



Aplicação de cromatografia centrífuga de contra-corrente na purificação de ácido ursólico das folhas de *Eugenia brasiliensis* Lam.

N. Frighetto^{1*}, R.M. Welendorf¹, A.M.P. Silva², M.J. Nakamura², A.C. Siani²

¹Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas – CPQBA, Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP, C.P. 6171, Betel, 13083-970, Campinas, SP, Brasil,

²Departamento de Química de Produtos Naturais, Instituto de Tecnologia em Fármacos, Fundação Oswaldo Cruz FIOCRUZ, R. Sizenando Nabuco, 100, 21041-250, Rio de Janeiro, RJ, Brasil

RESUMO: Os ácidos triterpênicos são metabólitos comuns na família Myrtaceae, especialmente no gênero *Eugenia*. O ácido ursólico foi descrito como um dos principais constituintes, nas folhas de *Eugenia brasiliensis*, coletada no Sudoeste do Brasil. Uma partição prévia, por solventes, do extrato etanólico ou do extrato clorofórmico de *E. brasiliensis*, seguida por uma purificação por cromatografia de contra-corrente de alta velocidade (CCCAV), conduziu ao isolamento do ácido ursólico com alto grau de pureza (> 97%). Esta substância, também foi isolada por cromatografia convencional de coluna aberta (rendimento de 0.22% a partir do extrato etanólico), e caracterizada por ¹³C-RMN, GC-EM e co-injeção com padrão comercial em CG-DIC, na forma do éster metílico. A técnica de CCCAV, usualmente usada para triterpenos glicosilados, foi aqui aplicada para a aglicona. As fases móvel e estacionária, no experimento de CCCAV, foram geradas pela mistura de n-hexano : acetato de etila : metanol : água, na proporção 10:5:2,5:1. A seleção do sistema de solventes (fases estacionária e móvel) foi determinada pela máxima distribuição equitativa do ácido ursólico em ambas as fases, medida por densitometria e monitorada por cromatografia em camada delgada, CCD, usando-se ácido ursólico comercial como referência.

Unitermos: *Eugenia brasiliensis*, Myrtaceae, ácido ursólico, cromatografia de contra-corrente

ABSTRACT: “Application of counter-current chromatography in the purification of ursolic acid from leaves of *Eugenia brasiliensis* Lam.”. Triterpene acids are common metabolites in the Myrtaceae family, especially in the genus *Eugenia*. Ursolic acid was found in *Eugenia brasiliensis* collected in Southeastern Brazil. A previous solvent partition of the ethanol or chloroform extracts of the leaves of *E. brasiliensis*, followed by rapid high-speed counter-current chromatography (HSCCC) afforded ursolic acid in high purity (> 97%). This compound was also purified apart by conventional column chromatography (yield of 0.22% from the ethanolic extract) and characterized by ¹³C-NMR, GC-MS and co-injection of its methyl ester with standards in GC-FID. The HSCCC technique, usually applied to triterpene glycosides, was here applied successfully to an aglycone, to which examples are rarely described. The mobile and stationary phase for the HSCCC experiment were derived from the two-phase solvent system composed by n-hexane : ethyl acetate : methanol : water in the proportion of 10:5:2.5:1. The choice of the developing solvent system for optimum HSCCC separation was determined by TLC coupled to densitometric measurements of ursolic acid in both stationary and mobile phase, generated by the upper and lower layer of the system above. Commercial ursolic acid was used as standard.

Keywords: *Eugenia brasiliensis*, Myrtaceae, ursolic acid, counter-current chromatography.

INTRODUÇÃO

Uma grande diversidade de vegetais, normalmente utilizados como alimentos ou com aplicação medicinal, apresenta ácidos triterpênicos em sua constituição química, tanto na forma livre, quanto na forma de agliconas de saponinas triterpenóides. Na família Myrtaceae, em especial em várias espécies do representativo gênero *Eugenia*, relata-se a presença de ácidos triterpênicos em várias espécies. De acordo com a espécie da qual foram isoladas, as estruturas destes metabólitos usualmente variam entre os esqueletos ursano, oleonano e lupano, contendo normalmente um

ou dois grupos hidroxilas. Esta correlação pode ser visualizada na Tabela 1.

