

**Estudo fitoquímico e da atividade
biológica do extrato hexânico de galhos
de *Maytenus gonoclada* (Celastraceae)**

Fernando César Silva

UFMG-ICEx/DQ.827

D.479

FERNANDO CÉSAR SILVA

**ESTUDO FITOQUÍMICO E DA ATIVIDADE BIOLÓGICA DO
EXTRATO HEXÂNICO DE GALHOS DE *MAYTENUS*
GONOCCLADA (CELASTRACEAE)**

Dissertação 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 Mestre em Química – Química Orgânica.

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

Belo Horizonte

2010

S586e Silva, Fernando César,
2010 Estudo fitoquímico e da atividade biológica do
D extrato hexânico de galhos de *Maytenus gonoclada*
(Celastraceae) / Fernando César Silva. 2010.
xii, 136 f. : il.

Orientadora: Grácia Divina de Fátima Silva.
Co-orientadora: Lucienir Pains Duarte.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de
Minas Gerais. Departamento de Química.
Bibliografia: 123-136.

1. Química orgânica - Teses 2. Fitoquímica - Teses
3. Celastraceae - Teses 4. Triterpenos tetracíclicos
- Teses I. Silva, Grácia Divina de Fátima,
Orientadora II. Duarte, Lucienir Pains, Co-orientadora
III. Título.

CDU 043



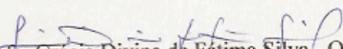
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA - ICEx
31270-901 - BELO HORIZONTE - MG
TEL.: 031 - 3499-5732
FAX: 031 - 3499-5700
E-MAIL: pgquimic@zeus.qui.ufmg.br

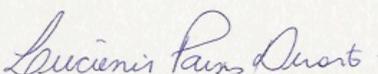


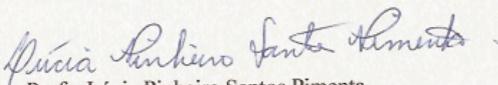
"Estudo Fitoquímico e da Atividade Biológica do Extrato Hexânico de Galhos
de *Maytenus gonoclada* (Celastraceae)"

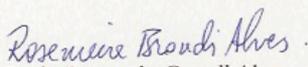
Fernando César Silva

Dissertação aprovada pela banca examinadora constituída pelos Professores:


Prof. Grácia Divina de Fátima Silva - Orientadora
UFMG


Prof. Lucienir Pains Duarte - Co-Orientadora
UFMG


Prof. Lúcia Pinheiro Santos Pimenta
UFMG


Prof. Rosemeire Brondi Alves
UFMG

Belo Horizonte, 29 de julho de 2010.

O trabalho descrito nesta dissertação foi realizado sob orientação da Professora Doutora Grácia Divina de Fátima Silva e co-orientação da Professora Doutora Lucienir Pains Duarte.

O trabalho descrito nesta dissertação foi desenvolvido sob a colaboração do professor Doutor Sidney Augusto Vieira Filho (UFOP).

“Cada planta tem centenas de substâncias e uma delas pode ser mais importante que uma galáxia.”

Otto Richard Gottlieb

Dedico este trabalho ao meu pai José Batista da Silva, minha mãe Maria Sueli de Melo Silva, minha irmã Ana Paula Silva e minha eterna mestra Lucienir Pains Duarte.

AGRADECIMENTOS

A Deus, meu Divino Pai Eterno, por guiar cada passo meu, por fortalecer meu coração e iluminar minha mente e por colocar em meu caminho pessoas que são meu suporte e minha companhia.

Aos meus pais, que mesmo nunca tendo visto seus nomes impressos em um livro ou jornal, muito me ensinaram: que o conhecimento é o nosso maior patrimônio e que a honestidade é a nossa maior virtude. Obrigado por tudo!

A minha irmã Ana Paula, pela força contínua e irrestrita. Obrigado por ser a pessoa maravilhosa que é.

A minha família em Contagem, Sr. Nenzinho (meu pai), Dona Laíde (minha mãe), Patrícia, Valéria e Beatriz (minhas irmãs), Walter e Marcelo (meus irmãos) e Isabela, Ana Luíza e Vinícius (minhas sobrinhas e sobrinho), pessoas que desde o primeiro momento me acolheram e me acolhem, dando-me todo o apoio, carinho e amor. Foi no ombro de vocês que eu pude enxergar mais longe!

Ao meu primo Harly, por ser a pessoa que tem estado o maior tempo ao meu lado. Obrigado irmão!

Às minhas orientadoras Dr^a. Grácia Divina de Fátima Silva e Dr^a. Lucienir Pains Duarte, pela valiosa orientação e constante incentivo; porque por meio de suas palavras, ensinamentos e de suas experiências que tão bem sabem transmitir, me foi possível aprender muito mais que estudando por muitos livros. A professora Grácia pelo seu zelo e amor ao Departamento de Química. A professora Lucienir (nossa tão estimada Lu), que com seu sorriso, confiança e carinho me deram forças para enfrentar todas as dificuldades encontradas neste trabalho. Obrigado Lu por ser tão especial! Sou muito grato por ter tido a oportunidade de me formar ao lado de vocês.

Ao meu colaborador e amigo Professor Dr. Sidney Augusto Vieira Filho (Bibo), pelo incansável apoio, colaboração e permanente disponibilidade, me permitiram encontrar informações e soluções que em muito contribuíram para a execução desta dissertação.

À minha colaboradora Professora Dr^a. Jacqueline Aparecida Takahashi, que para mim é um privilégio e honra tê-la ao meu lado. Quero agradecer por tudo que

Agradecimentos

tem me ensinado, todo tempo e esforço que tem me dedicado e seus contínuos conselhos pessoais e profissionais.

À minha eterna professora Dr^a. Rosemeire Brondi Alves, uma das responsáveis por me fazer amar ainda mais a Química Orgânica, pelo seu exemplo de dedicação ao ensino e a pesquisa. Obrigado Rose, você é e sempre será um referencial para mim!

À professora Dr^a. Rute Cunha Figueiredo, por me ensinar a “caminhar” em um laboratório, pelos seus ensinamentos de fitoquímica e pelo imenso apoio para que eu fosse aceito no NEPLAM.

À minha professora Dr^a. Lúcia Pinheiro dos Santos Pimenta, pelos ensinamentos, oportunidades de crescimento e companheirismo.

À Dr^a. Ivana Silva Lula do Laboratório de Ressonância Magnética de Alta Resolução, pela eficiência na execução e processamento dos espectros de RMN.

Aos meus professores da pós-graduação: Rose, Fernando Carazza, Grácia, José Dias, Wagner Batista de Almeida, Lúcia Pinheiro, Geraldo Magela de Lima, Zenilda Cardeal e Jacqueline Takahashi, pela contribuição à minha formação acadêmica e por me fazer refletir sobre a pesquisa.

Aos meus professores da Universidade de Itaúna: Wagner Pedersoli, Mauro, Salim, Luiz Carlos Ananias, Marcelo Britto (responsável pelo meu interesse em Química Orgânica), Ana Maria de Melo, Taranto Goulart, Haendel Busatti e Penha Souza (responsável pelo meu interesse em Ensino de Química), pela inspiração e pelo amor ao conhecimento.

Aos meus professores da Escola Estadual “Hermenegildo Vilaça” (Piracema/MG), pela contribuição em minha formação na Educação Básica. A vocês o meu respeito e admiração!

A todos os professores, funcionários e diretoria da Escola Padre João Bosco Penido Burnier (Belo Horizonte/ MG), por me incentivarem e me darem suporte para realização das disciplinas isoladas na UFMG.

A Jac, William e Fabiana do Departamento de Química da UFMG, pela realização dos testes antimicrobianos e da capacidade de inibição da enzima acetilcolinesterase.

A professora Dr^a. Maria Aparecida Gomes do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG e o professor Dr. Haendel Busatti Nogueira da Faculdade de Farmácia da Universidade de Itaúna, pela realização dos testes contra *Giardia lamblia*.

Agradecimentos

Ao professor Dr. Jair Campos Moraes do Departamento de Entomologia da UFLA, Dr. Stephan Malfitano Carvalho (Pefa) e Dona Irene, pela realização dos testes inseticida. Pefa e Dona Irene jamais me esquecerei do apoio e da amizade de vocês.

Ao professor Dr. Ricardo José Alves da Faculdade de Farmácia da UFMG, por me permitir usar o espectrofotômetro de absorção na região do infravermelho. Tati, Raquel, Carol, Saulo, Thiago e Marcela, obrigado pela paciência e disponibilidade.

Ao professor Dr. Cláudio Luís Donicci e Sheila Rodrigues de Oliveira do Departamento de Química da UFMG, pela realização dos espectros de massa.

As professoras, Dr^a. Rosemeire Brondi Alves, Dr^a. Lúcia Pinheiro dos Santos Pimenta e Dr^a. Henriete da Silva Vieira, por aceitarem participar de minha banca e pelos valiosos comentários.

A minha avó Bonifácia, pelo amor, carinho e as incansáveis orações que são essenciais para minha vida.

A minha tia Simone, pelo amor sem limite, o apoio e por me dar o ombro em todos os momentos.

Aos meus avós, tios, tias, primos, primas, afilhados e afilhadas, por me fazerem tão feliz.

Ao meu grande amigo Leonardo Vinícius de Andrade, pela amizade sincera, as palavras de apoio e a convivência agradável desde os tempos de criança. Obrigado meu irmão!

A minha prima Sheila, um exemplo de profissional e pessoa. Obrigado pelas palavras de incentivo, pelos conselhos e por contribuir para minha formação.

Aos meus amigos Reginaldo (Naia) e Fernanda, pela força dada num dos momentos mais difíceis de minha vida. Obrigado do fundo de meu coração!

A minha estimada Vanessa Gregório Rodrigues, por todo o apoio profissional e pessoal, toda a paciência, por confiar e crer em mim, por ser como uma irmã e, sobretudo, por sua valiosa amizade.

Aos amigos Frank, Mauro e Fred e minha amiga Kátia, pelas valiosas aulas para a seleção do Mestrado e o imenso incentivo.

A Dayse Silva, minha amiga, que merece muito mais linhas e entrelinhas que esse espaço pode oferecer. Obrigado por tudo que você é e faz.

Agradecimentos

Aos amigos e amigas do grupo de oração PontosCMV, pelo apoio espiritual e por me fazer refletir sobre a vida.

Aos amigos e amigas do NEPLAM: Ariane, Carol, Betânia, Aline, Grasi, Fred, Mauro, Djalma, Cássia, Grazi Duarte, Jailton, Marcela, Isabela, Leandro, Thaisa e Marcos, pelo apoio, carinho e amizade.

Aos meus companheiros e companheiras do Departamento de Química da UFMG, Wedson, Shirley, Alison, Viviane, Isabela, Patrícia, Thiago Silva, Paula, Camila, Júnia, Thiago Borgati, Juliana, Maria Elisa, Míriam, Fabrício, Daniel, Diego, Deyse, Aline, Luíza, Isaac, Jeferson, por seu apoio e ânimo em cada etapa que se passa e vem ao longo dos anos de estudo.

Aos amigos e amigas do GMEEQ, em especial a professora Ana Luiza de Quadros, por me fazer refletir sobre o fazer educação.

A Paulete, Kátia e Lílian, funcionárias da secretaria da pós-graduação, pela disponibilidade de me receber, ouvir e esclarecer minhas dúvidas.

Aos funcionários e funcionária, Sr. Romário, Sr. Onésimo, Sr. Jair, Sr. Geraldo, Anderson, Rogério, Edinho, Wladimir e Arlete, pela boa vontade e atenção comigo.

Ao Departamento de Química e a Universidade Federal de Minas Gerais, pela oportunidade de realização deste trabalho.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, pela concessão da bolsa de mestrado.

A Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais, pelo financiamento dos projetos de pesquisa.

SUMÁRIO

ÍNDICE DE FIGURAS.....	i
ÍNDICE DE TABELAS.....	vi
LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS.....	viii
RESUMO.....	xi
ABSTRACT.....	xii

INTRODUÇÃO

Produtos Naturais: fim ou retorno?.....	01
Medicina Popular: expansão e conservação.....	03
Inseticidas Naturais: uma contribuição.....	07
A família Celastraceae.....	08
O gênero <i>Maytenus</i>	14
A espécie <i>Maytenus gonoclada</i> Martius.....	15
Biossíntese de triterpenos pentacíclicos.....	19

OBJETIVOS

Objetivos do trabalho.....	25
----------------------------	----

CAPÍTULO 1: ESTUDO FITOQUÍMICO

1.1 – Parte Experimental.....	26
1.1.1 – Materiais e métodos.....	26
1.1.1.1 – Métodos Cromatográficos.....	26
1.1.1.2 – Solventes e reagentes.....	26
1.1.1.3 – Instrumentos.....	27
1.1.2 – Coleta e identificação do material vegetal.....	27
1.1.3 – Preparação do extrato hexânico dos galhos de <i>Maytenus gonoclada</i>	28
1.1.3.1 – Elaboração de SH1.....	29
1.1.3.2 – Elaboração de FH2.....	35
1.1.3.3 – Elaboração de FH3.....	41
1.1.3.4 – Elaboração de SH3.....	42
1.2 – Determinação estrutural das substâncias e misturas isoladas.....	43
1.2.1 – MG01: 3-oxofriedelano.....	43
1.2.2 – MG02: 3 β -hidroxifriedelano.....	48
1.2.3 – MG03: 3,11-dioxofriedelano e MG04: 3,16-dioxofriedelano.....	53
1.2.4 – MG05: 3-oxo-12 α -hidroxifriedelano.....	58

1.2.5 – MG05: 3-oxo-12 α -hidroxifriedelano e MG06: 3-oxo-29-hidroxifriedelano.....	63
1.2.6 – MG07: Ácido oléico.....	68
1.2.7 – MG08: 3-oxo-12 α ,29-di-hidroxifriedelano.....	73
1.2.8 – MG09: β -sitosterol.....	88
1.2.9 – MG10: Ácido Palmítico.....	93

CAPÍTULO 2: ESTUDO DA ATIVIDADE BIOLÓGICA

2.1 – Introdução Geral.....	99
2.1.1 – Atividade Antimicrobiana.....	99
2.1.1.1 – Introdução.....	99
2.1.1.2 – Testes antimicrobianos realizados no Laboratório de Biotecnologia e Bioensaios.....	101
A – Método de Difusão em Disco.....	101
A.1 – Metodologia.....	101
A.2 – Análise dos Resultados e Discussão.....	102
B – Método de Concentração Inibitória Mínima.....	104
B.1 – Metodologia.....	104
B.2 – Análise dos Resultados e Discussão.....	105
C – Método de Bioautografia.....	106
C.1 – Metodologia.....	106
C.2 – Análise dos Resultados e Discussão.....	106
2.1.1.3 – Testes antimicrobianos realizados no Laboratório de Amebíase e Protozoários Intestinais.....	107
A – Método de Colorimétrico.....	107
A.1 – Metodologia.....	108
A.2 – Análise dos Resultados e Discussão.....	110
2.1.2 – Atividade de inibição da enzima acetilcolinesterase.....	112
2.1.2.1 – Introdução.....	112
A – Método de Bioautografia.....	112
A.1 – Metodologia.....	113
A.2 – Análise dos Resultados e Discussão.....	115
2.1.3 – Atividade Inseticida.....	114
2.1.3.1 – Introdução.....	114
A – Método de Preferência alimentar com chance de escolha.....	116
A.1 – Metodologia.....	116
A.2 – Análise dos Resultados e Discussão.....	117
CONCLUSÃO.....	121
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	123

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Número de medicamentos aprovados nos Estados Unidos no período de 1981 a 2007 (Li e Vederas, 2009).....	02
Figura 2: Distribuição geográfica da família Celastraceae (em vermelho) (Núñez Rivas, 2004).....	09
Figura 3: Estrutura química do elaeodendrosídeo W (Hou et al., 2009).....	10
Figura 4: Estrutura química do ácido populnônico (Ácido 3-oxo-friedelan-29-óico) (Andrade et al., 2007).....	10
Figura 5: Estrutura química do sesquiterpeno 1-acetiloxi-9-benzoiloxi-8-cinamoiloxi-4,6-diidroxi-hidro- β -agarofurano (Torres-Romero et al., 2008).....	11
Figura 6: Estrutura química da opositina A (Whitson et al., 2006).....	12
Figura 7: Estrutura química da tingenona (Mena-Rejón et al., 2007).....	12
Figura 8: Estrutura química de 3-benzoato-(-)-epicatequin-5-O- β -D-glicosila (Hwang et al., 2001).....	13
Figura 9: Estrutura química da triptolida (Luo et al., 2004).....	14
Figura 10: Fotografia de <i>Maytenus gonoclada</i> Martius.....	15
Figura 11: Substâncias isoladas das folhas de <i>M. gonoclada</i> (Oliveira, 2007).....	16
Figura 12: Fotografia de <i>Maytenus salicifolia</i> Reissek.....	17
Figura 13: Resumo da biossíntese dos terpenos (Roberts, 2007).....	20
Figura 14: Biossíntese compartimentada do IPP e DMAPP. (Esquerda) Via do mevalonato: 3-hidroxi-3-metil coenzima A redutase (HMGR) e difosfato de isopentenila isomerase (IDI). (Direita) Via do metileritritol: 1-desoxi-D-xilulose 5-fosfato sintase (DXS), 1-desoxi-D-xilulose 5-fosfato redutoisomerase (DXR), hidroxi-2-metil-2-(E)-4-butenil difosfato sintase (HDS), difosfato de isopentenila:difosfato de dimetilalila sintase (IDS) e IDI. As setas tracejadas indicam mais de uma etapa (Roberts, 2007).....	21

Figura 15: Rota biossintética de alguns esqueletos de triterpenos pentacíclicos (Núñez Rivas, 2004).....	23
Figura 16: Preparação dos extratos dos galhos de <i>M. gonoclada</i>	28
Figura 17: Fracionamento de SH1.....	34
Figura 18: Fracionamento de FH2.....	40
Figura 19: Fracionamento de FH3.....	42
Figura 20: Espectro na região do IV de MG01 (ATR).....	44
Figura 21: Espectro de RMN de ^1H (400 MHz) de MG01 em CDCl_3 + Piridina- d_5	45
Figura 22: Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz) de MG01 em CDCl_3 + Piridina- d_5	45
Figura 23: Expansão do espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz) de MG01 em CDCl_3 + Piridina- d_5	46
Figura 24: Subespectro DEPT135 (100 MHz) de MG01 em CDCl_3 + Piridina- d_5	46
Figura 25: Espectro na região do IV de MG02 (ATR).....	49
Figura 26: Espectro de RMN de ^1H (400 MHz) de MG02 em CDCl_3	50
Figura 27: Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz) de MG02 em CDCl_3	50
Figura 28: Subespectro DEPT135 (100 MHz) de MG02 em CDCl_3	51
Figura 29: Espectro na região do IV da mistura de MG03 e MG04 (ATR).....	54
Figura 30: Espectro de RMN de ^1H (400 MHz) da mistura de MG03 e MG04 em CDCl_3 + Piridina- d_5	54
Figura 31: Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz) da mistura de MG03 e MG04 em CDCl_3 + Piridina- d_5	55
Figura 32: Expansão do espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz) da mistura de MG03 e MG04 em CDCl_3 + Piridina- d_5	56

Figura 33: Subespectro DEPT135 (100 MHz) da mistura de MG03 e MG04 em CDCl ₃ + Piridina-d ₅	56
Figura 34: Espectro na região do IV de MG05 (ATR).....	59
Figura 35: Espectro de RMN de ¹ H (400 MHz) de MG05 em CDCl ₃	60
Figura 36: Expansão do espectro de RMN de ¹ H (400 MHz) de MG05 em CDCl ₃	60
Figura 37: Espectro de RMN de ¹³ C (100 MHz) de MG05 em CDCl ₃	61
Figura 38: Subespectro DEPT135 (100 MHz) de MG05 em CDCl ₃	61
Figura 39: Espectro na região do IV da mistura de MG05 e MG06 (ATR).....	64
Figura 40: Espectro de RMN de ¹ H (400 MHz) da mistura de MG05 e MG06 em CDCl ₃	64
Figura 41: Espectro de RMN de ¹³ C (100 MHz) da mistura de MG05 e MG06 em CDCl ₃	65
Figura 42: Expansão do espectro de RMN de ¹³ C (100 MHz) da mistura de MG05 e MG06	66
Figura 43: Subespectro DEPT135 (100 MHz) da mistura de MG05 e MG06 em CDCl ₃	66
Figura 44: Espectro na região do IV de MG07 (ATR).....	69
Figura 45: Espectro de RMN de ¹ H (200 MHz) de MG07 em CDCl ₃	70
Figura 46: Espectro de RMN de ¹³ C (50 MHz) de MG07 em CDCl ₃	70
Figura 47: Subespectro DEPT135 (50 MHz) de MG07 em CDCl ₃	71
Figura 48: Espectro na região do IV de MG08 (ATR).....	74
Figura 49: Espectro de RMN de ¹ H (400 MHz) de MG08 em CDCl ₃ + Piridina-d ₅	75
Figura 50: Espectro de RMN de ¹³ C (100 MHz) de MG08 em CDCl ₃ + Piridina-d ₅	76

Figura 51: Subespectro DEPT135 (100 MHz) de MG08 em CDCl ₃ + Piridina-d ₅	77
Figura 52: Expansão do mapa de contornos HSQC (400 MHz) de MG08 em CDCl ₃ + Piridina-d ₅	78
Figura 53: Expansão do mapa de contornos HSQC (400 MHz) de MG08 em CDCl ₃ + Piridina-d ₅	79
Figura 54: Expansão do mapa de contornos HMBC (400 MHz) de MG08 em CDCl ₃ + Piridina-d ₅	80
Figura 55: Expansão do mapa de contornos HMBC (400 MHz) de MG08 em CDCl ₃ + Piridina-d ₅	81
Figura 56: Expansão do mapa de correlações espaciais NOESY (400 MHz) de MG08 em CDCl ₃ + Piridina-d ₅	83
Figura 57: Expansão do mapa de correlações espaciais NOESY (400 MHz) de MG08 em CDCl ₃ + Piridina-d ₅	84
Figura 58: Algumas correlações de MG08 de acordo com o estudo do mapa de correlações espaciais NOESY.....	85
Figura 59: Espectro de massas (EM-ESI) de MG08	86
Figura 60: Espectro na região do IV de MG09 (ATR).....	89
Figura 61: Espectro de RMN de ¹ H (200 MHz) de MG09 em CDCl ₃	90
Figura 62: Espectro de RMN de ¹³ C (50 MHz) de MG09 em CDCl ₃	90
Figura 63: Subespectro DEPT135 (50 MHz) de MG09 em CDCl ₃	91
Figura 64: Espectro na região do IV de MG10 (ATR).....	94
Figura 65: Espectro de RMN de ¹ H (200 MHz) de MG10 em CDCl ₃	94
Figura 66: Espectro de RMN de ¹³ C (50 MHz) de MG10 em CDCl ₃	95
Figura 67: Subespectro DEPT135 (50 MHz) de MG10 em CDCl ₃	95
Figura 68: Cromatograma de MG10	96

Figura 69: Espectro de massas de MG10	96
Figura 70: Algumas fragmentações de MG10	97
Figura 71: Bioautograma das amostras testadas frente ao fungo filamentoso <i>C. cladosporioides</i>	107
Figura 72: Bioautograma das amostras (em diferentes tempos). Da esquerda para direita, extrato hexânico (FH2), 3-oxofriedelano (MG01), 3 β -hidroxifriedelano (MG02), 3,11-dioxofriedelano e 3,16-dioxofriedelano (MG03 e MG04), 3-oxo-12 α -hidroxifriedelano (MG05), β -sitosterol (MG09), ácido palmítico (MG10) e ácido oléico (MG07).....	114
Figura 73: Fotografia das fases do ciclo de vida de <i>T. molitor</i> . Na esquerda (larva), centro (pupa) e direita (inseto adulto).....	115
Figura 74: Fotografia da caixa de madeira utilizada para criação de <i>T. molitor</i>	116
Figura 75: Fotografia da placa de Petri onde larvas de <i>T. molitor</i> migraram para o alimento com a amostra.....	117

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1: Constituintes químicos isolados de <i>M. gonoclada</i> e <i>M. salicifolia</i> (Valladão, 2005; Miranda, 2007; Oliveira, 2007).....	18
Tabela 2: Ordem de eluição da coluna A.....	29
Tabela 3: Ordem de eluição da coluna B.....	30
Tabela 4: Ordem de eluição da coluna C.....	31
Tabela 5: Ordem de eluição da coluna D.....	32
Tabela 6: Ordem de eluição da coluna E.....	33
Tabela 7: Ordem de eluição da coluna F.....	35
Tabela 8: Ordem de eluição da coluna G.....	37
Tabela 9: Ordem de eluição da coluna H.....	38
Tabela 10: Ordem de eluição da coluna I.....	39
Tabela 11: Ordem de eluição da coluna J.....	41
Tabela 12: Comparação dos dados de RMN de ^{13}C de MG01 com os dados da literatura para 3-oxofriedelano (Queiroga et al., 2000).....	47
Tabela 13: Comparação dos dados de RMN de ^{13}C de MG02 com os dados da literatura para 3 β -hidroxifriedelano (Salazar et al., 2000).....	52
Tabela 14: Comparação dos dados de RMN de ^{13}C de MG03 e MG04 com os dados da literatura para 3,11-dioxofriedelano e 3,16-dioxofriedelano (Oliveira, 2007).....	57
Tabela 15: Comparação dos dados de RMN de ^{13}C de MG05 com os dados da literatura para 3-oxo-12 α -hidroxifriedelano (Oliveira et al., 2007).....	62
Tabela 16: Comparação dos dados de RMN de ^{13}C de MG05 e MG06 com os dados da literatura para 3-oxo-12 α -hidroxifriedelano e 3-oxo-29-hidroxifriedelano (Oliveira et al., 2007; Mahato e Kundu, 1994).....	67

Tabela 17: Comparação dos dados de RMN de ^{13}C de MG07 com os dados da literatura para o ácido oléico (Oliveira, 2004).....	72
Tabela 18: Dados de RMN 1D e 2D (400 MHz) de MG08 em CDCl_3 + Piridina- d_5	87
Tabela 19: Comparação dos dados de RMN de ^{13}C de MG09 com os dados da literatura para o β -sitosterol (Salazar, 2005).....	92
Tabela 20: Comparação dos dados de RMN de ^{13}C de MG10 com os dados da literatura para o ácido palmítico (Couperus et al., 1978).....	98
Tabela 21: Atividade antimicrobiana do extrato hexânico dos galhos de <i>Maytenus gonoclada</i> e substâncias isoladas utilizando método de difusão em disco.....	103
Tabela 22: CIM do extrato hexânico (FH2) e de 3-oxo-12 α -hidroxifriedelano (MG05).....	105
Tabela 23: Porcentagem de inibição sobre o crescimento de <i>G. lamblia</i> frente ao extrato hexânico (FH2).....	111
Tabela 24: Resultados do teste de preferência alimentar com chance de escolha para quatro amostras frente a larva de <i>T. molitor</i> em diferentes tempos de exposição. O valor de χ^2 -tabelado é 14.2.....	118

ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

δ - Deslocamento químico

[α] – rotação óptica

1D – Uma dimensão

2D – Duas dimensões

ATCC – *American Type Culture Collection*

ATR – *Attenuated Total Reflection* (Reflectância Total Atenuada)

BHI – *Broth Heart Infusion*

CC – Cromatografia em Coluna

CCD – Cromatografia em Camada Delgada

CerQBio - Laboratório de Químico e Bioprospecção de Plantas do Cerrado

CG-EM – Cromatografia a Gás acoplada ao Espectrômetro de Massas

CI – Concentração Inibitória

CIL – *Cambridge Isotope Laboratories*

CIM – Concentração Inibitória Mínima

CLAE – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

DEPT135 – *Distortionless Enhancement by Polarization Transfer 135*

DMAPP – *Dimethylallyldiphosphate* (Pirofosfato de γ,γ -dimetilalila)

DMSO – Dimetilsulfóxido

DQ – Departamento de Química

DXR – 1-Desoxi-D-xilulose 5-fosfato redutoisomerase

DXS – 1-Desoxi-D-xilulose 5-fosfato sintase

EM – Espectrometria de Massas

EM-ESI – Espectrometria de Massas com ionização por *Electrospray*

FDA – *Food & Drug Administration*

FPP – *Farnesyl pyrophosphate* (Pirofosfato de farnesila)

GGPP – *Geranylgeranyl pyrophosphate* (Difosfato de Geranilgeranila)

GPP – *Geranyl pyrophosphate* (Difosfato de geranila)

HDS – *1-hydroxy-2-methyl-2-(E)-butenyl 4-diphosphate synthase* (1-Hidroxi-2-metil-2-(E)-4-butenil difosfato sintase)

HMBC – *Heteronuclear-Multiple-Bond-Correlation Spectroscopy*

HMGR – *3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase* (3-Hidroxi-3-metilglutaril coenzima A redutase)

HSQC – *Heteronuclear-Single-Quantum-Coherence Spectroscopy*

HTS – *High Throughput Screening*

ICB – Instituto de Ciências Biológicas

IDI – *Isopentenyl diphosphate isomerase* (Difosfato de isopentenila isomerase)

IDS – *Isopentenyl diphosphate:dimethylallyl diphosphate synthase* (Difosfato de isopentenila:difosfato de dimetilalila sintase)

IDSA – *Infectious Diseases Society of America*

IPP – *Isopentenyl diphosphate* (Pirofostato de isopentenila)

IV – Infravermelho

J – Constante de acoplamento

LANAGRO – Laboratório Nacional Agropecuário

LAREMAR – Laboratório de Ressonância Magnética de Alta Resolução

LB – Liebermann Burchard

MEP – Via do metileritritol fosfato

MVA – Via do mevalonato

NADPH – nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato

NEPLAM – Núcleo de Estudo de Plantas Medicinais

NOESY – *Two-Dimensional Nuclear-Overhauser-Effect Spectroscopy*

OMS – Organização Mundial da Saúde

PBS – *Phosphate buffered saline* (Fosfato de Potássio Monobásico)

Rf – Fator de retenção

RMN – Ressonância Magnética Nuclear

RMN de ^{13}C – Ressonância Magnética Nuclear de Carbono-13

RMN de ^1H – Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio

TMS – Tetrametilsilano

UFC – Unidades Formadoras de Colônias

UFLA – Universidade Federal de Lavras

UFMG – Universidade Federal de Minas Gerais

UFOP – Universidade Federal de Ouro Preto

UFV – Universidade Federal de Viçosa

RESUMO

Os estudos fitoquímico e da atividade biológica de *Maytenus gonoclada*, família Celastraceae, constituem parte de um projeto que vem sendo desenvolvido sobre plantas utilizadas na medicina popular no Núcleo de Estudo de Plantas Medicinais (NEPLAM), do Departamento de Química (DQ) da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG).

O estudo fitoquímico do extrato hexânico dos galhos de *M. gonoclada* resultou no isolamento de sete triterpenos pentacíclicos: 3-oxofriedelano, 3 β -hidroxifriedelano, 3,11-dioxofriedelano, 3,16-dioxofriedelano, 3-oxo-12 α -hidroxifriedelano, 3-oxo-29-hidroxifriedelano e 3-oxo-12 α ,29-di-hidroxifriedelano; foram isolados também, dois ácidos graxos de cadeia longa, ácido oléico e ácido palmítico, além do esteroide, β -sitosterol. As estruturas químicas foram determinadas por métodos espectrofotométricos (IV, EM, RMN de ^1H , RMN de ^{13}C , HSQC, HMBC e NOESY). Um dos pontos mais importantes desta pesquisa é que 3-oxo-12 α ,29-di-hidroxifriedelano é inédito.

O estudo da atividade biológica consistiu da avaliação de atividade antimicrobiana, atividade da capacidade de inibição da enzima acetilcolinesterase e atividade inseticida. Outro ponto relevante deste estudo mostra que se verificou atividade antibacteriana contra *Staphylococcus aureus*, antifúngica contra *Candida albicans*, giardicida contra *Giardia lamblia* e inseticida contra larvas de *Tenebrio molitor* (uma praga que atinge grãos armazenados) para o extrato hexânico. O triterpeno, 3-oxo-12 α -hidroxifriedelano, mostrou-se ativo contra a levedura *C. albicans* e larvas de *T. molitor*. O triterpeno, 3 β -hidroxifriedelano apresentou atividade inibitória moderada frente a enzima acetilcolinesterase. A mistura de triterpenos, 3,11-dioxofriedelano e 3,16-dioxofriedelano também se mostrou ativa contra larvas de *T. molitor*.

ABSTRACT

Phytochemical study and biological activity of *Maytenus gonoclada*, family Celastraceae, is part of a project being developed on plants used in folk medicine at the Núcleo de Estudo de Plantas Medicinais (NEPLAM), of the Departamento de Química (DQ) at Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG).

Phytochemical study of the hexane extract of stems of *M. gonoclada* resulted in the isolation of seven pentacyclic triterpenes: 3-oxofriedelane, 3 β -hydroxyfriedelane, 3,11-dioxofriedelane, 3,16-dioxofriedelane, 3-oxo-12 α -hydroxyfriedelane, 3-oxo-29-hydroxyfriedelane and 3-oxo-12 α ,29-dihydroxyfriedelane; it also was isolated, two long chain fatty acids, oleic acid and palmitic acid, as well as steroids, β -sitosterol. The chemical structures were determined by spectrophotometric methods (IR, MS, ^1H NMR, ^{13}C NMR, HSQC, HMBC and NOESY). One of the most important points of this research is that 3-oxo-12 α ,29-dihydroxyfriedelane is a new compound.

The study of biological activity consisted of antimicrobial activity, activity of the capacity to inhibit acetylcholinesterase and insecticide activity. Another relevant finding of this study shows that it was found antibacterial activity against *Staphylococcus aureus*, antifungal against *Candida albicans*, giardicidal against *Giardia lamblia* and insecticide against larvae of *Tenebrio molitor* (a plague that affects grain storage) for the hexane extract. The triterpene, 3-oxo-12 α -hydroxyfriedelane, was active against the yeast *C. albicans* and larvae of *T. molitor*. The triterpene, 3 β -hydroxyfriedelane showed moderate inhibitory activity against acetylcholinesterase. The mixture of triterpenes, 3,11-dioxofriedelane and 3,16-dioxofriedelane was also active against larvae of *T. molitor*.

INTRODUÇÃO

Produtos Naturais: fim ou retorno?

A busca por substâncias “virtuosas” começou na década de 1780 com o trabalho de Scheele sobre os ácidos orgânicos de plantas (CORDELL, 2000). Após a Revolução Industrial e o desenvolvimento da Química Orgânica surgiu uma preferência para os produtos sintéticos por parte da indústria farmacêutica (RATES, 2001). No entanto, produtos naturais obtidos de plantas, fungos, insetos, organismos marinhos e bactérias foram modelos para a maioria dos medicamentos (HARVEY, 2008) e, ainda representam uma área promissora para a descoberta de novas substâncias bioativas (MILLER E CLARDY, 2009).

Observa-se que a introdução da Química Combinatorial e dos sistemas automatizados de testes em larga escala [*High Throughput Screening* – (HTS)], juntamente com a promessa de uma fonte aparentemente inesgotável de bibliotecas de compostos químicos contribuíram para o desinteresse pela triagem de produtos naturais (MCCHESNEY *et al.*, 2007). Além disso, existem outros fatores que aumentaram o interesse por produtos sintéticos (LI E VEDERAS, 2009), tais como:

- O isolamento de substâncias a partir de extratos é um processo longo e caro;
- Problemas de solubilização dos extratos para serem inseridos em sistemas automatizados de testes em larga escala (HTS);
- Falta de um suprimento adequado do composto ativo para o seu posterior desenvolvimento em fármaco;
- O recorrente isolamento de substâncias conhecidas, portanto, sem interesse para o patenteamento e,
- Dificuldade para implementar novas técnicas de crescimento e desenvolvimento de microrganismos.

Esses fatores, na década de 1990, contribuíram para a diminuição da aprovação do número de medicamentos obtidos a partir de produtos naturais e seus derivados (Figura 1, pág. 2).

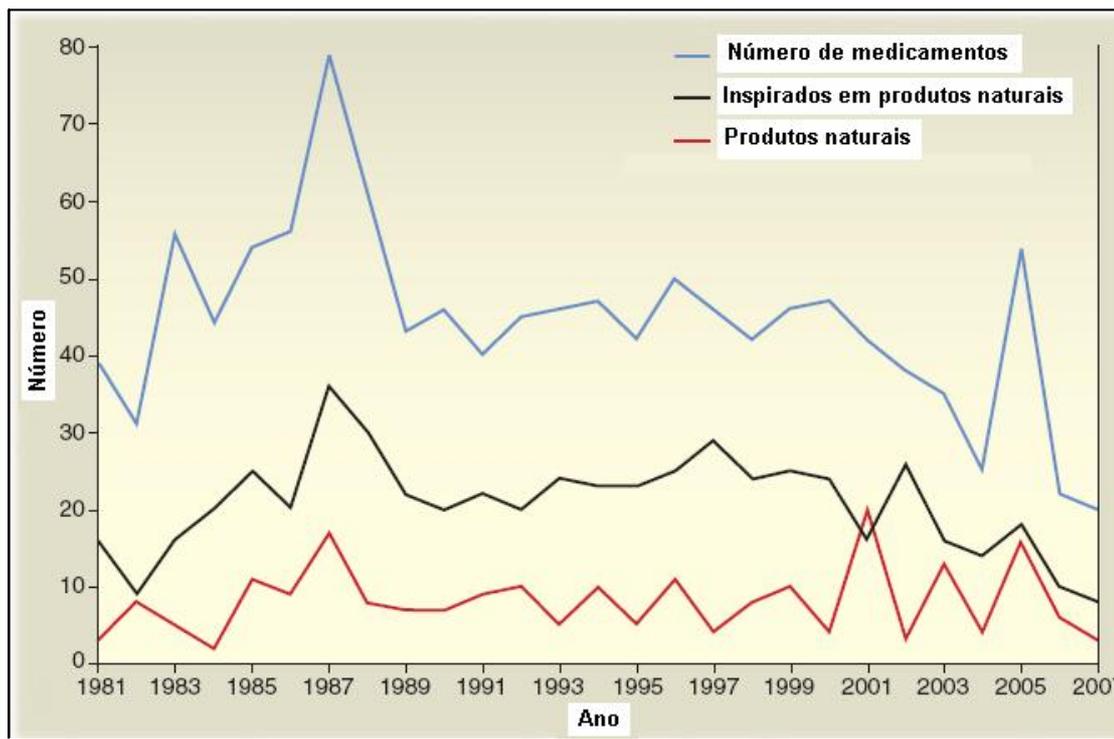


Figura 1: Número de medicamentos aprovados nos Estados Unidos no período de 1981 a 2007 (LI E VEDERAS, 2009).

Ressalta-se que a aprovação de um novo medicamento pela *Food & Drug Administration* (FDA) dos Estados Unidos, dependendo da área terapêutica pode demorar muitos anos e envolver gastos consideráveis. Estima-se que o custo para o desenvolvimento de um novo medicamento oscila em torno de 800 milhões de dólares (HERGENROTHER, 2006). Entre 2005 e 2007, nos Estados Unidos foram aprovados 13 medicamentos inspirados em produtos naturais, dentre eles estão: os peptídeos, exenatido e ziconotido, e três moléculas pequenas, ixabepilono, retapamulina e trabectedina (HARVEY, 2008; LI E VEDERAS, 2009). Além disso, os produtos naturais continuam a representar um grande impacto na área do câncer (BAILLY, 2009; SCHMIDT *et al.*, 2007). Dos atuais medicamentos anticancerígenos, acima de 60% são de uma forma ou de outra, originários de produtos naturais (CRAGG E NEWMAN, 2009).

Algumas alternativas foram desenvolvidas para facilitar a busca por substâncias bioativas a partir de produtos naturais (LI E VEDERAS, 2009), como por exemplo:

- Separação prévia de extratos por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) gerando bibliotecas de frações enriquecidas, que contêm no máximo três substâncias, para serem testadas em sistemas de HTS;
- Miniaturização de experimentos de crescimento e desenvolvimento de microrganismos, gerando bibliotecas de extratos para serem submetidos em sistemas de HTS e,
- Técnicas genômicas, enzimáticas e metabolômicas de exploração do potencial de biossíntese de microrganismos.

Resultados de HTS de milhares de produtos sintéticos resultaram em um número pequeno de substâncias bioativas, propensas a servirem de modelo para o desenvolvimento de novos fármacos (LI E VEDERAS, 2009). A principal diferença entre o produto natural e o sintético é que o primeiro é “afinado” pelo processo evolutivo do organismo que o gerou (CLARDY E WALSH, 2004), possibilitando uma diversidade química extraordinária e inúmeras atividades biológicas. Desta forma, os produtos naturais são uma das mais importantes fontes de compostos inovadores (BAILLY, 2009).

A diversidade funcional e arquitetônica que ocorre em produtos naturais durante a biossíntese fornece lições para químicos sintéticos e medicinais em suas estratégias para fazer ou imitar compostos biologicamente ativos (CLARDY E WALSH, 2004). Portanto, a parceria entre químicos sintéticos, medicinais e de produtos naturais é uma boa estratégia para a descoberta de novos fármacos (BARREIRO E BOLZANI, 2009).

Medicina Popular: expansão e conservação

Apesar do enorme arsenal de medicamentos desenvolvidos pela indústria farmacêutica há certa aversão de uma parte da população mundial em consumir esses medicamentos (PHILLIPSON, 2001). Essa aversão se relaciona ao fato do conhecimento sobre plantas medicinais simbolizar muitas vezes o único recurso terapêutico de muitas comunidades e grupos étnicos (MACIEL *et al.*, 2002), estando restrito a elas. Por exemplo, 70-80% da população da Etiópia e da Índia ainda dependem da medicina tradicional como atenção primária à saúde. Entretanto, a

partir da década de 1990 o uso da medicina tradicional tem crescido, principalmente em função do estímulo dado pela Organização Mundial da Saúde (OMS).

Autoridades Nacionais de Saúde de todo o mundo foram convidadas a estudar formas de integrar medicina popular/ medicina complementar ou alternativa em seus sistemas de saúde (OMS, 2009). Muitos países estão regularizando e licenciando a venda desses produtos (KAPOOR *et al.*, 2009).

É interessante notar que este crescimento do uso de produtos naturais ou derivados destes não está ocorrendo apenas em países emergentes, mas em muitos países desenvolvidos, onde ela é referida como medicina complementar ou alternativa (OMS, 2009).

Em várias regiões do Brasil, plantas medicinais são comercializadas em feiras livres, mercados populares e são também encontradas em quintais residenciais (MACIEL *et al.*, 2002). Infelizmente, essas plantas são consumidas com pouca ou nenhuma comprovação de suas propriedades farmacológicas, propagadas por usuários ou comerciantes que alegam “benefícios seguros, já que se trata de fonte natural”. Comparada com a dos medicamentos usados nos tratamentos convencionais, a toxicidade de plantas medicinais pode parecer trivial, porém isso não é verdade, visto que a toxicidade de plantas medicinais é um problema sério de saúde pública (VEIGA JR. *et al.*, 2005). As principais causas da intoxicação por plantas e seu agravamento (PARDAL, 2006), são:

- A existência de vários nomes populares para uma mesma espécie, o que ocasiona dificuldades na sua identificação;
- Variação de nomenclatura entre botânicos;
- Desconhecimento da equipe de saúde que atende uma vítima, de qual ou quais são os princípios ativos da planta e muito menos em que concentrações se encontram. Esse fato decorre da não contemplação do assunto nos currículos médicos e,
- Indefinição da dose, pois raramente se sabe qual a quantidade total ingerida ou absorvida, o que torna muito difícil estabelecer qualquer prognóstico.

Além disso, é comum a prática de adulterações que são feitas com produtos de menor valor agregado, como óleos vegetais ou minerais. Por exemplo, o óleo de copaíba é utilizado na medicina popular para combater as inflamações, entretanto,

quando adulterado potencializa a inflamação, provocando um aumento do volume dos edemas (VEIGA JR., *et al.*, 2001). Produtos adulterados são comumente encontrados na região Amazônica, mas podem ocorrer também, em farmácias de todas as regiões do país (VEIGA JR. *et al.*, 2005).

A possibilidade de contaminações microbiológicas também deve ser atentamente observada, especialmente em plantas medicinais vendidas em feiras e mercados populares, como ocorre comumente no Brasil (VEIGA JR. *et al.*, 2005). Alguns gêneros de fungos, como por exemplo, *Aspergillus sp.* e *Penicillium sp.*, que estão amplamente distribuídos no ecossistema brasileiro, produzem micotoxinas que, em sua maioria representam sérios danos a saúde. Portanto, é necessário estabelecer padrões para a presença de fungos toxigênicos em drogas vegetais a fim de reduzir os riscos à saúde do consumidor (BUGNO *et al.*, 2006).

Percebe-se que as plantas medicinais são parte integrante de um intenso ciclo industrial e comercial, sendo que, muitas sociedades tradicionais são economicamente dependentes da colheita dessas plantas. Deste modo, surge uma questão: a criação de áreas protegidas encerra as opções de uso futuro da terra? No entanto, a limitada disponibilidade de recursos naturais e as ameaças à diversidade de espécies, somadas ao rápido esgotamento dos ecossistemas, exigem medidas que estabeleçam prioridades de conservação (MELO *et al.*, 2009). A extinção em massa de espécies, se permitido persistir, constituiria um problema com um impacto muito mais duradouro do que qualquer outro risco ambiental. De acordo com a evidência de extinções em massa ocorridas no passado pré-histórico, os processos evolutivos não gerariam um estoque de reposição de espécies dentro de menos de vários milhares de anos (MYERS *et al.*, 2000). Portanto, o maior desafio é permitir que a sociedade atinja o seu ideal e partilhe os frutos do crescimento econômico sem prejuízo de uma biosfera que não apenas sustente uma faixa de funções ecológicas, mas mantenha a diversidade de vida (ADAMS *et al.*, 2004).

Cabe ressaltar ainda, que devido ao impacto da urbanização e industrialização, os recursos naturais e os conhecimentos da medicina popular estão rapidamente desaparecendo. A maioria das sociedades tradicionais do mundo já não é mais cercada pelo *habitat* natural que antigamente serviu como um berço da medicina tradicional e áreas de conhecimento popular que se acumularam e foram se aperfeiçoando por milhares de anos (ALVES E ROSA, 2007).

O Brasil possui uma das mais ricas floras do mundo, estima-se que há mais de 56 mil espécies de plantas superiores (ARAÚJO *et al.*, 2007). Porém, a perda e a fragmentação de áreas florestais associada à exploração indiscriminada de seus recursos ameaçam muitas populações de plantas (MELO *et al.*, 2009). Somente de floresta amazônica, o Brasil já perdeu 700 mil Km² nas últimas quatro décadas (GREENPEACE, 2009). Dentre alguns programas de proteção à biodiversidade implantados no Brasil, destaca-se o de demarcação das terras indígenas. Além de ser uma excelente estratégia de proteção às florestas, evita a destruição do conhecimento indígena sobre a biodiversidade. Os índices de desmatamento em terras indígenas são inferiores aos observados em unidades de conservação, até mesmo daquelas de proteção integral (BRASIL, 2009a; RICKETTS *et al.*, 2010).

Outro problema que afeta países detentores de grande biodiversidade é a questão da “biopirataria”. Estima-se que os países em desenvolvimento perdem cerca de 5,4 bilhões de dólares por ano, pois as companhias farmacêuticas e de processamento de alimentos usam germoplasmas e plantas medicinais nativas, sem a devida recompensa pelo direito de uso destes recursos naturais (LEVIDOW E CARR, 1997). Desta forma, medidas legais rigorosas estão sendo criadas para restringir a pesquisa em biodiversidade (RATES, 2001). Por outro lado, os limites colocados sobre a investigação em biodiversidade e sobre o acesso aos recursos biológicos estão se tornando um importante obstáculo à pesquisa científica nacional (GÓMEZ-POMPA, 2004). Uma ciência preparada para fornecer respostas a questões ligadas aos mecanismos do funcionamento da natureza terá condições de alfabetizar ecologicamente e contribuirá para o entendimento e a vivência em conformidade com os princípios ecológicos (GOTTLIEB *et al.*, 1998). Então, o estudo da biodiversidade é essencial, pois possibilita o conhecimento dos mecanismos da natureza, que são compreendidos por meio da linguagem químico-biológica (GOTTLIEB *et al.*, 1998; GOTTLIEB E BORIN, 2002).

Inseticidas Naturais: uma contribuição

Desde que a humanidade trocou o extrativismo pelo cultivo de plantas com a finalidade de produzir alimentos em maior escala, iniciava-se uma guerra contra os insetos. Uma espécie de inseto torna-se praga porque sua população cresce sem

limites. Na floresta não há insetos-praga porque existe a grande biodiversidade envolvendo um ecossistema que tem um delicado equilíbrio. Não é adequado que ocorra o crescimento desenfreado de nenhuma espécie porque o alimento é disperso e existem sempre muitos inimigos naturais. Num ambiente agrícola a diversidade é reduzida e o monocultivo em grandes extensões favorece o desaparecimento de muitas espécies de insetos, principalmente aqueles que se alimentam apenas de uma fonte vegetal. Com a diminuição da diversidade destes insetos também desaparecem os inimigos naturais. Neste momento se estabelece o inseto-praga, geralmente uma espécie polífaga, que passa a se alimentar do vegetal que está sendo cultivado. A grande oferta de alimento e ausência de inimigos naturais contribui para o crescimento populacional desenfreado do inseto-praga (ZARBIN *et al.*, 2009). Deste modo, torna-se necessário o uso de inseticidas para combater as infestações. No Brasil, o faturamento do mercado de inseticidas aumenta a cada ano. De 2007 para 2008 houve um crescimento de aproximadamente 20% (BRASIL, 2009b).

Embora produtos sintéticos sejam os mais utilizados como inseticidas, eles são altamente tóxicos para os organismos vivos e para o meio ambiente (PETROSKI E STANLEY, 2009). Sabe-se que, de forma global, a existência de uma área contaminada pode gerar inúmeros problemas à sociedade, tais como danos à saúde pública, comprometimento da qualidade de recursos hídricos utilizados para o consumo humano, restrições ao uso do solo e, até mesmo, danos ao patrimônio público e privado com a desvalorização das propriedades e outros (JARDIM *et al.*, 2009). Além destes problemas, o uso exagerado de inseticidas conduz a uma resistência dos insetos aos princípios ativos. As perdas mundiais em produtos armazenados, devido ao ataque de insetos-praga na pós colheita, são estimadas anualmente em 15 % e custos elevados são envolvidos para a proteção destes produtos contra as infestações (MOREIRA *et al.*, 2005). É importante considerar que a toxicidade de uma substância em insetos não a qualifica necessariamente como inseticida. Várias propriedades devem estar associadas à atividade, tais como: eficácia mesmo em baixas concentrações, ausência de toxicidade frente a animais superiores, ausência de fitotoxicidade, fácil obtenção, manipulação e aplicação, viabilidade econômica e não ser cumulativa no tecido adiposo humano e de animais domésticos. Dentro da classificação de inseticidas são incluídas também substâncias que repelem e atraem insetos (VIEGAS JR., 2003). Uma alternativa aos

inseticidas sintéticos são produtos naturais, pois em sua maioria oferecem pouca ameaça ao ambiente e à saúde humana (ISMAN, 2006; SALUNKE *et al.*, 2009). Muitos metabólitos secundários gerados pelas plantas, microrganismos e animais são resultado de co-evolução de organismos produtores com outros seres vivos. Deste modo, os recursos naturais possuem diversos compostos bioativos com propriedades inexploradas, sendo que alguns destes compostos podem ser potencialmente utilizados diretamente no controle de pragas ou plantas daninhas (PETROSKI E STANLEY, 2009). Extratos de plantas vêm sendo utilizados pelo ser humano desde a Idade Antiga, numa prática que persiste até hoje, com mais de 2.000 espécies de plantas conhecidas por suas propriedades inseticidas (VIEGAS JR., 2003).

