

**Estudo fitoquímico e atividade biológica
de raízes de *Maytenus imbricata* Mart. ex.
Reissek**

Vanessa Gregório Rodrigues

UFMG-ICEx/DQ.00865^a

D. 0497^a

VANESSA GREGÓRIO RODRIGUES

**ESTUDO FITOQUÍMICO E ATIVIDADE BIOLÓGICA DE RAÍZES
DE *Maytenus imbricata* Mart. ex. Reissek**

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

2011

Rodrigues, Vanessa Gregório

Estudo fitoquímico e atividade biológica de raízes de *Maytenus imbricata* Mart. ex. Reissek / Vanessa Gregório Rodrigues. 2011.

170f.: il.

Orientadora: Lucienir Pains Duarte.

Co-orientadora: Grácia Divina de Fátima Silva.

Colaborador: Sidney Augusto Vieira Filho.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Minas Gerais. Departamento de Química.

1 - Química orgânica. 2 - Fitoquímica. 3 - Celastraceae 4 - Triterpenos pentacíclicos.

I - Título II - Orientador

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

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

“O Senhor é meu pastor, nada me faltará.”
(Salmo 22).

“O senhor é minha luz e a minha salvação, a quem temerei?” (Salmo 26).

Dedico este trabalho ao meu pai Antônio José Rodrigues, minha mãe Jadna Maria Gregório Rodrigues e meus irmãos, Patrícia, Fabiana e Breno.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, por me colocar numa família iluminada e abençoada, me dar força sempre quando eu mais preciso e guiar sempre meu caminho para junto Dele.

Aos meus pais pelo incentivo aos estudos, educação religiosa, por nos unir na fé. Obrigada pelo amor, carinho, por apoiarem as minhas escolhas, ajudar em tudo que preciso, ouvir as minhas chateações e serem muito pacientes nessas horas. Amo vocês incondicionalmente!

Aos meus irmãos Patrícia, Fabiana e Breno pela alegria da convivência e sermos tão unidos. É maravilhoso sentir que tenho vocês comigo, pessoas que confio de coração. Não sei como seria sem vocês na minha vida. Amo vocês!

Aos meus sobrinhos Bianca, Bernardo, Brenda e Ana Luísa (afilhada). Meus amores, obrigada pela alegria, descontração e entenderem as minhas ausências.

Aos cunhados Cristiano, Leonardo e Joana, por completar nossa família com muita alegria, além de amar e cuidar das pessoas que mais amo nessa vida.

À minha família Gregório, sempre presente em minha vida e por quem guardo o gosto maravilhoso da minha infância de todos os fins de semana. Como era doloroso voltar para Divinópolis depois de tanto aconchego junto à vovó Justina (*in memoriam*) e ao vovô Tatinha (*in memoriam*) em Cláudio, com quem aprendi o dom da palavra carinho, a mais pura bondade e a fé em Deus. E aos tios, Jussara, Janice, Jair, Jairo, Duque e Lilo, uma família regada com muito amor.

Tia Jussara e tia Janice, por serem tão especiais. Obrigada pelo amor, pelas preocupações, pelas palavras motivadoras e orações constantes.

Aos primos e amigos, Amanda, Letícia, Julhiam, George, Sávio, Glauco, José Guilherme, Saulo, Nicolas e Danilo, pela energia positiva e pelo carinho.

À minha família Rodrigues, vovó Quita e vovô Viquinho (*in memoriam*) e todos os meus dezenove tios, alguns não mais aqui, mas sei que estão felizes comigo lá no céu. Obrigada pelo carinho e pelos divertidos encontros. A todos os primos, que juntos compartilhamos a alegria de termos uma grandiosa família sempre unida na fé e no amor.

Em especial, agradeço as minhas primas irmãs Debinhah, Pri e Sú e à Madrinha Marialva. Obrigada pelo amor, apoio e por mais de duas décadas de

amizade! E ao meu primo Álvaro pelos momentos de diversão, em Cláudio, às visitas a Lavras, Viçosa, BH e quem sabe EUA. Com você tudo é motivo de alegria!

À minha madrinha Dorli e ao padrinho Coimbra, pelo carinho e lembranças de uma infância feliz junto a eles.

Ao meu amado Félix, pelas infinitas ajudas diárias todo este tempo, junto a você não há problema que eu não possa resolver. Obrigada por me incentivar nas escolhas, apoiar nas decisões, me confortar nos desafios, cuidando e zelando do nosso amor. Amor da minha vida, obrigada por tudo!

Aos meus antigos e melhores amigos: Nanana (Marília), Tê (Stefânia), Dé (André), Aline (Tirelli) e Má (Maíra), que comemoram comigo hoje mais uma vitória! É sempre bom lembrar nossos momentos de alegria e convivência diária. Hoje, cada um no seu lugar, mas com a certeza que a distância nunca abala o que sentimos, porque é amizade verdadeira e eterna como sempre imaginávamos. Obrigada pelo carinho e estou muito feliz por que tenho vocês até hoje no meu caminho e na minha vida. Amo vocês.

À turma de Cláudio pela diversão e alegria: Dryka, Rafa, Gabezinha, Zi, Gá, Dé, Dedéia, Alvinho, Tavim, Mariana, Rodrigo, Samuel e Pedrinho.

Às amigas Isabella e Brilliann, por me incentivar e não me deixar desistir dos sonhos e desafios. Agradeço a ótima companhia, ensinamentos e amizade.

À Lilian, por ter sido uma ótima amiga e o cupido certo na hora certa. Em nossa moradia foi muitas as conversas, brigas e diversões. E por falar em dividir um lar, agradeço também a companhia de Van, Tê, Ana e Vivi.

À minha orientadora Dr^a. Lucienir Pains Duarte por ser uma pessoa maravilhosa, não só pelos valiosos ensinamentos, ajuda e grande dedicação, mas pelo incentivo direto e indireto, porque não há quem conviva com você, que não queira continuar sempre por perto. Obrigada pela amizade e alegria que transmite, você é muito especial. Lu, esse trabalho nunca teria sido possível sem a sua orientação, muito obrigada por tudo!

À minha co-orientadora Dr^a. Grácia Divina de Fátima Silva, pela oportunidade de realização do trabalho, pela orientação, pelo bom convívio durante todo este tempo e tranquilidade que nos proporciona.

Ao meu colaborador Professor Dr. Sidney Augusto Vieira Filho (Bibo), pela amizade e pela boa vontade em ajudar no que for preciso sem receber nada em troca. É de pessoas como você que o mundo precisa.

À minha colaboradora Professora Dr^a. Jacqueline Aparecida Takahashi, pela sua constante disponibilidade e pelas sugestões. Foi muito importante a sua contribuição na realização deste trabalho.

À minha colaboradora professora Dr^a. Lúcia Pinheiro dos Santos Pimenta, pela oportunidade e confiança na realização do teste biológico, além dos ensinamentos e alegria da convivência.

Às professoras Henriete da Silva Vieira, Maria Amélia Diamantino Boaventura e ao professor Antônio Flávio de Carvalho Alcântara por aceitarem o convite para participar da banca e contribuir para essa dissertação.

À minha amiga Gi (Gisele), por ser uma grande companheira desde a iniciação científica e por tornar as coisas mais fáceis com nossos encontros para conversarmos sobre a vida ou estudar para as tantas provas que fizemos juntas. Tenho certeza que a nossa ajuda mútua fez muita diferença no que somos e fazemos hoje, Obrigada!

Ao meu amigo Fernando, pelo seu exemplo de dedicação e esforço. Obrigada pela grande amizade, paciência, ajuda e ótimos conselhos. Nunca me esquecerei dos ensinamentos e do seu jeito especial de tratar uma desconhecida em 2008. Você é muito especial para mim!

Aos amigos e amigas do NEPLAM: Lorena, Isabella e Jeff, pela grande ajuda e amizade; Grasi Souza, pela companhia na batalha das disciplinas e estudos; Jailton, pelas diversões; Aline, minha vizinha de bancada e suas ótimas risadas; Fernanda, pela rápida conquista com seu jeito de ser; Leandro, pela enorme simpatia; Grazi, pela tranquilidade que transmite; Nathany, pela sua alegria; Cássia, pelo incentivo ao mestrado antes mesmo de nos unirmos ao NEPLAM; Marcela, pela calma e simpatia; Roqueline, que em pouco tempo já se tornou uma pessoa especial, com ótimas conversas sobre relacionamento. Ao Fred e Djalma pelo apoio. A todos, pela ótima convivência, carinho e amizade.

Aos amigos do Departamento de Química da UFMG, Alessandra (Lelê), Luíza, Salomão, Deyse, Marcela, Mariana Pires, Silvéria, Darliane, Leonel, Jaqueline (Jackie), Maria José (Bulé), Isabela, Ligiane, Paulo, Saulo, Daniel, Adilson e Jaque pelas conversas, desabafos e momentos de descontração.

À Camila, William e Karine Campos do Laboratório de Biotecnologia e Bioensaios do Departamento de Química da UFMG, pela realização dos testes antimicrobianos e da capacidade de inibição da enzima acetilcolinesterase.

Agradecimentos

À Dr^a. Ivana Silva Lula do Laboratório de Ressonância Magnética de Alta Resolução, pela obtenção dos espectros de RMN, que foi de grande valia na realização deste trabalho.

À Dr^a. Vanny Ferraz do Laboratório de Cromatografia, pela execução das análises de cromatografia gasosa e a disposição em ajudar.

À Paulete, Kátia e Lílian, funcionárias da secretaria da pós-graduação, pela paciência de me receber a qualquer hora e me ajudar com muita boa vontade.

Aos meus professores da pós-graduação: Fernando Carazza, Cláudio Luiz Donicci, Ângelo de Fátima, Adão A. Sabino, Wagner B. Almeida, Geraldo Magela, Zenilda Cardeal e José Dias, pela contribuição à minha formação acadêmica.

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

Ao CNPq pelo apoio financeiro.

SUMÁRIO

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

INTRODUÇÃO

Plantas medicinais	1
Atividades biológicas de produtos naturais	2
Metabolismo secundário	4
Biossíntese de triterpenos pentacíclicos	8
A família Celastraceae	11
O gênero <i>Maytenus</i>	13
A espécie <i>Maytenus imbricata</i>	16

OBJETIVOS

Objetivos do trabalho	19
-----------------------------	----

CAPÍTULO 1: ESTUDO FITOQUÍMICO

1.1 – Parte Experimental.....	20
1.1.1 – Materiais e métodos	20
1.1.1.1 – Métodos Cromatográficos	20
1.1.1.2 – Solventes e reagentes.....	20
1.1.1.3 – Instrumentos.....	21
1.1.1.4 – Atividade biológica.....	21
1.1.2 – Coleta e identificação do material vegetal	22
1.1.3 – Preparação do extrato hexânico-éter etílico das raízes de <i>Maytenus imbricata</i>	22
1.1.3.1 – Primeira elaboração de SEH	24
1.1.3.2 – Segunda elaboração de SEH	38

1.1.3.3 – Elaboração de FSEH.....	43
1.2 – Determinação Estrutural.....	51
1.2.1 – Determinação estrutural das substâncias e misturas isoladas de raízes de <i>Maytenus imbricata</i>	51
1.2.1.1 – M1: 11 α -hidroxilup-20(29)-en-3-ona	52
1.2.1.2 – M2: tingenona.....	58
1.2.1.3 – M3: 6-oxo-tingenol.....	63
1.2.1.4 – M4: mistura de hidrocarbonetos	73
1.2.1.5 – M1 + M5: 11 α -hidroxilup-20(29)-en-3-ona e 30-hidroxilup-20(29)-en-3-ona	76
1.2.1.6 – M6: 3,7-dioxo-friedelano.....	83
1.2.1.7 – M7: ácido palmítico.....	88
1.2.1.8 – M8: 3-oxo-29-hidroxifriedelano	91
1.2.1.9 – M9: 3 β ,11 α -di-hidroxi-lup-20(29)-eno (Nepeticina).....	96

CAPÍTULO 2: ESTUDO DA ATIVIDADE BIOLÓGICA

2.1 – Introdução Geral.....	102
2.2 – Atividade Antimicrobiana	103
2.2.1 – Introdução	103
2.2.2 – Teste antimicrobiano	105
2.2.3 – Método de Concentração Inibitória Mínima	106
2.2.3.1 – Metodologia	106
2.2.4 – Análise dos Resultados e Discussão.....	108
2.3 – Atividade de inibição da enzima acetilcolinesterase.....	122
2.3.1 – Introdução	122
2.3.2 – Método de Bioautografia	124
2.3.2.1 – Metodologia.....	124
2.3.3 – Análise dos Resultados e Discussão.....	126
2.4 – Avaliação do potencial tóxico através da atividade larvícida sobre <i>Artemia salina</i>	
2.4.1 – Introdução	128
2.4.2 – Método experimental, segundo Pimenta et al., 2003	130
2.4.3 – Análise dos Resultados e Discussão.....	132

CONCLUSÃO	135
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	137
ANEXO.....	156

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Principais fatores que podem influenciar o conteúdo dos metabólitos secundários de plantas (GOBBO-NETO e LOPES, 2007).	4
Figura 2: Exemplos de metabólitos secundários que podem ter sua concentração alterada por vários fatores (adaptado de GOBBO-NETO e LOPES, 2007).	6
Figura 3: Representação simplificada do ciclo biossintético dos metabólitos secundários terpenoides, que ocorrem em plantas do gênero <i>Maytenus</i> (adaptado de SANTOS, 2001).	7
Figura 4: Estrutura química do isopreno.	8
Figura 5: Esquema geral da via mevalonato de isoprenoides em plantas. Várias etapas são indicadas por setas tracejadas (Adaptado de MANN, 1995; CROTEAU et al., 2000; DEWICK, 2002; SOLOMONS e FRYHLE, 2006; KIRBY e KEASLING, 2009).	9
Figura 6: Esquema da rota biossintética simplificada dos triterpenos (Adaptado de DEWICK, 2002; XU et al., 2004; SOLOMONS e FRYHLE, 2006).	10
Figura 7: Estrutura química de substâncias isoladas de <i>A. populnea</i> da família Celastraceae.	12
Figura 8: Estrutura química de 3-oxo-12 α -hidroxifriedelano isolado de galhos de <i>M. gonoclada</i> , uma espécie do gênero <i>Maytenus</i>	14
Figura 9: Triterpenos quinonametídeos e aromáticos isolados de <i>M. chuchuhuasca</i> , uma espécie do gênero <i>Maytenus</i>	14
Figura 10: Nepeticina e 3- <i>epi</i> -nepeticina, lupanos isolados de raízes de espécies do gênero <i>Maytenus</i>	15
Figura 11: Fotografia de raízes, folhas e frutos de <i>Maytenus imbricata</i> (Foto da autora).	16
Figura 12: Substâncias isoladas de folhas, caules e galhos de <i>Maytenus imbricata</i>	17
Figura 13: Preparação dos extratos das raízes de <i>Maytenus imbricata</i>	23
Figura 14: Fracionamento de SEH1.	38
Figura 15: Fracionamento de SEH2.	42
Figura 16: Fracionamento de FSEH.	50
Figura 17: Espectro de M1 obtido no IV (KBr, cm ⁻¹).	53

Figura 18: Espectro e ampliações de RMN de ^1H de M1 (CDCl_3 ; 400 MHz).	54
Figura 19: Espectro de RMN de ^{13}C de M1 (CDCl_3 ; 100 MHz).	55
Figura 20: Expansão do espectro de RMN de ^{13}C de M1 (CDCl_3 ; 100 MHz).	55
Figura 21: Subespectro DEPT-135 de M1 (CDCl_3 ; 100 MHz).	56
Figura 22: Espectro de M2 obtido na região do IV (KBr , cm^{-1}).	59
Figura 23: Espectro e expansões de RMN de ^1H de M2 (CDCl_3 , 400 MHz).	60
Figura 24: Espectro de RMN de ^{13}C de M2 (CDCl_3 , 100 MHz).	60
Figura 25: Expansão do espectro de RMN de ^{13}C de M2 (CDCl_3 , 100 MHz).	61
Figura 26: Subespectro de DEPT-135 de M2 (CDCl_3 , 100 MHz).	61
Figura 27: Espectro de M3 obtido na região do IV (KBr , cm^{-1}).	64
Figura 28: Espectro de RMN de ^1H (400 MHz) de M3 em CDCl_3 e gotas de CD_3OD	65
Figura 29: Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz) de M3 em CDCl_3 e gotas de CD_3OD	65
Figura 30: Expansão do espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz) de M3 em CDCl_3 e gotas de CD_3OD	66
Figura 31: Subespectro DEPT-135 (100 MHz) de M3 em CDCl_3 e gotas de CD_3OD	66
Figura 32: Mapa de contornos HSQC (400 MHz) de M3 em CDCl_3 e gotas de CD_3OD	67
Figura 33: Expansão do mapa de contornos HSQC (400 MHz) de M3 em CDCl_3 e gotas de CD_3OD	68
Figura 34: Mapa de contornos HMBC (400 MHz) de M3 em CDCl_3 e gotas de CD_3OD	69
Figura 35: Expansão do mapa de contornos HMBC (400 MHz) de M3 em CDCl_3 e gotas de CD_3OD	70
Figura 36: Expansão do mapa de contornos HMBC (400 MHz) de M3 em CDCl_3 e gotas de CD_3OD	71
Figura 37: Cromatograma de M4 Coluna BP1 30 m x 0,25 mm (SGE); temperatura inicial 200 °C até 300 °C (10 °C /min), detector de 300 °C	74

Figura 38: Espectro de RMN de ^1H (400 MHz) de M4 em CDCl_3	74
Figura 39: Espectro e expansões de RMN de ^{13}C (100 MHz) de M4 em CDCl_3	75
Figura 40: Subespectro DEPT-135 (100 MHz) de M3 em CDCl_3	75
Figura 41: Espectro de M1 + M5 obtido na região do IV (KBr , cm^{-1}).	77
Figura 42: Espectro e expansões de RMN de ^1H de M1 + M5 (CDCl_3 , 400 MHz). ..	78
Figura 43: Espectro e expansões de RMN de ^{13}C de M1 + M5 (CDCl_3 , 100 MHz).	79
Figura 44: Expansão do espectro de RMN de ^{13}C de M1 + M5 (CDCl_3 , 100 MHz).	79
Figura 45: Expansão do espectro de RMN de ^{13}C de M1 + M5 (CDCl_3 , 100 MHz).	80
Figura 46: Subespectro DEPT-135 (100 MHz) de M1 + M5 em CDCl_3	80
Figura 47: Expansão do subespectro DEPT-135 (100 MHz) de M1 + M5 em CDCl_3	81
Figura 48: Espectro de M6 obtido na região do IV (KBr , cm^{-1}). A banda em 3442 cm^{-1} foi atribuída a umidade do KBr	84
Figura 49: Espectro e expansão de RMN de ^1H (200 MHz) de M6 em CDCl_3	85
Figura 50: Espectro de RMN de ^{13}C (50 MHz) de M6 em CDCl_3	85
Figura 51: Expansão do espectro de RMN de ^{13}C (50 MHz) de M6 em CDCl_3	86
Figura 52: Subespectro DEPT-135 (50 MHz) de M6 em CDCl_3	86
Figura 53: Espectro de RMN de ^1H (200 MHz) de M7 em CDCl_3	89
Figura 54: Espectro de RMN de ^{13}C (50 MHz) de M7 em CDCl_3	89
Figura 55: Subespectro DEPT-135 (50 MHz) de M7 em CDCl_3	90
Figura 56: Espectro na região do IV de M8 (KBr , cm^{-1}).	92
Figura 57: Espectro e expansões de RMN de ^1H (400 MHz) de M8 em CDCl_3	93
Figura 58: Espectro e expansão de RMN de ^{13}C (100 MHz) de M8 em CDCl_3	93
Figura 59: Subespectro DEPT-135 e expansão (100 MHz) de M8 em CDCl_3	94
Figura 60: Espectro de M9 obtido no IV (KBr).	97

Figura 61: Espectro de RMN de ^1H de M9 (CDCl_3 ; 200 MHz).	98
Figura 62: Espectro de RMN de ^{13}C de M9 (CDCl_3 ; 50 MHz).	99
Figura 63: Expansão do espectro de RMN de ^{13}C de M9 (CDCl_3 ; 50 MHz).	99
Figura 64: Subespectro DEPT-135 de M9 (CDCl_3 ; 50 MHz).	100
Figura 65: Fotos dos microorganismos avaliados.	105
Figura 66: Gráficos das concentrações de 250-0,12 $\mu\text{g/mL}$ das amostras M1, M2, M3, M1 + M5, SEH e FSEH e a % de inibição sobre <i>Salmonella typhimurium</i>	108
Figura 67: Gráficos das concentrações de 250-0,12 $\mu\text{g/mL}$ das amostras SEAT, FSEAT e SEM e a % de inibição sobre <i>Salmonella typhimurium</i>	109
Figura 68: Gráfico das concentrações de 250-0,12 $\mu\text{g/mL}$ da amostra M1, M2, M3 e M1 + M5 e a % de inibição sobre <i>Escherichia coli</i>	110
Figura 69: Gráfico das concentrações de 250-0,12 $\mu\text{g/mL}$ das amostras SEH, FSEH, SEAT, FSEAT e SEM e a % de inibição sobre <i>Escherichia coli</i>	111
Figura 70: Gráfico das concentrações de 250-0,12 $\mu\text{g/mL}$ das amostras M1, M2, M3 e M1 + M5 e a % de inibição sobre <i>Staphylococcus aureus</i>	112
Figura 71: Gráfico das concentrações de 250-0,12 $\mu\text{g/mL}$ das amostras SEH, FSEH, SEAT, FSEAT e SEM e a % de inibição sobre <i>Staphylococcus aureus</i>	113
Figura 72: Gráfico das concentrações de 250-0,12 $\mu\text{g/mL}$ das amostras M1, M2, M3, e M1 + M5 e a % de inibição sobre <i>Bacillus cereus</i>	114
Figura 73: Gráfico das concentrações de 250-0,12 $\mu\text{g/mL}$ das amostras SEH, FSEH, SEAT, FSEAT e SEM e a % de inibição sobre <i>Bacillus cereus</i> . ..	115
Figura 74: Gráfico das concentrações de 250-0,12 $\mu\text{g/mL}$ das amostras M1, M2, M3, e M1 + M5 e a % de inibição sobre <i>Candida albicans</i>	116
Figura 75: Gráfico das concentrações de 250-0,12 $\mu\text{g/mL}$ das amostras SEH, FSEH, SEAT, FSEAT e SEM e a % de inibição sobre <i>Candida albicans</i>	117
Figura 76: Hidrólise da acetilcolina em colina e ácido acético, catalisada pela enzima acetilcolinesterase (MIAO et al., 2010).	122
Figura 77: Exemplos representativos de fármacos usados no tratamento de mal de Alzheimer (BARBOSA FILHO et al., 2006).	123

Figura 78. Reação da acetilcolinesterase com acetato de naftila e a formação do composto de coloração púrpura (Figura adaptada de MIAO, et al., 2010).....	126
Figura 79: Bioautograma das amostras testadas e do padrão utilizado (Galantamina) e estrutura química desta (Foto dos extratos: William S. T. Sallum e das substâncias: autora).	127
Figura 80: Estrutura química de substâncias que apresentam atividade citotóxica	129
Figura 81: <i>Artemia salina</i> com ampliação de tamanho.	129
Figura 82: Experimento realizado no Laboratório de Químico e Bioprospecção de Plantas do Cerrado.	132

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1. Ordem de eluição da coluna A e grupos relacionados	24
Tabela 2. Ordem de eluição da coluna B e subgrupos relacionados	25
Tabela 3. Ordem de eluição da coluna C e subgrupos relacionados	26
Tabela 4. Ordem de eluição da coluna D e subgrupos relacionados	27
Tabela 5. Ordem de eluição da coluna E e subgrupos relacionados	28
Tabela 6. Ordem de eluição da coluna F e subgrupos relacionados.....	29
Tabela 7. Ordem de eluição da coluna G e subgrupos relacionados	30
Tabela 8. Subgrupos relacionados com a coluna H.....	30
Tabela 9. Ordem de eluição da coluna I e subgrupos relacionados.....	32
Tabela 10. Subgrupos relacionados com a coluna J.....	33
Tabela 11. Ordem de eluição da coluna K e subgrupos relacionados	34
Tabela 12. Subgrupos relacionados com a coluna L.....	35
Tabela 13. Ordem de eluição da coluna M e subgrupos relacionados.....	36
Tabela 14. Subgrupos relacionados com a coluna N	37
Tabela 15. Ordem de eluição da coluna A e grupos relacionados	39
Tabela 16. Ordem de eluição da coluna B e subgrupos relacionados	40
Tabela 17. Ordem de eluição da coluna C e subgrupos relacionados	41
Tabela 18. Grupos relacionados com a coluna A.....	43
Tabela 19. Ordem de eluição da coluna B e subgrupos relacionados	45
Tabela 20. Ordem de eluição da coluna C e subgrupos relacionados	46
Tabela 21. Ordem de eluição da coluna D e subgrupos relacionados	47
Tabela 22. Ordem de eluição da coluna E e subgrupos relacionados	48
Tabela 23. Ordem de eluição da coluna F e subgrupos relacionados.....	49
Tabela 24: Substâncias e misturas isoladas de <i>Maytenus imbricata</i>	51

Tabela 25: Comparação dos dados de RMN de ^{13}C de M1 com os dados da literatura para 11 α -hidroxilup-20(29)-en-3-ona (SILVA, 2007a).....	57
Tabela 26: Comparação dos dados de RMN de ^{13}C de M2 com os dados da literatura para tingenona (SOTANAPHUN et al., 1998)	62
Tabela 27: Comparação dos dados de RMN de ^{13}C de M3 com os dados da literatura para 6-oxo-tingenol (DUARTE, 2000)	72
Tabela 28: Dados obtidos por cromatografia gasosa de M4	73
Tabela 29: Comparação dos dados de RMN de ^{13}C de M1 e M5 com os dados da literatura para 11 α -hidroxilup-20(29)-en-3-ona e 30-hidroxilup-20(29)-en-3-ona (SILVA, 2007a), respectivamente	82
Tabela 30: Comparação dos dados de RMN de ^{13}C de M6 com os dados da literatura (MAHATO e KUNDU, 1994)	87
Tabela 31: Comparação dos dados de RMN de ^{13}C de M7 com os dados da literatura para o ácido palmítico (COUPERUS et al., 1978)	90
Tabela 32: Comparação dos dados de RMN de ^{13}C de M8 com os dados da literatura para 3-oxo-29-hidroxifriedelano (MAHATO e KUNDU, 1994) ..	95
Tabela 33: Comparação dos dados de RMN de ^{13}C de M9 com os dados da literatura para 3 β ,11 α -di-hidroxilup-20(29)-eno (MAHATO e KUNDU, 1994)	101
Tabela 34: Amostras utilizadas no teste antimicrobiano	107
Tabela 35: Concentração inibitória mínima-CIM ₅₀ das amostras frente aos cinco micro-organismos	118
Tabela 36: Concentração inibitória mínima-CIM ₉₀ das amostras frente aos cinco micro-organismos	120
Tabela 37: Amostras utilizadas no teste de inibição da enzima acetilcolinesterase	125
Tabela 38: Amostras avaliadas quanto ao seu potencial larvicida sobre <i>A. salina</i> ..	130
Tabela 39: Concentrações das amostras utilizadas no teste	131
Tabela 40: Toxicidade dos extratos e substâncias isoladas de raízes de <i>Maytenus imbricata</i> contra <i>Artemia salina</i>	133

ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

δ – Deslocamento químico

1D – Uma dimensão

2D – Duas dimensões

AcOEt – Acetato de etila

ATCC – *American Type Culture Collection*

ATP – Adenosina Trifosfato

BHI – *Broth Heart Infusion*

BP1 – *Base peak*

CC – Cromatografia em Coluna

CCD – Cromatografia em Camada Delgada

CeBio – Centro de Bioterismo

CerQBio - Laboratório de Químico e Bioprospecção de Plantas do Cerrado

CG – Cromatografia a Gás

CIM – Concentração Inibitória Mínima

CIM₅₀ – Concentração Inibitória Mínima para inibir 50% dos indivíduos

CIM₉₀ – Concentração Inibitória Mínima para inibir 90% dos indivíduos

d – duplete

DEPT-135 – *Distortionless Enhancement by Polarization Transfer 135*

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

DMSO – Dimetilsulfóxido

DL₅₀ – Dose Letal de 50% dos indivíduos

DQ – Departamento de Química

DXP – 1-Desoxi-D-xilulose 5-fosfato

FDA – *Food and Drug Administration*

FPP – *Farnesyl pyrophosphate* (Pirofosfato de farnesila)

FSEH – filtrado do extrato em hexano/éter etílico (1:1)

FSEAT – filtrado do extrato em acetato de etila

GGPP – *Geranylgeranyl pyrophosphate* (Difosfato de Geranilgeranila)

GPP – *Geranyl pyrophosphate* (Difosfato de geranila)

HC – Hidrocarboneto

Hex – hexano

HIV – *Human immunodeficiency vírus* (vírus da imunodeficiência adquirida)

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

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

IPP – *Isopentenyl diphosphate* (Pirofostato de isopentenila)

ICB – Instituto de Ciências Biológicas

IV – Infravermelho

J – Constante de acoplamento

LAREMAR – Laboratório de Ressonância Magnética de Alta Resolução

LB – Liebermann Burchard

NEPLAM – Núcleo de Estudo de Plantas Medicinais

OMS – Organização Mundial da Saúde

pág. – página

PP – difosfato

RMN – Ressonância Magnética Nuclear

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

RMN de ^1H – Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio

s – simpleto

SEH – sólido do extrato em hexano/éter etílico (1:1)

SEAT – sólido do extrato em acetato de etila

SEM – sólido do extrato em metanol

T_r – tempo de retenção

TTPC – triterpeno pentacíclico

TMS – Tetrametilsilano

RESUMO

Este trabalho descreve o estudo fitoquímico do extrato hexânico/éter etílico (1:1) das raízes de *Maytenus imbricata*, bem como uma avaliação da atividade biológica de extratos e substâncias isoladas.

O estudo fitoquímico resultou no isolamento e caracterização de sete triterpenos pentacíclicos, 11 α -hidroxilup-20(29)-en-3-ona, tingenona, 6-oxo-tingenol, 30-hidroxilup-20(29)-en-3-ona, 3,7-dioxofriedelano, 3-oxo-29-hidroxifriedelano e 3 β ,11 α -di-hidroxilup-20(29)-eno, e também, ácido palmítico e uma mistura de hidrocarbonetos de cadeia longa (C-27 a C-32). Todas as substâncias tiveram suas estruturas elucidadas por métodos espectrométricos (IV, RMN de ^1H e de ^{13}C) e cromatografia gasosa.

Tingenona, 6-oxo-tingenol, 3,7-dioxo-friedelano, 3-oxo-29-hidroxifriedelano, 3 β ,11 α -di-hidroxi-lup-20(29)-eno, ácido palmítico e a mistura de hidrocarbonetos foram isolados pela primeira vez em *M. imbricata*. O composto 6-oxo-tingenol foi isolado pela primeira vez no NEPLAM e sua estrutura foi determinada por meio de RMN 1D e 2D.

Os extratos e alguns constituintes foram submetidos a testes de atividade antimicrobiana (antibacteriana e antifúngica), da propriedade de inibição da enzima acetilcolinesterase e de avaliação do potencial tóxico através da atividade larvicida usando *Artemia salina*.

Todos os extratos e 11 α -hidroxilup-20(29)-en-3-ona, tingenona e 6-oxo-tingenol apresentaram atividade frente a *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Salmonella typhimurium*, *Escherichia coli* e *Candida albicans*. A mistura de triterpenos (11 α -hidroxilup-20(29)-en-3-ona + 30-hidroxilup-20(29)-en-3-ona) apresentou atividade contra *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus* e *Candida albicans*.

Na avaliação da capacidade de inibição da enzima acetilcolinesterase pelo método de bioautografia, os constituintes 11 α -hidroxilup-20(29)-en-3-ona, 3,7-dioxofriedelano e 3-oxo-29-hidroxifriedelano foram ativas.

Pelo teste utilizando *Artemia salina*, todos os extratos e substâncias testadas apresentaram potencial atividade larvicida.

ABSTRACT

This work described the phytochemical study of the hexane/diethyl ether (1:1) extract of the roots of *Maytenus imbricata*, and the evaluation of biological activity of extracts and isolated substances.

The phytochemical study resulted in the isolation and characterization of seven pentacyclic triterpenes, 11 α -hydroxylup-20(29)-en-3-one, tingenone, 6-oxo-tingenol, 30-hydroxylup-20(29)-en-3-one, 3,7-dioxofriedelane, 3-oxo-29-hydroxyfriedelane and 3 β ,11 α -di-hydroxylup-20(29)-ene, as well as palmitic acid and a mixture of long chain hydrocarbons (C-27 to C-32). All substances had their structures elucidated by spectrometric methods (IR, ^1H and ^{13}C NMR) and gas chromatography.

Tingenone, 6-oxo-tingenol, 3,7-dioxofriedelane, 3-oxo-29-hydroxyfriedelane, 3 β , 11 α -di-hydroxylup-20(29)-ene, palmitic acid and the mixture of hydrocarbons were isolated by first time in *M. imbricata*. The compound 6-oxo-tingenol was for the first time isolated in NEPLAM and its structure was determined by 1D and 2D NMR.

The extracts and some constituents were submitted to assays of antimicrobial activity (antibacterial and antifungal), inhibition property of the enzyme acetylcholinesterase, and evaluation of toxic potential through the larvicidal activity using *Artemia salina*.

All extracts and 11 α -hydroxylup-20(29)-en-3-one, tingenone and 6-oxo-tingenol showed activity against *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Salmonella typhimurium*, *Escherichia coli* and *Candida albicans*. The mixture of triterpenes (11 α -hydroxylup-20(29)-en-3-one + 30-hydroxylup--20(29)-en-3-one) was active against *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus* and *Candida albicans*.

In the evaluation of inhibition capacity of the enzyme acetylcholinesterase by the bioautography method, the constituents 11 α -hydroxylup-20(29)-en-3-one, 3,7-dioxofriedelan and 3-oxo-29-hydroxyfriedelan were active.

By the method using *Artemia salina*, all extracts and compounds tested showed potential larvicidal activity.

INTRODUÇÃO

Plantas medicinais

Desde antigos períodos na história o uso de plantas medicinais está presente não só devido ao seu caráter alimentar, mas, também, às suas propriedades fitoterápicas, cosméticas e agroquímicas. O alívio e cura de doenças pela ingestão de ervas podem ser considerados a primeira forma de utilização dos produtos naturais na medicina popular (JÚNIOR e BOLZANI, 2006).

A biodiversidade genética brasileira é muito complexa, contando com mais de 55.000 espécies catalogadas de um total estimado entre 350.000-550.000 existentes, sendo que 50% são angiospermas, que popularmente apresentam várias atividades biológicas (SIMÕES e SCHENKEL, 2001). A biodiversidade amazônica apresenta uma grande fonte de plantas medicinais ricas em compostos bioativos, cuja exploração racional contribui para o desenvolvimento sustentável da região (DIAS et al., 2010). Inúmeras plantas brasileiras utilizadas pela população não foram estudadas e pesquisas são de grande importância no descobrimento e desenvolvimento de novas moléculas com atividade terapêutica e fitoterápicos genuinamente nacionais (MONTANARI e BOLZANI, 2001).

Os fármacos derivados de produtos naturais são capazes de tratar 87% das enfermidades humanas, podendo ser usados como antibacterianos, anticoagulantes, antiparasitários, imunossupressores e anticancerígenos (BRANDÃO et al., 2010).

Estudos mostraram que 50% dos medicamentos aprovados entre 1981 e 2006, pelo *Food and Drug Administration* (FDA), são direta ou indiretamente derivados de produtos naturais (FERREIRA e PINTO, 2010). E que mais de 60% de medicamentos anticancerígenos têm sua origem em uma fonte natural (CRAGG e NEWMAN, 2009).

Além disso, a Organização Mundial de Saúde (OMS), afirma que cerca de 80% da população de países em desenvolvimento dependem essencialmente do uso de plantas para cuidados com a saúde (VEIGA, JÚNIOR, 2005; CALIXTO, 2000; SOUZA-MOREIRA et al., 2010). Pesquisas realizadas por Araújo e colaboradores (2007) mostraram o uso de plantas medicinais por pacientes com câncer, de

hospitais da rede pública de saúde, para o combate a hipertensão, colesterol alto, inflamação, ferimentos, má digestão, nervosismo, insônia e cólicas infantis.

O uso de extratos vegetais no tratamento de doenças é generalizado no Brasil, por ter uma rica medicina tradicional (ANDRADE et al., 2007). A indústria farmacêutica, motivada pela descoberta de quimioterápicos eficazes, aumentou o interesse pelos medicamentos de origem vegetal, como a vimblastina e a vincristina, alcaloides antitumorais isolados da vinca (MONTANARI e BOLZANI, 2001).

As atividades terapêuticas no organismo são causadas por componentes químicos chamados de princípios ativos. Há uma grande busca por processos que os identifiquem e caracterizem, comprovando sua eficácia. (OLIVEIRA et al., 2006b).

Alguns princípios ativos eficazes, ainda são isolados de plantas, como por exemplo, a morfina, um analgésico derivado do ópio, isolado da papoula (MONTANARI e BOLZANI, 2001).

Outro exemplo é a própolis, um produto de resinas encontradas nas flores de diversas plantas de ampla utilidade para abelhas e para os seres humanos. Devido à suas inúmeras propriedades benéficas, há amplo uso comercial em produtos farmacêuticos, cosméticos e de higiene pessoal na forma de extratos líquidos, além de comprovada atividade biológica, como antioxidante e antibacteriana (CABRAL et al., 2009).

Atividades biológicas de produtos naturais

As indústrias farmacêuticas produziram e desenvolveram uma variedade de antibióticos que, devido ao uso abusivo da população, resultou na ineficiência de fármacos utilizados no combate a doenças infecciosas, causando sérios problemas de saúde pública. Por este motivo, há muitos testes antibacterianos e antifúngicos com o uso de substâncias e extratos oriundos de plantas como meio alternativo para a descoberta de novas moléculas com este potencial (ROJAS et al., 2003; BOUZADA et al., 2009; PACHECO et al., 2010).

Recentes estudos utilizando extratos e substâncias isoladas de plantas, mostraram que estes apresentam grande potencial como antioxidante (SANTOS et al., 2009; VASCONCELOS et al., 2009; ALMEIDA et al., 2010), antimicrobiano (SANTOS et al., 2010; PACHECO et al., 2010), larvicida (SANTOS et al., 2009;

VASCONCELOS et al., 2009; COSTA et al., 2009; DAMASCENO et al., 2011), leishmanicida (ALVARENGA et al., 2008; DELGADO-MÉNDEZ et al., 2008), tripanomicida (LIAO et al., 2008), anti-inflamatório (SOSA et al., 2007) e antitumoral (CHÁVEZ et al., 1999; RUFINO et al., 2009; VAZDEKIS et al., 2009; DE ALMEIDA et al., 2010).

Atualmente, têm-se evidenciado um aumento significativo no uso e na avaliação da capacidade antioxidante de extratos e substâncias isoladas de plantas, pois os antioxidantes sintéticos têm sido restringidos por seus efeitos adversos em diferentes espécies de animais em experiência (DURAN e PADILLA, 1993). Há inúmeras pesquisas na procura de substâncias e extratos isolados de plantas com potencial antioxidante (PERES et al., 2009; AYRE et al., 2009; PESSUTO et al., 2009; ALMEIDA et al., 2010; DAMASCENO et al., 2011).

Na agricultura, observa-se também uma busca incessante por produtos naturais com atividades biológicas que minimizem o impacto ambiental causado por diversos defensivos agrícolas, como os inseticidas. Os constituintes químicos presentes em plantas têm essas atividades e mostram-se promissores no combate a pragas na agricultura (BRITO et al., 2006). Estudos recentes comprovam o potencial inseticida de substâncias e extratos isolados de plantas frente a vários insetos-pragas que causam sérios prejuízos a plantações ou a grãos armazenados (MATOS et al., 2009; LIMA et al., 2009; NEBO et al., 2010; LIMA et al., 2010).

Estes princípios ativos distribuem-se pelos diferentes órgãos das plantas, estando envolvidos no metabolismo secundário (OLIVEIRA et al., 2006b). A fitoquímica é umas das áreas que está envolvida na pesquisa de novas substâncias oriundas de plantas, que visa o isolamento, purificação e caracterização destes metabólitos (ALBUQUERQUE e HANAZAKI, 2006).

Metabolismo secundário

O metabolismo corresponde o conjunto de reações químicas que ocorrem nas células. Os compostos químicos são formados, degradados ou transformados pela ação de enzimas, suprimindo o organismo de energia e compostos. A presença de enzimas específicas garante certa direção a essas reações, estabelecendo o que se denomina de rotas metabólicas (LENHINGER et al., 2002).

As plantas possuem dois tipos de metabolismo: o primário que se constitui pela formação das principais macromoléculas (proteínas, carboidratos, lipídeos e ácidos nucleicos, que são as mesmas em um organismo animal ou vegetal) e o secundário, que produz múltiplos compostos que não são considerados essenciais, porém garantem vantagem para a sobrevivência da planta (SIMÕES et al., 2004).

A síntese de metabólitos secundários pode ser afetada por condições ambientais, por representarem uma interface química entre as plantas e o meio ambiente circundante (KUTCHAN, 2001). Os fatores que podem influenciar o conteúdo de metabólitos secundários estão mostrados na Figura 1 (GOBBO-NETO e LOPES, 2007).

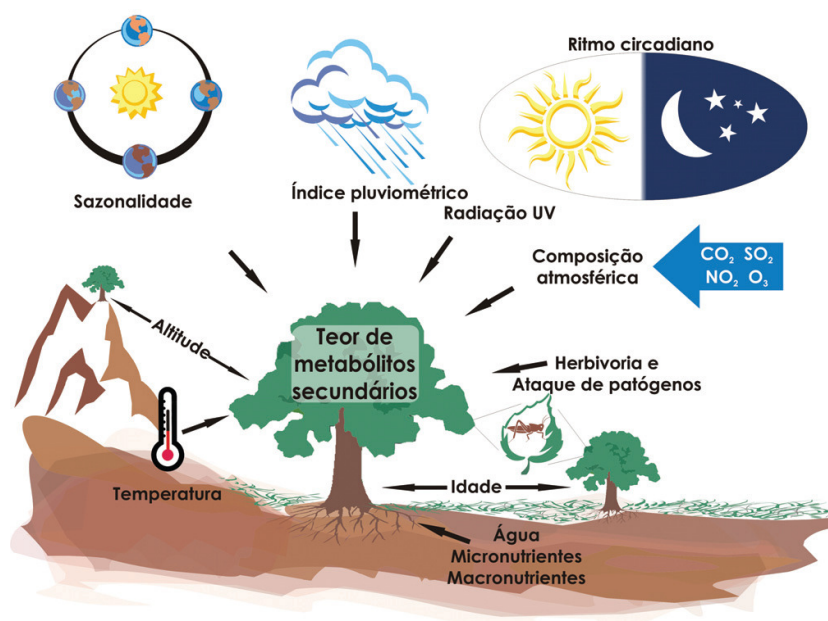


Figura 1: Principais fatores que podem influenciar o conteúdo dos metabólitos secundários de plantas (GOBBO-NETO e LOPES, 2007).

A Figura 2 (pág. 6) apresenta alguns metabólitos secundários de plantas que podem ser influenciados pelos fatores: **sazonalidade**, como exemplo a ginkgetina, encontrada nas folhas de *Ginkgo biloba* e utilizada no tratamento de distúrbios vasculares periféricos e cerebrais. Esta apresenta concentrações variadas de acordo com a época de coleta. O **ritmo circadiano**, como o eugenol, encontrado no óleo essencial da alfavaca (*Ocimum gratissimum*), que apresenta uma variação de mais de 80% na concentração, o qual atinge um máximo em torno do meio-dia, horário em que é responsável por 98% do óleo essencial, em contraste em torno de 17h, com concentração apenas de 11%. A **idade ou desenvolvimento**, como a helenalina, uma lactona sesquiterpênica, encontrada em *Arnica montana* e utilizada como anti-inflamatório. Quando jovens, acumulam majoritariamente derivados da helenalina, mas praticamente não há formação deste composto quando chega na fase adulta. A **temperatura**, como exemplo a escopolina, encontrado em folhas de tabaco (*Nicotiana tabacum*). Quando há uma diminuição de temperatura o conteúdo deste metabólito sofre um aumento de quatro a cinco vezes. A **disponibilidade hídrica**, como a hiperforina, encontrada em flores de *Hypericum perforatum* e apresenta um decréscimo na concentração sob condições de escassez de água. A **radiação ultravioleta**, como a vimblastina, encontrada em *Catharanthus roseus* (vinca) e apresenta atividade antitumoral, sendo utilizada na terapêutica de vários tipos de câncer. A sua produção aumenta quando na presença de radiação UV na faixa entre 290-380 nm. Os **nutrientes**, cuja escassez resulta em aumento nas concentrações de metabólitos secundários, exceto no caso da deficiência de nitrogênio e enxofre, em que diminui a produção de metabólitos secundários. A relação apenas metabólitos e nutrientes é muito complexa, dependendo da planta e de outros fatores. A **altitude**, como a piretrina, encontradas em *Chrysanthemum* e utilizadas comercialmente como inseticidas, tem maior conteúdo em maiores altitudes. A **poluição atmosférica**, como a digoxina, encontrada em *Digitalis lanata* e utilizada na terapêutica da insuficiência cardíaca congestiva. Esta produz 3,5 vezes mais quando cultivada em casas de vegetação com atmosfera enriquecida com CO₂ (GOBBO-NETO e LOPES, 2007).

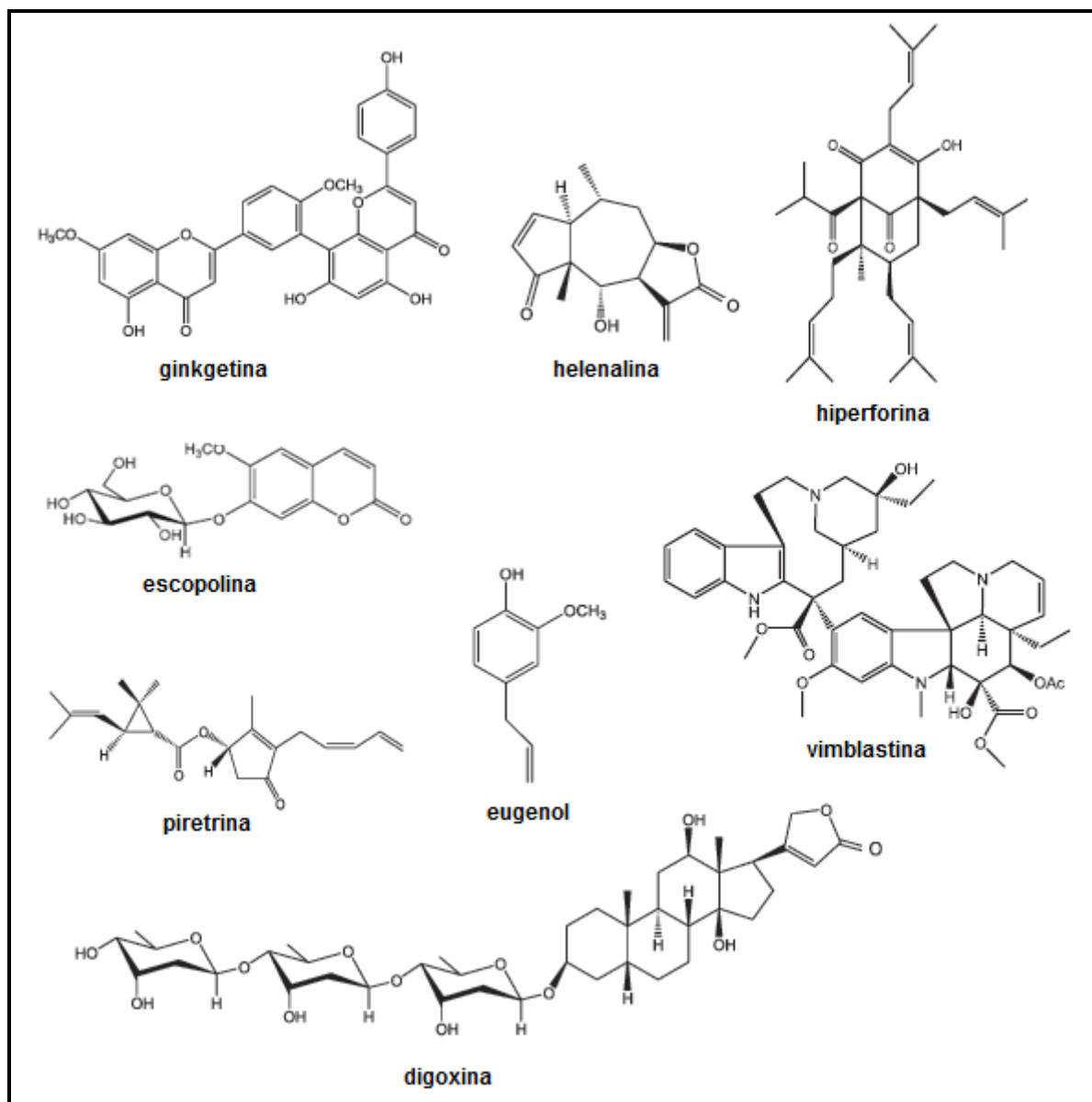


Figura 2: Exemplos de metabólitos secundários que podem ter sua concentração alterada por vários fatores (adaptado de GOBBO-NETO e LOPES, 2007).

A produção destes componentes tem como função proteger a planta da herbivoria, do ataque de patógenos, bem como beneficiá-la na competição com outros vegetais. Além disso, favorecem a atração de polinizadores, de dispersores de semente e micro-organismos simbiotes (ALVES, 2001).

Os vários compostos provenientes do metabolismo são interessantes aos seres humanos principalmente por sua potencialidade em se tornar um produto terapêutico. Muitos desses componentes, quando utilizados em doses adequadas,

convertem-se em medicamentos, atuando como antidepressivos, sedativos, relaxantes musculares ou anestésicos (BRISKIN, 2000).

Metabólitos secundários de origem vegetal são uma fonte potencial de fármacos antitrombóticos. A procura de novas moléculas com esta atividade a partir de produtos naturais é justificada pelo aumento da incidência de doenças cardiovasculares e acidentes vasculares, que segundo a OMS, em 2015 será a principal causa de óbitos nos países desenvolvidos e subdesenvolvidos (CHAVES et al., 2010).

Os metabólitos secundários originam-se do metabolismo da glicose, via dois intermediários principais: o ácido chiquímico e o acetato (Figura 3). Eles produzem moléculas dotadas de grandes grupos funcionais, como ácidos graxos, ésteres, hidrocarbonetos, alcoóis, aldeídos, cetonas, compostos acetilênicos, alcaloides, compostos fenólicos e cumarinas (SANTOS, 2001). Existem três grandes grupos de metabólitos secundários: terpenos, compostos fenólicos e alcaloides.

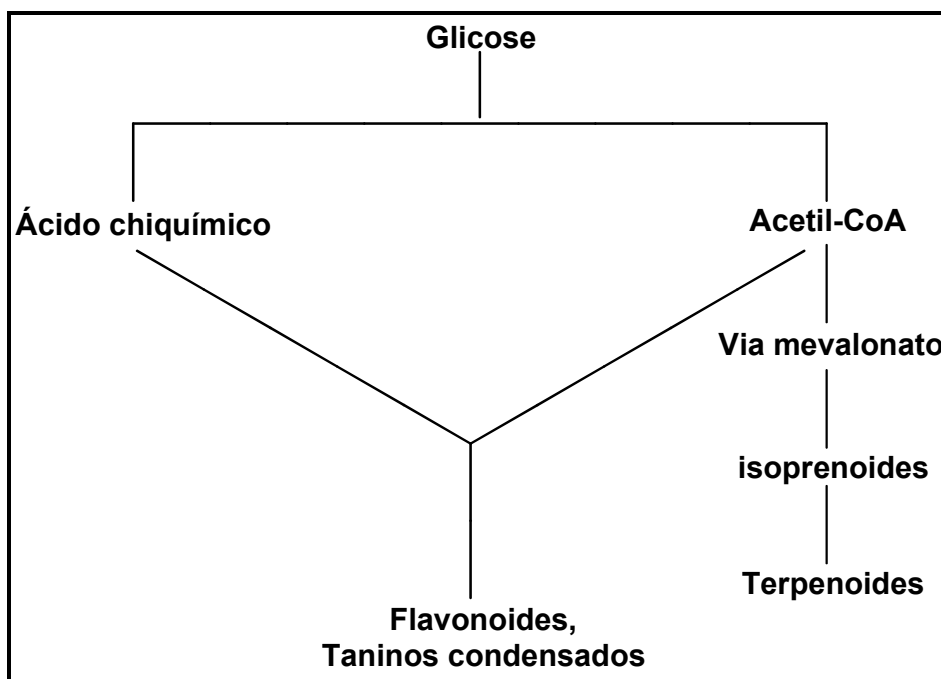


Figura 3: Representação simplificada do ciclo biossintético dos metabólitos secundários terpenoides, que ocorrem em plantas do gênero *Maytenus* (adaptado de SANTOS, 2001).

Biossíntese de triterpenos pentacíclicos

Isoprenoide, também chamado de isopreno ou unidade isoprênica, contém cinco átomos de carbono e constitui um dos diversos grupos de produtos naturais na natureza (Figura 4).

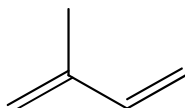


Figura 4: Estrutura química do isopreno.

Os isoprenoides são sintetizados através de duas unidades básicas: o pirofosfato de isopentenila (IPP) e seu isômero pirofosfato de γ,γ -dimetilalila (DMAPP), podendo ser produzidos por duas rotas: a via do mevalonato ou da 1-desoxi-D-xilulose 5-fosfato (DXP). Ambos os percursos são encontrados em plantas, mas diferem na sua localização, as enzimas da via do mevalonato estão localizadas no citosol e as enzimas da via DXP são encontradas nos plastídeos (KIRBY e KEASLING, 2009).

A Figura 5 (pág. 9) exemplifica a via do mevalonato, em que ocorre primeiramente a fosforilação, seguida por descarboxilação, dando origem ao pirofosfato de isopentenila (IPP). O IPP isomeriza, formando o pirofosfato de γ,γ -dimetilalila (DMAPP) (KIRBY e KEASLING, 2009).

IPP e DMAPP reagem, produzindo o difosfato de geranila (GPP), que é precursor dos monoterpenos (GARCÍA e CARRIL, 2009). Um exemplo de monoterpeno é o limoneno, encontrado em óleos essenciais de *Citrus limon* e possui atividade inseticida (SIMÕES et al., 2004).

A adição de uma molécula de IPP ao GPP produz o pirofosfato de farnesila (FPP), precursor dos sesquiterpenos (GARCÍA e CARRIL, 2009). A artemisina é um exemplo de sesquiterpeno com comprovada atividade antimalárica (WANG, 1989).

A reação de IPP com FPP produz o difosfato de geranilgeranila (GGPP), precursor dos diterpenos (GARCÍA e CARRIL, 2009). Um exemplo deste é o taxol, com comprovada atividade citotóxica, por ser um medicamento quimioterápico no tratamento de câncer (MONTANARI e BOLZANI, 2001). A interação de dois FPP forma o esqualeno, que, após sucessivas reações, produz os triterpenos (Figura 5, pág. 9) e dois GGPP produzem os tetraterpenos (KIRBY e KEASLING, 2009).

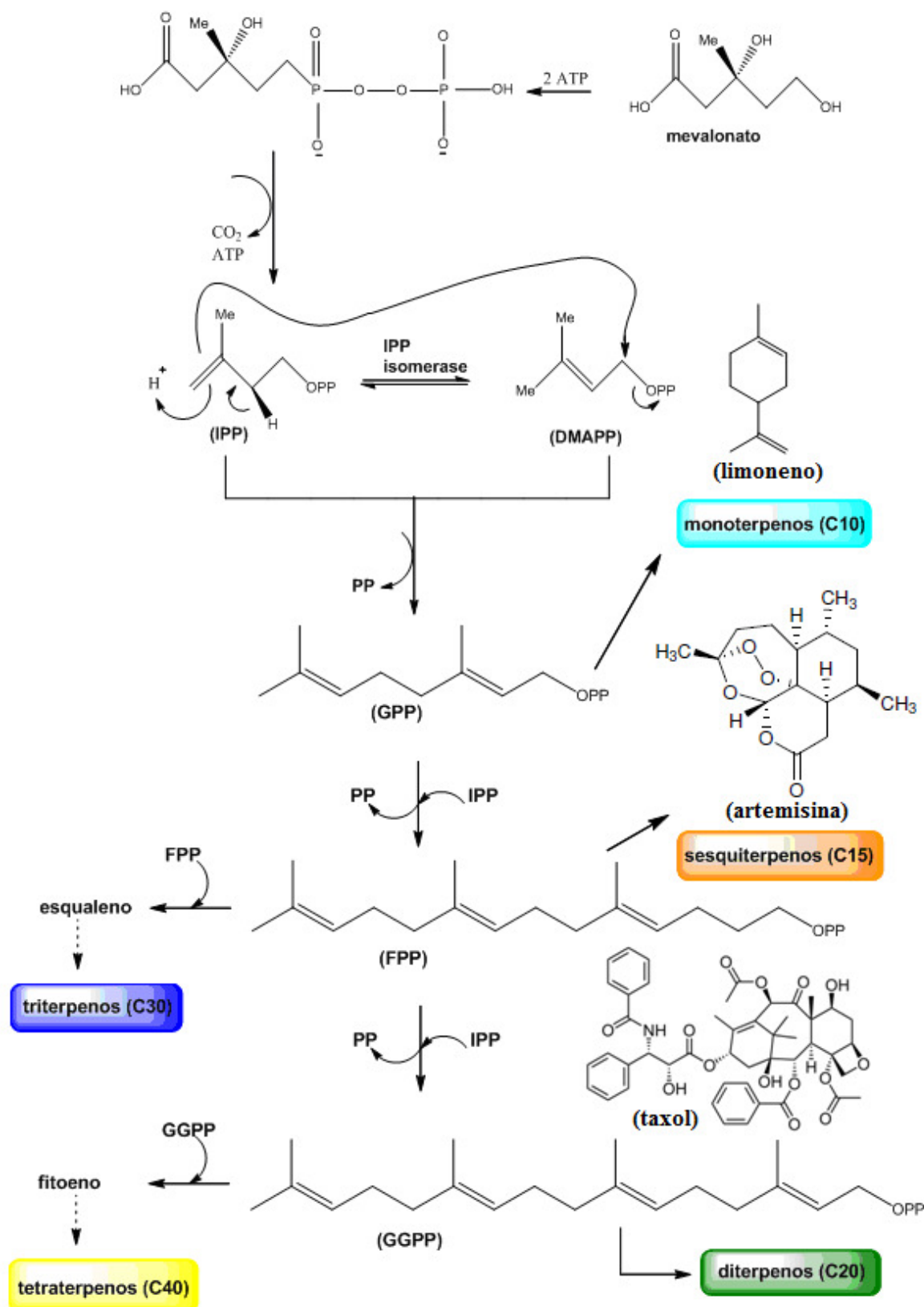


Figura 5: Esquema geral da via mevalonato de isoprenoides em plantas. Várias etapas são indicadas por setas tracejadas (Adaptado de MANN, 1995; CROTEAU et al., 2000; DEWICK, 2002; SOLOMONS e FRYHLE, 2006; KIRBY e KEASLING, 2009).

A sequência de transformações do esqualeno aos triterpenos pentacíclicos começa pela oxidação enzimática da ligação dupla do esqualeno para formar o 2,3-óxido de esqualeno, chamado também de 2,3-epoxiesqualeno (Figura 6). Neste ponto, inicia-se uma série de reações de alcenos que, na análise tridimensional, prossegue através da conformação denominada de cadeira-bote-cadeira. A protonação do 2,3-óxido de esqualeno resulta em um carbocátion terciário, que funciona como eletrófilo para uma adição a ligação dupla entre C6 e C7. À medida que o alceno ataca o carbono terciário, outro carbocátion terciário começa a se formar e assim por diante, até que resulte no carbocátion terciário exocíclico, chamado de cátion damarenila. Posteriormente, ocorre uma expansão do anel de cinco átomos de carbono para seis, formando o cátion bacharenila. O ataque da ligação π ao carbocátion resulta em mais uma ciclização e, com sucessivas reações, formam os diversos tipos de triterpenos pentacíclicos, como oleanano, lupano, friedelano e ursano (SOLOMONS e FRYHLE, 2006; DEWICK, 2009).

