6.1**)

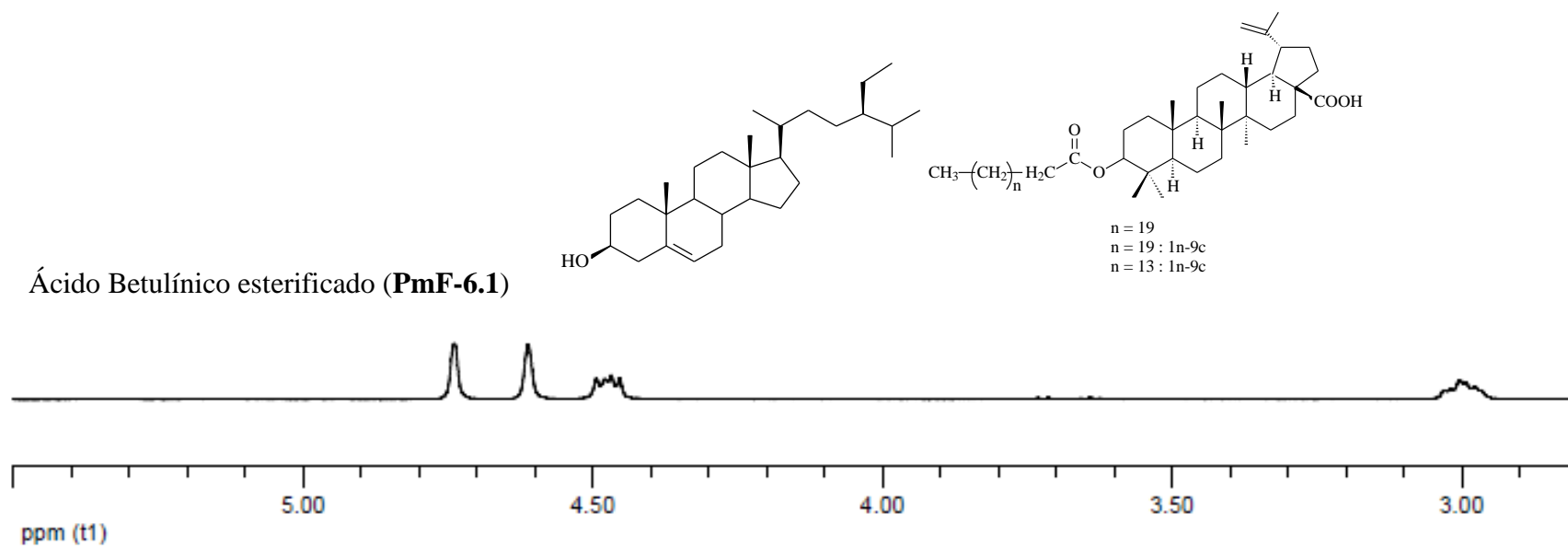
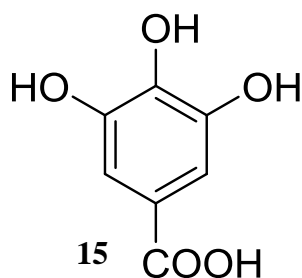


Figura 70: Comparação do espectro de ^1H (400 MHz) de PmF-6 e PmF-6.1 em CHCl_3 .

5.4.7. Determinação estrutural de PmF-14.1: ácido gálico



PmF-14.1 foi isolado por cromatografia em coluna da fração oriunda do GS (57-60), conforme descrição página 46. Foi obtido um sólido amarelo palha ($m = 0,0294$ g) solúvel em CHCl_3 e com faixa de fusão de $178-180^\circ\text{C}$.

O espectro no infravermelho de **PmF-14.1** (Figura 71, Página 114) mostrou banda de absorção muito larga em 3374 cm^{-1} , característico de estiramento de ligação OH, banda em 1701 cm^{-1} referente a estiramento C=O e bandas em 1619 , 1541 e 1451 cm^{-1} de estiramento C=C de composto aromático, em $600-800\text{ cm}^{-1}$ sugerem substituição de anel, indicativo de substância aromática.

O espectro de RMN de ^1H de **PmF-14.1** (Figura 72, Página 115) apresenta apenas um sinal em $\delta_{\text{H}} 7,27$ confirmando a natureza aromática do composto. O espectro de RMN de ^{13}C apresentou 1 sinal de carbono aromático em $109,58$ relativo aos carbonos equivalentes C-2 e C-6, e 3 sinais de carbono não hidrogenados em $\delta_{\text{C}} 122,10$ (C-1); $138,67$ (C-4) e $145,66$ (C-3 e C-5 equivalentes) e um sinal de carbonila em $\delta_{\text{C}} 169,37$ (C1') característico de carbono carbonílico de ácido carboxílico (Figura 73, Página 116). A comparação desses dados com a literatura (Dini, 2011) permite sugerir a estrutura de **PmF-14.1** como do ácido gálico. As correlações observadas no espectro $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ HMBC (Figura 74, Página 117) foram observadas correlações dos hidrogênios H2/H6 equivalentes, em $\delta_{\text{H}} 7,27$ (1H, s, H-2/H-6) com $\delta_{\text{C}} 109,58$ (C-2/C-6); $122,10$ (C-1); $138,67$ (C-4) e $145,66$ (C-3/C-5). Esta correlação permitiu identificar **PmF-14.1** como sendo o ácido gálico.

PmF-14.1 já foi isolado de uma fração butanólica dos frutos de *P. obovata* (DINI, 2011).