A família Celastraceae

A família Celastraceae inclui, aproximadamente, 1.210 espécies em 98 gêneros (SIMMONS *et al.*, 2008) distribuídos principalmente em climas tropicais e subtropicais, embora existam alguns representantes em climas temperados (Figura 2, pág. 9) (NÚÑEZ RIVAS, 2004). No Brasil a família Celastraceae é representada por três gêneros: *Maytenus* Juss., *Austroplenckia* Lund. e *Franhoferia* Mart. (CARVALHO-OKANO, 1992). O reconhecimento de *Goupia* Reiss. em Celastraceae, proposto por alguns autores, não encontrou sustentação nos trabalhos de filogenia e este gênero tem sido tratado em uma família à parte, Goupiaceae (SOUZA E LORENZI, 2005). Geralmente, as espécies dessa família se caracterizam por serem árvores, arbustos e raras vezes trepadeiras; possuem folhas simples, opostas e dentadas; flores não vistosas e pequenas (tetrâmeras ou pentâmeras), verdes claras ou brancas; frutos encapsulados e, sementes com arilo branco ou laranja (NÚÑEZ RIVAS, 2004; SOUZA E LORENZI, 2005).

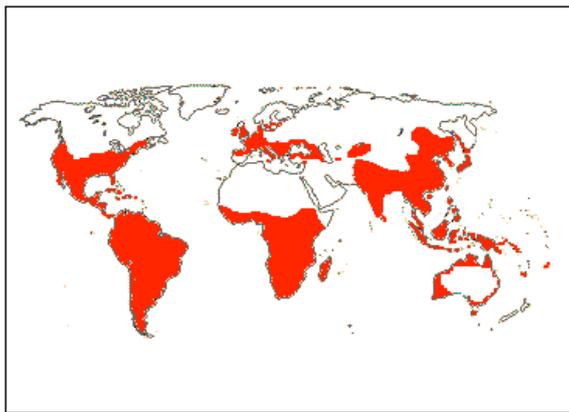


Figura 2: Distribuição geográfica da família Celastraceae (em vermelho) (NÚÑEZ RIVAS, 2004).

Numerosas espécies da família Celastraceae são conhecidas especialmente na China e América Latina por seu uso como inseticida na agricultura tradicional e também para o tratamento de doenças como distúrbios estomacais, artrite reumatóide e câncer (SPIVEY *et al.*, 2002). Além da sua diversidade de atividades farmacológicas, muitos grupos de pesquisa a estudam também por sua ampla distribuição botânica, natureza química e complexidade de seus metabólitos (RODRÍGUEZ PÉREZ, 2000).

Diversas substâncias isoladas de espécies da família Celastraceae apresentam propriedades biológicas interessantes, por exemplo:

Glicosídeos cardiotônicos, um glicosídeo da aglicona digitoxigenina. O composto elaeodendrosídeo W (Figura 3, pág. 10), isolado dos troncos de *Elaeodendron alluadianum*, apresenta atividade antiproliferativa contra câncer de ovário humano. Existem aproximadamente, 40 espécies do gênero *Elaeodendron*, sendo encontradas no México, Madagascar, Índia e Austrália (HOU *et al.*, 2009).

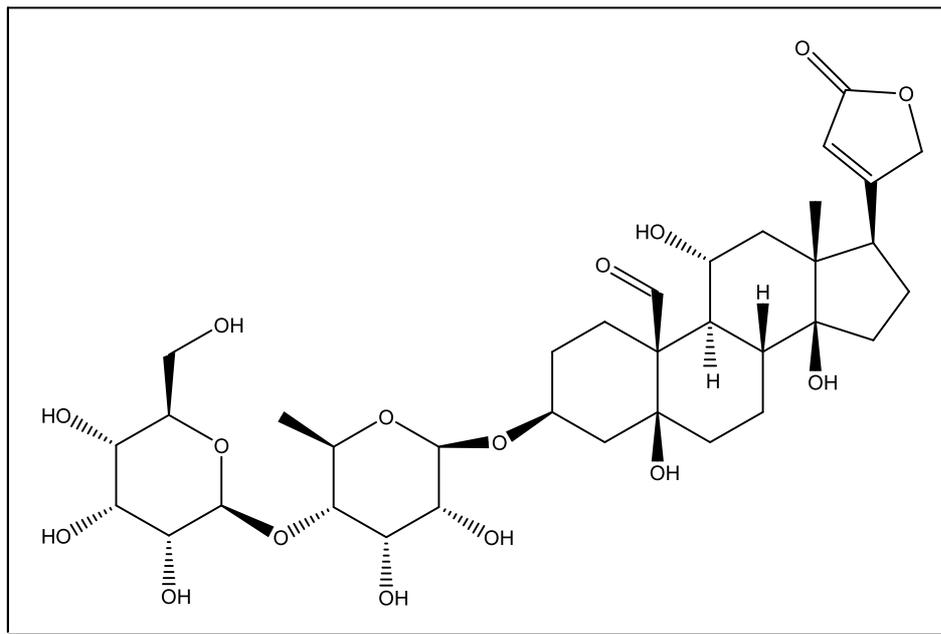


Figura 3: Estrutura química do elaeodendrosídeo W (HOU *et al.*, 2009).

Triterpenos pentacíclicos, são formados por um esqueleto de 30 átomos de carbono que podem estar dispostos em cinco anéis de seis membros (NÚÑEZ RIVAS, 2004). O ácido populnônico (Figura 4), isolado das cascas de *Austroplenckia populnea*, apresenta atividade anti-inflamatória. Essa planta é encontrada no cerrado brasileiro e muito utilizada na medicina popular para o tratamento de disenterias e inflamações, como o reumatismo (ANDRADE *et al.*, 2007).

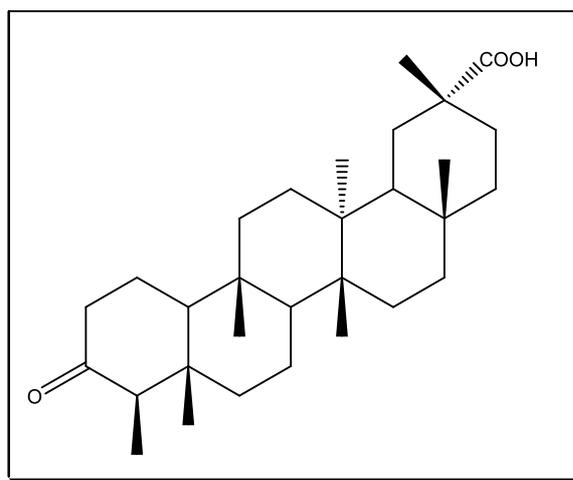


Figura 4: Estrutura química do ácido populnônico (Ácido 3-oxo-friedelan-29-óico) (ANDRADE *et al.*, 2007).

Sesquiterpenos, com esqueleto básico de di-hidro- β -agarofurano. Essa estrutura compreende anéis A e B na forma de uma decalina, possuindo uma ponte tetra-hidrofuranil fundida. O sesquiterpeno 1-acetiloxi-9-benzoiloxi-8-cinamoiloxi-4,6-diidroxi-hidro- β -agarofurano (Figura 5), isolado das folhas de *Celastrus vulcanicola*, apresenta atividade de inibição fotossintética. Os constituintes isolados desta planta e sua atividade biológica ainda não tinham sido investigados. *Celastrus vulcanicola* é uma trepadeira lenhosa subtropical distribuída na América Central e no Caribe (TORRES-ROMERO *et al.*, 2008).

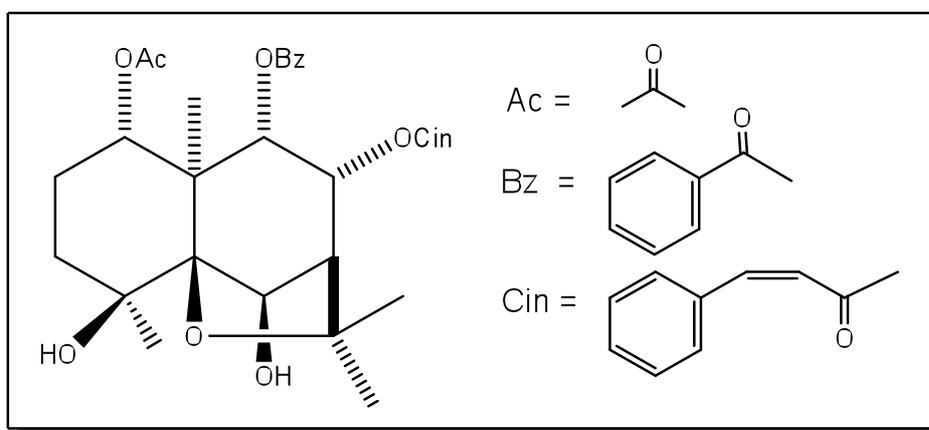


Figura 5: Estrutura química do sesquiterpeno 1-acetiloxi-9-benzoiloxi-8-cinamoiloxi-4,6-di-hidroxi-hidro- β -agarofurano (TORRES-ROMERO *et al.*, 2008).

Alcaloides sesquiterpênicos piridínicos, com esqueleto básico de sesquiterpeno do tipo di-hidro- β -agarofurano com ácido dicarboxílico piridínico incorporado. A substância opositina A (Figura 6, pág. 12), isolada dos troncos de *Pleurostyliia opposita*, apresenta moderada atividade citotóxica contra células tumorais de colo humano (WHITSON *et al.*, 2006). *P. opposita* é uma árvore de tamanho médio encontrada na zona seca do Sri Lanka (DANTANARAYANA *et al.*, 1981).

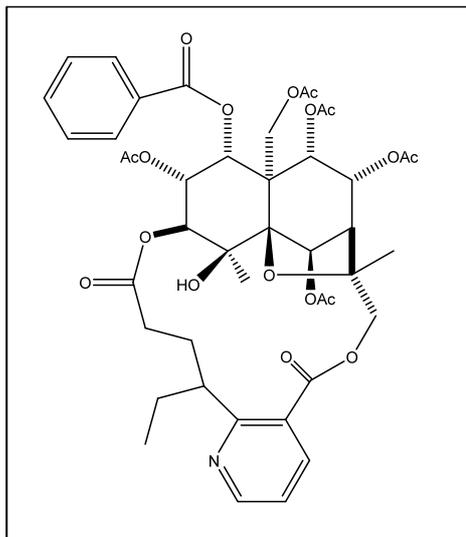


Figura 6: Estrutura química da opositina A (WHITSON *et al.*, 2006).

Triterpenos quinonametídeos, são metabólitos secundários restritos a plantas superiores da família (CORSINO *et al.*, 2000). Tingenona (Figura 7) é uma substância isolada das raízes de várias espécies da família Celastraceae, por exemplo, *Austroplenckia populnea* (DUARTE *et al.*, 2002), *Maytenus acanthophylla* (OLIVEIRA *et al.*, 2006) e *Hippocratea excelsa* (MENA-REJÓN *et al.*, 2007). Apresenta numerosas atividades biológicas, tais como: atividade contra *Trypanosoma cruzi* (DUARTE *et al.*, 2002), *Giardia intestinalis* (MENA REJÓN *et al.*, 2007) e inibição da proteína tubulina que pode ser o modo de ação que justifica a atividade citotóxica e antitumoral (MORITA *et al.*, 2008).

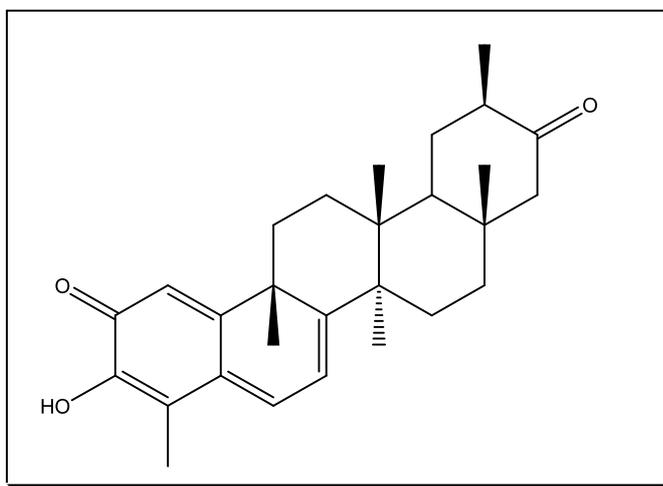


Figura 7: Estrutura química da tingenona (MENA-REJÓN *et al.*, 2007).

Flavonoides glicosilados, da classe dos flavan-3-ol. O metabólito 3-benzoato(-)-epicatequin-5-O- β -D-glicosila (Figura 8), isolado das partes aéreas de *Celastrus orbiculatus*, apresenta moderada atividade antioxidante. Esta planta é utilizada na medicina popular para o tratamento de artrite, infecções bacterianas e como tranquilizante (HWANG *et al.*, 2001; GUO *et al.*, 2004) e é amplamente distribuída na China (GUO *et al.*, 2004).

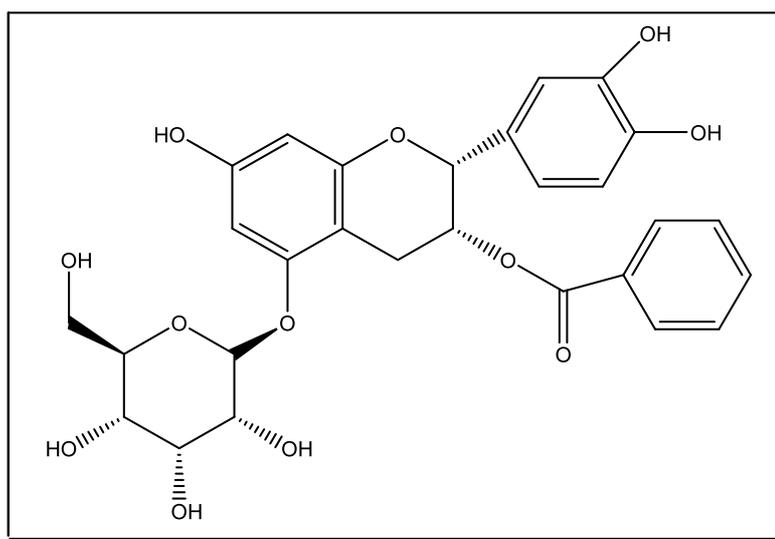


Figura 8: Estrutura química de 3-benzoato(-)-epicatequin-5-O- β -D-glicosila (HWANG *et al.*, 2001).

Diterpenos, apesar de serem pouco frequentes na família, os de esqueleto isopimarano e abietano têm sido os mais isolados (RODRÍGUEZ PÉREZ, 2000). A substância triptolida (Figura 9, pág. 14), isolada das cascas das raízes de *Tripterygium wilfordii*, apresenta potente atividade contra a larva de *Mythimna separata* (LUO *et al.*, 2004), praga de cereais e gramíneas forrageiras (HAN E GATEHOUSE, 1991). Esta substância também possui atividade antileucêmica e imunossupressora (RODRÍGUEZ PÉREZ, 2000). *T. wilfordii* é utilizada como anticancerígena e inseticida por centenas de anos na China (LI *et al.*, 1997).

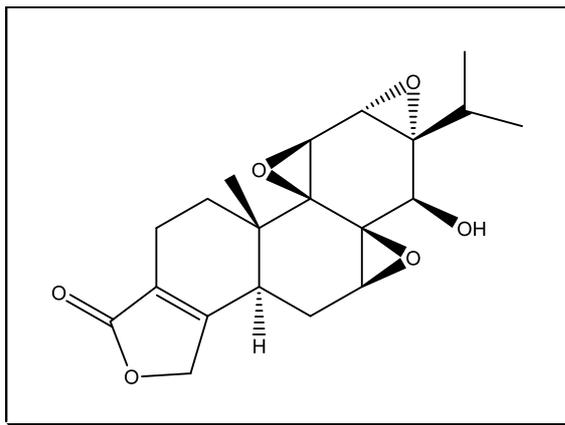


Figura 9: Estrutura química da triptolida (LUO *et al.*, 2004).

O gênero *Maytenus*

O gênero *Maytenus* é um dos maiores da família Celastraceae, sendo que, 225 espécies são tropicais. Deste total, 77 espécies são citadas para a flora brasileira (CARVALHO-OKANO, 1992). As espécies *Maytenus ilicifolia* e *Maytenus aquifolium* são amplamente utilizadas na medicina popular brasileira. São ingeridas, na forma de infusão aquosa, para o tratamento de úlcera e outras afecções intestinais. Em várias regiões do Brasil são encontrados locais onde folhas dessas plantas verdes, secas ou na forma de pó, em cápsulas são comercializadas (OLIVEIRA, 2007).

Os extratos de plantas do gênero *Maytenus* apresentam uma variedade de atividades biológicas: o extrato etanólico das raízes de *Maytenus putterlickoides* apresenta atividade antileucêmica (SCHNEBERG *et al.*, 2001), o extrato metanólico das cascas das raízes de *M. senegalensis* apresenta atividade antibacteriana (LINDSEY *et al.*, 2006) e o extrato clorofórmico das raízes apresenta atividade anti-inflamatória (SOSA *et al.*, 2007), o extrato em acetato de etila e metanólico das folhas de *M. truncata* apresentam considerável atividade analgésica e antiulcerogênica (FONSECA *et al.*, 2007) e o extrato etanólico das cascas de *M. rigida* apresenta atividade anti-inflamatória, antiulcerogênica e antidiarréica (SANTOS *et al.*, 2007).

Vários metabólitos bioativos já foram isolados de espécies do gênero *Maytenus*, como por exemplo: maitensinoides com atividade inseticida (MADRIGAL *et al.*, 1985), poliésteres sesquiterpênicos com atividade antitumoral (SHIROTA *et*

al., 1994), dímeros triterpênicos com atividade antimicrobiana (GONZÁLEZ *et al.*, 1996), triterpenos lupânicos com potente atividade anti-inflamatória (REYES *et al.*, 2006), sesquiterpenos com esqueleto básico de di-hidro- β -agarofurano com atividade inibitória à resistência do parasita *Leishmania* à algumas drogas (DELGADO-MÉNDEZ *et al.*, 2008) e triterpenos friedelânicos com atividade antiulcerogênica e antimicrobiana (ANDRADE *et al.*, 2008; SALEEM *et al.*, 2010).

A espécie *Maytenus gonoclada* Martius

A espécie *Maytenus gonoclada* Martius é conhecida como “Tiuzinho” e ocorre principalmente nos estados da Bahia, Minas Gerais, Rio de Janeiro e São Paulo. É importante mencionar que *Maytenus lagoensis* e *Maytenus gonoclada* var. *glaziovii* são considerados sinônimos de *M. gonoclada*. É uma árvore medindo até quatro metros de altura e caracteriza-se principalmente por seus ramos novos nitidamente quadrangulares (Figura 10) (CARVALHO-OKANO, 1992).



Figura 10: Fotografia de *Maytenus gonoclada* Martius (Foto: Fernando César Silva).

Desta espécie, até o momento, somente as folhas já foram estudadas fitoquimicamente (OLIVEIRA, 2007). Em sua dissertação de mestrado, Oliveira (2007) estudou os extratos hexânico, em acetato de etila e etanólico. Na Figura 11, pág. 16 estão representadas as estruturas químicas das substâncias isoladas das folhas de *M. gonoclada*.

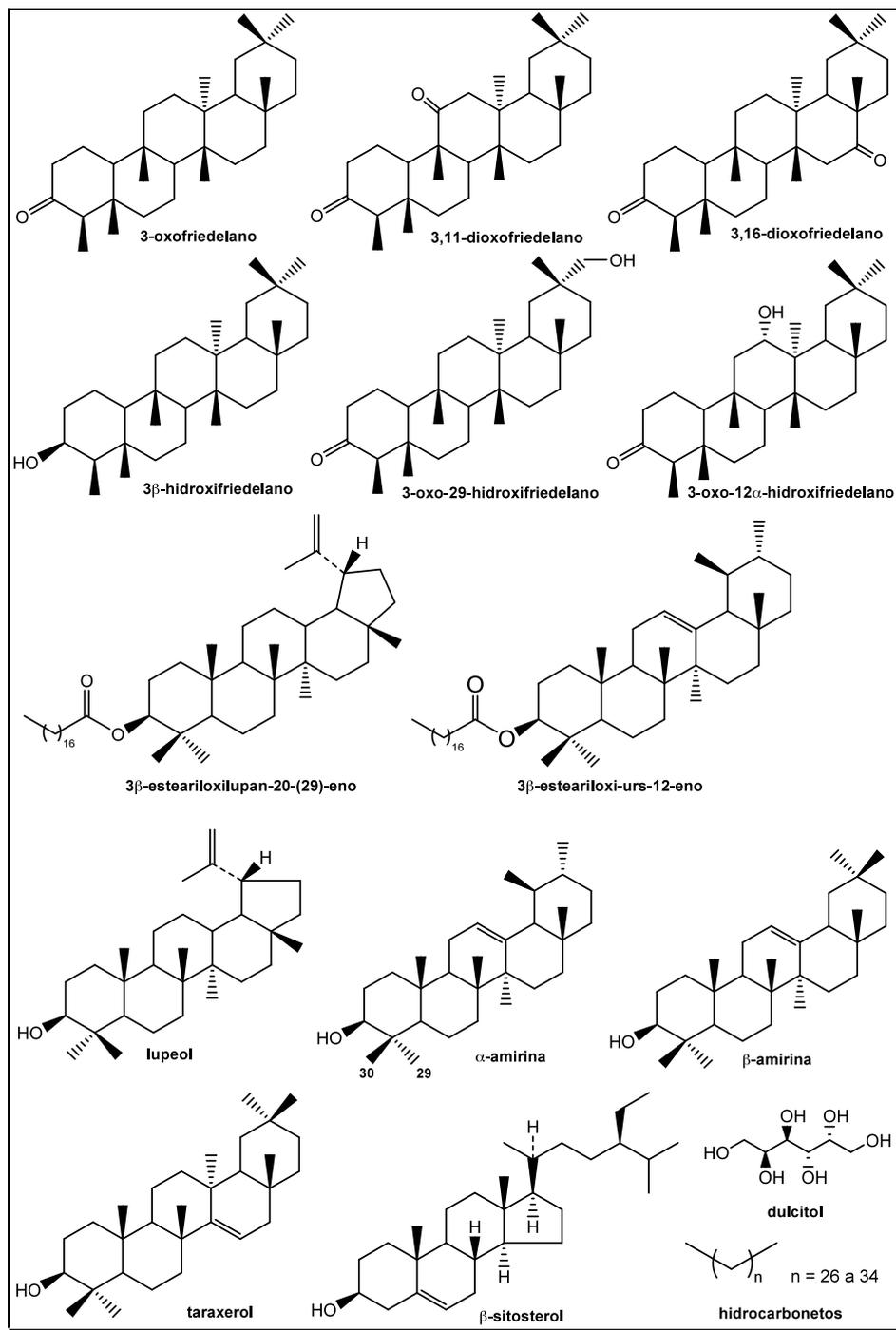


Figura 11: Substâncias isoladas das folhas de *M. gonoclada* (OLIVEIRA, 2007).

Para avaliar o potencial farmacológico, Oliveira (2007) realizou testes de atividade antibacteriana e antifúngica nos extratos hexânico, em acetato de etila e etanólico, bem como de sólidos obtidos durante a preparação destes extratos e da

friedelina. Nas condições testadas e concentrações utilizadas, todos os testes apresentaram resultados negativos (OLIVEIRA, 2007).

Maytenus gonoclada apresenta muitas similaridades com a espécie *M. salicifolia* (Figura 12), o que as distingue são os ramos, mais quadrangulares e as folhas mais rijas (CARVALHO-OKANO, 1992). Estas plantas constituem um caso onde a similaridade parece sugerir tratar-se de apenas uma espécie (VALLADÃO, 2005). Em sua dissertação de mestrado, Valladão (2005) desenvolveu um estudo anatômico e químico de populações de *M. salicifolia* e uma de *M. gonoclada*. O estudo anatômico de *M. gonoclada* mostrou diferenças em relação a todas as populações de *M. salicifolia* e o estudo quimiotaixonômico dessas espécies apresentou similaridade apenas entre uma população.



Figura 12: Fotografia de *Maytenus salicifolia* Reissek (Foto: Roqueline Rodrigues Silva de Miranda).

Na Tabela 1, pág. 18, estão representados os constituintes químicos isolados das folhas de *M. gonoclada* (OLIVEIRA, 2007), polpa de fruto (VALLADÃO, 2005), tronco e folhas de *M. salicifolia* (MIRANDA, 2007).

Tabela 1: Constituintes químicos isolados de *M. gonoclada* e *M. salicifolia* (VALLADÃO, 2005; MIRANDA, 2007; OLIVEIRA, 2007)

Constituinte químico	Classe	Espécie de Celastraceae	
		<i>M. salicifolia</i>	<i>M. gonoclada</i>
Hidrocarbonetos de cadeia longa	Hidrocarboneto	+ (P e F)	+ (F)
Gutta-percha	Polímero	+ (F)	-
Dulcitol	Carboidrato	+ (F)	+ (F)
β -Sitosterol	Esteróide	+ (P, F)	+ (F)
Sitostenona		+ (P)	-
Estigmasta-3,5-dien-7-ona		+ (F)	-
3-O- β -D-Glicosil- β -sitosterol		+ (P)	-
3-Oxofriedelano	Triterpeno Pentacíclico (TTPC) (Friedelano)	+ (P e F)	+ (F)
3 β -Hidroxifriedelano		+ (F)	+ (F)
3,11-Dioxofriedelano		-	+ (F)
3,16-Dioxofriedelano		-	+ (F)
3-Oxo-12 α -hidroxifriedelano		-	+ (F)
3-Oxo-29-hidroxifriedelano		-	+ (F)
Ácido 3,4-seco-friedelan-3-óico		+ (F)	-
β -Hidroxi-D:B-friedo-olean-5-eno	TTPC (Friedo-oleanano)	+ (P)	-
Lupeol	TTPC (Lupano)	+ (P, F e T)	+ (F)
3 β -Estearilxilupan-20-(29)-eno		+ (F)	+ (F)
3 β ,15 α -Diidroxilupan-20-(29)-eno		+ (F)	-
3 β -Esteariloxi-ursan-12-eno	TTPC (Ursano)	+ (F)	+ (F)
3 β ,3 α -Diidroxil-ursan-12-eno		+ (F)	-
3 β ,28-Diidroxilursan-12-eno		+ (F)	-
α -Amirina		+ (F)	+ (F)
α -Amirona		+ (F)	-
3 β -Esteariloxiolean-18-eno	TTPC (Oleanano)	+ (F)	-
β -Amirina		+ (P e F)	+ (F)
β -Amirona		+ (F)	-
Taraxerol	TTPC (Taraxerano)	-	+ (F)
Canferol-3-O-glicopiranosídeo	Flavonoide	+ (F)	-
4'-O-Metilepigalocatequina		+ (T)	-
Proantocianidina	Tanino Condensado	+ (T)	-

F = folha, P = polpa de fruto e T = tronco.

Observa-se que os triterpenos pentacíclicos (friedelano, friedo-oleanano, ursano, lupano e oleanano) são a classe predominante. Sendo que os friedelanos

são mais abundantes em *M. gonoclada* e os ursanos em *M. salicifolia*. O isolamento de triterpenos é consistente com o perfil químico de outras espécies estudadas do gênero *Maytenus*, sendo estes considerados marcadores taxonômicos (SILVA *et al.*, 2008).

Biossíntese de triterpenos pentacíclicos

Terpenoides, também conhecidos como isoprenoides constituem uma diversificada classe de produtos naturais, que possuem muitas funções no reino vegetal e na saúde humana (ROBERTS, 2007). Esta classe de substâncias defendem muitas espécies de plantas, animais e microrganismos contra predadores, patógenos e competidores, e estão envolvidos na transmissão de mensagens sobre a presença de alimento, amigos e inimigos. No entanto, o papel biológico de diversos terpenoides ainda não é conhecido (GERSHENZON E DUDAREVA, 2007). Nessa classe, existem mais de 40 mil estruturas diferentes, com vários compostos que servem como importantes agentes farmacêuticos (ROBERTS, 2007).

O pirofosfato de isopentenila (IPP) e o seu isômero pirofosfato de γ,γ -dimetilalila (DMAPP), também chamados de unidades de isopreno, são os precursores dos terpenoides. Os diversos tipos de terpenoides são formados pela condensação de moléculas de IPP por meio de enzimas conhecidas como preniltransferases, (Figura 13, pág. 20) (ROBERTS, 2007). A combinação de uma molécula de IPP e uma de DMAPP produz o difosfato de geranila (GPP), que é o precursor dos monoterpênos. A adição de uma molécula de IPP ao GPP produz o pirofosfato de farnesila (FPP) que constitui o precursor dos sesquiterpenos. A adição de uma molécula de IPP ao FPP produz o difosfato de geranilgeranila (GGPP), que forma os diterpenos, a combinação de duas moléculas de FPP produz o esqualeno que forma os triterpenos e, a combinação de duas moléculas de GGPP dá origem aos tetraterpenos (DEWICK, 2002).

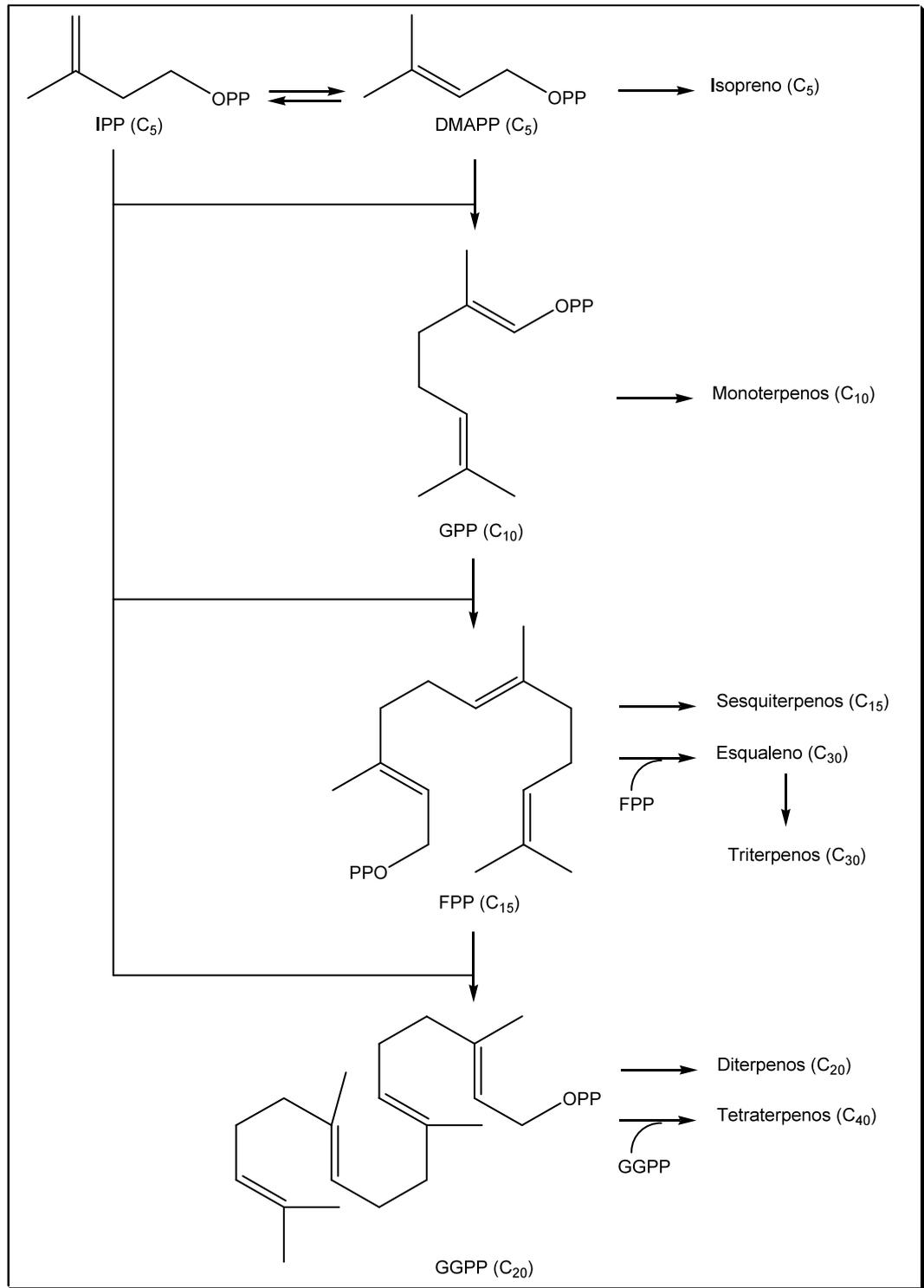


Figura 13: Resumo da biossíntese dos terpenos (ROBERTS, 2007).

Duas vias distintas podem gerar os precursores dos terpenos (Figura 14, pág. 21). A clássica via do mevalonato (MVA) descoberta na década de 1950 e que foi considerada a única fonte de IPP e DMAPP. A rota MVA ocorre no citoplasma e é

ativa nas bactérias, fungos, plantas e animais, fornecendo os precursores para a formação de sesquiterpenos e triterpenos. Recentemente, descobriu-se um caminho alternativo para o fornecimento de IPP e DMAPP, a chamada rota metileritritol fosfato (MEP). A rota MEP ocorre nos plastídios e é geralmente usada para fornecer os precursores dos monoterpenos, diterpenos e tetraterpenos (ROBERTS, 2007).

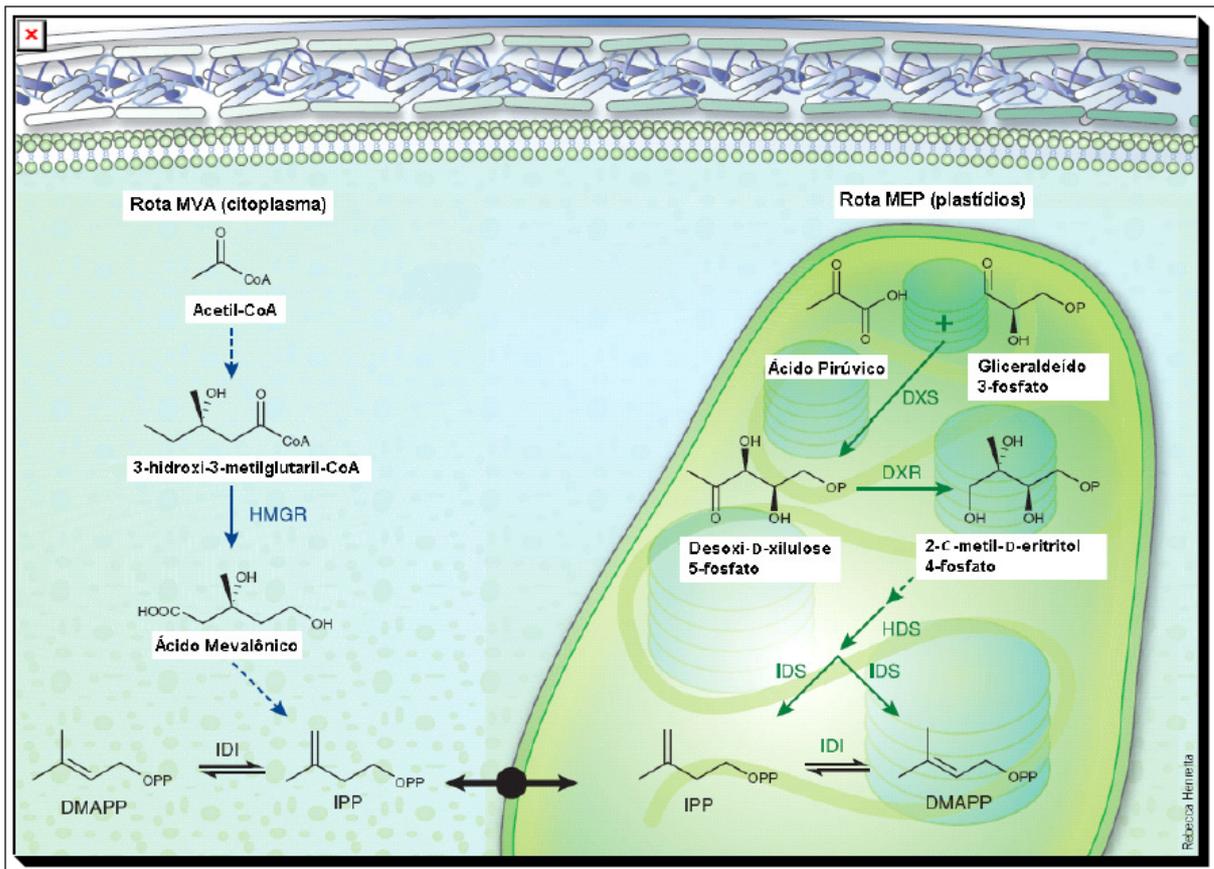


Figura 14: Biossíntese compartimentada do IPP e DMAPP. (Esquerda) Via do mevalonato: 3-hidroxi-3-metil coenzima A redutase (HMGR) e difosfato de isopentenila isomerase (IDI). (Direita) Via do metileritritol: 1-desoxi-D-xilulose 5-fosfato sintase (DXS), 1-desoxi-D-xilulose 5-fosfato redutoisomerase (DXR), hidróxi-2-metil-2-(E)-4-butenil difosfato sintase (HDS), difosfato de isopentenila:difosfato de dimetilalila sintase (IDS) e IDI. As setas tracejadas indicam mais de uma etapa (Roberts, 2007).

Os triterpenos são um dos grupos de terpenos mais estruturalmente diversificados, contendo acima de 100 esqueletos descritos como produtos naturais (DOMINGO *et al.*, 2009). A maioria deles são tetracíclicos 6-6-6-5 e pentacíclicos 6-

6-6-6-5 e 6-6-6-6-6, mas podendo ocorrer acíclicos, monocíclicos, bicíclicos, tricíclicos e hexacíclicos (XU *et al.*, 2004). A origem desta diversidade está no mecanismo envolvido durante a sua biossíntese (DOMINGO *et al.*, 2009). Ruzicka e colaboradores, na década de 1950, deduziram que todos os triterpenos hidroxilados $C_{30}H_{50}O$ conhecidos foram biossintetizados da mesma forma e propuseram um conjunto de princípios para explicar a formação de cada esqueleto triterpênico (XU *et al.*, 2004). A ciclização do esqualeno ocorre a partir do intermediário 2,3-epoxiesqualeno, um produto de oxidação enzimática que requer uma flavoproteína e nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH), e que pode assumir diferentes conformações como, por exemplo: cadeira-cadeira-cadeira-barco e cadeira-barco-cadeira-barco (LOBO E LOURENÇO, 2007). As enzimas conhecidas como triterpenos sintases provocam adições eletrofílicas às ligações duplas promovendo as ciclizações, clivagem do epóxido e formação de carbocátion, conforme está representado na Figura 15, pág. 23 (XU *et al.*, 2004; LOBO E LOURENÇO, 2007; DOMINGO *et al.*, 2009). O 2,3-epoxiesqualeno é provavelmente o precursor da maioria dos triterpenoides 3β -hidroxilados (XU *et al.*, 2004).

Após as ciclizações iniciais forma-se um esqueleto do tipo 6-6-6-5 com um carbocátion terciário, chamado de cátion damarenila (Etapa I, Figura 13, pág. 23). A expansão do anel de 5 para um de 6 leva a formação do cátion bacharenila (Etapa II). A ocorrência de mais uma ciclização e a formação de um carbocátion terciário leva a formação do cátion lupenila (Etapa III). Mesmo com a formação de um carbocátion secundário, a expansão de anel ocorre e leva a formação do cátion germanicanila (Etapa IV). Com a formação deste cátion há possibilidades de duas rotas biossintéticas e rearranjos do tipo Wagner-Meerwein ocorrem em todas as etapas. Na primeira possibilidade acontece migração 1,2 de metila levando a formação do cátion taraxasterila (Etapa V). A migração em cadeia 1,2 de hidreto leva a formação do cátion ursila (Etapa VI). Na segunda possibilidade a migração em cadeia 1,2 de hidreto leva a formação do cátion oleanila (Etapa VII). Desta vez, a migração 1,2 de metila leva a formação do cátion taraxarenila (Etapa VIII). A migração em cadeia 1,2 de hidreto e 1,2 de metila levam a formação do cátion glutinanila (Etapa IX). E por fim a migração 1,2 de metila leva a formação do cátion friedelanila (Etapa X) (NÚÑEZ RIVAS, 2004).

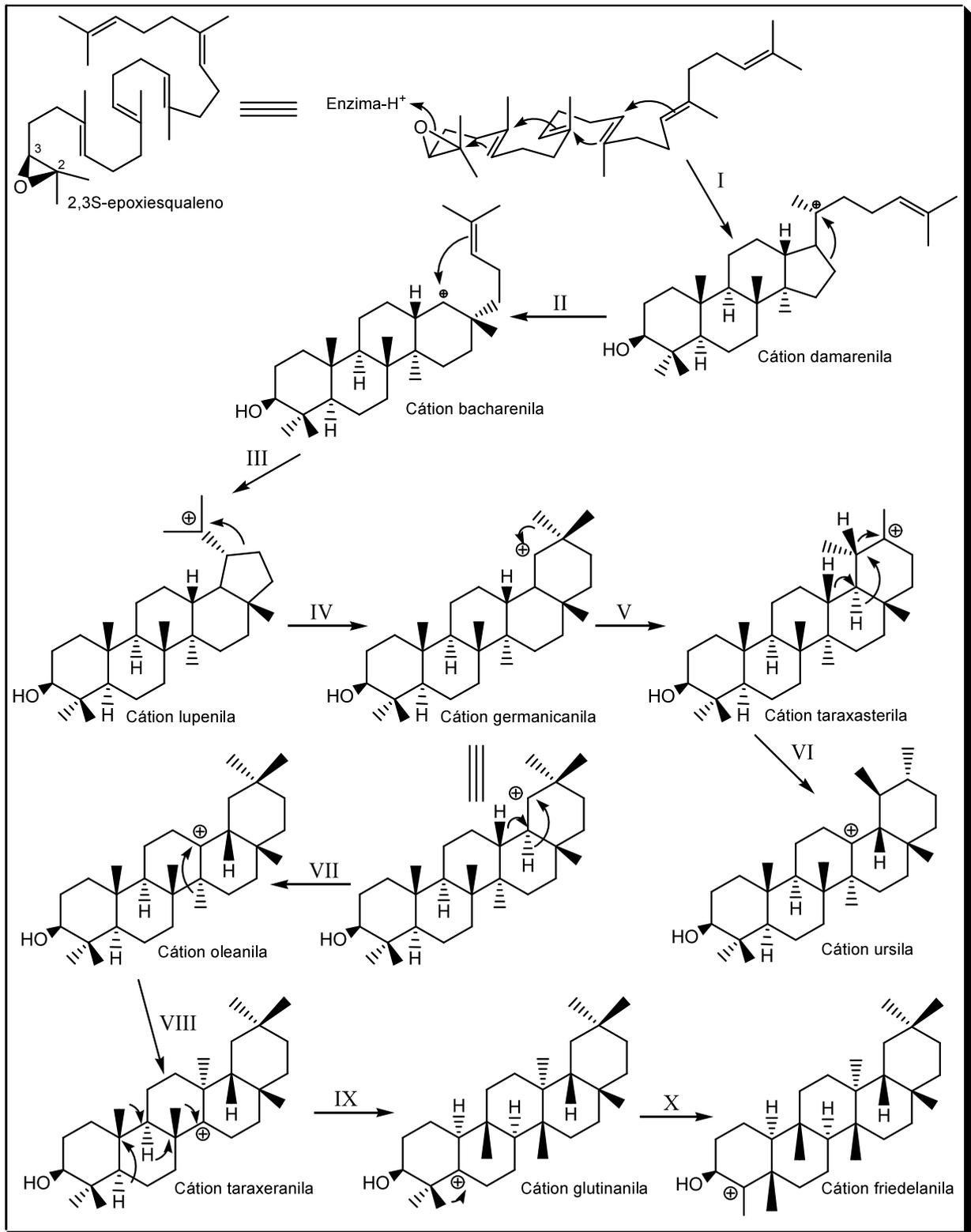


Figura 15: Rota biossintética de alguns esqueletos de triterpenos pentacíclicos (NÚÑEZ RIVAS, 2004).

Com os esqueletos formados, transformações complementares, como oxidação, redução e isomerização, podem ocorrer levando aos vários compostos conhecidos (XU *et al.*, 2004). O 3 β -hidroxifriedelano (um triterpeno formado a partir do cátion friedelanila) sob ação da enzima oxidoreductase é transformado em 3-oxofriedelano (CORSINO *et al.*, 2000), que é uma substância amplamente isolada das espécies da família Celastraceae. Experimentos indicam que o 3-oxofriedelano biossintetizado nas folhas dessas espécies deslocam para as raízes formando os quinonametídeos (CORSINO *et al.*, 2000).

OBJETIVOS

Objetivos do trabalho

No NEPLAM são realizadas pesquisas que visam o isolamento e identificação de novos metabólitos secundários com atividade biológica, centradas em espécies da família Celastraceae. No isolamento dessas substâncias, nossa atenção tem sido direcionada para a classe dos triterpenos pentacíclicos, dentre eles os quinonametídeos por mostrarem atividade antitumoral e os oleananos e friedelanos por apresentarem atividade antimicrobiana.

O principal objetivo deste trabalho é dar continuidade às pesquisas com os membros da família Celastraceae, buscando comprovar ou não suas propriedades farmacológicas. E, uma espécie que tem sido pesquisada por nosso grupo é a *Maytenus gonoclada*. Neste contexto, o grande interesse do presente trabalho envolve os seguintes objetivos:

- Realizar um estudo fitoquímico dos galhos.
- Promover um estudo detalhado de confirmação estrutural dos metabólitos secundários isolados, utilizando métodos espectroscópicos e espectrométricos.
- Estabelecer relações fitoquímicas entre espécies da família Celastraceae contribuindo para o estudo quimiotaxonômico.
- Realizar estudos de atividade biológica de extratos e das substâncias isoladas.
- Estabelecer correlações entre estrutura química e atividade biológica.

1 – ESTUDO FITOQUÍMICO

1.1 – Parte Experimental

1.1.1 – Materiais e métodos

Os critérios de pureza adotados foram: visualização de uma única mancha em cromatoplaça com variação de eluentes, estreita faixa de fusão, bandas bem definidas no espectro de absorção na região do IV e o número de sinais no espectro de RMN de ^1H e ^{13}C .

1.1.1.1 – Métodos Cromatográficos

Para cromatografia em camada delgada (CCD) foi utilizada sílica gel 60G Merck em placa de vidro de 0,25 mm de espessura (para CCD analítica) e 0,50 mm ou 0,75 mm de espessura (para CCD preparativa), ambas ativadas a 100 °C em estufa. E para o preparo de colunas cromatográficas clássicas foram utilizadas como fases estacionárias sílica gel 60 Merck com tamanho de partícula 0,063-0,200 mm (70-230 Mesh) e 0,040-0,063 mm (230-400 Mesh). A proporção da amostra e fase estacionária foi, em geral, de 1:50.

1.1.1.2 – Solventes e reagentes

Os solventes utilizados como eluentes nos métodos cromatográficos foram destilados. A reutilização destes solventes, quando em mistura e para a mesma coluna, foi realizada usando refração da luz medida em refratômetro para correção das proporções das misturas.

Solventes deuterados (CDCl_3 e Piridina- d_5) da marca Cambridge Isotope Laboratories (CIL) foram utilizados para obtenção dos espectros de RMN 1D e 2D.

Como revelador de cromatoplaças utilizou-se solução 1:1 de ácido perclórico a 3% em água e vanilina a 1% em etanol. E para teste de Liebermann Burchard (MATOS, 1980) foram utilizados 1 mL de anidrido acético e 2 gotas de ácido sulfúrico, ambos concentrados.

1.1.1.3 – Instrumentos

As temperaturas das faixas de fusão foram determinadas em aparelho Fisher-Johns. Para correção das proporções das misturas foi utilizado o refratômetro modelo Biobrix e as massas de extratos, frações e substâncias medidas em balança analítica AB104 Mettler Toledo do NEPLAM no DQ da UFMG.

Os espectros na região do IV foram obtidos utilizando-se aparelho modelo Spectrum One Perkin Elmer do Laboratório de Química Farmacêutica da Faculdade de Farmácia da UFMG. Este aparelho possui dispositivo ATR permitindo que o espectro seja obtido diretamente da amostra sólida sem a necessidade do uso de pastilha.

As rotações ópticas foram medidas em polarímetro Perkin Elmer 341 do Laboratório de Químico e Bioprospecção de Plantas do Cerrado (CerQBio) do DQ da UFMG, usando um tubo de 1 dm.

Os espectros de RMN de 1D e 2D foram obtidos em espectrômetros Bruker *Avance* DPX-200 e DRX-400 do Laboratório de Ressonância Magnética de Alta Resolução (LAREMAR) no DQ da UFMG, operando à temperatura de 300 K. Os deslocamentos químicos (δ) foram registrados em ppm usando o tetrametilsilano (TMS) como padrão de referência interna e as constantes de acoplamento (J) dadas em Hz.

O espectro de massas (CG-EM) foi obtido em cromatógrafo à gás SOCUS acoplado a espectrômetro de massas SINGLE Quadrupolo DSQ Thermo do Laboratório Nacional Agropecuário (LANAGRO-MG).

O espectro de massas (EM-ESI) foi obtido em espectrômetro Modelo LCQ Fleet Thermo Scientific do Laboratório de Análise Instrumental no DQ da UFMG.

1.1.2 – Coleta e identificação do material vegetal

Maytenus gonoclada Martius (Celastraceae) foi coletada na Serra da Piedade, município de Caeté, estado de Minas Gerais, Brasil, em 18 de outubro de 2004 pelo Prof. Dr. Sidney Augusto Vieira Filho da Escola de Farmácia da Universidade Federal de Ouro Preto (UFOP).

O material vegetal foi identificado pela Profa. Dra. Rita Maria Carvalho-Okano do Departamento de Biologia Vegetal da Universidade Federal de Viçosa (UFV).

Uma exsicata do *especimen* (Nº. HBCB 60280) encontra-se depositada no Herbário do Instituto de Ciências Biológicas (ICB) da UFMG.

1.1.3 – Preparação do extrato hexânico dos galhos de *Maytenus gonoclada*

Após coleta e secagem à temperatura ambiente, os galhos foram pulverizados em moinho de martelos e submetidos à extração exaustiva com hexano, clorofórmio, acetato de etila e etanol, puros e sequencialmente em aparelho Soxhlet. A filtração e remoção do solvente, por destilação à pressão reduzida, conduziram aos respectivos extratos. A preparação dos extratos está esquematizada na Figura 16.

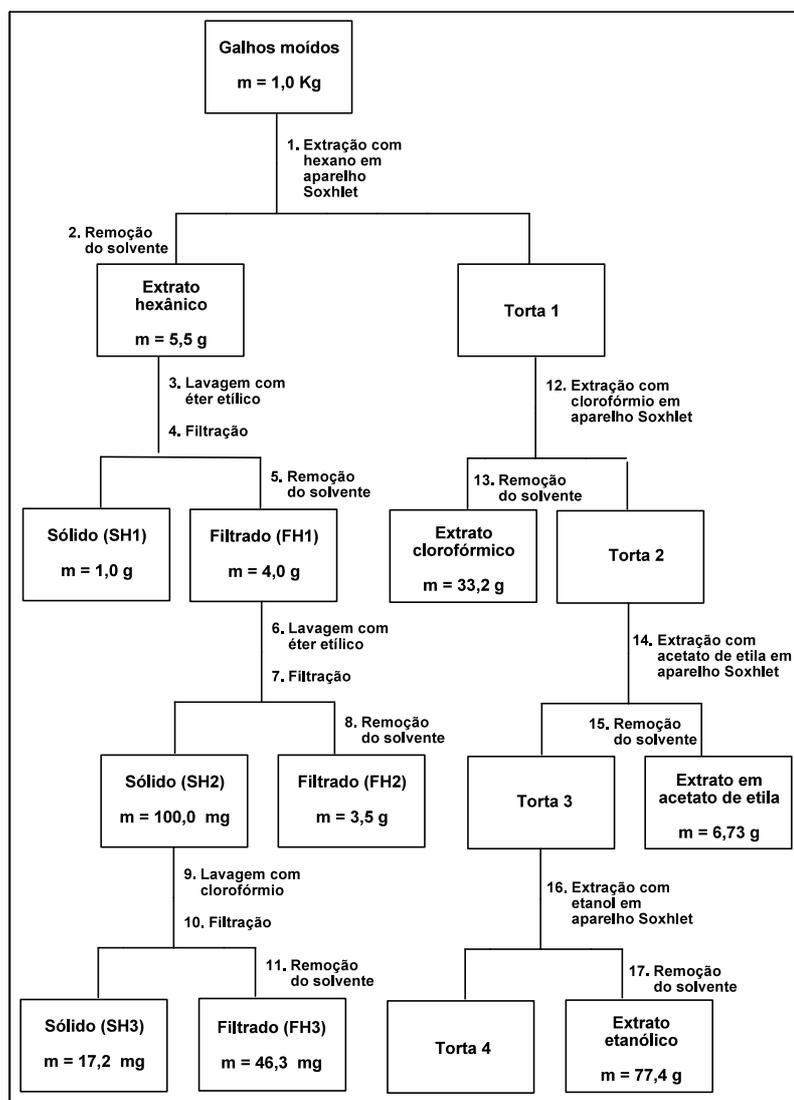


Figura 16: Preparação dos extratos dos galhos de *M. gonoclada*.