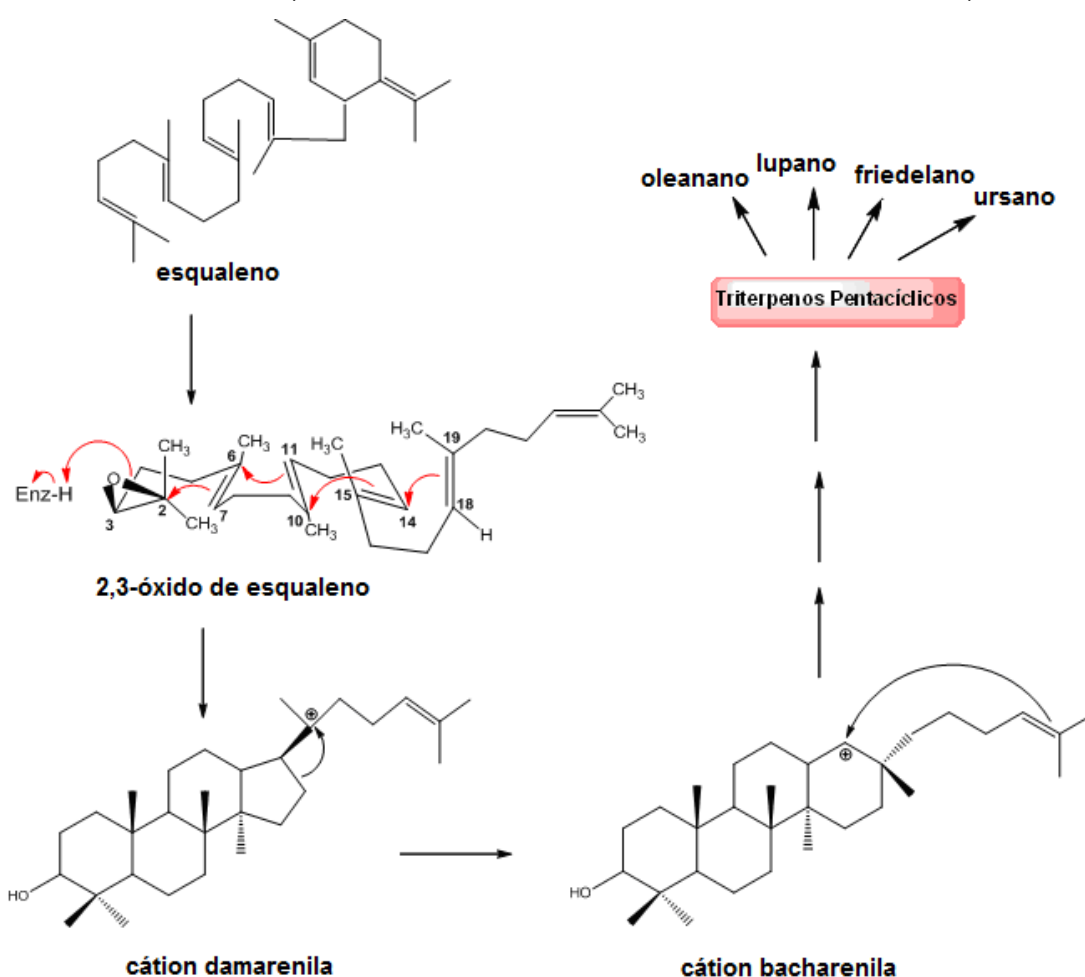


Figura 6: Esquema da rota biossintética simplificada dos triterpenos (Adaptado de DEWICK, 2002; XU et al., 2004; SOLOMONS e FRYHLE, 2006).

Atualmente, os terpenos constituem o grupo mais numeroso de metabólitos secundários, com mais de 40.000 moléculas diferentes (GARCÍA e CARRIL, 2009), com função de defesa da planta ou atração de organismos benéficos (THOLL e LEE, 2011).

Dentre os terpenóides, os triterpenos pentacíclicos (TTPC) são metabólitos secundários encontrados em maior abundância em plantas da família Celastraceae.

A família Celastraceae

A família Celastraceae distribui-se nas regiões tropical e subtropical, incluindo no norte da África, América do Sul e Ásia, particularmente na China (SPIVEY et al., 2002; DUARTE et al., 2010). É constituída por 98 gêneros e aproximadamente 1200 espécies (SIMMONS et al., 2008), sendo que, no Brasil, essa família é representada por quatro gêneros: *Maytenus* Juss., *Austroplenckia* Lund., *Franhofera* Mart. e *Salacia* Mart. (OLIVEIRA et al., 2006a). Nas plantas dessa família foram encontrados diversos triterpenos das classes: friedelano, oleanano, lupano, ursano e quinonametídeo, que apresentam atividade citotóxica, antibiótica e antioxidante (GONZALEZ et al., 2000).

Vários trabalhos foram realizados com espécies da família Celastraceae devido às inúmeras atividades biológicas. Estudos de Miranda e colaboradores (2009) sobre a espécie *Austroplenckia populnea* da família Celastraceae resultaram no isolamento de triterpenos pentacíclicos friedelanos (friedelina, friedelinol, 28-hidroxifriedelina e ácido populnônico), ursano (α -amirina) e quinonametídeo (pristimerina), dentre outros. Todas as substâncias apresentaram atividade antibacteriana (Figura 7, pág. 12).

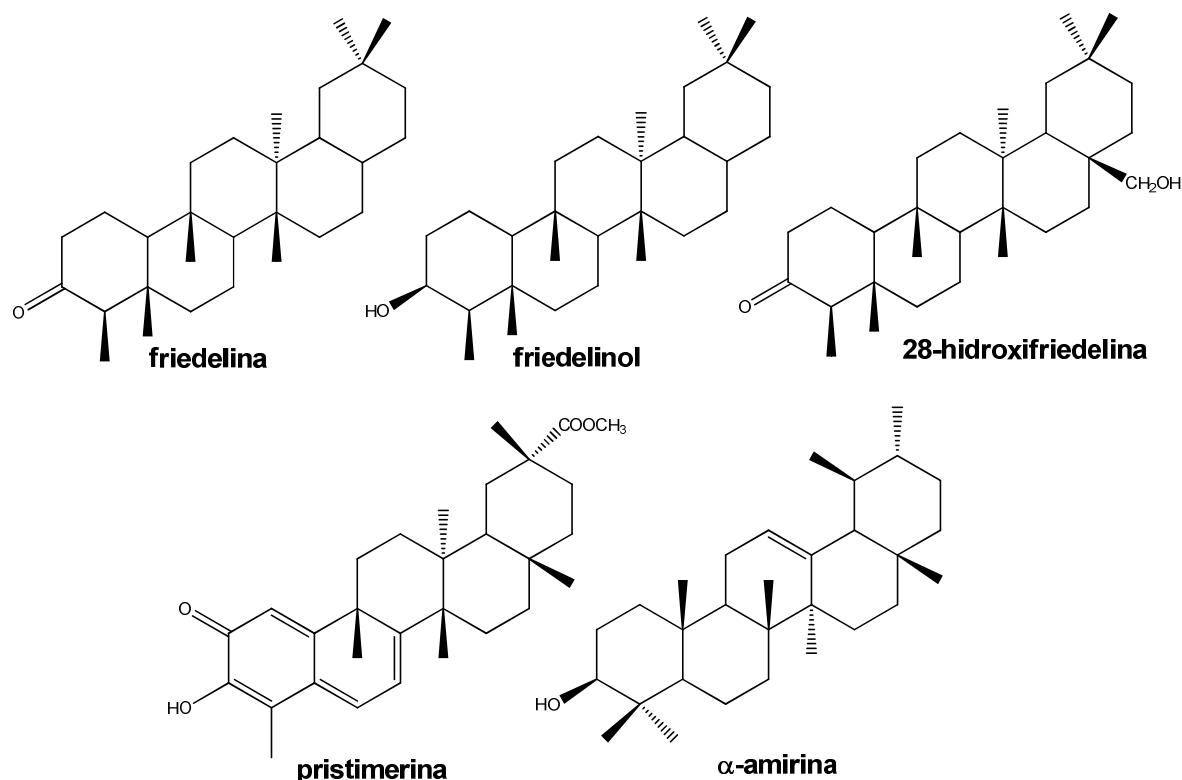


Figura 7: Estrutura química de substâncias isoladas de *A. populnea*, da família Celastraceae.

Pristimerina (Figura 7) e celastrol (Figura 9), isolados de raízes de *Celastrus hypoleucus*, apresentaram potencial inibitório frente a diversos fungos fitopatogênicos, como *Rhizoctonia solani* e *Glomerella cingulata* (LUO et al., 2005).

Trabalhos realizados com raízes de *Maytenus vitis-idaea* levaram ao isolamento de vários TTPC, como 15α-hidroxitingenona e tingenona. Pela comprovada ação citotóxica da tingenona, 15α-hidroxitingenona foi testada e apresentou também atividade antitumoral frente a células tumorais humanas (DE ALMEIDA et al., 2010).

Ferreira e colaboradores (2010) realizaram testes com extratos e substâncias isoladas de raízes de quatro espécies da família Celastraceae apresentaram atividade anti-HIV, quando realizados *in vitro* e em cultivo celular. O HIV é o vírus da imunodeficiência humana que produz a base patológica da síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS). Como esta patologia permanece como um dos principais problemas de saúde mundial, com cerca de 25 milhões de mortes no mundo, este estudo foi de grande importância.

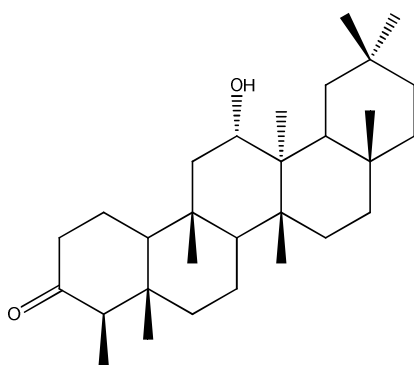
O gênero *Maytenus*

O gênero *Maytenus* é um dos maiores da família Celastraceae, contendo cerca de 80 espécies distribuídas em todo território brasileiro (SANTOS et al., 2007). A bioatividade de espécies *Maytenus* tem sido atribuída a vários grupos de metabólitos secundários, como triterpenos (SHIROTA et al., 1996; HUTCHINGS et al., 1996; ORABI et al., 2001), sesquiterpenos (CORSINO et al., 1998; GONZALEZ et al., 2000), glicosídeos fenólicos (SANNOMIYA et al., 1998), alcaloides (HUTCHINGS et al., 1996; ORABI et al., 2001), flavonoides (TIBERTI et al., 2007; DE SOUZA et al., 2008; SOUZA et al., 2009) e taninos (DE SOUZA et al., 2008). Este gênero é importante pelas atividades biológicas (SOUZA et al., 2005; DIAS et al., 2007) e, também, por ser utilizado na medicina popular como anti-séptico, antiasmático, antitumoral (JELLER et al., 2004; NAKAGAWA et al., 2004; PERESTELO et al., 2010), antiviral (HUSSEIN et al., 1999), no tratamento de problemas gástricos (BAGGIO et al., 2007; CIPRIANI et al., 2009) e anti-inflamatório (SOSA et al., 2007).

Os triterpenos pentacíclicos das espécies de *Maytenus* têm sido o foco de atenção de um grande número de grupos de pesquisa japonesa na busca de compostos biologicamente ativos (OHSAKI et al., 2004).

No NEPLAM há também um grande interesse, visto que já foram estudadas muitas espécies de *Maytenus*, como *M. gonoclada*, *M. salicifolia*, *M. ilicifolia*, dentre outras.

Um recente estudo foi realizado com galhos de *Maytenus gonoclada*, levando ao isolamento de seis triterpenos friedelanos oriundos do extrato hexânico: 3-oxo-friedelano, 3 β -hidroxifriedelano, 3-oxo-12 α -hidroxifriedelano, 3,11-dioxofriedelano, 3,16-dioxofriedelano e 3-oxo-12 α , 29-di-hidroxifriedelano (Figura 8, pág. 14). O extrato hexânico e as substâncias isoladas foram testadas frente a *Escherichia coli*, *Citrobacter freundii*, *Bacillus cereus* e *Candida albicans*. O extrato apresentou atividade antimicrobiana moderada frente a todos microbianos testados e 3-oxo-12 α -hidroxifriedelano apresentou atividade antimicrobiana frente a *C. albicans* (SILVA, 2011).



3-oxo-12 α -hidroxifriedelano

Figura 8: Estrutura química de 3-oxo-12 α -hidroxifriedelano isolado de galhos de *M. gonoclada*, uma espécie do gênero *Maytenus*.

Morita e colaboradores (2008) em seus estudos com cascas das raízes de *Maytenus chuchuhuasca*, isolaram quatro triterpenos quinonametídeos, pristimerina (Figura 7), tingenona, 22 β -hidroxitingenona e celastrol, e dois triterpenos aromáticos, 6-oxo-pristimerol e 3-metil-6-oxo-tingenol (Figura 9). Os quinonametídeos apresentaram inibição da proteína tubulina na mitose celular, podendo supor atividade citotóxica e antitumoral.

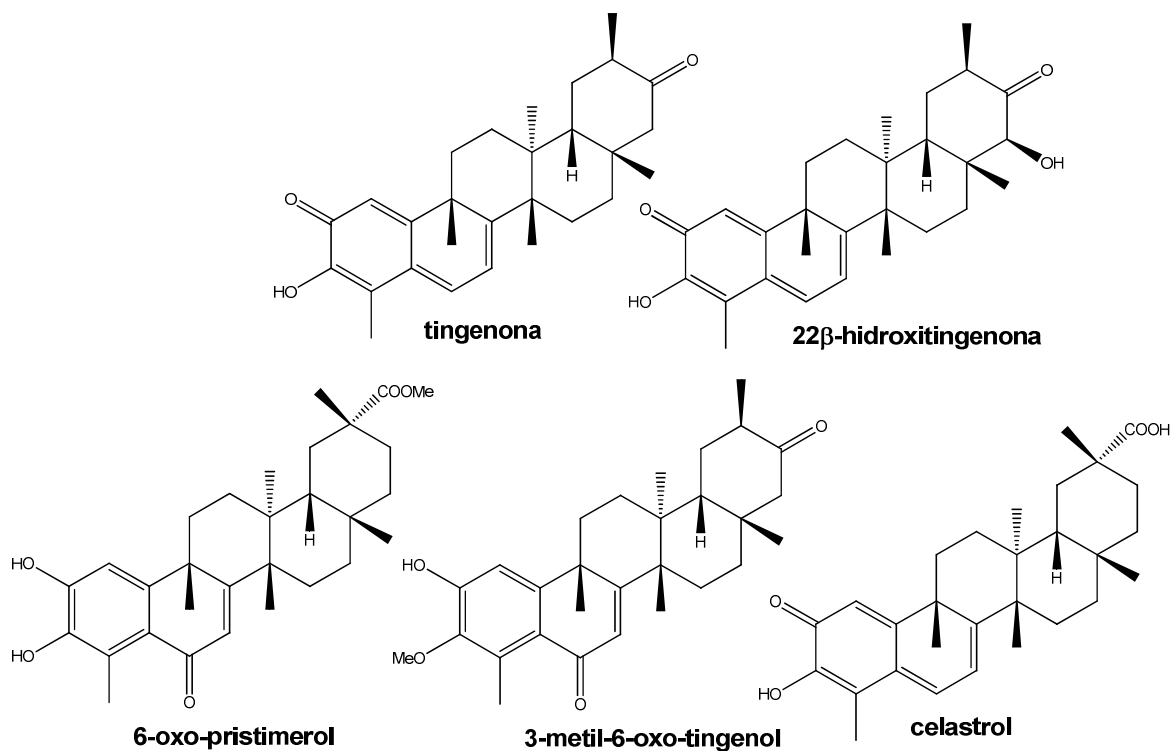


Figura 9: Estrutura química dos triterpenos quinonametídeos e aromáticos isolados de *M. chuchuhuasca*, uma espécie do gênero *Maytenus*.

Os estudos com raízes de outras espécies de *Maytenus*, apresentaram atividades como antiplasmódica, leishmanicida (ALVARENGA et al., 2008), antibacteriana (LINDSEY et al., 2006; SANTOS et al., 2011), anti-inflamatória (JORGE et al., 2004; LINDSEY et al., 2006) e antiulcerogênica (JORGE et al., 2004). Extratos de várias espécies de *Maytenus* são utilizados pela medicina popular no tratamento de distúrbios gástricos (ANDRADE et al., 2007; BAGGIO et al., 2009).

Pesquisas de Velloso e colaboradores (2006) comprovam que raízes de *M. ilicifolia* é utilizada amplamente no Brasil, pelo importante potencial no tratamento do câncer e indicaram que essa parte da planta tem uma grande fonte de antioxidantes.

Trabalhos realizados com raízes de *Maytenus cuzcoina* e folhas de *Maytenus chiapensis* levaram ao isolamento de três lupanos inéditos, sendo um deles a 3-*epi*-nepeticina, e outros dezesseis conhecidos, como a nepeticina (Figura 10). Neste trabalho, Reyes e colaboradores (2006) realizaram teste anti-inflamatório com os compostos isolados e vários foram ativos.

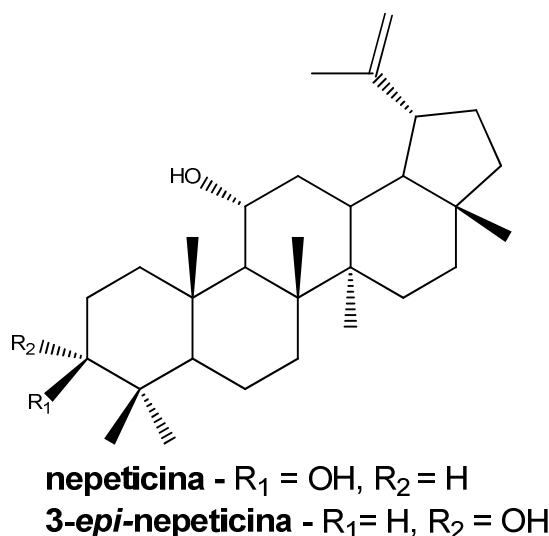


Figura 10: Nepeticina e 3-*epi*-nepeticina, lupanos isolados de raízes de espécies do gênero *Maytenus*.

A espécie *Maytenus imbricata*

Maytenus imbricata Mart, ex. Reissek (Figura 11) encontra-se distribuída por toda a região de cerrado nos estados de Minas Gerais e Bahia. É um arbusto de porte inferior a 1,20 m de altura ou subarbusto com até 0,50 m.

Carvalho-Okano (1992), em sua tese de doutorado, apresentou a descrição botânica e SILVA (2007a) apresentou estudos anatômicos desta espécie.



Figura 11: Fotografia de raízes, folhas e frutos de *Maytenus imbricata* (Foto da autora).

Desta espécie, as folhas, galhos e caules foram estudados fitoquimicamente (SILVA, 2007a) e realizou-se o isolamento de substâncias a partir do sólido e extrato hexânico dos caules e galhos, do sólido e extrato hexânico das folhas, dos extratos em acetato de etila e etanol das folhas e analisou-se o óleo essencial das folhas. Na Figura 12 (pág. 17), estão representadas as estruturas químicas das substâncias isoladas previamente de folhas, galhos e caule de *M. imbricata*.

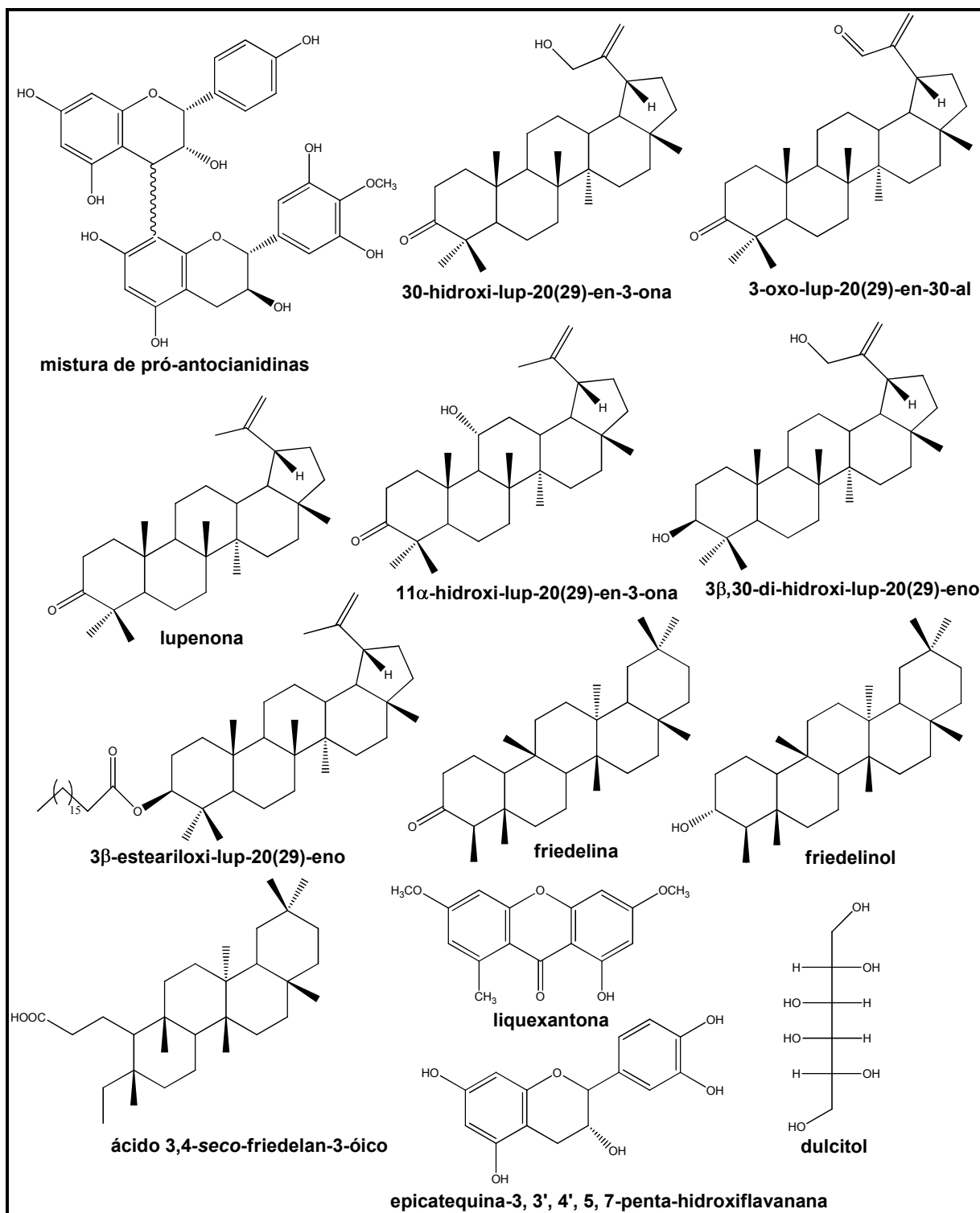


Figura 12: Substâncias isoladas de folhas, caules e galhos de *Maytenus imbricata*.

Para avaliação da atividade biológica de *M. imbricata*, Silva (2007a) realizou testes antioxidante e herbicida. O teste antioxidante foi realizado para os extratos Hex, EtOH, AcOEt e CHCl₃ das folhas, extratos Hex e AcOEt dos galhos e extrato hidroalcoólico das raízes. Os compostos testados foram o dulcitol e a epicatequina, obtidos das folhas, e mistura de proantocianidinas, obtida dos galhos. Os extratos AcOEt, EtOH e CHCl₃ das folhas, extratos hidroalcoólico das raízes, extrato AcOEt dos galhos e a epicatequina apresentaram atividade antioxidante (SILVA, 2007a; SILVA et al., 2009).

O teste herbicida foi realizado para friedelina, epicatequina, dulcitol, 30-hidroxi-lup-20(29)-en-3-ona, 3β,30-di-hidroxi-lup-20(29)-eno e ácido 3,4-seco-friedelan-3-óico. Apenas este último apresentou atividade inibitória na síntese de ATP, podendo indicar que, futuramente, o mesmo poderá ser utilizado no desenvolvimento de herbicidas naturais (SILVA, 2007b; SILVA et al., 2009).

Deve-se ressaltar a importância da continuidade dos estudos iniciados com *Maytenus imbricata*, com a complementação do estudo fitoquímico, visando o isolamento de metabólitos secundários das raízes desta planta e a realização de testes biológicos, pois há a possibilidade de se encontrar substâncias com atividade biológica nesta parte da planta.

OBJETIVOS

Objetivos do trabalho

O objetivo geral deste trabalho é dar continuidade às pesquisas de espécies da família Celastraceae, buscando comprovar suas propriedades biológicas. Neste contexto, há um grande interesse pelas raízes de *Maytenus imbricata*, pois esta parte da planta não foi estudada ainda. Como objetivos específicos pretende-se:

- Realizar o estudo fitoquímico das raízes de *Maytenus imbricata*.
- Realizar a identificação estrutural das substâncias isoladas, utilizando métodos espectroscópicos, tais como: infravermelho, ressonância magnética nuclear de ^1H e de ^{13}C (DEPT, HSQC, HMBC).
- Estabelecer relações fitoquímicas entre espécies da família Celastraceae, contribuindo para o estudo quimiotaxonômico da mesma.
- Realizar testes biológicos, como atividade antimicrobiana (antibacteriana e antifúngica), capacidade inibitória da enzima acetilcolinesterase e avaliação do potencial tóxico através da atividade larvicida sobre *Artemia salina*, buscando isolar metabólitos com ação farmacológica.
- 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 cromatoplasmas eluídas com diferentes eluentes, faixa de fusão estreita, bandas bem definidas no espectro de absorção na região do IV e os sinais no espectro de RMN de ^1H e ^{13}C .

1.1.1.1 – Métodos Cromatográficos

Nas cromatografias em camada delgada (CCD) foi utilizada sílica gel 60G (Merck ou Vetec) 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. As colunas cromatográficas clássicas foram preparadas com fases estacionárias sílica gel 60 de tamanho de partícula 0,063-0,200 mm (70-230 Mesh) e 0,040-0,063 mm (230-400 Mesh).

Para o preparo de colunas cromatográficas por diferença de tamanho de moléculas e não por polaridade foi utilizado Sephadex LH-20, partículas de 25-100 µm de diâmetro.

1.1.1.2 – Solventes e reagentes

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

Solventes deuterados, como CDCl_3 e CD_3OD , foram utilizados para obtenção dos espectros de RMN 1D e 2D.

Como revelador de cromatoplasmas utilizou-se solução 1:1 de ácido perclórico a 3% em água e vanilina a 1% em etanol. No teste de Liebermann Burchard

(MATOS, 1980) foram utilizados CHCl_3 , para solubilizar a amostra e após completa solubilização, 1 mL de anidrido acético e duas gotas de ácido sulfúrico, os ácidos concentrados.

1.1.1.3 – Instrumentos

As faixas de fusão foram determinadas em aparelho digital da Microquímica Equipamentos LTDA (MQAPF-302). Para correção das proporções das misturas foram utilizados 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, em pastilhas de KBr ou filme, foram obtidos utilizando-se espectrômetro Shimadzu IR408 pertencente ao DQ da UFMG quando necessário.

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 a 300 K. Os deslocamentos químicos (δ) foram registrados em ppm, usando tetrametilsilano (TMS) como padrão de referência interna. As constantes de acoplamento (J) foram dadas em Hz.

As análises de CG foram realizadas em um Cromatógrafo a Gás HP5890 equipado com detector por ionização de chamas. Utilizou-se uma coluna BP1 30 m X 0,32 mm com gradiente de temperaturas: 200 °C, 1 min, 10 °C/min até 300 °C; injetor (split de 1/50) a 300 °C e detector a 310 °C. Hidrogênio foi utilizado como gás de arraste (2 mL/min) e volume de injeção de 1 µL. As amostras *in natura* foram diluídas em clorofórmio a 1% p/v e injetadas no Cromatógrafo a gás (1 µL).

1.1.1.4 – Atividade biológica

A avaliação da atividade inibitória da enzima acetilcolinesterase, atividades antibacteriana e antifúngica foram realizadas em colaboração com a professora doutora Jacqueline Takahashi no Laboratório de Biotecnologia e Bioensaios da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG). A avaliação do potencial tóxico através da atividade larvicida sobre *Artemia salina* foi realizada em colaboração com

a professora doutora Lúcia Pimenta no laboratório de Químico e Bioprospecção de Plantas do Cerrado, realizado na mesma Universidade.

1.1.2 – Coleta e identificação do material vegetal

As raízes de *Maytenus imbricata* (Celastraceae) foram coletadas no Morro de Santana, Município de Ouro Preto, Minas Gerais. A planta foi identificada pelas Professoras doutora Rita Maria de Carvalho Okano do Departamento de Botânica da Universidade Federal de Viçosa (UFV) e Maria Cristina Teixeira do Departamento de Botânica da Universidade Federal de Ouro Preto (UFOP). Uma exsicata do material encontra-se depositada no herbário do Departamento de Botânica da UFV, sob o número 27780.

A indicação dos solventes usados na preparação dos extratos e eluição das colunas foi feita empregando as letras: Hex, Et₂O, CHCl₃, AcOEt, CH₂Cl₂, EtOH e MeOH para os solventes: hexano, éter etílico, clorofórmio, acetato de etila, diclorometano, etanol e metanol, respectivamente.

1.1.3 – Preparação do extrato hexânico-éter etílico das raízes de *Maytenus imbricata*

Após a secagem e moagem em moinho de martelos, obteve-se 1,5 kg de raízes da planta. A amostra foi submetida a extrações exaustivas em aparelho Soxhlet, com solventes em ordem crescente de polaridade: Hex-Et₂O (1:1), AcOEt e MeOH. Após filtração e remoção do solvente por destilação a pressão reduzida, foram obtidos os respectivos sólidos e extratos: SEH, FSEH, SEAT, FSEAT e SEM.

A Figura 13 apresenta o esquema utilizado para preparação dos extratos das raízes de *M. imbricata*.

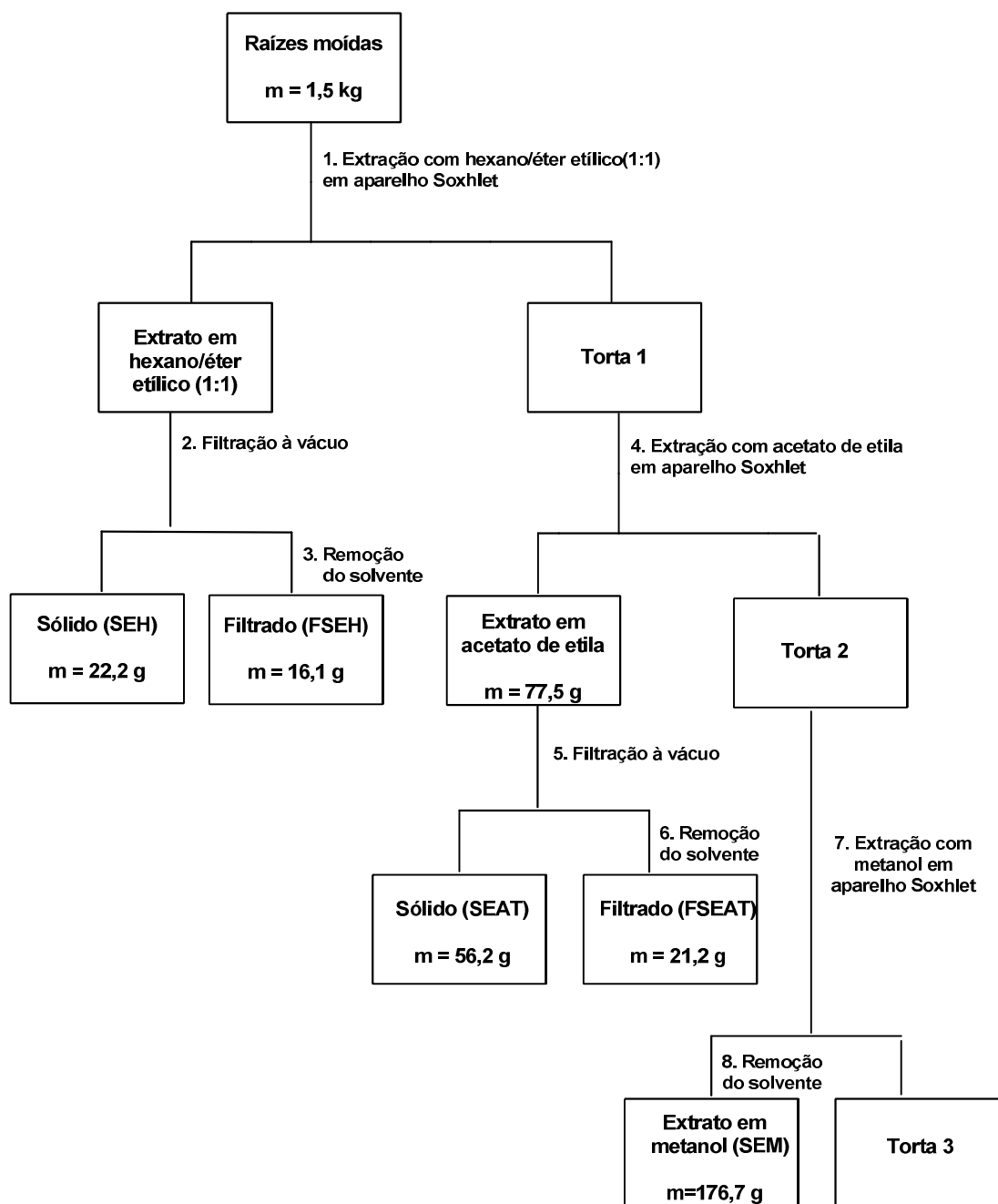


Figura 13: Preparação dos extratos das raízes de *Maytenus imbricata*.

O sólido **SEH** e o extrato **FSEH** foram utilizados para isolamento de substâncias, utilizando colunas cromatográficas e cromatografia em camada delgada. Para os testes biológicos utilizaram-se todos os sólidos e extratos: SEH, FSEH, SEAT, FSEAT e SEM, além das substâncias isoladas.

As frações das colunas que foram trabalhadas posteriormente foram escolhidas baseando-se em dois critérios: massa e perfil da fração em CCD (frações

cuja massa foram pequenas e apresentaram muitas manchas não foram trabalhadas).

A notação empregada para codificar as frações obtidas das colunas realizadas no estudo fitoquímico de **SEH** e **FSEH**, das raízes de *Maytenus imbricata*, tem a inicial da letra da coluna e seguida pela ordem de obtenção das mesmas. As substâncias isoladas receberam a inicial M de *Maytenus*, seguida pela ordem de isolamento das mesmas.

1.1.3.1 – Primeira elaboração de SEH

Parte de **SEH**, denominado **SEH 1** (2,0 g), foi submetido à coluna cromatográfica (Coluna **A**: 3 cm/1,1 m), utilizando 107,9 g de sílica gel 60 com tamanho de partícula 0,063-0,200 mm (70-230 Mesh). Desta coluna foram obtidas 114 frações de 25 mL cada e foram utilizados como eluente Hex, AcOEt e MeOH puros ou em misturas em gradiente de polaridade (Tabela 1).

Tabela 1. Ordem de eluição da coluna A e grupos relacionados

Eluente	Fração de 25 mL	Grupo	Massa (mg)
Hex	1 – 6	A1 (1 – 32)	–
Hex/AcOEt (9:1)	7 – 16	A2 (33 – 42)	55,0 mg
Hex/AcOEt (8:2)	17 – 81	A3 (43 – 52)	48,1 mg
Hex/AcOEt (7:3)	82 – 91	A4 (53 – 65)	41,0 mg
Hex/AcOEt (1:1)	92 – 102	A5 (66 – 85)	314,0 mg
AcOEt	103 – 113	A6 (86 – 93)	110,0 mg
MeOH	114	A7 (94 – 102)	300,9 mg
		A8 (103 – 104)	43,8 mg
		A9 (105 – 107)	58,1 mg
		A10 (108 – 113)	139,6 mg
		A11 (114)	460,6 mg

As frações foram analisadas por CCD e agrupadas de acordo com o perfil observado nas cromatoplas (Tabela 1). Nove grupos foram trabalhados, os demais não foram por se tratar de misturas complexas e/ou pequena quantidade.

Um fluxograma mostrando o isolamento de todas as substâncias encontra-se na Figura 14, pág. 38.

⇒ **Grupo A2 (frações 33-42):** apresentou-se como sólido marrom (55,0 mg) com quatro manchas em cromatoplaça de coloração roxas e rosas. O grupo A2 foi submetido à CC (Coluna **B**: 1,5 cm/52,0 cm), utilizando 18,3 g de sílica gel. Após o empacotamento da coluna com Hex, utilizaram-se os eluentes Hex, AcOEt e MeOH puros ou em misturas em gradiente de polaridade (Tabela 2).

Tabela 2. Ordem de eluição da coluna B e subgrupos relacionados

Eluente	Fração de 3 mL	Subgrupo	Massa (mg)
Hex	1 – 8	B1 (1 – 12)	–
Hex/AcOEt (9:1)	9 – 53	B2 (13 – 15)	3,4 mg
Hex/AcOEt (8:2)	54 – 68	B3 (16)	–
Hex/AcOEt (7:3)	69 – 74	B4 (17 – 19)	2,9 mg
Hex/AcOEt (6:4)	75 – 78	B5 (20)	–
Hex/AcOEt (1:1)	79 – 81	B6 (21 – 23)	1,6 mg
Hex/AcOEt (4:6)	82 – 87	B7 (24 – 27)	–
Hex/AcOEt (3:7)	88 – 92	B8 (28 – 32)	2,4 mg
Hex/AcOEt (2:8)	93 – 96	B9 (33 – 47)	14,0 mg
Hex/AcOEt (1:9)	97 – 103	B10 (48 – 51)	–
AcOEt	104 – 109	B11 (52 – 63)	2,1 mg
AcOEt / MeOH (9,9:0,1)	110 – 111	B12 (64 – 95)	5,8 mg
AcOEt / MeOH (9:1)	112 – 114	B13 (96 – 114)	8,1 mg
MeOH	115 – 117	B14 (115 – 117)	6,8 mg

Foram recolhidas 117 frações de 3 mL cada. As frações foram analisadas por CCD e agrupadas de acordo com o perfil observado nas cromatoplaças.

Subgrupo B9 (frações 33-47): Foram obtidos cristais brancos (14,0 mg), com faixa de fusão de 154,2-158,8 °C. Apresentou uma única mancha de coloração roxa em CCD quando revelada com ácido perclórico/vanilina e teste Liebermann-Burchard (LB) positivo para triterpenos pentacíclicos, pois observou-se a mudança de coloração de incolor para pardo avermelhada. A análise dos espectros na região

do IV, RMN de ^1H e ^{13}C , permitiu identificar os cristais como sendo **11 α -hidroxilup-20(29)-en-3-ona (M1)**.

Subgrupo B14 (frações 115-117): foi obtido um sólido amarelo pálido (6,8 mg). Observou-se uma única mancha de coloração azul em CCD quando revelada com ácido perclórico/vanilina e muito polar. Apresentou teste LB negativo para triterpeno e esteroide, e não foi possível caracterizá-la por RMN, por baixa solubilidade em todos solventes testados.

Os demais subgrupos da coluna B não foram trabalhados por tratar de misturas complexas com pequena massa.

⇒ **Grupo A3 (frações 43-52):** apresentou-se como um sólido marrom (48,1 mg), por apresentar quatro manchas em CCD, foi feita uma coluna cromatográfica (Coluna **C**: 1,5 cm/40 cm), utilizando 9,1 g de sílica gel. Após o empacotamento da coluna com Hex, utilizaram-se os eluentes Hex, CHCl_3 , AcOEt e MeOH puros ou em misturas em gradiente de polaridade (Tabela 3).

Tabela 3. Ordem de eluição da coluna C e subgrupos relacionados

Eluente	Fração de 10 mL	Subgrupo	Massa (mg)
Hex	1 – 4	C1 (1 – 32)	—
Hex/ CHCl_3 (9:1)	5 – 8	C2 (33 – 53)	27,6 mg
Hex/ CHCl_3 (8:2)	9 – 13	C3 (54)	5,2 mg
Hex/ CHCl_3 (7:3)	15 – 23	C4 (55 – 58)	2,8 mg
Hex/ CHCl_3 (6:4)	24 – 45	C5 (59)	0,8 mg
Hex/ CHCl_3 (1:1)	46 – 50	C6 (60)	5,9 mg
Hex/ CHCl_3 (4:6)	51 – 57		
Hex/ CHCl_3 (2:8)	58 – 61		
CHCl_3	62 – 65		
MeOH	66		

Foram recolhidas 66 frações de 10 mL cada. As frações foram analisadas por CCD e agrupadas de acordo com o perfil observado nas cromatoplasas.

Subgrupo C2 (frações 33-53): apresentou-se um sólido alaranjado (27,6 mg), constituído de quatro manchas em cromatoplasa, este foi submetido à CC

(Coluna **D**: 1,0 cm/32,0 cm), utilizando 3,2 g de sílica gel. Após o empacotamento da coluna com Hex, utilizaram-se como eluentes Hex, CHCl_3 , AcOEt e MeOH puros ou em misturas em gradiente de polaridade (Tabela 4).

Tabela 4. Ordem de eluição da coluna D e subgrupos relacionados

Eluente	Fração de 5 mL	Subgrupo	Massa (mg)
Hex/ CHCl_3 (1:1)	1 – 2	D1 (1 – 14)	–
Hex/ CHCl_3 (3:7)	3 – 4	D2 (15 – 16)	7,8 mg
Hex/ CHCl_3 (2:8)	5 – 7	D3 (17 – 18)	10,0 mg
Hex/ CHCl_3 (1:9)	8 – 10	D4 (19)	1,4 mg
CHCl_3	11 – 13	D5 (20)	–
CHCl_3 /AcOEt (9:1)	14 – 30	D6 (21 – 31)	–
CHCl_3 /AcOEt (8:2)	31 – 35	D7 (32 – 33)	1,5 mg
CHCl_3 /AcOEt (7:3)	36 – 39	D8 (34 – 37)	0,8 mg
CHCl_3 /AcOEt (1:1)	40 – 41	D9 (38 – 40)	–
AcOEt	42 – 43	D10 (41 – 44)	1,9 mg
MeOH	44		

Foram recolhidas 44 frações de 5 mL cada. As frações foram analisadas por CCD e agrupadas de acordo com o perfil observado nas cromatoplaças.

Subgrupo D2 (frações 15 e 16): apresentou-se como um sólido amorfo (7,8 mg). Quatro manchas foram observadas na cromatoplaça. Essa fração foi submetida a uma CCD preparativa (eluente: Hex/ CHCl_3 /AcOEt – 3:6:1), levando a obtenção de 3 frações puras, **D2A** (0,8 mg), **D2B** (1,6 mg) e **D2C** (0,2 mg). Apesar da análise por CCD indicar que as frações estavam puras não foi possível caracterizá-las devido a pequena quantidade.

Subgrupo D4 (fração 19): apresentou-se como um sólido amarelo (1,4 mg), que continha três manchas na cromatoplaça. A comparação com amostra autêntica de β -sitosterol indicou este composto como presente na amostra, no entanto, não foi possível purificá-lo devido a pequena quantidade.

Subgrupo D8 (frações 34-37): apresentou-se como um sólido amorfo (0,8 mg) e havia apenas uma mancha de coloração rosa em CCD, mas não foi caracterizada por não ter quantidade suficiente para análise.

Os demais subgrupos não foram trabalhados por se tratar de misturas complexas e pequena quantidade.

⇒ **Grupo A4 (frações 53-65):** apresentou-se como sólido marrom (41,0 mg) com quatro manchas em cromatoplaça. O grupo A4 foi submetido à CC (Coluna **E**: 1,5 cm/50,0 cm), utilizando 9,6 g de sílica gel. Após o empacotamento da coluna com Hex, foram utilizados como eluentes Hex, CHCl_3 , AcOEt e MeOH puros ou em misturas em gradiente de polaridade (Tabela 5).

Tabela 5. Ordem de eluição da coluna E e subgrupos relacionados

Eluente	Fração de 10 mL	Subgrupo	Massa (mg)
Hex	1 – 3	E1 (1 – 32)	–
Hex/ CHCl_3 (3:7)	4 – 8	E2 (33)	0,8 mg
Hex/ CHCl_3 (2:8)	9 – 77	E3 (34)	0,9 mg
Hex/ CHCl_3 (1:9)	78 – 86	E4 (35 – 51)	24,2 mg
Hex/ CHCl_3 (1:9)	87 – 90	E5 (52 – 90)	2,4 mg
CHCl_3	91 – 102	E6 (91 – 93)	0,7 mg
AcOEt	103 – 110	E7 (111)	3,9 mg
MeOH	111		

Foram recolhidas 111 frações de 10 mL cada. As frações foram analisadas por CCD e agrupadas de acordo com o perfil observado nas cromatoplaças.

Subgrupo E4 (frações 35-51): obteve-se um sólido (24,2 mg) com quatro manchas em cromatoplaça. O subgrupo E4 foi submetido à CC (Coluna **F**: 1,0 cm/32,0 cm), utilizando 3,2 g de sílica gel. Após empacotamento da coluna com Hex, utilizaram-se os eluentes Hex, AcOEt e MeOH puros ou em misturas em gradiente de polaridade (Tabela 6).

Tabela 6. Ordem de eluição da coluna F e subgrupos relacionados

Eluente	Fração de 5 mL	Subgrupo	Massa (mg)
Hex	1 – 2	F1 (1 – 10)	–
CHCl ₃ /AcOEt (9:1)	3 – 7	F2 (11)	0,4 mg
CHCl ₃ /AcOEt (8,5:1,5)	8 – 10	F3 (12 – 13)	3,4 mg
CHCl ₃ /AcOEt (8:2)	11 – 13	F4 (14)	3,7 mg
CHCl ₃ /AcOEt (6:4)	14 – 15	F5 (15 – 18)	12,6 mg
AcOEt	16 – 17		
MeOH	18		

Foram recolhidas 18 frações de 5 mL cada. As frações foram analisadas por CCD e agrupadas de acordo com o perfil observado nas cromatoplacas.

Subgrupo F3 (frações 12 e 13): apresentou-se como um sólido alaranjado (3,4 mg), e por comparação em CCD com amostras autênticas, indicou tratar-se da **tingenona (M2)**.

Os demais subgrupos não foram trabalhados por se tratar de misturas complexas e pequena quantidade.

⇒ **Grupo A5 (frações 66-85):** apresentou-se como um sólido alaranjado (314,0 mg), com faixa de fusão de 145,0-147,9 °C. Apresentou uma única mancha de coloração alaranjada em CCD quando revelada com ácido perclórico/vanilina. A análise por espectroscopia no IV, RMN de ¹H e ¹³C indicou tratar-se da **tingenona (M2)**. Esta substância é inédita na espécie *Maytenus imbricata*. A quantidade de tingenona obtida corresponde a 15,7% do extrato das raízes, sendo este, o composto majoritário.

⇒ **Grupo A6 (frações 86-93):** apresentou-se como sólido marrom (110,0 mg), contendo quatro manchas com rastro em cromatoplaca. O grupo A6 foi submetido à CC (Coluna **G**: 2,0 cm/48,0 cm), utilizando 24,6 g de sílica gel. Após o empacotamento da coluna com Hex, utilizaram-se os eluentes Hex, CHCl₃ e MeOH puros ou em misturas em gradiente de polaridade (Tabela 7).

Tabela 7. Ordem de eluição da coluna G e subgrupos relacionados

Eluente	Fração de 10 mL	Subgrupo	Massa (mg)
Hex	1 – 5	G1 (1 – 19)	–
Hex/CHCl ₃ (9:1)	6 – 14	G2 (20 – 39)	9,7 mg
Hex/CHCl ₃ (8:2)	15 – 33	G3 (40 – 62)	23,0 mg
Hex/CHCl ₃ (7:3)	34 – 79	G4 (63 – 92)	15,0 mg
Hex/CHCl ₃ (6:4)	80 – 86	G5 (93)	8,7 mg
Hex/CHCl ₃ (1:1)	87 – 91	G6 (94 – 110)	8,0 mg
Hex/CHCl ₃ (3:7)	92 – 98	G7 (111)	16,3 mg
Hex/CHCl ₃ (1:9)	99 – 104		
CHCl ₃	105 – 110		
MeOH	111		

Foram recolhidas 111 frações de 10 mL cada. As frações foram analisadas por CCD e agrupadas de acordo com o perfil observado nas cromatoplaças.

Subgrupo G3 (frações 40-62): obteve-se um sólido amorfo (23,0 mg). Este subgrupo apresentou três manchas em CCD e foi submetido a uma coluna cromatográfica isocrática (Coluna **H**: 1,5 cm/62,0 cm), utilizando 11,3 g de sílica gel. Empacotou e eluiu-se a coluna com CHCl₃/AcOEt/Hex (8:1:1).

Tabela 8. Subgrupos relacionados com a coluna H

Subgrupo	Massa (mg)
H1 (1 – 9)	–
H2 (10 – 18)	1,0 mg
H3 (19 – 30)	1,6 mg
H4 (31 – 32)	3,7 mg
H5 (33 – 35)	1,0 mg
H6 (36 – 37)	2,2 mg
H7 (38 – 59)	2,9 mg
H8 (60 – 82)	5,8 mg
H9 (83 – 106)	–
H10 (107 – 119)	1,2 mg
H11 (120 – 128)	–
H12 (129 – 131)	1,1 mg

Foram recolhidas 131 frações de 3 mL cada. As frações foram analisadas por CCD e agrupadas de acordo com o perfil observado nas cromatoplasas (Tabela 8).

Subgrupo H4 (frações 31 e 32): apresentou-se como um sólido alaranjado (3,7 mg) e observou-se na cromatoplasa apenas uma mancha alaranjada quando revelada com ácido perclórico/vanilina. A análise dos espectros no IV, RMN de ^1H e ^{13}C indicaram tratar-se de **tingenona (M2)**.

Subgrupo H8 (frações 60-82): apresentou-se como um sólido alaranjado (5,8 mg), e espectroscopia no IV, dados de RMN de ^1H e ^{13}C indicaram tratar-se de **tingenona (M2)**, porém impura.

Subgrupo G6 (frações 94-110): apresentou-se como um sólido amorfo (8,0 mg) com três manchas em cromatoplasa. Essa fração foi submetida a uma CCD preparativa (eluente: $\text{CHCl}_3/\text{AcOEt}$ - 8:2) e obtiveram-se **G6A** (1,8 mg) mancha roxa, **G6B** (1,9 mg) mancha marrom e **G6C** (3,2 mg) mancha marrom. Como não havia quantidade significativa, não foi possível caracterizá-las.

Os demais subgrupos não foram trabalhados por se tratar de misturas complexas e pequena quantidade.

⇒ **Grupo A7 (frações 94-102):** apresentou-se como um sólido marrom (300,9 mg), com cinco manchas com rastro em cromatoplasa. O grupo A7 foi submetido à CC (Coluna I: 3,0 cm/80,0 cm), utilizando 126,9 g de sílica gel. Após o empacotamento da coluna com Hex, utilizaram-se os eluentes Hex, AcOEt e MeOH puros ou em misturas em gradiente de polaridade (Tabela 9).

Tabela 9. Ordem de eluição da coluna I e subgrupos relacionados

Eluente	Fração de 3 mL	Subgrupo	Massa (mg)
Hex	1 – 4	I1 (1 – 29)	–
Hex/AcOEt (9:1)	5 – 12	I2 (30 – 39)	15,4 mg
Hex/AcOEt (8:2)	13 – 18	I3 (40 – 53)	9,9 mg
Hex/AcOEt (7:3)	19 – 160	I4 (54 – 62)	8,0 mg
Hex/AcOEt (6:4)	161 – 169	I5 (63)	3,9 mg
Hex/AcOEt (1:1)	170 – 174	I6 (64 – 72)	2,9 mg
Hex/AcOEt (4:6)	175 – 185	I7 (73)	4,5 mg
Hex/AcOEt (3:7)	186 – 194	I8 (74 – 85)	7,9 mg
Hex/AcOEt (2:8)	195 – 209	I9 (86 – 99)	13,3 mg
Hex/AcOEt (1:9)	210 – 216	I10 (100 – 120)	24,6 mg
AcOEt	217 – 226	I11 (121 – 133)	7,9 mg
Hex /MeOH (9:1)	227 – 279	I12 (134 – 147)	14,9 mg
Hex /MeOH (8:2)	280 – 293	I13 (148 – 159)	18,6 mg
MeOH	294	I14 (160 – 168)	8,9 mg
		I15 (169 – 218)	12,8 mg
		I16 (219 – 240)	7,6 mg
		I17 (241 – 295)	8,1 mg
		I18 (294)	82,4 mg

Foram recolhidas 294 frações de 3 mL cada. As frações foram analisadas por CCD e agrupadas de acordo com o perfil observado nas cromatoplasas.

Subgrupo I7 (fração 73): apresentou-se como um sólido alaranjado (4,5 mg). Foi observada na cromatoplasa apenas uma mancha alaranjada quando revelada com ácido perclórico/vanilina. As análises dos espectros no IV, RMN de ^1H e ^{13}C , indicaram tratar-se de **tingenona (M2)**.

Subgrupo I10 (frações 100-120): apresentou-se como um sólido alaranjado (24,6 mg) com duas manchas em cromatoplasa. Este subgrupo foi submetido a uma CCD preparativa (eluente: Hex/AcOEt - 1:1) e obtiveram-se: **I10A** (5,6 mg) mancha amarela e **I10B** (13,9 mg) mancha alaranjada. A análise por CCD indicou que essas frações tratavam-se de **6-oxo-tingenol (M3)** e **tingenona (M2)**, respectivamente.

Subgrupo I11 (frações 121-133): apresentou-se como um sólido amarelo pálido (7,9 mg) com faixa de fusão de 218,7-221,4 °C. Observou-se na cromatoplaça apenas uma mancha amarela quando revelada em ácido perclórico/vanilina. As análises dos espectros de IV, RMN de ^1H e ^{13}C , HSQC e HMBC, indicaram tratar-se **6-oxo-tingenol (M3)**. Esta substância é inédita na espécie *Maytenus imbricata* e foi isolada pela primeira vez no NEPLAM.

Subgrupo I12 (frações 134-147): apresentou-se como um sólido amorfo (14,9 mg) com três manchas bem distantes em cromatoplaça. Este subgrupo foi submetido a uma CCD preparativa (eluente: Hex/AcOEt - 8:2), obtendo-se: **I12A** (2,1 mg), **I12B** (1,1 mg) e **I12C** (1,3 mg). Cada fração apresentou apenas uma mancha roxa na placa quando revelada em ácido perclórico/vanilina, mas como não havia quantidade significativa não foi possível caracterizá-las.

Os demais subgrupos não foram trabalhados por se tratar de misturas complexas e pequena quantidade.

⇒ **Grupo A8 (frações 103 e 104):** apresentou-se como um sólido marrom (43,8 mg) com muitas manchas em cromatoplaça. O grupo A8 foi submetido à CC (Coluna **J**: 2,5 cm/62,0 cm), utilizando 162,0 cm³ de Sephadex LH-20. Utilizou-se como eluente CH₂Cl₂/acetona (3:2).

Tabela 10. Subgrupos relacionados com a coluna J

Subgrupo	Massa (mg)
J1 (1 – 14)	—
J2 (15 – 53)	1,6 mg
J3 (54 – 77)	18,5 mg
J4 (78 – 141)	19,7 mg

Foram recolhidas 141 frações de 3 mL cada. As frações foram analisadas por CCD e agrupadas de acordo com o perfil observado nas cromatoplaças (Tabela 10).

Subgrupo J3 (frações 54-77): apresentou-se como um sólido alaranjado (18,5 mg). A comparação em CCD com amostra autêntica de **tingenona (M2)**, indicou tratar-se desta substância.

Subgrupo J4 (frações 78-141): apresentou-se como um sólido amorfo (19,7 mg) com manchas bem separadas por polaridade, portanto, outra coluna cromatográfica foi feita (Coluna K: 1,5 cm/32,0 cm), utilizando 9,3 g de sílica gel. A coluna foi empacotada com Hex e utilizaram-se os eluentes Hex, AcOEt e MeOH puros ou em misturas em gradiente de polaridade (Tabela 11).

Tabela 11. Ordem de eluição da coluna K e subgrupos relacionados

Eluente	Fração de 5 mL	Subgrupo	Massa (mg)
Hex/AcOEt (9:1)	1 – 26	K1 (1 – 29)	–
Hex/AcOEt (8:2)	27 – 56	K2 (30)	0,2 mg
Hex/AcOEt (7:3)	57 – 79	K3 (31 – 33)	3,9 mg
Hex/AcOEt (6:4)	80 – 84	K4 (34 – 44)	0,3 mg
Hex/AcOEt (1:1)	85 – 101	K5 (45 – 52)	0,9 mg
Hex/AcOEt (4:6)	102 – 108	K6 (53 – 100)	4,3 mg
Hex/AcOEt (3:7)	109 – 114	K7 (101 – 127)	3,2 mg
Hex/AcOEt (2:8)	115 – 122	K8 (128 – 132)	0,2 mg
Hex/AcOEt (1:9)	123 – 127	K9 (133 – 141)	3,9 mg
AcOEt	128 – 132		
Hex/MeOH (9:1)	133 – 135		
Hex/MeOH (8:2)	136 – 140		
MeOH	141		

Foram recolhidas 141 frações de 5 mL cada. As frações foram analisadas por CCD e agrupadas de acordo com o perfil observado nas cromatoplasas.

Subgrupo K3 (frações 31-33): apresentou-se com um sólido alaranjado (3,9 mg) e observou na cromatoplasa apenas uma mancha alaranjada quando revelada em ácido perclórico/vanilina. Por comparação em CCD com amostra autêntica de **tingenona (M2)**, indicou tratar-se desta substância.

Os demais subgrupos não foram trabalhados por se tratar de misturas complexas e pequena quantidade.

⇒ **Grupo A9 (frações 105-107):** apresentou-se como um sólido marrom (58,1 mg) com perfil muito complexo em cromatoplaça, pelo fato, de deixar rastros, devido a alta polaridade da fração. O grupo A9 foi submetido à CC isocrática (Coluna **L**: 2,0 cm/60,0 cm), utilizando 109,9 cm³ de Sephadex LH-20 e eluiu com CH₂Cl₂/acetona (3:2).

Tabela 12. Subgrupos relacionados com a coluna L

Subgrupo	Massa (mg)
L1 (1 – 5)	4,8 mg
L2 (6 – 27)	14,9 mg
L3 (28)	2,0 mg
L4 (29 – 41)	10,1 mg
L5 (42 – 60)	12,7 mg
L6 (61 – 64)	1,2 mg
L7 (65)	8,7 mg

Foram recolhidas 65 frações de 3 mL cada. O desenvolvimento da coluna foi acompanhado por CCD e as frações agrupadas de acordo com o perfil observado nas cromatoplaças (Tabela 12).

Subgrupo L3 (fração 28): apresentou-se como um sólido alaranjado (2,0 mg) e por comparação em cromatoplaça, indicou se tratar de **tingenona (M2)**.

Subgrupo L6 (frações 61-64): apresentou-se um sólido amarelo pálido (1,2 mg) e por comparação em cromatoplaça com amostra autêntica, indicou tratar-se de **6-oxo-tingenol (M3)**.

Os demais subgrupos não foram trabalhados por se tratar de misturas complexas e pequena quantidade.

⇒ **Grupo A10 (fração 108-113):** apresentou-se como um sólido marrom (139,6 mg), com muitas manchas não definidas. O grupo **A10** foi submetido à CC (Coluna **M**: 1,5 cm/50,0 cm) utilizando 8,9 g de sílica. Após empacotamento com hex, utilizaram-se os eluentes Hex, CH₂Cl₂, AcOEt e MeOH puros ou em misturas em gradiente de polaridade (Tabela 13).

Tabela 13. Ordem de eluição da coluna M e subgrupos relacionados

Eluente	Fração de 10 mL	Subgrupo	Massa (mg)
Hex	1 – 3	M1 (1 – 24)	–
Hex/CHCl ₃ (7:3)	4 – 9	M2 (25 – 27)	4,0 mg
Hex/CHCl ₃ (1:1)	10 – 14	M3 (28)	3,9 mg
Hex/CHCl ₃ (2:8)	15 – 18	M4 (29 – 33)	6,9 mg
CHCl ₃	19 – 24	M5 (34)	5,1 mg
CHCl ₃ /AcOEt (9:1)	25 – 38	M6 (35 – 68)	43,0 mg
CHCl ₃ /AcOEt (8:2)	39 – 66	M7 (69 – 70)	7,2 mg
CHCl ₃ /AcOEt (7:3)	67 – 79	M8 (71 – 72)	8,3 mg
CHCl ₃ /AcOEt (1:1)	80 – 90	M9 (73 – 78)	9,1 mg
CHCl ₃ /AcOEt (2:8)	91 – 95	M10 (79)	4,8 mg
AcOEt	96 – 98	M11 (80 – 103)	14,8 mg
AcOEt / MeOH (1:1)	99 – 102		
MeOH	103		

Foram recolhidas 103 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.

Subgrupo M2 (frações 25-27): apresentou-se como um sólido amorfo pastoso bege (4,0 mg). Apresentaram uma mancha azul em CCD quando revelada com ácido perclórico/vanilina. Este sólido foi analisado por CG e RMN de ¹H e ¹³C, indicando tratar-se de uma **mistura de hidrocarbonetos: C27-C31 (M4)**. Esta mistura foi isolada pela primeira vez na espécie *Maytenus imbricata*.

Subgrupo M6 (frações 35-68): apresentou-se como um sólido amorfo (43,0 mg) com muitas manchas não definidas em cromatoplasa. Foi feita uma coluna cromatográfica de Sephadex (Coluna **N**: 1,5 cm/53,0 cm) utilizando 33,6 cm³ de Sephadex LH-20 e eluiu com CHCl₃/acetona (3:2).

