

**ESTUDO QUÍMICO E AVALIAÇÃO DO
POTENCIAL FARMACOLÓGICO E
HERBICIDA DE *Maytenus imbricata*
Mart. ex. Reissek
SILVIA RIBEIRO DE SOUZA E SILVA**

UFMG-ICE_x/DQ. 663

T. 257

SILVIA RIBEIRO DE SOUZA E SILVA

**ESTUDO QUÍMICO E AVALIAÇÃO DO POTENCIAL
FARMACOLÓGICO E HERBICIDA DE *Maytenus imbricata* Mart.
ex. Reissek**

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

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

Belo Horizonte
2007

D Silva, Silvia Ribeiro de Souza e
S_____ Estudo químico e avaliação do potencial
T farmacológico e herbicida de *Maytenus imbricata*
2007 Mart. ex. Reissek. Belo Horizonte:
UFMG/ICEx/Química, 2007.
Xxxf..:il

Orientadora: Grácia Divina de Fátima Silva
Co-orientador: Luiz Cláudio de Almeida Barbosa
Colaboradores: Lucienir Pains Duarte e Sidney
Augusto Vieira Filho
Tese UFMG/ICEx/Química.

1. Química Orgânica 2. Produtos Naturais 3.
Fitoquímica 4. *Celastraceae* 5. *Maytenus imbricata*
6. Triterpenos pentacíclicos I. Título II. Orientador

"Não te mandei eu? Esforça-te, e tem bom ânimo. Não te pases, nem te espantes, porque o Senhor teu Deus é contigo por onde quer que andares."

Josué 1:9

O trabalho descrito nesta tese foi realizado sob a orientação da Professora Doutora Grácia Divina de Fátima Silva e co-orientação do Professor Doutor Luiz Cláudio de Almeida Barbosa.

O trabalho descrito nesta tese foi realizado com a colaboração dos professores Doutora Lucienir Pains Duarte (UFMG) e Doutor Sidney Augusto Vieira Filho (UFOP).

AGRADECIMENTOS

À Deus, presença constante em minha vida e meu sustentáculo.

À minha querida e amada mãe, por sempre me transmitir tranquilidade.

Aos meus irmãos Wagner e Ernesto, pelo amor, carinho e pelo incentivo constante.

À minha querida orientadora, professora Grácia Divina de Fátima Silva, com quem aprendi muito mais que os conhecimentos fitoquímicos, agradeço de coração a confiança, a compreensão, os estímulos freqüentes e a certeza de que tudo daria certo.

Ao meu co-orientador professor Luiz Cláudio de Almeida Barbosa, pelas valiosas sugestões durante o desenvolvimento deste trabalho, permitindo que ele fosse realizado também em Viçosa e pela amizade.

À Professora Dra. Lucienir Pains Duarte, que se transformou ao longo deste trabalho na querida amiga Lu, pelo carinho, aconselhamentos e, principalmente, pela oportunidade de aprender sempre mais um pouco.

Aos companheiros de luta do Núcleo de Estudo de Plantas Medicinais (NEPLAM), Roqueline, Perpétua, Bibo, Djalma, Fred, Mauro, e toda a galera da iniciação científica pela ajuda, amizade, pelos bons momentos compartilhados e por colaborarem direta ou indiretamente para a realização deste trabalho.

À professora e minha amiga Sônia Ribeiro, pela solidariedade e incentivo nos momentos difíceis do dia-a-dia.

Aos professores Blas Lotina Hennsen e Sueli Fumie Ogatta, pela realização dos testes biológicos.

Ao Prof. Antônio Carlos Doriguetto, pela execução das análises cristalográficas dos triterpenos.

À Rosana Gonçalves, pela colaboração nas análises da anatomia foliar e pelos momentos de descontração, sempre preciosos.

Agradecimentos

À professora Magda Narciso Leite, por acreditar em meu trabalho, pela amizade e pelo incentivo profissional.

À querida amiga e excelente anfitriã, Virgínia Ribeiro Silva pelo carinho e acolhida sempre verdadeiros.

Aos amigos e familiares Leila, Lília, Nanci, Regina, Jones, Roberto, Márcia, Wilson e Deise, pela torcida sempre sincera.

À Ivana, pela amizade e pela presteza constante na realização das análises de RMN.

À Paulete, Lilian, Kátia e demais funcionários do Departamento de Química da UFMG pela constante boa vontade e pronto atendimento, sem eles seria impossível a realização deste trabalho.

Aos funcionários do Laboratório de Análise e Síntese de Agroquímicos (LASA), Sr. Antônio e José Luiz, pela atenção, pela amizade e pelo auxílio voluntário de qualidade realizado durante a fase experimental.

Aos companheiros do LASA, Flaviano, Robson, Ana Paula, Fabrício, Guilherme, Felipe e Jodhie, por tornarem o nosso dia-a-dia mais agradável.

À Marisa, Jorge, Marilda e demais funcionários do Departamento de Química da UFV pelo atendimento sempre atencioso que permitiram a realização deste trabalho.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão da bolsa de estudos.

Às Universidades Federais de Viçosa e de Minas Gerais e aos Departamentos de Química, pela oportunidade de realização deste trabalho.

Enfim, a todas as pessoas que, de alguma forma, contribuíram para a realização deste trabalho.

SUMÁRIO

SUMÁRIO.....	i
ÍNDICE DE ESQUEMAS.....	v
ÍNDICE DE FIGURAS.....	vi
ÍNDICE DE FLUXOGRAMAS.....	xv
ÍNDICE DE TABELAS.....	xvii
LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS.....	xix
RESUMO.....	xxii
ABSTRACT.....	xxiv
INTRODUÇÃO GERAL	1
A família <i>Celastraceae</i> e o gênero <i>Maytenus</i>	5
Proposta de trabalho.....	11
CAPÍTULO 1- Estudo anatômico de <i>Maytenus imbricata</i>	
1.1 - Anatomia foliar de <i>Maytenus imbricata</i> Mart. ex. Reissek.....	13
1.1.2 – Introdução.....	13
1.2 – Resultados.....	16
1.2.2 – Descrição macroscópica da planta.....	16
1.2.3 Anatomia da lâmina foliar - descrição microscópica.....	18
1.3 – Discussão.....	21
1.4 – Parte Experimental.....	22
1.5 – Conclusões.....	23
CAPÍTULO 2- Estudo fitoquímico de <i>Maytenus imbricata</i>	
2.1 - Determinação estrutural das substâncias e misturas isoladas de folhas, galhos e caule de <i>Maytenus imbricata</i>	24
G1: Mistura de pró-antocianidinas.....	25
G2: 3-Oxo-lup-20(29)-en-30-al.....	25
G3: Mistura de 3-oxo-lup-20(29)-en-30-al, 11 α -hidroxi-lup- 20(29)-en-3-ona, 30-hidroxi-lup-20(29)-en-3-ona.....	38
G4: 30-Hidroxi-lup-20(29)-en-3-ona.....	39
G5: 11 α -Hidroxi-lup-20(29)-en-3-ona.....	49
G6, F5: 3 β ,30-Di-hidroxi-lup-20(29)-eno.....	38
G7: Mistura de 30-hidroxi-lup-20(29)-en-3-ona e 11 α -hidroxilup-20(29)-en-3-ona.....	69
G8: Lupenona.....	73
G9, F2, F7: Friedelina.....	76

G10: 1-Hidroxi-3,6-dimetoxi-8-metil-9-xantona (liquexantona).....	81
G11: 3 β -Esteariloxi-lupan-20(29)-eno.....	91
F1: Galactitol (Dulcitol).....	99
F3, F4, F8: Mistura de friedelinol e friedelina.....	103
F6: Mistura de ésteres de cadeia longa.....	108
F9, F10: Ácido 3,4-seco-friedelan-3-óico.....	110
F12: Epicatequina.....	120
F13: Óleo essencial das folhas.....	128
Se1 e Se2: Óleo das sementes e do elaiosoma.....	129
Compostos identificados por CG-EM nos extratos de <i>M. imbricata</i>	130
2.2 – Parte Experimental.....	131
2.2.1 - Métodos Gerais.....	131
2.2.2- Estudo Fitoquímico de <i>Maytenus imbricata</i>	132
2.2.3- Preparação dos extratos dos galhos e caule de <i>Maytenus imbricata</i> (IGH).....	133
2.2.3.1. - Elaboração do sólido obtido na remoção do solvente do extrato hexânico dos galhos e caule de <i>M. imbricata</i> (IGHS).....	134
2.2.3.2. - Elaboração do extrato hexânico dos galhos e caule de <i>Maytenus imbricata</i> (IGH).....	138
2.2.3.3. - Elaboração do sólido obtido na remoção do solvente do extrato em acetato de etila dos galhos e caule de <i>Maytenus imbricata</i> (G1).....	140
2.2.4 - Preparação dos extratos das folhas de <i>M. imbricata</i> (IFH).....	140
2.2.4.1. - Elaboração do sólido obtido na remoção do solvente do extrato hexânico das folhas de <i>M. imbricata</i> (IFHS).....	141
2.2.4.2. - Elaboração do extrato hexânico das folhas de <i>Maytenus imbricata</i> (IFH).....	141
2.2.4.3. - Elaboração do extrato clorofórmico das folhas de <i>M. imbricata</i> (IFCI).....	148
2.2.4.4. - Elaboração do extrato em acetato de etila das folhas de <i>M. imbricata</i> (IFAc).....	149
2.2.4.5. - Elaboração do extrato etanólico das folhas de <i>M. imbricata</i> (IFEt).....	154
2.3 – Análise dos extratos de <i>M. imbricata</i> por CG-EM.....	155
2.4 – Obtenção do óleo essencial das folhas de <i>M. imbricata</i> (F13).....	156
2.5 – Obtenção do óleo das sementes (Se1) e elaiosoma (Se2) de <i>M. imbricata</i>	156
2.6 – Dados físico-químicos das substâncias e misturas isoladas de <i>M. imbricata</i>	158

CAPÍTULO 3- Transformações químicas

3.1 – Transformações químicas realizadas com a Friedelina.....	171
3.1.1 – Introdução.....	171
3.2 – Resultados e Discussão.....	172
3.3 – Parte Experimental.....	180
3.3.1 – Métodos Gerais.....	180

3.3.2 – Obtenção de Friedelina.....	180
3.3.3 – Obtenção da Friedelinolactona (Reação de Bayer-Villiger).....	180
3.3.4 – Reação com MeONa.....	180

CAPÍTULO 4- Análise Cristalográfica

4.1 - Isolamento e cristalização de G4 [30-hidroxi-lup-20(29)-en-3-ona].....	181
4.1.1 - Análise cristalográfica por difração de raios-X.....	182
4.1.2- Resultados e discussões.....	182
4.2 - Isolamento e cristalização de G5 [11 α -hidroxi-lup-20(29)-en-3-ona].....	185
4.2.1 - Análise cristalográfica por difração de raios-X.....	185
4.2.2- Resultados e discussões.....	186
4.3 - Isolamento e cristalização de G6 [3 β ,30-di-hidroxi-lup-20(29)-eno].....	187
4.3.1 - Análise cristalográfica por difração de raios-X.....	187
4.3.2- Resultados e discussões.....	188

CAPÍTULO 5- Avaliação das atividades antioxidante, herbicida e tripanocida de *M. Imbricata*

5.1 - Avaliação da atividade antioxidante de <i>M. imbricata</i>	191
5.1.1 – Introdução.....	191
5.1.2- Análise dos resultados e discussão.....	192
5.1.2.1 – Contéudo de fenólicos totais.....	192
5.1.2.2 – Atividade de retirada de radical (DPPH) e poder redutor dos extratos de <i>M. imbricata</i>	193
5.1.2.3 – Atividade de retirada de radical (DPPH) e poder redutor de compostos isolados de <i>M. imbricata</i>	197
5.1.3 - Parte Experimental.....	198
5.1.3.1 – Métodos Gerais.....	198
5.1.3.2 – Determinação de fenólicos totais.....	198
5.1.3.3 – Atividade de retirada de radical (ARR) usando o método DPPH.....	199
5.1.3.4 – Poder redutor (PR).....	199
5.1.4- Análises estatísticas	199
5.1.5- Conclusão.....	200
5.2 - Avaliação da atividade inibitória da síntese de ATP.....	200
5.2.1 – Introdução.....	200
5.2.2- Análise dos resultados e discussão	203
5.2.2.1 – Inibição da síntese de ATP.....	203
5.2.2.2 – Efeito do ácido 3,4-seco-friedelan-3-óico sobre o transporte de elétrons.....	204
5.2.2.3 – Determinação da fluorescência da clorofila A.....	206
5.2.2.4 – Atividade da enzima Mg ²⁺ -ATPase.....	207
5.2.3- Parte Experimental.....	208
5.2.3.1 – Métodos Gerais.....	208

5.2.3.2 – Isolamento de cloroplastos e determinação da concentração de clorofila.....	209
5.2.3.3 – Medida da síntese de ATP e determinação do fluxo de elétrons.....	209
5.2.3.4 – Determinação de reações parciais.....	210
5.2.3.5 – Determinação da fluorescência da clorofila A.....	211
5.2.3.6 – Atividade da enzima Mg ²⁺ ATPase.....	211
5.2.4- Conclusão.....	211
5.3 - Avaliação da Atividade tripanocida de <i>Maytenus imbricata</i>	212
5.3.1 – Introdução.....	212
5.3.2- Análise dos resultados e discussão	213
5.3.2.1 – Atividade tripanocida <i>in vitro</i> de <i>Maytenus imbricata</i>	213
5.3.3- Parte Experimental	214
5.3.3.1 – Avaliação da atividade de <i>M. imbricata</i> sobre o crescimento de <i>T. cruzi</i>	214
5.3.4- Conclusão	214
CONCLUSÃO	215
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	217

ÍNDICE DE ESQUEMAS

CAPÍTULO 2- Estudo fitoquímico de *Maytenus imbricata*

Esquema 2.1: Prováveis caminhos de fragmentação de G2 [3-oxo-lup-20(29)-en-30-al]	37
Esquema 2.2: Prováveis caminhos de fragmentação de G4 [30-hidroxi-lup-20(29)-en-3-ona].....	45
Esquema 2.3: Fragmentações importantes observadas de G10 (1-hidroxi-3,6-dimetoxi-8-metil-9-xantona)	90
Esquema 2.4: Prováveis caminhos de fragmentação de F1 (dulcitol)	102
Esquema 2.5: Prováveis caminhos de fragmentação de F9 (ácido 3,4 seco-friedelan-3-óico)	118

CAPÍTULO 3- Transformações químicas

Esquema 3.1: Mecanismo geral da reação de Bayer-Villiger.	172
Esquema 3.2: Obtenção de friedelina a partir da reação de oxidação da mistura friedelina + friedelinol	173
Esquema 3.3: Tentativa de obtenção do éster metílico do ácido 3,4-seco-friedelan-3-óico a partir da friedelina	173

ÍNDICE DE FIGURAS

INTRODUÇÃO

Figura 1: Rota biossintética simplificada dos terpenos	10
Figura 2: Rota biossintética simplificada dos triterpenos e esteróides.....	11

CAPÍTULO 1- Estudo anatômico de *Maytenus imbricata*

Figura 1.1: Representação esquemática da espécie <i>Maytenus imbricata</i>	14
Figura 1.2: Fotos de <i>Maytenus imbricata</i> : a) aspecto geral da planta, salientando o crescimento em touceiras; b) folhas; c) fruto capsular e bivalvar e d) flor.....	17
Figura 1.3: Cortes transversais da folha de <i>Maytenus imbricata</i> : 1.3A – detalhe da nervura central evidenciando o feixe vascular envolvido por esclereídes (Es). 1.3B – detalhe da epiderme abaxial (AB), estômatos (es), parênquima lacunoso (pl) e cutícula (ct). 1.3C – detalhe da epiderme adaxial (AD) e dos estômatos (es), células guarda (cg) e câmara subestomática (cs).....	19
Figura 1.4: Cortes transversais da folha de <i>Maytenus imbricata</i> : 1.4A - detalhe da nervura lateral evidenciando o feixe vascular envolvido por esclereídes. 1.4B - nervura, detalhe do feixe vascular. 1.4C- detalhe do mesofilo: as esclereídes (Es), cristais (cr) e idioblastos (id) contendo compostos fenólicos	20

CAPÍTULO 2- Estudo fitoquímico de *M. imbricata*.

Figura 2.1: Espectro de G1 [mistura de pró-antocianidinas] obtido no IV (KBr, cm^{-1}).....	26
Figura 2.2: Cromatograma de G1 analisado por CLAE.....	26
Figura 2.3: Espectro de G2 [3-oxo-lup-20(29)-en-30-al] obtido no IV (KBr, cm^{-1}).....	27
Figura 2.4: Espectro de RMN de ^1H de G2 [3-oxo-lup-20(29)-en-30-al] (CDCl_3 ; 400 MHz). Em destaque ampliação da região entre δ_{H} 1,56 e 0,83.....	28
Figura 2.5: Espectro de RMN de ^{13}C de G2 [3-oxo-lup-20(29)-en-30-al] (CDCl_3 ; 100 MHz). Em destaque ampliação da região entre δ_{C} 55,06 e 14,39.....	29
Figura 2.6: Subespectro DEPT-135 de G2 [3-oxo-lup-20(29)-en-30-al] (CDCl_3 ; 100 MHz). Em destaque ampliação da região entre δ_{C} 54,99 e 14,39....	30
Figura 2.7: Mapa de contornos HMQC de G2 [3-oxo-lup-20(29)-en-30-al] (CDCl_3 ; 400 MHz). B- Seção expandida da região entre δ_{H} 0,5 e 2,6.....	32
Figura 2.8: Mapa de contornos HMBC de G2 [3-oxo-lup-20(29)-en-30-al] (CDCl_3 ; 400 MHz). B - Seção expandida da região entre δ_{H} 0,5 e 3,5.....	33
Figura 2.9: Mapa de contornos NOESY de G2 [3-oxo-lup-20(29)-en-30-al] (CDCl_3 ; 400 MHz).....	34
Figura 2.10: Seção expandida do mapa de contornos NOESY de G2 [3-oxo-lup-20(29)-en-30-al] (CDCl_3 ; 400 MHz), região entre δ_{H} 3,0 e 0,83.....	34
Figura 2.11: Espectro de Massas de G2 [3-oxo-lup-20(29)-en-30-al].....	37
Figura 2.12: Espectro de G3 [mistura de 3-oxo-lup-20(29)-en-30-al, 11 α -hidroxilup-20(29)-en-3-ona, 30-hidroxi-lup-20(29)-en-3-ona] obtido no IV (KBr, cm^{-1}).....	38
Figura 2.13: Espectro de G4 [30-hidroxi-lup-20(29)-en-3-ona] obtido no IV (KBr, cm^{-1}).....	40
Figura 2.14: Espectro de RMN de ^1H de G4 [30-hidroxi-lup-20(29)-en-3-ona] (CDCl_3 ; 400 MHz). Em destaque ampliação da região entre δ_{H} 1,07 e 0,79.....	41
Figura 2.15: Espectro de RMN de ^{13}C de G4 [30-hidroxi-lup-20(29)-en-3-ona] (CDCl_3 ; 100 MHz). Em destaque ampliação da região entre δ_{C} 65,01 e 14,46.....	42
Figura 2.16: Subespectro DEPT-135 de G4 [30-hidroxi-lup-20(29)-en-3-ona] (CDCl_3 ; 100 MHz).....	43

Figura 2.17: Espectro de massas de G4 [30-hidroxi-lup-20(29)-en-3-ona].....	44
Figura 2.18: Mapa de contornos HMQC de G4 [30-hidroxi-lup-20(29)-en-3-ona] (CDCl ₃ ; 400 MHz). Em destaque ampliação da região entre δ_H 0,8 e 1,5.....	46
Figura 2.19: Mapa de contornos HMBC de G4 [30-hidroxi-lup-20(29)-en-3-ona] (CDCl ₃ ; 400 MHz). Em destaque ampliação da região entre δ_H 0,8 e 5,0.....	47
Figura 2.20: Seção expandida do mapa de contornos HMBC de G4 [30-hidroxi-lup-20(29)-en-3-ona] (CDCl ₃ ; 400 MHz), da região entre δ_H 0,96 e 1,14.....	48
Figura 2.21: Espectro de G5 [11 α -hidroxilup-20(29)-en-3-ona] obtido no IV (KBr, cm ⁻¹).....	49
Figura 2.22: Espectro de RMN de ¹ H de G5 [11 α -hidroxilup-20(29)-en-3-ona] (CDCl ₃ ; 400 MHz). Em destaque ampliação da região entre δ_H 1,69 e 0,77.....	54
Figura 2.23: Espectro de RMN de ¹³ C de G5 [11 α -hidroxilup-20(29)-en-3-ona] (CDCl ₃ ; 100 MHz). Em destaque ampliação da região entre δ_C : 70,49 e 14,42.....	55
Figura 2.24: Subespectro DEPT-135 de G5 [11 α -hidroxilup-20(29)-en-3-ona] (CDCl ₃ ; 100 MHz). Em destaque ampliação da região entre δ_C 54,85 e 34,19.....	56
Figura 2.25: Mapa de contornos HMQC de G5 [11 α -hidroxilup-20(29)-en-3-ona] (CDCl ₃ ; 400 MHz). Em destaque ampliação da região entre δ_H 0,5 e 3,0.....	57
Figura 2.26: Seção expandida do mapa de contornos HMQC de G5 [11 α -hidroxilup-20(29)-en-3-ona] (CDCl ₃ ; 400 MHz), região entre δ_H 1,69 e 0,79..	58
Figura 2.27: Seção expandida do mapa de contornos HMBC de G5 [11 α -hidroxilup-20(29)-en-3-ona] (CDCl ₃ ; 400 MHz) entre: A) δ_H 2,67 e 0,79, B) δ_H 4,2 e 3,8 e C) δ_H 1,69 e 0,79.....	59
Figura 2.28: Mapa de contornos NOESY de G5 [11 α -hidroxilup-20(29)-en-3-ona] (CDCl ₃ ; 400 MHz). B- Seção expandida entre δ_H 0,79 e 2,5....	60
Figura 2.29: Mapa de contornos COSY de G5 [11 α -hidroxilup-20(29)-en-3-ona] (CDCl ₃ ; 400 MHz). Em destaque ampliação da região entre δ_H 4,75 e 3,90.....	61

Figura 2.30: Conformações possíveis de G5 [11 α -hidroxilup-20(29)-en-3-ona] mostrando os hidrogênios olefínicos.....	52
Figura 2.31: Espectro de G6 [3 β ,30-di-hidroxi-lup-20(29)-eno] obtido no IV (KBr, cm ⁻¹).....	62
Figura 2.32: Espectro de RMN de ¹ H de G6 [3 β ,30-di-hidroxi-lup-20(29)-eno] (CDCl ₃ ; 200 MHz). Em destaque ampliação entre: A) δ_H 1,07 e 0,75, B) δ_H 2,2 e 2,0 e C) δ_H 4,0 a 3,25.....	65
Figura 2.33: Espectro de RMN de ¹³ C de G6 [3 β ,30-di-hidroxi-lup-20(29)-eno] (CDCl ₃ ; 50 MHz).....	66
Figura 2.34: Subespectro DEPT-135 de G6 [3 β ,30-di-hidroxi-lup-20(29)-eno] (CDCl ₃ ; 50 MHz).....	66
Figura 2.35: Mapa de contornos HSQC de G6 [3 β ,30-di-hidroxi-lup-20(29)-eno] (CDCl ₃ ; 200 MHz).....	67
Figura 2.36: Mapa de contornos HMBC de G6 [3 β ,30-di-hidroxi-lup-(29)-eno] (CDCl ₃ ; 200 MHz). Em destaque ampliação da região entre δ_H 0,5 e 3,5.....	68
Figura 2.37: Espectro de G7 [mistura de 30-hidroxi-lup-20(29)-en-3-ona e 11 α -hidroxilup-20(29)-en-3-ona] obtido no IV (KBr, cm ⁻¹).....	69
Figura 2.38: Espectro de RMN de ¹ H de G7 [mistura de 30-hidroxi-lup-20(29)-en-3-ona e 11 α -hidroxilup-20(29)-en-3-ona] (CDCl ₃ ; 400 MHz). Em destaque ampliação da região entre δ_H 1,10 e 0,75.....	71
Figura 2.39: Espectro de RMN de ¹³ C de G7 [mistura de 30-hidroxi-lup-20(29)-en-3-ona e 11 α -hidroxilup-20(29)-en-3-ona] (CDCl ₃ ; 100 MHz).....	72
Figura 2.40: Subespectro DEPT-135 de G7 [mistura de 30-hidroxi-lup-20(29)-en-3-ona e 11 α -hidroxilup-20(29)-en-3-ona] (CDCl ₃ ; 100 MHz).....	72
Figura 2.41: Espectro de G8 [lupenona] obtido no IV (KBr, cm ⁻¹).....	73
Figura 2.42: Espectro de RMN de ¹ H de G8 (lupenona) (CDCl ₃ ; 400 MHz). Em destaque ampliação da região entre δ_H 1,75 e 0,75.....	74
Figura 2.43: Espectro de RMN de ¹³ C de G8 (lupenona) (CDCl ₃ ; 100 MHz).....	75
Figura 2.44: Subespectro DEPT-135 de G8 (lupenona) (CDCl ₃ ; 100 MHz).....	75
Figura 2.45: Espectro de G9 (friedelina) obtido no IV (KBr, cm ⁻¹).....	77
Figura 2.46: Espectro de RMN de ¹ H de G9 (friedelina) (CDCl ₃ ; 200 MHz). Em destaque ampliação da região entre δ_H 2,43 e 0,74.....	78
Figura 2.47: Espectro de RMN de ¹³ C de G9 (friedelina) (CDCl ₃ ; 50 MHz).....	78

Figura 2.48: Subespectro DEPT-135 de G9 (friedelina) (CDCl ₃ ; 50 MHz).....	79
Figura 2.49: Espectro de Massas de G9 (friedelina).....	80
Figura 2.50: Espectro de G10 (1-hidroxi-3,6-dimetoxi-8-metil-9-xantona) (liquexantona) obtido no IV (KBr, cm ⁻¹).....	81
Figura 2.51: Espectro de RMN de ¹ H de G10 (1-hidroxi-3,6-dimetoxi-8-metil-9-xantona) (liquexantona) (CDCl ₃ ; 400 MHz). Em destaque ampliação da região entre δ_H 6,7 e 6,3.....	85
Figura 2.52: Espectro de RMN de ¹³ C de G10 (1-hidroxi-3,6-dimetoxi-8-metil-9-xantona) (liquexantona) (CDCl ₃ ; 100 MHz).....	86
Figura 2.53: Subespectro DEPT-135 de G10 (1-hidroxi-3,6-dimetoxi-8-metil-9-xantona) (liquexantona) (CDCl ₃ ; 100 MHz).....	86
Figura 2.54: Mapa de contornos HSQC de G10 (1-hidroxi-3,6-dimetoxi-8-metil-9-xantona) (liquexantona) (CDCl ₃ ; 100 MHz).....	87
Figura 2.55: Mapa de contornos HMBC e expansão de G10 (1-hidroxi-3,6-dimetoxi-8-metil-9-xantona) (liquexantona) (CDCl ₃ ; 100 MHz).....	88
Figura 2.56: Mapa de contornos NOESY de G10 (1-hidroxi-3,6-dimetoxi-8-metil-9-xantona) (liquexantona) (CDCl ₃ ; 100 MHz).....	89
Figura 2.57: Espectro de Massas G10 (1-hidroxi-3,6-dimetoxi-8-metil-9-xantona) (liquexantona).....	90
Figura 2.58: Espectro de G11 [3 β -esteariloxi-lup-20(29)-eno] obtido o IV (KBr, cm ⁻¹).....	91
Figura 2.59: Espectro de RMN de ¹ H de G11 [3 β -esteariloxi-lup-20(29)-eno] (CDCl ₃ ; 400 MHz). Em destaque ampliação da região entre δ_H 2,50 e 0,75.....	95
Figura 2.60: Espectro de RMN de ¹³ C de G11 [3 β -esteariloxi-lup-20(29)-eno] (CDCl ₃ ; 100 MHz).....	96
Figura 2.61: Subespectro DEPT-135 de G11 [3 β -esteariloxi-lup-20(29)-eno] (CDCl ₃ ; 100 MHz).....	97
Figura 2.62: Mapa de contornos HSQC de G11 [3 β -esteariloxi-lup-20(29)-eno] (CDCl ₃ ; 100 MHz).....	97
Figura 2.63: Mapa de contornos HMBC de G11 [3 β -esteariloxi-lup-20(29)-eno] (CDCl ₃ ; 100 MHz).....	98
Figura 2.64: Cromatograma de G11 [3 β -esteariloxi-lup-20(29)-eno].....	93
Figura 2.65: Espectro de massas de G11 [3 β -esteariloxi-lup-20(29)-eno].....	93
Figura 2.66: Espectro de F1 (Dulcitol) obtido no IV (KBr, cm ⁻¹).....	99

Figura 2.67: Espectro de RMN de ^1H de F1 (dulcitol) (D_2O ; 400 MHz).....	100
Figura 2.68: Espectro de RMN de ^{13}C de F1 (dulcitol) (D_2O ; 100 MHz).....	101
Figura 2.69: Subespectro DEPT-135 de F1 (dulcitol) (D_2O ; 100 MHz).....	101
Figura 2.70: Espectro de Massas (EI) de F1 (dulcitol).....	102
Figura 2.71: Espectro de F3 (friedelina+friedelinol) obtido no IV (KBr, cm^{-1}).....	103
Figura 2.72: Espectro de RMN de ^1H de F3 (friedelina + friedelinol) (CDCl_3 ; 400 MHz). Em destaque ampliação da região entre δ_{H} 0,6 e 2,4.....	106
Figura 2.73: Espectro de RMN de ^{13}C de F3 (friedelina + friedelinol) (CDCl_3 ; 100 MHz).....	107
Figura 2.74: Subespectro DEPT-135 de F3 (friedelina + friedelinol) (CDCl_3 ; 100 MHz).....	107
Figura 2.75: Espectro de F6 (mistura de ésteres de ácidos graxos) obtido no IV (NaCl).....	108
Figura 2.76: Cromatograma de F6 (mistura de ésteres de ácidos graxos) obtido por CG-EM.....	109
Figura 2.77: Espectro de F9 (ácido 3,4-seco-friedelan-3-óico) obtido no IV (KBr, cm^{-1}).....	110
Figura 2.78: Espectro de RMN de ^1H de F9 (Ácido 3,4-seco-friedelan-3-óico) (CDCl_3 ; 400 MHz). Em destaque ampliação da região entre δ_{H} 2,41 e 0,78.....	111
Figura 2.79: Espectro de RMN de ^{13}C de F9 (Ácido 3,4-seco-friedelan-3-óico) (CDCl_3 ; 100 MHz). Em destaque ampliação da região entre δ_{C} 40,00 e 17,00.....	112
Figura 2.80: Subespectro DEPT-135 de F9 (Ácido 3,4-seco-friedelan-3-óico) (CDCl_3 ; 100 MHz). Em destaque ampliação da região entre δ_{C} 40,00 e 17,00.....	113
Figura 2.81: Seção expandida do mapa de contornos HMQC de F9 (Ácido 3,4-seco-friedelan-3-óico) (CDCl_3 ; 400 MHz), região entre δ_{H} 0,5 e 2,5.....	115
Figura 2.82: Seção expandida do mapa de contornos HMBC de F9 (Ácido 3,4-seco-friedelan-3-óico) (CDCl_3 ; 400 MHz), região entre δ_{H} 0,7 e 1,7.....	116
Figura 2.83: Seção expandida do mapa de contornos HMBC de F9 (Ácido 3,4-seco-friedelan-3-óico) (CDCl_3 ; 400 MHz), região entre δ_{H} 0,6 e 2,5.....	117

Figura 2.84: Espectro de Massas de F9 (ácido 3,4-seco-friedelan-3-óico).....	118
Figura 2.85: Espectro de F12 (Epicatequina) obtido no IV (KBr, cm^{-1}).....	120
Figura 2.86: Espectro de RMN de ^1H de F12 (Epicatequina) (MeOD; 400 MHz). Em destaque ampliação das regiões entre a) δ_{H} 6,85 e 6,9; b) δ_{H} 6,7 e 6,65; c) δ_{H} 5,9 e 5,8; δ_{H} 4,0 e 4,1; δ_{H} 2,8 e 2,0.....	121
Figura 2.87: Espectro de RMN de ^{13}C de F12 (Epicatequina) (MeOD; 100 MHz)...	122
Figura 2.88: Subespectro DEPT-135 de F12 (Epicatequina) (MeOD; 100 MHz).....	123
Figura 2.89: Mapa de contornos HSQC de F12 (Epicatequina) (MeOD; 400 MHz).....	124
Figura 2.90: Mapa de contornos HMBC de F12 (Epicatequina) (MeOD; 400 MHz). Em destaque ampliação da região entre δ_{H} 8,0 e 4,0.....	125
Figura 2.91: Mapa de contornos NOESY de F12 (Epicatequina) (MeOD; 400 MHz).....	126
Figura 2.92: Seção expandida do mapa de contornos NOESY de F12 (Epicatequina), região entre δ_{H} 7,0 e 4,0 (MeOD; 400 MHz).....	127
Figura 2.93: Espectro de F13 (óleo essencial das folhas) obtido no IV (KBr, cm^{-1}).....	128
Figura 2.94: Cromatograma do óleo essencial das folhas (F13).....	128
Figura 2.95: Espectro do óleo das sementes (Se1) obtido no IV (KBr, cm^{-1}).....	129

CAPÍTULO 3- Transformações químicas

Figura 3.1: Espectro de LF-1 (friedelinolactona impura) obtido no IV (KBr, cm^{-1})....	174
Figura 3.2: Espectro de Massas de LF-1 (friedelinolactona).....	174
Figura 3.3: Espectro de RMN de ^1H de pbv2 (friedelinolactona impura) (CDCl_3 , 100 MHz).....	175
Figura 3.4: Espectro de RMN de ^{13}C pbv2 (friedelinolactona impura) (CDCl_3 , 400 MHz). Em destaque ampliação da região entre δ_{C} 29,7 e 57,0 (CDCl_3 , 100 MHz).....	176
Figura 3.5: Subespectro DEPT-135 de pbv2 (friedelinolactona impura) (CDCl_3 , 100 MHz). Em destaque ampliação da região entre δ_{C} 29,72 e 41,22....	177
Figura 3.6: Espectro de Massas do produto obtido após reação da lactona com MeONa.....	178
Figura 3.7: Espectro de RMN de ^1H do produto obtido após reação da lactona com MeONa. (CDCl_3 , 300 MHz).....	179

CAPÍTULO 4- Análise cristalográfica

- Figura 4.1: Representação Mercury 1.4.1 de G4 (30-hidroxi-lup-20(29)-en-3-ona) com elipsóides a 50% de probabilidade.....182
- Figura 4.2: Vista em perspectiva de G4 30-hidroxi-lup-20(29)-en-3-ona) e representação ORTEP da estrutura molecular.....184
- Figura 4.3: Interações intermoleculares da região desordenada de G4 (30-hidroxi-lup-20(29)-en-3-ona).....185
- Figura 4.4: Vista em perspectiva de G5 (11 α -hidroxi-lup-20(29)-en-3-ona) e representação ORTEP da estrutura molecular.....186
- Figura 4.5: Interações intermoleculares de G5 (11 α -hidroxi-lup-20(29)-en-3-ona)..187
- Figura 4.6: Vista em perspectiva de G6 (3 β ,30-di-hidroxi-lup-20(29)-eno) e representação ORTEP da estrutura molecular.....188
- Figura 4.7: Vista das ligações de hidrogênio entre moléculas de G6 (3 β ,30-di-hidroxi-lup-20(29)-eno).....189

CAPÍTULO 5- Avaliação das atividades antioxidante, herbicida e tripanocida de *M. imbricata*

- Figura 5.1: Porcentagem de retirada de radical (DPPH) dos extratos em acetato de etila (EAcEtF), etanol (EEtF), em clorofórmio (ECIF) das folhas, hidroalcoólico das raízes (EHetR) e em acetato de etila dos galhos (EAcEtG) de *M. imbricata* e do padrão BHA.....194
- Figura 5.2: Estimativa de DPPH (\hat{Y}) para diferentes concentrações (c) nos extratos obtidos a partir das folhas de *M. imbricata*.....195
- Figura 5.3: Poder redutor dos extratos em etanol (EEtF), acetato de etila (EAcEtF) e clorofórmio (ECIF) das folhas, em acetato de etila (EAcEtG) dos galhos e hidroalcoólico das raízes (EHAR) de *M. imbricata*.....196
- Figura 5.4: Fotossíntese: fase clara (reações com luz) e fase escura (fixação de CO₂).....201
- Figura 5.5: Diagrama simplificado do transporte de elétrons acíclico no cloroplasto vegetal.....202
- Figura 5.6: Efeito do ácido 3,4-seco-friedelan-3-óico (F9) sobre a síntese de ATP em cloroplastos de espinafre.....203

- Figura 5.7: Efeito do ácido 3,4-seco-friedelan-3-óico (F9) sobre o transporte basal de elétrons (■), a fosforilação (●) e transporte desacoplado de elétrons (▲) transporte de elétrons em cloroplastos de espinafre...204
- Figura 5.8: Aumento na cinética da fluorescência sobre tilacóides infiltradas com 500 μM (linha ---) de ácido 3,4-seco-friedelan-3-óico. HCMU, 10 μM (linha □□□□). Tilacóides tratadas com Tris (linha ○○○○) e controle (linha —).....206
- Figura 5.9: Comparação entre a banda K acerca de 300 μs das tilacóides incubadas com 0,8 Tris (°) e tilacóides tratadas com 500 μM de ácido 3,4-seco-friedelan-3-óico (%).....207

ÍNDICE DE FLUXOGRAMAS

Fluxograma 2.1: Preparação dos extratos dos galhos + caule de <i>Maytenus imbricata</i>	133
Fluxograma 2.2: Elaboração do precipitado IGHs obtido a partir dos galhos e caule de <i>Maytenus imbricata</i>	136
Fluxograma 2.3: Elaboração da fração 12-14 obtida na CC do precipitado IGHs.....	137
Fluxograma 2.4: Elaboração da fração 15-23 obtida na CC do precipitado IGHs.....	137
Fluxograma 2.5: Elaboração do extrato hexânico (IGH) dos galhos e caule de <i>M. imbricata</i>	139
Fluxograma 2.6: Preparação dos extratos das folhas de <i>Maytenus imbricata</i>	140
Fluxograma 2.7: Elaboração do IFHs obtido durante a remoção do solvente do extrato hexânico das folhas de <i>M. imbricata</i>	142
Fluxograma 2.8: Elaboração do extrato hexânico das folhas de <i>M. imbricata</i>	146
Fluxograma 2.9: Elaboração da fração 18-19 obtida na CC do IFH.....	147
Fluxograma 2.10: Elaboração da fração 22-39 obtida na CC do IFH	147
Fluxograma 2.11: Elaboração da fração 20-21 obtida na CC do IFH.....	148
Fluxograma 2.12: Elaboração da fração 28-115 obtida na CC do IFH.....	148
Fluxograma 2.13: Elaboração do extrato em acetato de etila das folhas de <i>M. imbricata</i>	152
Fluxograma 2.14: Elaboração da fração 17-19 obtida na CC do IFAcE.....	153
Fluxograma 2.15: Elaboração da fração 36-40 obtida na CC do IFAcE.....	153
Fluxograma 2.16: Elaboração da fração 53-55 obtida na CC do IFAcE.....	154
Fluxograma 2.17: Elaboração do extrato etanólico das folhas de <i>M. imbricata</i>	154
Fluxograma 2.18: Procedimento empregado na extração do óleo essencial das folhas de <i>Maytenus imbricata</i>	156

Fluxograma 2.19: Procedimento empregado na extração do óleo das sementes de <i>Maytenus imbricata</i>	157
Fluxograma 2.20: Procedimento empregado na extração do óleo do elaiosoma que envolve as sementes de <i>Maytenus imbricata</i>	157

ÍNDICE DE TABELAS

INTRODUÇÃO

Tabela 1: Espécies do gênero <i>Maytenus</i> , classes de compostos isolados e atividade exibida.....	6
---	---

CAPÍTULO 2 – Estudo fitoquímico de *Maytenus imbricata*.

Tabela 2.1: Substâncias isoladas de <i>Maytenus imbricata</i>	24
Tabela 2.2: Atribuição dos sinais de RMN de ^{13}C e RMN de ^1H para G2 [3-oxo-lup-20(29)-en-30-al] e comparação com lup-20(29)-en-30-al-3-ol (I) e lup-20(29)-en-30-ol-3-ona (II).....	36
Tabela 2.3: Substâncias identificadas por CG-EM na amostra G3.....	39
Tabela 2.4: Atribuição dos sinais de RMN de ^{13}C e RMN de ^1H para G4 [30-hidroxi-lup-20(29)-en-3-ona].....	45
Tabela 2.5: Atribuição dos sinais de RMN de ^{13}C e RMN de ^1H para G5 [11 α -hidroxi-lup-20(29)-en-3-ona].....	53
Tabela 2.6: Atribuição dos sinais de RMN de ^{13}C para G6 [3 β ,30-di-hidroxi-lup-20(29)-eno].....	64
Tabela 2.7: Atribuição dos sinais de RMN de ^{13}C para G7 [mistura de 11 α -hidroxi-lup-20(29)-en-3-ona e 30-hidroxi-lup-20(29)-en-3-ona].....	70
Tabela 2.8: Atribuição dos sinais de RMN de ^{13}C G8 (lupenona).....	76
Tabela 2.9: Atribuição dos sinais de RMN de ^{13}C de G9 (friedelina).....	80
Tabela 2.10: Atribuição dos sinais de RMN de ^{13}C e de ^1H para G10 (1-hidroxi-3,6-dimetoxi-8-metil-9-xantona) (liquexantona).....	84
Tabela 2.11: Comparação dos sinais de carbono e hidrogênio de G11 [3 β -Esteariloxi-lupan-20(29)-eno] com dados da literatura.....	94

Tabela 2.12: Atribuição dos sinais de RMN de ^{13}C para F3 (Friedelina e Friedelinol) e comparação com os dados da literatura.....	105
Tabela 2.13: Dados obtidos por CG-EM para F6 e padrões de ésteres de ácidos graxos (C14:0, C16:0, C18:0, C18:1, C18:3, C20:0).....	109
Tabela 2.14: Comparação dos sinais de RMN de ^{13}C de F9 (Ácido 3,4-seco-friedelan-3-óico) com os dados da literatura.....	119
Tabela 2.15: Atribuição dos sinais de RMN de ^{13}C para F12 (Epicatequina).....	127
Tabela 2.16: Principais compostos dos óleos de sementes (S) e elaiosoma (E) extraídos com hexano (OSH), (OEH) e CHCl_3 (OSC), (OEC) de <i>Maytenus imbricata</i>	130

CAPÍTULO 4 – Análise cristalográfica

Tabela 4.1: Dados cristalográficos obtidos dos triterpenos lupânicos isolados de <i>M. imbricata</i>	190
--	-----

CAPÍTULO 5 – Avaliação das atividades antioxidante, herbicida e tripanocida de *M. imbricata*

Tabela 5.1: Rendimento dos extratos e conteúdo de fenólicos totais em extratos e compostos isolados de <i>Maytenus imbricata</i>	192
Tabela 5.2: DPPH e poder redutor (PR) dos extratos das folhas de <i>M. imbricata</i> ...	193
Tabela 5.3: Comparação da atividade antioxidante dos extratos a 100 ppm, com os padrões BHA e AG (100 ppm) para a atividade de retirada de radical (DPPH).....	194
Tabela 5.4: Comparação da atividade antioxidante dos extratos das folhas a 100 ppm com os padrões BHA e AG (100 ppm) para o poder redutor.....	196
Tabela 5.5: Efeito do ácido 3,4-seco-friedelan-3-óico (F9) sobre o transporte desacoplado de elétrons no fotossistema FSII da água para DCPIP, da água para SiMo e do DPC para DCPIP e no fotossistema FSI do DCPIP para MV, da TMQH_2 para MV.....	205
Tabela 5.6: Efeito do aumento das concentrações do ácido 3,4-seco-friedelan-3-óico e do NH_4Cl sobre a atividade da Mg^{2+} ATPase.....	208
Tabela 5.7: Atividade tripanocida <i>in vitro</i> de <i>M. imbricata</i> sobre formas de <i>T. cruzi</i> cepa y.....	214

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

δ	Deslocamento químico
λ	Comprimento de onda
ν	estiramento
AcE	Acetato de etila
ATP	Adenosina trifosfato
ax	Axial
CC	Cromatografia em coluna
CCD	Cromatografia em camada delgada
CCDP	Cromatografia em camada delgada preparativa
CG	Cromatografia gás-líquido
CG-EM	Cromatografia gás-líquido acoplado a espectrometria de Massas
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
CL	Clorofórmio
clp	cloroplasto
COSY	<i>“Correlated spectroscopy”</i>
d	Dupleto
DEPT	<i>“Distortionless enhancement by polarization transfer”</i>
Eq	Equatorial
EE	Éter etílico
EM	Espectrometria de Massas
Et	Etanol
eV	elétron Volt
Fig.	Figura
H	Hexano
HMBC	<i>“Heteronuclear multiple bond correlation”</i>
HMQC	<i>“Heteronuclear multiple quantum correlation”</i>

Hz	Hertz
IFAc	Extrato em acetato de etila das folhas de <i>Maytenus imbricata</i>
IFCI	Extrato clorofórmico das folhas de <i>Maytenus imbricata</i>
IFEt	Extrato etanólico das folhas de <i>Maytenus imbricata</i>
IFH	Extrato hexânico das folhas de <i>Maytenus imbricata</i>
IFHs	Sólido obtido durante a preparação do extrato hexânico das folhas de <i>Maytenus imbricata</i>
IGAc	Extrato em acetato de etila dos galhos de <i>Maytenus imbricata</i>
IGEt	Extrato etanólico dos galhos de <i>Maytenus imbricata</i>
IGH	Extrato hexânico dos galhos de <i>Maytenus imbricata</i>
IGHs	Sólido obtido durante a preparação extrato hexânico dos galhos de <i>Maytenus imbricata</i>
IV	Infravermelho
<i>J</i>	Constante de acoplamento escalar
LB	Liebermann Burchard
LIT	“Liver Infusion Tryptose”
<i>m</i>	Multiplete
<i>m/z</i>	Razão massa/carga elétrica do fragmento
MeOH	Metanol
MeOD	Metanol deuterado (CD ₃ OD)
MHz	Mega Hertz
MM	Massa molar
NOESY	“ <i>Nuclear overhauser enhancement spectroscopy</i> ”
Pág.	Página
PBS	“Phosphate buffer-saline”
PF	Ponto de fusão
RMN de ¹ H	Ressonância magnética nuclear de hidrogênio
RMN de ¹³ C	Ressonância magnética nuclear de carbono-13
<i>s</i>	Simpleto
<i>t</i>	Tripleto
THF	Tetrahidrofurano
TMS	Tetrametilsilano
T _R	Tempo de retenção

TTPC Triterpeno pentacíclico

UV Ultravioleta

RESUMO

Neste trabalho, foram estudados folhas, galhos e sementes de *Maytenus imbricata* cuja constituição química e atividade farmacológica até o momento não têm sido relatadas na literatura.

Do extrato hexânico das folhas e dos galhos de *Maytenus imbricata* foram isolados e identificados 3-oxo-lup-20(29)-en-30-al, 30-hidroxi-lup-20(29)-en-3-ona, 11 α -hidroxi-lup-20(29)-en-3-ona, 3 β ,30-di-hidroxi-lup-20(29)-eno, lupenona, 3 β -esteariloxi-lupan-20(29)-eno, friedelina, ácido 3,4-seco-friedelan-3-óico e 1-hidroxi-3,6-dimetoxi-8-metil-9-xantona. Também foram identificadas misturas de friedelina e friedelinol, misturas de ésteres de ácidos graxos e misturas dos lupanos citados anteriormente.

O extrato clorofórmico das folhas foi analisado por CG-EM, detectando a presença de ácido palmítico e de ácido esteárico, como constituintes principais.

Do extrato em acetato de etila obtido de folhas e galhos foram isolados epicatequina e uma mistura de proantocinidinas. Também foram identificados por CG-EM, ácido palmítico, ácido adípico, o açúcar sorbitol e os hidrocarbonetos de cadeia longa *n*-octadecano e eicosano.

Na obtenção do extrato etanólico dos galhos observou-se a precipitação de dulcitol, um poliol isolado comumente de espécies da família Celastraceae. A análise por CG-EM do extrato etanólico dos galhos e folhas possibilitou a identificação dos açúcares glicopiranosose e sorbitol, bem como dos ácidos adípico e eicosanóico.

O óleo essencial isolado das folhas apresentou como constituintes β -pineno, 2-feniltridecano, 3-feniltridecano e hexanodioato de dioctila.

Nas sementes e no elaiosoma foram identificados principalmente ésteres de ácidos graxos, predominando ésteres dos ácidos oléico, esteárico e palmítico.

Para a obtenção e caracterização dos constituintes de *Maytenus imbricata* foram utilizadas técnicas cromatográficas (CCD, CG-EM, CLAE) e métodos espectrométricos de análise (IV, RMN de ^1H e de ^{13}C , incluindo experimentos DEPT-135 e de 2D).

A análise cristalográfica por difratometria de raios-X foi utilizada como um recurso para confirmação da estrutura e conformação molecular dos lupanos 30-hidroxi-lup-20(29)-en-3-ona, 11 α -hidroxi-lup-20(29)-en-3-ona e 3 β ,30-di-hidroxi-lup-20(29)-eno.

O estudo da anatomia foliar possibilitou verificar que caracteres comuns a outras espécies do gênero *Maytenus* estão presentes em *M. imbricata*, como esclereídes e cutícula espessa, idioblastos contendo compostos fenólicos, cristais de oxalato de cálcio e ausência de tricomas.

A friedelina foi submetida à reação de Bayer-Villiger e a lactona correspondente foi obtida.

Extratos e substâncias isolados de *M. imbricata* foram submetidos a testes de avaliação da atividade antioxidante para verificar sua potencialidade como fitoterápico. O extrato em acetato de etila das folhas, etanólico, clorofórmico e hidroalcoólico das raízes, o extrato em acetato de etila dos galhos e a epicatequina mostraram resultados bastante promissores, exibindo potencial atividade antioxidante, alto conteúdo de fenólicos totais e poder redutor. O ácido 3,4-seco-friedelan-3-óico se mostrou altamente eficaz na inibição da síntese do ATP.

ABSTRACT

In this work, it was studied leaves, branches and seeds of *Maytenus imbricata*, whose chemical constitution and pharmacological activities until this moment had not been reported in literature.

From *Maytenus imbricata* leaves and branches hexane extracts were isolated and identified 3-oxo-lup-20(29)-en-30-al, 30-hydroxy-lup-20(29)-en-3-one, 11 α -hydroxy-lup-20(29)-en-3-one, 3 β ,30-dihydroxy-lup-20(29)-ene, lupenone, 3 β -esteariloxy-lupan-20(29)-ene, friedelin, 3,4-seco-friedelan-3-oic acid and 1-hydroxy-3,6-dimethoxy-8-methyl-9-xantone. Also it was identified mixtures of friedelin and friedelinol, fat acid esters mixtures and mixtures of the above cited lupanes.

The leave chloroform extract was analyzed by GC-MS, being detected the presence of palmitic and stearic acids like as major compounds.

From the leave and branche ethyl acetate extracts were isolated epicatechin and a mixture of proanthocyanidines. In these extracts, palmitic and adipic acids, the sugar sorbitol and the long chain hydrocarbons *n*-octadecane and eicosane, also were identified by GC-MS.

During the branches ethanolic extract preparation precipitation, of dulcitol was observed. This polyol is commonly encountered in various species of the Celastraceae family. Through GC-MS analysis in this extract was possible to identify the sugars glucopyranose and sorbitol, and adipic and eicosanoic acids.

The essential oil isolated from leaves showed as constituents: β -pinene, 2-phenyltridecane, 3-phenyltridecane and dioctyl hexanedioate.

In the seeds and elaiosome were identified mainly fat acid esters, among which predominated palmitic, stearic and oleic acids.

The constituents of *M. imbricata* were obtained and characterized by chromatographic techniques (TLC, CC, GC-MS and HPLC) and spectrometric methods (IR, ^1H and ^{13}C NMR, including DEPT-135 and 2D experiments).

The crystallographic analysis by X-ray diffractometry was used to confirm the molecular and conformational structure of the lupanes 30-hydroxy-lup-20(29)-en-3-one, 11 α -hydroxy-lup-20(29)-en-3-one and 3 β ,30-dihydroxy-lup-20(29)-ene.

By *Maytenus imbricata* foliar anatomy study was possible to verify the presence of characters commonly observed in other species of Celastraceae family, like as sclereids and thick cuticle, idioblasts with phenolic compounds, calcium oxalate crystals and absence of trichomes.

The friedelin was submitted to the Bayer-Villiger reaction and the correspondent lactone was obtained.

Extracts and substances isolated from *Maytenus imbricata* were submitted to antioxidant activity assays to evaluate its potentiality as phytotherapeutic. The leaves ethyl acetate extract, and ethanol, chloroform and hydroalcoholic extracts from roots, the branch ethyl acetate extract and epicatechin showed very promising results showing potential antioxidant activity, high total phenolic content and reductor power effect. In relation to ATP synthesis inhibition, the 3,4-seco-friedelan-3-oic acid was highly efficient.

INTRODUÇÃO GERAL

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 sendo observado em quase todas as culturas (VEIGA JÚNIOR et al., 2005).

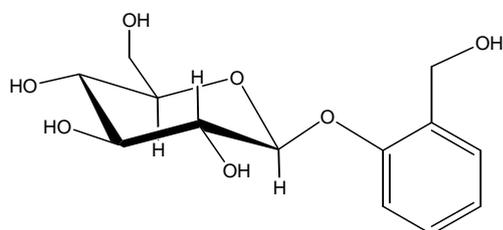
A Botânica e a Medicina eram consideradas como sendo um só campo até 1700 d.C. Registros arqueológicos que retratam desenhos de ópio feito pelos Sumérios datados de 2500 a.C. sugerem conhecimento sobre as atividades exibidas pela papoula. Outros relatos sumerianos descrevem a utilização de plantas como salgueiro e cássia com finalidades terapêuticas ([wikipedia](#), 2006a).

O código de Hammurabi datado de 1770 a.C. menciona uma série de plantas como meimendo (*Hyoscyamus niger*, *Solanaceae*), alcaçuz (*Glycyrrhiza sp.*, *Fabaceae*) e menta (*Mentha sp.*, *Lamiaceae*). Os antigos egípcios registraram muitos conhecimentos sobre o uso de plantas medicinais como a acácia, utilizada para queimaduras, a mamona como laxante e o coentro com função digestiva ([greciantiga](#), 2006).

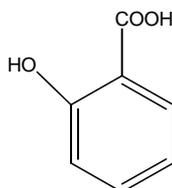
A Grécia contribuiu significativamente também para o avanço dos estudos sobre plantas medicinais. Hipócrates (460-377 a.C.), Aristóteles (384-322 a.C.) e Theophrastus (372-287 a.C.) basicamente iniciaram os estudos em Botânica. Dioscorides (ca. 40-90 d.C) escreveu cinco volumes do trabalho intitulado “Matéria Médica” que contribuiu para padronizar os trabalhos nas áreas médicas por aproximadamente 1500 anos. O livro foi seguido e aceito até o século XV, quando Paracelsus (1493-1451) elaborou a “Doutrina das Assinaturas” que possuía métodos mais objetivos de trabalho ([life](#), 2003).

No século XIX substâncias como quinina, estriquinina, morfina e efedrina foram isoladas e estudadas. Em 1838 foi isolada a salicina (1), a partir da espécie *Salix alba*, iniciando os primeiros progressos na área de síntese química, que

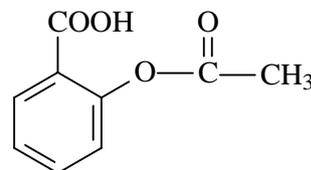
levaram em 1860 à síntese do ácido salicílico (2) e, posteriormente, do ácido acetilsalicílico (3) (HARDMAN et al., 1996). No Brasil encontram-se relatos médicos do estudo de plantas medicinais desde 1841 (ELISABETSKY, 1987).



(1) salicina

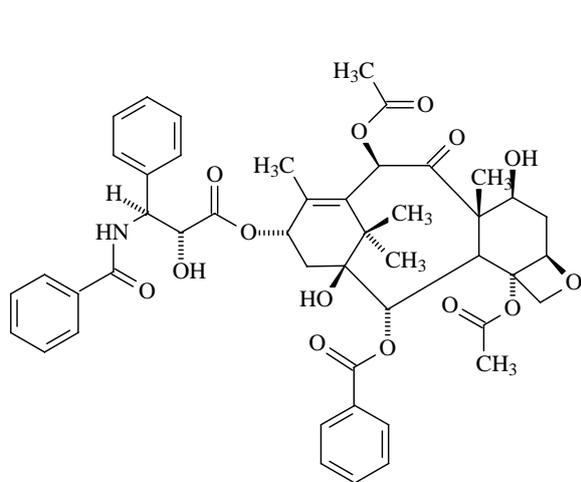


(2) ácido salicílico

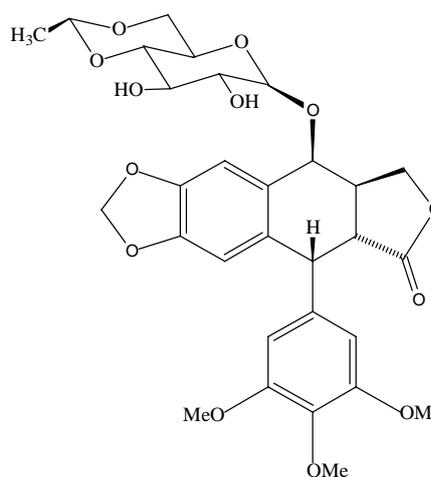


(3) ácido acetilsalicílico

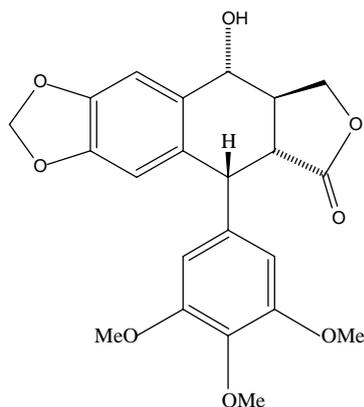
Historicamente, todas as preparações medicinais foram derivadas da natureza e, atualmente, plantas, microorganismos, organismos marinhos e insetos continuam sendo importantes fontes para o descobrimento de novos fármacos, além de atuarem no setor de nutracêuticos e na indústria de higiene pessoal e cosméticos. Como exemplos de produtos naturais utilizados pela indústria farmacêutica, podemos citar o taxol (4), um diterpenóide taxano obtido de *Taxus sp*, recentemente registrado nos EUA para tratamento de câncer ovariano. O etoposídeo (5), um composto semi-sintético obtido a partir da lignana podofilotoxina (6) que possui ação reconhecida no tratamento de carcinoma testicular, carcinoma pulmonar e leucemia não-linfocítica. A pilocarpina (7), um alcalóide usado no tratamento de glaucoma, dentre outros (BARREIRO e FRAGA, 2001).



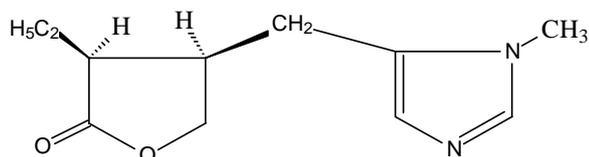
(4) taxol



(5) etoposídeo



(6) podofilotoxina



(7) pilocarpina

A Organização Mundial da Saúde (OMS) define planta medicinal como sendo “todo vegetal que possui, em um ou mais órgãos, substâncias que podem ser utilizadas com finalidades terapêuticas ou que sejam precursoras de fármacos semi-sintéticos”. Cerca de 80% da população mundial utiliza plantas medicinais de acordo com a OMS (SIMÕES et al., 2003). Estima-se também que 25.000 espécies de plantas sejam usadas nas preparações pela medicina tradicional e que mais de 365.000 espécies de plantas já conhecidas tenham sido catalogadas, o que corresponde à cerca de 60% das plantas existentes (ARAÚJO, 2003)

Cerca de 2/3 das espécies de plantas encontram-se nos trópicos. Como conseqüência, pode-se esperar que as futuras descobertas de novos produtos naturais biologicamente ativos ocorrerão em regiões de florestas tropicais.

O Brasil possui uma situação bastante privilegiada em relação à possibilidade de desenvolvimento de produtos fitoterápicos ou de obtenção de substâncias puras biologicamente ativas. O país possui cerca de 60.000 espécies de plantas, o que corresponde à cerca de 20% de toda a flora mundial conhecida e, no mínimo, 75% de todas as espécies existentes nas grandes florestas. Detém ainda em seu território populações conhecedoras das propriedades medicinais das plantas, grande parte já adaptada ao uso das mesmas para fins medicamentosos (FUNARI e FERRO, 2005). Tais atributos são significativos e mostram a importância dos estudos das plantas medicinais e como a investigação de mais espécies se faz necessária.

Embora possua uma flora com grande diversidade, pouco se conhece sobre a biodiversidade das florestas tropicais, como a da Amazônia, o que nos mostra o

quanto o estudo de plantas medicinais no Brasil ainda é fragmentário e escasso (CARLINE e RODRIGUES, 2005).

Somente cerca de 8% das espécies existentes veem sendo sistematicamente estudadas em termos de compostos bioativos e apenas 1.100 das 365.000 espécies de plantas conhecidas foram estudadas em relação às suas propriedades medicinais. Na velocidade em que ocorre o processo de extinção das espécies vegetais, um grande número de plantas com propriedades medicinais corre o risco de desaparecer antes de terem seu valor reconhecido, o que torna ainda mais urgente o avanço das pesquisas nesta área (ELISABETSKY e ETKIN, 2005).

Nos Estados Unidos e na Europa há mais controle tanto no registro quanto na comercialização e uso dos produtos obtidos de plantas. A Alemanha é o país onde se consome metade dos extratos vegetais comercializados em toda Europa (VEIGA JR. et al., 2005) e que possui uma legislação que garante ao consumidor a certeza de que está adquirindo um produto seguro e eficaz terapêuticamente.

Em 1995, o mercado europeu faturou cerca de US\$ 6,5 bilhões com a venda de fitoterápicos e, em 1999, nos Estados Unidos, 64% dos produtos comercializados continham plantas medicinais em sua composição (TRENTINI, 2000). Em 2003, o consumo mundial de fármacos de origem vegetal movimentou cerca de US\$ 21 bilhões, com previsão de crescimento para US\$ 27 bilhões em 2007 (ARAÚJO, 2003).

No Brasil, o mercado de fitoterápicos corresponde à cerca de 7% do total de medicamentos comercializados e equivale a R\$ 600 milhões/ano. Todavia, boa parte das plantas nativas utilizadas pelos brasileiros é consumida com pouca ou nenhuma comprovação de suas atividades farmacológicas, o que acarreta grandes problemas de intoxicação, devido ao uso incorreto ou a associações de plantas indevidas, constituindo um sério problema de saúde pública (VEIGA JR. et al., 2005).

Todas essas informações mostram o quanto a flora pode contribuir para o desenvolvimento e aperfeiçoamento de medicamentos para a maioria das enfermidades, bastando para isso saber explorá-la sem, contudo extinguí-la.

A família Celastraceae e o gênero *Maytenus*

Dentro do vasto universo das plantas medicinais estão as plantas da família *Celastraceae*, encontradas em sua maioria em regiões tropicais e subtropicais. São geralmente plantas cosmopolitas de portes variáveis, apresentando-se como árvores, arbustos e lianas, de caule ou tronco retorcido ou enroscado.

Compreendem cerca de 98 gêneros, onde o gênero *Maytenus*, devido ao número de espécies que abriga e aos constituintes isolados, que apresentam atividades farmacológicas (Tabela 1, pág. 6) pelo uso popular e por diversos trabalhos científicos, se destaca (SOUSA e ALMEIDA, 2005; JORGE et al., 2004; MONTANARI e BELIVACQUA, 2002).

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

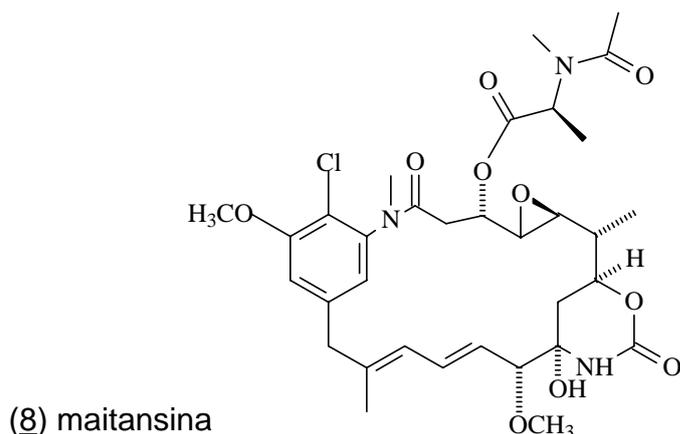
Dentre estas espécies se destacam *Maytenus ilicifolia* Mart. ex Reiss., *M. aquifolium* Mart., *M. truncata* Reiss., usadas na medicina popular principalmente no tratamento de problemas estomacais como gastrites e úlceras (LORENZI e MATOS, 2002; GONZALEZ et al., 2001; SILVA et al 2005b, MACAÚBAS et al., 1988) e como abortivas (MONTANARI e BELIVACQUA, 2002). Estas espécies são conhecidas e comercializadas como espinheira santa, espinheira divina, espinho-de-Deus, cancorosa salva-vidas, quebracillo, maiteno, espinho-santo, salva-vidas, cormilho-do-campo (PIO CORRÊA, 1926-1978).

Tabela 1: Espécies do gênero *Maytenus*, classes de compostos isolados e atividade exibida

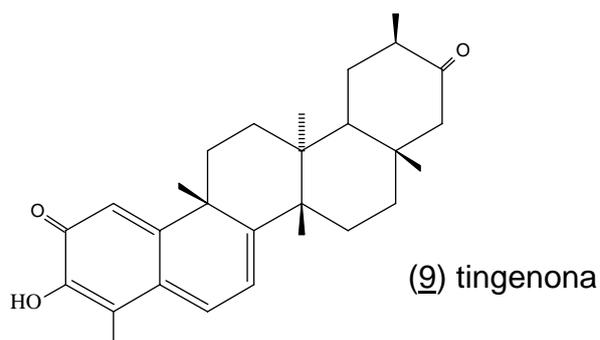
Espécies do gênero <i>Maytenus</i>	Classe de compostos	Atividade biológica
<i>Maytenus laevis</i> <i>Maytenus aquifolium</i> <i>Maytenus evonymoides</i> <i>Maytenus guianensis</i> <i>Maytenus ilicifolia</i> <i>Maytenus myrsinoides</i>	Flavonóides	Antiinflamatória
<i>Maytenus serrata</i> <i>Maytenus buchananii</i>	Maitansinóides	Antileucêmica Antitumoral
<i>Maytenus disticha</i> <i>Maytenus boaria</i>	Sesquiterpenos não alcaloídicos	Antiulcerogênica Antidiarréica Inseticida Sedativa
<i>Maytenus aquifolium</i> <i>Maytenus buchananii</i> <i>Maytenus emarginata</i> <i>Maytenus krukovii</i> <i>Maytenus ilicifolia</i>	Sesquiterpenos alcaloídicos	Inseticida Citotóxica Cicatrizante Antitumoral
<i>Maytenus senegalensis</i> <i>Maytenus macrocarpa</i> <i>Maytenus ilicifolia</i>	Triterpenos friedelânicos	Antibacteriana Antimitótica
<i>Maytenus diversifolia</i> <i>Maytenus canariensis</i>	Triterpenos oleanânicos	Antileucêmica Antibacteriana Tripanosomicida
<i>Maytenus dispermus</i> <i>Maytenus scutioides</i>	Triterpenos quinonóides	Antibacteriana Antitumoral

Além dos atributos medicinais apresentam características ornamentais em função da semelhança de suas folhas e frutos com o “azevinho” utilizado em decorações de natal do hemisfério norte, tendo por essa razão sido introduzida no paisagismo. Outros membros da família *Celastraceae*, como os do gênero *Evonymus*, *Celastrus* e *Paxistima*, são cultivados como plantas ornamentais.

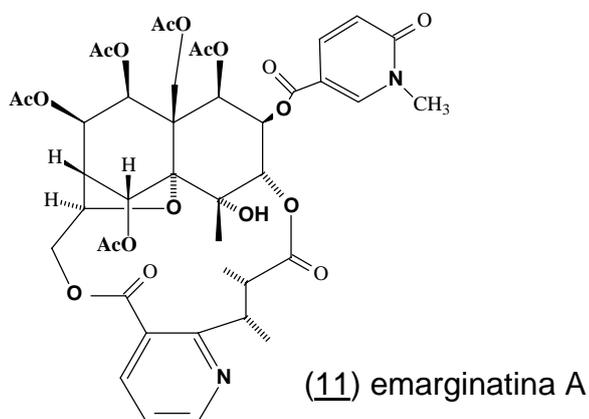
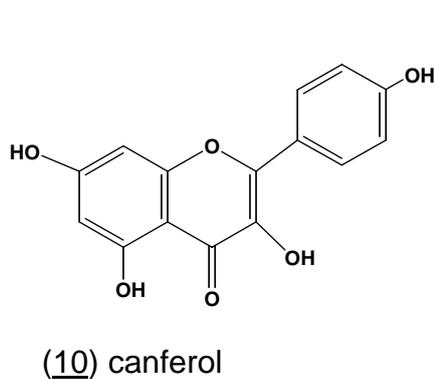
O interesse científico pela família iniciou-se com a descoberta da maitansina (8), um alcalóide ansamacrolídeo presente no lenho de plantas do gênero *Maytenus* sp. provenientes da África Oriental e que exibe atividade antitumoral (KUPCHAN et al., 1972).

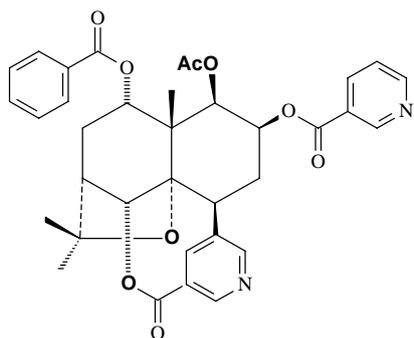


A descoberta da ação antitumoral exercida pela tingenona (9), um triterpeno quinonametídeo encontrado em diversas espécies da família *Celastraceae* também contribuiu para o aumento do interesse pela família (RAVELO et al., 2004; MARINI-BETTOLO, 1974).

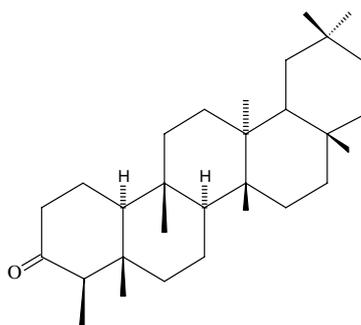


Com os avanços das pesquisas foram encontrados outros tipos de metabólitos secundários biologicamente ativos no gênero *Maytenus*, dentre os quais destacam-se flavonóides (10) (VILEGAS et al., 1999; SANNOMIYA et al., 1998), alcalóides piridínicos sesquiterpenos (11) (CORSINO et al., 1998), agarofurânicos (12), terpenóides (13) e taninos condensados (SHIROTA et al., 1994), entre outros.



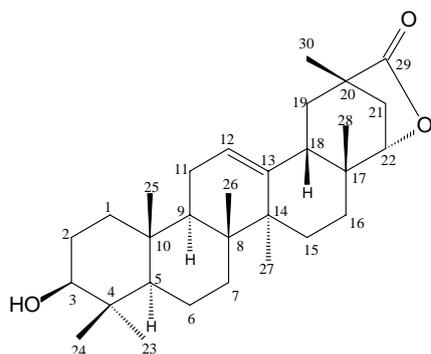


(12) heterofilina

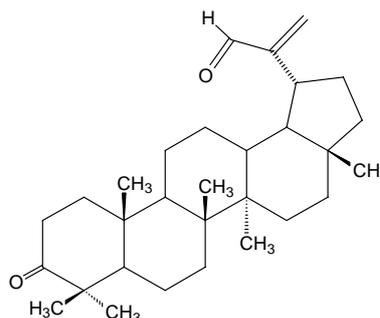


(13) friedelina

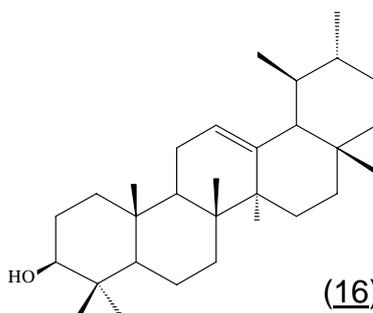
Dentre os terpenóides, os triterpenos pentacíclicos (TTPC) são as substâncias encontradas em maior abundância nas plantas da família *Celastraceae* (14, 15, 16), sendo inclusive reconhecidos como marcadores quimiotaxonômicos da família.



(14) abruslactona A



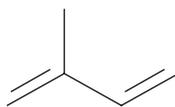
(15) 3-oxo-lup(20)29-en-30-al

(16) α -amirina

Diferentes atividades biológicas são atribuídas a triterpenos tais como antisséptica, antiasmática, antimicrobiana (ORABI et al., 2001; CORSINO et al., 1998), antiespermatogênica (VIEIRA FILHO, 2002) antiplasmódica (TAHIR e SATTI, 1999), analgésica e antiulcerogênica (GONZALEZ et al., 2001; QUEIROGA et al., 2000), inseticida (AVILLA et al., 2000), citotóxica (SHIROTA et al., 1994), antitumoral

(GONZALEZ et al., 2000), moluscicida, alelopática, antiinflamatória (BITTNER e SILVA, 1992).

Os triterpenos são compostos derivados do metabolismo do ácido mevalônico e constituídos pela reunião de unidades do isopreno (17) (também chamadas de unidades pentacarbonadas ou unidades isoprênicas (MANN, 1995).



(17)

O ácido mevalônico (21) é formado pela condensação de uma molécula de acetilcoenzima A (18) com uma molécula de acetoacetyl-CoA (19). Após a adição aldólica estereoespecífica, ocorre uma hidrólise originando a 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA (HMG-CoA) (20), que em seguida é reduzida a ácido mevalônico (21). O ácido mevalônico (21) sofre fosforilação, seguida de descarboxilação para dar origem ao pirofosfato de isopentenila ou isopreno ativo (22), que é a unidade básica na formação dos terpenos. Este sofre isomerização formando o pirofosfato de γ , γ -dimetilalila (23).

Pirofosfato de isopentenila (22) e pirofosfato de γ , γ -dimetilalila (23) reagem entre si e formam o *trans*-pirofosfato de geranila (24). Inserções posteriores de grupos pirofosfato de isopentenila levam à formação dos compostos monoterpenóides, sesquiterpenóides, diterpenóides, triterpenóides e, assim, sucessivamente (Figura 1, pág. 10).

Ligações *cabeça-cauda* entre *trans*-pirofosfato de geranila (24) e pirofosfato de isopentenila (22) resultarão pirofosfato de farnesila (25), precursor dos sesquiterpenos (C15). A reunião de pirofosfato de isopentenila (22) e pirofosfato de farnesila (25) leva à formação pirofosfato de geranilgeranila (26), precursor dos diterpenos (C20) e tetraterpenos (carotenóides) (Figura 1, pág.10). Ligações *cabeça-cabeça* entre duas moléculas de pirofosfato de farnesila (25) formarão o esqualeno, precursor dos triterpenos e esteróides (SIMÕES et al., 2003) (Figura 2, pág. 11).

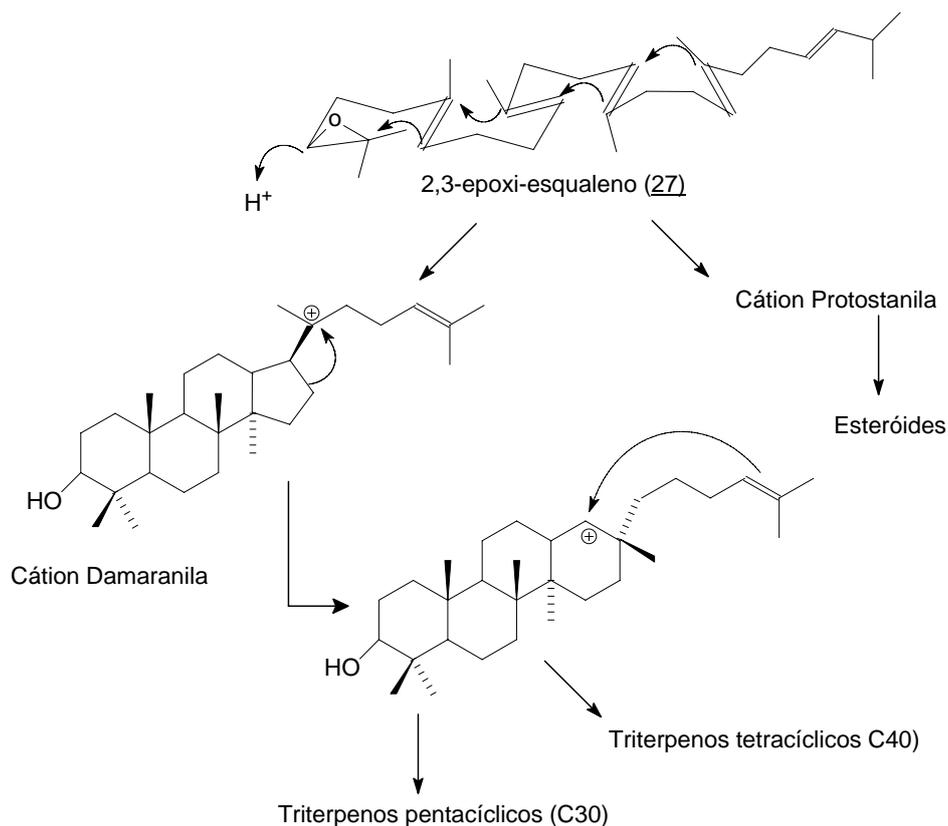


Figura 2: Rota biossintética simplificada dos triterpenos e esteróides (SIMÕES et al., 2003).

Proposta deste trabalho

Em abordagem fitoquímica preliminar desenvolvida anteriormente no NEPLAM foi isolado e caracterizado o triterpeno 30-hidroxi-lup-(20)29-en-3-ona a partir dos galhos de *Maytenus imbricata* (BRITTO et al., 1992). A diversidade de metabólitos secundários ativos e as atividades farmacológicas encontradas em outras espécies da família e do gênero, associados à inexistência de informações na literatura sobre *Maytenus imbricata*, levaram a continuidade dos estudos desta espécie.

O trabalho descrito nesta tese consistiu na realização de estudos anatômicos da folha, fitoquímicos de folhas, galhos e caule de *Maytenus imbricata*, bem como a avaliação de atividades biológicas em extratos, misturas e substâncias isoladas desta espécie. Testes farmacológicos foram realizados para avaliação das atividades antioxidante, de inibição da síntese de ATP e tripanocida dando

continuidade ao estudo das relações entre constituição química e propriedades biológicas da família *Celastraceae*. Realizou-se ainda a análise da composição química do óleo essencial obtido das folhas e do óleo obtido das sementes e do elaiosoma, uma estrutura nutritiva que reveste a semente e que é utilizada como alimento por diversas espécies de formigas, atuando, portanto na dispersão das sementes.

Também foram realizadas transformações químicas com a friedelina, um triterpeno pentacíclico encontrado abundantemente em *M. imbricata*, visando a obtenção do ácido 3,4-seco-friedelan-3-óico, que exibe importantes atividades biológicas. Objetivou-se ainda estabelecer as relações fitoquímicas existentes entre espécies do gênero *Maytenus*, de modo a contribuir para o estudo quimiotaxonômico da família *Celastraceae*.

Os estudos tiveram início pela avaliação fitoquímica das partes aéreas da planta, que envolveram os seguintes passos:

- Obtenção de extratos brutos de folhas, por processo de extração contínua em aparelho de Soxhlet e do extrato bruto de galhos e caule por extração sob temperatura ambiente, usando percolador e solventes de diferentes polaridades, previamente destilados;
- Fracionamento dos extratos por meio de processos cromatográficos;
- Purificação de constituintes químicos através de diferentes processos cromatográficos, lavagens e recristalizações;
- Elucidação estrutural com o auxílio de métodos espectrométricos de análise.

Parte dos trabalhos fitoquímicos e os estudos de transformações químicas em triterpenos pentacíclicos (TTPC) e a caracterização dos produtos resultantes foram realizados com o apoio e a participação do prof. Dr. Luiz Cláudio de Almeida Barbosa no Laboratório de Síntese e Análise de Agroquímicos (LASA) da Universidade Federal de Viçosa. A escolha dos TTPC foi determinada em função da presença constante destes compostos em diversos membros da família *Celastraceae*.

Na investigação da atividade de inibição da síntese de ATP contou-se com o apoio e a participação do pesquisador Dr. Blas Lotina Hensen da Universidade Autônoma do México (UNAM) na realização dos testes. A avaliação da atividade tripanocida contou com a participação da pesquisadora Dra. Sueli Fumie Ogatta, da Universidade Federal de Londrina.

CAPÍTULO 1 – Estudo Anatômico de *Maytenus imbricata* Mart. ex. Reissek

1.1. Anatomia Foliar de *Maytenus imbricata* Mart. ex. Reissek

1.1.2. Introdução

A família *Celastraceae* consiste de 98 gêneros e 1264 espécies dentre as quais encontram-se árvores, arbustos e lianas de porte habitual ou reduzido, de distribuição pantropical (SIMMONS et al., 2001).

O gênero *Maytenus* é o maior da família, contendo cerca de 250 espécies (CARVALHO - OKANO, 1992) e está inserido na subfamília *Celastroideae* e reunido em duas seções: *Maytenus* e *Oxyphylla*. Atualmente são reconhecidas cerca de 80 espécies distribuídas pelo território brasileiro, sendo a distribuição do gênero *Maytenus* predominantemente tropical. Contudo, algumas espécies como *Maytenus ilicifolia*, *M. dasyclada*, *M. boaria*, *M. glaucenscens* e *M. cassineformis* possuem distribuição subtropical (CARVALHO-OKANO, 1992).

No gênero, os órgãos vegetativos são os principais caracteres usados na taxonomia para determinação dos táxons superiores, sendo, contudo inconsistentes para categorias infragenéricas (CRONQUIST, 1988).

Maytenus imbricata Mart. ex. Reissek (Figura 1.1, pág. 14) é uma espécie da família *Celastraceae*, encontrada em regiões de cerrado dos estados de Minas Gerais e Bahia (CARVALHO - OKANO, 1992).

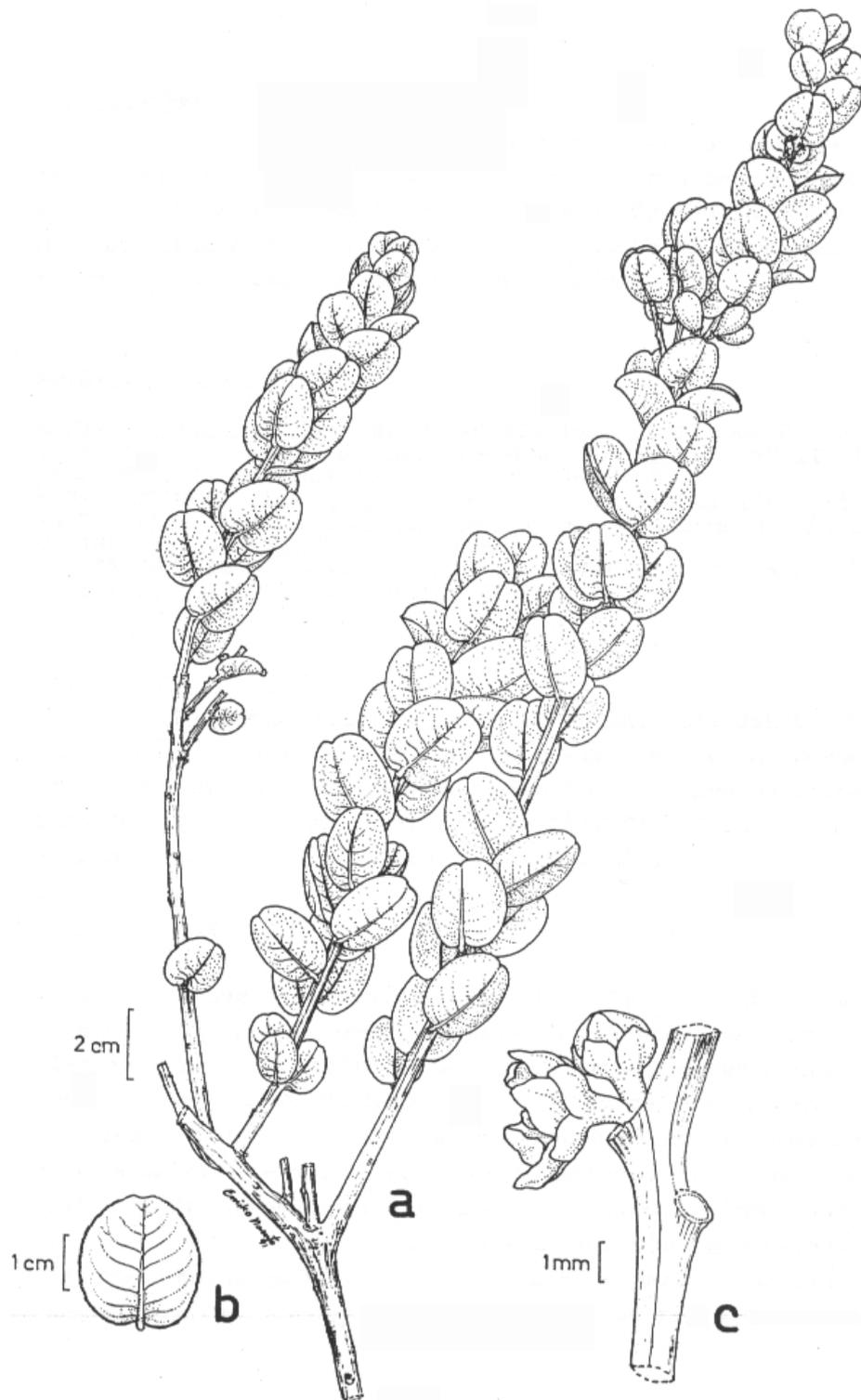


Figura 1.1: Representação esquemática da espécie *Maytenus imbricata*.
Fonte: CARVALHO-OKANO, 1992.

Poucos estudos relatam as características anatômicas de espécies da família *Celastraceae* (DEN HARTOG e BAAS; 1978, METCALFE e CHALK, 1981) e quantidade ainda menor de trabalhos tratam da anatomia de espécies do gênero *Maytenus*. A maior parte destes trabalhos relata estudos anatômicos de espécies africanas e asiáticas (SEBSEBE, 1985; VAN WYK e ARCHER, 1987).

Estudos descrevendo a anatomia de espécies brasileiras (JOFFILY e VIEIRA, 2005; WATSON e DALLWITZ, 2006) são pouco encontrados, estando os trabalhos concentrados na área fitoquímica e farmacológica (OKINE et al., 2005; SOUSA e ALMEIDA, 2005; SPIVEY et al., 2002).

METCALFE e CHALK (1981) descrevem na família *Celastraceae* algumas características peculiares de alguns gêneros, como pequenos vasos, tipo de perfuração de vasos, tricomas geralmente ausentes e que, quando ocorrem, podem ser unicelulares e uniseriados acompanhando as papilas. Epiderme com muitas camadas ou hipoderme, mesofilo com idioblastos esclerenquimatosos. No gênero *Maytenus* a folha é isobilateral ou dorsiventral, com presença de hipoderme em ambas as superfícies, de cristais de oxalato de cálcio, estômatos nas epidermes adaxial e abaxial, mesofilo com idioblastos esclerenquimatosos, fibras, células taníferas.

De acordo com WATSON e DALLWITZ (2006) observam-se anatomicamente nesta família plantas com ou sem lactíferos, que quando presentes estão dispostos no caule ou nas folhas. Floema em discos ou pilhas (*Euonymus*, *Maytenus*). Hastes com estruturas secretoras ou não. Câmbio corticoso, superficial, com cristais dispersos. Anel cambial com crescimento secundário convencional ou anômalo, anelar ou concêntrico (por exemplo, *Salacia*).

As informações anatômicas além de contribuírem para a identificação do táxon, fornecem subsídios para se entender as variações encontradas dentro de um grupo de táxons relacionados, que poderão ser qualitativas e quantitativas. As folhas são órgãos variáveis e tais variações podem ser específicas em espécies, gênero ou famílias. Vários caracteres anatômicos foliares têm mostrado grande valor sistemático em diferentes linhagens (DICKISON, 2000). Outro ponto relevante é a utilização dos materiais frescos que mantêm seus caracteres morfoanatômicos e fornecem informações mais precisas do que as obtidas a partir de materiais

herborizados, onde muitos caracteres podem estar danificados (JOFFILY e VIEIRA, 2005).

O objetivo desta parte do trabalho é contribuir para a caracterização anatômica de *Maytenus imbricata*, espécie ainda não descrita anatomicamente.

1.2. Resultados

1.2.2. Descrição macroscópica da planta

Subarbusto com até 50 cm de altura ou arbusto de porte inferior a 120 cm de altura, dispostos em grupos organizados em 5 a 50 plantas. Ramos novos glabros cilíndrico-carenados, cilíndrico de até 10 cm de diâmetro, liso ou ligeiramente rugoso.

Folhas congestas, eretas, imbricadas, coriáceas, glabras e com cerosidade em ambas as superfícies, pecíolo com cerca de 0,1 a 0,2 cm de comprimento e estípulas inconspícuas. Limbo medindo de 1,5 a 3 cm de comprimento e de 1 a 3 cm de largura, nervura primária saliente da face adaxial e nervuras secundárias evidentes, não salientes no limbo. Forma orbicular, oval ou mais comumente cordiforme, com base sempre cordada, ápice obtuso, obtuso-emarginado e margem levemente crenada, revoluta (Figura 1.1 pág. 14).

Inflorescências em glomérulos paucifloros, com 1 a 3 flores. Pedicelos florais de 0,1 a 0,2 cm de comprimento. Sépalas obtusas subciliadas, medindo cerca de 0,1 cm de comprimento. Pétalas oblongas medindo cerca de 0,2 cm de comprimento e 0,1 de largura. Perianto com cálice e corola distintos; cálice com 5 sépalas, regular, imbricado.

Corola imbricada, regular, pentâmera, pétalas ligeiramente amareladas, caducas, actinomorfas, hipocrateriforme (Figura 1.2d, pág.17). Estames com filetes achatados na base. Androceu com estames férteis, opostos às sépalas. Gineceu carpelado, sincarpo, ovário súpero. Estigma capitato, subséssil e ovário imerso no disco carnosos.

Fruto capsular, bivalvar, orbicular, pericarpo maduro de coloração amarelo-alaranjado. As sementes possuem tegumento claro, esponjoso e ligeiramente membranoso (Figura 1.2c) (Carvalho-Okano, 1992).



Figura 1.2: Fotos de *Maytenus imbricata*: a) aspecto geral da planta, salientando o crescimento em touceiras; b) folhas; c) fruto capsular e bivalvar e d) flor

1.2.3. Anatomia da lâmina foliar - Descrição microscópica

Epiderme adaxial constituída por células poligonais ou ligeiramente arredondadas, unisseriadas, papilosa, de paredes sinuosas e levemente espessas.

Epiderme abaxial com células poligonais, alongadas, unisseriadas, de paredes muito sinuosas e espessas, recoberta por cutícula espessa. Em ambas as epidermes estão presentes estômatos (Figuras 1.3B e 1.3C, pág. 19) e pequenos cristais de oxalato de cálcio. Não foram observados tricomas.

A nervura principal exhibe epiderme com células menores do que as da região intercostal (C). O parênquima paliçádico dispõe-se de forma paralela à epiderme, podendo ser interrompido pela presença de colênquima, tipo lamelar ou angular, ou de parênquima fundamental (Figuras 1.4A, pág. 20). No colênquima observam-se inúmeros cristais amorfos de oxalato de cálcio, bem como células contendo grãos de amido, compostos fenólicos e esclereídes (Figura 1.4C, pág. 20).

O feixe vascular é envolvido por uma bainha de fibras bem desenvolvida, completa, circundada por fibras e numerosas células pétreas e esclereídes esparsas (Figura 1.4A e 1.4B, pág. 20). Feixe vascular constituído por floema e xilema. Xilema radial em arco contínuo, envolvido por floema, onde se encontram cristais de oxalato de cálcio, células pétreas, esclereídes, idioblastos com compostos fenólicos (Figura 1.4A, pág. 20).

O mesofilo com organização dorsiventral, parênquima paliçádico com 4-6 camadas de células, entremeado ao colênquima do tipo lamelar ou angular na região da nervura central. Parênquima esponjoso semi-compacto, com 4 a 6 camadas de células de paredes delgadas, ocupando cerca de 60% do mesofilo. Células pétreas, compostos fenólicos, grãos de amido e cristais são encontrados no mesofilo (Figura 1.4C, pág. 20).

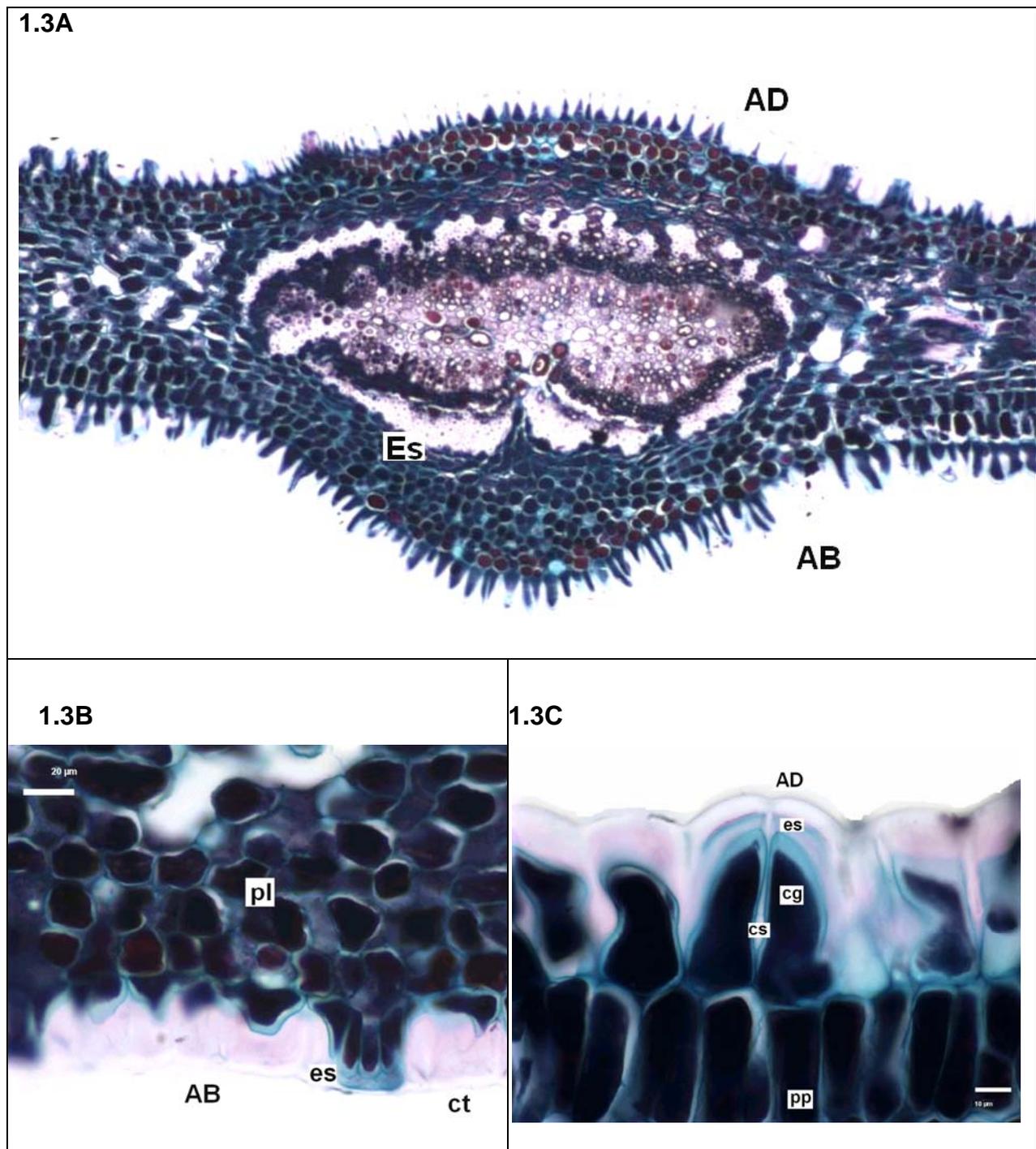


Figura 1.3: Cortes transversais da folha de *M. imbricata*. **1.3A** - Detalhe da nervura central evidenciando o feixe vascular envolvido por esclereídes (Es). **1.3B** - Detalhe da epiderme abaxial (AB), estômatos (es), parênquima lacunoso (pl) e cutícula (ct). **1.3C** - Detalhe da epiderme adaxial (AD) e dos estômatos (es), células guarda (cg) e câmara subestomática (cs).

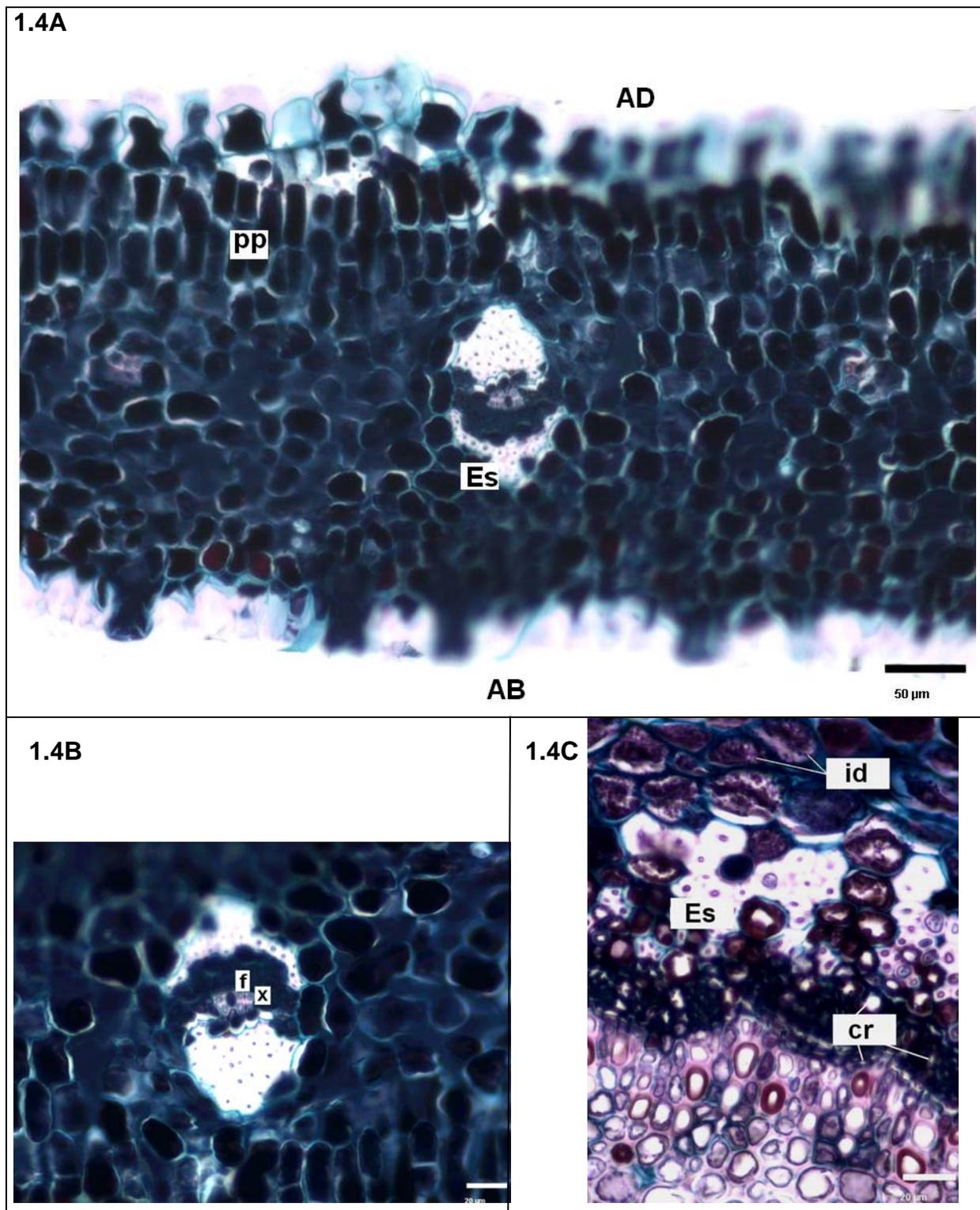


Figura 1.4: Cortes transversais da folha de *M. imbricata*. 1.4A - detalhe da nervura lateral evidenciando o feixe vascular envolvido por esclereídes. 1.4B - nervura, detalhe do feixe vascular. 1.4C - detalhe do mesófilo: esclereídes (Es), cristais (cr) e idioblastos (id) contendo compostos fenólicos.