As frações submetidas às separações cromatográficas foram escolhidas baseando-se em dois critérios: massa e perfil da fração em CCD (fração cuja massa era muito pequena e apresentasse muitas manchas não foi trabalhada).

A notação empregada para codificar as substâncias ou misturas isoladas durante o estudo fitoquímico do extrato hexânico dos galhos de *Maytenus gonoclada*, tem as iniciais da planta seguida da ordem de isolamento das mesmas.

1.1.3.1 – Elaboração de SH1

SH1 (1,0 g) foi obtido da primeira lavagem do extrato hexânico com éter etílico e apresentou-se como sólido branco. Este sólido foi submetido à CC (Coluna A: 30 mm/70 cm), utilizando 50,0 g de sílica gel 60 (70-230 Mesh) e os eluentes hexano, clorofórmio, acetato de etila e metanol puros ou em misturas em gradiente de polaridade (Tabela 2).

Tabela 2. Ordem de eluição da coluna A

Eluentes	Frações de 50 mL
Hexano	1 – 10
Hexano/clorofórmio (9:1)	11 – 15
Hexano/clorofórmio (8:2)	16 – 18
Hexano/clorofórmio (7:3)	19 – 21
Hexano/clorofórmio (1:1)	22 – 39
Hexano/clorofórmio (3:7)	40 – 43
Clorofórmio	44 – 55
Acetato de etila	56
Acetato de etila/metanol (1:1)	57

Foram recolhidas 57 frações de 50 mL cada. As frações foram analisadas por CCD e agrupadas de acordo com o perfil observado nas cromatoplacas. As frações foram reunidas em oito grupos (Figura 17, pág. 34).

Grupo A1 (fração 22): apresentou-se como sólido branco (6,5 mg). A comparação dos espectros na região do IV, o perfil em CCD utilizando amostras

autênticas de 3-oxofriedelano (friedelina) e 3 β -hidroxifriedelano (3 β -friedelinol) e a análise por RMN de ^1H e ^{13}C , indicaram tratar-se de 3-oxofriedelano (**MG01**).

Grupo A2 (frações 23 a 27): apresentou-se como um sólido branco cristalino em forma de pequenas placas (112,8 mg). A comparação dos espectros na região do IV, o perfil em CCD utilizando amostras autênticas de 3-oxofriedelano e 3 β -hidroxifriedelano e os experimentos de RMN de ^1H e ^{13}C , indicaram tratar-se de mistura destes dois compostos codificados como **MG01** e **MG02**.

Grupo A3 (frações 28 a 33): apresentou-se como um sólido branco (12,0 mg) com faixa de fusão de 255-273 °C. Cinco manchas foram observadas na cromatoplaça e devido à pequena quantidade de amostra, este grupo não foi trabalhado.

Grupo A4 (frações 34 e 35): apresentou-se como um sólido amorfo (34,5 mg). Foi observada na cromatoplaça apenas uma mancha violeta quando revelada com ácido perclórico/vanilina. A análise por IV, RMN de ^1H e ^{13}C , indicou tratar-se de mistura de 3,11-dioxofriedelano (**MG03**) e 3,16-dioxofriedelano (maitensifolina B) (**MG04**).

Grupo A5 (frações 36 e 37): apresentou-se como um sólido branco (233,7 mg). O perfil em CCD indicou a presença de três manchas, que quando comparadas com amostras de 3-oxofriedelano e 3 β -hidroxifriedelano apresentaram diferentes Rfs. O grupo A5 foi recromatografado em CC (Coluna **B**: 25 mm/50 cm), utilizando 10,2 g de sílica gel 60 (70-230 Mesh) e os eluentes hexano, clorofórmio e acetato de etila puros ou em misturas em gradiente de polaridade (Tabela 3).

Tabela 3. Ordem de eluição da coluna B

Eluentes	Frações de 25 mL
Hexano/clorofórmio (7:3)	1 – 33
Hexano/clorofórmio (1:1)	34 – 52
Clorofórmio	53 – 62
Acetato de etila	63 – 73

Foram recolhidas 73 frações de 25 mL cada. O desenvolvimento da coluna foi acompanhado por CCD e as frações agrupadas de acordo com o perfil observado nas cromatoplaças. As frações foram reunidas em dois subgrupos (Figura 17, pág. 34).

Subgrupo B1 (frações 25 a 29): apresentou-se como um sólido amorfo (75,3 mg). O perfil em CCD e a análise por IV, RMN de ^1H e ^{13}C , indicaram tratar-se de mistura de 3,11-dioxofriedelano (**MG03**) e 3,16-dioxofriedelano (**MG04**).

Subgrupo B2 (frações 30 a 45): apresentou-se como um sólido branco (116,2 mg). Foi observada na cromatoplaça apenas uma mancha rosa quando revelada em ácido perclórico/vanilina. A amostra foi recristalizada em etanol e gotas de acetona, obtendo-se um sólido cristalino em forma de agulhas (41,4 mg). A análise por CCD, PF, IV, RMN de ^1H e ^{13}C , indicaram tratar-se de 3-oxo-12 α -hidroxifriedelano (**MG05**).

Grupo A6 (frações 38 a 43): apresentou-se como um sólido branco (173,2 mg). O perfil em CCD indicou a presença de manchas de Rfs bem próximos. O grupo A6 foi recromatografado em CC sob pressão (Coluna **C**: 20 mm/40 cm), utilizando 5,7 g (15 cm) de sílica gel 60 (230-400 Mesh) e os eluentes hexano, clorofórmio, acetato de etila e metanol puros ou em misturas em gradiente de polaridade (Tabela 4).

Tabela 4. Ordem de eluição da coluna C

Eluentes	Frações de 10 mL
Hexano/clorofórmio (1:1)	1 – 30
Clorofórmio	31 – 36
Acetato de etila	37 – 41
Metanol	42 – 47

Foram recolhidas 47 frações de 10 mL cada. O desenvolvimento da coluna foi acompanhado por CCD e as frações agrupadas de acordo com o perfil observado

nas cromatoplasas. As frações foram reunidas em dois subgrupos (Figura 17, pág. 34).

Subgrupo C1 (frações 39 a 42): apresentou-se como um sólido branco (114,6 mg). Quatro manchas foram observadas na cromatoplasa. O subgrupo C1 foi recromatografado em CC (Coluna **D**: 20 mm/40 cm), utilizando 8,0 g de sílica gel 60 (70-230 Mesh) e os eluentes hexano, acetato de etila e metanol puros ou em misturas em gradiente de polaridade (Tabela 5).

Tabela 5. Ordem de eluição da coluna D

Eluentes	Frações de 10 mL
Hexano/acetato de etila (7:3)	1 – 16
Hexano/acetato de etila (1:1)	17 – 22
Acetato de etila	23 – 28
Metanol	29 – 34

Foram recolhidas 34 frações de 10 mL cada. O desenvolvimento da coluna foi acompanhado por CCD e as frações agrupadas de acordo com o perfil observado nas cromatoplasas. As frações foram reunidas em quatro subgrupos (Figura 17, pág. 34).

Subgrupo D1 (frações 6 e 7): apresentou-se como um sólido branco (2,5 mg). A análise por CCD, PF, IV, RMN de ^1H e ^{13}C , indicou tratar-se de 3,16-dioxofriedelano (**MG04**) como componente majoritário.

Subgrupo D2 (frações 8 a 10): apresentou-se como um sólido branco (3,4 mg) com faixa de fusão de 245-265 °C. Três manchas foram observadas na cromatoplasa e devido à pequena quantidade de amostra, este grupo não foi trabalhado.

Subgrupo D3 (frações 11 a 14): apresentou-se como um sólido branco (12,7 mg). A análise por CCD, RMN de ^1H e ^{13}C , indicou tratar-se de 3-oxo-12 α -hidroxifriedelano (**MG05**).

Subgrupo D4 (frações 15 a 25): apresentou-se como um sólido branco (20,4 mg). Duas manchas foram observadas na cromatoplaça, sendo a de menor R_f, lilás e a de maior, rosa (revelador: ácido perclórico/vanilina). A amostra foi recristalizada em etanol e gotas de acetona, obtendo-se um sólido cristalino em forma de agulhas (3,6 mg). A análise por IV, RMN de ¹H e ¹³C, indicou tratar-se de mistura de 3-oxo-12 α -hidroxifriedelano (**MG05**) (mancha rosa) e 3-oxo-29-hidroxifriedelano (**MG06**) (mancha lilás).

Subgrupo C2 (frações 43 a 46): apresentou-se como um sólido branco oleoso (23,2 mg). A análise por IV, RMN de ¹H e ¹³C, indicou tratar-se de ácido oléico (**MG07**).

Grupo A7 (frações 44 a 55): apresentou-se como um sólido branco (17,9 mg). Quatro manchas foram observadas na cromatoplaça e comparação com amostras autênticas da mistura de 3,11-dioxofriedelano e 3,16-dioxofriedelano indicou uma das manchas como mistura desses compostos. Este grupo não foi fracionado devido à pequena quantidade e a sua complexidade.

Grupo A8 (fração 56): apresentou-se como um sólido amarelo (56,3 mg). Três manchas foram observadas na cromatoplaça. O grupo A8 foi recromatografado em CC (Coluna E: 15 mm/40 cm), utilizando 5,8 g de sílica gel 60 (70-230 Mesh) e os eluentes clorofórmio e acetato de etila puros ou em misturas em gradiente de polaridade (Tabela 6).

Tabela 6. Ordem de eluição da coluna E

Eluentes	Frações de 10 mL
Clorofórmio/acetato de etila (1:1)	1 – 70
Acetato de etila	71 – 75

Foram recolhidas 75 frações no total, de 10 mL cada. O desenvolvimento da coluna foi acompanhado por CCD e as frações agrupadas de acordo com o perfil observado nas cromatoplaças. As frações foram reunidas em dois subgrupos (Figura 17, pág. 34).

1.1.3.2 – Elaboração de FH2

FH2 foi obtido como filtrado da segunda lavagem do extrato hexânico (FH1) com éter etílico. Após evaporação do solvente, FH2 (3,5 g) foi submetido à CC (Coluna F: 40 mm/100 cm), utilizando 300,0 g de sílica gel 60 (70-230 Mesh) e os eluentes hexano, clorofórmio, acetato de etila e etanol puros ou em misturas em gradiente de polaridade (Tabela 7).

Tabela 7. Ordem de eluição da coluna F

Eluentes	Frações de 200 mL
Hexano	1 – 34
Hexano/clorofórmio (1:1)	35 – 57
Clorofórmio	58 – 112
Clorofórmio/acetato de etila (1:1)	113 – 126
Acetato de etila	127 – 135
Etanol	136 – 140

Foram recolhidas 140 frações de 200 mL cada. A evolução do processo de eluição da coluna foi acompanhada por CCD e as frações agrupadas de acordo com o perfil observado nas cromatoplasas. As frações foram reunidas em nove grupos (Figura 18, pág. 40).

Grupo F1 (frações 55 a 66): apresentou-se como um sólido branco (9,2 mg). Quatro manchas foram observadas na cromatoplasa. Não foram realizados outros testes devido à pequena quantidade de amostra e as frações posteriores também apresentaram indícios da substância com a mancha mais intensa e, portanto, mais promissoras.

Grupo F2 (frações 67 a 69): apresentou-se como um material branco pastoso (56,0 mg). Este material foi submetido à lavagem com éter etílico, obtendo um sólido branco (28,0 mg) e um material oleoso. O material sólido foi comparado por CCD com amostras autênticas de 3-oxofriedelano e indicou tratar-se dessa substância. A análise por IV, RMN de ^1H e ^{13}C confirmou a presença de 3-

oxofriedelano (**MG01**) contaminado com substância de cadeia longa (não foi possível sua identificação). A análise por CCD da fração oleosa indicou a presença de quatro manchas e devido à pequena quantidade não foi trabalhada.

Grupo F3 (fração 70): apresentou-se como um material branco pastoso em forma de pequenas placas (40,0 mg). O material foi submetido à lavagem com éter etílico e hexano, obtendo um sólido branco cristalino em forma de pequenas placas (35,3 mg) e um material oleoso. A comparação dos espectros na região do IV e por CCD utilizando amostras autênticas de 3-oxofriedelano e 3 β -hidroxifriedelano, indicaram tratar-se de mistura dessas substâncias (**MG01**) e (**MG02**). A análise por CCD da fração oleosa indicou a presença de três manchas e devido à pequena quantidade não foi trabalhada.

Grupo F4 (frações 71 e 72): apresentou-se como um material branco pastoso (8,5 mg). O material foi submetido à lavagem com éter etílico e hexano, obtendo um sólido branco cristalino em forma de pequenas placas (3,3 mg) e um material oleoso. A comparação por CCD com amostra autêntica de 3 β -hidroxifriedelano indicou tratar-se dessa substância. A análise desta amostra por IV, RMN de ^1H e ^{13}C confirmou a presença de 3 β -hidroxifriedelano (**MG02**) contaminado com ácido de cadeia longa (não foi possível sua identificação). A fração oleosa não foi trabalhada devido à pequena quantidade e complexidade.

Grupo F5 (frações 73 a 88): apresentou-se como um sólido branco (9,0 mg). Três manchas foram observadas na cromatoplaça. Não foram realizados outros testes devido à pequena quantidade de amostra e as frações posteriores também apresentaram indícios da substância com maior proporção e, portanto, mais promissoras.

Grupo F6 (frações 89 a 101): apresentou-se como um material amarelo pastoso (33,0 mg). Todo material foi submetido à lavagens com hexano, obtendo um sólido branco (30,0 mg). O teste LB indicou a presença de esteroide (coloração esverdeada). A comparação por CCD com amostra autêntica de β -sitosterol indicou tratar-se dessa substância. A análise desta amostra por IV, RMN de ^1H e ^{13}C confirmou a presença de β -sitosterol (**MG09**).

Grupo F7 (frações 102 a 113): apresentou-se como um material amarelo pastoso (5,0 mg). Três manchas foram observadas na cromatoplaça e devido à pequena quantidade de amostra, este grupo não foi trabalhado.

Grupo F8 (fração 114): apresentou-se como um sólido amarelo pastoso (100,7 mg). Cinco manchas foram observadas na cromatoplaça. O grupo F8 foi recromatografado em CC (Coluna **G**: 20 mm/40 cm), utilizando 7,0 g de sílica gel 60 (70-230 Mesh) e os eluentes clorofórmio, acetato de etila e metanol puros ou em misturas em gradiente de polaridade (Tabela 8).

Tabela 8. Ordem de eluição da coluna G

Eluentes	Frações de 5 mL
Clorofórmio/acetato de etila (9:1)	1 – 35
Acetato de etila/metanol (1:1)	36 – 46
Metanol	47 – 49

Foram recolhidas 49 frações de 5 mL cada. O desenvolvimento da coluna foi acompanhado por CCD e as frações agrupadas de acordo com o perfil observado nas cromatoplaças. As frações foram reunidas em quatro subgrupos (Figura 18, pág. 40).

Subgrupo G1 (frações 3 e 4): apresentou-se como um sólido amorfo (13,0 mg). A análise por CCD, IV, RMN de ^1H e ^{13}C , indicou tratar-se de mistura de 3,11-dioxofriedelano (**MG03**) e 3,16-dioxofriedelano (**MG04**).

Subgrupo G2 (frações 5 a 8): apresentou-se como um sólido branco (50,3 mg). Quatro manchas foram observadas na cromatoplaça. O subgrupo G2 foi recromatografado em CC (Coluna **H**: 15 mm/50 cm), utilizando 4,7 g de sílica gel 60 (70-230 Mesh) e os eluentes clorofórmio, acetato de etila e metanol puros ou em misturas em gradiente de polaridade (Tabela 9, pág. 38).

Tabela 9. Ordem de eluição da coluna H

Eluentes	Frações de 5 mL
Clorofórmio	1 – 53
Clorofórmio/acetato de etila (7:3)	54 – 61
Clorofórmio/acetato de etila (6:4)	62 – 69
Clorofórmio/acetato de etila (1:1)	70 - 77
Acetato de etila	78 – 85
Acetato de etila/metanol (1:1)	86 – 94
Metanol	95 – 97

Foram recolhidas 97 frações no total, de 5 mL cada. A evolução do processo de eluição da coluna foi acompanhada por CCD e as frações agrupadas de acordo com o perfil observado nas cromatoplas. As frações foram reunidas em três subgrupos (Figura 18, pág. 40).

Subgrupo H1 (frações 11 a 19): apresentou-se como um sólido amorfo (5,2 mg). A análise por CCD, RMN de ^1H e ^{13}C , indicou tratar-se de mistura de 3,11-dioxofriedelano (**MG03**) e 3,16-dioxofriedelano (**MG04**).

Subgrupo H2 (frações 20 a 39): apresentou-se como um sólido branco (2,0 mg). Foi observada na cromatoplas apenas uma mancha de R_f diferente de todas as substâncias e misturas isoladas até o momento. Devido à pequena quantidade de amostra não foi possível identificá-la.

Subgrupo H3 (frações 40 a 54): apresentou-se como um sólido branco (11,5 mg). A amostra foi recristalizada em etanol e gotas de clorofórmio, obtendo-se um sólido cristalino em forma de agulhas (8,3 mg). Apenas uma mancha rosa (revelador: ácido perclórico/vanilina) foi observada na cromatoplas. A análise por RMN de ^1H e ^{13}C indicou tratar-se de 3-oxo-12 α -hidroxifriedelano (**MG05**).

Subgrupo G3 (frações 9 a 13): apresentou-se como um sólido amorfo (17,0 mg). Três manchas foram observadas na cromatoplas. O subgrupo G3 foi submetido a uma CCD preparativa (eluente: clorofórmio/acetato de etila – 8,5:1,5) obtendo apenas um sólido amorfo (4,0 mg). O perfil em CCD e a análise por RMN de

^1H e ^{13}C , indicaram tratar-se de mistura de 3,11-dioxofriedelano (**MG03**) e 3,16-dioxofriedelano (**MG04**).

Subgrupo G4 (frações 14 a 21): apresentou-se como um sólido branco (11,2 mg). O perfil em CCD mostrou-se complexo e devido à pequena quantidade de amostra, este subgrupo não foi trabalhado.

Grupo F9 (frações 115 a 121): apresentou-se como um sólido amarelo pastoso (1,1 g). Cinco manchas foram observadas na cromatoplaça. O grupo G9 foi recromatografado em CC (Coluna I: 20 mm/70 cm), utilizando 43,0 g de sílica gel 60 (70-230 Mesh) e os eluentes hexano, clorofórmio, acetato de etila e metanol puros ou em misturas em gradiente de polaridade (Tabela 10).

Tabela 10. Ordem de eluição da coluna I

Eluentes	Frações de 10 mL
Hexano	1 – 15
Hexano/clorofórmio (1:1)	16 – 33
Hexano/clorofórmio (3:7)	34 - 46
Clorofórmio	47 – 64
Clorofórmio/acetato de etila (9:1)	65 – 72
Clorofórmio/acetato de etila (7:3)	73 – 82
Clorofórmio/acetato de etila (1:1)	83 – 90
Acetato de etila	91 – 98
Acetato de etila/metanol (1:1)	99 – 106
Metanol	107 – 109

Foram recolhidas 109 frações de 10 mL cada. O desenvolvimento da coluna foi acompanhado por CCD e as frações agrupadas de acordo com o perfil observado nas cromatoplaças. As frações foram reunidas em três subgrupos (Figura 18, pág. 40).

Subgrupo I1 (frações 60 e 61): apresentou-se como um sólido marrom pastoso (41,8 mg). A análise por IV, CG-EM, RMN de ^1H e ^{13}C , indicou tratar-se de ácido palmítico (**MG10**).

Subgrupo I2 (frações 62 a 77): apresentou-se como um sólido marrom pastoso (23,5 mg). A análise por IV, RMN de 1D e 2D, indicou tratar-se de uma mistura de triterpenos de esqueletos diferentes. Devido a complexidade da mistura não foi possível identificá-los.

Subgrupo I3 (frações 78 a 105): apresentou-se como um material oleoso (316,0 mg). O perfil observado na cromatoplaça indicou tratar-se de uma mistura complexa. Este subgrupo foi recromatografado em CC de sílica gel 60 (70-230 Mesh). Mesmo assim não foi possível identificar substância alguma.

De FH2 foi possível isolar sete substâncias (algumas como mistura), conforme está representado na Figura 18.

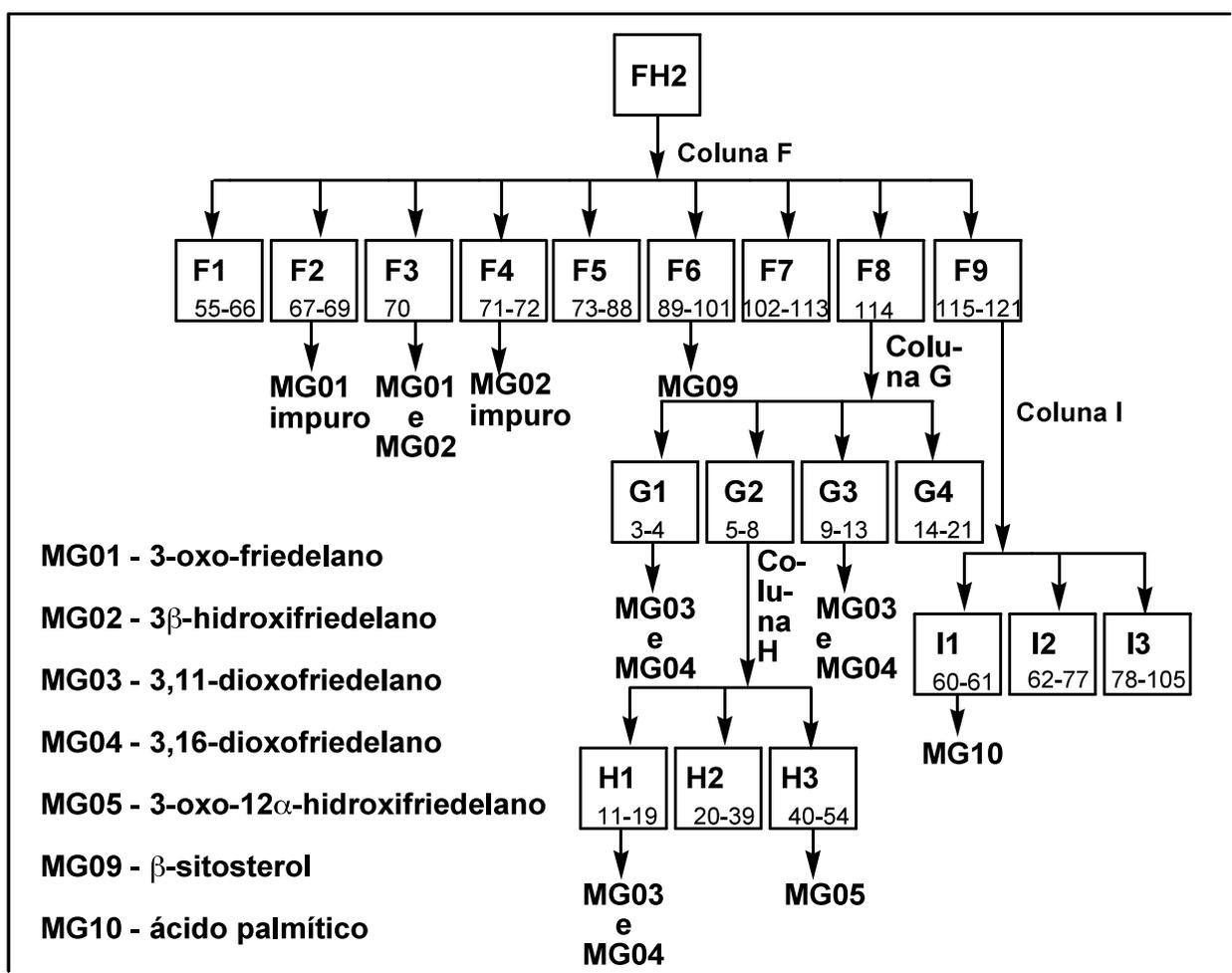


Figura 18: Fracionamento de FH2.

1.1.3.3 – Elaboração de FH3

FH3 foi obtido pela lavagem de SH2 com clorofórmio (Figura 16, pág. 28). FH3 (46,3 mg) foi submetido à CC (Coluna J: 15 mm/40 cm), utilizando 3,3 g de sílica gel 60 (70-230 Mesh) e os eluentes hexano, clorofórmio, acetato de etila e etanol puros ou em misturas em gradiente de polaridade (Tabela 11).

Tabela 11. Ordem de eluição da coluna J

Eluentes	Frações de 5 mL
Hexano	1 – 10
Clorofórmio	11 – 39
Clorofórmio/acetato de etila (9,5:0,5)	40 – 53
Clorofórmio/acetato de etila (9:1)	54 – 61
Clorofórmio/acetato de etila (8:2)	62 – 69
Clorofórmio/acetato de etila (1:1)	70 – 75
Acetato de etila	76 – 80
Etanol	81 – 85

Foram recolhidas 85 frações de 5 mL cada. O desenvolvimento da coluna foi acompanhado por CCD e as frações agrupadas de acordo com o perfil observado nas cromatoplas. As frações foram reunidas em cinco grupos (Figura 19, pág. 42).

Grupo J1 (frações 11 a 19): apresentou-se como um sólido branco cristalino em forma de pequenas placas (6,0 mg). A análise comparativa por CCD e pelos espectros na região do IV utilizando amostras autênticas de 3-oxofriedelano e 3 β -hidroxifriedelano indicaram tratar-se de mistura dos dois compostos **MG01** e **MG02**.

Grupo J2 (frações 20 a 47): apresentou-se como um sólido branco (5,0 mg). Foram observadas três manchas na cromatoplasca e devido à pequena quantidade de amostra, este grupo não foi trabalhado.

Grupo J3 (frações 48 a 57): apresentou-se como um sólido branco (17,8 mg). Três manchas foram observadas na cromatoplasca. O subgrupo J3 foi submetido a uma CCD preparativa (eluente: hexano/clorofórmio – 1:1) obtendo

apenas um sólido branco (2,0 mg). A análise por CCD, RMN de ^1H e ^{13}C , indicou tratar-se de mistura de 3-oxofriedelano (**MG01**) e ácido de cadeia longa (não foi possível sua identificação).

Grupo J4 (frações 58 a 76): apresentou-se como um sólido branco (4,0 mg). Quatro manchas foram observadas na cromatoplaça e devido à pequena quantidade de amostra, este grupo não foi trabalhado.

Grupo J5 (frações 77 a 79): apresentou-se como sólido branco (3,2 mg). O teste LB indicou a presença de esteroide (coloração esverdeada). Apenas uma mancha violeta (revelador: ácido perclórico/vanilina) foi observada na cromatoplaça e a comparação com amostra autêntica de β -sitosterol, indicou tratar-se do mesmo (**MG09**).

De FH3 foi possível isolar três substâncias (algumas como mistura), conforme está representado na Figura 19.

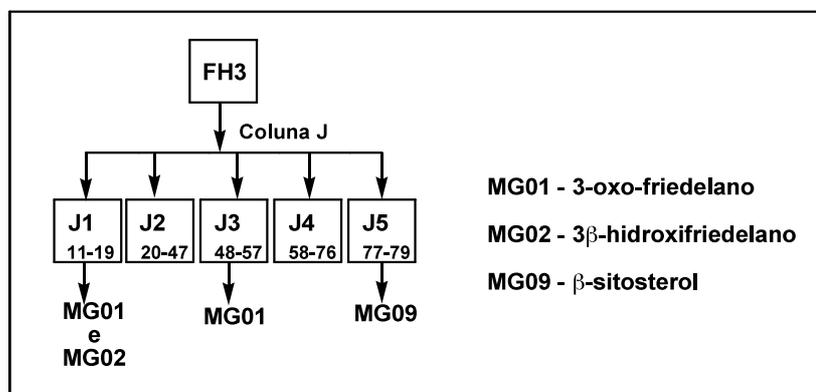


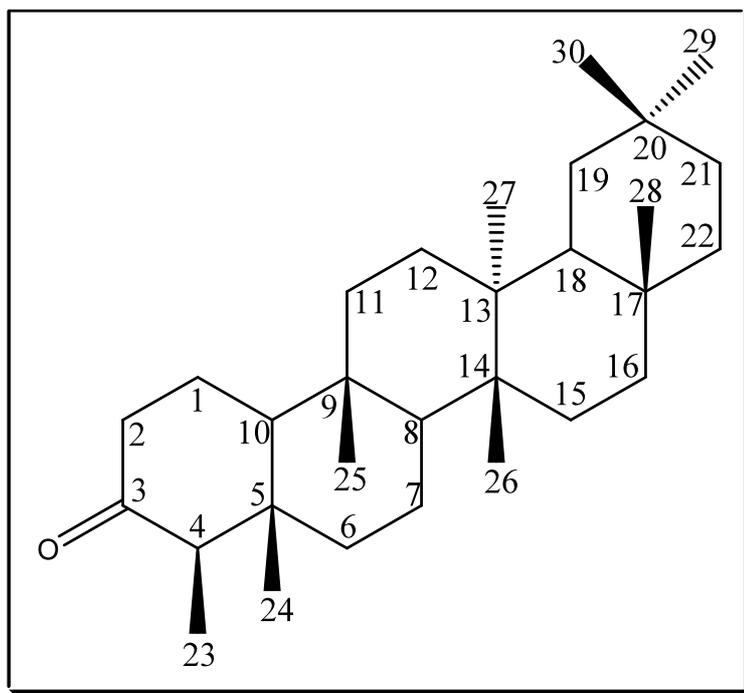
Figura 19: Fracionamento de FH3.

1.1.3.4 – Elaboração de SH3

SH3 (17,2 mg) foi obtido como sólido marrom pela lavagem de SH2 com clorofórmio (Figura 16, pág. 28). O espectro na região do IV não foi informativo para identificação do sólido. Análises posteriores não foram possíveis, pois o sólido não foi solúvel em solvente orgânico e nem em água.

1.2 – Determinação Estrutural

1.2.1 – MG01: 3-oxofriedelano (friedelina)



MG01 foi isolado de SH1, FH2 e FH3 conforme representado nas Figuras 17, 18 e 19 pág. 34, 40 e 42. Apresentou-se como sólido branco, solúvel em clorofórmio e de faixa de fusão 257-261 °C. A fórmula molecular foi determinada como $C_{30}H_{50}O$ baseada no experimento de RMN de ^{13}C . O teste LB foi positivo para triterpeno pentacíclico. A análise por CCD deste sólido usando diferentes eluentes evidenciou a existência de uma mancha amarela (revelador: ácido perclórico/vanilina).

O espectro na região do IV (Figura 20, pág. 44), de **MG01** apresentou bandas de absorção em: 2925-2849 cm^{-1} característica de estiramento simétrico e assimétrico da ligação CH de compostos alifáticos, 1714 cm^{-1} característica de estiramento de ligação CO de carbonila de cetona e 1462 e 1389 cm^{-1} característica de deformação angular no plano de ligação simples CH de compostos alifáticos.

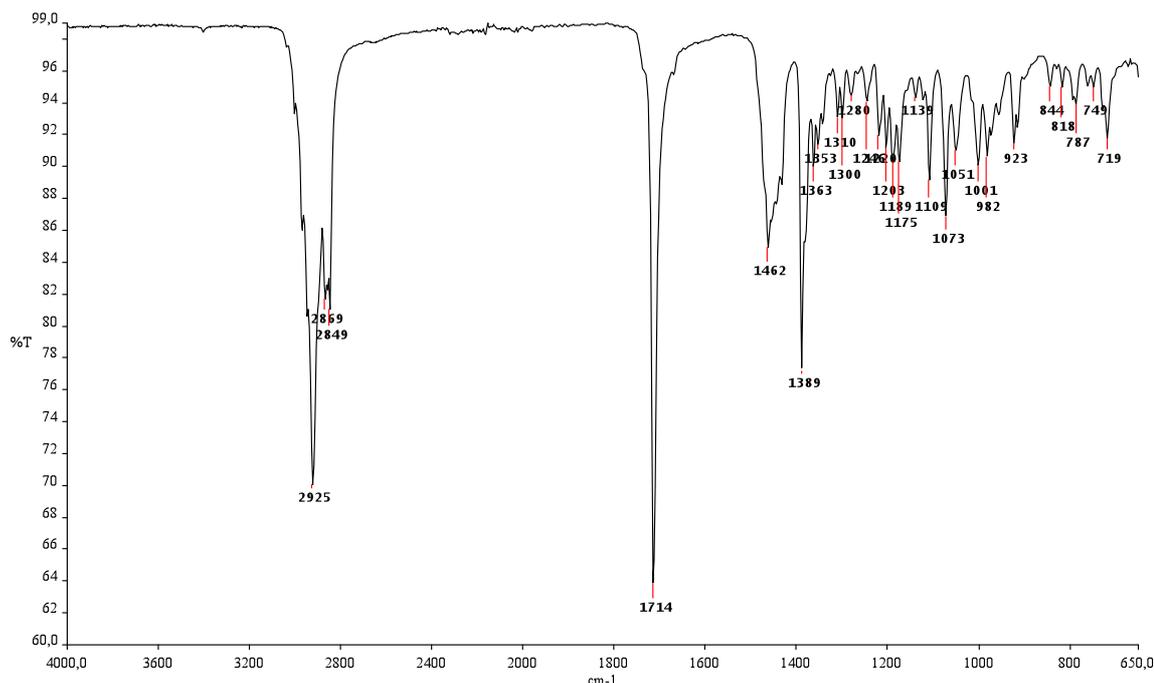


Figura 20: Espectro na região do IV de **MG01** (ATR).

O espectro de RMN de ^1H (Figura 21, pág. 45) apresentou sete simpletos em δ_{H} 0,72; δ_{H} 0,86; δ_{H} 0,96; δ_{H} 1,01 (a integral deste sinal indicou a sobreposição de dois sinais); δ_{H} 1,05 e δ_{H} 1,18 relativos a sete metilas e um duplete em δ_{H} 0,88 ($J = 6,8$ Hz) associado à outra metila (C-23) característica de triterpenos de esqueleto friedelano (MAHATO E KUNDU, 1994).

A análise do espectro de RNN de ^{13}C e subespectro DEPT135 (Figuras 22, 23 e 24 pág. 45 e 46) indicou um total de 30 sinais de carbono, que foram classificados como sendo 8 CH_3 , 11 CH_2 , 4 CH e 7 C . O sinal em δ_{C} 213,06 confirmou a presença de carbonila de cetona.

Estes dados aliados a faixa de fusão, a comparação direta com amostra autêntica e a dados de RMN de ^{13}C da literatura (QUEIROGA *et al.*, 2000) (Tabela 12, pág. 47), permitiram identificar **MG01** como sendo 3-oxofriedelano. **MG01** já foi isolado das folhas de *Maytenus gonoclada* (OLIVEIRA *et al.*, 2007).

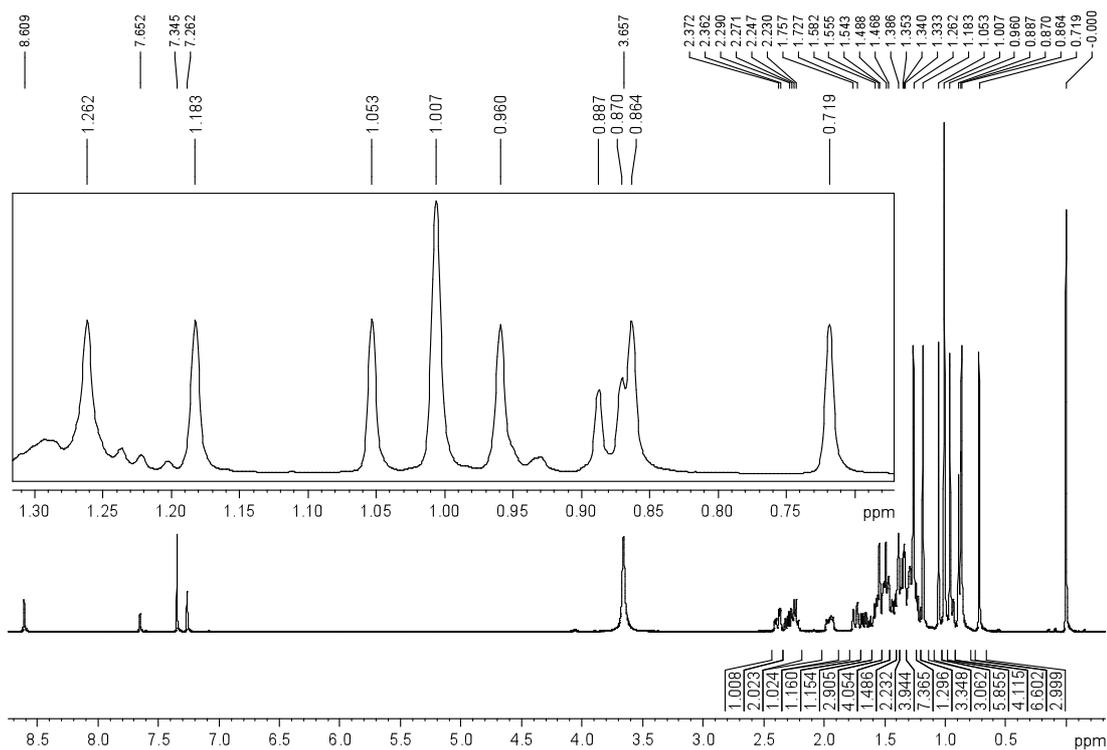


Figura 21: Espectro de RMN de ^1H (400 MHz) de **MG01** em CDCl_3 + Piridina- d_5 .

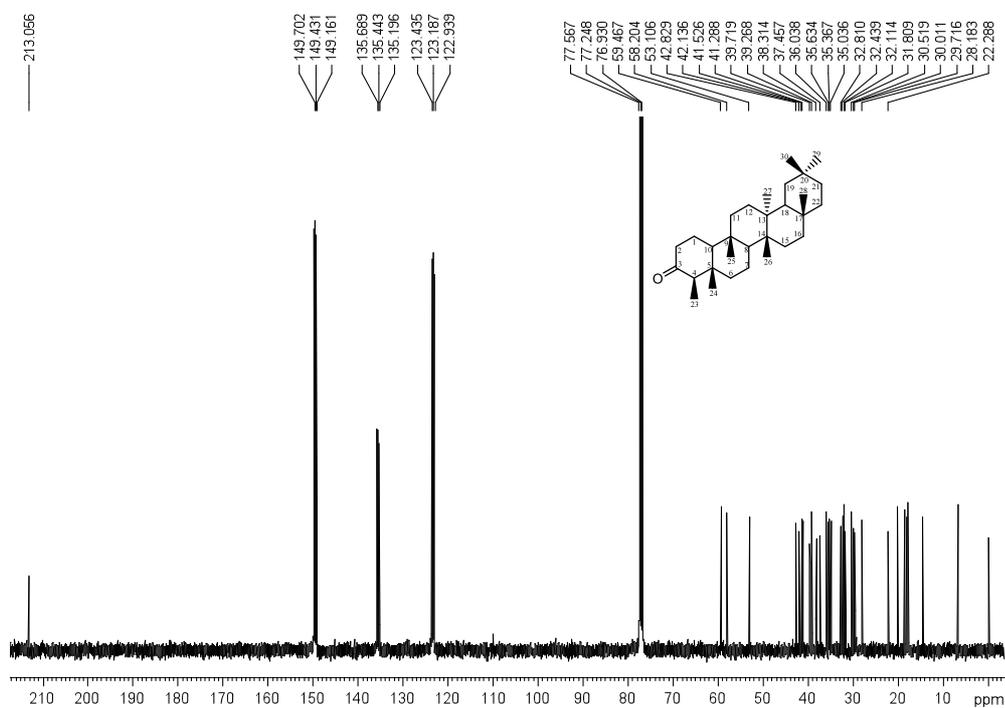


Figura 22: Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz) de **MG01** em CDCl_3 + Piridina- d_5 .

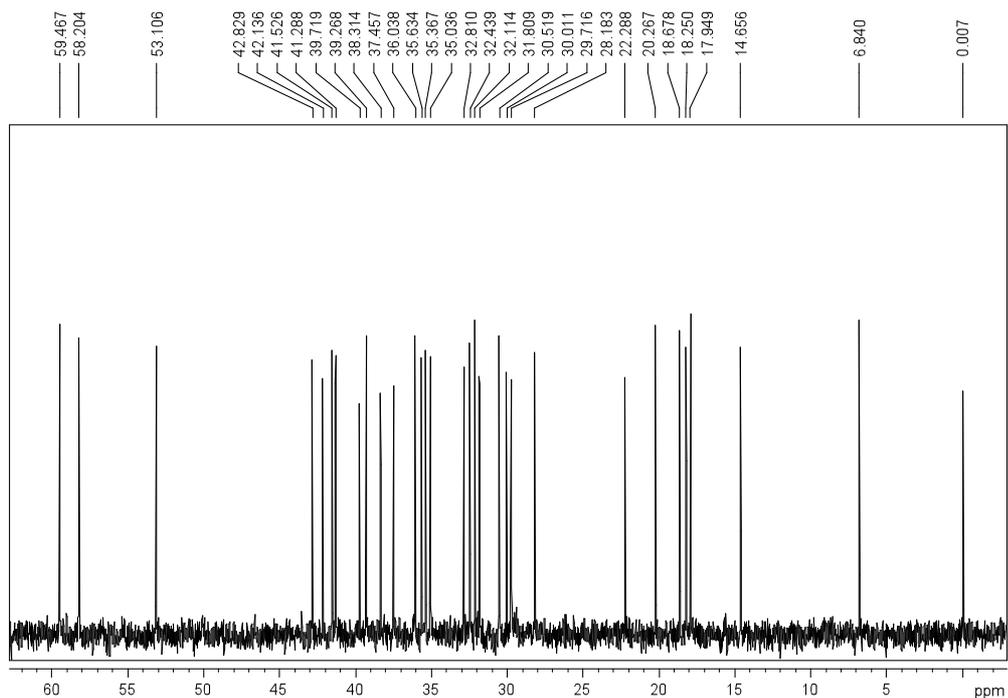


Figura 23: Expansão do espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz) de **MG01** em CDCl_3 + Piridina- d_5 .

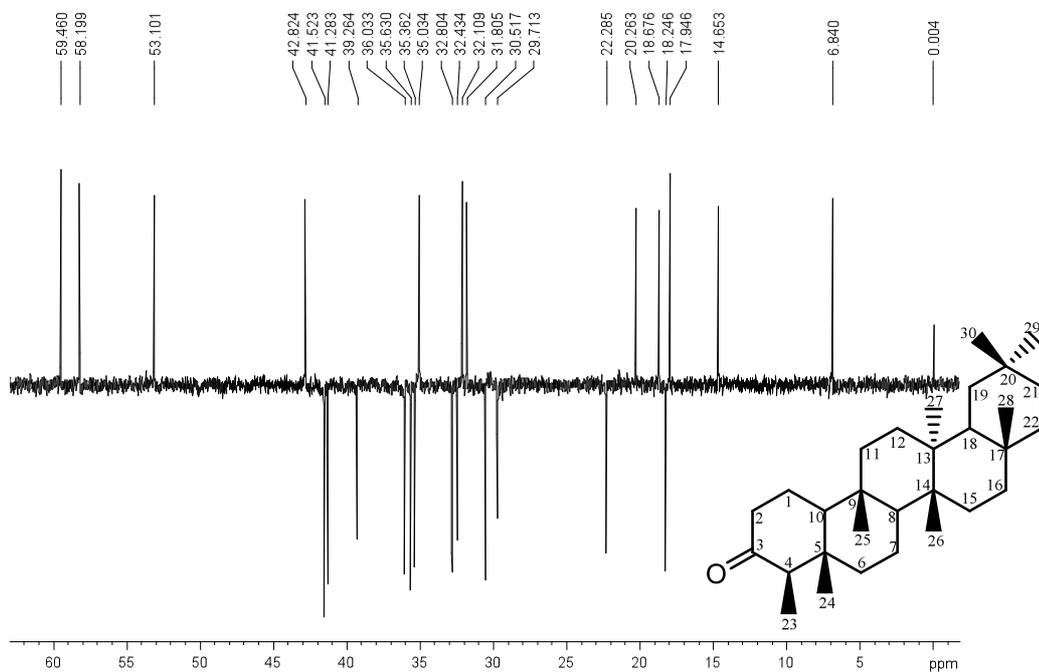
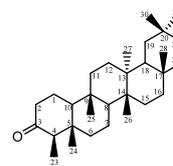


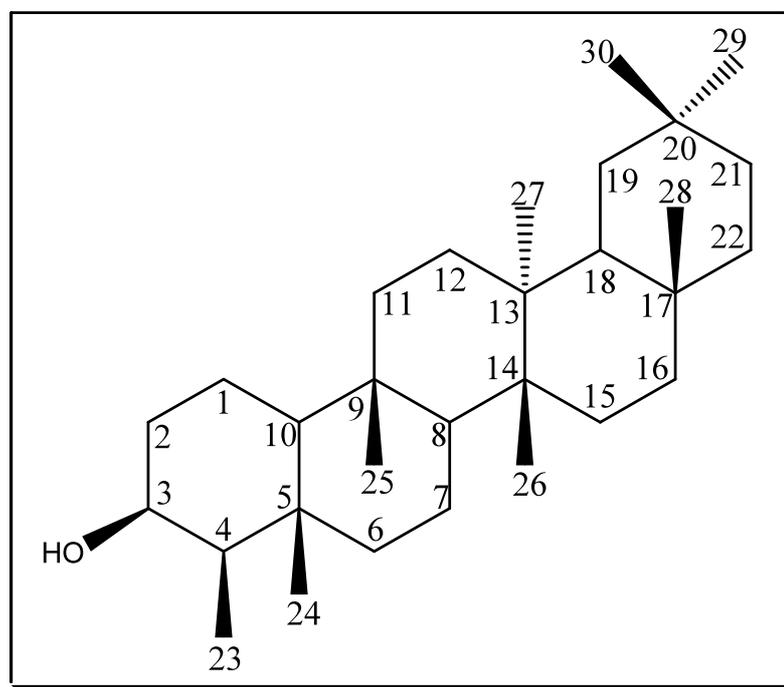
Figura 24: Subespectro DEPT135 (100 MHz) de **MG01** em CDCl_3 + Piridina- d_5 .

Tabela 12: Comparação dos dados de RMN de ^{13}C de **MG01** com os dados da literatura para 3-oxofriedelano (QUEIROGA *et al.*, 2000)

Nº	Tipo de carbono	δ_c^* de MG01	δ_c^{**} (QUEIROGA <i>et al.</i> , 2000)
1	CH ₂	22,29	22,3
2	CH ₂	41,53	41,5
3	C	213,06	213,2
4	CH	58,20	58,3
5	C	42,14	42,1
6	CH ₂	41,29	41,3
7	CH ₂	18,25	18,2
8	CH	53,11	53,1
9	C	37,46	37,4
10	CH	59,47	59,4
11	CH ₂	35,63	35,6
12	CH ₂	30,52	30,5
13	C	39,72	39,7
14	C	38,31	38,3
15	CH ₂	32,44	32,4
16	CH ₂	36,04	36,0
17	C	30,01	30,0
18	CH	42,83	42,8
19	CH ₂	35,37	35,3
20	C	28,18	28,1
21	CH ₂	32,81	32,7
22	CH ₂	39,27	39,2
23	CH ₃	6,84	6,8
24	CH ₃	14,66	14,6
25	CH ₃	17,95	17,9
26	CH ₃	20,27	20,2
27	CH ₃	18,68	18,6
28	CH ₃	32,11	32,1
29	CH ₃	35,04	35,0
30	CH ₃	31,81	31,8



Solvente: *CDCl₃ + Piridina-d₅ **CDCl₃

1.2.2 – MG02: 3β-hidroxifriedelano (3β-friedelinol)

MG02 foi isolado do sólido de SH1, FH2 e FH3 conforme representado nos esquemas 17, 18 e 19 pág. 34, 40 e 42. Apresentou-se como sólido branco cristalino em forma de pequenas placas, parcialmente solúvel em clorofórmio e de faixa de fusão 276-281 °C. A fórmula molecular foi determinada como C₃₀H₅₀O baseada no experimento de RMN de ¹³C. O teste LB foi positivo para triterpeno pentacíclico. A análise por CCD deste sólido usando diferentes eluentes evidenciou a existência de uma mancha lilás (revelador: ácido perclórico/vanilina).

O espectro na região do IV (Figura 25, pág. 49), de **MG02** apresentou bandas de absorção em: 3619 e 3471 cm⁻¹ característica de estiramento de ligação OH de hidroxila, 2925-2869 cm⁻¹ características de estiramento simétrico e assimétrico da ligação CH de compostos alifáticos e 1448 e 1384 cm⁻¹ características de deformação angular no plano de ligação simples CH de compostos alifáticos. As bandas em 1706 cm⁻¹ característica de estiramento de ligação CO de carbonila de cetona, contaminando **MG02**.

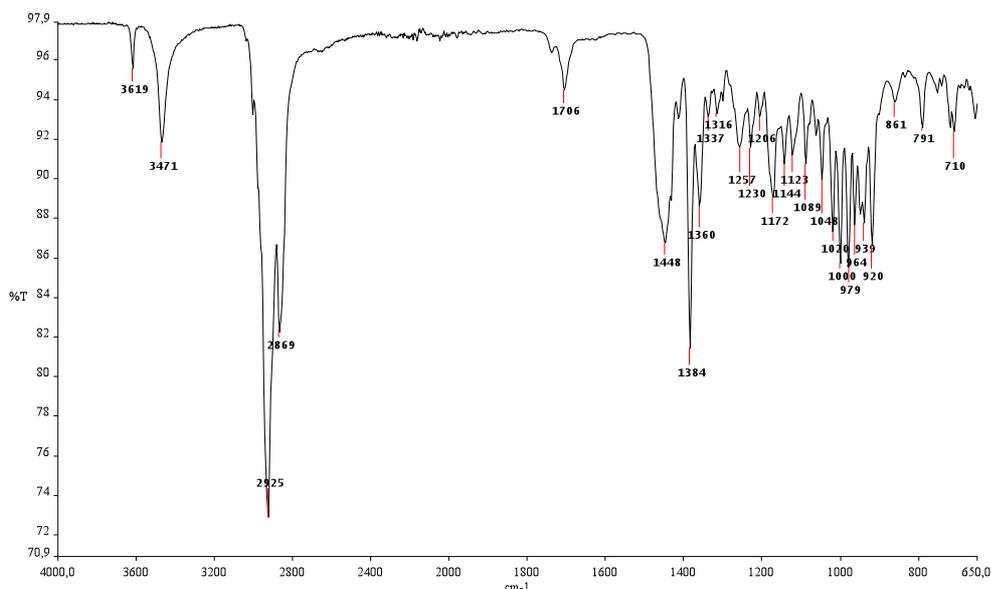


Figura 25: Espectro na região do IV de **MG02** (ATR).

O espectro de RMN de ^1H (Figura 26, pág. 50) apresentou oito simpletos em δ_{H} 0,86; δ_{H} 0,93; δ_{H} 0,95; δ_{H} 0,97; δ_{H} 0,99; δ_{H} 1,00; δ_{H} 1,01 e δ_{H} 1,17 correspondente a oito metilas, características de triterpenos pentacíclicos. O perfil apresentado pelos sinais de δ_{H} 0,86 a δ_{H} 2,09 indica a natureza triterpênica de **MG02**. Também foi possível observar um multiplete em δ_{H} 3,73 referente a hidrogênio ligado em carbono hidroxilado. O sinal intenso em δ_{H} 1,26 confirma a presença de contaminação de natureza graxa juntamente com **MG02**.