Tabela 14. Subgrupos relacionados com a coluna N

Subgrupo	Massa (mg)
N1 (1 – 3)	–
N2 (4 –10)	3,9 mg
N3 (11 – 20)	6,9 mg
N4 (21 – 26)	2,3 mg
N5 (27)	0,9 mg
N6 (28 – 42)	7,4 mg
N7 (43 – 46)	4,3 mg
N8 (47 – 51)	2,1 mg
N9 (52)	11,8 mg

Foram recolhidas 52 frações de 3 mL cada. O desenvolvimento da coluna foi acompanhado por CCD e as frações agrupadas de acordo com o perfil observado nas cromatoplasas (Tabela 14).

Subgrupo N7 (frações 43-46): apresentou-se como um sólido amarelo pálido (4,3 mg). A comparação por CCD indicou tratar-se de **6-oxo-tingenol**, porém impuro (**M3**).

Subgrupo N8 (frações 47-51): apresentou-se como sólido amarelo pálido (2,1 mg). Comparou-se por CCD com amostra autêntica de 6-oxo-tingenol e foi feita análise por espectroscopia de IV, confirmando a presença deste composto puro (**M3**). Observou-se que a purificação de 6-oxo-tingenol é mais eficiente com o uso de Sephadex.

Os demais subgrupos não foram trabalhados por se tratar de misturas complexas e pequena quantidade.

⇒ **Grupo A11 (fração 114):** apresentou-se como um sólido marrom escuro (460,6 mg). Este grupo por ser muito polar, não possibilitou o trabalho pelo método em coluna cromatográfica de sílica. Esta observação foi feita ao longo do trabalho, impossibilitando a separação de substâncias em frações muito polares.

A Figura 14 mostra um resumo de toda a operação realizada na separação de SEH 1.

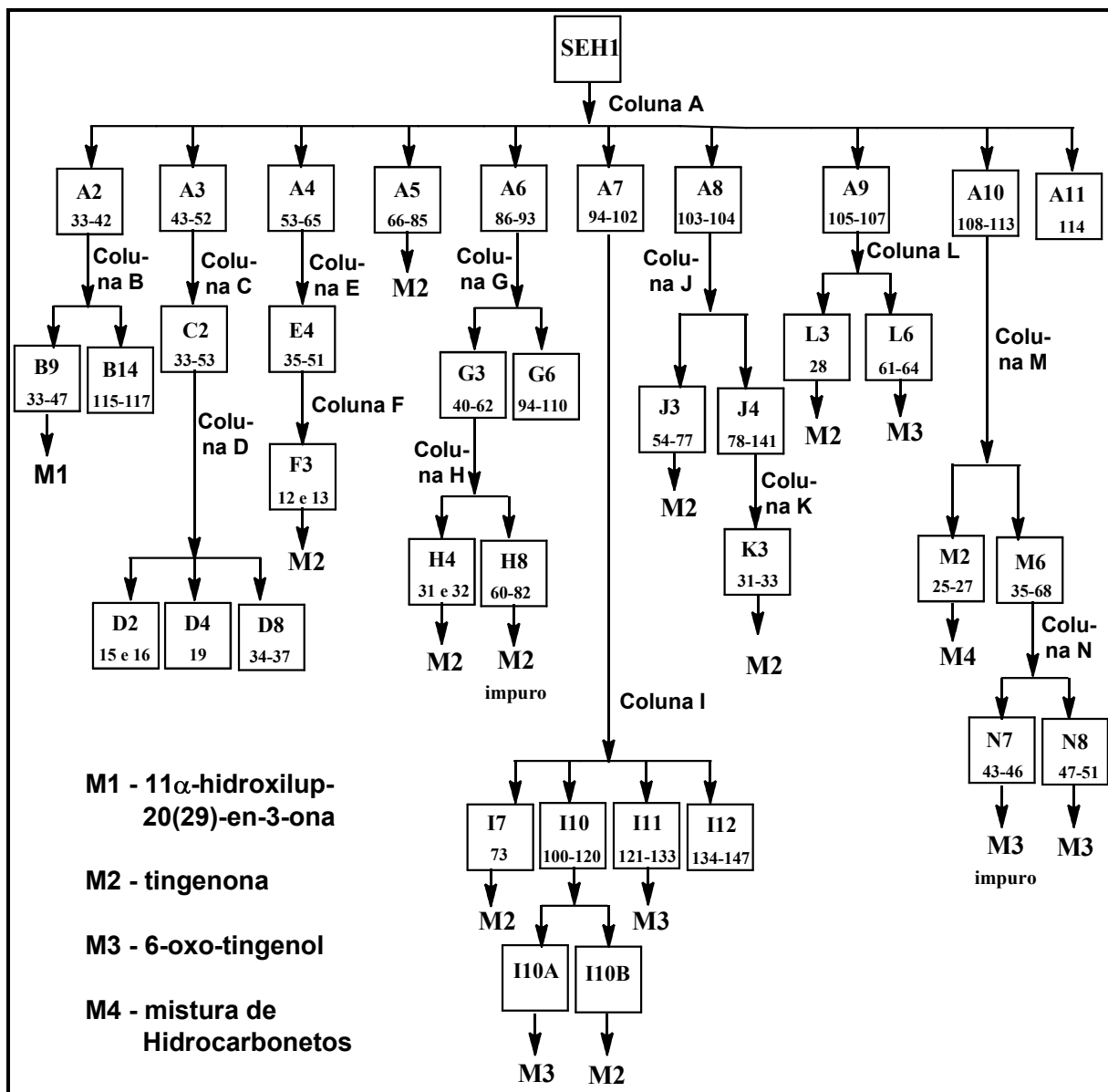


Figura 14: Fracionamento de SEH1.

1.1.3.2 – Segunda elaboração de SEH

Foi feito uma nova coluna cromatográfica (Coluna A) com 4,0 g de **SEH**, denominado **SEH 2**, com o objetivo de obter maior quantidade de tingenona, para futuramente ser utilizado como material em transformações químicas e para realização de diversos testes biológicos. Como a proporção de sílica em relação a

amostra foi maior do que na elaboração de **SEH 1**, observou-se que durante o processo outra substância foi isolada.

Um fluxograma mostrando o isolamento de todas as substâncias encontra-se na Figura 15, pág. 42.

Na Coluna **A**: 4,0 cm/1,08 cm utilizaram-se 281,2 g de sílica gel. Fez-se o empacotamento da coluna com Hex e posteriormente utilizaram-se os eluentes Hex, AcOEt e MeOH puros ou em misturas em gradiente de polaridade (Tabela 15).

Tabela 15. Ordem de eluição da coluna A e grupos relacionados

Eluente	Fração de 20 mL	Grupo	Massa (mg)
Hex/AcOEt (8:2)	1 – 153	A1 (1 – 7)	15,1 mg
Eluente	Fração de 200 mL	A2 (8)	49,0 mg
Hex/AcOEt (8:2)	154 – 184	A3 (9 – 11)	15,6 mg
Hex/AcOEt (7:3)	185 – 405	A4 (12)	18,0 mg
Hex/AcOEt (1:1)	406 – 429	A5 (13 – 38)	18,3 mg
AcOEt	430 – 443	A6 (39 – 44)	88,8 mg
AcOEt/MeOH (1:1)	444 – 476	A7 (45 – 87)	16,9 mg
MeOH	477	A8 (88 – 104)	1586,0 mg
		A9 (105 – 108)	17,1 mg
		A10 (109 – 152)	52,0 mg
		A11 (153 – 158)	74,4 mg
		A12 (159 – 477)	979,5 mg

Foram recolhidas 477 frações, 153 de 20 mL e 324 de 200 mL cada. O desenvolvimento da coluna foi acompanhado por CCD e as frações agrupadas de acordo com o perfil observado nas cromatoplasas.

Seis grupos foram trabalhados, os demais não foram por se tratar de misturas complexas e pequena quantidade.

⇒ **Grupo A2 (fração 8)**: apresentou-se como cristais brancos em forma de escama (49,0 mg) no balão durante a redução do volume. Estes cristais foram recolhidos após filtração e observou-se apenas uma mancha roxa na cromatoplasa (revelador: ácido perclórico/vanilina). A análise dos espectros no IV, RMN de ^1H e ^{13}C , indicou tratar-se de **11 α -hidroxilup-20(29)-en-3-ona (M1)**.

⇒ **Grupo A4 (fração 12):** apresentou-se como sólido amarelo pálido (18,0 mg) com faixa de fusão de 89,6-93,4 °C. Foi observado apenas uma mancha roxa em cromatoplaça (revelador: ácido perclórico/vanilina). A análise dos espectros de RMN de ^1H e ^{13}C indicou tratar-se de mistura contendo como constituintes principais **11 α -hidroxilup-20(29)-en-3-ona (M1)** e **30-hidroxilup-20(29)-en-3-ona (M5)**. Esta mistura apresenta impurezas graxas e outro composto que não foi possível identificar.

⇒ **Grupo A6 (frações 39-44):** apresentou-se como um sólido alaranjado (88,8 mg) com duas manchas em CCD, uma alaranjada e outra amarela. A análise comparativa por CCD indicou tratar-se de **tingenona (M2)** e **6-oxo-tingenol (M3)**, respectivamente.

⇒ **Grupo A8 (frações 88-104):** apresentou-se como um sólido alaranjado (1586,0 mg). A análise comparativa por CCD indicou tratar-se da **tingenona (M2)**. Sendo assim, o objetivo foi alcançado, já que se obteve quantidade expressiva dessa substância.

⇒ **Grupo A10 (frações 109-152):** apresentou-se um sólido marrom alaranjado (52,0 mg) com mais de quatro manchas bem definidas em cromatoplaça. O grupo A10 foi submetido à CC (Coluna **B**: 2,0 cm/32,0 cm). Foram adicionados 35,4g de sílica gel. Fez-se o empacotamento da coluna com Hex e utilizaram os eluentes Hex, AcOEt e MeOH puros ou em misturas em gradiente de polaridade (Tabela 16).

Tabela 16. Ordem de eluição da coluna B e subgrupos relacionados

Eluente	Fração de 10 mL	Subgrupo	Massa (mg)
Hex/AcOEt (9:1)	1 – 53	B1 (1 – 11)	–
Hex/AcOEt (8:2)	54 – 112	B2 (12 – 31)	2,3 mg
Hex/AcOEt (7:3)	113 – 130	B3 (32 – 55)	1,0 mg
Hex/AcOEt (1:1)	131 – 140	B4 (56 – 65)	25,2 mg
AcOEt	141 – 150	B5 (66 – 68)	2,1 mg
MeOH	151	B6 (69 – 77)	11,1 mg
		B7 (78 – 151)	5,7 mg

Foram recolhidas 151 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.

Subgrupo B3 (frações 32-55): apresentou-se como um sólido amorfo (1,0 mg). Foi observada na cromatoplasa apenas uma mancha roxa de R_f diferente de todas as substâncias e misturas isoladas até o momento (revelador: ácido perclórico/vanilina). Devido à pequena quantidade de amostra não foi possível identificá-la.

Subgrupo B4 (frações 56-65): apresentou-se como um sólido marrom claro (25,2 mg) com cinco manchas bem definidas. O subgrupo B4 foi submetido à CC (Coluna **C**: 1,5cm/32,0cm), utilizando 9,2 g de sílica gel. A coluna foi empacotada com Hex e utilizaram os eluentes Hex, AcOEt e MeOH puros ou em misturas em gradiente de polaridade (Tabela 17).

Tabela 17. Ordem de eluição da coluna C e subgrupos relacionados

Eluente	Fração de 10 mL	Subgrupo	Massa (mg)
Hex/AcOEt (8,5:1.5)	1 – 16	C1 (1 – 5)	4,4 mg
Hex/AcOEt (8:2)	17 – 22	C2 (6 – 14)	3,0 mg
Hex/AcOEt (7,5:2,5)	23 – 30	C3 (15 – 27)	1,1 mg
Hex/AcOEt (6,5:3,5)	31 – 38	C4 (28 – 33)	1,2 mg
Hex/AcOEt (6:4)	39 – 45	C5 (34 – 40)	3,1 mg
Hex/AcOEt (1:1)	46 – 49	C6 (41 – 45)	1,0 mg
Hex/AcOEt (4:6)	50 – 52	C7 (46 – 85)	5,3 mg
Hex/AcOEt (3:7)	53 – 56	C8 (86 – 94)	1,9 mg
Hex/AcOEt (2:8)	57 – 60		
AcOEt	61 – 63		
Hex/MeOH (9:1)	64 – 77		
Hex/MeOH (8:2)	78 – 83		
Hex/MeOH (7:3)	84 – 93		
MeOH	94		

Foram recolhidas 94 frações de 10 mL cada. As frações foram analisadas por CCD e agrupadas de acordo com o perfil observado nas cromatoplasas.

Subgrupo C2 (frações 6-14): apresentou-se como um sólido branco pardo (3,0 mg) com duas manchas na cromatoplaça (revelador: ácido perclórico/vanilina). Comparou-se com o padrão de lupeol, disponível no laboratório, e uma das manchas, a de coloração roxa, apresentou o mesmo R_f, isto permitiu sugerir que o lupeol é um dos constituintes de C2. Não foi possível purificar esta fração, pela pequena massa da amostra.

Subgrupo C4 (frações 28-33): apresentou-se um sólido alaranjado (1,2 mg). A análise comparativa por CCD indicou tratar-se da **tingenona (M2)**.

Os demais subgrupos não foram trabalhados por se tratar de misturas complexas e pequena quantidade.

Subgrupo B6 (frações 69-77): apresentou-se como um sólido alaranjado (11,1 mg). A análise comparativa por CCD indicou tratar-se de **tingenona (M2)**.

⇒ **Grupo A11 (frações 152-158)** (74,4 mg) e **A12 (frações 159-477)** (979,5 mg) apresentaram-se como um sólido marrom. Estes grupos por serem muito polares, não possibilitaram o trabalho pelo método em coluna cromatográfica de sílica.

A Figura 15 representa um resumo de toda a operação realizada na elaboração de SEH 2.

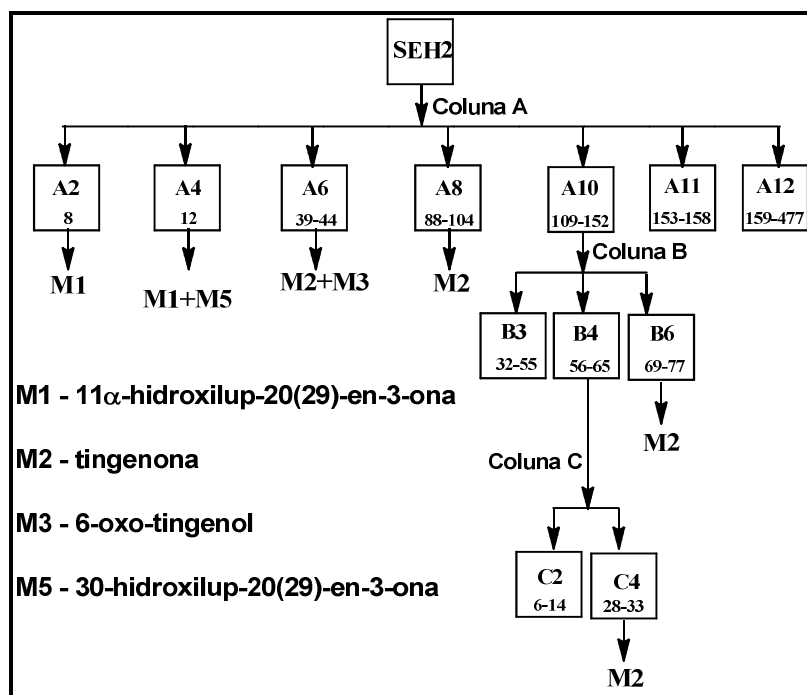


Figura 15: Fracionamento de SEH2.

1.1.3.3 – Elaboração de FSEH

FSEH (3,0 g) foi submetido à coluna cromatográfica isocrática (Coluna **A**: 4 cm/1,08 m), utilizando 300,8 g de sílica gel. Fez-se o empacotamento da coluna com Hex e empregou-se como eluente Hex-AcOEt (9:1).

Tabela 18. Grupos relacionados com a coluna A

Grupo	Massa (mg)	Grupo	Massa (mg)
A1 (1 – 10)	—	A16 (129 – 138)	12,1 mg
A2 (11 – 13)	4,1 mg	A17 (139 – 150)	308,9 mg
A3 (14 – 19)	12,3 mg	A18 (151 – 169)	16,9 mg
A4 (20 – 27)	14,5 mg	A19 (170 – 197)	17,1 mg
A5 (28 – 33)	4,1 mg	A20 (198 – 204)	14,9 mg
A6 (34 – 43)	11,1 mg	A21 (205 – 207)	146,7 mg
A7 (44 – 49)	63,1 mg	A22 (208 – 216)	13,9 mg
A8 (50)	7,0 mg	A23 (217 – 236)	17,3 mg
A9 (51)	7,3 mg	A24 (237 – 250)	29,3 mg
A10 (52 – 55)	13,0 mg	A25 (251 – 279)	13,6 mg
A11 (56 – 81)	11,0 mg	A26 (280 – 285)	12,6 mg
A12 (82 – 83)	15,0 mg	A27 (286 – 299)	14,3 mg
A13 (84 – 96)	7,0 mg	A28 (300 – 341)	81,6 mg
A14 (97 – 106)	17,8 mg	A29 (342 – 350)	1115,9 mg
A15 (107 – 128)	183,3 mg		

Foram coletadas 350 frações de 100 mL, que foram reduzidas no rotaevaporador. O desenvolvimento da coluna foi acompanhado por CCD e as frações agrupadas de acordo com o perfil observado nas cromatoplasas.

Treze grupos foram trabalhados, os demais não foram por se tratar de misturas complexas e pequena quantidade (Tabela 18).

Um fluxograma mostrando o isolamento de todas as substâncias encontra-se na Figura 16, pág. 50.

⇒ **Grupo A2 (frações 11-13):** apresentou-se como um sólido branco (4,1 mg). A comparação por CCD com amostra autêntica de lupeol indicou tratar-se desta substância. Porém a análise de RMN não foi conclusiva.

⇒ **Grupo A3 (frações 14-19):** apresentou-se como cristais brancos (12,3 mg) com faixa de fusão de 247,7-250,1 °C. Este sólido apresentou uma mancha roxa em CCD quando revelado com ácido perclórico/vanilina. A análise dos espectros no IV, RMN de ^1H e ^{13}C indicou tratar-se de **3,7-dioxo-friedelano (M6)**. Esta substância é inédita na espécie *Maytenus imbricata*.

⇒ **Grupo A5 (frações 28-33):** apresentou-se como um sólido bege pastoso (4,1 mg) e uma mancha azul em CCD quando revelada com ácido perclórico/vanilina. A análise dos espectros no RMN de ^1H e ^{13}C indicou tratar-se de **ácido palmítico (M7)**. Esta substância é inédita na espécie *Maytenus imbricata*.

⇒ **Grupo A7 (frações 44-49):** apresentou-se como cristais brancos em forma de escamas (63,1 mg). A análise por CCD, RMN de ^1H e ^{13}C , indicou tratar-se de **11 α -hidroxilup-20(29)-en-3-ona (M1)**.

⇒ **Grupo A8 (fração 50):** apresentou-se como um sólido branco (7,0 mg) e apenas uma mancha roxa (revelador: ácido perclórico/vanilina) foi observada na cromatoplaça. A análise por CCD, RMN de ^1H e ^{13}C indicou tratar-se de **11 α -hidroxilup-20(29)-en-3-ona (M1)** impuro.

⇒ **Grupo A13 (frações 84-96):** apresentou-se como cristais brancos (7,0 mg) com faixa de fusão de 146,9-148,4 °C e foi observado apenas uma mancha roxa em cromatoplaça (revelador: ácido perclórico/vanilina). A análise dos espectros no IV, RMN de ^1H e ^{13}C , indicou tratar-se de **3-oxo-29-hidroxifriedelano (M8)**. Esta substância é inédita na espécie *Maytenus imbricata*.

⇒ **Grupo A15 (frações 107-128):** apresentou-se como um sólido amorfo (183,3 mg) com duas manchas não definidas em cromatoplaça. O grupo A7 foi submetido à CC (Coluna **B**: 2,0 cm/60,0 cm). Foram adicionados 51,7 g de sílica gel. Fez-se o empacotamento da coluna com Hex e utilizaram os eluentes Hex, AcOEt e MeOH puros ou em misturas em gradiente de polaridade (Tabela 19).

Tabela 19. Ordem de eluição da coluna B e subgrupos relacionados

Eluente	Fração de 10 mL	Subgrupo	Massa (mg)
Hex/AcOEt (9:1)	1 – 44	B1 (1 – 15)	–
Hex/AcOEt (8,5:1,5)	45 – 63	B2 (16 – 38)	2,0 mg
Hex/AcOEt (8:2)	64 – 122	B3 (39 – 63)	14,1 mg
Hex/AcOEt (7:3)	123 – 216	B4 (64 – 83)	16,1 mg
Hex/AcOEt (6:4)	217 – 224	B5 (84 – 104)	12,6 mg
Hex/AcOEt (1:1)	225 – 233	B6 (105 – 141)	9,7 mg
AcOEt	234 – 239	B7 (142 – 196)	7,1 mg
MeOH	240	B8 (197 – 210)	11,4 mg
		B9 (211 – 235)	64,4 mg
		B10 (236 – 239)	12,7 mg
		B11 (240)	13,0 mg

Foram recolhidas 151 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.

Subgrupo B2 (frações 16-38): apresentou-se como um sólido amarelo pálido (2,0 mg) e observou-se uma mancha roxa na cromatoplasa (revelador: ácido perclórico/vanilina). Como não havia quantidade significativa não foi possível caracterizá-la.

Subgrupo B9 (frações 211-235): apresentou-se como um sólido alaranjado (64,4 mg). A análise comparativa por CCD indicou tratar-se de **tingenona (M2)**.

Os demais subgrupos não foram trabalhados por se tratar de misturas complexas e pequena quantidade.

⇒ **Grupo A17 (frações 139-150):** apresentou-se como um sólido marrom (308,9 mg) com cinco manchas bem definidas em cromatoplasa. O Grupo A17 foi submetido à CC (Coluna **C**: 2,0 cm/96,0 cm). Foram adicionados 28,2 g de sílica gel. Fez-se o empacotamento da coluna com Hex e empregaram-se os eluentes Hex, AcOEt e MeOH puros ou em misturas em gradiente de polaridade (Tabela 20).

Tabela 20. Ordem de eluição da coluna C e subgrupos relacionados

Eluente	Fração de 10 mL	Subgrupo	Massa (mg)
Hex/AcOEt (9:1)	1 – 11	C1 (1 – 10)	6,4 mg
Hex/AcOEt (8,5:1,5)	12 – 243	C2 (11 – 14)	13,6 mg
Hex/AcOEt (8:2)	244 – 266	C3 (15 – 31)	14,7 mg
Hex/AcOEt (7,5:2,5)	267 – 287	C4 (32 – 46)	9,2 mg
Hex/AcOEt (7:3)	288 – 323	C5 (47 – 58)	14,3 mg
Hex/AcOEt (6,5:3,5)	324 – 336	C6 (59 – 82)	14,1 mg
Hex/AcOEt (6:4)	337 – 346	C7 (83 – 96)	63,9 mg
Hex/AcOEt (1:1)	347 – 359	C8 (97 – 110)	14,5 mg
Hex/AcOEt (4:6)	360 – 370	C9 (111 – 316)	92,3 mg
Hex/AcOEt (3:7)	371 – 383	C10 (317 – 400)	14,9 mg
Hex/AcOEt (2:8)	384 – 390	C11 (401 – 402)	1,3 mg
Hex/AcOEt (1:9)	391 – 397	C12 (403 – 435)	8,9 mg
AcOEt	398 – 407	C13 (436 – 447)	6,2 mg
AcOEt/MeOH (7:3)	408 – 432		
AcOEt/MeOH (1:1)	433 – 446		
MeOH	447		

Foram recolhidas 447 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.

Subgrupo C7 (frações 83-96): apresentou sólido marrom (63,9 mg) com quatro manchas bem definidas na cromatoplasa. O subgrupo C7 foi submetido à CC (Coluna **D**: 3,0 cm/52,0 cm). Foram adicionados 16,6 g de sílica gel. Fez-se o empacotamento da coluna com Hex e utilizaram-se os eluentes Hex, AcOEt e MeOH puros ou em misturas em gradiente de polaridade (Tabela 21).

Tabela 21. Ordem de eluição da coluna D e subgrupos relacionados

Eluente	Fração de 10 mL	Subgrupo	Massa (mg)
Hex/AcOEt (9,5:0,5)	1 – 16	D1 (1 – 27)	–
Hex/AcOEt (9,25:0,75)	17 – 20	D2 (28 – 29)	2,0 mg
Hex/AcOEt (9:1)	21 – 24	D3 (30)	2,1 mg
Hex/AcOEt (8,5:1,5)	25 – 26	D4 (31 – 34)	3,4 mg
Hex/AcOEt (8:2)	27 – 37	D5 (35 – 48)	8,1 mg
Hex/AcOEt (7,5:2,5)	38 – 43	D6 (49 – 53)	11,3 mg
Hex/AcOEt (7:3)	44 – 47	D7 (54 – 57)	12,6 mg
Hex/AcOEt (6:4)	48 – 51	D8 (58)	6,1 mg
AcOEt	52 – 56	D9 (59)	4,8 mg
AcOEt/MeOH (1:1)	57	D10 (60)	3,0 mg

Foram recolhidas 57 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.

Subgrupo D2 (frações 28 e 29): apresentou-se como um sólido alaranjado (2,0 mg). Foi observada por comparação em CCD, que se tratava de **tingenona (M2)**.

Subgrupo C9 (frações 111-316): apresentou-se como um sólido alaranjado (92,3 mg). Foi observada na cromatoplasa apenas uma mancha alaranjada quando revelada com ácido perclórico/vanilina e por comparação indicou tratar-se de **tingenona (M2)**.

Subgrupo C11 (frações 401 e 402): apresentou-se como um sólido amarelo pálido (1,3 mg). Observou-se apenas uma mancha amarela em CCD, quando revelada com ácido perclórico/vanilina, mas não foi possível caracterizar pela pequena massa.

⇒ **Grupo A21 (frações 205-207):** apresentou-se como um sólido amorfo (146,7 mg), com muitas manchas bem definidas na cromatoplaça. O grupo A21 foi submetido à CC (Coluna **E**: 3,5 cm/42,0 cm). Foram adicionados 17,3 g de sílica gel. Fez-se o empacotamento da coluna com Hex e utilizaram-se os eluentes Hex, AcOEt e MeOH puros ou em misturas em gradiente de polaridade (Tabela 22).

Tabela 22. Ordem de eluição da coluna E e subgrupos relacionados

Eluente	Fração de 10 mL	Subgrupo	Massa (mg)
Hex/AcOEt (9:1)	1 – 56	E1 (1 – 15)	25,3 mg
Hex/AcOEt (8:2)	57 – 104	E2 (16 – 53)	41,8 mg
Hex/AcOEt (7:3)	105 – 113	E3 (54 – 60)	8,9 mg
Hex/AcOEt (6:4)	114 – 115	E4 (61 – 75)	16,7 mg
Hex/AcOEt (1:1)	116 – 120	E5 (76)	8,0 mg
Hex/AcOEt (4:6)	121 – 123	E6 (77 – 137)	12,4 mg
Hex/AcOEt (3:7)	124 – 127		
AcOEt	128 – 136		
MeOH	137		

Foram recolhidas 137 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.

Subgrupo E1 (frações 1-15): apresentou-se como um sólido alaranjado (25,3 mg) com três manchas na cromatoplaça. Essa fração foi submetida a uma CCD preparativa (eluente: Hex/AcOEt – 7:3) e obtiveram-se **E1A** (11,0 mg) mancha rosa, **E1B** (2,9 mg) mancha alaranjada e **E1C** (1,9 mg) mancha roxa. A fração **E1A** apresentou-se como sólido amarelo pálido com faixa de fusão de 212,9 - 218,6 °C. Apresentou teste LB positivo para triterpeno pentacíclico. A análise dos espectros de IV, RMN de ^1H e ^{13}C indicou se tratar de **3 β ,11 α -di-hidroxilup-20(29)-eno (M9)**. Esta substância é inédita na espécie *Maytenus imbricata*. Não foi possível identificar as outras frações por apresentarem pequenas massas.

Subgrupo E2 (frações 16-53): apresentou-se como um sólido alaranjado (41,8 mg). Foi observada na cromatoplaça apenas uma mancha alaranjada quando revelada com ácido perclórico/vanilina e por comparação indicou tratar-se de **tingenona (M2)**.

Subgrupo E5 (fração 76): apresentou-se como um sólido amorfo (8,0 mg). Foi observada na cromatoplaça apenas uma mancha amarela quando revelada com ácido perclórico/vanilina e comparação com amostra autêntica indicou tratar-se de **6-oxo-tingenol (M3)**.

⇒ **Grupo A24 (frações 237-250):** apresentou-se como um sólido marrom (29,3 mg) com muitas manchas não definidas em cromatoplaça. O grupo A24 foi submetido à CC (Coluna F: 2,0 cm/43,0 cm). Foram adicionados 18,6 g de sílica gel 60. Fez-se o empacotamento da coluna com Hex e utilizaram-se os eluentes Hex, AcOEt e MeOH puros ou em misturas em gradiente de polaridade (Tabela 23).

Tabela 23. Ordem de eluição da coluna F e subgrupos relacionados

Eluente	Fração de 10 mL	Subgrupo	Massa (mg)
Hex/AcOEt (8,5:1,5)	1 – 9	F1 (1 – 9)	9,0 mg
Hex/AcOEt (8:2)	10 – 15	F2 (10 – 12)	2,1 mg
Hex/AcOEt (7:3)	16 – 21	F3 (13 – 30)	9,4 mg
Hex/AcOEt (6:4)	22 – 31	F4 (31 – 32)	7,2 mg
AcOEt	32		

Foram recolhidas 32 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.

Subgrupo F4 (frações 31-32): apresentou-se como um sólido amorfo (7,2 mg). Foi observada na cromatoplaça apenas uma mancha amarela (revelada com ácido perclórico/vanilina) e comparação com amostra autêntica indicou tratar-se de **6-oxo-tingenol (M3)**.

⇒ **Grupo A28 (frações 300-341):** apresentou-se como um sólido alaranjado (81,6 mg). Foi observada na cromatoplaça apenas uma mancha alaranjada (revelada com ácido perclórico/vanilina) e comparação com amostra autêntica indicou tratar-se de **tingenona (M2)**.

⇒ **Grupo A29 (frações 342-350):** apresentou-se como um sólido marrom (1115,9 mg). Este grupo por ser muito polar, não possibilitou o trabalho pelo método em coluna cromatográfica de sílica

Os demais subgrupos não foram trabalhados por se tratar de misturas complexas e/ou pequena quantidade.

A Figura 16 representa um resumo de toda a operação realizada na elaboração de FSEH.

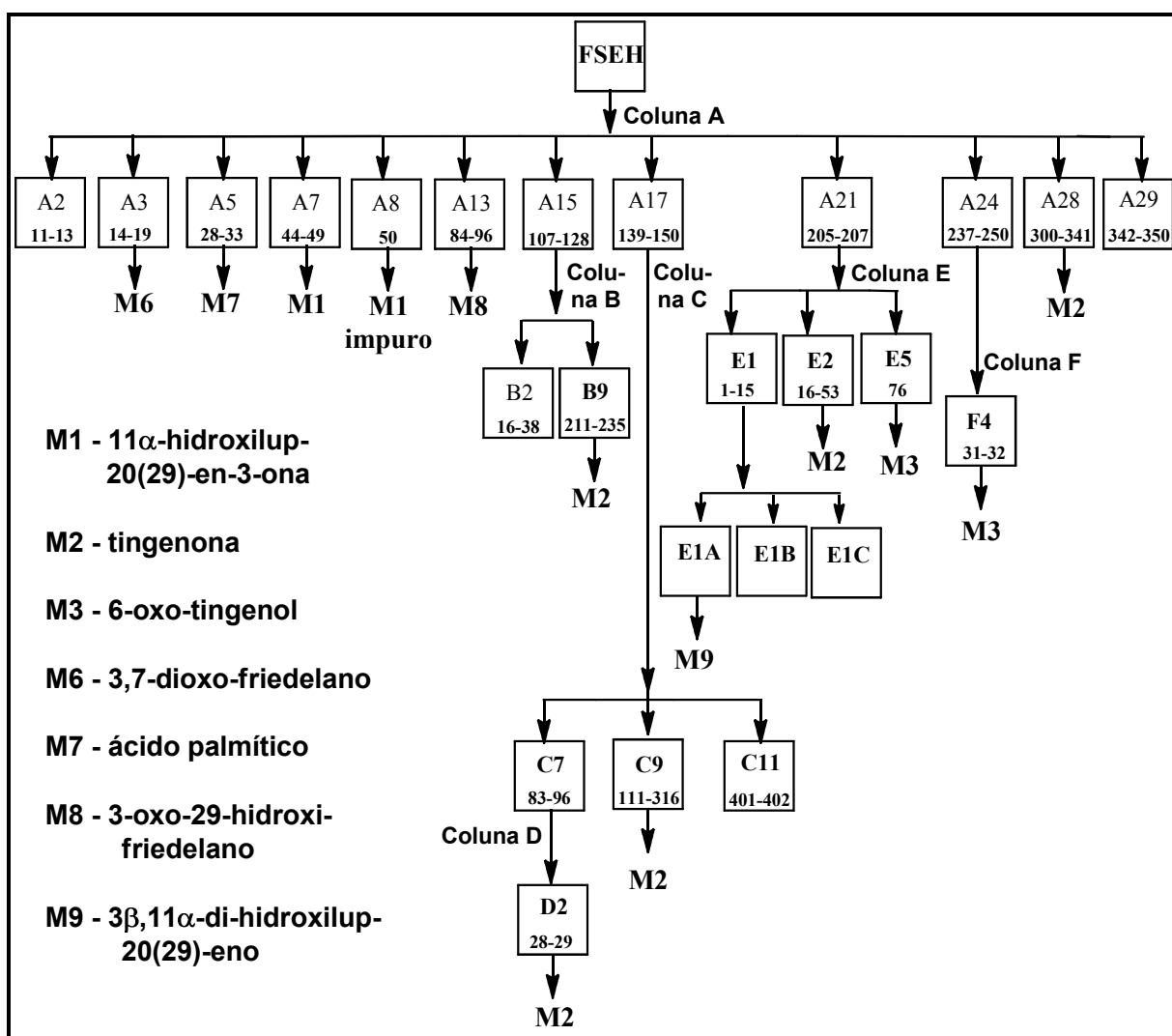


Figura 16: **Fracionamento de FSEH.**

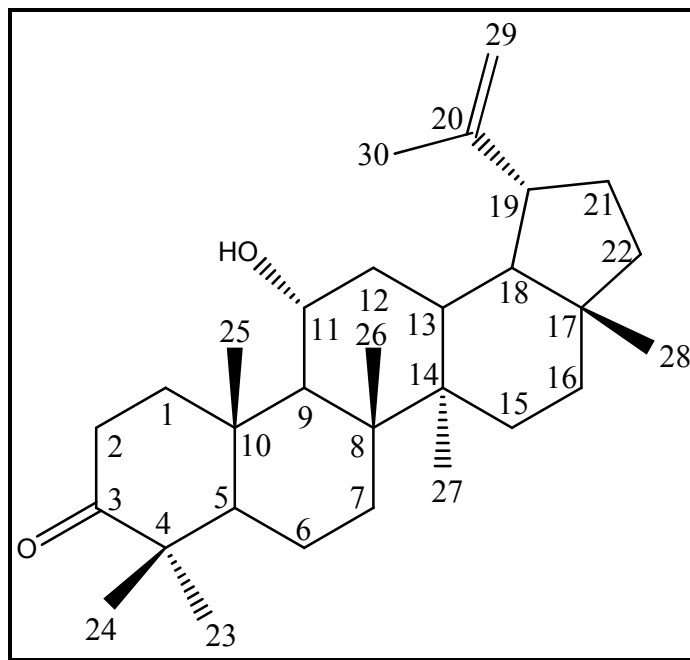
1.2 – Determinação Estrutural

1.2.1 Determinação estrutural das substâncias e misturas isoladas de raízes de *Maytenus imbricata*

As substâncias puras ou misturas isoladas do sólido de extrato hexânico/éter etílico (1:1) (SEH1 e/ou SEH2) e do extrato hexânico/éter etílico (1:1) (FSEH) estão listadas na Tabela 24.

Tabela 24: Substâncias e misturas isoladas de *Maytenus imbricata*

Código da amostra	Substância ou mistura	Origem	Discussão (pág.)
M1	11 α -hidroxilup-20(29)-en-3-ona	SEH1, SEH2, FSEH	52
M2	tingenona	SEH1, SEH2, FSEH	58
M3	6-oxo-tingenol	SEH1, SEH2, FSEH	63
M4	mistura de hidrocarbonetos	SEH1	73
M1 + M5	11 α -hidroxilup-20(29)-en-3-ona, 30-hidroxilup-20(29)-en-3-ona	SEH2	76
M6	3,7-dioxofriedelano	FSEH	83
M7	ácido palmítico	FSEH	88
M8	3-oxo-29-hidroxifriedelano	FSEH	91
M9	3 β ,11 α -di-hidroxilup-20(29)-eno	FSEH	96

1.2.1.1 – M1: 11 α -hidroxilup-20(29)-en-3-ona

M1 apresentou-se como cristais brancos em forma de escama, com faixa de fusão de 154,2 - 158,8 °C e solúvel em clorofórmio. Foi obtido a partir de SEH (rendimento máximo de 1,2 %) e FSEH (rendimento de 2,1 %) conforme representado nas Figuras 14, 15 e 16, pág. 38, 42 e 50. Apresentou teste Liebermann-Burchard (LB) positivo para triterpenos pentacíclicos (TTPC), pela mudança de coloração de incolor para pardo avermelhada.

O espectro na região do IV (Figura 17, pág. 53) de **M1** apresentou bandas de absorção em 3504-3434 cm⁻¹ características de estiramento de ligação de OH de álcool, 1076-1108 cm⁻¹ correspondente a estiramento de ligação de CO de álcool, 2942 e 2858 cm⁻¹ características de estiramento simétrico e assimétrico de ligação CH de compostos alifáticos, 1458 e 1382 cm⁻¹ característica de deformação angular de ligação simples CH de compostos alifáticos. Além disso, também apresentou uma banda em 1690 cm⁻¹ característica de estiramento de ligação de CO de carbonila de cetona e bandas fracas entre 1675-1645 cm⁻¹ relativa a estiramento de ligação C=C de olefinas.

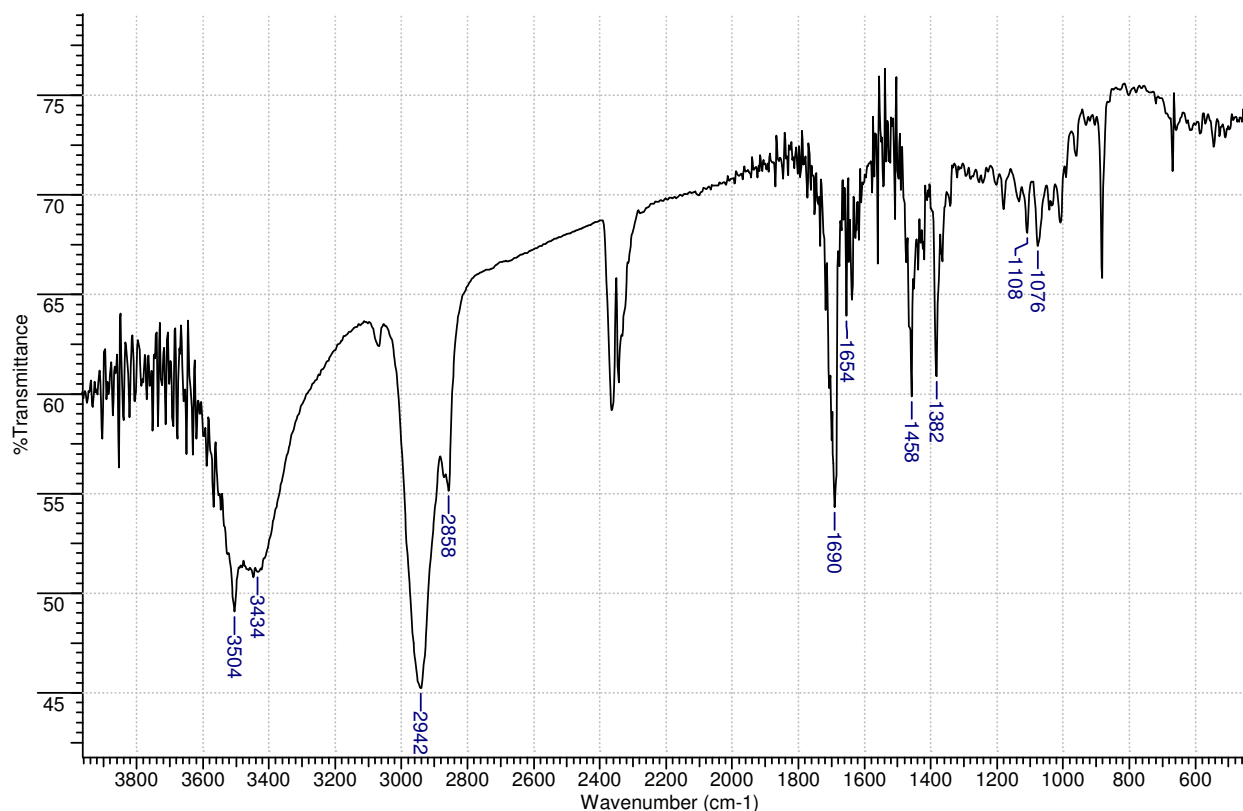


Figura 17: Espectro de **M1** obtido no IV (KBr, cm^{-1}).

O espectro de RMN de ^1H (Figura 18, pág. 54) apresentou seis simpletos, os quais foram atribuídos a sete metilas, em δ 1,69 (3H), 1,09 (3H), 1,07 (6H), 1,06 (3H), 0,98 (3H) e 0,80 (3H). Apresentou um triplo duplete em δ 3,91 característico de hidrogênio metínico indicando que esse hidrogênio apresenta dois acoplamentos de spin diaxial ($J = 10,8$ Hz) e um axial-equatorial ($J = 4,8$ Hz) (SILVERSTEIN, et al. 1994). O espectro também apresentou dois simpletos largos em δ 4,72 e δ 4,60, correspondentes a hidrogênios olefínicos, o que indicou a presença de ligação dupla terminal.

O espectro de RMN de ^{13}C (Figura 19, 20, pág. 55) apresentou sinais em δ 109,95 (C29) e δ 150,22 (C20), e estes sinais juntamente com a presença dos dois sinais de hidrogênios olefínicos sugeriram que **M1** pertence a classe dos TTPC da série dos lupanos (MAHATO e KUNDU, 1994). Pela análise deste espectro e do subespectro DEPT-135 (Figura 21, pág. 56), determinou-se a presença de 30 sinais de carbonos, atribuídos a sete carbonos de grupos metila, dez carbonos de grupos metileno, seis carbonos de grupos metino e sete carbonos não hidrogenados.

A comparação entre os valores dos sinais de RMN de ^{13}C com aqueles da literatura (SILVA, 2007a) (Tabela 25, pág. 57) permitiu identificar **M1** como sendo 11 α -hidroxilup-20(29)-en-3-ona. **M1** já foi isolado de galhos de *Maytenus imbricata* (SILVA, 2007a).

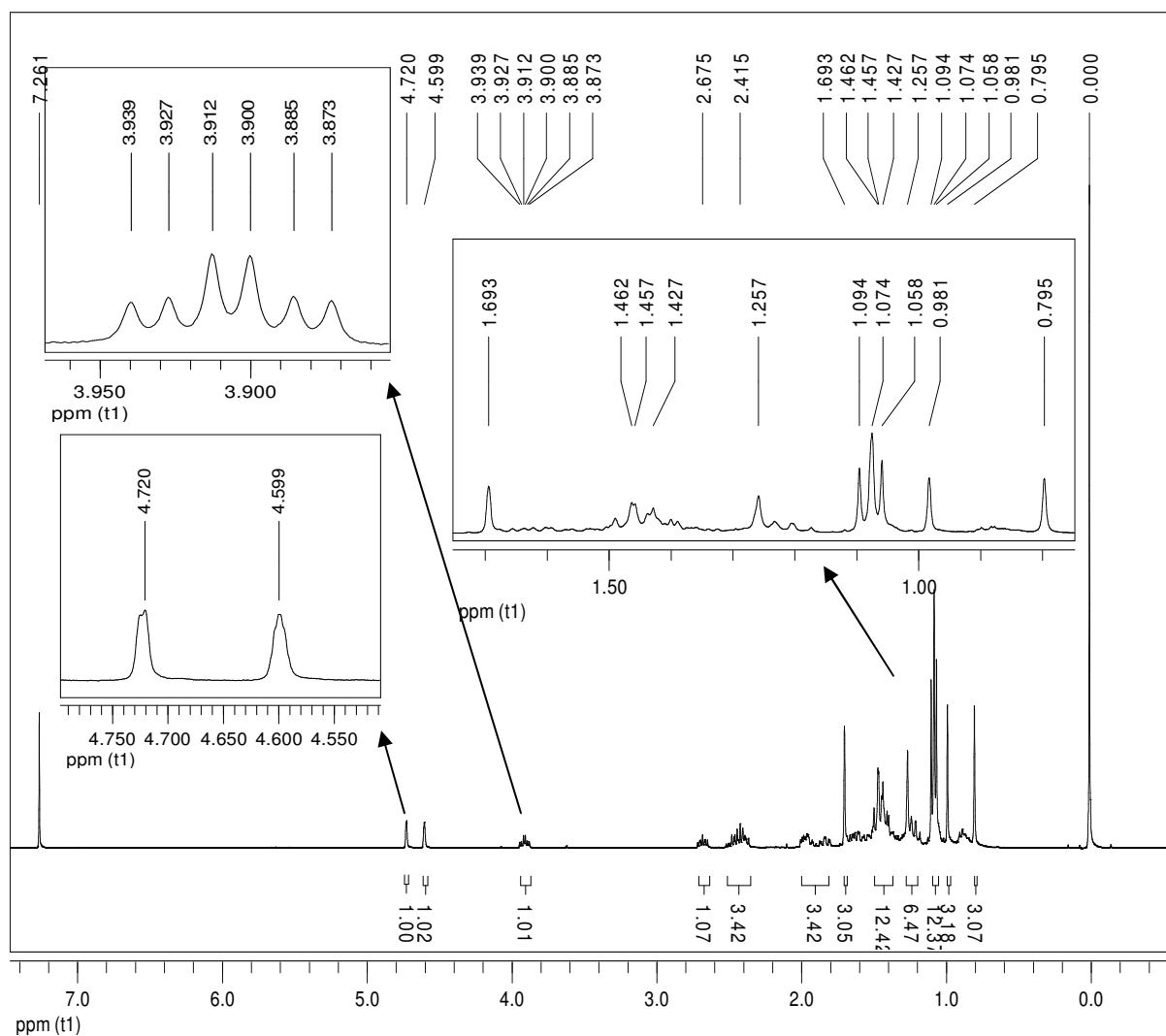


Figura 18: Espectro e ampliações de RMN de ^1H de **M1** (CDCl_3 ; 400 MHz).

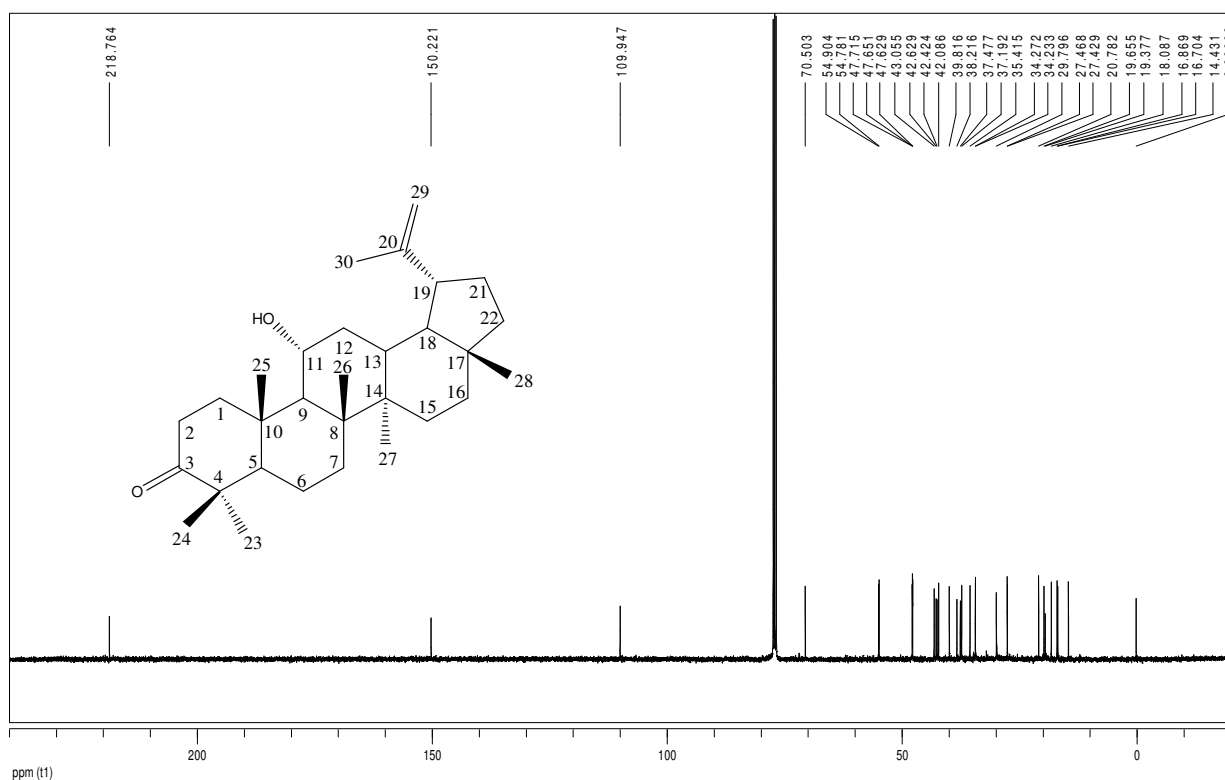


Figura 19: Espectro de RMN de ^{13}C de **M1** (CDCl_3 ; 100 MHz).

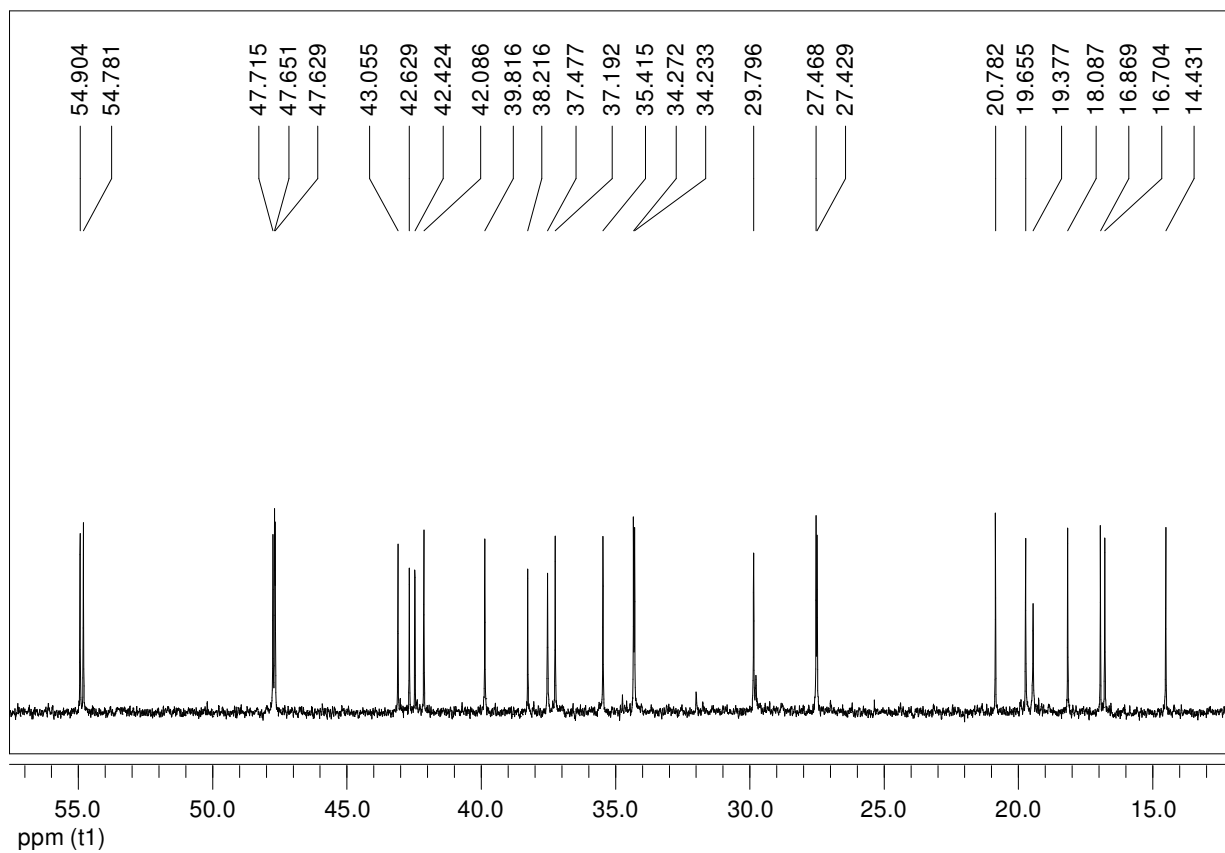


Figura 20: Expansão do espectro de RMN de ^{13}C de **M1** (CDCl_3 ; 100 MHz).

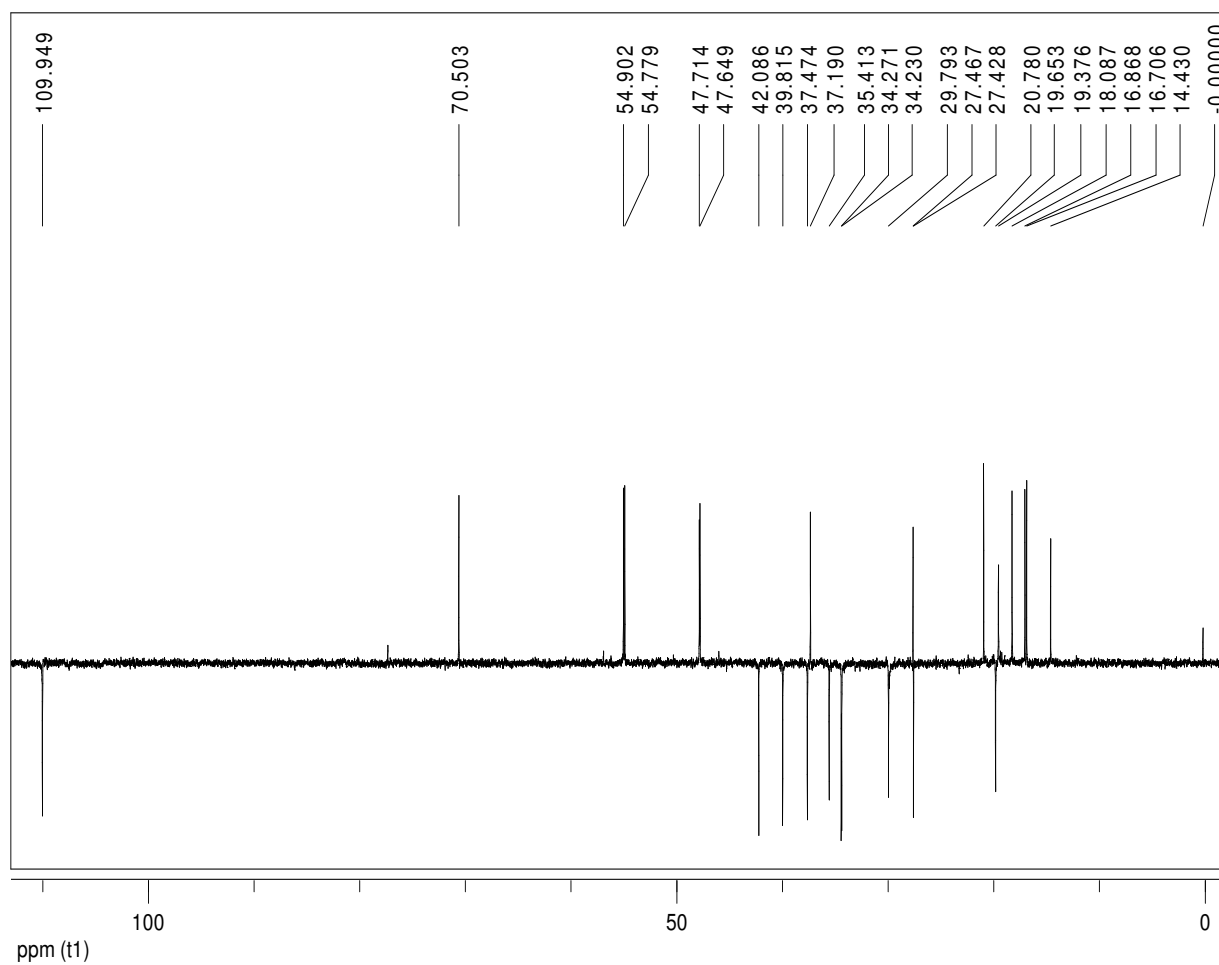


Figura 21: Subespectro DEPT-135 de **M1** (CDCl₃; 100 MHz).

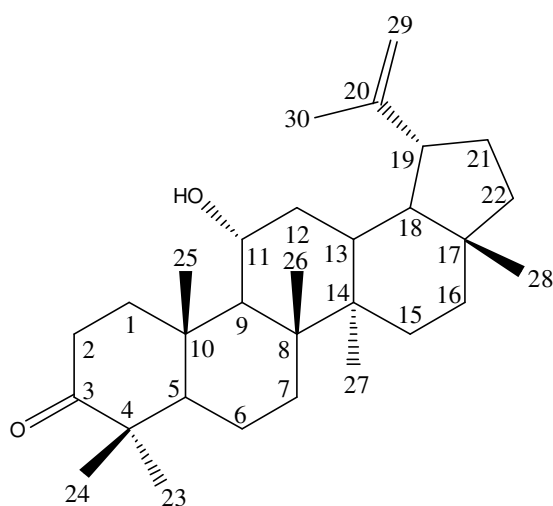
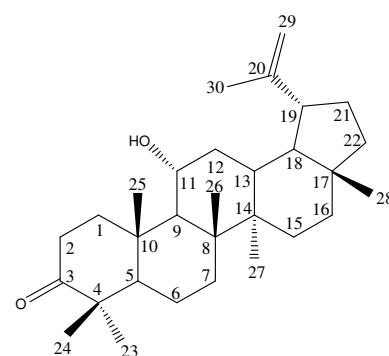


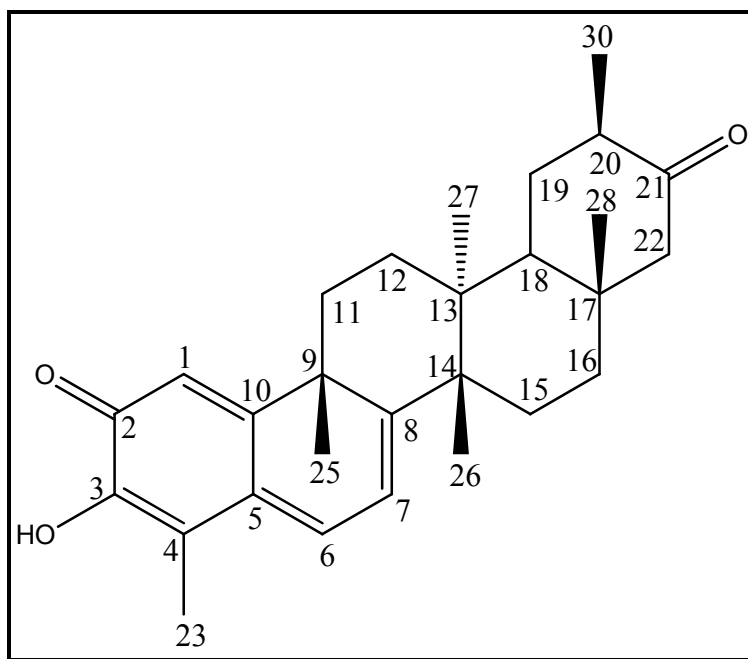
Tabela 25: Comparação dos dados de RMN de ^{13}C de **M1** com os dados da literatura para 11 α -hidroxilup-20(29)-en-3-ona (SILVA, 2007a)

Nº	Tipo de carbono	δ_{C}^* de M1	δ_{C}^* (SILVA, 2007a)
1	CH ₂	42,09	42,07
2	CH ₂	34,23	34,21
3	C=O	218,78	218,84
4	C	47,63	47,63
5	CH	54,78	54,76
6	CH ₂	19,66	19,64
7	CH ₂	34,27	34,27
8	C	42,63	42,41
9	CH	54,90	54,87
10	C	38,22	38,20
11	CHOH	70,50	70,49
12	CH ₂	37,48	37,44
13	CH	37,19	37,17
14	C	42,42	42,16
15	CH ₂	27,43	27,41
16	CH ₂	35,42	35,40
17	C	43,06	43,05
18	CH	47,65	47,63
19	CH	47,72	47,70
20	C	150,22	150,20
21	CH ₂	29,80	29,78
22	CH ₂	39,82	39,80
23	CH ₃	27,47	27,46
24	CH ₃	20,78	20,77
25	CH ₃	16,70	16,71
26	CH ₃	16,87	16,86
27	CH ₃	14,43	14,42
28	CH ₃	18,09	18,08
29	=CH ₂	109,95	109,95
30	CH ₃	19,38	19,37

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



1.2.1.2 – M2: tingenona



M2 foi isolado do fracionamento do extrato SEH (rendimento máximo de 39,9 %) e FSEH (rendimento de 9,4 %), representando o composto majoritário destes extratos, conforme as Figuras 14, 15 e 16, pág. 38, 42 e 50. **M2** apresentou-se como sólido alaranjado, solúvel em clorofórmio e com faixa de fusão 145,0 - 147,9 °C. A análise por CCD deste sólido evidenciou a existência de uma mancha alaranjada (revelador: ácido perclórico/vanilina (1:1)).

