

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS

MAURÍCIO LEITE DE ARAÚJO

ESTUDO FITOQUÍMICO DE CONSTITUINTES POLARES DE RESINAS DE
BURSERACEAE

MANAUS

2019

MAURÍCIO LEITE DE ARAÚJO

ESTUDO FITOQUÍMICO DE CONSTITUINTES POLARES DE RESINAS DE
BURSERACEAE

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Química da Universidade Federal do Amazonas, como requisito parcial para a obtenção do Título de Mestre em Química, área de concentração em Química de Produtos Naturais e Biomoléculas.

VALDIR FLORÊNCIO DA VEIGA JÚNIOR

MANAUS

2019

Ficha Catalográfica

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

A663e Araújo, Maurício Leite de
Estudo fitoquímico de constituintes polares de resinas de
Burseraceae / Maurício Leite de Araújo. 2019
178 f.: il. color; 31 cm.

Orientador: Valdir Florêncio da Veiga Júnior
Dissertação (Mestrado em Química de Prod. Naturais) -
Universidade Federal do Amazonas.

1. Burseraceae. 2. triterpenos ácidos. 3. resina. 4. ésteres
metílicos. I. Veiga Júnior, Valdir Florêncio da II. Universidade
Federal do Amazonas III. Título

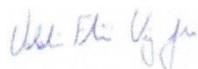
“Estudo fitoquímico dos constituintes polares de resinas de Burseraceae”

Maurício Leite de Araújo

Dissertação de Mestrado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Química, do Instituto de Ciências Exatas da Universidade Federal do Amazonas como requisito parcial para a obtenção do Grau de Mestre em Química.

Aprovado, em 29 de agosto de 2019.

COMISSÃO EXAMINADORA



Dr. Valdir Florêncio da Veiga Júnior
Universidade Federal do Amazonas
Orientador



Dr. Anderson Cavalcante Guimarães
Membro Externo/UFAM



Dr. Emmanoel Vilaça Costa
Membro UFAM

Universidade Federal do Amazonas
Manaus, 29 de agosto de 2019.

Àquele que entrou em minha casa,
Que fez o ambiente cheirar a rosas,
Que confortou a minha alma e
Que esvaziou o meu fardo pesado.

Meu Jesus Cristo

AGRADECIMENTOS

A Deus, criador do céu e Terra que em Jesus Cristo seu único filho concedeu-nos a vida eterna.

Ao prof^o Dr^o Valdir Veiga pela paciência e estímulo nas horas decisivas para a realização das etapas desse trabalho.

Aos integrantes do grupo de pesquisa Q-BiomA: Milena Campelo, Larissa Silva; Karen Alves; Karen Maciel; Priscila Duarte; Renata Duarte; Glaucia Bolson; Steve Manickchand; Emily Silva e Rodrigo Cunha pelas contribuições nas etapas da pesquisa.

Ao Prof^o Dr^o Anderson Gruimarães pelas conversas descontraídas, discussões sobre a ciência da Química de Produtos Naturais e pela amizade estabelecida.

Dedico um parágrafo ao Dr^o André Luís Rüdiger pela amizade firmada, pela “coorientação”, pelos debates sobre o isolamento de triterpenos ácidos, pelas reuniões via internet, sua interação com o meu trabalho me comoveu. Enfim, muito obrigado!

À minha família mãe Nazaré, mãe Mirian, Necy Emily, Alex Júnior, Beatriz e pai Mauricélio pelos dias ausentes, pelas minhas falhas, pelas minhas perdas, por suportarem dias a fio nessa jornada e por estarem comigo mesmo não entendendo as etapas.

Dedico àquela que me faz crescer junto com ela, que acredita na superação dos meus desafios e, que principalmente está ao meu lado nas horas que nem imaginei. Bruna Waayen obrigado por tornar meus dias mais felizes.

Dedico a todas as demais pessoas que, de alguma forma, contribuíram para meus conhecimentos.

Ao Centro Acadêmico Disciplinar– Central Analítica– da Universidade Federal do Amazonas pelas análises realizadas constantes nesse trabalho.

À Central Analítica do Laboratório Temático de Química de Produtos Naturais (CALTQPN-INPA) pelas análises por RMN.

À CAPES pelo apoio financeiro.

A vitória pertence àqueles que persistem.

Não ao melhor.

João Rodrigo Leão

RESUMO

A Amazônia se destaca por sua vasta biodiversidade vegetal, que pode ser considerada origem da descoberta de novas substâncias naturais. Nessa família, o estudo de triterpenos ácidos vem se destacando devido à sua aplicação biológica contra atividade nociva à saúde humana. Nesse aspecto, o estudo teve como objetivo isolar os constituintes químicos polares das resinas de Burseraceae, bem como modificar estruturalmente as substâncias isoladas em seus respectivos derivados ésteres metílicos para o isolamento dos triterpenos ácidos mais polares. Para alcançar esses objetivos, primeiro foi realizada uma ampla reanálise dos extratos em hexano e acetato de etila por meio de técnicas clássicas (CCD). Em seguida, selecionaram-se cinco espécies sendo elas: *P. strumossum*; *P. paniculatum* var *modestum*; *P. cf. heptaphyllum*; *P. altsonii* e *P. hebetatum*. As frações ácidas dessas espécies foram comparadas por meio de CCD, e realizou-se o tratamento estatístico por análise multivariada (HCA e PCA). Essa análise permitiu fracionar os extratos de *P. hebetatum* e *P. altsonii* e as substâncias isoladas foram identificadas por EM (APCI) e RMN (1-D/2D). Os resultados mostraram que a espécie *P. altsonii* levou ao isolamento do ácido 3 α -hidroxitirucala-7,24-dieno-21-oico. Além disso, identificou-se em mistura os ácidos 3-oxo-tirucala-8,24-dieno-21-oico, 3 β -hidroxitirucala-8,24-dieno-21-óico e 3 α -hidroxioleanano-12-eno-23-oxo-28-oico nas demais frações dessa espécie. Já o estudo de *P. hebetatum* levou à elucidação estrutural da mistura do ácido 3-oxo-tirucala-8,24-dieno-21-oico (ácido β -elemólico); 3 α -hidroxitirucala-8,24-dieno-21-óico (α -elemólico) e 3 α -hidroxitirucala-7,24-dieno-21-óico. O desenvolvimento da estratégia em formular derivados metílicos, a partir das frações ácidas e dos padrões obtidos, foi resolvido por meio do emprego de trimetilsilildiazometano sendo acompanhada a reação por CCD e espectroscopia de RMN de ^1H . Posteriormente, o estudo da metodologia em aumento de escala consistiu em transformar os triterpenos ácidos em ésteres metílicos de *P. strumossum* utilizando catálise ácida empregando ácido clorídrico em metanol que rendeu bons resultados, quando observado o aumento do fator de retenção das substâncias em CCD. Os ésteres metílicos de *P. strumossum* foram separados por cromatografia de sílica *flash*, e submetidos à identificação por EM (APCI). A análise do espectro de massas permitiu apontar a presença da mistura dos derivados metílicos de 3-oxo-hidroxitirucala-8,24-dien-21-oico, 3-hidroxitirucala-8,24-dien-21-oico (β -elemólico) e 3-hidroxitirucala-7,24-dien-21-oico (α -elemólico). Os resultados também foram sugestivos para a presença do derivado de 3-acetóxi do ácido elemólico, aos análogos metilados aos ácidos ursólico e oleanoico.

Palavras-chave: Burseraceae; triterpenos ácidos; resina; ésteres metílicos.

ABSTRACT

The Amazon stands out for its vast plant biodiversity, which can be considered the source of the discovery of new natural substances. In this family, the study of acid triterpenes has been highlighted due to its biological application against harmful activity to human health. In this regard, the study aimed to isolate the polar chemical constituents of Burseraceae resins, as well as structurally modify the isolated substances in their respective methyl ester derivatives for the isolation of the most polar acid triterpenes. To achieve these goals, a broad reanalysis of hexane and ethyl acetate extracts by classical techniques (CCD) was first performed. Then, five species were selected: *P. strumossum*; *P. paniculatum var modestum*; *P. cf. heptaphyllum*; *P. altsonii* and *P. hebetatum*. The acid fractions of these species were compared by CCD, and the statistical treatment was performed by multivariate analysis (HCA and PCA). This analysis allowed the fractionation of *P. hebetatum* and *P. altsonii* extracts and the isolated substances were identified by MS (APCI) and NMR (1-D / 2D). The results showed that *P. altsonii* led to the isolation of 3 α -hydroxytirucala-7,24-diene-21-oic acid. In addition, 3-oxo-tirucala-8,24-diene-21-oic acids, 3 β -hydroxytirucala-8,24-diene-21-oic acids and 3 α -hydroxyoleanan-12-eno-23-oxide were identified. 3-oxo-28-oic in the other fractions of this species. The study of *P. hebetatum* led to the structural elucidation of the mixture of 3-oxo-tirucala-8,24-diene-21-oic acid (β -elemolic acid); 3 α -hydroxytirucala-8,24-diene-21-oic (α -elemolic) and 3 α -hydroxytirucala-7,24-diene-21-oic. The development of the strategy to formulate methyl derivatives from the acid fractions and the obtained standards was solved by the use of trimethylsilylthiazomethane, followed by CCD reaction and ¹H NMR spectroscopy. Subsequently, the study of the scaling up methodology consisted of transforming the acid triterpenes into *P. strumossum* methyl esters using acid catalysis employing hydrochloric acid in methanol which yielded good results, when the increase of the retention factor of the substances in CCD was observed. The *P. strumossum* methyl esters were separated by flash silica chromatography and subjected to MS identification (APCI). Mass spectrum analysis showed the presence of a mixture of 3-oxohydroxytirucala-8,24-dien-21-oic, 3-hydroxytirucala-8,24-dien-21-oic methyl derivatives (β -elemolic) and 3-hydroxytirucala-7,24-dien-21-oic (α -elemolic). The results were also suggestive for the presence of the elemolic acid 3-acetoxy derivative to the ursolic and oleanic acid methylated analogs.

Keywords: Burseraceae; acid triterpenes; resin; methyl esters.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Cátion damarenil (I) e cátion protoesteril (II) precursores de triterpenos tetracíclicos e pentacíclicos. 33

Figura 2. Cátion protoesteril (III) e cátion curcubitenil (IV) precursores de triterpenos tetracíclicos. com OH em C-1. 34

Figura 3. Triterpenos do tipo oleanano e ursano encontrados nas resinas de Burseraceae. 35

Figura 4. Triterpenos derivados oxigenado da série ursano e oleanano presentes na família Burseraceae. 36

Figura 5. Estrutura do ácido 2-Boswélico encontrada em *Boswellia carteri* e *Boswellia serrata*. 37

Figura 6. Triperpenos diidroxilados encontrados em oleorresinas de *Bowelia serrata*. 37

Figura 7. Principais fragmentos do tipo ursano e oleanano a partir do mecanismo retro Dials-Alder. 38

Figura 8. Fragmentos do tipo ursano e oleanano para m/z 203. 39

Figura 9. Substâncias identificadas nos frutos de *Canarium schweinfurthii* Engl (Burseraceae). 40

Figura 10. Estruturas dos ácidos identificados em *Bursera graveolens*. Legendas: (1) ácido 3-oxotirucala-8,24-dien-21-oico (ácido β -elemólico); (2) 3 α -hidroxitirucala-8,24-dien-21-oico (α -elemólico) e (3) 3 α -hidroxitirucala- 7,24-dien- 21-oico. 40

Figura 11. Fragmentação a partir da clivagem em C-7 do ácido α -elemólico. 41

Figura 12. Fragmentação a partir da clivagem em C-8 do ácido 3-oxo-tirucala (Budzikiewicz *et al.*, 1963). 42

Figura 13. Esqueletos do tipo multiflorano encontrados em *Protium picramnioides* (sin. *Tetragastris panamensis*) (Rüdiger, 2012). Legenda: em (A) ácido 3-oxo-triptocálico B; em (B) ácido triptocálico B e em (C) Multiflora-7-eno-3-ol. 43

Figura 14. Síntese química de derivados 1,2,3-triazólicos utilizando o lupeol como material de partida (Borgati *et al.*, 2017). 44

Figura 15. Derivado 1,2,3-triazólicos a partir do ácido betulínico. 45

Figura 16. Hidrogenação da dupla ligação (derivado do ácido oleanólico) que apresentou atividade anti-HIV. 46

Figura 17. Derivado do ácido oleanólico inibidor do vírus influenza. 46

Figura 18. Fluxograma experimental das atividades desenvolvidas na dissertação. 59

Figura 19. Cromatograma por CCD para os extratos em hexano, acetato de etila e metanol de resina das espécies *Protium cf rubrum* (PRU), *Protium aracouchini* (PAR), *Protium elegans* (PEL), *Protium grandifolium* (PGR), *Protium opacum var. opaccum* (POO), *Protium cf. paniculatum* (PPA) e *Protium paniculatum var. riedelianum* (PPR). 61

Figura 20. CCD dos extratos obtidos em acetato de etila e metanol de resina das espécies *Protium grandifolium* (PGR), *Protium paniculatum var. riedelianum* (PPR), *Protium opacum var. opaccum* (POO) e *Protium cf. paniculatum* (PPA). 62

Figura 21. CCD para os extratos obtidos em hexano, acetato de etila e metanol de *Protium polybotryum ssp blackii* (PPB), *Protium nitidifolium* (PNI), *Protium sp2* (BRC-2) e *Dracyodes hopkinsii* (DHO). 63

Figura 22. Cromatograma por CCD para os extratos obtidos em hexano, acetato de etila e metanol de *Trattinnickia glaziovii* (TGL), *Trattinnickia peruviana* (TPE), *Crepidosperrum rhoifolium* (CRH) e *Tetragastris panamensis* (TPA). 64

Figura 23. Cromatograma por CCD dos extratos obtidos em hexano, acetato de etila e metanol de oleorresina de *Tetragastris panamensis* (TPA), *Protium tenuifolium* (PTE), *Protium apiculatum* (PAP-1) e *Protium cf. apiculatum* (PAP-2). As amostras foram eluídas em Hex//DCM/AcOEt (6:2:2) e reveladas em vanilina sulfúrica 65

Figura 24. Cromatograma das amostras de resina de *Protium cf. apiculatum* (PAP-2), *Protium bahianum* (PBA) *Protium sp.1* (BRC-1) em hexano (5) e *Protium cf. kleinii* (PKL). 66

Figura 25. Esqueleto dos ácidos ursólico e oleanólico de *Protium bahianum* isoladas e identificadas por RNM 1-D/2-D Rüdiger (2007). 67

Figura 26. Análise por CCD das amostras de resinas de *Protium cf. heptaphyllum* (PHP-1) obtidas em hexano (1 e 2) e acetato de etila (3,4) e, amostras de *Protium strumossum* (PSP) extraídas em acetato de etila (5). 68

Figura 27. Análise por CCD das amostras de óleo-resina de *Protium decandrum* (PDE;1), *Protium paniculatum* var. *modestum* (PPN;2 e 3), *Protium hebetatum* forma A (PHB-1;4), *Protium hebetatum* (PHB-2;5), *Protium altsonii* (PAL;6) e *Protium cf. laxiflorum* (PLA;7). 69

Figura 28. Fluxograma do fracionamento do extrato em acetato de etila de . 71

Figura 29. Perfil cromatográfico do fracionamento de *P. cf. heptaphyllum* (EDFB25) por cromatografia de sílica impregnada com KOH. Legenda: (1) α,β -amirina (2) extrato bruto de EDFB25b, (3) fração hexânica (EDFB25h), (4) fração dos não-ácidos (EDFB25n), (5) fase ácida (EDFB25pH3). 72

Figura 30. Fluxograma do fracionamento da resina de *Protium strumossum*. 73

Figura 31. CCD do fracionamento de *P. strumossum* (ECRQ25) por cromatografia de sílica impregnada com KOH. Legenda: (1) α,β -amirina (2) extrato bruto de ECRQ25b, (3) fração hexânica (ECRQ25h), (4) fração dos não-ácidos (ECRQ25n), (5) fase ácida (ECRQ25pH3). 74

Figura 32. Fluxograma do fracionamento da resina de *Protium paniculatum* var *modestum*. 75

Figura 33. Perfil cromatográfico do fracionamento de *Protium paniculatum* var *modestum* (ECNC21) por sílica impregnada com KOH. Legenda: (1) - α,β -amirina; (2) extrato bruto de ECNC21b, (3) fração hexânica (ECNC21h); (4) fração dos não-ácidos (ECNC21n), (4) fase ácida (ECNC21pH13). 76

Figura 34. Fluxograma do fracionamento da resina de *Protium hebetatum*. 77

Figura 35. Perfil cromatográfico do fracionamento de *Protium hebetatum* (ECVC21) por sílica impregnada com KOH. Legenda: (1) - α,β -amirina; (2) extrato bruto de ECVC21b, (3) fração hexânica (ECVC21h); (4) fração dos não-ácidos (ECVC21n), (4) fase ácida (ECVC21pH4) 78

Figura 36. Fluxograma do fracionamento do extrato em hexano de *Protium. altsonii*. 79

Figura 37. Perfil cromatográfico do fracionamento de *P. altsonii* (ECAH21) por cromatografia de sílica impregnada com KOH. Legenda: (1) α,β -amirina (2) extrato bruto de ECAH21b, (3) fração hexânica (ECAH21h), (4) fração dos não-ácidos (ECAH21n), (5) fase ácida (ECAH21). 80

Figura 38. Perfil químico por cromatografia em camada delgada das fases ácidas obtidas através da coluna de KOH. Legenda: em (1) *P. cf. heptaphyllum*

(EDFB25pH3); (2) *P. strumosum* (ECRQ25pH3); (3) *P. paniculatum var. modestum* (ECNC21pH2); (4) *P. hebetatum* 2 (pH4); (5) *Protium altsonii* (pH5). 82

Figura 39. Dendograma obtido para as fases ácidas de resinas de Burseraceae a partir da análise de ausência e presença de Rf. 84

Figura 40. Distribuição de cinco espécies por análises de componentes principais utilizando como variáveis os fatores de retenção. 85

Figura 41. Fluxograma do fracionamento da fase ácida de *P. altsonii*. 87

Figura 42. Perfil cromatográfico do fracionamento dos ácidos de *P. altsonii*. 88

Figura 43. Fluxograma da coluna de fracionamento dos ácidos de *P. altsonii*. 89

Figura 44. Perfil cromatográfico da coluna de fracionamento da fase ácida de *P. altsonii* em (A) e, em (B), análise por CCD das frações de f1.1 à f1.4. 90

Figura 45. Cristais obtidos da fração 1.3 de *P. altsonii* após recristalização por MeOH. 90

Figura 46. Fluxograma do fracionamento de *P. altsonii*, no modo isocrático, da amostra f2.1 por cromatografia de sílica flash. 91

Figura 47. Perfil cromatográfico do fracionamento de f2.1 por cromatografia de sílica flash de *P. altsonii*. 92

Figura 48. Escaneamento completo obtido por APCI no modo negativo $[M - H]^-$. Mostrando o pico de maior intensidade em 455,49 m/z de PA1. 93

Figura 49. Espectro de RMN de 1H de PA1 (300 MHz, solvente: $CDCl_3$). 94

Figura 50. Espectro de RMN de 1H de PA1 e expansão da região entre δ 2,2-0,75 ppm (300 MHz, solvente: $CDCl_3$). 95

Figura 51. Espectro de RMN de ^{13}C de PA1 e expansão da região entre δ 207-118 ppm (300 MHz, solvente: $CDCl_3$). 96

Figura 52. Sugestão de triterpenos ácidos encontrados em PA1. Legenda: em (A) ácido 3α -hidroxitirucala-8,24-dien-21-óico e (B) 3α -hidroxitirucala-7,24-dien-21-óico. 97

Figura 53. Espectro de RMN de ^{13}C de PA1 destacando na seta em azul o sinal em δ 207 ppm (300 MHz, solvente: $CDCl_3$). 98

Figura 54. Gipsogenina (ácido 3 α -hidroxioleanano-12-eno-23-oxo-28-oico) isolada de *Arenaria filicaulis*. 98

Figura 55. Escaneamento completo obtido por APCI no modo negativo [M -- H]⁻. Mostrando o pico de maior intensidade em 471,51 m/z de PA3. 99

Figura 56. Escaneamento completo obtido por APCI, no modo negativo [M -- H]⁻, de PA2 mostrando o pico de maior intensidade em 453,65 m/z. 100

Figura 57. Espectro de RMN de ¹H de PA2 e suas expansões (500 MHz, solvente: CDCl₃). 102

Figura 58. Espectro de RMN de ¹³C em (A) e DEPT 135 em (B) de PA2 (500 MHz, solvente: CDCl₃). 103

Figura 59. Espectro de correlação COSY e ampliações (500 MHz, solvente: CDCl₃). 105

Figura 60. Estrutura do ácido 3-oxo-tirucala-8,24-dien-21-oico, identificado em PA2, mostrando as correlações dos principais deslocamentos de ¹H,¹³C, DEPT 135 e COSY. 106

Figura 61. Espectro de HSQC de PA2 e ampliações (500 MHz, solvente: CDCl₃). 107

Figura 62. Estrutura do ácido 3-oxo-tirucala-8,24-dieno-21-oico identificado de *P. altsonii* (PA2), com sinais de correlação de RMN de ¹³C, HMBC e COSY. 108

Figura 63. Espectro de HMBC de PA2 e ampliações (500 MHz, solvente: CDCl₃). 111

Figura 64. Substâncias presentes nos cristais obtidos de *Protium altsonii* (PA2). Ácido 3-oxo-tirucala-8,24-dien-21-óico em (A) e ácido 3 β -hidroxitirucala-8,24-dieno-21-óico em (B). 113

Figura 65. Escaneamento completo obtido por APCI, no modo negativo [M - H]⁻, de PA4 mostrando o pico de maior intensidade em 455,53 m/z. 114

Figura 66. Espectro de RMN de ¹H de PA4 e ampliações (300 MHz, solvente: CDCl₃). 115

Figura 67. Espectro de RMN de ¹³C de PA4 e ampliação da região em (A) (300 MHz, solvente: CDCl₃). 116

Figura 68. Espectro de correlação homonuclear (^1H - ^1H) COSY de PA4 (300 MHz, solvente: CDCl_3). 117

Figura 69. Espectro de correlação heteronuclear (^1H - ^{13}C -HSQC) da amostra PA4 e ampliação em C-20 (300 MHz, solvente: CDCl_3). 118

Figura 70. Espectro bidimensional (^1H - ^{13}C -HMBC) da amostra PA4 e ampliação (300 MHz, solvente: CDCl_3). 119

Figura 71. Ampliação do espectro bidimensional (^1H - ^{13}C -HMBC), da amostra PA4, mostrando a correção de δ 13,08 ao anel A e B do triterpeno (300 MHz, solvente: CDCl_3). 120

Figura 72. Estrutura do ácido 3α -hidroxitirucala-7,24-dieno-21-óico isolado de *Protium altsonii* (PA4). Em (A) correlações de ^{13}C e em (B) correlações de COSY e HMBC. 121

Figura 73. Formação do esqueleto tirucalano a partir da isomerização alílica do esqueleto tipo eufol (C-B-B-B). 123

Figura 74. Fluxograma do fracionamento da fase ácida de *Protium hebetatum* (ECVC21). 124

Figura 75. Cromatografia em camada delgada do fracionamento por coluna *flash* de *Protium hebetatum*. 125

Figura 76. Cromatografia em camada delgada de *Protium hebetatum* da fração f1.1 a f1.4. 126

Figura 77. Escaneamento completo obtido por APCI, $[\text{M} - \text{H}]^-$, da fração PH13 mostrando o pico de maior intensidade em 453,56 m/z. 127

Figura 78. Espectro de RMN de ^1H de PH13 e suas ampliações (300 MHz, solvente: CDCl_3). 129

Figura 79. Espectro de RMN de ^{13}C de PH13 (300 MHz, solvente: CDCl_3). 130

Figura 80. Espectro de correlação homonuclear (^1H - ^1H) - COSY de PH13 e ampliações (300 MHz, solvente: CDCl_3). 131

Figura 81. Espectro de correlação heteronuclear (^1H - ^{13}C) da amostra PH13 e ampliações (300 MHz, solvente: CDCl_3). 133

Figura 82. Esqueleto alifático da amostra PH13 mostrando as correções dos deslocamentos dos hidrogênios e ^{13}C . 135

Figura 83. Esqueleto alifático e anel D da amostra PH13 mostrando as correções dos deslocamentos dos hidrogênios e ^{13}C . 135

Figura 84. Espectro de correlação a longa distância (^{13}C - ^1H) HMBC e expansões (300 MHz, solvente: CDCl_3). 136

Figura 85. Estrutura do ácido 3 α -hidroxitirucala-7,24-dieno-21-oico identificado de *P. hebetatum* (PH13), com sinais de correlação de RMN de ^{13}C (em A) e HMBC (em B). 138

Figura 86. Estruturas dos ácidos identificados em *Protium hebetatum* das resinas de Burseraceae. Legendas: (1) ácido 3-oxotirucala-8,24-dien-21-óico (ácido β -elemólico); (2) 3 α -hidroxitirucala-8,24-dien-21-óico (α -elemólico) e (3) 3 α -hidroxitirucala-7,24-dien-21-oico. 139

Figura 87. Perfil cromatográfico comparativo entre as fases ácidas concentradas através da coluna de KOH, e as substâncias obtidas através do fracionamento de *P. hebetatum* e *P. altsonii*. Legenda: em (a) *P. cf. heptaphyllum* (EDFB25pH3); (b) *P. strumossum* (ECRQ25pH3); (c) *P. paniculatum* Var. *modestum* (ECNC21pH2), (d) *P. hebetatum* (ECVC21pH4) e (e) *P. altsonii* (ECAH21pH4); **PA1** (mistura dos ácidos 3 α -hidroxitirucala-8,24-dien-21-oico e 3 α -Hidroxitirucala-7,24-dien-21-oico), **PA2** (mistura dos ácidos 3-oxo-tirucala-8,24-dien-21-óico e 3 β -hidroxitirucala-8,24-dien-21-óico) e **PA4** (ácido 3 α -hidroxitirucala-7,24-dien-21-óico); **PH13** (mistura do ácido β -elemólico, α -elemólico e 3 α -hidroxitirucala-7,24-dien-21-oico). 141

Figura 88. Perfil químico das fases ácidas antes e após derivatização com TMSD. Legenda: (a) fase ácida de *P. cf. heptaphyllum* (EDFB25pH3) e **a1** fase ácida de *P. cf. heptaphyllum* derivatizada com TMSD; (b) fase ácida *P. strumossum* (ECRQ25pH3) e **b1** fase ácida de *P. strumossum* derivatizada com TMSD; (c) fase ácida de *P. paniculatum* Var. *modestum* (ECNC21pH2) e **c1** fase ácida de *P. paniculatum* Var. *modestum* derivatizada com TMSD; (d) fase ácida de *P. hebetatum* (ECVC21pH4) e **d1** fase ácida de *P. hebetatum* derivatizada com TMSD; (e) fase ácida de *P. altsonii* (ECAH21pH4) e **e1** fase ácida de *P. altsonii* derivatizada com TMSD. 143

Figura 89. Perfil cromatográfico das substâncias obtidas através do fracionamento de *P. hebetatum* e *P. altsonii*, antes e após a esterificação por TMSD. Legenda: **PA1** (mistura dos ácidos 3 α -hidroxitirucala-8,24-dien-21-oico e 3 α -Hidroxitirucala-7,24-dien-21-oico), **PA2** (mistura dos ácidos 3-oxo-tirucala-8,24-dien-21-óico e 3 β -hidroxitirucala-8,24-dien-21-óico) e **PA4** (ácido 3 α -hidroxitirucala-7,24-dien-21-óico); **PH13** (mistura do ácido β -elemólico, α -elemólico e 3 α -hidroxitirucala-7,24-dien-21-oico). A letra "T" na legenda da descrição denota que a mesma substância foi esterificada com TMSD. 146

Figura 90. Espectro de RMN de ^1H de (PA1; PA2; PA4 e PH13) antes e após a derivatização por TMSD. Legenda: **PA1** (mistura dos ácidos 3 α -hidroxitirucala-8,24-dien-21-oico e 3 α -hidroxitirucala-7,24-dien-21-oico), **PA2** (mistura dos ácidos 3-oxotirucala-8,24-dien-21-oico e 3 β -hidroxitirucala-8,24-dien-21-oico) e **PA4** (ácido 3 α -hidroxitirucala-7,24-dien-21-oico); **PH13** (mistura do ácido β -elemólico, α -elemólico e 3 α -hidroxitirucala-7,24-dien-21-oico). As letras “CT” adicionais na legenda da descrição denotam que a substância foi esterificada com TMSD. 149

Figura 91. Comparação do perfil cromatográfico antes e após a derivatização dos ácidos de *P. strumossum*. Legenda: em (a) fração ácida de *P. strumossum* não derivatizada; em (b) ésteres metílicos após derivatização por metodologia de bancada. 151

Figura 92. Fluxograma da coluna de fracionamento da fase ácida de *Protium strumossum* (ECRQ25PpH3). 154

Figura 93. Perfil cromatográfico do fracionamento de *P. strumossum* (ECRQ25pH3) por cromatografia de sílica *flash*. 155

Figura 94. Perfil cromatográfico por CCD antes e após derivatização por HCl:MeOH da fração metanólica de *P. strumossum*. Legenda: Em (a) fração metanólica de *P. strumossum* antes da síntese em ésteres metílicos e (b) derivados metílicos após esterificação por HCl:MeOH. 156

Figura 95. Derivatização das fases ácidas em ésteres metílicos através da reação com $\text{AlCl}_3/\text{MeOH}$ 14%. Legenda: (a) fase ácida de *P. strumossum*; (b) fase orgânica solúvel em *n*-hexano; (c) fase orgânica residual. 158

Figura 96. Derivatização das fases ácidas em ésteres metílicos através da reação com $\text{AlCl}_3/\text{MeOH}$ 14%. Legenda: (a) fase ácida de *P. strumossum* (b) fase orgânica solúvel em *n*-hexano; (c) fase orgânica residual. 159

Figura 97. Fluxograma da coluna de isolamento de ésteres metílicos de *P. strumossum*. 160

Figura 98. Perfil Químico da coluna de isolamento de ésteres metílicos por cromatografia por coluna de sílica *flash*. Legenda: P- fração esterificada de *P. strumossum*. 161

Figura 99. Espectro de massas obtido por APCI ($[\text{M} + \text{H}]^+$), da fração 8 mostrando o pico de maior intensidade em m/z 439,56. 163

Figura 100. Espectro de massas obtido por APCI ($[\text{M} + \text{H}]^+$) da fração 6 mostrando o pico em 512 m/z sugestivo ao 3-acetóxi. 163

Figura 101. Fragmentos do derivado elemólico 3 α -acetóxi-tirucala-8,24-dien-óico (Assimopoulou e Papageorgiou, 2005). 164

Figura 102. Espectro de massas obtido por APCI ($[M + H]^+$) da fração 13 mostrando a perda da cadeia lateral em m/z 313. 165

Figura 103. Esqueleto do tipo tirucalano sugerindo a perda da cadeia lateral pela presença do íon m/z 313. 165

Figura 104. Principais fragmentos do ácido ursólico e oleanólico sugerido por (Sanchez-Avila *et al.*, 2009). 166

Figura 105. Espectro de massas obtido por APCI ($[M + H]^+$) da fração 18. 167

Figura 106. Fragmentos do ácido manslínico mostrando os íons em m/z 409, 203 e 189. 168

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Descrição das espécies de Burseraceae estudadas, sigla, local/período de coleta e extrato. 50

Tabela 2. Rendimento das fases ácidas obtidas após fracionamento por cromatografia de sílica impregnada com KOH. 81

Tabela 3. Correlações por RMN (1-D e 2-D) de PA2. 109

Tabela 4. Correlações por RMN DE ^{13}C e DEPT em comparação com dados de Usubillaga *et al.*, 2004). 112

Tabela 5. Correlações dos deslocamentos por RMN de 3 α -hidroxi-tirucala-7,24-dieno-21-óico obtido de *P. altsonii*. Dados comparativo de acordo com (Mora *et al.*, 2001). 122

Tabela 6. Correlações dos deslocamentos por RMN de 3 α -hidroxi-tirucala-7,24-dieno-21-óico obtido de *P. hebetatum* comparativo com os dados de (Mora *et al.*, 2001). 137

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

ACN – Acetonitrila

APCI- Ionização Química por pressão Atmosférica

cm – centímetros

Arb- medida de fluxo de gás

CDCl₃ – Clorofórmio deuterado

CCD- Cromatografia em Camada Delgada

CCF- cromatografia por coluna *flash*

CAM- Centro de Apoio Multidisciplinar

CA-LTQPN- Central Analítica do Laboratório Temático de Química de Produtos Naturais

COSY- espectroscopia de correlação (sigla em inglês *Correlation Spectroscopy*)

CGEM- cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas

DCM – diclorometano

DEPT – Intensificação da distorção por transferência de polarização (sigla inglês *distortionless enhancement by polarization transfer*).

END – Exsicata não depositada

EDFB25- *Protium hebetatum*

ECRQ25- *Protium strumosum*

ECNC21 – *Protium paniculatum var. modestum*

ECVC21 – *Protium habetatum*

ECAH21- *Protium altsonii*

g- grama

h- horas

J – Constante de acoplamento

MHz- Megahertz

Hex– Hexano

HPLC- Cromatografia Líquida Acoplada à Espectrometria de Massas (do inglês *High Pressure Liquid Chromatography*)

HSQC -Correlação Heteronuclear Múltiplo Quântica (do inglês *Heteronuclear Single Quantum Correlation*)

HMBC -Coerência heteronuclear através de múltiplas ligações (do inglês *Heteronuclear Multiple Bond Coherence*)

HCA- Análise por Agrupamento Hierárquico

H₂O – água

INPA- Instituto Nacional de Pesquisa da Amazônia

IDH- índice de deficiência de hidrogênio

KOH – Hidróxido de potássio

Km- quilômetro

Kv – quilovolts

LBCEM- Laboratório de Cromatografia e Espectrometria de Massas

lbf/pol²- medida de pressão

L- litro

mL - mililitro

m/z- razão massa carga

MEC – metil-etil-cetona

MeOH- metanol

M- molar

mL/min- mililitro por minuto

NaCl- cloreto de sódio

Nm- nanômetro

PCA- Análises de Componentes Principais

ppm- partes dos milhão

PA1- *Protium altsonii* 1

PA2- *Protium altsonii* 2

PA3- *Protium altsonii* 3

PA4- *Protium altsonii* 4

PH13 – *Protium hebetatum* 13

μM- micrômetro

Ph- potencial hidrogeniônico

Kgf/cm²- quilograma força por centímetro ao quadrado

RMNLAB – Laboratório de Ressonância Magnética Nuclear.

RMN ¹H- Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio

RMN ¹³C- Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear de Carbono 13

RMN- Ressonância Magnética Nuclear

Rf- fator de retenção

UFAM- Universidade Federal do Amazonas

V-volts

[M+H]⁺ - modo positivo

[M-H]⁻ - modo negativo

μL – microlitro

Ø- diâmetro

α- alfa

β-beta

δ-delta

°C- Graus Celsius

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	27
2. REVISÃO DA LITERATURA	29
2.1 ASPECTOS DA FAMÍLIA BURSERACEAE.....	29
2.2 IMPORTÂNCIA QUÍMICA EM RESINAS DE BURSERACEAE	31
2.3 CONSTITUINTES QUÍMICOS DAS RESINAS DE BURSERACEAE	32
2.4 TRITERPENOS DO TIPO URSANO E OLEANANO	34
2.5 TRITERPENOS DO TIPO EUFANO E TIRUCALANO	39
2.6 TRITERPENOS ÁCIDOS E MODIFICAÇÃO ESTRUTURAL	42
3. OBJETIVOS	49
3.1 OBJETIVO GERAL	49
3.1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	49
4. METODOLOGIA.....	50
4.1 OBTENÇÃO DO MATERIAL BIOLÓGICO.....	50
4.2 METODOLOGIA PARA FRACIONAMENTO E ELUCIDAÇÃO ESTRUTURAL	51
4.2.1 CROMATOGRAFIA DE SÍLICA IMPREGNADA COM HIDRÓXIDO DE	51
POTÁSSIO	51
5. CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA	52
5.1 PRÉ-DERIVATIZAÇÃO CROMATOGRÁFICA.....	52
5.1.2 CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA DE ALTA EFICIÊNCIA	52
5.2 CROMATOGRAFIA POR COLUNA <i>flash</i> (CF).....	53
6. ANÁLISES INSTRUMENTAIS	53
6.1 RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR.....	53
6.2 ESPECTROMETRIA DE MASSAS.....	54
7. MODIFICAÇÃO ESTRUTURAL DAS FASES ÁCIDAS E SUBSTÂNCIAS ISOLADAS.	55

7.1 MÉTODO DE ESTERIFICAÇÃO DE CATÁLISE ÁCIDA EMPREGANDO ÁCIDO CLORÍDRICO EM METANOL	55
7.2 MÉTODO DE ESTERIFICAÇÃO DE CATÁLISE ÁCIDA EMPREGANDO TRICLORETO DE ALUMÍNIO EM METANOL	56
8. RESULTADOS E DISCUSSÃO	57
8.1 SELEÇÕES DOS EXTRATOS DE RESINAS DE BURSERACEAE	59
8.2.1 CROMATOGRAFIA EM COLUNA DE SÍLICA IMPREGNADA COM KOH DE <i>Protium cf. heptaphyllum</i>	70
8.2.2 CROMATOGRAFIA EM COLUNA DE SÍLICA IMPREGNADA COM KOH DE <i>Protium strumosum</i>	73
8.2.4 CROMATOGRAFIA EM COLUNA DE SÍLICA IMPREGNADA COM KOH DE <i>Protium hebetatum</i>	77
8.2.5 CROMATOGRAFIA EM COLUNA DE SÍLICA IMPREGNADA COM KOH DE <i>Protium altsonii</i>	78
8.3 ISOLAMENTO E ELUCIDAÇÃO ESTRUTURAL DE RESINAS DE BURSERACEAE	85
8.3.1 FRACIONAMENTO DE <i>Protium altsonii</i>	86
8.3.2 IDENTIFICAÇÃO ESTRUTURAL DE PA1 E PA3	92
8.3.3 IDENTIFICAÇÃO E ELUCIDAÇÃO ESTRUTURAL DE PA2	99
8.3.4 IDENTIFICAÇÃO E ELUCIDAÇÃO ESTRUTURAL DE PA4	114
8.3 FRACIONAMENTO DE <i>Protium hebetatum</i>	124
8.3.1 IDENTIFICAÇÃO E ELUCIDAÇÃO ESTRUTURAL DE PH13	126
8.4. DERIVATIZAÇÃO DAS FRAÇÕES ÁCIDAS EM ÉSTERES METÍLICOS.....	140
8.5 ESTERIFICAÇÃO DA FRAÇÃO ÁCIDA DE <i>P. strumosum</i> POR METODOLOGIA DE BANCADA	150
8.6 FRACIONAMENTO DOS ÉSTERES METÍLICOS DE <i>Protium strumosum</i> E IDENTIFICAÇÃO POR ESPECTOMETRIA DE MASSAS.....	160
9. CONSIDERAÇÕES FINAIS	170
10. REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA	172

1 INTRODUÇÃO

Os estudos que envolvem a composição química das resinas de Burseraceae revestem-se de grande importância. Os produtos naturais presentes nessa família, possuem inúmeras aplicações em indústrias farmacêuticas, biotecnológicas e agrícolas. Além disso, a busca pelas substâncias oxigenadas tem despertado interesse por conta de sua ampla aplicação em atividades biológicas (SALMON *et al.*, 2016).

A Associação Vida Verde da Amazônia (AVIVE) estimou que 1,5 toneladas de resina e 15 litros de breu são produzidos por ano na região de Silves, no interior do Amazonas (UNDP, 2012). Isso demonstra que atividade extrativista não madeireira é crescente com o manejo desse recurso. Além disso, o surgimento dessa atividade cria oportunidades de mercado sócio-ambiental mantendo a preservação da Flora Amazônica.

De folhas alternas e compostas, e de tronco reto podendo apresentar sapopemas. As árvores da família Burseraceae podem ser encontradas em climas tropicais e subtropicais (RIBEIRO e DALY, 1999). Essas árvores exudam oleorresinas contendo substâncias terpenóides, constituindo de um líquido viscoso, amarelo translúcido e altamente inflamável (BANDEIRA *et al.*, 2007). Essas resinas ocorrem em diversas espécies de Burseraceae (*Canarium e Protium*), e, na Amazônia, são comuns o gênero *Protium*, também produtora de uma oleorresina conhecida como goma-limão do Brasil (MAIA *et al.*, 2000).

Nesse sentido, Rüdiger (2007) reporta que as substâncias não-voláteis presentes nessas resinas, constituem-se de triterpenos pentacíclicos e tetracíclicos, além disso predominam-se majoritariamente de misturas binárias de α,β -amirina (COSTA, 1975). Essas resinas são acumuladoras dos esqueletos do tipo oleanano e

usarno (KHALID *et al.*, 1983) e suas cetonas correspondentes α,β -amirenona e ainda aquelas oxidadas como breína ($3\beta,16\alpha$ -dihidroxi-oleana-12-eno), maniladiol ($3\beta,16\alpha$ -dihidroxi-ursa-12-eno) e taraxtan-3-oxo-20-ol e taraxtano-3-20-diol (MAIA *et al.*, 2000).

A importância dos estudos dos triterpenos oxigenados está em sua aplicação, no que diz respeito, à saúde humana. Como, por exemplo, o ácido betulínico é usualmente distribuído na natureza, e de acordo com o artigo de revisão de (BHATTI e KHERA, 2014) apresentou inibição do vírus de imunodeficiência humana bloqueando a entrada de HIV-1 nas células. Outro fator relevante está associado ao impacto negativo que a obesidade causa, isso afeta a saúde pública e vem sendo acompanhada com outras doenças como a cardiovascular e diabetes do tipo 2 (CARVALHO *et al.*, 2015).

A habilidade de introduzir grupos funcionais em regiões estereoseletivas, bem como o estudo de triterpenos ácidos, desempenha transformações em terpenóides podendo levar à descoberta de novas substâncias, metabólitos ainda não conhecidos com estruturas diferentes das biotransformações já realizadas pela natureza.

De acordo com os pormenores descritos, a pesquisa da família Burseraceae busca a clareza do conhecimento em torno das substâncias ácidas presentes em suas resinas.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 ASPECTOS DA FAMÍLIA BURSERACEAE

A Amazônia possui uma vasta biodiversidade em sua floresta de terra firme, mas a família Burseraceae se destaca.

Os gêneros desta angiosperma têm sido reclassificados ao longo dos últimos 13 anos com o advento dos estudos filogenéticos. Segundo Weeks (2005) eram descritos 18 gêneros divididos em 3 tribos (Canarieae, Protieae e Bursereae). Thulin *et al.* (2008) descreveu uma nova espécie para a tribo Canarieae (*Ambilobea* sp.) e reclassificou o gênero *Beiselia* dentro de uma nova tribo, Beiseleae. De 2005 até 2018, Daly e colaboradores vem apresentando estudos que incluem análises filogenéticas, principalmente dentro da tribo Protieae, o que culminou na reclassificação dos gêneros *Tetragastris* e *Crepidospermum* como seções dentro do gênero *Protium* (Daly e Fine, 2018). Todas essas tribos estão presentes na América, África e trópicos indo-asiáticos, mas a diversidade é acentuada no hemisfério sul devido à Burseraceae não resistir em ambientes de baixas temperaturas e elevadas altitudes (Weeks *et al.*, 2005). Além disso, possui semelhanças com a família Anacardiaceae (Sapindales), mas pode ser distinguida morfológicamente pelas pétalas e resinas (WEEKS *et al.*, 2005).

Na Amazônia, o gênero *Protium* se destaca com 85 espécies descritas segundo MABBERLEY (1998) apud GUIMARÃES (2007, p 68). Dados da Flora do Brasil mostram 53 espécies presentes no Amazonas sendo 12 endêmicas. Recente artigo publicado por Daly (2017) descreve novo táxon denominado de *Protium decorum*, espécie que é restrita na Amazônia periférica encontrada nos limites definidos em Rondônia, Acre, Pado (Bolívia) e regiões no Peru.

A morfologia desse gênero compreende de folíolos com peciólolos pulvinulados e flexionados, exceto *P. subseratum* e *P. apiculatum*. As folhas são alternas e compostas, comportam-se como árvores de pequeno porte, mas arbustos podem ser encontrados na família (RIBEIRO e DALY., 1999).

Seus troncos podem chegar ao dossel da floresta e exsudam um líquido viscoso (semissólido) diferente de oleorresinas presentes em leguminosas (RIBEIRO e DALY, 1999).. A composição química não volátil dessas resinas possui relevante interesse em produtos naturais contra atividades que afetam a saúde humana.

Resinas exsudadas dos troncos das árvores amazônicas são popularmente chamadas de breu branco (*P. hebetatum* Daly), amescla vermelha (*P. heptaphyllum* (Aubl) Marchand), pau-de-breu (*P. strumossum* Daly) e breu vermelho (*P. apiculatum* stuart). Recente estudo de Silva (2016) sobre a composição química de breu, concluiu que diferenciações entre breu preto e branco são mais culturais e regionais que propriamente científicas. Nesses mesmos moldes, elas fazem parte do extrativismo não madeireiro da floresta e geram renda para comunidade no interior do Estado como a Ilha de Silves (SIANI *et al.*, 2017).

Resinas de plantas são mencionadas erroneamente na literatura como exsudados que incluem substâncias insolúveis em água e endurecem quando expostas ao ar. Deve ficar claro que resinas produzidas em plantas não devem se confundir com látex, gomas, óleos ou ceras. Sendo assim, a definição correta segundo Langheim (2003) para resinas devem possuir em sua composição química substâncias voláteis e não voláteis derivadas de metabólitos secundários como terpenos e fenóis. Além disso, devem ser secretadas em locais específicos e interagir significativamente com o meio ambiente.

Em angiospermas, as resinas localizam-se nos aparelhos secretores constituídos por bolsas esquizogêneas que ocorrem no floema primário e xilema de tecido de plantas jovens. Alguns fatores podem afetar a produção de resinas nas plantas, eles envolvem injúrias mecânicas, fatores bióticos (patógenos e insetos) e químicos (PLAWDEN, 2001).

2.2 IMPORTÂNCIA QUÍMICA EM RESINAS DE BURSERACEAE

Vários estudos estão arraigados na literatura científica à respeito dos isoprenóides produzidos em plantas. Eles constituem a unidade básica de terpenos. Sendo assim, há no mínimo duas rotas biossintéticas conhecidas: a do ácido mevalônico e o da 1-Desoxi-D-xilulose-5-fosfato.

A rota do mavelonato é preferencialmente encontrada em seres eucariotos e ocorre no citosol. Sesquiterpenos e triterpenos são sintetizados preferencialmente nessa via. Essa rota biossintética ocorre em seis etapas e utiliza a condensação de *Claisen* a partir de duas moléculas de acetil-CoA. Já a 1-Desoxi-D-xilulose-5-fosfato (ou chamada de metileritritol fosfato) ocorre nos plastídeos e é realizada em sete etapas tendo o gliceraldeído-3-fosfato com a perda da carboxila do ácido pirúvico como material de partida na biossíntese. Nas plantas, os monoterpenos, clorofilas, diterpenos e carotenóides possuem essa via como preferencial (KIRBY e KEASLING, 2009).

Ambas as rotas descritas acima foram evidenciadas com o objetivo de explicar a obtenção de isopentenil difosfato e seu isômero dimetilalil difosfato, os quais servem como base para a formação de terpenóides. Desse modo, as classes comuns já mencionadas compreendem os monoterpenos (10 carbonos), diterpenos (20 carbonos), sesterpenos (25 carbonos) e triterpenos (30 carbonos) (KIRBY e KEASLING, 2009).

Várias dessas moléculas já foram descritas como promissoras para o tratamento de doenças que acometem a saúde humana. O diterpeno paclitaxel obtido de *Taxusbrevifolia* é efetivo anti-câncer ministrado como droga denominado Taxol (TABATA, 2006). Mas há controvérsias, pois, o número de espécies desmatadas pode chegar à 3 mil para produzir apenas 1 Kg de taxol (HORWITZ, 1994; JENNEWEIN e CROTEAU, 2001).

Em torno dos casos descritos acima, a classe de terpenóides seletos diz respeito aos triterpenos ácidos. Weizanzang (2014) mencionou que células tumorais foram induzidas à apoptose em indivíduos *in vivo* e *in vitro*. Nesse mesmo molde, o ácido betulínico é usualmente distribuído na natureza, e, de acordo com o artigo de revisão de (BHATTI e KHERA *et al.*, 2013) apresentou inibição do vírus de imunodeficiência humana com replicação em células H9 de linfócitos, bloqueou a entrada de HIV-1 nas células, e apresentou citotoxicidade contra uma variedade de células tumorais cultivadas.

Apesar de triterpenos ácidos não possuírem administração comercial farmacêutica regulamentada como droga, eles são obtidos sem impacto ambiental ou qualquer outro fator ecológico degradante. Isso pode ser observado na extração de resinas de Burseraceae que emprega injúrias mecânicas no tronco de suas árvores sob cortes transversais (ZUNIGA *et al.*, 2017). Esse material exsudado de seu tronco torna-se produto extrativo não madeireiro preservando a flora local (SIANI *et al.*, 2017). Dessa maneira, essas argumentações servem como base para a pertinência do estudo voltado para a classe de triterpenos ácidos nesse trabalho.

2.3 CONSTITUINTES QUÍMICOS DAS RESINAS DE BURSERACEAE

Os dois tipos de esqueletos têm muito em comum. Triterpenos tetracíclicos e pentacíclicos são derivados a partir de uma série de ciclizações via protonação do

oxigênio no óxido do esqualeno. Os dois possuem suas estruturas estabilizadas através de rearranjo de carbocátions e, além disso, há expansão do anel C (5 membros) para o de 6 membros., conferindo desse modo, maior estabilidade para a estrutura. Isso dá a explicação para os dois tipos de cátions precursores: o cátion protoesteril que possui conformação (cadeira-bote-cadeira-bote) e o cátion damarenil (cadeira-cadeira-cadeira-bote) (figura 1) (XU *et al.*, 2004).

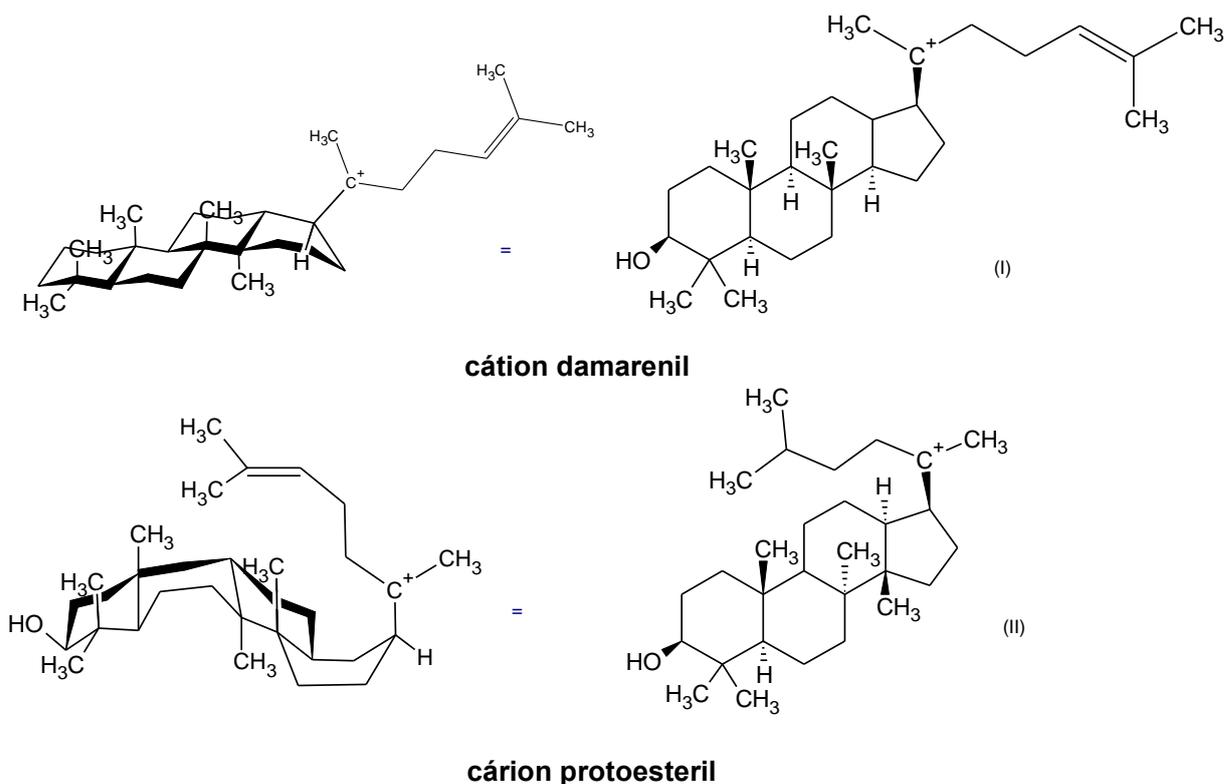


Figura 1. Cátion damarenil (I) e cátion protoesteril (II) precursores de triterpenos tetracíclicos e pentacíclicos.

Nesse primeiro momento, devem-se exaurir os principais cátions precursores conhecidos, uma vez que a reatividade e a formação das diversas conformações de triterpenos em Burseraceae dependem da reatividade relativa de seus cátions. Dito isso, triterpenos tetracíclicos derivados do cátion protoesteril (6-6-6-5) são corriqueiramente mais estudados porque são intermediários cíclicos na biossíntese

de esteróis. Através dele, derivam-se outros cátions como, por exemplo, o lanosteril e cucurbitenil (figura 2) (XU *et al.*, 2004).

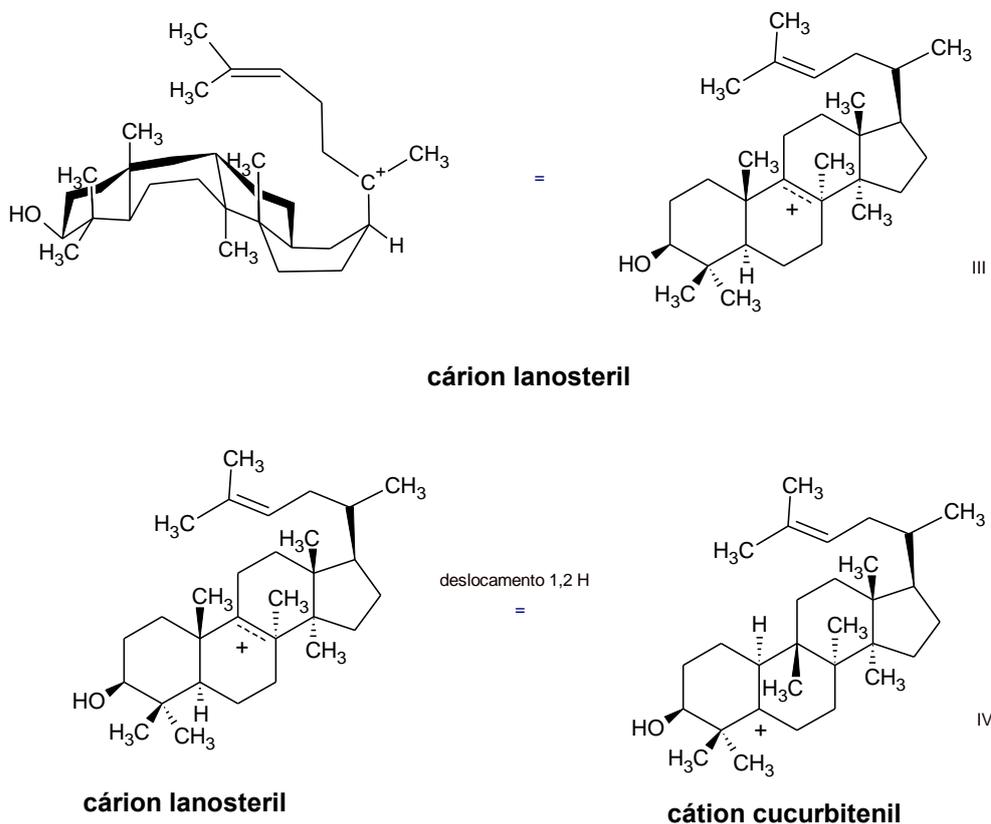


Figura 2. Cátion protoesteril (III) e cátion cucurbitenil (IV) precursores de triterpenos tetracíclicos. com OH em C-1.

Os tipos de esqueletos descritos acima, bem como os do tipo damarano, hopano, cicloartano, friedelano, taraxareno também fazem parte dos constituintes químicos presentes em Burseraceae (SIANI *et al.*, 1999; RUDIGER *et al.*, 2007).

2.4 TRITERPENOS DO TIPO URSANO E OLEANANO

A composição química da família Burseraceae é predominantemente acumuladora de esqueletos do tipo ursano e oleanano, esses dois diferenciam-se apenas na posição do hidrogênio em C-29 para oleananos e a presença do carbono em C-29 para ursanos. As duas substâncias comumente encontrada nas resinas de breu são a α -amirina (ursa-12-eno-3 β -ol) e a β -amirina (olean-12-eno-3 β -ol) (figura 3)

que, em sua biossíntese, apresenta como cátion precursor o taraxasteril e oleanil, respectivamente.

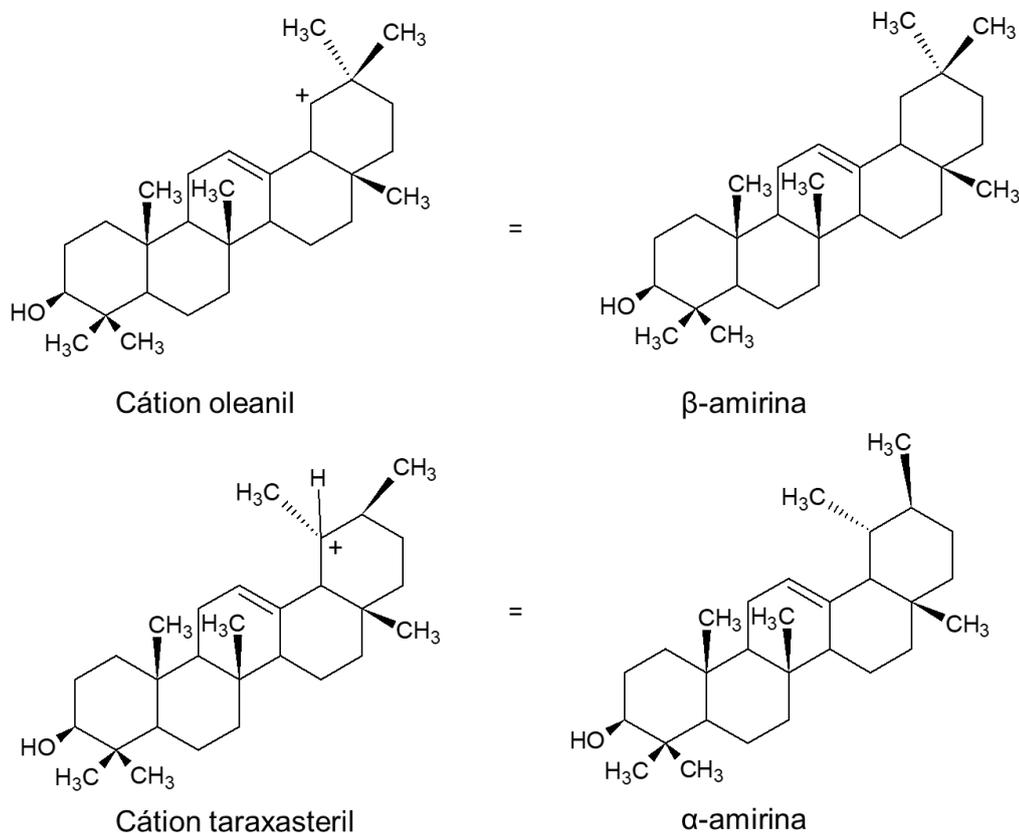


Figura 3. Triterpenos do tipo oleanano e ursano encontrados nas resinas de Bursearaceae.

Além da função álcool presente em suas estruturas são encontrados também seus derivados carbonilados α,β -amirenona (carbonila na posição C-3 do anel A) (Silva *et al.*, 2012) e os hidroxilados breína ($3\beta,16\alpha$ -diidroxiursa-12-eno) e maniladiol ($3\beta,16\alpha$ -diidroxiursa-12-eno) (RÜDIGER e VEIGA JÚNIOR, 2013) (figura 4).

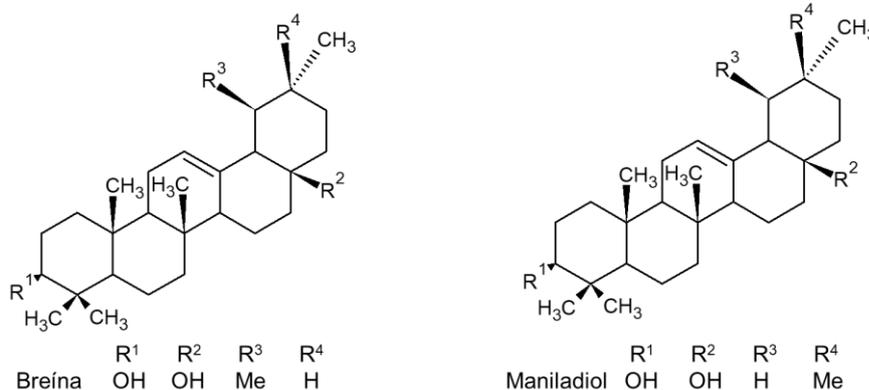


Figura 4. Triterpenos derivados oxigenado da série ursano e oleanano presentes na família Burseraceae.

As substâncias descritas acima possuem grupos orgânicos distintos em suas estruturas que conferem, desse modo, polaridades distintas. Dessa maneira, (FERREIRA *et al.*, 2017) avaliou o potencial inibitório de α -amilase a partir de oxidação da mistura binária de amirinas, empregando-se a oxidação por clorocromato de piridínio em diclorometano levando à obtenção das misturas binárias α,β -amirenona. Entretanto, testes antimicrobianos em *Escherichia Coli* e *Staphylococcus aureus* de derivados dos esqueletos oleanano e ursano (ésteres metílicos), confirmaram que a hidroxila livre na posição C-3 (do anel A) apresenta importância para atividades biológicas (SILVA *et al.*, 2012)..

Boswelliacarteri e *Boswelliaserrata* são espécies pertencentes à família Burseraceae, podendo ser encontradas na Península Arábica, Somália e Índia. As resinas destas espécies, conhecida usualmente como *olibanum*, foram examinadas por (AKIHISA *et al.*, 2006) e revelaram quinze triterpenos ácidos. O isolamento do ácido Boswélico que pertence ao esqueleto do tipo ursano (figura 5) foi importante para a investigação de seu potencial farmacológico. Apesar de sazonalidade interferir na composição química entre as espécies, torna-se relevante mencionar os constituintes químicos identificados nesse local, uma vez encontrada similaridades

volatilidade, opta-se pela fragmentação dos principais íons utilizando derivados de ésteres metílicos analisados por CG-MS (XU *et al.*, 2018). Em geral, a presença da dupla ligação norteia a fragmentação dessas substâncias sugerindo padrões nos diferentes tipos de esqueletos (BUDZIKIEWICZ *et al.*, 1963).

