

Universidade Federal de Minas Gerais
Instituto de Ciências Exatas
Departamento de Química

CÁSSIA GONÇALVES MAGALHÃES

**ESTUDO FITOQUÍMICO DO TRONCO E RAIZ DE *MAYTENUS SALICIFOLIA* REISSEK
(CELASTRACEAE) E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE BIOLÓGICA
DE SEUS CONSTITUINTES E DE ÉSTERES DERIVADOS DO LUPEOL**

Belo Horizonte

2012

UFMG/ICEx/DQ.909^a

T.400^a

CÁSSIA GONÇALVES MAGALHÃES

**ESTUDO FITOQUÍMICO DO TRONCO E RAIZ DE *MAYTENUS SALICIFOLIA* REISSEK
(CELASTRACEAE) E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE BIOLÓGICA
DE SEUS CONSTITUINTES E DE ÉSTERES DERIVADOS DO LUPEOL**

Tese apresentada ao Departamento de
Química do Instituto de Ciências Exatas da
Universidade Federal de Minas Gerais como
requisito parcial para a obtenção do grau de
Doutor em Ciências – Química.

Belo Horizonte

2012

M188e
2012
T

Magalhães, Cássia Gonçalves
Estudo fitoquímico do tronco e raiz de *Maytenus salicifolia* Reissek (Celastraceae) e avaliação da atividade biológica de seus constituintes e de ésteres derivados do lupeol. 2012.
xii, 186 f. : il.

Orientadora: Grácia Divina de Fátima Silva
Co-orientadora: Lucienir Pains Duarte
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Minas Gerais. Departamento de Química.
Inclui bibliografia.

1. Química orgânica - Teses 2. Produtos naturais - Teses 3. Celastraceae - Teses 4. *Maytenus salicifolia* - Teses I. Silva, Grácia Divina de Fátima, Orientadora II. Duarte, Lucienir Pains, Coorientadora. III. Título.

CDU 043



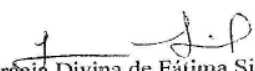
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA - ICEx
31270-901 - BELO HORIZONTE - MG
TEL.: 031 - 3409-5732
FAX: 031 - 3409-5711
E-MAIL: pgquimic@qui.ufmg.br

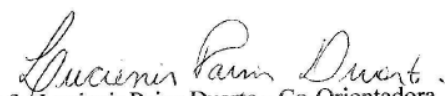


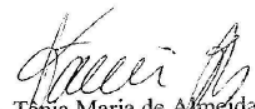
**"Estudo Fitoquímico do Tronco e Raiz de *Maytenus salicifolia* Reissek
(Celastraceae) e Avaliação da Atividade Biológica de seus Constituintes e de
Ésteres Derivados do Lupeol."**

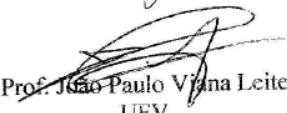
Cássia Gonçalves Magalhães

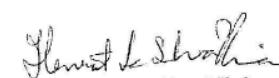
Tese aprovada pela banca examinadora constituída pelos Professores:

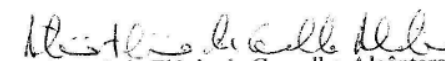

Profa. Grácia Divina de Fátima Silva - Orientadora
UFMG


Profa. Lucienir Pains Duarte - Co-Orientadora
UFMG


Dra. Tânia Maria de Almeida Alves
Centro de Pesquisas/René Rachou


Prof. João Paulo Viana Leite
UFV


Profa. Henriete da Silva Vieira
UFMG


Prof. Antônio Flávio de Carvalho Alcântara
UFMG

Belo Horizonte, 20 de julho de 2012.

O trabalho aqui descrito foi realizado sob a orientação da Prof.^a.
Dr.^a. Grácia Divina de Fátima Silva, co-orientação da Prof.^a. Dr.^a.
Lucienir Pains Duarte e colaboração do Prof. Dr. Sidney Augusto
Vieira Filho e da Prof.^a. Dr.^a. Isabel López Bazzocchi.

*A meus pais, José e Nely,
que atravessaram obstáculos monumentais
para que eu tivesse uma educação exemplar.
Às minhas irmãs, Poliana e Danúbia.*

AGRADECIMENTOS

A Deus, por tornar esse momento possível, por me dar forças para seguir adiante e por sempre me iluminar. À Nossa Senhora do Carmo por sempre me proteger e à Serva de Deus, Benigna Victima de Jesus, a sua poderosa intercessão.

À Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), em especial ao Departamento de Química (DQ), pela oportunidade concedida.

Às professoras Dra. Grácia Divina de Fátima Silva e Dra. Lucienir Pains Duarte, por me concederem o privilégio de fazer parte da **FAMÍLIA NEPLAM**. Agradeço a confiança depositada em mim e a oportunidade de realização deste trabalho, a orientação dedicada, o carinho, o incentivo e a amizade.

À minha família, que mesmo sem entender quando optei por fazer o Doutorado, apoiou minha decisão. Agradeço o amor dedicado a mim em todos os momentos, que me ajudou a superar cada obstáculo.

À professora Dra. Rute Cunha Figueiredo, que de maneira tão simples e desinteressada, contribuiu enormemente para meu crescimento profissional e pessoal.

Ao professor Dr. Sidney Augusto Vieira Filho (Bibo) pelos ensinamentos, pelas inúmeras caronas, pelo apoio constante e amizade.

Aos professores do *Instituto Universitario de Bioorgánica Antonio González* (IUBO-AG), Dra. Isabel López Bazzocchi e Dr. Ignacio Antonio Jiménez Díaz, pela contribuição valiosa na realização deste trabalho, pela co-orientação e oportunidade de fazer parte de seu grupo de pesquisa e, sobretudo, pelo carinho e amizade.

Aos amigos Fernando, Jailton, Djalma, Marcela, Aline, Vanessa, Leandro, Grazielle, Grasiely e demais colegas do NEPLAM e DQ, pelo companheirismo e auxílio durante a realização deste trabalho.

Aos amigos Juan Carlos (*El Boli*), Oliver, Nuria, Nayra, Gabriel e demais colegas do IUBO-AG e de Tenerife, por tornarem o estágio na Espanha um período tão feliz.

Às tias Elaine e Neuza pelo acolhimento em sua casa, pelo carinho e cuidado para comigo.

Ao amigo Alvimar Viana, pelo incentivo e encorajamento constante por meio de suas sábias palavras.

Aos amigos Renato e Paola, pela oportunidade de passar o Natal em família, mesmo tão longe de casa. Obrigada pelo apoio e pelos momentos tão agradáveis!

À professora Dra. Laila Moujir e ao Dr. Manuel Rodríguez López (*Profesor Lolo*), do Departamento de Microbiologia da *Universidad de La Laguna*, pela colaboração na realização dos ensaios de citotoxicidade. Muito obrigada pela recepção no laboratório, pela paciência, ensinamentos e amizade.

Aos professores Dra. Ana Luiza Ruiz Gois e Dr. João Ernesto de Carvalho da Universidade Estadual de Campinas e ao professor Dr. Ângelo de Fátima, pelo auxílio na realização do ensaio de atividade citotóxica.

Às professoras Dra. Lúcia Pinheiro S. Pimenta, Dra. Rosimeire Brondi Alves e Dra. Maria Amélia Diamantino Boaventura os ensinamentos nas disciplinas cursadas.

Aos professores Dra. Henriete da Silva Vieira, Dr. Fernando Carazza e Dr. Antônio Flávio de Alcântara pelas valiosas sugestões apresentadas durante o exame de qualificação.

Ao professor Dr. Vagner Santos, do Departamento de Clínica Patológica e Cirurgia Odontológica da UFMG, pelo auxílio nos ensaios antimicrobianos.

Aos professores Dra. Ninoska Flores, Dr. Alberto Giménez e Dr. Efraim Salamanca, da *Universidad Mayor de San Andrés*, Bolívia, pelo auxílio nos ensaios de atividade leishmanicida.

À professora Dra. Jacqueline Aparecida Takahashi pelo auxílio com os ensaios de atividade inibitória da acetilcolinesterase e atividade antimicrobiana.

Ao professor Dr. Luiz Cláudio de Almeida Barbosa, pela amizade e o incentivo a seguir adiante na pós-graduação.

Aos amigos Leandro Marcos e Rafael Augusto, companheiros de longa data, pela cumplicidade, carinho e companheirismo.

À Fátima Maffili e Joaquim Sant'anna, pelo incentivo e amizade.

Às secretárias do Programa de Pós-Graduação em Química, especialmente à Paulete Gerken, pela atenção e eficiência durante todo o processo.

À CAPES, FAPEMIG e ao CNPq pelo auxílio financeiro.

À Maria do Carmo Mariano, por suas orações e por me mostrar que para Deus nada é impossível.

Enfim, a todos que de alguma forma contribuíram para que mais essa vitória fosse conquistada.

*“Nunca deixe que lhe digam que não vale a pena acreditar no sonho que se tem,
ou que seus planos nunca vão dar certo, ou que você nunca vai ser alguém...”*

Quem acredita sempre alcança.”

Renato Russo

Sumário

ÍNDICE DE FIGURAS.....	i
ÍNDICE DE TABELAS	v
LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS	viii
RESUMO	x
ABSTRACT	xii
INTRODUÇÃO.....	1
Taxonomia.....	5
OBJETIVOS DO TRABALHO.....	8
CAPÍTULO 1. ESTUDO FITOQUÍMICO DE <i>MAYTENUS SALICIFOLIA</i>.....	9
1.1. Materiais e métodos.....	9
1.2. Obtenção do material vegetal e preparo dos extratos de <i>M. salicifolia</i>	11
1.2.1. Preparação dos extratos da raiz de <i>M. salicifolia</i>	11
1.2.2. Preparação dos extratos do tronco de <i>M. salicifolia</i>	13
1.3. Elaboração dos extratos e sólidos oriundos do tronco e raiz de <i>M. salicifolia</i>	14
1.3.1. Elaboração do sólido obtido durante a remoção do solvente do extrato hexânico do tronco de <i>M. salicifolia</i>	14
1.3.2. Elaboração do extrato hexânico do tronco de <i>M. salicifolia</i>	15
1.3.3. Elaboração do extrato clorofórmico do tronco de <i>M. salicifolia</i>	18
1.3.4. Elaboração do extrato em acetato de etila do tronco de <i>M. salicifolia</i>	20
1.3.5. Elaboração do extrato etanólico do tronco de <i>M. salicifolia</i>	22
1.3.6. Elaboração do sólido vermelho obtido durante a remoção do solvente do extrato hexânico da raiz de <i>M. salicifolia</i>	22
1.3.7. Elaboração do extrato hexânico da raiz de <i>M. salicifolia</i>	24
1.3.8. Elaboração do extrato clorofórmico da raiz de <i>M. salicifolia</i>	36
1.3.9. Elaboração do extrato em acetato de etila da raiz de <i>M. salicifolia</i>	43
1.3.10. Elaboração do extrato etanólico da raiz de <i>M. salicifolia</i>	44
1.4. DETERMINAÇÃO ESTRUTURAL DAS SUBSTÂNCIAS ISOLADAS DE <i>MAYTENUS SALICIFOLIA</i>.....	45
MS1: Friedelina.....	45
MS2: 3,16-dioxofriedelano.....	48
MS3: 30-hidroxifriedelan-3-ona.....	51

MS4: 28-hidroxilup-20(29)-en-3-ona.....	54
MS5: lupeol.....	57
MS6: betulina.....	60
MS7: lup-20(29)-en-3,30-diol.....	63
MS8: 3-oxo-15 α ,28-di-hidroxi-lup-20(29)-eno.....	66
MS9: β -sitosterol.....	69
MS10: 4'-O-metilepigalocatequina	70
MS11: proantocianidina A.....	73
MS12: tingenona.....	76
MS13: rigidinol.....	79
MS14: lupenona.....	82
MS15: ferruginol.....	83
MS16: pristimerina.....	85
MS17: gloquidona.....	86
MS18: glutinol.....	88
MS19: friedelan-1,3-diona.....	89
MS20: 11 α -hidroxigloquidona.....	91
MS21: gloquidonol.....	92
MS22: 29-hidroxifriedelan-3-ona.....	94
MS23: pinostrobin.....	97
MS24: salicassina.....	98
MS25: 30-hidroxilupenona.....	108
MS26: nepeticina.....	109
MS27: 3-epigloquidiol.....	113
MS28: mistura de 7,8-di-hidroisoxuxuarina A α e isoxuxuarina A α	114
MS29: 16 β -hidroxipristimerina.....	116
MS30: 6,7-desidroferruginol.....	124
MS31: abruslactona A.....	125
MS32: mistura de 3-oxo-olean-9(11):12-dieno e 3-oxo-ursan-9(11):12-dieno....	127
MS33: 3'-metoxi-4'-hidroxi- <i>trans</i> -cinamaldeído	128
MS34: siringaldeído	130
MS35: 2'-(2-hidroxipropil)- 4'-O-metilepigalocatequina.....	131
CAPÍTULO 2. SÍNTESE DE ÉSTERES DERIVADOS DO LUPEOL.....	137
2.1. Procedimento experimental.....	137

2.2. Resultados e discussão.....	138
CAPÍTULO 3. AVALIAÇÃO DO POTENCIAL BIOLÓGICO DE SUBSTÂNCIAS	
ISOLADAS E SINTETIZADAS.....	149
3.1-Avaliação da atividade inibitória sobre a enzima acetilcolinesterase.....	151
3.1.1- Procedimento experimental.....	151
3.1.2- Resultados e Discussão	151
3.2- Avaliação da atividade antimicrobiana frente a patógenos da cavidade oral.....	153
3.2.1- Procedimento experimental.....	153
3.2.2- Resultados e Discussão.....	154
3.3- Avaliação da atividade citotóxica de 16 β -hidroxipristimerina.....	157
3.3.1- Conservação de linhagens e meios de cultura celulares.....	157
3.3.2- Propagação e conservação das linhagens celulares.....	157
3.3.3- Efeito citotóxico do produto e análise da viabilidade celular.....	158
3.3.4- Resultados e Discussão.....	159
3.4- Avaliação da atividade citotóxica de ésteres derivados do lupeol.....	161
3.4.1- Atividade antiproliferativa.....	161
3.4.2- Resultados e discussão	162
3.5 - Avaliação da atividade leishmanicida de ésteres do lupeol.....	164
3.5.1- Procedimento experimental.....	164
3.5.2- Resultados e discussão.....	165
3.6- Avaliação da atividade frente a <i>Helicobacter pylori</i>	166
3.6.1- Procedimento experimental.....	166
3.6.2- Resultados e discussão.....	167
CONCLUSÃO	169
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	171

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 – Fotos de <i>Maytenus salicifolia</i> : A) Aspecto geral dos galhos, frutos e folhas; B) Detalhe dos frutos; C) Detalhe das folhas; D), E) Fragmento da raiz	7
Figura 2 - Representação esquemática da espécie <i>Maytenus salicifolia</i> Reiss. (Okano, 1992).....	8
Figura 3 - Sequência da obtenção dos extratos da raiz de <i>M. salicifolia</i>	12
Figura 4 - Sequência da obtenção dos extratos do tronco de <i>M. salicifolia</i>	13
Figura 5 - Grupos de frações obtidas de SEHT por cromatografia em coluna.....	15
Figura 6 - Grupos de frações obtidas de EHT por cromatografia em coluna.....	18
Figura 7 - Grupos de frações obtidas de ECT por cromatografia em coluna.....	19
Figura 8 - Grupos de frações obtidas de EAT por cromatografia em coluna.....	22
Figura 9 - Grupos de frações obtidas de SVR por cromatografia em coluna.....	24
Figura 10 - Compostos obtidos de EHR por métodos cromatográficos diversos.....	35
Figura 11 - Compostos obtidos de ECR por métodos cromatográficos diversos.....	42
Figura 12 - Compostos obtidos de EAR por métodos cromatográficos diversos.....	44
Figura 13 - Espectro de RMN de ^1H de MS1 (CDCl_3 ; 400 MHz).....	45
Figura 14 - Espectro de RMN de ^{13}C de MS1 (CDCl_3 ; 100 MHz).....	46
Figura 15 - Espectro de RMN de ^1H de MS2 (CDCl_3 ; 400 MHz).....	48
Figura 16 - Espectro de RMN de ^{13}C de MS2 (CDCl_3 , 100 MHz).....	49
Figura 17 - Subespectro DEPT-135 de MS2 (CDCl_3 , 100 MHz).....	49
Figura 18 - Espectro de RMN de ^1H de MS3 (CDCl_3 , 400 MHz).....	51
Figura 19 - Espectro de RMN de ^{13}C de MS3 (CDCl_3 , 100 MHz).....	52
Figura 20 - Subespectro DEPT-135 de MS3 (CDCl_3 , 100 MHz).....	52
Figura 21 - Espectro de RMN de ^1H de MS4 (CDCl_3 , 400MHz).....	54
Figura 22 - Espectro de RMN de ^{13}C de MS4 (CDCl_3 , 100MHz).....	55
Figura 23 - Subespectro DEPT-135 de MS4 (CDCl_3 , 100 MHz).....	55
Figura 24 - Espectro de RMN de ^1H de MS5 (CDCl_3 , 200 MHz).....	57
Figura 25 - Espectro de RMN de ^{13}C de MS5 (CDCl_3 , 50MHz).....	58
Figura 26 - Subespectro DEPT-135 de MS5 (CDCl_3 , 50 MHz).....	59
Figura 27 - Espectro de RMN de ^1H de MS6 (CDCl_3 , 400 MHz).....	60
Figura 28 - Espectro de RMN de ^{13}C de MS6 (CDCl_3 , 100 MHz).....	61

Figura 29 - Subespectro DEPT-135 de MS6 (CDCl ₃ , 100 MHz).....	61
Figura 30 - Espectro de RMN de ¹ H de MS7 (DMSO/ py, 400 MHz).....	63
Figura 31 - Espectro de RMN de ¹³ C de MS7 (DMSO/py, 100 MHz).....	64
Figura 32 - Subespectro DEPT-135 de MS7 (DMSO/py, 100 MHz).....	64
Figura 33 - Espectro de RMN de ¹ H de MS8 (CDCl ₃ , 400 MHz).....	66
Figura 34 - Espectro de RMN de ¹³ C de MS8 (CDCl ₃ , 100 MHz).....	67
Figura 35 - Subespectro DEPT-135 de MS8 (CDCl ₃ , 100 MHz).....	67
Figura 36 - Espectro de RMN de ¹ H de MS9 (CDCl ₃ , 400 MHz).....	69
Figura 37 - Espectro de RMN de ¹ H de MS 10 (CD ₃ OD, 400 MHz).....	71
Figura 38 - Espectro de RMN de ¹³ C de M10 (CD ₃ OD, 100 MHz).....	72
Figura 39 - Subespectro DEPT-135 de MS10 (CD ₃ OD, 100 MHz).....	72
Figura 40 - Espectro de RMN de ¹ H de MS 11 (CD ₃ OD, 400 MHz).....	74
Figura 41 - Espectro de RMN de ¹³ C de MS11 (CD ₃ OD, 100 MHz).....	75
Figura 42 - Espectro de RMN de ¹ H de MS12 (CDCl ₃ , 400 MHz).....	76
Figura 43 - Espectro de RMN de ¹³ C de MS12 (DMSO/py, 100 MHz).....	77
Figura 44 - Subespectro DEPT-135 de MS12 (DMSO/py, 100 MHz).....	77
Figura 45 - Espectro de RMN de ¹ H de MS13 (CDCl ₃ , 400 MHz).....	79
Figura 46 - Espectro de RMN de ¹³ C de MS13 (CDCl ₃ , 100 MHz).....	80
Figura 47 - Subespectro DEPT-135 de MS13 (CDCl ₃ , 100 MHz).....	80
Figura 48 - Espectro de RMN de ¹ H de MS14 (CDCl ₃ , 400 MHz).....	82
Figura 49 - Espectro de RMN de ¹ H de MS15 (CDCl ₃ , 400 MHz).....	84
Figura 50 - Espectro de RMN de ¹ H de MS16 (CDCl ₃ , 400 MHz).....	85
Figura 51 - Espectro de RMN de ¹ H de MS17 (CDCl ₃ , 400 MHz).....	87
Figura 52 - Espectro de RMN de ¹ H de MS18 (CDCl ₃ , 400 MHz).....	88
Figura 53 - Espectro de RMN de ¹ H de MS19 (CDCl ₃ , 400 MHz).....	90
Figura 54 - Espectro de RMN de ¹ H de MS20 (CDCl ₃ , 400 MHz).....	91
Figura 55 - Espectro de RMN de ¹ H de MS21 (CDCl ₃ , 400 MHz).....	93
Figura 56 - Espectro de RMN de ¹ H de MS22 (CDCl ₃ , 400 MHz).....	94
Figura 57 - Espectro de RMN de ¹³ C de MS22 (CDCl ₃ , 100 MHz).....	95
Figura 58 - Subespectro DEPT-135 de MS22 (CDCl ₃ , 100 MHz).....	95
Figura 59 - Espectro de RMN de ¹ H de MS23 (CDCl ₃ , 400 MHz).....	97
Figura 60 - Espectro de absorção na região do IV de MS24 (KBr).....	99
Figura 61 - Espectro na região do UV-Vis de MS24	99
Figura 62 - Espectro de RMN de ¹ H de MS24 (CDCl ₃ , 600 MHz).....	100

Figura 63 - Espectro de RMN de ^{13}C de MS24 (CDCl_3 , 150 MHz).....	102
Figura 64 - Expansão do mapa de contornos HSQC de MS24 na região de δ 0,50 a 4,30 (CDCl_3 , 600 MHz).....	102
Figura 65 - Expansão do mapa de contornos HSQC de MS24 na região de δ 5,00 a 8,40 (CDCl_3 , 600 MHz).....	103
Figura 66 - Expansão do mapa de contornos COSY de MS24 na região de δ 0,50 a 4,50 (CDCl_3 , 600 MHz).....	103
Figura 67 - Expansão do mapa de contornos HMBC de MS24 na região de δ 5,0 a 11,5 (CDCl_3 , 600 MHz).....	104
Figura 68 - Mapa de contornos ROESY de MS24 (CDCl_3 , 600 MHz).....	104
Figura 69 - Estrutura tridimensional de MS24	105
Figura 70 - Espectro de massas (ESI-MS) de MS24	105
Figura 71 - Espectro de massas (HR-MS) de MS24	105
Figura 72 - Proposta de fragmentação para o composto MS24	106
Figura 73 - Espectro de RMN de ^1H de MS25 (CDCl_3 , 400 MHz).....	108
Figura 74 - Espectro de RMN de ^1H de MS26 (CDCl_3 , 400 MHz).....	110
Figura 75 - Espectro de RMN de ^{13}C de MS26 (CDCl_3 , 100 MHz).....	111
Figura 76 - Subespectro DEPT-135 de MS26 (CDCl_3 , 100 MHz).....	111
Figura 77 - Espectro de RMN de ^1H de MS27 (CDCl_3 , 400 MHz).....	113
Figura 78 - Espectro de RMN de ^1H de MS28 (CDCl_3 , 400 MHz).....	115
Figura 79 - Espectro de absorção no IV de MS29 (KBr).....	117
Figura 80 - Espectro na região do UV-Vis de MS29	117
Figura 81 - Espectro de RMN de ^1H de MS29 (CDCl_3 , 500 MHz).....	118
Figura 82 - Espectro de RMN de ^{13}C de MS29 (CDCl_3 , 125 MHz).....	119
Figura 83 - Subespectro DEPT-135 de MS29 (CDCl_3 , 125 MHz).....	119
Figura 84 - Expansão do mapa de contornos HSQC de MS29 (CDCl_3 , 500 MHz).....	120
Figura 85 - Mapa de contornos HMBC de MS29 (CDCl_3 , 500 MHz).....	120
Figura 86 - Mapa de contornos ROESY de MS29 (CDCl_3 , 500 MHz).....	121
Figura 87 - Estrutura tridimensional de MS24	121
Figura 88 - Espectro de massas (HR-MS) de MS29	122
Figura 89 - Proposta de fragmentação para o composto MS29	122
Figura 90 - Espectro de RMN de ^1H de MS30 (CDCl_3 , 400 MHz).....	124
Figura 91 - Espectro de RMN de ^1H de MS31 (CDCl_3 , 400 MHz).....	126
Figura 92 - Espectro de RMN de ^1H de MS32 (400 MHz, CDCl_3).....	127

Figura 93 - Espectro de RMN de ^1H de MS33 (CDCl_3 , 400 MHz).....	129
Figura 94 - Espectro de RMN de ^1H de MS34 (CDCl_3 , 400 MHz).....	130
Figura 95 - Espectro de RMN de ^1H de MS35 (CD_3OD , 400 MHz).....	132
Figura 96 - Espectro de RMN de ^{13}C de MS35 (CD_3OD , 100 MHz).....	132
Figura 97 - Subespectro DEPT-135 de MS35 (CD_3OD , 100 MHz).....	133
Figura 98 - Mapa de contornos HSQC de MS35 (CD_3OD , 400 MHz).....	134
Figura 99 - Mapa de contornos HMBC de MS35 (CD_3OD , 400 MHz).....	134
Figura 100 - Mapa de contornos NOESY de MS35 (CD_3OD , 400 MHz).....	135
Figura 101 - Esquema das reações de esterificação do lupeol.....	138
Figura 102 - Espectro na região do IV de CIL (inserção direta).....	140
Figura 103 - Espectro de RMN de ^1H de CIL (200 MHz, CDCl_3).....	140
Figura 104 - Espectro de RMN de ^{13}C de CIL (50 MHz, CDCl_3).....	141
Figura 105 - Subespectro DEPT-135 de CIL (50 MHz, CDCl_3).....	141
Figura 106 - Reação da acetilcolinesterase com acetato de naftila e a formação do composto diazo.....	152
Figura 107 - Halos correspondentes à atividade inibitória das amostras EF , PL , ML , 11L , CIF , CIL , EU , MS2 , EL , COL , MS5 e MS3 frente à enzima acetilcolinesterase observados após 90 minutos de reação.....	153
Figura 108 - Redução do MTT a formazan.....	158
Figura 109 - Esquema representativo da montagem da placa de cultivo utilizada no ensaio de citotoxicidade.....	159
Figura 110 - Efeito inibitório da 16 β -hidroxipristimerina sobre o crescimento das linhagens celulares HeLa e A-549.....	160
Figura 111 - Inibição do crescimento de linhagens tumorais pela doxorrubicina.....	162
Figura 112 - Inibição do crescimento de linhagens tumorais por ésteres derivados do lupeol.....	163

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1 - Dados de RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) de MS1 e dados da friedelina descritos na literatura (MAHATO e KUNDU, 1994)	47
Tabela 2 - Dados de RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) de MS2 e dados do 3,16-dioxofriedelano descritos na literatura (MAHATO e KUNDU, 1994).....	50
Tabela 3 - Dados de RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) de MS3 e dados de 30-hidroxifriedelan-3-ona descritos na literatura (BETANCOR <i>et al.</i> , 1980).....	53
Tabela 4 - Dados de RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) de MS4 e dados da 28-hidroxilup-20(29)-en-3-ona descritos na literatura (KIM <i>et al.</i> , 2002).....	56
Tabela 5 - Dados de RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) de MS5 e dados do lupeol descritos na literatura (MAHATO e KUNDU, 1994).....	59
Tabela 6 - Dados de RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) de MS6 e dados da betulina descritos na literatura (KIM <i>et al.</i> , 2002).....	62
Tabela 7 - Dados de RMN de ^{13}C (100 MHz, DMSO/piridina) de MS7 e dados do lup-20(29)-en-3,30-diol descritos na literatura (ABDEL- MOGIB, 1999).....	65
Tabela 8 - Dados de RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) de MS8 e dados do 3-oxo-15 α ,28-dihidroxi-lup-20(29)-eno descritos na literatura (MAHATO e KUNDU, 1994)....	68
Tabela 9 - Dados de RMN de ^{13}C RMN de ^1H (CDCl_3 , 400 MHz) de MS9 e dados do β -sitosterol descritos na literatura (SILVA, 2007).....	70
Tabela 10 - Dados de RMN de ^{13}C (100 MHz, CD_3OD) de MS10 e dados da 4'-O-metil-epigallocatequina descritos na literatura (MIRANDA, 2007).....	73
Tabela 11 - Dados de RMN de ^{13}C (CD_3OD , 100 MHz) de MS11 e dados da proantocianidina A descritos na literatura (SALAZAR, 2006).....	75
Tabela 12 - Dados de RMN de ^{13}C (CDCl_3 , 100 MHz) de MS12 e dados da tingenona descritos na literatura (GUNATILAKA, 1989).....	78
Tabela 13 - Dados de RMN de ^{13}C de MS13 e dados do rigidenol descritos na literatura (SILVA <i>et al.</i> , 2005).....	81
Tabela 14 - Dados de RMN de ^1H de MS14 (CDCl_3 , 400 MHz) e dados da lupenona descritos na literatura (HUI e LI, 1976).....	83
Tabela 15 - Dados de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) observados para MS15 e dados do ferruginol descritos na literatura a literatura (WANG <i>et al.</i> , 2002).....	84
Tabela 16 - Dados de RMN de ^1H (CDCl_3 , 400 MHz) de MS16 e dados da pristimerina	

descritos na literatura (GUNATILAKA, 1989).....	86
Tabela 17 - Dados de RMN de ^1H (CDCl_3 , 400 MHz) de MS17 e dados da gloquidona descritos na literatura (HUI e LI, 1976).....	87
Tabela 18 - Dados de RMN de ^1H (CDCl_3 , 400 MHz) de MS18 e dados do glutinol descritos na literatura (HUI e LI, 1976).....	89
Tabela 19 - Dados de RMN de ^1H (CDCl_3 , 400 MHz) de MS19 e dados da friedelan-1,3-diona descritos na literatura (KLASS <i>et al.</i> , 1992).....	90
Tabela 20 - Dados de RMN de ^1H (CDCl_3 , 400 MHz) de MS20 e dados da 11 α -hidroxigloquidona descritos na literatura (REYES <i>et al.</i> , 2006).....	92
Tabela 21 - Dados de RMN de ^1H (CDCl_3 , 400 MHz) de MS21 e dados do gloquidonol descritos na literatura (HUI e LI, 1976).....	93
Tabela 22 - Dados de RMN de ^{13}C de MS22 (CDCl_3 , 100 MHz) e dados de 29-hidroxifriedelan-3-ona descritos na literatura (BETANCOR <i>et al.</i> , 1980).....	96
Tabela 23 - Dados de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) de MS23 e dados da pinostrobina descritos na literatura (ABDELWAHAB <i>et al.</i> , 2011).....	98
Tabela 24 - Deslocamentos químicos de RMN de ^1H (600 MHz, CDCl_3) e ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) de MS24	107
Tabela 25 - Dados de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) de MS25 e dados da 30-hidroxilupenona descritos na literatura (SILVA <i>et al.</i> , 2005).....	109
Tabela 26 - Dados de RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) de MS26 e dados da nepeticina descritos na literatura (AHMAD <i>et al.</i> , 1981).....	112
Tabela 27 - Dados de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) de MS27 e dados do 3- <i>epi</i> -gloquidiol descritos na literatura (SRIVASTAVA e KULSHRESHTHA, 1988).....	114
Tabela 28 - Dados de RMN de ^1H obtido da mistura MS28 e dados de isoxuxuarina A α e 7,8-di-hidroisoxuxuarina A α descritos na literatura (PÉREZ, 2000).....	116
Tabela 29 - Deslocamentos químicos de RMN de ^1H (500MHz, CDCl_3) e ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) de MS29	123
Tabela 30 - Dados de RMN de ^1H (CDCl_3 , 400 MHz) de MS30 dados do 6,7-desidroferruginol descritos na literatura (WANG <i>et al.</i> , 2002).....	125
Tabela 31 - Dados de RMN de ^1H (CDCl_3 , 400 MHz) de MS31 e dados da abruslactona A descritos na literatura (SILVA <i>et al.</i> , 1998).....	126
Tabela 32 - Principais deslocamentos de RMN de ^1H de MS32 e comparação com a	

literatura (GONZÁLEZ <i>et al.</i> , 1987).....	128
Tabela 33 - Principais deslocamentos de RMN de ^1H de MS33 e comparação com a literatura (KWON e LEE, 2001).....	129
Tabela 34 - Principais deslocamentos químicos de RMN de ^1H de MS34 e comparação com a literatura (GUTIERREZ e HERZ, 1988).....	131
Tabela 35 - Deslocamentos químicos de RMN de ^1H e ^{13}C (100 MHz, CD_3OD) de MS35	136
Tabela 36 - Condições empregadas nas esterificações do lupeol (1,0 mmol).....	138
Tabela 37 - Dados de RMN de ^{13}C da cadeia triterpênica dos ésteres alifáticos sintetizados (50 MHz, CDCl_3).....	142
Tabela 38 - Dados de RMN de ^{13}C referentes à porção alifática dos ésteres alifáticos sintetizados (CDCl_3 , 50 MHz).....	143
Tabela 39 - Deslocamentos químicos de RMN de ^{13}C dos ésteres aromáticos sintetizados (CDCl_3 , 50 MHz).....	144
Tabela 40 - Atividade antimicrobiana das amostras avaliadas.....	155
Tabela 41 - Valores de IC_{50} ($\mu\text{M.mL}^{-1}$) observados para as linhagens celulares ensaiadas..	159
Tabela 42 - Avaliação leishmanicida de ésteres do lupeol.....	164
Tabela 43 - Porcentagens de inibição do crescimento <i>H. pylori</i> frente as amostras testadas.....	167

LISTA DE ABREVIATURAS

δ	Deslocamento químico
λ	Comprimento de onda
ν	Número de ondas (cm^{-1})
ax	Axial
CC	Cromatografia em coluna de sílica-gel
CCDS	Cromatografia em camada delgada de sílica
CCDP	Cromatografia em camada delgada preparativa
COSY	“Correlation Spectroscopy”
d	Dupleto
dd	Duplo dupleto
DEPT	“Distortionless enhancement by polarization transfer”
eq	Equatorial
EAR	Extrato em acetato de etila da raiz
ECR	Extrato clorofórmico da raiz
EEtR	Extrato etanólico da raiz
EHR	Extrato hexânico da raiz
EAT	Extrato em acetato de etila do tronco
ECT	Extrato clorofórmico do tronco
EEtT	Extrato etanólico do tronco
EHT	Extrato hexânico do tronco
Fig.	Figura(s)
Hex	Hexano
HMBC	“Heteronuclear multiple bond correlation”
HSQC	“Heteronuclear simple quantum correlation”
IV	Infravermelho
J	Constante de acoplamento escalar
L.B.	Liebermann Burchard
m	múltiplo
MHz	Megahertz
MM	Massa molar

p.	Página(s)
PF	Ponto de fusão
Rf	Fator de retenção, em cromatografia em camada delgada
RMN de ^1H	Ressonância magnética nuclear de hidrogênio
RMN de ^{13}C	Ressonância magnética nuclear de carbono-13
ROESY	“Rotating frame Overhause Effect Spectroscopy”
s	Simpleto
SAR	Sólido alaranjado da raiz
SEAT	Sólido do extrato acetato-etílico do tronco
SECT	Sólido do extrato clorofórmico do tronco
SEHT	Sólido do extrato hexânico do tronco
SVR	Sólido vermelho da raiz
t	Tripleto
TTPC	Triterpeno pentacíclico

RESUMO

No presente trabalho descreve-se o estudo fitoquímico do tronco e raiz de *Maytenus salicifolia* Reissek (coletada em Ouro Branco, MG), cuja constituição química e avaliação biológica ainda não haviam sido relatadas na literatura. Do tronco foram isolados oito compostos conhecidos, sendo cinco lupanos (lupeol, 3-oxo-15 α ,28-di-hidroxi-lup-20(29)-eno, lup-20(29)en-3,30-diol, betulina e 28-hidroxi-lup-20(29)-en-3-ona) e três friedelanos (friedelina, 3,16-dioxofriedelano e 30-hidroxi-friedelan-3-ona).

Da raiz foram isolados 22 compostos já descritos na literatura, sendo dois compostos aromáticos (siringaldeído e 3'-metoxi-4'-hidroxi-*trans*-cinamalaldeído), dois diterpenos (ferruginol e 6,7-desidroferruginol), um esteroide (β -sitosterol), três flavonoides (pinostrobin, 4'-O-metilepigalocatequina e proantocianidina A), um glutinano (glutinol), dois friedelanos (29-hidroxi-friedelan-3-ona e friedelan-1,3-diona), oito lupanos (gloquidonol, lupenona, rigidinol, 3-epigloquidiol, 30-hidroxi-lup-20(29)-en-3-ona, 11 α -hidroxigloquidona, gloquidona e nepeticina), um oleanano (abruslactona A) e dois quinonametídeos (tingenona e pristimerina). Isolaram-se ainda uma mistura de triterpenos, sendo identificada como 3-oxo-olean-9(11):12-dieno / 3-oxo-ursan-9(11):12-dieno e uma mistura de dímeros, que foi identificada como 7,8-di-hidroisoxuxuarina A α / isoxuxuarina A α .

Três dos compostos isolados são novos na literatura científica: 2'-(2-hidroxipropil-4'-O-metilepigalocatequina), 16 β -hidroxipristimerina e salicassina; ambos foram obtidos de extratos da raiz. Este último trata-se de um aduto formado por uma chalcona e um diterpeno abietano. É a primeira vez que um composto dessa natureza é isolado da família Celastraceae.

Além do estudo fitoquímico, foram sintetizados 11 ésteres a partir do lupeol isolado desta espécie, tendo em vista a atividade biológica diversificada observada para esses compostos. Assim, foram obtidos seis derivados alifáticos e cinco aromáticos. Destes, são inéditos o caprilato de lupeolila, tricloroacetato de lupeolila, 3',4'-dimetoxibenzoato de lupeolila, 3',4',5'-dimetoxibenzoato de lupeolila e 3',5'-dinitrobenzoato de lupeolila.

Os extratos e compostos isolados de *M. salicifolia*, bem como os ésteres derivados do lupeol foram submetidos a ensaios biológicos variados. Os extratos hexânico, em acetato de etila e etanólico da raiz foram testados contra micro-organismos encontrados na cavidade oral. Todos os extratos avaliados foram ativos frente a pelo menos um dos micro-organismos, sendo que *Candida albicans* foi sensível a todos os extratos avaliados. O lupano rigidinol exibiu atividade inibitória frente a *Helicobacter pylori*, assim como 16 β -hidroxipristimerina, que também apresentou atividade citotóxica frente a células HeLa e A-549. O palmitato de

lupeolila foi citotóxico para a linhagem celular K-562. O caproato de lupeolila inibiu o crescimento de *H. pylori*, bem como a atividade da enzima acetilcolinesterase. Esta foi inibida também pelo composto 30-hidroxifriedelan-3-ona.

Os resultados obtidos contribuíram para o estudo quimiotaxonômico da família Celastraceae e mostram que *M. salicifolia* pode vir a ser uma fonte alternativa de compostos que sejam possíveis protótipos de fármacos que atuem em diferentes enfermidades.

ABSTRACT

In this work it is described the phytochemistry study of stems and roots of *Maytenus salicifolia* Reissek (collected in Ouro Branco city, Minas Gerais state), which chemical constitution and biological activity have not been yet reported in the literature. It were isolated eight known compounds from the stems: $\Delta^3, 16$ -dioxofriedelane, Δ^3 -lupeol, betulin, friedelin, Δ^3 -30-hydroxyfriedelan-3-one, 3-oxo-15 α ,28-di-hydroxy-lup-20(29)-ene, lup-20(29)-en-3,30-diol, and 28-hydroxylup-20(29)-en-3-one.

Siringaldehyde, 3'-methoxy-4'-hydroxy-*trans*-cinamaldehyde, pinostrobin, 4'-O-methylepigallocatechin, proanthocyanidin A, Δ^3 - β -sitosterol, ferruginol, 6,7-dehydroferruginol, glutinol, 29-hydroxy-friedelin, friedelan-1,3-dione, glochidonol, 3-epiglochidiol, lupenone, 30-hydroxy-lup-20(29)-en-3-one, 11 α -hydroxyglochidone, glochidone, rigidinol, nepeticin, abruslactone A, tingenone and pristimerin were isolated from roots.. It was also isolated a triterpenes mixture, identified as 3-oxo-olean-9(11):12-diene / 3-oxo-ursan-9(11):12-diene and a dimmers mixture, identified as 7,8-dihydroisoxuxuarin A α / isoxuxuarin A α .

Three compounds are new in the literature: 2'-(2-hydroxypropyl-4'-O-methylepigallocatechin), 16 β -hydroxypristimerin e salicassin, obtained from root extracts. The last one is the first adduct reported composed of a chalcone and a diterpene.

Eleven esters were also synthesized from lupeol isolated of this specie, six aliphatic and five aromatic esters.

The compounds and extracts isolated from *M. salicifolia*, as well as lupeol esters were submitted to several biologic assays. The hexanic, ethyl acetate and ethanolic extracts from roots were evaluated against oral cavity microorganisms. All the extracts evaluated were active against at least one of microorganisms, and *Candida albicans* was sensible at all extracts assayed. Rigidinol exhibited inhibitory activity against *Helicobacter pylori*, as well as 16 β -hydroxypristimerin, which also presented cytotoxic activity against HeLa and A-549 cell lines. Lupeol palmitate was cytotoxic for K-562 cell line. Lupeol caproate inhibited the *H. pylori* growth, as well as the activity of acetylcholinesterase enzyme. This enzyme was also inhibited by 30-hydroxyfriedelan-3-one.

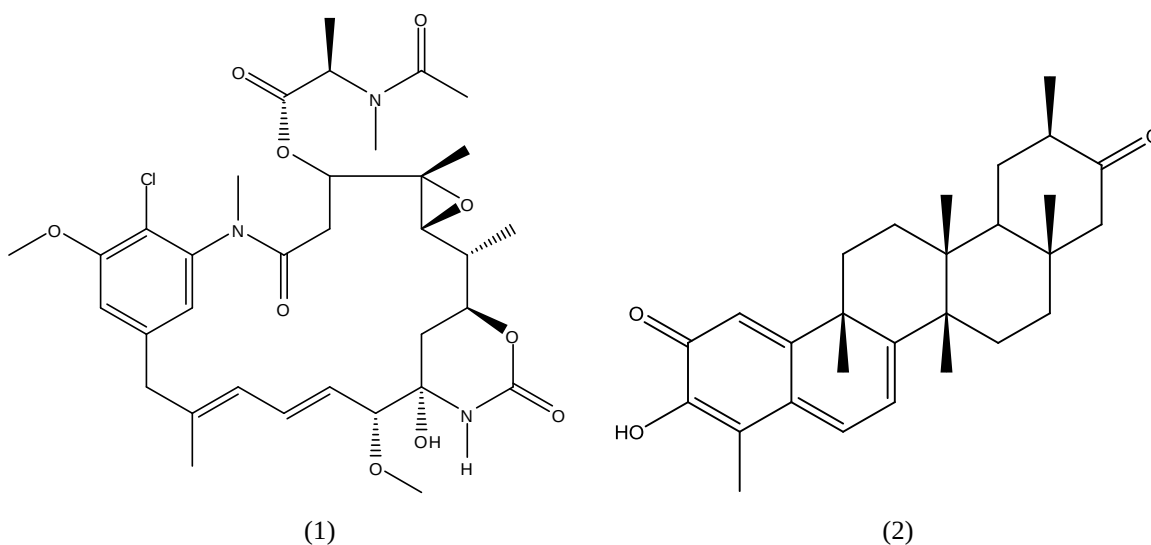
The results obtained contributed for the chemotaxonomic study of Celastraceae family and show that *M. salicifolia* can be an alternative source of compounds that are possible prototypes of drugs that acts in different diseases.

INTRODUÇÃO

A utilização de plantas com fins medicinais para tratamento, cura e prevenção de doenças é uma das mais antigas formas de prática medicinal da humanidade (VEIGA JR e PINTO, 2005). Nos últimos anos tem sido verificado o aumento do interesse científico pelas plantas, principalmente devido à perda acelerada da biodiversidade vegetal (PÉREZ, 2000). Além disso, produtos naturais têm sido úteis como compostos-modelo (“lead structures”) para a obtenção de novos fármacos e para o desenvolvimento de novos agroquímicos (COPPING e DUKE, 2007).

A família Celastraceae é pantropical e constitui-se por ervas, cipós lenhosos, arbustos e árvores que ocorrem em regiões tropicais e subtropicais. A literatura lista cerca de 100 gêneros, com aproximadamente 1.300 espécies (SIMMONS *et al.*, 2008). Além dos atributos medicinais, plantas dessa família apresentam características ornamentais em função da semelhança de suas folhas e frutos com o “azevinho”, utilizado em decorações de natal no hemisfério norte tendo, por essa razão, sido introduzida no paisagismo (SILVA, 2007).

As primeiras pesquisas químicas sobre Celastráceas tiveram início no fim do século XIX, a partir do isolamento da maitansina (1), um alcaloide ansamacrolídeo presente no lenho de plantas do gênero *Maytenus sp.* provenientes da África Oriental e que exibe atividade antitumoral (KUPCHAN *et al.*, 1972). O interesse por essa família foi intensificado com a descoberta da ação antitumoral apresentada pela tingenona (2), um quinonametídeo de natureza



O estudo de espécies da família *Celastraceae* faz parte de um projeto desenvolvido pelo Núcleo de Estudo de Plantas Medicinais (NEPLAM) do Departamento de Química (DQ) da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) e tem por objetivo caracterizar química e biologicamente plantas desta família, principalmente aquelas que ainda não foram submetidas à avaliação fitoquímica e biológica.

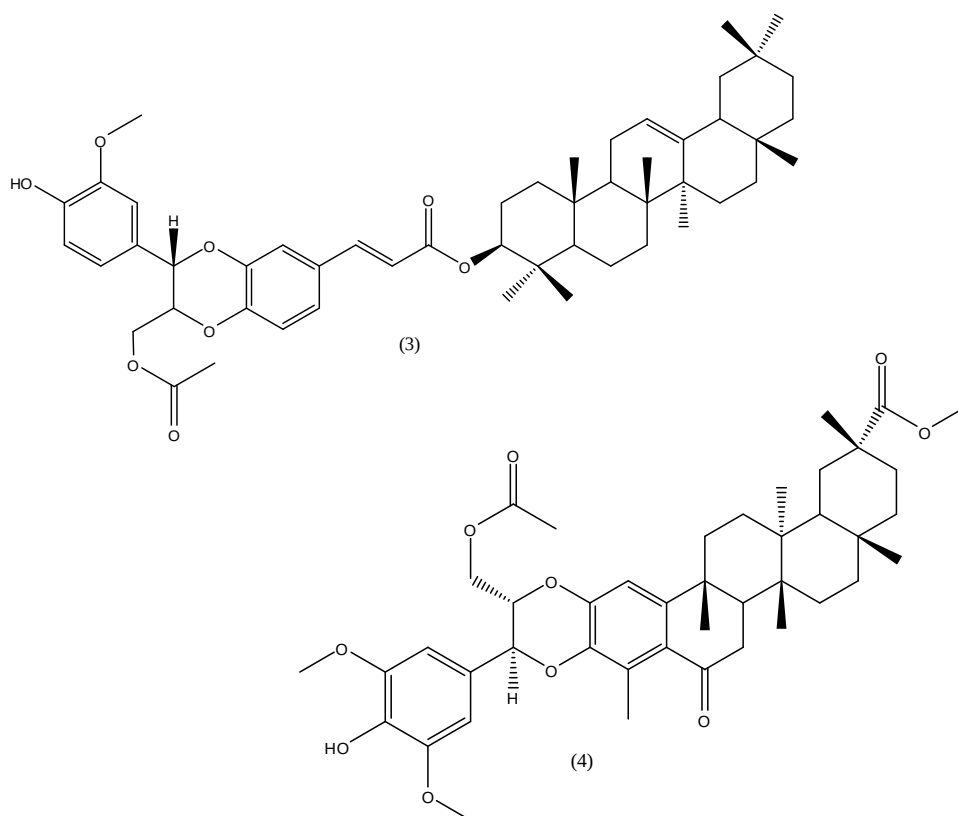
Os gêneros com espécies mais comumente encontradas no Brasil são *Austroplenkia* Juss, *Maytenus* Reiss e *Salacia* Lund. Nos últimos anos, nota-se significativo aumento no interesse por plantas do gênero *Maytenus* Juss, especialmente no Brasil, onde existem 76 espécies catalogadas, que estão amplamente distribuídas em todo o território nacional (NIERO *et al.*, 2011). Dentre as espécies empregadas pela medicina tradicional, destaca-se *Maytenus guyanensis*, encontrada em algumas áreas da floresta Amazônica, principalmente no Peru, Equador e Colômbia, é conhecida como chuchuhuasi, xixuá e chuchasha (REVILLA, 2002). O pó vermelho da casca da raiz dessa planta é usado pelos indígenas na forma de infusão alcoólica como um tônico geral, para o tratamento de reumatismo, como contraceptivo e como afrodisíaco. Para o uso tópico, é empregada como agente antitumoral em câncer de pele e, também, para o tratamento de feridas (DA SILVA, 1990).

O uso medicinal de *Maytenus ilicifolia*, conhecida popularmente como espinheira-santa é datado da década de 1920, quando foram feitos registros escritos de sua utilização. Segundo o uso popular, acredita-se que esta espécie possa combater várias doenças, dentre as quais destacam-se gastrites e dispepsias. Possui ações tônicas, analgésicas, anti-sépticas, cicatrizantes, diuréticas e laxativas. Estudos farmacológicos e clínicos, feitos a partir de 1988 com extratos e compostos isolados de *M. ilicifolia* reportam resultados concordantes com as experiências médicas e populares do passado, no tratamento de queixas dispépticas, e suportam sua eficácia e segurança terapêutica no tratamento dessa enfermidade (OLIVEIRA *et al.*, 2009). A espinheira-santa é um dos poucos fitoterápicos que possuem efeitos farmacológicos comprovados pela Central de Medicamentos (Ceme) do Ministério da Saúde do Brasil, havendo assim total segurança de seu uso (DI STASI, 2004).

Atividades biológicas variadas foram determinadas também para outras espécies do gênero *Maytenus*, tais como atividade inibitória de DNA Polimerase β -liase, determinada para *M. putterlickoides* (FENG *et al.*, 2004). A atividade de proteção solar foi observada em *M. guyanensis* (MACARI *et al.*, 2006). Atividades antileishmania, anti-inflamatória, antimicrobiana e atividade moderada contra HIV-1 protease foram observadas nos extratos de *M. senegalensis* (HUSSEIN *et al.*, 1999; SOSA *et al.*, 2007).

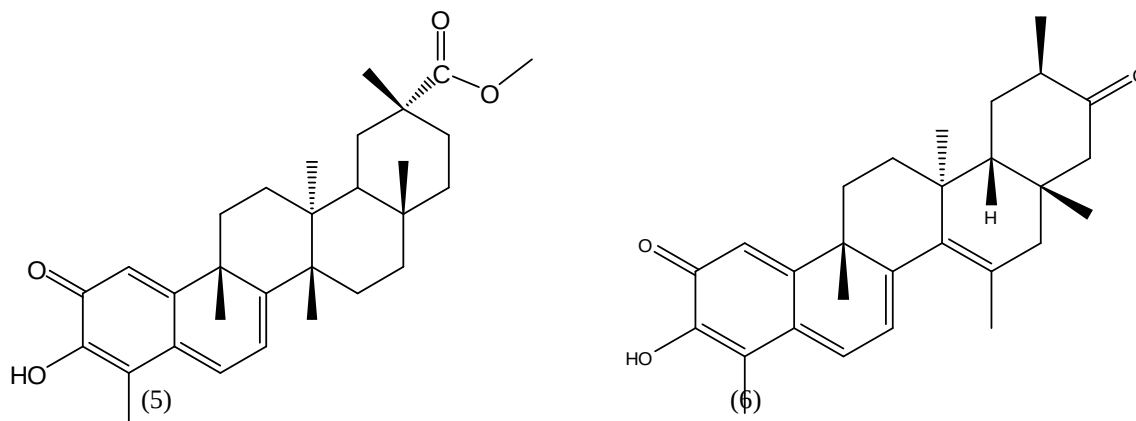
Estudos fitoquímicos de espécies do gênero *Maytenus* reportam a presença de compostos de variadas classes, como alcaloides, sesquiterpenos, taninos condensados e, principalmente, triterpenos pentacíclicos (TTPCs) (NIERO *et al.*, 2011). Os TTPCs exibem atividades biológicas diversificadas, tais como ação anti-inflamatória (REYES *et al.*, 2006) antimicrobiana (CHUNG *et al.*, 2011), hepatoprotetora (SUNITHA *et al.*, 2001) e antitumoral (LAGE *et al.*, 2010), dentre outras.

As espécies de Celastraceae biossintetizam triterpenos diméricos (GONZÁLEZ *et al.*, 1996), triméricos (GONZÁLEZ *et al.*, 1999) e triterpenos unidos a adutos sesquiterpenos octacíclicos (MESA-SIVERIO *et al.*, 2005) provavelmente por reações hetero-Diels-Alder através da formação de um sistema 1-4 dioxano. Uragogina (3), um éster de neolignana unido a triterpeno e blepharodina (4), um arilpropanoide heptacíclico-nor-triterpenofenol, isolados de *Crossopetalum uragoga* e *Maytenus magellanica*, respectivamente, são exemplos de adutos hetero-Diels-Alder construídos com pontes dioxano (NÚÑEZ *et al.*, 2011).



Os quinonametídeos são triterpenos pentacíclicos aparentemente restritos às famílias Celastraceae e Hippocrateaceae (GUNATILAKA, 1986) e, portanto, considerados marcadores químicos destas famílias. Alguns destes compostos foram isolados de raízes de espécies do gênero *Maytenus*, tais como pristimerina (5) e tingenona (1) (*M. acanthophylla*) (OLIVEIRA

et al., 2006) e escutona (6), de *M. scutioides* (GONZÁLEZ *et al.*, 1996). Estes compostos apresentaram atividade citotóxica sobre células de carcinomas de colo de útero e laringe e atividade inseticida (RODRIGUEZ *et al.*, 2005; AVILLA *et al.*, 2000).

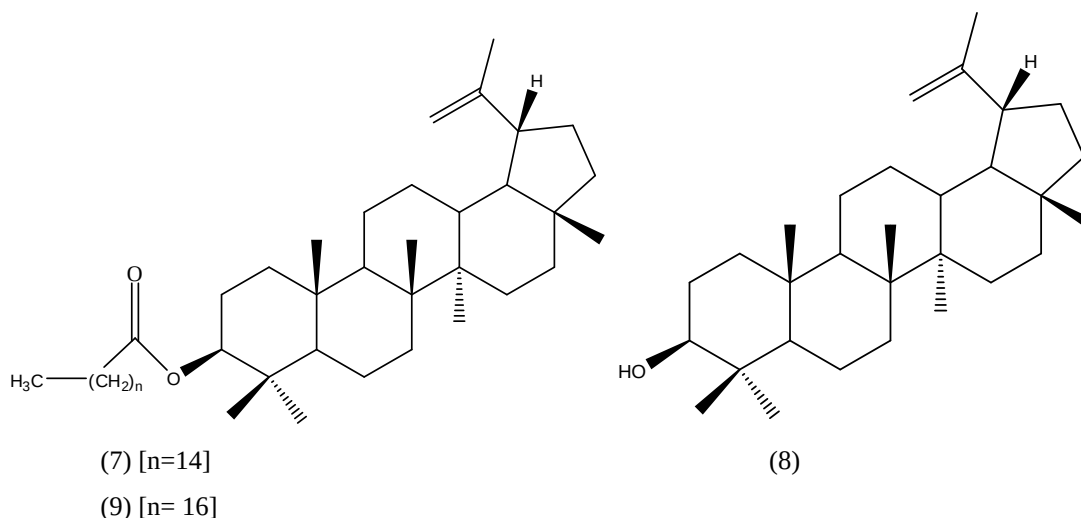


Tendo como base o uso popular de *M. salicifolia* contra patologias, a diversidade de metabólitos secundários ativos e as atividades biológicas encontradas em outras espécies da família e do gênero, deu-se início ao estudo fitoquímico da raiz e tronco desta espécie.

Maytenus salicifolia Reiss. (Fig. 1, p.6; Fig. 2, p.7) pertence à família Celastraceae, é encontrada geralmente em matas do interior dos estados de Minas Gerais, São Paulo e Rio de Janeiro. Em Minas Gerais, esta espécie recebe o nome popular de “cafezinho”. As folhas de *M. salicifolia* são utilizadas popularmente para o tratamento de úlceras estomacais e toda a planta, sob forma de decocto, é empregada em banhos para aliviar pruridos e alergias (CARVALHO e RODRIGUES, 2001). Não foram encontrados na literatura relatos a respeito do estudo fitoquímico da raiz de *M. salicifolia* e poucos dados foram encontrados para os extratos do tronco.

Grande variedade de TTPCs é obtida de espécies da família Celastraceae em quantidades expressivas, o que viabiliza a implantação de diversos estudos de correlação entre estrutura química e atividade biológica. A possibilidade de modificação estrutural desses triterpenos, em especial o aumento da capacidade de interação por ligação de hidrogênio com os sítios receptores, pode induzir à descoberta de derivados com maior atividade biológica que os compostos de partida (OLIVEIRA *et al.*, 2007). Estudos mostraram que ésteres derivados de triterpenos pentacíclicos possuem maior atividade biológica que o triterpeno não esterificado. O éster palmitato de lupeolila (7) mostrou maior atividade no tratamento de

artrite que o lupeol (8) (KWEIFIO-OKAI *et al.*, 1995). Além disso, o linoleato de lupeolila (9) exibiu efeito antitumoral mais relevante que o lupeol (CHATURVEDI *et al.*, 2008).



Tendo em vista que no NEPLAM foi obtida expressiva quantidade de lupeol a partir do extrato hexânico das folhas de *M. salicifolia* (MIRANDA, 2007), tornou-se possível realizar transformações químicas deste triterpeno para obtenção de derivados, principalmente ésteres que possam contribuir em estudos de correlação estrutura química - atividade biológica e toxicológica de derivados lupânicos. A obtenção dos ésteres e a realização de testes biológicos, como antitumoral e anti-inflamatório, se justificam para estes derivados, uma vez que estas atividades já foram verificadas em compostos análogos (CHATURVEDI *et al.*, 2008).

Taxonomia (Reissek) (OKANO, 1992):

Reino: Plantae
Divisão: Embriophyta
Classe: Angiospermae
Ordem: Celastrus
Sub-ordem: Celastrinae
Família: Celastraceae
Gênero: *Maytenus*
Espécie: *M. salicifolia*



Figura 1- Fotos de *Maytenus salicifolia*, exemplar localizado na Serra de Ouro Branco, Minas Gerais. A) aspecto geral dos galhos, frutos e folhas; B) detalhe dos frutos; C) detalhe das folhas; D) e E) fragmentos da raiz (Foto: Cássia Gonçalves Magalhães, 09/2008)

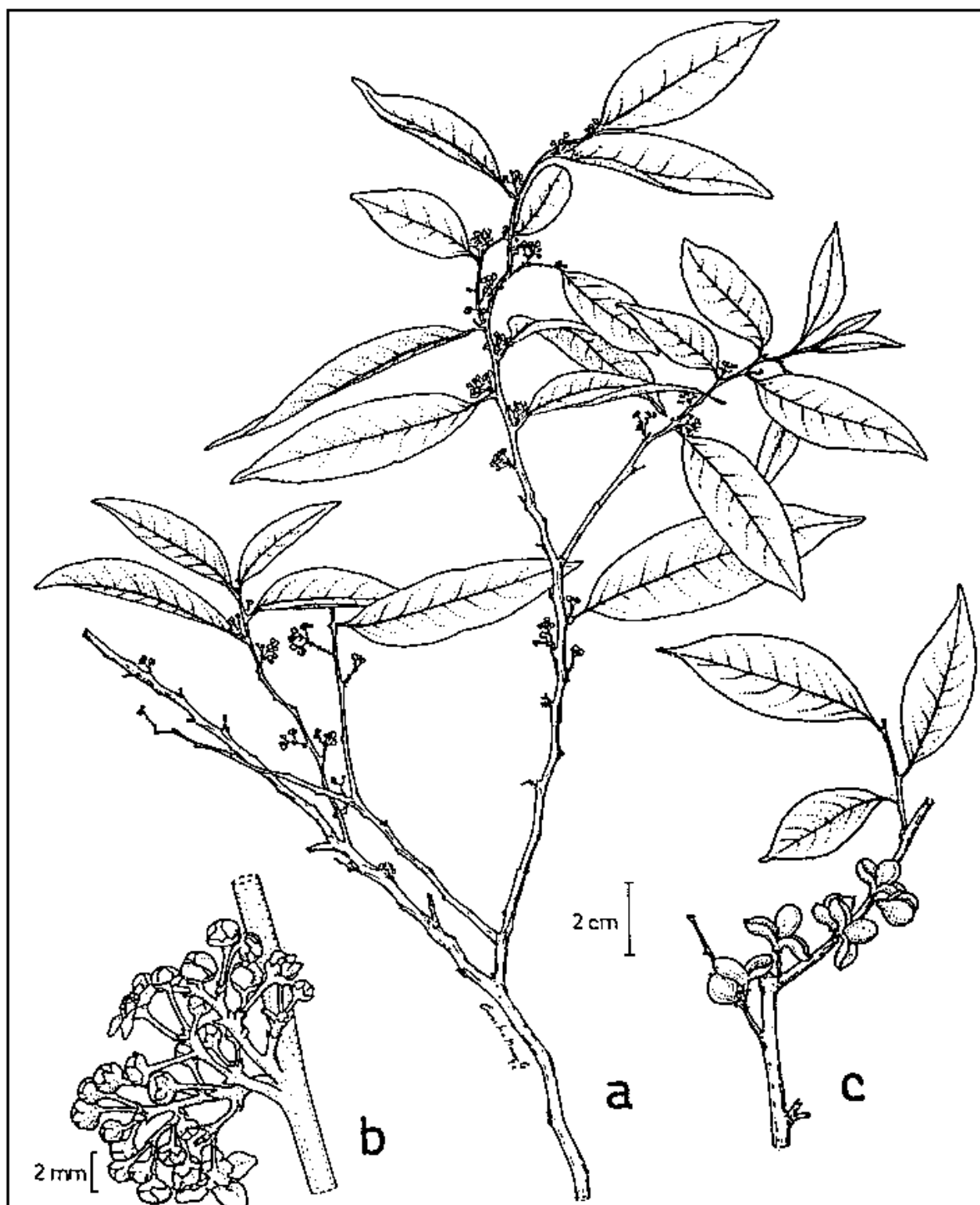


Figura 2 - Representação esquemática da espécie *Maytenus salicifolia* Reiss. (OKANO, 1992 apud MIRANDA, 2007).

OBJETIVOS DO TRABALHO

Os objetivos deste trabalho consistiram na realização do estudo fitoquímico do tronco e raiz de *Maytenus salicifolia*, realização de testes biológicos (envolvendo atividade antimicrobiana e antitumoral, dentre outras) com extratos, frações e constituintes químicos puros isolados da planta e síntese de ésteres derivados do lupeol.

Este trabalho propiciou a continuidade do estudo da relação entre constituição química e potencial biológico de espécies do gênero *Maytenus* e outras espécies da família Celastraceae, de modo a contribuir para o estudo quimiotaxonômico da mesma. Foram feitas também, modificações estruturais em um triterpeno pentacíclico isolado desta planta e, posteriormente, avaliação de atividade biológica dos derivados.

CAPÍTULO 1. ESTUDO FITOQUÍMICO DE *MAYTENUS SALICIFOLIA*

1.1. Materiais e métodos

Os experimentos utilizados neste trabalho envolveram:

- ✓ obtenção de extratos brutos de tronco e raiz por extração a temperatura ambiente, usando solventes de diferentes polaridades, previamente destilados;
- ✓ fracionamento dos extratos por meio de processos cromatográficos;
- ✓ purificação de constituintes químicos através de diferentes processos cromatográficos;
- ✓ elucidação estrutural com o auxílio de métodos espectroscópicos de análise;
- ✓ reações de esterificação do triterpeno pentacíclico lupeol;
- ✓ realização de testes antimicrobianos, leishmanicida, citotóxicos e de inibição da enzima acetilcolinesterase com constituintes isolados ou sintetizados.

Estabeleceu-se como critério de pureza a visualização de uma única mancha em cromatoplas obtidas por cromatografia em camada delgada, utilizando eluentes com diferentes polaridades e, pelo menos, dois tipos de reveladores. Na preparação das cromatoplas utilizou-se suspensão de sílica-gel Merck 60 G em água [7 g para 15 mL], formando camada de 0,25 mm de espessura, sobre suporte de vidro. Após secagem parcial a temperatura ambiente, as placas foram ativadas em estufa a 100 °C por uma hora. Como reveladores de cromatoplas utilizaram-se luz ultravioleta, iodo e pulverização com uma mistura 1:1 (v/v) de uma solução de vanilina em álcool etílico (1:99) e com solução de ácido perclórico em água (3:97), recém misturadas, seguida de aquecimento em estufa a 100 °C. Foram utilizadas também placas de sílica-gel 60 com indicador de fluorescência Polygram-Sil G/UV254, Macherey – Nagel.

Nas cromatografias em coluna de fracionamento dos extratos utilizou-se sílica-gel Merck 60 (70-230 Mesh), onde adotou-se a proporção de 1 g de extrato por 40 g de fase estacionária. A proporção de 1 g de amostra por 100 g de fase estacionária foi utilizada na fase de purificação. Todos os solventes utilizados nos processos de cromatografia em coluna foram de grau analítico (P.A.).

As placas de cromatografia em camada preparativa de sílica-gel foram preparadas com 0,5 mm de espessura.

Para a purificação de algumas amostras, foi utilizada cromatografia planar rotacional, com placas circulares de sílica-gel 60G PF₂₅₄ de 1,0 ou 2,0 mm de espessura, para cromatografia preparativa.

Os testes de Liebermann-Burchard foram realizados para amostras dissolvidas em clorofórmio, com adição de gotas de anidrido acético e, lentamente, gotas de ácido sulfúrico concentrado, apresentando coloração violeta/azul permanente para triterpenos pentacíclicos e coloração esverdeada para esteróides

Pontos de fusão, obtidos em graus Celsius, foram determinados em aparelho Metler FP82 equipado com processador Metler FP800.

Os espectros de absorção na região do ultravioleta foram obtidos em espectrômetro Jasco V-560. A determinação do valor da atividade ótica [α_D] foi realizada em polarímetro Perkin Elmer, modelo 241.

Espectros de absorção na região do infravermelho foram obtidos em espectrômetro Bruker IFS 55 (FTIR) utilizando pastilhas de KBr [a 1 % (m/m)] ou em filme.

Os espectros de RMN de ^1H e de ^{13}C foram obtidos em espectrômetros Bruker Avance III 600, Bruker Avance AMX- 500 (do *Instituto Universitário de Bioorgánica Antonio González* – Espanha), Bruker Avance DRX-400 ou em Bruker Avance DPX-200 MHz. Nos experimentos de RMN foi utilizado como referencial interno, o sinal do tetrametilsilano (TMS). Solventes deuterados utilizados encontram-se indicados em cada caso. Os deslocamentos químicos (δ) foram expressos em partes por milhão (ppm) e as constantes de acoplamento (J), em Hertz (Hz).

Os espectros de massas de alta e baixa resolução foram obtidos em espectrômetro Micromass AutoSpec do *Instituto Universitário de Bioorgánica Antonio González* - Espanha .

1.2. Obtenção do material vegetal e preparo dos extratos de *Maytenus salicifolia*

O tronco e a raiz de *Maytenus salicifolia* Reissek foram coletados de um exemplar localizado na Serra de Ouro Branco, município de Ouro Branco, Minas Gerais, em setembro de 2008. O material coletado foi identificado pela Prof^a. Dra. Rita Maria Carvalho-Okano, do Departamento de Botânica da Universidade Federal de Viçosa (UFV), com a colaboração da Prof^a. Maria Cristina Teixeira, do Departamento de Botânica da Universidade Federal de Ouro Preto (UFOP). Uma exsicata do material encontra-se depositada no Herbário José Badini do Departamento de Botânica da UFOP sob o número 18094.

O material vegetal foi devidamente separado e submetido à secagem em local arejado e à temperatura ambiente. Após secagem completa, as amostras foram moídas e pesadas, dando origem a 2,52 Kg de tronco e 678,05 g de raiz.

A nomenclatura dos extratos foi feita da seguinte forma: letra **E**, para extrato; **H** para hexânico; **C** para clorofórmico; **A** para acetato de etila; **Et** para etanólico, **R** para raiz e **T** para tronco. Para indicar a presença de um sólido foi incluída, na nomenclatura, a letra **S**. Portanto, para identificação da origem do extrato cita-se como exemplo: **EHR** significando Extrato Hexânico da Raiz e **SEHT**: Sólido obtido no Extrato Hexânico do Tronco e assim por diante. A nomenclatura para as substâncias isoladas foi feita utilizando-se as iniciais do nome da espécie em estudo (**MS**) na sequência de obtenção.

1.2.1. Preparação dos extratos da raiz de *M. salicifolia*

A raiz de *M. salicifolia* (678,05 g), seca e triturada, foi submetida à extração exaustiva por maceração durante 15 dias, a temperatura ambiente, primeiro com hexano, depois com clorofórmio, acetato de etila e, finalmente, com etanol. Após filtração e remoção dos solventes, por destilação a pressão reduzida, foram obtidos os respectivos extratos (Figura 3, p.12). Durante a evaporação do hexano de **EHR**, observou-se a formação de um sólido vermelho (**SEHR**; 1,35 g), que foi separado de **EHR** por filtração a pressão reduzida.

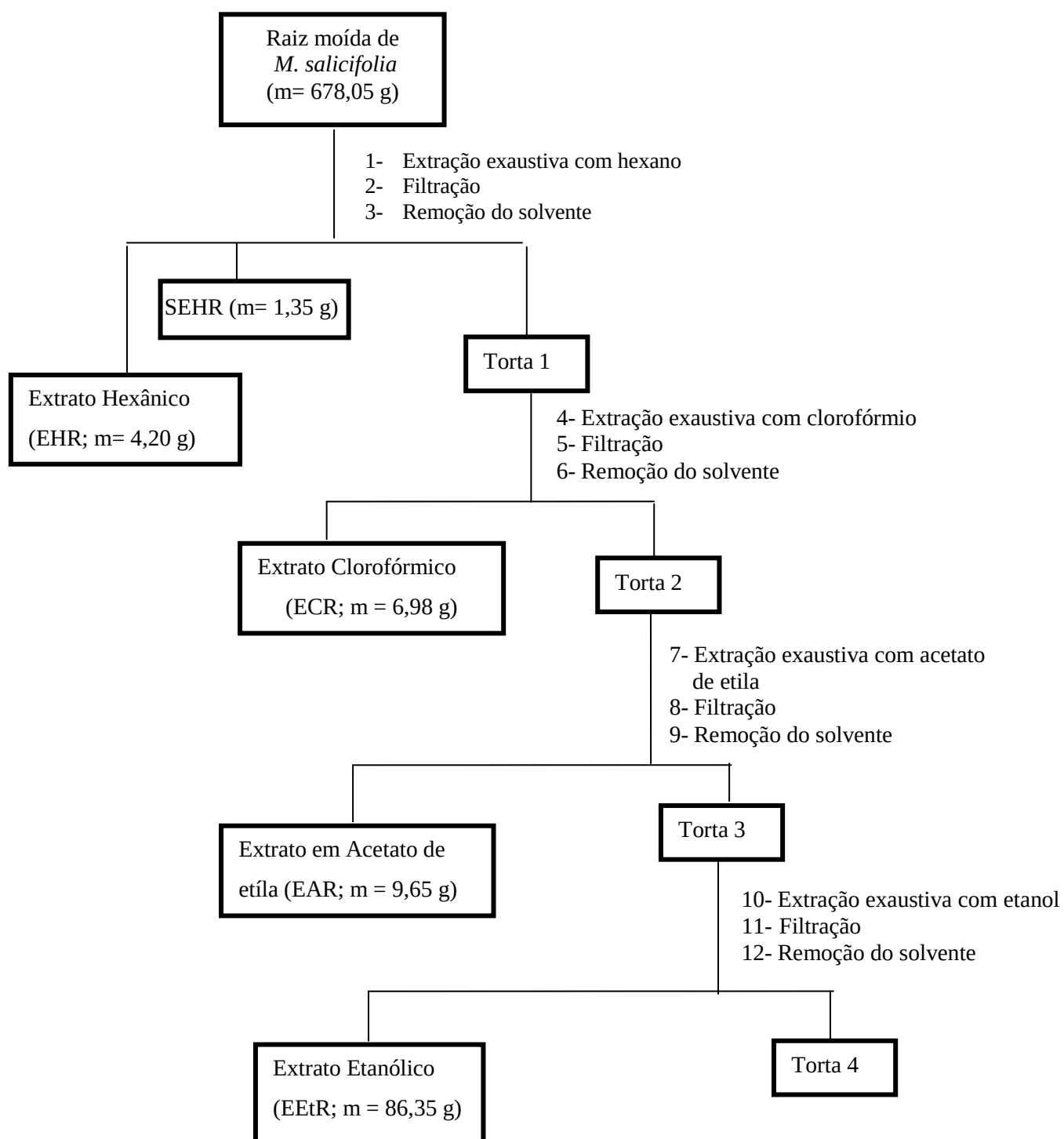


Figura 3 - Sequência da obtenção dos extratos da raiz de *M. salicifolia*.