O espectro na região do IV (Figura 22, pág. 59) de **M2** apresentou bandas de absorção em 3368 cm^{-1} , característica de estiramento de ligação OH de álcool, 2952-2871 cm^{-1} características de estiramento simétrico e assimétrico da ligação CH de compostos alifáticos, 1708 cm^{-1} característica de estiramento de ligação C=O de carbonila de cetona cíclica, 1597, 1516 e 1438 cm^{-1} características de estiramento de C=C e 1186-1084 cm^{-1} características de estiramento de ligação CO de alcoóis. A feição do espectro, principalmente na região de 1500-1708 cm^{-1} , onde se encontra ligação C=O e C=C cm^{-1} sugeriu tratar-se de um triterpeno quinonametídeo.

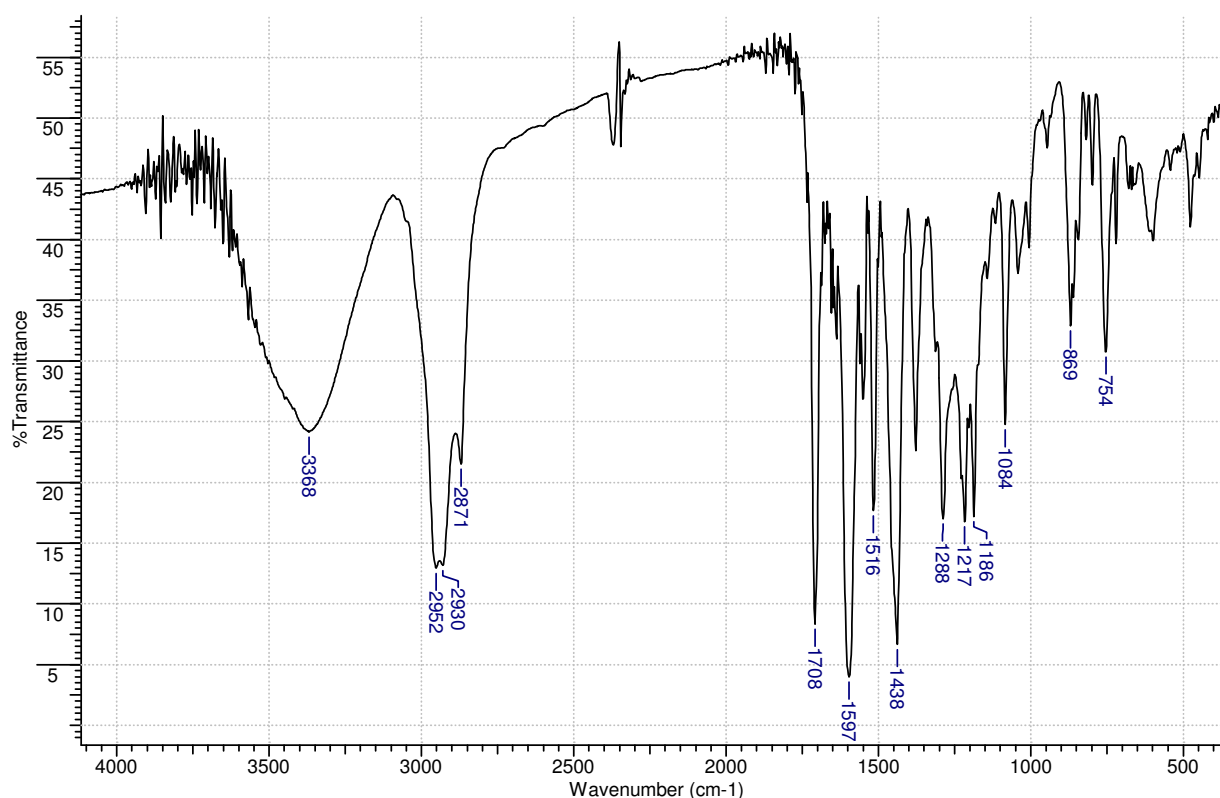


Figura 22: Espectro de **M2** obtido na região do IV (KBr, cm^{-1}).

O espectro de RMN de ^1H (Figura 23, pág. 60) de **M2** sugeriu tratar-se de um quinonametídeo por apresentar um duplete em δ 7,03 (7,2 Hz, 1H, H6), um simpleto em 6,55 (1H, H1) e um duplete em 6,38 (7,2 Hz, 1H, H7). Na região entre δ 0,7-2,4 foi possível observar cinco simpletos relativos a cinco metilas δ (0,98; 1,01; 1,35; 1,51 e 2,23) e um duplete em δ 1,00 relativo a uma metila (C30). O espectro também apresenta um duplete em δ 2,92 ($J = 14,4$ Hz) relativo ao H ligado ao C22 e um multipeto em δ 2,51, relativo ao H ligado ao C20.

O espectro de RMN de ^{13}C (Figura 24 e 25, pág. 60 e 61) apresentou 28 sinais de carbono e a análise deste espectro juntamente com o subespectro de DEPT-135 (Figura 26, pág. 61), possibilitou a identificação de seis carbonos metílicos, seis metilênicos, cinco metínicos e onze não hidrogenados.

Os valores de deslocamento químico de carbono de **M2** foram comparados com a literatura (SOTANAPHUN et al., 1998) (Tabela 26, pág. 62) e permitiram identificar este composto como sendo tingenona. **M2** é inédita na espécie *Maytenus imbricata*.

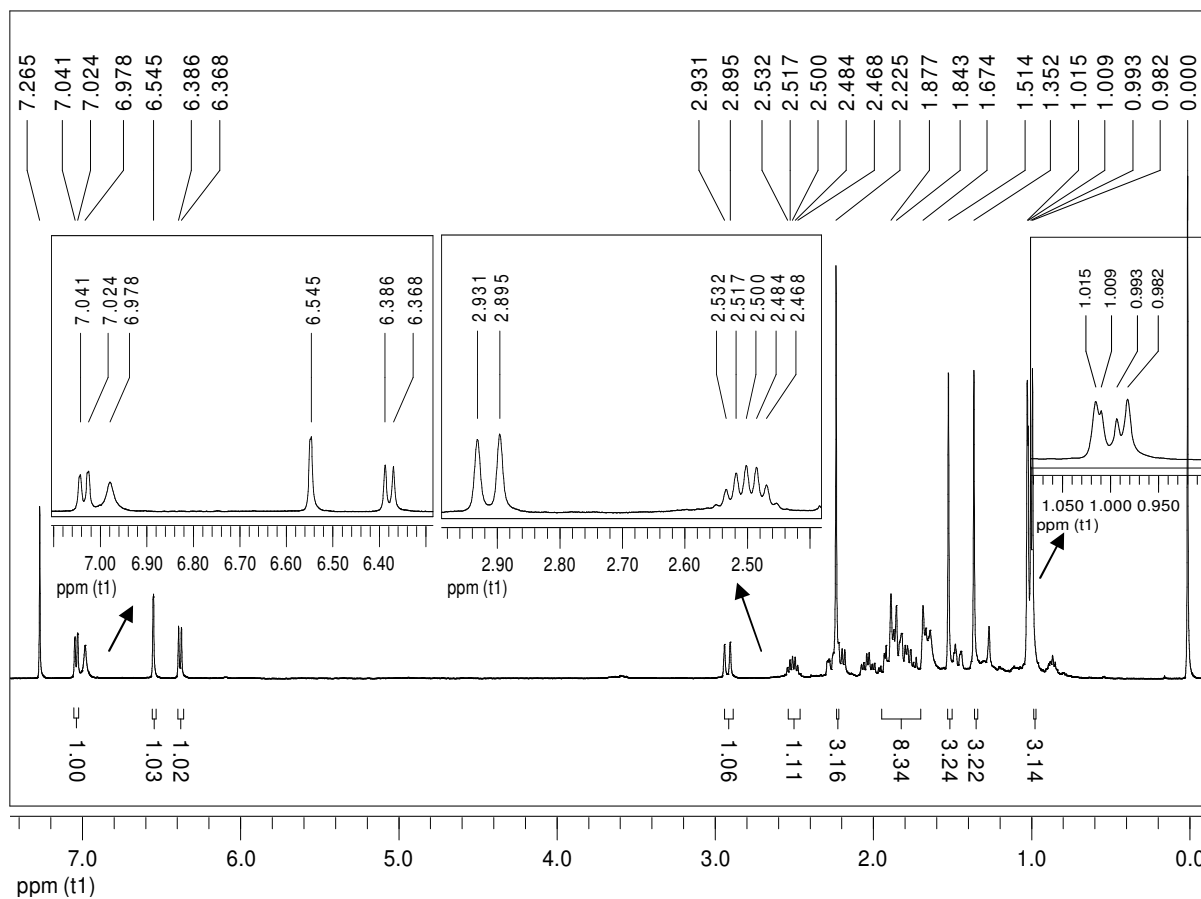


Figura 23: Espectro e expansões de RMN de ^1H de **M2** (CDCl_3 , 400 MHz).

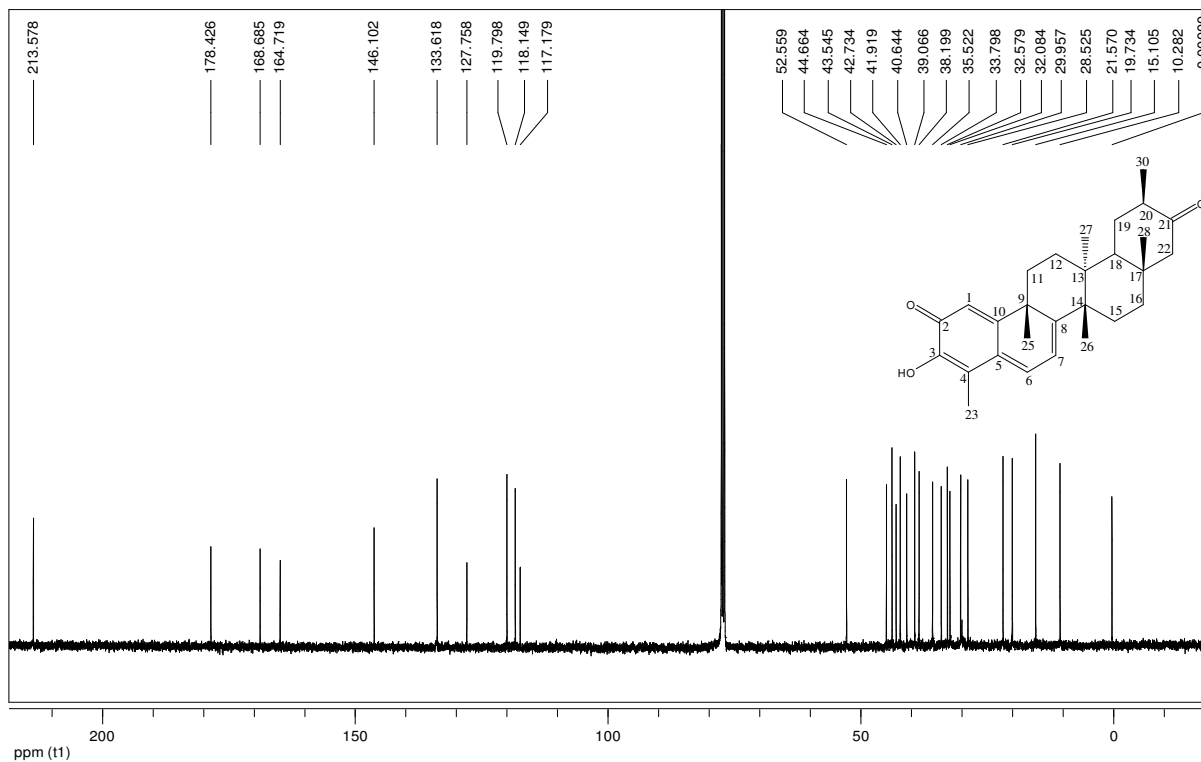


Figura 24: Espectro de RMN de ^{13}C de **M2** (CDCl_3 , 100 MHz).

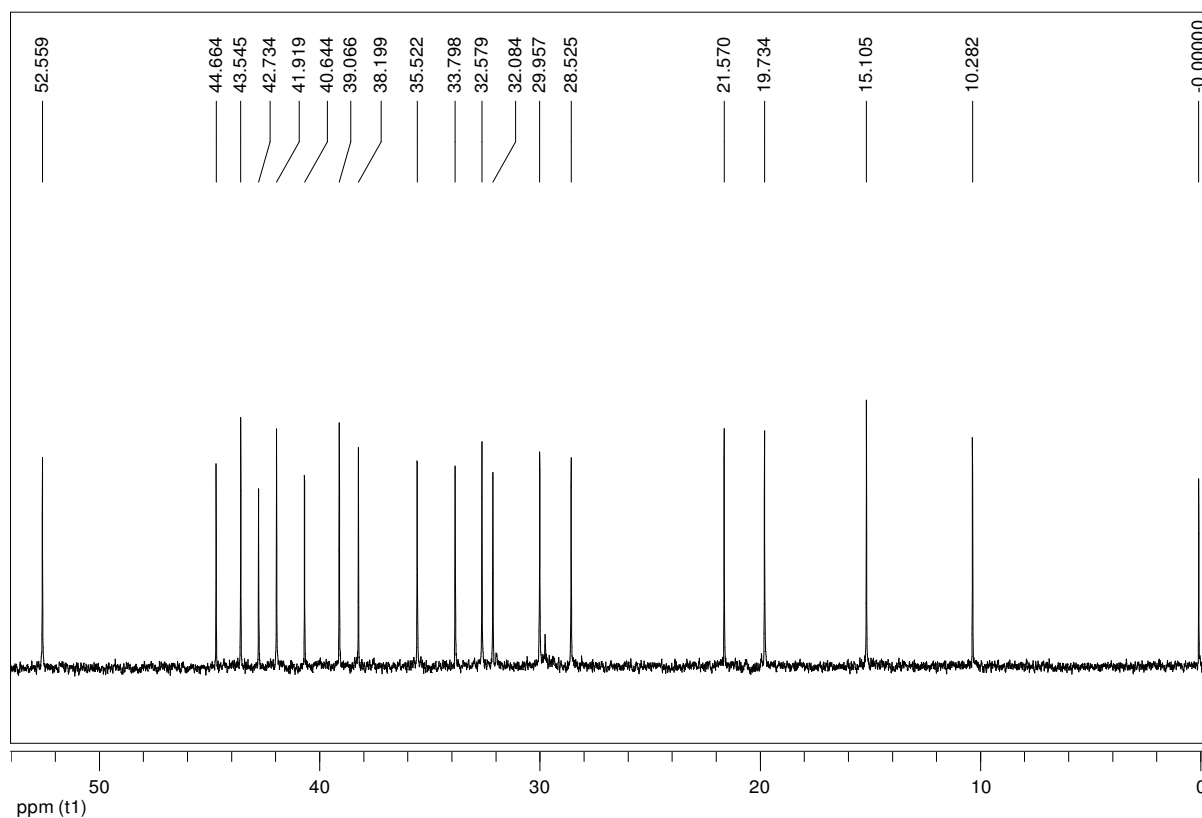


Figura 25: Expansão do espectro de RMN de ^{13}C de **M2** (CDCl₃, 100 MHz).

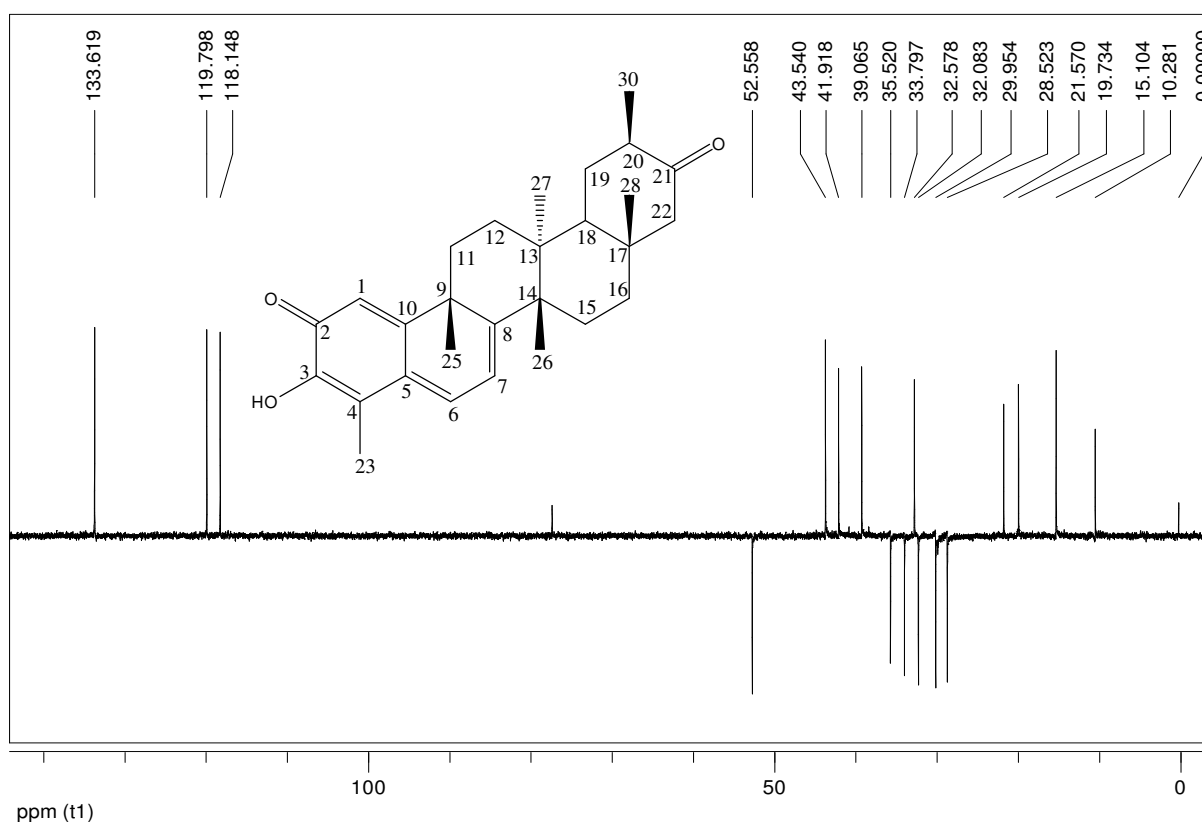
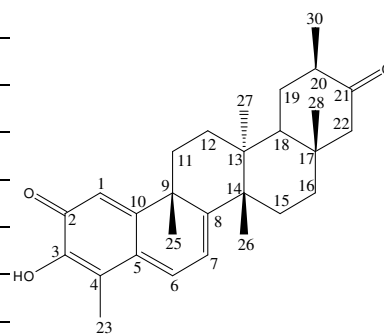


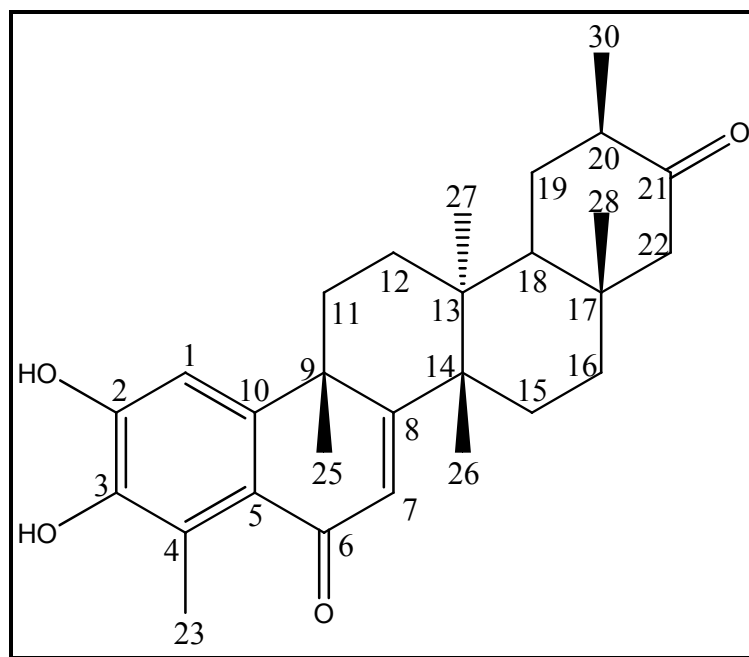
Figura 26: Subespectro de DEPT-135 de **M2** (CDCl₃, 100 MHz).

Tabela 26: Comparação dos dados de RMN de ^{13}C de **M2** com os dados da literatura para tingenona (SOTANAPHUN et al., 1998)

Nº	Tipo de carbono	δ_c^* de M2	δ_c^* (SOTANAPHUN et al., 1998)
1	CH	119,80	119,80
2	C	178,43	178,40
3	C	146,10	146,00
4	C	117,18	117,10
5	C	127,76	127,70
6	CH	133,62	133,60
7	CH	118,15	118,10
8	C	168,69	168,70
9	C	42,73	42,70
10	C	164,72	164,70
11	CH ₂	33,80	33,80
12	CH ₂	29,96	29,90
13	C	40,64	40,60
14	C	44,66	44,60
15	CH ₂	28,53	28,50
16	CH ₂	35,52	35,50
17	C	38,20	38,20
18	CH	43,55	43,50
19	CH ₂	32,08	32,00
20	CH	41,92	41,80
21	C	213,58	213,60
22	CH ₂	52,56	52,50
23	CH ₃	10,28	10,20
25	CH ₃	39,07	39,00
26	CH ₃	21,57	21,50
27	CH ₃	19,73	19,70
28	CH ₃	32,58	32,50
30	CH ₃	15,11	15,10

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



1.2.1.3 – M3: 6-oxo-tingenol

M3 foi isolado a partir dos extratos SEH (rendimento máximo de 0,8 %) e FSEH (rendimento de 0,5 %), conforme representado nas Figuras 14, 15 e 16 pág. 38, 42 e 50. Apresentou-se como sólido amarelo pálido, solúvel em clorofórmio e com faixa de fusão de 218,7 - 221,4 °C. 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 27, pág. 64) de **M3** apresentou bandas de absorção em 3422 cm^{-1} , característica de estiramento de ligação OH, $2960\text{-}2870\text{ cm}^{-1}$ características de estiramento simétrico e assimétrico da ligação CH de compostos alifáticos, 1698 cm^{-1} característica de estiramento de ligação C=O de carbonila de cetona cíclica, 1642 cm^{-1} de cetona conjugada, 1592 e 1458 cm^{-1} características de estiramento de C=C de compostos aromáticos.

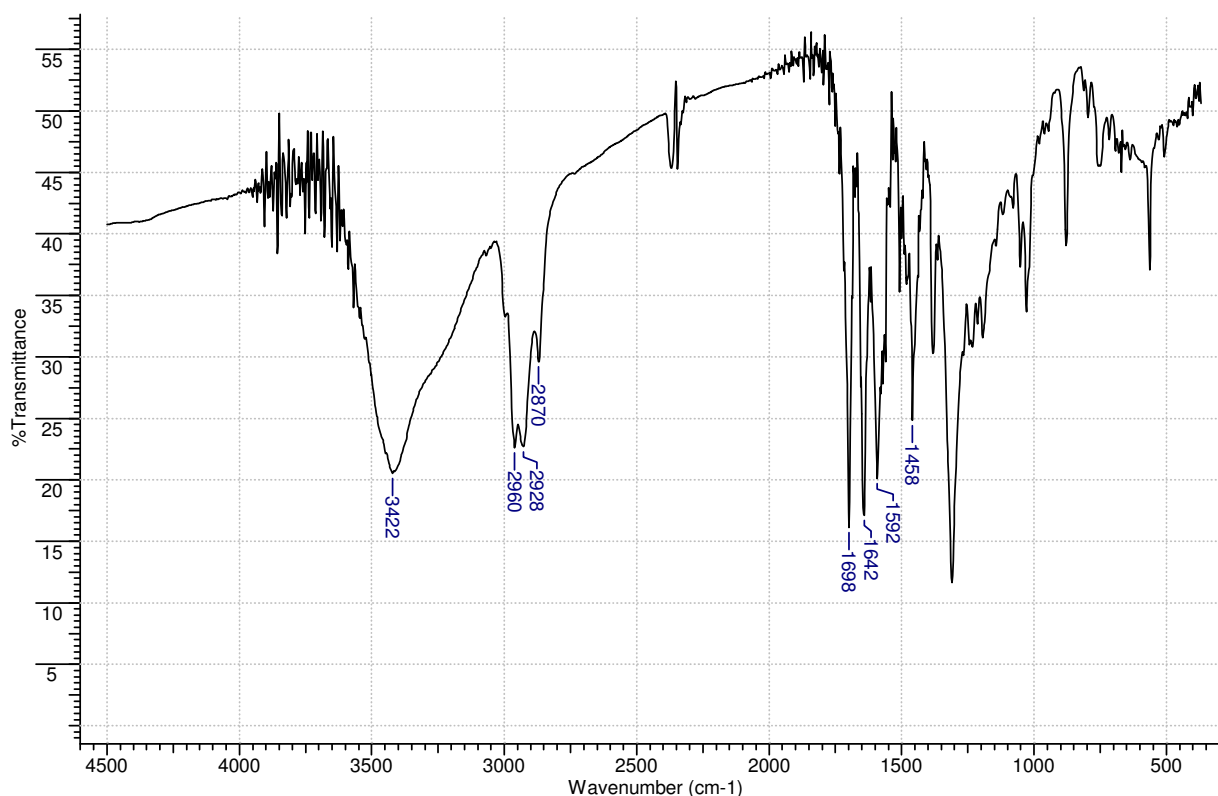


Figura 27: Espectro de **M3** obtido na região do IV (KBr, cm^{-1}).

O espectro de RMN de ^1H (Figura 28, pág. 65) apresentou cinco simpletos, os quais foram atribuídos a cinco metilas δ 2,63; 1,58; 1,38; 1,00; 0,99 e um duplete em δ 0,99 referente à outra metila (C30). Apresentou também dois simpletos em δ 6,86 (H1) e δ 6,25 (H7) indicando tratar de hidrogênios aromático e olefínico, respectivamente.

A análise do espectro de RMN de ^{13}C e subespectro DEPT-135 (Figuras 29, 30 e 31, pág. 65 e 66) indicou a presença de 28 sinais de carbono, sendo seis carbonos metílicos, seis metilênicos, quatro metínicos e doze não hidrogenados.

Os dados de RMN de ^{13}C e de IV sugeriram que a substância trata-se de um triterpeno aromático e os sinais característicos foram comparados com dados da literatura (Tabela 27, pág. 72) (DUARTE, 2000; GONZÁLEZ, et al., 1996). Como até o momento, não havia sido isolado nenhum triterpeno aromático no nosso grupo de pesquisa, uma análise detalhada nos mapas de contorno HSQC e HMBC foi realizada.

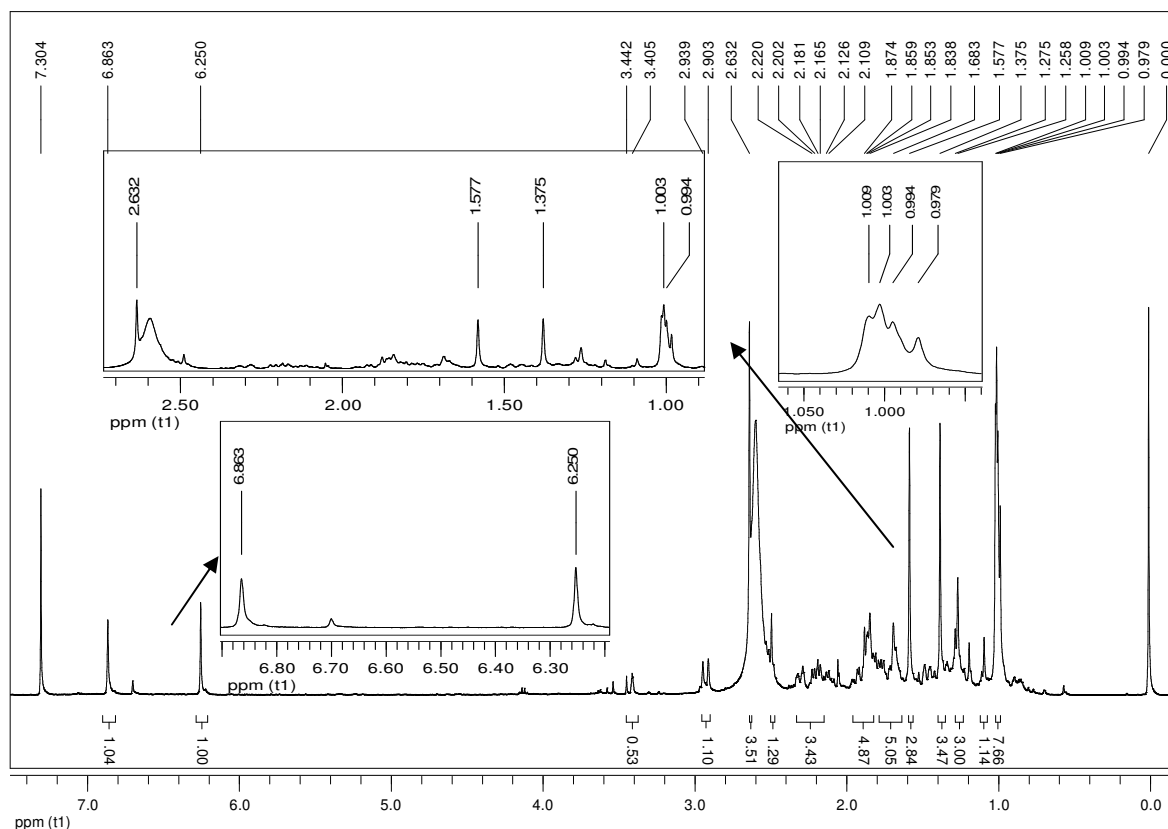


Figura 28: Espectro e expansões de RMN de ^1H (400 MHz) de **M3** em CDCl_3 e gotas de CD_3OD .

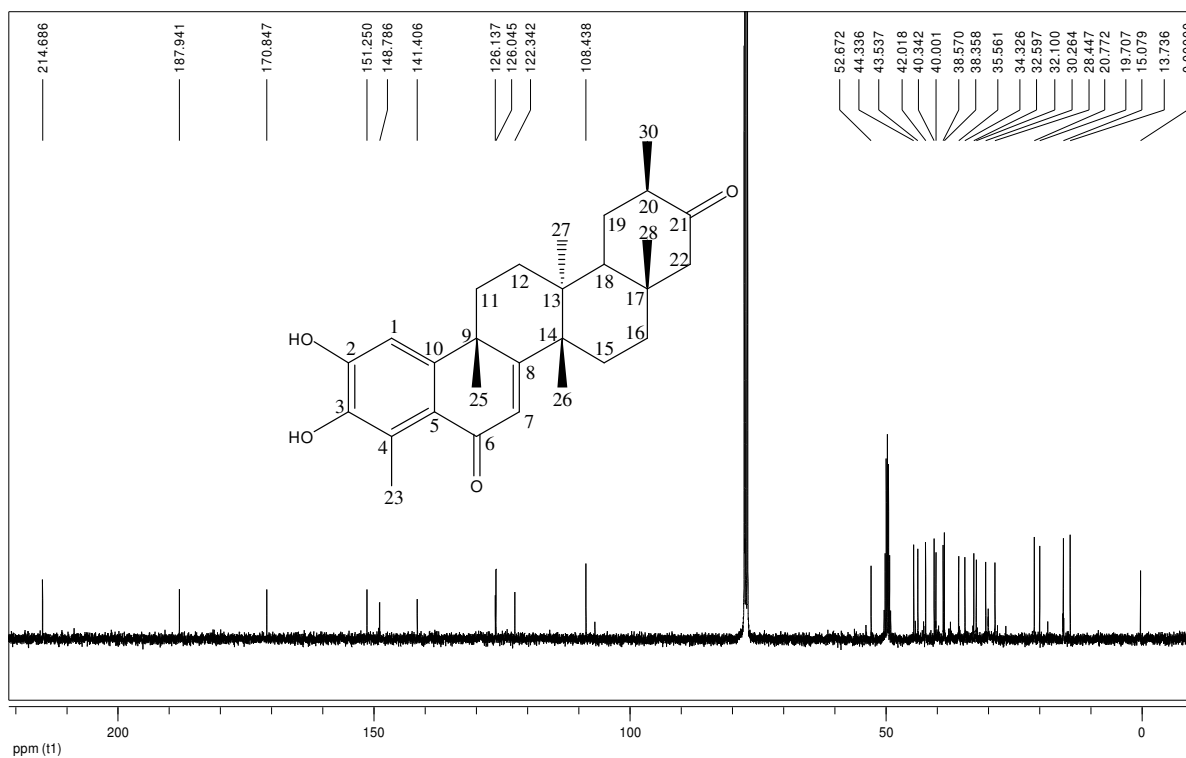


Figura 29: Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz) de **M3** em CDCl_3 e gotas de CD_3OD .

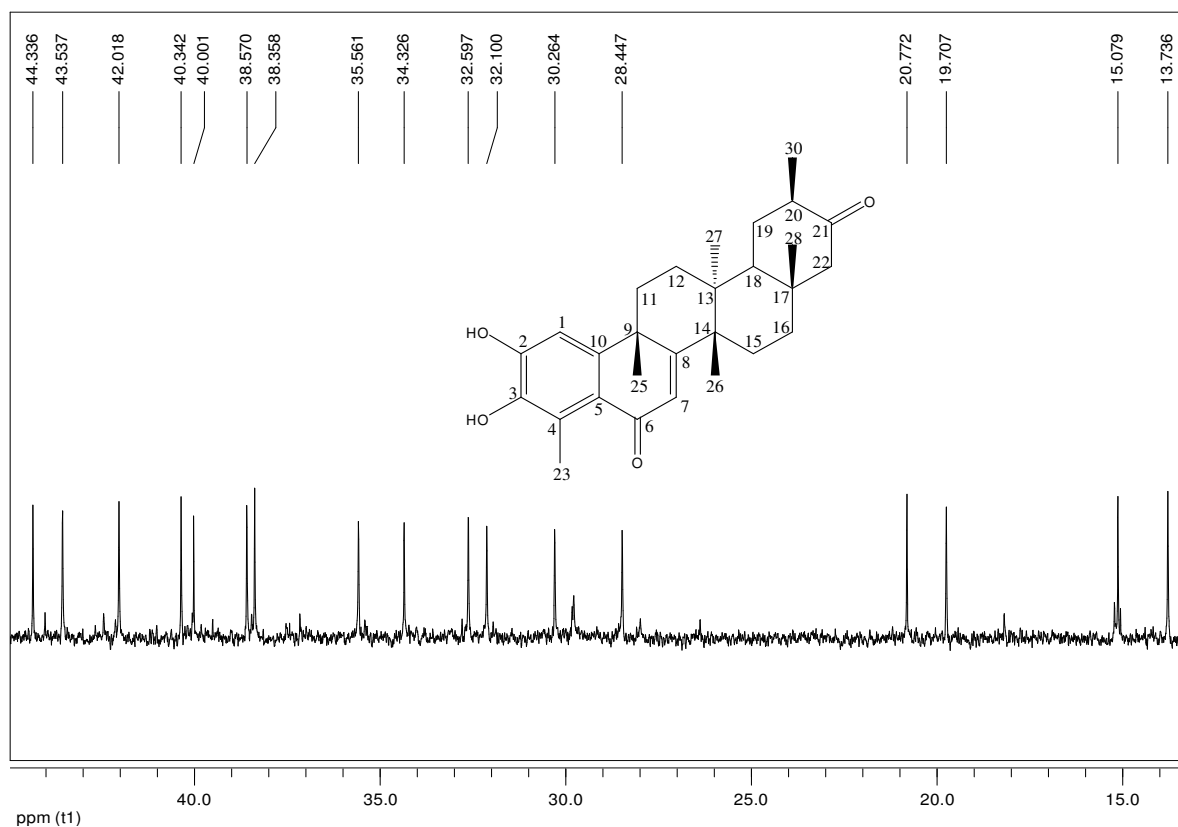


Figura 30: Expansão do espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz) de **M3** em CDCl_3 e gotas de CD_3OD .

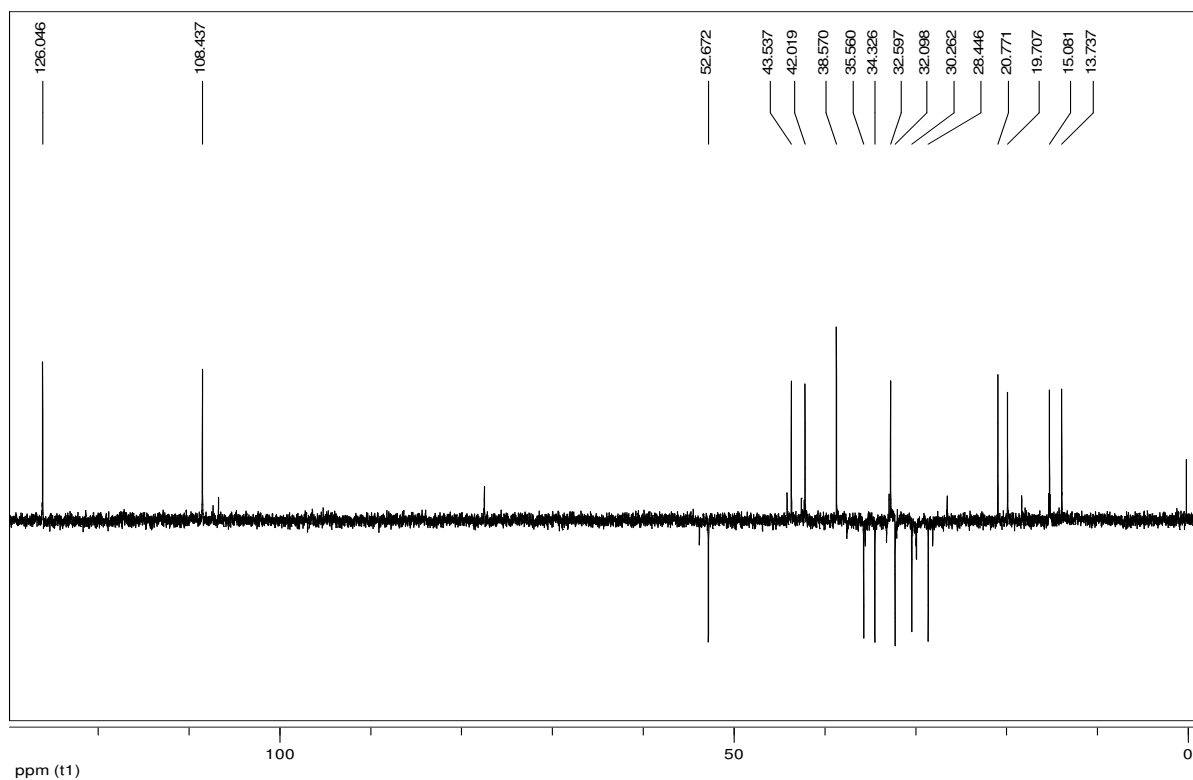


Figura 31: Subespectro DEPT-135 (100 MHz) de **M3** em CDCl_3 e gotas de CD_3OD .

O sinal de metila em δ 2,61 é característico de metila ligada a anel aromático, e uma primeira análise do mapa de contorno HSQC (Figura 32) de **M3** permitiu correlacionar o sinal do carbono C23 em δ 13,23 com H23 em δ 2,61. Outros sinais de carbonos foram correlacionados aos seus respectivos hidrogênios (Figura 32 e 33, pág. 67 e 68), após análise do mapa de contornos HSQC.

Utilizando os valores de C23 e H23 como ponto de partida, procedeu-se a análise do mapa de contornos HMBC (Figura 34, 35 e 36, pág. 69, 70 e 71) para atribuir os demais sinais aos carbonos e hidrogênios da molécula.

O sinal de H23 em δ 2,61 mostrou correlação com os sinais de carbono em δ 141,41 (C3), δ 126,14 (C4) e δ 122,34 (C5) (Figura 36, pág. 71).

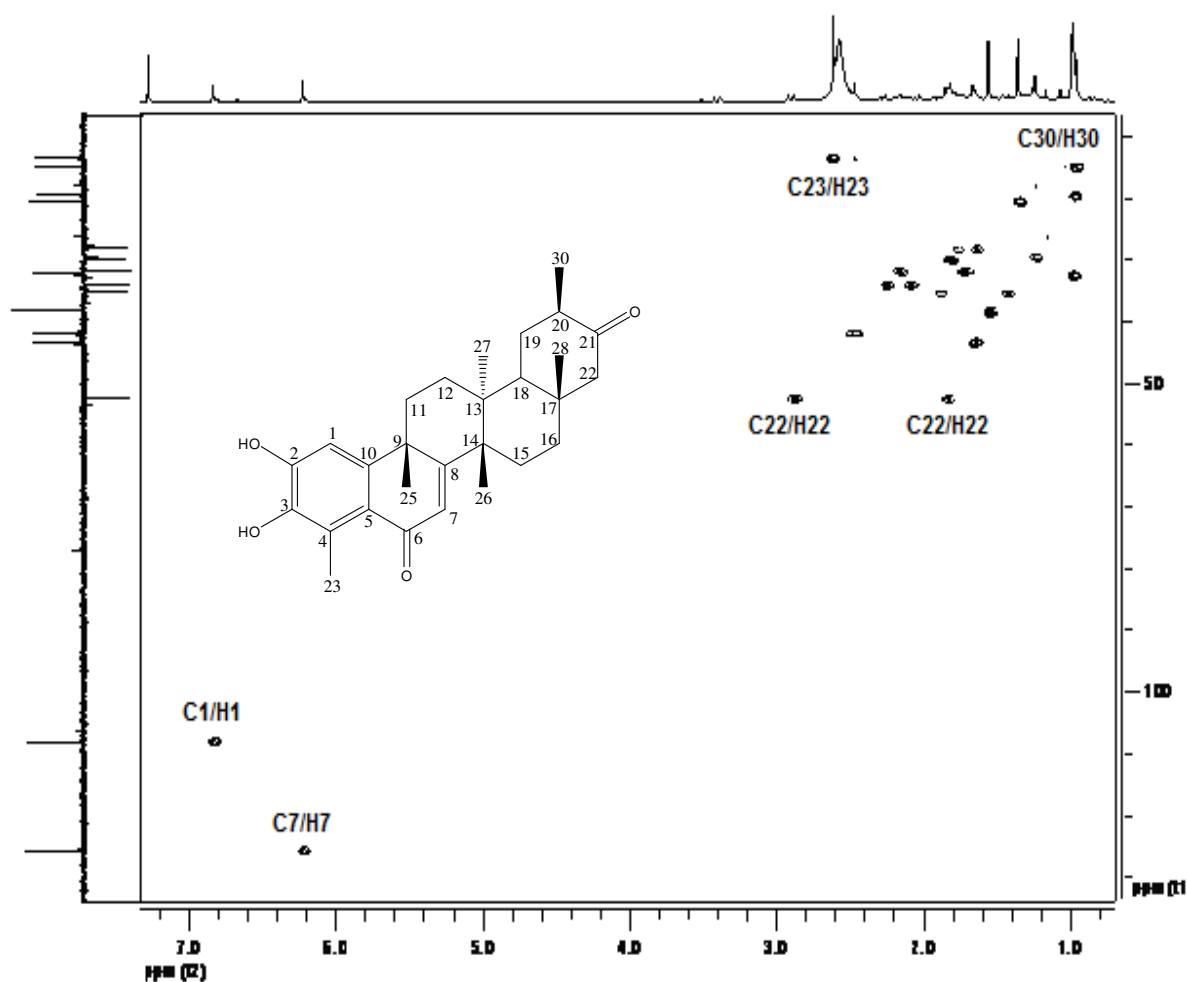


Figura 32: Mapa de contornos HSQC (400 MHz) de **M3** em CDCl_3 e gotas de CD_3OD .

No mapa de contornos HMBC, o sinal de hidrogênio H1 em δ 6,84 mostrou correlação com os sinais de carbono em δ 148,79 (C2) (Figura 36, pág. 71), δ 141,41 (C3), δ 122,34 (C5) e δ 40,34 (C9) (Figura 35, pág. 70).

O sinal de H7 em δ 6,22 mostrou correlação com os sinais de carbono em δ 122,34 (C5), δ 40,34 (C9) e δ 44,34 (C14) (Figuras 35 e 36, pág. 70 e 71).

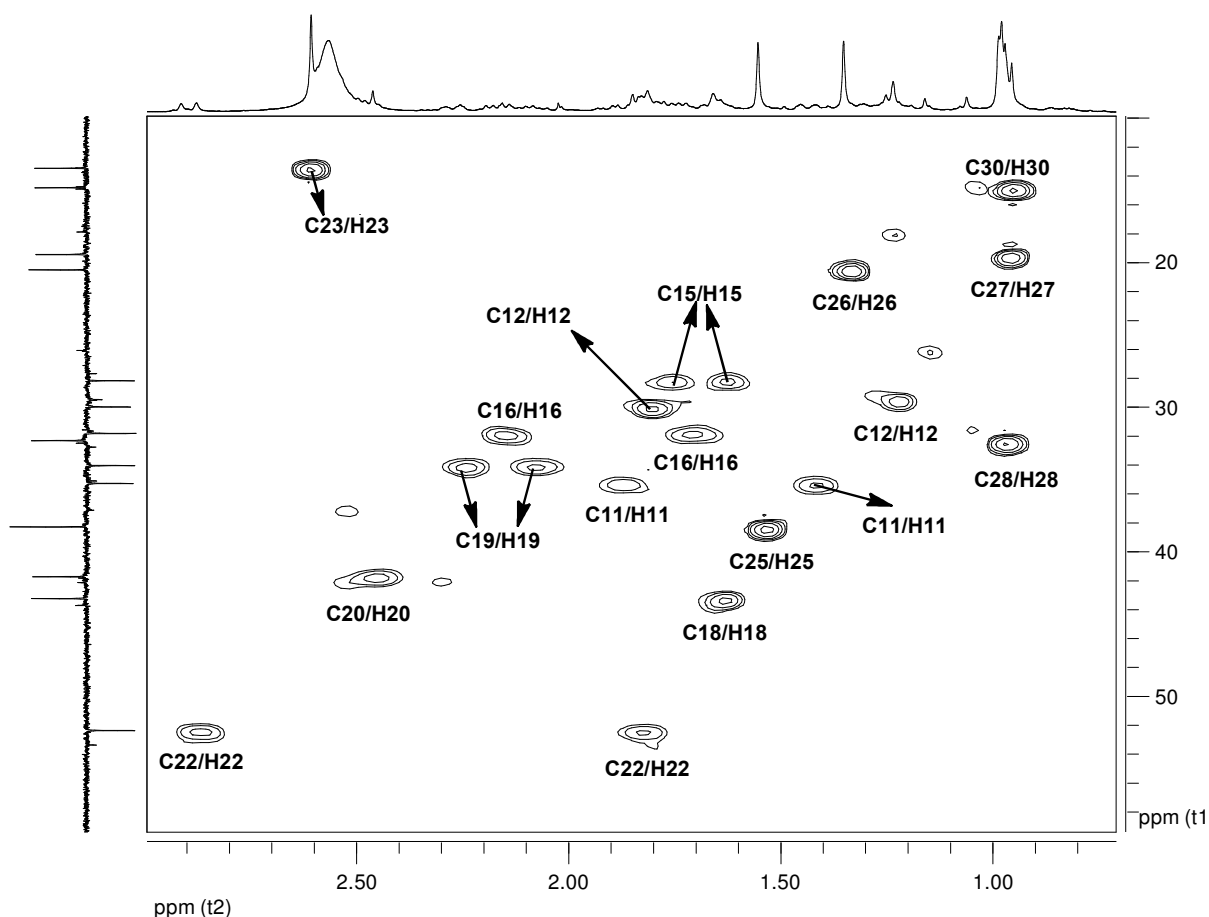


Figura 33: Expansão do mapa de contornos HSQC (400 MHz) de **M3** em CDCl₃ e gotas de CD₃OD.

O sinal de H18 em δ 1,64 mostrou correlação com os sinais de carbono em δ 52,67 (C22), δ 19,71 (C27), δ 32,60 (C28) e δ 42,02 (C20) (Figura 35, pág. 70).

Os sinais de H22 em δ 1,82 e δ 2,86 mostraram correlação com o sinal de carbono em δ 214,69 (C21) (Figura 34 e 36, pág. 69 e 71). O sinal de H22 em δ 2,86 mostrou correlação com os sinais de carbono em δ 38,36 (C17) e δ 32,60 (C28) (Figura 34 e 35, pág. 69 e 70).

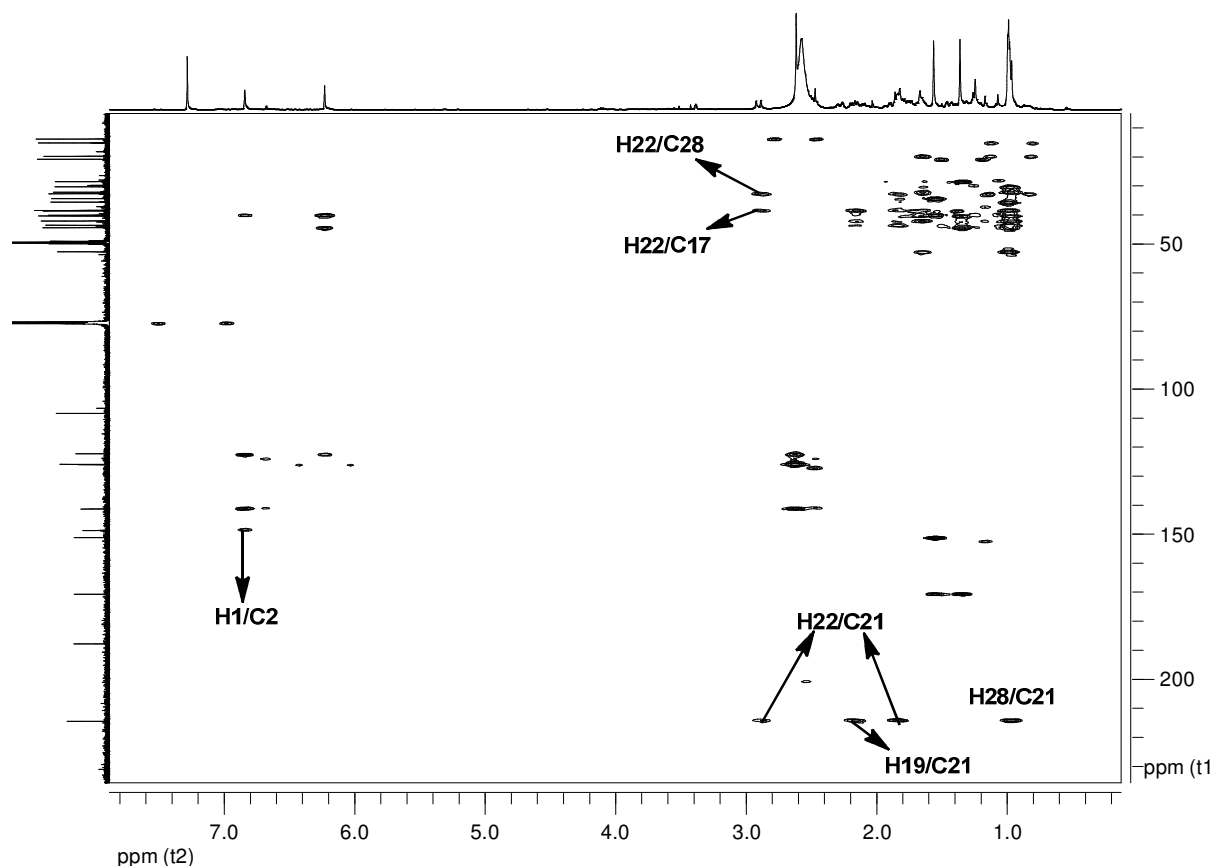


Figura 34: Mapa de contornos HMBC (400 MHz) de **M3** em CDCl₃ e gotas de CD₃OD.

O sinal de H28 em δ 0,96 mostrou correlação com os sinais de carbono em δ 32,10 (C16), δ 38,36 (C17), δ 43,54 (C18), δ 52,67 (C22) e δ 214,69 (C21) (Figuras 34, 35 e 36, pág. 69, 70 e 71).

O sinal de H27 em δ 0,95 mostrou correlação com os sinais de carbono em δ 30,26 (C12), δ 43,54 (C18), δ 40,00 (C13) e δ 44,34 (C14) (Figura 35, pág. 70).

O sinal de H19 em δ 2,07 mostrou correlação com os sinais de carbono em δ 214,69 (C21) (Figuras 34 e 36, pág. 69 e 71).

O sinal de H25 em δ 1,53 mostrou correlações com os sinais de carbono em δ 170,85 (C8) (Figura 36, pág. 71) e δ 40,34 (C9) (Figura 35, pág. 70) e δ 151,25 (C10) (Figura 36, pág. 71).

O sinal de H26 em δ 1,33 mostrou correlação com o sinal de carbono em δ 170,85 (C8) (Figura 36, pág. 71), δ 28,45 (C15), δ 40,00 (C13) e δ 44,34 (C14) (Figura 35, pág. 70).

O sinal de H30 em δ 0,94 mostrou correlação com o sinal de carbono em δ 42,02 (C20) (Figura 35).

A análise dos espectros de RMN 1D e 2D permitiu atribuir o deslocamento químico de todos os hidrogênios e carbonos de **M3**. Estes dados estão listados na Tabela 27, pág. 72, juntamente com os dados da literatura (DUARTE, 2000). Todas essas informações possibilitaram identificar este composto como sendo 6-oxo-tingenol. **M3** é inédita na espécie *Maytenus imbricata* e isolada pela primeira vez no NEPLAM.

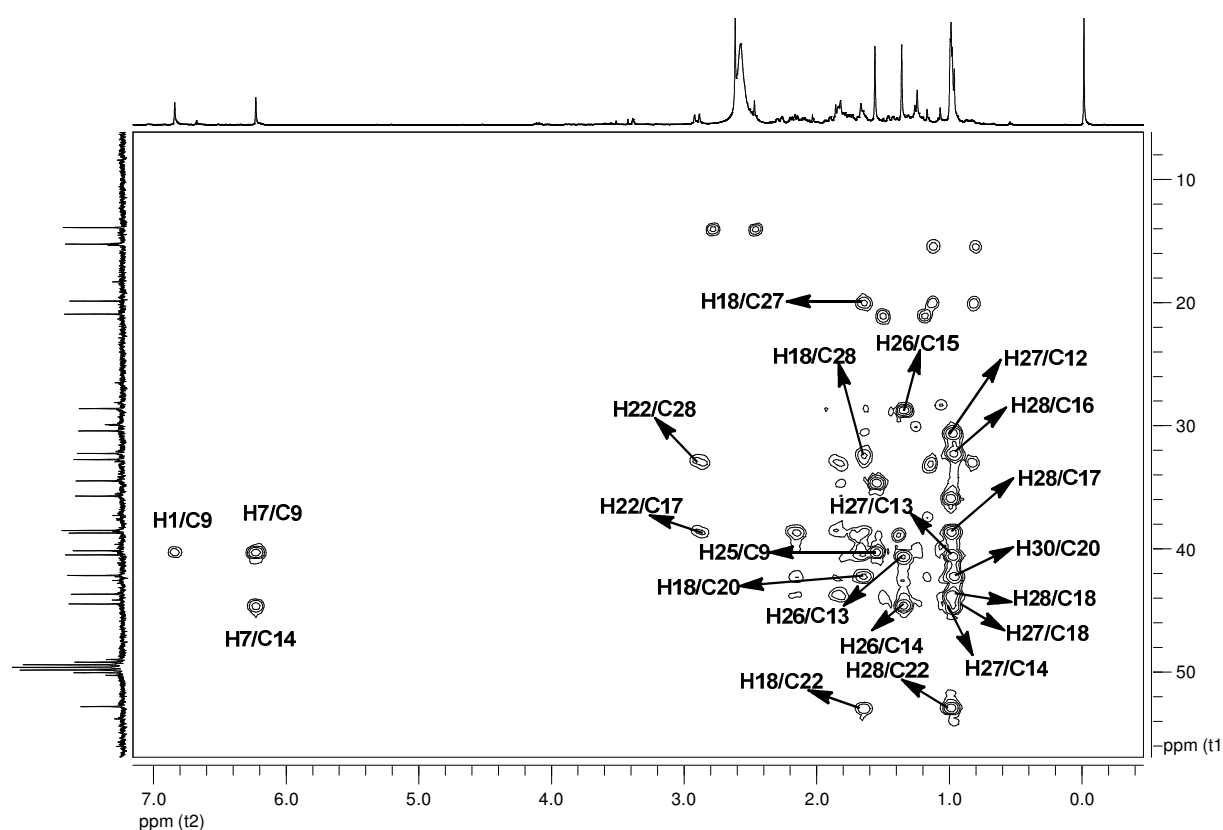


Figura 35: Expansão do mapa de contornos HMBC (400 MHz) de **M3** em CDCl_3 e gotas de CD_3OD .

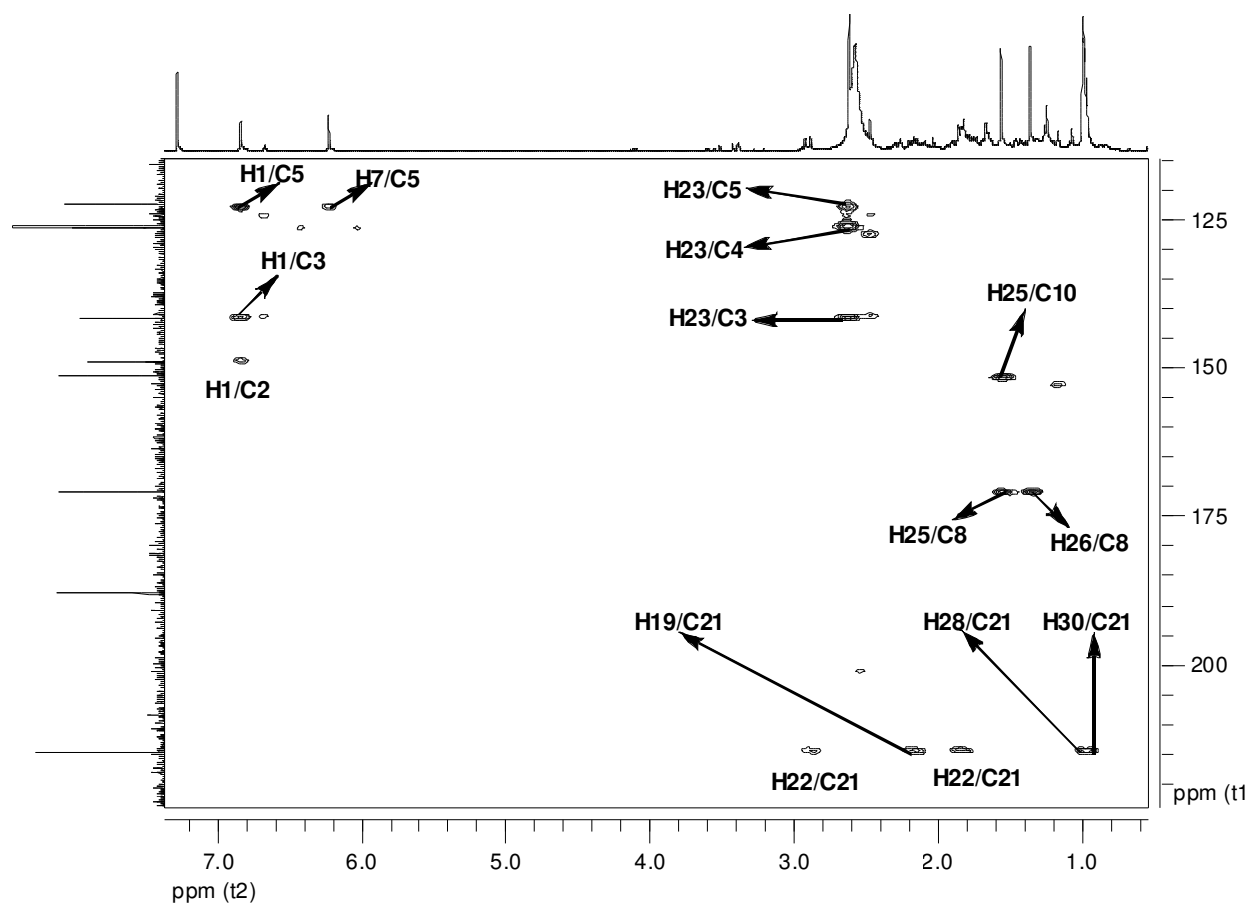


Figura 36: Expansão do mapa de contornos HMBC (400 MHz) de **M3** em CDCl₃ e gotas de CD₃OD.