Nesse contexto, os fragmentos dos triterpenos do tipo oleanano e ursano seguem pelo mecanismo de retro-Diels-Alder partindo da dupla ligação presente no anel C (figura 7). A massa do dieno pode ser modificada a depender do grupo funcional presente na posição C-3, porém isso não é observável no fragmento do anel C resultando no pico base em m/z 218 (BUDZIKIEWICZ *et al.*, 1963)..

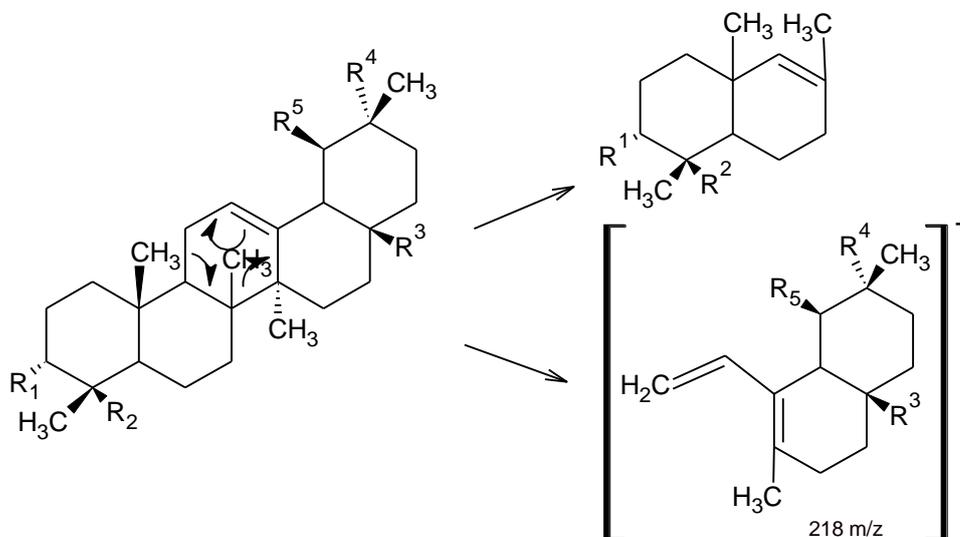


Figura 7. Principais fragmentos do tipo ursano e oleanano a partir do mecanismo retro Diels-Alder.

A diferença entre os espectros de massas dos dois esqueletos é o fragmento observado em 203 m/z. O estudo de (KARLINER e DJERASSI, 1966) com esses terpenos deuteroados analisaram os possíveis mecanismos e concluíram que a expulsão do carbono C-20 juntamente com a quebra homolítica de C-18 e C-19 resulta no cátion dienil. Em contrapartida, nos esqueletos ursanos a clivagem no carbono 28

leva apenas à 35% de abundância do pico em 203 m/z e, desse modo, observa-se a intensidade menor em relação ao oleanano (figura 8).

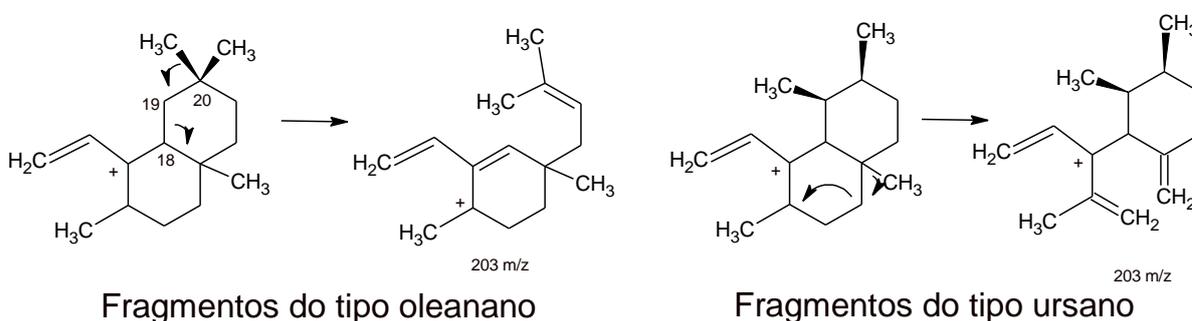


Figura 8. Fragmentos do tipo ursano e oleanano para m/z 203.

Da mesma forma, todas as substâncias possuem padrões de fragmentações e isso também é observável nos esqueletos tetracíclicos do tipo tirucalano.

2.5 TRITERPENOS DO TIPO EUFANO E TIRUCALANO

Esqueletos do tipo eufano e tirucalano foram descritos em espécies de *Protium* e *Tratinnickia* (MAIA *et al.*, 2000). Em 2012, estudos de Siani e colaboradores demonstraram a presença de 13% desses esqueletos em *Tratinnickia rhoifolia* Wild de suas resinas coletadas no Estado do Rio de Janeiro. As estruturas de seus esqueletos provêm do cátion lanosteril (XU *et al.*, 2004) e, foram encontradas, também, em espécies de *Protium crenatum* Sandwich na Venezuela (USUBILLAGA *et al.*, 2004). Na região da África - na República Democrática do Congo- foi identificado em frutos de *Canarium schweinfurthii* Engl (Burseraceae) substâncias fenólicas como o pinoresinol, catecol e o ácido triterpênico 3 α -hidroxiturucala-8,24-dieno-21-oico (figura 9) (NGBOLUA *et al.*, 2015)

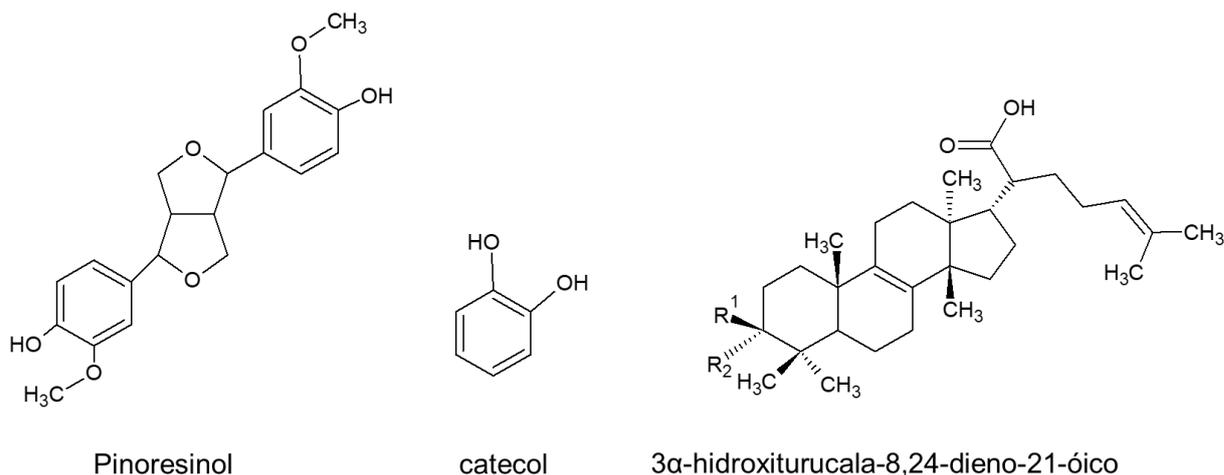


Figura 9. Substâncias identificadas nos frutos de *Canarium schweinfurthii* Engl (Burseraceae).

O material vegetal estudado de *Bursera graveolens* -conhecido como sassafrás na Colômbia – foi avaliado através de estudos fitoquímicos e identificaram-se três triterpenos: 3-oxotirucala-8,24-dien-21-oico (ácido β-elemónico) com função 3-oxo no carbono em C-3 (δ 218,1 ppm - ^{13}C RMN); o ácido 3α-hidroxitirucala-8,24-dien-21-oico (α-elemónico) com uma hidroxila na posição C-3 (*t*, $J = 19\text{Hz}$, H-3 – ^1H RMN) e, por último, o ácido 3α-hidroxitirucala-7,24-dien-21-oico que apresentou o íon molecular em 456 m/z e um hidrogênio olefínico em δ 5,31 ppm (^1H -NMR) demonstrando que a posição da dupla ligação encontra-se na posição C-7 (ROBLES *et al.*, 2005) (figura 10).

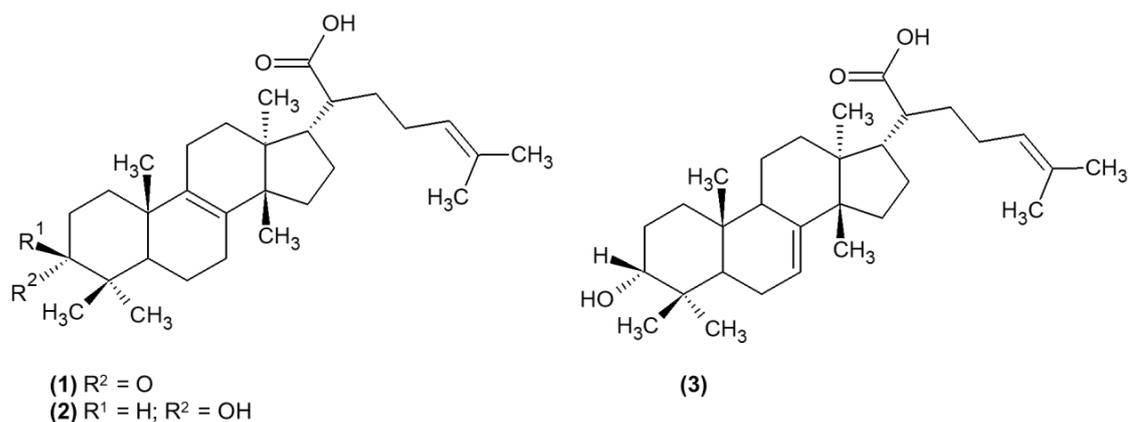


Figura 10. Estruturas dos ácidos identificados em *Bursera graveolens*. Legendas: (1) ácido 3-oxotirucala-8,24-dien-21-oico (ácido β-elemónico); (2) 3α-hidroxitirucala-8,24-dien-21-oico (α-elemónico) e (3) 3α-hidroxitirucala-7,24-dien-21-oico.

A posição da dupla ligação nos eufanos e nos tirucalanos é o que os diferencia. Estudos por CG-MS do éster metílico do ácido α -elemólico, apresentou as principais fragmentações em m/z 189, 159 e 133 (SIANI *et al.*, 2012). Além disso, o mecanismo de fragmentação foi observado pela clivagem do anel em C-7 de acordo com o sugerido por (BUDZIKIEWICZ *et al.*, 1963) (figura 11).

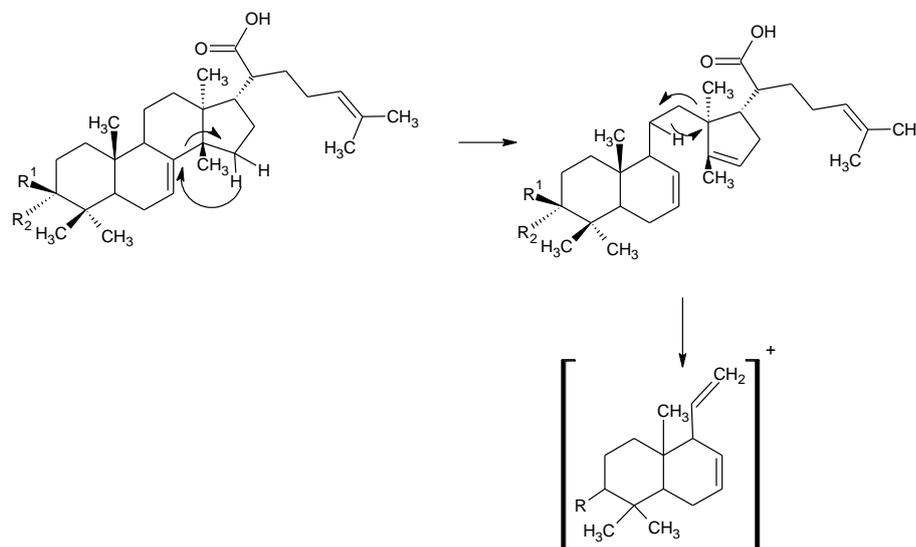


Figura 11. Fragmentação a partir da clivagem em C-7 do ácido α -elemólico.

Trabalhos como o de (SIANI *et al.*, 2012) analisaram fragmentações de ésteres metílicos com amostras de resinas da Flora Amazônica. Com isso, os triterpenos metilado 3-oxo-tirucala-8,24-dien-21-oico, de fórmula $C_{31}H_{48}O_3$, apresentou o íon molecular em m/z 468 $[M]^+$ e as principais fragmentações observadas foram: m/z 119; 189; 393; 421 e 453 (100%). Nesse sentido, Mora e colaboradores estudaram a interação molecular de triterpenos tetracíclicos e, com isso, constataram que a geometria da cadeia alifática presente na cadeia lateral do ácido α -elemólico e de seu isômero, desempenha papel importante na inatividade de membranas celulares, isso assume uma posição *anti* ao carbono C-22 ao C-13 presente cadeia rígida tetracíclica (figura 12) (MORA *et al.*, 2001).

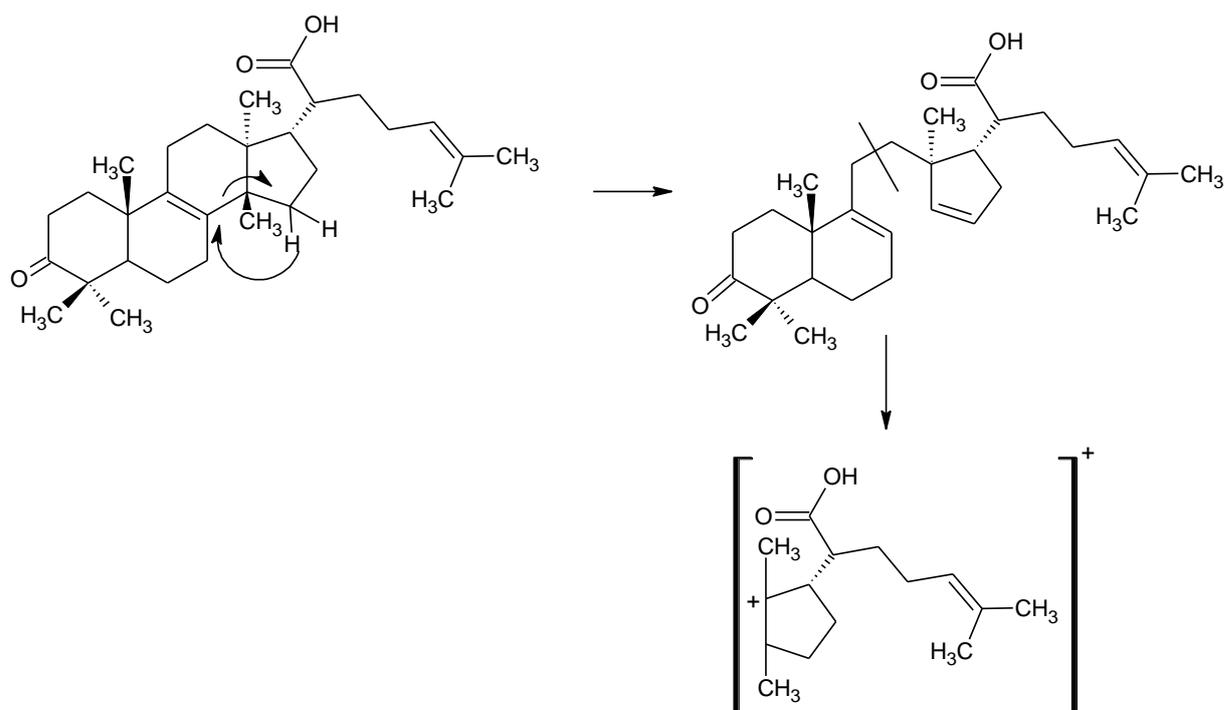


Figura 12. Fragmentação a partir da clivagem em C-8 do ácido 3-oxo-tirucal (BUDZIKIEWICZ *et al.*, 1963).

Muito se fala a respeito dos triterpenos ácidos, isso porque a presença de grupos doadores/retiradores de elétrons em suas estruturas influencia papel importante quanto às doenças nocivas aos seres humanos.

2.6 TRITERPENOS ÁCIDOS E MODIFICAÇÃO ESTRUTURAL

A classe de metabólitos secundários que vêm sendo continuamente estudada pelos pesquisadores diz respeito aos triterpenos ácidos. Essas substâncias ganharam maior atenção devido à sua ação antimicrobiana, anti-tumoral e antioxidante (XU *et al.*, 2018).

Recente artigo de revisão de (ZHANG *et al.*, 2014) mostrou que cada tipo de esqueleto triterpênico influencia em mecanismos diferentes, porém os ácidos do tipo lupano, ursano, oleanano, lanostano possuem a semelhança de agir contra atividade anti-carcinogênica. Os mecanismos citados por esses autores, envolvem a inibição da

proliferação de células tumorais, indução à apoptose de células cancerígenas, inibição de fatores angiogênicos e prevenção de células à metástase.

Das espécies Amazônicas de Burseraceae, Rüdiger (2012) isolou de *Protium bahianum* as misturas do ácido ursólico e oleanólico, do extrato em acetato de etila identificou e elucidou a estrutura dos ácidos α,β -elemólico. Já em de *Protium picramnioides* isolou o ácido 3β -hidroximultiflora-7-eno-29-óico (ácido triptocálico B) demonstrando sua estrutura por dados espectrocópicos, e, também o ácido 3-oxo-multiflora-7-eno-29-óico (ácido 3-oxo-triptocálico B) (figura 13) do extrato em acetato de etila. Do mesmo modo, do extrato em hexano identificou por CG-MS o esqueleto do tipo multiflorano que em estudos anteriores de (LIMA *et al.*, 2001) permanecia sendo o único dessa série quando identificado em *P. altissimum* (sin. *Tetragastris altissima*)

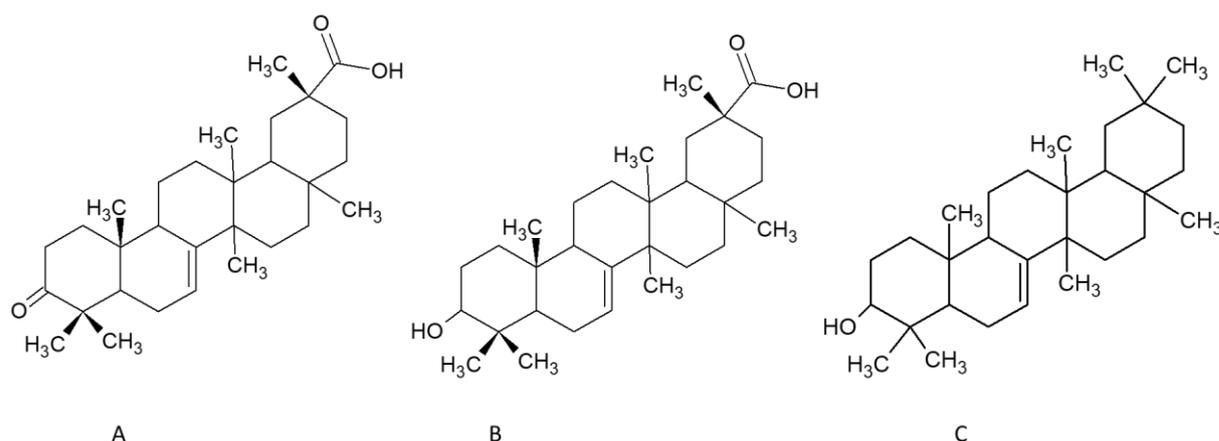


Figura 13. Esqueletos do tipo multiflorano encontrados em *Protium picramnioides* (sin. *Tetragastris panamensis*) (RÜDIGER, 2012). Legenda: em (A) ácido 3-oxo-triptocálico B; em (B) ácido triptocálico B e em (C) Multiflora-7-eno-3-ol.

Modificações estruturais das substâncias oriundas da natureza vêm continuamente sendo estudadas devido a sua atividade bioativa.

Análogos derivados do ácido betulínico- triterpeno do tipo lupano- foram avaliados após a modificação estrutural do anel A que exibiu atividade terapêutica

importante anti-HIV, anti-protozoário (BORKOVA *et al.*, 2018), anti-diabética e antiobesidade (RIOS e MANEZ, 2018). A síntese química desses derivados sintéticos, clinicamente são promissores de uso como drogas terapêuticas (BORKOVA *et al.*, 2018).

Os casos de malária assolam países tropicais devido à disseminação do protozoário *Plasmodium* transmitido através do mosquito *Anopheles*. Através desse problema foi que (BORGATI *et al.*, 2017) avaliou o potencial de derivados triazólicos (figura 14) do lupeol extraídos das cascas de *Parahancornia fasciculata*, e, concluíram que esses derivados sintéticos apresentaram maior lipofilicidade frente ao lupeol, consequentemente, baixa solubilidade nos testes *in vitro* levando à baixa atividade anti-plasmodial.

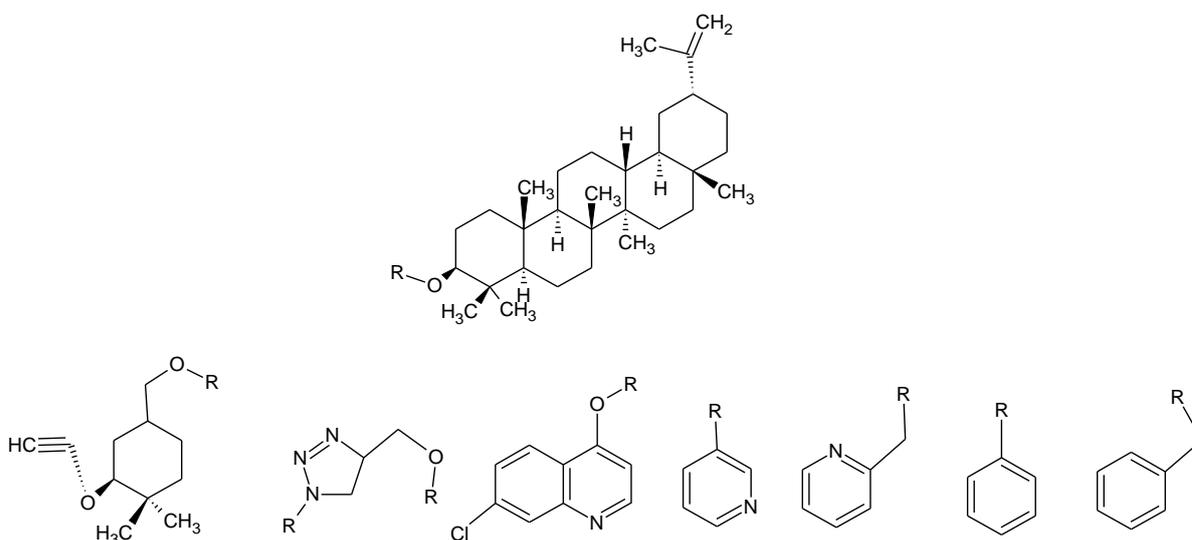


Figura 14. Síntese química de derivados 1,2,3-triazólicos utilizando o lupeol como material de partida (BORGATI *et al.*, 2017).

Diferentemente do que foi descrito acima, os derivados 1,2,3-triazólicos foram avaliados a partir da síntese química, com azida de cobre, a partir do 3-acetil-betulino e a betulona (figura 15). A inserção dos grupos triazólicos foram direcionados para o carbono C-28 e o derivado carbonil betulona apresentou ser promissora para a terapia anti-câncer (BEĀBENEK *et al.*, 2018).

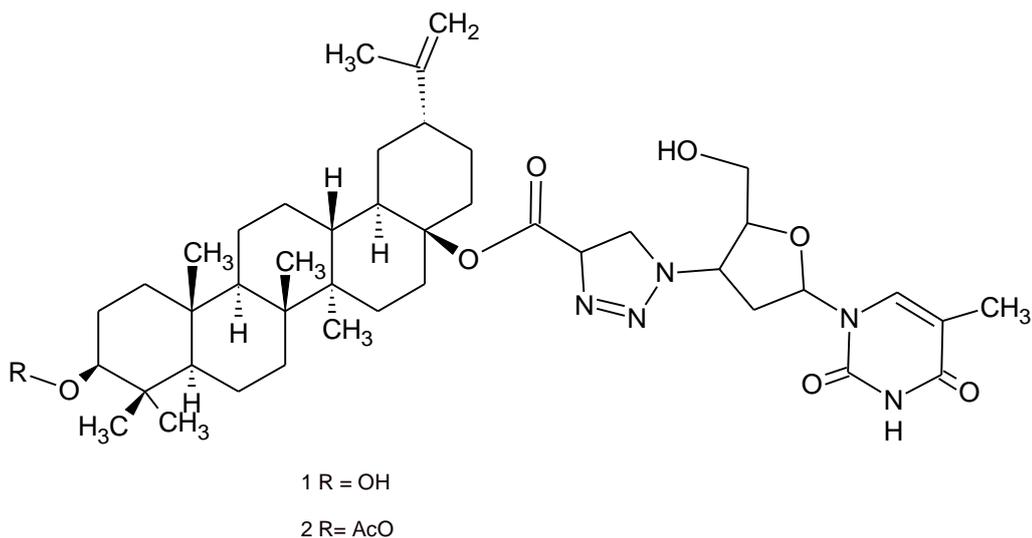


Figura 15. Derivado 1,2,3-triazólicos a partir do ácido betulínico.

Outro produto natural bastante mencionado na literatura diz respeito ao ácido oleanólico. Ele possui três sítios ativos: hidroxila em C-3, insaturação em C-12 e C-13 além do grupo carboxílico em C-28 (BEĀENEK *et al.*, 2018). Esse triterpeno foi mencionado como tendo atividade antioxidante dos frutos de *Punitagranatum* (Punicaceae) (PATTNAIK *et al.*, 2016), anti-inflamatória das folhas de *Rosa laevigata* (Rosaceae) (YAN *et al.*, 2013), anti-microbiana das folhas de *Viburbunchingii* (Asteraceae) (CHEN *et al.*, 2011), anti-diabética das folhas de *Phyllanthusamarus* (Phyllantaceae) (ALI *et al.*, 2006) e analgésica das folhas de *Viscum álbum* (Salantaceae) (RALI *et al.*, 2016)..

No artigo de revisão de (KHWAZA *et al.*, 2018) ele menciona quais grupos funcionais foram inseridos no ácido oleanólico e as diferentes atividades que seus derivados apresentaram. De acordo com isso, hidrogenação da dupla ligação em C-12 e C-13 apresentou ser 3 vezes mais eficaz que o ácido oleanólico na análise da atividade anti-HIV (ZHU *et al.*, 2001) (figura 16).

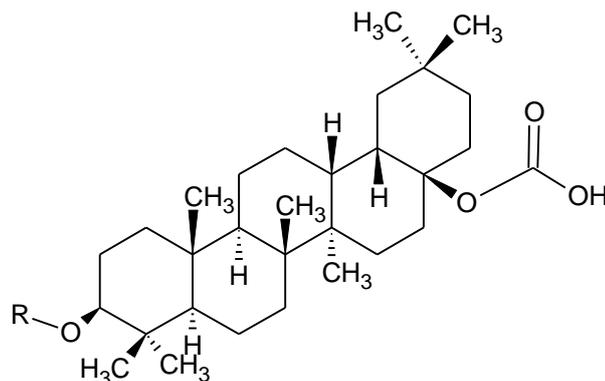


Figura 16. Hidrogenação da dupla ligação (derivado do ácido oleanólico) que apresentou atividade anti-HIV.

Nesses mesmos moldes, o ácido siálico foi inserido no C-28 do ácido oleanólico e inibiu a atividade do vírus influenza quando liga à proteína hemaglutinina (figura 17) (HAN *et al.*, 2016).

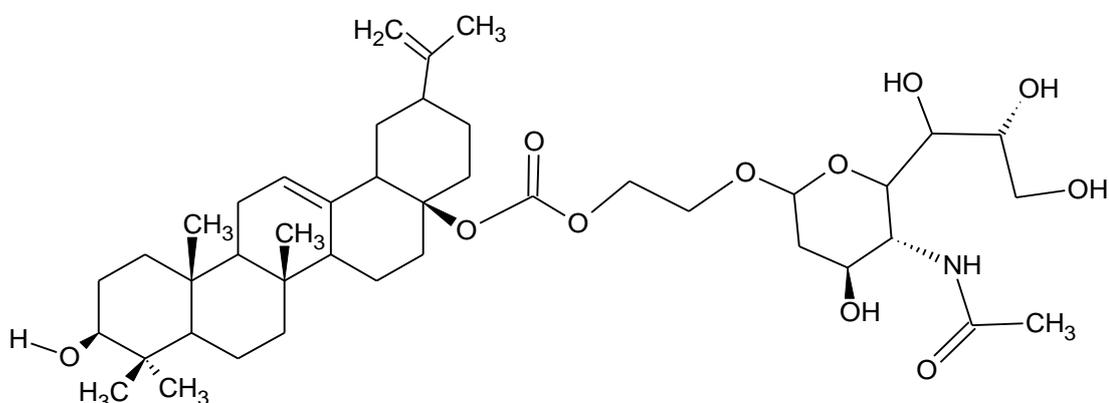


Figura 17. Derivado do ácido oleanólico inibidor do vírus influenza.

Dados da literatura mencionam uma variedade de reagentes que promovem a modificação estrutural em triterpenos. Comercialmente disponível, o trimetilsilildiazometano (TMSD) é um reagente explosivo quando utilizado em larga escala, tóxico, cancerígeno e poluidor do meio ambiente. Mesmo com essas características o grupo diazo possibilita uma eficiente metilação quando presente junto à ácidos carboxílicos. Foi nesse aspecto que (MIGOWSKA *et al.*, 2010) descreveu em seu trabalho sobre a derivatização de drogas que são despejadas no meio ambiente por meio de resíduos. A derivatização por TMSD foi favorável porque empregou-se

tempo de reação reduzido (20 minutos) e, ainda, utilizou-se o sistema em temperatura ambiente, diferentemente do observado por métodos convencionais que empregam a metilação através de ácidos de Lewis.

Ésteres derivados do ácido betulínico foram avaliados por (SILVA *et al.*, 2012) através da síntese de cloretos de alcanóila. A reação baseou-se na inserção dos grupos substituintes na posição C-3 no anel A do triterpeno. Os pesquisadores observaram que a reação prolongada (24h), empregando uma temperatura constante de 45°C, permitiu a síntese de 12 diferentes tipos de moléculas, porém os testes antimicrobianos por difusão em ágar não apresentaram atividades contra *Staphylococcus* e *Escherichia coli*.

Por último, a alternativa que (JHAM *et al.*, 1982) empregou para a derivatização de lipídeos, foi a utilização da catálise ácida empregando HCl/MeOH como agente de derivatização. A primeira etapa da síntese consistiu na hidrólise de lipídeos (KOH 0,5 M) e, em seguida, a etapa de metilação por catálise ácida empregando o ácido clorídrico em metanol. Os resultados avaliados demonstraram que o emprego dessa reação levou a resultados favoráveis frente ao método convencional de BF₃/MeOH, isso pelo baixo tempo de reação (20 min) e a utilização de reagente não tóxicos (MeOH; HCl e H₂O).

Dentre os pormenores descritos anteriormente, os metabólitos secundários mencionados na família Burseraceae, especificamente os triterpenos ácidos, tomam o norte para a construção desse trabalho que, subdivide-se em cinco partes: a primeira é a seleção das espécies endêmicas de breu Amazônico, a segunda trata-se do pré-fracionamento para a obtenção dos extratos concentrados em substâncias ácidas. O terceiro momento engloba o fracionamento das substâncias polares presentes nas oleorresinas. Após conhecidas as substâncias mais oxidadas presentes no breu, a

quarta etapa reporta-se à síntese química em ésteres metílicos e, por fim, a análise e conhecimento das substâncias dos derivados metílicos.

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

- Isolar e identificar os constituintes polares de resinas de espécies de Burseraceae da Amazônia, e desenvolver metodologias de separação com aumento de escala para a preparação de derivados metílicos.

3.1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Concentrar os constituintes polares dos extratos em acetato de etila e hexano das resinas das espécies Burseraceae por cromatografia de troca iônica, com sílica impregada com KOH;

- Isolar os constituintes por cromatografia por coluna de sílica *flash*;

- Identificar as substâncias isoladas e em misturas por técnicas por técnicas espectroscópicas e espectrométricas;

- Realizar modificações estruturais nos ácidos triterpênicos;

4. METODOLOGIA

4.1 OBTENÇÃO DO MATERIAL BIOLÓGICO

A coleta das resinas foi realizada por André Luis Rüdiger no período de obtenção do título de Mestre em Química. Dissertação intitulada “Estudo fitoquímico de oleorresinas de espécies da família Burseraceae” no ano de 2008. Já os extratos foram preparados no Laboratório de Química de Produtos Naturais da Amazônia (Q-BiomA) situado na Universidade Federal do Amazonas, Setor Norte.

O estudo prévio das resinas exsudadas de Burseraceae compreendeu diversas regiões do Brasil, mas a disponibilidade de material biológico no grupo Q-BiomA tornou-se base para esta pesquisa as espécies descritas na tabela 01. Sendo assim, os locais de coleta compreenderam: ^aReserva Florestal Adolfo Ducke (Inpa) localizada na Rodovia AM-010/Km 26, Itacoatiara-Manaus-Brasil; ^bReserva Biológica de Campina (INPA) localizada na Rodovia BR 174 (Manaus-Boa-Vista), Km 60 Manaus-Amazonas; ^cFazenda Experimental da Universidade Federal do Amazonas, rodovia BR-174, Km 38 (Manaus-Boa Vista) e ^dMacapá-Amapá.

Tabela 1. Descrição das espécies de Burseraceae estudadas, sigla, local/período de coleta e extrato.

Nome Científico	Sigla	Exsicata	Período/local de coleta	Extrato
<i>Protium cf. heptaphyllum</i>	EDFB25	END	^a jun-(2006)	Etanoato de Etila
<i>Protium strumosum</i>	ECRQ25	178257	^b Julh-Nov (2009)	Etanoato de Etila
<i>Protium paniculatum var. modestum</i>	ECNC21	1413737;191303	^c Jun- 2006	Hexano
<i>Protium hebetatum 2</i>	ECVC21	END	^c Jun- 2006	Hexano
<i>Protium altisonii</i>	ECAH21	END	^d Macapá	Hexano

Legenda: **191303 e 178257** - exsicata depositada no herbário do INPA; **1413737** exsicata depositada no herbário do Jardim Botânico de Nova Iorque, os quais fizeram parte do projeto Flora da Reserva Ducke. **END**-Exsicata Não Depositada.

4.2 METODOLOGIA PARA FRACIONAMENTO E ELUCIDAÇÃO ESTRUTURAL

4.2.1 CROMATOGRAFIA DE SÍLICA IMPREGNADA COM HIDRÓXIDO DE POTÁSSIO

Cromatografia com sílica impregnada com KOH permite transformação da fase estacionária em resina de troca iônica durante o processo cromatográfico devido aos grupos silanóis (Si-OH) modificados em Si-OK.

A metodologia foi descrita de acordo com (Pinto *et al.*, 2000), e reproduzidas em triplicatas para cada espécie descrita nesse trabalho, tendo como objetivo a obtenção de maior rendimento das frações ácidas. Com isso, para o preparo da sílica foram adicionados 100 mL de solução aquosa de KOH a 10% em 100 g de sílica de fase normal (Mesh 70-230). Em seguida, deixou-se secar em estufa durante 24h a 90°C.

A cromatografia foi realizada em coluna aberta com diâmetro interno variável e altura da sílica superior a 12 cm. O sistema de eluição consistiu em três eluentes: a primeira fração em hexano para eluição da fração apolar das resinas de breu, a segunda permitiu a eluição da fração não ácida com diclorometano e, a terceira, a fração salina em metanol. Em seguida, as frações foram concentradas em evaporador rotatório da Büchi (Waterbath B-480, Switzerland) sob pressão reduzida. Após, foi realizada a partição líquido-líquido da fração salina em metanol. Para isso, foram adicionados 100 mL de H₂O destilada e 20 mL de diclorometano à fração metanólica previamente concentrada em um funil de separação. O sistema foi agitado cuidadosamente de modo a prevenir a formação de emulsão. O experimento seguiu acidificando o sistema com HCl a 1M até atingir o pH 2, 3 e 4. Por fim, foram realizadas sucessivas extrações com diclorometano.

5. CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA

5.1 PRÉ-DERIVATIZAÇÃO CROMATOGRÁFICA

As placas cromatográficas foram dispostas em uma câmara e as zonas de aplicação foram vedadas por uma tira de vidro. Logo em seguida, colocou-se 1 mL de solução 1% de iodo em clorofórmio em um vidro de relógio a distância de 1,2 cm das placas. O sistema foi condicionado em uma câmara escura durante 10 minutos. Após o término, as placas foram expostas ao jato de ar quente para remover o excesso de iodo (SWIEBODA *et al.*, 2014)..

5.1.2 CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA DE ALTA EFICIÊNCIA

A análise dos perfis por cromatografia em camada delgada foi realizada com o auxílio do TLC *visualizer* CAMAG (número de série: 210607; câmara do tipo: DXA252, série 712721314;) com aplicador automático LINOMAT 5 (número de série 170602).

As placas cromatográficas foram de sílica gel 60F₂₅₄ (Merck, Darmstadt, Germany, Lote N. 0345548) com tamanho de partícula de 8 µM e espessura de 200 µM; com larguras variáveis de acordo com o número de amostras. A primeira posição de aplicação consistiu de 15 mm e o espaço entre as amostras de 17,5 mm. As amostras foram aplicadas com concentração de 1mg/mL, volume de 5 µL utilizando a seringa de 100 µL (CAMAG) com pressão de 6 Kgf/cm² de nitrogênio.

Em seguida, as placas foram dispostas na posição vertical em uma cuba saturada com hexano, diclorometano, metil-etil-cetona ou etanoato de etila em diferentes proporções, a eluição ocorreu com a fase móvel na distância de 7 ou 4 cm. Em seguida, as placas foram secas na capela de exaustão e, logo após, borrifou-se etanol (10% H₂SO₄ v/v) ou vanilina sulfúrica. Transcorridos 5 minutos, submeteu-se imediatamente ao jato de ar quente a 100°C por 3 minutos. A documentação foi

realizada a 366 nm e editada utilizando o programa winCATS (*Planar Chromatography Manager*) versão 1.4.9.2001.

5.2 CROMATOGRAFIA POR COLUNA *flash* (CF)

As fases ácidas, das resinas (item 4.2.1) foram submetidas à cromatografia de coluna *flash* de acordo com os parâmetros descrito por (Still *et al.*, 1978). Para isso, foi utilizada sílica F60 da Silicycle *Parc-Tecnologique* BLVD (Quebec, Canadá) com granulometria de 40-63 µM (230-400 Mesh).

Para a eluição da fase móvel, utilizou-se como auxílio uma bomba à vácuo TE-0581 (TECNAL), sob pressão constante de 5 lbf/pol², ligada à coluna por uma mangueira de silicone e uma junta de vidro esmerilhada (24/40).

6. ANÁLISES INSTRUMENTAIS

6.1 RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR

Os experimentos de ressonância magnética nuclear foram obtidos na Central Analítica – Centro Acadêmico Multidisciplinar (CAM-NMRLAB) - da Universidade Federal do Amazonas, e também, na Central Analítica do Laboratório Temático de Química de Produtos Naturais (CA-LTQPN/INPA).

Para o preparo das amostras, essas foram solubilizadas em clorofórmio deuterado em tubos *vials*, em seguida foram centrifugadas por 3 minutos a 10.000 rpm. Após, ressuspenderam-se as amostras com o auxílio de pipeta *pasteur* e adicionou-se trimetilsilano. Os espectros foram realizados utilizando o espectrômetro da Bruker Avance III HD, com campo magnético de 11,75 Tesla e frequência de aquisição dos núcleos de ¹H e ¹³C a 500,13 e 125,76 MHz, respectivamente, equipado com uma sonda multinuclear de 5 mm (BBFO Plus SmartProbe™) com gradiente de campo na direção Z (dados equipamento CAM-NMRLAB). Já os dados referentes ao

equipamento do CA-LTQPN, consistem do RMN da marca Bruker Biospin (modelo Fourier 300) de 7,0 Tesla, equipado com sonda para núcleos de $^{13}\text{C}/^1\text{H}$, bobina de gradiente e canal de lock de deutério. Também foram obtidos dados de correlação espectroscopia homonuclear (COSY), de correlação heteronuclear múltiplo quântica (HSQC), de coerência heteronuclear através de múltiplas ligações (HMBC) e intensificação da distorção por transferência de polarização (DEPT 135°).

Para a referência dos deslocamentos químicos (δ), a escala foi ajustada de acordo com o sinal do TMS e os espectros foram editados utilizando o programa TopSpin (Versão Acadêmica 4.0.4 - Ano 2018) da Bruker.

6.2 ESPECTROMETRIA DE MASSAS

As análises por espectrometria de massas foram realizadas no laboratório LABCEM (Central Analítica UFAM/Setor norte), utilizando o espectrômetro da Thermo Scientific LCQ Fleet com fonte de ionização por APCI no modo negativo (dados da fonte: temperatura do vaporizador: 350°C; taxa de fluxo de gás: 35 Arb; taxa de fluxo do gás auxiliar 10 Arb; fluxo de varredura do gás: 0; descarga de corrente: 5 μA ; Temperatura do capilar: 250°C; Voltagem do capilar: 35 V; Lente do tubo: 110 V e voltagem da descarga: 3,21 kV).

Para o preparo das amostras, essas foram solubilizadas em MeOH (grau HPLC) na concentração final de 10 ppm e, em seguida, foram colocadas no banho ultrassônico por 2 minutos. As amostras foram injetadas no espectrômetro manualmente (10 μL) e os espectros de massas foram editados utilizando o programa Xcalibur (versão 2.0.7).

7. MODIFICAÇÃO ESTRUTURAL DAS FASES ÁCIDAS E SUBSTÂNCIAS ISOLADAS.

As substâncias isoladas, bem como as fases ácidas, obtidas de resinas de Burseraceae, foram submetidas à modificação estrutural de acordo com o descrito por (MIGOWSKA *et al.*, 2010). Para isso, foi utilizado 2 M de trimetilsilildiazometano em hexano (TMSD) (da Sigma Aldrich; Lot # SHBF5862V) e uma solução de 10% de metanol em acetona. O preparo da reação consistiu na adição de 220 µL dessa última solução com 30 µL de TMSD em tubos *vials*. Seguindo, o meio reacional foi deixado em temperatura ambiente durante 20 minutos.

Por fim, para a confirmação da modificação estrutural, foram realizados testes em Cromatografia em Camada Delgada e Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear de ¹H.

7.1 MÉTODO DE ESTERIFICAÇÃO DE CATÁLISE ÁCIDA EMPREGANDO ÁCIDO CLORÍDRICO EM METANOL.

Para a derivatização dos ácidos triterpênicos com aumento de escala, tomou-se como ponto de partida a metodologia descrita por (JHAM *et al.*, 1982). Para isso, solubilizaram-se 30 mg da fase ácida em 30 mL de KOH a 0,5 M, essa solução foi transferida para um balão de fundo redondo de 100mL e, aquecida em banho de óleo a 100°C por 5 minutos. O sistema foi mantido sob refluxo utilizando um condensador e agitação magnética constante. Após, resfriou-se em temperatura ambiente e adicionaram-se 12,4mL de HCl e MeOH (grau HPLC) (4:1 v/v). A mistura foi novamente aquecida em banho a 100°C por 15 minutos. A solução foi resfriada novamente e foram adicionados 62 mL de H₂O deionizada, logo em seguida, a mistura reacional foi mantida sob agitação magnética por 10 minutos a 280 rpm.

Posteriormente, os ésteres metílicos foram extraídos adicionando-se ao balão 93 mL de éter de petróleo e submetidos a banho ultrassônico durante 30 minutos. O sobrenadante foi coletado e utilizou-se o mesmo procedimento de extração para o solvente ciclohexano. As etapas de extração foram realizadas em triplicatas para cada solvente. Por fim, as amostras obtidas foram analisadas por Cromatografia em Camada Delgada.

7.2 MÉTODO DE ESTERIFICAÇÃO DE CATÁLISE ÁCIDA EMPREGANDO TRICLORETO DE ALUMÍNIO EM METANOL

Para a derivatização, a síntese foi realizada a partir de 1 mg dos ácidos empregando $\text{AlCl}_3/\text{MeOH}$. Adicionaram-se 250 μL de uma solução de 14 % de AlCl_3 em MeOH e foi aquecida em uma chapa aquecedora utilizando banho de óleo a 63°C durante 30 min. O sistema foi realizado em um *vail*. Logo após, a mistura reacional foi resfriada em temperatura ambiente e, adicionaram-se 250 μL de *n*-hexano. Em seguida, a solução foi submetida ao Vortex durante 5 minutos. A fase superior contendo o *n*-hexano foi coletada e analisada por Cromatografia em Camada Delgada.

8. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O trabalho intitulado: “Estudo fitoquímico dos constituintes polares de resinas de Burseraceae” consistiu em seis partes. A primeira delas teve o objetivo de selecionar os extratos polares entre os extratos das resinas presentes no laboratório Q-BiomA para o estudo fitoquímico das substâncias polares. Tendo como base a análise dos cromatogramas presentes na dissertação de Rüdiger (2007), foi realizada uma ampla reanálise, buscando definir as similaridades dos extratos, suas diferenças e complexidades, de forma a escolher aqueles extratos mais diferentes, que poderiam render novos ácidos triterpênicos ou outras substâncias mais polares. Selecionou-se os extratos de resinas de Burseraceae pertencentes às espécies: *P. strumosum*; *P. paniculatum* var *modestum*; *P. cf. heptaphyllum*; *P. altsonii* e *P. hebetatum*.

A segunda etapa consistiu em concentrar os ácidos triterpênicos utilizando cromatografia de sílica impregnada com KOH das espécies selecionadas. Em seguida, o perfil cromatográfico das frações ácidas dessas espécies foi comparado por CCD e, realizou-se o tratamento estatístico por HCA e PCA. Essa análise multivariada foi produzida qualitativamente observando-se as manchas de mesmo Rf em placa CCD, isso permitiu relacionar semelhanças quanto à composição química entre as fases ácidas. Por conta disso, a análise da distância euclidiana do dendrograma e o agrupamento dos eixos principais de *P. altsonii* e *P. hebetatum*, mostraram-se distintas, o que levou à seleção dessas duas espécies ao fracionamento.

Na terceira etapa foram realizados os fracionamentos das frações ácidas dessas duas espécies, com o objetivo de isolar as substâncias químicas mais polares. Para isso, os experimentos sucederam-se com o estudo do sistema de solventes para o extrato das duas espécies selecionadas. O fracionamento de *P. altsonii* levou ao

isolamento do ácido 3 α -hidroxitirucala-7,24-dieno-21-oico, que teve sua estrutura elucidada por dados espectroscópicos de RMN 1-D/2-D e seu íon molecular obtido por EM-APCI. Além disso, identificou-se em mistura os ácidos 3-oxo-tirucala-8,24-dieno-21-oico, 3 β -hidroxitirucala-8,24-dieno-21-oico e 3 α -hidroxioleanano-12-eno-23-oxo-28-oico nas demais frações dessa espécie. Já o estudo de *P. hebetatum* levou à elucidação estrutural da mistura de três substâncias em uma mesma fração. Sendo assim, foram denominados de ácido 3-oxo-tirucala-8,24-dieno-21-oico (ácido β -elemólico); 3 α -hidroxitirucala-8,24-dieno-21-oico (α -elemólico) e 3 α -hidroxitirucala-7,24-dieno-21-oico por RMN 1-D;2-D e identificação do íon molecular por EM-APCI.

A quarta etapa compreendeu em transformar os ácidos triterpênicos em seus respectivos derivados ésteres metílicos para o isolamento dos triterpenos ácidos mais polares. Realizou-se a derivatização utilizando trimetilsilildiazometano (TMSD) nas frações ácidas de *P. strumossum*; *P. paniculatum* Var *modestum*; *P. cf. heptaphyllum*; *P. altsonii* e *P. hebetatum* acompanhando a reação em Cromatografia em Camada Delgada. Os padrões ácidos anteriormente isolados também foram submetidos à derivatização por TMSD acompanhando por Cromatografia em Camada Delgada e RMN de ^1H . Ao final dessa etapa, empregou-se o estudo de metodologia para derivatização em escala de bancada diferente do TMSD.

A quinta parte dessa pesquisa consistiu em transformar os triterpenos ácidos em ésteres metílicos de *P. strumossum* utilizando aumento de escala pela metodologia de bancada. No decurso dessa etapa, os ácidos de *P. strumossum* foram submetidos à derivatização em ésteres metílicos utilizando metodologia de bancada acompanhando por CCD.

Por fim, a sexta etapa teve como principal atividade fracionar os ésteres metílicos obtidos a partir da derivatização da fração de ácidos de *P. strumossum*. Com

isso, realizou-se fracionamento por cromatografia de sílica *flash* e a identificação do íon molecular por EM-APCI dos derivados metílicos. A figura 18 demonstra o delineamento experimental do trabalho desenvolvido.

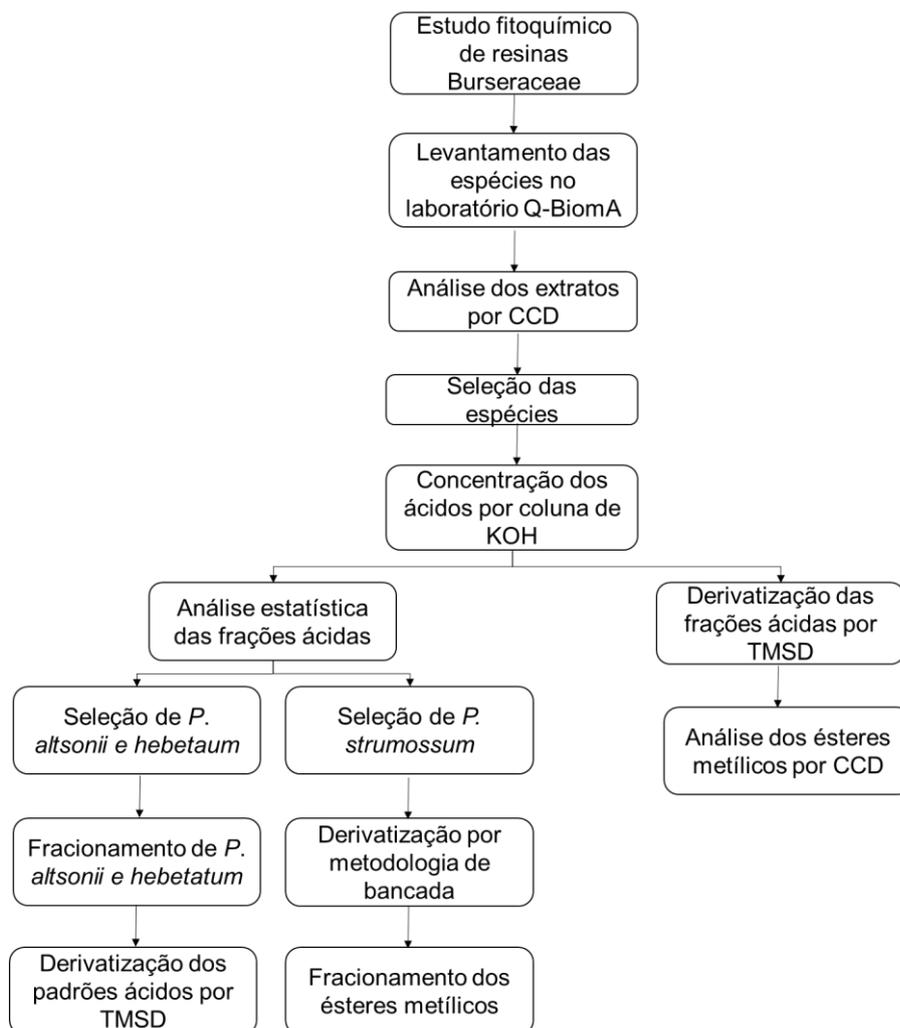


Figura 18. Fluxograma experimental das atividades desenvolvidas na dissertação.

8.1 SELEÇÕES DOS EXTRATOS DE RESINAS DE BURSERACEAE

Os extratos das resinas constituem parte dos projetos desenvolvidos no laboratório de Pós-Graduação em Química de Produtos Naturais (Q-BiomA). Sendo assim, na dissertação de Rüdiger (2007) intitulada “Estudo fitoquímico de oleorresina exsudado de espécies de Burseraceae”, realizou-se previamente as análises dos cromatogramas realizados por CG-DIC pelo autor comparando os resultados em placa

CCD de sua dissertação. Com isso, foi possível indicar a massa de extrato disponível para o desenvolvimento da pesquisa. Essa análise prévia permitiu apontar as amostras que possuíam maior teor de substâncias ácidas, indicativas de maior polaridade.

O perfil cromatográfico de diferentes extratos das espécies de Burseraceae foi estudado com o intuito de observar em CCD as espécies que possuíam maiores teores de substâncias polares. Em meio à tais observações, a figura 19 mostra a CCD dos extratos de *Protium cf. rubrum* (PRU) obtida em metanol (1) e em acetato de etila (2), seguida de *Protium aracouchini* (PAR), *Protium elegans* (PEL), *Protium grandifolium* (PGR) obtido em hexano (5), acetato de etila (6) e metanol (7). O extrato de *Protium. opacum var. opaccum* (POO) foi obtido em hexano (8), metanol (9) e acetato de etila (10). Já *Protium cf. paniculatum* (PPA) foi realizado em metanol (11) e hexano (12) como solvente de extração e, por último, *Protium paniculatum var. riedelianum* (PPR) em metanol (13) e em acetato de etila (14).

O perfil cromatográfico de PEL (4) presente na figura 24 apresentou R_f 0,25 em hexano indicando substância de menor polaridade e, ainda assim, apresentou R_f 0,45 na revelação por UV-254 nm. A amostra PAR obtida em metanol apresentou R_f 0,62 e em hexano foi observado R_f em 0,25, 0,33 e 0,45 indicando manchas de baixa polaridade e, quando submetidas à luz UV-254 nm revelaram R_f em 0,33 e 0,45 podendo indicar a presença de cromóforos nessas duas manchas.

Já as amostras de PGR apresentaram duas manchas em comum de cor roxa de R_f 0,25, e os extratos em hexano (5) e acetato de etila (6) possuíam massa de 4,52 g e 1,09 g, respectivamente. Dentre as amostras de POO analisadas, apenas o extrato em acetato de etila apresentou massa de 1,27 g, e o levantamento dessas amostras mostrou R_f em 0,16 revelada tanto em sulfato cérico quanto em UV-254 nm.

Por fim, as amostras PPA e PPR apresentam uma mancha de menor polaridade de R_f 0,18, mas apenas os extratos em hexano de PPA (12) apresentaram massa de 1,27 g e PPR (acetato de etila) de 9,44 g.

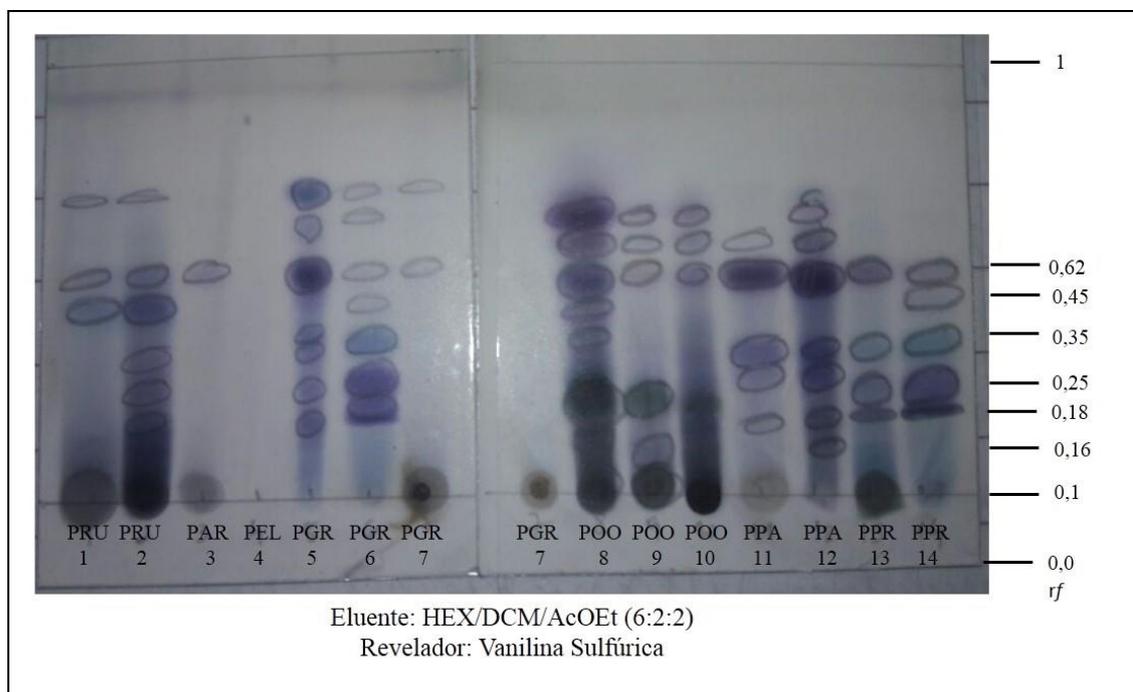


Figura 19. Cromatograma por CCD para os extratos em hexano, acetato de etila e metanol de resina das espécies *Protium cf rubrum* (PRU), *Protium aracouchini* (PAR), *Protium elegans* (PEL), *Protium grandifolium* (PGR), *Protium opacum var. opaccum* (POO), *Protium cf. paniculatum* (PPA) e *Protium paniculatum var. riedelianum* (PPR).

Na figura 20 foram repetidas as análises dos extratos de *Protium grandifolium* (PGR), *Protium paniculatum var. riedelianum* (PPR), ambas obtidas em acetato de etila, *Protium opacum var. opaccum* (POO) e *Protium cf. paniculatum* (PPA) extraídas em metanol. Os cromatogramas foram dispostos de acordo com o aumento da polaridade de 30% em A, 35% em B e 37,5% em C. Pode-se apontar que em todas as espécies observaram-se manchas de cor roxa presentes no R_f 0,56, que pode ser indicativo da presença de α,β -amirina ocorrência comum no material de Burseraceae. Além disso, as placas cromatográficas B e C (figura 20) apresentaram similaridade das manchas presentes no R_f 0,30 de todas as espécies, porém uma mancha verde em POO de R_f 0.19 foi observada apenas na placa B, sugerindo que esse eluente

permitiu maior separação das substâncias presentes em *Protium opacum* var. *opaccum*.

Seguindo, PPR e PPA apresentaram uma mancha de baixa polaridade no Rf 0,1 e, em contrapartida, apenas a espécie POO apresentou uma mancha de Rf 0,21 na placa B. A espécie *Protium grandifolium* (PGR) mostrou-se com perfil cromatográfico distinto no aumento de polaridade, porém na placa C foi identificado uma mancha roxa de Rf 0,17.

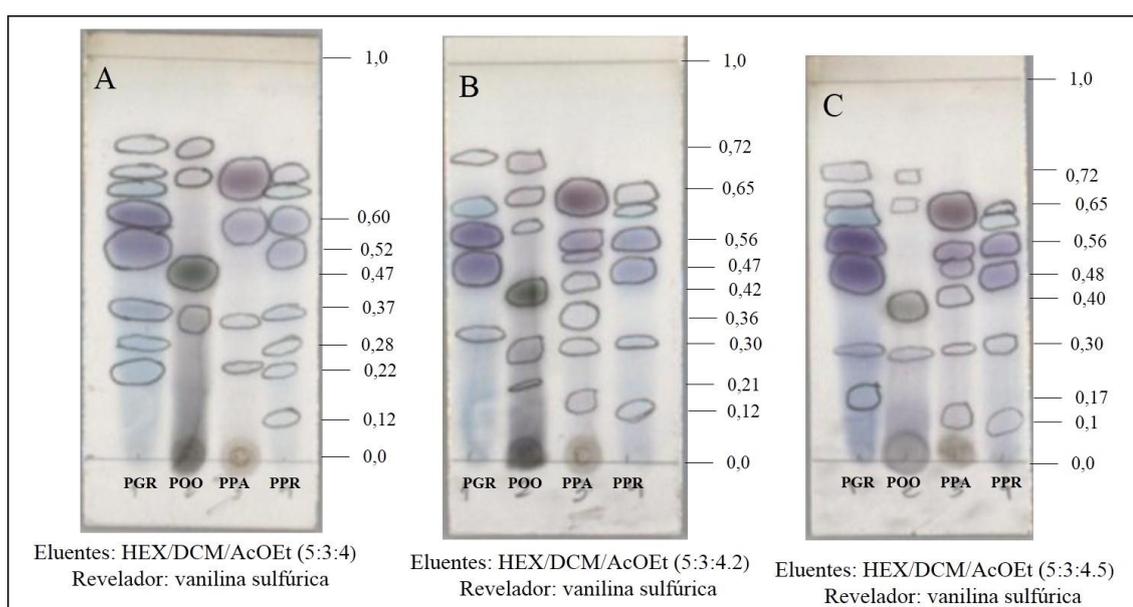


Figura 20. CCD dos extratos obtidos em acetato de etila e metanol de resina das espécies *Protium grandifolium* (PGR), *Protium paniculatum* var. *riedelianum* (PPR), *Protium opacum* var. *opaccum* (POO) e *Protium* cf. *paniculatum* (PPA).

Já na figura 21 foram analisadas amostras de resina de *Protium polybotryum* ssp *blackii* (PPB;1), *Protium nitidifolium* (PNI;2) extraídas em acetato de etila, hexano (2.1) e metanol (2.2), *Protium* sp2 (BRC-2) obtidas em metanol (3) e hexano (3,1) e, por último *Dracyodes hopkinsii* (DHO) em extrato metanólico (4).

