



# Esteróide e Triterpenos de espécies de *Qualea* – Bioatividade sobre *Mycobacterium tuberculosis*

Ana Lucia Martiniano Nasser<sup>1\*</sup>; Fernando Rogério Pavan<sup>2</sup>; Nivaldo Boralle<sup>1</sup>; Guilherme Julião Zocolo<sup>1</sup>; Lourdes Campaner dos Santos<sup>1</sup>; Mary Rosa Rodrigues de Marchi<sup>1</sup>; Clarice Queico Fujimura Leite<sup>2</sup>; Wagner Vilegas<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Instituto de Química, UNESP, Araraquara, São Paulo  
<sup>2</sup>Faculdade de Ciências Farmacêuticas, UNESP, Araraquara, São Paulo

## RESUMO

O extrato clorofórmico das cascas de *Qualea parviflora* (Vochysiaceae) foi fracionado em cromatografia em coluna usando sílica gel para fornecer triterpenos (lupeol, lupenona, betulina, ácido epibetulinico, e friedelina) e um esteroide ( $\beta$ -sitosterol). Os compostos  $\beta$ -sitosterol, lupenona e lupeol foram identificados também em *Q. grandiflora* e *Q. multiflora*, enquanto friedelina foi detectada apenas em *Q. multiflora* utilizando a cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas. A atividade anti-*Mycobacterium tuberculosis* do extrato clorofórmico e dos compostos isolados foi determinada por MABA e o valor da CIM variou de 250,0 a 31,2  $\mu\text{g/mL}$ . Esta investigação constitui o primeiro relato do estudo químico e antitubercular de compostos apolares das espécies de *Qualea*.

**Palavras-chave:** Espécies de *Qualea*. Triterpenos. Atividade anti-*M. tuberculosis*

## INTRODUÇÃO

A família Vochysiaceae é formada por árvores tropicais, é dividida em duas tribos, seis gêneros e aproximadamente duzentas espécies. A tribo Erismeeae apresenta dois gêneros: *Erismadelphus* e *Erisma*, enquanto a tribo Vochyseae é composta de quatro gêneros: *Callisthene*, *Salvertia*, *Vochysia* e *Qualea* (60 espécies), sendo todas neotropicais (Mayworm et al., 2000). As espécies de *Qualea* são conhecidas popularmente como “pau-terra” e são utilizadas na medicina tradicional para os mais variados fins. Septímio (1994) destaca o uso de algumas espécies como adstringente e antidiarreica; Almeida et al. (1998) utiliza para limpeza de úlceras externas e inflamações; Lorenzi (1998) e Pott & Pott (1994) como antiséptico externo e contra azia; Hiruma-Lima et al. (2006) como antiúlcera gástrica e Gaspi et al. (2006) como analgésica e anticonvulsivante. Estudos fitoquímicos de espécies do

gênero *Qualea* resultaram na identificação de ácidos graxos (Mayworm & Salatino, 2002), polissacarídeos (Mayworm et al., 2000), taninos pirogálicos e catequínicos (Rocha et al., 1979/80), flavonoides (Corrêa et al., 1981), terpenoides (Nasser et al., 2006) e derivados de ácido elágico (Nasser et al., 2008).

O agente da tuberculose, *Mycobacterium tuberculosis* (TB), é responsável por elevado índice de mortalidade no mundo, levando, anualmente, cerca de 1,7 milhões de pessoas a óbito (WHO, 2010). Esses dados mostram a grande necessidade de novos quimioterápicos mais efetivos no combate a tuberculose (Tripathi et al., 2005). A descoberta de novos fármacos representa um desafio principalmente em relação às substâncias com atividade contra micobactéria, que são patógenos de crescimento lento. Sua parede celular rica em lipídios representa verdadeira proteção contra os agentes agressores (Rando et al., 2002).

Portanto, em relação à atividade antimicobacteriana, os extratos e princípios ativos apolares são os mais promissores. As plantas, através de vias metabólicas secundárias, produzem diversos compostos, sendo verificada atividade biológica contra micobactérias em algumas classes de terpenoides (Higuchi et al., 2011) e fisalinas (Januário et al., 2002). Neste estudo, relatamos o isolamento e a identificação estrutural de um esteroide ( $\beta$ -sitosterol – **1**) e de cinco triterpenos pentacíclicos (friedelina – **2**, lupenona – **3**, lupeol – **4**, betulina – **5**, e ácido *epi*-betulinico – **6**) do extrato apolar das cascas de *Q. parviflora* (Figura 1). Os compostos de **1-4** foram determinados nos extratos de *Q. grandiflora* e *Q. multiflora* utilizando a cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM). A atividade anti-*M. tuberculosis* dos compostos **1-6** isolados de *Q. parviflora* foi avaliada.

