



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

**AVALIAÇÃO DAS PROPRIEDADES BIOLÓGICAS DOS
DERIVADOS SINTÉTICOS DO β -SITOSTEROL E
TRITERPENOS**

RAULDENIS ALMEIDA FONSECA SANTOS

**Salvador, Bahia
2010**

RAULDENIS ALMEIDA FONSECA SANTOS

**AVALIAÇÃO DAS PROPRIEDADES BIOLÓGICAS DOS
DERIVADOS SINTÉTICOS DO β -SITOSTEROL E
TRITERPENOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal da Bahia, como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Química.

Orientador: Prof. Dr. Jorge Maurício David.

**Salvador, Bahia
2010**

"O homem, criatura viva e criador individual, é sempre mais importante do que qualquer estabelecido estilo ou sistema."
(Bruce Lee)

“Todas as batalhas na vida servem para ensinar-nos algo, inclusive aquelas que perdemos.”
(Paulo Coelho)

Dedico este trabalho para todas as pessoas que colaboraram direta ou indiretamente (através de ajuda, palavras encorajadoras, amizade, paciência,...) para a concretização desse sonho.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof^o. DSc. Jorge Maurício David, pela orientação e pela incrível paciência.

A Prof^a. DSc. Juceni Pereira David, pelo apoio e por permitir o uso do laboratório de Farmácia.

Ao Programa de Pós-graduação em Química da Universidade Federal da Bahia pelo espaço físico.

A CAPES pela concessão da bolsa de estudos.

Aos Professores de graduação que marcaram a minha formação profissional e pessoal: Reinaldo da S. Gramacho, Neurivaldo J. de G. Filho, Edson J. Wartha, Marcelo Pimentel e a Raildo Mota de Jesus pelo seu fundamental apoio e conselhos, sem o qual não completaria esse trabalho.

A todos os colegas de laboratório de produtos naturais (GPPN): Bruno Moreira, Larissa Cavalcante, Darlan Coutinho, Clayton Queiroz, José Candido, Prof. Jéferson, Érika Ribeiro, Roberta, Patrícia, Cida, Manuela.

A Luciano Lima pela amizade e fundamental colaboração no trabalho.

Aos ex-colegas de residência: Airam Oliveira, João Victor e Robson Mota pelo companheirismo, amizade, curtições e resenhas.

Aos técnicos e estudantes que realizaram os espectros de RMN e EM, Prof. Edson (UFAL) e Adalberto (UFBA).

RESUMO

O presente trabalho descreve a obtenção de derivados esterificados a partir do β -sitosterol e dos ácidos ursólico, betulínico, oleanólico, além do lupeol, bem como alguns testes bioquímicos desenvolvidos com os derivados. Os triterpenos foram isolados das partes aéreas de *Eriope blanchetti* (Lamiaceae), fornecendo os ácidos ursólico (**2**), betulínico (**3**) e oleanólico (**4**). Em seguida, o β -sitosterol e os triterpenos foram submetidos à esterificação com anidrido acético, benzóico, propiônico, butírico e succínico, além de cloreto de 3-clorobenzoíla e cloreto cinâmico, obtendo-se assim 16 derivados químicos, que tiveram suas estruturas elucidadas através de dados de RMN e IV. Os derivados foram submetidos a ensaios para avaliar suas atividades biológicas (frente às larvas de *Artemia salina* e inibição da enzima acetilcolinesterase). No teste de letalidade frente á larvas de *Artemia salina*, a maioria dos derivados, incluindo os reagentes, foram considerados inativos e, 3 β -formestigmast-5-eno (**1d**) ($LC_{50}=221,3\mu\text{g/mL}$), 3 β -3-clorobenzoxestigmast-5-eno (**1g**) ($LC_{50}=889,7\mu\text{g/mL}$), *trans*-cinamato de estigmast-5-eno (**1h**) ($LC_{50}=721,6\mu\text{g/mL}$), ácido 3 β -(3-clorobenzoil) oleanólico (**4a**) ($LC_{50}=477,2\mu\text{g/mL}$) e 3 β -(3-clorobenzoil) lupeol (**5a**) ($LC_{50}=797,8\mu\text{g/mL}$), foram considerados moderadamente ativos. O composto mais citotóxico foi o ácido 3 β -(3-clorobenzoil) betulínico (**3a**) ($LC_{50}=117,1\mu\text{g/mL}$). No teste qualitativo de atividade anticolinesterásica, a substância 3 β -clorobenzoxestigmast-5-eno (**1g**) mostrou atividade inibitória. É digno de nota que o ácido 3 β -(3-clorobenzoil) ursólico (**2e**) e 3 β -(3-clorobenzoil) lupeol (**5a**) estão sendo descritos neste trabalho pela primeira vez.

Palavras-chave: β -sitosterol, triterpenos, esterificação, letalidade frente á *Artemia salina*.

ABSTRACT

This work describes the synthesis of esterified derivatives of sitosterol, ursolic, betulinic and oleanolic acids as well as lupeol and, the determination of their cytotoxicity (brine shrimp test) and AchE inhibition effects. The triterpenes were isolated from the aerial parts of *Eriope blanchetti* (Lamiaceae) furnishing the triterpene acids. Besides all the compounds were submitted to esterification reactions employing acetic, benzoic, propionic, butyric and succinic anhydrides as well as 3-chlorobenzoil and cinnamoil chlorides. These procedures permitted to obtain 16 derivatives and their structures were elucidated by IR and NMR techniques. The 3 β -formistigmast-5-ene (**1d**) (LC₅₀=221,3 μ g/mL), 3 β -3-clorobenzoxistigmast-5-ene (**1g**) (LC₅₀=889,7 μ g/mL), *trans*-cinamat of stigmast-5-ene (**1h**) (LC₅₀=721,6 μ g/mL), acid 3 β -(3-clorobenzoil) oleanolic (**4a**) (LC₅₀=477,2 μ g/mL) e 3 β -(3-clorobenzoil) lupeol (**5a**) (LC₅₀=797,8 μ g/mL) showed moderate activities in the Brine Shrimp Test (*Artemia salina*) and acid 3 β -(3-clorobenzoil) betulinic (**3a**) (LC₅₀=117,1 μ g/mL) was the most active. By the other side, 3 β -clorobenzoxistigmast-5-ene (**1g**) was the unique derivative which showed inhibition of the AchE. This is the first time the derivates acid 3 β -(3-clorobenzoil) ursolic (**2e**) and 3 β -(3-clorobenzoil) lupeol (**5a**) is being described.

Keywords: β -sitosterol, triterpens, esterification, lethality in the brine shrimp.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Anel ciclopentanoperidrofenantrênico, numeração convencional e designação dos anéis do sistema cíclico dos esteróides.....	21
Figura 2: Exemplos de colesterol, esteróis e estanois vegetais e suas diferenças.....	22
Figura 3: Exemplos de Fitoesteróis com variação da cadeia lateral e no padrão de insaturação.....	23
Figura 4: Condensação das unidades de acetil-CoA até a formação do isopreno ativo.....	25
Figura 5: Formação do esqualeno.....	26
Figura 6: Sistemas dos anéis básicos das séries 5 α e 5 β dos esteróides.....	27
Figura 7: Estrutura química do β -sitosterol (1).....	29
Figura 8: Estrutura do Isopreno.....	30
Figura 9: Alguns esqueletos carbônico dos triterpenos e suas classes.....	32
Figura 10: Diferenças na formação dos esteróides e triterpenos.....	33
Figura 11: Estrutura química do ácido ursólico (2).....	34
Figura 12: Estrutura química do ácido betulínico (3).....	35
Figura 13: Estrutura química do ácido oleanólico (4).....	36
Figura 14: Naupliis de <i>Artemia salina</i>	37
Figura 15: Exsicata da espécie botânica <i>Eriope blanchetti</i> (Lamiaceae).....	41
Figura 16: Foto de um espécimen de <i>E. blanchetti</i> (Parque Restinga da Lagoa do Abaeté, foto Hugo N. Brandão).....	41
Figura 17: Reação de esterificação do β -Sitosterol com diferentes anidridos.....	44
Figura 18: Reação de formilação.....	48
Figura 19: Reação de esterificação usando cloreto de acila.....	49
Figura 20: Preparo do <i>trans</i> -cinamato de estigmast-5-eno (1h).....	50
Figura 21: Reação de esterificação do ácido ursólico com diferentes anidridos.....	52
Figura 22: Reações de esterificação usando cloreto de acila no preparo de: ácidos 3 β -(3-clorobenzoil)ursólico (2e) 3 β -(3-clorobenzoil)betulínico (3a), 3 β -(3-clorobenzoil)oleanólico (4a) e 3 β -(3-clorobenzoil)lupeol (5a).....	56
Figura 23: Espectro de ^1H do β -sitosterol (1) e do estigmasterol (6) [300 MHz, CDCl_3 , δ (ppm)].....	61
Figura 24: Espectro de ^1H do ácido betulínico (3) [300 MHz, piridina- d_5 , δ (ppm)].....	62
Figura 25: Espectro de ^{13}C do ácido betulínico (3) [75 MHz, piridina- d_5 , δ (ppm)].....	63

Figura 26: Espectro de ^1H do ácido oleanóico (4) [300 MHz, piridina- d_5 , $\delta(\text{ppm})$]	64
Figura 27: Espectro de RMN de ^{13}C do ácido oleanóico (4) [75 MHz, piridina- d_5 , $\delta(\text{ppm})$]	65
Figura 28: Mecanismo de síntese dos derivados esterificados com anidridos	67
Figura 29: Mecanismo de síntese do 3 β -formestigmast-5-eno (1d)	68
Figura 30: Espectro de ^1H do 3 β -acetoxistigmast-5-eno (1a) [300 MHz, CDCl_3 , $\delta(\text{ppm})$]	69
Figura 31: Espectro de ^{13}C do 3 β -acetoxestigmast-5-eno (1a) [300 MHz, CDCl_3 , $\delta(\text{ppm})$]	70
Figura 32: Espectro no IV do 3 β -acetoxestigmast-5-eno (1a)	70
Figura 33: Espectro de ^1H do 3 β -propoxestigmast-5-eno (1b) [300 MHz, CDCl_3 , $\delta(\text{ppm})$]	71
Figura 34: Espectro de ^{13}C do 3 β -propoxestigmast-5-eno (1b) [300 MHz, CDCl_3 , $\delta(\text{ppm})$]	72
Figura 35: Espectro no IV do 3 β -propoxestigmast-5-eno (1b)	72
Figura 36: Espectro de ^1H do 3 β -butoxestigmast-5-eno (1c) [300 MHz, CDCl_3 , $\delta(\text{ppm})$]	73
Figura 37: Espectro de ^{13}C do 3 β -butoxestigmast-5-eno (1c) [300 MHz, CDCl_3 , $\delta(\text{ppm})$]	74
Figura 38: Espectro no IV do 3 β -butoxestigmast-5-eno (1c)	74
Figura 39: Espectro de ^1H do 3 β -formestigmast-5-eno (1d) [400 MHz, CDCl_3 , $\delta(\text{ppm})$]	75
Figura 40: Espectro no IV do 3 β -formestigmast-5-eno (1d)	75
Figura 41: Espectro de ^1H do 3 β -carboxisuccinatoxestigmast-5-eno (1e) [300 MHz, CDCl_3 , $\delta(\text{ppm})$]	76
Figura 42: Espectro de ^{13}C do 3 β -carboxisuccinatoxestigmast-5-eno (1e) [300 MHz, CDCl_3 , $\delta(\text{ppm})$]	77
Figura 43: Espectro no IV do 3 β -carboxisuccinatoxestigmast-5-eno (1e)	77
Figura 44: Espectro de ^1H do 3 β -benzoxestigmast-5-eno (1f) [300 MHz, CDCl_3 , $\delta(\text{ppm})$]	78
Figura 45: Espectro de ^{13}C do 3 β -benzoxestigmast-5-eno (1f) [300 MHz, CDCl_3 , $\delta(\text{ppm})$]	79
Figura 46: Espectro no IV do 3 β -benzoxestigmast-5-eno (1f)	79
Figura 47: Espectro de ^1H do 3 β -clorobenzoxestigmast-5-eno (1g) [400 MHz, CDCl_3 , $\delta(\text{ppm})$]	80
Figura 48: Espectro no IV do 3 β -clorobenzoxestigmast-5-eno (1g)	80
Figura 49: Espectro de ^1H do <i>trans</i> -cinamato de estigmast-5-eno (1h) [300 MHz, CDCl_3 , $\delta(\text{ppm})$]	83
Figura 50: Espectro de ^{13}C do <i>trans</i> -cinamato de estigmast-5-eno (1h) [300 MHz, CDCl_3 , $\delta(\text{ppm})$]	82
Figura 51: Espectro no IV do Ácido 3 β -acetilursólico (2a)	85

Figura 52: Espectro de ^1H do ácido 3 β -propilursólico (2b) [400 MHz, CDCl_3 , $\delta(\text{ppm})$].....	86
Figura 53: Espectro no IV do ácido 3 β -propilursólico (2b).....	86
Figura 54: Espectro no IV do ácido 3 β -butilursólico (2c) [400 MHz, CDCl_3 , $\delta(\text{ppm})$].....	87
Figura 55: Espectro no IV do ácido 3 β -butilursólico (2c).....	88
Figura 56: Espectro de ^1H do ácido 3 β -benzoilursólico (2d) [400 MHz, CDCl_3 , $\delta(\text{ppm})$].....	89
Figura 57: Espectro no IV do ácido 3 β -benzoilursólico (2d).....	89
Figura 58: Espectro de ^1H do ácido 3 β -(3-clorobenzoil) ursólico (2e) [400 MHz, CDCl_3 , $\delta(\text{ppm})$].....	90
Figura 59: Espectro no IV do ácido 3 β -(3-clorobenzoil) ursólico (2e).....	91
Figura 60: Espectro de RMN de ^1H do ácido 3 β -(3-clorobenzoil) betulínico (3a) [300 MHz, piridina- d_5 , $\delta(\text{ppm})$].....	92
Figura 61: Espectro no IV do ácido 3 β -(3-clorobenzoil) betulínico (3a).....	92
Figura 62: Espectro de RMN de ^1H do ácido 3 β -(3-clorobenzoil) oleanólico (4a) [300 MHz, acetona- d_6 , $\delta(\text{ppm})$].....	93
Figura 63: Espectro no IV do ácido 3 β -(3-clorobenzoil) oleanólico (4a).....	94
Figura 64: Espectro de ^1H do ácido 3 β -(3-clorobenzoil) lupeol (5a) [400 MHz, CDCl_3 , $\delta(\text{ppm})$].....	95
Figura 65: Espectro no IV do ácido 3 β -(3-clorobenzoil) lupeol (5a).....	95
Figura 66: Alcalóide Fisostigmina (7).....	98

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1: Fluxograma geral do desenvolvimento da obtenção do ácido ursólico, ácido betulínico e ácido oleanólico a partir do material vegetal (*Eriope blanchetii* (Lamiaceae)).....43

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Composição da fração de esteróis (%) de óleos vegetais.....	24
Tabela 2: Classificação dos terpenos segundo o número de unidades isoprênicas.....	31
Tabela 3: Massas dos extratos das folhas da <i>Eriope blanchetii</i>	42
Tabela 4: Dados espectroscópicos de RMN de ¹³ C para os ácidos ursólico (2), betulínico (3) e oleanólico (4) [75 MHz, piridina-d ₆ , δ (ppm)].....	66
Tabela 5: Dados espectroscópicos de RMN de ¹³ C para os derivados do β-sitosterol [75 MHz, CDCl ₃ , δ (ppm)].....	83
Tabela 6: Dados de RMN de ¹ H dos ácidos oleanólico (4a), betulínico (3a) e seus derivados esterificados [300-400MHz, δ(ppm) J(Hz)].....	84
Tabela 7: Resultados do Teste de Letalidade de <i>Artemia salina</i> com derivados esterificados do β-sitosterol e triterpenos	96

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

AcOEt	acetato de etila
Ac-d₆	acetona deuterada
AIDS	síndrome da Imunodeficiência Adquirida
BuOH	butanol
CC	cromatografia em coluna
CCDC	cromatografia em camada delgada comparativa
CCDP	cromatografia de camada delgada preparativa
CD₃OD	metanol deuterado
CDCl₃	clorofórmio deuterado
CL₅₀	concentração Letal Mínima
CoA	coenzima A
DMAP	2,4 – dimetil amino piridina
DMAPP	dimetil-alil-difosfato
EM	espectrometria de massa
EtOH	etanol
g	gramas
Hex.	hexano
HIV	vírus da Imunodeficiência Humana
Hz	hertz
IV	infravermelho
J	constante de acoplamento
LDL	lipoproteína de baixa densidade
LPPN	Laboratório de Pesquisa Produtos Naturais
MeOH	metanol
mg	miligrama
MHZ	megahertz
mL	mililitros
mol/L	moles por litro
PF	ponto de fusão
ppm	parte por milhão
Pyr-d₅	piridina deuterada
R_f	índice de retenção
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
RMN ¹³C	Ressonância Magnética Nuclear de Carbono-13
RMN ¹H	Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio
RSD %	desvio padrão relativo
UV	ultravioleta
α	alfa
δ	deslocamento químico (ppm)
[α]²⁰_D	desvio rotatório a 20 graus Celsius
°C	graus Celsius

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
2 OBJETIVOS	20
2.1 Objetivo geral	20
2.2 Objetivos específicos	20
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	21
3.1 FITOESTEÓIDES	21
3.1.1 β -SITOSTEROL	29
3.2 TRITERPENOS	30
3.2.1 TRITERPENOS MAIS COMUNS	34
3.2.1.1 Ácido ursólico	34
3.2.1.2 Ácido betulínico	35
3.2.1.3 Ácido oleanólico	36
3.4 ATIVIDADES BIOLÓGICAS	37
3.4.1 ATIVIDADE CITOTÓXICA	37
3.4.2 ATIVIDADE ANTICOLINESTERÁSICA	38
4 PARTE EXPERIMENTAL	39
4.1 Equipamentos utilizados nas reações e caracterizações dos reagentes e produtos	39
4.2 Solventes e reagentes utilizados	40
4.3 Coleta do material vegetal e identificação da espécie	41
4.4 Isolamento dos triterpenos de <i>Eriope blanchetii</i>	42
4.5 Derivados do β-sitosterol	44
4.5.1 Preparo dos derivados do β -Sitosterol obtidos pela reação com anidridos	44
4.5.2 Preparo do 3β -formestigmast-5-eno (1d)	47
4.5.3 Preparo do 3β -clorobenzoxestigmast-5-eno (1g)	48
4.5.4 Preparo do <i>trans</i> -cinamato de estigmast-5-eno (1h)	50
4.6 Derivados dos triterpenos	52
4.6.1 Derivados do ácido ursólico obtidos pela reação com anidridos	52
4.6.2 Preparação dos ácidos 3β -(3-clorobenzoil) ursólico (2e), 3β -(3-clorobenzoil) betulínico (3a), 3β -(3-clorobenzoil) oleanólico (4a) e 3β -(3-clorobenzoil) lupeol (5a)	55
4.7 Testes Biológicos	59
4.7.1 Ensaio de toxicidade de <i>Artemia salina</i>	59
4.7.2 Ensaio de inibição da acetilcolinesterase	60
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	61
5.1 Identificação do β -sitosterol e dos ácidos triterpênicos	61
5.2 Esterificação do β -sitosterol e triterpenos	67
5.3 Identificação dos derivados do β -sitosterol	68
5.4 Identificação dos derivados dos ácidos triterpênicos	84

5.5 Atividade citotóxica (Letalidade contra <i>Artemia salina</i>).....	96
5.6 Atividade anticolinesterásica.....	98
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	99
7 REFERÊNCIAS.....	101

1. INTRODUÇÃO

O Brasil possui características territoriais marcadas principalmente pela sua imensa biodiversidade, sendo um celeiro para a busca de substâncias novas de interesse biológico ou não. Estima-se que 22% da diversidade vegetal do planeta estejam concentrados em território brasileiro espalhados por diferentes hábitats. Sendo a maioria desconhecida, onde somente cerca de 5% têm sido estudadas fitoquimicamente e uma porcentagem ainda menor avaliadas sob os aspectos biológicos (PINTO, et al., 2002). Dessa forma, o Brasil apresenta um potencial para a descoberta e identificação de novas substâncias de origem vegetal úteis ao homem.

É milenar o uso de plantas para a cura de doenças através de diferentes formas, como na forma, de ingestão de infusões e extratos, banhos de folhas, incensos, unguentos, etc. O conhecimento e a popularização dessas plantas contribuíram para a obtenção de vários fármacos amplamente usados até hoje (FILHO, V. C.; YUNES, R. A.; 1998). Em muitos países subdesenvolvidos e em desenvolvimento, os produtos de origem vegetal ainda é a única forma de tratamento de doenças. Através do conhecimento de plantas com potencial terapêutico, muitas substâncias responsáveis pelas atividades medicinais são identificadas, isoladas e testadas do ponto de vista biológico, podendo-se transformar em fármaco (YUNES, R. A., 2001).

O reino vegetal vem contribuindo de forma significativa para o fornecimento de metabólicos secundários, com diversidade e complexidade única. Nos últimos anos mais de 100.000 substâncias originadas de plantas foram isoladas e identificadas, sendo que esse número cresce anualmente. Muitas dessas substâncias são consumidas diariamente na forma de alimentos, cosméticos e medicamentos. Algumas destas apresentam comprovada ação farmacológica tanto em estudo pré-clínico quanto clínicos e constituem modelos para desenvolvimento de medicamentos sintéticos ou semi-sintéticos (SERAFIN, 2006).

Durante o período de 1987 á 2002 foram registradas 877 novas substâncias químicas, sendo que 49% originam-se de produtos naturais, produtos naturais modificados e compostos sintéticos baseados no grupo farmacofórico de substâncias isoladas de plantas. (SERAFIN, 2006).

Os vegetais produzem estimulados por fatores externos como: competição, predadores, polinizadores e mudanças ambientais, uma variedade de compostos orgânicos que não apresentam função direta no seu crescimento. Esses compostos são conhecidos como metabólicos secundários (metabólitos especiais) ou ainda produtos naturais. Em contrapartida, substâncias consideradas essenciais ao desenvolvimento estrutural da planta como carboidratos, proteínas, nucleotídeos, ácidos orgânicos e fitoesteróis são chamadas de metabólicos primários (STROHL, 2000).

Os metabólitos secundários (metabólitos especiais) apresentam várias funções ecológicas na planta que podem ser aproveitadas como potencial medicinal para o ser humano, como por exemplo, compostos produzidos na defesa contra herbívoros com ação neurotóxica, que devido à essa característica podem, por associação, tornar-se um medicamento com ação no sistema nervoso central humano (antidepressivo, sedativo, relaxante muscular, anestésico) (BRISKIN, 2000).

O uso de alguns metabólitos vegetais como matéria-prima para síntese de substâncias bioativas, especialmente fármacos, vem assumindo destaque na pesquisa de novos medicamentos (GUERRA, 2004). Vários métodos de otimização de atividade biológica podem ser realizadas em substâncias de origem vegetal, como por exemplo, a modificação molecular. Muitas mudanças podem ser introduzidas numa molécula, dependendo de seus grupos reativos. As modificações podem ter o objetivo de introduzir grupos que conferem ao composto uma maior ou menor hidrofobicidade ou ainda grupos doadores e/ou receptores de elétrons, que podem estar relacionados com a ampliação da atividade biológica (FILHO, V. C.; YUNES, R. A.; 1998).

O β -sitosterol é um fitoesteróide (esteróides de plantas) de ocorrência comum nos vegetais, podendo ser detectado em quase todas as espécies, principalmente nas plantas superiores. Apresenta diversas funções, como na composição das membranas celulares, participando no transporte intracelular, além de desempenhar outras funções biológicas. Frequentemente o β -sitosterol e outros fitoesteróides podem ser encontrados na forma de derivados mais complexos, como ésteres de ácidos graxos, aromáticos ou glicosilados (PRIDHAM, 1967; LEHNINGER, NELSON, COX, 1995; ROBINSON, 1991). Esses ésteres podem conferir ao β -sitosterol propriedades peculiares e interessantes do ponto de vista biológico, tais como: agente alelopático, feromônio de agregação, desenvolve atividades

farmacológicas, agindo frente ao vírus da hepatite (ensaios *in vitro*) e ainda apresentando atividade citotóxica seletiva contra alguns tipos de células cancerígenas como as células P-388, A-549, HT-29 (IC₅₀:1,25 µg/mL), tem ação antiviral, antiinflamatória, além de atuarem na diminuição do colesterol total do plasma sanguíneo e no combate a arteriosclerose (enrijecimento das artérias) (EPINDOLA, 2006; MORI, 1993; CUI, 2008; DROZDOVA, 2007; OLIVEIRA, 2007; SOLOMONS, 2006). Além dos ésteres de β-sitosterol outros derivados oxigenados também apresentam importantes propriedades biológicas, como citotoxicidade em células de monócitos humanos U937, em células de adenocarcinomas CaCo-2 e células de hepatoma Hep G2 (MISHARIN, 2008).

Outra classe de compostos de origem vegetal com interessante atividade biológica e farmacológica é os triterpenóides, que apresentam diversas funções nos vegetais como, na defesa contra patógenos e predadores. Os triterpenos são compostos de origem animal e vegetal, formados estruturalmente por seis unidades de isopreno (C₅H₁₀), biosintetizados pela ciclização do esqualeno (assim como os esteróides), que também podem ser encontrados na forma de derivados glicosilados, esterificados, ou oxigenados e apresentam comprovada atividade antiinflamatória, antibacteriana, antifúngica, antiviral, analgésica, cardiovascular, antitumoral e anti-HIV (PATROČKA, 2003; DEWICK, 2002).

Os ácidos triterpênicos são metabólitos secundários (metabólitos especiais) presentes em várias famílias de vegetais sendo os ácidos ursólico, oleanólico e betulínico os mais comuns. Durante muito tempo estes compostos eram considerados inativos farmacologicamente, usados quase exclusivamente como agente emulsificante em preparações farmacêuticas, cosméticas e alimentícias. Ainda hoje o ácido ursólico é usado como cosmético embora empregado para combater câncer de pele (MEZZETTE, 1971; HARRY, 1963). Contudo novas propriedades farmacológicas, de uso tópico ou interno, foram atribuídas ao ácido ursólico e a seus derivados, como: propriedades antiinflamatória, hepatoprotetora, analgésica, cardiotônica, sedativa e tônica (VECHIA, 2009).

Dessa forma, percebe-se que produtos de origem vegetal, devido a sua diversidade, complexidade e ação biológica, constituem uma ótima fonte de matéria-prima nobre e abundante para síntese de novos fármacos, especialmente os derivados esterificados do β-sitosterol (fitoesteróide) e do ácido ursólico (triterpeno), que podem fornecer substâncias para combater patologias que ainda não possuem um tratamento adequado. Por isso, a comunidade

científica vem buscando novas fontes de moléculas ativas contra esses males, sendo que algumas classes de metabólitos secundários como triterpenos, esteróides, alcalóides e flavonóides já tem apresentada atividade “in vitro” e “in vivo” satisfatórias (SERAFIM, 2006).

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Este trabalho tem como objetivo obter derivados esterificados a partir do β -sitosterol e dos triterpenos: ácido ursólico, ácido betulínico, ácido oleanólico, lupeol e, submetê-los a testes de atividades biológicas.

2.2 Objetivos específicos

- ✓ Isolar de fontes naturais os ácidos: ursólico, betulínico e oleanólico além do lupeol.
- ✓ Submeter o β -sitosterol e os triterpenos a reações de esterificação com diversos anidridos e ácidos orgânicos.
- ✓ Submeter os derivados obtidos ao teste de letalidade frente à *Artemia salina* e de inibição da enzima acetilcolinesterase.
- ✓ Determinar as concentrações citotóxica mínimas dos derivados necessários para inibir o crescimento da *Artemia salina*.
- ✓ Avaliar a influência dos substituintes nos anéis A do fitoesteróide e dos triterpenos, sobre a sua atividade citotóxica e de inibição da enzima acetilcolinesterase.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 FITOESTERÓIDES

Os fitoesteróides são substâncias esteroidais ou terpenóides tetracíclicos extraídos de espécies vegetais, sendo os mais comuns o β -sitosterol, campesterol e estigmasterol. Possuem o esqueleto carbônico formado pelo anel ciclopentanoperidrofenantrênico (figura 1) onde podem ser encontradas duplas ligações, principalmente na posição C-5. Nos animais, o principal esteróide é o colesterol que apresenta função análoga aos fitoesteróides, mas diferenciam-se pela presença de grupo metila ou etila e/ou presença de uma dupla ligação na cadeia lateral (OLIVEIRA, 2007).

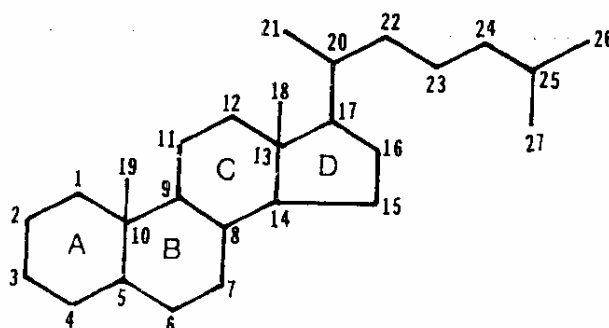


Figura 1: Anel ciclopentanoperidrofenantrênico, numeração convencional e designação dos anéis do sistema cíclico dos esteróides.

Quando os esteróides apresentam cadeia lateral com 7 a 11 átomos de carbono, ligação dupla no carbono C-5 e presença de pelo menos uma hidroxila no C-3, podem ser chamados de esteróis (do grego= sólido) e na sua forma saturada são chamados de estanois (QUILEZ, 2003; GROS, 1985) (figura 2, pág. 22).

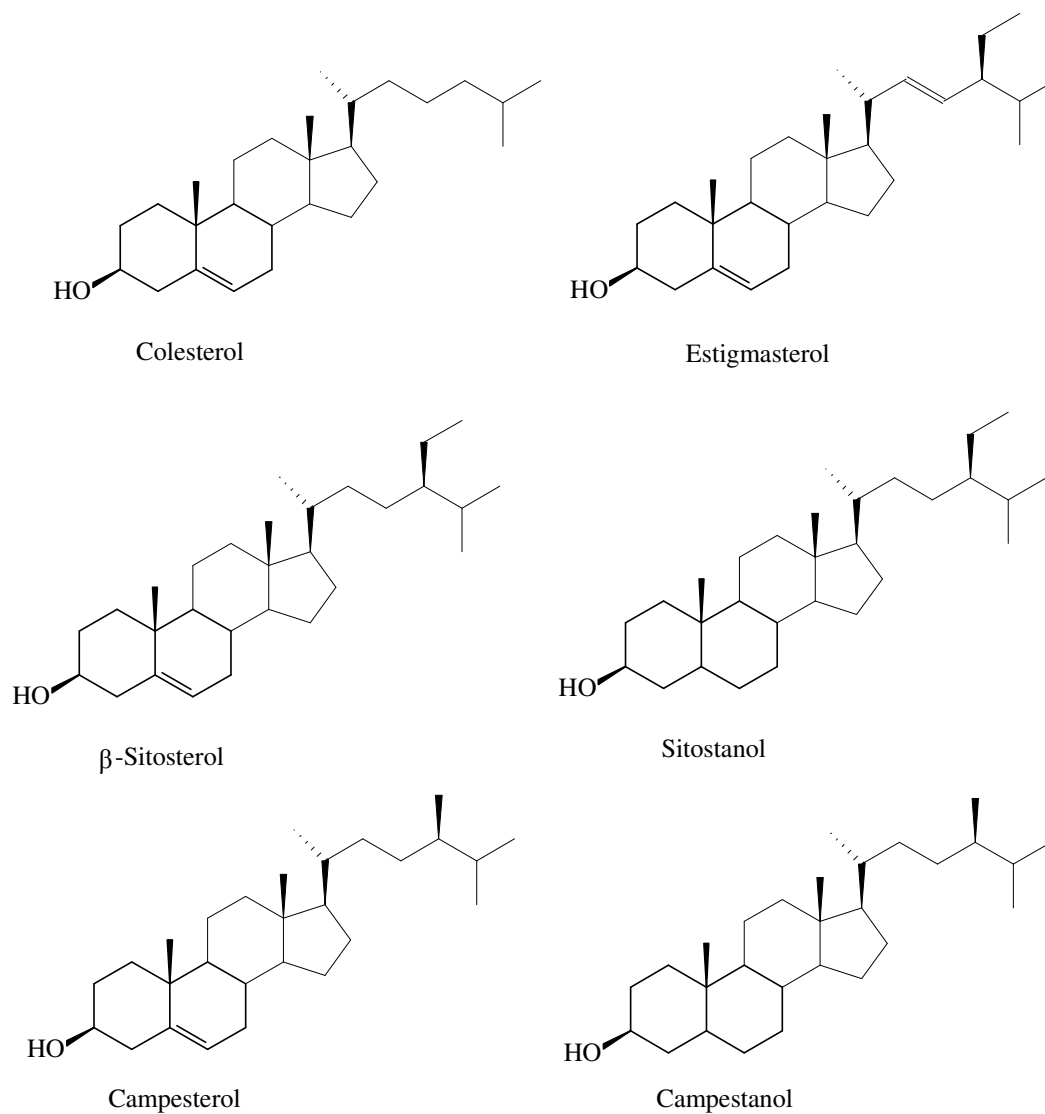


Figura 2: Exemplos de colesterol, esteróis e estanois vegetais e suas diferenças.

A diversidade dos compostos derivados dos fitoesteróides resulta principalmente na variação da cadeia lateral (ligado ao C-17), na diferença da substituição e do grau de insaturação. A figura-3 (pág. 23) mostra alguns exemplos de fitoesteróis que apresentam variação em sua estrutura (GROS, 1985).