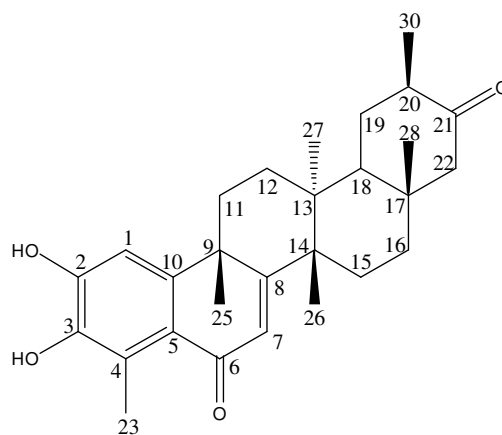
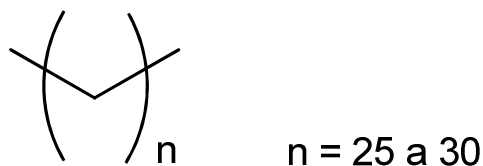


Tabela 27: Comparação dos dados de RMN de ^{13}C de **M3** com os dados da literatura para 6-oxo-tingenol (DUARTE, 2000)

Nº	Tipo de carbono	δ_{C}^{**} de M3	δ_{C}^{**} (DUARTE, 2000)	δ_{H}^{**}	HMBC
1	CH	108,44	108,19	6,86 (6,79*), s(1H)	C2, C3, C5, C9
2	C	148,79	148,87		
3	C	141,41	141,42		
4	C	126,14	125,87		
5	C	122,34	121,71		
6	C=O	187,94	187,90		
7	CH	126,05	125,53	6,25 (6,18*), s(1H)	C5, C9, C14
8	C	170,85	171,02		
9	C	40,34	40,07		
10	C	151,25	150,99		
11	CH ₂	35,56	35,23	1,41; 1,87	
12	CH ₂	30,26	29,93	1,22; 1,8	
13	C	40,00	39,75		
14	C	44,34	44,02		
15	CH ₂	28,45	28,14	1,62; 1,75	
16	CH ₂	32,10	31,81	1,7; 2,14	
17	C	38,36	38,18		
18	CH	43,54	43,23	1,64	C27, C22, C28, C20
19	CH ₂	34,33	33,99	2,07; 2,24	C21
20	CH	42,02	41,74	2,45	
21	C=O	214,69	215,08		
22	CH ₂	52,67	52,35	1,82; 2,86	C28, C17, C21
23	CH ₃	13,74	13,23	2,61 (2,56*), s (3H)	C5, C4, C3, C23
25	CH ₃	38,57	38,09	1,53 (1,52*), s (3H)	C10, C8, C9, C11
26	CH ₃	20,77	20,40	1,33 (1,32*), s (3H)	C8, C13, C14, C15
27	CH ₃	19,71	19,30	0,95 (0,94*), s (3H)	C12, C13, C14, C18
28	CH ₃	32,60	32,12	0,96 (0,94*), s (3H)	C16, C17, C18, C21, C22
30	CH ₃	15,08	14,55	0,94 (0,91*), d (3H)	C20

*Dados da Literatura DUARTE, 2000; Solvente: $^{**}\text{CDCl}_3$ e gotas de CD_3OD .

1.2.1.4 – M4: mistura de hidrocarbonetos



M4 foi isolado do extrato SEH das raízes de *Maytenus imbricata* (rendimento de 0,2 %), conforme representado na Figura 14, pág. 38. Apresentou como um sólido amorfo pastoso bege. A análise por CCD usando diferentes eluentes evidenciou a existência de uma mancha azul (revelador: ácido perclórico/vanilina).

A análise dos espectros de RMN de ^1H , ^{13}C e subespectro DEPT-135 (Figuras 38, 39 e 40, pág. 74 e 75), indicou presença de muitos sinais de CH_2 , sugerindo a natureza alifática da substância.

Foi realizada análise por Cromatografia Gasosa de Alta Resolução (Figura 37, pág. 74) o que permitiu a identificação de seis hidrocarbonetos presentes em **M4**.

A partir dos dados obtidos do espectro de RMN de ^1H , ^{13}C e subespectro DEPT-135 e pela comparação dos valores de tempo de retenção do cromatograma da amostra com o de um padrão de série de hidrocarbonetos C-27 a C-32 (Tabela 28), concluiu-se que **M4** é uma mistura de hidrocarbonetos de cadeia linear e apresenta dentre seus constituintes os hidrocarbonetos C-27, C-28, C-29, C-30, C-31 e C-32 nas proporções relativas apresentadas na Tabela 28. **M4** é inédita na espécie *Maytenus imbricata*.

Tabela 28: Dados obtidos por cromatografia gasosa de **M4**

Padrões		M4	
HC (Cn)	T _r	T _r	% (*)
C ₂₇	10,23	10,22	6,12
C ₂₈	10,96	10,97	4,03
C ₂₉	11,91	11,81	5,18
C ₃₀	12,77	12,78	2,57
C ₃₁	13,92	13,90	1,52
C ₃₂	15,06	15,23	7,95

(*) percentuais relativos aos seis picos identificados com os padrões.

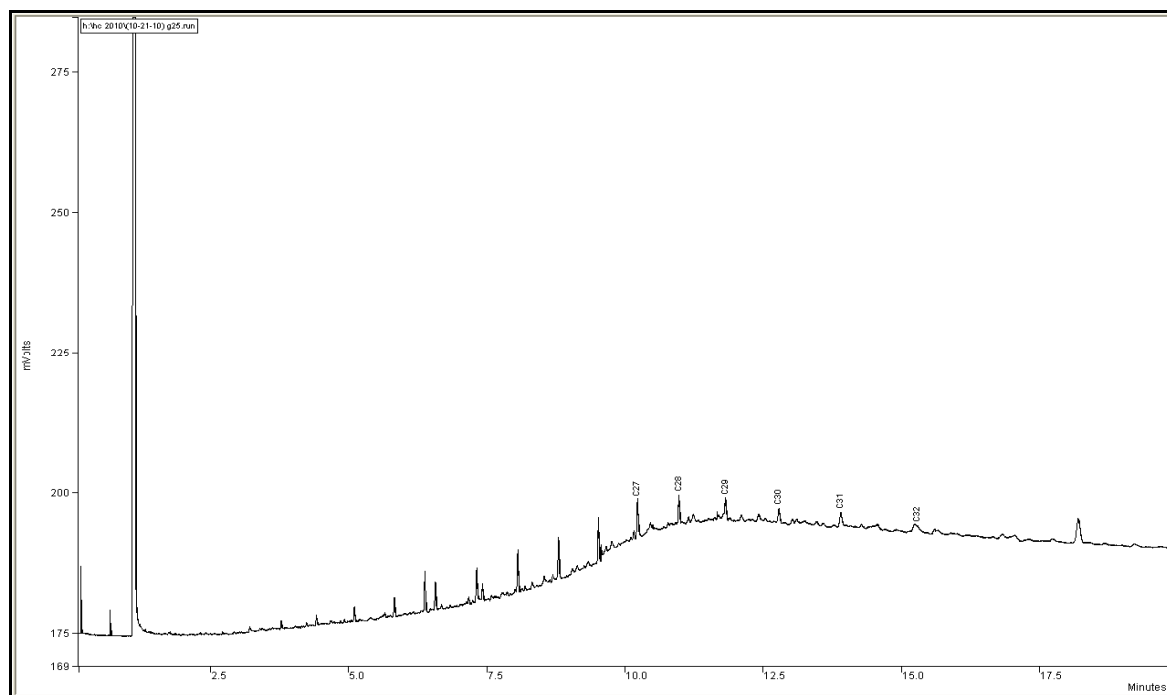


Figura 37: Cromatograma de **M4**. Coluna BP1 30 m x 0,25 mm (SGE); temperatura inicial 200 °C até 300 °C (10 °C /min), detector de 300 °C.

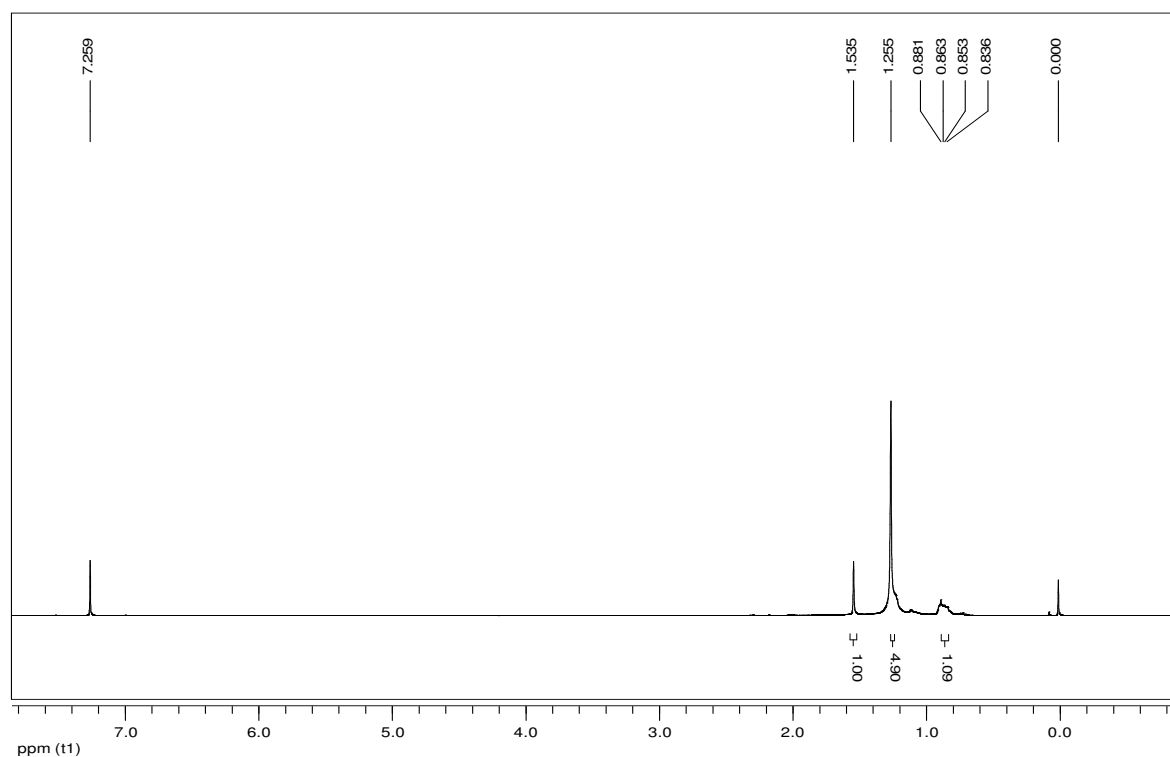


Figura 38: Espectro de RMN de ¹H (400 MHz) de **M4** em CDCl₃.

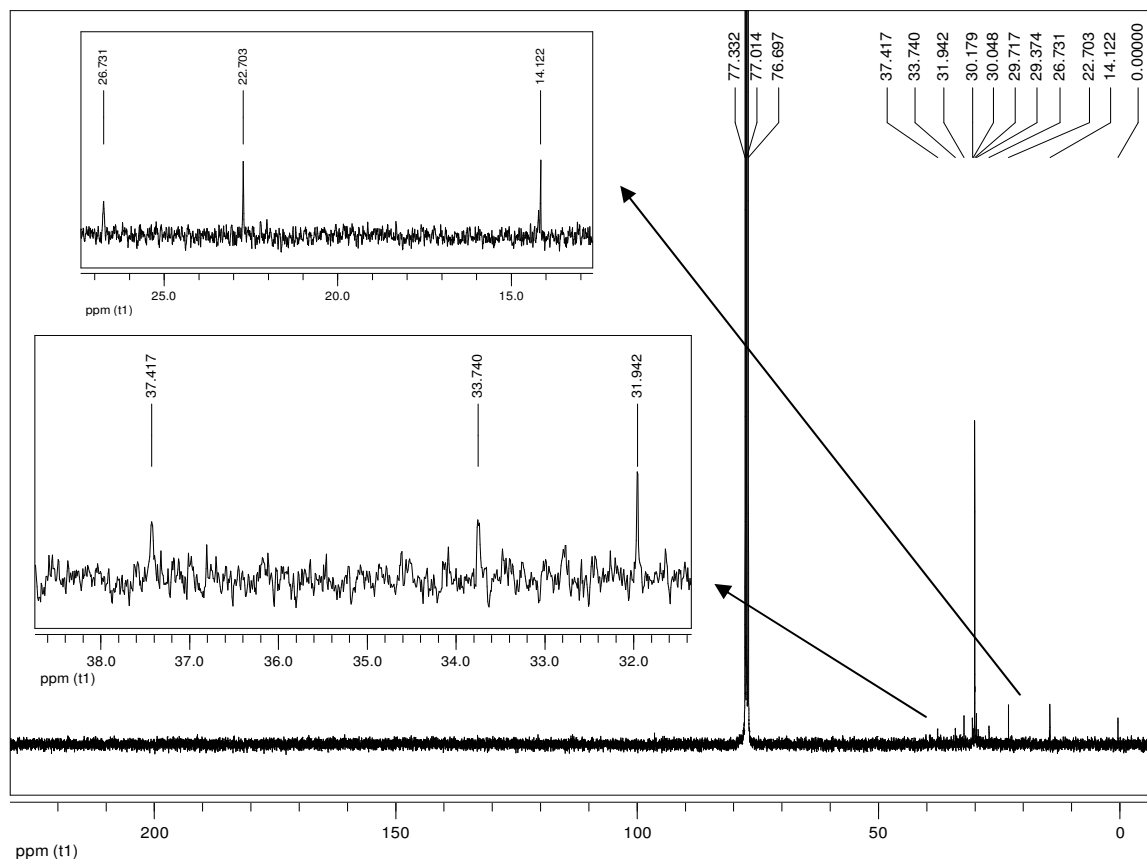


Figura 39: Espectro e expansões de RMN de ^{13}C (100 MHz) de **M4** em CDCl_3 .

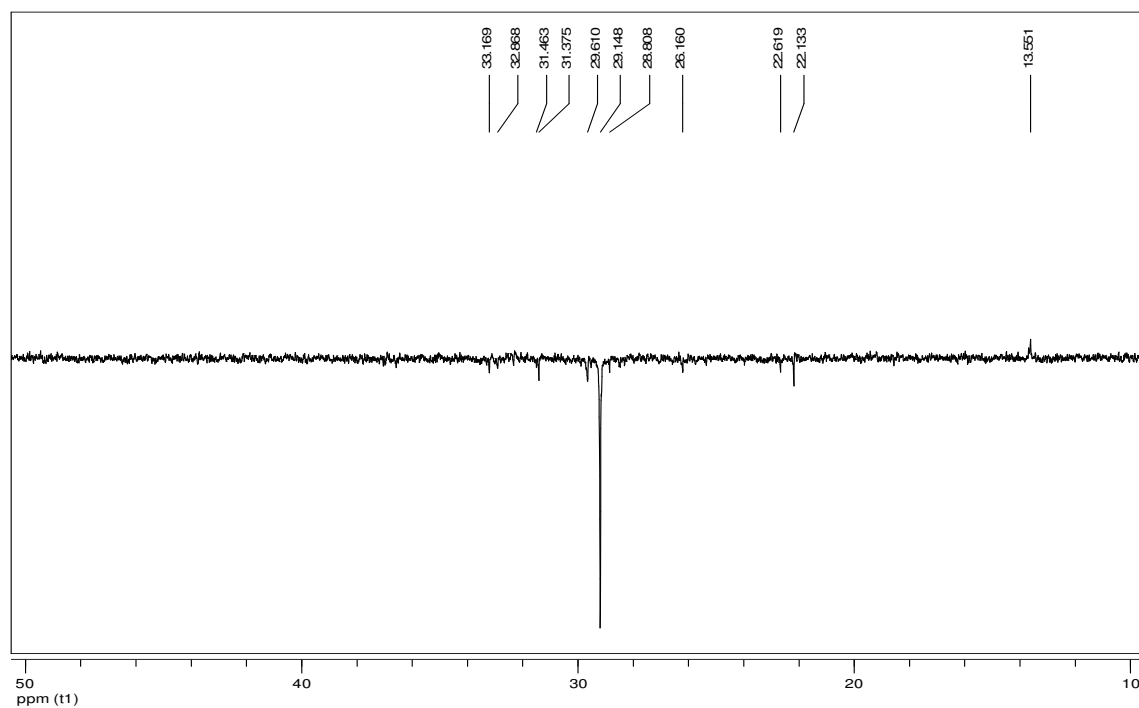
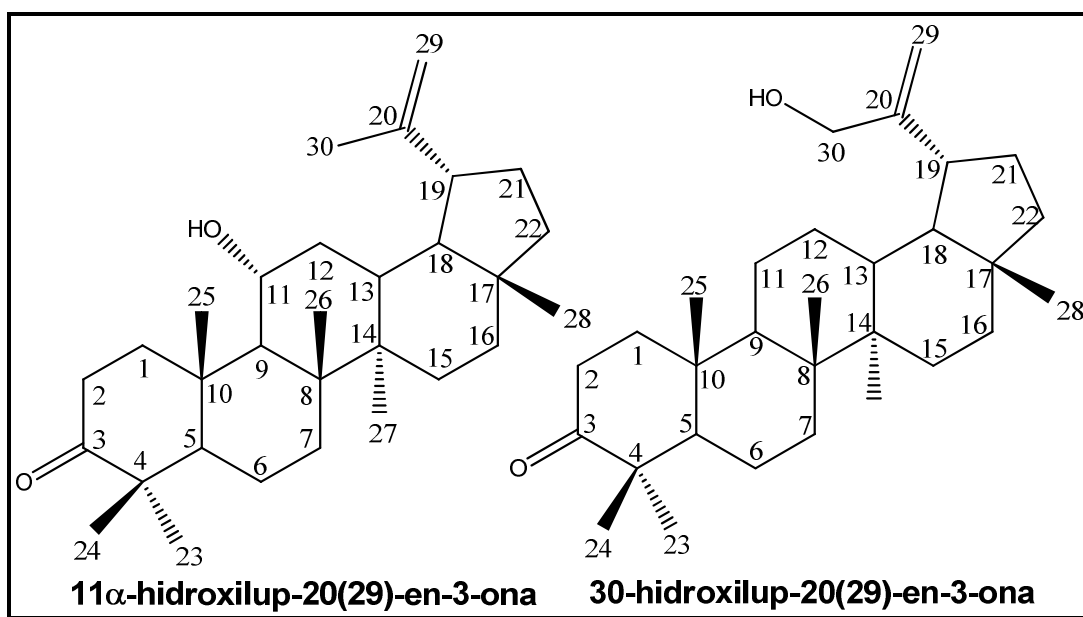


Figura 40: Subespectro DEPT-135 (100 MHz) de **M3** em CDCl_3 .

1.2.1.5 – M1 + M5: 11 α -hidroxilup-20(29)-en-3-ona e 30-hidroxilup-20(29)-en-3-ona

A mistura de **M1** (11 α -hidroxilup-20(29)-en-3-ona) e **M5** (30-hidroxilup-20(29)-en-3-ona) foi isolada a partir do extrato SEH, correspondente por 0,4 % do extrato, conforme representado na Figura 15, pág. 42. Apresentou-se como um sólido amarelo pálido, solúvel em clorofórmio e com faixa de fusão de 89,6 – 93,4 °C. O teste LB foi positivo para triterpeno pentacíclico. A análise por CCD desta mistura utilizando diferentes eluentes apresentou apenas uma mancha violeta (revelador: ácido perclórico/vanilina).

O espectro na região do IV (Fig. 41, pág. 77) de **M1 e M5** apresentou bandas de absorção em 3448 cm⁻¹, que corresponde a estiramento de ligação OH de hidroxila e 2946-2870 cm⁻¹, estiramento simétrico e assimétrico de ligação CH de compostos alifáticos. A banda em 1706 cm⁻¹ é correspondente a estiramento de ligação CO de carbonila de cetona e as duas bandas em 1458 e 1382 cm⁻¹ são características de deformação angular da ligação simples de CH de compostos alifáticos.

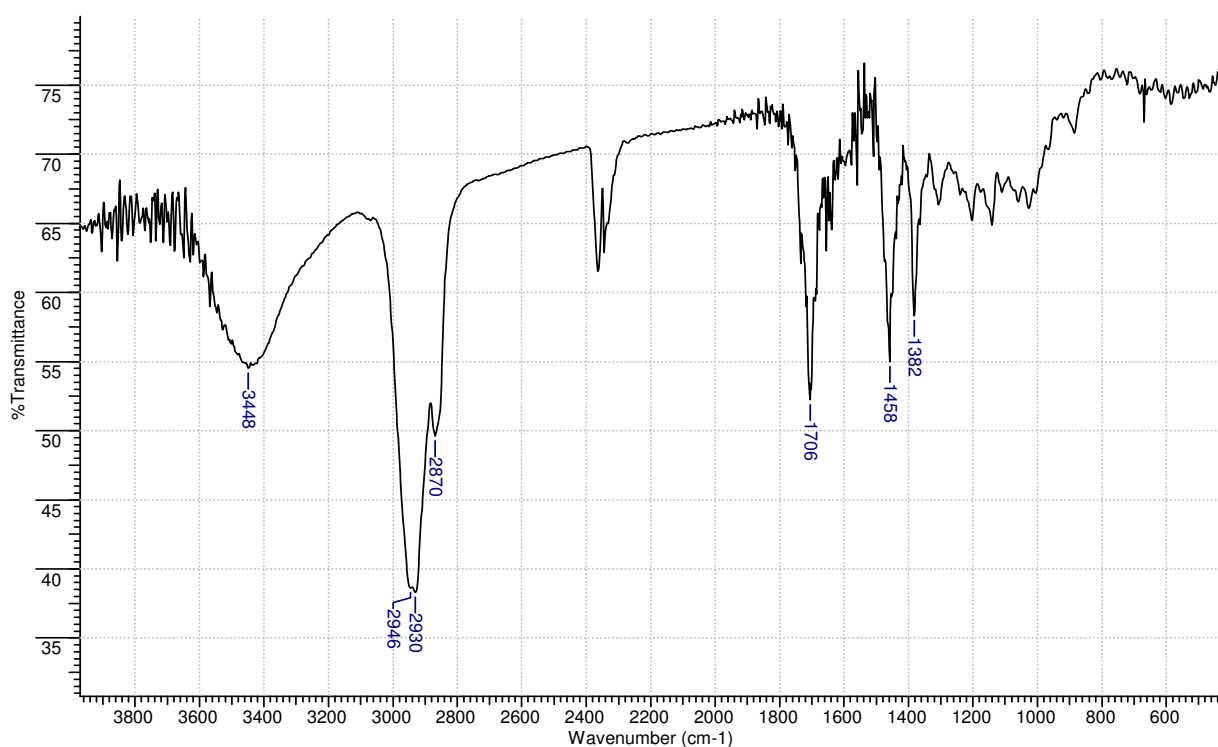


Figura 41: Espectro de **M1 + M5** obtido na região do IV (KBr, cm⁻¹).

O espectro de RMN de ¹H (Figura 42, pág. 78) apresentou um grande número de sinais entre δ 0,7 e 2,6 sugerindo tratar-se de uma mistura de TTPC. Apresentou um triplo duplete em δ 3,91 característico de hidrogênio metínico hidroxilado indicando que esse hidrogênio apresenta dois acoplamentos de spin diaxial ($J = 10,8$ Hz) e um axial-equatorial ($J = 4,8$ Hz) (SILVERSTEIN et al., 1994). Apresentou quatros simpletos largos em δ 4,60, δ 4,72, δ 4,91 e δ 4,94 correspondentes a quatros hidrogênios olefínicos, indicando a presença de duas ligações duplas terminais de esqueleto lupânico. O espectro apresentou ainda, um multiplete em δ 4,12, característico de grupo metilênico hidroxilado (SILVERSTEIN et al., 1994).

No espectro de RMN de ¹³C (Figuras 43, 44 e 45, pág. 79 e 80) foram observados vários sinais indicando que a amostra continha mais de um triterpeno. O espectro apresentou sinais em δ 109,95; δ 106,95; δ 150,23 e δ 154,73, além da presença de sinais relativos a hidrogênios olefínicos, confirmando que duas substâncias são TTPC da série dos lupanos. O espectro apresentou também, sinais de carbono em δ 218,78 e δ 218,19 de carbono carbonílico (C3) e δ 70,51 (C11) e um sinal em δ 65,07 (C30) que se refere a carbono metilênico hidroxilado.

O subespectro DEPT-135 (Figuras 46 e 47, pág. 80 e 81) apresentou sinais intensos em δ 29,71, esta informação aliada ao baixo ponto de fusão da amostra, permitiu inferir que a amostra apresenta impureza graxa. Outros sinais presentes no espectro de RMN de ^{13}C não atribuídos, também são devido a impurezas ou a presença de outros compostos que não foram possíveis de identificar.

No entanto, a comparação dos sinais de mesma intensidade com dados da literatura (SILVA, 2007a) (Tabela 29, pág. 82) para triterpenos lupânicos permitiu identificar os triterpenos **M1** (11 α -hidroxilup-20(29)-en-3-ona) e **M5** (30-hidroxilup-20(29)-en-3-ona) como constituintes majoritários.

A análise do espectro de RMN de ^{13}C juntamente com o subespectro DEPT-135 (Figuras 43 a 47, pág. 79 a 81) possibilitou a atribuição dos sinais como sendo 7 CH_3 , 19 CH_2 , 6 CH e 7 C para o composto **M1**, 6 CH_3 , 11 CH_2 , 5 CH e 7 C para o composto **M5**.

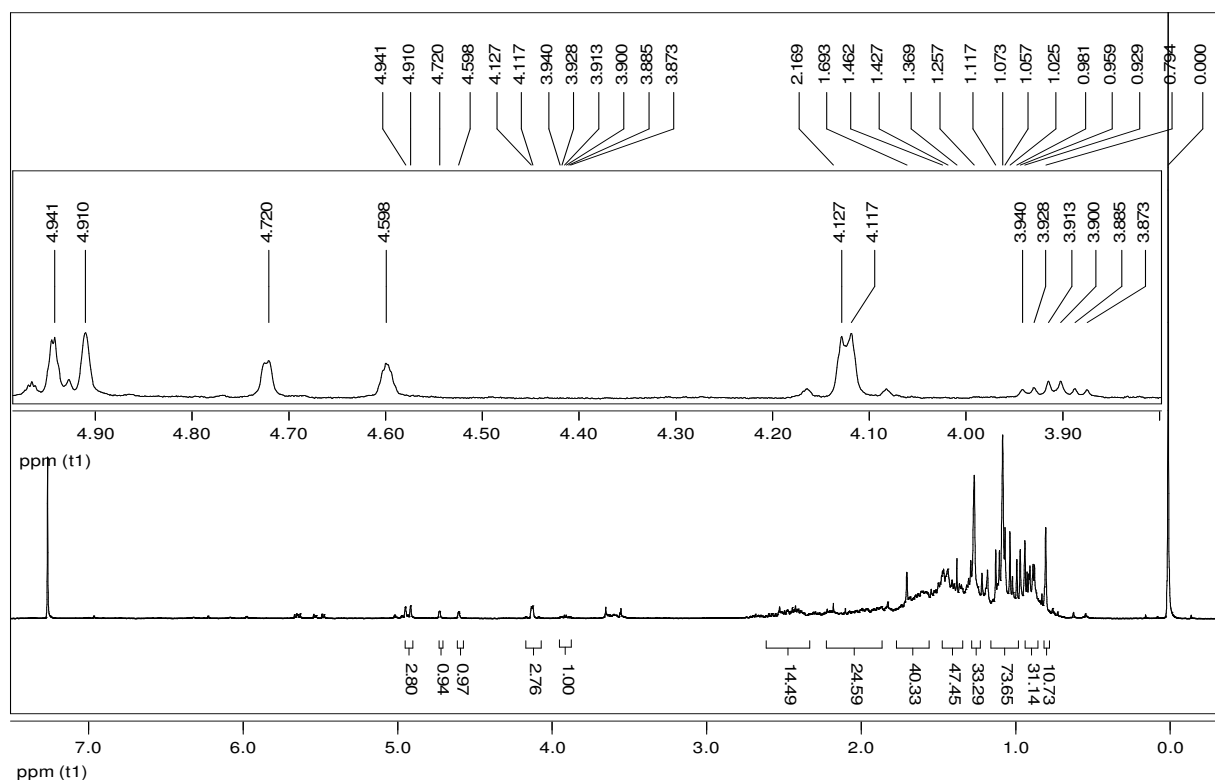


Figura 42: Espectro e expansões de RMN de ^1H de **M1** + **M5** (CDCl_3 , 400 MHz).

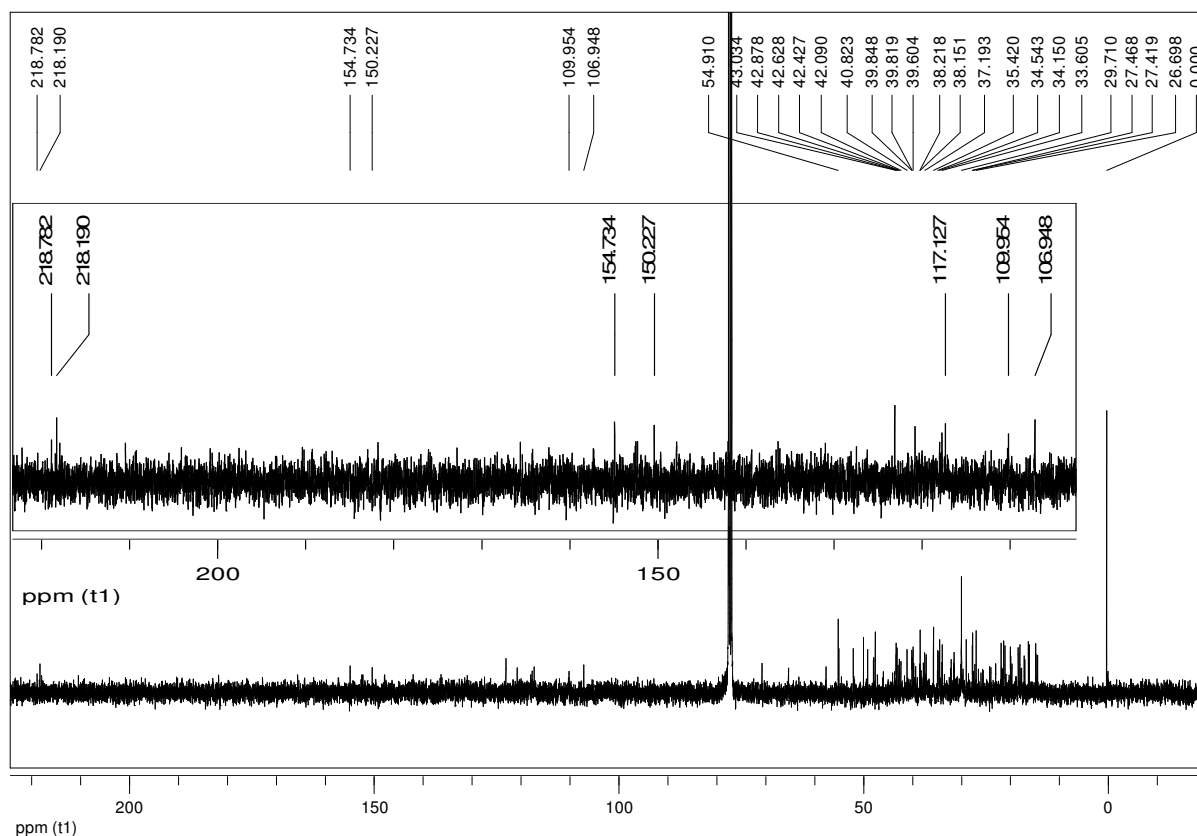


Figura 43: Espectro e expansões de RMN de ^{13}C de **M1** + **M5** (CDCl₃, 100 MHz).

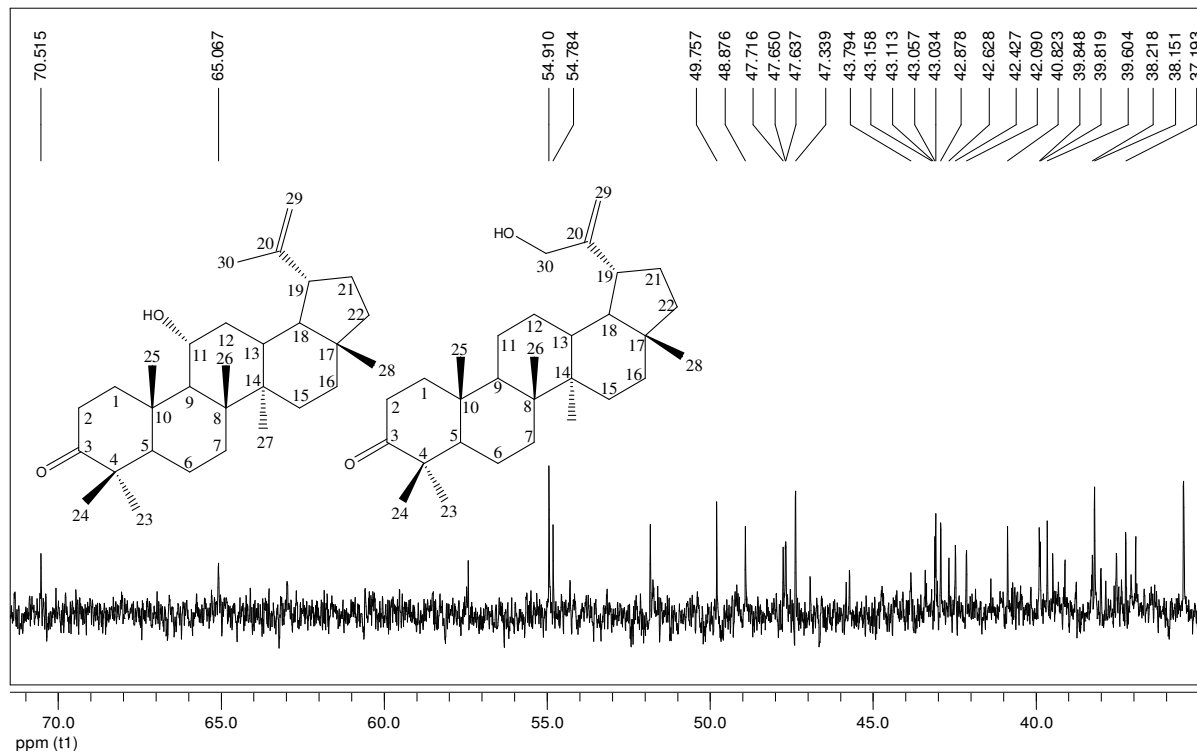


Figura 44: Expansão do espectro de RMN de ^{13}C de **M1** + **M5** (CDCl₃, 100 MHz).

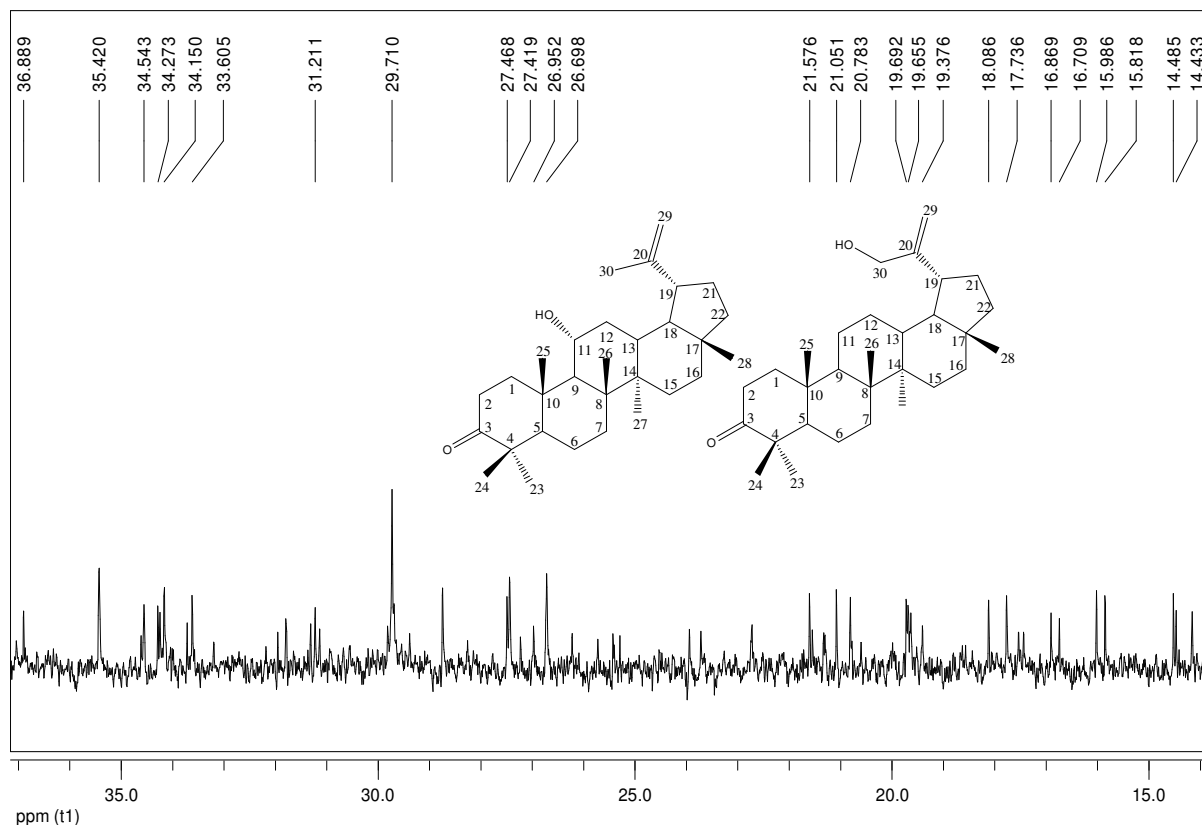


Figura 45: Expansão do espectro de RMN de ^{13}C de **M1** + **M5** (CDCl_3 , 100 MHz).

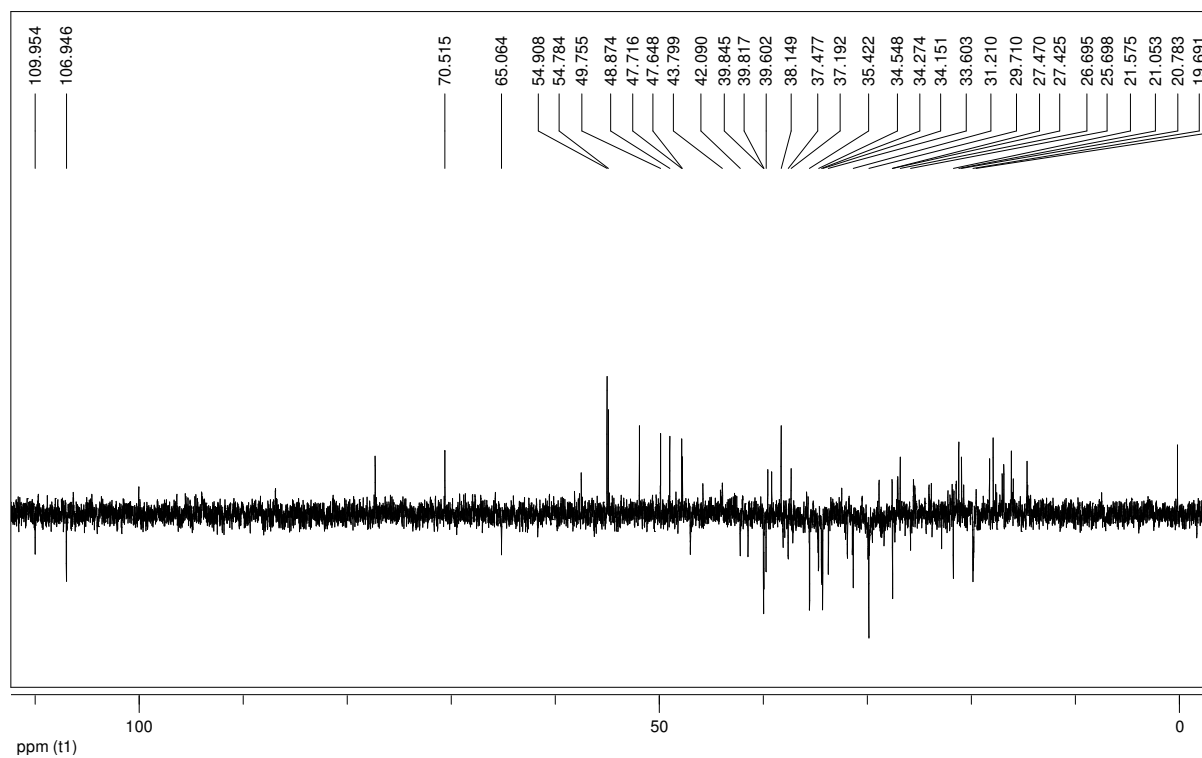


Figura 46: Subespectro DEPT-135 (100 MHz) de **M1** + **M5** em CDCl_3 .

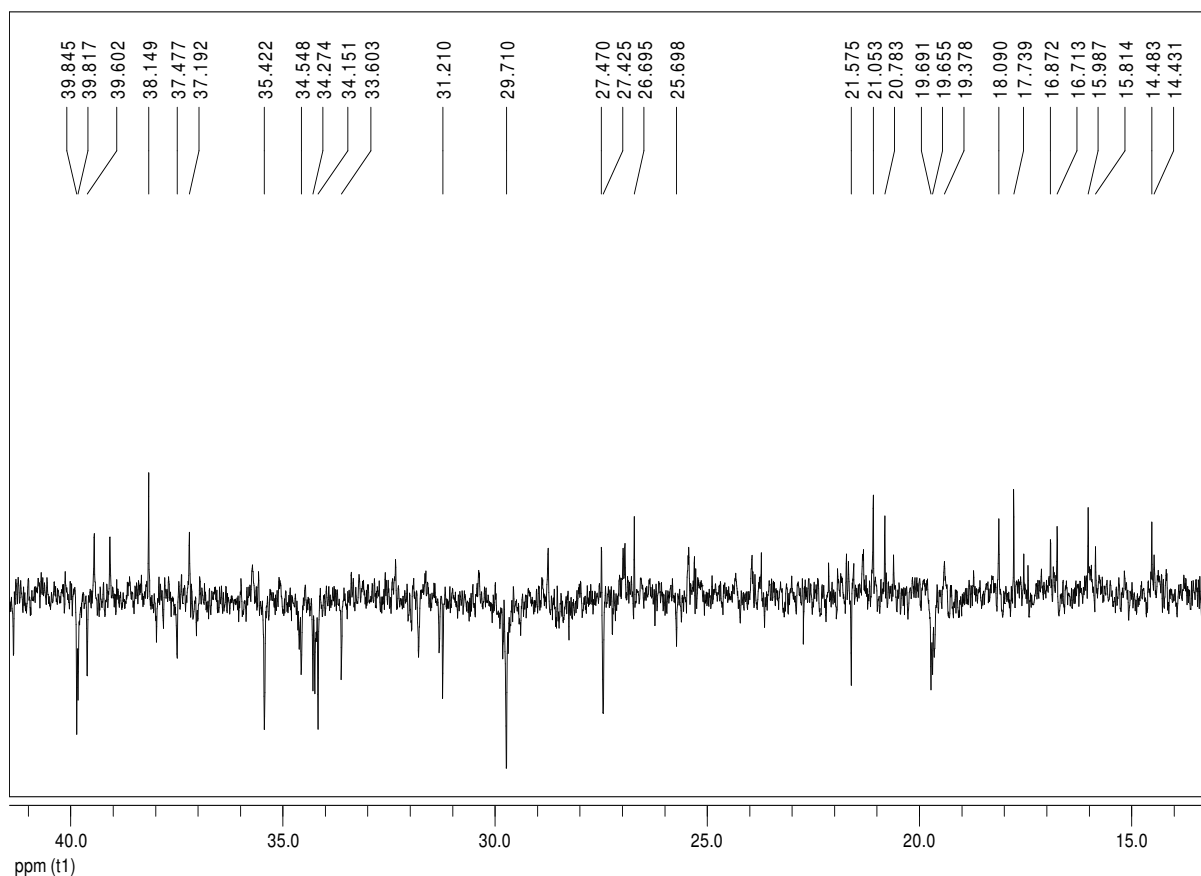


Figura 47: Expansão do subespectro DEPT-135 (100 MHz) de **M1** + **M5** em CDCl_3 .

Os compostos 11 α -hidroxilup-20(29)-en-3-ona e 30-hidroxilup-20(29)-en-3-ona já foram isolados de galhos desta espécie (SILVA, 2007a).

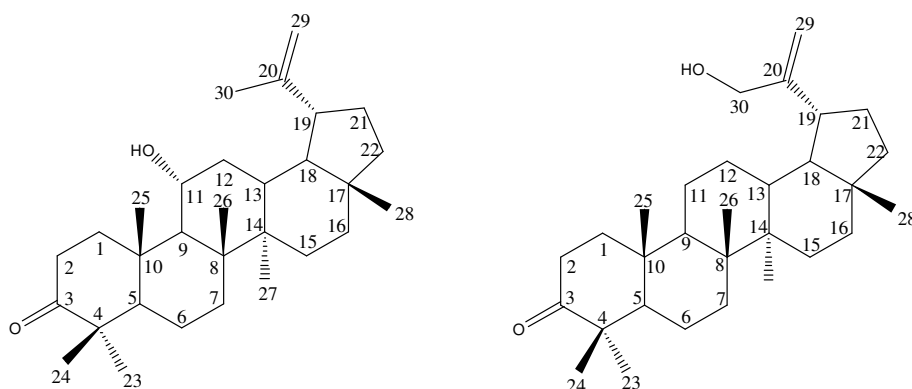
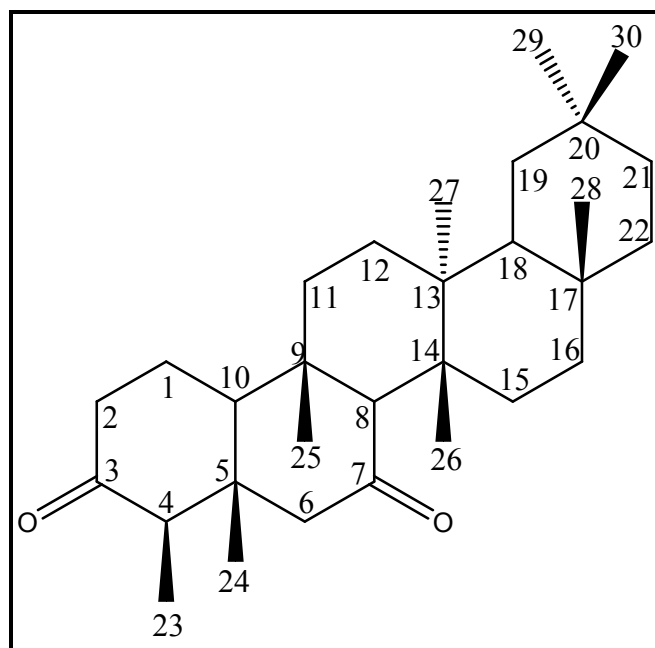


Tabela 29: Comparação dos dados de RMN de ^{13}C de **M1** e **M5** com os dados da literatura para 11 α -hidroxilup-20(29)-en-3-ona e 30-hidroxilup-20(29)-en-3-ona (SILVA, 2007a), respectivamente

Nº	Tipo de carbono	δ_c^* de M1	δ_c^* (SILVA, 2007a)	Tipo de carbono	δ_c^* de M5	δ_c^* (SILVA, 2007a)
1	CH ₂	42,09	42,07	CH ₂	39,60	39,58
2	CH ₂	34,55	34,21	CH ₂	34,15	34,14
3	C=O	218,78	218,84	C=O	218,19	218,25
4	C	47,65	47,63	C	47,34	47,32
5	CH	54,78	54,76	CH	54,78	54,87
6	CH ₂	19,69	19,64	CH ₂	19,69	19,67
7	CH ₂	34,27	34,27	CH ₂	33,60	33,57
8	C	42,43	42,41	C	40,82	40,79
9	CH	54,91	54,87	CH	49,75	49,72
10	C	38,22	38,20	C	36,89	36,86
11	CHOH	70,52	70,49	CH ₂	21,57	21,55
12	CH ₂	37,48	37,44	CH ₂	25,70	26,67
13	CH	37,19	37,17	CH	38,15	38,11
14	C	42,63	42,16	C	42,88	42,85
15	CH ₂	27,43	27,41	CH ₂	27,43	27,39
16	CH ₂	35,42	35,40	CH ₂	35,42	35,40
17	C	43,06	43,05	C	43,03	43,01
18	CH	47,65	47,63	CH	48,87	48,83
19	CH	47,72	47,70	CH	43,80	43,77
20	C	150,23	150,20	C	154,73	154,71
21	CH ₂	29,71	29,78	CH ₂	31,21	31,75
22	CH ₂	39,82	39,80	CH ₂	39,85	39,82
23	CH ₃	27,47	27,46	CH ₃	26,70	26,67
24	CH ₃	20,78	20,77	CH ₃	21,05	21,04
25	CH ₃	16,71	16,71	CH ₃	15,99	15,98
26	CH ₃	16,87	16,86	CH ₃	15,82	15,80
27	CH ₃	14,43	14,42	CH ₃	14,49	14,46
28	CH ₃	18,09	18,08	CH ₃	17,74	17,72
29	=CH ₂	109,95	109,95	=CH ₂	106,95	106,87
30	CH ₃	19,38	19,37	CH ₂ OH	65,07	65,01

Solvente: *CDCl₃

1.2.1.6 – M6: 3,7-dioxo-friedelano

M6 foi isolado a partir do extrato FSEH (rendimento de 0,4 %) conforme representado na Figura 16, pág. 50. Apresentou-se como cristais brancos, solúvel em clorofórmio e de faixa de fusão de 247,7 – 250,1 °C. O teste LB foi positivo para triterpeno pentacíclico. Na placa de cromatografia, este sólido, após revelação, apresentou uma mancha roxa (revelador: ácido perclórico/vanilina).

O espectro na região do IV (Figura 48, pág. 84) de **M6** apresentou bandas de absorção em: 2928-2862 cm^{-1} característica de estiramento simétrico e assimétrico da ligação CH de compostos alifáticos, 1712 cm^{-1} característica de estiramento de ligação CO de carbonila de cetona e 1458 e 1384 cm^{-1} característica de deformação angular de ligação simples CH de compostos alifáticos.

O espectro de RMN de ^1H (Figura 49, pág. 85) apresentou sete simpletos em δ 0,77; δ 0,88; δ 0,91; δ 0,96; δ 1,00; δ 1,07 e δ 1,18 relativos a sete metilas e um duplete em δ 0,88 ($J = 6,8 \text{ Hz}$) associado à outra metila (C23), características de triterpenos de esqueleto friedelano (SILVA, 2011).

A análise do espectro de RMN de ^{13}C e subespectro DEPT-135 (Figuras 50, 51 e 52, pág. 85 e 86) indicou um total de 30 sinais de carbono, que foram

classificados como sendo 8 CH₃, 10 CH₂, 4 CH e 8 C. Os sinais em δ 211,12 e δ 210,62 confirmaram a presença de carbonilas de cetona.

Estas informações aliadas à comparação com os dados de RMN de ¹³C da literatura (Tabela 30, pág. 87) (MAHATO e KUNDU, 1994) permitiram identificar **M6** como sendo 3,7-dioxofriedelano. **M6** é inédita nas raízes de *Maytenus imbricata*.

De acordo com Corsino e colaboradores (2000) triterpenos friedelanos não são encontrados em sua maioria nas folhas das plantas da família Celastraceae, enquanto os quinonametídeos são encontrados exclusivamente nas raízes e não se encontram nas folhas. Corsino e colaboradores (2000) não isolaram friedelanos em *Maytenus aquifolium* e *Salacia campestris*, no entanto, foi isolado este tipo de triterpeno nas raízes de *Maytenus imbricata*.

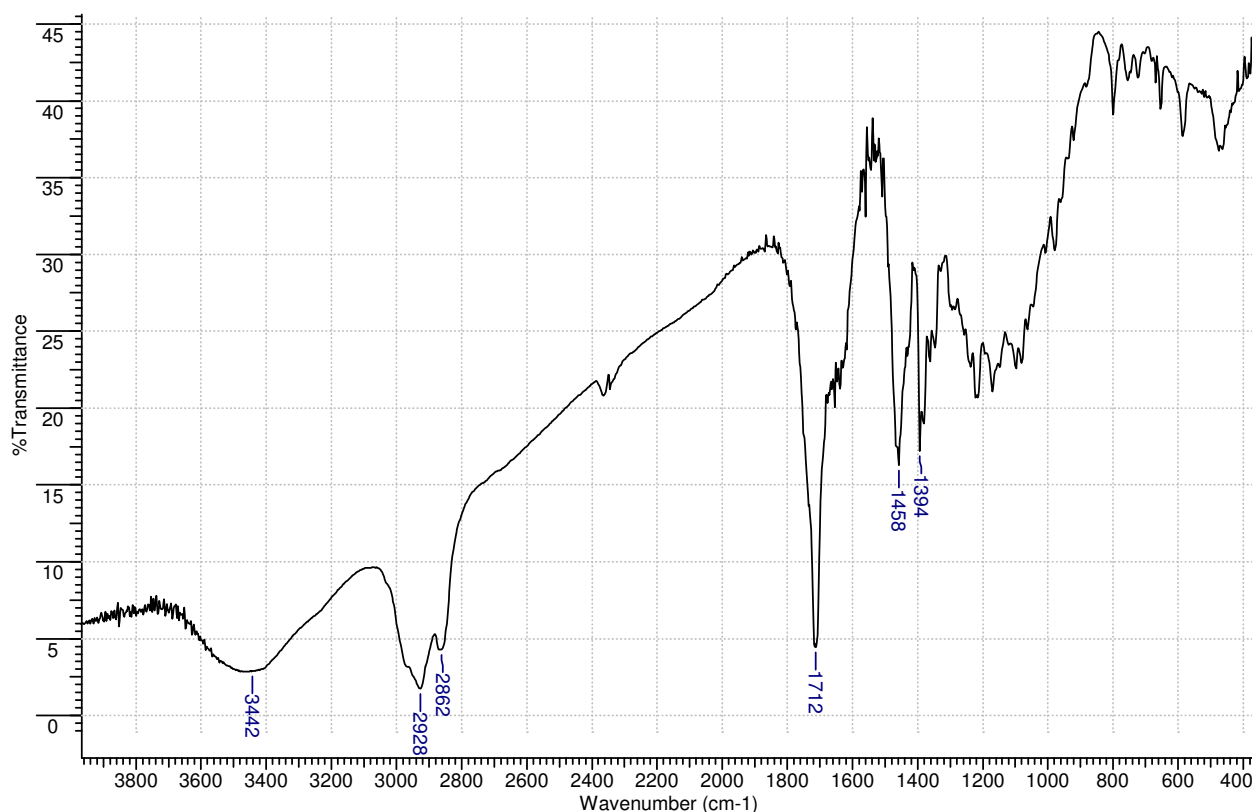


Figura 48: Espectro de **M6** obtido na região do IV (KBr, cm⁻¹). A banda em 3442 cm⁻¹ foi atribuída a umidade do KBr.

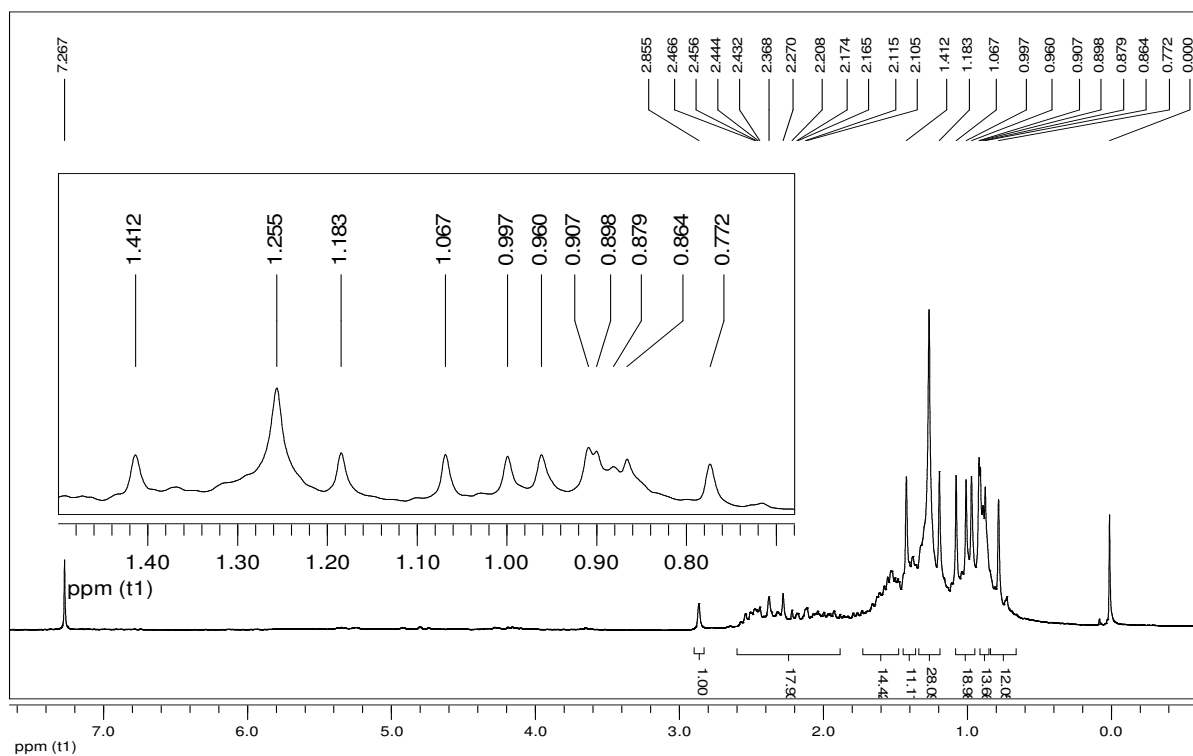


Figura 49: Espectro e expansão de RMN de ^1H (200 MHz) de **M6** em CDCl_3 .

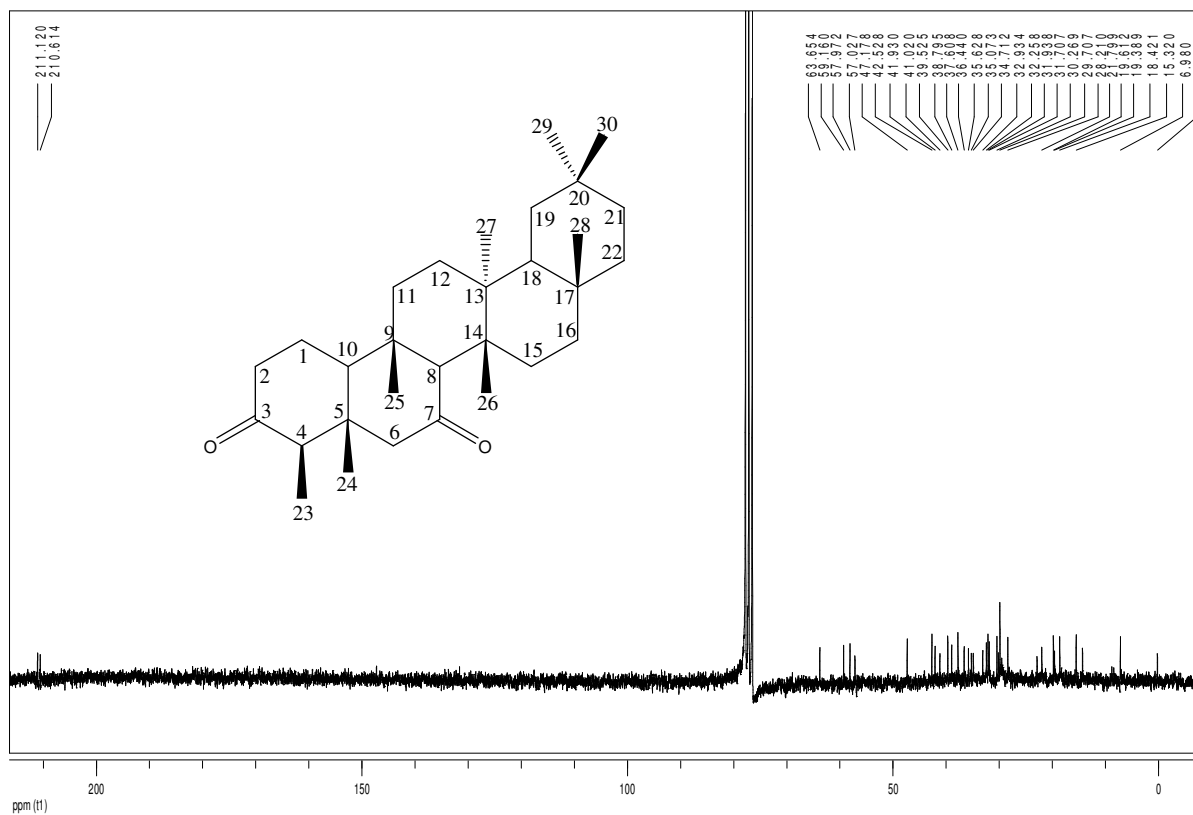


Figura 50: Espectro de RMN de ^{13}C (50 MHz) de **M6** em CDCl_3 .