## MATERIAL E MÉTODOS

Sílica gel 60H Merck<sup>®</sup> (Darmstadt, Germany) para coluna cromatográfica e sílica gel 60 PF254 Merck<sup>®</sup> (Rio de Janeiro, Brasil) para cromatografia em camada delgada comparativa e preparativa (CCDP) foram utilizadas. Clorofórmio (CHCl<sub>3</sub>), metanol (CH<sub>3</sub>OH) e hexano (C<sub>6</sub>H<sub>14</sub>) grau PA foram obtidos da Merck<sup>®</sup> (Darmstadt, Germany). Os compostos de **1-6** foram isolados e purificados em nosso laboratório, sendo que os compostos de **1-4** foram utilizados como padrão.

*Autor correspondente:* Ana Lucia Martiniano Nasser - Departamento de Alimentos e Nutrição - Faculdade de Ciências Farmacêuticas - UNESP Rodovia Araraquara-Jau, km1 - CEP.14801-902 - Araraquara - SP - Brasil fone: (16)97919587 - fax: (16) 3301-6920 - e-mail: nasser@fcfar.unesp.br

### Preparação do extrato clorofórmico

As cascas de *Q. parviflora* foram coletadas no Porto Nacional, no Estado de Tocantins por Adriane R. Duarte em 10 de dezembro de 2003; as cascas de *Q. grandiflora* foram coletadas na estrada Pedro Afonso, no Estado de Tocantins por Cristiano Borges Pereira em 25 de outubro de 2003 e as cascas de *Q. multiflora* foram coletadas na região do cerrado, no Estado de Tocantins pela Dr<sup>a</sup>. Clélia Akiro Hiruma-Lima em 02 de agosto de 2003. A identificação de todas as espécies vegetais foi realizada pela Dr<sup>a</sup>. Solange de Fatima Lolis (UNITINS) e catalogadas com o número de exsicata 3379, 4158 e 9226, respectivamente, e foram depositadas no herbário da Universidade do Tocantins (HTINS). As cascas (0,5 Kg) foram secas e trituradas em moinho de facas e em seguida, foram submetidas à extração por maceração em clorofórmio por uma semana. Após a evaporação do solvente em rotaevaporador foram obtidos os extratos clorofórmicos de *Q. parviflora*, *Q. grandiflora* e *Q. multiflora* com rendimentos de 3,46%; 3,66% e 3,38%, respectivamente.

### Instrumentação

#### Cromatografia gasosa – espectrometria de massa

Cromatógrafo gasoso GC-17A (Shimadzu) acoplado a um espectrômetro de massas (Shimadzu) Quadrupolo QP 5050A e injetor automático AOAC 20i, técnica de ionização por impacto eletrônico com energia de 70eV. Coluna cromatográfica LM-5 (5% fenil, 95% metilpolisiloxano L&M) 15m x 0.2mm d.i.; 0.2 µm de espessura do filme). A temperatura de trabalho da coluna foi otimizada utilizando-se a seguinte programação: 150 a 300°C (8°C/min) permanecendo 10 minutos nesta temperatura; enquanto as temperaturas do injetor e detector foram mantidas em 250°C e 310°C, respectivamente. Os gases do sistema foram: ar sintético (291 mL/min) e hidrogênio (33mL/min) para a chama do detector e nitrogênio como make-up (31mL/min) e gás de arraste (1 mL/min). O modo de injeção foi o splitless/split (12s seguido de split 1:20 e o volume de injeção foi de 1µL). O tempo total da análise foi de 28,75 minutos. EZChrom Elite Data System software foi usado para a detecção e processamento dos dados. Cartuchos de extração em fase normal (Sílica – Sigma<sup>®</sup>) foram usados nas etapas de clean up dos extratos, sendo as soluções resultantes filtradas em discos de 0,45 µm de poro (Millipore<sup>®</sup>).

#### Ressonância Magnética Nuclear

Espectrômetro Varian INOVA 500 de 11,7 T operando a 500 MHz (RMN de <sup>1</sup>H) e 125 MHz (RMN de <sup>13</sup>C) foi utilizado para a realização dos experimentos de RMN 1D (<sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C). Os deslocamentos químicos foram dados em δ (ppm) usando tetrametilsilano (TMS) como padrão interno.