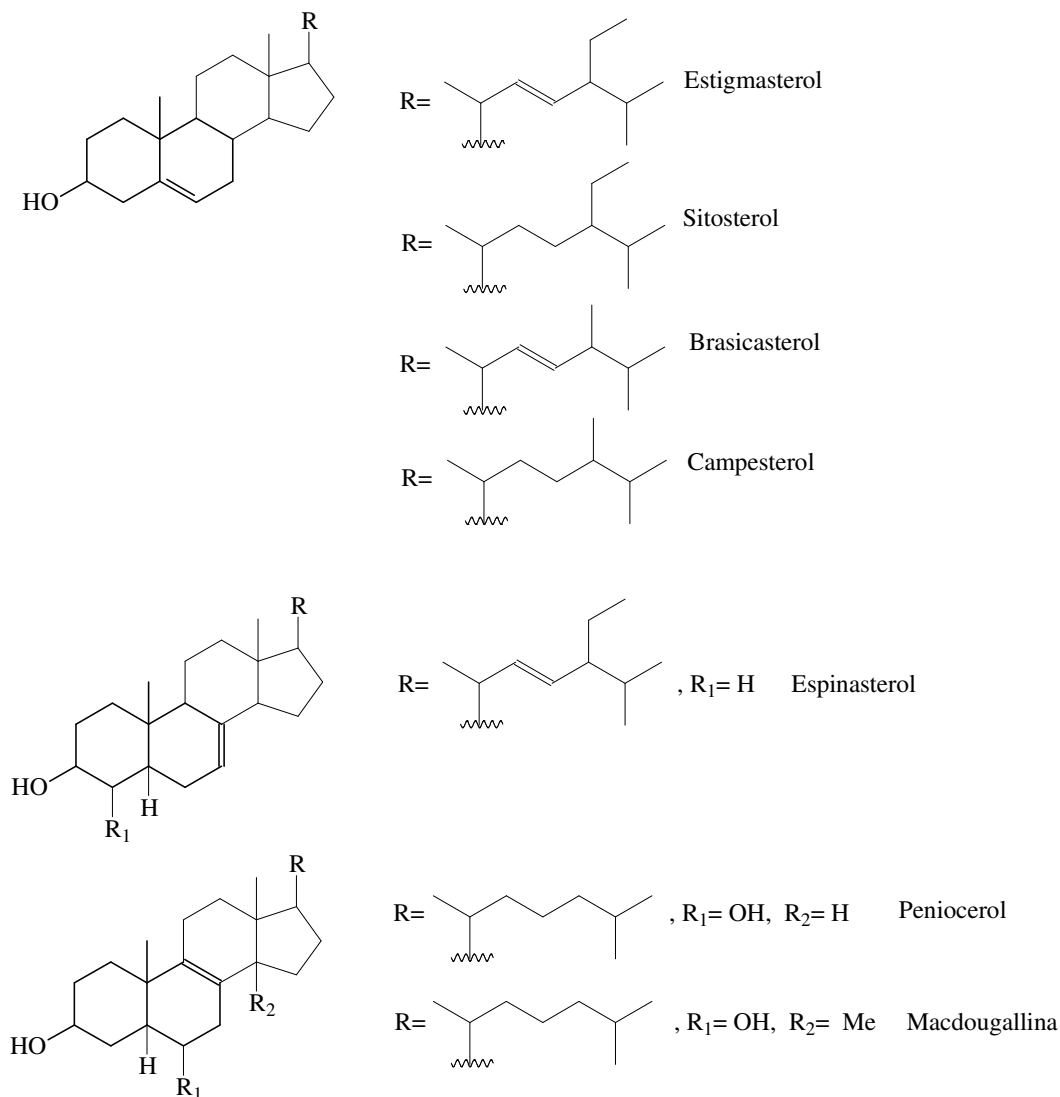


Figura 3: Exemplos de fitoesteróis com variação da cadeia lateral e no padrão de insaturação.

O colesterol é o mais representativo dos esteróides e, nos animais, modula a fluidez e é um componente essencial da membrana citoplasmática das células. Ele é precursor de sais biliares, que facilitam a digestão de gorduras, como também da vitamina D, que estimula a captação de cálcio pelos intestinos e também é precursor de todos os hormônios esteróides (BELITZ, 1987). Enquanto que os fitoesteróides também fazem parte de membranas celulares dos vegetais participando do transporte intracelular, modulando seu crescimento, além de desempenhar outras funções biológicas essenciais.

Atualmente a maior fonte de fitoesteróides são os óleos vegetais que contém em média 100-500 mg de esteróis por 100g, principalmente sitosterol, estigmasterol e campesterol

(Tabela 1). Outra fonte de fitoesteróides é como subproduto da indústria de papel a partir da madeira (SALES, 2007).

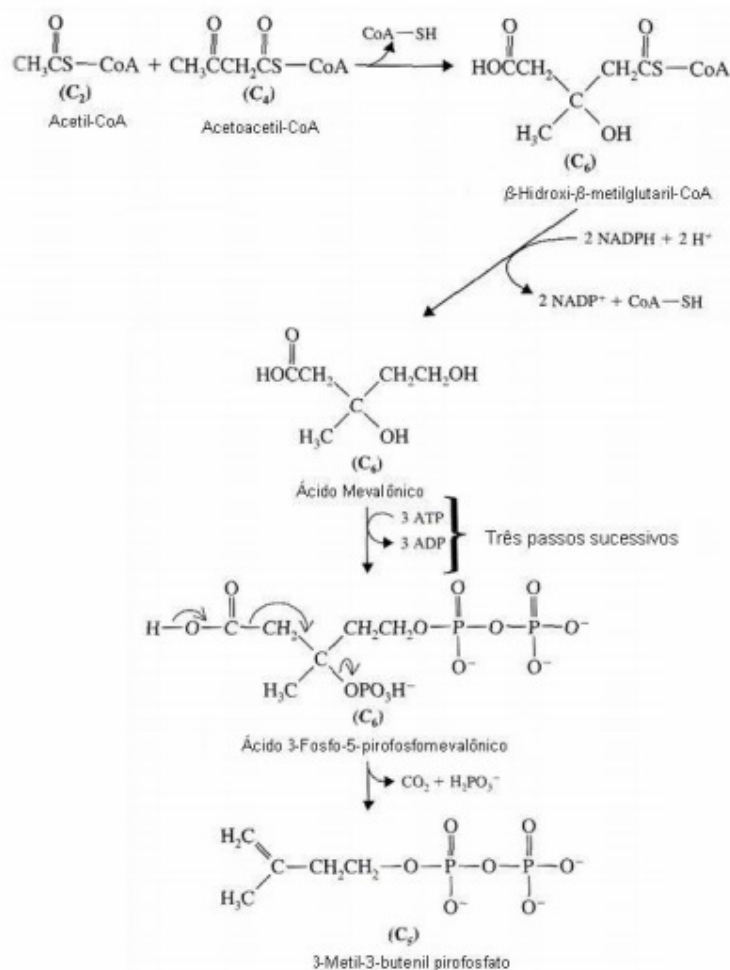
Tabela 1: Composição da fração de esteróis (%) de óleos vegetais.

Oleo	Fração Esterólica (%)	Colesterol (%)	Campesterol (%)	Estigmaesterol (%)	Beta-Sitoesterol (%)	Avenasterol (%)
Algodão	0,35	Trços	9,2	2,5	88,2	Trços
Amendoim	0,25	-	12,8	10,8	74,6	-
Milho	0,9	-	22,1	7,2	62,2	3,5
Colza	0,84	0,8	29,4	-	54,9	5,7
Oliva	0,16	Trços	3,9	2,1	85,4	8,6
Soja	0,37	Trços	21,3	19,1	53,5	2,4

Fonte: Sales, 2007.

Os esteróides são sintetizados intracelularmente pela condensação de um único precursor, o acetato (CH_3COO^-), como acetyl-CoA, que forma uma série de outros precursores e intermediários, capazes de polimerizarem-se gerando outras classes de compostos como triterpenos (LEHNINGER, NELSON, COX, 1995).

A primeira etapa da biosíntese dos esteróides consiste na condensação de unidades de acetato (composto por dois carbonos) até a formação do mevalonato (composto de seis carbonos). A etapa de formação de mevalonato é limitante da síntese (irreversível), e é catalizada pela enzima denominada HMG-CoA redutase. As referidas reações estão representadas na figura-4 (pág. 25). Em seguida o mevalonato recebe três grupos fosfato (grupo ativante), formando o 3-fosfo-5-pirofosfomevalonato, que tem uma dos fosfatos retirado, seguida de descarboxilação, gerando a unidade isoprênica (3-metil-3-butenil-pirofosfato ou isopentenil-pirofosfato) composta por cinco átomos de carbono (LEHNINGER, NELSON, COX, 1995). (Figura 4, pág. 25)

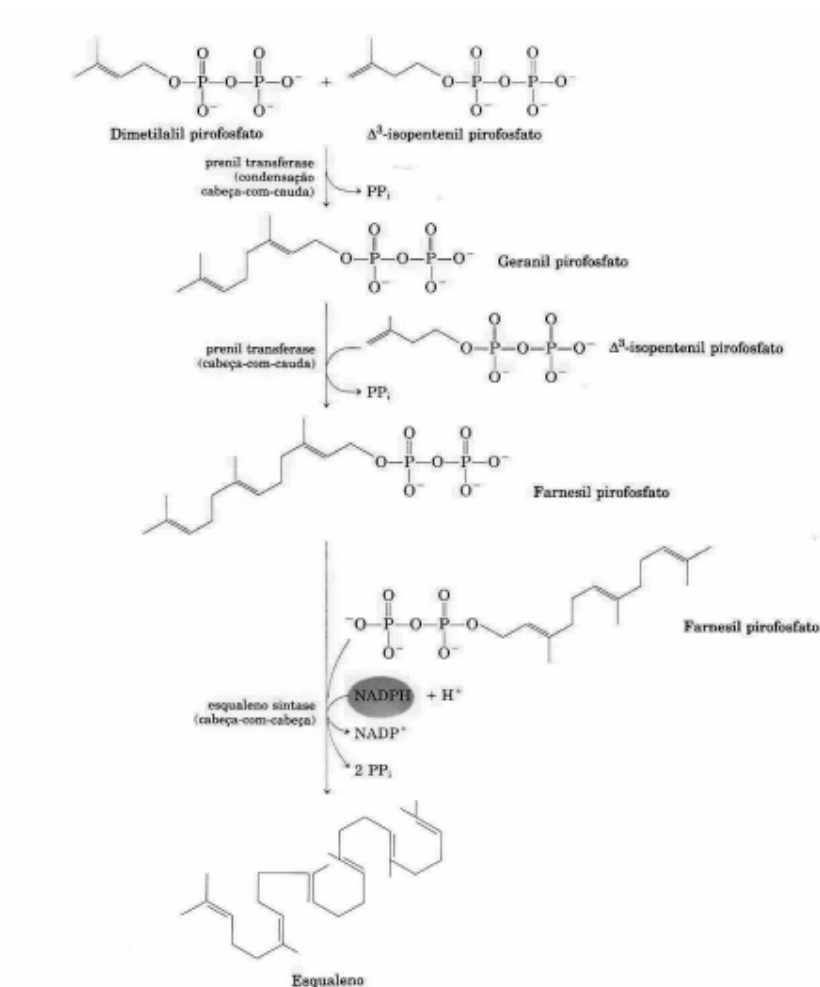


Fonte: SOLOMONS, 1998.

Figura 4: Condensação das unidades de acetil-CoA até a formação do isopreno ativo.

Os dois isômeros isoprênicos (3-metil-3-butenil-pirofosfato ou isopentenil-pirofosfato) sofrem uma condensação “cabeça-cauda” (cabeça é o lado onde o pirofosfato está ligado), formando o geranyl-pirofosfato com dez carbonos, que subsequente condensa-se com 3-metil-3-butenil-pirofosfato gerando farnesil-pirofosfato (composto por quinze átomos de carbono). Em seguida, duas moléculas de farnesil-pirofosfato unem-se “cabeça-cauda” de forma redutiva, para formar o esqualeno (com trinta átomos de carbono, sendo vinte e quatro na cadeia principal e seis na forma de ramificações) (LEHNINGER, NELSON, COX, 2007). Recentemente foi descoberta uma novo caminho para a biosíntese do isopentenil-pirofosfato diferente do caminho via ácido mevalônico (via deoxixilulose fosfato), contudo a via ácido mevalônico é a mais conhecida (DEWICK, 2002).

O esqualeno é oxidado a esqualeno 2,3-epóxido e as duplas ligações são posicionadas de tal forma que permite o epóxido-esqualeno linear, converter-se em estrutura cíclica para formação do núcleo ciclopentanoperidrofenantrenico (LEHNINGER, NELSON, COX, 2007). (Figura 5)



Fonte: LEHNINGER, NELSON, COX, 2007.

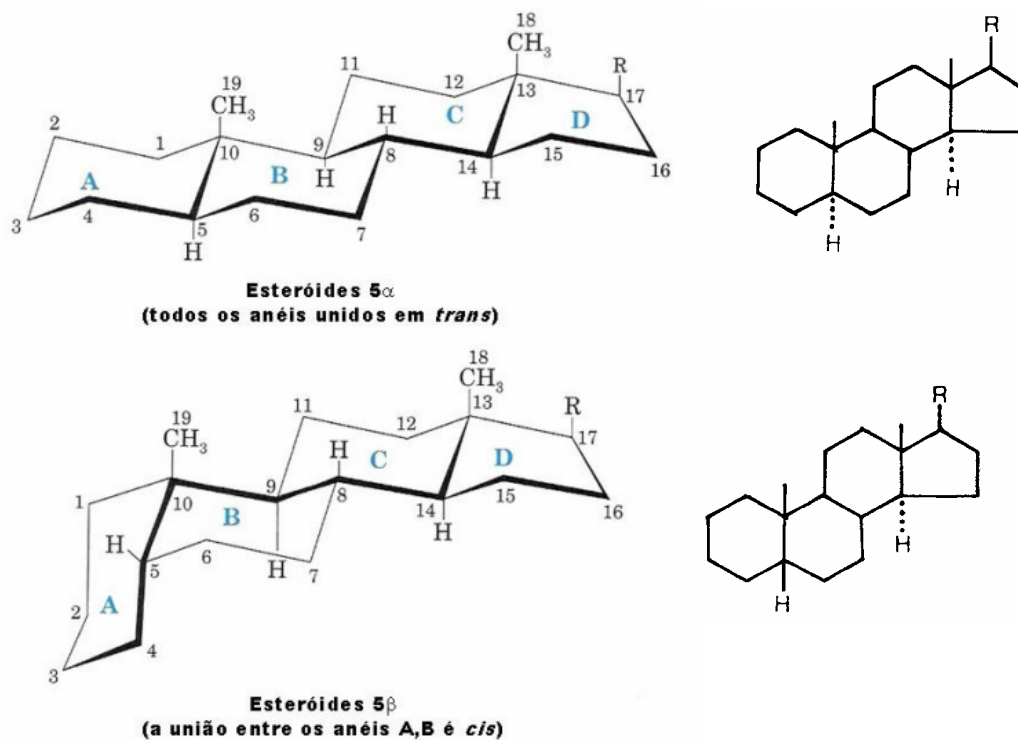
Figura 5: Formação do esqualeno.

A síntese de esteróides é coincidente para vários organismos (animais, vegetais, marinhos, etc) até a etapa de formação do 2,3-epóxido esqualeno. A formação de fitoesteróides, colesterol e outros esteróides seguem rotas específicas após esse intermediário. Em células animais ocorre a formação do lanosterol que após várias reações de oxidações, perdas e migrações dos grupos metil, transforma-se em colesterol. Em células vegetais forma-

se o cicloartenol que é intermediário para a formação dos fitoesteróis (PIIRONEN et al., 2000; VOLIN, 2001).

A fusão dos anéis, a partir do esqualeno, permite a formação de uma série de isômeros estereoquimicamente dependente da conformação do sistema de anéis ciclopentanoperidrofenantrênico.

Em muitos esteróides naturais as junções dos anéis B,C e C,D são trans. Entretanto, a junção dos anéis A,B pode ser cis ou trans, essa possibilidade dá origem a dois grupos gerais de esteróides (SOLOMONS, 2006). Os grupos que se projetam por cima do plano geral do sistema de anéis, do mesmo lado que os grupos metila dos carbonos C-10 e C-13, se designam β (representados por cunha sólida), no entanto os substituintes que estão por baixo do plano do anel, são designados α (representados por linhas tracejadas). Dessa forma, o sistema de anel A,B é trans, quando o hidrogênio do carbono C-5 é α (equatorial); e quando o sistema de anel A,B é cis se o hidrogênio do carbono C-5 é β (axial) (GROS, 1985; OLIVEIRA, 2007).(Figura 6)



Fonte: SOLOMONS, 2006 e GROS, 1985.

Figura 6: Sistemas dos anéis básicos das séries 5 α e 5 β dos esteróides.

Em quase todos os esteróides naturais o substituinte no carbono C-3 e a cadeia lateral no C-17 encontram-se na orientação β . Os substituintes no carbono C-9 e C-10; C-8 e C-14 encontram-se na orientação trans, um em relação ao outro (GROS, 1985).

Dessa forma, os esteróides apresentam um esqueleto carbônico cíclico, planar, rígido; onde considerando apenas o anel ciclopentanoperidrofenantrênico; podem apresentar pelo menos sete centros assimétricos (C-5, 8, 9, 10, 13, 14, 17), originando 128 possíveis estereoisômeros. As conformações mais estáveis são aquelas constituídas por conformações em cadeira sucessivas onde a maioria dos possíveis substituintes encontra-se na posição equatorial, já a conformação bote confere um fator de instabilidade espacial e raramente são encontrados nos esteróides. O conhecimento dessas conformações determina muitas propriedades físico-químicas dos fitoesteróides (GROS, 1985; OLIVEIRA, 2007).

Estima-se que o consumo médio de fitosteróis gira em torno de 167–437 mg/dia, sendo que a absorção desses compostos nos seres humanos é muito baixa: sitosterol (0,51%); campesterol (1,9%); sitostanol (0,04%); e campestanol (0,16%). Estes dados indicam que os estanois são menos absorvidos que os esteróis. Já para o colesterol ingerido, sua absorção é bem maior variando de 12,1-56,2% (RICHARD, E.; 2002).

Atualmente considera-se que os fitoesteróides têm a capacidade de reduzir os níveis de colesterol total, LDL-colesterol e triacilglicerídeos no soro sanguíneo humano (hipocolesterolemia). Sendo que a redução máxima (10%) foi observada com uma dieta de 2 g/dia de fitoesterróide. Essa correlação também foi observada em uma série de derivados esterificados dos fitoesteróides (oleato, estearato e palmitato), onde os estanois apresentaram uma redução na absorção do colesterol maior que os esteróis. O modo de ação dos fitoesteróides na absorção do colesterol ainda não é bem compreendido. Contudo, estudos confirmam que os fitoesteróides competem e deslocam o colesterol na formação das micelas de fosfolípido, inibindo sua absorção no intestino. Por isso, em muitos produtos alimentícios como iogurtes, queijos, margarinas, azeites, maioneses e cereais, são adicionados fitoesteróides em suas fórmulas com objetivo de contribuir com a redução da incidência de doenças cardiovascular (RICHARD, 2002; PARISENTI, 2006; LICHTENSTEIN e DECKELBAUM, 2001; KATAN, 2003).

Estudos recentes demonstram que os fitoesteróides apresentam ação de proteção contra câncer de próstata, de mama e de cólon. Eles atuam em enzimas responsáveis pelo metabolismo dos hormônios sexuais e no estímulo a apoptose (morte celular) (AWAD e FINK, 2000; OLIVEIRA, 2007). Contudo, muitos estudos ainda são necessários para compreender os mecanismos pelos quais os fitoesteróides atuam na prevenção e proteção contra certos tipos de câncer e na redução da absorção do colesterol total no soro sanguíneo.

3.1.1 β -SITOSTEROL

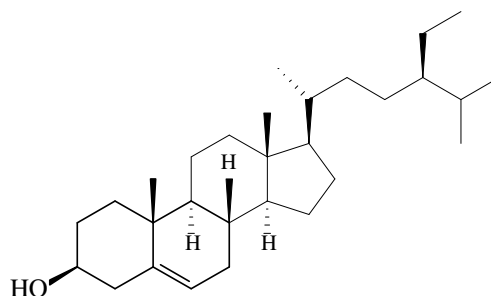


Figura 7: Estrutura química do β -sitosterol (1).

O β -sitosterol (Sitosterol, Stigmast-5-en-3-ol, (24R)-etilcolest-5-en-3 β -ol) é um fitoesteróide bastante difundido no reino vegetal juntamente com o estigmasterol e o campesterol. Diferencia-se do colesterol pela presença da cadeia lateral com dez carbonos e dos outros fitoesteróides pela presença de um grupo etila no carbono C-24, pertencendo ao grupo dos colestanos.

Em relação às propriedades físico-químicas, o β -sitosterol é um sólido cristalino amorfo, com baixa solubilidade em água e boa solubilidade em solventes orgânicos, possui ponto de fusão 140 °C, desvio rotatório $[\alpha]_D^{20} = -36^\circ$, fórmula molecular $C_{29}H_{50}O$ e peso molecular 414,71g/mol (ZULLO, 1987; OJA, 2009).

Em sua estrutura apresenta insaturação no C-5, grupo álcool secundário (carbono C-3). Dessa forma, a dupla ligação pode ser halogenada ou oxidada, assim como a hidroxila pode ser oxidada ou reduzida.

O β -sitosterol e os fitoesteróides, em geral, são sujeitos à oxidação quando expostos ao ar, em especial a dupla ligação entre C-5 e C-6, tendo como produto final o derivado 7-ceto (BERGSTRÖM, WINTERSTEINER, 1942; MISHARIN, 2008; KOVGANKO, 1999). Contudo, os fitoesteróides também podem ser oxidados pelo aumento de temperatura, ação da luz, radicais livres ou catalisadores químicos que originam produtos de oxidação de vários grupos funcionais como polihidroxi, ceto e epóxi. Como exemplo pode-se citar os 5,6-époxi, 5,6-hidoxi, 7-ceto, 7-hidroxisitosterol. Esses derivados podem ser encontrados em vegetais ou sintetizados e apresentam uma série de propriedades biológicas interessantes (McCARTHY, 2005; MISHARIN, 2008).

Estudos científicos demonstram que o β -sitosterol melhora os sintomas e previne a incontinência urinária causada pelo aumento da próstata (hiperplasia benigna da próstata). Quando os homens envelhecem, freqüentemente, as células das glândulas da próstata crescem demais, causando um inchaço que obstrui a bexiga, resultando em lentidão urinaria. Esta amplificação não-maligna da glândula próstata causa pressão na uretra, agindo como uma braçadeira. O resultado é um fluxo urinário fraco e outros sintomas urinários incômodos como aumento da freqüência durante a noite. Dessa forma, estudos mostram que o β -sitosterol pode ser usado sozinho ou combinado com fármacos já usados no combate a hiperplasia benigna da próstata (STRUM, 2005).

3.2 TRITERPENOS

Os triterpenos são compostos muito difundidos na natureza, principalmente no reino vegetal e pertencem a uma classe de substâncias químicas conhecidas como terpenóides (terpenos). Estes compostos são todos formados pela união de unidades de isopreno (C_5H_8) que se unem, formando cadeias maiores (DEWICK, 2000).

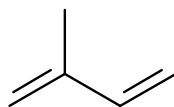


Figura 8: Estrutura do Isopreno.

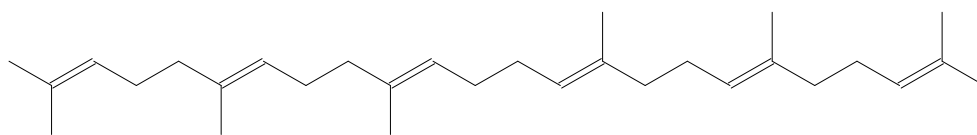
Essa relação do isopreno com os terpenóides, durante muito tempo foi considerada meramente formal, já que, o isopreno nunca tinha sido isolado nos vegetais (GROS, 1985). Contudo, após seu isolamento de algumas espécies vegetais descobriu-se que sua relação com terpenóides não é meramente formal (MILLER, 2001). O conhecimento das unidades isoprênicas, como componente da estrutura dos terpenos, tem sido de fundamental importância na elucidação de suas estruturas. Dessa forma, um terpenóide pode ser dividido em unidades de isopreno, onde os compostos que contem múltiplos deste grupo se agrupam da seguinte maneira:

Tabela 2: Classificação dos terpenos segundo o número de unidades isoprênicas.

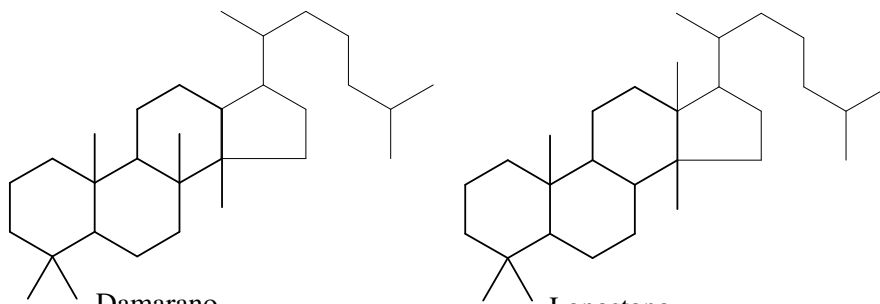
Nome	Fórmula molecular	Nº. de unidades
Hemiterpenos	C_5H_8	1
Monoterpenos	$C_{10}H_{16}$	2
Sesquiterpenos	$C_{15}H_{24}$	3
Diterpenos	$C_{20}H_{32}$	4
Sesterterpenos	$C_{25}H_{40}$	5
Triterpenos	$C_{30}H_{48}$	6
Tetraterpenos	$C_{40}H_{64}$	8
Politerpenos	$C_{5n}H_{8n}$	n

Os triterpenos são moléculas constituídas por trinta átomos de carbono (seis unidades de isopreno) e esqueleto carbônico que pode ser tetracíclico (comuns em animais) ou pentacíclico (comum em vegetais). Esses anéis podem ser do tipo cinco anéis de seis membros (Ursanos e Lonastanos) ou quatro anéis de seis membros e um de cinco (Lupanos e Hopanos) (PATROČKA, 2003; ADIL, 1994). (Figura 9, pág. 32)

Os triterpenos podem ser encontrados na forma livre ou de derivados oxigenados, glicosilados (triterpenos saponinas) e esterificados pela hidroxila no carbono C-3 ou em outras posições.

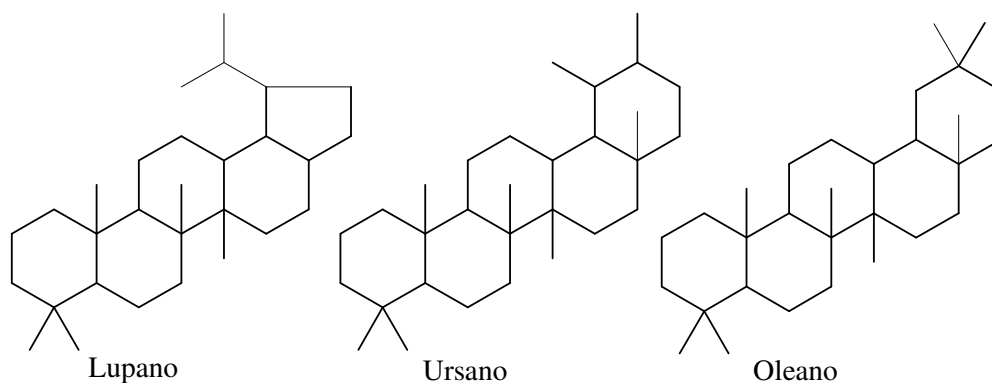
Acíclicos:

Esqualeno

Tetracíclicos:

Damarano

Lanostano

Pentacíclicos:

Lupano

Ursano

Oleano

Fonte: GROS, 1985.

Figura 9: Alguns esqueletos carbônicos dos triterpenos e suas classes.

A biosíntese dos triterpenos é similar a biosíntese dos esteróides até a formação do 2,3-epóxido esqualeno. A partir desse intermediário, o 2,3-epóxido esqualeno é ciclizado formando vários comômeros, que quando associado a algumas reações de rearranjo de metila ou de hidrogênios, geram cadeias carbônicas específicas comuns aos triterpenos (tetra ou pentacíclicos) (PATROČKA, 2003; ADIL, 1994; GROS, 1985). (Figura 9)

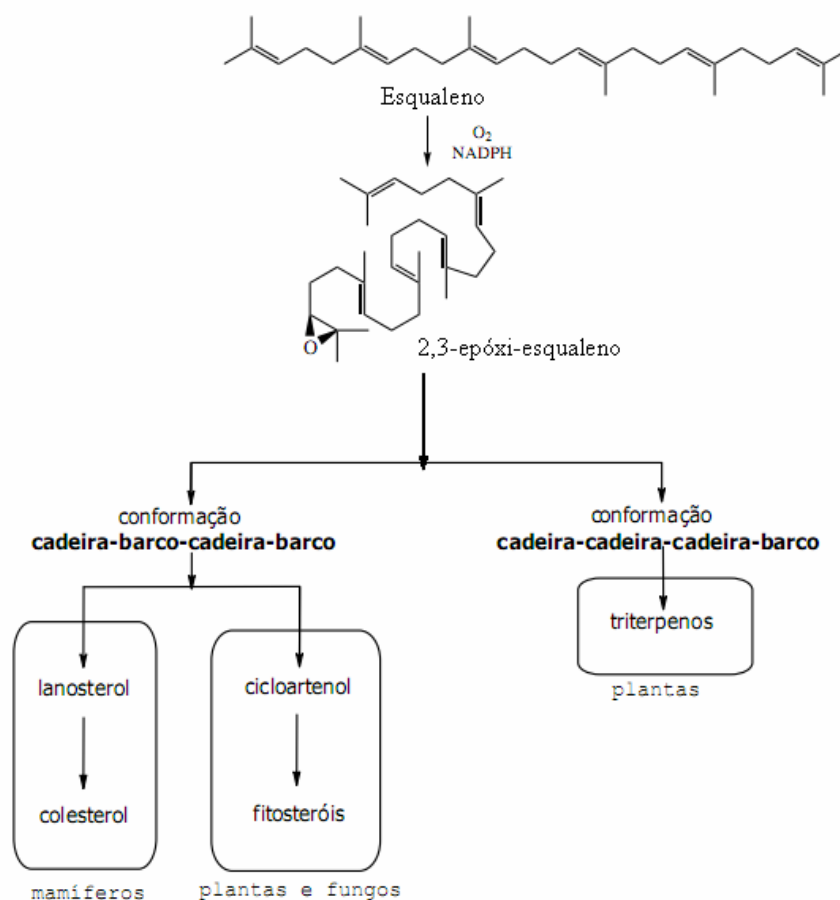


Figura 10: Diferenças na formação dos esteróides e triterpenos.

Os triterpenóides têm várias potencialidades medicinais, com grandes propriedades biológicas tais como: antiinflamatórios, antibacterianos, fungicidas, antivirais, analgésicos, cardiovasculares e antitumorais (PATROČKA, 2003).

Existem, pelo menos cerca de 4000 triterpenóides conhecidos isolados de fontes naturais, a maioria deles facilmente encontrados em muitas plantas. Os triterpenos de estrutura pentacíclica são aqueles que possuem maiores capacidade anticancerígena. (PATROČKA, 2003; MAHATO, 1994). Devido à sua enorme diversidade, o seu estudo tem despertado grande interesse na tentativa de novas e reais aplicabilidades.

Os ácidos triterpênicos são metabólitos secundários (metabólitos especiais) presentes em várias famílias de vegetais, principalmente as superiores (angiospermas), sendo o ácido

ursólico, ácido betulínico, ácido olenólico, além do lupeol e α e β -amirinas os triterpenos mais comumente encontrados (MAHATO, 1994).

3.2.1 TRITERPENOS MAIS COMUNS

3.2.1.1 Ácido ursólico

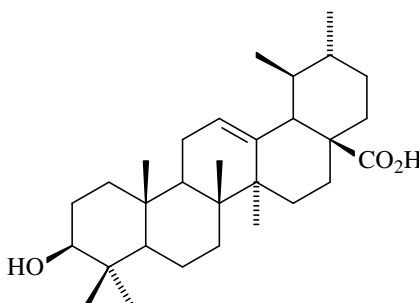


Figura 11: Estrutura química do ácido ursólico (2).

O ácido ursólico (ácido 3 β -hidroxi-urs-12-en-28-óico) é um triterpeno pentacíclico (grupo dos ursanos) de ocorrência em vários vegetais de diferentes famílias. Apresenta-se como um sólido cristalino branco, com ponto de fusão de 232,8–235,2 °C, fórmula molecular C₃₀H₄₈O₃ e peso molecular 456,68 g/mol (COSTA, 2008). Esse terpenoide tem atraído considerável interesse devido a suas promissoras propriedades biológicas como quimioterápico, quimiopreventivo, anti-inflamatório (influenciando a ação da óxido nítrico sintase e ciclooxigenase), anti-microbiana, e inibidor de mutação em bactérias. Além disso, derivados do ácido ursólico, especialmente os dicarboxílicos, exibem atividade frente ao vírus HIV (embora seja levemente tóxico), através da inibição da dimerização da protease. Também exibem atividade citotóxica inibindo o crescimento de células tumorais *in vivo*, sendo um potencial candidato para tratamento e prevenção de câncer de pele e melanoma por indução a apoptose. Além de apresenta uma baixa ou nenhuma toxicidade, sendo, inclusive, utilizado como aditivo em bebida, alimento e em cosmético (VECHIA, 2009; DENG, 2008; LEUNG, 1996).

Derivados ursólicos acilados no carbono C-3, em configuração beta, apresentam importante contribuição para semi-síntese de compostos que apresentam atividades

biológicas. Observa-se que os grupos funcionais presentes no C-3 e C-28 são as principais posições responsáveis pela atividade citotóxica do ácido ursólico e dos ácidos triterpênicos em geral. Substituintes doadores de ligação de hidrogênio no carbono C-3 e C-28 são essenciais para a ampliação dessa capacidade, assim como o aumento da hidroxilação na cadeia (MENG, 2009, VECHIA, 2009). Entretanto, apenas uma quantidade limitada de derivados sintéticos apresenta bioatividade. Uma série de novos derivados do ácido ursólico ainda necessita ter a correlação estrutura-atividade analisadas. (DENG, 2008).

3.2.1.2 Ácido betulínico

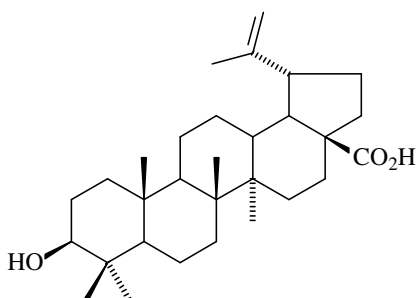


Figura 12: Estrutura química do ácido betulínico (3).

É um triterpeno de esqueleto carbônico do tipo lupânico, encontrado em diversas espécies de plantas e pode ser obtido comercialmente pela oxidação da betulina (encontrado em maior quantidade). Possui ponto de fusão 315-321 °C, fórmula molecular $C_{30}H_{48}O_3$ e massa molecular 456.7 g/mol (VIEIRA, 2004). Assim como o ácido ursólico e oleanólico, apresenta uma série de propriedades biológicas como anti-câncer, anti-inflamatório, anti-microbiana, anti-HIV, inibidor de mutação em bactérias e baixa ou nenhuma toxicidade frente as células saudáveis (TANACHATCHAIRATANA, 2008; VECHIA, 2009; PATROČKA, 2003). Os principais estudos com este composto, envolve sua atividade frente ao melanoma e ao cancro, contudo, ainda não foi comprovada sua atividade frente á outros tipos de células cancerígenas (PATROČKA, 2003).

Entre os triterpenos, o ácido betulínico é o que mais apresenta maior número de estudos tanto do ponto de vista de atividade biológica como de modificação estrutural (RIEBER, 1998; ZUCO, 2002; KVASNICA, 2005; TANACHATCHAIRATANA, 2008; BI, 2007; KIM, 1998; MUKHERJEE, 2004).

3.2.1.3 Ácido oleanólico

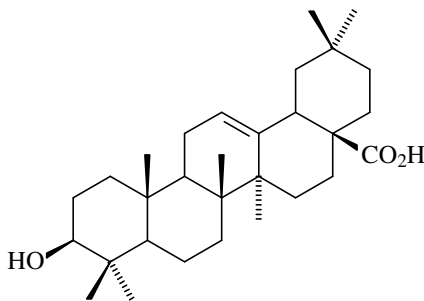


Figura 13: Estrutura química do ácido oleanólico (4).

O ácido oleanólico (ácido 3 β -hidroxioleano-12-em-28-óico), é um triterpeno de esqueleto carbônico do tipo oleano, é encontrado quase sempre com seu isômero, o ácido ursólico. Contudo, é observado que triterpenos de esqueleto oleano apresentam atividade biológica menor que os triterpenos ursano e lupano (VECHIA, 2009). Alguns de seus derivados são mais ativos que o próprio ácido oleanólico, contudo, mesmo assim apresenta propriedades biológicas maiores que outros triterpenos como o lupeol (SPORN, 2000, VECHIA, 2009). O ácido oleanólico apresenta ponto de fusão 310 °C, fórmula molecular C₃₀H₄₈O₃ e peso molecular 456,68 g/mol (HICHRI, 2003).