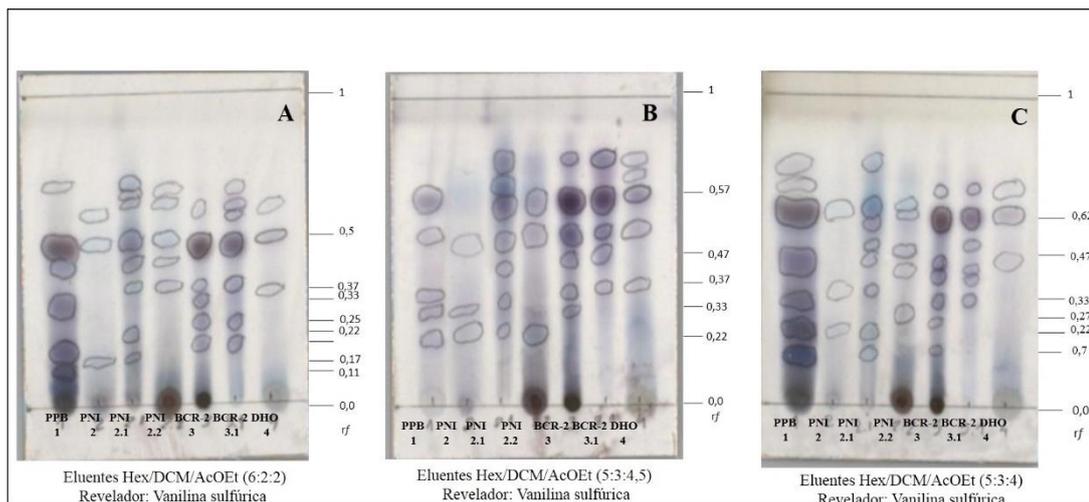


Figura 21. CCD para os extratos obtidos em hexano, acetato de etila e metanol de *Protium polybotryum ssp blackii* (PPB), *Protium nitidifolium* (PNI), *Protium sp2* (BRC-2) e *Dracyodes hopkinsii* (DHO).

Os cromatogramas da figura acima foram dispostos de acordo com a polaridade: na placa A (20 %), 37,5% em B e 30% na placa C. Dentre essas amostras, *Protium nitidifolium* (PNI)- obtida em acetato de etila- apresentou massa disponível de 0,56 mg e *Protium sp2* (BRC-2) com 24,8 g. O extrato hexânico de PPB e de BRC-2 apresentaram Rf em 0,16 e 0,26, mas no cromatograma abaixo, observa-se apenas manchas de Rf 0,22 e 0,25 para BRC-2 e para PPB manchas polares de Rf em 0,11 e 0,17. Contudo, tanto as espécies DHO quanto BRC-2 apresentaram manchas em Rf 0,37, mas apenas as amostras 1 e 3 apresentaram manchas em 0,33 indicativo de breína e maniladiol. Já na análise revelada por UV-254 nm, apenas PNI apresentou Rf em 0,67 e PPB Rf em 0,33, 0,37 e 0,48.

O perfil cromatográfico apresentado de *Trattinnickia glaziovii* (TGL) em acetato de etila (5), *Trattinnickia peruviana* (TPE) em hexano (6), *Crepidosperrum rhoifolium* (CRH;7) e *Tetragastris panamensis* (TPA;8) em acetato de etila, metanol (8,1) e hexano (8,2) está disposto na figura 22.

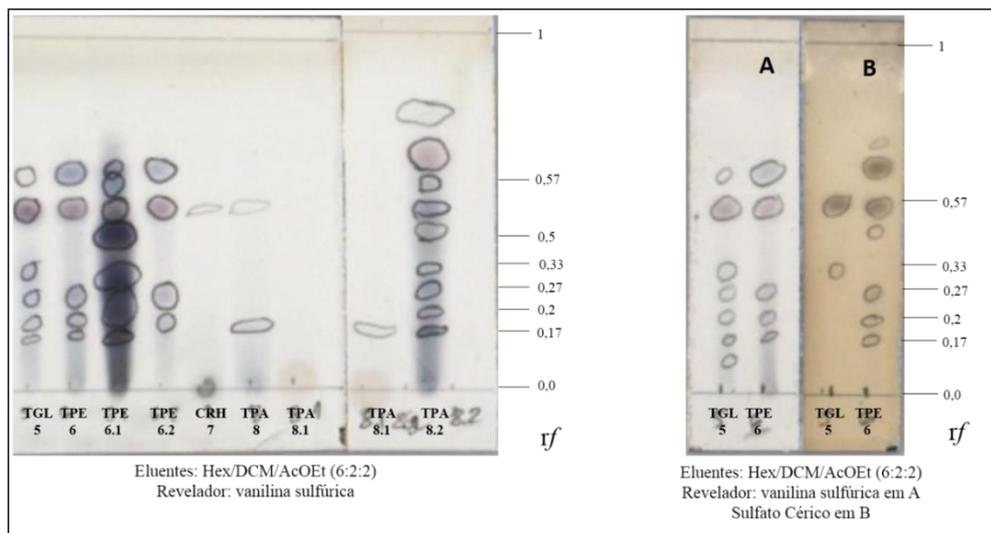


Figura 22. Cromatograma por CCD para os extratos obtidos em hexano, acetato de etila e metanol de *Trattinnickia glaziovii* (TGL), *Trattinnickia peruviana* (TPE), *Crepidospermum rhoifolium* (CRH) e *Tetragastris panamensis* (TPA).

A figura 22 permite discutir que a CCD das espécies de Burseraceae revela manchas no Rf 0,17 em todas as amostras, mas a mancha de Rf 0,2 não foi observada em TPA (8 e 8,1) e CRH. Em meio à essas observações, Rüdiger (2008) descreveu que foi possível identificar a ocorrência de triterpenos diidroxilados em *Trattinnickia glaziovii* (TGL). O perfil do fracionamento avaliado por ele em CCD apresentou manchas em Rf 0,33 e experimentos como a CG-EM revelaram que ambas as substâncias apresentaram o mesmo íon molecular de 442 m/z $[M]^+$ e hidroxila na posição 16, sugerindo que esse extrato possui a presença de breína e maniladiol. Seguindo, os extratos das espécies foram repetidos e revelados em sulfato cérico e vanilina sulfúrica. Observou-se que apenas *Trattinnickia glaziovii* apresentou a mancha em Rf 0,33 em ambos os reveladores, isso corrobora a reprodutibilidade do experimento apontado a presença dos triterpenos diidroxilados. Em contrapartida, outras manchas de Rf de baixa polaridade em *Trattinnickia peruviana* foram identificadas em 0,27; 0,2 e 0,17. O levantamento das quantidade de material vegetal foi de 0,438 g de TGL (5), assim como TPE (6) com 4,63 g de extrato, o extrato em

hexano de TPE (6) possuiu 3,11 g, TPA (8,2) com 0,9 g de amostra e TPA (8) com 2,5 g de extrato em acetato de etila.

A figura 23 representa o perfil dos extratos de resinas de *Tetragastris panamensis* (TPA;8) em acetato de etila, *Protium tenuifolium* (PTE) em hexano (9) e acetato de etila (9,1), *Protium apiculatum* (PAP-1) em metanol (7), hexano (10,1) e em acetato de etila (10,2 e 10,3) e, por último, *Protium cf. apiculatum* (PAP-2;11) em acetato de etila. Dentre estas, apenas PAP-1 (10) possuiu massa de 48,09 g e PAP-1 (10,3) possui 35,58 g de amostra disponível. De acordo com o cromatograma, observaram-se manchas de Rf 0,22 em todas as amostras exceto em PAP-1 (10). Nesse mesmo sentido, apenas PAP-1 (10,2 e 10,3) apresentaram Rf em 0,12. Já as manchas de menor polaridade foi observada em 0,57 (região de α,β - amrinas) e 0,75 para todas as amostras, exceto PAP-1 (10), PTE (9,1) e TPA. Observa-se que em todas os extratos de resinas apresentaram rastro em placa, isso permite apontar a presença de substâncias ácidas.

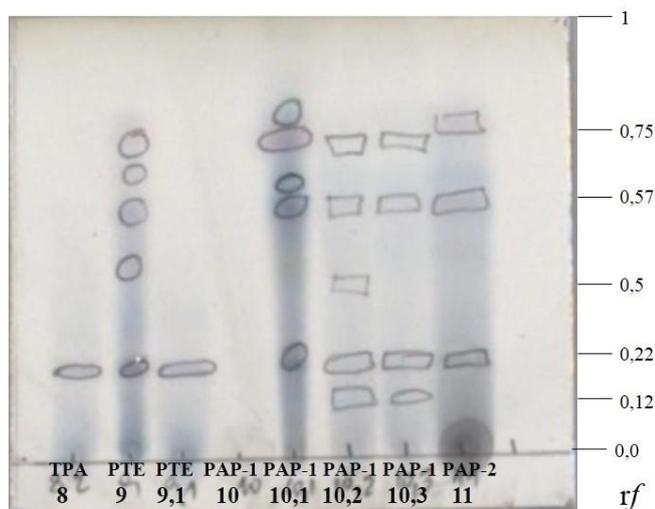
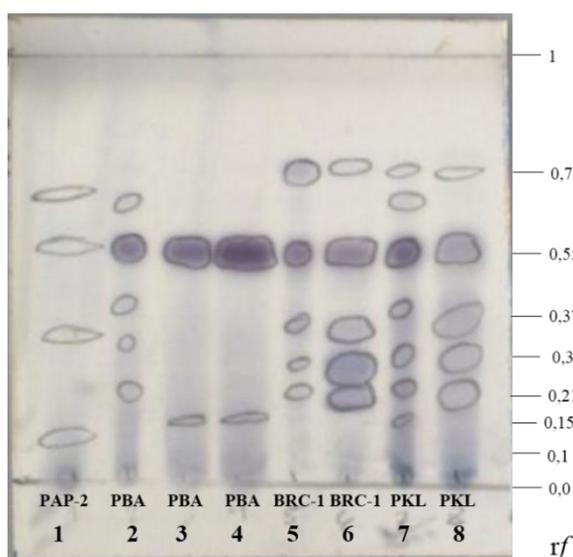


Figura 23. Cromatograma por CCD dos extratos obtidos em hexano, acetato de etila e metanol de oleorresina de *Tetragastris panamensis* (TPA), *Protium tenuifolium* (PTE), *Protium apiculatum* (PAP-1) e *Protium cf. apiculatum* (PAP-2). As amostras foram eluídas em Hex//DCM/AcOEt (6:2:2) e reveladas em vanilina sulfúrica

Seguindo o levantamento das espécies, as amostras evidenciadas no cromatograma 24, mostram *Protium cf. apiculatum* (PAP-2;1) em acetato de etila,

Protium bahianum (PBA) em hexano (2) e acetato de etila (3 e 4), *Protium sp.1* (BRC-1) em hexano (5) e acetato de etila (6) e, por último, *Protium cf. kleinii* (PKL) em hexano (7) e acetato de etila (8) foram dispostas na figura 29. Dentre estas, apenas PBA (2) apresentou 14,64 g de amostra, assim como, PBA (3) com 1,48 g de extrato, PBA em (4) com 0,817 g, BRC-1 em (5) com 60,10 g, BRC-1 em (6) com 37,40 g, PKL em (7) com 33,37 g e, finalmente, PKL em (8) com 6,80 g. Observou-se a mancha de Rf 0,1 apenas em PAP-2 (1), já o Rf de 0,15 foi observado em PBA (3 e 4) e PKL (7). No Rf 0,3 característicos de breína e maniladiol apresentou manchas nessa região apenas nas espécies BRC-1 (5;6) e PKL (7;8). Entretanto, as manchas características de α . β -amirinas foi possível observar em todas as amostras. Em comparação com as análises descritas por Rüdiger (2007), PGA apresentou Rf em 0,15, 0,25 e 0,49 quando reveladas em UV-254nm. Já PFE foi a única que apresentou mancha de Rf em 0,40 e, também, em PBA foi observado apenas duas manchas de Rf em 0,35 e 0,55.



Eluentes: Hex//DCM/AcOEt (6:2:2)
Revelador: vanilina sulfúrica.

Figura 24. Cromatograma das amostras de resina de *Protium cf. apiculatum* (PAP-2), *Protium bahianum* (PBA) *Protium sp.1* (BRC-1) em hexano (5) e *Protium cf. kleinii* (PKL).

Outrossim, é possível observar manchas evidentes no R_f 0,55 de *Protium bahianum*. Isso também foi discutido por Rüdiger (2008) que após o fracionamento do extrato em acetato de etila desta espécie, identificou-se uma mancha no R_f 0,54 utilizando clorofórmio e acetato de etila (7:3). Com isso, foi possível isolar a mancha obtida neste R_f a partir de sucessivos fracionamentos em coluna e, após, identificadas por espectrometria de massas e RMN de ^{13}C demonstrou que as frações de PBA tratava-se de uma mistura de ácido ursólico e oleanólico (figura 25).

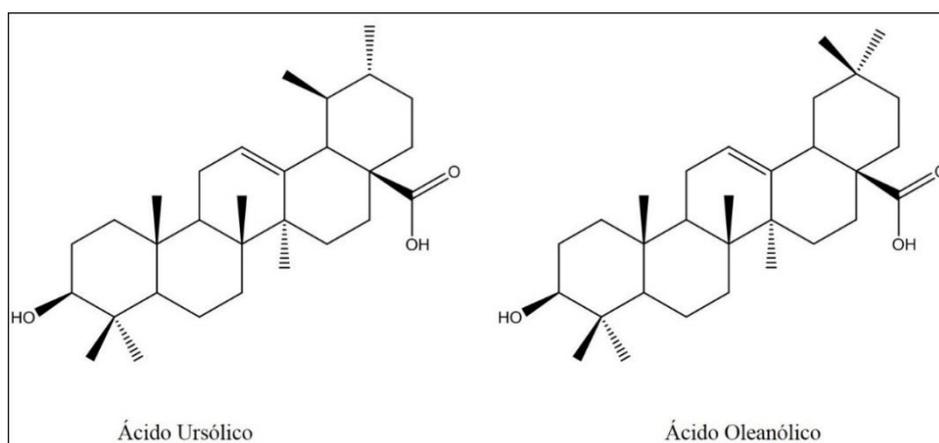
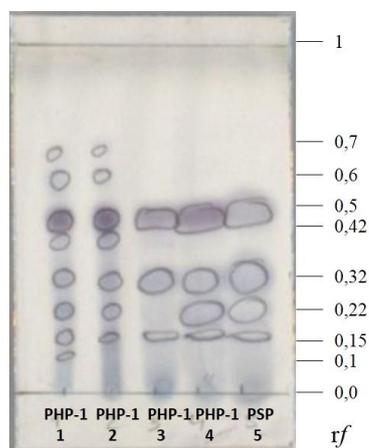


Figura 25. Esqueleto dos ácidos ursólico e oleanólico de *Protium bahianum* isoladas e identificadas por RNM 1-D/2-D Rüdiger (2007).

Na figura 26, analisou-se os extratos obtidos em hexano (1 e 2) e acetato de etila (3, 4 e 5) de resinas obtidas de *Protium cf. heptaphyllum* (PHP-1) e *Protium strumossum* (PSP;5). Observou-se manchas polares no R_f de 0,1 apenas em PHP-1 (1). Mas o R_f de 0,15 e 0,32 apareceu em todas as amostras, este último característico de regiões de breína e maniladiol. Manchas polares de R_f 0,22 foi observada em todas as espécies exceto PHP-1 em (3). Identificou-se também manchas de menor polaridade em 0,7, 0,6 e 0,5 (regiões de α,β -amirinas). Sendo assim, *Protium cf. heptaphyllum* (PHP-1) apresentou massa disponível de 27,10 g em extrato hexano, já o extrato em acetato de etila da mesma espécie possuiu 8,14 g de amostra, (3) possui

53,23g, em (4) 21,67 g e, finalmente em (5) contém 14,19 g de amostra. Nenhuma delas apresentou manchas na região do UV-254 nm.



Eluentes: Hex/DCM/AcOEt (6:2:2)
Revelador: vanilina sulfúrica

Figura 26. Análise por CCD das amostras de resinas de *Protium cf. heptaphyllum* (PHP-1) obtidas em hexano (1 e 2) e acetato de etila (3,4) e, amostras de *Protium strumosum* (PSP) extraídas em acetato de etila (5).

Por último, na figura 27 foram analisadas as amostras de resinas de *Protium decandrum* (PDE;1) em acetato de etila, *Protium paniculatum var. modestum* (PPN;2 e 3) em hexano, *Protium hebetatum* forma A (PHB-1) em acetato de etila (4), *Protium hebetatum* (PHB-2) forma B em hexano (5), *Protium altsonii* (PAL;6) e *Protium cf. laxiflorum* (PLA;7) ambas em hexano.

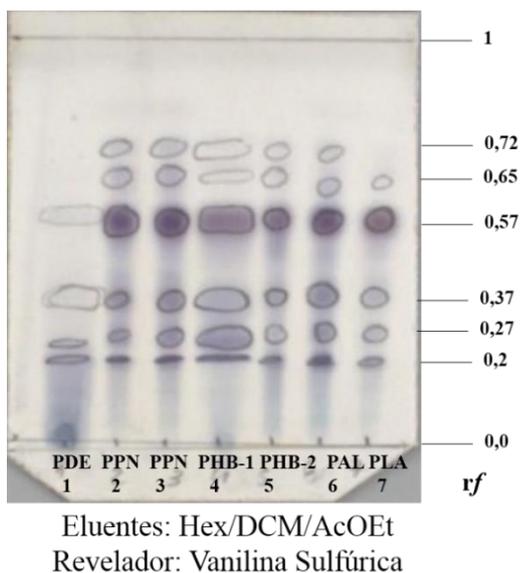


Figura 27. Análise por CCD das amostras de óleoresina de *Protium decandrum* (PDE;1), *Protium paniculatum* var. *modestum* (PPN;2 e 3), *Protium hebetatum* forma A (PHB-1;4), *Protium hebetatum* (PHB-2;5), *Protium altsonii* (PAL;6) e *Protium cf. laxiflorum* (PLA;7).

O perfil cromatográfico apresentado na figura 27, amostra que todas as amostras apresentaram Rf 0,2; 0,27; 0,37 (provável região de breína e maniladiol) e, também, em Rf de maior polaridade, como por exemplo, 0,57 (região das amirinas), Rf em 0,65 e 0,72 podem indicar substâncias como lupeol, acetato de α,β -amirina e amirenona. Com isso, as análises realizadas por Rüdiger (2007) mostraram que, quando revelada em UV-254 nm, apenas PDE apresentou Rf em 0,28; 0,30 e 0,33. Das amostras descritas, apenas (PPN) apresentou massa de 8,89 g, assim como, PHB-1 continha 37,85 g, PHB-2 apenas 16,67 g e PAL com 15,69 g.

As análises dos perfis cromatográficos permitiram visualizar as manchas de menor Rf presentes nas resinas das espécies de Burseraceae. Sendo assim, *Protium strumosum*, *Protium altsonii*, *Protium paniculatum* var. *modestum*, *Protium hebetatum* e *Protium cf. heptaphyllum* apresentaram teor de substâncias de maior polaridade, bem como aparente quantidade de material disponível, demonstrando potencial indicativo para o isolamento e caracterização de triterpenos oxidados.

8.2 CONCENTRAÇÃO DOS ÁCIDOS POR CROMATOGRAFIA DE RESINA DE TROCA IÔNICA

Os ácidos triterpênicos de *P. strumosum*, *P. paniculatum var modestum*, *P. cf. heptaphyllum*, *P. altsonii* e *P. hebetatum* foram concentrados através da coluna de sílica impregnada com hidróxido de potássio.

8.2.1 CROMATOGRAFIA EM COLUNA DE SÍLICA IMPREGNADA COM KOH DE *Protium cf. heptaphyllum*

O extrato de acetato de etila de *Protium cf. heptaphyllum* (EDFB25) foi submetido à coluna de sílica impregnada com KOH ($\varnothing_{\text{inter}} = 2,2$ cm; $A_{\text{sílica}} = 15,8$ cm; $m_{\text{sílica}} = 47,36$ g; aplicação da amostra: 2,0039 g em pastilha) com o objetivo de separar as substâncias em três grupos: a primeira hexânica (EDFB25 h), seguida de diclorometano (EDFB25 n) e, por último a salina (EDFB25 s) em metanol. Logo após, as amostras foram concentradas em evaporador rotatório sob pressão reduzida, e em seguida, foi realizada partição líquido-líquido até o pH 3. A emulsão foi quebrada utilizando NaCl a 1M. Em seguida, realizou-se 8 extrações com adição de 20 mL de DCM e foram obtidas 400 mg (19,96%) da fase ácida denominada EDFB25pH3 (figura 28).

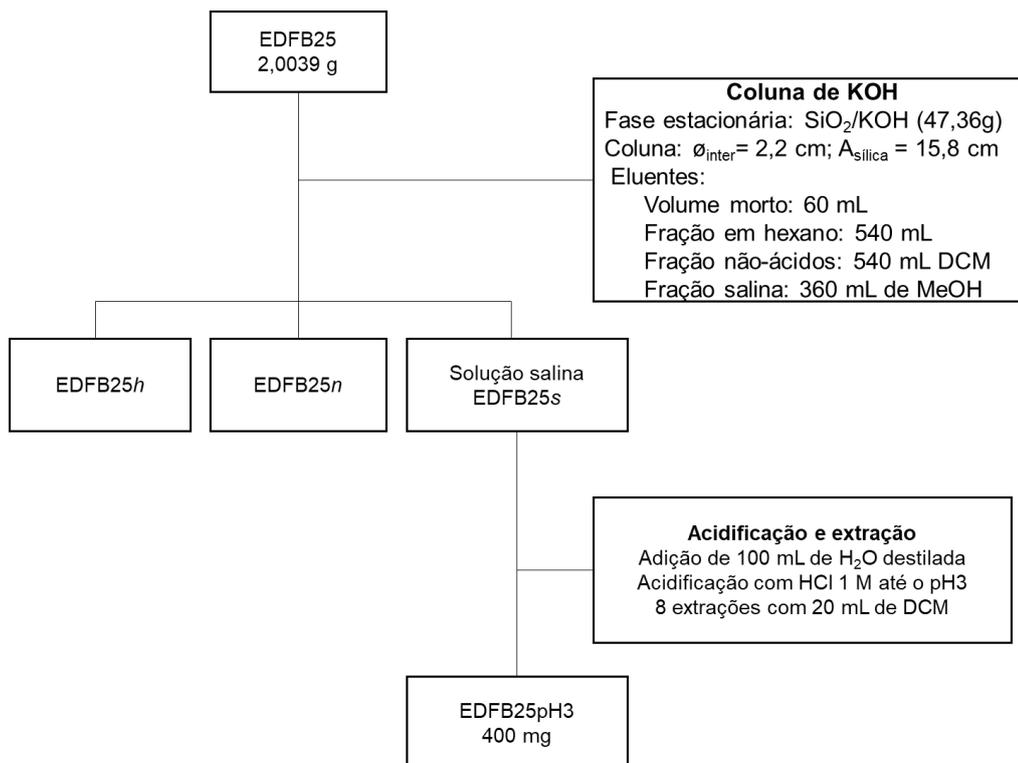


Figura 28. Fluxograma do fracionamento do extrato em acetato de etila de *Protium cf. heptaphyllum*.

A quantidade de hexano utilizada para a remoção das amirinas, foi estabelecida após a visualização da reatividade da amostra com a vanilina sulfúrica analisada em placa. Desse modo, a observação do rápido aparecimento da mancha de cor roxa no Rf 0,7, demonstrava que a quantidade da mistura binária presente no extrato vegetal era majoritária, necessitando do aumento do volume de solvente para a remoção dessas moléculas. Com isso, o pré-fracionamento de *Protium cf. heptaphyllum* através da resina de troca iônica foi analisada em placa como mostrado na figura 29.

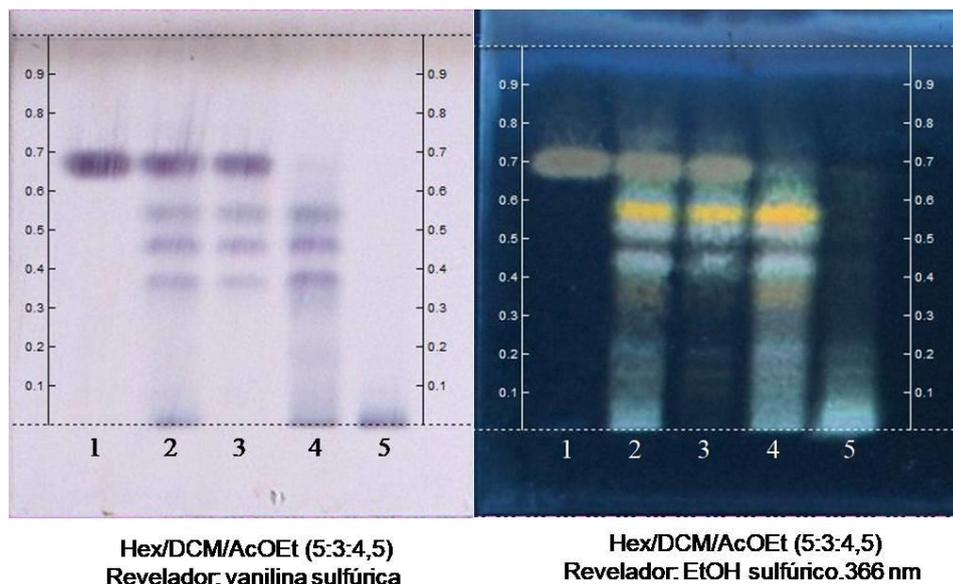


Figura 29. Perfil cromatográfico do fracionamento de *P. cf. heptaphyllum* (EDFB25) por cromatografia de sílica impregnada com KOH. Legenda: (1) α,β -amirina (2) extrato bruto de EDFB25b, (3) fração hexânica (EDFB25h), (4) fração dos não-ácidos (EDFB25n), (5) fase ácida (EDFB25pH3).

O perfil cromatográfico apresentado na figura 29 permite discutir que o padrão de amirina inserida na placa apresentou mancha de cor roxa no Rf 0,7 quando revelada em vanilina sulfúrica (figura 29; amostra 1). Porém, isso não foi observado na fração concentrada de ácidos (figura 29; amostra 5), mostrando a eficiência do método na remoção dessas substâncias como interferentes. Ainda assim, todas as frações apresentam uma mancha de cor amarela quando revelada em etanol sulfúrico exposta à luz ultravioleta (366 nm), exceto na fração de ácidos. Por último, o perfil em placa da fração ácida mostrou rastro em indicativo da concentração de substâncias que podem apresentar grupos carboxílicos em suas estruturas.

8.2.2 CROMATOGRAFIA EM COLUNA DE SÍLICA IMPREGNADA COM KOH DE *Protium strumossum*.

O extrato em acetato de etila *Protium strumossum* (ECRQ25) foi submetido à coluna de sílica impregnada com KOH ($\varnothing_{\text{inter}} = 2,8$ cm; $h_{\text{sílica}} = 16,3$ cm; $m_{\text{sílica}} = 60,43$ g; aplicação da amostra: 2,0113 g em pastilha) para separar as substâncias em três grupos: a primeira hexânica (ECRQ25h), seguida de diclorometano (ECRQ25n) e, por último a salina (ECRQ25s) em metanol. Em seguida, as amostras foram concentradas em evaporador rotatório sob pressão reduzida e realizada partição líquido-líquido até o pH 3, com a adição de HCl 1M. Após, realizaram-se sete extrações com adição de 20 mL de DCM e foram obtidos 611 mg de ácidos denominados de ECRQ25pH3 (figura 30).

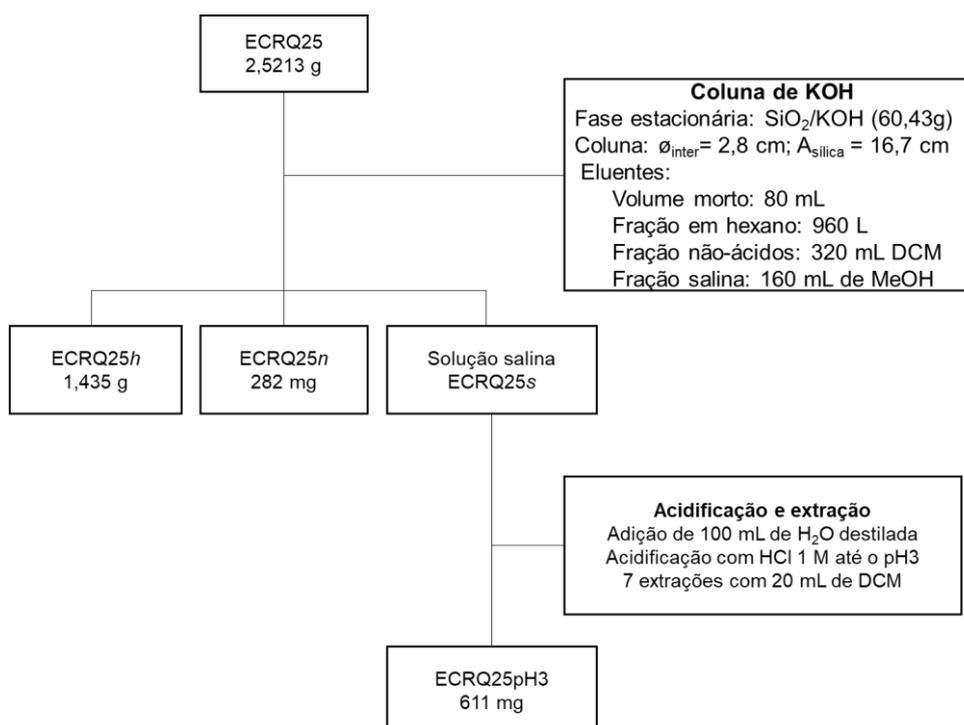


Figura 30. Fluxograma do fracionamento da resina de *Protium strumossum*.

As frações foram analisadas por CCD e disposta na figura 31, pode-se observar o resultado do pré-fracionamento da fase ácida de ECRQ25pH3.

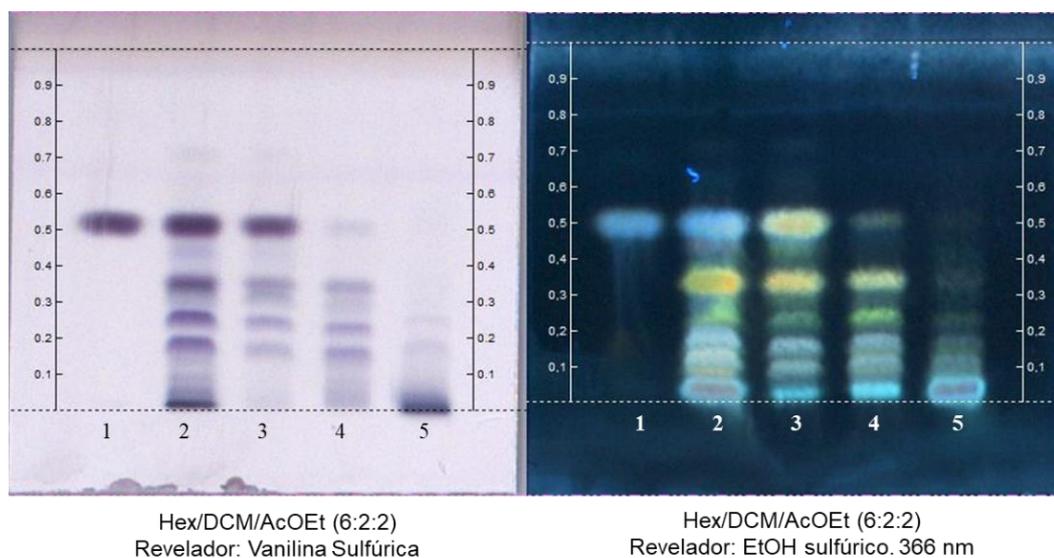


Figura 31. CCD do fracionamento de *P. strumossum* (ECRQ25) por cromatografia de sílica impregnada com KOH. Legenda: (1) α,β -amirina (2) extrato bruto de ECRQ25b, (3) fração hexânica (ECRQ25h), (4) fração dos não-ácidos (ECRQ25n), (5) fase ácida (ECRQ25pH3).

Observa-se no perfil cromatográfico da figura acima, que o emprego do solvente *n*-hexano como primeiro eluente foi suficiente para a retirada da mistura binária de α,β -amirina. Isso é observável na redução da intensidade da mancha de cor roxa presente no Rf 0.5 quando revelada em vanilina sulfúrica (figura 31; amostra 4), e seu nítido desaparecimento na amostra na amostra 5 quando revelada em etanol sulfúrico. A análise qualitativa em placa desse pré-fracionamento permite sugerir a ausência dessas substâncias que podem servir como contaminantes para as moléculas presentes na fração metanólica.

8.2.3 CROMATOGRAFIA EM COLUNA DE SÍLICA IMPREGNADA COM KOH DE *Protium Paniculatum var. modestum*.

O extrato hexânico de *Protium paniculatum var. modestum* (ECNC21) foi direcionado à coluna de sílica impregnada com KOH ($\varnothing_{\text{inter}} = 2,2 \text{ cm}$; $h_{\text{sílica}} = 14,5 \text{ cm}$;

$m_{\text{silica}} = 36,06$ g; aplicação da amostra: 1,5809 g em pastilha) obtendo, dessa maneira três frações: a primeira hexânica (ECNC21 h), seguida de diclorometano (ECNC21 n) e, por último a salina (ECNC21 s) em metanol.

Em seguida, as amostras foram concentradas em evaporador rotatório sob pressão reduzida e realizada partição líquido-líquido até o pH 2, com a adição de HCl 1M. Após, realizaram-se 5 extrações com adição de 20 mL de DCM e obtida uma fase denominada ECNC21pH2 (figura 32).

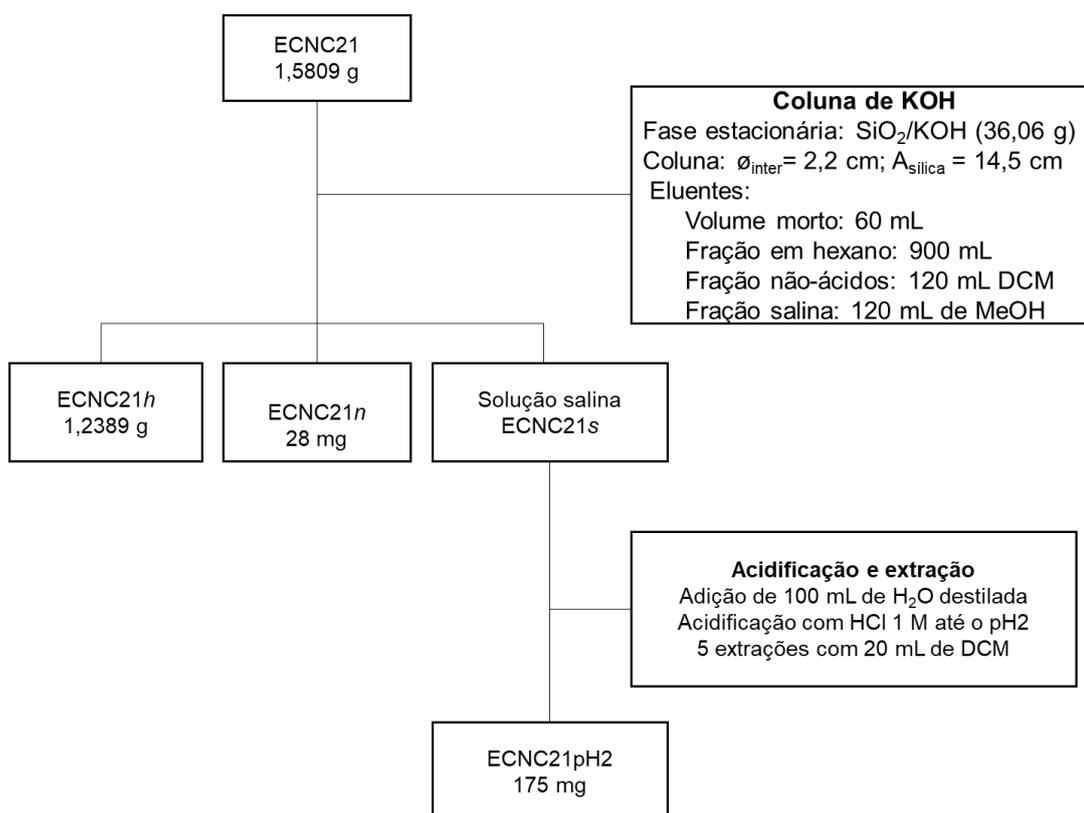


Figura 32. Fluxograma do fracionamento da resina de *Protium paniculatum var modestum*.

Os resultados do pré-fracionamento de *P. paniculatum var. modestum*, mostraram que o extrato em hexano possuiu apenas 11,06% de teor de ácidos. Dados da literatura mencionam que triterpenos ácidos são comumente encontrados em extratos empregando acetato de etila como solvente, isso pode explicar a baixa porcentagem de ácidos obtidos para essa espécie.

A avaliação do perfil cromatográfico do pré-fracionamento foi disposta em placa CCD de acordo com a figura 33. As amostras foram dispostas em ordem crescente de polaridade e reveladas em vanilina e etanol sulfúrico.

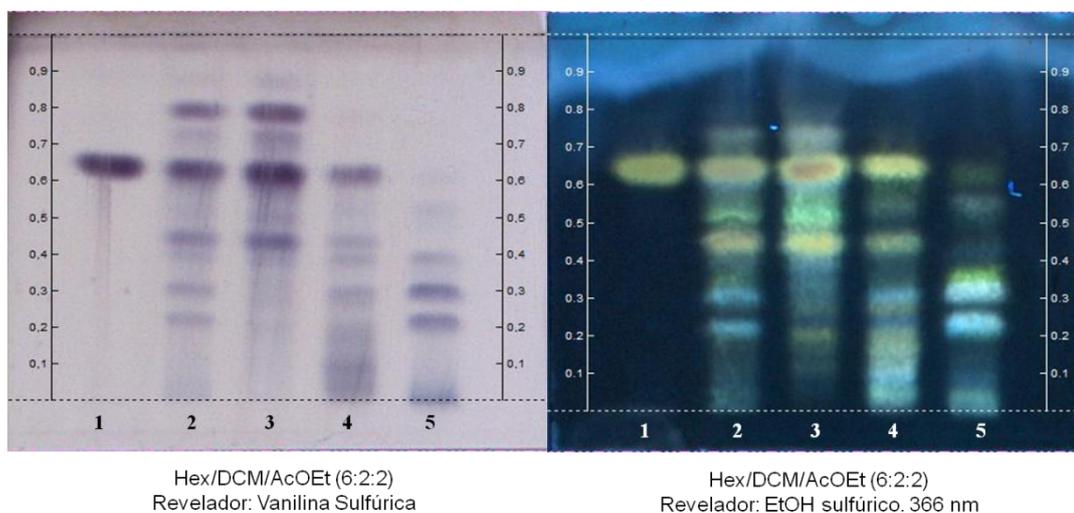


Figura 33. Perfil cromatográfico do fracionamento de *Protium paniculatum var modestum* (ECNC21) por sílica impregnada com KOH. Legenda: (1) - α,β -amirina; (2) extrato bruto de ECNC21b, (3) fração hexânica (ECNC21h); (4) fração dos não-ácidos (ECNC21n), (4) fase ácida (ECNC21pH13).

A placa CCD mostra manchas presentes no Rf 0,8, 0,85 e 0,7 no extrato bruto e em hexano, que podem ser indicativo de substâncias apolares como: α,β -amirina, β -amiradienol, lupeol e fridelano-3-ol. Essas manchas não foram observadas na fase concentrada de ácidos. Nesse ínterim, a figura mostra que o padrão relativo a mistura binária de α,β -amirina- presente no Rf 0,65 (figura 33; amostra 1)- foi também identificada com menor intensidade na fração concentrada de ácidos. Isso sugere que a quantidade de hexano empregado para a retirada dessas moléculas como interferentes não foi suficiente. Desse modo, empregou-se como alternativa de eliminar essas moléculas da fase ácida a precipitação seletiva utilizando a mistura de metanol em água. Os resultados mostraram-se insatisfatórios pois o rendimento de ácidos após a precipitação foi inferior a 1%.

8.2.4 CROMATOGRAFIA EM COLUNA DE SÍLICA IMPREGNADA COM KOH DE *Protium hebetatum*.

O extrato de *Protium hebetatum* (ECVC21) foi submetido à coluna de sílica impregnada com KOH ($\varnothing_{inter} = 2,2$ cm; $h_{sílica} = 17,9$ cm; $m_{sílica} = 43,5$ g; aplicação da amostra: 1,7818 g em pastilha) com o intuito de separar as substâncias em três grupos: a primeira hexânica (ECVC21 h), seguida de diclorometano (ECVC21 n) e, por último a salina (ECVC21 s) em metanol.

Em seguida, as amostras foram concentradas em evaporador rotatório sob pressão reduzida e realizada partição líquido-líquido até o pH 4, com a adição de HCl 1M. Após, realizaram-se 10 extrações com adição de 20 mL de DCM e, com isso, foi obtido 539 mg de ácidos que foram denominados de ECVC21pH4 (figura 34).

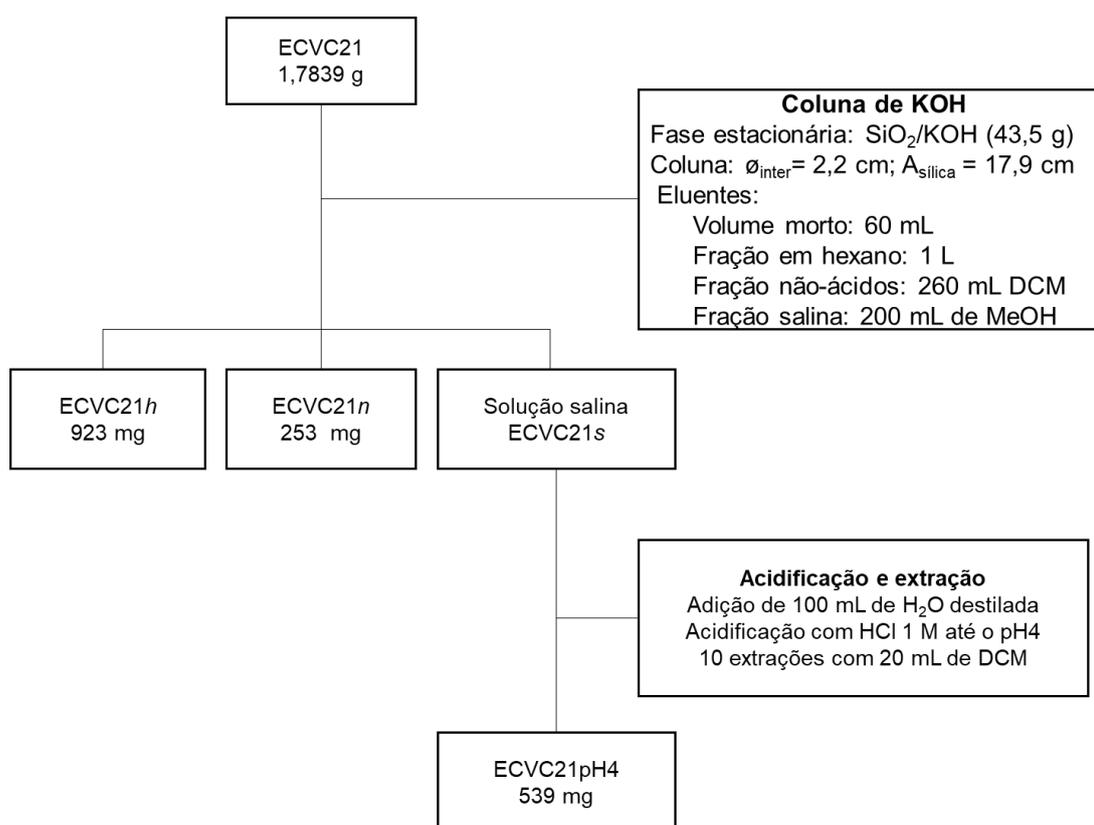


Figura 34. Fluxograma do fracionamento da resina de *Protium hebetatum*.

A figura 35 representa o resultado do pré-fracionamento de *P. hebetatum*, as amostras foram dispostas em ordem crescente de polaridade com o objetivo de observar a retirada das substâncias apolares do extrato em hexano.

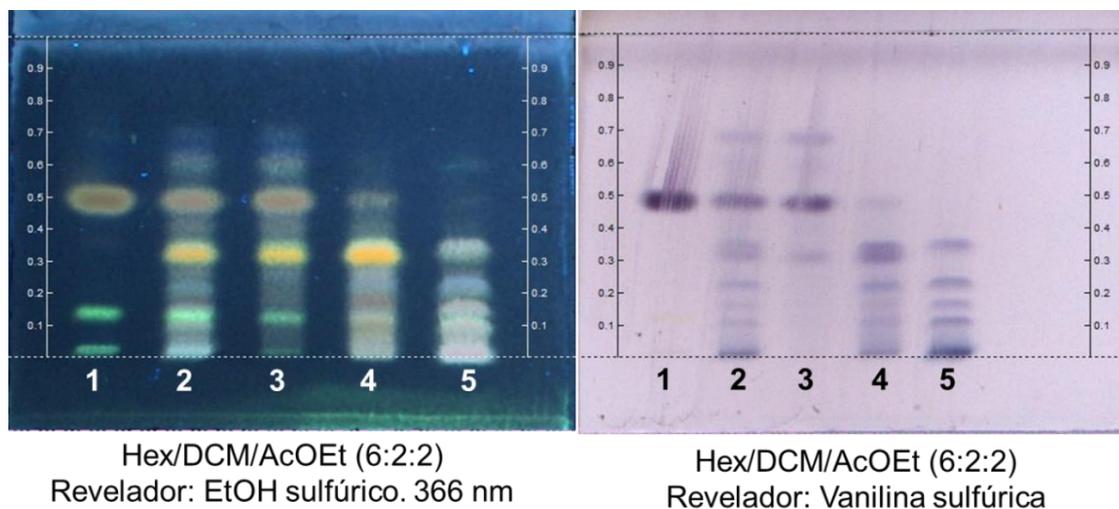


Figura 35. Perfil cromatográfico do fracionamento de *Protium hebetatum* (ECVC21) por sílica impregnada com KOH. Legenda: (1) - α,β -amirina; (2) extrato bruto de ECVC21b, (3) fração hexânica (ECVC21h); (4) fração dos não-ácidos (ECVC21n), (4) fase ácida (ECVC21pH4)

O resultado do pré-fracionamento de *P. hebetatum* revelou de 30,21% de teor de ácidos foram obtidos. Mesmo utilizando-se hexano como solvente para a retirada de substâncias apolares, observou-se a presença de uma mancha verde no Rf 0,6 quando analisado em placa CCD (figura 35; amostra 5). Porém, a mancha relativa às amirinas no Rf 0,5 não foi observada quando revelada em etanol e vanilina sulfúrica.

8.2.5 CROMATOGRAFIA EM COLUNA DE SÍLICA IMPREGNADA COM KOH DE *Protium altsonii*.

O extrato de *Protium altsonii* (ECAH21) foi submetido à coluna de sílica impregnada com KOH (\varnothing_{inter} = 3,5 cm; $h_{sílica}$ = 12,2 cm; $m_{sílica}$ = 114,4602 g; aplicação da amostra: 3,6065 g) obtendo a primeira fração hexânica (ECAH21h), seguida de diclorometano (ECAH21n) e, por último a salina (ECAH21s) em metanol. Em seguida,

as amostras foram concentradas em evaporador rotatório sob pressão reduzida e realizada partição líquido-líquido até o pH 4, com a adição de HCl 1M. Após, realizaram-se 5 extrações com adição de 20 mL de DCM e foi obtido 1g de ácidos, essa fração foi denominada de ECAH21pH4 (figura 36).

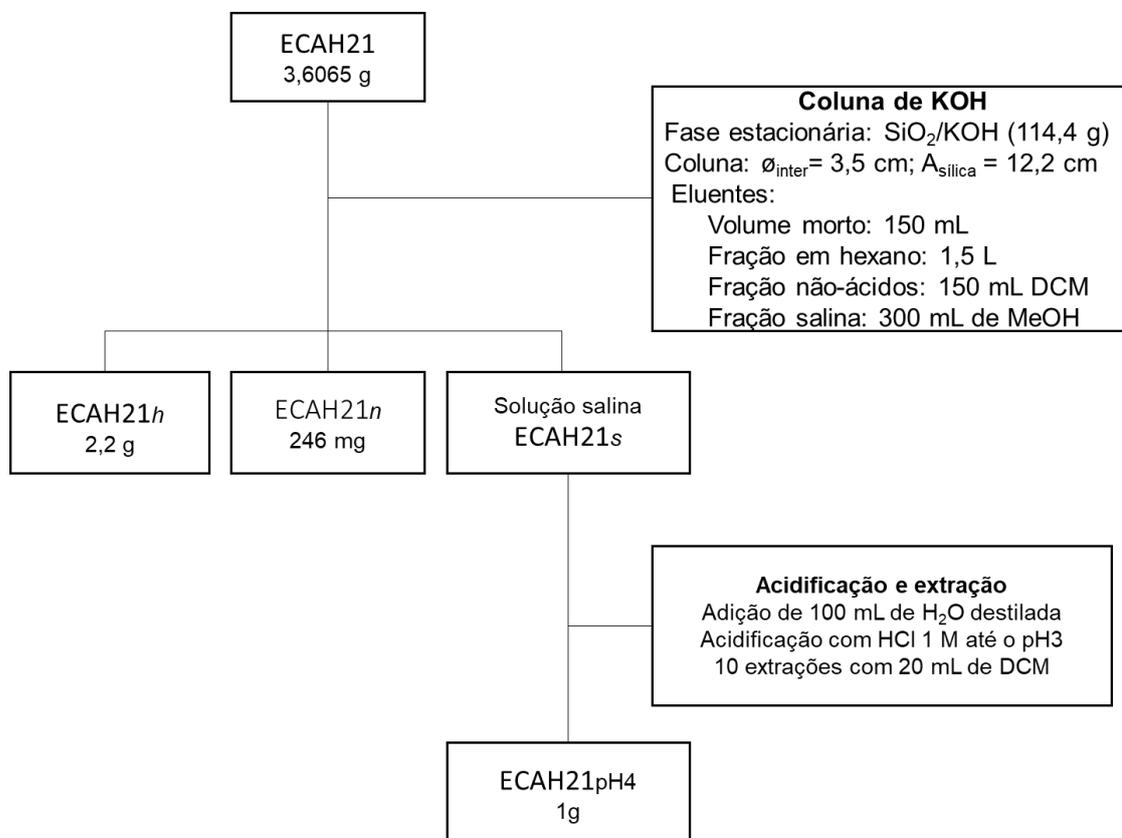


Figura 36. Fluxograma do fracionamento do extrato em hexano de *Protium altsonii*.

O pré-fracionamento por coluna de sílica impregnada com hidróxido de potássio, tem como objetivo de nesse trabalho em separar as substâncias por grupos. Esses compreendem os ácidos e as substâncias neutras (terpenos que possuem apenas uma hidroxila na sua estrutura). Com isso, comumente é empregado o diclorometano (próton aceptor) que tem a funcionalidade de eluir os hidrocarbonetos não-ácidos e, o metanol que possui força eluotrópica para a retirada dos ácidos retidos na coluna cromatográfica. Embora esse seja o usual quando se utiliza a coluna impregnada com base, a metodologia descrita por (PINTO *et al.*, 2000) foi modificada

porque a literatura científica relata que as resinas de Burseraceae contém, como substâncias majoritárias, predominantemente misturas binárias de α,β -amirina (RUDIGER *et al.*, 2007).

Por conta disso, o padrão da mistura de α,β -amirina utilizada no perfil cromatográfico presente na figura 37, assim como nos demais cromatogramas apresentados nesse trabalho, serviu como guia para demonstrar a retirada dessas moléculas com o uso do *n*-hexano. Entretanto, a mancha de Rf 0,5 foi observada com presente em menor intensidade na fração de ácidos, isso indica que a quantidade de solvente utilizada não foi suficiente para a retirada das amirinas.

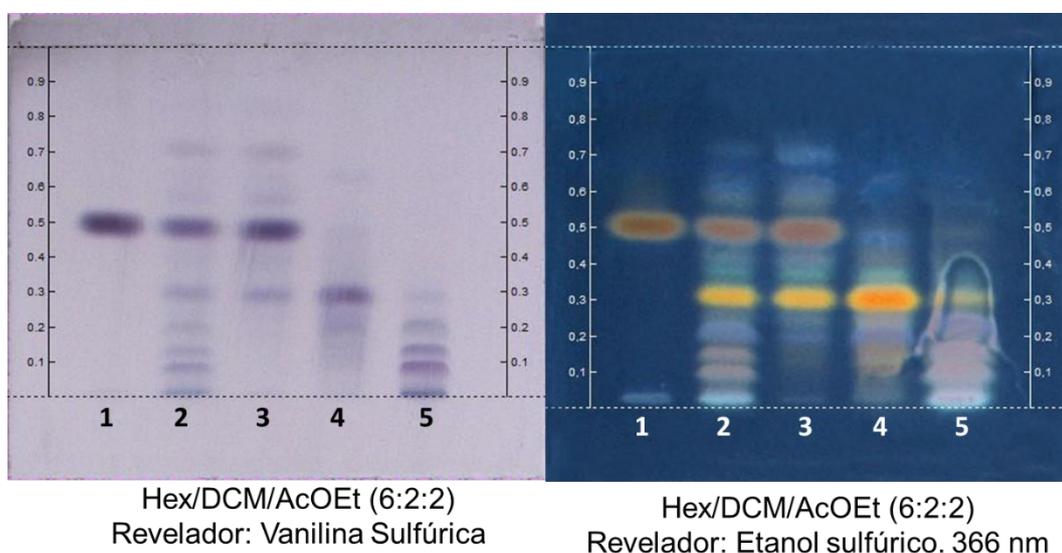


Figura 37. Perfil cromatográfico do fracionamento de *P. altsonii* (ECAH21) por cromatografia de sílica impregnada com KOH. Legenda: (1) α,β -amirina (2) extrato bruto de ECAH21b, (3) fração hexânica (ECAH21h), (4) fração dos não-ácidos (ECAH21n), (5) fase ácida (ECAH21).

No perfil químico demonstrado na figura 37, pode-se identificar uma mancha de cor amarela evidente em todas as frações quando revelada em etanol sulfúrico (UV-366nm) e, em menor intensidade na fase ácida (figura 37; amostra 5). Ainda assim, identifica-se manchas no Rf 0,7 e 0,8 indicativo de substâncias apolares. As substâncias ácidas presentes na espécie em estudo, apresentaram Rf 0,25 de cor

roxa quando revelada em etanol sulfúrico. Já as manchas de Rf 0,15 e 0,1 apresentaram cor lilás. A tabela 02, reúne as informações acerca dos rendimentos obtidos nessa etapa.

Tabela 2. Rendimento das fases ácidas obtidas após fracionamento por cromatografia de sílica impregnada com KOH.

Espécies	Sigla	Extrato	Massa Extrato	Massa fase ácida			% ácidos
				PH2	PH3	PH4	
<i>Protium cf. heptaphyllum</i>	EDFB25	AcOEt	6,3209 g	413 mg	400 mg		12.86
<i>Protium strumosum</i>	ECRQ25	AcOEt	2,5213 g		611 mg		24.23
<i>Paniculatum</i> Var. <i>Modestum</i>	ECNC21	Hexano	1,5809 g	121 mg	54 mg		11.06
<i>Protium hebebatum</i>	ECVC21	Hexano	1,7839 g			539 mg	30.21
<i>Protium altsonii</i>	ECAH21	Hexano	3,6065 g			1 g	27.72

Portanto, pode-se inferir que as espécies *P. altsonii* e *P. hebebatum* revelaram o maior teor de ácidos entre as espécies a partir do pré-fracionamento por coluna de KOH.

Após a concentração dos ácidos por cromatografia de resina de troca iônica, as fases ácidas foram reanalisadas buscando a similaridade entre os extratos e suas diferenças, possibilitando a busca por substâncias que possam indicar novos ácidos para a química de substâncias mais oxidadas de Burseraceae.

As amostras da figura 43 foram dispostas a dois diferentes sistemas de eluição: o primeiro deles foi empregado 40% de polaridade em acetato de etila e teve como objetivo de apontar aquelas substâncias de menor polaridade entre as fases ácidas. Já a segunda, aumentou-se a polaridade do sistema para 60% a fim de visualizar aquelas substâncias presentes na base da placa e, com isso, comparar seus fatores de retenção.

Os resultados apresentados na figura 38, permitem visualizar que o sistema de solvente empregado na separação dos ácidos nas cinco espécies foi eficiente, isso porque a nítida visualização das manchas dispostas na placa fornece dados suficientes podendo agrupá-las, de modo que, suas similaridades e diferenças possam ser discutidas.

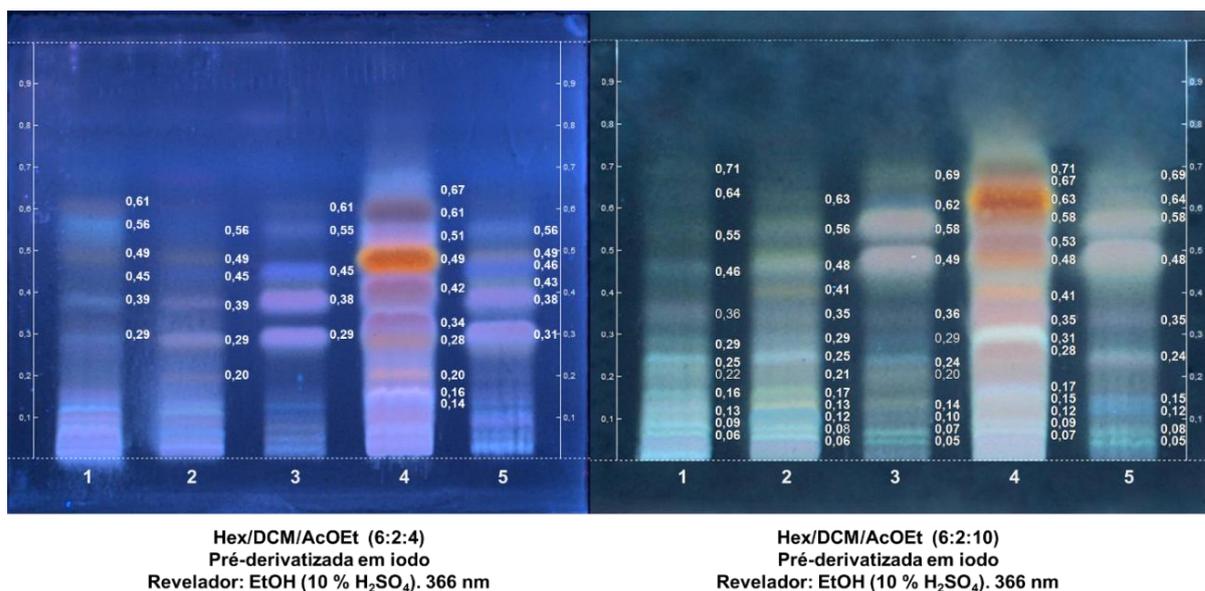


Figura 38. Perfil químico por cromatografia em camada delgada das fases ácidas obtidas através da coluna de KOH. Legenda: em (1) *P. cf. heptaphyllum* (EDFB25pH3); (2) *P. strumosum* (ECRQ25pH3); (3) *P. paniculatum* var. *modestum* (ECNC21pH2); (4) *P. hebetatum* 2 (pH4); (5) *Protium altsonii* (pH5).

A figura acima mostra que o extrato em hexano de *P. hebetatum* apresentou perfil químico distinto de todas as espécies, isso porque uma mancha de cor laranja foi observada no Rf 0,49 quando revelada em etanol sulfúrico. Além disso, uma mancha de cor amarela presente no Rf 0,16 e azul de Rf 0,14 apontam para as substâncias mais polares. Do mesmo modo, nas espécies *Protium paniculatum* var. *modestum* e *P. altsonii* foram observadas manchas de cor lilás no Rf 0,29 e 0,38, assim como uma mancha de cor azul pertencente ao Rf 0,45. Isso pode indicar a similaridade entre essas duas espécies. Já as frações ácidas de *P. altsonii* e *P. cf. heptaphyllum* apresentaram manchas de cor azul de baixa intensidade observadas no Rf 0,39 e 0,29.

Já a placa obtida com o aumento de polaridade, permite identificar manchas de menor fator retenção em todos os extratos, porém uma mancha de cor amarela no Rf 0,13 e azul no Rf 0,12 identificadas como presentes em *P. strumosum* não foram visualizadas nas demais espécies. Destaca-se também a mancha de cor verde de Rf 0,05 e 0,08 presentes tanto em *P. paniculatum* var. *modestum* quanto em *P. altsonii*.

É variada a diversidade de substâncias ácidas presentes em resinas de Burseraceae. No entanto, estudos acerca da detecção de triterpenos através de pré-derivatização das placas cromatográficas vêm sendo destacados (ANANDJIWALA *et al.*, 2006).

A classe secundária de metabólitos investigada compreende os triterpenos ácidos. Essas substâncias possuem dupla ligação em sua rígida estrutura, um grupo carboxílico e a ausência de cromóforos (WOZNIAK *et al.*, 2017). Por conta desse problema, a pré-derivatização com iodo e, a revelação por etanol sulfúrico, promoveram a rápida e simples detecção dos triterpenos ácidos na placa cromatográfica, substituindo métodos de custo elevado como sílica impregnada com fase estacionária quiral (WOJCIAK-KOSIOR, 2007; SWIEBODA *et al.*, 2014).

O estudo do perfil cromatográfico dos ácidos em placa, permitiu indicar as espécies mostrando suas semelhanças e complexidades. Para isso, a análise prévia das manchas identificadas em cada espécie, foram dispostas a um tratamento estatístico.

A fim de verificar a semelhança entre os perfis químicos dos ácidos resinosos que, por sua vez, correspondem às semelhanças na composição química, utilizou-se a análise por agrupamento hierárquico (HCA) e análises de componentes principais (PCA). Esses dados visam examinar a ausência e presença de substâncias de mesmo R_f entre as fases ácidas e direcionar a seleção das espécies para o fracionamento buscando isolar e identificar as substâncias mais oxidadas.

A avaliação de agrupamentos no dendograma exposta na figura 39, mostra a similaridade de *P. strumossum* e *P. cf. heptaphyllum*, assim como a semelhança de R_fs entre as espécies *P. paniculatum* Var. *modestum* e *P. altsonii*, ao passo que *P. hebetatum* foi a única espécie que se apresentou diferente das demais.

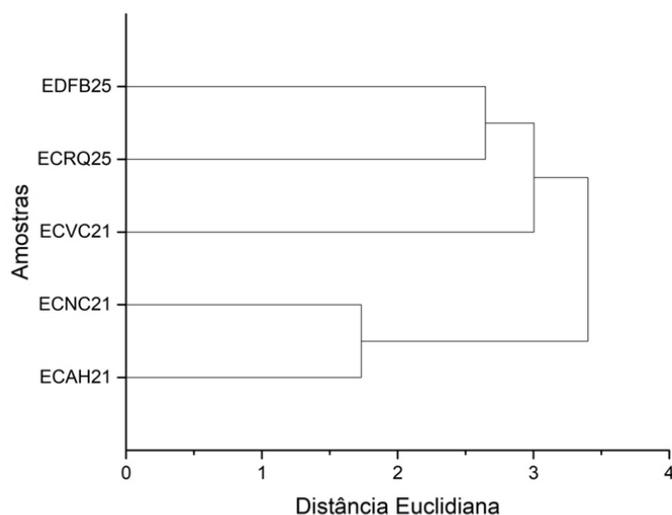


Figura 39. Dendrograma obtido para as fases ácidas de resinas de Burseraceae a partir da análise de ausência e presença de Rf.