A análise do espectro de RMN de ^{13}C e subespectro DEPT135 (Figuras 27 e 28 pág. 50 e 51) indicou a presença de 32 sinais de carbono, sendo que 30 são característicos de triterpeno da série friedelano. O sinal em δ_{C} 72,78 foi atribuído ao carbono ligado à hidroxila e o sinal em δ_{C} 29,72 juntamente com o sinal em δ_{C} 14,67 (carbono metílico) foram atribuídos à impureza graxa da amostra.

Estes dados aliados a faixa de fusão, a comparação direta com amostra autêntica e a dados de RMN de ^{13}C da literatura (SALAZAR *et al.*, 2000) (Tabela 13, pág. 52), permitiram identificar **MG02** como sendo 3 β -hidroxifriedelano. **MG02** já foi isolado das folhas de *Maytenus gonoclada* (OLIVEIRA *et al.*, 2007).

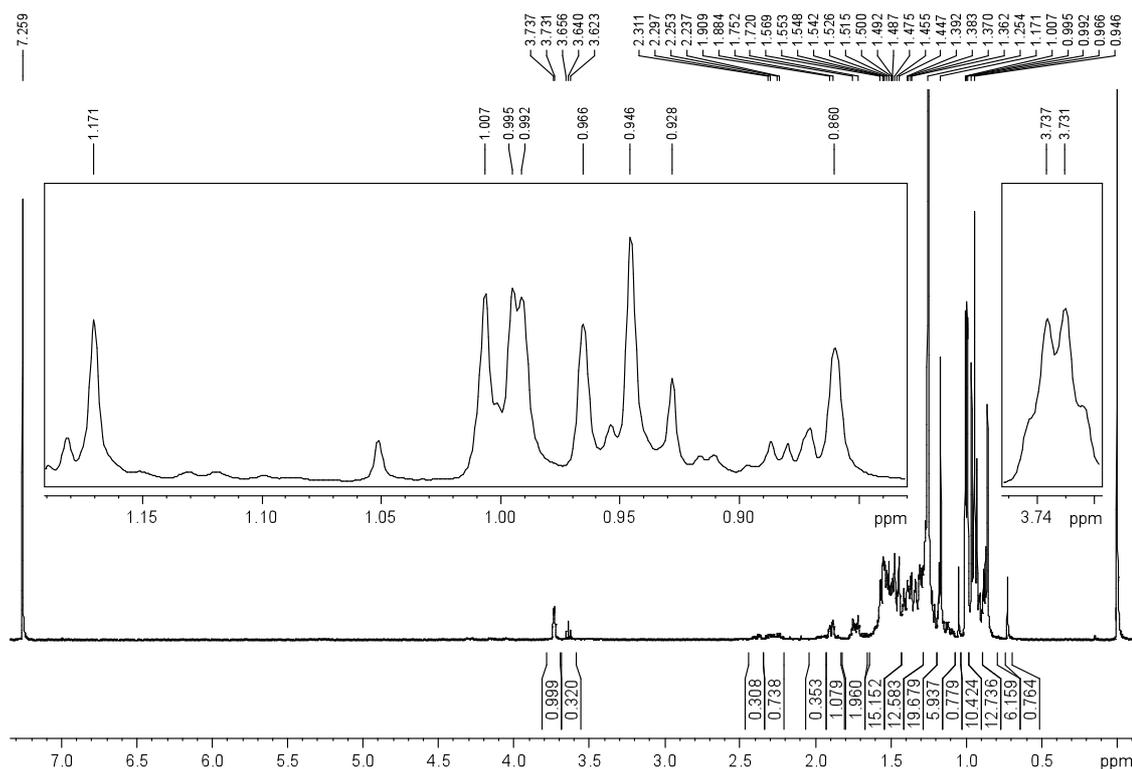


Figura 26: Espectro de RMN de ^1H (400 MHz) de **MG02** em CDCl_3 .

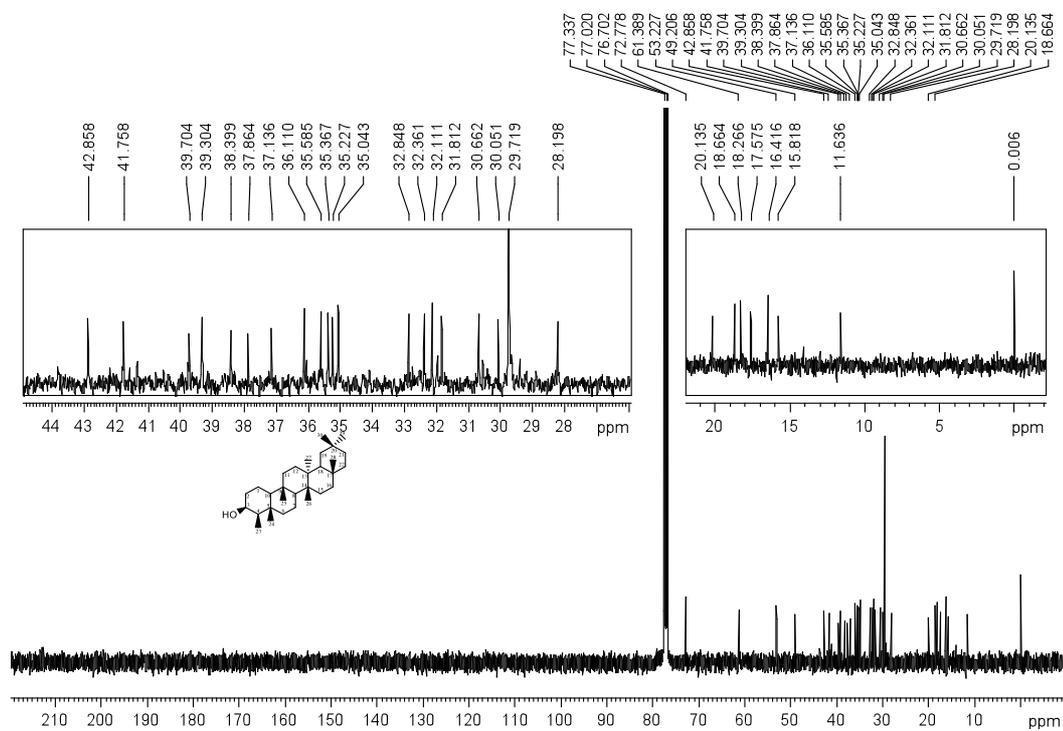


Figura 27: Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz) de **MG02** em CDCl_3 .

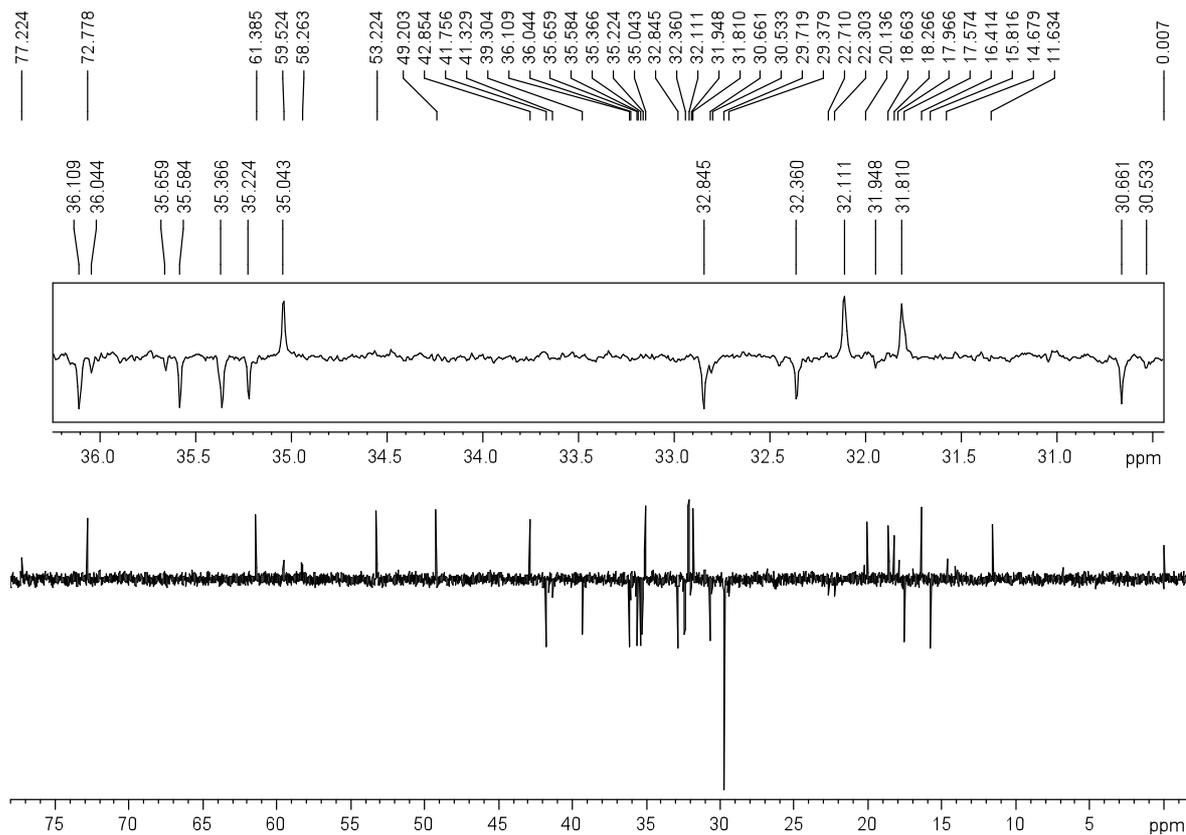


Figura 28: Subespectro DEPT135 (100 MHz) de **MG02** em CDCl₃.

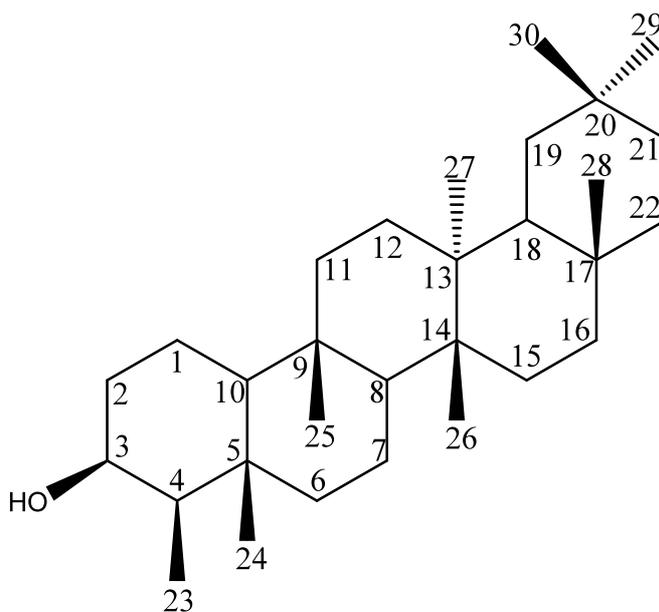
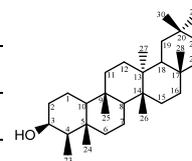
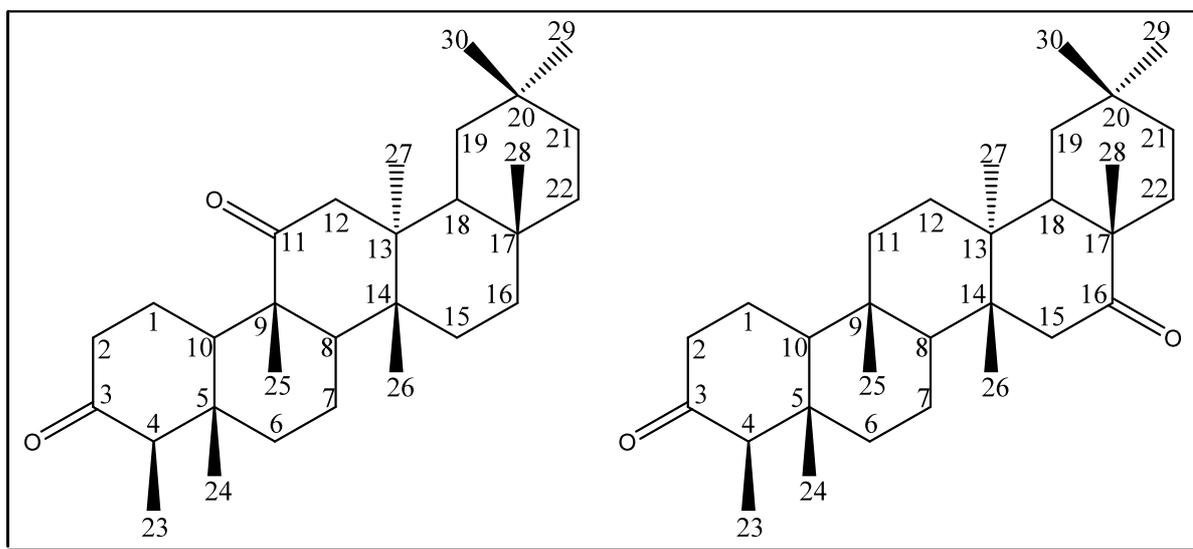


Tabela 13: Comparação dos dados de RMN de ^{13}C de **MG02** com os dados da literatura para 3 β -hidroxifriedelano (SALAZAR *et al.*, 2000)

Nº	Tipo de carbono	δ_{C}^* de MG02	δ_{C}^{**} (SALAZAR <i>et al.</i> , 2000)
1	CH ₂	15,82	16,16
2	CH ₂	36,11	36,14
3	CH	72,78	71,59
4	CH	49,21	49,62
5	C	37,86	38,09
6	CH ₂	41,76	41,99
7	CH ₂	17,58	17,69
8	CH	53,23	53,27
9	C	37,14	37,18
10	CH	61,39	61,65
11	CH ₂	35,37	35,66
12	CH ₂	30,66	30,69
13	C	38,40	38,38
14	C	39,70	39,69
15	CH ₂	32,36	32,34
16	CH ₂	35,58	35,90
17	C	30,05	30,02
18	CH	42,86	42,88
19	CH ₂	35,23	35,36
20	C	28,20	28,17
21	CH ₂	32,85	32,88
22	CH ₂	39,30	39,28
23	CH ₃	11,64	12,09
24	CH ₃	16,42	16,58
25	CH ₃	18,27	18,35
26	CH ₃	20,14	20,13
27	CH ₃	18,66	18,69
28	CH ₃	32,11	32,12
29	CH ₃	35,04	35,02
30	CH ₃	31,81	31,85



Solvente: *CDCl₃ **CDCl₃ + Piridina-d₅

1.2.3 – MG03: 3,11-dioxofriedelano e MG04: 3,16-dioxofriedelano

A mistura de **MG03** (3,11-dioxofriedelano) e **MG04** (3,16-dioxofriedelano) foi isolada de SH1 e FH2, conforme representado nas Figuras 17 e 18 pág. 34 e 40. Apresentou-se como sólido amorfo, solúvel em clorofórmio e de ponto de fusão 268-274 °C. O teste LB foi positivo para triterpeno pentacíclico. A análise por CCD desta mistura usando diferentes eluentes evidenciou a existência de uma mancha lilás (revelador: ácido perclórico/vanilina).

O espectro na região do IV (Figura 29, pág 54), da mistura de **MG03** e **MG04**, apresentou bandas de absorção em: 2925 e 2868 cm^{-1} características de estiramento simétrico e assimétrico da ligação CH de compostos alifáticos, 1715 e 1693 cm^{-1} características de estiramento de ligação dupla CO de cetona e 1458 e 1391 cm^{-1} característica de deformação angular no plano de ligação simples CH de compostos alifáticos.

O espectro de RMN de ^1H (Figura 30, pág 54) apresentou um grande número de multipletos entre δ_{H} 0,67 e 2,28 sugerindo tratar-se de uma mistura de triterpenos pentacíclicos. Apresentou também um duplete em δ_{H} 2,62 e multiplete em δ_{H} 2,36, ambos possivelmente de hidrogênios vizinhos a carbono carbonílico (PAVIA *et al.*, 2001).

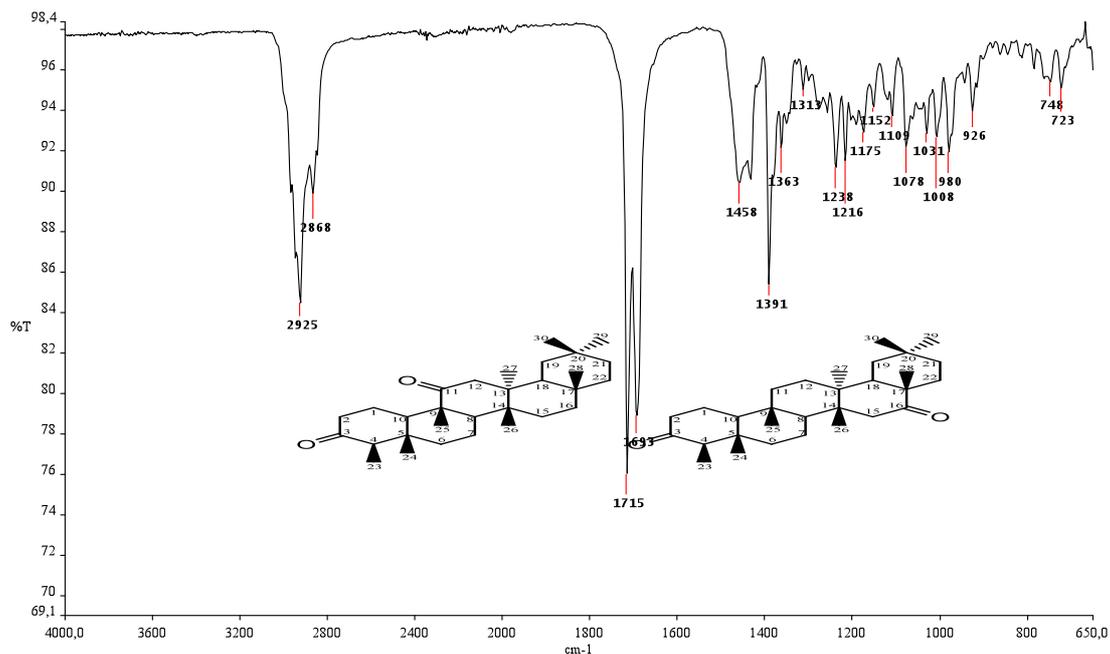


Figura 29: Espectro na região do IV da mistura de **MG03** e **MG04** (ATR).

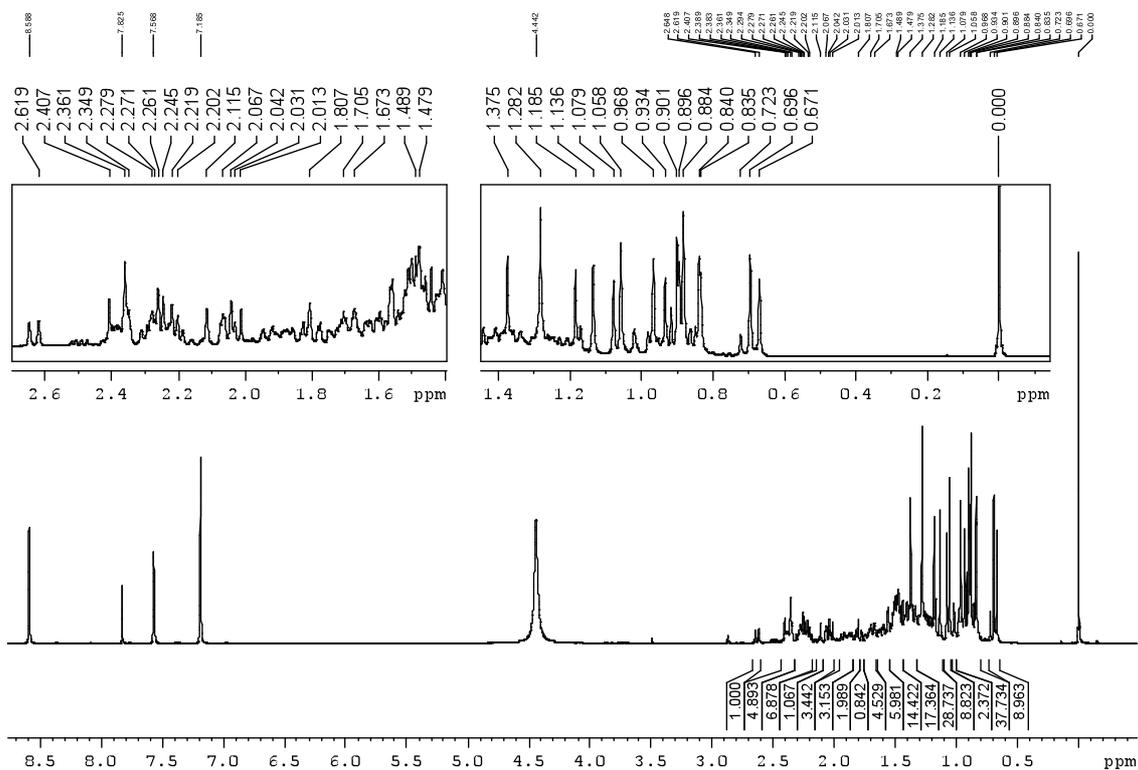


Figura 30: Espectro de RMN de ^1H (400 MHz) da mistura de **MG03** e **MG04** em CDCl_3 + Piridina- d_5 .

O espectro de RMN de ^{13}C (Figuras 31 e 32, pág. 55 e 56) indicou a presença de 57 sinais. As intensidades de alguns sinais observados possibilitaram a identificação de três sinais de carbono sobrepostos, totalizando assim, 60 sinais. Com o auxílio do subspectro DEPT 135 (Figura 33, pág. 56), estes sinais foram classificados como sendo 16 CH_3 , 20 CH_2 , 8 CH e 16 C , confirmando uma mistura de triterpenos. A presença dos sinais em δ_{C} 6,91 e δ_{C} 6,96 característicos de carbono metílico (C-23) próximo a carbonila (C-3) sugeriram a presença de triterpenos pentacíclicos de esqueleto friedelano (MAHATO E KUNDU, 1994). Os sinais em δ_{C} 211,48, δ_{C} 212,02, δ_{C} 213,69 e δ_{C} 218,14 indicaram a presença de triterpenos dicarbonílicos.

A comparação dos dados de RMN de ^{13}C com a literatura (OLIVEIRA, 2007) (Tabela 14, pág. 57), confirmaram a presença de 3,11-dioxofriedelano (**MG03**) e 3,16-dioxofriedelano (**MG04**) na mistura. A mistura destes compostos já foi isolada das folhas de *Maytenus gonoclada* (OLIVEIRA *et al.*, 2007; OLIVEIRA, 2007).

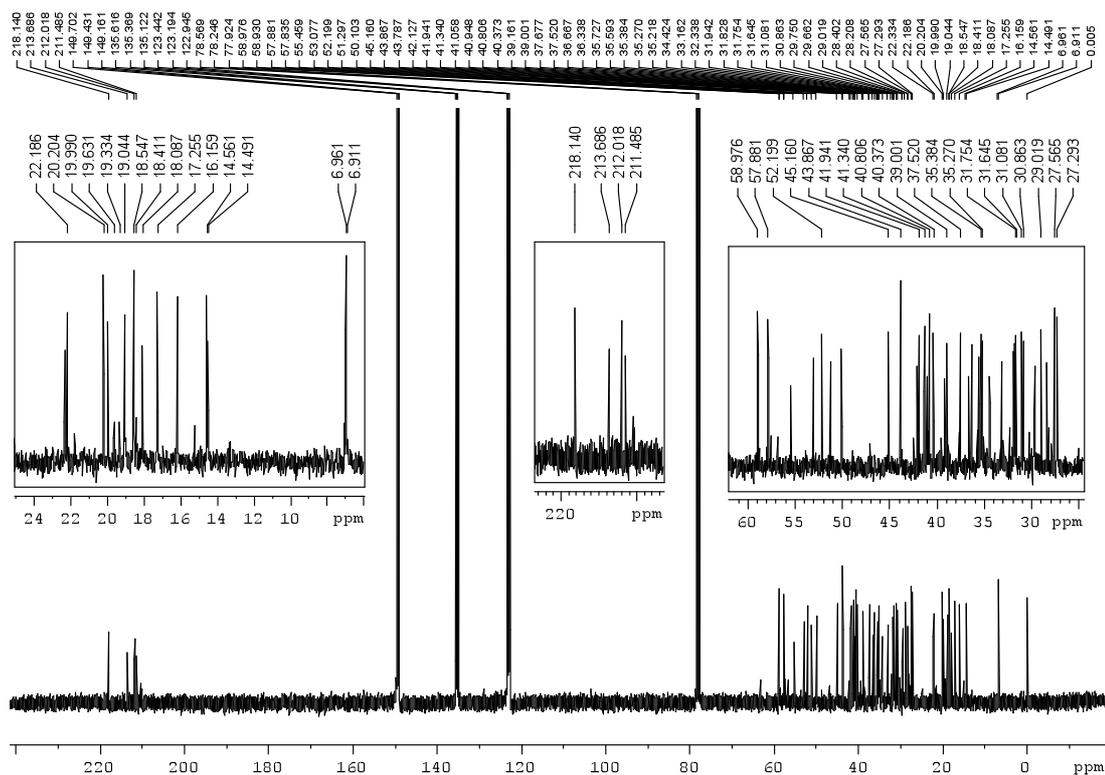


Figura 31: Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz) da mistura de **MG03** e **MG04** em CDCl_3 + Piridina- d_5 .

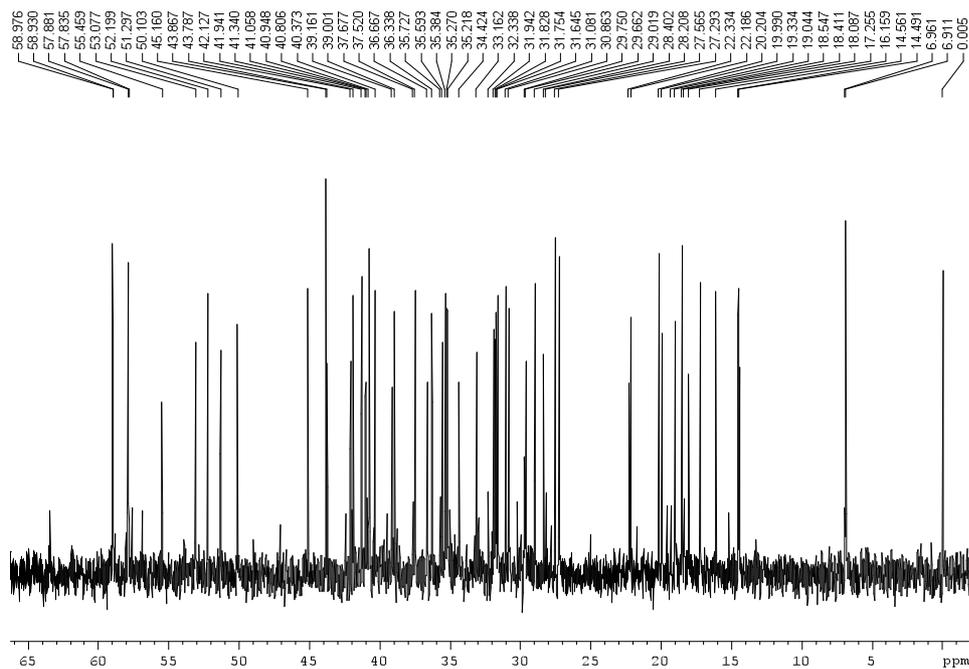


Figura 32: Expansão do espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz) da mistura de **MG03** e **MG04** em CDCl_3 + Piridina- d_5 .

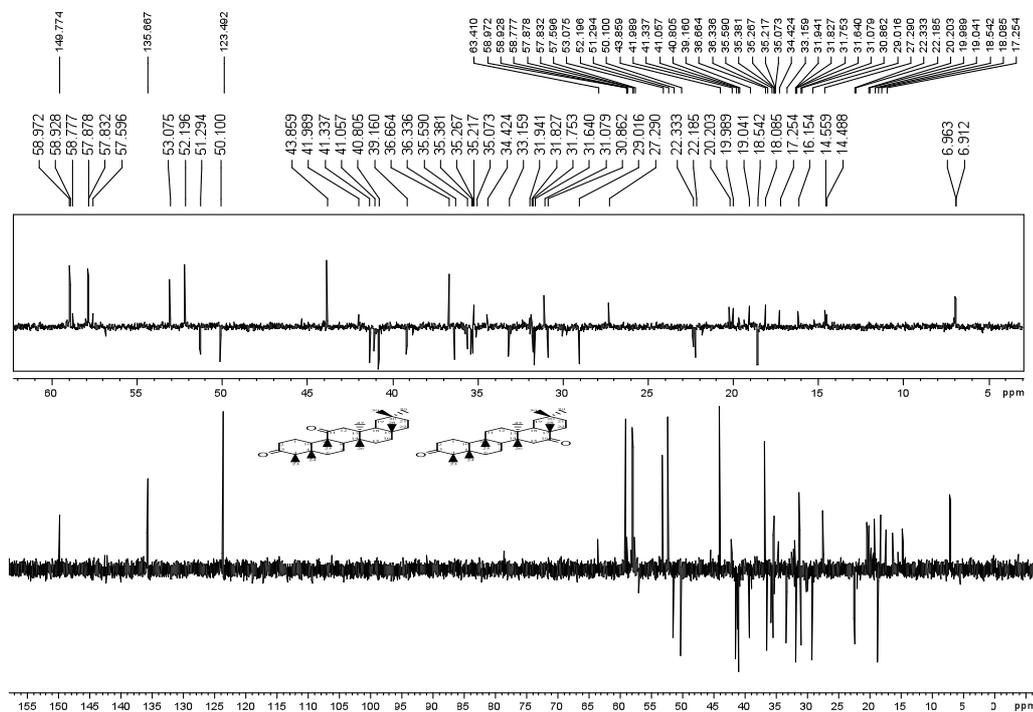


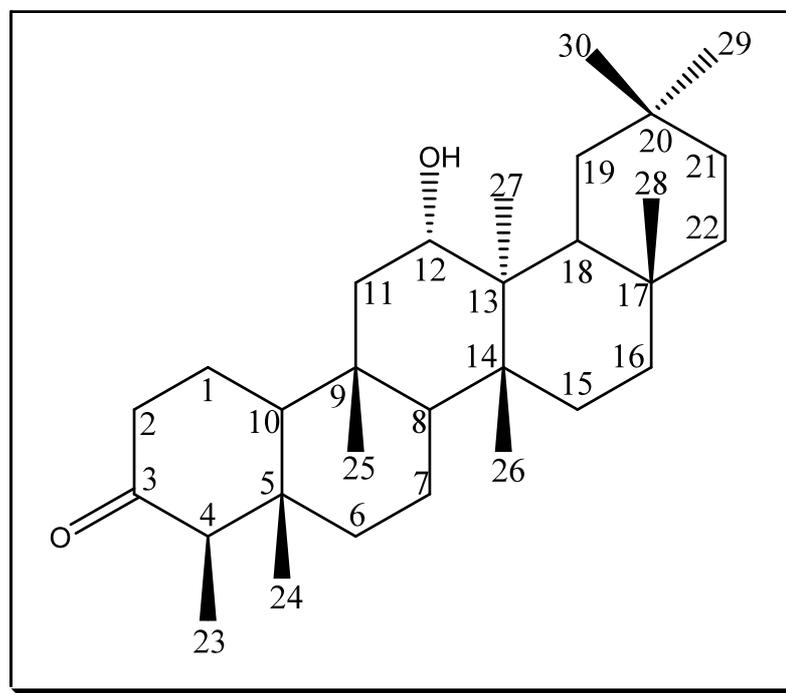
Figura 33: Subspectrum DEPT135 (100 MHz) da mistura de **MG03** e **MG04** em CDCl_3 + Piridina- d_5 .

Tabela 14: Comparação dos dados de RMN de ^{13}C de **MG03** e **MG04** com os dados da literatura para 3,11-dioxofriedelano e 3,16-dioxofriedelano (OLIVEIRA, 2007)

Nº	Tipo de carbono	δ_{C}^* de MG03	δ_{C}^{**} (OLIVEIRA, 2007)	Tipo de carbono	δ_{C}^* de MG04	δ_{C}^{**} (OLIVEIRA, 2007)
1	CH ₂	22,33	22,38	CH ₂	22,19	22,24
2	CH ₂	40,81	40,94	CH ₂	41,34	41,42
3	C	211,48	212,72	C	212,02	212,10
4	CH	58,93	58,10	CH	57,84	58,10
5	C	42,13	42,26	C	41,94	42,08
6	CH ₂	41,06	41,00	CH ₂	41,06	41,15
7	CH ₂	18,41	18,60	CH ₂	18,55	18,60
8	CH	53,08	53,18	CH	52,20	52,30
9	C	55,46	55,56	C	37,52	37,61
10	CH	53,08	53,18	CH	58,98	59,30
11	C	213,69	214,18	CH ₂	35,27	35,35
12	CH ₂	51,30	51,39	CH ₂	29,02	29,06
13	C	43,87	44,00	C	39,00	39,08
14	C	43,79	43,89	C	40,37	40,41
15	CH ₂	31,75	31,58	CH ₂	50,10	50,15
16	CH ₂	36,34	36,28	C	218,14	219,04
17	C	29,66	29,70	C	45,16	45,27
18	CH	36,67	36,62	CH	43,87	43,89
19	CH ₂	35,59	35,60	CH ₂	35,38	35,41
20	C	28,40	28,40	C	27,56	27,59
21	CH ₂	33,16	33,16	CH ₂	31,64	31,76
22	CH ₂	39,16	39,14	CH ₂	30,86	30,74
23	CH ₃	6,96	6,91	CH ₃	6,91	6,85
24	CH ₃	14,49	14,61	CH ₃	14,56	14,66
25	CH ₃	18,09	18,18	CH ₃	17,25	17,37
26	CH ₃	19,04	19,15	CH ₃	20,20	20,28
27	CH ₃	19,99	19,94	CH ₃	16,16	16,22
28	CH ₃	31,94	31,95	CH ₃	27,29	27,36
29	CH ₃	31,83	31,87	CH ₃	31,08	31,08
30	CH ₃	34,42	34,33	CH ₃	35,22	35,25

Solvente: *CDCl₃ + Piridina-d₅ **CDCl₃

1.2.4 – MG05: 3-oxo-12 α -hidroxifriedelano



MG05 foi isolado de SH1 e FH2, conforme representado nas Figuras 17 e 18 pág. 34 e 40. Apresentou-se como sólido branco, solúvel em clorofórmio e de faixa de fusão 269-273 °C. A fórmula molecular foi determinada como C₃₀H₅₀O₂ baseada no experimento de RMN de ¹³C. O teste LB foi positivo para triterpeno pentacíclico. A análise por CCD deste sólido usando diferentes eluentes evidenciou a existência de apenas uma mancha, rosa (revelador: ácido perclórico/vanilina).

O espectro na região do IV (Figura 34, pág. 59), de **MG05** apresentou bandas de absorção em: 3510 cm⁻¹ característica de estiramento da ligação OH de hidroxila, 2970-2862 cm⁻¹ características de estiramento simétrico e assimétrico da ligação CH de compostos alifáticos, 1716 cm⁻¹ característica de estiramento de ligação dupla CO de cetona e 1454 e 1382 cm⁻¹ características de deformação angular no plano de ligação simples CH de compostos alifáticos.

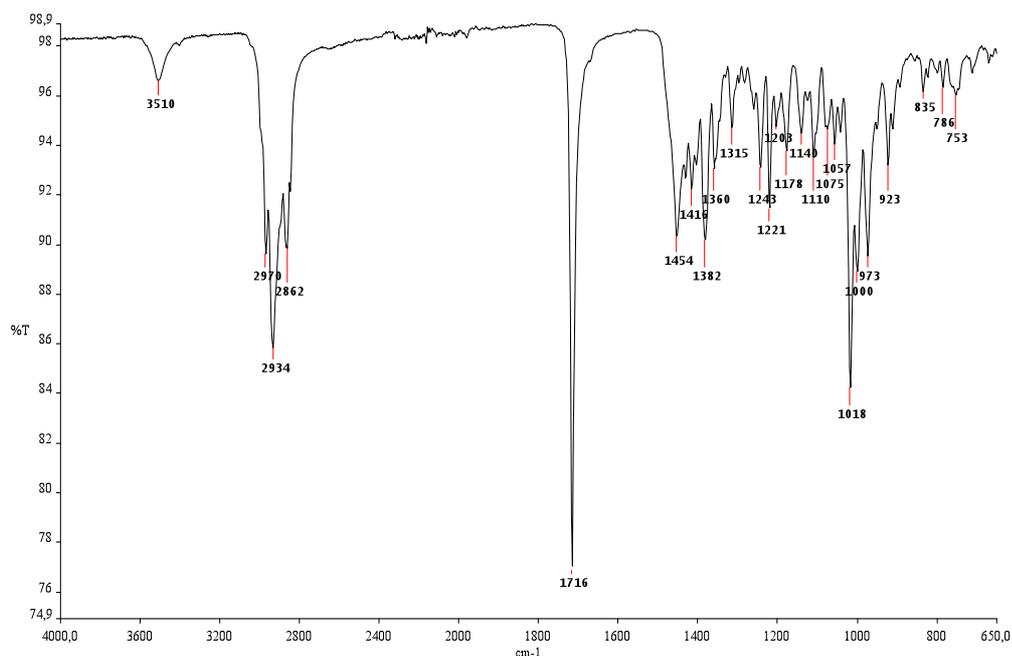


Figura 34: Espectro na região do IV de **MG05** (ATR).

O espectro de RMN de ^1H (Figura 35, pág. 60) apresentou seis simpletos em δ_{H} 0,72; δ_{H} 0,96 (a intensidade e integral deste sinal indicaram a sobreposição de dois sinais); δ_{H} 1,02; δ_{H} 1,04; δ_{H} 1,06 e δ_{H} 1,21 relativos a sete metilas e um duplete em δ_{H} 0,88 ($J = 6,4$ Hz) associado à outra metila (C-23) característica de triterpenos de esqueleto friedelano (MAHATO E KUNDU, 1994). Foi observado um duplete duplo em δ_{H} 3,90 ($J = 4,4$ e 11,2 Hz) confirmando a presença de hidroxila. O perfil apresentado pelos sinais de δ_{H} 0,72 a δ_{H} 2,39 é característico de triterpenos pentacíclicos (Figura 36, pág. 60).

A análise do espectro de RMN de ^{13}C e subespectro DEPT135 (Figuras 37 e 38, pág. 61) indicou um total de 30 sinais de carbono, que foram classificados como sendo 8 CH_3 , 10 CH_2 , 5 CH e 7 C . O sinal em δ_{C} 212,73 confirmou a presença de carbonila de cetona e o sinal em δ_{C} 73,15 foi atribuído ao carbono hidroxilado.

Estes dados aliados a faixa de fusão (269-273 °C), a comparação direta com amostra autêntica e a dados de RMN de ^{13}C da literatura (OLIVEIRA *et al.*, 2007) (Tabela 15, pág. 62), permitiram identificar **MG05** como sendo 3-oxo-12 α -hidroxifriedelano. **MG05** foi isolado pela primeira vez das folhas de *Maytenus gonoclada* (OLIVEIRA *et al.*, 2007; OLIVEIRA, 2007).

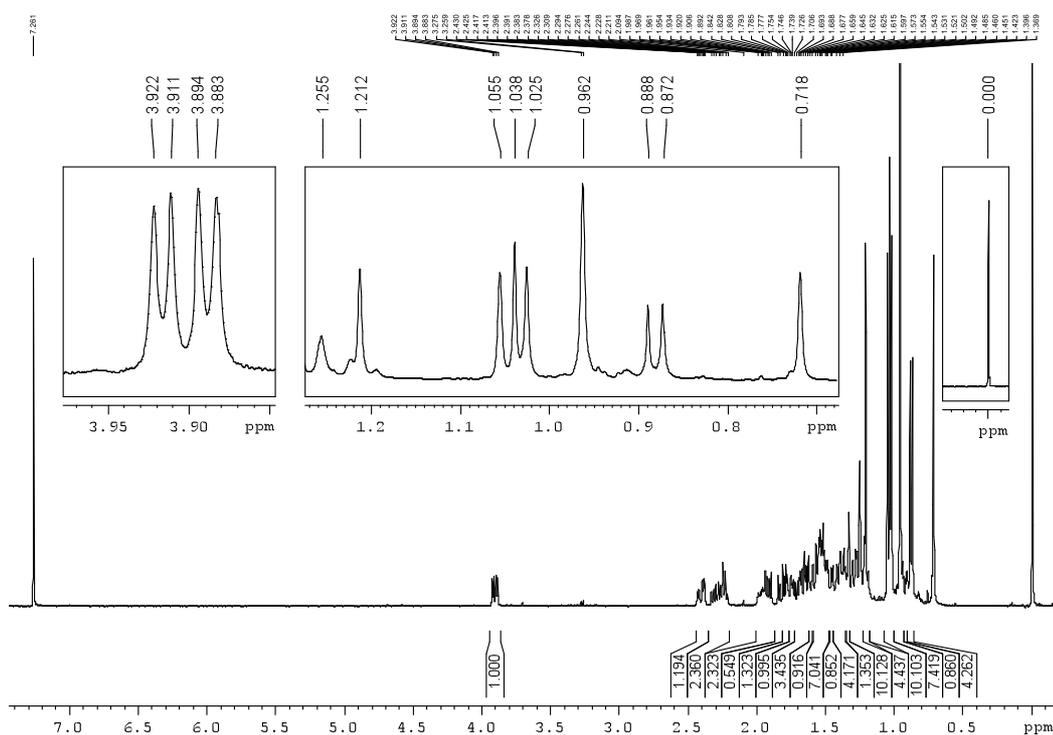


Figura 35: Espectro de RMN de ^1H (400 MHz) de **MG05** em CDCl_3 .

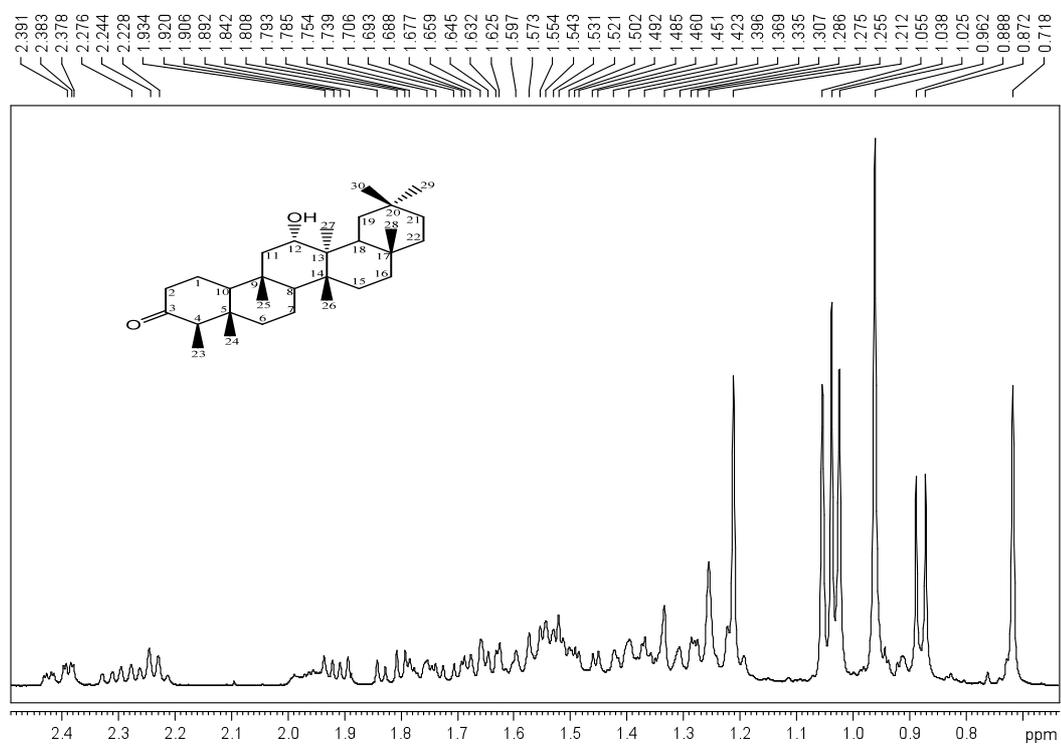


Figura 36: Expansão do espectro de RMN de ^1H (400 MHz) de **MG05** em CDCl_3 .

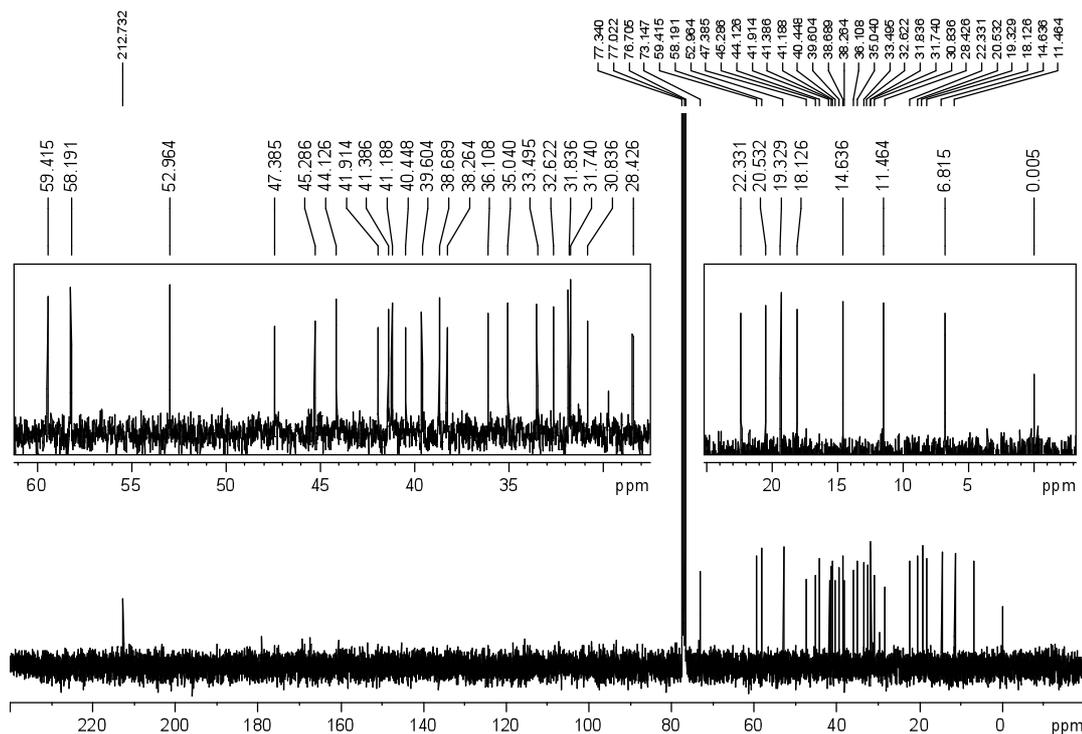


Figura 37: Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz) de **MG05** em CDCl_3 .

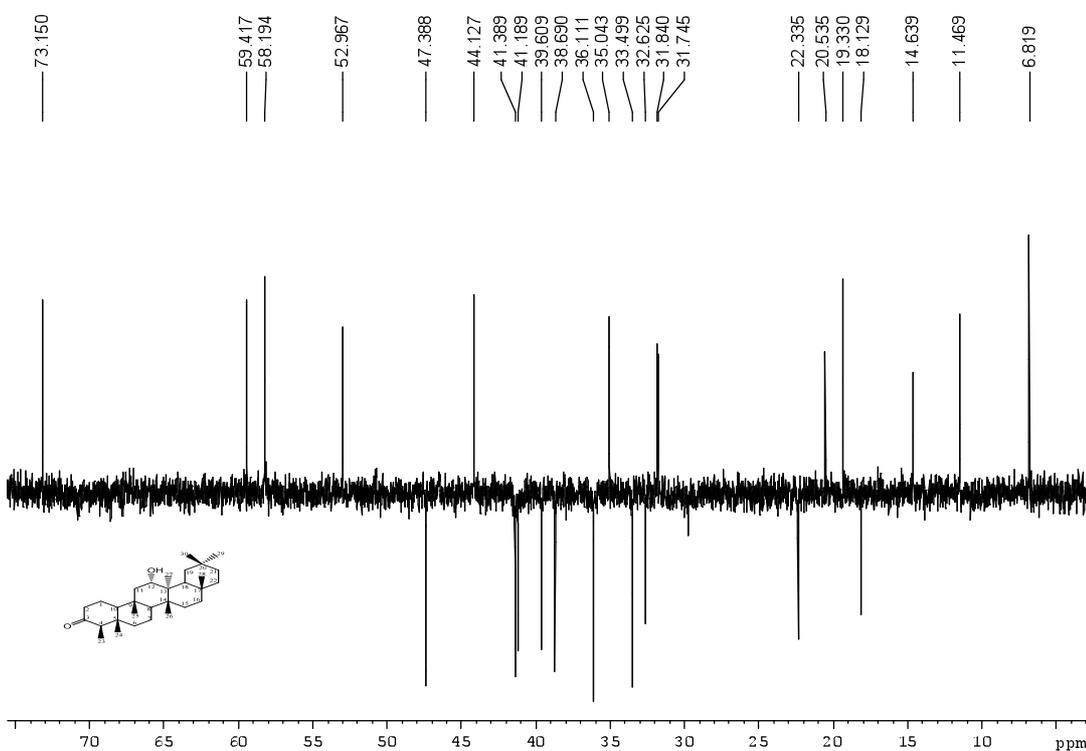
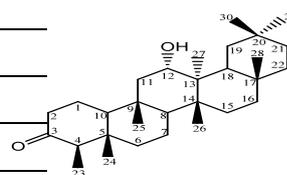


Figura 38: Subespectro DEPT135 (100 MHz) de **MG05** em CDCl_3 .

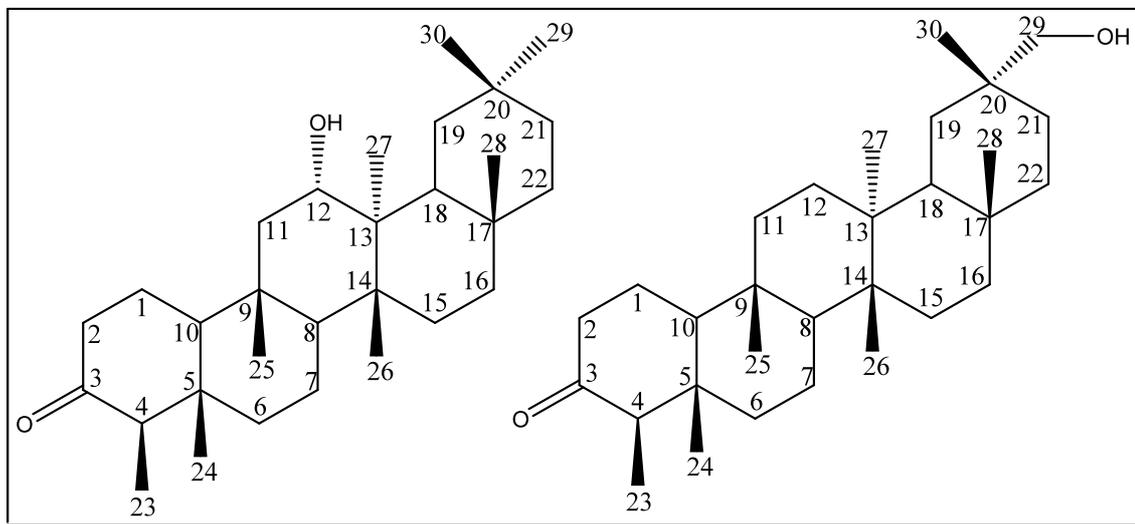
Tabela 15: Comparação dos dados de RMN de ^{13}C de **MG05** com os dados da literatura para 3-oxo-12 α -hidroxifriedelano (OLIVEIRA *et al.*, 2007)

Nº	Tipo de carbono	δ_c^* de MG05	δ_c^{**} (OLIVEIRA <i>et al.</i> , 2007)
1	CH ₂	22,33	22,3
2	CH ₂	41,39	41,4
3	C	212,73	212,7
4	CH	58,19	58,1
5	C	41,91	41,9
6	CH ₂	41,19	41,2
7	CH ₂	18,13	18,1
8	CH	52,96	52,9
9	C	38,26	38,2
10	CH	59,42	59,4
11	CH ₂	47,38	47,4
12	CH	73,15	72,7
13	C	45,29	45,3
14	C	40,45	40,4
15	CH ₂	33,50	33,4
16	CH ₂	36,11	36,1
17	C	30,84	30,8
18	CH	44,13	44,2
19	CH ₂	38,70	38,4
20	C	28,43	28,4
21	CH ₂	32,62	32,7
22	CH ₂	39,60	39,6
23	CH ₃	6,81	6,8
24	CH ₃	14,64	14,6
25	CH ₃	19,33	19,3
26	CH ₃	20,53	20,5
27	CH ₃	11,46	11,6
28	CH ₃	31,74	31,8
29	CH ₃	35,04	34,9
30	CH ₃	31,84	31,9



Solvente: *CDCl₃ **CDCl₃+ Piridina-d₅

1.2.5 – MG05: 3-oxo-12 α -hidroxifriedelano e MG06: 3-oxo-29-hidroxifriedelano



A mistura de **MG05** (3-oxo-12 α -hidroxifriedelano) e **MG06** (3-oxo-29-hidroxifriedelano) foi isolada de SH1, conforme representado na Figura 17 pág. 34. Apresentou-se como sólido branco, solúvel em clorofórmio e de faixa de fusão 253-272 °C. O teste LB foi positivo para triterpeno pentacíclico. A análise por CCD desta mistura usando diferentes eluentes evidenciou a existência de duas manchas, uma de maior R_f, violeta e outra de menor, rosa (revelador: ácido perclórico/vanilina). Devido a pequena diferença de R_f não foi possível isolar estas substâncias utilizando métodos cromatográficos clássicos. A comparação com padrão de 3-oxo-12 α -hidroxifriedelano em CCD indicou que a mancha rosa tratava-se deste triterpeno.