1.2.2- Preparação dos extratos de tronco de *Maytenus salicifolia*

O tronco de *M. salicifolia* (cascas e madeira; 2,52 kg), seco e pulverizado, foi submetido à extração exaustiva a temperatura ambiente por 15 dias, utilizando-se sucessivamente como solvente hexano, clorofórmio, acetato de etila e etanol. Os extratos foram obtidos por filtração e remoção do solvente por destilação a pressão reduzida (Figura 4).

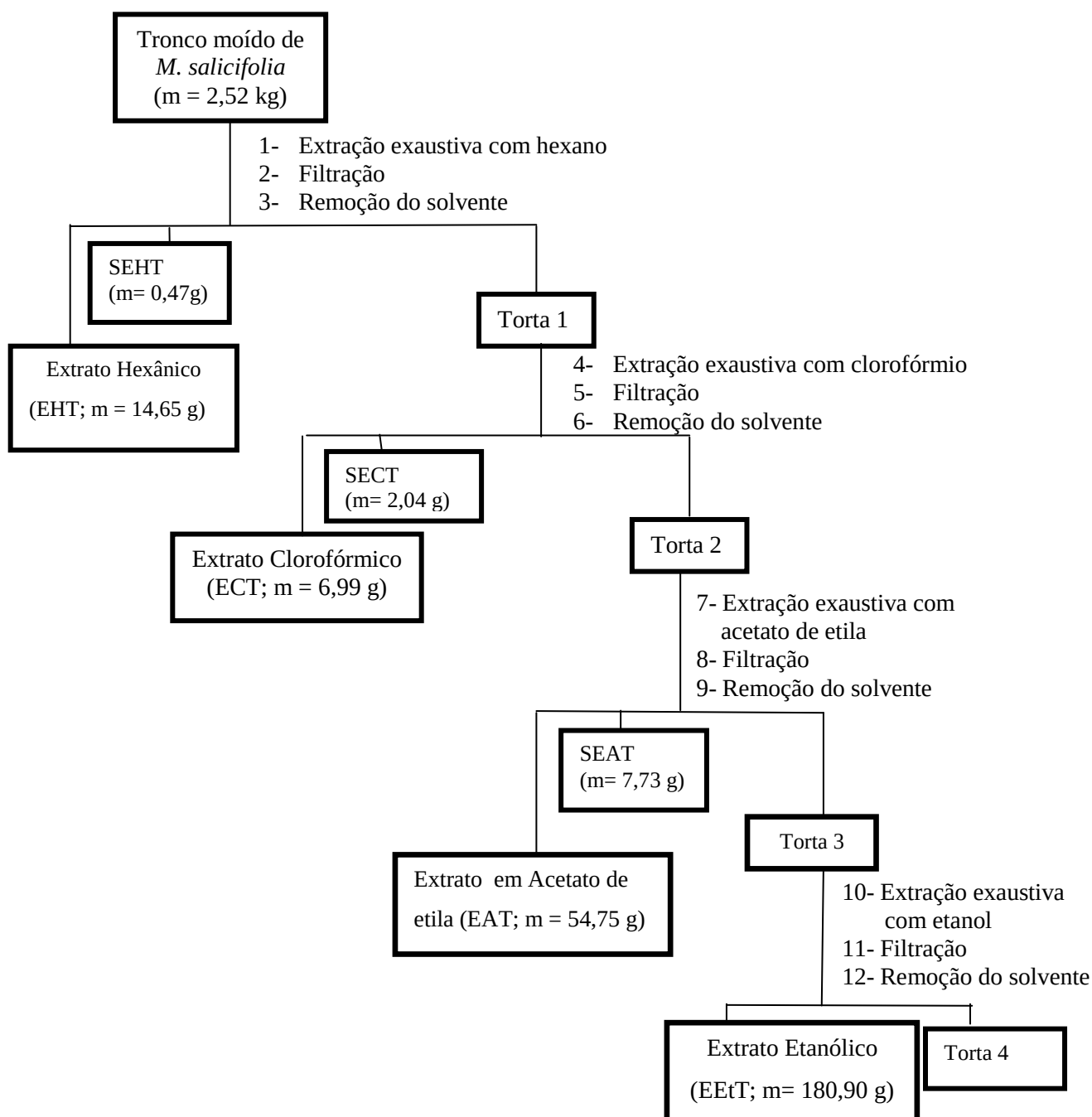


Figura 4 - Sequência de obtenção dos extratos do tronco de *M. salicifolia*.

1.3. Elaboração dos extratos e sólidos oriundos do tronco e raiz de *Maytenus salicifolia*

1.3.1- Elaboração do sólido obtido durante a remoção do solvente do extrato hexânico do tronco de *M. salicifolia*

Durante a remoção do hexano para se obter **EHT**, observou-se a precipitação de um sólido branco (0,47 g), denominado **SEHT**, que foi separado por filtração a pressão reduzida. O sólido apresentou teste de Liebermann-Burchard positivo, indicando a presença de triterpenos pentacíclicos. Este foi submetido à separação cromatográfica, utilizando-se 20,0 g de sílica-gel. Foram coletadas 18 frações de aproximadamente 10 mL cada, utilizando-se como eluente clorofórmio, acetato de etila e depois metanol, puros ou em misturas em ordem crescente de polaridade. Por análise comparativa das frações coletadas foi possível, através de cromatografia em camada delgada de sílica (CCDS) agrupar somente as frações 12 a 16 (**SEHT12**) e as frações 17 e 18 (**SEHT17**). Entretanto, **SEHT12** e **SEHT17** apresentaram massa desprezível e não foram estudadas. As demais frações foram analisadas separadamente.

A fração 3 apresentou-se como um sólido branco que, após análise por RMN, foi identificado como friedelina (**MS1**; 13,0 mg). Na fração 4 também foi observada a presença de friedelina, porém com impurezas.

A fração 7 (293,0 mg) foi recromatografada em coluna de sílica-gel 60 (13,0 g), tendo clorofórmio como eluente. Foram coletadas 28 frações de 5,0 mL cada, obtendo-se um sólido nas frações 9 a 20. Estas foram reagrupadas e a análise deste material por RMN indicou tratar-se de 3,16-dioxofriedelano (**MS2**; 227,0 mg). As frações 22 e 23 foram agrupadas (**MS3**; 27,0 mg) e análises por RMN indicaram tratar-se de 30-hidroxfriedelan-3-ona.

Na Figura 5 (p.15) está esquematizada a elaboração de **SEHT**, apresentando os grupos de frações que levaram à obtenção dos compostos já mencionados previamente.

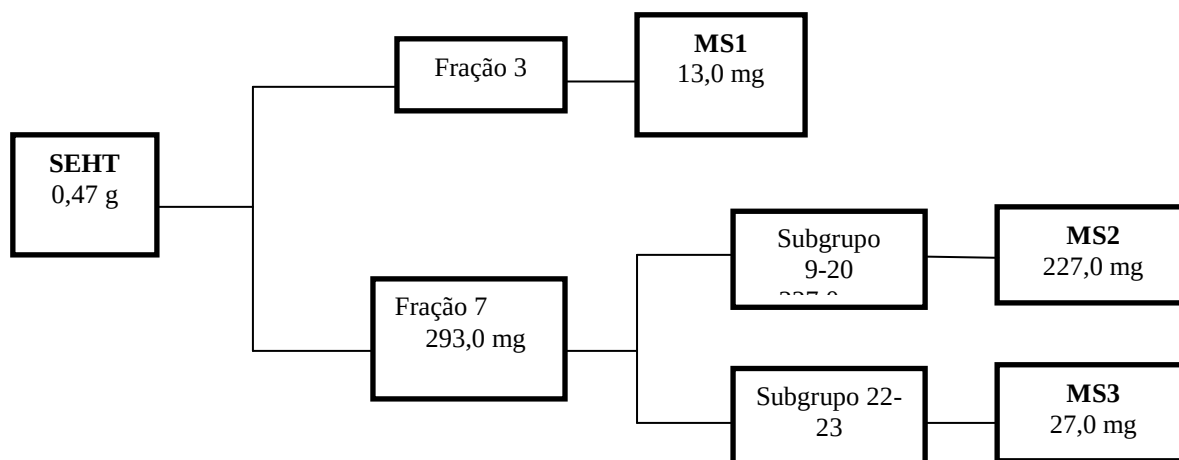


Figura 5: Compostos obtidos de **SEHT** por cromatografia em coluna. **MS1:** friedelina; **MS2:** 3,16-dioxofriedelano; **MS3:** 30-hidroxifriedelan-3-ona.

1.3.2- Elaboração do extrato hexânico do tronco de *Maytenus salicifolia*

O extrato hexânico do tronco de *M. salicifolia* (**EHT**; 14,65 g) apresentou cor verde escura e consistência viscosa. Foi submetido à CC, utilizando-se 586,0 g de sílica-gel 60 (70-230 Mesh) como fase estacionária e como fase móvel hexano, clorofórmio, acetato de etila e, finalmente, metanol, puros ou em misturas de polaridades crescentes. Foram obtidas 52 frações de aproximadamente 200 mL cada. As frações foram reunidas em 14 grupos de acordo com a semelhança do perfil cromatográfico observado através de CCDS. O procedimento de purificação dos grupos estudados é descrito a seguir.

Grupo 6 (fração 29)

Adicionou-se hexano à fração 29 e observou-se a precipitação de sólido esverdeado. Este foi lavado com acetona e tornou-se branco. Após filtração e secagem, a análise dos espectros no IV e de RMN deste sólido (86,0 mg) e comparação com padrões permitiram identificá-lo como 3,16-dioxofriedelano (**MS2**).

Grupo 7 (fração 30)

Esta fração (1,70 g) apresentou-se como um sólido verde escuro pastoso. A análise por CCDS deste grupo indicou que, além de clorofila, havia mais de uma substância presente. Este sólido foi então purificado por CC de sílica-gel 60 (58,0g) e como fase móvel foi utilizada a mistura de $\text{CHCl}_3/\text{AcOEt}$ nas seguintes proporções: (7:1), (6:1), (5:1) e (1:1), finalizando com AcOEt (100%) e MeOH (100%). Foram coletadas 31 frações de 5,0 mL cada. Após análise por CCDS, foi possível reunir as frações em quatro grupos. O terceiro grupo (**G3**, frações 10 a 26) foi lavado com hexano, sendo observada a formação de um sólido branco. A análise por RMN indicou tratar-se de uma mistura onde o composto majoritário é o 28-hidroxilup-20(29)-en-3-ona (**MS4**, 30,0 mg).

Grupo 8 (fração 31)

Esta fração apresentou-se como um sólido branco (137,0 mg). Pela análise por CCDS observaram-se duas manchas na placa. Foi feita purificação por CC, utilizando como fase estacionária sílica-gel 60 (7,0 g) e como sistema eluente uma mistura de hexano e clorofórmio nas proporções de (8:2) e (1:1). Foram coletadas 25 frações de 5 mL cada. Agruparam-se as frações 5 a 12 e 15 a 23. Pela análise por CCDS e comparação com padrões, verificou-se que o primeiro grupo é lupeol (**MS5**, 93,0 mg) e o segundo é 3,16-dioxofriedelano (**MS2**, 34,0 mg).

Grupo 10 (frações 33 a 35)

O grupo 10 (25,0 mg) apresentou-se como um sólido de cor esverdeada, que após ser lavado com hexano, tornou-se branco. Pela análise por CCDS observou-se somente uma mancha na placa. Após análise por RMN, verificou-se que a substância isolada é o lupeol (**MS5**, 20,0 mg).

Grupo 11 (frações 37 e 38)

Este grupo apresentou-se como um sólido de cor esverdeada (20,0 mg), que foi purificado como o grupo anterior. Após confirmação estrutural por RMN, verificou-se que a substância isolada é a betulina (**MS6**; 13,0 mg).

Grupo 12 (fração 40)

Esta fração (2,48 g) apresentou-se como um sólido de cor esverdeada. Por análise por CCDS observou-se que havia mais substâncias presentes além da clorofila. Foi feita uma nova purificação por CC. Desta coluna, onde se utilizaram 100,0 g de sílica-gel 60 (70-230 Mesh) como fase estacionária e como eluente clorofórmio, acetato de etila e finalmente metanol, puros ou em misturas de polaridades crescentes, foram coletadas 67 frações de 5,0 mL cada. Estas foram reunidas em 14 grupos de acordo com a semelhança do perfil cromatográfico observado nas placas de CCDS. Entretanto, apenas os grupos 8 e 14 foram trabalhados devido à alta quantidade de clorofila presente nas outras frações e da pouca quantidade de material isolado. O grupo 8 (fração 41, 32,0 mg) apresentou-se como um sólido branco, insolúvel em clorofórmio. Através de análise por RMN e comparação com dados da literatura (ABDEL, 1999) concluiu-se que este composto é o lup-20(29)-en-3,30-diol (**MS7**; 32,0 mg). O grupo 14 (frações 66 e 67; 20,0 mg) foi identificado por comparação com padrões por CCD como sendo friedelina (**MS1**).

Na Figura 6 (p. 18) está esquematizada a elaboração de **EHT**, enfatizando os grupos de frações que levaram à obtenção dos compostos mencionados previamente.

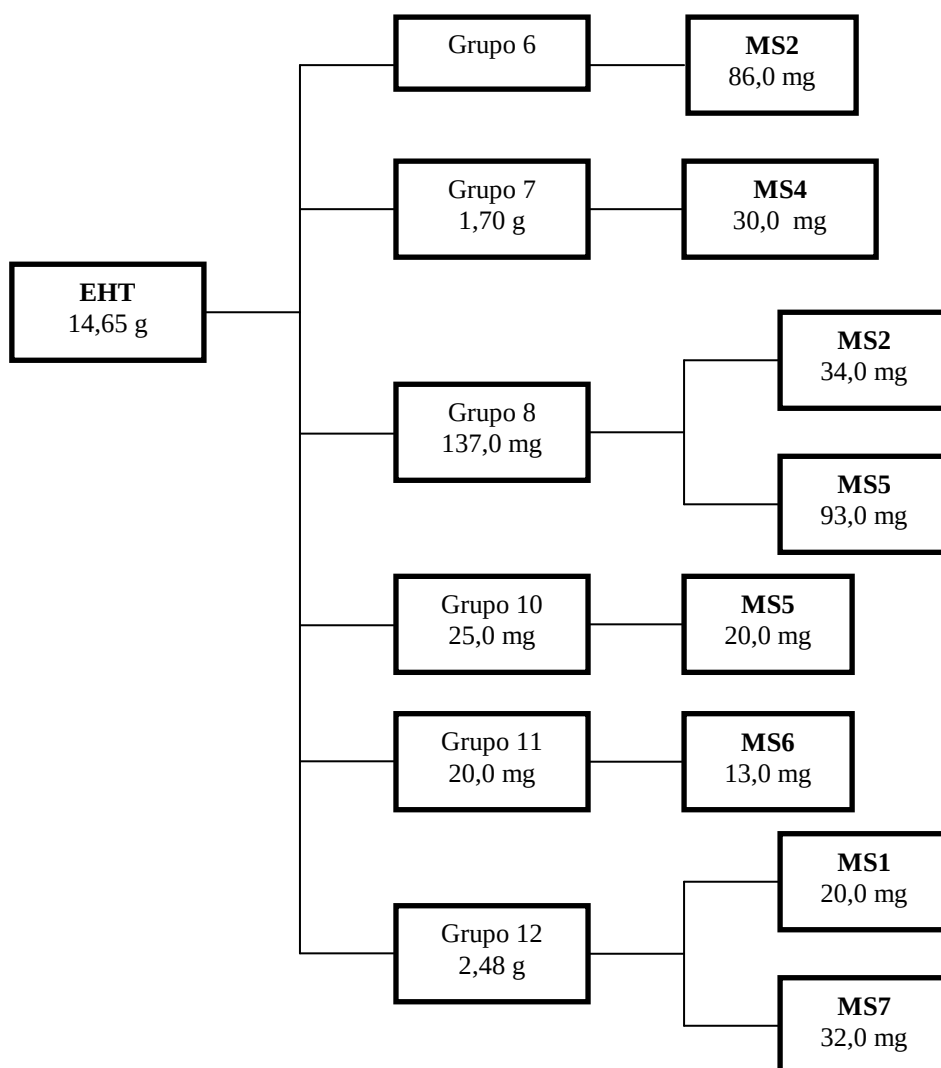


Figura 6: Compostos obtidos de **EHT** por cromatografia em coluna. **MS1:** friedelina; **MS2:** 3,16-dioxofriedelano; **MS4:** 28-hidroxilup-20(29)-en-3-ona; **MS5:** lupeol; **MS6:** betulina; **MS7:** lup-20(29)-en-3,30-diol.

1.3.3- Elaboração do extrato clorofórmico do tronco de *M. salicifolia*

O extrato clorofórmico do tronco de *M. salicifolia* (**ECT**, 6,98 g) foi submetido à cromatografia em coluna de sílica-gel (280,0 g). Foram coletadas 70 frações de aproximadamente 250 mL cada, utilizando como sistema eluente hexano, clorofórmio, acetato de etila e depois metanol, puros ou em misturas em ordem crescente de polaridade. Após análise comparativa por CCDS das frações coletadas, estas foram reunidas em 24 grupos.

Destes, apenas os grupos 18 (**ECT18**, 1,94 g) e 20 (**ECT 20**, 1,41 g) foram estudados, por se mostrarem mais promissores.

Grupo 18

O material deste grupo (**ECT18**; 1,94 g) apresentou-se com aspecto pastoso e de cor verde. Foi purificado por CC, tendo como sistema eluente clorofórmio, acetato de etila e metanol, puros ou em misturas de polaridades crescentes. Foram obtidas 21 frações de 125 mL cada. A fração 5 foi lavada com acetona e, em seguida, observou-se a precipitação de um sólido branco. A análise por RMN e comparação com padrões indicaram tratar-se de 3,16-dioxofriedelano (**MS2**, 15,0 mg).

Grupo 20

O material deste grupo (**ECT20**; 1,41 g) apresentou o mesmo aspecto de **ECT 18** e foi submetido a CC de sílica-gel, utilizando-se como eluentes clorofórmio, acetato de etila e depois metanol, puros ou em misturas em ordem crescente de polaridade. Esta coluna levou à obtenção de 44 frações de 125 mL cada, que foram reunidas em 22 subgrupos. A análise comparativa por CCDS permitiu reunir os subgrupos 8, 9 e 10 (**C28**, 37,5 mg). A fração **C28** foi submetida à CC de sílica-gel, utilizando os eluentes descritos anteriormente. Desta coluna foram obtidas 28 frações de aproximadamente 10 mL cada, as quais foram agrupadas após análise por CCDS em dois subgrupos. O primeiro (**C3A**, 8,4 mg) foi purificado por meio de cromatoplaça preparativa. Após filtração e secagem, foi obtido um sólido branco (3,6 mg), que foi submetido à análise por RMN e identificado como 3-oxo-15 α ,28-di-hidroxilup-20(29)-eno (**MS8**).

Na Figura 7 esquematiza-se a elaboração de **ECT**, enfatizando os grupos de frações que levaram à obtenção dos compostos mencionados previamente.

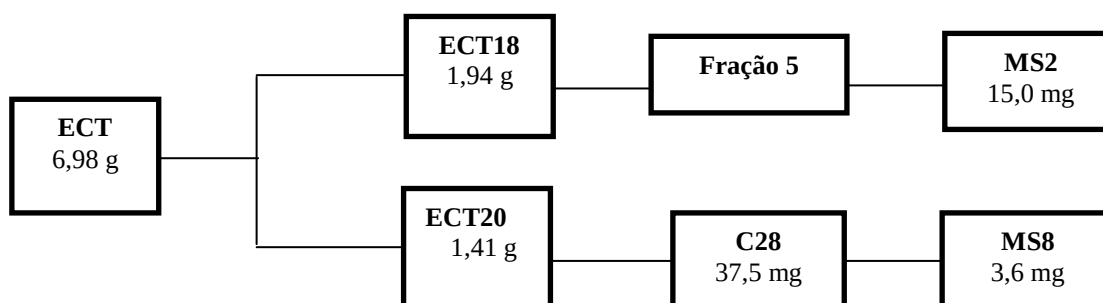


Figura 7: Compostos obtidos de **ECT** por cromatografia em coluna. **MS2**: 3,16-dioxofriedelano; **MS8**: 3-oxo-15- α -28-di-hidroxilup-20(29)-eno.

Foi feita CCDS de **SECT** (2,04 g), porém, nenhuma mancha bem definida referente a qualquer substância foi observada. Assim, esta amostra não foi estudada.

A análise por CCDS de **EAT** e **SEAT** (7,73 g) mostrou que ambos possuíam a mesma constituição química. Assim, trabalhou-se somente **EAT**.

1.3.4- Elaboração do extrato em acetato de etila do tronco de *M. salicifolia*

O extrato em acetato de etila do tronco de *M. salicifolia* (**EAT**; 54,75 g) apresentou cor avermelhada. Foi submetido à CC de sílica-gel 60, onde o sistema eluente utilizado foi a mistura CH₂Cl₂ – AcOEt nas seguintes proporções: 1:0; 4:1; 3:2; 2:3, 1:4; 0:1. Em seguida, utilizou-se acetona 100% e MeOH 100%. Foram recolhidas 19 frações de 500 mL cada. As frações foram reunidas em sete grupos de acordo com a semelhança do perfil cromatográfico observado através de CCDS. Destes, foram estudados os seguintes grupos:

Grupo EA2 (frações 4 e 5)

Este grupo (201,8 mg) se apresentou na placa de CCDS como um ponto bem definido acompanhado de alguma impureza. Após comparação com padrão, definiu-se o composto majoritário deste grupo como β -sitosterol (**MS9**).

Grupo EA4 (fração 10)

EA4 (28,4 mg) se apresentou como um único ponto na placa. A elucidação por RMN indicou tratar-se de 4'-O-metilepigallocatequina (**MS10**).

Grupo EA5 (frações 11 e 12)

Este grupo (2,00 g) apresentou-se na placa de CCDS como um ponto bem definido acompanhado por uma mancha bem menos intensa. Após obtenção do espectros de RMN, verificou-se que a substância majoritária presente era quantidade adicional de **MS10**.

Grupo 6 (frações 13 a 17)

Desta reunião (**EA6**; 23,59 g) foram separados 7,79 g. Esta amostra foi submetida a coluna de sephadex LH-20, cuja fase móvel foi a mistura CHCl_3 1:1 MeOH. A coluna foi finalizada com MeOH 100%. Foram coletadas 42 frações, das quais estudou-se o grupo (26-30; 1,72 g). Deste, uma alíquota de 255 mg foi submetida a cromatografia flash utilizando sílica-gel 60 (ϕ 40-63 μm). A fase móvel utilizada foi a mistura CH_2Cl_2 : AcOEt nas proporções de: 1:0; 3:2; 5,5:4,5; 1:1; aumentando a concentração de AcOEt na taxa de 5% até a proporção 0:1. Foram recolhidas 40 frações, reagrupadas de acordo com o perfil observado na placa de CCDS. Os subgrupos estudados dessa coluna foram:

Subgrupo 1 (frações 20 a 28)

O material deste grupo (23,0 mg) apresentou-se como um único ponto na placa de CCDS. Após análise por RMN, concluiu-se que é quantidade adicional de **MS10**. Este foi o componente mais abundante no extrato (10% em massa).

Subgrupo 3 (frações 30 a 34)

Este subgrupo (20,0 mg) apresentou-se como um ponto bem definido na placa de CCDS. Após análise por RMN, foi identificado como proantocianidina A (**MS11**).

Na Figura 8 (p. 22) está esquematizada a elaboração de **EAT**, enfatizando os grupos de frações que levaram à obtenção dos compostos já mencionados.

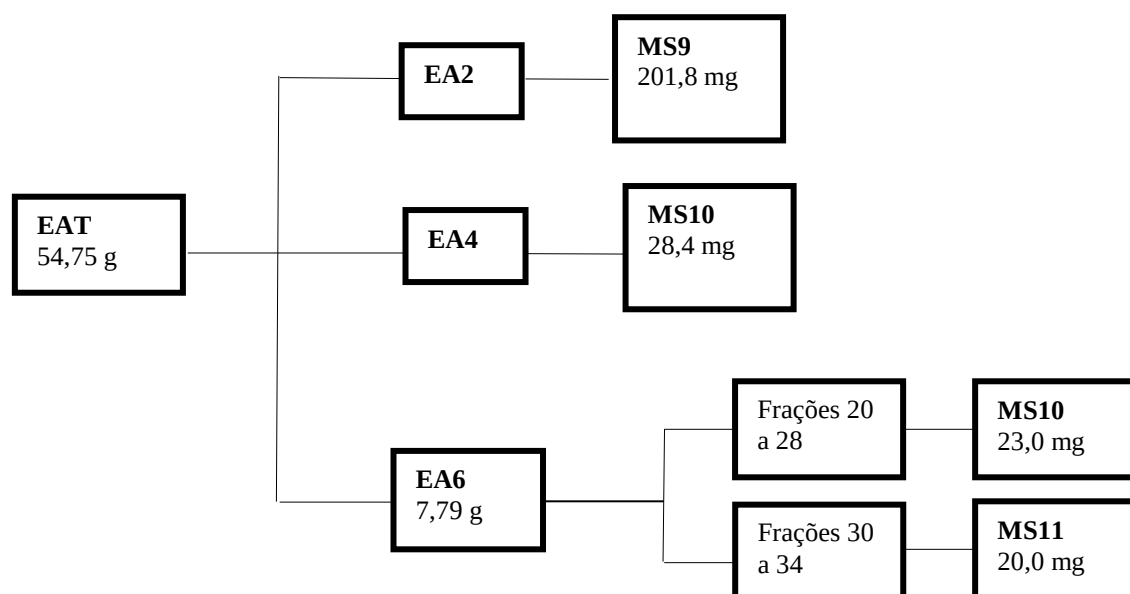


Figura 8 - Compostos obtidos de **EAT** por cromatografia em coluna. **MS9**: β -sitosterol; **MS10**: 4'-O-metilepigallocatequina; **MS11**: proantocianidina A.

1.3.5- Elaboração do extrato etanólico do tronco de *M. salicifolia*

O extrato etanólico do tronco (**EEtT**, 180,90 g) de *M. salicifolia* apresentou-se como um sólido de cor vinho. Foi feita análise comparativa por CCDS de **EEtT** com **MS10** e o extrato em acetato de etila do tronco. Entretanto, a resolução não foi boa e não se observou ponto referente a qualquer composto, mesmo utilizando sistemas eluentes diferentes. Assim, optou-se por não elaborar o extrato.

1.3.6- Elaboração do sólido obtido durante a remoção do solvente do extrato hexânico da raiz de *M. salicifolia*

Durante a remoção do hexano para se obter **EHR**, observou-se a formação de um sólido de cor vermelha (**SEHR**; 1,35 g). Este foi filtrado e submetido à CC, utilizando-se 20,0 g de sílica-gel 60 e, como eluente, hexano, clorofórmio, acetato de etila e depois metanol, puros ou em misturas em ordem crescente de polaridade. Foram coletadas 68 frações

de aproximadamente 10 mL cada. Pela análise comparativa das frações coletadas foi possível, através de CCDS reuni-las em nove grupos. Entretanto, observou-se que apenas o quinto grupo (**SHR5**; 856,0 mg) era mais promissor. **SHR5** foi submetido a CC de sílica-gel 60, tendo como eluente hexano, clorofórmio, acetato de etila e depois metanol, puros ou em misturas em ordem crescente de polaridade. Esta purificação deu origem a 57 frações, que foram reunidas em seis subgrupos, conforme a semelhança observada nas placas de CCDS. Destes, os mais promissores foram estudados.

Subgrupo 1 (frações 1 a 5)

Este subgrupo (133,0 mg) foi submetido a CC de sílica-gel 60, tendo como sistema eluente hexano, clorofórmio, acetato de etila e depois metanol, puros ou em misturas em ordem crescente de polaridade. Esta deu origem a 40 frações, que foram reunidas em quatro subgrupos, conforme a semelhança observada nas placas de CCDS. O subgrupo mais promissor (**SR5A1**; 15,0 mg) foi analisado por comparação com padrões por meio de CCDS e identificado como β -sitosterol (**MS9**).

Subgrupo 2 (frações 6 a 11)

Este subgrupo (507,0 mg) foi submetido a CC de sílica-gel 60, cuja fase móvel foi a mistura CHCl_3 :AcOEt nas seguintes proporções: 1:0, 19:1; 9:1; 4:1; 1:1, 0:1. A coluna foi finalizada com MeOH. Foram recolhidas 28 frações, que foram reunidas em cinco subgrupos de acordo com o perfil apresentado na placa de CCDS. Destes, foram estudados os seguintes subgrupos:

Subgrupo SR5B1 (frações 10 a 12)

Este subgrupo (30,0 mg) apresentou-se como um único ponto na placa de CCDS. Após análise por RMN, foi possível identificá-lo como rigidinol (**MS13**).

Subgrupo SR5B2 (frações 16 a 28)

Este subgrupo (87,0 mg) apresentou o mesmo perfil do subgrupo anterior, porém com distinto Rf. Após análise por RMN, foi possível concluir que é tingenona (**MS12**).

A Figura nove esquematiza a elaboração de **SEHR**, enfatizando os grupos de frações que levaram à obtenção dos compostos mencionados previamente.

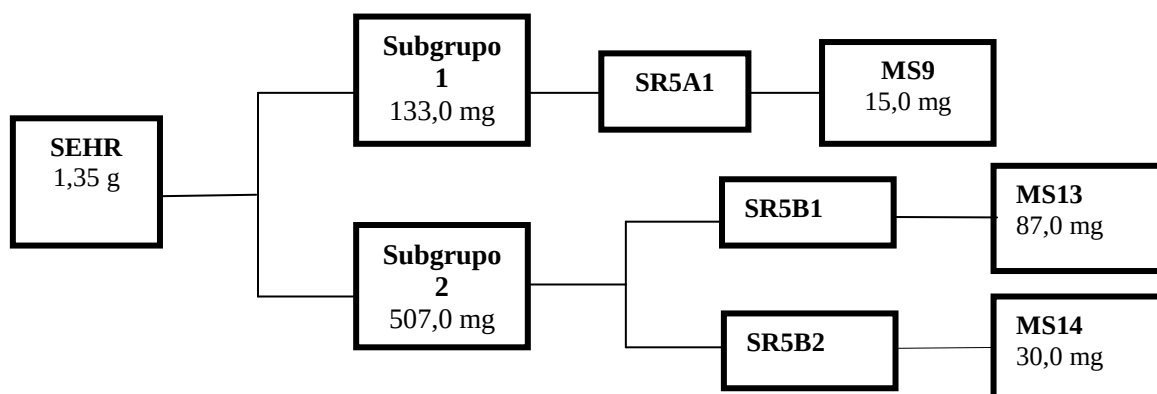


Figura 9- Compostos obtidos de **SEHR** por cromatografia em coluna. **MS9**: β -sitosterol; **MS12**: tingenona; **MS13**: rigidinol.

1.3.7- Elaboração do extrato hexânico da raiz de *Maytenus salicifolia*

O extrato hexânico da raiz de *M. salicifolia* (**EHR**, 4,20g) apresentou-se como um sólido avermelhado. Foi submetido à cromatografia em coluna de sílica-gel 60, cuja fase móvel foi a mistura diclorometano – acetona nas seguintes proporções: 100:0, 95:5, 90:10, 80:20 e 0:100. A coluna foi finalizada com 100 mL de MeOH. Foram coletadas seis frações, que foram submetidas a sucessivas purificações.

Fração 1

O material da fração 1 (45,0 mg) apresentou-se como um sólido amarelo e, por estar impuro, foi submetido à CCDS preparativa. O sistema eluente foi a mistura C_6H_{14} - CH_2Cl_2 (4:1). Contudo, não foi isolada substância pura deste grupo.

Fração 2

A fração 2 (250,0 mg) apresentou-se como um sólido de cor alaranjada. Foi submetido à CC de sílica-gel 60, cuja fase móvel utilizada foi 15 mL da mistura hexano:AcOEt nas seguintes proporções: 1:0, 39:1, aumentando-se a concentração de AcOEt na taxa de 2% até 3:1. Em seguida, utilizou-se AcOEt 100%. A coluna foi finalizada com MeOH. Foram obtidas 44 frações, que foram agrupadas de acordo com a semelhança apresentada na placa de CCDS. Das reuniões formadas, estudou-se o subgrupo **ER2**.

O material deste subgrupo (frações 2 a 6; 60,0 mg) apresentou-se como um sólido vermelho. Este foi submetido a CC de sílica-gel 60, utilizando-se 15 mL da mistura hexano / éter etílico como fase móvel nas proporções de: 100:0, 98:2, aumentando-se a concentração de éter etílico na taxa de 1% até 90:10. Em seguida utilizaram-se as proporções 88:12, 85:15 e 70:30. A coluna foi finalizada com 15 mL de AcOEt. Foram recolhidas 40 frações, reagrupadas segundo a semelhança apresentada nas placas de CCDS. Estes resultaram em dois subgrupos.

Subgrupo **ER2A** (frações 5 e 6)

ER2A (20 mg) foi submetido a CCDS preparativa, tendo como sistema eluente a mistura hexano /CH₂Cl₂ (7:3). Foi isolado o composto **MS14** que foi identificado após análise por RMN como lupenona (9,0 mg).

Subgrupo **ER2B** (frações 8 a 13)

Este subgrupo (18,3 mg) foi submetido a CCDS preparativa, cuja fase móvel foi a mistura hexano/AcOEt (9:1). Dessa purificação, foi isolado o composto **MS15**, identificado após análise por RMN como ferruginol (1,0 mg).

Fração 3

Esta fração (2,03 g) apresentou-se como um sólido vermelho e foi submetido a coluna de sephadex LH-20; a fase móvel foi a mistura C₆H₁₄:CHCl₃:MeOH (2:1:1). Foram recolhidas 24 frações de 20 mL cada, reunidas conforme a semelhança apresentada nas placas de CCDS. Foram obtidos cinco subgrupos, dos quais quatro foram estudados.

Subgrupo **ER3** (frações 1 a 5; 429,7 mg)

Este subgrupo foi submetido a CC de sílica-gel 60, tendo como sistema eluente 50 mL da mistura C_6H_{14} : AcOEt nas seguintes proporções: 100:0, 98:2, aumentando a concentração de AcOEt na taxa de 2% até 80:20. Em seguida, foram utilizadas as proporções 70:30, 50:50 e AcOEt 100%. A coluna foi finalizada com 50 mL de MeOH. Foram recolhidas 61 frações, que foram reagrupadas pelo procedimento descrito anteriormente, resultando em quatro subgrupos. A purificação do subgrupo mais promissor dessa coluna é descrita a seguir.

Subgrupo **ER3B** (frações 13 a 21)

Este subgrupo (99,7 mg) foi submetido a CC de sílica-gel 60, tendo como sistema eluente 15 mL da mistura CH_2Cl_2 : AcOEt nas proporções de: 100:0; 99:1; 97,5:2,5; 95:5; 92,5:7,5, 92:8, 90:10, 80:20, 50:50 e AcOEt 100%. A coluna foi finalizada com 10 mL de MeOH. Foram recolhidas 27 frações, que foram reunidas segundo a semelhança apresentada nas placas de CCDS. Dessas reuniões, estudou-se apenas a reunião das frações 1 a 4 (20 mg). Esta foi submetida a CCDS preparativa, sendo utilizada como fase móvel CH_2Cl_2 . Desta cromatografia foi isolada quantidade adicional de **MS13** (2,0 mg).

Subgrupo **ER3D** (frações 43 a 61)

Esta reunião (205,8 mg) apresentou um único ponto na placa. Foi feita comparação com padrão e identificado como pristimerina (**MS16**).

Subgrupo **ER4** (frações 6 a 9)

Este subgrupo **ER4** (677,0 mg) foi submetido a CC de sílica-gel 60 tendo como fase móvel 100 mL da mistura C_6H_{14} : AcOEt nas seguintes proporções: 100:0; 97,5:2,5, aumentando a proporção de AcOEt na taxa de 2,5% até 80:20. Em seguida, utilizaram-se as proporções 75:25, 60:40 e AcOEt 100%. A coluna foi lavada com 100 mL de MeOH, perfazendo um total de 33 frações coletadas. Estas foram reagrupadas conforme o perfil apresentado nas placas de CCDS, resultando em seis subgrupos, dos quais os mais promissores foram submetidos a novas purificações.

Subgrupo **ER4B** (frações 3 a 6)

Este subgrupo (26,8 mg) foi submetido a CCDS preparativa, cuja fase móvel foi CH_2Cl_2 . Dessa cromatografia foi isolado o composto **MS17** que, após análise por RMN, foi identificado como gloquidona (3,5 mg).

Subgrupo **ER4C** (frações 7 e 8)

Este subgrupo (13,6 mg) foi submetido a purificação pelo mesmo método usado para **ER4B**. O composto **MS18** foi isolado, sendo identificado como glutinol (3,0 mg).

Subgrupo **ER4D** (frações 9 a 11)

Este subgrupo (66,1 mg) foi submetido a CC isocrática de sílica-gel 60. A fase móvel utilizada foi CH₂Cl₂. Foram coletadas 20 frações, agrupadas de acordo com a semelhança apresentada nas placas de CCDS. Desta coluna, resultaram quatro subgrupos, dos quais dois foram estudados:

Subgrupo **ER4D1** (frações 5 e 6)

Este subgrupo (19,4 mg) foi submetido a CCDS preparativa utilizando-se como fase móvel CH₂Cl₂. Desta cromatografia foi isolado **MS19**, que foi identificado por análise de RMN como friedelan-1,3-diona (2,2 mg).

Subgrupo **ER4D2** (frações 8 a 10)

Este subgrupo (17,2 mg) foi submetido a CCDS preparativa cuja fase móvel foi a mistura C₆H₁₄ /AcOEt (4:1). Desta cromatografia foi isolada quantidade adicional de lupeol (**MS5**; 3,7 mg).

Subgrupo **ER4E** (frações 12 a 15)

Esta reunião (147,9 mg) foi submetida a separação por cromatotron. Utilizou-se placa de sílica-gel 60 G de 1,0 mm de espessura. A fase móvel utilizada foi 150 mL da mistura hexano/éter etílico (7:3). A cromatografia foi finalizada com 70 mL de AcOEt. Foram recolhidas 40 frações, reunidas em quatro subgrupos, dos quais os mais promissores foram estudados.

Subgrupo **ER4E2** (frações 19 a 25)

Este subgrupo (23,9 mg) foi submetido a CCDS preparativa tendo como fase móvel a mistura CH₂Cl₂/AcOEt (98:2). Desta cromatografia foi possível isolar o composto **MS20** que, após análise por RMN, foi identificado como 11 α -hidroxigloquidona (4,6 mg).

Subgrupo **ER4E3** (frações 26 a 33)

Este subgrupo (61,0 mg) foi submetido a CC de sílica-gel 60, tendo como fase móvel a mistura CH₂Cl₂ : AcOEt nas proporções de 100:0, 100:1, 50:1, 33:1, 25:1, 20:1, 16:1, 14:1, 12:1, 11:1, 10:1. A coluna foi finalizada com 2,0 mL de AcOEt 100%. Foram recolhidas 20 frações, das quais a terceira até a décima primeira foram identificadas, após comparação com padrão, por CCDS, como quantidade adicional de β -sitosterol (**MS9**, 17,0 mg).

Subgrupo **ER4F** (frações 16 a 33)

ER4F (386,6 mg) foi submetido à CC de sílica-gel 60, cujo sistema eluente foi 50 mL da mistura CH₂Cl₂ : AcOEt nas seguintes proporções: 100:0; 99,96:0,04; 99,92:0,08; aumentando a concentração de AcOEt na taxa de 0,04% até 99,8:0,2. Em seguida, a mesma mistura foi utilizada nas proporções 99,3:0,7; 99,6:0,4; 99,2:0,8; 98,8:1,2; 80:20 e AcOEt 100%. A coluna foi finalizada com 50 mL de metanol. Foram obtidas 48 frações, reunidas em cinco subgrupos.

Subgrupo **ER4F2** (frações 14 a 18)

Esta reunião (20,0 mg) foi submetida à CCDS preparativa, cuja fase móvel foi a mistura CH₂Cl₂ – AcOEt (98:2). Desta cromatografia, isolou-se um produto que, após comparação com padrão, foi identificado como quantidade adicional de **MS9** (2,0 mg).

Subgrupo **ER4F4** (frações 34 a 42)

Este subgrupo (63,3 mg) apresentou-se na placa de CCDS como um único ponto. Foi identificado, após comparação com padrão, como quantidade adicional de **MS13**.

Subgrupo **ER4F5** (frações 43 a 48)

ER4F5 (39,0 mg) foi submetido à CCDS preparativa. A fase móvel utilizada foi a mistura hexano/éter etílico (3:2). Desta cromatografia, foram obtidos dois produtos que foram identificados, após análise por RMN, como pristimerina (**MS16**, 1,5 mg) e tingenona (**MS12**, 2,0 mg).

Subgrupo ER5 (frações 10 a 12)

Este subgrupo (543,2 mg) foi submetido a CC de sílica-gel 60, como fase móvel, 50 mL da mistura hexano/éter etílico nas proporções de 1:0; 9:1, 22:3; 17:3; 4:1, aumentando a proporção de éter etílico na taxa 2% até 7:3. Em seguida, utilizou-se a mesma mistura nas proporções 13:7, 3:2; 2:3 e 0:1. A coluna foi finalizada com 50 mL de acetona e logo após, 40 mL de metanol. Foram recolhidas 54 frações, agrupadas segundo o perfil apresentado na placa. Estas deram origem a cinco subgrupos.

Fração ER5A

Esta fração (3,0 mg) apresentou-se como uma mancha bem definida, acompanhada de uma segunda mancha mais clara na placa de CCDS. Após análise por RMN, concluiu-se que **ER5A** é constituída principalmente por 11 α -hidroxigloquidona (**MS20**).

Subgrupo ER5B (frações 23 a 26)

Esta amostra (20,0 mg) foi submetida a CCDS preparativa, cuja fase móvel foi a mistura hexano/éter etílico (3:7), resultando em quantidade adicional de rigidinol (**MS13**; 2,0 mg).

Subgrupo ER5C (frações 27 a 32)

Este subgrupo (203,5 mg) foi submetido à purificação em cromatotron, utilizando-se placa de sílica-gel 60 G de 2,0 mm de espessura. O sistema eluente empregado foi 200 mL da mistura hexano/éter etílico (2:3). A purificação foi finalizada com 40 mL de acetona e 40 mL de metanol. Foram recolhidas 50 frações, agrupadas segundo o perfil apresentado nas placas de CCDS. Obtiveram-se cinco subgrupos, dentre os quais dois foram estudados.

Subgrupo ER5C1 (frações 1 a 3)

Este subgrupo (3,0 mg) foi analisado por RMN, indicando tratar-se de quantidade adicional de **MS13**.

Subgrupo ER5C2 (frações 9 a 14)

ER5C2 (15,0 mg) foi submetido a CCDS preparativa, cuja fase móvel foi a mistura CH₂Cl₂ /acetona (25:1). Obteve-se **MS21** (2,0 mg) que, após análise por RMN, foi identificado como gloquidonol.

Subgrupo **ER5D** (frações 33 a 44)

Este subgrupo (23,8 mg) foi submetido a CCDS preparativa, cujo sistema eluente foi a mistura hexano/éter etílico (3:7). Desta purificação foram obtidas quantidades adicionais de **MS20** (5,0 mg) e **MS13** (3,0 mg), identificadas por comparação com padrões.

Subgrupo **ER5E** (frações 45 a 50)

Este subgrupo (12,0 mg) apresentou-se como um único ponto na placa de CCDS. A análise estrutural por RMN deste composto indicou tratar-se de 29-hidroxifriedelan-3-ona (**MS22**).

Subgrupo **ER6** (frações 13 a 22)

ER6 (217,0 mg) foi submetido a separação por cromatotron. Utilizou-se uma placa de sílica-gel 60 G de 2,0 mm de espessura. A fase móvel empregada foi 350 mL da mistura C₆H₁₄/AcOEt (17:3). Este procedimento foi finalizado com 50 mL de AcOEt 100% e 40 mL de MeOH. Foram recolhidas 73 frações, reagrupadas em cinco subgrupos, segundo a semelhança observada nas placas de CCDS.

Subgrupo **ER6A** (frações 3 a 11)

ER6A (12,9 mg) foi submetido a CCDS preparativa, cuja fase móvel foi a mistura C₆H₁₄/AcOEt (4:1). Deste procedimento foi isolado **MS23** que, após análise por RMN, foi identificado como pinostrobina (3,2 mg).

Subgrupo **ER6B** (frações 12 a 23)

A purificação de **ER6B** (11,4 mg) também foi feita por CCDS preparativa, cuja fase móvel foi a mistura C₆H₁₄/AcOEt (3:1). Deste procedimento foi isolado o composto **MS24**, que após análise por RMN foi identificado como um aduto inédito denominado salicassina (4,2 mg).

Subgrupo ER6C (frações 31 a 43)

Este subgrupo (13,5 mg) foi submetido a CCDS preparativa, cuja fase móvel foi a mistura $C_6H_{14}/AcOEt$ (4:1). Desta purificação foi isolada quantidade adicional de **MS16** (2,0 mg).

Subgrupo ER6D

A purificação de **ER6D** (frações 58 a 73; 20,0 mg) foi feita pelo método usado no subgrupo anterior, diferindo somente na fase móvel (hexano/éter etílico 4:1). Desta cromatografia, foi isolada quantidade adicional de **MS12** (1,8 mg).

Fração 4

A fração **4** (1,13 g) foi submetida a cromatografia em coluna de sephadex LH-20, cuja fase móvel foi a mistura $C_6H_{14}-CHCl_3-CH_3OH$ (2:1:1). Foram recolhidas 17 frações de 20 mL cada. Estas foram agrupadas segundo o perfil apresentado na placa de CCDS, resultando nos seguintes subgrupos:

Subgrupo ER7 (frações 4 a 7)

Este subgrupo (643,3 mg) foi submetido a CC de sílica-gel 60, cujo sistema eluente foi 50 mL da mistura hexano / $AcOEt$ nas seguintes proporções: 9:1, 17:3, 4:1, aumentando a proporção de $AcOEt$ na taxa de 2,5% até 7:3. Continuou-se com a mistura nas proporções 13:7, 3:2 e 0:1. A coluna foi finalizada com 50 mL de metanol. Foram recolhidas 18 frações, que foram reagrupadas em quatro subgrupos, de acordo com a semelhança observada nas placas de CCDS.

Subgrupo ER7A (frações 4 a 6)

ER7A (240,4 mg) foi submetido a separação em cromatotron. Empregou-se uma placa de sílica-gel 60 G de 2,0 mm de espessura e 250 mL da mistura hexano éter /etílico (7:3) como fase móvel. A separação foi finalizada com 43 mL de $AcOEt$. Foram recolhidas 73 frações, que foram agrupadas em cinco subgrupos, segundo o perfil observado nas placas de CCDS.

Subgrupo **ER7A1** (frações 27 a 29)

Este subgrupo (3,6 mg) apresentou-se como um único ponto na placa de CCDS. Foi submetido a análise por RMN e identificado como quantidade adicional de **MS20**.

Subgrupo **ER7A2** (frações 38 a 41)

ER7A2 (35,0 mg) foi submetido a CCDS preparativa, tendo como fase móvel CH_2Cl_2 100%. Desta purificação foi possível isolar quantidade adicional de **MS13** (5,0 mg) e **MS12** (3,0 mg).

Subgrupo **ER7A3** (frações 42-47)

Este subgrupo (22,5 mg) apresentou-se como um ponto bem definido na placa de CCDS, acompanhado de uma mancha menos intensa. Após comparação por CCDS, constatou-se que o produto majoritário é **MS13**.

Subgrupo **ER7A4** (frações 68 a 70)

Este subgrupo (10,0 mg) apresentou perfil similar a **ER7A3**. Após análise por RMN, verificou-se que o composto majoritário é **MS9**.

Subgrupo **ER7A5** (frações 71 e 72)

ER7A5 (3,0 mg) apresentou-se como um único ponto na placa de CCDS. Após comparação com amostra autêntica em CCDS, constatou-se que o composto é **MS16**.

Subgrupo **ER7B** (frações 7 e 8)

Este subgrupo (96,5 mg) foi submetido a purificação por cromatotron. Empregou-se placa de sílica-gel com gesso de 1,0 mm de espessura e como fase móvel, 175 mL da mistura hexano/acetona (17:3). O fracionamento foi finalizado com 50 mL de acetona. Foram obtidas 54 frações, reagrupadas em quatro subgrupos, de acordo com a semelhança observada nas placas de CCDS. Destes, os mais promissores foram estudados.

Subgrupo **ER7B2** (frações 31 a 42)

Este subgrupo (28,0 mg) foi submetido a CCDS preparativa utilizando como sistema eluente a mistura hexano/éter etílico (3:2). Desta cromatografia foi possível isolar um

composto, que foi analisado por RMN. Os dados observados permitiram identificar **ER7B2** como 30-hidroxilupenona (**MS25**, 2,0 mg)

Subgrupo **ER7B3** (frações 44 a 48)

Este subgrupo (23,4 mg) foi purificado pelo método usado para **ER7B2**. Após comparação com padrão e análise por RMN, concluiu-se que **ER7B2** é quantidade adicional de **MS22** (2,0 mg).

Subgrupo **ER7B4** (frações 49-54)

Este subgrupo (27,9 mg) apresentou-se como único ponto na placa de CCDS. A comparação com padrão levou a concluir que **ER7B4** é quantidade adicional de **MS9**.

Subgrupo **ER7C** (frações 9 a 11)

Esta reunião (179,1 mg) foi submetida a purificação por cromatotron em placa de sílica-gel 60 G de 2,0 mm de espessura. A fase móvel utilizada inicialmente foi 200 mL da mistura hexano- diclorometano- acetona (7:90:3), passando a 100 mL da mesma mistura, na proporção (6:90:4). O fracionamento foi finalizado com 50 mL de AcOEt. Foram obtidas 61 frações, reagrupadas em cinco subgrupos, de acordo com o perfil observado nas placas de CCDS. Destes, foram estudados os mais promissores:

Subgrupo **ER7C1** (frações 49 a 55)

Esta reunião (19,4 mg) foi submetida a CCDS preparativa utilizando como sistema eluente a mistura CH₂Cl₂ 95:5 acetona. Desta cromatografia foi possível isolar quantidade adicional de **MS12** (3,0 mg).

Subgrupo **ER7C2** (fração 60)

ER7C2 (16,0 mg) foi purificada pelo método usado para **ER7C1**. Dessa cromatografia foi possível isolar o composto **MS26** que após análise por RMN foi identificado como nepeticina (1,5 mg).

Subgrupo **ER7D** (frações 8 a 11)

ER7D (139,2 mg) apresentou-se como único ponto na placa. A análise por RMN deste composto permitiu verificar que **ER7D** é quantidade adicional de **MS12**.

Fração 6

A fração 6 (53,7 mg) foi submetida a CC de sílica-gel 60 tendo como sistema eluente 10 mL da mistura CH₂Cl₂-acetona nas seguintes proporções: 1:0; 99:1; 49:1, aumentando a concentração de acetona na taxa de 2% até 9:1. Em seguida utilizou-se a mesma mistura nas concentrações 1:1 e 0:1. A coluna foi finalizada com 10 mL de AcOEt. Foram recolhidas 38 frações, reagrupadas em quatro subgrupos, de acordo com a semelhança observada nas placas de CCDS. Dos subgrupos obtidos, o subgrupo **ER8C** (frações 32 34; 34,0 mg) foi submetido a CCDS preparativa, cuja fase móvel foi a mistura CH₂Cl₂ 98:2 acetona. Desta cromatografia foi possível isolar **MS27**, que após análise por RMN foi identificado como 3-*epi*-gloquidiol (2,5 mg).

Na Figura 10 (p.35) está esquematizada a elaboração de **EHR**, enfatizando os grupos de frações que levaram à obtenção dos compostos anteriormente citados.

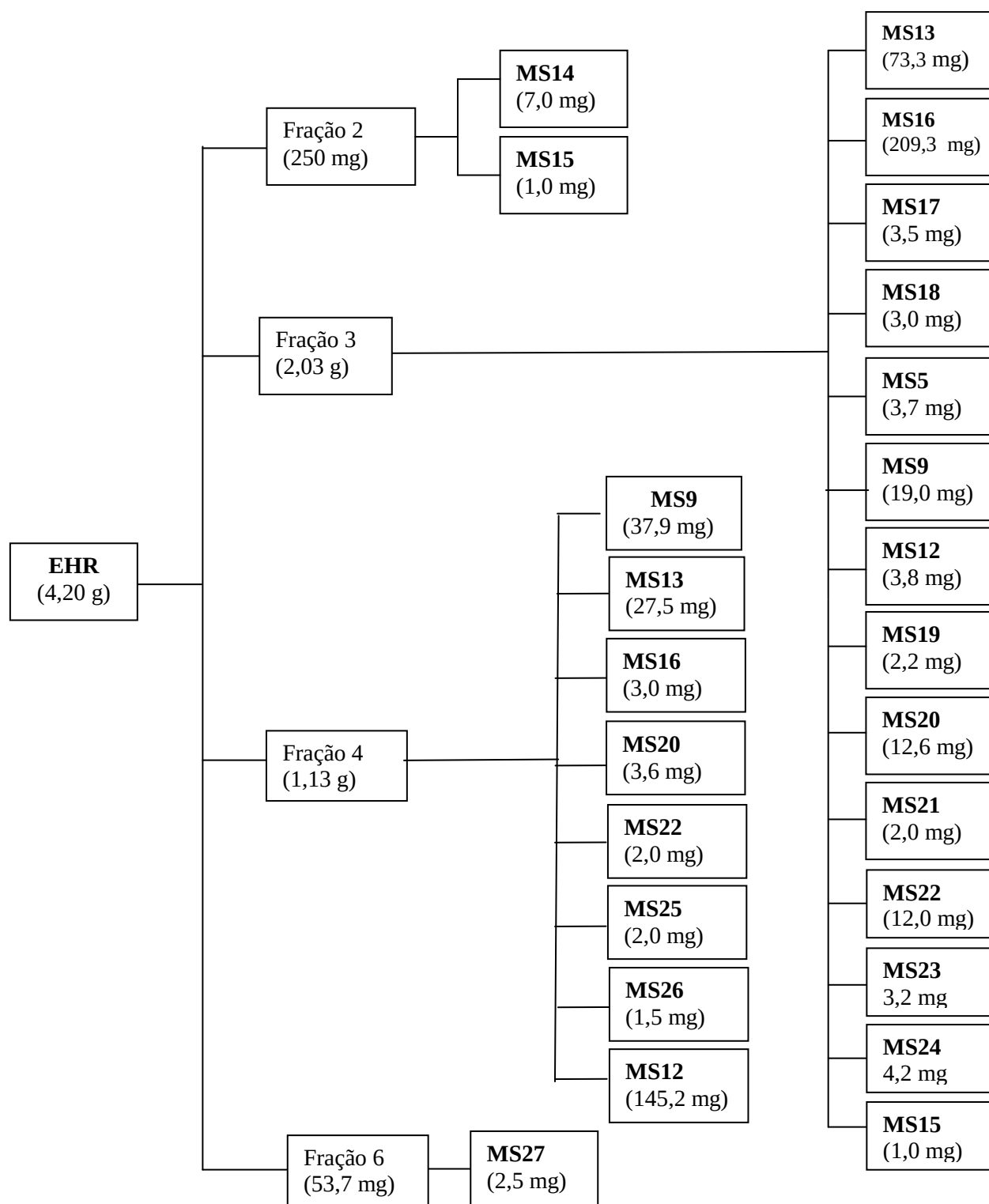


Figura 10: Compostos obtidos de **EHR** por diversos métodos cromatográficos. **MS1:** friedelina; **MS9:** β -sitosterol; **MS12:** tingenona; **MS13:** rigidinol; **MS14:** lupenona; **MS15:** ferruginol; **MS16:** pristimerina; **MS17:** gloquidona; **MS18:** glutinol; **MS19:** friedelan-1,3-diona; **MS20:** 11 α -hidroxigloquidona; **MS21:** gloquidonol; **MS22:** 29-hidroxifriedelan-3-ona; **MS23:** pinostrobin; **MS24:** salicassina; **MS25:** 30-hidroxilupenona; **MS26:** nepeticina; **MS27:** 3-*epi*-gloquidiol.

1.3.8- Elaboração do extrato clorofórmico da raiz de *M. salicifolia*

O extrato clorofórmico da raiz de *M. salicifolia* (**ECR**, 6,98 g) foi submetido à cromatografia em coluna de sílica-gel. Foram coletadas 70 frações de 250 mL cada, utilizando como sistema eluente hexano, clorofórmio, acetato de etila e metanol, puros e/ou em misturas em ordem crescente de polaridade. Por análise comparativa das frações coletadas foi possível, através de CCDS, reuni-las em 14 grupos. Destes, alguns não foram estudados devido à alta complexidade e pouca quantidade de material. Assim, restaram somente os grupos abaixo descritos, que foram submetidos a sucessivas purificações.

Grupo 10 (frações 8 a 10)

Este grupo (258,7 mg) apresentou-se como um sólido vermelho. Foi submetido à cromatografia flash em coluna utilizando sílica e, como sistema eluente, 20 mL da mistura C_6H_{14} - AcOEt nas seguintes proporções: 100:0, 88:12, aumentando a quantidade de AcOEt na taxa de 2% até 60:40. A mesma mistura foi utilizada na proporção de 1:1 e em seguida, utilizou-se AcOEt 100%. A coluna foi finalizada com 45 mL de MeOH 100%. Foram recolhidas 49 frações, que foram agrupadas segundo a semelhança observada nas placas de CCDS. A seguir, é apresentada a descrição da purificação do subgrupo mais promissor.

Subgrupo 7 (frações 36 a 45)

Este subgrupo (50,8 mg) foi submetido à cromatografia flash em coluna utilizando sílica-gel 60 (ϕ 40-63 μ m) e, como sistema eluente, 5,0 mL da mistura diclorometano – acetona nas seguintes proporções: 100:0, 97,5:2,5, aumentando a quantidade de acetona na taxa de 0,5% até 90:10. A mesma mistura foi utilizada na proporção de 50:50 e em seguida, utilizou-se acetona 100%. A coluna foi finalizada com 5 mL de AcOEt e 8 mL de MeOH 100%. Foram recolhidas 34 frações, que foram agrupadas conforme o perfil observado nas placas de CCDS. Feitas as reuniões, estudou-se o subgrupo 24 (frações 24 a 31; 27,5 mg). Este foi submetido à CCDS preparativa tendo como fase móvel a mistura hexano/AcOEt (55:45). Desta cromatografia, foi possível isolar **MS28** (6,0 mg), que após comparação dos dados obtidos em seu espectro de RMN de ^1H com os dados disponíveis na literatura, foi identificado como uma mistura dos dímeros 7,8-di-hidroisoxuxuarina $A\alpha$ e isoxuxuarina $A\alpha$.

Grupo 13 (frações 13 e 14)

Este grupo (782,0 mg) foi submetido à cromatografia em coluna de Sephadex LH-20. A fase móvel utilizada foi a mistura $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ (1:1). Foram recolhidas 32 frações, que foram agrupadas segundo a semelhança apresentada nas placas de CCDS. O estudo dessas frações é descrito a seguir.

Subgrupo **EC5** (frações 21 a 24)

EC5 (180,0 mg) foi submetido a cromatografia em cromatotron, utilizando uma placa de sílica-gel 60 G PF₂₅₄ de 2,0 mm de espessura. Utilizaram-se 300 mL de fase móvel, que era constituída da mistura hexano/acetato de etila (3:2). A cromatografia foi finalizada com 50 mL de AcOEt e 50 mL de MeOH. Foram recolhidas 59 frações que foram reunidas de acordo com o perfil apresentado na placa de CCDS. A análise das mesmas é descrita a seguir.

Subgrupo **EC5C** (frações 7 a 11)

EC5C (15,5 mg) foi submetido à CCDS preparativa, sendo a mistura CH_2Cl_2 / acetona (95:5) utilizada como fase móvel. Desta cromatografia foi isolado o composto **MS26** (3,0 mg) que após análise de seu espectro de RMN de ^1H e comparação com os dados da literatura foi identificado como nepeticina.

Subgrupo **EC5D** (frações 12 a 19)

Esta amostra (34,0 mg) foi submetida a CCDS preparativa nas mesmas condições que o grupo anterior. Desta cromatografia, foi isolada quantidade adicional de **MS26** (6,0 mg).

Subgrupo **EC5G** (frações 28 a 34)

De **EC5G** (49,8 mg), foram separados 27,0 mg, que foram submetidos a CCDS preparativa, utilizando como sistema eluente a mistura hexano/*iso*-propanol (4:1). Desta cromatografia, foi isolado o composto **MS29**, que após análise dos espectros de RMN de 1D e 2D foi identificado como 16 β -hidroxipristimerina (15,0 mg), inédito na literatura científica.

Subgrupo **EC7** (fração 27)

Esta fração apresentou-se como um único ponto na placa de CCDS. Após análise por RMN, verificou-se que se tratava do 6,7-desidroferruginol (**MS30**, 5,0 mg).

Grupo 15 (frações 15 a 18)

O grupo 15 (125,0 mg) apresentou-se como um sólido vermelho e foi submetido a CC flash, empregando-se sílica-gel 60 (ϕ 40-63 μ m), e como fase móvel, 20 mL da mistura hexano-acetato de etila nas seguintes proporções: 10:0, 17:3, 9:2, aumentando-se a concentração de AcOEt na razão de 2% até 1:1. A seguir, aumentou-se a concentração de AcOEt na razão de 10% até 3:7. Em seguida utilizou-se AcOEt 100%. A coluna foi finalizada com 40 mL de MeOH. Foram recolhidas 47 frações que foram agrupadas segundo o perfil apresentado na placa de CCDS. Porém, dessa coluna só foi possível isolar tingenona (**MS12**, 3,0 mg).

Grupo 17 (frações 17 e 18)

O grupo 17 (1,6 g) foi submetido a CC flash, empregando-se sílica-gel 60 (ϕ 40-63 μ m). A fase móvel utilizada foi uma mistura de diclorometano e acetona nas seguintes proporções: 100:0; 97,5:2,5; 92,5:7,5; 90:10; 87,5:12,5; 85:15; 82,5:17,5; 80:20; 70:30; 50:50; 0:100. Em seguida, empregou-se acetato de etila 100% e finalizou-se a coluna com metanol 100%. Desta cromatografia foram obtidas 50 frações de 20 mL cada, que foram agrupadas em 12 subgrupos. Destes, estudou-se o subgrupo **EC8**, por se mostrar mais promissor.

Subgrupo **EC8** (frações 7 a 10)

O subgrupo **EC8** (18,0 mg) foi purificado por CCDS preparativa, utilizando como eluente a mistura tolueno/acetato de etila (3:1). Desta separação foi obtido um sólido branco (**MS31**, 6,0 mg), que após análise de seu espectro de RMN de ^1H e comparação com dados disponíveis na literatura foi identificado como abruslactona A.

Grupo 21 (frações 19 a 21)

O grupo 21 (708,4 mg) se apresentou como um sólido vermelho e foi purificado por CC, tendo como fase móvel 50,0 mL da mistura hexano/acetato de etila nas seguintes proporções: 100:0; 97,5:2,5; 95:5; 92,5:7,5; 90:10; 87,5:12,5; 85:15; 82,5:17,5; 80:20; 77,5:22,5; 75:25; 70:30; 50:50; 0:100. A coluna foi finalizada com metanol 100%. Foram recolhidas 16 frações de 25,0 mL cada. Após análise por CCDS as frações foram reunidas em 10 subgrupos. Destes, quatro subgrupos foram estudados, conforme descrito a seguir.

Subgrupo EC9 (frações 3 e 4)

Para **EC9** (12,0 mg) foi feita CCDS preparativa, cujo sistema eluente foi a mistura hexano/éter etílico na proporção de 17:3. Desta purificação, foram obtidos os compostos, que após análise dos dados de RMN, foram identificados como β -sitosterol (**MS9**, 1,3 mg) e gloquidona (**MS17**, 1,2 mg).

Subgrupo EC10 (fração 5)

O subgrupo **EC10** (15,0 mg) foi submetido à mesma separação cromatográfica descrita para **EC9**. Da purificação deste subgrupo foi obtida quantidade adicional de **MS9** (4,0 mg) além da mistura de 3-oxo-olean-9(11):12-dieno e 3-oxo-ursan-9(11):12-dieno (**MS32**, 3,0 mg).

Subgrupo EC11 (fração 6)

O subgrupo **EC11** (120,0 mg) foi submetido à purificação em cromatotron, onde foi empregada placa de sílica-gel 60 G de 1,0 mm de espessura. Como fase móvel utilizou-se 150 mL da mistura hexano/acetato de etila (4:1), finalizando a separação com 35,0 mL de hexano. Foram recolhidas 44 frações de 5,0 mL cada. As frações foram reunidas de acordo com o perfil apresentado nas placas de CCDS, resultando em 12 subgrupos. Destes, foram estudados os seguintes subgrupos:

Subgrupo EC11A (frações 1 e 2)

A análise do espectro de RMN de ^1H de **EC11A** permitiu identificá-lo como 11 α -hidroxi-gloquidona (**MS20**; 4,1mg).

Subgrupo EC11B (frações 5 a 7)

O subgrupo **EC11B** (23,0 mg) foi submetido a CCDS preparativa, onde a fase móvel utilizada foi a mistura hexano/acetato de etila (4:1). Desta purificação, foi obtido rigidol (**MS13**; 14,0 mg), além de quantidade adicional de **MS20** (3,1 mg).

Subgrupo EC11C (frações 8 a 13)

O subgrupo **EC11C** (18,2 mg) foi submetido a CCDS preparativa nas mesmas condições que **EC11B**. Desta cromatografia, foi obtida quantidade adicional de **MS13** (6,9 mg), além de ser obtida novamente **MS32** (1,8 mg).

Subgrupo EC11D (frações 16 a 18)

EC11D (6,0 mg) se apresentou como um único ponto na placa de CCDS. O espectro de RMN de ^1H do mesmo foi obtido, e a análise do mesmo possibilitou identificar **EC11D** como **MS13**.

Subgrupo EC12 (frações 7 a 9)

EC12 (296,7 mg) foi submetido a CC, onde a fase móvel utilizada foi 20 mL de cada gradiente da mistura diclorometano/acetona nas seguintes proporções: 100:0; 99,95:0,05, aumentando a proporção de acetona na razão de 0,05% até 0,50. Em seguida, empregou-se a mesma fase móvel nas proporções 99,3:0,70; 99:1, 90:10; 0:100 e por fim, metanol 100%. Foram coletadas 43 frações de 5,0 mL cada, as quais foram reunidas em sete subgrupos. Destes, foram estudados os seguintes:

Subgrupo EC12C (frações 7 e 8)

O subgrupo **EC12C** apresentou um único ponto na placa de CCDS. A análise do espectro de RMN de ^1H desta fração permitiu identificá-la como 3'-metoxi,4'-hidroxi-*trans*-cinamaldeído (**MS33**, 9,0 mg).

Subgrupo EC12E (frações 10 a 12)

O subgrupo **EC12E** (23,0 mg) foi submetido a CCDS preparativa, utilizando como fase móvel a mistura diclorometano - acetona (96:4). Desta separação, foi obtida quantidade adicional de abruslactona A (**MS31**; 3,0 mg).

Subgrupo EC12F (frações 13-24)

Este subgrupo (89,0 mg) apresentou um ponto definido na placa de CCDS, juntamente com uma mancha arrastada de menor intensidade. O composto principal foi identificado como **MS12** após a análise do espectro de RMN.

Subgrupo EC13 (frações 10 e 11)

EC13 (79,2 mg) foi submetido à CC utilizando como fase móvel 10 mL da mistura hexano-acetato de etila nas seguintes proporções: 90:10; 88:12, aumentando a concentração de acetato de etila na razão de 2% até 80:20. Em seguida a mistura foi utilizada nas

proporções 70:30; 60:40; 50:50 e 100%. A coluna foi finalizada com metanol, sendo recolhidas 51 frações, das quais estudou-se o subgrupo **EC13E** (frações 34 a 37, 12,0 mg). Este foi submetido a CCDS preparativa, para a qual o sistema eluente foi a mistura hexano/éter etílico (3:7). Dessa cromatografia foi possível isolar **MS34** (1,7 mg), que após análise de seu espectro de RMN de ^1H e comparação com os dados da literatura foi identificado como siringaldeído.

Grupo 22 (frações 22 a 24)

Este grupo (163,6 mg) apresentou-se como um sólido vermelho e foi submetido a CC flash, utilizando-se sílica, onde o sistema eluente foi 20 mL da mistura hexano-acetato de etila em cada uma das proporções: 100:0, 88:12, 86:14 aumentando-se a concentração de AcOEt na razão de 2% até 60:40. Em seguida a mistura foi utilizada na concentração de 40:60 e AcOEt 100%. A coluna foi finalizada com 40 mL de MeOH. Foram recolhidas 51 frações que foram agrupadas em 10 subgrupos, segundo o perfil apresentado na placa de CCDS. A análise dos grupos mais promissores é descrita a seguir.

Subgrupo **EC14** (frações 9-10)

O subgrupo **EC14** (2,0 mg) apresentou único ponto na placa de CCDS. A análise do espectro de RMN de ^1H obtido levou à identificação de **EC14** como rigidinol (**MS13**).

Subgrupo **EC15** (frações 15 a 27)

Esta amostra (22,0 mg) foi submetida a CCDS preparativa, tendo como fase móvel a mistura CH_2Cl_2 /acetona (97:3). Desta cromatografia obteve-se quantidade adicional de **MS9** (3,3 mg).

Na Figura 11 (p.42) está esquematizada a elaboração de **ECR**, enfatizando os grupos de frações que levaram à obtenção dos compostos já mencionados.