O gráfico da figura 40 apresenta no seu eixo as duas componentes principais, representando graficamente 67,1 % da informação multivariada a partir dos dados analíticos. O posicionamento de *P. strumossum* (ECRQ25) e *P. cf. heptaphyllum* (EDFB25) no mesmo quadrante mostra a similaridade entre as características químicas pelos Rfs encontrados em 0,56; 0,49; 0,45; 0,39 e 0,29. Já a proximidade entre *P. altsonii* e *P. paniculatum var. modestum* mostraram as mesmas substâncias presentes no Rf 0,56; 0,38; 0,24; 0,05 e, em contra partida *P. hebetatum* diferenciou-se pelas manchas de Rf observadas em 0,67; 0,71; 0,41 e 0,53.

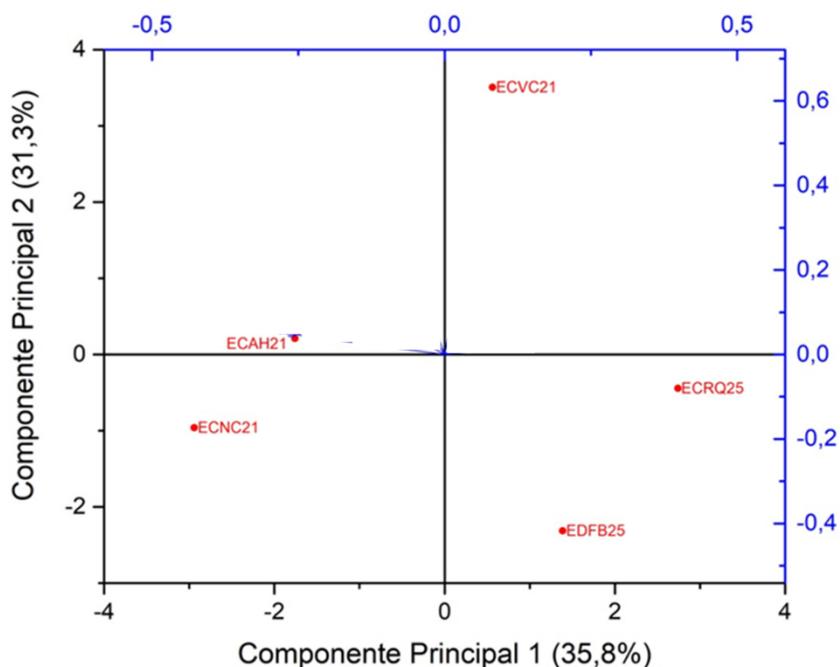


Figura 40. Distribuição de cinco espécies por análises de componentes principais utilizando como variáveis os fatores de retenção.

Os resultados através da comparação entre as similaridades das fases ácidas -de resinas de Burseraceae- e o tratamento estatístico apresentado anteriormente, tornam-se de guia para o planejamento em busca das substâncias polares presentes nos extratos de breu. Desse modo, o pré-fracionamento e isolamento de *P. hebetatum* é descrito nas próximas seções, além das espécies *P. altsonii* e *P. strumossum* que podem sugerir as mesmas substâncias presentes em *P. paniculatum* var *modestum* e *P. cf. hepetaphyllum*, respectivamente.

8.3 ISOLAMENTO E ELUCIDAÇÃO ESTRUTURAL DE RESINAS DE BURSERACEAE

As fases ácidas de *P. altsonii* e *P. hebetatum* foram fracionadas por cromatografia de sílica *flash*, buscando o isolamento e a identificação de novos triterpenos ácidos ou outras substâncias mais oxidadas.

O fracionamento de *P. altsonii* levou ao isolamento do ácido 3 α -hidroxitirucala-7,24-dien-21-oico obtido da fração PA4. Além disso, identificou-se em mistura os ácidos 3-oxo-tirucala-8,24-dien-21-oico e 3 β -hidroxitirucala-8,24-dien-21-oico da fração PA2. Do mesmo modo, na fração PA1 identificou-se em mistura os isômeros de posição 3 α -hidroxitirucala-7,24-dien-21-oico e o ácido 3 α -hidroxitirucala-8,24-dien-21-oico. E, por fim, na fração PA1 sugeriu-se a presença do ácido 3 α -hidroxioleanano-12-eno-23-oxo-28-oico.

Tratando-se do fracionamento da espécie *P. hebetatum*, a fração denominada de PH13 levou à identificação em mistura dos seguintes ácidos: 3-oxo-tirucala-8,24-dien-21-oico (ácido β -elemólico); 3 α -hidroxitirucala-8,24-dien-21-oico (α -elemólico) e 3 α -hidroxitirucala-7,24-dien-21-oico. Os pormenores da elucidação estrutural de todas as substâncias foram discutidos através de dados de RMN unidimensionais e bidimensionais e, o íon molecular por espectrometria de massas utilizando a fonte APCI. Deve-se deixar claro que os ácidos de esqueleto do tipo tirucalol e eufol foram identificados em todas as frações, por conta disso a elucidação estrutural foi detalhada apenas nas amostras PA2, PA4 e PH13, evitando a repetição de informações experimentais nas demais frações.

8.3.1 FRACIONAMENTO DE *Protium altsonii*

Tratando-se da estratégia de isolamento de triterpenos ácidos, uma quantidade de 100 mg da fração ácida de *P. altsonii* foi submetida à cromatografia por coluna de sílica *flash*. O sistema de eluente consistiu na mistura fixa de hexano e diclorometano (6:2), variando-se a proporção do terceiro solvente (metil-etil-cetona) de 10 a 80%. Desse modo, após a retirada do volume morto, coletaram-se 3 frações de 15 mL por eluente e, ao final, utilizou-se MeOH 100% para a limpeza da coluna. O delineamento experimental está disposto na figura 41.

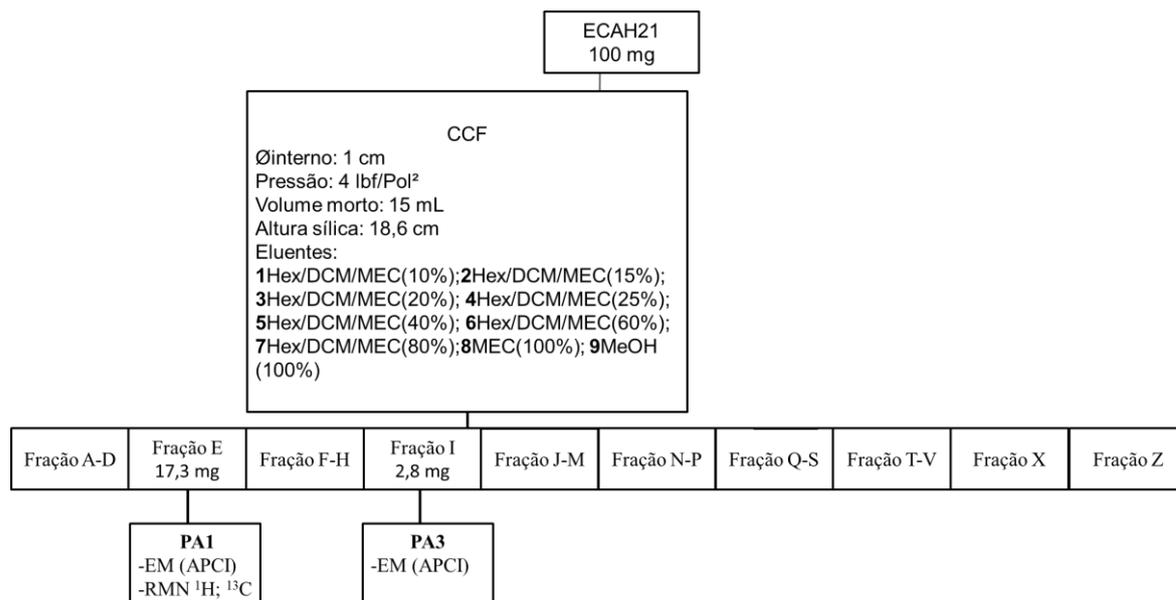
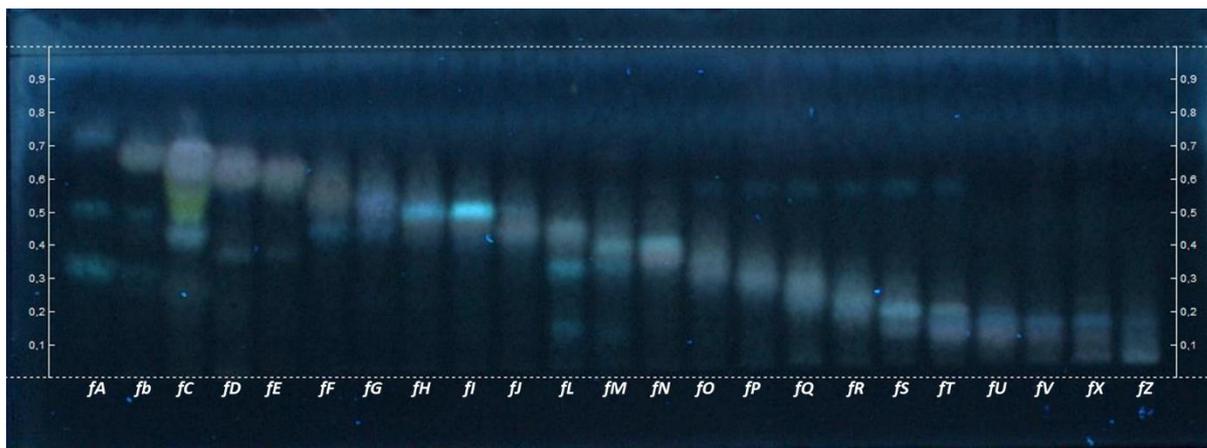


Figura 41. Fluxograma do fracionamento da fase ácida de *P. altsonii*.

A coluna de fracionamento de *P. altsonii* foi avaliada por cromatografia em camada delgada a qual está disposta na figura 42. Contudo, observou-se que as substâncias foram separadas com o aumento de polaridade do sistema de eluente. Ainda assim, a placa mostra a mistura de substâncias nas frações mais apolares e, algumas manchas puras como nas frações I e E. Sendo assim, apenas uma mancha de cor roxa na fração E de Rf 0,62 e, uma mancha azul intensa na fração I (Rf 0,57) foram observadas quando reveladas em etanol sulfúrico. Por conta disso, essas amostras foram denominadas de PA1 e PA3 e submetidas à análise por RMN unidimensional (¹H/¹³C) e Espectrometria de Massas (APCI; [M - H]⁻) para a determinação do íon molecular.



Eluentes: Hex/DCM/MEC (6:2:5,5)
Revelador: EtOH Sulfúrico. 366nm

Figura 42. Perfil cromatográfico do fracionamento dos ácidos de *P. altsonii*.

O método estratégico de fracionamento disposto na figura acima, apresentou-se suficiente para separação das substâncias de diferentes polaridades. Porém, a quantidade de solvente empregado e o tempo de realização da coluna mostraram-se dispendiosas. Com o intuito de aumentar a eficiência da coluna, reduzindo a quantidade de solvente, um novo fracionamento dos ácidos foi submetido à coluna filtrante. Para isso, uma quantidade de 107,5 mg de ECAH21pH4 foi utilizado para a realização da cromatografia por coluna *flash*. Tratando-se do sistema eluotrópico, utilizou-se mistura fixa de hexano e diclorometano (6:2) e, variou-se a proporção do terceiro solvente que consistiu em metil-etil-cetona a 7, 20 e 40%, respectivamente. Desse modo, após a retirada do volume morto, coletaram-se 4 frações de 16 mL por eluente e, ao final, utilizou-se metanol para a limpeza da coluna. Os resultados do fracionamento contendo as massas das frações, estão dispostos no fluxograma da figura 43.

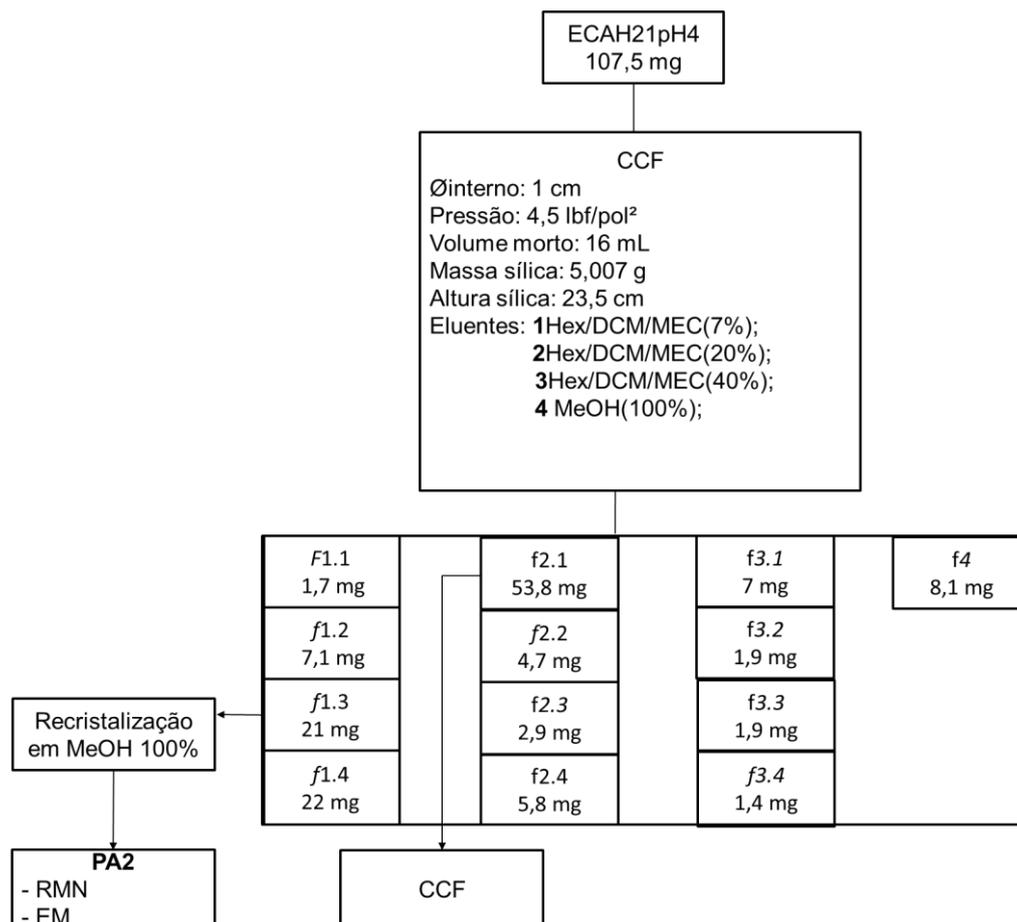


Figura 43. Fluxograma da coluna de fracionamento dos ácidos de *P. altsonii*.

Na avaliação do perfil por CCD (figura 44; placa A), observou-se a eficácia na separação a partir da seletividade do sistema de solvente empregado. Quando revelada em vanilina sulfúrica, identificou-se uma única mancha de cor verde presente no Rf 0,75 (figura 44; placa A). Outras manchas puras podem ser visualizadas de cor azul no Rf 0,2 nas frações mais polares. Por outro lado, uma mistura de substâncias pode ser indicada como presente nas frações f2.4 e f3.1, ainda assim observa-se a presença de rastro em placa indicativo de substâncias oxidadas.

Buscando avaliar o grau de pureza das substâncias obtidas, as frações de f1 a f.4 foram avaliadas por CCD (figura 44 – placa B) reduzindo-se a polaridade do sistema para a investigação de manchas presentes em cada fração.

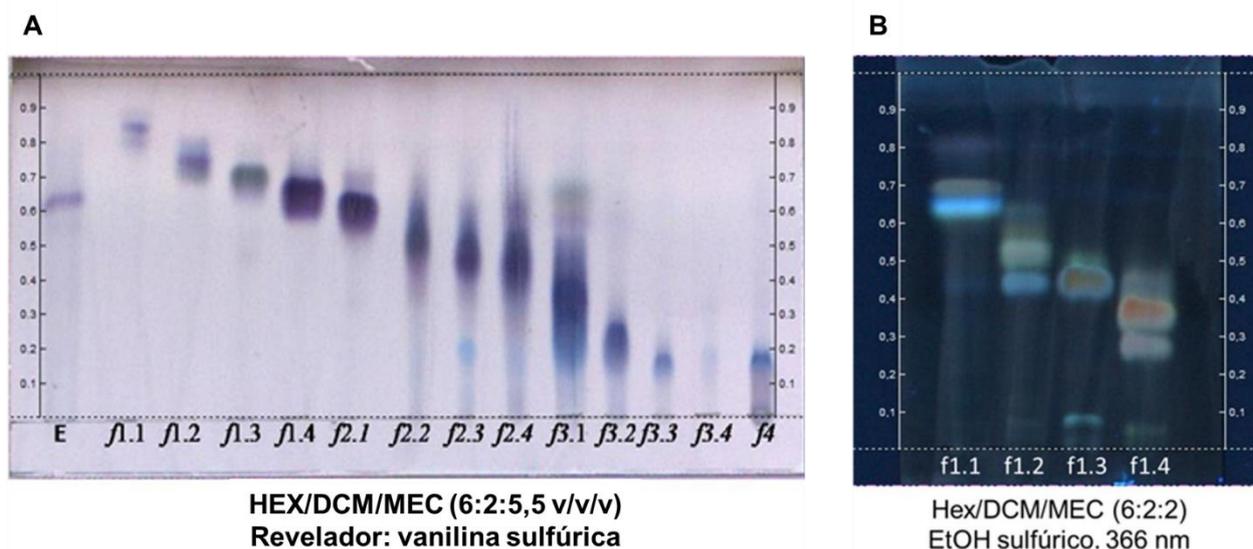


Figura 44. Perfil cromatográfico da coluna de fracionamento da fase ácida de *P. altsonii* em (A) e, em (B), análise por CCD das frações de f1.1 à f1.4.

Após a avaliação em placa, observou-se uma única mancha no Rf 0,45 da fração f1.3 (figura 44 - B). Nesse molde, a amostra foi selecionada para recristalização utilizando MeOH a 100%. Os cristais apresentaram-se como em formato de agulha (figura 45) e foram submetidos à análise de identificação estrutural por RMN (^1H , ^{13}C , DEPT 135°, COSY, HSQC e HMBC) e Espectrometria de Massas (APCI; $[\text{M} - \text{H}]^-$).

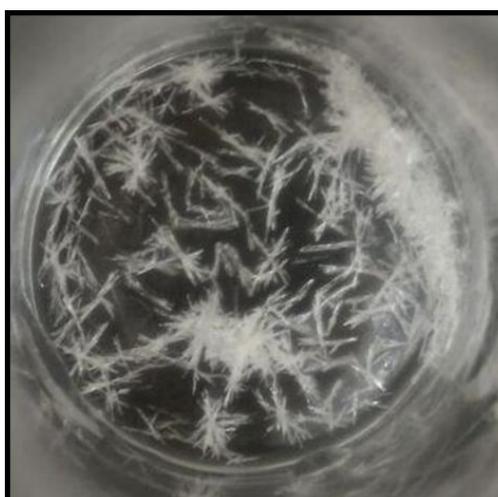


Figura 45. Cristais obtidos da fração 1.3 de *P. altsonii* após recristalização por MeOH.

Seguindo o fracionamento de *P. altsonii*, uma quantidade de 53,8 miligramas da fração 2.1, obtida através da coluna filtrante de ECAH21pH4 (figura 46), foi submetida a um novo fracionamento por cromatografia de sílica *flash*. Com isso, após

a retirada de 13,5 mL do volume morto, foram coletadas 20 frações de 5 mL totalizando 100 mL de eluente (modo isocrático de Hex/DCM/MEC (6:2:2 v/v/v)) (STILL *et al.*, 1978).. E para a limpeza do material retido na coluna foi utilizado 100 mL de MeOH a 100%. Os resultados foram dispostos no fluxograma da figura 46.

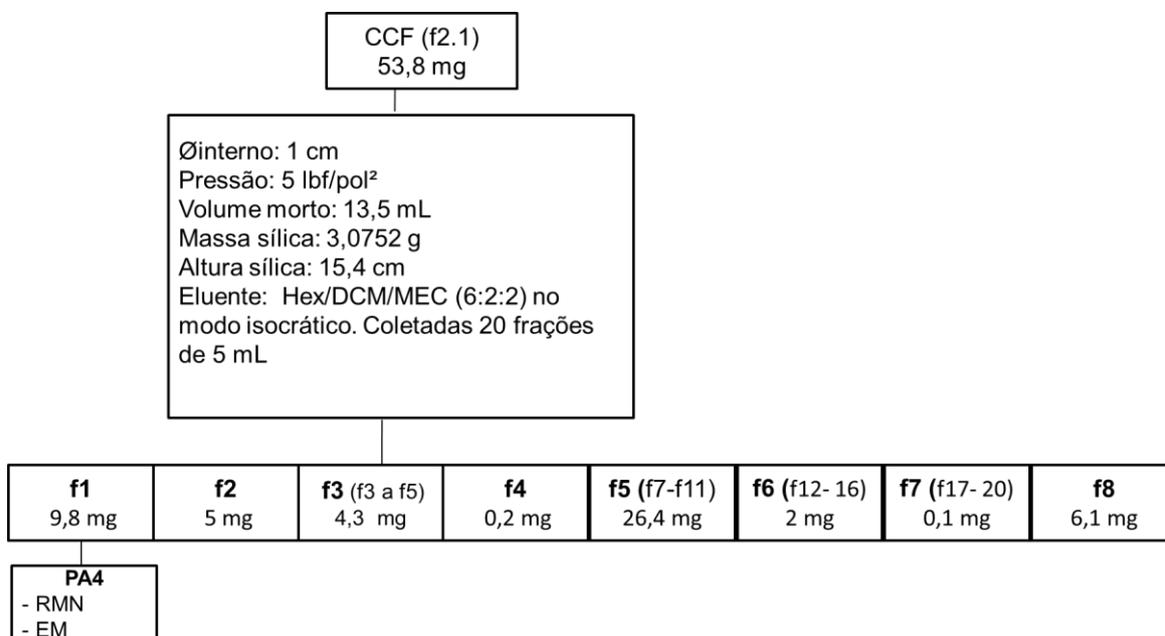


Figura 46. Fluxograma do fracionamento de *P. altsonii*, no modo isocrático, da amostra f2.1 por cromatografia de sílica *flash*.

Diante do exposto, as frações similares foram reunidas e o perfil químico da coluna assinalada anteriormente foi avaliado por cromatografia em camada delgada disposta na figura 47. A placa mostra a presença de uma única mancha de cor azul no R_f 0,5 da fração f1.

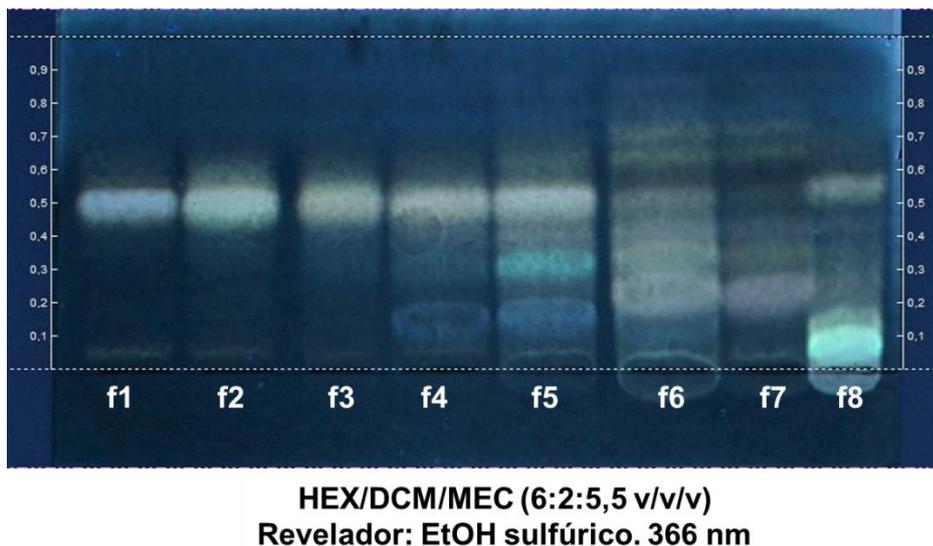


Figura 47. Perfil cromatográfico do fracionamento de f2.1 por cromatografia de sílica flash de *P. altsonii*.

A mancha azul de f1 observada na figura 47, foi denominada de PA4 e foram realizados os experimentos por RMN de ^1H , ^{13}C e bidimensionais, assim como a identificação do íon molecular por Espectrometria de Massas empregando a fonte APCI no modo negativo.

8.3.2 IDENTIFICAÇÃO ESTRUTURAL DE PA1 E PA3

A fração denominada como PA1, apresentou-se com a coloração amarela e oleosa. A análise dessa fração por Espectrometria de Massas ($[\text{M} - \text{H}]^-$) apresentou o íon molecular de maior intensidade em 455,49 m/z que é referente à massa 456 m/z. De fórmula molecular igual a $\text{C}_{30}\text{H}_{48}\text{O}_3$ é sugestivo para a classe dos triterpenos trioxigenados.

A figura 48 permite visualizar a instabilidade do íon molecular, na análise por Espectrometria de Massas quando utilizado a fonte de ionização química por pressão atmosférica. Isso é observável na presença do íon 911,87 m/z (PA1). Essa instabilidade observada pode ser explicada pela maior diferença protônica entre o gás reagente e a molécula, que garante maior abundância em íons moleculares e um

número menor de íons fragmentados, isso porque mais energia pode ser transferida para a amostra durante a ionização.

pA1 #22-26 RT: 0,37-0,44 AV: 5 NL: 1,35E8
F: -c APCI Q1MS [150,000-1000,000]

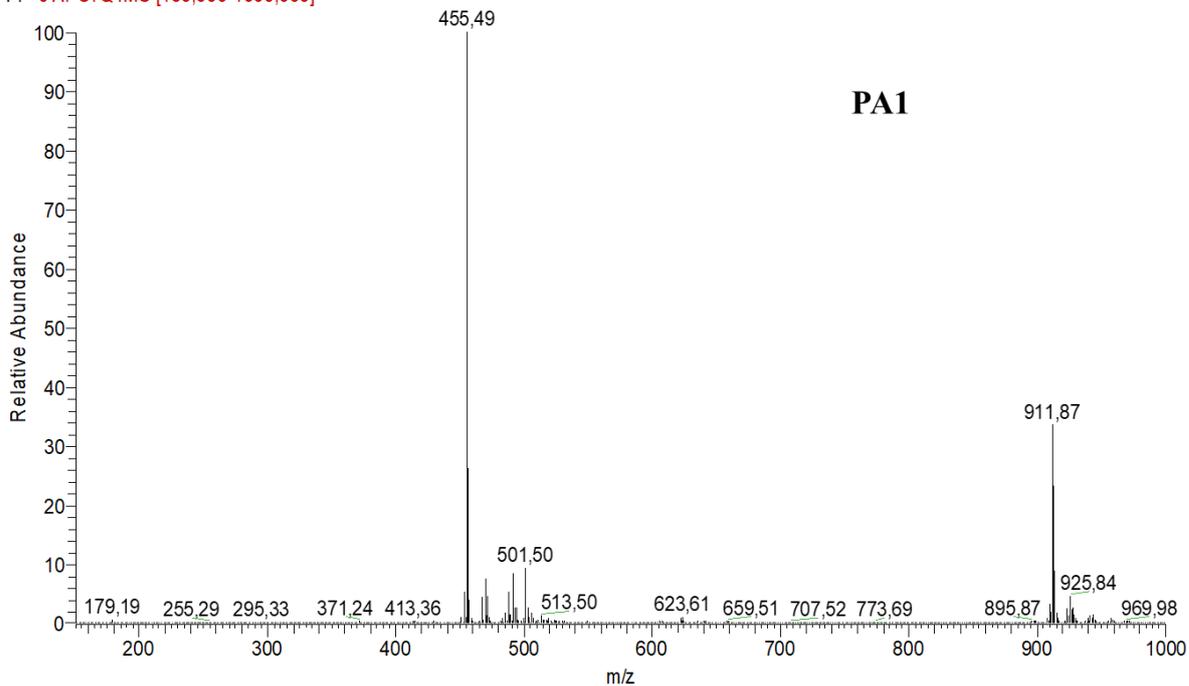


Figura 48. Escaneamento completo obtido por APCI no modo negativo $[M - H]^-$. Mostrando o pico de maior intensidade em 455,49 m/z de PA1.

Os dados obtidos por RMN 1H de PA1, na figura 49, mostram os principais sinais para a interpretação da estrutura do triterpeno ácido.

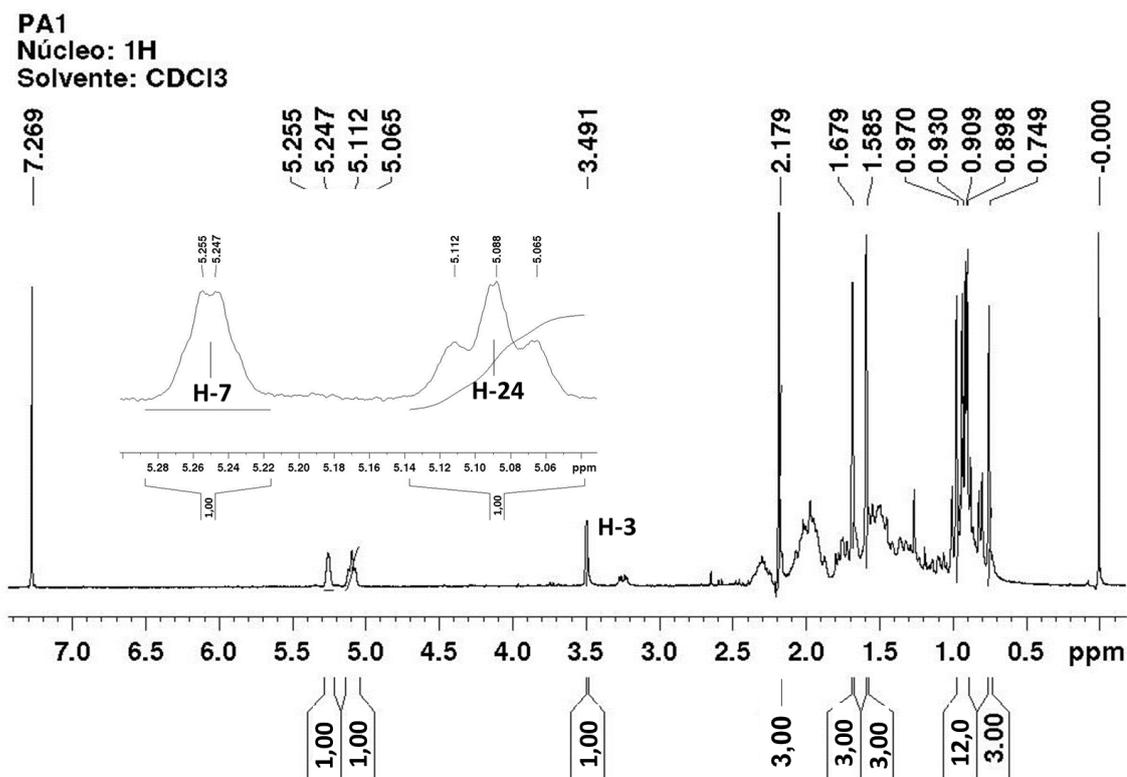


Figura 49. Espectro de RMN de ^1H de PA1 (300 MHz, solvente: CDCl_3).

Dessa maneira, em δ 5,25 (*d*, $J=2,01$ Hz, 1H) ppm representa um grupo metino ligado a um carbono olefínico presente no anel B, em δ 5,09 (*t*, $J=8,68$; 6,61 e 6,61 Hz, 1H) ppm indica outro grupo metino presente na cadeia lateral da molécula. Além disso, o sinal intenso em δ 3,49 ppm permite indicar a presença de hidroxila em H-3 que para triterpenos faz parte de sua biossíntese (Xu *et al.*, 2004; Kirby e Keasling, 2009).

A figura 50 mostra a expansão do espectro de ^1H para a visualização dos sinais de campo alto. Nessa região permite identificar as metilas que, possuem o deslocamento em δ 0,75 (H-30); 0,90; 0,91; 0,93 e 0,97 (H-28) ppm. Já os sinais em δ 1,58 (H-26) e 1,68 (H-27) ppm indicam metilas ligadas a carbonos olefínicos e, um singlete largo em δ 2,18 ppm (3H).

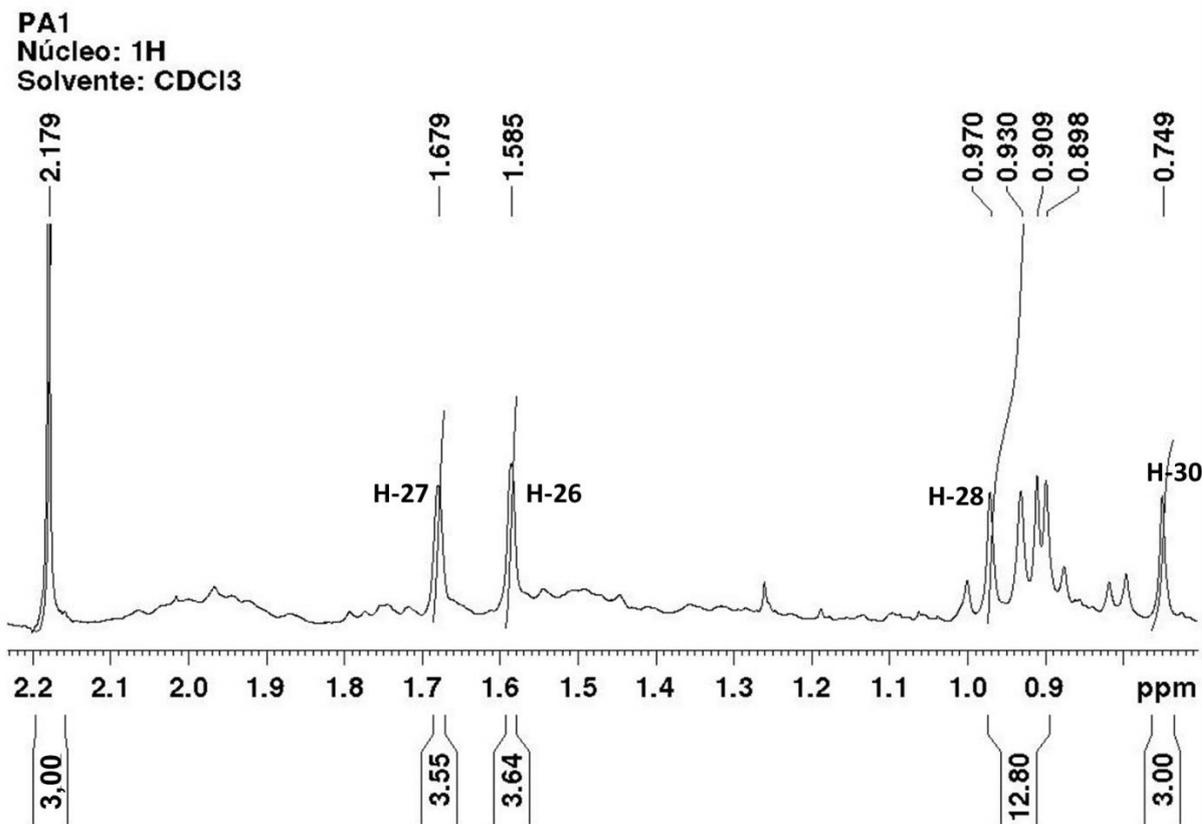
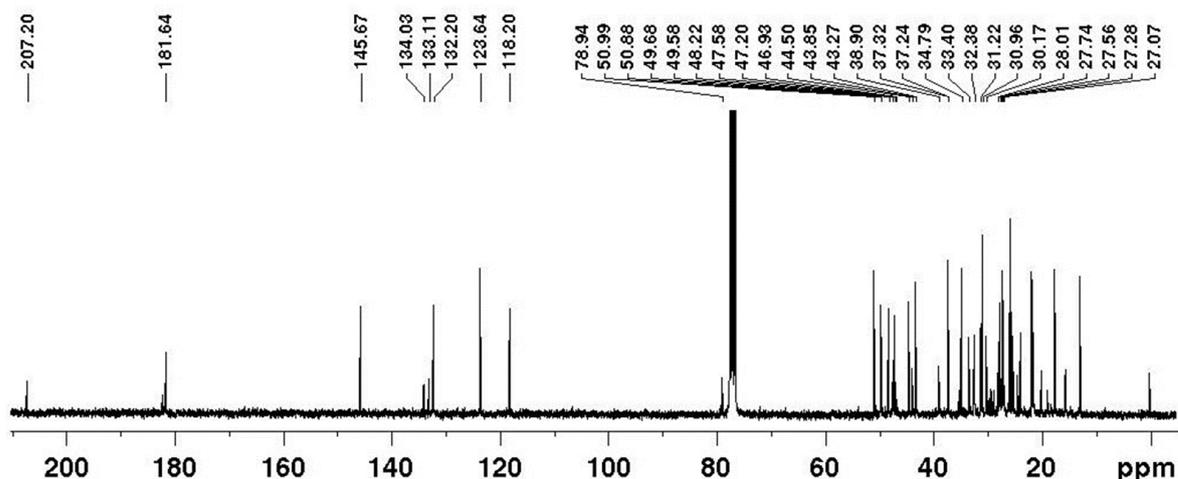


Figura 50. Espectro de RMN de ^1H de PA1 e expansão da região entre δ 2,2-0,75 ppm (300 MHz, solvente: CDCl_3).

Os deslocamentos químicos, mencionados anteriormente, são comuns nas resinas de *Protium*. Reportando-se aos dados da literatura, os sinais em δ 3,50 diz respeito à hidroxila na posição C-3 (Anel A), o duplete em δ 5,25 denota a presença de um grupo -CH ligado à dupla ligação. Esse sinal geralmente é encontrado em esqueletos do tipo tirucalano (MORA *et al.*, 2001), já o sinal em δ 5,29 mostra o grupo metino presente na cadeia lateral, comumente esse sinal é encontrado em triterpenos tetracíclicos como descrito por (MANGURO e WAGAI, 2016)..

Tratando-se dos dados referentes ao RMN de ^{13}C (figura 51), observaram-se mais de 30 sinais de carbono evidenciando que PA1 trata-se de uma mistura. Os sinais ligados à dupla ligação estão presentes em δ 133,1; 123,6; 134,0; 145,67 e 118,19 ppm. Além disso, observou-se o sinal em δ 207,20 ppm referente a aldeído (CHO) (NIE *et al.*, 1989).

PA1
Núcleo: ^{13}C
Solvente: CDCl_3



PA1
Núcleo: ^{13}C
Solvente: CDCl_3

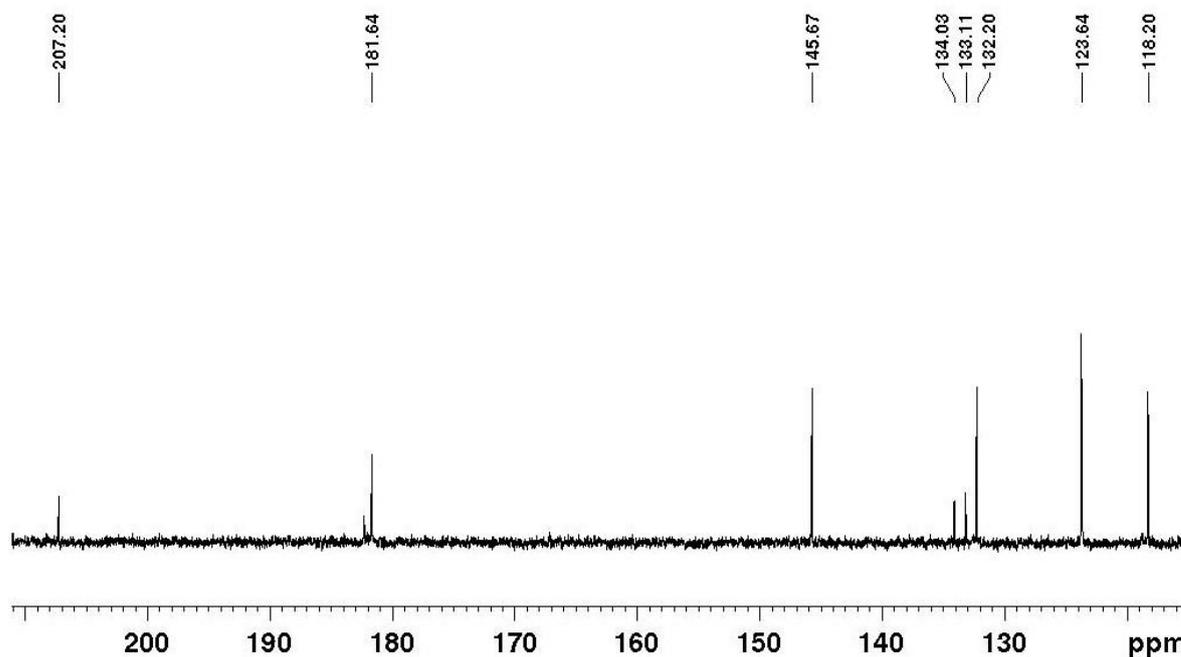


Figura 51. Espectro de RMN de ^{13}C de PA1 e expansão da região entre δ 207-118 ppm (300 MHz, solvente: CDCl_3).

Diante dos resultados expostos e em comparação dos dados de (MORA *et al.*, 2001; ROBLES *et al.*, 2005; MANGURO e WAGAI, 2016) sugere-se que a substância majoritária presente em PA1 trata-se do ácido 3 α -hidroxitirucala-7,24-dien-21-óico, isso porque o duplete em δ 5,25 ppm (H-7), além do tripleto em δ 5,09 ppm (H-24) e a presença dos sinais de ^{13}C em δ 118 e 145,67 ppm demonstram a posição da dupla

ligação presente em C-7 e C-8. A segunda substância sugerida, trata-se de isômero de posição, diferenciando-se apenas na posição da dupla ligação em C-8 (δ 134,03 ppm) e C-9 (δ 132,19 ppm) denominado de 3 α -hidroxitirucala-8,24-dien-21-oico (figura 52).

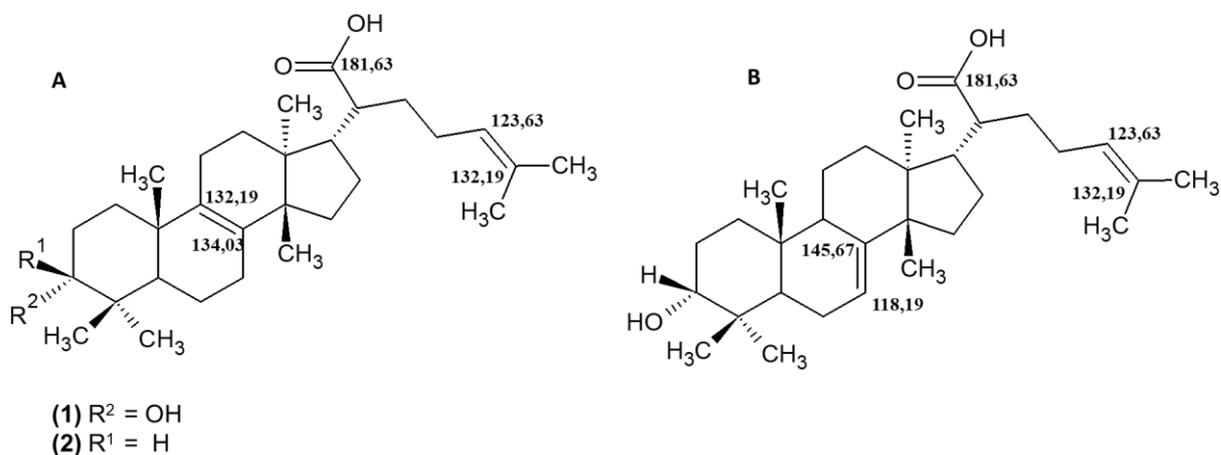


Figura 52. Sugestão de triterpenos ácidos encontrados em PA1. Legenda: em (A) ácido 3 α -hidroxitirucala-8,24-dien-21-oico e (B) 3 α -hidroxitirucala-7,24-dien-21-óico.

Além do discutido anteriormente, deve-se mencionar o sinal incomum do ¹³C observado no deslocamento em δ 207,2 ppm (figura 53).

PA1
Núcleo: ¹³C
Solvente: CDCl₃

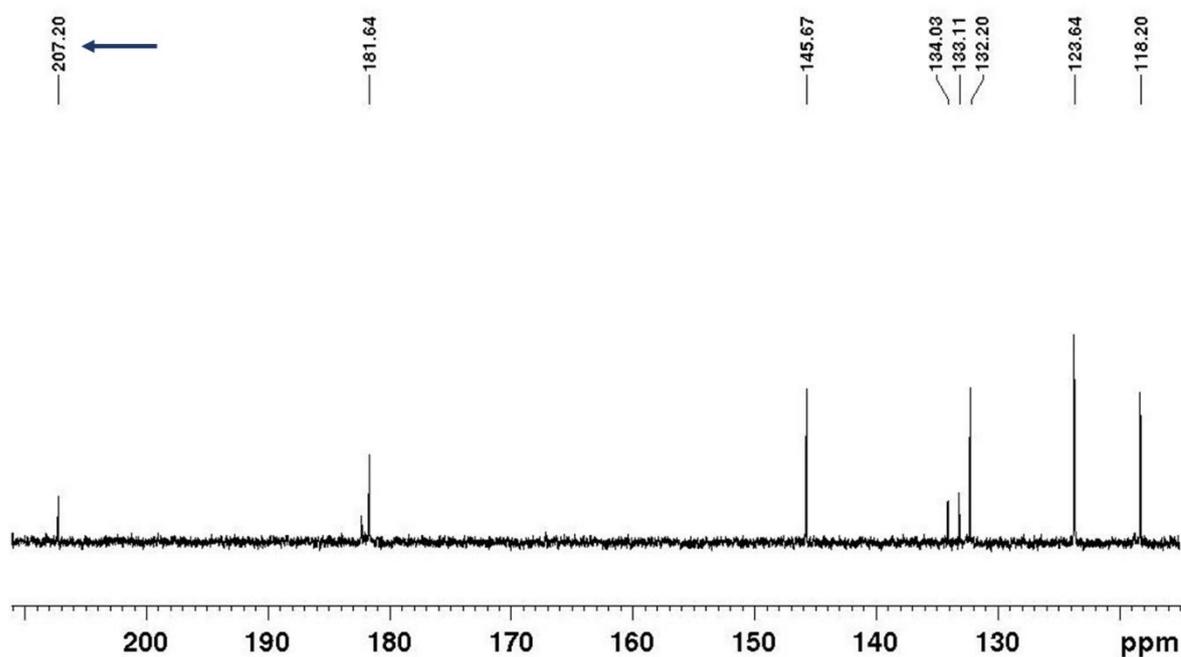


Figura 53. Espectro de RMN de ^{13}C de PA1 destacando na seta em azul o sinal em δ 207 ppm (300 MHz, solvente: CDCl_3).

Esses dados foram observados também no trabalho realizado por (NIE *et al.*, 1989; SOLIMAN *et al.*, 1999) onde a substância encontrada por ele denominava-se de ácido-3 α -hidroxioleanano-12-eno-23-oxo-28-óico (Gipsogenina) figura 54. Esse autor mencionou em seu artigo que os dados de RMN de ^1H apresentavam um singlete largo no deslocamento em δ 9,5 ppm, o qual estaria ligado diretamente ao aldeído no carbono em C-23 (δ 207 ppm). Outros sinais importantes mencionados por ele dizem respeito à dupla ligação em C-12 (δ 122,5 ppm) e C-13 (δ 144 ppm). Essa substância foi isolada da planta *Arenaria filicaulis*, e da *Thladiantha hookeri* Var. *pentadactyla* muito utilizada na medicina tradicional arábica que tem potencial antirreumática e laxativa (NIE *et al.*, 1989; SOLIMAN *et al.*, 1999).

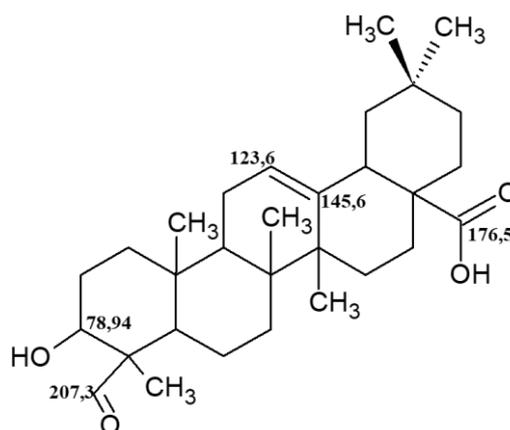


Figura 54. Gipsogenina (ácido 3 α -hidroxioleanano-12-eno-23-oxo-28-óico) isolada de *Arenaria filicaulis*.

Já em PA3, observou-se além da presença do íon 455,53 m/z o sinal em 471,51 m/z de fórmula $\text{C}_{30}\text{H}_{46}\text{O}_4$ segundo (NIE *et al.*, 1989) (figura 55).

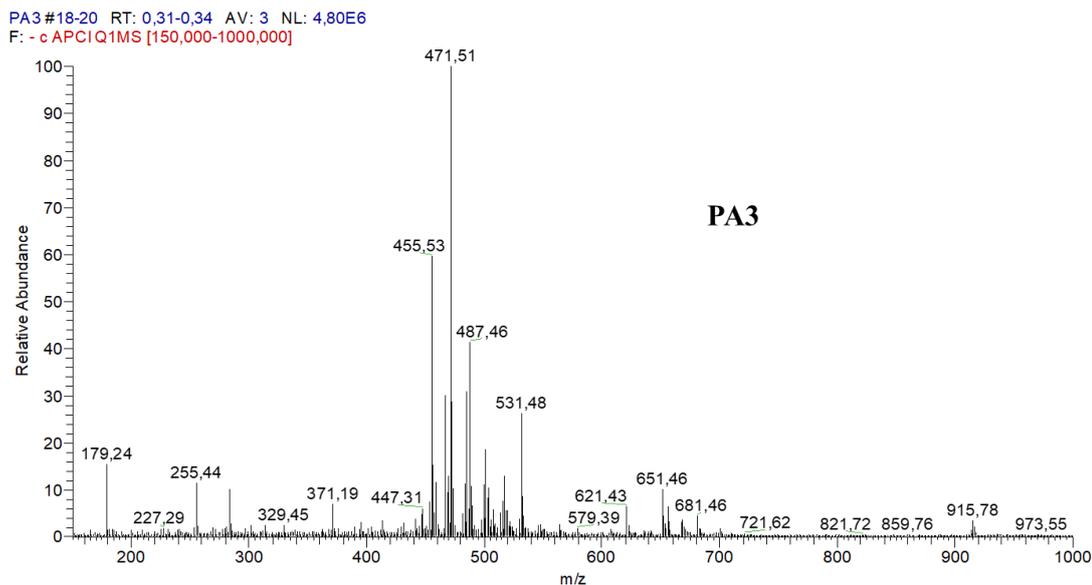


Figura 55. Escaneamento completo obtido por APCI no modo negativo $[M - H]^-$. Mostrando o pico de maior intensidade em 471,51m/z de PA3.

O espectro de massas da figura 55 permite visualizar a presença do sinal em m/z 455 que é referente aos ácidos do tipo eufol e tirucalol, já identificados como presentes nas resinas de *P. altsonii*. Outrora, observa-se o sinal em m/z 471,51 que segundo (SIANI *et al.*, 2012) descreve em seu artigo que a intensidade desse sinal se trata de um epímero do ácido α -elemólico. Esse autor identificou essa substância em espécies endêmicas da Amazônia. Experimentos adicionais não foram realizados para essa amostra devido ao grau de impureza quando observado a presença dos sinais em m/z 487; 531 e 651.

8.3.3 IDENTIFICAÇÃO E ELUCIDAÇÃO ESTRUTURAL DE PA2

A seguintes etapas serão dispostas para a elucidação das substâncias presentes em PA2: análise por espectrometria de massas, ao qual será atribuída a fórmula molecular e o índice de deficiência de hidrogênios que servirão como guia para a segunda etapa, que consistirá na elucidação estrutural por RMN de 1H , seguido de ^{13}C , DEPT 135°, COSY ($^1H - ^1H - ^3J$), HSQC ($^1H - ^{13}C - ^1J$) e, por último, HMBC ($^1H - ^{13}C - ^4J$).

O espectro de massas mostrado na figura 56, apresentou o íon molecular de maior intensidade em 453,65 m/z (modo negativo [M - H]⁻) que é referente a massa molecular 454 m/z, de fórmula C₃₀H₄₆O₃ e índice de deficiência de hidrogênio igual à oito. Essas informações dão suporte para predizer que se trata da classe dos triterpenos trioxigenados.

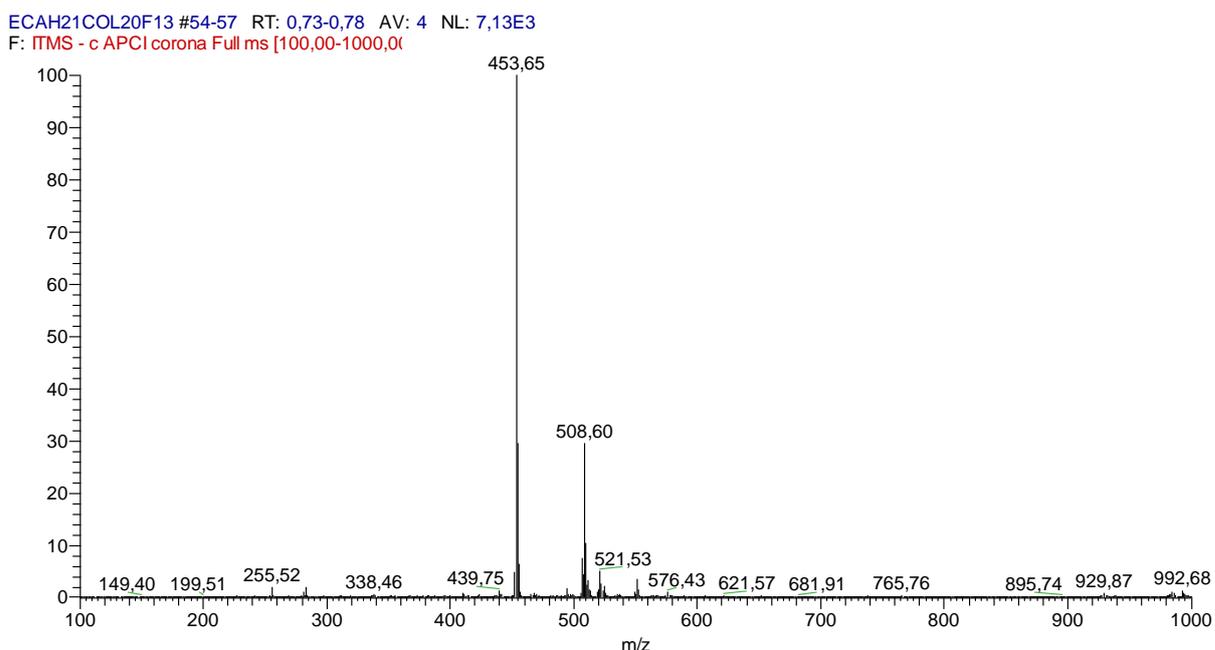


Figura 56. Escaneamento completo obtido por APCI, no modo negativo [M - H]⁻, de PA2 mostrando o pico de maior intensidade em 453,65 m/z.

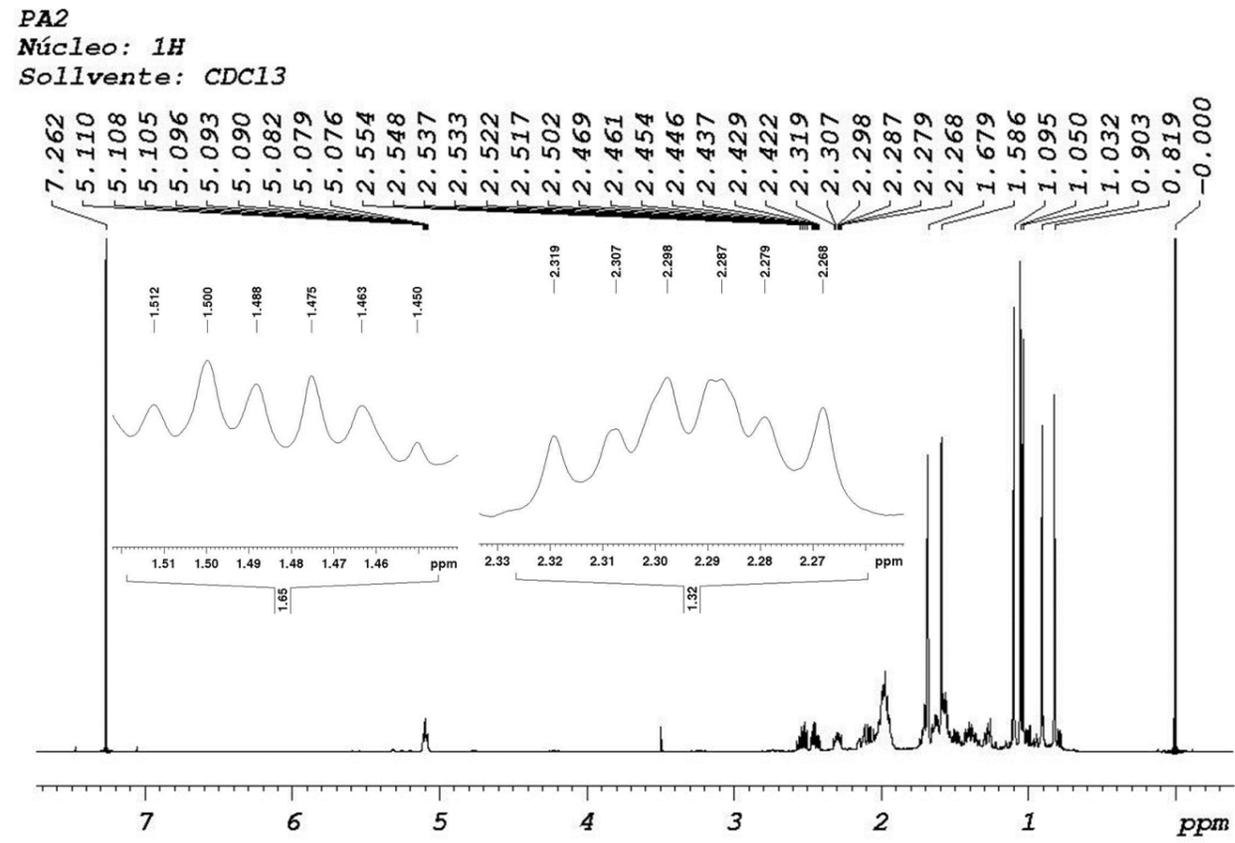
Os isômeros possíveis recorrentes presentes nas resinas de Burseraceae compreendem: o ácido ursólico (456 m/z), ácido oleanólico (456 m/z), ácido betulínico (456 m/z), eritrodiool (442 m/z) e uvaol (442 m/z). Por conta disso, esses isômeros apresentam a mesma massa molecular e, conseqüentemente, um único pico no espectro de massas (RHOURRI-FRIH *et al.*, 2009).

Nesse íterim, justifica-se a escolha da fonte de ionização, analisada em EM, para a determinação da massa molecular de PA2 e de outras amostras realizadas nesse trabalho. Autores como (SANCHEZ-GONZALEZ *et al.*, 2013) mostraram que

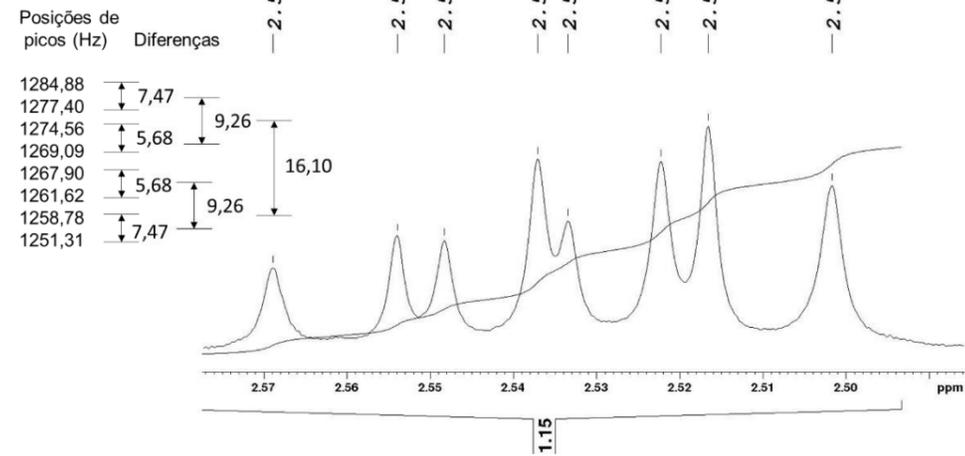
os experimentos realizadas em CL-EM, para a determinação do ácido manslínico no plasma, apresentaram como melhor resultado, a fonte de ionização química por pressão atmosférica em comparação com a eletronspray, isso porque esse método é eficiente para substâncias polares e iônicas e, àquela para substâncias apolares.

Pode-se também discutir, o modo negativo empregado na análise demonstrada na figura 56. No ano de 2008, Rhourri-Frihe e colaboradores afirmaram em seu artigo que, o modo negativo para a análise de triterpenos ácidos tem a vantagem de observar a molécula desprotonada (COO^-), e, no modo positivo, para que o íon molecular tenha um tempo de duração mais prolongado, seria necessário sucessivas colisões com solventes básicos (metanol), ou aditivos da fase móvel como ácidos ou tampões, que prontamente perderiam o próton e tornar-se-iam neutros.

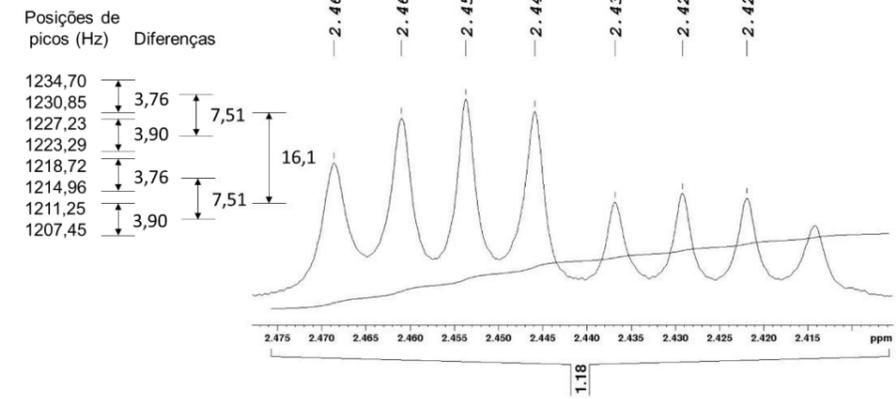
Para a elucidação estrutural foram obtidos dados de RMN 1-D/2-D. Com isso, o espectro de ^1H (figura 57), mostra os deslocamentos de grupos metílicos em δ 0,82 (3H); δ 0,90 (3H); δ 1,03 (3H); δ 1,05 (3H); δ 1,09 (3H); δ 1,59 (3H) e δ 1,68 (3H). Ainda assim, um sinal em δ 5,09 ppm (*dt*; $J = 8,60; 6,91; 1,68$ e $1,36$ Hz; 1H) tratando-se de hidrogênio olefínico. Em δ 2,53 ppm (*ddd*; $J = 16,1; 9,26; 7,47$ e $5,68$ Hz; 1H) acopla com o multipeto de primeira ordem em δ 2,44 ppm (*m*; $J = 16,1; 7,51; 3,90$ e $3,76$ Hz, 1H). Também foram observados os sinais em δ 1,48 (*ddd*; $J = 12,74; 6,31$ Hz, 2H) e δ 2,29 (*dt*; $J = 11,03; 10,36; 5,19$ e $5,37$ Hz, 1H). Em Novembro de 2004, Usubillaga publicou um artigo descrevendo as substâncias isoladas de *Protium crenatum* Sandwith e, dentre elas, mostrou os dados obtidos por RMN de ^1H (CDCl_3) que em δ 2,27 (*dt*; $J = 10; 4,1$; 1H) referia-se ao grupo metino em C-20 e, que também, os hidrogênios em δ 2,42 (H-1 α) e 2,45 (H-1 β) apresentaram-se como multipletos. Corroborando assim, com os dados citados anteriormente.