O espectro na região do IV (Figura 39, pág. 64), da mistura de **MG05** e **MG06**, apresentou bandas de absorção em: 3509 cm⁻¹ característica de estiramento da ligação OH de hidroxila, 2930-2868 cm⁻¹ características de estiramento simétrico e assimétrico da ligação CH de compostos alifáticos, 1714 cm⁻¹ característica de estiramento de ligação dupla CO de cetona e 1452 e 1388 cm⁻¹ características de deformação angular no plano de ligação CH de compostos alifáticos.

O espectro de RMN de ^1H (Figura 40) apresentou um grande número de multipletos entre δ_{H} 0,67 e 2,28 sugerindo tratar-se de uma mistura de triterpenos pentacíclicos. A presença de um duplete duplo em δ_{H} 3,90 ($J = 4,0$ e $11,2$ Hz) e um aparente quarteto em δ_{H} 3,27 confirmaram a presença de grupos hidroxila.

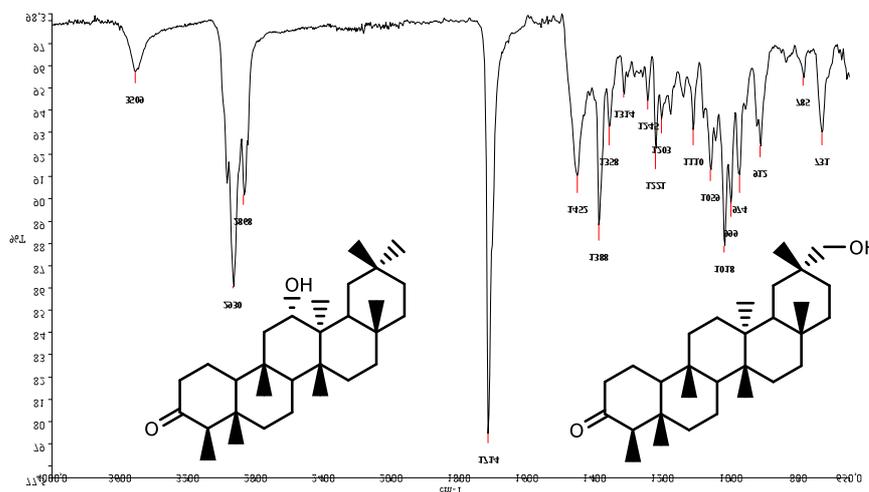


Figura 39: Espectro na região do IV da mistura de **MG05** e **MG06** (ATR).

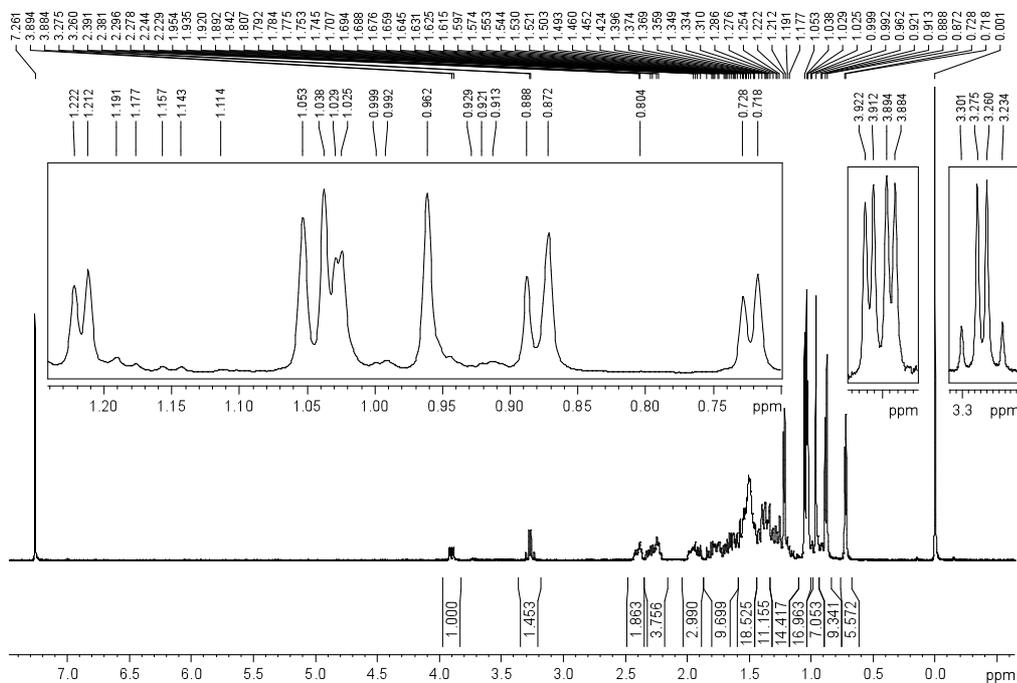


Figura 40: Espectro de RMN de ^1H (400 MHz) da mistura de **MG05** e **MG06** em CDCl_3 .

O espectro de RMN de ^{13}C (Figuras 41 e 42, pág. 65 e 66) indicou a presença de 58 sinais. As intensidades dos sinais observados possibilitaram a identificação de dois sinais de carbono sobrepostos, totalizando assim, 60 sinais. Com o auxílio do subespectro DEPT 135 (Figura 43, pág. 66), estes sinais foram classificados como sendo 15 CH_3 , 22 CH_2 , 9 CH e 14 C , indicando que uma das metilas de um triterpeno deve estar hidroxilada. O sinal em δ_{C} 6,81 foi atribuído ao carbono metílico (C-23) de esqueleto friedelano (MAHATO E KUNDU, 1994). Os sinais em δ_{C} 212,73 e δ_{C} 213,16 indicaram a presença de duas carbonilas.

As intensidades dos sinais das carbonilas indicaram que a proporção destes triterpenos na amostra é de, aproximadamente, 1:1.

A comparação dos dados de RMN de ^{13}C com a literatura (OLIVEIRA *et al.*, 2007; MAHATO E KUNDU, 1994) (Tabela 16, pág. 67), confirmaram a presença de 3-oxo-12 α -hidroxifriedelano (**MG05**) e 3-oxo-29-hidroxifriedelano (**MG06**) na mistura. A mistura destes compostos já foi isolada das folhas de *Maytenus gonoclada* (OLIVEIRA, 2007).

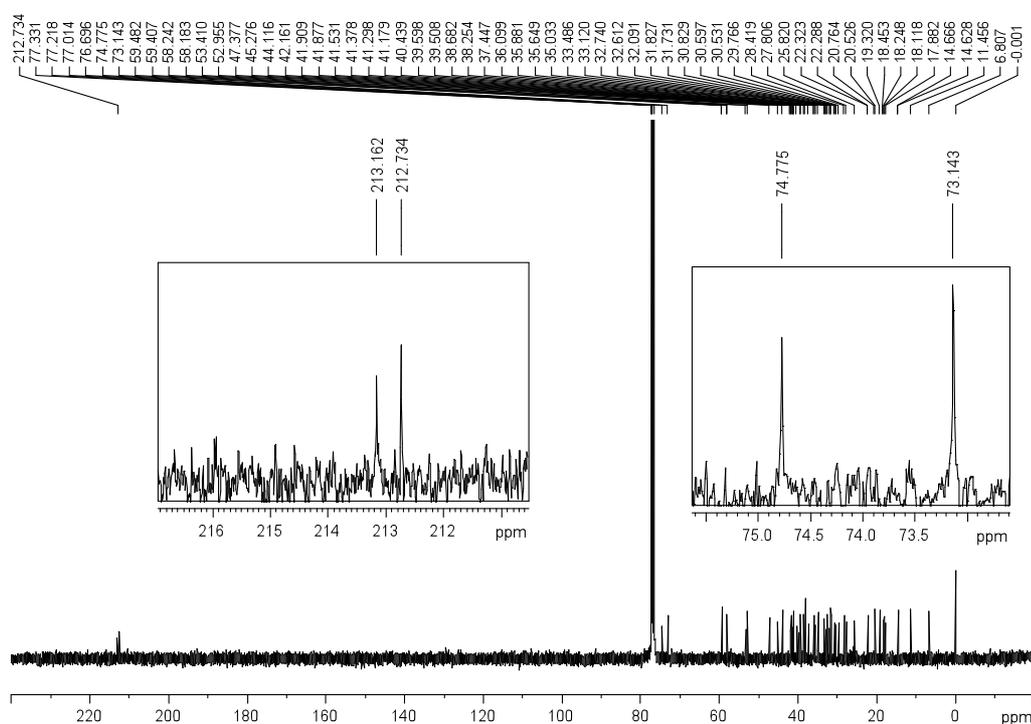


Figura 41: Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz) da mistura de **MG05** e **MG06** em CDCl_3 .

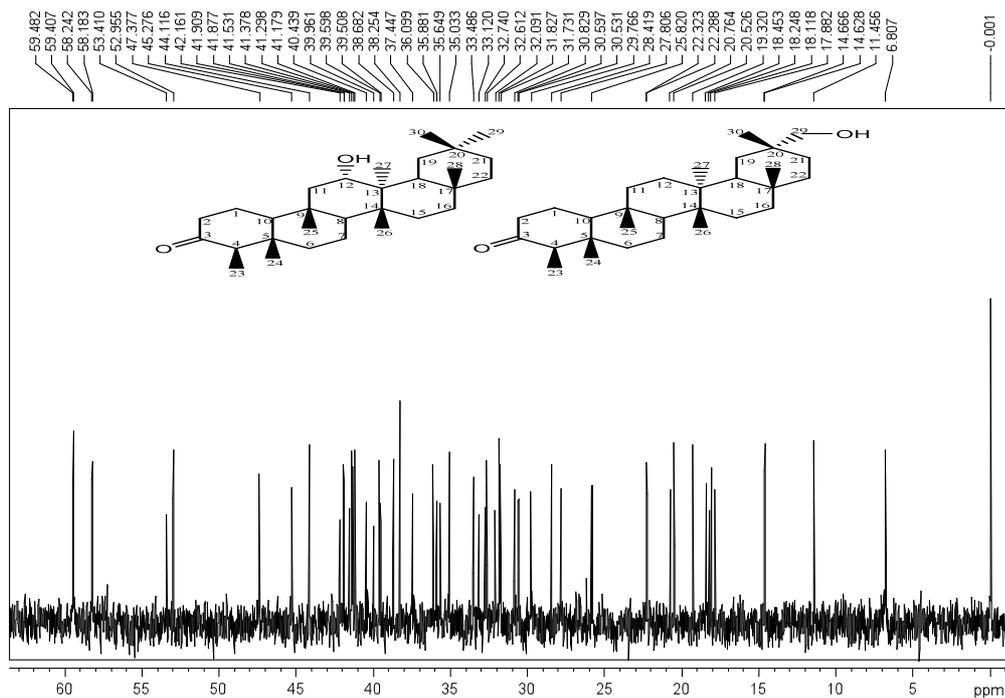


Figura 42: Expansão do espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz) da mistura de **MG05** e **MG06**.

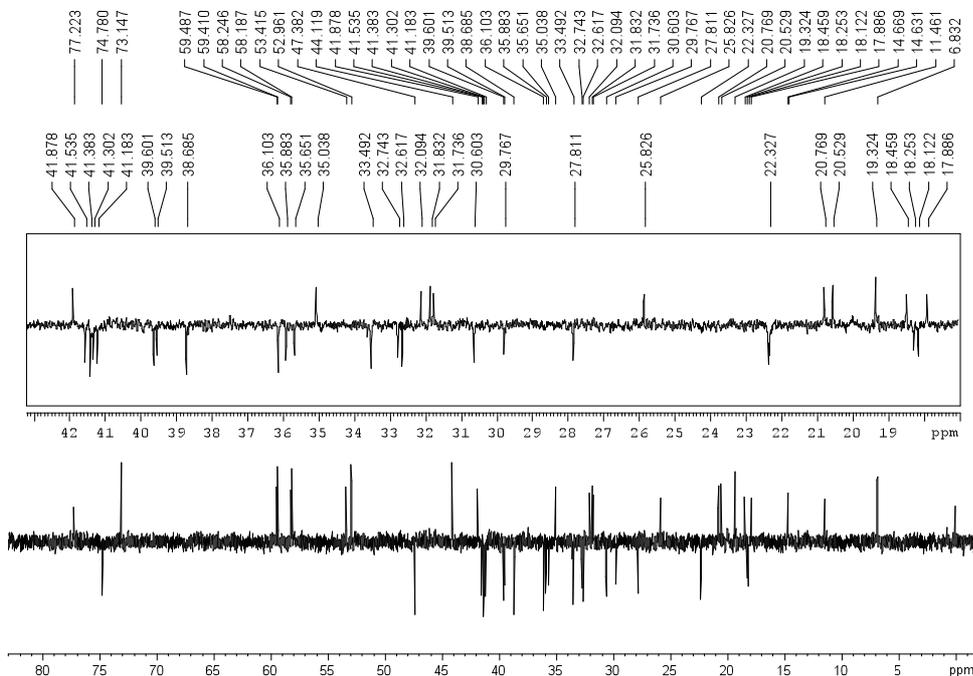


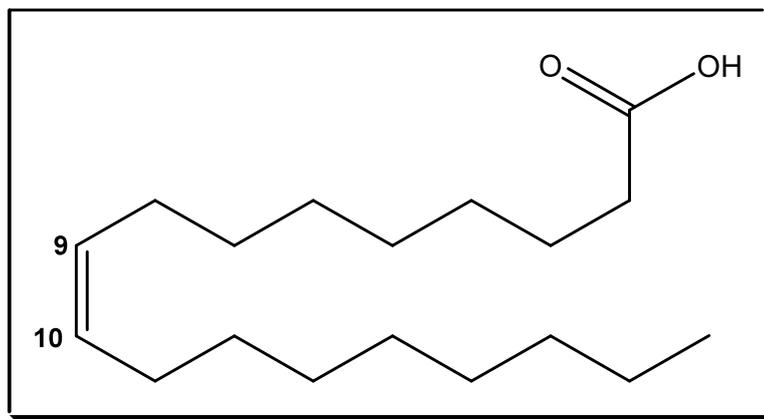
Figura 43: Subespectro DEPT135 (100 MHz) da mistura de **MG05** e **MG06** em CDCl_3 .

Tabela 16: Comparação dos dados de RMN de ^{13}C de **MG05** e **MG06** com os dados da literatura para 3-oxo-12 α -hidroxifriedelano e 3-oxo-29-hidroxifriedelano (OLIVEIRA *et al.*, 2007; MAHATO E KUNDU, 1994)

Nº	Tipo de carbono	δ_{C}^* de MG05	δ_{C}^* (OLIVEIRA,2007)	Tipo de carbono	δ_{C}^* de MG06	δ_{C}^* (MAHATO E KUNDU, 1994)
1	CH ₂	22,32	22,3	CH ₂	22,29	22,3
2	CH ₂	41,30	41,4	CH ₂	41,53	41,6
3	C	213,16	212,7	C	212,73	212,2
4	CH	58,18	58,1	CH	58,2	58,3
5	C	41,91	41,9	C	42,16	42,2
6	CH ₂	41,18	41,2	CH ₂	41,38	41,4
7	CH ₂	18,12	18,1	CH ₂	18,25	18,3
8	CH	52,96	52,9	CH	53,41	53,5
9	C	38,25	38,2	C	37,45	37,5
10	CH	59,41	59,4	CH	59,48	59,6
11	CH ₂	47,38	47,4	CH ₂	35,65	35,7
12	CH	73,14	72,7	CH ₂	29,77	29,8
13	C	45,28	45,3	C	39,96	40,0
14	C	40,44	40,4	C	38,25	38,3
15	CH ₂	33,49	33,4	CH ₂	32,61	32,8
16	CH ₂	36,10	36,1	CH ₂	35,88	36,0
17	C	30,83	30,8	C	30,53	29,8
18	CH	44,12	44,2	CH	41,88	42,0
19	CH ₂	38,68	38,4	CH ₂	30,60	30,6
20	C	28,42	28,4	C	33,12	33,2
21	CH ₂	32,74	32,7	CH ₂	27,81	27,9
22	CH ₂	39,60	39,6	CH ₂	39,51	39,6
23	CH ₃	6,81	6,8	CH ₃	6,81	6,8
24	CH ₃	14,63	14,6	CH ₃	14,67	14,7
25	CH ₃	19,32	19,3	CH ₃	17,88	17,9
26	CH ₃	20,53	20,5	CH ₃	18,45	18,4
27	CH ₃	11,47	11,6	CH ₃	20,76	20,8
28	CH ₃	31,73	31,8	CH ₃	32,09	32,1
29	CH ₃	35,03	34,9	CH ₂	74,78	74,8
30	CH ₃	31,83	31,9	CH ₃	25,82	25,9

Solvente: *CDCl₃

1.2.6 – MG07: Ácido oléico



MG07 foi isolado de SH1, conforme representado na Figura 17 pág. 34. Apresentou-se como um sólido branco oleoso e solúvel em clorofórmio. A análise por CCD deste sólido usando diferentes eluentes evidenciou a existência de uma mancha azul (revelador: ácido perclórico/vanilina).

O espectro na região do IV (Figura 44, pág. 69), de **MG07** apresentou banda de absorção em: 3512 cm^{-1} característica de estiramento da ligação OH de hidroxila, $2968\text{-}2868\text{ cm}^{-1}$ características de estiramento simétrico e assimétrico da ligação CH de compostos alifáticos, 1716 cm^{-1} característica de estiramento de ligação dupla CO de ácido carboxílico (PAVIA *et al.*, 2001), 1574 cm^{-1} característica de estiramento de ligação dupla C=C e 1415 cm^{-1} característica de deformação angular no plano de ligação simples H-C= de alcenos cis (BARBOSA, 2008).

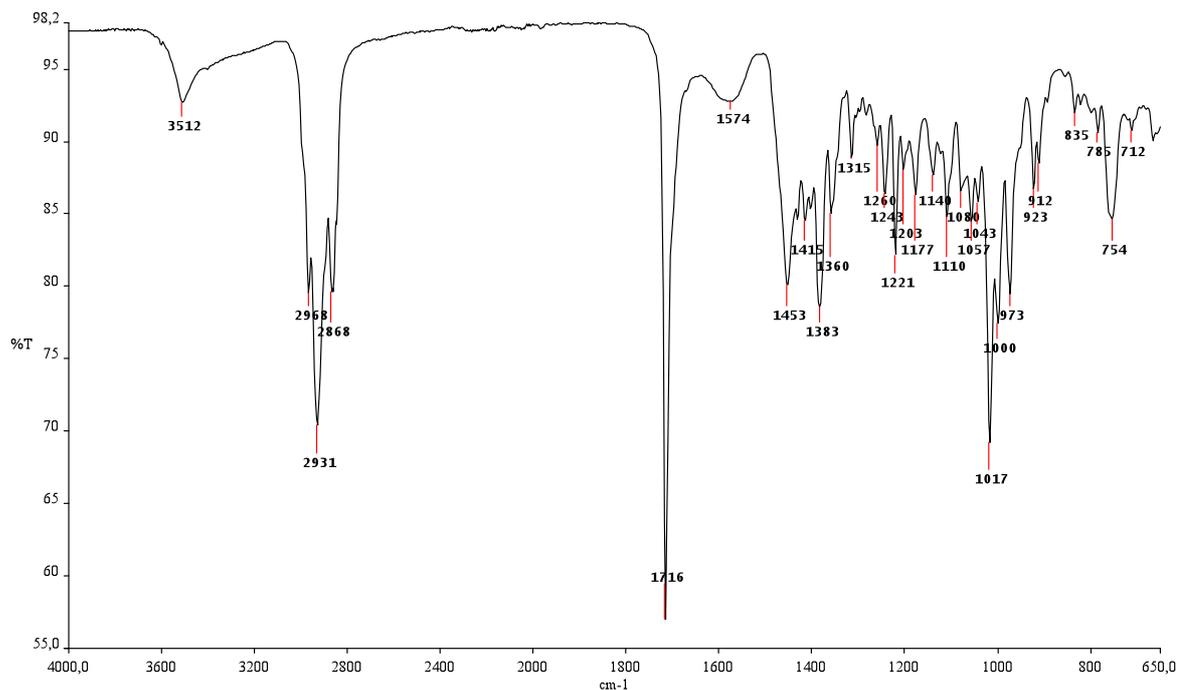


Figura 44: Espectro na região do IV de **MG07** (ATR).

O espectro de RMN de ^1H (Figura 45, pág. 70) apresentou um multiplete em δ_{H} 5,36 atribuído aos hidrogênios olefínicos. Os sinais em δ_{H} 2,34 indicam hidrogênios de carbono metilênico vizinhos à carbonila e o sinal intenso em δ_{H} 1,26 indica hidrogênios de cadeia graxa.

A análise do espectro de RMN de ^{13}C (Figura 46, pág. 70) indicou que o composto não estava puro, porém foi possível observar 18 sinais (alguns sinais sobrepostos) de maiores intensidades. Com o auxílio do subespectro DEPT 135 (Figura 47, pág 71), estes sinais foram classificados como sendo 1 CH_3 , 14 CH_2 , 2 CH e 1 C . Os sinais em δ_{C} 129,74 e δ_{C} 130,03 foram atribuídos aos carbonos olefínicos. O sinal em δ_{C} 179,43 foi atribuído ao carbono carbonílico de ácido.

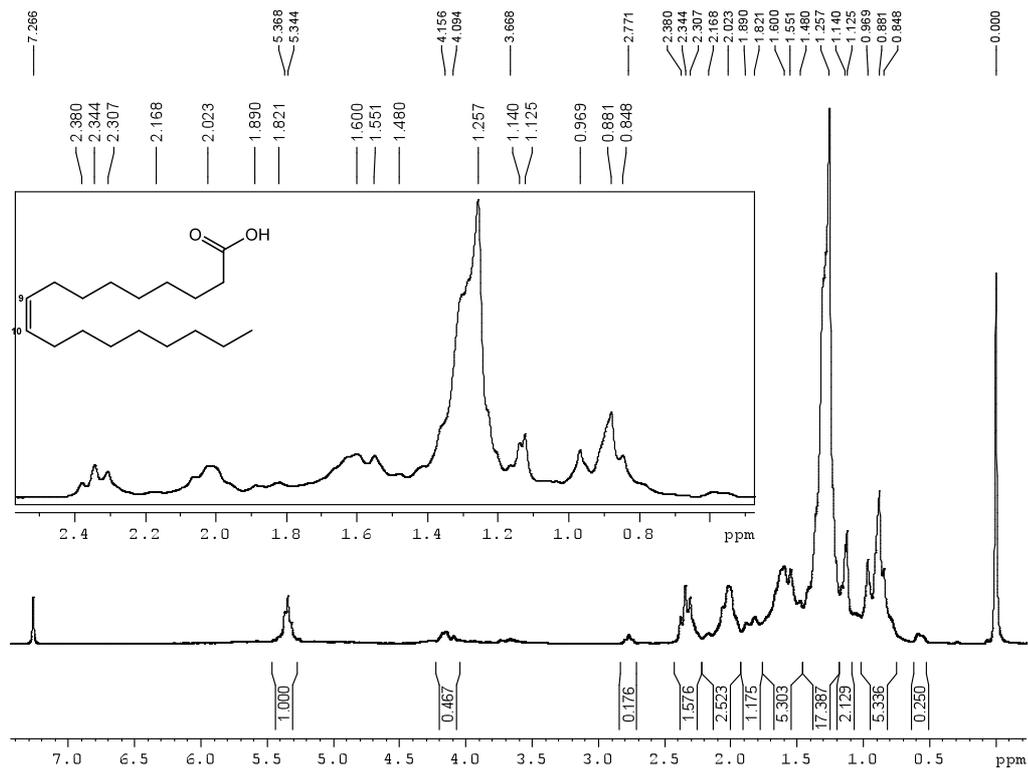


Figura 45: Espectro de RMN de ¹H (200 MHz) de **MG07** em CDCl₃.

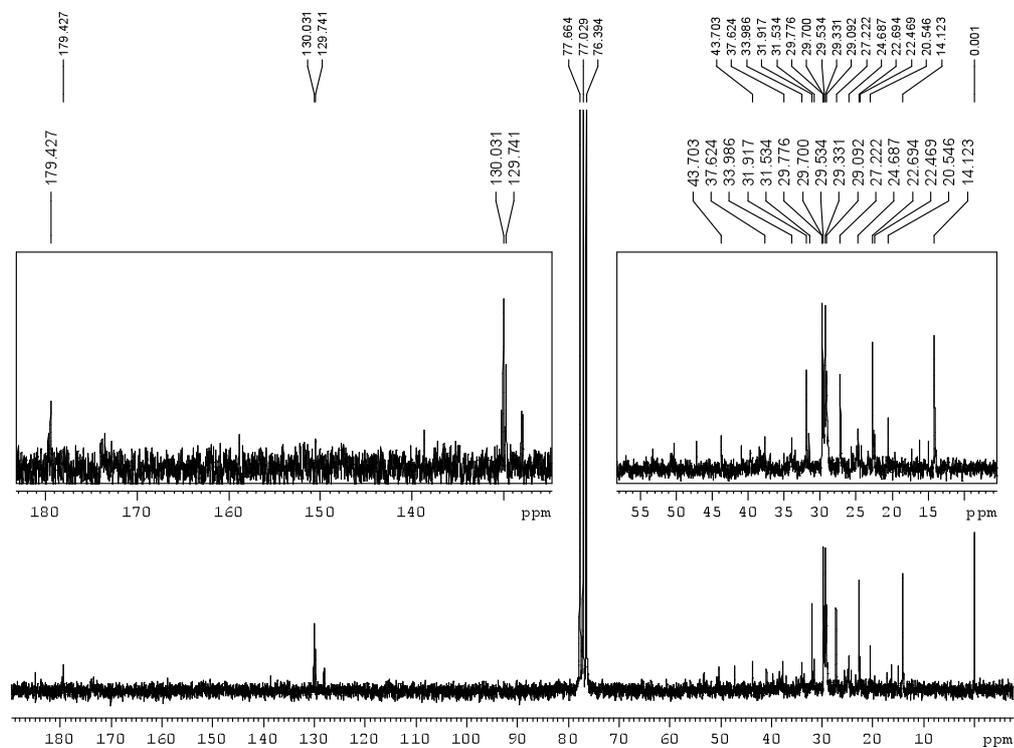


Figura 46: Espectro de RMN de ¹³C (50 MHz) de **MG07** em CDCl₃.

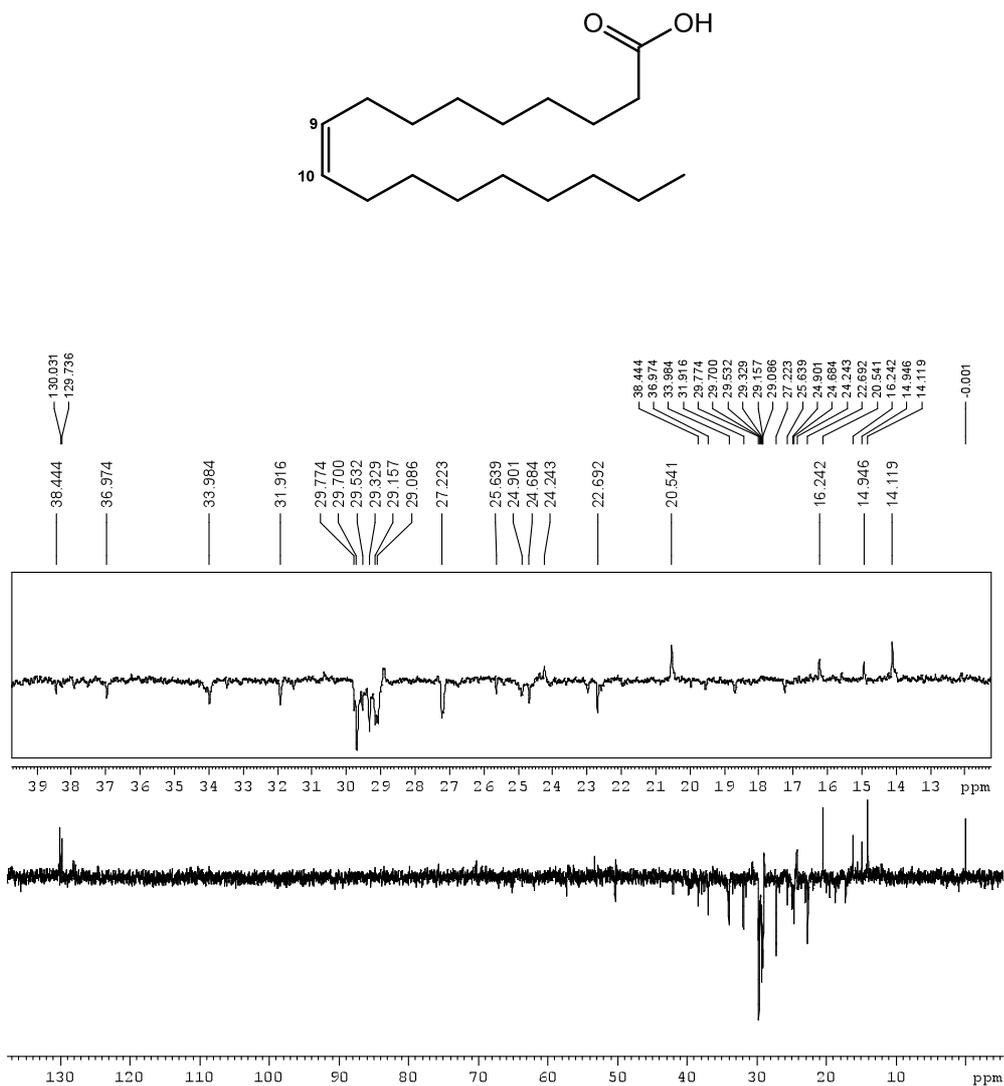
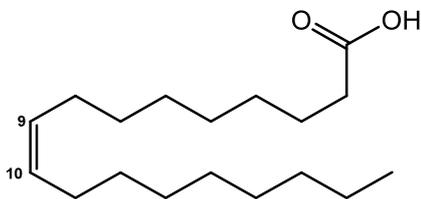


Figura 47: Subespectro DEPT135 (50 MHz) de **MG07** em CDCl_3 .

A comparação dos sinais de maiores intensidades do espectro de RMN de ^{13}C com os dados da literatura (OLIVEIRA, 2004) estão descritos na Tabela 17, pág. 72. Estes dados aliados à comparação direta com amostra autêntica permitiram sugerir **MG07** como sendo ácido oléico, o composto majoritário.

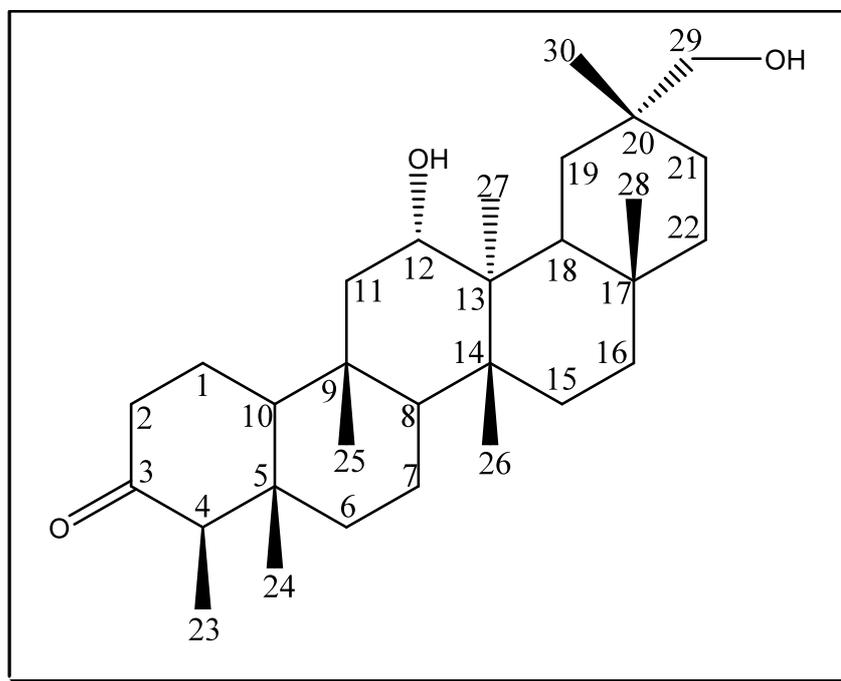
É a primeira vez que se isola ácido oléico de *M. gonoclada*.

Tabela 17: Comparação dos dados de RMN de ^{13}C de **MG07** com os dados da literatura para o ácido oléico (OLIVEIRA, 2004)



Nº	Tipo de carbono	δ_{C}^* de MG06	δ_{C}^* (OLIVEIRA, 2004)
1	C	179,43	179,50
2	CH ₂	33,99	33,97
3	CH ₂	24,69	24,70
4	CH ₂	29,09	29,25
5	CH ₂	29,09	29,08
6	CH ₂	29,09	29,15
7	CH ₂	29,78	29,78
8	CH ₂	27,22	27,23
9	CH	130,03	130,03
10	CH	129,74	129,74
11	CH ₂	27,22	27,16
12	CH ₂	29,70	29,70
13	CH ₂	29,33	29,45
14	CH ₂	29,53	29,53
15	CH ₂	29,33	29,33
16	CH ₂	31,92	31,93
17	CH ₂	22,69	22,70
18	CH ₃	14,12	14,12

Solvente: $^*\text{CDCl}_3$

1.2.7 – MG08: 3-oxo-12 α ,29-di-hidroxifriedelano

MG08 foi isolado de SH1, conforme está representado na Figura 17, pág. 34. Apresentou-se como sólido amorfo, totalmente solúvel em clorofórmio, de ponto de fusão 250-254 °C e possui $[\alpha]_D^{25} = -23$ ($c = 0,0012$; CHCl_3). A fórmula molecular foi determinada como $\text{C}_{30}\text{H}_{50}\text{O}_3$ baseada no experimento de RMN de ^{13}C e de EM-ESI. O teste LB foi positivo para triterpeno pentacíclico. A análise por CCD deste sólido usando diferentes eluentes evidenciou a existência de uma mancha rósea muito intensa (ácido perclórico/vanilina).

O espectro na região do IV (Figura 48, pág 74), de **MG08**, apresentou bandas de absorção em: 3327 cm^{-1} característica de estiramento da ligação OH de hidroxila, 2920 e 2850 cm^{-1} características de estiramento da ligação CH de compostos alifáticos, 1712 cm^{-1} característica de ligação dupla CO de cetona e 1454 e 1381 cm^{-1} características de deformação angular no plano de ligação simples CH de compostos alifáticos. Estes dados sugeriram tratar-se de uma substância que possui hidroxila e carbonila de cetona.

O espectro de RMN de ^1H (Figura 49, pág. 75) apresentou seis simpletos em δ 0,70; δ 0,93; δ 0,97; δ 1,01; δ 1,17 e δ 1,18 e um duplete em δ 0,87 ($J = 7,0\text{ Hz}$)

correspondendo a sete grupos metila. O duplete presente em δ 0,87 permitiu classificar **MG08** como um triterpeno da série friedelano.

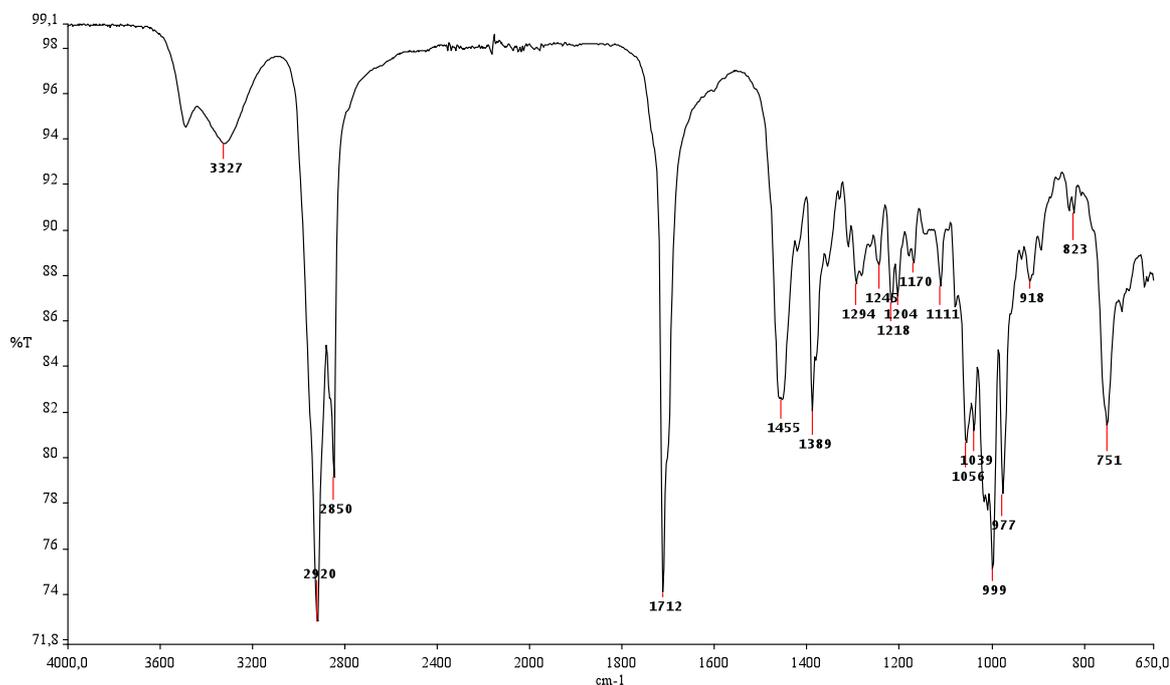


Figura 48: Espectro na região do IV de **MG08** (ATR).

Foram observados, ainda, dois dupletos em δ 3,12 ($J = 11,2$ Hz) e δ 3,64 ($J = 10,8$ Hz) e um duplete duplo em δ 3,94 ($J = 4,4$ e $11,2$ Hz) indicando a presença de grupos hidroxilas.

A ausência de um dos oito grupos metila existentes no esqueleto básico de triterpenos da série friedelano sugeriu a presença de um grupo CH_2OH .

Para o sinal em δ_{H} 3,94 (duplete duplo, $J = 4,4$ e $11,2$ Hz) o valor da constante de acoplamento de $4,4$ Hz sugeriu a presença de um hidrogênio vicinal acoplado a esse hidrogênio em um ângulo de 60° , e o valor da constante de acoplamento de $11,2$ Hz sugeriu a existência de acoplamento com um hidrogênio vicinal em um ângulo de 180° . Essas informações sugeriram um posicionamento axial para o hidrogênio ligado ao carbono hidroxilado (OLIVEIRA, 2007).

O espectro de RMN de ^{13}C (Figura 50, pág. 76) apresentou 30 sinais, que foram classificados como sendo 7 CH_3 , 11 CH_2 , 5 CH e 7 C , com o auxílio do

subespectro DEPT135 (Figura 51, pág. 77). A presença do sinal em δ_C 6,80, característico de metila C-23 de friedelanos que possui carbonila em C-3 (MAHATO E KUNDU, 1994), juntamente com os sinais em δ_C 212,67 (C=O), δ_C 71,62 (CH) e δ_C 72,06 (CH₂) indicaram que **MG08** trata-se de um derivado friedelano que possui dois grupos hidroxilas, faltando apenas definir a localização da hidroxila.

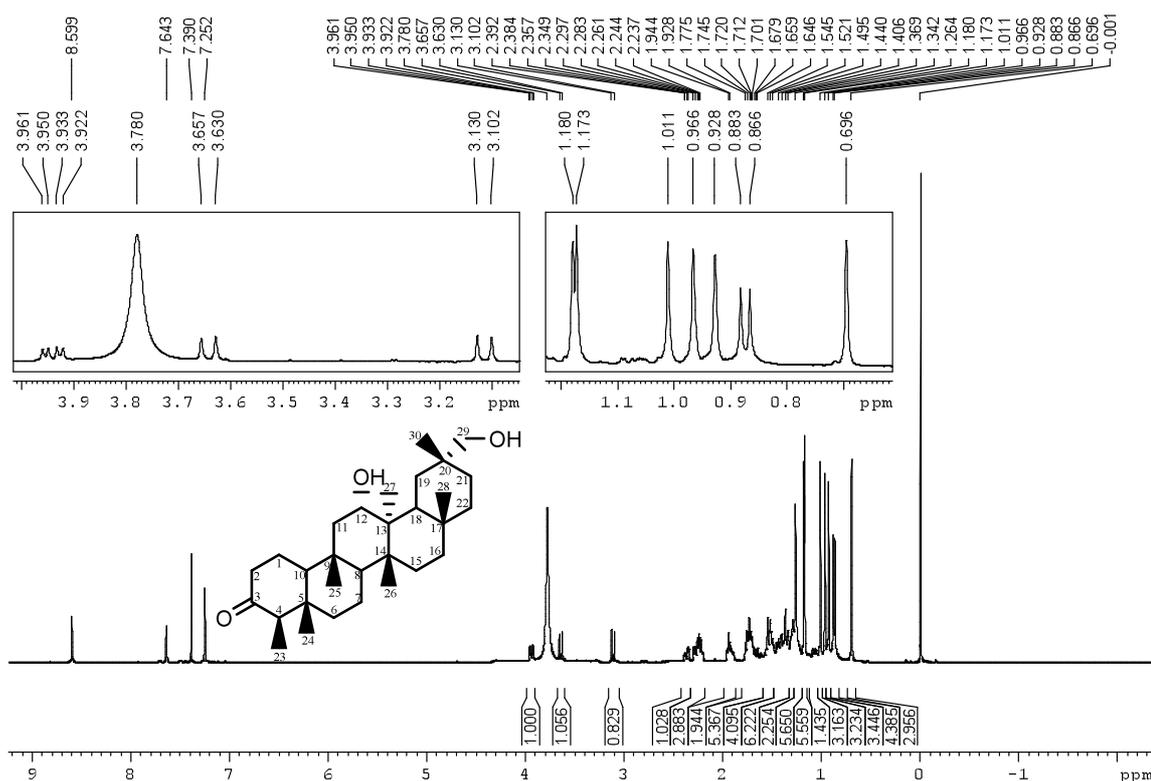


Figura 49: Espectro de RMN de ¹H (400 MHz) de **MG08** em CDCl₃ + Piridina-d₅.

Uma vez que a substância se trata de um derivado friedelano, alguns sinais característicos foram comparados à literatura (OLIVEIRA *et al.*, 2007) (Tabela 18, pág. 87) e uma análise detalhada nos mapas de contorno HSQC e HMBC foi realizada.

Uma primeira análise do mapa de contorno HSQC (Figura 52, pág. 78) de **MG08** permitiu correlacionar o sinal do carbono C-23 em δ 6,80 com H-23 em δ 0,87. Outros sinais de carbonos foram correlacionados aos seus respectivos hidrogênios pelo HSQC (Figura 52 e 53, p. 78 e 79), após análise do mapa de contornos HMBC.

Utilizando estes valores (C-23/H-23) como ponto de partida, procedeu-se, então, à análise do mapa de contornos HMBC (Figura 54 e 55, pág. 80 e 81) a fim de se atribuir os demais sinais aos carbonos e hidrogênios da molécula.

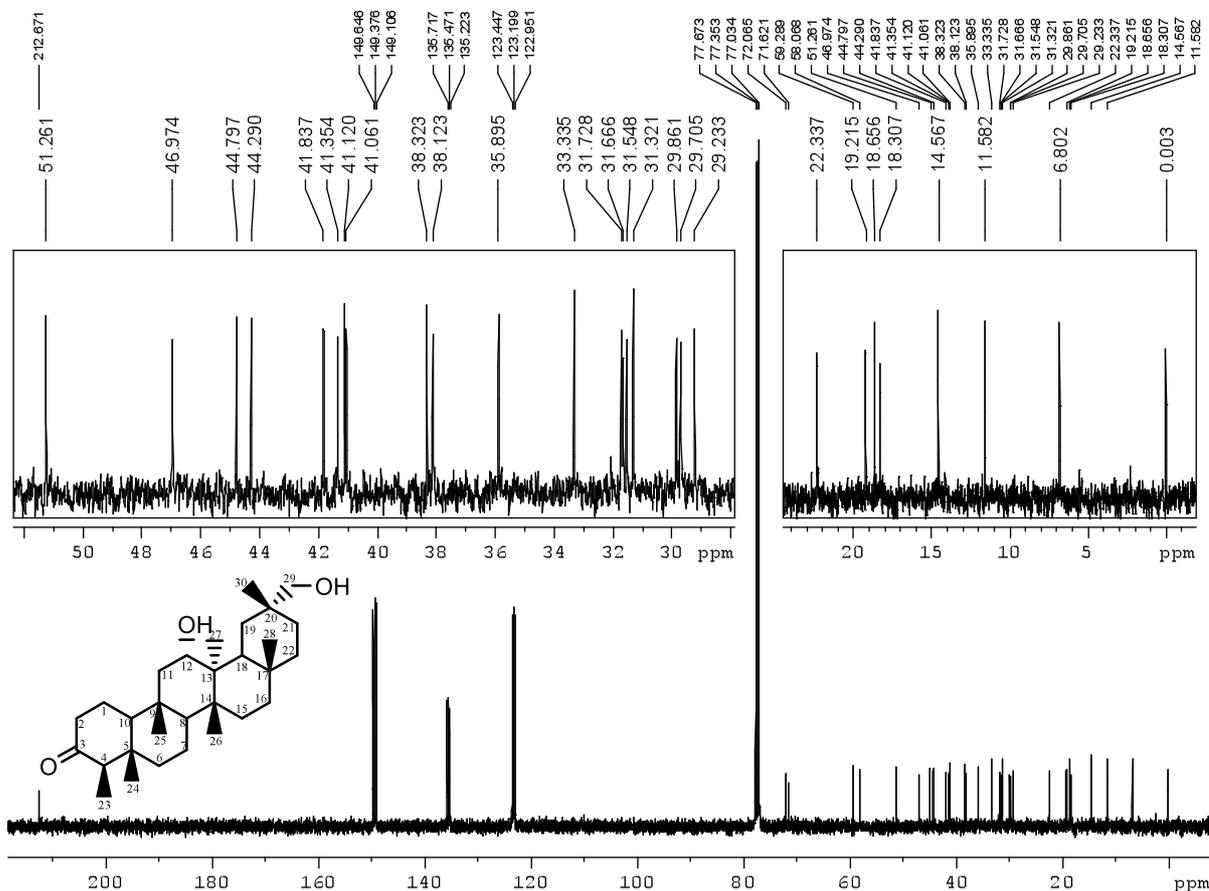


Figura 50: Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz) de **MG08** em CDCl_3 + Piridina- d_5 .

O sinal de H-23 em δ 0,87 mostrou correlação com os sinais de carbono em δ 41,84 (C-5) e em δ 58,07 (C-4) (Figura 54 e 55, pág. 80 e 81). Pelos mapas de contorno HSQC foram atribuídos os valores dos sinais de hidrogênio para esses carbonos.

No mapa de contornos HMBC, o sinal de hidrogênio H-4 em δ 2,22 mostrou correlação com os sinais de carbono em δ 14,57 (C-24) (Figura 54, pág. 80) e δ 41,84 (C-5) (Figura 54 e 55, pág. 80 e 81).

O sinal de H-24 em δ 0,70 mostrou correlação com os sinais de carbono em δ 41,84 (C-5), em δ 58,07 (C-4), em δ 41,06 (C-6) e em δ 59,29 (C-10) (Figura 54 e 55, pág. 80 e 81).

O sinal de H-10 em δ 1,57 mostrou correlação com o sinal de carbono em δ 38,32 (C-9) (Figura 55, pág. 81).

O sinal de C-9 em δ 38,32 mostrou correlação com o sinal de hidrogênio em δ 0,93 (Figura 54 e 55, pág. 80 e 81). Como esse sinal se refere a hidrogênio de carbono metílico, há possibilidade de correlação apenas com os hidrogênios de C-25.

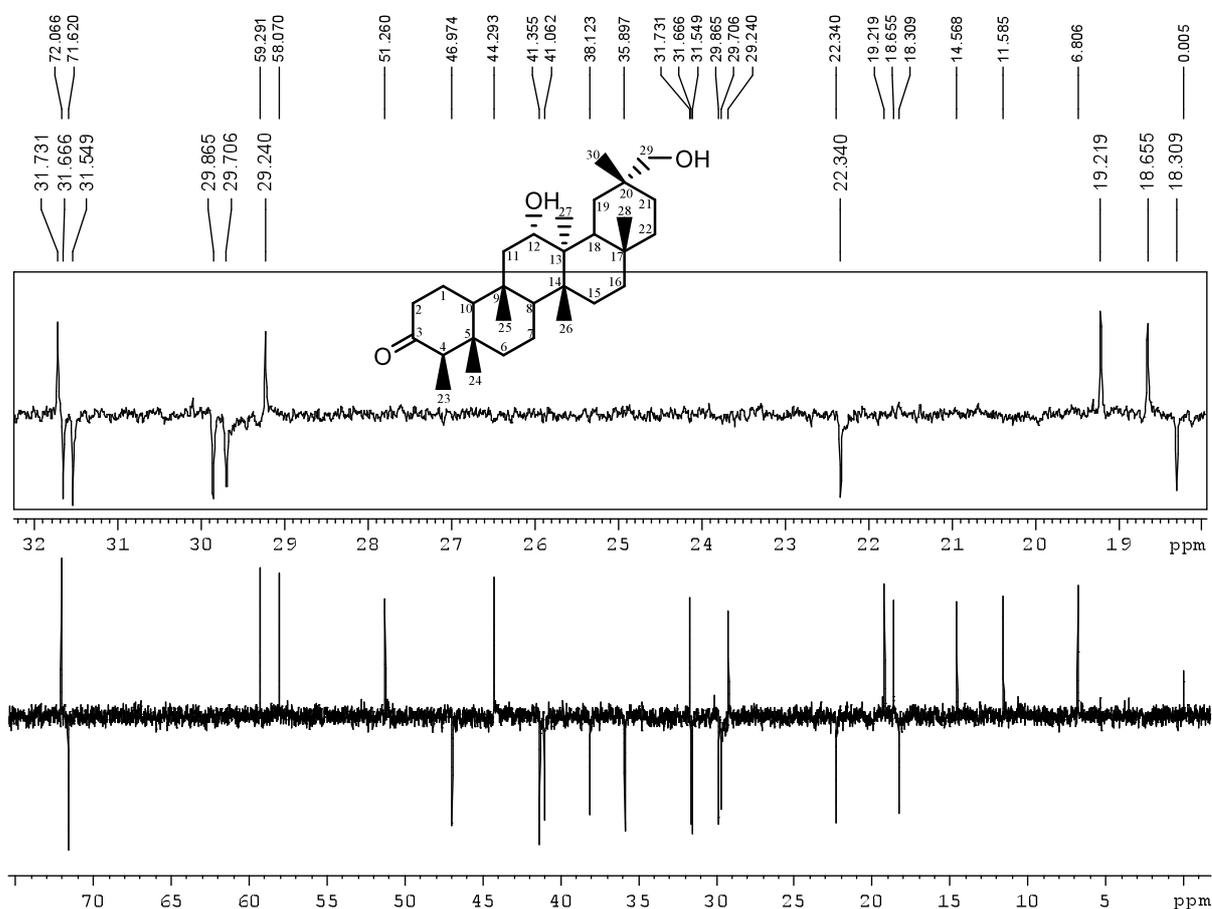


Figura 51: Subespectro DEPT135 (100 MHz) de **MG08** em $\text{CDCl}_3 + \text{Piridina-d}_5$.