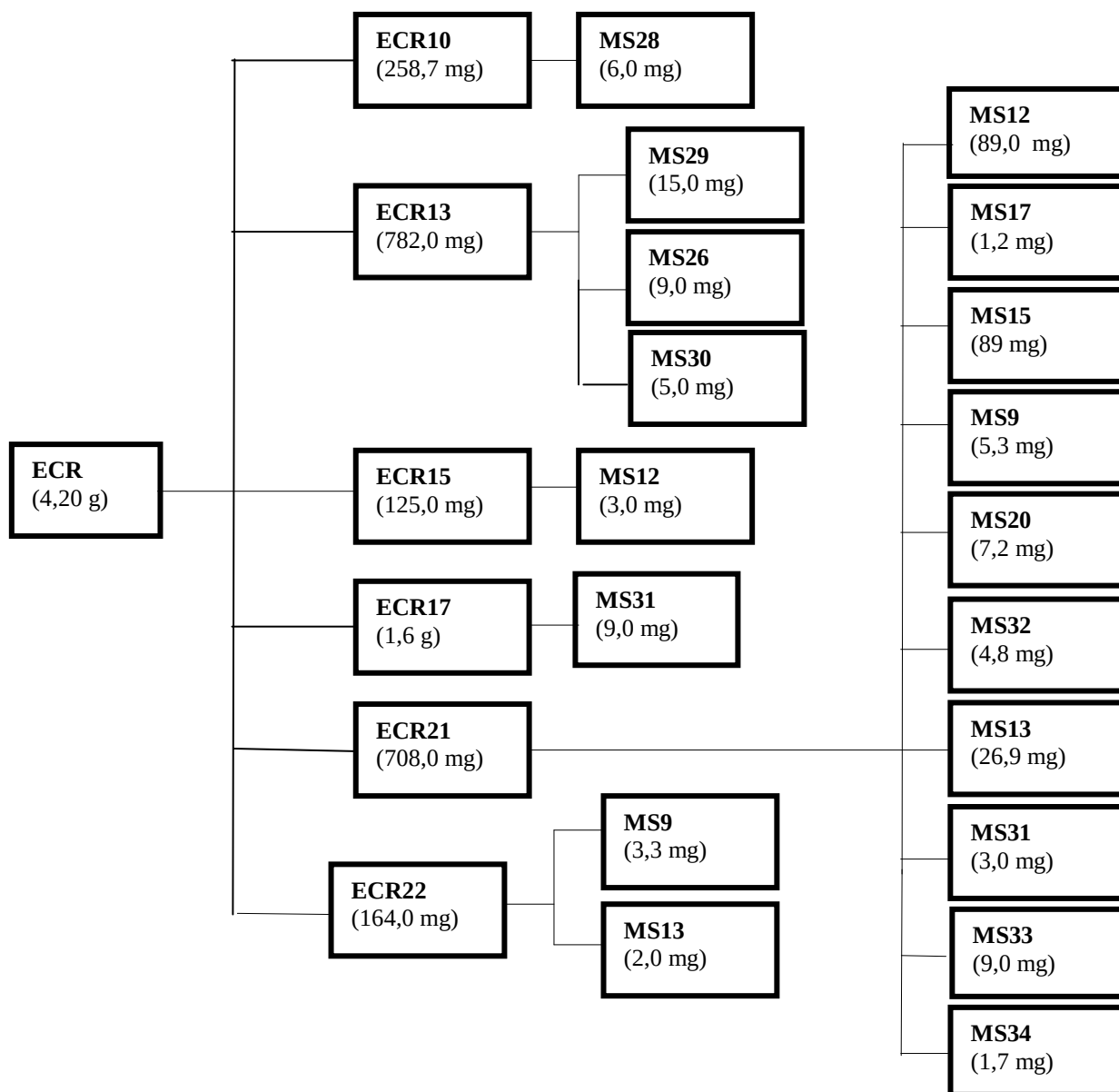


Figura 11: frações obtidas de **ECR** por métodos cromatográficos diversos. **MS9:** β -sitosterol; **MS12:** tingenona; **MS13:** rigidinol; **MS17:** gloquidona; **MS20:** 11 α -hidroxigloquidona; **MS26:** nepeticina; **MS28:** mistura de dímeros; **MS29:** 16 β -hidroxipristimerina; **MS30:** 6,7-desidroferruginol; **MS31:** abruslactona A; **MS32:** mistura de dienos; **MS33:** 3'- metoxi- 4'-hidroxi-*trans*-cinamaldeído; **MS34:** siringaldeído.

1.3.9- Elaboração do extrato em acetato de etila da raiz de *M. salicifolia*

O extrato em acetato de etila da raiz de *M. salicifolia* (**EAR**; 9,6 g) apresentou cor avermelhada. Uma alíquota da amostra foi submetida à CC, onde utilizaram-se 2,78 g do extrato em pó e Sephadex LH-20 como fase estacionária. A resina ocupou 46,0 cm numa coluna de 80 cm de altura e 4,0 cm de largura. O sistema eluente utilizado foi a mistura diclorometano/acetona (3:2). Foram recolhidas 26 frações de 125 mL cada. As frações que se apresentavam mais promissoras foram reunidas em 3 grupos de acordo com a semelhança do perfil cromatográfico observado através de CCDS.

Grupo 1 (fração 7)

O constituinte dessa fração possuía o R_f maior que as frações posteriores na placa de CCDS. A análise por RMN do composto obtido levou à confirmação da estrutura do mesmo, identificado como 2'-(2-hidroxipropil)- 4'-O-metilepigalocatequina (**MS35**, 8,0 mg), um flavonoide inédito.

Grupo 2 (frações 8-10)

O constituinte deste grupo (208,5 mg) apresentou-se como um ponto avermelhado na placa de CCDS e possuía menor R_f. A análise por RMN deste composto levou à confirmação da estrutura como proantocianidina A (**MS11**). Esta substância é a segunda mais abundante encontrada nesse extrato (7,5 % da composição).

Grupo 3 (frações 14 a 22)

Este grupo (417,0 mg) apresentou-se como um sólido cristalino ligeiramente amarelado. A análise por RMN deste sólido levou à confirmação da estrutura da 4'-O-metilepigalocatequina (**MS10**). Assim como em **EAT**, **MS10** é a substância presente em maior quantidade nesse extrato, correspondendo a 15% de sua composição.

Na Figura 12 (p.44), está esquematizada a elaboração de **EAR**, enfatizando os grupos de frações que levaram à obtenção dos compostos já mencionados.

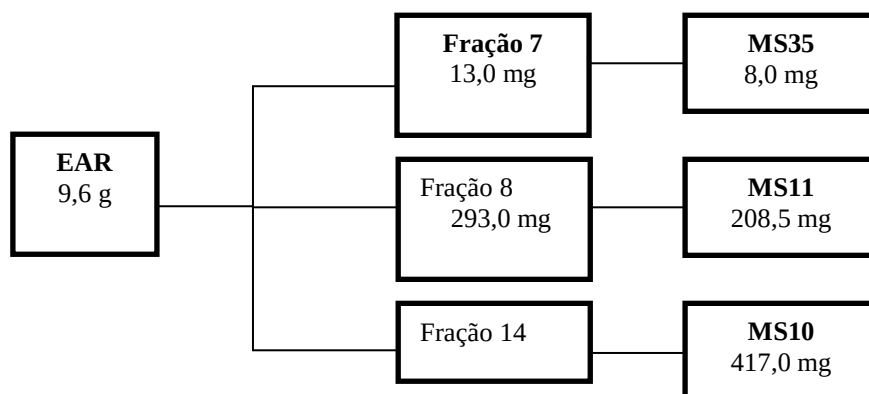


Figura 12- Frações obtidas de **EAR** por diversos métodos cromatográficos. **MS10**: 4'-O-metilepigalocatequina; **MS11**: proantocianidina A; **MS35**: 2'-(2-hidroxipropil)-4'-O-metilepigalocatequina.

1.3.10- Elaboração do extrato etanólico da raiz de *Maytenus salicifolia*

O extrato etanólico da raiz (**EER**; 86,35 g) de *M. salicifolia* se apresentou como um sólido de cor vinho. Foi coletada uma alíquota de 300 mg desse extrato, que foi submetida a CC flash utilizando sílica. A fase móvel utilizada foi 25 mL da mistura CH₂Cl₂ – AcOEt nas seguintes proporções: 1:0; 3:2; 11:9, sendo aumentada a proporção de AcOEt na taxa de 5% até a proporção 0:1. A coluna foi finalizada com acetona 100% e em seguida metanol 100%. Foram recolhidas 47 frações, que foram reunidas segundo o perfil observado nas placas de CCDS. Dos subgrupos obtidos, estudou-se o de número 4. Este subgrupo (frações 21 a 29; 20,0 mg) apresentou-se como um único ponto na placa. A análise por RMN deste composto levou à confirmação da estrutura como 4'-O-metilepigalocatequina (**MS10**), que corresponde a 6,7% do extrato.

[illegible][illegible]

45

O espectro de RMN de ^{13}C de **MS1** (Fig. 14) mostrou um sinal em δ_{C} 213,1, atribuído ao carbono do grupo carbonila. Os sinais em δ_{C} 14,7 e 6,8 são atribuídos aos grupos metila característicos da classe friedelano (C-24 e C-23, respectivamente) (MAHATO e KUNDU, 1994). Pela comparação com dados da literatura (MAHATO e KUNDU, 1994; Tabela 1, p.48), **MS1** foi identificado como friedelina.

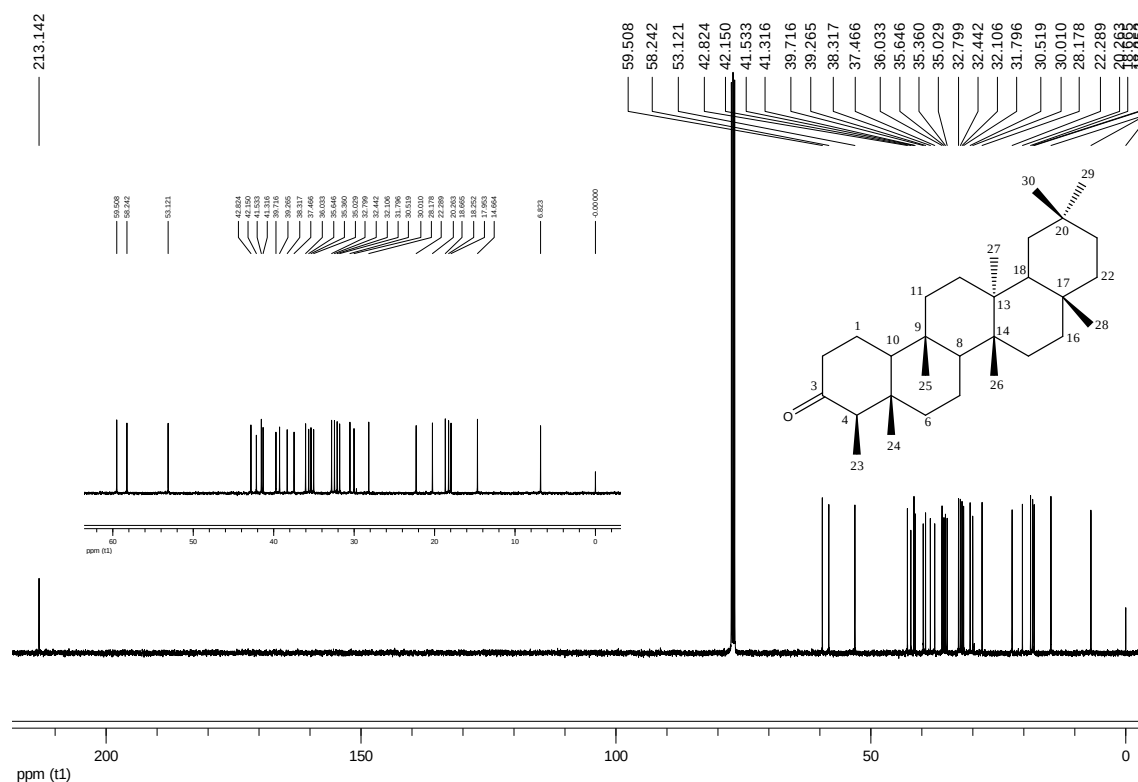
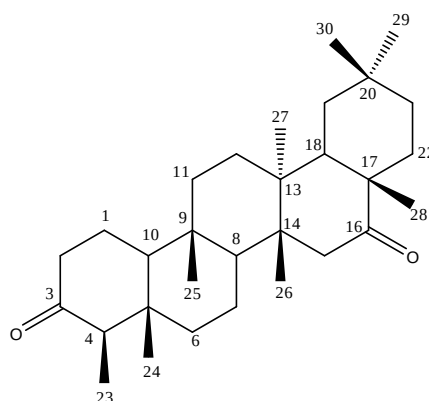


Figura 14- Espectro de RMN de ^{13}C de **MS1** (friedelina) (CDCl_3 ; 100MHz).

Tabela 1 – Dados de RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) de **MS1** e dados da friedelina descritos na literatura (MAHATO e KUNDU, 1994)

MS1		Friedelina (CDCl_3)	
Carbono	δ_{C}	DEPT-135	δ_{C}
1	22,3	CH_2	22,3
2	41,5	CH_2	41,5
3	213,1	C	213,2
4	58,2	CH	58,2
5	42,1	C	42,1
6	41,3	CH_2	41,3
7	18,2	CH_2	18,2
8	53,1	CH	53,1
9	37,5	C	37,4
10	59,5	CH	59,4
11	35,6	CH_2	35,6
12	30,5	CH_2	30,5
13	39,7	C	39,7
14	38,3	C	38,3
15	32,4	CH_2	32,4
16	36,0	CH_2	36,0
17	30,0	C	30,0
18	42,8	CH	42,8
19	35,2	CH_2	35,3
20	28,2	C	28,1
21	32,8	CH_2	32,7
22	39,3	CH_2	39,2
23	6,8	CH_3	6,8
24	14,7	CH_3	14,6
25	18,0	CH_3	17,9
26	20,3	CH_3	20,2
27	18,7	CH_3	18,6
28	32,1	CH_3	32,1
29	35,0	CH_3	35,0
30	31,8	CH_3	31,8

➡ **MS2: 3,16-dioxofriedelano**



O triterpeno **MS2** apresentou ponto de fusão 238-240 °C. Exibiu coloração rósea quando submetido ao teste de Liebermann-Burchard, um resultado positivo para triterpeno pentacíclico.

O espectro de RMN de ^1H (Fig. 15) indicou a presença de sinais em δ_{H} 0,74, δ_{H} 0,87, δ_{H} 0,90, δ_{H} 0,96, δ_{H} 1,05, δ_{H} 1,20, δ_{H} 1,30 e δ_{H} 1,42, referentes a oito grupos metila.

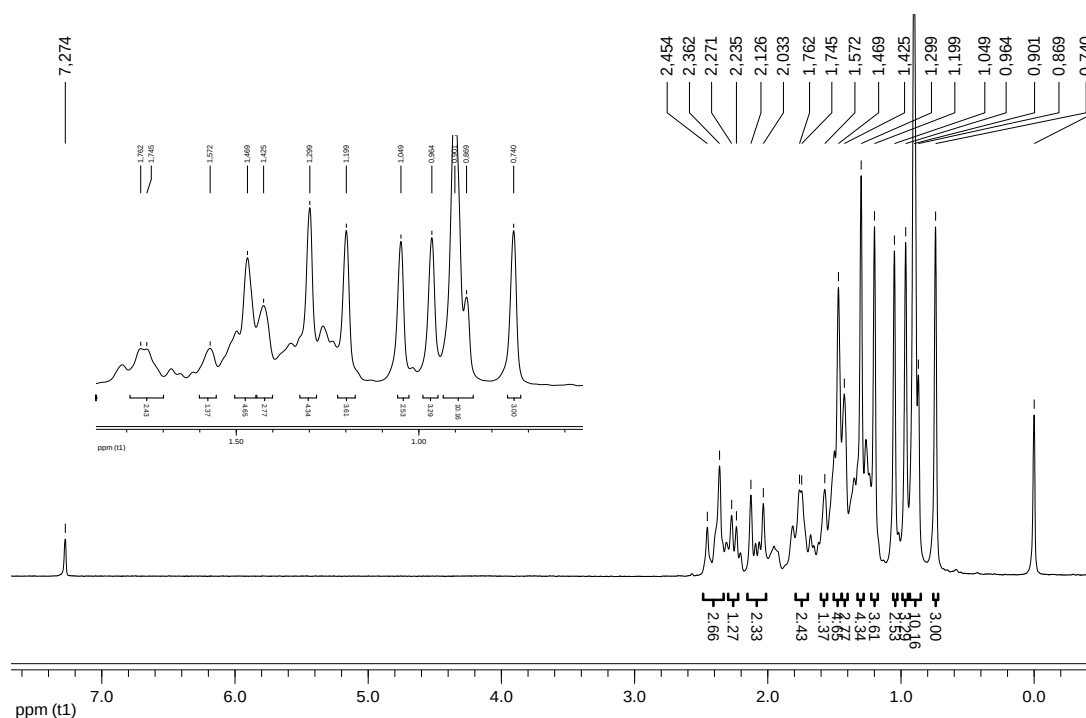


Figura 15. Espectro de RMN de ^1H de **MS2** (3,16-dioxofriedelano) (CDCl_3 ; 400 MHz).

O espectro de RMN de ^{13}C e o subspectro DEPT-135 (Figs.16 e 17, p.49) de **MS2** apresentaram sinais correspondentes a 30 átomos de carbono, sendo oito CH_3 , dez CH_2 , quatro grupos CH e oito átomos de carbono não hidrogenado. Os sinais em δ_{C} 219,1 e 212,8 foram associados a grupos carbonílicos em C-3 e C-16, respectivamente. A comparação com

dados da literatura (Tabela 2, p.50) permitiu identificar **MS2** como 3,16-dioxofriedelano. Este composto foi isolado pela primeira vez de *M. diversifolia* (NOZAKI *et al.*, 1986).

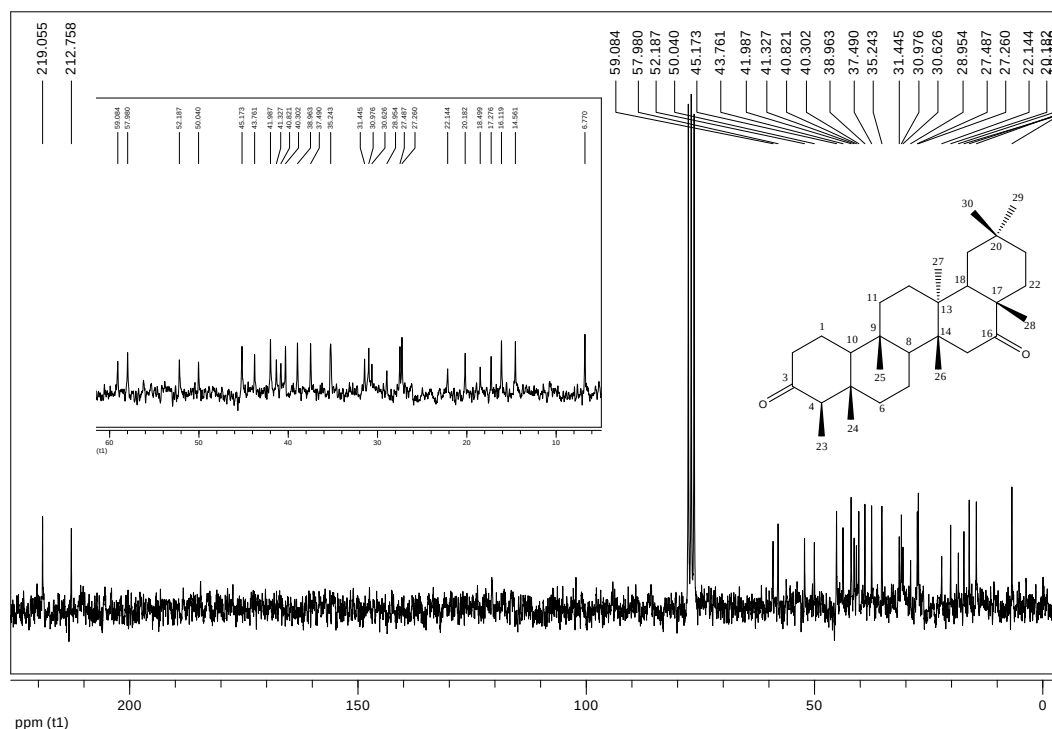


Figura 16 - Espectro de RMN de ^{13}C de **MS2** (3,16-dioxofriedelano) (CDCl_3 , 100 MHz).

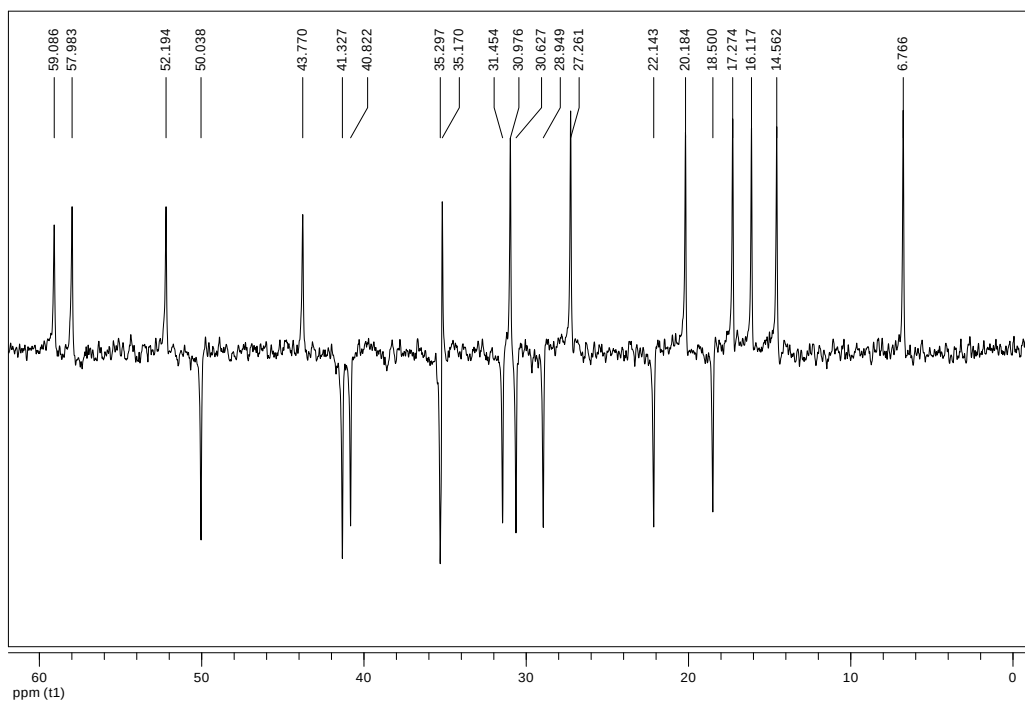
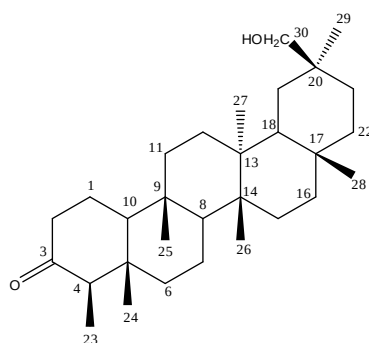


Figura 17- Subespectro DEPT-135 de **MS2** (3,16-dioxofriedelano) (CDCl_3 , 100 MHz).

Tabela 2 – Dados de RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) de **MS2** e dados do 3,16-dioxofriedelano descritos na literatura (MAHATO e KUNDU, 1994)

MS2			3,16-dioxofriedelano, (CDCl_3)
Carbono	δ_{C}	DEPT- 135	δ_{C}
1	22,1	CH_2	22,2
2	41,3	CH_2	41,4
3	212,8	C	212,5
4	58,0	C	58,2
5	42,0	C	42,1
6	40,8	CH_2	41,0
7	18,5	CH_2	18,6
8	52,2	CH	52,4
9	37,5	C	37,7
10	59,1	CH	59,4
11	35,3	CH_2	35,4
12	29,0	CH_2	29,1
13	39,0	C	39,2
14	40,3	C	40,5
15	50,0	CH_2	50,2
16	219,0	C	218,8
17	45,2	C	45,3
18	43,8	CH	44,0
19	35,3	CH	35,5
20	27,5	C	27,6
21	31,5	CH_2	31,7
22	30,6	CH_2	30,8
23	6,8	CH_3	6,8
24	14,6	CH_3	14,7
25	17,3	CH_3	17,3
26	20,2	CH_3	20,3
27	16,1	CH_3	16,2
28	27,5	CH_3	27,4
29	31,0	CH_3	31,1
30	35,2	CH_3	35,2

➡ **MS3:** (30-hidroxifriedelan-3-ona)



O composto **MS3** apresentou teste L.B. positivo para triterpenos pentacíclicos e ponto de fusão 243-244 °C. O espectro de RMN de ^1H (Fig. 18) de **MS3** apresentou um sinal em δ_{H} 3,35 (1H, d, $J= 10,8$ Hz) e outro em δ_{H} 3,43 (1H, d, $J= 10,4$ Hz), que estão relacionados a átomos de hidrogênio diastereotópico em carbono oxigenado. Foi observado também um duplete em δ_{H} 0,87 (3H, $J = 6,8$ Hz), característico da metila C-23 de compostos do tipo friedelano.

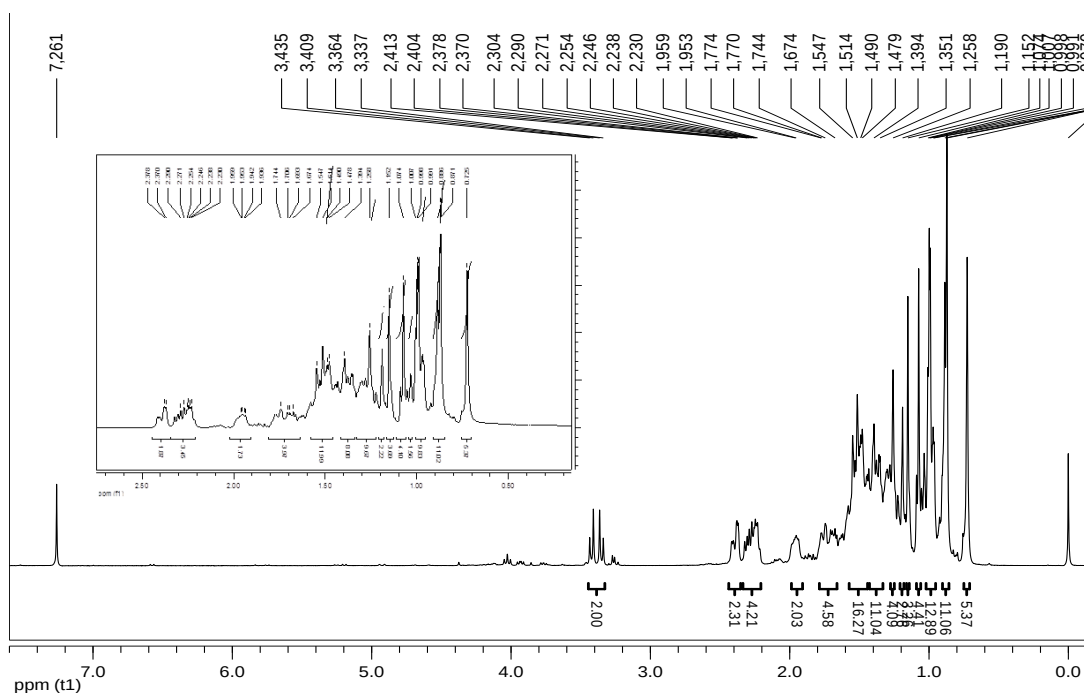


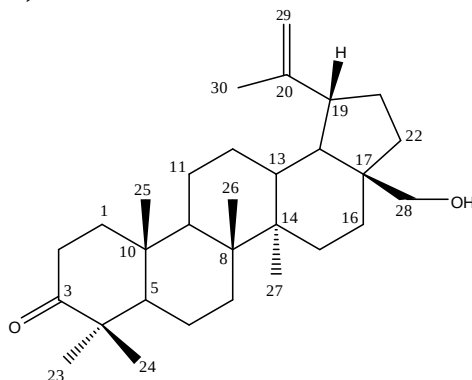
Figura 18- Espectro de RMN de ^1H de **MS3** (30-hidroxifriedelan-3-ona) (CDCl_3 , 400 MHz).

A análise do espectro de RMN de ^{13}C , e do subespectro DEPT-135 (Figs. 19 e 20, p.52), permitiu identificar a presença de 30 átomos de carbono, dentre os quais há sete grupos CH_3 , 12 CH_2 , quatro CH e sete átomos de carbono não hydrogenado (Tabela 3, p.53). O sinal

Tabela 3- Dados de RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) de **MS3** e dados de 30-hidroxifriedelan-3-ona descritos na literatura (BETANCOR *et al.*, 1980)

Carbono	30-hidrofriedelan-3-ona (CDCl_3)		
	MS3	DEPT-135	
	δ_{C}		δ_{C}
1	22,3	CH_2	22,3
2	41,5	CH_2	41,6
3	213,3	C	212,9
4	58,2	CH	58,3
5	42,1	C	42,5
6	41,2	CH_2	41,4
7	18,2	CH_2	18,3
8	53,0	CH	53,1
9	37,4	C	37,5
10	59,4	CH	59,1
11	35,6	CH_2	35,7
12	29,7	CH_2	29,4
13	39,8	C	39,4
14	38,3	C	38,2
15	32,1	CH_2	32,2
16	29,7	CH_2	29,7
17	30,0	C	30,1
18	42,7	CH	42,9
19	30,5	CH_2	30,6
20	33,4	C	33,5
21	28,2	CH_2	28,3
22	39,8	CH_2	39,9
23	6,8	CH_3	6,8
24	14,7	CH_3	14,7
25	18,0	CH_3	18,0
26	18,6	CH_3	18,6
27	20,0	CH_3	20,0
28	32,1	CH_3	32,2
29	28,9	CH_3	29,0
30	71,8	CH_2	72,1

➡ **MS4:** 28-hidroxilup-20(29)-en-3-ona



MS4 apresentou-se como um sólido branco amorfo de ponto de fusão 165,1-167,1°C. O espectro de RMN de ^1H de **MS4** (Fig. 21) apresentou um sinal em δ_{H} 3,34 (1H, d, $J = 22,0$ Hz) e outro em δ_{H} 3,80 (1H, d, $J = 22,0$ Hz), característicos de átomos de hidrogênio metilênico diastereotópico. A baixa resolução dos sinais relativos aos átomos de hidrogênio dos grupos metila indicou a possibilidade de **MS4** tratar-se de uma mistura.

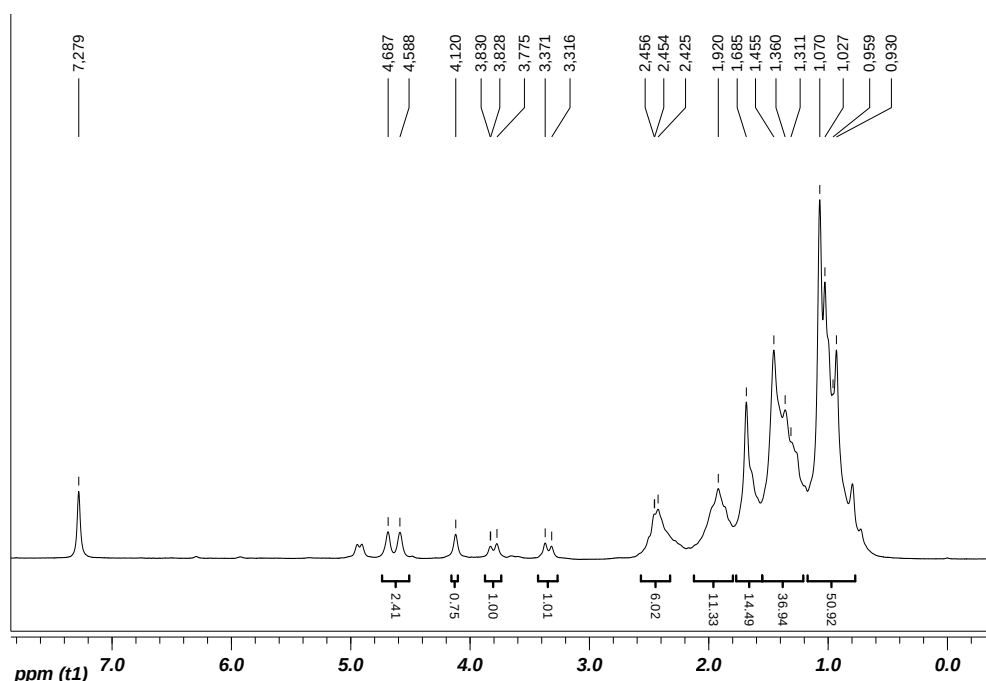


Figura 21- Espectro de RMN de ^1H de **MS4** (CDCl_3 , 400 MHz).

O espectro de RMN de ^{13}C (Fig. 22, p.55) exibiu 55 sinais, o que confirmou tratar-se de uma mistura. Os 30 sinais mais intensos foram listados, e por meio do subespectro DEPT-135 (Fig. 23, p. 55) foram classificados em seis CH_3 , onze CH_2 , cinco grupos CH e sete átomos de carbono não hydrogenado. Os sinais em δ_{C} 109,7 e em δ_{C} 150,3 indicaram tratar-se de um lupano. A substância em menor proporção apresentou sinais que se referem a um

triterpeno da mesma classe (δ_C 106,8 e em δ_C 154,6), porém este não foi completamente elucidado. Na Tabela 4 (p.56), foram listados valores dos átomos de carbono de maior intensidade e estes foram comparados com a literatura (KIM *et al.*, 2002), sugerindo para a substância majoritária de **MS4** o triterpeno 28-hidroxilup-20(29)-en-3-ona.

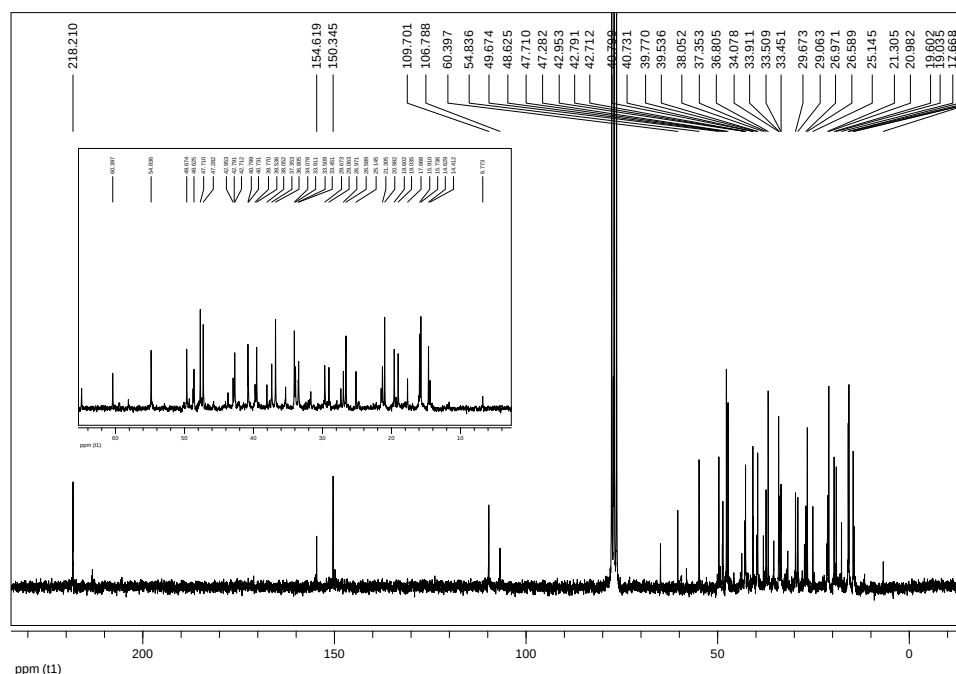


Figura 22- Espectro de RMN de ^{13}C de **MS4** (CDCl_3 , 100 MHz).

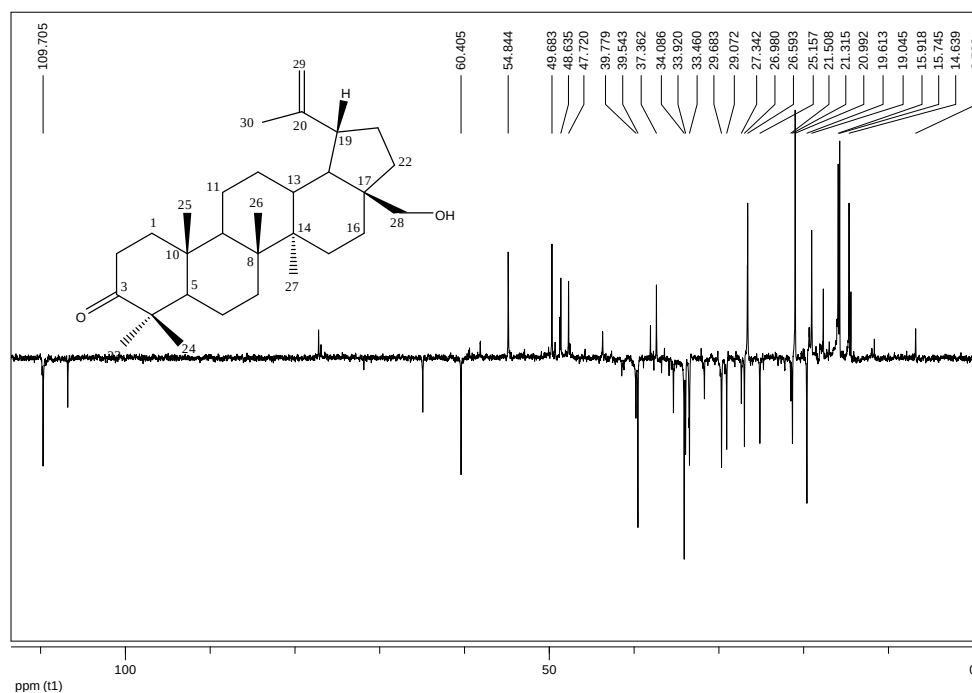
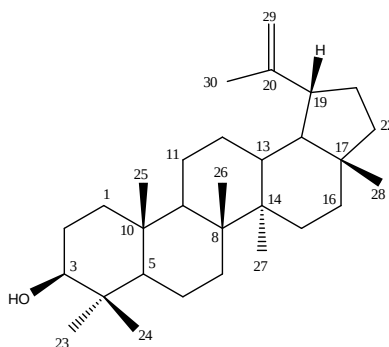


Figura 23- Subespectro DEPT-135 de **MS4** (CDCl_3 , 100 MHz)

Tabela 4- Dados de RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) de **MS4** e dados da 28-hidroxilup-20(29)-en-3-ona descritos na literatura (KIM *et al*, 2002)

MS4		28-hidroxilup-20(29)-en-3-ona (CDCl_3)	
Carbono	δ_{C}	DEPT-135	δ_{C}
1	39,5	CH_2	39,5
2	33,4	CH_2	33,4
3	218,3	C	218,2
4	47,3	C	47,3
5	54,8	CH	54,8
6	19,0	CH_2	19,0
7	34,1	CH	34,1
8	40,8	C	40,8
9	49,7	CH	49,7
10	36,8	C	36,8
11	21,0	CH_2	21,0
12	25,1	CH_2	25,1
13	37,4	CH	37,3
14	42,7	C	42,7
15	26,6	CH_2	26,6
16	29,1	CH_2	29,1
17	47,7	C	47,7
18	48,6	CH	48,6
19	47,7	CH	47,7
20	150,3	C	150,3
21	29,7	CH_2	29,7
22	33,9	CH_2	33,9
23	27,0	CH_3	27,0
24	21,3	CH_3	21,3
25	15,9	CH_3	15,9
26	15,8	CH_3	15,7
27	14,6	CH_3	14,6
28	60,4	CH_2	60,4
29	109,7	CH_2	109,7
30	19,6	CH_3	19,6

➔ **MS5:** lupeol



O composto **MS5** apresentou-se como um sólido branco de ponto de fusão de 227-229 °C. No espectro de RMN de ^1H de **MS5** (Figura 24) foram observados dois simpletos largos em δ_{H} 4,58 e em δ_{H} 4,68 característicos de átomos de hidrogênio de dupla ligação terminal. Apresentou também um duplo duplete em δ_{H} 3,18 ($J = 4,8\text{Hz}; 10,8\text{Hz}$), atribuído ao hidrogênio H-3 (MIRANDA, 2007).

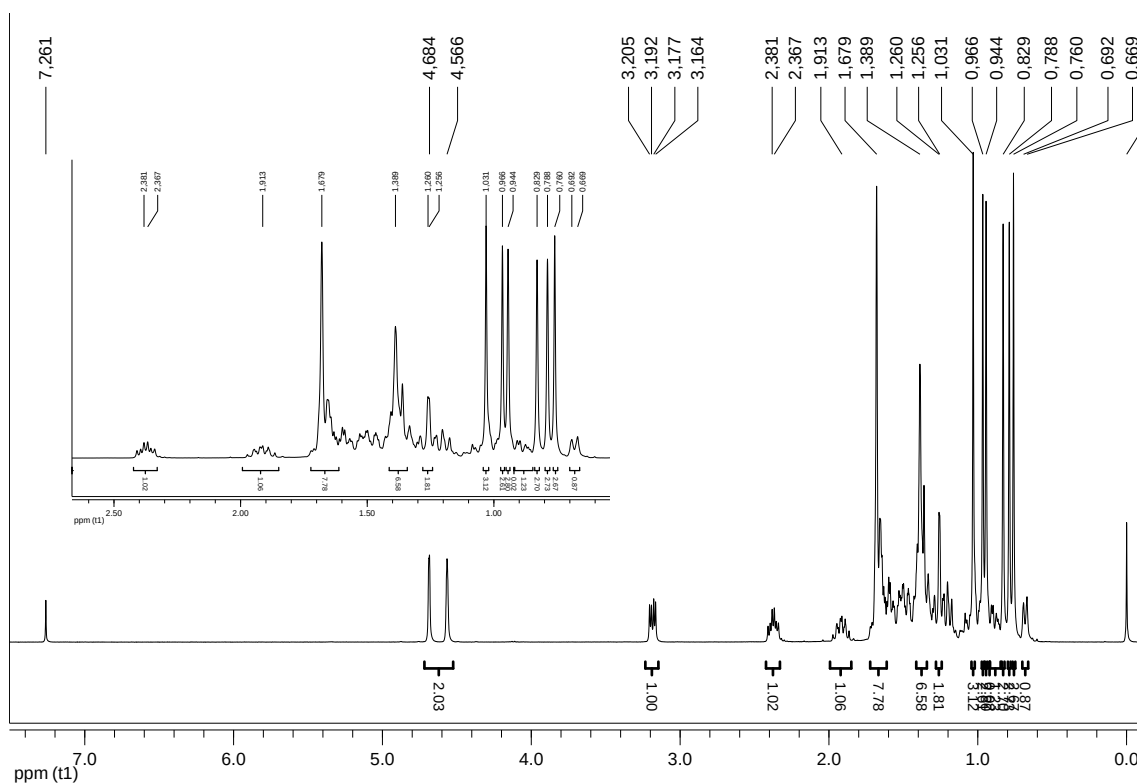


Figura 24- Espectro de RMN de ^1H de **MS5** (lupeol) (CDCl_3 , 200MHz).

Na análise do espectro de RMN de ^{13}C e do subespectro DEPT-135 (Figs. 25 e 26, p.58), foram observados 30 sinais, identificados como sendo sete grupos CH_3 , onze CH_2 , seis grupos CH e seis átomos de carbono não hidrogenado. Foram observados sinais em δ_{C} 109,3 e

δ_C 150,9, atribuídos a carbono olefínico de triterpenos lupânicos e um sinal em δ_C 79,0, relacionado ao carbono carbinólico C-3.

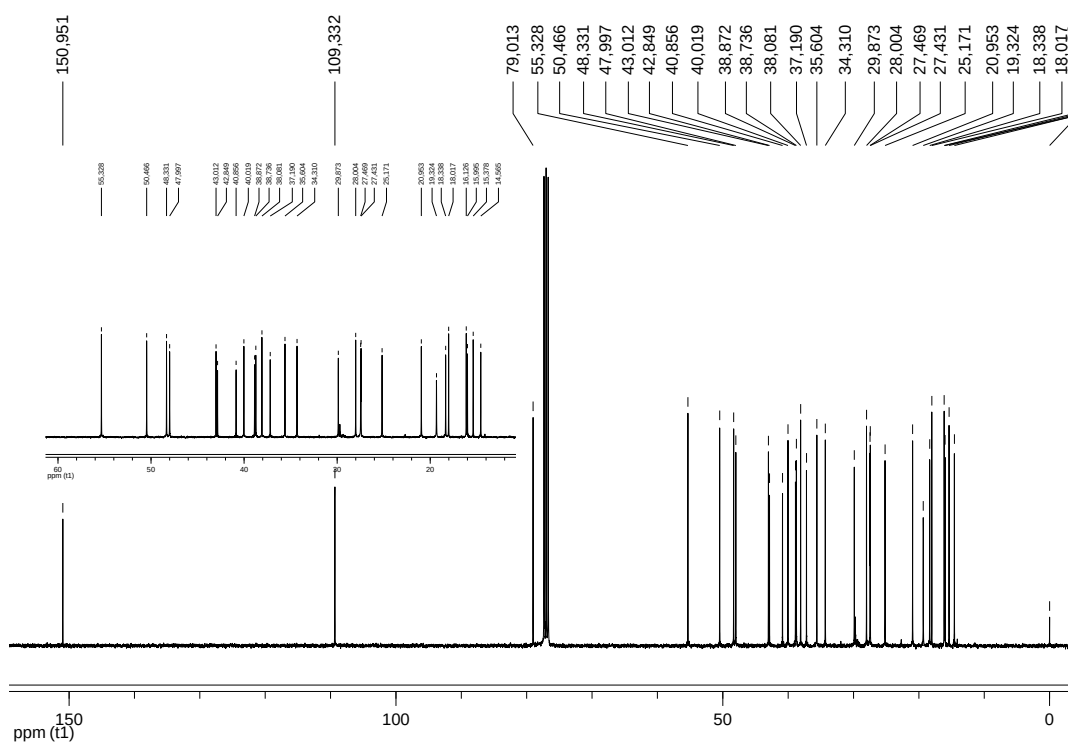


Figura 25- Espectro de RMN de ^{13}C de MS5 (50MHz, CDCl_3).

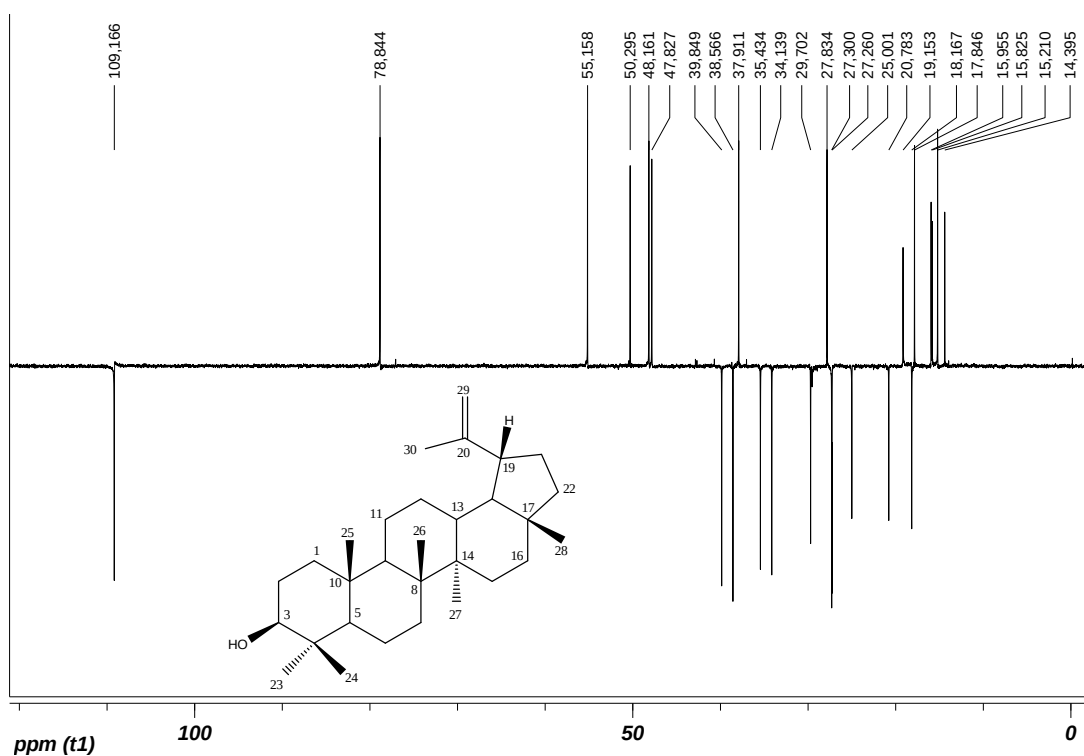


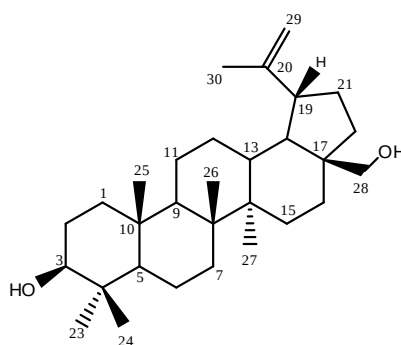
Figura 26- Subespectro DEPT-135 de MS5 (50 MHz, CDCl_3).

Esses dados, somados aos outros sinais visualizados no espectro de RMN de ^{13}C (Tabela 5) permitiram identificar **MS5** como lupeol (MAHATO e KUNDU, 1994).

Tabela 5- Dados de RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) de **MS5** e dados do lupeol descritos na literatura (MAHATO e KUNDU, 1994)

MS5		Lupeol (CDCl_3)	
Carbono	δ_c	DEPT-135	δ_c
C1	38,7	CH_2	38,7
C2	27,4	CH_2	27,4
C3	79,0	CH	78,9
C4	38,8	C	38,8
C5	55,3	CH	55,3
C6	18,3	CH_2	18,3
C7	34,3	CH_2	34,2
C8	40,9	C	40,8
C9	50,5	CH	50,4
C10	37,2	C	37,1
C11	21,0	CH_2	20,9
C12	25,2	CH_2	25,1
C13	38,1	CH	38,0
C14	42,8	C	42,8
C15	27,5	CH_2	27,4
C16	35,6	CH_2	35,5
C17	43,0	C	43,0
C18	48,3	CH	48,2
C19	48,0	CH	47,9
C20	151,0	C	150,9
C21	29,9	CH_2	29,8
C22	40,0	CH_2	40,0
C23	28,0	CH_3	28,0
C24	15,4	CH_3	15,4
C25	16,1	CH_3	16,1
C26	16,0	CH_3	15,9
C27	14,6	CH_3	14,5
C28	18,0	CH_3	18,0
C29	109,3	CH_2	109,3
C30	19,3	CH_3	19,3

➡ **MS6:** betulina



O composto **MS6** foi isolado como um sólido branco amorfo de ponto de fusão 166-168,2 °C. No espectro de RMN de ^1H de **MS6** (Fig. 27) verificaram-se seis simpletos localizados em δ_{H} 0,79; 0,82; 0,97; 0,98; 1,02 e 1,68, correspondentes a seis grupos metila. O sinal em δ_{H} 3,20 indicou a presença de um hidrogênio carbinólico (H-3). Os sinais observados em δ_{H} 3,79 e 3,30, são relacionados a átomos de hidrogênio metilênico diastereotópico ligados a uma hidroxila (H-28). Apresentou, também, sinais em δ_{H} 4,58 e 4,68, característicos de lupanos.

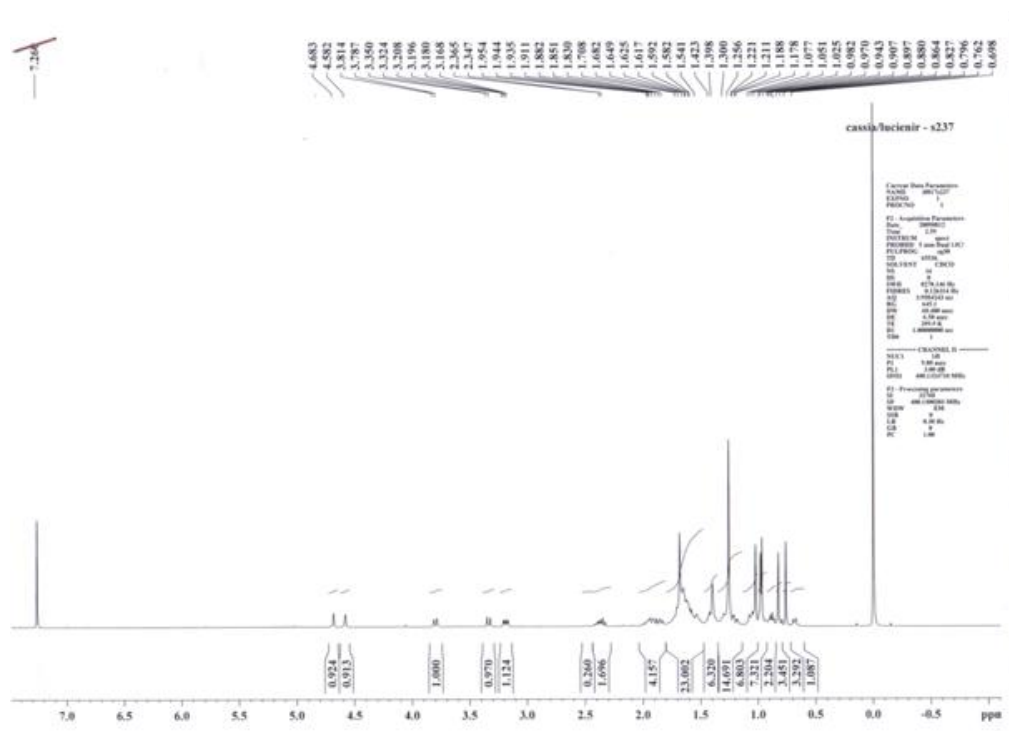


Figura 27- Espectro de RMN de ^1H de **MS6** (CDCl_3 , 400 MHz).

Na análise do espectro de RMN de ^{13}C e do subespectro DEPT-135 (Figs.28 e 29, p.61), foram observados 30 sinais de carbono, identificados como sendo seis grupos CH_3 ,

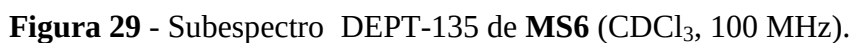
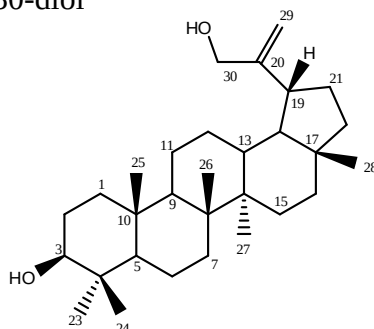


Tabela 6- Dados de RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) de **MS6** e dados da betulina descritos na literatura (KIM *et al*, 2002)

MS6			Betulina (CDCl_3)
Carbono	δ_{C}	DEPT- 135	δ_{C}
1	38,5	CH_2	38,8
2	27,2	CH_2	27,4
3	78,7	CH	79,0
4	38,6	C	38,9
5	55,1	CH	55,3
6	18,0	CH_2	18,6
7	34,0	CH_2	34,2
8	20,5	CH	20,8
9	25,0	CH	25,2
10	40,7	C	40,9
11	50,2	CH_2	50,4
12	36,9	CH_2	37,2
13	37,1	CH	37,3
14	42,4	C	42,7
15	27,1	CH_2	27,0
16	29,4	CH_2	29,2
17	47,5	C	47,8
18	48,5	CH	48,7
19	47,5	CH	47,8
20	150,6	C	150,5
21	29,6	CH_2	29,7
22	33,8	CH_2	34,1
23	27,6	CH_3	28,1
24	15,1	CH_3	15,4
25	15,8	CH_3	16,1
26	15,8	CH_3	16,0
27	14,5	CH_3	14,8
28	60,3	CH_2	60,4
29	109,4	CH_2	109,4
30	18,9	CH_3	19,10

➡ **MS7:** lup-20(29)-en-3,30-diol



O triterpeno **MS7** apresentou-se como um sólido branco amorfo de ponto de fusão 243-244 °C. No espectro de RMN de ^1H de **MS7** (Fig. 30) foram observados seis simpletos referentes aos átomos de hidrogênio metílicos e um sinal em δ_{H} 3,91, referente a átomos de hidrogênio metilênico de carbono carbinólico. Foi observado também um multipletto em δ_{H} 2,98, referente a átomo de hidrogênio metínico de carbono carbinólico. Além disso, os sinais em δ_{H} 4,88 e em δ_{H} 4,77 foram atribuídos aos átomos de hidrogênio olefínicos, característicos do esqueleto lupano.

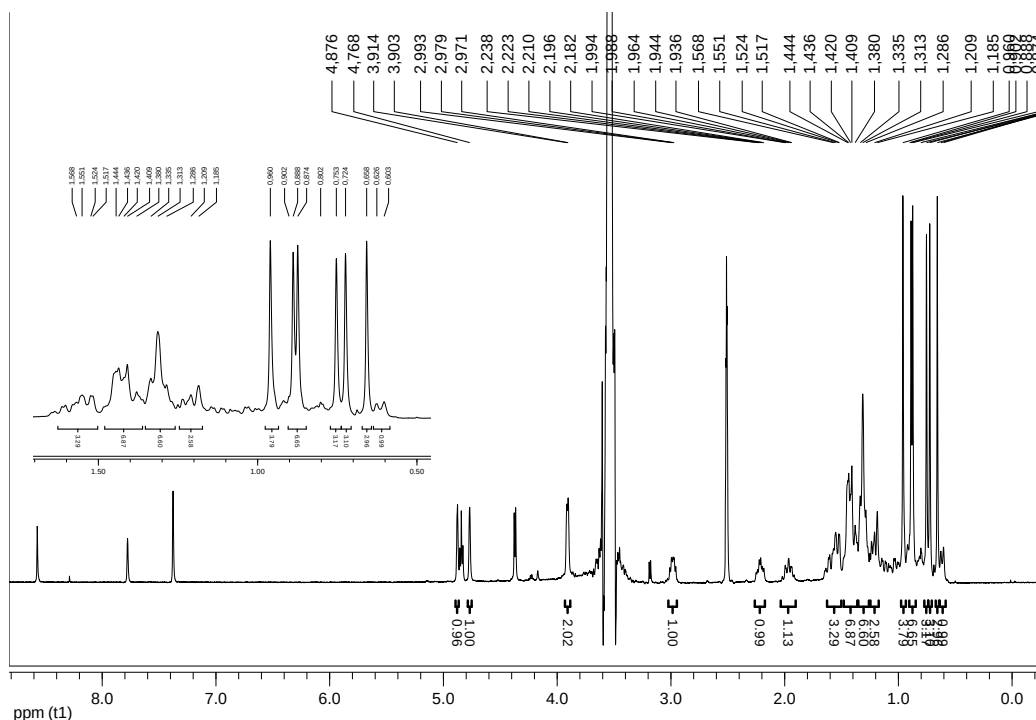


Figura 30- Espectro de RMN de ^1H de **MS7** (DMSO- d_6 / piridina- d_5 , 400 MHz).

A análise do espectro de RMN de ^{13}C e do subespectro DEPT-135 (Figs. 31 e 32, p.64), indicou a presença de 30 átomos de carbono, sendo cinco metílicos, doze metilênicos, seis grupos metínicos e seis átomos de carbono não hidrogenado. Constatou-se que o sinal em

δ_C 155,0 estava mais desprotegido e o sinal em δ_C 105,7, mais protegido em relação aos sinais observados para o lupeol, devido ao efeito anisotrópico. O sinal em δ_C 77,0 foi atribuído ao carbono hidroxilado C-3 e o sinal em δ_C 62,8 foi associado ao carbono metilênico C-30. Esses dados, somados aos outros sinais visualizados no espectro de RMN de ^{13}C e a comparação com a literatura (Tabela 7, p.65) permitiram identificar **MS7** como lup-20(29)-en-3,30-diol.

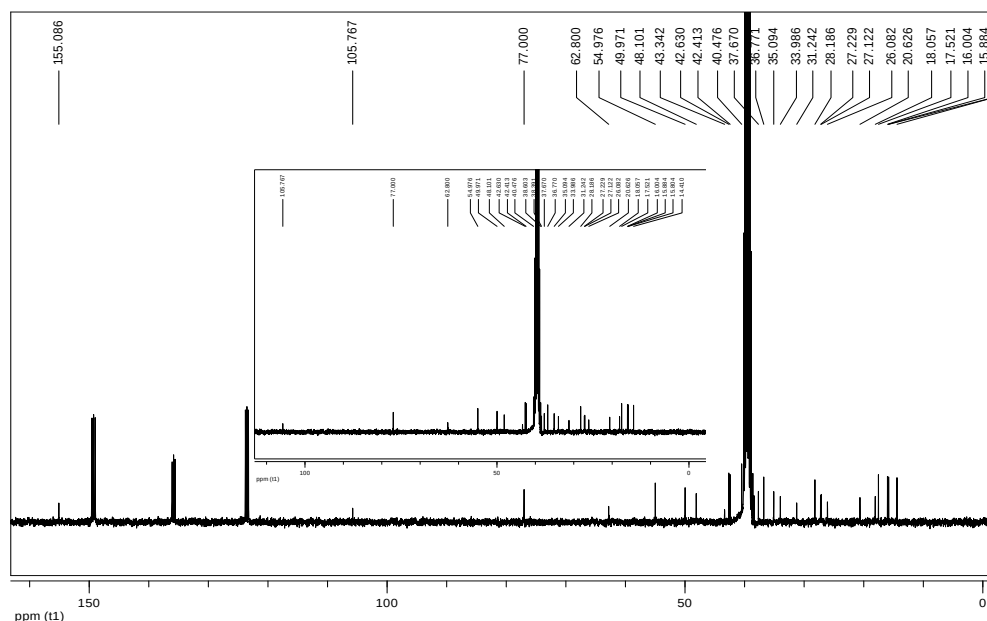


Figura 31 – Espectro de RMN de ^{13}C de **MS7** (DMSO-d₆/ piridina-d₅, 100 MHz).

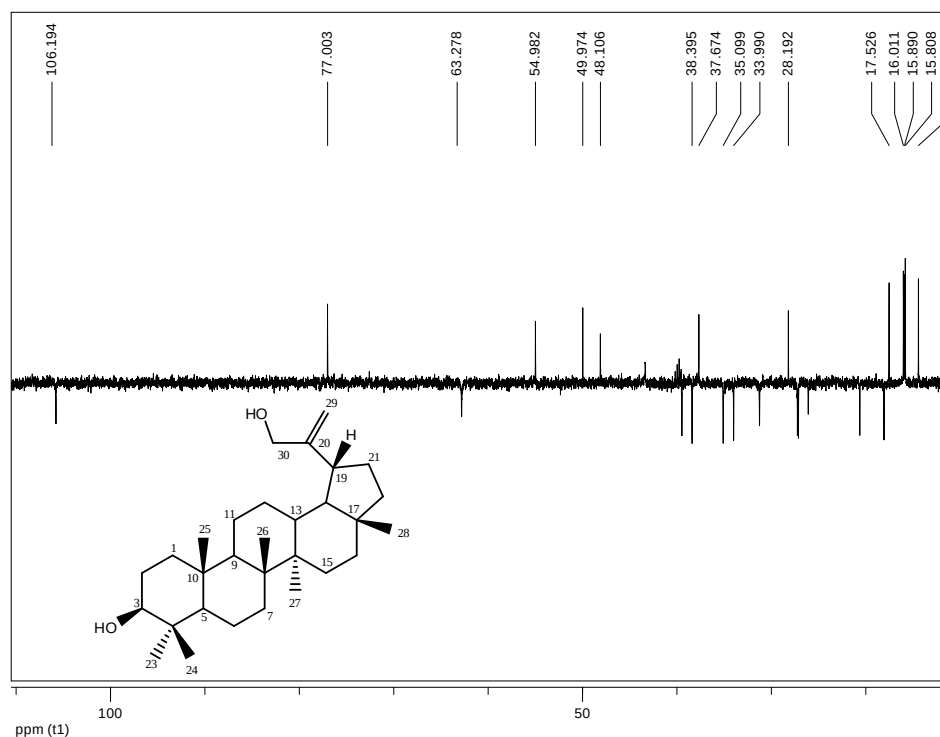
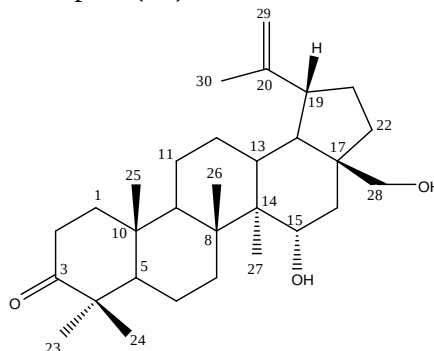


Figura 32– Subespectro DEPT-135 de **MS7** (DMSO-d₆/ piridina-d₅, 100 MHz).

Tabela 7- Dados de RMN de ^{13}C (100 MHz, DMSO/piridina) de **MS7** e dados do lup-20(29)-en-3,30-diol descritos na literatura (ABDEL- MOGIB,1999)

MS7			lup-20(29)-en-3,30-diol (CDCl_3)
Carbono	δ_{C}	DEPT-135	δ_{C}
1	38,5	CH_2	38,7
2	27,2	CH_2	27,4
3	77,0	CH	78,7
4	38,4	C	38,9
5	55,0	CH	55,3
6	18,1	CH_2	18,3
7	34,0	CH_2	34,3
8	40,0	C	40,8
9	50,0	CH	50,3
10	36,8	C	37,1
11	20,6	CH_2	20,9
12	26,1	CH_2	26,5
13	37,7	CH	37,9
14	42,6	C	43,0
15	27,2	CH_2	27,4
16	35,1	CH_2	35,4
17	42,6	C	42,7
18	48,1	CH	48,8
19	43,4	CH	43,8
20	155,0	C	154,9
21	31,2	CH_2	31,7
22	39,9	CH_2	39,8
23	28,2	CH_3	28,0
24	16,0	CH_3	16,1
25	15,9	CH_3	16,0
26	15,8	CH_3	15,5
27	14,4	CH_3	14,5
28	17,5	CH_3	17,7
29	105,7	CH_2	106,3
30	62,8	CH_2	64,4

☛ **MS8:** 3-oxo-15 α ,28-dihidroxi-lup-20(29)-eno



O composto **MS8** apresentou-se como um sólido branco amorfo de ponto de fusão 251-253,3 °C. No espectro de RMN de ^1H de **MS8** (Fig. 33) foram observados os sinais em δ_{H} 4,61 e em δ_{H} 4,68, relativos a átomos de hidrogênio olefinicos, característicos de lupanos. Observou-se também um sinal em δ_{H} 4,23 (1H, dd, $J = 4,8; 6,4$ Hz, H-15), associado a hidrogênio metínico de carbono carbinólico. Os sinais em δ_{H} 3,39 (1H, d, $J = 10,8$ Hz, H-28_a) e δ_{H} 3,67 (1H, d, $J = 10,8$ Hz, H-28_b) foram atribuídos a átomos de hidrogênio metilênico diastereotópico de carbono carbinólico.

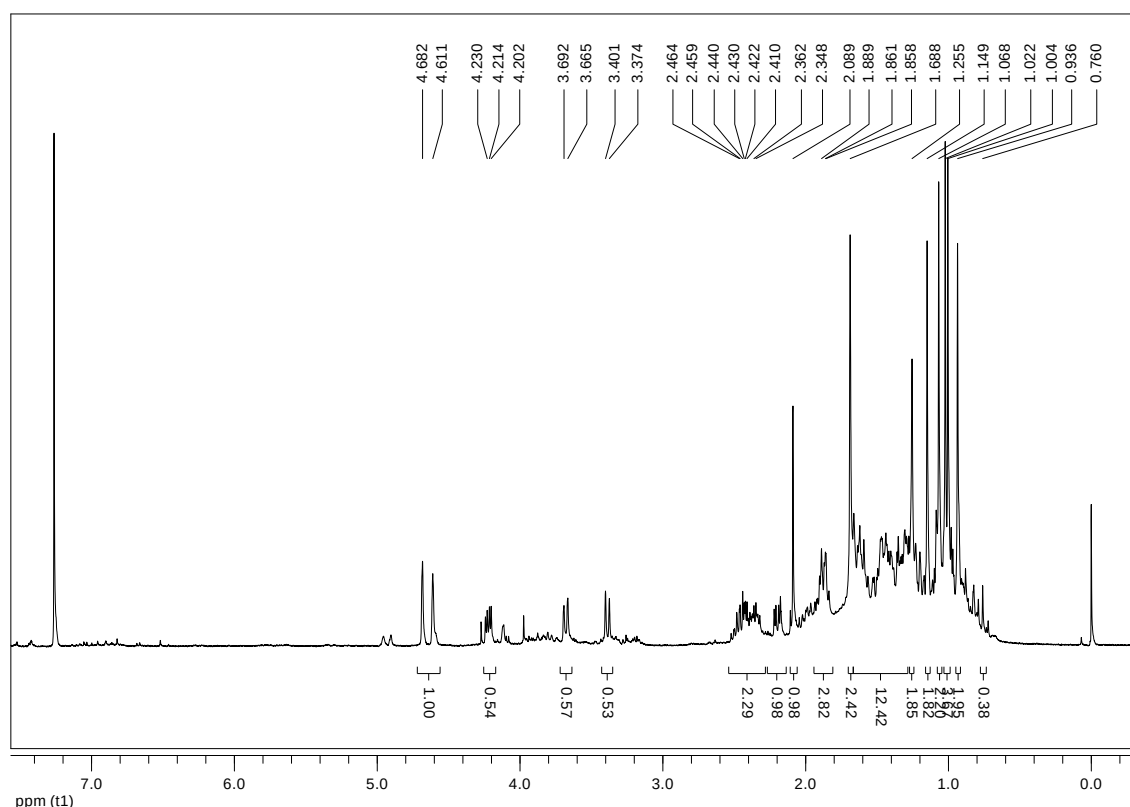


Figura 33- Espectro de RMN de ^1H de **MS8** (400 MHz, CDCl_3).

No espectro de RMN de ^{13}C e DEPT-135 (Figs. 34 e 35, p. 67), foram observados 30 sinais de carbono, classificados como sendo seis CH_3 , doze CH_2 , cinco CH e sete átomos de

carbono não hidrogenado. Foram observados sinais em δ_C 69,1, atribuído a carbono metínico hidroxilado e em δ_C 61,7, atribuído a carbono metilênico hidroxilado. De posse de todos os dados de **MS8** e após comparação com a literatura (Tabela 8, p.68), a substância foi identificada como 3-oxo-15 α ,28-dihidroxi-lup-20(29)-eno.