3.4 ATIVIDADES BIOLÓGICAS

3.4.1 ATIVIDADE CITOTÓXICA

Os ovos de *Artemia salina* podem ser empregados na análise e avaliação de resíduos de pesticidas, micotoxinas, poluentes, óleos tóxicos e intoxicação de ambiente marinho, isto através da inibição da eclosão dos ovos. A partir de 1982, iniciou-se o emprego de *Artemia salina* no monitoramento de extratos de plantas ou substâncias puras, com vistas à detecção da presença de compostos citotóxicos (MEYER, 1982). Os ovos desse camarão de água salgada, *Artemia salina* Leach, são facilmente obtidos a baixo custo em lojas especializadas em aquários e peixes ornamentais. Quando colocadas em solução salina, em 24-48 horas, os ovos eclodem dando origem a um grande número de larvas (nauplii). Atualmente este organismo pode ser considerado como um indicador confiável quanto a toxicidade de substâncias que se encontram nos extratos orgânicos testados ou substâncias puras. Esta consideração encontra-se fundamentada em estudos de bioensaios comparativos, com diversas substâncias reconhecidamente citotóxicas, entre o teste de letalidade do camarão e testes *in vitro* efetuados com linhagens de células cancerígenas (ANDERSON, 1991). Ficou demonstrado que o teste com *Artemia salina* provou ser tão acurado quanto os testes realizados com células cancerígenas, proporcionando assim um teste preliminar para seleção de substâncias que apresentam atividade anticancerígena de forma simples, barata e confiável.



Figura 14: Naupliis de *Artemia salina*.

Fonte: <http://www.portalpez.com/la-artemia-salina-vt2425.html> acessado em 22/12/09

3.4.1 ATIVIDADE ANTICOLINESTERÁSICA

Acetilcolina (ACh) é um dos neurotransmissores excitatórios mais importante do sistema nervoso central e periférico. Desempenha diversas funções cognitivas como no processamento de informações sensoriais e outras. A ação da enzima acetilcolinesterase (AChE) envolve o controle do mecanismo colinérgico, catalisando a hidrólise do substrato ACh em ácido acético e colina. Por isto, a AChE tem sido alvo de estudo para o tratamento de doenças neurodegenerativas progressivas como o mal de Alzheimer e Parkinson, pela restauração da função colinérgica, através da elevação do nível de acetilcolina (VIEGAS, 2005; ROGERS, 2005; BRUNEAU, 2005).

Os mais modernos medicamentos utilizados para tratar os sintomas do mal de Alzheimer elevam os níveis de acetilcolina pela inibição da enzima acetilcolinesterase (AChE). O medicamento considerado mais efetivo no tratamento é a galantamina, um alcalóide anticolinesterásico, isolado de plantas da família Amaryllidaceae. Além de alcalóides, outras classes de metabólitos possuem compostos que inibem a acetilcolinesterase (GIORDANI, R. B., 2008). Contudo, essa inibição não pode ser exagerada, pois pode causar uma elevada atividade dos receptores colinérgicos, causando possíveis efeitos tóxicos como alterações comportamentais: hiperatividade, asfixia e finalmente a morte (WALKER, 2001). Mecanismo semelhante ao que ocorre no envenenamento pelos pesticidas organofosforados e carbamatos.

Existem na literatura várias formas de determinar a inibição da enzima acetilcolinesterase. Uma forma simples e rápida consiste em um pré-teste qualitativo. Onde a inibição da acetilcolinesterase é determinada através da detecção da conversão do acetato de naftila em naftol e a formação do corante de cor púrpura correspondente, quando reage com o sal de fast blue B. Inibidores de colinesterases produzem spots brancos destacando-se da sílica da placa que apresenta cor azul. O alcalóide fisostigmina, pode ser utilizado como padrão positivo e para determinar a sensibilidade do método (MARSTON, 2002).

4 PARTE EXPERIMENTAL

4.1 Equipamentos utilizados nas reações e caracterizações dos reagentes e produtos

As reações de esterificação foram realizadas usando o banho termostatizado com agitador magnético modelo (78HW-1) da BIOMIXER.

A pureza dos produtos foi determinada através da comparação do R_f (índice de retenção) dos reagentes de partida com os dos produtos gerados, usando a CCDC e como reveladores, radiação com luz UV (254-365 nm), vapores de iodo e/ou reveladores químicos. Dentre estes, o mais utilizado foi o reagente de Liberman-Burchard.

A solução de Liberman-Burchard foi preparada a partir da mistura, cuidadosa, de 10 mL de ácido sulfúrico concentrado e 10 mL de anidrido acético a 5 mL de etanol resfriado em banho de gelo (STAHL, 1969).

Nas CCDC foram utilizadas placas pré-preparadas com gel de sílica 60 F₂₅₄ da Merck e da J. T. Baker-Chemical Co.

As purificações foram realizadas por cromatografia em coluna (CC), tendo como fase estacionária sílica gel 60 a Merck com diâmetro entre 0,063-0,200 mm e/ou polímero sephadex (LH20) da Pharmacia (Carlo Erba) e diferentes eluentes como fase móvel.

Os reagentes e produtos foram caracterizados por técnicas espectroscópicas de ressonância magnética nuclear (RMN), infravermelho (IV) e pelo ponto de fusão.

Os espectros de RMN foram obtidos em aparelho GEMINI 2000 da Varian e Bruker AC-400 operando a 300 e 400MHZ para ¹H e 75 e 100MHZ para ¹³C e utilizando CDCl₃, Ac-d₆, MeOD ou Pyr-d₅ como solvente e o sinal do ¹H ou do ¹³C dos solventes, como referencia interna.

O aparelho de ponto de fusão foi o (MQAPF-302) da Microquímica Equipamentos, em quanto os espectros no infravermelho foram registrados em aparelho VARIAN 1000 FT-IR da Scimitar Series, usando como técnica de registro pastilha de KBr e filme de CHCl₃ em célula de quartzo.

O moinho usado para triturar o material vegetal foi do tipo lâminas de faca da marca TECNAL.

O evaporador rotatório utilizado para evaporação de solventes à pressão reduzida foi da marca HEIDOLPH LABOROTA 4000- EFFICIENT, com temperatura em geral entre 35°C e 50°C.

4.2 Reagentes e solventes utilizados.

- ✓ Acros Organic: anidridos propiônico, butírico, benzóico e succínico, cloreto de 3-clorobenzoíla.
- ✓ Nuclear: sulfato de sódio.
- ✓ Riedel: ácido cinâmico.
- ✓ Merck: ácido perclórico 70%, ácido fórmico 88%, anidrido acético, bicarbonato de potássio, piridina.
- ✓ QUEMIS: ácido acético glacial, acetato de etila, clorofórmio, diclorometano, etanol, metanol, hexano, todos P.A..
- ✓ MP BIOMEDICAL: β -sitosterol.
- ✓ O lupeol foi cedido pelo estudante de Doutorado Clayton Queiroz que isolou da planta *Cenostigma gardnerianum Tul.*
- ✓ Os ácidos betulínico, ursólico e oleanólico foram isolados da planta *Eriope blanchetti* (Lamiaceae) procedimento descrito na seção 4.4 (pág.42).

4.3 Coleta do material vegetal e identificação da espécie

A espécie *Eriope blanchetii* (Lamiaceae) foi coletada na área do Parque Metropolitano do Abaeté, localizado na cidade de Salvador – BA (Figura 16), identificada pela Profa. Maria Lenise Guedes sendo uma exsicata depositada no Herbário Prof. Alexandre Leal Costa, do Instituto de Biologia da UFBA, sob o número 045599 (Figura 15).

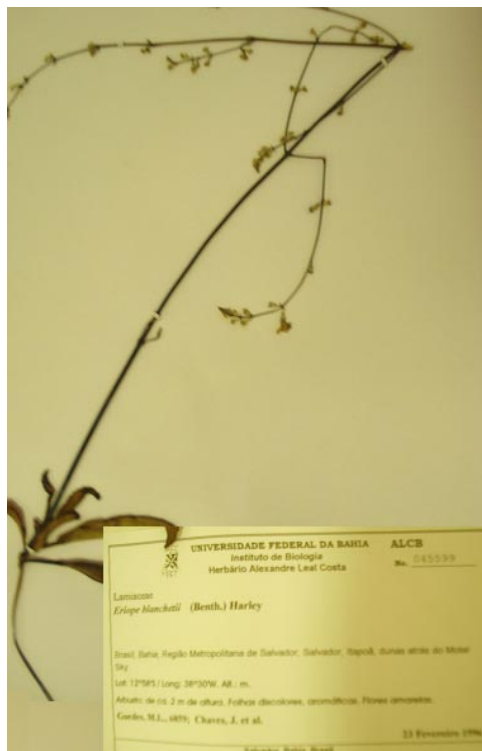


Figura 15: Exsicata da espécie botânica *Eriope blanchetii* (Lamiaceae).



Figura 16: Foto de um espécimen de *E. blanchetii* (Parque Restinga da Lagoa do Abaeté, foto Hugo N. Brandão).

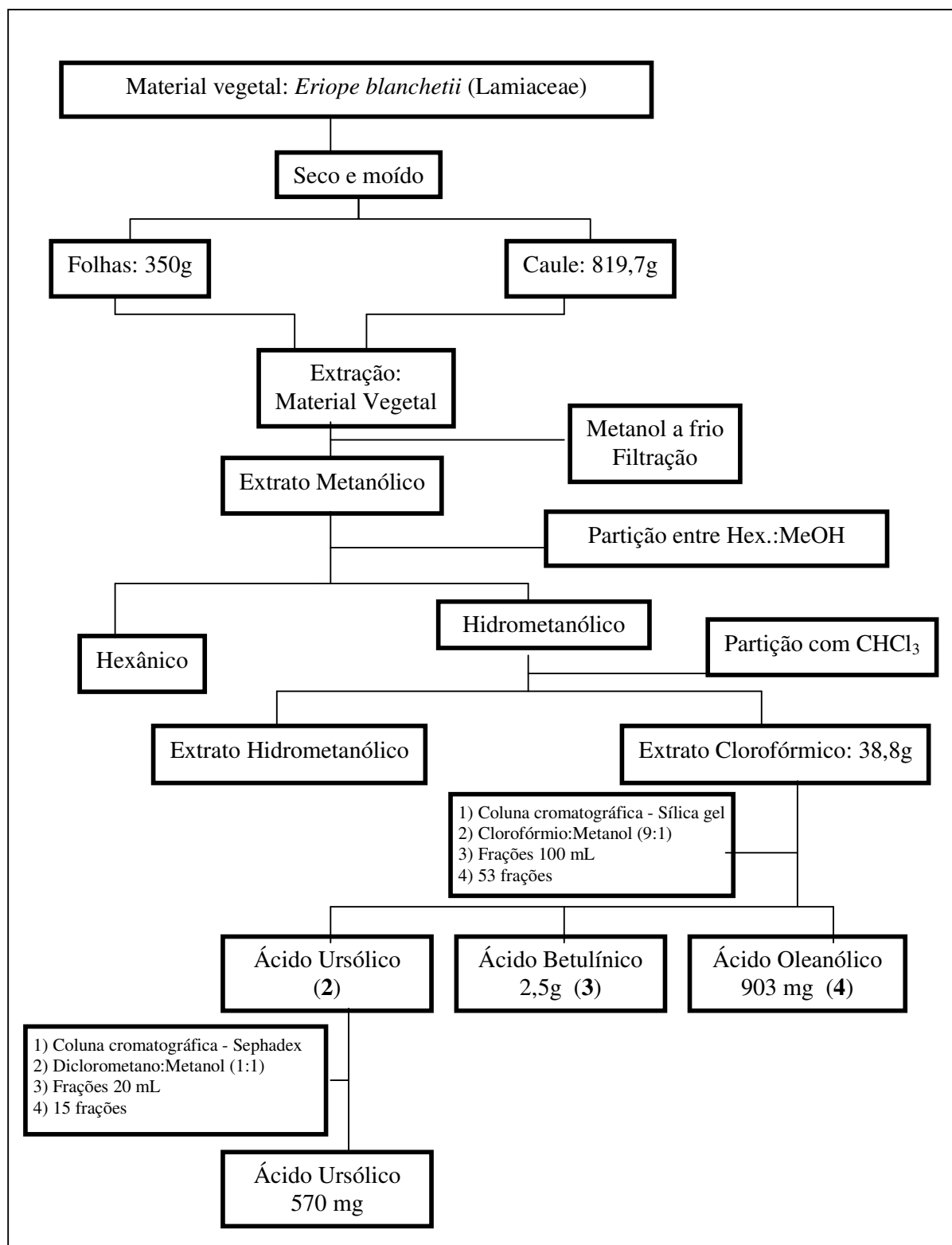
4.4 Isolamento dos triterpenos de *Eriope blanchetii*

Após a coleta, o material vegetal, folhas 350 g e caule 819,7 g, de *Eriope blanchetii* foi seco em estufa a 40°C com ventilação, moído (moedor tipo TECNAL) e submetidas à maceração por 48 horas por quatro vezes consecutivas em MeOH. O extrato metanólico bruto obtido após concentração no evaporador rotatório, foi particionado com hexano e em seguida com clorofórmio, onde o procedimento realizado encontra-se ilustrado no fluxograma (Esquema 1, pág. 43). E as massas obtidas nestes procedimentos encontram-se descritas na (Tabela 3).

Tabela 3: Massas dos extratos das folhas da *Eriope blanchetii*

Extrato das folhas	Massa (g)	Extrato do caule	Massa (g)
Hexânico	12,3	Hexânico	14,8
CHCl ₃	38,8	CHCl ₃	8,4

Os ácidos ursólico (**2**) (Figura 11, pág. 34), betulínico (**3**) (Figura 12, pág. 35) e oleanólico (**4**) (Figura 13, pág. 36) foram isolados dos extratos CHCl₃ através de metodologia previamente descrita (DAVID et al, 2001). Em resumo a fase CHCl₃ foi submetida a fracionamento em coluna cromatográfica utilizando-se sílica gel como adsorvente e, como fase móvel misturas de CHCl₃:MeOH em ordem crescente de polaridade. As frações obtidas desta coluna foram analisadas por cromatografia em camada delgada comparativa (CCDC), utilizando-se reagente de Liebermann-Buchard como revelador dos ácidos triterpenos. As frações que mostraram-se puras neste procedimento e deram teste positivo para terpenos foram submetidas a análise por RMN. O ácido betulínico (**3**) também foi obtido como um precipitado durante a partição do extrato metanólico com hexano, onde o terpeno foi depositado no funil de separação, sendo, dessa forma, separado dos solventes e coletado. De modo geral, foram obtidos 1,47 % de rendimento de ácido ursólico (**2**), 6,44 % para o ácido betulínico (**3**) e 2,38 % para o ácido oleanólico (**4**).



Esquema 1: Fluxograma geral do desenvolvimento da obtenção do ácido ursólico, ácido betulínico e ácido oleanólico a partir do material vegetal (*Eriope blanchetii* (Lamiaceae)).

4.5 Derivados do β -Sitosterol

4.5.1 Preparo dos derivados do β -Sitosterol pela reação com anidridos

As reações para o preparo dos derivados do β -Sitosterol, se desenvolveu obedecendo a seguinte metodologia: em 5 (cinco) balões de 50 ml, foram adicionados, separadamente, 200 mg de β -Sitosterol, 2 mL de Piridina e 2,0 mg de 2,4-dimetil amino piridina (DMAP). Em cada balão foram adicionados os respectivos anidridos, 0,045 mL de anidrido acético, 0,0618 mL de anidrido propiônico, 0,0792 mL de anidrido butírico, 0,023 mg de anidrido succínico e 0,255 mg de anidrido benzóico. A mistura foi mantida em refluxo durante 29 horas em temperatura de 43 °C. O solvente foi evaporado em capela (temperatura ambiente) e o meio reacional obtido (produto), foi dissolvido em clorofórmio (CHCl_3) e lavado 2 (duas) vezes com água destilada. A fase orgânica foi misturada com uma porção de Na_2SO_4 , filtrada e o solvente foi eliminado usando rotaevaporador (KOVGANKO, 1999; McCARTHY, 2005; SONG, 2004). O sólido formado foi purificado por cromatografia em coluna (CC), tendo como fase estacionária sílica gel e fase móvel hex:AcOEt (9:1). Os produtos foram agrupados após a análise da CCDC revelada em UV (245-365nm) e reagente de Liebermann Buchard. A identificação dos produtos foi obtida e RMN ^1H e ^{13}C . A Figura 17 ilustra as reações ocorridas.

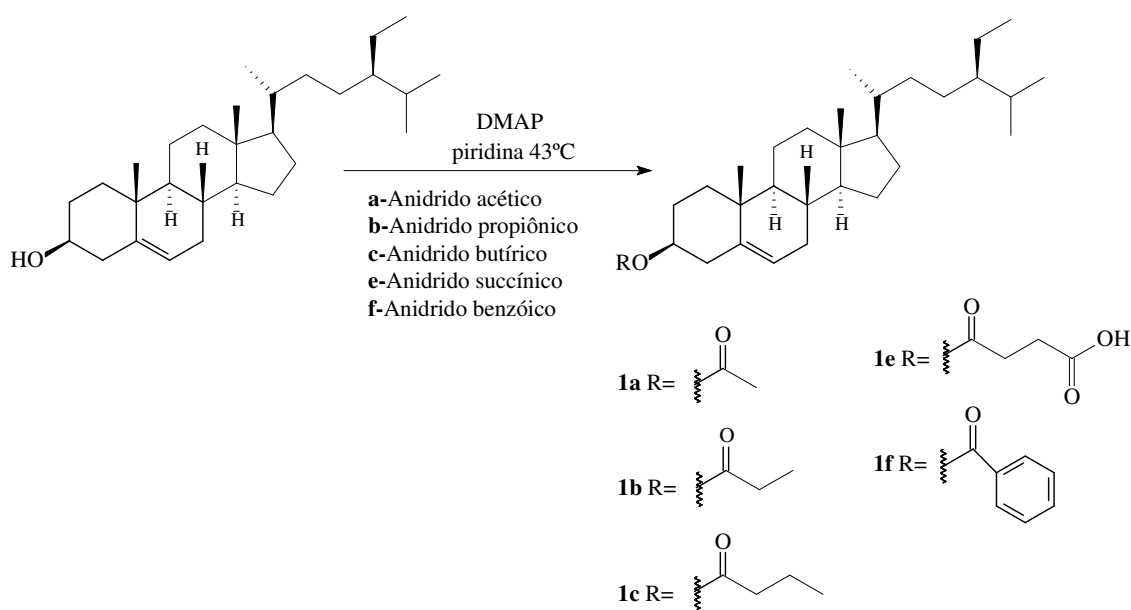
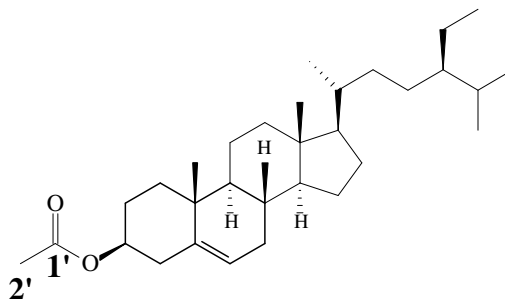


Figura 17: Reação de esterificação do β -Sitosterol com diferentes anidridos.

3 β -acetoxestigmast-5-eno (**1a**)

Rendimento: 75,7%

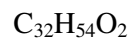
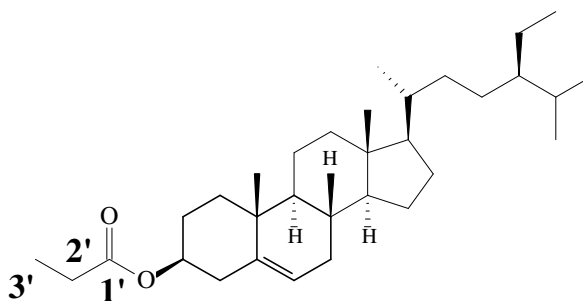
IV (filme, cm^{-1}): 3010 (C-H), 1710 (C=O), 1222 (C-O)

RMN ^1H (300 M Hz), δ : 5,35 (1H, $J=5$, d , H-6); 4,9-5,19 (3H, m , H-3,22,23); 2,05 (3H, s , H-2')

RMN ^{13}C (300 M Hz): Tabela-5, pág. 83

R_f: 0,64 (hexano: acetato de etila 9:1 v/v)

PF: 118,6-119,5°C

3 β -propoxestigmast-5-eno (**1b**)

Rendimento: 75,4%

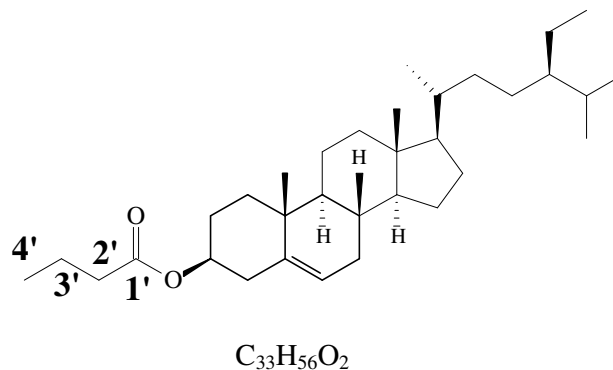
IV (filme, cm^{-1}): 3009 (C-H), 1715 (C=O), 1222 (C-O)

RMN ^1H (300 M Hz), δ : 5,37 (1H, $J=5$, d , H-6); 4,56-4,63 (1H, m , H-3); 2,3-2,4 (2H, $J=7,5$, t , H-2')

RMN ^{13}C (300 M Hz): Tabela-5, pág. 83

R_f: 0,75 (hexano: acetato de etila 9:1 v/v)

PF: 73,1-73,9°C

3 β -butoxestigmast-5-eno (**1c**)

Rendimento: 84,3%

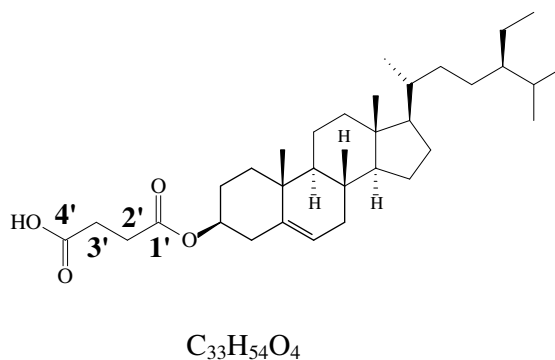
IV (filme, cm^{-1}): 3008-2964 (C-H), 1716 (C=O), 1222 (C-O)

RMN 1H (300 M Hz), δ : 5,39(1H, J= 5, *d*, H-6); 4,58-4,70 (1H, *m*, H-3); 2,2-2,25 (2H, J= 7,2, *t*, H-2')

RMN ^{13}C (300 M Hz): Tabela-5, pág. 83

R_f: 0,80 (hexano: acetato de etila 9:1 v/v)

PF: 80,3-81,5°C

3 β -carboxisuccinatoxestigmast-5-eno (**1e**)

Rendimento: 47,8%

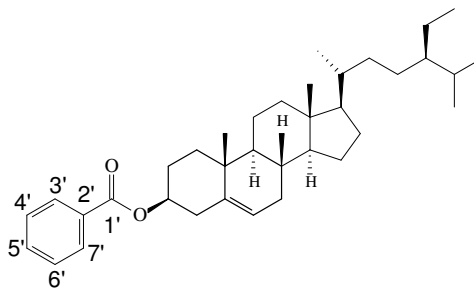
IV (filme, cm^{-1}): 3600-3414 (OH), 3007 (C-H), 1720 (C=O), 1222 (C-O)

RMN 1H (300 M Hz), δ : 5,39(1H, J= 5, *d*, H-6); 4,55-4,76(1H, *m*, H-3); 2,5(2H, *t*, H-2'); 2,8(2H, *t*, H-3')

RMN ^{13}C (300 M Hz): Tabela-5, pág. 83

R_f: 0,14 (hexano: acetato de etila 9:1 v/v)

PF: 135,2-135,5°C

3 β -benzoxestigmast-5-eno (**1f**)

Rendimento: 63,7%

IV (filme, cm^{-1}): 3007 (C-H), 1716 (C=O), 1222 (C-O)

RMN ^1H (300 M Hz), δ : 8,06 (2H, J= 1,7 e 8,3, *d*, H-3' e 7'); 7,55 (1H, J= 7,5, *t*, H-5'); 7,43 (2H, J= 7,5, *t*, H-4' e 6'); 5,41 (1H, J= 5, *d*, H-6); 4,8-4,99 (1H, *m*, H-3)

RMN ^{13}C (300 M Hz): Tabela-5, pág. 83

Rf: 0,80 (hexano: acetato de etila 9:1 v/v)

PF: 123,6-124,9°C

4.5.2 Preparo do 3 β -formestigmast-5-eno (**1d**)

Em um balão de 50 mL foram adicionados 200 mg de β -Sitosterol, 2 mL de CHCl_3 , 0,4 mL de ácido fórmico e 3 de ácido perclórico. A mistura foi mantida em agitação por 2 horas em temperatura de 50 °C, em seguida, foram adicionados 4 mL de anidrido acético e 30 mL de água (SOLDI, 2008). Após o fim da reação o solvente foi evaporado em capela e o resíduo formado foi purificado por cromatografia em coluna (CC), tendo como fase estacionária sílica gel e fase móvel hex: AcOEt: MeOH, em ordem crescente de polaridade. Os produtos foram agrupados por CCDC e revelados em UV (245-365nm) e Liebermann Buchard, A identificação do produto foi obtida através dos espectros IV e RMN ^1H .

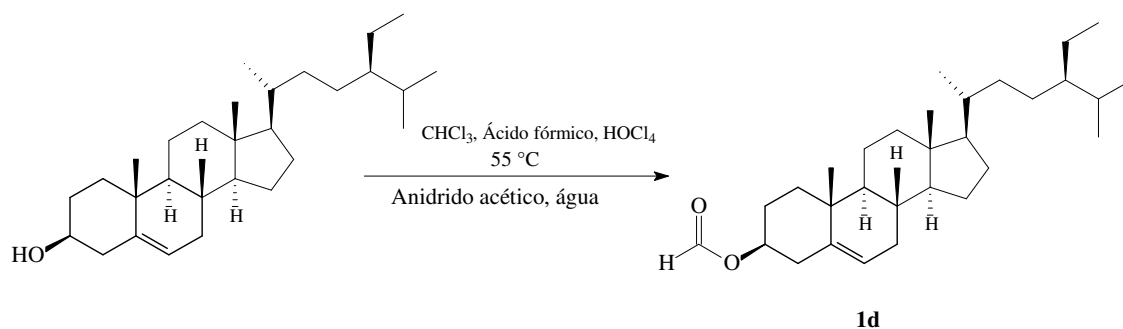
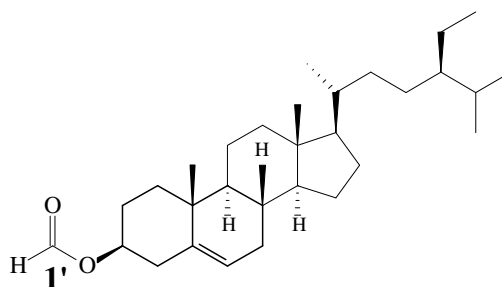


Figura 18: Reação de formilação.

3β-formestigmast-5-eno (**1d**)



Rendimento: 70,6%

IV (filme, cm^{-1}): 3007-2936 (C-H), 1717 (C=O), 1222 (C-O)

RMN 1H (300 MHz), δ : 8,2 (1H, *s*, H-1'); 5,4 (1H, *d*, J= 5, H-6); 4,8-4,6 (1H, *m*, H-3)

R_f: 0,63 (hexano: acetato de etila 9:1 v/v).

PF: 73,6-74,8°C

4.5.3 Preparo do 3β-clorobenzoxestigmast-5-eno (**1g**)

Em um balão de 50 mL foram adicionados, 500 mg de β-Sitosterol, 2 mL de piridina e 0,31 mL de cloreto de 3-clorobenzoíla sobre banho de gelo em agitação durante 24 horas. Em seguida, o solvente foi evaporado em capela e o sólido submetido à CC, tendo como fase estacionária sílica gel e fase móvel hex:AcOEt (8:2). Foram recolhidas 10 frações, agrupadas por CCDC e reveladas em UV (245-365nm) e Lieberman-Buchard., obtendo-se desta maneira o produto purificado que foi identificado por IV e RMN 1H .

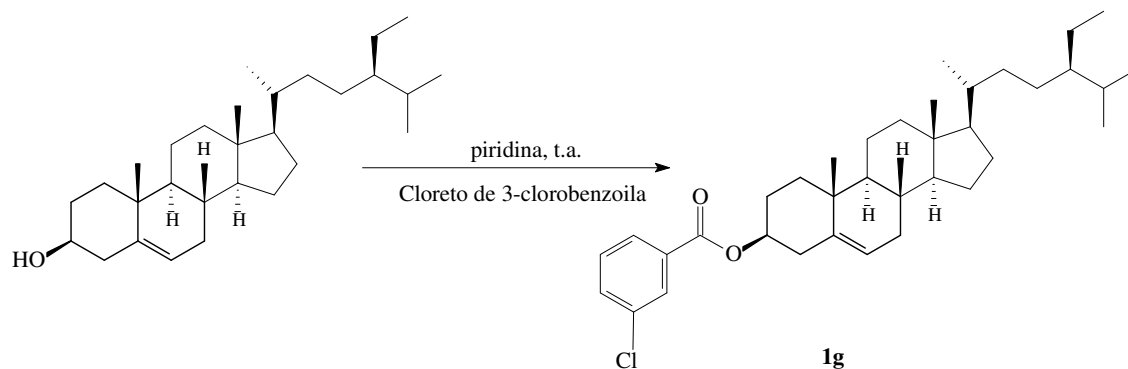
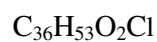
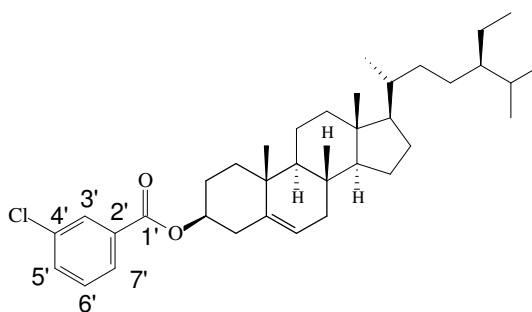


Figura 19: Reação de esterificação usando cloreto de acila.

3 β -3-clorobenzoxestigmast-5-eno (**1g**)



Rendimento: 57%

IV (KBr, cm^{-1}): 2976-2832(C-H), 1717(C=O), 1571-1426(C=C), 1222(C-O), 1125(C-Cl), 747(C-H)

RMN 1H (300 M Hz), δ : 8,1 (1H, J= 1,7, *t*, H-3'); 7,95-7,54 (1H, J= 1,3 e 7,8, *dt*, H-7'); 7,53 (1H, J= 1,1 e 9,1, H-5'), 7,4 (1H, J= 7,8, *t*, H-6'); 5,4 (1H, J= 5, *d*, H-6); 4,8-4,9 (1H, *m*, H-3)

R_f: 0,24 (hexano: acetato de etila 8:2 v/v)

PF: 115,9-116,9°C.

4.5.4 Síntese do *trans*-cinamato de estigmast-5-eno (**1h**)

Em um balões de 50 mL foram adicionados 2,5g de ácido cinâmico e 10 mL de CH₂Cl₂ (vedados com septo de borracha). Em seguida, foi adicionado cloreto de tionila (SOCl₂) por meio de seringa de vidro de 5 mL. Após 2 horas de reação em banho de gelo, o solvente foi retirado em pressão reduzida, formando um resíduo oleoso.

O resíduo do balão contendo o respectivo cloreto cinâmico, foi dissolvido em 10 mL de CH₂Cl₂ e em seguida, adicionado em outro balão contendo 1,4 g de β-Sitosterol dissolvido em CH₂Cl₂. A reação foi mantida durante 24 horas em temperatura ambiente. Depois de completada a reação, foram adicionados mais CH₂Cl₂, o solvente foi transferido para um funil de separação, lavado com solução saturada de KHCO₃ e a fase orgânica foi concentrada em pressão reduzida (ESPINDOLA, 2006; FERREIRA, 2006). Fornecendo o éster de sitosterol impuro, que foi purificados em coluna de sílica flash, tendo como eluentes hex:AcOEt (8:2). Foram recolhidas frações, as frações semelhantes foram agrupadas por CCDC e reveladas em UV (245-365 nm) e Lieberman-Buchard., obtendo-se desta maneira o produto esterificado, purificado e identificado por IV e RMN ¹H e ¹³C.

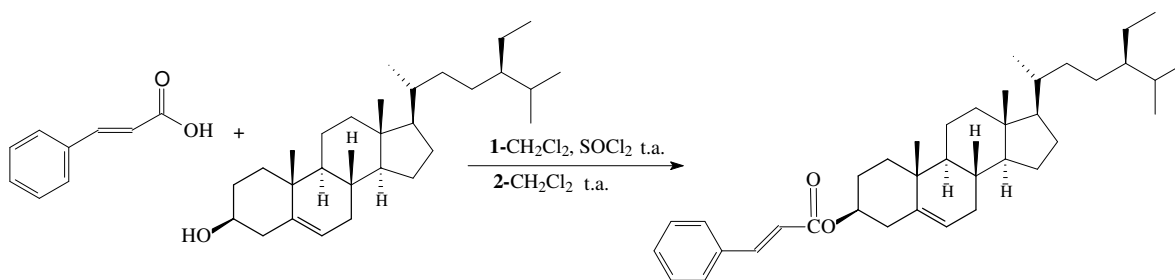
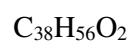
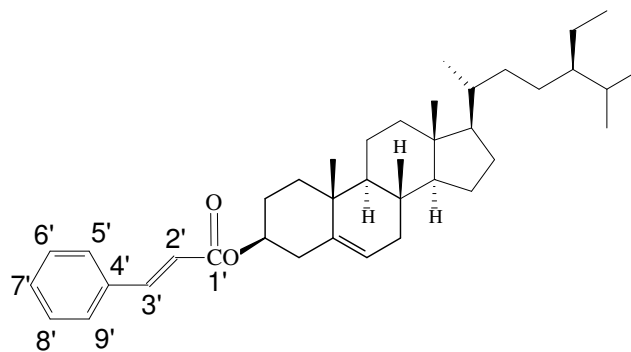


Figura 20: Preparo do *trans*-cinamato de estigmast-5-eno (**1h**).

trans-cinamato de estigmast-5-eno (**1h**)

Rendimento: 68,72%

IV (filme, cm^{-1}): 3007-2927 (C-H), 1716 (C=O), 1223 (C-O), 760 (C-H)

RMN ^1H (300 M Hz), δ : 7,53 (2H, *J*= 15, *d*, H-5' e 9'); 7,38 (1H, *J*=3,6 e 4,8, *dd*, H-6', 8'); 7,71 - 7,66 (1H, *d*, H-2'); 6,46 - 6,41 (1H, *d*, H-3'); 5,41 (1H, *J*= 5, *d*, H-6); 4,8-4,7 (1H, *m*, H-3)

RMN ^{13}C (300 M Hz):Tabela-5, pág. 83

R_f: 0,77 (hexano: acetato de etila 9:1 v/v).