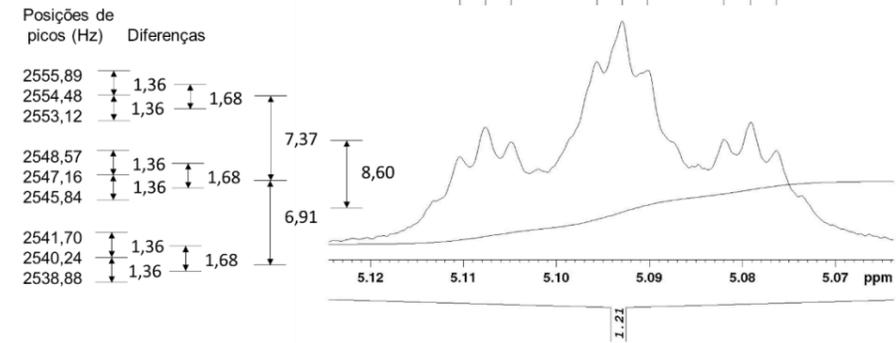
PA2
Núcleo: ^1H
Solvente: CDCl_3



PA2
Núcleo: ^1H
Solvente: CDCl_3



PA2
Núcleo: ^1H
Solvente: CDCl_3



PA2
Núcleo: ^1H
Solvente: CDCl_3

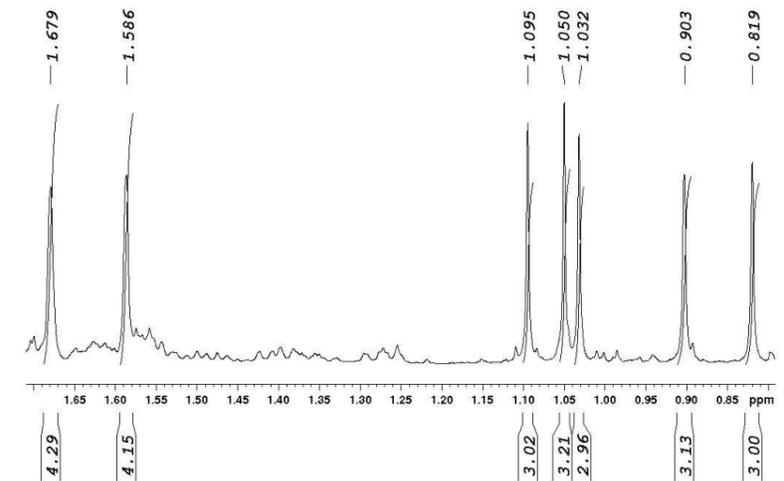


Figura 57. Espectro de RMN de ^1H de PA2 e suas expansões (500 MHz, solvente: CDCl_3).

A análise por ^{13}C e DEPT 135 (figura 58) mostram que os sinais observados apresentaram mais de 30 carbonos, indicando que PA2 trata-se de duas moléculas.

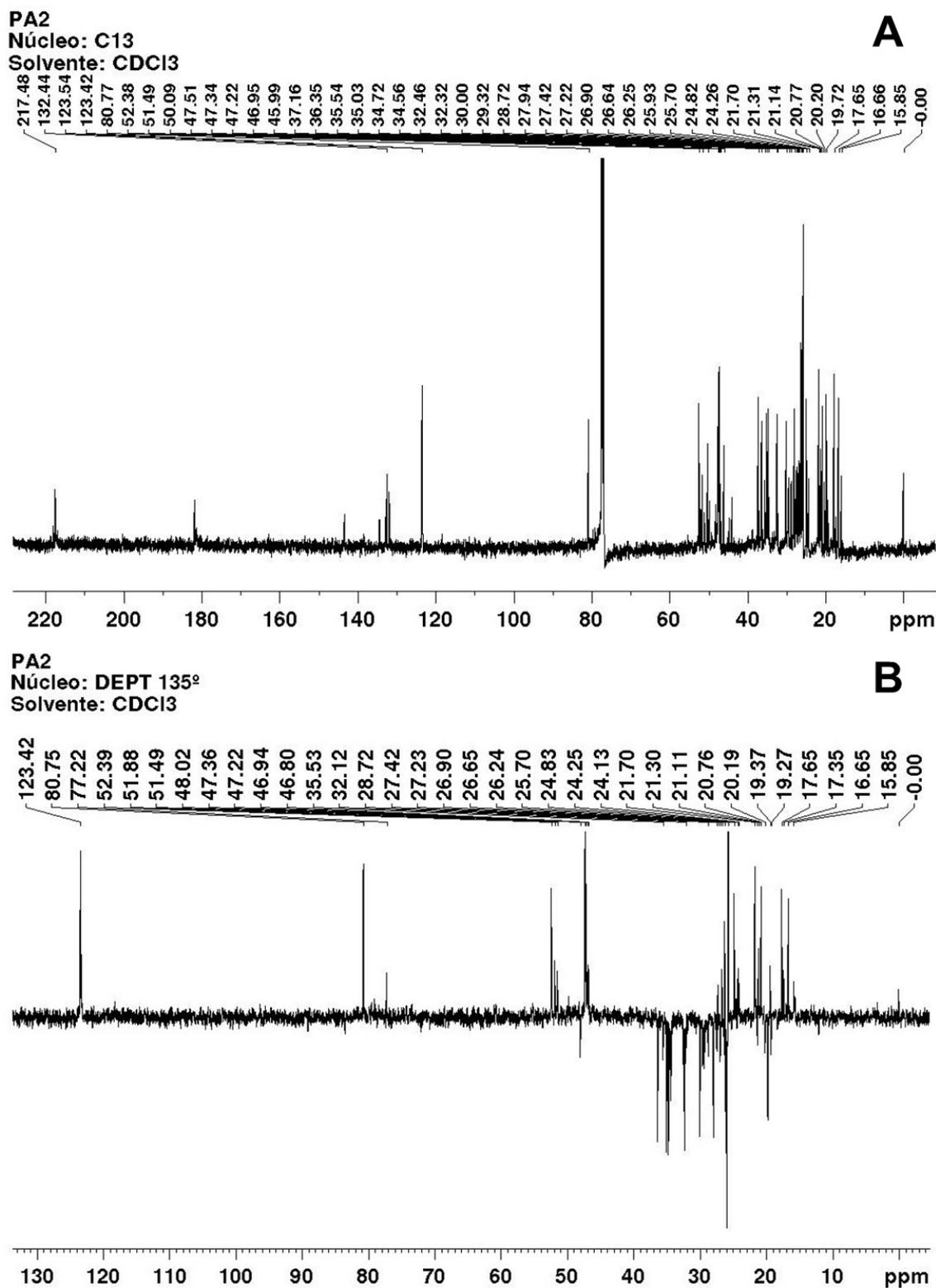


Figura 58. Espectro de RMN de ^{13}C em (A) e DEPT 135 em (B) de PA2 (500 MHz, solvente: CDCl_3).

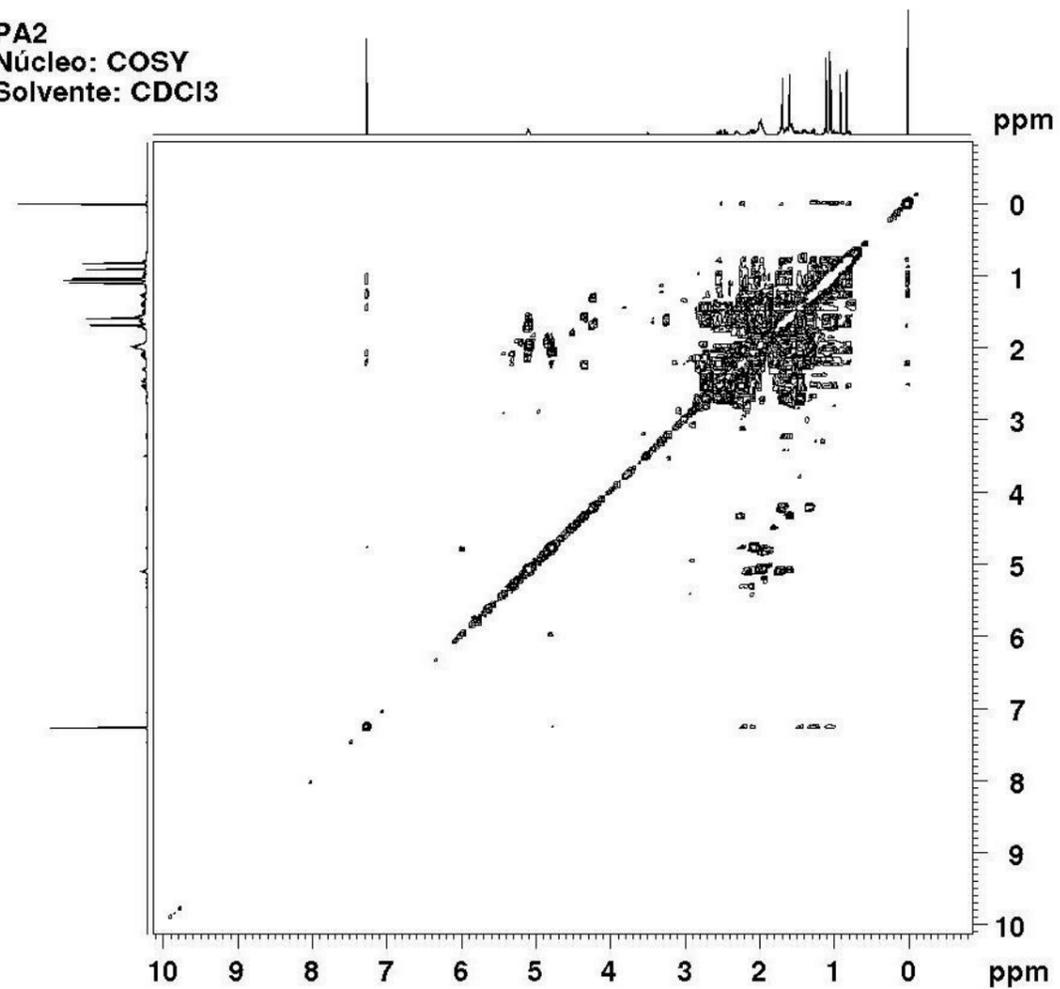
Mesmo em mistura, alguns deslocamentos químicos importantes devem ser mencionados, como por exemplo, em δ 217,48 (C-3) ppm é sugestivo para carbono carbonílico. O sinal em δ 181,75 (C-21) ppm é característico de ácido carboxílico. Já os carbonos ligados à dupla ligação possuem o sinal em δ 134,32 (C-8); 132,54 (C-9); 132,45 (C-25) e 123,42 (C-24) ppm. O experimento por DEPT 135° (figura 58 - B) confirma o carbono olefínico em δ 123,42 ppm e, os metínicos em δ 47,19 (C-20); 51,88 (C-17) e 52,40 (C-5).

Mas, para além dos valores de cada um, é recomendável mencionar os deslocamentos químicos dos carbonos quaternários observados em δ 47,34 (C-4); 36,87 (C-10); 48,86 (C-13) e 50,93 (C-14) ppm. Seguindo, o experimento por DEPT 135° não mostra apenas os carbonos hibridizados em sp^2 e sp , mas mostra também os metílicos (sp^3) que são facilmente identificáveis em δ 24,48 (C-28), 26,27 (C-29), 16,65 (C-19); 24,48 (C-30); 15,85 (C-18); 17,90 (C-27) e, por fim, 25,70 (C-26).

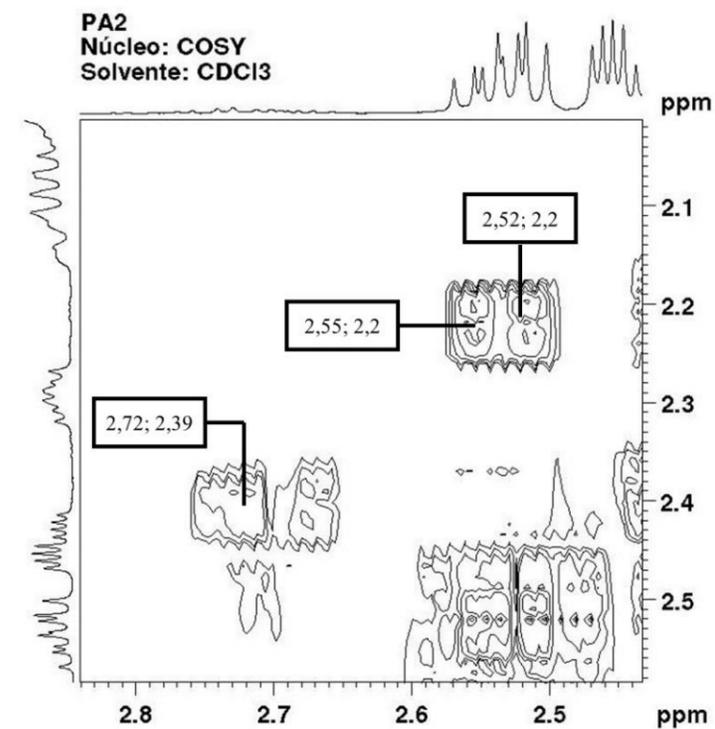
Em meio a essas descrições, acerca das análises de ^{13}C e de ^1H até aqui indicadas, pode-se inferir o seguinte: o triterpeno ácido é tetracíclico possuindo um anel de cinco membros. Além disso, é composto de uma cadeia lateral contendo o grupo carboxílico em C-21 e, uma insaturação em C-24. Por outro lado, a segunda insaturação encontra-se entre os carbonos C-8 e C-9 (anel B) e, por fim, a função 3-oxo localiza-se no anel A em C-3.

Uma vez descrito os experimentos unidimensionais, vale detalhar os pormenores sobre as análises bidimensionais. Partindo-se da correlação ($^1\text{H} - ^1\text{H} - ^3\text{J}$) COSY mostrada na figura 59, pode-se observar o acoplamento do hidrogênio em δ 5,09 ao δ 1,68 (H-26); 1,58 (H-27) e 1,98 (H-23) ppm. Seguindo, o ^1H em δ 2,52 (H-2) acopla com δ 2,21 (H-1) e vice-versa.

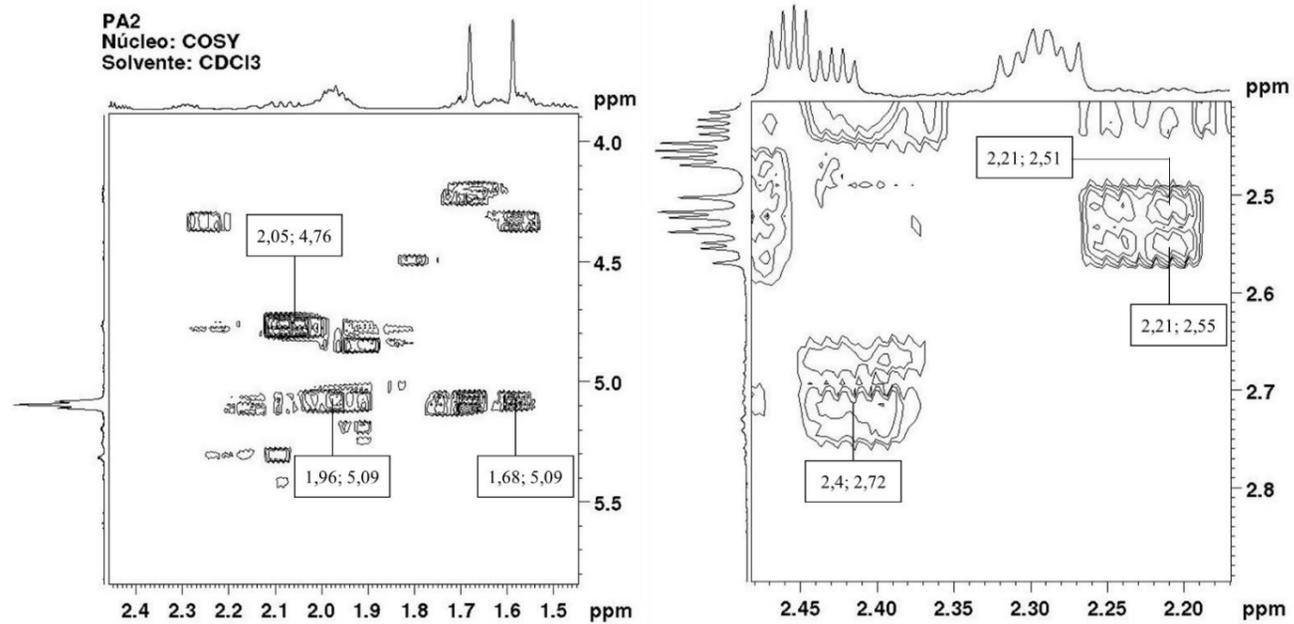
PA2
Núcleo: COSY
Solvente: CDCl₃



PA2
Núcleo: COSY
Solvente: CDCl₃



PA2
Núcleo: COSY
Solvente: CDCl₃



PA2
Núcleo: COSY
Solvente: CDCl₃

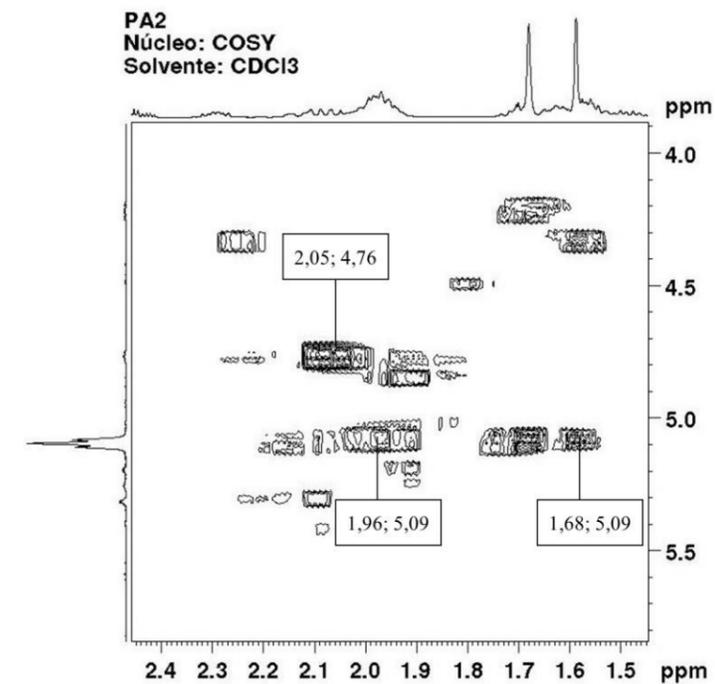
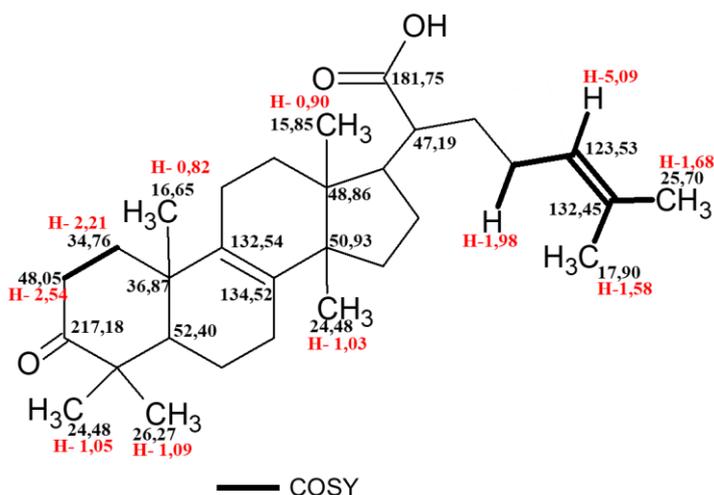


Figura 59. Espectro de correlação COSY e ampliações (500 MHz, solvente: CDCl₃).

O triterpeno identificado na amostra PA2 denomina-se de ácido 3-oxo-tirucala-8,24-dien-21-oico. Prosseguiu-se, desse modo, definindo as correlações e identificações estabelecidas até aqui. Isso para maior clareza e síntese dos dados mencionados ao longo do texto foi disposta a estrutura do ácido na figura 60, que representa os principais dados de ^1H , ^{13}C , DEPT 135 $^\circ$ e COSY já discutidos.



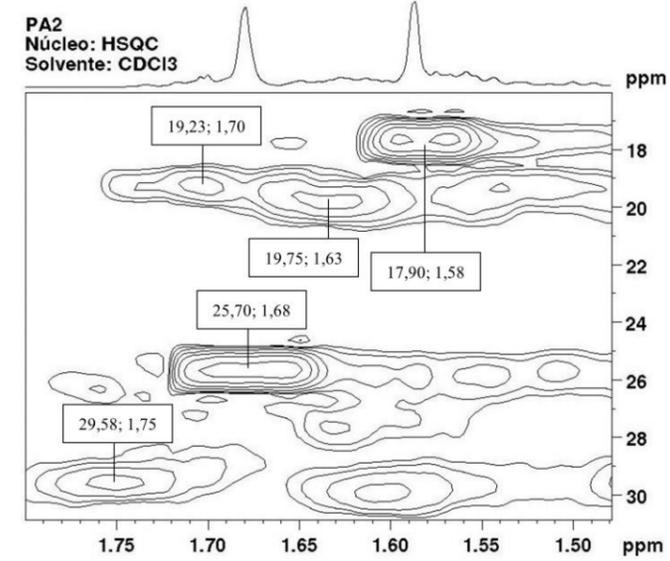
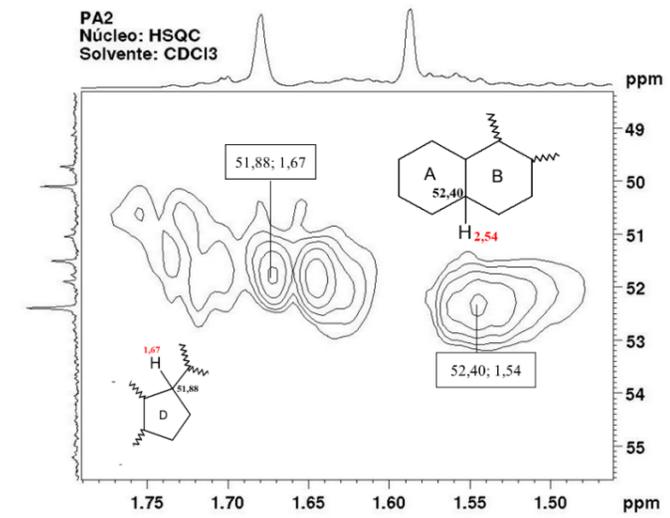
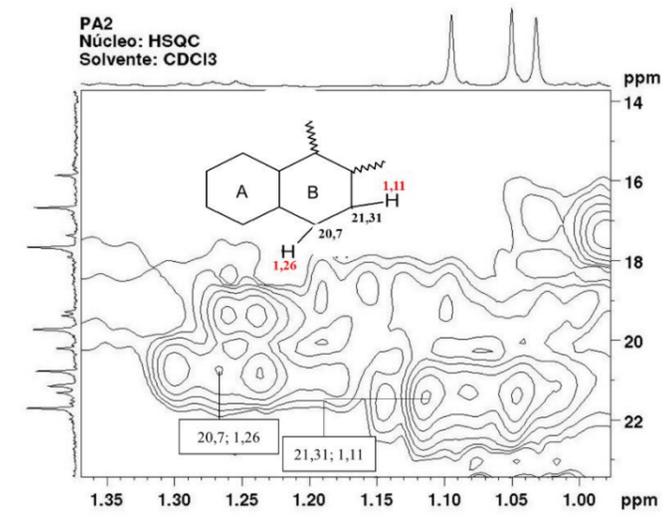
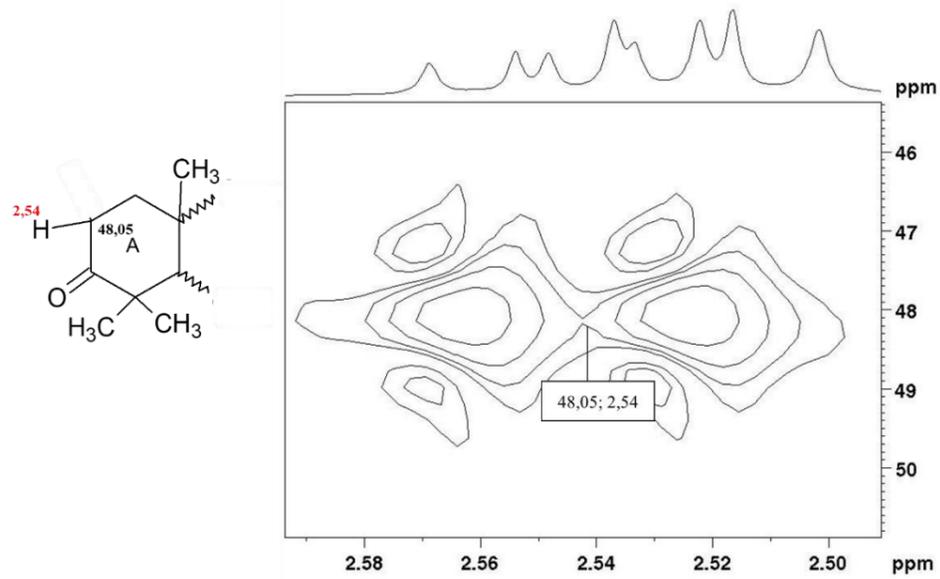
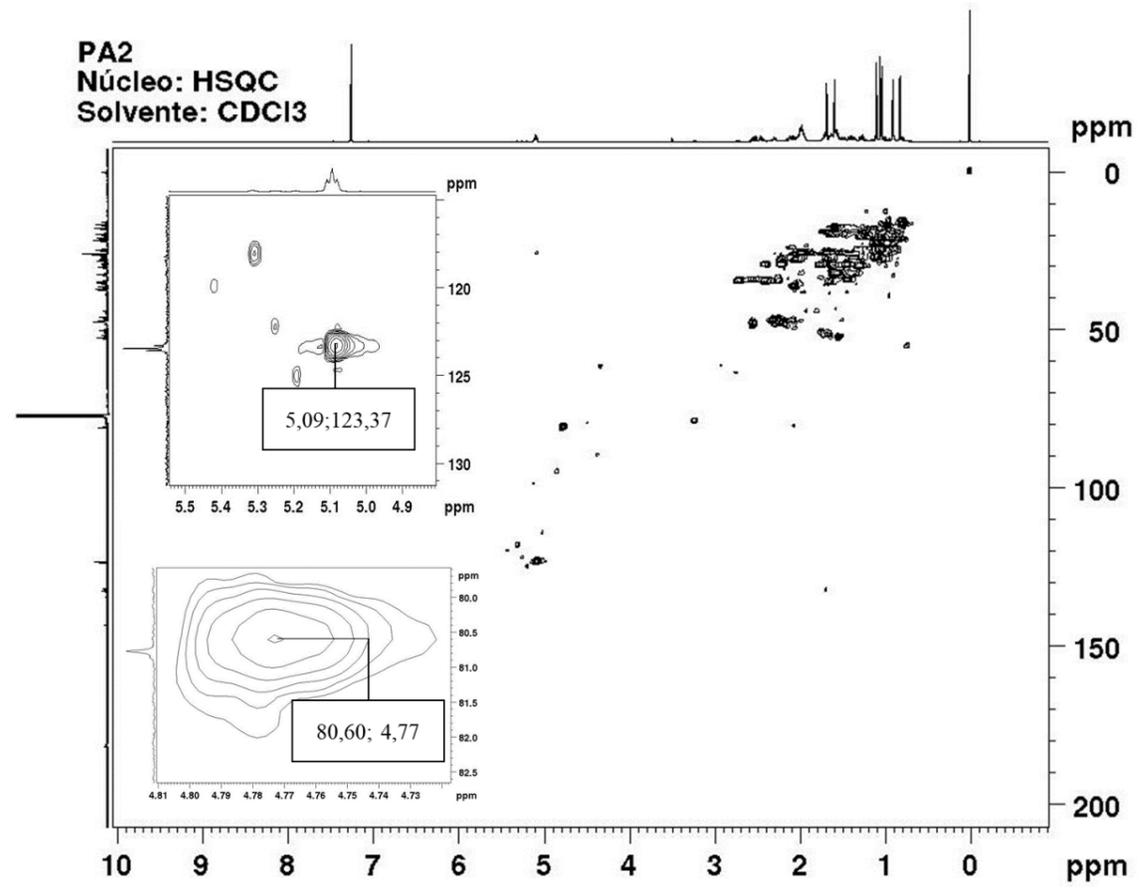


Figura 61. Espectro de HSQC de PA2 e ampliações (500 MHz, solvente: CDCl₃).

A estereoquímica da molécula não foi provada usando os experimentos descritos nesse trabalho, mas sim em comparação aos resultados de (USUBILLAGA *et al.*, 2004). No entanto, os dados de correlações à longa distância HMBC-2D mostra o carbono metilênico em δ 25,88 ($^{13}\text{C}/\text{DEPT}$) aparece como um duplete em $J=1,68$ Hz e, dessa maneira acopla com uma das menores constantes do hidrogênio metínico observado em δ 5,09 Hz ($J=1,68$ Hz). Isso é confirmado no acoplamento do H-23 ao carbono δ 123,37 e δ 32,24 ppm (C-22) por HMBC (figura 63). Outro carbono (sp^2) diz respeito ao sinal observado em δ 19,23 (C-15) que, ligado ao hidrogênio δ 1,70 ppm (HSCQ) acopla a longa distância com o δ 51,88 (C-17) e δ 48,86 (C-13). As demais correlações observadas estão representadas na figura 62.

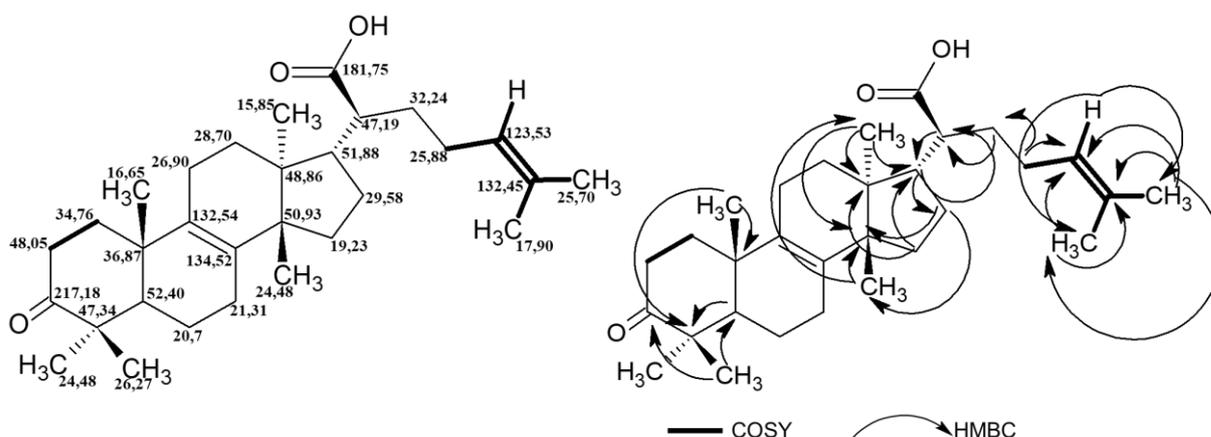


Figura 62. Estrutura do ácido 3-oxo-tirucala-8,24-dieno-21-oico identificado de *P. altsonii* (PA2), com sinais de correlação de RMN de ^{13}C , HMBC e COSY.

A tabela 3 reúne as informações a respeito da identificação da molécula em comparação com os dados obtidos por (USUBILLAGA *et al.*, 2004). A comparação dos resultados permitiu observar que C-2; C-15; C-16 e C-26 apresentaram deslocamentos distintos ao observado pela literatura. Isso pode ser explicado pela diferença de solvente deuterado utilizado nas análises espectroscópicas. Em solventes polares como o metanol, causam distorções no deslocamento devido a presença da hidroxila.

Tabela 3. Correlações por RMN (1-D e 2-D) de PA2.

	δ_c (ppm)	DEPT	HSQC δ_H [m, J Hz, \int]	COSY δ_H (ppm)	HMBC δ_c (ppm)	δ_c^a (ppm)
1	34,76	CH ₂	2,44 (<i>m</i> ; <i>J</i> = 16,1; 7,51; 3,9; 3,76;1H)	2,21	29,33; 51,18;134,32	35,5
2	48,05	CH ₂	2,54 (<i>ddd</i> ; <i>J</i> = 16,1; 9,26;7,47;5,68;1H)	2,52		34,5
3	217,18	C	-			218,1
4	47,34	CH	-			47,3
5	52,40	CH	1,54		19,89;21,28;47,47	51,40
6	20,70	CH ₂	1,26			20,7
7	21,31	CH ₂	1,11			21,4
8	134,32	C	-			134,4
9	132,54	C	-			132,6
10	36,87	C	-			37,1
11	26,9	CH ₂	-			26,8
12	28,7	CH ₂	-			28,6
13	48,86	C	-			43,9
14	50,93	C	-			49,6
15	19,23	CH ₂	1,70		51,88;48,86	29,2
16	29,58	CH ₂	1,75		50,93;24,48	17,4
17	51,88	CH	1,67		47,19;29,50;27,27	47,6
18	15,85	CH ₃	0,90		51,88; 30,04;48,26;50,93	15,8
19	16,65	CH ₃	0,82		16,65;47,34	19,6
20	47,19	CH	2,29 (<i>dt</i> ; <i>J</i> = 11,03; 10,36; 5,19; 5,37, 1H)		51,88	46,9
21	181,75	C	-			183,1
22	32,24	CH ₂	1,55		47,19	32,4
23	25,88	CH ₂	1,98 (<i>dd</i> ; <i>J</i> =1,68)		123,38;32,24	25,9
24	123,37	CH	5,09 (<i>dt</i> ; <i>J</i> = 8,60; 6,91; 1,68;1,36; 1H)	1,68;1,58;1,98	17,90;25,70	123,5

25	132,45	C	-		132,4
26	25,70	CH ₃	1,68		17,6
27	17,90	CH ₃	1,58	123,38;132,52	25,6
28	24,82	CH ₃	1,05	29,48;44,60	26,5
29	26,27	CH ₃	1,09	52,40;217,18;21,86; 47,58;26,27	21,1
30	24,48	CH ₃	1,03	15,57;50,93	24,30

^a – δ de RMN ¹³C obtido na literatura (Usubillaga *et al.*, 2004).

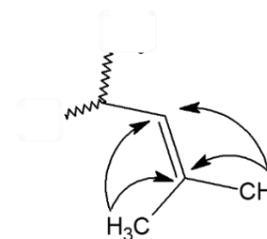
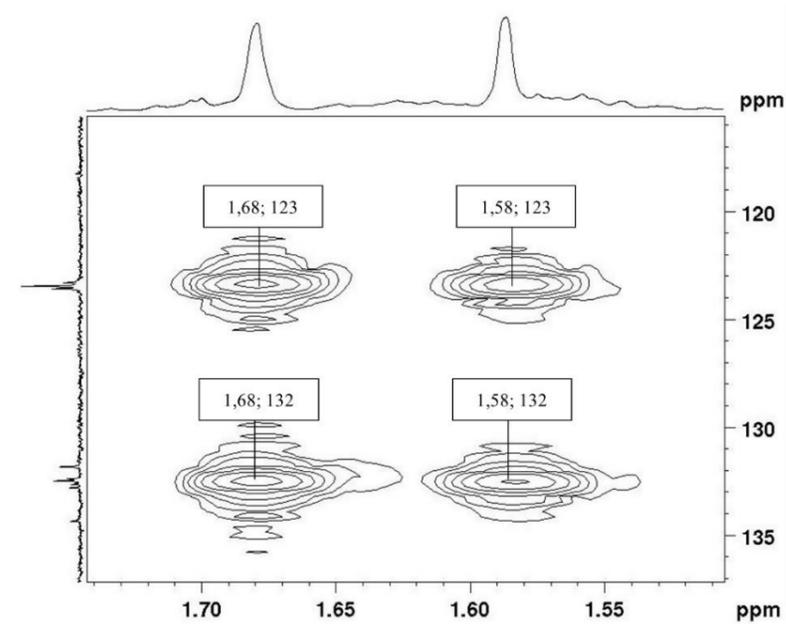
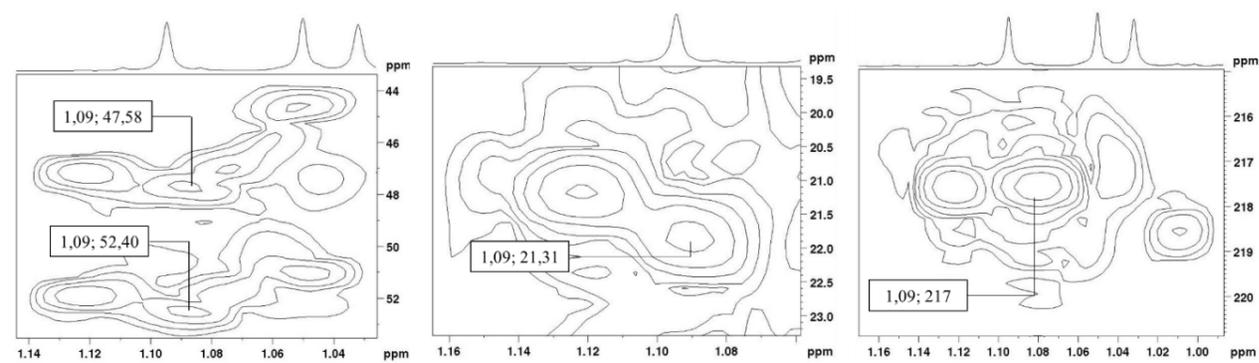
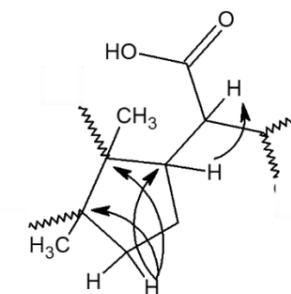
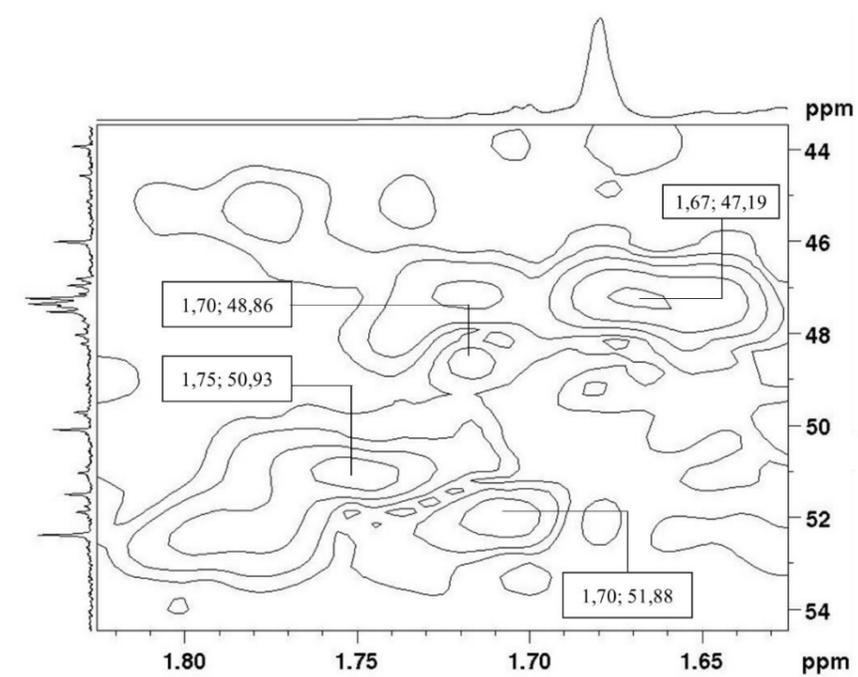
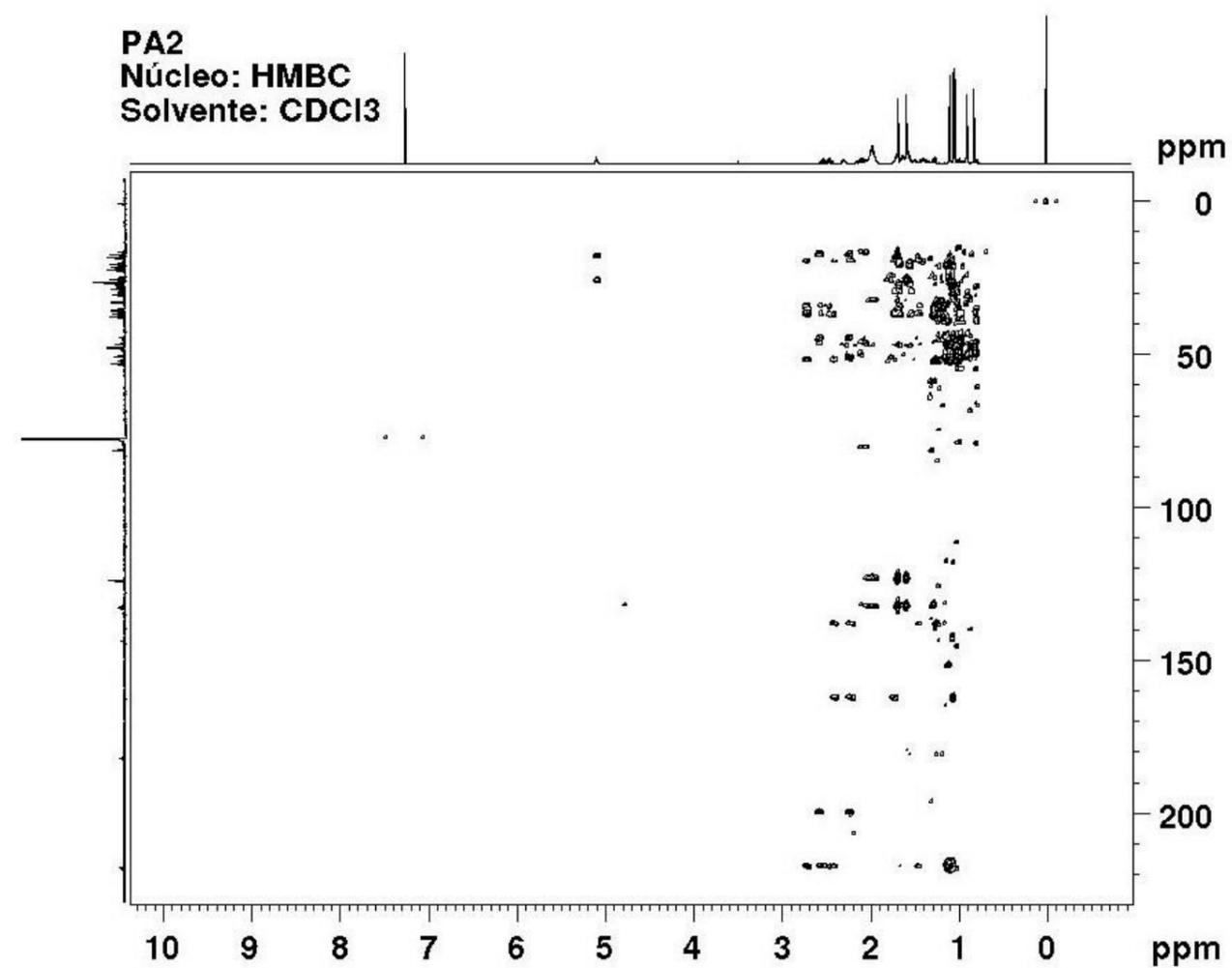


Figura 63. Espectro de HMBC de PA2 e ampliações (500 MHz, solvente: CDCl₃).

A tabela 4 compara dados de ^{13}C e DEPT obtidos para os ácidos 3-oxo-tirucala-8,24-dien-21-óico e o ácido 3 β -hidroxitirucala-8,24-dieno-21-óico. Ela permite observar os mesmos valores de deslocamento para todos os carbonos, exceto no carbono em C-3 da função hidroxila (δ 80 ppm), a qual possui menor deslocamento que a função 3-oxo (δ 217 ppm) devido a blindagem que o grupo hidroxila incide sobre os núcleos.

Tabela 4. Correlações por RMN DE ^{13}C e DEPT em comparação com dados de Usubillaga *et al.*, 2004.

3-oxo-tirucala-8,24 -dieno-21-óico				3 β -hidroxitirucala-8,24-dieno-21-óico		
No.	δ_c (ppm)	DEPT	Literatura ^a	δ_c (ppm)	DEPT	Literatura ^a
1	34,76	CH ₂	35,5	29,45	CH ₂	29,7
2	48,05	CH ₂	34,5	26,64	CH ₂	26,8
3	217,18	C	218,1	80,77	CH	76,1
4	47,34	CH	47,3	37,16	CH	37,2
5	52,40	CH	51,40	44,55	CH	44,5
6	20,70	CH ₂	20,7	20,20	CH ₂	20,4
7	21,31	CH ₂	21,4	21,14	CH ₂	21,3
8	134,32	C	134,4	134,32	C	134,4
9	132,54	C	132,6	132,77	C	132,9
10	36,87	C	37,1	37,16	C	37,7
11	26,9	CH ₂	26,8	26,0	CH ₂	26,0
12	28,7	CH ₂	28,6	27,42	CH ₂	28,7
13	48,86	C	43,9	43,91	C	43,8
14	50,93	C	49,6	49,71	C	49,6
15	19,23	CH ₂	29,2	29,32	CH ₂	29,4
16	29,58	CH ₂	17,4	17,65	CH ₂	17,7
17	51,88	CH	47,6	47,51	CH	47,7
18	15,85	CH ₃	15,8	15,85	CH ₃	15,8
19	16,65	CH ₃	19,6	19,72	CH ₃	19,6
20	47,19	CH	46,9	46,9	CH	46,9
21	181,75	C	183,1	181,75	C	182,4

22	32,24	CH ₂	32,4	35,54	CH ₂	35,7
23	25,88	CH ₂	25,9	25,93	CH ₂	25,8
24	123,37	CH	123,5	123,26	CH	123,7
25	132,45	C	132,4	132,61	C	132,2
26	25,70	CH ₃	17,6	17,6	CH ₃	17,6
27	17,90	CH ₃	25,6	25,7	CH ₃	25,6
28	24,82	CH ₃	26,5	26,25	CH ₃	26,5
29	26,27	CH ₃	21,1	21,1	CH ₃	21,1
30	24,48	CH ₃	24,30	24,26	CH ₃	24,3

^a – δ de RMN ¹³C obtido na literatura (USUBILLAGA *et al.*, 2004).

As estruturas da mistura de substâncias identificadas em *Protium altsonii* (PA2) estão representadas na figura 64. Além da similaridade dos deslocamentos numéricos da cadeia lateral, não se atribuiu todos os sinais observáveis à substância que possui a hidroxila na posição 3, porque o sinal em δ 3,49 ppm – relativo à hidroxila – não apresentou intensidade suficiente no espectro de hidrogênio ($J=0$). Portanto, os dois triterpenos, representados foram sugeridos como as substâncias presentes nos cristais de PA2.

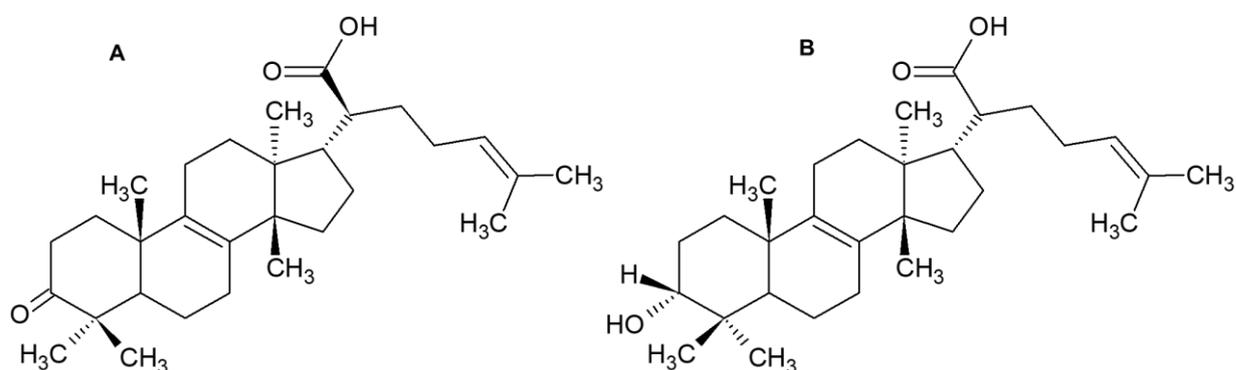


Figura 64. Substâncias presentes nos cristais obtidos de *Protium altsonii* (PA2). Ácido 3-oxo-tirucala-8,24-dien-21-oico em (A) e ácido 3 β -hidroxitirucala-8,24-dieno-21-oico em (B).

8.3.4 IDENTIFICAÇÃO E ELUCIDAÇÃO ESTRUTURAL DE PA4

A identificação de PA4 tem seu ponto de partida na observação do íon molecular 455,53 m/z (figura 65), que é referente ao íon 456 m/z (no modo negativo). De fórmula molecular igual a $C_{30}H_{48}O_3$ é sugestivo para a classe dos triterpenos ácidos.

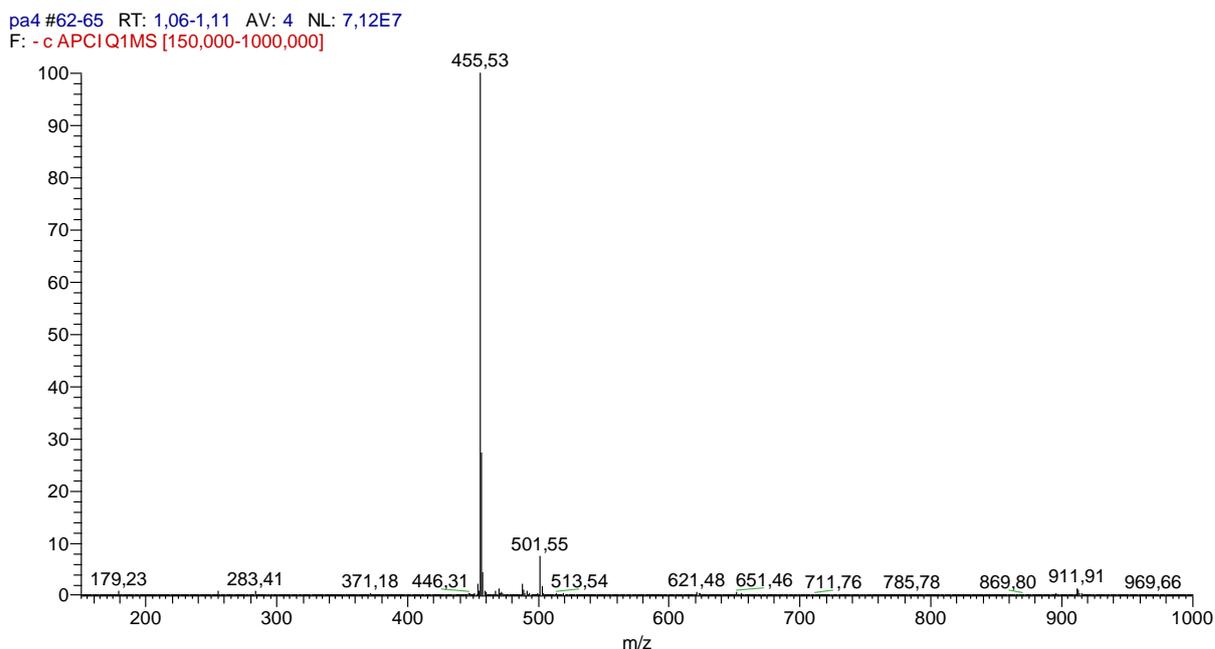
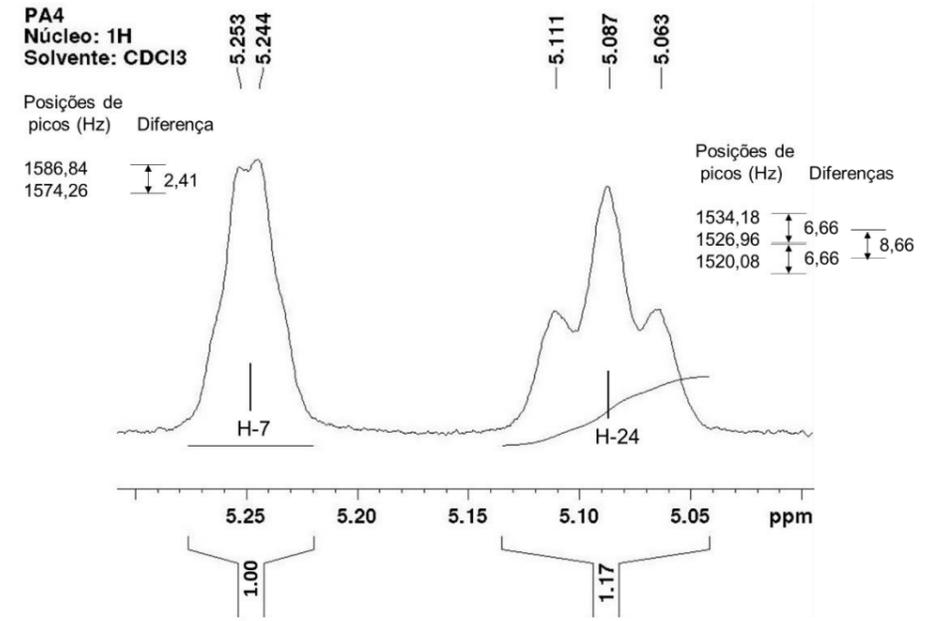
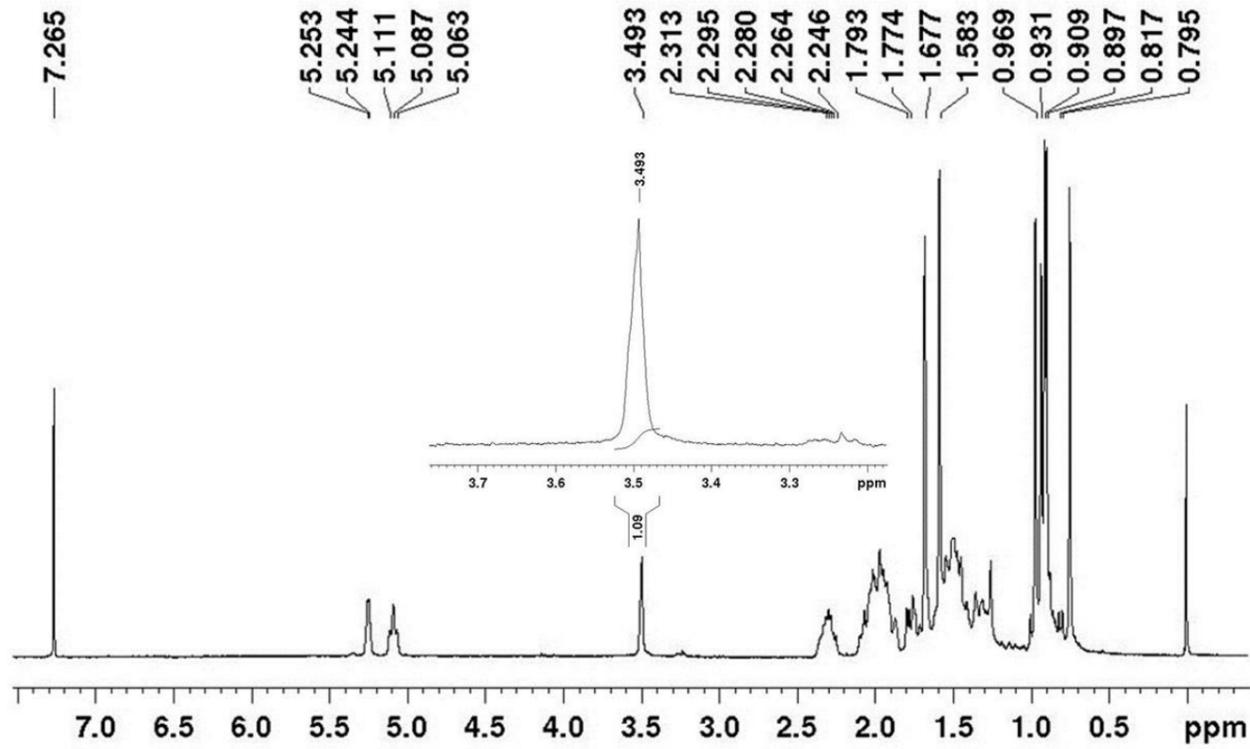


Figura 65. Escaneamento completo obtido por APCI, no modo negativo $[M - H]^-$, de PA4 mostrando o pico de maior intensidade em 455,53 m/z.

Por conseguinte, a elucidação estrutural terá como início o espectro de 1H (figura 66) que, apresentou os sinais metílicos em δ 0,75 (3H); 0,90 (3-H); 0,91 (3-H); 0,93 (3-H); 0,97 (3-H) ppm. Ainda assim, os deslocamentos em δ 1,58 (3-H) ppm e δ 1,68 (3-H) ppm sugerem metilas ligadas à carbonos olefínicos. Alguns deslocamentos químicos são observáveis no campo baixo do espectro (maior frequência), isso porque estão mais desprotegidos como em δ 5,09 (*t*, $J = 8,66$; 6,66 Hz; 1H) e δ 5,24 (*o*, 2,41 Hz; 1H) ppm que representam os hidrogênios olefínicos presentes na molécula. Destaca-se, também, o hidrogênio carbinólico em δ 3,49 ppm.

PA4
 Núcleo: 1H
 Solvente: CDCl3



PA4
 Núcleo: 1H
 Solvente: CDCl3

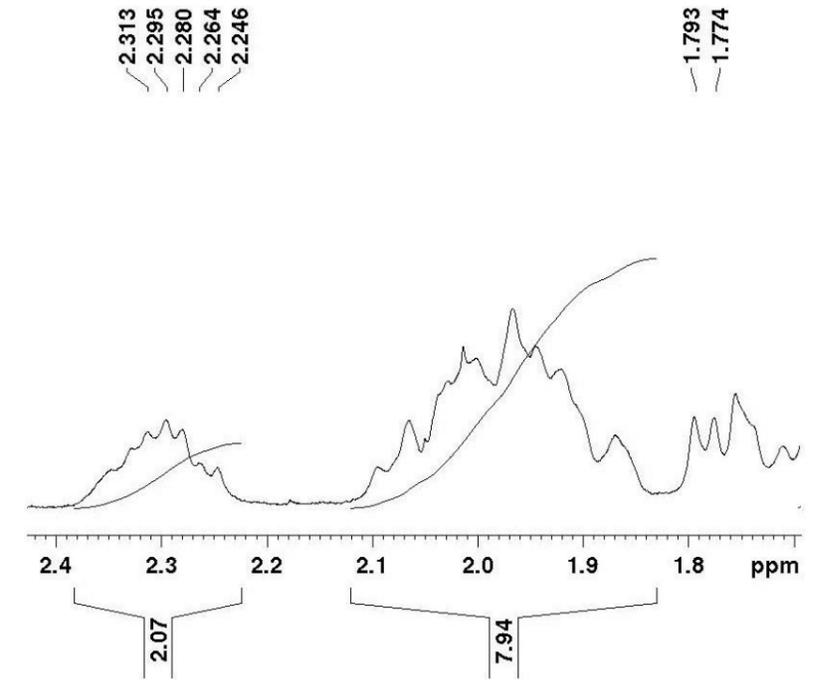
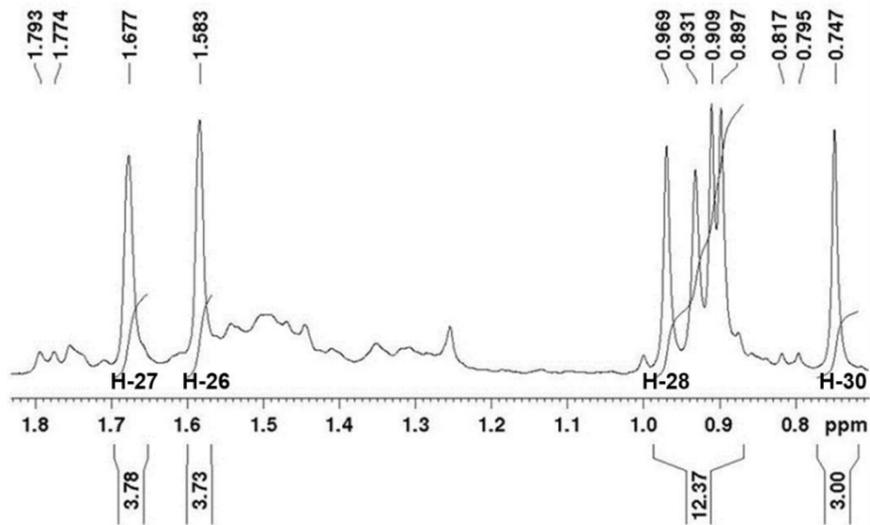


Figura 66. Espectro de RMN de 1H de PA4 e ampliações (300 MHz, solvente: CDCl3).

O segundo núcleo, ilustrado na figura 67, mostra 29 deslocamentos químicos de ^{13}C sugerindo uma única substância presente na amostra PA4. Com isso, é possível descrever, além do carbono quaternário em δ 145,88 (C-8) e metínicos em 132,39 (C-25); 123,85 (C-24) e 118,39 (C-7) ppm, o sinal referente a ácido carboxílico encontra-se em δ 181,99 (C-21) ppm.