Os ácidos triterpênicos mono-hidroxilados (oleanólico, ursólico e betulínico) foram muito investigados no tocante ao seu amplo espectro de atividades biológicas, onde se destacam as atividades: antiinflamatória (Liu, 1995), antineoplásica (Tokuda et al., 1986; Pisha et al., 1995), antivirótica (Pavlova et al., 2003), antimicrobiana (Sattar et al., 1995), antiparasitária (Leite et al., 2001), hepatoprotetora (Saraswat et al., 1996), e outras. Estes ácidos apresentam uma baixa ou nenhuma toxicidade, sendo, inclusive, utilizados como aditivos em bebidas, alimentos e em cosméticos (Leung;

Tabela 1. Ácidos triterpenóicos isolados de espécies do gênero *Eugenia* (Myrtaceae)

Ácido triterpenóico	Espécies (parte da planta)	Referência ⁶
Betulinico	<i>Eugenia jambolana</i> Lamk. ¹ (casca do caule) <i>Eugenia fruticosa</i> Roxb. (casca do caule) <i>Eugenia javanica</i> Lamk. ² (casca) <i>Eugenia formosa</i> Wall. (folhas) <i>Eugenia florida</i> DC (galhos, caule) <i>Eugenia moraviana</i> Berg (folhas, caule) <i>Eugenia wallichii</i> Wight (casca do caule) <i>Eugenia florida</i> DC (galhos, caule) <i>Eugenia moraviana</i> Berg (folhas, caule) <i>Eugenia moraviana</i> Berg (folhas, caule) <i>Eugenia gustavioioides</i> F. M. Bailey ³ (caule)	Sengupta, 1965; Gupta, 1974 Majumdar, 1968 Majumdar, 1969 Majumdar, 1970 Junges, 2000 Lunardi, 2001 Gupta, 1974 Junges, 2000 Lunardi, 2001 Lunardi, 2001 Bannon, 1976
Platânico	<i>Eugenia florida</i> Berg (galhos, caule)* <i>Eugenia jambolana</i> Lamk. ¹ (flores, pericarpo do fruto) <i>Eugenia gustavioioides</i> ³ (caule)	Junges, 2000 Nair, 1962; Sengupta, 1965; Muri, 1944 Bannon, 1976; Yazaki, 1977 Junges, 2000
6-Hidroxiobetulinico	<i>Eugenia kurzii</i> Duthie (partes aéreas) <i>Eugenia kurzii</i> Duthie (partes aéreas) <i>Eugenia jambolana</i> Lamk. ¹ (flores) <i>Eugenia gustavioioides</i> F. M. Bailey ³ (caule) <i>Eugenia crebrinervis</i> C.T.White ⁴ (caule) <i>Eugenia gustavioioides</i> F. M. Bail ³ (caule)	Painuly, 1983 Painuly, 1983 Sengupta, 1965 Bannon, 1976 Bannon, 1976 Bannon, 1976
Ursólico	<i>Eugenia florida</i> Berg (galhos, caule) <i>Eugenia gustavioioides</i> ³ (caule)	Junges, 2000
Oleanólico	<i>Eugenia florida</i> Berg (galhos, caule) <i>Eugenia gustavioioides</i> F. M. Bailey ³ (caule)	Nair, 1962; Sengupta, 1965; Muri, 1944 Bannon, 1976; Yazaki, 1977 Junges, 2000
Δ^{18} -Ursólico	<i>Eugenia kurzii</i> Duthie (partes aéreas) <i>Eugenia kurzii</i> Duthie (partes aéreas) <i>Eugenia jambolana</i> Lamk. ¹ (flores) <i>Eugenia gustavioioides</i> F. M. Bailey ³ (caule) <i>Eugenia crebrinervis</i> C.T.White ⁴ (caule) <i>Eugenia gustavioioides</i> F. M. Bail ³ (caule)	Junges, 2000 Painuly, 1983 Painuly, 1983 Sengupta, 1965 Bannon, 1976 Bannon, 1976 Bannon, 1976
Epi-Oleanólico	<i>Eugenia florida</i> Berg (galhos, caule) <i>Eugenia gustavioioides</i> F. M. Bailey ³ (caule)	Junges, 2000 Bannon, 1976
Maslinico (Cratególico)	<i>Eugenia florida</i> Berg (galhos, caule) <i>Eugenia moraviana</i> Berg (folhas e galhos) <i>Eugenia florida</i> Berg (galhos, caule) <i>Eugenia moraviana</i> Berg (folhas, caule) <i>Eugenia florida</i> Berg (galhos, caule) <i>Eugenia florida</i> Berg (folhas)	Bannon, 1976 Junges, 2000 Junges, 2000 Lunardi, 2001 Junges, 2000 Junges, 2000 Junges, 1999
Asiático, Ajumólico	<i>Eugenia florida</i> Berg (galhos, caule) <i>Eugenia gustavioioides</i> F. M. Bailey ³ (caule)	Junges, 2000 Bannon, 1976
2 α -Hidroxiursólico	<i>Eugenia florida</i> Berg (galhos, caule) <i>Eugenia gustavioioides</i> F. M. Bailey ³ (caule)	Junges, 2000 Bannon, 1976
2 β -Hidroxi epi-ursólico	<i>Eugenia florida</i> Berg (galhos, caule)	Junges, 2000
2 β -Hidroxi epi-oleanólico	<i>Eugenia florida</i> Berg (galhos, caule)	Junges, 2000
6 α -Hidroxiobetulinico	<i>Eugenia moraviana</i> Berg (folhas e galhos)	Lunardi, 2001
3-Cetoursólico	<i>Eugenia florida</i> Berg (galhos, caule)	Junges, 2000
3-Cetooleanólico	<i>Eugenia florida</i> Berg (galhos, caule)	Junges, 2000
29-Hidroxiplatan-28-ato de β -D-glicosila	<i>Eugenia florida</i> Berg (folhas)	Junges, 1999