### Preparo das amostras

Uma alíquota do extrato clorofórmico (10 mg) das cascas de cada espécie foi dissolvida em acetato de etila

(4,0 mL), filtrada em cartucho Sep-Pak (Sílica, Sigma<sup>®</sup>) e em Millex (0,45µm) e então, analisadas por CG-EM.

#### Isolamento e Purificação dos compostos de 1-6

Uma porção do extrato clorofórmico (5,0 g) de *Q. parviflora* foi fracionada em coluna de sílica gel (125g; 10 cm x 4,5 cm d.i.), empregando-se como eluente um gradiente crescente de polaridade Hexano-AcOEt-MeOH. Foram obtidas oito frações (F1 a F8). A análise de F1 permitiu identificar uma mistura rica em β-sitosterol (**1**, 280 mg). Foram realizados dois novos fracionamentos a partir de F2 e F3 em coluna de sílica gel 60H (10 cm x 2 cm d.i.) utilizando como eluente o mesmo gradiente descrito acima. F2 (670 mg) foi fracionado em 110 sub-frações, dentre as quais, F8-10 forneceu friedelina (**2**, 17 mg). F3 (910 mg) foi fracionado em 150 sub-frações, dentre as quais F15-18 foi submetida à cromatografia em camada delgada preparativa (CCDP) utilizando sílica gel como fase estacionária e AcOEt (100%) como fase móvel para fornecer lupenona (**3**, 5 mg). As sub-frações F23-25, F48-49 e F76-80 (obtidas do fracionamento de F3) levaram ao isolamento e identificação de lupeol (**4**, 18 mg), betulina (**5**, 10 mg) e ácido *epi*-betulínico (**6**, 12 mg), respectivamente.

#### Identificação dos compostos de 1-4

Análises por CG-EM do extrato clorofórmico das cascas de *Q. parviflora* foram realizadas a fim de traçarmos o perfil cromatográfico da planta. Os cromatogramas e os espectros de massas obtidos dos compostos de **1-4**, isolados de *Q. parviflora*, foram utilizados como padrões, por comparação de seus tempos de retenção ( $t_R$ ) e de seus respectivos espectros de massas, na identificação dos mesmos compostos presentes no extrato clorofórmico de *Q. grandiflora* e *Q. multiflora*.

### Avaliação da Atividade Anti*Mycobacterium tuberculosis*

A avaliação da atividade anti*M. tuberculosis* de cada composto foi realizada utilizando o MABA (*Microplate Alamar Blue Assay*) como método analítico (Frazblau et al., 1998). Soluções estoque dos compostos foram preparadas em dimetilsulfóxido e diluídas em caldo Middlebrook 7H9 (Difco<sup>®</sup>) suplementado com ácido oleico, albumina, dextrose e catalase (OADC enrichment - BBL/Becton-Dickinson, Sparks, MD, USA), obtendo a concentração final das amostras entre 0,15 -1600 µg/mL. A isoniazida foi solubilizada em água destilada estéril, de acordo com as recomendações do fabricante (Difco laboratories<sup>®</sup>, Detroit, MI, USA) e utilizada como fármaco controle.

Uma suspensão do *M. tuberculosis* H<sub>37</sub>Rv (ATCC 27294) foi preparada e comparada com a escala de turbidez de McFarland n°1 e diluída a 1:25 em Middlebrook 7H9 suplementado com OADC. O inóculo foi adicionado em cada poço da microplaca de 96 poços (Falcon 3072; Becton Dickinson, Lincoln Park, NJ) contendo os compostos em análise. As microplacas foram incubadas por 7 dias a 37°C, e após, adicionado Alamar Blue para leitura e incubadas por 24 horas. Após incubação, a fluorescência foi determinada utilizando filtros de excitação/emissão de

530/590 nm, respectivamente, em um leitor de microplacas SPECTRAfluor Plus (Tecan®). A concentração inibitória mínima (CIM) foi definida como a menor concentração do composto capaz de inibir em 90% o crescimento do *M. tuberculosis* (Franzblau et al., 1998). A CIM da isoniazida foi determinada a cada ensaio. As amostras foram analisadas em triplicata.

## RESULTADOS

O estudo do extrato clorofórmico das cascas de *Q. parviflora* resultou no isolamento do  $\beta$ -sitosterol-1, friedelina-2, lupenona-3, lupeol-4, betulina-5 e ácido *epi*-betulínico-6 (Figura 1) e seus dados espectrométricos são apresentados abaixo.