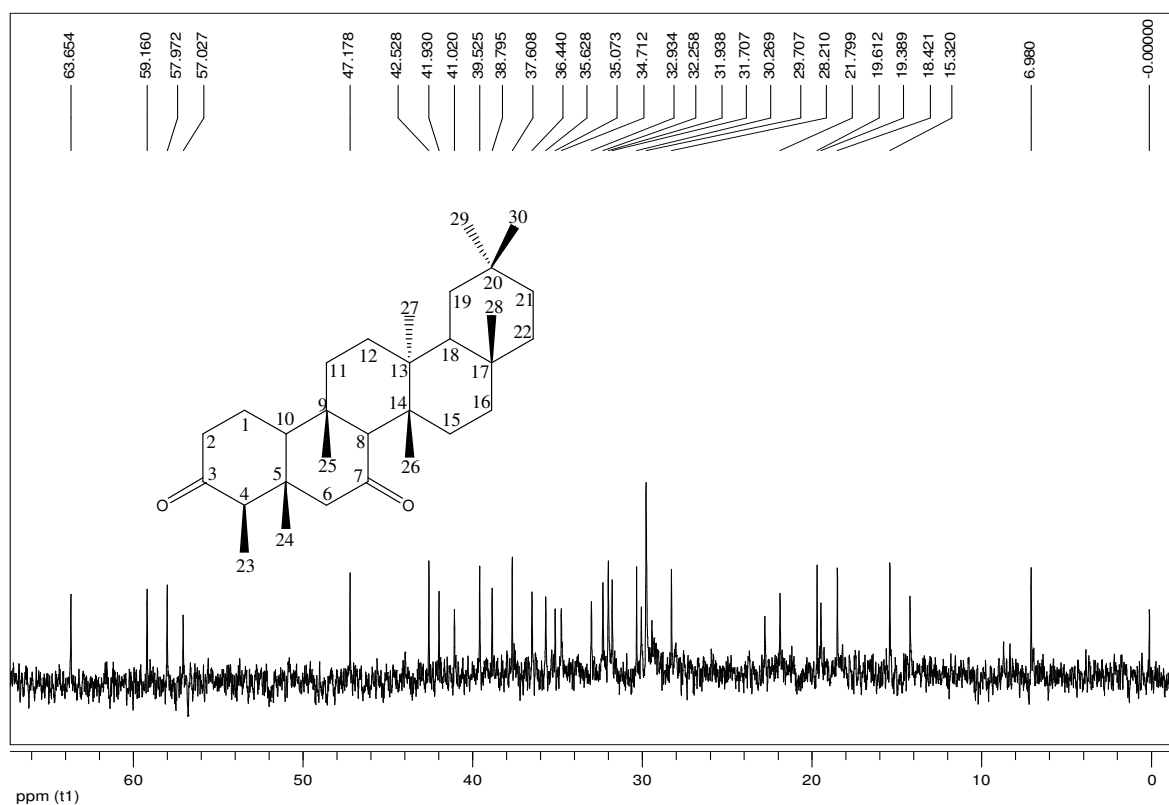


Figura 51: Expansão do espectro de RMN de ^{13}C (50 MHz) de **M6** em CDCl_3 .

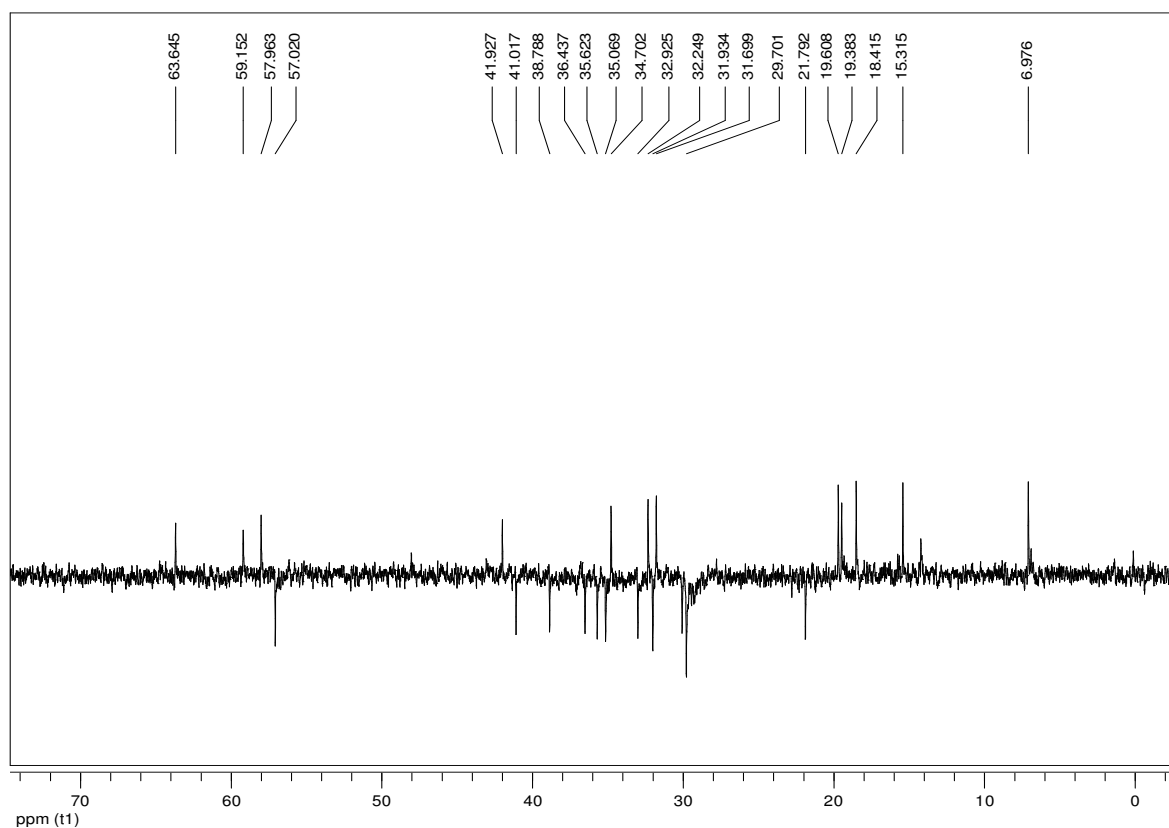
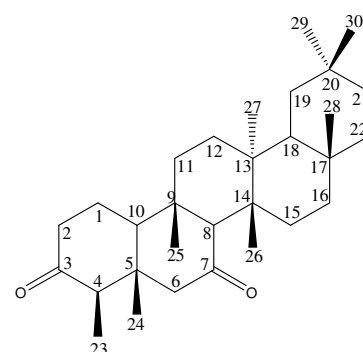


Figura 52: Subespectro DEPT-135 (50 MHz) de **M6** em CDCl_3 .

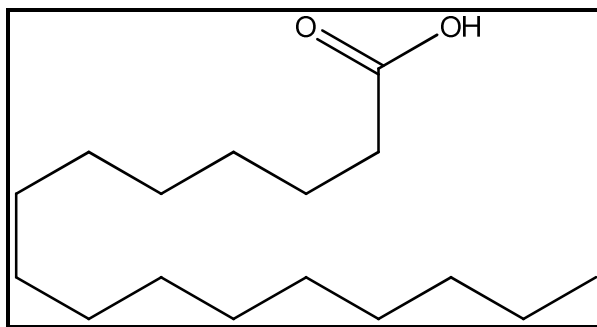
Tabela 30: Comparação dos dados de RMN de ^{13}C de **M6** com os dados da literatura (MAHATO e KUNDU, 1994)

Nº	Tipo de carbono	δ_{C}^* de M6	δ_{C}^* (MAHATO e KUNDU, 1994)
1	CH_2	21,80	21,6
2	CH_2	41,02	40,8
3	$\text{C}=\text{O}$	211,12	210,6
4	CH	57,97	57,8
5	C	47,18	47,0
6	CH_2	57,03	56,9
7	$\text{C}=\text{O}$	210,61	210,2
8	CH	63,65	63,4
9	C	42,53	42,4
10	CH	59,16	59,0
11	CH_2	35,63	35,5
12	CH_2	29,71	29,8
13	C	39,53	39,4
14	C	37,61	37,5
15	CH_2	31,94	31,6
16	CH_2	36,44	36,3
17	C	30,27	30,1
18	CH	41,93	41,8
19	CH_2	35,07	34,9
20	C	28,21	28,0
21	CH_2	32,93	32,8
22	CH_2	38,80	38,6
23	CH_3	6,98	6,8
24	CH_3	15,32	15,1
25	CH_3	18,42	18,2
26	CH_3	19,39	19,2
27	CH_3	19,61	19,4
28	CH_3	32,26	32,1
29	CH_3	31,71	31,8
30	CH_3	34,71	34,6

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



1.2.1.7 – M7: ácido palmítico



M7 foi isolado do extrato FSEH (rendimento de 0,1 %), conforme representado na Figura 16, pág. 50. Apresentou-se como um sólido bege pastoso e solúvel em clorofórmio. A substância apresentou em CCD uma mancha azul quando revelada com ácido perclórico/vanilina.

O espectro de RMN de ^1H (Figura 53, pág. 89) de **M7** apresentou um tripleto em δ 2,35 ($J = 7,6$ Hz) atribuído ao hidrogênio adjacente a carbonila (PAVIA et al., 2001) e outro tripleto em δ 0,88 ($J = 6,4$ Hz) que se refere aos hidrogênios metílicos.

Através da análise do espectro de RMN de ^{13}C (Figura 54, pág. 89), observou-se a presença de alguns sinais sobrepostos em δ 29,71, e um sinal em δ 181,15 atribuído ao carbono carbonílico do ácido. A análise deste espectro juntamente com o subespectro DEPT-135 (Figura 55, pág. 90) foi possível identificar 16 sinais, classificados como sendo 1 CH_3 , 14 CH_2 e 1 C.

A análise dos espectros no RMN de ^1H e ^{13}C e a comparação com os valores de RMN de ^{13}C da literatura (Tabela 31, pág. 90) (COUPERUS et al., 1978) permitiram identificar **M7** como sendo ácido palmítico. **M7** é inédito na espécie *Maytenus imbricata*.

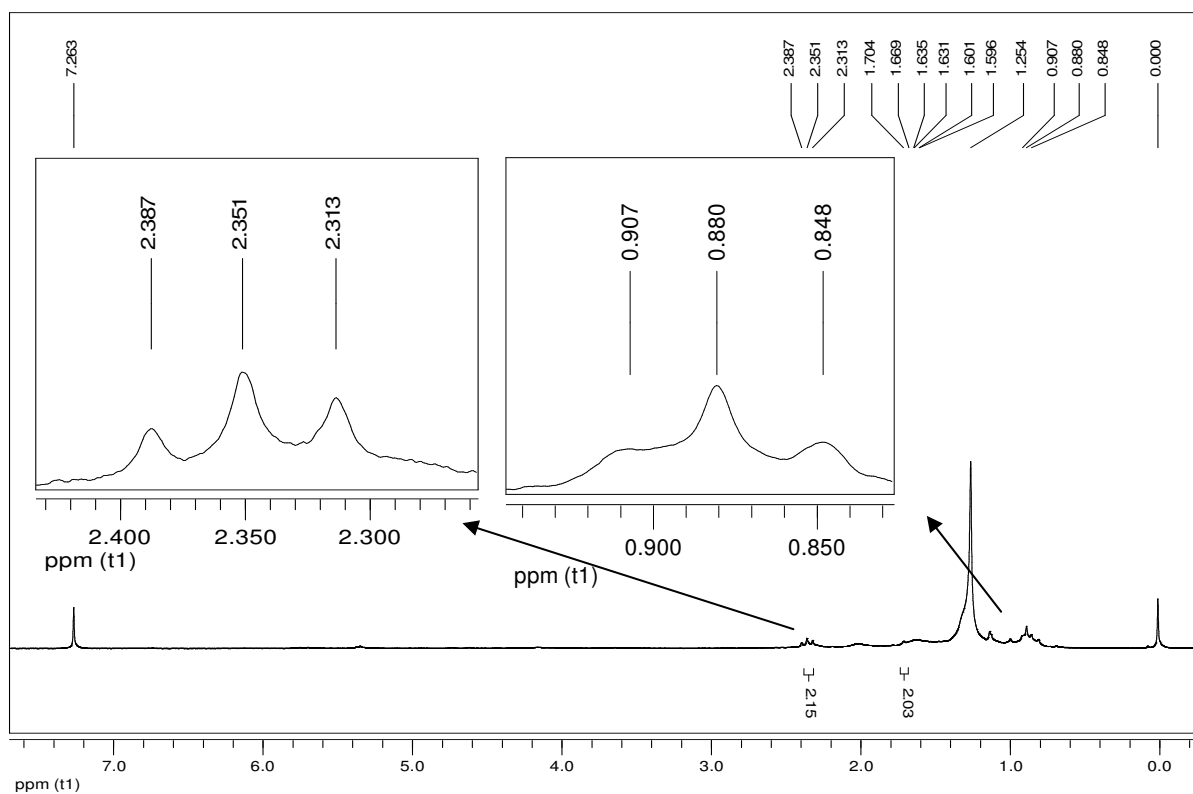


Figura 53: Espectro de RMN de ¹H (200 MHz) de **M7** em CDCl₃.

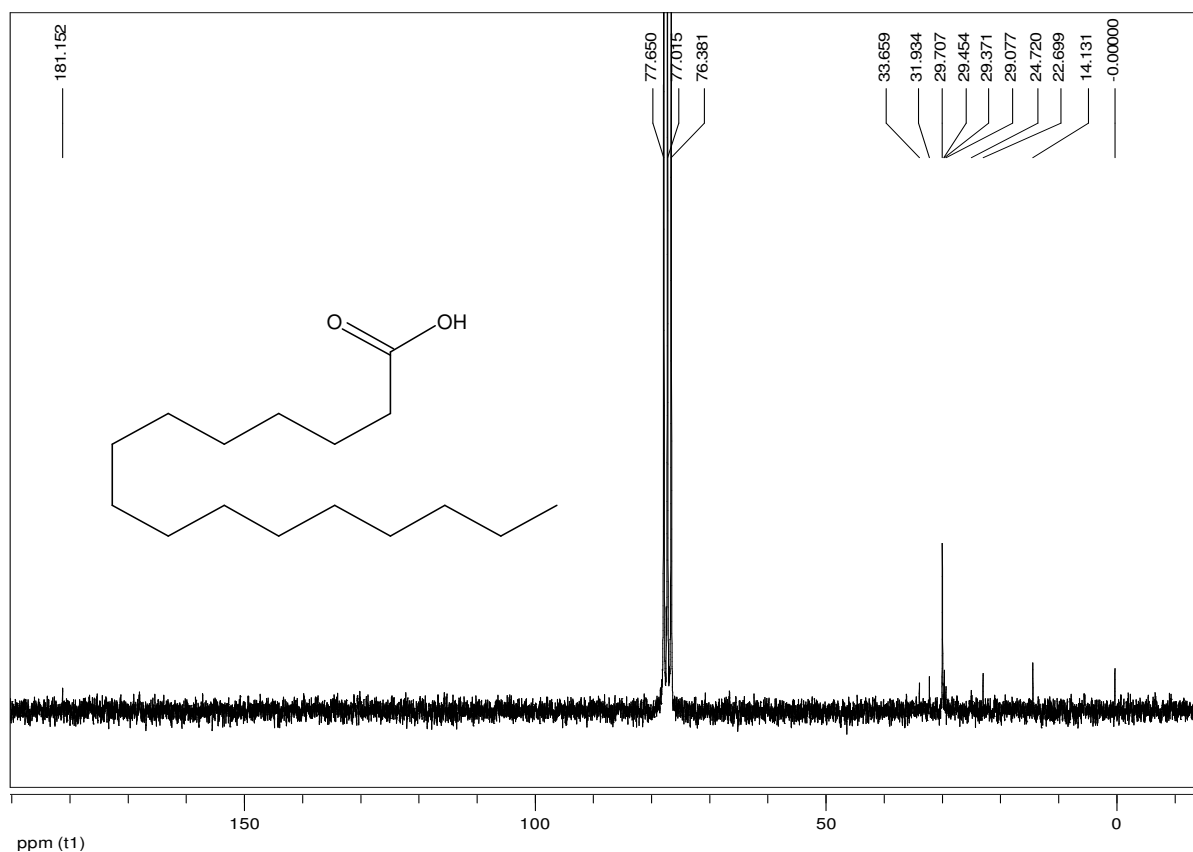


Figura 54: Espectro de RMN de ¹³C (50 MHz) de **M7** em CDCl₃.

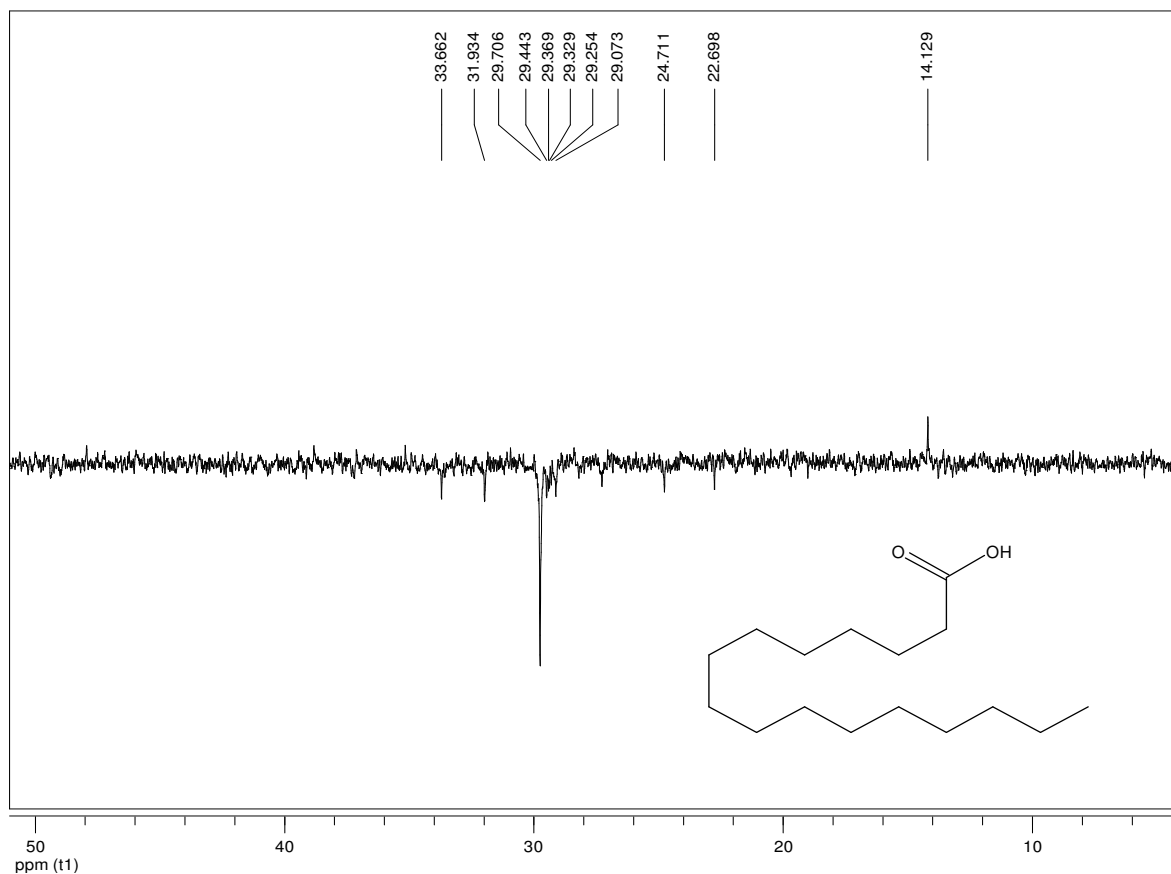
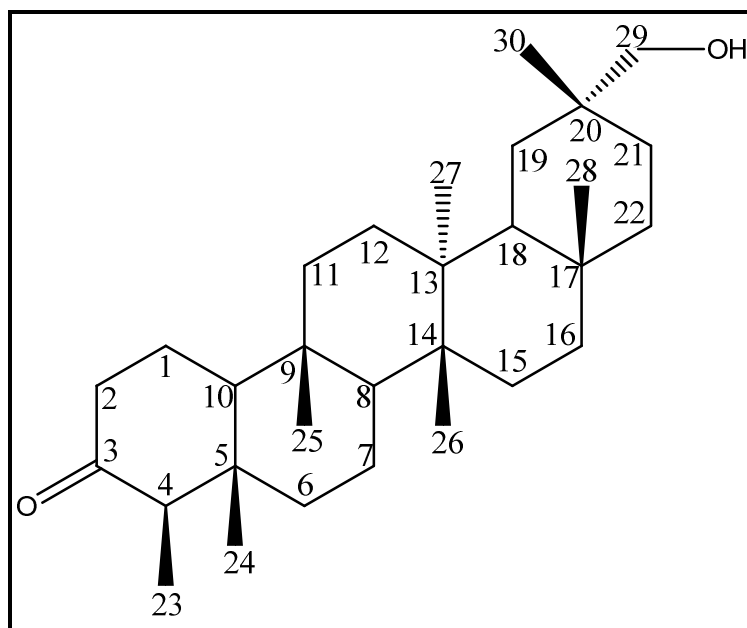


Figura 55: Subespectro DEPT-135 (50 MHz) de **M7** em CDCl_3 .

Tabela 31: Comparação dos dados de RMN de ^{13}C de **M7** com os dados da literatura para o ácido palmítico (COUPERUS et al., 1978)

Nº	Tipo de carbono	δ_c^* de M7	δ_c^* (COUPERUS, 1978)	Nº	Tipo de carbono	δ_c^* de M7	δ_c^* (COUPERUS, 1978)
1	C	181,15	180,66	9	CH	29,71	29,77
2	CH_2	33,66	34,22	10	CH	29,71	29,77
3	CH_2	24,72	24,76	11	CH_2	29,71	29,77
4	CH_2	29,08	29,17	12	CH_2	29,71	29,77
5	CH_2	29,45	29,52	13	CH_2	29,37	29,34
6	CH_2	29,71	29,77	14	CH_2	31,93	32,03
7	CH_2	29,71	29,77	15	CH_2	22,70	22,76
8	CH_2	29,71	29,77	16	CH_3	14,13	14,12

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

1.2.1.8 – M8: 3-oxo-29-hidroxifriedelano

M8 foi obtido a partir do extrato FSEH (rendimento de 0,2 %), conforme representado na Figura 16, pág. 50. Apresentou-se como cristais brancos, solúvel em clorofórmio e de faixa de fusão de 146,9 – 148,4 °C. O teste LB foi positivo para triterpeno pentacíclico. A análise por CCD deste sólido indicou apenas uma mancha roxa (revelador: ácido perclórico/vanilina).

O espectro na região do IV (Figura 56, pág. 92) de **M8** apresentou bandas de absorção em 3468 cm^{-1} correspondente a estiramento da ligação OH de hidroxila, $2928\text{--}2870\text{ cm}^{-1}$ características de estiramento simétrico e assimétrico da ligação CH de compostos alifáticos, 1710 cm^{-1} característica de estiramento de ligação CO de cetona e 1458 e 1388 cm^{-1} características de deformação angular no plano de ligação simples CH de compostos alifáticos. Apresentou também bandas em torno de 1060 cm^{-1} , correspondente a estiramento de ligação C-O de álcool primário.

O espectro de RMN de ^1H (Figura 57, pág. 93) apresentou seis simpletos entre δ 0,7 e 1,3 relativos a seis metilas, δ 0,73; δ 0,87; δ 1,03; δ 1,04; δ 1,05 δ 1,22 e um duplete em δ 0,88 ($J = 6,0\text{ Hz}$) associado à outra metila (C23) características de TTPC da série dos friedelanos (SILVA, 2011). A presença de um sinal em δ 3,27 característica de hidrogênio ligado a carbono hidroxilado confirmou a presença do grupo hidroxila.

A análise do espectro de RMN de ^{13}C (Figura 58, pág. 93) indicou a presença de 30 sinais. Com o auxílio do subespectro DEPT-135 (Figura 59, pág. 94) estes sinais foram classificados como sendo 7 CH_3 , 12 CH_2 , 5 CH e 6 C indicando que uma das metilas se apresenta hidroxilada. O sinal em δ_{C} 6,83 foi atribuído ao carbono metílico (C23) de esqueleto friedelânico (MAHATO e KUNDU, 1994). Pode-se observar também sinais em δ 213,18 relativo a carbono ligado a carbonila (C3) e δ 74,78 relativo a carbono ligado a hidroxila (C29).

A comparação dos dados de RMN de ^{13}C com a literatura (MAHATO e KUNDU, 1994) (Tabela 32, pág. 95), permitiu identificar **M8** como sendo 3-oxo-29-hidroxifriedelano. Podemos observar mais uma vez que é possível o isolamento de friedelanos de raízes de espécies da família Celastraceae, diferentemente do que foi encontrado em Corsino e colaboradores (2000) em sua pesquisa. **M8** é inédita na espécie *Maytenus imbricata*.

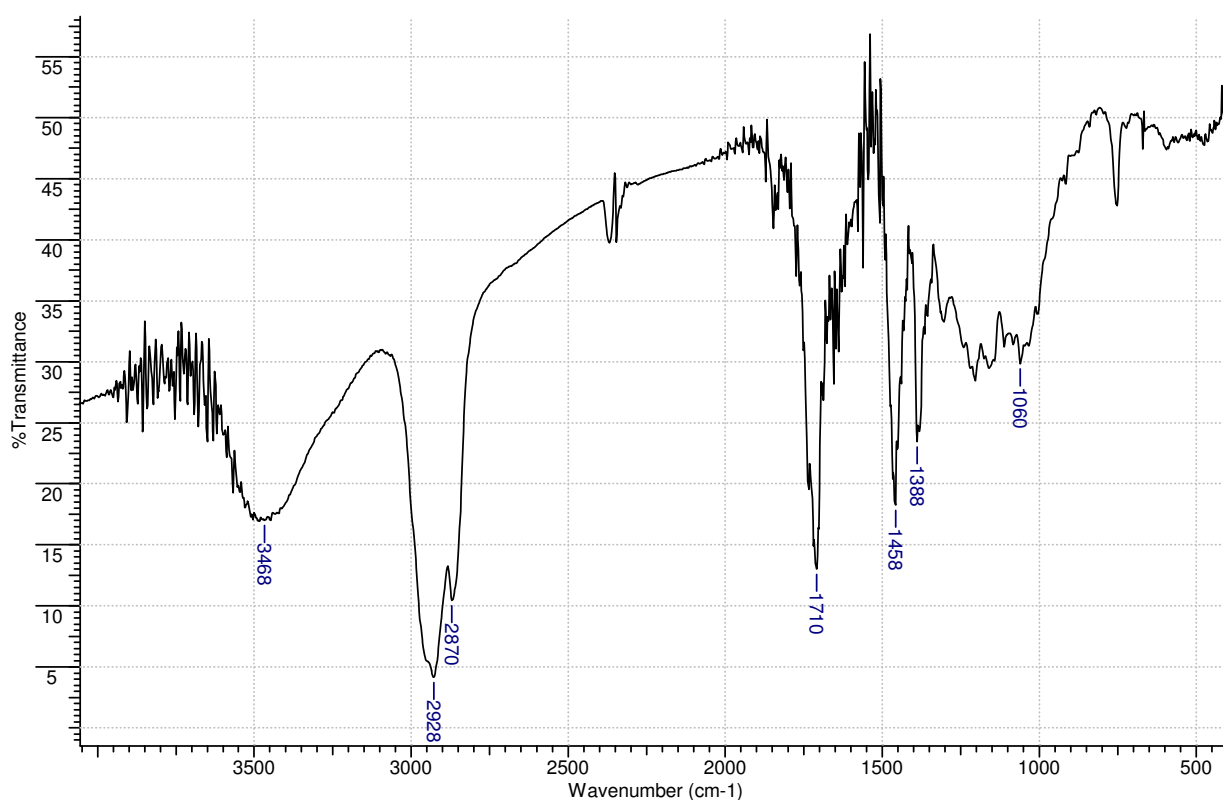


Figura 56: Espectro na região do IV de **M8** (KBr, cm^{-1}).

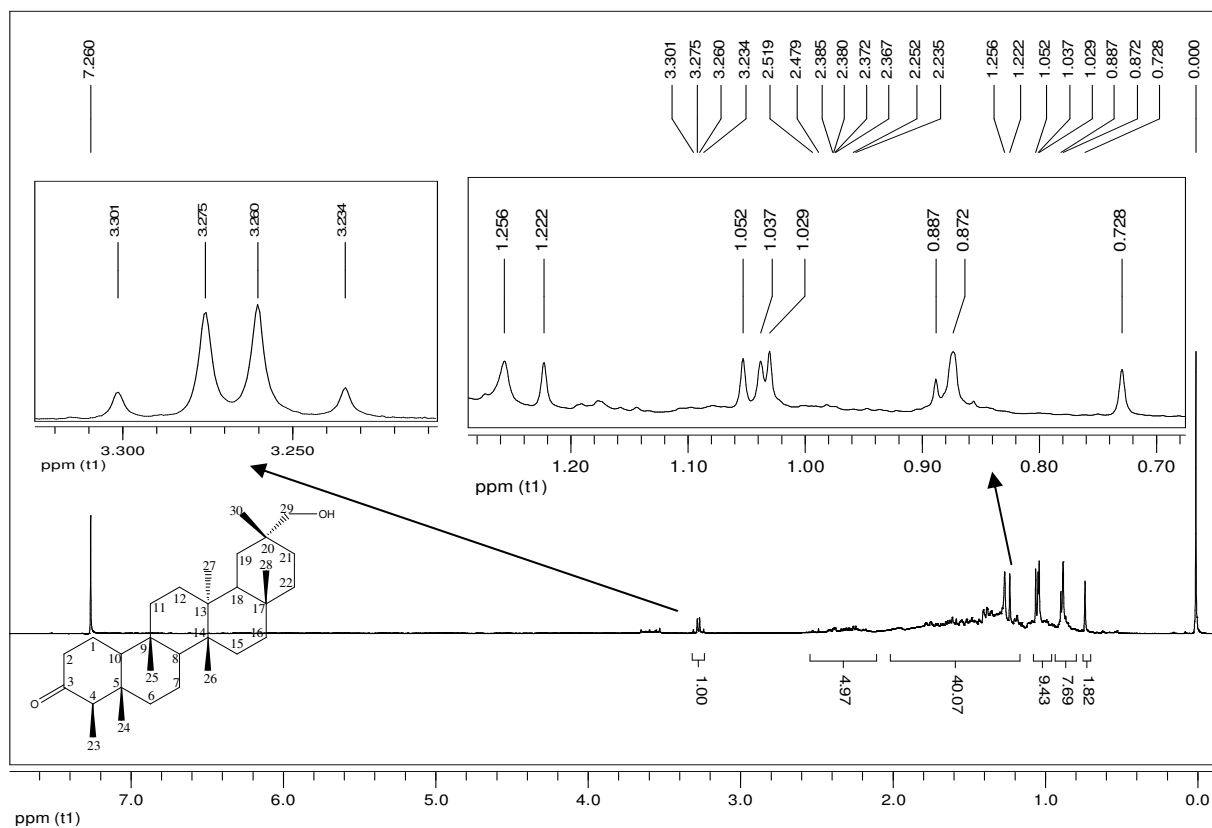


Figura 57: Espectro e expansões de RMN de ^1H (400 MHz) de **M8** em CDCl_3 .

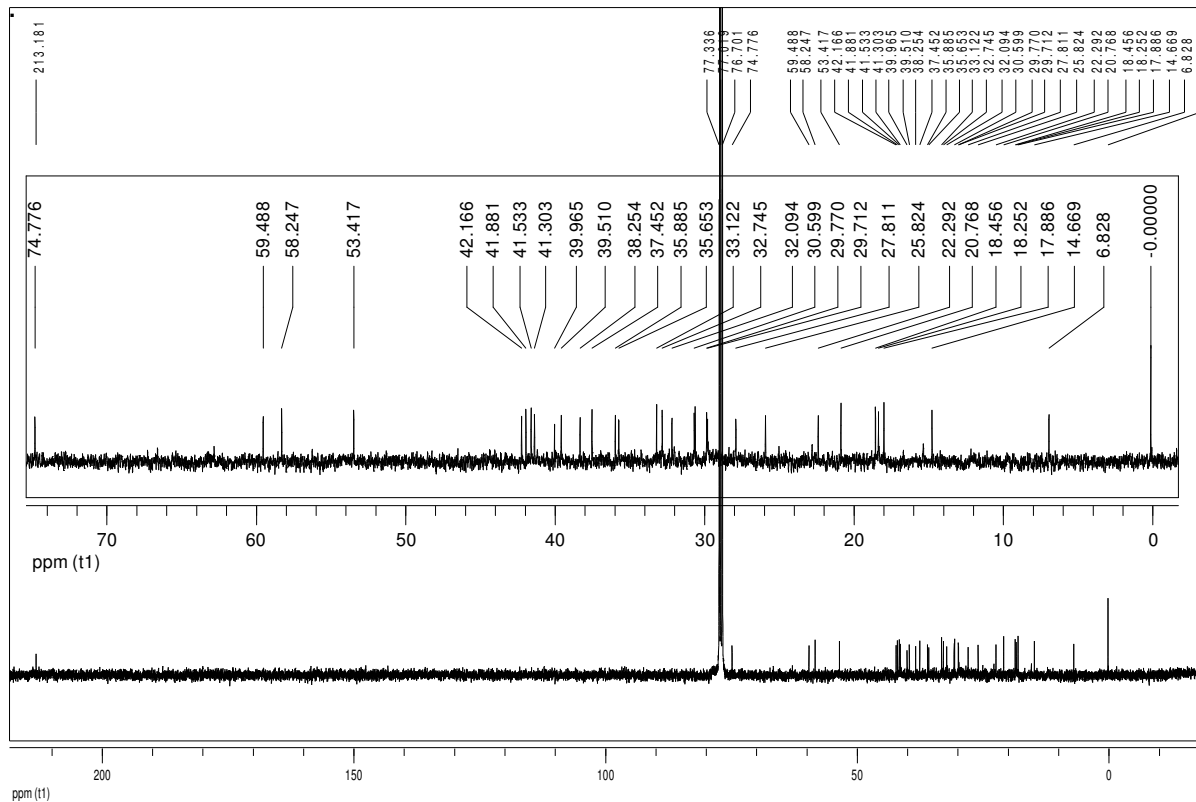


Figura 58: Espectro e expansão de RMN de ^{13}C (100 MHz) de **M8** em CDCl_3 .

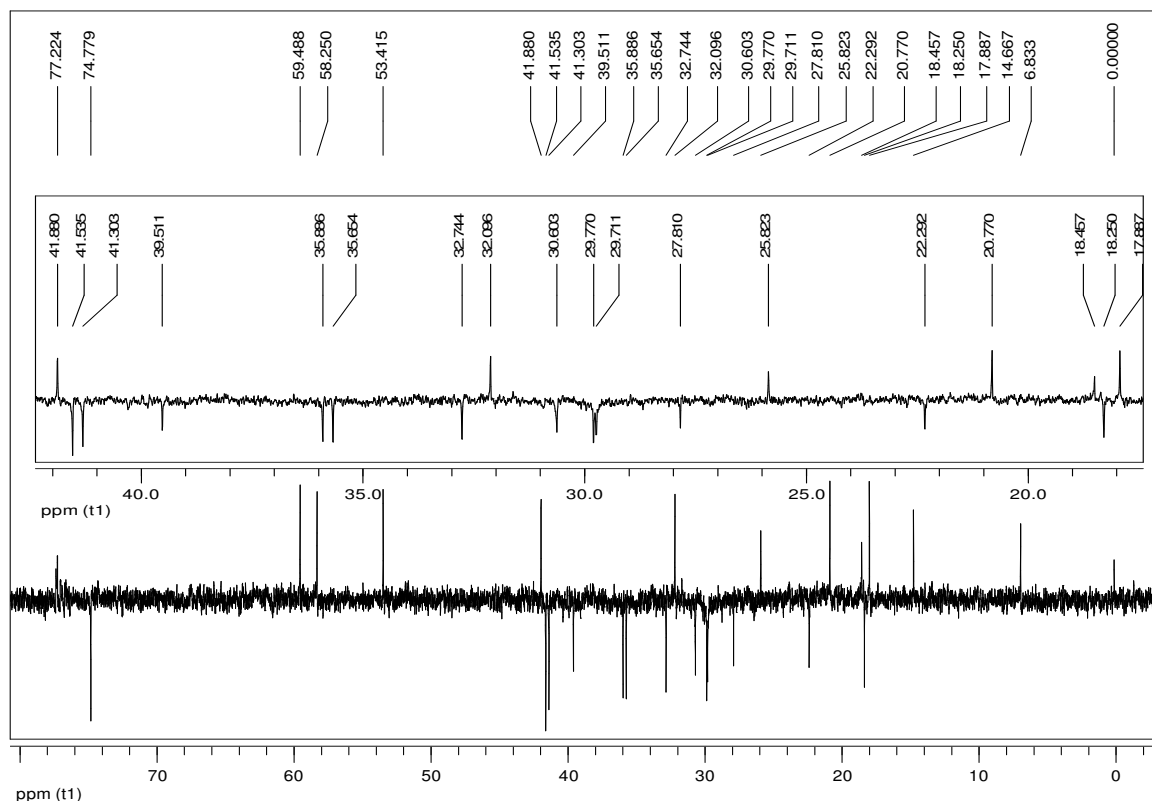


Figura 59: Subespectro DEPT-135 e expansão (100 MHz) de **M8** em CDCl_3 .

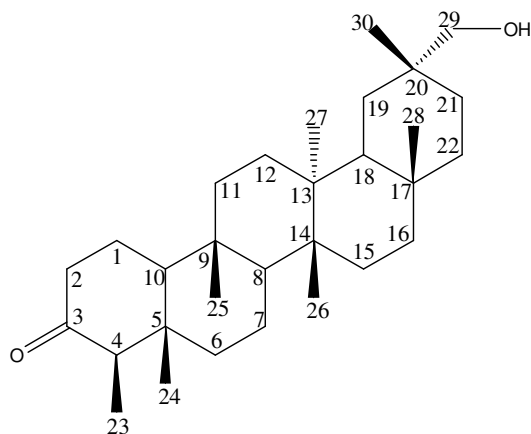
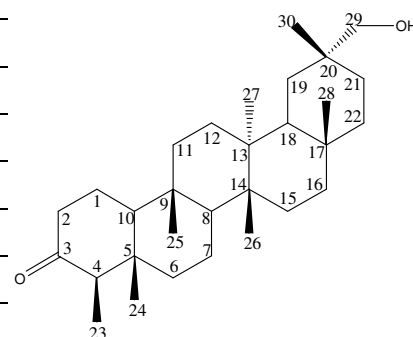
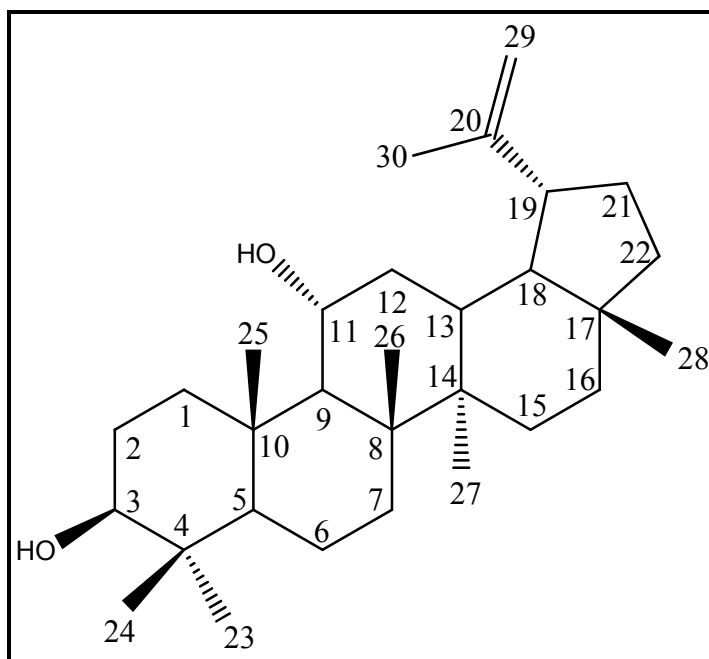


Tabela 32: Comparação dos dados de RMN de ^{13}C de **M8** com os dados da literatura para 3-oxo-29-hidroxifriedelano (MAHATO e KUNDU, 1994)

Nº	Tipo de carbono	δ_{C}^* de M8	δ_{C}^* (MAHATO e KUNDU, 1994)
1	CH_2	22,29	22,3
2	CH_2	41,53	41,6
3	C	213,18	212,2
4	CH	58,25	58,3
5	C	42,17	42,2
6	CH_2	41,30	41,4
7	CH_2	18,25	18,3
8	CH	53,42	53,5
9	C	37,45	37,5
10	CH	59,49	59,6
11	CH_2	35,65	35,7
12	CH_2	29,71	29,8
13	C	39,97	40,0
14	CH	38,25	38,3
15	CH_2	32,75	32,8
16	CH_2	35,89	36,0
17	C	29,77	29,8
18	CH	41,88	42,0
19	CH_2	30,60	30,6
20	C	33,12	33,2
21	CH_2	27,81	27,9
22	CH_2	39,51	39,6
23	CH_3	6,83	6,8
24	CH_3	14,67	14,7
25	CH_3	17,89	17,9
26	CH_3	18,46	18,4
27	CH_3	20,77	20,8
28	CH_3	32,09	32,1
29	CH_2	74,78	74,8
30	CH_3	25,82	25,9

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



1.2.1.9 – M9: 3 β ,11 α -di-hidroxi-lup-20(29)-eno (Nepeticina)

M9 foi obtido a partir do extrato FSEH (rendimento 0,4%) conforme representado na Figura 16, pág. 50. Apresentou-se como um sólido branco, solúvel em clorofórmio e de faixa de fusão de 212,9 – 218,6 °C. O teste LB foi positivo para triterpeno pentacíclico. A análise por CCD deste sólido evidenciou a existência de apenas uma mancha rosa (revelador: ácido perclórico/vanilina).

O espectro na região do IV (Fig. 60, pág. 97) apresentou bandas de absorção em 3422 cm⁻¹ características de estiramento de ligação OH de hidroxila, 2944 e 2870 cm⁻¹ correspondentes a estiramento simétrico e assimétrico de ligação CH de compostos alifáticos, 1458 cm⁻¹ e 1382 cm⁻¹ bandas características de deformação angular de ligação simples de CH de compostos alifáticos e 1186 e 1040 cm⁻¹ correspondentes a estiramento da ligação OH de álcool.

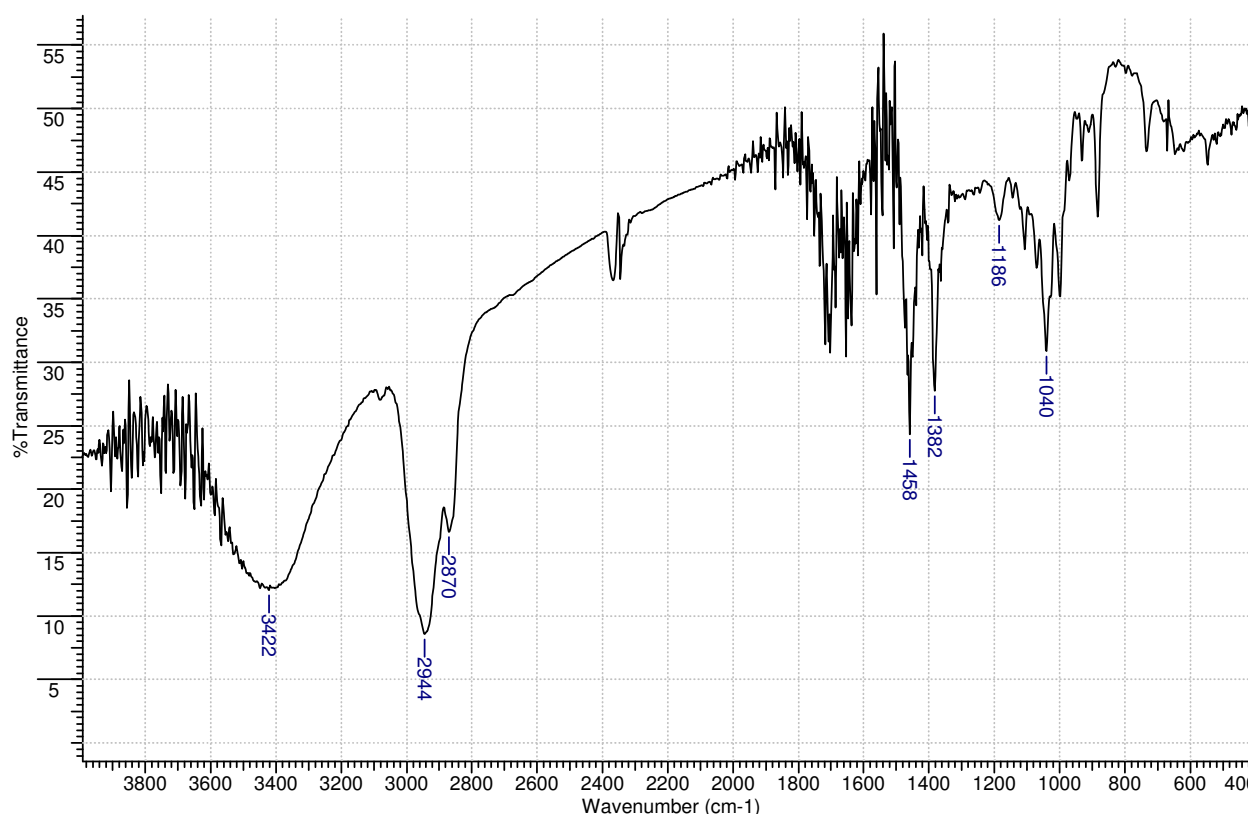


Figura 60: Espectro de **M9** obtido no IV (KBr).

O espectro de RMN de ^1H (Fig. 61, pág. 98) apresentou 5 simpletos, os quais foram atribuídos a sete metilas, em δ 1,69 (3H), 1,26 (3H), 1,04 (9H), 0,96 (3H) e 0,79 (3H). Apresentou um triplo duplete em δ 3,93 característico de hidrogênio metínico e indicou que esse hidrogênio (H11) apresenta dois acoplamentos diaxial ($J = 10,8$ Hz) e um axial-equatorial ($J = 4,8$ Hz) (SILVERSTEIN et al., 1994), referindo-se ao hidrogênio ligado ao carbono com hidroxila na posição axial (C11). Em δ 3,21 apresentou um sinal, característico de hidrogênio metínico e indicou que esse hidrogênio (H3) está ligado ao carbono hidroxilado (C3). O espectro também apresentou dois simpletos largos em δ 4,59 e δ 4,72 correspondentes a hidrogênios olefínicos (H29), o que indicou a presença de ligação dupla terminal de TTPC com esqueleto lupânico.

Os sinais em δ_{C} 109,95 e δ_{C} 150,25, no espectro de RMN de ^{13}C (Fig. 62 e 63, pág. 99) juntamente com a presença dos dois sinais de hidrogênios olefínicos, confirmaram que **M9** pertence à classe dos TTPC da série dos lupanos (MAHATO e KUNDU, 1994). Além da análise deste espectro, foi analisado o subespectro DEPT-

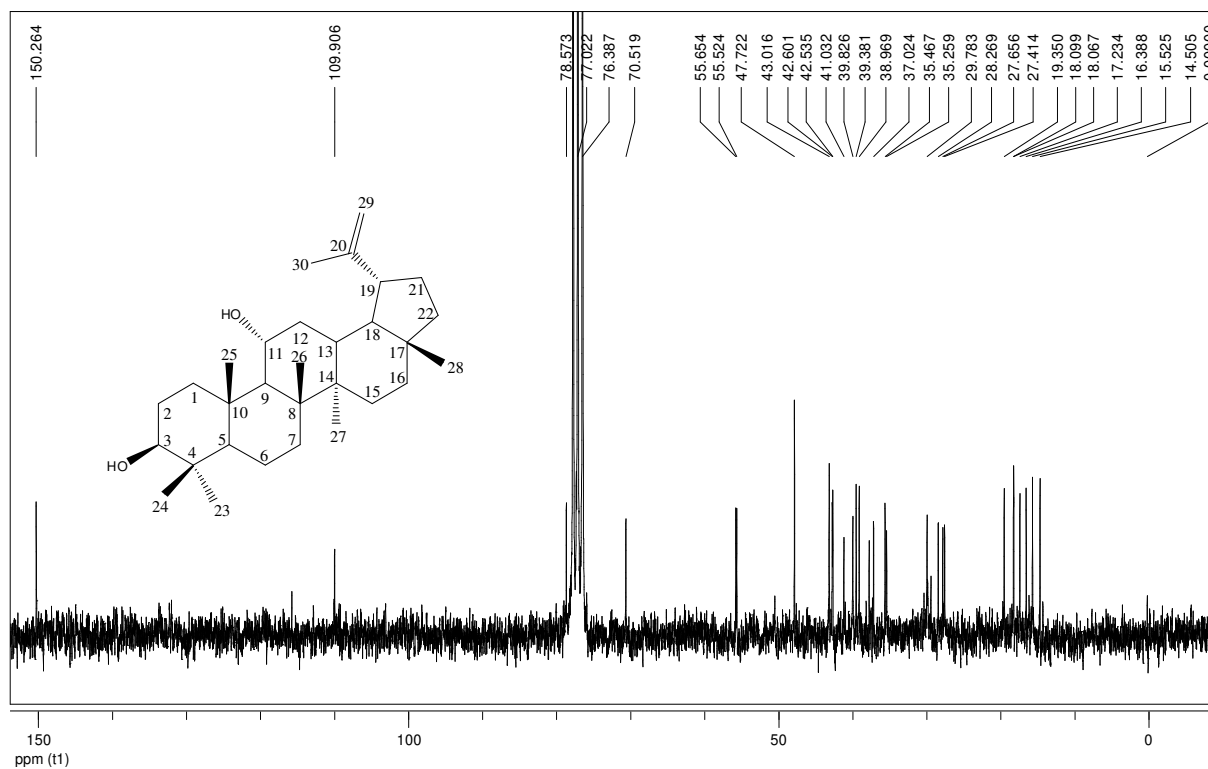


Figura 62: Espectro de RMN de ^{13}C de **M9** (CDCl_3 ; 50 MHz).

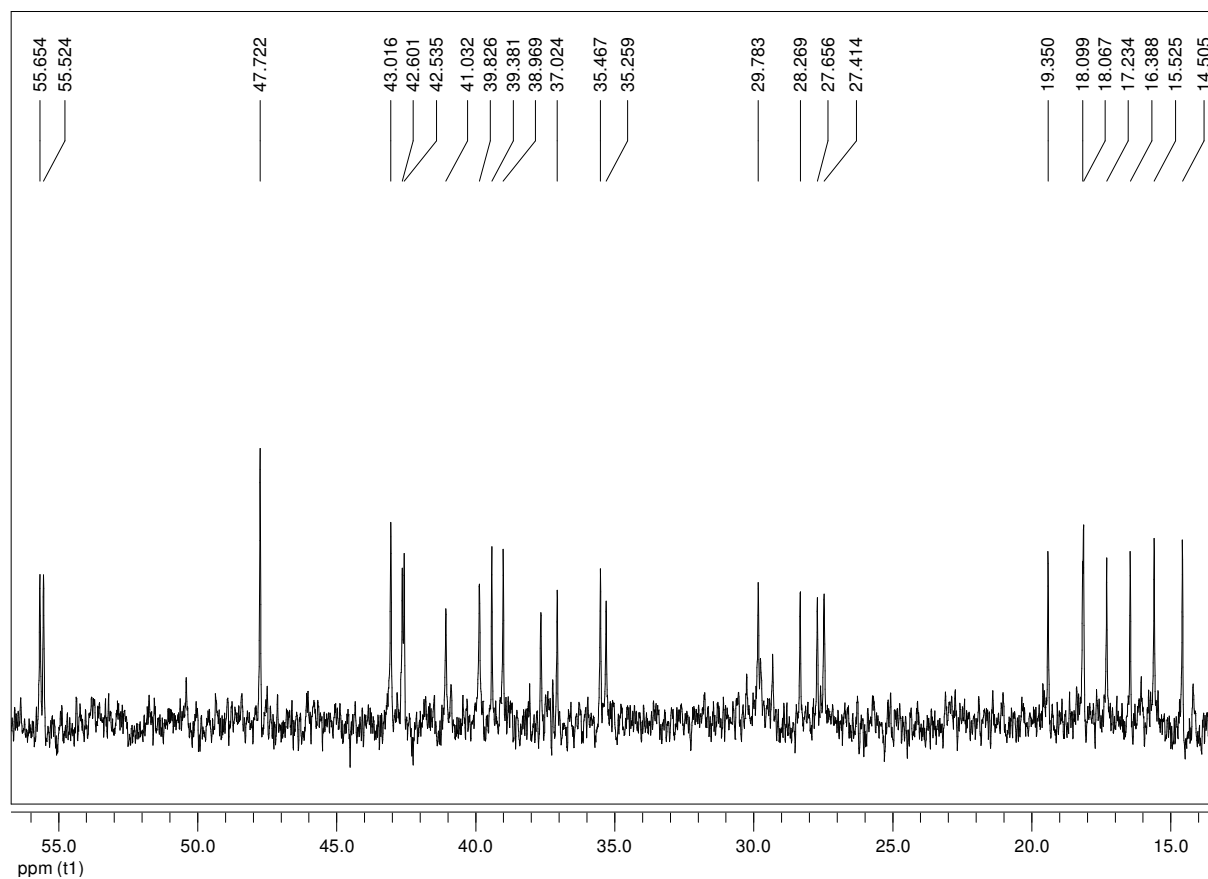


Figura 63: Expansão do espectro de RMN de ^{13}C de **M9** (CDCl_3 ; 50 MHz).

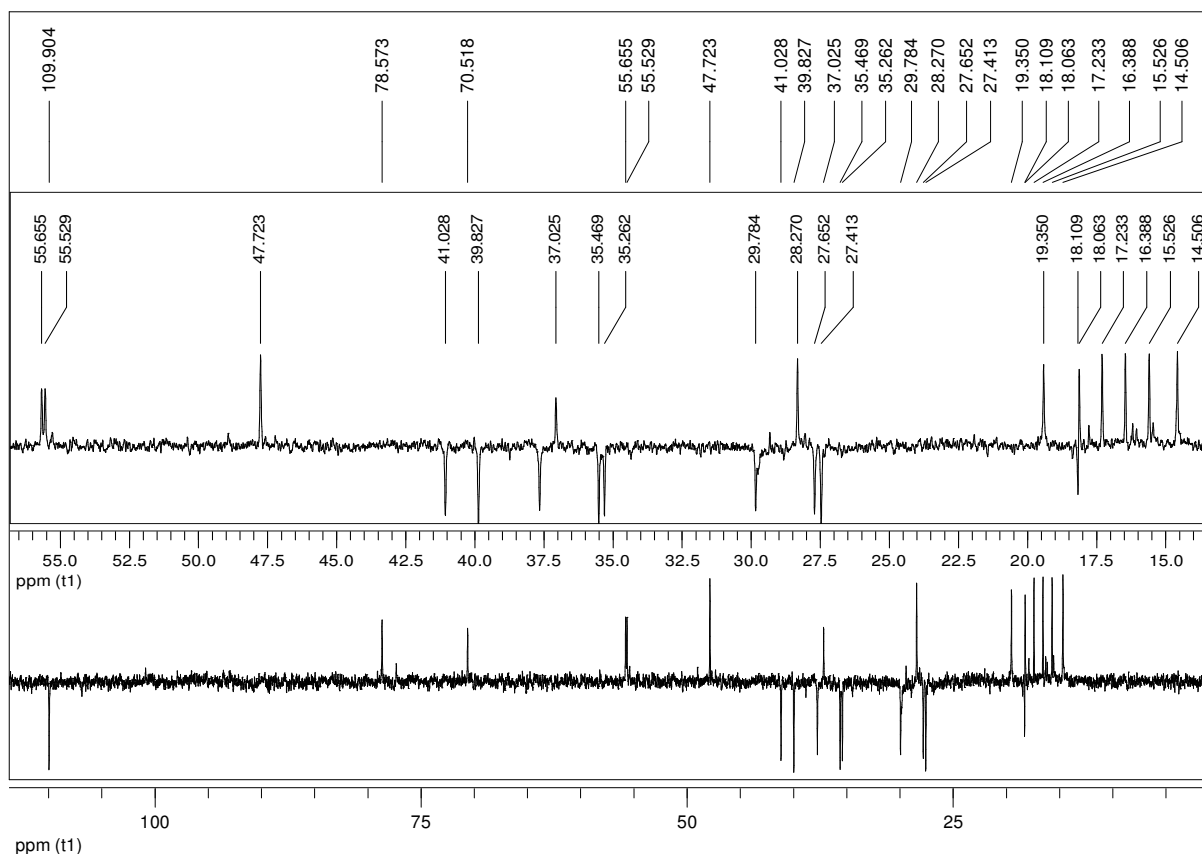


Figura 64: Subespectro DEPT-135 de **M9** (CDCl_3 ; 50 MHz).

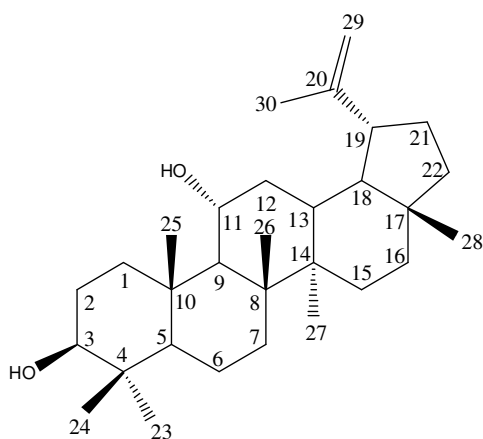
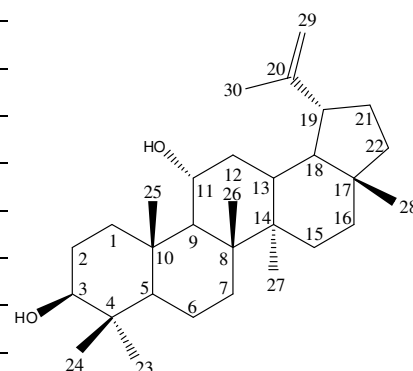


Tabela 33: Comparação dos dados de RMN de ^{13}C de **M9** com os dados da literatura para 3 β ,11 α -di-hidroxilup-20(29)-eno (MAHATO e KUNDU, 1994)

Nº	Tipo de carbono	δ_{C}^* de M9	δ_{C}^* (MAHATO e KUNDU, 1994)
1	CH ₂	39,83	39,0
2	CH ₂	27,41	27,5
3	CH	78,57	78,6
4	C	39,38	39,4
5	CH	55,52	55,6
6	CH ₂	18,10	18,1
7	CH ₂	35,26	35,3
8	C	42,54	41,1
9	CH	55,65	55,7
10	C	38,97	37,7
11	CH	70,52	70,5
12	CH ₂	27,66	27,7
13	CH	37,02	37,7
14	C	42,60	42,6
15	CH ₂	27,41	27,5
16	CH ₂	35,47	35,5
17	C	43,02	43,0
18	CH	47,72	47,7
19	CH	47,72	47,7
20	C	150,26	150,2
21	CH ₂	29,78	29,9
22	CH ₂	41,03	39,9
23	CH ₃	28,27	28,3
24	CH ₃	15,53	15,6
25	CH ₃	16,39	16,1
26	CH ₃	17,23	17,3
27	CH ₃	14,51	14,5
28	CH ₃	18,07	18,1
29	CH ₂	109,91	109,8
30	CH ₃	19,35	19,4

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



2 – ESTUDO DA ATIVIDADE BIOLÓGICA

2.1 – Introdução Geral

O uso abusivo e indiscriminado de antimicrobianos tem proporcionado o surgimento de resistência dos microrganismos aos fármacos de uso corrente e, como consequência, a necessidade de se pesquisar novos produtos. A resistência de antimicrobianos é considerada como um problema inerente à terapia antimicrobiana, por este motivo é preciso sempre buscar novas fontes terapêuticas. Testar produtos naturais pode ser uma medida alternativa importante para ajudar a resolver esse problema de resistência.

Na década de 80 com o surgimento de novos fármacos oriundos de fonte natural, surgiram métodos para detectar as mais variadas atividades biológicas de extratos e substâncias isoladas de plantas, mas o problema nesta época, na maioria destes testes, era a pequena quantidade de material obtida para serem testadas. Observa-se, nos dias atuais, ensaios em microescala, viabilizando ensaios de substâncias puras na ordem de microgramas ($\mu\text{g/mL}$).

Deste modo, os extratos e substâncias isoladas de raízes de *Maytenus imbricata* foram submetidas aos seguintes estudos da atividade biológica:

- Atividade antimicrobiana (antibacteriana e antifúngica);
- Atividade de inibição da enzima acetilcolinesterase;
- Avaliação do potencial tóxico através da atividade larvicida sobre *Artemia salina*.

Os esquemas de obtenções das amostras utilizadas no estudo da atividade biológica estão representadas nas Figuras 14, 15 e 16 pág. 38, 42 e 50.