¹Sinonímia: *Syzygium cumini* Skells; ²sinonímia *Syzygium samarangense* (Bl.) Merr. & Perry; ³sinonímia: *Cleitocalyx gustavioides* (F.M. Bailey) Merr. & Perry; ⁴sinonímia: *Syzygium crebrinerve* (C.T. White) L.Johnson; ⁵descrito na espécie também como o éster metílico; ⁶Citado apenas o primeiro autor de cada referência.

Foster, 1996). A disponibilização de ácidos triterpênicos para a composição de medicamentos ou outras aplicações exige a purificação destas substâncias, a partir de fontes naturais, em processos que sejam industrialmente viáveis e, portanto, adaptados à escala de produção. Apesar do ácido betulínico estar presente em inúmeras espécies tropicais (Hayek et al., 1989); as fontes tradicionais dessa substância são espécies europeias do gênero *Betula*, que produzem o álcool precursor, a betulina (Kim et al., 1997). Recentemente, a técnica de cromatografia de contracorrente de alta velocidade (CCCAV) foi descrita como uma alternativa para a purificação de ácido betulínico a partir de extratos brutos ou semipurificados de *Eugenia florida* (Frighetto et al., 2002).

O presente trabalho reporta o isolamento e a purificação por cromatografia de contra-corrente de alta velocidade (CCCAV), de um outro ácido triterpênico de aplicação medicinal, o ácido ursólico, a partir de extratos brutos e semi-purificados das folhas de *Eugenia brasiliensis* Lam., espécie de Myrtaceae descrita como anti-reumática conhecida popularmente como “grumixama” (Corrêa, 1984). Nesta técnica cromatográfica, a composição do sistema bifásico de solventes a ser utilizado como fase estacionária e como fase móvel foi, primeiramente, estabelecido através de cromatografia em camada delgada (CCD), buscando-se condições otimizadas para uma boa resolução do material a ser separado e purificado na coluna (bobina). Além disso, como um dos critérios de eficiência do sistema bifásico, as fases resultantes devem ser susceptíveis de uma imediata separação e recomposição, após agitação intensa (Conway, 1990). O processo requer ainda que a amostra a ser analisada apresente boa solubilidade no sistema bifásico de solventes e, fundamentalmente, alcance uma distribuição equitativa, o mais próximo possível da unidade (1:1) em ambas as fases (Hostettmann; Marston, 2001). Para atingir estes objetivos, as concentrações de ácido ursólico, em ambas as fases testadas, foram monitoradas por CCD, cuja placa de sílica gel foi avaliada mediante leitura ótica, por meio de densitômetro. Este procedimento parametrizou a seleção da composição do sistema quaternário-bifásico de solventes para gerar as fases estacionária e móvel a serem utilizadas no CCCAV. Vários parâmetros operacionais foram ensaiados, como a escolha da fase estacionária e da fase móvel, o sentido do fluxo do solvente dentro da coluna, se na direção “cabeça-cauda” ou “cauda-cabeça”, a orientação de rotação da coluna, no sentido horário ou anti-horário, a velocidade de rotação desta, expressa em rpm; os volumes relativos das fases móvel e estacionária, e a concentração da amostra injetada.