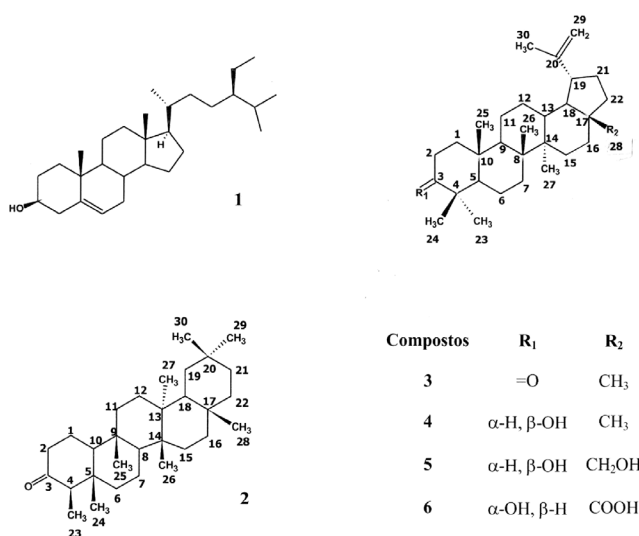


Figura 1. Compostos isolados do extrato clorofórmico de *Q. parviflora* (1-6).

*b*-sitosterol (1): RMN de <sup>13</sup>C (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ : 37.3 (C-1), 31.7 (C-2), 71.8 (C-3), 42.4 (C-4), 140.8 (C-5), 121.7 (C-6), 31.9 (C-7), 31.9 (C-8), 50.2 (C-9), 36.5 (C-10), 21.1 (C-11), 39.8 (C-12), 42.3 (C-13), 56.8 (C-14), 24.3 (C-15), 28.2 (C-16), 56.1 (C-17), 11.9 (C-18), 19.4 (C-19), 36.2 (C-20), 18.8 (C-21), 34.0 (C-22), 26.2 (C-23), 45.9 (C-24), 29.2 (C-25), 19.8 (C-26), 19.1 (C-27), 23.1 (C-28), 12.0 (C-29) (Faizi et al., 2001; Kojima et al., 1990).

Friedelina (2): RMN de <sup>13</sup>C (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ : 22.3 (C-1), 41.5 (C-2), 213.1 (C-3), 58.3 (C-4), 42.2 (C-5), 41.3 (C-6), 18.3 (C-7), 53.1 (C-8), 37.5 (C-9), 59.5 (C-10), 35.7 (C-11), 30.5 (C-12), 39.7 (C-13), 38.3 (C-14), 32.5 (C-15), 36.0 (C-16), 30.0 (C-17), 42.9 (C-18), 35.4 (C-19), 28.2 (C-20), 32.8 (C-21), 39.3 (C-22), 6.8 (C-23), 14.7 (C-24), 17.9 (C-25), 20.3 (C-26), 18.7 (C-27), 32.1 (C-28), 35.0 (C-29), 31.8 (C-30) (Mahato et al., 1992; Souza et al., 2001).

Lupenona (3): RMN de <sup>13</sup>C (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ : 39.6 (C-1), 34.2 (C-2), 217.8 (C-3), 48.0 (C-4), 55.0 (C-5), 19.7 (C-6), 33.6 (C-7), 40.9 (C-8), 49.8 (C-9), 36.9 (C-10), 21.5 (C-11), 25.2 (C-12), 38.2 (C-13), 43.0 (C-14), 27.5 (C-15), 35.6 (C-16), 43.0 (C-17), 48.3 (C-18), 48.0 (C-19), 151.0 (C-20), 29.9 (C-21), 40.0 (C-22), 26.7 (C-23), 21.0 (C-24), 15.8 (C-25), 16.0 (C-26), 14.5 (C-27), 18.0 (C-28), 109.4 (C-29), 19.3 (C-30) (Mahato et al., 1992; Olea & Roque, 1990).

Lupeol (4): RMN de <sup>13</sup>C de (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ : 38.7 (C-1), 27.4 (C-2), 79.0 (C-3), 38.9 (C-4), 55.4 (C-5), 18.3 (C-6), 34.3 (C-7), 40.9 (C-8), 50.5 (C-9), 37.2 (C-10), 21.0 (C-11), 25.2 (C-12), 38.1 (C-13), 42.9 (C-14), 27.4 (C-15), 35.6 (C-16), 43.0 (C-17), 48.4 (C-18), 48.0 (C-19), 151.0 (C-20), 29.9 (C-21), 40.0 (C-22), 28.0 (C-23), 15.4 (C-24), 16.1 (C-25), 16.0 (C-26), 14.6 (C-27), 18.0 (C-28), 109.3 (C-29), 19.3 (C-30) (Kojima et al., 1990; Mahato et al., 1992; Burns et al., 2000).