Tabela 12: Comparação dos dados de RMN de ^{13}C de PmF-14.1 com os dados da literatura para o ácido gálico (DINI, 2011).

Posição	C¹³/DEPT	δ^{C} (δ)*	lit. δ^{C} (δ)*
1	C	122,10	122,6
2	CH	109,58	110,1
3	C	145,66	146,3
4	C	138,67	139,1
5	C	145,66	146,3
6	CH	109,58	110,1
1'	C	169,37	171,1

* CDCl_3 e piridina- d_5 , a literatura D_2O .

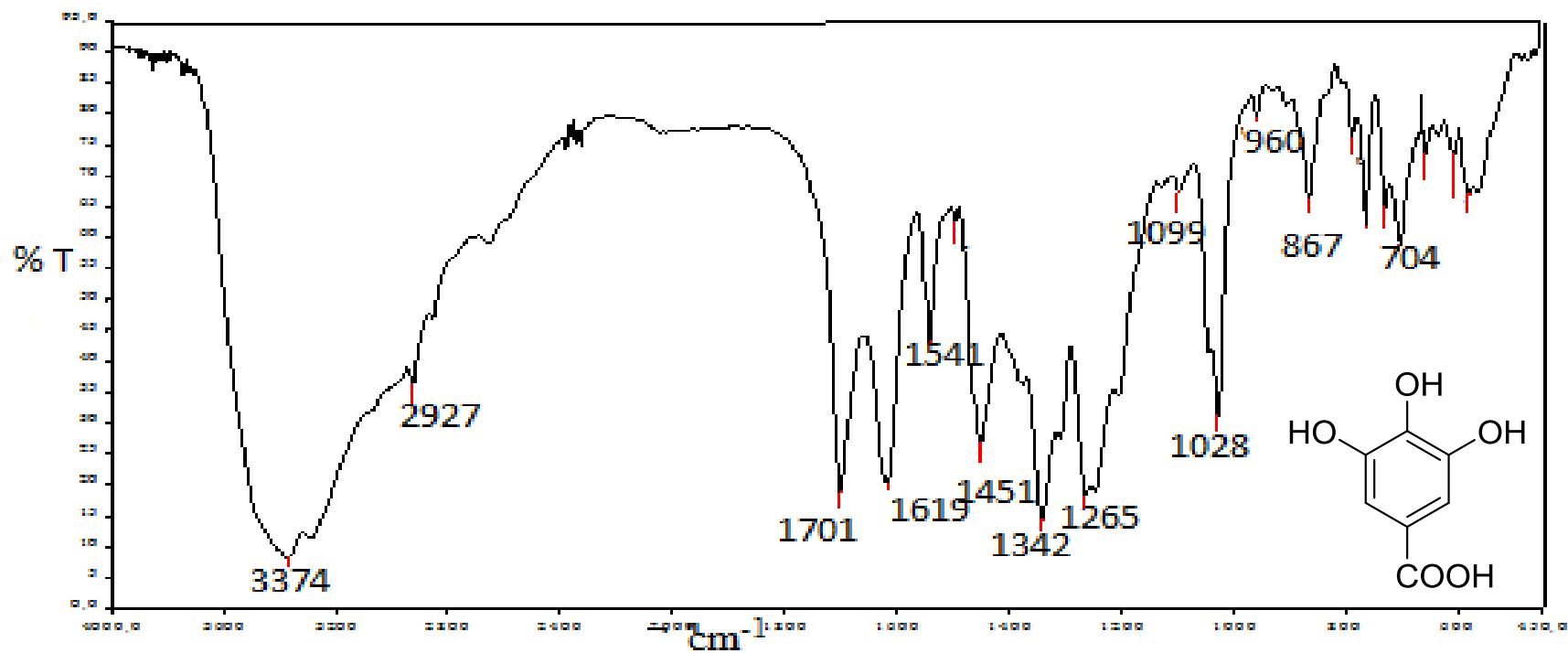
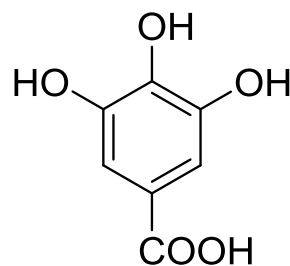
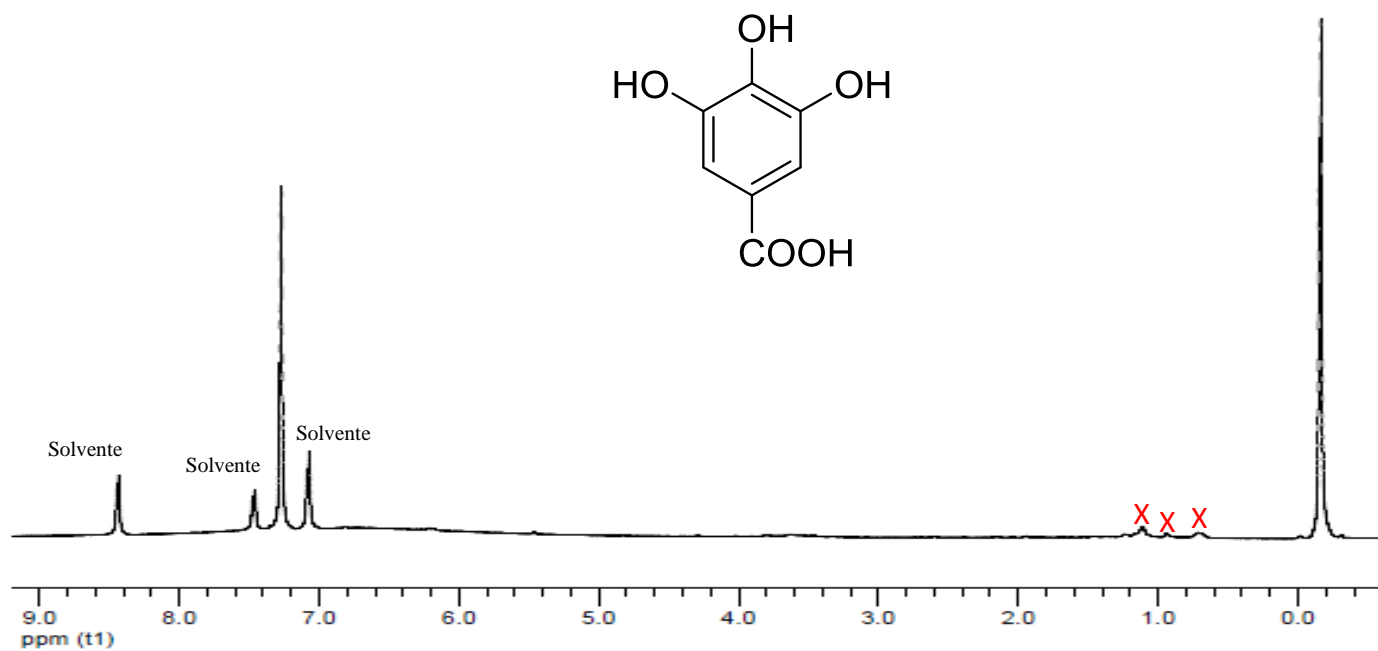