O sinal de H-25 em δ 0,93 mostrou correlação com os sinais de carbono em δ 46,97 (C-11), em δ 51,26 (C-8), em δ 38,32 (C-9) e em δ 59,29 (C-10) (Figura 54 e 55, pág. 80 e 81).

O sinal de H-8 em δ 1,37 mostrou correlação com o sinal de carbono em δ 41,12 (C-13 ou C-14) (Figura 55, pág. 81).

O sinal de C-8 em δ 51,26 mostrou correlação com o sinal de hidrogênio em δ 0,97. Como esse sinal se refere a hidrogênio de carbono metílico e o sinal dos hidrogênios de C-25 já foi determinado, há possibilidade de correlação apenas com os hidrogênios de C-26 (Figura 54 e 55, pág. 80 e 81).

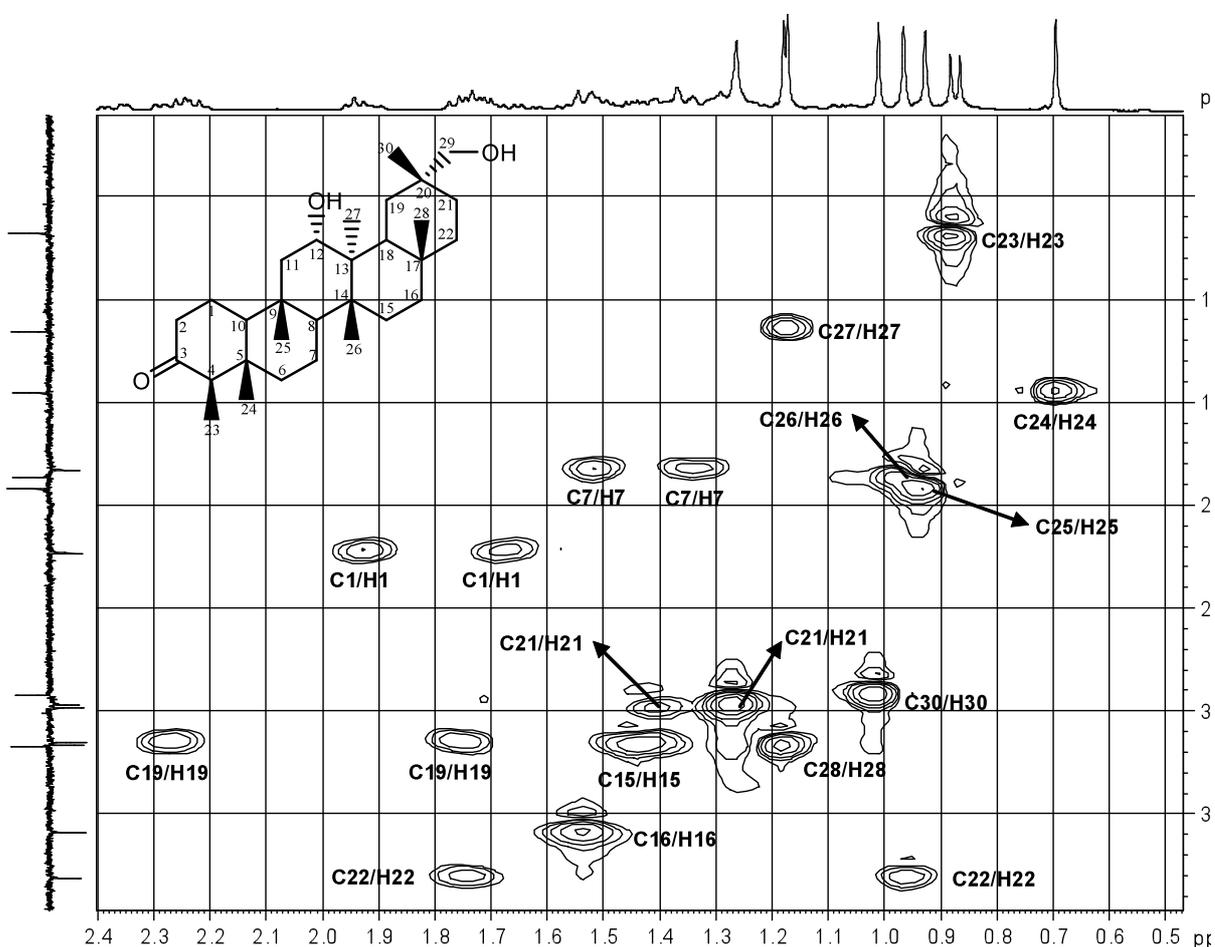


Figura 52: Expansão do mapa de contornos HSQC (400 MHz) de **MG08** em $\text{CDCl}_3 + \text{Piridina-d}_5$.

O sinal de H-26 em δ 0,97 mostrou correlação com os sinais de carbono em δ 51,26 (C-8), δ 41,12 (C-13 ou C-14) e δ 44,80 (C-13 ou C-14) (Figura 54 e 55, pág. 80 e 81).

Os sinais de carbono em δ 41,12 e δ 44,80 (C-13 e/ou C-14) mostraram correlação com o sinal de hidrogênio de metila em δ 1,17, sendo este atribuído a H-27 (Figura 54 e 55, pág. 80 e 81). Visto que, o sinal dos hidrogênios da metila C-26 já foi atribuído.

O sinal de H-27 em δ 1,17 mostrou correlação com os sinais de carbono em δ 44,29 (C-18), δ 41,12 (C-13 ou C-14), δ 44,80 (C-13 ou C-14) e em δ 72,06, este sinal só pode ser de C-12 (Figura 54 e 55, pág. 80 e 81). Como o sinal de C-12 está na região de carbono hidroxilado determinou-se a localização de uma das hidroxilas.

O sinal de H-18 em δ 1,94 mostrou correlação com os sinais de carbono em δ 11,58 (C-27), em δ 31,73 (C-28), em δ 31,32 (C-17), em δ 44,80 (C-13 ou C-14), em δ 31,67 (C-19 ou C-22), em δ 38,12 (C-19 ou C-22) e em δ 33,34 (C-20) (Figuras 54 e 55, pág. 80 e 81).

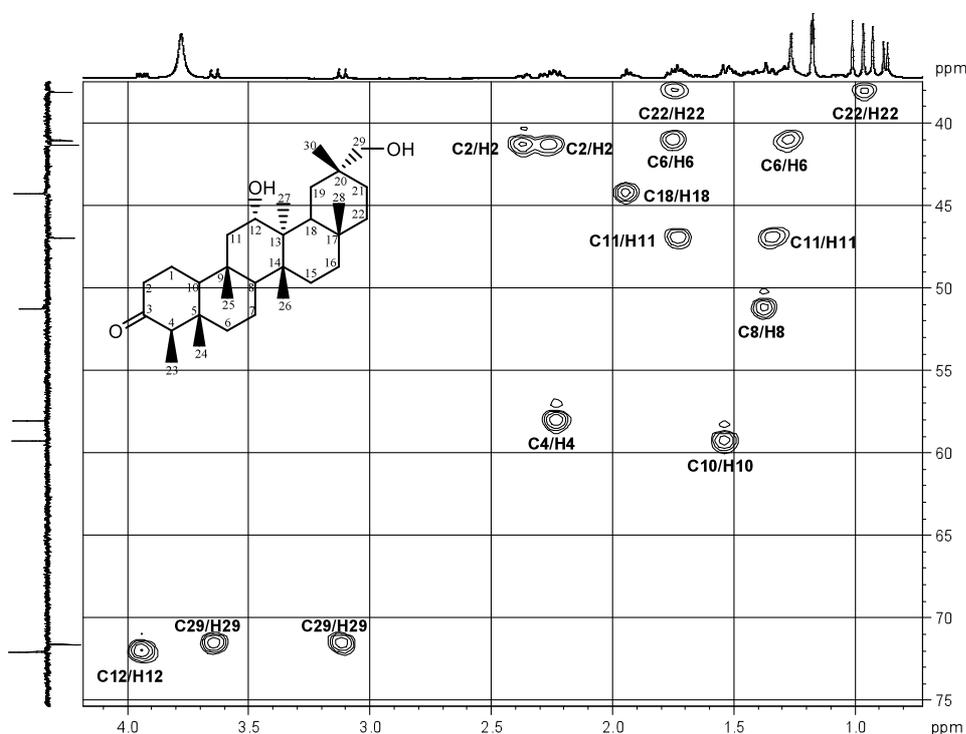


Figura 53: Expansão do mapa de contornos HSQC (400 MHz) de **MG08** em $\text{CDCl}_3 + \text{Piridina-d}_5$.

O sinal de H-28 em δ 1,18 mostrou correlação com os sinais de carbono em δ 31,32 (C-17), em δ 44,29 (C-18), δ 35,90 (C-16 ou C-22) e em δ 38,12 (C-16 ou C-22) (Figura 54 e 55, pág. 80 e 81).

Como o sinal de carbono em δ 38,12 mostrou correlação com os sinais de hidrogênio em δ 1,94 (H-18) e em δ 1,18 (H-28) este foi atribuído ao carbono 22, consequentemente δ_c 31,67 foi atribuído a C-19 e δ_c 35,90 a C-16.

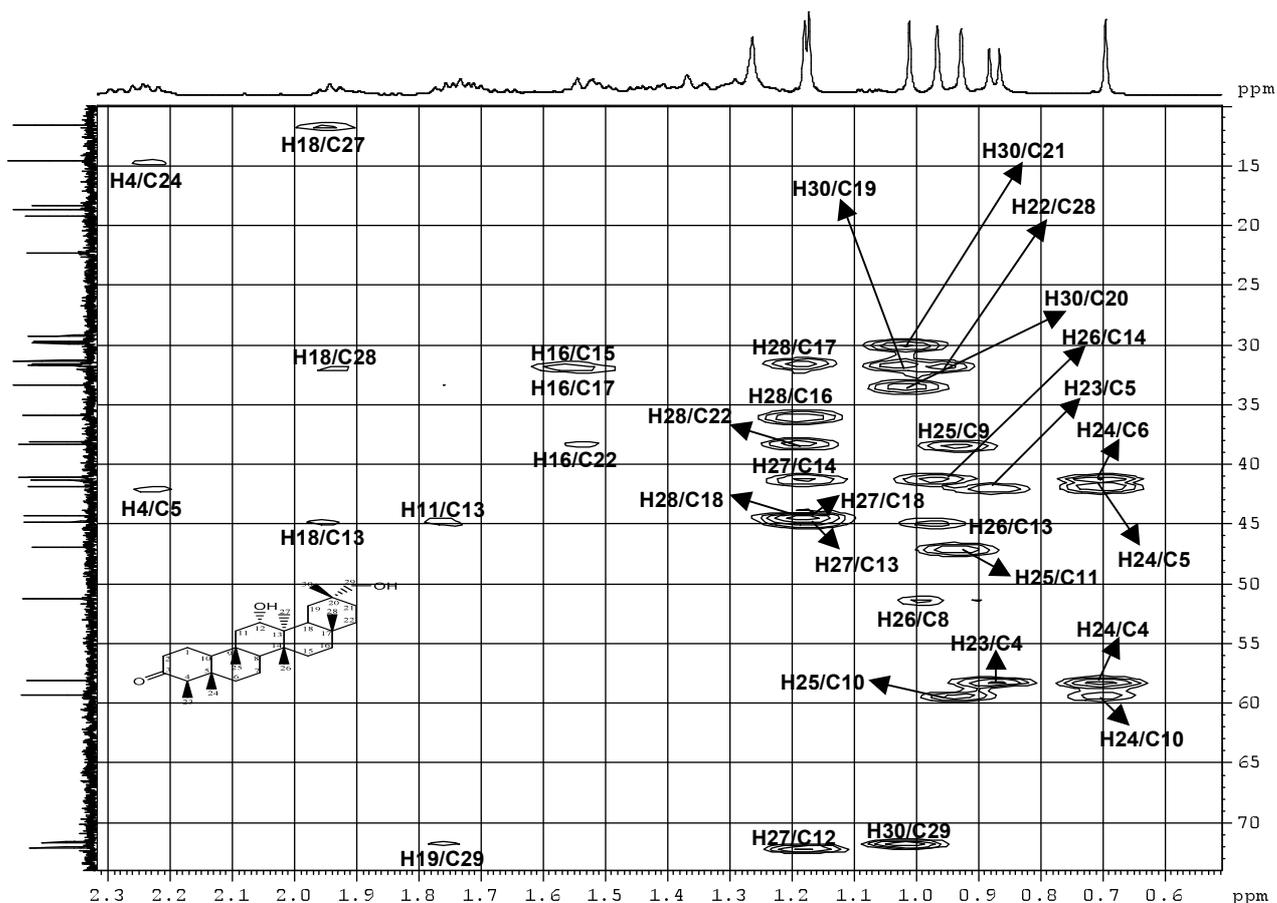


Figura 54: Expansão do mapa de contornos HMBC (400 MHz) de **MG08** em CDCl_3 + Piridina- d_5 .

O sinal de H-11 em δ 1,75 mostrou correlação com o sinal de carbono em δ 44,80, que só pode ser C-13 (Figura 54 e 55, pág. 80 e 81). Desta forma, definiu-se o sinal do C-13 em δ 44,80 e de C-14 em δ 41,12.

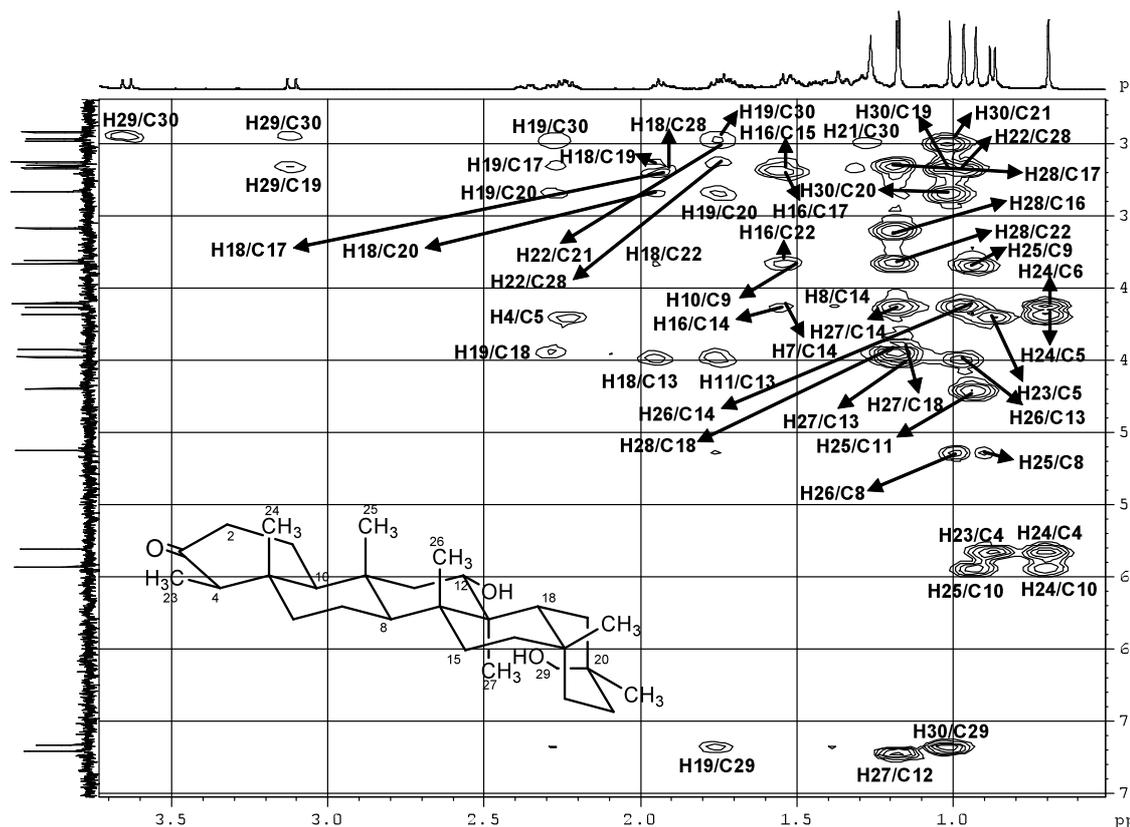


Figura 55: Expansão do mapa de contornos HMBC (400 MHz) de **MG08** em CDCl_3 + Piridina- d_5 .

Um dos sinais de H-22 em δ 1,75 mostrou correlação com os sinais de carbono em δ 31,73 (C-28) e em δ 29,86 (C-21) e o outro sinal em δ 0,96 mostrou correlação com o sinal de carbono em δ 31,73 (C-28). Desta forma, foi possível confirmar o sinal de C-19 em δ 31,67 e definir C-21 em δ 29,86 (Figura 55, pág. 81).

O sinal de H-16 em δ 1,54 mostrou correlação com os sinais de carbono em δ 41,12 (C-14), em δ 38,12 (C-22), em δ 31,32 (C-17) e em δ 31,55 (C-15) (Figuras 54 e 55, pág. 80 e 81).

O sinal de C-14 em δ 41,12 mostrou correlação com os sinais de CH_2 em δ 1,53 sendo este atribuído a H-7, visto que os outros sinais de CH_2 que poderiam acoplar com C-14 já foram atribuídos.

O sinal de H-19 em δ 2,26 mostrou correlação com os sinais de carbono em δ 31,32 (C-17), em δ 33,34 (C-20) e em δ 44,29 (C-18) (Figura 55, pág. 81).

A partir da análise dos mapas de correlações NOESY de **MG08** foi possível definir a estereoquímica da molécula e localizar a outra hidroxila.

No mapa de correlações NOESY de **MG08** observou-se que o sinal de hidrogênio em δ 0,87 (H-23) mostrou correlação com os sinais de hidrogênio em δ 2,22 (H-4ax), em δ 2,26 (H-2ax), em δ 1,75 (H-6eq) e em δ 0,70 (H-24) (Figura 56, pág. 83). O sinal de hidrogênio em δ 0,70 (H-24) mostrou correlação com os sinais de hidrogênio em δ 1,67 (H-1ax), em δ 1,75 (H-6eq) e em δ 0,93 (H-25) (Figura 56, pág. 83). O sinal de hidrogênio em δ 0,93 (H-25) mostrou correlação com os sinais de hidrogênio em δ 1,75 (H-11eq) (Figura 57, pág. 84) e em δ 3,94 (H-12) (Figura 57, pág. 84). O sinal de hidrogênio em δ 3,94 (H-12) mostrou correlação com os sinais de hidrogênio em δ 0,97 (H-26), em δ 1,75 (H-11eq) e em δ 1,94 (H-18) (Figura 57, pág. 84), ficando assim estabelecido que H-12 está na posição axial. O sinal de hidrogênio em δ 2,22 (H-4ax) mostrou correlação com os sinais de hidrogênio em δ 1,26 (H-6ax) e em δ 1,57 (H-10) (Figura 56, pág. 83). O sinal de hidrogênio em δ 1,37 (H-8) mostrou correlação com os sinais de hidrogênio em δ 1,17 (H-27) e em δ 1,57 (H-10) (Figura 56, pág. 83). O sinal de hidrogênio em δ 1,94 (H-18) mostrou correlação com o sinal de hidrogênio em δ 1,18 (H-28) e em δ 0,97 (H-26) (Figura 56). Essas correlações estabelecem que os anéis B, C e D do esqueleto friedelânico estão na forma de cadeira (Figura 58, pág. 85).

O sinal de hidrogênio em δ 1,18 (H-28) mostrou correlação com o sinal de hidrogênio em δ 2,26 (H-19ax) (Figura 56, pág. 83). O sinal de hidrogênio em δ 2,26 (H-19ax) mostrou correlação com o sinal de hidrogênio em δ 1,26 (H-21ax) (Figura 56, pág. 83). O sinal de hidrogênio em δ 1,75 (H-22ax) mostrou correlação com o sinal de hidrogênio em δ 1,17 (H-27) (Figura 56, pág. 83). O sinal de hidrogênio em δ 1,17 (H-27) mostrou correlação com o sinal de hidrogênio em δ 3,64, que foi atribuído ao hidrogênio da metila 29 (Figura 57, pág. 84). Como esse sinal está na região de carbono hidroxilado localizou-se a outra hidroxila. O sinal de hidrogênio em δ 3,64 (H-29b) mostrou correlação com o sinal de hidrogênio em δ 1,75 (H-22ax) (Figura 57, pág. 84). O sinal de hidrogênio em δ 3,12 (H-29a) mostrou correlação com o sinal de hidrogênio em δ 1,01 (H-30) (Figura 57). Essas correlações estabelecem que o anel E do esqueleto friedelânico também está na forma de cadeira (Figura 58, pág. 85).

Correlações no mapa de contornos HMBC confirmaram a posição da hidroxila em C-29.

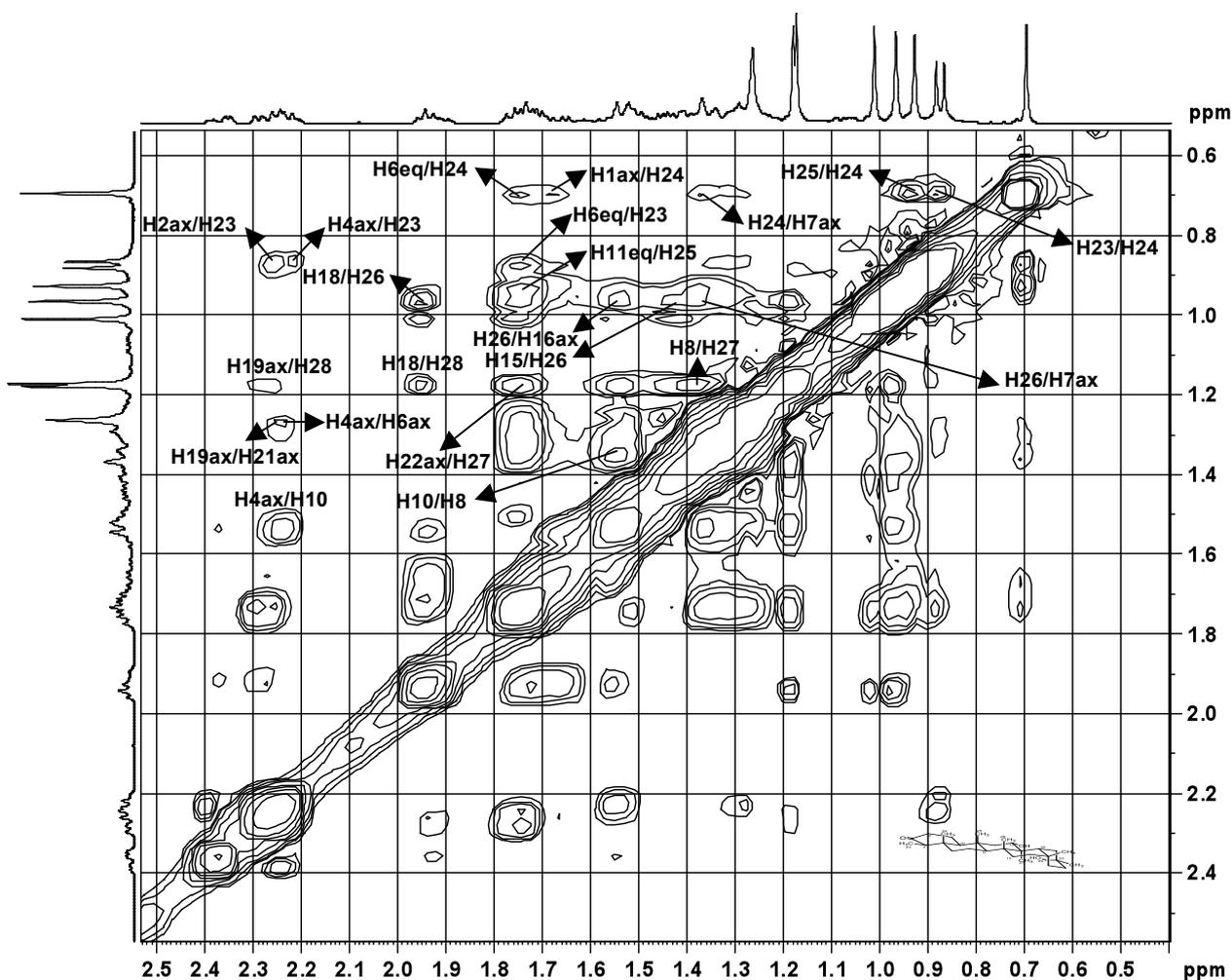


Figura 56: Expansão do mapa de correlações espaciais NOESY (400 MHz) de **MG08** em CDCl_3 + Piridina- d_5 .

O sinal de C-20 em δ 33,34 mostrou correlação com o sinal de hidrogênio em δ 1,01 (C-30) (Figura 54, pág. 80).

O sinal de H-30 em δ 1,01 mostrou correlação com os sinais de carbono em δ 33,34 (C-20), em δ 71,62 (C-29), δ 29,86 (C-21) e em δ 31,67 (C-19) (Figura 54 e 55, pág. 80 e 81).

O sinal de H-21 em δ 1,26 mostrou correlação com o sinal de carbono em δ 29,23 (C-30) (Figura 55, pág. 81).

O sinal de C-30 em δ 29,23 mostrou correlação com o sinal de hidrogênio em δ 3,12 (H-29) e em δ 3,64 (H-29), confirmando o sinal de C-29 em δ 71,62 (Figura 55, pág. 81).

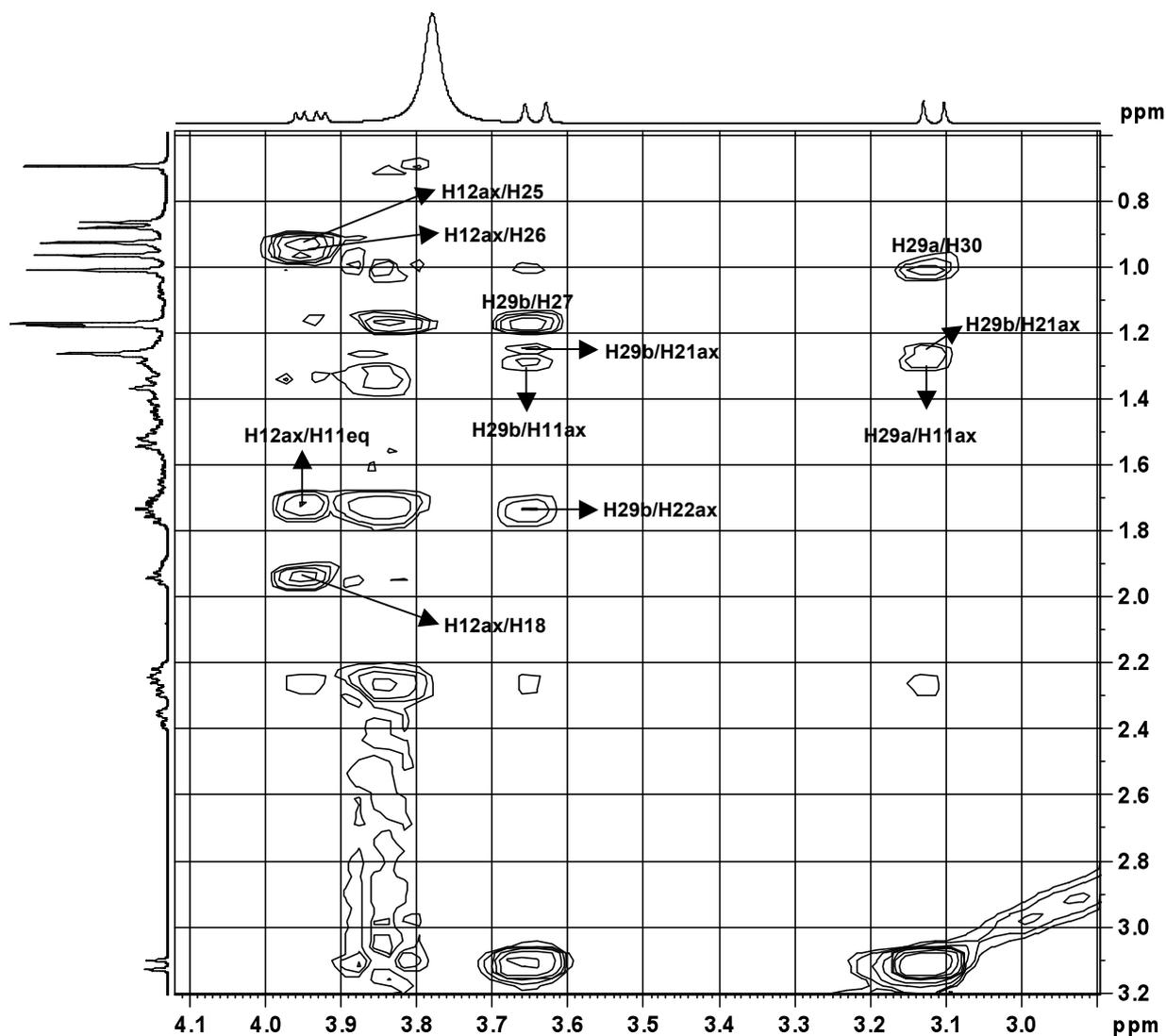


Figura 57: Expansão do mapa de correlações espaciais NOESY (400 MHz) de **MG08** em CDCl₃ + Piridina-d₅.

O sinal de H-29 em δ 3,12 mostrou correlação com o sinal de carbono em δ 31,67 (C-19) (Figura 55, pág. 81).

O sinal de H-19 em δ 1,75 mostrou correlação com os sinais de carbono em δ 29,23 (C-30) e em δ 71,62 (C-29) e o outro sinal em δ 2,26 mostrou correlação com o sinal de carbono em δ 29,23 (C-30) (Figura 55, pág. 81).

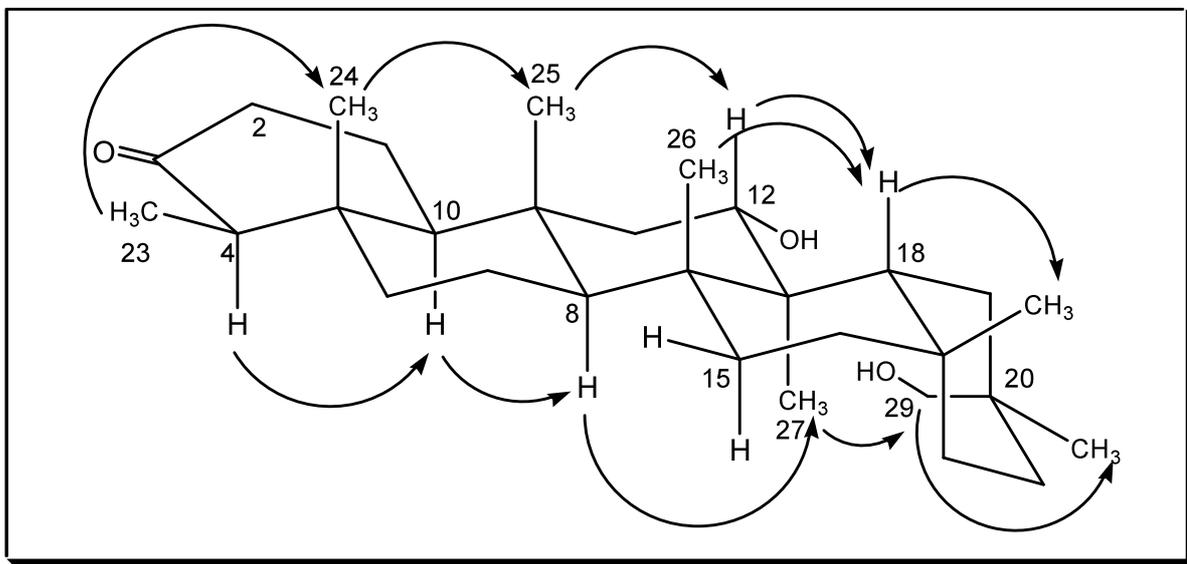


Figura 58: Algumas correlações de **MG08** de acordo com o estudo do mapa de correlações espaciais NOESY.

A análise dos espectros de RMN 1D e 2D permitiram atribuir o deslocamento químico de todos os hidrogênios e carbonos para **MG08**. Estes dados estão listados na Tabela 18, pág. 87, juntamente com os dados da literatura para o 3-oxo-12 α -hidroxifriedelano (OLIVEIRA *et al.*, 2007).

A presença do fragmento $m/z = 423,35$ (24 %) no espectro de massas (EM-ESI, modo positivo) (Figura 59, pág. 86) confirmou a estrutura do composto. Esse fragmento refere-se à massa do composto com um hidrogênio a mais e a perda de duas moléculas de H₂O [$M + H - 2H_2O$] sendo que esse tipo de fragmentação é comum em triterpenos pentacíclicos hidroxilados, como por exemplo, na betulina. A perda de duas moléculas de água na betulina ocorreu devido aos dois grupos hidroxilas, como observado para (**MG08**) (RHOURE-FRIH *et al.*, 2009). Desta forma, (**MG08**) foi identificado como 3-oxo-12 α ,29-di-hidroxifriedelano, sendo, portanto, um composto inédito.

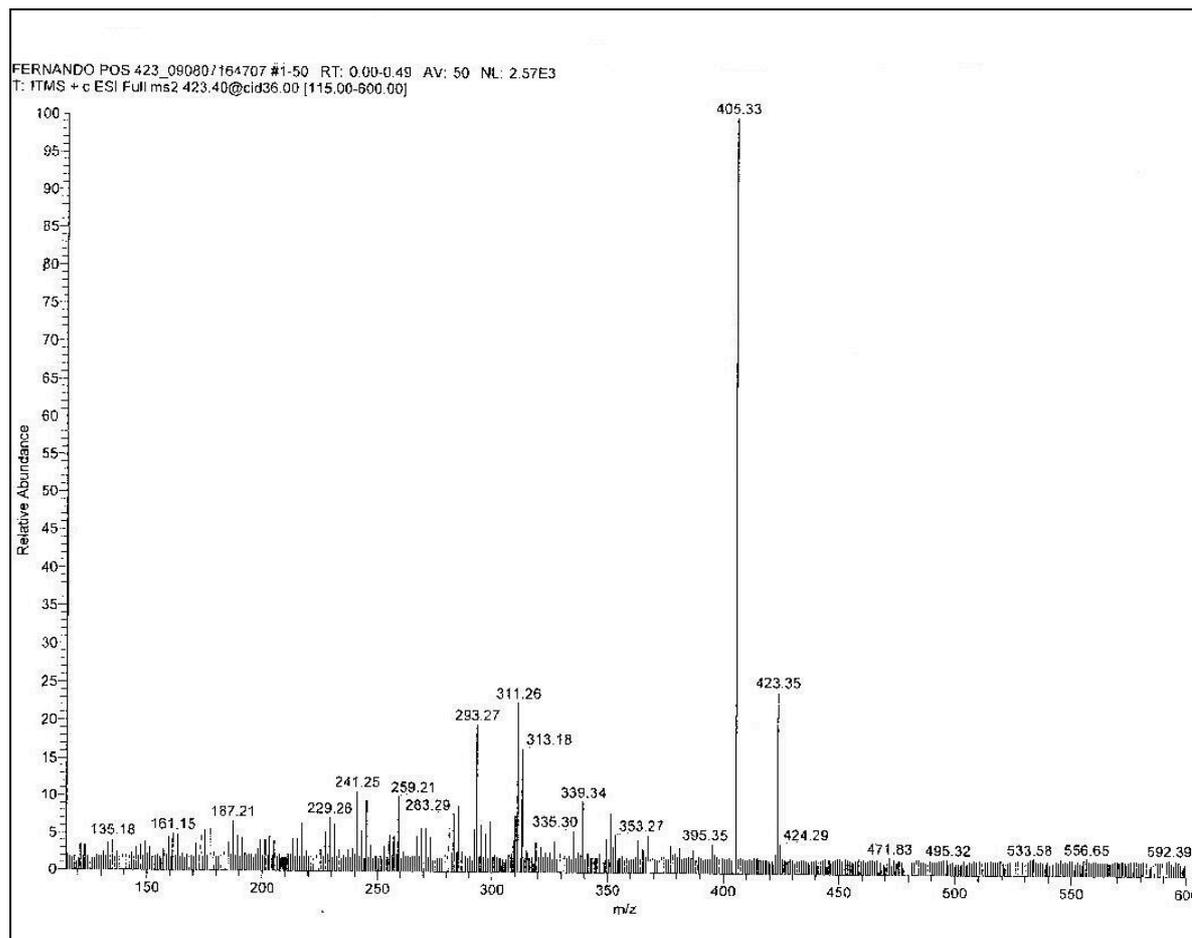


Figura 59: Espectro de massas (EM-ESI) de **MG08**. Condições de análise: modo positivo, temperatura do capilar 290 °C, gás N₂, tensão de spray de 4,8 KV e tensão capilar de 2,0 V.

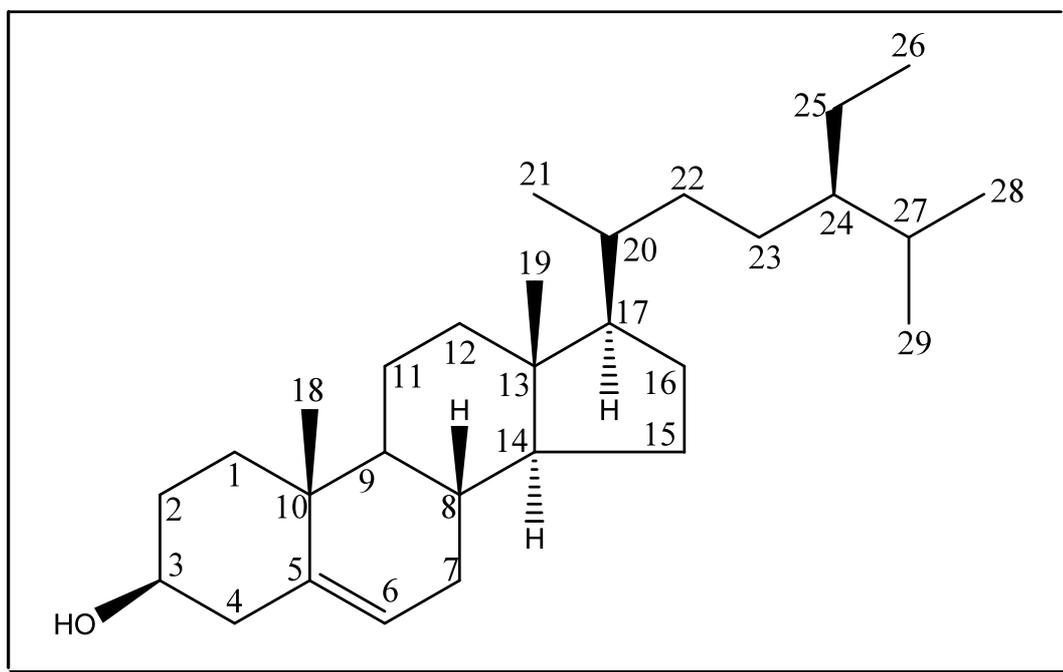
Tabela 18: Dados de RMN 1D e 2D (400 MHz) de **MG08** em CDCl₃ + Piridina-d₅

Nº	δ_C	* δ_C (OLIVEIRA <i>et al.</i> , 2007)	Tipo de car- bono	** δ_H	HMBC	NOESY
1	22,34	22,3	CH ₂	1,67 ax; m e 1,93 eq; m		24
2	41,35	41,4	CH ₂	2,26 ax; J = 6,2 e 14,6; dd e 2,35 eq; J = 3,2 e 14,6; dd		23
3	212,67	212,7	C	-		
4	58,07	58,1	CH	2,22; J = 7,0; q	5, 24	H 6ax, 10, 23
5	41,84	41,9	C	-		
6	41,06	41,2	CH ₂	1,26 ax; m e 1,75 eq; m		4ax, 23, 24
7	18,31	18,1	CH ₂	1,35 ax; m e 1,53 eq; m	14	
8	51,26	52,9	CH	1,37; m	14	10, 27
9	38,32	38,2	C	-		
10	59,29	59,4	CH	1,57; m	9	4ax, 8
11	46,97	47,4	CH ₂	1,34 ax; m e 1,75 eq; m		12ax, 25
12	72,06	72,7	CH	3,94; J = 4,4 e 11,2; dd		11eq, 18, 26
13	44,80	45,3	C	-		
14	41,12	40,4	C	-		
15	31,55		CH ₂	1, 44; m		26
16	35,90	36,1	CH ₂	1,54; m	14, 15, 17, 22	
17	31,32	30,8	C	-		
18	44,29	44,2	CH	1,94; m	13, 17, 19, 20, 22, 27, 28	12ax, 26, 28
19	31,67		CH ₂	2,26 ax; m e 1,75 eq; m	17, 18, 20, 21, 29, 30	21ax, 28
20	33,34		C	-		
21	29,86		CH ₂	1,40 eq; m e 1,26 ax; m	30	19ax
22	38,12	39,6	CH ₂	0,96 eq; m e 1,75 ax; m	21, 28	29b
23	6,80	6,8	CH ₃	0,87; J = 7,0; d	4, 5	2ax, 4ax, 6eq, 24
24	14,57	14,6	CH ₃	0,70; s	4, 5, 6, 10	1ax, 6eq, 23, 25
25	19,22	19,3	CH ₃	0,93; s	8, 9, 10, 11	11eq, 12ax, 24
26	18,66		CH ₃	0,97; s	8, 13, 14	12ax, 15eq, 18
27	11,58	11,6	CH ₃	1,17; s	12, 13, 14, 18	8, 29b
28	31,73	31,8	CH ₃	1,18; s	16, 17, 18, 22	18, 19ax
29	71,62		CH ₂	3,12 a; J = 11,2; d e 3,64 b; J = 10,8; d	19, 30	22ax, 27, 30
30	29,23		CH ₃	1,01; s	19, 20, 21, 29	29a

* 3-oxo-12 α -hidroxifriedelano (OLIVEIRA *et al.*, 2007).

** Os valores de J são dados em Hz.

1.2.8 – MG09: β -Sitosterol



MG09 foi isolado de FH2 e FH3, conforme representado nos esquemas 18 e 19 pág. 40 e 42. Apresentou-se como sólido branco, totalmente solúvel em clorofórmio e de faixa de fusão 136-139 °C. A fórmula molecular foi determinada como $C_{29}H_{50}O$ baseada no experimento de RMN de ^{13}C . O teste LB foi positivo para esteroide (coloração esverdeada). A análise por CCD deste sólido usando diferentes eluentes evidenciou a existência de uma mancha rosa (revelador: ácido perclórico/vanilina).

O espectro na região do IV (Figura 60, p. 89), de **MG09** apresentou bandas de absorção em: 3417 cm^{-1} característica de estiramento da ligação OH de hidroxila, $2983\text{-}2865\text{ cm}^{-1}$ características de estiramento simétrico e assimétrico da ligação CH de compostos alifáticos, 1643 característica de estiramento de ligação dupla C=C, 1463 e 1375 cm^{-1} característica de deformação angular no plano de ligação simples CH de compostos alifáticos e 838 cm^{-1} característica de deformação angular fora do plano de ligação simples H-C= (BARBOSA, 2008). O perfil espectral sugere tratar-se de substância que possui hidroxila e ligação dupla C=C.

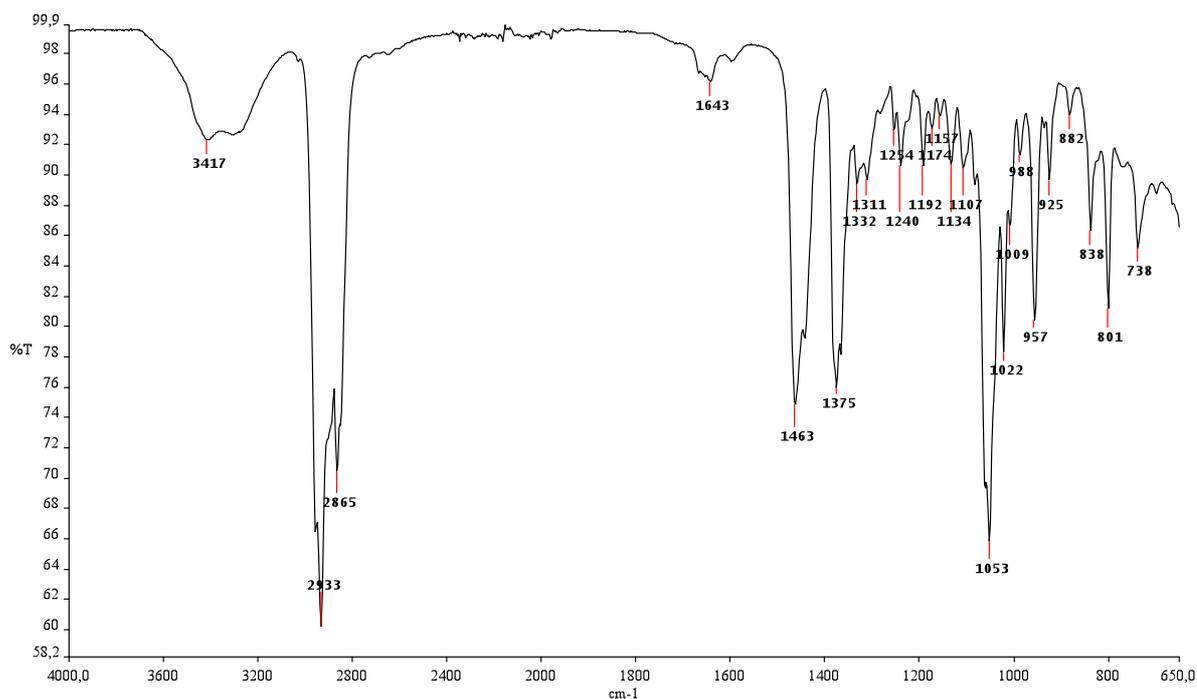


Figura 60: Espectro na região do IV de **MG09** (ATR).

O espectro de RMN de ^1H (Figura 61, pág. 90) apresentou sinais múltiplos na região entre δ_{H} 0,61 e δ_{H} 2,39, correspondentes aos sinais de hidrogênios metílicos, metilênicos e metínicos do esqueleto de um esteróide. Foi observado um multipletto entre δ_{H} 3,43 e δ_{H} 3,48 atribuído ao hidrogênio do carbono hidroxilado em C-3. O sinal em δ_{H} 5,28 foi atribuído ao hidrogênio olefínico H-6.

A análise do espectro de RMN de ^{13}C (Figura 62, pág. 90) e subespectro DEPT135 (Figura 63, pág. 91) indicou a presença de 28 sinais, sendo 6 CH_3 , 11 CH_2 , 9 CH e 2 C . O sinal em δ_{C} 42,31 foi atribuído aos carbonos em C-4 e em C-13, conforme verificado na literatura (OLIVEIRA, 2004; MIRANDA, 2007). O sinal em δ_{C} 71,81 foi atribuído ao carbono hidroxilado e os sinais em δ_{C} 121,73 e δ_{C} 140,74 foram atribuídos aos carbonos olefínicos.

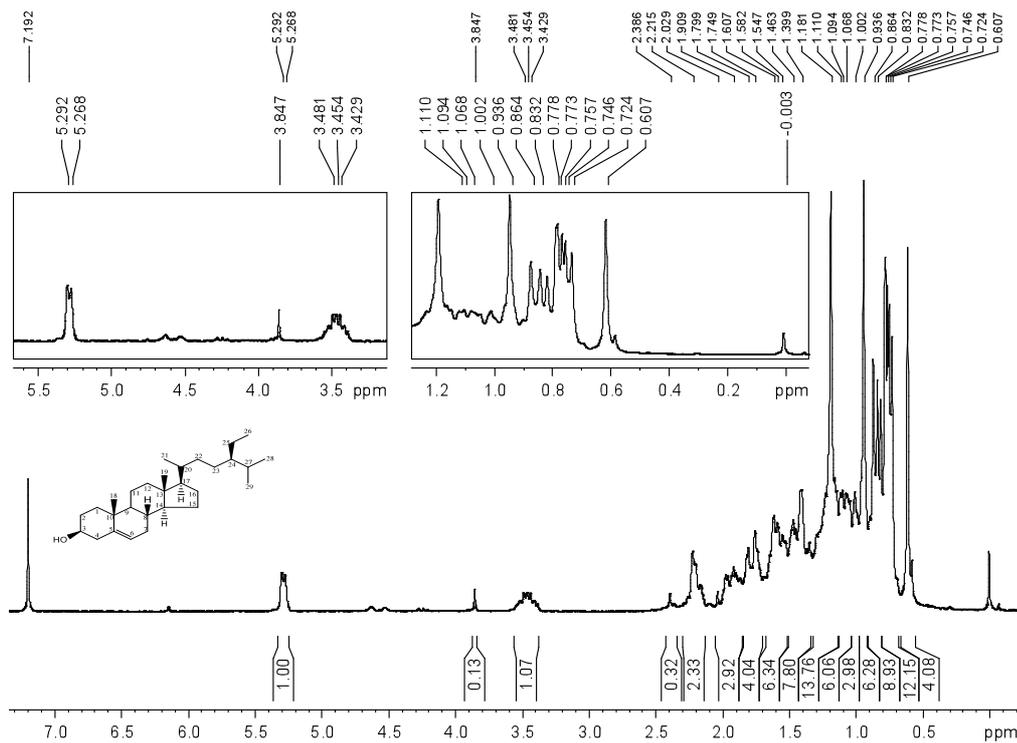


Figura 61: Espectro de RMN de ^1H (200 MHz) de **MG09** em CDCl_3 .

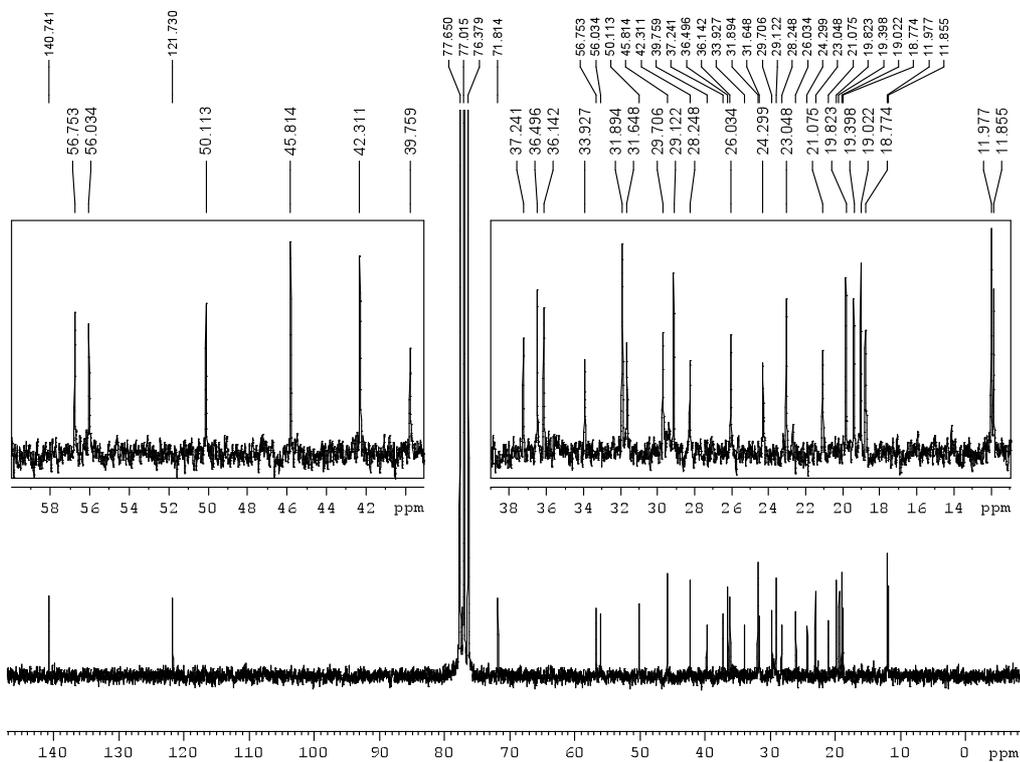


Figura 62: Espectro de RMN de ^{13}C (50 MHz) de **MG09** em CDCl_3 .