2.2 – Atividade Antimicrobiana

2.2.1 – Introdução

Nas últimas décadas a maioria dos países têm voltado sua preocupação na produção e armazenamento dos alimentos, já que estes tem um importante papel na economia mundial (SHINOHARA et al., 2008). A Organização Mundial de Saúde alertou sobre a necessidade de se evitar a contaminação de alimentos por agentes biológicos que podem apresentar riscos à saúde, como a contaminação por *Salmonella typhimurium*, que causa gastroenterites e é resistente à maioria dos antimicrobianos em uso terapêutico. Esta intoxicação é causada pela falta de higiene do manipulador ou locais inadequados para a fabricação e armazenamento (SHINOHARA et al., 2008; PEREIRA et al., 2008). A frequência de infecção por *Salmonella* é alta em pacientes com HIV, tendo taxas superiores a 45% (MINCIS et al., 2008).

Outro agente causador de infecção é a bactéria *Staphylococcus aureus*, que apresenta-se como microrganismo patogênico clássico sendo comumente reconhecido como agente etiológico de infecções hospitalares e comunitárias (SILVA et al., 2010). Cerca de 50 a 87% das infecções hospitalares tem *Staphylococcus* como agente responsável, sendo que em 16 a 43% dos casos os pacientes evoluem para óbito em função do amplo espectro de resistências desses microrganismos aos antimicrobianos (METAM et al., 2005).

Dentre as principais bactérias esporuladas, o gênero *Bacillus* é um dos mais resistentes ao calor e de importância na microbiologia alimentar. Nas espécies do gênero *Bacillus*, uma das mais importantes na indústria de alimentos é a *Bacillus cereus*, tendo em vista sua capacidade de produzir toxinas, responsáveis por toxinfecções alimentares, enzimas extracelulares, que determinam o potencial de deterioração, e esporos, que podem resistir às adversidades do meio ambiente (RODRIGUES et al., 2003).

No Brasil, Estado de São Paulo, no Município de Ibiúna, Soto e colaboradores (2005) descreveram intoxicação alimentar em 120 operários de uma empreiteira cujo microorganismo responsável foi o *Bacillus cereus*, representando prejuízo para a saúde pública e para a empresa pelos dias de trabalho perdidos pelos funcionários.

A diarreia infecciosa aguda é a segunda causa de morte em escala global, superada pela cardiovascular. A grande perda hidroeletrolítica que ocorre em pouco tempo, pode causar desidratação, acidose e hipopotassemia, sendo capaz de desencadear insuficiência renal aguda. Vírus, bactérias e parasitas são normalmente os responsáveis, mas estudos mostraram que as bactérias foram os patógenos mais frequentes de diarreias agudas em crianças, com alta predominância de *Escherichia coli*. A ocorrência de diarreia persistente, em doentes de AIDS é de 95% e as causas se relacionam à própria infecção pelo vírus (MINCIS et al, 2008).

As infecções fúngicas também são uma das principais causas de mortalidade, principalmente em indivíduos imunossuprimidos. A infecção por *Candida* é a causa mais comum de doença do esôfago em pacientes com HIV (MINCIS et al, 2008).

Estima-se que aproximadamente 75% das mulheres apresentem pelo menos um episódio de candidíase vaginal, causado pelo fungo *Candida albicans*, onde 40 a 50% vivenciam novos surtos e 5% tornam-se recorrentes (ALVES, et al., 2010).

A grande incidência de doenças infecciosas, e a resistência de microrganismos patogênicos a múltiplas drogas tem aumentado devido ao uso indiscriminado de antibióticos em atual uso clínico. Isto exige uma contínua e indispensável busca por novos compostos antimicrobianos, com diferentes estruturas químicas e mecanismos de ação (ROJAS et al., 2003). Os produtos de origem vegetal surgem como uma alternativa promissora, uma vez que cerca de 70% dos novos antibióticos aprovados entre 1981 e 2002 pelo FDA (*Food and drug Administration*) eram de origem natural e as plantas constituem uma excelente fonte de substâncias para novas drogas antimicrobianas, tendo em vista que a diversidade molecular dos produtos naturais é muito superior àquela derivada dos processos de síntese química (NOVAIS et al., 2003; MURARI, 2007).

Portanto, é relevante o estudo de extratos e substâncias isoladas de raízes de *M. imbricata* na descoberta de alternativas menos agressivas para o controle de microorganismos que causam a deterioração dos alimentos e/ou são patogênicas para o homem. Esta planta pertence a um gênero que é usado na medicina popular no combate às várias infecções.

2.2.2 – Teste antimicrobiano

O teste foi realizado no Laboratório Biotecnologia e Bioensaios, no Departamento de Química da Universidade Federal de Minas Gerais, sob a orientação da Professora Dr^a Jacqueline Aparecida Takahashi.

As culturas de micro-organismos utilizadas neste experimento foram: duas bactérias *Gram*-negativas: *Salmonella typhimurium* ATCC 13311 e *Escherichia coli* ATCC 25723, duas bactérias *Gram*-positivas: *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 e *Bacillus cereus* ATCC 11778 e um fungo, leveduriforme: *Candida albicans* ATCC 18804, (Figura 65).

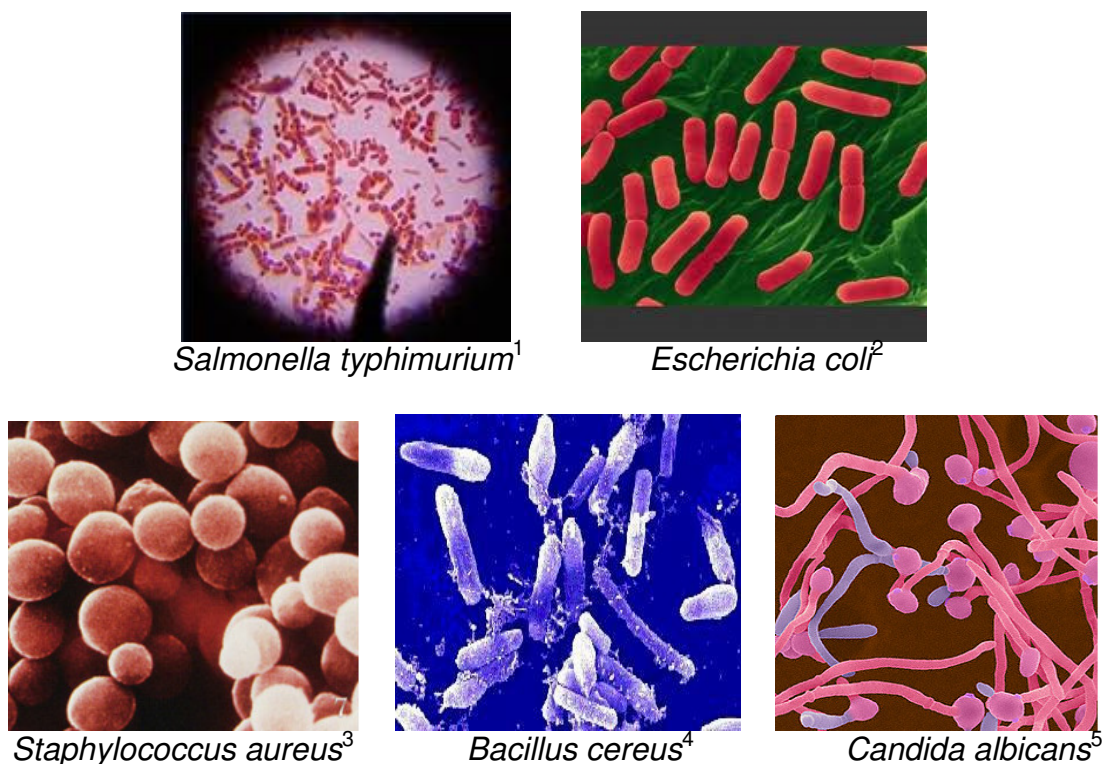


Figura 65: Fotos dos microorganismos avaliados.

Fonte:, acesso: 13/03/2011

¹ <http://www.ehow.com/salmonella-typhimurium/>

² <http://pathmicro.med.sc.edu/fox/enterobact.htm>

³ <http://www.textbookofbacteriology.net/staph.html>

⁴ <http://www.frilabo.pt/fcms/index.php?option=content&task=view&id=595>

⁵ <http://pathmicro.med.sc.edu/mycology/mycology-3.htm>

2.2.3 – 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 inoculada 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 (ZACCHINO e GUPTA, 2007).

2.2.3.1 – Metodologia

O sólido e o filtrado do extrato hexano/éter etílico (**SEH e FSEH**), o sólido e o filtrado do extrato acetato de etila (**SEAT e FSEAT**), o sólido do extrato metanólico (**SEM**), três substâncias isoladas a partir do SEH e FSEH: 11 α -hidroxilup-20(29)-en-3-ona (**M1**), tingenona (**M2**) e 6-oxo-tingenol (**M3**), e uma mistura de triterpenos isolada a partir de SEH: 11 α -hidroxilup-20(29)-en-3-ona e 30-hidroxilup-20(29)-en-3-ona (**M1 + M5**) (Tabela 34, pág. 107) foram testados contra *Salmonella typhimurium*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus* e *Candida albicans* pelo método CIM.

As bactérias e a levedura foram mantidas em meio de BHI (*Broth Heart Infusion*), sob refrigeração a 7 °C. Uma triagem inicial foi realizada em placas de poliestireno com todas amostras (em duplicata), utilizando uma concentração de 100 µg/mL (em DMSO). Para as amostras que apresentaram atividade na etapa de triagem, foi realizado o teste pelo método de CIM utilizando as concentrações 250; 125; 62,5; 31,3; 15,6; 7,81; 3,91; 1,95; 0,98; 0,49; 0,24 e 0,12 µg/mL, totalizando 12 concentrações diferentes, solubilizadas de acordo com os solventes apresentados na Tabela 34, pág. 107, e água. Os experimentos foram realizados de acordo com Zacchino e Gupta (2007). Os testes foram realizados em microdiluição e em duplicata. Para as bactérias, o controle positivo utilizado foi o cloranfenicol (MIC₅₀ = 0,24 µg/mL e MIC₉₀ = 15,6 µg/mL) e para a levedura utilizou-se o miconazol (MIC₅₀ = 3,32 µg/mL e MIC₉₀ = 600,48 µg/mL). Os inóculos das bactérias e do fungo continham 4,16 x10³ células/mL, e observa-se que quanto maior o crescimento destes micro-organismos, maior a turbidez do meio. A leitura é feita após 24 horas

da montagem do experimento, em leitora de microplaca TP-reader (Thermoplate, Brasil). A toxicidade dos solventes utilizados para solubilizar as amostras, a cor da amostra e alguma possível contaminação foram descontados a partir de uma fórmula matemática que permite eliminar estes possíveis erros.

Tabela 34: Amostras utilizadas no teste antimicrobiano

Amostra	Composto	Solubilidade
M1	11 α -hidroxilup-20(29)-en-3-ona	CHCl ₃
M2	tingenona	CHCl ₃
M3	6-oxo-tingenol	CHCl ₃
M1 + M5	11 α -hidroxilup-20(29)-en-3-ona + 30-hidroxilup-20(29)-en-3-ona	CHCl ₃
SEH	sólido do extrato em hexano/éter etílico	CHCl ₃
FSEH	filtrado do extrato em hexano/éter etílico	CHCl ₃
SEAT	sólido do extrato em acetato de etila	Acetona
FSEAT	filtrado do extrato em acetato de etila	Acetona
SEM	sólido do extrato em metanol	MeOH

O grau de resistência ou sensibilidade das bactérias e da levedura frente às amostras testadas foi determinado pela presença ou ausência de inibição. Os resultados encontrados para as amostras testadas, estão apresentados na forma de Tabelas, (Tabelas A1 a A15, pág. 156 e 170) e Gráficos, (Figuras 66 a 75, pág. 108 a 117). Como os testes foram realizados em duplicata, os resultados apresentados mostram os dois valores de % de inibição, a média destes e desvio padrão, em diferentes concentrações das amostras.

2.2.4 – Análise dos Resultados e Discussão

As Figuras 66 e 67 apresentam os resultados do teste realizado contra a bactéria *Salmonella typhimurium* para as amostras avaliadas.

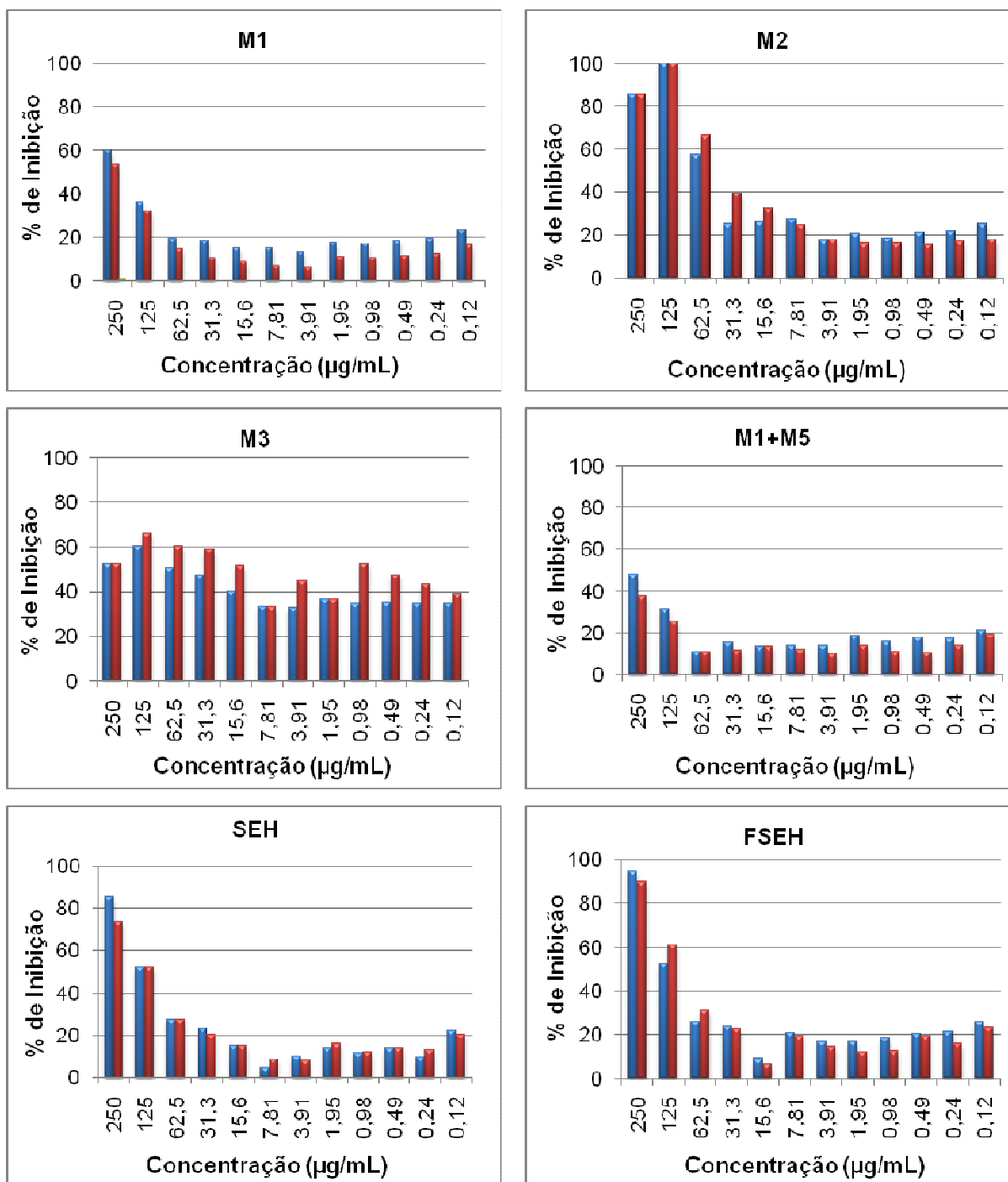


Figura 66: Gráficos das concentrações de 250-0,12 µg/mL das amostras **M1**, **M2**, **M3**, **M1 + M5**, **SEH** e **FSEH** e a % de inibição sobre *Salmonella typhimurium*.

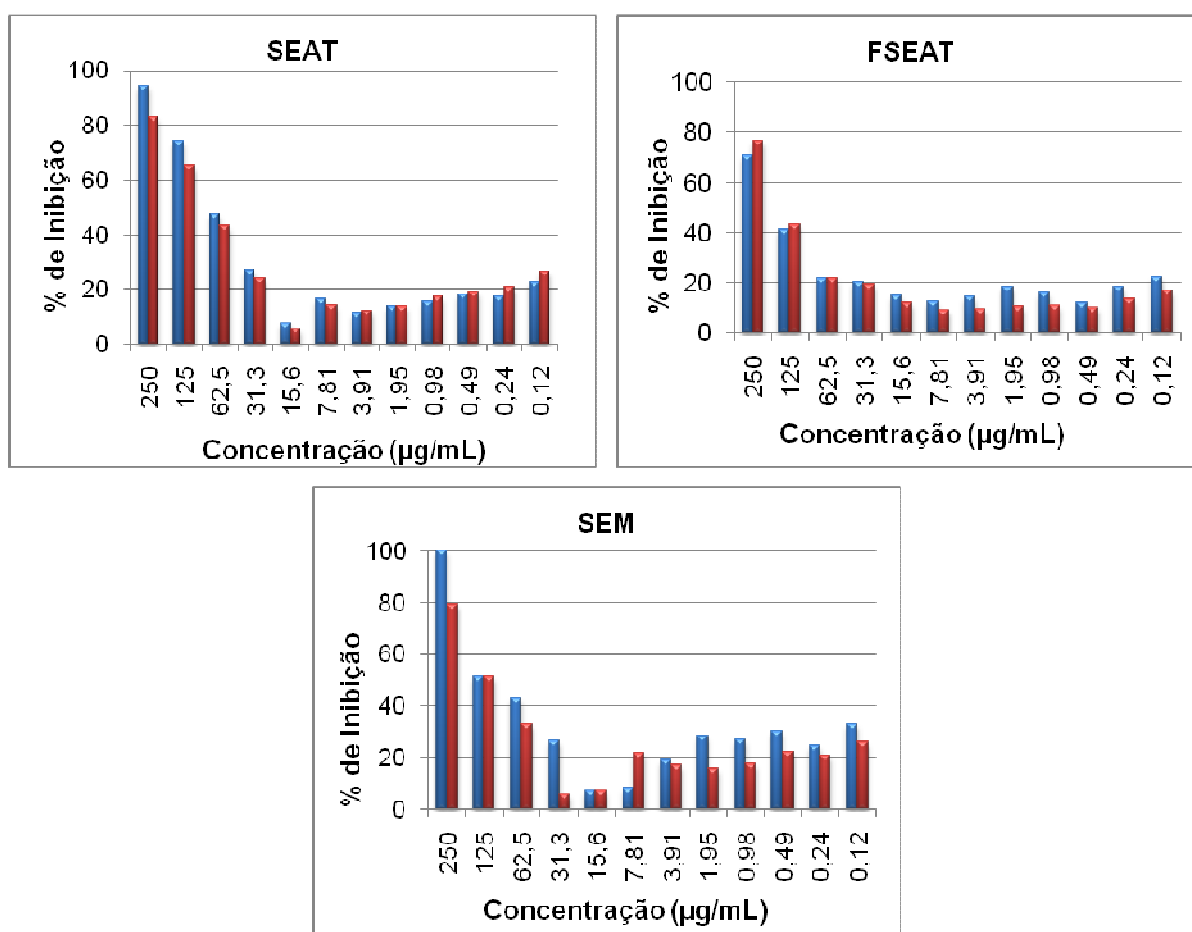


Figura 67: Gráficos das concentrações de 250-0,12 µg/mL das amostras **SEAT**, **FSEAT** e **SEM** e a % de inibição sobre *Salmonella typhimurium*.

Como observado na Figura 66, pág. 108, a amostra **M1** apresentou CIM₅₀ apenas na concentração de 250 µg/mL (Tabela 35, pág. 118), em menores concentrações não foram encontradas inibições consideráveis. Já a amostra **M2** apresentou alta inibição na concentração de 125 µg/mL, com 100% de inibição dos indivíduos e CIM₅₀ 62,5 µg/mL (Tabela 35, pág. 118) quando testadas frente a *Salmonella typhimurium*.

Na Figura 66, pág. 108, observa-se que **M3** não apresentou diferenças significativas de inibição nas várias concentrações, mas foi possível encontrar CIM₅₀ (31,3 µg/mL) (Tabela 35, pág. 118), portanto se apresentou ativo frente a *S. typhimurium*.

A mistura de triterpenos (**M1** + **M5**) não apresentou CIM₅₀ e quando uma substância desta mistura foi testada na sua forma pura (**M1**) obteve-se inibição

parecida com a mistura para cada concentração, mas **M1** apresentou CIM₅₀ de 250 µg/mL (Tabela 35, pág. 118).

Os extratos **SEH**, **FSEH**, **SEAT**, **FSEAT** e **SEM**, apresentaram alta inibição sobre *Salmonella typhimurium* de aproximadamente 70-90% na concentração de 250 µg/mL. A amostra **SEH**, **FSEH**, **SEAT** e **SEM** apresentaram CIM₅₀ de 125 µg/mL e **FSEAT** de 250 µg/mL. Portanto, estes extratos se mostraram muito ativos frente a este microorganismo (Figuras 66 e 67, pág. 108 e 109).

As Figuras 68 e 69 apresentam os resultados do teste frente a *Escherichia coli* para as amostras avaliadas.

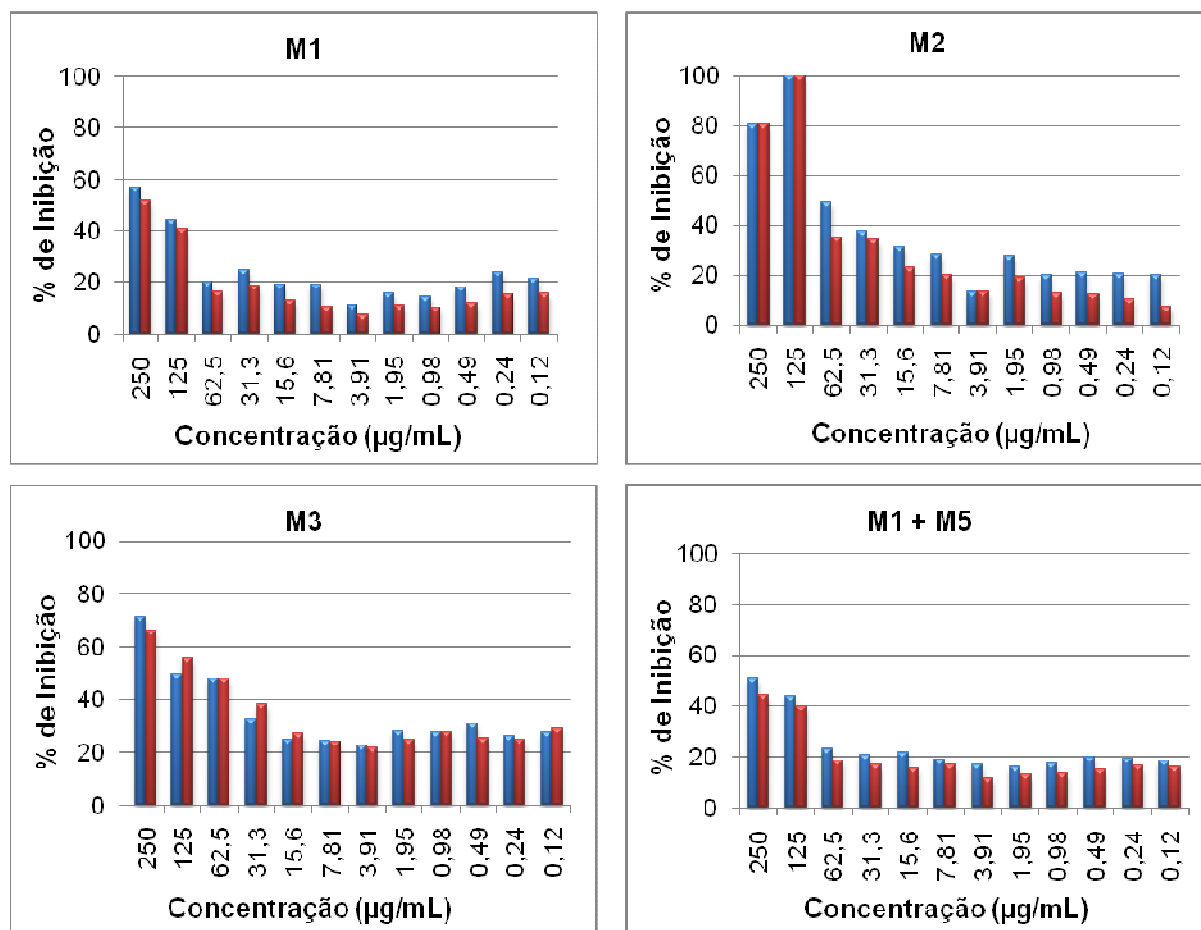


Figura 68: Gráfico das concentrações de 250-0,12 µg/mL da amostra **M1**, **M2**, **M3** e **M1 + M5** e a % de inibição sobre *Escherichia coli*.

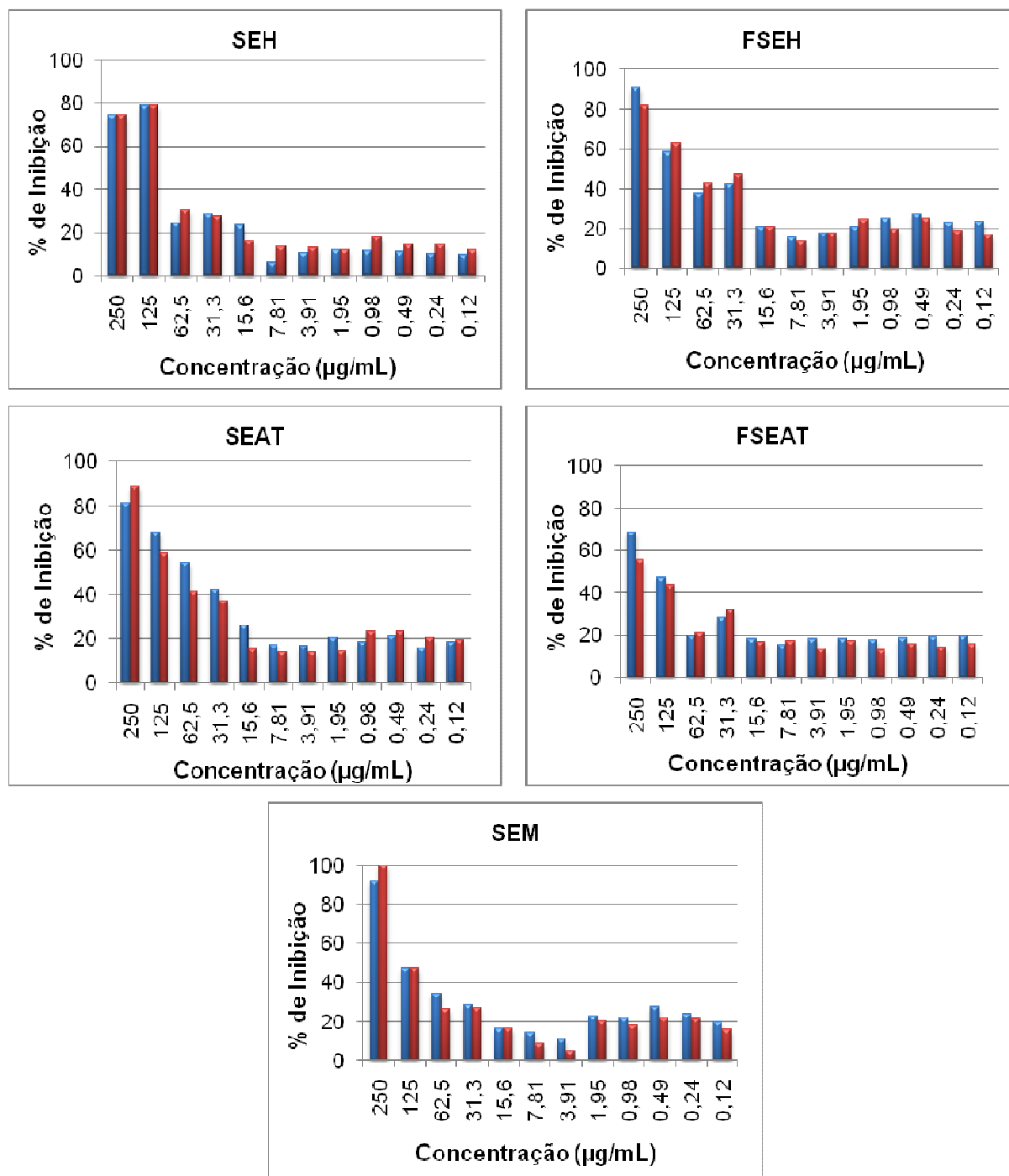


Figura 69: Gráfico das concentrações de 250-0,12 µg/mL das amostras **SEH**, **FSEH**, **SEAT**, **FSEAT** e **SEM** e a % de inibição sobre *Escherichia coli*.

Pode-se observar que **M2** apresentou 100% de inibição sobre *Escherichia coli*, na concentração de 125 µg/mL (Figura 68, pág. 110) e **SEM** 90% na concentração de 250 µg/mL (CIM₉₀), portanto, estas amostras se mostraram muito ativas frente a *E. coli*.

Na Tabela 35, pág. 118, pode-se observar que **M2**, **M3**, **SEH**, **FSEH** e **SEAT** apresentaram mesma atividade inibitória na concentração que inibe 50% dos indivíduos (125 µg/mL).

As concentrações abaixo de 125 µg/mL da mistura de triterpenos (**M1** + **M5**) foram parecidas com a da substância **M1**, mas se diferem na concentração de 250 µg/mL, onde **M1** inibi 50% dos indivíduos, e a mistura não apresentou MIC₅₀, indicando que a substância pura nesta concentração é mais ativa do que a mistura (Figura 68, pág. 110).

As Figuras 70 e 71 apresentam os resultados do teste frente a *Staphylococcus aureus* das amostras avaliadas.

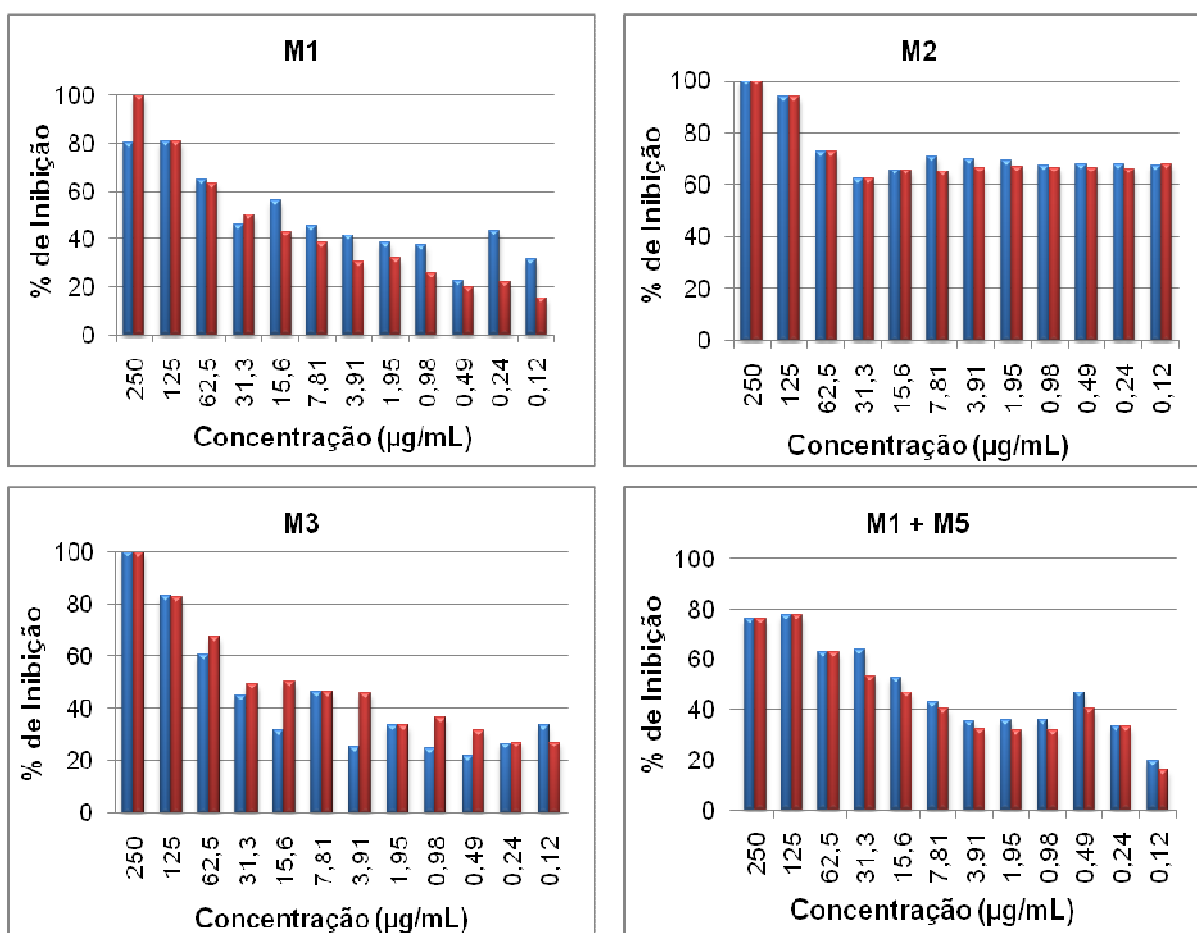


Figura 70: Gráfico das concentrações de 250-0,12 µg/mL das amostras **M1**, **M2**, **M3** e **M1 + M5** e a % de inibição sobre *Staphylococcus aureus*.

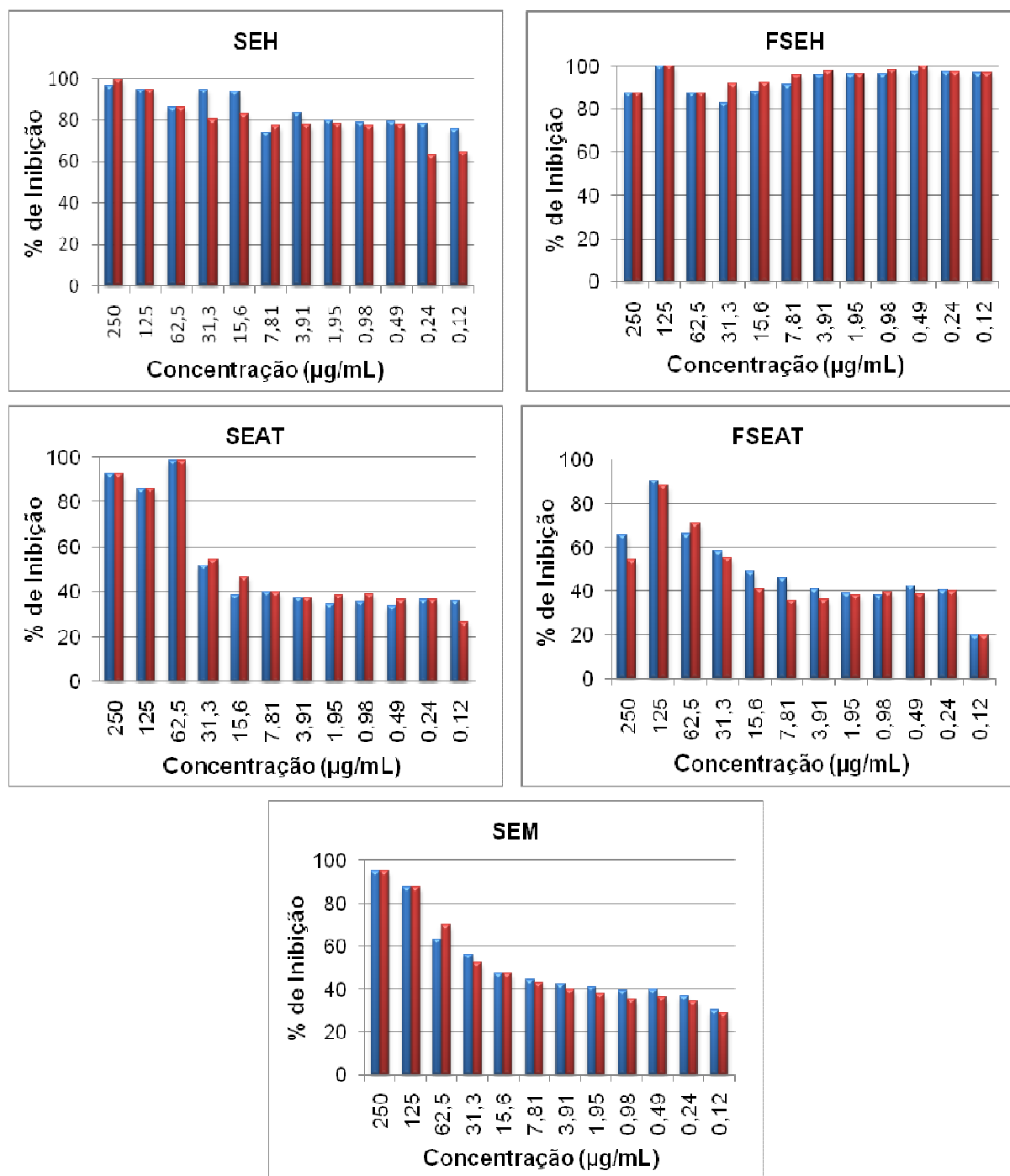


Figura 71: Gráfico das concentrações de 250-0,12 µg/mL das amostras **SEH**, **FSEH**, **SEAT**, **FSEAT** e **SEM** e a % de inibição sobre *Staphylococcus aureus*.

Foi observado, nas Figuras 70 e 71, pág. 112 e 113, alta atividade sobre *Staphylococcus aureus* em todas concentrações testadas para o extrato **SEH**, com 70-100% de inibição e **FSEH** com 80-100% de inibição. Pode-se observar também que **M2** e **M3** apresentaram 100% de inibição na concentração de 250 µg/mL,

podendo inferir que os extratos e essas substâncias são muito potentes frente a *S. aureus*.

Observa-se que **M1** apresentou maior atividade inibitória que a mistura de triterpenos (**M1** + **M5**), com CIM₉₀ de 250 µg/mL para **M1**, já a mistura não obteve uma concentração que inibisse 90% de *S. aureus*, apesar da CIM₅₀ de **M1** (62,5 µg/mL) ter sido maior que da mistura (31,3 µg/mL) (Tabelas 35 e 36, pág. 118 e 120).

As Figuras 72 e 73 apresentam os resultados do teste frente a *Bacillus cereus* das amostras avaliadas.

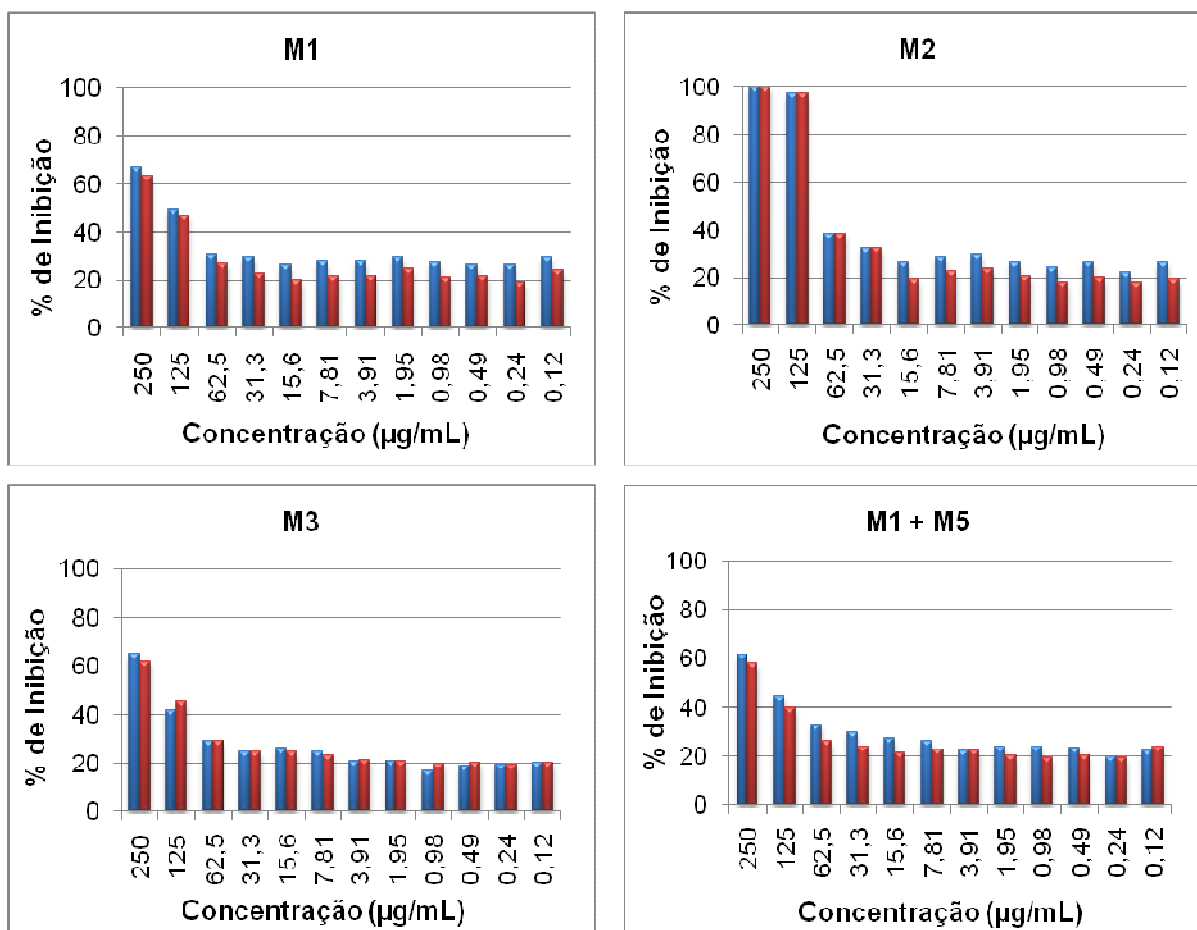


Figura 72: Gráfico das concentrações de 250-0,12 µg/mL das amostras **M1**, **M2**, **M3**, e **M1** + **M5** e a % de inibição sobre *Bacillus cereus*.

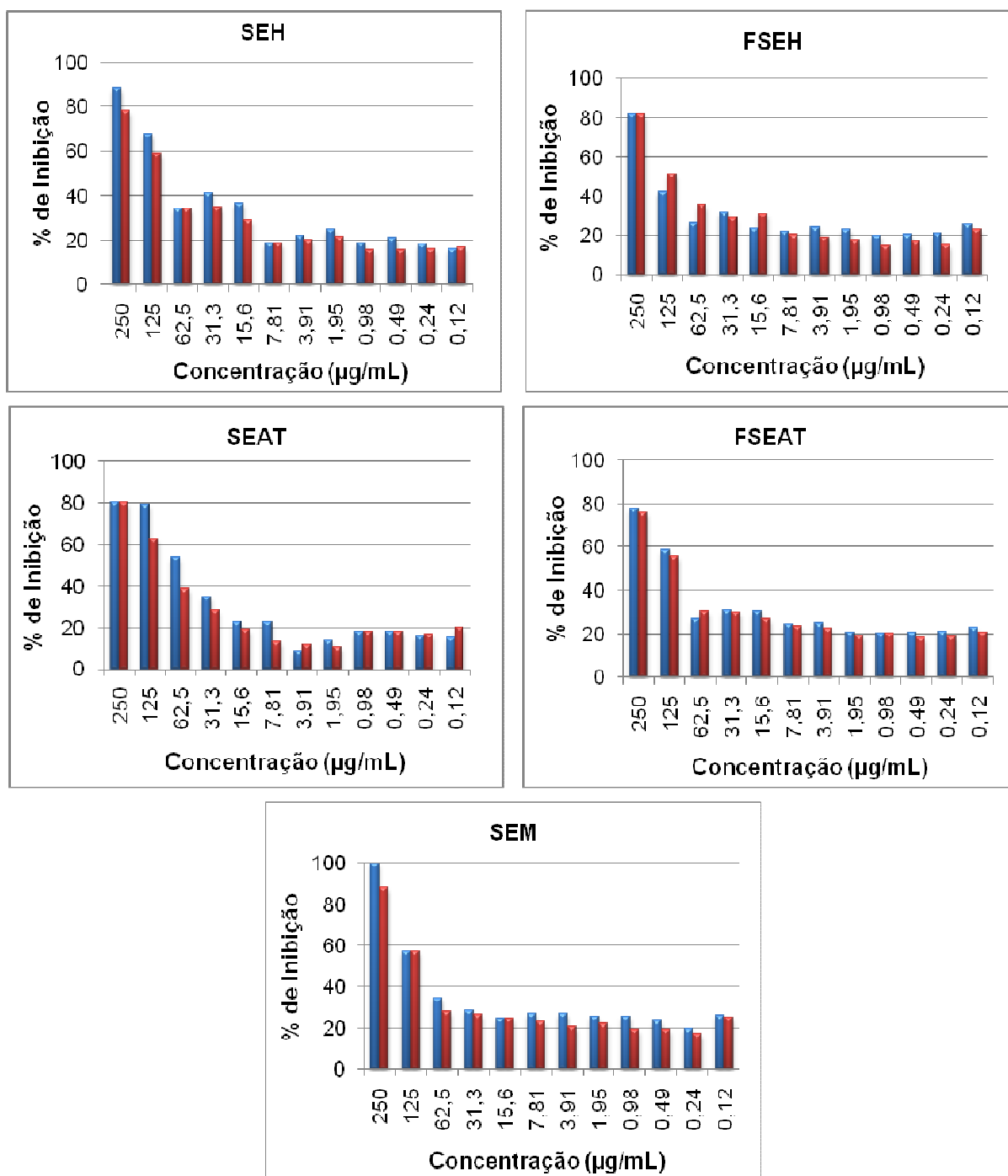


Figura 73: Gráfico das concentrações de 250-0,12 µg/mL das amostras **SEH**, **FSEH**, **SEAT**, **FSEAT** e **SEM** e a % de inibição sobre *Bacillus cereus*.

Na Figura 72, pág. 114, pode-se observar que **M2** apresentou 100% de inibição na concentração de 250 µg/mL, mostrando assim alta atividade dessa substância frente a *Bacillus cereus*.

Pela Tabela 36, pág. 120, e pelas Figuras 72 e 73, podemos observar que **M2** e o extrato **SEM** foram os mais ativos, por serem os únicos a apresentar CIM₉₀,

125 µg/mL e 250 µg/mL, respectivamente. **SEH**, **SEAT**, **FSEAT** e **SEM** foram eficientes também contra essa bactéria na inibição de 50% dos indivíduos (CIM_{50} de 125 µg/mL). Já **M1**, **M3** e **M1 + M5** e **FSEH** foram os menos ativos, apesar de ter apresentado CIM_{50} (250 µg/mL).

As Figuras 74 e 75 apresentam os resultados do teste frente a *Candida albicans* das amostras avaliadas.

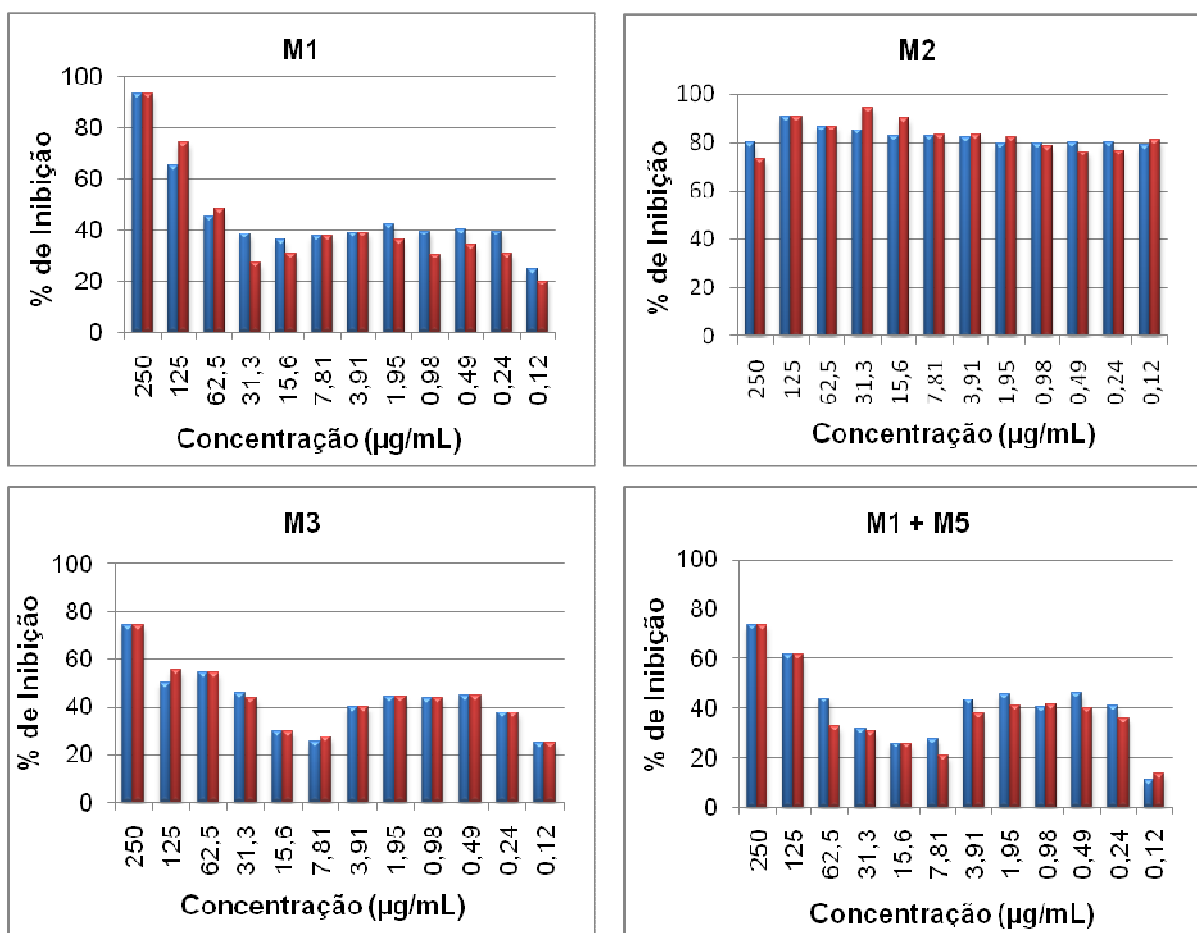


Figura 74: Gráfico das concentrações de 250-0,12 µg/mL das amostras **M1**, **M2**, **M3**, e **M1 + M5** e a % de inibição sobre *Candida albicans*.

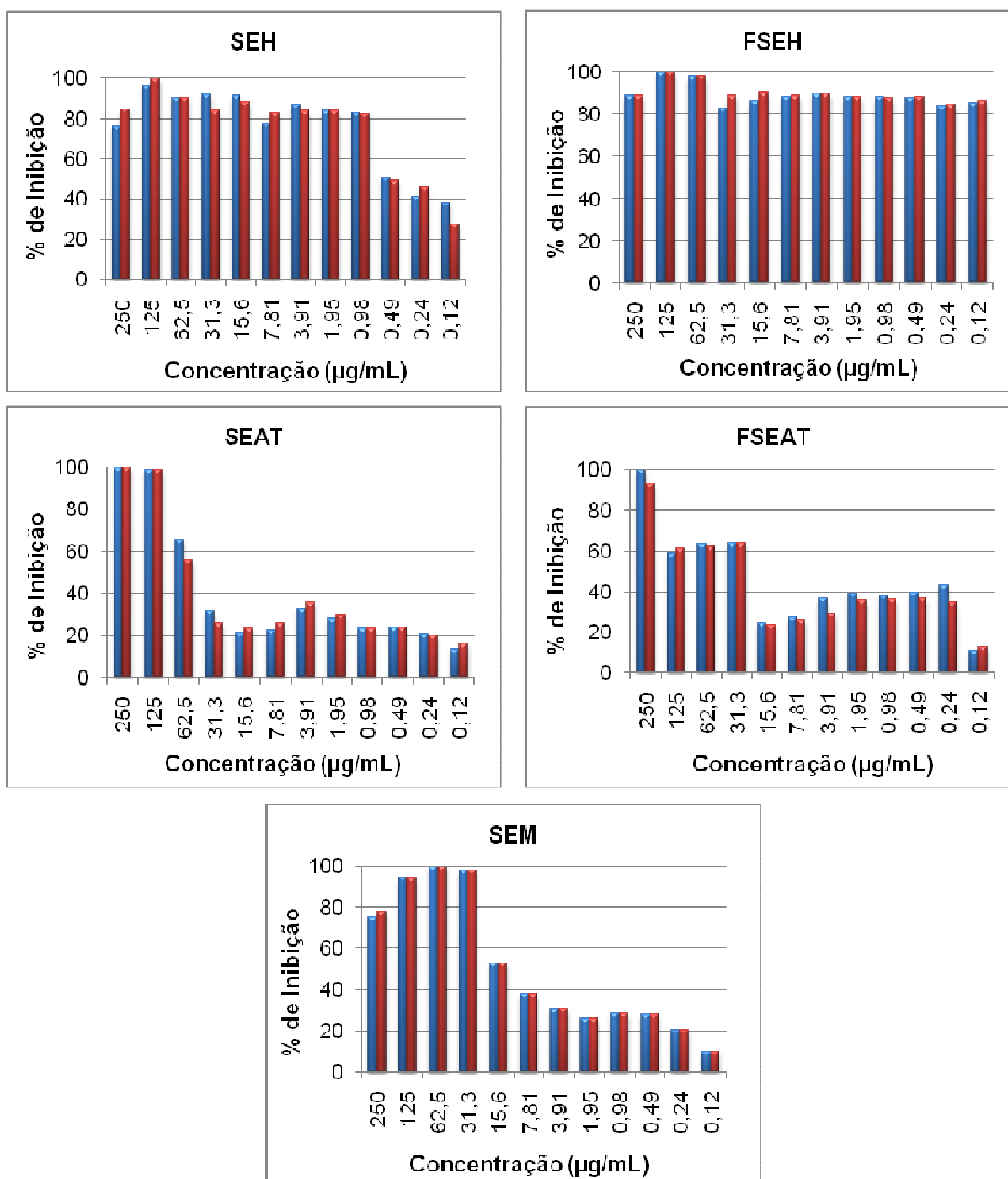


Figura 75: Gráfico das concentrações de 250-0,12 µg/mL das amostras **SEH**, **FSEH**, **SEAT**, **FSEAT** e **SEM** e a % de inibição sobre *Candida albicans*.

Pelos dados da Figura 74, pág. 116, é possível observar que **M1** e a mistura (**M1** + **M5**) apresentam proporções parecidas de inibição para cada concentração, apresentando mesmo CIM₅₀ (125 µg/mL) (Tabela 35, pág. 118). Mas na maior concentração **M1** inibiu 90% de *Candida albicans* (CIM₉₀ = 250 µg/mL) (Tabela 36, pág. 120), já a mistura não apresentou uma concentração que inibisse 90%, sendo

menos ativa em mistura, podendo supor que a outra substância (**M5**) não é ativa ou é pouco ativa.

Observa-se, pelas Figuras 74 e 75, pág. 116 e 117, que *C. albicans* mostrou-se o microorganismo mais sensível. Os extratos **SEH** e **FSEH**, e a substância **M2** isolada a partir de ambos, se mostraram altamente ativos, pois em praticamente todas as concentrações testadas apresentaram alta inibição deste fungo, mas os extratos **SEM** e **SEAT** se apresentaram mais ativos frente a este fungo, com 100% de inibição na concentração de 62,5 e 250 µg/mL, respectivamente.

A partir dos dados das Tabelas A1 a A15, pág. 156 a 170, em anexo, e Figuras 66 a 75, pág. 108 a 117, foram construídas as Tabelas 35 e 36, pág. 118 e 120, onde podemos observar CIM₅₀ e CIM₉₀, que representa a concentração mínima das amostras para a inibição de 50% e 90% dos indivíduos, respectivamente.

Tabela 35: Concentração inibitória mínima-CIM₅₀ das amostras frente aos cinco micro-organismos

Amostras	Concentração inibitória mínima-CIM ₅₀ (µg/mL)				
	<i>S. typhimurium</i>	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>	<i>B. cereus</i>	<i>C. albicans</i>
M1	250	250	62,5	250	125
M2	62,5	125	0,12	125	0,12
M3	31,3	125	62,5	250	62,5
M1 + M5	ND	ND	31,3	250	125
SEH	125	125	0,12	125	0,49
FSEH	125	125	0,12	250	0,12
SEAT	125	125	31,3	125	62,5
FSEAT	250	250	31,3	125	31,3
SEM	125	250	31,3	125	15,6

ND (não detectado)

Na Tabela 35, podemos observar que todas as amostras apresentaram CIM₅₀ na faixa de concentração utilizada, exceto a mistura de triterpenos (**M1 + M5**) sobre *S. typhimurium* e *E. coli*. Esta mistura apresentou menor atividade que a substância pura (**M1**), porém, como M5 não foi testada separadamente, não se pode inferir que

ocorreu antagonismo ou sinergismo, mas apenas que a outra amostra pode não ser ativa.

Observamos a alta atividade apresentada pelos extratos **SEH** e **FSEH** e pela substância **M2**, isolada de ambos, sobre *S. aureus*. **FSEH** e **M2** apresentaram alta inibição frente a *C. albicans*, pois como observa-se na menor concentração utilizada (0,12 µg/mL) obteve-se uma inibição maior que 50% de indivíduos.

Segundo Bedout e colaboradores (2003), o fluconazol, um fármaco utilizado comercialmente como antifúngico foi testado sobre *C. albicans* e apresentou CIM₅₀ de 1,1 µg/mL, sendo portanto, menos eficiente que as amostras **SEH**, **FSEH** e **M2**.

A azitromicina, um antibiótico com comprovada resistência a *Staphylococcus* spp, foi testada sobre *S. aureus* e apresentou CIM₅₀ de 4,0 µg/mL. Observa-se que este antibiótico possui atividade ainda menor do que foi apresentado para as amostras **SEH**, **FSEH** e **M2** (PEREIRA et al., 2009).

Estevam e colaboradores (2009) realizaram testes antimicrobianos com extratos da entrecasca de *Maytenus rigida* sobre *E. coli* e *S. aureus* e foi observado semelhanças e diferenças nos extratos comparando-os aos extratos de *M. imbricata*. O extrato em acetato de etila apresentou atividade semelhante a amostra **FSEAT**, mas a fração hexânica de *M. rigida* não exibiu qualquer atividade, diferentemente das amostras **SEH** e **FSEH**, que apresentaram alta atividade.

De acordo com Voss-Rech e colaboradores (2011) extratos de folhas de *Maytenus ilicifolia* não foram ativas contra *Salmonella* sp., já os extratos de raízes de *M. imbricata*, **SEH**, **FSEH**, **SEAT**, **FSEAT** e **SEM** foram ativos frente a este microorganismo, bem como as substâncias **M1**, **M2** e **M3**.

Muitos trabalhos realizados com substâncias e extratos de plantas frente a bactérias e fungos fazem análise de CIM, ou seja, concentração inibitória de 100% dos indivíduos testados, porém, inibir 100% pode indicar toxicidade ou ausência de seletividade. Utilizando o valor de CIM₉₀, é possível a comparação dessas concentrações realizadas com as amostras de raízes de *M. imbricata* com substâncias e extratos isolados de outras espécies do gênero *Maytenus*, que não obtiveram CIM₉₀, mas obtiveram CIM.

Tabela 36: Concentração inibitória mínima-CIM₉₀ das amostras frente aos cinco micro-organismos

Amostras	Concentração inibitória mínima-CIM ₉₀ (µg/mL)				
	<i>S. typhimurium</i>	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>	<i>B. cereus</i>	<i>C. albicans</i>
M1	ND	ND	250	ND	250
M2	125	125	125	125	125
M3	ND	ND	250	ND	ND
M1 + M5	ND	ND	ND	ND	ND
SEH	ND	ND	125	ND	62,5
FSEH	250	ND	0,12	ND	62,5
SEAT	ND	ND	250	ND	125
FSEAT	ND	ND	ND	ND	250
SEM	ND	250	250	250	31,3

ND (não detectado)

Pela Tabela 36, podemos observar que as amostras que se destacaram por apresentarem alta atividade foram **FSEH**, sobre *S. aureus* e **SEM** sobre *C. albicans*, com CIM₉₀ de 0,12-15,6 µg/mL e 31,3-125 µg/mL, respectivamente.

De acordo com França e colaboradores (2009) a vancomicina é o medicamento de primeira escolha no tratamento de infecções causadas por *S. aureus* e este é um dos principais patógenos hospitalares e responsável pelas mortes por infecção hospitalar. Em seu trabalho eles encontraram uma CIM de 1,5 µg/mL da vancomicina sobre esta bactéria, ou seja, um valor próximo ao encontrado para **FSEH** com CIM₉₀ entre 0,12-15,6 µg/mL. Apesar desta inibição ser de 90%, observa-se uma boa comparação.