1.3. Discussão

As folhas de *M. imbricata* são coriáceas, cerosas em ambas superfícies com epiderme adaxial recoberta por cutícula espessa, características também apresentadas por *M. ilicifolia* (DUARTE e DEBUR, 2005) servem como revestimento externo, além de protegerem a planta contra a perda excessiva de água (HLWATIKA e BHAT, 2002). Tais características são relatadas na família *Celastraceae* e no gênero *Maytenus* por METCALFE e CHALK, 1981. A presença de bordos recortados ou chanfrados, levemente crenados que acompanham as terminações dos recortes em *M. imbricata* pode ser vista como um mecanismo de defesa mecânica contra a herbivoria (LUCAS et al., 2000). O bordo é uma característica utilizada na identificação de espécies do gênero *Maytenus*, que se caracteriza pela presença de bordo inteiro, serrilhado, dentilhado ou crenado, se apresentando amplamente variável e relativamente constante (CARVALHO-OKANO, 2005).

O mesofilo de *M. imbricata* apresenta conformação dorsiventral como ocorre predominantemente na família *Celastraceae* (METCALFE e CHALK, 1950).

Esclereídes foram observadas dispersas no mesofilo e ao redor do sistema vascular em *Maytenus imbricata*. Formas irregulares de esclereídes são relatadas em diferentes gêneros da família *Celastraceae* (METCALFE e CHALK, 1950). Esclereídes polimórficas são encontradas em *M. obtusifolia* e podem estar associadas ao grau de luminosidade que os espécimes estão expostos, sendo sua variação de tipos relacionada a um menor grau de sombreamento ao qual o vegetal é submetido.

Semelhante ao observado em outras espécies do gênero, idioblastos contendo compostos fenólicos foram encontrados dispersos no mesofilo de *M. imbricata*. Tais células podem ser relacionadas à presença de compostos como taninos e flavonóides. Células contendo compostos fenólicos (células taníferas) são comuns em espécies de *Maytenus* e relatadas também para outros gêneros como *Cassine*, *Euonymus* e *Pachystima*. Constituem uma importante ferramenta no auxílio à taxonomia e nas relações filogenéticas envolvendo o gênero *Maytenus* (JOFFILY e VIEIRA, 2005; DUARTE e DEBUR, 2005).

Os compostos fenólicos conferem sabor adstringente e amargo, tornando o vegetal pouco atraente ao consumo de insetos e herbívoros, constituindo um mecanismo de defesa química contra a herbivoria. A capacidade de complexação dos taninos com as enzimas digestivas, leva à formação de produtos tóxicos no trato gastro-intestinal do animal dificultando assim o processo digestivo (SIMÕES et al., 2003).

A presença de cristais de oxalato de cálcio dispostos entre as células do mesofilo de *M. imbricata* é peculiar na família *Celastraceae*, sendo relatados também nos gêneros *Elaeodendron* e *Catha*, além de *Maytenus* (METCALFE e CHALK, 1981). Cristais aciculares são relatados em *Maytenus ardisiaefolia*, *M. brasiliensis*, *M. communis* e *M. obtusifolia*, constituindo-se em característica anatômica importante a ser explorada e utilizada em estudos taxonômicos posteriores das demais espécies do gênero (JOFFILY e VIEIRA, 2005).

Os cristais de oxalato de cálcio funcionam como mecanismo de proteção contra o ataque de insetos, extremos de temperatura e demais fenômenos climáticos, conferindo maior firmeza à estrutura do tecido vegetal, aumentando sua resistência, além disso, constituem reserva de íons cálcio e promovem a diminuição da taxa de transpiração, funcionando como estratégia de economia de água da planta (DUARTE e DEBUR, 2005).

A ausência de tricomas em *Maytenus imbricata* é observada também em outras espécies do gênero, como *M. ilicifolia* (DUARTE e DEBUR, 2005) e está de acordo com descrito por METCALFE e CHALK, (1981) para espécies de celastráceas.

As estruturas anatômicas observadas em folhas de *M. imbricata* são semelhantes às estruturas descritas na literatura para outras espécies do gênero *Maytenus* e constituem em um valor taxonômico para as mesmas.

1.4. Parte Experimental

Foram coletadas partes aéreas (folhas) de *Maytenus imbricata* provenientes da região do Morro do Santana, no município de Ouro Preto, estado de Minas

Gerais, Brasil. A exsicata correspondente encontra-se depositada no Herbário da UFV, sob o número 27780, identificada devidamente pela botânica Dra. Rita Maria de Carvalho Okano, do Departamento de Botânica da Universidade Federal de Viçosa (UFV). Foram analisados os aspectos botânicos macroscópicos com base na terminologia adotada por HICKEY (1974).

Folhas em estágio primário e secundário de desenvolvimento, totalmente expandidas, foram coletadas e fixadas em FAA₅₀ (formalina, ácido acético e etanol 50%) (JOHANSEN, 1940) a fim de proceder ao preparo do material de estudos anatômicos (descrição microscópica) e descrição macroscópica. Cortes transversais e longitudinais foram obtidos manualmente com auxílio de micrótomo de mesa LPJ, modelo Rolemberg e Bhering, em pecíolo de embaúba. As secções foram clarificadas, corados com fucsina básica e azul de Astra e desidratada em série etílica (KRAUS e ARDUIN, 1997). As lâminas permanentes foram montadas em bálsamo do Canadá.

Na observação da epiderme em vista frontal, amostras das hastes foram diafanizadas conforme metodologia proposta por JOHANSEN (1940). As informações foram complementadas pela análise de cortes paradérmicos obtidos à mão-livre. As lâminas diafanizadas foram montadas em bálsamo do Canadá, enquanto as cortadas à mão-livre foram montadas em glicerina.

Para obtenção de fotomicrografias do material analisado em microscopia de luz, utilizou-se microscópio fotônico Olympus AX70 equipado com sistema U-PHOTO Olympus. As observações e documentação das amostras foram analisadas pelo software IMAGE PRO-PLUS 4.0 e digitalizadas no Laboratório de Anatomia Vegetal do Departamento de Biologia Vegetal, da Universidade Federal de Viçosa.

1.5. Conclusões

Através da descrição da anatomia foliar de *Maytenus imbricata*, pode-se concluir que sua morfologia e filotaxia seguem as mesmas descritas por BARROSO (1991) e WATSON e DALLWITZ (2006) para o gênero *Maytenus*. A ocorrência de caracteres comuns a outras espécies do gênero atende prontamente os padrões morfoanatômicos requeridos para a espécie de acordo com METCALFE e CHALK (1981).

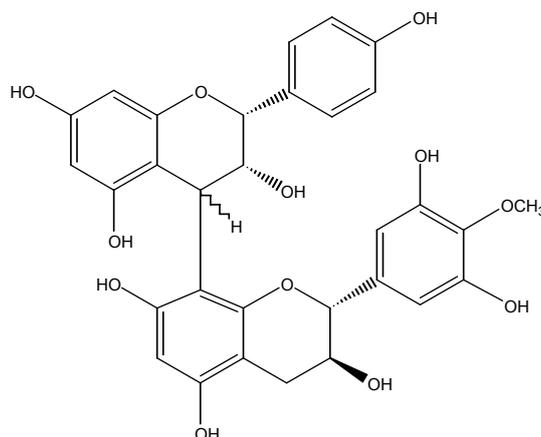
CAPÍTULO 2 – Estudo fitoquímico de *Maytenus imbricata*

2.1. Determinação estrutural das substâncias e misturas isoladas de folhas, galhos e caule de *Maytenus imbricata*

A notação utilizada para nomear as substâncias ou misturas isoladas de *Maytenus imbricata* foi definida empregando-se as letras F, G, Se e s de acordo com a origem das mesmas: extrato das folhas, dos galhos, sementes ou sólidos dos extratos, respectivamente. As substâncias isoladas estão listadas na Tabela 2.1. Os solventes utilizados na preparação dos extratos foram hexano (H), acetato de etila (Ac), clorofórmio (Cl) e etanol (Et).

Tabela 2.1: Substâncias isoladas de *Maytenus imbricata*

Substância ou mistura	Origem	Discus. (pág)
G1: Mistura de proantocianidinas	GAc	25
G2: 3-Oxo-lup-20(29)-en-30-al	GHs	27
G3: Mistura de 3-oxo-lup-20(29)-en-30-al, 11 α -hidroxi-lup-20(29)-en-3-ona e 30-hidroxi-lup-20(29)-eno	GHs	38
G4: 30-Hidroxi-lup-20(29)-en-3-ona	GHs	39
G5: 11 α -Hidroxi-lup-20(29)-en-3-ona	GHs	49
G6, F5: 3 β ,30-Di-hidroxi-lup-20(29)-eno	GHs, IFH	61
G7: Mistura de 30-hidroxi-lup-20(29)-en-3-ona e 11 α -hidroxi-lup-20(29)-en-3-ona	GHs	69
G8: Lupenona	GH	73
G9, F2, F7: Friedelina	FHs e FH	76
G10: 1-Hidroxi-3,6-dimetil-8-metil-9-xantona	GH	81
G11: 3 β -Esteariloxi-lup-20(29)-eno	GH	91
F1: Dulcitol	FEt	99
F3, F4, F8: Mistura de friedelinol e friedelina	FHs	103
F6: Mistura de ésteres de cadeia longa	FH	108
F9, F10: Ácido 3,4-seco-friedelan-3-óico	FH	110
F12: Epicatequina	FAC	120
F13: Óleo essencial das folhas	F	128
Se1; Se2: Óleo das sementes e do elaisoma	Se	129
Compostos identificados por CG-EM	FCl, FEt, FAc, GEt, GAc	130

G1: Mistura de pró-antocianidinas

G1 foi isolado do extrato em acetato de etila dos galhos e caule, durante a remoção do solvente, como sólido amorfo de cor marrom-alaranjado, e com ponto de fusão difícil de ser determinado visto que, quando em aquecimento rápido, mostrou processo de decomposição e quando submetido a aquecimento lento, apresentou fusão entre 183–209 °C.

O espectro de G1 obtido na região do infravermelho, evidenciou sua natureza aromática, através das bandas de absorção em 1610, 1514 e 1445 cm^{-1} (Figura 2.1, pág. 26). A presença de grupo hidroxila foi detectada através da banda de absorção centrada em 3417 cm^{-1} (SILVERSTEIN, 1994). Observou-se ainda banda em 1115 cm^{-1} , referente ao estiramento da ligação C-O.

Os dados de ponto de fusão e a feição do espectro no infravermelho sugeriram tratar-se de uma mistura de pró-antocianidinas. Efetuou-se então uma comparação entre os dados de infravermelho obtidos para G1 e os dados obtidos para pró-antocianidina A (DA SILVA, 1990).

Este composto já havia sido anteriormente isolado a partir de *Maytenus guianensis* (PINHEIRO, 1980) e de *Maytenus myrsinoides* (DA SILVA, 1990), ambas pertencentes à família das Celastráceas; fez-se então, CCD em diferentes tipos de eluentes, para comparação de G1 com amostra autêntica obtida de *M. myrsinoides*.

Através da comparação direta dos espectros obtidos na região de infravermelho, contidos em trabalhos anteriormente mencionados (PINHEIRO, 1980 e DA SILVA, 1990) e das CCD comparativas realizadas foi possível sugerir a presença de pró-antocianidina A em G1.

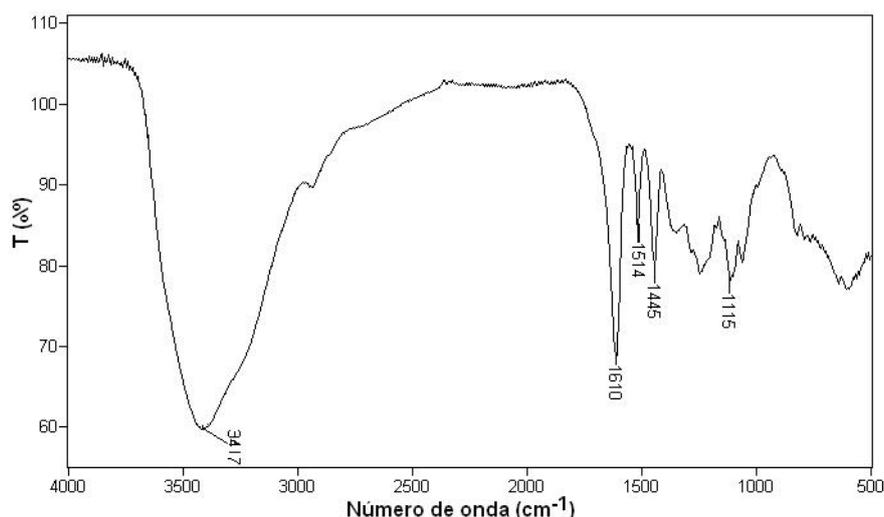


Figura 2.1: Espectro de G1 (mistura de pró-antocianidinas) obtido na região de infravermelho (KBr).

De acordo com HATANO et al., (2002) existem aproximadamente 250 tipos diferentes de pró-antocianidinas que ocorrem na maioria das vezes em misturas de difícil separação. Análises preliminares utilizando cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) foram feitas visando separar e, posteriormente, identificar os constituintes de G1.

O cromatograma obtido mostrou a presença de vários picos (Figura 2.2) e comparado aos dados de literatura indicou tratar-se de uma mistura de pró-antocianidinas (t_R 12-18 min) (ESQUENAZI et al., 2002).

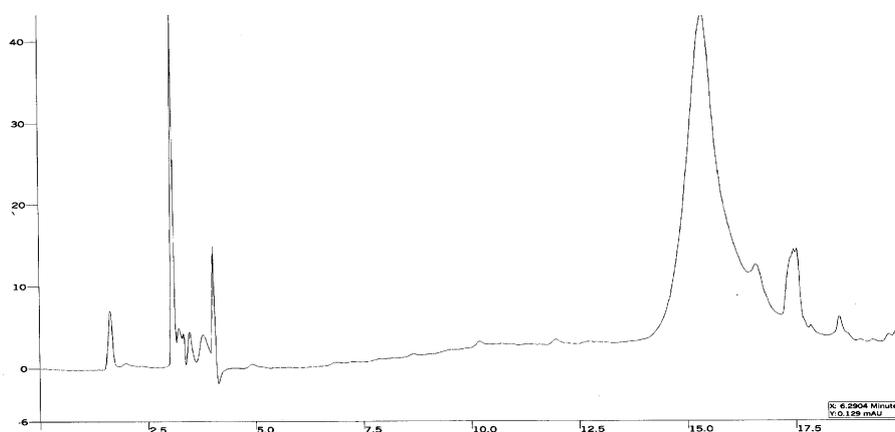
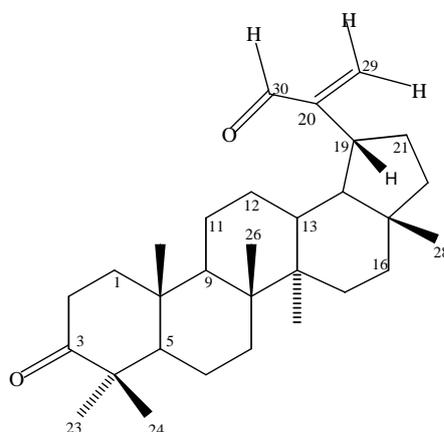


Figura 2.2: Cromatograma de G1 (mistura de pró-antocianidinas) obtido por CLAE, em aparelho Varian ProStar 210. Condições: Fluxo 1,0 mL/ min, empregando gradiente Água (A): Acetonitrila (B)- 90 a 75 de A em 10 min e 100 de B até o final (20 min), detector DAD-UV 280 nm.

G2: 3-oxo-lup-20(29)-en-30-al

G2 foi isolado a partir da CC do sólido obtido durante a remoção do solvente do extrato hexânico dos galhos de *M. imbricata* e apresentou-se como um sólido esbranquiçado de ponto de fusão 177-181 °C e forneceu teste de Liebermann-Burchard positivo para triterpenos pentacíclicos.

O espectro no IV (Figura 2.3) mostra a presença de bandas de absorção em 2936 e 2856 cm^{-1} que evidenciam a natureza alifática do composto. Apresentou também duas bandas características de grupos carbonila em 1700 e 1683 cm^{-1} , bandas em 1676 cm^{-1} , característica de estiramento C=C e 918 cm^{-1} , referente à deformação C-H de grupo olefina.

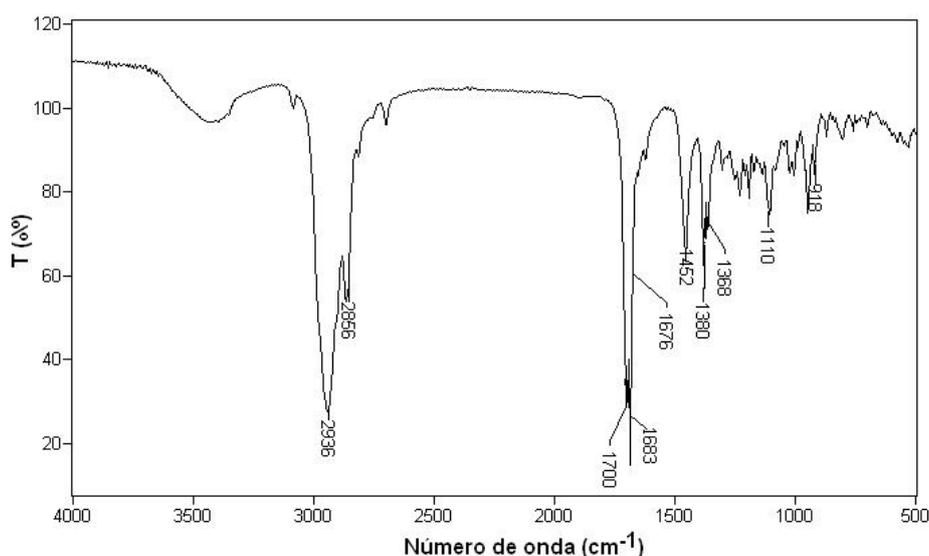


Figura 2.3: Espectro de G2 [3-oxo-lup-20(29)-en-30-al] obtido no IV (KBr).

O espectro de RMN de ^1H (Figura 2.4) apresenta seis simpletos localizados em δ_{H} 1,07, 1,05, 1,02, 0,94, 0,92 e 0,83, correspondentes a seis grupos metila além de sinais múltiplos na região de δ_{H} 2,5 a 1,2 que indicam a presença de hidrogênios metilênicos e metínicos pertencentes a estrutura de um triterpeno pentacíclico (TTPC) (MAHATO e SEN, 1997). O espectro apresenta também dois simpletos em δ_{H} 5,91 e 6,29, característicos de dupla ligação terminal.

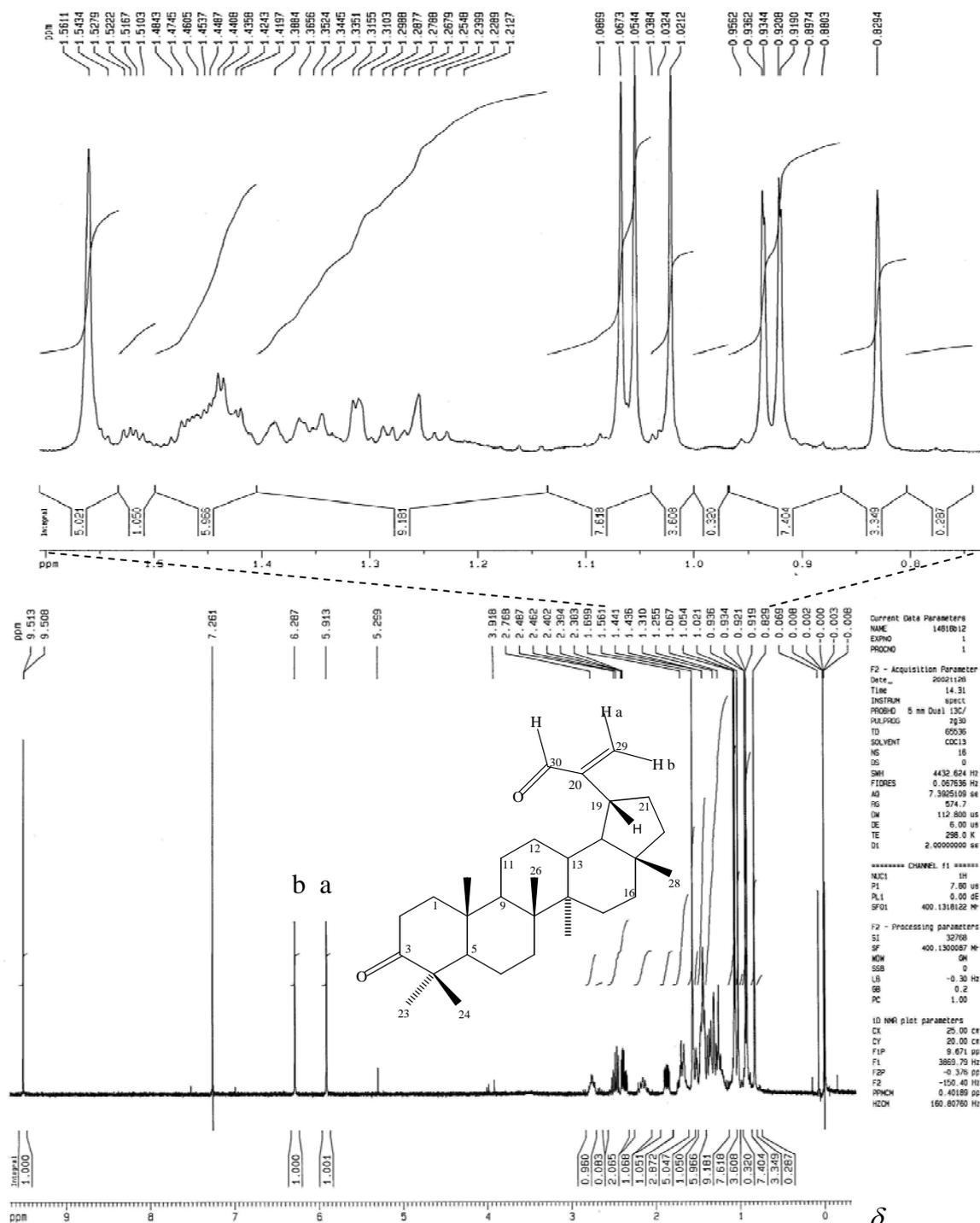


Figura 2.4: Espectro de RMN de ^1H de G2 [3-oxo-lup-20(29)-en-30-al] (CDCl_3 ; 400 MHz). Em destaque ampliação da região entre δ_{H} 1,56 e 0,83.

A análise do espectro de RMN de ^{13}C (Figura 2.5) bem como do subespectro DEPT-135 (Figura 2.6, pág. 30), inicialmente permitiu detectar 27 sinais de carbono, sendo seis carbonos metílicos, sete não hidrogenados, dez metilênicos e quatro metínicos (Tabela 2.2, pág. 36). Os sinais de carbono em δ_{C} 133,05 ($=\text{CH}_2$; C-29) e δ_{C} 157,21 ($\text{C}=\text{}$; C-20) são característicos de triterpenos da série lupano, funcionalizados em C-20 (MAHATO e SEN, 1997). Observa-se ainda no espectro um sinal em δ_{C} 217,92, característico de carbonila de grupo cetona, e outro em δ_{C} 194,99, característico de carbonila de grupo aldeído.

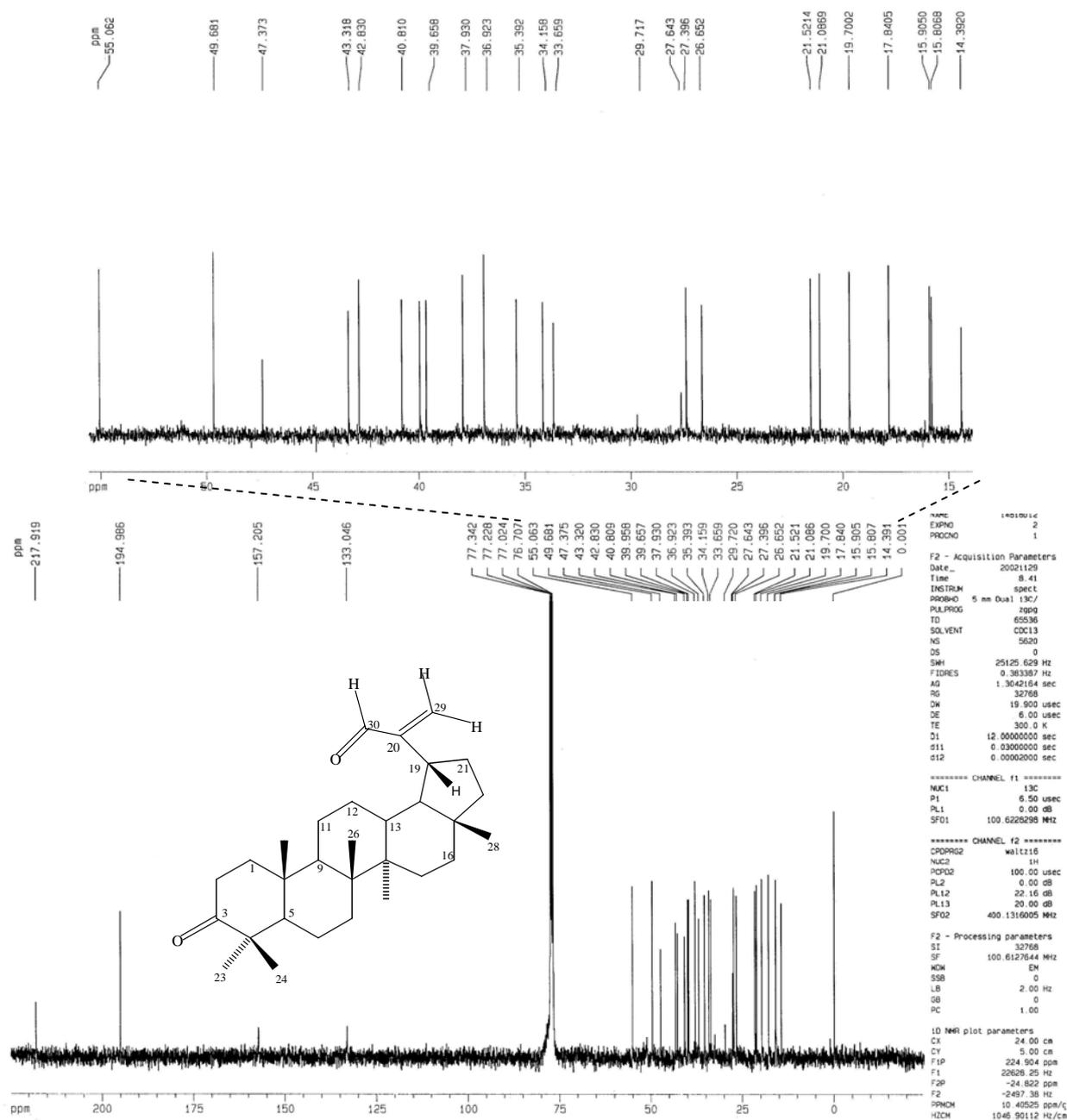


Figura 2.5: Espectro de RMN de ^{13}C de G2 [3-oxo-lup-20(29)-en-30-al] (CDCl_3 ; 100 MHz). Em destaque ampliação da região entre δ_{C} 55,06 e 14,39.

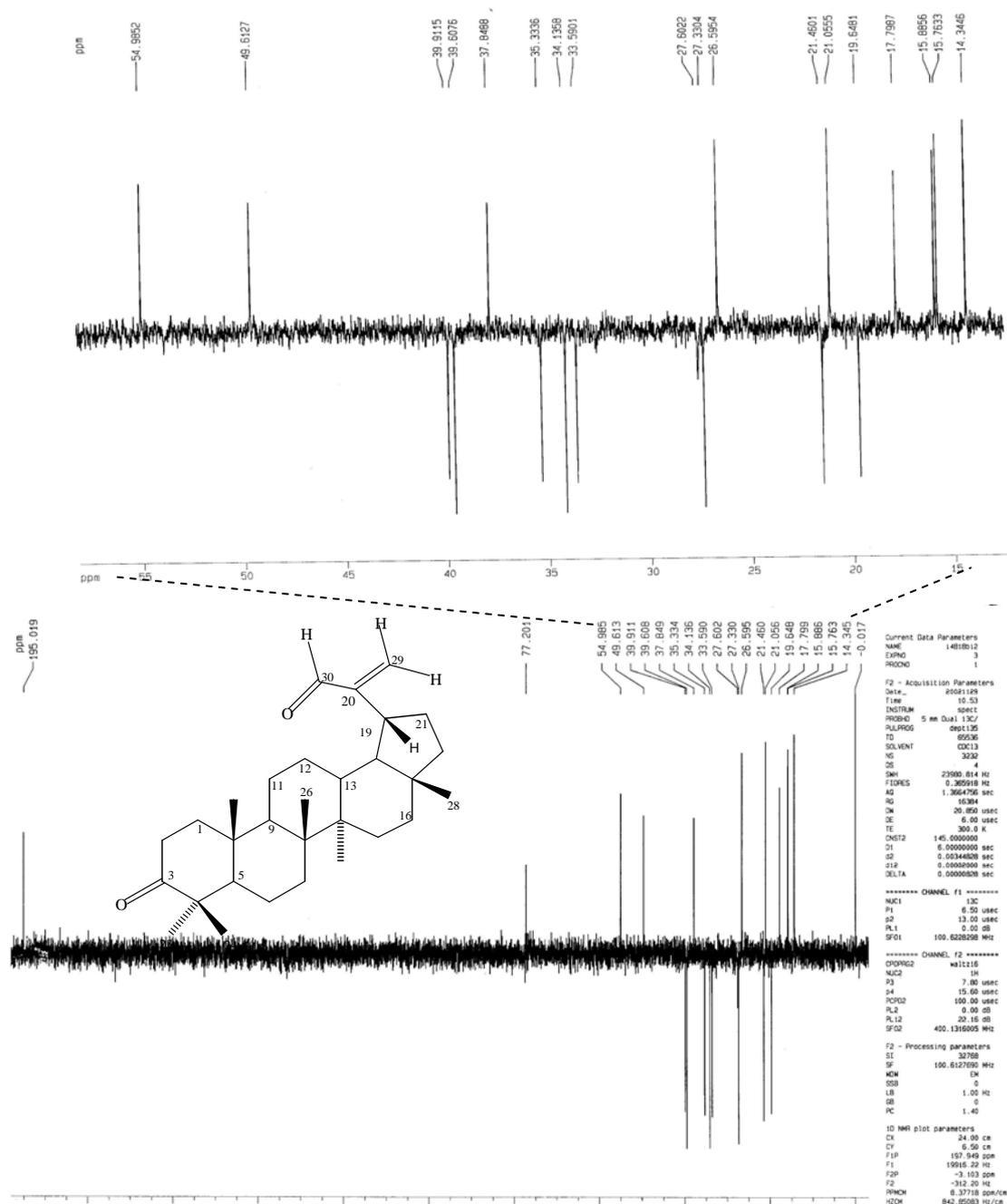


Figura 2.6: Subespectro DEPT-135 de G2 [3-oxo-lup-20(29)-en-30-al] (CDCl_3 ; 100 MHz). Em destaque ampliação da região entre δ_c 54,99 e 14,39.

Através dos mapas de contornos HMQC (Figura 2.7, pág. 32) e HMBC (Figura 2.8, pág. 33) e de suas seções expandidas, foi possível atribuir os sinais dos carbonos e hidrogênios para G2, 3-oxo-lup-20(29)-en-30-al, partindo dos sinais de carbono das carbonilas em δ_c 217,92 e 194,99.

O mapa de contornos HMBC (Figura 2.8, pág. 33) mostra que o sinal de carbono em δ_c 217,92 correlaciona-se com os sinais de hidrogênio em δ_H 2,50 (m, CH_2), 1,87 (m, CH_2), e com os sinais de metila em δ_H 1,07 e 1,02. No esqueleto

lupano, a única possibilidade de um carbono carbonílico se correlacionar com dois grupos metilas é o mesmo ocupar a posição 3 do anel. Deste modo, o sinal em δ_C 217,92 foi atribuído a C-3. Os sinais em δ_H 2,50 (δ_C 34,16) e δ_H 1,87 (δ_C 39,66) foram atribuídos a C-2 e C-1, respectivamente. Os sinais das metilas em δ_H 1,07 (δ_C 26,65) e 1,02 (δ_C 21,09) foram atribuídos às metilas 23 e 24, respectivamente.

O sinal em δ_H 1,07 (H-23) mostra correlação com os sinais em δ_C 47,37 (C-4), 55,06 (C-5) e 21,09 (C-24), o que pode ser observado no mapa de contornos HMBC (Figura 2.8, pág. 33). O sinal de carbono em δ_C 55,06 (C-5) apresenta correlação, com os sinais de três grupos metila em δ_H 1,07, 1,02 e 0,92 sendo o último sinal pertencente aos hidrogênios da metila H-25 (Figura 2.8B, pág. 33). Este sinal, por sua vez, correlaciona-se com os sinais de carbono em δ_C 49,68 (C-9), 39,66 (C-1) e 36,92 (C-10) (Figura 2.8B, pág. 33). O sinal de carbono correspondente a C-9 (δ_C 49,68) mostra também correlação com o sinal de hidrogênios metilícos em δ_H 1,05, sendo este atribuído aos hidrogênios da metila 26 (H-26). Esta metila correlaciona-se com os carbonos em δ_C 33,66 (C-7), 49,68 (C-9), 42,83 (C-14 ou C-8) e 40,81 (C-14 ou C-8). Estes dois últimos sinais correlacionam-se com o sinal de hidrogênio de metila em δ_H 0,94, que foi atribuído à metila C-27 (Figura 2.8B, pág. 33).

O sinal de hidrogênio correspondente a H-27 (δ_H 0,94) mostra correlação por HMBC, com os sinais de carbono em δ_C 37,93 (C-13) e 27,40 (C-15). O sinal de hidrogênio do grupo formila (δ_H 9,51) correlaciona-se com o sinal de carbono em δ_C 157,21 atribuído ao carbono C-20. No esqueleto lupano este tipo de correlação é observado quando o grupo aldeído está no carbono C-30. Isto permite concluir que o sinal de hidrogênio em δ_H 0,83, não atribuído ainda, corresponde à metila em C-28.

Pode se observar ainda no mapa de contornos HMBC (Figura 2.8, pág. 33), que o sinal de hidrogênio em δ_H 0,83 (H-28) mostra correlações com os sinais de carbono em δ_C 43,32 (C-17), 39,96 (C-16 ou C-22) e 35,39 (C-16 ou C-22). O sinal de hidrogênio em δ_H 1,45 (H-7) mostra correlação com o sinal δ_C 19,70, sendo atribuído portanto a C-6. O sinal de carbono em δ_C 34,16 foi atribuído ao C-2, pela correlação observada com o sinal de hidrogênio em δ_H 1,87 (H-1).

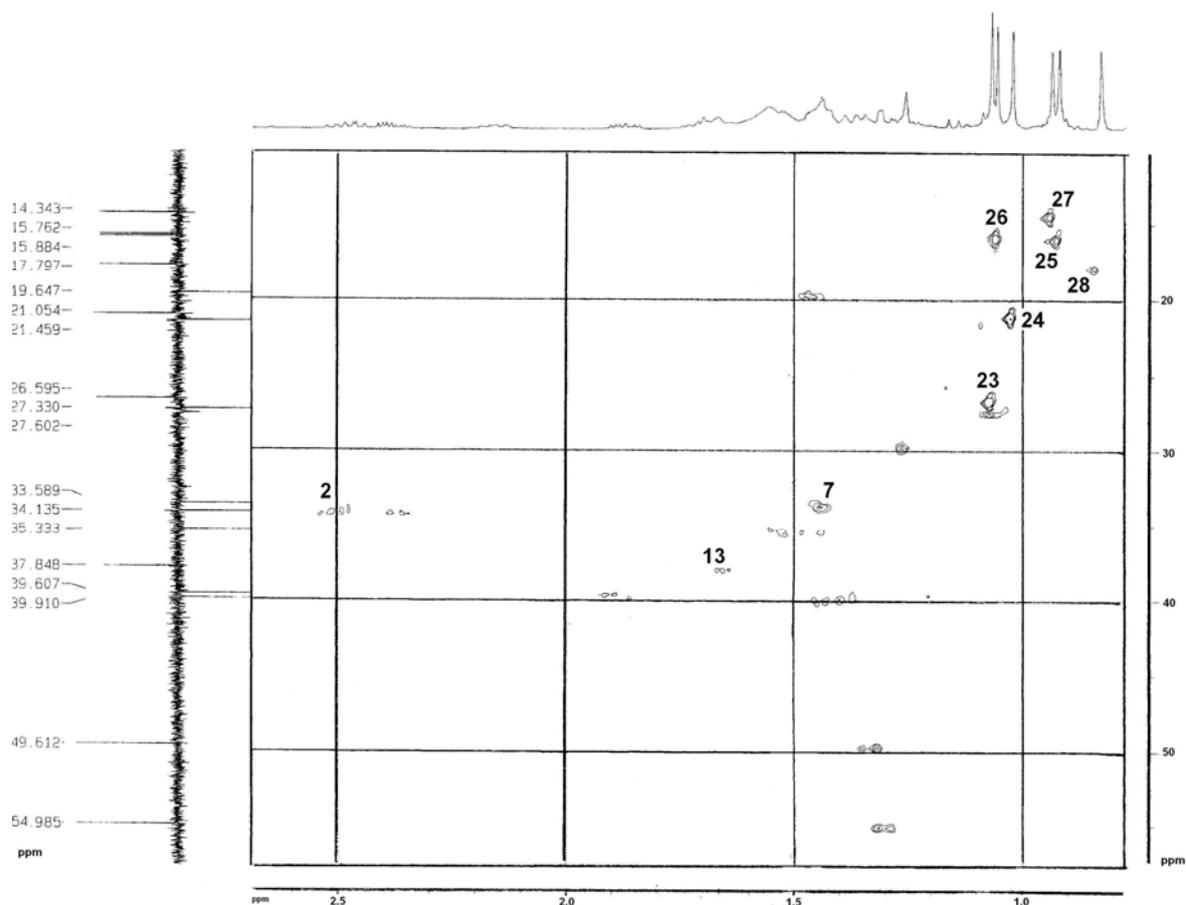
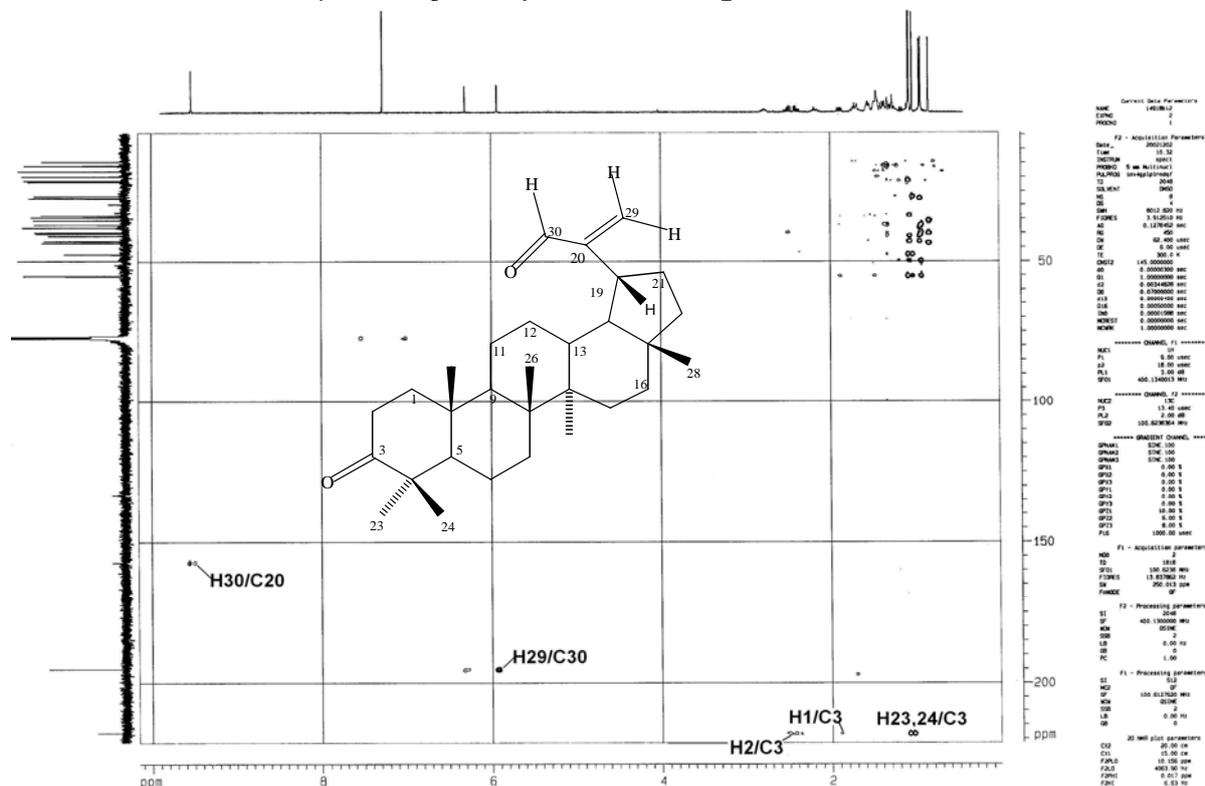


Figura 2.7: Mapa de contornos HMBC de G2 [3-oxo-lup-20(29)-en-30-al] (CDCl₃; 400 MHz). B- Seção expandida da região entre δ_H 0,5 e 2,6.



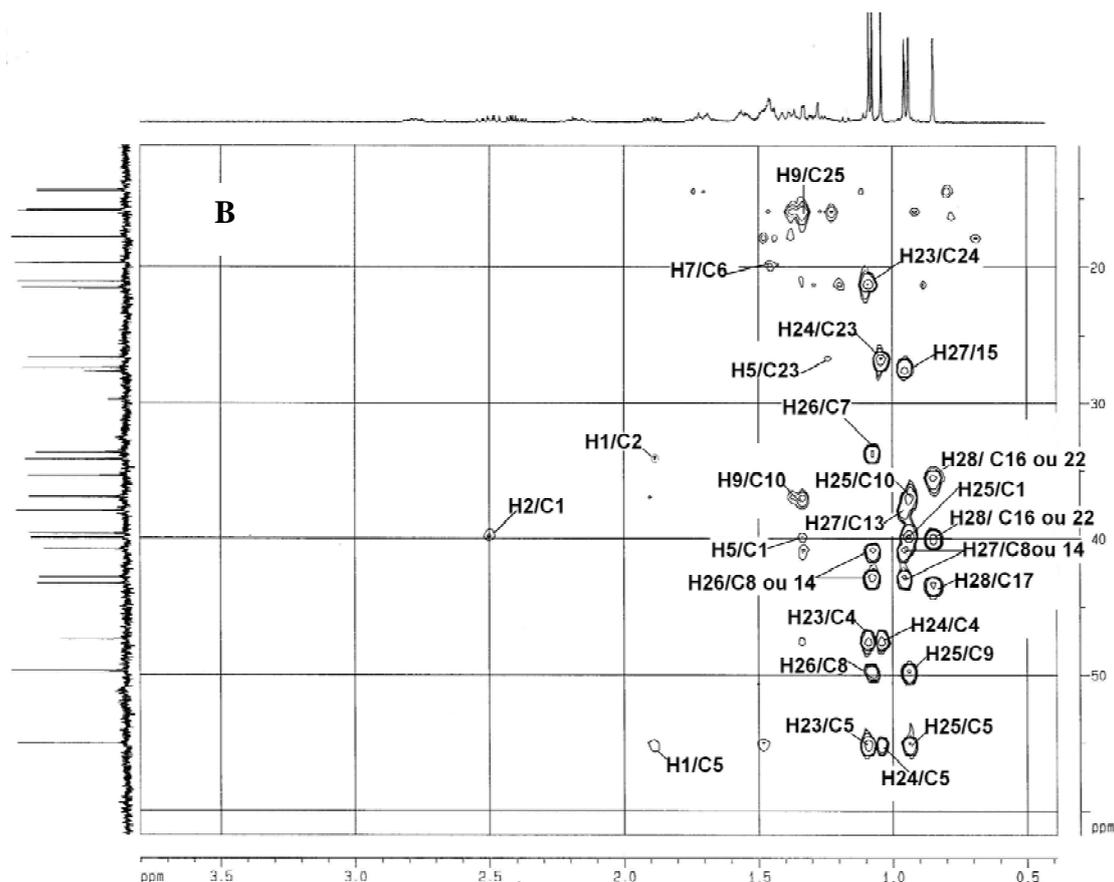


Figura 2.8: Mapa de contornos HMBC de G2 [3-oxo-lup-20(29)-en-30-al] (CDCl_3 ; 400 MHz). B - Seção expandida da região entre δ_{H} 0,5 e 3,5.

Utilizando apenas os mapas de contornos HMQC e HMBC não foi possível atribuir os deslocamentos químicos dos carbonos C-11 (CH_2); C-12 (CH_2); C-21 (CH_2); C-18 (C-H) e C-19 (C-H).

Pelo mapa de contornos NOESY (Figura 2.9) observa-se a correlação do hidrogênio olefínico (H-29) com o hidrogênio do aldeído (H-30), indicando a preferência pela conformação na qual o hidrogênio aldeídico é *cis* ao hidrogênio olefínico (Ha). O hidrogênio Hb mostra correlação com H-27; H-21 e H-18, confirmando a conformação preferencial da molécula e permitindo atribuir o valor do deslocamento químico para C-18 e C-20. Observam-se também sinais de correlação da metila H-28 (δ_{H} 0,83) com os sinais de hidrogênio H-22 β , H-15 β , H-21 β e H-19 β (Figura 2.10, pág. 35), isto permite atribuir os sinais de hidrogênio de C-21 e C-19, que não aparecem no mapa de contornos HMBC (Figura 2.8, pág. 33), o mesmo foi observado por BURNS et al., 2000, para o lup-20(29)-en-30-al-3-ol. Para detectar estes sinais, Burns realizou o experimento HMBC a temperatura de 35 °C.

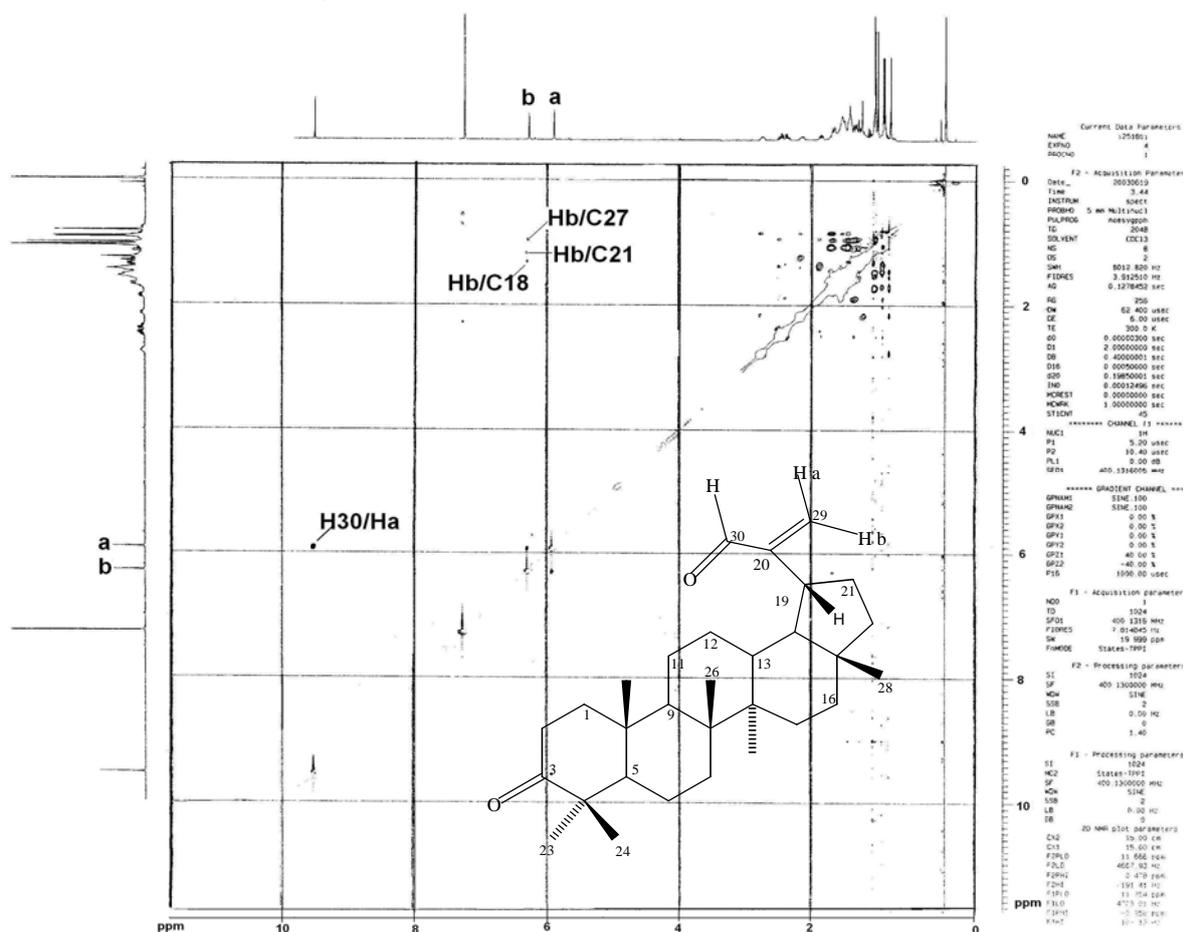


Figura 2.9: Mapa de contornos NOESY de G2 [3-oxo-lup-20(29)-en-30-a] (CDCl₃; 400 MHz).

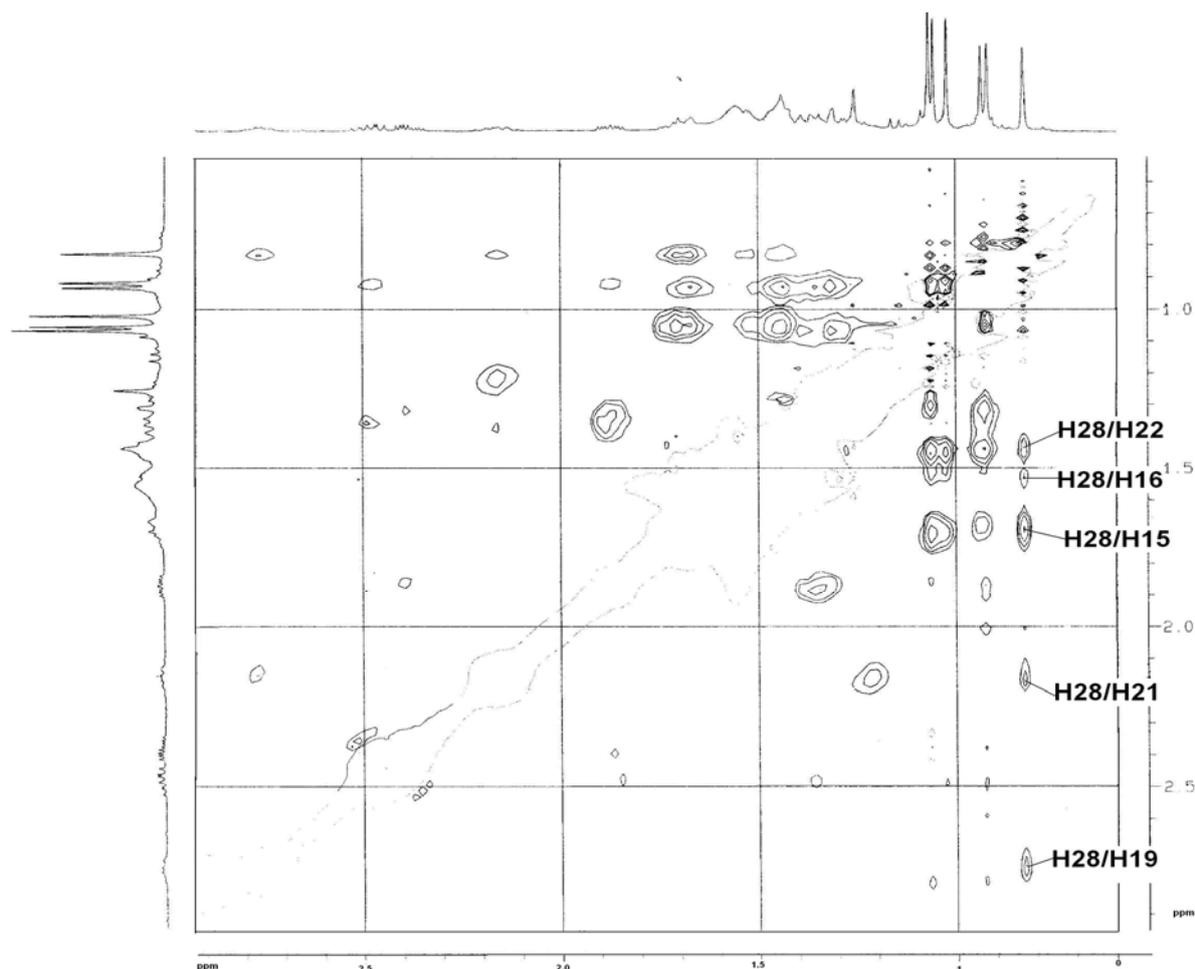


Figura 2.10: Seção expandida do mapa de contornos NOESY de G2 [3-oxo-lup-20(29)-en-30-al] (CDCl_3 ; 400 MHz), região entre δ_{H} 3,0 e 0,83.

Os dados obtidos através dos métodos espectrométricos e a comparação com aqueles disponíveis na literatura permitiram completar a atribuição de todos os carbonos e hidrogênios da molécula (Tabela 2.2, pág. 36) e identificá-la como sendo o lupano 3-oxo-lup-20(29)-en-30-al (28), substância anteriormente isolada de *Gymnosporia emarginata* (WIJERATNE et al., 1981).

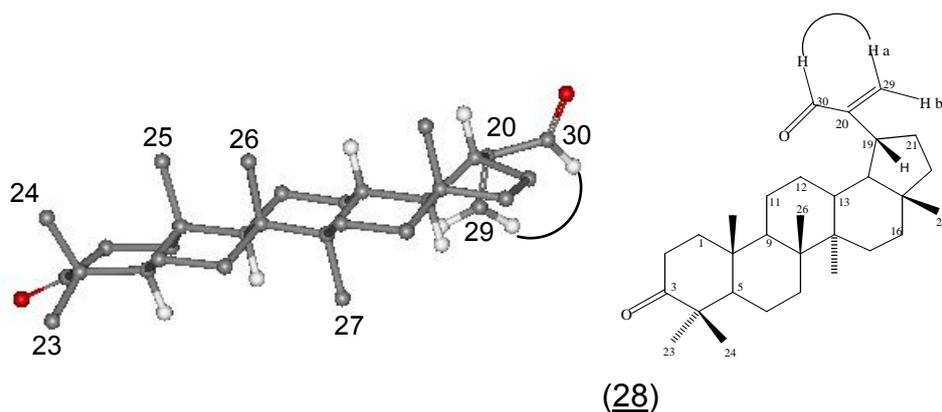
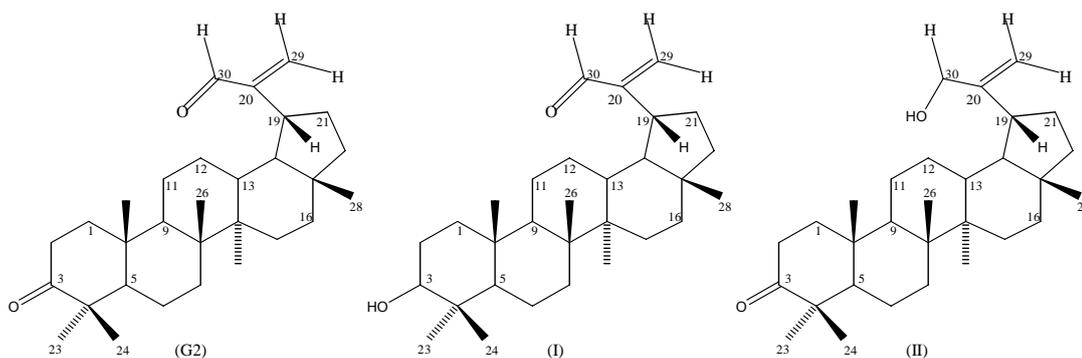


Tabela 2.2: Atribuição dos sinais de RMN de ^{13}C e RMN de ^1H para G2 [3-oxo-lup-20(29)-en-30-al] (CDCl_3 ; 100 MHz) e comparação com lup-20(29)-en-30-al-3-ol (I) e lup-20(29)-en-30-ol-3-ona (II)

C_n	δ_{C} G2	DEPT	HMBC	δ_{H}	Lit. ^a . (I)	Lit. ^b . (II)
1	39,66	CH_2	H-2	1,87	38,70	39,59
2	34,16	CH_2	H-1	2,50	27,40	34,13
3	217,92	C=O		-	78,99	218,27
4	47,37	C		-	38,87	47,32
5	55,06	CH		1,25	55,29	54,87
6	19,70	CH_2		1,48	18,30	19,68
7	33,66	CH_2	H-6	1,45	34,28	33,58
8	40,81	C		-	40,77	40,79
9	49,68	CH	H-10	1,31	50,24	49,73
10	36,92	C		-	37,14	36,87
11	21,52	CH_2		1,39	20,94	21,57
12	27,64	CH_2		1,04	27,64	26,68
13	37,93	CH	H-27	1,67	37,73	38,12
14	42,83	C		-	42,69	42,85
15	27,40	CH_2		1,09; 1,71	27,34	27,40
16	35,39	CH_2		1,53	35,39	35,40
17	43,32	C		-	43,28	43,01
18	37,86	CH			51,20	48,81
19	47,70	CH		2,75	36,70	43,75
20	157,21	C		-	157,00	154,67
21	34,14	CH_2		2,67; 2,38	32,60	31,75
22	39,96	CH_2		1,42	39,93	39,83
23	26,65	CH_3	H-5, 3 e 24	1,07	27,10	26,68
24	21,09	CH_3	H-5, 3, e 23	1,02	15,37	21,04
25	15,91	CH_3	H-5, 9, 10 e 1	0,92	16,07	15,99
26	15,81	CH_3	H-9, 7, 8 e 14	1,05	15,94	15,80
27	14,39	CH_3	H-15, 13, 8 e 14	0,94	14,41	14,47
28	17,84	CH_3	H-16, 22 e 17	0,83	17,79	17,72
29	133,05	CH_2		6,29 e 5,91	132,90	106,83
30	194,99	CHO	H-20	9,51	195,08	64,95

a- BURNS et al., *Magn. Reson. Chem.*; v. 38, p. 488-493, 2000, (CDCl_3 ; 125 MHz).

b- TINTO et al., *J. Nat. Products*, v. 55, n. 3, p. 395-398, 1992, (CDCl_3 ; 100 MHz).



Nos espectros de Massas de TTPC da série lupano nem sempre o pico do íon molecular está presente (OGUNKOYA, 1981). Embora não tenha sido observado o pico do íon molecular, o espectro de massas de G2 (Figura 2.11) apresentou picos em m/z 219 (29%), 205 (65%), 203 (47%) e 189 (19%), característicos de TTPC da série lupano, com fragmentação iniciada pela clivagem da ligação entre os carbonos C-8 e C-14 (Esquema 2.1) de acordo com proposta de MATHE et al. (2004) e SHIOJIMA et al. (1992).

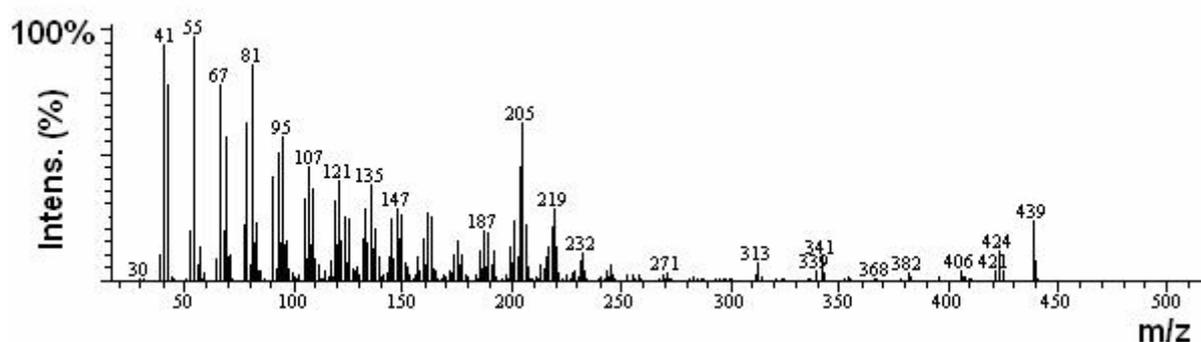
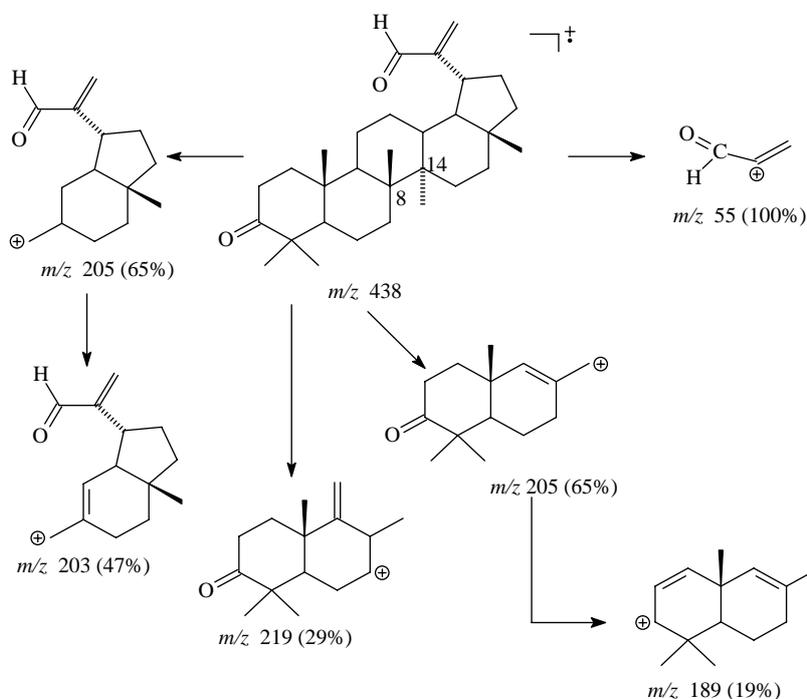
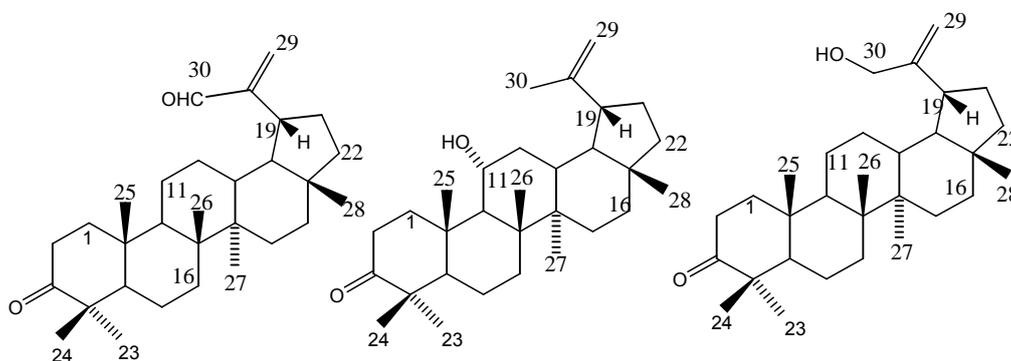


Figura 2.11: Espectro de Massas de G2 [3-oxo-lup-20(29)-en-30-al]. Cromatógrafo CG-17A- CG-EM QP5050, EI, 70 eV. A faixa de análise do EM foi de 30 a 500 Daltons.



Esquema 2.1: Prováveis caminhos de fragmentação para G2 [3-oxo-lup-20(29)-en-30-al] (MATHE et al., 2004).

G3: Mistura de 3-oxo-lup-20(29)-en-30-al, 11 α -hidroxi-lup-20(29)-en-3-ona, 30-hidroxi-lup-20(29)-en-3-ona

G3 apresentou-se como um óleo viscoso amarelado, obtido a partir do fracionamento por CC do sólido (IGHs) que precipitou durante a remoção do solvente do extrato hexânico dos galhos de *M. imbricata* (IGH). Após secagem em aparelho de Abdem-Haldem adquiriu aspecto de um sólido brilhante em forma de agulhas.

A análise por CCD em diferentes sistemas de eluição e a comparação com amostras autênticas mostrou que G3 consistia em uma mistura de triterpenos lupânicos. O espectro no IV (Figura 2.12) mostra a presença de bandas de absorção em 3444 cm^{-1} características de $\nu_{\text{O-H}}$, absorções em 2948 e 2872 cm^{-1} correspondentes a $\nu_{\text{C-H}}$ de compostos alifáticos. Mostra ainda uma banda na região de 1700 cm^{-1} , correspondente a grupo carbonila, e outra em 1466 cm^{-1} , característica de deformação C-H de alcanos.

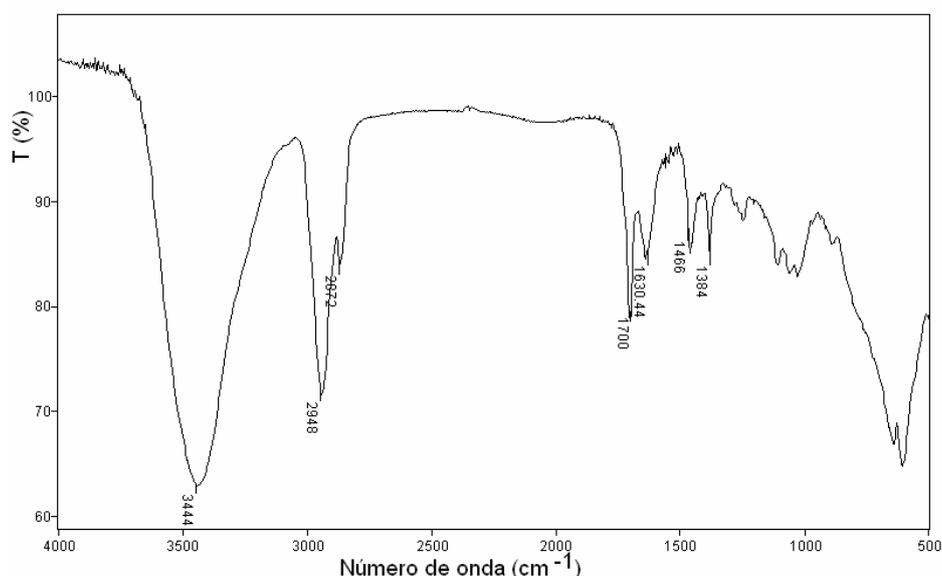


Figura 2.12: Espectro obtido no IV de G3 [mistura de 3-oxo-lup-20(29)-en-30-al, 11 α -hidroxi-lup-20(29)-en-3-ona e 30-hidroxi-lup-20(29)-en-3-ona] (KBr).

A análise por CG – EM de G3 indicou a presença majoritária dos lupanos 3-oxo-lup-20(29)-en-30-al (G2), 30-hidroxi-lup-20(29)-en-3-ona (G4) e 11 α -hidroxi-lup-20(29)-en-3-ona (G5), que foram confirmados através da comparação com os respectivos padrões (Tabela 2.3).

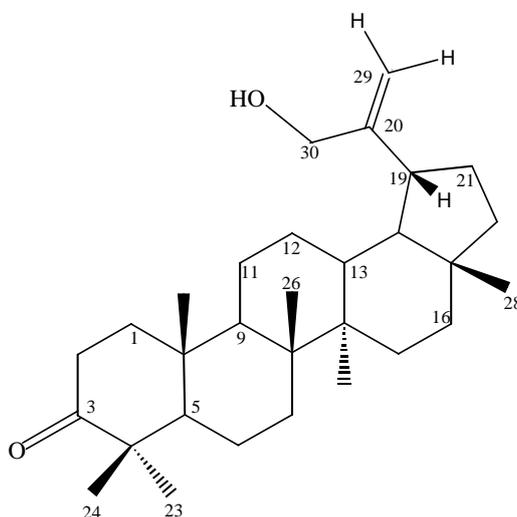
Tabela 2.3: Substâncias identificadas por CG-EM na amostra G3

T_R padrão	T_R amostra	Identificação	%
66,316	66,875	11 α -hidroxi-lup-20(29)-en-3-ona	13,72
67,145	67,964	3-oxo-lup-20(29)-en-30-al	2,06
70,460	70,026	30-hidroxi-lup-20(29)-en-3-ona	51,69

T_R = tempo de retenção. % = porcentagem relativa na amostra

Condições de análise: coluna cromatográfica DB-5 de 30 m de comprimento e 0,25 mm de diâmetro interno e 0,5 μ de espessura do filme; temperaturas de 220 $^{\circ}$ C no injetor e 240 $^{\circ}$ C no detector; programação da temperatura de realização das análises de 60 a 290 $^{\circ}$ C, sendo acrescida de 3 $^{\circ}$ C por minuto durante 25 min; o fluxo do gás foi de 1,0 mL/min.

G4: 30-hidroxi-lup-20(29)-en-3-ona



G4 foi obtido a partir do fracionamento por CC do sólido que precipitou durante a preparação do extrato hexânico dos galhos de *M. imbricata* (IGHs), apresentou-se como um sólido branco, de ponto de fusão de 178,0 a 180,8 $^{\circ}$ C e exibiu teste de Liebermann Burchard positivo para TTPC.

O espectro obtido no IV (Figura 2.13, pág. 40) apresenta bandas de absorção em 3541 e 3464 cm^{-1} correspondente a $\nu_{\text{O-H}}$; em 2936 e 2866 cm^{-1} correspondentes

a ν_{C-H} alifáticos e 1380 cm^{-1} correspondente à deformação da ligação C-H. Apresenta também uma banda de absorção forte em 1694 cm^{-1} característica de $\nu_{C=O}$ de cetona em anel de 6 membros, 1644 cm^{-1} correspondente ao $\nu_{C=C}$ de alquenos, 1452 cm^{-1} referente a deformação da ligação C-H de alcanos alicíclicos e bandas entre 1030 e 896 cm^{-1} correspondentes ao ν_{O-H} de álcool primário.

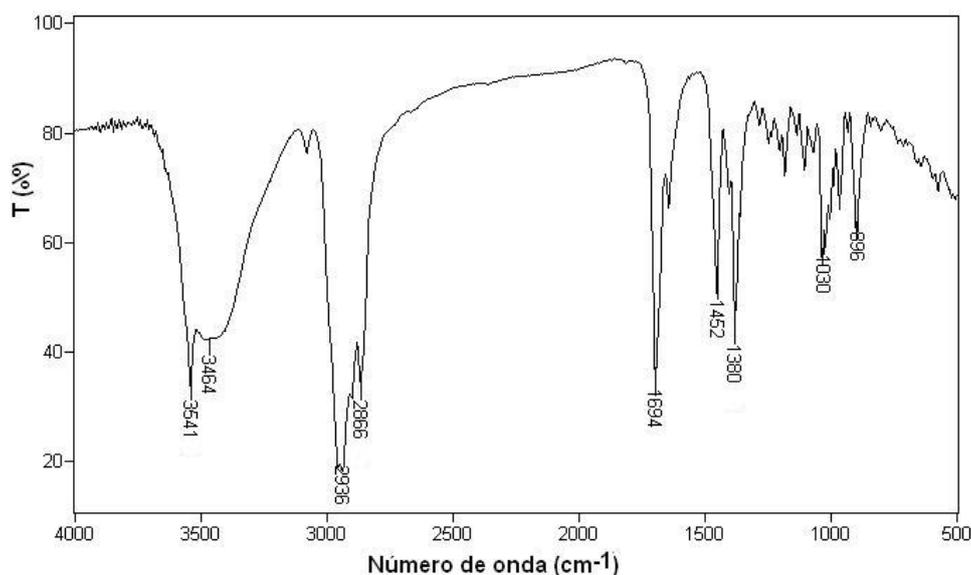


Figura 2.13: Espectro de G4 [30-hidroxilup-20(29)-en-3-ona] obtido no IV (KBr)

O espectro de RMN de ^1H (Figura 2.14, pág. 41) mostra 6 simpletos em δ_{H} 1,07, 1,06, 1,02, 0,96, 0,93 e 0,79 indicativos de hidrogênios metílicos e sinais múltiplos entre δ_{H} 2,49 e 1,33 correspondentes a hidrogênios metilênicos e metínicos. Mostrou ainda um multipletto entre δ_{H} 4,17 e 4,07, característico de grupo metilênico contendo um grupo hidroxila (SILVERSTEIN, 1994), e um duplo dupletto referente aos hidrogênios olefínicos em δ_{H} 4,95 e 4,93 (Figura 2.14, pág. 41).

Através da análise do espectro de RMN de ^{13}C (Figura 2.15, pág. 42) e do subespectro DEPT-135 (Figura 2.16, pág. 43) foi possível identificar 29 sinais de carbono (Tabela 2.4, pág. 45), sendo seis metílicos, onze metilênicos, cinco metínicos e sete não hidrogenados característicos de triterpenos da série lupano (MAHATO e KUNDU, 1994; TINTO et al., 1992; CARPENTER et al., 1980)

Os espectros de RMN de ^{13}C e de RMN de ^1H de G4 foram muito semelhantes aos dados espectrométricos observados para o aldeído 3-oxo-lup-20(29)-en-30-al (G2) anteriormente descrito (página 27), porém apresentando um sinal de hidrogênio metilênico característico de álcool primário em δ_{H} 4,17.

Em função da similaridade estrutural das substâncias G4 e 3-oxo-lup-20(29)-en-30-al a discussão sobre os deslocamentos químicos de hidrogênio e carbono foi elaborada baseando-se nas diferenças observadas entre as duas substâncias.

A comparação entre os dados de G4 e G2, bem como os dados obtidos na literatura estão compilados na Tabela 2.4, página 45.

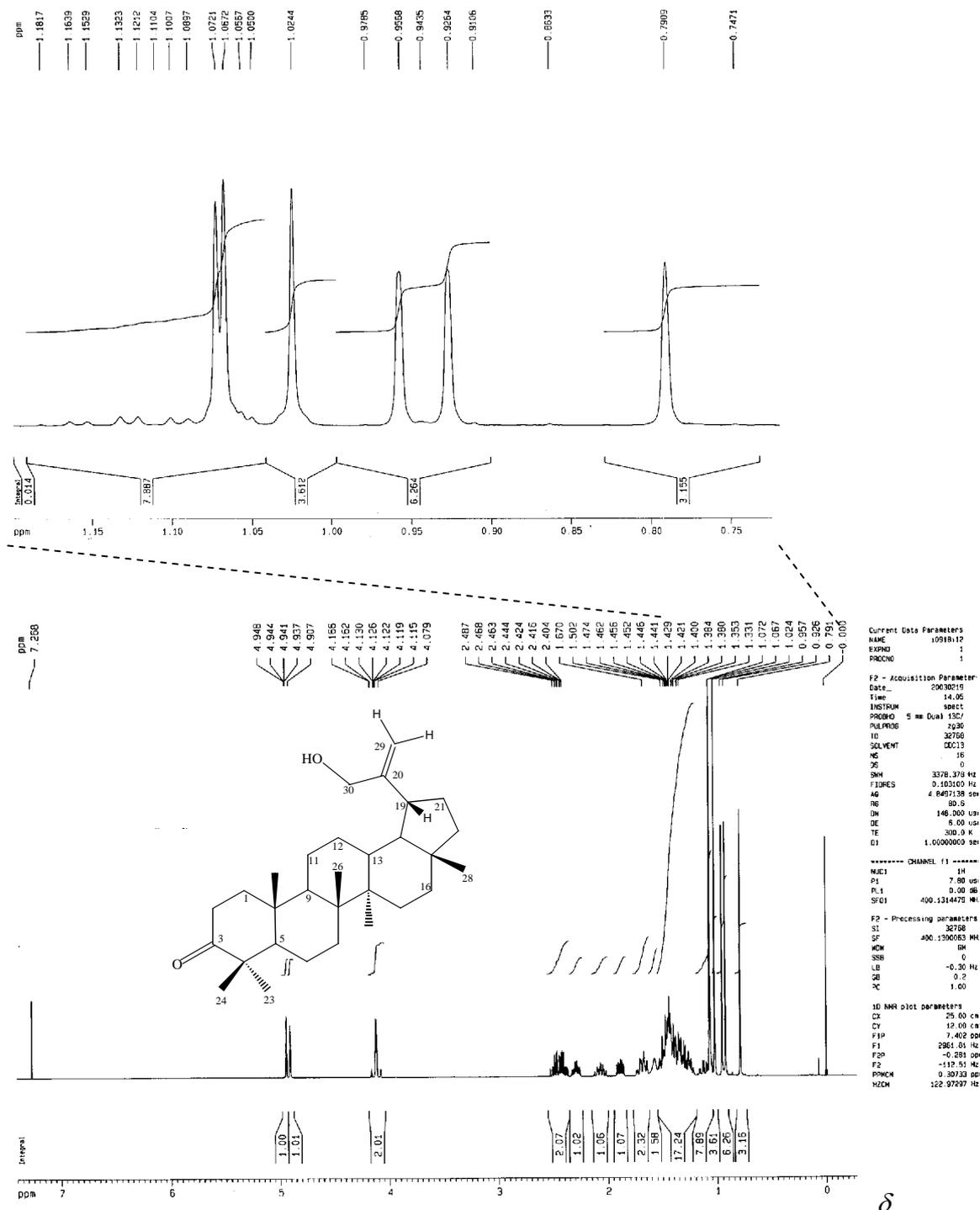


Figura 2.14: Espectro de RMN de ^1H de G4 [30-hidroxi-lup-20(29)-en-3-ona] (CDCl_3 ; 400 MHz). Em destaque ampliação da região entre δ_{H} 1,07 e 0,79.

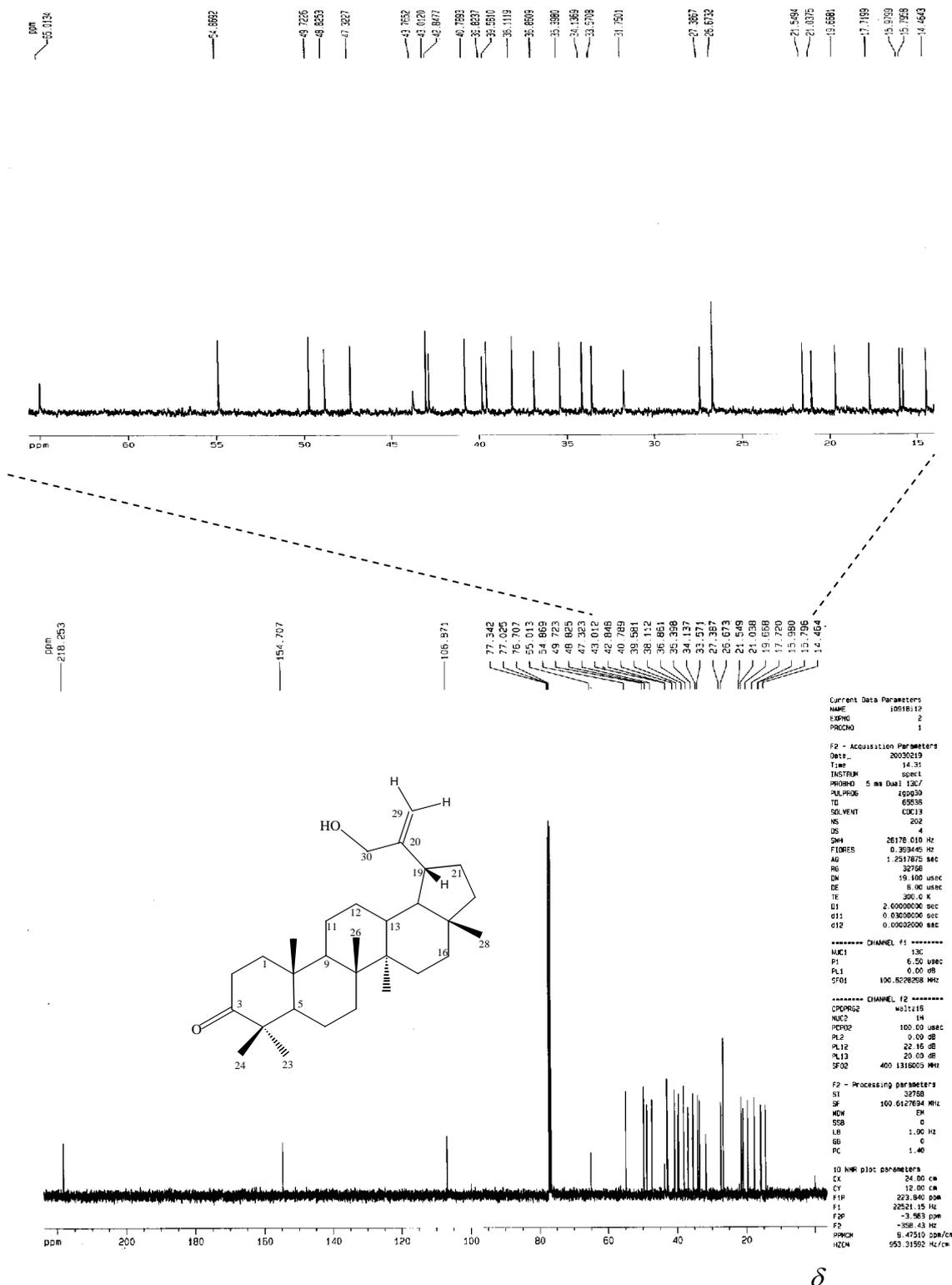


Figura 2.15: Espectro de RMN de ¹³C de G4 [30-hidroxi-lup-20(29)-en-3-ona] (CDCl₃; 100 MHz). Em destaque ampliação da região entre δ_C 65,01 e 14,46.

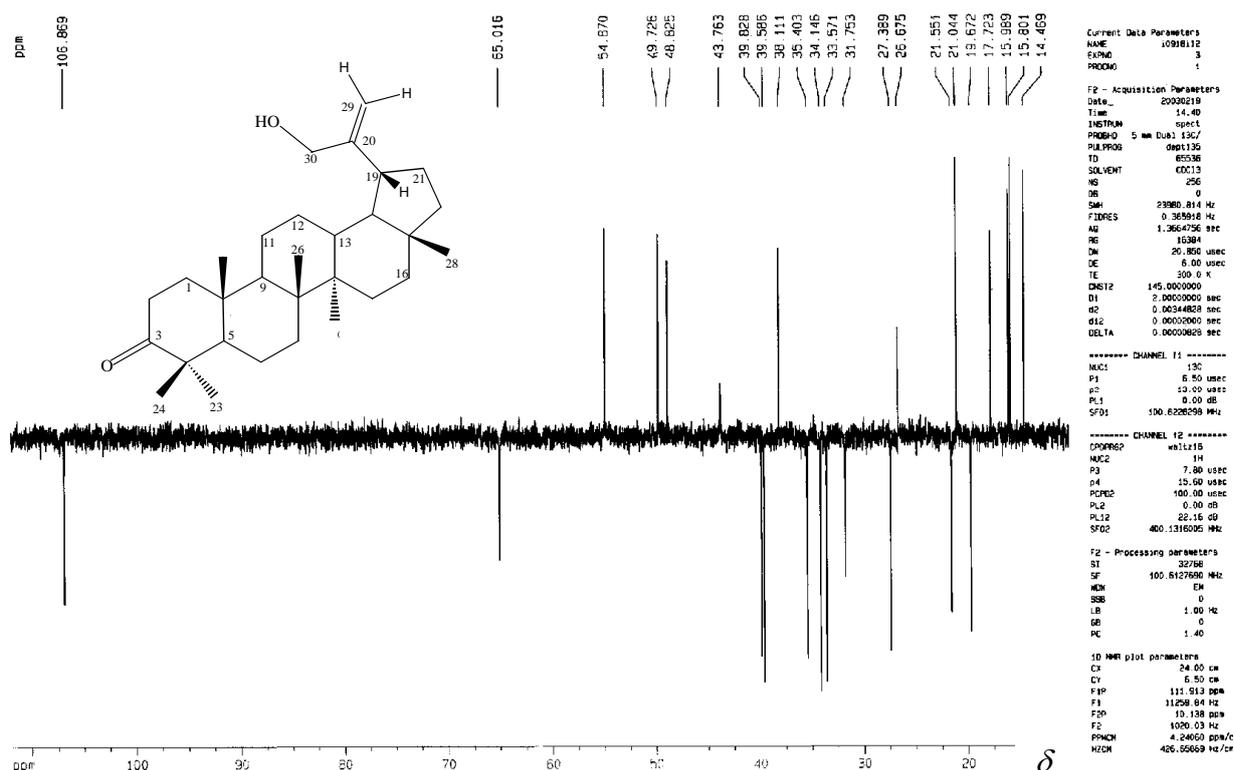


Figura 2.16: Subespectro DEPT-135 de G4 [30-hidroxi-lup-20(29)-en-3-ona] (CDCl_3 , 100 MHz).

Sabendo-se tratar de um TTPC da série lupano, foram obtidos os mapas de contornos HMQC (Figura 2.18, pág. 46) e HMBC (Figura 2.19 e 2.20 pág. 47 e 48) para G4 com o objetivo de determinar o grupo hidroxila e atribuir os deslocamentos químicos de todos os hidrogênios e carbonos da molécula.

Pela análise detalhada dos mapas de contornos HMQC e HMBC observa-se a correlação do sinal de carbono em δ_C 218,25 (C-3) com os hidrogênios em δ_H 2,42(H-2 α), 2,49 (H-2 β), 1,89 (H-1 β) e com os sinais em δ_H 1,07 (H-23) e 1,02 (H-24) (Figura 2.19, pág. 47). Estes, por sua vez, correlacionam-se com os sinais de carbono em δ_C 54,87 (C-5), 218,25 (C-3) e 47,32 (C-4), confirmando as mesmas correlações observadas para o aldeído 3-oxo-lup-20(29)-en-30-al (Figura 2.20, pág. 48).

Observa-se que o sinal de carbono em δ_C 26,67 apresenta uma intensidade maior que os demais sinais de carbono, sugerindo haver dois carbonos sobrepostos. Isto foi comprovado pela análise do mapa de contornos HMBC (Figura 2.19 e 2.20 pág. 47 e 48) onde o sinal do carbono em δ_C 26,67 apresenta correlação com o sinal de hidrogênio em δ_H 1,27 (H-11 β) e com o sinal da metila em δ_H 1,02 (H-24). Estas

correlações permitiram atribuir o sinal em δ_C 26,67 aos carbonos C-23 e C-12. Foi possível observar ainda a correlação do C-27 (δ_C 14,46) com o hidrogênio H-12 (δ_H 1,13), o que reforça a atribuição de C-12.

O sinal de hidrogênio em δ_H 4,91 mostra correlação por HMBC com os sinais de carbono em δ_C 65,01 e 43,77, sendo atribuídos respectivamente a C-30 e C-19 (Figura 2.19, pág. 47). O sinal de carbono em δ_C 154,71 correlacionou-se com o sinal de hidrogênio em δ_H 4,13, sendo então atribuído a H-30. Estes dados permitem localizar o grupo OH no carbono C-30.

O espectro de Massas de G4 (Figura 2.17) não apresentou o pico do íon molecular, porém pode-se observar o pico em m/z 441 (M+H; 9,8%) e picos característicos de TTPC da série lupano em m/z 205 (61%), 189 (22%), formados a partir da clivagem do anel C e m/z 383 (8%), formado a partir da perda do grupo C_3H_4OH , ligado ao anel E. Os prováveis caminhos de fragmentação, de acordo com MATHE et al., (2004) são apresentados no Esquema 2.2, pág. 45.

Através dos resultados obtidos pelas análises espectrométricas foi possível identificar G4 como sendo o lupano 30-hidroxilup-20(29)-en-3-ona.

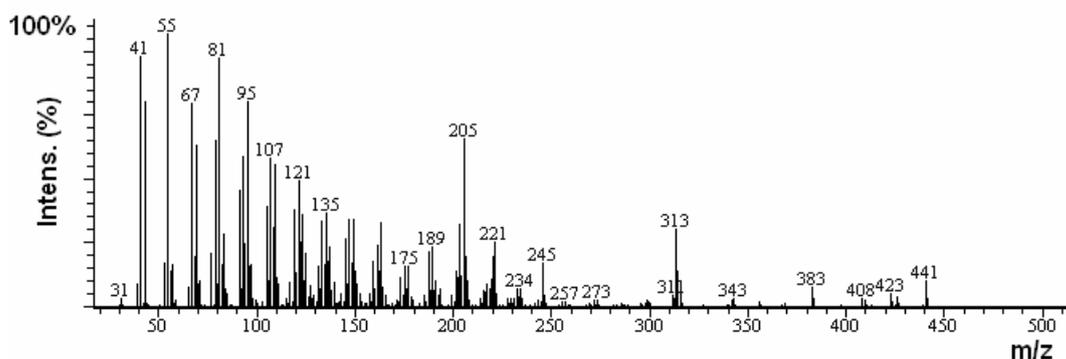
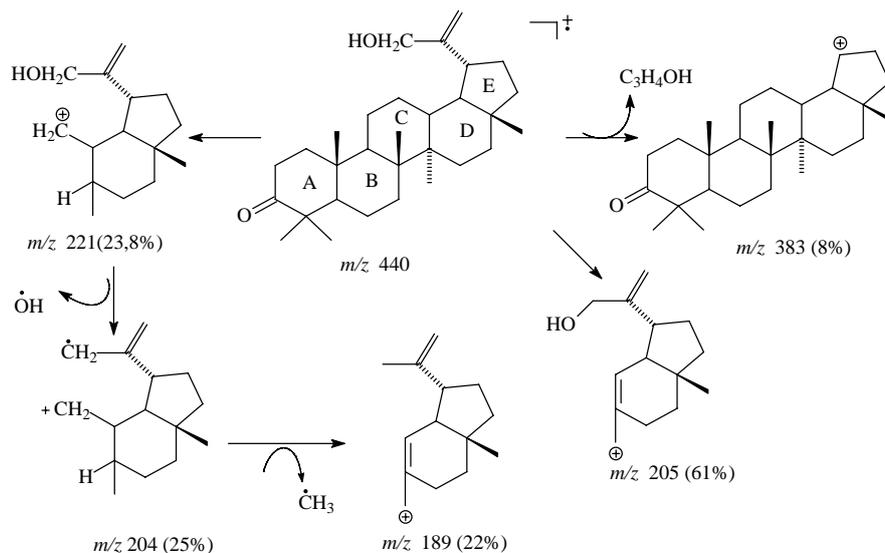


Figura 2.17: Espectro de Massas de G4 [30-hidroxi-lup-20(29)-en-3-ona]. Cromatógrafo CG-17A- CG-EM QP5050, EI, 70 eV. A faixa de análise do EM foi de 30 a 600 Daltons.



Esquema 2.2: Prováveis caminhos de fragmentação para G4 (MATHE et al., 2004).

Tabela 2.4: Atribuição dos sinais de RMN de ¹³C e RMN de ¹H para G4 [30-hidroxi-lup-20(29)-en-3-ona] (CDCl₃; 100 MHz)

C _n	δ _c	DEPT	HMBC	δ _H	δ _c G2	Lit. ^a δ _c
1	39,58	CH ₂	H-3	1,89	39,66	39,6
2	34,14	CH ₂	H-1 e 3	2,42; 2,49	34,16	34,1
3	218,25	C=O			217,16	218,3
4	47,32	C			47,37	47,3
5	54,87	CH		1,31	55,06	54,9
6	19,67	CH ₂		1,47	19,70	19,7
7	33,57	CH ₂		1,43	33,66	33,6
8	40,79	C			40,81	40,8
9	49,72	CH	H-26 e 25	1,38	49,68	49,7
10	36,86	C			36,92	36,9
11	21,55	CH ₂	H-12 e 9	1,27	21,52	21,6
12	26,67	CH ₂	H-27	1,13	27,64	26,7
13	38,11	CH		1,67	37,93	38,1
14	42,85	C			42,83	42,9
15	27,39	CH ₂	H-27	1,70; 1,05	27,40	27,4
16	35,40	CH ₂		1,35; 1,52	39,96	35,4
17	43,01	C			43,32	43,0
18	48,83	CH	H-19	1,50	37,86	48,8
19	43,77	CH		2,29		43,8
20	154,71	C			157,21	154,7
21	31,75	CH ₂		1,29; 2,06	34,14	31,8
22	39,82	CH ₂	H-18 e 19	1,26; 1,28	35,39	39,8
23	26,67	CH ₃	H-3 e 4	1,07	26,65	26,7
24	21,04	CH ₃	H- 3, 23 e 4	1,02	21,09	21,0
25	15,98	CH ₃	H-1, 9, 5 e 10	0,93	15,91	16,0
26	15,80	CH ₃		1,06	15,81	15,8
27	14,46	CH ₃	H-15, 13, 14 e 8	0,96	14,39	14,5
28	17,72	CH ₃	H-17, 16 e 22	0,79	17,84	17,7
29	106,87	=CH ₂	H-30 e 19	4,91; 4,93	133,05	106,8
30	65,01	CH ₂ OH	H-29 e 20	4,17; 4,07	194,99	65,0

^a MAHATO, S. B. e, KUNDU, A. P., *Phytochemistry*, v. 37, n. 6, p.1517-1575,1994.

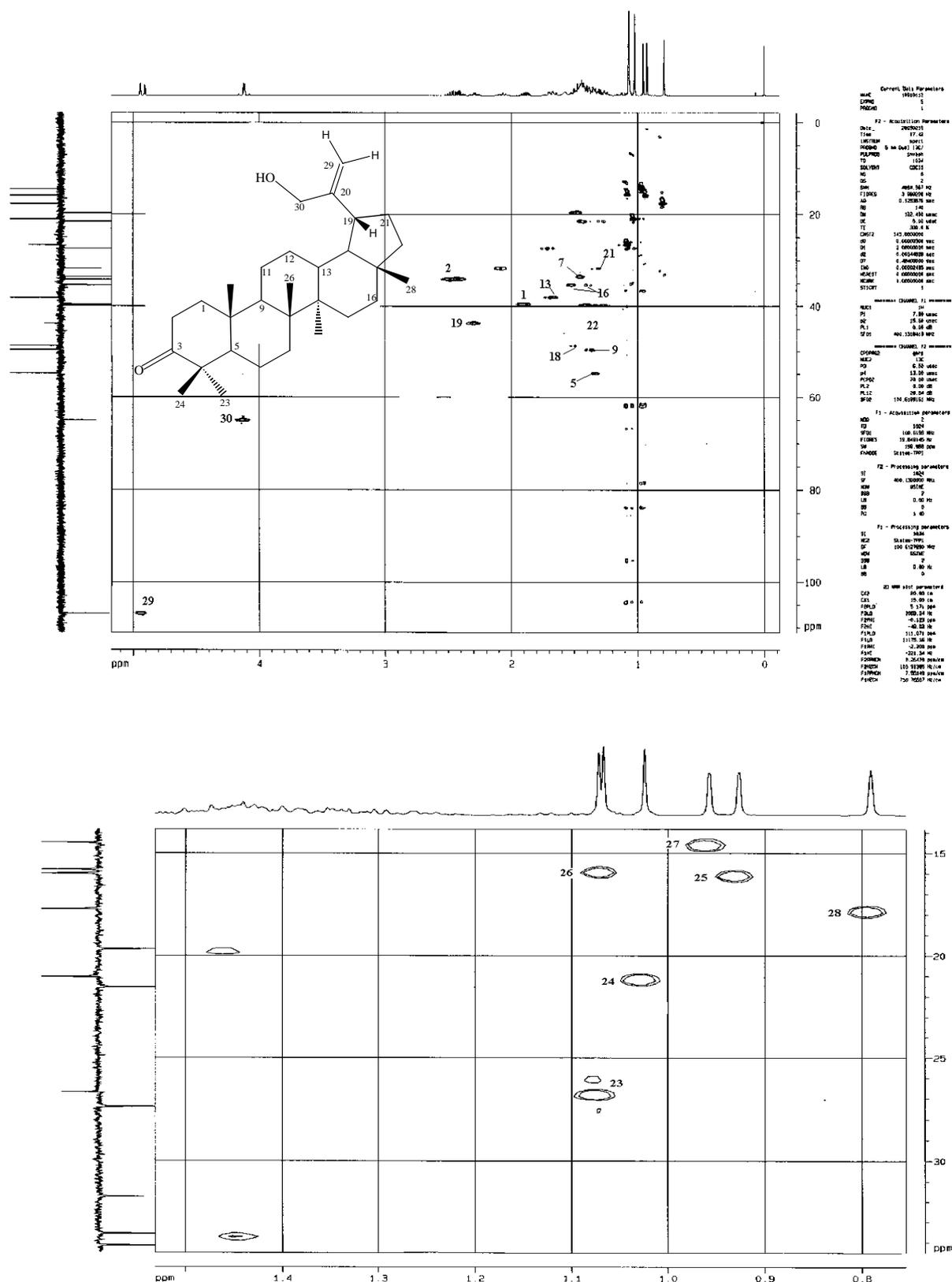


Figura 2.18: Mapa de contornos HMQC de G4 [30-hidroxi-lup-20(29)-en-3-ona] (CDCl₃; 400 MHz). Em destaque ampliação da região entre δ_H 0,8 e 1,5.