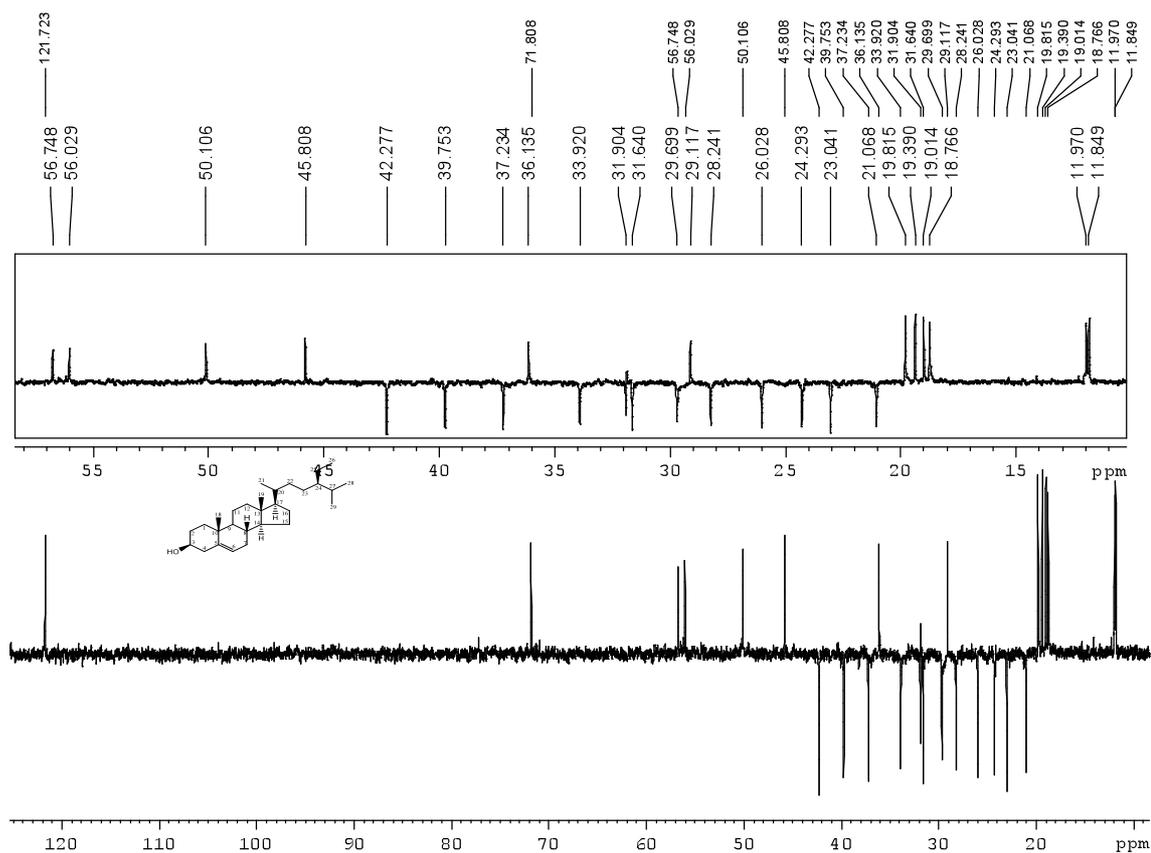


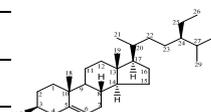
Figura 63: Subespectro DEPT135 (50 MHz) de **MG09** em CDCl₃.

A comparação dos sinais do espectro de RMN de ¹³C com os dados da literatura (SALAZAR, 2005) estão descritos na Tabela 19, pág. 92. Estes dados aliados a faixa de fusão 136-139 °C e a comparação direta com amostra autêntica permitiram identificar **MG09** como sendo β-sitosterol.

O β-sitosterol é um esteroide muito encontrado em espécies vegetais, e já foi isolado das folhas de *Maytenus gonoclada* (OLIVEIRA, 2007). Assim como, outras espécies da família Celastraceae, por exemplo, *Austroplenckia populnea* (DUARTE, 2000), *Maytenus acanthophylla* (OLIVEIRA, 2004), *M. truncata* (SALAZAR, 2005) e *M. salicifolia* (MIRANDA, 2007).

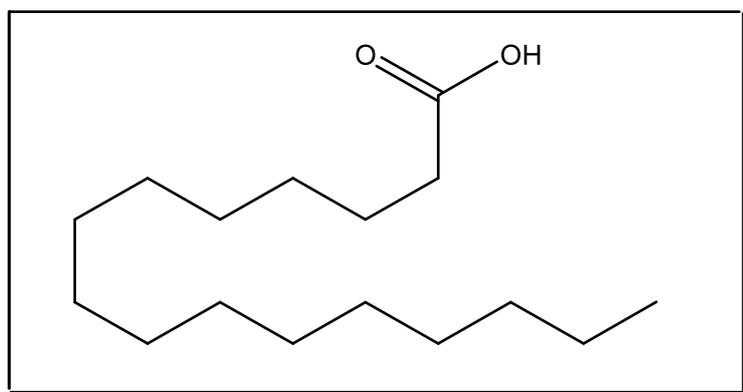
Tabela 19: Comparação dos dados de RMN de ^{13}C de **MG09** com os dados da literatura para o β -sitosterol (SALAZAR, 2005)

Nº	Tipo de carbono	δ_{C}^* de MG09	δ_{C}^* (SALAZAR, 2005)
1	CH ₂	37,24	37,30
2	CH ₂	31,65	31,71
3	CH	71,81	71,84
4	CH ₂	42,31	42,34
5	C	140,74	140,80
6	CH	121,73	121,72
7	CH ₂	31,89	31,96
8	CH	29,12	29,14
9	CH	50,11	50,20
10	C	36,50	36,54
11	CH ₂	21,08	21,12
12	CH ₂	39,76	39,82
13	C	42,31	42,36
14	CH	56,75	56,81
15	CH ₂	24,30	24,33
16	CH ₂	28,25	28,25
17	CH	56,03	56,12
18	CH ₃	11,86	11,88
19	CH ₃	19,02	19,07
20	CH	36,14	36,17
21	CH ₃	18,77	18,81
22	CH ₂	33,93	34,01
23	CH ₂	26,03	26,18
24	CH	45,81	45,91
25	CH ₂	29,71	29,20
26	CH ₃	19,82	19,82
27	CH	19,40	19,41
28	CH ₃	23,05	23,12
29	CH ₃	11,98	12,00



Solvente: $^*\text{CDCl}_3$

1.2.9 – MG10: Ácido palmítico



MG10 foi isolado de FH2, conforme representado na Figura 18 pág. 40. Apresentou-se como um sólido marrom pastoso e solúvel em clorofórmio. A fórmula molecular foi determinada como $C_{16}H_{32}O_2$ baseada no experimento de RMN de ^{13}C e de CG-EM. A análise por CCD deste sólido usando diferentes eluentes evidenciou a existência de uma mancha azul (revelador: ácido perclórico/vanilina).

O espectro na região do IV (Figura 64, pág. 94), de **MG10** apresentou bandas de absorção em 1698 cm^{-1} característica de estiramento de ligação dupla CO de ácido carboxílico envolvida em ligação de hidrogênio (PAVIA *et al.* 2001), em $1348\text{--}1187\text{ cm}^{-1}$ característica de deformação angular no plano de grupos CH_2 , comum de ácidos graxos de cadeia longa e em 938 cm^{-1} característica de deformação angular fora do plano de ligação O-H*** O no caso de dímero. A banda de estiramento de ligação OH de ácidos carboxílicos que se encontram associados por meio de ligação de hidrogênio ficam sobrepostas às bandas em $2955\text{--}2848\text{ cm}^{-1}$ características de estiramento simétrico e assimétrico da ligação CH de compostos alifáticos (BARBOSA, 2008).

O espectro de RMN de 1H (Figura 65, pág. 94) apresentou um tripleto em δ_H 2,34 ($J = 7,6\text{ Hz}$) atribuído ao hidrogênio adjacente a carbonila (PAVIA *et al.*, 2001). O sinal em δ_H 0,88 (t; $J = 6,6\text{ Hz}$) refere-se aos hidrogênios metílicos.

A análise do espectro de RMN de ^{13}C (Figura 66, pág. 95) indicou a presença de alguns sinais sobrepostos que juntamente com os demais totalizaram 16 sinais. Com o auxílio do subespectro DEPT 135 (Figura 67, pág. 95), estes sinais foram

classificados como sendo 1 CH₃, 14 CH₂ e 1 C. O sinal em δ_C 179,51 foi atribuído ao carbono carbonílico de ácido.

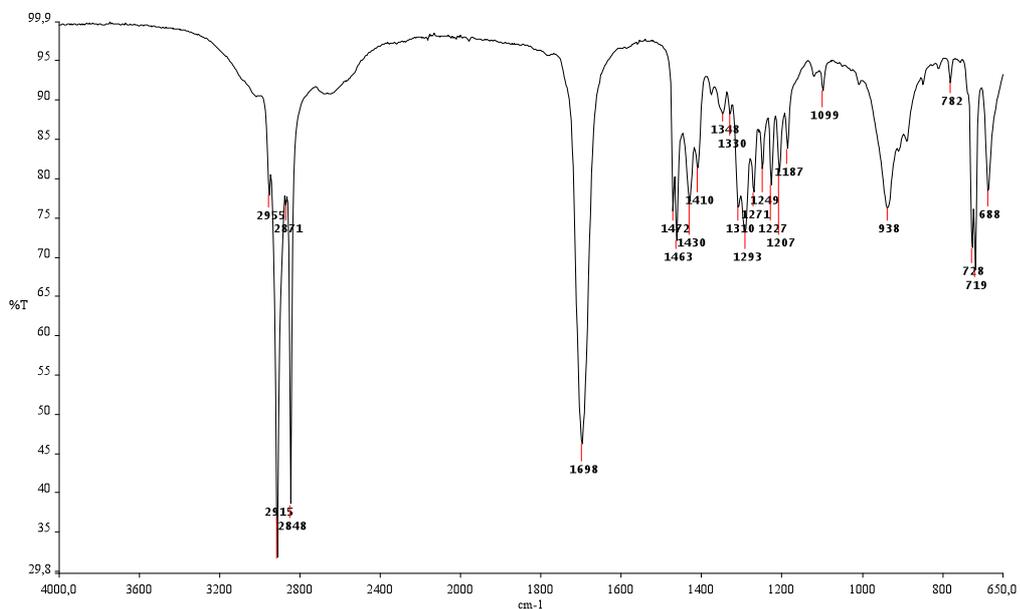


Figura 64: Espectro na região do IV de **MG10** (ATR).

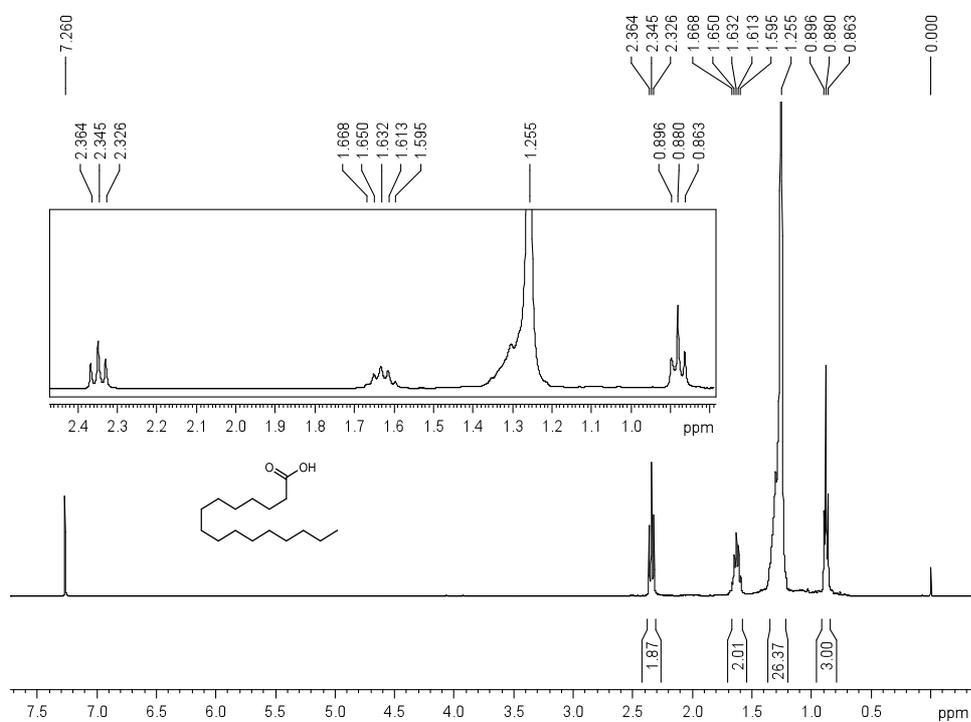


Figura 65: Espectro de RMN de ¹H (200 MHz) de **MG10** em CDCl₃.

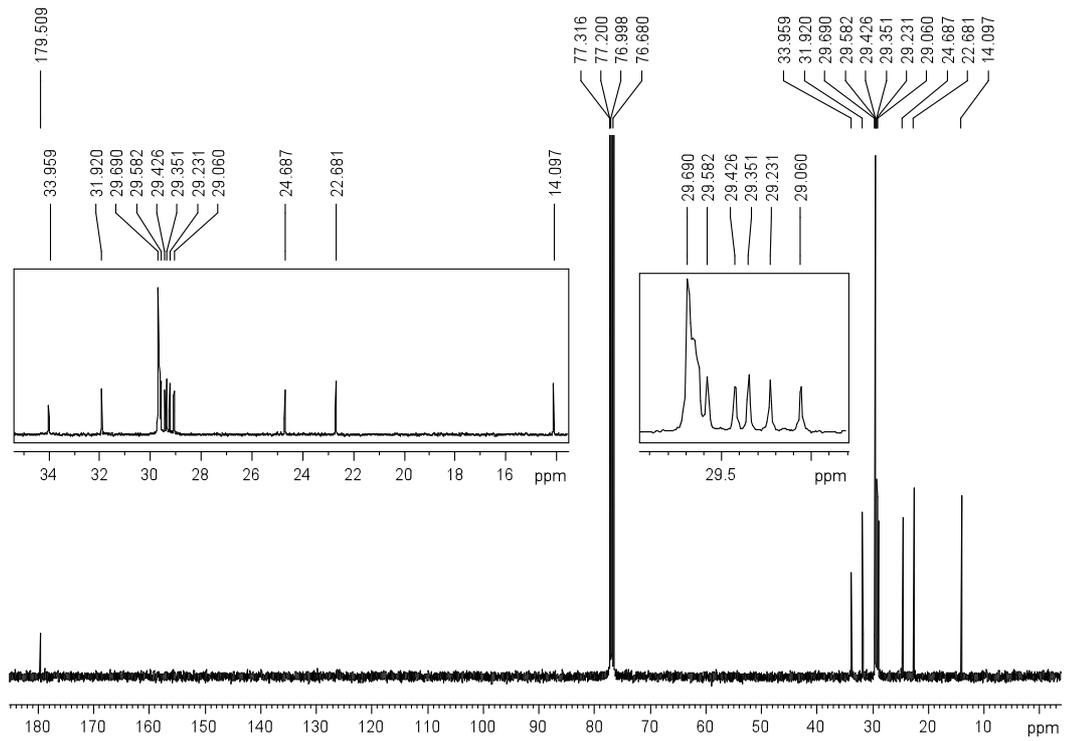


Figura 66: Espectro de RMN de ^{13}C (50 MHz) de **MG10** em CDCl_3 .

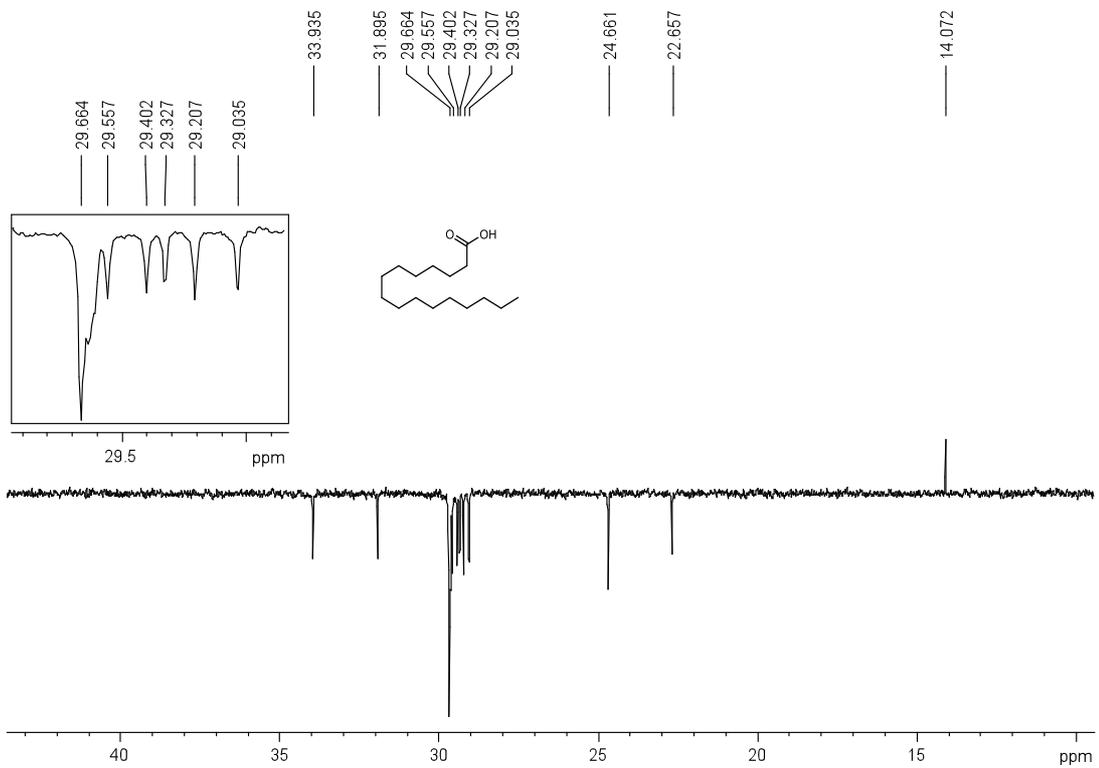


Figura 67: Subespectro DEPT135 (50 MHz) de **MG10** em CDCl_3 .

Foi realizada análise no CG-EM, a substância com fator de retenção 31,44 (Figura 68) foi fragmentada obtendo-se o espectro de massas (Figura 69). O pico do íon molecular é de 256,15 compatível com a fórmula molecular $C_{16}H_{32}O_2$. As possíveis fragmentações estão representadas na Figura 70, pág 97.

A comparação dos sinais do espectro de RMN de ^{13}C com os dados da literatura (COUPERUS *et al.*, 1978) estão descritos na Tabela 20, pág. 98. Estes dados aliados à comparação direta com amostra autêntica e as fragmentações obtidas no espectro de massas permitiram identificar **MG10** como sendo ácido palmítico.

É a primeira vez que se isola ácido palmítico de *Maytenus gonoclada*.

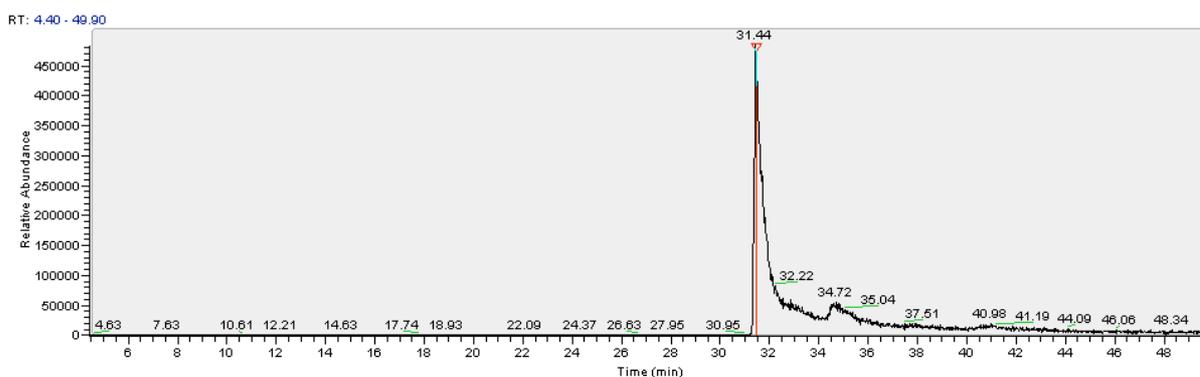


Figura 68: Cromatograma de **MG10**. Condições de análise: isotérmica 310 ° por 50 minutos.

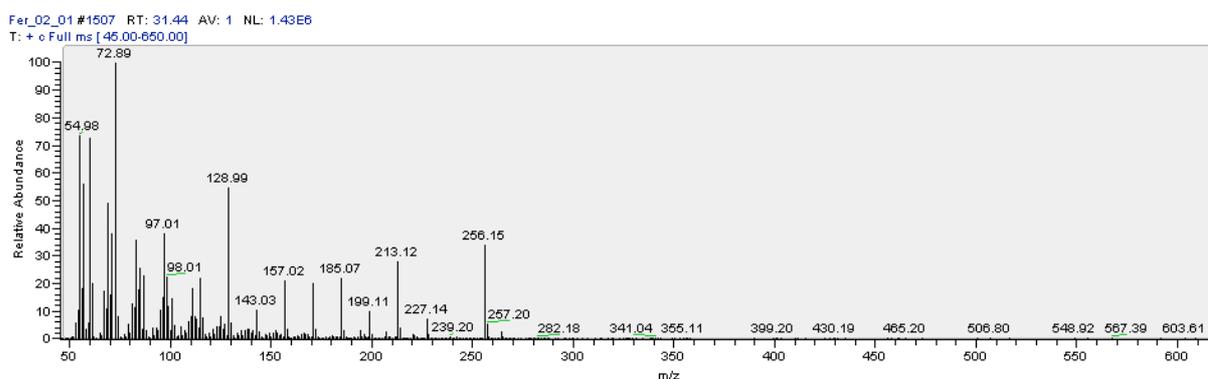


Figura 69: Espectro de massas de **MG10**.

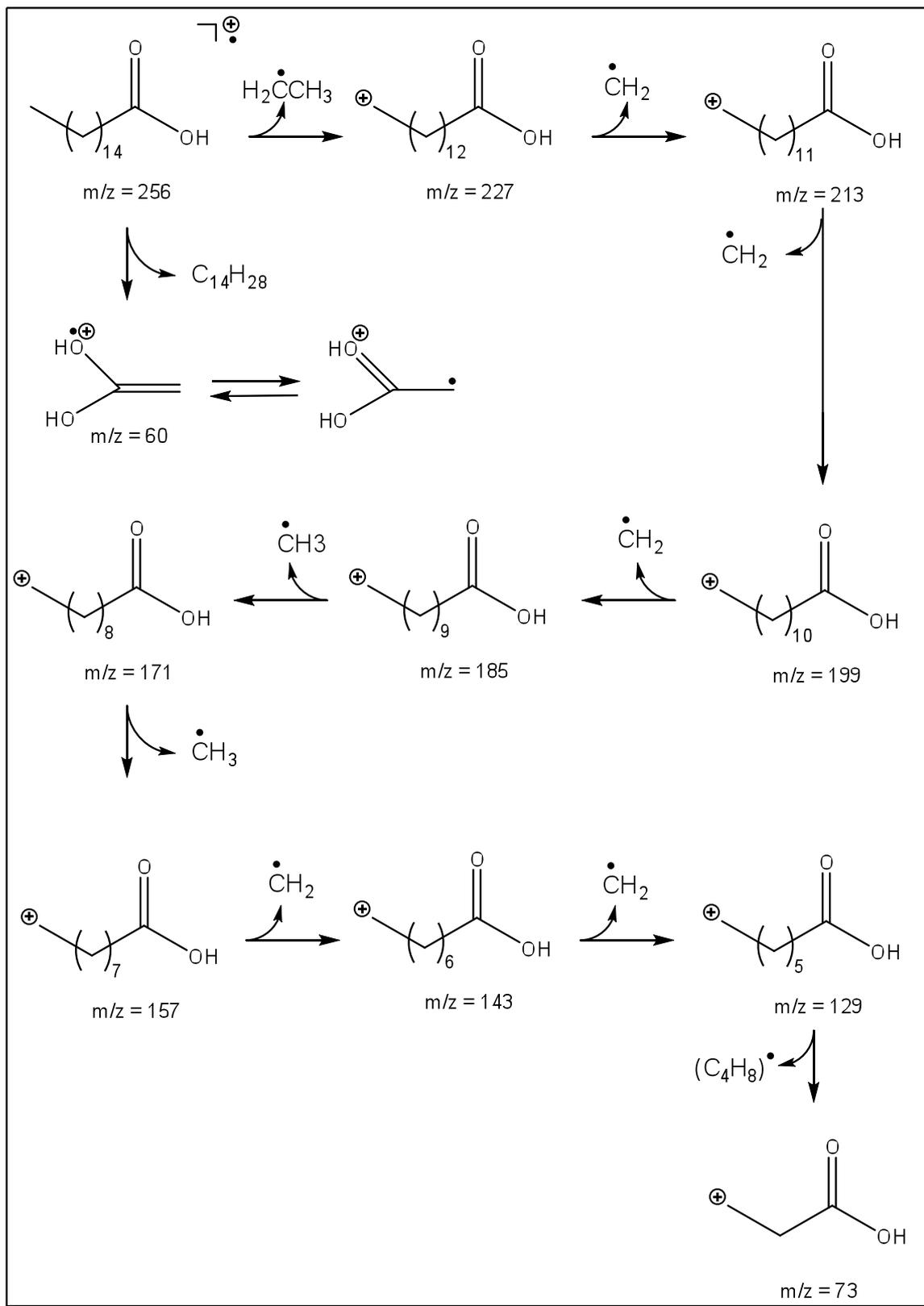
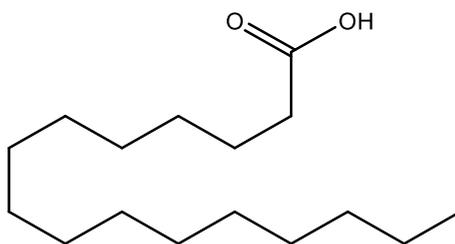


Figura 70: Algumas fragmentações de MG10.

Tabela 20: Comparação dos dados de RMN de ^{13}C de **MG10** com os dados da literatura para o ácido palmítico (COUPERUS *et al.*, 1978)

Nº	Tipo de carbono	δ_c^* de MG10	δ_c^* (COUPERUS <i>et al.</i> , 1978)
1	C	179,51	180,66
2	CH ₂	33,96	34,22
3	CH ₂	24,69	24,76
4	CH ₂	29,06	29,17
5	CH ₂	29,42	29,52
6	CH ₂	29,66	29,77
7	CH ₂	29,66	29,77
8	CH ₂	29,66	29,77
9	CH	29,66	29,77
10	CH	29,66	29,77
11	CH ₂	29,66	29,77
12	CH ₂	29,66	29,77
13	CH ₂	29,35	29,34
14	CH ₂	31,92	32,03
15	CH ₂	22,68	22,76
16	CH ₃	14,10	14,12

Solvente: $^*\text{CDCl}_3$



2 – ESTUDO DA ATIVIDADE BIOLÓGICA

2.1 – Introdução Geral

O estudo da atividade biológica do extrato hexânico dos galhos de *Maytenus gonoclada* e das substâncias isoladas foi direcionado para testes em que extratos de espécies da família Celastraceae e substâncias isoladas apresentaram atividade, conforme está descrito na Introdução, pág. 08 e 14. Entretanto, na medida em que parcerias com novos grupos de pesquisa surgiam outros testes foram realizados. O estudo da atividade biológica neste trabalho compreende:

- Estudo da atividade antimicrobiana (bactérias, fungos e protozoários);
- Estudo da atividade da capacidade de inibição da enzima acetilcolinesterase e,
- Estudo da atividade inseticida.

A obtenção das amostras utilizadas no estudo da atividade biológica estão representadas nas figuras 16, 17, 18 e 19 pág. 28, 34, 40 e 42.

Os testes antimicrobianos foram realizados em dois laboratórios diferentes, portanto, para facilitar o entendimento, os mesmos foram descritos separadamente.

2.1.1 – Atividade Antimicrobiana

2.1.1.1 – Introdução

O desenvolvimento de resistência a micróbios é um dos grandes problemas que afeta a sociedade e requer muitos estudos para o seu combate (DEMAIN E SANCHEZ, 2009). Os microrganismos que desenvolvem resistência contra agentes antimicrobianos são frequentemente, causadores das Doenças Infecciosas Emergentes. Essas doenças provocaram a morte de 15 milhões de pessoas em 2002 (SOTO, 2009). A Sociedade de Doenças Infecciosas da América (do inglês, IDSA) divulgou que em 2004 nos hospitais dos Estados Unidos, aproximadamente 2 milhões de pessoas adquiriram infecções bacterianas. A bactéria Gram-positiva

Staphylococcus aureus é a responsável por metade das infecções hospitalares e mata cerca de 100 mil pacientes a cada ano nos Estados Unidos (DEMAIN E SANCHEZ, 2009). Outra doença infecciosa que ainda mata muitas pessoas é a diarreia. Essa doença foi a causa de 1,9 milhões de mortes em 2002 (SOTO, 2009). *Escherichia coli* é uma das principais causadoras das infecções diarreicas bacterianas agudas e *Giardia lamblia* é a causa mais frequente de diarreia parasitária em pacientes imunossuprimidos (BALDI *et al.*, 2009). *G. lamblia* é o agente causador da giardíase, uma das mais comuns infecções parasitárias do trato intestinal humano. Para tratamento dessa doença utilizam-se os medicamentos da classe dos nitroimidazóis. Nos últimos anos muitos outros têm sido desenvolvidos, e várias substâncias sintéticas e naturais têm sido testadas na busca de novos compostos giardicida (BUSATTI *et al.*, 2009).

As infecções fúngicas também são uma das principais causas de mortalidade, principalmente em indivíduos imunossuprimidos. A frequência de infecções fúngicas continua a aumentar em consonância com a crescente população de pacientes imunossuprimidos, incluindo os indivíduos infectados com o HIV, bem como aqueles submetidos à quimioterapia, cirurgia de grande porte, ou transplante de órgãos sólidos etc. Infecções causadas por *Candida albicans* é a quarta causa mais comum de infecções hospitalares e a principal causa de candidíase sistêmica, com taxas de mortalidade se aproximando de 50% (COWEN *et al.*, 2009).

Desta forma, novos medicamentos que sejam ativos contra bactérias, protozoários e fungos resistentes são necessários. E os metabólitos secundários de plantas têm exercido um impacto importante sobre o controle de doenças, principalmente as infecciosas (DEMAIN E SANCHEZ, 2009).

Os testes antimicrobianos foram realizados nos seguintes laboratórios: Laboratório de Biotecnologia e Bioensaios coordenado pela Professora Dr^a. Jacqueline Aparecida Takahashi do Departamento de Química da UFMG e Laboratório de Amebíase e Protozoários Intestinais coordenado pela Professora Dr^a. Maria Aparecida Gomes do Departamento de Parasitologia da UFMG.

2.1.1.2 – Testes antimicrobianos realizados no Laboratório de Biotecnologia e Bioensaios

As culturas de microrganismos utilizadas neste experimento foram: duas bactérias Gram-positivas (*Staphylococcus aureus* ATCC (American Type Culture Collection) 25923 e *Escherichia coli* ATCC 25723), duas bactérias Gram-negativas (*Citrobacter freundii* ATCC 29935 e *Bacillus cereus* ATCC 11778), dois fungos, sendo um, levedura (*Candida albicans* ATCC 18804) e o outro filamentoso (*Cladosporium cladosporioides* ATCC 16022), utilizado somente no método de bioautografia.

A – Método de Difusão em Disco

Este método é um dos mais utilizados nos laboratórios de microbiologia no Brasil. O princípio deste método baseia-se na difusão, por meio do ágar, da amostra impregnada em um disco de papel-filtro. A difusão do antimicrobiano leva à formação de um halo de inibição do crescimento do microrganismo. É um método qualitativo (SEJAS *et al.*, 2003).

O teste de difusão em disco é um método prático, de fácil execução e idealizado para microrganismos de crescimento rápido. Entretanto, este método apresenta algumas limitações, como dificuldade na avaliação da suscetibilidade às amostras que difundem mal por meio do ágar (SEJAS *et al.*, 2003).

A.1 – Metodologia

Bactérias e fungos foram cultivados em um tubo de ensaio contendo 2,0 mL de meio BHI (*Broth Heart Infusion*) e incubados por 18 horas em estufa a 37 °C. Uma alíquota de 0,5 mL foi transferida para outro tubo contendo 4,5 mL de solução salina para produzir uma suspensão contendo aproximadamente 10⁵ UFC/mL. Dessa suspensão, 10 µL foram adicionados em 10 mL de ágar estéril a 40 °C. Em seguida, essa mistura foi depositada sobre uma placa de Petri contendo ágar. Foram pesados 1,0 mg de cada amostra a ser testada e dissolvidas em clorofórmio até completarem um volume de 1 mL. Com o auxílio de uma micropipeta, 100 µL da

solução foram aplicadas em cada disco de papel de 6 mm de diâmetro (100 µg/mL). Após a evaporação do solvente, 5 discos de cada amostra e dois discos contendo o controle (um positivo e o outro negativo), foram colocados na placa de ágar previamente inoculada. Para as bactérias, o controle positivo utilizado foi o cloranfenicol (30 µg/mL) e para a levedura utilizou-se o miconazol (50 µg/mL). Como controle negativo utilizou-se clorofórmio. O grau de resistência ou sensibilidade das bactérias e da levedura frente às amostras testadas foi determinado pela presença ou ausência de halos de inibição após 18 hs de incubação a 37 °C. A leitura dos halos de inibição foi feita medindo-se o diâmetro dos mesmos e os resultados expressos em milímetros. Como os testes foram realizados em triplicata, os resultados apresentados são os valores médios das três medições.

A.2 – Análise dos Resultados e Discussão

O extrato hexânico (**FH2**), duas misturas de triterpenos: 3-oxofriedelano e 3β-hidroxifriedelano (**MG01 e MG02**), 3,11-dioxofriedelano e 3,16-dioxofriedelano (**MG03 e MG04**), quatro triterpenos: 3-oxofriedelano (**MG01**), 3,16-dioxofriedelano (**MG04**), 3-oxo-12α-hidroxifriedelano (**MG05**) e 3-oxo-12α,29-di-hidroxifriedelano (**MG08**) foram testados contra *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Citrobacter freundii*, *Bacillus cereus* e *Candida albicans* por meio do método de difusão em disco.

O diâmetro dos halos de inibição do crescimento das bactérias e da levedura está listado na Tabela 21.

Tabela 21: Atividade antimicrobiana de **FH2**, **MG01**, **MG01** e **MG02**, **MG03** e **MG04**, **MG05** e **MG08** pelo método de difusão em disco (Concentração: 100 µg/mL)

Amostras	Halo de inibição (mm)				
	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>	<i>C. freundii</i>	<i>B. cereus</i>	<i>C. albicans</i>
FH2	8	ND	ND	ND	8
MG01	ND	ND	ND	ND	ND
MG01 e MG02	ND	ND	ND	ND	ND
MG03 e MG04	ND	ND	ND	ND	ND
MG04	ND	ND	ND	ND	ND
MG05	ND	ND	ND	ND	ND
MG08	ND	ND	ND	ND	ND
Clorofórmio^a	ND	ND	ND	ND	ND
Cloranfenicol^b	23	22	29	20	-
Miconazol^c	-	-	-	-	17

^aControle negativo. ^bControle positivo (bactérias). ^cControle positivo (levedura). ND (não detectado)

O extrato hexânico (**FH2**) foi ativo no método de difusão em disco. As misturas de triterpenos e os triterpenos puros não apresentaram halo de inibição frente aos microrganismos testados. Isso pode ser explicado pelo fato dos triterpenos pentacíclicos serem altamente hidrofóbicos, dificultando a difusão dos mesmos no meio.

Chiozem e colaboradores (2009) realizaram testes antimicrobianos pelo método de difusão em disco com seis triterpenos pentacíclicos. Um destes triterpenos testados foi 3-oxofriedelano, que apresentou um halo de inibição de 11 mm na concentração de 200 µg/mL frente a *S. aureus* (CHIOZEM *et al.*, 2009). A não detecção de halo de inibição para 3-oxofriedelano (**MG01**) nos testes realizados neste trabalho pode ser explicada pela diferença de concentração.

B – Método de Concentração Inibitória Mínima

A Concentração Inibitória Mínima (CIM) é a menor concentração da amostra capaz de inibir o crescimento microbiano. Neste método, a CIM é determinada com uma sequência decrescente de concentrações da amostra em um meio nutriente (líquido), que é inoculado com a concentração padronizada do microrganismo em teste. A leitura do teste é feita observando quais foram os sistemas nos quais não houve crescimento do microrganismo (LUCAS, 2008).

Este método não possibilita determinar se o efeito da amostra sobre o microrganismo causou sua morte (bactericida/fungicida) ou apenas impediu a multiplicação (bacteriostática/fungiostática) (LUCAS, 2008).

B.1 – Metodologia

Para a avaliação da CIM utilizou-se o teste de diluição em caldo de carne a partir de um inóculo padrão de 10^8 UFC/mL. Prepararam-se 10 tubos de ensaio esterilizados contendo 1,0 mL do meio de cultura BHI (37,0 g/L) cada e identificados de 1 a 10 para as diversas concentrações da amostra a ser testada. Foram pesados 2,05 mg de cada amostra e dissolvidas em DMSO até completarem um volume de 2,0 mL. Desta solução, transferiu-se 1,0 mL para o tubo 1, em seguida, adicionou-se 1,0 mL de DMSO no mesmo. Depois de homogeneizada a solução do tubo 1, retirou-se 1,0 mL para o tubo 2, em seguida, adicionou-se 1,0 mL de DMSO no mesmo. Estes procedimentos foram repetidos sucessivamente até o tubo 10, do qual 1,0 mL foi desprezado. Estas diluições em série forneceram as concentrações finais de 512, 256, 128, 64, 32, 16, 8, 4, 2 e 1 $\mu\text{g/mL}$. Para as bactérias, o controle positivo utilizado foi o cloranfenicol e para a levedura utilizou-se o miconazol. Como controle negativo utilizou-se DMSO. Adicionaram-se 100 μL do inóculo microbiano aos tubos de 1 a 10 e aos tubos contendo o controle positivo e negativo. Após incubação de 18 hs a 37 °C, a CIM é determinada visualmente. Estes testes foram realizados em duplicata com acordo total entre os dois resultados.

B.2 – Análise dos Resultados e Discussão

Como o extrato hexânico (**FH2**) apresentou halo de inibição contra a bactéria *Staphylococcus aureus* e a levedura *Candida albicans* realizou-se o teste de CIM. O triterpeno pentacíclico 3-oxo-12 α -hidroxifriedelano (**MG05**) não apresentou halo de inibição contra nenhum microrganismo testado, mas optou-se realizar o teste de CIM.

A CIM das amostras testadas está listada na Tabela 22.

Tabela 22: CIM do extrato hexânico (**FH2**) e de 3-oxo-12 α -hidroxifriedelano (**MG05**)

Amostras	Concentração Inibitória Mínima ($\mu\text{g/mL}$)				
	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>	<i>C. freundii</i>	<i>B. cereus</i>	<i>C. albicans</i>
FH2	512	NA	NA	NA	512
MG05	ND	ND	ND	ND	512
DMSO^a	ND	ND	ND	ND	ND
Cloranfenicol^b	32	8	4	8	-
Miconazol^c	-	-	-	-	16

^aControle negativo. ^bControle positivo (bactérias). ^cControle positivo (levedura). ND (não detectado). NA (não avaliado).

O extrato hexânico (**FH2**) apresentou CIM de 512 $\mu\text{g/mL}$ frente a *S. aureus* e *C. albicans*.

O 3-oxo-12 α -hidroxifriedelano (**MG05**) foi ativo contra a levedura *C. albicans*, apresentando um valor de CIM de 512 $\mu\text{g/mL}$.

O mecanismo de ação dos triterpenos não é bem entendido. Acredita-se que ocorre o rompimento da membrana da célula do microrganismo, visto que esses compostos são bastante lipofílicos (KUETE *et al.*, 2007; SALEEM *et al.*, 2010).

Apesar do método de difusão em disco e o de CIM serem bastante utilizados para avaliar a atividade antimicrobiana, os resultados obtidos para cada método podem diferir em muitos fatores, tais como: diferença no crescimento microbiano, exposição dos microrganismos as amostras, o uso e a quantidade de emulsificantes e outros compostos que são utilizados nos bioensaios etc (ARAÚJO *et al.*, 2009).

C – Método de Bioautografia

A bioautografia foi a primeira e bem sucedida tentativa em combinar ensaios químico-analíticos e biológicos de forma contínua. É um método simples que consiste na aplicação da amostra sobre uma placa de CCD e em seguida, o microrganismo ou a enzima é borrifado na mesma. Após um período de incubação, as zonas de inibição tornar-se-ão visíveis (POTTERAT E HAMBURGER, 2006).

A vantagem deste método está no custo e na possibilidade de acompanhamento de substâncias bioativas em misturas complexas, utilizando pequenas quantidades da amostra. Como os ensaios podem ser feitos em quase todos os laboratórios, têm-se tornado muito popular entre os pesquisadores de produtos naturais. Um fator limitante desta técnica refere-se a falta de dados quantitativos (POTTERAT E HAMBURGER, 2006).

C.1 – Metodologia

A suspensão fúngica foi padronizada em solução salina segundo a escala 0,5 de MacFarland.

Volumes de 5 μL das amostras em clorofórmio (20 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) foram aplicados sobre placas de sílica gel GF₂₅₄ (2,5 x 5,0 cm). A placa contendo o extrato foi submetida ao sistema eluente hexano:clorofórmio (1:9 v/v). Clorofórmio foi utilizado como controle negativo. Após secagem, as cromatoplasas foram depositadas em placas de Petri onde foram vertidos os meios de cultura ágar nutriente contendo a suspensão fúngica previamente padronizada. Após 3 dias de incubação à 30 °C, observou-se a existência ou não de halos de inibição nos bioautogramas. O teste foi realizado em duplicata.

C.2 – Análise dos Resultados e Discussão

O extrato hexânico (**FH2**), uma mistura de triterpeno, 3,11-dioxofriedelano e 3,16-dioxofriedelano (**MG03 e MG04**); três triterpenos, 3-oxofriedelano (**MG01**), 3 β -hidroxifriedelano (**MG02**) e 3-oxo-12 α -hidroxifriedelano (**MG05**); um esteroide, β -sitosterol (**MG09**) e dois ácidos graxos, ácido oléico (**MG07**) e ácido palmítico

(MG10) foram testados contra *Cladosporium cladosporioides* por meio do método de bioautografia.

Halos de inibição não foram detectados nos bioautogramas ensaiados frente ao fungo filamentososo testado (Figura 71).

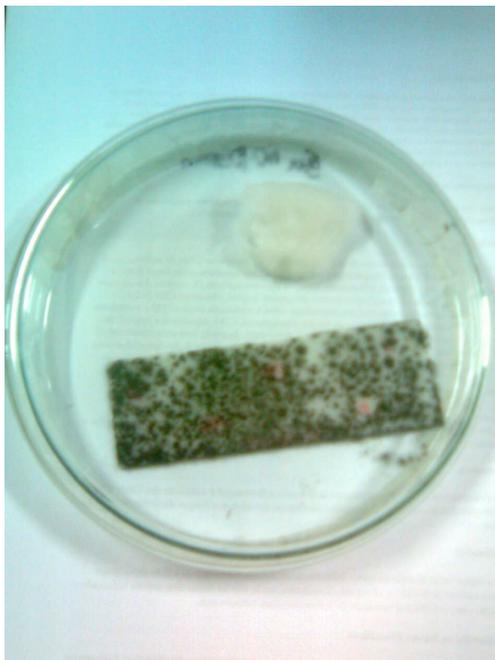


Figura 71: Bioautograma das amostras testadas frente ao fungo filamentososo *C. cladosporioides* (Foto: Fabiana de Moura).

2.1.1.3 – Testes antimicrobianos realizados no Laboratório de Amebíase e Protozoários Intestinais

O microrganismo utilizado neste experimento foi o protozoário *Giardia lamblia* ATCC 30888.

A – Método Colorimétrico

O método colorimétrico utilizado neste teste é simples, barato e confiável (BUSATTI E GOMES, 2007).

Após o término de incubação da amostra com os trofozoítos de *Giardia lamblia*, fixam-se as células dos mesmos com metanol e coram-se com azul de

metileno. A inclusão de azul de metileno nos trofozoítos é medida espectrofotometricamente para determinar a atividade giardicida da amostra, isto é, a ação da droga é avaliada pela intensidade do corante azul de metileno (BUSATTI E GOMES, 2007).

A.1 – Metodologia

Os trofozoítos foram cultivados em tubos de vidro contendo meio TYI-S-33 (KEISTER, 1983) e incubados em estufa bacteriológica com temperatura entre 35,5 e 37,0 °C. Os repiques, para manutenção, foram feitos a cada 72/96 horas. As culturas foram observadas em microscópio invertido, com objetiva de 100X, avaliando crescimento, atividade e aderência dos trofozoítos à parede do tubo. Os tubos que apresentaram bom crescimento dos trofozoítos foram invertidos várias vezes e rolados entre as palmas da mão, para o desprendimento de parte dos trofozoítos aderidos. Um volume de aproximadamente 0,2 a 0,5 mL da suspensão de trofozoítos foi transferido para um tubo de vidro (10 x 100 mm ou 16 x 120 mm) contendo meio novo, pré-aquecido em banho-maria a 37,0 °C, por 10 minutos. Após o repique, os tubos foram mantidos em estufa bacteriológica entre 35,5 a 37,0 °C.

As amostras (10 mg de cada) foram dissolvidas diretamente em 1 mL de DMSO obtendo-se soluções estoques de 10 mg/mL. Alíquotas das soluções foram diluídas em 10 mL de meio TYI-S-33, para se obter as seguintes concentrações finais: 9,28; 4,64; 2,32; 1,16; 0,58; 0,29 e 0,145 µg/mL. As soluções foram filtradas em uma membrana esterilizante de nitrocelulose de 0,2 µm e, alíquotas, em volumes crescentes, foram adicionadas aos poços das placas de cultivo contendo os trofozoítos em culturas axênicas.

A ação das amostras sobre o crescimento dos trofozoítos de *G. lamblia* foi avaliada “in vitro” por comparação com controles negativos (na ausência das amostras), controles positivos (na presença de metronidazol), e na presença de DMSO, o solvente das amostras testadas. Todos os ensaios foram realizados em triplicata e repetidos duas vezes independentes.

Inicialmente foi realizado um teste tipo ‘screening’, das amostras para se determinar aquelas que possuíssem algum efeito sobre a viabilidade e/ou proliferação dos trofozoítos de *G. lamblia*, cepa Portland. A viabilidade foi

determinada qualitativamente observando-se a motilidade e aderência dos trofozoítos em microscópio invertido e a proliferação foi quantificada pelo método colorimétrico, de acordo com Busatti e Gomes, 2007. As amostras ativas foram associadas aos trofozoítos de *G. lamblia* em concentrações crescentes buscando determinar a CI_{50} .

Para o cálculo do número de trofozoítos por mililitro (mL) de suspensão foi empregada a seguinte equação:

$$Z = Fc \times Fd \times Y$$

Sendo:

Z = número de trofozoítos por mL de suspensão.

Fc = fator de correção da câmara de Neubauer.

Fd = fator de diluição.

Y = número de trofozoítos contados nos quatro retículos laterais da câmara.

Diluição da suspensão de trofozoítos = 1/3 (Fd = 3).

Fator de correção da câmara de Neubauer = 2500.

Portanto:

$$Z = 2500 \times 3 \times Y$$

Resultado expresso em Z trofozoítos por mL de suspensão (CARVALHO E SILVA, 1988).

Foram utilizados $1,5 \times 10^5$ trofozoítos de *G. lamblia*, em fase logarítmica de crescimento, e distribuídos em placas de cultura de células de 24 poços (Nunc[®] e Sarsted[®]) contendo meio para um volume final de 2,5 mL. O crescimento das culturas foi avaliado pela observação em microscópio invertido e quantificado pelo método colorimétrico, princípio da densidade ótica. As amostras e DMSO foram associadas a cada poço e as placas foram incubadas em estufa a 37,0 °C, atmosfera de CO₂ a 5%, por 48 horas.

Após o ensaio de inibição, os trofozoítos não aderidos foram retirados com o auxílio de uma pipeta de vidro e cada poço foi lavado, cuidadosamente, duas vezes com solução salina tamponada pH 7,2 (PBS). Em seguida, os trofozoítos aderidos à placa foram fixados com metanol por 15 minutos. Após nova lavagem com solução salina tamponada pH 7,2, para retirar o excesso de metanol, os trofozoítos foram corados com azul de metileno 0,1% em tampão borato 0,1 mol/L pH 8,7, por 10 minutos. O excesso de corante foi removido por meio de lavagens sucessivas dos poços com solução de tampão borato 0,01 mol/L pH 8,7, e o corante incorporado pelos trofozoítos foi extraído pela adição de 500 µL de solução de ácido clorídrico 0,1M em cada orifício, por 10 minutos.

Alíquotas de 100 µL, de cada poço, foram então transferidas para placa de Elisa de 96 poços e levadas ao leitor de ELISA (BIO-RAD modelo 3550). A leitura foi realizada em 655 nm (BUSATTI E GOMES, 2007).

A inibição do crescimento dos trofozoítos foi expressa em porcentagem.

Para o cálculo da porcentagem de inibição do crescimento foi utilizada a seguinte equação:

$$\text{Porcentagem de inibição} = [1 - (A_{655} \text{ teste} \div A_{655} \text{ controle negativo})] \times 100$$

Sendo:

A_{655} = absorvância a 655 nm.

A_{655} controle negativo = absorvância do controle negativo.

A_{655} teste = absorvância referente à ação da amostra.

A.2 – Análise dos Resultados e Discussão

Somente o extrato hexânico (**FH2**) foi testado contra *Giardia lamblia* por meio do método colorimétrico (BUSATTI E GOMES, 2007), pois as duas misturas de triterpenos: 3-oxofriedelano e 3β-hidroxifriedelano (**MG01 e MG02**), 3,11-dioxofriedelano e 3,16-dioxofriedelano (**MG03 e MG04**) e o triterpeno: 3-oxo-12α-hidroxifriedelano (**MG05**) precipitaram no meio utilizado para o teste. Desta forma,

não foi possível determinar a atividade das misturas e do triterpeno contra *G. lamblia*.

A porcentagem de inibição do crescimento de *G. lamblia* provocada pelo extrato hexânico (FH2) está representada na Tabela 23.

Tabela 23: Porcentagem de inibição sobre o crescimento de *G. lamblia* frente ao extrato hexânico (FH2)

Concentração (µg/mL)	Porcentagem de inibição sobre o crescimento de <i>Giardia lamblia</i>
0,145	17,33
	9,83
	11,83
	15,03
	9,56
0,290	15,91
	13,35
	11,83
	14,66
	17,22
0,580	29,67
	50,19
	31,63
	30,02
	32,26
1,160	66,38
	54,64
	65,06
	47,50
	52,01
2,320	73,5
	70,83
	82,20
	84,09
	84,56
4,640	88,64
	90,25
	88,64
	86,33
	82,01
9,280	88,33
	88,67
	90,72
	90,15
	91,57

Percebe-se que a atividade do extrato hexânico (**FH2**) foi dose dependente, visto que na concentração de 1,160 $\mu\text{g/mL}$ a inibição do crescimento dos trofozoítos foi acima de 50 % e na concentração de 9,280 $\mu\text{g/mL}$ foi cerca de 90 %.