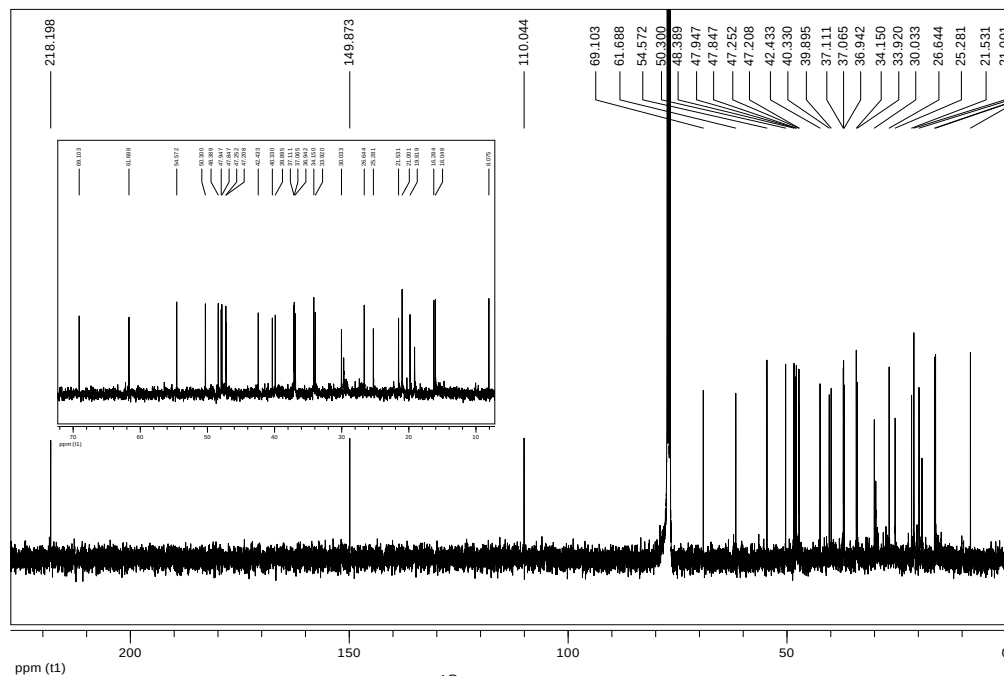
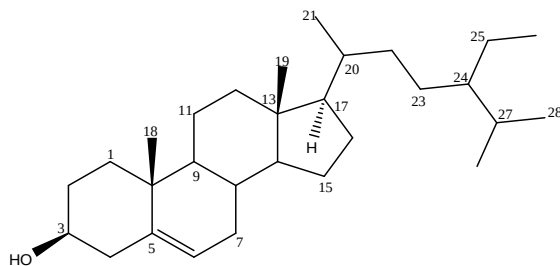


Tabela 8- Dados de RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) de **MS8** e dados do 3-oxo-15 α ,28-dihidroxi-lup-20(29)-eno descritos na literatura (MAHATO e KUNDU,1994)

MS8			3-oxo-15 α ,28-dihidroxi-lup-20(29)-eno (CDCl_3)
Carbono	δ_{C}	DEPT-135	δ_{C}
1	39,9	CH_2	39,9
2	34,2	CH_2	34,1
3	218,2	C	218,3
4	47,2	C	47,2
5	54,6	CH	54,5
6	19,8	CH_2	19,8
7	36,9	CH_2	36,9
8	42,4	C	42,4
9	50,3	CH	50,3
10	37,1	C	37,1
11	21,5	CH_2	21,5
12	25,3	CH_2	25,2
13	37,1	CH	37,0
14	47,8	C	47,8
15	69,1	C	69,0
16	40,3	CH_2	40,3
17	47,9	C	47,9
18	48,4	CH	48,3
19	47,2	CH	47,2
20	149,9	C	149,9
21	30,0	CH_2	30,0
22	33,9	CH_2	33,9
23	26,6	CH_3	26,6
24	21,0	CH_3	21,0
25	16,1	CH_3	16,1
26	16,3	CH_3	16,3
27	8,1	CH_3	8,1
28	61,7	CH_2	61,5
29	110,0	CH_2	110,0
30	19,2	CH_3	19,1

MS9: β -sitosterol



O composto **MS9** apresentou-se como um sólido branco de ponto de fusão 135-137 °C. O espectro de RMN de ^1H de **MS9** (Fig.36) apresentou seis simpletos, referentes a 6 grupos metila. Foi observado ainda um sinal em δ_{H} 5,35 (1H, d, $J = 5,2$ Hz, H-6), característico de hidrogênio de dupla ligação em C-5. O sinal em δ_{H} 3,52 (1H, dd, $J = 4,8; 9,6$ Hz, H-3) foi atribuído ao hidrogênio metínico de carbono carbinólico (C-3). A comparação dos dados obtidos com os da literatura (Tabela 9, p. 70) e comparação por CCDS com amostra autêntica de β -sitosterol permitiu identificar **MS9** como aquele esteroide.

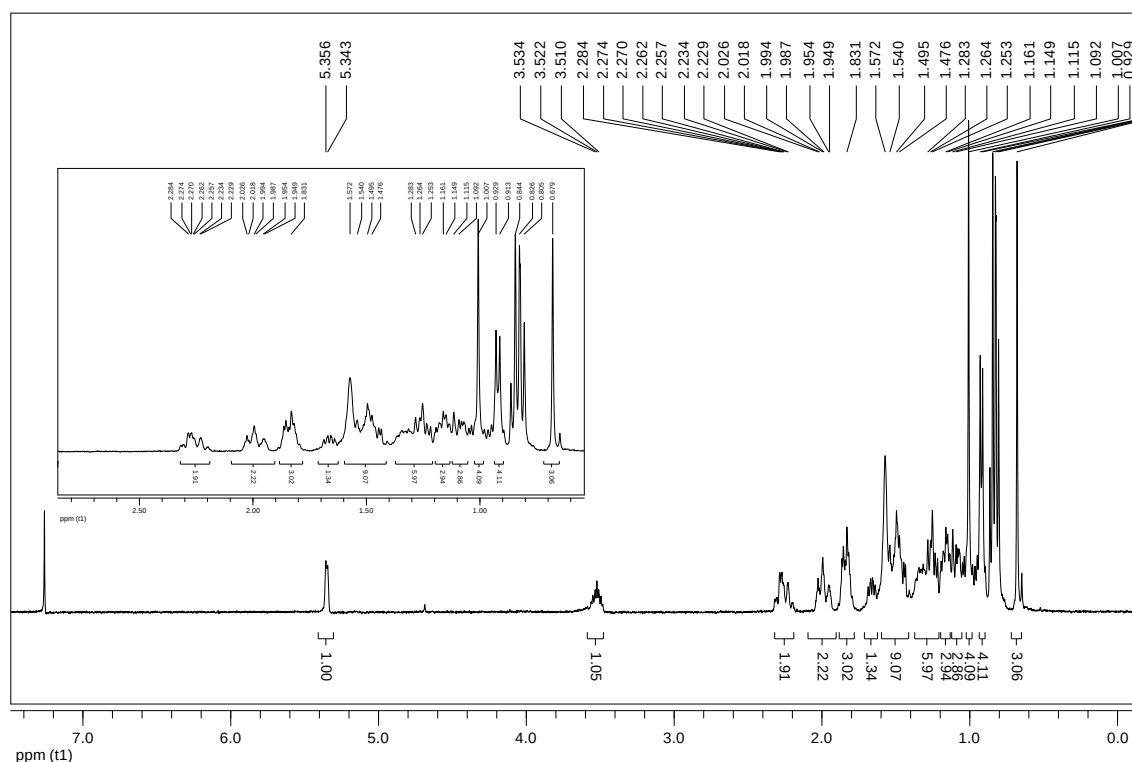
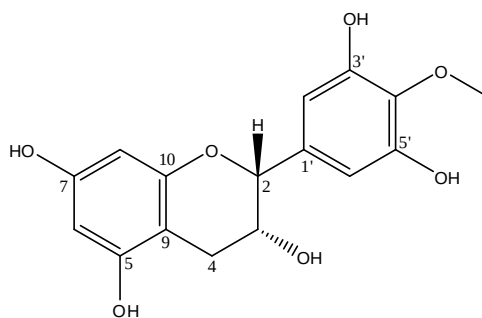


Figura 36- Espectro de RMN de ^1H de **MS9** (CDCl_3 , 400 MHz).

Tabela 9- Dados de RMN de ^1H (CDCl_3 , 400 MHz) de **MS9** e dados do β -sitosterol descritos na literatura (SILVA, 2007)

Hidrogênio	MS9	β -sitosterol (CDCl_3)
	δ_{H}	δ_{H}
3	3,52 (dd, $J= 4,8; 9,6$ Hz)	3,52 (dd, $J= 4,8; 9,6$ Hz)
6	5,35 (d, $J= 5,2$ Hz)	5,35 (d, $J= 5,2$ Hz)
18	0,68(s)	0,68 (s)
19	1,01(s)	1,01 (s)
21	0,92 (d, $J= 6,4$ Hz)	0,92 (d, $J= 6,5$ Hz)
26	0,82 (s)	0,83 (s)
28	0,80 (s)	0,81 (s)
29	0,84 (s)	0,84 (s)

☞ **MS10:** 4'-O-metilepigallocatequina



O composto **MS10** apresentou-se como um sólido amorfo ligeiramente amarelado, de faixa de fusão 136,0-139,0 °C. No espectro de RMN de ^1H de **MS10** (Fig. 37, p.71) foram observados sinais em δ_{H} 6,53 (2H, s, H-2'; H-6'), δ_{H} 5,95 (1H, d, $J= 2,0$ Hz, H-8) e δ_{H} 5,93 (1H, d, $J= 2,4$ Hz, H-6) referentes a hidrogênio de anel aromático. Estes sinais, juntamente com aqueles observados em δ_{H} 2,85 (1H, dd, $J= 4,2; 16,4$ Hz, H-4a) e δ_{H} 2,73 (1H, dd, $J= 4,2; 16,4$ Hz, H-4b), atribuídos a átomos de hidrogênio metilênico, sugeriram para **MS10** a estrutura de uma flavana do tipo epigallocatequina (MIRANDA, 2007). O sinal em δ_{H} 3,79

(3H, s) é relativo a átomos de hidrogênio de grupo metoxila e aqueles observados em δ_H 4,78 (1H, s, H-2) e em δ_H 4,19 (1H, sl, H-3) foram associados aos hidrogênios carbinólicos.

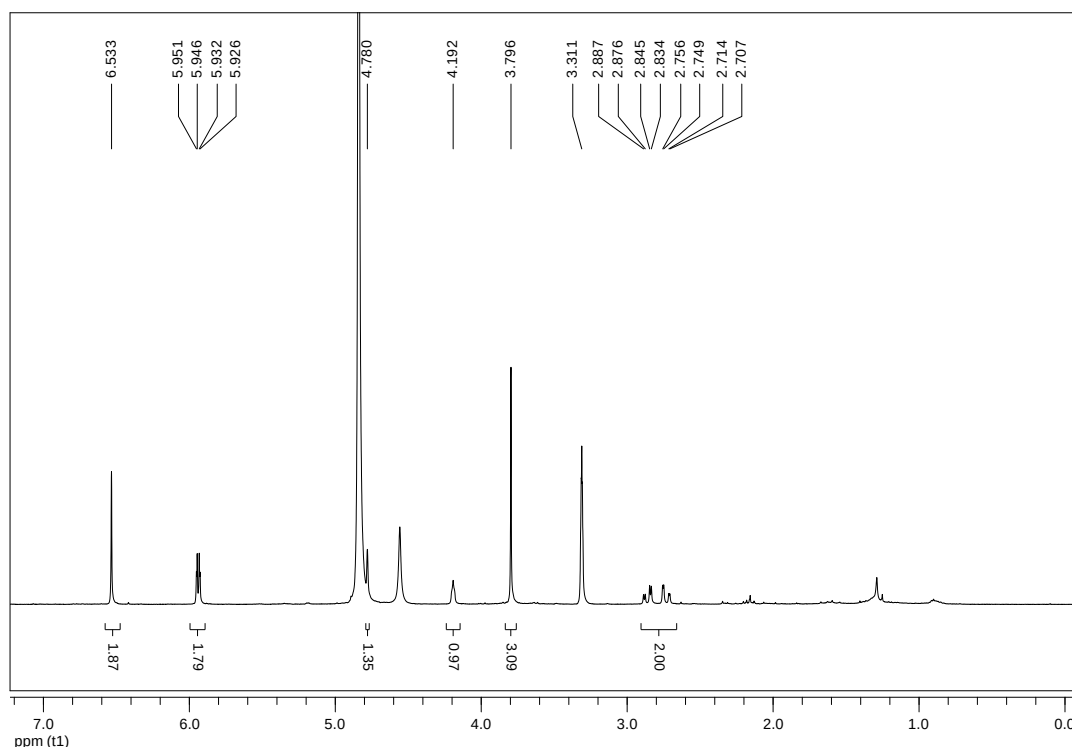


Figura 37- Espectro de RMN de ^1H de **MS10** (CD_3OD , 400 MHz).

No espectro de RMN de ^{13}C e DEPT-135 (Figs. 38 e 39, p. 72), foram observados 14 sinais de carbono, que foram classificados como sendo um CH_3 de grupo metoxila, um CH_2 , cinco CH e cinco átomos de carbono não hidrogenado. A análise dos dados obtidos e comparação com a literatura (Tabela 10, p.73), permitiu sugerir a estrutura da 4'-O-metil-epigallocatequina para **MS10**.

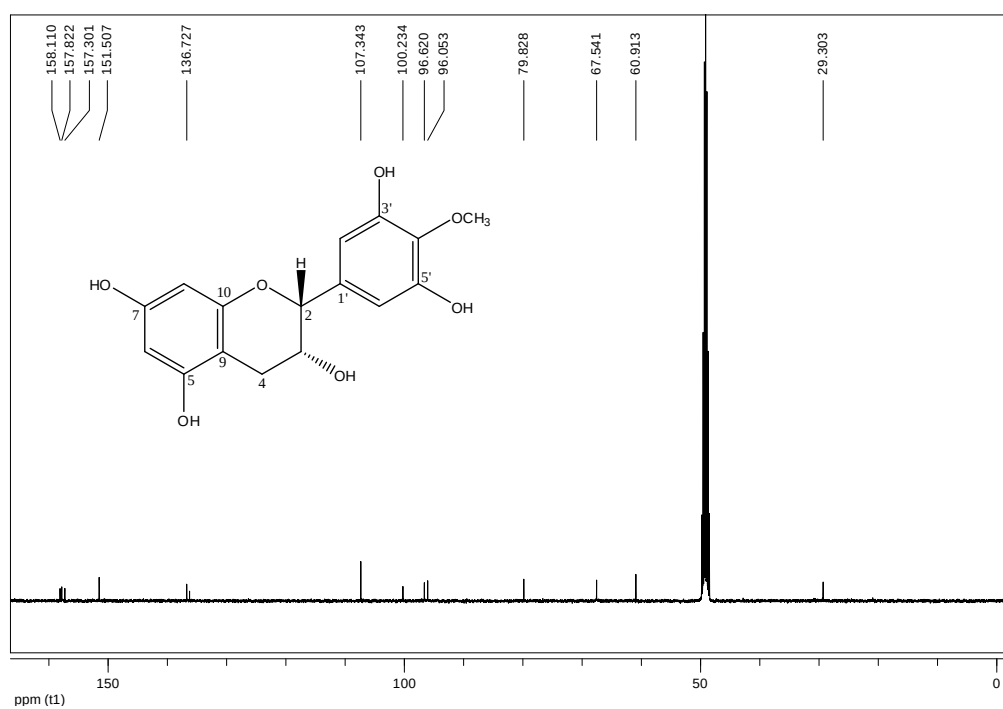


Figura 38- Espectro de RMN de ^{13}C de **MS10** (CD_3OD , 100 MHz).

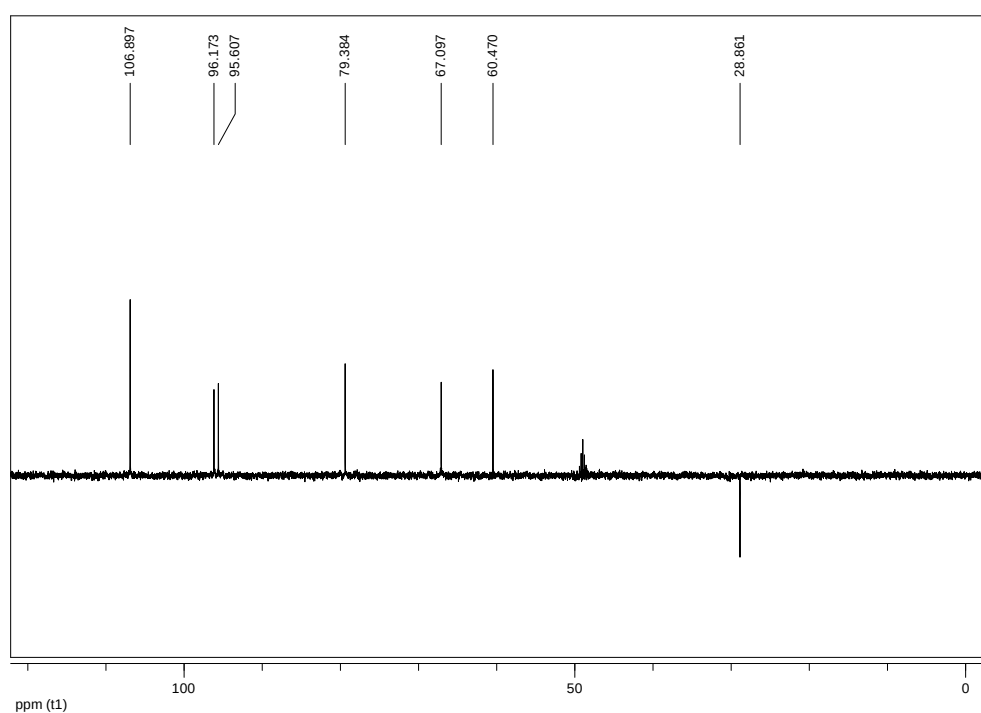
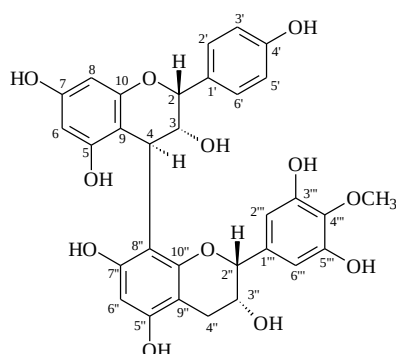


Figura 39- Subspectro DEPT-135 de **MS10** (CD_3OD , 100 MHz).

Tabela 10- Dados de RMN de ^{13}C (100 MHz, CD_3OD) de **MS10** e dados da 4'-O-metil-epigallocatequina descritos na literatura (MIRANDA, 2007)

MS10			4'-O-metil- epigallocatequina (CD_3OD)
Carbono	δ_{C}	DEPT-135	δ_{C}
2	79,8	CH	79,8
3	67,5	CH	67,6
4	29,3	CH_2	29,3
5	100,2	C	100,2
6	96,6	CH	96,6
7	157,3	C	157,3
8	96,0	CH	96,0
9	158,1	C	158,1
10	157,8	C	157,9
1'	136,7	C	136,8
2'	107,3	CH	107,3
3'	151,5	C	151,5
4'	136,3	C	136,3
5'	151,5	C	151,5
6'	107,3	CH	107,3
OMe	60,9	CH_3	60,9

MS11: proantocianidina A

O composto **MS11** apresentou-se como um sólido amorfo de cor vinho, de ponto de fusão 200,2-203,0 °C. No espectro de RMN de ^1H de **MS11** (Fig. 40, p. 74) foram observados sinais em δ_{H} 7,21, δ_{H} 6,72, δ_{H} 6,59 e δ_{H} 5,93 referentes a hidrogênio de anel aromático. O sinal em δ_{H} 3,75 foi atribuído aos átomos de hidrogênio metílico do grupo metoxila, assim

como o sinal em δ_H 2,89 foi atribuído a hidrogênios metilênicos vizinhos a carbono aromático. Os sinais em δ_H 5,14 e em δ_H 3,89 foram associados, respectivamente, ao hidrogênio metínico vizinho a oxigênio de ligação C-O e ao hidrogênio metínico geminal a grupo OH.

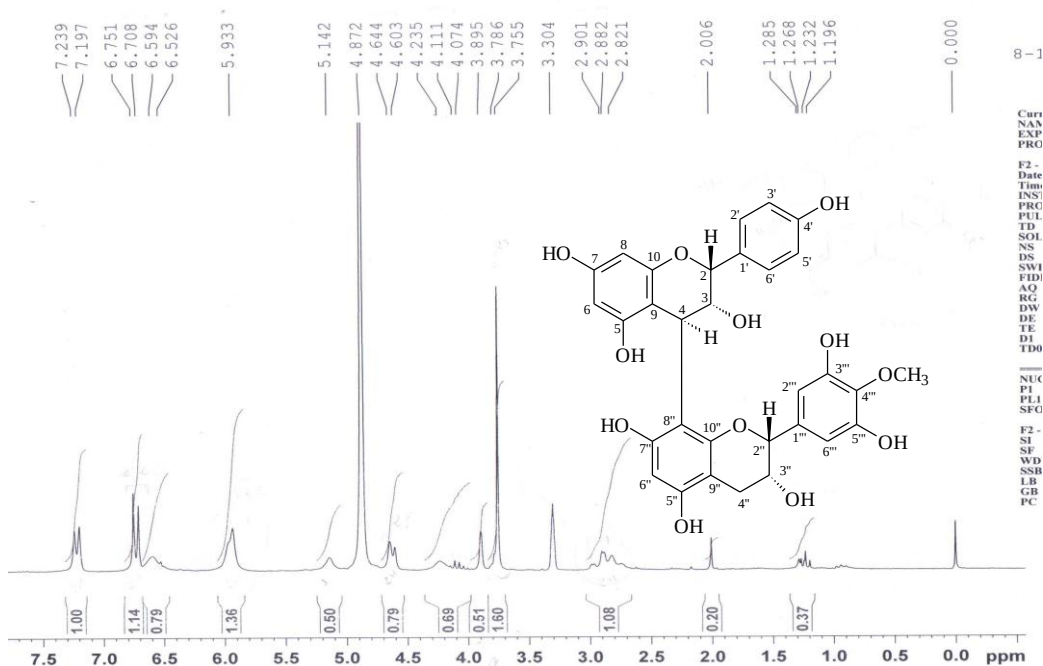


Figura 40- Espectro de RMN de ^1H de **MS11** (CD_3OD , 400 MHz).

O espectro de RMN de ^{13}C (Fig.41, p.75) de **MS11** apresentou 17 sinais. A comparação de todos os deslocamentos químicos com a literatura (Tabela 11, p.75) permitiu identificar **MS11** como proantocianidina A.

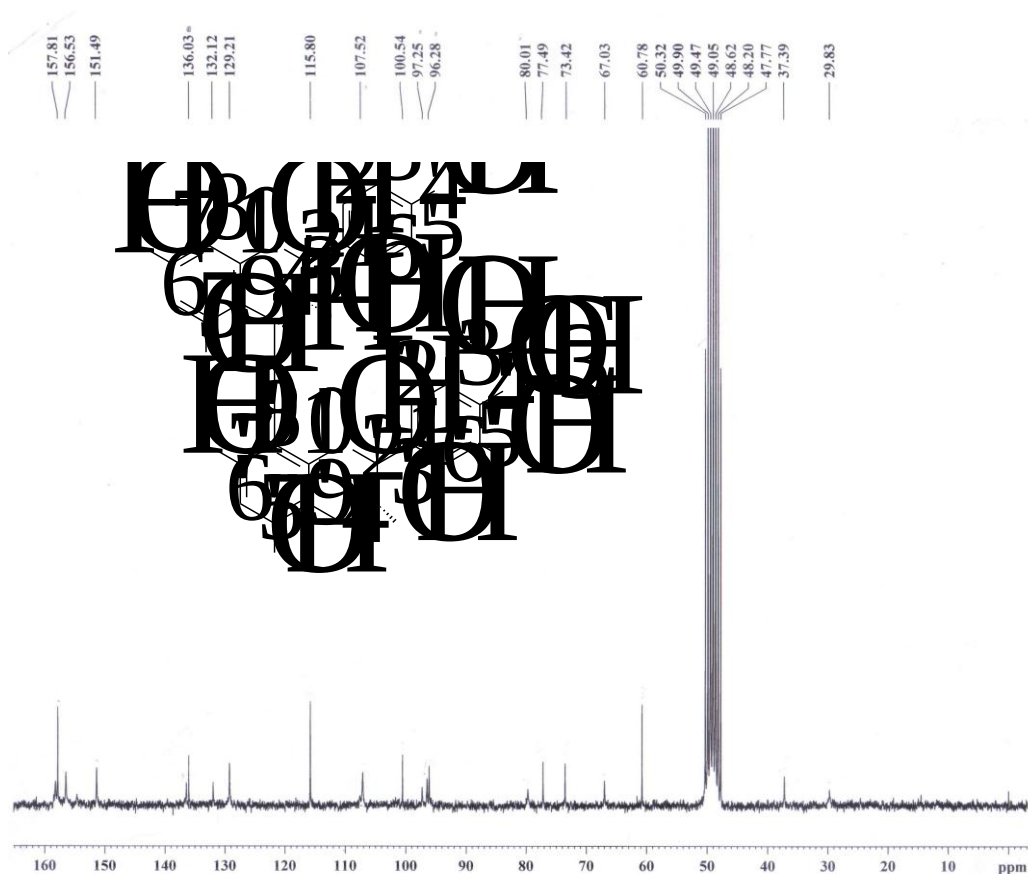
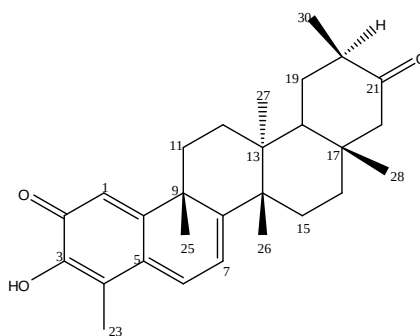


Figura 41- Espectro de RMN de ^{13}C de **MS11** (CD_3OD , 100 MHz).

Tabela 11- Dados de RMN de ^{13}C (CD_3OD , 100 MHz) de **MS11** e dados da proantocianidina A descritos na literatura (SALAZAR, 2006)

Carbono	Proantocianidina A	MS11	Carbono	Proantocianidina A	MS11
2	80,0	78,1	3''	67,0	65,0
3	73,4	71,7	4''	29,8	28,2
4	37,4	39,5	5''	-	-
5	-	-	6''	96,3	94,1
6	97,2	95,1	7''	157,8	156,2
7	157,8	156,2	8''	107,5	106,1
8	96,3	94,1	9''	100,5	98,6
9	100,5	98,6	10''	156,5	155,8
10	156,5	155,8	1'''	132,1	132,1
1'	129,2	129,7	2'''	107,5	106,1
2'	129,2	128,2	3'''	151,4	150,4
3'	115,8	114,5	4'''	136,0	134,4
4'	156,5	157,8	5'''	151,4	150,4
5'	114,5	115,8	6'''	107,5	106,1
6'	129,3	128,2	OMe	60,8	59,0
2''	77,4	78,1			

☞ **MS12:** tingenona



MS12 foi obtido como um sólido alaranjado de ponto de fusão 135-137 °C. O espectro de RMN de ^1H de **MS12** (Fig. 42) apresentou seis sinais referentes a seis grupos metila. Os sinais observados em δ_{H} 7,04 (H-7), 6,54 (H-1) e em 6,37 (H-6) são característicos de compostos da classe dos quinonametídeos. O sinal em δ_{H} 2,21 foi associado aos hidrogênios da metila C-23 ligada a carbono sp^2 (GUNATILAKA *et al.*, 1989).

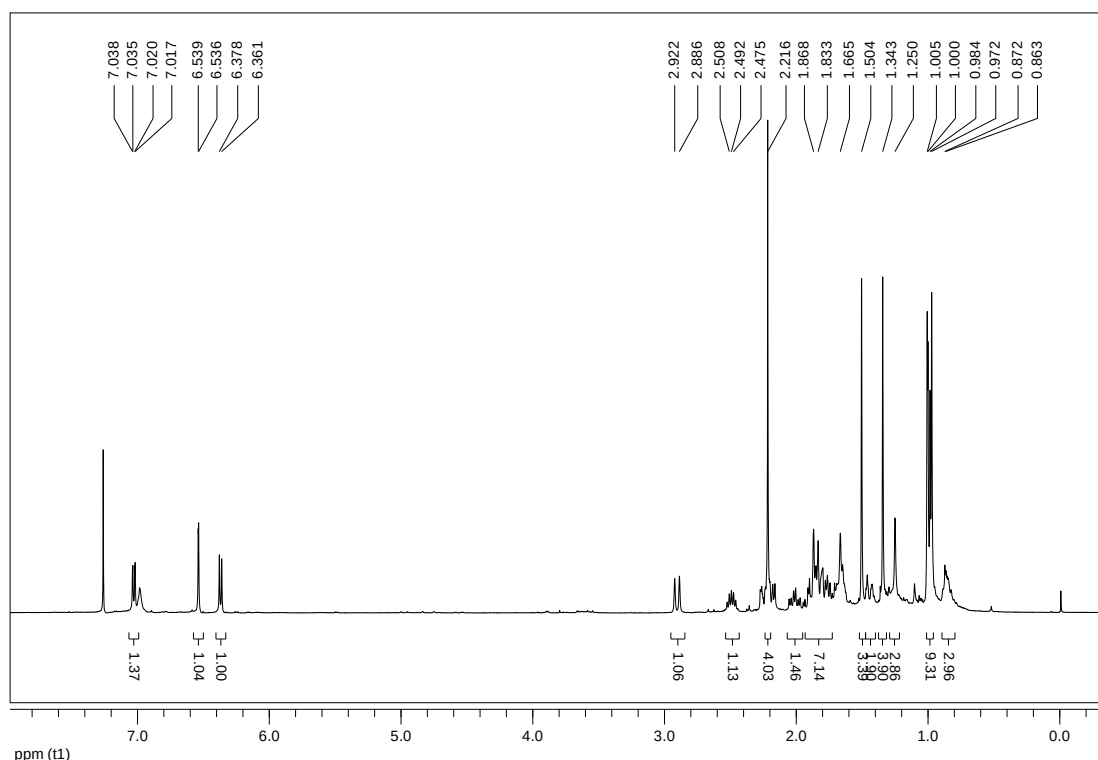


Figura 42. Espectro de RMN de ^1H de MS12 (CDCl_3 , 400 MHz)

O espectro de RMN de ^{13}C de **MS12** e subespectro DEPT-135 (Figs. 43 e 44, p.77) apresentaram sinais correspondentes a 28 átomos de carbono, sendo seis metílicos, seis metilênicos, cinco metínicos e onze átomos de carbono não hidrogenado. A análise dos dados

obtidos e comparação dos mesmos com a literatura (GUNATILAKA *et al.*, 1989; Tabela 12, p.78) permitiu identificar **MS12** como tingenona.

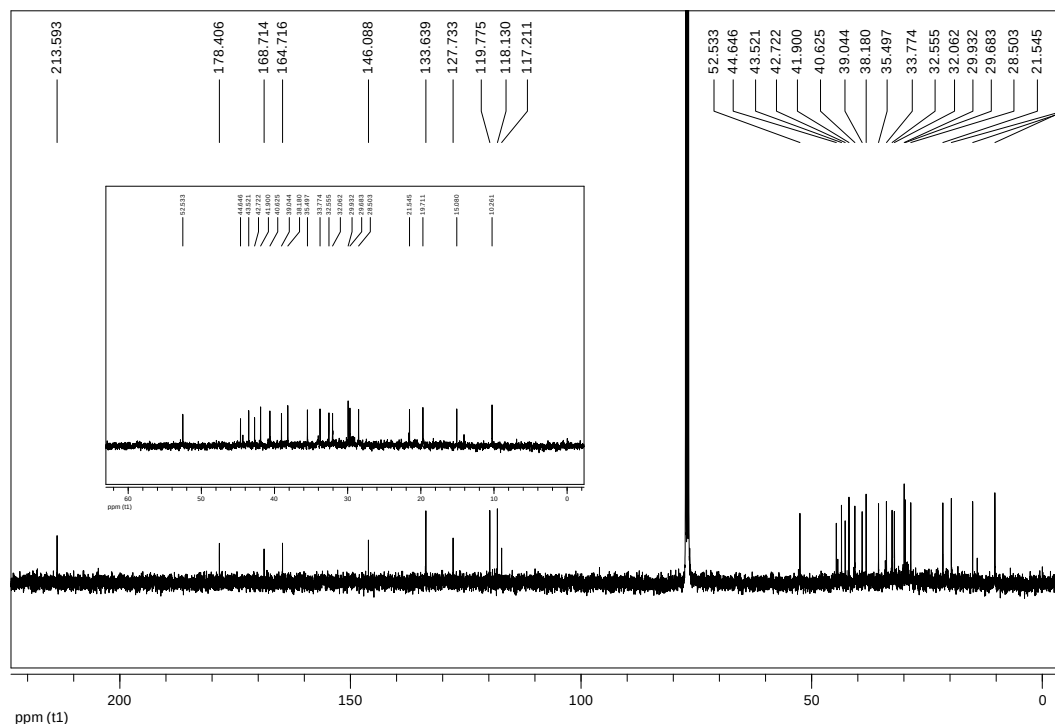


Figura 43. Espectro de RMN de ^{13}C de **MS12** (CDCl_3 , 100 MHz)

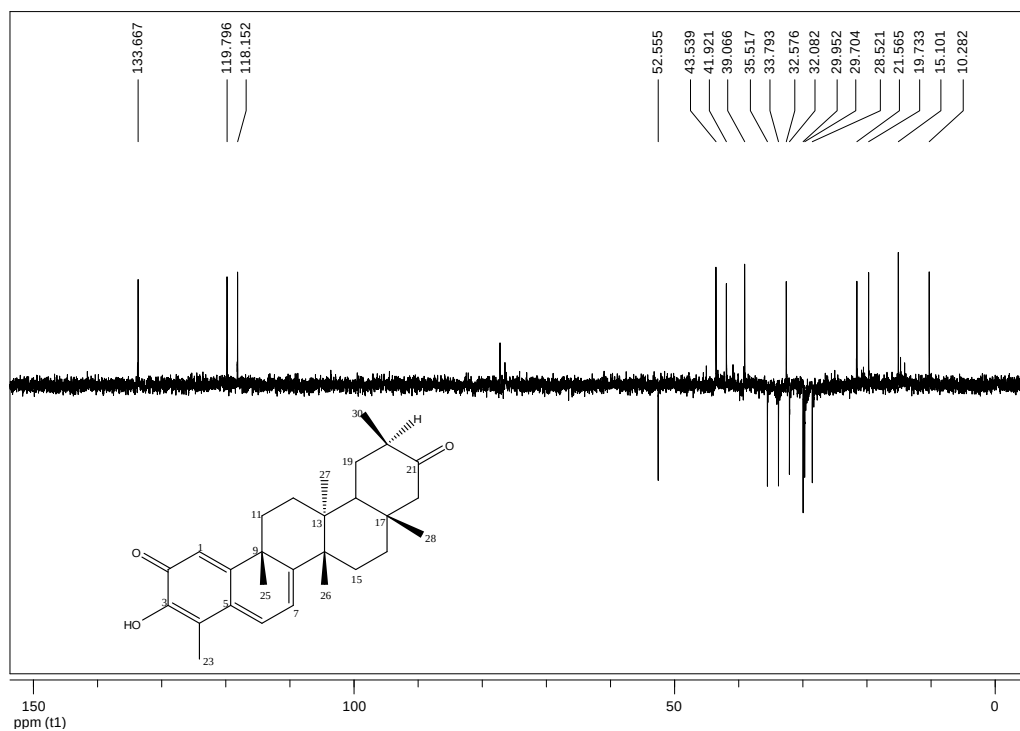
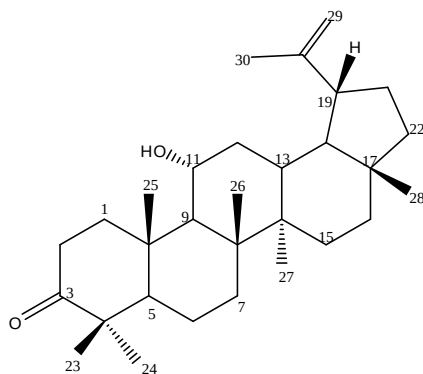


Figura 44. Subespectro DEPT-135 de **MS12** (CDCl_3 , 100 MHz)

Tabela 12. Dados de RMN de ^{13}C (CDCl_3 , 100 MHz) de **MS12** e dados da tingenona descritos na literatura (GUNATILAKA, 1989)

MS12			Tingenona (CDCl_3)
Carbono	δ_{C}	DEPT-135	δ_{C}
1	119,8	CH	119,8
2	178,4	C	178,4
3	146,1	C	146,1
4	117,1	C	117,1
5	127,8	C	127,8
6	133,7	CH	133,5
7	118,2	CH	118,1
8	168,7	C	168,6
9	42,7	C	42,7
10	164,7	C	164,7
11	33,8	CH_2	33,8
12	29,9	CH_2	30,0
13	40,6	C	40,6
14	44,6	C	44,7
15	28,5	CH_2	28,5
16	35,5	CH_2	35,5
17	38,2	C	38,2
18	43,5	CH	43,6
19	32,1	CH_2	32,1
20	41,9	CH	41,9
21	213,6	C	213,5
22	52,5	CH_2	52,5
23	10,3	CH_3	10,3
25	39,0	CH_3	39,1
26	21,6	CH_3	21,6
27	19,7	CH_3	19,7
28	32,6	CH_3	32,6
30	15,1	CH_3	15,1

MS13: rigidinol

MS13 foi obtido como um sólido branco amorfo de ponto de fusão 154-157 °C. O espectro de RMN de ^1H de **MS13** (Fig. 45) apresentou sinais em δ_{H} 4,72 (sl) e 4,59 (d, $J = 1,2$ Hz), característicos de átomos de hidrogênio metilênico de dupla ligação terminal de lupanos. Foi observado também um sinal em δ_{H} 3,89 (1H, dt, $J = 6,0; 10,8$ Hz, H-11) associados a hidrogênio metínico de carbono hidroxilado.

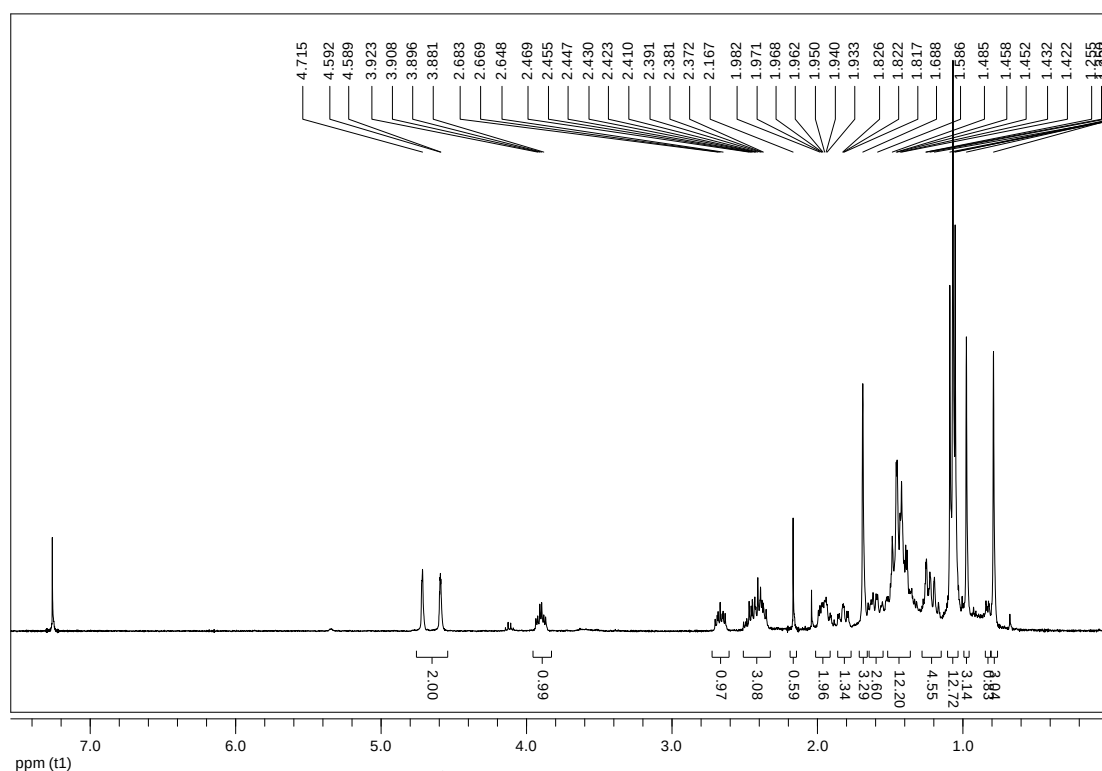


Figura 45- Espectro de RMN de ^1H de **MS13** (CDCl_3 , 400 MHz).

O espectro de RMN de ^{13}C (Fig.46, p.80) de **MS13** apresentou 30 sinais, que com o auxílio do subespectro DEPT-135 (Fig.47, p. 80) foram classificados como sendo sete metílicos, dez metilênicos, seis metínicos e sete átomos de carbono não hidrogenado. A

comparação dos dados obtidos com os da literatura (Tabela 13, p.81) permitiu identificar **MS13** como rigidinol.

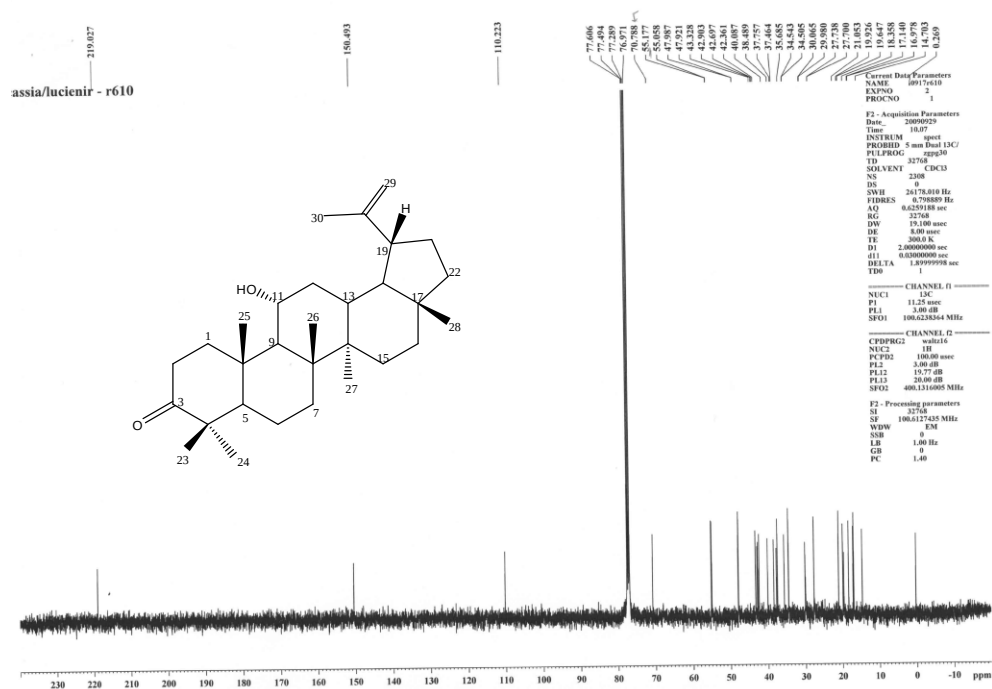


Figura 46-Espectro de RMN de ^{13}C de **MS13** (CDCl_3 , 400 MHz).

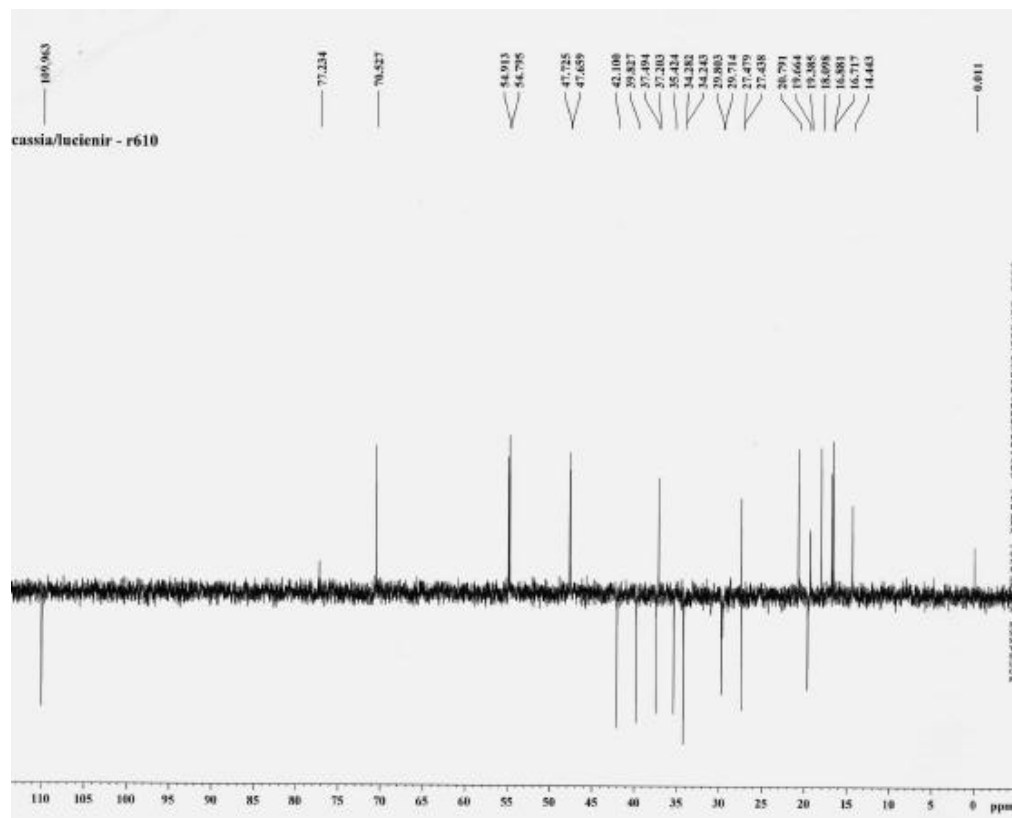
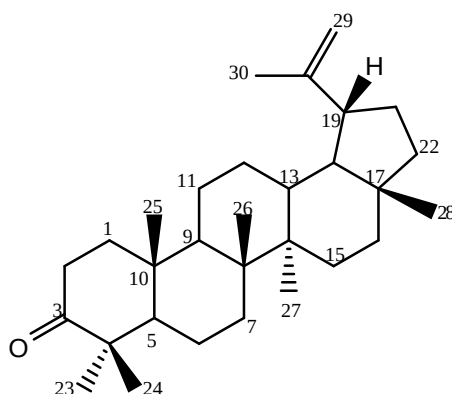


Figura 47- Subespectro DEPT-135 de **MS13** (CDCl_3 , 400 MHz).

Tabela 13. Dados de RMN de ^{13}C de **MS13** e dados do rigidinol descritos na literatura (SILVA *et al.*, 2005)

Carbono	MS13		Rigidinol (CDCl_3)
	δ_{C}	DEPT	δ_{C}
1	42,1	CH_2	42,0
2	34,2	CH_2	34,2
3	219,0	C	218,8
4	47,9	C	47,6
5	54,8	CH	54,7
6	19,6	CH_2	19,6
7	34,2	CH_2	34,2
8	42,4	C	42,4
9	54,9	CH	54,8
10	38,5	C	38,2
11	70,8	CH	70,4
12	37,5	CH_2	37,4
13	37,2	CH	37,1
14	42,7	C	42,6
15	27,5	CH_2	27,4
16	35,4	CH_2	35,4
17	42,9	C	43,0
18	47,6	CH	47,6
19	47,7	CH	47,7
20	150,5	C	150,0
21	29,7	CH_2	29,7
22	39,8	CH_2	39,8
23	27,4	CH_3	27,4
24	20,8	CH_3	20,7
25	16,7	CH_3	16,7
26	16,9	CH_3	16,8
27	14,7	CH_3	14,4
28	18,1	CH_3	18,0
29	110,2	CH_3	109,9
30	19,4	CH_3	19,3

☞ **MS14:** lupenona



O triterpeno **MS14** apresentou-se como um sólido branco amorfo de ponto de fusão 199-201 °C. O espectro de RMN de ^1H de **MS14** (Fig. 48) exibiu sinais em δ_{H} 4,69 e 4,57, característicos de átomos de hidrogênio metilênico de dupla ligação terminal de lupanos. Apresentou também sete simpletos referentes a hidrogênios de grupo metila. A comparação dos dados do espectro de **MS14** com os dados da literatura (Tabela 14, p.83), associada à comparação com amostra autêntica em placa de CCDS, permitiu identificá-lo como lupenona.

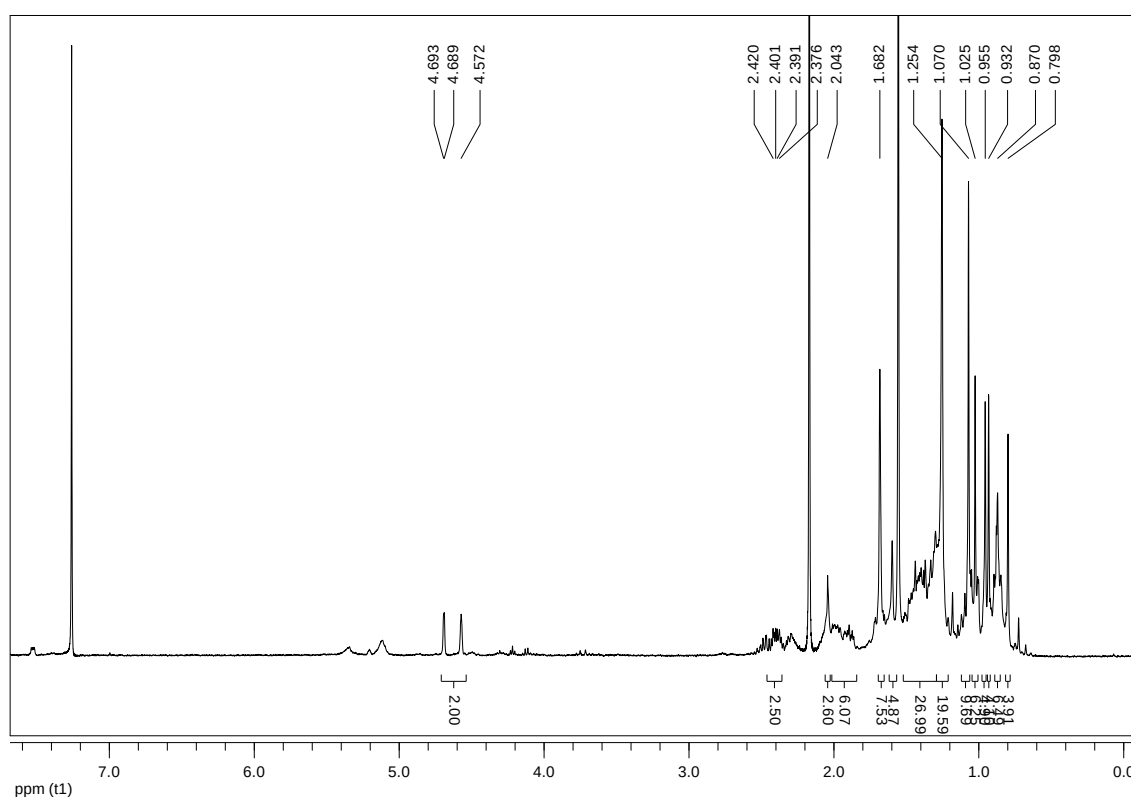


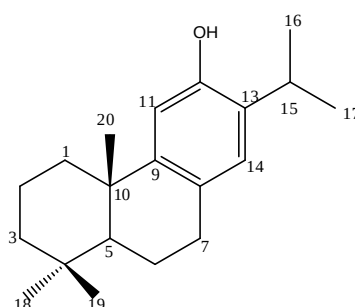
Figura 48- Espectro de RMN de ^1H de **MS14** (CDCl_3 , 400 MHz).

Tabela 14. Dados de RMN de ^1H de **MS14** (CDCl_3 , 400 MHz) e dados da lupenona descritos na literatura (HUI e LI, 1976)

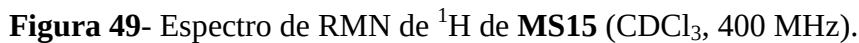
Nº H	MS14	Lupenona (CDCl_3)
3	δ_{H}	δ_{H}
23	1,07 (s)	1,07 (s)
24	1,02 (s)	1,02 (s)
25	0,93 (s)	0,93 (s)
26	0,96 (s)	0,95 (s)
27	0,87 (s)	0,87 (s)
28	0,80 (s)	0,79 (s)
29	4,69 (d, J= 1,6 Hz); 4,57(sl)	4,69*; 4,57*
30	1,68 (s)	1,68 (s)

* na referência não é descrita a multiplicidade deste sinal.

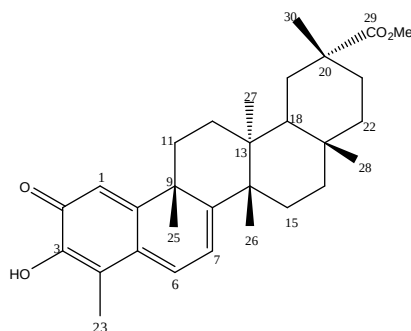
➤ **MS15:** ferruginol



O espectro de RMN de ^1H de **MS15** (Fig. 49, p.84) apresentou dois dupletos em δ_{H} 1,23 (H-17) e 1,25 (H-16) além de três simpletos em δ_{H} 0,92 (H-18), 0,94 (H-19) e 1,21 (H-20), característicos de grupos metila de diterpenos abietanos (YING e KUBO, 1991). Foram observados também sinais em δ_{H} 6,83 (1H, s, H-11) e 6,63 (1H, s, H-14), atribuídos a átomos de hidrogênio de anel aromático tetrassubstituído. A comparação dos dados de RMN de ^1H de **MS15** com a literatura (Tabela 15, p.84) permitiu identificá-lo como ferruginol.



☞ **MS16**: pristimerina



O composto **MS16** apresentou-se como um sólido alaranjado de ponto de fusão 205-207 °C. O espectro de RMN de ^1H de **MS16** (Fig.50) revelou a presença de simpletos em δ_{H} 0,77, 1,09, 1,17, 1,26 e 1,45, atribuídos a 5 grupos metila. Os sinais em δ_{H} 6,39 (1H, d, $J = 7,2$ Hz, H-7), δ_{H} 6,62 (1H, s, H-1) e em δ_{H} 7,10 (1H, d, $J = 8,4$ Hz, H-6) caracterizam o esqueleto quinonametideo de **MS16** (GUNATILAKA *et al.*, 1989). Foi observado também um sinal em δ_{H} 3,54 (3H, s), atribuído a hidrogênios de grupo metoxila. O simpleto em δ_{H} 2,23, característico de grupo metila ligado a carbono do tipo sp^2 (H-23), confirma a natureza do composto. De posse desses dados e comparação dos mesmos com a literatura (Tabela 16, p.86), além de comparação com amostra autêntica por CCDS, **MS16** foi identificado como pristimerina.

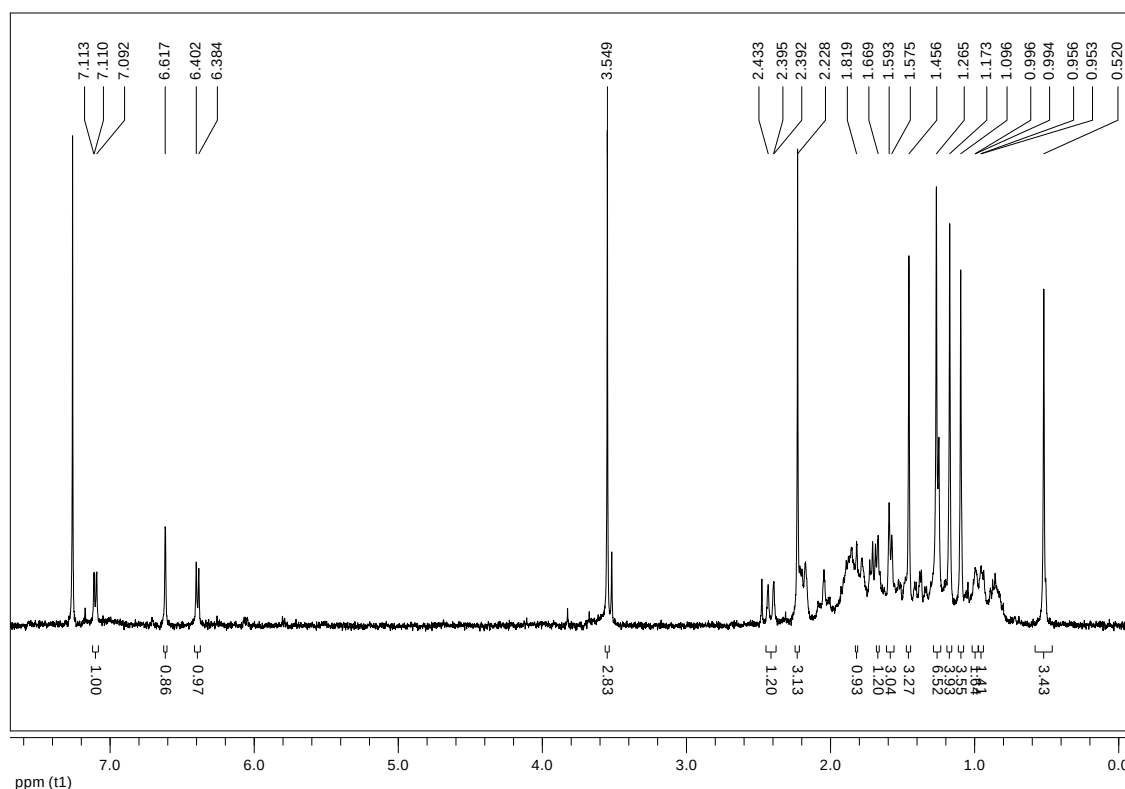
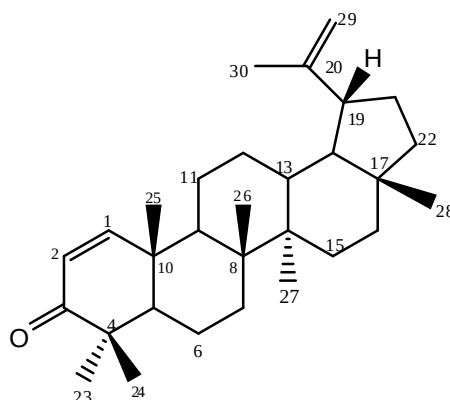


Figura 50- Espectro de RMN de ^1H de **MS16** (CDCl_3 , 400 MHz).

Tabela 16 – Dados de RMN de ^1H (CDCl_3 , 400 MHz) de **MS16** e dados da pristimerina descritos na literatura (GUNATILAKA, 1989)

Nº H	MS16	Pristimerina (CDCl_3)
	δ_{H}	δ_{H}
1	6,62 (s)	6,53 (s)
6	7,10 (d, $J = 8,4$ Hz)	7,06 (d, $J = 8,4$ Hz)
7	6,39 (d, $J = 7,2$ Hz),	6,35 (d, $J = 7,2$ Hz)
23	2,23 (s)	2,21 (s)
25	1,46	1,45 (s)
26	1,26 (s)	1,26 (s)
27	0,53 (s)	0,53 (s)
28	1,10 (s)	1,10 (s)
OCH_3	3,54 (s)	3,55 (s)
30	1,17 (s)	1,18 (s)

➡ **MS17**: gloquidona



O composto **MS17** apresentou-se como um sólido branco de ponto de fusão 167-169 °C. No espectro de RMN de ^1H de **MS17** (Fig.51, p.87) foram observados sinais em δ_{H} 4,72 e 4,61, característicos de hidrogênios metilênicos de dupla ligação terminal de esqueleto lupano (MAHATO e KUNDU, 1994). Os sinais em δ_{H} 7,12 e em 5,81 foram associados a hidrogênios olefínicos de cetona α,β -insaturada. A comparação dos dados obtidos com os disponíveis na literatura (Tabela 17, p.87) permitiu identificar **MS17** como gloquidona.

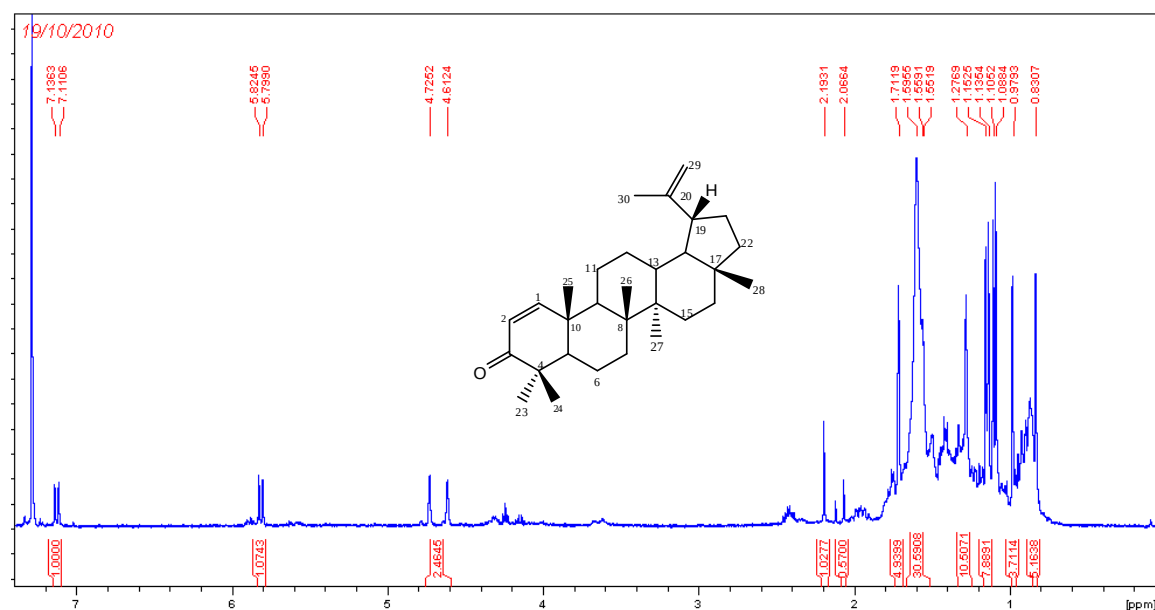


Figura 51- Espectro de RMN de ^1H de **MS17** (CDCl_3 , 400 MHz).

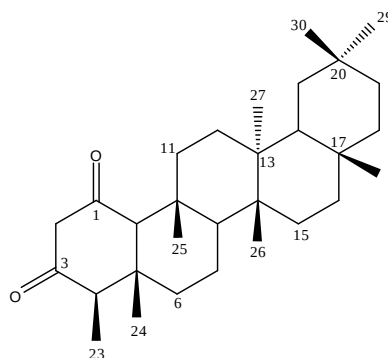
Tabela 17 – Dados de RMN de ^1H (CDCl_3 , 400 MHz) de **MS17** e dados da gloquidona descritos na literatura (HUI e LI, 1976)

Nº H	MS17	Gloquidona (CDCl_3)
	δ_{H}	δ_{H}
1	7,12 (d, $J = 10,2$ Hz)	7,10 (d, $J = 9,8$ Hz)
2	5,81 (d, $J = 10,3$ Hz)	5,79 (d, $J = 9,8$ Hz)
23	1,09 (s)	1,07 (s)
24	1,10 (s)	1,08 (s)
25	1,15 (s)	1,13 (s)
26	1,13(s)	1,11 (s)
27	0,98 (s)	0,96 (s)
28	0,83 (s)	0,81 (s)
29	4,72 (d, $J = 2,7$ Hz)	4,71 (d, $J = 2,7$ Hz)
	4,61 (d, $J = 2,7$ Hz)	4,59 (d, $J = 2,7$ Hz)
30	1,71 (s)	1,69 (s)

Tabela 18 – Dados de RMN de ^1H (CDCl_3 , 400 MHz) de **MS18** e dados do glutinol descritos na literatura (HUI e LI, 1976)

Nº H	MS18	Glutinol (CDCl_3)
	δ_{H}	δ_{H}
3	3,47 (s)	3,45 (s)
6	5,63 (d, $J= 6,0$ Hz)	5,60 (m)
23	1,04 (s)	1,05 (s)
24	1,14 (s)	1,15 (s)
25	0,85 (s)	0,85 (s)
26	1,09 (s)	1,09 (s)
27	1,01 (s)	1,00 (s)
28	1,16 (s)	1,17 (s)
29	0,95 (s)	0,95 (s)
30	0,99 (s)	0,98 (s)

➤ **MS19:** fridelan-1,3-diona



No espectro de RMN de ^1H de **MS19** (Fig. 53, p.90) foi notada a ausência de sinais relativos a hidrogênios olefínicos, além de ter sido observado um quarteto em δ_{H} 2,58 relativo ao hidrogênio metínico (H-4) vizinho à C-23 de friedelanos. Foram observados também dois dupletos, em δ_{H} 3,46 e em 3,25, atribuídos a hidrogênio de carbono metilênico unido a dois grupos carbonila. Por meio da comparação dos dados do espectro RMN de ^1H de **MS19** com a literatura (Tabela 19, p.90), a substância foi identificada como friedelan-1,3-diona.

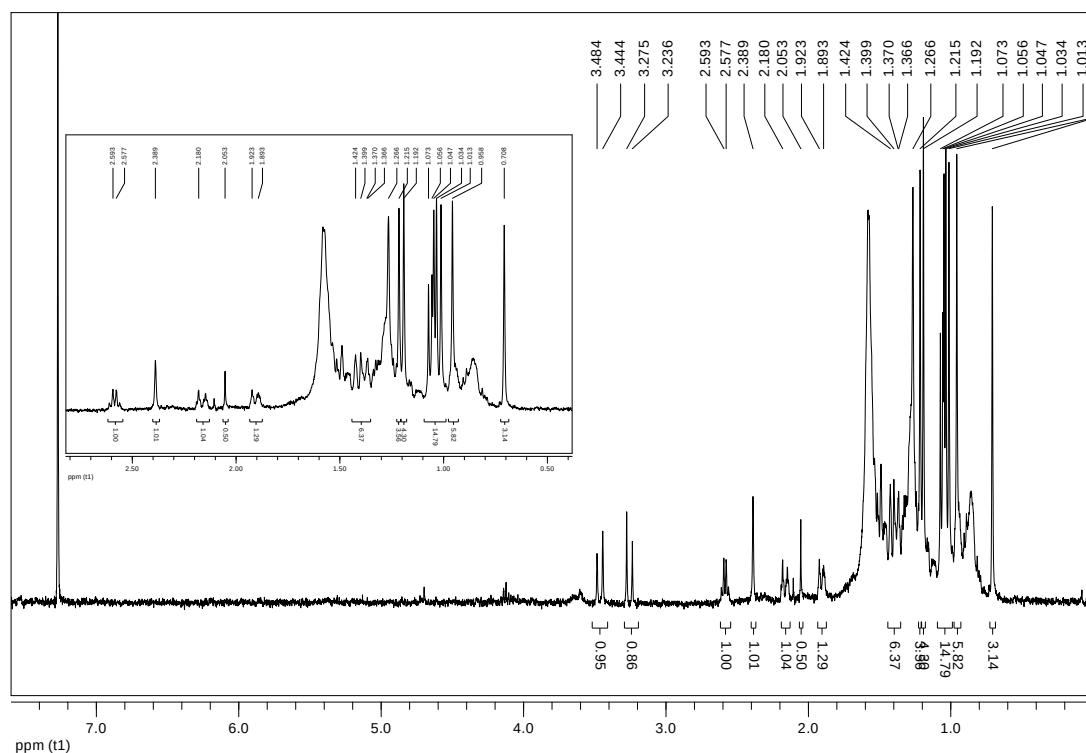


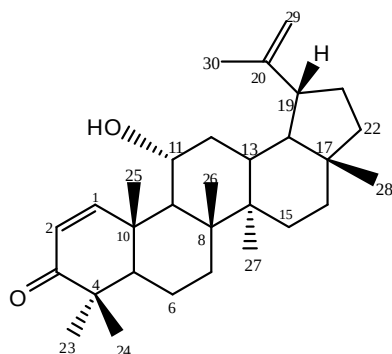
Figura 53- Espectro de RMN de ^1H do composto **MS19** (400 MHz, CDCl_3).

Tabela 19 – Dados de RMN de ^1H (CDCl_3 , 400 MHz) de **MS19** e dados da friedelan-1,3-diona descritos na literatura (KLASS *et al.*, 1992)

Nº H	MS19	friedelan-1,3-diona (CDCl_3)
	δ_{H}	δ_{H}
2	3,46(d, $J= 16,0$ Hz, H-1 _a); 3,25 (d, $J= 15,6$ Hz, H-1 _b)	3,46;* 3,24*
4	2,58 (m)	2,58
8	1,27 (m)	1,25
10	2,39	2,38
18	1,57	1,57
23	1,07 (s)	1,05 (s)
24	0,69 (s)	0,69 (s)
25	1,21 (s)	1,20 (s)
26	1,05 (s)	1,03 (s)
27	1,04 (s)	1,02 (s)
28	1,19 (s)	1,18 (s)
29	1,01 (s)	1,00 (s)
30	0,94 (s)	0,94 (s)

* não foi relatada na literatura a multiplicidade destes sinais.

☞ **MS20**: 11 α -hidroxigloquidona



O triterpeno **MS20** foi obtido como um sólido branco. No espectro de RMN de ^1H de **MS20** (Fig. 54), os sinais em δ_{H} 4,73 e em 4,61, foram atribuídos a hidrogênios metilênicos de dupla ligação terminal de lupanos (MAHATO e KUNDU, 1994). Foram observados também dois dupletos em δ_{H} 8,30 (1H, $J = 8,4$ Hz, H-1) e δ_{H} 5,71 (1H, $J = 8,4$ Hz, H-2) associados a hidrogênios olefínicos de cetona α,β -insaturada. O sinal em δ_{H} 4,08 é relativo a hidrogênio metínico de carbono carbinólico. A comparação dos dados obtidos com os disponíveis na literatura (Tabela 20, p.92) permitiu identificar **MS20** como 11 α -hidroxigloquidona.

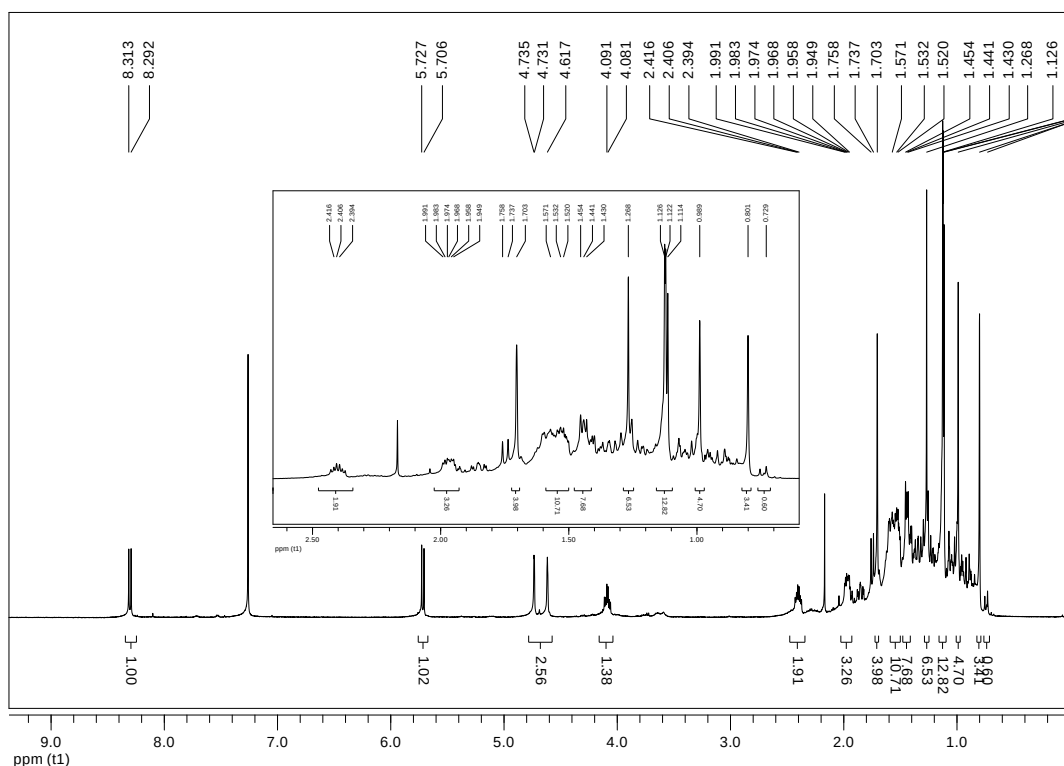
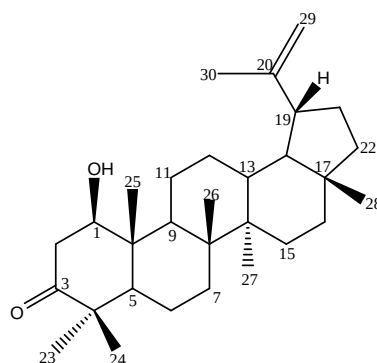


Figura 54- Espectro de RMN de ^1H do composto **MS20** (400 MHz, CDCl_3).