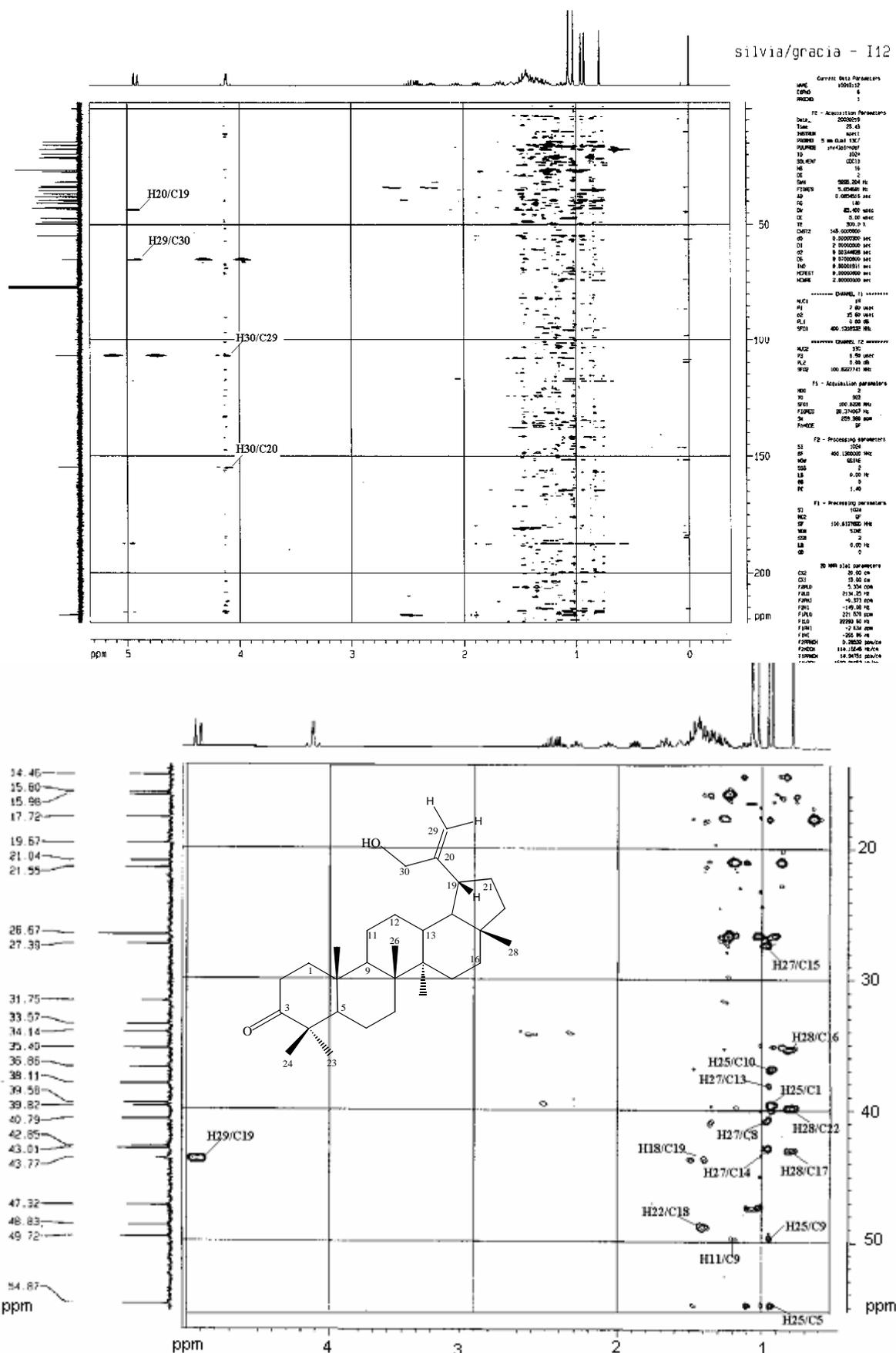


Figura 2.19: Mapa de contornos HMBC de G4 [30-hidroxi-lup-20(29)-en-3-ona] (CDCl₃; 400 MHz). Em destaque ampliação da região entre δ_H 0,8 e 5,0.

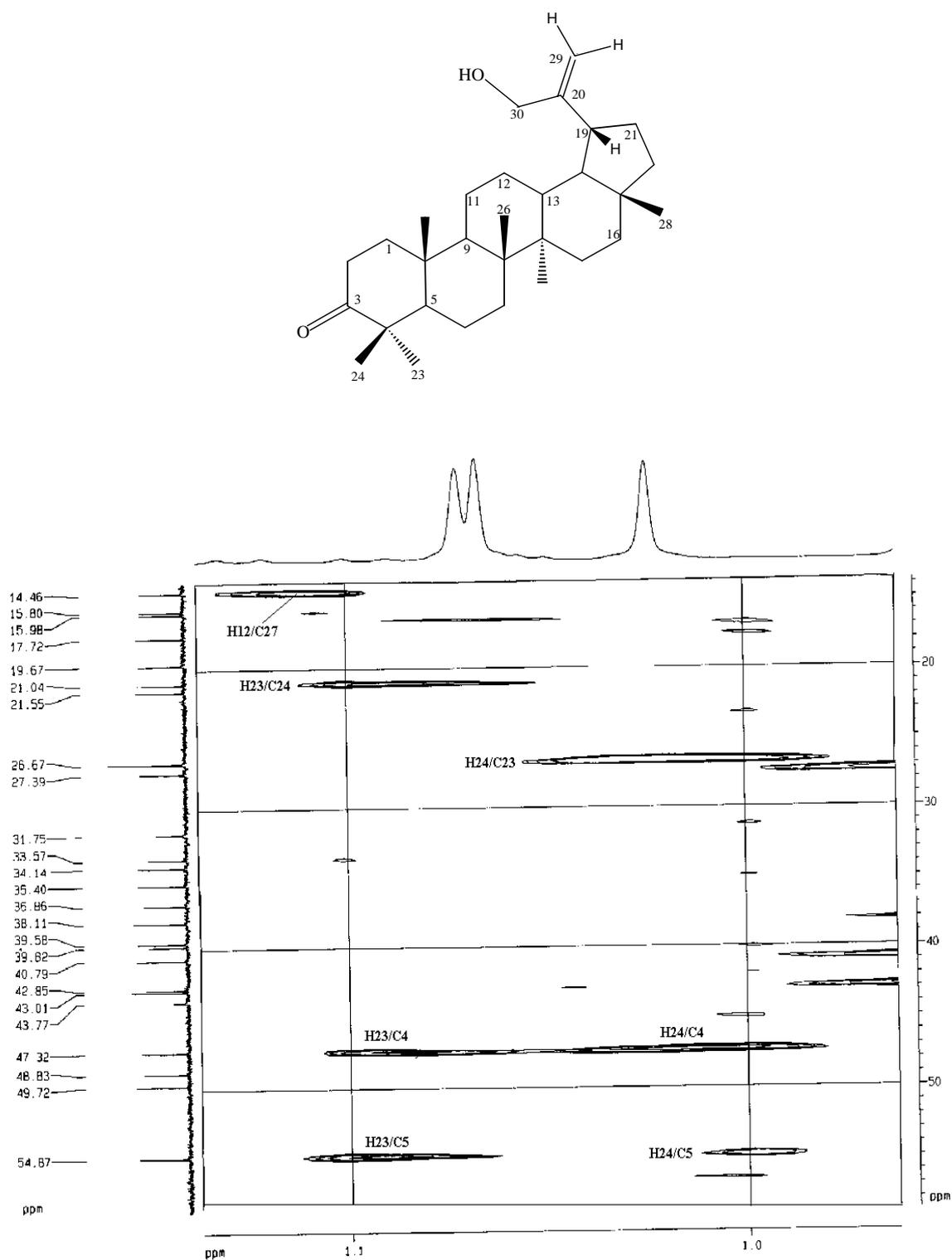
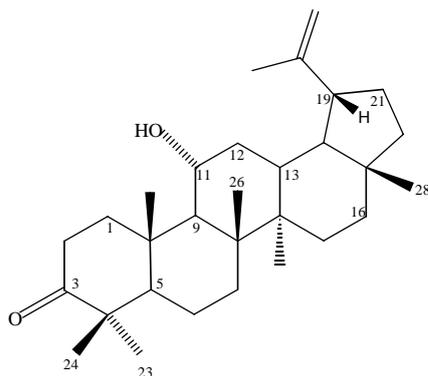


Figura 2.20: Seção expandida do mapa de contornos HMBC de G4 [30-hidroxi-lup-20(29)-en-3-ona] (CDCl_3 ; 400 MHz), da região entre δ_{H} 0,96 e 1,14.

G5: 11 α -hidroxi-lup-20(29)-en-3-ona

G5 apresentou-se como um sólido branco, de ponto de fusão 155,8 - 158,6 °C e foi obtido a partir do fracionamento sólido que precipitou durante a preparação do extrato hexânico dos galhos de *M. imbricata* (IGHs).

O espectro no IV (Figura 2.21) mostra a presença de bandas de absorção em 3500-3000 cm^{-1} características de $\nu_{\text{O-H}}$, em 2940 e 2850 cm^{-1} correspondentes ao $\nu_{\text{C-H}}$ de estruturas alifáticas. Mostra ainda uma banda forte em 1688 cm^{-1} correspondente a $\nu_{\text{C=O}}$ de grupo carbonila de cetona, além das bandas em 1457 e 1385 cm^{-1} correspondente à deformação assimétrica e simétrica de CH_3 , respectivamente.

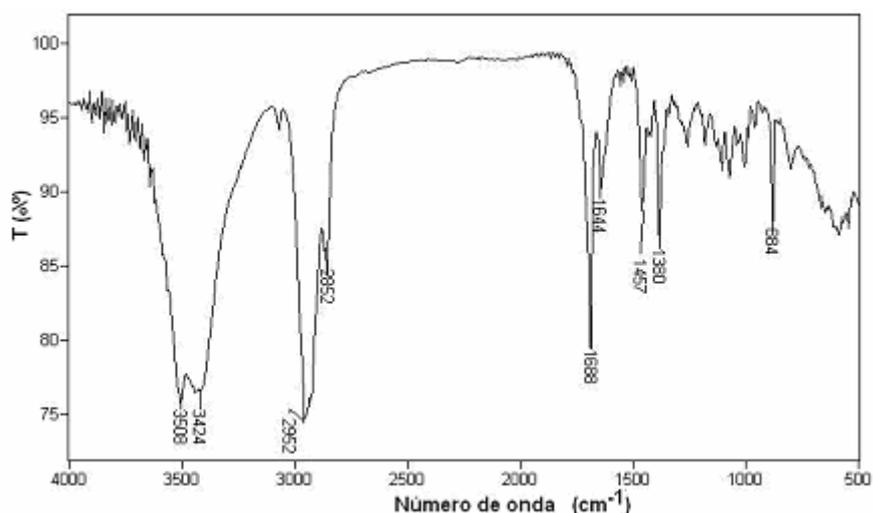


Figura 2.21: Espectro de G5 [11 α -hidroxilup-20(29)-en-3-ona] obtido no IV (KBr).

O espectro de RMN de ^1H (Figura 2.22, pág. 54) mostra a presença de 6 simples em δ_{H} 1,69 (3H), 1,09 (3H), 1,07 (6H), 1,06 (3H), 0,98 (3H) e 0,79 (3H) totalizando sete grupos metílicos e sinais múltiplos entre δ_{H} 2,48 e 2,39 e δ_{H} 1,68 e

1,28, correspondentes a hidrogênios metilênicos e metínicos. Mostra também um tripleto duplo em δ_{H} 3,91 ($J = 10,9$ e $5,9$ Hz) característico de hidrogênio metínico de álcool secundário em posição axial e dois multipletos em δ_{H} 4,60 e 4,72 correspondentes a dois hidrogênio olefínicos (SILVERSTEIN, 1994).

Pela análise do espectro de RMN de ^{13}C (Figura 2.23, pág. 55) e do subespectro DEPT-135 (Figura 2.24, pág. 56) foi possível determinar a presença de 29 sinais de carbono, sendo sete metílicos, dez metilênicos, seis metínicos e seis não hidrogenados.

Os sinais de carbono em δ_{C} 109,95 ($=\text{CH}_2$) e 150,20 ($=\text{C}$) permitiram concluir que G5 tratava-se de um TTPC da série lupano. Baseados neste fato, para localização do grupo hidroxila no esqueleto lupano e atribuição dos sinais de RMN de ^1H e de ^{13}C presentes no espectro, foram obtidos os mapas de contorno HMQC (Figura 2.25 e 2.26, pág. 57 e 58), HMBC (Figura 2.27, pág. 59), NOESY (Figura 2.28, pág. 60) e COSY (Figura 2.29, pág. 61) de G5.

Pela análise do mapa de contornos HMBC (Figura 2.27, pág. 59), observa-se que o sinal de carbono em δ_{C} 218,84 (C-3) correlaciona-se com os hidrogênios em δ_{H} 2,67 (H-1ax), 2,49, 2,51 (H-2 α), 1,66 (H-1eq), 1,09 (H-23) e 1,06 (H-24). O sinal de hidrogênio em δ_{H} 2,67 (H-1) mostra correlação com os sinais de carbono em δ_{C} 54,76 (C-5), 34,21 (C-2), 16,71 (C-25) e 38,20 (C-10). O sinal de carbono em δ_{C} 38,20 (C-10) mostra correlação com o sinal de metila em δ_{H} 1,07 (H-25) (Figura 2.27, pág. 59).

O sinal de hidrogênio em δ_{H} 1,07 (H-25) correlaciona-se com os sinais de carbono em δ_{C} 54,87 (C-9), δ_{C} 54,76 (C-5), δ_{C} 42,07 (C-1) e δ_{C} 38,20 (C-10) (Figura 2.27, pág. 59) como pode ser observado no mapa de contornos HMBC. O sinal dos hidrogênios metílicos em δ_{H} 1,07 mostra também correlação com os sinais de carbono em δ_{C} 42,61 (C-14), 42,41 (C-8) e 34,27 (C-7), indicando que este sinal pode ser atribuído também aos hidrogênios da metila H-26 (Figura 2.27, pág. 59). O sinal de carbono em δ_{C} 54,87 (C-9) apresenta correlação com o hidrogênio em δ_{H} 3,91, atribuído ao carbono hidroxilado. Esta observação permitiu localizar a hidroxila em C-11.

A confirmação da posição da hidroxila foi feita através da análise do mapa de contornos NOESY (Figura 2.28, pág. 60) de G5, onde se observa a correlação H-11

axial com os sinais de metila em δ_H 1,07 (H-25, H-26), com o sinal em δ_H 1,81 (H-13 ax) e com sinal em δ_H 1,9 (H-12 eq) (Figura 2.28, pág. 60).

Continuando a análise do mapa de contornos HMBC (Figura 2.27, pág. 59), observou-se que o sinal de carbono em δ_C 37,17 (C-13) mostra correlação com o sinal dos hidrogênios metílicos em δ_H 0,98, atribuído a H-27 (δ_C 14,42). O sinal em δ_H 0,98, (C-27) correlaciona-se também com os sinais de carbono em δ_C 42,16 (C-14), 42,41 (C-8) e 27,41 (C-15) (Figura 2.27, pág. 59). Os sinais de hidrogênio olefínicos em δ_H 4,60 e 4,72 mostram correlação com os sinais de carbono em δ_C 47,70 (C-19), 19,37 (C-30) e 150,20 (C-20). Este último correlaciona-se também com os sinais de hidrogênio em δ_H 1,39 (H-21, δ_C 29,78) e δ_H 1,41 (H-18, δ_C 47,63).

O sinal de carbono em δ_C 47,63 (C-18) mostra correlação por HMBC com os sinais dos hidrogênios metílicos em δ_H 1,09 (H-23) e 1,06 (H-24), o que permite dizer que C-4 e C-18 têm o mesmo deslocamento químico, que pôde ser percebido também no espectro de RMN de ^{13}C (Figura 2.23, pág. 55), onde o sinal de carbono em δ_C 47,63 apresenta o dobro de intensidade em relação aos demais. Esta informação completa os 30 carbonos encontrados em um TTPC.

O carbono em δ_C 47,63 (C-18) mostra também correlação com o sinal de hidrogênio em δ_H 0,79, que só pode ser a metila 28. O sinal dos hidrogênios da metila 28 (δ_H 0,79) mostra correlação com os sinais de carbono em δ_C 43,05 (C-17) e δ_C 35,40 (C-16 ou C-22) e δ_C 39,80 (C-16 ou C-22).

Através da análise do mapa de contornos NOESY (Figura 2.28, pág. 60), observa-se a correlação do hidrogênio olefínicos em δ_H 4,72 com o hidrogênio H-18 axial, H-19 axial, H-21 axial. Uma vez determinado o deslocamento químico de H-21 (δ_H 1,96), localizou-se por HMQC (Figura 2.25, pág. 57) o carbono 21 (δ_C 29,78).

A correlação observada no mapa de contornos NOESY (Figura 2.28, pág. 60) do hidrogênio olefínicos H-b com o hidrogênio H-18 (δ_H 1,41) e H-19 (δ_H 2,41) permite dizer que existem duas conformações possíveis para este grupo na molécula (Figura 2.30, pág. 52). O mesmo foi observado por BURNS et al., (2000) ao analisar a molécula do lup-20(29)-en-30-al-3-ol.

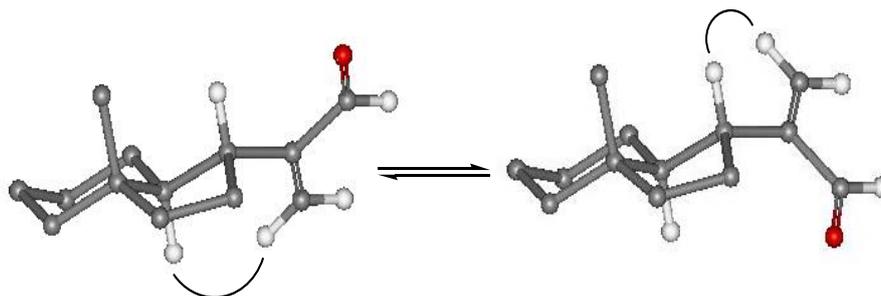


Figura 2.30: Conformações possíveis de G5 [11 α -hidroxi-lup-20(29)-en-3-ona], mostrando os hidrogênios olefínicos.

Todas estas informações permitem identificar G5 como sendo o lupano 11 α -hidroxi-lup-20(29)-en-3-ona.

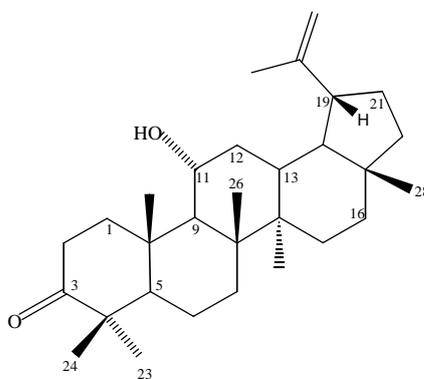
Esta substância já havia sido isolada anteriormente por ALVES et al., (2000), a partir do extrato clorofórmico (CHCl₃) dos galhos de *Maytenus obtusifolia* (*Celastraceae*). Nesta referência estão todas as atribuições dos carbonos e hidrogênios para o lupano 11 α -hidroxi-lup-20(29)-en-3-ona, porém, algumas atribuições propostas para G5 diferem das relatadas por ALVES et al. (2000) (Tabela 2.5, pág. 53).

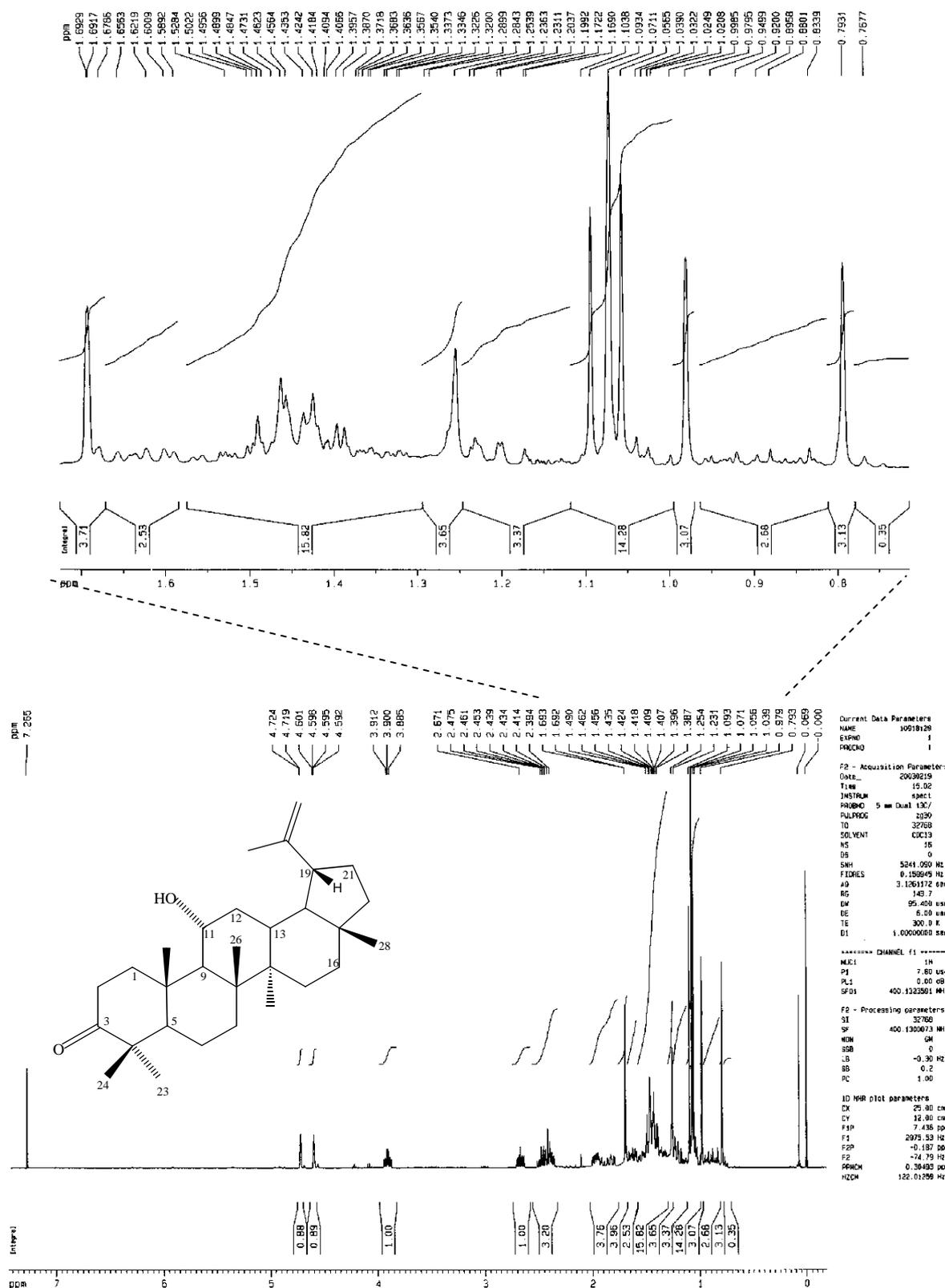
ALVES et al. (2000) atribui a C-12 o sinal em δ_C 27,3 e a C-15 o sinal em δ_C 37,4. Observa-se pelas análises dos mapas de contornos NOESY (Figura 2.28, pág. 60) e COSY (Figura 2.29, pág. 61) de G5 que estes valores não coincidem, pois H-12 encontra-se em δ_H 1,9, o que corresponde no HMQC ao δ_C 37,44 (Figura 2.27, pág. 59), o que mostra que a atribuição de ALVES et al. (2000) está incorreta. A comparação entre os dados de G5 com os dados obtidos na literatura estão compilados na Tabela 2.5, pág. 53.

Tabela 2.5: Atribuição dos sinais de RMN de ^{13}C e RMN de ^1H para G5 [11 α -hidroxilup-20(29)-en-3-ona] (CDCl_3 ; 100 MHz)

C_n	$\delta^{13}\text{C}$	DEPT	HMBC	δ_{H}	Lit. ^a δ_{C}
1	42,07	CH_2	H-3 e 5	2,67; 1,66	42,1
2	34,21	CH_2	H-3, 5 e 25	2,49; 2,51	34,1
3	218,84	$\text{C}=\text{O}$			218,9
4	47,63	C			47,6
5	54,76	CH		1,49	54,7
6	19,64	CH_2		1,46	19,5
7	34,27	CH_2		1,43; 1,44	35,5
8	42,41	C			43,0
9	54,87	CH		1,46	54,9
10	38,20	C			38,2
11	70,49	CHOH	H-9	3,91	70,2
12	37,44	CH_2		1,23; 1,99	27,3
13	37,17	CH		1,81	37,2
14	42,16	C			42,6
15	27,41	CH_2		1,62; 1,06	37,4
16	35,40	CH_2		1,42; 1,20	34,1
17	43,05	C			42,4
18	47,63	CH	H-20	1,41	47,7
19	47,70	CH	H-20 e 29	2,41	47,7
20	150,20	C			150,0
21	29,78	CH_2		1,39; 1,96	29,5
22	39,80	CH_2		1,19; 1,50	39,7
23	27,46	CH_3	H-3, 5, 24, 4	1,09	27,2
24	20,77	CH_3	H-3, 5, 23 e 4	1,06	20,6
25	16,71	CH_3	H-1, 9 e 10	1,07	16,7
26	16,86	CH_3	H-9, 7, 14 e 8	1,07	16,8
27	14,42	CH_3	H-15, 13, 14 e 8	0,98	14,2
28	18,08	CH_3	H-17 e 16, H-22 e 18	0,79	18,1
29	109,95	$=\text{CH}_2$	H-30 e 19	4,60; 4,72	109,8
30	19,37	CH_3	H-29, 20 e 19	1,69	19,3

^a ALVES et al., *Magn. Reson. Chem.* v. 38, p. 201-206, 2000; (CDCl_3 ; 125 MHz)





δ

Figura 2.22: Espectro de RMN de ¹H de G5 [11α-hidroxi-lup-20(29)-en-3-ona] (CDCl₃; 400 MHz). Em destaque ampliação da região entre δ_H 1,69 e 0,77.

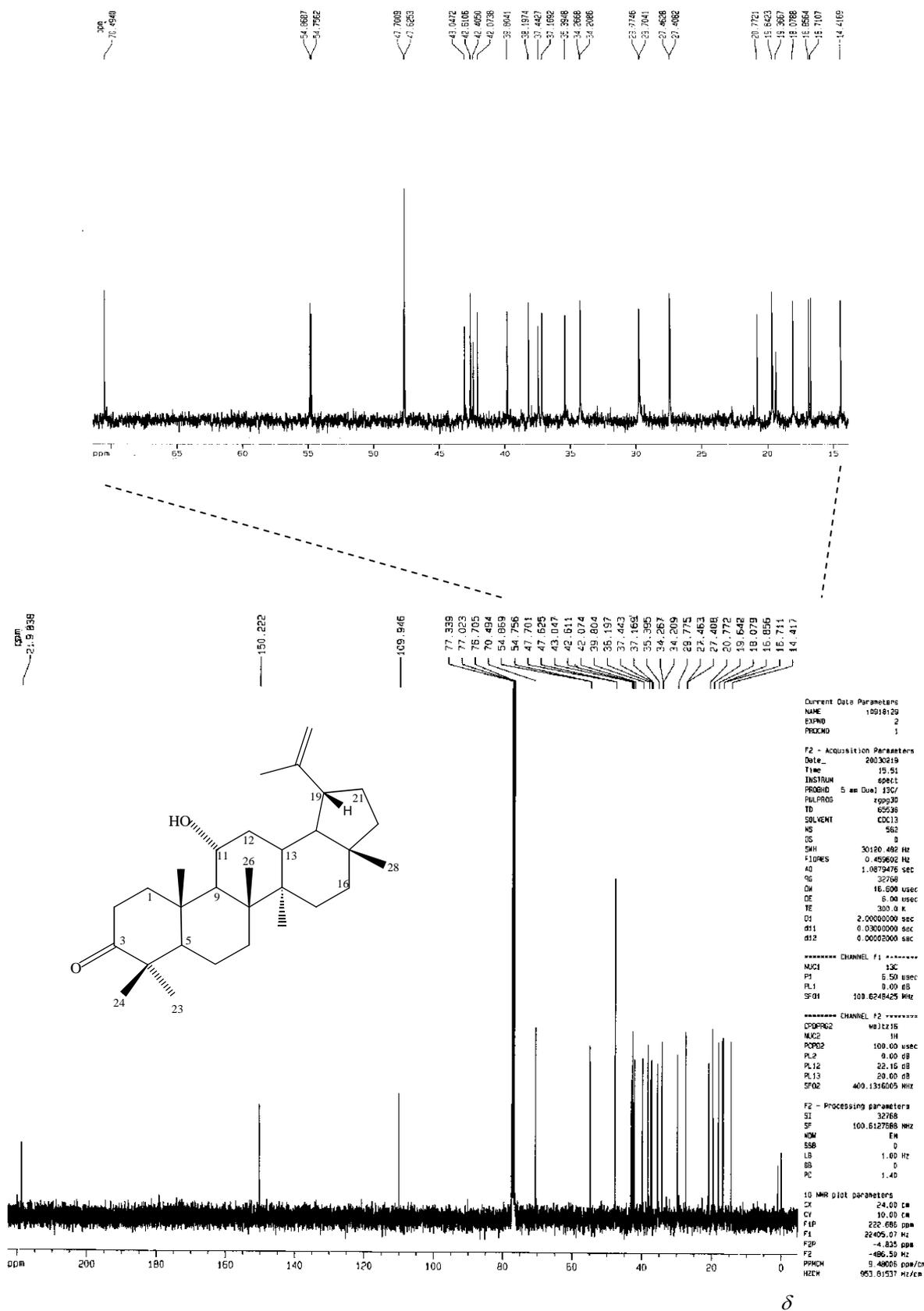


Figura 2.23: Espectro de RMN de ¹³C de G5 [11 α -hidroxi-lup-20(29)-en-3-ona] (CDCl₃; 100 MHz). Em destaque ampliação da região entre δ_C 70,49 e 14,42.

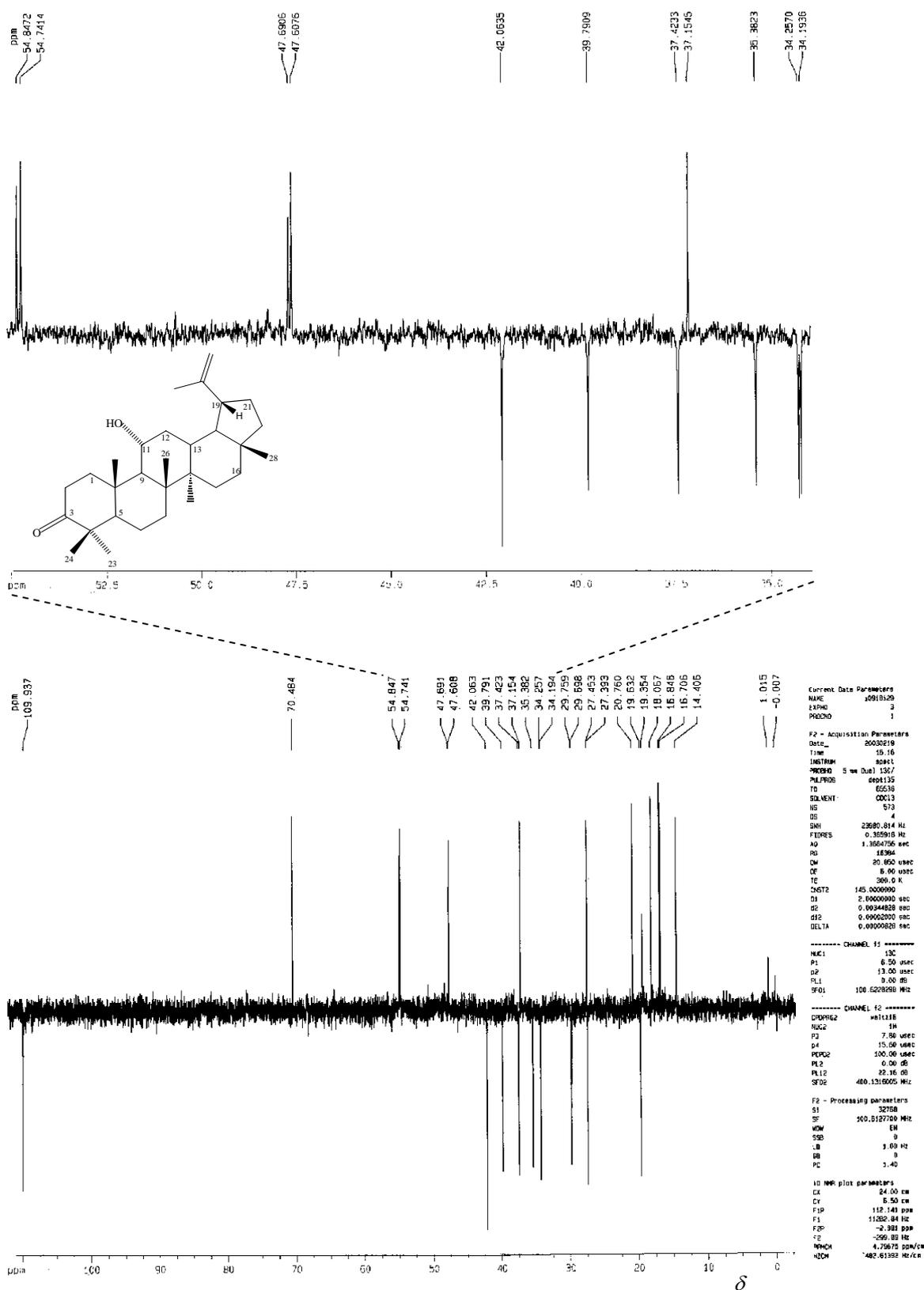


Figura 2.24: Subespectro DEPT-135 de G5 [11 α -hidroxi-lup-20(29)-en-3-ona] (CDCl₃; 100 MHz). Em destaque ampliação da região entre δ_C 54,85 e 34,19.

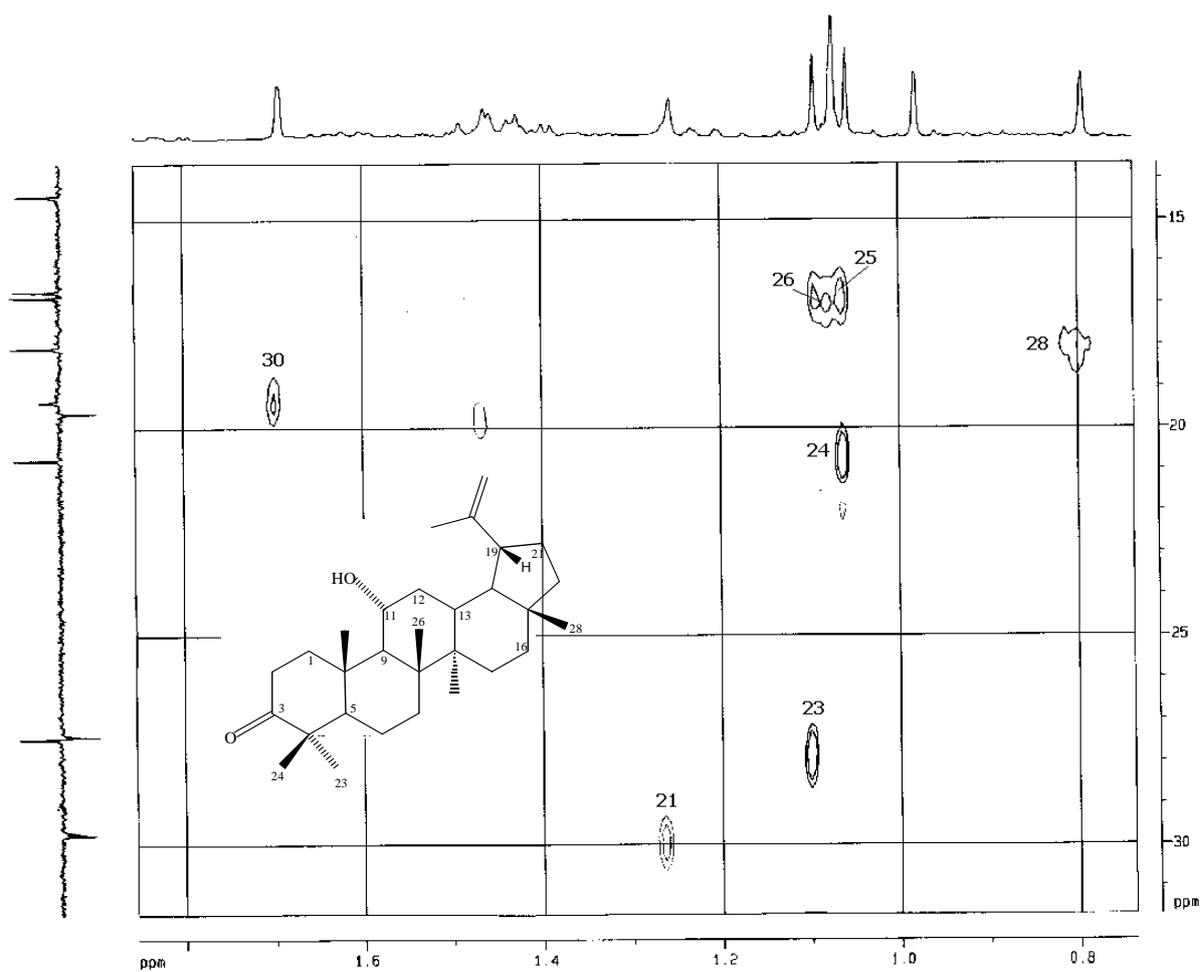


Figura 2.26: Seção expandida do mapa de contornos HMQC de G5 [11 α -hidroxilup-20(29)-en-3-ona] (CDCl₃; 400 MHz) região entre δ_H 1,69 e 0,79.

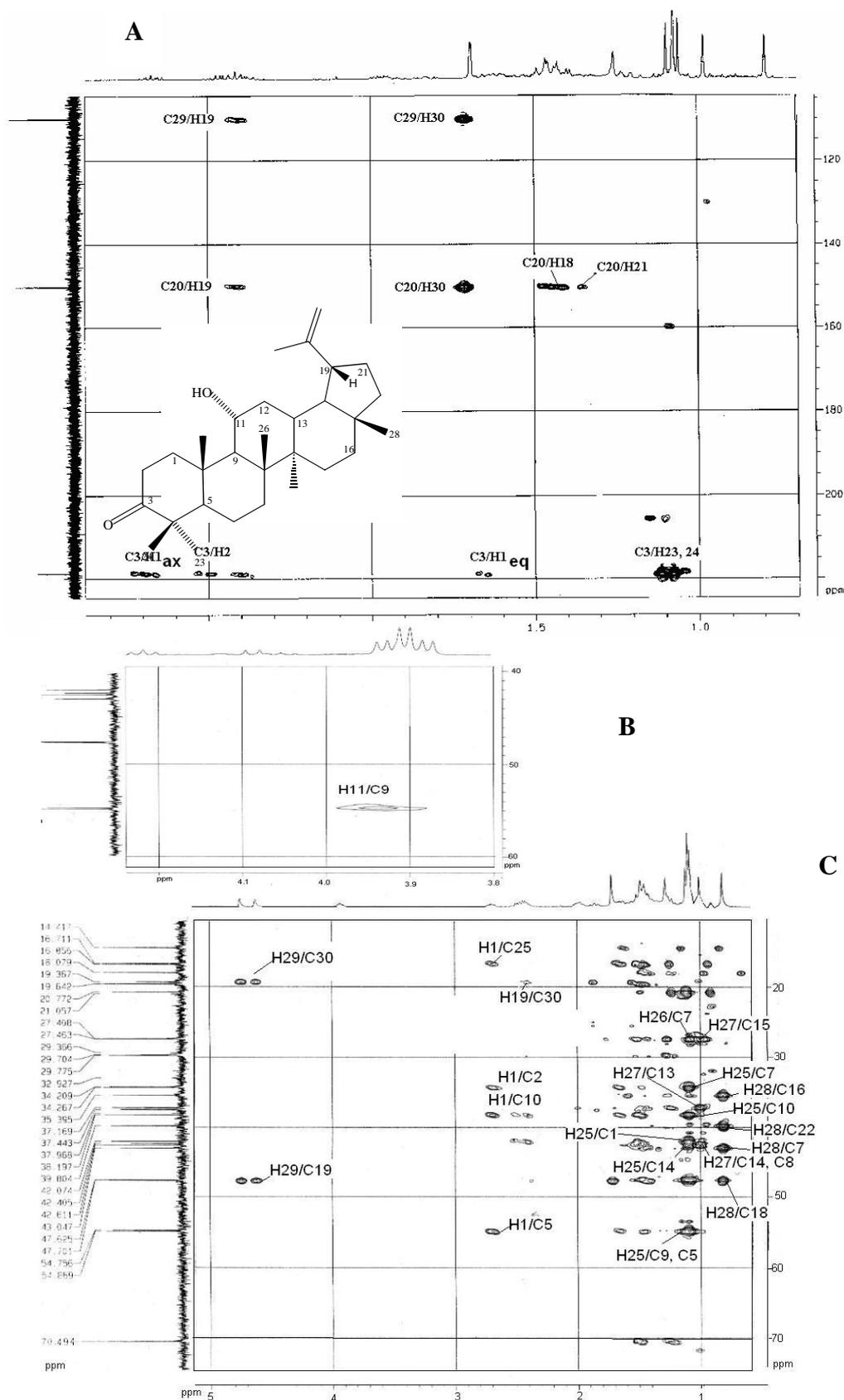


Figura 2.27: Seções expandidas dos mapas de contornos HMBC de G5 [11 α -hidroxi-lup-20(29)-en-3-ona] (CDCl₃; 400 MHz) entre: A) δ_H 2,67 e 0,79; B) 4,2 e 3,8 e C) 5,0 e 0,79.

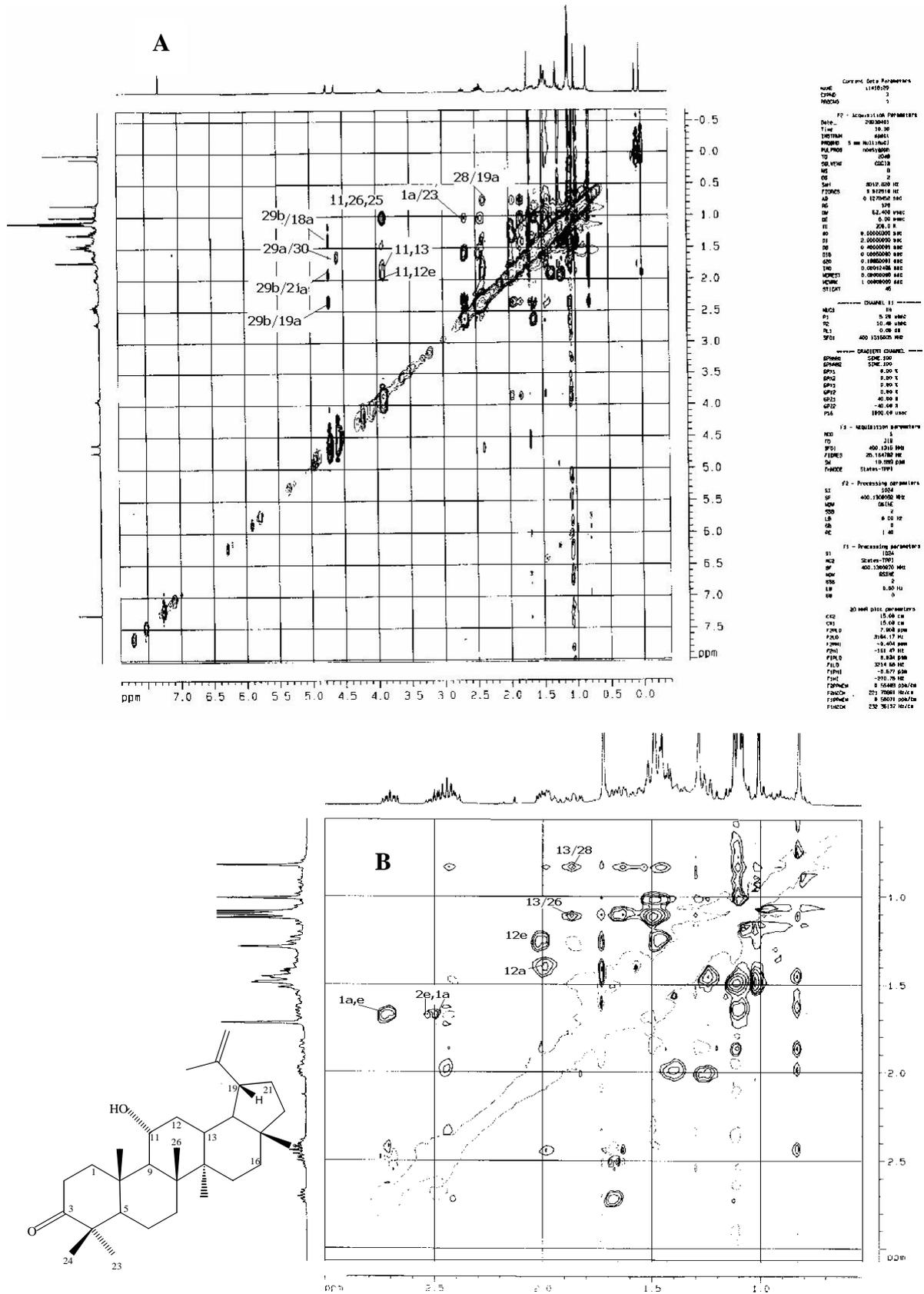


Figura 2.28: A: Mapa de contornos NOESY de G5 [11 α -hidroxi-lup-20(29)-en-3-ona] (CDCl₃; 400 MHz). B: Seção expandida entre δ_H 0,79 e 2,5.

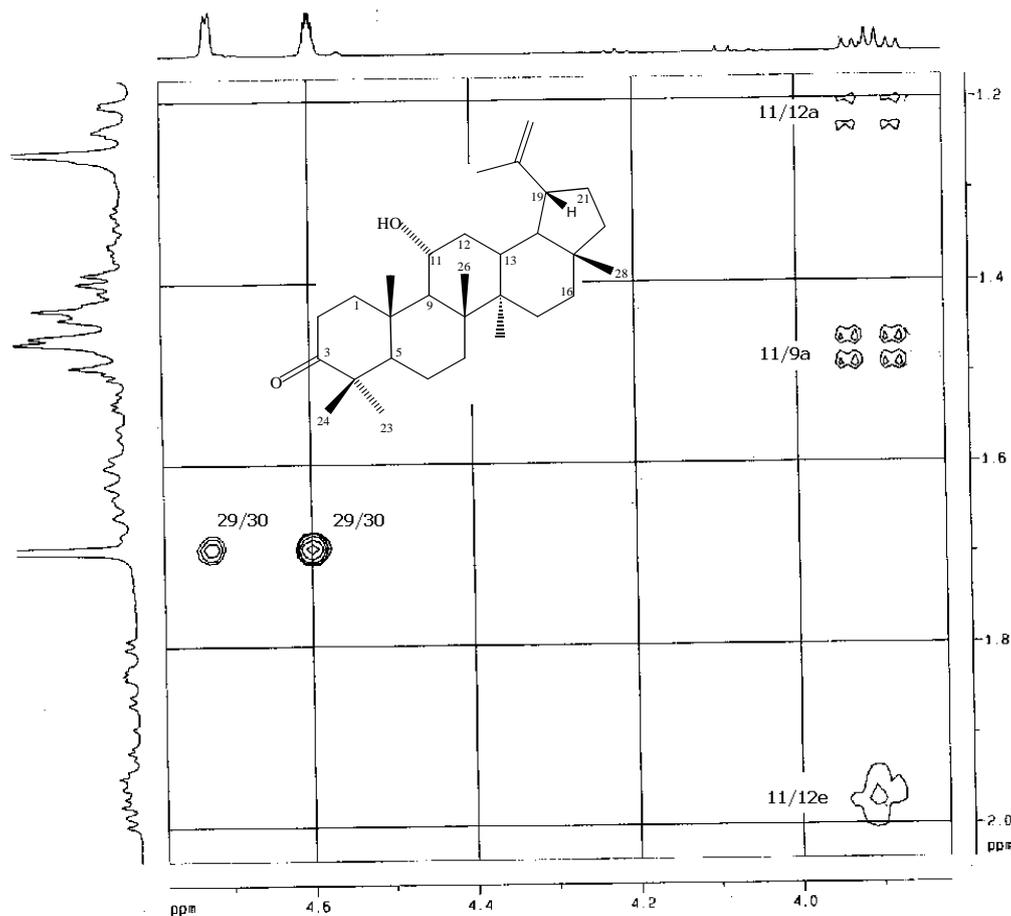
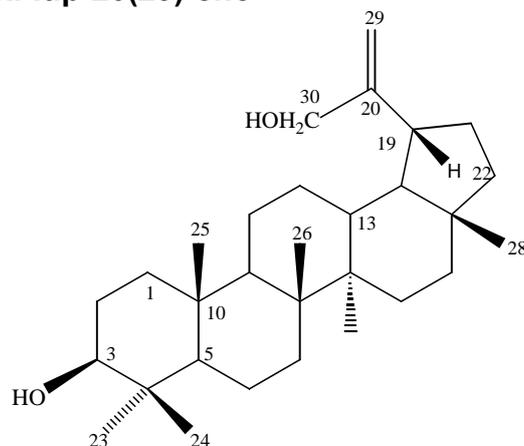


Figura 2.29: Mapa de contornos COSY de G5 [11 α -hidroxi-lup-20(29)-en-3-ona] (CDCl₃; 400 MHz). Em destaque ampliação da região entre δ_H 4,75 e 3,90.

G6; F5: 3 β ,30-Di-hidroxi-lup-20(29)-eno



G6 e F5 foram obtidos a partir dos fracionamentos cromatográficos de IGHS e IFH, respectivamente; G6 apresentou-se como um sólido branco de ponto de fusão 199-201 °C. Ao serem submetidas ao teste de Liebermann-Burchard ambas

amostras apresentaram teste positivo, com coloração róseo-violácea, sugerindo pertencer estes sólidos a classe dos TTPC. A análise comparativa por CCD em sistemas de eluentes de diferentes polaridades revelou a presença de apenas uma mancha nas amostras.

Os espectros obtidos no IV para G6 e F5 apresentaram perfil semelhante (Figura 2.31). A análise que se segue corresponde à amostra G6. O espectro no IV mostrou banda de absorção em 3500 a 3100 cm^{-1} , característico de $\nu_{\text{O-H}}$ de grupo hidroxila. Apresentou também bandas em 3000 a 2700 cm^{-1} que evidenciam o caráter alifático da amostra.

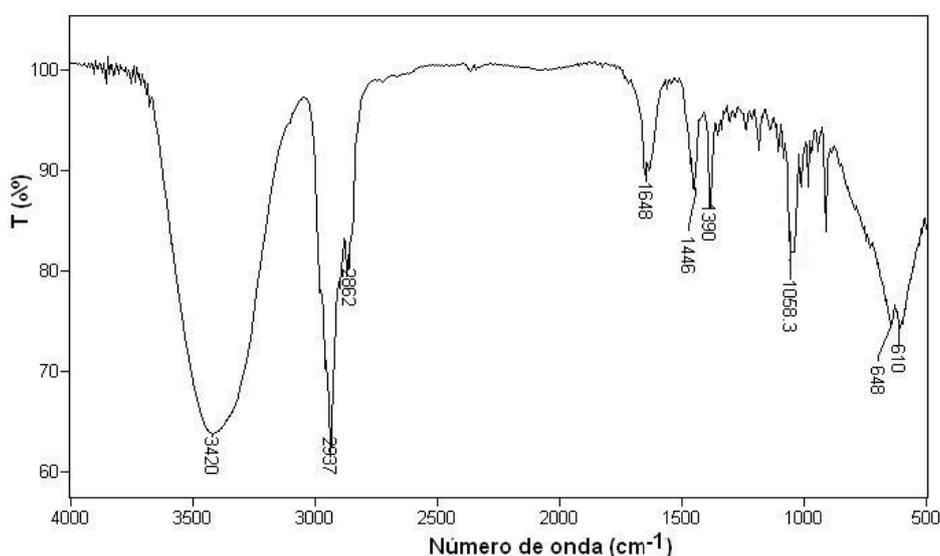


Figura 2.31: Espectro obtido no IV de G6 [$3\beta,30$ -di-hidroxi-lup-20(29)-eno] (KBr).

O espectro de RMN de ^1H (Figura 2.32, pág. 65) apresenta 5 simpletos em δ_{H} 1,02, 0,98, 0,94, 0,83, 0,78 (6H) referentes a 6 grupos metila. Apresenta ainda sinais múltiplos em δ_{H} 2,31 a 1,07, correspondentes aos hidrogênios metilênicos e metínicos e dois sinais em δ_{H} 4,98 e 5,00 correspondentes a dois hidrogênios olefínicos, um duplo duplete em 3,19 referente a hidrogênio metínico carbono hidroxilado, um triplo duplete em 2,29 ($J = 11,4$ e $5,6$ Hz) referente a hidrogênio metínico e um duplete em δ_{H} 4,13 ($J = 14,7$ Hz) referente a hidrogênio metilênico de álcool secundário.

O espectro de RMN de ^{13}C (Figura 2.33, pág. 66) e o subespectro DEPT - 135 (Figura 2.34, pág. 66) mostram a presença de 30 carbonos sendo 6 metílicos, 12 metilênicos, 6 metínicos e 6 não hidrogenados. Os sinais de carbono em δ_{C} 154,99 e 106,99 permitiram concluir que G6 tratava-se de um TTPC da série lupano.

A feição do espectro no IV e os dados de RMN permitiram concluir que G6 trata-se de um TTPC da série lupano com dois grupos OH. Baseados neste fato, para localização dos grupos hidroxila no esqueleto lupano e atribuição dos sinais de todos os hidrogênios e carbonos presentes na estrutura obtiveram-se os mapas de contorno HSQC (Figura 2.35, pág. 67) e HMBC (Figura 2.36, pág. 68) de G6.

Através da análise do mapa de contornos HMBC verifica-se que o sinal de hidrogênio em δ_H 3,19 (H-3) atribuído ao CH do álcool se correlaciona com os sinais de carbono em δ_C 0,98 (C-23) e 0,78 (C-24). O sinal de carbono em δ_C 38,94 (C-1) correlaciona-se com os hidrogênios em 1,66 (H-2), 0,66 (H-5), 0,83 (H-25) e δ_H 3,19 (H-3). Este fato permite localizar uma das hidroxilas em C-3 (Figura 2.36, pág. 68). O sinal de carbono em δ_C 55,38 (C-5) mostra correlação com os sinais de hidrogênios metílicos em δ_H 0,78 (H-24), 0,83 (H-25), 0,98 (H-23) e 1,37 (H-7) (Figura 2.36, pág. 68). O sinal de hidrogênio em δ_H 0,66 (H-5) mostra correlação com os sinais de carbono em δ_C 37,19 (C-10), 34,36 (C-7) e 18,35 (C-6) (Figura 2.36, pág. 68). O sinal de carbono em δ_C 37,19 (C-10) apresenta correlação com o hidrogênio em δ_H 1,23 (H-9) e, este, com os sinais de carbono em δ_C 34,36 (C-7), 40,89 (C-8), 16,01 (C-25) e 16,14 (C-26).

Continuando a análise do mapa de contornos HMBC (Figura 2.36, pág. 68), pode-se observar que o sinal de carbono em δ_C 43,24 (C-17) mostra correlação com o sinal de hidrogênio metílico em δ_H 0,78, atribuído à metila H-28 (δ_C 17,73). Este sinal, δ_H 0,78, correlaciona-se com o sinal de carbono em δ_C 39,89 (C-22) (Figura 2.36, pág. 68).

Os sinais dos hidrogênios olefínicos em δ_H 4,98 e 5,00 mostram correlação por HMBC com os sinais de carbono em δ_C 43,78 (C-19) e 64,63 (C-30) que pertence ao CH ligado a grupo hidroxila. O sinal de hidrogênio em δ_H 2,29 (H-19) se correlaciona com os sinais de carbono em δ_C 155,16 (C-20). Este último com os sinais dos hidrogênios olefínicos em δ_H 4,98 e 5,00 (H-29) e em δ_H 4,13 (H-30). Este fato permitiu localizar a segunda hidroxila em C-30.

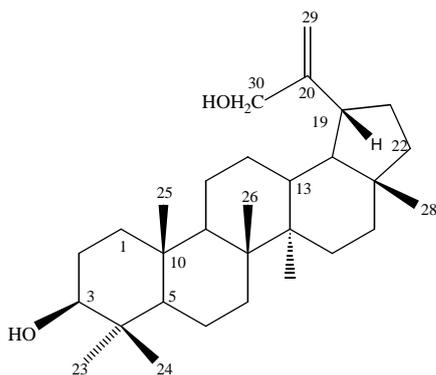
O espectro de Massas apresentou picos em m/z 442 (M^+ , 3%), 424 ($[M-H_2O]$, 4%), 384 ($[M-C_3H_2O]$, 5%), 220 ($[M-C_{15}H_{24}O]^+$, 18%), 205 ($[M-C_{16}H_{29}O]$, 14%), característicos de TTPC da série lupano (MATHE et al., 2004).

Estas informações aliadas à comparação com os dados da literatura (Tabela 2.6) (BURNS et al., 2000) e as informações obtidas do espectro de Massas permitiram identificar G6 como sendo o lupano 3 β ,30-Di-hidroxi-lup-20(29)-eno.

Tabela 2.6: Atribuição dos sinais de RMN de ^{13}C para G6 [3 β ,30-di-hidroxi-lup-20(29)-eno], (CDCl_3 ; 100 MHz)

C_n	δ_c	DEPT	HMBC	δ_H	Lit. ^a
1	38,94	CH ₂	H-2; 3; 5 e 25	0,89; 1,63	38,69
2	27,46	CH ₂		1,62; 1,66	27,41
3	78,77	CH	H-23, 24 e 2	3,19 (<i>dd</i> , $J=10,5$; 5,2 Hz)	78,98
4	38,80	C	H-23 e 24		38,86
5	55,38	CH	H-23, 24, 25 e 7	0,66	55,27
6	18,35	CH ₂	H-9, 26 e 5	1,38 (β); 1,50 (α)	18,31
7	34,36	CH ₂		1,10 (β); 1,37 (α)	34,30
8	40,89	C	H-9, 27 e 26		40,85
9	50,44	CH	H-26, 25 e 7	1,23	50,38
10	37,19	C	H-9, 25 e 5		37,16
11	21,02	CH ₂		1,17 (β); 1,32 (α)	21,01
12	26,66	CH ₂		1,05 (β); 1,40 (α)	26,69
13	38,05	CH	H-27	1,61 <i>m</i>	38,01
14	42,81	C	H-27 e 26		42,79
15	27,46	CH ₂	H-27	1,55, 1,67	27,41
16	35,52	CH ₂		1,35-1,50	35,47
17	43,03	C	H-28		43,02
18	49,86	CH	28	1,44 <i>m</i>	48,90
19	43,78	CH		2,29 (<i>td</i> , J 11,4; 5,6 Hz)	43,83
20	155,16	=C	H-29 e 30		154,76
21	31,79	CH ₂		1,32 (α)	31,77
22	39,89	CH ₂	H-28	1,25 (α), 1,35 (β)	39,85
23	28,08	CH ₃	H-24 e 3	0,98(<i>s</i>)	27,99
24	15,49	CH ₃	H-23 e 3	0,78(<i>s</i>)	15,38
25	16,01	CH ₃		0,83(<i>s</i>)	16,12
26	16,14	CH ₃	H-9	1,02(<i>s</i>)	15,99
27	14,56	CH ₃		0,94(<i>s</i>)	14,51
28	17,73	CH ₃		0,78(<i>s</i>)	17,71
29	106,42	=CH ₂	H-30 e 19	4,98 (<i>s</i>); 5,00 (<i>dd</i> , J 2,8; 1,6 Hz)	106,81
30	64,63	CH ₂	H-29	4,13 (<i>d</i> , $J=14,7$ Hz)	65,03

^a BURNS et al., *Magn. Reson. Chem.* v. 38, p. 488-493, 2000; (CDCl_3 ; 125 MHz)



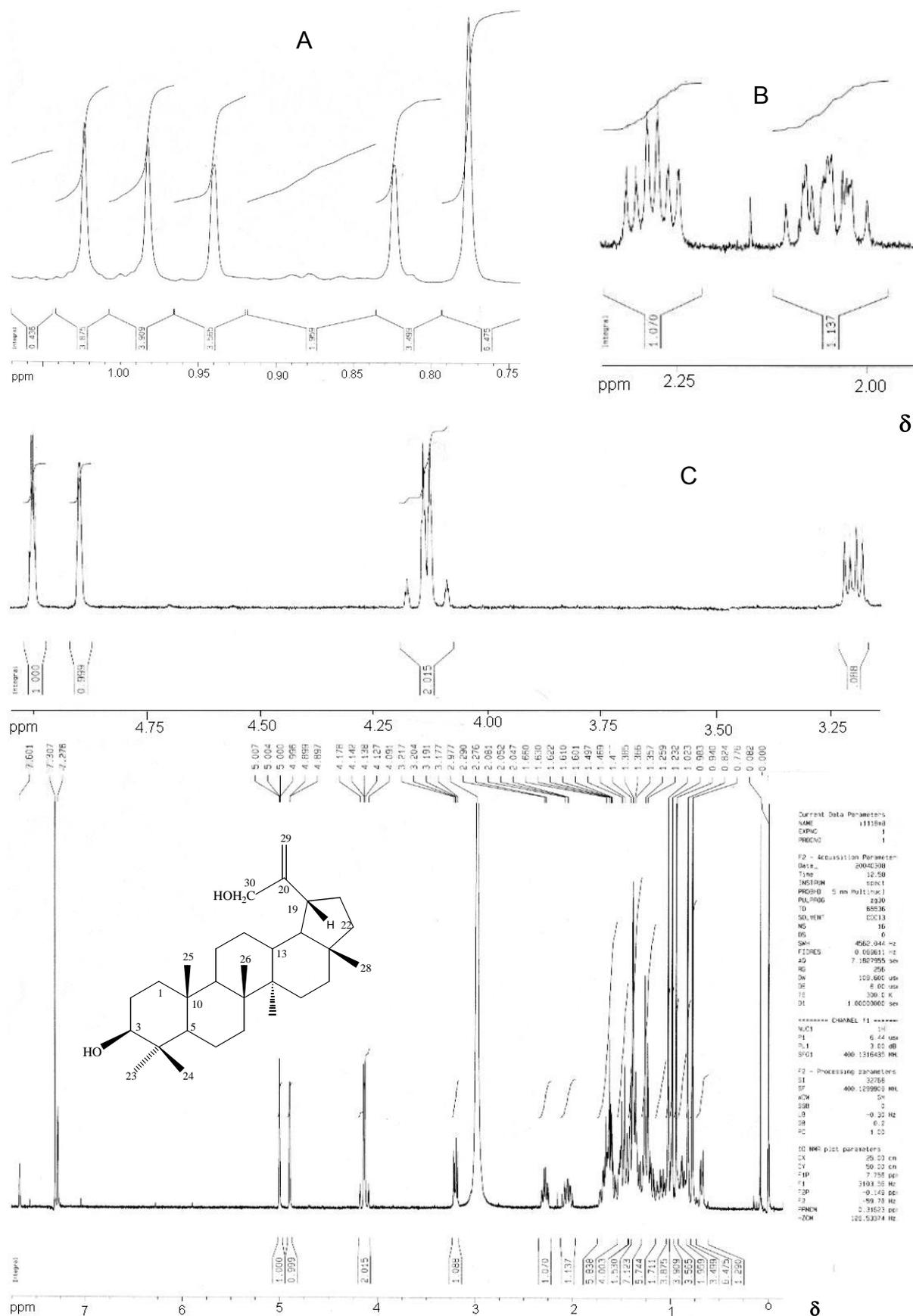


Figura 2.32: Espectro de RMN de ¹H de G6 [3β,30-di-hidroxi-lup-20(29)-eno] (CDCl₃; 400 MHz). Em destaque ampliação das regiões: A) δ_H 0,75 a 1,07; B) 2,0 a 2,25 e C) 3,25 a 5,0.

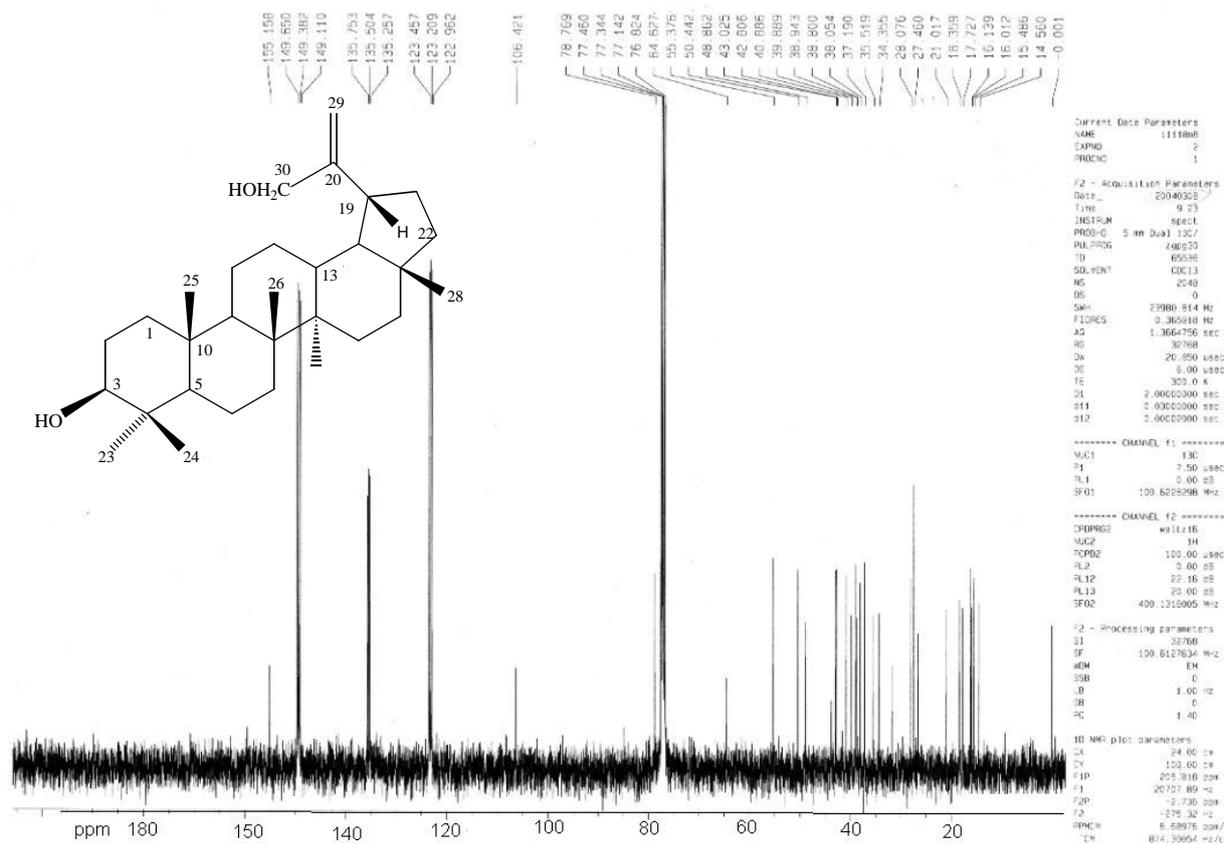


Figura 2.33: Espectro de RMN de ¹³C de G6 [3β,30-di-hidroxi-lup-20(29)-eno] (CDCl₃; 400 MHz) (CDCl₃; 100 MHz).

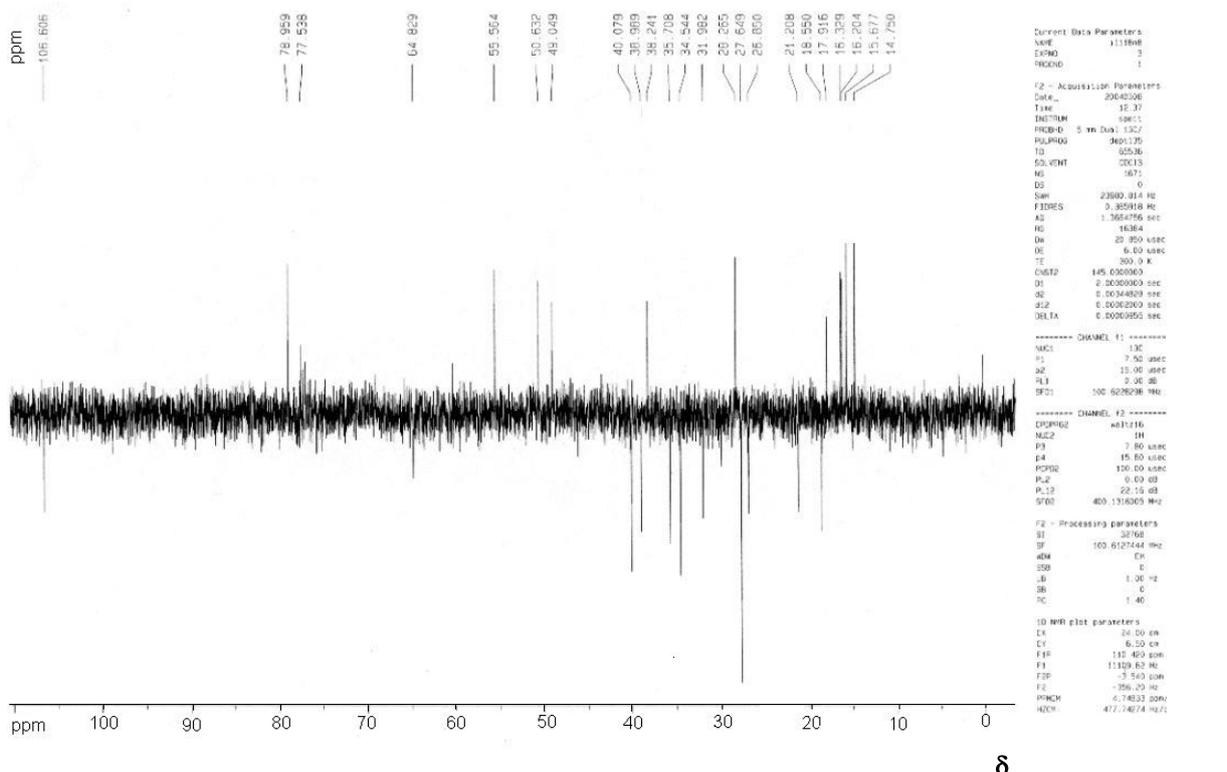


Figura 2.34: Subespectro DEPT-135 de G6 [3β,30-di-hidroxi-lup-20(29)-eno] (CDCl₃; 100 MHz).

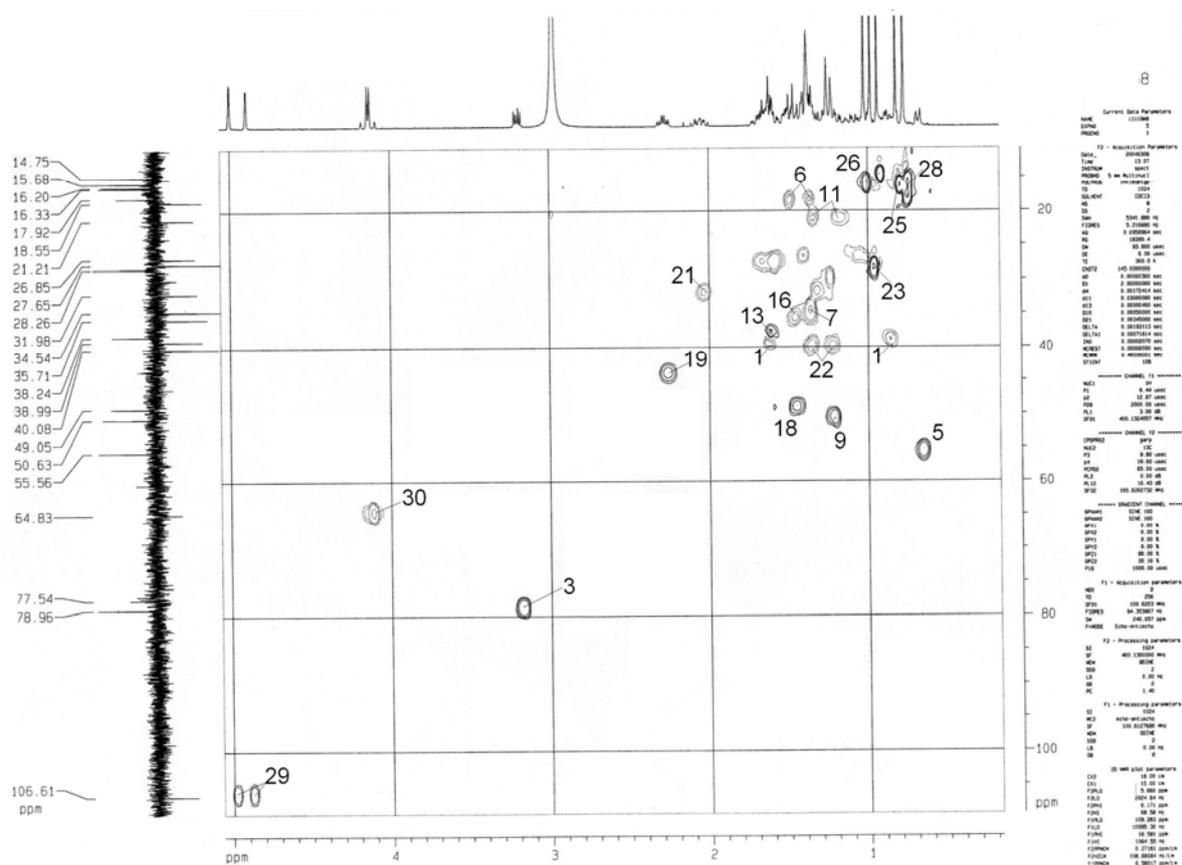
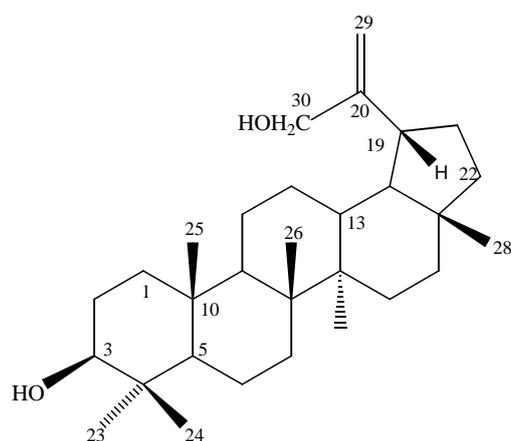


Figura 2.35: Mapa de contornos HSQC de G6 [3β,30-di-hidroxi-lup-20(29)-eno]. (CDCl₃; 400 MHz).



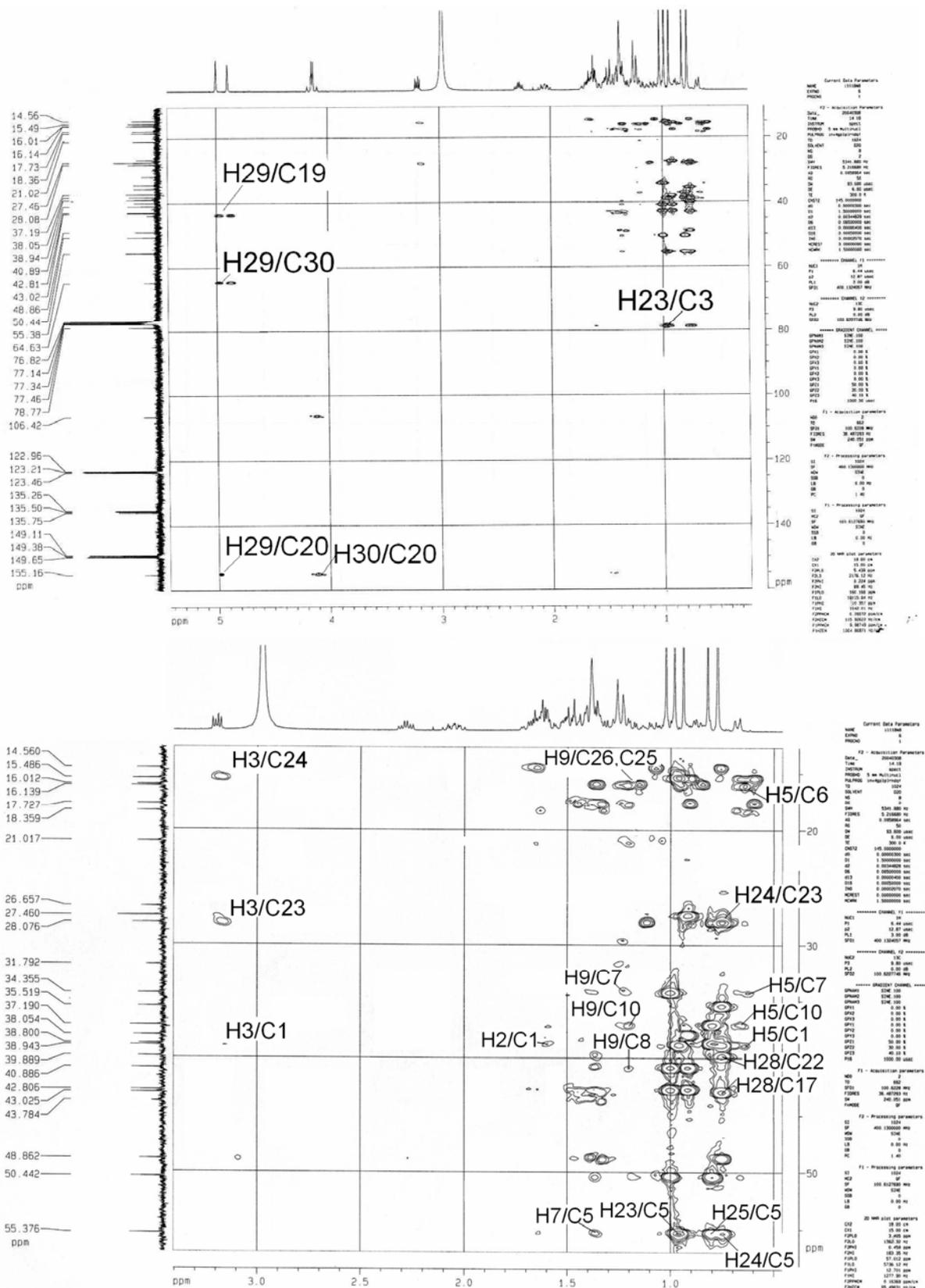
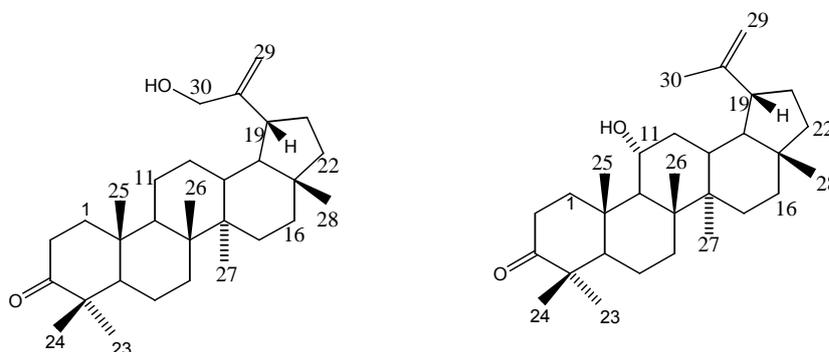


Figura 2.36: Mapa de contornos HMBC de G6 [3 β ,30-Di-hidroxi-lup-20(29)-eno] (CDCl₃; 400 MHz). Em destaque ampliação da região entre δ_H 0,5 e 3,5.

G7: Mistura de 30-hidroxi-lup-20(29)-en-3-ona (G4) e 11 α -hidroxi-lup-20(29)-en-3-ona (G5)

G7 foi obtida a partir do fracionamento da CC do IGHs e apresentou-se como um sólido esbranquiçado, de ponto de fusão 166,9-168,3 °C.

A análise por CCD em diferentes sistemas de eluentes e a comparação com padrões mostrou que G7 era constituída por uma mistura de lupanos, provavelmente 30-hidroxi-lup-20(29)-en-3-ona e 11 α -hidroxi-lup-20(29)-en-3-ona.

O espectro no IV (Figura 2.37) mostra a presença de bandas de absorção em 3540 e 3464 cm^{-1} , características de $\nu_{\text{O-H}}$. As bandas observadas em 1093-1025 cm^{-1} são características de álcool primário; e em 2936 e 2866 cm^{-1} correspondem ao $\nu_{\text{C-H}}$ de estruturas alifáticas. Mostra ainda banda na região de 1700 a 1650 cm^{-1} correspondente a grupo carbonila, além da banda em 1400-1450 cm^{-1} , característica de deformação C-H de alcanos.

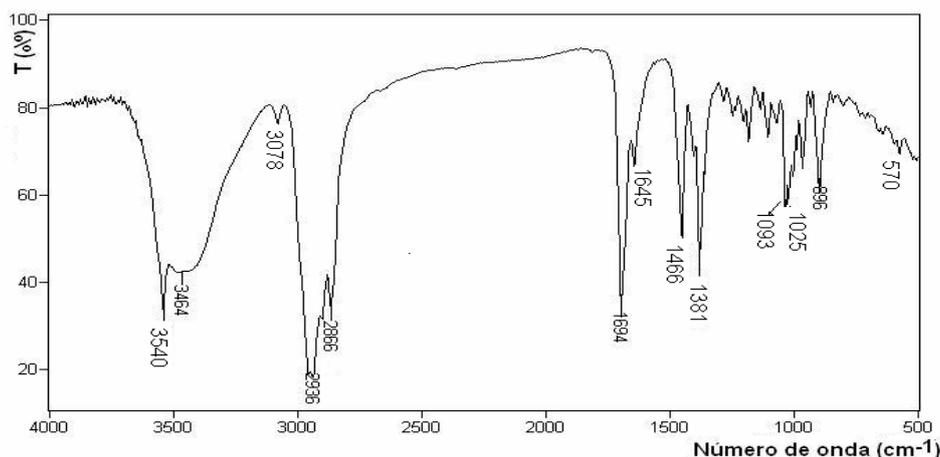


Figura 2.37: Espectro de G7 [mistura de 30-hidroxi-lup-20(29)-en-3-ona (G4) e 11 α -hidroxi-lup-20(29)-en-3-ona (G5)] obtido no IV (KBr).

Os espectros de RMN de ^{13}C e de RMN de ^1H de G7 mostraram-se muito semelhantes aos espectros de G4 (Figuras 2.14 e 2.15, pág. 41 e 42) e G5 (Figuras 2.22 e 2.23, pág. 54 e 55), substâncias descritas anteriormente. Através da

comparação dos dados de deslocamento químico de hidrogênio, observados no espectro de RMN de ^1H (Figura 2.38, pág. 71) e de ^{13}C (Figura 2.39, pág. 72) e no subespectro DEPT-135 (Figura 2.40, pág. 72) com os dados da literatura (SILVA et al., 2005c; BURNS et al., 2000; MAHATO e KUNDU, 1994) foi possível sugerir que G7 trata-se da mistura das substâncias 30-hidroxi-lup-20(29)-en-3-ona (G4) e 11 α -hidroxilup-20(29)-en-3-ona (G5) (Tabela 2.7).

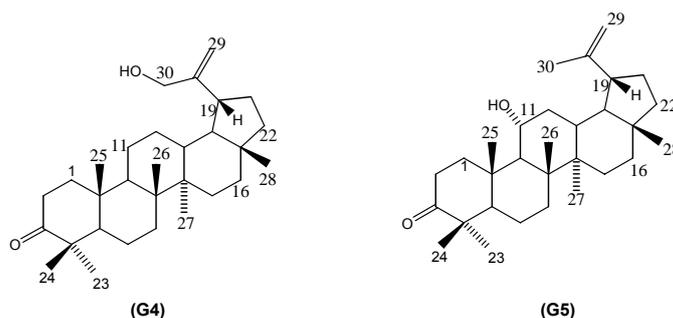
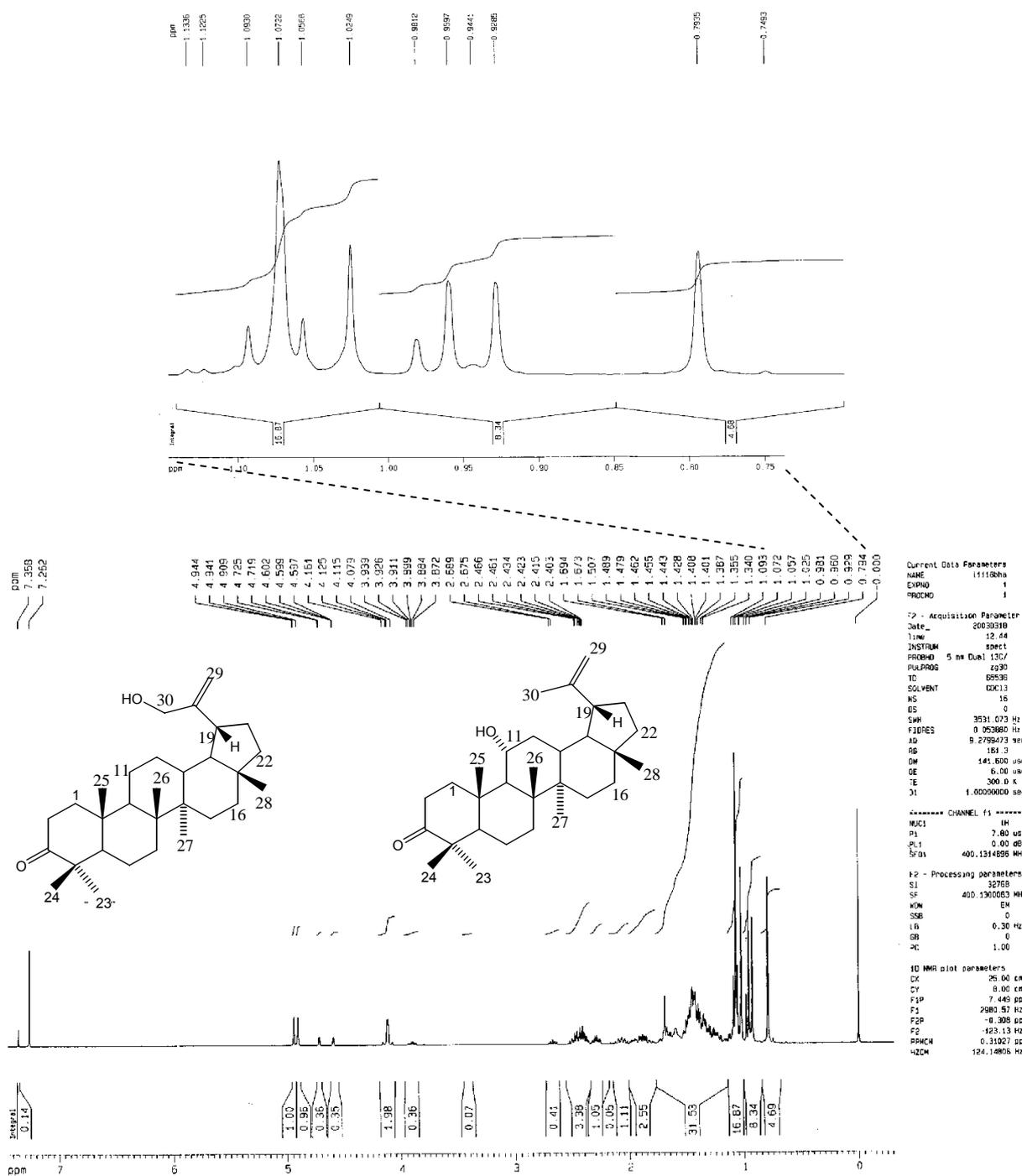


Tabela 2.7 : Atribuição dos sinais de RMN de ^{13}C para G7 (mistura de 11 α -hidroxilup-20(29)-en-3-ona (G4) e 30-hidroxi-lup-20(29)-en-3-ona (G5), (CDCl_3 ; 100 MHz)

Carbono	G7 δ_c	G7 δ_c	Lit. ^a δ_c G5	Lit. ^b δ_c G4
1	39,61	42,64	42,07	39,58
2	34,15	34,28	34,21	34,14
3	218,14		218,84	218,25
4	47,33	47,67	47,63	47,32
5		54,79	54,76	54,87
6	19,66	19,70	19,64	19,67
7	33,62	34,25	34,27	33,57
8	40,84	42,44	42,41	40,79
9	49,77	54,93	54,87	49,72
10		38,23	38,20	36,86
11	21,59	70,51	70,49	21,55
12	26,71	37,50	37,44	26,67
13	38,17	37,21	37,17	38,11
14	42,89	42,09	42,16	42,85
15		27,43	27,41	27,39
16		39,85	39,80	35,40
17	43,04	43,06	43,05	43,01
18	48,89	47,64	47,63	48,83
19	43,81	47,72	47,70	43,77
20	154,74	150,23	150,20	154,71
21	31,79	29,81	29,78	31,75
22	39,83	35,44	35,40	39,82
23	26,71	27,47	27,46	26,67
24	21,05	20,79	20,77	21,04
25	15,99	16,70	16,71	15,98
26	15,83	16,87	16,86	15,80
27	14,49	14,44	14,42	14,46
28	17,75	18,09	18,08	17,72
29	106,96	109,94	109,95	106,87
30	65,07	19,38	19,37	65,01

^a- BURNS et al., *Magn. Reson. Chem.* v.38., p. 488-493,2000; (CDCl_3 ; 125 MHz).

^b- MAHATO, S.B. e KUNDU, A. P., *Phytochemistry*. v.37, n. 6, 1517-1575,1994.



δ

Figura 2.38: Espectro de RMN de ¹H de G7 [mistura de 30-hidroxi-lup-20(29)-en-3-ona e 11 α -hidroxi-lup-20(29)-en-3-ona] (CDCl₃; 400 MHz). Em destaque ampliação da região entre δ_H 1,10 e 0,75.

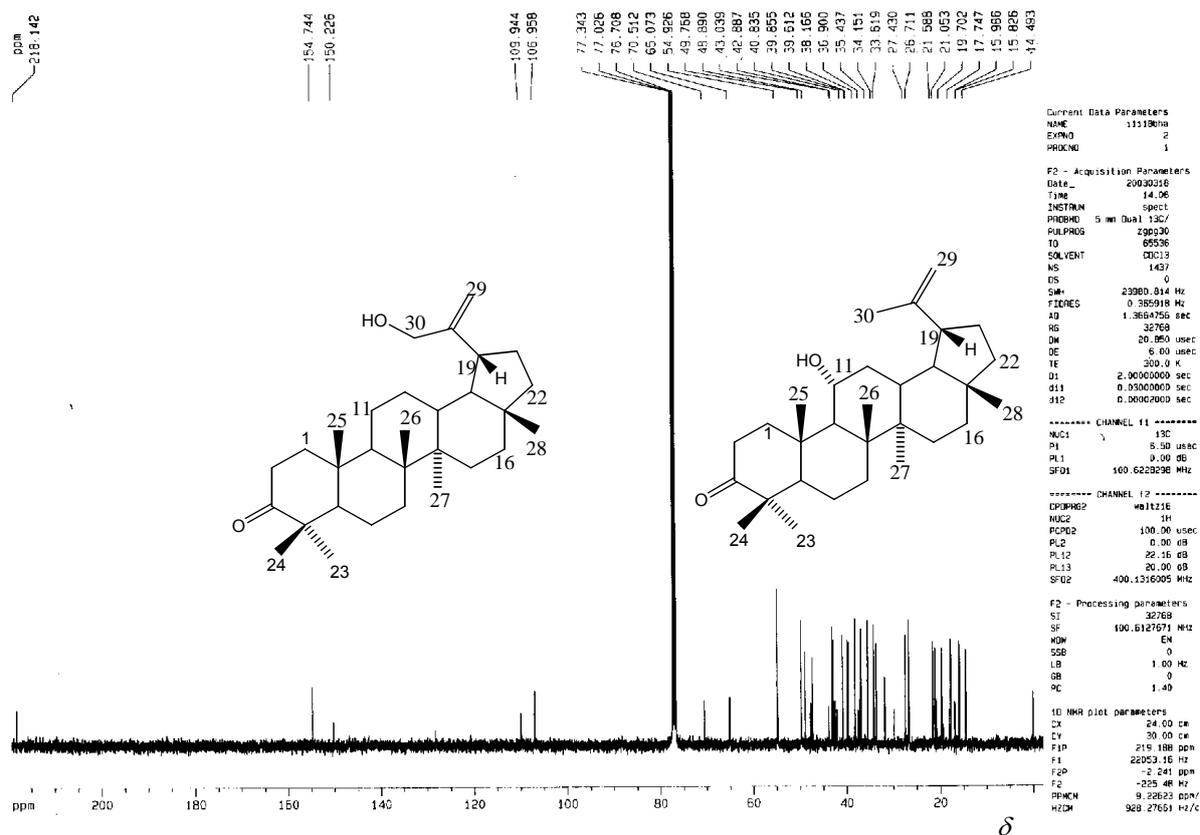


Figura 2.39: Espectro de RMN de ¹³C de G7 [mistura de 30-hidroxi-lup-20(29)-en-3-ona e 11 α -hidroxi-lup-20(29)-en-3-ona] (CDCl₃; 100 MHz).

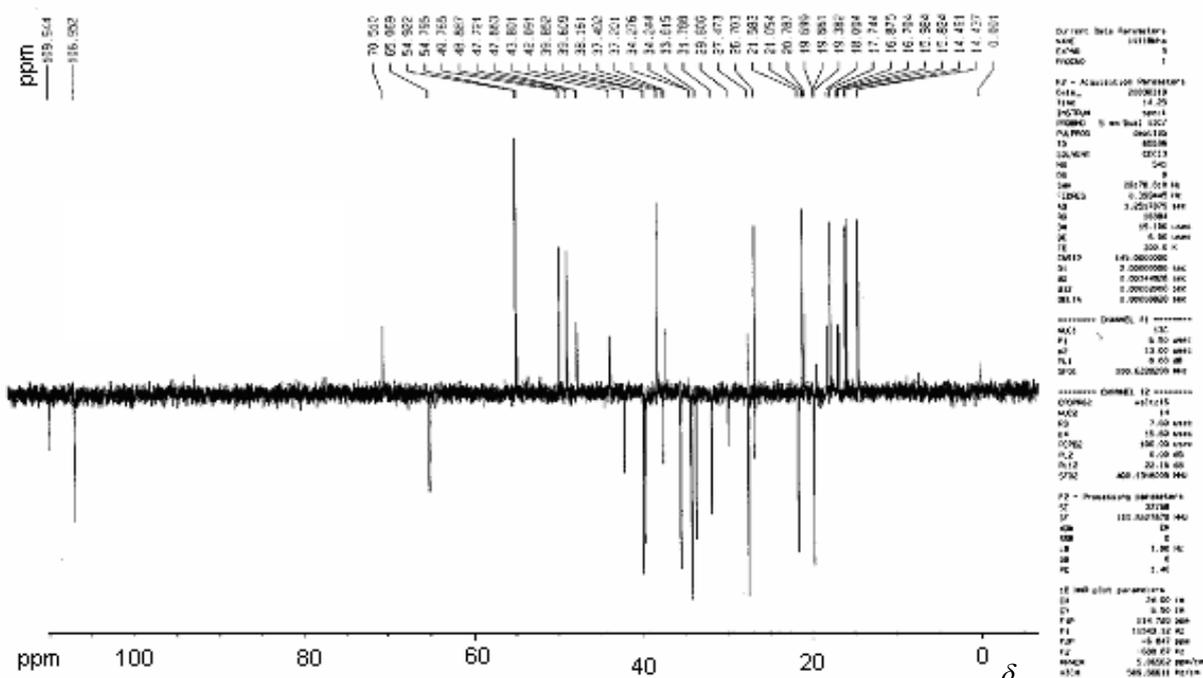
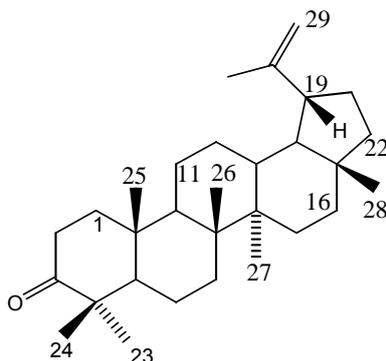


Figura 2.40: Subespectro DEPT-135 de G7 [mistura de 30-hidroxi-lup-20(29)-en-3-ona e 11 α -hidroxi-lup-20(29)-en-3-ona] (CDCl₃; 100 MHz).

G8: Lupenona

G8 foi obtido do IGH apresentou-se como um sólido branco de ponto de fusão 199-201 °C. Ao ser submetido ao teste de Liebermann-Burchard apresentou resultado positivo, com coloração róseo-violácea, sugerindo pertencer este sólido a classe dos TTPC.

O espectro obtido no IV (Figura 2.41) apresenta bandas em 2927 e 2868 cm^{-1} que evidenciam o caráter alifático da amostra e banda em 1714 cm^{-1} referente ao $\nu_{\text{C=O}}$ de cetonas. A banda em 3447 cm^{-1} refere-se a ν_{OH} .

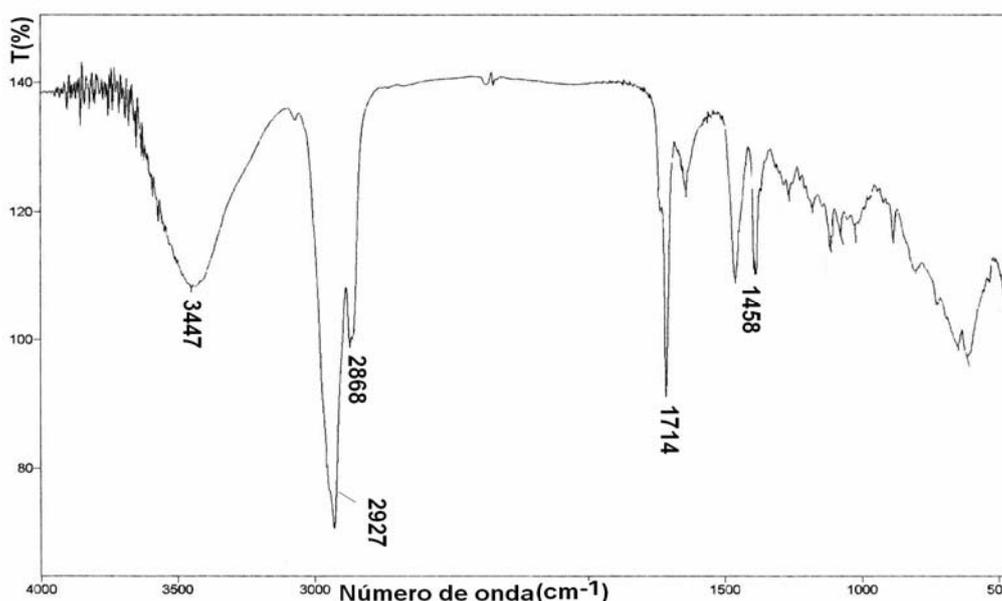


Figura 2.41: Espectro de G8 (Lupenona) obtido no IV (KBr).

O espectro de RMN de ^1H (Figura 2.42, pág. 74) apresenta sete simpletos em δ_{H} 1,68, 1,25, 1,07, 1,02, 0,95, 0,93 e 0,79 referentes a sete grupos metila. Apresenta também dois multipletos em δ_{H} 4,57 e 4,68 correspondentes a dois hidrogênios olefínicos.

O espectro de RMN de ^{13}C (Figura 4.43, pág. 75) e o subespectro de DEPT - 135 (Figura 2.44, pág. 75) mostram a presença de 30 carbonos sendo sete metílicos, onze metilênicos, cinco metínicos e sete não hidrogenados. A ausência de sinais característicos de álcool, sugere a possibilidade da banda observada em 3447 cm^{-1} no espectro no infravermelho, estar associada à umidade no KBr. Observam-se ainda nos espectros de RMN de ^1H e ^{13}C , sinais referentes a impurezas presentes em G8. Estas informações aliadas à comparação com os dados da literatura (Tabela 2.8, pág. 76) (HISHAM et al., 1995) permitiram identificar em G8 a lupenona, como componente majoritário.