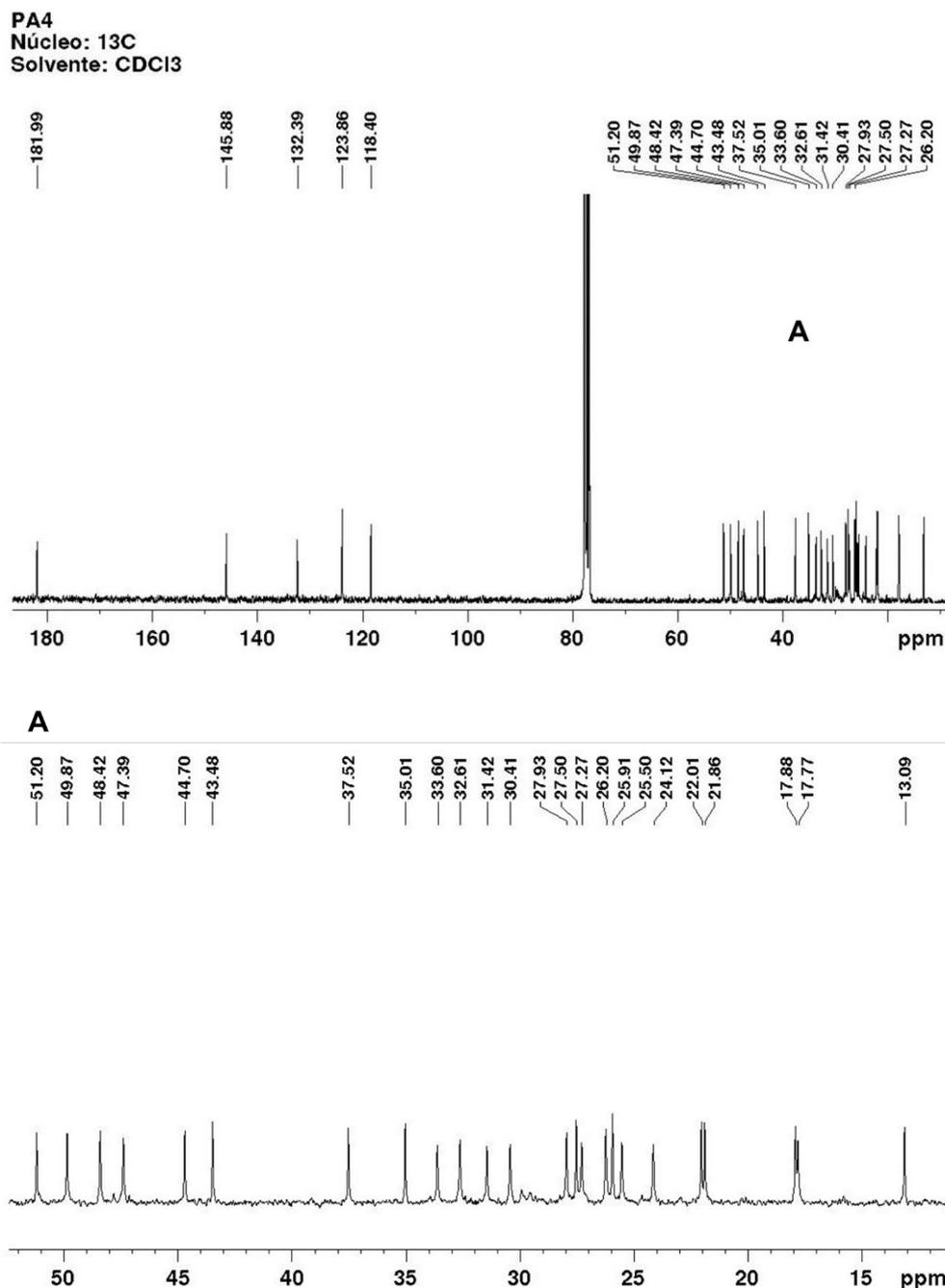


Figura 67. Espectro de RMN de ^{13}C de PA4 e ampliação da região em (A) (300 MHz, solvente: CDCl_3).

As correlações dos espectros bidimensionais serão descritas adiante, iniciando-se pelo acoplamento (^1H - ^1H -COSY) (figura 68). Para tanto, o hidrogênio metínico δ 5,24 (H-7) acopla aos ^1H em δ 2,01 (H-6) e δ 2,31 (H-9). Ainda assim, o ^1H em δ 5,09 (H-24) acopla aos hidrogênios em δ 1,96 (H-23) e 1,65 (H-23) ppm. Como trata-se de acoplamento 3J , as mesmas correlações foram observadas em ambos os lados da diagonal.

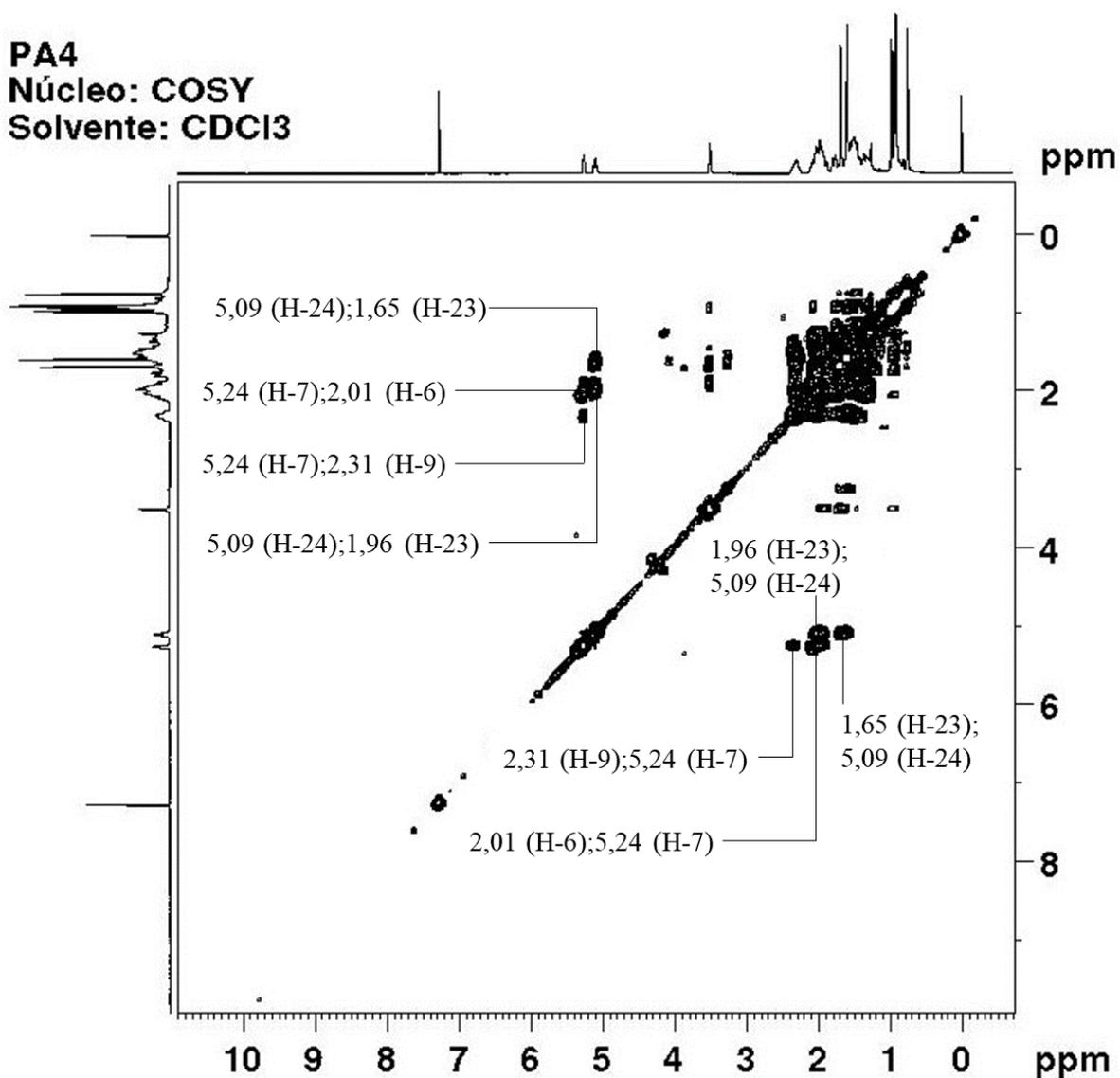


Figura 68. Espectro de correlação homonuclear (^1H - ^1H) COSY de PA4 (300 MHz, solvente: CDCl₃).

Seguindo, apenas, com as principais correlações para a elucidação estrutural do triterpeno ácido. O experimento de RMN por HSQC (^1H - ^{13}C - ^1J), ilustrado na figura-69, indica o acoplamento do carbono sp^2 em δ 118,39 (C-7) ppm ao hidrogênio em δ 5,24 ppm. Ao passo que, o carbono metínico em δ 49,87 (C-17), que faz parte da ligação entre a cadeia lateral e o anel D, acopla ao ^1H em δ 2,04 ppm. Não obstante, deve-se deixar claro o carbono vizinho ao grupo carboxila que, consiste do deslocamento em δ 47,39 (C-20) acoplado ao ^1H em δ 2,28 ppm.

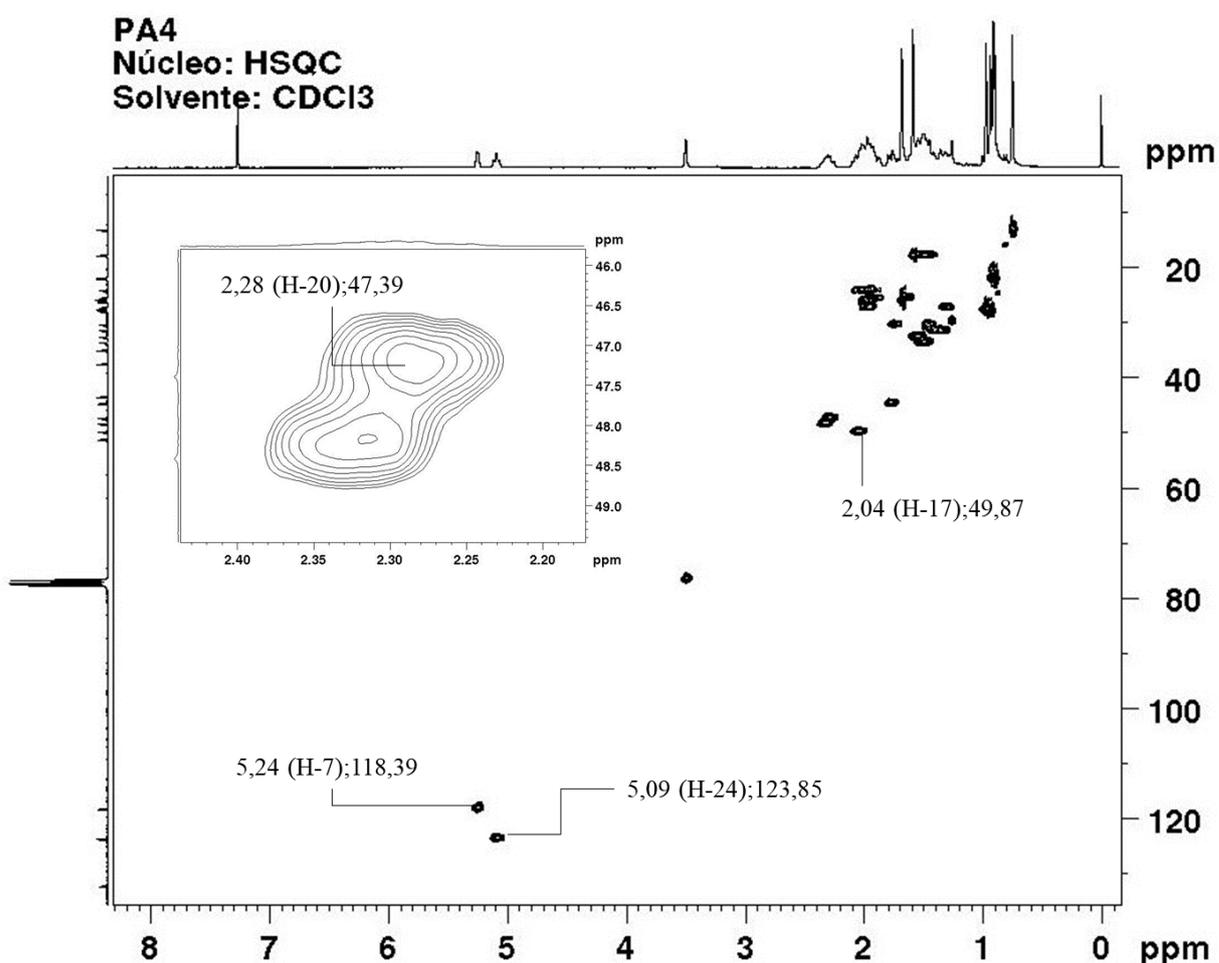


Figura 69. Espectro de correlação heteronuclear (^1H - ^{13}C -HSQC) da amostra PA4 e ampliação em C-20 (300 MHz, solvente: CDCl_3).

O descrito até agora, ilustra os dois carbonos de dupla ligação, além daqueles vizinhos à função carboxila. Contudo, os sinais observados do acoplamento à longa distância são essenciais para elucidar o anel de cinco membros do terpeno.

Tendo-se como ponto de partida o espectro de RMN por HMBC (^1H - ^{13}C - ^4J), ilustrado na figura 70, o hidrogênio em δ 0,97 (H-19) ppm acopla aos carbonos em δ 51,20 (C-14); 43,47 (C-13) e 145,88 (C-8). Do mesmo modo, o ^1H metílico em δ 0,90 (H-18) acopla aos carbonos δ 43,47 (C-13); δ 51,20 (C-14) e δ 49,87 (C-17). Isso dá suporte para afirmar que esses sinais estão relacionados ao anel D (cinco membros) do esqueleto tirucalano.

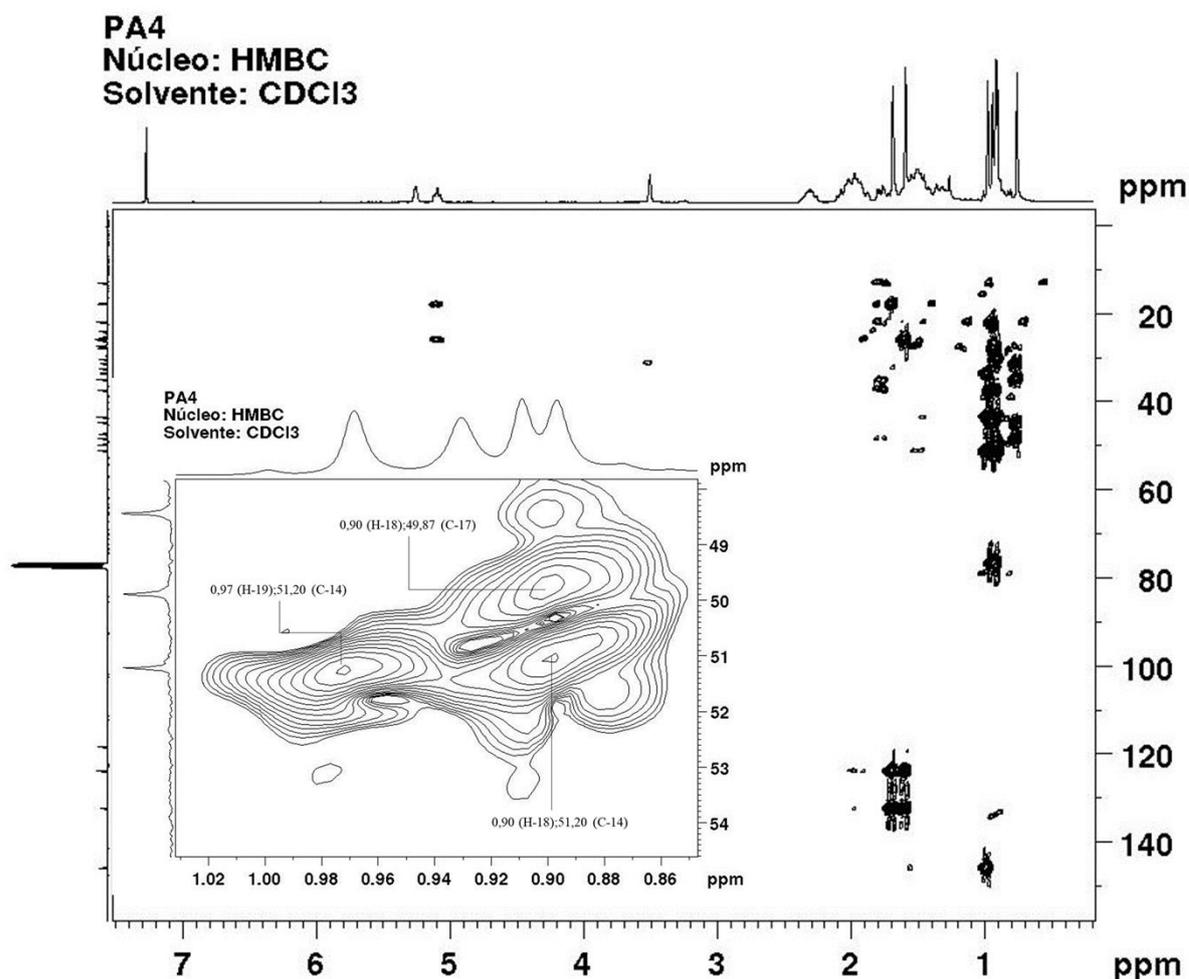


Figura 70. Espectro bidimensional (^1H - ^{13}C -HMBC) da amostra PA4 e ampliação (300 MHz, solvente: CDCl₃).

Por outro lado, a metila observada em δ 13,08 (H-19; δ 0,75 ppm) acopla à longa distância com os carbonos em δ 31,42 (C-1); 35,9 (C-10); 44,70 (C-5) e 48,41 (C-9) ppm (figura 71). A descrição desses sinais, leva à sugestão de parte da composição do anel A e B do ácido triterpênico.

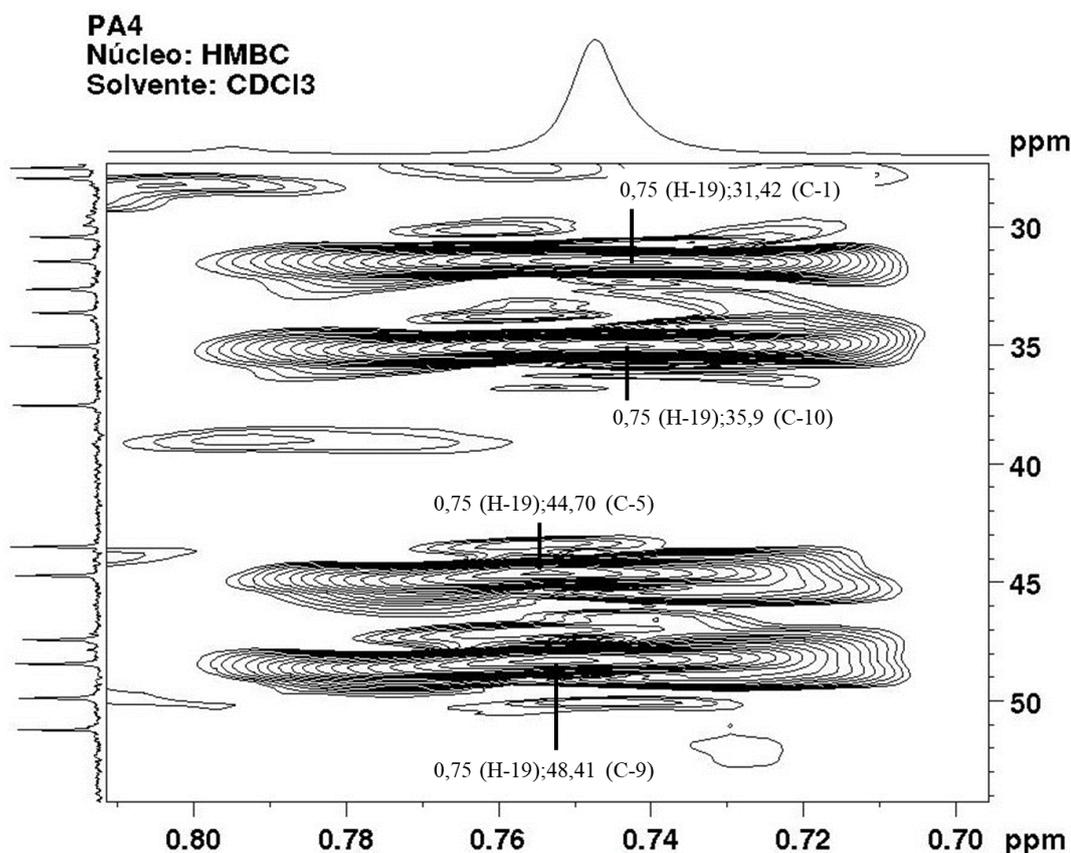


Figura 71. Ampliação do espectro bidimensional (^1H - ^{13}C -HMBC), da amostra PA4, mostrando a correção de δ 13,08 ao anel A e B do triterpeno (300 MHz, solvente: CDCl_3).

Todas as correlações descritas anteriormente foram essenciais para a elucidação do esqueleto do tipo tirucalano, mas algumas se revestem de maior importância. Diante disso, a parte mais rígida do anel possui o sinal em δ 5,24 (d ; 2,41 Hz; 1H), apresenta-se como um duplete. Logo, deve permanecer em um mesmo ambiente químico. Isso é confirmado pelo deslocamento dos hidrogênios metilênicos em H-6 (δ 2,01 ppm) que, possuem o mesmo sinal. Além disso, os hidrogênios H-23 despertam uma informação importante quanto à estereoquímica da molécula: hidrogênios ligados ao mesmo carbono, que possuem deslocamentos químicos

diferentes, sugerem carbonos pró-quirais. Mudando-se apenas um hidrogênio por outro substituinte, tem-se um centro estereogênico, e isso foi observado no experimento COSY (RMN 2-D). Não obstante, a presença da dupla ligação em (C-24) desprotege esses hidrogênios fazendo com que entre em ressonância em uma maior frequência, esse comportamento é chamado, pelos químicos orgânicos, de anisotropia diamagnética.

À luz dos dados obtidos por RMN (1D-2D), tal como a observação do íon 456 m/z por Espectrometria de Massas, leva à sugestão do ácido 3 α -hidroxitirucala-7,24-dieno-21-oico (figura 72), presente na amostra PA4.

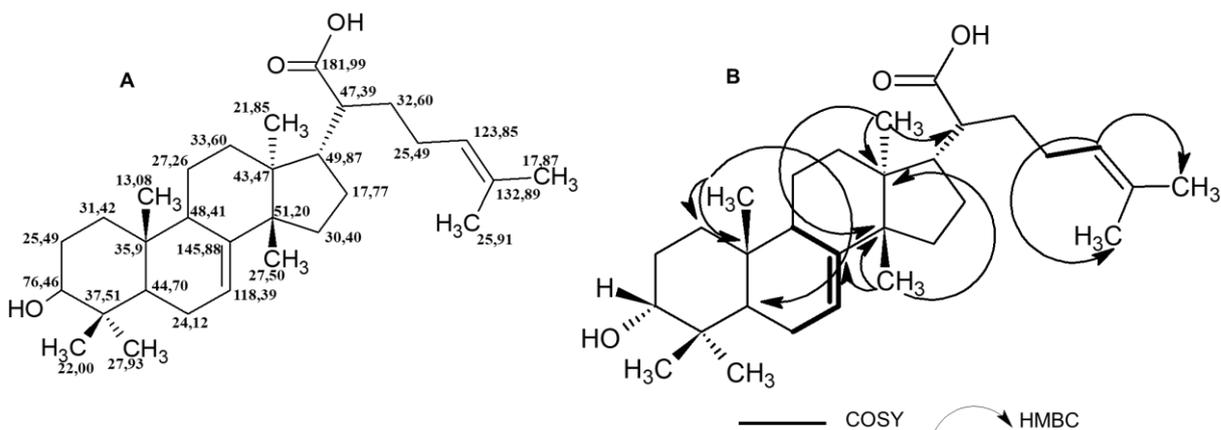


Figura 72. Estrutura do ácido 3 α -hidroxitirucala-7,24-dieno-21-oico isolado de *Protium altsonii* (PA4). Em (A) correlações de ^{13}C e em (B) correlações de COSY e HMBC.

A tabela 5 reúne os dados de RMN 1-D/2-D do triterpeno ácido identificado. Os deslocamentos de ^{13}C foram dispostos em ordem crescente e comparados com os dados de (MORA *et al.*, 2001). Todos os deslocamentos de ^{13}C apresentaram o mesmo valor quando comparados com a literatura, exceto nos carbonos C-28 e C-29.

Tabela 5. Correlações dos deslocamentos por RMN de 3 α -hidroxi-tirucala-7,24-dieno-21-oico obtido de *P. altsonii*. Dados comparativo de acordo com (MORA *et al.*, 2001).

C n°	δ_C (ppm)	^{13}C	HSQC δ_H [m, J]	HMBC δ_C (ppm)	δ_C^* (ppm)
1	31,42	CH ₂	1,35 [m]	-	31,2
2	25,49	CH ₂	1,89 [m] 1,96 [m]	-	25,3
3	76,46	-	3.49	C5;C1	76,5
4	37,51	C	-	-	37,3
5	44,70	CH	1,77 [m]	C30	44,5
6	24,12	CH ₂	2,01 [m]	-	23,9
7	118,39	CH	5,24 [d, $J= 2,41$ Hz, 1H]	-	118,2
8	145,88	C	-	-	145,3
9	48,41	CH	2,31 [m]	-	48,2
10	35,9	C	-	-	34,8
11	27,26	CH ₂	1,31 [m]	-	27,0
12	33,60	CH ₂	1,49 [m]	-	33,4
13	43,47	C	-	-	43,3
14	51,20	C	-	-	51,0
15	30,40	CH ₂	1,39 [m]	-	30,2
16	17,77	CH ₂	1,58 [m]	-	17,5
17	49,87	CH	-	-	49,7
18	21,85	CH ₃	0,90 [s]	C17;C13;C14	21,8
19	13,08	CH ₃	0.75 [s]	-	12,9
20	47,39	CH	2,28 [m]	C17;C24;	47,8
21	181,99	C	-	-	181,8
22	32,60	CH ₂	1.54 [m]	C24;C25;C21;C20	32,4
23	25,49	CH ₂	1.96 [m]	C26;C25;C24	26,0
24	123,85	CH	5.09 [t, $J= 8,66$; 6,66 Hz; 1H]	C26;C27	123,7
25	132,89	C	-	-	132,1
26	17,87	CH ₃	1.58 [s]	C27	17,6
27	25,91	CH ₃	1.68 [s]	C26	25,7

28	22,00	CH ₃	0.91 [s]	C14;C13;C8	27,7
29	27,93	CH ₃	0.93 [s]		21,7
30	27,50	CH ₃	0.97 [s]	C9;C10;C1	27,3

A discussão, muito pertinente, em torno do acoplamento em δ 5,24 (H-7) ao ^1H em δ 2,31 (H-9) - observado no experimento COSY (3J) - tem sua origem na biossíntese.

Esqueletos do tipo tirucalano tem como material de partida o óxido de escaleno que, através de sucessivas ciclizações e migrações 1,2-hidreto *Wagner Merweein*, forma-se o cátion damarenil (C-C-C-B) que, por fim, ocorre a isomerização alílica a partir esqueleto eufol (dupla presente em C-8 e C-9) (XU *et al.*, 2004).

Sugere-se que a posição da dupla ligação (figura 73) diminui o comprimento de ligação entre C-7 e C-8, na estrutura do ácido isolado de PA4, além da conformação bote (anel B) que reduz o ângulo de ligação e aumenta a tensão angular nessa região. Por essa razão, além de sugerir que o hidrogênio em C-7 se encontra na posição equatorial (desprotegido) (SILVERSTEIN *et al.*, 2006), dá suporte suficiente para ratificar o acoplamento entre H-7 e H-9.

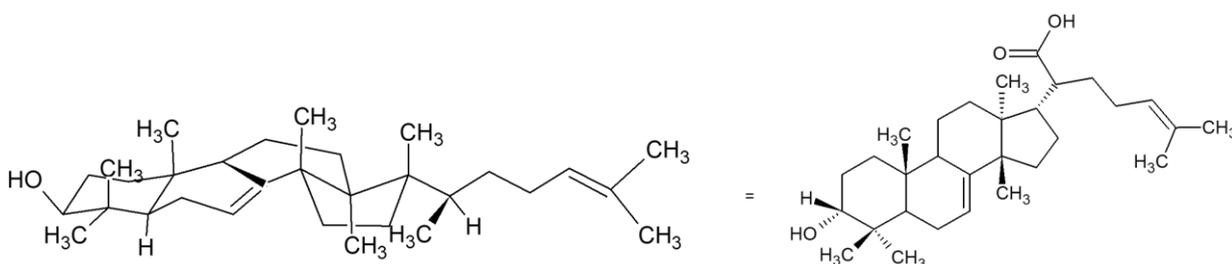


Figura 73. Formação do esqueleto tirucalano a partir da isomerização alílica do esqueleto tipo eufol (C-B-B-B).

O efeito “w” é observável em terpenos (PAVIA *et al.*, 2015). Por conta disso, a baixa frequência na constante de acoplamento do dubleto em δ 5,24 ppm ($J=2,41$ Hz) sugere que acopla com o sinal em δ 2,31 ppm ($J=2,41$ Hz). Apesar de não observável essa multiplicidade no hidrogênio metínico (*m*,H-9), por conta da baixa frequência do

equipamento (300 MHz) empregado na obtenção dos espectros, essas discussões são plausíveis com os resultados obtidos por (MORA *et al.*, 2001).

8.3 FRACIONAMENTO DE *Protium hebetatum*

Para o fracionamento de *P. hebetatum*, uma quantidade de 103,2 miligramas da fração ácida de ECVC21pH4 foi submetida à cromatografia por coluna *flash*. Os eluentes consistiram em uma mistura fixa de Hexano e diclorometano (6:2) e, empregou-se um gradiente crescente, de polaridade de eluição, em metil-etil-cetona (7; 40 e 60%) e, por último, foi adicionado MeOH para a eluição do material retido na coluna. Após a retirada do volume morto foram coletadas 4 frações de 17 mL para cada proporção de eluente. As massas das frações obtidas foram dispostas na figura 74.

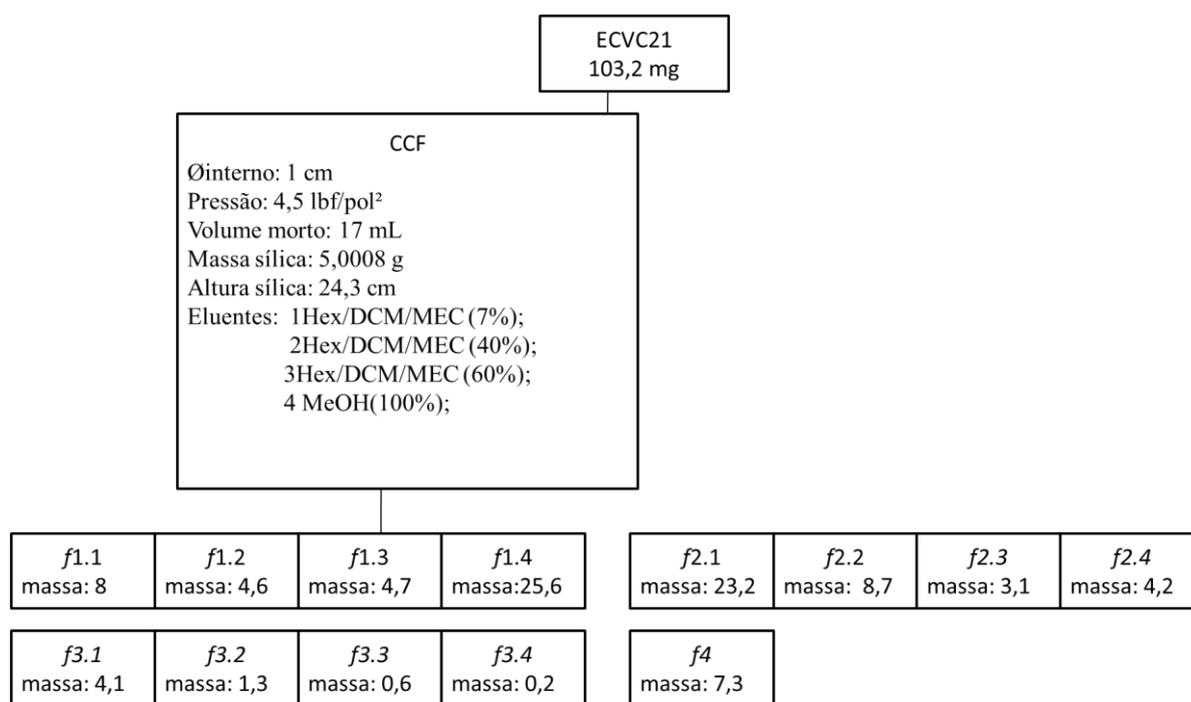


Figura 74. Fluxograma do fracionamento da fase ácida de *Protium hebetatum* (ECVC21).

Após avaliação por CCD demonstrada na figura 75, foi possível verificar a seletividade do solvente metil-etil-cetona diante do aumento da polaridade. Deve-se deixar claro que a seletividade consiste da cetona, empregada neste caso, dissolver

substâncias com polaridades não tão fáceis de serem comparadas (Johnson e Vitha, 2011), como alguns isômeros de posição encontrados na família Burseraceae sendo eles o ácido ursólico e oleanólico (RÜDIGER, 2012).

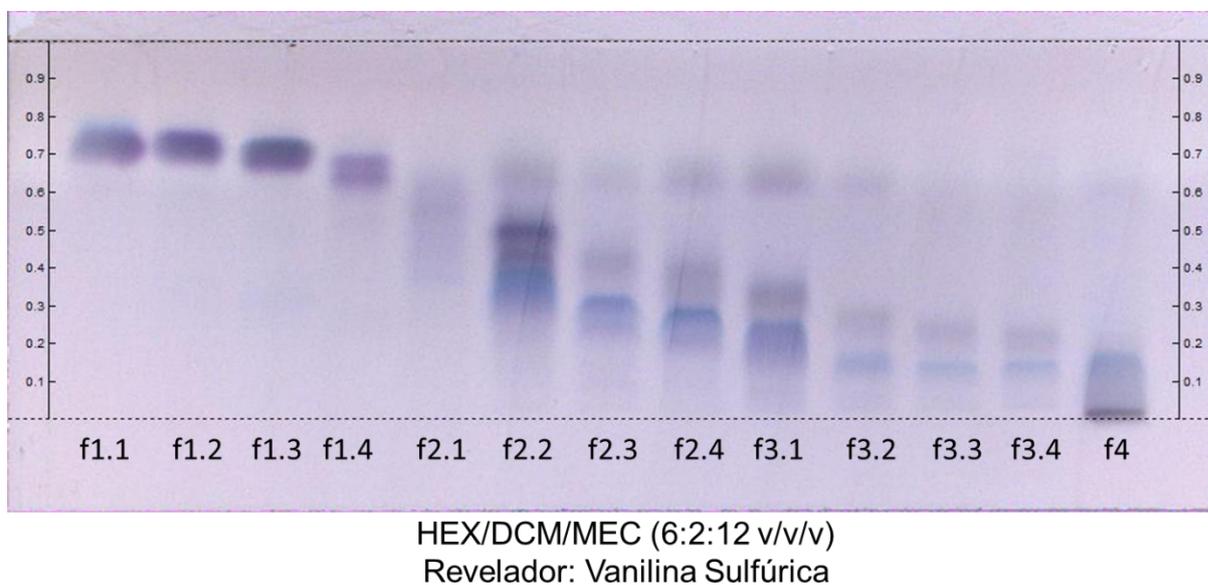


Figura 75. Cromatografia em camada delgada do fracionamento por coluna *flash* de *Protium hebetatum*.

À luz de tais discussões, a placa da figura acima mostra a eficiência da separação cromatográfica pela polaridade crescente das manchas. Além disso, observa-se uma mancha pura de cor roxa presente na fração f1.3 quando revelada em vanilina sulfúrica, diferente das demais que apresentam a mistura de duas ou mais substâncias. Nesse sentido, as frações f1 a f4 foram reavaliadas por CCD e disposta na figura 76.

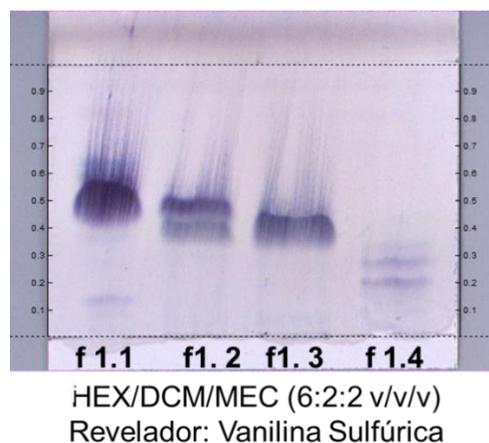


Figura 76. Cromatografia em camada delgada de *Protium hebetatum* da fração f1.1 a f1.4.

A polaridade do sistema disposta na placa da figura 76 foi reduzida com o objetivo de verificar possíveis coeluições de substâncias, e, por conta disso, a presença de uma única substância observável no Rf 0,45, da fração f1.3, foi denominada de PH13, e, submetida à identificação e elucidação estrutural por Espectrometria de Massas e RMN (^1H , ^{13}C , COSY, HMBC e HSQC).

8.3.1 IDENTIFICAÇÃO E ELUCIDAÇÃO ESTRUTURAL DE PH13

A elucidação estrutural da substância terá como base as seguintes etapas: análise por espectrometria de massas, ao qual será atribuída a fórmula molecular e o índice de deficiência de hidrogênios que servirão como guia para a segunda etapa, que consistirá na análise por RMN dos experimentos unidimensionais e bidimensionais.

O espectro de massas (figura 77) da fração PH13 apresentou o íon molecular de maior intensidade em 453,65 m/z, na fonte de ionização APCI no modo negativo $[\text{M} - \text{H}]^-$, que é referente ao íon 454 m/z e, permite inferir a fórmula molecular $\text{C}_{30}\text{H}_{48}\text{O}_3$ e índice de deficiência de hidrogênio igual à oito. Nesse sentido, aponta-se para a possibilidade da classe dos triterpenos.

PH13 #57-61 RT: 0,78-0,84 AV: 5 NL: 1,52E7
 F: -c APCIQ1MS [100,000-1000,000]

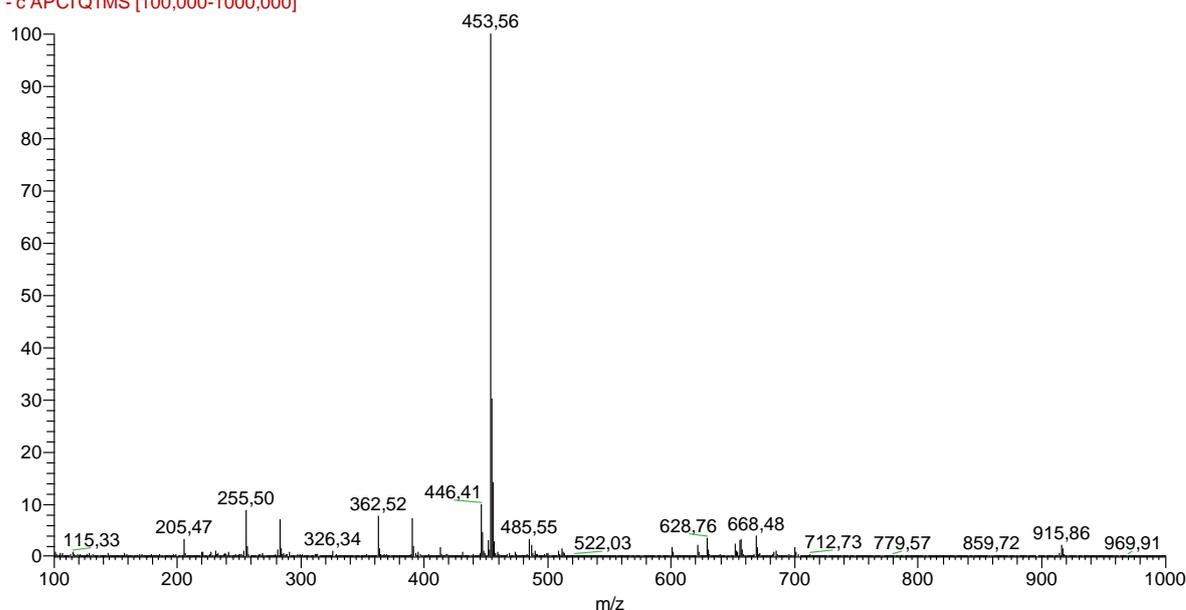


Figura 77. Escaneamento completo obtido por APCI, $[M - H]^-$, da fração PH13 mostrando o pico de maior intensidade em 453,56 m/z.

Em relação dos dados obtidos por RMN, uma rápida visualização do espectro de 1H (figura 78) mostra o deslocamento de sinais de primeira ordem em campo baixo e de ordem superior próximo ao deslocamento de grupos metílicos. Essas informações são mostradas com mais clareza onde foram selecionados seis sinais de simpletos metílicos em δ 0,82 (3H), δ 0,90 (3H), δ 1,03 (6H), δ 1,09 (3H), δ 1,58 (3H), δ 1,68 (3H). Ainda assim, um sinal em δ 5,09 (t; $J=9,0; 7,0$ Hz; 1H) tratando-se de um hidrogênio olefínico. Já no deslocamento de δ 2,44 [ddd; $J=16,1; 7,4; 4,0$ Hz, 1H] e δ 2,54 [ddd; $J=16,1; 2,72$ Hz, 1H] integram-se em dois hidrogênios, isso demonstra que estão acoplando entre si. Além disso, outro duplo duplo duplete δ 2,29 [ddd; $J=19,09; 9,0; 7,0$ Hz, 1H] foi observado tratando-se de hidrogênio metínico e δ 3,50 ppm indicativo de hidroxila. Vale mencionar que os sinais de primeira ordem descritos anteriormente apresentaram-se com distorções do espectro devido ao campo magnético aplicado (7 Tesla.)

Publicações como de MORA (2001) avaliou o extrato em éter dietílico de resinas de *Protium crenatum* Sandwith, na reserva florestal da Venezuela e, com isso,

obtiveram sinais de ^1H por RMN (400 MHz, CDCl_3) em δ 3,50 (H-3) referente à hidroxila, em δ 5,09 (H-24) relativo à dupla ligação. Os deslocamentos em δ 2,30 (H-20) e δ 2,32 (H-9) referente a hidrogênios olefínicos, ao passo que os hidrogênios metílicos foram observados em δ 0,80 (H-28); δ 0,94 (H-29); δ 0,72 (H-19); δ 0,92 (H-18); δ 0,95 (H-30); δ 1,57 (H-26) e δ 1,67 (H-28).

Nesses mesmos moldes, as pesquisas realizadas por (ROBLES *et al.*, 2005) em *Bursera graveolens* avaliaram o extrato em éter de petróleo e, após o fracionamento em coluna de sílica gel, identificaram por RMN de ^1H o deslocamento em δ 2,54 ppm (H-2) que trata-se de hidrogênio vizinho à função 3-oxo.

Em síntese, essas informações dão suporte para predizer a estrutura do triterpeno tetracíclico possuindo duas insaturações e sete grupos metílicos.

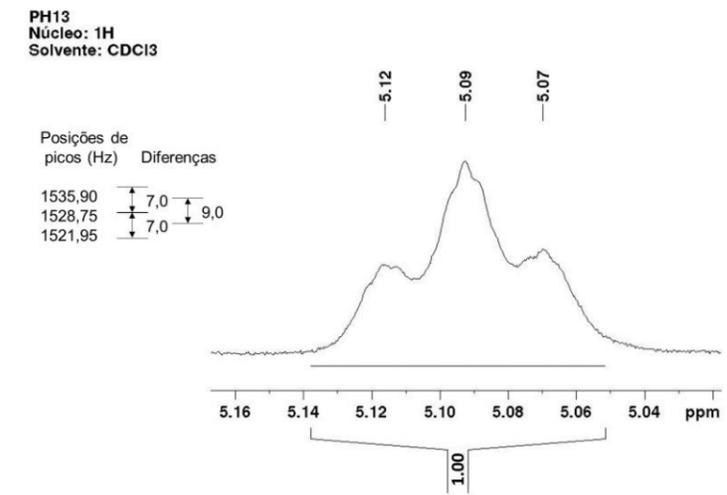
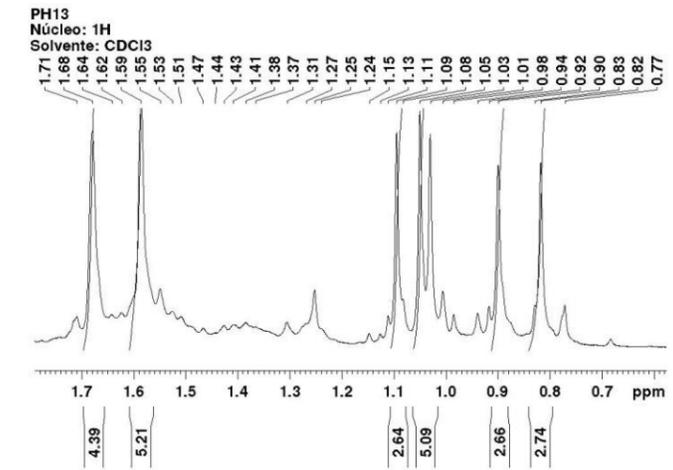
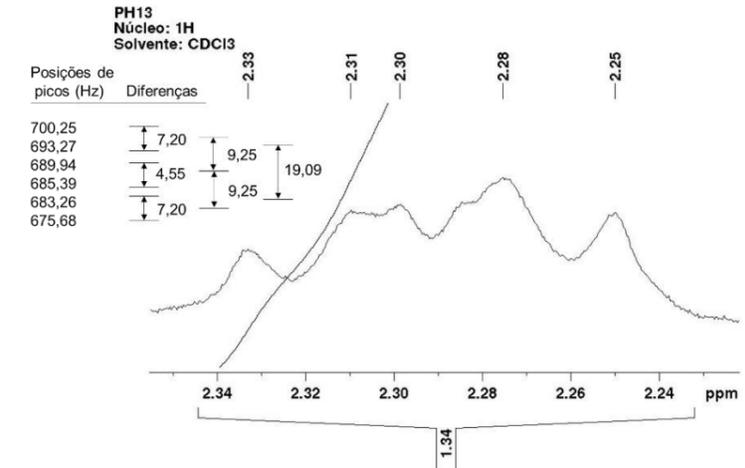
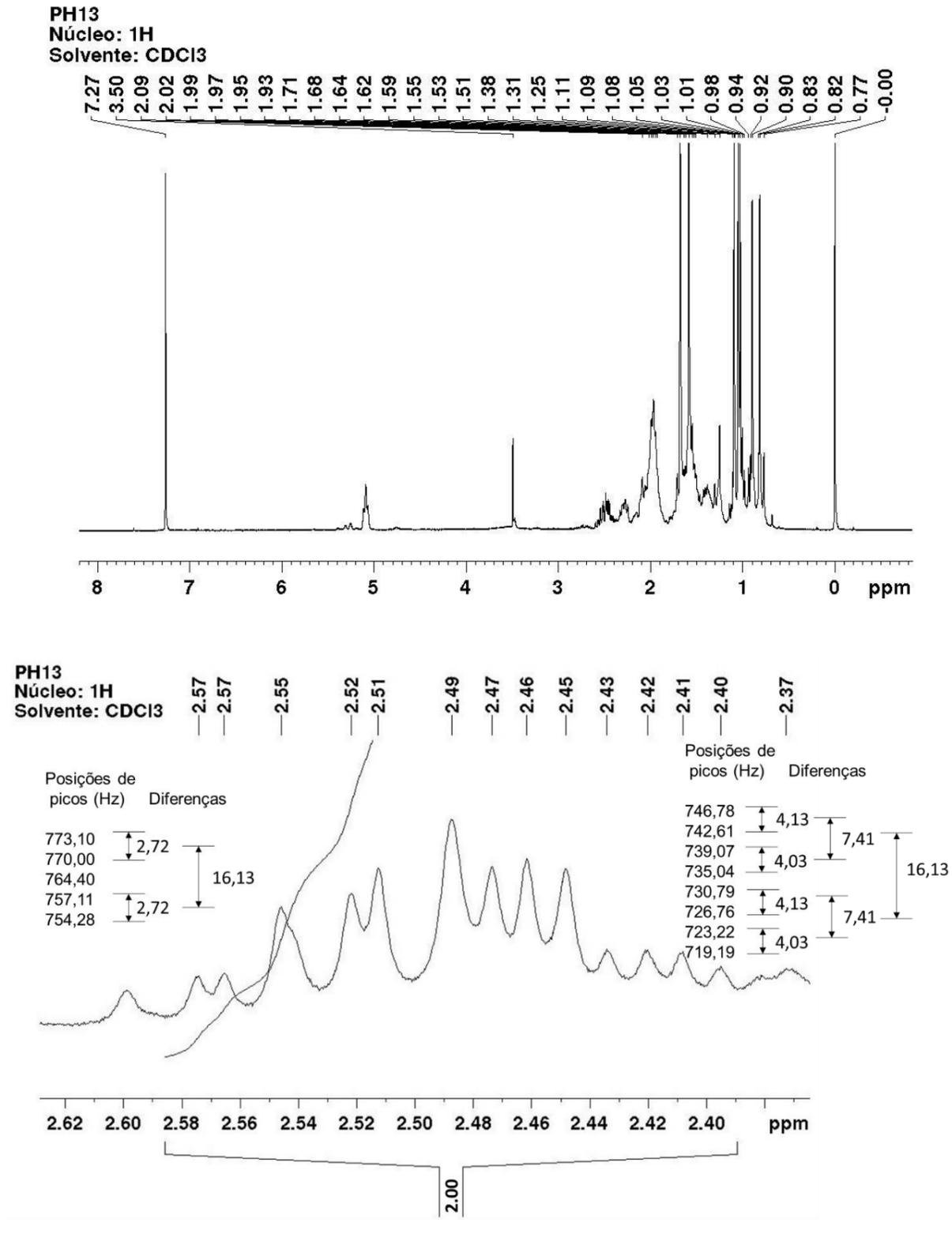


Figura 78. Espectro de RMN de ^1H de PH13 e suas ampliações (300 MHz, solvente: CDCl_3).

Após a análise do espectro de hidrogênio, outro núcleo importante é o de ^{13}C . A figura 79 mostra as identificações por RMN e, com isso, foram detectados mais de 30 sinais de ^{13}C o que indica a presença de outras duas substâncias. Apesar de tais correlações dos sinais em mistura, foi possível identificar os sinais de carbonos olefínicos em δ 145,67; 134,23; 132,34; 123,53 e 118,32 ppm. Ainda assim, o leitor atento perceberá a presença em δ 181,85 e δ 80,78 ppm o deslocamento sugestivo de ácido carboxílico e hidroxila, respectivamente. Outro sinal observado também em δ 217,54 ppm diz respeito à função cetona. Essas observações suportam o alcance do objetivo específico desse trabalho onde a pesquisa foi direcionada para o isolamento de ácidos triterpênicos de Burseraceae.

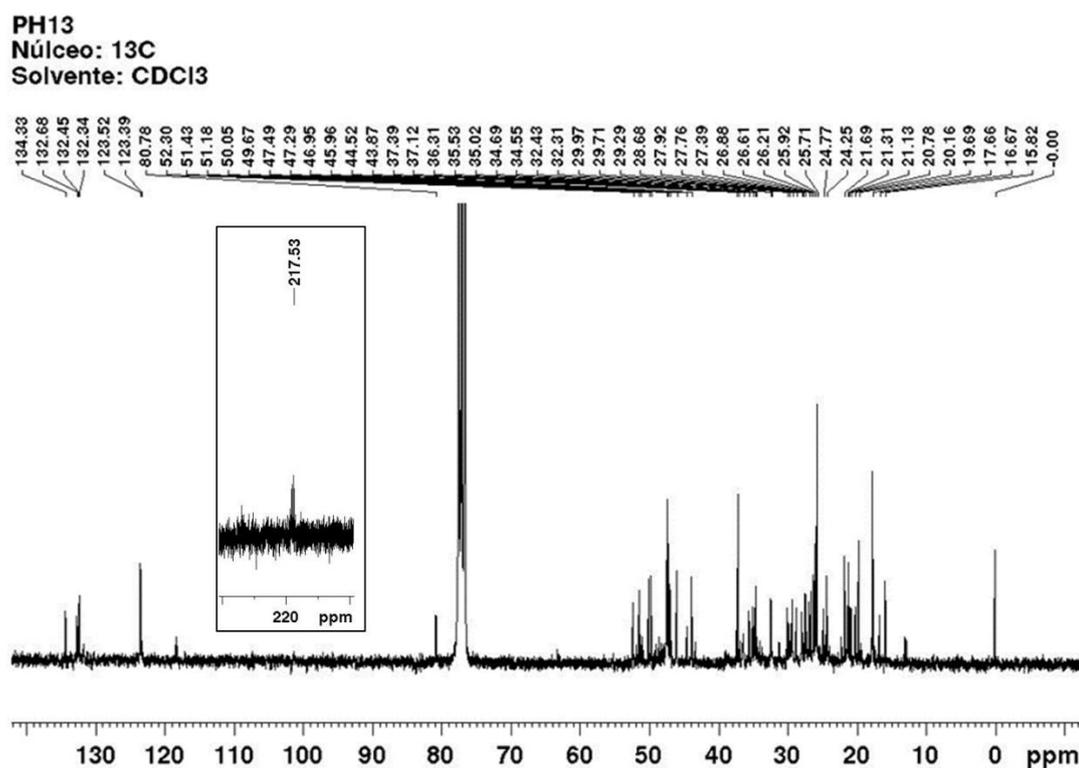


Figura 79. Espectro de RMN de ^{13}C de PH13 (300 MHz, solvente: CDCl_3).

Dominada as informações a respeito dos experimentos unidimensionais, é preciso nesse segundo momento expor os dados relativos aos experimentos bidimensionais. O primeiro deles, refere-se ao mapa de correlação homonuclear (^1H -

^1H – COSY (figura 80) que mostrou que δ 5,09 (H-24) ppm se correlacionou com δ 1,59 e δ 2,02. Do mesmo modo, δ 3,46 confrontou com δ 1,59, assim como δ 1,62 com δ 3,46 e δ 5,09 ppm. E, por fim, em δ 1,59 concatenou-se com δ 5,09 ppm.

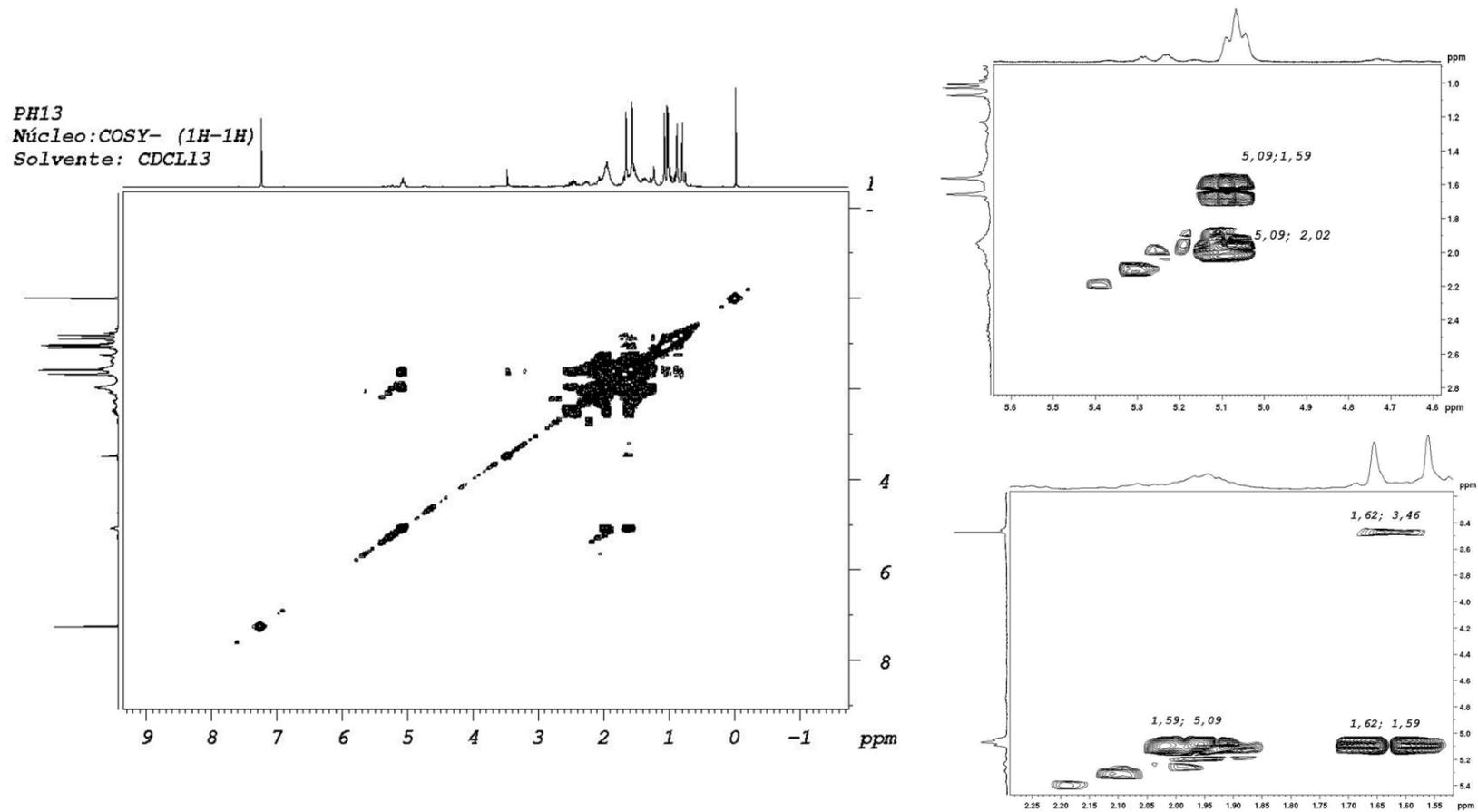


Figura 80. Espectro de correlação homonuclear (^1H - ^1H) - COSY de PH13 e ampliações (300 MHz, solvente: CDCl_3).

Tão comum quanto ao anterior é apresentar os dados de correlação de (^{13}C - ^1H) HSQC (figura 81). As principais concatenações para a elucidação estrutural podem ser visualizadas na tabela 6. Dentre elas, a correlação J^1 do carbono em δ 118,32 ppm com o hidrogênio em δ 5,28 ppm é indicativo que está relacionado à dupla ligação. Esse alto valor do deslocamento ocorre devido a dois fatores: anisotropia diamagnética e hibridização do carbono sp^2 (PAVIA *et al.*, 2006). A primeira está relacionada com a desblindagem alta por conta do campo magnético aplicado. Já a segunda, trata-se da parte rígida da molécula que possui carbono hibridizado (sp^2). Desse modo, a eletronegatividade do carbono é refletida na ressonância de seu hidrogênio, o aumento do caráter “s” do carbono hibridizado em sp^2 , o que espera-se um deslocamento químico mais à esquerda do espectro de RMN (campo baixo) (SILVERSTEIN *et al.*, 2006).

Importante discutir, também, a correlação do carbono em δ 31,19 ppm que diz respeito a carbono pró-quiral, já que ele está diretamente ligado a dois hidrogênios com deslocamentos diferentes em δ 2,44 e δ 2,12 ppm. Carbonos pró-quirais possuem dois ligantes idênticos (hidrogênio), e, conseqüentemente, são aquirais.

No caso acima descrito, trocando-se um dos hidrogênios por outro ligante diferente forma-se um centro estereogênico. Desse modo, isso dá suporte para discutir quimicamente o deslocamento desigual dos hidrogênios, ou seja, que a dupla ligação se encontra no anel B, nas posições 7 e 8, respectivamente.

Das formas de composição dos anéis A e B do triterpeno mencionadas acima, pode-se dizer que outro deslocamento a ser descrito relaciona o carbono em δ 27,35 ppm ao hidrogênio δ 2,13 ppm que dá início à composição do anel C. No que tange à presença das demais correlações, busca-se, desse modo, avaliá-las a longa distância.