MATERIAL E MÉTODOS

Material vegetal

As folhas de *Eugenia brasiliensis* Lam. foram coletadas nas cercanias do campus da Universidade

Estadual de Campinas, em Agosto de 1996. A espécie foi identificada pela Dra. Graziela M. Barrozo (*in memoriam*), e uma exsiccata foi preparada e depositada no Herbário do Jardim Botânico do Rio de Janeiro, sob código RB #326234.

Obtenção dos extratos

As folhas (1,412 Kg), após secagem à temperatura ambiente, foram trituradas em um moinho de facas e, em seguida, maceradas com etanol absoluto (10 L), durante 8 dias. A filtração e evaporação do solvente forneceram 134,2 g (9.50%) de extrato I. A re-extração do resíduo de folhas com uma segunda carga de etanol (10 L, 8 dias) resultou em 58,3 g (4.13%) de extrato II. As amostras I e II foram submetidas à cromatografia líquido-líquido, no CCCAV.

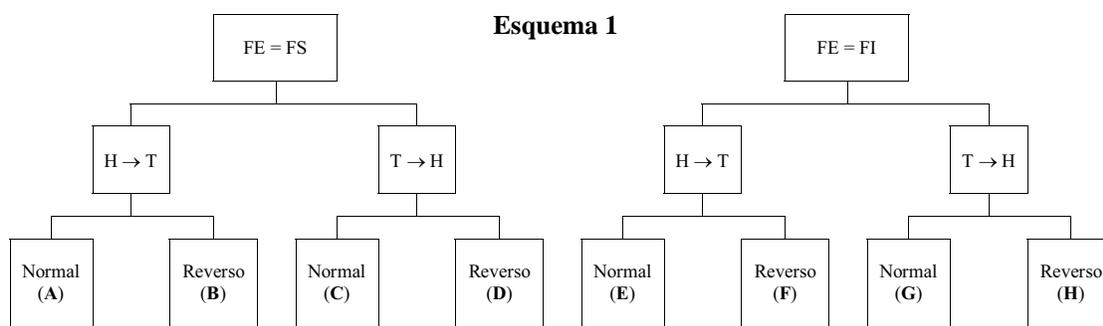
Isolamento do ácido ursólico

A 20.4 g do extrato I juntou-se CHCl_3 (2 x 500 mL) e a fração solúvel (2.35 g), após evaporação, foi purificada por tratamento com éter de petróleo (3 x 100 mL). A parte insolúvel (0.400 g) foi cromatografada em coluna de sílica gel G 60, utilizando-se, como eluente, uma mistura gradiente de MeOH em CHCl_3 (0, 1, 3, 5, 8, 10, 13, 15, 20 e 100% de metanol; 50 mL cada). Foram coletadas 50 frações de 10 mL, posteriormente reunidas segundo similaridade em CCD, utilizando-se como eluente CHCl_3 :MeOH 9:1. As frações 24 a 27 foram agrupadas, evaporadas, re-dissolvidas em CH_2Cl_2 e purificadas com carvão ativado (agitação, 2h), fornecendo 45,3 mg de ácido ursólico.

Instrumentação e material cromatográfico

O espectro de IV foi obtido em espectrofotômetro Nicolet 205. O espectro de ^{13}C -RMN foi obtido em um espectrômetro Bruker AC 200-A (50,3 MHz), usando-se CDCl_3 , como solvente. A análise por CG-EM foi realizada em um equipamento HP, Mod. 6890, acoplado a um detector de massas, HP Mod. 5971, dotado de biblioteca de espectros Wiley (*software* 59943B). Foi utilizada uma coluna capilar MS-HP-5 (30m x 0,32 mm x 0,25 μm de filme), gás carreador He (fluxo 0,5 ml/min), T-injetor 250 °C, e taxa de *split* 1/20. As condições de operação foram: Ti 150 °C, ti 0 min, Tf 280 °C, taxa de aquecimento 10°/min, fluxo de He: 1 ml/min; injeção de 1 μL de uma solução de 4-6 mg de ácido ursólico em 1 mL de CH_2Cl_2 .