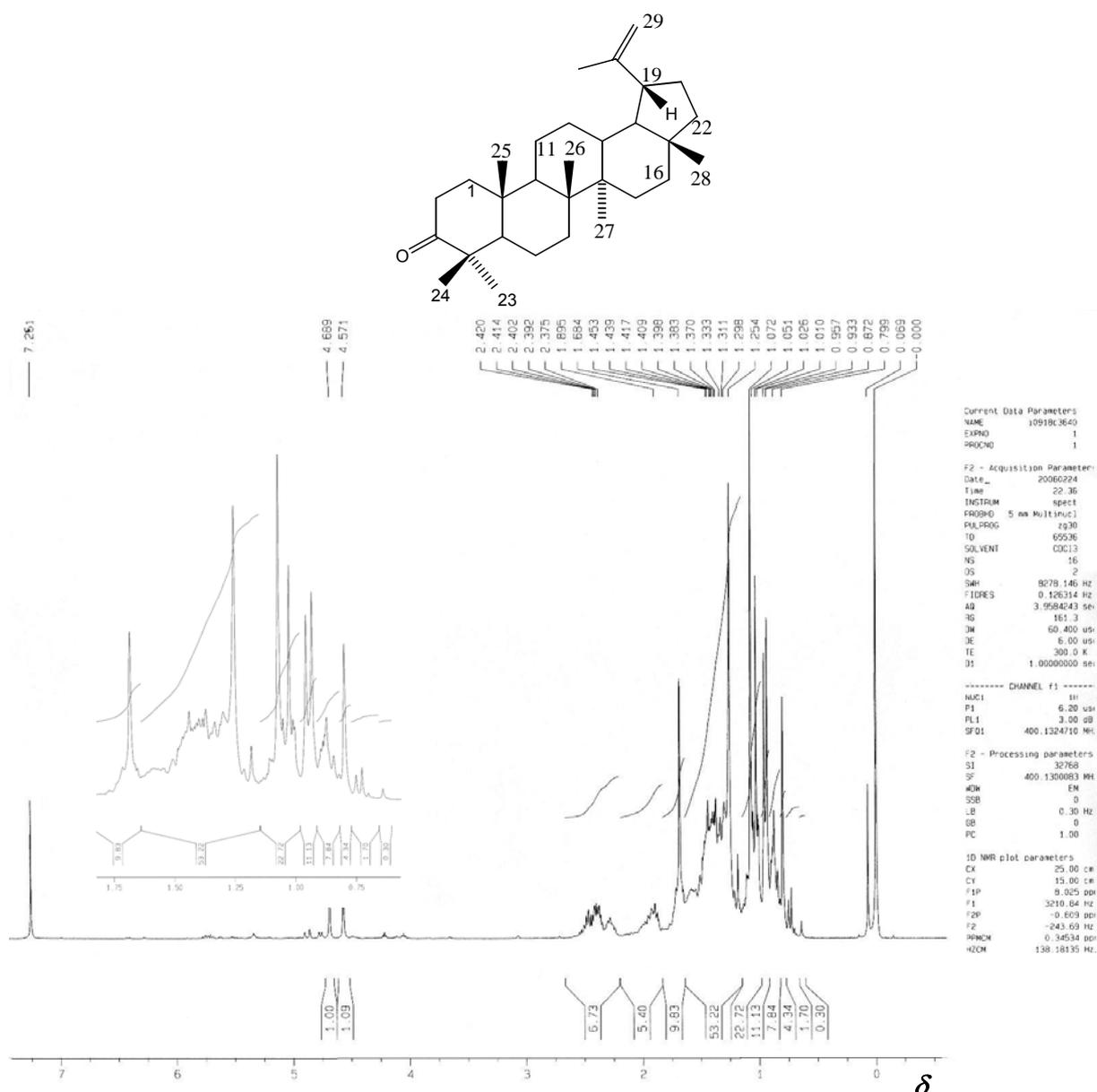


Figura 2.42: Espectro de RMN de ^1H de G8 (lupenona) (CDCl_3 ; 400 MHz). Em destaque a ampliação da região entre δ_{H} 1,75 e 0,75.

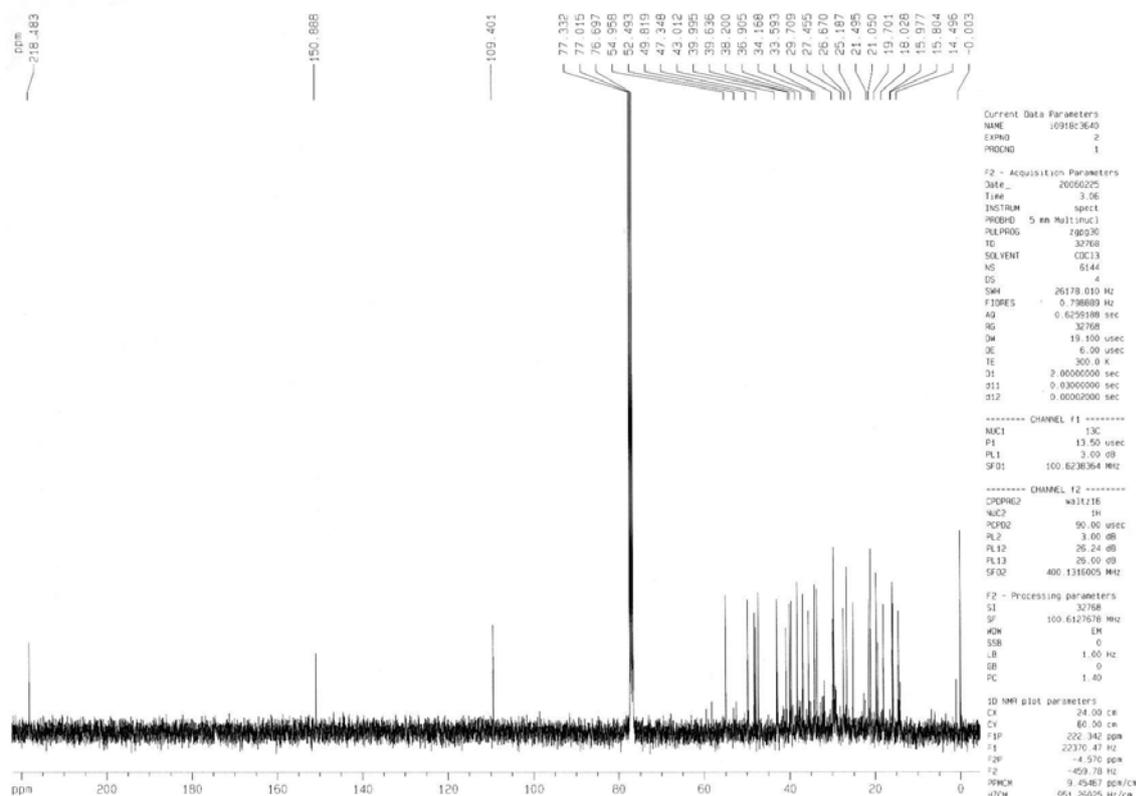


Figura 2.43: Espectro de RMN de ¹³C de G8 (lupenona) (CDCl₃; 100 MHz).

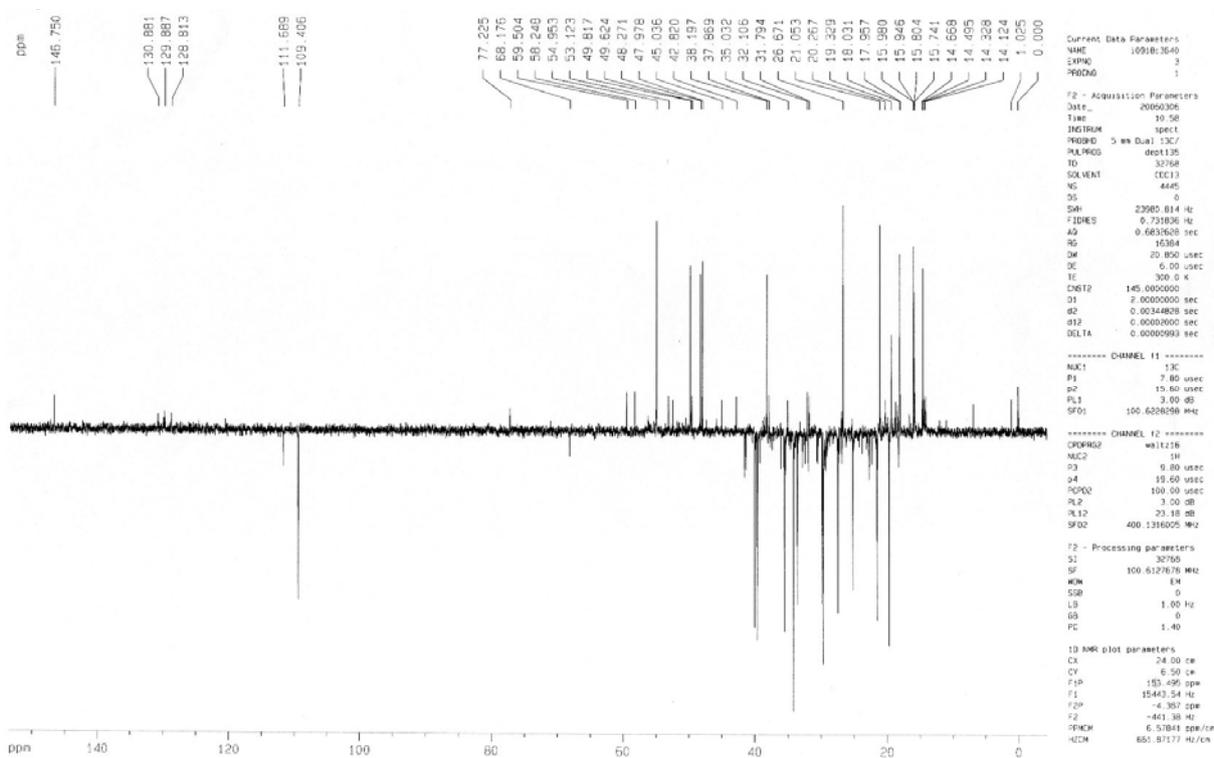


Figura 2.44: Subespectro DEPT-135 de G8 (lupenona) (CDCl₃; 100 MHz).

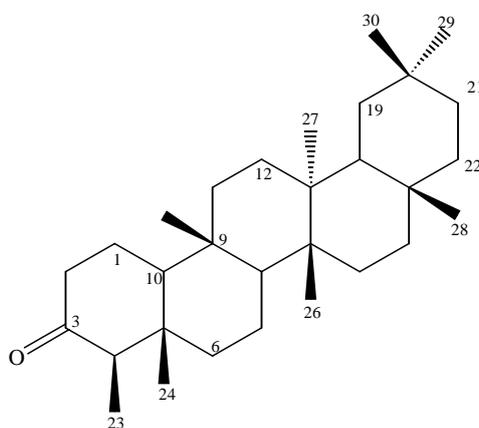
δ

Tabela 2.8: Atribuição dos sinais de RMN de ^{13}C para G8 (lupenona) e comparação com os dados da literatura, CDCl_3 ; 100 MHz

Carbono	δ_c G8	Lit. ^a δ_c	Carbono	δ_c G8	Lit. ^a δ_c
1	39,64	39,60	16	35,54	35,60
2	34,17	34,10	17	43,01	43,00
3	218,18	217,90	18	48,28	48,30
4	47,35	47,30	19	47,98	47,90
5	54,96	54,90	20	150,89	150,80
6	19,70	19,70	21	29,86	29,80
7	33,59	33,60	22	39,99	40,00
8	40,82	40,80	23	26,67	26,60
9	49,82	49,80	24	21,05	21,00
10	36,91	36,90	25	15,98	15,90
11	21,49	21,50	26	15,80	15,80
12	25,19	25,10	27	14,50	14,50
13	37,45	37,40	28	18,03	18,00
14	42,82	42,80	29	109,40	109,00
15	27,45	27,40	30	19,33	19,30

^a HISHAM et al., *Phytochemistry*, v. 40, n. 4, p. 1227, 1995; 67,9 MHz, CDCl_3

G9; F2; F7: Friedelina



G9, F2 e F7 foram obtidas dos extratos IGH, IFHs e IFH. Todas as amostras apresentaram-se como um sólido branco de ponto de fusão na faixa de 237-239 $^{\circ}\text{C}$ e com resultados positivos para o teste de Liebermann-Burchard exibindo coloração rósea-violácea. A análise comparativa por CCD em sistemas de eluentes de diferentes polaridades e com co-aplicação mostrou que as mesmas tratavam-se de substâncias idênticas.

Os espectros obtidos no IV para as amostras foram superponíveis. Portanto, será discutida a elucidação estrutural apenas para uma das amostras, representada

pela sigla G9 (Figura 2.45). O espectro no IV apresenta bandas de absorção em 2924 cm^{-1} e 2862 cm^{-1} que evidenciam o caráter alifático da amostra. Apresenta ainda banda em 1715 cm^{-1} referente ao $\nu_{\text{C=O}}$ do grupo carbonílico e banda na região de 3500 cm^{-1} .

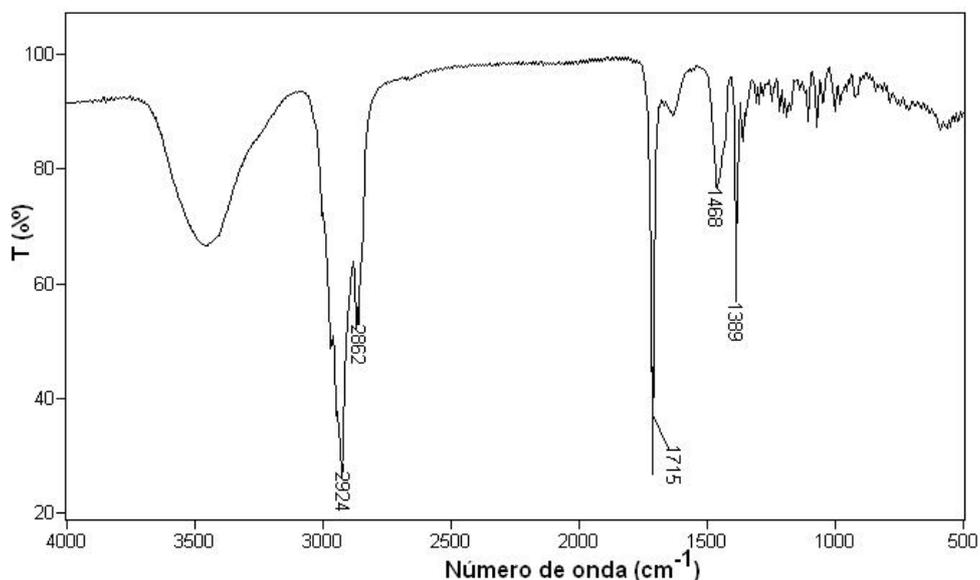


Figura 2.45: Espectro de G9 (Friedelina) obtido no IV (KBr).

O espectro de RMN de ^1H (Figura 2.46, pág. 78) apresentou sete simpletos em δ_{H} 1,18, 1,05, 1,01, 1,00, 0,95, 0,87 e 0,73 referentes a sete grupos metila. Apresentou ainda um duplete em 0,88 ($J = 6,0\text{ Hz}$) referente ao grupo metila H-23, característico de esqueleto friedelano (VIEIRA FILHO, 2002) e sinais entre δ_{H} 1,93 e 2,41, correspondentes aos hidrogênios metilênicos e metínicos.

O espectro de RMN de ^{13}C (Figura 2.47, pág. 78) e o subespectro DEPT 135 (Figura 2.48, pág. 79) mostram a presença de 30 carbonos sendo oito metílicos, 11 metilênicos, quatro metínicos e sete não hidrogenados, característicos de TTPC da série friedelano e a presença de um sinal em δ_{C} 213,16 referente à carbonila.

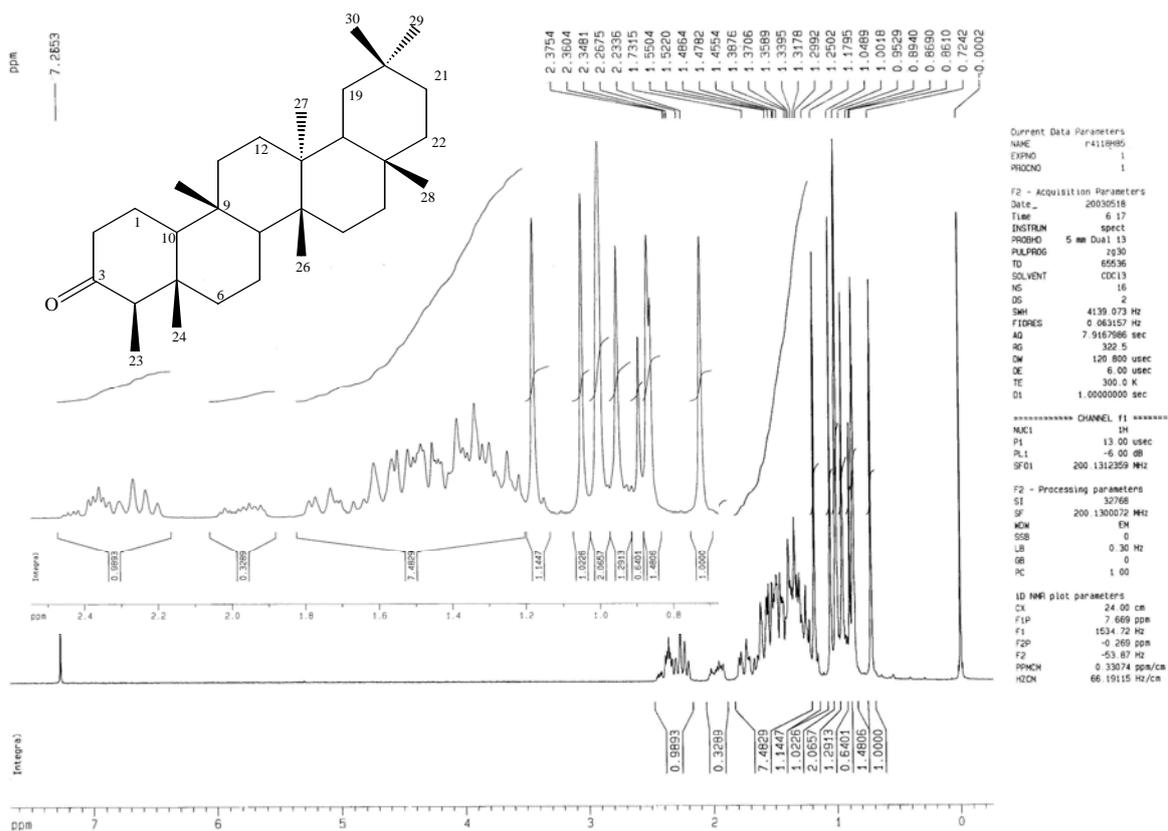


Figura 2.46: Espectro de RMN de ^1H de G9 (Friedelina) (CDCl_3 ; 400 MHz). Em destaque a ampliação da região entre δ_H 2,43 e 0,74.

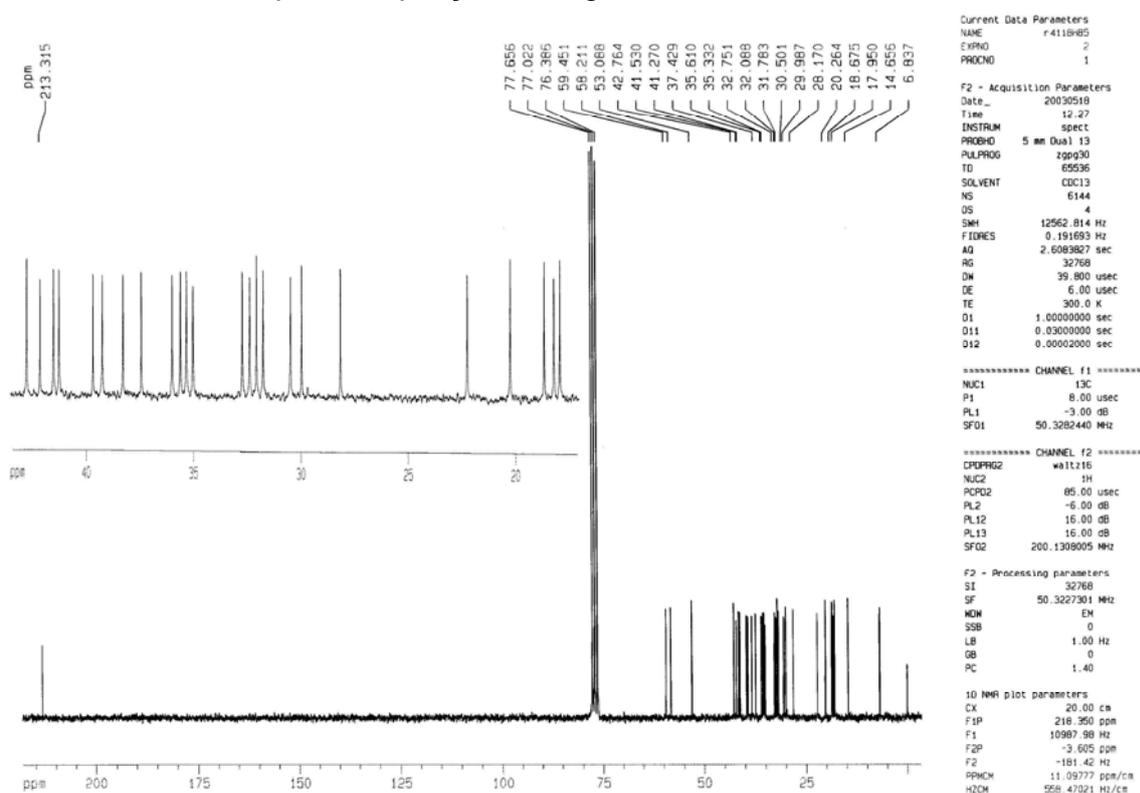


Figura 2.47: Espectro de RMN de ^{13}C de G9 (Friedelina) (CDCl_3 ; 100 MHz).

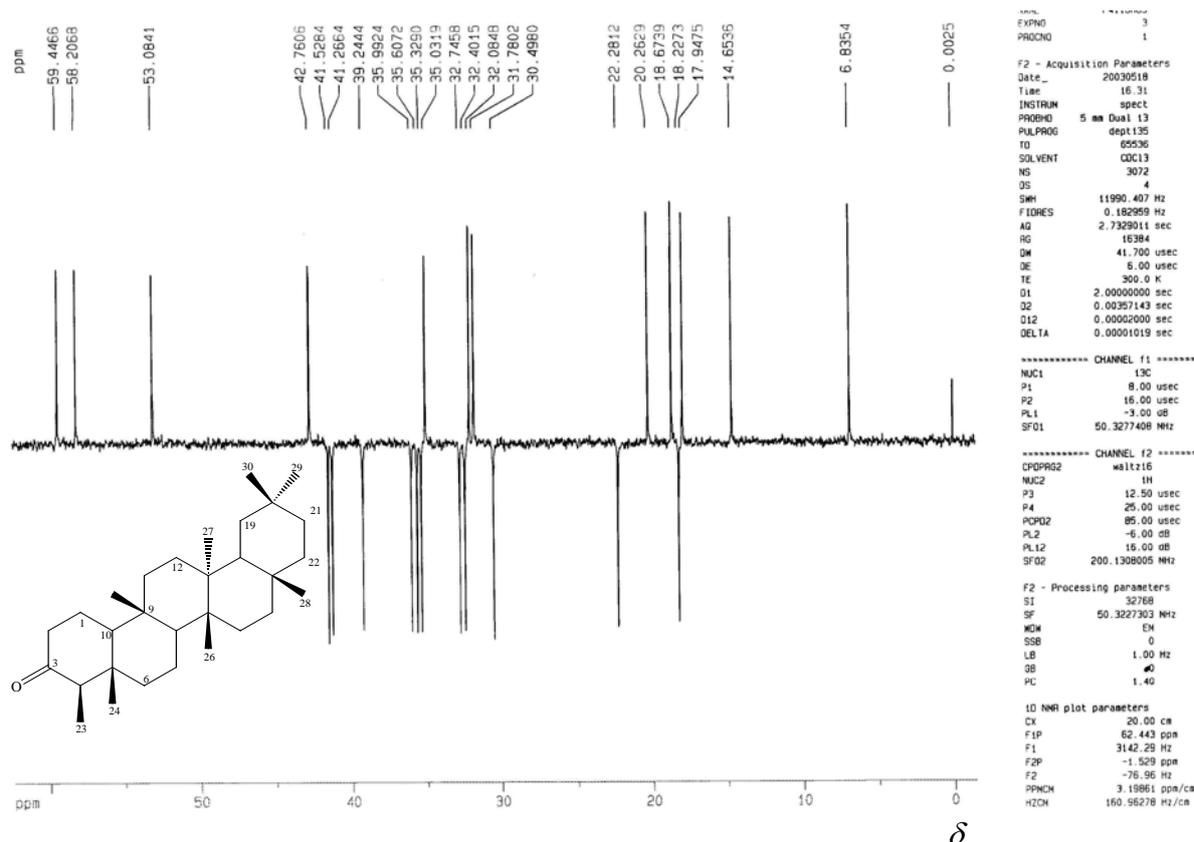


Figura 2.48: Subespectro DEPT-135 de G9 (Friedelina) (CDCl_3 ; 100 MHz).

A feição do espectro no IV, os dados de RMN e a comparação em CCD com amostras autênticas permitiu identificar G9 como friedelina, um TTPC pertencente à classe dos friedelanos e encontrado comumente na família *Celastraceae* (DUARTE, 2000; VIEIRA FILHO, 2002).

O espectro de Massas de G9 (Fig. 2.49, pág. 80) apresenta um pico em 426, correspondente ao íon molecular $[\text{M}]^+$, compatível com fórmula molecular $\text{C}_{30}\text{H}_{50}\text{O}$. Foram detectados também no espectro de massas picos em m/z 411 ($\text{M}^+ - \text{CH}_3$), m/z 231 proveniente da quebra no lado esquerdo da molécula, m/z 218 e 191, originados a partir da clivagem da ligação entre os carbonos C-13 e C-14 e m/z 204 referente à clivagem entre os carbonos C-8 e C-14, compatíveis com fragmentações de triterpenos pentacíclicos da série friedelano (SHIOJIMA et al., 1992). A identificação de G9 foi realizada por comparação dos dados espectrométricos obtidos com os descritos na literatura (Tabela 2.9, pág. 80).

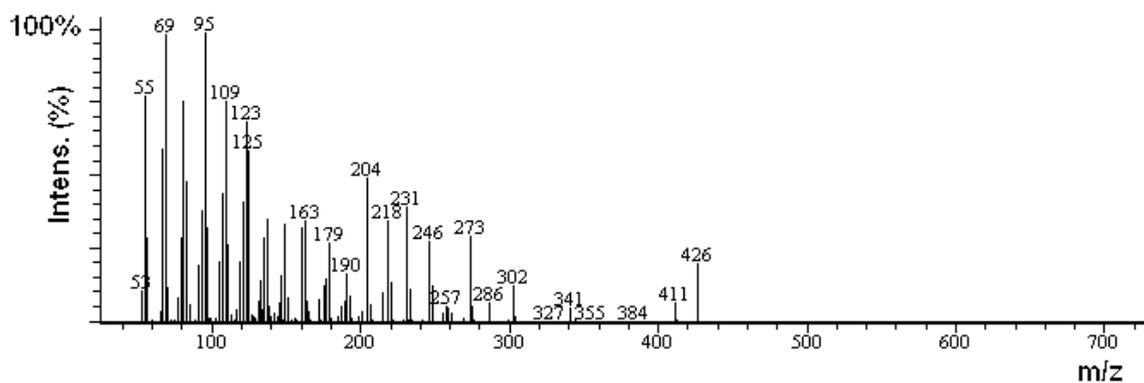
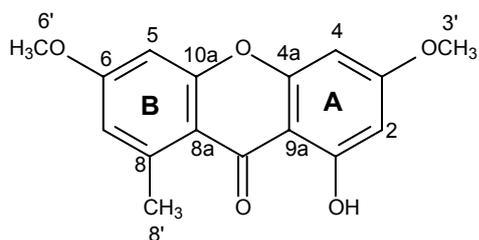


Figura 2.49: Espectro de Massas de G9 (Friedelina). Cromatógrafo CG-17A-CG-EM QP5050. Análise por inserção direta no EM, EI, 70 eV. A faixa de análise do EM foi de 30 a 600 Daltons.

Tabela 2.9: Atribuições dos sinais de RMN de ^{13}C de G9 (Friedelina), CDCl_3 ; 100 MHz, baseadas nos dados da literatura

Carbono	δ_c G9	DEPT	Lit. ^a δ_c	Carbono	δ_c G9	DEPT	Lit. ^a δ_c
1	22,28	CH ₂	22,31	16	35,99	CH ₂	36,08
2	41,53	CH ₂	41,56	17	29,99	C	30,05
3	213,32	C=O	212,98	18	42,76	CH	42,90
4	58,21	CH	58,30	19	35,33	CH ₂	35,40
5	42,15	C	42,17	20	28,17	C	28,20
6	41,27	CH ₂	41,38	21	32,75	CH ₂	32,86
7	18,23	CH ₂	18,29	22	39,25	CH ₂	39,30
8	53,09	CH	53,18	23	6,84	CH ₃	6,81
9	37,43	C	37,52	24	14,66	CH ₃	14,68
10	59,45	CH	59,58	25	17,95	CH ₃	17,97
11	35,61	CH ₂	35,69	26	20,26	CH ₃	20,27
12	30,50	CH ₂	30,55	27	18,68	CH ₃	18,66
13	39,69	C	39,77	28	32,09	CH ₃	32,13
14	38,28	C	38,37	29	35,03	CH ₃	35,03
15	32,41	CH ₂	32,50	30	31,78	CH ₃	31,81

^a DUARTE, P. L., Tese Doutorado, Departamento de Química, UFMG, 2000; (CDCl_3 ; 100 MHz).

G10: 1-hidroxi-3,6-dimetoxi-8-metil-9-xantona (liquexantona)

G10 foi isolado do extrato hexânico dos galhos e apresentou teste positivo para compostos fenólicos com FeCl_3 .

O espectro no IV (Figura 2.50) apresentou bandas de absorção em 3474 cm^{-1} característica de grupo OH, bandas em 2914 e 2846 cm^{-1} , referentes a estiramento C-H e em 1472 cm^{-1} , atribuída à deformação de C-H. Observa-se também uma banda em 1708 cm^{-1} , referente à deformação C=O (SILVERSTEIN, 1998).

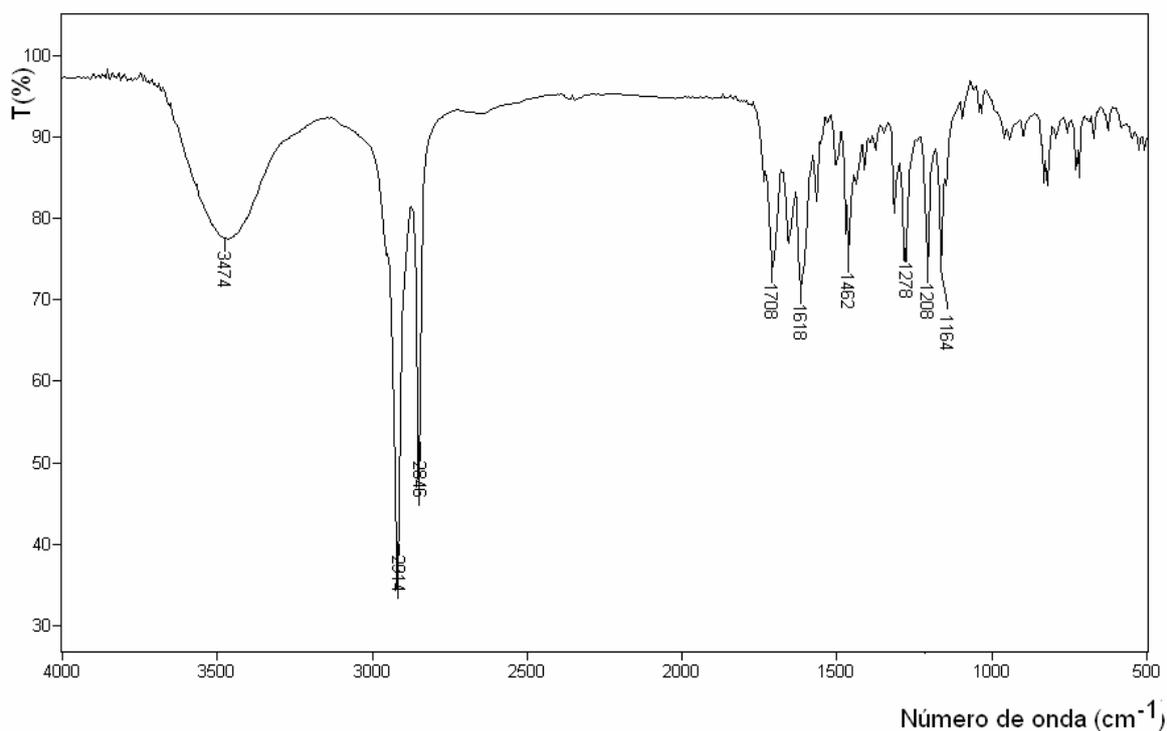


Figura 2.50: Espectro de G10 (1-hidroxi-3,6-dimetoxi-8-metil-9-xantona) (liquexantona) obtido no IV (KBr).

O espectro de RMN de ^1H (Figura 2.51, pág. 85) apresenta três dupletos em δ_{H} 6,31 ($J = 2,30\text{ Hz}$), 6,33 ($J = 2,30\text{ Hz}$), 6,69 ($J = 2,5\text{ Hz}$) e um multipletto em δ_{H}

6,67 referentes a hidrogênios aromáticos. Os valores das constantes de acoplamento indicam que os hidrogênios estão em padrão de substituição meta.

Apresenta ainda dois simpletos em δ_H 3,90 e 3,87, referentes a hidrogênios metoxílicos e um simpleto em δ_H 2,85 referente a grupo metila ligado ao anel aromático. O espectro de RMN de ^{13}C (Figura 2.52, pág. 86) e o subespectro DEPT 135 (Figura 2.53, pág. 86) apresentam 16 sinais sendo nove correspondentes a carbonos não hidrogenados, quatro referentes a carbonos metínicos, dois sinais correspondentes a carbonos metoxílicos, um sinal referente a carbono metílico e um sinal referente a carbono carbonílico de cetona conjugada em δ_C 182,45 (C=O).

Comparando estes dados, às informações da literatura (WERLE, 1995) concluiu-se que G10 apresenta um esqueleto xantônico dimetoxilado, contendo um grupo metila e um grupo hidroxila como substituintes.

O deslocamento químico do carbono carbonílico (C-9) das xantonas é bastante influenciado pela presença de grupos hidroxila nas posições *orto* e *para*. Os grupos hidroxila quando ligados ao C-1 e/ou C-8 apresentam ligação de hidrogênio com o oxigênio da carbonila, levando a deslocamentos característicos para C-9 (WERLE, 1995). De acordo com WERLE (1995), pelo deslocamento observado para C-9 (δ_C 182,45) (Figura 2.52, pág. 86) pode-se propor que o grupo hidroxila encontra-se ligado em C-1, já que não há outro grupo hidroxila em G10. O carbono que possui o grupo hidroxila vizinho a carbonila apresenta deslocamento em torno de δ_C 165. Portanto, C-1 poderia apresentar os deslocamentos químicos de δ_C 165,92 ou 165,86.

Para determinar as posições dos grupos substituintes, bem como os deslocamentos dos carbonos e hidrogênios de G10, foi feita a análise dos mapas de contornos HSQC (Figura 2.54, pág. 87), HMBC (Figura 2.55, pág. 88) e NOESY (Figura 2.56, pág. 89).

Através da análise do mapa de contornos HMBC (Figura 2.55, pág. 88) observa-se que o sinal em δ_C 165,86 correlaciona-se com o sinal de hidrogênio metoxílico em δ_C 3,87. Isto levou a atribuir o valor de δ_C 165,92 ao C-1. O sinal em δ_C 165,92, por sua vez, correlaciona-se com o sinal em δ_H 6,31, que não mostra correlação com o sinal do hidrogênio metílico em δ_H 2,85, indicando portanto que a metila não se encontrava no mesmo anel que o grupo hidroxila. Como o padrão de substituição observado no espectro de RMN de 1H é meta, pode-se concluir que o

anel A apresenta como substituintes um grupo metoxila e um grupo hidroxila. Conseqüentemente, o outro grupo metoxila e o grupo metila, também em meta, estão no anel B.

Observam-se também pelo mapa de contornos HMBC (Figura 2.55, pág. 88) as correlações do hidrogênio metílico em δ_H 2,85 (δ_C 23,44) com os sinais de carbono em δ_C 143,52 e 115,46 que foram então atribuídos aos carbonos C-8a e C-7, respectivamente.

A análise do mapa de contornos HSQC (Figura 2.54, pág. 87) permitiu relacionar os carbonos aos seus respectivos hidrogênios. Portanto, foi possível correlacionar os valores de C-3' (δ_C 55,66; δ_H 3,87), C-6' (δ_C 55,72, δ_H 3,90), C-5 (δ_C 98,51; δ_H 6,69), C-7 (δ_C 115,46; δ_H 6,67) e C-4 (δ_C 92,11; δ_H 6,33).

Através da análise do mapa de contornos HMBC (Figura 2.55, pág. 88) pode-se observar a correlação do sinal de carbono em δ_C 165,92 (C-1) com o hidrogênio em δ_H 6,31 (H-2) e, deste sinal com o sinal em δ_C 104,14 (C-9a). O sinal de carbono em δ_C 104,14 (C-9a) correlaciona-se com o sinal em δ_H 6,33 (H-4) e 6,31 (H-2). O sinal de C-6 em δ_C 163,79 mostra correlação com o sinal em δ_H 3,90 (H-6'); δ_C 55,72) e o sinal em δ_C 165,86 (C-3) mostra correlação com o sinal em δ_H 3,87 (H-3'; δ_C 55,66).

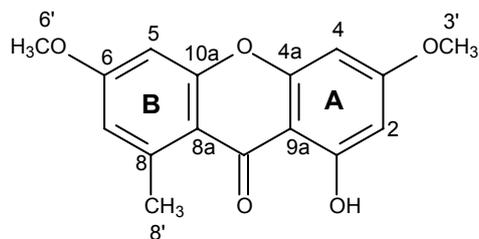
Através da análise do mapa de contornos NOESY (Figura 2.56, pág. 89) pode se observar as correlações entre os sinais em δ_H 6,69 (H-5) e 3,90 (H-6'), δ_H 6,67 (H-7) e δ_H 2,86 (H-8'), δ_H 6,31 (H-2) e δ_H 3,87 (H-3'), δ_H 6,33 (H-4) e δ_H 3,87 (H-3'), indicando a posição relativa dos substituintes.

O espectro de Massas de G10 (Fig. 2.57, pág. 90), apresenta pico correspondente ao íon molecular em m/z 286 (M^+ , 100%), compatível com fórmula molecular $C_{16}H_{14}O_5$. Foram detectados também no espectro de Massas de G10, picos em m/z 285 [M-H] (15,81%), 257 (76,6%), 256 (17,6%), 242 (13,92%), 214 (9,9%), 199 (14,3%) característicos desta classe de compostos (Esquema 2.3 pág. 90) (GOTTILIEB, 1968).

Na Tabela 2.10, pág. 84 são mostradas as atribuições feitas utilizando dados de RMN de 1H e ^{13}C para G10. Estas informações aliadas aos dados do espectro de Massas permitiram identificar G10 como sendo a xantona 1-hidroxi-3,6-dimetoxi-8-metil-9-xantona (liquexantona).

Tabela 2.10: Atribuição dos sinais de RMN de ^1H e de ^{13}C , incluindo correlações HMBC e NOESY para G10 (1-hidroxi-3,6-dimetoxi-8-metil-9-xantona) (liquexantona) (CDCl_3 ; 400 MHz)

Átomo	δ_{C} G10	HMBC	δ_{H}	NOESY
9	182,45	-		
8	113,03	-		
6	163,79	-		
3	165,86	-		
4a	157,04	-		
10a	159,50	-		
9a	104,14	-		
2	96,80	H-4, 9a e 1	6,31 ($d J = 2,3$ Hz)	H-8'
1	165,92	-		
8a	143,52	-		
4	92,11	H-2, 9a e 4a	6,33 ($d J = 2,3$ Hz)	H-3'
7	115,46	H-5, 8, 10a e 8'	6,67	H-6'
5	98,51	H-7 e 10a	6,69 ($d J = 2,5$ Hz)	H-6'
3'	55,66	H-3	3,87	H-4
6'	55,72	H-6	3,90	H-5 e 7
8'	23,44	H-8, 7 e 8a	2,85	H-7



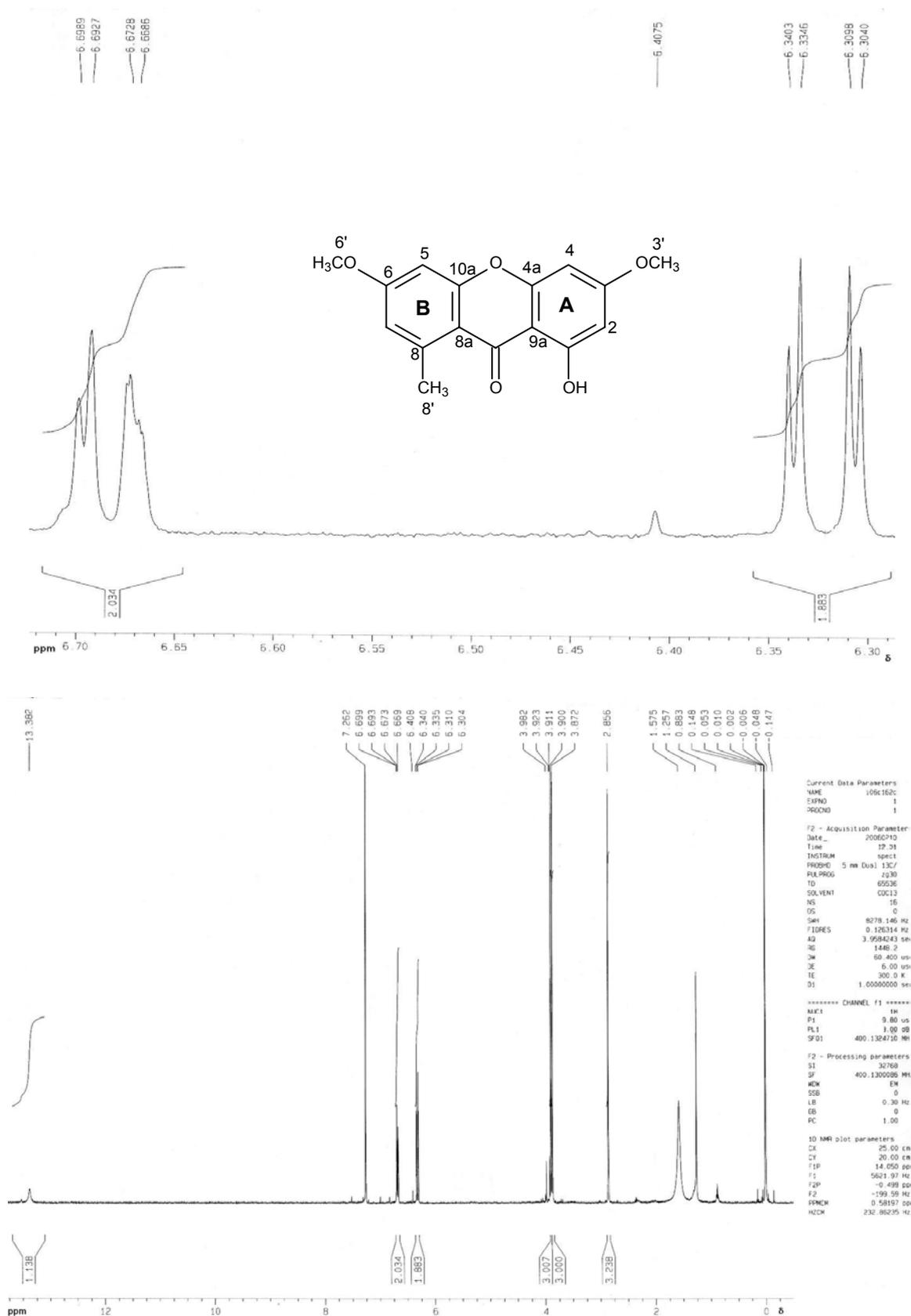


Figura 2.51: Espectro de RMN de ^1H de G10 (1-hidroxi-3,6-dimetoxi-8-metil-9-xantona) (liquexantona) (CDCl_3 ; 400 MHz). Em destaque ampliação da região entre δ_{H} 6,7 e 6,30.

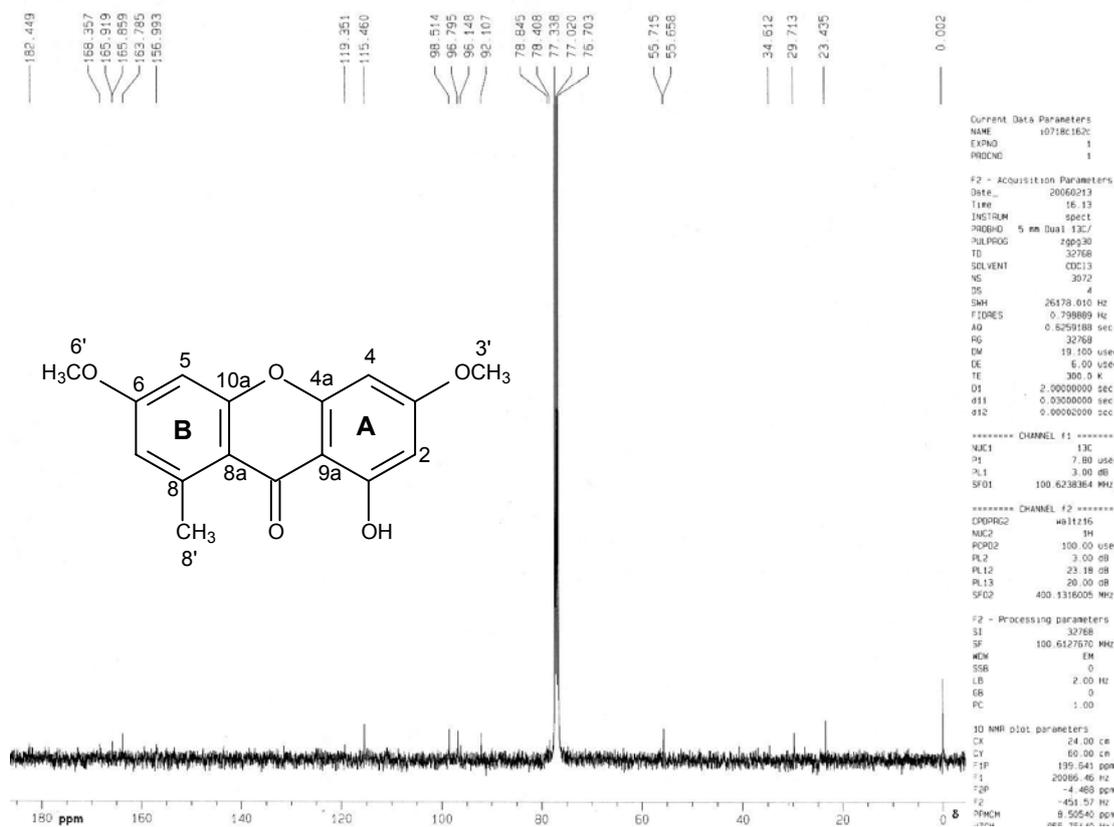


Figura 2.52: Espectro de RMN de ^{13}C de G10 (1-hidroxi-3,6-dimetoxi-8-metil-9-xantona (liquesxantona) (CDCl_3 ; 100 MHz).

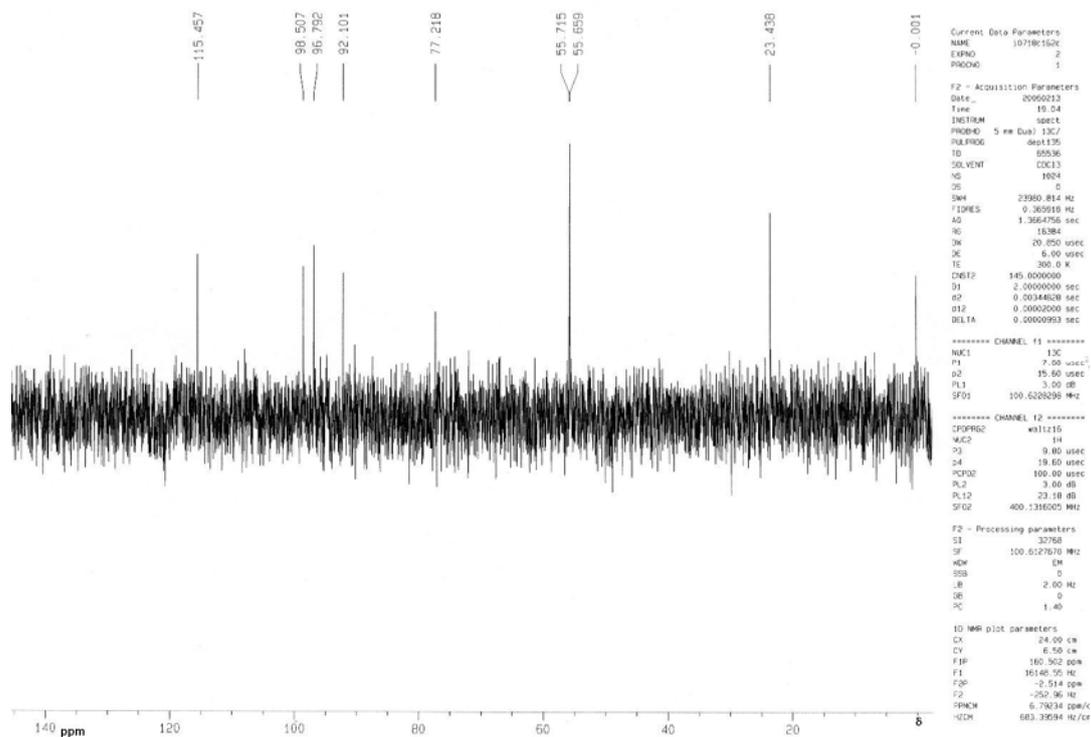


Figura 2.53: Subespectro DEPT-135 de G10 (1-hidroxi-3,6-dimetoxi-8-metil-9-xantona (liquesxantona) (CDCl_3 ; 100 MHz).

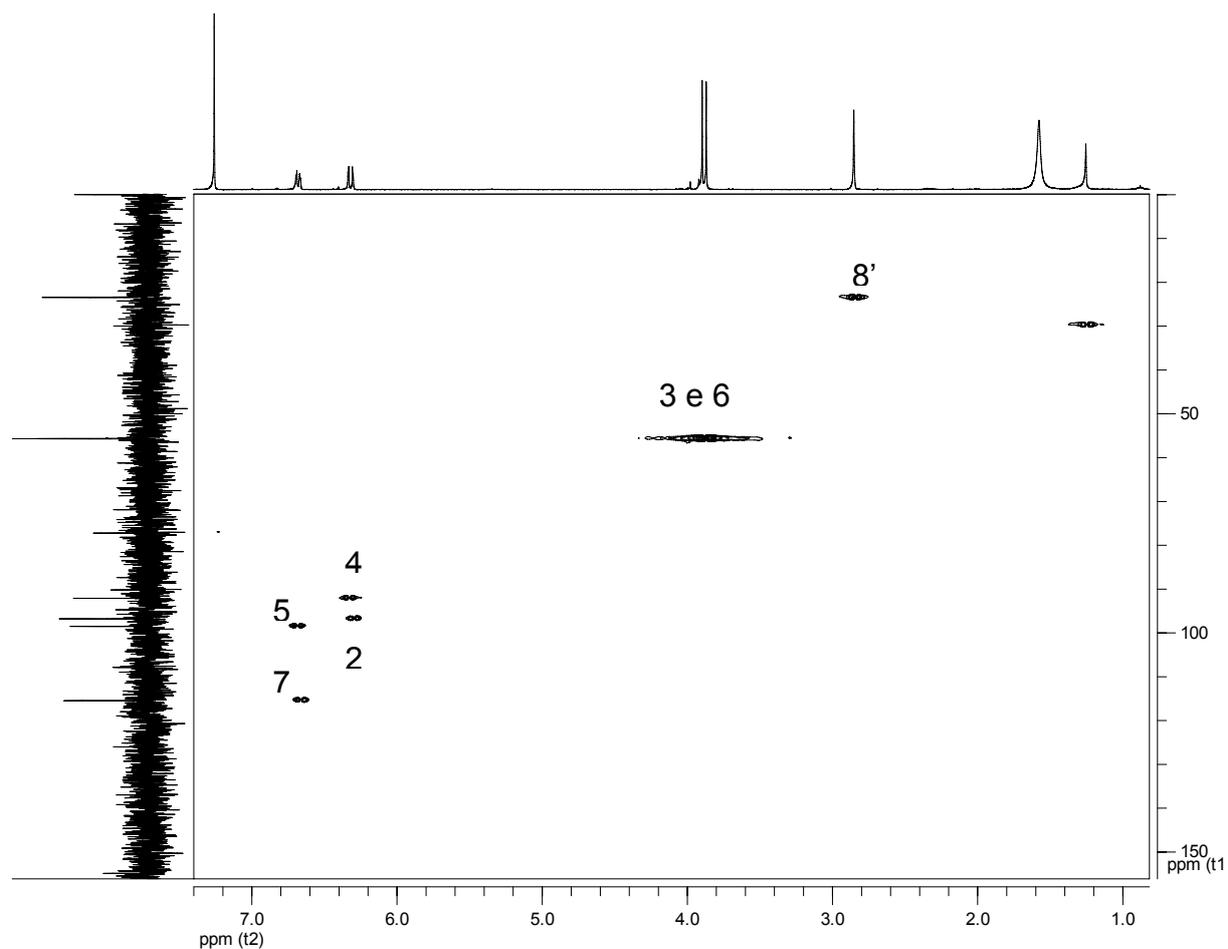
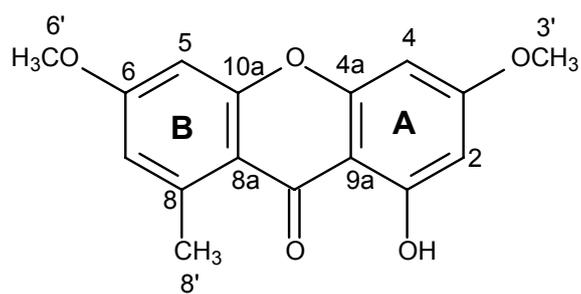


Figura 2.54: Mapa de contornos HSQC de G10 (1-hidroxi-3,6-dimetoxi-8-metil-9-xantona) (liquexantona) (CDCl_3 ; 400 MHz).



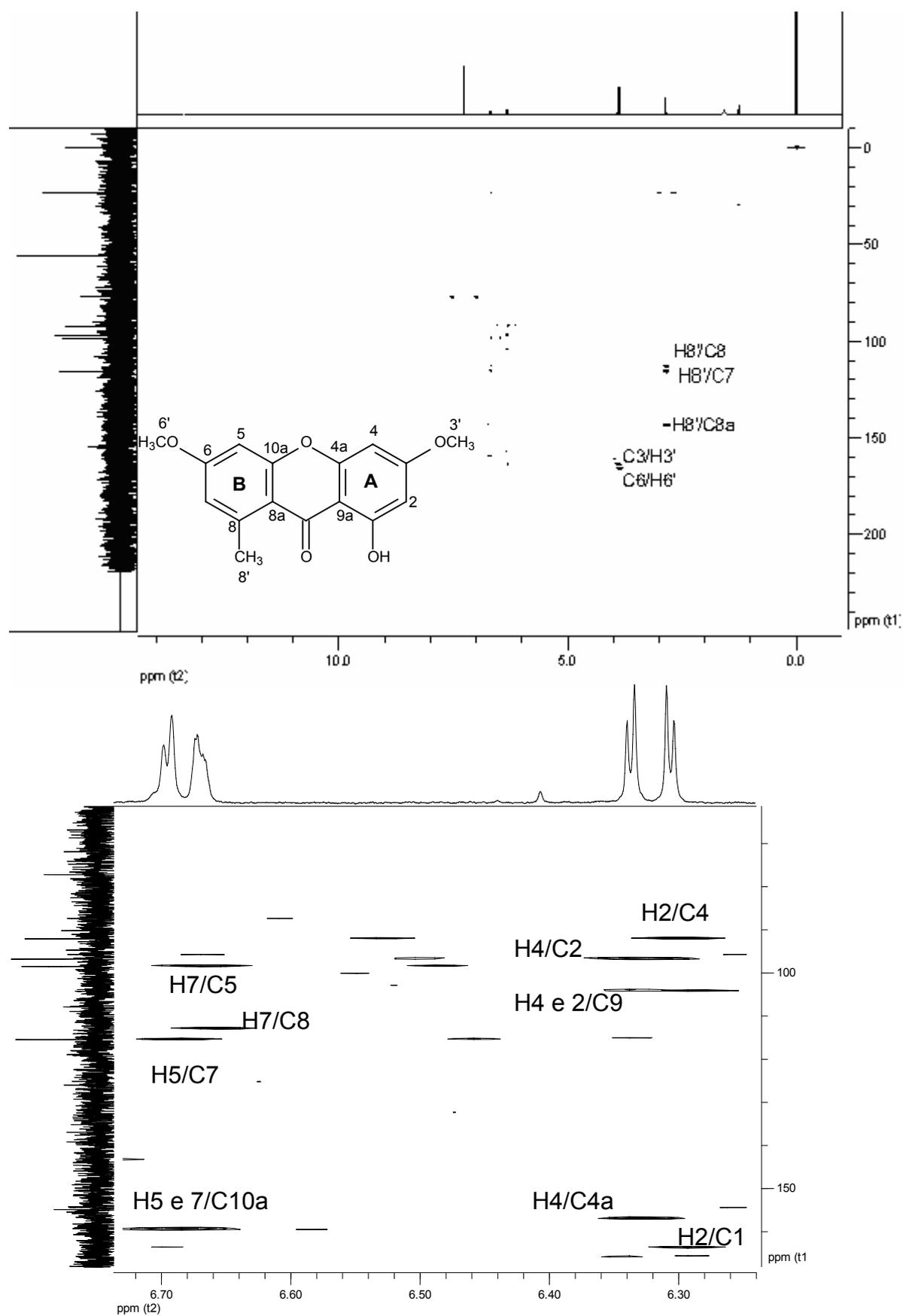


Figura 2.55: Mapa de contornos HMBC e expansão de G10 (1-hidroxi-3,6-dimetoxi-8-metil-9-xantona) (liquexantona) (CDCl₃; 400 MHz).

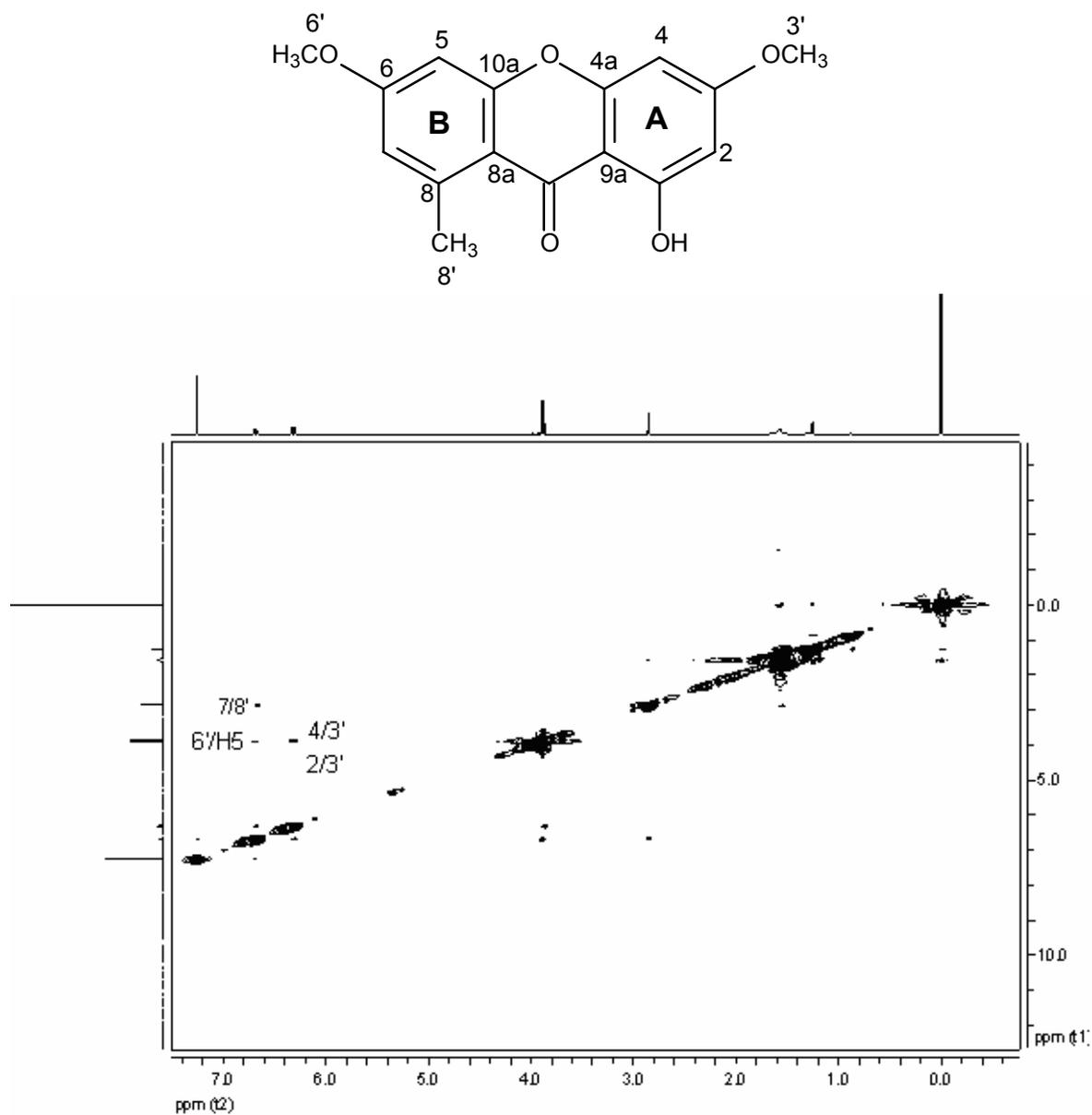


Figura 2.56: Mapa de contornos NOESY de G10 (1-hidroxi-3,6-dimetoxi-8-metil-9-xantona) (liquexantona) (CDCl_3 ; 400 MHz).

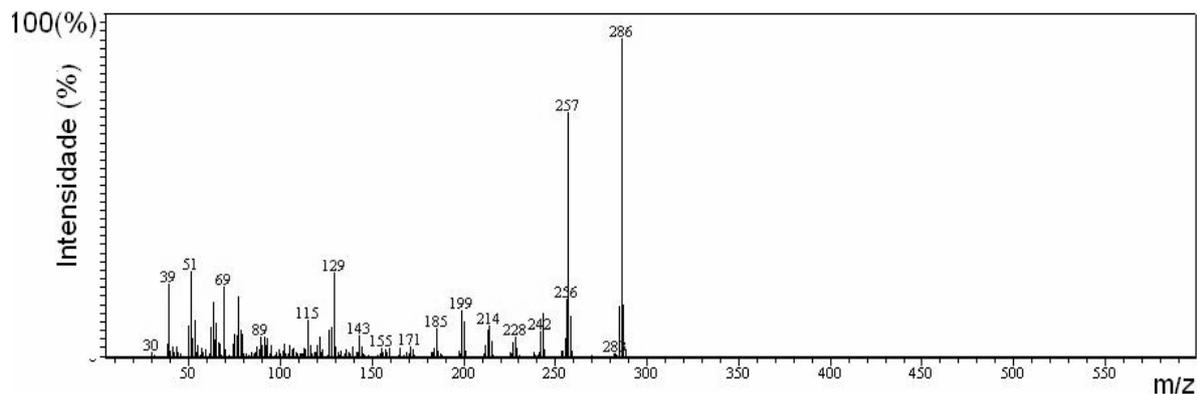
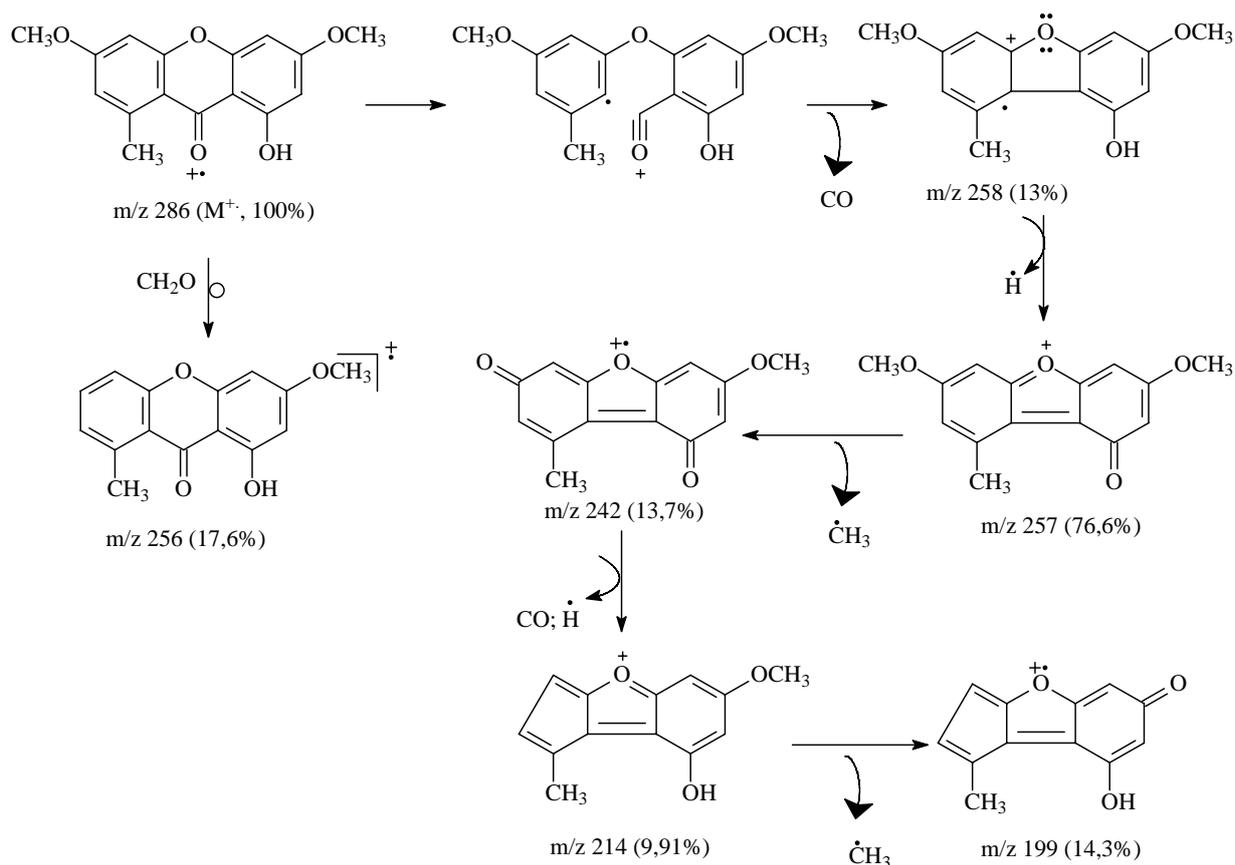
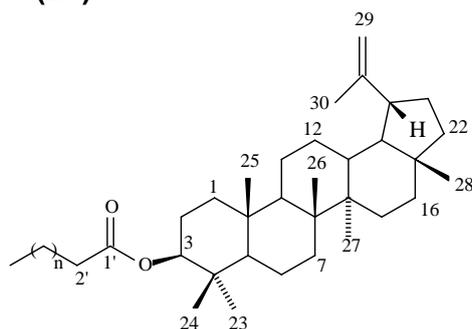


Figura 2.57: Espectro de Massas G10 (1-hidroxi-3,6-dimetoxi-8-metil-9-xantona) (liquexantona).

Cromatógrafo CG-17A-CG-EM QP5050. Análise por inserção direta no EM, EI, 70 eV. Temperatura de 240 ° C na interface. A faixa de análise do EM foi de 30 a 600 Daltons.



Esquema 2.3: Fragmentações importantes observadas para G10 (1-hidroxi-3,6-dimetoxi-8-metil-9-xantona) (GOTTILIEB, 1968).

G11: 3 β -esteariloxi-lup-20-(29)-eno

G11 foi isolado do extrato hexânico dos galhos e apresentou teste Liebermann-Burchard positivo para triterpenos pentacíclicos.

O espectro no IV (Figura 2.58) apresenta bandas de absorção em 2920 e 2850 cm^{-1} , características de $\nu_{\text{C-H}}$, e em 1463 e 1379 cm^{-1} , atribuídas à deformação de C-H. Observa-se também banda forte em 1734 cm^{-1} , referente à deformação C=O de ésteres alifáticos (SILVERSTEIN, 1994).

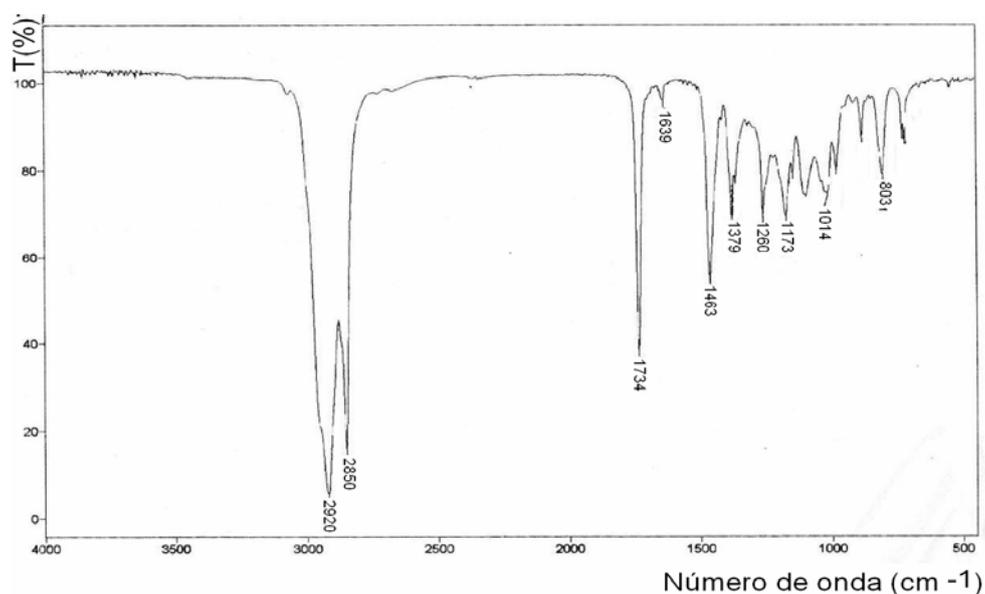


Figura 2.58: Espectro de G11 (3 β -esteariloxi-lup-20-(29)-eno) obtido no IV (KBr).

O espectro de RMN de ^1H (Figura 2.59, pág. 95) apresenta vários sinais na região entre δ_{H} 0,76 e 1,05, correspondentes a grupos metila (MIRANDA et al., 2007). O sinal em δ_{H} 4,49 indica a presença de um hidrogênio carbinólico e dois multipletos em δ_{H} 4,57 e 4,68 sugerem dupla ligação terminal. Um duplo duplete em δ_{H} 2,30, juntamente com um intenso sinal em δ_{H} 1,25 sugerem também a presença de uma cadeia lateral contendo um grupo carbonila.

O espectro de RMN de ^{13}C (Figura 2.60, pág.96) e o subespectro DEPT (Figura 2.61, pág. 97) indicaram que a amostra não se apresenta totalmente pura, porém, podem se observar sinais em δ_{C} 150,97 (C) e 109,36 (CH_2) indicando que G11 possui um triterpeno pentacíclico do tipo lupano (SILVA et al., 2005c). Observa-se também um sinal em δ_{C} 173,69, característico de C=O de ésteres, outro sinal em δ_{C} 80,64, referente à C-O e sinais metilênicos intensos em δ_{C} 29,19 a 29,87.

Estes dados comparados com dados da literatura (MIRANDA et al., 2007) referentes ao triterpeno 3β -estearil-lupeol, indicam que G11 contém o lupeol com um grupo éster ligado a C-3.

Para confirmar esta suspeita foi realizada a análise dos mapas de contornos HSQC (Figura 2.62, pág. 97) e HMBC (Figura 2.63, pág.98).

A análise detalhada do mapa de contornos HMQC (Figura 2.62, pág. 97), HMBC (Figura 2.63, pág.98) e a comparação com os dados da literatura (MIRANDA et al., 2007) permitiram atribuir os hidrogênios e carbonos da parte triterpênica de G11. No espectro de RMN de ^{13}C observam-se os sinais em δ_{C} 130,00 (C-9), 129,78 (C-10), 34,88 (C-2), 31,95 (C-16), 27,24 (C-8), 22,71(C-17) e 14,12 (C-18) que são referentes aos sinais de carbono de ácido graxo insaturado (OLIVEIRA, 2005).

No mapa de contornos HMBC (Figura 2.63, pág. 98) se observa a correlação de C-1' (δ_{C} 173,69) com os sinais de hidrogênio em δ_{H} 4,50 (H-3), 2,30 (H-2') e 1,27 (H-3'), confirmando que o triterpeno possui um éster de cadeia longa ligado em C-3 (δ_{C} 80,64). Observam-se também as correlações do sinal de carbono em δ_{C} 109,36 (C-29) com os sinais em δ_{H} 2,40 (H-19) e 1,70 (H-30). O sinal em δ_{H} 2,40 (H-19) correlaciona-se também com o sinal em δ_{C} 150,97, atribuído a C-20, que por sua vez, mostra correlação com o sinal em δ_{H} 1,70 (H-30).

Através da análise por CG-EM (Figura 2.64, pág. 93) foi possível a detecção em G11 dos ácidos palmítico (pico 1- 6,33%), oléico (pico 3- 3,60%) e esteárico (pico 4- 1,40%), observados também no RMN de ^{13}C , além do hidrocarboneto hexacosano (pico 10- 10,76%). Como a análise do EM foi realizada em um intervalo de 30-600 Daltons, não foi possível determinar se a cadeia lateral do grupo éster ligado ao lupano possui 18 carbonos como indicaram os dados de RMN de ^{13}C comparados aos dados do triterpeno 3β -estearil-lupeol. Porém, pode se observar que o pico 19, observado no cromatograma de G11, representa cerca de 18% da amostra. Não foi possível observar no espectro de Massas correspondente a esse pico majoritário em

G11 (Figura 2.65, pág. 93), o pico referente ao íon molecular, do 3 β -esteariloxi-lup-20-(29)-eno, que deveria ocorrer em m/z 692. Entretanto, observam-se os picos em m/z 218 (5,17%), 203 (5,3%), 189 (7,83%), característicos de esqueleto lupano, como já apresentado para os lupanos anteriormente isolados e o pico em m/z 408 (2,48%), que pode ser atribuído a perda da cadeia lateral ligada ao C-3 do esqueleto lupano (Esquema 2.4). De acordo com as análises obtidas pode-se sugerir como constituinte majoritário de G11 o 3 β -esteariloxi-lup-20-(29)-eno.

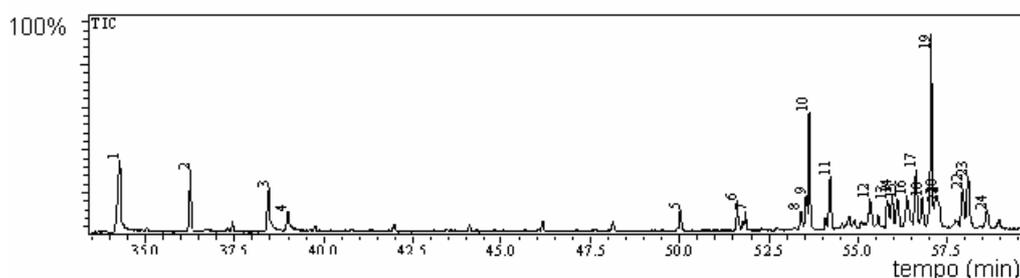


Figura 2.64: Cromatograma de G11 (3 β -esteariloxi-lup-20-(29)-eno).

Cromatógrafo CG-17A-CG-EM QP5050. Análise por inserção direta no EM, EI, 70 eV. Temperatura de 240 ° C na interface. Faixa de análise do EM foi de 30 a 600 Daltons.

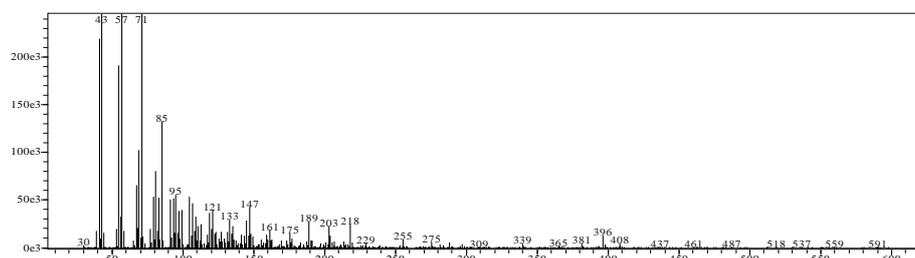
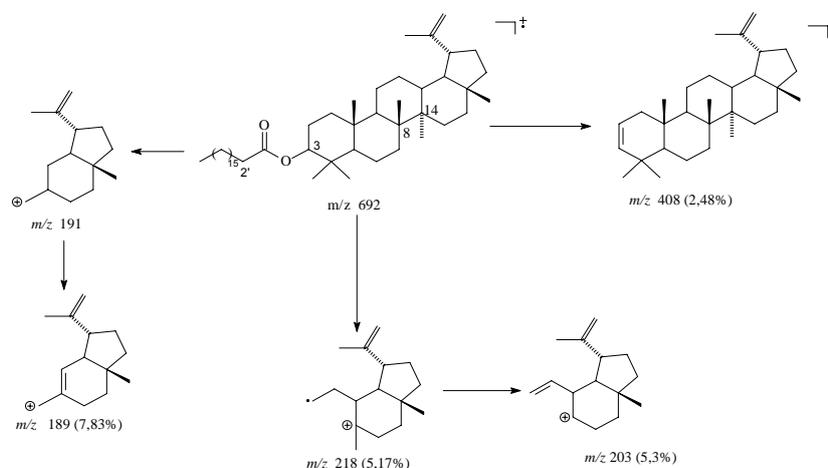


Figura 2.65: Espectro de Massas do pico 19 (3 β -esteariloxi-lup-20-(29)-eno).

Cromatógrafo CG-17A-CG-EM QP5050. Análise por inserção direta no EM, EI, 70 eV. Temperatura 240 °C na interface. Faixa de análise do EM foi de 30 a 600 Daltons.



Esquema 2.4: Fragmentações importantes observadas para o pico 19 (3 β -esteariloxi-lup-20-(29)-eno) (MATHE et al., 2004).

Na Tabela 2.11 são mostradas as atribuições feitas utilizando dados de RMN, bem como a comparação com dados da literatura para o triterpeno 3β -estearil-lupeol (MIRANDA et al., 2007).

Tabela 2.11: Comparação dos deslocamentos químicos de carbono e hidrogênio de G11 (3β -esteariloxi-lup-20-(29)-eno) com dados da literatura

C _n	δ_c G11	^a 3β -estearil-lupeol	δ_H	C _n	Cadeia Alifática δ_c G11	^a 3β -estearil-lupeol	δ_H
1	38,42	38,43	1,00, <i>m</i>	1'	173,70	173,69	-
2	23,77	23,78	1,65, <i>m</i>	2'	34,88	34,88	2,30, <i>m</i>
3	80,64	80,65	4,50, <i>m</i>	3'	25,28	25,19	1,27, <i>m</i>
4	37,87	37,87	-	4'	29,20	29,19	1,27, <i>m</i>
5	55,42	55,44	0,83	5'	29,28	29,27	1,00-1,20, <i>m</i>
6	18,24	18,24	1,40, <i>m</i> 1,50, <i>m</i>	6'	29,38	29,37	
7	34,25	34,27	1,23, <i>m</i>	7'	29,54	29,60	
8	40,89	40,91	-	8'	29,60	29,69	
9	50,38	50,40	1,27, <i>m</i>	9'	29,72	29,71	
10	37,12	37,14	-	10'	29,72	29,71	
11	20,98	20,99	1,27, <i>m</i> 1,44, <i>m</i>	11'	29,72	29,71	
12	25,20	25,15	1,10, <i>m</i> 1,65, <i>m</i>	12'	29,72	29,71	
13	38,09	38,11	1,70, <i>m</i>	13'	29,72	29,71	
14	42,87	42,88	-	14'	29,60	29,65	
15	27,47	27,48	1,04, <i>m</i> 1,10, <i>m</i>	15'	29,49	29,48	
16	35,61	35,65	1,40, <i>m</i> 1,51, <i>m</i>	16'	31,95	31,94	
17	43,02	43,03		17'	22,71	22,70	
18	48,33	48,35	1,39, <i>m</i>	18'	14,12	14,11	0,90, <i>m</i>
19	48,04	48,04	2,40, <i>m</i>				
20	150,97	150,96					
21	29,87	29,88	1,27, <i>m</i>				
22	40,03	40,03	1,15, <i>m</i> 1,41, <i>m</i>				
23	28,00	28,00	0,87				
24	16,60	16,59	0,90				
25	16,19	16,18	0,89				
26	16,00	16,01	1,05				
27	14,55	14,55	0,93				
28	18,02	18,03	0,83				
29	109,36	109,36	4,59, <i>s</i> / 4,64, <i>s</i> /				
30	19,31	19,31	1,70, <i>s</i>				

^a MIRANDA et al., *Helvetica Chimica Acta*, in press, 2007.

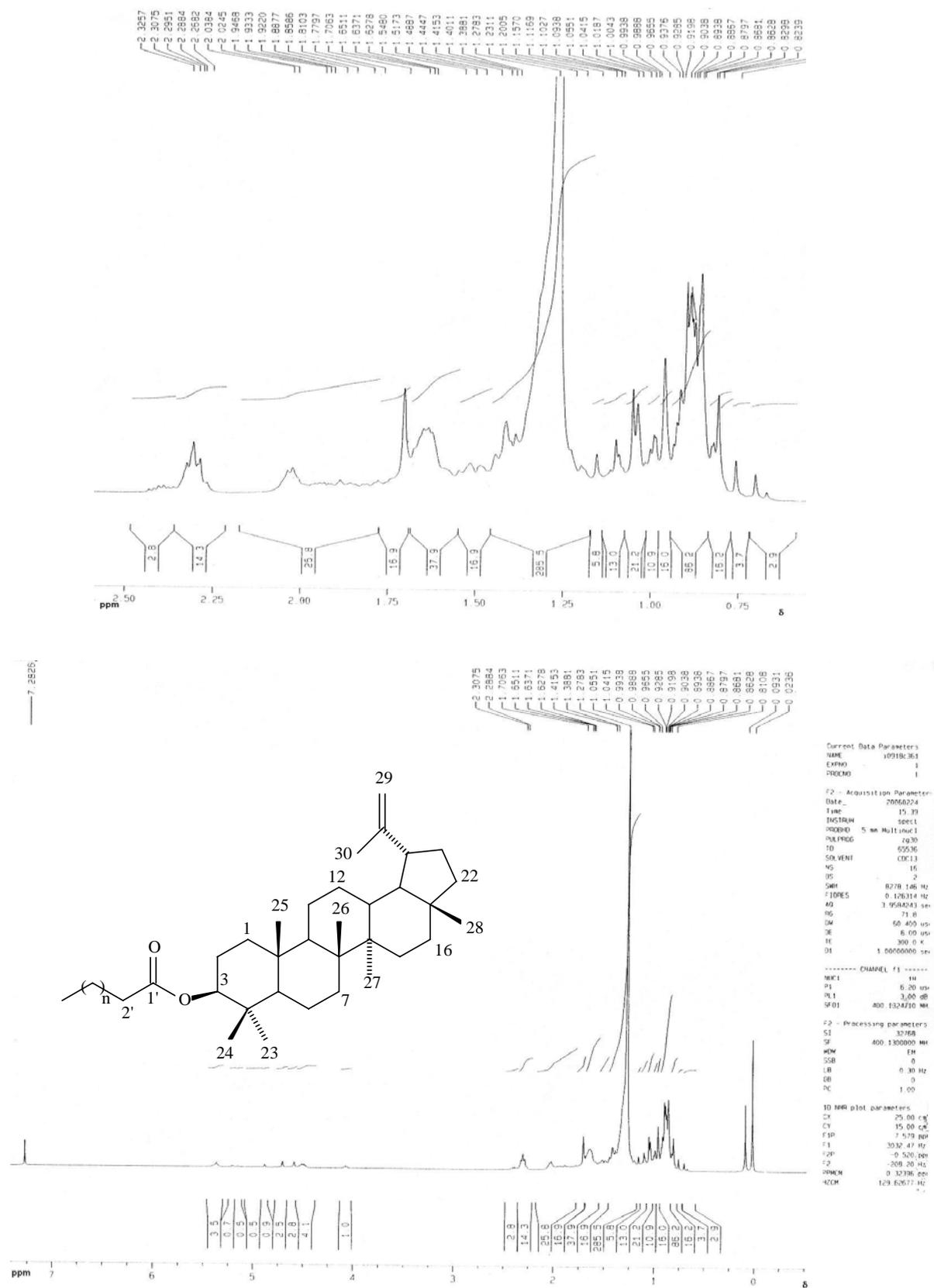


Figura 2.59: Espectro de RMN de ^1H de G11 (3 β -esteariloxi-lup-20-(29)-eno) (CDCl_3 ; 400 MHz). Em destaque ampliação da região entre δ_H 2,50 e 0,75.

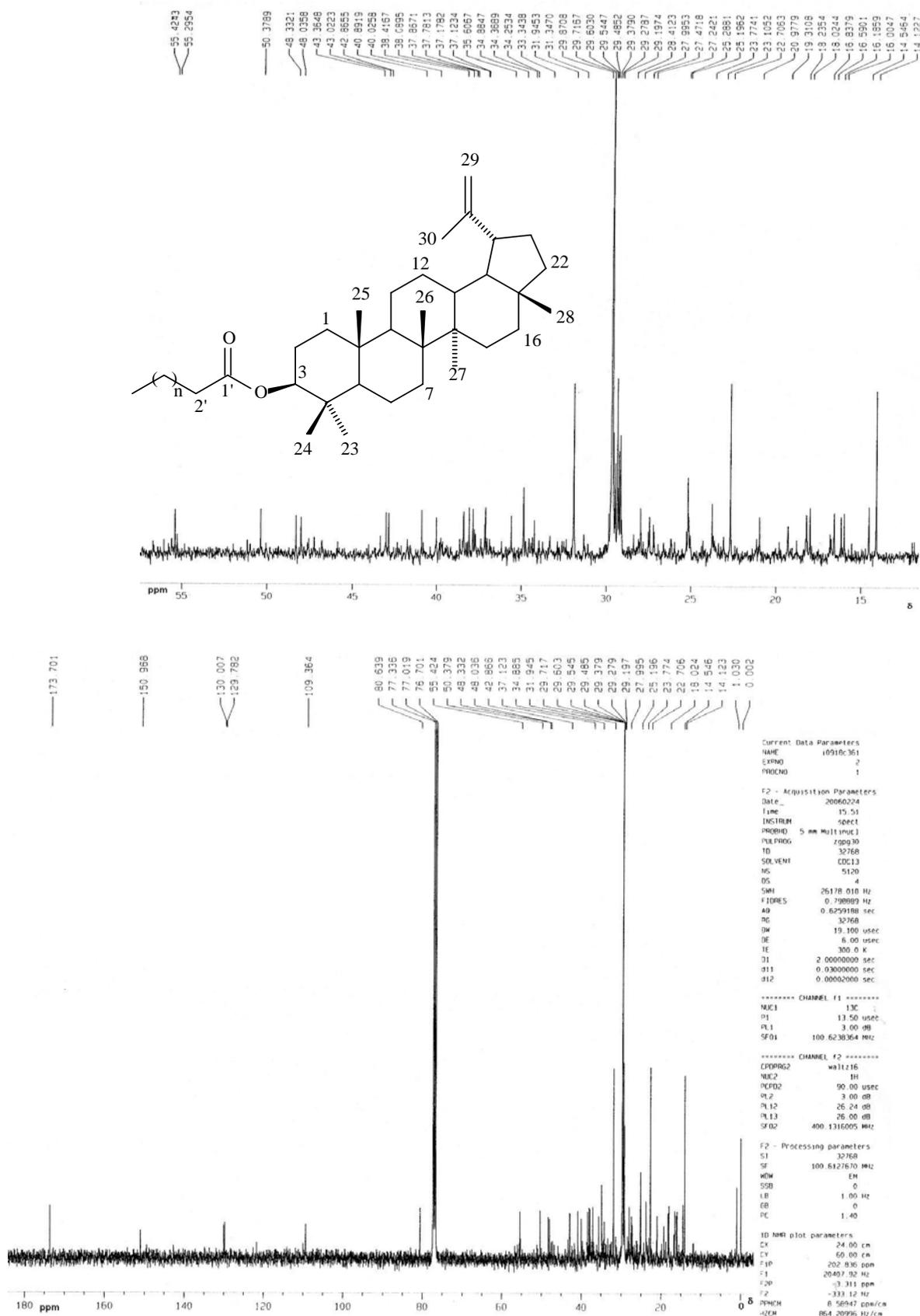


Figura 2.60: Espectro de RMN de ^{13}C de G11 (3β-esteariloxi-lup-20(29)-eno) (CDCl_3 ; 100 MHz). Em destaque ampliação da região entre δ_{C} 15,00 e 55,00.

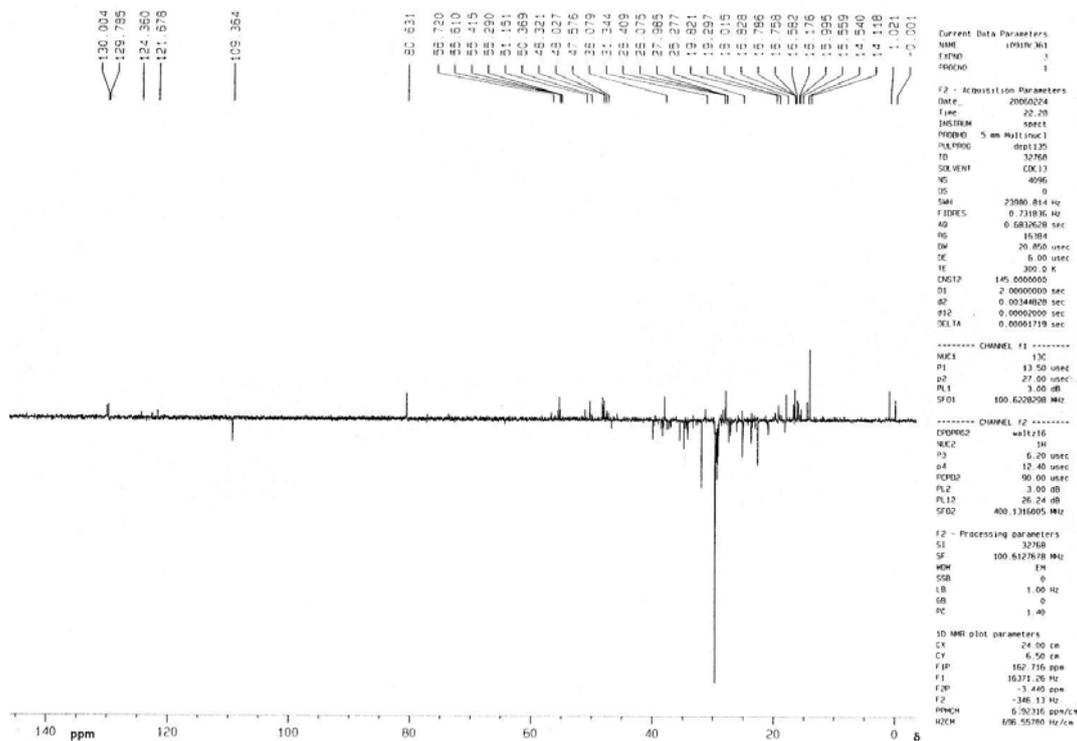


Figura 2.61: Subespectro DEPT-135 de G11 (3β-esteariloxi-lup-20-(29)-eno) (CDCl₃; 100 MHz).

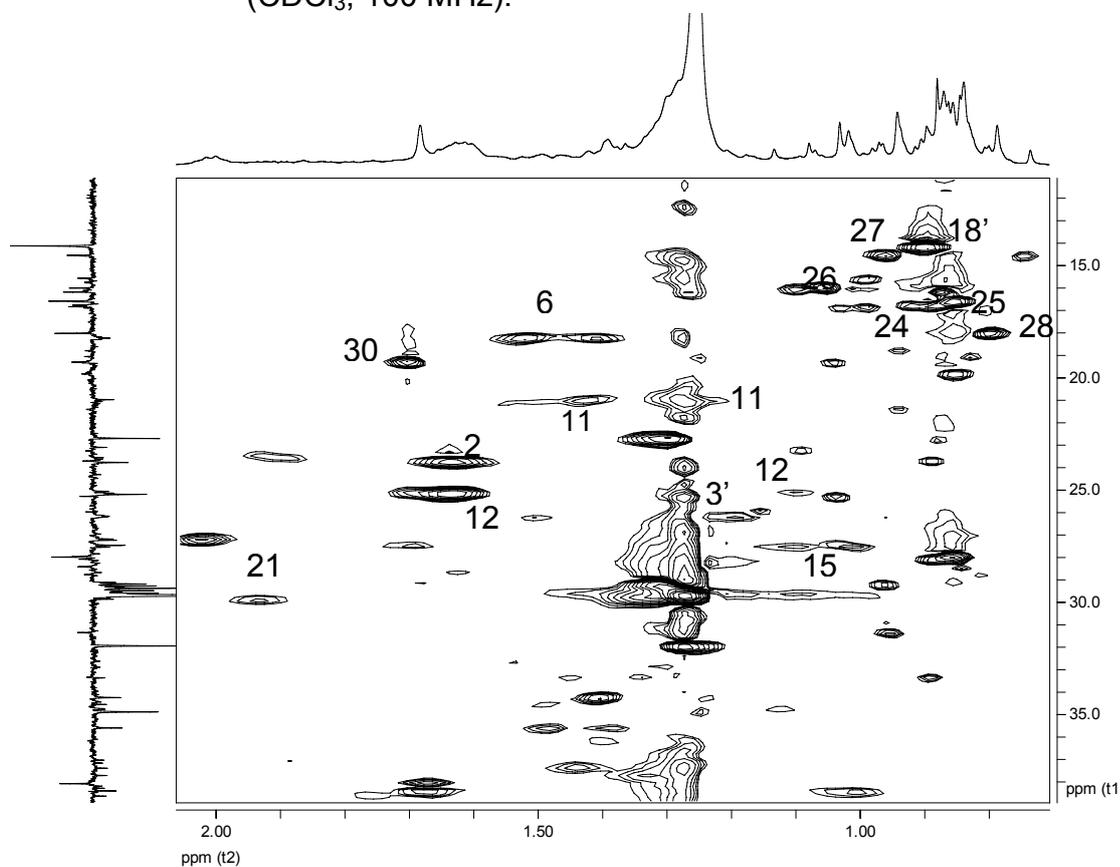


Figura 2.62: Mapa de contornos HMBC de G11 (3β-esteariloxi-lup-20-(29)-eno) (CDCl₃; 100 MHz).

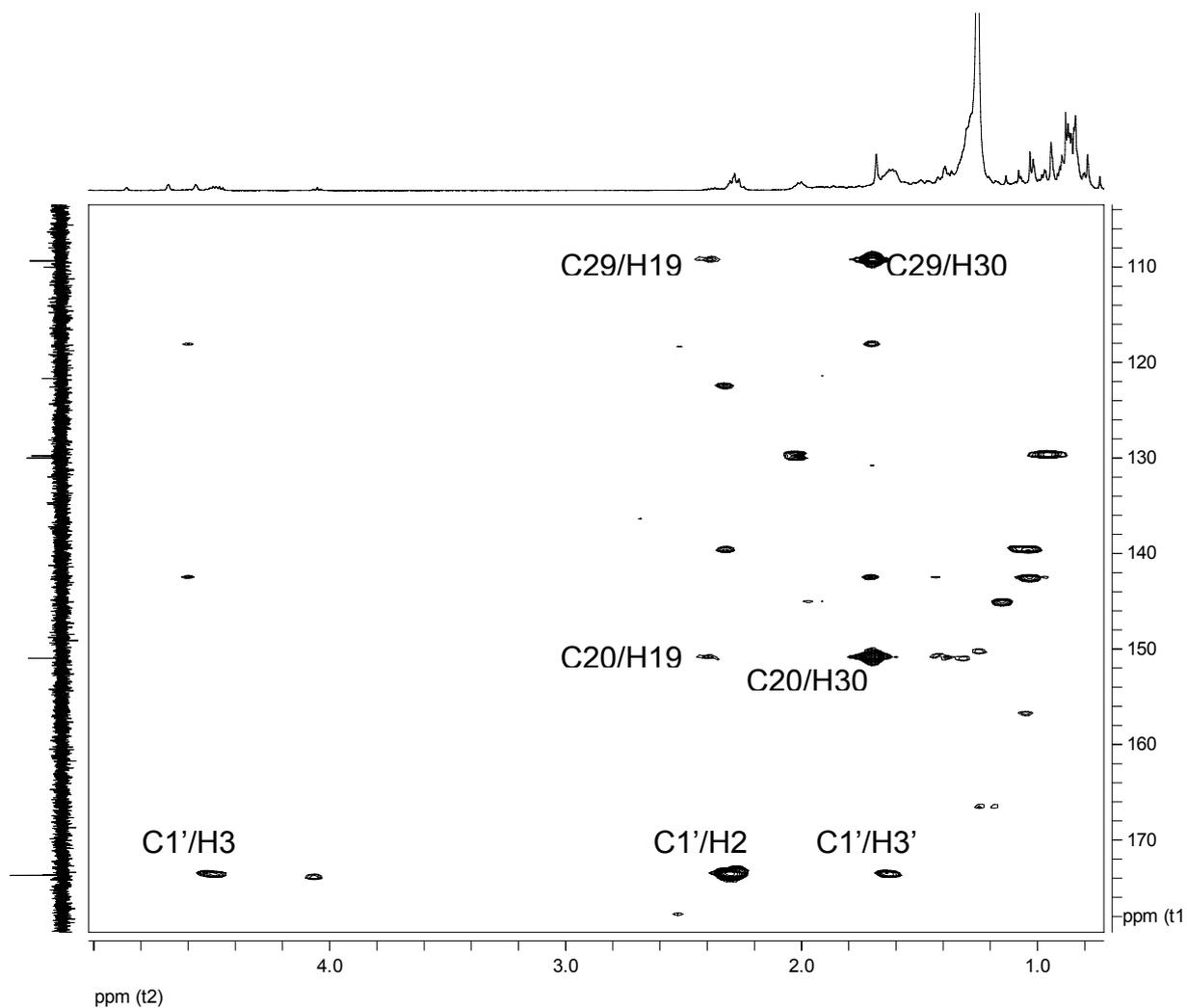
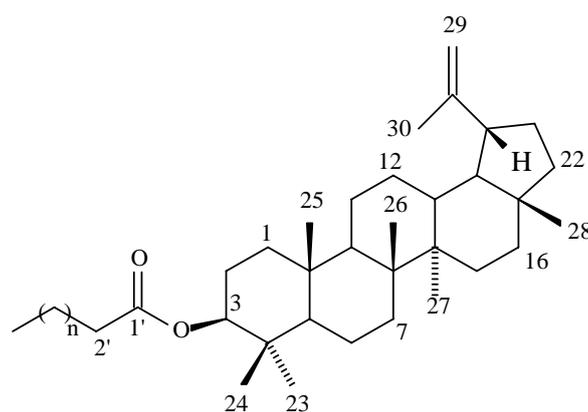
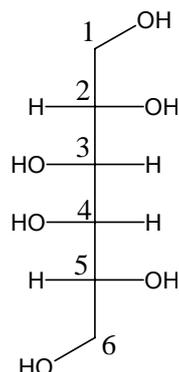


Figura 2.63: Mapa de contornos HMBC de G11 (3 β -esteariloxi-lup-20-(29)-eno) (CDCl₃; 100 MHz).