PF: 124,2-125,4°C

4.6 Derivados dos triterpenos

4.6.1 Derivados do ácido ursólico obtidos pela reação com anidridos

No preparo dos derivados do ácido ursólico foram empregados 4 (quatro) balões de 50 ml, nos quais foram adicionados, separadamente, 100 mg de ácido ursólico, 2 mL de Piridina e 2,0 mg de 2,4-dimetil amino piridina (DMAP). Em cada balão foram adicionados os respectivos anidridos, 0,02 mL de anidrido acético, 0,4 mL de anidrido propiônico, 0,072 mL de anidrido butírico e 0,057 mg de anidrido benzóico. A mistura foi mantida em refluxo durante 29 horas em temperatura de 43 °C. O solvente foi evaporado em capela (temperatura ambiente) e o meio reacional obtido (produto), foi dissolvido em clorofórmio (CHCl₃) e lavado 2 (duas) vezes com água destilada. A fase orgânica foi misturada com uma porção de Na₂SO₄, filtrada e concentrada em rotaevaporador. O sólido formado foi purificado por cromatografia em coluna (CC), tendo como fase estacionária sílica gel e fase móvel hex: AcOEt (9:1). Os produtos foram agrupados por CCDC e revelados em UV (245-365nm) e Liebermann Buchard. A identificação dos produtos foi realizada por RMN ¹H.

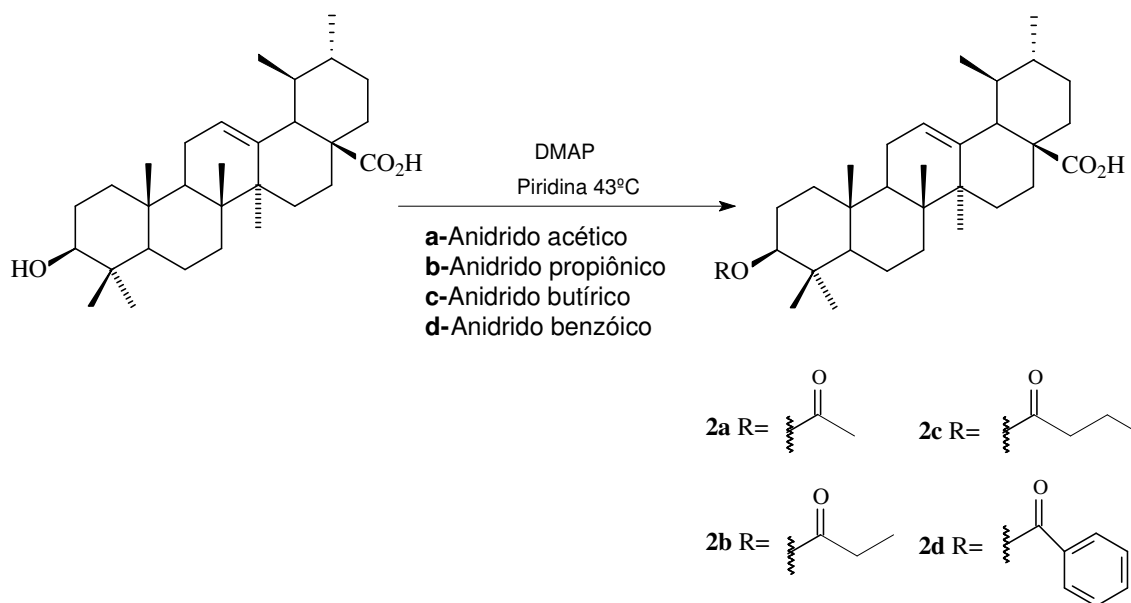
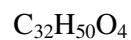
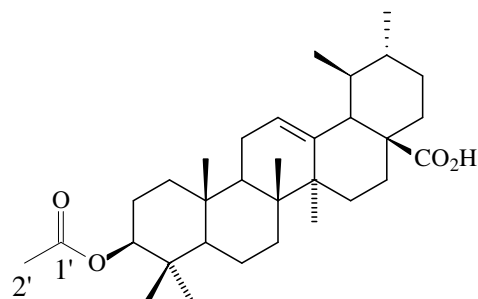


Figura 21: Reação de esterificação do ácido ursólico com diferentes anidridos.

Ácido 3 β -acetilursólico (**2a**)



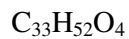
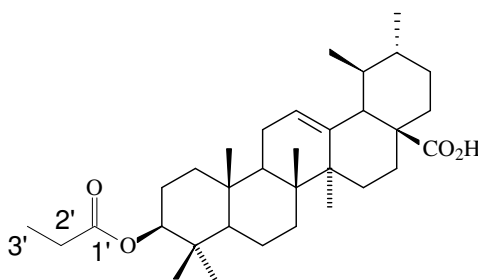
Rendimento: 27,1%

IV (filme, cm^{-1}): 3005-2925 (C-H), 1712 (C=O), 1222 (C-O)

R_f: 0,69(hexano: acetato de etila 9:1 v/v)

PF: 176,1-177,2°C

Ácido 3 β -propilursólico (**2b**)



Rendimento: 55,3%

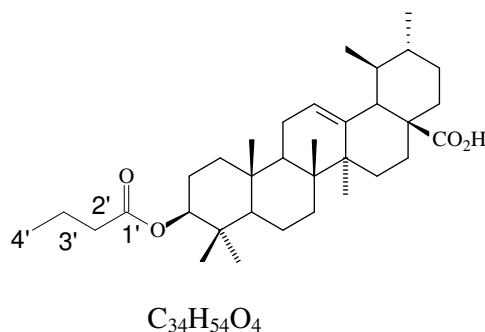
IV (filme, cm^{-1}): 3006-2879 (C-H), 1712 (C=O), 1222 (C-O)

RMN ^1H (300 M Hz), δ : 5,2 (1H, J= 3,3, *t*, H-12); 4,51 (1H, J= 6 e 8,6, *dd*, H-3); 2,3-2,4 (2H, J= 7,5, *q*, H-2'); 2,2 (1H, J= 11, *d*, H-18)

R_f: 0,71(hexano: acetato de etila 9:1 v/v)

PF: 266,5-267,3°C

Ácido 3β-butilursólico (2c)



Rendimento: 59,82%

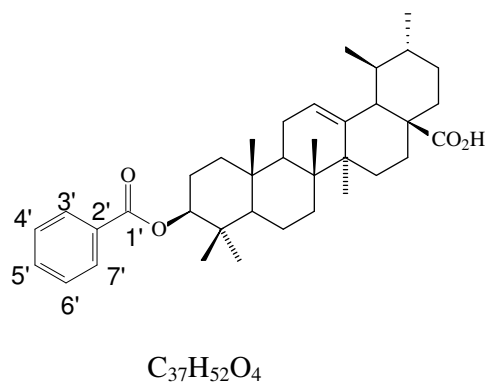
IV (filme, cm^{-1}): 3006-2927 (C-H), 1714 (C=O), 1222 (C-O)

RMN 1H (300 M Hz), δ : 5,2 (1H, J= 3,3, *t*, H-12); 4,51 (1H, J= 5,6 e 8,9, *dd*, H-3); 2,3-2,4 (2H, J= 7,2, *t*, H-2'); 2,2 (1H, J= 11, *d*, H-18)

Rf: 0,71(hexano: acetato de etila 9:1 v/v)

PF: 265,0-265,1°C

Ácido 3β-benzoilursólico (2d)



Rendimento: 51,4%

IV (filme, cm^{-1}): 3006-2926 (C-H), 1714 (C=O), 1222 (C-O)

RMN 1H (300 M Hz), δ : 8,15 (2H, J= 1,7 e 8,3, *dt*, H-3', 7'); 7,65 (1H, J= 1,3 e 7,5, *tt*, H-5'); 7,5 (2H, J= 1,5 e 8, *td,m*, H-4' e 6'); 5,3 (1H, *s*, H-12); 4,76 (1H, J= 5,6 e 8,9, *dd*, H-3); 2,25(1H, J= 11, *d*, H-18)

Rf: 0,57(hexano: acetato de etila 9:1 v/v)

PF: 97,3 - 99,5°C

4.6.2 Preparação dos ácidos 3 β -(3-clorobenzoil) ursólico (**2e**) 3 β -(3-clorobenzoil) betulínico (**3a**), 3 β -(3-clorobenzoil) oleanólico (**4a**) e 3 β -(3-clorobenzoil) lupeol (**5a**)

As reações foram realizadas em 4 (quatro) balões de 50 mL, onde foram adicionados 42,3 mg do ácido ursólico, 28 mg (μmol) do ácido betulínico, 25 mg de ácido oleanólico, 21,5 mg de Lupeol, 2 mL de piridina (separadamente em cada balão), sequencialmente foram adicionados 84 μmL ; 23,6 μmL ; 21 μmL e 19,42 μmL de cloreto de 3-clorobenzoíla sobre banho de gelo e agitação durante 24 horas (na capela). Em seguida, o solvente foi evaporado em capela e o sólido submetido à cromatografia em coluna, tendo como fase estacionária sílica flash e fase móvel hex: AcOEt (8:2). Foram recolhidas 10 frações (de cada amostra), agrupadas por CCDC e reveladas em UV (245-365nm) e Lieberman-Buchard., obtendo-se desta maneira os produtos purificados que foram identificados por IV e RMN ¹ H.

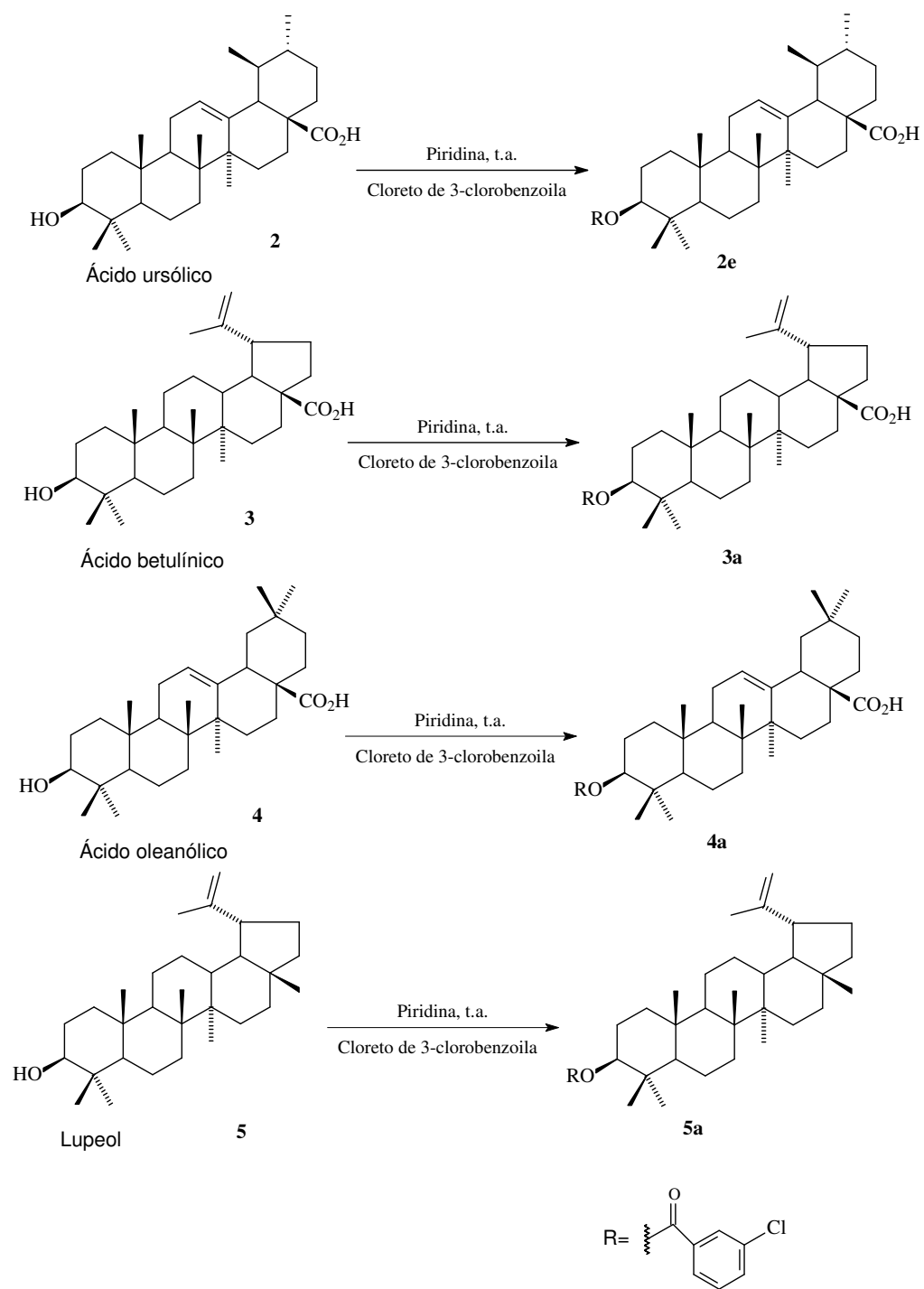
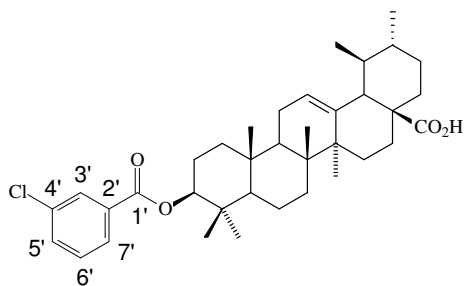


Figura 22: Reações de esterificação dos triterpenos usando cloreto de acila no preparo de: ácidos 3β-(3-clorobenzoil)ursólico (2e) 3β-(3-clorobenzoil)betulínico (3a), 3β-(3-clorobenzoil)oleanólico (4a) e 3β-(3-clorobenzoil)lupeol (5a).

Ácidos 3 β -(3-clorobenzoil) ursólico (**2e**)

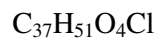
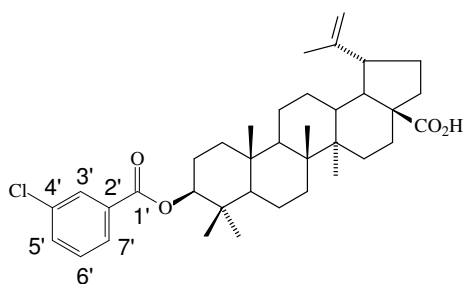
Rendimento: 69%

IV (KBr, cm^{-1}): 3084-2867 (OH), 3005-2925 (C-H), 1692 (C=O), 1572 (C=C), 1309-1261 (C-O), 846 (C-Cl), 717 (C-H)

RMN 1H (300 M Hz), δ : 8,1(1H, J= 1,7 e 2,5, *dd*, H-3'); 8,0(1H, J= 1 e 7,5, *dt*, H-7'); 7,5(1H, J= 1 e 8, *td*, H-5'); 7,4(1H, J= 7,8, *t*, H-6'); 5,2(1H, J= 3,3, *t*, H-12); 4,75(1H, J= 8,9, *t*, H-3); 2,2(1H, J= 11, *d*, H-18)

Rf: 0,54 (hexano: acetato de etila 8:2 v/v)

PF: 55,2-57,9°C

3 β -(3-clorobenzoil)betulínico (**3a**)

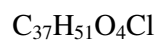
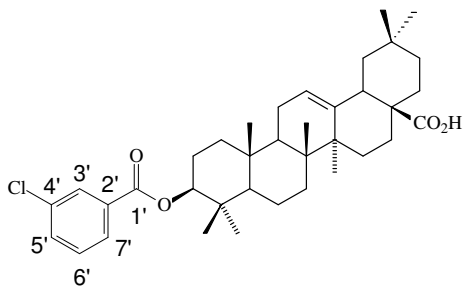
Rendimento: 13%

IV (KBr, cm^{-1}): 3522-3281 (OH), 3005-2925 (C-H), 1691 (C=O), 1586 (C=C), 1299-1262 (C-O), 847 (C-Cl), 727 (C-H)

RMN 1H (300 M Hz), δ : 4,72 (1H, *s*, H-29); 4,62 (1H, *s*, H-29); 3,7 (1H, J= 7, *t*, H-3)

Rf: (hexano: acetato de etila 8:2 v/v)

PF: 65,9-66,4°C

3 β -(3-clorobenzoil) oleanólico (**4a**)

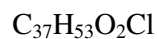
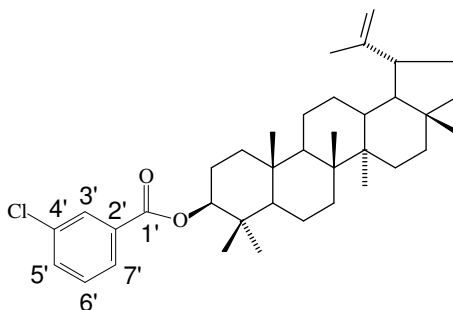
Rendimento: 34,6%

IV (KBr, cm^{-1}): 3511-3312 (OH), 3061-2701 (C-H), 1646 (C=O), 1565 (C=C), 1249-1299 (C-O), 894 (C-Cl), 727 (C-H)

RMN 1H (300 M Hz), δ : 7,99 (1H, *s*, H-3'); 7,99- 7,96 (1H, *d*, H-7'); 7,6 (1H, *d*, H-5'); 7,5 (1H, *t*, H-6'); 4,35 (1H, *J*= 7,7, *m*, H-3); 2,3 (1H, *J*= 11, *d*, H-18)

Rf: (hexano: acetato de etila 8:2 v/v)

PF: 52,9-54,1°C

3 β -(3-clorobenzoil)lupeol (**5a**).

Rendimento: 70%

IV (KBr, cm^{-1}): 23078-2863(C-H), 1712(C=O), 1571(C=C), 1299-1262(C-O), 847(C-Cl), 727(C-H)

RMN 1H (300 M Hz), δ : 8,0(1H, *J*= 2, *t*, H-3'); 7,9(1H, *J*= 1 e 7,8, *dt*, H-7'); 7,55(1H, *J*= 1 e 8, *dt*, H-5'); 7,4-7,35(1H, *J*= 7,8, *t*, H-6'); 4,8(1H, *J*= 2,5, *d*, H-29); 4,6(1H, *J*= 2,4, *d*, H-29); 4,32(1H, *J*= 7, *t*, H-3)

RF: 0,24 (hexano: acetato de etila 8:2 v/v)

Rf: 65,9-66,4°C

4.7 Testes Biológicos

4.7.1 Ensaio de toxicidade de *Artemia salina*

Em um aquário de vidro com uma divisória escura, contendo pequenas aberturas (para migração das larvas), os cistos de *Artemia salina* (500 mg) do fabricante Miramar, adquiridos no comércio local, foram incubados em solução marinha artificial (13,39 g de sal marinho: 3,5 L de água mineral), sob iluminação artificial (lâmpada de 60w), temperatura ambiente de 28° C e estado de saturação de oxigênio conseguido através de uma bomba de ar conectada ao fundo do aquário. O aquário foi recoberto com papel alumínio deixando-se um pequeno espaço para penetração da iluminação. Como as larvas (nauplii) têm afinidade pela luz, ou seja, apresentam fototropismo positivo, foi possível separá-las dos cistos de forma manual através do uso de becker.

O bioensaio envolvendo *Artemia salina* consiste em avaliar a exposição de um determinado composto frente a esse crustáceo. A análise é feita mediante o cálculo da Concentração Letal Mínima (CL₅₀) (DOLABELA, 1997). O efeito tóxico dos compostos foi testado pelo método de Meyer (1982) modificado para se adequar às condições de nosso laboratório. Após 48 horas de incubação no claro, dez larvas foram transferidos para os frascos contendo as amostras (substâncias a serem testadas) em triplicatas e completado o volume até 5 mL com a água do mar artificial. Com auxílio de uma pipeta de Pasteur, foi realizada a contagem dos indivíduos mortos, após 24 horas de contato com as amostras e em iluminação a 28°C. Cada um dos derivados do β -sitosterol e dos triterpenos foram testados nas concentrações de 25, 50, 75, 100, 150, 200 e 250 $\mu\text{g/mL}$ em triplicata. Para cada triplicata da amostra foi feito um controle contendo somente a água do mar artificial e as 10 larvas. Os naupliis foram considerados mortos caso não exibissem nenhum movimento durante dez segundos de observação.

4.7.2 Ensaio de inibição da acetilcolinesterase

A autobiografia foi desenvolvida em uma cromatoplaça de sílica gel, onde foram aplicadas as amostras. A enzima acetilcolinesterase foi dissolvida em tampão Tris 0,05 M (pH 7,8) seguida da adição de 150 mg de albumina de soro bovino para estabilização da mesma. Esta solução foi mantida à temperatura de 4 °C e nebulizada sobre a cromatoplaça com as amostras. A placa foi incubada a 37 °C, durante 20 min. Em seguida, a placa foi nebulizada com uma solução contendo 1-naftil acetato, em etanol, e sal de Fast Blue B, em água, ocorrendo o desenvolvimento de coloração púrpura após 1 a 2 min. As regiões da placa que contêm substâncias capazes de inibir a ação da enzima acetilcolinesterase apresentam uma mancha branca contra a coloração de fundo (neste caso ocorre formação do diazônio púrpura). Como padrão positivo foram utilizados uma solução-mãe a 1 mg/mL do alcalóide fisostigmina (GIORDANI, 2008).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Identificação do β -sitosterol e dos ácidos triterpênicos

Apesar do β -sitosterol usado nas reações ser de origem comercial, sua identificação e pureza foi determinada através da análise dos dados de RMN ^1H (Figura 23). Neste espectro foi detectada a presença de um multipletto em δ 3,5 referente ao hidrogênio carbinólico H-3, dois duplos dubletos em δ 5,05 e 5,17 referentes á hidrogênios olefínicos na posição H-22 e 23; indicando a presença de estigmasterol (**6**); portanto o padrão comercial utilizado consiste na mistura de β -sitosterol (**1**) e estigmasterol (**6**). Além desses sinais, pode ser verificado também, um dubleto em δ 5,38 ($J= 4,4$, 1H) referente ao hidrogênio olefínico na posição H-6.

De acordo com as especificações do fitoesteróide obtido comercialmente (MP BIOMEDICAL), a concentração de β -sitosterol é de 40,7% e a de estigmasterol é de 25,1%.

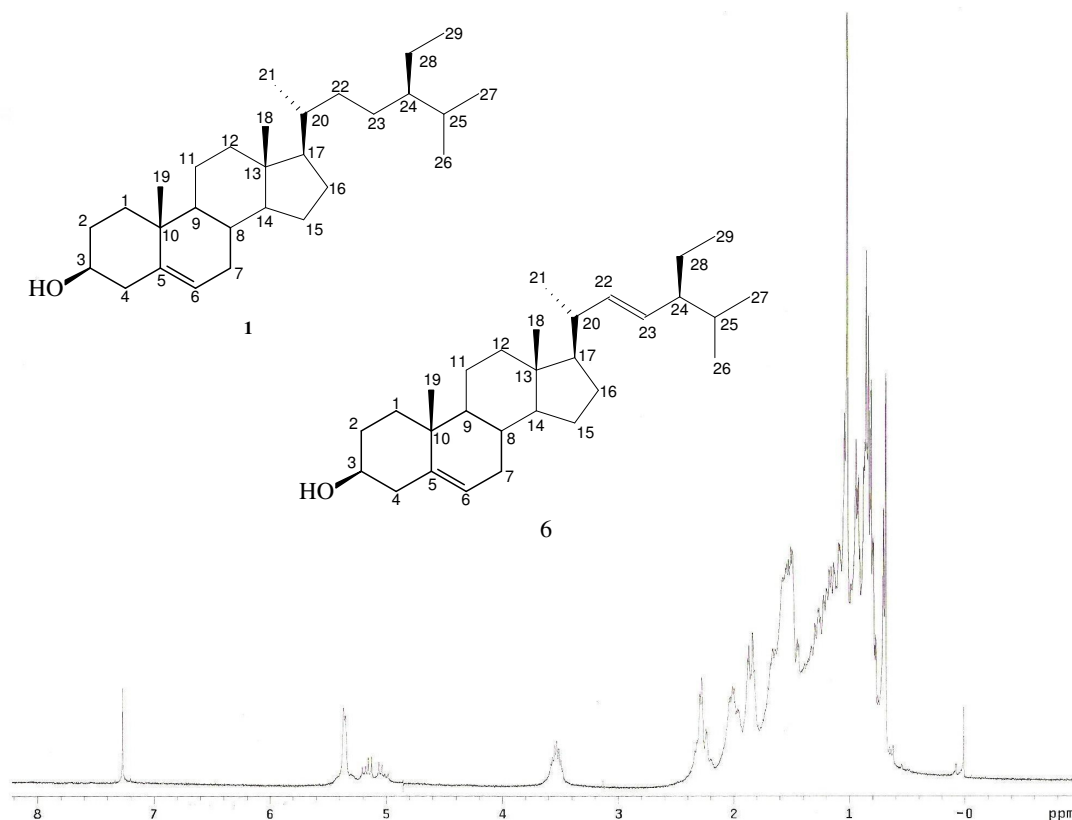


Figura 23: Espectro de ^1H do β -sitosterol (**1**) e do estigmasterol (**6**)[300 MHz, CDCl_3 , δ (ppm)]

A identificação do ácido betulínico foi realizada através da análise dos dados espectroscópicos de RMN ^1H e ^{13}C . O espectro de RMN ^1H (Figura 24) apresentou dois singletos largos em δ 4,4 e 4,6 característicos de hidrogênios olefinicos H-29 de terpenos da série dos lupenos. Ainda, através deste espectro foi possível destacar em δ 3,5 ($J=7$ Hz, 1H) um tripleto indicativo da presença de um hidrogênio carbinólico na posição H-3 também característico de triterpenos (MAHATO, 1994).

O espectro de RMN ^{13}C (Figura 25, pág. 63) apresentou sinais importantes que permitiram a identificação da substância, que foram comparadas com dados já descritos na literatura (Tabela-4, pág.66). Os sinais apresentaram deslocamento químico em δ 151,3 e 110,0 que podem ser atribuídos a carbonos olefinicos não hidrogenados e metínico (C-20 e C-29) de esqueleto da série lupano. Ainda neste espectro foi possível destacar o sinal com deslocamento químico em δ 78,1 atribuído ao carbono carbinólico C-3, além do sinal em δ 178,9 referente a um carbono acila do grupamento ácido.

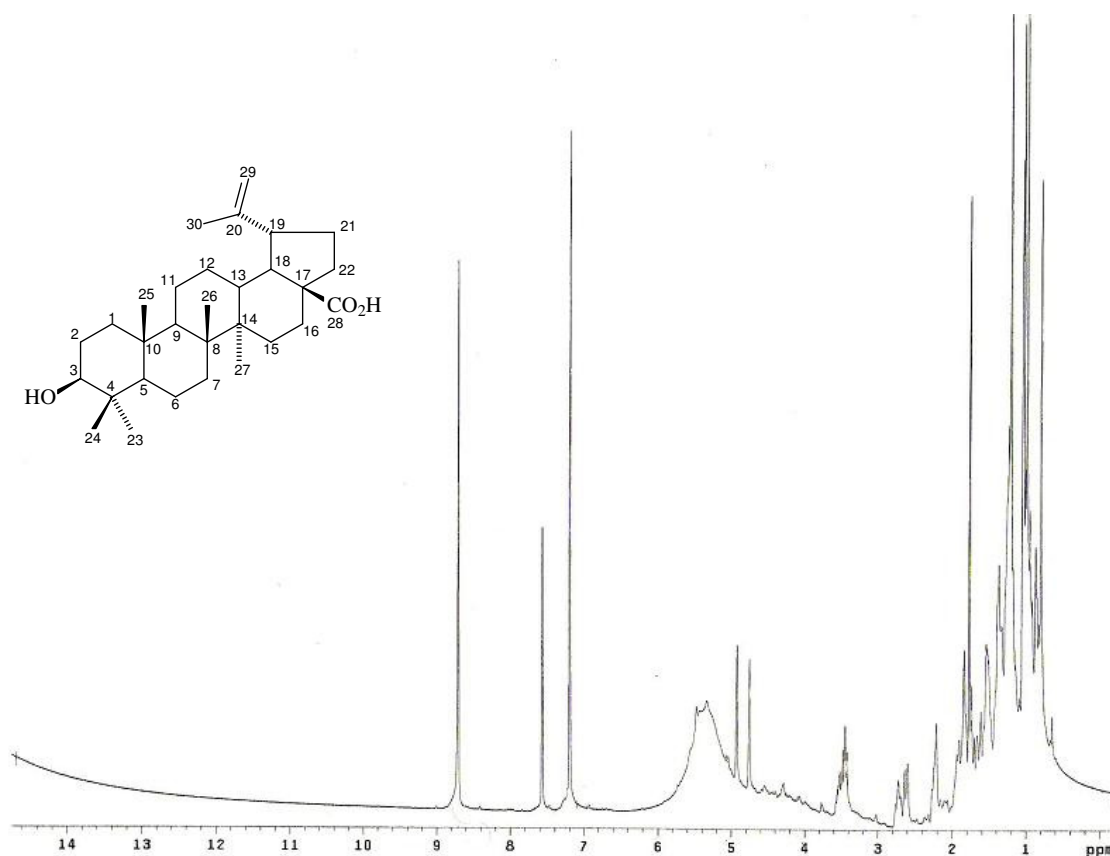


Figura 24: Espectro de ^1H do ácido betulínico (**3**) [300 MHz, piridina- d_5 , δ (ppm)]

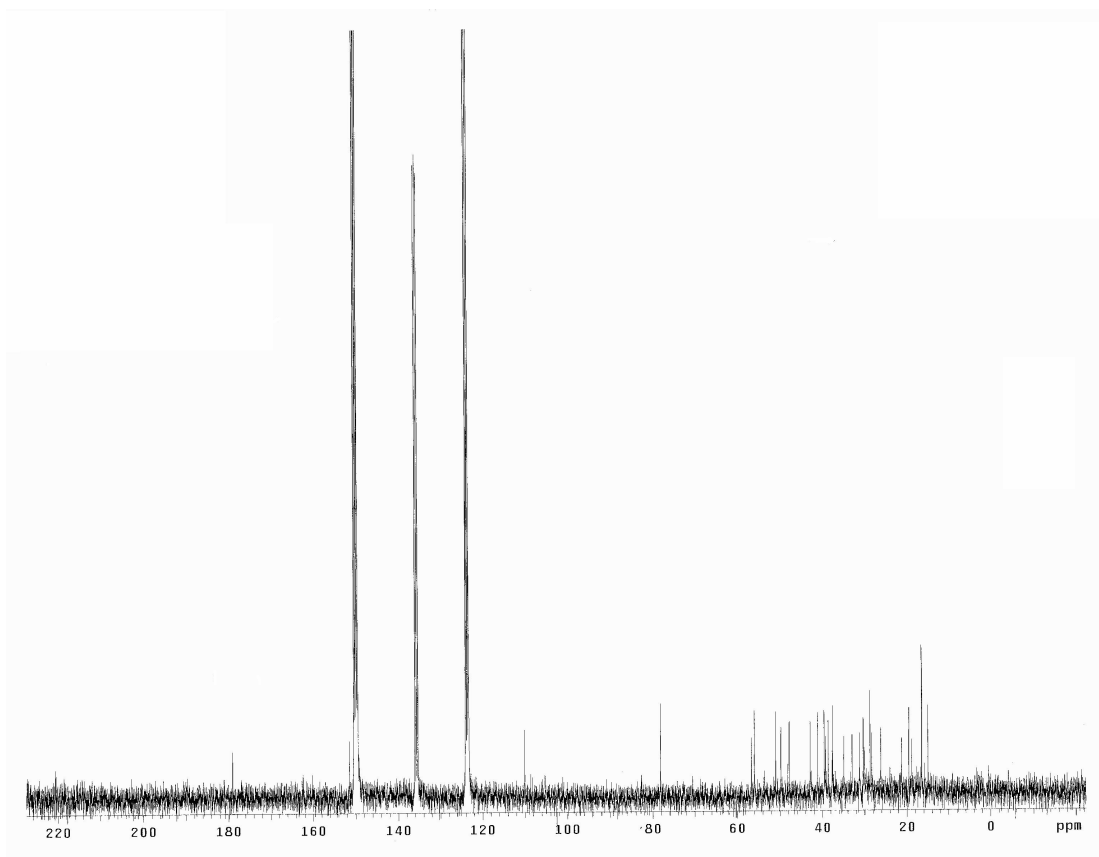


Figura 25: Espectro de ^{13}C do ácido betulínico (**3**) [75 MHz, piridina- d_5 , $\delta(\text{ppm})$]

A identificação do ácido oleanólico, foi realizada através da análise dos dados espectroscópicos de RMN ^1H e ^{13}C da substância isolada e comparada com dados da literatura (Tabela-4, pág. 66). O espectro de RMN ^1H (Figura 26), apresentou um singlete largo em δ 5,40 referente ao hidrogênio olefínico H-12, um tripleto em δ 3,5 ($J= 8$, 1H) indicativo da presença de hidrogênio oximetínico na posição 3, um dubleto em δ 2,6 ($J= 11$, 1H) referente ao hidrogênio H-18 e vários sinais relativos a grupos metilas entre δ 2,4-0,8.

O espectro de RMN ^{13}C (Figura 27, pág. 65), apresentou sinais em δ 144,9 e 122,7 registrados como carbono olefínicos e não hydrogenado. Além do sinal em δ 78,8 atribuído ao carbono carbinólico. Esses sinais são indicativos de triterpenos da série oleanano (MAHATO, 1994). Os dados de RMN ^{13}C foram comparados com dados descritos na literatura permitindo a identificação da substância (Tabela-4, pág. 66).