Tabela 20 – Dados de RMN de ^1H (CDCl_3 , 400 MHz) de **MS20** e dados da 11 α -hidroxigloquidona descritos na literatura (REYES *et al.*, 2006)

Nº H	MS20	11 α -hidroxigloquidona (CDCl_3)
	δ_{H}	δ_{H}
1	8,30 (d, $J = 8,4$ Hz)	8,30 (d, $J = 10,4$ Hz)
2	5,71 (d, $J = 8,4$ Hz)	5,71 (d, $J = 10,4$ Hz)
11	4,09 (d, $J = 4,0$ Hz)	4,05 (d, $J = 4,8$ Hz)
23	1,15 (s)	1,12 (s)
24	1,15 (s)	1,12 (s)
25	1,26 (s)	1,26 (s)
26	1,14 (s)	1,11 (s)
27	1,01 (s)	0,98 (s)
28	0,82 (s)	0,80 (s)
29	4,73 (d, $J = 1,6$ Hz); 4,61 (sl)	4,73 (sl); 4,61 (sl)
30	1,70 (s)	1,70

➤ **MS21:** gloquidonol



O composto **MS21** foi obtido como um sólido amorfo de ponto de fusão 227-230 °C.

No espectro de RMN de ^1H de **MS21** (Fig. 55, p.93) os sinais em δ_{H} 4,68 e 4,56 foram atribuídos a hidrogênios metilênicos de dupla ligação terminal de lupanos (MAHATO e KUNDU, 1994). Observou-se também um sinal em δ_{H} 3,90 (1H, sl, H-1) associado a hidrogênio metínico de carbono carbinólico. A comparação dos dados obtidos com os disponíveis na literatura (Tabela 21, p.93) permitiu identificar **MS21** como gloquidonol.

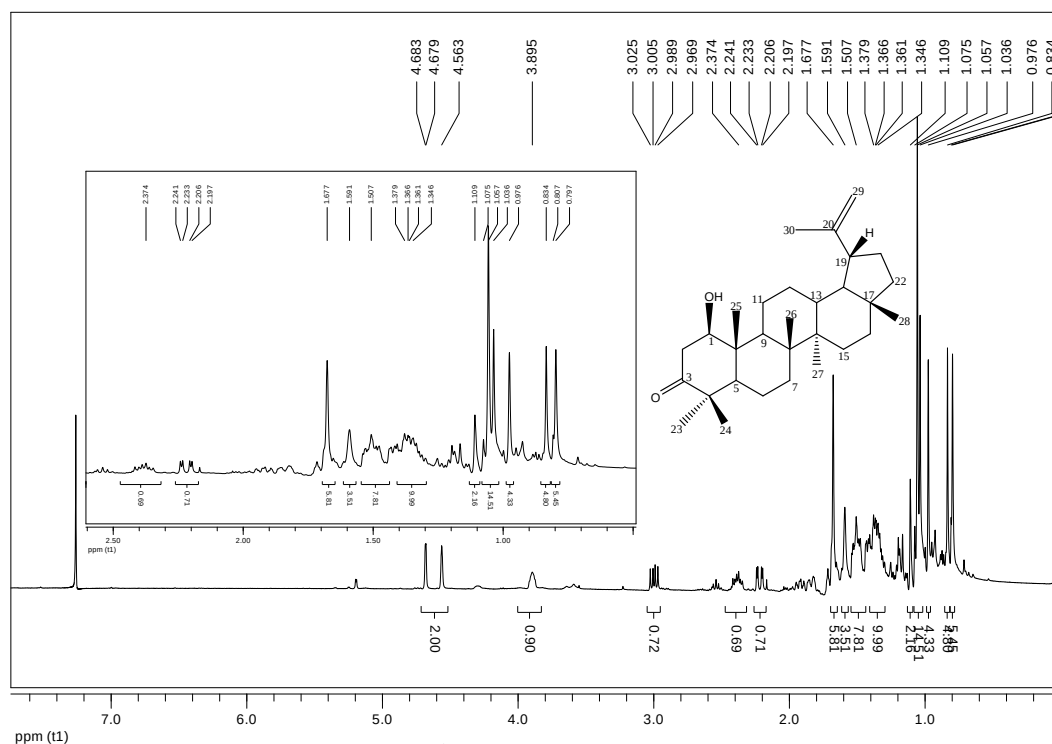
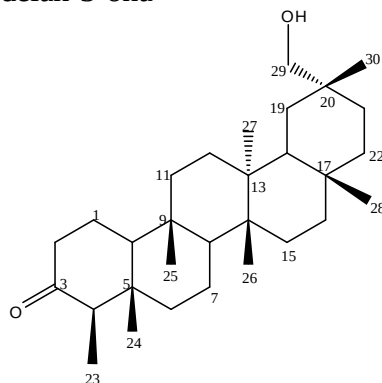


Figura 55- Espectro de RMN de ^1H de **MS21** (400 MHz, CDCl_3).

Tabela 21 – Dados de RMN de ^1H (CDCl_3 , 400 MHz) de **MS21** e dados do gloquidonol descritos na literatura (HUI e LI, 1976)

Nº H	MS21	Gloquidonol (CDCl_3)
	δ_{H}	δ_{H}
1	3,90 (sl)	3,91 (q, $J = 8,4$ Hz)
2	2,22 (dd, $J = 3,6; 14,4$ Hz); 3,01 (dd, $J = 8,4; 14,4$ Hz)	2,22 (q, $J = 14,4$ Hz); 3,01 (q, $J = 14,8$ Hz)
23	1,05 (s)	1,06 (s)
24	1,04 (s)	1,04 (s)
25	0,98 (s)	0,98 (s)
26	0,98 (s)	0,98 (s)
27	0,84 (s)	0,84 (s)
28	0,80 (s)	0,78 (s)
29	4,57 (sl) 4,68 (d, $J = 2,0$ Hz)	4,56 (sl) 4,69 (sl)
30	1,68 (s)	1,68 (s)

☞ **MS22**: 29-hidroxifriedelan-3-ona



O composto **MS22** apresentou-se como um sólido branco de ponto de fusão 269 - 270 °C. No espectro de RMN de ^1H de **MS22** (Fig. 56) foi observado um sinal em δ_{H} 0,87 (d, $J = 5,2$ Hz, 3H), característico de hidrogênio da metila C-23 de friedelanos. O sinal em δ_{H} 3,27 foi atribuído a átomos de hidrogênio metilênico de carbono carbinólico. Por meio do espectro de RMN de ^{13}C , associado ao subespectro DEPT-135 (Figs. 57 e 58, p. 95) foi possível identificar a presença de 30 carbonos, entre os quais há sete grupos metílicos, doze metilênicos, quatro metínicos e sete átomos de carbono não hidrogenado. A comparação dos dados dos espectros com a literatura (Tabela 22, p.96), possibilitou identificar **MS22** como 29-hidroxifriedelan-3-ona.

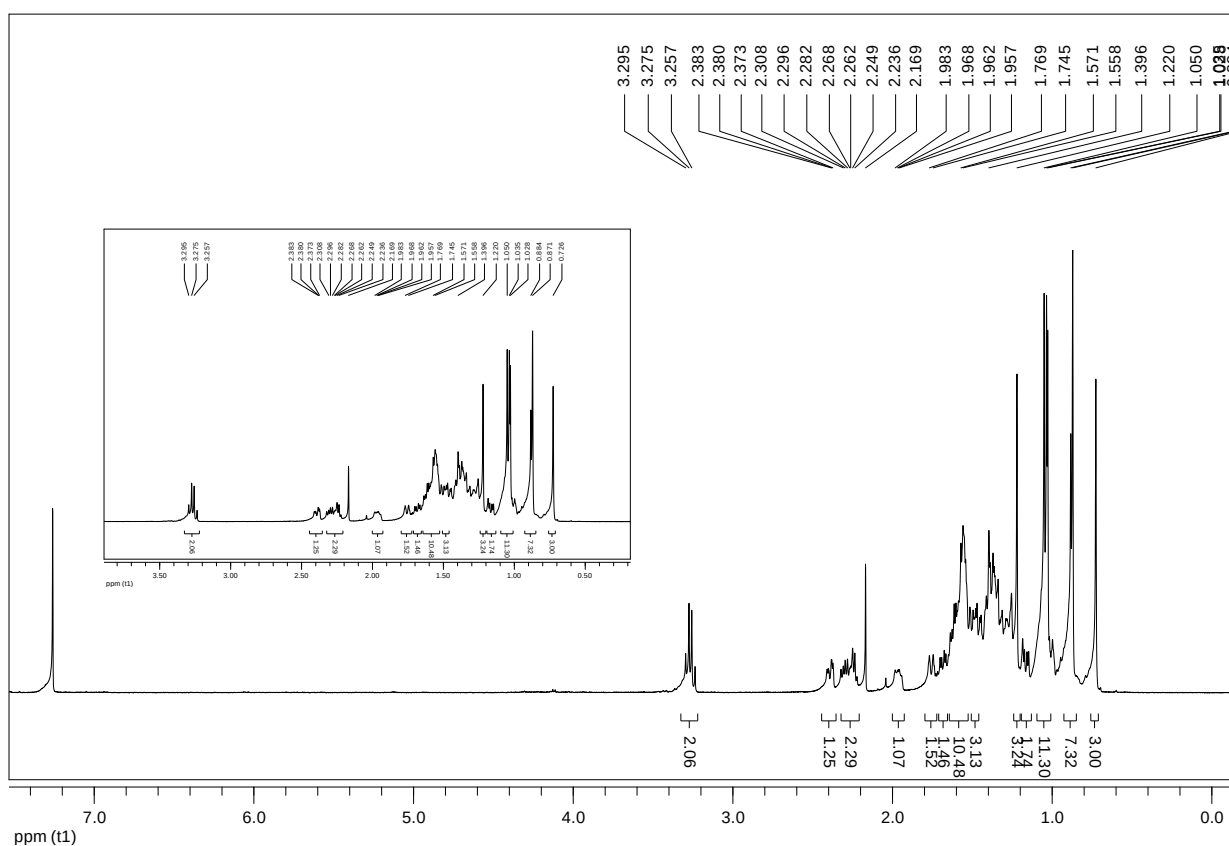


Figura 56- Espectro de RMN de ^1H do composto **MS22** (400 MHz, CDCl_3).

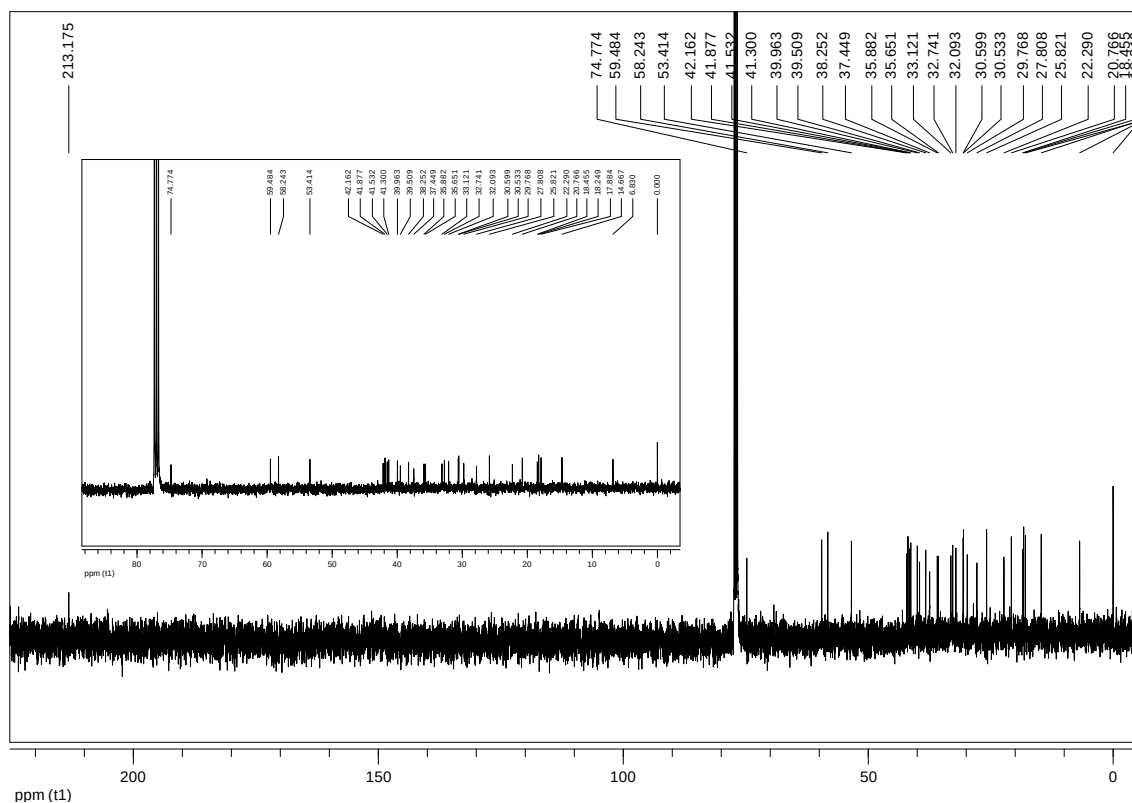


Figura 57- Espectro de RMN de ^{13}C do composto **MS22** (100 MHz, CDCl_3).

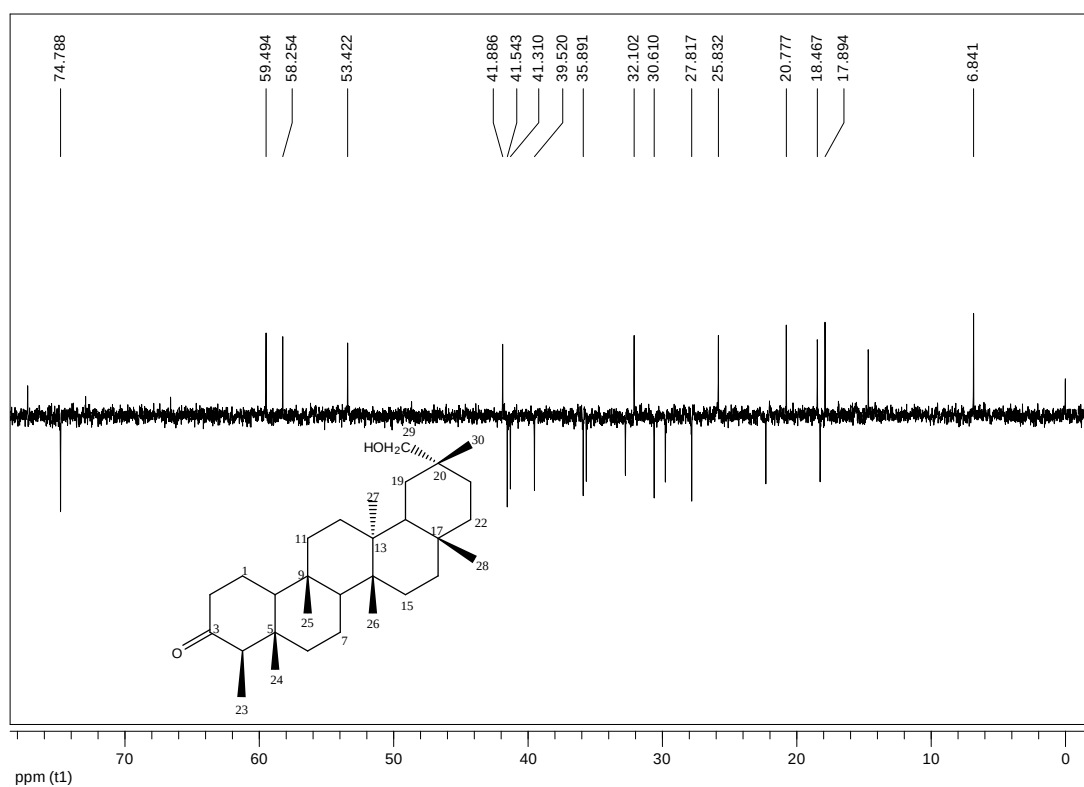
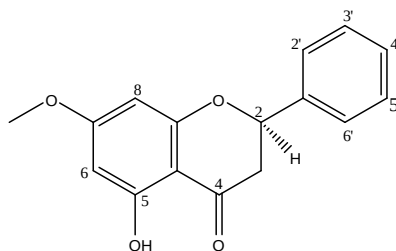


Figura 58- Subespectro DEPT-135 do composto **MS22** (100 MHz, CDCl_3).

Tabela 22- Dados de RMN de ^{13}C de **MS22** (CDCl_3 , 100 MHz) e dados de 29-hidroxifriedelan-3-ona descritos na literatura (BETANCOR *et al.*, 1980)

MS22			29-hidroxifriedelan-3-ona (CDCl_3)
Carbono	δ_{C}	DEPT-135	δ_{C}
1	22,3	CH_2	22,3
2	41,5	CH_2	41,6
3	213,2	C	212,2
4	58,2	CH	58,3
5	42,2	C	42,2
6	41,3	CH_2	41,4
7	18,3	CH_2	18,3
8	53,4	CH	53,1
9	37,4	C	37,5
10	59,5	CH	59,6
11	35,6	CH_2	35,7
12	29,8	CH_2	29,8
13	40,0	C	40,0
14	38,3	C	38,3
15	32,7	CH_2	32,8
16	35,9	CH_2	36,0
17	29,8	C	29,8
18	41,9	CH	42,0
19	30,6	CH_2	30,6
20	33,1	C	33,2
21	27,8	CH_2	27,9
22	39,5	CH2	39,6
23	6,8	CH_3	6,8
24	14,7	CH_3	14,7
25	17,9	CH_3	17,9
26	18,4	CH_3	18,4
27	20,8	CH_3	20,8
28	32,1	CH_3	32,1
29	74,8	CH_2	74,8
30	25,8	CH_3	25,9

☞ **MS23:** pinostroquina



O composto **MS23** apresentou-se como um sólido branco de ponto de fusão 96-98 °C. No espectro de RMN de ^1H de **MS23** (Fig. 59), o sinal em δ_{H} 7,42 (5H, H-2', H-3', H-4', H-5', H-6') foi atribuído a hidrogênio de anel aromático monossustituído. Observaram-se sinais em δ_{H} 12,03 (1H), associado a hidrogênio de grupo OH que participa de ligação de hidrogênio, e em δ_{H} 3,81 (3H), característico de hidrogênio de grupo metoxila. O sinal em δ_{H} 5,42 (1H, H-2) foi atribuído a hidrogênio metínico de carbono oxigenado, e aquele observado em δ_{H} 6,07 (2H, H-6, H-8) é característico de hidrogênio aromático. Os sinais em δ_{H} 3,07 (1H, H-3_a) e em δ_{H} 2,82 (1H, H-3_b) foram atribuídos a átomos de hidrogênio metilênico vizinhos a grupo carbonila. Feita a atribuição de todos os sinais e comparação dos mesmos com a literatura (Tabela 23, p.98), sugeriu-se para **MS23** a estrutura da flavanona denominada pinostroquina.

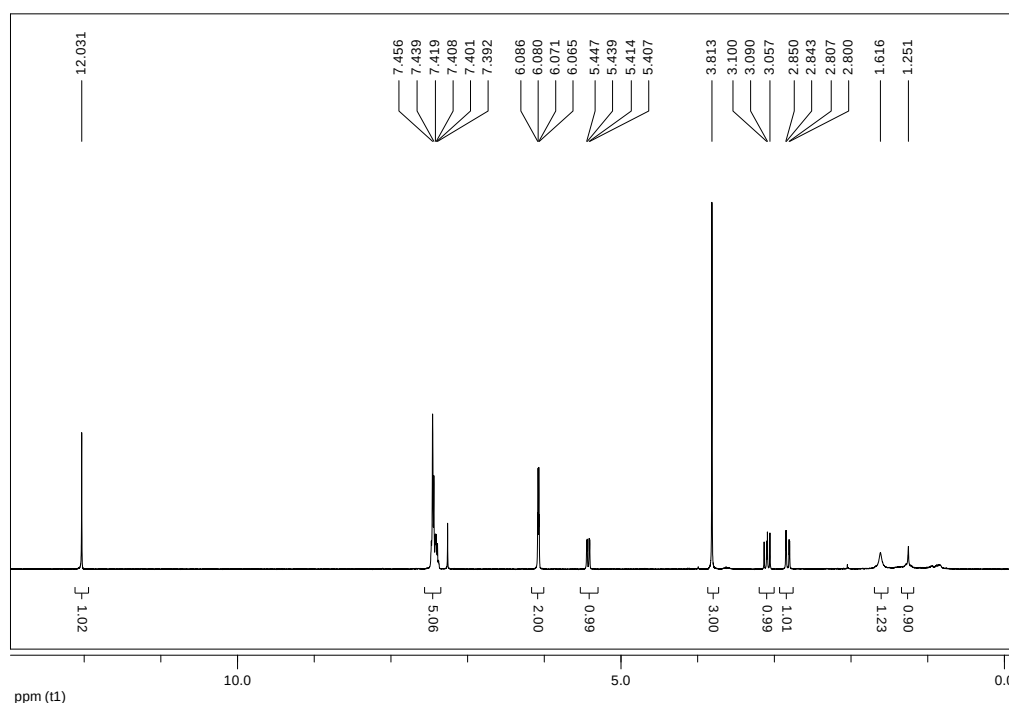
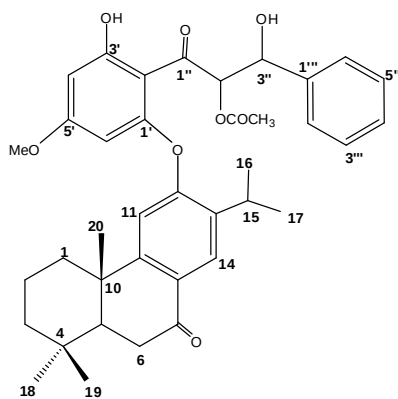


Figura 59- Espectro de RMN de ^1H do composto **MS23** (400 MHz, CDCl_3).

Tabela 23 – Dados de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) de **MS23** e dados da pinostrobinha descritos na literatura (ABDELWAHAB *et al.*, 2011)

Nº H	MS23	pinostrobinha (CDCl_3)
	δ_{H}	δ_{H}
2	5,42 (dd, $J = 2,8; 12,8$ Hz)	5,39 (dd, $J = 2,8; 12,8$ Hz)
3	3,07 (dd, $J = 13,2; 16,9$ Hz, H_a) 2,82 (dd, $J = 2,8; 16,9$ Hz, H_b)	3,06 (dd, $J = 12,8; 15,1$ Hz, H_a) 2,79 (dd, $J = 2,8; 14,7$ Hz, H_b)
6	6,07 (d, $J = 2,4$ Hz)	6,05 (d, $J = 2,7$ Hz)
8	6,08 (d, $J = 2,4$ Hz)	6,05 (d, $J = 2,7$ Hz)
2'	7,42 (m)	7,41 (m)
3'	7,42 (m)	7,41 (m)
4'	7,42 (m)	7,41 (m)
5'	7,42 (m)	7,41 (m)
6'	7,42 (m)	7,41 (m)
OCH_3	3,81 (s)	3,79 (s)

➡ **MS24**: salicassina



O composto **MS24** apresentou-se como um sólido branco amorfo de ponto de fusão 151,6 – 152,0 °C. No espectro no IV de **MS24** (Fig. 60, p.99) foram observadas bandas largas em 3401 cm^{-1} , característica de grupo OH, e em 1642 cm^{-1} , associada a deformação axial de C=O. As bandas em 1574 , 1503 e 1454 cm^{-1} foram atribuídas a deformação axial de C=C de anel aromático, e aquelas observadas em 762 e em 699 cm^{-1} , referentes a deformação angular de cinco átomos de hidrogênio adjacentes sugeriram a ocorrência de um anel aromático monossustituído (BARBOSA, 2007). No espectro na região do UV-VIS de **MS24** (Fig. 61,

p.99) foram observadas bandas de absorção em 227 e 291 nm. Esses valores foram observados para diterpenos abietanos (YING e KUBO, 1991).

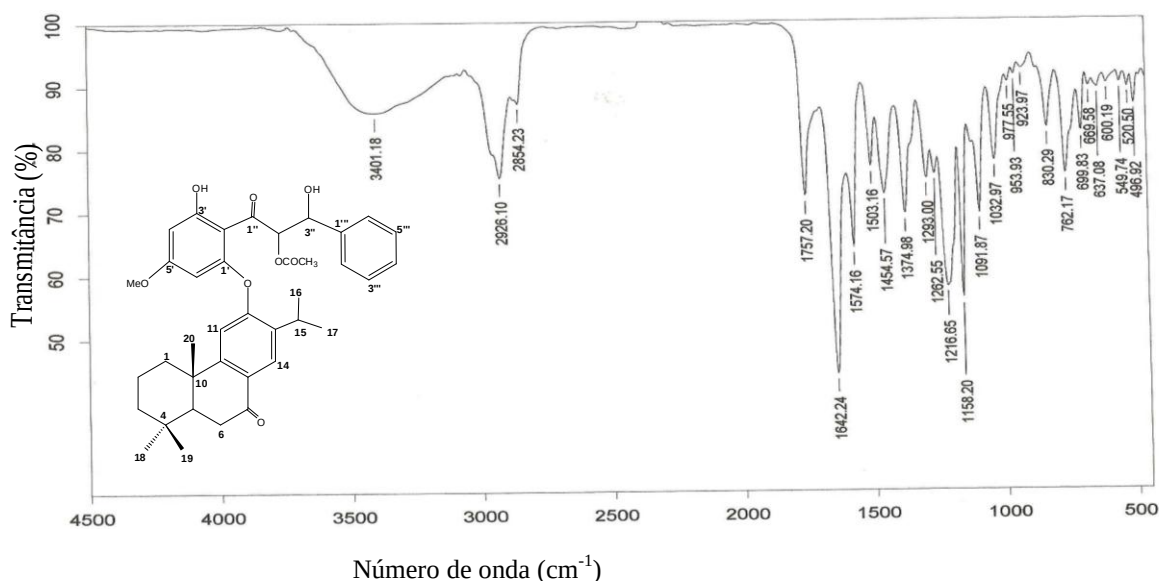


Figura 60- Espectro na região do IV de **MS24** (KBr).

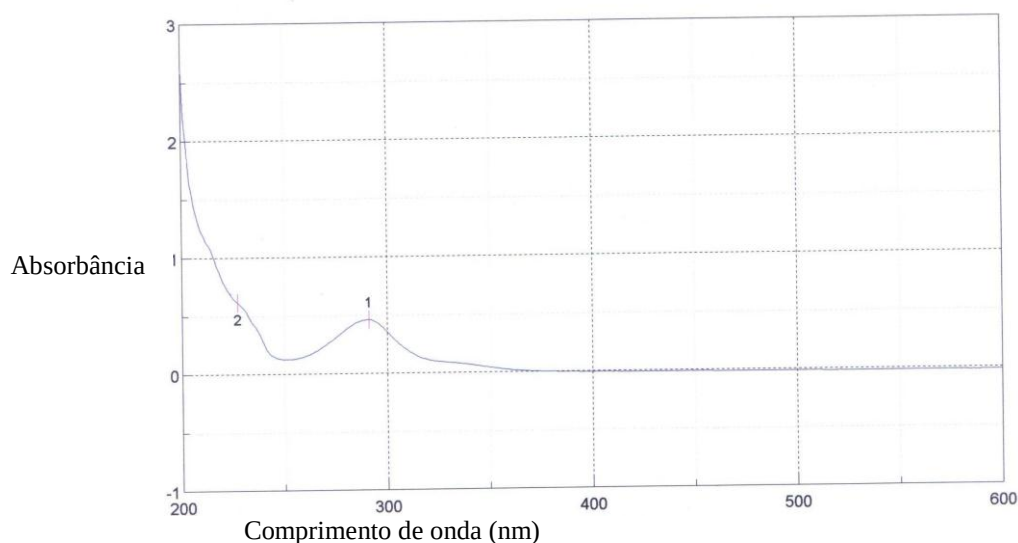


Figura 61- Espectro na região do UV-Vis de **MS24**.

O espectro de RMN de ^1H de **MS24** (Fig.62, p.100) apresentou simpletos em δ_{H} 0,95, 1,01, 1,25 e dupletos em δ_{H} 1,27 ($J = 7,0$ Hz) e 1,29 ($J = 5,2$ Hz), característicos de grupos metila de diterpeno abietano. Foram observados também sinais em δ_{H} 6,70 (1H, s, H-11) e 7,90 (1H, s, H-14), referentes aos átomos de hidrogênio aromáticos. Estes e outros sinais foram similares aos dados previamente reportados para o sugiol (YING e KUBO, 1991). Os sinais observados em δ_{H} 7,36 (3H, dd, $J = 2,1, 4,8$ Hz) e em 7,40 (2H, d, $J = 1,8$ Hz) foram

correlação do sinal do hidrogênio do grupo metoxila (δ_H 3,76) com δ_C 164,1 (C-5') indicou a presença deste grupo em C-5'. Foram observadas ainda, correlações referentes à unidade diterpênica, de δ_H 7,36 (H-14) com δ_C 198,7 (C-7) e δ_C 26,8 (C-15). As correlações de δ_H 11,49 (OH-3') com δ_C 101,9 (C-2'), 164,2 (C-3') e 94,7 (C-4') confirma a posição do grupo OH quelado a um grupo carbonila na molécula. A correlação de δ_H 5,78 (OH-3'') com δ_C 81,3 (C-3''), indicou um grupo hidroxila na posição C-3''.

No mapa de contornos ROESY (Fig. 68, p.104), o sinal do hidrogênio do grupo metoxila (δ_H 3,76) correlacionou com o sinal de H-6' (δ_H 6,15) e de H-4' (δ_H 6,10) confirmando a posição do substituinte em C-5'. Outras correlações foram também observadas: δ_H 5,40 (H-3'') com δ_H 5,85 (H-2'') e δ_H 7,40 (H-2''' e H-6'''). Por meio da representação da estrutura em três dimensões (Fig. 69, p.105), pode-se observar a correlação de H-2' com o hidrogênio do grupo metoxila.

Por meio da análise do espectro de massas por ionização por elétron-spray (Fig.70, p.105), obteve-se a fórmula molecular $C_{38}H_{44}O_8$ (MM 628,0 g mol^{-1}), uma vez que foi observado um pico em m/z 629 [M+H]. Foram observados também picos em m/z 651[M+Na] e 351, relacionado à unidade chalcona da molécula. No espectro de massas de alta resolução (Fig. 71, p.105) foi possível observar os picos em m/z 300 ($C_{20}H_{28}O_2$) e 328 ($C_{18}H_{16}O_3$), relacionados às duas unidades formadoras de **MS24**. Na Figura 72 (p. 107) é apresentada a proposta de fragmentação de **MS24**, considerando os picos observados no espectro de massas.

De posse de todos os dados espectroscópicos de **MS24**, sugeriu-se que a estrutura indicada é um aduto no qual um diterpeno abietano (sugiol) está unido a uma chalcona por meio de uma ponte éter formada entre C-1' do anel A da chalcona e o C-12 do anel C do sugiol. Este foi identificado como 12-O-[3'-hidroxi-5'-metoxi-2'-(2''-acetoxi-3''-hidroxi-1''-oxo-3''-fenil)propil-sugiol e nomeado por nosso grupo como salicassina, uma substância inédita. É importante ressaltar que é a primeira vez que um aduto composto por uma chalcona e um diterpeno é isolado da família Celastraceae.

A ocorrência natural de adutos terpeno-chalcona é extremamente rara, tendo sido descritos na literatura poucos exemplos, onde são reportados adutos formados por uma chalcona e um monoterpeno (HUA *et al.*, 2009), um sesquiterpeno (HUA *et al.*, 2008) ou um diterpeno labdano (NGO e BROWN, 1998). Até o momento, a salicassina apresenta-se como primeiro exemplo de um metabólito envolvendo um diterpeno abietano e uma chalcona. Além disso, **MS24** é um exemplo raro de aduto em espécies da família Celastraceae, tendo em vista que este é formado por uma ponte éter entre as duas unidades da molécula. Para espécies

dessa família foram reportados adutos formados possivelmente por reações hetero-Diels-Alder, através da formação de um sistema 1-4 dioxano (NÚÑEZ *et al.*, 2011).

Na Tabela 12 (p.108) são apresentadas todas as atribuições feitas utilizando RMN de 1D e 2 D para a salicassina.

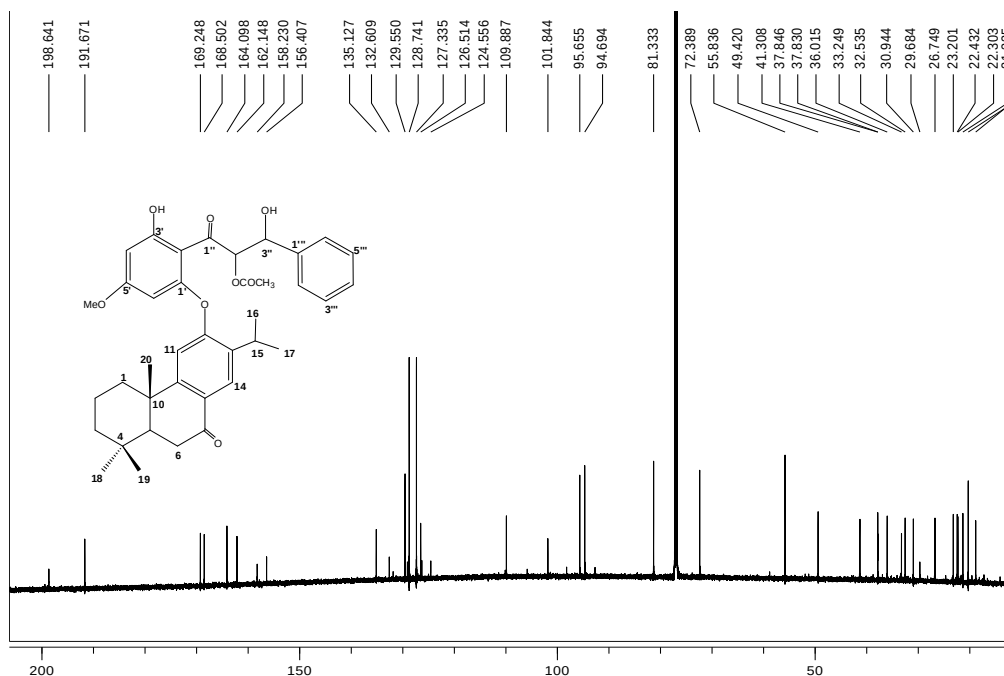


Figura 63- Espectro de RMN de ^{13}C de **MS24** (CDCl_3 , 150 MHz).

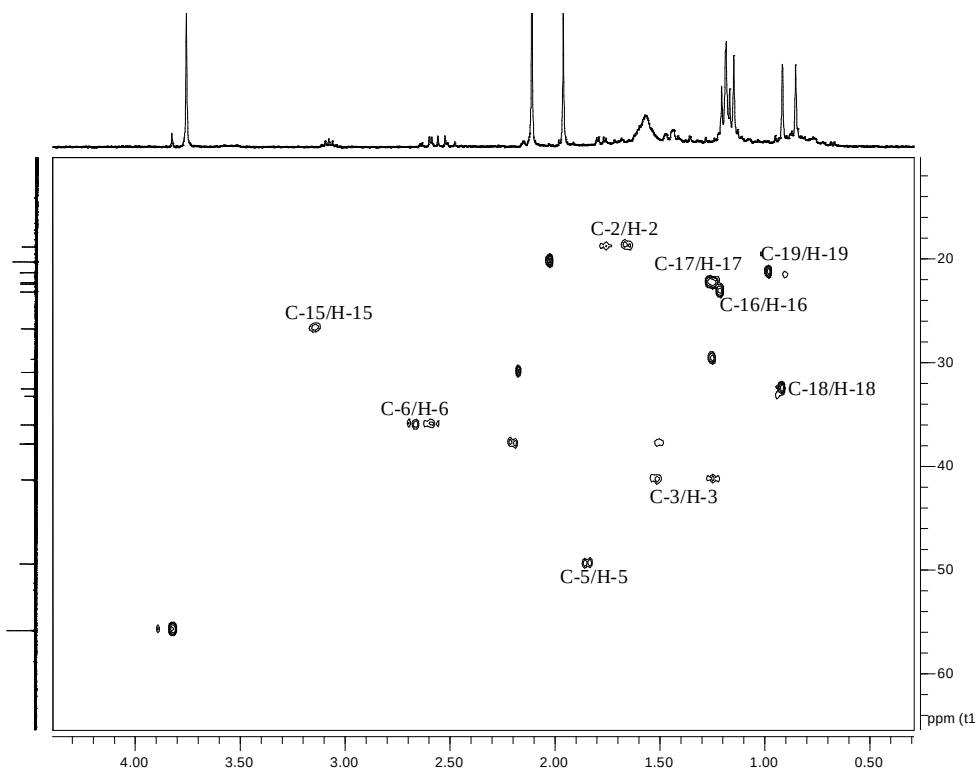


Figura 64- Expansão do mapa de contornos HSQC de **MS24** na região de δ 0,50 a δ 4,30 (CDCl_3 , 600 MHz).

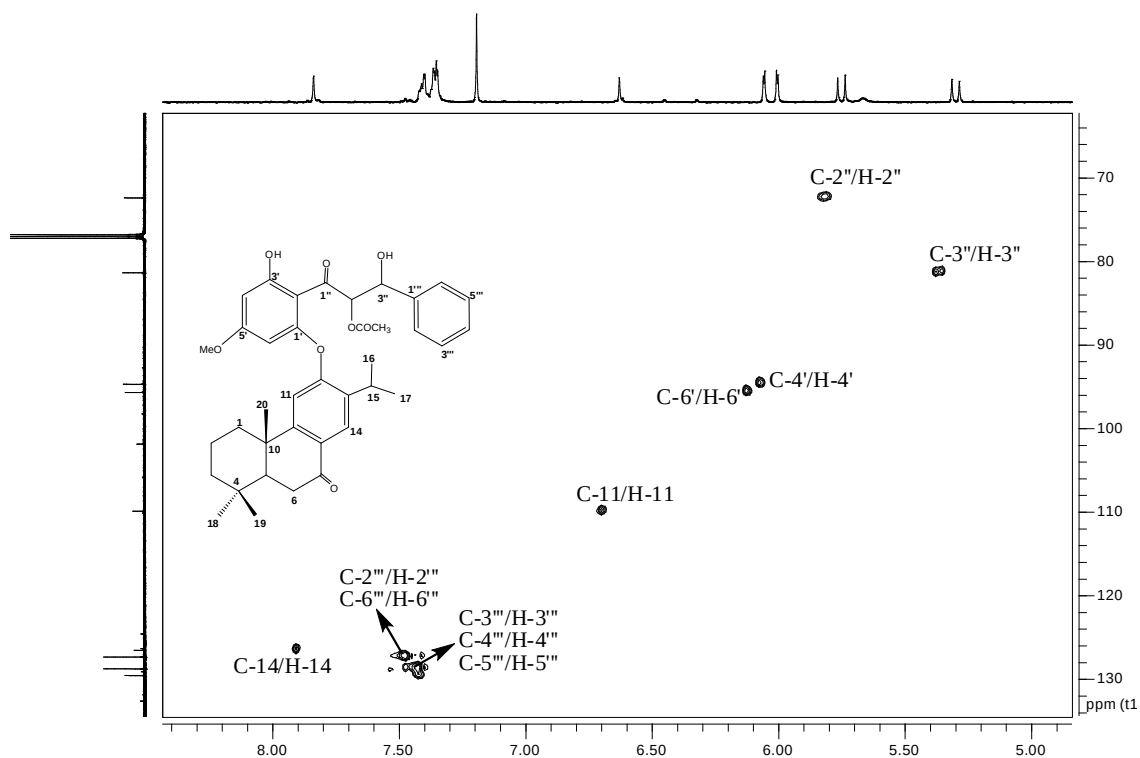


Figura 65- Expansão do mapa de contornos HSQC de **MS24** na região de δ 5,00 a δ 8,40 (CDCl_3 , 600 MHz).

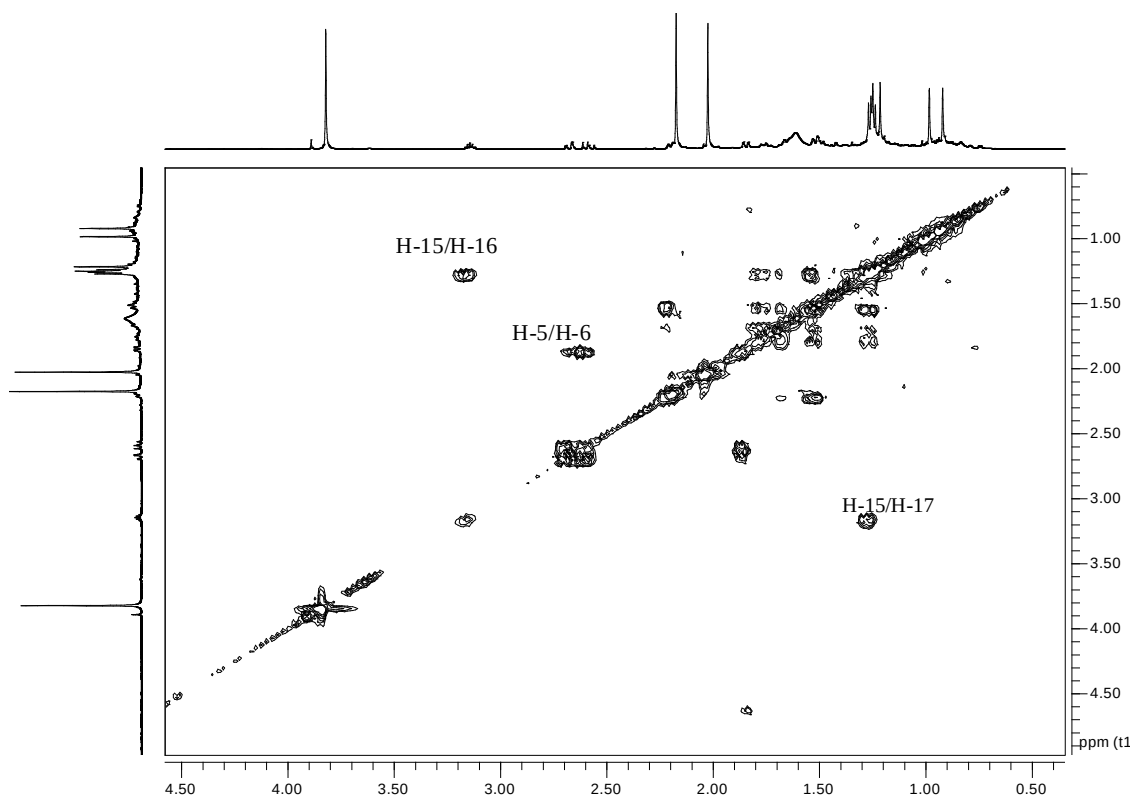


Figura 66- Expansão do mapa de contornos COSY de **MS24** na região de δ 0,50 a δ 4,50 (CDCl_3 , 600 MHz).

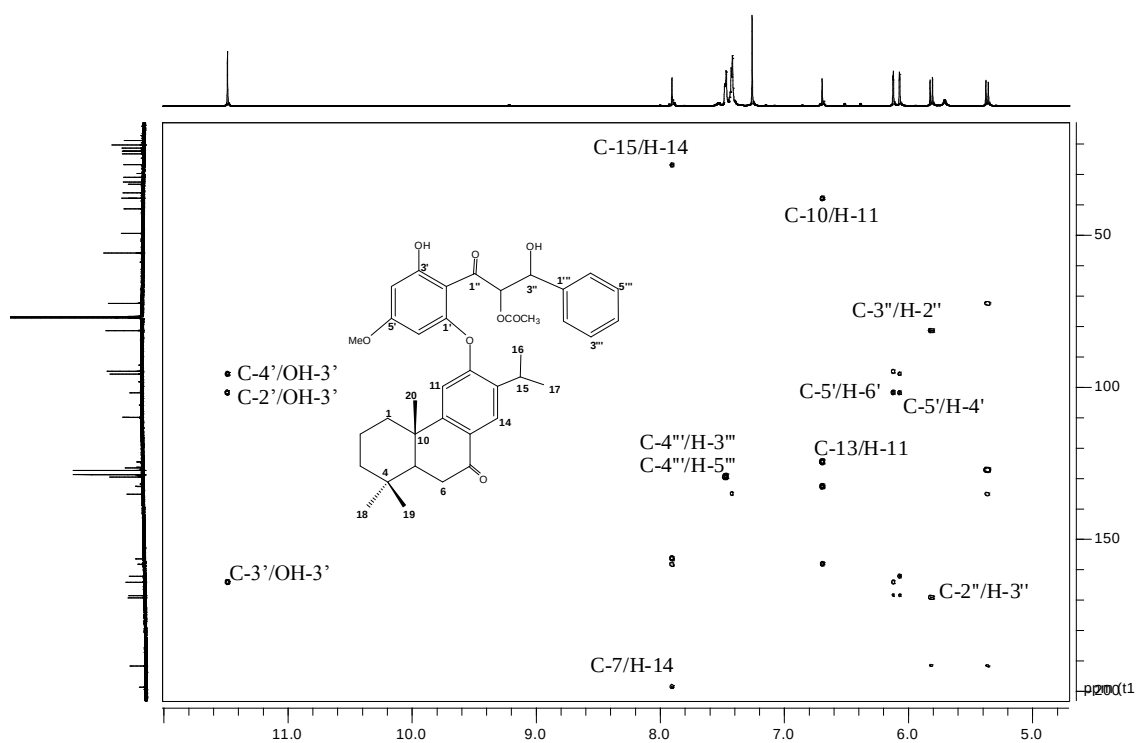


Figura 67- Expansão do mapa de contornos HMBC de **MS24** na região de δ 5,0 a δ 11,5 (CDCl_3 , 600 MHz).

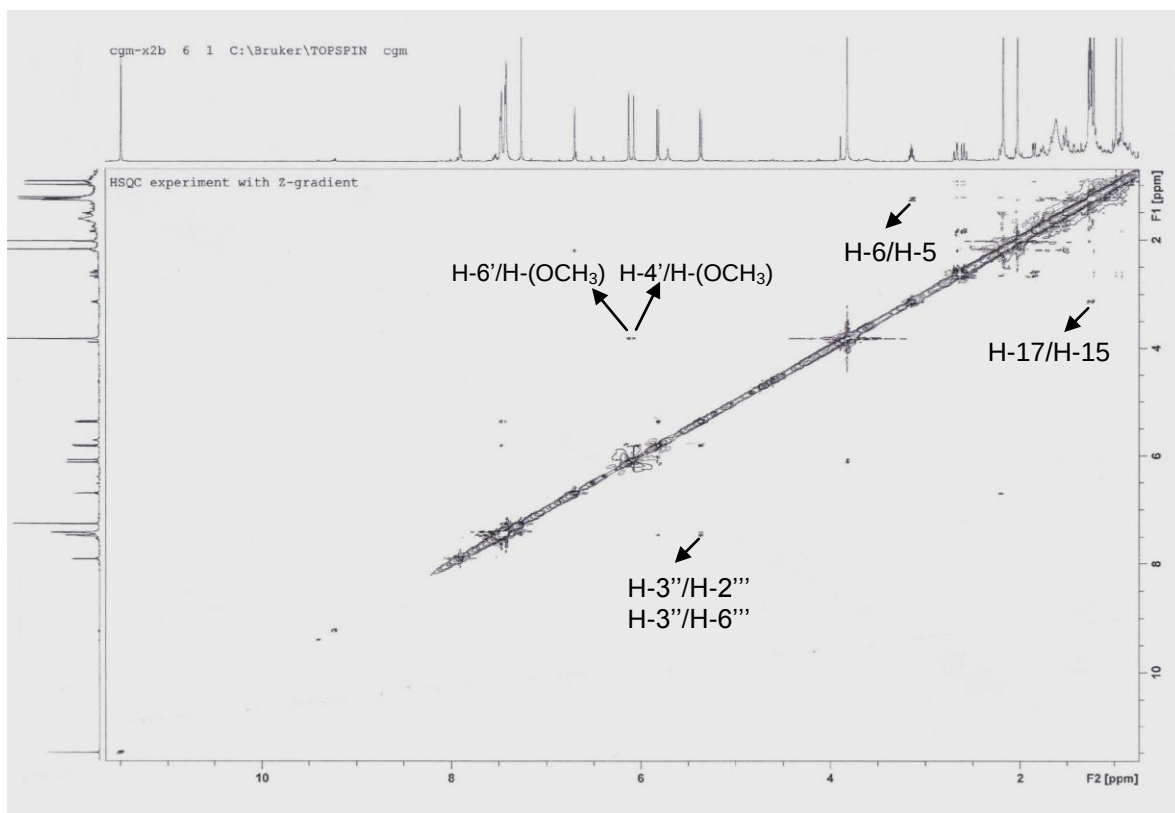


Figura 68- Mapa de contornos ROESY de **MS24** (CDCl_3 , 600 MHz).

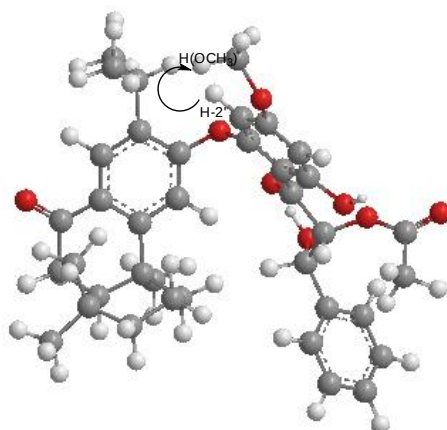


Figura 69- Estrutura tridimensional de MS24.

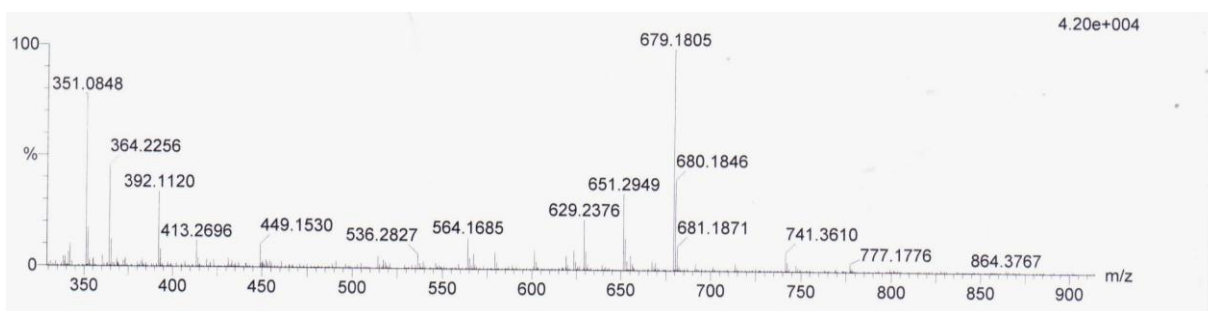


Figura 70- Espectro de massas (ESI-MS) de MS24.

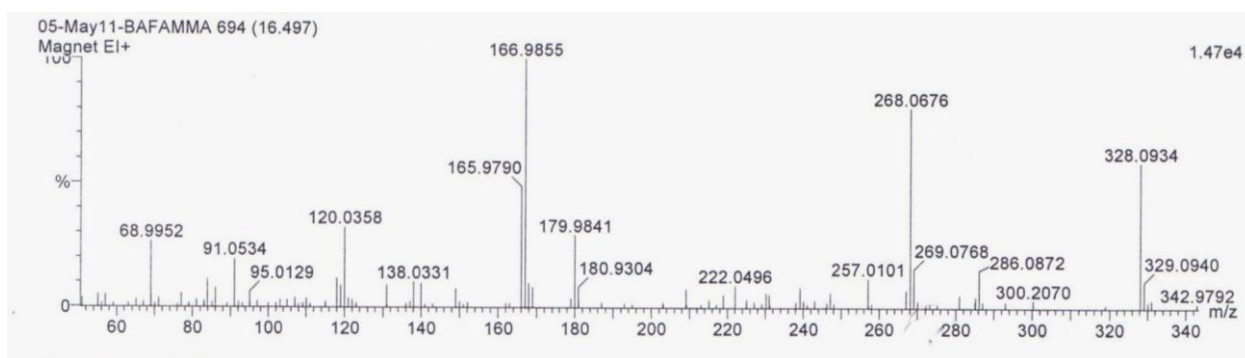


Figura 71- Espectro de massas (HR-MS) de MS24.

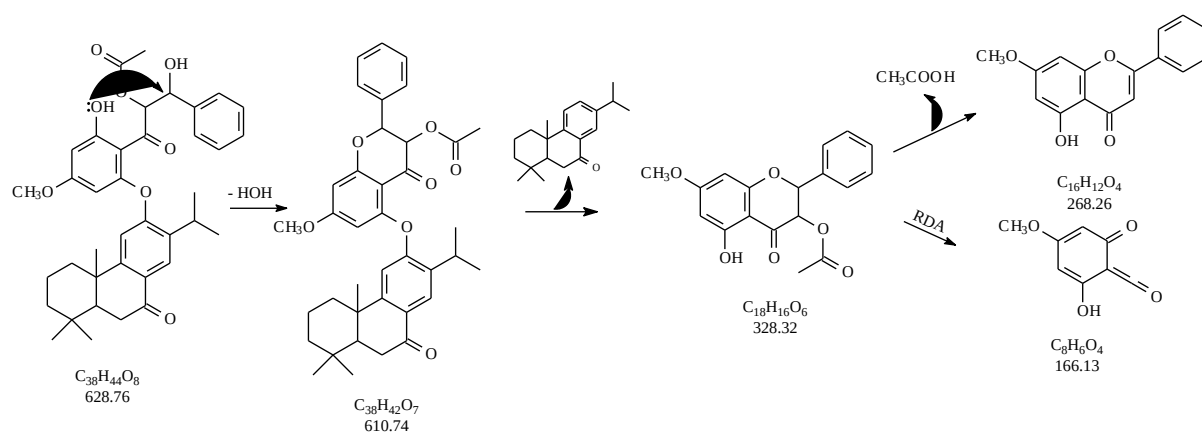


Figura 72 – Proposta de fragmentação para **MS24**.

Dados físico-químicos de MS24:

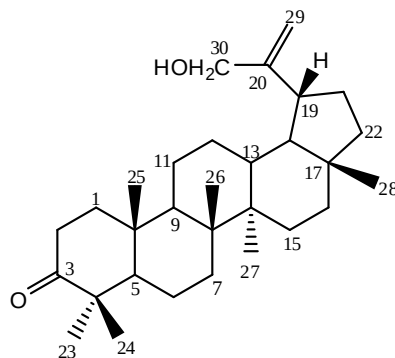
$[\alpha]_D^{20}$: +53,08 (c 0,13, $CHCl_3$);

UV (EtOH) λ_{max} ($\log \epsilon$): 291 (4,49) nm; calculado 285 nm;
227 (4,49) nm; calculado 221 nm.

Tabela 24- Deslocamentos químicos de RMN de ^1H (600 MHz, CDCl_3) e ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) de **MS24**

Nº	δ_{C}	DEPT	δ_{H} (J em Hz)	Nº	δ_{C}	DEPT	δ_{H} (J em Hz)
1	37,9	CH_2	1,52; 2,20, m	1'	169,3	C	
2	18,5	CH_2	1,79; 1,65, m	2'	101,9	C	
3	41,3	CH_2	1,51; 1,29, m	3'	164,1	C	
4	33,3	C		4'	94,7	CH	6,10, d (2,0)
5	49,4	CH	1,85; dd (13,8; 3,8)	5'	162,2	C	
6	36,1	CH_2	2,59; dd (18,1; 13,8) 2,68; dd (18,1; 3,8)	6'	95,7	CH	6,15, d (2,0)
7	198,7	C		5'- OCH_3	55,8		3,76, s
8	132,6	C		1''	191,7	C	
9	156,5	C		2''	72,4	CH	5,85, d (11,8)
10	37,9	C		3''	81,3	CH	5,40, d (11,8)
11	109,9	CH	6,70, s	1'''	153,2	C	
12	158,3	C		2'''	126,6	CH	7,40, d (1,8)
13	135,2	C		3'''	128,7	CH	7,36, dd (7,8; 2,1)
14	124,6	CH	7,90, s	4'''	129,6	CH	7,36, dd (7,8; 2,1)
15	26,8	CH	3,18, hept (7.0)	5'''	128,7	CH	7,36, dd (7,8; 2,1)
16	22,3	CH_3	1,27, d (7.0)	6'''	126,6	CH	7,40, d (1,8)
17	22,5	CH_3	1,29, d (7.0)	3'-OH			11,49 s
18	32,6	CH_3	0,95, s	3''-OH			5,78 s
19	21,4	CH_3	1,01, s	2''- CH_3CO_2	20,3 168,5	CH_3 C	2,03 s
20	23,2	CH_3	1,25, s				

➡ **MS25:** 30-hidroxilupenona



MS25 foi obtido como um sólido amorfo de ponto de fusão 181-183 °C. No espectro de RMN de ^1H de **MS25** (Fig. 73) foram constatados 6 simpletos referentes a grupos metila de esqueleto triterpênico, bem como dois sinais em δ_{H} 4,94 e em 4,91 característicos de hidrogênios de dupla ligação terminal de lupanos. Observou-se a presença de sinal de δ_{H} 4,12, relativo a hidrogênios metilênicos vizinhos a grupo hidroxila. A comparação dos dados do espectro com a literatura (Tabela 25, p.109) e comparação com padrão por meio de CCDS permitiram identificar **MS25** como 30-hidroxilupenona.

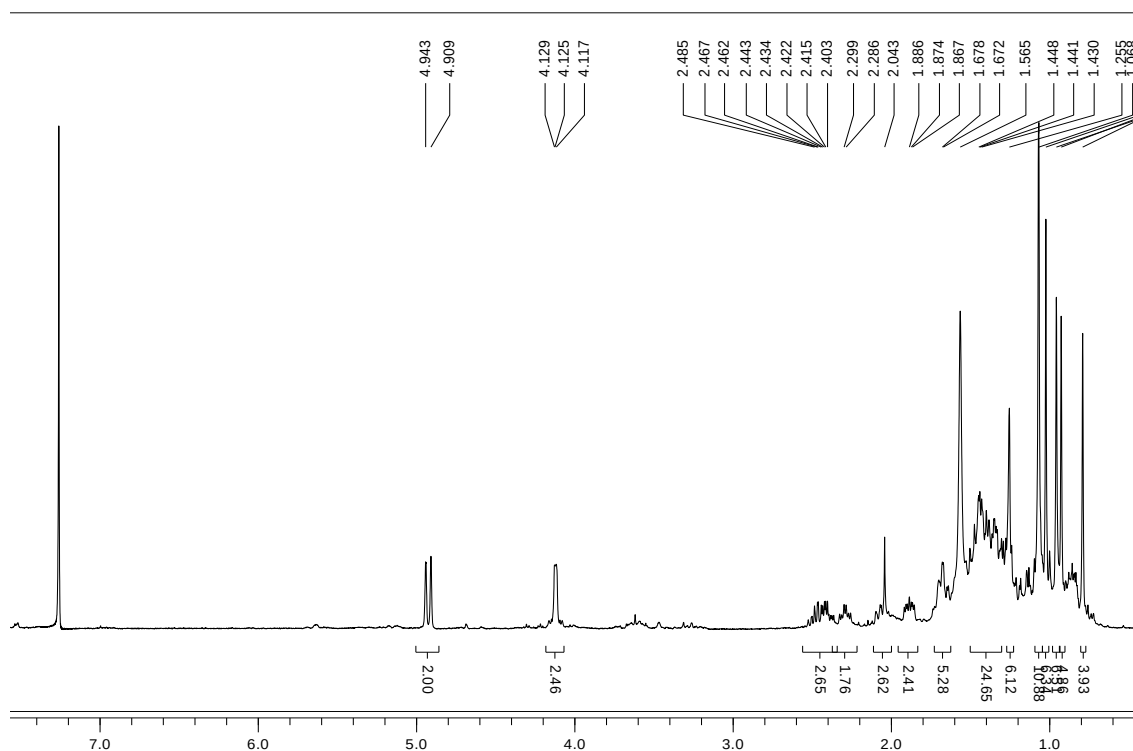
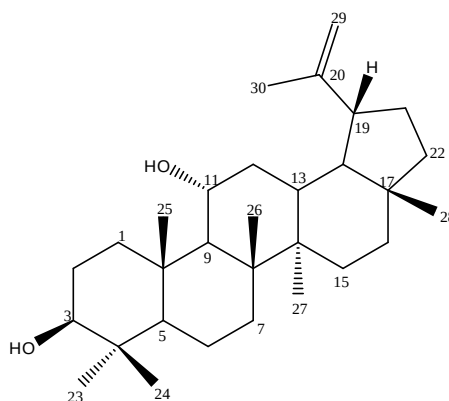


Figura 73- Espectro de RMN de ^1H de **MS25** (CDCl_3 , 400 MHz).

Tabela 25- Dados de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) de **MS25** e dados da 30-hidroxilupenona descritos na literatura (SILVA *et al.*, 2005)

Nº H	MS25	30-hidroxilupenona
	δ_{H}	δ_{H}
23	1,07 (s)	1,07 (s)
24	1,02 (s)	1,02 (s)
25	0,93 (s)	0,93 (s)
26	1,06 (s)	1,06 (s)
27	0,96 (s)	0,96 (s)
28	0,79 (s)	0,79 (s)
29	4,94 (sl); 4,91(sl)	4,94 (sl); 4,91(sl)
30	4,12 (dd, $J = 1,6; 4,8$ Hz)	4,15 (dd, $J = 1,4; 4,5$ Hz)

➔ **MS26:** nepeticina



MS26 apresentou-se como um sólido branco amorfo de faixa de fusão 212 – 215 °C. No espectro de RMN de ^1H de **MS26** (Fig. 74, p.110) foram observados seis simpletos referentes a grupos metila de esqueleto triterpênico, bem como dois sinais em δ_{H} 4,72 e 4,59, relativos a dupla ligação terminal de esqueleto lupano. Os sinais em δ_{H} 3,95 (1H, dd, $J = 5,2; 10,4$ Hz, H-11) e 3,20 (1H, dd, $J = 7,2; 16,4$ Hz, H-3), foram atribuídos a átomos de hidrogênio metínico de carbono carbinólico.

O espectro de RMN de ^{13}C (Fig.75, p.111) de **MS26** apresentou 30 sinais, e pela análise do subespectro DEPT (Fig.76, p.111) foram classificados como sendo sete metílicos CH_3 , dez metilênicos, sete metínicos e seis átomos de carbono não hidrogenado. A comparação de todos os dados obtidos com a literatura (Tabela 26, p.112) permitiu identificar **MS26** como nepeticina.

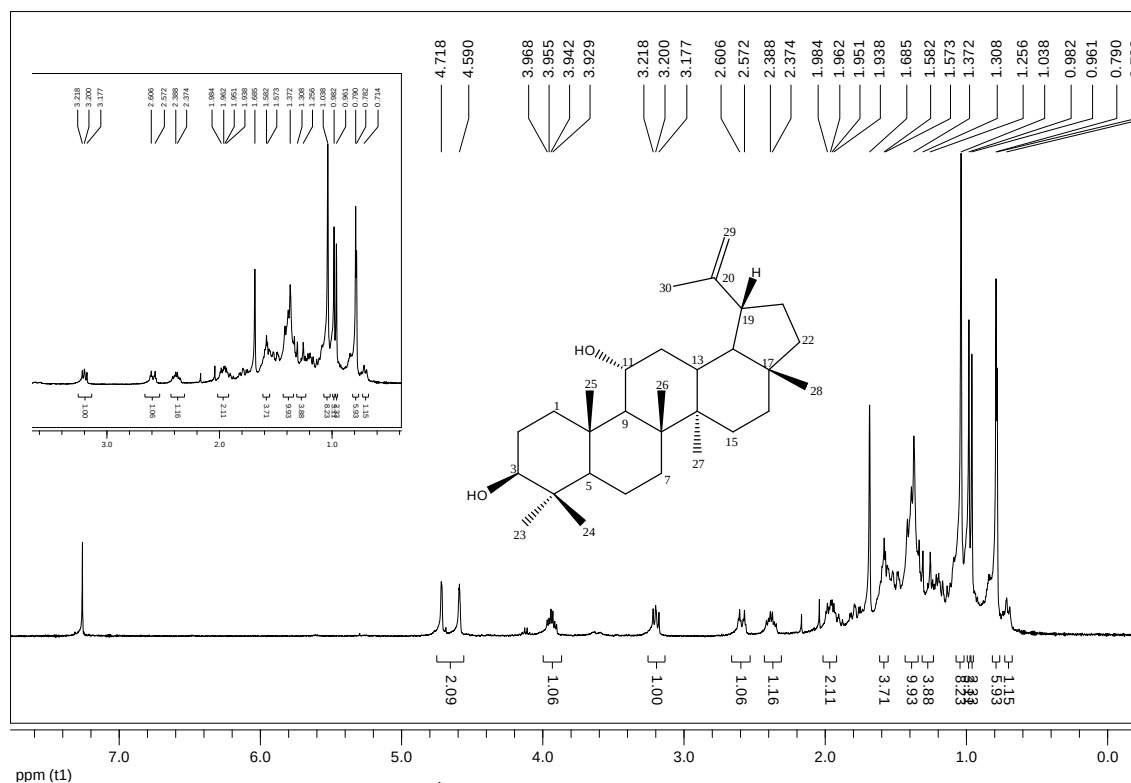


Figura 74- Espectro de RMN de ^1H de **MS26** (CDCl_3 , 400 MHz).

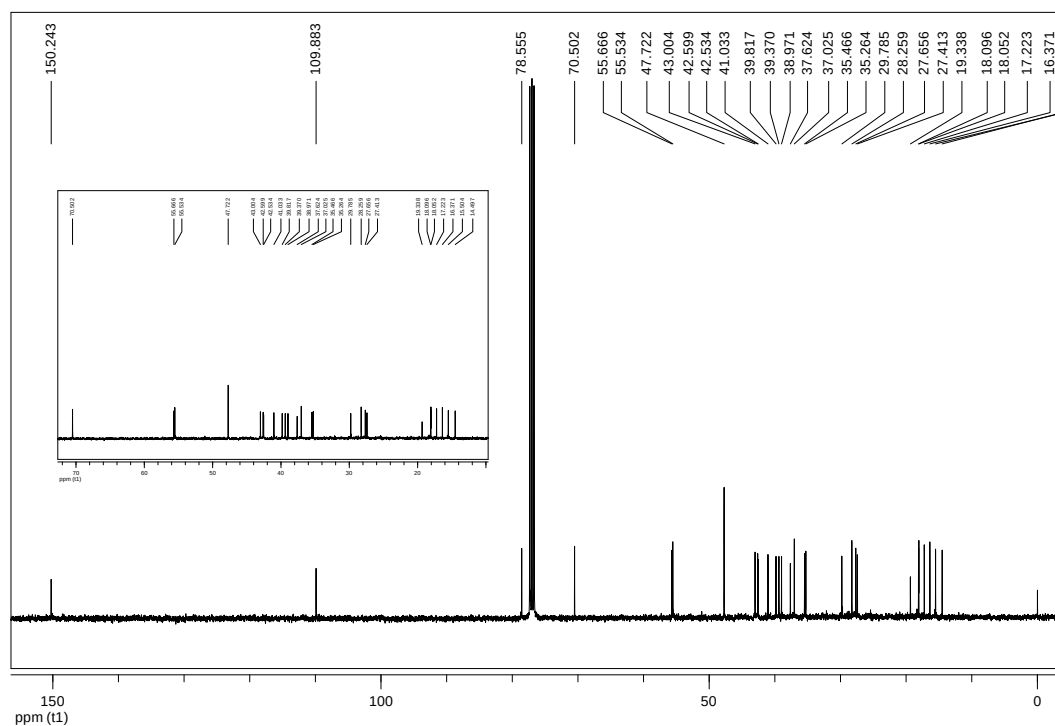


Figura 75- Espectro de RMN de ^{13}C de **MS26** (CDCl_3 , 100 MHz).

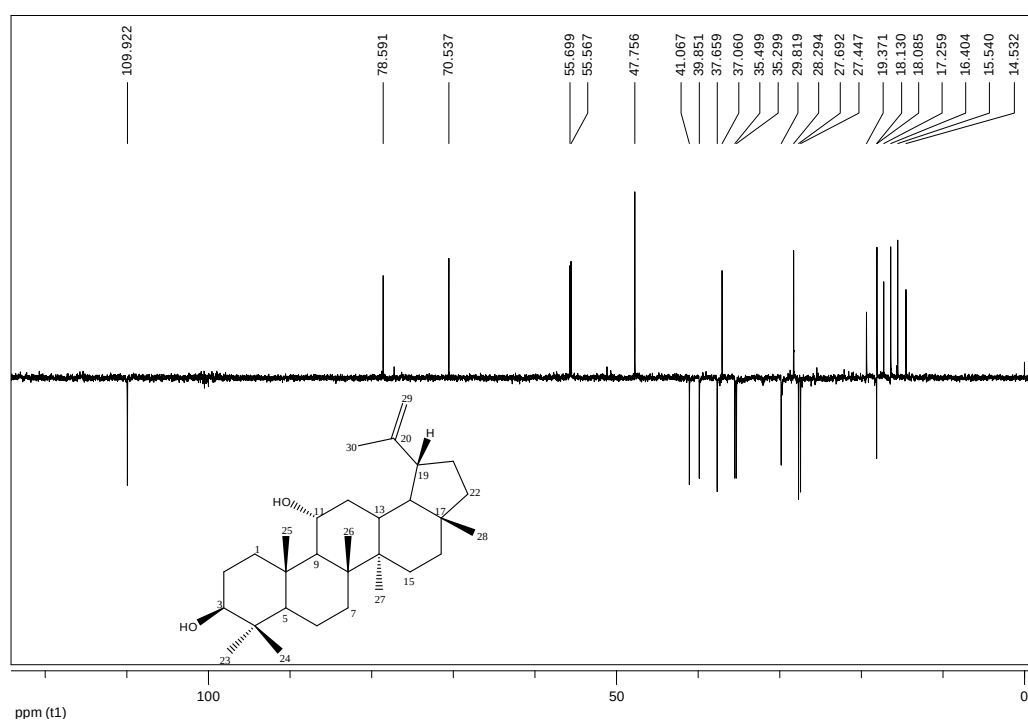
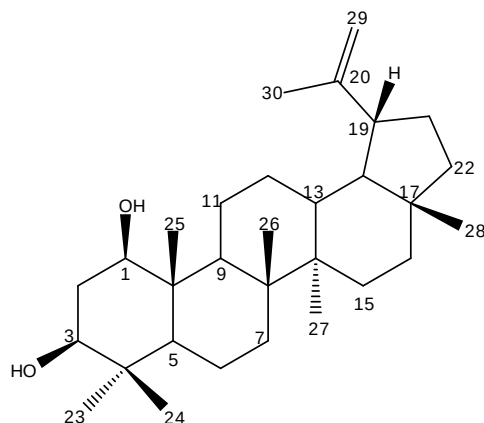


Figura 76- Subespectro DEPT-135 de **MS26** (CDCl_3 , 100 MHz).