Figura 71: Espectro na região do IV de PmF-14.1 (KBr).



Date:
1 Feb 2017
Document's Title:
H
Spectrum Title:
PmF-14.1
Frequency (MHz):
(f1) 400.180
Original Points Count:
(f1) 65536
Actual Points Count:
(f1) 65536
Acquisition Time (sec):
(f1) 8.1789
Spectral Width (ppm):
(f1) 20.023
Pulse Program:
Unknown

Figura 72: Espectro de RMN de ¹H (400 MHz) de PmF-14.1 em CDCl₃ e piridina-d₅.

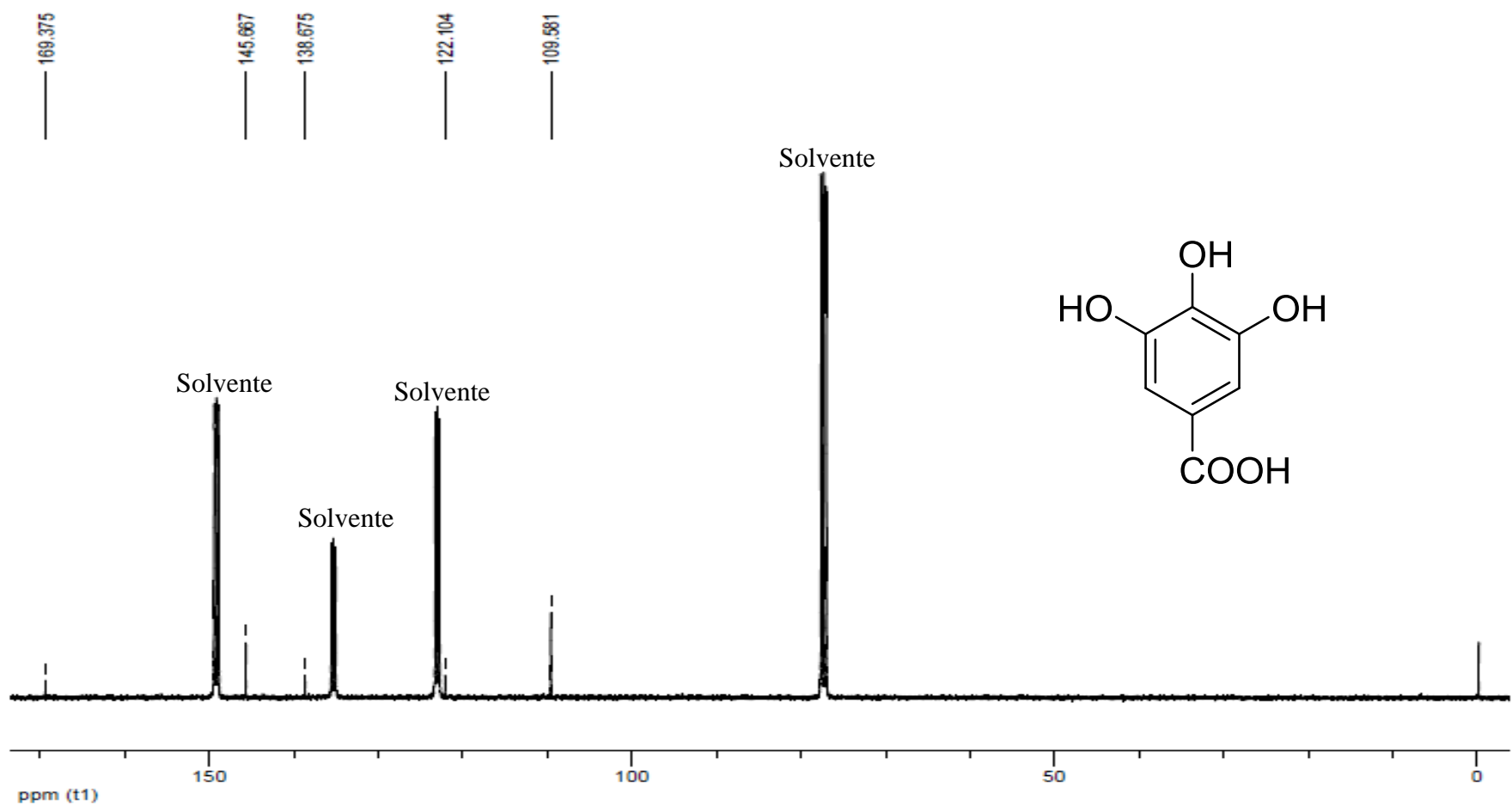


Figura 73: Espectro de RMN de C^{13} (100 MHz) de PmF-14.1 em $CDCl_3$ e piridina- d_5 .