2.1.2 – Atividade de inibição da enzima acetilcolinesterase

2.1.2.1 – Introdução

A doença de Alzheimer é uma doença degenerativa que causa a demência em pessoas idosas (DI GIOVANNI *et al.*, 2008). Mais de 20 milhões de pessoas no mundo têm a doença de Alzheimer, sendo as causas não totalmente conhecidas (CISSE E MUCKE, 2009). As mudanças mais importantes observadas no cérebro de pacientes com doença de Alzheimer é a diminuição de diversos neurotransmissores cerebrais, como a acetilcolina, a noradrenalina e a serotonina. Os níveis de acetilcolina podem diminuir em cerca de 90%, provocando deficiências relativas à memória, à capacidade intelectual, à coordenação motora, ao equilíbrio, à postura etc (TREVISAN *et al.*, 2003; DI GIOVANNI *et al.*, 2008). A enzima acetilcolinesterase está envolvida na hidrólise metabólica de acetilcolina, desta forma o uso de inibidores da acetilcolinesterase tem sido o tratamento para a doença de Alzheimer (DI GIOVANNI *et al.*, 2008; YANG *et al.*, 2009).

Os fármacos inibidores da acetilcolinesterase possuem preços bastante onerosos e alguns provocam diversos efeitos colaterais (TREVISAN *et al.*, 2003; YANG *et al.*, 2009). Portanto, torna-se interessante o desenvolvimento de inibidores alternativos para o tratamento da doença de Alzheimer, como a utilização de plantas medicinais.

A – Método de Bioautografia

O método de bioautografia é um método simples e rápido utilizado para detecção de inibidores da enzima acetilcolinesterase. Por este método pode-se selecionar e direcionar o isolamento de inibidores encontrados em extratos de plantas. Porém existem algumas limitações, tais como: o grande consumo da enzima, tornando o teste caro; os metabólitos que estão em quantidades traço não

são detectados e, a presença de taninos nos extratos podem levar a resultados positivos falsos, ou seja, não há inibição e sim desnaturação da enzima acetilcolinesterase (TREVISAN *et al.*, 2003; YANG *et al.*, 2009). É necessário considerar que este método apenas auxilia na otimização da seleção e não elimina, de forma alguma, os testes *in vivo* (TREVISAN *et al.*, 2003).

A.1 – Metodologia

Volumes de 5 μL e 40 μL das amostras em clorofórmio (20 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) foram aplicados sobre placas de sílica gel GF₂₅₄ (2,5 x 5,0 cm) e eluídas em n-hexano:clorofórmio (1:9 v/v). Após secagem, as cromatoplasas foram borrifadas com a solução de acetilcolinesterase e incubadas a 37 °C. Após 20 minutos, uma solução de acetato de α -naftila e sal de Fast Blue B foram pulverizados nas cromatoplasas. O aparecimento de um halo branco (RHEE *et al.*, 2001) indica a inibição da enzima. O teste foi realizado em duplicata.

A.2 – Análise dos Resultados e Discussão

A atividade inibitória contra a enzima acetilcolinesterase do extrato hexânico (FH2), de uma mistura de triterpeno, 3,11-dioxofriedelano e 3,16-dioxofriedelano (MG03 e MG04); de três triterpenos, 3-oxofriedelano (MG01), 3 β -hidroxifriedelano (MG02) e 3-oxo-12 α -hidroxifriedelano (MG05); de um esteroide, β -sitosterol (MG09) e de dois ácidos graxos, ácido oléico (MG07) e ácido palmítico (MG10) foi avaliada por meio do método de bioautografia.

Nas cromatoplasas em que foram aplicados volumes de 5 μL de amostras não foram observados halos de inibição em nenhuma das amostras. Quando o volume aplicado foi de 40 μL foi observado halo de inibição (indicado por uma seta) em apenas uma amostra. A amostra que apresentou atividade inibitória refere-se ao triterpeno, 3 β -hidroxifriedelano (MG02) (Figura 72, pág. 114).

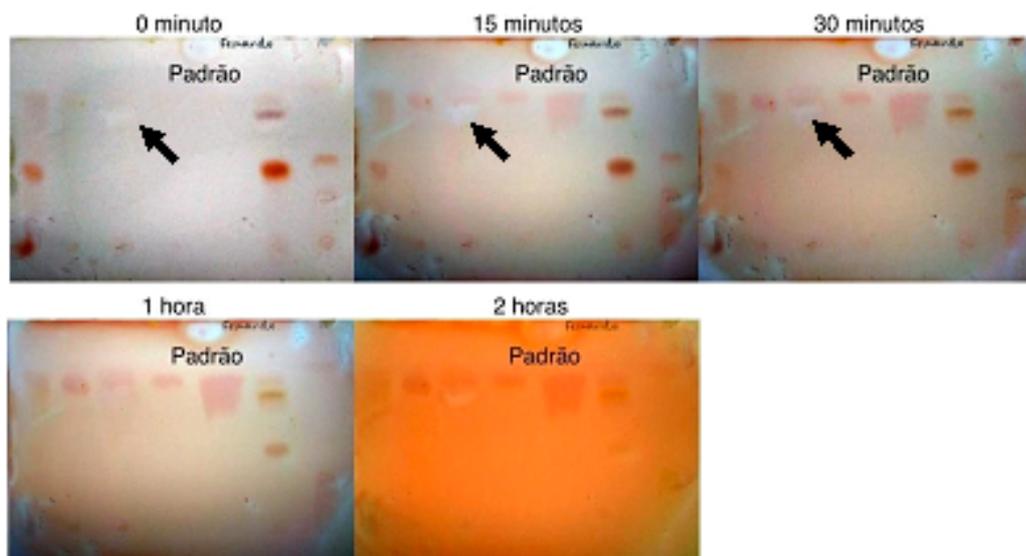


Figura 72: Bioautograma das amostras (em diferentes tempos). Da esquerda para direita, extrato hexânico (**FH2**), 3-oxofriedelano (**MG01**), 3 β -hidroxifriedelano (**MG02**), 3,11-dioxofriedelano e 3,16-dioxofriedelano (**MG03** e **MG04**), 3-oxo-12 α -hidroxifriedelano (**MG05**), β -sitosterol (**MG09**), ácido palmítico (**MG10**) e ácido oléico (**MG07**) (Foto: William S. T. Sallum).

2.1.3 – Atividade Inseticida

2.1.4.1 – Introdução

Além de doenças outro grande problema que afeta a população mundial é o abastecimento de alimentos para a população que até 2025 pode chegar a 8 bilhões de pessoas (SALUNKE *et al.*, 2009), visto que uma série de obstáculos precisa ser enfrentada até o processamento final do alimento. O armazenamento é uma das etapas mais importantes do setor agrícola. No Brasil, as perdas pós-colheita podem atingir até 15% (CONAB, 1997) e uma das principais causas disso é o ataque de insetos-praga.

Os insetos encontrados nos produtos armazenados podem ser classificados (GALLO *et al.*, 2002), segundo seus hábitos alimentares, em três grupos:

- Pragas primárias: são aquelas capazes de atacar os grãos íntegros e sadios. Como exemplo, têm-se o gorgulho-do-milho *Sitophilus zeamais* Mots.

- Pragas secundárias: são aquelas que não conseguem atacar os grãos íntegros. Alimentam-se de grãos previamente danificados pelos insetos primários, acidentalmente quebrados ou trincados, com defeitos na casca e que apresentam infecção fúngica. Como exemplo, tem-se o coleóptero *Tribolium castaneum* Herbst. etc.
- Pragas associadas: são aquelas que não atacam os grãos, alimentando-se apenas dos detritos e fungos. Como exemplo, tem-se o *Tenebrio molitor* L (Figura 73) etc. Esses insetos contribuem para prejudicar o aspecto e a qualidade do produto armazenado.



Figura 73: Fotografia das fases do ciclo de vida de *T. molitor*. Na esquerda (larva), centro (pupa) e direita (inseto adulto) (Foto: Vanessa Gregório Rodrigues).

As pragas dos produtos armazenados apresentam algumas características próprias, que explicam sua capacidade de infestação e proliferação. São elas: elevado número de indivíduos em cada reprodução, capacidade de infestar o produto nos depósitos e no campo e capacidade de atacar diferentes produtos (GALLO *et al.*, 2002). Desta forma, agentes químicos são utilizados para combater as infestações. Porém os compostos sintéticos têm sido substituídos pelos inseticidas naturais, pois as chances de acúmulo de resíduos nos alimentos são menores (SALUNKE *et al.*, 2009).

Os testes de atividade inseticida foram realizados no Laboratório de Manejo Integrado de Pragas coordenado pelo Professor Dr. Jair Campos Moraes do Departamento de Entomologia da Universidade Federal de Lavras (UFLA).

A – Método de Preferência alimentar com chance de escolha

Este método também é conhecido como teste de repelência. Neste método, utiliza-se uma placa de Petri e nas duas extremidades coloca-se o alimento, e em apenas uma delas a amostra é adicionada. Os insetos são colocados no meio da placa e quatro repetições são realizadas para cada concentração. Durante intervalos de tempo observa-se a migração dos insetos. O teste de χ^2 (Qui-quadrado) é utilizado para comparar o número de insetos em cada extremidade da placa (COSIMI *et al.*, 2009).

A.1 – Metodologia

Para avaliação da atividade inseticida utilizou-se o método de preferência alimentar com chance de escolha. As larvas de *T. molitor* foram criadas em caixa de madeira (60 x 40 x 20 cm), mantidos em farelho de milho e aveia na proporção de 9:1 e cobertos por algodão, devidamente tampados e com ausência de luz (Figura 74). Mensalmente, adicionavam-se outros tipos de alimento, como por exemplo, chuchu e pão.



Figura 74: Fotografia da caixa de madeira utilizada para criação de *T. molitor* (Foto: Vanessa Gregório Rodrigues).

Cada amostra foi solubilizada em acetona e gotas de DMSO. Para os testes, foram preparadas soluções de 1,453; 0,726; 0,363; 0,182; 0,091; 0,045 e 0,023 %

p/v. Em placa de Petri (20 cm) foram colocados, em posições opostas, discos de papel de filtro (2 cm) e sobre ele, farelo de milho esterilizado (0,1 g). Em apenas um dos discos de papel foi aplicada a solução teste. Após a evaporação total do solvente, 5 larvas foram colocadas no centro da placa. Cada teste foi realizado em quadruplicata, totalizando-se 20 larvas. Avaliou-se o número de insetos que migraram para o alimento contendo a amostra (Figura 75), após 1^a, 2^a e 3^a hora. A análise estatística foi realizada pelo método do χ^2 (Qui-quadrado).

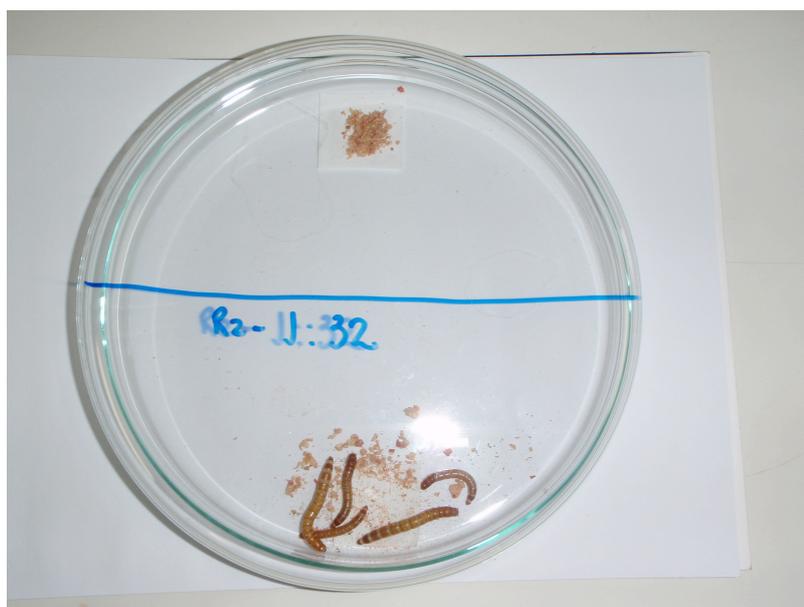


Figura 75: Fotografia da placa de Petri onde larvas de *T. molitor* migraram para o alimento com a amostra (Foto: Fernando César Silva).

A.2 – Análise dos Resultados e Discussão

O extrato hexânico (**FH2**), uma mistura de triterpeno, 3,11-dioxofriedelano e 3,16-dioxofriedelano (**MG03 e MG04**) e dois triterpenos, 3-oxofriedelano (**MG01**) e 3-oxo-12 α -hidroxifriedelano (**MG05**) foram testados contra as larvas da praga de grãos armazenados, *T. molitor*.

Os resultados estão listados na Tabela 24, pág. 118.

Tabela 24: Resultados do teste de preferência alimentar com chance de escolha para quatro amostras frente a larva de *T. molitor* em diferentes tempos de exposição. O valor de χ^2 -tabelado é 14.2

Amostras	Concentração (% p/v)	Repetições	Número de larvas em cada metade da placa de Petri após a exposição								
			1h			2h			3h		
			Tr ^a	Cn ^b	χ^2	Tr	Cn	χ^2	Tr	Cn	χ^2
Extrato Hexânico (FH2)	1,453	1	5	0	10,4	5	0	10,4	5	0	12,0
		2	3	2		3	2		4	1	
		3	5	0		5	0		5	0	
		4	3	2		3	2		3	2	
	0,726	1	1	4	7,2	1	4	10,4	2	3	7,2
		2	5	0		5	0		5	0	
		3	3	2		1	4		2	3	
		4	2	3		1	4		1	4	
	0,363	1	5	0	8,8	5	0	13,6	5	0	16,8 ^c
		2	4	1		5	0		5	0	
		3	2	3		1	4		0	5	
		4	1	4		1	4		1	4	
	0,182	1	5	0	8,8	5	0	10,4	5	0	13,6
		2	4	1		3	2		4	1	
		3	2	3		2	3		1	4	
		4	1	4		0	5		0	5	
	0,091	1	4	1	5,6	4	1	8,8	4	1	12,0
		2	3	2		3	2		3	2	
		3	1	4		0	5		0	5	
		4	1	4		1	4		0	5	
	0,045	1	4	1	7,2	5	0	12,0	5	0	10,4
		2	5	0		5	0		3	2	
		3	3	2		2	3		0	5	
		4	2	3		1	4		2	3	
0,023	1	3	2	7,2	3	2	0,8	3	2	2,4	
	2	1	4		3	2		4	1		
	3	3	2		3	2		3	2		
	4	0	5		2	3		2	3		
3-oxo-friedelano (MG01)	1,453	1	4	1	2,4	4	1	2,4	4	1	7,2
		2	3	2		3	2		4	1	
		3	3	2		3	2		4	1	
		4	2	3		3	2		4	1	
	0,726	1	3	2	2,4	4	1	10,4	4	1	7,2
		2	3	2		4	1		5	0	
		3	4	1		1	4		2	3	
		4	2	3		5	0		3	2	
	0,363	1	4	1	4,0	4	1	7,2	4	1	7,2
		2	2	3		2	3		3	2	
		3	4	1		5	0		5	0	
		4	2	3		2	3		3	2	
	0,182	1	2	3	5,6	3	2	4,0	3	2	7,2
		2	4	1		4	1		5	0	
		3	4	1		4	1		3	2	
		4	4	1		3	2		4	1	
	0,091	1	1	4	4,0	3	2	5,6	4	1	10,4
		2	2	3		4	1		4	1	
		3	4	1		4	1		4	1	
		4	3	2		4	1		5	0	
	0,045	1	3	2	0,8	1	4	7,2	3	2	2,4
		2	2	3		3	2		3	2	
		3	3	2		5	0		4	1	
		4	3	2		2	3		2	3	
0,023	1	2	3	12,0	4	1	2,4	4	1	5,6	
	2	4	1		3	2		4	1		
	3	5	0		3	2		4	1		
	4	5	0		3	2		3	2		

Continuação da Tabela 27.

Amostras	Concentração (% p/v)	Repetições	Número de larvas em cada metade da placa de Petri após a exposição								
			1h			2h			3h		
			Tr	Cn	χ^2	Tr	Cn	χ^2	Tr	Cn	χ^2
3,11-dioxo-friedelano e 3,16-dioxo-friedelano (MG03 e MG04)	1,453	1	5	0	13,6	4	1	16,8 ^c	5	0	20,0 ^c
		2	5	0		5	0		5	0	
		3	1	4		0	5		0	5	
		4	1	4		0	5		0	5	
	0,726	1	4	1	16,8 ^c	4	1	12,0	4	1	8,8
		2	5	0		5	0		5	0	
		3	5	0		5	0		4	1	
		4	0	5		2	3		3	2	
	0,363	1	2	3	4,0	3	2	8,8	3	2	4,0
		2	4	1		5	0		4	1	
		3	2	3		1	4		2	3	
		4	1	4		4	1		1	4	
	0,182	1	2	3	12,0	4	1	5,6	4	1	8,8
		2	0	5		2	3		0	5	
		3	4	1		1	4		3	2	
		4	5	0		4	1		4	1	
	0,091	1	4	1	12,0	4	1	10,4	4	1	8,8
		2	3	2		4	1		3	2	
		3	0	5		0	5		0	5	
		4	0	5		1	4		1	4	
0,045	1	4	1	13,6	4	1	13,6	5	0	8,8	
	2	5	0		5	0		3	2		
	3	5	0		4	1		4	1		
	4	1	4		0	5		1	4		
0,023	1	3	2	8,8	3	2	7,2	5	0	13,6	
	2	4	1		5	0		5	0		
	3	1	4		1	4		1	4		
	4	0	5		2	3		1	4		
3-oxo-12 α -hidroxifriedelano (MG05)	1,453	1	4	1	5,6	4	1	8,8	4	1	8,8
		2	3	2		3	2		3	2	
		3	1	4		0	5		0	5	
		4	1	4		1	4		1	4	
	0,726	1	4	1	7,2	4	1	16,8 ^c	3	2	12,0
		2	3	2		5	0		4	1	
		3	5	0		5	0		5	0	
		4	3	2		5	0		5	0	
	0,363	1	5	0	12,0	5	0	10,4	5	0	10,4
		2	5	0		5	0		5	0	
		3	3	2		3	2		3	2	
		4	1	4		2	3		3	2	
	0,182	1	4	1	10,4	3	2	12,0	3	2	7,2
		2	1	4		4	1		4	1	
		3	4	1		5	0		5	0	
		4	0	5		0	5		2	3	
	0,091	1	4	1	8,8	4	1	12,0	4	1	12,0
		2	5	0		5	0		5	0	
		3	3	2		3	2		3	2	
		4	1	4		0	5		0	5	
0,045	1	5	0	7,2	5	0	7,2	5	0	10,4	
	2	2	3		3	2		1	4		
	3	2	3		2	3		1	4		
	4	1	4		1	4		1	4		
0,023	1	3	2	0,8	2	3	0,8	4	1	4,0	
	2	2	3		2	3		2	3		
	3	2	3		2	3		1	4		
	4	2	3		2	3		3	2		

^a Alimento com amostra (Tr). ^b Alimento sem amostra (Un). ^c Resultado significativo $\chi^2 > \chi^2$ -tabelado.

O extrato hexânico (**FH2**) apresentou resultado significativo em baixa concentração após três horas de exposição. 3-Oxofriedelano (**MG01**) não demonstrou nenhum resultado significativo. A mistura de triterpenos, 3,11-dioxofriedelano (**MG03**) e 3,16-dioxofriedelano (**MG04**) apresentou resultado significativo a partir de uma hora de exposição. 3-Oxo-12 α -hidroxifriedelano (**MG05**) demonstrou resultado significativo depois de duas horas de exposição.

Durante as três horas de teste não se observou morte de nenhuma larva. De acordo com o número de larvas no lado da placa com o alimento tratado com a amostra verificou-se que o efeito atrativo representou a atividade inseticida predominante.

CONCLUSÃO

O principal objetivo deste projeto de pesquisa foi o de estudar quimicamente e avaliar algumas atividades biológicas do extrato hexânico e constituintes dos galhos de *Maytenus gonoclada* Martius (Celastraceae), coletados na Serra da Piedade em Caeté, Minas Gerais, Brasil.

O estudo do extrato hexânico resultou no isolamento e caracterização de sete triterpenos pentacíclicos (3-oxofriedelano, 3 β -hidroxifriedelano, 3,11-dioxofriedelano, 3,16-dioxofriedelano, 3-oxo-12 α -hidroxifriedelano, 3-oxo-29-hidroxifriedelano e 3-oxo-12 α ,29-di-hidroxifriedelano), um esteroide (β -sitosterol) e dois ácidos graxos de cadeia longa (ácido oléico e ácido palmítico), identificados principalmente pela técnica de RMN de ^1H e ^{13}C .

Dos triterpenos isolados, 3-oxo-12 α ,29-di-hidroxifriedelano, é inédito. Sua estrutura foi determinada por meio de RMN de ^1H , ^{13}C , HSQC, HMBC, NOESY e espectrometria de massas (ESI).

O isolamento de novos tipos de estruturas renova o interesse pelo estudo dos metabólitos secundários de celastráceas, pois possibilita o conhecimento sobre novos compostos bioativos e contribui para o estudo de rotas biossintéticas.

Os triterpenos friedelânicos são predominantes em *M. gonoclada*, sendo o isolamento de triterpenos consistente com o perfil químico de outras espécies do gênero *Maytenus*.

As atividades biológicas, do extrato hexânico e substâncias isoladas, determinadas foram: atividade antimicrobiana, inibitória da enzima acetilcolinesterase e inseticida.

O extrato hexânico (**FH2**) apresentou atividade moderada contra a bactéria Gram-positiva *Staphylococcus aureus* (halo de inibição: 8 mm), contra a levedura *Candida albicans* (halo de inibição: 8 mm e CIM: 512 $\mu\text{g/mL}$), potente atividade contra o protozoário *Giardia lamblia* (CI_{50} de 1,16 $\mu\text{g/mL}$) e atividade inseticida, sendo o efeito atrativo predominante, contra as larvas de pragas de grãos armazenados *Tenebrio molitor*.

O triterpeno, 3 β -hidroxifriedelano (**MG02**), apresentou atividade moderada de inibição da enzima acetilcolinesterase pelo método de bioautografia.

A mistura de triterpenos, 3,11-dioxofriedelano (**MG03**) e 3,16-dioxofriedelano (**MG04**), apresentou atividade inseticida, sendo o efeito atrativo predominante, contra as larvas de *T. molitor*.

O triterpeno, 3-oxo-12 α -hidroxifriedelano (**MG05**), apresentou atividade moderada e seletiva contra a levedura *Candida albicans* (CIM de 512 μ g/mL). Apresentou também atividade inseticida, sendo o efeito atrativo predominante, contra as larvas de *T. molitor*.

O extrato hexânico (**FH2**), a mistura de triterpenos, 3,11-dioxofriedelano (**MG03**) e 3,16-dioxofriedelano (**MG04**) e o triterpeno, 3-oxo-12 α -hidroxifriedelano (**MG05**) podem ser promissores agentes inseticidas com efeito atrativo predominante.

A realização de alguns testes com os triterpenos isolados foi muitas vezes inviável devido à baixa solubilidade destes compostos no meio utilizado para os ensaios. Acredita-se que esse problema pode ser solucionado utilizando biotransformações e/ou semi-sínteses.

É importante dar continuidade aos estudos de galhos e iniciar o de raízes de *M. gonoclada*, visando o isolamento de metabólitos com potencial atividade biológica (principalmente quinonametídeos), ou mesmo o isolamento em quantidade adicional dos que já foram isolados.

O objetivo do estudo dos produtos naturais não se limita ao conhecimento da biodiversidade. Acredita-se que o entendimento sobre os mesmos permite solucionar ou minimizar problemas básicos de sobrevivência, como por exemplo, a pobreza, a densidade populacional e as doenças. A utilização de fármacos é essencial, e sua fabricação depende direta e/ou indiretamente de produtos naturais, sendo que esses são buscados nas florestas, principalmente as tropicais. No entanto o desmatamento e a má utilização dos recursos naturais têm levado a extinção de muitas espécies constituindo um grave problema, visto que uma única espécie pode conter dezenas de metabólitos bioativos.

Enfim, o que se faz ou se deixa de fazer determinará o futuro da biodiversidade.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Adams, W. M.; Aveling, R.; Brockington, D.; Dickson, B.; Elliott, J.; Hutton, J.; Roe, D.; Vira, B.; Wolmer, W. Biodiversity conservation and the eradication of poverty. *Science*, **306**, 1146-1149, 2004.

Alves, R. R. N.; Rosa, I. M. L. Biodiversity, traditional medicine and public health: where do they meet? *Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine*, **3**, 14-22, 2007.

Andrade, S. F.; Cardoso, L. G. V.; Carvalho, J. C. T.; Bastos, J. K. Anti-inflammatory and antinociceptive activities of extract, fractions and populnic acid from bark wood of *Austroplenckia populnea*. *Journal of Ethnopharmacology*, **109**, 464-471, 2007.

Andrade, S. F.; Comunello, E.; Noldin, V. F.; Monache, F. D.; Cechinel Filho, V.; Niero, R. Antiulcerogenic activity of fractions and 3,15-Dioxo-21 α -hydroxyfriedelane isolated from *Maytenus robusta* (Celastraceae). *Archives of Pharmacal Research*, **31**, 41-46, 2008.

Araújo, E. L.; Castro, C. C.; Albuquerque, U. P. Dynamics of Brazilian Caatinga – a review concerning the plants, environment and people. *Functional Ecosystems the Communities*, **1**, 15-28, 2007.

Araújo, F. M.; Passos, M. G. V. M.; Lima, E. O.; Roque, N. F.; Guedes, M. I. S.; Souza-Neta, L. C.; Cruz, F. G.; Martins, D. Composition and antimicrobial activity of essential oils from *Poiretia bahiana* C. Müller (Papilionoideae-Leguminosae). *Journal of the Brazilian Chemical Society*, **20**, 1805-1810, 2009.

Bailly, C. Ready for a comeback of natural products in oncology. *Biochemical Pharmacology*, **77**, 1447-1457, 2009.

Baldi, F.; Bianco, M. A.; Nardone, G.; Pilotto, A.; Zamparo, E. Focus on acute diarrhoeal disease. *World Journal of Gastroenterology*, **15**, 3341-3348, 2009.

Barbosa, L. C. A. Espectroscopia no Infravermelho na caracterização de compostos orgânicos. 1 ed. Editora UFV, Viçosa MG, 2008, 189p.

Barreiro, E. J.; Bolzani, V. da S. Biodiversidade: fonte potencial para a descoberta de fármacos. *Química Nova*, **32**, 679-688, 2009.

Brasil. Programa para Proteção das Florestas Tropicais do Brasil. Caminhos para a sustentabilidade: as contribuições do maior programa ambiental do país para o uso e a proteção das florestas tropicais brasileiras. Ministério do Meio Ambiente, Brasília: 2009a.

Brasil. Secretaria de Política Agrícola. Informativo de Economia Agrícola. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, Brasília: 2009b.

Bugno, A.; Almodovar, A. A. B.; Pereira, T. C.; Pinto, T. J. A.; Sabino, M. Occurrence of toxigenic fungi in herbal drugs. *Brazilian Journal Microbiology*, **37**, 47-51, 2006.

Busatti, H. G. N. O.; Gomes, M. A. A simple colourimetric method to determine anti-giardial activity of drugs. *Parasitology Research*, **101**, 819-821, 2007.

Busatti, H. G. N. O.; Santos, J. F. G.; Gomes, M. A. The old and new therapeutic approaches to the treatment of giardiasis: Where are we? *Biologics: Targets & Therapy*, **3**, 273-287, 2009.

Carvalho, M. G.; SILVA, M. B. S. Hematologia: técnicas laboratoriais e interpretação. Imprensa Universitária, Belo Horizonte, p. 21-22, 1988.

Carvalho-Okano, R. M. Estudos taxonômicos do gênero *Maytenus* Mol. Emend. Mol (Celastraceae) do Brasil Extra Amazônico. Tese de Doutorado. Instituto de Biologia. Universidade Estadual de Campinas. Campinas, São Paulo. 1992.

Chiozem, D. D.; Trinh-Van_Dufat, H.; Wansi, J. D.; Djama, C. M.; Fannang, V. S.; Seguin, E.; Tillequin, F.; Wandji, J. New friedelane triterpenoids with antimicrobial

activity from the stems of *Drypetes paxii*. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*, **57**, 1119-1122, 2009.

Cisse, M.; Mucke, L. A prion protein connection. *Nature*, **457**, 1090-1091, 2009.

Clardy, J.; Walsh, C. Lessons from natural molecules. *Nature*, **432**, 829-837, 2004.

CONAB. Companhia Nacional de Abastecimento. Previsão e acompanhamento de safras. Brasília, ano 21, n. 4, p. 6, 1997.

Cordell, G. A. Biodiversity and drug discovery – a symbiotic relationship. *Phytochemistry*, **55**, 463-480, 2000.

Corsino, J.; Carvalho, P. R. F.; Kato, M. J.; Latorre, L. R.; Oliveira, O. M. M. F.; Araújo, A. R.; Bolzani, V. da 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*, **55**, 741-748, 2000.

Cosimi, S.; Rossi, E.; Cioni, P. L.; Canale, A. Bioactivity and qualitative analysis of some essential oils from Mediterranean plants against stored-product pests: Evaluation of repellency against *Sitophilus zeamais* Motschulsky, *Cryptolestes ferrugineus* (Stephens) and *Tenebrio molitor* (L.) *Journal of Stored Products Research*, **45**, 125-132, 2009.

Couperus, P. A.; Claugue, A. D. H. ; Dongen, J. P. C. M. Carbon-13 Chemical Shifts of some Model Carboxylic Acids and Esters. *Organic Magnetic Resonance*, **11**, 590-597, 1978.

Cowen, L. E.; Singh, S. D.; Köhler, J. R.; Collins, C.; Zaas, A. K.; Schell, W. A.; Aziz, H.; Mylonakis, E.; Perfect, J. R.; Whitesell, L.; Lindquist, S. Harnessing Hsp90 function as powerful, broadly effective therapeutic strategy for fungal infectious disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **106**, 2818-2823, 2009.

Cragg, G. M.; Newman, D. J. Nature: a vital source of leads for anticancer drug development. *Phytochemistry Reviews*, **8**, 313-331, 2009.

Dantanarayana, A. P.; Kumar, N. S.; Sultanbawa, M. U. S. Structures of four new oxygenated lupanes from *Pleurostyliya opposite* (Celastraceae). *Journal of Chemical Society*, **1**, 2717-2723, 1981.

Delgado-Méndez, P.; Herrera, N.; Chávez, H.; Estévez-Braun, A.; Ravelo, A. G.; Cortes, F.; Castanys, S.; Gamarro, F. New terpenoids from *Maytenus apurimacensis* as MDR reversal agents in the parasite *Leishmania*. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, **16**, 1425-1430, 2008.

Demain, A. L.; Sanchez, S. Microbial drug discovery: 80 years of progress. *The Journal of Antibiotics*, **62**, 5-16, 2009.

Dewick, P. M. Medicinal Natural Products: a biosynthetic approach. 2ª Edição, John Wiley & Sons, Inc., New York, 2002, 507 p.

Di Giovanni, S.; Borloz, A.; Urbain, A.; Marston, A.; Hostettmann, K.; Carrupt, P. A.; Reist, M. *In vitro* screening assays to identify natural or synthetic acetylcholinesterase inhibitors: Thin layer chromatography versus microplate methods. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, **33**, 109-119, 2008.

Domingo, V.; Arteaga, J. F.; Moral, J. F. Q.; Barrero, A. F. Unusually cyclized triterpenes: occurrence, biosynthesis and chemical synthesis. *Natural Product Reports*, **26**, 115-134, 2009.

Duarte, L. P. Estudo químico, estrutural e da atividade bacteriana de triterpenos pentacíclicos isolados dos galhos e raízes de *Austroplenckia populnea*. Tese de Doutorado. Departamento de Química. Universidade Federal de Minas Gerais. Belo Horizonte, Minas Gerais. 2000.

Duarte, L. P.; Vieira Filho, S. A.; Silva, G. D. F.; Sousa, J. R.; Pinto, A. S. Anti-trypansomal activity of pentacyclic triterpenes isolated from *Austroplenckia*

populnea (Celastraceae). *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, **44**, 109-112, 2002.

Fonseca, A. P. N. D.; Silva, G. D. F.; Carvalho, J. J.; Salazar, G. C. M.; Duarte, L. P.; Silva, R. P.; Jorge, R. M.; Tagliati, C. A.; Zani, C. L.; Alves, T. M. A.; Peres, V.; Vieira Filho, S. A. Estudo fitoquímico do decocto das folhas de *Maytenus truncata* Reissek e avaliação das atividades antinociceptiva, antiedematogênica e antiulcerogênica de extratos do decocto. *Química Nova*, **30**, 842-847, 2007.

Gallo, D.; Nakano, O.; Neto, S. S.; Carvalho, R. P. L.; Baptista, G. C.; Filho, E. B.; Parra, J. R. P.; Zucchi, R. A.; Alves, S. B.; Vendramim, J. D.; Marchini, L. C.; Lopes, J. R. S.; Omoto, C. Entomologia Agrícola. Volume 10. Fundação de Estudos Agrários Luiz de Queiroz (FEALQ), Piracicaba, 2002, 920 p.

Gershenzon, J.; Dudareva, N. The function of terpene natural products in the natural world. *Nature Chemical Biology*, **3**, 408-414, 2007.

Gómez-Pompa, A. The role of biodiversity scientists in a trouble world. *BioScience*, **54**, 217-225, 2004.

González, A. G.; Alvarenga, N.; Ravelo, A.; Bazzocchi, I.; Ferro, E.; Navarro, A.; Moujir, L. Scutione, a new bioactive norquinonemethide triterpene from *Maytenus scutioides* (Celastraceae). *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, **4**, 815-820, 1996.

Gottlieb, O. R.; Borin, M. R. de M. B. Quantitative Chemobiology: a guide into the understanding of plant bioactivity. *Journal of Brazilian Chemical Society*, **13**, 772-776, 2002.

Gottlieb, O. R.; Borin, M. R. de M. B.; Pagotto, C. L. A. da C.; Zocher, D. H. T. Biodiversidade: o enfoque interdisciplinar brasileiro. *Ciência & Saúde Coletiva*, **3**, 97-102, 1998.

Greenpeace. Lula, desmatamento zero e os carecas. 08 de outubro de 2009. Disponível em: <http://www.greenpeace.org/brasil/>. Acesso em 16 de outubro de 2009.

Guo, Y. Q.; Li, X.; Xu, J.; Li, N.; Meng, D. L.; Wang, J. H. Sesquiterpene esters from the fruits of *Celastrus orbiculatus*. *Chemical Pharmaceutical Bulletin*, **52**, 1134-1136, 2004.

Han, E. N.; Gatehouse, G. Genetics of precalling period in the oriental armyworm, *Mythimna separate* (Walker) (Lepidoptera: Noctuidae), and implications for migration. *Evolution*, **45**, 1502-1510, 1991.

Harvey, A. L. Natural products in drug discovery. *Drug Discovery Today*, **13**, 894-901, 2008.

Hergenrother, P. J. Obtaining and screening compound collections: a user's guide and a call to chemists. *Current Opinion in Chemical Biology*, **10**, 213-218, 2006.

Hou, Y.; Cão, S.; Brodie, P.; Callmänder, M.; Ratovoson, F.; Randrianaivo, R.; Rakotobe, E.; Rasamison, V. E.; Rakotonandrasana, S.; TenDyke, K.; Suh, E. M.; Kingston, D. G. I. Antiproliferative cardenolide glycosides of *Elaeodendron alluaudianum* from the Madagascar Rainforest. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, **17**, 2215-2218, 2009.

Hwang, B. Y.; Kim, H. S.; Lee, J. H.; Hong, Y. S.; Ro, J. S.; Lee, K. S.; Lee, J. J. Antioxidant Benzoylated Flavan-3-ol Glycoside from *Celastrus orbiculatus*. *Journal of Natural Products*, **64**, 82-84, 2001.

Isman, M. B. Botanical insecticides, deterrents and repellents in modern agriculture and increasingly regulated world. *Annual Review of Entomology*, **51**, 45-66, 2006.

Jardim, I. C. S. F.; Andrade, J. A.; Queiroz, S. C. N. Resíduos de agrotóxicos em alimentos: uma preocupação ambiental global – um enfoque às maçãs. *Química Nova*, **32**, 996-1012, 2009.

Kapoor, V. K.; Dureja, J.; Chadha, R. Herbals in the control of ageing. *Drug Discovery Today*, **14**, 992-998, 2009.

Keister, D. B. Axenic cultivation of *Giardia lamblia* in TYI-S-33 medium supplemented with bile. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, **77**, 487-488, 1983.

Kuete, V.; Nguemeving, J. R.; Beng, V. P.; Azebaze, A. G. B.; Etoa, F-X.; Meyer, M.; Bodo, B.; Nkengfack, A. E. Antimicrobial activity of the methanolic extracts and compounds from *Vismia laurentii* De Wild (Guttiferae). *Journal of Ethnopharmacology*, **109**, 372-379, 2007.

Levidow, L.; Carr, S. How biotechnology regulation sets a risk/ethics boundary. *Agriculture and Human Values*, **14**, 29-43, 1997.

Li, J. W. H.; Vederas, J. C. Drug discovery and natural products: end of an era or an endless frontier? *Science*, **325**, 161-164, 2009.

Li, K.; Duan, H.; Kawazoe, K.; Takaishi, Y.; Terpenoids from *Tripterygium wilfordii*. *Phytochemistry*, **45**, 791-796, 1997.

Lindsey, K. L.; Budesinsky, M.; Kohout, L.; Staden, J. V. Antibacterial activity of maytenonic acid isolated from the root-bark of *Maytenus senegalensis*. *South African Journal of Botany*, **72**, 473-477, 2006.

Lobo, A. M.; Lourenço, A. M. Biossíntese de produtos naturais. 1 edição, IST Press, Lisboa, 2007, 272 p.

Lucas, E. M. F. Prospecção Química e Biológica de Extratos Fúngicos Visando o Isolamento de Substâncias Bioativas. Tese de Doutorado. Departamento de Química. Universidade Federal de Minas Gerais. Belo Horizonte, Minas Gerais. 2008.

- Luo, D. Q.; Zhang, X.; Tian, X.; Liu, J. K. Insecticidal compounds from *Tripterygium wilfordii* active against *Mythimna separata*. *Zeitschrift für Naturforschung*, **59 c**, 421-426, 2004.
- Maciel, M. A. M.; Pinto, A. C.; Veiga Jr., V. F.; Grynberg, N. F.; Echevarria, A. Plantas Medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. *Química Nova*, **25**, 429-438, 2002.
- Madrigal, R. V.; Zilkowski, B. W.; Smith, Jr.; Structure – activity relationships among maytansinoids in their effect on the European Corn Borer. *Journal of Chemical Ecology*, **11**, 501-506, 1985.
- Mahato, S. B.; Kundu, A. P. ¹³C NMR spectra of pentacyclic triterpenoids – a compilation and some salient features. *Phytochemistry*, **37**, 1517-1575, 1994.
- Matos, F. J. A. Introdução a Fitoquímica Experimental. UFC, Fortaleza, 1980, 129 p.
- McChesney, J. D.; Venkataraman, S. K.; Henri, J. T. Plant natural products: back to the future or into extinction? *Phytochemistry*, **68**, 2015-2022, 2007.
- Melo, J. G.; Amorim, E. L. C.; Albuquerque, U. P. Native medicinal plants – commercialized in Brazil – priorities for conservation. *Environmental Monitoring and Assessment*, **156**, 567-580, 2009.
- Mena-Rejón, G. J.; Pérez-Espadas, A. R.; Moo-Puc, R. E.; Cedillo-Rivera, R.; Bazzocchi, I. L.; Jiménez-Díaz, I. A.; Quijano, L. Antigiardial activity of triterpenoids from root bark of *Hippocratea excelsa*. *Journal of Natural Products*, **70**, 863-865, 2007.
- Miller, S. J.; Clardy, J. Beyond grind and find. *Nature Chemistry*, **1**, 261-263, 2009.
- Miranda, R. R. S. Estudo fitoquímico e avaliação do potencial farmacológico de *Maytenus salicifolia* Reissek. Tese de Doutorado. Departamento de Química. Universidade Federal de Minas Gerais. Belo Horizonte, Minas Gerais. 2007.

Moreira, M. A. B.; Zarbin, P. H. G.; Coracini, M. D. A. Feromônios associados aos coleópteros-praga de produtos armazenados. *Química Nova*, **28**, 472-477, 2005.

Morita, H.; Hirasawa, Y.; Muto, A.; Yoshida, T.; Sekitab, S.; Shirotab, O. Antimitotic quinoid triterpenes from *Maytenus chuchuhuasca*. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, **18**, 1050-1052, 2008.

Myers, N.; Mittermeier, R. A.; Mittermeier, C. G.; Fonseca, G. A. B.; Kent, J. Biodiversity hotspots for conservation priorities. *Nature*, **403**, 853-858, 2000.

Núñez Rivas, M. J. Metabolitos secundarios bioactivos aislados de *Maytenus chiapensis* y *Crossopetalum uragoga* (Celastraceae). Tesis Doctoral. Departamento de Química Orgánica. Universidad de La Laguna. La laguna, Tenerife. 2004.

Oliveira, D. M. Estudo fitoquímico de raízes de *Maytenus acanthophylla* Reissek (Celastraceae) e avaliação da atividade antimicrobiana do extrato clorofórmico. Dissertação de Mestrado. Departamento de Química. Universidade Federal de Minas Gerais. Belo Horizonte, Minas Gerais. 2004.

Oliveira, D. M.; Silva, G. D. F.; Duarte, L. P.; Vieira Filho, S. A. Chemical constituents isolated from roots of *Maytenus acanthophylla* Reissek (Celastraceae). *Biochemical Systematics and Ecology*, **34**, 661-665, 2006.

Oliveira, M. L. G. Estudo fitoquímico de folhas de *Maytenus gonoclada* Martius (Celastraceae) e obtenção de derivados nitrogenados da friedelina. Dissertação de Mestrado. Departamento de Química. Universidade Federal de Minas Gerais. Belo Horizonte, Minas Gerais. 2007.

Oliveira, M. L. G.; Duarte, L. P.; Silva, G. D. F.; Vieira Filho, S. A.; Knupp, V. F.; Alves, F. G. P. 3-Oxo-12 α -hydroxyfriedelano from *Maytenus gonoclada*: structure elucidation by ^1H and ^{13}C chemical shift assignments and 2D-NMR spectroscopy. *Magnetic Resonance in Chemistry*, **45**, 895-898, 2007.

Organização Mundial da Saúde (OMS)

Herbal and Traditional Medicines. *WHO Drug Information*, **23**, 8-11, 2009.

Pardal, P. P. O. Envenenamento por plantas. – Módulo XI. Curso de Toxicologia – NUTES/UFRJ. 2006. <http://ltc.nutes.ufrj.br/toxicologia/mXI.gast.htm> Acesso em 04 de outubro de 2009.

Pavia, D. L.; Lampman, G. M.; Kriz, G. S. Introduction to Spectroscopy: a guide for students of Organic Chemistry. Third Edition. Thomson Learning, United States of America, 2001, 578 p.

Petroski, R. J.; Stanley, D. W. Natural compounds for pest and weed control. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **57**, 8171-8179, 2009.

Phillipson, J. D. Phytochemistry and medicinal plants. *Phytochemistry*, **56**, 237-243, 2001.

Potterat, O.; Hamburger, M. Natural Products in Drug Discovery - Concepts and approaches for tracking bioactivity. *Current Organic Chemistry*, **10**, 899-920, 2006.

Queiroga, C. L.; Silva, G. F.; Dias, P. C.; Possenti, A.; Carvalho, J. E. Evaluation of the antiulcerogenic activity of friedelan-3 β -ol and friedelin isolated from *Maytenus ilicifolia* (Celastraceae). *Journal of Ethnopharmacology*, **72**, 465-468, 2000.

Rates, S. M. K. Plants as source of drugs. *Toxicon*, **39**, 603-613, 2001.

Reyes, C. P.; Núñez, M. J.; Jiménez, I. A.; Busserolles, J.; Alcaraz, M. J.; Bazzocchi, I. L. Activity of lupane triterpenoids from *Maytenus* species as inhibitors of nitric oxide and prostaglandin E₂. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, **14**, 1573-1579, 2006.

Rhee, I.; Meent, M.; Ingkaninan, K.; Verpoorte, R. Screening for acetylcholinesterase inhibitors from Amaryllidaceae using silica gel thin-layer chromatography in combination with bioactivity staining. *Journal of Chromatography A*, **915**, 217-223, 2001.

Rhourri-Frih, B.; Chaimbault, P.; Claude, B.; Lamy, C.; André, P.; Lafosse, M. Analysis of pentacyclic triterpenes by LC-MS : a comparative study between APCI and APPI. *Journal of Mass Spectrometry*, **44**, 71-80, 2009.

Ricketts, T. H.; Soares-Filho, B.; Fonseca, G. A. B.; Nepstad, D.; Pfaff, A.; Peterson, A.; Anderson, A.; Boucher, D.; Cattaneo, A.; Conte, M.; Creighton, K.; Linden, L.; Maretti, C.; Moutinho, P.; Ullman, R.; Victurine, R. Indigenous lands, protected areas, and slowing climate change. *PLOS Biology*, **8**, 1-4, 2010.

Roberts, S. C. Production and engineering of terpenoids in plant cell culture. *Nature Chemical Biology*, **3**, 387-395, 2007.

Rodríguez Pérez, F. M. Estudio fitoquímico de especies de la familia Celastraceae (flora panameña): *Maytenus blepharodes* y *Crossopetalum lobatum*. Tesis Doctoral. Departamento de Química orgánica. Universidad de La laguna. La Laguna, Tenerife. 2000.

Salazar, G. C. M. *Maytenus truncata* Reissek: estudo fitoquímico, análises histológicas e da capacidade sortiva de folhas e avaliação de atividade biológica de extratos. Tese de Doutorado. Departamento de Química. Universidade Federal de Minas Gerais. Belo Horizonte, Minas Gerais. 2005.

Salazar, G. C. M.; Silva, G. D. F.; Duarte, L. P.; Vieira Filho, S. A.; Lula, I. S. Two epimeric friedelane triterpenes isolated from *Maytenus truncata* Reiss: ^1H and ^{13}C chemical shift assignments. *Magnetic Resonance in Chemistry*, **38**, 977-980, 2000.

Saleem, M.; Nazir, M.; Ali, M. S.; Hussain, H.; Lee, Y. S.; Riaz, N.; Jabbar, A. Antimicrobial natural products: na update on future antibiotic drug candidates. *Natural Product Reports*, **27**, 238-254, 2010.

Salunke, B. K.; Prakash, K.; Vishwakarma, K. S.; Maheshwari, V. L. Plant metabolites: an alternative and sustainable approach towards post harvest pest management in pulses. *Physiology and Molecular Biology of Plants*, **15**, 185-197, 2009.

- Santos, V. L.; Costa, V. B. M.; Agra, M. F.; Silva, B. A.; Batista, L. M. Pharmacological studies of ethanolic extracts of *Maytenus rígida* Mart (Celastraceae) in animal models. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*, **17**, 336-342, 2007.
- Schmidt, B. M.; Ribnicky, D. M.; Lipsky, P. E.; Raskin, I. Revisiting the ancient concept of botanical therapeutics. *Nature Chemical Biology*, **3**, 360-366, 2007.
- Schneberg, B. T.; Green, D. K.; Sneden, A. T. Dihydroagarofuran sesquiterpene alkaloid from *Maytenus putterlickoides*. *Journal of Natural Products*, **64**, 624-626, 2001.
- Sejas, L. M.; Silbert, S.; Reis, A. O.; Sader, H. S. Avaliação da qualidade dos discos com antimicrobianos pra testes de disco-difusão disponíveis comercialmente no Brasil. *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial*, **39**, 27-35, 2003.
- Shirota, O.; Morita, H.; Takeya, K.; Itokawa, H. Cytotoxic aromatic triterpenes from *Maytenus ilicifolia* and *Maytenus chuchuhuasca*. *Journal of Natural Products*, **57**, 1675-1681, 1994.
- Silva, M. S.; De Sousa, D. P.; Medeiros, V. M.; Folly, M. A. B.; Tavares, J. F.; Barbosa-Filho, J. M. Alkaloid, flavonoids, and pentacyclic triterpenoids of *Maytenus obtusifolia* Mart. *Biochemical Systematics and Ecology*, **36**, 500-503, 2008.
- Simmons, M. P.; Cappa, J. J.; Archer, R. H.; Ford, A. J.; Eichstedt, D.; Clevinger, C. C. Phylogeny of the Celastreae (Celastraceae) and the relationships of *Catha edulis* (qat) inferred from morphological characters and nuclear and plastid genes". *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **48**, 745-757, 2008.
- Sosa, S.; Morelli, C. F.; Tubaro, A.; Cairoli, P.; Speranza, G.; Manitto, P. Anti-inflammatory activity of *Maytenus senegalensis* root extracts and of maytenoic acid. *Phytomedicine*, **14**, 109-114, 2007.
- Soto, S. M. Human migration and infectious diseases. *Clinical Microbiology and Infection*, **15**, 26-28, 2009.

Souza, V. C.; Lorenzi, H. Botânica Sistemática - Guia ilustrado para identificação das famílias de angiospermas da flora brasileira, baseado em APG II. *Plantarum*, Nova Odessa, 2005. 640p.

Spivey A. C.; Weston, M.; Woodhead, S. Celastraceae sesquiterpenoids: biological activity and synthesis. *Chemical Society Reviews*, **31**, 43-59, 2002.

Torres-Romero, D.; King-Díaz, B.; Jiménez, I. A.; Lotina-Hennsen, B.; Bazzocchi, I. L. Sesquiterpenes from *Celastrus vulcanicola* as photosynthetic inhibitors. *Journal of Natural Products*, **71**, 1331-1335, 2008.

Trevisan, M. T. S.; Macedo, F. V. V.; Meent, M. V.; Rhee, I. K.; Verpoorte, R. Seleção de plantas com atividade anticolinesterase para tratamento da doença de Alzheimer. *Química Nova*, **26**, 301-304, 2003.

Valladão, F. N. Estudo quimiotaxonômico em folhas de espécies celastraceae e estudo fitoquímico em polpa de fruto de *Maytenus salicifolia* Reiss. (Celastraceae). Dissertação de Mestrado. Departamento de Química. Universidade Federal de Minas Gerais. Belo Horizonte, Minas Gerais. 2005.

Veiga Jr., V. F.; Pinto, A. C.; Maciel, M. A. M. Plantas Medicinais: cura segura? *Química Nova*, **28**, 519-528, 2005.

Veiga Jr., V. F.; Pinto, A. C.; Patitucci, M. L.; Zanino, L.; Calixto, J. B. Phytochemical and antioedematogenic studies of commercial Copaíba Oils available in Brazil. *Phytotherapy Research*, **15**, 476-480, 2001.

Viegas Jr., C. Terpenos com atividade inseticida: uma alternativa para o controle químico de insetos. *Química Nova*, **26**, 390-400, 2003.

Whitson, E. L.; Damayanthi Mala, S. M. V.; Veltri, C. A.; Bugni, T. S.; Dilip de Silva, E.; Ireland, C. M. Oppositines A and B, sesquiterpenes pyridine alkaloids from a Sri Lankan *Pleurostyliia opposita*. *Journal of Natural Products*, **69**, 1833-1835, 2006.

Xu, R.; Fazio, G. C.; Matsuda, S. P. T. On the origins of triterpenoid skeletal diversity. *Phytochemistry*, **65**, 261-291, 2004.

Yang, Z.; Zhang, X.; Duan, D.; Song, Z.; Yang, M.; Li, S. Modified TLC bioautographic method for screening acetylcholinesterase inhibitors from plants extracts. *Journal of Separation Science*, **32**, 3257-3259, 2009.

Zarbin, P. H. G.; Rodrigues, M. A. C. M.; Lima, E. R. Feromônios de insetos: tecnologia e desafios pra uma agricultura competitiva no Brasil. *Química Nova*, **32**, 722-731, 2009.