Tabela 26- Dados de RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) de **MS26** e dados da nepeticina descritos na literatura (AHMAD *et al.*, 1981)

n°C	MS26		Nepeticina (CDCl_3)
	δ_{C}	DEPT	δ_{C}
1	39,0	CH_2	39,0
2	27,4	CH_2	27,5
3	78,6	CH	78,6
4	39,4	C	39,4
5	55,5	CH	55,6
6	18,1	CH_2	18,1
7	35,3	CH_2	35,3
8	41,1	C	41,1
9	55,7	CH	55,7
10	37,7	C	37,7
11	70,5	CH	70,5
12	27,7	CH_2	27,7
13	37,7	CH	37,7
14	42,6	C	42,6
15	27,4	CH_2	27,5
16	35,5	CH_2	35,5
17	43,0	C	43,0
18	47,7	CH	47,7
19	47,7	CH	47,7
20	150,3	C	150,2
21	29,8	CH_2	29,9
22	39,9	CH_2	39,9
23	28,3	CH_3	28,3
24	15,5	CH_3	15,6
25	16,4	CH_3	16,1
26	17,2	CH_3	17,3
27	14,5	CH_3	14,5
28	18,1	CH_3	18,1
29	109,9	CH_2	109,8
30	19,3	CH_3	19,4

➡ **MS27:** 3-*epi*-gloquidiol



MS27 foi obtido como um sólido amorfo de ponto de fusão 230-232 °C. No espectro de RMN de ^1H de **MS27** (Fig. 77) foram observados sinais em δ_{H} 4,66 e em 4,53, atribuídos a átomos de hidrogênio metilênico de dupla ligação terminal de esqueleto lupano. Observaram-se também sinais em δ_{H} 3,40 e 3,22, atribuídos a hidrogênio metínico de carbono carbinólico. Por meio da comparação do espectro de **MS27** com os dados da literatura (Tabela 27, p. 114) e comparação com amostra autêntica por meio de CCDS, **MS27** foi identificado como 3-*epi*-gloquidiol.

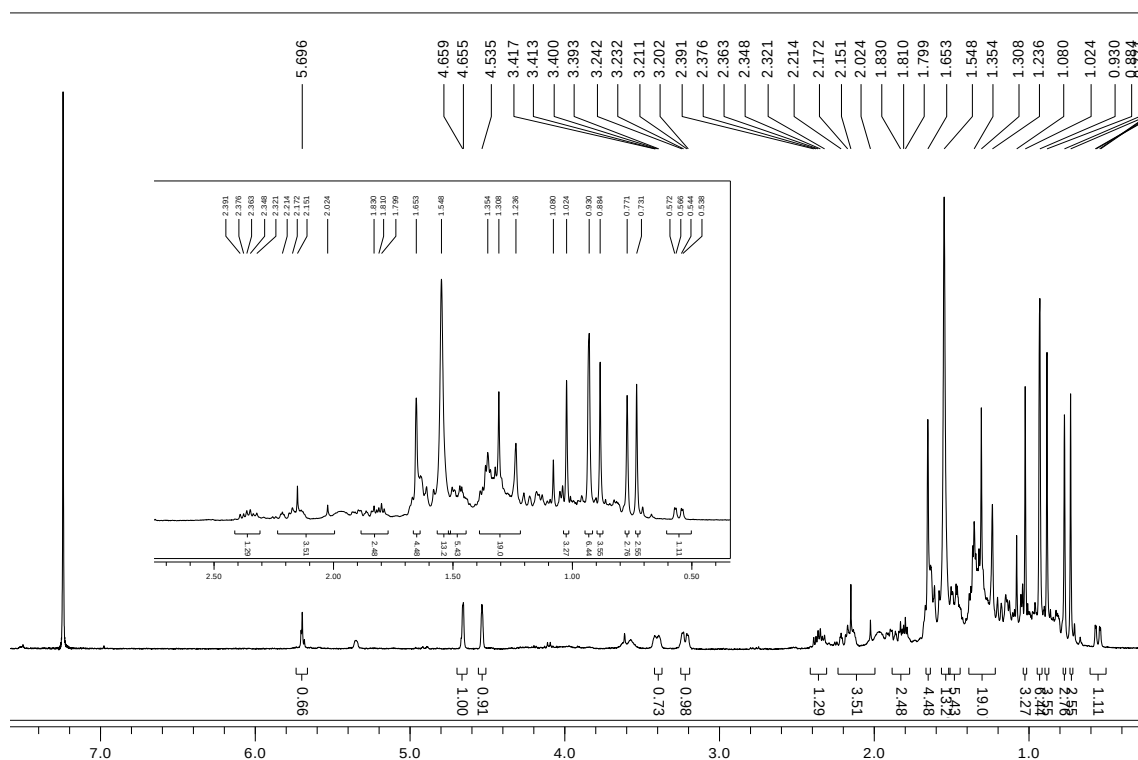
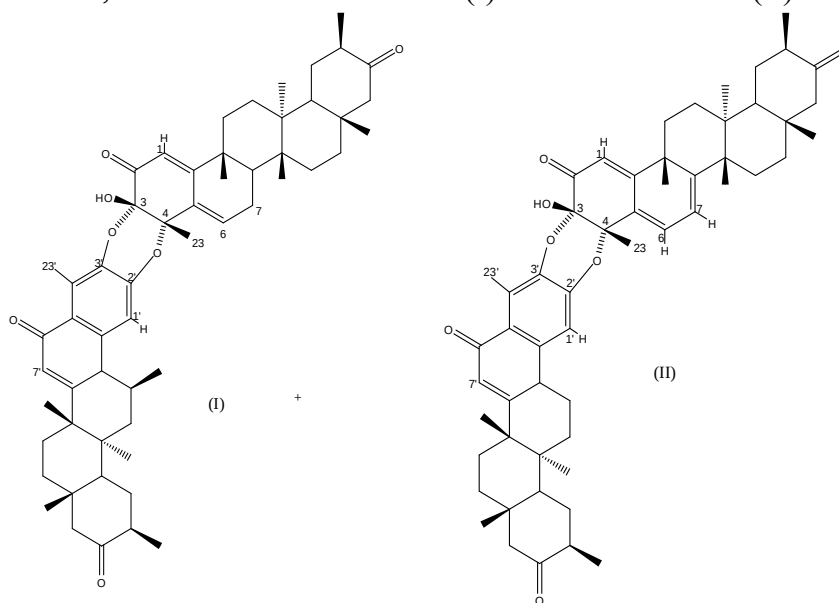


Figura 77- Espectro de RMN de ^1H de **MS27** (CDCl_3 , 400 MHz).

Tabela 27. Dados de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) de **MS27** e dados do 3-*epi*-gloquidiol descritos na literatura (SRIVASTAVA e KULSHRESHTHA, 1988)

Nº H	MS27	3- <i>epi</i> -gloquidiol (CDCl_3)
	δ_{H}	δ_{H}
1	3,40 (dd, $J = 2,8; 8,0$ Hz)	3,35 (dd, $J = 4,0; 10$ Hz)
3	3,22 (dd, $J = 4,0, 12,0$ Hz)	3,18 (dd, $J = 6,0; 12$ Hz)
23	0,93 (s)	0,90 (s)
24	0,73 (s)	0,70 (s)
25	0,88 (s)	0,85 (s)
26	1,02 (s)	0,99 (s)
27	0,93 (s)	0,90 (s)
28	0,77 (s)	0,73 (s)
29	4,53 (sl)	4,56 (sl)
	4,66 (d, $J = 1,6$ Hz)	4,66 (sl)
30	1,65 (s)	1,62 (s)

➡ **MS28:** Mistura de 7,8-di-hidroisoxuxuarina A α (I) e isoxuxuarina A α (II)



O espectro de RMN de ^1H de **MS28** (Fig. 78, p.115) apresentou sinais duplicados sugerindo hidrogênios de esqueleto quinonametídeo, δ_{H} 6,03 (1H, s, H-1), δ_{H} 7,01 (1H, s, H-1'), δ_{H} 6,28 (1H, s, H-7') e a presença de dímeros. O sinal em δ_{H} 2,5, atribuído a grupos metila (H-23') de dímeros, que também aparece duplicado, reforçou a hipótese de se tratar de uma mistura.

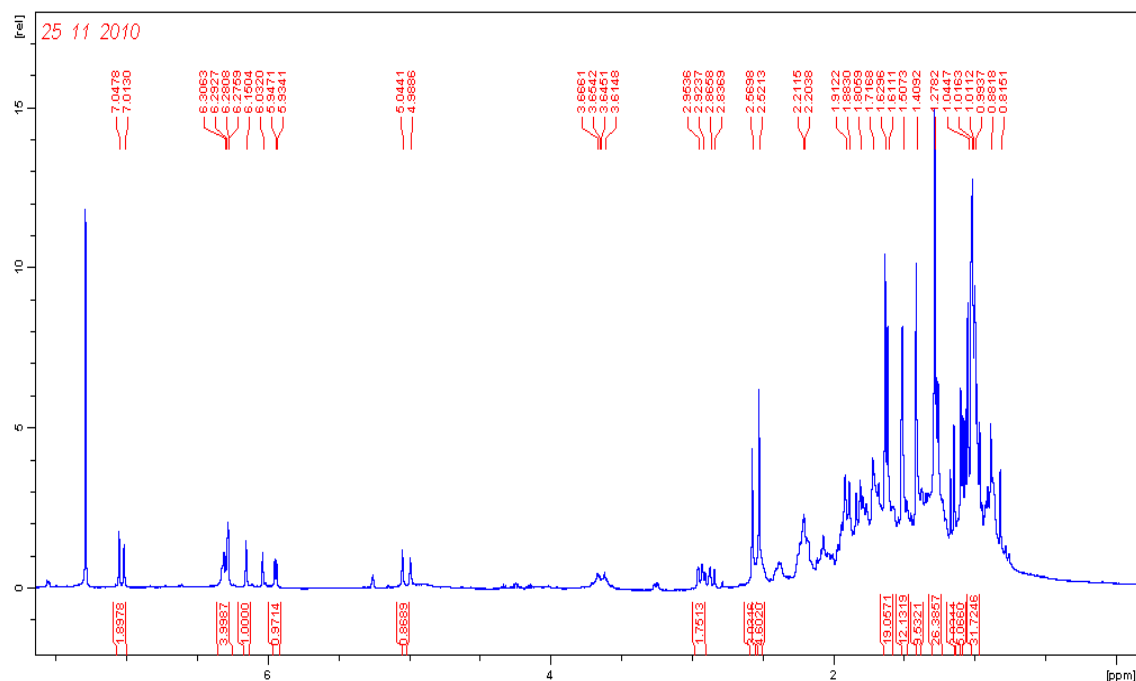


Figura 78- Espectro de RMN de ^1H de **MS28** (CDCl_3 , 400 MHz).

Os sinais observados em δ_{H} 5,04 e em δ_{H} 4,99 são característicos do hidrogênio do grupo hidroxila do grupo hemiacetal em C-3, sendo um para cada dímero. Este é um sinal típico de dímeros oriundos de união A-A (união do anel A da subunidade quinônica com o anel A da subunidade aromática). A união das duas subunidades envolvendo os átomos de carbono 3 - O - 3' e 4 - O - 2' caracteriza o regioisômero A ou *iso* (PÉREZ, 2000). A comparação dos dados obtidos com os da literatura (Tabela 28, p.116) permitiu propor para **MS28** as estruturas de 7,8-di-hidroisoxuxuarina A α (I) e isoxuxuarina A α (II).

Este interessante grupo de substâncias é constituído de duas unidades: um quinonametídeo, derivado de pristimerina (**MS16**), tingenona (**MS12**), netzahualcayona (10) e/ou seus análogos, sendo uma subunidade na forma quinônica e outra na forma aromática, unidas por uma ponte diéter em disposição *cis* entre os anéis A de ambas subunidades ou entre o anel A da unidade aromática e o anel B da quinônica (PÉREZ, 2000). Os dímeros isolados neste trabalho são formados pela união 7,8-di-hidrotingenona/ -6-oxotingenol (I) e tingenona/6-oxotingenol (II).

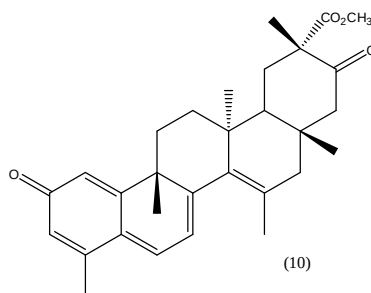
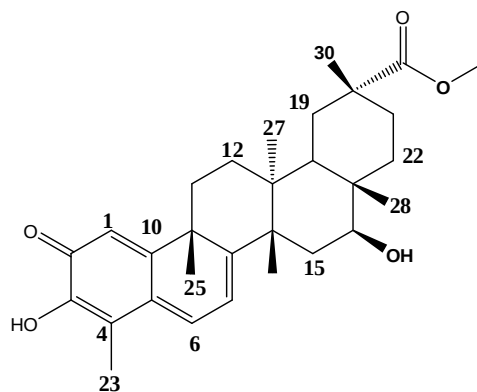


Tabela 28- Dados de RMN de ^1H obtido da mistura **MS28** e dados de 7,8-di-hidroisoxuxuarina $A\alpha$ e isoxuxuarina $A\alpha$ descritos na literatura (PÉREZ, 2000)

Nº H	(I)	7,8-di-hidroisoxuxuarina $A\alpha$	(II)	Isoxuxuarina $A\alpha$
1	6,03 (s)	6,01 (s)	6,15 (s)	6,13 d ($J=1,6$)
6	6,30 (sl)	6,30 (sl)	6,28 d ($J = 6,4$)	6,28 dd ($J = 1,6; 6,5$)
7	2,04 (m)	2,05 (m)	5,91 d ($J = 5,2$)	5,92 d ($J = 6,5$)
23	1,51 (s)	1,49 (s)	1,61(s)	1,59 (s)
1'	7,01 (s)	6,99 (s)	7,04	7,03 (s)
7'	6,28 (s)	6,26 (s)	6,25 (s)	6,25 (s)
23'	2,57 (s)	2,55 (s)	2,50 (s)	2,50 (s)

➔ **MS29:** 16 β -hidroxipristimerina



O composto **MS29** foi obtido como um sólido vermelho amorfo de ponto de fusão 99,1 – 100,2 °C. O espectro na região do IV de **MS29** (Fig. 79, p.117) exibiu bandas de absorção em 3375 cm^{-1} , referente a deformação axial de grupo OH e em 1645 cm^{-1} , atribuída a grupo C=O. Foi observada também uma banda em 1078 cm^{-1} , correspondente deformação axial de ligação C-O de álcool primário saturado (BARBOSA, 2007).

O espectro na região do UV-Vis de **MS29** (Fig 80, p.117) exibiu banda de absorção em 421 nm, condizente com a presença de um sistema quinonametídeo (RODRIGUES, 1989).

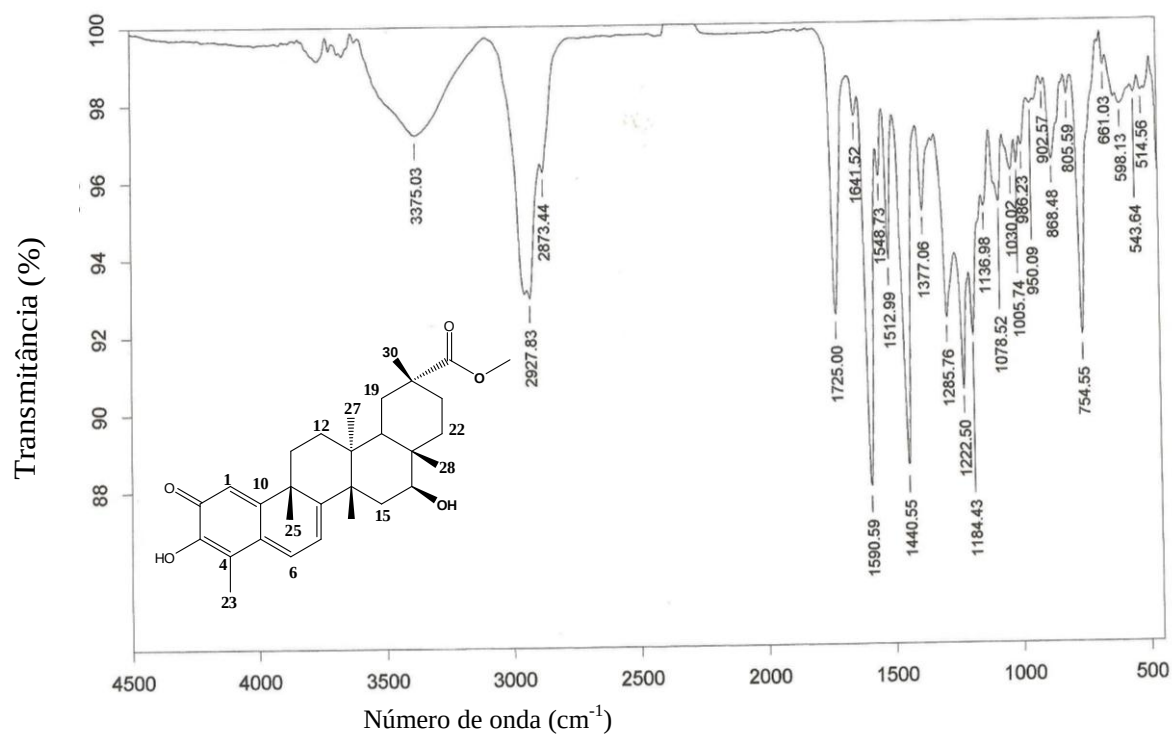


Figura 79- Espectro de absorção no IV de **MS29** (KBr).

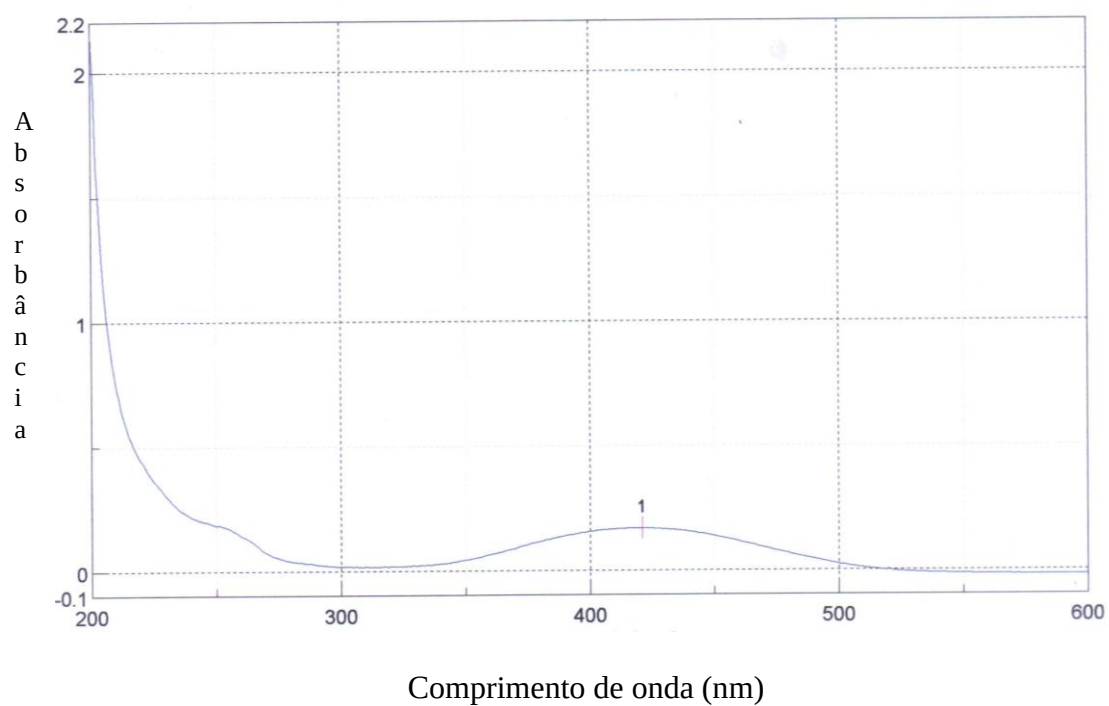


Figura 80- Espectro na região do UV-Vis de **MS29** (CDCl_3 , 500 MHz).

O espectro de RMN de ^1H (Fig.81) revelou a presença de 6 simpletos em δ 2,23, 1,47, 1,31, 1,24, 1,09 e 0,49, atribuídos a 6 grupos metila. Os sinais em δ_{H} 6,35 (d, $J = 7,10$ Hz), δ_{H} 6,53 (s) e em δ_{H} 7,03 (1H, $J = 7,10$ Hz) caracterizam esqueleto quinonametídeo e foram atribuídos a H-7, H-1 e H-6, respectivamente. O simpleto em δ_{H} 2,23 (3H, H-23) é característico de grupo metila ligado a carbono do tipo sp^2 e o sinal em δ_{H} 4,12 é relativo a hidrogênio metínico em carbono oxigenado.

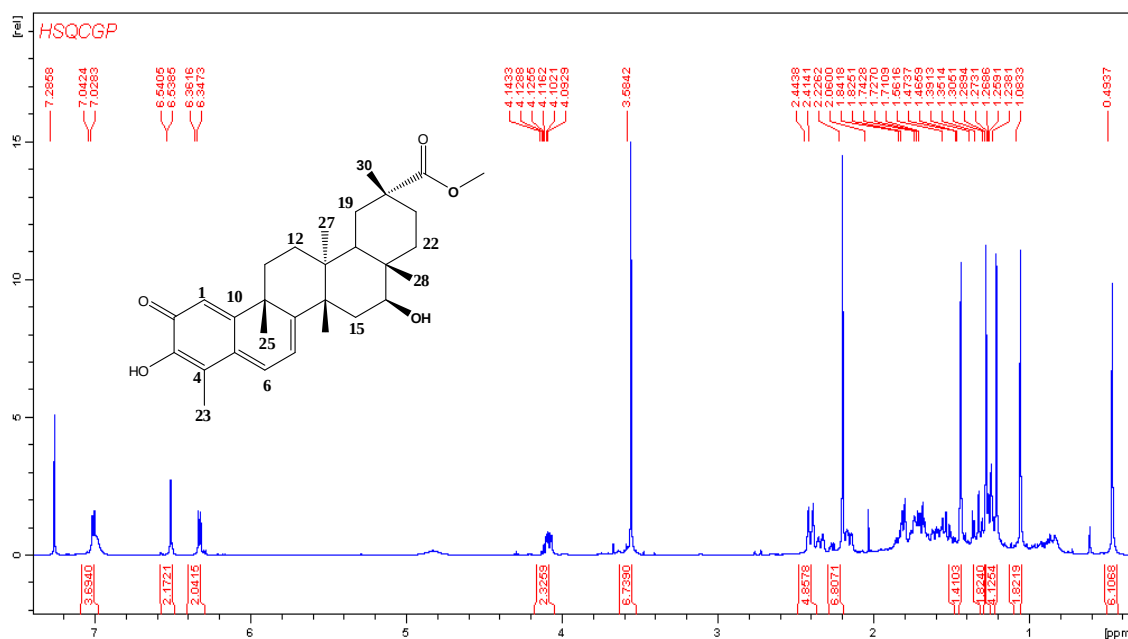


Figura 81- Espectro de RMN de ^1H de **MS29** (CDCl_3 , 500 MHz).

Por meio do espectro de RMN de ^{13}C (Fig. 82, p. 119) associado ao subespectro DEPT-135 (Fig. 83, p.120) foi possível constatar a presença de 30 carbonos, sendo sete grupos metila, seis grupos metilênicos, cinco átomos de carbono metínico e 12 átomos de carbono não hidrogenado (Tabela 29, p. 123).

Pela comparação de dados de RMN do esqueleto base da pristimerina (JELLER *et al.*, 2004) com as correlações observadas no mapa de contornos HSQC (Fig. 84, p.120) de δ_{H} 1,84 com δ_{C} 46,95 e δ_{H} 2,40 e 1,39 com δ_{C} 38,34 foi possível identificar C-18 e C-22, respectivamente, além de outros sinais. As correlações observadas no mapa de contornos HMBC (Fig. 85, p.121) do sinal em δ_{H} 1,09 (H-28) com o sinal em δ_{C} 68,21 e do sinal em δ_{H} 4,12 com δ_{C} 38,34 (C-22) confirmaram que a hidroxila está ligada ao C-16. O grupo éster foi confirmado pelo simpleto em δ_{H} 3,58 (3H) atribuído à metoxila deste grupo em C-29, que foi

confirmada pela correlação observada entre os hidrogênios do grupo metila em δ_H 1,24 (H-30) com o carbono carbonílico do grupo éster em δ_C 178,2 (C-29). A estereoquímica relativa de H-16 foi deduzida pelos valores das constantes de acoplamento ($J_{16ax-15ax} = 11,70$ Hz e $J_{16ax-15eq} = 4,65$ Hz), que confirmam a posição equatorial do grupo hidroxila. No mapa de contornos ROESY (Fig.86, p.121), o sinal dos átomos de hidrogênio H-22 $_{\alpha}$ (δ_H 2,40) e H-27 (δ_H 0,49) correlaciona com o sinal de H-16 (δ_H 4,12), reafirmando a posição do grupo hidroxila em C-16. No desenho da conformação dos anéis D e E da molécula (Fig.87, p.121) observa-se o efeito NOE entre H-16 e H-22 e entre H-16 e H-27.

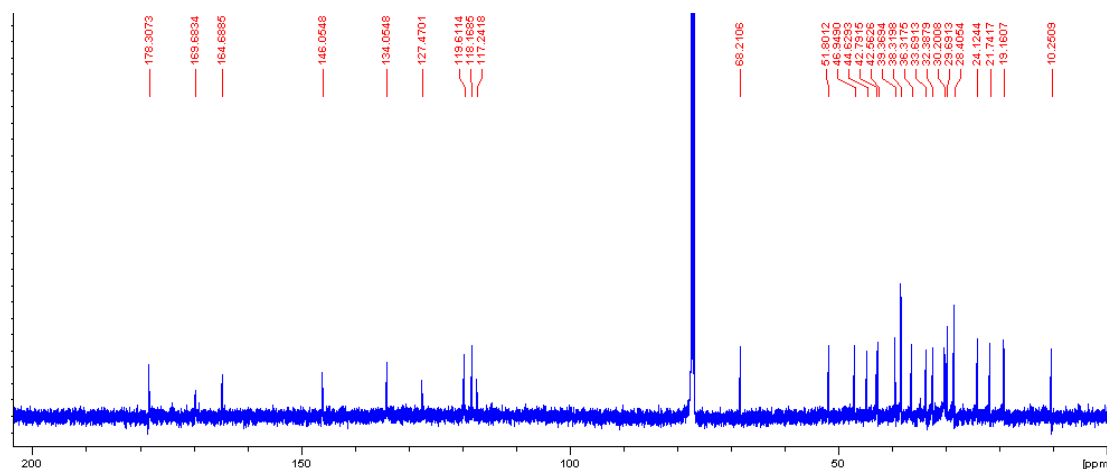


Figura 82- Espectro de RMN de ^{13}C de **MS29** ($CDCl_3$, 125 MHz).

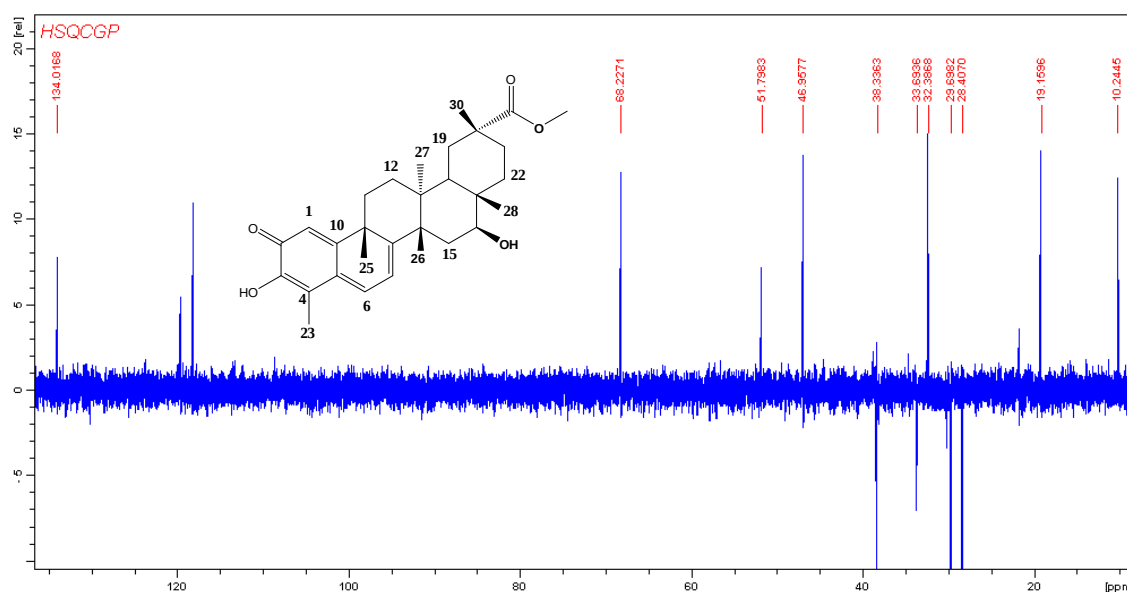


Figura 83- Subespectro DEPT-135 de **MS29** ($CDCl_3$, 125 MHz).

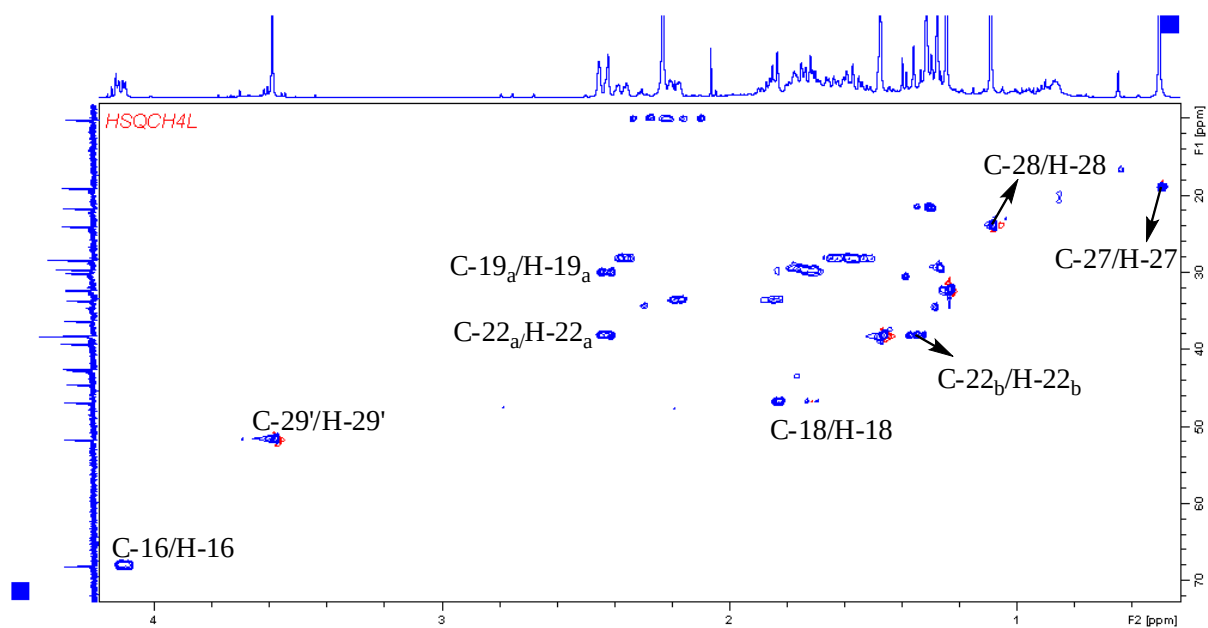


Figura 84- Expansão do mapa de contornos HSQC de **MS29** (CDCl₃, 500 MHz).

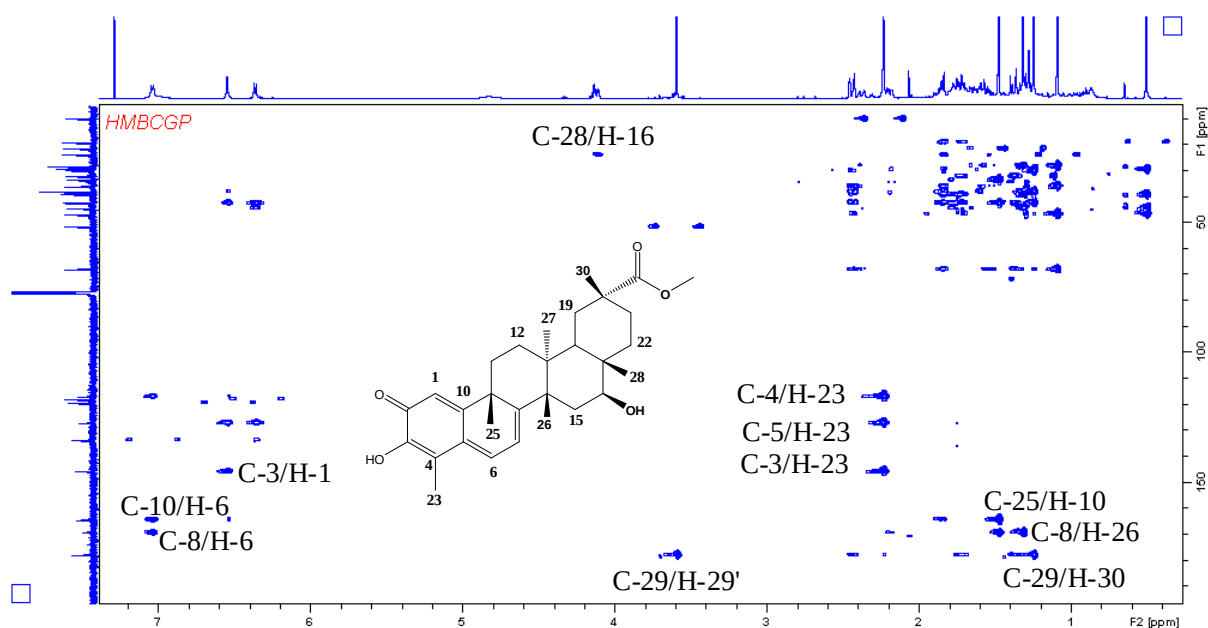


Figura 85- Mapa de contornos HMBC de **MS29** (CDCl₃, 500 MHz).

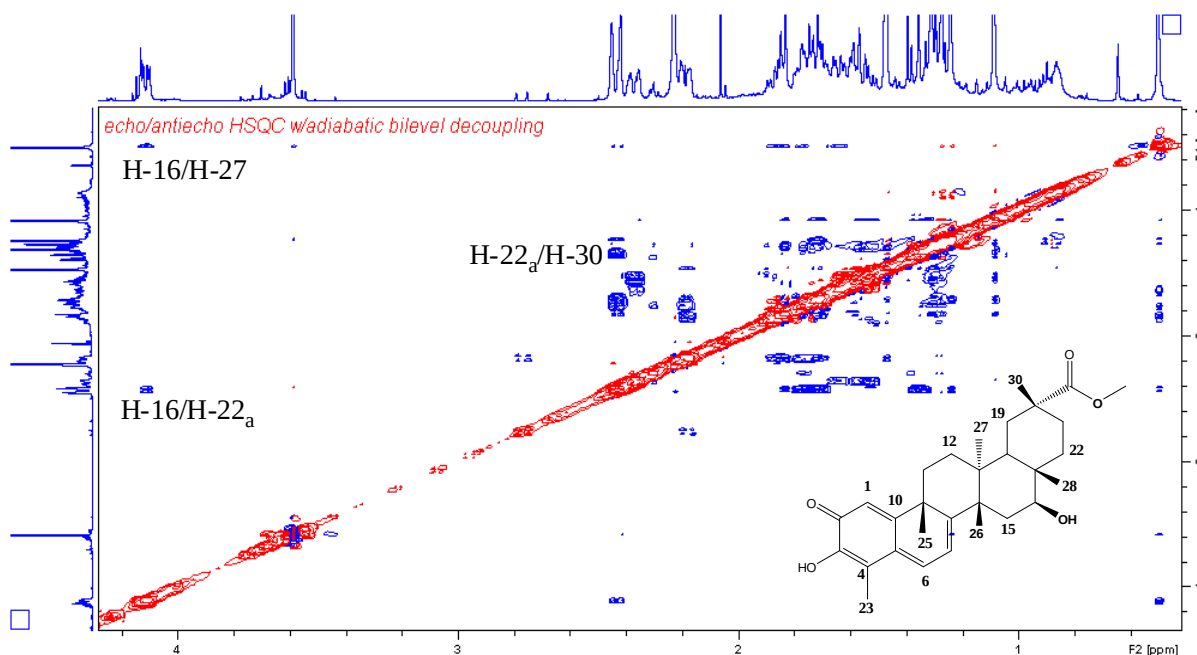


Figura 86- Mapa de contornos ROESY de **MS29** (CDCl₃, 500 MHz).

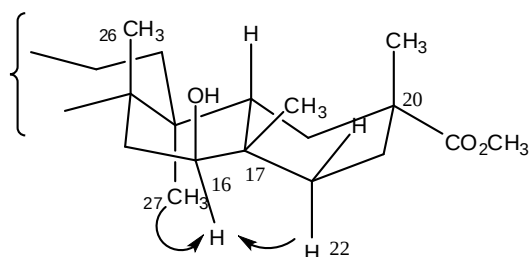


Figura 87- Conformação dos anéis D e E mostrando os NOE observados.

Por meio da análise do espectro de massas de alta resolução de **MS29** (Fig.88, p.122), obteve-se a fórmula molecular C₃₀H₄₀O₅ (MM 480,0 g mol⁻¹), uma vez que foram observados picos em *m/z* 481 [M+H] e 480 [M+]. Foram observados também picos em *m/z* 202[M+Na] e 201. Na Figura 89 (p. 122) é apresentada a proposta de fragmentação de **MS29**, considerando os picos observados no espectro de massas.

Assim, de posse de todos os dados de RMN de 1D e 2D (Tabela, 29, p.123), concluiu-se que **MS29** trata-se da 16 β -hidroxipristimerina, nova na literatura científica.

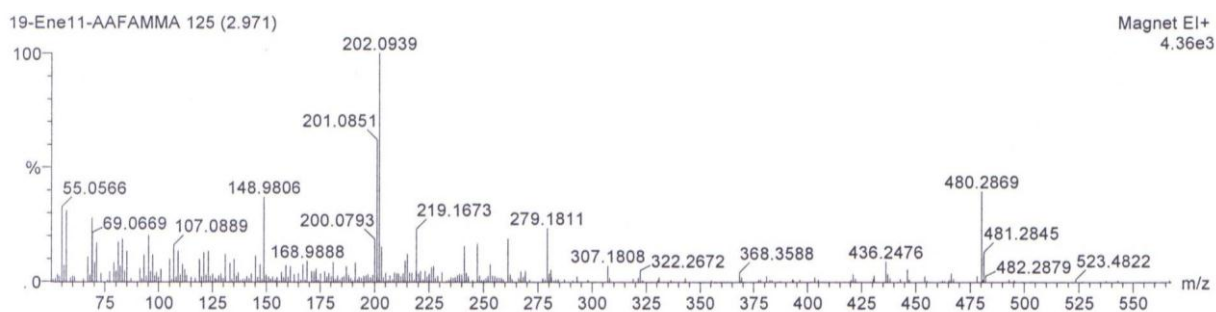


Figura 88- Espectro de massas (HR-MS) de **MS29**.

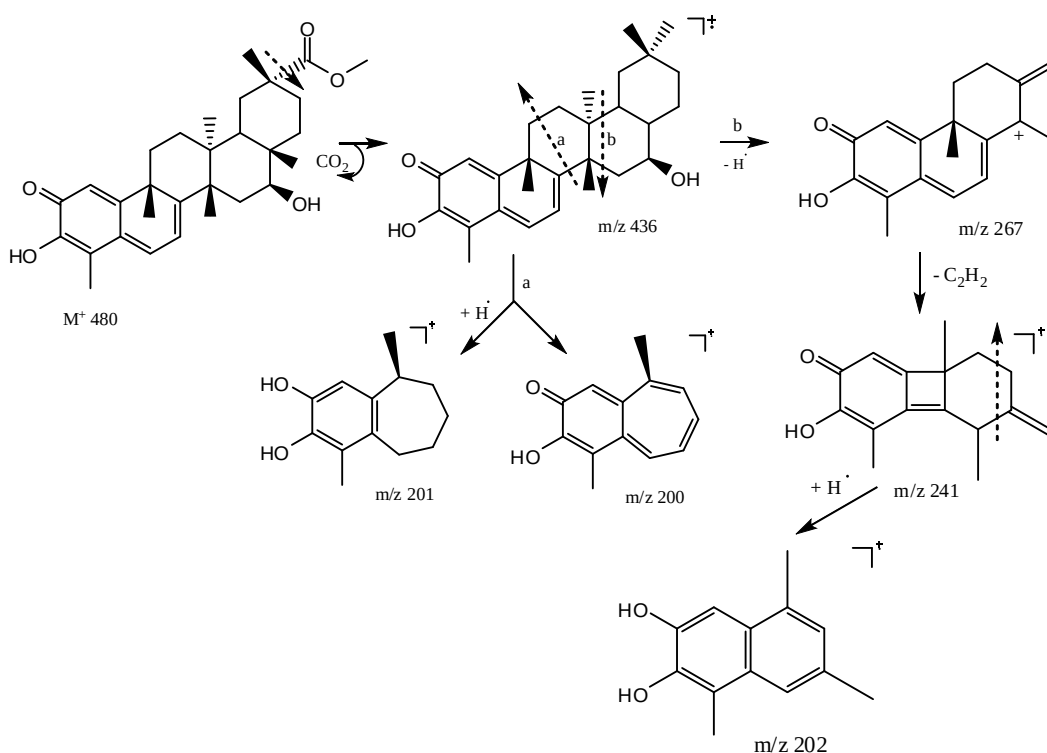


Figura 89- Proposta de fragmentação para o composto **MS29**.

A seguir são apresentados outros dados físico-químicos obtidos para **MS29**.

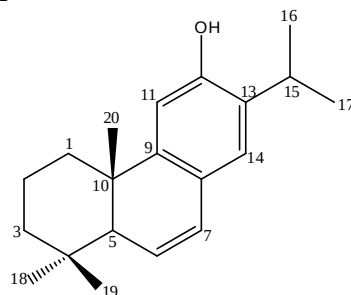
$[\alpha]_D^{20}$: -80,0, (0,001, CHCl_3)

UV $\lambda_{\text{max}}^{\text{EtOH}}$ nm (log ϵ): 421 (3,91); calculado: 426 nm.

Tabela 29. Deslocamentos químicos de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) e ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) de **MS29**

Nº	δ_{C}	DEPT-135	δ_{H}	HMBC	ROESY
1	164,7	CH	6,53 (s)	C-3, C-5	
2	178,3	C			
3	146,0	C			
4	118,2	C			
5	127,5	C			
6	134,0	CH	7,03 (d) $J= 7,1$	C-7, C-8, C-10	
7	117,2	CH	6,35 (d) $J= 7,1$	C-5, C-14	
8	169,7	C			
9	47,8	C			
10	164,0	C			
11	33,7	CH_2	2,20 (dd, $J= 2,3, 13,7$; H_a) 2,22 (1H, m, H_b)	C-9, C-12, C-25	
12	30,2	CH_2	1,26 (m)		
13	42,6	C			
14	44,6	C			
15	28,4	CH_2	2,37 (dd, $J= 3,4; 12,8$, H_a) 2,18 (d, $J= 2,5$; H_b)	C-16	
16	68,2	CH	4,12 (dd, $J= 4,6; 11,7$)	C-15, C-22, C-28	H-22 _a ; H-27
17	30,2	C			
18	46,9	CH	1,84 (dd, $J= 1,2; 8,4$)		
19	29,6	CH_2	2,40 (dd, $J= 3,2; 8,2$, H_a) 1,73 (d, $J= 8,1$, H_b)	C-18, C-21	H-16
20	39,4	C			
21	28,4	CH_2	2,31 (d, $J= 4,6$; H_a) 1,53 (d, $J= 5,9$; H_b)		
22	38,3	CH_2	2,40 (dd, $J= 3,2; 8,2$; H_a) 1,39 (dd, $J= 3,4; 6,7$; H_b)	C-18	
23	10,2	CH_3	2,23 (s)	C-3, C-4, C-5	
25	38,3	CH_3	1,47 (s)	C-8, C-9, C-10, C-11	
26	21,7	CH_3	1,31 (s)	C-8, C-13, C-15	
27	19,2	CH_3	0,49 (s)	C-12, C-13, C-14, C-18	H-16
28	24,1	CH_3	1,09 (s)	C-16, C-17, C-18, C-22	
29	178,3	C			
29'	51,8	CH_3	3,58 (s)		
30	32,4	CH_3	1,24 (s)	C-19, C-20, C-21, C-29	H-19 _a

➡ **MS30:** 6,7-desidroferruginol



O composto **MS30** foi obtido como um sólido amorfo amarelado, de ponto de fusão 53,1-54,6 °C. O espectro de RMN de ^1H de **MS30** (Fig.90) apresentou um sinal em δ_{H} 1,01 (6H, s, H-18; H-19) referente a dois grupos metila geminais e um sinal em δ_{H} 1,24 referentes a grupos metílicos geminais de grupo isopropila, característicos de esqueleto do tipo diterpeno abietano. Foram observados também sinais em δ_{H} 6,88 e em δ_{H} 6,56, relativos a hidrogênios de anel aromático, além de sinais em δ_{H} 5,84 e em 6,52 relacionados a hidrogênios de dupla ligação conjugada. De posse desses dados, comparação dos mesmos com a literatura (Tabela 30, p.125) e comparação por CCDS com amostra autêntica, foi possível sugerir para **MS30** a estrutura do 6,7-desidroferruginol.

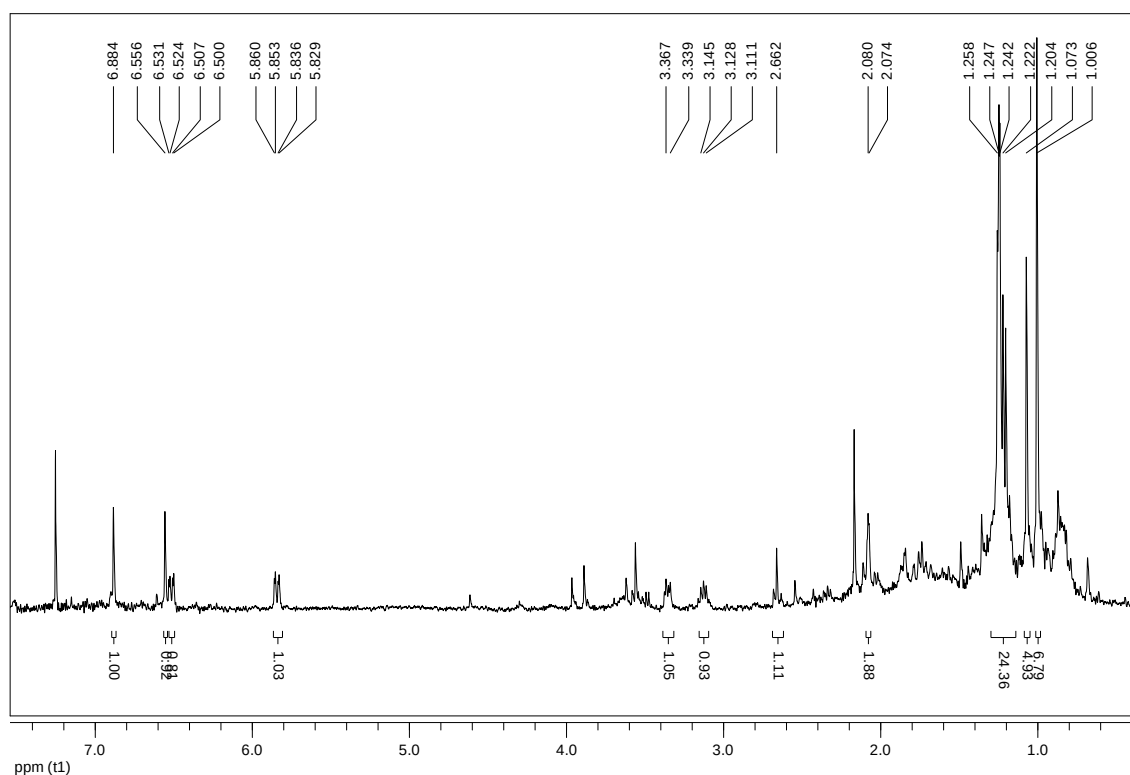
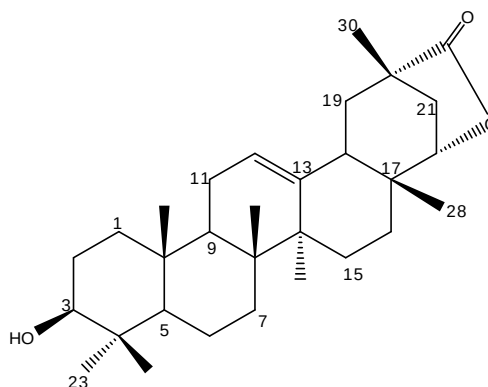


Figura 90- Espectro de RMN de ^1H de **MS30** (CDCl_3 , 400 MHz).

Tabela 30 – Dados de RMN de ^1H (CDCl_3 , 400 MHz) de **MS30** dados do 6,7-desidroferruginol descritos na literatura (WANG *et al.*, 2002)

Nº H	MS30	6,7-desidroferruginol (CDCl_3)
	δ_{H}	δ_{H}
6	5,84 (dd, $J = 2,8; 9,6$ Hz)	5,84 (dd, $J = 3,0; 9,2$ Hz)
7	6,52 (dd, $J = 2,8; 9,6$ Hz)	6,48 (dd, $J = 3,0; 9,2$ Hz)
11	6,56 (s)	6,54 (s)
14	6,88 (s)	6,88 (s)
15	3,12 (dd, $J = 6,8; 13,6$ Hz)	3,12 (sept, $J = 7,0$ Hz)
16	1,24 (d, $J = 6,9$ Hz)	1,22 (d, $J = 7,0$ Hz)
17	1,24 (d, $J = 6,9$ Hz)	1,24 (3H, d, $J = 7,0$ Hz)
18	1,01 (s)	0,90 (s)
19	1,01 (s)	0,96 (s)
20	1,07 (s)	1,03 (s)

➡ **MS31**: abruslactona A



No espectro de RMN de ^1H de **MS31** (Fig.91, p.126) foi observado um sinal em δ_{H} 5,31, característico de hidrogênio olefínico de dupla ligação em C-12. Observaram-se também um sinal em δ_{H} 3,25, relativo a hidrogênio metínico de carbono carbinólico e um sinal em δ_{H} 4,17, atribuído a hidrogênio metínico geminal a oxigênio. A comparação do espectro de **MS31** com os dados da literatura (Tabela 31, p.126) permitiu identificá-lo como

abruslactona A. Este composto também é conhecido como wilforlídeo A (NAKANO et al., 1997).

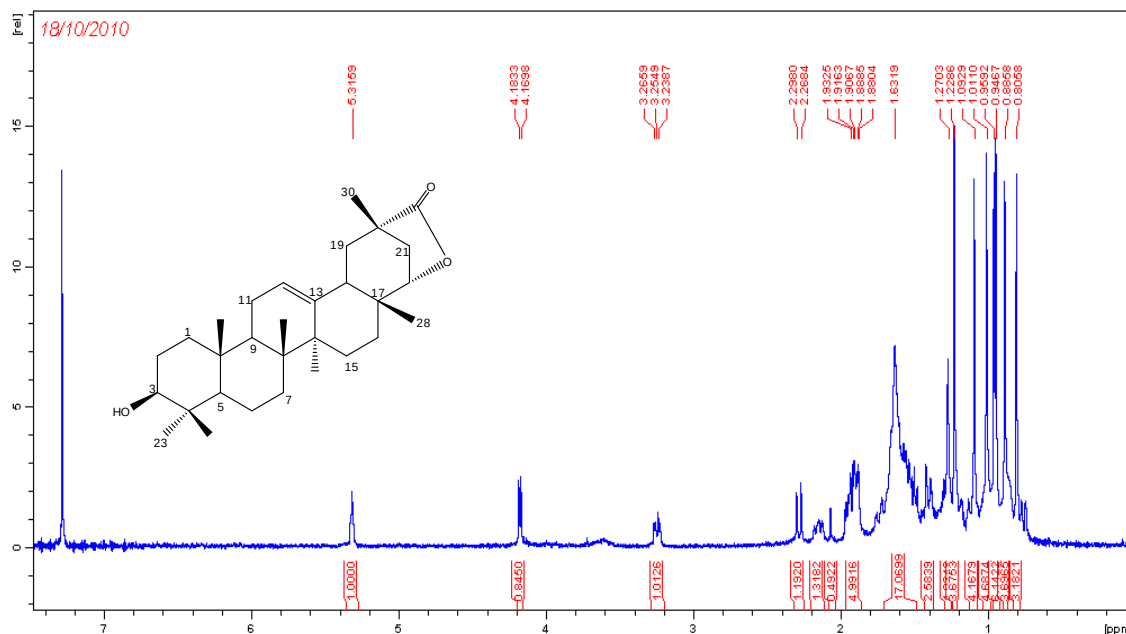
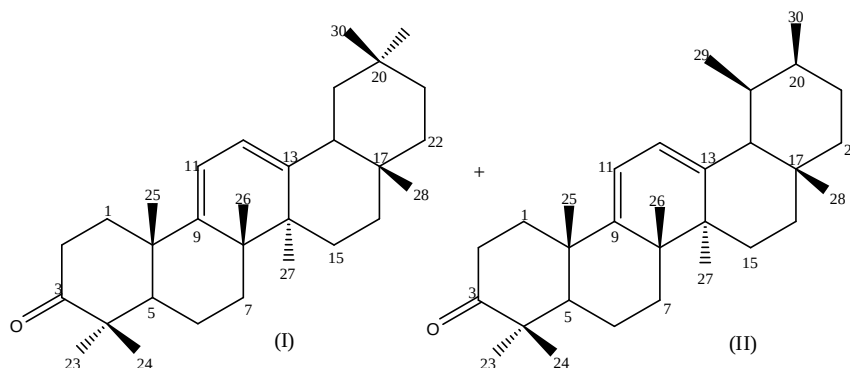


Figura 91. Espectro de RMN de ^1H de **MS31** (CDCl_3 , 400 MHz).

Tabela 31 – Dados de RMN de ^1H (CDCl_3 , 400 MHz) de **MS31** e dados da abruslactona A descritos na literatura (SILVA et al., 1998)

Nº H	MS31	Abruslactona A
	δ_{H}	δ_{H}
3	3,25 (dd, $J = 4,4; 10,8$ Hz)	3,20 (dd, $J = 6,0; 9,0$ Hz)
12	5,32 (sl)	5,30 (t, $J = 3,0$ Hz)
22	4,17 (d, $J = 5,4$ Hz)	4,17 (d, $J = 5,0$ Hz)
23	1,22 (s)	1,21 (s)
24	1,09 (s)	1,07 (s)
25	1,01 (s)	0,99 (s)
26	0,96 (s)	0,94 (s)
27	0,95 (s)	0,93 (s)
28	0,88 (s)	0,87 (s)
30	0,80 (s)	0,79 (s)

☉ **MS32**: mistura de 3-oxo-olean-9(11):12-dieno e 3-oxo-ursan-9(11):12-dieno.



O espectro de RMN de ^1H de **MS32** (Fig. 92) apresentou abundância de sinais referentes a hidrogênios metílicos, o que levou a crer que se tratava de uma mistura. Os sinais próximos a δ_{H} 5,6 foram atribuídos a hidrogênios de duplas ligações conjugadas. Por meio da integração, constatou-se que os hidrogênios olefínicos perfaziam um total de 4, sendo oriundos, portanto de dois compostos. A comparação dos dados obtidos com a literatura (Tabela 32, p. 128), permitiu sugerir para **MS32** as estruturas de 3-oxo-olean-9(11):12-dieno (I) e 3-oxo-ursan-9(11):12-dieno (II) (GONZALEZ *et al.*, 1987).

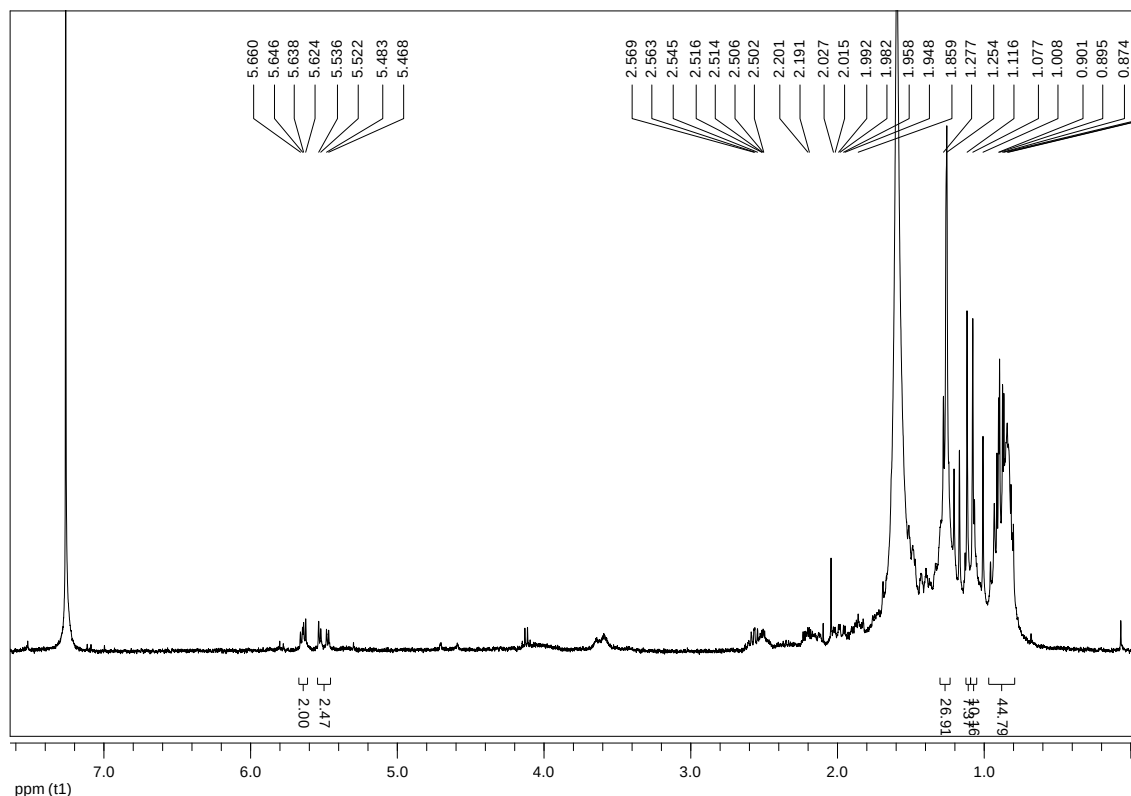
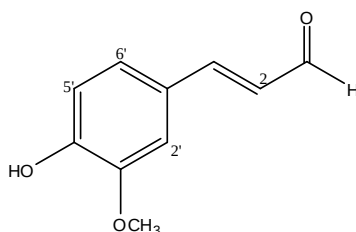


Figura 92- Espectro de RMN de ^1H de **MS32** (CDCl_3 , 400 MHz).

Tabela 32 – Principais deslocamentos de RMN de ^1H (CDCl_3 , 400 MHz) observados para **MS32** e comparação com a literatura (GONZÁLEZ *et al.*, 1987)

Nº H	MS32	3-oxo-olean-9(11):12-dieno (I)	MS32	3-oxo-ursan-9(11):12-dieno (II)
	δ_{H}	δ_{H}	δ_{H}	δ_{H}
11	5,63 (d, $J = 5,6$ Hz)	5,63 (d, $J = 6,0$ Hz)	5,65 (d, $J = 5,6$ Hz)	5,65 (d, $J = 5,6$ Hz)
12	5,53 (d, $J = 5,6$ Hz)	5,51 (d, $J = 6,0$ Hz)	5,47 (d, $J = 6,0$ Hz)	5,49 (d, $J = 5,6$ Hz)
23	1,01 (s)	1,01 (s)	1,01 (s)	1,01 (s)
24	0,86 (s)	0,88 (s)	0,90 (s)	0,89 (s)
25	1,14 (s)	1,17 (s)	1,14 (s)	1,17 (s)
26	1,28 (s)	1,26 (s)	1,28(s)	1,24 (s)
27	1,10 (s)	1,12 (s)	1,10 (s)	1,13 (s)
28	1,08 (s)	1,08 (s)	1,08 (s)	1,08 (s)
29	0,90 (s)	0,90 (s)	0,86 (s)	0,83 (d, $J = 6,1$ Hz)
30	0,90 (s)	0,90 (s)	0,90 (s)	0,93 (sl)

➔ **MS33**: 3'-metoxi,4'-hidroxi- *trans*-cinamaldeído



MS33 foi obtido como um sólido amorfo de faixa de fusão 63- 66° C. O espectro de RMN de ^1H de **MS33** (Fig. 93, p.129) apresentou sinais que sugeriram a presença de impurezas. Porém, foi possível caracterizar, após comparação com a literatura (Tabela 33, p.129), os sinais mais intensos. Foi observado um sinal em δ_{H} 9,65, atribuído a hidrogênio de grupo aldeído. O sinal em 3,94 foi correlacionado a hidrogênios de grupo metoxila e aqueles observados em δ_{H} 7,08, em δ_{H} 6,96 e em δ_{H} 7,12 foram associados aos hidrogênios de anel aromático trissubstituído. Os sinais observados em δ_{H} 6,60 e em δ_{H} 7,40 foram atribuídos a hidrogênios olefínicos. Assim, de posse de todos esses dados e comparação dos mesmos com

a literatura sugeriu-se para **MS33** a estrutura do 3'-metoxi,4'-hidroxi-*trans*-cinamaldeído como componente majoritário.

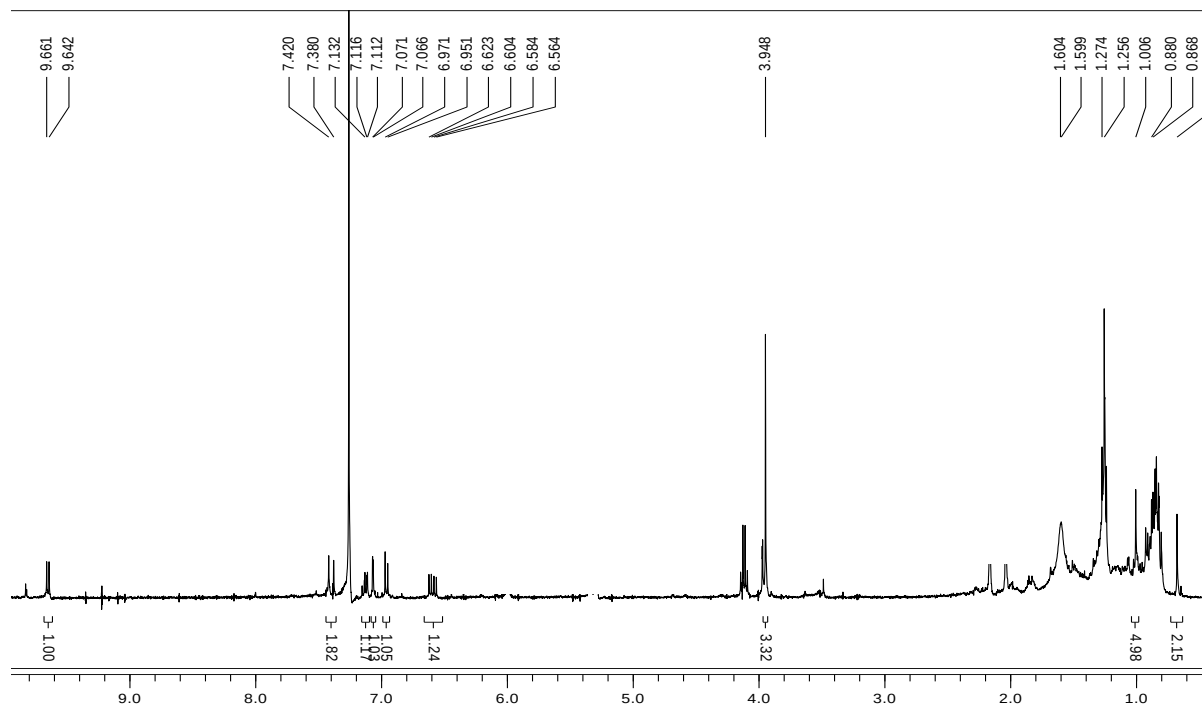
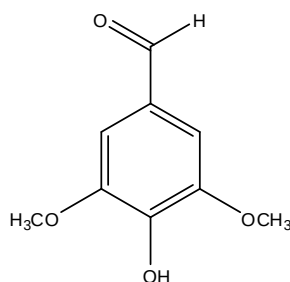


Figura 93 – Espectro de RMN de ^1H de **MS33** (400 MHz, CDCl_3).

Tabela 33 – Principais deslocamentos de RMN de ^1H (CDCl_3 , 400 MHz) de **MS33** e comparação com a literatura (KWON e LEE, 2001)

Nº H	MS33	3'-metoxi,4'-hidroxi- <i>trans</i> -cinamaldeído (CDCl_3)
	δ_{H}	δ_{H}
1	9,65 (d, $J = 7,6$)	9,65 (d, $J = 7,7$ Hz)
2	6,60 (dd, $J = 7,6; 16,0$ Hz)	6,61 (dd, $J = 7,7, 15,9$ Hz)
3	7,40 (d, $J = 16,0$ Hz)	7,41 (1H, d, $J = 15,9$ Hz)
2'	7,08 (d, $J = 2,0$ Hz)	7,08 (d, $J = 1,9$ Hz)
5'	6,96 (d, $J = 8,0$ Hz)	6,98 (d, $J = 8,2$ Hz)
6'	7,12 (dd, $J = 1,6; 8,0$ Hz)	7,13 (dd, $J = 1,9; 8,2$ Hz)
OCH_3	3,94 (s)	3,97 (s)

➡ **MS34:** siringaldeído



MS34 foi obtido como um sólido amorfo de faixa de fusão 107,0-111,0 °C. Embora o espectro de RMN de ^1H de **MS34** (Fig. 94) tenha apresentado sinais que comprovaram que o composto apresentava impurezas, assim como para **MS33**, foi possível caracterizar, após comparação com a literatura (Tabela 34, p.131), os sinais mais intensos. O sinal em δ_{H} 9,84 (1H, s) é característico de hidrogênio de grupo aldeído. O sinal em δ_{H} 7,17 (2H, s) foi atribuído a hidrogênio de anel aromático tetrassubstituído e aquele observado em δ_{H} 3,99 (6H, s) foi associado a hidrogênio de grupo metoxila. Dessa forma, sugeriu-se para **MS34** a estrutura do siringaldeído como componente majoritário.

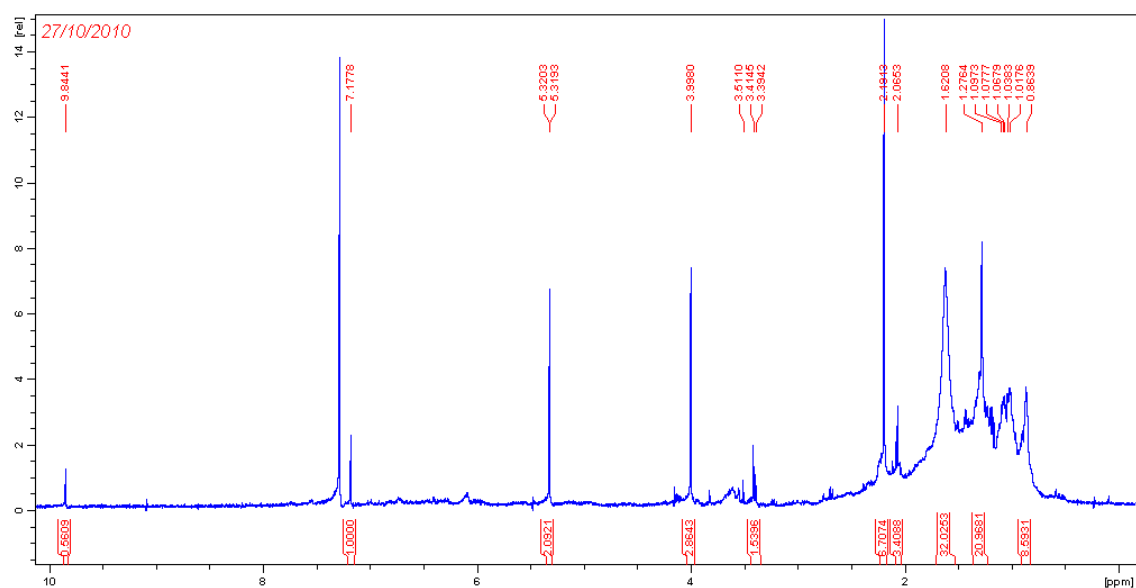
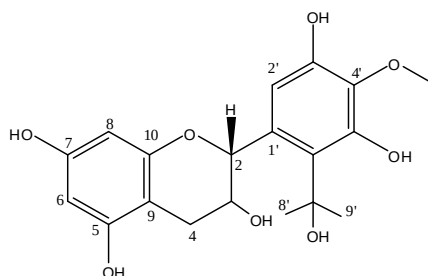


Figura 94- Espectro de RMN de ^1H de **MS34** (CDCl_3 , 400 MHz).

Tabela 34 – Principais deslocamentos químicos de RMN de ^1H (CDCl_3 , 400 MHz) de **MS34** e comparação com a literatura (GUTIERREZ e HERZ, 1988)

Nº H	MS34	Siringaldeído (CDCl_3)
	δ_{H}	δ_{H}
CHO	9,84 (s)	9,80 (s)
2	7,17 (s)	7,16 (s)
6	7,17 (s)	7,16 (s)
OCH_3	3,99 (s)	3,96 (s)

☛ **MS35: 2'-(2-hidroxiopropil)- 4'-O-metilepigalocatequina**



O composto **MS35** apresentou-se como um sólido amorfo de faixa de fusão 137,0 - 141,0 °C. No espectro de RMN de ^1H (Fig. 95, p.132) de **MS35** foram observados sinais em δ_{H} 6,44 (1H, s, H-6'), δ_{H} 5,95 (1H, d, J = 2,4 Hz, H-8) e δ_{H} 5,81 (1H, d, J = 2,0 Hz, H-6) referentes a hidrogênios de anel aromático. A presença destes três sinais, juntamente com aquele em δ_{H} 2,88, atribuído a hidrogênios metilênicos vizinhos a carbono de dupla ligação, sugeriu que **MS35** possuía a estrutura de uma flavana do tipo epigalocatequina (MIRANDA, 2007). O sinal em δ_{H} 4,44 (1H, s, H-2) foi atribuído ao hidrogênio metínico em carbono oxigenado, e aquele observado em δ_{H} 4,27 (1H, d, J = 3,6 Hz, H-3) foi associado ao hidrogênio metínico geminal a grupo OH. Foram observados também sinais em δ_{H} 1,63 e 1,65, correspondentes a hidrogênios de grupo CH_3 .