Betulina (5): RMN de <sup>13</sup>C (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ : 38.8 (C-1), 27.4 (C-2), 79.0 (C-3), 38.9 (C-4), 55.4 (C-5), 18.3 (C-6), 34.3 (C-7), 41.0 (C-8), 50.5 (C-9), 37.2 (C-10), 20.9 (C-11), 25.3 (C-12), 37.4 (C-13), 42.8 (C-14), 27.1 (C-15), 29.2 (C-16), 47.8 (C-17), 48.8 (C-18), 47.8 (C-19), 150.5 (C-20), 29.8 (C-21), 34.0 (C-22), 28.0 (C-23), 15.3 (C-24), 16.1 (C-25), 16.0 (C-26), 14.8 (C-27), 18.0 (C-28), 109.7 (C-29), 19.1 (C-30) (Kojima et al., 1990; Mahato et al., 1992; Burns et al., 2000).

Ácido *epi*-betulínico (6): RMN de <sup>13</sup>C (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ : 33.3 (C-1), 25.4 (C-2), 76.3 (C-3), 76.3 (C-4), 49.1 (C-5), 18.3 (C-6), 34.2 (C-7), 40.9 (C-8), 50.3 (C-9), 37.5 (C-10), 20.7 (C-11), 25.5 (C-12), 38.4 (C-13), 42.5 (C-14), 30.6 (C-15), 32.2 (C-16), 56.4 (C-17), 47.0 (C-18), 49.3 (C-19), 150.4 (C-20), 29.7 (C-21), 37.4 (C-22), 28.2 (C-23), 22.1 (C-24), 15.9 (C-25), 16.1 (C-26), 14.8 (C-27), 181.0 (C-28), 109.7 (C-29), 19.4 (C-30) (Kojima et al., 1990; Mahato et al., 1992; Burns et al., 2000).

## Identificação por cg-em dos compostos de 1-4 presentes em *Qualea parviflora*

O extrato clorofórmico e os compostos de 1-4 isolados de *Q. parviflora* foram analisados por CG-EM, sob condições analíticas previamente otimizadas. Os tempos de retenção ( $t_R$ ) referentes aos picos dos compostos de 1-4 foram respectivamente, 19,23; 21,00; 19,74 e 19,93 minutos e os pesos moleculares foram respectivamente, 414, 424, 426 e 426.

## Identificação por CG-EM dos compostos 1-4 presentes em *Q. grandiflora* e *Q. multiflora*

Os cromatogramas demonstraram que o perfil químico de *Q. grandiflora* e *Q. multiflora* é semelhante ao de *Q. parviflora*, apresentando substâncias na mesma faixa de tempo de retenção. Embora não tenha sido realizada a quantificação dos metabólitos, observam-se diferenças em seus teores presentes nas espécies em estudo. O extrato clorofórmico de *Q. multiflora* apresenta predominantemente,  $\beta$ -sitosterol; o de *Q. grandiflora*, lupeol; enquanto que o extrato clorofórmico de *Q. parviflora* apresenta teores mais homogêneos de  $\beta$ -sitosterol, lupenona, lupeol e friedelina (Figura 2). Os triterpenos 5 e 6, referentes à betulina e ao ácido *epi*-betulínico, não eluíram nem mesmo em temperaturas elevadas, devido à maior polaridade.

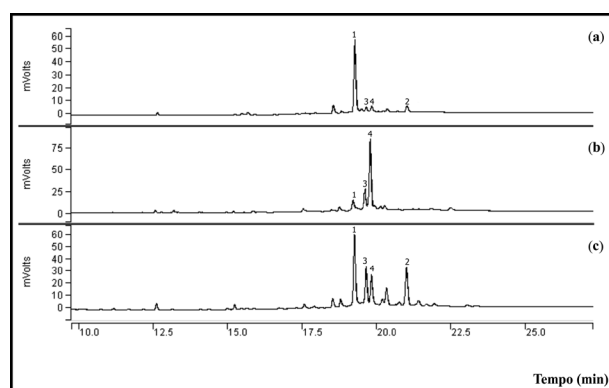


Figura 2. Perfil cromatográfico por CG-EM do extrato clorofórmico de: (a) *Qualea multiflora*, (b) *Q. grandiflora* e (c) *Q. parviflora*.