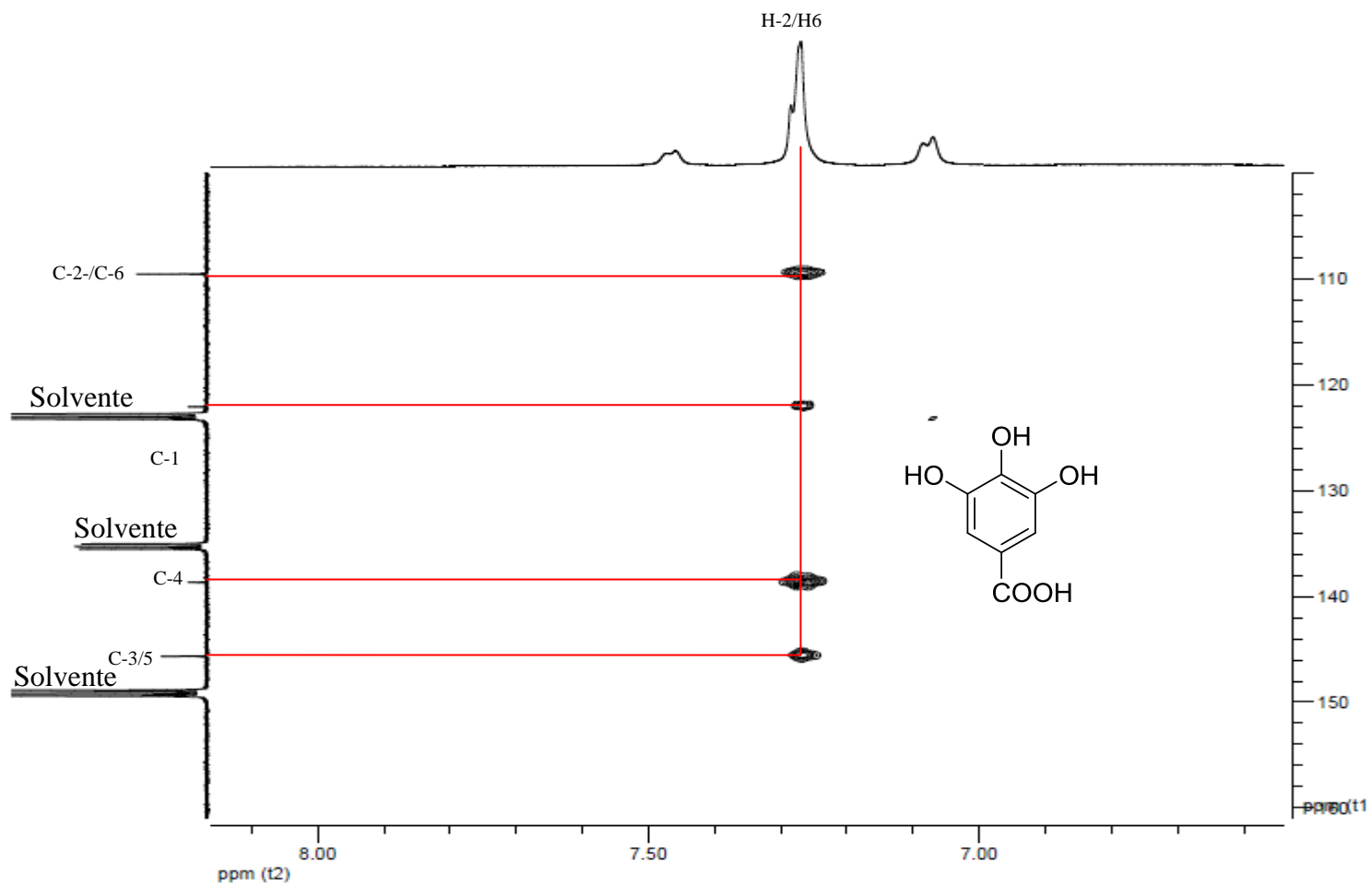


Figura 74: Ampliação do mapa de contornos HMBC (CHCl_3 e piridina- d_5) de PmF-14.1.

5.4.8. Demais Grupos

O sólido **PmF-4.1** apresentou no espectro no IV característica de triterpeno e os espectros RMN de H^1 e C^{13} foram característicos de triterpeno pentacíclicos oxigenado, no entanto, devido a pouca massa, apenas foi possível fazer análise em 2D, não sendo possível sua identificação.

A sólido **PmF-5** apresentou nos espectros no IV, RMN de H^1 e C^{13} sinais característica de triterpeno pentacíclicos oxigenado, porém em meio a uma mistura, necessitando de maior purificação.