F1: Galactitol (Dulcitol)

F1 foi isolado do extrato etanólico das folhas de *Maytenus imbricata*, durante a remoção do solvente, e apresentou-se como um sólido esbranquiçado, de ponto de fusão 180-195 °C, insolúvel em metanol e clorofórmio e solúvel em água.

O espectro de F1 obtido na região do infravermelho (Figura 2.66) apresenta banda de absorção em 3500– 3000 cm^{-1} , que corresponde a estiramentos O-H, indicativa da presença do grupo hidroxila. Mostra também bandas de absorção em 1120–1000 cm^{-1} correspondentes a deformações da ligação C-O (SILVERSTEIN, 1994). O perfil do espectro no infravermelho, principalmente na região entre 1250 cm^{-1} e 800 cm^{-1} e a comparação por CCD com amostra autêntica, indicou tratar-se do dulcitol.

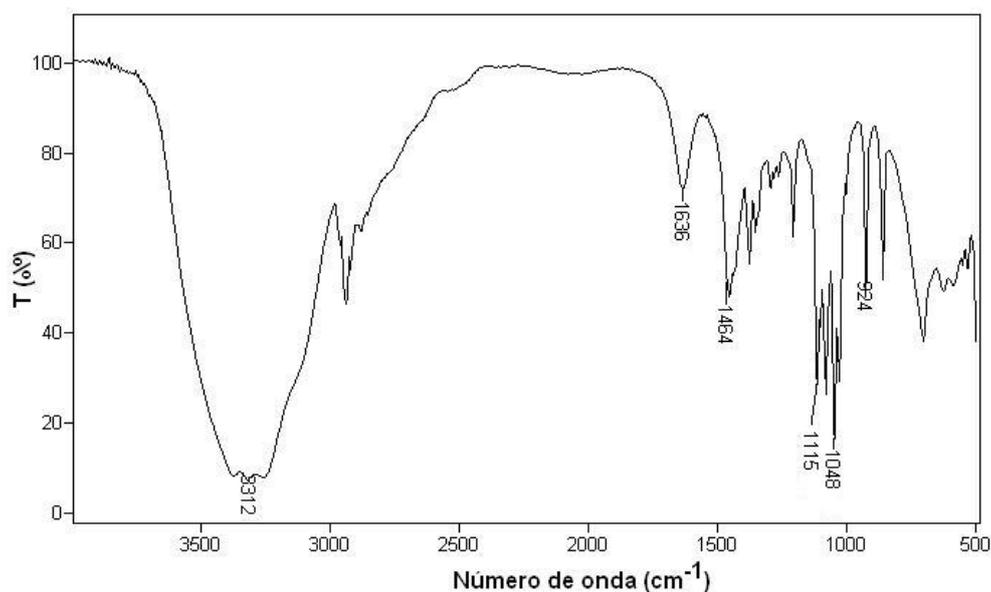


Figura 2.66: Espectro de F1 (Dulcitol) obtido no IV (KBr).

O espectro de RMN de ^1H (Figura 2.67, pág. 100) mostra a presença de dois sinais largos em δ_{H} 3,69 atribuído a H-1 e H-6 e em δ_{H} 3,72 foi atribuído aos

hidrogênios H-3 e H-4, e um tripleto em δ_H 3,99 ($J = 6,0$ Hz) foi atribuído aos hidrogênios H-2 e H-5.

O espectro de RMN de ^{13}C (Figura 2.68, pág. 101) indica a presença de três sinais, mostrando a simetria da molécula, sendo um CH_2 e dois CH , pela análise do subspectro DEPT 135 (Figura 2.69, pág. 101). O sinal em δ_C 63,28 foi atribuído a C-1 e C-6, o sinal em δ_C 69,38 atribuído a C-3 e C-4 e o sinal em δ_C 70,19 atribuído a C-2 e C-5.

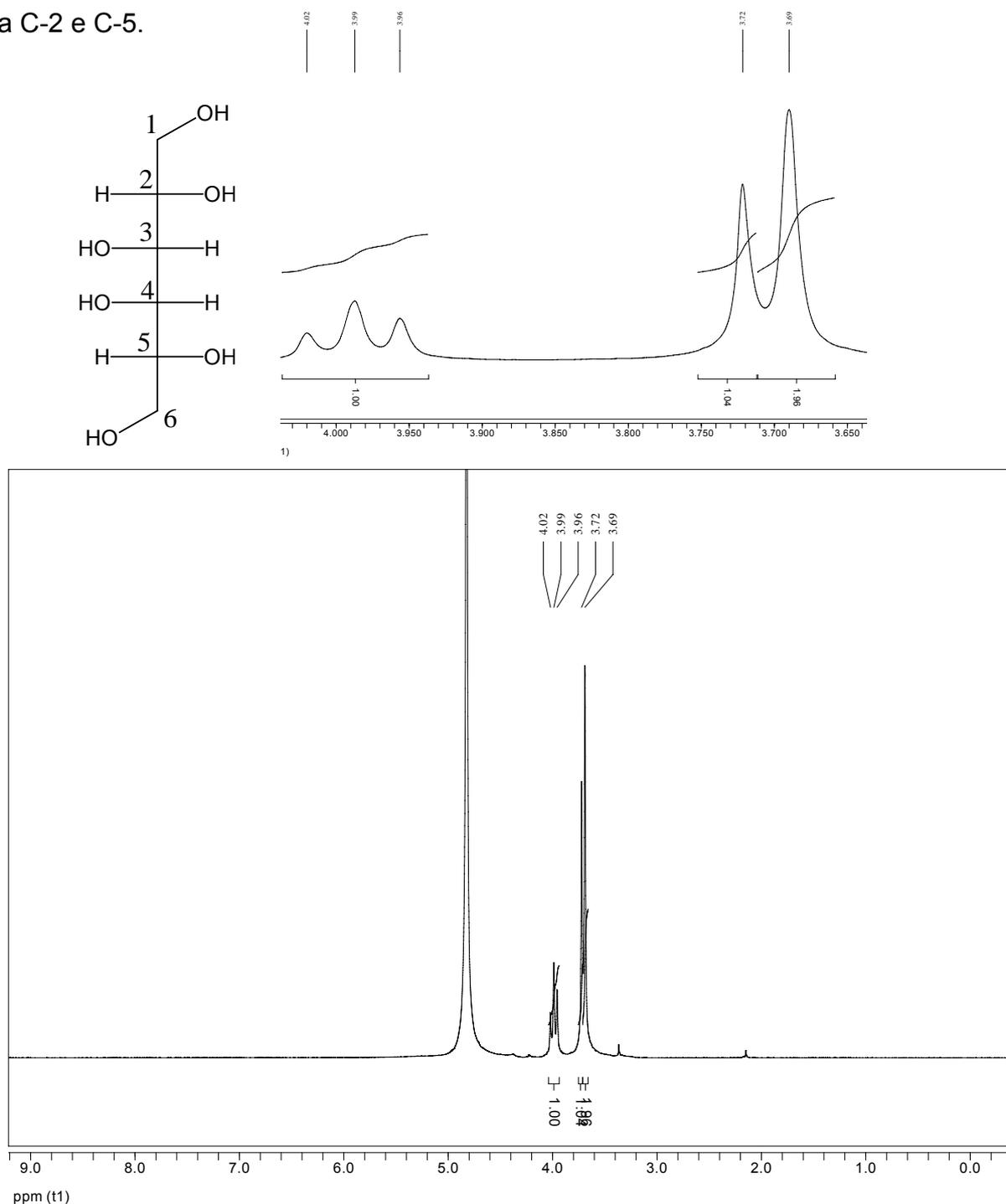


Figura 2.67: Espectro de RMN de 1H de F1 (dulcitol) (D_2O ; 400 MHz).

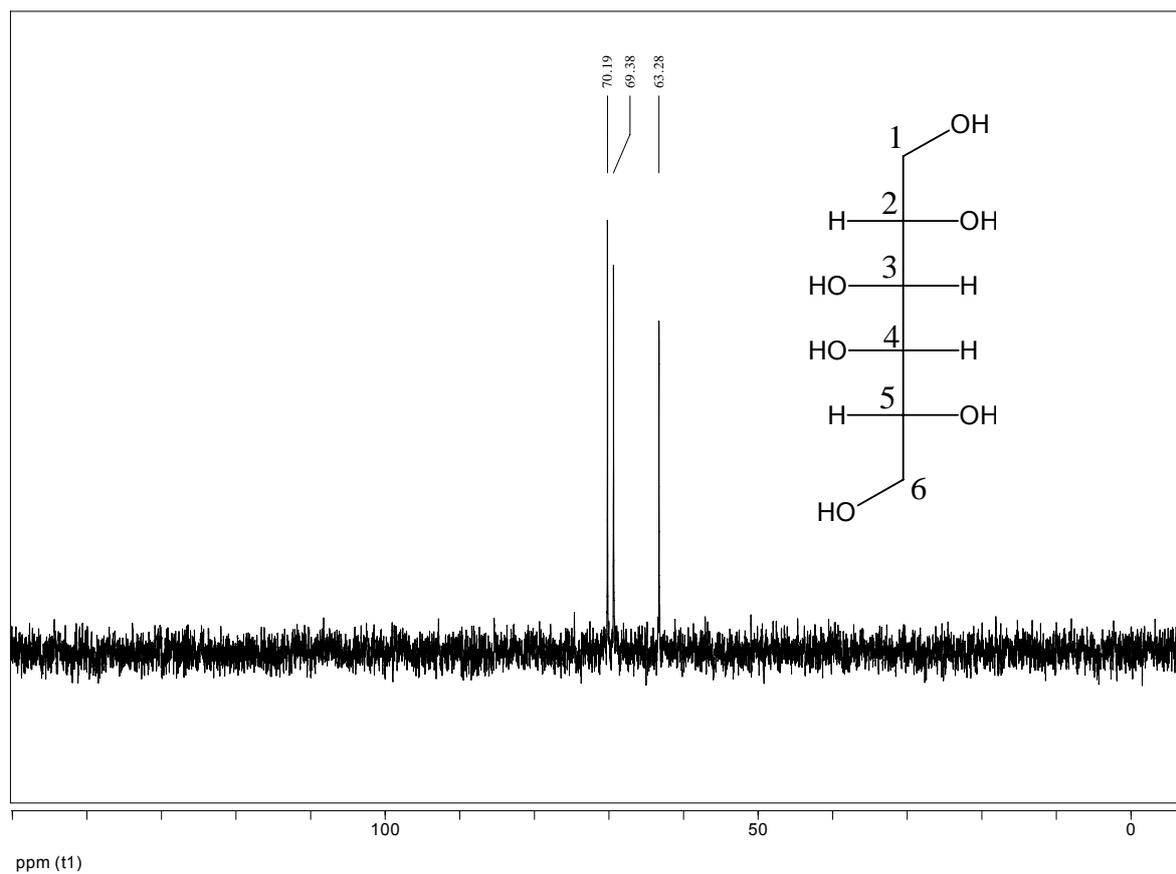


Figura 2.68: Espectro de RMN de ^{13}C de F1 (dulcitol) (D_2O ; 100 MHz).

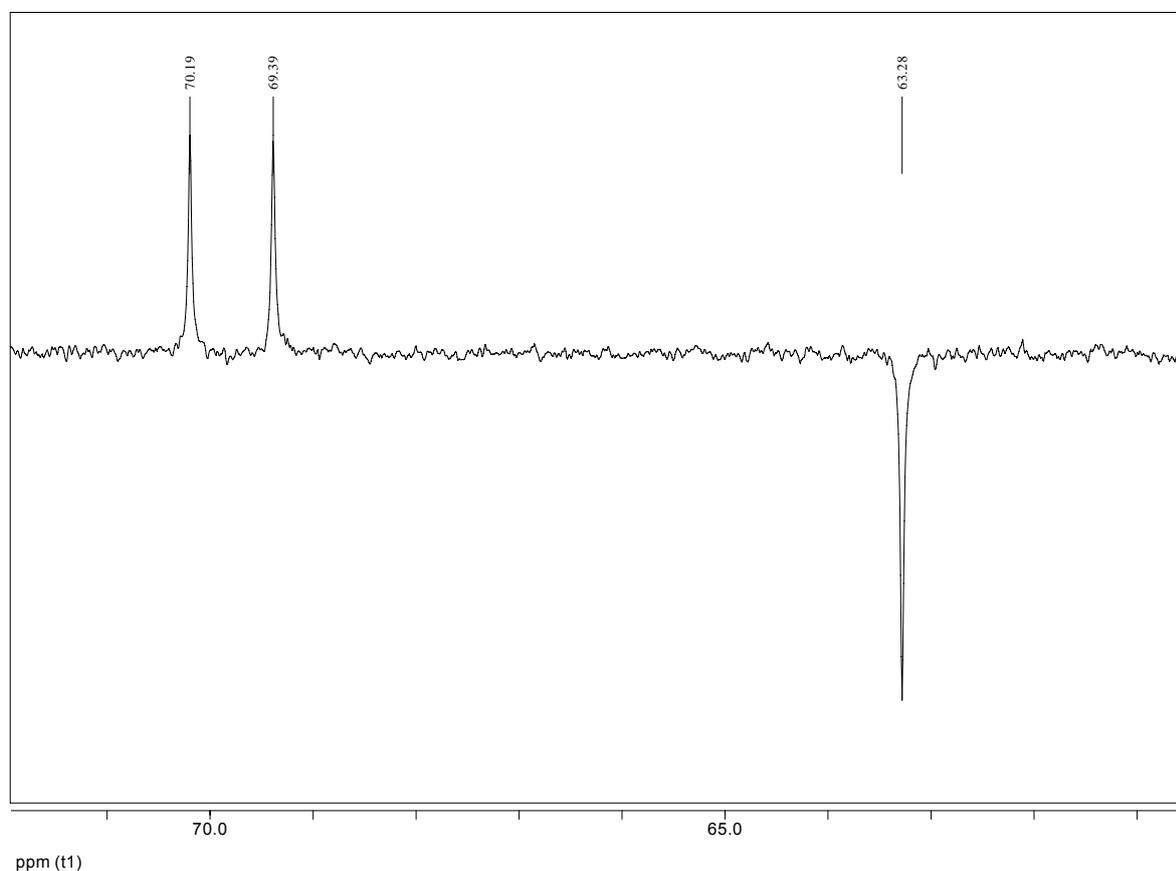


Figura 2.69: Subespectro DEPT-135 de F1 (dulcitol) (D_2O ; 100 MHz).

O espectro de Massas de F1 (Figura 2.70) apresentou picos em m/z 183 ($[M+1]$ 0,2%), 103 (14%), 73 (100%). Os prováveis caminhos de fragmentação são representados no Esquema 2.4.

A feição do espectro no IV, os dados de RMN, de EM, a comparação em CCD com amostra autêntica obtida no NEPLAM e com os dados da literatura (FONSECA, 2004) nos permitiram identificar F1 como sendo o galactitol ou dulcitol, um poliol comumente encontrado na família *Celastraceae* (DUARTE, 2000, VIEIRA FILHO 2002).

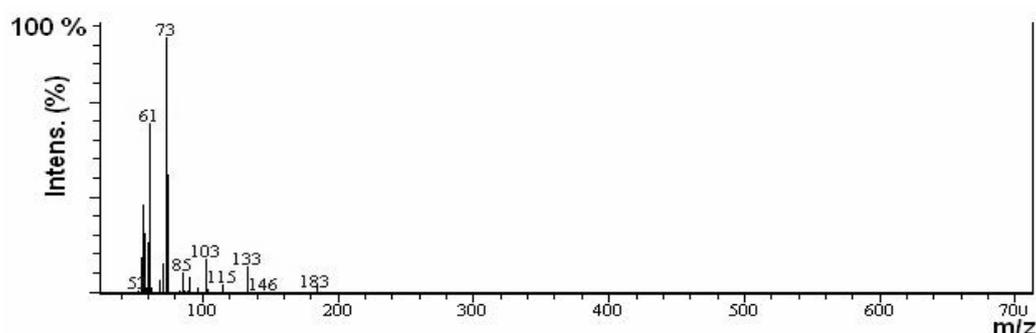
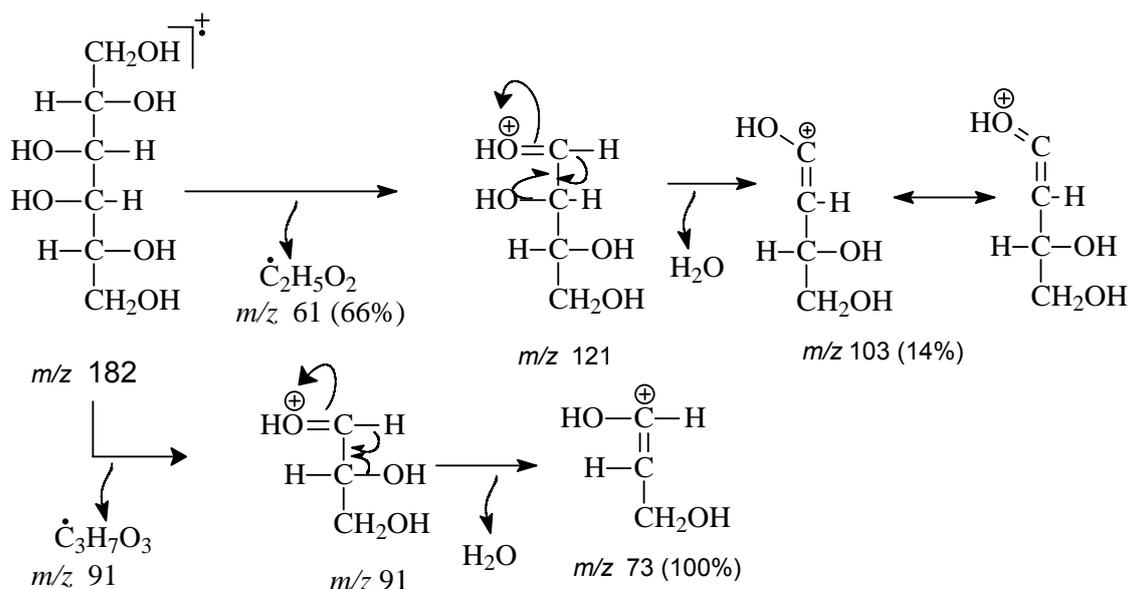
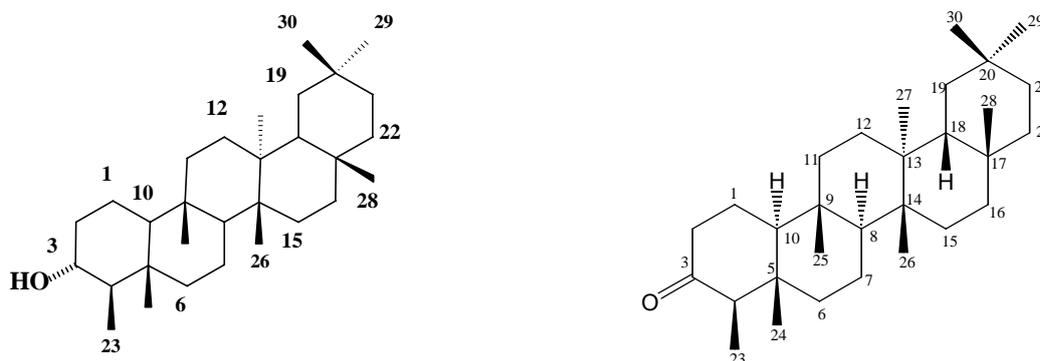


Figura 2.70: Espectro de massas (EI) de F1 (Dulcitol).

Cromatógrafo CG-17A- CG-EM QP5050. Análise por inserção direta no EM, EI, 70 eV. Temperatura 240 °C na interface. A faixa de análise do EM foi de 30 a 700 Daltons.



Esquema 2.4: Prováveis caminhos de fragmentação para F1 (dulcitol) (GOTTILIEB, 1968).

F3, F4, F8: Mistura de Friedelinol e Friedelina

F3 apresentou-se como sólido branco de ponto de fusão 261-263 °C indicando tratar-se de uma substância pura. Apresentou teste Liebermann-Burchard positivo para triterpenos pentacíclicos. A comparação por CCD com as amostras F4 e F8 indicaram tratar-se do mesmo material.

Os espectros no IV obtidos para as amostras foram superponíveis, sendo, portanto apresentado apenas o espectro de F3 (Figura 2.71). Observam-se bandas de absorção em 2930, 2862 e 1452 cm^{-1} , características de ν de ligação C-H, além de banda larga em 3486 cm^{-1} característica de ν de grupo hidroxila.

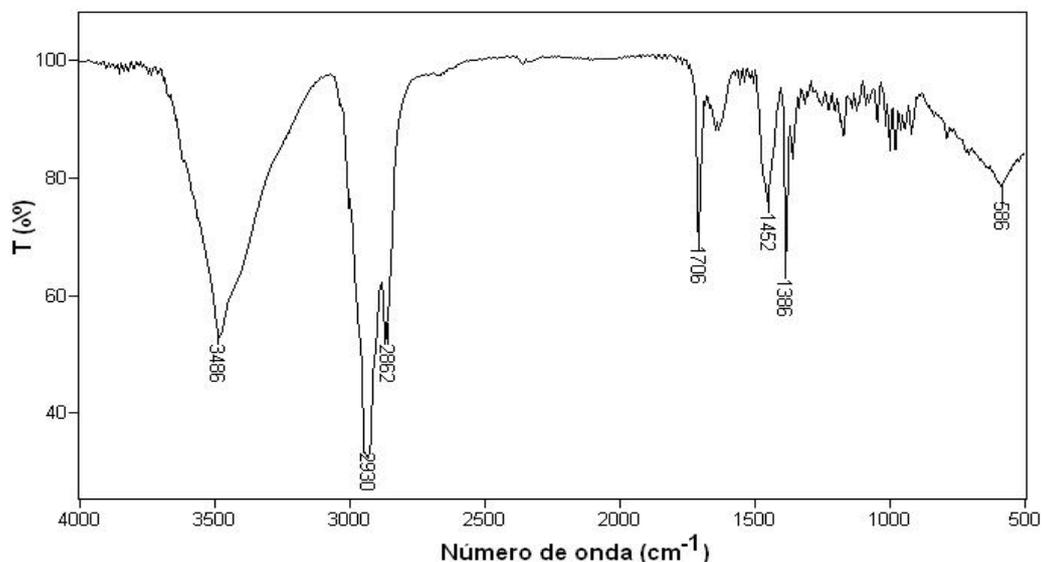


Figura 2.71: Espectro de F3 (Friedelinol+Friedelina) obtido no IV (KBr).

O espectro de RMN de ^1H (Figura 2.72, pág. 106) mostra vários sinais correspondentes a grupos metila entre δ_{H} 0,73 e 1,17, além de sinal em δ_{H} 3,75 correspondente a hidrogênio ligado a carbono alcoólico, indicando que a amostra não estava pura.

O espectro de RMN de ^{13}C (Figura 2.73, pág. 107) e o subespectro DEPT-135 (Figura 2.73 pág. 107) indicaram a presença de 50 sinais confirmando que F3 tratava-se de uma mistura.

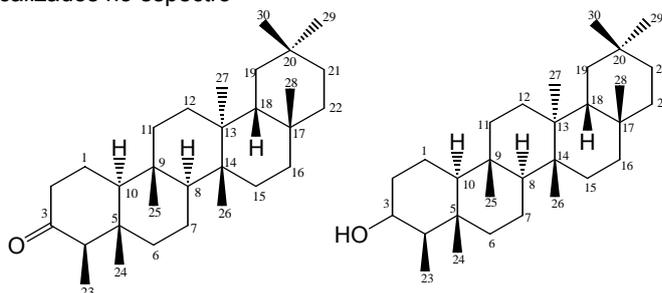
O espectro de RMN de ^1H e de ^{13}C , a feição do espectro no IV e a comparação em CCD com amostras autênticas permitiram identificar F3, F4 e F8 como sendo uma mistura de friedelina e friedelinol, dois TTPC pertencentes à classe dos friedelanos, comuns em *Celastraceae* (DUARTE, 2000; VIEIRA FILHO 2001). Com base nestas informações, a determinação estrutural das amostras foi realizada comparando-se os dados de RMN de ^{13}C obtidos com os já descritos na literatura (Tabela 2.12, pág. 105).

Tabela 2.12: Atribuição dos sinais de RMN de ^{13}C de F3 (Friedelina e Friedelinol) baseando-se nos dados descritos na literatura, (CDCl_3 ; 200 MHz).

Carbono n°	$\delta^{13}\text{C}$ de F3		^a . δ_{C} 3 α -Friedelinol	^b . δ_{C} Friedelina
	Friedelina	Friedelinol		
1	22,54	-	19,76	22,31
2	41,95	-	37,00	41,56
3	-	73,01	71,11	212,98
4	58,47	53,43	53,41	58,30
5	-	38,06	38,12	42,17
6	41,53	41,79	41,53	41,38
7	-	-	17,92	18,29
8	53,34	53,34	53,00	53,18
9	37,68	37,34	37,05	37,52
10	59,71	61,57	60,25	59,58
11	35,87	35,79	35,57	35,69
12	30,76	30,88	30,64	30,55
13	39,91	38,53	38,31	39,77
14	38,61	39,53	39,70	38,37
15	32,66	32,57	32,38	32,50
16	36,25	36,31	36,12	36,08
17	30,26	30,26	30,01	30,05
18	43,04	42,41	42,88	42,90
19	35,58	35,41	35,36	35,40
20	28,43	28,43	28,16	28,20
21	33,05	33,05	32,88	32,86
22	-	-	39,27	39,30
23	7,09	11,89	10,22	6,80
24	16,03	14,91	14,63	14,60
25	17,79	18,21	18,17	17,97
26	20,51	20,38	20,18	20,27
27	18,50	18,92	18,68	18,66
28	32,34	32,34	32,13	32,13
29	35,29	35,29	35,02	35,03
30	-	-	31,86	31,81

^a Salazar et al, Magnetic Resonance in Chem.2000; 38:977-980; (CDCl_3 ; 400 MHz)

^b Duarte, P. L., Tese Doutorado, Departamento de Química, UFMG, 2000; (CDCl_3 ; 400 MHz); (-): valores não localizados no espectro



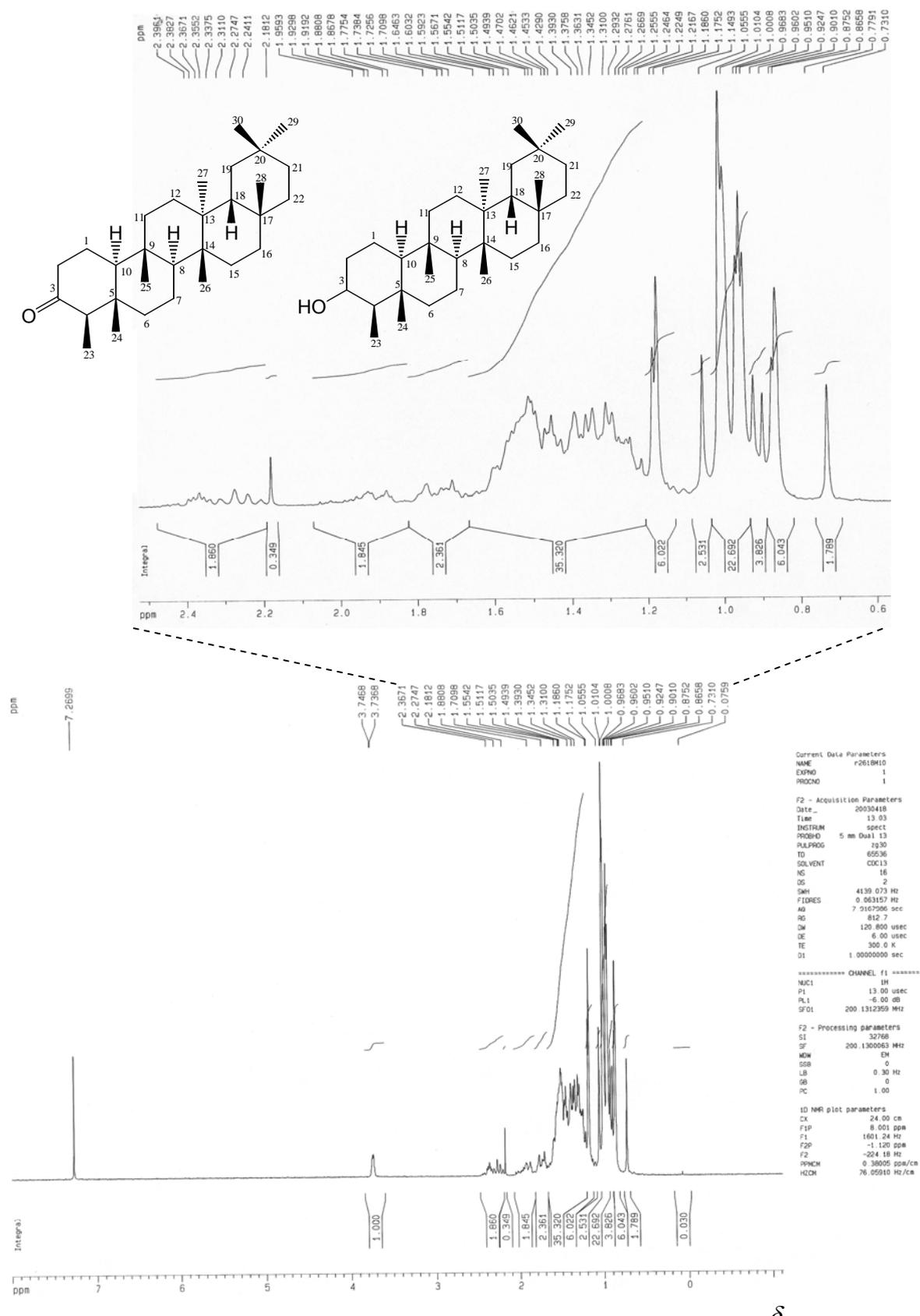
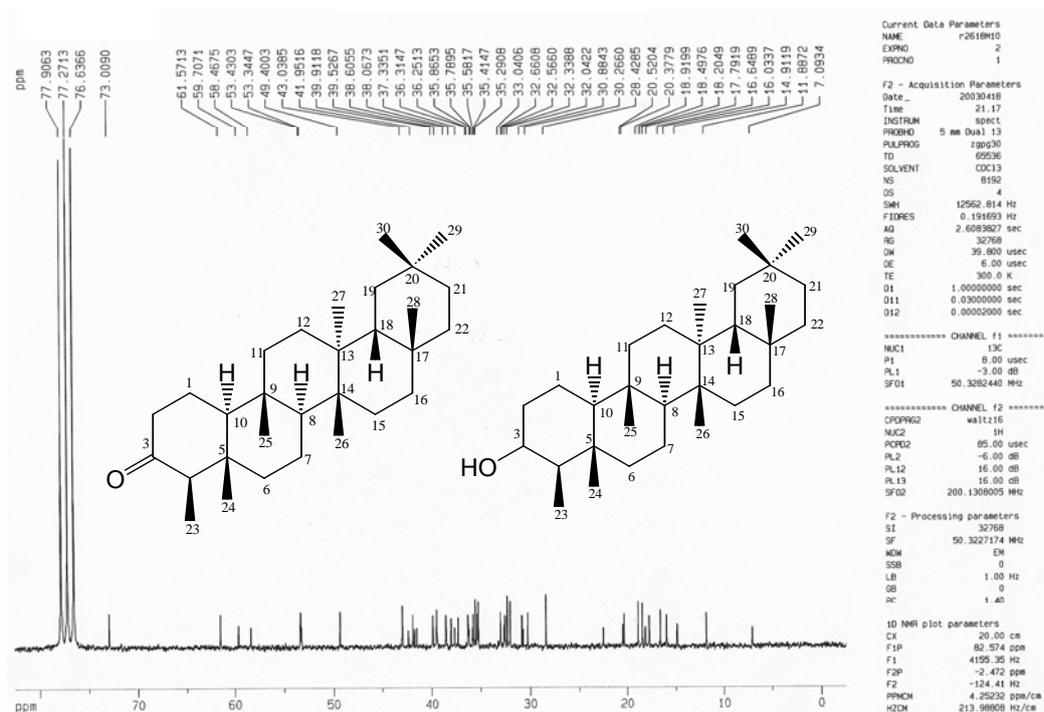
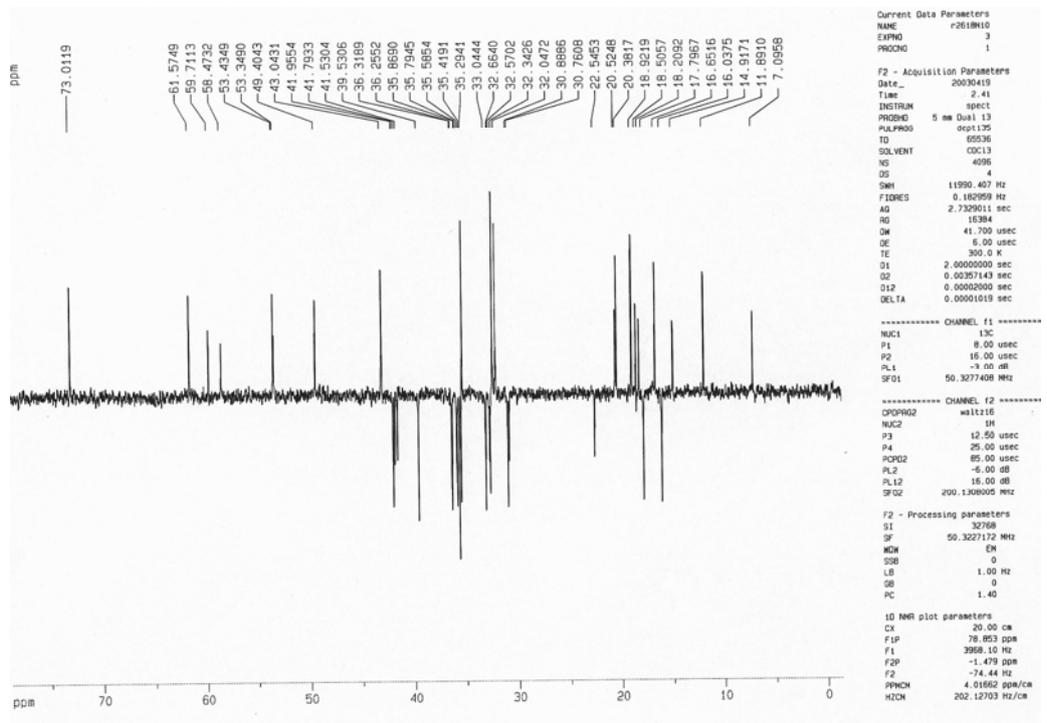


Figura 2.72: Espectro de RMN de ^1H de F3 (friedelina + friedelinol) (CDCl_3 ; 200 MHz). Em destaque ampliação da região entre δ_{H} 0,6 e 2,4.



δ

Figura 2.73: Espectro de RMN de ^{13}C de F3 (friedelina + friedelinol) (CDCl_3 ; 50 MHz).



δ

Figura 2.74: Subespectro DEPT-135 de F3 (friedelina + friedelinol) (CDCl_3 ; 50 MHz).

F6: Mistura de ésteres de cadeia longa

F6 foi obtido durante o fracionamento da CC do IFH e apresentou-se como um material esbranquiçado e de ponto de fusão 51-57 °C. O espectro no IV (Figura 2.75) apresenta feição característica de éster de cadeia longa com bandas de absorção em 3000-2900 cm^{-1} , correspondentes a $\nu_{\text{C-H}}$ de estruturas alifáticas e absorções em 1734 e 1171 cm^{-1} referentes a grupo éster.

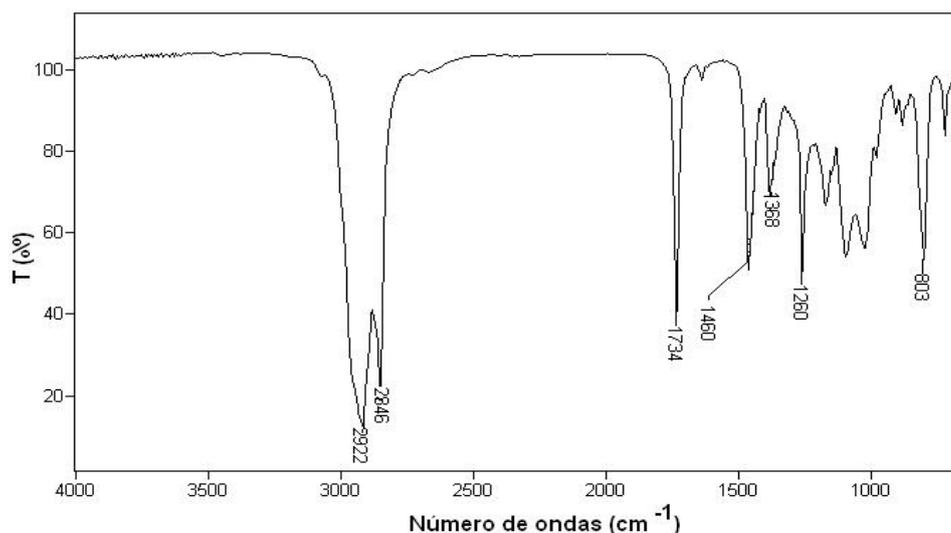


Figura 2.75: Espectro obtido no IV de F6 (mistura de ésteres de ácidos graxos) (NaCl).

Estas informações sugerem que F6 seja constituída por uma mistura de ésteres de cadeia longa. Para caracterizá-los a amostra foi analisada por CG-EM de acordo com metodologia descrita na pág. 114. Foram utilizados como padrão os ésteres miristato de metila (C14:0), palmitato de metila (C16:0), estearato de metila (C18:0), oleato de metila (C18:1), linoleato de metila (C18:3) e licosonoato de metila (C20:0). O cromatograma obtido (Figura 2.76, pág. 109) permitiu identificar na amostra, cinco dos seis padrões utilizados na análise (Tabela 2.13, pág. 109). A análise dos resultados permitiu identificar em F6 a presença de miristato de metila, palmitato de metila, oleato de metila, linoleato de metila, licosonoato de metila, conforme apresentado na Tabela 2.13 (pág.109). Hidrocarbonetos e TTPC foram identificados também através dos padrões de fragmentação.

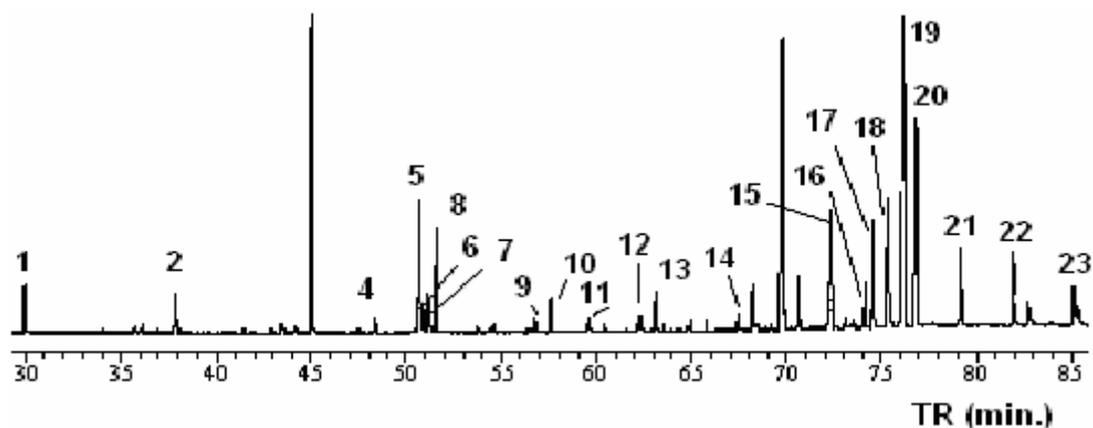
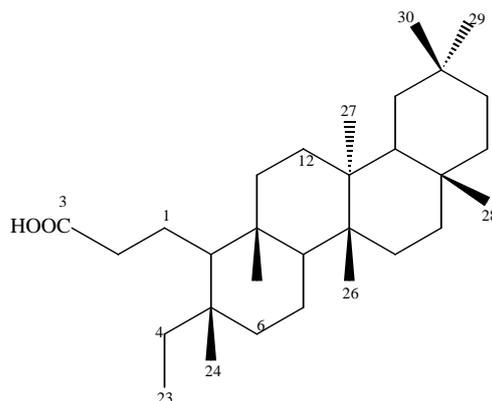


Figura 2.76: Cromatograma de F6 obtido por CG-EM em aparelho Shimadzu, CG-MS QP5050, coluna DB-5 de 30 m x 0,25 mm di x 0,5 μ m. 220 $^{\circ}$ C no injetor e 240 $^{\circ}$ C na interface. Rampa de 60 $^{\circ}$ C a 290 $^{\circ}$ C acrescida 3 $^{\circ}$ C/min 25,67 min. Fluxo de 1,0 mL/min.

Tabela 2.13: Dados obtidos por CG-EM para F6 e padrões de ésteres de ácidos graxos (C14:0, C16:0, C18:0, C18:1, C18:3, C20:0)

Nº Pico	Nome da substância ou classe	TR	% total	TR dos padrões
1	Dodecanoato de metila	29,961	1,1	
2	Miristato de metila	37,832	2,2	37,892 (C14:0)
3	Palmitato de metila	45,050	10,3	45,029 (C16:0)
4	Estearato de metila	48,339	0,4	50,515 (C18:0)
5	Oleato de metila	50,721	3,6	50,728 (C18:1)
6	Decanoato de metila	50,887	0,6	
7	Fitol	51,131	1,3	
8	Linoleato de metila	51,557	2,8	51,585 (C18:3)
9	Hidrocarboneto	56,741	0,4	
10	Licosonoato de metila	57,553	1,0	57,566 (C20:0)
11	Hidrocarboneto	59,575	0,5	
12	Hidrocarboneto	62,307	1,4	
13	Hidrocarboneto	63,088	1,3	
14	Hidrocarboneto	67,473	1,1	
15	Hidrocarboneto	72,290	4,8	
16	TTPC	74,095	1,7	
17	Hidrocarboneto	74,488	4,4	
18	TTPC	75,336	5,2	
19	TTPC	76,125	13,3	
20	Hidrocarboneto	76,809	8,1	
21	Hidrocarboneto	79,109	6,0	
22	Hidrocarboneto	81,939	4,6	
23	TTPC	85,119	3,0	

F9, F10: Ácido 3,4-seco-friedelan-3-óico

F9 foi isolado do extrato hexânico das folhas de *M. imbricata* e apresentou-se como um sólido branco de ponto de fusão 176-179 °C. O espectro no IV (Figura 2.77) apresenta banda de absorção em 3434 cm⁻¹ referente ao ν O-H e em 1706 cm⁻¹ referente à ν C=O. Mostrou ainda bandas em 2931 e 2866 cm⁻¹ correspondentes ao ν C-H de composto alifático.

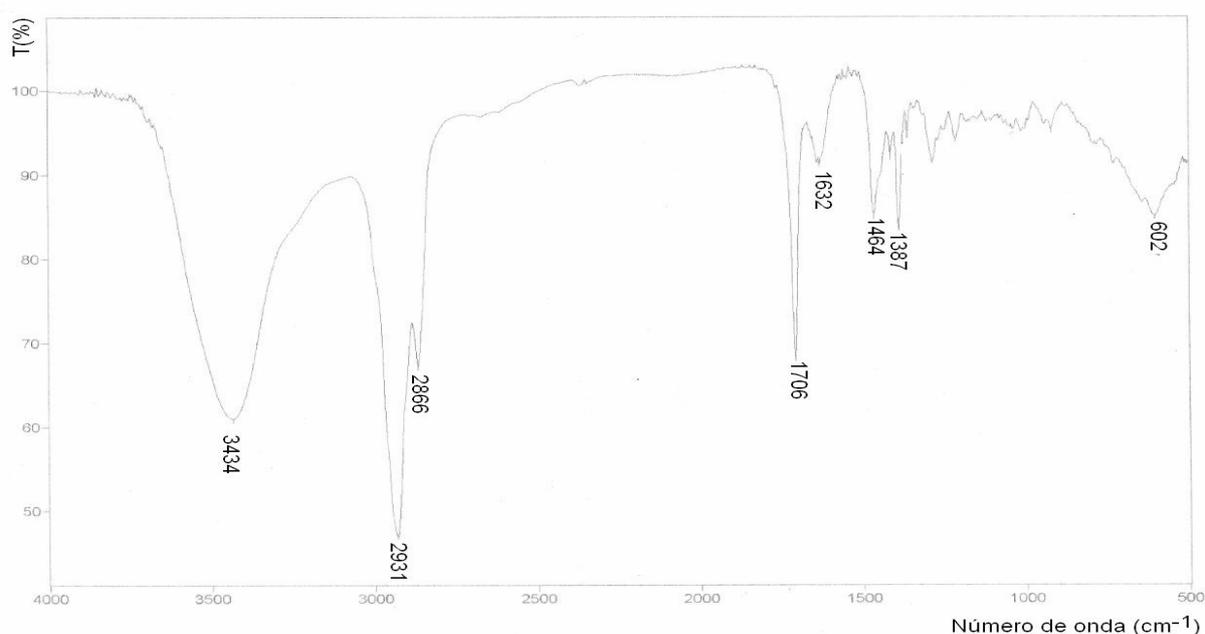


Figura 2.77: Espectro de F9 (ácido 3,4-seco-friedelan-3-óico) obtido no IV (KBr).

No espectro de RMN de ¹H (Figura 2.78, pág. 111), observa-se a presença de sete simpletos δ_H 1,17, 1,01, 0,99, 0,98, 0,95, 0,88, 0,79 e um triplete em δ_H 0,78 ($J=7,5$ Hz) num total de oito grupos metílicos. Observou-se ainda a presença de um duplo duplo duplete em δ_H 2,39 ($J=8,56, 8,12$ e 1,2 Hz) referente a dois hidrogênios que estão ligados possivelmente ao carbono α à carbonila devido ao seu deslocamento químico.

A presença de um tripleto em δ_H 0,78 ($J= 7,5$ Hz) referente a um grupo metila vizinho de um grupo metilênico sugeriu a abertura de um dos anéis no TTPC.

Estas informações aliadas à ausência de sinais na região de hidrogênios olefínicos, sugeriu tratar-se de um triterpeno pertencente à classe dos friedelanos.

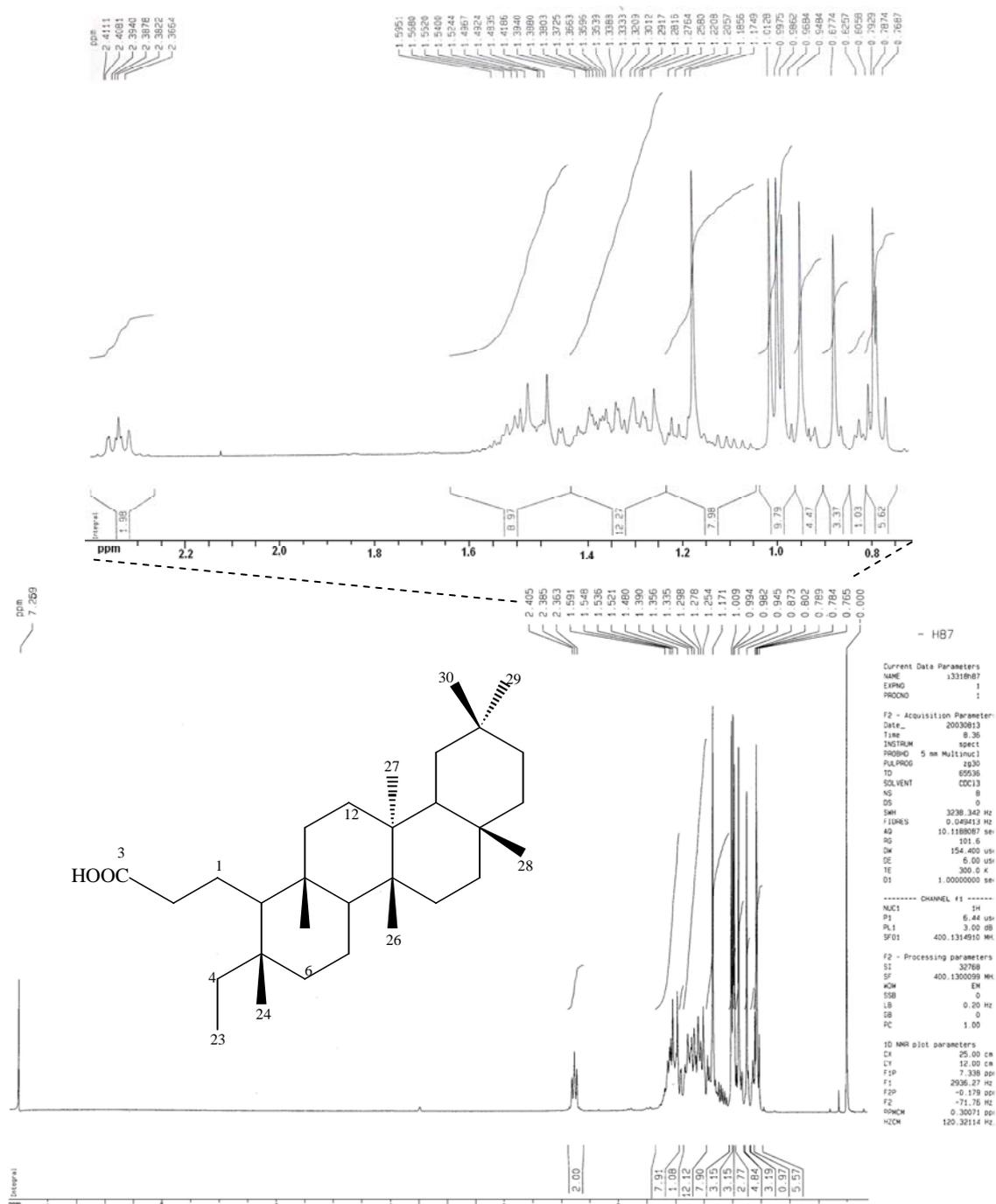


Figura 2.78: Espectro de RMN de 1H de F9 (Ácido 3,4-seco-friedelan-3-óico) ($CDCl_3$; 400 MHz). Em destaque ampliação da região entre δ_H 2,41 e 0,78.

O espectro de RMN de ^{13}C (Figura 2.79) e o subespectro DEPT-135 (Figura 2.80, pág. 113) mostram 29 sinais de carbono, sendo oito metílicos, 12 metilênicos, três metínicos e seis não hidrogenados.

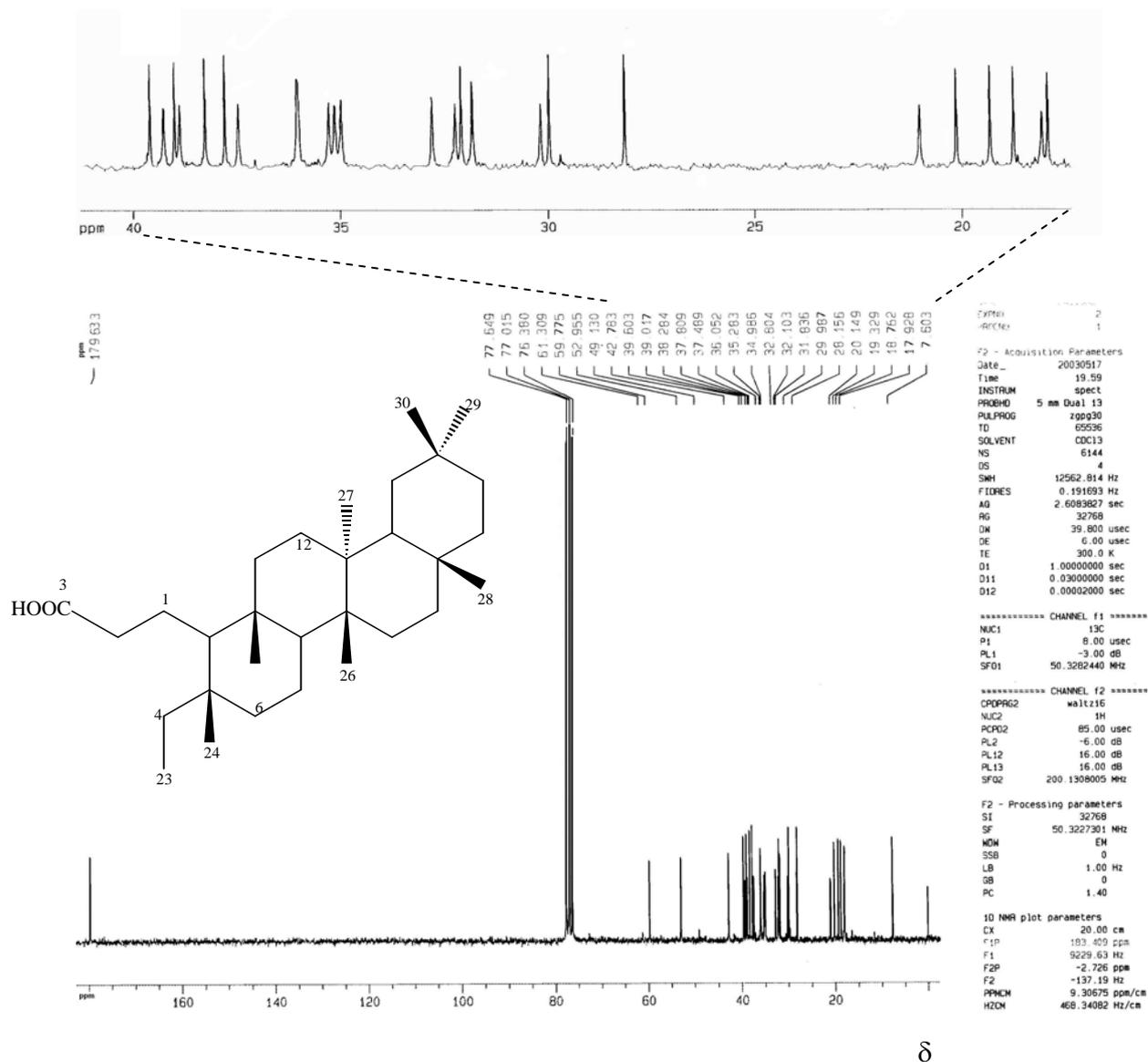


Figura 2.79: Espectro de RMN de ^{13}C de F9 (Ácido 3,4-seco-friedelan-3-óico) (CDCl_3 ; 50 MHz). Em destaque ampliação da região entre δ_{C} 40,00 e 17,00.

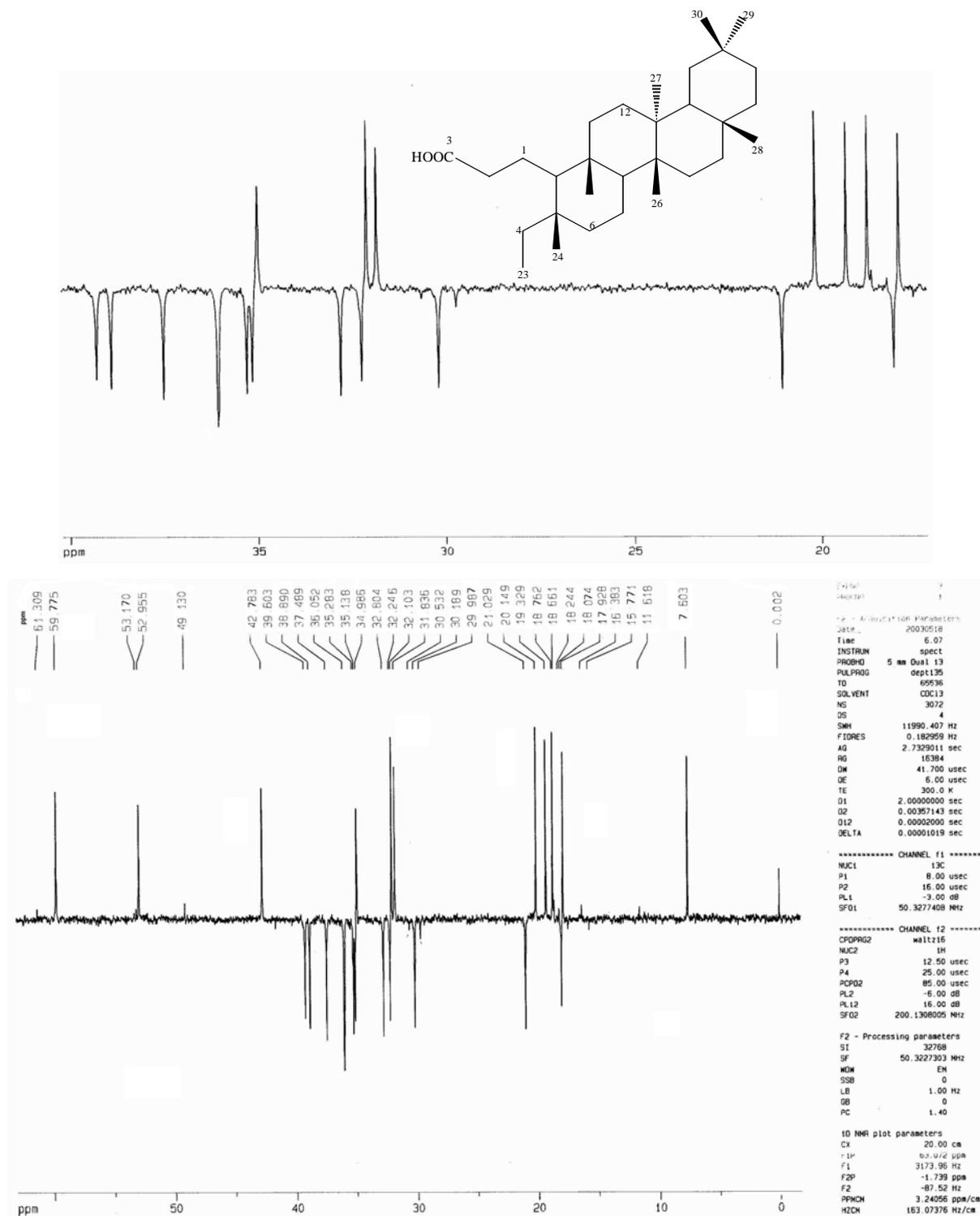
 δ

Figura 2.80: Subespectro DEPT-135 de F9 (Ácido 3,4-seco-friedelan-3-óico) (CDCl_3 ; 50 MHz). Em destaque ampliação da região entre δ_c 40,00 e 17,00.

Através da análise dos mapas de contornos HMQC (Figura 2.81, pág. 115) e HMBC (Figura 2.82 e 2.83 págs. 116 e 117) foi possível atribuir os sinais de todos os hidrogênios e carbonos da molécula.

O mapa de contornos HMBC (Figura 2.83, pág. 117) mostra a correlação do sinal de hidrogênio em δ_H 2,39 (2H) com os sinais de carbono em δ_C 21,03 e 179,63. O sinal de carbono em δ_C 179,63 foi atribuído à carbonila de um ácido carboxílico, sugerindo a existência de um sistema do tipo $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{COOH}$, possivelmente no anel A. Desta forma, o sinal em δ_C 179,63 foi atribuído a C-3, em δ_C 37,49 (δ_H 2,39) a C-2 e em δ_C 21,03 a C-1.

O sinal de hidrogênio em δ_H 0,78 (t) correlaciona-se por HMQC com o sinal de carbono metílico em δ_C 7,60, logo este pode ser o C-23.

O sinal de hidrogênio em δ_H 0,78 (H-23) correlaciona-se por HMBC com os sinais de carbono em δ_C 36,05 (C-4) e 37,81 (C-5). Os sinais de carbono em δ_C 36,05 (C-4) e 37,81 (C-5) mostram correlações com o sinal de hidrogênio em δ_H 0,79 que pode então ser atribuído à metila H-24 (Figura 2.83, pág. 117). O sinal em δ_H 0,79 (δ_C 19,33; C-24) correlaciona-se com os sinais de carbono em δ_C 39,28 (C-6) e 59,78 (C-10).

A atribuição de C-10 permitiu localizar a metila 25, através da correlação de C-10 (δ_C 59,78) com o hidrogênio metílico em δ_H 0,88, que foi então atribuído a H-25 (δ_C 17,93) (Figura 2.83, pág. 117). O sinal em δ_H 0,88 (H-25) mostra correlação por HMBC com os sinais de carbono em δ_C 39,02 (C-9), 35,28 (C-11) e 52,96 (C-8). Este último correlaciona-se com o sinal de hidrogênio em δ_H 0,98 (δ_C 20,15), que foi atribuído a H-26 (Figura 2.83, pág. 117). Tal correlação permitiu corrigir a atribuição incorreta de H-26, feita por Vieira Filho (2001), que atribuiu ao H-26, δ_C 18,61.

O sinal em δ_H 0,98 (δ_C 20,15; C-26) correlaciona-se com os sinais de carbono em δ_C 38,89 (C-14), 39,60 (C-13) e 32,25 (C-15).

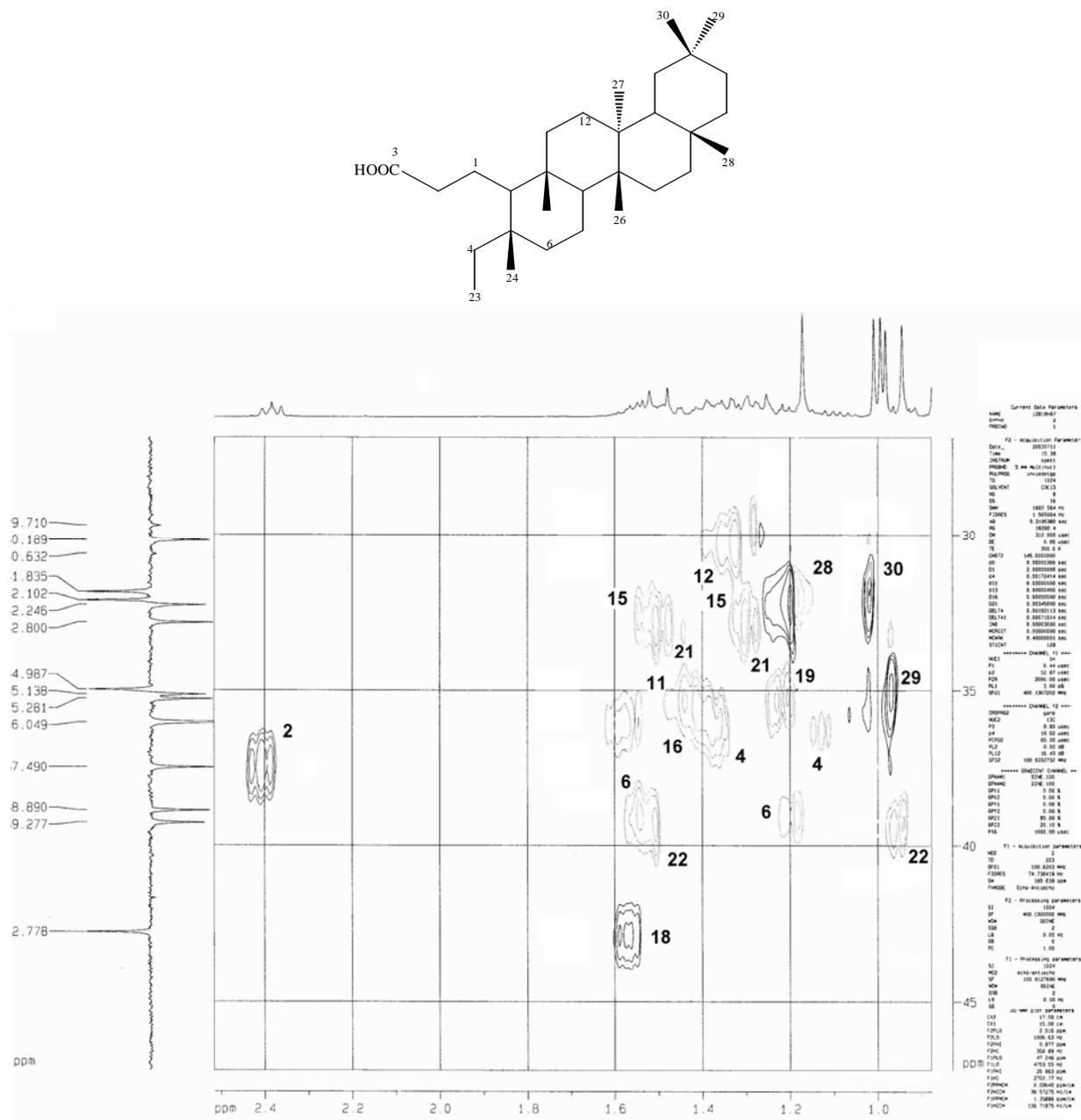


Figura 2.81: Seção expandida do mapa de contornos HMQC de F9 (Ácido 3,4-seco-friedelan-3-óico), região entre δ_H 0,5 e 2,5 (CDCl₃; 400 MHz).

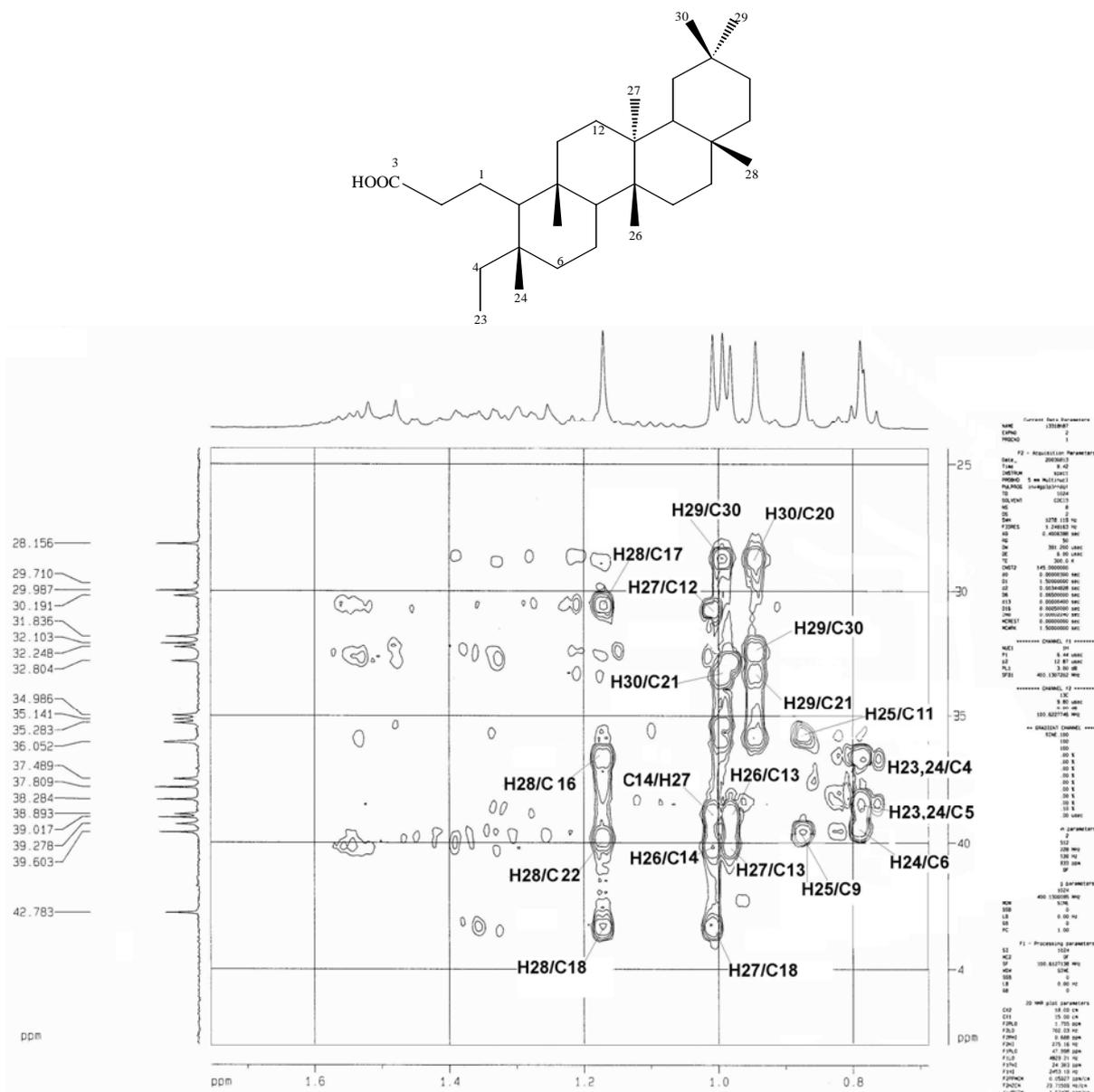


Figura 2.82: Seção expandida do mapa de contornos HMBC de F9 (Ácido 3,4-seco-friedelan-3-óico), região entre δ_{H} 0,7 e 1,7 (CDCl_3 ; 400 MHz).

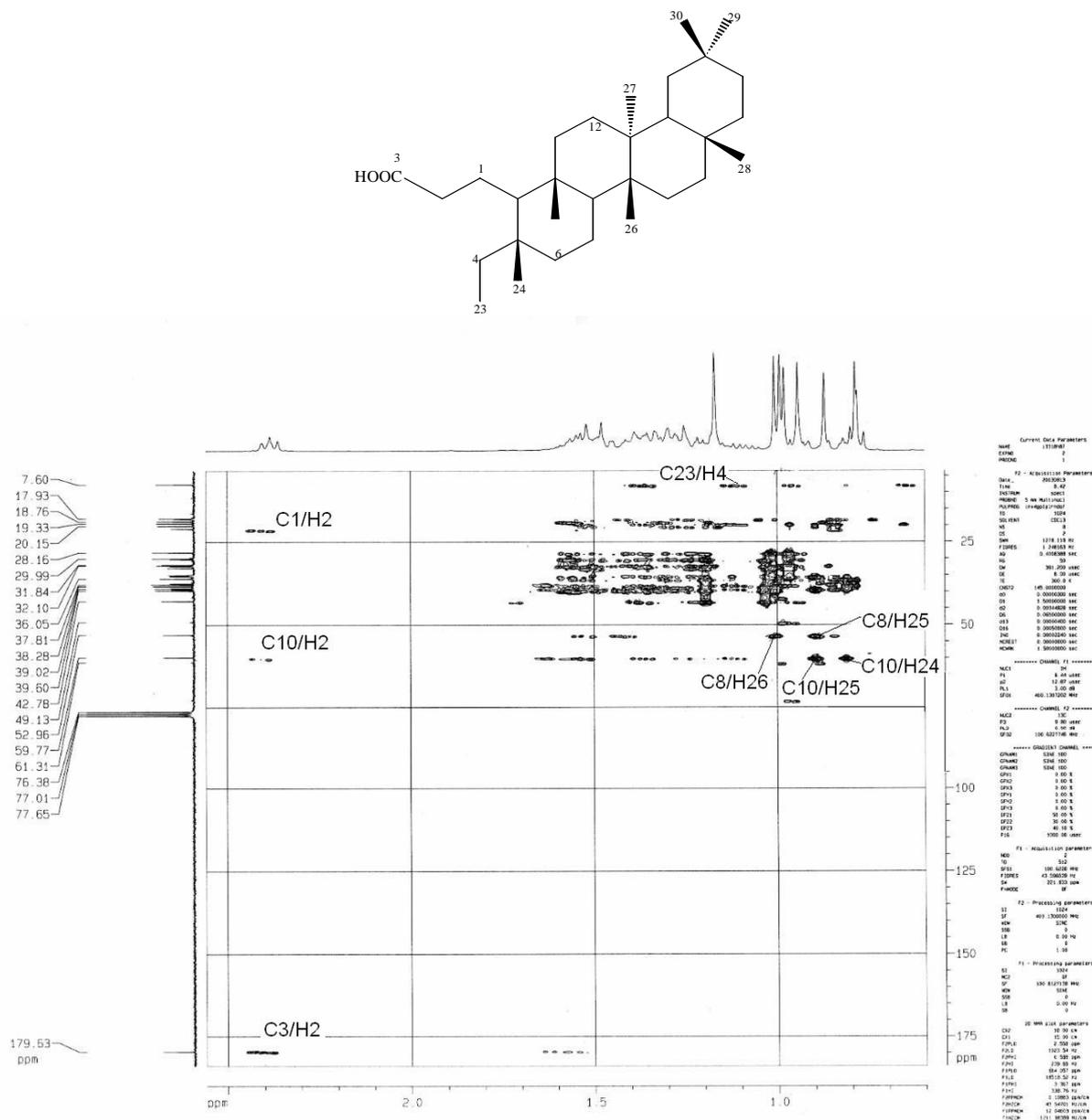


Figura 2.83: Seção expandida do mapa de contornos HMBC de F9 (Ácido 3,4-secopriedelan-3-óico), região entre δ_H 0,6 e 2,5 (CDCl₃; 400 MHz).

O espectro de Massas (Figura 2.84, pág. 118) apresenta picos em m/z 444 [M]⁺ (2,77%), 429 [M-15] (8,46%), 218 (27,06%), 205 (20,41%), 149 (21,78%), 109 (53,36%), característicos de TTPC da série friedelano (Esquema 2.5, pág. 118) (MATHE et al., 2004; SHIOJIMA, et al., 1992).

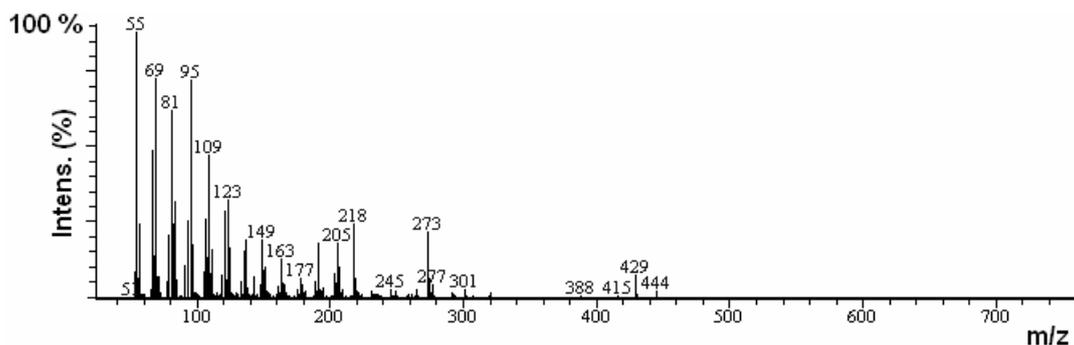
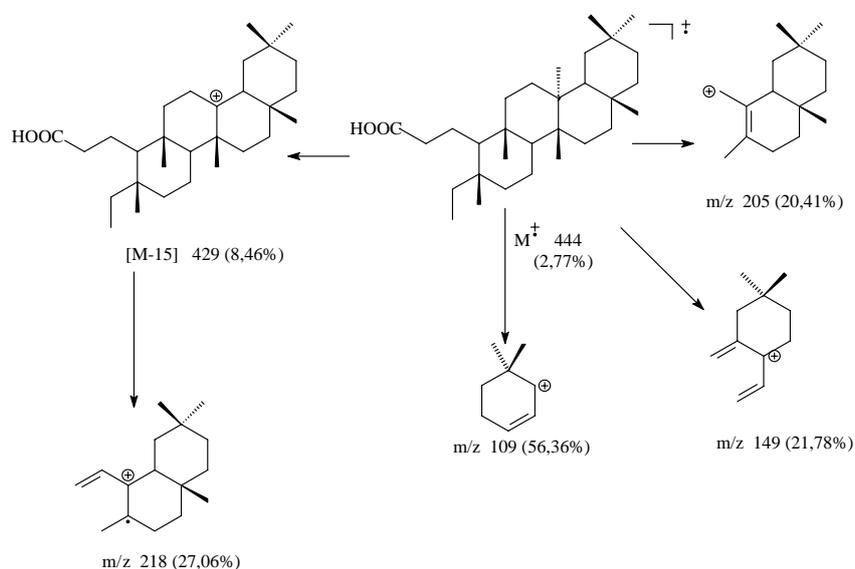


Figura 2.84: Espectro de massas de F9 (ácido 3,4-seco-friedelan-3-óico).

Cromatógrafo CG-17A- CG-EM QP5050. Análise por inserção direta no EM, EI, 70 eV. Temperatura 240 °C na interface. Faixa de análise do EM foi de 50 a 700 Daltons.



Esquema 2.5: Prováveis caminhos de fragmentação para F9 (ácido 3,4-seco-friedelan-3-óico) (SHIOJIMA, et al., 1992).

O espectro obtido no IV, a análise criteriosa dos espectros de RMN e dos mapas de contornos HMBC e HMQC, bem como a comparação com os dados da literatura (Tabela 2.14, pág. 119) e o espectro de Massas permitiram propor para F9 a estrutura do ácido 3,4-seco-friedelan-3-óico. Triterpenos do tipo 3,4-seco-friedelan-3-óico já haviam sido relatados na literatura para a família *Celastraceae*. Vieira Filho (2001) isolou os compostos 3,4-seco-friedelan-3-óico e 3,4-seco-28-hidroxi-friedelan-3-óico (pág. 119) das folhas de *Austroplenckia polpunea*.

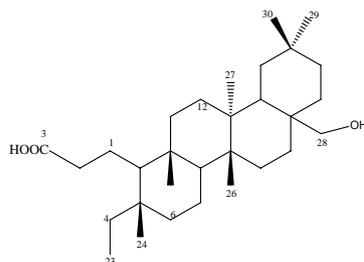
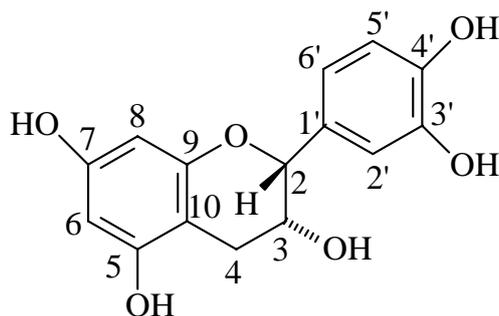


Tabela 2.14: Atribuição dos sinais de RMN de $C^{13}C$ de F9 (Ácido 3,4-secofriedelan-3-óico) e comparação dos deslocamentos químicos de RMN com os dados da literatura

C n	$\delta^{13}C$ F9	DEPT	HMBC	δ^1H	^a . $\delta^{13}C$
1	21,03	CH ₂	H-2	1,59	21,09
2	37,49	CH ₂		2,39 (ddd; 8,56; 8,12; 1,2 Hz)	37,24
3	179,63	C=O	H-2		178,78
4	36,05	CH ₂	H-23; H-24	1,12; 1,37	36,18
5	37,81	C	H-23; H-24		37,90
6	38,89	CH ₂	H-24	1,17; 1,55	39,05
7	18,08	CH ₂	H-6	1,41	18,67
8	52,96	CH	H-25; H-26	1,26	53,07
9	39,02	C	H-25; H-29		39,14
10	59,78	CH	H-25; H-24	0,86	59,89
11	35,28	CH ₂	H-25	1,45	35,28
12	29,71	CH ₂	H-27	1,29	30,27
13	39,60	C	H-18; H-26; H-27		39,70
14	38,89	C	H-26; H-27		38,40
15	32,25	CH ₂	H-26	1,30; 1,54	32,38
16	36,05	CH ₂	H-28	1,39	36,15
17	30,19	C	H-28		30,07
18	42,78	CH	H-27; H-28	1,57	42,97
19	35,14	CH ₂	H-30	1,26	35,39
20	28,16	C	H-30		28,20
21	32,80	CH ₂	H-29; H-30	1,34; 1,50	32,95
22	39,28	CH ₂	H-28	0,97; 1,55	39,34
23	7,60	CH ₃	H-4	0,78 (t; 7,5 Hz)	7,60
24	19,33	CH ₃	H-10	0,79 (s)	19,50
25	17,93	CH ₃	H-10	0,88 (s)	17,96
26	20,15	CH ₃	H-8	0,98 (s)	18,61
27	18,76	CH ₃		1,01 (s)	18,74
28	32,10	CH ₃	H-22	1,17 (s)	32,16
29	34,99	CH ₃	H-30	0,95 (s)	34,98
30	31,84	CH ₃	H-29	0,99 (s)	31,88

^a. VIEIRA FILHO, et al., *Magn. Reson. Chemistry*, v.39, p. 746-748, 2001.

F12: Epicatequina- 3, 3', 4', 5, 7-penta-hidroxi flavanana

F12 foi isolado a partir do extrato em acetato de etila das folhas de *M. imbricata* apresentando-se como um sólido alaranjado claro de ponto de fusão 226-228 °C. Apresentou teste com FeCl_3 positivo para taninos catéquicos (cor verde escura intensa) e perfil em CCD igual ao observado para os padrões de catequina e epicatequina.

O espectro no IV (Figura 2.85) mostra bandas de absorção em 3500 – 3400 cm^{-1} referentes à presença de grupo hidroxila e bandas em 2931 cm^{-1} , características de estiramento C-H alifático. Mostra ainda bandas em 1620, 1520 e 1441 cm^{-1} características $\nu_{\text{C}=\text{C}}$ e $\nu_{\text{C}=\text{C}}$ aromático, bem como em 1144 cm^{-1} , característica de $\nu_{\text{C}-\text{O}}$.

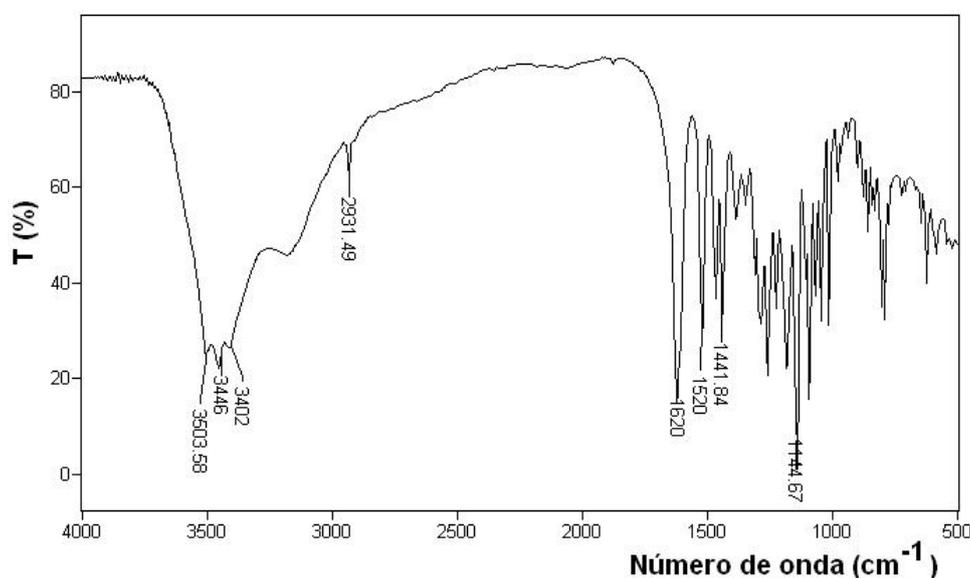


Figura 2.85: Espectro de F12 (Epicatequina) obtido no IV (KBr).

O espectro de RMN de ^1H (Figura 2.86, pág. 121) apresenta na região de hidrogênios aromáticos quatro dupletos localizados em δ_{H} 5,81 ($J= 2,3$ Hz); 5,84 ($J= 2,3$ Hz), um duplete em δ_{H} 6,87 ($J= 2,0$ Hz) e um *ddd* em δ_{H} 4,08 ($J= 1,4, 3,1$ e 4,6

Hz) atribuído a H-3, além de três duplos dupletos em δ_H 2,63 ($J= 2,52$ e $16,76$), δ_H 2,75 ($J= 4,52$ e $16,76$), atribuídos a H-4 e em δ_H 6,69 ($J= 1,9$ e $8,2$ Hz) atribuídos a H-6'.

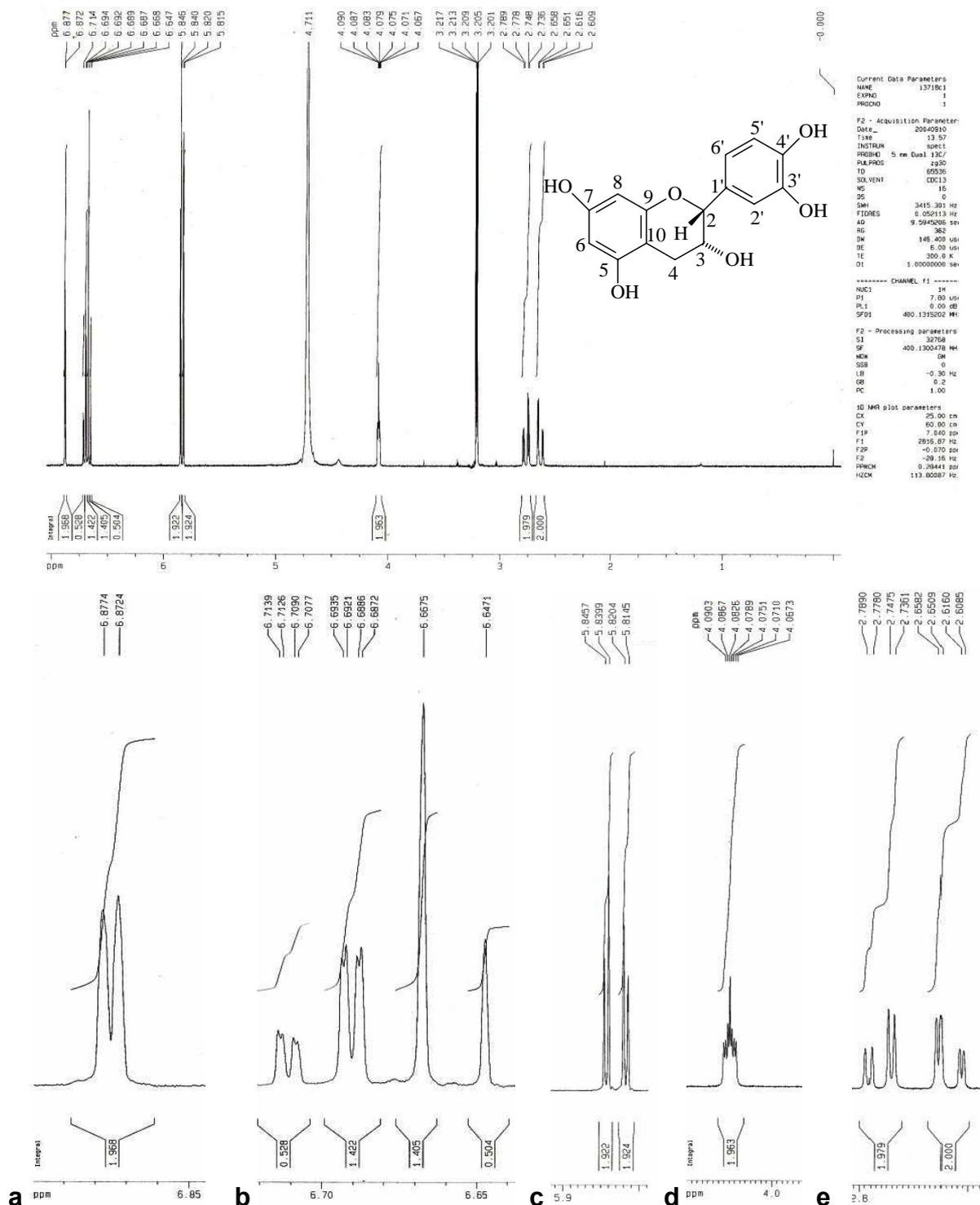


Figura 2.86: Espectro de RMN de ^1H de F12 (Epicatequina) (MeOD; 400 MHz). Em destaque ampliação das regiões entre: a) δ_H 6,85 e 6,9; b) δ_H 6,7 e 6,65; c) δ_H 5,9 e 5,8; d) δ_H 4,0 e 4,1 e e) δ_H 2,8 e 2,0.

A análise do espectro de RMN de ^{13}C (Figura 2.87) e do sub-espectro DEPT-135 (Figura 2.88, pág. 123) permitiu detectar 15 sinais de carbono, sendo sete não hidrogenados, um metilênico e sete metínicos (Tabela 2.16, pág. 130).

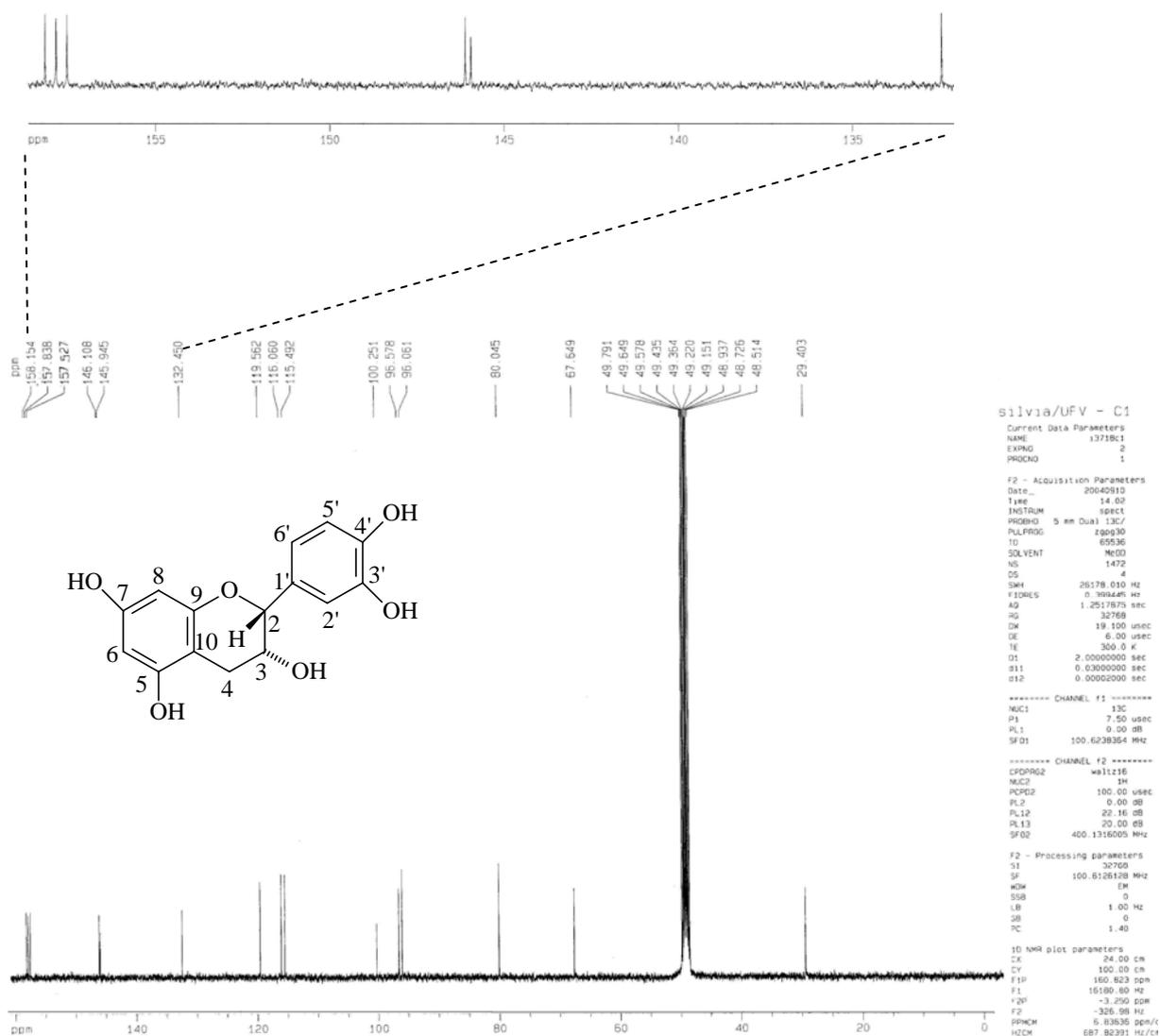


Figura 2.87: Espectro de RMN de ^{13}C de F12 (Epicatequina) (MeOD; 100 MHz).

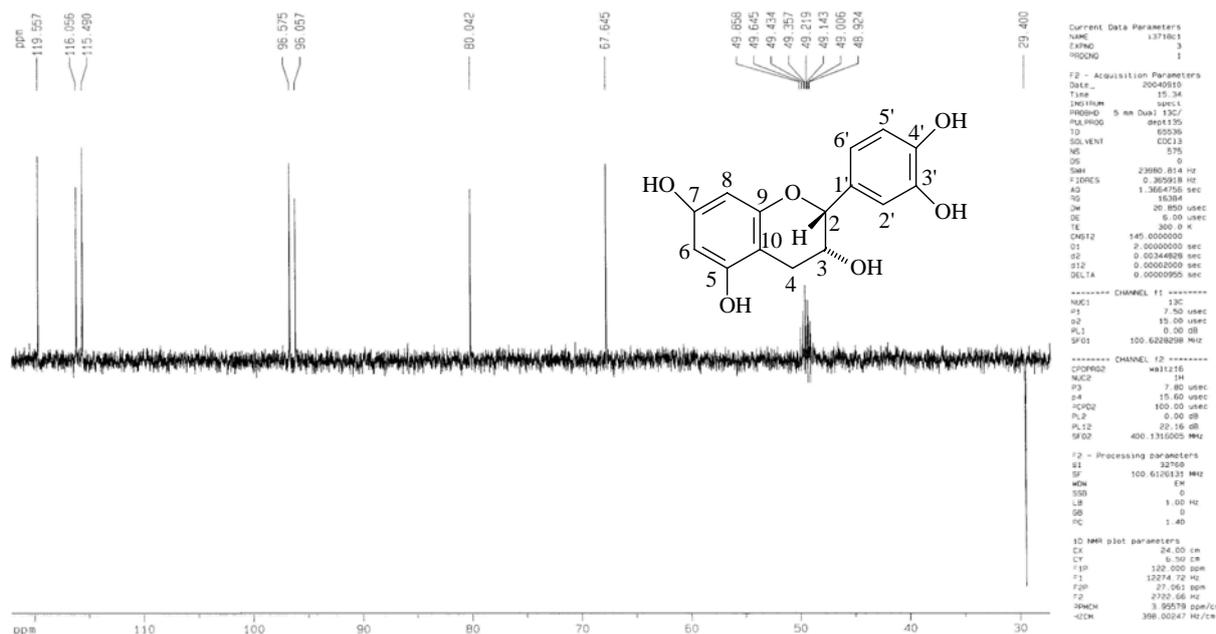


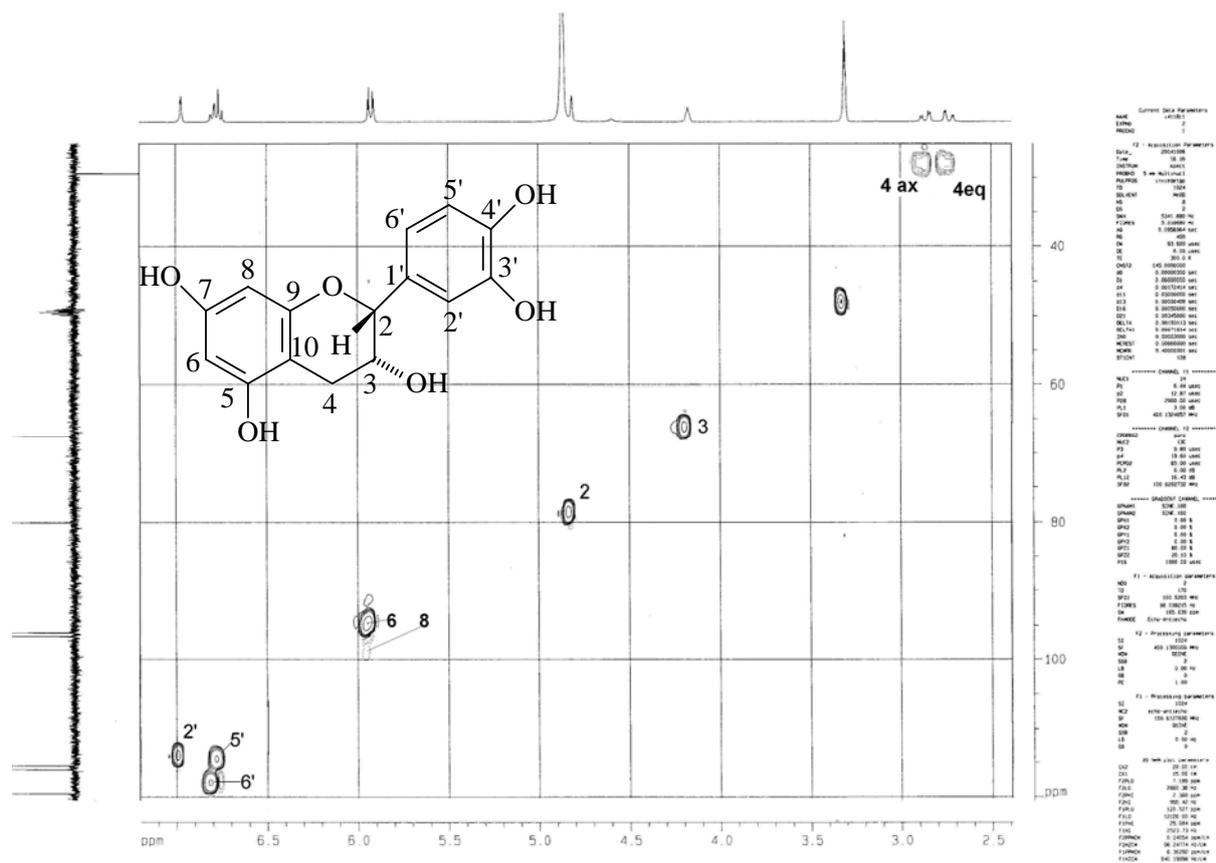
Figura 2.88: Subespectro DEPT-135 de F12 (Epicatequina) (MeOD; 100 MHz).

Através dos mapas de contornos HSQC (Figura 2.89, pág. 124), HMBC (Figura 2.90 pág. 125) e NOESY (Figura 2.91 e 2.92, pág. 126 e 127) e de suas seções expandidas, foi possível atribuir os sinais de carbono e hidrogênio para a molécula.

Pelo mapa de contornos HSQC, o sinal em δ_C 29,40, referente ao carbono metilênico, correlaciona-se com os sinais de hidrogênio em δ_H 2,75 e 2,63, sendo atribuído a C-4.

Pelo mapa de contornos HMBC, os sinais correspondentes aos hidrogênios H-4, mostram correlações com os sinais dos carbonos metínicos em δ_C 67,65 e 80,05, bem como com os sinais em δ_C 100,25 (C-10), 157,84 (C-5) e 158,15 (C-9). O sinal de carbono em δ_C 80,05 mostra correlação com os sinais de hidrogênios aromáticos em δ_H 6,87 (H-2'), 6,69 (H-6'), e com os sinais em δ_H 2,75 e 2,63 (H-4), sendo, portanto atribuído ao C-2. Logo, o sinal em δ_C 67,65 corresponde a C-3.

O sinal em δ_H 4,70 (H-2) correlaciona-se por HMBC com os sinais em δ_C 158,15 (C-9), 132,45 (C-11), 119,56 (C-6') e 115,50 (C-2'). Este último sinal (δ_C 115,50) se correlaciona com os sinais em δ_H 6,71 (H-5') e 4,70 (H-2). O sinal em δ_H 6,69 (H-6') mostra correlação com os sinais de carbono em δ_C 115,50 (C-2'), 116,06 (C-5') e 145,95 (C-4'). O sinal em δ_H 6,71 (H-5') apresenta correlação com o sinal de carbono em δ_C 132,45 (C-11).