## Ensaio de atividade anti *Mycobacterium tuberculosis*

Os resultados dos ensaios da atividade anti *M. tuberculosis* estão apresentados na Tabela 1.

Tabela 1. Valores de CIM do extrato clorofórmico de *Q. parviflora* e dos compostos de 1-6 isolados de *Q. parviflora*.

Extrato/ Classe de Metabólito	Compostos	CIM (mg/mL)
extrato clorofórmico	Esteróide e triterpenos	250
	Lupeol	62,5
Triterpeno	Lupenona	125
	Betulina	31,25
	Ácido <i>epi</i> -betulínico	62,5
	Friedelina	125
Esteróide	$\beta$ -sitosterol	125

De acordo com Gu et al. (2004) compostos que apresentam valor de CIM igual ou inferior a 128 µg/mL são considerados promissores contra o *M. tuberculosis*, destacando assim, os triterpenos lupeol (CIM de 62,5 µg/mL), betulina (CIM de 31,2 µg/mL) e ácido *epi*-betulínico (CIM de 62,5 µg/mL).

## DISCUSSÃO

O estabelecimento do perfil cromatográfico do extrato clorofórmico de *Q. parviflora* foi usado como ponto de partida para a investigação das outras espécies de *Qualea*, pois muitas vezes espécies de um mesmo gênero apresentam os mesmos constituintes químicos. Os cromatogramas apresentados na Figura 2, confirmam a eficiência dessa técnica para o estudo das substâncias mais apolares, sem a necessidade do isolamento e identificação das mesmas.

A concentração inibitória dos triterpenos lupeol, betulina e ácido *epi*-betulínico é comparável ao CIM do fármaco de primeira linha na terapêutica contra TB, pirazinamida (20-100µg/mL à pH ácido) (Handbook of Anti-Tuberculosis Agents, 2008). Por outro lado, os outros triterpenos isolados (lupenona e friedelina) e o esteroide (β-sitosterol) com valor de CIM de 125,0 µg/mL mostraram-se menos ativos contra o *M. tuberculosis*. Em relação ao lupeol, Wächter et al. (1999), determinaram CIM de 64,0 µg/mL em lupeol isolado de *Chuquiraga ulcina* (Argentina). Neste mesmo trabalho pôde-se observar diferença de atividade entre o lupeol (62,5 µg/mL) e lupenona (125,0 µg/mL) apesar da semelhança estrutural destes dois compostos. Segundo Cantrell et al. (2001), nos triterpenos, a presença de hidroxila em beta no C3 é importante na atividade antimicobacteriana, fato que pode justificar a diferença de atividade, uma vez que na lupenona, a hidroxila em beta foi substituída por um grupamento cetona. Semelhante aos resultados obtidos no presente trabalho, lupenona isolada de *Chuquiraga ulicina* apresentou valor de CIM igual ou superior a 128,0 µg/mL.

Em relação à betulina (CIM de 31,2 µg/mL) e ácido *epi*-betulínico (62,5µg/mL), os valores aqui determinados são muito próximos dos descritos por Coop & Pearce (2007), respectivamente de 30,0 µg/mL e 62,1 µg/mL, para os isolados de *Valeriana laxiflora* e de 32,0 µg/mL e 64,0 µg/mL para os isolados de *Monttea aphyra*, relatados por Cantrell et al. (2001). Nestes dois compostos a diferença de atividade pode ser justificada também pela substituição da hidroxila em beta do C3 da betulina, pela epimerização em ácido *epi*-betulínico. Ainda segundo Aderbauer et al. (2008), betulina tem sido isolado de plantas utilizadas na medicina popular chinesa para a cura de reumatismos e neuralgias sendo comprovada a sua atividade supressora de superóxidos gerados pelos neutrófilos.

Em relação ao triterpeno friedelina, o mesmo valor de CIM de 125,0 µg/mL foi encontrado por Higuchi et al. (2008) para a friedelina isolada de *Byrsonima crassa*. Para o esteroide β-sitosterol, mesmo na extensa revisão envolvendo levantamento de 13 anos de publicações em atividade antimicobacteriana de produtos naturais, realizada por Coop (2003) e Coop & Pearce (2007), não foi verificado nenhuma citação para este composto. Entretanto, em 1999, Donald et al. (1997), relataram o uso de

β-sitosterol como adjuvante no tratamento da TB pulmonar. Os autores verificaram maior aumento no ganho do peso e aumento na contagem de linfócitos e de eusínófilos em pacientes que receberam β-sitosterol, junto com um regime quimioterápico eficiente em relação aos pacientes que fizeram apenas o tratamento com quimioterápicos.