No espectro de RMN de ^{13}C de **MS35** (Fig. 96, p.132) e subespectro DEPT-135 (Fig.97, p.133) foram observados sinais que permitiram caracterizar o esqueleto epigalocatequina. A fim de se confirmar a posição dos substituintes na molécula, foram realizados os experimentos bidimensionais.

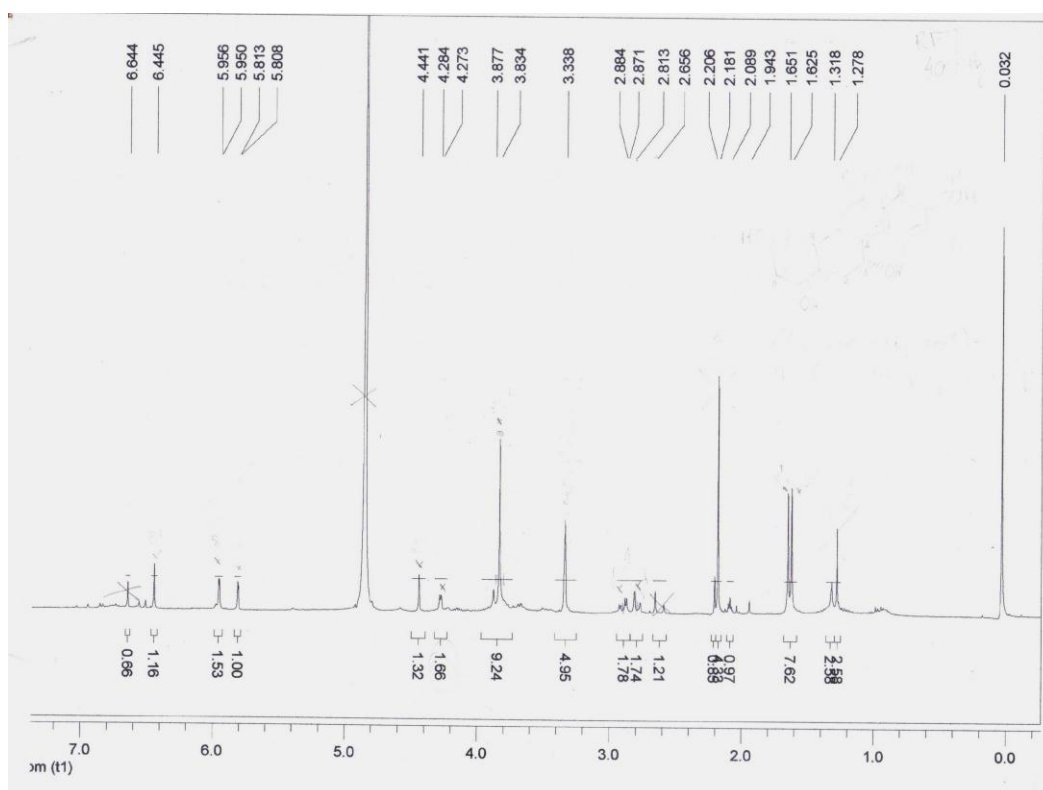


Figura 95. Espectro de RMN de ¹H de MS35 (CD₃OD, 400 MHz).

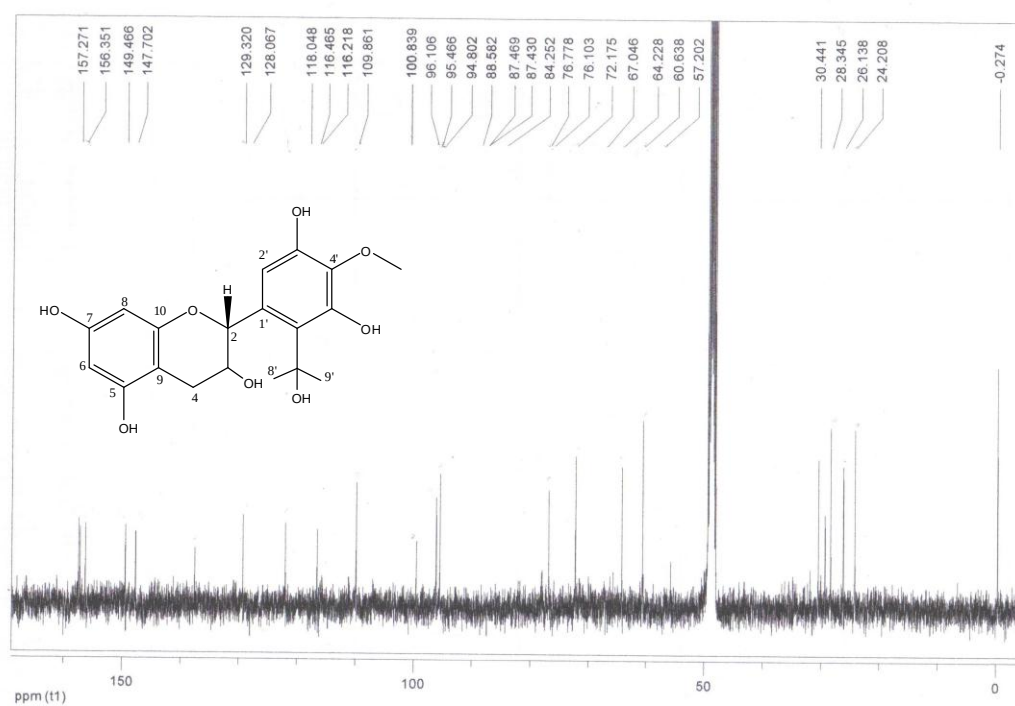


Figura 96. Espectro de RMN de ¹³C de MS35 (CD₃OD, 100 MHz).

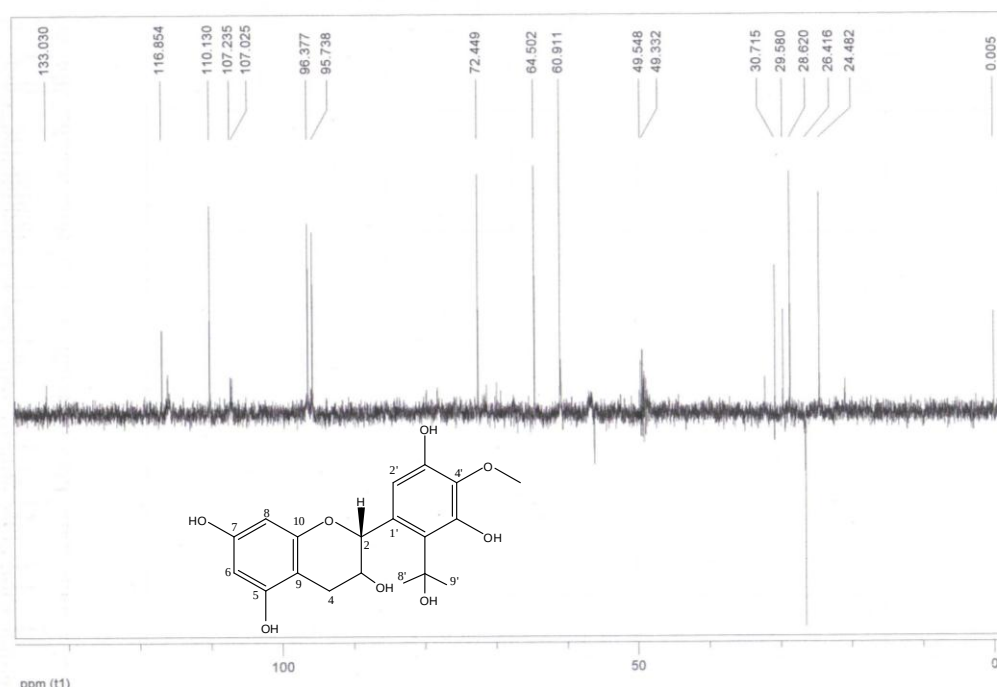


Figura 97. Subespectro de DEPT-135 de **MS35** (CD₃OD, 100 MHz).

As correlações observadas no mapa de contornos HSQC (Fig.98, p.134) do sinal em δ_H 1,65 com o sinal em δ_C 24,2 e do sinal em δ_H 1,63 (H-9') com δ_C 28,3 confirmaram a presença do grupo *gem*-dimetila. Os dois grupos metila estão unidos a um átomo de carbono quaternário ligado a grupo OH, o que foi verificado pela correlação observada no mapa de contornos HMBC (Fig.99, p.134) de δ_H 1,63 (H-9') e δ_H 1,65 (H-8') com δ_C 76,8 (C-7'). Também foi observada correlação entre os sinais de hidrogênio em δ_H 1,63 (H-9') com o sinal do carbono não hidrogenado em δ_C 122,0 (C-2'). A posição do grupo metoxila foi confirmada pela correlação observada entre os hidrogênios do grupo metila em δ_H 3,83 (H-10') com δ_C 138,0 (C-4'). Pela comparação de dados da literatura (MIRANDA, 2007) com as correlações observadas no mapa de contornos HSQC de δ_H 4,44 com δ_C 72,4 e δ_H 4,28 com δ_C 64,5 foi possível identificar C-2 e C-3, respectivamente. No mapa de contornos NOESY (Fig.100, p.135), o sinal dos hidrogênios δ_H 4,44 (H-2) e δ_H 4,28 (H-3) correlaciona com o sinal de δ_H 4,12 (H-4). Foram observadas também correlações de δ_H 1,65 (H-8') com δ_H 4,28 (H-3), que permitiu confirmar a posição do grupo 2-hidroxipropil na molécula, e de δ_H 4,44 (H-2) com δ_H 6,44 (H-6'). Assim, de posse de todos os dados de RMN de 1D e 2D, foi possível sugerir para **MS35** a estrutura da 2'-(2-hidroxipropil)-4'-O-metilepigallocatequina, inédita na literatura científica, como componente majoritário.

Na Tabela 35 (p.136) são apresentados os dados de RMN de ^1H e ^{13}C de **MS35**.

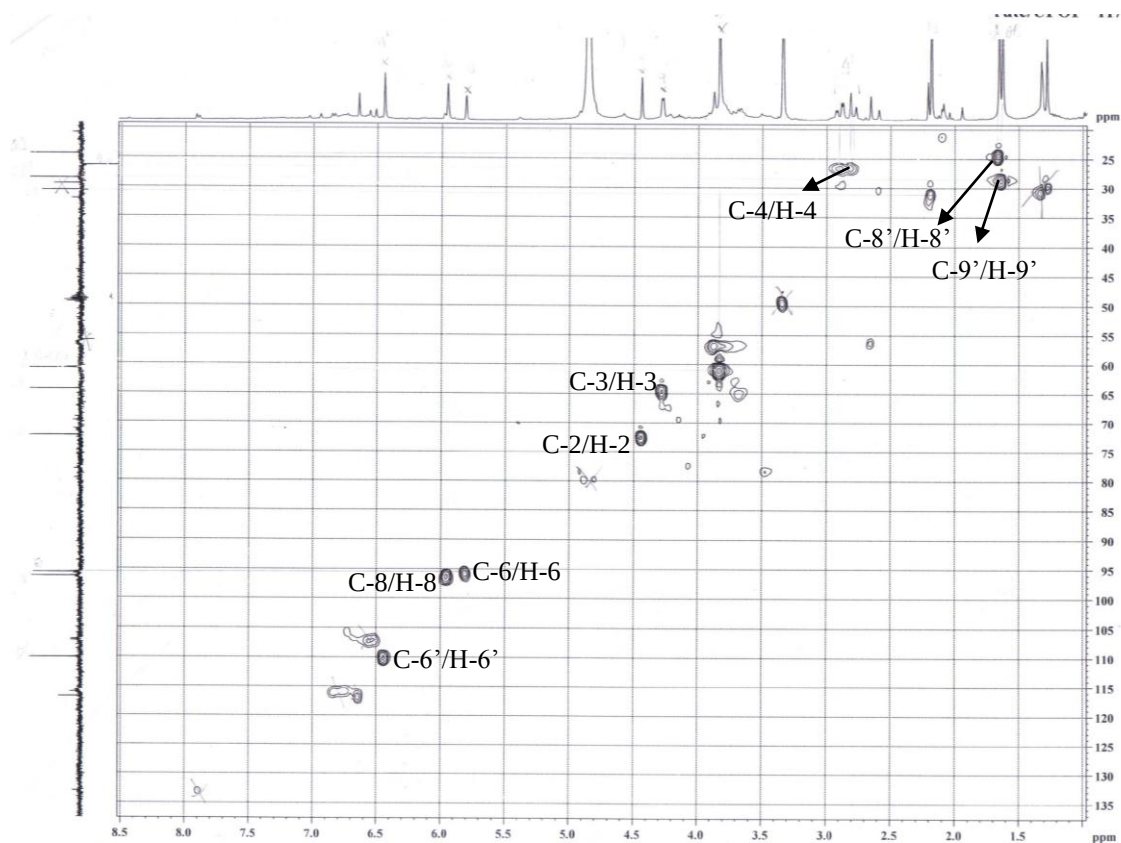


Figura 98- Mapa de contornos HSQC de **MS35** (CD_3OD , 400 MHz).

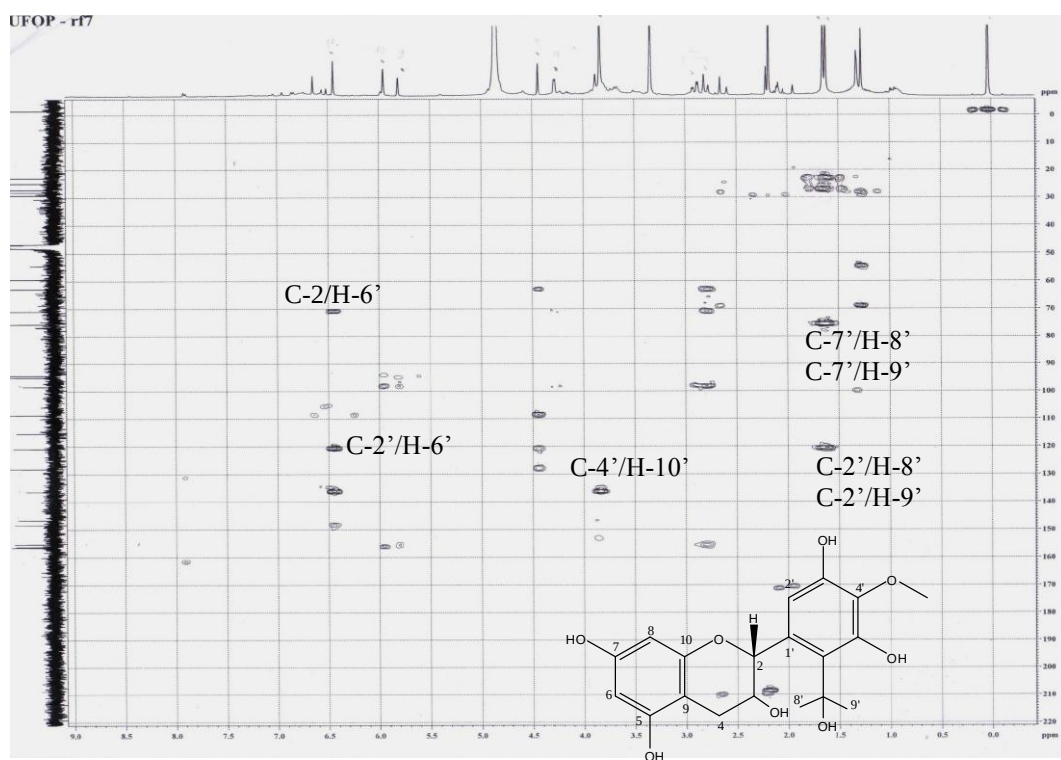


Figura 99- Mapa de contornos HMBC de **MS35** (CD_3OD , 400 MHz).

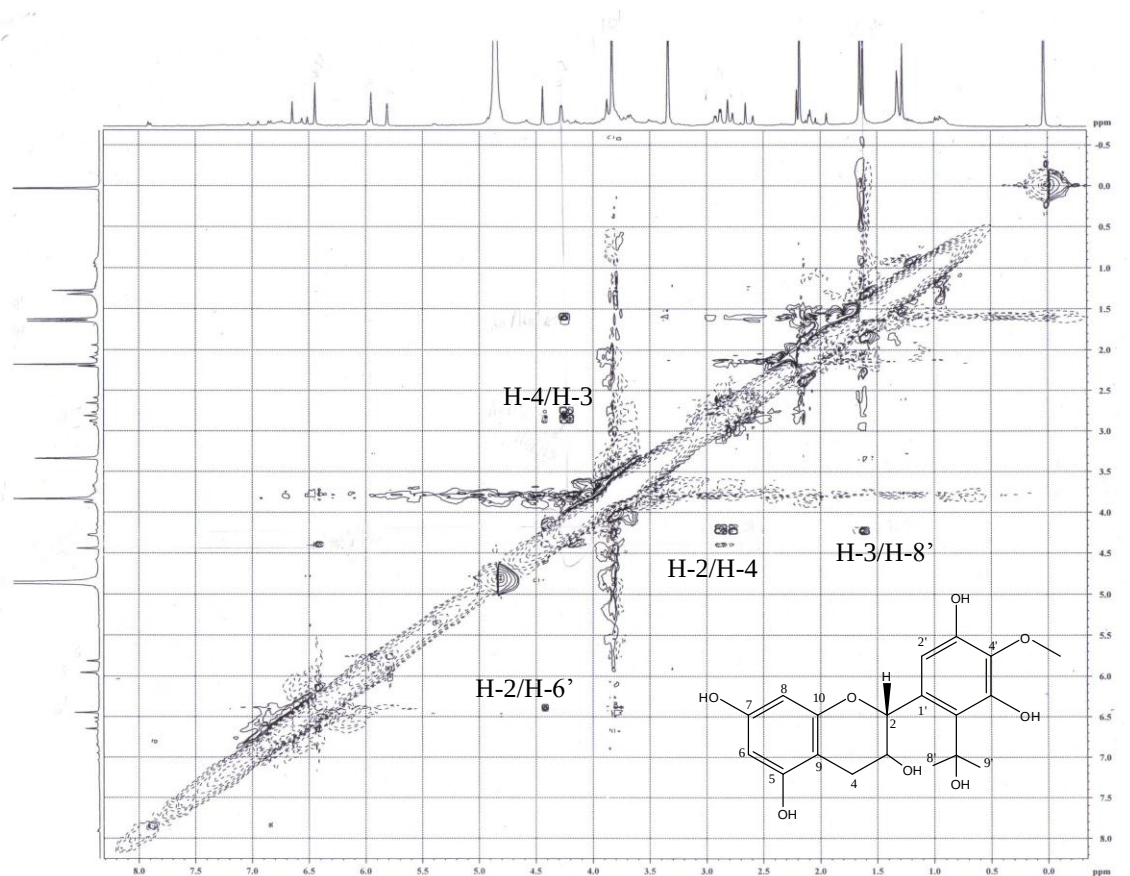


Figura 100- Mapa de contornos NOESY de **MS35** (CD₃OD, 400 MHz).

Tabela 35. Deslocamentos químicos de RMN de ^1H (400 MHz, CD_3OD) e ^{13}C (100 MHz, CD_3OD) de **MS35**

Nº	δ_{C}	DEPT	δ_{H}	HMBC	NOESY
2	72,4	CH	4,44 (s)	C-3, C-1'	H-4
3	64,5	CH	4,28 (d, $J= 3,6$ Hz)		H-4
4	26,4	CH_2	2,88 (d, $J= 5,2$ Hz)	C-2, C-10	
5	100,8	C			
6	96,4	CH	5,81 (d, $J= 2,0$ Hz)	C-7,C-10	
7	157,3	C			
8	95,7	CH	5,95 (d, $J= 2,4$ Hz)	C-7,C-10	
9	157,1	C			
10	156,3	C			
1'	129,3	C			
2'	122,0	C			
3'	149,5	C			
4'	138,0	C			
5'	149,5	C			
6'	110,1	CH	6,44 (s)	C-2, C-1', C-2', C-4'	H-2
7'	76,8	C			
8'	24,2	CH_3	1,65 (s)	C-7', C-9'	H-3
9'	28,3	CH_3	1,63 (s)	C-8'	
10'	60,9	OCH_3	3,83 (s)		

Em suma, o estudo fitoquímico do tronco e raiz de *M. salicifolia* proporcionou o isolamento de 33 compostos, sendo dois aromáticos, dois diterpenos, quatro flavonoides, um esteroide, um aduto chalcona-diterpeno, três quinonametídeos e 19 triterpenos pentacíclicos, incluindo 13 lupanos, cinco friedelanos, um glutinano e um oleanano. Foram isoladas uma mistura de dímeros e uma mistura de dienos. Observou-se maior abundância de compostos na raiz, onde destaca-se maior variedade de lupanos. O perfil químico descrito direciona a extração e a parte da planta a ser coletada em ocasiões futuras. Por exemplo, se o interesse está no isolamento de compostos mais polares (flavonoides), é conveniente que se faça a extração em acetato de etila. Se o objetivo é a obtenção de tingenona, o extrato da raiz deve ser feito com hexano.

CAPÍTULO 2 - SÍNTESE DE ÉSTERES DERIVADOS DO LUPEOL

O triterpeno pentacíclico lupeol é encontrado em várias espécies vegetais, tais como plantas frutíferas (manga e morango) e plantas medicinais (*Celastrus paniculatus* e *Leptadenia hastata*) (CHATURVEDI *et al.*, 2008). Foi encontrado também no presente estudo e nas folhas de *M. salicifolia* (MIRANDA, 2007). Este composto apresenta diversificada atividade biológica, dentre elas, antiartrite (GEETHA *et al.*, 1998; GEETHA e VARALAKSHMI, 1999), anti-inflamatória (FERNÁNDEZ *et al.*, 2001) e antitumoral (SALLEM, 2009). É eficaz contra diabetes e doenças do coração (ANDRIKOPOULOS *et al.*, 2003). Estudos têm mostrado a maior eficácia de ésteres graxos derivados do lupeol frente ao lupano não esterificado. Em dados reportados por Sudhahar *et al* 2006 e 2007 verificou-se que o linoleato de lupeolila apresenta maior atividade quando comparado ao lupeol na diminuição de anomalias oxidativas em estágios iniciais da aterosclerose, além de melhor efeito cardioprotetor em condições hipercolesterolêmicas. Este éster também exibiu maior efeito hepatoprotetor que o lupeol (SUNITA *et al.*, 2001).

Com base nessas informações, foi realizada a síntese de ésteres do lupeol para posterior avaliação da atividade biológica dos mesmos.

2.1- Procedimento experimental

No preparo dos ésteres lupânicos, utilizaram-se os ácidos capróico, caprílico, mirístico, palmítico, esteárico, tricloroacético, benzóico, 3,4-dimetoxibenzóico, 3,4,5-trimetoxibenzóico, 3,5-dinitrobenzóico e salicílico. O esquema da síntese dos ésteres é apresentado na Figura 101.

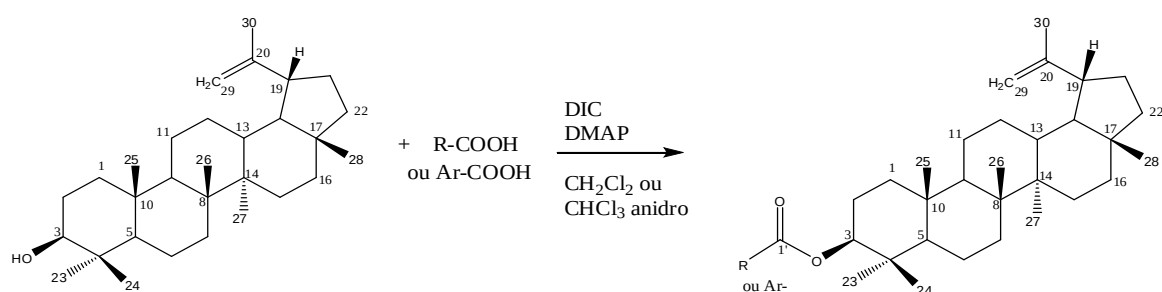


Figura 101 - Esquema das esterificações do lupeol.

Em um balão de 25 mL, equipado com tubo de CaCl_2 , foram adicionados x mmol de ácido e y mmol de N,N -dimetilaminopiridina (DMAP) em 7,0 mL de diclorometano ou clorofórmio anidro. Em seguida, adicionou-se 1,0 mmol de lupeol. A mistura reacional foi resfriada a 0°C e adicionaram-se z mmol de di-isopropilcarbodiimida (DIC). A mistura permaneceu sob agitação magnética por t h. A proporção estequiométrica do ácido e DIC foi de 1:1. A reação foi acompanhada por CCDS. O material bruto foi purificado usando CC, com clorofórmio como fase móvel, obtendo-se os ésteres como um material ceroso branco. Os dados de cada reação, bem como o rendimento dos ésteres derivados do lupeol são apresentados na Tabela 36.

Tabela 36- Condições empregadas nas esterificações do lupeol (1,0 mmol)

Ácido	x (ácido, mmol)	y (DMAP, mmol)	z (volume de DIC, mmol)	t (Tempo de reação, h)	produto obtido (mmol)	Rendimento (%)	Sigla
capróico	4,0	0,12	4,0	3,5	0,87	87	COL
caprílico	3,0	0,12	3,0	4,0	0,96	96	CIL
mirístico	3,0	0,12	3,0	22	0,95	95	ML
palmítico	5,0	0,12	5,0	2	0,90	90	PL
esteárico	4,5	0,02	4,5	7	0,85	85	EL
benzóico	5,0	0,21	5,0	48	0,91	91	BL
3,4- dimetoxibenzóico	5,0	0,21	5,0	48	0,78	78	DBL
3,4,5- trimetoxibenzóico	5,0	0,21	5,0	48	0,85	85	TBL
3,5-dinitrobenzóico	5,0	0,21	5,0	2	0,95	95	NBL
salicílico	5,0	0,21	5,0	24	0,28	28	SL
tricloroacético	5,0	0,21	5,0	3	0,95	95	TAL

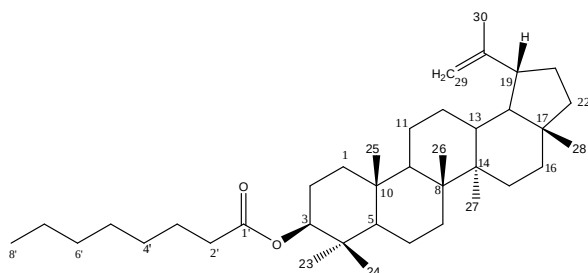
2.2-Resultados e Discussão

Foram sintetizados seis ésteres graxos e cinco ésteres aromáticos derivados do lupeol. Destes, são inéditos o caprilato de lupeolila, 3',4'-dimetoxibenzoato de lupeolila, 3',4',5'-trimetoxibenzoato de lupeolila, 3',5'-dinitrobenzoato de lupeolila e tricloroacetato de lupeolila. Observaram-se rendimentos altos para as reações realizadas, salvo para o salicilato de lupeolila, provavelmente devido ao fato de o ácido salicílico ser mais fraco que os outros ácidos aromáticos utilizados. O tempo de reação para a síntese do 3,5-dinitrobenzoato de lupeolila foi o mais curto. A metodologia empregada usualmente para a síntese de ésteres derivados de triterpenos é aquela feita a partir da formação de cloreto de ácido (GUEETHA *et al*, 1998; SUNITHA *et al*, 2001; SUDHAHAR *et al*, 2006). No entanto, como o lupeol apresenta dupla ligação, esta metodologia não se mostra adequada, uma vez que há liberação de HCl durante a

reação. Isso implica na obtenção de produtos não desejados. A metodologia utilizada nas esterificações descritas já foi empregada também na síntese de outros ésteres (FORREST *et al*, 2006).

É importante ressaltar que os espectros desses ésteres são muito parecidos, diferenciando-se apenas na cadeia lateral. Observaram-se para todos os compostos sintetizados, sinais no espectro de RMN de ^{13}C que comprovaram o sucesso da esterificação. São eles: sinal próximo a δ_{C} 173,7 correspondente a carbonila de éster alifático, sinal próximo a δ_{C} 166,0 correspondente a carbonila de éster aromático, e próximo a δ_{C} 80,6 característico de carbono carbinólico (C-3) do lupeol esterificado. Assim, será feita a descrição detalhada de apenas um dos derivados. Contudo, serão apresentados os dados de RMN de ^{13}C de todos eles (Tabelas 37 a 39).

☉ **CIL**: caprilato de lupeolila



O éster **CIL** (531,0 mg) foi obtido como um sólido ceroso branco de ponto de fusão 145,0-145,7 °C. No espectro na região do IV (Fig. 102, p. 140) de **CIL** foram observadas bandas em 2927 e 2852 cm^{-1} , características de deformação axial de grupo CH, além da banda em 1727 cm^{-1} , correspondente à carbonila de ésteres. Observou-se também uma banda em 1179 cm^{-1} , relacionada ao estiramento da ligação CO-O-C (BARBOSA, 2007).

No espectro de RMN de ^1H (Fig. 103, p.140) de **CIL** foram observados sinais em δ_{H} 4,69 e 4,58, característicos dos hidrogênios metilênicos do esqueleto lupano, além de um sinal em δ_{H} 4,47 (1H, dd, $J = 6,8; 9,0$ Hz, H-3) relacionado ao hidrogênio carbinólico. Observou-se também um sinal em δ_{H} 2,29, característico do grupo CH_2 vizinho a grupo acila (SILVERSTEIN e WEBSTER, 1998). Tanto no espectro de RMN de ^{13}C como no subespectro DEPT-135 (Figs. 104 e 105, p. 141) foram observados sinais que indicaram a formação do éster, sendo estes classificados em grupos metínico, metílico, metilênico e não hidrogenado. Os dados de RMN de ^{13}C relacionados à cadeia

triterpênica dos ésteres sintetizados são apresentados na Tabela 37 (p.142), assim como os valores de δ_C observados para a cadeia alifática dos ésteres são mostrados na Tabela 38 (p.143). Os dados de RMN de ^{13}C relacionados aos ésteres aromáticos são mostrados na Tabela 39 (p.144).

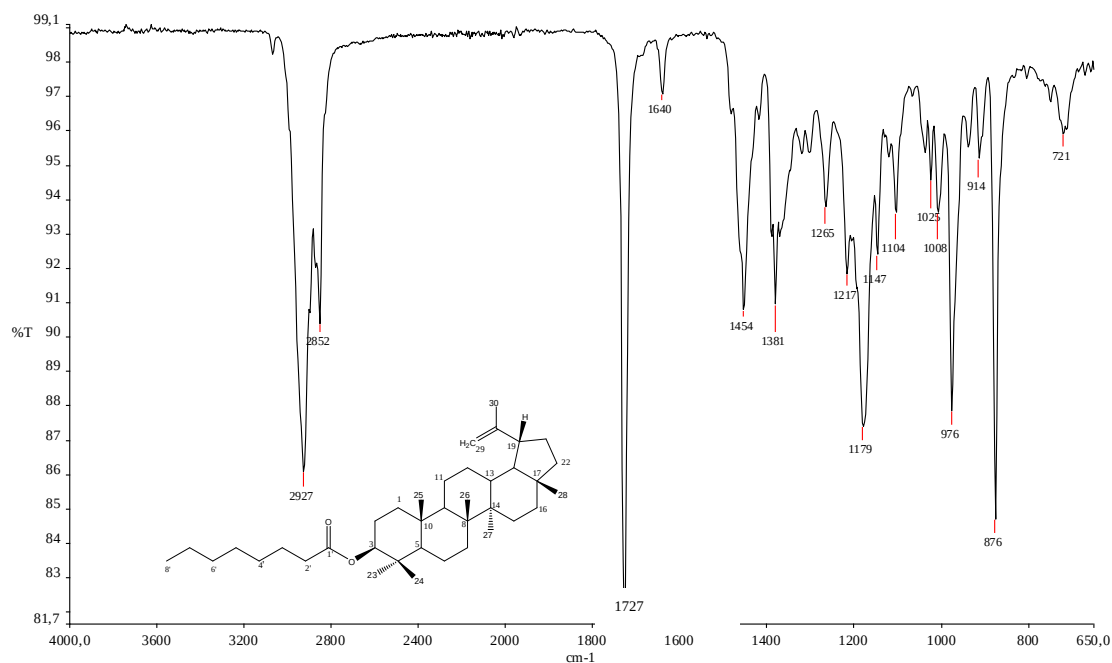


Figura 102- Espectro na região do IV de **CIL** (caprilato de lupeolila; inserção direta).

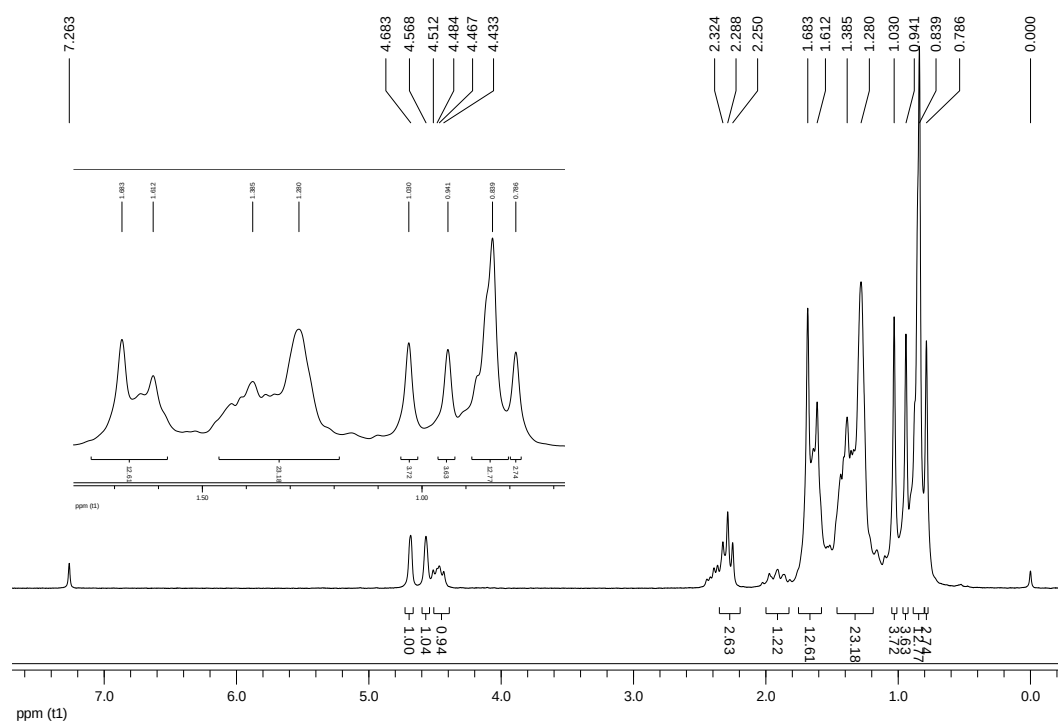


Figura 103- Espectro de RMN de ^1H de **CIL** (caprilato de lupeolila; 200 MHz, $CDCl_3$).

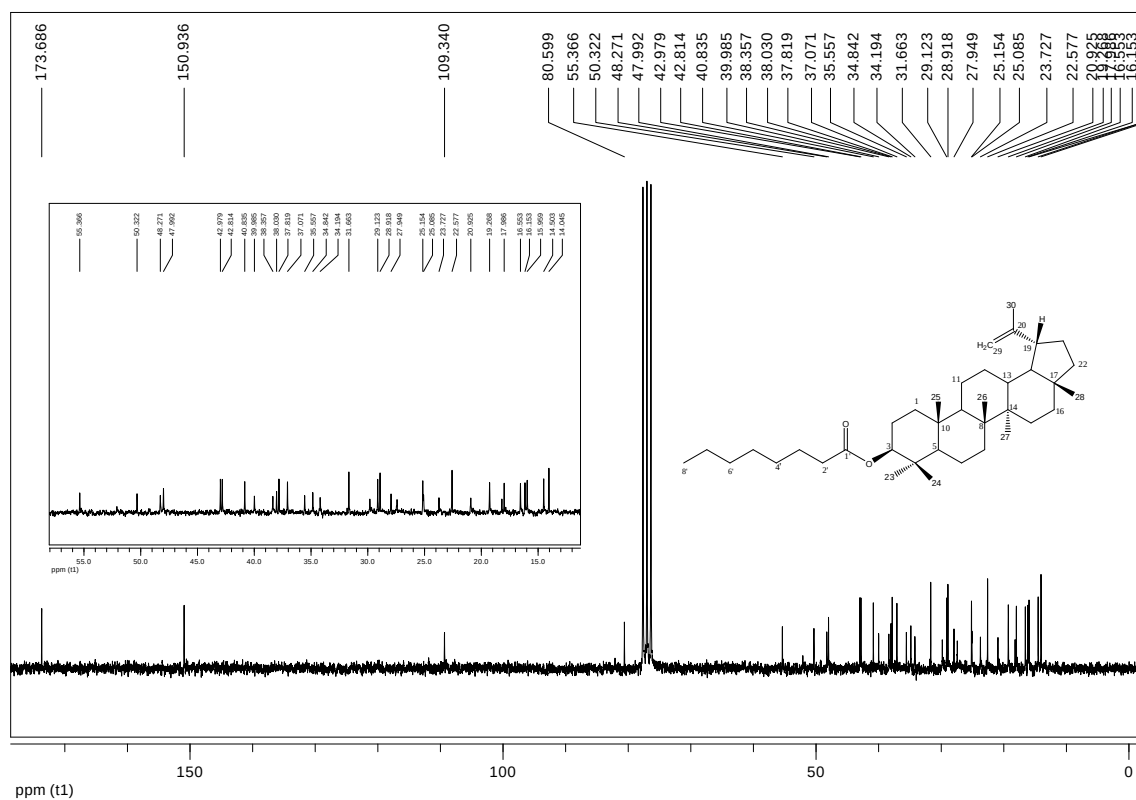


Figura 104- Espectro de RMN de ^{13}C de **CIL** (caprilato de lupeolila) (50 MHz, CDCl_3).

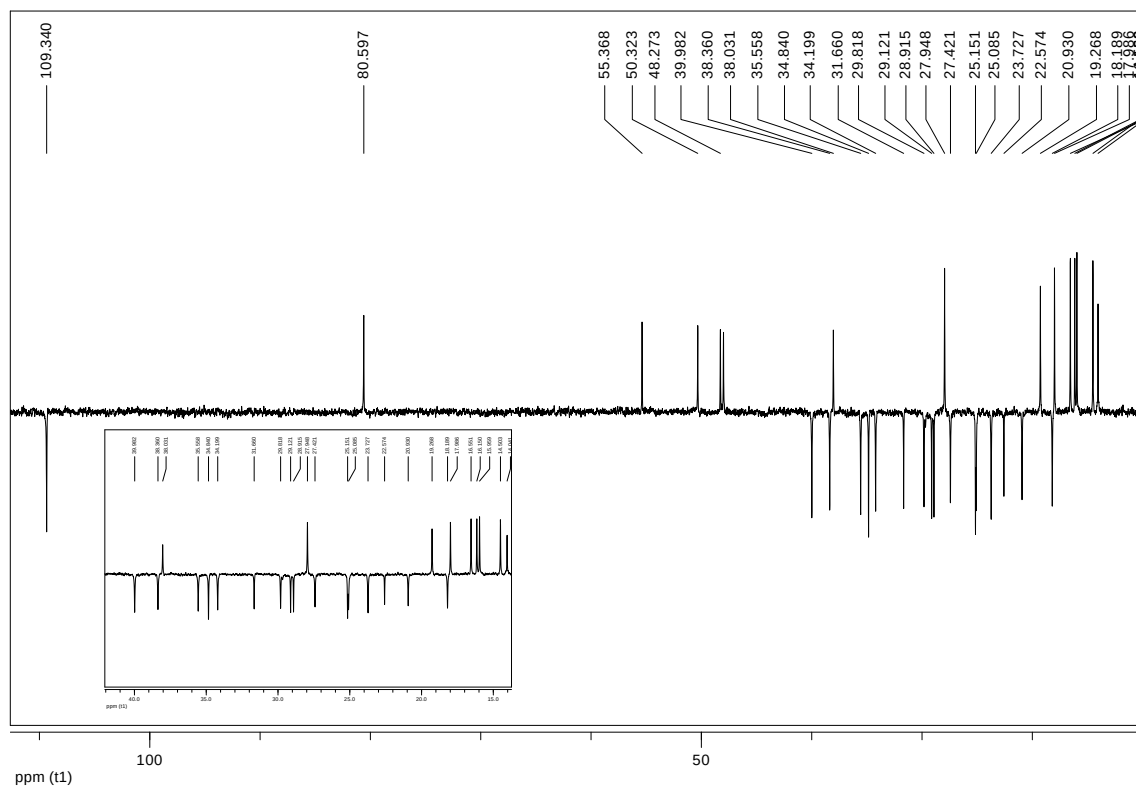


Figura 105- Subespectro DEPT-135 de **CIL** (caprilato de lupeolila) (50 MHz, CDCl_3).

Tabela 37- Dados de RMN de ^{13}C da cadeia triterpênica dos ésteres alifáticos sintetizados (50 MHz, CDCl_3)

		CIL	COL	ML	PL	EL	TAL
Carbano	DEPT-135	δ_c	δ_c	δ_c	δ_c	δ_c	δ_c
1	CH_2	38,37	38,36	38,36	38,40	38,39	38,21
2	CH_2	23,74	23,74	23,74	23,71	23,75	25,05
3	CH	80,60	80,62	80,61	80,63	80,61	87,45
4	C	38,04	37,83	37,83	37,85	37,84	38,42
5	CH	55,38	55,37	55,37	55,41	55,40	55,31
6	CH_2	18,22	18,20	18,20	18,21	18,21	18,11
7	CH_2	34,21	34,20	34,20	34,24	34,23	34,15
8	C	40,84	40,84	40,84	40,88	40,87	40,85
9	CH	50,33	50,32	50,32	50,37	50,35	50,32
10	CH	37,07	37,08	37,08	37,11	37,10	38,42
11	CH_2	20,94	20,94	20,93	20,97	20,96	22,94
12	CH_2	25,16	25,08	25,08	25,13	25,12	25,04
13	CH	38,03	38,03	38,03	38,01	38,07	38,02
14	C	42,82	42,82	42,82	42,85	43,00	43,77
15	CH_2	27,43	27,43	27,43	27,46	27,45	27,43
16	CH_2	35,57	35,57	35,56	35,60	35,58	35,56
17	C	42,99	43,00	43,00	43,01	42,84	44,04
18	CH	48,28	48,27	48,28	48,31	48,31	48,28
19	CH	47,99	48,01	48,01	48,32	48,01	48,00
20	C	150,94	150,97	150,98	150,95	150,94	150,92
21	CH_2	29,83	29,82	29,83	29,86	29,70	29,82
22	CH_2	40,84	40,00	40,00	40,01	40,00	40,00
23	CH_3	27,96	27,96	27,97	27,98	27,97	27,93
24	CH_3	16,56	16,58	16,58	16,58	16,57	15,98
25	CH_3	16,16	16,19	16,17	16,18	16,16	16,32
26	CH_3	15,97	15,99	15,97	15,99	15,98	16,16
27	CH_3	14,51	14,53	14,52	14,53	14,52	14,54
28	CH_3	18,20	18,02	18,00	18,02	18,00	18,01
29	CH_2	109,34	109,36	109,36	109,36	109,35	109,40
30	CH_3	19,28	19,30	19,28	19,30	19,29	19,30

Tabela 38- Dados de RMN de ^{13}C referentes à porção alifática dos ésteres alifáticos sintetizados (CDCl_3 , 50 MHz)

Carbono	CIL	COL	ML	PL	EL	TAL
	δ_c	δ_c	δ_c	δ_c	δ_c	δ_c
1'	173,67	173,72	173,67	173,69	173,67	161,68
2'	34,84	34,82	34,87	34,87	34,86	90,54
3'	25,16	24,84	25,18	25,01	25,17	
4'	29,13	31,34	29,48	29,47	29,26	
5'	29,13	22,33	29,37	29,6	29,26	
6'	31,67	13,95	29,65	29,65	29,36	
7'	22,58		29,60	29,69	29,58	
8'	14,10		29,60	29,69	14,1	
9'			29,60	29,69	29,84	
10'			29,60	29,69	29,70	
11'			29,27	29,69	29,70	
12'			31,93	29,65	29,70	
13'			22,70	29,27	29,70	
14'			14,13	31,93	29,67	
15'				22,70	29,46	
16'				14,12	31,93	
17'					22,69	
18'					14,10	

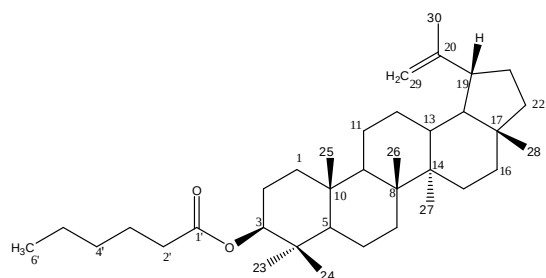
Carbono	BL	DBL	TBL	NBL	SL
----------------	-----------	------------	------------	------------	-----------

	δ_c	δ_c	δ_c	δ_c	δ_c
1	38,40	38,4	38,39	38,39	38,35
2	25,10	25,11	25,11	25,11	25,08
3	81,82	81,38	81,73	81,73	82,41
4	38,20	38,22	38,23	38,23	38,18
5	55,45	55,44	55,41	55,41	55,44
6	18,24	18,24	18,24	18,24	18,22
7	34,22	34,22	34,22	34,22	34,19
8	40,87	40,88	40,88	40,88	40,86
9	50,35	50,35	50,36	50,36	50,34
10	37,13	37,14	37,14	37,14	37,12
11	20,97	20,98	20,99	20,99	20,98
12	23,77	23,83	23,8	25,08	25,08
13	38,05	38,06	38,06	38,06	38,03
14	42,85	42,86	42,86	42,86	42,85
15	27,45	27,45	27,45	27,45	27,44
16	35,58	35,58	35,58	35,58	35,57
17	43,00	43,00	43,01	43,01	43,00
18	48,29	48,29	48,3	48,3	48,28
19	48,01	48,01	48,02	48,02	48,01
20	150,95	150,96	150,95	150,95	150,95
21	29,84	29,84	29,84	29,84	29,71
22	40,00	40,01	40,01	40,01	40,00
23	28,12	28,14	28,16	28,16	28,12
24	16,00	16,00	16,01	16,01	15,99
25	16,80	16,81	16,82	16,82	16,76
26	16,2	16,19	16,19	16,19	16,18
27	14,55	14,55	14,56	14,56	14,53
28	18,01	18,02	18,02	18,02	18,01
29	109,38	109,38	109,39	109,39	109,39
30	19,30	19,30	19,31	19,31	19,31
1'	166,28	166,10	165,87	165,87	169,93
2'	132,68	152,79	126,05	126,05	113,08
3'	129,52	112,02	106,73	129,18	161,70
4'	128,30	148,59	152,9	152,9	117,56
5'	131,01	150,96	142,04	142,04	135,44
6'	128,30	110,2	152,9	152,9	119,04
7'	129,52	123,35	106,73	106,73	129,77
8'		55,94	56,18	56,18	
9'		55,94	60,91	60,91	
10'				56,18	

Tabela 39- Deslocamentos químicos de RMN de ^{13}C dos ésteres aromáticos sintetizados (CDCl_3 , 50 MHz)

A seguir, são apresentados outros dados físico-químicos dos ésteres sintetizados.

COL: Caproato de lupeolila



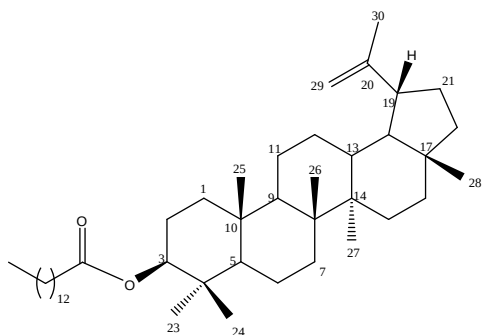
Massa molar: 524,0 g.mol⁻¹

Faixa de fusão: 156,4- 159,7 °C

IV (cm⁻¹): 2936, 2858, 1727, 1180, 877

RMN de ¹³C (CDCl₃, 50 MHz): Tabelas 37 e 38 (p.142 e 143).

ML: miristato de lupeolila



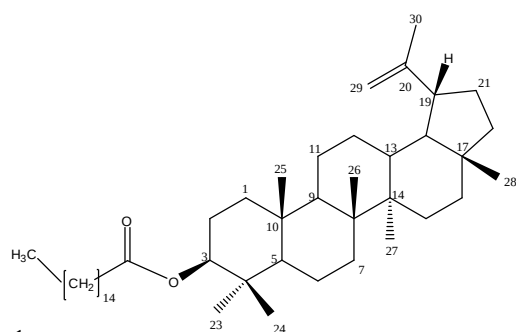
Massa molar: 636,0 g.mol⁻¹

Faixa de fusão: 84,5- 86,8 °C

IV (cm⁻¹): 2953, 2850, 1728, 1171, 881

RMN de ¹³C (CDCl₃, 50 MHz): Tabelas 37 e 38 (p.142 e 143).

PL: palmitato de lupeolila



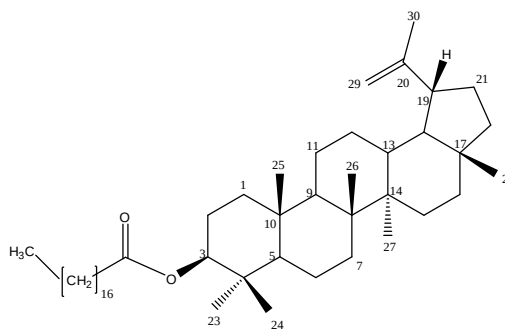
Massa molar: 664,0 g.mol⁻¹

Faixa de fusão: 52,0 – 56,0 °C

IV (cm⁻¹): 3071, 2915, 2850, 1726, 1641, 1171, 881

RMN de ¹³C (CDCl₃, 50 MHz): Tabelas 37 e 38 (p.142 e 143).

EL: estearato de lupeolila



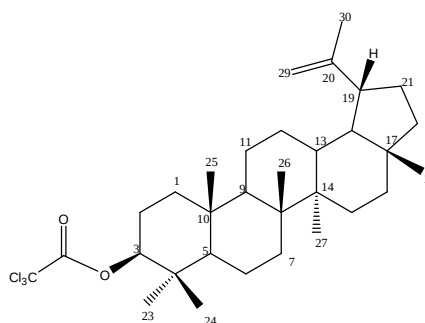
Massa molar: 692,0 g.mol⁻¹

Faixa de fusão: 51,7- 52,7 °C

IV (cm⁻¹): 3071, 2915, 2850, 1727, 1640, 1172, 882

RMN de ¹³C (CDCl₃, 50 MHz): Tabelas 37 e 38 (p.142 e 143).

TAL: tricloroacetato de lupeolila



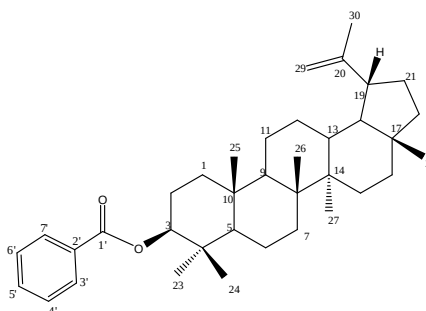
Massa molar: 571,5 g.mol⁻¹

Faixa de fusão: 276,1- 277,8°C

IV (cm⁻¹): 2978, 2935, 1756, 1249, 938, 823, 678

RMN de ¹³C (CDCl₃, 50 MHz): Tabelas 37 e 38 (p.142 e 143).

BL: benzoato de lupeolila

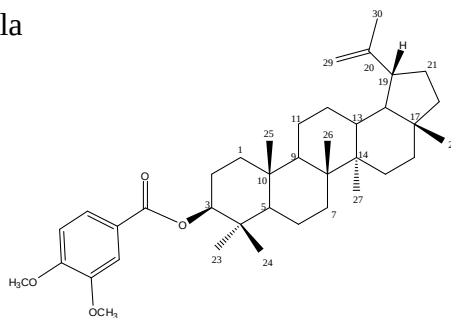


Massa molar: 530,0 g.mol⁻¹

Faixa de fusão: 249,5 – 250,4 °C

IV (cm⁻¹): 3072, 1714, 1602, 1584, 1282, 886, 710

RMN de ¹³C (CDCl₃, 50 MHz): Tabela 39 (p. 144).

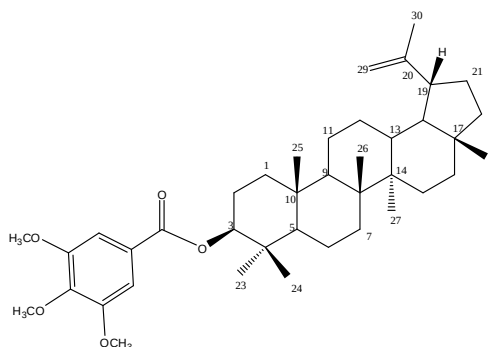
DBL: 3,4-dimetoxibenzoato de lupeolila

Massa molar: 590,0 g.mol⁻¹

Faixa de fusão: 243,6 – 245,3 °C

IV (cm⁻¹): 2944, 2857, 1704, 1267, 1247, 968, 761

RMN de ¹³C (CDCl₃, 50 MHz): Tabela 39 (p. 144).

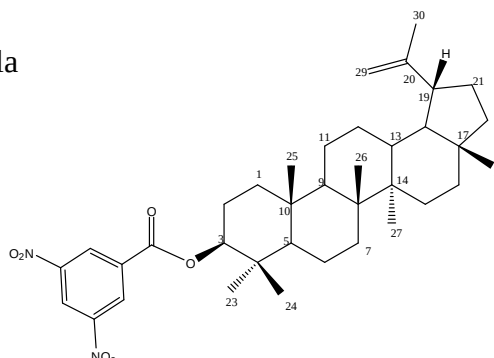
TBL: trimetoxibenzoato de lupeolila

Massa molar: 620,0 g.mol⁻¹

Faixa de fusão: 248,7 – 249,5 °C

IV (cm⁻¹): 3068, 1710, 1590, 1510, 1464, 1228, 1130, 864, 762

RMN de ¹³C (CDCl₃, 50 MHz): Tabela 39 (p. 144).

NBL: 3,5-dinitrobenzoato de lupeolila

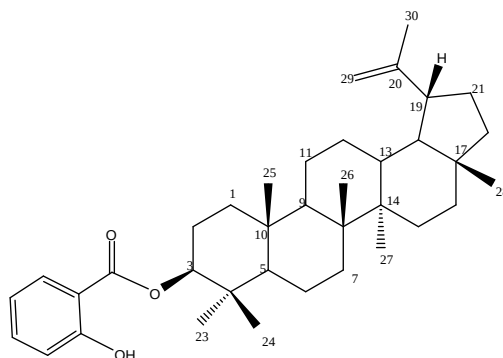
Massa molar: 620,0 g.mol⁻¹

Ponto de fusão: 284,4 – 285,0 °C

IV (cm⁻¹): 2965, 2935, 1724, 1540, 1340, 1274, 1170, 715

RMN de ¹³C (CDCl₃, 50 MHz): Tabela 39 (p. 144).

SL: salicilato de lupeolila



Massa molar: 546,0 g.mol⁻¹

Faixa de fusão: 252,7 – 254,0 °C

IV (cm⁻¹): 2937, 2857, 1658, 1610, 1213, 1155, 759

RMN de ¹³C (CDCl₃, 50 MHz): Tabela 39 (p. 144).

CAPÍTULO 3. Avaliação do potencial biológico de extratos e compostos isolados de *M. salicifolia*

No decorrer deste trabalho, foram isolados vários compostos cuja atividade biológica já fora reportada na literatura. De maneira geral, observa-se a diversificada atividade descrita para triterpenos da classe lupano. Estudos têm mostrado as diversas atividades biológicas *in vitro* e *in vivo* do lupeol (**MS5**). A literatura sugere que **MS5** é um agente não-tóxico, pois não foi observada qualquer toxicidade sistêmica em animais tratados com doses que variam de 300 a 2000 mg/kg. É importante ressaltar a seletividade deste lupano para células doentes, poupando as células normais e saudáveis (GEETHA *et al.*, 1998; CHATURVEDI *et al.*, 2008). Devido ao grande número de pesquisas nos últimos 30 anos, algumas atividades biológicas reportadas para o lupeol estão sendo confirmadas por testes pré-clínicos (SIDDIQUE e SALEEM, 2011). Além do lupeol, observou-se que a betulina (**MS6**), o rigidinol (**MS13**) e a 11 α -hidroxigloquidona (**MS20**) apresentaram alta atividade anti-inflamatória, inibindo fortemente a produção de óxido nítrico (NO) e prostaglandinas E₂ em macrófagos produzidos em processos inflamatórios (REYES *et al.*, 2006). Em estudos de relação estrutura-atividade, sugeriu-se que a presença do grupo OH em **MS20** em posição α aumenta a atividade inibitória, principalmente para NO (REYES *et al.*, 2006). O gloquidonol (**MS21**) exibiu leve atividade citotóxica (IC₅₀ < 10 μ g/mL) contra as linhas celulares HeLa (carcinoma de colo de útero humano) e Hep-2 (carcinoma de laringe humano) (NÚÑEZ *et al.*, 2005).

Para friedelanos, estudos mostraram que a friedelina (**MS1**) apresentou leve atividade citotóxica frente à linhagem celular de câncer de mama humano (MBA-MD-231) (EE *et al.*, 2005), porém expressiva atividade analgésica e antipirética (ANTONISAMY *et al.*, 2011). EE *et al.*, 2005, compararam a atividade citotóxica da friedelina e da fridelan-1,3-diona (**MS19**) frente à linhagem celular HeLa. Esta foi mais sensível à fridelan-1,3-diona (IC₅₀=4,6 μ g/mL) que ao análogo monocarbonilado (IC₅₀ = 35,0 μ g/mL). Na avaliação da relação estrutura-atividade, sugeriu-se que o grupo carbonila em C-1 de **MS19** pode ser o responsável pela expressiva atividade observada.

A literatura reporta a expressiva atividade biológica dos quinonametídeos tingenona (**MS123**) e pristimerina (**MS16**), tais como inseticida (AVILLA *et al.*, 2000) e citotóxica (RAVELO *et al.*, 2004, GOMES *et al.*, 2011). A pristimerina induz a

apoptose em células cancerosas de próstata e mama (YANG *et al.*, 2008, WU *et al.*, 2005).

O oleanano abruslactona A (**MS31**) exibe relevante atividade anti-inflamatória (XUE *et al.*, 2010); o triterpeno glutinol exibiu citotoxicidade moderada frente às linhagens celulares humanas HL-60 (leucemia), SK-OV-3 (ovário), A-549 (pulmão) e HT-29 (cólon) (DING *et al.*, 2010).

Dos diterpenos isolados, observou-se que o ferruginol apresenta diferentes atividades biológicas, dentre elas antitumoral (IWAMOTO *et al.*, 2003) e antiplasmódio (CLARKSON *et al.*, 2003). Estudos recentes mostraram seu efeito gastroprotetor em lesões gástricas induzidas em animais. O ferruginol acelera o processo de cura da lesão gástrica após a indução da úlcera. Isso está relacionado à capacidade que o mesmo tem de aumentar o conteúdo de prostaglandina gástrica *in vitro* e às propriedades antioxidantes do composto (ESPINOZA *et al.*, 2008).

Diversos estudos têm reportado a atividade de flavonoides. Verificou-se que a pinostrobin (**MS23**) administrada a doses de 20 e 40 mg/kg em ratos reduziu a incidência de úlcera em 83,40% e 92,03%, respectivamente. Ambos os valores são estatisticamente maiores que o observado para o omeprazol (76,67%) (ABDELWAHAB *et al.*, 2011). Proantocianidinas, conhecidas também como taninos condensados, conferem proteção à planta contra herbivoria e são responsáveis também pelo sabor adstringente de vinhos, além de serem benéficas à saúde humana (XIE e DIXON, 2005).

O β -sitosterol (**MS9**) possui atividade anti-inflamatória e antipirética, com efeito similar à hidrocortisona e à oxifenbutasona, além de induzir a apoptose em células leucêmicas humanas (U-937) (PARK *et al.*, 2007). O β -sitosterol apresenta ainda ampla margem de segurança com mínimo efeito ulcerogênico, o que lhe confere alto valor terapêutico (PÉREZ, 2000).

Com base nessas informações, foram propostos ensaios biológicos para extratos e outros compostos isolados de *M. salicifolia*, bem como para os ésteres derivados do lupeol sintetizados.

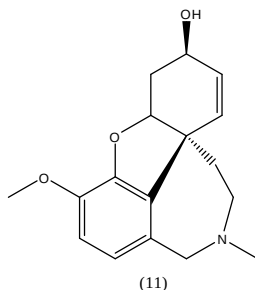
3.1-Avaliação da atividade inibitória sobre a enzima acetilcolinesterase

O principal papel da enzima acetilcolinesterase é diminuir a quantidade de acetilcolina nos neurônios colinérgicos e limitar a transmissão do impulso nervoso. A inibição dessa enzima serve como estratégia para o tratamento da doença de Alzheimer (ARECHE *et al.*, 2009). Com base na importância do teste de inibição da enzima acetilcolinesterase, propôs-se a realização desse ensaio para as substâncias isoladas e/ou sintetizadas nesse trabalho.

3.1.1- Procedimento experimental

O teste de inibição da enzima acetilcolinesterase foi realizado no laboratório coordenado pela Professora Jacqueline Aparecida Takahashi, do Departamento de Química da UFMG.

Neste teste foram empregados os seguintes compostos: 3,16-dioxofriedelano (**MS2**), 30-hidroxifriedelan-3-ona (**MS3**), lupeol (**MS5**), rigidinol (**MS13**) e os ésteres caprilato de lupeolila (**CIL**), caproato de lupeolila (**COL**), palmitato de lupeolila (**PL**), miristato de lupeolila (**ML**) e estearato de lupeolila (**EL**). Foram aplicados sobre placas de sílica gel GF₂₅₄ (2,5 x 5,0 cm) 100 µL das amostras solubilizadas em clorofórmio (20 µg/µL). Após secagem, as cromatoplasas foram borrifadas com a solução de acetilcolinesterase e incubadas a 37 °C. Decorridos 20 min., uma solução de acetato de α -naftila e sal de *Fast Blue B* foi pulverizada sobre as cromatoplasas. O aparecimento de um halo branco (RHEE *et al.*, 2001) indica a inibição da enzima. A análise foi realizada em duplicata. O controle utilizado neste teste foi a galantamina (11).



3.1.2-Resultados e discussão

No ensaio empregado, se não há inibidores da enzima (Fig.106, p.152), ocorre a reação da acetilcolinesterase com o acetato de α -naftila. Forma-se então α -naftol, que ao

regir com a solução reveladora, produz um composto diazo de coloração púrpura (RHEE *et al.*, 2001).

Os ésteres caprilato de lupeolila (**CIL**), caproato de lupeolila (**COL**) e o triterpeno 30-hidroxifriedelan-3-ona (**MS3**) apresentaram alta atividade inibitória frente à enzima acetilcolinesterase. O composto estearato de lupeolila (**EL**), por sua vez, apresentou atividade moderada, enquanto os compostos 3,16-dioxofriedelano (**MS2**), rigidinol (**MS13**), palmitato de lupeolila (**PL**), miristato de lupeolila (**ML**) e lupeol (**MS5**) não inibiram a enzima (Figura 107, p. 153).

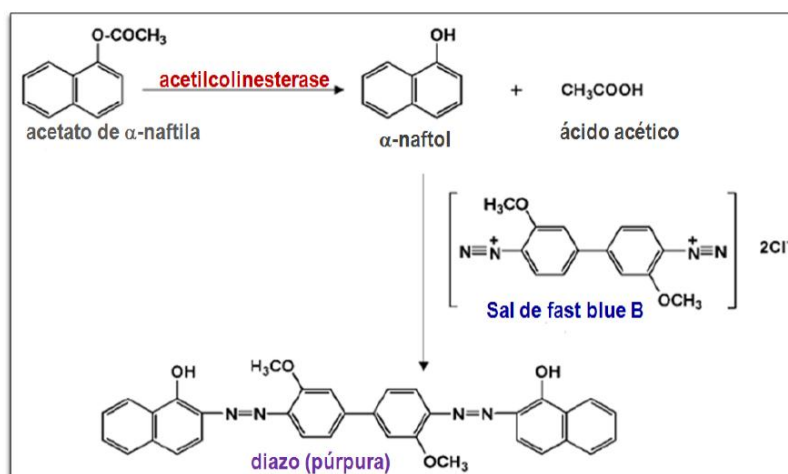


Figura 106- Reação da acetilcolinesterase com acetato de naftila e a formação do composto diazo (RODRIGUES, 2011).

O teste realizado confirma a maior eficácia de ésteres derivados do lupeol em comparação com o material de partida. Observou-se ainda que para essa atividade o tamanho da cadeia lateral exerce influência sobre a inibição da enzima, pois o aumento da cadeia lateral diminuiu a eficácia do éster. Cabe ressaltar que as substâncias que apresentaram atividade podem vir a ser protótipos para fármacos utilizados no tratamento de doenças relacionadas ao sistema nervoso, como o mal de Alzheimer.

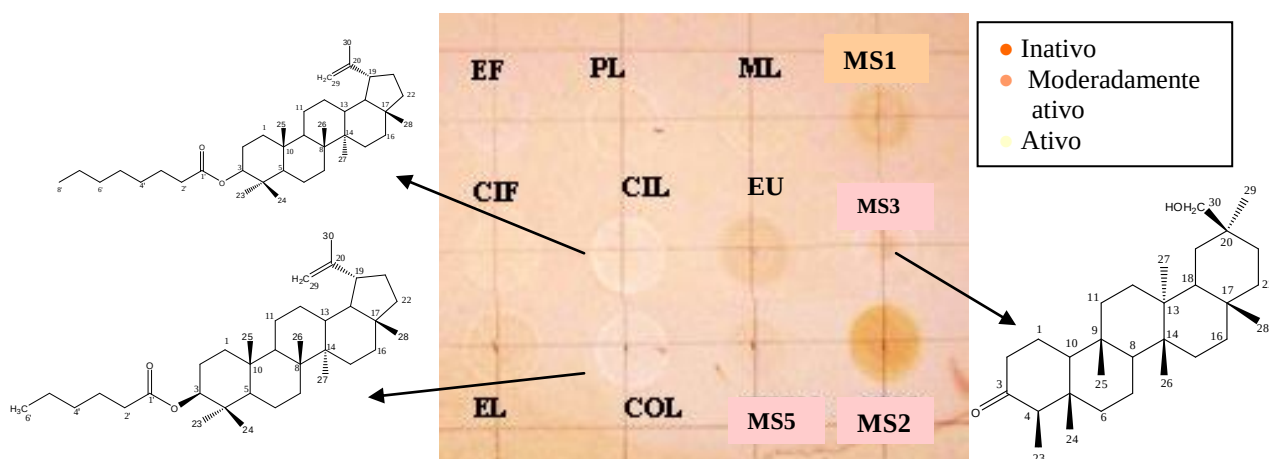


Figura 107- Halos correspondentes à atividade inibitória das amostras **EF**, **PL**, **ML**, **MS13**, **CIF**, **CIL**, **EU**, **MS2**, **EL**, **COL**, **MS5** e **MS3** frente à enzima acetilcolinesterase, observados após 90 minutos de reação. *

* As substâncias estearato de friedelanila (**EF**), caprilato de friedelanila (**CIF**), eucaliptina (**EU**) foram isoladas ou sintetizadas em outros estudos feitos no NEPLAM (MIRANDA, 2007).

3.2- Avaliação da atividade antimicrobiana frente a patógenos da cavidade oral

Doenças orais estão entre os principais problemas de saúde. Dada a incidência dessas enfermidades e o aumento da resistência de bactérias a antibióticos, surge a necessidade de prevenção e tratamentos opcionais que sejam seguros, econômicos e eficazes. Assim, torna-se necessária a busca por novos tratamentos, onde o uso de produtos naturais isolados de plantas é considerado uma boa alternativa (PORTO *et al.*, 2009). Como exemplo, constatou-se que o extrato do rizoma de *Aristolochia cymbifera* exibe relevante atividade contra uma série de bactérias orais (ALVIANO *et al.*, 2008). Foi observado ainda que triterpenos da classe dos lupanos exibem efeito sinérgico quando associados a antibióticos que combatem diferentes linhagens de *Staphylococcus aureus* (CHUNG *et al.*, 2011)

Apesar do uso de *M. salicifolia* na medicina popular, existem poucos relatos no que se refere à atividade antimicrobiana de extratos dessa espécie frente a micro-organismos orais associados a condições infecciosas. Assim, o objetivo deste ensaio foi

avaliar a susceptibilidade *in vitro* de bactérias e fungo patogênicos da cavidade oral a extratos etanólicos e a compostos isolados de *M. salicifolia*.

3.2.1 - Procedimento experimental

Este teste foi realizado no Laboratório de Microbiologia da Faculdade de Odontologia da UFMG, coordenado pelo Professor Vagner Rodrigues Santos.

A atividade antimicrobiana de extratos de tronco e raiz de *M. salicifolia*, bem como da tingenona (**MS12**), oriunda do extrato hexânico da raiz e 4'-O-metilepigalocatequina (**MS10**) isolada do extrato em acetato de etila desta espécie, foi avaliada frente a *Candida albicans* (ATCC 18804), *Streptococcus mutans* (ATCC 70069), *Staphylococcus aureus* (ATCC 12692), e *Streptococcus sanguinis* (ATCC 10557). O ensaio foi feito pelo método de difusão em ágar (FERRARO *et al.*, 2003). As bactérias *S. aureus*, *S. mutans* e *S. sanguinis* foram cultivadas durante a noite, incubadas a 37 °C em meio *Brain Heart Infusion* (BHI) (Difco-USA) em ambiente aeróbico. O fungo *C. albicans* foi cultivado em ágar Sabouraud, em ambiente aeróbico (Difco-USA), no qual uma alíquota de 0,1 mL de micro-organismos em suspensão, correspondente a 1×10^8 UFC/mL, foi usado. Acrescentou-se ágar Mueller-Hinton ou ágar Sabouraud quando necessário. Discos estéreis (CECON- São Paulo- Brasil) foram embebidos com 20 µL do extrato ou composto solubilizado às concentrações de 0,5%, 1,0% e 2,0% (m/V). Em seguida, foram colocados em contato com o ágar. Discos brancos estéreis foram embebidos também com 20 µL do antifúngico controle nistatina (Nys- Sigma-USA), e 20 µL do antibiótico controle clorexidina 0.12% (Chlor- Sigma-USA). Etanol 70% e água destilada foram usados como controle negativo de inibição. Os testes foram realizados em triplicata e repetidos em três momentos diferentes. Após 24 horas de incubação, o diâmetro das zonas de inibição foi medido e comparado. Os micro-organismos foram considerados sensíveis quando o diâmetro da zona de inibição era maior, igual ou 3,0 mm menor que o apresentado pelo controle positivo. A sensibilidade aos extratos foi considerada intermediária quando as zonas de inibição observadas eram até 4,0 mm menor que o apresentado pelo controle positivo (SUMMANEN *et al.*, 1993). Os resultados foram reportados de acordo com a média e desvio padrão (SD).