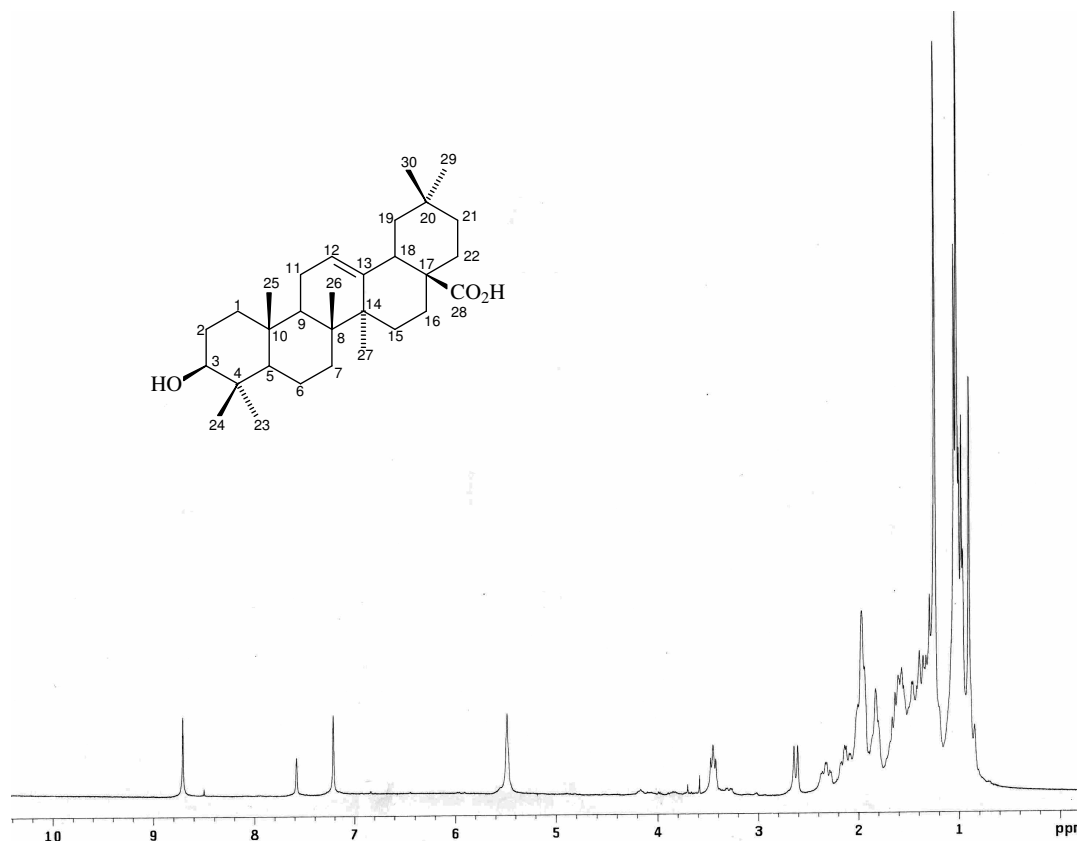


Figura 26: Espectro de ^1H do ácido oleanólico (**4**) [300 MHz, piridina- d_5 , δ (ppm)]

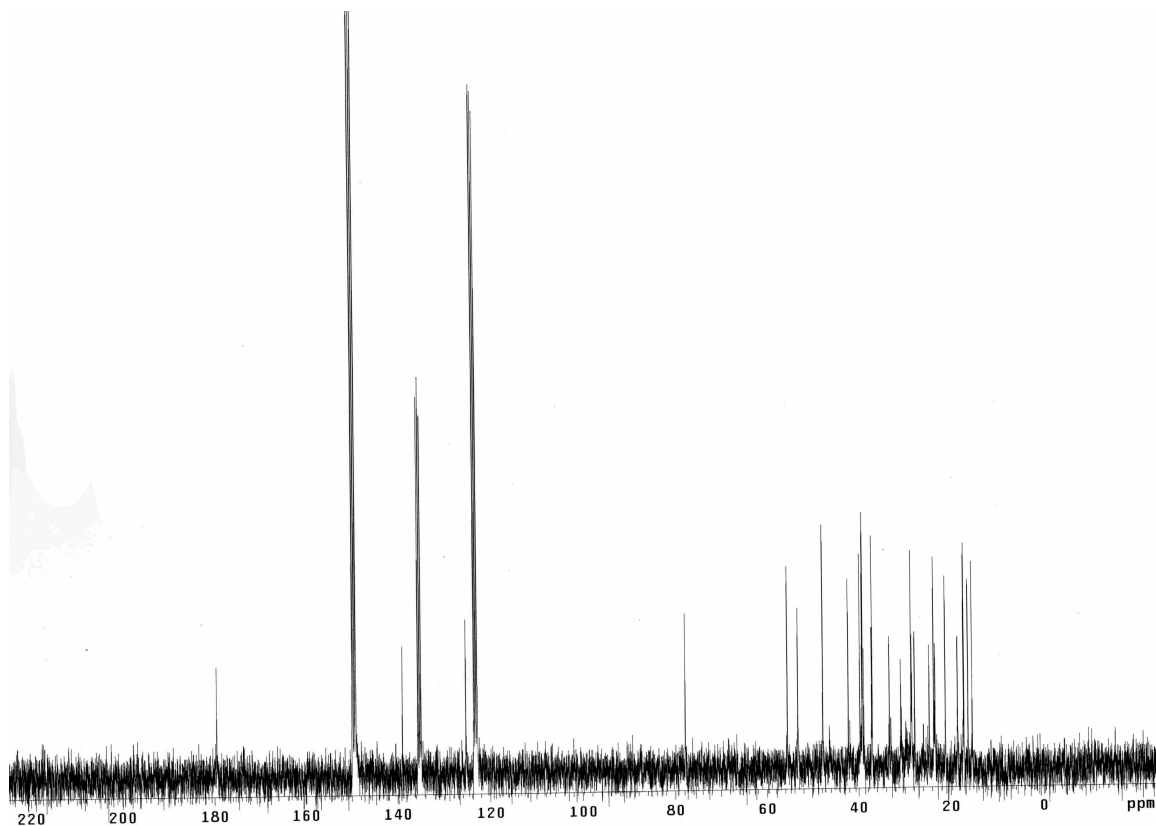


Figura 27: Espectro de RMN de ^{13}C do ácido oleanóico (**4**) [75 MHz, piridina- d_5 , $\delta(\text{ppm})$]

Tabela 4: Dados espectroscópicos de RMN de ^{13}C para os ácidos ursólico (**2**), betulínico (**3**) e oleanólico (**4**) [75 MHz, piridina- d_6 , δ (ppm)]

C	Triterpenos isolados			Dados da literatura*		
	2	3	4	2**	3	4
1	39.5	37,5	38,8	39,4	38,5	38,5
2	28.6	26,1	27,3	28,1	27,2	27,4
3	78.0	78,1	78,8	79,9	78,1	78,7
4	39.5	39,3	38,8	40,6	38,6	38,7
5	55.1	55,9	55,5	56,9	54,9	55,2
6	18.7	18,8	18,4	19,4	18,0	18,3
7	33.7	34,8	33,0	34,5	34,0	33,1
8	40.1	41,1	39,6	40,9	40,3	39,3
9	48.1	49,9	47,5	49,1	49,9	47,6
10	37.5	37,5	37,0	38,3	37,6	37,0
11	23.7	21,2	23,3	24,2	20,5	23,1
12	125.7	26,1	122,7	127	25,1	122,1
13	139.3	39,5	144,9	139,8	38,3	143,4
14	42.6	42,8	41,2	43,4	41,9	41,6
15	28.8	30,3	28,2	29,4	30,1	27,7
16	25.0	31,2	41,6	25,5	31,7	41,6
17	48.1	56,6	48,1	49,3	55,4	46,6
18	53.6	41,1	41,3	54,6	46,6	41,3
19	39.5	42,8	45,8	40,6	48,5	45,8
20	39.4	151,3	30,6	40,2	150,2	30,6
21	31.1	34,8	33,8	31,9	29,1	33,8
22	37.4	32,9	32,3	38,3	36,7	32,3
23	28.8	28,3	28,1	28,9	28,0	28,1
24	16.5	15,7	15,6	16,2	15,7	15,6
25	15.8	14,9	15,3	16,5	15,8	15,3
26	17.5	16,4	16,9	17,7	15,9	16,8
27	24.0	14,9	26,0	24,5	14,3	26,0
28	179.9	178,9	180,0	181,9	180,7	181,0
29	17.5	110,0	33,1	17,9	109,5	33,1
30	21.4	19,5	21,2	21,7	19,0	23,6

*MAHATO & KUNDU (1994) [CDCl_3 , δ (ppm)], **COSTA (2008) [MeOD, δ (ppm)]

5.2 Esterificação do β -sitosterol e triterpenos

Verificou-se que os derivados esterificados do β -sitosterol, ácido ursólico, ácido betulínico, ácido oleanólico e lupeol foram obtidos, na maioria, com rendimentos entre 40-84%, com exceção de alguns derivados com rendimento em torno de 40-13%. Para as reações que apresentaram baixo rendimento, foi atribuído ao fato das reações não terem ocorrido em atmosfera inerte (nitrogênio ou argônio), que evita a degradação por hidrólise dos anidridos ou dos cloretos de acila usados como reagente. Contudo, essa foi uma condição comum em todas as reações; incluindo as que obtiveram bons rendimentos. Dessa forma, o fato do menor rendimento em algumas reações foi atribuído á perdas na etapa de purificação.

O método de purificação mais adotado foi CC (cromatografia em coluna) que, apesar de ser o mais eficiente, acaba ocasionando percas de massa devido a interação dos produtos com a fase estacionária, principalmente de substâncias polares, como no caso dos derivados de ácidos triterpênicos.

Quanto as reações de síntese de ésteres, aquelas que ocorreram através do uso de piridina e anidridos de ácidos, seu mecanismo pode ser ilustrado na figura 28. Outro tipo de reação realizada ao longo do trabalho, foi a reação de formilação que pode ter seu mecanismo ilustrado na figura 29 (pág. 68).

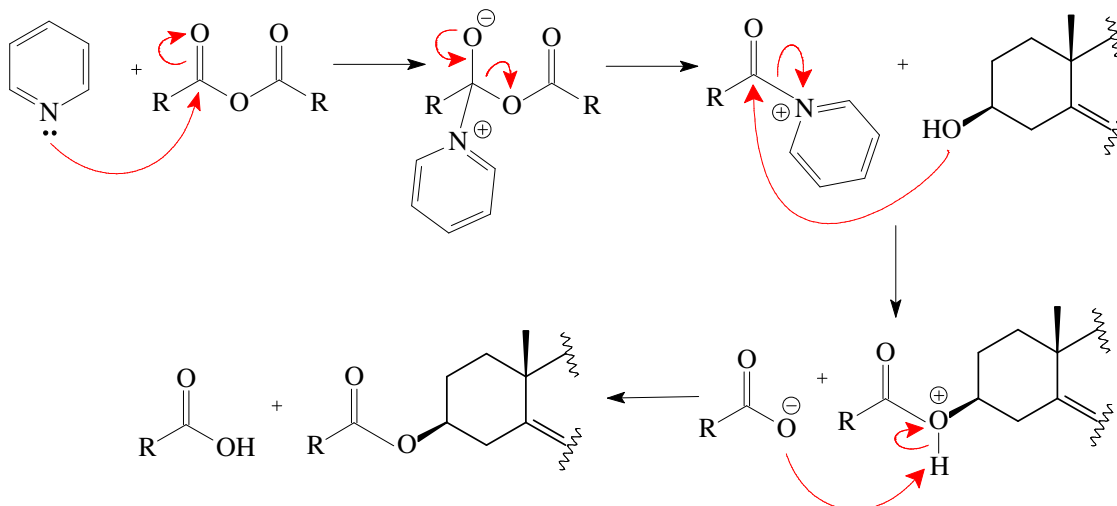


Figura 28: Mecanismo de síntese dos derivados esterificados com anidridos

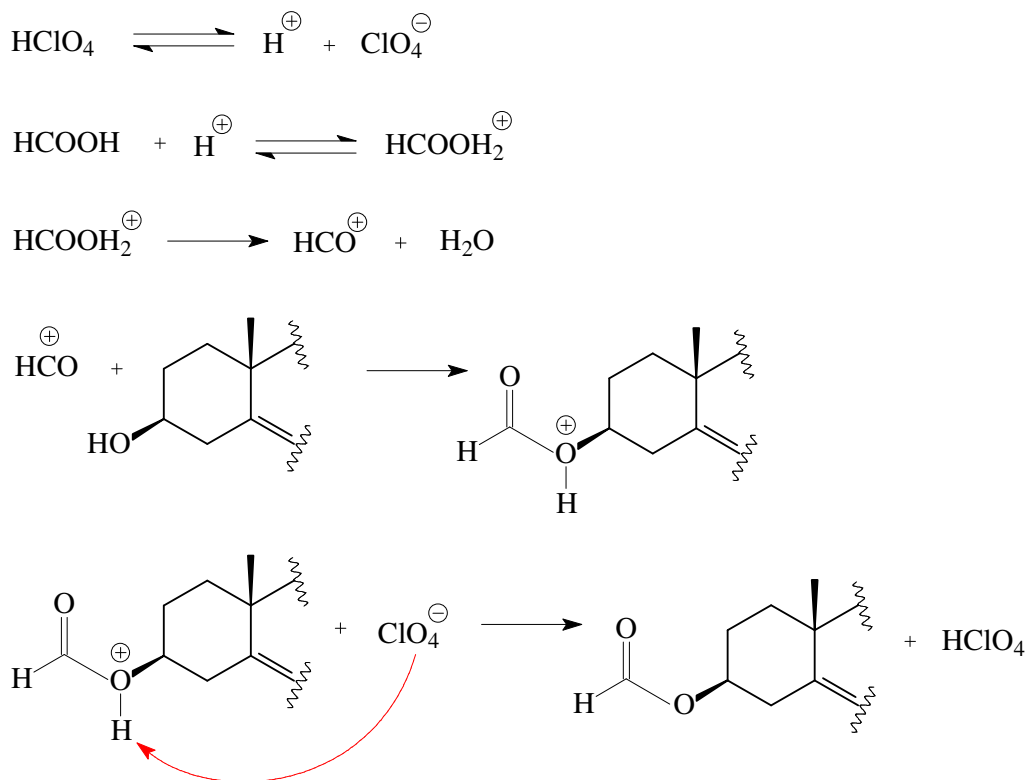


Figura 29: Mecanismo de síntese do 3 β -formestigmast-5-eno (**1d**)

5.3 Identificação dos derivados do β -sitosterol

A identificação do derivado 3 β -acetoxestigmast-5-eno (**1a**) foi realizada através da análise dos dados espectroscópicos de RMN ^1H , ^{13}C e IV, onde no espectro de RMN ^1H (Figura 30, pág. 69) foi detectada a presença de um duplete em δ 5,35 ($J = 5$, 1H) referente ao hidrogênio olefínico na posição H-6, um multiplete característico em δ 4,9-5,19 referente ao hidrogênio carbinólico H-3, dois duplos dupletos em δ 4,9 e 5,19 referentes aos hidrogênios olefínicos na posição H-22 e 23 do estigmasterol (presente como impureza) além de um singlete em δ 2,05 referente a três hidrogênios vizinhos à carbonila H-2'.

O hidrogênio na posição H-3 dos derivados esterificados apresenta-se mais desprotegido em relação ao do β -sitosterol (δ 3,5), devido ao efeito anisotrópico do grupo éster ligado no C-3. Portanto, o deslocamento do H-3 pode ser um indicativo da formação do derivado. No caso do derivado 3 β -acetoxestigmast-5-eno (**1a**) é possível verificar a presença também do reagente β -sitosterol livre, devido ao multiplete em δ 3,5 (Figura 30, pág. 69).

No espectro de RMN ^{13}C (Figura 31, pág. 70) do derivado **1a** foi possível destacar os sinais em δ 170,4 referente a carbonila de éster, dois carbonos olefínicos em δ 139,52 e 122,55 (C-5 e 6) e um carbono carbinólico em δ 73,9 referente ao carbono C-3, além de outros sinais referentes aos carbonos do esqueleto esteroidal.

O espectro no IV do derivado **1a** (Figura 31, pág. 70) apresentou sinais em 1710 cm^{-1} e 1222 cm^{-1} característicos de estiramento de carbonila e C-O de éster. Esses sinais também são indicativos da formação do produto esterificado, pois o β -sitosterol não apresenta estiramentos de carbonila, nem de ligação C-O de éster. Contudo, os deslocamentos dos respectivos ésteres no espectro no infravermelho apresentam-se deslocados do sinal esperado. De acordo com a literatura (SILVERSTEIN, 2007), o estiramento da carbonila de éster localiza-se entre $1750\text{--}1730\text{ cm}^{-1}$ e o estiramento C-O, entre $1200\text{--}1000\text{ cm}^{-1}$. A explicação para essa discrepância é a calibração inadequada do aparelho quando realizado espectros em filme de CHCl_3 , fornecendo espectros deslocados cerca de 20 cm^{-1} .

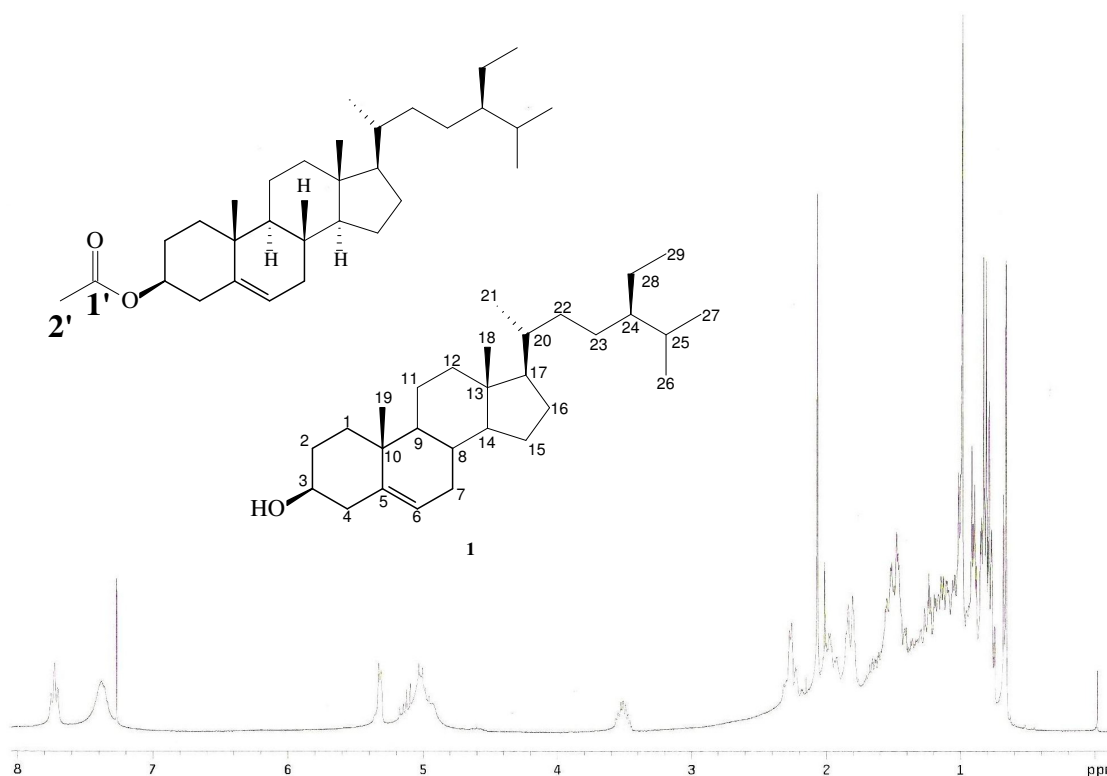


Figura 30: Espectro de ^1H do 3 β -acetoxestigmaster-5-eno (**1a**) [300 MHz, CDCl_3 , $\delta(\text{ppm})$]

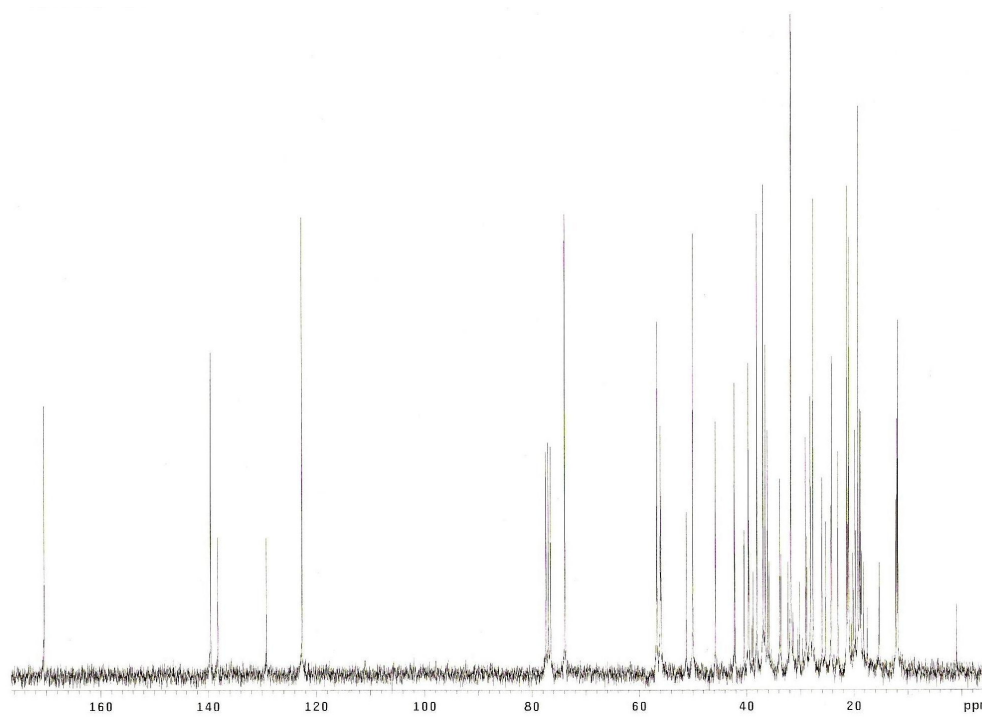


Figura 31: Espectro de ^{13}C do 3 β -acetoxestigmast-5-eno (**1a**) [300 MHz, CDCl_3 , $\delta(\text{ppm})$]

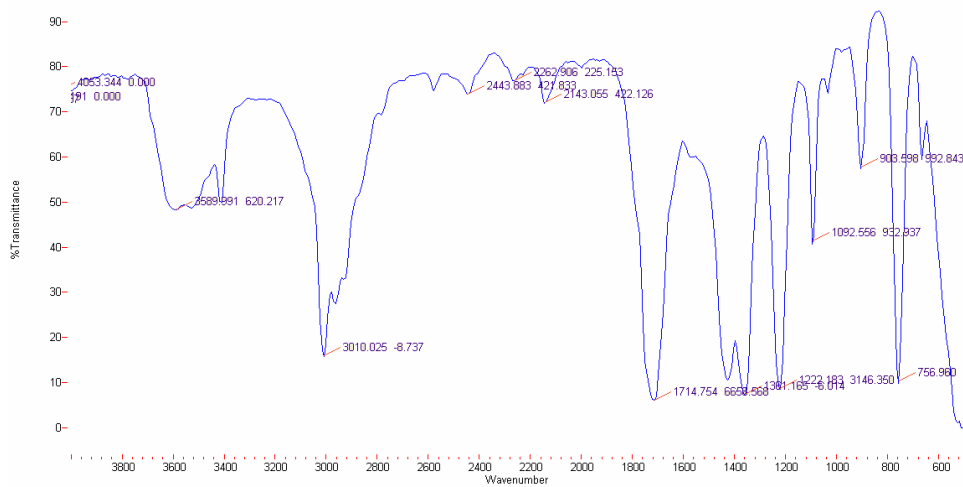


Figura 32: Espectro no IV do 3 β -acetoxestigmast-5-eno (**1a**)

O derivado 3 β -propoxestigmast-5-eno (**1b**) foi identificado através da análise dos dados de RMN ^1H , ^{13}C e IV, onde no espectro de RMN ^1H (Figura 33) foi detectada a presença de um duplete em δ 5,37 ($J = 5$, 1H) referente ao hidrogênio olefínico na posição H-6, um multiplete característico em δ 4,56-4,63 referente ao hidrogênio carbinólico H-3 e um quarteto em δ 2,3-2,4 ($J = 7,5$, 2H) de hidrogênios vizinhos a carbonila H-2'.

No espectro de RMN ^{13}C (Figura 34, pág. 72) do derivado **1b**, foi possível destacar os sinais em δ 173 referente à carbonila de éster, dois carbonos olefínicos em δ 139 e 122 (C-5 e 6) e um carbono carbinólico em δ 73,69 referente ao carbono C-3, além de outros sinais referentes aos carbonos do esqueleto esteroidal.

O espectro no IV (Figura 35, pág. 72) do derivado **1b** apresentou sinais em 1715 cm^{-1} e 1222 cm^{-1} característicos de estiramento de carbonila e C-O de éster.

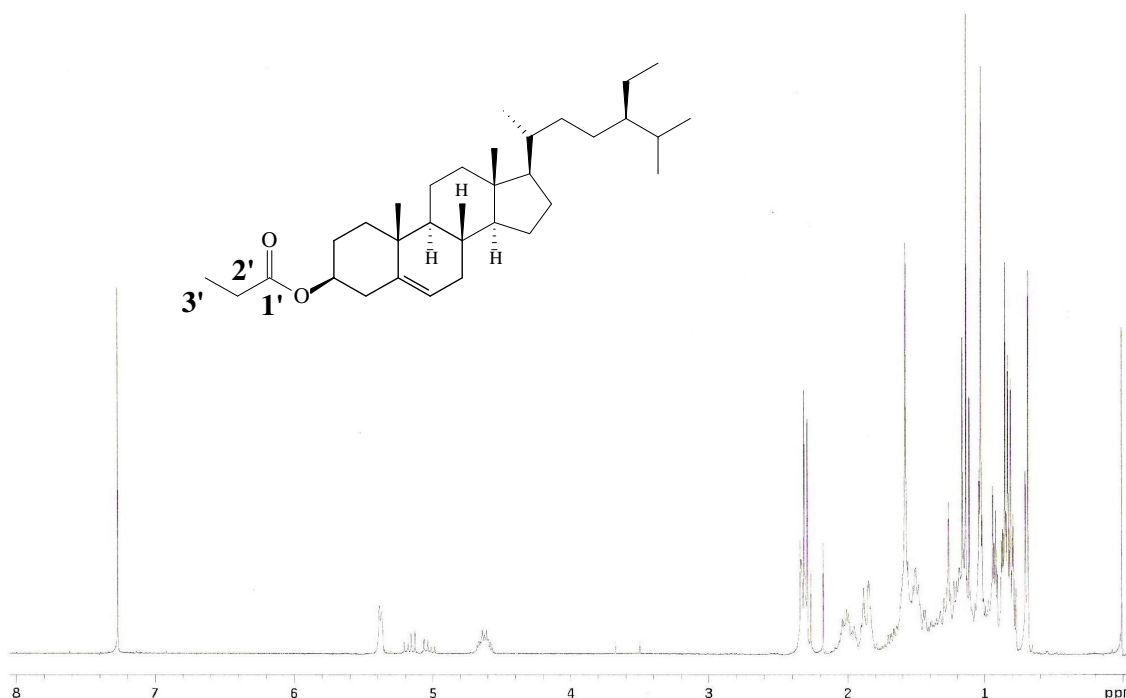


Figura 33: Espectro de ^1H do 3 β -propoxestigmast-5-eno (**1b**) [300 MHz, CDCl_3 , $\delta(\text{ppm})$]

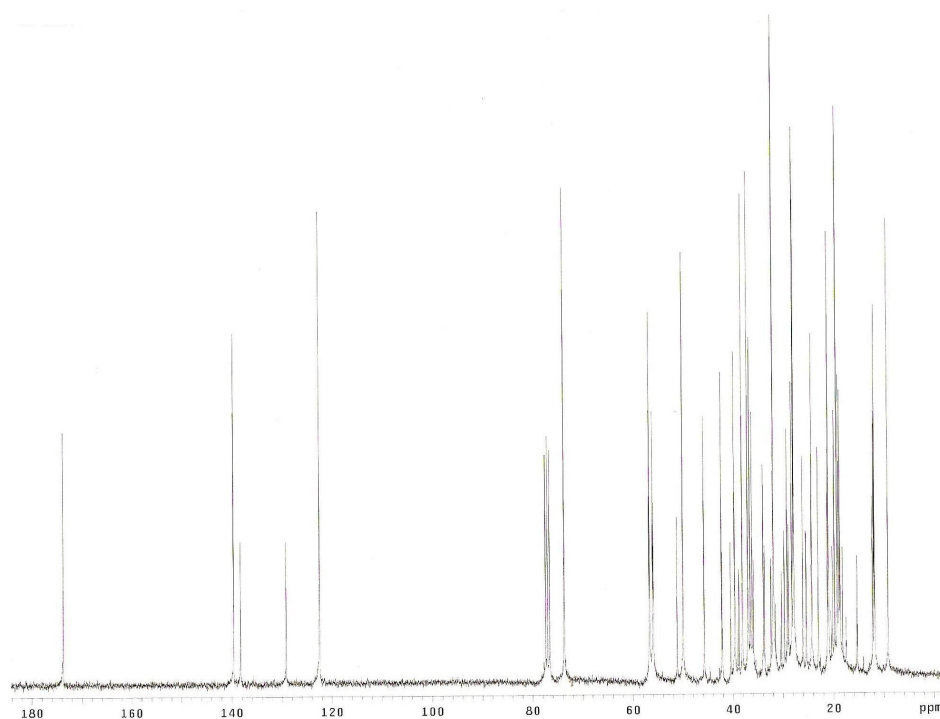


Figura 34: Espectro de ^{13}C do 3 β -propoxestigmast-5-eno (**1b**) [300 MHz, CDCl_3 , $\delta(\text{ppm})$]

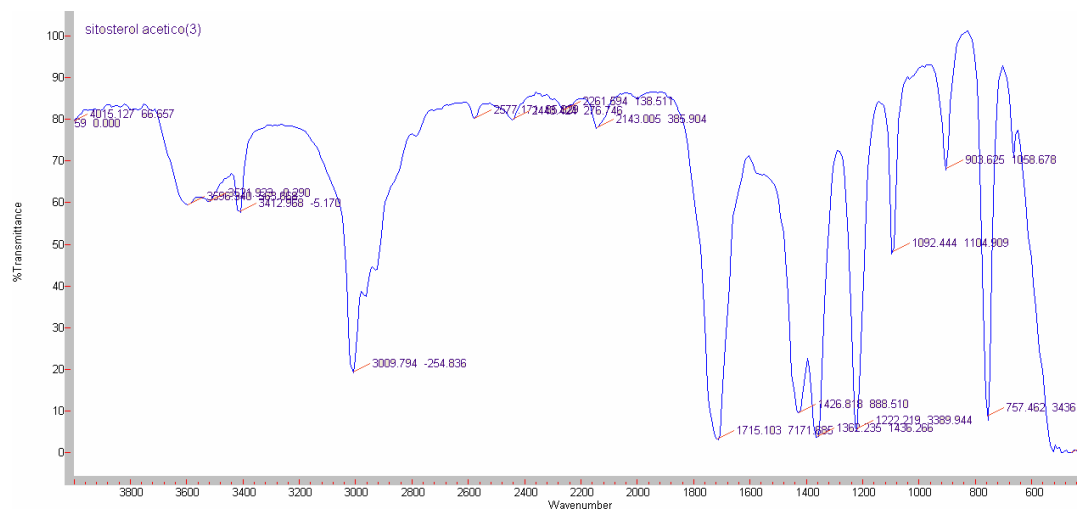


Figura 35: Espectro no IV do 3 β -propoxestigmast-5-eno (**1b**)

O derivado 3 β -butoxestigmast-5-eno (**1c**) foi identificado através da análise dos dados espectroscópico de RMN ^1H , ^{13}C e IV, onde no espectro de RMN ^1H (Figura 36) foi detectada a presença de um duplete em δ 5,39 referente ao hidrogênio olefínico na posição H-6 ($J= 5$, 1H), um multiplete característico em δ 4,58-4,70 referente ao hidrogênio carbinólico H-3 e um triplete em δ 2,2-2,25 ($J= 7,2$, 2H) de hidrogênios vizinhos á carbonila H-2'.

No espectro de RMN ^{13}C (Figura 37, pág. 74) do derivado **1c**, foi possível destacar os sinais em δ 173,08 referente à carbonila de éster, dois carbonos olefínicos em δ 139,7 e 122,5 (C-5 e 6) e um carbono carbinólico em δ 73,67 referente ao carbono C-3, além de outros sinais referentes aos carbonos do esqueleto esteroidal.

O espectro no IV do derivado **1c** (Figura 38, pág. 74) apresentou sinais em 1716 cm^{-1} e 1222 cm^{-1} característicos de estiramento de carbonila e C-O de éster.

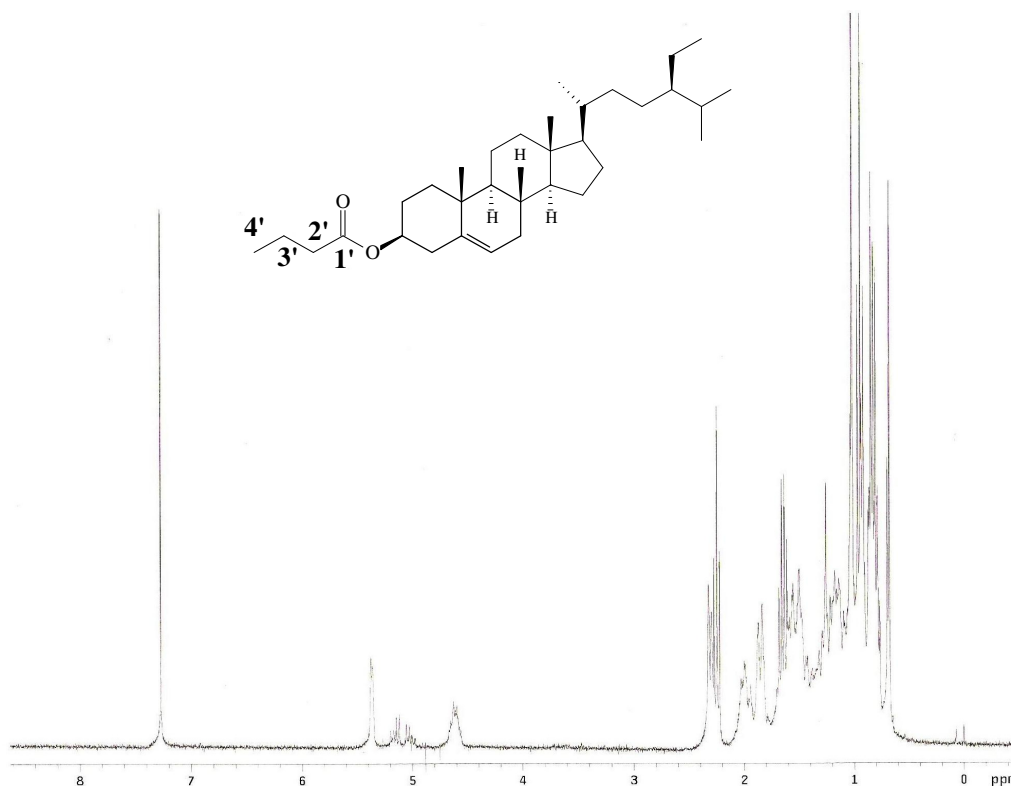


Figura 36: Espectro de ^1H do 3 β -butoxestigmast-5-eno (**1c**) [300 MHz, CDCl_3 , $\delta(\text{ppm})$]

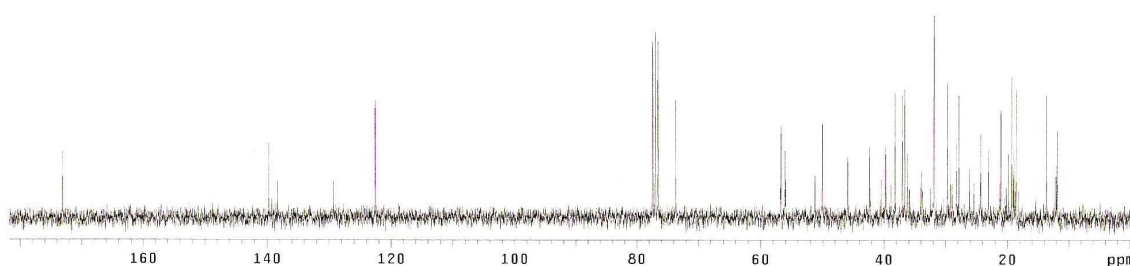


Figura 37: Espectro de ¹³C do 3β-butoxestigmast-5-eno (**1c**) [300 MHz, CDCl₃, δ(ppm)]

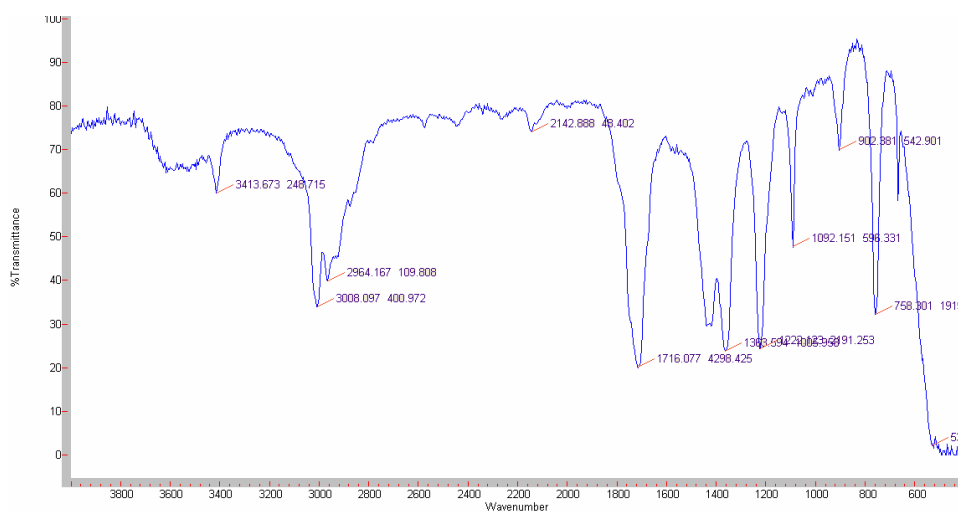


Figura 38: Espectro no IV do 3β-butoxestigmast-5-eno (**1c**)

O derivado 3β-formestigmast-5-eno (**1d**) foi identificado através da análise dos dados espectroscópicos de RMN ¹H e IV, onde no espectro de RMN ¹H foi detectada a presença de um singlete em δ 8,2 característico do hidrogênio α (alfa) a carbonila. Além disso, foi verificada a presença de um dubleto em δ 5,4 (J= 5, 1H) referente ao hidrogênio olefínico na posição H-6 e um multipletto característico em δ 4,8-4,6 referente ao hidrogênio carbinólico H-3 (Figura 39, pág. 75).