Nas medidas de densitometria ótica, utilizouse um densitômetro Pharmacia-Biotech, acoplado ao *software* apropriado. Os experimentos de CCCAV foram executados em um aparelho P. C. (Potomac, USA), equipado com coluna múltipla, para análises em diferentes escalas.



FE = Fase estacionária; (H) → (T) = Fluxo do sistema de solventes no sentido: Cabeça (*head*) → Cauda (*tail*);

(T) → (H) = Fluxo do sistema de solventes no sentido: Cauda (*tail*) → Cabeça (*head*). Normal e Reverso referem-se ao sentido de rotação da bobina no sentido horário ou anti-horário, respectivamente. Para o sistema de solventes escolhido (n-hexano:AcOEt:MeOH:H₂O 10:5:2,5:1) e testes realizados a 960 rpm: Caminhos dos fluxogramas: (A) – Retém a fase estacionária com sangria de 3,6%; (B) – Não retém a fase estacionária; (C) – Não retém a fase estacionária; (D) – Retém a fase estacionária com sangria de 7,2%; (E) – Não retém a fase estacionária; (F) – Retém a fase estacionária com sangria de 23,2%; (G) – Retém a fase estacionária com sangria de 14,5%; (H) – Não retém a fase estacionária.

Identificação do ácido ursólico

Após metilação com diazometano, o ácido ursólico foi identificado por IV, ¹³C-RMN, CG-EM (fragmentação característica e co-injeção com padrão de ácido ursólico comercial metilado) (Budzikiewicz et al., 1963) e CCD (comparação com padrão em diferentes sistemas de solventes). O ácido ursólico livre forneceu um espectro de IV totalmente superponível ao do padrão comercial (C=O, η_{\max} 1693 cm⁻¹). O padrão de fragmentação obtido para o ursolato de metila (tempo de retenção 26.32 min. nas condições utilizadas) foi comparado com os espectros de massas do banco de dados Wiley, demonstrando compatibilidade acima de 97% [m/z 470 (M⁺), 455, 410, 262 (100%), 203, 189]. Os sinais característicos em ¹³C-RMN, para o ursolato de metila, utilizados como diagnóstico da estrutura do triterpeno pentacíclico, foram (δ , ppm): 79,7 (C3; COH), 126,3 (C-12), 138,9 (C-13) e 178,8 (C-28; C=O). As comparações do ácido ursólico isolado com o padrão comercial foram realizadas em CCD (sílica gel GF 60), utilizando-se como eluentes as misturas de CHCl₃:MeOH:Et₂O 90:5:5 e benzeno:acetona 75:2; sistemas onde o ácido ursólico possui R_f de 0,49 e 0,52, respectivamente. As placas foram reveladas com iodo ou solução de anisaldeído ou vanilina em H₂SO₄.

Seleção do sistema de solventes e doseamento do ácido ursólico via densitometria ótica

Diferentes composições de um sistema quaternário, constituído de uma mistura de n-hexano (12.5% a 25%), acetato de etila (12.5% a 25%), metanol (6.25% a 25%) e água (1.25% a 25%) foram ensaiados no experimento de CCD. As amostras foram preparadas, diluindo-se os extratos I e II (2 a 5 mg) na mistura de

solventes em diferentes proporções (2 mL de cada fase), e aplicadas separadamente em placas de sílica gel GF 60 (200 mm x 100 mm x 0,2 mm), usando-se uma pipeta de 10 μ L. Foram também aplicadas, na mesma placa, alíquotas entre 0.50 e 2.0 μ g/mL de solução de ácido ursólico padrão (2 mg/mL), com o objetivo de se atingir diferentes concentrações nos *spots*. A placa foi então eluída em hexano:AcOEt (1:1). Após a eluição completa, os sinais pertinentes ao ácido ursólico foram revelados com anisaldeído/ácido acético/ácido sulfúrico em álcool etílico (Wagner; Bladt, 1996) e, então, submetidos às medidas de densitometria ótica. As medidas no densitômetro foram computadas pelo número de pixels e as quantidades de ácido ursólico, presentes em cada fase, calculadas por comparação com as respostas fornecidas pelos sinais do padrão, parametrizados numa curva: concentração vs. n^o de pixels. Todos os experimentos foram efetuados em duplicatas e a média das medidas consideradas.