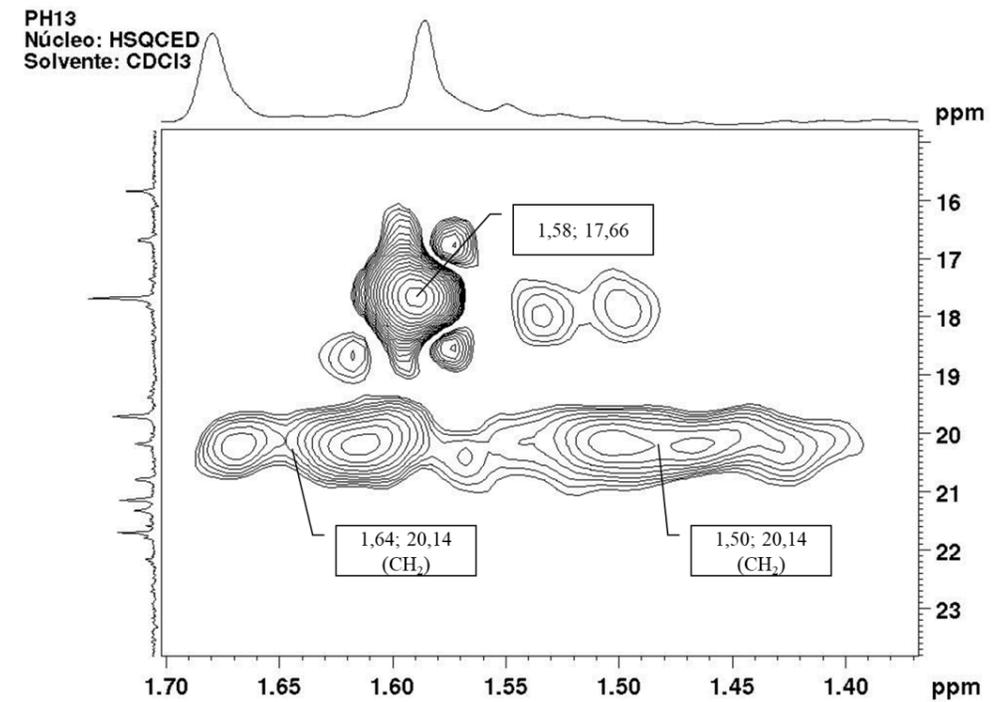
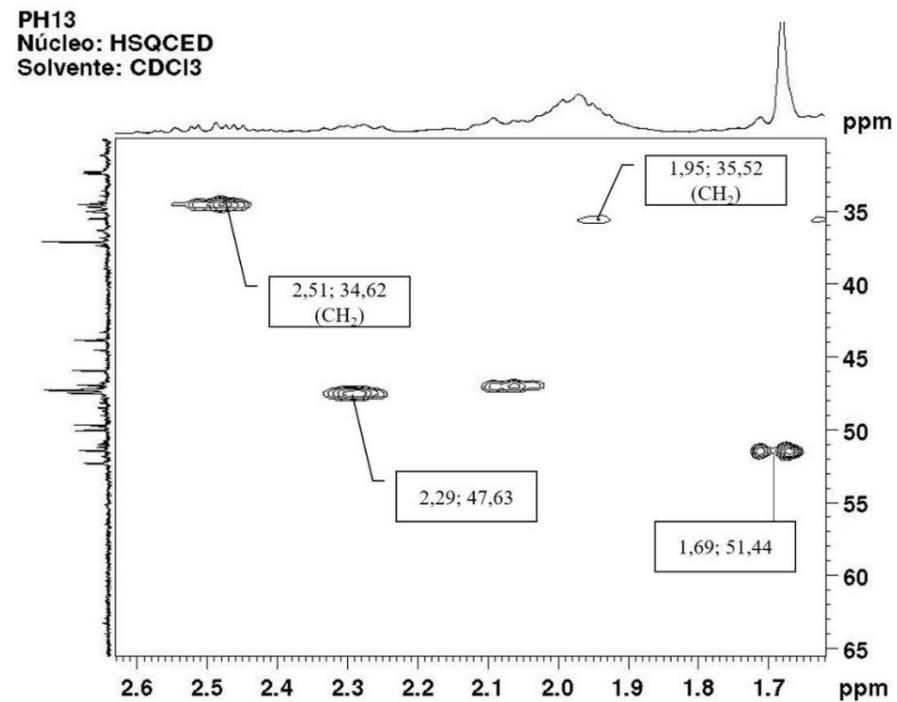
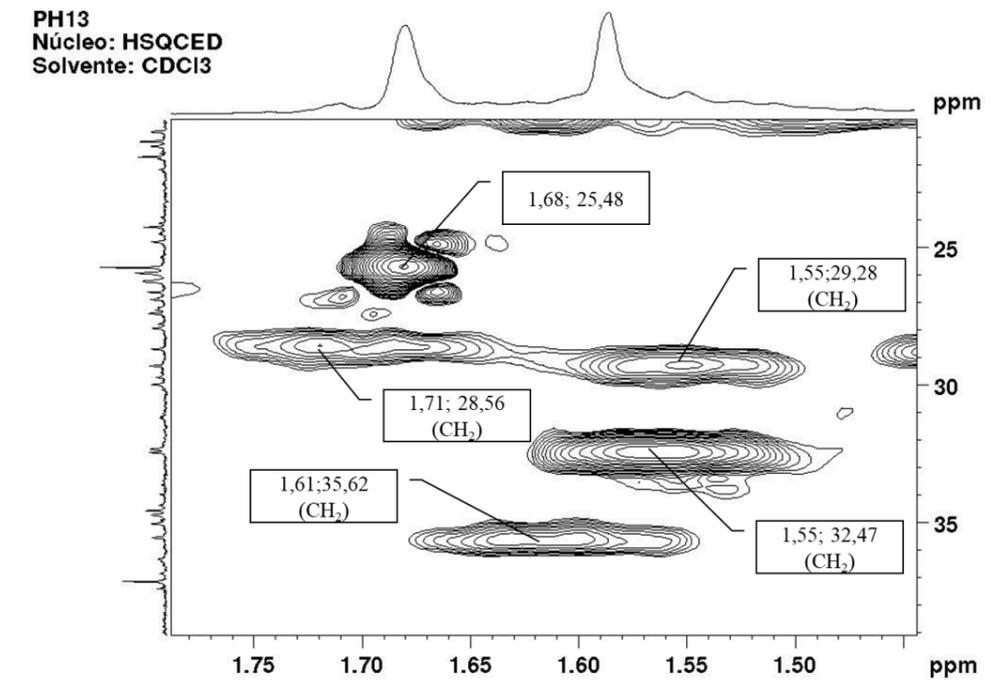
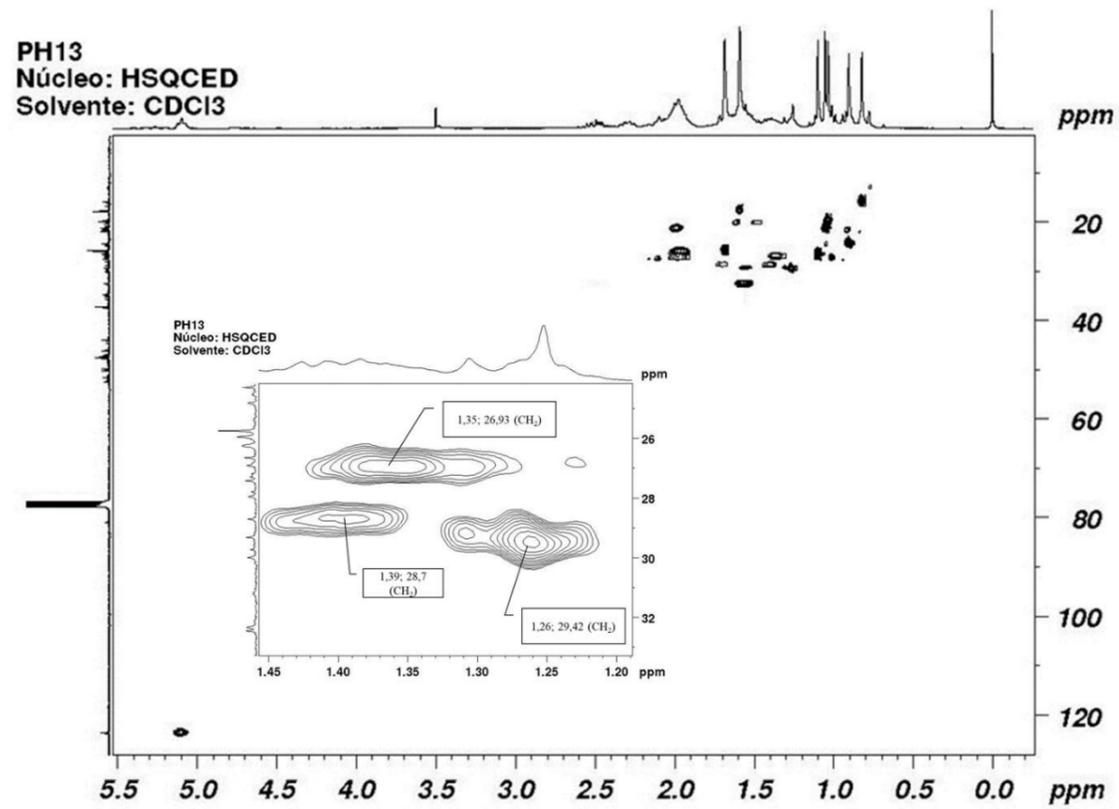


Figura 81. Espectro de correlação heteronuclear (¹H -¹³C) da amostra PH13 e ampliações (300 MHz, solvente: CDCl₃).

Já afirmou-se, em oportunidade anterior, que as correlações à longa distância aferidos por (^{13}C - ^1H) HMBC (figura 84) podem ser decisivas para as demais partes do anel do triterpeno. Como de praxe a descrição para essas observações correlacionam o hidrogênio em δ 5,09 com os carbonos δ 17,67 e δ 25,71 ppm. Seguindo, o hidrogênio δ 1,64 correlaciona-se com o carbono δ 25,71 e δ 47,30 ppm. Pôde-se observar, também, que o sinal em δ 1,09 ppm correlaciona-se com os carbonos em δ 36,63, δ 37,13 e δ 145,47. Ao lado de tais constatações, o hidrogênio em δ 0,82 ppm correlaciona-se com o carbono δ 28,68, δ 43,88, δ 47,30 e δ 49,68.

Até agora, foram descritos os experimentos unidimensionais e as correlações dos ^1H - ^{13}C ($J^I - J^A$). Nesse momento, deve-se reunir as informações dadas a respeito da estrutura da substância afim de evidenciá-la. Para tanto, o grupo metileno em δ 28,56 ppm está acoplando ao hidrogênio em δ 1,71 ppm (H-23), e, os dados de HMBC revelaram que esse mesmo núcleo possui correlação aos carbonos δ 17,67 (C-26); 132,35 (C-25) e 123,53 (C-24) ppm. Seguindo, o carbono que faz intermédio entre a ramificação e a parte mais rígida do terpeno é o de δ 20,14 ppm (C-22), porque no experimento HSQC editado é representado como grupo metileno e está ligado diretamente ao hidrogênio δ 1,64 (H-22) ppm. Logo, esse mesmo hidrogênio nos dados obtidos por HMBC acopla com os carbonos em δ 123,53 (C-24); 132,35 (C-25); 181,85 (C-21) e, por último, 47,30 (C-20) ppm. Deixemos claro, que nesse último, o hidrogênio em δ 2,03 (H-20) ppm está ligado diretamente ao carbono δ 47,30 (C-20) ppm pelos dados de correlação (^1H - ^{13}C) HSQC e, o acoplamento a longa distância revela que δ 2,03 (H-20) ppm possui como vizinhos os carbonos em δ 51,42 (C-17) e 123,53 (C-24). Esses dados observados e as correlações definidas, permitem sugerir que a molécula possui uma ramificação alifática com a função ácido carboxílico (figura 82).

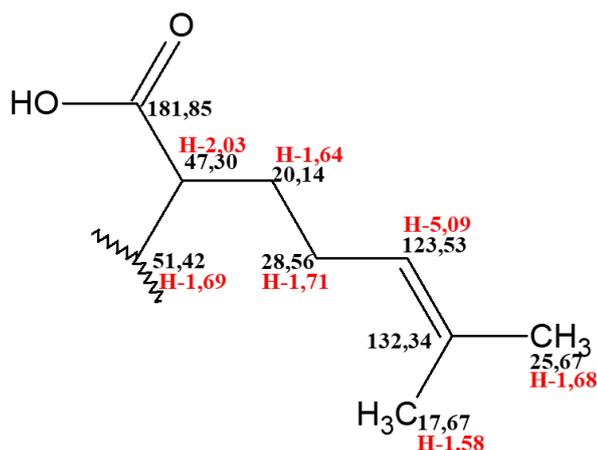


Figura 82. Esqueleto alifático da amostra PH13 mostrando as correções dos deslocamentos dos hidrogênios e ^{13}C .

Para evidenciar a estrutura do anel D do triterpeno. É possível descrever que o ^1H metílico em δ 0,82 (H-18) ppm está ligado ao carbono δ 15,81 e que o hidrogênio em δ 0,98 (H-30) ppm está ligado ao carbono δ 12,67 (dados de HSQC). Correlações a longa distância por HMBC (figura 84) são essenciais para predizer a relação de carbonos quaternários e, é isso que acontece, quando brilhantemente o H-18 acopla com o carbono em δ 49,68 (C-14) e 47,30 (C-20) ppm e, outrora o hidrogênio metílico (H-30) acopla com o carbono em δ 43,88 (C-13) ppm. Fica claro, o ciclo formado de cinco membros quando os dados de HMBC revelam que δ 0,82 acopla com o carbono δ 28,68, assim como em δ 0,98 (H-30) possui correlação com o carbono δ 29,29 (C-16) ppm (figura 83).

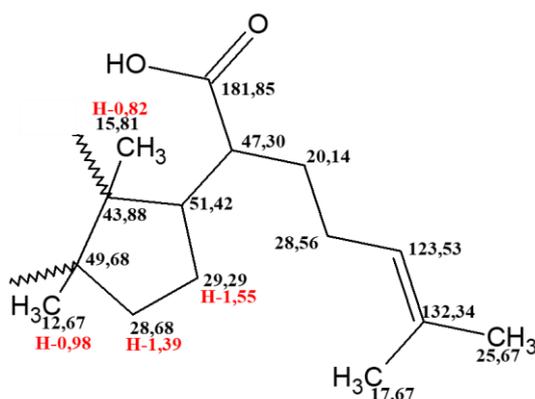


Figura 83. Esqueleto alifático e anel D da amostra PH13 mostrando as correções dos deslocamentos dos hidrogênios e ^{13}C .

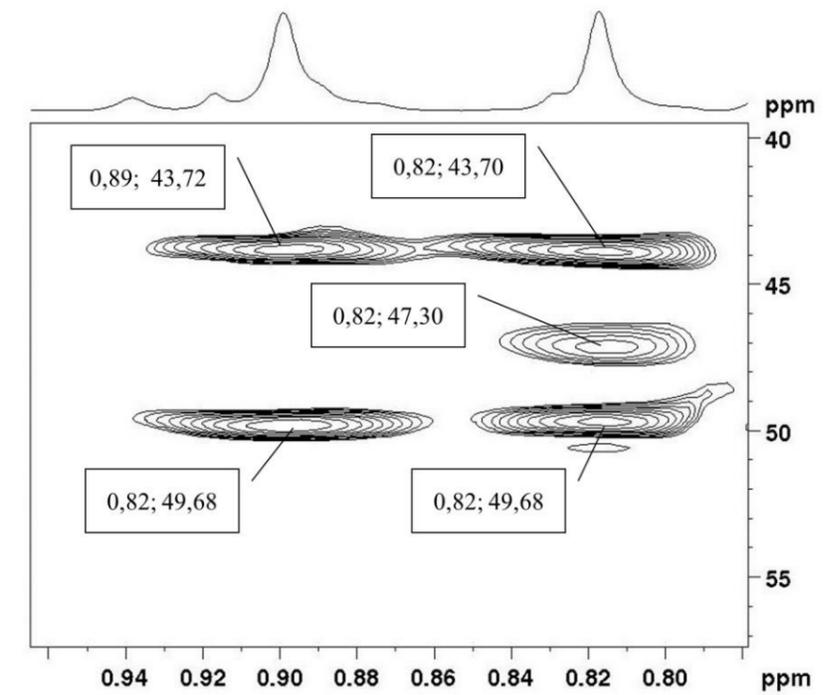
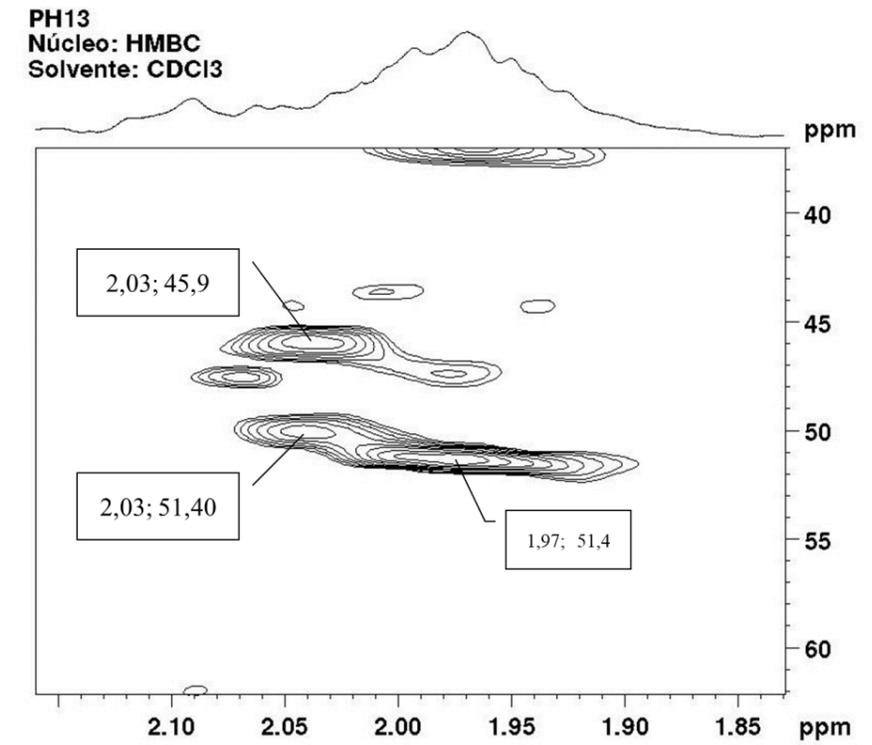
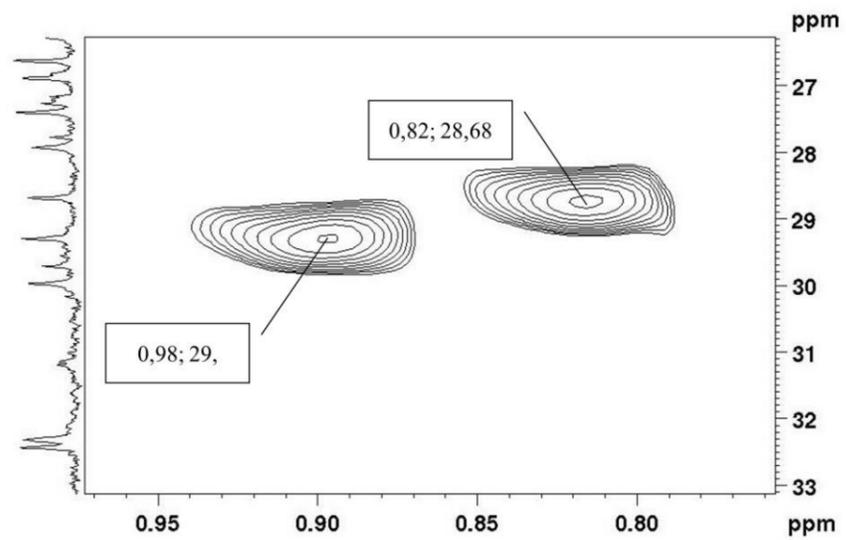
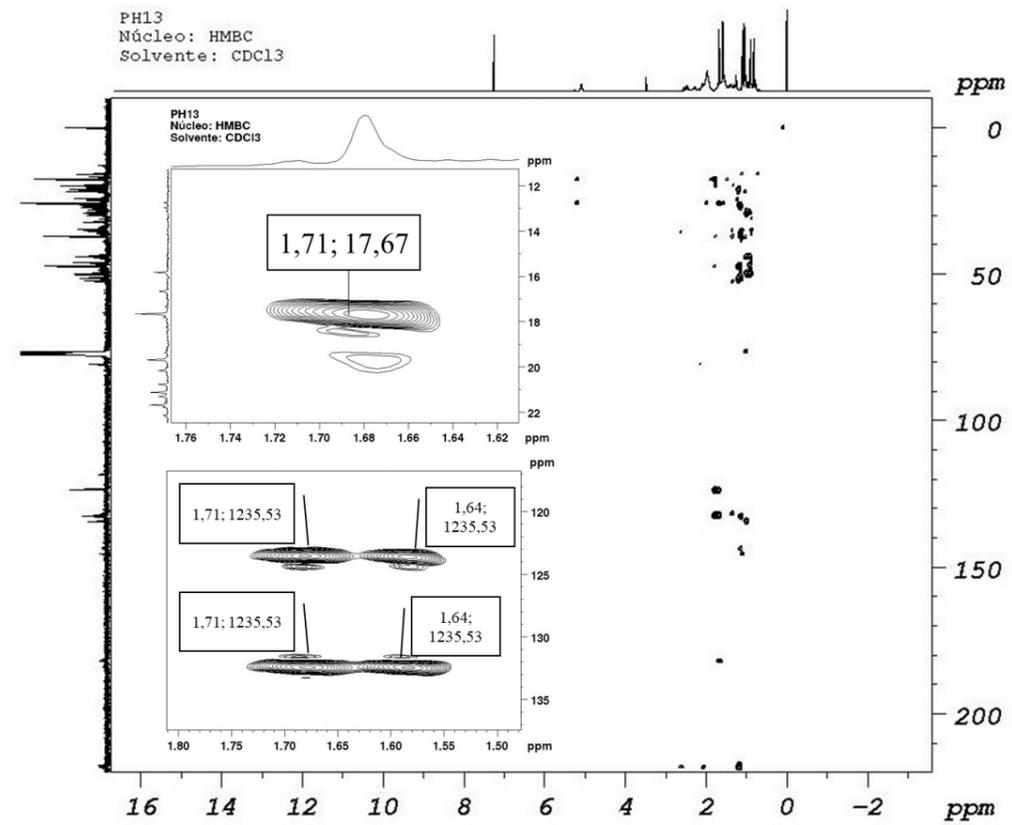


Figura 84. Espectro de correlação a longa distância (^{13}C - ^1H) HMBC e expansões (300 MHz, solvente: CDCl_3).

Associando-se os vários momentos desse percurso para a elucidação estrutural, e, valendo-se que existem três moléculas outrora já mencionadas. Pode-se sugerir que a substância majoritária obtida de *P. hebetatum* denomina-se ácido 3 α -hidroxitirucala-7,24-dien-21-oico (figura 85). Os sinais de ^{13}C e as demais correlações estão dispostas na tabela 6.

Tabela 6. Correlações dos deslocamentos por RMN de 3 α -hidroxitirucala-7,24-dieno-21-oico obtido de *P. hebetatum* comparativo com os dados de (MORA *et al.*, 2001).

C n°	δC (ppm)	^{13}C	HSQC δH [m, J]	HMBC δC (ppm)	δC^* (ppm)
1	31,19	CH ₂	1,39 [m]	-	31,2
2	25,92	CH ₂	2,44 [ddd; J=16,1; 7,4; 4,0 Hz] 2,54 [ddd; J=16,1; 2,72 Hz]		25,3
3	80,78	-	3,50	-	76,5
4	37,13	C	-	-	37,3
5	44,52	CH	1,68 [m]		44,5
6	24,26	CH ₂	2,13 [m]	-	23,9
7	118,32	CH	5,28	-	118,2
8	145,67	C	-	-	145,3
9	47,51	CH	2,29 [ddd; J=19,09; 9,25; 7,20 Hz]	-	48,2
10	34,55	C	-	-	34,8
11	27,35	CH ₂	-	-	27,0
12	34,5	CH ₂	1,43 [m] 1,8 [m]	-	33,4
13	43,88	C	-	-	43,3
14	49,68	C	-	-	51,0
15	28,68	CH ₂	1,39 [m]		30,2
16	29,29	CH ₂	1,55 [m] 1,74 [m]	-	17,5
17	51,42	CH	-	-	49,7

18	15,81	CH ₃	0,82 [s]	C14;C20	21,8
19	12,97	CH ₃	0.82 [s]		12,9
20	47,30	CH	2,03	C17;C24;	47,8
21	181,85	C	1.41 [m]		181,8
			2.22 [m]	-	
22	20,14	CH ₂	1.64 [m]	C24;C25;C21;C20	32,4
23	28,56	CH ₂	1.71 [m]	C26;C25;C24	26,0
24	123,53	CH	5.09 [t, J= 9; 7 Hz]		123,7
25	132,34	C	-		132,1
26	17,67	CH ₃	1.58 [s]		17,6
27	25,67	CH ₃	1.68 [s]		25,7
28	27,26	CH ₃	0.80 [s]		27,7
29	21,69	CH ₃	0.98 [s]		21,7
30	12,67	CH ₃	0.98 [s]	C13	27,3

A reunião das correlações descritas na tabela acima, levaram à construção da estrutura do triterpeno ilustrado na figura 85, juntamente confrontado com os dados obtidos (RÜDIGER., *et al* 2012) (dados não publicados) e, outros autores, evidenciam o ácido descrito acima.

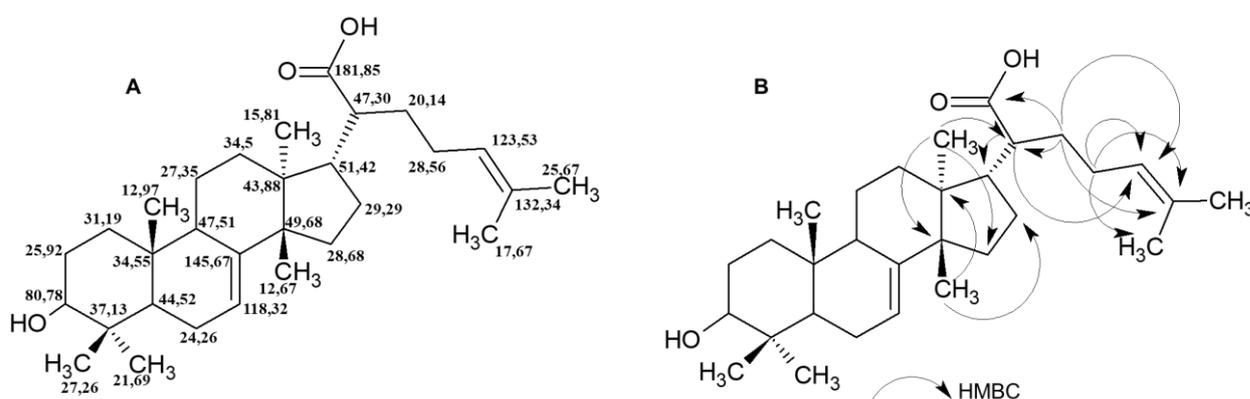


Figura 85. Estrutura do ácido 3 α -hidroxitirucala-7,24-dieno-21-oico identificado de *P. hebetatum* (PH13), com sinais de correlação de RMN de ¹³C (em A) e HMBC (em B).

Além disso, o sinal observado em δ 217,53 ppm é relativo à função 3-oxo que, possui também, a posição da dupla ligação em carbonos olefínicos (posição

8 e 9) com deslocamentos em δ 134,33 (C-9) e 132,68 (C-8) ppm, denomina-se, no entanto, de ácido 3-oxotirucala-8,24 -dien-21-oico ou ácido β -elemólico (454 m/z) (ROBLES *et al.*, 2005). Pode-se descrever também que a mesma posição da dupla ligação no carbono 8 e 9 e o deslocamento em δ 80,79 ppm é sugestivo para o isômero de posição denominado de 3 α -hidroxitirucala- 8,24 - dien- 21 – oico (α -elemólico) (figura 86).

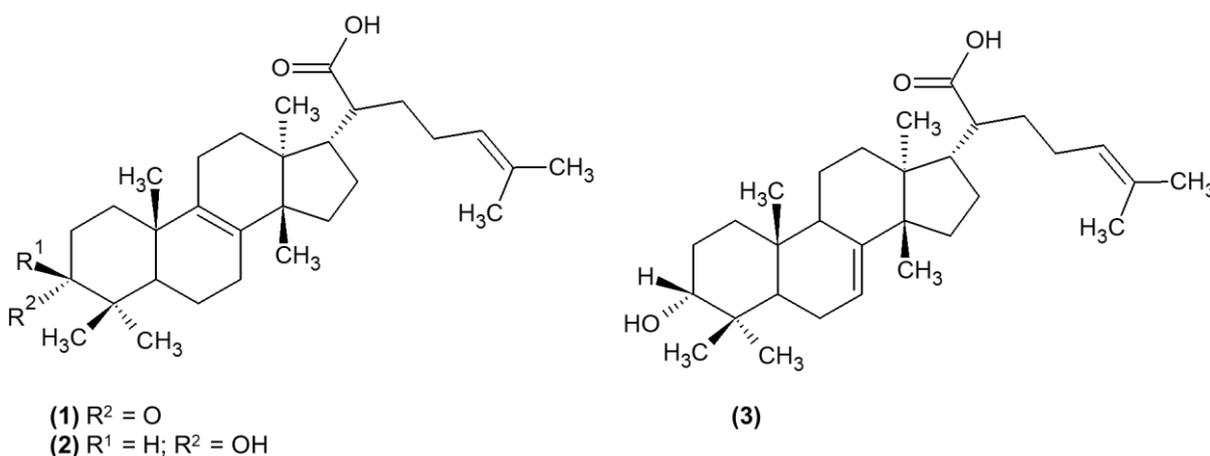


Figura 86. Estruturas dos ácidos identificados em *Protium hebetatum* das resinas de Burseraceae. Legendas: (1) ácido 3-oxotirucala-8,24-dien-21-oico (ácido β -elemólico); (2) 3 α -hidroxitirucala-8,24-dien-21-oico (α -elemólico) e (3) 3 α -hidroxitirucala- 7,24-dien- 21-oico.

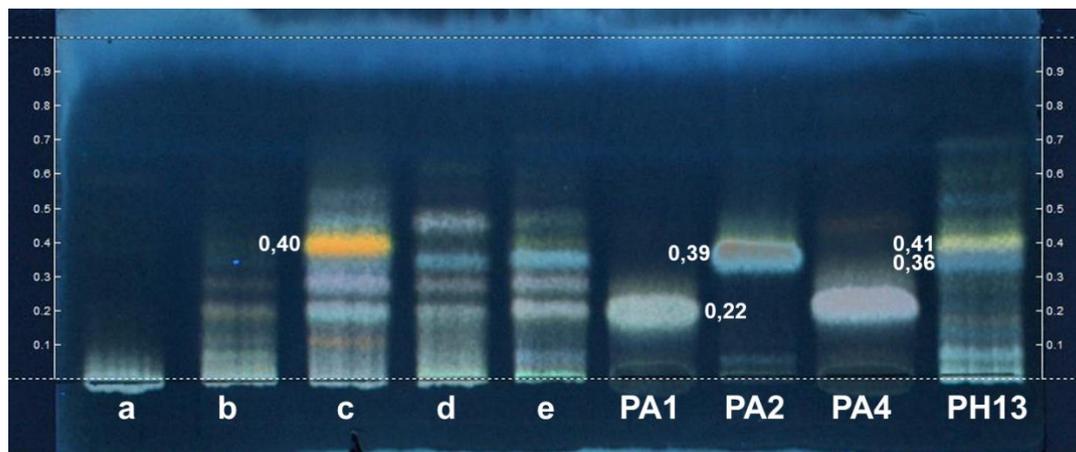
Mesmo não se tratando de uma substância inédita os ácidos identificados de *P. hebetatum* já foram mencionados por (MAIA *et al.*, 2000). Reportando-se à literatura, a pesquisa de (ROBLES *et al.*, 2005) e colaboradores isolaram as mesmas substâncias em resinas de *Bursera graveolens* (Burseraceae). Essas moléculas de esqueletos do tipo eufano e tirucalano, apresentaram atividade anti-microbiana a *Bacillus subtilis* e *Staphylococcus aureus*. Não fica para trás a pesquisa realizada por (RÜDIGER, 2012) que, através do estudo do extrato em acetato de etila de *Protium paniculatum* var. *modestum*, isolou os ácidos 3 α -hidroxitirucala-8,24-dieno-21-oico e 3 α -hidroxitirucala-7,24-dieno-21-oico da fração PPM-2 denominada, assim, por ele.

8.4. DERIVATIZAÇÃO DAS FRAÇÕES ÁCIDAS EM ÉSTERES METÍLICOS.

As frações ácidas das espécies *P. strumossum*, *P. paniculatum* Var. *modestum*, *P. cf. heptaphyllum*, *P. altsonii* e *P. hebetatum* foram derivatizadas em ésteres metílicos, isso porque frações esterificadas possibilitam uma melhor separação entre as moléculas do que nas frações de ácidos. Assim, a proposta na formulação de derivados metílicos torna-se como pressuposto para o isolamento de análogos às substâncias ácidas.

Primeiramente, as frações ácidas de todas as espécies foram comparadas com os padrões obtidos pelo fracionamento de *P. hebetatum* e *P. altsonii*. Em seguida, realizou-se a derivatização das frações ácidas utilizando trimetilsilildiazometano (TMSD). Ao final desta etapa, os padrões ácidos foram derivatizados por TMSD e a reação foi acompanhada por CCD e espectroscopia de RMN de ^1H .

A figura 87 mostra o perfil cromatográfico dos padrões ácidos e as frações ácidas de *P. strumossum*, *P. paniculatum* Var. *modestum*, *P. cf. heptaphyllum*, *P. altsonii* e *P. hebetatum*. Isso pode indicar as moléculas que podem estar presentes ou ausentes nas resinas de *Protium*.



Eluentes: Hex/DCM/AcOEt (6:2:4)
Revelador: EtOH sulfúrico (366nm)

Figura 87. Perfil cromatográfico comparativo entre as fases ácidas concentradas através da coluna de KOH, e as substâncias obtidas através do fracionamento de *P. hebetatum* e *P. altsonii*. Legenda: em (a) *P. cf. heptaphyllum* (EDFB25pH3); (b) *P. strumossum* (ECRQ25pH3); (c) *P. paniculatum* Var.modestum (ECNC21pH2), (d) *P. hebetatum* (ECVC21pH4) e (e) *P. altsonii* (ECAH21pH4); **PA1** (mistura dos ácidos 3 α -hidroxitirucala-8,24-dien-21-oico e 3 α -Hidroxitirucala-7,24-dien-21-oico), **PA2** (mistura dos ácidos 3-oxo-tirucala-8,24-dien-21-oico e 3 β -hidroxitirucala-8,24-dien-21-oico) e **PA4** (ácido 3 α -hidroxitirucala-7,24-dien-21-oico); **PH13** (mistura do ácido β -elemólico, α -elemólico e 3 α -hidroxitirucala- 7,24-dien- 21-oico).

A figura acima permite observar que a mistura dos ácidos 3 α -hidroxitirucala-8,24-dien-21-oico e 3 α -hidroxitirucala-7,24-dien-21-oico, identificadas como pertencentes à mancha de Rf 0,22 em PA1, estão presentes em todas as fases ácidas exceto em *P. cf. heptaphyllum* (figura 87; amostra a).

Da mesma maneira, o ácido 3 α -hidroxitirucala-7,24-dien- 21-oico, isolado de *Protium altsonii* (PA4), apresenta-se como ausente na fase ácida de *Protium cf. heptaphyllum*. Em contrapartida, a mancha de menor intensidade observável em azul no Rf 0,22 de *P. strumossum* (figura-87; amostra c), pode ser indicativo de substâncias distintas quando comparada com a única mancha de cor roxa em PA4.

Já a mistura dos ácidos 3-oxo-tirucala-8,24-dien-21-oico e 3 β -hidroxitirucala-8,24-dien-21-oico identificados em PA2 foi observada na mancha

de Rf 0,39, pode-se sugerir que ela estar presente em todas as espécies exceto nas fases ácidas de *P. cf. heptaphyllum* e *P. strumossum*.

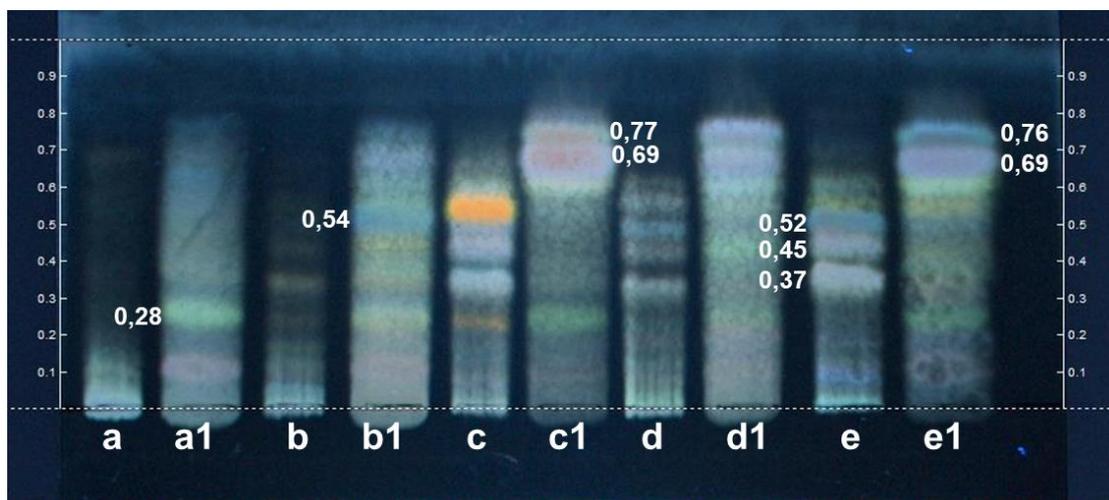
Por outro lado, na espécie *P. hebetatum* foi identificado a mistura dos ácidos β -elemólico, α -elemólico e 3 α -hidroxitirucala-7,24-dien-21-oico. Com isso, observou-se a presença de uma mancha no Rf 0,41 de cor amarela. Essa mesma mancha foi observada em *P. paniculatum* Var. *modestum*, porém com maior intensidade. Além disso, no Rf 0,36 apresenta uma mancha de cor azul observada também em *P. paniculatum* Var. *modestum* e ausente nas demais espécies.

Os resultados mostrados acima, permitem esclarecer a utilização do fracionamento de *P. altsonii* e *P. hebetatum*, mostrando que as moléculas identificadas nessas espécies, podem estar presentes ou ausentes nas fases ácidas concentradas através de sílica impregnada com KOH de *P. strumossum*, *P. paniculatum* Var. *modestum*, *P. cf. heptaphyllum*, *P. altsonii* e *P. hebetatum*, não sendo necessário a realização de fracionamento de todas as demais espécies para identificar a mesma substância.

Triterpenos ácidos pentacíclicos e tetracíclicos possuem algo em comum: elevada temperatura de ebulição e grupos funcionais que compreendem os ácidos carboxílicos. Por conta de sua elevada massa molecular e ponto de ebulição, algumas estratégias podem ser adotadas afim de modificar estruturalmente as propriedades físicas e químicas dessas moléculas (SILVA *et al.*, 2009). Uma possibilidade para reduzir a temperatura de ebulição é adicionar metilas em suas estruturas.

Por conta disso, as fases ácidas de todas as espécies foram submetidas à modificação estrutural por Trimetilsilildiazometano (TMSD). Essas fases ácidas

foram comparadas antes e após a derivatização. A figura 88 mostra o comportamento das substâncias quando analisadas por cromatografia em camada delgada.



Eluentes: Hex/DCM/AcOEt (6:2:4)
Revelador: EtOH sulfúrico (366nm)

Figura 88. Perfil químico das fases ácidas antes e após derivatização com TMSD. Legenda: (a) fase ácida de *P. cf. heptaphyllum* (EDFB25pH3) e **a1** fase ácida de *P. cf. heptaphyllum* derivatizada com TMSD; (b) fase ácida *P. strumossum* (ECRQ25pH3) e **b1** fase ácida de *P. strumossum* derivatizada com TMSD; (c) fase ácida de *P. paniculatum* Var. *modestum* (ECNC21pH2) e **c1** fase ácida de *P. paniculatum* Var. *modestum* derivatizada com TMSD (**d**) fase ácida de *P. hebetatum* (ECVC21pH4) e **d1** fase ácida de *P. hebetatum* derivatizada com TMSD (**e**) fase ácida de *P. altsonii* (ECAH21pH4) e **e1** fase ácida de *P. altsonii* derivatizada com TMSD.

O perfil químico da figura acima permite visualizar o aumento do fator de retenção das substâncias quando esterificadas. Desse modo, na fase ácida de *P. cf. heptaphyllum* permite observar a retenção das manchas na base da placa cromatográfica. Porém, quando derivatizadas (figura 88; amostra a1) observou-se uma mancha verde de Rf 0,28, e uma mancha lilás de Rf 0,12 quando reveladas por etanol sulfúrico.

Na fase ácida não derivatizada de *P. strumossum* (figura 93; amostra b) aponta a ausência de substâncias superior ao Rf 0,5, mas quando modificadas

na presença de TMSD (figura 88; amostra b1) indica uma mancha azul intensa no Rf 0,54, 0,7 e 0,65. Além disso, observa-se uma mancha lilás no Rf 0,12 indicativo de maior polaridade, essa mesma mancha foi observada também na espécie *P. cf. heptaphyllum* (figura 88; amostra a1).

Já na fase ácida de *P. strumossum* esterificada, mostra a ausência da mancha amarela intensa presente no Rf 0,56 quando não derivatizada (figura 88; amostra c). Além disso, é possível apontar a presença da mancha verde no Rf 0,28, e duas manchas lilás intensas no Rf 0,77 e 0,69, essa intensidade pode ser indicada por meio da coeluição de todas as substâncias derivatizadas nessa espécie.

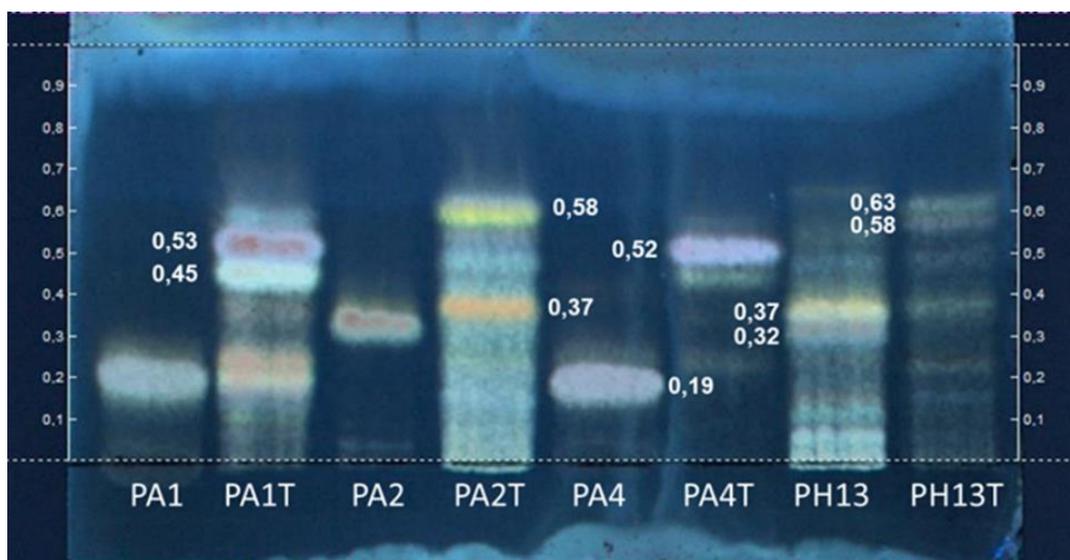
Na análise do perfil químico de *P. hebetatum* (figura 88; amostra d1) e *P. altsonii* (figura 88; amostra e1), observaram-se duas manchas intensas de cor azul presentes no Rf 0,76 e 0,69 que podem estar associadas à coeluição das substâncias após derivatizadas por TMSD, por outro lado esse comportamento não foi observado na fase ácida das mesmas espécies quando ausentes de TMSD mostrando a ausência de manchas superiores ao Rf 0,6.

Os resultados permitem inferir que todas as fases ácidas após concentradas por coluna de sílica impregnada com KOH, apontam para a presença de grupos carboxílicos na estrutura das substâncias, pois a modificação com a inserção de metoxilas de ésteres atribuiu características apolar às substâncias, isso pode ser observado no aumento do fator de retenção das manchas analisadas por CCD e, conseqüentemente, o decréscimo de sua polaridade, quando comparado com àquelas não derivatizadas (figura 88) (WELLS, 1999).

No ano de 2010, (MIGOWSKA *et al.*, 2010) e colaboradores realizaram modificações estruturais em drogas farmacêuticas que, segundo os autores, elas representam concentrações significativas no que tange ao descarte desse material no meio ambiente. A alternativa para analisar o ibuprofeno, cetoprofeno e naproxeno nesse estudo foi transformá-los em ésteres metílicos empregando o agente de derivatização Trimetilsilildiazometano (TMSD). Desse modo, os autores optaram pela derivatização por TMSD e compararam com outros reagentes sendo eles: *N*-metil-*N*-[terc-butildimetil-silil] trifluoacetamida (MTBSTFA), *N*-*O*-bis(trimetilsilil)fluroacetamida (BSTFA) e trimetilclorosilano (TMSC) e, por último, como alternativa, o trifluoreto de boro em metanol. Através disso, concluíram que apesar de o TMSD apresentar-se como prejudicial à saúde humana e nocivo ao meio ambiente, obtiveram os derivados em ésteres metílicos de modo rápido e com produtos estáveis, desse mesmo modo foi observado na derivatização das resinas de *Protium* reproduzidas nesse trabalho (MIGOWSKA *et al.*, 2010).

Grupos funcionais de ácidos carboxílicos possuem afinidade com a fase estacionária devido à ligação de hidrogênio com os grupos silanóis, isso aumenta a retenção de substâncias ácidas na fase estacionária quando submetidas a processos cromatográficos. Por conta desse problema na separação de triterpenos das resinas de Burseraceae, a modificação de grupos acídicos em ésteres metílicos pode atribuir interação química distinta, possibilitando a separação de isômeros,

As substâncias obtidas através do fracionamento de *P. hebetatum* e *P. altsonii* foram derivatizadas por TMSD e comparadas por cromatografia em camada delgada que está ilustrada na figura 89.



Eluentes: Hex/DCM/AcOEt (6:2:4)
Revelador: EtOH sulfúrico (366nm)

Figura 89. Perfil cromatográfico das substâncias obtidas através do fracionamento de *P. hebetatum* e *P. altsonii*, antes e após a esterificação por TMSD. Legenda: **PA1** (mistura dos ácidos 3 α -hidroxitirucala-8,24-dien-21-oico e 3 α -hidroxitirucala-7,24-dien-21-oico), **PA2** (mistura dos ácidos 3-oxo-tirucala-8,24-dien-21-oico e 3 β -hidroxitirucala-8,24-dien-21-oico) e **PA4** (ácido 3 α -hidroxitirucala-7,24-dien-21-oico); **PH13** (mistura do ácido β -elemólico, α -elemólico e 3 α -hidroxitirucala-7,24-dien-21-oico). A letra “T” na legenda da descrição denota que a mesma substância foi esterificada com TMSD.

A análise da CCD da figura acima permite identificar uma única mancha azul no Rf 0,2 em PA1, porém quando esterificada por trimetilsilildiazometano (figura 89; amostra PA1T) observa-se a separação em quatro substâncias diferentes: primeira delas apresenta Rf 0,53 de cor lilás, a segunda é observada no Rf 0,45 de cor verde intensa e, por último a presença de duas substâncias de cor laranja no Rf 0,23 e 0,19.

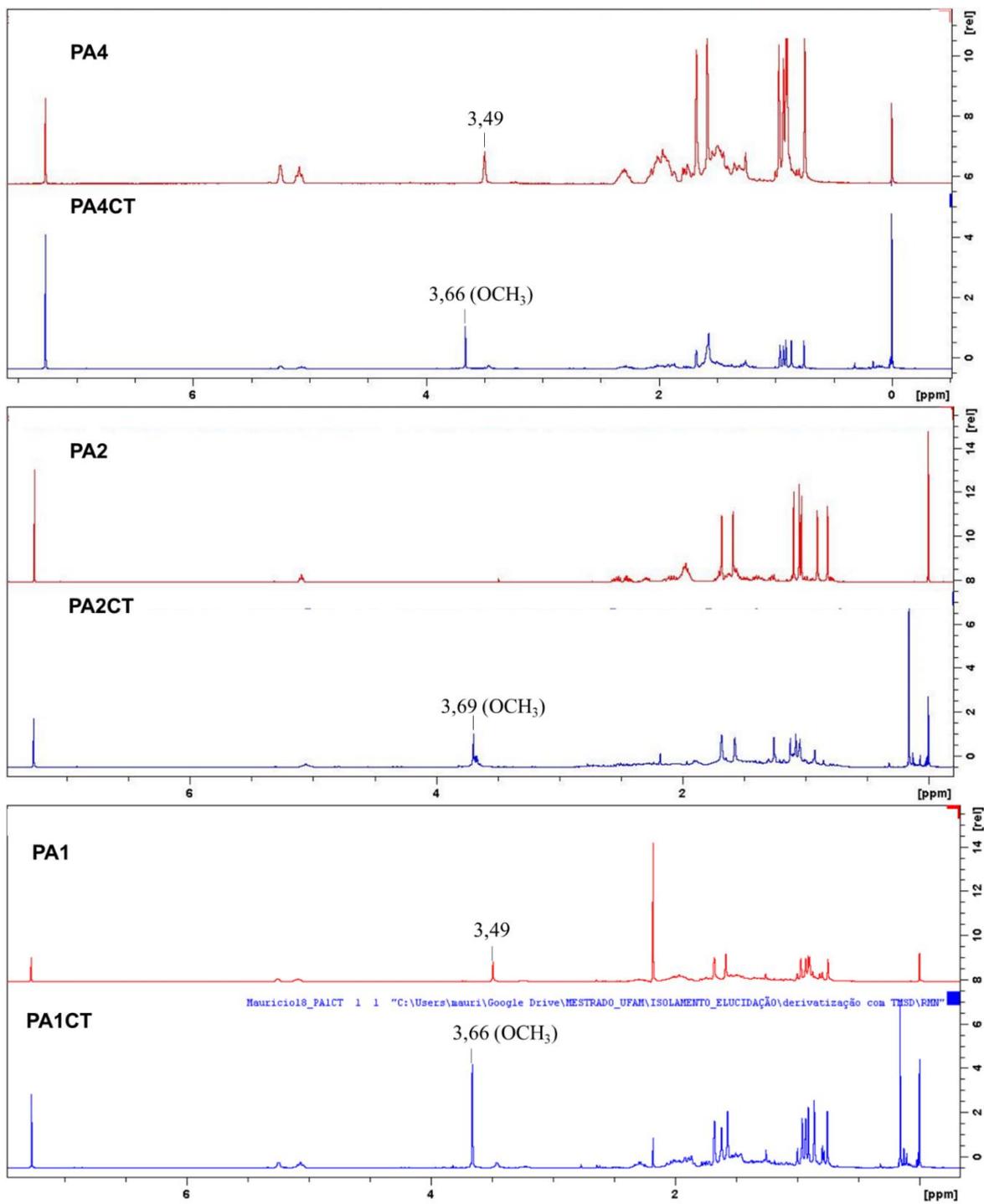
Na amostra denominada de PA2, identifica-se uma única mancha de cor laranja no Rf 0,35 que diz respeito à mistura dos ácidos 3-oxo-tirucala-8,24-dien-21-oico e 3 β -hidroxitirucala-8,24-dien-21-oico. Essas moléculas possuem dupla ligação em C-8, porém diferenciam-se apenas no grupo funcional em C-3. Mesmo possuindo estruturas similares, a modificação em ésteres metílicos (figura 89; amostra PA2T) possibilitou a separação efetiva entre as duas

moléculas. Com isso, observou-se uma mancha amarela no Rf 0,58 que pode ser sugestivo à substância que possui a função 3-oxo, outra de cor laranja no Rf 0,37 que pode ser referenciada ao triterpeno que possui hidroxila em C-3, isso porque a função carbonila apresenta menor polaridade em relação à diferença de potencial entre o hidrogênio e o oxigênio identificado como presente no ácido 3 β -hidroxitirucala-8,24-dien-21-oico.

Já a amostra PA4 foi isolada de *p. altsonii* e identificada como ácido 3 α -hidroxitirucala-7,24-dien-21-oico. Essa substância apresentou-se como uma mancha azul de Rf 0,19. Quando esterificada, foi observado o aumento do fator de retenção dessa molécula quando analisada por CCD, e observou-se uma única mancha de cor azul no Rf 0,52 (figura 89; amostra PA4T). Esses resultados podem ratificar a presença do isolamento de uma única molécula em PA4.

Por outro lado, o perfil da amostra denominada de PH13 (figura 89) observou-se a presença de sete manchas, porém a de cor amarela observada no Rf 0,37 e uma de cor azul no Rf 0,32 destacam-se. Essa mesma amostra quando esterificada (figura 89; amostra PH13T) apresentou perfil distinto e observou-se duas manchas próxima de Rf 0,63 e 0,58. O resultado da derivatização dessa amostra foi inconclusivo, e não foi possível identificar o aumento do fator de retenção das manchas majoritárias descritas anteriormente.

As substâncias obtidas do fracionamento de *P. altsonii* e *P. hebetatum* derivatizadas por TMSD, foram analisadas por RMN de ^1H com o intuito de confirmar o sinal característico de metoxila de éster (figura 90).



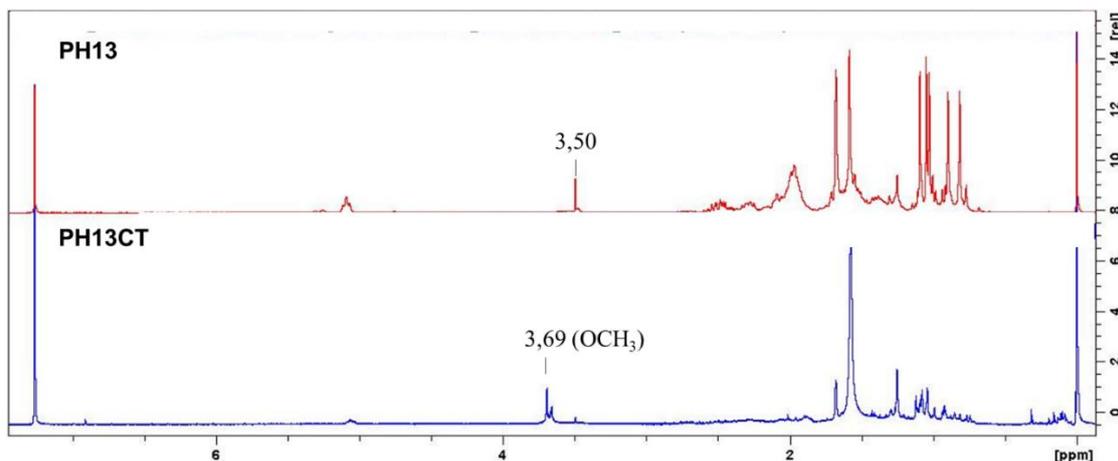


Figura 90. Espectro de RMN de ^1H de (PA1; PA2; PA4 e PH13) antes e após a derivatização por TMSD. Legenda: **PA1** (mistura dos ácidos 3α -hidroxitirucala-8,24-dien-21-oico e 3α -Hidroxitirucala-7,24-dien-21-oico), **PA2** (mistura dos ácidos 3 -oxo-tirucala-8,24-dien-21-oico e 3β -hidroxitirucala-8,24-dien-21-oico) e **PA4** (ácido 3α -hidroxitirucala-7,24-dien-21-oico); **PH13** (mistura do ácido β -elemólico, α -elemólico e 3α -hidroxitirucala-7,24-dien-21-oico). As letras “CT” adicionais na legenda da descrição denotam que a substância foi esterificada com TMSD.

Embora em muitos aspectos estruturais das substâncias mostradas acima cruze com o já discutido anteriormente na elucidação estrutural, o confronto dos espectros de RMN de ^1H caracteriza-se mais precisamente pela observação do grupo $-\text{OCH}_3$ presente em todas as moléculas esterificadas. Os sinais dos hidrogênios das metoxilas foram observados em δ 3,66 ppm. Pode-se discutir que os hidrogênios desse grupo funcional são desblindados pela eletronegatividade do oxigênio, isso faz com que o sinal referente aos ésteres entre em ressonância deslocando-se o sinal à esquerda do espectro de RMN ^1H .

Contudo, a premissa de derivatizar as frações ácidas em ésteres metílicos conferiram a redução da polaridade dos formulados, isso fez com que a diminuição da interação entre a função éster e os grupos silanóis da fase estacionária, promovessem uma efetiva separação entre as substâncias. Com isso, tornou-se estratégico a inserção de metoxilas de ésteres e, com isso, levar

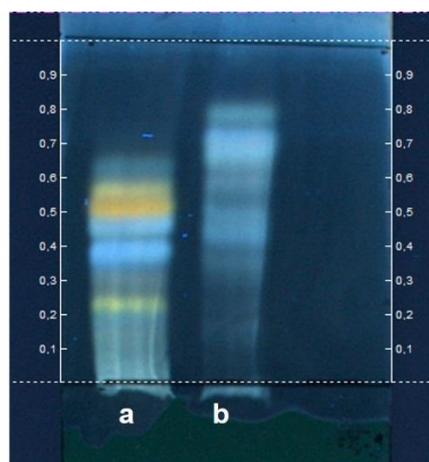
ao conhecimento de moléculas mais polares presentes nas fases ácidas de resinas de Burseraceae.

8.5 ESTERIFICAÇÃO DA FRAÇÃO ÁCIDA DE *P. strumossum* POR METODOLOGIA DE BANCADA.

Tendo a proposição de que a formulação de derivados metílicos promoveu uma efetiva separação entre as substâncias mais oxidadas, realizou-se a esterificação dos ácidos de *P. strumossum* por metodologia de bancada diferente do empregado pelo agente de derivatização trimetilsilildiazometano, isso porque esse reagente é explosivo em larga escala, além de ofensivo ao meio ambiente e à saúde humana (MIGOWSKA *et al.*, 2010).

Nesse aspecto, a alternativa de esterificar os ácidos terpênicos em escala maior, pode ser promissora na separação de substâncias polares de resinas de Burseraceae. Foi por esse motivo que os ácidos resinosos de *P. strumossum* foram modificados com eficiência de acordo com a metodologia de (JHAM *et al.*, 1982).. Para isso, realizaram-se estudos de bancada para a derivatização dos ácidos que consistiu em duas etapas: a primeira delas foi realizada um teste piloto utilizando ácido clorídrico em metanol como agente de derivatização. Já a segunda, utilizou-se a tentativa de esterificação empregando o AlCl_3 em metanol, metodologia análoga ao BF_3 que é comumente empregada na esterificação de terpenos.

A fração ácida de *P. strumossum* foi condicionada à esterificação por catálise ácida empregando ácido clorídrico em metanol (metodologia item 7.1). A figura 91 mostra o resultado comparando o perfil cromatográfico antes e após a reação de síntese.



Eluentes: Hex/DCM/AcOEt (6:2:4)
Revelador: Etanol Sulfúrico (366 nm)

Figura 91. Comparação do perfil cromatográfico antes e após a derivatização dos ácidos de *P. strumossum*. Legenda: em (a) fração ácida de *P. strumossum* não derivatizada; em (b) ésteres metílicos após derivatização por metodologia de bancada.

O rendimento da reação foi de 54% que é relativo à 18,7 mg da fração esterificada. O perfil cromatográfico mostrado na figura 91 sugere que os ácidos da espécie *P. estrumossum* foram esterificados devido ao aumento do fator de retenção observado na amostra “b”. Todas as manchas dessa fração apresentaram-se com a cor azul quando revelada em etanol sulfúrico e, ainda assim, observou-se a presença de rastros na placa que podem ser indicativo da interação das substâncias com a fase móvel. Em comparação com a fração não esterificada, a placa mostra uma mancha amarela de Rf 0,25 e, ainda assim, uma mancha de cor azul de Rf 0,19 (figura 91; amostra a). Pode-se constatar ainda, que na fração de ácidos duas manchas de cor amarela estão dispostas no Rf 0,5 e 0,55 e, desse modo, não foram identificadas após a derivatização por catálise ácida, podendo sugerir que a inserção de grupos metoxilas de ésteres podem modificar características das substâncias quando expostas à luz ultravioleta.

É importante discutir algumas informações a respeito do desenvolvimento experimental realizado nesta seção: o emprego de ácido clorídrico em metanol, a adição de água, o tempo e temperatura empregada.

A primeira delas está relacionada à adição HCl:MeOH (4:1 v/v). Esse atua como agente de derivatização no meio reacional, ligando-se ao carbono da carbonila. Deve-se mencionar também, a utilização da água no meio reacional pode ser sugestiva para o reestabelecimento da dupla ligação da carbonila presente na função éster.

A última delas, reporta-se ao tempo e temperatura empregada na reação. Com isso, o artigo publicado por Jham (1982) menciona que a temperatura de 100°C e o tempo de 20 minutos de reação são suficientes para promover a esterificação dos grupos carboxílicos. Por outro lado, produtos de degradação podem ser observados quando a temperatura passa a ser superior a 100°C.

A metodologia de derivatização descrita por (JHAM *et al.*, 1982) foi empregada em lipídeos. Essas moléculas possuem uma longa cadeia carbônica e um grupo carboxílico terminal livre. Diferentemente, os grupos ácidos de triterpenos pentacíclicos presentes nas resinas de breu são impedidos estericamente por átomos de carbono provenientes dos anéis D e E, isso pode dificultar a aproximação do grupo funcional com o agente de esterificação. Essas explicações podem ser sugestivas para o rendimento de 54 % obtido no experimento. Porém, o autor compara ao longo de seu artigo com o método de catálise ácida utilizando BF₃ em metanol, comumente empregado na esterificação de substâncias de elevada massa molecular. Além disso, reporta que o método de esterificação por HCl:MeOH tornou-se eficiente em seu estudo,

além de mencionar o baixo custo quando comparável com os resultados utilizando BF₃.

Com base nessas informações, a estratégia em formular derivados metílicos a partir dos ácidos carboxílicos, mostrou-se como uma metodologia simples e rápida. Além disso, o emprego de agentes menos tóxicos e o rendimento reacional significativo, tornaram-se razões suficientes para estabelecer essa metodologia na esterificação dos ácidos carboxílicos, e servir de estratégia na separação de substâncias mais polares presentes nas resinas de Burseraceae.

Tendo como objetivo principal desse trabalho separar as substâncias mais oxidadas, foi realizada previamente uma ampla reanálise dos ácidos de *P. strumossum* em placa, e isso permitiu sugerir que as manchas de menor Rf compreendiam aquelas que poderiam render novas substâncias ácidas. Partindo dessa premissa, um *clean up* da fração de ácidos de *P. strumossum* foi realizado com o intuito de purificar ainda mais a fração polar, uma vez que os ácidos hidroxilados e carbonilados já teriam sido isolados por trabalhos anteriores ao grupo de pesquisa. Então, a opção por encontrar as substâncias mais polares foi em realizar quatro vezes um *clean up* da fração de ácidos, e separar em treze frações em ordem crescente de polaridade.

No que diz respeito ao *clean up* da fração de ácidos de *P. strumossum*. Uma quantidade de 100 mg dessa amostra foi fracionada por cromatografia de sílica *flash*. O sistema de eluentes consistiu na mistura fixa de hexano e diclorometano (6:2), variando-se a proporção do terceiro solvente (metil-etil-cetona) em 10; 20 e 40%. Desse modo, após a retirada do volume morto, coletaram-se 4 frações de 20 mL por eluente e, ao final, utilizou-se MeOH 100%

para a limpeza da coluna. Esse mesmo fracionamento – empregando as mesmas condições- foi repetido 4 vezes com o objetivo de obter-se quantidade suficiente de material da fração metanólica para a formulação de derivados. Posteriormente, as frações similares foram reunidas e o resultado do fracionamento foi disposto no fluxograma da figura 92.