A substância **PmF-5.1** apresentou nos espectros de IV, RMN de H^1 e C^{13} característica de triterpeno pentacíclicos oxigenado, após análise foi possível concluir que trata-se do eritrodiol esterificado em meio a uma mistura não definida.

5.4.9. Atividade Antimicrobiana

Tanto o extrato etanólico quanto as substâncias isoladas e identificadas: 3 β -hidroxifriedelano “**PmF-4**” e 3-oxifriedelano “**PmF-4.2**”, mistura de behenato e erucicato de eritrodiol “**PmF-4.3**”, mistura de behenato, erucicato e palmitoleicoato de ácido betulínico “**PmF-6.1**” e o ácido gálico “**PmF-14.1**” foram testados frente as bactérias *Escherichia coli*, *Enterococcus aerogenes*, *Streptococcus mutans*, *Bacillus subtilis* pelo método difusão em ágar e o fungo *Candida albicans* pela técnica de microdiluição, em triplicata.

Nos testes com bactérias foi utilizado como controle positivo cetriaaxona, e para o fungo clorofenicol.

No teste frente as bactérias somente o extrato etanólico apresentou halo de inibição de 9 mm para a bactéria *Streptococcus mutans*.

Nesses testes foram observados halo de inibição para cetriaaxona de 45 mm para *Streptococcus mutans*, 46 mm para *Enterococcus aerogenes*, 44 mm para *Escherichia coli* e 37 para *Bacillus subtilis*.

Para o fungo *Candida albicans* não foi observado inibição do extrato e das substâncias.

6. CONCLUSÕES

Neste trabalho foram apresentados os resultados, referentes à prospecção fitoquímica, atividade antioxidante e antimicrobiana do extrato de *P. macahensis*, além do isolamento de seus constituintes químicos.

A prospecção fitoquímica do extrato etanólico indicou a presença de metabólitos como: fenóis e taninos; flavonoides; flavonas; esteroides, triterpenoides; saponinas e alcaloide. Esses dados estão de acordo com o relato para o gênero *Pouteria*.

A partir do extrato etanólico das folhas de *P. macahensis* foram isoladas onze substâncias naturais, sendo oito elucidadas através de técnicas de RMN de ^1H e ^{13}C uni e bidimensional e comparações com valores da literatura. Destas até o momento 3β -hidroxifriedelano, 3-oxifriedelano, eritrodiol e ácido gálico, já tinham sido isoladas em estudos anteriores para o gênero. Os ésteres de triterpenos: mistura de behenato e erucicato de eritrodiolila e palmitoleicoato de eritrodiolila, além da mistura behenato, erucicato e palmitoleicoato do ácido betulínico são a primeira vez relatados no gênero.

Sete das substâncias identificadas em *P. macahensis* apresentou esqueleto carbônico do tipo pentacíclico, pertencente à classe dos triterpenos, sendo dois friedelanos (3β -hidroxifriedelano “**PmF-4**” e 3-oxifriedelano “**PmF-4.2**”) e dois oleanos esterificados (mistura de behenato e erucicato de eritrodiolila “**PmF-4.3**”, e palmitoleicoato de eritrodiolila “**PmF-4.4**”), um lupano (mistura behenato, erucicato e palmitoleicoato de ácido betulínico “**PmF-6.1**”) e um esteroide (β -sitosterol em mistura “**PmF-6**”). Também foi isolado um composto aromático (ácido gálico “**PmF-14.1**”) todos descritos pela primeira vez para a espécie.

O extrato etanólico das folhas exibiu atividade antioxidante e alto poder redutor frente ao radical livre DPPH. O isolamento do ácido gálico sugere que este composto colabora para esta atividade, juntamente com os outros compostos presentes no extrato e detectados pela prospecção fitoquímica. O extrato etanólico e as substâncias não mostraram atividade para as bactérias *Escherichia coli*, *Enterococcus aerogenes*, *Streptococcus mutans*, *Bacillus subtilis* e *Candida albicans*.

Este trabalho coloca em evidência a importância de estudos com a espécie, visto que é escasso estudos na região de coleta e sua vegetação vem sendo reduzida ao longo dos anos, fazendo-se necessário maior atenção com o Bioma Mata atlântica e a riqueza de sua biodiversidade.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMEIDA, M. Z. **Plantas Mediciniais**. 3ª ed. Salvador: EDUFBA, p. 43. 2011.

ALVES, T. M.; SILVA, A. F.; BRANDÃO, M.; GRANDI, T. S. M.; SMÂNIA, E. F. A.; JÚNOR, S. A.; ZANI, C. L. Biological screening of Brazilian medicinal plants. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 95, n. 3, p. 367-373, 2000.

ALVES-ARAÚJO, A. **Taxonomia e Filogenia de Pouteria Aubl. (Sapotaceae) na Mata Atlântica setentrional**. Tese de doutorado, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2012.

ALVES-ARAÚJO, A.; ALVES, M. Checklist of Sapotaceae in northeastern Brazil. **Check List**, v. 9, n. 1, p. 59–62, 2013.

ANTONISAMY, P.; DURAI PANDIYAN, V.; IGNACIMUTHU, S. Anti-inflammatory, analgesic and antipyretic effects of friedelin isolated from *Azima tetraantha* Lam. in mouse and rat models. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 63, n. 8, p. 1070–1077, 2011.

ASEERVATHAM, G. S. B.; SIVASUDHA, T.; SASIKUMAR, J. M.; CHRISTABEL, P. H.; JEYADEVI, R.; ANANTH, D.A. Antioxidant and hepatoprotective potential of *Pouteria campechiana* on acetaminophen-induced hepatic toxicity in rats. **Journal Physiol Biochem**, v.70, p.1-14, 2014.