O espectro no IV do composto **1d** apresentou sinais em 1717 cm⁻¹ e 1222 cm⁻¹ característicos de estiramento de carbonila e C-O de éster (Figura 40, pág. 75).

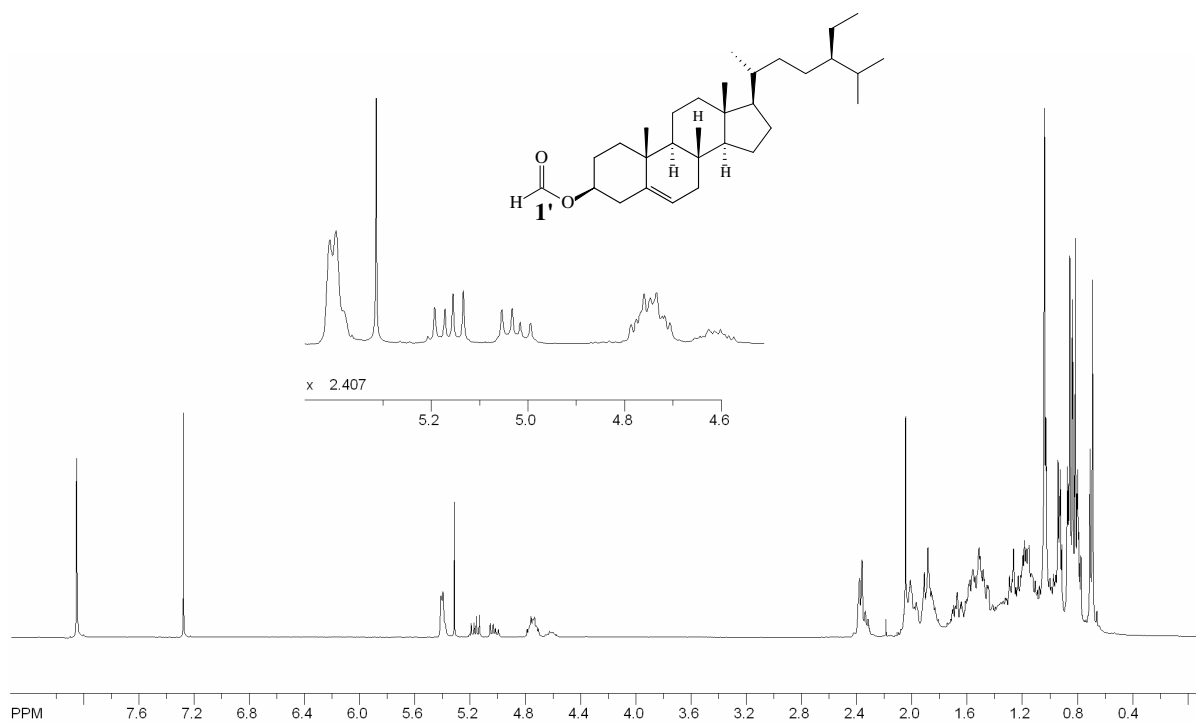


Figura 39: Espectro de ^1H do 3 β -formestigmast-5-eno (**1d**) [400 MHz, CDCl_3 , $\delta(\text{ppm})$]



Figura 40: Espectro no IV do 3 β -formestigmast-5-eno (**1d**)

O derivado 3 β -carboxisuccinatolestigmast-5-eno (**1e**) foi identificado através da análise dos dados espectroscópicos de RMN ^1H , ^{13}C e IV, onde no espectro de RMN ^1H (Figura 41) foi detectada a presença de um duplete em δ 5,39 ($J= 5$, 1H) referente ao hidrogênio olefínico na posição H-6, um multipletto característico em δ 4,55-4,76 referente ao hidrogênio carbinólico H-3 desprotegido e dois duplos dupletos em δ 2,5 (2H) e 2,8 (2H) de hidrogênios H-2' e 3' vizinhos a carbonila.

No espectro de RMN ^{13}C (Figura 42, pág. 77) do derivado **1e** foi possível destacar sinais em: δ 171,52 e 176,69 de carbonilas de éster e ácido (C-1' e 4'), dois carbonos olefínicos em δ 139,7 e 122,5 (C-5 e 6) e um carbono carbinólico em δ 73,67 referente ao carbono C-3, além de outros sinais referentes aos carbonos do esqueleto esteroidal.

O espectro no IV do derivado **1e** revelou sinais de estiramento OH em 3600-3414, de deformação axial larga em 1720 cm^{-1} característico de carbonila de ácido e estiramento em 1222 cm^{-1} característico de ligação C-O de éster (Figura 43, pág. 77).

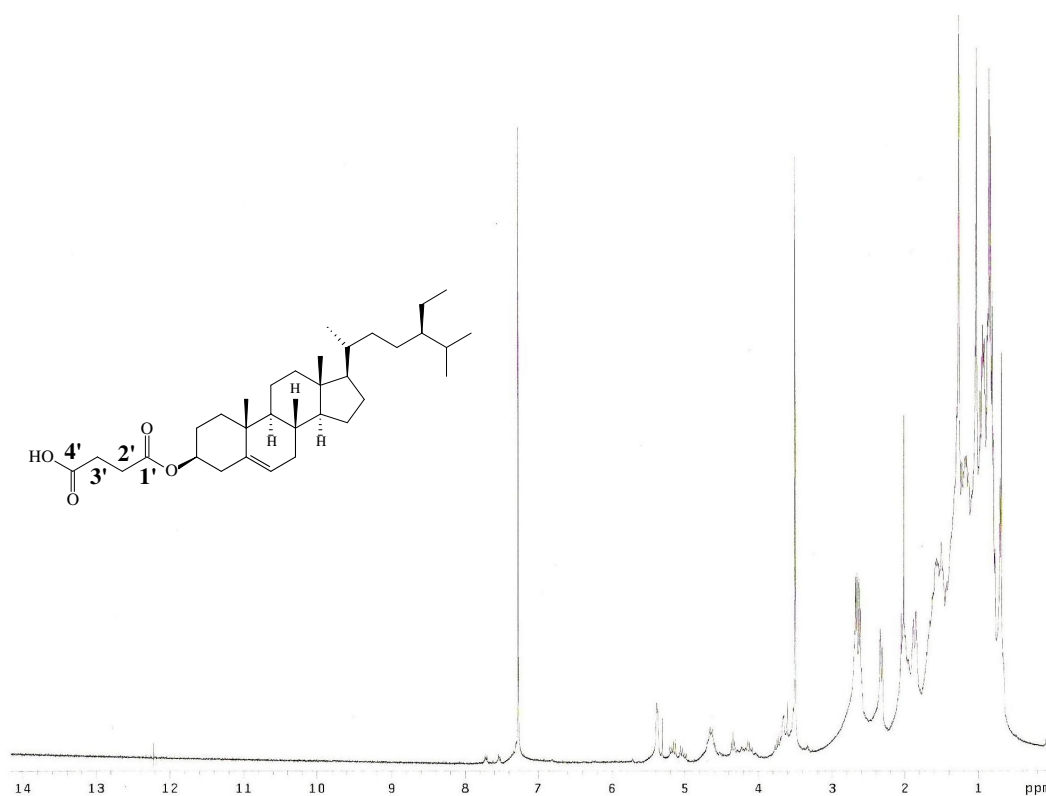


Figura 41: Espectro de ^1H do 3 β -carboxisuccinatolestigmast-5-eno (**1e**) [300 MHz, CDCl_3 , $\delta(\text{ppm})$]

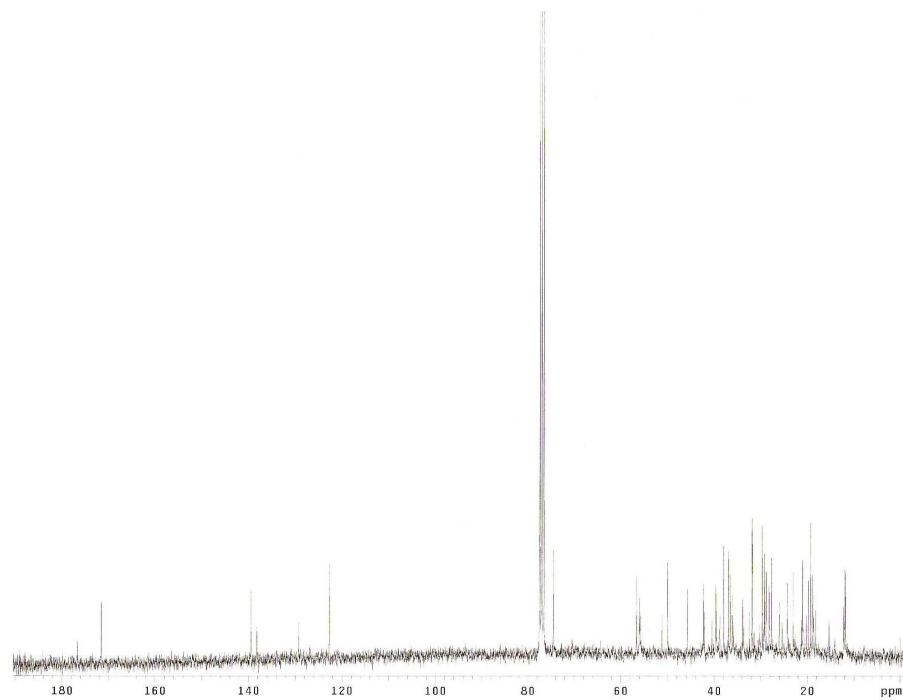


Figura 42: Espectro de ^{13}C do 3 β -carboxisuccinatolestigmast-5-eno (**1e**) [300 MHz, CDCl_3 , $\delta(\text{ppm})$]

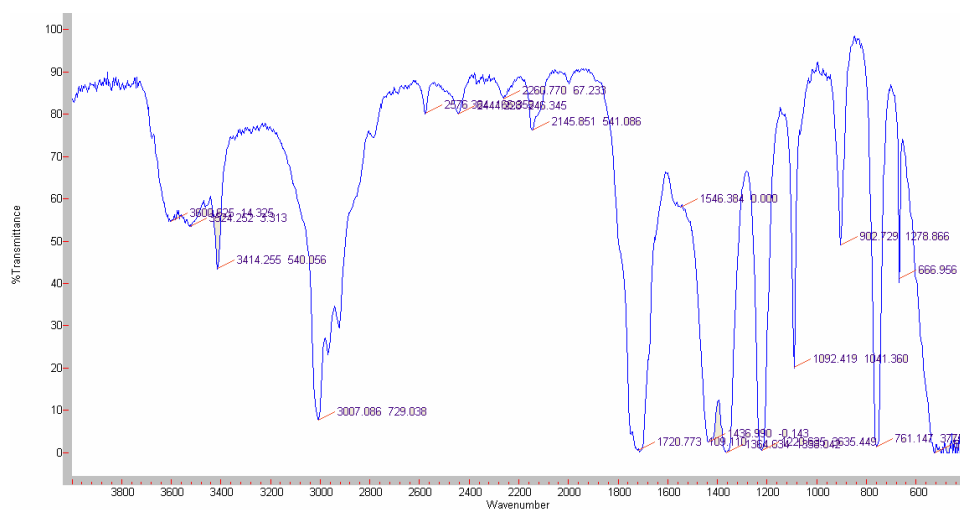


Figura 43: Espectro no IV do 3 β -carboxisuccinatolestigmast-5-eno (**1e**)

O derivado 3 β -benzoxestigmast-5-eno (**1f**) foi identificado através da análise dos dados espectroscópicos de RMN ^1H , ^{13}C e IV, onde no espectro de RMN ^1H (Figura 44) foi detectada a presença de um dubleto em δ 8,06 (J= 1,7 e 8,3, 2H) e dois tripletos em δ 7,55 (J= 7,5, 1H) e 7,43 (J= 7,5, 2H) referentes aos hidrogênios do anel aromático não substituído. Além disso, foi verificada a presença de um dubleto em δ 5,41 (J= 5, 1H) referente ao hidrogênio olefínico na posição H-6 e um multiplete em δ 4,8-4,99 referente ao hidrogênio carbinólico H-3 desprotegido.

No espectro de RMN ^{13}C (Figura 45, pág. 79) do derivado **1f** foi possível destacar sinais em: δ 165,97 de carbonila de éster, dois carbonos olefínicos em δ 139,65 e 122,75 (C-5 e 6), um carbono carbinólico em δ 73,67 (C-3) e sinais referentes aos carbonos aromáticos em δ 130,75, 129,51, 128,22 e 132,67 (C-5', 3' e 7', 4' e 6', 2').

O espectro do IV (Figura 46, pág. 79) do derivado **1f** apresentou sinais em 1716 cm^{-1} e 1222 cm^{-1} característicos de estiramento de carbonila e C-O de éster.

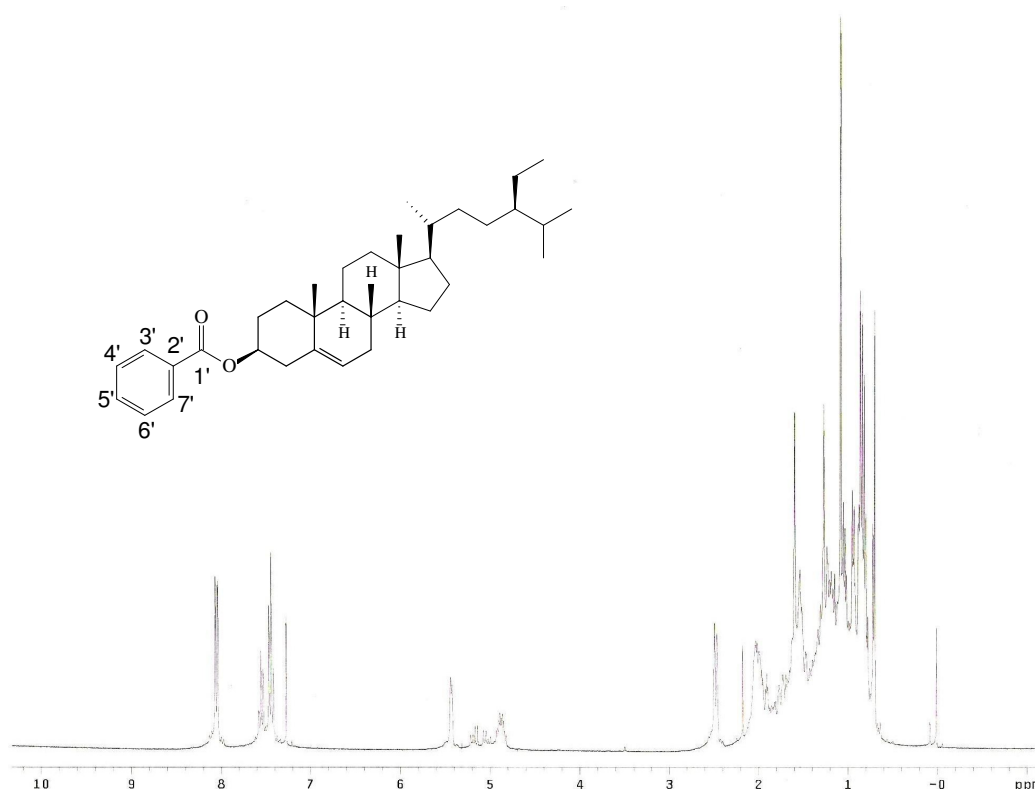


Figura 44: Espectro de ^1H do 3 β -benzoxestigmast-5-eno (**1f**) [300 MHz, CDCl_3 , $\delta(\text{ppm})$]

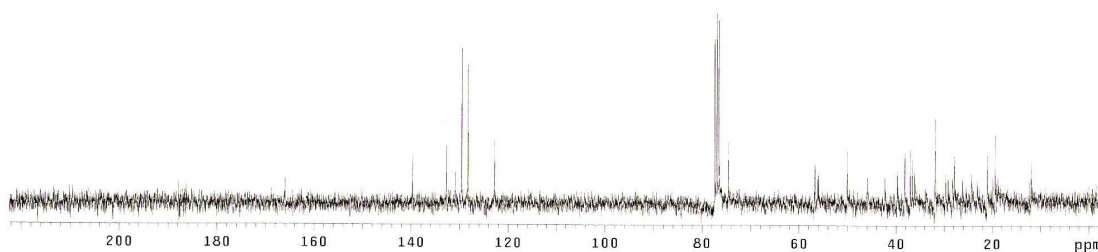


Figura 45: Espectro de ¹³C do 3β-benzoxestigmast-5-eno (**1f**) [300 MHz, CDCl₃, δ(ppm)]

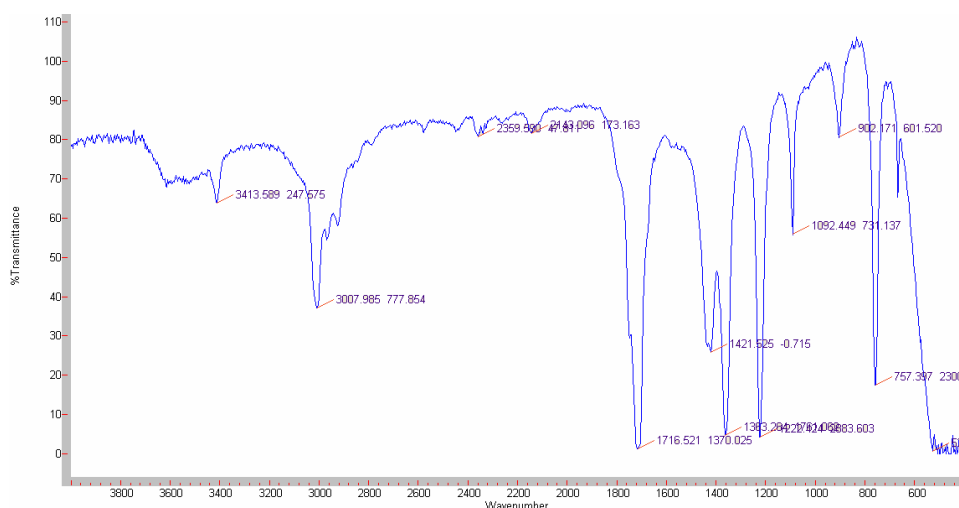


Figura 46: Espectro no IV do 3β-benzoxestigmast-5-eno (**1f**)

O derivado 3β-clorobenzoxestigmast-5-eno (**1g**) foi identificado através da análise dos dados de RMN ¹H e IV, onde no espectro de RMN ¹H (Figura 47, pág. 80) foi detectada a presença de um tripleto em δ 8,1 (J= 1,7; 1H), um duplo tripleto em δ 7,95-7,54 (J= 1,3 e 7,8, 1H), um duplo tripleto em δ 7,53 (J= 1,1 e 9,1, 1H) e um tripleto em δ 7,4 (J= 7,8; 1H) dos hidrogênios H-3', 7', 5' e 6', característicos de compostos aromáticos. Além disso, foi verificada a presença de um dubleto em δ 5,4 (J= 5, 1H) referente ao hidrogênio olefínico na posição H-6 e um multipletto em δ 4,8-4,9 referente ao hidrogênio carbinólico H-3 desprotegido.

O espectro no IV (Figura 48) do derivado **1g** apresentou sinais em 1716 cm^{-1} e 1222 cm^{-1} característico de estiramento de carbonila e de ligação C-O de éster, além de sinais em 1125 cm^{-1} e 747 cm^{-1} de ligação C-Cl e de deformação angular fora do plano de ligação C-H de compostos aromáticos.

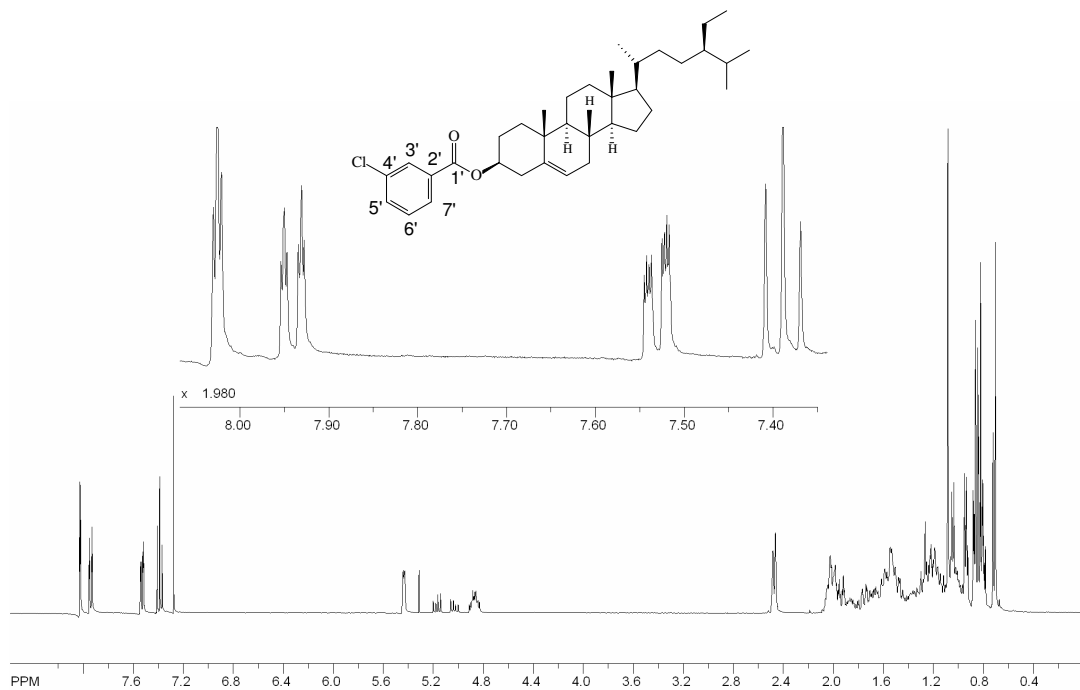


Figura 47: Espectro de ^1H do 3 β -clorobenzoxestigmast-5-eno (**1g**) [400 MHz, CDCl_3 , $\delta(\text{ppm})$]

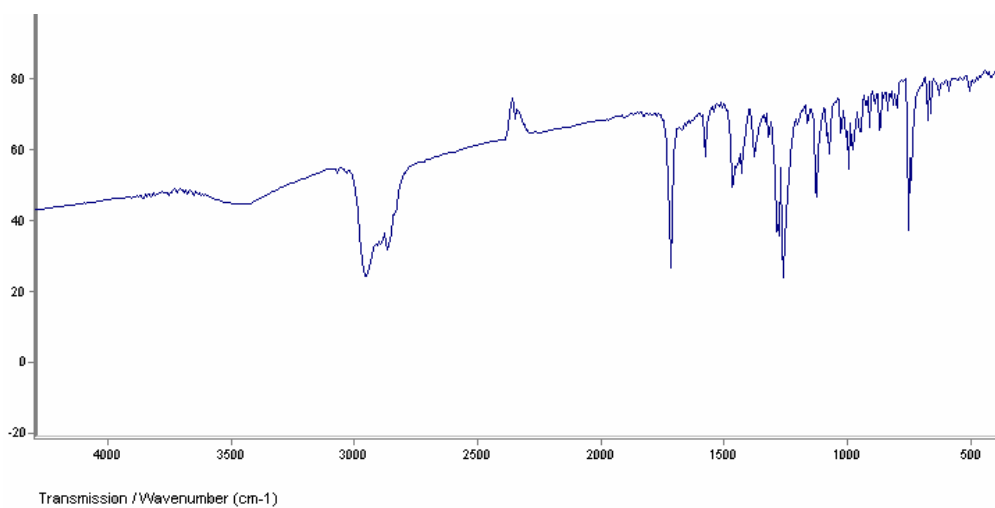


Figura 48: Espectro no IV do 3 β -clorobenzoxestigmast-5-eno (**1g**)

O derivado *trans*-cinamato de estigmast-5-eno (**1h**) foi identificado através da análise dos dados de RMN ^1H (Figura 49), onde foi detectada a presença de um duplo dubleto em δ 7,53 ($J=3,6$ e $4,8$, 1H), um tripleto em δ 7,38 ($J= 3,5$, 2H) referente, respectivamente, aos hidrogênios H-5',9' e H-6',8'; todos sinais característicos de compostos aromáticos, acrescidos de dois dubletos entre δ 7,71-7,66 ($J= 15$, 1H, H-2') e entre δ 6,46-6,41 ($J= 15$, 1H, H-3') de hidrogênios olefínicos, indicando a presença de derivado do ácido *trans*-cinâmico. Além disso, foi verificada a presença de um dubleto em δ 5,41 ($J= 5$, 1H) referente ao hidrogênio olefínico na posição H-6 e um multiplete em δ 4,8-4,7 referente ao hidrogênio carbinólico H-3.

No espectro de RMN ^{13}C do derivado **1h** foi possível destacar sinais em: δ 166,35 de carbonila de éster, dois carbonos olefínicos em δ 139,64 e 122,68 (C-5 e 6), um carbono carbinólico em δ 74,06 (C-3), sinais referentes aos carbonos aromáticos em δ 144,38, 128,82, 127,99 e 134,5 (C-7', 5' e 9', 6' e 8', 4') e mais dois sinais de carbonos olefínicos em 130,10 e 118,67 (C-2' e 3') (Figura 50, pág. 82).

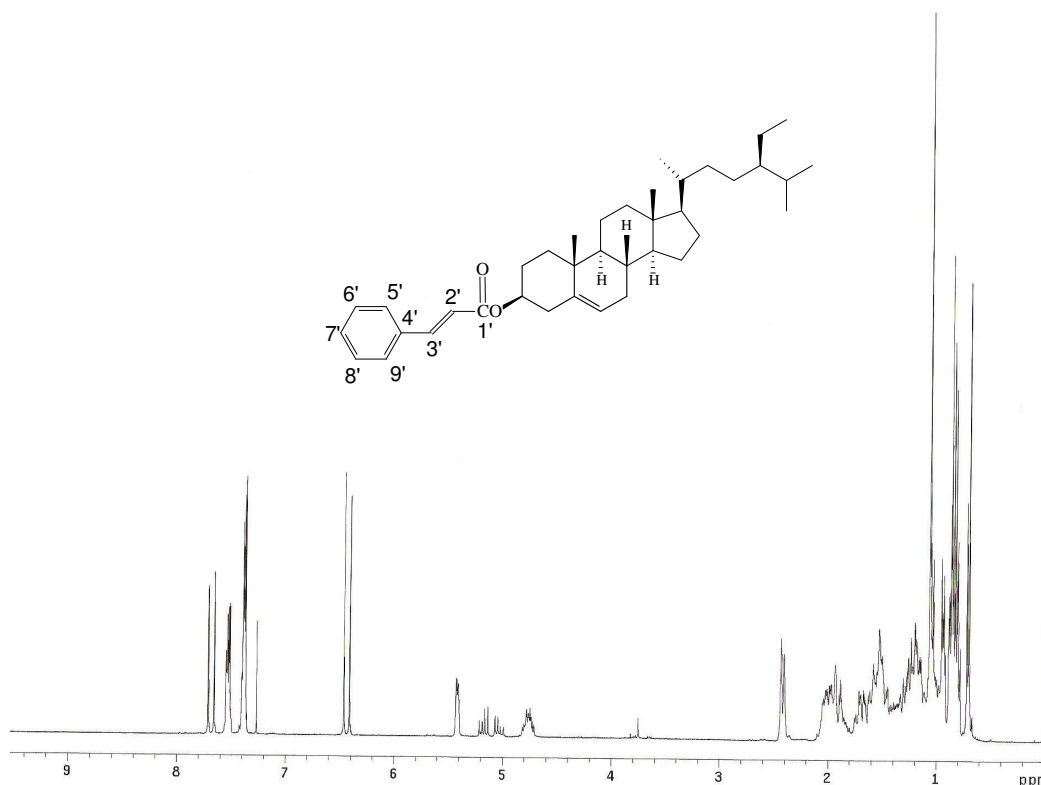


Figura 49: Espectro de ^1H do *trans*-cinamato de estigmast-5-eno (**1h**) [300 MHz, CDCl_3 , $\delta(\text{ppm})$]

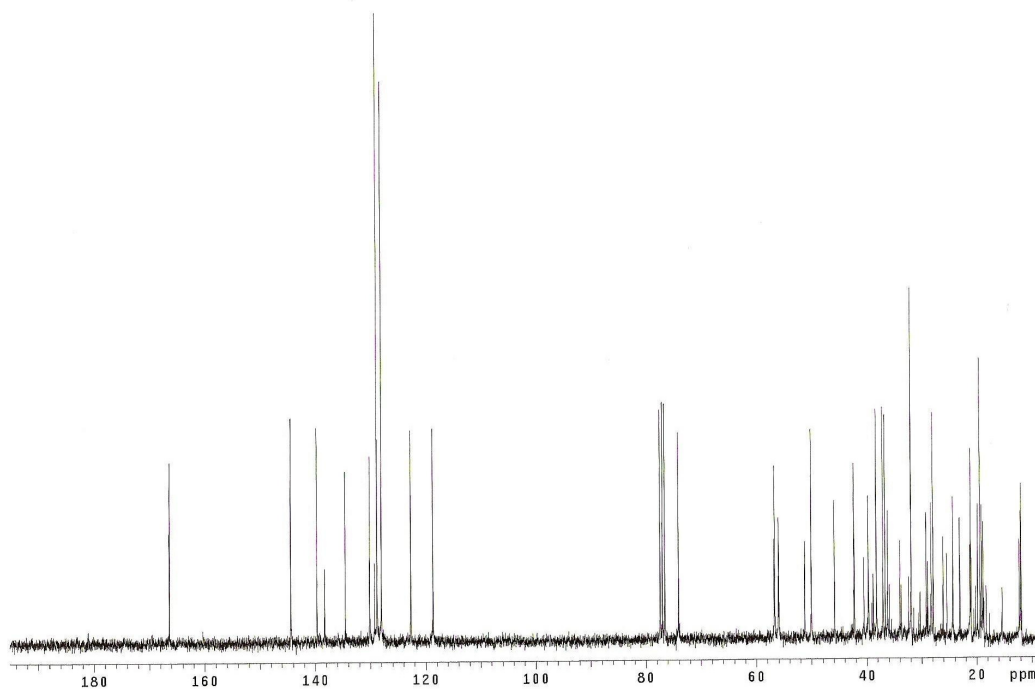


Figura 50: Espectro de ^{13}C do *trans*-cinamato de estigmast-5-eno (**1h**) [300 MHz, CDCl_3 , $\delta(\text{ppm})$]

Tabela 5: Dados espectroscópicos de RMN de ^{13}C para os derivados do β -sitosterol [75 MHz, CDCl_3 , δ (ppm)]

C	Derivados do β -sitosterol						
	1*	1a	1b	1c	1e	1f	1h
1	37,2	36,9	36,93	37,01	36,88	37	37,1
2	31,6	29,08	28,2	29,18	29,2	31	30,26
3	71,7	73,9	73,69	73,67	74,49	71	74,06
4	38,9	38,05	38,09	38,17	37,95	38	38,21
5	140,7	139,52	139	139,7	139,45	139,65	139,64
6	121,6	122,55	122	122,5	122,66	122,75	122,68
7	31,8	31,79	29,64	29,69	31,82	31	31,89
8	31,8	31,83	31,85	31,87	31,78	31	31,85
9	50,1	49,9	49,9	50,05	49,94	50	50,02
10	36,4	36,52	36,5	36,59	36,52	36	36,59
11	21,1	21,04	20,9	20,19	20,97	21	21,01
12	39,7	39,66	39,67	39,74	39,65	39	39,70
13	42,3	42,24	42,25	42,32	42,25	42	42,29
14	56	56,7	56,6	56,69	56,61	56	56,67
15	24,2	24,29	24,24	24,29	24,2	24	24,27
16	28,1	27,7	27,73	27,83	27,6	28	27,87
17	56,1	56,01	56	56,05	55,97	56	56,06
18	11,9	11,8	9,12	11,85	11,8	11	11,84
19	19,3	19,25	19,27	19,32	19,25	19	19,32
20	36	36,09	36,1	36,15	36,1	36	36,13
21	18,7	18,83	18,97	18,78	18,72	18	18,76
22	33,9	33,87	33	33,96	33,82	33	33,91
23	26,1	26	26	26,12	26	26	26,06
24	45,8	45,76	45,5	45,86	45,76	45	45,81
25	29,1	28,18	27,87	28,23	28,79	29	29,13
26	19,6	19,76	19,8	19,80	19,75	19	19,80
27	18,9	18,98	18,97	18,98	18,97	18	19,02
28	23	23	23	23,09	23	23	23,05
29	11,9	11,99	9,12	13,62	11,93	11	11,96
1'		170,4	173	173,08	171,52	165,97	166,35
2'		21,36	20,97	21,03	21,04	130,75	130,10
3'			19,5	19,04	21,17	129,51	118,67
4'				18,54	176,69	128,22	134,5
5'						132,67	128,82
6'						128,22	127,99
7'						129,51	144,38
8'							127,99
9'							128,82

*MACARI et al., (1990) [CDCl_3 , δ (ppm)]

5.4 Identificação dos derivados dos ácidos triterpênicos

A série dos derivados de ácidos triterpênicos foram identificados através da análise dos dados de RMN de ^1H e IV.

Quando se compara os espectros de RMN de ^1H (**2a/2e**; **3a**; **4a** e **5a**) das substâncias preparadas, com os ácidos betulínico e oleanólico pode ser verificado que houve deslocamento do sinal do hidrogênio H-3. Nos ácidos triterpênicos livres, este hidrogênio é registrado entre δ 3,42 e 3,18, dependendo do solvente utilizado. Nos espectros de RMN de ^1H dos derivados, este hidrogênio é registrado em campo mais baixo que δ 4 ppm, devido ao efeito exercido pelo grupamento acila do éster formado, além de outros efeitos referentes ao grupamento inserido; diferença observada também no β -sitosterol e seus derivados esterificados. A Tabela-6 apresenta os valores observados para os H-3 das substâncias descritas, indicando que todas as substâncias foram esterificadas.

Tabela 6: Dados de RMN de ^1H dos ácidos ursólico (**3**), oleanólico (**4**), betulínico (**3**) e seus derivados esterificados [300-400MHz, δ (ppm) J(Hz)].