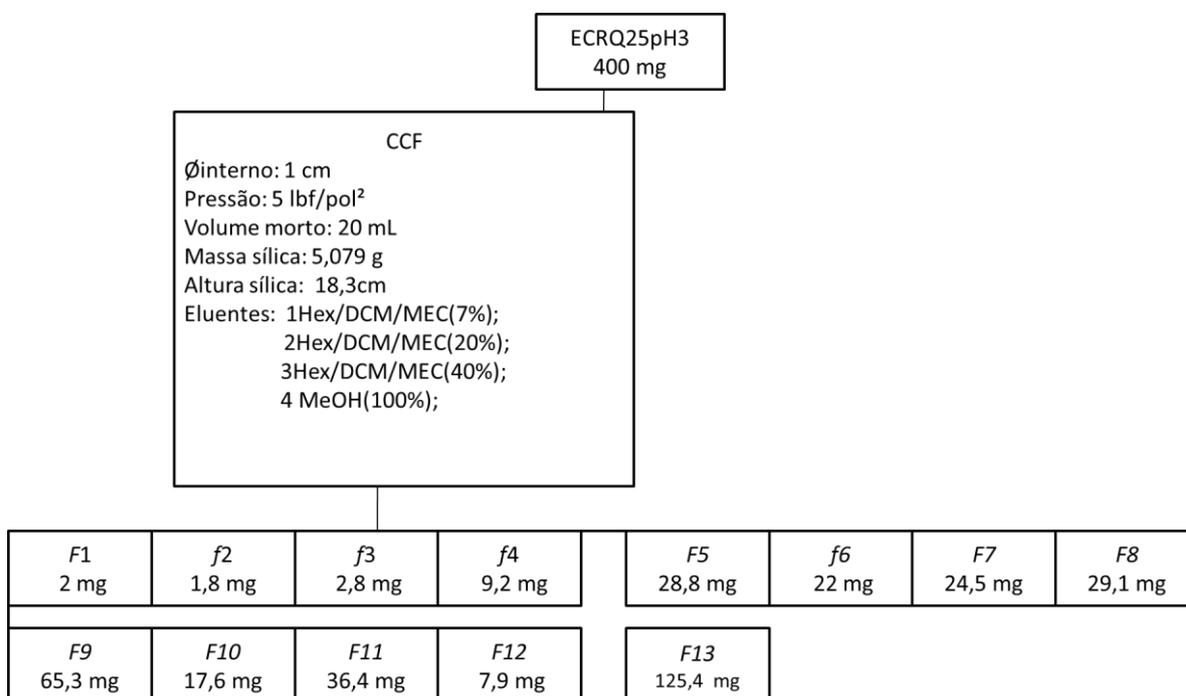
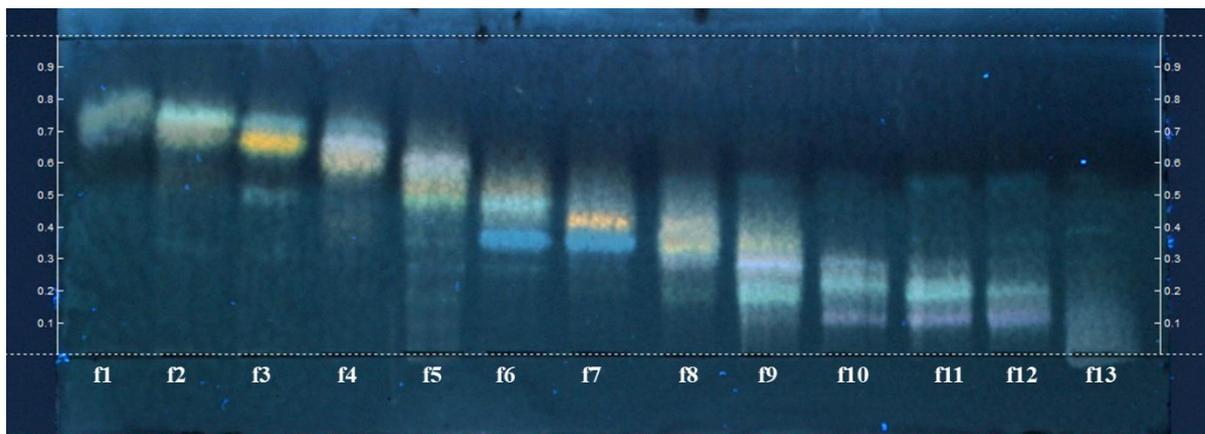


Figura 92. Fluxograma da coluna de fracionamento da fase ácida de *Protium strumosum* (ECRQ25PpH3).

O perfil cromatográfico da figura 93 permite observar que o fracionamento empregado, possibilitou uma efetiva separação entre as substâncias com polaridade crescente. A utilização da metil-etil-cetona como eluente foi baseada no estudo dos sistemas de solventes de acordo com o triângulo de Snyder e atua como solvente localizante (SNYDER, 1978). Além disso, não foi encontrado registro na literatura acerca da seletividade desse sistema na separação de triterpenos ácidos, sendo a primeira vez descrita nesse trabalho.

Desse modo, a CCD da figura 93 permite inferir que o *clen up* dos ácidos resinosos permitiu a separação das substâncias em três grupos: o de baixa

polaridade da fração f1 à f4, as de média polaridade que compreendeu as frações f5 à f9, e as de alta polaridade da fração f10 à f13.



Eluentes: Hex/DCM/MEC (6:2:4)
Revelador: EtOH sulfúrico. 366 nm

Figura 93. Perfil cromatográfico do fracionamento de *P. strumossum* (ECRQ25pH3) por cromatografia de sílica *flash*.

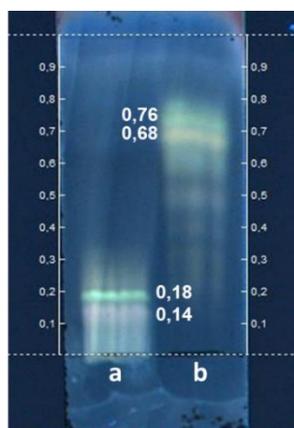
O primeiro grupo mostra a presença de uma mancha de cor amarela presente na fração f3 de Rf 0,69. Do mesmo modo, foi observada uma mancha lilás de Rf 0,68 presente na fração f4, além de um verde intenso identificado na mancha de Rf 0,78 na segunda fração. Essas observações em placa permitem prever que as manchas observadas dizem respeito àquelas substâncias ácidas menos polares, podendo apresentar carbonilas e hidroxilas em suas estruturas, que por esse motivo conferem baixa interação molecular com a fase estacionária promovendo o seu aumento no fator de retenção.

O segundo grupo do fracionamento relaciona as substâncias de média polaridade. Por conta disso, na fração f5 mostra a mistura de manchas de cor lilás, amarela e verde quando reveladas em etanol sulfúrico. Por outro lado, as frações f6 e f7 mostram similaridade com a presença de uma mancha de cor azul intensa de Rf 0,38. Dentre as frações obtidas nesse grupo, em f8 foi observada

a mistura de várias substâncias e, com isso, não foi possível indicar o fator de retenção.

Já o terceiro grupo sugere as frações mais polares dentre aquelas apresentadas, por conta de seu baixo fator de retenção quando analisado em placa. Nesse aspecto, todas as frações apresentaram-se com perfil cromatográfico similar apontando para a presença de substâncias de cor roxa de Rf 0,15 e um verde intenso no Rf 0,2. Dentre essas, a mais polar encontra-se em f13 devido à sua retenção na fase estacionária. Isso pode apontar para a presença de grupos ácidos e forte interações moleculares que promovem a retenção com a fase estacionária.

A separação entre as moléculas na fração 13 pode ser resolvida quando grupos doadores/retiradores de elétrons são inseridos na molécula (CECHINEL e YUNES, 1998). Por conseguinte, realizou-se a esterificação da partir da fração 13 obtida após o *clean up* de *P. strumossum*. Decorrente disso, o rendimento total da reação foi de 53,66% que corresponde à massa de 67,3 mg de substâncias esterificadas. A figura 94 mostra o perfil cromatográfico comparando a reação de síntese com a fração ácido de *P. strumossum*.



Eluentes: Hex/DCM/MEC (2,2:0,7:2)
Revelador: EtOH sulfúrico (366nm)

Figura 94. Perfil cromatográfico por CCD antes e após derivatização por HCl:MeOH da fração metanólica de *P. strumossum*. Legenda: Em (a) fração

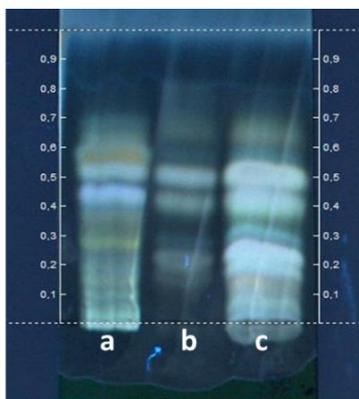
metanólica de *P. strumossum* antes da síntese em ésteres metílicos e (b) derivados metílicos após esterificação por HCl:MeOH.

A figura acima permite visualizar duas manchas presentes no Rf 0,14 e 0,18 (figura 94; amostra a). No perfil cromatográfico da amostra “b”, observou-se a diminuição da polaridade nas manchas de Rf 0,68 e 0,76. A diferença do fator de retenção antes e após a síntese sugere a efetiva transformação química a partir da catálise ácida.

Com isso, deve-se mencionar que a metodologia descrita por (JHAM *et al.*, 1982) sofreu modificações quando reproduzida nessa pesquisa. O agente de derivatização, responsável pela síntese química, compreendeu à adição de HCl:MeOH (4:1 v/v). Uma das etapas realizadas na metodologia corresponde à proporção desse reagente aplicado à síntese. O volume de reagente de esterificação foi duplicado para a obtenção de um maior rendimento da reação e isso tornou-se a etapa principal para a síntese efetiva de ésteres metílicos. Outro motivo para a escolha dessa metodologia foi o baixo tempo de reação (20 min) e a utilização de reagentes menos tóxicos (MeOH e H₂O) em comparação com o TMSD.

Além do método de derivatização apresentado nos parágrafos anteriores, a literatura menciona que o ácido de Lewis BF₃ é um agente de derivatização eficiente em moléculas de alta massa molecular. Visto isso, realizou-se outra reação- de metodologia diferente-, com a tentativa de aumentar o rendimento de derivados metílicos a partir dos ácidos resinosos. A indisponibilidade de BF₃ para a síntese levou à modificação da metodologia pelo uso do AlCl₃/MeOH, mesmo sendo um ácido de Lewis fraco.

Os experimentos para essa metodologia consistiram na adaptação do tempo reacional, temperatura a manutenção do sistema sob refluxo. A primeira delas foi realizada a síntese de 1 mg dos ácidos resinosos empregando 14% de $\text{AlCl}_3/\text{MeOH}$. Após realizado a síntese (metodologia item 7.2), as amostras foram avaliadas por cromatografia em camada delgada e dispostas na figura 95.



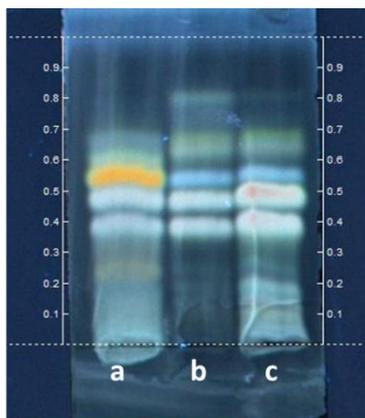
Eluentes: Hex/DCM/AcOEt (6:2:4)
Revelador: EtOH sulfúrico (366nm)

Figura 95. Derivatização das fases ácidas em ésteres metílicos através da reação com $\text{AlCl}_3/\text{MeOH}$ 14%. Legenda: (a) fase ácida de *P. strumossum*; (b) fase orgânica solúvel em *n*-hexano; (c) fase orgânica residual.

O resultado disposto na figura acima mostrou que não houve reação efetiva com o reagente e as condições experimentais empregadas, isso porque as manchas, após comparadas em placa, apresentaram o mesmo Rf. Além disso, a insolubilidade do cloreto de alumínio em metanol pode ter sido fator determinante para o rendimento final da reação apresentar-se inferior a 1%.

A segunda tentativa de derivatização empregando o ácido de Lewis foi prosseguida utilizando as mesmas condições experimentais, exceto no tempo de reação que foi de 60 minutos, temperatura de 100°C e utilizou-se um condensador com refluxo. Observou-se que após 30 minutos do percurso da reação parte do solvente foi evaporado e, com isso, foi observado o aparecimento de um resíduo com aspecto oleoso após o resfriamento. Esse

resíduo foi solubilizado em *n*-hexano e avaliado em placa, o perfil cromatográfico é mostrado na figura 96.



Eluentes: Hex/DCM/AcOEt (6:2:4)
Revelador: EtOH sulfúrico (366nm)

Figura 96. Derivatização das fases ácidas em ésteres metílicos através da reação com $\text{AlCl}_3/\text{MeOH}$ 14%. Legenda: (a) fase ácida de *P. strumossum* (b) fase orgânica solúvel em *n*-hexano; (c) fase orgânica residual.

A figura acima mostra que a fase orgânica solúvel em hexano não foi derivatizada, devido às manchas da amostra possuírem o mesmo fator de retenção que a fração de ácidos. Isso mostra que a catálise ácida empregando AlCl_3 não possuiu eficácia na esterificação de terpenos. Isso pode estar intimamente relacionada às condições experimentais utilizadas como o ambiente reacional empregado e as condições do reagente utilizado.

Portanto, a esterificação da fração ácida de *P. strumossum* utilizando o aumento de escala por metodologia de bancada, mostrou-se eficaz na síntese de substância polares das resinas de Burseraceae. Esse estudo tornou-se de guia para a estratégia em separar as substâncias mais polares das resinas de Burseraceae.

8.6 FRACIONAMENTO DOS ÉSTERES METÍLICOS DE *Protium strumossum* E IDENTIFICAÇÃO POR ESPECTOMETRIA DE MASSAS.

As substâncias esterificadas de *P. strumossum* por HCl:MeOH, foram separadas por meio do emprego da cromatografia por coluna de sílica *flash*. Para isso, utilizou-se como eluente a mistura de 100 mL de Hex/AcOEt (6:4) empregando o modo isocrático. Para o experimento, coletaram-se 40 frações de 2,5 mL incluindo o volume morto e, ao final, foi realizada a limpeza da coluna com 100 mL de metanol. As frações similares foram reunidas e as massas dispostas no fluxograma da figura 97.

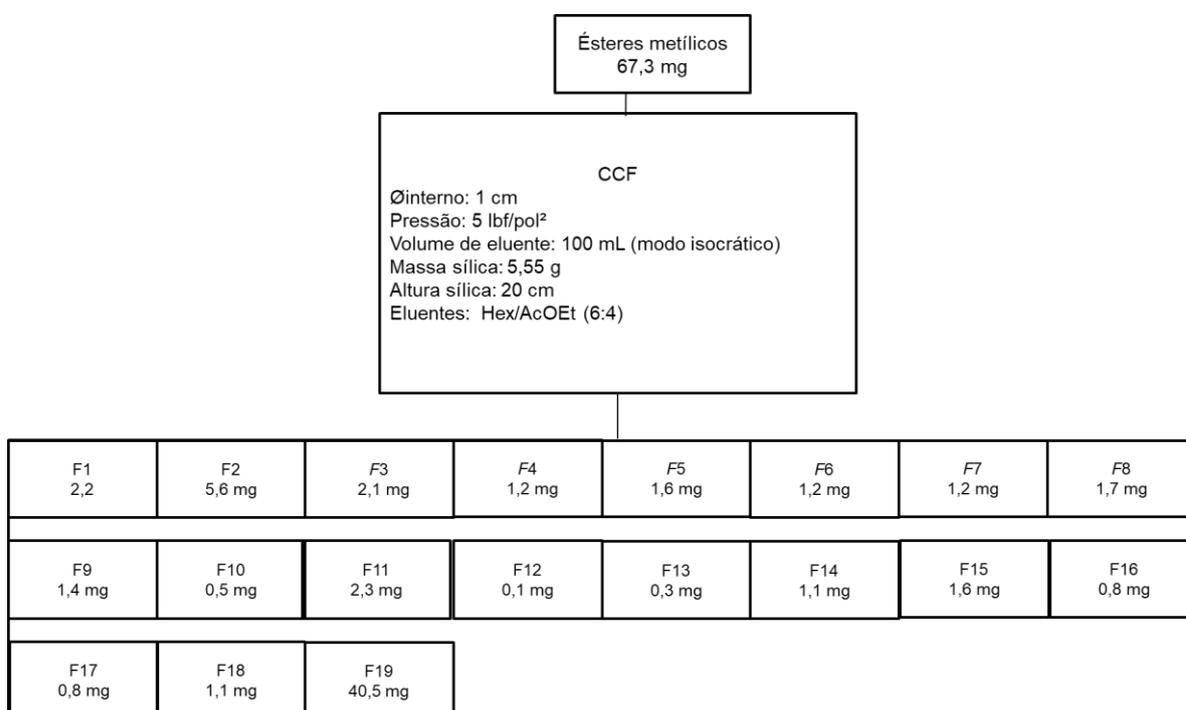


Figura 97. Fluxograma da coluna de isolamento de ésteres metílicos de *P. strumossum*.

O fluxograma disposto na figura 97, mostra que aproximadamente 60% das substâncias submetidas ao processo de fracionamento ficaram retidas na fase estacionária quando observada a massa da fração f-19 (40,5 mg), isso pode indicar afinidade química dessas moléculas com a sílica da fase estacionária.

As frações obtidas após o fracionamento por coluna foram dispostas na placa CCD (figura 98). O perfil das substâncias permite observar que a catálise ácida dos triterpenos proporcionou uma efetiva separação a partir de um sistema de solvente mais simples (Hex/AcOEt) em relação ao sistema ternário empregado aos ácidos resinosos (Hex/DCM/MEC).

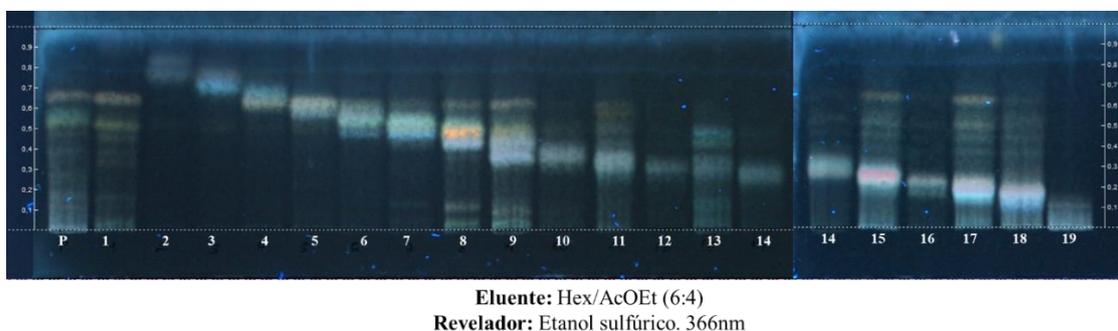


Figura 98. Perfil Químico da coluna de isolamento de ésteres metílicos por cromatografia por coluna de sílica *flash*. Legenda: P- fração esterificada de *P. strumossum*.

O comportamento das substâncias quando analisado na placa cromatográfica (figura 98), sugere perfis distintos com polaridade crescente. Todas as frações apresentaram-se com mistura de duas ou mais substâncias, exceto em f.10 e f.12 que indicaram apenas uma única mancha. Porém, a quantidade de amostra presente em ambas com 0,5 mg e 0,1 mg, respectivamente, são insuficientes para a obtenção de informações acerca de sua estrutura química.

A fração f.3 e f.4 mostraram semelhança na presença de uma mancha azul no Rf 0,7. Já nas frações f.4 e f.5 apresentaram uma mancha de cor marrom no Rf 0,7 quando revelada em etanol sulfúrico. De outro modo, a fração f.8 revelou-se diferente das demais amostras quando observado a única mancha de cor amarela presente no Rf 0,47.

Já o perfil cromatográfico das substâncias mais polares (menor Rf), revelou a presença de rastro na placa cromatográfica que pode indicar maior

interação dessas substâncias com a fase estacionária. Sendo assim, observou-se uma mancha intensa na amostra f.15 de Rf 0,29. Em contrapartida, na amostra denominada de f.19 observou-se uma mancha no Rf 0,1 livre de impurezas visíveis.

Após analisado o perfil cromatográfico dos derivados, as frações foram condicionadas à identificação do íon molecular por Espectrometria de Massas (fonte APCI e modo positivo $[M+H]^+$). Os resultados de todos dos espectros de massas mostraram-se inconclusivos porque não foi possível identificar o pico do íon molecular de maior intensidade, exceto nas frações 8, 6, 13 e 18.

A análise do espectro de massas da fração oito (figura 99) permitiu apontar o sinal proeminente do íon molecular em m/z 469 e perda de metila em m/z 455. Ainda assim, a perda de H_2O em m/z 439 e a metoxila em m/z 423 corroboram com os mesmo resultados de (SIANI *et al.*, 2012. De acordo com esse autor, esses sinais dizem respeito à mistura dos derivados metílicos de 3-oxo-hidroxitirucala-8,24-dien-21-oico, 3-hidroxitirucala-8,24-dien-21-oico (β -elemólico) e 3-hidroxitirucala- 7,24-dien-21-oico (α -elemólico). Sugere-se, desse modo, a presença dessas substâncias esterificadas a partir do método empregado por catálise ácida.

PS_Mauricio_20_02 #746-748 RT: 12,88-12,91 AV: 3 NL: 3,23E7
F: +c APCI Q1MS [100,000-1000,000]

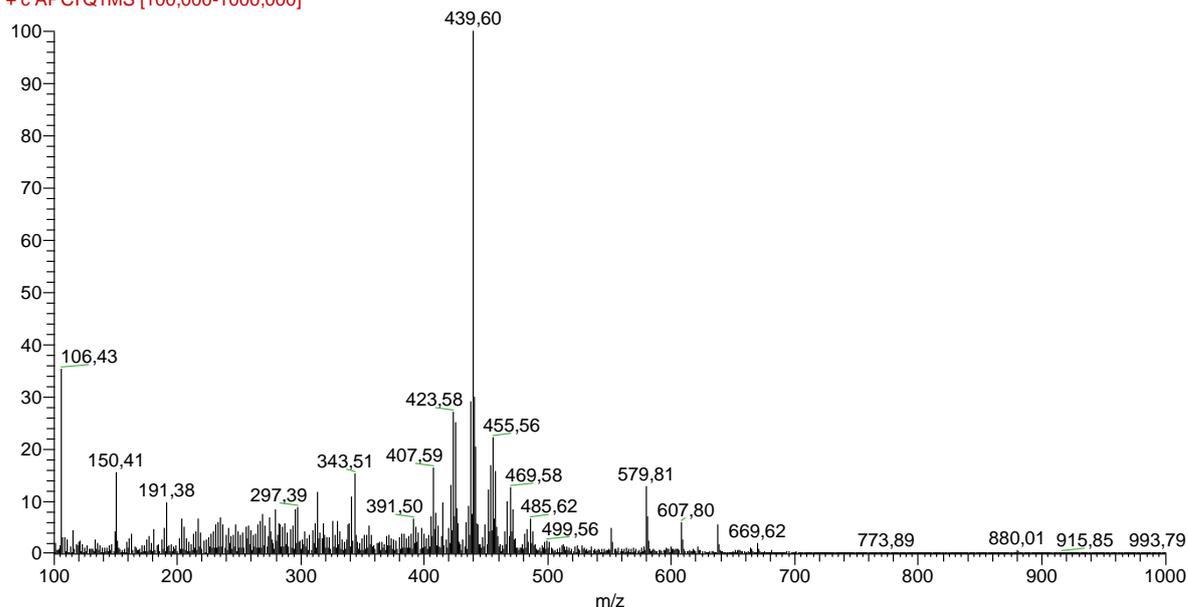


Figura 99. Espectro de massas obtido por APCI ($[M + H]^+$), da fração 8 mostrando o pico de maior intensidade em m/z 439,56.

Já a fração 6 mostra também a presença do sinal indicativo de perda de metila em m/z 455, além disso foi observado o sinal M^+ em m/z 512, que pode ser indicativo de derivado de 3-acetóxi do ácido elemólico (figura 100).

PS_Mauricio_20_02 #842-844 RT: 14,53-14,57 AV: 3 NL: 6,73E6
F: +c APCI Q1MS [100,000-1000,000]

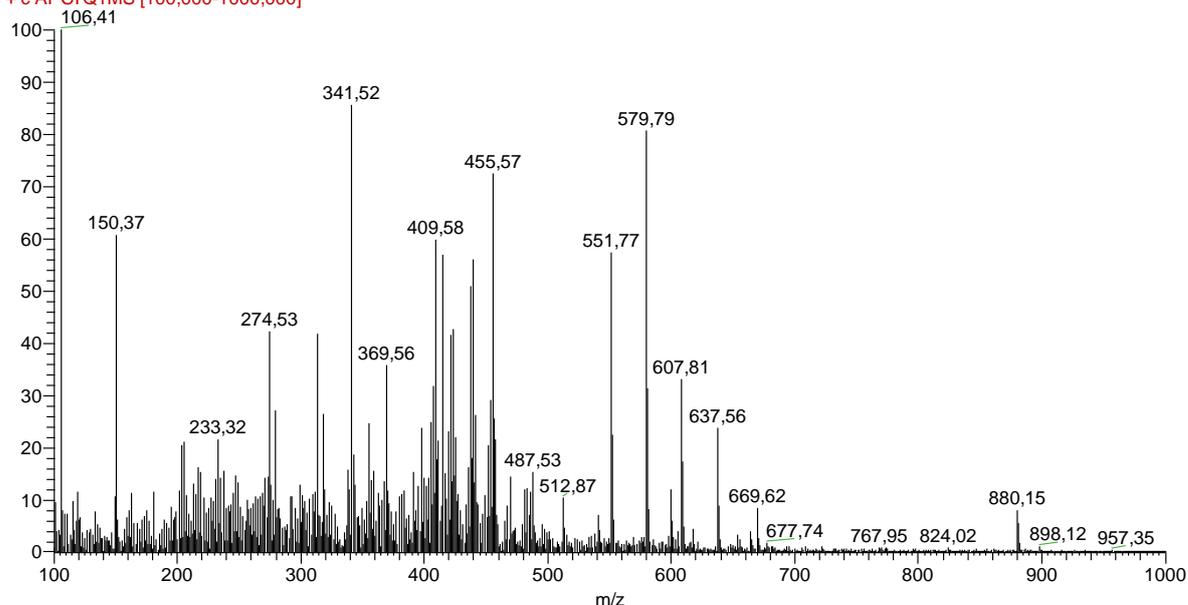


Figura 100. Espectro de massas obtido por APCI ($[M + H]^+$) da fração 6 mostrando o pico em 512 m/z sugestivo ao 3-acetóxi.

O derivado do ácido elemólico foi identificado na análise por CG-EM das resinas de *Pistacia lentiscus* Var. *chia* (família Anacardiaceae), árvore exclusiva encontrada na Grécia (ASSIMOPOULOU e PAPAGEORGIU, 2005). A mesma substância foi identificada nas resinas de *P. altsonii* Sandwith, *P. hebetatum* Daly, *P. heptaphyllum* (Aubl) March e *P. icariba* March através do trabalho desenvolvido por (SIANI *et al.*, 2012). De fórmula molecular $C_{33}H_{52}O_4$, o 3 α -acetóxi-tirucala-8,24-dien-oico possui íon molecular em m/z 512 $[M]^+$ e fragmentações em 497, 229 e 241 (figura 101) segundo os dados sugeridos por (ASSIMOPOULOU e PAPAGEORGIU, 2005).

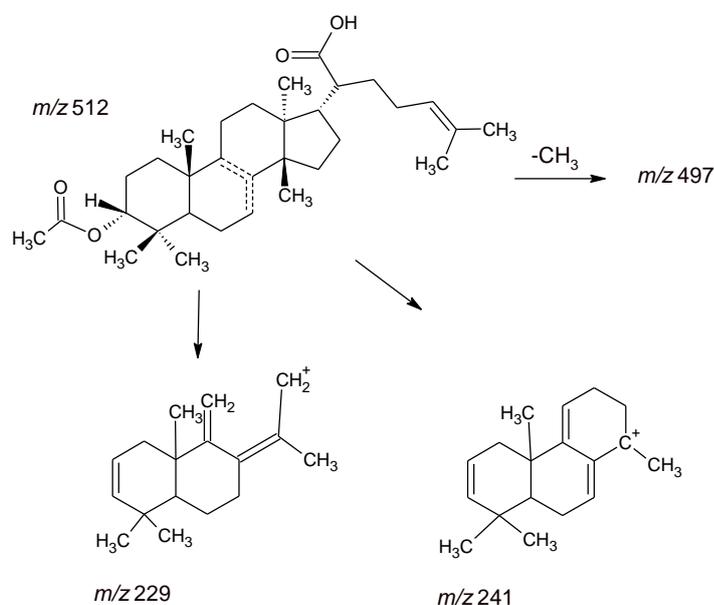


Figura 101. Fragmentos do derivado elemólico 3 α -acetóxi-tirucala-8,24-dien-óico (ASSIMOPOULOU e PAPAGEORGIU, 2005).

O espectro de massas da fração 13 (figura 102), observou-se o sinal de maior intensidade em m/z 439. Identificou-se a presença dos íons em m/z 425, 407 e 455. Já os sinais em m/z 191 e 313 indicam informações importantes quando se diz respeito à sua estrutura.

PS_Mauricio_20_02 #472-473 RT: 8,14-8,16 AV: 2 NL: 1,27E7
 F: + c APCI Q1MS [100,000-1000,000]

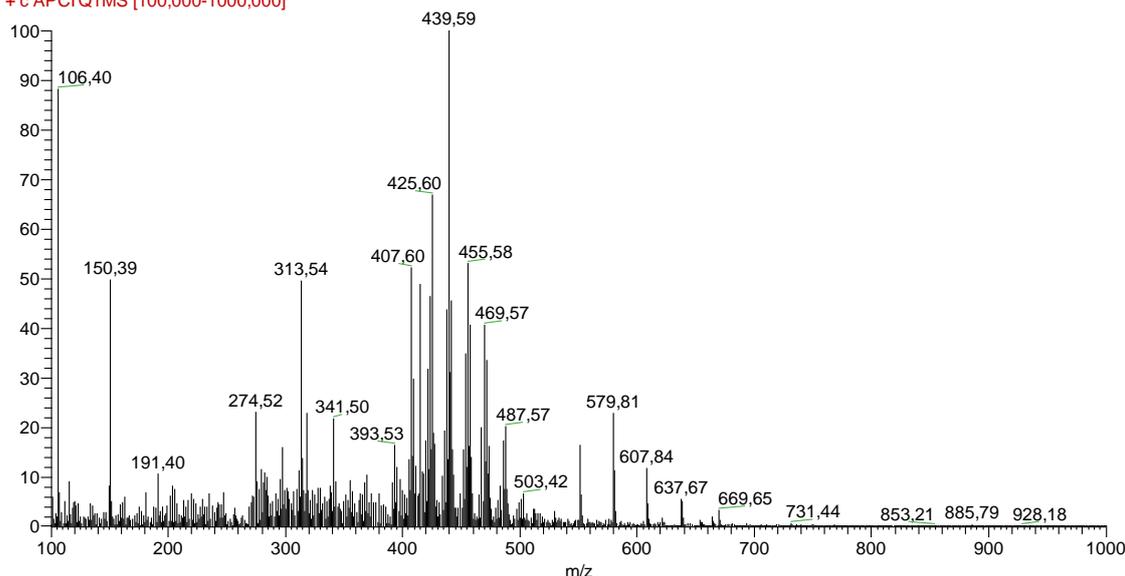


Figura 102. Espectro de massas obtido por APCI ($[M + H]^+$) da fração 13 mostrando a perda da cadeia lateral em m/z 313.

O fragmento de m/z 313 observado no espectro de massas, ilustrado na figura 103, pode estar relacionado com a perda da cadeia lateral do esqueleto do tipo tirucalano como reportado por (SIANI *et al.*, 2012). De acordo com esse autor, esse sinal é mais pronunciado ao isômero com a dupla ligação em C-7.

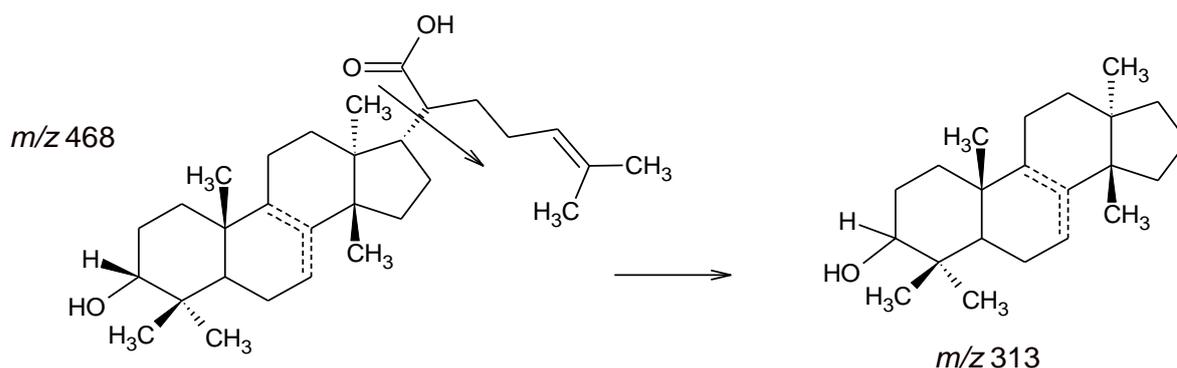


Figura 103. Esqueleto do tipo tirucalano sugerindo a perda da cadeia lateral pela presença do íon m/z 313.

O trabalho de (SANCHEZ-AVILA *et al.*, 2009) identificou triterpenos pentacíclicos através da cromatografia líquida, após a extração por micro-ondas. Por conta disso, mostraram que o íon precursor em m/z 439 está relacionado ao ácido ursólico, oleanólico e betulínico que, submetendo-os à colisão de 10 eV

resultaram no íon m/z 191, que foi também observado na fração 13. Por conseguinte, os autores sugeriram a fragmentação do esqueleto do tipo oleanano e ursano. Essas moléculas possuem a presença da dupla ligação em C-12, e geram como fragmentos o íon m/z 203 relacionado a perda do anel D e E, bem como o fragmento em m/z 191 que representa o sinal relativo aos fragmentos dos anéis A e B (figura 104).

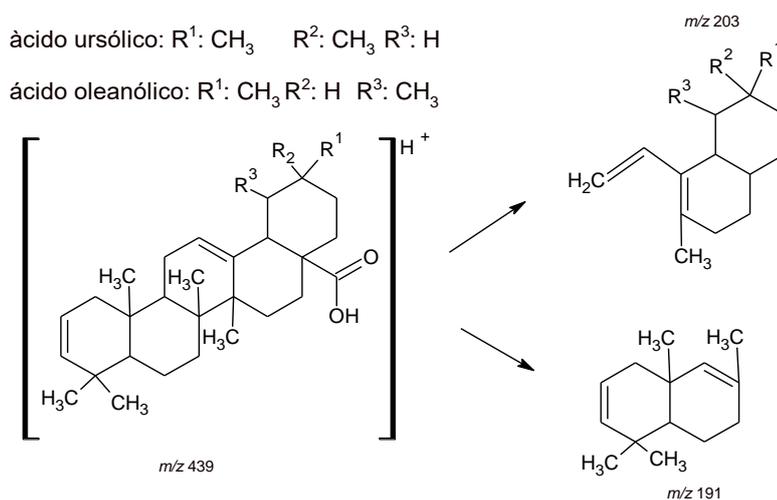


Figura 104. Principais fragmentos do ácido ursólico e oleanólico sugerido por (Sanchez-Avila *et al.*, 2009).

O resultado observado no espectro de massas da fração 18 (figura 105), suporta a sugestão do éster metílico após comparação dos resultados de (OLMO-GARCIA *et al.*, 2016) quando observado o íon molecular em m/z 485. Esse autor sugeriu experimentalmente a massa m/z 471 referente ao triterpeno ácido. Essa substância possui o esqueleto do tipo oleanano e, em m/z 471 a presença do íon molecular $[M+H]^+$ com a perda da carboxila em m/z 409 $[M-H_2O-COO]^+$ sugerindo que os sinais tratam-se dos análogos metilados ao ácidos ursólico e oleanólico.

PS_Mauricio_20_02 #153-156 RT: 2,63-2,68 AV: 4 NL: 1,02E7
 F: +c APCI Q1MS [100,000-1000,000]

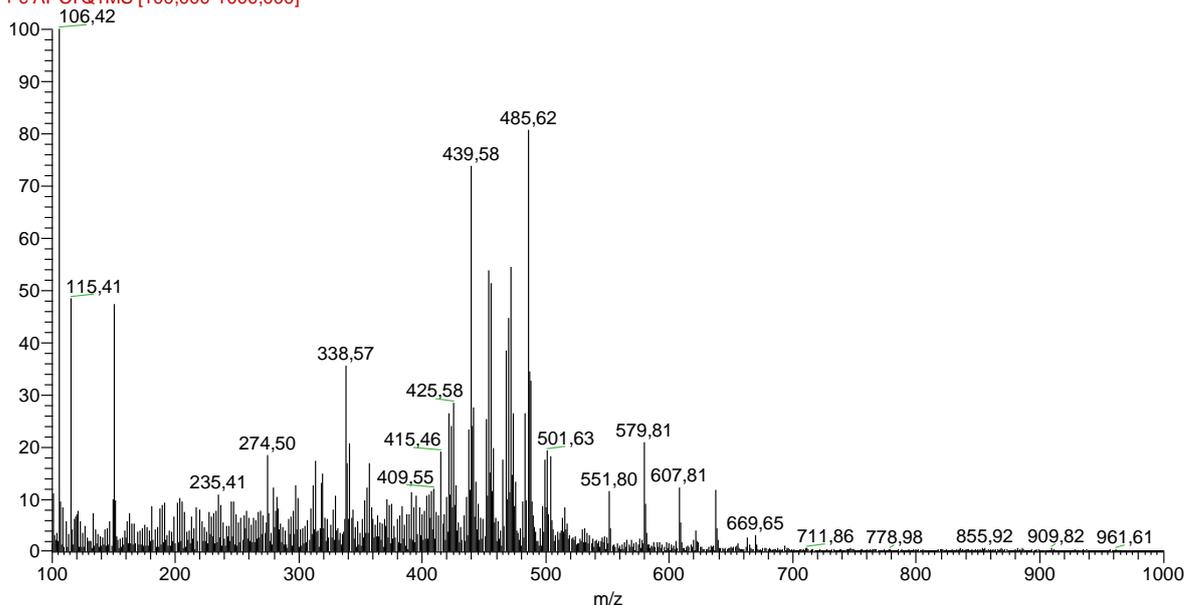


Figura 105. Espectro de massas obtido por APCI ($[M + H]^+$) da fração 18.

Esqueleto do tipo oleanano possui insaturação no carbono C-12. Esse triterpeno pode apresentar oxigenação nos carbonos em C-2 e C-3, além do grupo carboxílico em C-29. É importante descrever essas características porque a perda da hidroxila em C-2 gera o íon molecular em m/z 409 (SANCHEZ-AVILA *et al.*, 2009).. Esse mesmo sinal foi observado na fração 18 apresentado no espectro de massas da figura 105.

De fórmula molecular $C_{30}H_{47}O_4$, o ácido manslínico foi identificado por APCI-QTOF no modo positivo por (SANCHEZ-AVILA *et al.*, 2009. O autor sugeriu ainda a presença do sinal m/z 203 referente à fragmentação dos anéis D e E. Por conseguinte, o sinal em m/z 189 pode estar relacionado ao fragmento do anel A e B (figura 106). Não se pode afirmar que o ácido descrito acima está presente nas resinas de *p. strumossum*, porém pode-se apontar a presença do esqueleto do tipo oleanano e a metoxila de éster em m/z 485 observada na fração 18 quando comparado com dos dados de (SANCHEZ-GONZALEZ *et al.*, 2013; OLMO-GARCIA *et al.*, 2016).

ácido manslínico: R¹: CH₃ R²: CH₃ R³: H

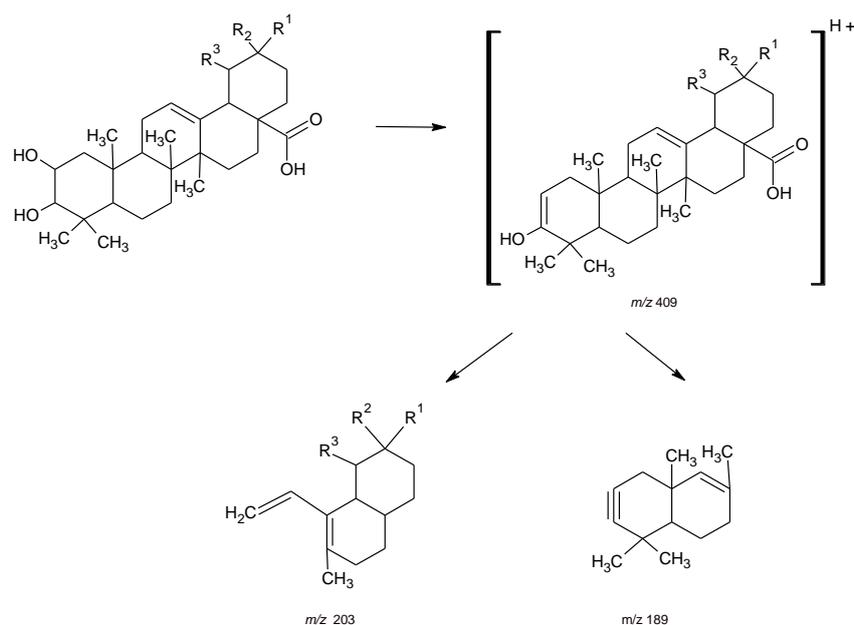


Figura 106. Fragmentos do ácido manslínico mostrando os íons em m/z 409, 203 e 189.

Em diferentes aspectos as substâncias químicas modificam-se quando submetidas à metilação. A modificação estrutural dos ácidos em ésteres metílicos, permite a redução de seu ponto de ebulição, que é comumente empregada na análise moléculas não voláteis promovendo a separação de isômeros (SIANI *et al.*, 2012).

O artigo publicado em 2005 por Vieira Júnior e colaboradores, avaliaram as propriedades térmicas de triterpenos isolados de *Protium heptaphyllum*, e mostraram que nas análises termogravimétricas, quando empregadas temperaturas elevadas, houveram perdas de massa e degradação das substâncias após metiladas por metanol sulfúrico e acetiladas por anidrido acético (VIEIRA *et al.*, 2005). Por esse motivo, nas análises por EM utilizando a fonte APCI, não se observou a presença do íon *Quasi* molecular $[M+H]^+$, mas um sinal intenso indicativo de perda de água $[M+H-H_2O]^+$. Esses mesmos resultados foram observados no trabalho de (NICOLAUS *et al.*, 2016) quando analisou

triterpenos metílicos de flores de *Calendula officinalis*. Em contrapartida, esses autores resolveram a sensibilidade submetendo as substâncias à análise por APCI-QTOF-MS, que permitiu a identificação de misturas complexas de triterpenos diésteres e monoésteres.

A comparação dos picos dos íons moleculares das frações obtidas após a formulação de derivados, sugere a presença de esqueletos tetracíclicos e pentacíclicos. Além disso, mostra a efetiva derivatização dos ácidos triterpênicos pelo método estabelecido. Esses resultados dão suporte para predizer a presença de ésteres metílicos formulados por catálise ácida, abrindo novas perspectivas para a separação triterpenos ácidos presente nas espécies de Burseraceae com o aumento de escala.

9. CONSIDERAÇÕES FINAIS

1. O estudo fitoquímico dos constituintes polares das resinas de Burseraceae, levou ao isolamento e à identificação dos triterpenos ácidos de esqueleto do tipo tirucalano e eufano.
2. A metodologia realizada por cromatografia de sílica impregnada com hidróxido de potássio, apresentou-se eficaz na concentração dos ácidos triterpênicos.
3. Da espécie *protium altsonii* foram identificadas as misturas dos ácidos 3 α -hidroxitirucala- 7,24-dien- 21-oico e 3 β -hidroxitirucala-8,24-dien-21-oico em PA1 e PA2. Na amostra denominada de PA4 foi isolado o esqueleto do tipo tirucalano e denominado de ácido 3 α -hidroxitirucala-7,24-dien- 21-óico.
4. Da espécie *protium hebetatum* foi identificado a misturas de três ácidos sendo eles: β -elemólico, α -elemólico e 3 α -hidroxitirucala- 7,24-dien- 21-oico. O sistema de solventes empregado (Hex/DCM/MEC) mostrou-se eficaz na seletividade das substâncias descritas em Burseraceae.
5. As modificações estruturais das frações polares e metodologia elaborada para o aumento de escala, mostraram-se eficaz para a separação das substâncias polares, que diz respeito ao objetivo estabelecido nesse trabalho.
6. A formulação de derivados através da catálise ácida empregando ácido clorídrico em metanol, mostrou-se com rendimento de 53,66% em *P. strumossum*.

7. A análise por Espectrometria de Massas sugeriu a presença de sinais característicos de ésteres metílicos após comparado com dados da literatura.

Além desses aspectos, o estudo fitoquímico das resinas de breu vem adicionar informações à literatura científica, buscando explorar o potencial das substâncias nas formulações de derivados. Contudo, a perspectiva futura é sugerida a identificação das substâncias modificadas estruturalmente e realizar testes biológicos por parceiros farmacológicos especialistas.

10. REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

AKIHISA, T., TABATA, K., BANNO, N. Cancer chemopreventive effects and cytotoxic activities of the triterpene acids from the resin of *Boswellia carteri*. *Biol. Pharm. Bull.*, v. 29, n. 9, p. 1976-1979, // 2006. ISSN 0918-6158.

ALI, H.; HOUGHTON, P. J.; SOUMYANATH, A. α -Amylase inhibitory activity of some Malaysian plants used to treat diabetes; with particular reference to *Phyllanthus amarus*. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 107, n. 3, p. 449-455, 2006.

ANANDJIWALA, S.; KALOLA, J.; RAJANI, M. Quantification of eugenol, luteolin, ursolic acid, and oleanolic acid in black (Krishna tulsai) and green (Sri tulsai) varieties of *Ocimum sanctum* Linn. using high-performance thin-layer chromatography. *Journal of Aoac International*, v. 89, n. 6, p. 1467-1474, Nov-Dec 2006. ISSN 1060-3271.

ASSIMOPOULOU, A. N.; PAPAGEORGIU, V. P. GC-MS analysis of penta- and tetra-cyclic triterpenes from resins of *Pistacia* species. Part I. *Pistacia lentiscus* var. Chia. *Biomed. Chromatogr.*, v. 19, n. 4, p. 285-311, // 2005. ISSN 0269-3879.

BANDEIRA, P. N. Obtenção de derivados da mistura triterpenoídica α - e β -amirina. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, 1Universidade Estadual Vale do Acaraú, Secretaria de Ciências e Tecnologia, Av. da Universidade, 850, Betânia,, v. 17, n. 2, p. 204-208, março 21 2007.

BORGATI, T. F. Synthesis by Click Reactions and Antiplasmodial Activity of Lupeol 1,2,3-Triazole Derivatives. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 28, n. 10, p. 1850-1856, Oct 2017. ISSN 0103-5053.

BORKOVA, L.; HODON, J.; URBAN, M. Synthesis of Betulinic Acid Derivatives with Modified A-Rings and their Application as Potential Drug Candidates. **Asian Journal of Organic Chemistry**, v. 7, n. 8, p. 1542-1560, 2018.

BHATTI, H. N.; KHERA, R. A. Biotransformations of diterpenoids and triterpenoids: a review. **Journal of Asian Natural Products Research**, v. 16, n. 1, p. 70-104, Jan 2014. ISSN 1028-6020.

BUDZIKIEWICZ, H.; WILSON, J. M.; DJERASSI, C. Mass spectrometry in structural and stereochemical problems. XXXII. Pentacyclic triterpenes. **J. Am. Chem. Soc.**, v. 85, n. 22, p. 3688-99, // 1963. ISSN 0002-7863.

BĘBENEK, E. Novel triazoles of 3-acetylbetulin and betulone as anticancer agents. **Medicinal Chemistry Research**, v. 27, n. 9, p. 2051-2061, 2018.

CECHINEL, V.; YUNES, R. A. Strategies for obtaining pharmacologically active compounds from medicinal plants. Concepts about structural modification for improve the activity. **Quimica Nova**, v. 21, n. 1, p. 99-105, Jan-Feb 1998. ISSN 0100-4042.

CERT, A.; MOREDA, W. New method of stationary phase preparation for silver ion column chromatography: Application to the isolation of steroidal hydrocarbons in vegetable oils. **J. Chromatogr. A**, v. 823, n. 1 + 2, p. 291-297, // 1998. ISSN 0021-9673.

CHEN, X. Q. Triterpenoids and diterpenoids from *Viburnum chingii*. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v. 59, n. 4, p. 496-498, 2011.

COSTA, A. F. (1975). *Farmacognosia (Vol.1)*. Lisboa: Fundacao Calouste Gulbenkian.

DIAS, M. O.; HAMERSKI, L.; PINTO, A. C. Semi-preparative separation of α - and β -amyrin by high performance liquid chromatographic. **Quim. Nova**, v. 34, n. 4, p. 704-706, // 2011. ISSN 0100-4042.

FERREIRA, R. G. S. Physicochemical characterization and biological activities of the triterpenic mixture α, β -amyrenone. **Molecules**, v. 22, n. 2, p. 298/1-298/9, // 2017. ISSN 1420-3049.

GREVE, H. L. Terpenoids from the Oleo-Gum-Resin of *Boswellia serrata* and Their Antiplasmodial Effects In Vitro. **Planta Med.**, v. 83, n. 14/15, p. 1214-1226, // 2017. ISSN 0032-0943.

GUIMARÃES, A. C.; SIANI, A. C. Triterpenos das folhas de *Protium strumosum*. *Revista Fitos*, v.3, n.1, p.67-76, 2007.

HAN, X. Design, synthesis and biological activity evaluation of novel conjugated sialic acid and pentacyclic triterpene derivatives as anti-influenza entry inhibitors. **MedChemComm**, v. 7, n. 10, p. 1932-1945, 2016.

HORWITZ, S. B. How to make taxol from scratch. **Nature**, v. 367, n. 6464, p. 593-594, 1994.

JENNEWEIN, S.; CROTEAU, R. Taxol: biosynthesis, molecular genetics, and biotechnological applications. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 57, n. 1-2, p. 13-19, Oct 2001.

JHAM, G. N.; TELES, F. F. F.; CAMPOS, L. G. USE OF AQUEOUS HCl/MEOH AS ESTERIFICATION REAGENT FOR ANALYSIS OF FATTY-ACIDS DERIVED FROM SOYBEAN LIPIDS. **Journal of the American Oil Chemists Society**, v. 59, n. 3, p. 132-133, 1982 1982..

JOHNSON, A. R.; VITHA, M. F. Chromatographic selectivity triangles. **J. Chromatogr. A**, v. 1218, n. 4, p. 556-586.

KARLINER, J.; DJERASSI, C. Mass spectrometry in structural and stereochemical problems. CV. Terpenoids. 57. Mass spectral and nuclear magnetic resonance studies of pentacyclic triterpene hydrocarbons. **J. Org. Chem.**, v. 31, n. 6, p. 1945-56.

KHALID, S. A. CHEMISTRY OF THE BURSERACEAE. **Phytochemistry**, v. 22, n. 1, p. 11-11, 1983 1983. ISSN 0031-9422.

KHWAZA, V.; OYEDEJI, O. O.; ADERIBIGBE, B. A. Antiviral activities of oleanolic acid and its analogues.2018. **Molecules**, v. 23, n. 9.

KIRBY, J.; KEASLING, J. D. Biosynthesis of Plant Isoprenoids: Perspectives for Microbial Engineering. In: (Ed.). **Annual Review of Plant Biology**. Palo Alto: Annual Reviews, v.60, 2009. p.335-355. (Annual Review of Plant Biology).

LANGENHEIM, J. H. (2003). Plant Resins: Chemistry, Evolution and Ethobotany. Portland, OR: Timber Press, Inc.

LI, Y.-C. A new hexacyclic triterpene acid from the roots of *Euscaphis japonica* and its inhibitory activity on triglyceride accumulation. **Fitoterapia**, v. 109, p. 261-265.

Lima, K. F., Batista, M. J. N., Schmal, B., & Schmal, P. (2011). Manual of Good Practices in Non-Lumber Forest Management (56 p.). Silves, AM: Associação Vida Verde da Amazônia AVIVE.

LIMA, M.P., CASTRO, F.B.G., SILVA, M.F.G.F., FERREIRA, A.G., FO, E.R., FERNANDES, J.B. AND VIEIRA, P.C. Phytochemistry of *Crepidospermum rhoifolium*, *Tetragastris altissima*, *Protium icicariba* and *P. apiculatum*: chemisystematics implications. Revista Latino americana de Química, v.29, n.3, p.135-144, 2001.

LIU, W. One single standard substance for the simultaneous determination of 17 triterpenes in *Ganoderma lingzhi* and its related species using high-performance liquid chromatography. **J. Chromatogr. B: Anal. Technol. Biomed. Life Sci.**, v. 1068-1069, p. 49-55.

MAIA, R. M. et al. Triterpenos da resina de *Protium heptaphyllum* march (burseraceae): caracterização em misturas binárias. São Paulo. 23: 623-626 p. 2000.

MANGURO, L. O. A.; WAGAI, S. O. Ursane and tirucallane-type triterpenes of *Boswellia rivae* oleo-gum resin. **Journal of Asian Natural Products Research**, v. 18, n. 9, p. 854-864, 2016.

MARTINS BEZERRA CARVALHO, K. M. The Resin from *Protium heptaphyllum* Prevents High-Fat Diet-Induced Obesity in Mice: Scientific Evidence and Potential Mechanisms. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, 2015 2015. ISSN 1741-427X.

MIGOWSKA, N. Trimethylsilyldiazomethane (TMSD) as a new derivatization reagent for trace analysis of selected non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) by gas chromatography methods. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 397, n. 7, p. 3029-3034, Aug 2010.

MORA, A. J. 3 alpha-Hydroxytirucalla-7,24-dien-21-oic acid: a triterpene from *Protium crenatum* Sandwith. **Acta Crystallographica Section C-Crystal Structure Communications**, v. 57, p. 638-640, May 2001.

NICOLAUS, C. Mastering analytical challenges for the characterization of pentacyclic triterpene mono- and diesters of *Calendula officinalis* flowers by non-aqueous C30 HPLC and hyphenation with APCI-QTOF-MS. **J. Pharm. Biomed. Anal.**, v. 118, p. 195-205, // 2016.

NIE, R. L. A triterpenoid saponin from *Thladiantha hookeri* var. *pentadactyla*. **Phytochemistry**, v. 28, n. 6, p. 1711-1715, 1989.

OLMO-GARCIA, L. Evaluating the potential of LC coupled to three alternative detection systems (ESI-IT, APCI-TOF and DAD) for the targeted determination of triterpenic acids and dialcohols in olive tissues. **Talanta**, v. 150, p. 355-366, // 2016. ISSN 0039-9140.

PATTNAIK, B. Synthesis of ring-C modified oleanolic acid derivatives and their cytotoxic evaluation. **Bioorganic Chemistry**, v. 68, p. 152-158, 2016.

PAVIA, D. L., LAMPMAN, G. L., KRIZ, G. S., VYVYAN, J. R., Introdução à Espectroscopia. tradução da 5ª Edição Norte americana, 2015. 733 p. Título original: Introduction to Spectroscopy.

PINTO, A. C. Separation of acid diterpenes of *Copaifera cearensis* Huber ex Ducke by flash chromatography using potassium hydroxide impregnated silica gel. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 11, n. 4, p. 355-360, Jul-Aug 2000.

PLOWDEN, J. C., 2001. The ecology, management and marketing of non-timber forest products in the Alto Rio Guamá Indigenous Reserve (Eastern Brazilian Amazon). PhD dissertation, Pennsylvania State University, State College.

RALI, S. Semisynthesis of derivatives of oleanolic acid from *Syzygium aromaticum* and their antinociceptive and anti-inflammatory properties. *Mediators of Inflammation*, v. 2016, 2016.

RHOORRI-FRIH, B. Analysis of pentacyclic triterpenes by LC-MS. A comparative study between APCI and APPI. *J. Mass Spectrom.*, v. 44, n. 1, p. 71-80, // 2009. ISSN 1076-5174.

RIBEIRO, J. E. L.; DALY, D. C. Flora da reserva Ducke: Guia de identificação das plantas vasculares de uma floresta de terra firme na Amazônia Central. In: (Ed.). *Flora da Reserva Ducke: guia de identificação das plantas vasculares de uma floresta de terra-firme na Amazônia Central*. Manaus: INPA-DFID, 1999. p.534-543.

RIOS, J. L.; MANEZ, S. New Pharmacological Opportunities for Betulinic Acid. **Planta Med.**, v. 84, n. 1, p. 8-19, // 2018. ISSN 0032-0943.

ROBLES, J. Triterpenes isolated from the bark of *Bursera graveolens* (Burseraceae) and their biological activity. **Rev. Bras. Farmacogn.**, v. 15, n. 4, p. 283-286, // 2005. ISSN 0102-695X.

RODRIGUES DA SILVA, E. . Report on the Malungo expedition to the Erepecuru river, Oriximina´, Brazil. Part I: is there a difference between black and white breu? **Rev. Bras. Farmacogn.**, v. 26, n. 5, p. 647-656, // 2016. ISSN 0102-695X.

RUDIGER, A. L.; SIANI, A. C.; VEIGA, V. F., JR. The chemistry and pharmacology of the South America genus *Protium* Burm. f. (Burseraceae). **Pharmacogn. Rev.**, v. 1, n. 1, p. 93-104.

RUEDIGER, A. L.; VEIGA-JUNIOR, V. F. Chemodiversity of Ursane- and Oleanane-Type Triterpenes in Amazonian Burseraceae Oleoresins. **Chem. Biodiversity**, v. 10, n. 6, p. 1142-1153.

RÜDIGER, A. L., Estudo fitoquímico do oleoressina exsudado de espécies de Burseraceae. 2008. Dissertação (Mestrado em Química) - Instituto de Ciências Exatas, Universidade Federal do Amazonas, Amazonas, 2008.

SALMON, M. A conserved amino acid residue critical for product and substrate specificity in plant triterpene synthases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 113, n. 30, p. E4407-E4414, Jul 26 2016.

SANCHEZ-AVILA, N. Fast and selective determination of triterpenic compounds in olive leaves by liquid chromatography-tandem mass spectrometry with multiple reaction monitoring after microwave-assisted extraction. *Talanta*, v. 78, n. 1, p. 40-48. 2009.

SANCHEZ-GONZALEZ, M. Liquid chromatography-mass spectrometry determination in plasma of maslinic acid, a bioactive compound from *Olea europaea* L. **Food Chemistry**, v. 141, n. 4, p. 4375-4381. 2013.

SIANI, A. C. Chemical Composition of South American Burseraceae Non-volatile Oleoresins and Preliminary Solubility Assessment of their Commercial Blend. 2012. **Phytochemical Analysis**, v. 23, n. 5, p. 529-539.

SIANI, A. C., MORAES, R., & VEIGA JUNIOR, V. F. (2017). Toward Establishing the Productive Chain for Triterpene-Based Amazonian Oleoresins as Valuable Non-Timber Forest Products. *Open Journal of Forestry*, 7, 188-208.

SIANI, A. C., RAMOS, M. S. F., LIMA, O. M., Evaluation of anti-inflammatory-related activity of essential oils from the leaves and resin of species of *Protium*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 66, n. 1, p. 57-69, Jul 1999.

SILVA, J. R. D. Analysis of the Hexane Extracts From Seven Oleoresins of *Protium* Species. **Journal of Essential Oil Research**, v. 21, n. 4, p. 305-308, Jul-Aug 2009. ISSN 1041-2905.

SILVA, M. D. L. E. Bioactive Oleanane, Lupane and Ursane Triterpene Acid Derivatives. *Molecules*, v. 17, n. 10, p. 12197-12205, Oct 2012. ISSN 1420-3049.

SILVERSTEIN, R. M., WEBSTER, X. F., KIEMLE, D. J., Identificação Espectrométrica de Compostos Orgânicos. 7ª Edição. 530 p. ISBN-10: 8521615213.

SNYDER, L. R. Classification of the solvent properties of common liquids. *J. Chromatogr. Sci.*, v. 16, n. 6, p. 223-34.

SOLIMAN, H. S. M. A new gypsogenin saponin from *Arenaria filicaulis*. *J. Nat. Prod.*, v. 62, n. 6, p. 885-888.

STILL, W. C.; KAHN, M.; MITRA, A. RAPID CHROMATOGRAPHIC TECHNIQUE FOR PREPARATIVE SEPARATIONS WITH MODERATE RESOLUTION. *Journal of Organic Chemistry*, v. 43, n. 14, p. 2923-2925.

SWIEBODA, R. Thin layer chromatography and chemometric studies of selected *Potentilla* species. *Am. J. Anal. Chem.*, v. 5, n. 16, p. 1109-1120, // 2014.

TABATA, H. Production of paclitaxel and the related taxanes by cell suspension cultures of *Taxus* species. *Current Drug Targets*, v. 7, n. 4, p. 453-461, Apr 2006.

THULIN, M.; BEIER, B. A.; RAZAFIMANDIMBISON, S. G.; BANKS, H. I. *Ambilobea*, a new genus from Madagascar, the position of *Aucoumea*, and comments on the tribal classification of the frankincense and myrrh family (Burseraceae). *Nordic Journal of Botany*, v.26, n.3-4, p.218-229, 2008.

UNDP (2012). Equator Initiative Case Studies: Green Life Association of Amazonia (AVIVE), Brazil. <https://pt.scribd.com/document/180224601/Case-Studies-UNDP-GREEN-LIFE-ASSOCIATION-OF-AMAZONIA-AVIVE-Brazil>.

USUBILLAGA, A.; KHOURI, N. B., ALI A, A., Rojas, L. B. Triterpenes from the resin of *Protium crenatum* Sandwith. *Rev. Latinoam. Quim.*, v. 32, n. 3, p. 101-108.

VIEIRA, G. M.; DE SOUZA, C. M. L.; CHAVES, M. H. The *Protium heptaphyllum* resin: Isolation, structural characterization and evaluation of thermal properties. *Quimica Nova*, v. 28, n. 2, p. 183-187, Mar-Apr 2005.

WEEKS, A.; DALY, D. C.; SIMPSON, B. B. The phylogenetic history and biogeography of the frankincense and myrrh family (Burseraceae) based on nuclear and chloroplast sequence data. *Mol. Phylogenet. Evol.*, v. 35, n. 1, p. 85-101.

WELLS, R. J. Recent advances in non-silylation derivatization techniques for gas chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 843, n. 1-2, p. 1-18, May 28 1999.

WOJCIAK-KOSIOR, M. Separation and determination of closely related triterpenic acids by high performance thin-layer chromatography after iodine derivatization. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 45, n. 2, p. 337-340, Oct 18 2007.

WOZNIAK, L. Novel Method for HPLC Analysis of Triterpenic Acids Using 9-Anthryldiazomethane Derivatization and Fluorescence Detection. *Chromatographia*, v. 80, n. 10, p. 1527-1533.

XU, C. Techniques for the analysis of pentacyclic triterpenoids in medicinal plants. **Journal of Separation Science**, v. 41, n. 1, p. 6-19, Jan 2018. ISSN 1615-9306.

XU, R.; FAZIO, G. C.; MATSUDA, S. P. T. On the origins of triterpenoid skeletal diversity. *Phytochemistry*, v. 65, n. 3, p. 261-291.

YAN, M. Anti-inflammatory secondary metabolites from the leaves of *Rosa laevigata*. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, v. 21, n. 11, p. 3290-3297, 2013.

ZHANG, W.; MEN, X.; LEI, P. Review on anti-tumor effect of triterpene acid compounds. *Journal of Cancer Research and Therapeutics*, v. 10, n. 5, p. 14-19, Aug 2014. ISSN 0973-1482.

ZHU, Y. M. SHEN, J. K., WANG, H. K., COSENTINO, L., MARK L, K. H. Synthesis and anti-HIV activity of oleanolic acid derivatives. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, v. 11, n. 24, p. 3115-3118, 2001.

ZUNIGA, R. M.; SAMPAIO, P. T. B.; VEIGA JUNIOR, V. F. Use of ethephon in the extraction of resin in two species of *Protium* Burm f. and evaluation of its effect on hexane extract composition in *Protium strumosum* Daly. *Journal of Essential Oil Research*, v. 29, n. 5, p. 361-366, 2017 2017.