CAPITANI, C. D. **Modelagem matemática na avaliação do sinergismo da atividade antioxidante de compostos naturais aplicados em emulsões alimentícias**. Tese de doutorado, USP, São Paulo, 2009.

CASTRO, F. S.; SILVA, C. A. M.; PERFEITO, J. P. S.; SANTOS, M. L.; RESCK, I. S.; DE PAULA, J. E.; SILVEIRA, D. **Avaliação da atividade antioxidante de algumas espécies de Pouteria**. Anais de eventos. 29ª Sociedade Brasileira de Química (SBQ), p.1-2. Disponível em: <http://sec.s bq.org.br/cd29ra/resumos/T1446-2.pdf> Acesso em: 08-02-2017.

CHATURVEDULA, V. S. P.; PRAKASH, I. Isolation of Stigmasterol and β -Sitosterol from the dichloromethane extract of *Rubus suavissimus*. Chaturvedula and Prakash, **International Current Pharmaceutical Journal**, v.1, n.9, p. 239-242, 2012.

CNCFLORA, 2011. **Pouteria macanheis: avaliação do risco de extinção**. Disponível em: <http://cncflora.jbrj.gov.br/portal/pt-br/profile/Pouteria%20macahensis>. Acesso em: 25-08-2016.

COLLINS, C. H, BRAGA, G. L.; BONATO, P. S. **Fundamentos de cromatografia**. Unicamp, São Paulo, 2006.

COSTA, D. L.; RINALDO, D. VARANDA, E. A.; DE SOUZA, J. F.; NASSER, A. L.; SILVA, A. C.; BALDOQUI, D. C.; VILEGAS, W.; DOS SANTOS, L. C. Flavonoid detection in hydroethanolic extract of *Pouteria torta* (Sapotaceae) leaves by HPLC-DAD and the determination of its mutagenic activity. **Journal of medicinal food**, v. 17, n. 10, p. 1103–12, 2014.

DEWICK, P. M. Medicinal natural products: a biosynthetic approach. 2a ed. John Wiley & Sons Ltd, p. 212 e 168, 2002.

DINI, I. Flavonoid glycosides from *Pouteria obovata* (R. Br.) fruit flour. **Food Chemistry**, v. 124, n. 3, p. 884–888, 2011.

ERKAN, N.; AYRANCI, G.; AYRANCI, E. Antioxidant activities of rosemary (*Rosmarinus Officinalis* L.) extract, blackseed (*Nigella sativa* L.) essential oil, carnosic acid, rosmarinic acid and sesamol. **Food Chemistry**, v. 110, n. 1, p. 76–82, 2008.

Fundação SOS Mata Atlântica. **Atlas da Mata Atlântica 2013-2014**. Disponível em: <https://www.sosma.org.br/projeto/atlas-da-mata-atlantica/>. Acesso: 29-08-2016.

GIULIETTI, A. M.; HARLEY, R. M.; DE QUEIROZ, L. P.; WANDERLEY, M. G.L.; BERG, C. V. D. Biodiversidade e Conservação das Plantas no Brasil. **Megadiversidade**, v. 1, n.1, p. 52-61, 2005.

HUYKE, C.; LASZCZYK, M.; SCHEFFLER, A.; ERNST, R.; SCHEMPP, C. M. **Treatment of actinic keratoses with birch bark extract: a pilot study**. *Journal der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft*, v. 4, p.132-137, 2006.

IBGE. **Mapa dos biomas e vegetação**. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br/home/presidencia/noticias/21052004biomashtml.shtm>. Acesso: 29-08-2016.

IAL. INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Métodos físico-químicos para análises de alimentos**. 4. ed., São Paulo, p.1020 , 2008.

KLINK, C. A.; MACHADO, R. B. A conservação do Cerrado Brasileiro. **Megadiversidade**, v. 1, n. 1, p. 147-155, 2005.

LAGUERRE, M.; LECOMTE, J.; VILLENEUVE, P. Evaluation of the ability of antioxidants to counteract lipid oxidation: Existing methods, new trends and challenges. **Progress in Lipid Research**, v.46, n.5, p.244–282, 2007.

LIPORACCI, H. S. N. **Plantas medicinais e alimentícia na Mata Atlântica e Caatinga: uma revisão bibliográfica de cunho etnobotânico**. Dissertação de mestrado, Faculdade de Biologia de Fungos, Algas e Plantas, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2014.

LOPES, K. S. E. Estudo **químico e atividades biológicas de *Pouteria torta* (Mart.) Raldk (Sapotaceae)**. Brasília: Faculdade de ciências da saúde. Universidade de Brasília, dissertação de mestrado, 2005.

MA, J.; YANG, H. ; YANG, H.; BASILE, M. J.; KENNELLY, E. J. Analysis of polyphenolic antioxidants from the fruits of three *Pouteria* species by selected ion monitoring liquid chromatography-mass spectrometry. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, n. 19, 2004.

MAHATO, S.B.; KUNDU, A. P. ^{13}C NMR of pentacyclic triterpenoids. **Phytochemistry**, v.37, p.1517, 1994.

MAHATO, S. B.; SEN, S. Advances in triterpenoid research, 1990-1994. **Phytochemistry**. v.44, n.7, p.1185-1236, 1997.

MARQUI, S. R. **Estudo fitoquímico e busca de substâncias bioativas de *Chrysophyllum flexuosum* (Sapotaceae)**. Dissertação de mestrado, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, São Paulo, 2007.