Substância	Solvente	H-3
2	Py	-
2b	Cd	4,51 (<i>dd</i> , 6 e 8,6 Hz)
2c	Cd	4,51 (<i>dd</i> , 5,6 e 8,9 Hz)
2d	Cd	4,76 (<i>dd</i> , 5,6 e 8,9 Hz)
2e	Cd	4,75 (<i>t</i> , 8,9 Hz)
3	Py	3,5 (<i>t</i> , 7 Hz)
3a	Ac	3,7 (<i>t</i> , 7 Hz)
4	Py	3,5 (<i>t</i> , 8 Hz)
4a	Ac	4,35 (<i>t</i> , 7,7 Hz)
5	Cd	-
5a	Cd	4,32 (<i>t</i> , 7 Hz)

Py= piridina- d_5 , Ac=acetona - d_6 , Cd= CDCl_3

O derivado do ácido ursólico, o ácido 3 β -acetilursólico (**2a**) (Figura 21, pág. 52), foi identificado através da análise dos dados espectroscópicos no IV (Figura 51), onde foram detectados sinais em 1712 cm⁻¹ e 1222 cm⁻¹ característicos de estiramento de carbonila e de ligação C-O de éster. Indicando que a reação de esterificação do ácido ursólico com o anidrido acético formou o respectivo éster.

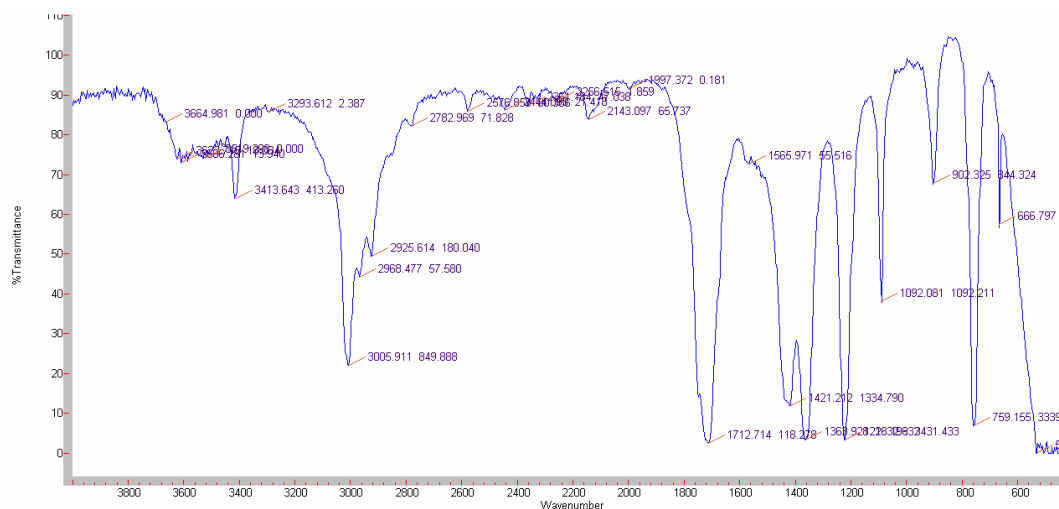


Figura 51: Espectro no IV do Ácido 3 β -acetilursólico (**2a**)

O derivado ácido 3 β -propilursólico (**2b**) (Figura 21, pág. 52), foi identificado através da análise dos dados espectroscópicos de RMN ¹H e IV, onde no espectro de RMN ¹H (Figura 52, pág. 85) foi detectada a presença de um tripleto em δ 5,2 (J= 3,3 Hz, 1H) referente ao hidrogênio olefínico na posição H-12, um duplo dubleto característico em δ 4,51 (J= 6 e 8,6 Hz, 1H) referente ao hidrogênio carbinólico H-3, um quarteto em δ 2,3-2,4 (J= 7,5 Hz, 2H) de dois hidrogênios H-2' vizinhos à carbonila e um dubleto em δ 2,2 (J= 11 Hz, 1H) referente ao hidrogênio H-18.

O espectro de IV (Figura 53, pág. 86) do ácido 3 β -propilursólico (**2b**) apresentou sinais em 1712 cm⁻¹, característico de estiramento C-O de carbonila de éster e em 1222 cm⁻¹ característico de estiramento carbono-oxigênio de éster.

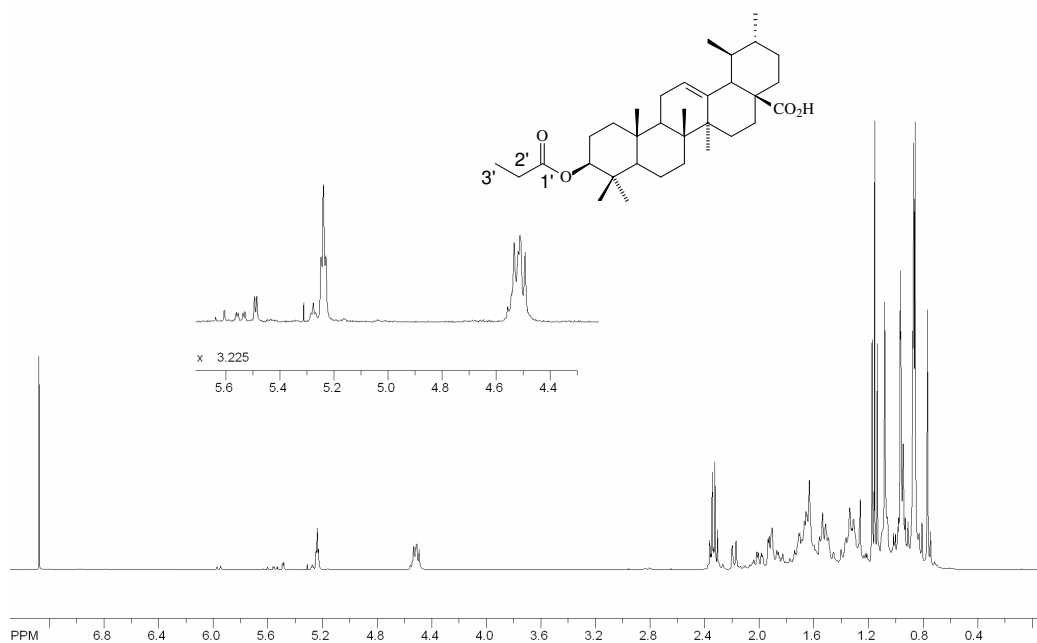


Figura 52: Espectro de ^1H do ácido 3 β -propilursólico (2b) [400 MHz, CDCl_3 , $\delta(\text{ppm})$]

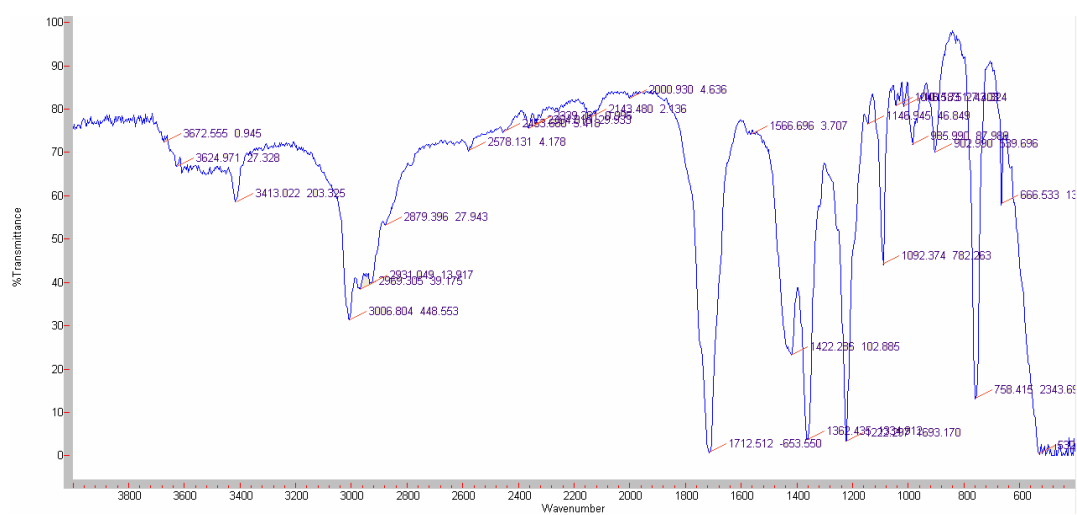


Figura 53: Espectro no IV do ácido 3 β -propilursólico (2b)

O derivado ácido 3 β -butilursólico (**2c**) foi identificado através da análise dos dados de RMN ^1H e no IV. No espectro de RMN ^1H (Figura 54) foi detectada a presença de um tripleto em δ 5,2 (J= 3,3, 1H) referente ao hidrogênio olefínico na posição H-12, além de um duplo dubleto característico em δ 4,51 (J= 5,6 e 8,9, 1H) referente ao hidrogênio carbinólico H-3, um tripleto em δ 2,3-2,4 (J= 7,2, 2H) de dois hidrogênios H-2' vizinhos á carbonila e um dubleto em δ 2,2 (J= 11, 1H) referente ao hidrogênio H-18.

O espectro de IV (Figura 55, pág. 88) do ácido 3 β -butilursólico (**2c**) apresentou sinais em 1714 cm^{-1} , característico de estiramento C-O de carbonila de éster e em 1222 cm^{-1} característico de estiramento carbono-oxigênio de éster.

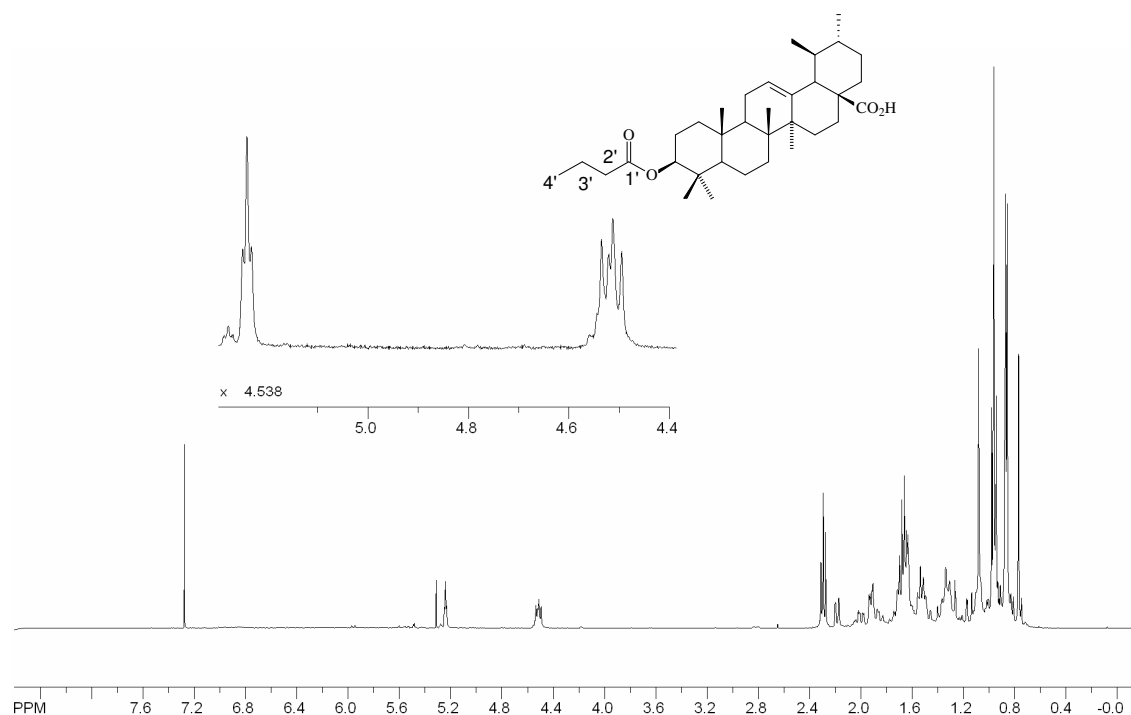


Figura 54: Espectro de RMN ^1H do ácido 3 β -butilursólico (**2c**) [400 MHz, CDCl_3 , $\delta(\text{ppm})$]

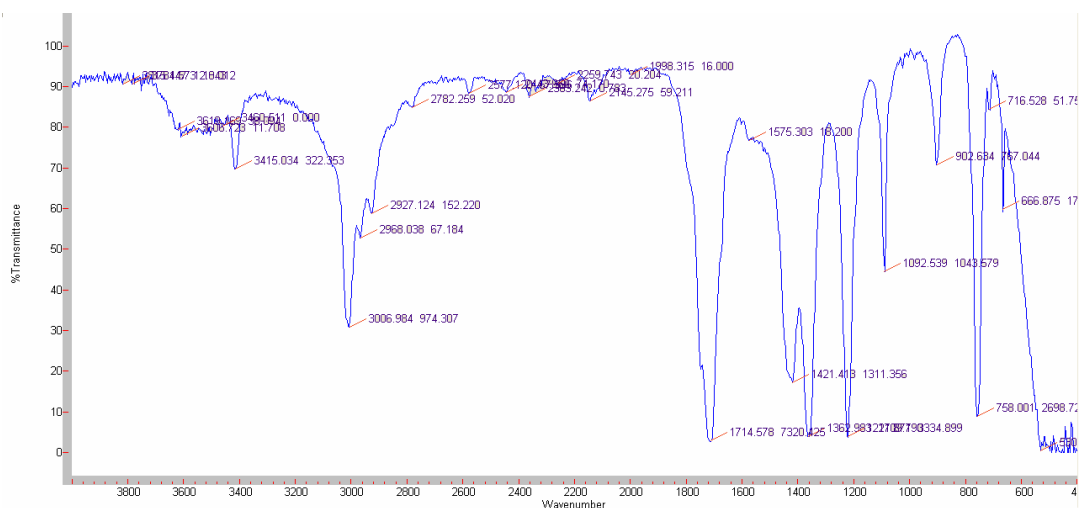


Figura 55: Espectro no IV do ácido 3 β -butilursólico (**2c**)

O derivado ácido 3 β -benzoilursólico (**2d**) foi identificado através da análise dos dados de RMN ^1H e no IV, onde no espectro de RMN ^1H (Figura 56, pág. 89) foi detectada a presença de um duplo tripleto em δ 8,15 ($J = 1,7$ e $8,3$, 2H), um tripleto tripleto em δ 7,65 ($J = 1,3$ e $7,5$, 1H) e um triplo dubleto em δ 7,5 ($J = 1,5$ e 8 , 2H), referentes aos hidrogênios H-3', 7', H-5' e H-4', 6'; todos sinais característicos de compostos aromáticos. Além disso, foi verificada a presença de um singlete em δ 5,3 (1H) referente ao hidrogênio olefínico na posição H-12, um duplo dubleto característico em δ 4,76 ($J = 5,6$ e $8,9$, 1H) referente ao hidrogênio carbinólico H-3 e um dubleto em δ 2,25 ($J = 11$, 1H) referente ao hidrogênio H-18.

O espectro de IV (Figura 57, pág. 89) do ácido 3 β -benzoilursólico (**2d**) apresentou sinais em 1714 cm^{-1} característico de carbonila e 1222 cm^{-1} característico de ligação carbono-oxigênio de éster.

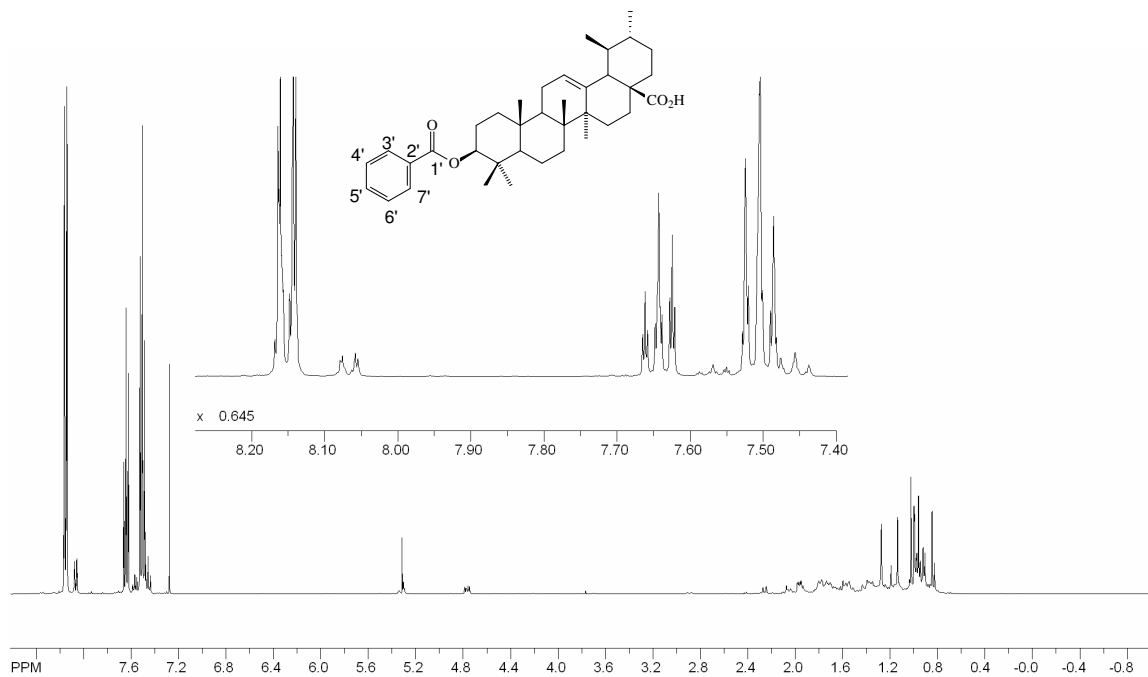


Figura 56: Espectro de RMN de ¹H do ácido 3β-benzoilursólico (2d) [400 MHz, CDCl₃, δ(ppm)]

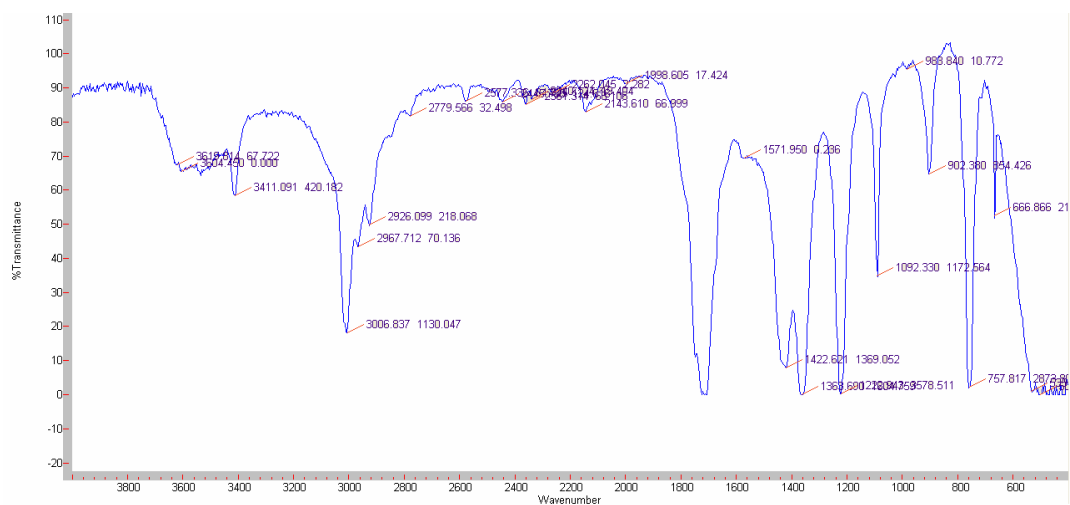


Figura 57: Espectro no IV do ácido 3β-benzoilursólico (2d)

A identificação do derivado ácido 3 β -(3-clorobenzoil) ursólico (**2e**) foi realizada através da análise dos dados de RMN ^1H e IV. O espectro de RMN ^1H (Figura 58), apresentou um duplo dubleto em δ 8,1 (J= 1,7 e 2,5, 1H), um duplo tripleto em δ 8,0 (J= 1 e 7,5, 1H) e 7,6 (J= 1 e 8, 1H) e um tripleto em δ 7,4 (J= 7,8, 1H), referentes aos hidrogênios H-3', 7', 5' e 6' de compostos aromáticos originados da esterificação com cloreto de 3-clorobenzoila. Também foram identificados um tripleto em δ 5,2 (J= 3,3, 1H) do hidrogênio H-12, um tripleto em δ 4,75 (J= 8,9, 1H) de hidrogênio carbinólico na posição H-3 e um dubleto em δ 2,2 (J= 11, 1H) referente ao hidrogênio H-18.

No espectro no IV (Figura 59, pág. 91), o ácido 3 β -(3-clorobenzoil) ursólico (**2e**) foi verificada a presença de sinais de deformação axial em 3084-2867 cm^{-1} de ligação oxigênio-hidrogênio de ácido carboxílico, sinais em 1692 cm^{-1} característico de carbonila e em 1309-1261 cm^{-1} característico de ligação carbono-oxigênio de éster, além de sinais em 846 cm^{-1} de ligação carbono-cloro e em 747 cm^{-1} de deformação angular fora do plano de ligação carbono-hidrogênio, característico de aromáticos.

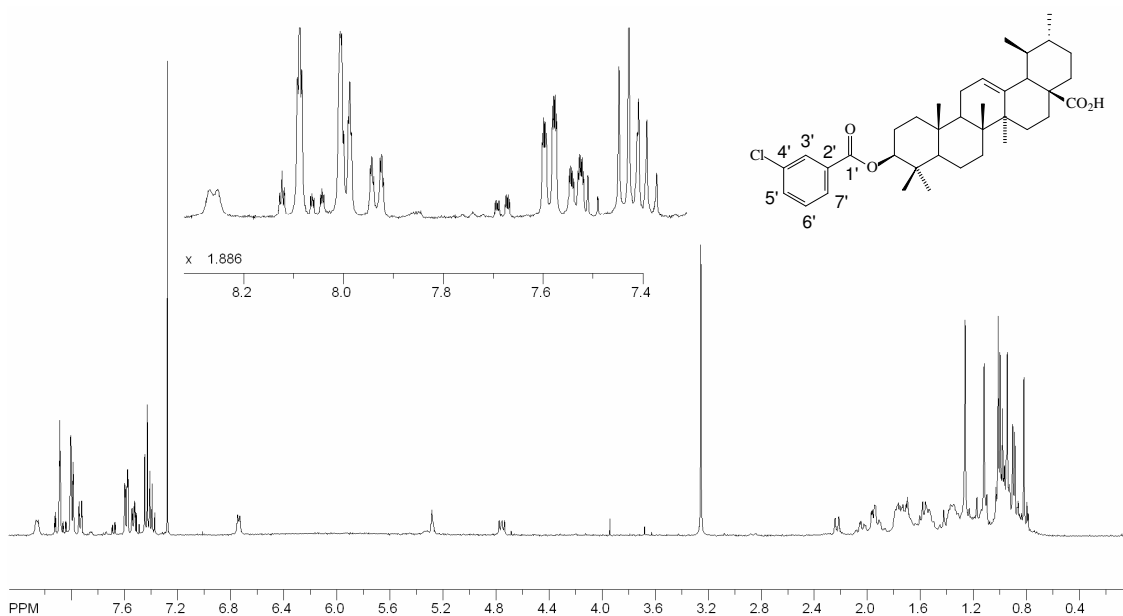


Figura 58: Espectro de ^1H do ácido 3 β -(3-clorobenzoil) ursólico (**2e**) [400 MHz, CDCl_3 , $\delta(\text{ppm})$]

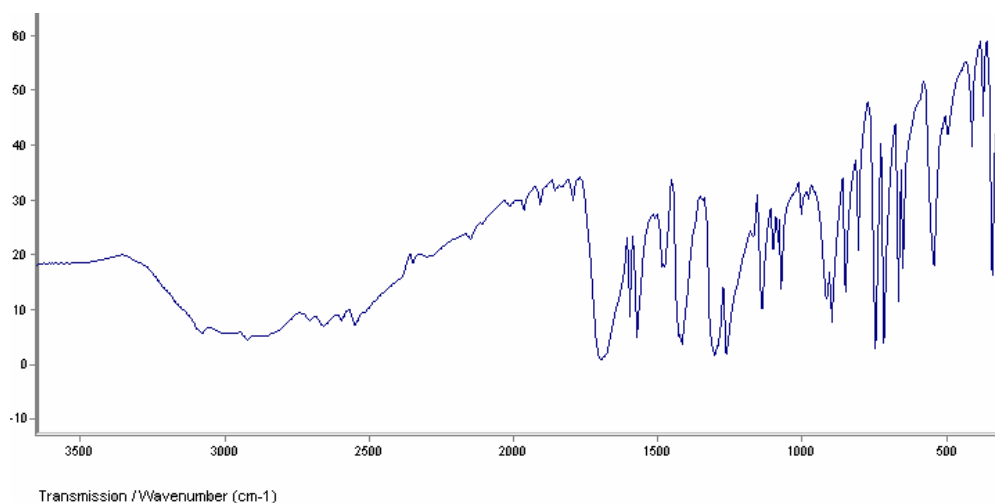


Figura 59: Espectro no IV do ácido 3 β -(3-clorobenzoil) ursólico (**2e**)

A identificação do ácido 3 β -(3-clorobenzoil) betulínico (**3a**) foi realizado através da análise dos dados de RMN ^1H e IV. No espectro de RMN ^1H (Figura 60, pág. 92) foi verificada presença de dois singletos em δ 4,72 (1H) e 4,62 (1H) referentes aos hidrogênios olefínicos H-29 e um tripleto em δ 3,7 ($J = 7$, 1H) do hidrogênio carbinólico na posição H-3.

O espectro de RMN ^1H revela que parte dos reagentes, ácido betulínico (**3**) não esterificado e ácido 3-cloro benzóico, ainda encontra-se misturados ao produto. O sinal em δ 3,4 de hidrogênio carbinólico H-3, indica presença de ácido betulínico não esterificado e sinais na região dos compostos aromáticos muito intensos indicam a presença de ácido 3-cloro benzóico.

No espectro no IV (Figura 61, pág. 92), o ácido 3 β -(3-clorobenzoil) betulínico (**3a**) apresentou sinais de deformação axial em 3522-3281 cm^{-1} de ligação oxigênio-hidrogênio de ácido carboxílico, em 1691 cm^{-1} característico de carbonila e em 1299-1262 cm^{-1} característico de ligação carbono-oxigênio de éster, além de sinais em 847 cm^{-1} de ligação carbono-cloro e em 727 cm^{-1} de deformação angular fora do plano de ligação carbono-hidrogênio.

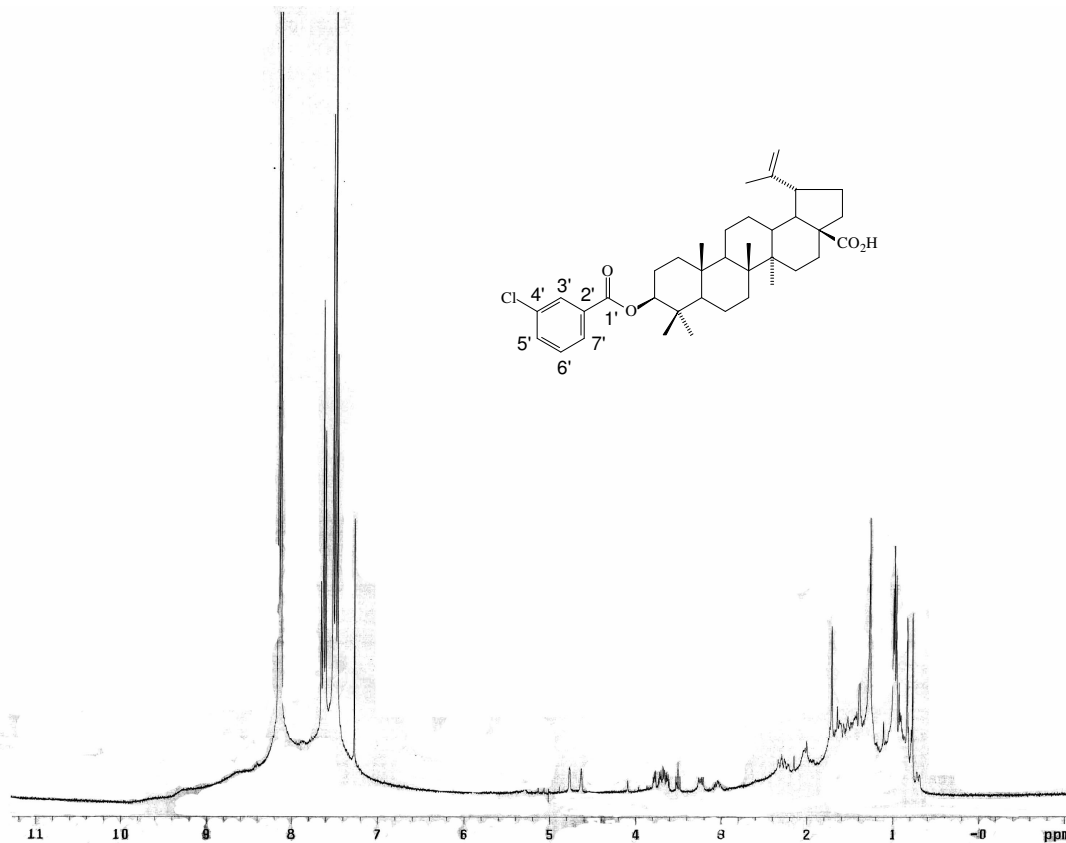


Figura 60: Espectro de RMN de ^1H do ácido 3 β -(3-clorobenzoil) betulínico (**3a**) [300 MHz, piridina- d_5 , $\delta(\text{ppm})$]

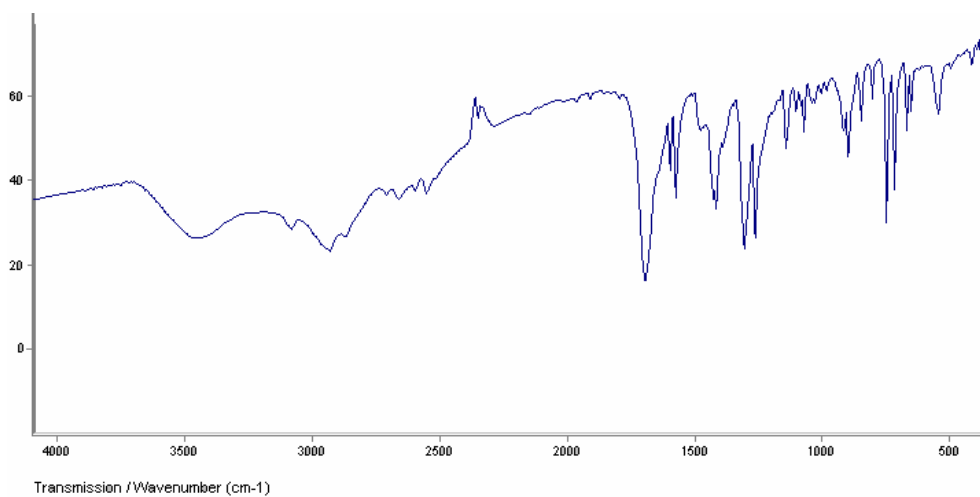


Figura 61: Espectro no IV do ácido 3 β -(3-clorobenzoil) betulínico (**3a**)

A identificação do ácido 3 β -(3-clorobenzoil) oleanólico (**4a**) foi realizada através da análise dos dados de RMN ^1H e IV. No espectro de RMN ^1H (Figura 62), foi encontrado um singlete em δ 7,99, um dubleto em δ 7,99-7,96, um dubleto em δ 7,6 e um triplete em δ 7,5 dos hidrogênios aromáticos H-3', 7', 5' e 6'. Também foram identificados um triplete em δ 4,35 (J= 7,7, 1H) indicativo da presença do hidrogênio na posição H-3 e um dubleto em δ 2,3 (J= 11, 1H) referente ao hidrogênio H-18.

No espectro no IV (Figura 63, pág. 94), o ácido 3 β -(3-clorobenzoil) oleanólico (**4a**) apresentou sinais de deformação axial em 3511-3312 cm^{-1} de ligação oxigênio-hidrogênio de ácido carboxílico, em 1646 cm^{-1} característico de carbonila e em 1249-1299 cm^{-1} característico de ligação carbono-oxigênio de éster, além de sinais em 894 cm^{-1} de ligação carbono-cloro e em 727 cm^{-1} de deformação angular fora do plano de ligação carbono-hidrogênio.

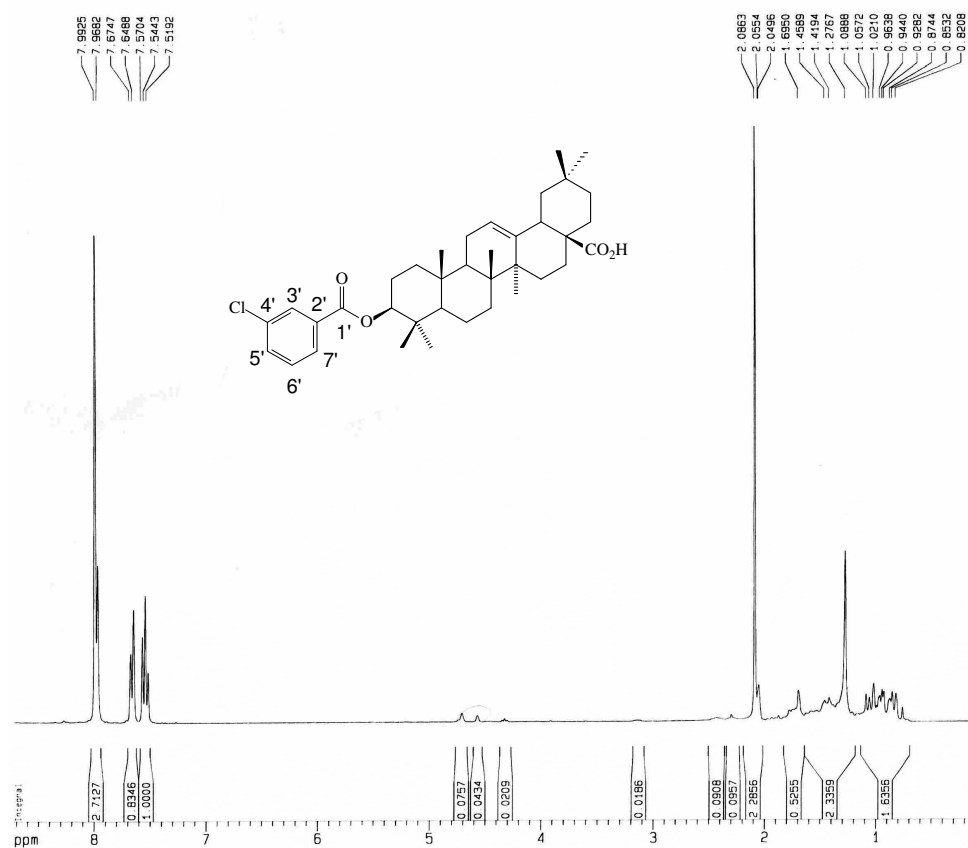


Figura 62: Espectro de RMN de ^1H do ácido 3 β -(3-clorobenzoil) oleanólico (**4a**) [300 MHz, acetona- d_6 , δ (ppm)]

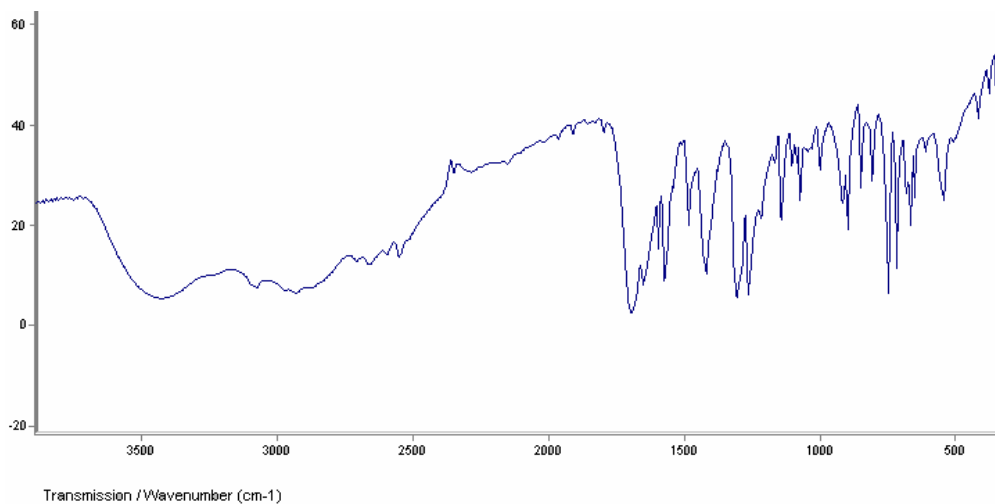


Figura 63: Espectro no IV do ácido 3 β -(3-clorobenzoil) oleanólico (**4a**)

A identificação do ácido 3 β -(3-clorobenzoil) lupeol (**5a**) foi realizado através da análise dos dados de RMN ^1H e IV. O espectro de RMN ^1H (Figura 64, pág. 95) foi encontrado um tripleto em δ 8,0 ($J= 2, 1\text{H}$), um duplo tripleto em δ 7,9 ($J= 1$ e 7,8, 1H) e em 7,55 ($J= 1$ e 8, 1H) e um tripleto em 7,4 ($J= 7,8, 1\text{H}$) dos hidrogênios aromáticos H-3', 7', 5' e 6'. Também foram identificadas presença de dois dubletos em δ 4,8 ($J= 2,5, 1\text{H}$) e 4,6 ($J= 2,4, 1\text{H}$) referentes a dois hidrogênios olefinicos H-29 e um tripleto em δ 4,32 ($J= 7, 1\text{H}$) do hidrogênio carbinólico na posição H-3.