3.2.2 – Resultados e discussão

Na Tabela 40 (p. 156) são apresentados os valores dos halos de inibição exibidos pelas amostras testadas frente aos micro-organismos *C. albicans*, *S. mutans*, *S. sanguinis* e *S. aureus*. Observou-se que o fungo *C. albicans* foi sensível a todas as amostras. De maneira geral, constatou-se que a atividade é dependente da concentração. O extrato **EHR** foi o mais eficaz frente a *C. albicans*. Exibiu um halo de inibição 4,0 cm maior que o controle a 0,5%. Observou-se ainda que a atividade diminuiu com o aumento da concentração de **EHR**. A amostra **EET** também foi mais ativa que o controle a 0,5%; o mesmo ocorreu com **MS10**. O composto **MS12** foi ativo nas três concentrações avaliadas, sendo mais ativo que o controle a 1%. O extrato **EER** exibiu atividade similar. Para este, o aumento na concentração não implica no aumento da atividade. A amostra **EAT** exibiu atividade moderada frente a esse micro-organismo.

Apenas o extrato **EHR** exibiu atividade frente a *S. mutans*. Os demais compostos avaliados foram inativos. Os extratos **EAT**, **EET** foram inativos frente a *S. sanguinis*. O composto **MS12** exibiu atividade à concentração de 2,0%, da mesma maneira que **EER**. **MS10**, por sua vez, apresentou atividade mais relevante a 1%. Para **EHR**, a atividade é diretamente proporcional o aumento da concentração.

A bactéria *S. aureus* foi sensível a todos os compostos avaliados. Para **MS10** e **EHR**, o aumento da concentração aumentou a atividade. Situação contrária foi observada para **EET**, onde o aumento da concentração implicou na diminuição da atividade. As amostras **MS12**, **EAT** e **EER** exibiram comportamento similar, sendo ativas nas três concentrações avaliadas.

Esses dados indicam que *M. salicifolia* pode vir a ser uma fonte alternativa de extratos e compostos para o tratamento de afecções da cavidade oral.

Tabela 40. Atividade antimicrobiana das amostras avaliadas

Amostras	Micro-organismos			
	Halos de inibição / mm (M±SD)			
	<i>C. albicans</i>	<i>S. mutans</i>	<i>S. sanguinis</i>	<i>S. aureus</i>
MS12 0,5%	14,5 ±0,33	12,0±0,00	11,5±0,35	11,0±0,00
MS12 1,0%	18,0 ±0,00	12,0±0,00	13,0±0,00	12,0±0,00
MS12 2,0%	15,5 ±0,25	12,0±0,00	16,5±0,00	12,0±0,00
EAT 0,5%	12,0 ±0,00	13,5±0,55	13,0±0,00	12,5±0,35
EAT 1,0%	11,5 ±0,13	14,5±0,35	13,0±0,00	12,0±0,00
EAT 2,0%	10,5 ±1,03	12,0±0,00	10,5±0,00	13,0±0,00
EER 0,5%	17,6 ±0,82	12,3±1,15	11,6±1,26	12,0±0,00
EER 1,0%	18,0 ±0,00	12,5±1,05	11,3±1,03	12,0±0,00
EER 2,0%	18,0 ±0,00	12,3±0,35	14,6±1,08	12,6±1,32
EEtT 0,5%	16,3 ±1,03	14,0±0,00	10,5±0,33	12,5±1,35
EEtT 1,0%	14,5 ±0,13	14,0±0,00	12,3±1,25	12,0±0,00
EEtT 2,0%	14,0 ±0,00	12,3±0,13	11,6±1,44	11,0±0,00
MS10 0,5%	16,5 ±1,25	13,0±0,00	14,0±0,00	11,6±1,22
MS10 1,0%	16,6 ±1,13	10,0±0,00	15,6±0,28	12,0±0,00
MS10 2,0%	12,0 ±0,00	14,0±0,00	13,3±0,39	12,3±0,33
EHR 0,5%	19,3 ±0,33	16,4±0,22	13,3±0,39	11,5±0,13
EHR 1,0%	14,0 ±0,00	17,0±0,00	14,5±1,26	13,0±0,00
EHR 2,0%	13,0 ±0,00	17,0±0,00	15,0±0,00	13,5±0,55
Clor* 0,12%	14,5 ±0,15	18,8±0,14	17,6±0,22	15,0±0,00
Etanol 70%	0,00 ±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00
D W**	0,00 ±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00

* clorexidina

** água destilada

3.3- Avaliação da atividade citotóxica de 16 β -hidroxipristimerina

A pristimerina é um composto natural da classe dos quinonametídeos, encontrado nas famílias Celastraceae e Hippocrateaceae (NIAMPOKA *et al.*, 2005). Este composto possui atividade antioxidante, antimalárica e inseticida (JELLER *et al.*, 2004; KHALID *et al.*, 2007; AVILLA *et al.*, 2000). Estudos recentes reportaram também que a pristimerina exerce efeito sinérgico sobre a propriedade anticâncer do taxol (EUM *et al.*, 2011) e induz a apoptose em células de câncer de mama (WU *et al.*, 2005), além de apresentar atividade citostática frente à linhagem celular HL-60 (leucemia pró-mielocítica) (COSTA *et al.*, 2008). Com base nessas informações, foi realizada a avaliação da atividade citotóxica do composto análogo, 16 β -hidroxipristimerina (**MS29**), frente às linhagens celulares HeLa (carcinoma epitelial de colo de útero humano) e A-549 (carcinoma de pulmão humano).

3.3.1- Conservação de linhagens e meios de cultura celulares

Este teste foi realizado no *Laboratorio de Microbiología* da *Facultad de Farmacia* da *Universidad de La Laguna*, Tenerife, Espanha, coordenado pela Professora Laila Moujir.

As células empregadas nos experimentos procederam de linhagens celulares estabelecidas a partir de He-La e A-549. Ambas foram desenvolvidas em monocamada.

As células foram cultivadas em meio mínimo de Eagle (MEM) modificado por Dulbecco (DMEM), obtido de Sigma e suplementado com soro bovino fetal (TB Diagnost) a 10%, glutamina (4 mM), antimicótico (ácido *p*-hidroxibenzóico butil éster) e mistura de estreptomicina-penicilina (100 UI/mL). Foram incubadas a 37 °C em atmosfera de CO₂ a 5% e umidade relativa de 98%.

3.3.2 -Propagação e conservação das linhagens celulares

As monocamadas confluentes foram lavadas com EDTA 0,02%. As células da placa foram suspensas com tripsina (a 0,05% em EDTA) com auxílio de uma pipeta Pasteur. Após misturá-las com DMEM para inativar a tripsina, foram centrifugadas em

uma centrífuga de mesa (Beckman, modelo TJ-6) a 2500 rpm. Em seguida, foram resuspensas no volume adequado para semeadura.

A conservação das células foi feita em nitrogênio líquido, na presença de DMSO a 7,0% em soro fetal ou em DMEM com concentração de soro a 20,0%. Ao descongelá-las, seu conteúdo foi diluído lentamente em meio com soro. O material celular foi então centrifugado a 2000 rpm e o *pellet* obtido foi resuspenso em 1,0 mL de meio para ser subcultivado no meio habitual.

3.3.3- Efeito citotóxico do produto e análise da viabilidade celular

O efeito da 16 β -hidroxipristimerina sobre a proliferação celular foi determinado pelo método colorimétrico. Este se baseia na capacidade que as células possuem de reduzir o MTT [(brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-difeniltetrazol), **1**] por meio da succinato desidrogenase (Figura 108) existente nas mitocôndrias (KASUGAI *et al.*, 1990), realizado em placas de cultivo de 96 poços (Fig. 109, p.159) a diferentes concentrações do produto.

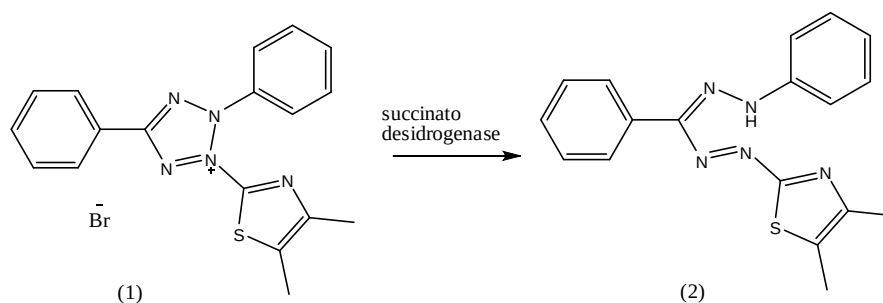


Figura 108 - Redução do MTT a formazan.

A partir da solução de **MS29** em DMSO, foram preparadas diluições em meio DMEM a 5,0% à concentração de 40,0 μ M. Destas, se depositaram 200,0 μ L nos poços da coluna 2 e nos restantes adicionaram-se 100,0 μ L de meio para realizar as diluições sucessivas à metade. As células ($2,0 \times 10^5$ células/poço) foram adicionadas em todos os poços, exceto na coluna 1, que foi utilizada como controle negativo. Como controle positivo, os poços foram inoculados nas mesmas condições (coluna 12), mas sem produto e com DMSO a uma concentração equivalente à máxima utilizada nos cultivos problema, sem que superasse 1,0% v/v.

As placas foram incubadas a 37 °C em atmosfera de CO₂ a 5,0 % e umidade relativa 98 %. Após 48 ou 72 h de incubação, para estabelecer a taxa de sobrevivência celular, foram acrescentados 20,0 µL de MTT (5,0 mg/mL dissolvido em tampão fosfato salino PBS), incubando-o posteriormente durante 4 h. Em seguida, o meio foi succionado e se acrescentaram 150,0 µL de DMSO para dissolver os cristais de formazan (**2**) formados pelas células vivas. A densidade ótica da cor observada foi medida num espectrofotômetro ELISA (Infinite M200, Tecan) ao comprimento de onda de 550 nm. Os resultados foram expressos em IC₅₀ em µM.mL⁻¹. A atividade observada foi comparada à atividade exibida pelo antineoplásico doxorrubicina (SADEGHI *et al.*, 2010).

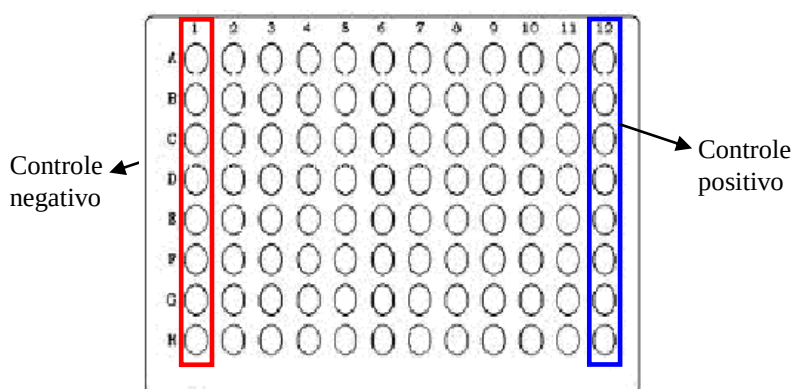


Figura 109 – Esquema representativo da montagem placa de cultivo utilizada no ensaio de citotoxicidade.

3.3.4- Resultados e Discussão

Ambas as linhagens celulares ensaiadas foram sensíveis frente a **MS29** (Figura 110, p. 160; Tabela 41, p.160), sendo que a atividade mais pronunciada foi observada frente a HeLa. O aumento do tempo de incubação não aumentou significativamente a citotoxicidade frente às mesmas. A atividade deste composto era esperada, por se tratar de um quinonametídeo. A relação estrutura-atividade sugere que anéis A e B contendo grupos carbonílicos α,β - insaturados são essenciais para a atividade citotóxica observada (GOMES *et al.*, 2011). Esta se intensifica com o aumento do grau de oxidação da molécula (RAVELO *et al.*, 2004, PÉREZ, 2000).

Com base nos resultados obtidos, pode-se concluir que a 16 β -hidroxipristimerina exerce promissor efeito citotóxico sobre os tipos de carcinoma estudados. Surge, assim, a necessidade de estudos posteriores, visando avaliar o

mecanismo de ação deste composto frente a essas linhagens celulares, bem como a avaliação de sua atividade *in vivo*.

Tabela 41- Valores de IC₅₀ ($\mu\text{M.mL}^{-1}$) da 16 β -hidroxipristimerina (**MS29**) observados frente às linhagens celulares ensaiadas

Linhagens celulares	Tempo de incubação			
	MS29		Doxorrubicina*	
	48 h	72 h	48h	72h
HeLa	2,55	2,57	1,12	0,37
A-549	3,40	3,49	0,52	0,83

*antineoplásico padrão

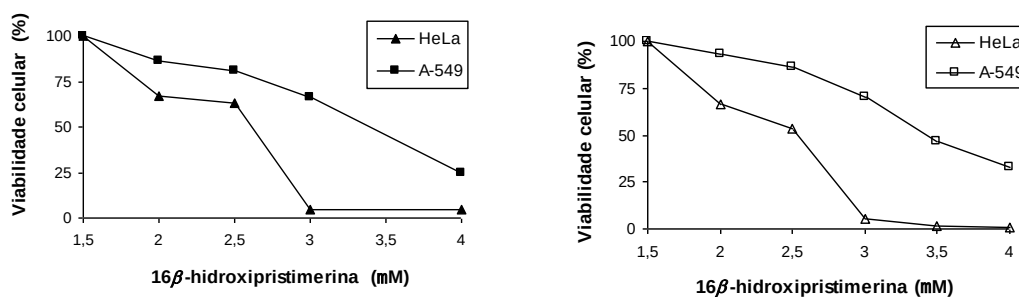


Figura 106- Efeito inibitório da 16 β -hidroxipristimerina sobre o crescimento das linhagens celulares HeLa e A-549. As células (2×10^4 células/poço) foram incubadas com o composto a várias concentrações por 48 h (símbolos sólidos) e 72 h (símbolos abertos).

3.4- Avaliação da atividade citotóxica de ésteres derivados do lupeol

A ideia de que os triterpenos possuem atividade antitumoral data do início da década de 1970, quando foram reportados os efeitos de um extrato de *Hyptis emoryi*, contendo ácido betulínico frente a células tumorais. Na mesma época, demonstrou-se que o lupeol, isolado de *Sarracenia flava*, exibia atividade frente a células de leucemia linfocítica P-388 (GALLO e SARACHINE, 2009). Estudos *in vitro* reportados recentemente mostram que o lupeol e triterpenos análogos exibem citotoxicidade frente a linhagens celulares de vários tipos de câncer (SIDDIQUE e SALEEM, 2011; CHATURVEDI *et al.*, 2008). Com base nos dados reportados, foi avaliado o efeito de ésteres do lupeol sobre o crescimento de nove linhagens celulares de tumores humanos.

3.4.1- Atividade antiproliferativa

Este ensaio foi realizado no laboratório coordenado pela Professora Ana Lucia Ruiz, da Universidade Estadual de Campinas.

O efeito dos ésteres caproato de lupeolila, caprilato de lupeolila, miristato de lupeolila, palmitato de lupeolila, estearato de lupeolila e 3,4-dimetoxibenzoato de lupeolila foi avaliado frente às linhagens celulares tumorais humanas UACC-62 (melanoma), MCF-7 (mama), NCI-ADR/RES (ovário resistente a adriamicina), 786-0 (rim), NCI-H460 (pulmão), PC-3 (próstata), OVCAR-03 (ovário), HT-29 (colon) e K562 (leucemia eritromieloblastóide). Estas foram adquiridas do *Frederick Cancer Research & Development Center, National Cancer Institute*, Frederick, MA, EUA. Culturas-estoque foram desenvolvidas em 5 mL de meio RPMI 1640 (GIBCO BRL, Life Technologies) suplementado com soro bovino fetal 5%. Penicilina / estreptomicina (100 µg/mL:1000 U/mL, 1 mL/L) foram acrescentadas às culturas experimentais Utilizou-se como controle positivo o antineoplásico doxorrubicina (11), que exibiu atividade apresentada na Figura 111 (p.162) . As células foram colocadas em placas de 96 poços (100 µL células/poço), a 37 °C e 5% CO₂ e expostas por 48 h a várias concentrações dos ésteres (0,25, 2,5, 25,0 e 250,0 µg/mL diluídas em DMSO à concentração final de 1%). Em seguida, uma solução de ácido tricloroacético (50% w/ V) foi adicionada a cada poço e a placa foi levada à incubação por 30 min a 4 °C. As células foram lavadas,

secas e a proliferação foi determinada pelo ensaio com sulforodamina B, com medidas feitas a 540 nm (MONKS *et al.*, 1991). O IC₅₀ (concentração mínima para inibir 50% do crescimento) e os valores de TIC (concentração que promove 100% de inibição de crescimento) foram determinados pela análise da regressão não-linear. Os resultados representados são de experimentos feitos em triplicata, com erro padrão menor que 5%.

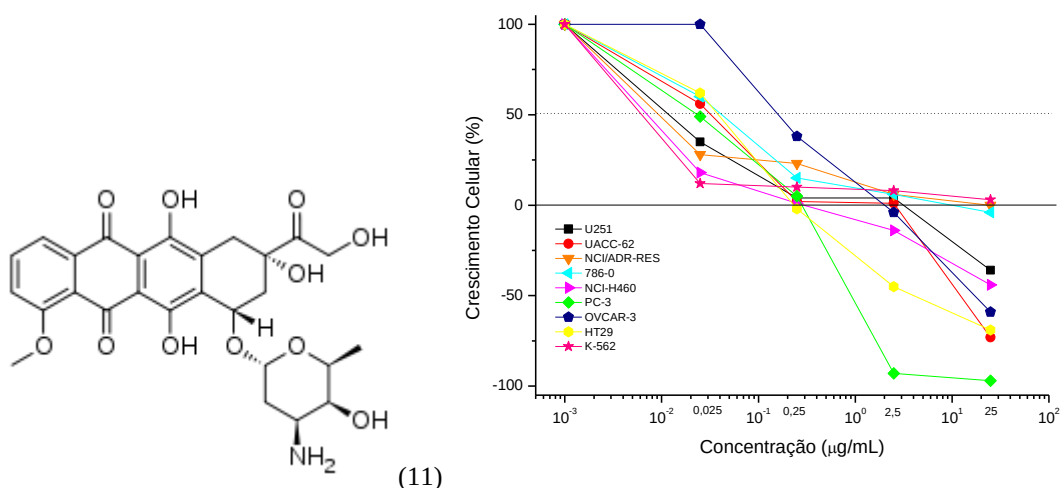


Figura 111 - Inibição do crescimento de linhagens tumorais pela doxorubicina.

3.4.2 - Resultados e discussão

Todos os ésteres foram capazes de inibir o crescimento da linhagem K-562 em uma razão concentração-dependente, sendo que o palmitato de lupeolila foi citotóxico para esta linhagem a 250 µg.mL⁻¹. Para as demais células, não se observaram atividades citotóxica ou citostática significantes quando tratadas com os outros análogos ao lupeol (Figura 112, p. 163). Estudos anteriores mostraram que o lupeol não apresenta inibição relevante frente à linhagem K-562 (GALLO e SARACHINE, 2009). O ácido palmítico, por sua vez, mostrou-se ativo frente a células leucêmicas (HARADA *et al.*, 2002). Isso leva a crer que a unidade graxa no éster é responsável pela atividade verificada. É possível inferir que os ésteres derivados do lupeol foram seletivos às células de leucemia eritromieloblastoide (K562), sendo uma importante alternativa como modelo para o desenvolvimento de novos agentes anticâncer para tratar este tipo de enfermidade.

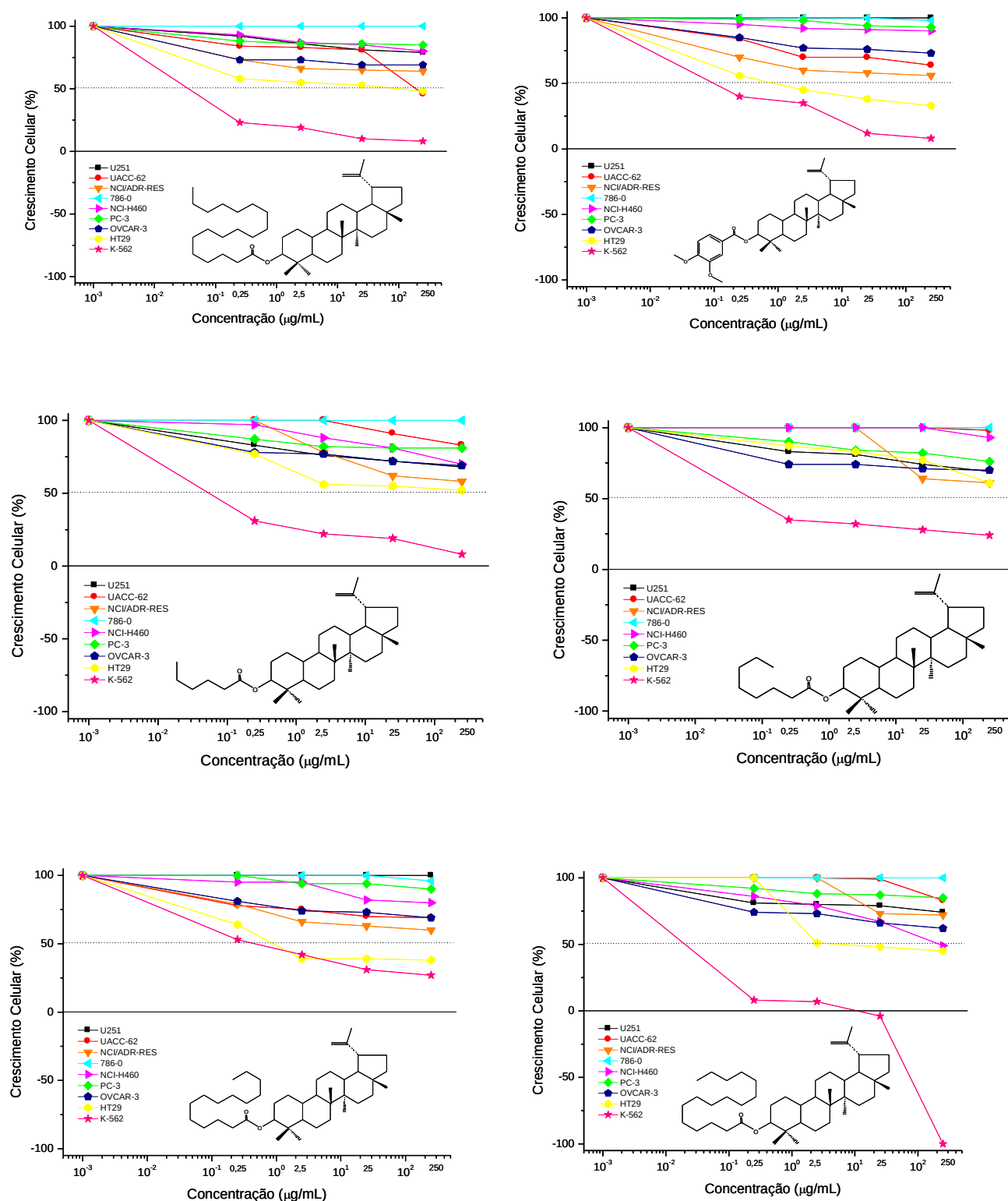


Figura 112 - Inibição do crescimento de linhagens tumorais por ésteres derivados do lupeol.

3.5 - Avaliação da atividade leishmanicida de ésteres do lupeol

Protozoários parasitas do gênero *Leishmania* causam uma série de doenças conhecidas coletivamente como leishmaniose. A incidência desse tipo de enfermidade aumentou nos últimos anos e a terapia empregada é ainda baseada em fármacos à base de antimônio, diaminas (pentamidina) e um polieno antifúngico (anfotericina B), que são tóxicos e nem sempre eficazes (TELES *et al.*, 2011, POLONIO e EFFERT, 2008). Produtos naturais são uma promissora fonte alternativa de compostos na busca de novos agentes contra leishmaniose e frente a outras protozooses. A partir de dados reportados do uso de plantas na medicina popular no tratamento da leishmaniose, foram isolados alcaloides, chalconas, triterpenos e acetogeninas que exibiram promissora atividade (FERREIRA *et al.*, 2010, CAPUSIRI *et al.*, 2008).

Estudos mostraram a atividade do lupeol frente às formas amastigota de *L. amazonensis* e promastigota de *L. braziliensis* (SCHINOR *et al.*, 2007; SIDDIQUE e SALEEM, 2011; FOURNET *et al.*, 1992). Com base nessas informações, desenvolveu-se o teste para ésteres derivados do lupeol para a forma promastigota das espécies *L. amazonensis* e *L. braziliensis*.

3.5.1- Procedimento experimental

Este ensaio foi realizado no laboratório coordenado pelo professor Alberto Giménez, do Instituto de Investigaciones Fármaco-Bioquímicas, da Universidad Mayor de San Andrés – Bolívia.

A atividade leishmanicida das amostras foi medida sobre cultivos *in vitro* do estágio promastigota de cepas de *Leishmania braziliensis* M2904 C192 RJR e *L. amazonensis* (MHOM/BR/76/LTB-012). A manutenção das formas promastigotas de *Leishmania* foi feita mediante ressemeaduras a cada 48 ou 72 h em 2,0 mL de meio RPMI (Roswell Park Memorial Institute) e incubação à temperatura de 22 °C. Foram avaliados os ésteres palmitato de lupeolila (**PL**), caprilato de lupeolila (**CIL**), caproato de lupeolila (**COL**), miristato de lupeolila (**ML**), 3',4'-dimetoxibenzoato de lupeolila (**DML**), 3',4',5'-trimetoxibenzoato de lupeolila (**TML**), 3',5'-dinitrobenzoato de lupeolila (**DNL**) e benzoato de lupeolila (**BL**).

Os ésteres derivados do lupeol foram dissolvidos em DMSO e armazenados a 4 °C até sua utilização. Os ensaios foram realizados em placas de 96 poços, nos quais foram colocados 250.000 parasitas em forma promastigota, procedentes de cultivos em fase logarítmica de crescimento. Utilizou-se como branco um controle de parasitas com Anfotericina B e outro com uma amostra padrão de alcaloides totais da casca de *Galipea longiflora* (CAT), de reconhecida atividade leishmanicida (CAPUSIRI *et al.*, 2008). A avaliação antiparasitária dos ésteres foi feita pelo método colorimétrico XTT - sódio(2,3-bis(2-metoxi-4-nitro-5-sulfofenil)-2-H-tetrazol-5-carboxanilida). As placas foram incubadas durante 72 h. Para determinar a IC₅₀ foi utilizada solução de XTT com metossulfato Fenasin (PMS).

3.5.2- Resultados e discussão

Os ésteres avaliados foram inativos frente às cepas testadas, pois apresentaram IC₅₀ superiores a 50 µg/mL (Tabela 42). Uma provável justificativa da ausência de atividade dos compostos avaliados seria a natureza apolar dos mesmos, o que sugere que a atividade do lupeol, se deve à presença do grupo OH em (C-3).

Tabela 42. Avaliação leishmanicida de ésteres do lupeol. Lam = *L. amazonensis*; Lbr = *L. brasiliensis*

Êster	Cepa avaliada	
	Lam	Lbr
PL	>50	>50
CIL	>50	>50
COL	>50	>50
ML	>50	>50
DML	>50	>50
TML	>50	>50
DNL	>50	>50
BL	>50	>50
CAT-etanol	24,6	23,6
Anfotericina B	0,25	0,1

3.6- Avaliação da atividade frente a *Helicobacter pylori*

Helicobacter pylori é uma bactéria Gram-negativa que coloniza o estômago por quase toda a vida do hospedeiro. Constatou-se que nos últimos 20 anos, *H. pylori* infecta mais da metade da população humana do mundo, provocando doenças gastroduodenais, como úlcera péptica, adenocarcinoma gástrico, linfoma do tecido linfoide associado à mucosa (MALT) e desenvolvimento de câncer (GEETHANGLI *et al.*, 2010). Em 1994, a Organização Mundial de Saúde (OMS) definiu essa bactéria como carcinógeno grupo I. O tratamento contra *H. pylori* é feito a base de antibióticos, omeprazol e bloqueadores de prótons (COGO *et al.*, 2010). Contudo, o aumento de bactérias resistentes a antibióticos, e a ocorrência de efeitos colaterais e o alto custo de terapias combinadas (tetraciclina e omeprazol com bismuto), limitam a implantação desses tratamentos.

Grande número de plantas medicinais com potencial anti-úlceras gástricas tem sido reportado, dentre elas, *Boesenbergia rotunda* (BHAMARAPRAVATI *et al.*, 2003), *Maytenus aquifolium* (NOSSACK *et al.*, 2004; YARIWAKE *et al.*, 2005) e *M. rigida* (SANTOS *et al.*, 2007).

A fim de se validar o uso na medicina popular de *Maytenus salicifolia*, realizou-se o ensaio de atividade antimicrobiana de compostos isolados dessa espécie, bem como de ésteres derivados do lupeol frente a *H. pylori*.

3.6.1- Procedimento experimental

Este ensaio foi realizado no laboratório coordenado pela Professora Jacqueline Aparecida Takahashi, do Departamento de Química da UFMG.

Neste teste, foram avaliadas as seguintes substâncias: estearato de lupeolila (**EL**), caprilato de lupeolila (**CIL**), caproato de lupeolila (**COL**), miristato de lupeolila (**ML**), benzoato de lupeolila (**BL**), 3',4'-dimetoxibenzoato de lupeolila (**DBL**), 3',4',5'-trimetoxibenzoato de lupeolila (**TBL**), 3',5'-dinitrobenzoato de lupeolila (**DNL**), tricloroacetato de lupeolila (**TCL**), lupeol (**MS5**), lup-20 (29)-en-3,30-diol (**MS7**), rigidinol (**MS13**), gloquidona (**MS17**), 11 α -hidroxigloquidona (**MS20**), nepeticina (**MS26**), e 16 β -hidroxipristimerina (**MS29**).

A cultura de *H. pylori* INCQS 00380, incubada por 72 h em caldo soja triptona Oxoid, foi padronizada em espectrofotômetro para uma concentração final de $1,33 \times 10^8$ UFC/mL ($4,0 \times 10^6$ UFC/poço). O bioensaio foi realizado em placas de microtitulação, para todos os compostos, em quintuplicata. Estes foram adicionados aos poços a partir de uma solução de concentração 500 µg/mL (50 µg/poço e concentração final de 250 µg/mL), em caldo soja triptona e, em seguida, 70 µL do inóculo bacteriano foram adicionados. As placas foram incubadas a 37 °C por 48 h e 72 h. Controles positivo (ampicilina) e negativo (caldo soja triptona) foram testados simultaneamente. A porcentagem de inibição de crescimento bacteriano foi determinada por leitura espectrofotométrica, a 630 nm, usando leitor de placas tipo ELISA. Posteriormente, também foi feita a leitura visual qualitativa do crescimento microbiano utilizando-se solução de azul de metileno $0,2 \text{ mg.L}^{-1}$.

3.6.2- Resultados e discussão

Dos compostos avaliados, somente foram ativos rigidinol (**MS13**), 16β -hidroxipristimerina (**MS29**) e caprolato de lupeolila (**COL**). Destes, **MS29** apresentou atividade relevante, que diminuiu com o tempo de incubação (Tabela 43, p.168). O éster inibiu levemente o crescimento de *H. pylori* após 48 h de incubação, tornando-se inativo após um intervalo de tempo maior. A bactéria foi também ligeiramente sensível ao rigidinol, que exibiu atividade também a um tempo de incubação superior. Observou-se, ainda, que o maior tempo de incubação leva à diminuição da atividade dos compostos. Isso pode estar relacionado ao fato de *H. pylori* ser uma bactéria do tipo Gram-negativa, o que dificultaria a interação do composto com a parede celular do micro-organismo.

Tanto a atividade frente a *H.pylori* observada para **MS13** e **MS29** como a atividade antiúlcera curativa amplamente reportada para catequinas (MABE *et al.*, 1999; HAMAISHI *et al.*, 2006; SANTOS *et al.*, 2012) e para outros compostos isolados dos extratos de *Maytenus salicifolia*, como pinostrobin e ferruginol, dão suporte ao uso desta planta na medicina popular do Brasil para o tratamento desse tipo de enfermidade. Tendo em vista que o uso de *M. salicifolia* é feito sob a forma de infusão, este é constituído principalmente de compostos fenólicos, que apresentam a atividade observada.

Tabela 43. Porcentagem de inibição do crescimento *H. pylori* frente às amostras testadas.

Amostra*	48h	72h
	%Inibição (M±SD)	
Ampicilina	100±6	82±8
EL	ND**	ND
CIL	ND	ND
COL	21±6	ND
ML	ND	ND
DBL	ND	ND
TBL	ND	ND
DNL	ND	ND
BL	ND	ND
TCL	ND	ND
MS5	ND	ND
MS7	ND	ND
MS13	26±7	24±6
MS17	ND	ND
MS20	ND	ND
MS26	ND	ND
MS29	84±4	73±4

* 250 µg.mL⁻¹

** atividade não detectada

CONCLUSÃO

O presente estudo contribuiu para o estudo quimiotaxonômico da família Celastraceae. Observou-se grande variedade de compostos químicos nos extratos estudados, sendo encontrados compostos aromáticos (3'-metoxi-4'-hidroxi-*trans*-cinamaldeído, siringaldeído e pinostrobin), diterpenos (ferruginol e 6,7-desidroferruginol), esteroide (β -sitosterol) e triterpenos pentacíclicos da classe dos glutinanos (glutinol), oleananos (abruslactona A), friedelanos (friedelina, 3,16-dioxofriedelano, 30-hidroxifriedelina, 29-hidroxi-friedelina, friedelan-1,3-diona) e quinonametídeos (tingenona e pristimerina), com ênfase na maior quantidade de triterpenos da classe dos lupanos (gloquidonol, 3-*epigloquidiol*, lupenona, lupeol, 30-hidroxi-lup-20(29)-en-3-ona, 3,30-dihidroxi-lup-20(29)-eno, betulina, rigidinol, nepeticina, gloquidona, 11 α -hidroxigloquidona).

Os extratos mais polares de *M. salicifolia* apresentaram expressivo teor de 4'-*O*-metilepigalocatequina e proantocianidina A, compostos de reconhecida atividade antioxidante. Isso corrobora a possibilidade de *M. salicifolia* vir a ser uma fonte alternativa desses compostos.

Dois dos compostos isolados são novos na literatura científica, salicassina e 16 β -hidroxipristimerina. Este exibiu promissora atividade citotóxica contra Hela e A-549, além de alto efeito inibitório frente à bactéria *Helicobacter pylori*. É a primeira vez que se reporta, em uma espécie da família Celastraceae, a ocorrência de um aduto no qual uma unidade chalcona é unida a um diterpeno abietano por ponte éter.

A presença de compostos de reconhecida atividade antiúlcera, como ferruginol e pinostrobin, além da atividade observada para os compostos 16 β -hidroxipristimerina e rigidinol frente a *H. pylori* não contraria o uso popular da espécie no tratamento de problemas estomacais.

Foram sintetizados 11 ésteres a partir do lupeol isolado desta espécie, sendo 6 derivados alifáticos (caprilato de lupeolila, caproato de lupeolila, miristato de lupeolila, palmitato de lupeolila, estearato de lupeolila, tricloroacetato de lupeolila) e 5 aromáticos (benzoato de lupeolila, 3,4-dimetoxibenzoato de lupeolila, trimetoxibenzoato de lupeolila, 3,5-dinitrobenzoato de lupeolila, salicilato de lupeolila). O palmitato de lupeolila foi seletivo para a linhagem celular K-562, ao passo que o caproato de lupeolila e o caprilato de lupeolila inibiram a atividade da enzima acetilcolinesterase.

Os resultados promissores dos ensaios biológicos realizados com extratos e compostos isolados de *M. salicifolia* ratificam a possibilidade de que essa espécie venha a ser uma fonte alternativa de protótipos de fármacos que atuem em diferentes enfermidades.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABDEL-MOGIB, M. A lupane triterpenoid from *Maerua oblongifolia*. **Phytochemistry** 51, p. 445- 448, 1999.
- ABDELWAHAB, S. I.; MOHAN, S.; ABDULLA, M. A.; SUKARI, M. A.; ABDUL, A. B.; TAHA, M. M. E.; SYAM, S.; AHMAD, S.; LEE, K. H. The methanolic extract of *Boesenbergia rotunda* (L.) Mansf. and its major compound pinostrobin induces anti-ulcerogenic property in vivo: Possible involvement of indirect antioxidant action. **J. Ethnopharm.** 137, p. 963– 970, 2011.
- AHMAD, V. U.; VOELTER, S. B. W.; FUCHS, W. Chemical examination of *Nepeta hindostana* (root) haines: the structure of nepeticin. **Tetrahedron Lett.** 22, p. 714-1718, 1981.
- ALVIANO, W. S.; ALVIANO, D. S.; DINIZ, C. G.; ANTONIOLI, A. R.; ALVIANO, C. S.; FARIAS, L. M.; CARVALHO, M. A. R.; SOUZA, M. M. G.; BOLOGNESE, A. M. *In vitro* antioxidant potential of medicinal plant extracts and their activities against oral bacteria based on Brazilian folk medicine. **Arch. Oral. Biol.** 53 (6), p. 545-552, 2008.
- ANDRIKOPOULOS, N. K.; KALIORA, A. C.; ASSIMOPOULOU, A. N.; PAPAPEORGIOU, V. P. Biological activity of some naturally occurring resins, gums and pigments against *in vitro* LDL oxidation. **Phytother. Res.** 17(5), p. 501–507, 2003.
- ANTONISAMY, P.; DURAIPANDIYAN, V.; IGNACIMUTHU, S. Anti-inflammatory, analgesic and antipyretic effects of friedelin isolated from *Azima tetraacantha* Lam. in mouse and rat models. **J. Pharm. Pharmacol.** 63 (8), p. 1070–1077, 2011.
- ARECHE, C.; CEJAS, P.; THOMA, S. P.; SAN-MARTÍN, A.; LUIS ASTUDILLO, L.; GUTIÉRREZ, M.; LOYOLA, L. Triterpenoids from *Azorella trifurcata* (Gaertn.) Pers and their effect against the enzyme acetylcholinesterase. **Quím. Nova** 32 (8), p. 2023-2025, 2009.

- AVILLA, J.; TEIXIDO, A.; VELASQUÉZ, C.; ALVARENGA, N.; FERRO, E.; CANELA, R.J. Insecticidal Activity of *Maytenus* Species (Celastraceae) Nortriterpene Quinone Methides against Codling Moth, *Cydia pomonella* (L.) (Lepidoptera: Tortricidae). **J. Agric. Food Chem.**, 48, p. 88-92, 2000.
- BANDEIRA, C. C., BRANDÃO, M.G.L., ANDRADE, G.T.B. **Circuito das Plantas Medicinais e Aromáticas de Belo Horizonte** – Guia Informativo, Belo Horizonte: O Lutador, 2003.
- BARBOSA, L.C.A. **Espectroscopia no infravermelho na caracterização de compostos orgânicos**. Viçosa: UFV, 2007.
- BETANCOR, C.; FREIRE, R.; GONZALEZ, A. G.; SALAZAR, J. A.; PASCARD, C.; PRANGE, T. Three triterpenes and other terpenoids from *Catha cassinoides*. **Phytochemistry** 19, p. 1989- 1993, 1980.
- BHAMARAPRAVATI, S.; PENDLAND, S. L.; MAHADY, G. B. Extracts of spice and food plants from Thai traditional medicine inhibit the growth of the human carcinogen *Helicobacter pylori*. **In vivo** 17 (6), p. 541-544, 2003.
- CAPUSIRI, E. S.; PINELL, G. R.; HUALLPARA, J. C. T.; TURBA, A. G. Método colorimétrico - XTT: como evaluación de alto rendimiento de sustancias con actividad leishmanicida. **BIOFARBO**, 16, p. 21-28, 2008.
- CARVALHO, D. A.; RODRIGUES, V. E. G. Levantamento etnobotânico de plantas medicinais no domínio do cerrado na região do alto Rio Grande - Minas Gerais. **Ciênc. Agrotec.** 25, p. 102-123, 2001.
- CHATURVEDI, P. K.; BHUI, K.; SHUKLA, Y. Lupeol: connotations for chemoprevention. **Cancer Lett.** 263, p.1-13, 2008.

- CHATURVEDULA, V. S. P.; SCHILLING, J. K.; MILLER, J. S.; ANDRIANSTSIKIFERANA, R.; RASAMISON, V. E.; KINGSTON, D. G. I. Two new Triterpene Esters from the Twigs of *Brachylaena ramiflora* from the Madagascar Rainforest, **J. Nat. Prod.**, 65(8), p.1222-1224, 2002.
- CLARKSON, C.; CAMPBELL, W. E.; SMITH, P. *In vitro* antiplasmodial activity of abietane and totarane diterpenes isolated from *Harpagophytum procumbens* (Devil's Claw). **Planta Med.** 69 (8), p. 720-724, 2003.
- COGO, L. L.; MONTEIRO, C. L. B.; MIGUEL, M. D.; MIGUEL, O. G.; CUNICO, M. M.; RIBEIRO, M. L.; CAMARGO, E. R.; KUSSEN, G. M. B.; NOGUEIRA, K. S.; COSTA, L. M. D. Anti-*Helicobacter pylori* activity of plant extracts traditionally used for the treatment of gastrointestinal disorders. **Braz. J. Microbiol.** 41, p. 304-309, 2010.
- COPPING, L. G.; DUKE, S. O. Natural products that have been used commercially as crop protection agents. **Pest. Man. Sci.** 63, p. 524-554, 2007.
- COSTA, P. M.; FERREIRA, P. M. P.; BOLZANI, V. S.; FURLAN, M.; SANTOS, V. A. F. F. M.; CORSINO, J.; MORAES, M. O.; COSTA-LOTUFO, L. V.; MONTENEGRO, R. C.; PESSOA, C. Antiproliferative activity of pristimerin isolated from *Maytenus ilicifolia* (Celastraceae) in human HL-60 cells. **Toxicol. Vit.**, 22, p. 854-863, 2008.
- CHUNG, P. Y.; NAVARATNAM, P.; CHUNG, L. Y. Synergistic antimicrobial activity between pentacyclic triterpenoids and antibiotics against *Staphylococcus aureus* strains. **An. Clin. Microbiol. Antimicrob.**, 10, p. 25-30, 2011.
- DA SILVA, M. G. Análise da constituição química de raiz e folhas de *Maytenus myrsinoides*. Belo Horizonte, Departamento de Química, ICEX, UFMG, Dissertação de Mestrado, 1990.
- DING, Y.; LIANG, C.; KIM, J. H.; LEE, Y. M.; HYUN, J. H.; KANG, H. K.; KIM, J. A.; MIN, B. S.; KIM, Y. H. Triterpene compounds isolated from *Acer mandshuricum* and their anti-inflammatory activity. **Bioorg. Med. Chem. Lett.** 20, p. 1528-1531, 2010.

- EE, G. C. L.; LIM, C. K.; RAHMAT, A.; LEE, H. L. Cytotoxic activities of chemical constituents from *Mesua daphnifolia*. **Trop. Biomed.** 22, p. 99-102, 2005.
- EUM, D.Y.; BYUN, J. Y.; YOON, C. H.; SEO, W. D.; PARK, K. H.; LEE, J. H.; CHUNG, H. Y.; AN, S.; SUH, Y.; KIM, M. J.; LEE, S. J. Triterpenoid pristimerin synergizes with taxol to induce cervical cancer cell death through reactive oxygen species-mediated mitochondrial dysfunction. **Anti-Cancer Drugs** 22 (8), p. 763–773, 2011.
- ESPINOZA, M.; SANTOS, L. S.; THEODULOZ, C.; SCHMEDA-HIRSCHMANN, G.; RODRÍGUEZ, J. A. New gastroprotective ferruginol derivatives with selective cytotoxicity against gastric cancer cells. **Planta Med.**, 74, p. 802–808, 2008.
- FENG, X.; GAO, Z.; LI, S.; JONES, S. H.; HECHT, S. M. DNA polymerase β lyase inhibitors from *Maytenus putterlickoides*. **J. Nat. Prod.** 67, p. 1744-1747, 2004.
- FERNÁNDEZ, M. A.; HERAS, B.; GARCIA, M. D.; SÁENZ, M. T.; VILLAR, A. New insights into the mechanism of action of the anti-inflammatory triterpene lupeol. **J. Pharm. Pharmacol.** 53(11), p.1533–1539, 2001.
- FERRARO, M.J.; WIKLER, M.A.; CRAIG, W. A.; DUDLEY, M. N.; ELIOPOULOS, G. M.; HECHT, D. W.; HINDLER, J.; RELLER, L. B.; SHELDON, A. T.; SWENSON, J. M.; TENOVER, F. C.; TESTA, R. T.; WEINSTEIN, M. P. Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests; Approved Standard – Eighth Edition, Vol. 23. Pennsylvania: Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI); 2003.
- FERREIRA, M. G. P. R.; KAYANO, A. M.; SILVA-JARDIM, I.; SILVA, T. O.; ZULIANI, J. P.; FACUNDO, V. A.; CALDERON, L. A.; ALMEIDA-E-SILVA, A.; CIANCAGLINI, P.; STÁBELI, R. G. Antileishmanial activity of 3-(3,4,5-trimethoxyphenyl) propanoic acid purified from Amazonian *Piper tuberculatum* Jacq., Piperaceae, fruits. **Braz. J. Pharmacogn.** 20 (6), p.1003-1006, 2010.

- FOURNET, A.; ANGELO, A.; MUÑOZ, V.; ROBLOT, F.; HOCQUEMILLER, R.; CAVÉ, A. Biological and chemical studies of *Pera benensis*, a bolivian plant used in folk medicine as a treatment of cutaneous leishmaniasis. **J. Ethnopharmacol.** 37, p. 159–64, 1992.
- FORREST, L. M.; ZHAO, A.; WON, C.Y.; MALICK, A. W.; KWON, G. S. Lipophilic prodrugs of Hsp90 inhibitor geldanamycin for nanoencapsulation in poly(ethylene glycol)-*b*-poly(ϵ -caprolactone) micelles J. Control. Rel. **Pharm. Res.** 116 (2), p. 139-149, 2006.
- GALLO, M. B. C.; SARACHINE, M. J. Biological activities of lupeol. **Int. J. Biom. Pharmac. Sci.** 3, p. 46-66, 2009.
- GEETHA, T., VARALAKSHIMI, P., LATHA, M., Effect of triterpenes from *Crataeva nurvala* stem bark on lipid peroxidation in adjuvant induced arthritis in rats, **Pharm. Res.** 37 (3), p. 191-195, 1998.
- GEETHA,T.; VARALAKSHMI, P. Anticomplement activity of triterpenes from *Crataeva nurvala* stem bark in adjuvant arthritis in rats. **Gen. Pharmacol.** 32, p.495–497, 1999.
- GEETHANGILI, M.; FANG,S. H.; LAI ,C. H.; RAO,Y. K.; LIEN, H. M.; TZENG, Y. M. Inhibitory effect of *Antrodia camphorata* constituents on the *Helicobacter pylori*-associated gastric inflammation. **Food Chem.** 119, p.149–153, 2010.
- GOMES, J. P. M.; CARDOSO, C. R. P.; VARANDA, E. A.; MOLINA, J. M.; FERNANDEZ, M. F.; OLEA, N.; CARLOS, I. Z.; VILEGAS, W. Antitumoral, mutagenic and (anti)estrogenic activities of tingenone and pristimerin. **Braz. J. Pharmacogn.** 21(6), p. 963-971, 2011.
- GONZÁLEZ, A. G.; FRAGA, B. M.; GONZÁLEZ, P.; MARTA, M.; MONACHE, F. D.; MARINI-BETTOLO, G. B.; MELLO, J. F.; GONÇALVES, O. A revised structure for the triterpene rigidinol . **Phytochemistry** 21 (2), p. 470-471, 1982.

- GONZÁLEZ, A. G.; FERRO, E. E.; RAVELO, A. G. Triterpenes from *Maytenus horrida*. **Phytochemistry** 26 (10), p. 2785-2788, 1987.
- GONZÁLEZ, A. G.; ALVARENGA, N. L.; ESTEVEZ-BRAUN, A., RAVELO; A. G., BAZZOCCHI; I. L., MOUJIR, L. M. Structure and absolute configuration of triterpene dimers from *Maytenus scutioides* **Tetrahedron** 52, p. 9597-9608, 1996.
- GONZÁLEZ, A.G.; ALVARENGA, N. L.; BAZZOCCHI, I. L.; RAVELO, A. G.; MOUJIR, L. Triterpene trimers from *Maytenus scutioides*: cycloaddition compounds? **J. Nat. Prod.** 62, p. 1185-1187, 1999.
- GONZÁLEZ, A. G.; KENNEDY, M. L.; RODRÍGUEZ, F. M.; BAZZOCCHI, I. L.; JIMÉNEZ, I. A.; RAVELO, A. G.; MOUJIR, L. Absolute configuration of triterpene dimers from *Maytenus* species (Celastraceae). **Tetrahedron** 57, p.1283-1287, 2001.
- GUNATILAKA, A. A. L. Triterpenoids and steroids of Sri Lankan plants: a review of occurrence and chemistry. **J. Natn. Sci. Coun. Sri Lanka** 14 (1), p. 1-54, 1986.
- GUNATILAKA, A. A. L.; FERNANDO, H. C.; KIKUCHI, T.; TEZUKA, Y. ¹H and ¹³C NMR analysis of three quinone-methide triterpenoids. **Magn. Reson. Chem.** 27 (8), p.803-811, 1989.
- GUTIERREZ, A. B.; HERZ, W. H. Bisabolones y other constituents of *Mikania shushunensis*. **Phytochemistry** 27, p. 3871-3874, 1988.
- HAMAISHI, K.; KOJIMA, R.; ITO, M. Anti-ulcer effect of tea catechin in rats. **Biol. Pharm. Bull.** 29 (11), p. 2206-2213, 2006.

- HARADA, H.; YAMASHITA, U.; KURIHARA, H.; FUKUSHI, E.; KAWABATA, J.; KAMEI, Y. Antitumor activity of palmitic acid found as a selective cytotoxic substance in a marine red alga. **Anticancer Res.** 22 (5), p. 2587-2590, 2002.
- HUA, S.H.; LUO, J. G.; WANG, X. B.; WANG, J. S.; KONG, L. Y. Two novel monoterpene–chalcone conjugates isolated from the seeds of *Alpinia katsumadai*. **Bioorg. Med. Chem. Lett.** 19, p. 2728–2730, 2009.
- HUA, S.H.; WANG, X. B.; LUO, J. G.; WANG, J. S.; KONG, L. Y. A pair of unique sesquiterpene–chalcone conjugates isolated from the seeds of *Alpinia katsumadai*. **Tetrahedron Lett** 49, p. 5658–5661, 2008.
- HUI, W. H.; LI, M. M. A new compound 21 [alpha]-hydroxyfriedel-4(23)-en-3-one and other triterpenoids from *Phyllanthus reticulatus*. **Phytochemistry** 15, p. 561-562, 1976.
- HUSSEIN, G.; NAKAMURA, N.; MESELHY, M. R.; HATTORI, M. Phenolics from *Maytenus senegalensis*. **Phytochemistry** 50, p. 689-694, 1999.
- IWAMOTO, M.; MINAMI, T.; TOKUDA, H.; OHTSU, H.; TANAKA, R. Potential Antitumor promoting diterpenoids from the stem bark of *Thuja standishii*. **Planta Med.**; 69 (1), p. 69-72, 2003.
- JELLER, A. H.; SILVA, D. H. S.; LIÃO, L. M.; BOLZANI, V. S.; FURLAN, M. Antioxidant phenolic and quinonemethide triterpenes from *Cheiloclinium cognatum*. **Phytochemistry** 65, p. 1977–1982, 2004.
- JORGE, R. M.; LEITE, J. P. V.; OLIVEIRA, A. B.; TAGLIATI, C. A. Evaluation of antinociceptive, anti-inflammatory and antiulcerogenic activities of *Maytenus ilicifolia*. **J. Ethnopharmacol.** 94, p. 94: 93-100, 2004.
- KASUGAI, S.; HASEGAWA, N.; OGUVA, H. A simple in vito cytotoxicity test using the MTT (3-(4,5)-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide) colorimetric

- assay: analysis of eugenol toxicity on dental pulp cells (RPC-C2A). **J. Pharmacol.** 52, p. 95-100, 1990.
- KHALID, S. A.; FRIEDRICHSEN, G. M.; CHRISTENSEN, S. B.; EL TAHIR, A.; SATTI, G. M. Isolation and characterization of pristimerin as the antiplasmodial and antileishmanial agent of *Maytenus senegalensis* (Lam.) Exell. **ARKIVOC** 9, p. 129-134, 2007.
- KIM, D. K.; NAM, Y.; KIM, J. W.; SHIN, T. Y.; LIM, J. P. Pentacyclic triterpenoids from *Ilex macropoda*. **Arch. Pharm. Res.** 25(5), p. 617-620, 2002.
- KLASS, J.; TINTO, W. F.; STEWART MCLEAN, S.; REYNOLDS, W. F. Friedeland Triterpenoids from *Peritassa compta*: Complete ^1H and ^{13}C assignments by 2D NMR spectroscopy. **J. Nat. Prod.** 55, p. 1626-1630, 1992.
- KUPCHAN, S. M.; KOMODA, Y.; COURT, W. A.; THOMAS, G. J.; SMITH, R. M.; KARIM, A.; GILMORE C. J.; HALTIWANGER, R. M.; BRYAN, R. F. Maytansine, a novel antileukemic ansamacrolide from *Maytenus ovatus*. **J. Am. Chem. Soc.** 94 (4), p. 1354-1356, 1972.
- KWEIFIO-OKAI, G.; BIRD, D.; FIELD, B.; AMBROSE, R.; CARROLL, A. R.; SMITH, P.; VALDES, R. Antiinflammatory activity of a Ghanaian antiarthritic herbal preparation. **J. Ethnopharmacol.** 46, p. 7-15, 1995.
- KWON, H. C.; LEE, K. R. Phytochemical Constituents of *Artemisia japonica* ssp. *Littoricola*. **Arch. Pharm. Res.** 24 (3), 194-197, 2001.
- MACARI, P. A. T.; PORTELA, C. N.; POHLIT, A. M. Antioxidant, cytotoxic and UVB-absorbing activity of *Maytenus guyanensis* Klotzch. (Celastraceae) bark extracts. **Acta Amazon.** 36 (4), p. 513-518, 2006.
- MAHATO, S. B.; KUNDU, A. P. ^{13}C NMR spectra of pentacyclic triterpenoids- a compilation and some salient features, **Phytochemistry** 37 (6), p. 1517-1575, 1994.

- MANN, J. **Secondary metabolism**. Oxford: Clarendon Press, 1987.
- MARINE-BETTOLO, G. B. La Chimie des Principes Actives de Celastraceae-Hippocrateaceae, **II Farmaco**, 29 (7), p. 531-533, 1974.
- MESA-SIVERIO, D., CHÁVEZ, H., ESTÉVEZ-BRAUN, A., RAVELO, A. G. Cheiloclones A–I. First examples of octacyclic sesquiterpene-triterpene hetero-Diels–Alder adducts. **Tetrahedron** 61, 429-436, 2005.
- MIRANDA, R. R. S. Estudo fitoquímico e avaliação do potencial farmacológico de *Maytenus salicifolia* Reissek. Belo Horizonte, Departamento de Química, UFMG, Tese de Doutorado, 2007.
- MONKS, A.; SCUDEIRO, D.; SKEHAN, P.; SHOEMAKER, R.; PAULL, K.; VISTICA, D.; HOSE, C.; LANGLEY, J.; CRONISE, P.; VAIGRO-WOLFF, A.; GRAY-GOODRICH, M.; CAMPBELL, H.; MAYO, J.; BOYD, M. Feasibility of a high-flux anticancer drug screen using a diverse panel of cultured human tumor cell lines. **J. Nat. Can. Inst.** 83 (11), 757-766, 1991.
- NGO, K. S.; BROWN, G. D. Stilbenes, monoterpenes, diarylheptanoids, labdanes and chalcones from *Alpinia katsumadai*. **Phytochemistry** 47 (6), p. 1117-1123, 1998.
- NIAMPOKA, C.; SUTTISRIR, R.; BAVOVADA, R.; TAKAYAMA, H.; AIMI, N. Potentially cytotoxic triterpenoids from the root bark of *Siphonodon celastrineus* Griff. **Arch. Pharmacol. Res.** 28 (5), p. 546-549, 2005.
- NIERO, R.; ANDRADE, S. F.; CECHINEL FILHO, V. A review of the ethnopharmacology, phytochemistry and pharmacology of plants of the *Maytenus* genus. **Curr. Pharm. Des.** 17, p. 1851-1871, 2011.
- NOSSACK, A. C.; CELEGHINI, R. M. S.; LANÇAS, F. M.; YARIWAKE, J. H. HPLC-UV and LC-MS analysis of quinonemethides triterpenes in hidroalcoholic extracts of

- “espinheira santa” (*Maytenus aquifolium* Martius, Celastraceae) leaves. **J. Braz. Chem. Soc.** 15 (4), p. 582-586, 2004.
- NOZAKI, H. N.; SUZUKI, H.; HIRAYAMA, T.; KASAI, R.; WU, R.; LEE, K. H. Antitumour triterpenes of *Maytenus diversifolia*. **Phytochemistry** 25, p. 479-485, 1986.
- NÚÑEZ, M. J.; KENNEDY, M. L.; JIMÉNEZ, I. A.; BAZZOCCHI, I. L. Uragogin and blepharodin, unprecedented hetero-Diels-Alder adducts from Celastraceae species. **Tetrahedron** 67, p. 3030-3033, 2011.
- NÚÑEZ, M. J.; REYES, C. P.; JIMÉNEZ, I. A.; MOUJIR, L.; BAZZOCCHI, I. L. Lupane triterpenoids from *Maytenus* species. **J. Nat. Prod.** 68, p. 1018-1021, 2005.
- OKANO, R. M. C. Estudos Taxonômicos do gênero *Maytenus* Mol. *Emend.* Mol (Celastraceae) do Brasil Extra Amazônico, Campinas, Instituto de Biologia, UNICAMP, Tese de Doutorado, 1992.
- OLEA, R. S. G.; TORRES, L. M. B.; ROQUE, L. C.; ROQUE, N. F. ^{13}C NMR spectroscopic data for glutinol and derivatives. **Magn. Reson. Chem.** 32 (6), p. 378-380, 1994.
- OLIVEIRA D. M.; SILVA, G. D. F.; DUARTE, L. P.; FILHO, S. A. V. Chemical constituents isolated from roots of *Maytenus acantophylla* Reissek (Celastraceae). **Biochem. System. Ecol.** 34, p. 661-665, 2006.
- OLIVEIRA, M. L. G.; DUARTE, L. P.; SILVA, G. D. F.; VIEIRA-FILHO, S. A.; KNUPP, V. F.; ALVES, F. G. P. 3-oxo-12 α -hydroxyfriedelane from *Maytenus gonoclada*: structure elucidation by ^1H and ^{13}C chemical shift assignments and 2D-NMR spectroscopy. **Magn. Reson. Chem.** 45, p. 895-898, 2007.

- PARK, C.; MOON, D. O.; RHU, C. H.; CHOI, B. T.; LEE, W. H.; KIM, G. Y.; CHOI, Y. H. β -sitosterol induces anti-proliferation and apoptosis in human leukemic U937 cells through activation of caspase-3 and induction of Bax/Bcl-2 ratio. **Biol. Pharm. Bull.** 30 (7), p. 1317-1323, 2007.
- PÉREZ, F. M. R. Estudio fitoquímico de especies de la familia Celastraceae (flora panameña): *Maytenus blepharodes* y *Crossopetalum lobatum*. La Laguna, Instituto Antonio González, ULL, Tesis doctoral , 2000.
- PINHEIRO, J. A. Análise da Constituição Química da Madeira de *Maytenus guianensis* Klotzch. Belo Horizonte, Departamento de Química, ICEX, UFMG, Dissertação de Mestrado, 124 p, 1980.
- POLONIO, T.; THOMAS EFFERTH, T. Leishmaniasis: Drug resistance and natural products (Review). **Int. J. Mol. Med.** 22, p. 277-286, 2008.
- PORTO, T. S.; RANGEL R.; FURTADO, N. A. J. C.; CARVALHO, T. C.; MARTINS, C. G. H.; VENEZIANI, R. C. S.; DA COSTA, F. B.; VINHOLIS, A. H. C.; CUNHA, W. R.; HELENO, V. C. G.; AMBROSIO, S. R.. Pimarane-type diterpenes: antimicrobial activity against oral pathogens. **Molecules** 14, p. 191-199, 2009.
- RAVELO, A. G.; ESTÉVEZ-BRAUN, A.; CHÁVEZ-ORELLANA, H.; PÉREZ-SACAU, E.; MESA- SILVÉRIO, D. Recent studies on natural products as anticancer agents. **Curr. Top. Med. Chem.** 4, p.241-265, 2004.
- REDDY, K. P.; SINGH , A. B.; PURI A.; SRIVASTAVA, A. K.; NARENDER, T. Synthesis of novel triterpenoid (lupeol) derivatives and their in vivo antihyperglycemic and antidyslipidemic activity. **Bioorg. Med. Chem. Lett.** 19, p. 4463–4466, 2009.
- RHEE, I. K.; VAN DE MEENT, M.; INGGANINAN, K.; VERPOORTE, R. Screening for acetylcholinesterase inhibitors from Amaryllidaceae using silica gel thin-layer chromatography. **J. Chromatogr. A** 915, p. 217–223, 2001.

- REVILLA, J. **Plantas úteis da bacia amazônica**. SEBRAE-AM/INPA, Manaus, 2002.
- REYES C. P.; NÚÑEZ, M. J.; JIMÉNEZ, I.A.; BUSSEROLLES, J.; ALCARAZ M. J.; BAZZOCCHI L. Activity of lupane triterpenoids from *Maytenus* species as inhibitors of nitric oxide and prostaglandin E₂. **Bioorg. Med. Chem.** 14, p.1573-1579, 2006.
- RODRIGUES, N. K. J. Triterpenos da casca da raiz de *Austroplenckia populnea*. Belo Horizonte, Departamento de Química, UFMG, Dissertação de Mestrado, 1989.
- RODRIGUES, V. G. Estudo fitoquímico e atividade biológica de raízes de *Maytenus imbricata* Mart. ex. Reissek. Belo Horizonte, Departamento de Química, UFMG, Dissertação de Mestrado, 2011.
- RODRÍGUEZ, F. M.; LÓPEZ, M. R.; JIMÉNEZ, I. A.; MOUJIR, L.; RAVELO, A. G. BAZZOCCHI, I. L. New phenolic triterpenes from *Maytenus blepharodes*. Semisynthesis of 6-deoxoblepharodol from pristimerin. **Tetrahedron** 61, p. 2513–2519, 2005.
- RUBINSTEIN I., GOAD L. J., CLAGUE A. D. H., MULHEIRN L. J. The 220 MHz NMR spectra of phytosterols. **Phytochemistry** 15, p. 195-200, 1976.
- SADEGHI, A. H.; MINAIYAN, M.; DABESTAN, A. Cytotoxic evaluation of doxorubicin in combination with simvastatin against human cancer cells. **Res. Pharm. Sci.**, 5 (2), p. 127-133, 2010.
- SALAZAR, G.C.M., Análise da Constituição Química da Casca da Madeira e Folhas de *Maytenus floribunda*, Belo Horizonte, Departamento de Química, ICEX, UFMG, Dissertação de Mestrado, **1993**.
- SALEEM, M. Lupeol, a novel anti-inflammatory and anti-cancer dietary triterpene. **Cancer Lett.** 285, p. 109–115, 2009.

- SANTOS, V. L.; COSTA, V. B. M.; AGRA, M. F.; SILVA, B. A.; BATISTA, L. M. Pharmacological studies of ethanolic extracts of *Maytenus rigida* Mart (Celastraceae) in animal models. **Rev. Bras. Farmacogn.** 17(3), p. 336-3420, 2007.
- SANTOS, R. C.; KUSHIMA, H.; RODRIGUES, C. M.; SANNOMIYA, M.; ROCHA, L. R. M.; BAUAB, T. M.; TAMASHIRO, J.; VILEGAS, W.; HIRUMA-LIMA, C. A. *Byrsonima intermedia* A. Juss.: Gastric and duodenal anti-ulcer, antimicrobial and antidiarrheal effects in experimental rodent models. **J. Ethnopharmacol.** 140, p. 203-212, 2012.
- SCHINOR, E. C.; SALVADOR, M. J.; PRAL, E. M. F.; ALFIERI, S. C.; ALBUQUERQUE, S.; DIAS, D. A. Effect of extracts and isolated compounds from *Chresta scapigera* on viability of *Leishmania amazonensis* and *Trypanosoma cruzi*. **Braz. J. Pharm. Sci.** 43 (2), p. 295-300, 2007.
- SETZER W. N.; SETZER, M. C. Plant-derived triterpenoids as potential antineoplastic agents. **Mini Rev. Med. Chem.** 3 (6), p. 540–556, 2003.
- SHIROTA, O.; MORITA, H.; TAKEYA, K.; ITOKAWA, H. Five new triterpene dimers from *Maytenus chuchuhuasca*. **J. Nat. Prod.** 60(11), p. 1100-1104, 1997.
- SIDDIQUE, H. R.; SALEEM, M. Beneficial health effects of lupeol triterpene: A review of preclinical studies **Life Sci.** 88, p. 285–293, 2011.
- SILVA, G.D.F.; DUARTE, L. P.; PAES, H.C.S.; SOUZA, J. R.; NONATO, M. C.; PORTEZ, P. J.; MASCARENHAS, Y. P. 3-Epiabruslactone A, a new triterpene lactone isolated from *Austroplenckia populnea*. **J. Braz. Chem. Soc.**, 9 (5), p. 461-464, 1998.
- SILVA, S. R. S.; SILVA, G. D. F.; BARBOSA, L. C. A; DUARTE, L. P.; VIEIRA FILHO, S. A. Lupane pentacyclic triterpenes isolated from stems and branches of *Maytenus imbricata*. **Helv. Chim. Act.**, 88, p. 1002-1109, 2005.

- SILVA, S. R. S. Estudo químico e avaliação do potencial farmacológico e herbicida de *Maytenus imbricata* Mart. Ex Reissek. Belo Horizonte, Departamento de Química, ICEx, UFMG, Tese de Doutorado, 226 p, **2007**.
- SILVERSTEIN, R. M., WEBSTER, F. X. **Identificação Espectrométrica de Compostos Orgânicos**, 6^a edição, Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, 1998.
- SIMMONS, M. P.; CAPPA, J. J.; ARCHER, R. H.; FORD, A. J.; EICHSTEDT, D.; CLEVINGER, C. C.. Phylogeny of the Celastrae (Celastraceae) and the relationships of *Catha edulis* (qat) inferred from morphological characters and nuclear and plastid genes **Mol. Phylogen. Evol.** 48, p.745–757, 2008.
- SOSA, S.; MORELLI, C. F.; TUBARO, A.; CAIROLI, P.; SPERANZA, G.; MANITTO, P. Anti-inflammatory activity of *Maytenus senegalensis* root extracts and of maytenoic acid. **Phytomedicine** 14, p. 109-114, 2007.
- SRIVASTAVA, R.; KULSHRESHTHA, D. K. Triterpenoids from *Glochidzon heyneanum*. **Phytochemistry** 27 (11), p. 3575 - 3578, 1988.
- SUDHAHAR, V.; KUMAR, S. A.; VARALAKSHMI, P. Role of lupeol and lupeol linoleate on lipemic- oxidative stress in experimental hypercholesterolemia. **Life Sci** 78, p. 1329-1335, 2006.
- SUDHAHAR, V.; KUMAR, S. A.; SUDHARSAN, P. T.; VARALAKSHMI, P. Protective effect of lupeol and its ester on cardiac abnormalities in experimental hypercholesterolemia. **Vascular Pharmacol.** 46, p. 412–418, 2007.
- SUMANEN, P.; BARON, E. J.; CITRON, D. M.; STRONG, C. A.; WEXLER, H. M., FINEGOLD, S. M. Wadsworth Anaerobic Bacteriology Manual, 5th edition. Belmont: Star Publishing Co. ; 1993:111-127.

- SUNITHA, S., NAGARAJ, M., VARALAKSHMI, P. Hepatoprotective effect of lupeol and lupeol linoleate on tissue antioxidant defense system in cadmium-induced hepatotoxicity in rats. **Fitoterapia**, 72, p. 516-523, 2001.
- TAKAISHI, Y., WARIISHI, N., TATEISHI, H., KAWAZOE, K., NAKANO, K., ONO, Y., TOKUDA, H., NISHINO, H., IWASHIMA, A. Triterpenoid inhibitors of interleukin-1 secretion and tumour-promotion from *Tripterygium wilfordii* var. *regelii*. **Phytochemistry** 45, p. 969-974, 1997.
- TELES, C. B. G.; MOREIRA, L. S.; SILVA, A. A. E.; FACUNDO, V. A.; ZULIANI, J. P.; STÁBELIA, R. G.; SILVA-JARDIM, I. Activity of the lupane isolated from *Combretum leprosum* against *Leishmania amazonensis* promastigotes. **J. Braz. Chem. Soc.** 22 (5), p. 936-942, 2011.
- VEIGA JR, V. F.; PINTO, A. C. Plantas medicinais: cura segura? **Quím. Nova** 28 (3), p. 519-528, 2005.
- VELLOSA, J. C. R.; KHALIL, N. M.; FORMENTON, V. A. F.; XIMENES, V. F.; FONSECA, L. M.; FURLAN, M.; BRUNETTI, I. L.; OLIVEIRA, O. M. M. F. Antioxidant activity of *Maytenus ilicifolia* root bark. **Fitoterapia** 77, p. 243-244, 2006.
- XUE, M.; JIANG, Z. Z.; LIU, J. P.; ZHANG, L. Y.; WANG, T.; WANG, H.; LIU, L.; ZHOU, Z. X. Comparative study on the anti-inflammatory and immune suppressive effect of wilforlide A. **Fitoterapia** 81, p. 1109–1112, 2010.
- WANG, S. Y.; WU, J. H.; SHYUR, L. F.; KUO, Y. H.; CHANG, S. T. Antioxidant activity of abietane-type diterpenes from heartwood of *Taiwania cryptomerioides* Hayata. **Holzforschung** 56, 487–492, 2002.
- WU, C-C.; CHAN, M-L.; CHEN, W-Y.; TSAI, C-Y.; CHANG, F-R.; WU, Y-C. Pristimerin induces caspase-dependent apoptosis in MDA-MB-231 cells via direct effects on mitochondria. **Mol. Cancer Ther.** 4, p. 1277–1285, 2005.

- XIE, D.Y.; DIXON, R. A. Proanthocyanidin biosynthesis – still more questions than answers? **Phytochemistry** 66, p. 2127–2144, 2005.
- YANG, H.; LANDIS-PIWOWAR, K. R.; LU, D.; YUAN, P.; LI, L.; REDDY, G. P. V.; YUAN, X.; DOU, Q. P. Pristimerin induces apoptosis by targeting the proteasome in prostate cancer cells. **J. Cell Biochem.** 103, p. 234–244, 2008.
- YARIWAKE, J. H.; LANÇAS, F. M.; CAPPELARO, E. A.; VASCONCELOS, E. C.; TIBERTI, L. A.; PEREIRA, A. M. S.; FRANCA, S. C. Variabilidade sazonal de constituintes químicos (triterpenos, flavonóides e polifenóis) das folhas de *Maytenus aquifolium* Mart. (Celastraceae). **Braz. J. Pharmacogn.** 15(2), p. 162-168, 2005.
- YING, B.; KUBO, I. Complete ^1H and ^{13}C NMR assignments of totarol and its derivatives. **Phytochemistry** 6, p. 1951–1955, 1991.
- ZHANG, L.; ZHANG, Y.; ZHANG, L.; YANG, X.; LV, Z. Lupeol, a dietary triterpene, inhibited growth, and induced apoptosis through down-regulation of DR3 in SMMC7721 cells. **Cancer Invest.**, 27 (2), p. 163-170, 2009.