MARQUES, E. J. **Estudo fitoquímico e avaliação da atividade citotóxica dos componentes de *Clausia criuva* em células GL-15 de glioblastoma humano**. Tese de doutorado, Faculdade de Química, Universidade Federal da Bahia, Salvador- BA, 2011.

MARTUCCIELLO, S.; BALESTRIERI, M. L.; FELICE, F.; ESTEVAM, C. S.; SANT'ANA, A. E.; PIZZA, C.; PIACENTE, S. Effects of triterpene derivatives from *Maytenus rigida* on VEGF-induced Kaposi's sarcoma cell proliferation. **Chemico-Biological Interactions**, v. 183, n. 3, p. 450–454, 2010.

MATOS, J. F. T. 2009. **Introdução à Fitoquímica Experimental**. Fortaleza: UFC, 2009, 150p.

MEDEIROS, F. A. **Estudo fitoquímico e biológico de espécies amazônicas: *Probusia huberi* (Ducke) Ducke (Sapotaceae) e *Licania macrophylla* Bent. (Chrysobalanaceae)**.

Tese de doutorado. Centro de ciências da saúde, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa-PB, 2008.

MELO, M. S. F. **Avaliação da atividade antimicrobiana de extrato do fruto, folha, casca de caule do *Zizyphus joazeiro* MART.** Dissertação de mestrado, Universidade Federal de Alfenas, Alfenas, Minas Gerais, 2010.

MOLYNEUX, P. The Use of the Stable Free Radical Diphenylpicryl-hydrazyl (DPPH) for Estimating Antioxidant Activity. **Songklanakarin Journal of Science and Technology**, v. 26, n.2, p. 211–219, 2004.

MONTENEGRO, L. H. M.; SILVA, T. B. C.; CONSERVA, L. M.; LEMOS, R. P. L. Constituintes Químicos de *Pouteria venosa* (Mart.) Baehni (Sapotaceae). In: Sociedade Brasileira de Química (SBQ), 25. **Anais**. Poços de Caldas, Minas Gerais, 2002. Disponível em: http://www.iaea.org/inis/collection/NCLCollectionStore/_Public/38/107/38107057.pdf. Acesso em: 29-08-2016.

MONTENEGRO, L. H. M.; OLIVEIRA, P. E. S.; CONSERVA, L. M.; ROCHA, E. M. M.; BRITO, A. C.; ARAÚJO, R. M.; TREVISAN, M. T. S.; LEMOS, R. P. L. Terpenóides e avaliação do potencial antimalárico, larvicida, anti-radicalar e anticolinesterásico de *Pouteria venosa* (Sapotaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 16, p. 611–617, 2006.

OLIVEIRA A. K. M.; PEREIRA, K. C. L.; MULLER, J. A. I.; MATIAS, R. Matias Análise fitoquímica e potencial alelopático das cascas de *Pouteria ramiflora* na germinação de alface. **Horticultura Brasileira**, v.32, p. 41-47, 2014.

PAVIA, D. L.; LAMPMAN, G. M.; KRIZ, G. S.; ENGEL, P. G. **Química orgânica experimental: técnicas de escala pequena**. Bookman, Porto Alegre, 2009.

PAVIA, D. L.; LAMPMAN, G. M.; KRIZ, G. S. **Introdução a espectroscopia**. Cengage learninf, São Paulo, 2012.

PENG, C.; GEOFFREY, B.; SHENGXIANG, Q.; FONG, H. H. S.; FARNSWORTH, N. R.; SHENGANG, Y; CHONGZHI, Z. Computer-Assisted Structure Elucidation: Application of CISOC–SES to the Resonance Assignment and Structure Generation of Betulinic Acid. **Magnetic resonance in chemistry**, v.36, p.267-278, 1998.

PENNINGTON T. D. The genera of Sapotaceae: Royal Botanic Gardens, **Kew New York Botanical Garden**, Bronx; 1991.

PERFEITO, J. P.; SANTOS, M. L.; LÓPEZ, K. S. E.; PAULA, J. E.; SILVEIRA, D. Characterization and biological properties of *Pouteria torta* extracts: apreliminary study. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.15, n.3, 2005.

PEREIRA, R. J.; CARDOSO, M. D. G. Metabólitos secundários vegetais e benefícios antioxidantes Vegetable secondary metabolites and antioxidants benefits. **Journal of Biotechnology and Biodiversity**, v. 3, n. November, p. 146–152, 2012.

PICMAN, A. K.; RANIERI, R. L.; TOWERS, G. H. N.; LAM, J. Visualization reagents for sesquiterpene lactones and polyacetylenes on thin-layer chromatograms. **Journal of chromatography**, v. 189, p. 187-198, 1980.

PINTO, A. C., SILVA, D. H. S. S.; BOLZAN, V. S.; LOPES, N. P.; EPIFANIO, R. A. Produtos Naturais: atualidade, desafios e perspectivas. **Química Nova**, v. 25, nº.1, p. 45-61, 2002.

PRADO, P. I.; PINTO, L.; MOURA, R. T.; CARVALHO, A. M.; THOMAS, W. W.; AMORIM, A.; AGUIAR, C. Caracterização dos Registros de ocorrência de espécies de Plantas e Mamíferos no Sul da Bahia, Brasil. **Corredor da Biodiversidade da mata Atlântica do Sul da Bahia**, 2003.