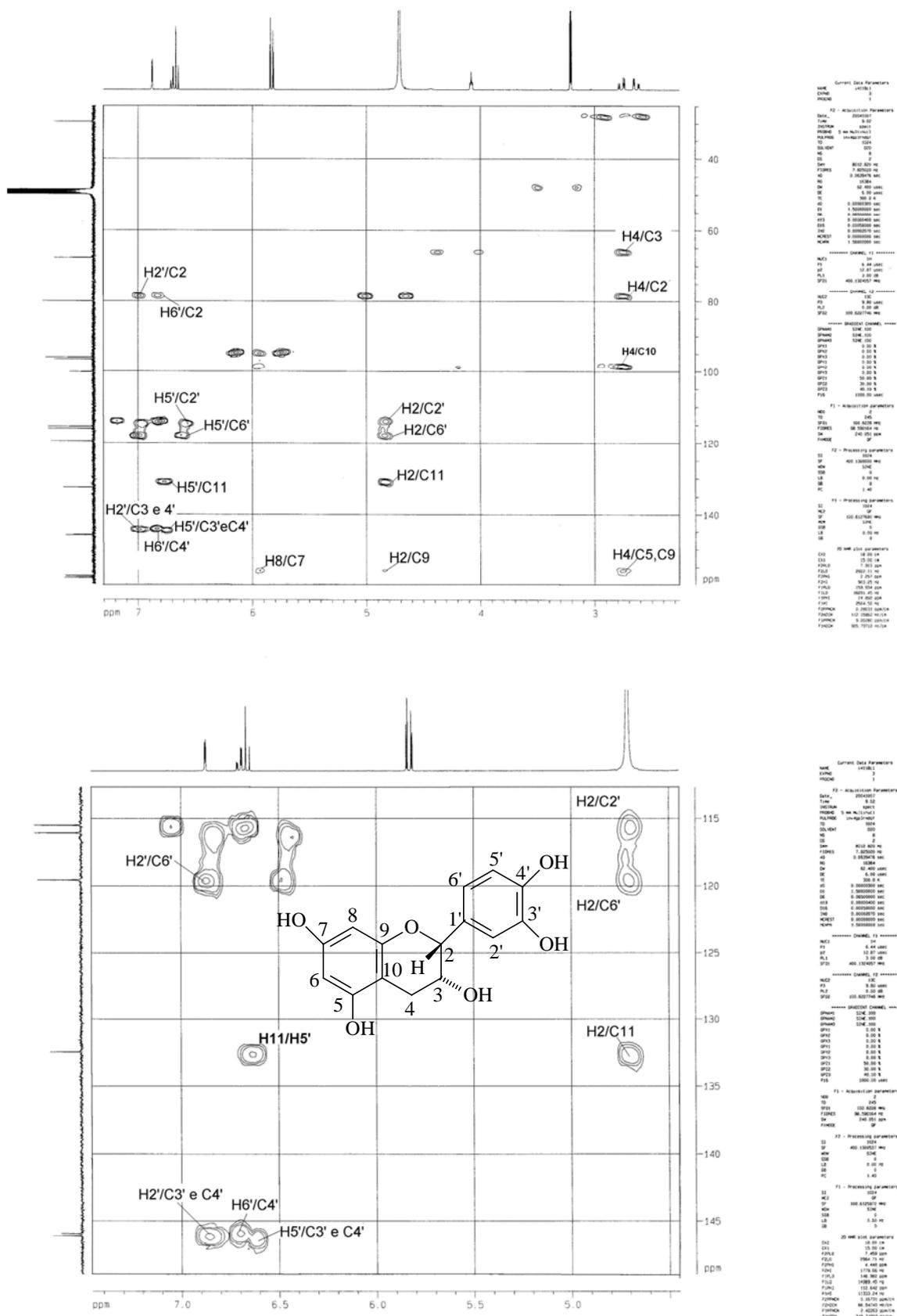
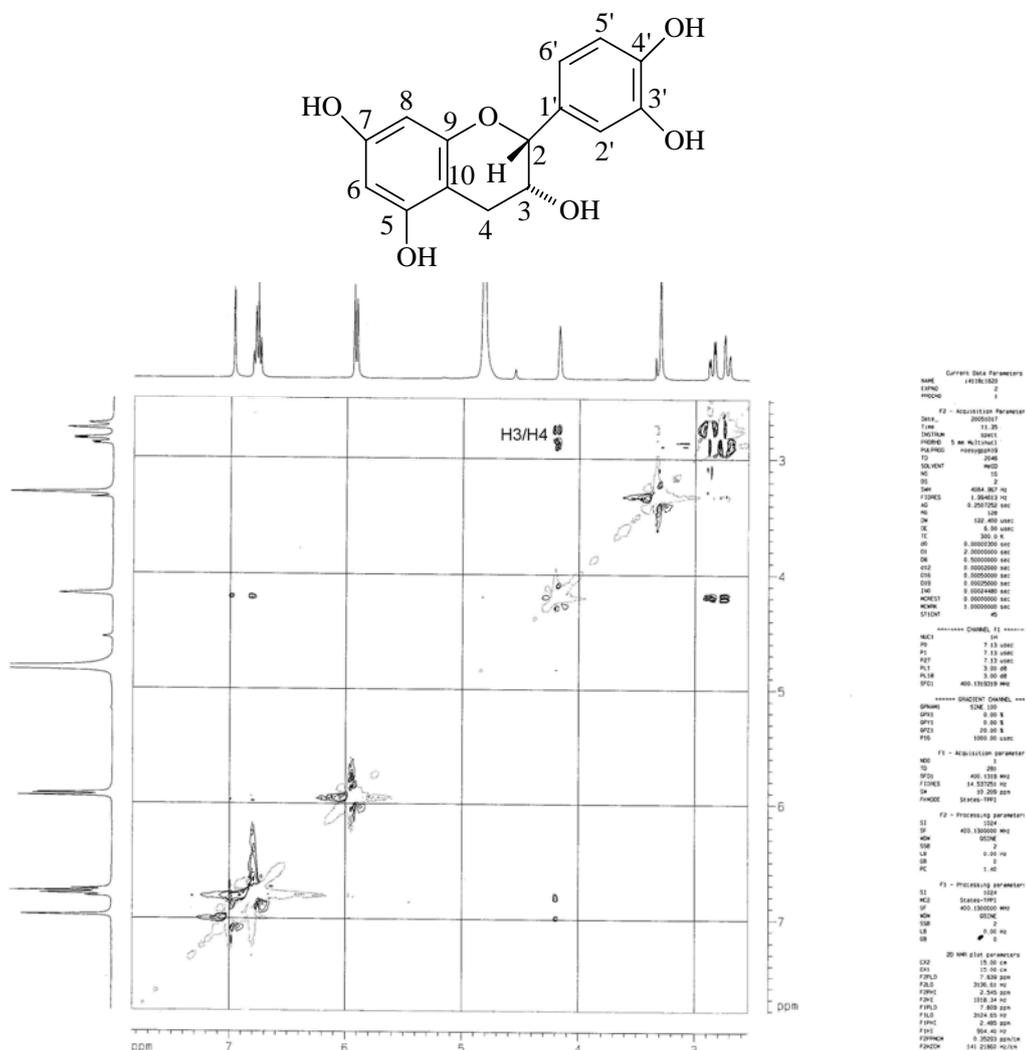


Figura 2.90: Mapa de contornos HMBC de F12 (Epicatequina). Em destaque ampliação da região entre δ_H 7,5 e 4,5 (MeOD; 400 MHz).

Observa-se pelo mapa de contornos NOESY (Figuras 2.91 e 2.92, págs. 126 e 127) que o sinal em δ_H 4,08 (H-3) correlaciona-se com os sinais em δ_H 6,87 (H-2') e δ_H 4,70 (H-2) indicando que estes hidrogênios localizam-se do mesmo lado na molécula. Observa-se também correlação do sinal em δ_H 4,08 (H-3) com δ_H 2,63 (H-4). Como H-3 correlaciona-se com os dois hidrogênios de H-4, ele só pode estar na posição equatorial. Portanto, pode-se afirmar que o grupo hidroxila encontra-se na posição axial e o anel B na posição equatorial, ou seja, do mesmo lado.

Os dados obtidos através dos métodos espectrométricos e a comparação com aqueles disponíveis na literatura permitiram identificar F12 como sendo a epicatequina, composto pertencente à classe dos flavonóides.



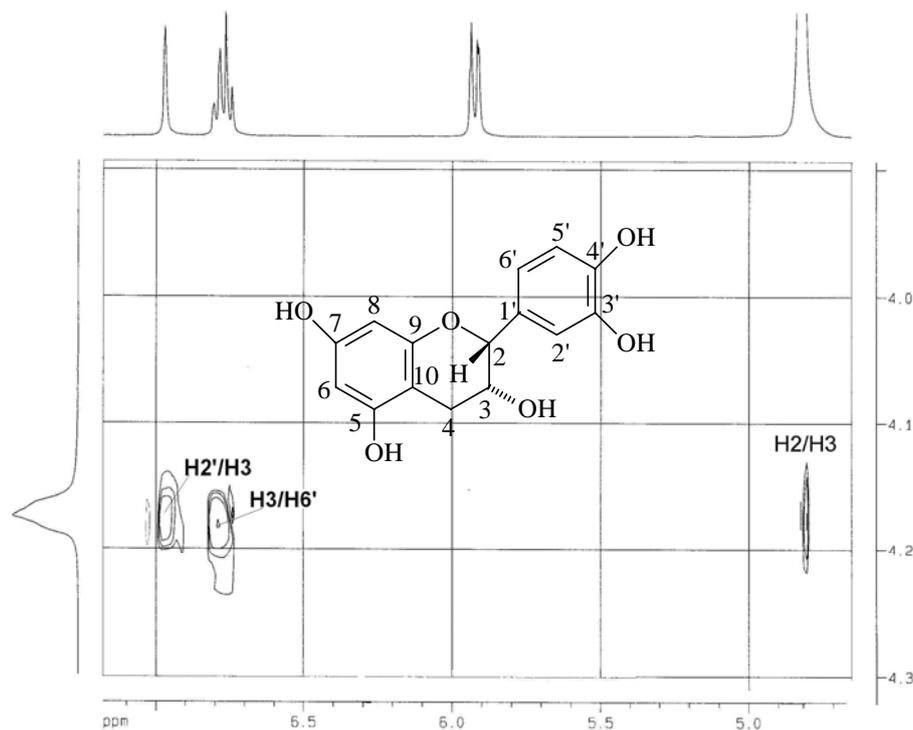


Figura 2.92: Ampliação da região entre δ_H 7,0 e 4,0 (MeOD; 400 MHz) do mapa de contornos NOESY de F12 (Epicatequina).

Tabela 2.15: Atribuição dos sinais de RMN de ^{13}C de F12 (Epicatequina)

Carbono n°	$\delta^{13}\text{C}$ F12	DEPT	HMBC	$\delta^1\text{H}$	^a $\delta^{13}\text{C}$
2	80,05	CH	H2'; H6'; H4'	4,70 <i>sl</i>	79,40
3	67,65	CH	H-2; H-4	4,08 <i>ddd</i> ($J= 1,4, 3,1$ e 4,6 Hz)	66,90
4	29,40	CH ₂	H-3; H4	2,75 _{ax} <i>dd</i> ($J= 4,52; 16,76$); 2,63 _{eq} <i>dd</i> ($J=2,52; 16,76$)	29,10
5	157,84	C	H-4		157,40
6	96,06	CH	H-8	5,81 <i>d</i> ($J=2,3$)	96,20
7	157,53	C	H-8		157,40
8	96,58	CH		5,84 <i>d</i> ($J=2,3$)	95,70
9	158,15	C	H-4; H-2		157,00
10	100,25	C	H-3; H-8; H-4		99,70
11	132,45	C	H-5'; H-2		132,10
2'	115,50	CH	H-2; H-6'	6,87 <i>d</i> ($J=2,0$)	115,20
3'	146,11	C	H-2'; H-5'		145,20
4'	145,95	C	H-6'		145,20
5'	116,06	CH	H-6'	6,71 <i>dd</i> ($J= 1,9$ e 8,2 Hz)	115,50
6'	119,56	CH	H2'; H-2	6,69 <i>dd</i> ($J= 1,9$ e 8,2 Hz)	119,40

^a Agrawal, P. K., Carbon-13 NMR of Flavonoids, 1989.

F13: Óleo essencial das folhas

O óleo essencial das folhas (F13) obtido por hidrodestilação apresentou-se como um líquido de aparência amarela, solúvel em hexano e CHCl_3 .

O espectro no IV (Figura 2.93) apresenta absorções em 3000 a 2500 cm^{-1} referentes a estiramento C-H de estrutura alifática, em 1739, referente a ν de C=O, e 1463 cm^{-1} , referente a $\delta_{\text{C-H}}$, são característicos de ésteres graxos.

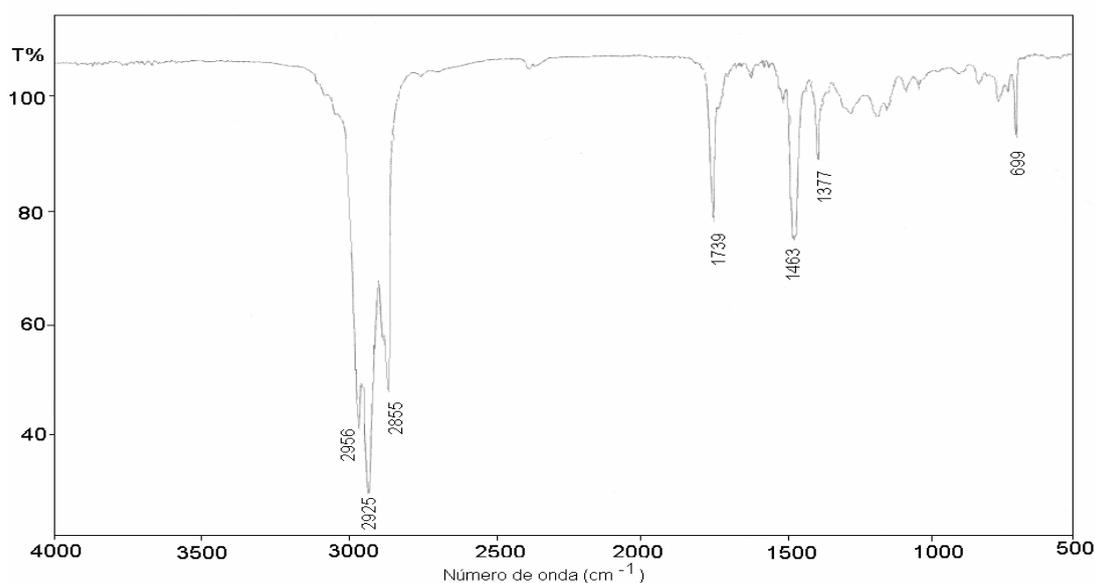


Figura 2.93: Espectro de F13 (óleo essencial das folhas) obtido no IV (KBr).

A análise por CG-EM (Figura 2.94) permitiu a identificação dos compostos 1 β -pineno (0,2%, pico 1), 2 β -pineno (0,7%, pico 2), 2-feniltridecano (1%, pico 3), 3-feniltridecano (6,1%, pico 4) e hexanodioato de dioctila (29,9%, pico 5).

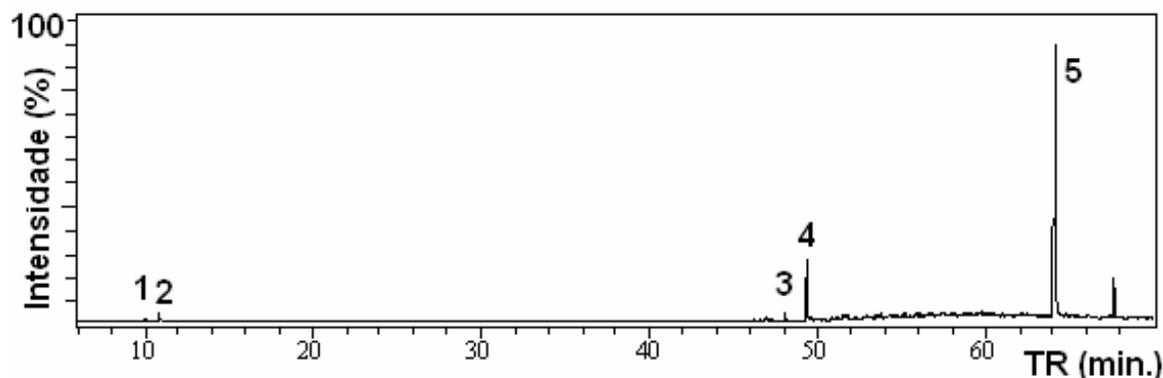


Figura 2.94: Cromatograma do óleo essencial das folhas (F13) obtido por CG-EM. Aparelho Shimadzu, modelo CG-17A-CG-EM QP5050, coluna cromatográfica DB-5 de 30 m de comprimento e 0,25 mm de diâmetro interno e 0,5 microm de espessura do filme.

Se1 e Se2: Óleo das sementes e do elaiosoma

Os óleos das sementes (Se1) e do elaiosoma (Se2) foram obtidos por maceração das amostras e extração com dois solventes (hexano e CHCl_3). Tanto o óleo das sementes quanto aquele obtido do elaiosoma apresentaram aspecto pastoso esbranquiçado e espectros no IV com o mesmo perfil, apresentando bandas em 3000 a 2800 cm^{-1} , referentes a estiramento C-H de alifáticos e, em 1740 cm^{-1} , referente a carbonila, característico de ésteres graxos (Figura 2.95).

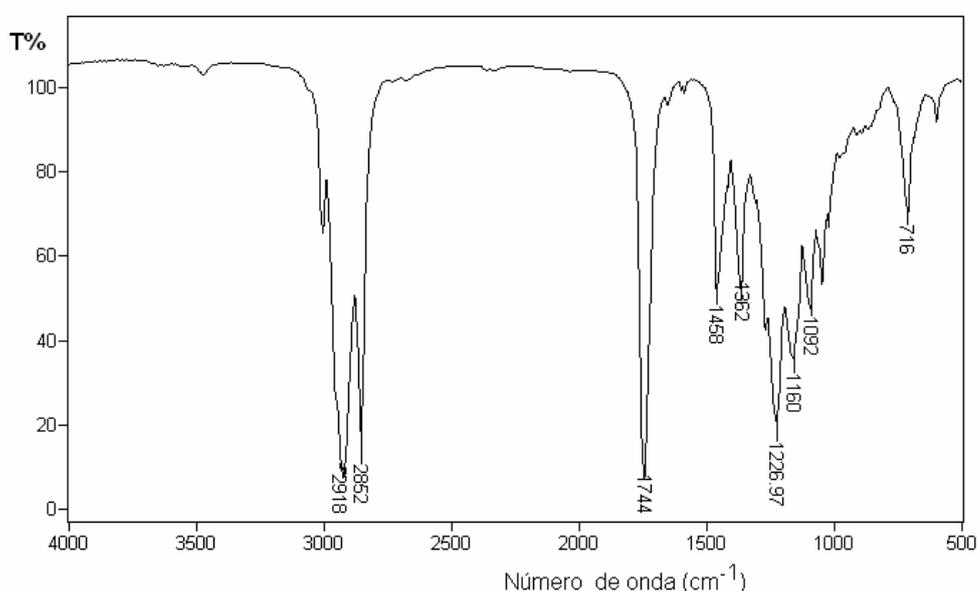


Figura 2.95: Espectro de óleo das sementes (Se1) obtido na região de infravermelho (KBr).

A análise por CG-EM de Se1 e Se2 permitiu a identificação de vários ésteres de ácidos graxos (Tabela 2.16, pág. 130). De acordo com KUSMENOGLU, et al., (1989), esta composição química exerce um alto poder de atração para as formigas, o que facilita assim sua dispersão no meio ambiente, num processo denominado mirmecoria.

Não foi observada diferença qualitativa nos compostos extraídos das sementes e do elaiosoma com os dois solventes utilizados. A análise por CG-EM das amostras mostrou que no óleo das sementes e elaiosoma predominaram os ésteres dos ácidos oléico, esteárico e palmítico, semelhantemente à composição encontrada em diversas sementes de outras espécies de plantas, indicando que as sementes de *Maytenus imbricata* também podem ser dispersas por mirmecoria (KUSMENOGLU, et al., 1989).

Tabela 2.16: Principais compostos dos óleos de sementes (Se1) e elaiosoma (Se2) extraídos com hexano (Se1H), (Se2H) e CHCl₃ (Se1C), (Se2C) de *Maytenus imbricata*.

Composto	T _R	Se1H (%)	Se2H (%)	Se1C (%)	Se2C (%)
Ácido benzóico	11,928	4,41	3,25	0,14	
Glicerol	14,143	0,22	0,29	0,43	0,86
Ácido hexanodióico	21,067	3,88	6,58	13,44	19,44
Ácido mirístico	30,860	0,40	0,47	1,07	0,81
Palmitato de etila	34,302	1,49		0,37	
Ácido palmitoléico	35,242	2,04	0,74	0,89	0,76
Ácido palmítico	36,211	15,07	9,50	8,72	5,13
Ácido heptadecanóico	38,164		0,31	0,39	0,27
Octadecanoato de etila	38,279	5,31			
Octadecan-1-ol	38,630		0,35	0,58	0,64
Acido linoléico	39,753	13,46	12,93	4,89	0,78
Ácido oléico	40,375	26,12	14,56	6,80	2,17
Ácido esteárico	40,875	14,43	3,87	3,30	2,58
Tetracosano	44,009	6,50	10,61	24,47	24,21
Ácido eicosanóico	44,635	0,70		1,06	0,81
Esqualeno	51,632	0,22			
Ác. Tetracosanóico	52,142	0,20	0,47	0,91	1,68
Estigmasterol	61,443	0,66	1,32	0,62	1,68

Compostos identificados por CG-EM nos extratos de *M. imbricata*

Os compostos abaixo relacionados foram identificados nos extratos das folhas, IFCl, IFEt, IFAcE e dos galhos, IGET e IGAcE de *M. imbricata* após serem analisados por CG-EM (procedimento descrito pág. 156).

IFCl: ácido palmítico (25,51%) e ácido esteárico (12,77%).

IFEt: ácido adípico (19,11%), ribitol (16,03%), D-sorbitol (26,67%) e eicosano (26,52%).

IFAcE: ácido adípico (24,92%), D-sorbitol (11,31%), *n*-octadecano (33,11%) e eicosano (23,95%).

IGEt: ácido adípico (14,13%), D-sorbitol (41,78%), ácido palmítico (7,58%), β-D-glicopirranose (15,04%) e eicosano (21,47%).

IGAcE: ácido adípico (18,20%), ácido palmítico (9,69%) e *n*-octadecano (48,38%).

2.2. PARTE EXPERIMENTAL

2.2.1. MÉTODOS GERAIS

Os critérios de pureza adotados foram: faixa de fusão, visualização de uma única mancha em cromatoplaça com variação de eluentes e bandas bem definidas no espectro obtido na região do IV.

A proporção da amostra e fase estacionária (FE) foi em geral de 1:50 quando se utilizou sílica gel 60 (70-230 Mesh). Foram utilizadas, ainda como fases estacionárias: sílica gel 60 (230-400 Mesh) para cromatografia rápida, placas de sílica gel 60G para cromatografia em fase delgada com indicador de fluorescência F254 nm (0,25 mm) em suporte de vidro, ativadas a 100 °C.

Como reveladores das cromatoplaças utilizaram-se luz ultravioleta, câmara saturada com vapor de iodo, solução de vanilina/ácido perclórico 3%, reagente de Liebermann Burchard e ácido fosfomolibdico. Os solventes utilizados na cromatografia em coluna foram todos P. A., destilados e secados previamente com sulfato de magnésio anidro P. A. (VETEC) quando necessário.

Os pontos de fusão foram determinados em aparelho MQAPF-301/Micro Química, sem correções, do Laboratório de Análise e Síntese de Agroquímicos (LASA), Universidade Federal de Viçosa (UFV) e aparelho Metler FP82, equipado com processador Metler FP800 pertencente ao Departamento de Química (DQ) da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG).

Espectros na região do infravermelho (IV) foram obtidos utilizando-se espectrômetro Perkin Elmer 1000 em pastilhas de KBr ou filme em janela de NaCl, pertencente ao DQ da UFV e espectrometro Shimadzu IR408 pertencente ao DQ da UFMG em pastilhas de KBr ou filme quando necessário.

Espectros de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) foram obtidos em espectrômetro Bruker *AVANCE* DPX 200 e DRX 400 do DQ da UFMG.

As análises por cromatografia gasosa e espectrometria de Massas foram realizadas em aparelho Shimadzu, modelo CG-17A- CG-MS QP5050, coluna cromatográfica DB-5 de 30 m de comprimento e 0,25 mm de diâmetro interno e 0,5 µm de espessura do filme, pertencentes ao LASA, na UFV. As condições usadas foram temperaturas de 220 °C no injetor e 240 °C na interface. A programação da temperatura de realização das análises foi de 60 °C a 290 °C sendo acrescida de 3 °C por minuto durante 25 min. O fluxo do gás foi de 1,0 mL/min. A faixa de análise do espectrômetro de Massas foi de 30 a 600 Daltons. No caso de condições diferentes estas são especificadas ao longo do texto.

A análise por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) foi realizada em aparelho Varian, modelo ProStar 210, utilizando coluna cromatográfica C-18, de fase reversa com 25 cm de comprimento e 4,6 mm de diâmetro interno, partícula de 5 µm de tamanho e poros de 100 Å, pertencentes ao LASA/UFV. Foram utilizadas as seguintes condições: fase móvel (FM) água (A) e acetonitrila (B) com gradiente de eluição iniciando com mistura A:B (90:10) (tempo (t) = 0 min), A:B (80: 20) (t = 5 min), A:B (75:25) (t = 10 min), A:B (0:100) (t = 15 a 20 min) e fluxo da FM 1,0 mL/min e detector DAD (UV 280 nm).

A avaliação da atividade inibitória da síntese de ATP foi realizada em colaboração com o prof. Blas Lotina-Hennsen da Universidade Nacional Autônoma do México (UNAM). A avaliação da atividade tripanocida foi realizada em colaboração com a Profa. Sueli Fumie Ogatta da Universidade Estadual de Londrina (UEL).

2.2.2. ESTUDO FITOQUÍMICO DE *Maytenus imbricata*

O material vegetal foi coletado na região de Ouro Preto, Morro do Santana, município de Ouro Preto, Minas Gerais. As plantas foram identificadas pelas Prof^{as}. Dra. Rita Maria de Carvalho Okano do Departamento de Botânica da Universidade Federal de Viçosa (UFV) e Maria Cristina Teixeira do Departamento de Botânica da

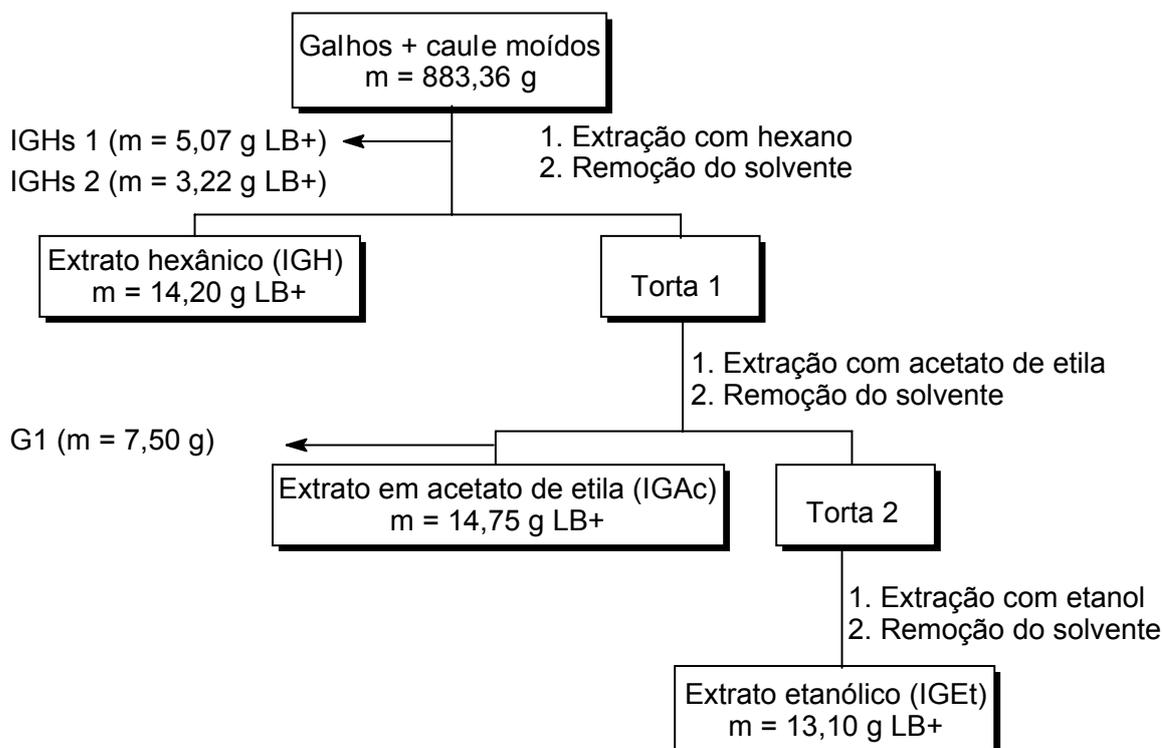
Universidade Federal de Ouro Preto (UFOP). Uma exsiccata do material encontra-se depositada no herbário do Departamento de Botânica da UFV, sob o número 27780.

As indicações dos solventes usados na preparação dos extratos e eluição das colunas foram feitas empregando as letras H, Cl, AcE, DCM, Et e Me para os solventes hexano, clorofórmio, acetato de etila, diclorometano, etanol e metanol, respectivamente.

2.2.3. PREPARAÇÃO DOS EXTRATOS DOS GALHOS E CAULE DE *Maytenus imbricata* (IGH)

Após a coleta, a planta foi seca a temperatura ambiente sendo seus galhos-caule, raízes e folhas separados, moídos e pesados, fornecendo as seguintes quantidades: 678,71 g de folhas, 883,36 g de galhos e caule e 107,12 g de raízes.

Os galhos-caule moídos foram submetidos a extrações exaustivas com solventes em ordem crescente de polaridade, em percolador, sob temperatura ambiente. Os respectivos extratos foram preparados de acordo com o Fluxograma 2.1.



Fluxograma 2.1: Preparação dos extratos dos galhos + caule de *Maytenus imbricata*. LB + = teste de Liebermann-Burchard positivo para TTPC.

2.2.3.1. ELABORAÇÃO DO SÓLIDO OBTIDO NA REMOÇÃO DO SOLVENTE DO EXTRATO HEXÂNICO DOS GALHOS E CAULE DE *M. imbricata* (IGHs)

Durante a remoção do hexano, foi observada a precipitação de 2 sólidos denominados IGHs1 e IGHs2. A análise por CCD destes sólidos, utilizando vários sistemas de eluentes e os espectros no IV das amostras mostrou que ambas tratavam-se da mesma substância, que foram então renomeadas como IGHs.

A amostra IGHs foi submetida à CC (COLUNA 1), usando sílica gel 60 (70-230 Mesh) e os eluentes benzeno (B), H: AcEt (7:3), H: AcEt (1:1), AcEt, AcEt:metanol (MeOH) (7:3) e MeOH. Foram recolhidas 33 frações no total, sendo as 23 primeiras benzênicas de 150 mL cada, nas demais recolheu-se aproximadamente 500 mL. O andamento da coluna foi acompanhado por CCD e as frações reunidas de acordo com os resultados observados nas cromatoplacas, totalizando 11 grupos (Fluxograma 2.2, pág. 136).

➤ **GRUPO 1:** As frações 1 e 2 foram reunidas e apresentaram-se como um sólido esbranquiçado (118 mg) que foi recromatografado em CC (COLUNA 2) utilizando sílica gel 60 (230-400 Mesh) e DCM como eluente. Foram recolhidas 29 frações de 5 mL que, posteriormente, foram reunidas em 5 grupos de acordo com as características observadas em CCD (Fluxograma 2.2, pág. 136). Durante a eluição da coluna houve a cristalização no bico da mesma de um sólido branco chamado de G2, que apresentou um único ponto em CCD em sistemas diferentes de eluentes, sendo então enviado para análises espectroscópicas. As frações de 14-22 (18 mg) apresentaram mesmo perfil cromatográfico que G2. Através das análises espectroscópicas G2 foi identificada como 3-oxo-lup-20(29)-en-30-al.

➤ **GRUPO 2:** O material deste grupo (fração 3) apresentou-se como um sólido branco impuro pela análise por CCD, que foi então recristalizado em uma mistura de hexano e 10 gotas de CHCl_3 , fornecendo 81,3 mg de um sólido branco (ainda impuro) que foi recromatografado em CC (COLUNA 3) utilizando sílica gel 60 (70-230 Mesh) e os eluentes H, H:AcEt (9:1), H:AcEt (7:3), H:AcEt (1:1), AcEt:MeOH (7:3) e MeOH. Foram recolhidas 28 frações de 10 mL cada que foram reunidas em 5 grupos de acordo com as características observadas em CCD (Fluxograma 2.2, pág. 136). As frações 10-12 apresentaram uma única mancha em CCD em sistemas diferentes de eluentes, sendo então enviadas para análises espectroscópicas (RMN), porém não foi possível a realização das mesmas devido à pequena

quantidade da amostra. As demais frações não conduziram ao isolamento de nenhuma substância.

➤ **GRUPO 3:** As frações 4-7 apresentaram-se como um óleo viscoso amarelado que, após ser secado em aparelho de Abdem-Haldem, adquiriu aspecto de um sólido brilhante em forma de agulhas, denominado G3. A análise por CCD e CG-EM mostrou que G3 tratava-se de uma mistura de TTPC lupânicos, identificados posteriormente como 11 α -hidroxi-lup-20(29)-en-3-ona e 3-oxo-lup-20(29)-en-30-al e 30-hidroxi-lup-20(29)-en-3-ona.

➤ **GRUPO 4:** As frações 8-11 foram submetidas a recristalização empregando a mistura de hexano:acetato de etila (2:1). Obteve-se um sólido branco (21,8 mg) denominado de G7 que estava aparentemente puro. Novas avaliações por CCD mostraram que G7 apresentava perfil cromatográfico semelhante à mistura das substâncias G4 e G5, isoladas no grupo 5. A análise dos espectros no IV, aliada a determinação da temperatura de fusão mostrou que G7 tratava-se da mistura dos lupanos 30-hidroxi-lup-20(29)-en-3-ona e 11 α -hidroxi-lup-20(29)-en-3-ona.

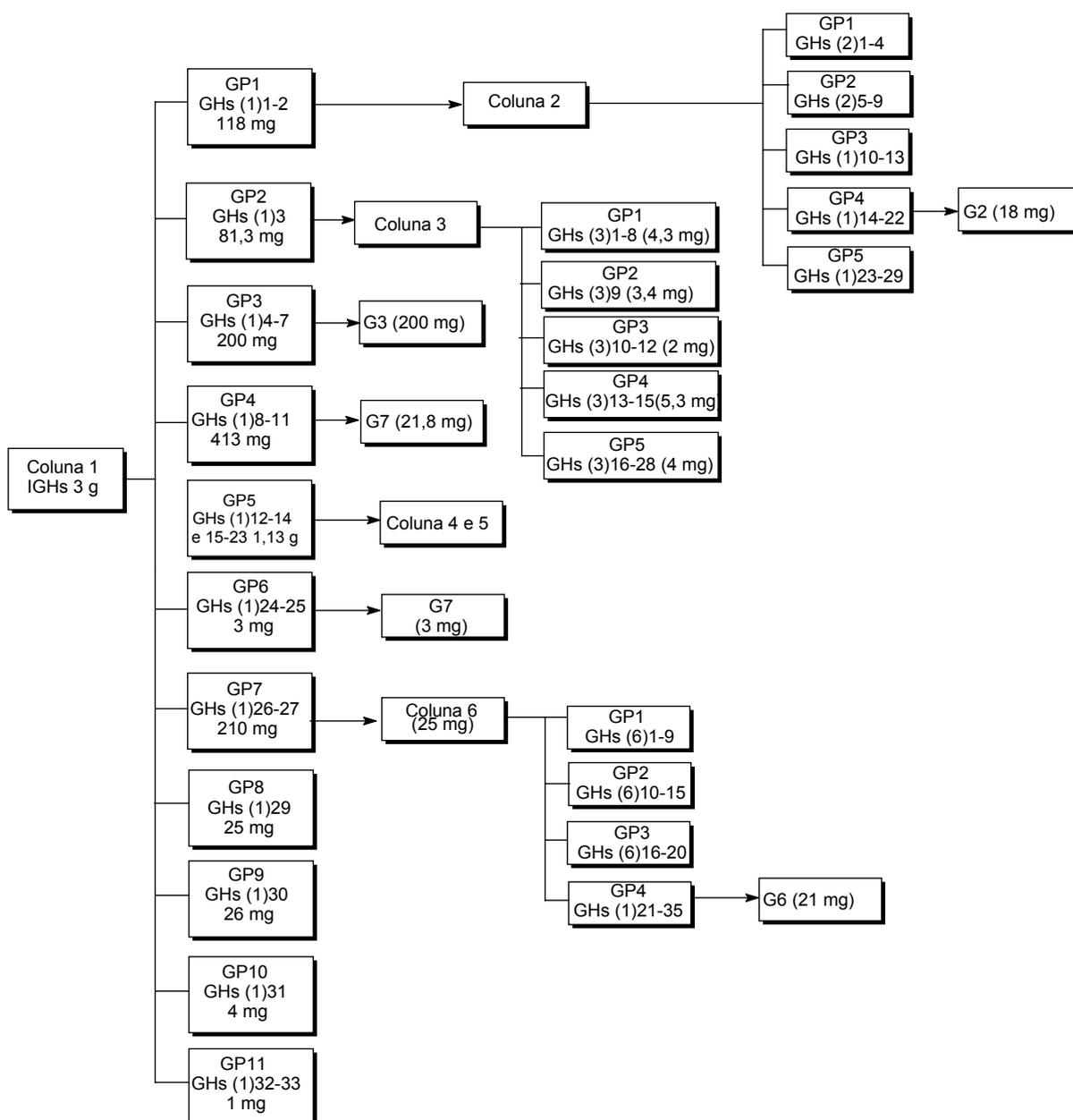
➤ **GRUPO 5:** As frações 12-14 e 15-23, embora tenham apresentado mesmo perfil cromatográfico, foram recromatografadas separadamente em CC (COLUNA 4, e COLUNA 5, respectivamente) utilizando sílica gel 60 (70-230 Mesh) e os eluentes H:AcEt (8:2). Foram recolhidas 108 frações na coluna 4 e 156 frações na coluna 5, de 10 mL cada que foram reunidas de acordo com as características observadas em CCD (Fluxogramas 2.3 e 2.4 pág. 137). Foi possível a separação de duas substâncias denominadas G4 (268,5 mg) e G5 (39,2 mg), identificadas posteriormente como 30-hidroxi-lup-20(29)-en-3-ona e 11 α -hidroxi-lup-20(29)-en-3-ona, respectivamente.

➤ **GRUPO 6:** A fração eluída com a mistura B:H:AcEt (2:7:3) apresentou-se como um sólido branco (3 mg), com uma única mancha em CCD em sistemas de diferentes eluentes. Análises espectroscópicas permitiram identificá-lo como quantidade adicional de G7 (mistura dos lupanos 30-hidroxi-lup-20(29)-en-3-ona e 11 α -hidroxi-lup-20(29)-en-3-ona).

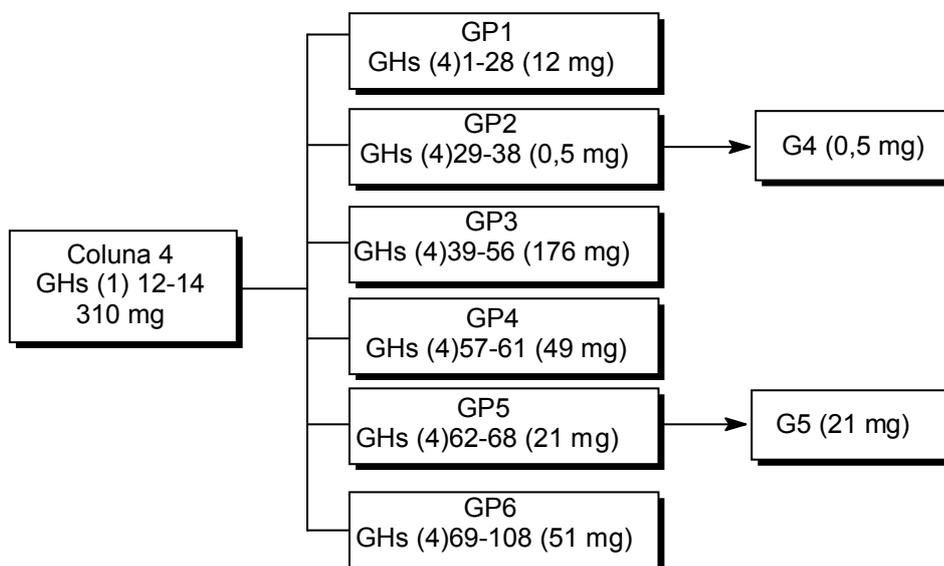
➤ **GRUPO 7:** Na fração eluída com H:AcEt (7:3) foi adicionado CHCl₃, após repouso por 24 horas, cristalizou um sólido branco (25 mg) que foi recromatografado em CC (COLUNA 6), utilizando sílica gel 60 (230-400 Mesh) e eluída com a mistura H:AcEt (4:1). Foram recolhidas 35 frações que puderam ser

reunidas em 4 grupos de acordo com as características observadas em CCD (Fluxograma 2.2). As frações 10-15 apresentaram perfil cromatográfico semelhante a G4 e foram enviadas para análises espectroscópicas (RMN de ^1H e RMN de ^{13}C), porém, devido a pouca quantidade da amostra, não foi possível a identificação da substância. As frações 21-35 conduziram a um sólido branco (21 mg), denominado G6, um TTPC identificado posteriormente como 3 β ,30-di-hidroxiup-20(29)-eno.

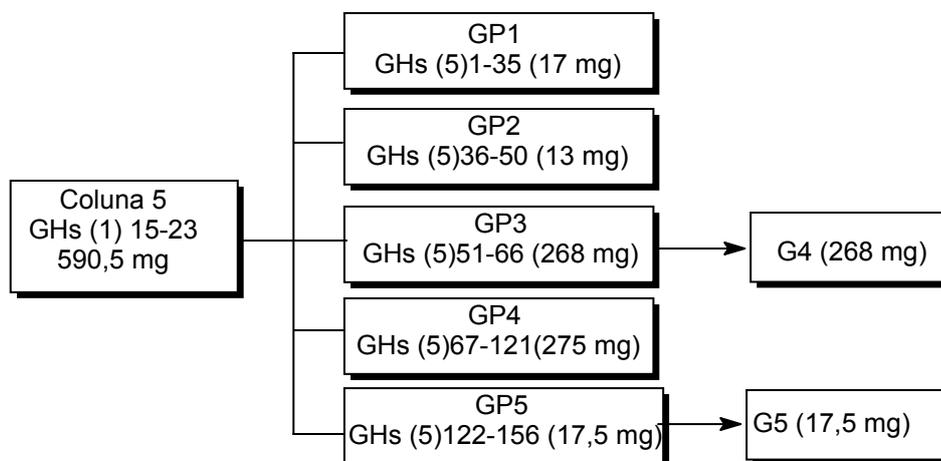
➤ Os demais grupos não conduziram ao isolamento de nenhuma substância pura, sendo desprezados.



Fluxograma 2.2: Elaboração do precipitado IGHs obtido a partir dos galhos e caule de *Maytenus imbricata*.



Fluxograma 2.3: Elaboração da fração 12-14 obtida na CC do precipitado IGHS.



Fluxograma 2.4: Elaboração da fração 15-23 obtida na CC do precipitado IGHS.

2.2.3.2. ELABORAÇÃO DO EXTRATO HEXÂNICO DOS GALHOS E CAULE DE *Maytenus imbricata* (IGH)

O extrato hexânico dos galhos e caule de *Maytenus imbricata* (IGH) apresentou perfil em CCD muito semelhante ao do sólido IGHs analisado anteriormente. O extrato hexânico dos galhos e caule (13,4 g) foi submetido à CC (COLUNA 7), usando sílica gel 60 (70-230 Mesh) e os eluentes H e AcEt puros ou em misturas de polaridade crescente. Foram recolhidas 42 frações no total de 130 mL cada. O andamento da coluna foi acompanhado por CCD e as frações reunidas de acordo com os resultados observados nas cromatoplasas, totalizando 10 grupos (Fluxograma 2.5, pág. 139).

➤ **GRUPO 1:** As frações 1-3 apresentaram-se como um material pastoso esbranquiçado (93,3 mg) com espectro no IV característico de éster graxo. A análise por CCD evidenciou a presença de várias manchas, de difícil separação. As análises não conduziram ao isolamento de nenhuma substância pura.

➤ **GRUPO 2:** O material deste grupo (fração 4) apresentou-se como um material pastoso esverdeado impuro, que foi recromatografado (480 mg) em CC (COLUNA 8), utilizando sílica gel 60 (70-230 Mesh) e os eluentes H:DCM (3:2). Foram recolhidas 86 frações de 20 mL cada que foram reunidas em 7 grupos de acordo com as características observadas em CCD (Fluxograma 2.5, pág. 139). No grupo 1 foi possível a identificação do lupano 3β -esteariloxi-lupan-20(29)-eno (G11), além de ácidos graxos e hexacosano. O grupo 6 (frações 40-52; m =19 mg) apresentou uma única mancha em CCD em sistemas diferentes de eluentes, tendo sido denominado de G8 e identificado como lupenona. As análises das demais frações não conduziram ao isolamento de nenhuma substância.

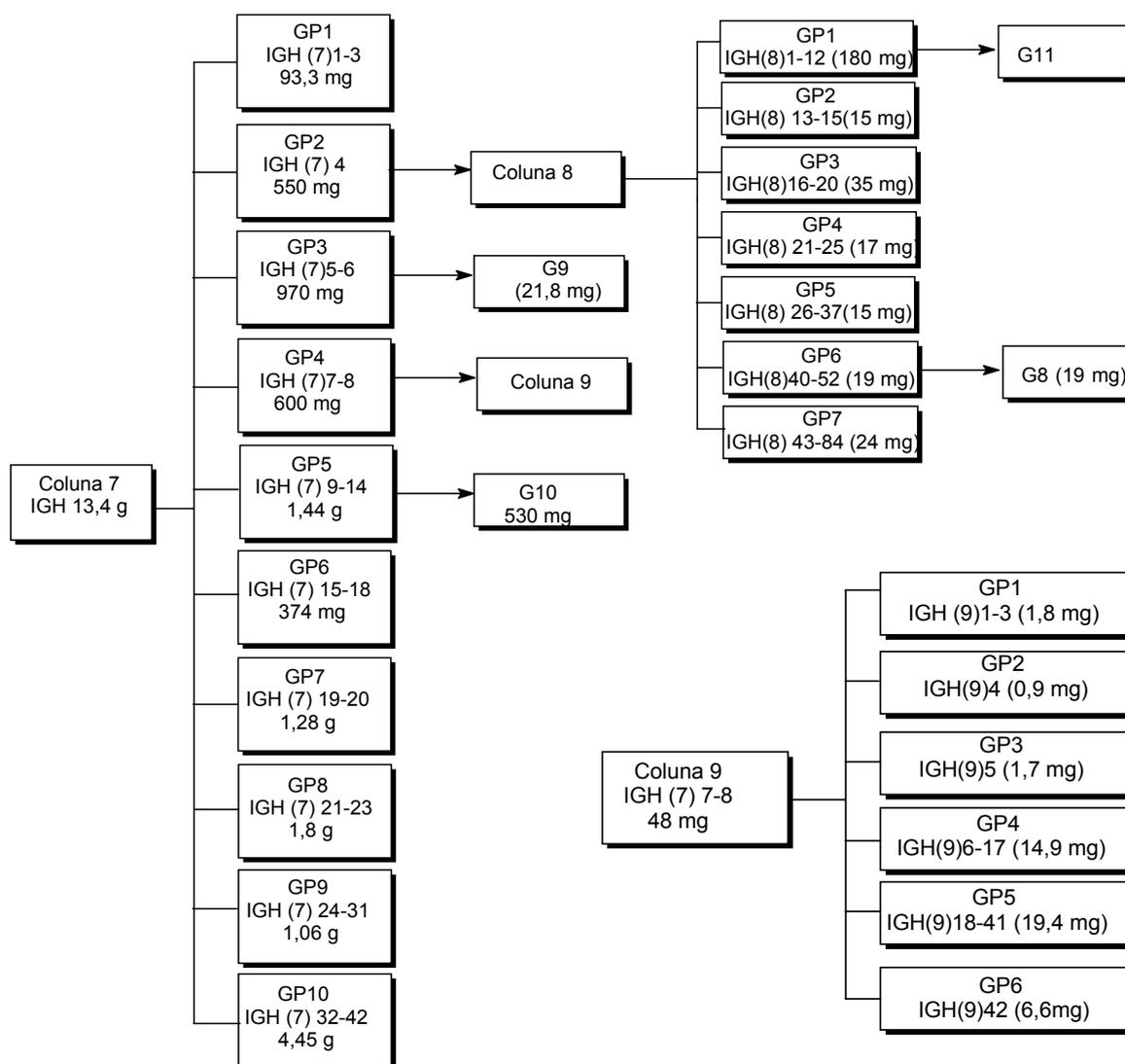
➤ **GRUPO 3:** As frações 5-6 foram submetidas a recristalização, empregando a mistura de hexano:acetato de etila (2:1). Obteve-se um sólido branco (21,8 mg) denominado G9. A análise por CCD e EM mostrou que G9 tratava-se de friedelina.

➤ **GRUPO 4:** As frações 7-8 foram recromatografadas em CC (COLUNA 9) utilizando sílica gel 60 (230-400 Mesh) e os eluentes H e AcEt puros ou em misturas de polaridades crescentes. Foram recolhidas 42 de 10 mL cada que foram

reunidas de acordo com as características observadas em CCD (Fluxograma 2.6 pág. 140). Não foi possível a separação de nenhuma substância pura.

➤ **GRUPO 5:** As frações 9-14 apresentaram-se como um sólido branco, denominado G10 (20 mg) que precipitou após adição de AcEt. Quantidades adicionais de G10 foram obtidas após sucessivas adições de AcEt, sendo os sólidos separados por filtração e recristalizados em hexano. G10 exibiu teste com $AlCl_3$ positivo, sugerindo a presença de um núcleo flavonoídico, posteriormente identificado como 1-hidroxi-3,6-dimetoxi-8-metil-9-xantona.

As análises por CCD e dos espectros no IV dos demais grupos indicaram que os mesmos se tratavam de misturas dos lupanos já isolados anteriormente e, portanto, não foram trabalhadas.



Fluxograma 2.5: Elaboração do extrato hexânico (IGH) dos galhos e caule de *M. imbricata*.

2.2.3.3. ELABORAÇÃO DO SÓLIDO OBTIDO NA REMOÇÃO DO SOLVENTE DO EXTRATO EM ACETATO DE ETILA DOS GALHOS E CAULE DE *M. imbricata* (G1)

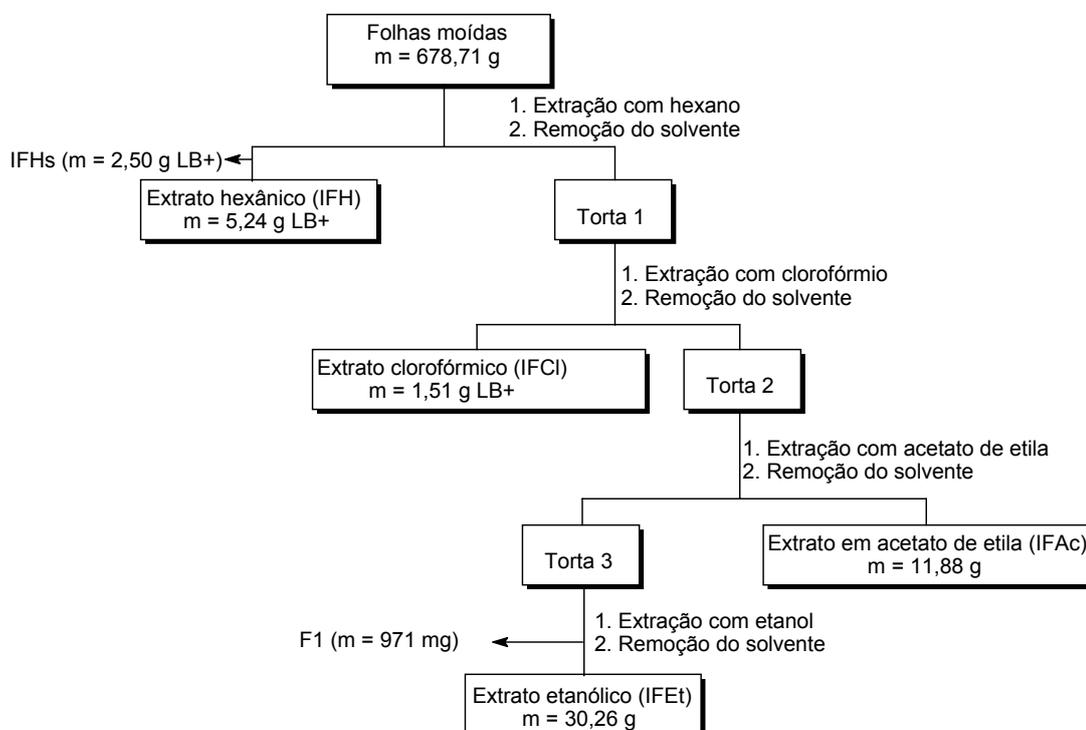
Durante a remoção do acetato de etila, foi observada a precipitação de um sólido denominado G1. A análise por CCD e o espectro no IV desta amostra indicou tratar-se de uma substância de natureza fenólica. O perfil cromatográfico exibido por G1, mostrou-se muito semelhante aquele apresentado para pró-antocianidina A. A comparação dos espectros obtidos no IV e das CCD com amostra autêntica de pró-antocianidina A indicaram que G1 tratava-se de uma mistura de pró-antocianidina A.

G1 foi então submetida à análise por CLAE, que permitiu a identificação de vários picos correspondentes a monômeros e polímeros. Não foi possível entretanto, a separação dos compostos presentes nesta mistura.

2.2.4. PREPARAÇÃO DOS EXTRATOS DAS FOLHAS DE *M. imbricata* (IFH)

Depois de secas as folhas foram moídas e submetidas a extrações exaustivas com solventes em ordem crescente de polaridade em aparelho Soxhlet.

Os respectivos extratos foram preparados de acordo com o Fluxograma 2.6.



Fluxograma 2.6: Preparação dos extratos das folhas de *Maytenus imbricata*.
LB + = teste de Liebermann-Burchard positivo para TTPC.

2.2.4.1. ELABORAÇÃO DO SÓLIDO OBTIDO NA REMOÇÃO DO SOLVENTE DO EXTRATO HEXÂNICO DAS FOLHAS DE *M. imbricata* (IFHs)

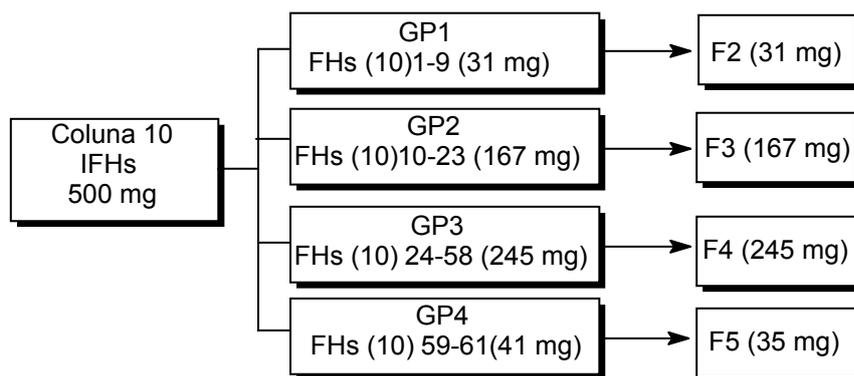
Parte do sólido amarelo (500 mg) obtido durante a remoção do hexano (IFHs) foi submetido a CC (COLUNA 10), usando sílica gel 60 (230-400 Mesh) e os eluentes H, AcEt puros ou em misturas de polaridades crescentes. Foram recolhidas 61 frações no total, de 10 mL cada. O andamento da coluna foi acompanhado por CCD e as frações agrupadas de acordo com os resultados observados nas cromatoplasas. As frações foram divididas em 4 grupos (Fluxograma 2.7, pág. 142).

➤ **GRUPO 1:** As frações 1-9 foram reunidas e apresentaram-se como um sólido branco (31 mg) denominado F2. Observou-se apenas uma mancha em CCD em sistemas de diferentes eluentes, sendo identificado posteriormente como quantidade adicional de friedelina (G9).

➤ **GRUPO 2:** O material deste grupo (frações 10-23) apresentou-se como um sólido branco (167 mg) denominado F3. A comparação dos espectros no IV e a análise por CCD utilizando amostras autênticas de α -friedelinol e friedelina indicaram tratar-se F3 de uma mistura de ambas substâncias.

➤ **GRUPO 3:** O material deste grupo (fração 24-58) denominado F4, apresentou-se como um sólido branco, com perfil cromatográfico semelhante à mistura de friedelina e friedelinol. A análise por CCD utilizando amostras autênticas de α -friedelinol e friedelina e a comparação dos espectros no IV indicaram tratar-se de quantidade adicional da mistura de ambas as substâncias.

➤ **GRUPO 4:** O material deste grupo denominado F5, após a evaporação do solvente, apresentou-se como um sólido misturado à clorofila. Após ser lavado com éter e eluído em CCD usando CHCl_3 exibiu uma única mancha nas cromatoplasas que quando comparadas aos padrões de α -friedelinol e friedelina, se apresentaram mais polares que estes. A análise desta amostra por RMN de ^1H e de ^{13}C indicou tratar-se de quantidade adicional do lupano 3 β ,30-di-hidroxi-lup-20(29)-eno (G6).



Fluxograma 2.7: Elaboração do IFHs obtido durante a remoção do solvente do extrato hexânico das folhas de *M. imbricata*.

2.2.4.2. ELABORAÇÃO DO EXTRATO HEXÂNICO DAS FOLHAS DE *Maytenus imbricata* (IFH)

O extrato hexânico (5,2 g) obtido das folhas de *Maytenus imbricata* (IFH) foi submetido a CC (COLUNA 11), usando sílica gel 60 (70-230 Mesh) e os eluentes hexano (H), acetato de etila (AcEt) e metanol (MeOH) puros ou em misturas de polaridades crescentes.

Foram recolhidas 25 frações, de aproximadamente 120 mL cada. A evolução do processo de eluição da coluna foi acompanhada por CCD e as frações reunidas de acordo com os resultados observados nas cromatoplaças, totalizando 11 grupos (Fluxograma 2.8, pág. 146).

➤ **GRUPO 1:** As frações 1 e 3 foram reunidas e apresentaram-se como um material esbranquiçado e pastoso (168 mg) com espectro no IV característico de éster de ácido graxo. O mesmo foi então submetido à transesterificação para obtenção dos respectivos ésteres metílicos de acordo com o procedimento que se segue: 20 mg da amostra foram dissolvidos em 0,5 mL de THF em um tubo de ensaio; em seguida, foi adicionado 1 mL da solução de metóxido de sódio 0,5 mol/L preparada em metanol anidro e sódio metálico sendo o tubo aquecido a 50 °C por 10 minutos. Adicionaram-se então 50 µL de ácido acético glacial, e posteriormente, 3 mL de água destilada. Os ésteres metílicos obtidos foram extraídos com hexano (2x5 mL), sendo a fase orgânica secada com sulfato de magnésio anidro, contendo 10% de carbonato ácido de potássio sólido e filtrada. O solvente foi removido em

evaporador rotativo e o material, denominado F6, foi dissolvido em 0,5 mL de hexano para análise em CG-EM, sendo identificado posteriormente como uma mistura dos ésteres de ácidos graxos miristato de metila (C14:0), palmitato de metila (C16:0), estearato de metila (C18:0), oleato de metila (C18:1), linoleato de metila (C18:3) e licosonoato de metila (C20:0), por comparação direta com padrões.

➤ **GRUPO 2:** O material deste grupo (fração 4) apresentou-se como um sólido branco impuro (10 mg) com muitas manchas em CCD. Na tentativa de se purificar a amostra, a mesma foi lavada primeiramente com hexano e, posteriormente, com éter etílico, sem, contudo apresentar resultados satisfatórios. A complexidade e a pequena quantidade de amostra nos levaram a não trabalhá-la.

➤ **GRUPO 3:** Duas tentativas iniciais de recristalização da fração 5 (600 mg) usando a mistura de H:AcEt foram realizadas. Entretanto, não se obteve sucesso, já que a amostra não se solubilizava totalmente. Numa terceira tentativa, a amostra foi fracionada em duas partes de aproximadamente 300 mg. Estas então foram submetidas à recristalização separadamente, empregando a mistura H:AcEt (2:1). Obteve-se um sólido branco (86 mg) denominado F7 e identificado como quantidade adicional de friedelina (G9).

➤ **GRUPO 4:** A fração 6 (147 mg) apresentou-se como um sólido com três pontos em CCD em sistemas de diferentes eluentes; a amostra foi então submetida a separação por CCDP, utilizando como eluentes a mistura H:DCM (2:1). Após a separação da amostra obteve-se um sólido denominado F8 em forma de agulhas, identificado como quantidade adicional de friedelina (21 mg) (G9).

➤ **GRUPO 5:** A fração 7 (1,9 g) foi submetida a recristalização empregando a mistura de H, AcEt e seis gotas de CHCl_3 . Após a solubilização da amostra foi adicionado carvão ativo para a retirada de pigmentos. Obteve-se um sólido branco (49 mg) denominado de F9 e, posteriormente, identificado como o ácido 3,4-seco-friedelan-3-óico.

➤ **GRUPO 6:** A fração 8 denominado F10 (103 mg) apresentou-se como um sólido de perfil cromatográfico muito parecido com a fração 7. A comparação dos espectros no IV de ambas amostras, bem como a CCD em diferentes sistemas de eluentes indicou tratar-se da mesma substância, identificada posteriormente como quantidade adicional do ácido 3,4-seco-friedelan-3-óico (F9).

➤ **GRUPO 7:** As frações 9-12 (320 mg) foram recromatografadas em CC (COLUNA 12) utilizando sílica gel 60 (70-230 Mesh) e eluída com a mistura H:DCM

(1:2). Recolheram-se 28 frações que foram agrupadas em 4 grupos de acordo com as características observadas em CCD (Fluxograma 2.9, pág. 146). As frações 9-10 apresentaram-se como um sólido branco (74 mg) denominado de F11, que, após ser recristalizado, foi submetido a análises espectroscópicas, indicando tratar-se de uma mistura de lupanos TTPC. As demais frações não conduziram ao isolamento de nenhuma substância e não foram estudadas.

➤ **GRUPO 8:** As frações 13-17 apresentaram-se como um material pastoso (23 mg), com bastante clorofila e perfil cromatográfico muito semelhante ao grupo 9, porém mais complexo. A complexidade e a semelhança com o grupo 9 nos levaram a não estudá-la.

➤ **GRUPO 9:** As frações 18-19 apresentaram-se como um material pastoso (790 mg), com bastante clorofila e perfil cromatográfico muito semelhante ao grupo 8. A amostra foi então recromatografada em CC (COLUNA 13), utilizando sílica gel 60 (70-230 Mesh) e os eluentes CHCl_3 , AcEt puros ou em misturas de polaridade crescente. As frações foram agrupadas em 6 grupos de acordo com as características observadas em CCD (Fluxograma 2.9, pág. 147), totalizando 105 frações. O GP2 (frações 22-39 (98,1 mg)) foi recromatografado em CC (COLUNA 14), utilizando sílica gel 60 (230-400 Mesh) e a mistura H:AcEt (5:1). Foram recolhidas 35 frações, agrupadas de acordo com o perfil observado em CCD (Fluxograma 2.10, pág. 147). A análise por CG-EM das frações C14/10 (9,5 mg), C14/12-16 (14,4 mg) e C14/11, não conduziram à identificação de nenhuma substância. As demais frações não conduziram ao isolamento de nenhuma substância.

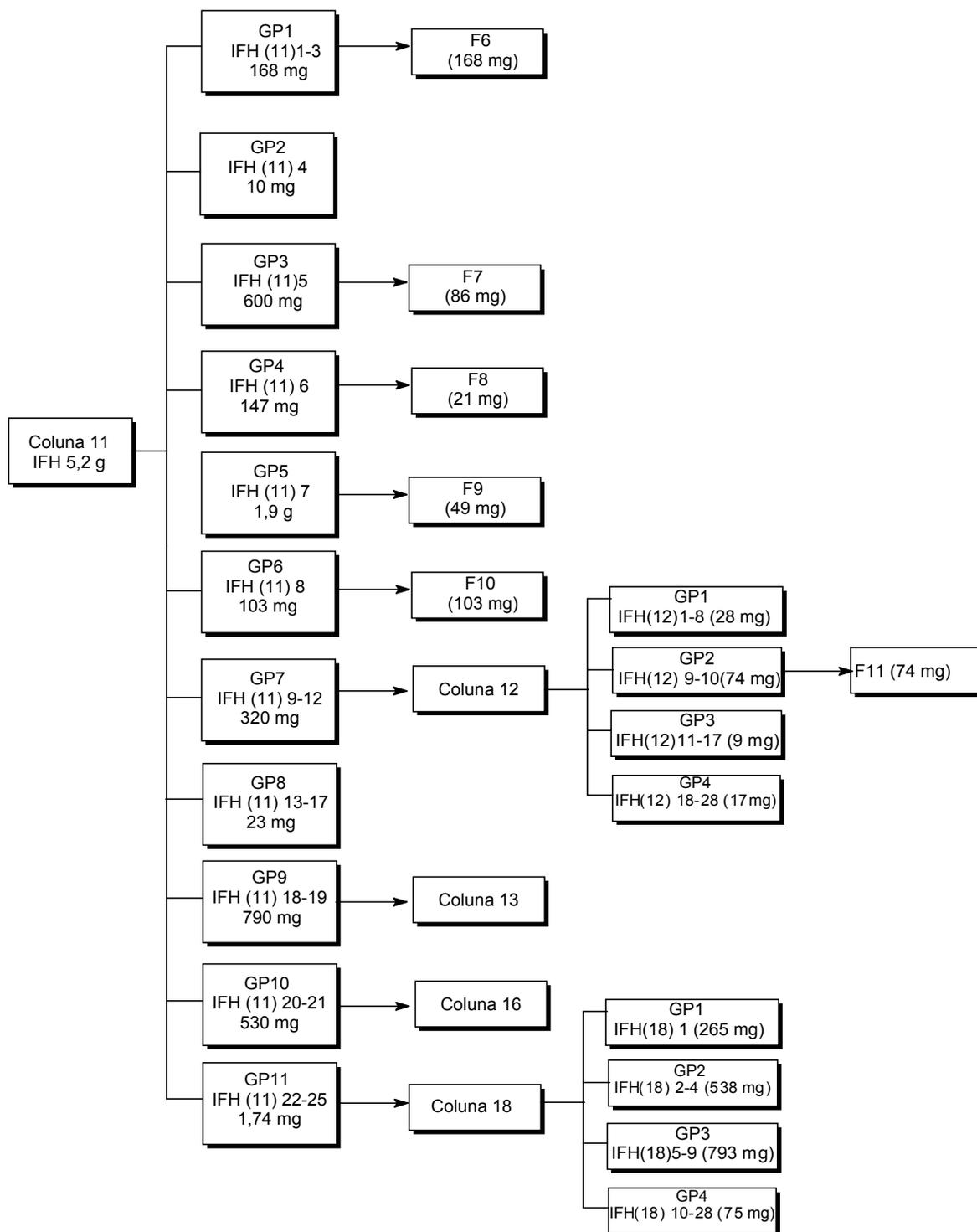
A fração 105 (270 mg) da COLUNA 13 após ser lavada com éter etílico, originou um sólido branco (70 mg) que foi recromatografado em CC (técnica cromatográfica: coluna seca, COLLINS, 1997) (COLUNA 15), utilizando sílica gel 60 (230-400 Mesh) e os eluentes H, EE, Me puros ou em misturas de polaridades crescentes. Foram recolhidas 45 frações, agrupadas de acordo com o perfil observado em CCD (Fluxograma 2.9, pág. 147), porém não conduziram ao isolamento de nenhuma substância.

Todas as frações da COLUNA 13 apresentaram uma coloração verde intensa, sendo que, a partir da fração 40 até a 104, o aspecto das amostras era pastoso, bem viscoso e, ao serem analisadas por CCD usando sílica ou alumina, apresentaram sob luz ultravioleta 365 nm uma coloração vermelha intensa,

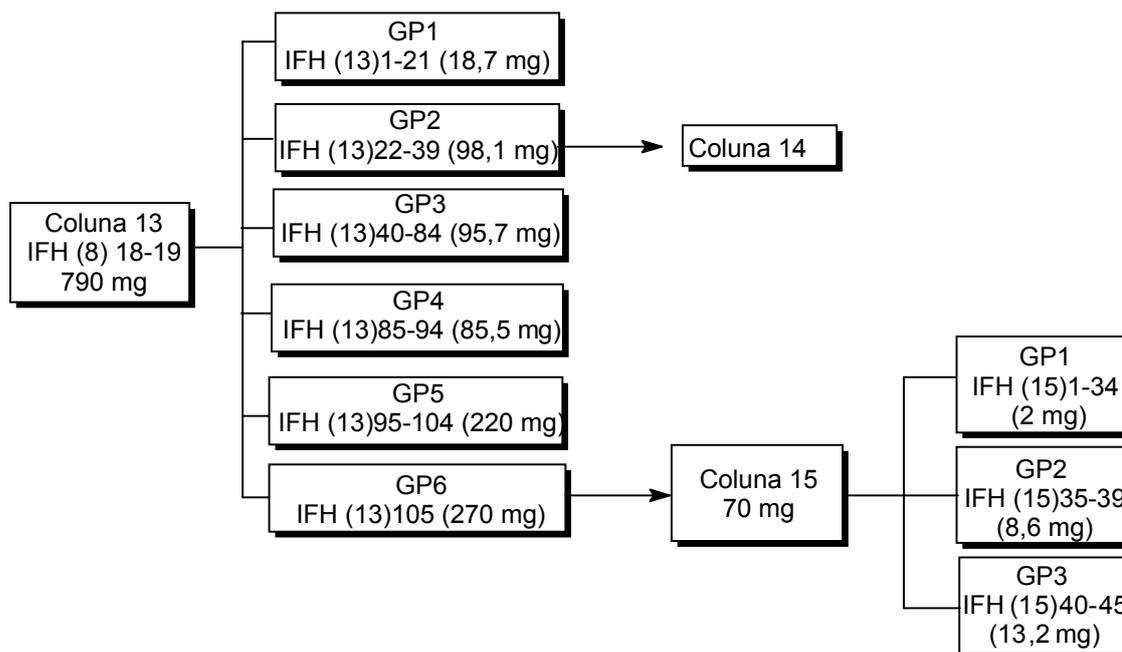
indicando a presença de grande quantidade de clorofila. Estas frações não foram estudadas.

➤ **GRUPO 10:** As frações 20-21 apresentaram-se como um material pastoso (530 mg), com bastante clorofila. Uma tentativa para se retirar a clorofila foi realizada empregando-se carvão ativo. A amostra foi solubilizada em AcEt e acrescida de pequena quantidade de carvão ativo, sendo em seguida aquecida a 60 °C por 30 min. Novas CCD foram realizadas e mostraram que o procedimento foi ineficiente. A amostra foi então recromatografada em CC (COLUNA 16), utilizando como eluentes H:AcEt puros ou em misturas de polaridades crescentes. As frações foram agrupadas em 4 grupos de acordo com as características observadas em CCD (Fluxograma 2.11, pág. 148), totalizando 117 frações. As frações 22-115 (66,7 mg) denominada de F12 foram recromatografadas (COLUNA 17), utilizando sílica gel 60 (230-400 Mesh) e a mistura H:AcEt (2:1). Foram recolhidas 25 frações, agrupadas de acordo com o perfil observado em CCD (Fluxograma 2.12, pág. 148), sendo possível o isolamento de quantidade adicional de 3 β ,30-di-hidroxi-lup-20(29)-eno (F5) nos grupos 4 e 6.

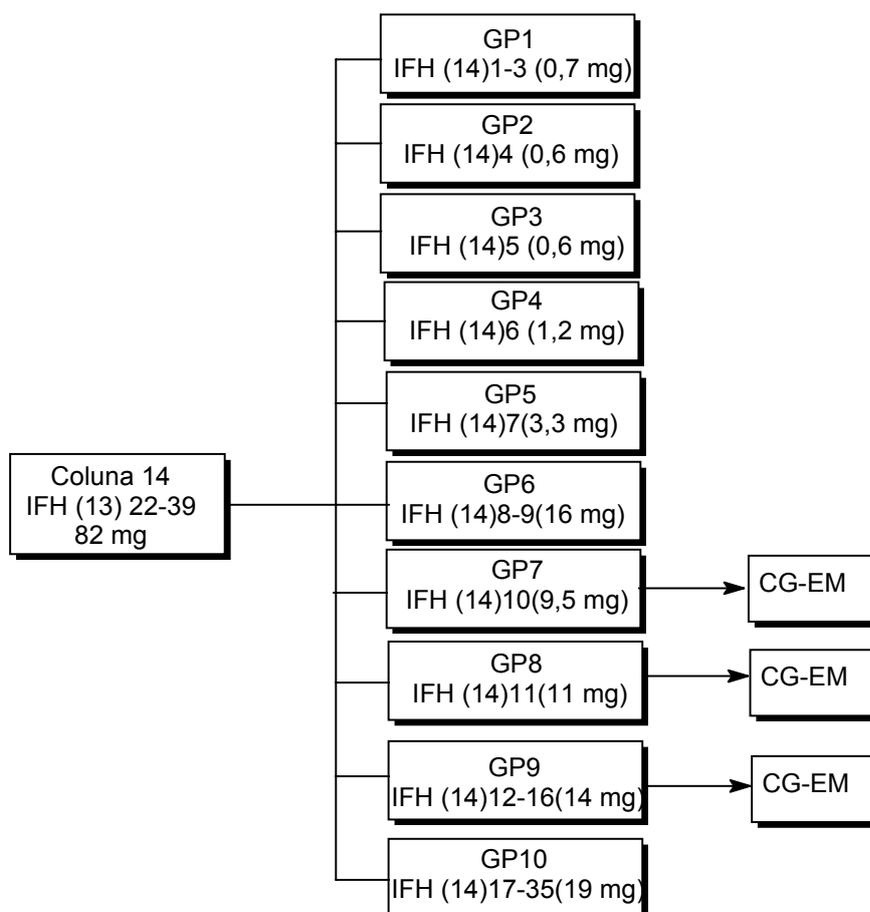
➤ **GRUPO 11:** As frações 22-25 apresentaram-se como um material pastoso (1,74 g), com bastante clorofila. A amostra foi então recromatografada em CC (COLUNA 18), utilizando a mistura H:AcEt:MeOH (7:4:1,5) na tentativa de se diminuir a quantidade de clorofila presente na amostra. Foram recolhidas 28 frações de 125 mL que foram agrupadas em 4 grupos de acordo com as características em CCD (Fluxograma 2.8, pág. 146). Todas as frações apresentaram o mesmo aspecto pastoso da amostra inicial e com bastante clorofila, não sendo possível a identificação de nenhuma substância.



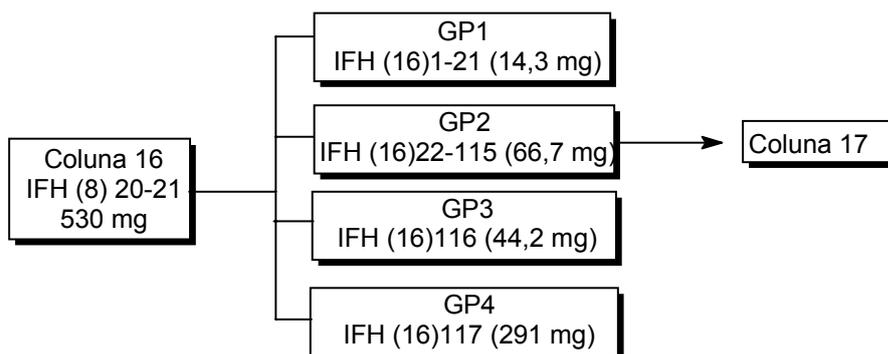
Fluxograma 2.8: Elaboração do extrato hexânico das folhas de *Maytenus imbricata*.



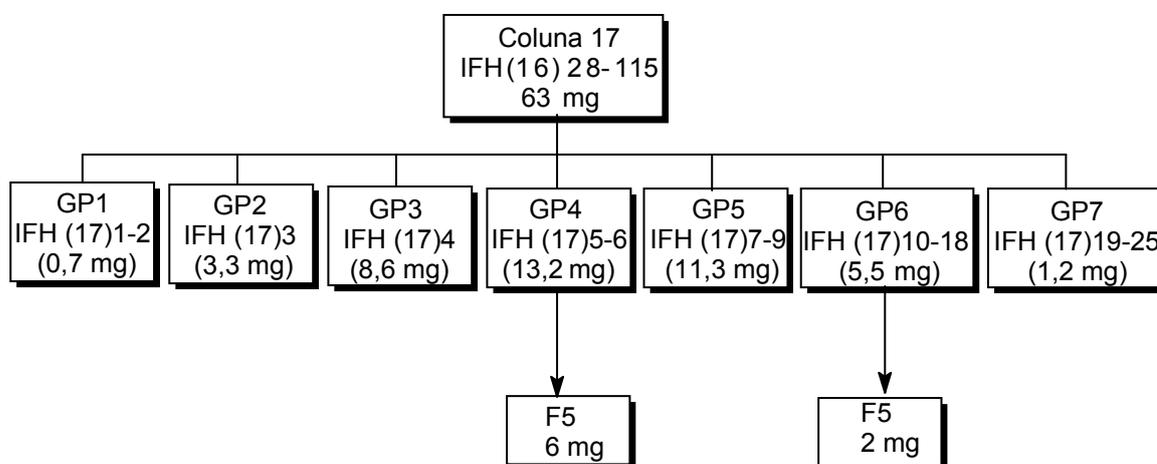
Fluxograma 2.9: Elaboração da fração 18-19 obtida na CC do IFH.



Fluxograma 2.10: Elaboração da fração 22-39 obtida na CC do IFH.



Fluxograma 2.11: Elaboração da fração 20-21 obtida na CC do IFH.



Fluxograma 2.12: Elaboração da fração 28-115 obtida na CC do IFH.

2.2.4.3. ELABORAÇÃO DO EXTRATO CLOROFÓRMICO DAS FOLHAS DE *M. imbricata* (IFCI)

O extrato clorofórmico (1,51 g) obtido das folhas de *Maytenus imbricata* (IFCI) foi submetido a várias tentativas para diminuir a quantidade de clorofila como a filtração da amostra em seringas contendo Fluorisil® e sílica (70-230 mesh) e a análise do extrato por CCD usando sílica, alumina e sistemas de eluentes distintos. Em todas as tentativas a mancha observada na cromatoplaça apresentava uma cauda intensa e sem separação suficiente para permitir seu fracionamento. Tais resultados aliados à pequena quantidade do material obtido, comparado com os galhos, nos levaram a analisá-lo por CG-EM. O IFCI foi então hidrolisado e derivatizado (sililado) de acordo com o procedimento descrito na página 155.

2.2.4.4. ELABORAÇÃO DO EXTRATO EM ACETATO DE ETILA DAS FOLHAS DE *M. imbricata* (IFAc)

Parte do extrato em acetato de etila (10,30 g) das folhas de *Maytenus imbricata* (IFAc) foi submetida a CC (COLUNA 18), usando sílica gel 60 (70-230 Mesh) e os eluentes hexano (H), éter etílico (EE), acetato de etila (AcEt) e metanol (MeOH) puros ou em misturas de polaridades crescentes. Foram recolhidas 66 frações no total, de aproximadamente 125 mL cada. A evolução do processo de eluição da coluna foi acompanhada por CCD e as frações reunidas de acordo com os resultados observados nas cromatoplasas, totalizando 11 grupos (Fluxograma 2.13, pág. 152).

➤ **GRUPOS 1, 2 e 3:** As frações 1-3 (GP1, 35 mg), 4-5 (GP2, 16,6 mg) e 6-8 (GP3, 27,7 mg) apresentaram-se como um material pastoso, contendo muita clorofila. Os espectros no IV exibiram bandas características de éster de ácido graxo. Na tentativa de se diminuir a quantidade de clorofila presente, as amostras foram submetidas à filtração em coluna utilizando Fluorisil® e eluentes hexano, éter etílico. Todavia, a eliminação da clorofila não foi eficiente em nenhuma das amostras, não sendo possível o isolamento de nenhuma substância pura. As amostras foram então sililadas e analisadas por CG-EM. Os compostos majoritários identificados foram:

GP1: ácido nonadecanóico (1,66%), ácido palmítico (1,68%), 1,11 dodecadieno (4,41%) e estigmasterol (5,4%).

GP3: ácido cinâmico (10,40%), ácido esteárico (2,08%) e ácido *p*-hidroxibenzóico (27%).

➤ **GRUPO 4:** As frações 9-16 (25 mg) apresentaram-se como um material pastoso, de cor marrom que foi recromatografado (COLUNA 19) utilizando sílica (230-400 Mesh) e como eluentes H, EE e AcEt puros ou em misturas de polaridade crescente. As frações não conduziram ao isolamento de nenhuma substância pura (Fluxograma 2.13, pág. 152).

➤ **GRUPO 5:** As frações 17-19 (63 mg) apresentaram aspecto pastoso, de cor alaranjada. A amostra foi submetida a cromatografia em camada delgada preparativa (CCDP) (Fluxograma 2.14, pág. 153). Porém, as substâncias obtidas não estavam puras e foram submetidas ao fracionamento por CC rápida utilizando sílica (230-400 Mesh) e como eluentes EE e DCM (7:1) (COLUNA 22 e 23,

respectivamente) e a novas CCDP sem, contudo permitir o isolamento de nenhuma substância pura (Fluxograma 2.14, pág. 153).

➤ **GRUPO 6:** As frações 20-23 (624 mg) apresentaram aspecto gelatinoso, de cor alaranjada, com precipitação de um sólido, denominado F12 (42 mg), durante a evaporação do solvente (EE:AcEt) (3:1) em banho-maria (40 °C) O filtrado foi deixado em repouso (48 h) e quantidades adicionais de F12 foram recolhidas (530 mg) na forma de cristais alaranjados. Testes com FeCl₃ indicaram que F12 possuía natureza fenólica. Análises espectroscópicas posteriores permitiram identificar F12 como a epicatequina.

➤ **GRUPO 7:** As frações 24-35 (200 mg) apresentaram aspecto sólido de cor vermelha, que foi recromatografado em coluna de gel de Sephadex LH20 (COLUNA 21) eluída com MeOH. Recolheram-se 32 frações de 10 mL que foram agrupadas em 4 grupos de acordo com as características observadas em CCD (Fluxograma 2.13, pág. 152). Posteriormente, foram sililadas e analisadas por CG-EM. A análise dos quatro grupos não conduziu a identificação de nenhuma substância pura.

➤ **GRUPO 8:** As frações 36-40 (1,14 g) apresentaram aspecto pastoso de cor vermelha, CCD e IV semelhantes àqueles obtidos para G1. As características desta amostra levaram a recromatografá-la em coluna de gel de Sephadex LH20 (COLUNA 20) eluída com AcEt e MeOH puros ou em misturas de polaridades crescentes. Recolheram-se 216 frações de 20 mL que foram agrupadas em 10 grupos de acordo com as características observadas em CCD (Fluxograma 2.15, pág. 153). Os grupos 1 e 2 foram sililados e analisados por CG-EM (pág. 155).

No grupo 1 foi possível identificar a presença de hidrocarbonetos (34,26%), ácido palmítico (6,88%), ácido esteárico (5,18%) e ácido mirístico (2,10%).

No grupo 2 não foi possível identificar nenhuma substância.

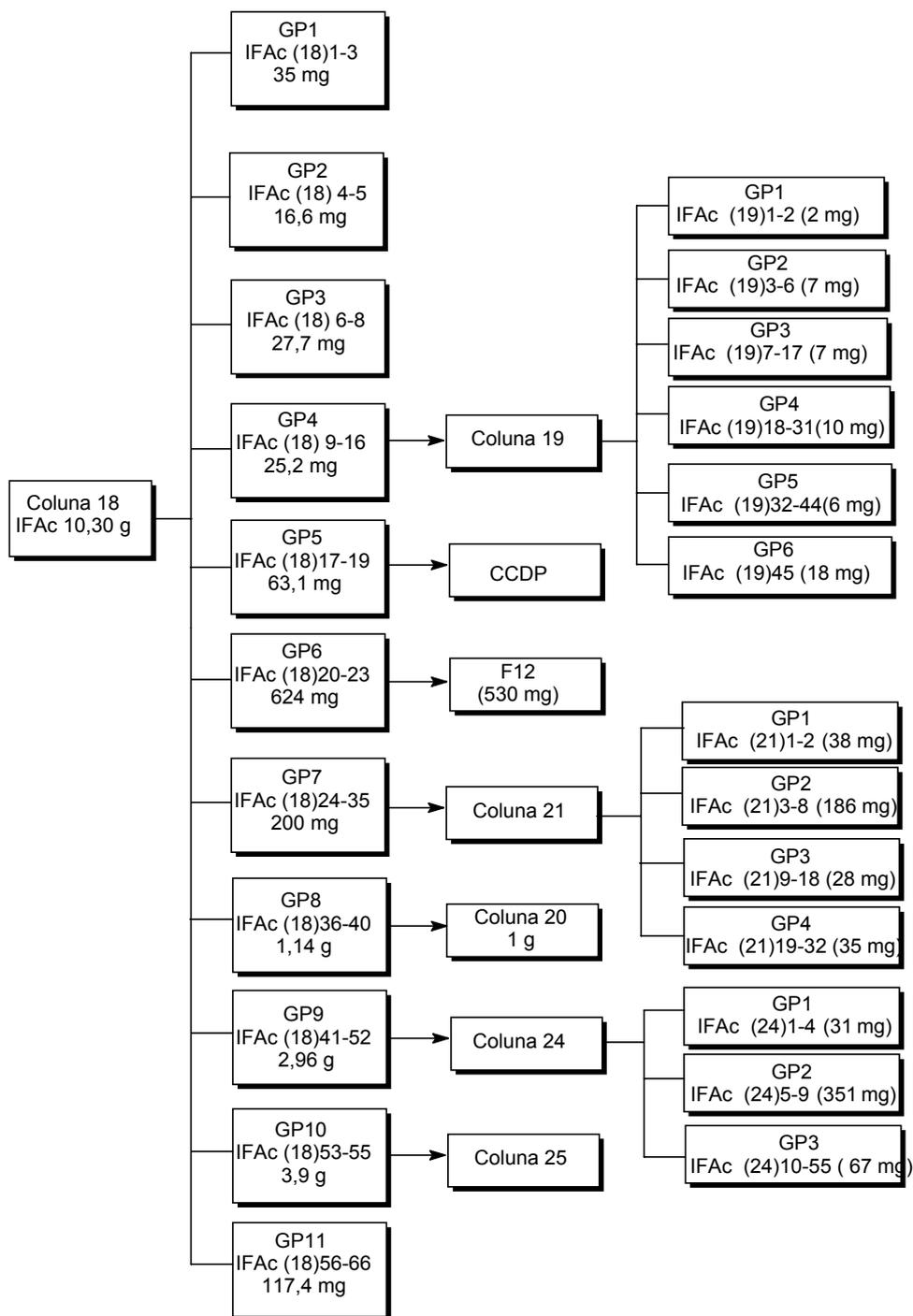
Os grupos 3, 4, 5 e 6 foram novamente recromatografados em coluna de gel de Sephadex (COLUNAS 26, 27, 28 e 29, respectivamente), as frações recolhidas foram agrupadas de acordo com o perfil observado em CCD, sililadas e analisadas por CG-EM (pág. 155), porém não foi possível identificar nenhuma substância.

➤ **GRUPO 9:** As frações 41-52 (2,96 g) apresentaram aspecto sólido de cor alaranjada. Análises por CCD e IV indicaram a presença de compostos fenólicos. A amostra foi então recromatografada em CC (COLUNA 24), utilizando gel de Sephadex LH20 e MeOH como eluente. As frações recolhidas foram agrupadas em

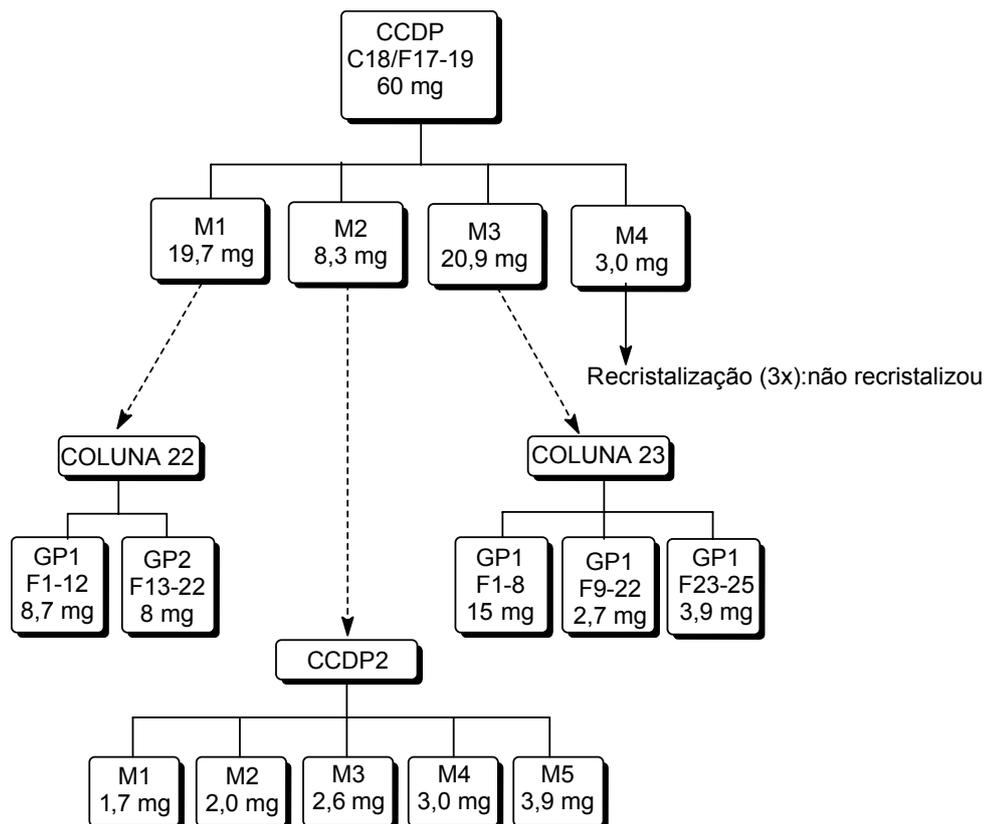
3 grupos de acordo com as características observadas em CCD, totalizando 55 frações (Fluxograma 2.13, pág. 152). As análises dos grupos por CG-EM, após serem derivatizados, não conduziram à identificação de nenhuma substância.

➤ **GRUPO 10:** As frações 53-55 (3,9 g) apresentaram aspecto sólido de cor alaranjada. Análises por CCD e IV indicaram a presença de compostos fenólicos. A amostra foi então recromatografada em CC (COLUNA 25), utilizando gel de Sephadex LH20 e MeOH como eluente. As frações recolhidas foram agrupadas em 8 grupos de acordo com as características observadas em CCD, totalizando 124 frações (Fluxograma 2.16, pág. 154). Os grupos 1 e 2 foram submetidos a análise por CLAE, entretanto não foi possível o isolamento de nenhuma substância pura. Os demais grupos apresentaram perfis cromatográficos semelhantes aos grupos 1 e 2, e não foram fracionados.

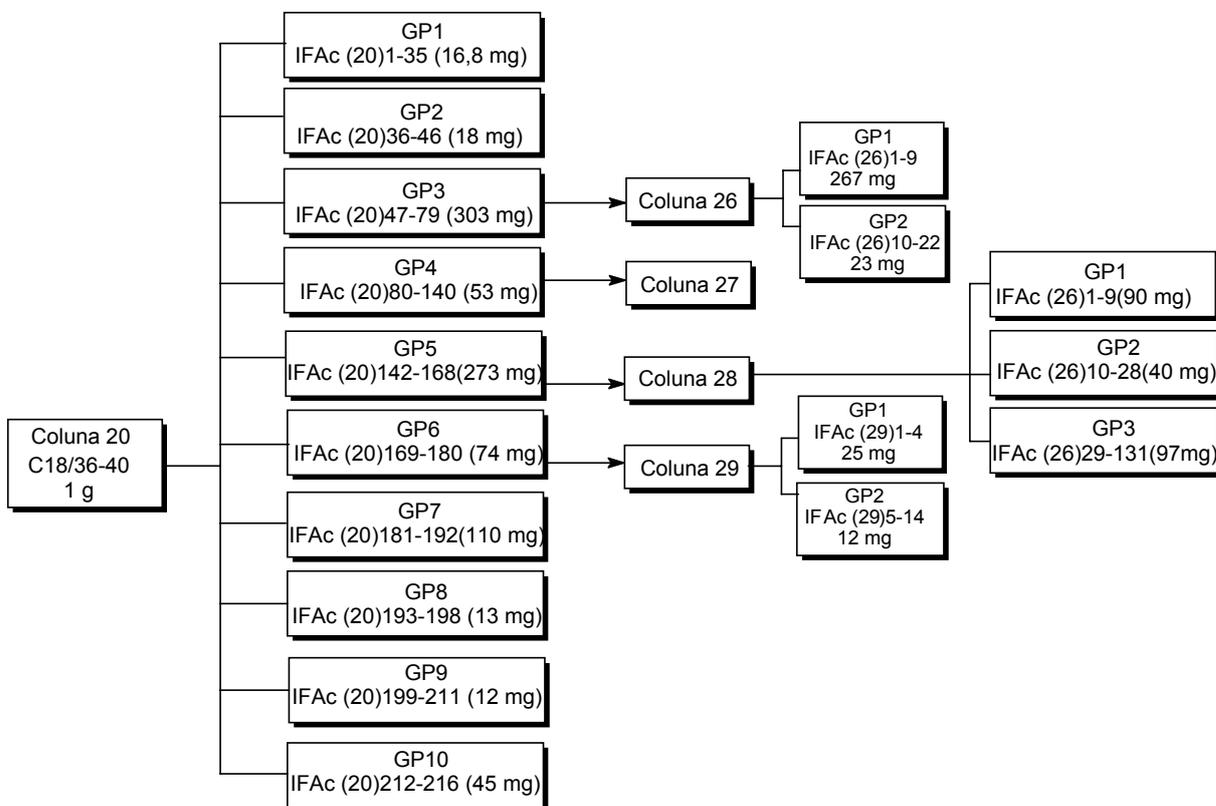
➤ **GRUPO 11:** As frações 56-66 apresentaram aspecto sólido de cor alaranjada. Análises por CCD e IV indicaram a presença de compostos fenólicos e o perfil cromatográfico semelhante ao observado para o grupo 10, não sendo portanto fracionado.



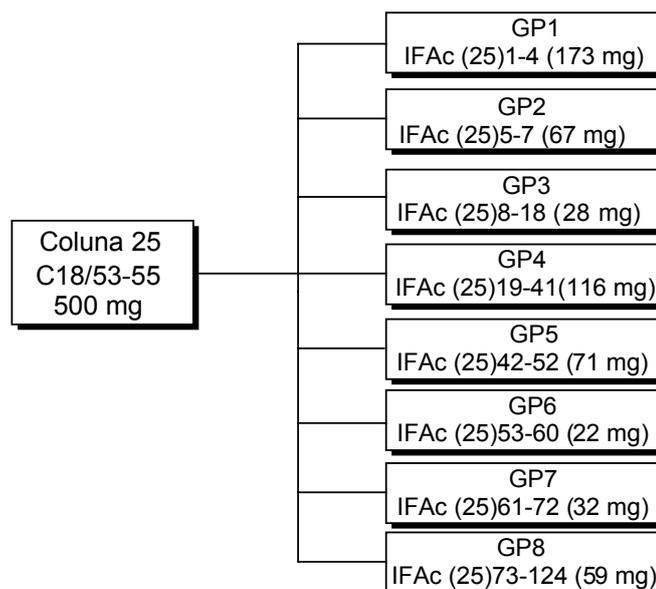
Fluxograma 2.13: Elaboração do extrato em acetato de etila das folhas de *M. imbricata*.



Fluxograma 2.14: Elaboração da fração 17-19 obtida na CC do IFAcE.



Fluxograma 2.15: Elaboração da fração 36-40 obtida na CC do IFAcE.

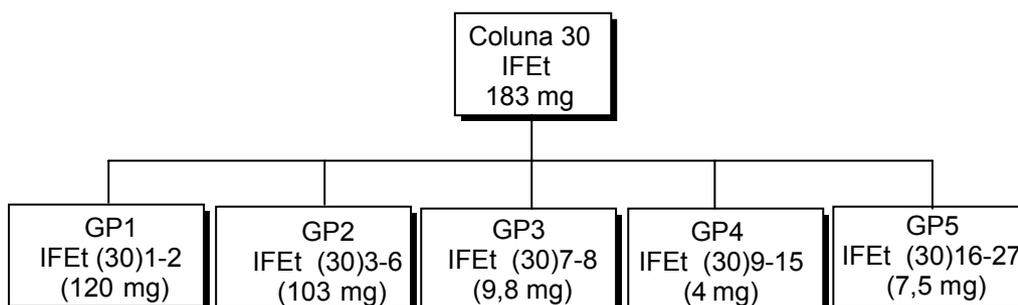


Fluxograma 2.16: Elaboração da fração 53-55 obtida na CC do IFAcE.

2.2.4.5. ELABORAÇÃO DO EXTRATO ETANÓLICO DAS FOLHAS DE *M. imbricata* (IFEt)

Durante a remoção do etanol, foi observada a precipitação de um sólido (971 mg) denominado F1. A análise por CCD e o espectro no IV desta amostra mostrou-se muito semelhante aquele apresentado para o dulcitol. A comparação dos espectros obtidos no IV e das CCD com amostra autêntica de dulcitol indicaram que F1 tratava-se deste poliol. F1 foi então submetido à análise por RMN e EM, que permitiram identificar F1 como sendo o galactitol.

Parte do extrato etanólico (183 mg), obtido das folhas de *Maytenus imbricata* (IFEt), foi submetida a cromatografia em CC (COLUNA 30), utilizando gel de Sephadex LH20, etanol e metanol como eluentes, puros ou em misturas de polaridades crescentes. Foram recolhidas 27 frações, agrupadas em 6 grupos de acordo com as características observadas em CCD (Fluxograma 2.17, pág. 155). Os grupos obtidos não conduziram ao isolamento de nenhuma substância. O IFEt foi então hidrolisado e siliado de acordo com metodologia descrita na pág. 155.



Fluxograma 2.17: Elaboração do extrato etanólico das folhas de *M. imbricata*.