Condições experimentais nos ensaios CCCAV

A escala analítica (volume da coluna de 14,8 mL) do equipamento de CCCAV permitiu injeções de até 20 mg de amostra (extratos I e II). As análises semipreparativas (coluna de 80 mL) e preparativas (coluna de 230 mL) permitiram injeções de 100 mg até 500 mg de amostra, respectivamente, utilizando-se um sistema quaternário-bifásico de solventes, nas condições de otimização descritas anteriormente e uma velocidade roto-elicooidal fixa da coluna (960 rpm). Uma série de ensaios foi realizada com o objetivo de definir as melhores condições operacionais para os experimentos. Para tanto, oito ensaios foram realizados, alternando cada uma das fases, como fase estacionária ou fase móvel, objetivando maximizar a retenção da fase estacionária,

no sentido de minimizar sua co-eluição com a fase móvel através da coluna; variando-se a combinação de diferentes parâmetros, como: (i) bombeamento do fluxo de solventes nos sentidos cabeça-cauda x cauda-cabeça; (ii) rotação da bobina no sentido normal (horário) e sentido reverso (anti-horário), conforme está explicitado no Esquema 1.

Com base na otimização dos ensaios anteriores, todos os experimentos foram realizados com fluxo de 1,0 mL/min, 4,0 mL/min e de 2,0 a 4,0 mL/min nas colunas analítica, semipreparativa e preparativa, respectivamente. Um ensaio foi realizado com uma coluna com capacidade de 325 mL, obtida pela interligação das três colunas, que suportou carga de 1000 mg de amostra para uma única análise. O volume de fase móvel utilizado foi sempre o dobro do volume da fase estacionária em cada experimento. Foram coletadas frações entre 3-4 mL, as quais foram monitoradas por CCD e reunidas posteriormente, conforme a similaridade na composição. Ao final de cada experimento, a fase estacionária foi exaurida completamente da coluna e concentrada em evaporador rotatório, assegurando-se, através de pesagem, a recuperação da totalidade de amostra introduzida na coluna.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os experimentos de CCD/densitometria definiram o melhor sistema de solventes como a mistura composta por n-hexano : acetato de etila : metanol : água, nas proporções 10:5:2.5:1, que resultou numa relação muito próxima à distribuição equitativa (1:1,15) das concentrações de ácido ursólico na fase superior e inferior, respectivamente. Conforme está evidenciado no Esquema 1, apenas duas, entre as oito possibilidades, foram adequadas, no sentido de manter a fase estacionária em um nível aceitável de perda por arraste da coluna (96,4% a 76,8%), segundo os caminhos **A** e **D**, respectivamente. A condição **D** foi eleita como a mais eficiente, uma vez que **A**, embora com menor volume de co-eluição, não conduziu a uma boa separação do ácido ursólico, provavelmente, devido à interferência de outros constituintes presentes nos extratos. Conforme mostrado no ensaio **D**, a fase superior do sistema de solventes foi utilizada como a fase móvel, levando à obtenção do ácido ursólico com alto grau de pureza, atestada pelo único sinal em CG, pelo espectro de ¹³C-RMN e por comparação cromatográfica com a substância isolada por cromatografia em coluna aberta. Os rendimentos de ácido ursólico variaram entre 87-96% para os experimentos realizados nas escalas preparativa, semi-preparativa e analítica, com os extratos I e II.

Estes resultados credenciam o uso da técnica de densitometria acoplada a CCD, como uma ferramenta útil para o sucesso dos experimentos de separação e purificação em CCCAV, de ácidos triterpênicos, a partir de extratos vegetais brutos ou semipurificados.