QUEIROZ, C. A. C., CARNEIRO, C. E. **Estudos Taxonômicos de *Pouteria Aublet* (Sapotaceae) para o Estado da Bahia, Brasil**. Disponível em: <http://www2.uefs.br/semic/upload/2011/2011XV-025CAR093-040.pdf>. acesso em: 24/08/2016.

RAGASA, C. Y.; LABACLADO, L. M.; RIDEOUT, J. A. Triterpenes and Sterol from *Pouteria campechiana*. **Journal of science**, v.6, n.2, p. 1-7, 2011.

RIGOTTI, M. Metabolismo Secundário. **Curso Biociência onLine**, 2011. Disponível em: <http://farmacobotanica.xpg.uol.com.br/aula6.html>. Acesso em: 25-08-2016.

RODRIGUES, P. M. **Estudo químico de folhas de *Pouteria ramiflora* Radlk. (Sapotaceae). Biomonitorado por inibição da alfa-amilase**. Dissertação de mestrado. Universidade de Brasília, Faculdade de Ciências da Saúde, Brasília, 2015.

SALAZAR, G. C. M.; SILVA, G. D. F.; DUARTE, L. P.; VIERIRA FILHO, S. A.; LULA, I. S. Two epimeric friedelane triterpenes isolated from *Maytenus truncata* Reiss: H-1 and C-13 chemical shift assignments. **Magnetic Resonance in Chemistry**, v. 38, n. 11, p. 977–980, 2000.

SÁNCHEZ-MORENO, C.; LARRAURI, J. A.; SAURA-CALIXTO, F. Produce to measure the antiradical efficiency or polyphenols. **Journal of the science of Food and Agricultural**, v. 76, p. 270-276, 1998.

SANTANA, D. G.; RANAL, M. A.; OLIVEIRA, M. C. Despolpamento e reguladores de crescimento na emergência de plântulas de duas espécies do gênero *Pouteria*. In: Simpósio nacional cerrado, 9, simpósio internacional savanas tropicais, 2. **Anais**. Brasília, DF: Embrapa-Cerrados, 2008.

SANTOS, R. F. E. P.; SILVA, I. S. M.; VERÍSSIMO, R. C. S. S.; LÚCIO, I. M. L.; CAMPESATTO, E. A.; CONSERVA, L. M.; BASTOS, M. L. A. Estudo do potencial antimicrobiano e citotóxico da espécie *Pouteria venosa* (Sapotaceae). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Campinas, v.17, n.3, p.367-373, 2015.

SAYRE, D. The Atlantic Forest of South America: Biodiversity Status, Threats, and Outlook. **Electronic Green Journal**, v.1, n. 19, p. 1-7, 2003.

SCHERER, R.; GODOY, H. T.. Antioxidant Activity Index (AAI) by the 2,2diphenyl-1-picrylhydrazyl method. **Food Chemistry**, v. 112, p.654-658, 2009.

SILVA, C. L. M. obtenção de ésteres metílicos a partir da transesterificação do óleo de andiroba com etanol. Dissertação de mestrado. Departamento de Química, Universidade Estadual de Campinas-UNICAMP, Campinas, 2005.

SILVA, C. A. M. **Contribuição ao estudo químico e biológico de *Pouteria gardinerii* (Mart. & Miq.) Baheni (Sapotaceae)**. Dissertação de mestrado, Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade de Brasília, Brasília, 2007.

SILVA, C. A. M.; SIMEONI, L. A.; SILVEIRA, D. Genus *Pouteria* : Chemistry and biological activity Revisão. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 19, n. 2A, p. 501–509, 2008.

SILVA, B. A.; GORDON, A.; JUNGFER, E.; MARX, F.; MAIA, J. G. S. Antioxidant capacity and phenolics of *Pouteria macrophylla*, an under-utilized fruit from Brazilian Amazon. **European Food Research and Technology**, v.234, p.761–768, 2012.

SILVA, F. C.; DUARTE, L. P.; VIEIRA-FILHO, S. A. Celastráceas: Fontes de Triterpenos Pentacíclicos com Potencial Atividade Biológica. **Revista Virtual de Química**, v. 6, n.5, p. 1205-1220, 2014.

SWENSON, U.; ANDERBERG, A. A. Phylogeny, character evolution, and classification of Sapotaceae (Ericales). **Cladistics**, v.21, p. 101–130, 2005.

TABARELLI, M.; PINTO, L. P.; SILVA, J. M. C.; HIROTA, M. M.; BEDÊ, L. C. Desafios e oportunidades para a conservação da biodiversidade na Mata Atlântica brasileira. **Megadiversidade**, v. 1, n.1, p. 131-138, 2005.

VIEIRA-FILHO, S. A. **Estudo fitoquímico em folhas e sâmaras de Austroplenckia populnea, avaliação da atividade antiespermato gênica do extrato hexânico das folhas e estudo fotoquímico em triterpenos pentacíclicos.** Tese de Doutorado. Departamento de Química, ICEx. Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2002.

WANDJI, J. Fatty acid esters of triterpenes and steroid glycosides from Gambeya Africana. **Planta med**, v.64, p.822-826, 2002.

WANG, B.; LI, G. Q.; GUAN, H.S.; YANG, L. Y.; TONG, G. Z. A new erythrodiol triterpene fatty ester from Scorzonera mongolica. **Yaoxue Xuebao**, v. 44, n. 11, p. 1258–1261, 2009.

ZWENGER, S.; BASU, C. Plant terpenoids: applications and future potentials. **Biotechnology an Molecular Biology Reviews**, v.3, n.1, p.1-7, 2008.