2.3. ANÁLISE DOS EXTRATOS DE *M. imbricata* POR CG-EM

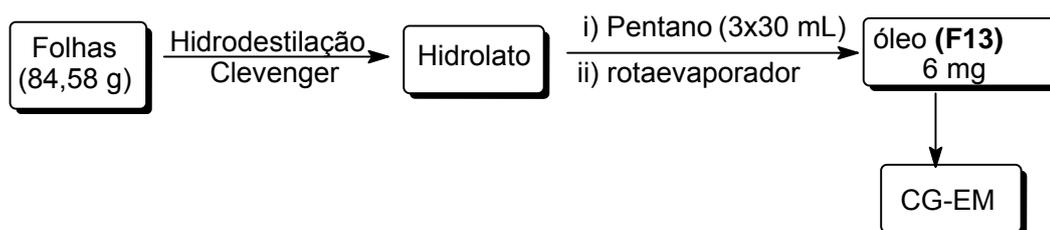
Os extratos das folhas IFCl, IFEt, IFAcE e dos galhos IGEt e IGAcE de *Maytenus imbricata*, após serem hidrolisados e derivatizados conforme procedimento abaixo, foram submetidos a análise por CG-EM.

Hidrólise: 20 mg da amostra foram colocados em um balão de fundo redondo e dissolvidos em 10 mL de KOH 1 mol/L, solução metanólica 10%. Em seguida foram colocados sob refluxo em atmosfera de nitrogênio, a 100 °C. Após 1 h, a solução foi deixada em repouso até esfriar e, em seguida, o pH foi ajustado até pH 2. Esta solução foi então extraída com 3x10 mL de DCM e a fase orgânica após a evaporação do solvente foi derivatizada.

Derivatização: a 3 mg da amostra foram adicionados os padrões internos ácido hexanodióico (10 µL) e tetracosano (10 µL) em CHCl₃. Após a evaporação do solvente, foram adicionados 60 µL de piridina e 100 µL da mistura bistrimetilsililfluoracetamida (BSTFA) e trimetilclorosilano (TMCS). A mistura foi colocada sob aquecimento em banho de glicerina a 70 °C por 30 min. Após esfriar, a amostra foi analisada por CG-EM. Os compostos foram identificados de acordo com os dados da biblioteca do equipamento.

2.4. OBTENÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL DAS FOLHAS DE *M. imbricata* (F13)

O óleo essencial das folhas foi extraído por hidrodestilação, utilizando aparelho de Clevenger (6h). O hidrolato foi extraído com pentano (3x30 mL) e o óleo obtido (6 mg) (F13) foi analisado por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de Massas (CG-EM) (Fluxograma 2.18).

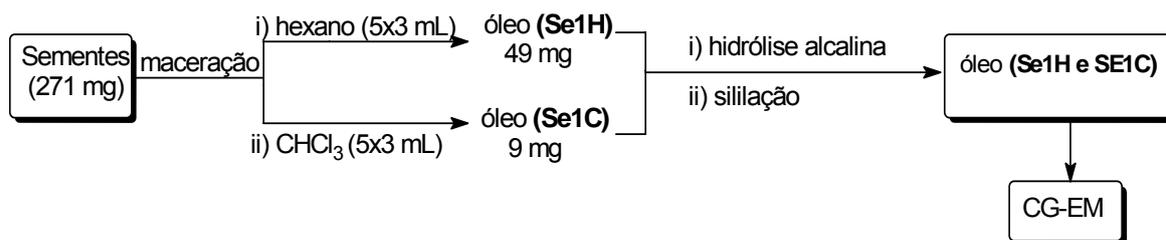


Fluxograma 2.18: Procedimento empregado na extração do óleo essencial das folhas de *Maytenus imbricata*.

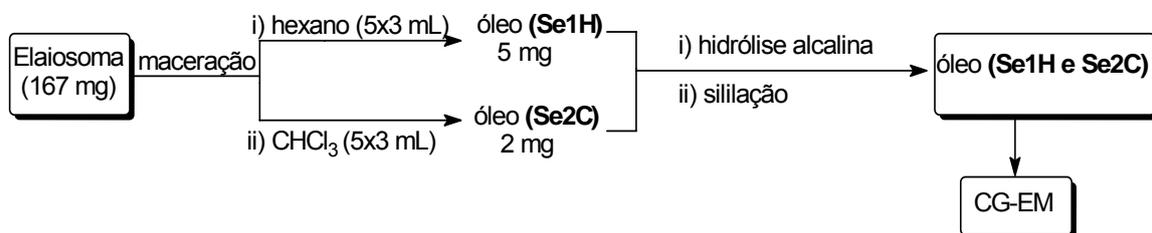
2.5. OBTENÇÃO DO ÓLEO DAS SEMENTES (Se1) E ELAIOSOMA (Se2) DE *M. imbricata*

As sementes (0,271 g) foram retiradas da cápsula que as envolvem e separadas do elaiosoma (0,167 g). Em seguida foram maceradas e extraídas inicialmente com hexano (5x3 mL) fornecendo 0,049 g de óleo (18,01%) (Se1H). A extração com CHCl_3 (5x3 mL) forneceu 0,009 g de óleo (3,32%) (Se1C). Os óleos obtidos foram submetidos à hidrólise alcalina e posterior silição para ser analisado por CG-EM (Fluxograma 2.19, pág. 157).

O elaiosoma, estrutura que envolve a semente, foi retirado com o auxílio de um estilete, macerado e submetido à extração inicialmente com hexano e CHCl_3 , fornecendo 0,005 g (3,03%) de óleo (Se2H) e 0,002 g (1,21%) (Se2C), respectivamente (Fluxograma 2.20, pág. 157).



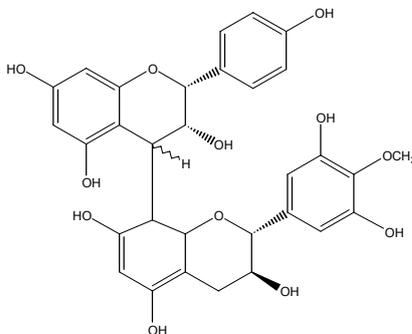
Fluxograma 2.19: Procedimento empregado na extração do óleo das sementes de *Maytenus imbricata*.



Fluxograma 2.20: Procedimento empregado na extração do óleo do elaiosoma que envolve as sementes de *Maytenus imbricata*.

2.6. DADOS FÍSICO-QUÍMICOS DAS SUBSTÂNCIAS E MISTURAS ISOLADAS DE *M. imbricata*

G1: Mistura pro-antocianidinas



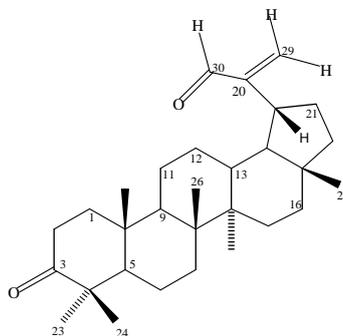
Aspecto físico: Sólido alaranjado amorfo

Ponto de fusão: 183-209 °C; (Lit.: 230d °C; SALAZAR, 1993)

Solubilidade: Solúvel em metanol, água. Insolúvel em hexano e clorofórmio.

IV (KBr, cm⁻¹): 3417, 1610, 1514, 1445 e 1115.

G2: 3-oxo-lup-20(29)-en-30-al



Aspecto físico: Sólido branco.

Ponto de fusão: 177- 181 °C (lit. 193 - 194 °C; BURNS et al., 2000).

Solubilidade: Solúvel em clorofórmio. Insolúvel em hexano.

Fórmula molecular: C₃₀H₄₆O₂

Massa molecular: 438 g/mol

IV (KBr, cm⁻¹): 2940, 2862, 1701, 1683, 1640 e 920.

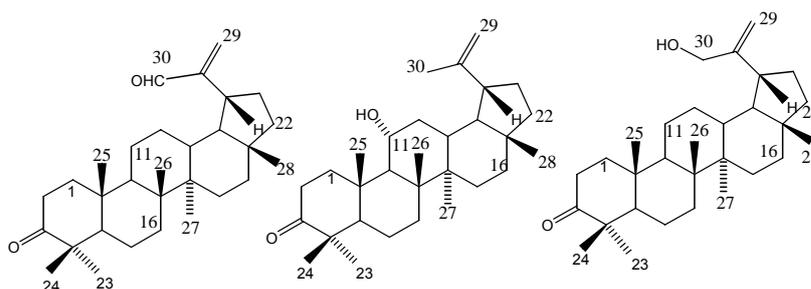
EM- m/z: 438 [M⁺], (24%), 382 [M-C₃H₂O]⁺ (1%), 232 ([M-C₁₄H₂₂O]⁺ (12%), 203 [M-C₁₆H₁₉O] (47%) e 55 (100%).

RMN de ¹H (400 MHz, CDCl₃, δ): 1,30-1,40 (*m*, H-1β), 1,89 (*ddd*, H-1α, *J* = 13,2; 7,6 e 4,3 Hz), 2,49 (*ddd*, H-2α, *J* = 15,6; 9,9 e 7,5 Hz), 2,39 (*ddd*, H-2β, *J* = 15,6; 7,6 e 4,4 Hz), 1,30-1,40 (*m*, 1H, H-5), 1,40-1,44 (*m*, H-6), 1,44-1,50 (*m*, H-7β), 1,30-1,40

(*m*, 1H, H-9), 1,30-1,34 (*m*, H-11), 1,00-1,10 (*m*, H-12), 1,00-1,10 (*m*, H-15), 1,40-1,50 (*m*, H-16 α e H-16 β); 2,75 (*m*, 1H, H-19), 2,10-2,20 (*m*, H-21); 1,40-1,30 (*m*, H-22), 1,07 (*s*, 3H, H-23), 1,02 (*s*, 3H, H-24), 0,92 (*s*, 3H, H-25), 0,94 (*s*, 3H, H-27), 1,05 (*s*, 3H, H-26), 0,83 (*s*, 3H, H-28), 5,91 (*s*, H-29 α), 6,29 (*s*, H-29 β) e 9,52 (*s*, H-30).

RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3 , δ): 39,66 (C-1), 34,16 (C-2), 217,16 (C-3), 47,37 (C-4), 55,06 (C-5), 19,70 (C-6), 33,66 (C-7), 40,81 (C-8), 49,68 (C-9), 36,92 (C-10), 21,52 (C-11), 27,64 (C-12), 37,93 (C-13), 42,83 (C-14), 27,40 (C-15), 35,39 (C-16), 43,32 (C-17), 47,70 (C-18), 47,70 (C-19), 157,21 (C-20), 32,73 (C-21), 39,96 (C-22), 26,65 (C-23), 21,09 (C-24), 15,91 (C-25), 15,81 (C-26), 14,39 (C-27), 17,84 (C-28), 133,05 (C-29) e 194,99 (C-30).

G3: Mistura de 3-oxo-lup-20(29)-en-30-al; 11 α -hidroxi-lup-20(29)-en-3-ona e 30-hidroxi-lup-20(29)-en-3ona

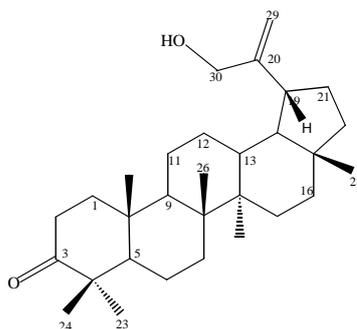


Aspecto físico: Sólido branco

Ponto de fusão: 158,9-170,3 °C

Solubilidade: Solúvel em clorofórmio. Insolúvel em hexano.

IV (KBr, cm^{-1}): 3444, 2948, 2872, 1700, 1630, 1466 e 1384.

G4: 30-hidroxi-lup-20(29)-en-3-ona

Aspecto físico: Sólido branco

Ponto de fusão: 178 - 180,8 °C (Lit. 184 - 185 °C; TINTO et al., 1992),

Solubilidade: Solúvel em clorofórmio. Insolúvel em hexano.

Fórmula molecular: C₃₀H₄₈O₂

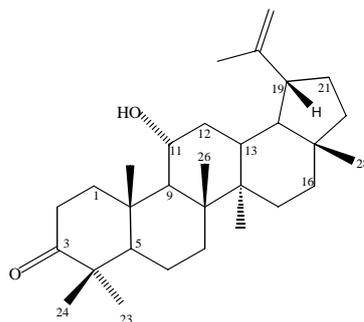
Massa molecular: 440 g/mol

IV (KBr, cm⁻¹): 3548, 3079, 2957, 2939, 2866, 1380, 1697, 1644, 1455, 1075 e 1010.

EM- m/z: 441 [M+1] (10%; C₃₀H₄₈O₂); 422 [M-H₂O] (5%); 234 [M-C₁₄H₂₂O]⁺ (7%), 221 [M-C₁₇H₂₅O]⁺ (23%), 205 [M-C₁₆H₂₇O] (61%) e 55 (100).

RMN de ¹H (400 MHz; CDCl₃; δ): 1,30-1,40 (*m*, H-1β); 1,89 (*ddd*, H-1α, *J* = 13,2; 8,6 e 7,5 Hz); 1,30-1,40 (*m*, H-1β); 2,39 (*ddd*, H-2α, *J* = 15,7; 7,5 e 9,7 Hz); 2,40 (*ddd*, H-2β, *J* = 15,7; 7,7 e 4,5 Hz); 2,29 (*td*, 1H, H-19, *J* = 11,2 e 5,4 Hz); 1,30-1,40 (*m*, 1H, H-5); 1,40-1,50 (*m*, H-6); 1,40-1,50 (*m*, H-7β); 1,40-1,45 (*m*, 1H, H-9); 1,45-1,48 (*m*, H-11α); 1,20-1,30 (*m*, H-11β); 1,13 (*m*, H-12); 1,00-1,10 (*m*, H-15α); 1,60-1,80 (*m*, H-15β); 1,40 (*m*, H-16α); 1,50-1,55 (*m*, H-16β); 1,30-1,40 (*m*, H-21α); 2,00-2,10 (*m*, H-21β); 1,26-1,40 (*m*, H-22), 1,07 (*s*, 3H, H-23); 1,02 (*s*, 3H, H-24); 0,93 (*s*, 3H, H-25); 1,06 (*s*, 3H, H-26); 0,96 (*s*, 3H, H-27); 0,79 (*s*, 3H, H-28); 4,91 (*s*, H-29a); 4,94 (*s*, H-29b) e 4,15 (*dd*, H-30, *J* = 14,5 e 1,4 Hz).

RMN de ¹³C (100 MHz, CDCl₃, δ): 39,58 (C-1); 34,14 (C-2); 218,25 (C-3); 47,32 (C-4); 54,87 (C-5); 19,67 (C-6); 33,57 (C-7); 40,79 (C-8); 49,72 (C-9); 36,86 (C-10); 21,55 (C-11); 26,67 (C-12); 38,11 (C-13); 42,85 (C-14); 27,39 (C-15); 35,40 (C-16); 43,01 (C-17); 48,83 (C-18); 43,77 (C-19); 154,71 (C-20); 31,75 (C-21); 39,82 (C-22); 26,67 (C-23); 21,04 (C-24); 15,98 (C-25); 15,80 (C-26); 14,46 (C-27); 17,72 (C-28); 106,87 (C-29) e 65,01 (C-30).

G5: 11 α -hidroxi-lup-20(29)-en-3-ona

Aspecto físico: Sólido branco.

Ponto de fusão: 155,8-158,6 °C,

Solubilidade: Solúvel em clorofórmio. Insolúvel em hexano.

Fórmula molecular: C₃₀H₄₈O₂

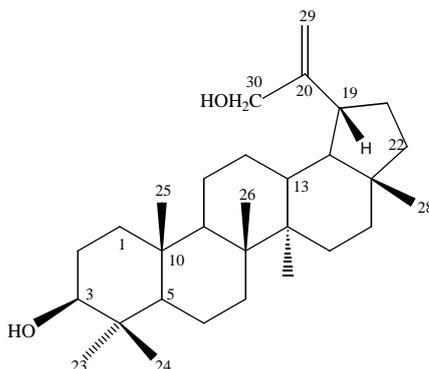
Massa molecular: 440 g/mol

IV (KBr, cm⁻¹): 3500-3000; 2940; 2850; 1700-1650 e 1400-1385.

EM- m/z: 440 [M⁺] (4%; C₃₀H₄₈O₂); 423 [M-OH] (15%); 218 [M-C₁₅H₂₆O]⁺ (15%) e 41 (100%).

RMN de ¹H (400 MHz; CDCl₃, δ): 2,67 (*ddd*, H-1 α , *J* = 13,7; 8,1 e 5,6 Hz); 1,60-1,70 (*m*, H-1 β); 2,42-2,52 (*m*, H-2); 1,49 (*m*, 1H, H-5); 1,46 (*m*, H-6); 1,43 (*m*, H-7); 1,46 (*m*, 1H, H-9); 3,91 (*dt*, H-11, *J* = 10,8 e 5,1 Hz); 1,94-2,00 (*m*, H-12); 1,83 (*ddd*, H-13, *J* = 13,2; 11,4 e 3,8 Hz); 1,60-1,70 (*m*, H-15); 1,41 (H-16 β); 1,50 (*m*, H-16 α); 1,41 (*m*, H-18); 2,34-2,43 (*m*, 1H, H-19); 1,90-1,96 (*m*, H-21 α); 1,40 (*m*, H-21 β); 1,44 (*m*, H-22 α); 1,20 (*m*, H-22 β); 1,09 (*s*, 3H, H-23); 1,06 (*s*, 3H, H-24); 0,79 1,07 (*s*, 3H, H-25); 1,07 (*s*, 3H, H-26); 0,98 (*s*, 3H, H-27); (*s*, 3H, H-28); 4,59 (*s*, H-29a); 4,72 (*s*, H-29b) e 1,69 (*sl*, H-30);

RMN de ¹³C (100 MHz, CDCl₃, δ): 42,07 (C-1); 34,21 (C-2); 218,84 (C-3); 47,63 (C-4); 54,76 (C-5); 19,64 (C-6); 34,27 (C-7); 42,41 (C-8); 54,87 (C-9); 38,20 (C-10); 70,49 (C-11); 37,44 (C-12); 37,17 (C-13); 42,61 (C-14); 27,41 (C-15); 35,40 (C-16); 43,05 (C-17); 47,63 (C-18); 47,70 (C-19); 150,20 (C-20), 29,78 (C-21); 39,80 (C-22); 27,46 (C-23); 20,77(C-24); 16,71 (C-25); 16,86 (C-26); 14,42 (C-27); 18,08 (C-28); 109,95 (C-29) e 19,37 (C-30).

G6;F5: 3β-30-di-hidroxi-lup-20(29)-eno

Aspecto físico: Sólido branco.

Ponto de fusão: 199- 201 °C (Lit. 230-232 °C; ABDEL-MOGIB, 1999),

Solubilidade: Solúvel em clorofórmio. Insolúvel em hexano.

Formula molecular: C₃₀H₅₀O₂

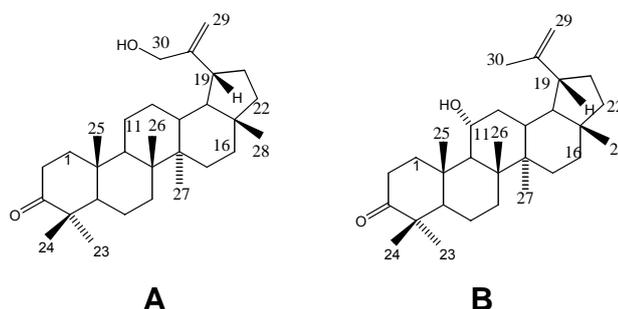
Massa molecular: 442 g/mol

IV (KBr, cm⁻¹): 3420; 2937, 2862, 1648, 146, 1390, 1069, 648 e 610.

EM- m/z: 442 [M⁺] (3%; C₃₀H₅₀O₂); 424 ([M-H₂O]4%); 384 [M-C₃H₂O] (5%); 220 [M-C₁₅H₂₄O]⁺ (18%); 205 [M-C₁₆H₂₉O] (14%); 43 (100%) e 41 (85%).

RMN de ¹H (400 MHz; CDCl₃; δ): 0,85-0,90 (*m*; H-1β); 1,60-1,65 (*m*; H-1α); 1,60-1,65 (*m*; H-2); 1,70-1,75 (*m*; H-2'); 3,19 (*dd*; 1H; *J* = 10,5 e *J* = 5,2 Hz; H-3); 0,60-0,70 (*m*; 1H; H-5); 1,50 (*m*; H-6α); 1,37-1,40 (*m*; H-6β); 1,35-1,40 (*m*; H-7α); 1,00-1,20 (*m*; H-7β); 1,23 (*m*; 1H; H-9); 1,30-1,35 (*m*; H-11α); 1,15-1,20 (*m*; H-11β); 1,40 (*m*; H-12α); 1,00-1,10 (*m*; H-12β); 1,60-1,65 (*m*; 1H; H-13); 1,50-1,60 (*m*; H-15); 1,65-1,70 (*m*; H-15'); 1,35-1,50 (*m*; H-16α e H-16β); 1,44 (*m*; 1H; H-18); 2,29 (*td*; 1H; *J*=11,4 e *J*=5,6 Hz; H-19); 1,30-1,35 (*m*; H-21α); 1,20-1,30 (*m*; H-22α); 1,30-1,40 (*m*; H-22β); 0,98 (*s*; 3H; H-23); 0,78 (*s*; 3H; H-24); 0,83 (*s*; 3H; H-25); 1,02 (*s*; 3H; H-26); 0,94 (*s*; 3H; H-27); 0,78 (*s*; 3H; H-28); 4,99 (*s*; H-29a) e 5,00 (*dd*; *J*=2,8 e *J*=1,6 Hz; H-29b) e 4,11 (*d*; *J*=14,7 Hz; H-30); 4,16 (*d*; *J*=14,7 Hz; H-30');

RMN de ¹³C (100 MHz; CDCl₃; δ): 38,94 (C-1); 27,46 (C-2); 78,77 (C-3); 38,80 (C-4); 55,38 (C-5); 18,35 (C-6); 33,36 (C-7); 40,89 (C-8); 50,44 (C-9); 37,19 (C-10); 21,02 (C-11); 26,66 (C-12); 38,05 (C-13); 42,81 (C-14); 27,46 (C-15); 35,52 (C-16); 43,03 (C-17); 48,86 (C-18); 43,78 (C-19); 155,16 (C-20); 31,79 (C-21); 39,89 (C-22); 28,08 (C-23); 15,40 (C-24); 16,01 (C-25); 16,14 (C-26); 14,56 (C-27); 17,73 (C-28); 106,42 (C-29) e 64,63 (C-30).

G7: Mistura de 30-hidroxi-lup-20(29)-en-3-ona (A) e 11 α -hidroxi-lup-20(29)-en-3-ona (B)

Aspecto físico: Sólido branco amorfo

Ponto de fusão: 166,9-168,3 °C

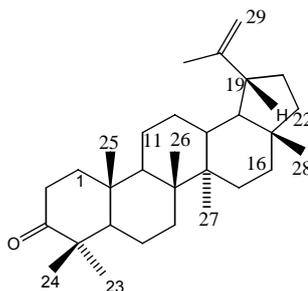
Solubilidade: Solúvel em clorofórmio. Insolúvel em hexano.

IV (KBr, cm⁻¹): 3540, 3443, 3078, 2887, 2840, 1699, 1645, 1456, 1381 e 1003.

RMN de ¹³C (100 MHz; CDCl₃; δ):

Dados para a molécula A: 39,61 (C-1); 34,15 (C-2); 47,33 (C-4); 19,66 (C-6); 33,62 (C-7); 40,84 (C-8); 49,77 (C-9); 21,59 (C-11); 26,71 (C-12); 38,17 (C-13); 42,89 (C-14); 43,04 (C-17); 48,89 (C-18); 43,81 (C-19); 154,74 (C-20); 31,79 (C-21); 39,83 (C-22); 26,71 (C-23); 21,05 (C-24); 15,99 (C-25); 15,83 (C-26); 14,49 (C-27); 17,75 (C-28); 106,96 (C-29); e 65,07 (C-30).

Dados para a molécula B: 42,64 (C-1); 34,28 (C-2); 47,67 (C-4); 54,79 (C-5); 19,70 (C-6); 34,25 (C-7); 42,44 (C-8); 54,93 (C-9); 38,23 (C-10); 70,51 (C-11); 37,50 (C-12); 37,21 (C-13); 42,09 (C-14); 27,43 (C-15); 39,85 (C-16); 43,06 (C-17); 47,64 (C-18); 47,72 (C-19); 150,23 (C-20); 29,81 (C-21); 35,44 (C-22); 27,47 (C-23); 20,79 (C-24); 16,70 (C-25); 16,87 (C-26); 14,44 (C-27); 18,09 (C-28); 109,94 (C-29); e 19,38 (C-30).

G8: Lupenona

Aspecto físico: Sólido branco.

Ponto de fusão: 199-201 °C (Lit.: 172-174 °C; CHAKRAVARTI e MITRA, 1964)

Solubilidade: Solúvel em clorofórmio.

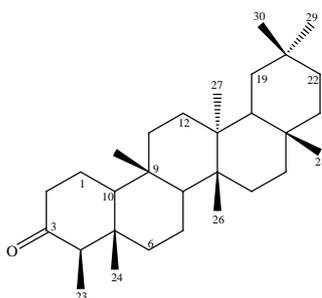
Fórmula molecular: C₃₀H₄₈O

Massa molecular: 424 g/mol

IV (KBr, cm⁻¹): 3447, 2927, 2868, 1714 e 1458.

RMN de ¹H (400 MHz; CDCl₃; δ): 4,57 (m), 4,68 (m), 1,68 (s); 1,25 (s); 1,07 (s); 1,02 (s); 0,95 (s); 0,93 (s) e 0,79 (s).

RMN de ¹³C (100 MHz; CDCl₃; δ): 39,64 (C-1); 34,17 (C-2); 218,18 (C-3); 47,35 (C-4); 54,96 (C-5); 19,70 (C-6); 33,59 (C-7); 40,82 (C-8); 49,82 (C-9); 36,91 (C-10); 21,49 (C-11); 25,19 (C-12); 37,45 (C-13); 42,82 (C-14); 35,54 (C-16); 43,01 (C-17); 48,28 (C-18); 47,98 (C-19); 154,89 (C-20); 29,86 (C-21); 39,99 (C-22); 26,67 (C-23); 21,05 (C-24); 15,98 (C-25); 15,80 (C-26); 14,50 (C-27); 18,03 (C-28); 109,40 (C-29) e 19,33 (C-30).

G9; F2; F7: Friedelina

Aspecto físico: Sólido branco cristalino em forma de agulhas

Ponto de fusão: 237-239 °C (Lit.: 260-263; SALAZAR, 2005)

Solubilidade: Solúvel em clorofórmio.

Fórmula molecular: C₃₀H₅₀O

Massa molecular: 426 g/mol

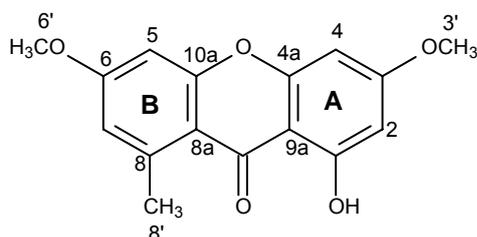
IV (KBr, cm^{-1}): 2924, 2862, 1715, 1468 e 1389.

EM- m/z : 426 [M^+] (20,10%), 411 (6,55%), 341 (4,74%), 302 (12,80%), 246 (28,56%), 231 (39,36%), 218 (35,27%), 204 (49,57%), 191 (12,89%), 163 (32,24%), 123 (62,22%), 109 (76,06%), 95, 81 (100%) e 69 (98,41 %).

RMN de ^1H (400 MHz; CDCl_3 ; δ): 2,41(*m*), 1,93 (*m*), 1,18 (*s*); 1,05 (*s*); 1,01 (*s*); 1,00 (*s*); 0,95 (*s*); 0,87 (*s*); 0,88 (*d*, $J = 6,00$, H2) e 0,73 (*s*).

RMN de ^{13}C (100 MHz; CDCl_3 ; δ): 22,28 (C-1); 41,53 (C-2); 213,32 (C-3); 58,21 (C-4); 42,15 (C-5); 41,27 (C-6); 18,23 (C-7); 53,09 (C-8); 37,43 (C-9); 59,45 (C-10); 35,61 (C-11); 30,50 (C-12); 39,69 (C-13); 38,28 (C-14); 32,41 (C-15); 35,99 (C-16); 29,99 (C-17); 42,76 (C-18); 35,33 (C-19); 28,17 (C-20); 32,75 (C-21); 39,25 (C-22); 6,84 (C-23); 14,66 (C-24); 17,95 (C-25); 20,26 (C-26); 18,68 (C-27); 32,09 (C-28); 35,03 (C-29) e 31,78 (C-30).

G10: 1-hidroxi-3,6-dimetoxi-8-metil-9-xantona



Aspecto físico: Sólido cristalino de cor amarelada

Ponto de fusão: 160,5-162,0 °C (Lit.: 165-166 °C; CALDERON et al., 2002)

Solubilidade: Solúvel em CHCl_3 , CH_2Cl_2 .

Fórmula molecular: $\text{C}_{16}\text{H}_{14}\text{O}_5$

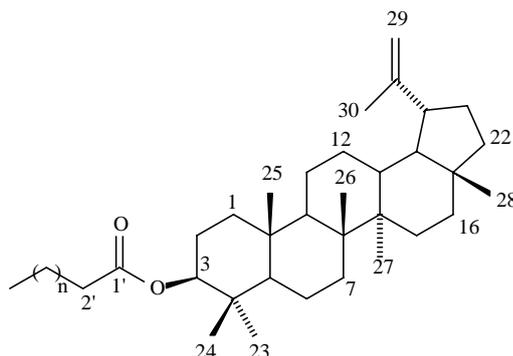
Massa molecular: 286 g/mol

IV (KBr, cm^{-1}): 3467, 2917, 2849, 1462, 1376 e 1708 cm^{-1} .

EM- m/z : 286 [M^+] (100%), 287 [$\text{M} + \text{H}$] (16,42%), 285 [$\text{M} - \text{H}$] (15,81%), 257 (76,96%), 256 (18,25%), 243 (13,92%) e 129 (26,32%).

RMN de ^1H (400 MHz; CDCl_3 ; δ): 6,31 (*d*, $J = 2,30$; H-2), 3,87 (*s*, H-3'); 6,33 (*d*, $J = 2,30$; H-4), 6,69 (*d*, $J = 2,5$; H-5); 6,67 (*m*; H-7); 3,90 (*s*; H-6') e 2,86 (*s*; H-8').

RMN de ^{13}C (100 MHz; CDCl_3 ; δ): 165,92 (C-1); 96,80 (C-2); 165,86 (C-3); 55,66 (C-3'); 157,04 (C-4a); 92,11 (C-4); 98,51 (C-5); 163,79 (C-6); 55,72 (C-6'); 115,46 (C-7); 143,52 (C-8a); 113,03 (C-8); 23,44 (C-8'). 104,14 (C-9a); 182,45 (C-9); 159,50 (C-10a);

G11: 3 β -esteariloxi-lupan-20(29)-eno

Aspecto físico: Material pastoso esbranquiçado

IV (KBr, cm⁻¹): 2920, 2850, 1463, 1379 e 1734.

EM- m/z: 218 (4,26%), 203 (3,64%), 189 (4,34%) e 408 (0,45%).

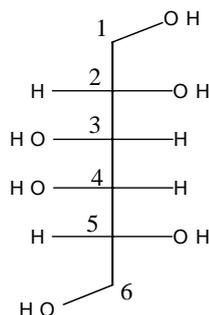
Solubilidade: Solúvel em hexano.

Fórmula molecular: C₄₈H₈₆O₂

Massa molecular: 693 g/mol

RMN de ¹H (400 MHz; CDCl₃; δ): 1,00 (*m*; H-1); 1,65 (*m*; H-2); 4,50 (*m*; H-3); 0,83 (H-5), 1,40; 1,50 (*m*, H-6); 1,23 (H-7); 1,27 (*m*, H-9); 1,27 (*m*, H-11); 1,10 e 1,65 (*m*; H-12); 1,70 (*m*; H-13); 1,04 e 1,10 (*m*; H-15); 1,40 e 1,51 (*m*; H-16); 1,39 (*m*; H-18); 2,40 (*m*; H-19); 1,27 (*m*; H-21); 1,15 e 1,41 (*m*; H-22); 0,87 (*s*, H-23); 0,90 (*s*, H-24); 0,89 (*s*, H-25); 1,05 (*s*, H-26); 0,93 (*s*, H-27); 0,83 (*s*, H-28); 4,59 e 4,64 (*sl*, H-29), 1,70 (*s*, H-30); 2,30 (*m*, H-2''); 1,27 (H-3'); 1,27 (H-4'); 1,00-1,20 (H-5') e 0,90 (H-18').

RMN de ¹³C (100 MHz; CDCl₃; δ): 38,42 (C-1); 23,77 (C-2); 80,64 (C-3); 37,87 (C-4); 55,42 (C-5); 18,24 (C-6); 32,25 (C-7); 40,89 (C-8); 50,38 (C-9); 37,12 (C-10); 20,98 (C-11); 25,20 (C-12); 38,09 (C-13); 42,87 (C-14); 27,47 (C-15); 35,61 (C-16); 43,07 (C-17); 48,33 (C-18); 48,04 (C-19); 150,97 (C-20); 29,87 (C-21); 40,03 (C-22); 28,00 (C-23); 16,60 (C-24); 16,19 (C-25); 16,00 (C-26); 14,55 (C-27); 18,02 (C-28); 109,36 (C-29); 19,31 (C-30); 173,70 (C-1'); 34,88 (C-2'); 25,28 (C-3'); 29,20 (C-4'); 29,28 (C-5'); 29,38 (C-6'); 29,54 (C-7'); 29,60 (C-8'); 29,72 (C-9'); 29,72 (C-10'); 29,72 (C-11'); 29,72 (C-12'); 29,72 (C-13'); 29,60 (C-14'); 29,49 (C-15'); 31,95 (C-16'); 22,71 (C-17') e 14,12 (C-18').

F1: Dulcitol

Aspecto físico: Sólido branco cristalino

Ponto de fusão: 180-195 °C (Lit.: 174-181 °C; SALAZAR, 2005)

Solubilidade: solúvel em água e insolúvel em metanol e clorofórmio.

Fórmula molecular: C₆H₁₄O₆

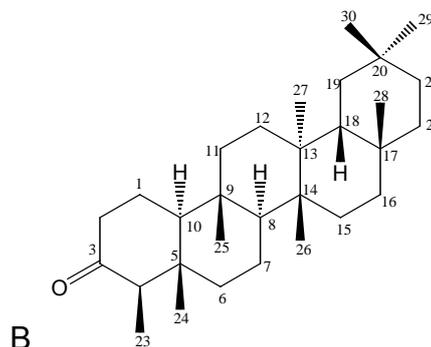
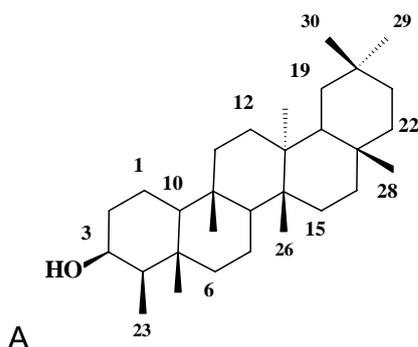
Massa molecular: 182 g/mol

EM- *m/z* : 183 [M]⁺ (0,19%), 133 (10,15%), 103 (13,72%), 73 (100%), 61 (66,49%), e 56 (34,41%),.

IV (KBr, cm⁻¹): 3312; 1636, 1464, 1115, 1048 e 924.

RMN de ¹H (400 MHz; D₂O; δ): 3,98 (*dd*; 4H; *J*=6,2 e 6,6 Hz; H-1 e H-6); 3,70 (*s*; 2H; H-3 e H-4); 3,69 (*d*; 2H; *J*= 6,8 Hz; H-1 e H-6).

RMN de ¹³C (100 MHz; D₂O; δ): 63,28 (C-1 e C-6); 69,43 (C-3 e C-4); 70,22 (C-2 e C-5).

F3; F4; F8: Mistura de Friedelinol e Friedelina

Aspecto físico: Sólido branco

Ponto de fusão: 261-263 °C

IV (KBr, cm⁻¹): 3486, 2930, 2862, 1706, 1452, 1386 e 586.

Solubilidade: Solúvel em clorofórmio.

RMN de ^{13}C (100 MHz; CDCl_3 ; δ): Dados para a molécula A: 73,01 (C-3); 53,43 (C-4); 38,06 (C-5); 41,79 (C-6); 53,34 (C-8); 37,34 (C-9); 61,57 (C-10); 35,79 (C-11); 30,88 (C-12); 36,31 (C-16); 38,53 (C-13); 39,53 (C-14); 35,41 (C-19); 28,17 (C-20); 30,26 (C-17); 42,41 (C-18); 32,57 (C-15); 33,05 (C-21); 10,22 (C-23); 14,63 (C-24); 18,17 (C-25); 18,92 (C-27); 20,38 (C-26); 32,34 (C-28) e 35,29 (C-29).

Dados para a molécula B: 22,54 (C-1); 41,95 (C-2); 58,47 (C-4); 41,53 (C-6); 37,68 (C-9); 59,71 (C-10); 35,87 (C-11); 39,91 (C-13); 38,61 (C-14); 30,76 (C-12); 32,66 (C-15); 36,25 (C-16); 43,04 (C-18); 30,26 (C-17); 33,05 (C-21); 35,58 (C-19); 28,43 (C-20); 7,09 (C-23); 16,03 (C-24); 17,79 (C-25); 20,51 (C-26); 18,50 (C-27); 32,34 (C-28) e 35,29 (C-29).

F6: Mistura de ésteres de cadeia longa

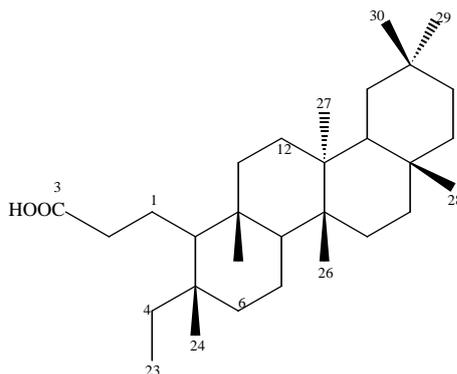
Aspecto físico: Material pastoso esbranquiçado

Ponto de fusão: 51-57 °C

IV (KBr, cm^{-1}): 2922, 2846, 1734, 1460, 1368, 1260 e 803.

Solubilidade: Solúvel em hexano.

F9; F10: Ácido 3,4-seco-friedelan-3-óico



Aspecto físico: Sólido branco

Ponto de fusão: 176-179 °C (Lit.: 117-119 °C; VIEIRA FILHO et al., 2001)

Solubilidade: Solúvel em clorofórmio.

Fórmula molecular: $\text{C}_{30}\text{H}_{52}\text{O}_2$

Massa molecular: 444 g/mol

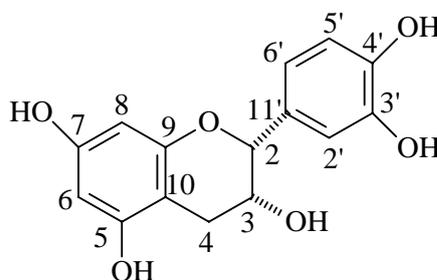
IV (KBr, cm^{-1}): 3430, 2924, 2866, 1710, 1458 e 1389.

EM- m/z : 444 $[M]^+$ (2,77%), 429 $[M-15]$ (8,46%), 218 (27,06%), 205 (20,41%), 149 (21,78%), 123 (36,89%), 109 (56,36%), 95 (81,74%), 81 (69,81%), 69 (81,86%) e 55 (100%).

RMN de 1H (400 MHz; $CDCl_3$; δ): 1,59 (H-1); 2,39 (*ddd*, $J = 8,56$; 8,12 e 1,2 Hz; H-2); 1,37 e 1,12 (H-4); 1,55 e 1,17 (H-6); 1,41 (*m*, H-7); 1,26 (*m*, H-8); 0,86 (*m*, H-10); 1,45 (*m*, H-11); 1,29 (*m*, H-12); 1,30 e 1,54 (*m*, H-15); 1,39 (*m*, H-16); 1,57 (*m*, H-18); 1,26 (*m*, H-19); 1,34 e 1,50 (*m*, H-21); 0,97 e 1,55 (*m*, H-22); 0,78 (*t*; H-23); 0,79 (*s*; H-24); 0,88 (*s*; H-25); 0,98 (*s*; H-26); 1,01 (*s*; H-27); 1,17 (*s*; H-28); 0,95 (*s*; H-29) e 0,99 (*s*; H-30).

RMN de ^{13}C (100 MHz; $CDCl_3$; δ): 21,03 (C-1); 37,49 (C-2); 179,63 (C-3); 36,05 (C-4); 37,81 (C-5); 38,89 (C-6); 18,08 (C-7); 52,96 (C-8); 39,02 (C-9); 59,78 (C-10); 35,28 (C-11); 29,71 (C-12); 39,60 (C-13); 38,89 (C-14); 32,25 (C-15); 36,05 (C-16); 30,19 (C-17); 42,78 (C-18); 35,14 (C-19); 28,16 (C-20); 32,80 (C-21); 39,28 (C-22); 7,60 (C-23); 19,33 (C-24); 17,93 (C-25); 20,15 (C-26); 18,77 (C-27); 32,10 (C-28); 34,99 (C-29) e 31,84 (C-30).

F12: Epicatequina



Aspecto físico: Sólido alaranjado claro

Ponto de fusão: 226-228 °C (Lit.: 234-236 °C; CHUL et al., 1988)

Solubilidade: Solúvel em metanol. Insolúvel em hexano.

Fórmula molecular: $C_{15}H_{14}O_6$

Massa molecular: 290 g/mol

IV (KBr, cm^{-1}): 3503, 3446, 3402, 2931, 1620, 1520, 1441 e 1144.

RMN de 1H (400 MHz; $CDCl_3$; δ): 4,83 (*sl*; H-2); 4,17 (*sl*, H-3); 2,75 ($J = 4,52$; 16,76; H-4_{ax}) e 2,63 ($J = 2,52$; 16,76; H-4_{eq}); 5,91 (H-5); 5,94 (*d*; $J = 2,12$ Hz; H-7); 6,97 (*sl*; H-2'); 6,75 (*d*; $J = 8,12$ Hz; H-5') e 6,79 (*d*; $J = 8,16$ Hz; H-6').

RMN de ^{13}C (100 MHz; CDCl_3 ; δ): 80,05 (C-2); 67,65 (C-3); 29,40 (C-4); 157,84 (C-5); 96,06 (C-6); 157,53 (C-7); 96,58 (C-8); 158,15 (C-9); 100,25 (C-10); 132,45 (C-11); 115,50 (C-2'); 146,11 (C-3'); 145,95 (C-4'); 116,06 (C-5'); 119,56 (C-6').

F13: Óleo essencial das folhas

Aspecto físico: líquido amarelo

Solubilidade: Solúvel em hexano e clorofórmio.

IV (KBr , cm^{-1}): 2956, 2925, 2855, 1739, 1463, 1377 e 669.

Se1 e Se2: Óleo das sementes e do do elaisoma

Aspecto físico: Material pastoso, esbranquiçado.

Solubilidade: Solúvel em hexano e clorofórmio.

IV (KBr , cm^{-1}): 2918, 2852, 1744, 1458, 1362, 1226, 1160, 1092 e 716.

Dados referentes a CG-EM

Composto	T_R	Se1H (%)	Se2H (%)	Se1C (%)	Se2C (%)
Ácido benzóico	11,928	4,41	3,25	0,14	
Glicerol	14,143	0,22	0,29	0,43	0,86
Ácido hexanodióico	21,067	3,88	6,58	13,44	19,44
Ácido mirístico	30,860	0,40	0,47	1,07	0,81
Palmitato de etila	34,302	1,49		0,37	
Ácido palmitoléico	35,242	2,04	0,74	0,89	0,76
Ácido palmítico	36,211	15,07	9,50	8,72	5,13
Ácido heptadecanóico	38,164		0,31	0,39	0,27
Octadecanoato de etila	38,279	5,31			
Octadecan-1-ol	38,630		0,35	0,58	0,64
Acido linoléico	39,753	13,46	12,93	4,89	0,78
Ácido oléico	40,375	26,12	14,56	6,80	2,17
Ácido esteárico	40,875	14,43	3,87	3,30	2,58
Tetracosano	44,009	6,50	10,61	24,47	24,21
Ácido eicosanóico	44,635	0,70		1,06	0,81
Esqualeno	51,632	0,22			
Ác. Tetracosanóico	52,142	0,20	0,47	0,91	1,68
Estigmasterol	61,443	0,66	1,32	0,62	1,68

CAPÍTULO 3- Transformações químicas

3.1. Transformações químicas realizadas em friedelina

3.1.1 - Introdução

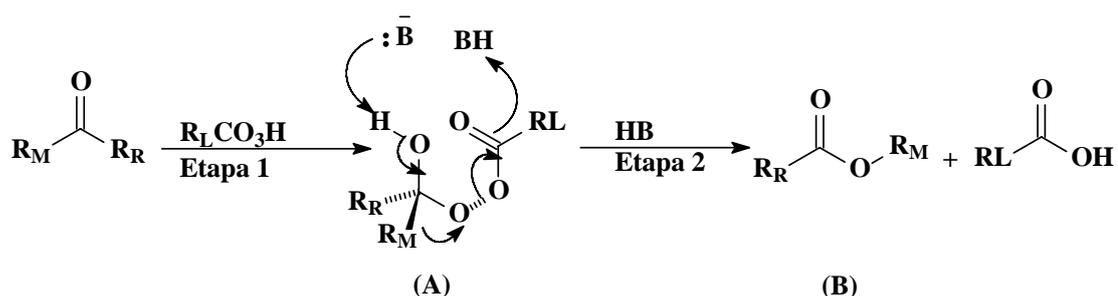
Os triterpenos pentacíclicos (TTPC) do tipo friedelano estão presentes em diversas espécies da família Celastraceae em quantidades apreciáveis (VIEIRA FILHO, 2002; CORSINO et al., 2000) e são também objeto de grande interesse para diversas reações de transformação química (DUTTA e RAY, 1991; PATRA e CHAUDHURI, 1989; TALAPATRA et al., 1983). Os seco-triterpenos são terpenóides que possuem um de seus anéis abertos e muitos deles possuem ruptura entre a ligação C3-C4, além de grupo carboxila em C3. O ácido 3,4-seco-friedelan-3-óico é encontrado em várias espécies da família *Celastraceae* (VIEIRA FILHO et al., 2001; MIRANDA, 2004), porém em pequenas proporções. Ações citotóxicas (BAAS, 1995) e inibitórias da síntese de ATP são atribuídas a esse triterpeno, o que o torna um herbicida potencial, ou ainda um possível protótipo para o desenvolvimento de herbicidas verdes (SILVA et al., 2007).

A conversão de TTPC do tipo friedelano à friedelinolactona e posterior obtenção dos seco-triterpenos 3,4-seco-friedelan-3,4-diol, 3,4-seco-friedelan-3-ol-4-ona e de seu hidróxiácido é relatada por Patra (PATRA e CHAUDHURI, 1989).

A reação de Bayer-Villiger é um importante processo para a síntese de lactonas, ésteres ou derivados de álcoois e ácidos a partir de cetonas, envolvendo a reação da cetona com um perácido (HARMATA & RASHATASAKHON, 2002).

Tais reações são conhecidas desde 1899, quando Bayer e Villiger relataram a oxidação da cânfora e outras cetonas alicíclicas a lactonas pelo tratamento com ácido per-monossulfúrico (BAYER e VILLIGER, 1899). Desde então, esta reação tem sido realizada utilizando diversos perácidos (KOBAYASHI et al., 2003; SMISSMAN

et al., 1968). A reação ocorre em duas etapas (ESQUEMA 3.1). Na etapa 1, a adição do perácido à cetona carbonílica fornece um intermediário de Criegee (**A**). Na etapa 2, que é determinante para a velocidade da reação, o intermediário **A** rearranja-se para o produto **B**; a migração do grupo R_M do carbono para o oxigênio (etapa 2) ocorre simultaneamente com a quebra da ligação O-O. Catalisadores ácidos facilitam a quebra da ligação O-O pela protonação do oxigênio carbonílico. Bases auxiliam o rearranjo através da remoção do próton da hidroxila (KROW, 1992)



Esquema 3.1: Mecanismo geral da reação de Bayer-Villiger.

Fonte: KROW, R. G, 1992.

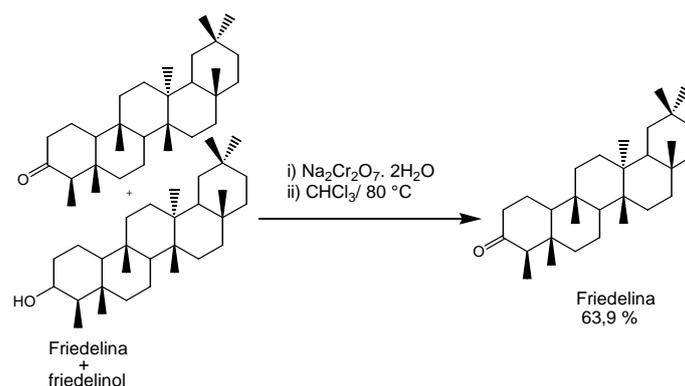
Devido à importância biológica verificada para o ácido 3,4-seco-friedelan-3-óico e a sua promissora atividade herbicida, realizaram-se reações de oxidação, a partir da friedelina, seguidas de tratamento com metóxido de sódio com o propósito de se obter o ácido 3,4-seco-friedelan-3-óico (PATRA e CHAUDHURI, 1989).

3.2 – Resultados e Discussão

Através da análise fitoquímica de *Maytenus imbricata* foi possível verificar que esta espécie também exibe quantidade apreciável dos triterpenos friedelina e friedelinol, que foram então utilizados na tentativa de se obter o ácido 3,4-seco-friedelan-3-óico.

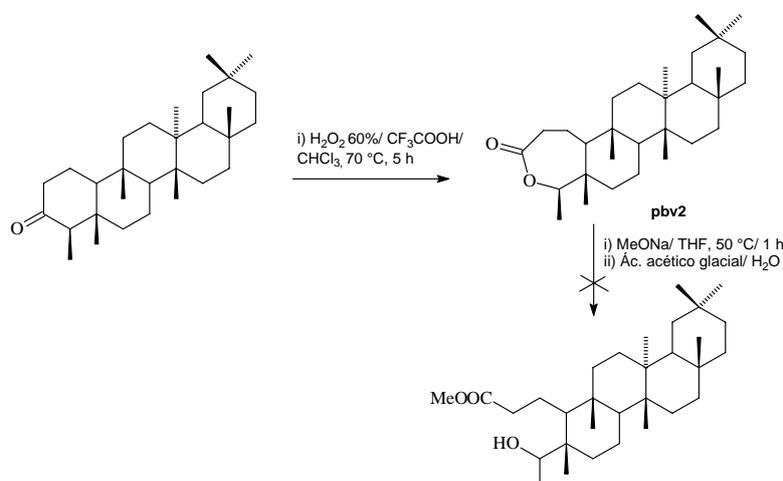
A friedelina submetida à reação de oxidação de Bayer-Villiger (SMISSMAN et al., 1968) foi obtida a partir do fracionamento das folhas do extrato hexânico de *Maytenus imbricata* (pág. 142) e, também, a partir da oxidação do friedelinol presente na mistura isolada destes triterpenos e que continha aproximadamente 75% de friedelinol. A primeira tentativa de oxidar a mistura friedelina e friedelinol foi realizada usando clorocromato de piridínio (PCC) de acordo com metodologia

descrita por HARWOOD e MOODY (1989), porém, embora as análises por CCD indicassem que o friedelinol havia sido consumido, observou-se que o mesmo permanecia na mistura, após a elaboração da reação. Numa segunda tentativa de oxidar essa mistura, empregou-se $\text{Na}_2\text{Cr}_2\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (Organic Synthesis, 1963; técnica modificada), sendo possível obter 174 mg de friedelina, que corresponde a 63,9% de rendimento, de acordo com a proporção de friedelinol presente na mistura (ESQUEMA 3.2).



Esquema 3.2: Obtenção de friedelina a partir da reação de oxidação da mistura friedelina e friedelinol.

Em seguida, a friedelina foi submetida a oxidação de Bayer-Villiger empregando-se a metodologia proposta por SMISSMAN et al. (1968) com algumas modificações. Utilizou-se H_2O_2 60% e CF_3COOH a 70°C por 5 h (ESQUEMA 3.3). O desenvolvimento da reação foi acompanhado por CCD, tendo sido observado após 5 h de reação, ausência da mancha referente ao material de partida (R_f 0,6), em DCM: H (3:2) e formação de uma mancha logo abaixo da friedelina (R_f 0,3).



Esquema 3.3: Tentativa de obtenção do éster metílico do ácido 3,4-seco-friedelan-3-óico a partir da friedelina.

A reação foi então elaborada e o produto obtido, denominado pbv2, submetido a análise por CG-EM e espectroscopia no infravermelho.

O espectro no IV (Fig. 3.1) obtido para pvb2 indica a presença de hidroxila pela banda de absorção em 3447 cm^{-1} . Apresenta ainda banda em 1726 cm^{-1} referente a estiramento da ligação C=O de éster (SILVERSTEIN, 1994) e bandas entre 1380 e 1180 cm^{-1} , atribuídas ao estiramento da ligação C-O.

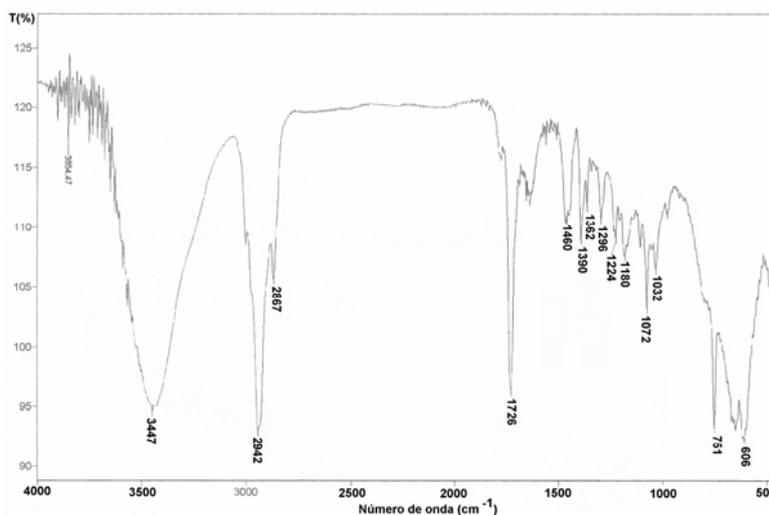


Figura 3.1: Espectro de LF-1 (Friedelinolactona impura no IV (KBr)).

O espectro de Massas (Figura 3.2) apresenta pico do íon molecular em m/z 442 [M^+] (6,4%) indicando assim que a lactona foi formada a partir da friedelina. Apresenta ainda picos de m/z 427 [$M - 15$] (2,2%), 398 [$M - CO_2$]⁺ (9,6%), 383 (4,0%), 218 (22,2%), 205 (30,0%), 191 (21,4%) e 109 (52,8%) característicos da lactona triterpênica, como descrito por MOITEIRO et al. (2006).

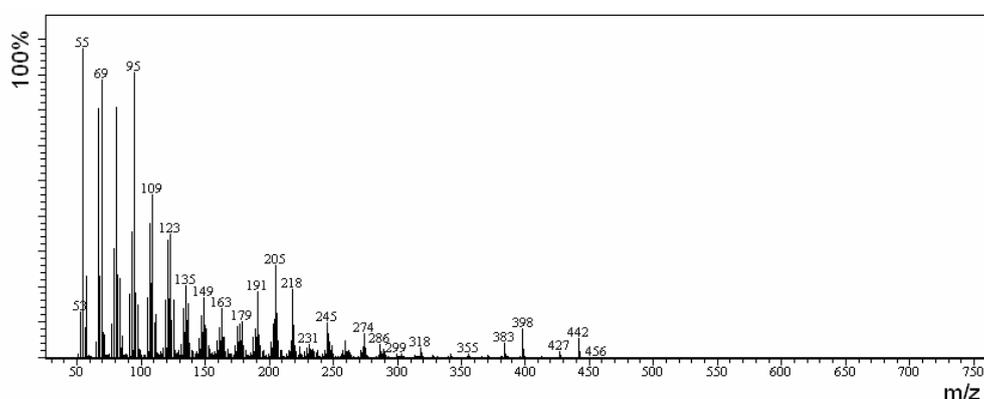


Figura 3.2: Espectro de Massas de LF-1 (friedelinolactona).

Cromatógrafo CG-17A-CG-EM QP5050. Análise por inserção direta no EM, EI, 70 eV. Temperatura $240\text{ }^{\circ}\text{C}$ na interface. A faixa de análise do EM foi de 50 a 750 Daltons.

O espectro de RMN de ^1H (Fig. 3.3) obtido para a amostra pbv2 apresentou vários sinais na região entre δ_{H} 1,20, 1,17, 1,00, 0,99, 0,95, 0,89 e 0,83, referentes aos grupos metila H-23, H-28, H-29, H-27 e H-30, H-26, H-24, H-25, respectivamente.

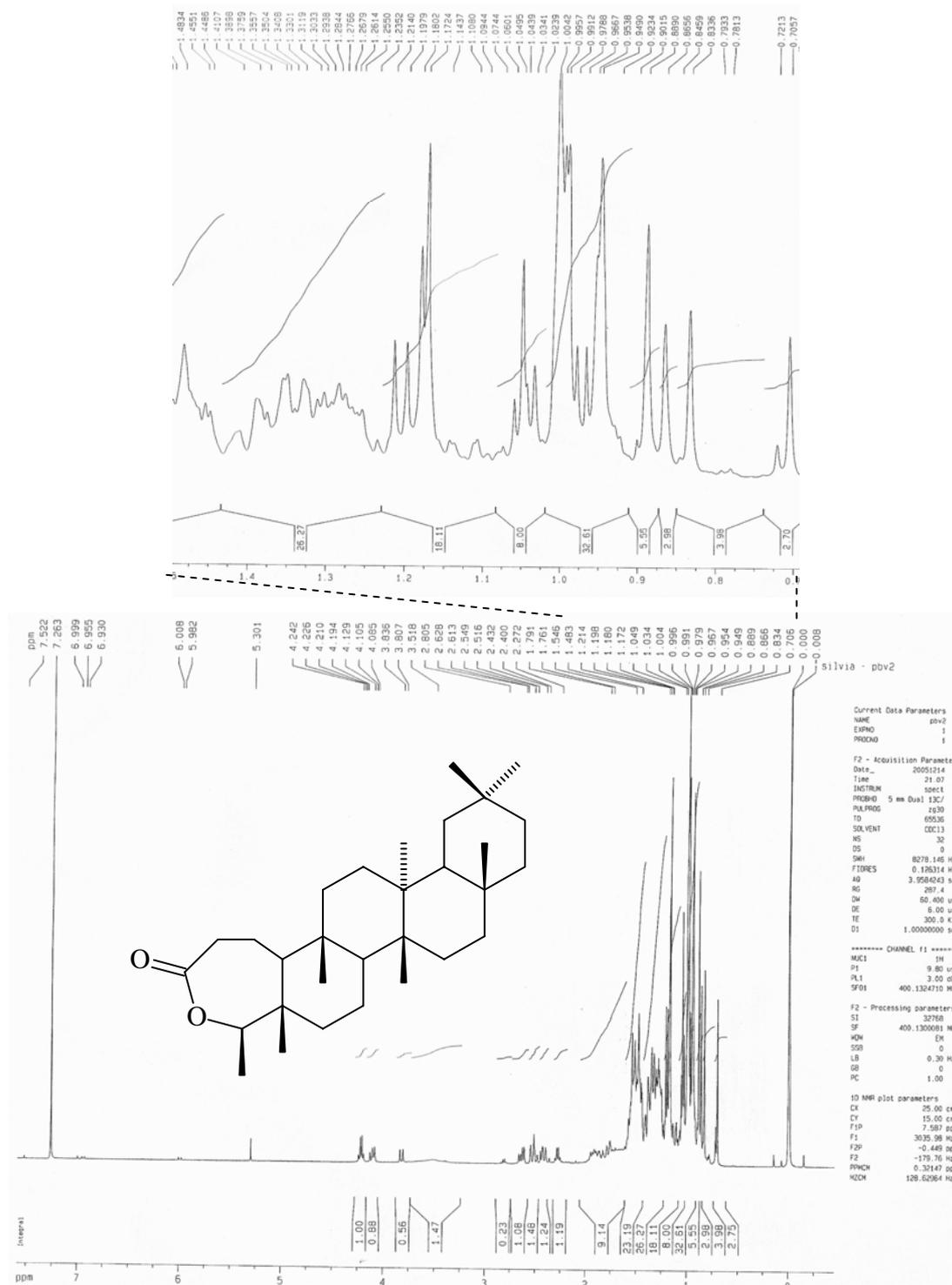


Figura 3.3: Espectro de RMN de ^1H pbv2 (friedelinolactona impura) (CDCl_3 , 400 MHz).

O espectro de RMN de ^{13}C (Figura 3.4) e o subespectro de DEPT 135 (Figura 3.5, pág. 177) mostram a presença de 56 carbonos indicando que a amostra contém impurezas. Porém, foi possível observar os sinais em δ_{C} 175,65, 84,93 e 40,67 referentes aos carbonos C-3, C-4 e C-5 respectivamente, do anel lactônico. Os sinais em δ_{C} 13,46 e 16,22 podem ser atribuídos às metilas C-23 e C-24 (MOITEIRO et al., 2006).

As atribuições dos outros sinais de carbono foram feitas por comparação dos dados de RMN de ^{13}C da friedelina, auxiliada pela análise do subespectro DEPT-135 em comparação com dados da literatura (VIEIRA FILHO, 2002).

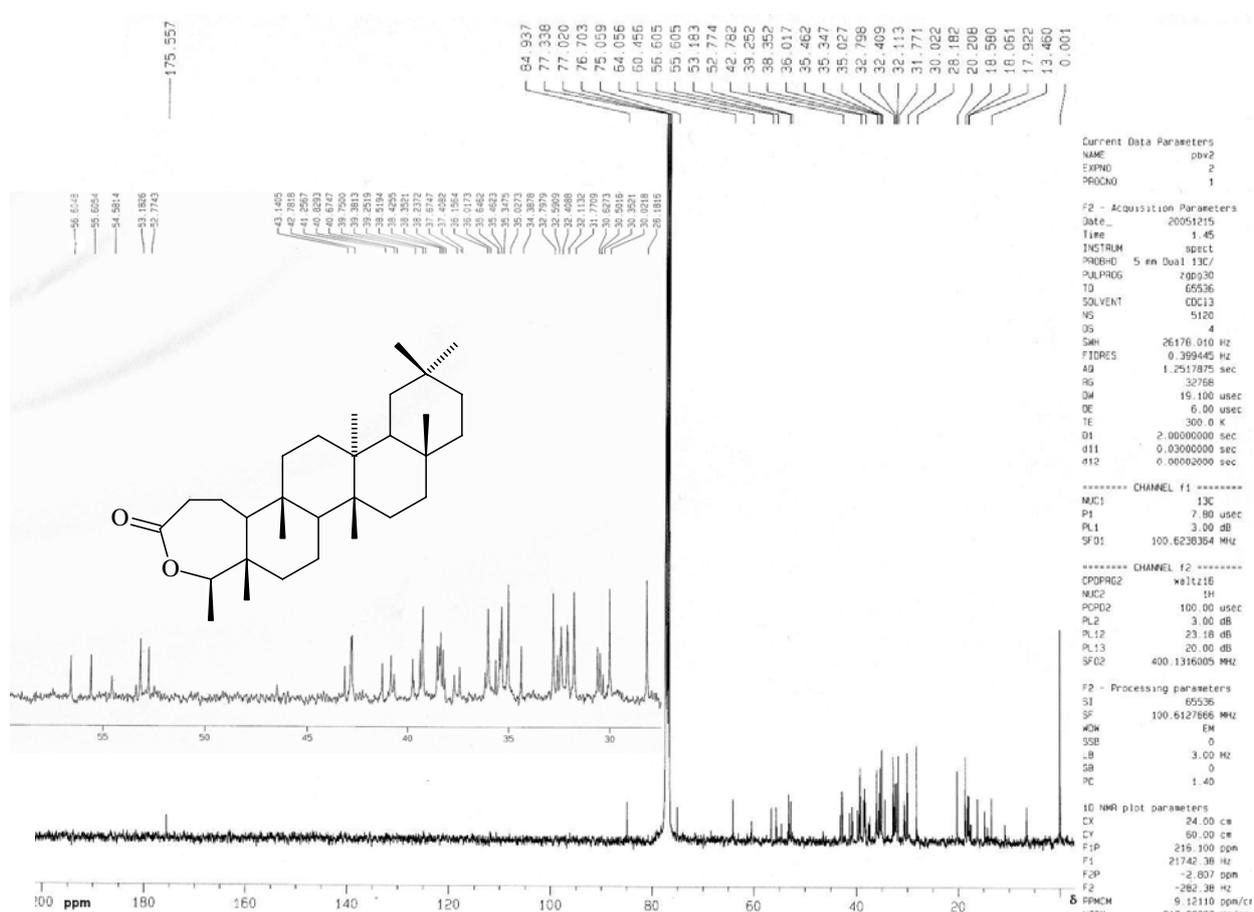


Figura 3.4: Espectro de RMN de ^{13}C de pbv2 (friedelinolactona impura). Em destaque ampliação da região entre δ_{C} 29,7 e 57,00 (CDCl_3 , 100 MHz).

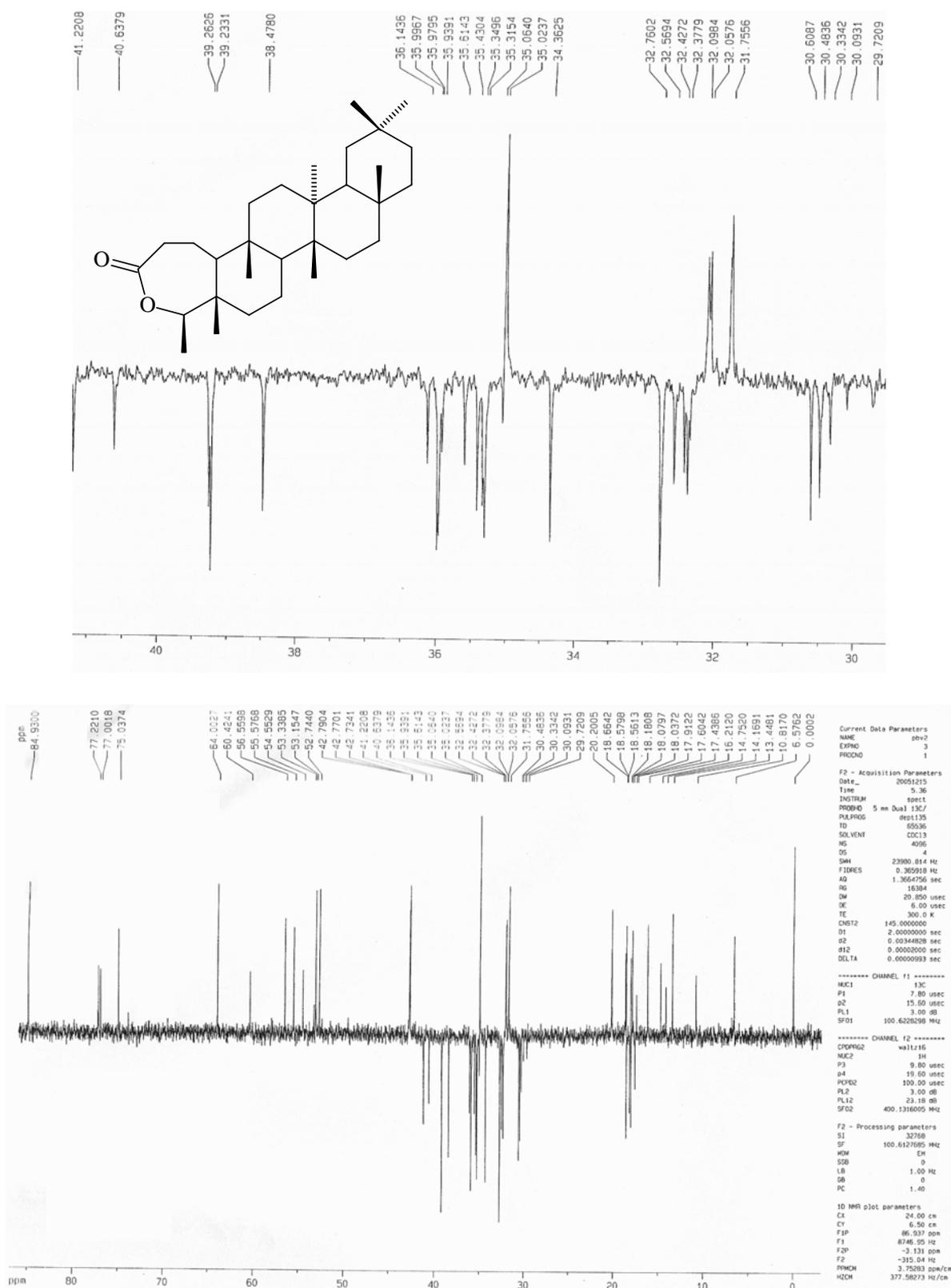


Figura 3.5: Subespectro DEPT-135 de pbv2 (friedelinolactona impura). Em destaque ampliação da região entre δ_c 29,72 e 41,22 ($CDCl_3$, 100 MHz).

Após a obtenção da lactona, a mesma foi submetida à reação com MeONa por 1 h, para que o anel A pudesse ser aberto e posteriormente em reações subseqüentes se obtivesse o ácido 3,4-seco-friedelan-3-óico. O desenvolvimento da reação foi acompanhado por CCD, tendo sido observado após 1 h de reação a formação de um produto (R_f 0,2) em DCM: H (1:1), que foi inicialmente analisado por CG-EM. Embora o pico correspondente ao íon molecular do éster metílico não tenha sido detectado (Figura 3.6), observa-se um pico em m/z 443, que poderia ser referente à perda do fragmento de m/z 31 (CH_3O) do éster. Todavia, o sinal correspondente a grupo metoxílico não foi observado no espectro de RMN de ^1H (Figura 3.7, pág. 179). Estas informações sugerem que o tratamento da lactona com MeONa, leva à abertura do anel, porém, o íon alcóxido formado na abertura do anel, ataca novamente o carbono carbonílico do éster, promovendo a re-lactonização do composto.

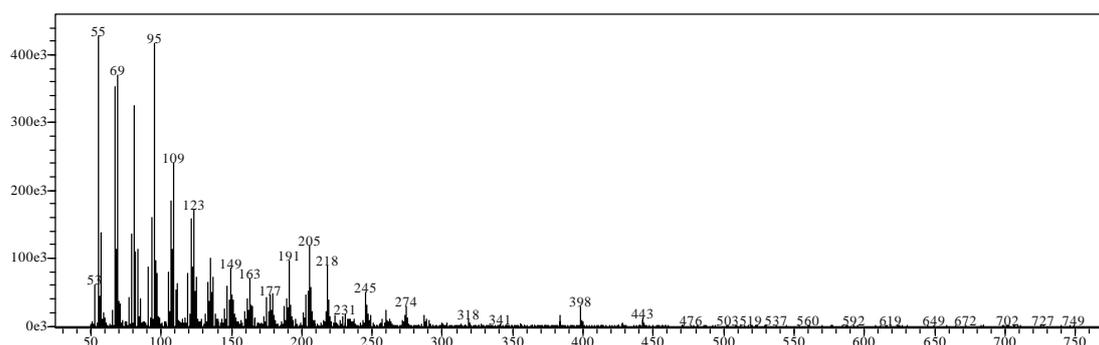


Figura 3.6: Espectro de Massas do produto obtido após reação da lactona com MeONa. Cromatógrafo CG-17A-CG-EM QP5050. Análise por inserção direta no EM, EI, 70 eV. Temperatura 240 °C na interface. A faixa de análise do EM foi de 50 a 750 Daltons.

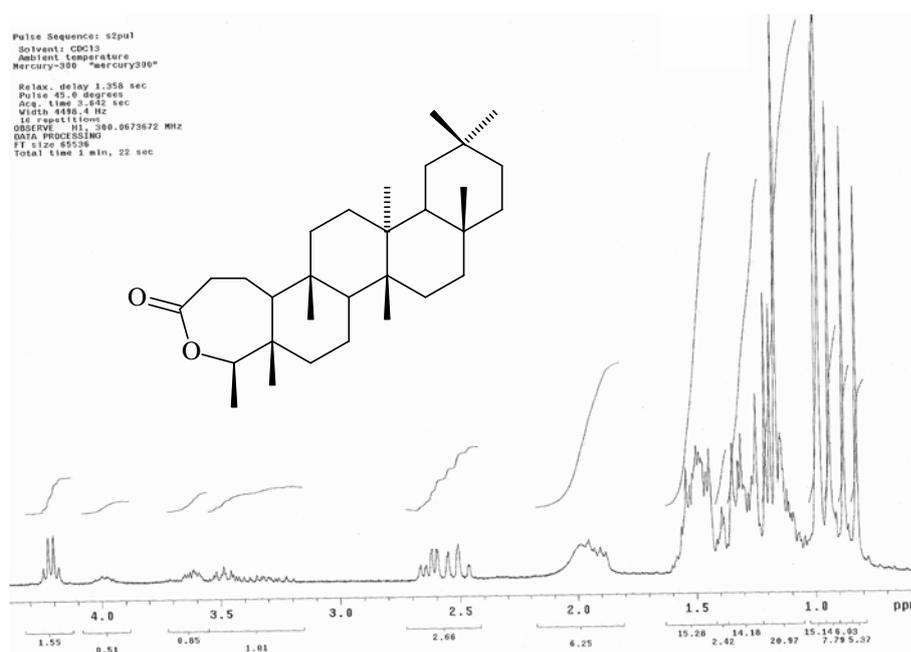


Figura 3.7: Espectro de RMN de ^1H do produto obtido após reação da lactona com MeONa. (CDCl_3 , 300 MHz).

3.3 – Parte experimental

3.3.1- Métodos Gerais

Tetra-hidrofurano foi secado e destilado na presença de sódio metálico utilizando benzofenona como indicador. O DCM e o éter etílico foram tratados de acordo com PERRIM e ARMAREGO (1988). As reações foram monitoradas por cromatografia em camada delgada. As demais condições experimentais são as mesmas descritas na página 131.

3.3.2- Obtenção de friedelina (Oxidação com $\text{Na}_2\text{Cr}_2\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)

Uma massa de 450 mg da mistura friedelina + fridelinol, isolada das folhas de *M. imbricata* (F3), foi dissolvida em 12 mL de CHCl_3 , a temperatura ambiente. Nesta mistura foram adicionados 2 mL de $\text{Na}_2\text{Cr}_2\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ em ácido acético pré-aquecidos a 80 °C, agitando-se por 45 min, e, deixada em repouso, em banho de gelo, por 10 min. Em seguida, a temperatura foi elevada a 25 °C e adicionaram-se 50 mL de água a 15 °C. O produto foi coletado em funil de Büchner e lavado com 2 mL de

MeOH, tendo sido obtido 174 mg de friedelina, que correspondem a 63,9% de rendimento.

3.3.3- Obtenção da friedelinolactona (Reação de Bayer-Villiger)

Uma solução de 0,5 mL de H_2O_2 e 0,3 mL de ácido trifluoroacético (TFA) foi colocada em um balão de fundo redondo e deixados sob agitação por 30 min. Em seguida, 245 mg de friedelina, solubilizados em 2 mL de $CHCl_3$, foram adicionados e mantida sob refluxo por 10 h. Após este período, análises por cromatografia em camada delgada indicaram que todo o material de partida havia sido consumido. Em seguida foram adicionados 1,5 mL de $Na_2S_2O_5$ 10% e 1,5 mL de $NaHCO_3$ 10% e a fase aquosa extraída com $CHCl_3$ (2 x 3 mL). A fase orgânica foi tratada com $MgSO_4$ anidro, filtrada e, em seguida, o solvente foi evaporado em rotavapor, levando à obtenção da lactona (240 mg).

3.3.4- Reação com MeONa

Uma massa de 100 mg (0,12 mmol) da friedelinolactona, dissolvida em 2,5 mL de THF seco foi adicionada a 5 mL de metóxido de sódio 0,5 mol/L. A mistura permaneceu sob agitação a 50 °C por 1 h. Após este período, adicionaram-se 250 μ L de ácido acético glacial e 15 mL de água. A solução foi, extraída então, com $CHCl_3$ (4x10 mL) e secada com $MgSO_4$ anidro. Filtração e evaporação do solvente. Levaram à obtenção de 72 mg (0,16 mmol) de um sólido branco. Análise por CCDS mostrou tratar-se de uma única mancha, que foi então analisada por inserção direta no espectrômetro de Massas.

CAPÍTULO 4 - Análise Cristalográfica

4- Análise Cristalográfica

4.1. Isolamento e cristalização de G4 (30-hidroxi-lup-20(29)-en-3-ona)

G4 foi isolada do extrato hexânico dos galhos de *Maytenus imbricata* (página 134). A estrutura molecular e a estereoquímica relativa de G4 foram estabelecidas por meio de técnicas espectroscópicas e cromatográficas: infravermelho (IV), ressonância magnética nuclear (RMN) 1D e 2D e, também, espectrometria de Massas (EM) (página 39).

Para a obtenção de monocristais adequados ao experimento de difração, foi utilizada a técnica de recristalização por evaporação lenta de solvente. Na escolha dos solventes adotou-se critério baseado, principalmente, na solubilidade dos TTPC. O critério adotado para a obtenção dos monocristais foi a utilização de misturas contendo dois solventes, sendo que em um deles, o TTPC é solúvel e no outro ele é pouco solúvel ou insolúvel. Com a evaporação do solvente mais volátil formam-se pequenos cristais nucleadores que, ainda na presença do líquido menos volátil, favorece o crescimento de cristais de faces bem formadas e de tamanhos adequados para o experimento de difração. Para a cristalização do composto G4 utilizaram-se as seguintes combinações de solventes: hexano:metanol, hexano:piridina, hexano:etanol, acetato de etila:metanol, acetato de etila:etanol, hexano:clorofórmio, clorofórmio:etanol e clorofórmio:metanol, todos na proporção 1:1. Os cristais obtidos foram acompanhados através da observação em um microscópio ótico do tipo lupa. Dos cristais obtidos, aqueles formados em clorofórmio:etanol se adequaram melhor às necessidades para serem utilizados no experimento de difração de raios-X, ou seja, tamanho e uniformidade adequados (entre 0,05 a 0,2 mm³), bem como ausência de germinações.

4.1.1. Análise cristalográfica por difração de raios-X

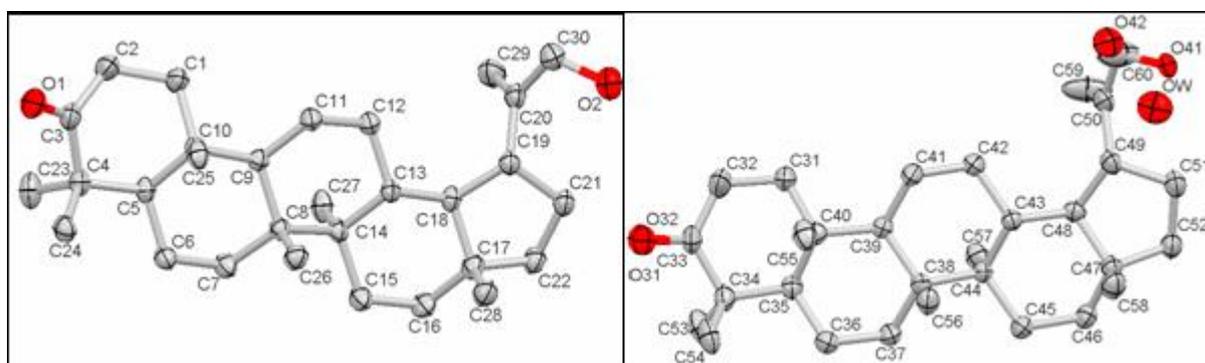
Os dados cristalográficos foram obtidos em um difratômetro Enraf-Nonius Kappa-CCD, pelo Prof. Dr. Antônio Carlos Doriguetto, da Universidade Federal de Alfenas, no Instituto de Física de São Carlos – USP. A radiação utilizada foi o $\text{MoK}\alpha$ (0,71073 Å).

A análise cristalográfica por difratometria de raios-X foi utilizada para a confirmação da estrutura molecular e para o estudo conformacional.

O tratamento dos dados foi conduzido usando o pacote de programas da WINGX (FARRUGIA e WATSON, 1999). A estrutura foi resolvida por métodos diretos usando o programa *SHELXS-97* (SHELDRICK, 1997) e o refinamento da estrutura cristalina por mínimos quadrados de matriz completa em F^2 com o programa *SHELXL-97* (SHELDRICK, 1997).

4.1.2. Resultados e discussões

G4 (30-hidroxi-lup-20(29)-en-3-ona) cristalizou no grupo espacial triclinico P1 com duas moléculas na unidade assimétrica. Essa simetria foi analisada cuidadosamente utilizando o programa PLATON (FISCHER, 1985), indicando que a estrutura não apresenta simetria. A Figura 4.1 mostra uma representação Mercury (MACRAE, et al., 2006) da estrutura. Os principais parâmetros cristalográficos de G4 são vistos na Tabela 4.1, pág. 190.



(Molécula 1)

(Molécula 2)

Figura 4.1: Representação Mercury 1.4.1 de G4 (30-hidroxi-lup-20(29)-en-3-ona) com elipsóides a 50% de probabilidade. Os átomos dos anéis estão rotulados. Os átomos de hidrogênio foram omitidos.

Observa-se que a molécula de G4 apresenta desordem estática provavelmente em decorrência de interações intermoleculares fracas como ligações de hidrogênio.

As geometrias intramoleculares das duas moléculas diferem quanto à conformação do anel. Na *molécula 1*, os anéis B, C, D adotam uma conformação em cadeira, já o anel A existe na conformação de cadeira distorcida. O anel de cinco membros, E, apresenta uma conformação de envelope. Na *molécula 2* a conformação dos anéis B, C, D e E são semelhantes aos da *molécula 1*. Por outro lado, o anel A assume a forma de envelope, no qual os átomos C31-C32-C33-C34-C35 encontram-se no mesmo plano.

Além da diferença na conformação dos anéis A entre as duas moléculas independentes por operação de simetria, um outro aspecto interessante observado foi a presença da desordem estática mostrada pela *molécula 2*. Esses aspectos contribuíram para a estrutura não ser centrossimétrica.

A geometria intramolecular de ambas as moléculas foram analisadas usando o MOGUL (BRUNO, et al., 2004) e os valores encontrados para os parâmetros intramoleculares comparados com os de estruturas similares, que estão depositadas na base de dados do CSD (ALLEN, 2002). Este estudo mostrou que todos os comprimentos de ligações e ângulos das ligações estão de acordo com os valores esperados, exceto para os valores referentes ao átomo de carbono que está ligado aos átomos de oxigênio desordenados O31 e O32 e para os oxigênios O41 e O42.

Encontrou-se que o comprimento de ligação entre C33-O31 (1,33 Å) é maior do que se esperava (1,20 Å). Uma explicação para a diferença encontrada seria o fato do átomo C33 ligar-se aos oxigênios O31 e O32 desordenadamente. E como ele se encontra dentro do anel, sua posição está restrita a esse anel de seis membros e assim, a perturbação provocada pela desordem estática causa uma modificação significativa no comprimento e ângulo de ligação. Além disto, o anel está numa conformação menos estável (envelope), ou seja, um pouco mais energética (Figura 4.2, pág. 184). Já o outro carbono, que está ligado aos outros oxigênios desordenados O41 e O42, não apresenta uma mudança tão significativa, pois está ligado apenas por ligações sigmas alifáticas, podendo girar livremente e se “adaptar” às variações ocorridas.

Com relação às interações intermoleculares de G4 observa-se que são mantidas por ligações de hidrogênio moderadas e fracas que estabilizam o empacotamento cristalino.

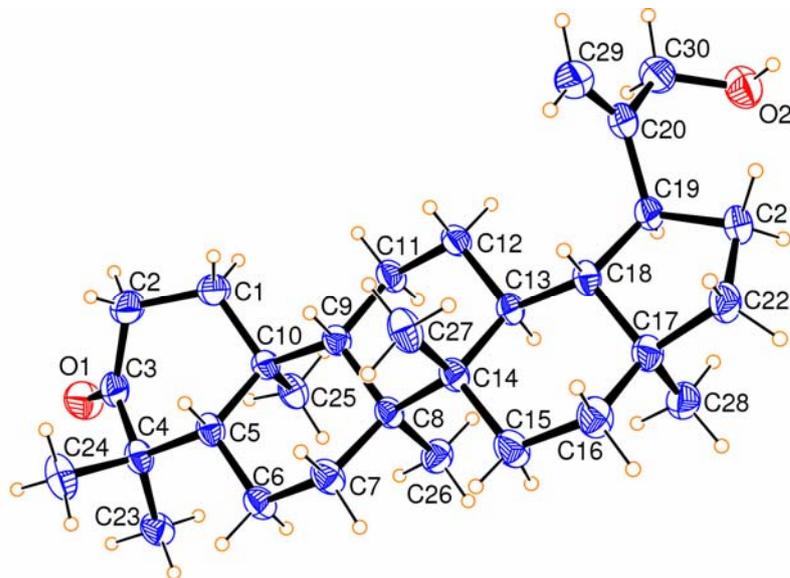


Figura 4.2: Vista em perspectiva de G4 (30-hidroxi-lup-20(29)-en-3-ona) e representação ORTEP da estrutura molecular.

Essas interações ocorrem ao longo da direção cristalográfica [001] e são responsáveis diretamente pela distorção do anel A de seis membros da molécula não desordenada (molécula 1). Interações intermoleculares (O...H-O) entre a hidroxila do oxigênio O2 e a carbonila do O1, que assumem o valor de 2,240 Å, ocorrem em uma orientação que promove a distorção do anel A. Mesmo ocorrendo tal distorção, que teoricamente não é energeticamente favorável, no caso dessa estrutura, a energia gasta é compensada pela energia de estabilização do empacotamento oriundas das interações intermoleculares fracas.

Dos quatorze lupanos cujas estruturas cristalinas já foram elucidadas, e estão armazenados no CSD (Crystal Standard Date), existe apenas um (ácido 3β -O-*trans*-feruloilbetulínico (CHIEN et al., 2004) que apresenta átomos desordenados. A estrutura cristalina de G4 apresentou desordem estática que pode ser uma consequência das interações intermoleculares que estabilizam o empacotamento da molécula A no plano (001).

Na Figura 4.3, pág. 185 pode ser visto que O4 está desordenado em três posições diferentes. A primeira ocorre de forma que a hidroxila fique voltada para cima, e, subsequentemente, há uma interação dessa hidroxila que é “puxada para

baixo” por uma carbonila que é induzida para cima. Além disso, existe uma terceira ligação entre a água e a carbonila, que dessa vez é “puxada para baixo”. Assim, a hidroxila e a carbonila apresentam dois sítios de ocupação fazendo com que ocorra a desordem no sistema.

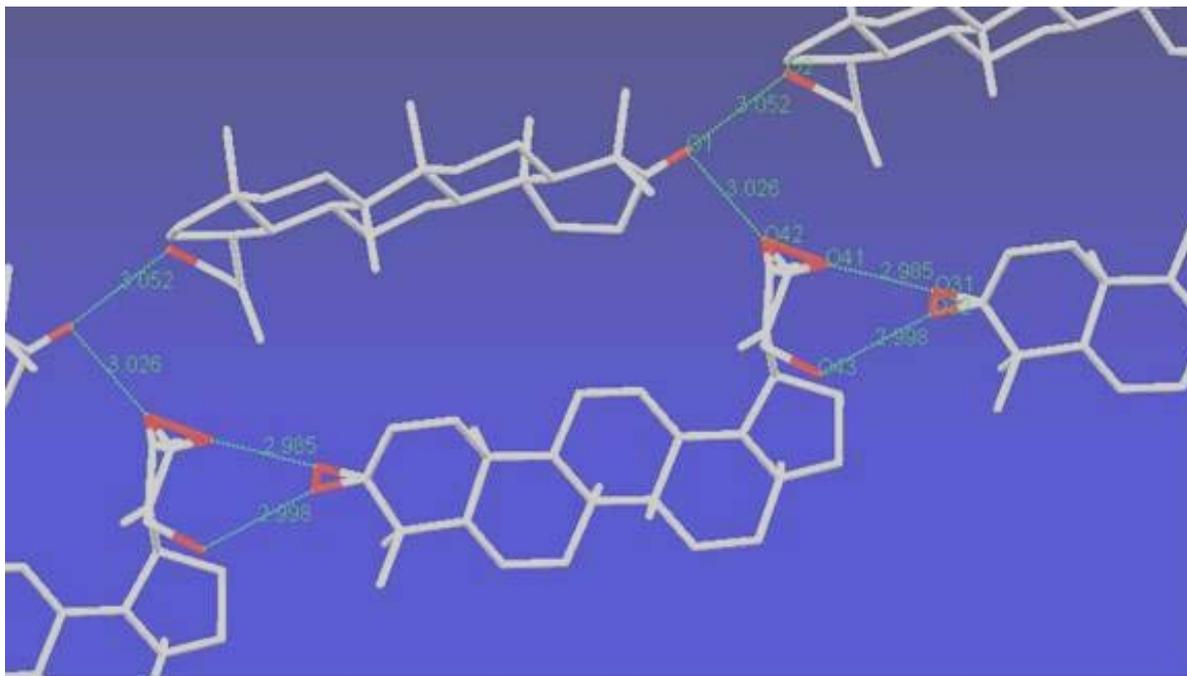


Figura 4.3: Interações intermoleculares da região desordenada de G4 (30-hidroxi-lup-20(29)-en-3-ona).

4.2. Isolamento e cristalização de G5 (11 α -hidroxi-lup-20(29)-en-3-ona)

G5 (11 α -hidroxi-lup-20(29)-en-3-ona) foi isolada do extrato hexânico de *Maytenus imbricata* (página 134). A estrutura molecular e a estereoquímica relativa de G5 foram estabelecidas por meio de técnicas espectroscópicas e cromatográficas: infravermelho (IV), ressonância magnética nuclear (RMN) 1D e 2D e por espectrometria de Massas (EM) (página 49).

G5 foi cristalizado em mistura binária de clorofórmio:etanol na proporção 1:1 e a estrutura cristalina foi determinada por meio de difração de raios-X por monocristal.

4.2.1. Análise cristalográfica por difração de raios-X

Os dados cristalográficos foram obtidos de acordo com o item 4.1.

4.2.2. Resultados e discussões

G5 cristalizou no grupo espacial triclinico $P2_1$ com duas moléculas independentes por simetria na unidade assimétrica.

Assim como para G4, essa simetria foi analisada cuidadosamente e a seqüência conformacional encontrada foi cadeira distorcida, cadeira, cadeira, cadeira para os anéis A, B, C e D, respectivamente. O anel de 5 membros E, apresenta uma conformação em envelope (Figura 4.4).

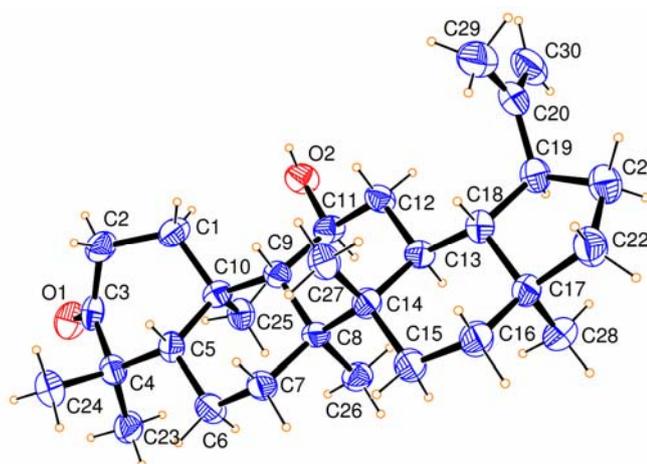


Figura 4.4: Vista em perspectiva de G5 (11 α -hidroxi-lup-20(29)-en-3-ona) e representação ORTEP da estrutura molecular.

O grupo hidroxila em C11 encontra-se na posição equatorial e pode-se observar pela Figura 4.5 (pág. 187) que ocorre a ligação de hidrogênio intermolecular entre a carbonila em C3 e a hidroxila em C11.

Os principais parâmetros cristalográficos de G5 estão listados na Tabela 4.1 (pág. 190). Com estas informações foi possível determinar a estrutura de G5 como sendo o lupano (11 α -hidroxi-lup-20(29)-en-3-ona).

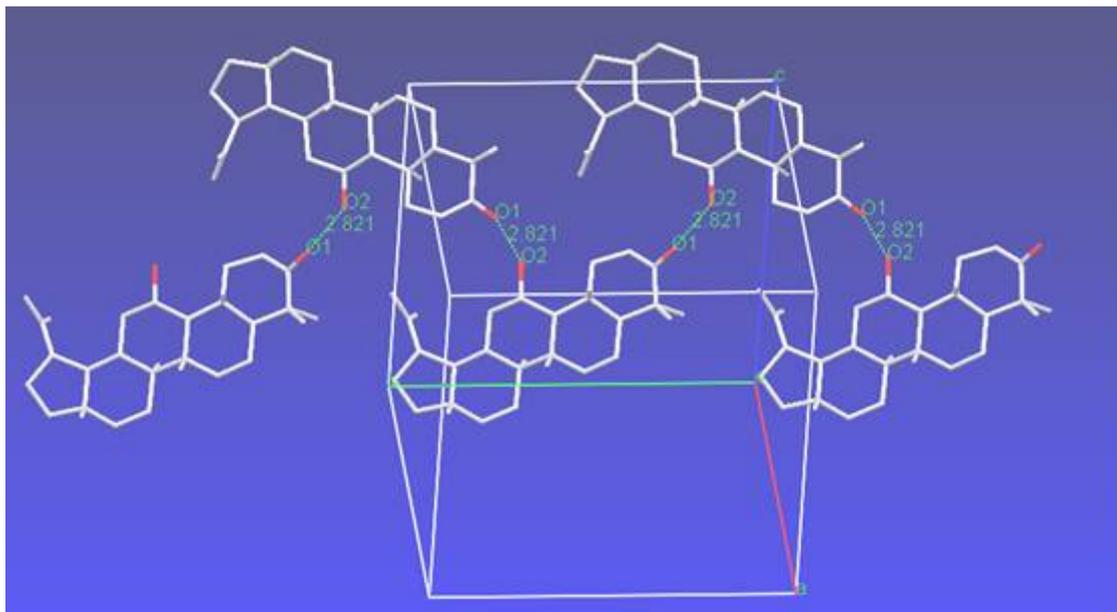


Figura 4.5: Interações intermoleculares de G5 (11 α -hidroxi-lup-20(29)-en-3-ona).

4.3. Isolamento e cristalização de G6 (3 β ,30-di-hidroxi-lup-20(29)-eno)

O triterpeno 3 β ,30-di-hidroxi-lup-20(29)-eno (G6) foi obtido a partir do fracionamento cromatográfico do extrato hexânico das folhas e galhos de *M. imbricata* (pág. 134).

A análise dos espectros no IV, RMN de ^1H e de ^{13}C nos levou a propor a estrutura do lupano 3 β ,30-di-hidroxi-lup-20(29)-eno para G6 (pág. 61).

G6 foi cristalizado em mistura binária de hexano:acetato de etila, sendo possível obter o monocristal adequado para a realização da análise cristalográfica através de difração de raios-X. A confirmação inequívoca da estrutura de G6 foi realizada após obtenção dos monocristais deste triterpeno. A análise dos dados cristalográficos obtidos permitiu resolver definitivamente a estrutura.

4.3.1. Análise cristalográfica por difração de raios-X

Os dados cristalográficos foram obtidos de acordo com o item 4.1.

4.3.2. Resultados e discussões

A seqüência conformacional encontrada para a estrutura do lupano $3\beta,30$ -di-hidroxi-lup-20(29)-eno foi cadeira, cadeira, cadeira, cadeira e envelope para os anéis A, B, C, D e E, respectivamente (Figura 4.6). Os grupos hidroxila em C-3 e C-30 estão em posição equatorial. Os dados cristalográficos para G6 estão listados na Tabela 4.1 (pág. 190). O arranjo entre as unidades moleculares sugere a formação de uma ligação intermolecular de hidrogênio entre as hidroxilas presentes na posição C-3 das moléculas, bem como entre as hidroxilas em posição C-30 (Figura 4.7, pág. 189) (PIMENTA JR. et al., 2006).

Estas interações moleculares formam infinitas cadeias ligadas ao longo do eixo *c*-axial; na Figura 4.7 (pág. 189). A estrutura cristalina de G6 é projetada sobre um plano *ab*, são representadas cinco cadeias, com uma ao centro e quatro ao redor.

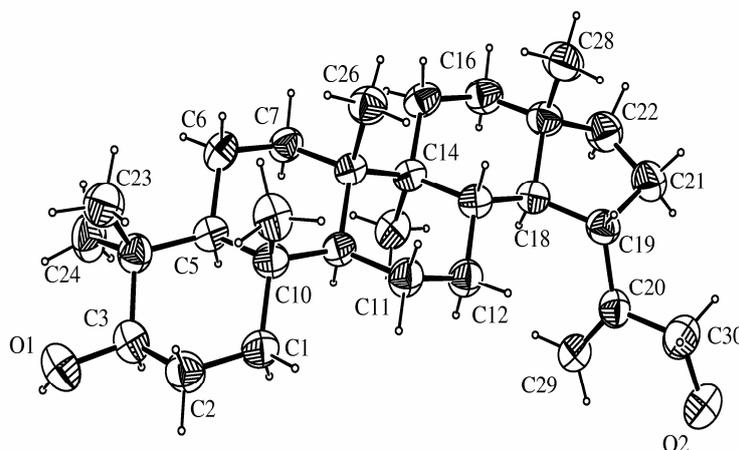


Figura 4.6: Vista em perspectiva de G6 ($3\beta,30$ -di-hidroxi-lup-20(29)-eno) e representação ORTEP da estrutura molecular.