A técnica de CCCAV, usualmente aplicada

para a purificação de muitas classes de substâncias é, freqüentemente, descrita para saponinas de esteróides e triterpenos, flavonóides, alcalóides e outros (Marston; Hostettmann, 1994). Contudo até o momento, foi encontrada apenas uma citação da aplicação desta técnica para ácidos triterpênicos (Ito, 1990), mesmo assim, utilizando misturas menos complexas de substâncias do que aquelas presentes nos extratos das folhas, como apresentado neste trabalho. Neste sentido, as espécies contidas na Tabela 1 poderiam ser exploradas para a obtenção desse grupo de metabólitos, utilizando-se inicialmente as condições aqui desenvolvidas. Além do extrato alcoólico, outros solventes de diferentes polaridades devem ser ainda testados, no intuito de extrair os ácidos triterpênicos a partir de folhas de diferentes mirtáceas. Solventes que reduzam a extração de clorofila nos extratos a serem purificados por CCCAV seriam preferíveis, mas esta seleção está condicionada à conformação do esqueleto, assim como o grau de hidroxilação dos ácidos triterpênicos presentes no vegetal.

Por outro lado, a técnica de CCCAV deveria ser mais bem aproveitada, tanto na separação, quanto na purificação de constituintes vegetais, visando à obtenção de substâncias de referência e de padrões, principalmente quando se almeja baixar custos operacionais, por intermédio da diminuição do tempo de análise e da utilização de solventes sem alto grau de pureza, como aqueles utilizados em CCCAV. Além disso, esta técnica permite a recuperação de todo o material vegetal sob análise, evitando perdas pela adsorção ou outros tipos de fatores, inerentes à cromatografia convencional.

REFERÊNCIAS

- Bannon CD, Eade RA, Simes JJH 1976. Extractives of Australian Timbers. XVI. The Constituents of the wood of *Eugenia crebrinervis* (syn. *Syzygium crebrinervis*) and *Eugenia gustavioides* (syn. *Cleitocalyx gustavioides*). *Aust J Chem* 29: 1135-1141.
- Budzikiewicz H, Wilson JM, Djerassi C 1963. Mass spectrometry in structural and stereochemical problems. XXXII. Pentacyclic triterpenes. *J Am Chem Soc* 85: 3688-3699.
- Conway WD 1990. *Countercurrent chromatography: Apparatus, theory and applications*. New York: VCH Publishers Inc., J. Wiley & Sons.
- Corrêa P 1984. *Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas*. Vol IV. Rio de Janeiro: Imprensa Nacional, Ministério da Agricultura, p. 429-430.
- Frighetto N, Terzi D, Welendorf RM, Siani AC 2002. Aplicação da técnica HSCCC no isolamento do ácido betulínico a partir do extrato etanólico de *Eugenia florida* DC (Myrtaceae). *XVII Simpósio de Plantas Mediciniais do Brasil*, Cuiabá, Brasil.
- Gupta GS, Sharma DP 1974. Triterpenoid and other constituents of *Eugenia jambolana* leaves. *Phytochemistry* 13: 2013-2014.
- Hayek EWH, Jordis U, Moche W, Sauter F 1989. A bicentennial