Enfim, as atividades promissoras encontradas nos ensaios realizados neste trabalho podem ser explicadas pela elevada lipofilicidade dos compostos isolados, o que provavelmente é um fator que permite a sua penetração através da parede celular micobacteriana. Através de técnicas sintéticas de alteração estrutural, é possível melhorar a atividade destes compostos, aumentando sua lipofilicidade com a introdução de grupos mais apolares.

## AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo pelo suporte deste trabalho e à ALMN pela bolsa concedida e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, pelo apoio a WV.

## ABSTRACT

*Sterol and Triterpenes from Qualea species: Bioactivity on Mycobacterium tuberculosis*

**The chloroform extract of bark of the tropical tree *Qualea parviflora* (Vochysiaceae) was fractionated by column chromatography on silica gel, yielding triterpenes (lupeol, lupenone, betulin, *epi*-betulinic acid and friedelin) and a steroid (β-sitosterol). β-sitosterol, lupenone and lupeol were also identified in *Q. grandiflora* and *Q. multiflora*, while friedelin was detected only in *Q. Multiflora*, by means of gas chromatography-mass spectrometry. The anti-*Mycobacterium tuberculosis* activity of the chloroform extract and isolated compounds was assayed by MABA and MIC values ranged from 250.0 to 31.2 µg/mL. This study is the first to investigate the chemistry and antitubercular activity of apolar compounds from *Qualea* species.**

**Keywords:** *Qualea* species. Triterpenes. Anti-*Mycobacterium tuberculosis* activity.

## REFERÊNCIAS

- Aderbauer B, Clausen P, Kershawc O, Melzig M.F. In vitro and in vivo trypanocidal effect of lipophilic extracts of medicinal plants from Mali and Burkina Faso. *J Ethnopharmacol.* 2008;119(2):225-31.
- Almeida SP, Proença ECE, Sano SM, Ribeiro JF. Cerrado: espécies vegetais úteis. Planaltina: EMBRAPA; 1998.
- Burns D, Reynolds WF, Buchanan G, Reese PB, Enriquez RG. Assignment of <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C spectra and investigation of hindered side-chain rotation in lupeol derivatives. *Mag Reson Chem.* 2000;38(7):488-93.
- Cantrell CL, Franzblau SG, Fischer NH. Antimycobacterial plant terpenoids. *Planta Med.* 2001;67(8):685-94.