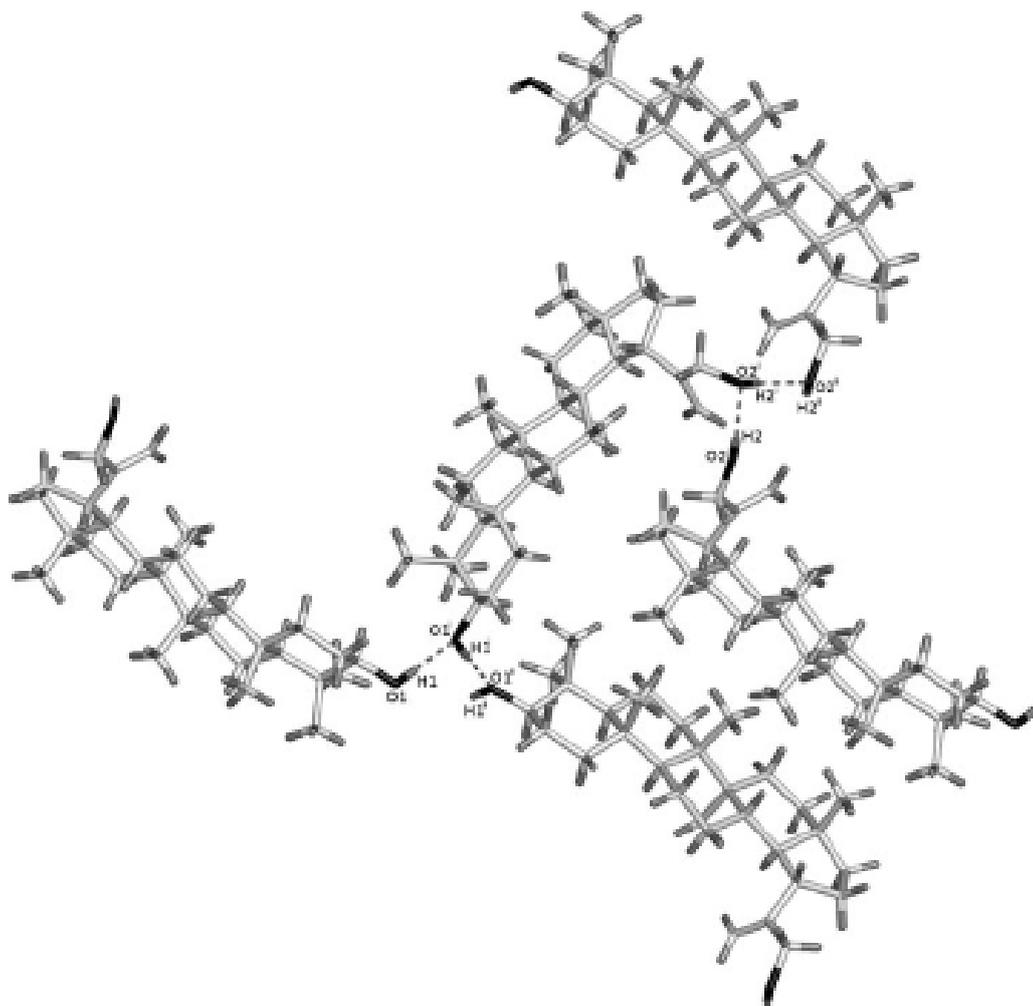


Figura 4.7: Vista das ligações de hidrogênio entre as moléculas de G6 (3 β ,30-dihidroxi-lup-20(29)-eno)

Tabela 4.1: Dados cristalográficos obtidos dos triterpenos lupânicos isolados de *M. imbricata*

	G4	G5	G6
Sistema Cristalino	Ortorrômbico	Ortorrômbico	Ortorrômbico
Grupo espacial	P1	P2 ₁	P4 ₁ 4 ₁ 4 ₁
Fórmula empírica	C ₆₀ H ₉₆ O ₄	C ₆₀ H ₉₆ O ₄	C ₆₀ H ₉₆ O ₄
Dimensões da cela unitária	a (Å) = 9,552 b (Å) = 9,708 c (Å) = 14,470 α (deg) = 93,83 β (deg) = 102,83 γ (deg) = 103,31	a (Å) = 13,444 b (Å) = 14,446 c (Å) = 13,522 α (deg) = 90 β (deg) = 99,70 γ (deg) = 90	a (Å) = 19,038(1) b (Å) = 19,038(1) c (Å) = 7,2290(4) α (deg) = 90,00 β (deg) = 90,00 γ (deg) = 90,00
Volume da cela unitária	1263,3 Å ³	2588,6 Å ³	2620,1(3) Å ³
Comp. de onda	MoK α	MoK α	MoK α
Z*	1	2	4
Densidade do cristal	1,159 mg m ⁻³	1,131 mg m ⁻³	1,122mg m ⁻³
F (000) [§]	488	976	984
Nº total de reflexões	33641	6920	15782
Nº de reflexões > 2 σ	R1= 0,0438 _w R2= 0,1157	R1= 0,0977 _w R2= 0,2337	R1= 0,0538 _w R2= 0,1109
Nº de parâmetros refinados	5778/6/594	4882/1/580	4279/1/298
μ ^{&}	0,070	0,068	0,067

* = número de moléculas (ou fórmulas) na célula unitária; § = Número total de elétrons na célula unitária; & = Coeficiente de absorção linear.

CAPÍTULO 5 – Avaliação das atividades antioxidante, herbicida e tripanocida de *M. imbricata*

5.1. Avaliação da atividade antioxidante de *M. imbricata*

5.1.1. Introdução

Os radicais livres, além de serem responsáveis pela peroxidação lipídica durante o processamento e estocagem dos alimentos (SINGH et al., 2002), estão diretamente envolvidos em processos como câncer, cardiopatias, diabetes (YILDIRIN et al., 2001), mal de Alzheimer (ALLISON et al., 2001), arteriosclerose, processos inflamatórios (JIN et al., 2002, HARDMAN et al., 1996) e outras patologias que acometem os seres humanos. Nos organismos vivos existem vários mecanismos que levam à formação de radicais livres. Por outro lado, existem defesas naturais contra os processos oxidativos desencadeados que, no entanto, nem sempre são eficazes (YILDIRIM et al., 2001).

Os antioxidantes são compostos que capturam radicais livres, atuando no controle de doenças e na conservação dos alimentos. A pesquisa de antioxidantes de origem natural, principalmente a partir de plantas, tem merecido grande atenção por parte dos pesquisadores e tem aumentado consideravelmente nos últimos anos (HARRISH e SHIVANANDAPYA, 2006; WU et al., 2006; CAPECKA et al., 2005; SILVA et al., 2005a; JELLER et al., 2004).

Diferentes espécies da família *Celastraceae* exibem atividade antioxidante (JORGE et al., 2004; ALLISON et al., 2001; HOWES e HOUGHTON, 2003) e têm sido avaliadas como fontes promissoras de novos fármacos (SOUSA e ALMEIDA, 2005).

Com o objetivo de se avaliar a atividade antioxidante (AA) em *Maytenus imbricata* foram determinados o teor de fenólicos totais, a capacidade de retirada de radical livre com 2,2-difenil-1-picrilhidrazila (DPPH) e o poder redutor (PR) dos

extratos em hexano (EHF), etanol (EEtF), acetato de etila (EAcEtF) e clorofórmio (ECIF) das folhas; em hexano (EHG), em acetato de etila (EacEtG) dos galhos, hidroalcoólico das raízes (EHAR) e sólido obtido do EFH e EGH (EFHs e EGHs) de *M. imbricata*, utilizando espectrofotometria. Os compostos isolados avaliados foram dulcitol (F1) e epicatequina (F12) obtidos das folhas e a mistura de proantocianidinas (G1) dos galhos desta espécie.

5.1.2. Análise dos resultados e discussão

5.1.2.1. Conteúdo de fenólicos totais

A presença de compostos de natureza fenólica nos extratos polares obtidos de folhas, galhos e raízes de *M. imbricata* foi verificada através de testes com reagente de Folin Ciocalteu (SINGH et al., 2002). Os resultados sugerem que existe uma correlação entre o conteúdo de fenólicos totais e a atividade antioxidante dos extratos das folhas, galhos e caule de *M. imbricata*, indicando a influência da composição química dos mesmos na atividade antioxidante (Tabela 5.1).

Tabela 5.1: Rendimento dos extratos e conteúdo de fenólicos totais em extratos e compostos isolados de *Maytenus imbricata*

Origem	Extrato ou amostra	Rendimento (%)	Fenólicos (mg/g) extrato ^a
Folhas 678,71g	EHF	4,09	nd
	EHsF	1,95	nd
	ECIF	1,01	nd
	EAcEtF	10,86	659,27 ± 31,68
	EEtF	34,86	440,89 ± 66,82
	F1	0,76	nd
	F12	17,7	1220,33 ± 8,51
Galhos 883,36 g	EGH	2,02	nd
	EHsG	0,46	nd
	EAcEtG	2,01	85,79 ± 3,07
	G1	75	307,65 ± 6,45
Raiz	EHAR	7,28	422,57 ± 15,89

nd = não detectado. ^a medida por espectrofotometria.

5.1.2.2. Atividade de retirada de radical (DPPH) e poder redutor dos extratos de *M. imbricata*

Para avaliar a atividade antioxidante de extratos e compostos isolados de *M. imbricata* foi realizado o teste do DPPH, que se baseia na propriedade de captura de um próton-radical (*próton-radical scavenging*). Na reação, a cor púrpura da solução metanólica de DPPH desaparece rapidamente na medida em que esse reage com compostos capturadores de próton-radical (WU et al., 2006; BLOIS, 1958).

A capacidade de retirada de radical apresentada pelo extrato em acetato de etila obtido das folhas foi maior que a observada para os extratos etanólico e clorofórmico em todas as concentrações avaliadas (Figura 5.1, pág. 194 e Tabela 5.2). O mesmo foi observado quando se comparou os resultados com os padrões butil-hidroxianisol (BHA) e ácido gálico (AG) (Tabela 5.3, pág. 194). A comparação entre a atividade de retirada de radical exibida pelos padrões e extratos foi realizada através de regressão linear (Figura 5.2, pág. 195).

Tabela 5.2: DPPH e poder redutor (PR) dos extratos das folhas de *Maytenus imbricata*

Concentração (ppm)	Extratos	DPPH(%)	PR
50	EAcEtF	42,79A	0,25A
	EEtF	30,64B	0,16B
	ECIF	0,00C	0,00C
100	EAcEtF	43,43A	0,41A
	EEtF	30,98B	0,41A
	ECIF	0,00C	0,01B
200	EAcEtF	47,75A	0,84A
	EEtF	37,68B	0,67A
	ECIF	7,38C	0,04B
300	EAcEtF	68,15A	1,10A
	EEtF	61,95B	0,93A
	ECIF	13,39C	0,10B

Em cada concentração, amostras seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P < 0,05$).

Extratos: EAcEtF = em acetato de etila; EEtF = em etanol; ECIF = em clorofórmio (% de retirada de radical medida por espectrofotometria).

Tabela 5.3: Comparação da atividade antioxidante dos extratos a 100 ppm com os padrões BHA e AG (100 ppm) para a atividade de retirada de radical (DPPH)

Extrato	DPPH
EAcEtF	43,43A
EEtF	30,98B
AG	18,78C
BHA	7,70D
ECIF	0,00E

Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P < 0,05$).
 Extratos: EAcEtF = em acetato de etila; EEtF = em etanol; ECIF = em clorofórmio;
 AG = ácido gálico; BHA = butil-hidroxianisol.

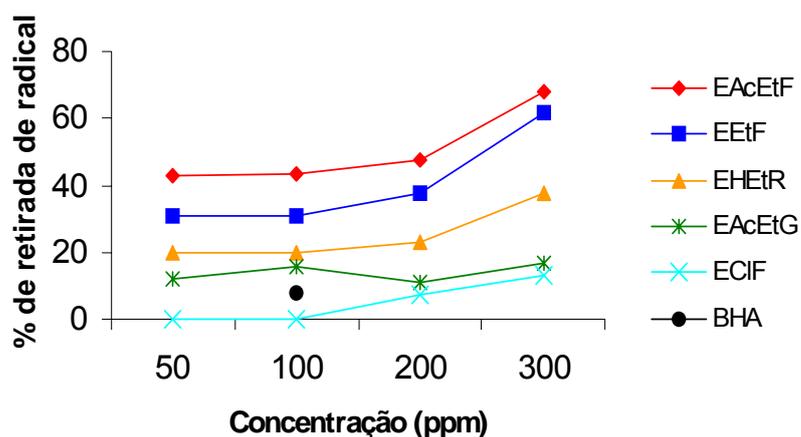
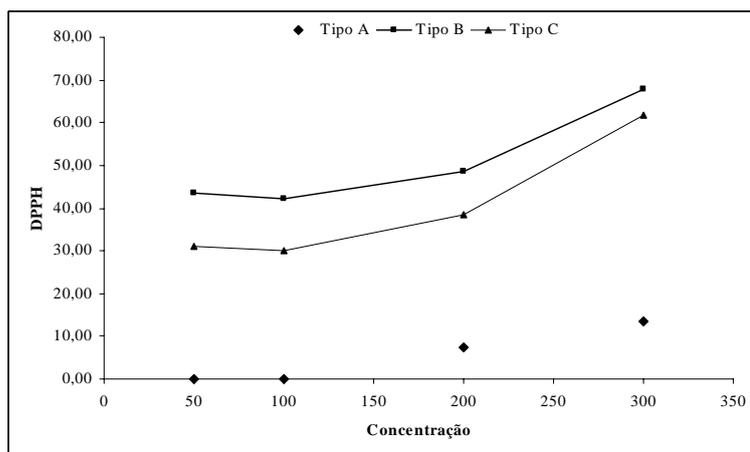


Figura 5.1: Porcentagem de retirada de radical (DPPH) dos extratos em acetato de etila (EAcEtF), etanol (EEtF) e clorofórmio das folhas (ECIF); hidroalcoólico das raízes (EHetR) e em acetato de etila dos galhos (EAcETG) de *M. imbricata* e do padrão BHA.



$$\text{Tipo A: } \hat{Y} = \bar{Y}$$

$$\text{Tipo B: } \hat{Y} = 48,126466 - 0,123735 * c + 0,000632 * c^2 \quad R^2 = 95,61\%$$

$$\text{Tipo C: } \hat{Y} = 36,240268 - 0,137613 * c + 0,000742 * c^2 \quad R^2 = 99,30\%$$

c = concentração; * Valores dos coeficientes significativos a 5%, pelo teste t . Tipo A: extrato clorofórmio (ECIF). Tipo B: extrato em acetato de etila (EAcEtF). Tipo C: extrato etanólico (EEtF).

Figura 5.2 – Estimativa de DPPH (\hat{Y}) para diferentes concentrações (c) nos extratos obtidos a partir das folhas de *M. imbricata*.

A maior atividade apresentada pelo extrato em acetato de etila pode ser resultante da contribuição da epicatequina, isolada a partir deste extrato e que possui atividade antioxidante comprovada (AGRAWAL, 1989). Outro fato pode ser a seletividade significativa do acetato de etila na extração das procianidinas, compostos com acentuada atividade antioxidante (PEKIC e STAMENKOVIC, 1972, citado por JAYAPRAKASHA et al., 2001).

O fato de não ter sido observada atividade antioxidante associada aos extratos obtidos a partir de solventes apolares não implica na ausência da mesma (KRANL et al., 2005). Sistemas ou ensaios que permitam a avaliação da atividade antioxidante em extratos e compostos menos polares devem ser utilizados para se concluir com certeza se os mesmos exibem ou não atividade antioxidante (MURCIA et al., 2004).

A atividade antioxidante do extrato em acetato de etila dos galhos nas concentrações testadas (50, 100, 200 e 300 ppm) foi superior à atividade exibida pelo BHA (100 ppm) e inferior a do ácido gálico (100 ppm). Resultado similar foi observado para o extrato hidroalcoólico das raízes em relação ao BHA (100 ppm),

porém, sendo superior ao ácido gálico (100 ppm) apenas nas concentrações de 200 e 300 ppm.

O poder redutor (PR) dos extratos das folhas foi dose dependente (Tabela 5.4 e Figura 5.3), sendo o extrato em acetato de etila, diferentemente do observado para o DPPH, superior aos demais extratos apenas na concentração 50 ppm. Nas concentrações de 100, 200 e 300 ppm, não se observou diferenças no PR dos extratos em acetato de etila e etanólico (Tabela 5.4). O PR do extrato clorofórmico foi observado a partir das concentrações de 200 e 300 ppm, sendo, contudo inferior a dos outros extratos. A comparação entre a atividade antioxidante dos extratos das folhas (Tabela 5.4) foi realizada através de regressão linear.

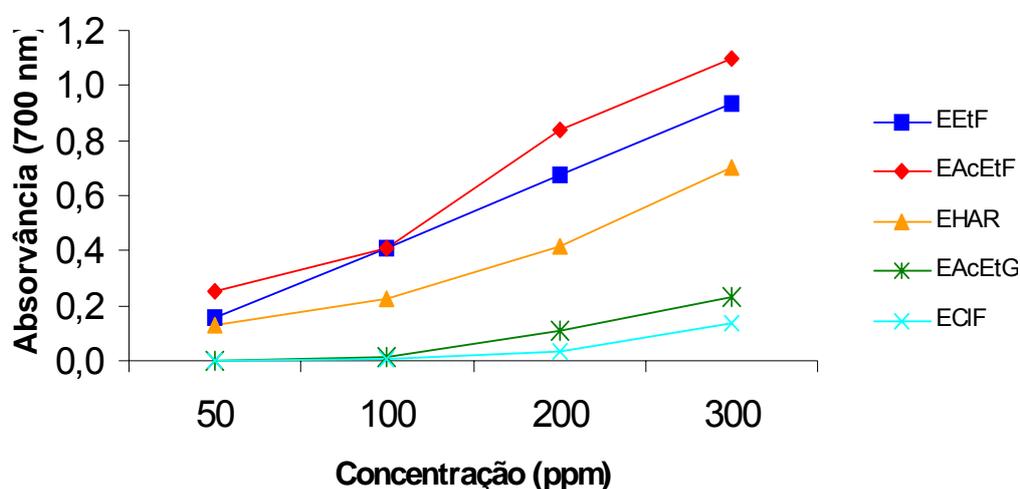


Figura 5.3: Poder redutor dos extratos em etanol (EEtF), acetato de etila (EAcEtF) e clorofórmio (ECIF) das folhas, em acetato de etila (EAcEtG) dos galhos e hidroalcoólico das raízes (EHAR) de *M. imbricata*.

Tabela 5.4: Comparação da atividade antioxidante dos extratos das folhas a 100 ppm com os padrões BHA e AG (100 ppm) para o poder redutor

Amostra	PR
AG	0,63A
EAcEtF	0,41B
EEtF	0,41B
BHA	0,33B
ECIF	0,01C

Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P < 0,05$).

Extratos: EAcEtF = em acetato de etila; EEtF = em etanol; ECIF = em clorofórmio; AG = ácido gálico

Os dados do PR dos extratos obtidos a partir de galhos e do extrato hidroalcoólico das raízes foram analisados por regressão linear. Para o extrato dos galhos, o PR verificado apresentou também variações de acordo com a concentração testada, porém, não se chegou a uma equação que explicasse o modelo encontrado. No extrato obtido a partir das raízes, o PR do extrato hidroalcoólico foi maior e superior ao dos padrões a 300 ppm. Os resultados mostram que os extratos das folhas, galhos e raízes de *M. imbricata* foram elétrondadores convertendo os radicais livres em produtos mais estáveis, finalizando assim as reações radicalares iniciadas.

Comparando as atividades dos extratos em acetato de etila das folhas e galhos, verificou-se que as folhas apresentaram maior atividade de retirada de radical, bem como maior PR (Figuras 5.1, pág. 194 e 5.3, pág. 196).

5.1.2.3. Atividade de Retirada de Radical (DPPH) e Poder Redutor de compostos isolados de *M. imbricata*

A epicatequina (F12) isolada a partir do fracionamento do extrato em acetato de etila das folhas foi identificada usando técnicas espectroscópicas de análise (pág. 120). A natureza fenólica do composto denominado G1, isolado a partir do extrato em acetato de etila dos galhos, foi verificada através da análise do espectro no IV, bem como dos testes com reagentes específicos (FeCl_3) que indicaram a presença de taninos condensados.

Tanto a epicatequina quanto o composto G1 (mistura de proantocianidinas) apresentaram nas concentrações de 50, 100, 200 e 300 ppm, AA superior ao BHA (100 ppm) e ao ácido gálico (100 ppm). Entretanto, o PR apresentado pela epicatequina foi superior ao dos padrões nas concentrações de 100, 200 e 300 ppm.

Os compostos fenólicos constituem um dos maiores grupos de substâncias distribuídas no reino vegetal (LI et al., 2006) e apresentam AA comprovada por meio de vários ensaios (KRANL et al., 2005; MURCIA et al., 2004). A atividade de retirada de radical (DPPH) dos compostos polifenólicos pode ser influenciada pelo número e posição das hidroxilas fenólicas na molécula (WU et al., 2006). Além disso, o

maior número de grupos hidroxila ligados aos núcleos flavonoídicos, também altera a atividade antioxidante (CAO, et al., 1997).

De acordo com CAPECKA et al. (2005), correlações entre o conteúdo de compostos antioxidantes e atividade antioxidante são difíceis de serem explicadas apenas por análises quantitativas. SKERGET et al. (2005) sugere que exista um sinergismo entre compostos antioxidantes e outros metabólitos secundários, que podem influenciar as diferenças quanto à capacidade antioxidante de extratos de plantas.

5.1.3. Parte experimental

5.1.3.1. Métodos gerais

O material foi coletado no mesmo local descrito na parte experimental, item 2.2.2, pág. 132. Os extratos e as substâncias isoladas foram obtidos de acordo com as técnicas descritas na pág. 133.

5.1.3.2. Determinação de fenólicos totais

Os extratos avaliados foram analisados de acordo com metodologia descrita por SINGH et al. (2002). Os extratos obtidos em solventes polares, bem como os compostos de natureza fenólica isolados, foram dissolvidos na mistura metanol:água (6:4), os extratos obtidos em solventes apolares foram solubilizados em mistura de metanol:CHCl₃ (1:2) e o dulcitol em água.

Alíquotas de 0,2 mL das amostras previamente preparadas foram misturadas a 0,1 mL de reagente de Folin Ciocalteu diluído de 10 vezes e 0,8 mL de solução de carbonato de sódio 7,5% .

Esta mistura foi deixada em repouso por 30 min a temperatura ambiente e as absorvâncias foram medidas a 765 nm. A curva de calibração foi realizada com ácido tânico, sendo os resultados encontrados expressos em equivalentes de ácido tânico, usando a equação linear: $A = 0,0049C + 0,1755$, $R^2 = 0,9367$, onde A =

absorvância e C= concentração de ácido tânico em ppm. Todos os testes foram realizados em triplicata.

5.1.3.3. Atividade de retirada de radical (ARR) usando o método DPPH

Seguindo a metodologia descrita por SINGH et al. (2002) e BLOIS (1958), alíquotas de 50 e 100 μL (50 e 100 ppm) de amostras e BHA (25 e 50 ppm) em etanol foram colocadas em tubos de ensaio, sendo o volume ajustado para 100 μL . Solução metanólica de DPPH 0,1 mM (5 mL) foi adicionada aos tubos que em seguida foram agitados vigorosamente. Os tubos foram deixados em repouso a 27 °C por 20 min. Um tubo controle contendo a mistura acima, sem o extrato, foi usado como branco e o metanol usado como corretor da linha de base; as absorvâncias foram medidas a 517 nm. Todos os testes foram realizados em triplicata e a atividade de retirada de radical (ARR) expressa como a porcentagem de inibição e calculada usando a fórmula:

$$\% \text{ ARR} = (\text{Abs. controle} - \text{Abs. amostra}) / \text{Abs. controle} \times 100$$

onde **Abs.** = absorvância.

5.1.3.4. Poder Redutor (PR)

Alíquotas de 1 mL (50 a 400 ppm) das amostras e BHA (25 e 50 ppm) em etanol foram preparadas como descrito anteriormente e analisadas de acordo com metodologia descrita por YILDIRIN et al. (2001). Acrescentou-se às alíquotas, 2,5 mL de tampão fosfato (0,2 mol/L, pH 6,6) e 2,5 mL de $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ (1%). Em seguida, as amostras foram incubadas a 50 °C por 30 min. Após este período adicionou-se 2,5 mL de ácido tricloroacético (10%) e a mistura foi centrifugada a 2500 rpm por 8 min. Retirou-se 2,5 mL da camada superior, que foram acrescidos de 2,5 mL de água destilada e 0,5 mL de FeCl_3 aquoso (0,1 %). A absorvância foi medida a 700 nm (YILDIRIN et al., 2001). O aumento do poder redutor foi avaliado com o aumento da absorvância.

5.1.4. Análises Estatísticas

Todas as análises foram realizadas em triplicata. Os cálculos estatísticos foram realizados usando programa ESTATÍSTICA para tratar as médias, o desvio padrão e a regressão linear R^2 . As diferenças entre as amostras foram determinadas pela análise de variância (ANOVA) a $P < 0,05$.

5.1.5. Conclusão

Os resultados mostram que os extratos das folhas, galhos e raízes, bem como os compostos isolados de *M. imbricata* têm um alto conteúdo de fenólicos totais e exibiram potencial atividade antioxidante (AA) e poder redutor (PR), quando comparados aos padrões BHA e GA.

Todavia, estudos futuros são necessários para determinar a presença de outros constituintes bioativos nos extratos de *M. imbricata*, bem como para verificar suas atividades em sistemas *in vivo*, já que atividade antioxidante e poder redutor dos extratos de *M. imbricata* são aqui reportados pela primeira vez.

5.2. Avaliação da atividade inibitória da síntese de ATP

Estes estudos foram realizados em colaboração com o Prof. Dr. Blas Lotina-Hennsen da Universidade Nacional Autônoma do México (UNAM).

5.2.1. Introdução

A agricultura brasileira representa um dos grandes mercados mundiais para os herbicidas químicos. Todavia estes são muitas vezes inviáveis economicamente e comumente tóxicos (ROBBS e BITTENCOURT, 1999).

A pesquisa dos chamados herbicidas verdes tem merecido destaque nos últimos anos, pois eles exibem a vantagem de serem inócuos ao meio ambiente, aos seres humanos e animais, além de se constituírem em uma solução a longo prazo para controlar as espécies daninhas que são particularmente resistentes aos herbicidas tradicionais (AIRES et al., 2005).

Os herbicidas são classificados de acordo com o mecanismo de ação que apresentam (KISSMANN, 2006). Herbicidas que atuam inibindo a fotossíntese impedem a formação de compostos essenciais para a atividade fisiológica e o desenvolvimento do vegetal. A fotossíntese ocorre em duas fases, uma dependente e outra não dependente de energia luminosa, ou seja, fase clara e escura, respectivamente (Figura 5.4).

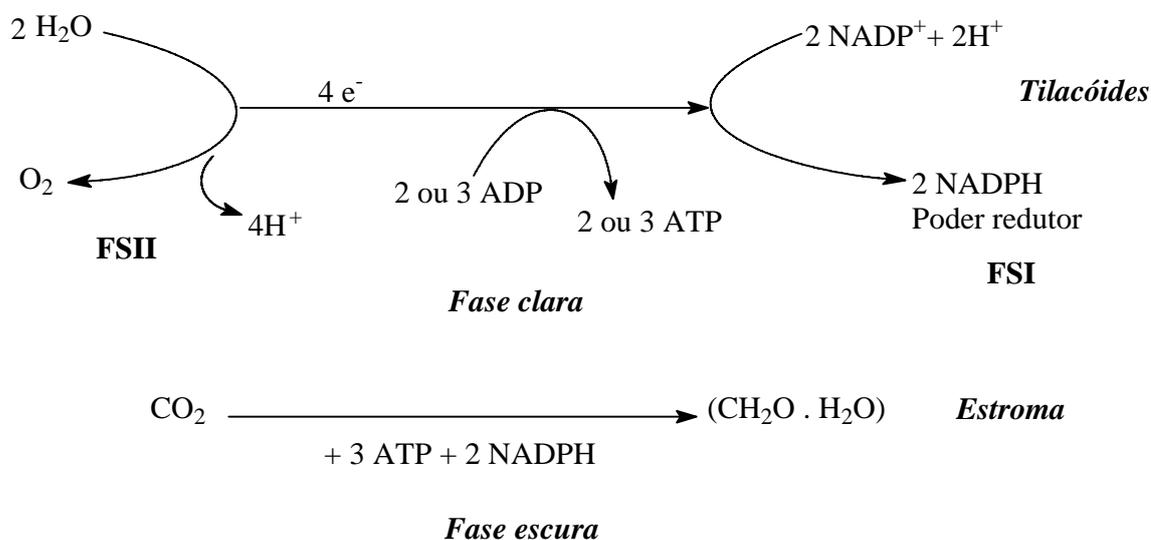


Figura 5.4: Fotossíntese: fase clara (reações com luz) e fase escura (fixação de CO_2).

Os pigmentos envolvidos na fotossíntese são clorofilas A e B, carotenóides e ficobilinas (HALL e RAO, 2001). A energia absorvida pelos pigmentos é transferida para centros de reação localizados nas membranas tilacóides, dentro dos cloroplastos.

Até o momento, foram identificados dois centros de reação que trabalham de forma coordenada para a fotossíntese. As fases processadas por esses dois centros são conhecidas como fotossistema II (FS II, 680 nm) e fotossistema I (FS I, 700 nm) que interagem entre si através de transportadores de elétrons (HALL e RAO, 2001). No centro de reação, além de pigmentos, encontram-se enzimas, proteínas estruturais e outras moléculas que catalisam as reações.

No fotossistema II, clorofilas excitadas do centro reativo, liberam elétrons que são capturados por moléculas de uma corrente transportadora. Através da reação de Hill (fotólise da água), moléculas de água próximas ao FS II são hidrolisadas, liberando oxigênio e dois hidrogênios, que cedem seus elétrons para a regeneração das clorofilas, restando prótons, que se dirigem aos centros de síntese de ATP (HALL e RAO, 2001).

No fotossistema I pigmentos no centro de reações absorvem também energia oriunda da luz, porém não há hidrólise de moléculas de água (Figura 5.5).

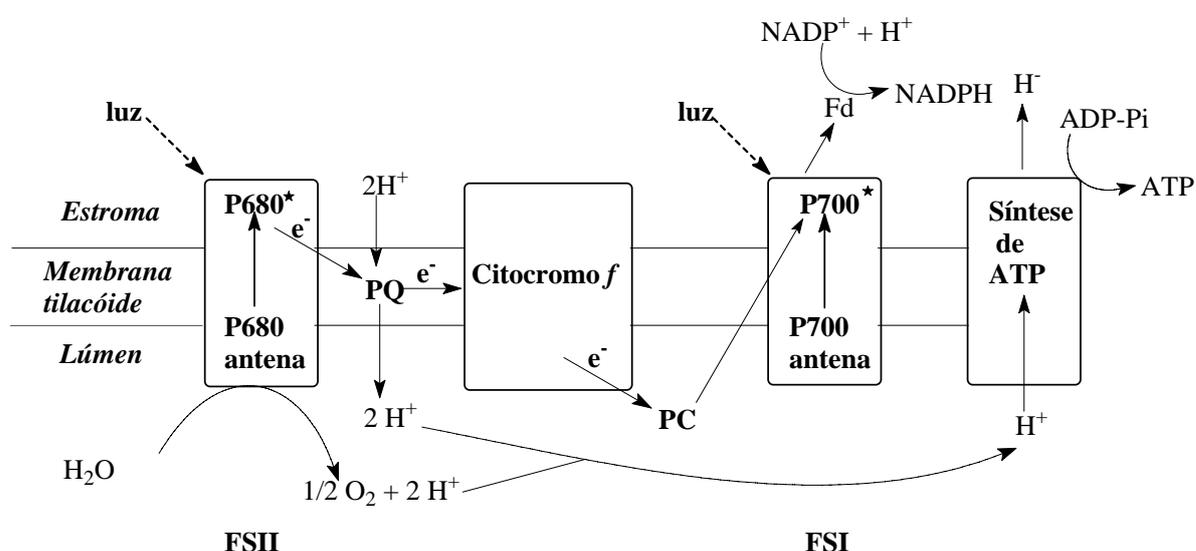


Figura 5.5: Diagrama simplificado do transporte de elétrons acíclico (não cíclico) no cloroplasto vegetal.

O maior grupo de herbicidas hoje no mercado apresenta mecanismos que impedem a redução da NADP para NADPH^+ , interrompendo o processo de fotossíntese. Porém, um efeito paralelo ocorre e é muito mais intenso e rápido. Como são compostos catiônicos solúveis na água, sofrem forte dissociação e redução, gerando compostos instáveis (radicais livres) que sofrem oxidação causada por oxigênio molecular do meio. Ocorre, então, a formação de peróxido de hidrogênio altamente oxidante e que em pequena quantidade pode destruir o cloroplasto, romper membranas de organelas e de células, causando extravasamento de protoplasma seguido da morte da célula, ou necrose celular. Em presença de luz, a ação do herbicida é muito rápida, com o aparecimento de sintomas em poucas horas, seguindo-se de dessecação e morte do vegetal.

Na ausência de luz são absorvidos e transportados no xilema, que não é afetado. Na volta da luz, a ação fica ainda mais intensa, porque o herbicida está mais difundido dentro da planta.

Existem outros herbicidas que afetam o fotossistema I, sem, contudo produzir radicais livres ou peróxido de hidrogênio, afetando apenas a fotossíntese e não causando danos mais graves ao vegetal. Compostos que apresentam este mecanismo de ação são cada vez mais desejados, pois são bem mais seletivos e menos deletérios.

Para se avaliar a atividade dos compostos friedelina (G9), epicatequina (F12), dulcitol (F1), 30-hidroxi-lup-20(29)-en-3-ona (G4), 3 β ,30-di-hidroxi-lup-20(29)-eno (G6) e o ácido 3,4-seco-friedelan-3-óico (F9) isolados de folhas e/ou galhos de *Maytenus imbricata* sobre a fotossíntese foram realizados testes de inibição da síntese de adenosina trifosfato (ATP), de determinação dos efeitos sobre transporte de elétrons, da fluorescência da clorofila A e avaliação da atividade da enzima Mg²⁺-ATPase.

5.2.2. Análise dos resultados e discussão

5.2.2.1. Inibição da síntese de ATP

Friedelina (G9), epicatequina (F12), dulcitol (F1), 30-hidroxi-lup-20(29)-en-3-ona (G4), 3 β ,30-di-hidroxi-lup-20(29)-eno (G6) e o ácido 3,4-seco-friedelan-3-óico (F9) foram submetidos a testes de inibição da síntese de ATP através da atividade de fotofosforilação em cloroplastos isolados de espinafre (KING-DIÁZ, et al., 2006). Nas condições do teste não foi detectada atividade de inibição da síntese de ATP em relação aos triterpenos G9, F12, G4 e G6. No entanto, o ácido 3,4-seco-friedelan-3-óico (F9) apresentou atividade inibitória na síntese do ATP na concentração de 144 μ M, que produz 50% de inibição (IC₅₀) (Figura 5.6, pág. 204). Tal resultado justificou a avaliação de sua atividade sobre outros parâmetros relacionados à fotossíntese.

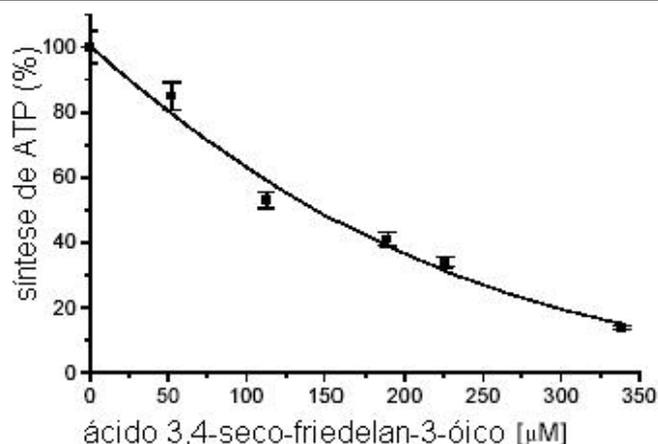


Figura 5.6: Efeito do ácido 3,4-seco-friedelan-3-óico (F9) sobre a síntese de ATP em cloroplastos (clp) de espinafre. Controle= 1100 μM de ATP mg^{-1} clp h^{-1} .

5.2.2.2. Efeito do ácido 3,4-seco-friedelan-3-óico sobre o transporte de elétrons

Para conhecer o mecanismo de inibição do ácido 3,4-seco-friedelan-3-óico sobre a síntese de ATP estudou-se o seu efeito sobre o transporte basal de elétrons, a fosforilação oxidativa e o transporte desacoplado de elétrons. Verificou-se que a fosforilação e o fluxo desacoplado de elétrons foi inibido até o máximo de 300 μM (Figura 5.7). Valores acima desta concentração levaram a um aumento em ambas atividades.

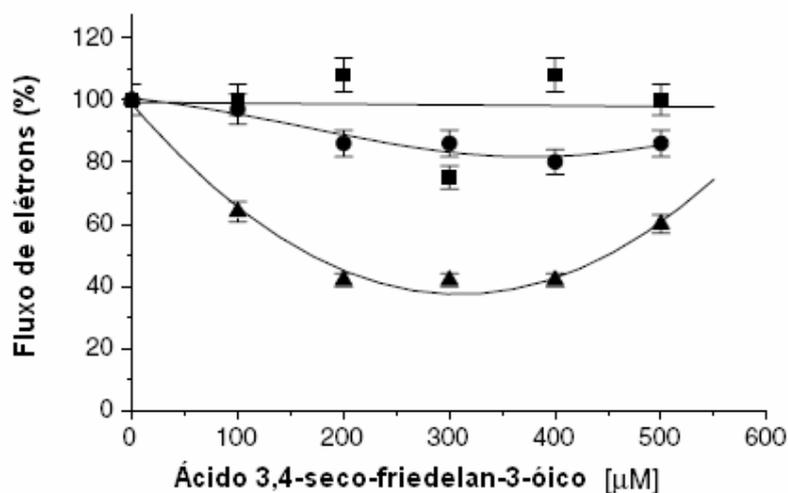


Figura 5.7: Efeito do ácido 3,4-seco-friedelan-3-óico (F9) sobre o transporte basal de elétrons (■), a fosforilação (●) e transporte desacoplado de elétrons (▲) em cloroplastos (clp) de espinafre. Controle = 480, 700 e 1060 $\mu\text{equiv. e}^-/\text{h}^{-1}$ mg^{-1} clp, respectivamente.

O valor de IC_{50} para o transporte desacoplado de elétrons da água para o herbicida MV (metil viologen) foi de 169 μM . Os resultados do efeito sobre o fluxo de

elétrons e a síntese de ATP indicaram que o ácido 3,4-seco-friedelan-3-óico atua como um inibidor da reação de Hill em baixas concentrações e como desacoplador em altas concentrações (Figura 5.7, pág. 204).

O fluxo basal de elétrons não foi afetado pelo ácido 3,4-seco-friedelan-3-óico (Figura 5.7). Este resultado sugere que o local onde o ácido 3,4-seco-friedelan-3-óico se ligaria na membrana das tilacóides, não está exposto, indicando que podem ter ocorrido mudanças conformacionais na molécula alvo, situada na membrana das tilacóides, indicando que o triterpeno pode atuar como um inibidor de transferência de elétrons ou como um desacoplador na síntese de ATP.

Para localizar o local de ação do ácido 3,4-seco-friedelan-3-óico na cadeia de transporte de elétrons dos cloroplastos foi avaliado seu efeito sobre os fotossistemas FSI e FSII. Verificou-se que o ácido 3,4-seco-friedelan-3-óico inibiu parcialmente o fotossistema desacoplado FSII da água para 2,6-diclorofenolindofenol oxidado (DCPIP_{ox}) e da água para siliciomolibdato de sódio (SiMo) em concentrações crescentes (Tabela 5.5). Os resultados indicaram que o alvo do triterpeno está localizado na parte doadora de FSII, ou seja, a enzima responsável pela hidrólise da água.

Tabela 5.5: Efeito do ácido 3,4-seco-friedelan-3-óico (F9) sobre o transporte desacoplado de elétrons no fotossistema FSII da água para DCPIP, da água para SiMo e do DPC para DCPIP e no fotossistema FSI do DCPIP para MV, da TMQH₂ para MV

MIF4 [μM]	PSI água para DCPIP		FSII água para SiMo		FSII DPC para DCPIP		FSI DCPIPred para MV		FSI TMQH ₂ para MV	
	a	b	a	b	c	b	a	b	a	b
0	333	100	120	100	737	100	400	100	300	100
100	400	120	80	67	759	103	400	100	300	100
200	333	100	40	33	-	-	400	100	500	167
300	267	80	20	18	725	98	400	100	500	167
400	200	60	0	0	735	100	400	100	500	167

a valores em μ equiv. e⁻ mg⁻¹ clp h⁻¹

b valores em percentual. c valores em mM DCPIPred mg⁻¹ clp h⁻¹

DCPIP (2,6-diclorofenolindofenol); SiMo (siliciomolibdato de sódio); MV (metil viologen); DCMU ([3-(3,4-diclorofenil)-1,1-dimetiluréia]); DPC (difetil carbazida); TMQH₂ (tetrametil-*p*-benzohidroquinona).
clp = cloroplastos

O transporte desacoplado de elétrons no FSI de 2,6-diclorofenolindofenol reduzido (DCPIP_{red}) a metil viologen (MV) e de tetrametil-p-benzohidroquinona (TMQH₂) a MV na presença de ácido 3,4-seco-friedelan-3-óico não foi afetado, já que a proporção do fluxo foi de 400 e 300 $\mu\text{equiv. e}^-/\text{h}^{-1} \text{mg}^{-1} \text{clp}$, respectivamente na presença ou ausência de 300 μM de ácido 3,4-seco-friedelan-3-óico. As reações parciais do fotossistema FSII de difenil carbazida (DPC) para DCPIPox não foram afetadas.

Assim como em suas propriedades desacopladoras, o transporte de elétrons do TMQH₂ para MV aumentou com concentrações crescentes do triterpeno, indicando o comportamento desacoplador do composto.

5.2.2.3. Determinação da fluorescência da clorofila A

A fluorescência da clorofila A na presença ácido 3,4-seco-friedelan-3-óico foi determinada para confirmar o local da interação do triterpeno com a parte doadora de FSII. O rápido aumento observado na fluorescência do herbicida [3-(3,4-diclorofenil)-1,1-dimetiluréia] (DCMU) durante sua indução cinética clássica, ocorre durante os primeiros 2 ms de indução e indica sua ação sobre a parte doadora de FSII (Figura 5.8). Verificou-se que o ácido 3,4-seco-friedelan-3-óico apresenta o mesmo modo de inibição, porém mais eficiente que o (hidroximetil-(aminometano) (Tris), um composto, reconhecido como inibidor da parte doadora de FSII (RICKERT et al., 1991). Esta ação é reportada pela primeira vez para este triterpeno (SILVA et al., 2007).

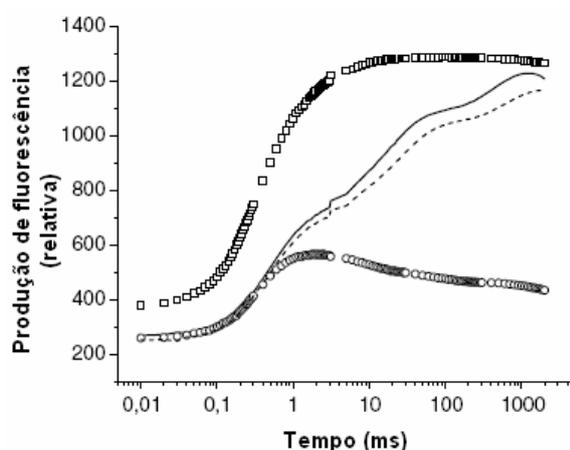


Figura 5.8: Aumento na cinética da fluorescência sobre tilacóides infiltradas com 500 μM de ácido 3,4-seco-friedelan-3-óico (linha ---). DCMU, 10 μM (linha · · · · ·). Tilacóides tratadas com Tris (linha ● ● ● ● ●) e controle (linha —).

A indução da fluorescência da clorofila A no FSII é chamada curva ou banda K (Kautsky), sendo calculada como a diferença entre a curva de Tris e a do composto controle sobre a fluorescência relativa variável. A criação da banda K aparece a 300 μs e surge em função de um desequilíbrio no fluxo de elétrons entre partes doadoras eceptoras de FSII (STRASSER, 1997).

A comparação da banda K entre as tilacóides incubadas com 0,8 mol/L Tris e tilacóides tratadas com 500 μM de ácido 3,4-seco-friedelan-3-óico mostra que o triterpeno exibe uma banda K mínima em relação aquela observada para Tris (Figura 5.9). Estes resultados contribuíram para reafirmar os dados polarográficos onde foi verificado que o alvo do ácido 3,4-seco-friedelan-3-óico é sobre a enzima responsável pela hidrólise da água, situada na parte doadora de FSII.

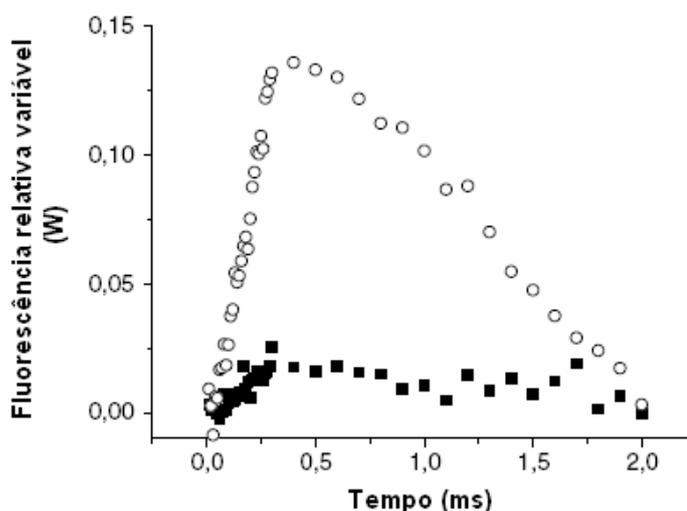


Figura 5.9: Comparação entre a banda K acerca de 300 μs das tilacóides incubadas com 0,8 Tris (°) e tilacóides tratadas com 500 μM de ácido 3,4-seco-friedelan-3-óico (%). Considerou-se a diferença de cada curva do controle com a variação da fluorescência relativa normalizada na amplitude $F_j - F_o$.

5.2.2.4. Atividade da enzima Mg^{2+} -ATPase

A atividade da enzima Mg^{2+} -ATPase é aumentada na presença de NH_4Cl , já que o mesmo é um desacoplador já conhecido e, portanto, utilizado como controle (HALL e RAO, 2001). O ácido 3,4-seco-friedelan-3-óico aumentou também a atividade da enzima Mg^{2+} -ATPase agindo então como um desacoplador (Tabela 5.6).

O ácido 3,4-seco-friedelan-3-óico mostrou-se cerca de 4 vezes mais potente do que o controle (NH_4Cl), o que explica a forte inibição da síntese de ATP (Figura

5.6, pág. 203). Em função desse resultado e comparativamente, pode também ser considerado mais potente que a tricolina A, outro produto natural que age também como inibidor da reação de Hill e desacoplador (ACHININE et al., 1999).

Tabela 5.6: Efeito do aumento das concentrações do ácido 3,4-seco-friedelan-3-óico e do NH₄Cl sobre a atividade da Mg²⁺-ATPase

Concentração do composto	$\mu\text{P mg}^{-1}\text{ clp h}^{-1}$	Atividade
Ácido 3,4-seco-friedelan-3-óico [μM]		
0	290	100
100	583	201
300	785	271
500	1350	466
Cloreto de amônia [mM]		
0	220	100
1	488	222
3	549	250
6	445	202

clp= cloroplasto

5.2.3. Parte Experimental

5.2.3.1. Métodos Gerais

O material foi coletado no mesmo local descrito na parte experimental-fitoquímica, item 2.2.2, pág. 132. Os extratos e as substâncias isoladas foram obtidas de acordo com o descrito na pág. 133.

5.2.3.2. Isolamento de cloroplastos e determinação da concentração de clorofila

Cloroplastos foram isolados a partir de folhas de espinafre (*Spinacea oleracea* L.) de acordo com LOTINA-HENNSEN et al. (1999). Para extração dos cloroplastos, as folhas livres da nervura central e das extremidades basal e apical (25 g) foram

trituras em liquidificador e submetidas à extração com 100 mL do seguinte meio: sacarose (400 mMol L⁻¹), MgCl₂ (5 mMol L⁻¹), KCl (10 mMol L⁻¹) e K⁺-tricina (30 mMol L⁻¹) em pH 8 (1 mol L⁻¹ KOH). O homogeneizado foi centrifugado (4000 RPM por 5 min a 4 °C), o sobrenadante eliminado e o sólido contendo os cloroplastos foi ressuspensionado em 1 mL meio constituído por: sorbitol (100 mMol L⁻¹), KCl (10 mMol L⁻¹), MgCl₂ (5 mMol L⁻¹) e K⁺-tricina (1 mMol L⁻¹) em pH 8 (1 mol L⁻¹ KOH) e estocado no escuro por 1 h a 4 °C (LOTINA-HENNSEN et al., 1999).

A concentração da clorofila foi determinada em 80 % de acetona de acordo com STRAIN et al., 1971.

5.2.3.3. Medida da síntese de ATP e determinação do fluxo de elétrons

A síntese de ATP foi determinada utilizando-se microeletrodo (Orion modelo 8103 Ross, Beverly, MA, USA) conectado a potenciômetro *Corning* modelo 12 (Corning Medical, Acton, MA, USA) com escala expandida e registrador Gilson (Kipp & Zonen, Bohemia, NY, USA) com pH ajustado em aproximadamente 8 (DILLEY, 1972) de acordo com HERNANDÉZ-TERRONES et al. (2003). Utilizou-se o seguinte meio reacional: clorofila (20 µg mL⁻¹), sacarose (100 mMol L⁻¹), MgCl₂.6H₂O (5 mMol L⁻¹), KCl (10 mMol L⁻¹), KCN (0,5 mM), e K⁺-tricina (1 mMol L⁻¹), pH 8 (1 mmol L⁻¹ KOH). Como aceptor de elétrons para a síntese de ATP foi utilizado solução de 50 µM do herbicida metil viologen (MV) na presença de ADP (1 mMol L⁻¹) e KH₂PO₄ (3 mMol L⁻¹). A reação teve início com iluminação saturante de 350 Watts.

O fluxo de elétrons fotossintético foi determinado pela captura de oxigênio utilizando-se um microeletrodo de Clark (Orion modelo 8103) conectado a um potenciômetro *Corning* modelo 12, com escala expandida e registrador Gilson. O transporte de elétrons basal foi determinado com um *oxygraph* YSI modelo 5300.

Cada cubeta durante a reação luminosa continha 20 mg de Chl mL⁻¹, assim como nas condições para captura de prótons, exceto nas concentrações de N-tricina que foram de 15 mMol L⁻¹, com um tempo de reação de 1 minuto, sob condições aeróbicas, e luz branca saturante de 350 Watts (HERNANDÉZ-TERRONES et al., 2003).

5.2.3.4. Determinação de reações parciais

Para determinar o ponto onde o ácido 3,4-seco-friedelan-3-óico inibiu a cadeia de transporte de elétrons nos cloroplastos, a atividade sobre fluxo de elétrons do fotossistema II desacoplado (FSII) e do fotossistema I (FSI) e suas reações parciais foram monitoradas de forma semelhante a do meio de transporte desacoplado não cíclico.

Para o fotossistema desacoplado FSII de água a 2,6-diclorofenolindofenol (DCPIP), foram adicionados ao meio sem metil viologen (MV), 1 μM 2,5-dibromo-6-isopropil-3-metil-1, 4-benzoquinona (DBMIB) e 50 μM DCPIP/300 μM $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$. O FSII foi medido pela redução do DCPIP- suportado pela evolução de O_2 , sendo o O_2 medido por polarografia. A reação parcial do transporte de elétrons desacoplado da água a siliciomolibdato de sódio (SiMo) foi determinada com a mesma mistura reacional do fluxo de elétron desacoplado sem MV, acrescida de 200 μM SiMo e 100 μM 3-(3,4-diclorofenil)-1,1-dimetiluréia (DCMU). A proporção da redução do difenil carbazida a DCPIP no transporte parcial de elétron desacoplado FSII foi medido em espectrômetro Beckman DU 650 e determinada em tilacóides tratadas previamente com 0,8 M (Tris) hidroximetil-aminometano, pH 8 e incubada por 30 min a 4 °C.

Para medir o fluxo de elétrons no fotossistema FSI de citocromo b_6f a MV foram usados 100 μM DCPIP com 300 μM de ascorbato de sódio como elétron doador e 10 μM de DCMU foram adicionados para inibir o fluxo de elétrons no fotossistema FSII. Para determinar o fluxo desacoplado de elétrons no FSI do tetrametil-*p*-benzohidroquinona (TMQH_2) a MV, foram adicionados 100 μM de TMQH_2 /300 μM ascorbato, 10 μM de DCMU e 6 mM NH_4Cl ao meio e a corrente basal de elétrons foi determinada polarograficamente. Todas as misturas de reação foram iluminadas com luz de actínio (GAF 2660) e passadas através de um filtro de 5 cm de solução de CuSO_4 , a temperatura de 20 °C. Para cada reação, um branco foi realizado utilizando somente cloroplastos no meio reacional. O valor de IC_{50} (concentração que produz 50% de inibição) foi medido e, para cada atividade, foi determinado *plots* de atividade na presença de diferentes concentrações de cada composto.

5.2.3.5. Determinação da fluorescência da clorofila A

A curva de indução da fluorescência da clorofila A foi construída a partir de medida à temperatura ambiente, no escuro, durante 5 min, em alíquotas da suspensão de cloroplastos ($20 \mu\text{g clp mL}^{-1}$) utilizando um Handy PEA (Plant Efficient Analyzer) Hansatech. O rendimento máximo da fluorescência na amostra foi obtido usando três diodos emissores de luz (650 nm). A luz ($2500 \mu\text{mol m}^2 \text{s}^{-1}$) foi gerada por uma lâmpada de halogênio e a duração do pulso foi de 2s. O meio reacional usado foi o mesmo empregado na determinação do transporte de elétrons basal.

5.2.3.6. Atividade da enzima Mg^{2+} ATPase

A atividade da enzima Mg^{2+} ATPase ligada a membranas tilacóides foi determinada de acordo com MILLS et al., (1980). A quantidade de fosfato inorgânico liberado foi medida por determinação colorimétrica como descrito por SUMNER (1944).

5.2.4. Conclusão

O ácido 3,4-seco-friedelan-3-óico se mostrou altamente eficaz na inibição da síntese do ATP, superando inclusive a atividade do composto usado como controle.

O modo de ação do ácido 3,4-seco-friedelan-3-óico como inibidor da reação de Hill e desacoplador da fotofosforilação permite supor que tais mecanismos podem ser similares aos que ocorrem nas interações com outras plantas indicando que futuramente o mesmo poderá ser utilizado no desenvolvimento de herbicidas verdes (SILVA et al., 2007).

5.3. Avaliação da Atividade tripanocida de *Maytenus imbricata*

Estes estudos foram realizados em colaboração com a profa. Dra. Suely Fumie Yamada Ogatta da Universidade Estadual de Londrina (UEL).

5.3.1. Introdução

Os seres humanos são hospedeiros de uma ampla gama de parasitas protozoários que podem ser transmitidos por insetos vetores, diretamente dos reservatórios mamíferos ou de uma pessoa a outra. Como a multiplicação dos protozoários ocorre em seus hospedeiros e a vacinação ainda não é eficiente, a farmacoterapia tem sido a opção de tratamento para indivíduos infestados.

A tripanosomíase, ou doença de Chagas é uma doença causada pelo parasita *Trypanosoma cruzi* e que atinge cerca de 24 milhões de pessoas do sul da Califórnia à Argentina e Chile, onde a forma crônica da doença em adultos é uma importante causa de miocardiopatia, megaesôfago, megacólon e morte (HARDMAN et al., 1996).

Transmitida por triatomídeos hematófagos, os tripomastigotos cíclicos entram nas células hospedeiras e proliferam como amastigotos dentro das células. Estas formas se diferenciam intracelularmente em tripomastigotos que são liberados na circulação. Os tripomastigotos se multiplicam quando invadem outras células ou quando são ingeridos por um inseto vetor (barbeiro) durante sua alimentação.

A doença crônica do coração e do trato gastro-intestinal resulta na destruição progressiva das células miocárdicas e dos neurônios do plexo mioentérico (PUNUKOLLU et al., 2006).

O tratamento é feito com a administração de fármacos como o benzonidazol, que pode suprimir a parasitemia e até curar a fase aguda da doença de Chagas, porém é pouco eficiente na fase crônica. A prevenção, ou seja, cuidados como o saneamento básico, a erradicação dos barbeiros, além de informação acerca do modo de contaminação constituem as melhores práticas para se evitar a doença. A busca de fármacos que possam atuar no controle da doença exibindo menos efeitos colaterais é crescente e várias plantas têm apresentado metabólitos ativos contra o

parasita (FARIA et al., 2005). Espécies brasileiras têm exibido também potencial bioativo no combate aos protozoários (DUARTE et al., 2002).

Para se avaliar a atividade dos compostos dulcitol (F1), 30-hidroxi-lup-20(29)-en-3-ona (G4), 3 β ,30-di-hidroxi-lup-20(29)-eno (G6), 11 α -hidroxi-lup-20(29)-en-3-ona (G5), ácido 3,4-seco-friedelan-3-óico (F9), isolados de folhas e/ou galhos de *Maytenus imbricata* bem como dos extratos obtidos das folhas e galhos sobre o parasito *T. cruzi*, foi realizado o experimento descrito no item 5.3.3.1.

5.3.2. Análise dos Resultados e Discussão

5.3.2.1. Atividade Tripanocida *in vitro* de *Maytenus imbricata*

A metodologia empregada na realização dos testes tripanocidas de amostras de *M. imbricata* é descrita por CAMARGO (1964).

O critério utilizado para determinar se a amostra avaliada exibia atividade tripanocida foi baseado em valores de IC₅₀ menores que 100, pois a substância padrão utilizada para tratamento da doença (benzonidazol) apresenta atividades em concentrações bem baixas, porém possui alta toxicidade. As substâncias e extratos avaliados não exibiram atividade tripanocida nas concentrações e condições do teste (1, 10, 50, 100 e 200 μ g/mL) (Tabela 5.7).

Tabela 5.7: Atividade tripanocida *in vitro* de *M. imbricata* sobre formas de *T. cruzi* cepa y

Substância	IC ₅₀ μ g/mL	Extratos	IC ₅₀ μ g/mL
F1	> 100	EFH	> 100
G4	> 100	EHsF	> 100
G5	> 100	ECIF	> 100
G6	> 100	EAcEtF	> 100
F9	> 100	EEtF	> 100
		EGH	> 100
		EHsG	> 100
		EAcEtG	> 100

Extratos em hexano (EFH), etanol (EEtF), acetato de etila (EAcEtF) e clorofórmio (ECIF) das folhas, em acetato de etila (EAcEtG) dos galhos e sólido obtido do EFH (EFHs) e EGH (EGHs) de *M. imbricata*.

5.3.3. Parte Experimental

5.3.3.1. Avaliação da atividade de *M. imbricata* sobre o crescimento de *T. cruzi*

Para a avaliação da atividade tripanocida, cerca de $1,0 \times 10^5$ parasitas na sua forma epimastigota foram inoculadas em um volume final de 2,0 mL de meio LIT (Liver Infusion Tryptose) (CAMARGO, 1964), distribuídos em tubos com tampa de rosca, juntamente com 1, 10, 50, 100 e 200 $\mu\text{g/mL}$ das substâncias a serem testadas. A seguir, as amostras foram incubadas a 28 °C. Culturas sem adição das substâncias foram utilizadas como controle. O crescimento microbiano foi determinado pela contagem das células, a cada 24h, utilizando-se uma câmara hematimétrica (*Improved Neubauer Chamber*). As células foram diluídas em tampão fosfato 0,01 M [phosphate buffer-saline (PBS)], contendo NaCl 0,15 M, pH 7,2. Antes de cada contagem foi realizada uma análise da viabilidade celular através de microscopia a fresco, para a verificação do índice de motilidade e da integridade da célula. Os testes foram realizados em duplicata em duas ocasiões diferentes.

5.3.4. Conclusão

Nas condições utilizadas nos experimentos, as amostras testadas não exibiram atividade contra *T. cruzi*.

CONCLUSÃO

O estudo químico, farmacológico e histológico de *Maytenus imbricata* representou uma contribuição significativa para o conhecimento das características da família *Celastraceae*, que apresenta várias espécies portadoras de diferentes tipos de atividade farmacológica e de metabólitos secundários de classes distintas.

O estudo da anatomia foliar possibilitou verificar a presença de caracteres morfoanatômicos comuns a outras espécies do gênero *Maytenus*.

Todos os constituintes isolados puros ou identificados em misturas são aqui descritos pela primeira vez, como sendo pertencentes a essa espécie. Do extrato hexânico das folhas e dos galhos de *M. imbricata* foram obtidos 6 triterpenos pentacíclicos (TTPC) pertencentes à classe dos lupanos, 3-oxo-lup-20(29)-en-30-al, 30-hidroxi-lup-20(29)-en-3-ona, 11 α -hidroxi-lup-20(29)-en-3-ona, 3 β ,30-di-hidroxi-lup-20(29)-eno; lupenona e 3 β -esteariloxi-lup-20(29)-eno; 2 TTPC pertencentes à classe dos friedelanos, friedelina e ácido 3,4-seco-friedelan-3-óico e a xantona, 1-hidroxi-3,6-dimetoxi-8-metil-9-xantona, além de misturas de friedelina e friedelinol, misturas de ésteres de ácidos graxos e misturas dos lupanos acima citados.

Maytenus imbricata mostrou-se especialmente rica em TTPC da série lupano, diferentemente do que tem sido observado em outras espécies de celastráceas, onde ocorre maior incidência de triterpenos das séries friedelano e oleanano.

O estudo do extrato em acetato de etila das folhas e galhos foi obtido 1 flavonóide, a epicatequina e uma mistura de proantocinidinas. A análise desse extrato por CG-EM permitiu a identificação dos ácidos palmítico e adípico, bem como de sorbitol e hidrocarbonetos de cadeia longa *n*-octadecano e eicosano.

Do extrato etanólico dos galhos, foi obtida quantidade apreciável de dulcitol, um poliol comumente encontrado em diferentes espécies da família *Celastraceae*.

Através da análise por CG-EM dos extratos etanólico dos galhos e folhas e clorofórmico das folhas foi possível identificar a presença de sorbitol, dos ácidos adípico, palmítico, esteárico e eicosano.

As folhas de *M.imbricata* apresentaram baixo teor de óleo essencial, constituído por β -pineno, 2-feniltridecano, 3-feniltridecano e o hexanodioato de dioctila, constituintes pouco comuns em óleos essenciais, onde predominam geralmente mono e sesquiterpenos. Nas sementes e no elaiosoma foram identificados principalmente ésteres de ácidos graxos, predominando os ésteres do ácido oléico, esteárico e palmítico.

A reação de Bayer-Villiger se mostrou eficiente para a oxidação da friedelina a lactona, um intermediário para a preparação do ácido 3,4-seco-friedelan-3-óico. Considerando que o ácido 3,4-seco-friedelan-3-óico exibe diversas atividades farmacológicas importantes e a friedelina é um dos triterpenos mais abundantes em espécies do gênero *Maytenus*, justifica-se a continuidade destes estudos, visando a obtenção do ácido 3,4-seco-friedelan-3-óico.

A análise cristalográfica por difratometria de raios-X permitiu a caracterização estrutural inequívoca dos lupanos 30-hidroxi-lup-20(29)-en-3-ona, 11 α -hidroxi-lup-20(29)-en-3-ona, 3 β ,30-di-hidroxi-lup-20(29)-eno, confirmando e ampliando os dados espectrométricos disponíveis na literatura para esses triterpenos.

Os extratos em acetato de etila, etanólico e clorofórmio das folhas, hidroalcoólico das raízes e em acetato de etila dos galhos, bem como a epicatequina exibiram potencial atividade antioxidante e alto poder redutor, o que justifica a continuidade dos estudos em *M. imbricata*, avaliando também suas atividades em sistemas *in vivo*, já que as mesmas são aqui reportadas pela primeira vez. O ácido 3,4-seco-friedelan-3-óico se mostrou altamente eficaz na inibição da síntese do ATP, indicando que no futuro o mesmo poderá ser utilizado no desenvolvimento de herbicidas verdes. Extratos das folhas e galhos, bem como os compostos dulcitol, 30-hidroxi-lup-20(29)-en-3-ona, 3 β ,30-di-hidroxi-lup-20(29)-eno, 11 α -hidroxi-lup-20(29)-en-3-ona, ácido 3,4-seco-friedelan-3-óico não exibiram atividade contra *T. cruzi*.

Os resultados obtidos durante a avaliação de *Maytenus imbricata* justificam a continuidade dos estudos desta espécie e reafirmam a importância do estudo das diversas famílias de plantas distribuídas pela grande biodiversidade brasileira.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABDEL-MOGIB, M., A lupane triterpenoid from *Maerua oblongifolia*. *Phytochemistry*, v. 51 n 3, p. 445-448, **1999**.
- ACHNINE, L., MATA, R., LOTINA-HENNSEN, B. Interference of the Natural Product 7-Oxo-7-deacetoxygedunin with CF₀ of H⁺-ATPase of Spinach Chloroplasts. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 63, 3, p. 139-149, **1999**.
- AGRAWAL, P. K., **Carbon-13 NMR of Flavonoids**, 1^a Ed. Elsevier, New York, 564p. **1989**.
- AIRES, S.S., FERREIRA, A.G., BORGHETTI, F., Efeito alelopático de folhas e frutos de *Solanum lycocarpum* A. St.-Hil. (*Solanaceae*) na germinação e crescimento de *Sesamun indicum* L. (*Pedaliaceae*) em solo sob três temperaturas, *Acta Botanica Brasílica*, v.19, n.2, p. 339-344, **2005**.
- ALLEN, F.H.; The Cambridge Structural Database: a quarter of a million crystal structures and rising, *Acta Crystallogr., Sect. B: Struct. Sci.*, p. 380-388, **2002**.
- ALLISON, A.C., CACABELOS, R., LOMBARDI, V.R.M., ÁLVAREZ, X.A., VIGO, C., Celastrol, a potent antioxidant and anti-inflammatory drug, as a possible treatment for Alzheimer's disease, *Prog. Neuro-Psychopharmacology & Biol. Psychiat.*, v. 25, p. 1341-1357, **2001**.
- ALVES, J.S., CASTRO, J.C.M., FREIRE, M.O., CUNHA, E.V.L., Complete assignments of the ¹H and ¹³C NMR spectra of four triterpenes of the ursane, artane, lupane and friedelane groups, *Magnetic Resonance in Chemistry*, v. 38, p. 201-206, **2000**.
- ARAÚJO, M., Fitoterápicos: as plantas que curam, *Guia da Farmácia*, ano X, n. 131, p. 92-94, **2003**.
- AVILLA, J., TEIXIDÒ, A., VELASQUÈZ, 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), *Journal Agricultural Food Chemistry*, v. 48, p. 88-92, **2000**.
- BAAS, W.J., Naturally Occurring Seco-Ring-A-Triterpenoids and their Possible Biological Significance, *Phytochemistry*, v. 24, n. 9, p. 1875-1889, **1995**.
- BARREIRO, E.J., FRAGA, C. A., Química Medicinal, Ed. ArtMed. São Paulo, 243 p. **2001**.
- BARROSO, G.M., Sistemática de angiospermas do Brasil. Vol. 3. Imprensa Universitária da Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, **1991**.
- BAYER-VILLIGER, 1899. In March, J.; **Advanced Organic Chemistry**, 4^a edição, Wiley, New York, 1098p, **1992**.
- BITTNER M., SILVA M., Estudio Químico de las especies de la Familia Podocarpaceae en Chile. In: *Química de la flora de Chile* (Ed. Munoz O.). Universidad de Chile, p. 243-261, **1992**.
- BLOIS, M.S., Antioxidant determination by the use of a stable free radical, *Nature*, v. 181, n. 4617, p. 1199-1120, **1958**.
- BRITTO, M.M., SOUZA, J.R., SILVA, G.D.F., SANTOS, A.K.O., Isolamento de 3-oxo-lup-20(29)-en-30-ol, 15^a Reunião da SBQ, Caxambu, Minas Gerais, **1992**.
- BRUNO, I.J., COLE, J.C., KESSLER, M., LUO, J., MOTHERWELL, W.D.S., PURKIS, L.H., SMITH, B.R., TAYLOR, R., COOPER, R.I., HARRIS S.E., ORPEN, A.G., *J. Chem. Inf. Comput. Sci.*, v. 44, p. 2133–2144, **2004**.
- BURNS, D., REYNOLDS, W.F., BUCHANAN, G., REESE, P.B., ENRIQUEZ, R.G., Assignments of ¹H and ¹³C spectra and investigation of hindered side-chain rotation in lupeol derivatives, *Magnetic Resonance in Chemistry*, v. 38, p. 488-493, **2000**.
- CALDERON, A.I., TERREAUX, C.S.K, KURT, P., BURDETTE, P., PEZZUTO, J.E., JOHN, M., GUPTA, M.P., HOSTETTMANN, K., Isolation and Structure Elucidation of an Isoflavone and a Sesterterpenoic Acid from *Henriettella fascicularis*, *Journal of Natural Products*, v. 65, n. 12, p. 1749-1753, **2002**.
- CAMARGO, E.P., Growth and differentiation in *Trypanosoma cruzi*. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*, v. 6, p. 93-100, **1964**.
- CAO, G., SOFIC, E., PRIOR, R.L., Antioxidant and Prooxidant Behavior of Flavonoids: Structure-Activity Relationships, *Free Radical Biol. and Medicine*, v. 22, n. 5, p. 749-760, **1997**.

- CAPECKA, E., MARECZEK, A., LEJA, M., Antioxidant activity of fresh and dry herbs of some *Lamiaceae* species, *Food Chemistry*, v. 93, p. 223-226, **2005**.
- CARLINE, E.L.A., RODRIGUES, E. Plantas medicinais do Brasil: o pesquisador brasileiro consegue estudá-las? *Revista Fitos*, v. 1, n. 2, p. 08-18, **2005**.
- CARPENTER, R.C., SOTHEESWARAN, S., SULTANBAWA, M.U.S., ¹³C NMR studies of some lupane and taraxerane triterpenes, *Org. Mag. Reson.*, v. 14, n. 6, p. 462-465, **1980**.
- CARVALHO-OKANO, R.M., Estudos Taxonômicos do gênero *Maytenus* Mol. emend. Mol (*Celastraceae*) do Brasil Extra Amazônico, Campinas, Instituto de Biologia, UNICAMP, Tese de Doutorado, 253 p, **1992**.
- CARVALHO-OKANO, R.M., LEITÃO FILHO, H.F., O gênero *Maytenus* Mol. emend. Mol. (Celastraceae) no Brasil extra-amazônico. In: M.S. Reis & S.R. Silva. Conservação e uso sustentável de Espinheira Santa, p.11-51, **2005**.
- CHAKRAVARTI, R.N., MITRA, M.N, Action of Raney nickel on lupeol, *Bull. of the Calcutta School of Tropical Medicine*, v. 12, n. 1, p. 21-2, **1964**.
- CHIEN, N.Q., HUNG, N.V., CUONG, N.M., FONG, H.H.S., TAN, G.T., New 3-O-Acyl Betulinic Acids from *Strychnos vanprukii* Craib, *J. of Nat. Prod.*, v. 67, n. 6, p. 994-998, **2004**.
- CHUL, D.J., KUN HO, S., SIK, K.S., Studies on the constituents of the roots of *Rubus parvifolius* (L). Isolation of (-)-epicatechin, *Saengyak Hakhoechi*, v. 19, n. 3, p. 170-173, **1988**.
- COLLINS, C.H., BRAGA, G.L., BONATO, P.S., **Introdução A Métodos Cromatográficos**, UNICAMP, São Paulo, 279 p, **1997**.
- CORSINO, J., BOLZANI, V.S., PEREIRA, A.M.S., FRANÇA, S.C., FURLAN, M., Bioactive sesquiterpene pyridine alkaloids from *Maytenus aquifolium*, *Phytochemistry*, v. 48, n. 1, p. 137-140, **1998**.
- CORSINO, J., CARVALHO, P.R.F., KATO, M.J., LATORRE, L.R., OLIVEIRA, O.M., ARAÚJO, A.R., BOLZANI, V.S., FRANÇA, S.C., PEREIRA, A.M.S., FURLAN, M., Biosynthesis of friedelane and quinonemethide triterpenoids is compartmentalized in *Maytenus aquifolium* and *Salacia campestris*, *Phytochemistry*, v. 55, p. 741-748, **2000**.
- CRONQUIST, A., **An integrated system of classification of flowering plants**. New York: Columbia University, **1988**.

- 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**.
- DEN HARTOG, R.M.; BASS, P., Epidermal characters of the *Celastraceae sensu lato*. *Acta Botanica Neerlandica*, v.27, p. 355-388, **1978**.
- DICKISON, W.C., **Integrative Plant Anatomy**, San Diego, Harcourt Academic Press. **2000**.
- DILLEY, R.A., Ion transport (H^+ , K^+ , Mg^{2+} exchange phenomena), *Methods Enzymology*, v. 24, p. 68–74, **1972**.
- DUARTE, L.P, Estudo Químico, estrutural e da atividade antibacteriana de triterpenos pentacíclicos isolados dos galhos e raízes de *Austroplenckia populnea*, Belo Horizonte, Departamento de Química, ICEx- UFMG, Tese de Doutorado, 243p, **2000**.
- DUARTE, L.P., VIEIRA FILHO, S.A., SILVA, G.D.F. SOUZA, J.R., PINTO, A.S., Atividade anti-tripanosomicida de triterpenes pentacíclicos isolados de *Austroplenckia populnea* (*Celastraceae*), *Rev. Inst. Med. Trop., S. Paulo*, v. 44, n. 2, p. 109-112, **2002**.
- DUARTE, M.R., DEBUR, M.C., Steam and leaf morphoanatomy of *Maytenus ilicifolia*, *Fitoterapia*, v. 76, p. 41-49, **2005**.
- DUTTA S., RAY, S.C., Reaction of triterpenoids with selenium dioxide and hydrogen peroxide, *Indian Journal of Chemistry*, 30B, n. 5, p. 513-515, **1991**.
- ELISABETSKY, E, ETKIN, N.L, Seeking a transdisciplinary and culturally germane science: The future of ethnopharmacology, *J. Ethnopharmacol.*, v. 100, p.1-2, **2005**.
- ELISABETSKY, E., Pesquisas em plantas medicinais, *Ciências e Cultura*, v. 39, n. 8, p. 697-702, **1987**.
- ESQUENAZI, D., WIGG, M.D., MIRANDA, M.M.F.S., RODRIGUES, H.M., TOSTES, J.B.F., ROZENTAL, S., SILVA, A.J.R., ALVIANO, C.S., Antimicrobial and antiviral activities of polyphenolics from *Cocos nucifera* Linn. (*Palmae*) husk fiber extract, *Res. in Microbiol.*, v. 153, p. 647-652, **2002**.
- FARIA, T.J. SILVA,. FONSECA L.G., SOUZA FILHO, J.D., Synthesis and trypanocidal activity of 7, 2'-dioxxygenated isoflavones and oxypropanolamine derivatives, *J. Braz. Chem. Soc.*, vol. 16, n. 6b, p. 1415-1419, **2005**.

- FARRUGIA, L.J., WATSON, I.M., (1,1,1,5,5,5-Hexafluoro-2,4-pentanedionato-O')(1,4,7,10,13- entaoxapentadecane-⁵O) sodium, *Acta Cryst. C*, v. **55**, p. 326-328, **1999**.
- FISCHER, R.X.; *STRUPLO84*, a Fortran plot program for crystal structure illustrations in polyhedral representation, *J. Appl. Cryst.*, v.18, 258-262, **1985**.
- FONSECA, A.P., Estudo fitoquímico do decocto das folhas de *Maytenus truncata* Reissek e avaliação das atividades antinociceptiva, antiedematogênica e antiulcerogênica de extratos do decocto, Belo Horizonte, Departamento de Química, ICEx- UFMG. Tese de Doutorado, **2004**.
- FUNARI, C.S., FERRO, V.O., Uso ético da biodiversidade brasileira: necessidade e oportunidade, *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v. 15, n. 2, p. 178-182, **2005**.
- GONZALEZ A.G., TINCUSI, B.M., BAZZOCHI, I.L., TOKUDA, H., NISHIMO, H., KONOSHIMA, T., JIMENÉZ, I.A., RAVELO, A.G., *Bioorg. and Medic. Chem.*, v. 8, p. 1773-1778, **2000**.
- GONZALEZ, F.G., PORTELA, T.Y., STIPP, E.J., Di STASI, L.C., Antiulcerogenic and analgesic effects of *Maytenus aquifolium*, *Sorocea bomplandii* and *Zolernia ilicifolia*, *J. of Ethnopharmacol.*, v. 77, p. 41-47, **2001**.
- GOTTILIEB, O.R., **Introdução à espectrometria de Massa das Substâncias Orgânicas**, 1ª Ed. UFRJ, Rio de Janeiro, 175p. **1968**.
- GRECIANTIGA, <http://greciantiga.org>; acessado em 06/06/06.
- HALL, D.O., RAO, K.K., M, **Photosynthesis, Studies'n Biology**, 6ª Ed., Cambridge University Press, New York, 211 p., **2001**.
- HARDMAN, J.G., LIMBIRD, L.E., MOLINOFF, P.B., RUDDON, R.W., GILMAN, G.A., **As Bases Farmacológicas da Terapêutica**, 9ª Ed., McGraw-Hill Interamericana, México, 1436 p., **1996**.
- HARMATA M., RASHATASAKHON P., Observations on the regioselectivity of some Baeyer–Villiger reactions *Tetrahedron Letters*, v. 43, n. 20, p. 3641-3644, **2002**.
- HARRISH, R., SHIVANANDAPYA, T., Antioxidant activity and hepatoprotective potential of *Phyllanthus niruri*, *Food Chemistry*, v. 95, n. 2, p. 180-185, **2006**.
- HARWOOD, L.M., MOODY C.J., **Experimental Organic Chemistry**, Blackwell Scient. Publ., **1989**.
- HATANO, T., MIYATAKE, H., NATSUME, M., OSAKABE, N., TAKIZAWA, T., ITO, H., YOSHIDA, T., Proanthocyanidin glycosides and related polyphenols from

- cacao liquor and their antioxidant effects, *Phytochemistry*, v. 59, p. 749-758, **2002**.
- HERNÁNDEZ-TERRONES, M.G., AGUILAR, M.I., KING-DIAZ, B., LOTINA-HENSEN B., Interference of methyl trachyloban-19-oate ester with CF₀ of spinach chloroplast H⁺-ATPase, *Archives of Biochemistry and Biophysics*, v. 418, n. 1, p. 93-97, **2003**.
- HICHEY, L.J. Clasificación de la Arquitectura de las Hojas de Dicotiledoneas. *Boletín de la Sociedad Argentina de Botánica*, v. 16, n.1-2, p. 1-26, **1974**.
- HISHAM, G.A., KUMAR, J., FUJIMOTO, Y., HARA N., Salacianone and salacianol, two triterpenes from *Salacia beddomei*, *Phytochemistry*, v. 40, n. 4, p. 1227-1231, **1995**.
- HLWATIKA, C.N.M., BHAT, R.B., An ecological interpretation of the difference in leaf anatomy and its plasticity in contrasting tree species in orange kloof, table mountain, South Africa, *Annals of Botany*, v. 89, p. 109-114, **2002**.
- HOWES, M.J., HOUGHTON, P.J., Plants used in chinese and indian traditional medicine for improvement of memory and cognitive function, *Pharmacol., Biochem. and Behavior*, v. 75, p. 513-527, **2003**.
- HUSSEIN, G., NAKAMURA, N., MESLHY, R.M., HATTORI, M., Phenolic from *Maytenus senegalensis*, *Phytochemistry*, v. 50, p. 689, **1999**.
- JAYAPRAKASHA, G.K., SINGH, R.P., SAKARIAH, K.K., Antioxidant activity of grape seed (*Vitis vinifera*) extracts on peroxidation models in vitro, *Food Chemistry*, v. 73, n. 3, p. 285 - 290, **2001**.
- JELLER, A.H., SILVA, D.H.S., LIÃO, L.M., BOLZANI, V.S., FURLAN, M., Antioxidant phenolic and quinonemethide triterpenes from *Cheiloclinium cognatum*, *Phytochemistry*, v. 65, p. 1977-1982, **2004**.
- JIN, H.Z., HWANG, B.Y., KIM, H.S., LEE, J.H., KIM, Y.H., LEE, J.J., Antiinflammatory Constituents of *Celastrus orbiculatus* Inhibit the NF- κ B Activation and NO Production, *Journal of Natural Products*, v. 65, p. 89-91, **2002**.
- JOFFILLY, A., VIEIRA, R.C., Anatomia foliar de *Maytenus* Mol. emend Mol. (*Celastraceae*), ocorrente no estado do Rio de Janeiro, Brasil, *Acta Bot. Bras.*, v. 19, n. 3, p. 549-561, **2005**.
- JOHANSEN, D.A.. **Plant microtechnique**. New York, Mc. Graw-Hill Book, **1940**.

- 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.*, v. 94, p. 93-100, **2004**.
- KING-DIAZ, B., PEREZ-REYES, A., LEITE DOS SANTOS, F.J., FERREIRA-ALVES, D.L., PILO'-VELOSO, D., URIBE-CARVAJAL, S., LOTINA-HENNSEN, B., Natural diterpen e β -lactone derivative as photosystem II inhibitor on spinach chloroplasts, *Pestic. Biochem. Physiol.*, v. 84, p.109–115, **2006**.
- KISMANN, K.G., Resistência de plantas daninhas a herbicidas, <http://www.hrac-br.com.br>, acessado em 06/07/06.
- KOBAYASHI, S; UYAMA, H; Enantioselective and Regioselective Polymerization with Lipase Catalysis to Polyesters. *ACS Symposium Series: Biocatalysis in Polymer Science*, p. 28-140, **2003**.
- KRANL, K., SCHLESIER, K., BITSCH, R., HERMANN, H., ROHE, M., BÖHM, V., Comparing antioxidative food additives and secondary plant products – use of different assays, *Food Chemistry*, v. 93, n. 1, p. 171-175, **2005**.
- KRAUS, J.E., ARDUIN, M., **Manual básico de métodos em morfologia vegetal**. Rio de Janeiro, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, **1997**.
- KROW, R.G.: The Bayer Villiger Reaction. In: LEY, S. V. (Ed). **Comprehensive Organic Synthesis - Selectivity, Strategy and Efficiency In Modern Organic Chemistry**, 1ª Ed., Pergamon Press, cap. 5, p. 671-688, **1992**.
- KUSMENOGLU, S., ROCKWOOD L.L., GRETZ, M.R Fatty acids and diacylglycerols from elaiosomes of some ant-dispersed seeds, *Phytochemistry*, v. 28, n. 10, p. 2601-2602, **1989**.
- LAZÁR, D., POSPÍSIL, P., NAUS, J., Decrease of fluorescence intensity after the K step in chlorophyll a fluorescence induction is suppressed by electron acceptors and donors to photosystem 2, *Photosynthetica*, v. 37, p. 255–26, **1999**.
- LI, Y., GUO, C., YANG, J., WEI, J., XU, J., CHENG, S., Evaluation of antioxidant properties of pomegranate peel extract in comparison with pomegranate pulp extract. *Food Chemistry*, v. 96, n. 1, p. 254-260, **2006**.
- LIFE, <http://www.life.uiuc.edu>; acessado em 22/01/03.
- LORENZI, H., MATOS, F.J.A., **Plantas medicinais no Brasil**, 1ª Ed., Instituto Plantarum: Nova Odessa, 544p, **2002**. LOTINA-HENNSEN, B.; MORENO-SÁNCHEZ, R.; IGLESIAS-PRIETO, R.; PEREDA-MIRANDA, R.; ACHNINE, L.

- Tricolorin A, a potent natural uncoupler and inhibitor of photosystem II acceptor side of spinach chloroplasts, *Physiologia Plantarum*, v.106, p. 246-252, **1999**.
- LUCAS, P.W.; TURNER, I.M.; DOMINY, N.J.; YAMASHITA, N. Mechanical defenses to herbivory, *Annals of Botany*, v. 86, p. 913-920, **2000**.
- MACAÚBAS, C.I.P., OLIVEIRA, M.G.M., FORMIGONI, M.L.O.S., FILHO. M.G.S., CARLINI, E.A., Estudo da ação antiúlcera gástrica de plantas brasileiras: *Maytenus ilicifolia* (Espinheira Santa) e outras. Brasília: CEME, 87p., **1988**.
- MACRAE, C.F., EDGINGTON, P.R., MCCABE, P., PIDCOCK, E., SHIELDS, G.P., TAYLOR, R., TOWLER, M., VAN DE STREEK, J., *Mercury: Visualization and analysis of crystal structures*, *J. Appl. Cryst.*, 39, 453-457, **2006**.
- MAHATO, S.B., KUNDU, A.P., ¹³C NMR spectra of pentacyclic triterpenoids - a compilation and some salient features, *Phytochemistry*, v. 37, n. 6, p. 1517-1575, **1994**.
- MAHATO, S.B., SEN, S., Advances in triterpenes research, 1990-1994, *Phytochemistry*, v. 44, n. 7, p. 1185-1236, **1997**.
- MANN, J. **Secondary Metabolism**. 2. Ed. Oxford: Oxford Science Publications, 374p, **1995**.
- MARINE-BETTOLO, G.B., Chemistry of active principles of *Celastraceae-Hippocrateaceae*, *Il Farmaco*, v. 29, n. 7, p. 531-533, **1974**.
- MATHE, C., CULIOLI, G., ARCHIER, P., VIEILLESZAZES, C. Characterization of archaeological frankincense by gas chromatography-mass spectrometry, *Journal of Chromatography A*, v. 1023, p. 277-285, **2004**.
- METCALFE C.R, CHALK L., **Anatomy of dicotyledons: leaves, stem, and woods in relation to taxonomy with notes on economics uses**, Oxford:Clarendon, v.1, 276p, **1981**.
- METCALFE, C.R., CHALK, L., **Anatomy of the Dicotyledons**, Oxford, Clarendon Press, v. 2, 1500p, **1950**.
- MILLS, J.D., MITCHELL, P., SCHURMANN, P., Modulation of coupling ATPase activity in intact chloroplasts, *FEBS Lett.*, v. 112, p. 173-177, **1980**.
- MIRANDA, R.R.S., Estudo Fitoquímico e avaliação do potencial farmacêutico de *Maytenus salicifolia* Reiss (Celastraceae), Belo Horizonte, Departamento de Química, ICEx- UFMG. *Exame de Qualificação*, **2004**.

- MIRANDA, R.R.S., SILVA, G.D.F., DUARTE, L.P., VIEIRA FILHO, S.A., Triterpene Esters Isolated from Leaves of *Maytenus salicifolia* Reissek, *Helvetica Chimica Acta*, *in press*, **2007**.
- MOITEIRO, C., CURTO, M.J.M., MOHAMED, N., MARTINEZ-DIAZ, M.B.R., COLOMA, A. G. Bio-valorization of friedelane triterpenes derived from the cork processing industry by-products, *J. Agric. Food Chem.*, v. 54, p. 3566-3571, **2006**.
- MONTANARI, T., BEVILACQUA, E., Effect of *Maytenus ilicifolia* Mart. on pregnancy mice, *Contraception*, v. 65, p. 171-175, **2002**.
- MURCIA, M.A, EGEA, I., ROMOJARO, F., PARRAS, P., JIMENEZ, A.M., MARTINEZ-TOME, M., Antioxidant Evaluation in Dessert Spices Compared with Common Food Additives: Influence of Irradiation Procedure, *J Agric Food Chem.*, v. 52, n. 7, p. 1872-1881, **2004**.
- OGUNKOYA, L., Application of mass spectrometry in structural problems in triterpenes, *Phytochemistry*, v. 20, p. 121-126, **1981**.
- OKINE, L.K.N., NYARKO, A.K., OSEI-KWABENA, N., OPPONG, I.V., BARNES, F., OFOSUHENE, M., The antidiabetic activity of herbal preparation ADD-199 in mice: a comparative study with two oral hypoglycaemic drugs, *J. of Ethnopharmacol.*, v. 97, n. 1, p. 31-38, **2005**.
- OLIVEIRA, D.M., Constituintes Químicos Isolados das Raízes de *Maytenus acanthophylla* Reissek (Celastraceae) Parte II e Produção e caracterização de blendas a partir de polímero natural 1,4-trans-poliisopreno extraído de plantas da família Celastraceae. Belo Horizonte, Departamento de Química, ICEx- UFMG. *Tese de Doutorado*, **2005**.
- ORABI, K.Y., AL-QASOUMI, S.I., EL-OLEMY M.M., MOSSA, J.S., MUHAMMAD, I., Dihydroagarofuran alkaloid and triterpenes from *Maytenus heterophylla* and *Maytenus arbutifolia*, *Phytochemistry*, v. 58, p. 475-480, **2001**.
- ORGANIC SYNTHESIS, Coll. Vol. 4, p.132, **1963**.
- PATRA, A., CHAUDHURI, S., Studies on triterpenoids: conversion of friedelanones into some secofriedelanes, *Indian J. of Chem.*, 22B, v. 5, p. 376-380, **1989**.
- PERRIM, D.D, ARMAREGO, W.L.F., **Purification of Laboratory Chemicals**, Butterworth-Heinemann; 4^a ed. Hardcover, 529 p., **1988**.

- PIMENTA J.R., SILVA, S.R.S., SILVA, G.D.F., BARBOSA, L.C.A., ELLENA, J., DORIGUETTO, A.C., A pentacyclic triterpene from *Maytenus imbricata*: structure elucidation by X-ray crystallography, *Structural Chemistry*, v. 1, n. 1, p. 149-153, **2006**.
- PINHEIRO, J.A., Análise da Constituição Química da madeira de *Maytenus guianenses*, Belo Horizonte, Departamento de Química, ICEx- UFMG, Dissertação de Mestrado, **1980**.
- PIO CORRÊA, M., **Dicionário das plantas úteis do Brasil**. Distrito Federal, Rio de Janeiro: Ministério da Agricultura, v. 1-6, **1926-1978**.
- PUNUKOLLU, G., GOWDA, R.M., KHAN, I.A., NAVARRO, V.S., VASAVADA, B.C., Clinical aspects of the Chagas' heart disease, *International Journal of Cardiology*, in Press, **2006**.
- QUEIROGA, C.L., SILVA, G.F., DIAS, P.C., POSSENTI, A., CARVALHO, J.E., Evaluation of antiulcerogenic activity of friedelan-3b-ol and friedelin isolated from *Maytenus ilicifolia* (Celastraceae), *J. of Ethnopharmacol.*, v. 72, p. 465-468, **2000**.
- RAVELO, A.G., BRAUN, A.E., ORELLANA, H.C., SACAU, E.P., SIVERIO, D.M., Recent studies on natural products as anticancer agents, *Curr. Top. Med. Chem.*, v. 4, p. 241-265, **2004**.
- RICKERT, K.W., SEARS, J., BECK, W.F., BRUDVIG, G.W., Mechanism of irreversible inhibition of O₂ evolution in photosystem II by Tris(hydroxymethyl)aminomethane, *Biochem.*, v. 13, n. 30 (32), p. 7888-7894, **1991**.
- ROBBS, C.F., BITTENCOURT, A.M., Controle Biológico de Insetos. EMBRAPA/CTAA, – *Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento*, **1999**.
- 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, 93 p. **1993**.
- SALAZAR, G.C.M., *Maytenus truncata* Reissek: Estudo Fitoquímico: Análises Histológica e da Capacidade Sortiva de Folhas e Avaliação de Atividade Biológica de Extratos, Belo Horizonte, Departamento de Química, ICEx, UFMG, Tese de Doutorado, 265 p. **2005**.
- SANNOMIYA, M., VILEGAS, W., RASTRELLI, L., PIZZA, C., A flavonoid glycoside from *Maytenus aquifolium*, *Phytochemistry*, v. 49, n. 1, p. 237-239, **1998**.

- SEBSEBE, D. The genus *Maytenus* (Celastraceae) in NE tropical Africa and tropical Arábia, *Acta Universitatis Upsaliensis Symbolae Botanicae Upsaliensis*, v. 25, n. 2, p. 1101, **1985**.
- SHELDRICK, G.M. *SHELXL-97. Program for Crystal Structures Analysis*, Univ. of Göttingen: Göttingen, Germany, **1997**.
- SHIOJIMA, K., ARAI, Y., MASUDA, K., TAKASE, Y., AGETA, t., AGETA H., Mass Spectra of pentacyclic triterpenoids, *Chem. Pharm. Bull.*, v. 40, n. 7, p. 1683-1690, **1992**.
- SHIROTA, O., MORITA, H., TAKEYA, K., HOKAWA, H., Cytotoxic aromatic triterpenes from *Maytenus ilicifolia* and *Maytenus chuchuhuasca*, *Journal of Natural Products*, v. 57, n. 12, p. 1675-1681, **1994**.
- SILVA, C.G. HERDEIRO, R.S., MATHIAS, C.J., PANEK, A.D., SILVEIRA, C.S., RODRIGUES, V.P., RENNÓ, M.N., FALCÃO, D.Q., CERQUEIRA, D.M., MINTO, A.B.M., NOGUEIRA, F.L.P., QUARESMA, C.H., SILVA, J.F.M., MENEZES, F.S., ELEUTHERIO, E.C.A., Evaluation of antioxidant activity of brazilian plants, *Pharmacological Research*, v. 52, p. 229-233, **2005a**.
- SILVA, J.L., SILVA, R.P., JORGE, R.M., SILVA, G.D.F., VIEIRA FILHO, S.A., FONSECA, A.P.N.D., TAGLIATI, C.A., Evaluation of antiulcerogenic activity of *Maytenus truncata* Reiss (Celastraceae), *Rev. Bras. Farmacognosia*, v. 15, **2005b**.
- SILVA, S.R.S., SILVA, G.D.F., BARBOSA, L.C.A., DUARTE, L.P., KING-DIAZ, B., ARCHUNDIA-CAMACHO, F., LOTINA-HENNSSEN, B. Uncoupling and inhibition properties of 3,4-seco-friedelan-3-oic acid isolated from *Maytenus imbricata*, *Pesticide Biochemistry and Physiology*, v. 87, n. 2, p. 109-114, **2007**.
- SILVA, S.R.S., SILVA, G.D.F., BARBOSA, L.C., DUARTE, L.P., VIEIRA FILHO, S.A., Lupane pentacyclic triterpenes isolated from stems and branches of *Maytenus imbricata* (Celastraceae), *Helvetica Chimica Acta*, v. 88, p. 1102-1109, **2005c**.
- SILVERSTEIN, R.M., BASSLER, G.C., MORRIL, T.C., **Identificação Espectrométrica de Compostos Orgânicos**, 5^a Ed. Rio de Janeiro, Editora Guanabara-Koogan, **1994**.
- SIMMONS, M.P., SAVOLAINEM, V., CLEVINGER, C.C.M, ARCHER, R.H., DAVIS, J.I., Phylogeny of the Celastraceae inferred from 26S nuclear ribosomal DNA,

- phytochrome B, *rbcl*, *atpB* and morphology, *Molecular Phylogenetics and Evolution*, v. 19, n. 3, p. 353-366, **2001**.
- SIMÕES, C.M.O., SCHENKEL, E.P., GOSMANN, G., MELLO, J.C.P., MENTZ, L.A., PETROVICK, P.R., **Farmacognosia, da planta ao medicamento**, 5ª Ed. Editora da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Rio Grande do Sul, 1102p, **2003**.
- SINGH, R.P., MURTHY, K.N.C., JAYAPRAKASHA, G.K., Studies on the antioxidant activity of Pomegranate (*Punica granatum*) peel and seed extracts using in vitro models, *Agric. Food Chem.*, v. 50, p. 81-86, **2002**.
- SKERGET, M., KOTNIK, P., HADOLIN, M., HRAS, A.R., SIMONIC, M., KNEZ, Z., Phenols, proanthocyanidins, flavones and flavonols in some plant materials and their antioxidant activities, *Food Chemistry*, v. 89, p. 191-198, **2005**.
- SMISSMAN, E.E., LI, J.P., ISRAILI, Z.H., Bayer-Villiger oxidation of α -substituted ketones, *Journal of Organic Chemistry*, v. 33, n. 11, p. 4231-4236, **1968**.
- SOCRATES, G., Infrared Characteristic Group Frequencies, 2ª edição, Editora John Wiley & Sons, United Kingdom, 249p. **1994**.
- SOUSA, D.P., ALMEIDA, R.N., Neuroleptic-like properties of the chloroform extract of *Maytenus obtusifolia* Mart. Roots, *Biol. Pharm. Bull.*, v. 28, n. 2, p. 224-225, **2005**.
- SPIVEY, A.C., WESTON, M., WOODHEAD, S., Celastraceae sesquiterpenoids: biological activity and synthesis, *Chem. Soc. Rev.*, v. 31, p. 43-59, **2002**.
- STRAIN, H.H., COPE, T., SVEC, M.A., Analytical procedures for the isolation, identification, estimation and investigation of the chlorophylls, *Methods Enzymology*, v. 23, p. 452-466, **1971**.
- STRASSER, B.J. Donor side capacity of photosystem II probed by chlorophyll a fluorescence transients, *Photosynth. Res.*, v. 52, p.147-155, **1997**.
- SUMNER, J.B., *Science*, v. 100, p. 413-418, **1944**.
- TAHIR A.E., SATTI, G.M.H., Antiplasmodial activity of selected sudanese medicinal plants with emphasis on *Maytenus senegalensis* (Lam.) Exell., *J. of Ethnopharmacol.*, v. 64, p. 227-233, **1999**.
- TALAPATRA, S.K., BHATTACHARYA, S.TALAPATRA, B., Terpenoid and related compounds.VI. Terpenoid and coumarin constituents of *Atalantia monophylla*, *Journal of the Indian Chemical Society*, v. 47, n. 6, p. 600-604, **1970**.

- TINTO, W.F., BLAIR L.C., ALLI, A., Lupane triterpenoids of *Salacia cordata*, *Journal of Natural Products*, v. 55, n. 3, p. 395-398, **1992**.
- TRENTINI, A.M.M., Plantas medicinais na indústria de fitoterápicos. In: IV workshop de plantas medicinais de Botucatu, 2000, Botucatu: Anais ... Botucatu: UNESP, p. 45, **2000**.
- VALDERAS, J.M., *Scientific American Brasil*, v. 01, p. 62, **2005**.
- VAN WYK, A.E., ARCHER, R.H. *Maytenus oleosa* (Celastraceae), a new species from southern Natal and Pondoland, *South African Journal of Botany*, v. 53, n. 2, p.155-160, **1987**.
- VEIGA JUNIOR, V.F., PINTO, A.C, MACIEL, M.A.M., Plantas medicinais: cura segura? *Química Nova*, v. 28, n. 3, **2005**.
- VIEIRA FILHO, S.A., Estudo Fitoquímico em folhas e sâmaras de *Austroplenckia populnea*, avaliação da atividade antiespermatogênica do extrato hexânico das folhas e estudo fotoquímico em triterpenos pentacíclicos, Belo Horizonte, Departamento de Química, ICEx- UFMG, Tese de Doutorado, 239p. **2002**.
- VIEIRA FILHO, S.A., DUARTE, L.P., SILVA, G.D.F., LULA, I.S. SANTOS, M.H., Total assignment of ^1H and ^{13}C NMR spectra of two 3,4-secofriedelanes from *Austroplenckia populnea*, *Magn. Reson. Chem.*, v. 39, p. 746-748, **2001**.
- VILEGAS, W.; SANOMMIYA, M.; RASTRELLI, L.; PIZZA, C.; Isolation and Structure Elucidation of Two New Flavonoid Glycosides from the Infusion of *Maytenus aquifolium* Leaves. Evaluation of the Antiulcer Activity of the Infusion, *J. Agric. Food Chem.*, v. 47, p. 403-406, **1999**.
- WATSON, L., DALLWITZ, M.J. The families of flowering plants: descriptions, illustrations, identification and information retrieval. Versão: 29, julho 2006. <http://biodiversity.uno.edu/delta>.
- WERLE, A.A., Estudo por RMN de ^{13}C de Xantonas. Belo Horizonte, Departamento de Química, ICEx- UFMG. Tese de Doutorado 188p. **1995**
- WIJERATNE, D.B.T, KUMAR, V., SULTANBAWA, M.U., 3-oxolup-20(29)-en-30-al, a new lupane from *Gymnosporia emarginata* (Celastraceae), *J. C. S. Perkin I*, p. 2724-2726, **1981**.
- WIKIPEDIA, <http://pt.wikipedia.org>; acessado em 06/06/ 2006.
- WU, C., CHEN, F., WANG, X., KIM, H. J., HE, G. ZITLIN, V. H., HUANG, G., *Food Chemistry*, v. 96, p. 220-227. **2006**.

YILDIRIN, A., MAVI, A., KARA, A.A., Determination of antioxidant and antimicrobial activities of *Rumex crispus* L. extracts, *Agric. Food Chem.*, v. 49, p. 4083-4089, **2001**.