- of betulin. *Phytochemistry* 28: 2229-2242.
- Hostettmann K, Marston A 2001. Countercurrent chromatography in the preparative separation of plant-derived natural products. *J Liq Chromatogr Relat Technol* 24: 1711-1721.
- Ito Y, Oka H, Kitazume E, Bhatnagar M, Lee YW 1990. Improved high-speed countercurrent chromatograph with three multilayer coils connected in series. III. Evaluation of semianalytical column with various biological samples and inorganic elements. *J Liq Chromatogr* 3: 2329-2349.
- Junges MJ, Fernandes JB, Vieira PC, Silva MFGF, Rodrigues-Filho E 1999. The use of C-13 and H-1-NMR in the structural elucidation of a new nor-lupane triterpene. *J Braz Chem Soc* 10: 317-320.
- Junges MJ, Fernandes JB, Vieira PC, Fernandes MFGS, Rodrigues-Filho E, Frühauf M, Barañano AG 2000. Triterpenos ursânicos e oleanânicos isolados do caule de *Eugenia florida* DC. *Revista de Pesquisa e Pós-graduação da Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões* 1: 13-29.
- Kim DSHL, Chen Z, Nguyen VT, Pezzuto JM 1997. A concise semi-synthetic approach to betulinic acid from betulin. *Synth Commun* 29: 1607-1612.
- Leite JPV, Lombardi JA, Chiari E, Oliveira AB 2001. Isolamento biomonitorado de uma substância tripanossomicida de *Arrabidaea triplinervia* (Bignoniaceae), o ácido ursólico. *Rev Bras Farmacogn* 11: 77-87.
- Leung AY, Foster S 1996 *Encyclopedia of common natural ingredients used in food, drug and cosmetics*. 2nd ed. New York: John Wiley & Sons Inc.
- Liu J 1995. Pharmacology of oleanolic acid and ursolic acid. *J Ethnopharmacol* 49: 57-68.
- Lunardi I, Peixoto JLB, Silva CC, Shuquel TA, Basso EA, Vidotti GJ 2001. Triterpenic acids from *Eugenia moraviana*. *J Braz Chem Soc* 12: 180-183.
- Majumdar SG, Thakur S 1968. Chemical investigation of the stem-bark of *Eugenia fruticosa* Roxb and bark of *Eugenia wallichii* Wight III. *J Ind Chem Soc* 45: 785-788.
- Majumdar SG, Thakur S 1969. Chemical investigation of the bark of *Eugenia javanica* Lamk. *J Ind Chem Soc* 46: 785-788.
- Majumdar SG, Thakur S 1970. Chemical investigation of the bark of *Eugenia formosa* Wall. *J Ind Chem Soc* 47: 181-182.
- Marston A, Hostettmann K 1994. Counter-current chromatography as a preparative tool – applications and perspectives. *J Chromatogr A* 658: 315-341.
- Murti PB, Rao NVS 1944. Wax and resin components of the pericarp of jambul fruits (*Eugenia jambolana*). *Proc Ind Acad Sci* 20A: 163-168.
- Nair AGR, Subramanian S 1962. Chemical examination of flowers of *Eugenia jambolana*. *J Sci Ind Res India* 21B: 457-458.
- Painuly P, Tandon JS 1983. A new triterpene from *Eugenia kurzii* Duthie. *Indian J Chem* 22B: 284-285.
- Pavlova NI, Savoniva OV, Nikolaeva SN, Boreko EI, Flekhter OB 2003. Antiviral activity of betulin, betulinic and betulonic acids against enveloped and non-enveloped viruses. *Fitoterapia* 74: 489-492.
- Pisha E, Chai H, Lee IS, Chagwedera TE, Farnsworth NR, Cordell GA, Beecher CWW, Fong HHS, Kinghorn AD, Brown DM, Wani MC, Wall ME, Hieken TJ, Gupta TKD, Pezzuto JM 1995. Discovery of betulinic acid as a selective inhibitor of human melanoma that functions by induction of apoptosis. *Nat Med* 1: 1046-1051.
- Saraswat B, Visen PKS, Dayal R, Agarwal DP, Patnaik GK 1996. Protective action of ursolic acid against chemical induced hepato-toxicity in rats. *Indian J Pharmacol* 28: 232-239.
- Sattar A, Bamkova V, Kujumgiev A, Galabov A, Ignatova A, Todorova C, Popov S 1995. Chemical composition and biological activity of leaf exudates from some Lamiaceae plants. *Pharmazie* 50: 62-65.
- Sengupta P, Bikram P 1965. Triterpenoids and related compounds. IV. Triterpenoids from the stem-bark of *Eugenia jambolana*. *J Ind Chem Soc* 42: 255-258, apud *Chemical Abstracts* 63: 7053e.
- Sengupta P, Bikram P 1965. Triterpenoids from the flowers of *Eugenia jambolana*. *J Ind Chem Soc* 42: 539-542.
- Tokuda H, Ohigashi H, Koshimizu K, Ito I 1986. Inhibitory effects of ursolic and oleanolic acid on skin tumor promotion by 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate. *Cancer Lett* 33: 279-285.
- Yazaki Y 1977. Polyphenols and triterpenes of *Eugenia gustavioides* wood. *Phytochemistry* 16: 138-139.
- Wagner H, Bladt S 1996. *Plant drug analysis*. 2 ed., Berlin Heidelberg: Springer.