- Coop BR. Antimycobacterial natural products. *Nat Prod Rep.* 2003;20(6):535-57.
- Coop CR, Pearce AN. Natural product growth inhibitors of *Mycobacterium tuberculosis*. *Nat Prod Rep.* 2007;24(2):278-97.
- Corrêa DB, Guerra LFB, Gottlieb OR, Maia JGS. C-Methyl phenolics from *Qualea* species. *Phytochemistry.* 1981;20(2):305-7.
- Donald PR, Lamprecht JH, Freestone M, Albrecht CF, Bouic PJD, Kotze D, Van Jaarsveld PP. A randomised placebo-controlled trial of the efficacy of beta-sitosterol and its glucoside as adjuvants in the treatment of pulmonary tuberculosis. *Int J Tubercul Lung Dis.* 1997;1(6):518-22.
- Faizi S, Saleem AM, Irfanullah R, Bibi I, Bibi S. Spectral assignments and reference data. *Magn Reson Chem.* 2001;39:399-405.
- Franzblau SG, Witzig RS, McLaughlin JC, Torres P, Madico G, Hernandez A, Degnan MT, Cook MB, Quenzer VK, Ferguson RM, Gilman RH. Rapid, low-technology MIC determination with clinical *Mycobacterium tuberculosis* isolates by using the microplate Alamar Blue assay. *J Clin Microbiol.* 1998;36(2):362-6.
- Gaspi FOG, Foglio MA, Carvalho JE, Moreno RA. Pharmacological activities investigation of crude extracts and fractions from *Qualea grandiflora* Mart. *J Ethnopharmacol.* 2006;107(1):19-24.
- Gu JQ, Wang YH, Franzblau SG. Antitubercular constituents of *Valeriana laxiflora*. *Planta Med.* 2004;70(6):509-514.
- Handbook of Anti-Tuberculosis Agents [editorial]. *Tuberculosis.* 2008;88(2):85.
- Higuchi CT, Pavan FR, Leite CQF, Sannomiya M, Vilegas W, Leite SRA, Sacramento LVS, Sato DN. Triterpenes and antitubercular activity of *Byrsonima crassa*. *Quím Nova.* 2008;31(7):1719-21.
- Higuchi CT, Pavan FR, Sannomiya M, Vilegas W, Leite SRA, Sacramento LVS, Sato DN, Leite CQF. *Byrsonima jagifolia* Niedenzu apolar compounds with antitubercular activity. *Evid Based Complement Alternat Med.* 2011;2011:128349. DOI: 10.1093/ecam/nen077.
- Hiruma-Lima CA, Santos LC, Kushima H, Pellizzon CH, Silveira GG, Vasconcelos PC, Vilegas W, Brito ARMS. *Qualea grandiflora*, a Brazilian «Cerrado» medicinal plant presents an important antiulcer activity. *J Ethnopharmacol.* 2006;104(1-2):207-14.
- Januário AH, Filho ER, Pietro RCLR, Kashima S, Sato DN, França SC. Antimycobacterial physalins from *Physalis angulata* L. (Solanaceae). *Phytother Res.* 2002;16(5):445-8.
- Kojima H, Sato N, Hatano A, Ogura H. Sterol glucosides from *Prunella vulgaris*. *Phytochemistry.* 1990;29:2351-5.
- Lorenzi H. Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas do Brasil. *Plantarum: Nova Odessa;* 1998.
- Mahato SB, Nandy AK, Kundu AK. Pentacyclic triterpenoid saponenols and their glycosides from *Terminalia bellerica*. *Tetrahedron.* 1992;48(12):2483-94.
- Mayworm MAS, Buckeridge MS, Salatino A. Monomer composition of polysaccharides of seed cell walls and the taxonomy of the Vochysiaceae. *Phytochemistry.* 2000;55(6):581-7.
- Mayworm MAS, Salatino A. Distribution of seed fatty acids and the taxonomy of Vochysiaceae. *Biochem Syst Ecol.* 2002;30(10):91-7.
- Nasser ALM, Carli CBA, Rodrigues CM, Maia DCG, Carlos IZ, Eberlin MN, Hiruma-Lima CA, Vilegas W. Identification of ellagic acid derivatives in methanolic extracts from *Qualea* species. *Z Naturforsch C.* 2008;63(11-12):794-800.
- Nasser ALM, Mazzolin LP, Hiruma-Lima CA, Santos LS, Eberlin MN, Brito ARMS, Vilegas W. Preparative droplet counter-current chromatography for the separation of the new nor-seco-triterpene and pentacyclic triterpenoids from *Qualea parviflora*. *Chromatographia.* 2006;64(11/12):695-9.
- Olea RS, Roque NF. Análise de misturas de triterpenos por RMN de <sup>13</sup>C. *Quim Nova.* 1990;13(4):278-81.
- Pot A, Pot VJ. Plantas do Pantanal. Planaltina: EMBRAPA; 1994.
- Rocha AB, Silva JB, Panizza S. Substâncias tânicas da casca de *Qualea grandiflora* Martius (Vochysiaceae). *Rev Bras Cienc Farm.* 1979/80;2:109-14.
- Rando DG, Sato DN, Siqueira L, Malvezzi A, Leite CQF, Amaral AT, Ferreira EI, Tavares LC. Potential tuberculostatic agents. Topliss application on benzoic acid [(5-nitro-thiophen-2-yl)-methylene]-hydrazide series. *Bioorg Med Chem.* 2002;10(3):557-60.
- Septímio LR. Fitoterapia baseada em ervas medicinais do cerrado. Brasília: Ministério da Agricultura; 1994.
- Souza ADL, Rocha AFI, Pinheiro MLB, Andrade CHS, Galotta A; Santos MPSS. Constituintes químicos de *Gustavia augusta* L. (Lecythidaceae). *Quím Nova.* 2001;24(4):439-42.
- Tripathi RP, Tewari N, Dwivedi N, Tiwari VK. Fighting tuberculosis: an old disease with new challenges. *Med Res Rev.* 2005;25(1):93-131.
- Wächter GA, Valcic S, Flagg ML, Franzblau SG, Montenegro G, Suarez E. Antitubercular activity of pentacyclic triterpenoids from plants of Argentina and Chile. *Phytomedicine.* 1999;6(5):341-5.
- World Health Organization - WHO. [cited 2010 July 16]. Available from: <http://www.who.int/globalatlas/dataQuery/reportData.asp?rptType=1>

Recebido em 29 de novembro de 2012

Aceito para publicação em 02 de maio de 2013