No espectro de IV (Figura 65, pág. 95), o ácido 3 β -(3-clorobenzoil) lupeol (**5a**) apresentou sinais de deformação axial em 1712 cm^{-1} característico de carbonila e em 1299-1262 cm^{-1} característico de ligação carbono-oxigênio de éster, além de sinais em 847 cm^{-1} de ligação carbono-cloro e em 727 cm^{-1} de deformação angular fora do plano de ligação carbono-hidrogênio de aromático.

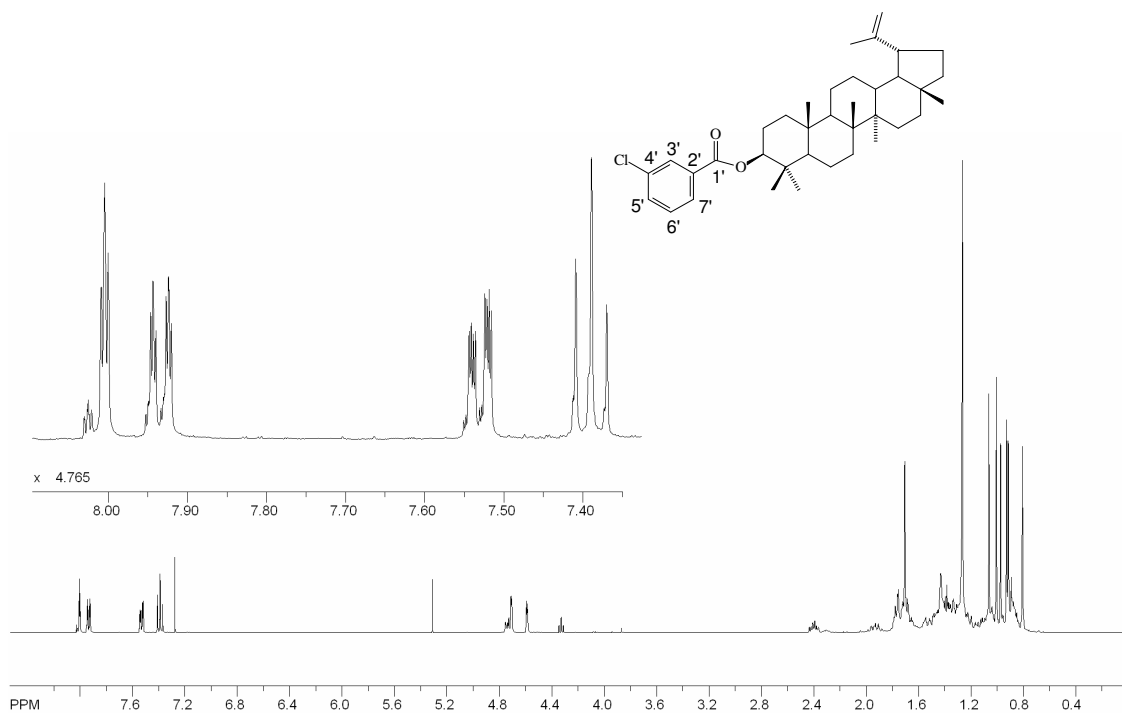


Figura 64: Espectro de ^1H do 3 β -(3-clorobenzoil) lupeol (**5a**) [400 MHz, CDCl_3 , $\delta(\text{ppm})$]

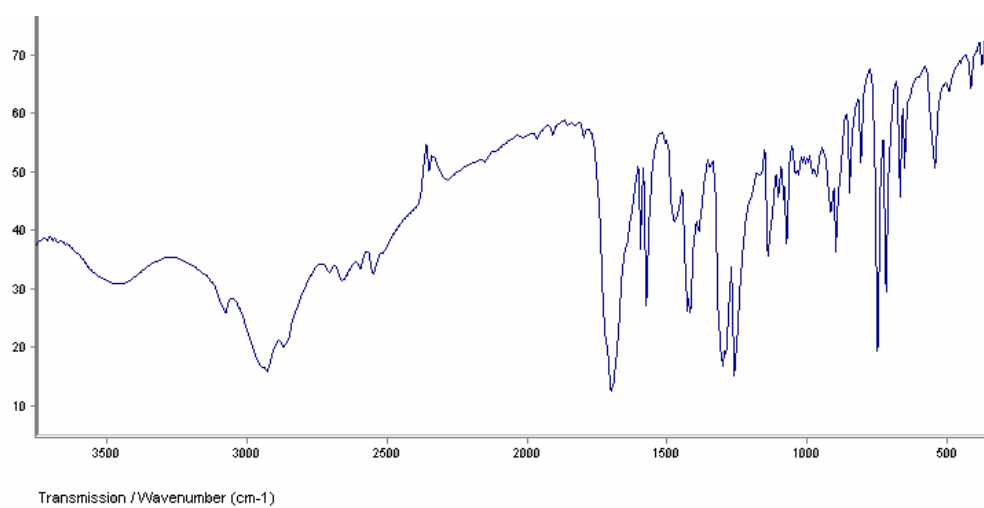


Figura 65: Espectro no IV do 3 β -(3-clorobenzoil) lupeol (**5a**)

5.5 Atividade citotóxica (Letalidade contra *Artemia salina*)

A letalidade frente a larvas da *Artemia salina* é um indicador confiável da toxicidade de certas substâncias. O desenvolvimento das larvas depende muito do meio onde se encontra, permitindo a utilização dessas larvas em bioensaios, e possibilitando desse modo, que se faça a correlação da atividade citotóxica dos compostos, com as suas estruturas químicas (ANDERSON et al., 1991).

Todos derivados esterificados do β -sitosterol e quatro derivados dos triterpenos foram submetidos ao teste de letalidade frente *Artemia salina* em sete concentrações distintas. Os resultados da toxidade dos derivados podem ser observados pela Tabela-7.

Compostos	Atividade citotóxica		
	CL ₅₀ ($\mu\text{g/mL}$)	Desvio padrão**	Atividade citotóxica
1a	>1000 $\mu\text{g/mL}$	-	Não ativo
1b	>1000 $\mu\text{g/mL}$	-	Não ativo
1c	>1000 $\mu\text{g/mL}$	-	Não ativo
1d	=221,3 $\mu\text{g/mL}$	2,698	Ativo
1e	>1000 $\mu\text{g/mL}$	-	Não ativo
1f	>1000 $\mu\text{g/mL}$	-	Não ativo
1g	=889,7 $\mu\text{g/mL}$	11,951	Ativo
1h	=721,6 $\mu\text{g/mL}$	1,847	Ativo
2e	>1000 $\mu\text{g/mL}$	-	Não ativo
3a	=117,1 $\mu\text{g/mL}$	0,418	Ativo
4a	=477,2 $\mu\text{g/mL}$	0,304	Ativo
5a	=797,8 $\mu\text{g/mL}$	0,452	Ativo
β -sitosterol (1)	>1000 $\mu\text{g/mL}$ *	-	Não ativo
Ácido ursólico (2)	>1000 $\mu\text{g/mL}$ *	-	Não ativo
Ácido betulínico (3)	-	-	-
Ácido oleanólico (4)	>1000 $\mu\text{g/mL}$ *	-	Não ativo
Lupeol (5)	>300 $\mu\text{g/mL}$ *	-	Ativo

* DAVID et al, 2001; GALOTTA et al, 2005

** 95% intervalo de confiança ($\mu\text{g/mL}$)

Tabela 7: Resultados do Teste de Letalidade de *Artemia salina* com derivados esterificados do β -sitosterol e triterpenos.

Segundo dados da literatura (DAVID et al., 2001; ANDERSON et al., 1991; MEYER, 1982), substâncias que apresentam $CL_{50} > 1000 \mu\text{g/mL}$ são consideradas inativas e aquelas que apresentam $CL_{50} < 100 \mu\text{g/mL}$ são consideradas muito ativas. Substâncias que apresentam o CL_{50} entre 100 e 900 $\mu\text{g/mL}$ são consideradas moderadamente ativas (MEYER, 1982).

Pode-se verificar pela Tabela-7 (pág. 96) que a maioria das amostras testadas foram inativas ou moderadamente ativas, com exceção do composto ácido (**3a**) 3β -(3-clorobenzoil) betulínico $CL_{50} = 117,1 \mu\text{g/mL}$. Percebe-se também, que ocorreu pouca variação na atividade citotóxica dos derivados em comparação com o CL_{50} dos seus respectivos protótipos: β -sitosterol, ácido ursólico, ácido betulínico, ácido oleanólico e lupeol (DAVID et al, 2001; GALOTTA et al, 2005).

Nos derivados do β -sitosterol, ocorreram poucas variações significativas da CL_{50} , sugerindo-se que a substituição da hidroxila no C-3 do β -sitosterol, por ésteres alifáticos, benzóicos e cinâmico não apresentam ampliação significativa da atividade citotóxica, através da comparação do CL_{50} do β -sitosterol com os respectivos derivados (Tabela-7).

Para os triterpenos, foi verificado em trabalho posterior (SILVA, 2008) que o derivado ácido 3β -(3-clorobenzoil) betulínico (**3a**) apresenta alta atividade citotóxica e o derivado ácido 3β -(3-clorobenzoil) oleanólico (**4a**) apresenta menor atividade, tendo suas respectivas sínteses e atividade biológica relatadas pela primeira vez na literatura. Esses resultados estimularam a realização da síntese desses derivados, assim como de outros triterpenos estruturalmente semelhantes como o ácido ursólico e o lupeol. A síntese e a atividade citotóxica desses derivados triterpênicos, constataram que o derivado ácido 3β -(3-clorobenzoil) betulínico (**3a**) é realmente muito ativo, o derivado ácido 3β -(3-clorobenzoil) oleanólico (**4a**) apresenta uma moderada atividade citotóxica e os derivados ácido 3β -(3-clorobenzoil) ursólico (**2e**) e 3β -(3-clorobenzoil) lupeol (**5a**) não apresentam atividade citotóxica. Dessa forma, a presença do cloro como substituinte no anel aromático esterificado aos triterpenos, nem sempre confere uma elevação na atividade citotóxica. Apesar do lupeol ser muito semelhante ao ácido betulínico, ambos apresentam esqueleto lupano, não foi observada melhora em sua atividade citotóxica quando esterificado com o grupo 3-clorobenzoil, indicando, assim a importância da carboxila no carbono C-28. Confirmando a maior atividade biológica dos triterpenos de esqueleto lupano em relação aos ursanos e oleanos, além da importância da carboxila no carbono C-28 para atividade citotóxica. Uma vez que, o que diferencia o ácido betulínico (**3**) do lupeol (**5**) é a existência do grupo ácido no C-28 do primeiro (VECHIA, 2009).

5.6 Atividade anticolinesterásica

Apenas os derivados cinâmico e 3-clorobenzoila do β -sitosterol e os respectivos reagentes, devido a redução do estoque de enzima no laboratório, foram submetidos ao ensaio preliminar de inibição da enzima acetilcolinesterase através de um ensaio colorimétrico. O intuito desse teste foi realizar uma triagem das substâncias que apresentam atividade anticolinesterásica para uma posterior análise quantitativa.

A confirmação da atividade anticolinesterásica de cada substância é realizada pela verificação dos spots que assumiram a coloração branca ou spots que apresentaram um aro branco ao redor do ponto de aplicação.

A cromatoplaça de sílica gel com as amostras, após a nebulização da solução de acetilcolinesterase, e os indicadores colorimétricos, revelaram que a substância 3 β -clorobenzoxestigmast-5-eno (**1g**) apresenta atividade de inibição da enzima quando comparada com o controle, alcalóide fisostigmina (**7**) (Figura 66).

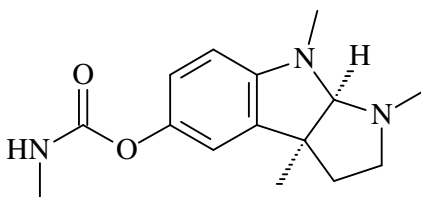


Figura 66: Alcalóide Fisostigmina (**7**)

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O β -sitosterol é um fitoesteróide bastante difundido no reino vegetal e apresenta diversas propriedades biológicas como: combate aos sintomas da hiperplasia benigna da próstata; redução dos níveis de colesterol total e triacilglicerídeos no soro sanguíneo; e combate a alopecia (STRUM, 2005; PRAGER, 2002; RICHARD, 2002; PARISENTI, 2006; LICHTENSTEIN e DECKELBAUM, 2001; KATAN, 2003).

Outra classe de compostos de propriedades biológicas interessantes são os triterpenos pentacíclicos como: ácido ursólico; ácido betulínico; ácido oleanólico e lupeol. Que apresentam inúmeras atividades, atuando na inibição da carcinogênese, no crescimento de melanoma, além de efeito antiviral (inibição da replicação do HIV-1), anti-helmíntico e antiinflamatório (MEZZETTE, 1971; HARRY, 1963; VECHIA, 2009). Deste modo, é digno de nota que a *Eriope blanchetii* pode ser considerada uma fonte natural para extração comercial destes três triterpenos, uma vez que foram obtidos com rendimento de 1,47 % de ácido ursólico, 2,38 % para o ácido oleanólico e 6,44 % para o ácido betulínico. Quanto ao lupeol, foi obtido de outra fonte natural.

As reações de esterificação do β -sitosterol e dos triterpenos citados acima, utilizando os anidridos acético, propiônico, butírico, benzóico e succínico, além do cloreto de (3-clorobenzoila) e cloreto cinâmico, foram realizadas com sucesso gerando um total de dezesseis derivados (oito do β -sitosterol e oito dos triterpenos): 3 β -acetoxestigmast-5-eno (**1a**), 3 β -propoxestigmast-5-eno (**1b**), 3 β -butoxestigmast-5-eno (**1c**), 3 β -formestigmast-5-eno (**1d**), 3 β -carboxisuccinatoestigmast-5-eno (**1e**), 3 β -benzoxestigmast-5-eno (**1f**), 3 β -3-clorobenzoxestigmast-5-eno (**1g**), *trans*-cinamato de estigmast-5-eno (**1h**), ácido 3 β -acetilursólico (**2a**), ácido 3 β -propilursólico (**2b**), ácido 3 β -butilursólico (**2c**), ácido 3 β -benzoilursólico (**2d**), ácido 3 β -(3-clorobenzoil) ursólico (**2e**), ácido 3 β -(3-clorobenzoil) betulínico (**3a**), ácido 3 β -(3-clorobenzoil) oleanólico (**4a**) e 3 β -(3-clorobenzoil) lupeol (**5a**).

Ressalta-se que os derivados, ácido 3 β -(3-clorobenzoil) ursólico (**2e**) e 3 β -(3-clorobenzoil) lupeol (**5a**) estão sendo descrito pela primeira vez, sendo, portanto, substâncias novas.

Das substâncias testadas quanto a Letalidade frente a larvas da *Artemia salina*, somente as substâncias 3 β -formestigmast-5-eno (**1d**) LC₅₀=221,3 μ g/mL, 3 β -clorobenzoxestigmast-5-eno (**1g**) LC₅₀=889,7 μ g/mL, *trans*-cinamato de estigmast-5-eno (**1h**) LC₅₀=721,6 μ g/mL, ácido 3 β -(3-clorobenzoil) betulínico (**3a**) LC₅₀=117,1 μ g/mL, ácido 3 β -(3-clorobenzoil) oleanólico (**4a**) LC₅₀=477,2 μ g/mL e 3 β -(3-clorobenzoil) lupeol (**5a**) LC₅₀=797,8 μ g/mL, apresentaram atividade citotóxica.

De acordo com os dados da literatura (MEYER, 1982), no teste da *Artemia salina* somente deve ser consideradas ativas substâncias citotóxicas que agem em concentrações inferiores a 100 μ g. Assim, pôde-se concluir que a maioria das substâncias testadas possui moderada ou não possuem atividade considerável neste teste. Este teste pode ser considerado como uma avaliação preliminar ('screen') para determinação de toxicidade geral bem como citotoxicidade para busca de substâncias anticancerígenas. No entanto, os ácidos ursólico (**2**), betulínico (**3**) e oleanólico (**4**), e alguns dos seus derivados, são empregados no tratamento de tumores (MEZZETTE, 1971; HARRY, 1963; DENG, 2008; LEUNG, 1996; PATROČKA, 2003). Portanto, é necessário que as substâncias testadas sejam também submetidas a testes *in vitro* de atividade anticancerígena de células epiteliais.

Já no teste qualitativo de inibição da enzima acetilcolinesterase, revelou que a substância 3 β -clorobenzoxestigmast-5-eno (**1g**) apresenta atividade anticolinesterásica. Sendo necessário testes quantitativos dessa substância para avaliar melhor seu potencial como agente anticolinesterásico.

Dessa forma, com a propriedade destes dados, este trabalho permite propor que um número limitado de derivados esterificados do β -sitosterol e dos triterpenos apresentam propriedades biológicas, sendo necessários ensaios mais específicos para determinar o real potencial biológico desses derivados.

REFERÊNCIAS

- ADIL, Q. **Isolation and structure elucidation studies in the Chemical constituents of *Thevetia Nerifolia* Juss.** Karachi- Pakistan, 1994. p. 21-37. Thesis (Doctor)- Research Institute of Chemistry University of Karachi Pakistan, 1994.
- ANDERSON, J. E.; GOETZ, A. **blind comparasion of simple bench-top bioassays and human tumour cell cytotoxicities and antitumour prescreens.** *Phytochemical Analysis*, v. 2, p. 107-111, 1991.
- AWAD, A. B.; FINK, C. S. **Phytosterols as anticancer dietary components: evidence and mechanism of action.** *Journal of Nutrition*, v. 130, p. 2127-2130. 2000.
- BELITZ, H. D.; GROSCH, W. & Schieberle, P. **Unsaponifiable constituents Food Chemistry.** Berlin: Springer-Veriag, p. 182-197, 1987.
- BERGSTRÖM, S.; WINTERSTEINER, O. **Autoxidation of sterols in colloidal aqueous solution: The influence of esterification and of constitutional factors.** *Journal of Biological Chemistry*, v. 145, p. 327-333, 1942.
- BI, Y.; XU, J. **Synthesis and cytotoxic activity of 17-carboxylic acid modified 23-hydroxy betulinic acid ester derivatives.** *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, v. 17, 1475–1478, 2007.
- BRISKIN, D. P. **Medicinal Plants and Phytomedicines. Linking Plant Biochemistry and Physiology to Human Health.** *Plant Physiology*, v. 124, p. 507 – 514, 2000.
- BRUNEAU, E.; SUTTER, D.; HUME, R. I.; AKAABOUNE, M. **Identification of Nicotinic Acetylcholine Receptor Recycling and Its Role in Maintaining Receptor Density at the Neuromuscular Junction *In Vivo*.** *The Journal of Neuroscience*, v. 25, p. 9949-59, 2005.
- COSTA, H. N. R. da; SANTOS, M. C. dos **Constituintes químicos e atividade antiedematogênica de *Peltodon radicans* (Lamiaceae),** *Quim. Nova*, v. 31, p. 744-750, 2008.
- CUI, J.; HUANG, L. **A facile and efficient synthesis of some (6E)-hydroximino-4-en-3-onosteroids, steroidal oximes from *Cinachyrella* spp.sponges.** *Steroids*, v. 73, 252–256, 2008.
- DAVID, J. P.; MEIRA, M. e DAVID J. M. **Triterpenos e Ferulatos de *Alquila de Maprounea guianensis*.** *Quím. Nova*, v. 27, p. 62-65, 2004.
- DAVID, J. P.; Silva, E. F.; de MOURA, D. L. **Lignanas e Triterpenos do extrato citotóxico de *Eriope blanchetii*.** *Quím. Nova*, v. 24, 2001.
- DENG, S. L., BAGLIN, I. **Synthesis of Phosphono dipeptide Conjugates of Ursolic Acid and Their Homologs.** *Heteroatom Chemistry*, v. 19, 2008.

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

DROZDOVA, F. V.; A. P. Mekhtieva; et al. Russian Journal of Bioorganic Chemistry, Vol. 33, p. 326–333, 2007.

ESPINDOLA, J. A. A. **Floresta e ambiente. Potencial alelopático de ésteres derivados do ácido cinâmico.** v. 13, p. 53-60, 2006.

FERREIRA, W. da S. **Utilização da piperina como protótipo na síntese de novos anti-chagásicos da classe das 1,3,4-tiadiazólio-2-fenilaminas.** Rio de Janeiro-RJ: UFRRJ, 2006. p. 55-56. Dissertação (Mestrado em Ciências), Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2006.

FILHO, V. C.; YUNES, R. A. **Estratégias para obtenção de compostos farmacologicamente ativos a partir de plantas medicinais. Conceitos sobre modificação estrutural para otimização da atividade.** Quím. Nova, v. 21, p. 99-105, 1998.

GALOTTA, A. L. Q. De Assis; BOAVENTURA, M. A. D. **Constituintes Químicos da raiz e do talo da folha do açai (*Euterpe precatoria* MART., Areaceae)** Quim. Nova, v. 28, p. 610-613, 2005.

GIORDANI, R. B.; PAGLIOSA, L. B. **Investigação do potencial antioxidante e anticolinesterásico de *Hippeastrum* (amaryllidaceae).** Quim. Nova, v. 31, p. 2042-2046, 2008.

GROS G, Eduardo; Pomilio, Alicia; Seldes, Alicia; Burton, Gerardo. (1985). **Introducción al Estudio de los Productos Naturales.** (1^a ed.). Organización de Estados Americanos: Washington D.C., Estados Unidos. 146 pp.; ed. Eva V. Chesneau, Serie de química ; monografia, n.º. 30, 1985.

GUERRA, M. P.; NODARI, R. O. **Biodiversidade: Aspectos biológicos, geográficos, legais e éticos.** In: SIMÕES, C.M.O.; GUERRA, M. P. et al “Farmacognosia: da planta ao medicamento”. 5^a ed. Porto Alegre/ Florianópolis: Editora da UFRGS/UFSC p.14-20, 2004.

HARRY, R. G. **Cosmetic Materials. Their Origin, Characteristics, Uses, and Dermatological Action.** Chemical Publishing Co., Inc., New York; 1963.

HICHRI, F.; JANNET, H. B.; et al. **Antibacterial activities of a few prepared derivatives of oleanolic acid and of other natural triterpenic compounds.** C. R. Chimie, v. 6, p. 473-483, 2003.

KATAN, M. B. **Efficacy and Safety of Plant Stanols and Sterols in the Management of Blood Cholesterol Levels.** Mayo Clin. Proc., v. 78, p. 965-978, 2003.

KIM, D. S. H. L.; PEZZUTO, J. M. **Synthesis of betulinic acid derivatives with activity against human melanoma.** Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, v. 8, p. 1707-1712, 1998.

KOYGANKO, N. V.; KASHKAN, Zh. N. **Synthesis of (24R)-3-hydroxystigmast-5-en-7-one**. Chemistry of Natural Compounds, v. 35, 1999.

KVASNICA, M.; SAREK, J. **Synthesis of phthalates of betulinic acid and Betulin with cytotoxic activity**. Bioorganic & Medicinal Chemistry, v. 13, p. 3447–3454, 2005.

LEHNINGER, A. L.; NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de Bioquímica**. 2ª ed. São Paulo : Sarvier Editora de Livros Médicos Ltda., p. 188-191 e 502-510, 1995.

LEHNINGER, A. L.; NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de Bioquímica**. 4ª ed. São Paulo : Sarvier Editora de Livros Médicos Ltda., p. 808-815, 2007.

LEUNG; A.Y.; FOSTER S. **Encyclopedia of common natural ingredients used in food, drug and cosmetics**. 2ª ed. New York: John Wiley & Sons Inc., 1996.

LICHTENSTEIN, A. H.; DECKELBAUM, R. J. **Stanol/Sterol Ester-Containing Foods and Blood Cholesterol Levels**, Journal the American Heart Association, v. 103, p.1177-1179, 2001.

MACARI, P. A. T.; EMERENCIANO, V. De P.; FERREIRA, Z. M. G. S. **Identificação dos triterpenos de *Miconia Albicanstriana* através de análise por microcomputador**. Química nova 13, v. 4, 1990, p. 260-262

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

MARSTON, A.; KISSILING, J. **A rapid TLC bioautographic method for the detection off acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase inhibitors in plants**, Phytochemical Analysis, v.13, p.51-54, 2002.

McCARTHY, F. O. **Synthesis, isolation and characterisation of b-sitosteroland b-sitostero loxidederivatives**. Org. Biomol. Chem, v. 3, p.3059–3065, 2005.

MEYER, B. N; FERRIGNI, N. R; PUTNAM, J. E; JACOBSEN, L. B; NICHOLS, D. E. ; MCLAUGHLIN, J. L. **Brine Shrimp- A convenient General Bioassay for Active Plant Constituents**. Planta Medica, v. 45, p.31 - 34, 1982.

MENG, Y.Q.; LIU, D.; *et al.* **The synthesis of ursolic acid derivatives with cytotoxic activity and the investigation of their preliminary mechanism of action**. Bioorganic & Medicinal Chemistry, v. 17, p. 848–854, 2009.

MEZZETTI, T.; ORZALESI, G.; BELLAVITA, V. **Chemistry of ursolic acid**. Planta Medica, v. 20, p. 244-252, 1971.

MILLER, B.; OSCHINSKI, C.; ZIMMER, W. **First isolation of an isoprene synthase gene from poplar and successful expression of the gene in *Escherichia coli***. *Planta*, v. 213, p. 483-487, 2001.

MISHARIN, A. Yu.; MEHTIEV, A. R.; MOROZEVICH, G. E.; TKACHEV, Y. V.; TIMOFEEV, V. P. **Synthesis and cytotoxicity evaluation of 22,23-oxygenated stigmastane derivatives**. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, v. 16, p. 1460-1473, 2008.

MORI, K.; FUKAMATSU, K. **Synthesis of Blattellastanoside A, the Aggregation Pheromone of a Steroid Qiuconside Isolated as the German Cockroach**. *Proc. Japan Acad.*; v. 69; Ser. B; 1993.

MUKHERJEE, R.; JAGGI, M. **Synthesis of 3-O-acyl/3-benzylidene/3-hydrazone/3-hydrazine/17 carboxyacryloyl ester derivatives of betulinic acid as anti-angiogenic agents**. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, v. 14, p. 3169-3172, 2004.

OLIVEIRA, A. B. **Microencapsulamento de estigmasterol proveniente de *Musa paradisiaca* L., Musaceae**. Curitiba-PR: UFPR, 2007. p. 11-31. Dissertação (Mestrado)- Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2007.

OJA, V.; CHEN, X. **Sublimation Thermodynamic Parameters for Cholesterol, Ergosterol, β -Sitosterol, and Stigmasterol**. *J.Chem Eng.*, v. 54, p. 730-734, 2009.

PARISENTI, J. **Determinação dos esteróis e dos ácidos graxos em ostras da região de Florianópolis-SC e efeito do seu consumo no colesterol sérico de ratos**. Florianópolis-SC: UFSC, 2006. p. 24-28. Dissertação (Mestrado)- Programa de Pós-graduação em Nutrição, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2006.

PATOČKA, J. **Biologically active pentacyclic triterpenes and their current medicine Signification**; *Journal of Applied Biomedicine*, 1: 7-12, 2003.
(http://www.zsf.jcu.cz/jab/1_1/2biologicallyactive.pdf)

PINTO, A. C.; SILVA, D. H. S. **Produtos naturais: atualidade, desafios e perspectivas**. *Quim. Nova*, v. 25, Supl. 1, p. 45-61, 2002.

PIIRONEN, V.; LINDSAY, D.G.; MIETTINEN, T.A.; TOIVO, J.; LAMPI, A.M. **Plant sterols: biosynthesis, biological function and their importance to human nutrition: review**. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, v. 80, p. 939-966, 2000.

PRAGER, N.; BICKETT, K. R.N.; FRENCH, N.; MARCOVICI, G. **A Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Trial to Determine the Effectiveness of Botanically Derived Inhibitors of 5- α -Reductase in the Treatment of Androgenetic Alopecia**. *The J. alternative and complementary med.* v. 8, p.143-152, 2002.

PRIDHAM, J. B. *Terpenoids in Plants*. London : Academic Press., p. 160-174 e 9-12, 1967.

QUILEZ, J.; GARCÍA-LORDA, P.; SALAS-SALVADOL, J. **Potential uses and benefits of phytosterols in diet: present situation and future directions.** *Clinical Nutrition*, v. 22, n. 4, p. 343-351, 2003.

RICHARD, E.; OSTLUND, Jr. **Phytosterols in human nutrition.** *Annu. Rev. Nutr.*, v. 22, p. 533-49, 2002.

RIEBER, M.; RIEBER M. S. **Induction of p53 without increase in p21WAF1 in betulinic acid-mediated cell death is preferential for human metastatic melanoma.** *DNA Cell Biol.*, v. 17, p. 399-406, 1998.

ROBINSON, T. *The Organic Constituents of Higher Plants.* 6^a ed. Massachusetts : Cordus Press., p. 151-153, 1991.

ROGERS, C. J.; HIXON, M. S.; YAMAMOTO N.; XU Y.; OLSON A. J.; JANDA K. D. *Biochemistry.* v. 44, p. 4845-53, 2005.

SALES, H. J. S. **Esterificação seletiva para a separação de esteróis, ácidos resínicos e ácidos graxos do resíduo oleoso de madeira (tall oil).** Campinas-SP: Unicamp, 2007. p.20-23. Tese (Doutorado)- Programa de Pós-graduação em Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2007.

SILVA, M. L. **Atividade biológica e antioxidante de derivados dos ácido betulínico e oleanólico.** Feira de Santana-Bahia: UEFS, 2008. p.18. Dissertação (Mestrado)- Programa de Pós-graduação em biotecnologia, Universidade Estadual de Feira de Santana, Feira de Santana, 2008.

SILVERSTEIN, R. M.; WEBSTER, F. X.; KIEMLE, D. J. *Identificação espectroscópica de compostos orgânicos*, tradução: Ricardo Bicca de Alencastro, 7^a ed. Rio de Janeiro: LTC, p. 93-96, 2007.

SOLDI, C.; PIZZOLATTI, M. G.; LUIZ, A. P.; MARCON, R.; MEOTTI, F. C. **Synthetic derivatives of the a- and b-amyrin triterpenes and their anti nociceptive properties.** *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, v. 16, p. 3377-3386, 2008.

SOLOMONS, T. W. G.; FRYHLE, C. B. *Organic Chemistry.* 17^a ed. New York : John Wiley & Sons, p. 937-941 e 1156-1157, 1998.

SOLOMONS, T. W.; FRYHLE, C. B. *Química Orgânica.* v.2, 8^a ed. Rio de Janeiro: LTC, p.416-426 e 115-116, 2006.

SONG, Y. H.; HONG, S.; LIM, H.; SEO, J.; CHUNG, S.; NO, I.; LEE, K.; YOON, M. **Effect of a New b b-Sitosterol Analogue on Plasma Lipid Concentrations in Rats.** *Chem. Pharm. Bull.* V. 52, p. 597-601, 2004.

SPORN, M. B.; NANJOO, S. **Chemoprevention of cancer.** *Carcinogenesis*, v.21, p.525-530, 2000.

STAHL, E. *Thin-Layer Chromatography: A Laboratory Handbook.* 2^a ed. New York: Heidelberg, p. 1041, 1969.

- STRUM, S. B.; FALOON, W. **Beta-Sitosterol and the Aging Prostate Gland**, Life Extension, Fort Lauderdale, FL, June 2005. Accessed: 12-19-2008.
- STROHL, W. R. **The role os natural products in a modern drug discovery program**. Drug Discovery Today, v. 5, p. 39-41, 2000.
- SERAFIN, C. **Estudo da composição químicas e das propriedades biológicas das partes aéreas de *Plinia glomerata***. Itajaí-SC: UNIVALI, 2006. p. ?.Dissertação (Mestrado), Universidade do Vale do Itajaí, Itajaí, 2006.
- TANACHATCHAIRATANA, T.; BREMNER J. B. **Antimycobacterial Activity of Cinnamate-Based Esters of the Triterpenes Betulinic, Oleanolic and Ursolic Acids**, Chem. Pharm. Bull., v. 56, p. 194-198, 2008.
- VOLIN, P. **Analysis of steroidal lipids by gas and liquid chromatography: review**. Journal of Chromatography A, v. 935, p. 125-140, 2001.
- VECHIA, L. D.; GNOATTO, S. C. B. **Derivados oleanos e ursanos e sua importância na descoberta de novos fármacos com atividade antitumoral, anti-inflamatória e antioxidante**. Quím. Nova, v. 32, p. 1245-1252, 2009.
- VIEIRA, T. R.; BARBOSA, L.C. A. **Constituintes químicos de *Melaleuca alternifolia* (Myrtaceae)**. Quím. Nova, v. 27, p. 536-539, 2004.
- VIEGAS, C. Jr.; BOLZANI V. da S.; BARREIRO E. J.; FRAGA C. A. Mini Ver. Med. Chem., 10, p. 915-26; Dickerson TJ, Beuscher AE 4th, 2005.
- WALKER, C.H. Organophosphorous and carbamate insectides. Organic Pollutants. An ecotoxicological Perspective. *Taylor & Francis* N Y, USA, 2001.
- YUNES, R. A.; PEDROSA, R. C. **Fármacos e fitoterápicos: a necessidade do desenvolvimento da indústria de fitoterápicos e fitofármacos no Brasil**. Quim. Nova, v. 24, p. 147-152, 2001.
- ZULLO, M. A. T.; RAMOS, M. T. B.; MONTEIRO, D. A.; JR., G. G. **Extração e isolamento de diosgenina de *Barbasco*, *Bragantia*, Campinas**, v. 46, p. 9-15, 1987.
- ZUCO, V.; SUPINO, R.; RIGHETTIS, S. C.; CLERIS, L.; MARCHESI, E.; et al. **Selective cytotoxicity of betulinic acid on tumor cell lines, but not on normal cells**. Cancer Lett., v. 175, p. 17-25, 2002.