Jain e colaboradores (2008), em seus estudos, testaram extrato etanólico preparado a partir de raízes de *Maytenus senegalensis* e testaram também a neomicina, um antibiótico de uso clínico, sobre *S. aureus*. Obtiveram CIM de 1250 µg/mL para o extrato e consideraram esta atividade alta. Apesar de ser concentração inibitória de 100% dos indivíduos, essa concentração é muito maior que a CIM₉₀ das amostras: **M1**, **M2**, **M3**, **SEH**, **FSEH**, **SEAT** e **SEM**. Para o antibiótico, padrão utilizado, foi encontrado CIM de 190 µg/mL, um valor muito baixo, mas ainda foi mais alto que a CIM₉₀ das amostras: **M2**, **SEH** e **FSEH**, quando testados sobre *S. aureus*, mostrando o alto potencial dos extratos e substâncias das raízes de *M. imbricata* frente a este microorganismo.

Cabral e colaboradores (2009) realizaram testes por um método parecido com o método realizado neste trabalho (em meio de BHI), utilizando extrato etanólico de própolis sobre *S. aureus* e concluiu alta atividade antibacteriana com CIM entre 62,5-125 µg/mL. Encontramos valores parecidos de CIM₉₀ nas amostras de **M2**, **SEH**, **FSEH** e **SEAT**.

Em especial, as atividades das amostras sobre *Candida albicans*, se mostraram muito altas. Como já foi observado, **M2** (Figura 74, pág. 116) inibiu essa levedura em aproximadamente 80% em todas as concentrações testadas e pela Tabela 36, pág. 120 observa-se a alta atividade desta substância, por apresentar uma CIM₅₀ bem menor que 0,12 µg/mL.

O extrato **SEH** inibiu em aproximadamente 80% até a concentração de 0,98 µg/mL (Figura 75, pág. 117) e foi observado uma CIM₉₀ de 125 µg/mL (Tabela 36, pág. 120) e CIM₅₀ de 0,49 µg/mL (Tabela 35, pág. 118). **FSEH** inibiu em aproximadamente 90% em todas concentrações (Figura 75, pág. 117) obtendo assim, CIM₉₀ até na menor concentração (0,12 µg/mL) e para encontrar uma CIM₅₀ seria necessário utilizar uma concentração bem menor que 0,12 µg/mL, evidenciando uma grande eficiência destes dois extratos como antifúngicos sobre *C. albicans*.

As amostras, em geral, apresentaram alta atividade antibacteriana e antifúngica, sobre os cinco microorganismos testados.

2.3 – Atividade de inibição da enzima acetilcolinesterase

2.3.1 – Introdução

A doença de Alzheimer é uma patologia neurodegenerativa, progressiva, que afeta principalmente a população idosa e seus sintomas envolvem a perda de memória, o déficit na linguagem, depressão, problemas de comportamento, inclusive agitação, alteração do humor e psicose (VIEGAS JR et al., 2004; BARBOSA FILHO et al., 2005; BARBOSA FILHO et al., 2006). De acordo com Eubanks e colaboradores (2006) os casos dessa doença podem triplicar nos próximos 50 anos.

As mudanças mais importantes observadas no cérebro de pacientes com doença de Alzheimer é a diminuição de diversos neurotransmissores cerebrais, como a acetilcolina, que tem papel muito importante na sinapse colinérgica (DI GIOVANNI et al., 2008).

Um dos caminhos utilizados no tratamento dessa doença consiste no aumento do nível de acetilcolina no cérebro usando inibidores de acetilcolinesterase, já que esta catalisa a hidrólise da acetilcolina, (ENZ et al., 1993; SCHNEIDER, 2001), como no Figura 76 (MIAO et al., 2010).

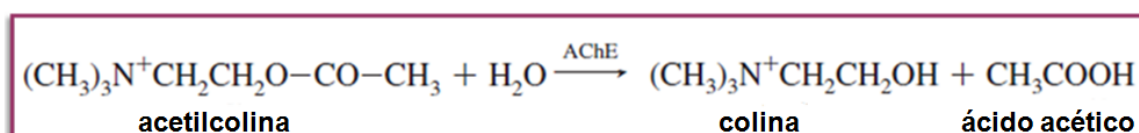


Figura 76: Hidrólise da acetilcolina em colina e ácido acético, catalisada pela enzima acetilcolinesterase (MIAO et al., 2010).

Vários inibidores da enzima acetilcolinesterase estão sendo investigados para o tratamento da Doença de Alzheimer, entretanto somente a tacrina, donezepil, rivastimina (Figura 77, pág. 123) e galantamina (Figura 79, pág. 127), moléculas que contém nitrogênio em sua composição, foram aprovadas pela *Food and Drug Administration* dos Estados Unidos. Estas substâncias apresentam valores altos no mercado e alguns provocam diversos efeitos colaterais, como hepatotoxicidade e desarranjo gastrointestinal (CAMPS et al., 2000; SCHNEIDER, 2001; ZAROTSKY et al., 2003).

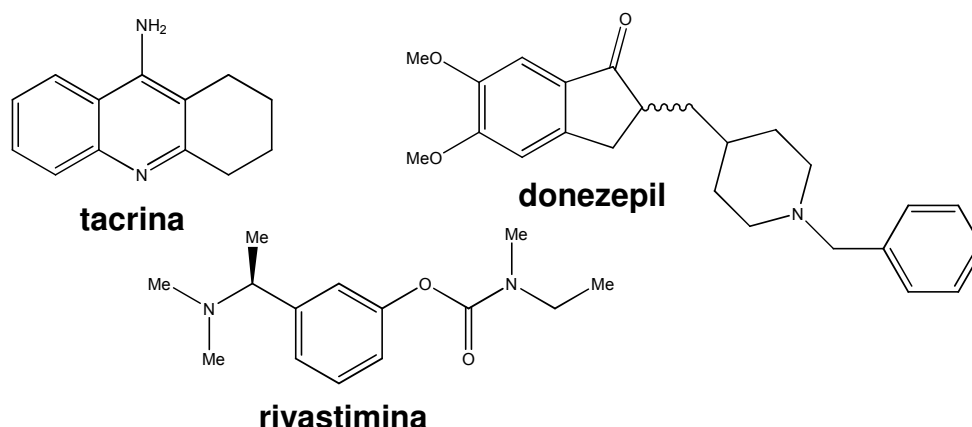


Figura 77: Exemplos representativos de fármacos usados no tratamento de mal de Alzheimer (BARBOSA FILHO et al., 2006).

Desde que essa doença, como uma comum causa de morte no mundo, se tornou uma ameaça para a saúde pública, estratégias de tratamento baseado nas plantas medicinais tem sido focalizada (HOWES et al., 2003; ORHAN et al., 2004).

Recentes estudos com extratos e substâncias isoladas de plantas de várias espécies brasileiras mostraram excelentes resultados como inibidores da enzima acetilcolinesterase (BARBOSA FILHO et al., 2006). Barbosa Filho e colaboradores (2006) fizeram um levantamento de substâncias isoladas de plantas com atividade inibidora da enzima acetilcolinesterase e encontraram 260 substâncias com esse potencial de diversas classes, como: alcaloide (139), monoterpenos (27), sesquiterpenos (5), diterpenos (8), triterpenos (17), cumarinas (18), flavonoides (14), benzenoides (13), heterocíclicos oxigenados (5), compostos sulfurosos (2), policíclicos (1), carotenoides (1) e outros.

Trevisan e colaboradores (2003) testaram extratos brutos de caule, casca, folha, raiz, talo, resina, semente e fruto de 58 plantas frente a enzima acetilcolinesterase e obtiveram bons resultados inibitórios.

Pelo exposto, torna-se evidente a necessidade de se explorar as espécies de plantas brasileiras, como fonte de fármacos potentes e seletivos e com baixo perfil de toxicidade, que permitam o controle da evolução da doença de Alzheimer.

2.3.2 – 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).

2.3.2.1 – Metodologia

O teste foi realizado no Laboratório Biotecnologia e Bioensaios, no Departamento de Química da Universidade Federal de Minas Gerais, sob a orientação da Professora Dr^a Jacqueline Aparecida Takahashi.

Utilizaram-se volumes de 100 μL (20 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) das amostras dissolvidas em solventes apropriados, de acordo com a Tabela 37, pág. 125.

Tabela 37: Amostras utilizadas no teste de inibição da enzima acetilcolinesterase

Amostra	Composto	Solubilidade
M1	11 α -hidroxilup-20(29)-en-3-ona	CHCl ₃
M2	tingenona	CHCl ₃
M3	6-oxo-tingenol	CHCl ₃
M1 + M5	11 α -hidroxilup-20(29)-en-3-ona + 30-hidroxilup-20(29)-en-3-ona	CHCl ₃
M6	3,7-dioxo-friedelano	CHCl ₃
M8	3-oxo-29-hidroxifriedelano	CHCl ₃
M9	3 β ,11 α -di-hidroxi-lup-20(29)-eno	CHCl ₃
SEH	sólido do extrato em hexano/éter etílico	CHCl ₃
FSEH	filtrado do extrato em hexano/éter etílico	CHCl ₃
SEAT	sólido do extrato em acetato de etila	Acetona
FSEAT	filtrado do extrato em acetato de etila	Acetona
SEM	sólido do extrato em metanol	MeOH

Os extratos foram aplicados sobre placas de sílica gel GF₂₅₄ (2,5 x 5,0 cm) e eluídos em Hex:CHCl₃ (1:9). Já as substâncias puras e a mistura não foram eluídas. 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 foi pulverizada nas cromatoplasas.

2.3.3 – Análise dos Resultados e Discussão

Observa-se pela Figura 78 que na ausência de inibidores da enzima, a reação da acetilcolinesterase com o acetato de naftila para a formação de um composto com a coloração púrpura se processa (MARSTON et al., 2002; MIAO, et al., 2010). O aparecimento de um halo branco indica a inibição da enzima (RHEE et al., 2001). O teste foi realizado em duplicata.

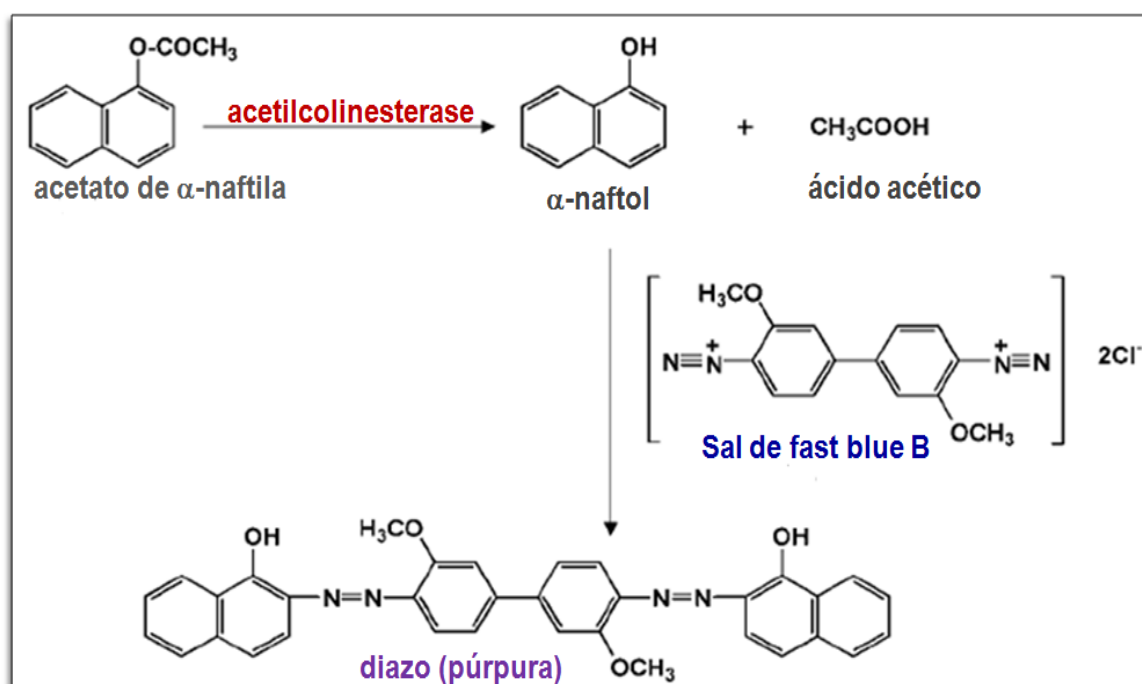


Figura 78. Reação da acetilcolinesterase com acetato de naftila e a formação do composto de coloração púrpura (Figura adaptada de MIAO, et al., 2010).

A atividade inibitória contra a enzima acetilcolinesterase foi avaliada por meio do método de bioautografia e testada para o sólido do extrato hexano/éter etílico (1:1) (**SEH**), o filtrado do extrato hexano/éter etílico (1:1) (**FSEH**), o sólido do extrato em acetato de etila (**SEAT**), o filtrado do extrato em acetato de etila (**FSEAT**), o sólido do extrato metanólico (**SEM**) e as substâncias **M1** (11 α -hidroxilup-20(29)-en-3-ona), **M2** (tingenona), **M3** (6-oxo-tingenol), **M1 + M5** (11 α -hidroxilup-20(29)-en-3-ona + 30-hidroxilup-20(29)-en-3-ona), **M6** (3,7-dioxo-friedelano), **M8** (3-oxo-29-hidroxifriedelano) e **M9** (3 β ,11 α -di-hidroxilup-20(29)-eno).

Pela Figura 79, observa-se halos de inibição para as amostras M1, M6 e M8 testadas frente à enzima acetilcolinesterase.

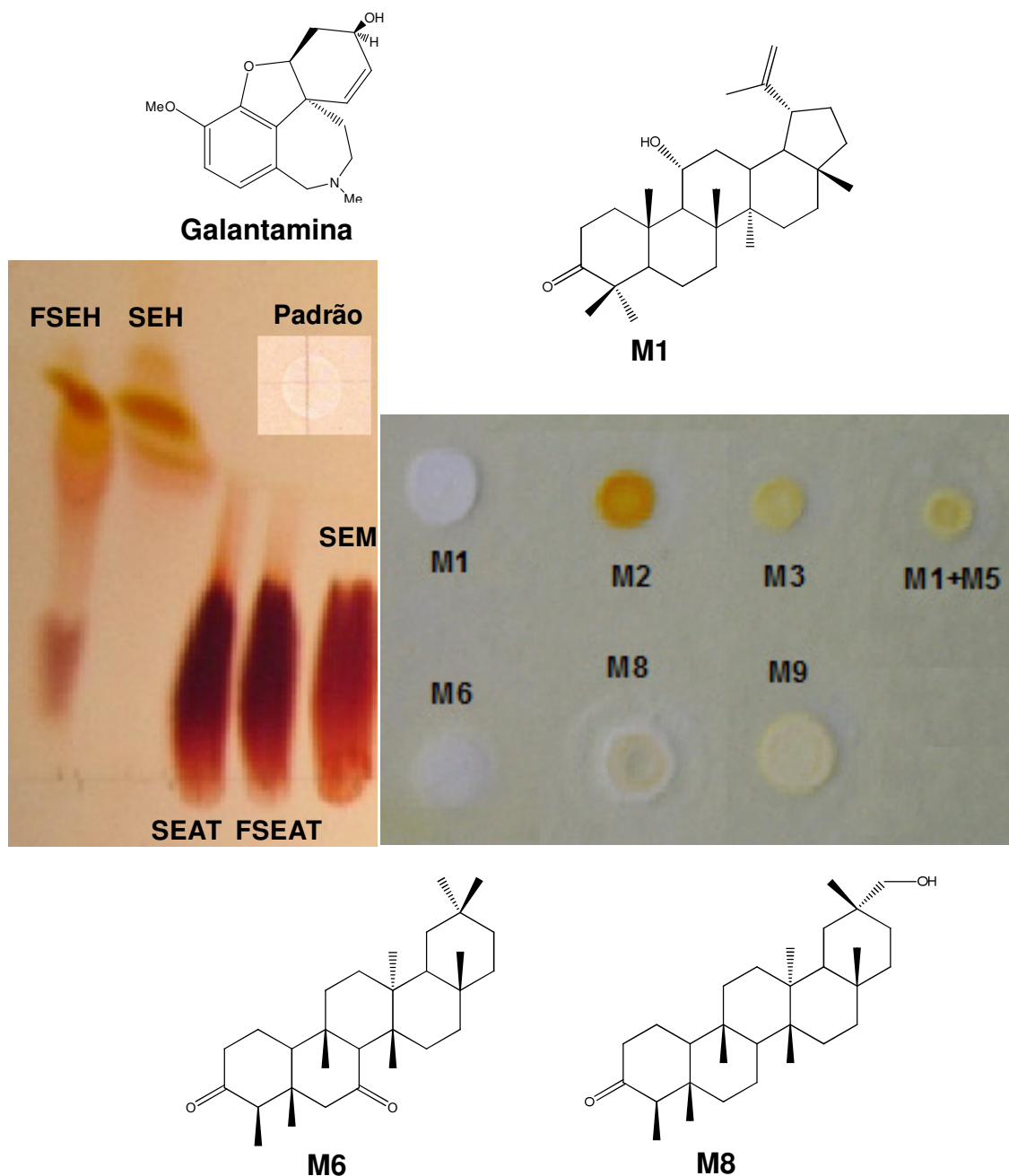


Figura 79: Bioautograma das amostras testadas e do padrão utilizado (Galantamina) e estrutura química desta (Foto dos extratos: William S. T. Sallum e das substâncias: autora).

De acordo com Barbosa Filho e colaboradores (2006), a maioria dos inibidores são conhecidos por conterem nitrogênio na sua estrutura. Apesar das substâncias testadas não conterem este elemento, as amostras **M1**, **M6** e **M8** apresentaram halo de inibição, indicando atividade frente a enzima acetilcolinesterase.

Estes resultados apresentam perspectivas para a realização de testes mais precisos para comprovar a atividade desta substância frente a doença de Alzheimer.

2.4 – Avaliação do potencial tóxico através da atividade larvicida sobre *Artemia salina*

2.4.1 – Introdução

A literatura relata que compostos com toxicidade frente à *Artemia salina* (Figura 81 pág. 129) também podem apresentar toxicidade frente a células de tumores humanos sólidos, sugerindo que este bioensaio pode constituir uma avaliação prévia de atividade citotóxica (MCLAUGHLIN et al., 1998).

Esse teste é simples, de baixo custo, requer uma pequena quantidade de amostra e não necessita de métodos assépticos nem de equipamentos especiais. Isto favorece sua utilização rotineira, podendo ser desenvolvido no próprio laboratório (SIQUEIRA et al., 1998).

Existem relatos na literatura que mostram o potencial citotóxico de substâncias isoladas de espécies de *Maytenus*. Nakao e colaboradores (2004) relataram que maytanprina (Figura 80, pág 129) isolada de extratos metanólicos de todas as partes de *Maytenus diversifolia*, exerceu ação inibitória potente no crescimento de células leucêmicas *in vitro*, mas afirma que pode ser difícil de gerenciar a sua ação citotóxica sob condições *in vivo*.

A betulina (Figura 80, pág. 129), um triterpeno lupânico, isolado de *Maytenus forsskaoliana*, mostrou-se com alta atividade citotóxica, com IC₅₀ de 40 µg/mL sobre células cancerígenas (EL DEEB et al., 2003; MARTUCCIELLO et al., 2010).

A pristimerina (Figura 80, pág. 129), isolada de cascas de raízes de *Maytenus ilicifolia* apresentou potencial antitumoral no ensaio realizado sobre células cancerígenas, exibindo efeito antiproliferativo (COSTA et al., 2008).

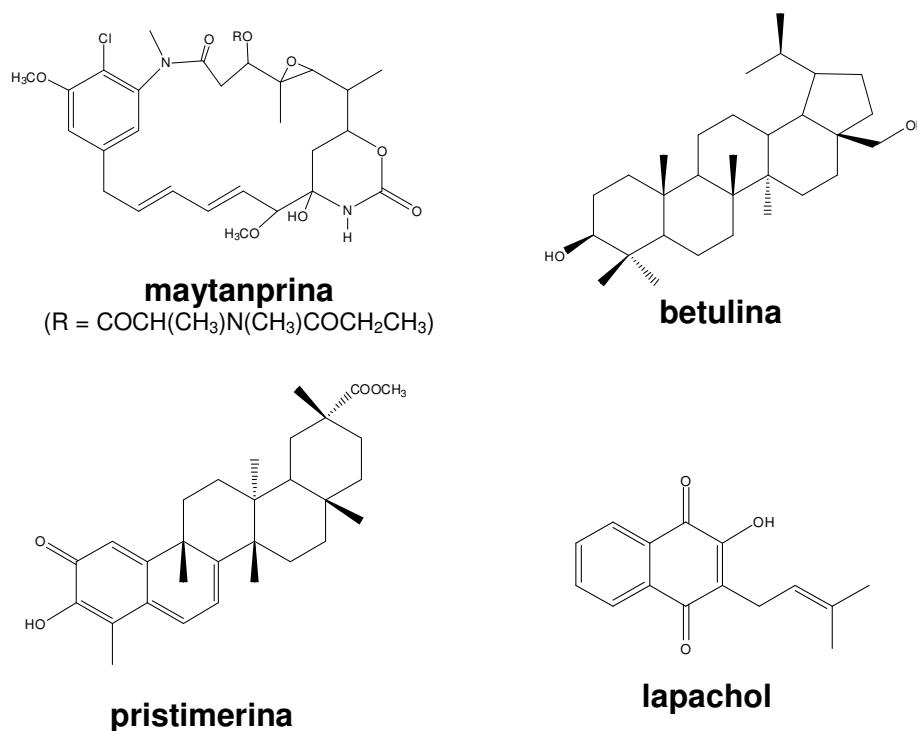


Figura 80: Estrutura química de substâncias que apresentam atividade citotóxica.

Baseado nestes relatos realizou-se a avaliação citotóxica de extratos e substâncias isoladas de raízes de *Maytenus imbricata* através da atividade larvica frente *Artemia salina*, um microcrustáceo bastante utilizado em teste de toxicidade.



Figura 81: *Artemia salina* com ampliação de tamanho.

Fonte: <http://www.ciadosdiscos.com.br/alimento.htm>, acesso: 10/04/11.

2.4.2 – Método experimental, segundo Pimenta et al., 2003

O teste foi realizado no Laboratório de Químico e Bioprospecção de Plantas do Cerrado, no Departamento de Química da Universidade Federal de Minas Gerais, sob a orientação da Professora Dr^a Lúcia Pinheiro Santos Pimenta.

Para realização dos testes preparou-se 1L de solução salina, usando-se sal marinho sintético e água deionizada (38,0 g/L). Em 100 mL de solução salina, adicionaram-se cerca de 10 mg de ovos de *A. salina*, sendo deixado sob iluminação artificial a 28 °C. A eclosão ocorreu aproximadamente após 24 horas.

Preparou-se uma solução de lapachol (Figura 80, pág. 129), composto com comprovada ação citotóxica sobre *A. salina* e as soluções das amostras-teste: extratos e substâncias isoladas, dissolvidas em DMSO (Tabela 38, pág. 130).

Tabela 38: Amostras avaliadas quanto ao seu potencial larvicida sobre *A. salina*

Amostra	Composto
M1	11 α -hidroxilup-20(29)-en-3-ona
M2	tingenona
M3	6-oxo-tingenol
M1 + M5	11 α -hidroxilup-20(29)-en-3-ona + 30-hidroxilup-20(29)-en-3-ona
M6	3,7-dioxo-friedelano
M8	3-oxo-29-hidroxifriedelano
SEH	sólido do extrato em hexano/éter etílico
FSEH	filtrado do extrato em hexano/éter etílico
SEAT	sólido do extrato em acetato de etila
FSEAT	filtrado do extrato em acetato de etila
SEM	sólido do extrato em metanol

Foram utilizadas cinco ou seis concentrações diferentes ($\mu\text{g/mL}$) (Tabela 39, pág. 131), dependendo da amostra. As concentrações foram estipuladas de acordo com um resultado preliminar onde cada amostra foi testada em uma grande faixa de concentração. A maior concentração foi aquela que apresentou a total mortalidade dos indivíduos e a menor concentração aquela onde não houve mortalidade.

Tabela 39: Concentrações das amostras utilizadas no teste

Amostra	Concentrações (µg/mL)					
M1	31,25	15,62	7,81	3,90	1,95	
M2	0,97	0,48	0,24	0,12	0,06	
M3	500,00	250,00	125,00	62,50	31,25	
M1 + M5	1000,00	500,00	250,00	125,00	62,50	
M6	125,00	62,50	31,25	15,62	7,81	
M8	125,00	62,50	31,25	15,62	7,81	
SEH	15,62	7,81	3,90	1,95	0,97	0,48
FSEH	15,62	7,81	3,90	1,95	0,97	0,48
SEAT	1000,00	500,00	250,00	125,00	62,50	
FSEAT	1000,00	500,00	250,00	125,00	62,50	
SEM	1000,00	500,00	250,00	125,00	62,50	

As soluções foram distribuídas em tubos de ensaio e o teste realizado em triplicata (Figura 81, pág. 132).

Preparou-se um grupo controle negativo, pela utilização de solução marinha contendo 1% de DMSO (v/v).

As larvas no estágio Metanauplii (2º ínstar), foram adicionadas às soluções a serem testadas, utilizando-se uma pipeta automática, sendo colocadas aproximadamente dez larvas para cada frasco (250 µL). Adicionaram-se as amostras a serem testadas.

Toda a bateria de ensaio foi mantida em local fresco durante 24 horas. Após este período, fez-se a leitura, pela contagem de larvas sobreviventes e mortas; esta foi realizada a olho nu, sendo usado um fundo branco ou luz branca para melhor visualização.

A determinação da DL_{50} (com intervalo de confiança de 95%) foi feita utilizando-se o método probitos de análise.

Foram realizados testes com o lapachol, cuja DL_{50} sobre o microcrustáceo é conhecida: 70 µg/mL ($61 < DL_{50} < 81$). A média dos resultados obtidos para esta substância, durante os ensaios, foi $DL_{50} = 68$ µg/mL ($57 < DL_{50} < 79$), valor próximo daquele descrito na literatura.

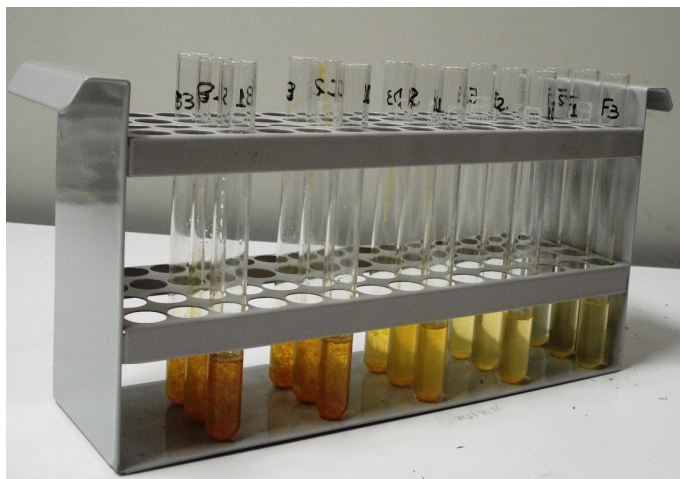


Figura 82: Experimento realizado no Laboratório de Químico e Bioprospecção de Plantas do Cerrado.

2.4.3 – Análise dos Resultados e Discussão

Segundo Meyer e colaboradores (1982), os extratos e as substâncias são considerados ativos quando a dose que mata 50% dos indivíduos (DL_{50}) é menor que 1000 $\mu\text{g/mL}$. Conforme pode ser observado na Tabela 40, pág. 133, todas as amostras apresentaram alta atividade larvicida sobre *A. salina*, podendo sugerir que apresentam potencial antitumoral.

Martucciello e colaboradores (2010) relataram que derivados triterpênicos, lupanos e friedelanos, isolados de *Maytenus rígida*, apresentaram efeito anti-proliferativo contra células cancerígenas (Sarcoma de Kaposi). Dentre os compostos testados os triterpenos lup-20(29)-ene-3 β ,30-diol e friedelan-3-ona apresentaram boa atividade antiproliferativa. Friedelan-3-ona teve efeito mais pronunciado que o ácido betulínico, um agente anticancerígeno.

As amostras testadas **M1** e **M1 + M5** são triterpenos lupânicos, e **M6** e **M8** são friedelanos e apresentaram atividade citotóxica, indicando que derivados lupânicos e friedelanos são potenciais agentes citotóxicos.

Tabela 40: Toxicidade dos extratos e substâncias isoladas de raízes de *Maytenus imbricata* contra *Artemia salina*

Composto	DL ₅₀ (µg/mL)	Limite de confiança (95%)
M1	9,28	7,69 < DL₅₀ < 11,20
M2	0,15	0,11 < DL₅₀ < 0,19
M3	33,74	26,13 < DL₅₀ < 43,58
M1 + M5	297,58	223,24 < DL ₅₀ < 396,67
M6	26,05	19,60 < DL₅₀ < 34,62
M8	47,43	39,83 < DL₅₀ < 56,48
SEH	2,10	1,66 < DL₅₀ < 2,65
FSEH	2,53	0,97 < DL₅₀ < 3,09
SEAT	236,16	197,92 < DL ₅₀ < 281,79
FSEAT	295,87	244,36 < DL ₅₀ < 358,24
SEM	384,93	308,47 < DL ₅₀ < 480,34

DL₅₀ = dose letal que causa a morte de 50% dos indivíduos

As substâncias **M1**, **M2**, **M3** e **M1 + M5** foram isoladas a partir do extrato **SEH** e todas as substâncias foram isoladas a partir do extrato **FSEH**. Estes dois extratos foram os mais tóxicos, apresentando uma DL₅₀ muito baixa em relação aos outros extratos.

A tingenona (**M2**) é uma substância com comprovada ação citotóxica (RAVELO et al., 2004) e se destacou por apresentar a maior toxicidade dentre as substâncias testadas. A alta atividade dos extratos **SEH** e **FSEH** pode ser devido a **M2** ser o composto majoritário em ambos, com uma quantidade expressiva de até 39,9%.

A mistura de triterpenos **M1 + M5** apresentou menor atividade que a substância **M1**, mas como **M5** não foi testada separadamente, não se pode afirmar sobre efeito antagônico ou sinérgico.

Macari e colaboradores (2006) realizaram estudos com extratos de cascas de *Maytenus guyanensis* sobre *Artemia franciscana* e o extrato hexânico apresentou DL₅₀ de 363 µg/mL, que foi considerado como um potente larvicida. Todas as amostras, exceto o extrato **SEM**, apresentaram DL₅₀ < 363 µg/mL, indicando que são mais ativas do que o extrato hexânico de cascas de *Maytenus guyanensis*.

Bouzada e colaboradores (2009), utilizando a mesma metodologia empregada neste trabalho, testou extrato metanólico de folhas de *Maytenus ilicifolia* sobre *A. salina* e este apresentou $DL_{50} > 250 \mu\text{g/mL}$. Já extrato etanólico de folhas de *Maytenus obtusifolia* mostrou baixa toxicidade para as larvas de *A. salina* com $DL_{50} > 1000 \mu\text{g/mL}$ (MOTA et al., 2008). Estes valores de concentração letal de 50% são considerados altos comparados com a Tabela 40, pág. 133, mostrando mais uma vez que os extratos de *M. imbricata* são mais ativos.

A partir dos resultados do teste de potencial tóxico através da atividade larvívora dos extratos e substâncias isoladas de raízes de *M. imbricata* frente a *Artemia salina*, é possível que estas amostras também apresentem potencial antitumoral, pesticida, tripanosomicida e/ou moluscida. Este teste é muito importante, pois permite executar uma primeira análise para realização de outros testes biológicos de maior complexidade como ensaios em células cancerígenas ou teste larvívora em *Aedes aegypti*.

CONCLUSÃO

Neste trabalho foi realizado o estudo fitoquímico do extrato em hexano/éter etílico (1:1) das raízes de *Maytenus imbricata* Mart. ex. Reissek (Celastraceae), coletadas no Morro de Santana, município de Ouro Preto, Minas Gerais, Brasil. Foi também avaliado o potencial quanto a algumas atividades biológicas deste extrato, bem como de alguns constituintes e misturas isoladas.

O estudo do extrato em hexano/éter etílico (1:1) resultou no isolamento e caracterização de sete triterpenos pentacíclicos, três pertencentes à classe dos lupanos (11 α -hidroxilup-20(29)-en-3-ona, 30-hidroxilup-20(29)-en-3-ona, 3 β ,11 α -di-hidroxilup-20(29)-eno), dois pertencentes à classe dos friedelanos (3,7-dioxofriedelano, 3-oxo-29-hidroxifriedelano), um quinonametídeo (tingenona) e um aromático (6-oxo-tingenol), além de um ácido graxo de cadeia longa (ácido palmítico) e uma mistura de hidrocarbonetos (C-27 a C-32) identificados principalmente pela técnica de RMN de ^1H e ^{13}C .

Tingenona, 6-oxo-tingenol, a mistura de hidrocarbonetos, 3,7-dioxo-friedelano, ácido palmítico, 3-oxo-29-hidroxifriedelano e 3 β ,11 α -di-hidroxi-lup-20(29)-eno são inéditas na espécie *M. imbricata*. O composto aromático 6-oxo-tingenol foi isolado pela primeira vez no NEPLAM e teve sua estrutura determinada por meio de RMN de 1D e 2D (^1H , ^{13}C , HSQC e HMBC).

As raízes de *M. imbricata* mostraram uma rica variedade de TTPC, diferentemente do que tem observado em outras espécies de celastráceas, onde ocorre maior incidência de triterpenos das séries oleananos e quinonametídeos. Este foi o primeiro relato de triterpeno friedelano em raízes de Celastraceae no NEPLAM.

O quinonametídeo tingenona foi o composto majoritário do extrato em hexano/éter etílico (1:1), com máximo de rendimento de 39,9 %. Este fato é importante já que possíveis estudos em síntese podem ser facilitados utilizando esta espécie como fonte principal de tingenona.

As atividades biológicas testadas para os extratos e para as substâncias isoladas foram a atividade antimicrobiana (antibacteriana e antifúngica), capacidade inibitória da enzima acetilcolinesterase e avaliação do potencial tóxico através da atividade larvicida sobre *Artemia salina*.

No teste antimicrobiano, foi testado o sólido do extrato em hexano/éter etílico (**SEH**), o filtrado do extrato em hexano/éter etílico (**FSEH**), o sólido do extrato em acetato de etila (**SEAT**), o filtrado do extrato em acetato de etila (**FSEAT**), o sólido do extrato em metanol (**SEM**), as substâncias 11 α -hidroxilup-20(29)-en-3-ona (**M1**), tingenona (**M2**), 6-oxo-tingenol (**M3**) e a mistura de 11 α -hidroxilup-20(29)-en-3-ona e 30-hidroxilup-20(29)-en-3-ona (**M1 + M5**). Todas as amostras apresentaram atividade contra as bactérias Gram-positivas *Staphylococcus aureus* e *Bacillus cereus*, e contra a levedura *Candida albicans*. Os resultados mais expressivos foram encontrados para **SEH** e tingenona (**M2**) que apresentaram CIM₅₀ de 0,12 μ g/mL e **FSEH** que apresentou CIM₉₀ de 0,12-15,6 μ g/mL, sobre *Staphylococcus aureus*. Tingenona (**M2**) e **FSEH** apresentaram CIM₅₀ de 0,12 μ g/mL e **SEM** apresentou CIM₉₀ de 31,3-125 μ g/mL, sobre *Candida albicans*, indicando ser potentes antifúngicos.

Todos os extratos e as substâncias testadas apresentaram atividade sobre as bactérias Gram-negativas *Salmonella typhimurium* e *Escherichia coli*, exceto a mistura de 11 α -hidroxilup-20(29)-en-3-ona e 30-hidroxilup-20(29)-en-3-ona (**M1 + M5**) que não apresentou atividade sobre essas duas bactérias. O melhor resultado foi encontrado para tingenona (**M2**) com CIM₅₀ de 62,5 μ g/mL e 6-oxo-tingenol (**M3**) com CIM₅₀ de 31,3 μ g/mL, sobre *Salmonella typhimurium*.

As substâncias 11 α -hidroxilup-20(29)-en-3-ona (**M1**), 3,7-dioxofriedelano (**M6**) e 3-oxo-29-hidroxifriedelano (**M8**) foram ativas na inibição da enzima acetilcolinesterase pelo método de bioautografia.

Todos os extratos e substâncias testadas apresentaram potencial tóxico através da atividade larvicida sobre *Artemia salina*.

Os resultados obtidos em DL₅₀ para os extratos sobre a *A. salina* foram: **SEH** de 2,10 μ g/mL, **FSEH** de 2,53 μ g/mL, **SEAT** de 236,16 μ g/mL, **FSEAT** de 295,87 μ g/mL e **SEM** de 384,93 μ g/mL. E as DL₅₀ para as substâncias 11 α -hidroxilup-20(29)-en-3-ona (**M1**) foi de 9,28 μ g/mL, tingenona (**M2**) de 0,15 μ g/mL, 6-oxo-tingenol (**M3**) de 33,74 μ g/mL, 11 α -hidroxilup-20(29)-en-3-ona e 30-hidroxilup-20(29)-en-3-ona (**M1 + M5**) de 297,58 μ g/mL, 3,7-dioxofriedelano (**M7**) de 26,05 μ g/mL e 3-oxo-29-hidroxifriedelano (**M8**) de 47,43 μ g/mL.

Este trabalho complementa o estudo fitoquímico da espécie *M. imbricata*. Os resultados obtidos tanto fitoquímicos quanto dos testes biológicos justificam a continuidade dos estudos em espécies da família Celastraceae.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Albuquerque, U. P.; Hanazaki, N.. As pesquisas etnodirigidas na descoberta de novos fármacos de interesse médico e farmacêutico: fragilidades e perspectivas. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 16, p. 678-689, 2006.

Almeida, M. C. S.; Alves, L. A.; Souza, L. G. S.; Machado, L. L.; Matos, M. C.; Oliveira, M. C. F.; Lemos, T. L. G.; Braz-Filho, R.. Flavonóides e outras substâncias de *Lippia siloides* e suas atividades antioxidantes. *Química Nova*, 33 (9), p. 1877-1881, 2010.

Alvarenga, N.; Canela, N.; Gómez, R.; Yaluff, G.; Maldonado, M.. Leishmanicidal activity of *Maytenus illicifolia* roots. *Fitoterapia*, 79, p. 381–383, 2008.

Alves, H. M.. A diversidade química das plantas como fonte de fitofármacos. *Cadernos Temáticos de Química Nova na Escola*, (3), p.10-15, 2001.

Alves, I. A.; Camargo, F. P.; Goulart, L. S.. Identificação por PCR e sensibilidade a antifúngicos de isolados clínicos vaginais de *Candida* sp. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 43 (5), p. 575-579, 2010.

Andrade, S. F.; Lemos, M.; Comunello, E.; Noldin, V. F.; Filho, V. C.; Niero, R.. Evaluation of the antiulcerogenic activity of *Maytenus robusta* (Celastraceae) in different experimental ulcer models. *Journal of Ethnopharmacology*, 113, p. 252-257, 2007.

Araújo, E. C.; Oliveira, R. A. G.; Coriolano, A. T.; Araújo, E. C.. Uso de plantas medicinais pelos pacientes com câncer de hospitais da rede pública de saúde em João pessoa (PB). *Revista Espaço para a Saúde*, Londrina, 8 (2), p. 44-52, 2007.

Ayres, M. C. C.; Chaves, M. H.; Rinaldo, D.; Vilegas, W.; Vieira Júnior, G. M.. Constituintes químicos e atividade antioxidante de extratos das folhas de *Terminalia fagifolia* Mart. Et Zucc. *Química Nova*, 32 (6), p. 1509-1512, 2009.

Baggio, C. H.; Freitas, C. S.; Otofui, G. M.; Cipriani, T. R.; Souza, L. M.; Sassaki, G. L.; Iacomini, M.; Rieck, L.; Mesia-Vela, S.; Marques, M. C. A.. Flavonoid-rich fraction of *Maytenus ilicifolia* Mart. ex. Reiss protect the gastric mucosa of rodents through inhibition of both H⁺, K⁺-ATPase activity and formation of nitric oxide. *Journal of Ethnopharmacology*, 113 , p. 433-440, 2007.

Baggio, C. H.; Freitas, C. S.; Mayer, B.; Santos, A. C.; Twardowschy, A.; Potrich, F. B.; Cipriani, T. R.; Souza, L. M. Sassaki, G. L.; Iacomini, M.; Marques, M. C. A.; Mesia-Vela, S.. Muscarinic-dependent inhibition of gastric emptying and intestinal motility by fractions of *Maytenus ilicifolia* Mart ex. Reissek. *Journal of Ethnopharmacology*. **123**, p. 385–391, 2009.

Barbosa Filho, J. M.; Vasconcelos, T. H. C.; Alencar, A. A.; Batista, L. M.; Oliveira, R. A. G.; Guedes, D. N.; Falcão, H. S.; Moura, M. D.; Diniz, M. F. F. M.; Modest-Filho, J.. Plants and their active constituents from South, Central, and North America with hypoglycemic activity. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, **15** (4), 392-413, 2005.

Barbosa Filho, J. M.; Medeiros, K. C. P.; Diniz, M. F. F. M.; Batista, L. M.; Athayde Filho, P. F.; Silva, M. S.; Da Cunha, E. V. L.; Almeida, J. R. G. S.; Quintans Junior, L. J.. Natural products inhibitors of the enzyme acetylcholinesterase. *Revista Brasileira de Farmacognosia*. **16** (2), p. 258-285, 2006.

Bedout, C.; Ayabaca, J.; Veja, R.; Méndez, M.; Santiago, A. R.; Pabón, M. L.; Tabares, A.; Arango, M.; Restrepo, A.; Newell, V.. Evaluación de La susceptibilidad de espécies de *Candida* al fluconazol por El método de difusión de disco. *Biomédica*, **23** (1), p. 31-37, 2003.

Bouzada, M. L. M.; Fabri, R. L.; Nogueiro, M.; Konno, T. U. P.; Duarte, G. G.; Scio, E.. Antibacterial, cytotoxic and phytochemical screening of some traditional medicinal plants in Brazil. *Pharmaceutical Biology*, **47** (1), p. 44-52, 2009.

Brandão, H. N.; David, J. P.; Couto, R. D.; Nascimento, J. A. P.. Química e farmacologia de quimioterápicos antineoplásicos derivados de plantas. *Química Nova*, **33** (6), p. 1359-1369, 2010.

- Briskin, D. P. Medicinal Plants and Phytomedicines. Linking Plant Biochemistry and Physiology to Human Health. *Plant Physiology*, **124**, p. 507–514, 2000.
- Brito, J. P.; Oliveira, J. E. M.; Bortoli, S. A. Toxicidade de óleos essenciais de *Eucalyptus* spp. sobre *Callosobruchus maculatus* (Fabr., 1775) (Coleoptera: Bruchidae). *Revista de Biologia e Ciência da Terra*, **6** (1), 2006.
- Cabral, I. S. R.; Oldoni, T. L. C.; Prado, A.; Bezerra, R. M. N.; De Alencar, S. M.. Composição fenólica, atividade antibacteriana e antioxidante da própolis vermelha brasileira. *Química Nova*, **32** (6), p. 1523-1527, 2009.
- Calixto, J. B. Efficacy, safety, quality control, marketing and regulatory guidelines for herbal medicines (phytotherapeutic agents). *Brazilian Journal Medical and Biological Research*, **33**, p. 179-189, 2000.
- Camps, P.; El-Achab, R.; Motral, J.; Torrero, D. M.; Badia, A.; Banos, J. E.; Vivas, N. M.; Barril, X.; Orozco, M.; Luque, F. J.. New tacrine-huperzine A hybrids (huprines): highly potent tight-binding acetylcholinesterase inhibitors of interest for the treatment of Alzheimer's disease. *Journal Medicinal Chemistry*, **43**, p. 4657-4666, 2000.
- 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. p. 253, 1992.
- Chaves, D. S. A.; Costa, S. S.; De Almeida, A. P.; Frattani, F.; Assafim, M.; Zingali, R. B.. Metabólitos secundários de origem vegetal: Uma fonte potencial de fármacos antitrombóticos. *Química Nova*, **33** (1), p. 172-180, 2010.
- Chávez, H.; Estévez-Braun, A.; Ravelo, A. G.; González, A. G. New phenolic and Quinone-Methide triterpenes from *Maytenus amazonica*. *Journal Natural Products*, **62**, p. 434-436, 1999.

Cipriani, T. R.; Mellinger, C. G.; Souza, L. M.; Baggio, C. H.; Freitas, C. S.; Marques, M. C. A.; Gorin, P. A. J.; Sassaki, G. L.; Iacomini, M.. Polygalacturonic acid: Another anti-ulcer polysaccharide from the medicinal plant *Maytenus ilicifolia*. *Carbohydrate Polymers*, **5**, p. 361-363, 2009.

Corsino, J.; Furlan, M.; Bolzani, V. D. A. S.; Pereira, A. M. S.; Franca, S. E.. Further sesquiterpene pyridine alkaloids from *Maytenus aquifolium*. *Phytochemistry*, **49**, p. 2181-2183, 1998.

Corsino, J., Carvalho, P. R. F., Kato, M. J., Latorre, L. R., Oliveira, O. M., Araújo, A. R., Bolzani, V. S., França, S. C., Pereira, A. M. S., Furlan, M., Biosynthesis of friedelane and quinonemethide triterpenoids is compartmentalized in *Maytenus aquifolium* and *Salacia campestris*, *Phytochemistry*, **55**, p. 741-748, 2000.

Costa, D. A.; Matias, W. N.; Lima, I. O.; Xavier, A. L.; Costa, V. B. M.; Diniz, M. F. F. M.; Agra, M. F.; Batista, L. M.; Souza, M. F. V.; Silva, D. A.. First secondary metabolites from *Herissantia crispa* L (Brizicky) and the toxicity activity against *Artemia salina* Leach. *Química Nova*, **32** (1), p. 48-50, 2009.

Costa, P. M.; Ferreira, P. M. P.; Bolzani, V. S.; Furlan, M.; Santos, V. A. F. F. M.; Corsino, J.; Moraes, M. O.; Costa-Lotufo, L. V.; Montenegro, R. C.; Pessoa, C.. Antiproliferative activity of pristimerin isolated from *Maytenus ilicifolia* (Celastraceae) in human HL-60 cells. *Toxicology in vitro*, **22**, p. 854-863, 2008.

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**, p. 590-597, 1978.

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

Croteau, R.; Kutchan, T. M.; Lewis, N. G.. Natural Products (Secondary Metabolites). In: Buchanan, B.; Gruissem, W.; Jones, R.. Biochemistry and Molecular Biology of Plants. *American Society of Plant Physiologists*, p. 1250–1318, 2000.

- Damasceno, E. I. T.; Silva, J. K. R.; Andrade, E. H. A.; Souza, P. J. C.; Maia, J. G. S.. Antioxidant capacity and larvicidal activity of essential oil and extracts from *Lippia grandis*. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, **21** (1), p. 78-85, 2011.
- De Almeida, M. T. R.; Rios-Luci, C.; Padrón, J. M.; Palermo, J. A.. Antiproliferative terpenoids and alkaloids from the roots of *Maytenus vitis-idaea* and *Maytenus spinosa*. *Phytochemistry*, **71**, p. 1741-1748, 2010.
- De Souza, L. M.; Cipriani, T. R.; Iacomini, M.. HPLC/ESI-MS and NMR analysis of flavonoids and tannins in bioactive extract from leaves of *Maytenus ilicifolia*. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, **47**, p. 59–67, 2008.
- Delgado-Méndez, P.; Herrera, N.; Chávez, H.; Estevez-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 e Medicinal Chemistry*, **16**, p. 1425-1430, 2008.
- Dewick, P. M. Medicinal Natural Products: A Biosynthetic Approach. 2ª Edição, John Wiley and Sons, 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**, p. 109-119, 2008.
- Dias, A. L. S.; De Souza, J. N. S.; Rogez, H.. Enriquecimento de compostos fenólicos de Folhas de *Inga edulis* por extração em fase sólida: Quantificação de seus compostos majoritários e avaliação da capacidade antioxidante. *Química Nova*, **33** (1), p. 38-42, 2010.
- Dias, K. S.; Marques, M. S.; Menezes, I. A. C.; Santos, T. C.; Silva, A. B. L.; Estevam, C. S.; Sant'Ana, A. E. G.; Pizza, C.; Antonioli, A. R.; Marcal, R. M.. Antinociceptive activity of *Maytenus rigida* stem bark. *Fitoterapia*, **78**, p. 460-464, 2007.

Dorko, C.. Antioxidants used in food. *Food Technology*, **48** (4), p. 33, 1994. In: Oliveira, A. C.; Valentim, I. B.; Goulart, M. O. F.; Silva, C. A.; Bechara, E. J. H.; Trevisan, M. T. S. Fontes vegetais naturais de antioxidantes. *Química Nova*, **32** (3), p. 689-702, 2009.

Duarte, L. P. Estudo Químico, estrutural e da atividade antibacteriana de triterpenos pentacíclicos isolados dos galhos e raízes de *Austroplenkia populnea*. Belo Horizonte, Departamento de Química, ICEX, UFMG, Tese de Doutorado, 2000, 243p.

Duarte, L. P.; Figueiredo, R. C.; De Souza, G. F.; Soares, D. B. S.; Rodrigues, S. B. V.; Silva, F. C.; Silva, G. D. F.. Chemical constituents of *Salacia elliptica* (Celastraceae). *Química Nova*, **22** (4), p. 900-903, 2010.

Duran, R. M.; Padilla, R. B. Actividad antioxidante delos compuestos fenólicos. *Grasas y Aceites*, **44** (2), p. 101-106, 1993.

El Deeb, K. S.; Al-Haidari, R. A.; Mossa, J. A.; Ateya, A. M.. Phytochemical and pharmacological studies of *Maytenus forsskaoliana*. *Saudi pharmaceutical journal*, **11** (4), p. 184-191, 2003.

Enz, A.; Amstutz, R.; Boddeke, H.; Gmelin, G.; Malonowski, J.. Brain selective inhibition of acetylcholinesterase: a novel approach to therapy for Alzheimer's disease. *Progress in Brain Research*, **98**, p. 431-445, 1993.

Estevam, C. S.; Cavalcanti, A. M.; Cambui, E. V. F.; Neto, V. A.; Leopoldo, P. T. G.; Fernandes, R. P. M.; Araújo, B. S.; Porfírio, Z.; Sant`Ana, A. E. G.. Perfil fitoquímico e ensaio microbiológico dos extratos da entrecasca de *Maytenus rígida* Mart. (Celastraceae). *Revista Brasileira de Farmacognosia*, **19** (1B), p. 299-303, 2009.

Eubanks, L. M.; Rogers, C. J.; Beuscher, I. V. A. E.; Koob, G. F.; Olson, A. J.; Dickerson, T. J.; Janda, K. D.. A molecular link between the active component of marijuana and Alzheimer's Disease Pathology. *Molecular Pharmaceutics*, **3**, p. 773-777, 2006.

Ferreira, R. C. S.; Riffel, A.; Sant'Ana, A. E. G.. HIV: Mecanismo de replicação, alvos farmacológicos e inibição por produtos derivados de plantas. *Química Nova*, **33** (8), p. 1743-1755, 2010.

Ferreira, V. F.; Pinto, A. C.. A fitoterapia no mundo. *Química Nova*, **33**, (9), p. 1829, 2010.

França, H. S.; Kuster, R. M.; Rito, P. N.; Oliveira, A. P.; Teixeira, L. A.; Rocha, L.. Atividade antibacteriana de floroglucinóis e do extrato hexânico de *Hypericum brasiliense* Choysl. *Química Nova*, **32** (5), p. 1103-1106, 2009.

García, A. A.; Carril, E, P. U.. Metabolismo secundario de plantas. *Reduca (Biología). Serie Fisiología Vegetal*, **2** (3), p. 119-145, 2009.

Gobbo-Neto, L.; Lopes, N. P.. Plantas medicinais: Fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. *Química Nova*, **30** (20), p. 374-381, 2007.

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 and Medicinal Chemistry*, **4** (6), p. 815-820, 1996.

González, A. G.; Tincusi, B. M.; Bazzocchi, I. L.; Tokuda, H.; Nishino, H.; Konoshima, T.; Jiménez, I. A.; Ravelo, A. G.. Anti-tumor Promoting effects of sesquiterpenes from *Maytenus cuzcoina* (Celastraceae). *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, **8**, p. 1773-1778, 2000.

Howes, M. J. R., Perry, N. S. L., Houghton, P. J.. Plants with traditional uses and activites, relevant to the management of Alzheimer's disease and other cognitive disorders. *Phytotherapy Research*. **17**, p. 1-18, 2003.

Hussein, G.; Nakamura, N.; Meselhy, M. R.; Hattorim, M.. Phenolics from *Maytenus senegalensis*. *Phytochemistry*, **50**, p. 689-694, 1999.

Hutchings, A.; Scott, A.; Lewis, A.; Cunningham, A. B.. Zulu Medicinal Plants: An Inventory. University of Natal Press, Pietermaritzburg, 1996.

Jain, N.; Light, M. E.; Van Staden, J.. Antibacterial activity of hairy-root cultures of *Maytenus senegalensis*. *South African Journal of Botany*, **74**, p. 163-166, 2008.

Jeller, A. H.; Silva, D. H. S.; Lião, L. M.; Bolzani, V. S.; Furlan, M.. Antioxidant phenolic and quinonemethide triterpenes from *Cheiloclinium cognatum*. *Phytochemistry*, **65**, p. 1977-1982, 2004.

Jorge, R. M.; Leite, J. P. V.; Oliveira, A. B.; Tagliati.. Evaluation of antinociceptive, anti-inflammatory and antiulcerogenic activities of *Maytenus ilicifolia*. *Journal of Ethnopharmacology*, **94**, p. 93-100, 2004.

Júnior, C. V.; Bolzani, V. S.. Os produtos Naturais e a Química Medicinal Moderna. *Química Nova*, São Paulo, **29**, p. 326-337, 2006.

Kirby, J.; Keasling, J. D. Biosynthesis of plant isoprenoids: perspectives for microbial engineering. *Annual review of plant biology*, **60**, p. 335-355, 2009.

Kutchan, T. M. Ecological arsenal and developmental dispatcher. The paradigm of secondary metabolism. *Plant Physiology*, **125**, p. 58-60, 2001. In: Souza, M. F. S.; Manganotti, S. A.; Souza, P. N. S.; Meira, M. R.; Matos, C. C.; Martins, E. R.. Influência do horário de coleta, orientação geográfica e dossel na produção de óleo essencial de *Cordia verbenacea* DC. *Biotemas*, **24** (1), p. 9-14, 2011.

Lehninger, A. L.; Nelson, D. L.; Cox, M. M.. *Princípios de Bioquímica*. 3ª edição. São Paulo: Sarvier, 2002, 975p.

Liao, L. M.; Silva, G. A.; Monteiro, M. R.; Albuquerque, S.. Trypanocidal activity of quinonemethide triterpenoids from *Cheiloclinium cognatum* (Hippocrateaceae). *Journal of Biosciences*, **63** (3-4), p. 207-210, 2008.

- Lima, R. K.; Cardoso, M. G.; Moraes, J. C.; Melo, B. A.; Rodrigues, V. G.; Guimarães, P. L.. Atividade inseticida do óleo essencial de pimenta longa (*Piper hispidinervum* C. DC.) sobre lagarta-do-cartucho do milho *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith, 1791) (Lepidoptera: Noctuidae). *Acta Amazonica*, **39** (2), p. 377-382, 2009.
- Lima, R. K.; Cardoso, M. G.; Moraes, J. C.; Andrade, M. A.; Melo, B. A.; Rodrigues, V. G.. Caracterização Química e Atividade inseticida do óleo essencial de *Ageratum conyzoides* L. sobre a lagarta-do-cartucho *Spodoptera frugiperda* (Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae). *Bioscience Journal*, **26**, p. 1-5, 2010.
- 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**, p. 473-477, 2006.
- Luo, D. Q.; Wang, H.; Tian, X.; Shao, H. J.; Liu, J. K.. Antifungal properties of pristimerin and celastrol isolated from *Celastrus hypoleucus*. *Pest Management Science*, **6**, p. 85–90, 2005.
- Macari, P. A. T.; Portela, C. N.; Pohlit, A. M.. Antioxidant, cytotoxic and UVB-absorbing activity of *Maytenus guyanensis* Klotzch. (Celastraceae) bark extracts. *Acta Amazônica*. **36** (4), p. 513-518, 2006.
- Mahato, S. B.; Kundu, A. P. ¹³C NMR spectra of pentacyclic triterpenoids – a compilation and some salient features. *Phytochemistry*, **37** (6), p. 1517-1575, 1994.
- Mann, J. Secondary Metabolism. 2^a Ed. Oxford: *Oxford Science Publications*, 1995, 374 p.
- Marston. A.; Kissling, J; Hostettmann, K.. A rapid TLC Bioautographic method for the detection of acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase inhibitors in plants. *Phytochemical Analysis*. **13**, p. 51–54, 2002.

- Martucciello, S.; Balestrieri, M. L.; Felice, F.; Estevam, C. S.; Sant'Ana, A. E. G.; Pizza, C.; Piacente, S.. Effects of triterpene derivatives from *Maytenus rigida* on VEGF-induced Kaposi's sarcoma cell proliferation. *Chemico-Biological Interactions*, **183** (3), p. 450-454, 2010.
- Matos, A. P.; Nebo, L.; Vieira, P. C; Fernandes, J. B.; Silva, M. F. G. F; Rodrigues, R. R.. Constituintes químicos e atividade inseticida dos extratos de frutos de *Trichilia elegans* e *T. catiguá* (Meliaceae). *Química Nova*, **32** (6), p. 1553-1556, 2009.
- Matos, F. J. A. Introdução a Fitoquímica Experimental. UFC, Fortaleza, 1980, 129 p.
- McLaughlin, J. L., Rogers, L. L., Anderson, J. E.. The use of biological assays to evaluate botanicals. *Drug information journal*, **32**, p. 513-524, 1998.
- Metan, G.; Zarakolu, P.; Unal, S.. Rapid detection of antibacterial resistance in emerging Gram-positive cocci. *Hospitalar Infection Review*, **61**, p. 93-99, 2005.
- Meyer, B. N.; Ferrigni, N. R.; Putnan, J. E.; Jacobsen, L. B.; Nicholas, D. E.; McLaughlin, J. L.. Brine shrimp: a convenient general bioassay for active plant constituents. *Planta Medica*, **45**, p. 31-34, 1982.
- Miao, Y., He, N., Zhu, J-J.. History and new developments of assays for cholinesterase activity and inhibition. *American Chemical Society*, **110**, p. 5216–5234 2010.
- Mincis, M.; Mincis, R.; Calichman, S.. Diarréias agudas: Atualização, diagnóstica e terapêutica. *Revista Prática Hospitalar*, **55**, p. 146-150, 2008.
- Miranda, R. R. S.; Duarte, L. P.; Silva, G. D. F.; Vieira Filho, S. A.; Carvalho, P. B.; Messas, A. C.. Evaluation of antibacterial activity of “Mangabarana” *Austroplenckia populnea* Reissek (Celastraceae). *Revista Brasileira de Farmacognosia*, **19** (2A), p. 370-375, 2009.

Montanari, C. A.; Bolzani, V. S.. Planejamento racional de fármacos baseado em produtos naturais. *Química Nova*, São Paulo, **24** (1), p. 105-111, 2001.

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

Mota, K. S. L.; Pita, J. C. L. R.; Estevam, E. C.; Medeiros, V. M.; Tavares, J. F.; Agra, M. F.; Diniz, M. F. F. M.; Silva, M. S.; Batista, L. M.. Evaluation of the toxicity and antiulcerogenic activity of the ethanol extract of *Maytenus obtusifolia* Mart. leaves. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, **18** (3), p. 441-446, 2008.

Murari, A. L. Constituintes voláteis e atividade antimicrobiana de *Senecio crassiflorus* (Poir). DC. var. *crassiflorus*. Santa Maria. Departamento de Ciências Farmacêuticas. UFSM, Dissertação de Mestrado, 2007, 140p.

Nakagawa, H.; Takaishi, Y.; Fujimoto, Y.; Duque, C.; Garzon, C.; Sato, M.; Okamoto, M.; Oshikawa, T.; Ahmed, S. U.. Chemical constituents from the Colombian medicinal plant *Maytenus laevis*. *Journal of Natural Products*, **67**, p. 1919-1924, 2004.

Nakao, H.; Senokuchi, K.; Umebayashi, C.; Kanemaru, K.; Masuda, T.; Oyama, Y.; Yonemori, S.. Cytotoxic activity of maytanprine isolated from *Maytenus diversifolia* in human leukemia K562 cells. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, **27** (8), p. 1236-1240, 2004.

Nebo, L.; Matos, A. P.; Vieira, P. C.; Fernandes, J. B.; Silva, M. F. G. F. Rodrigues, R. R.. Atividade inseticida dos frutos de *Trichilia claussensi* (Meliaceae) sobre *Spodoptera frugiperda*. *Química Nova*, **33** (9), p. 1849-1852, 2010.

Novais, T. S.; Costa, J. F. O.; David, J. P. L.; David, J. M.; Queiroz, L. P.; França, F.; Giulietti, A. M.; Soares, M. B. P.; Santos, R. R.. Atividade antibacteriana em alguns extratos de vegetais do semi-árido brasileiro. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, **14**, p. 8-11, 2003.

Ohsaki, A.; Imai, Y.; Naruse, M.; Ayabe, S.; Komiyama K.; Takashima, J.. Four new triterpenoids from *Maytenus ilicifolia*. *Journal of Natural Products*, **67**, p. 469-471, 2004.

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

Oliveira, R. A. G.; Lima, E. O.; Vieira, W. L.; Freire, K. R. L.; Trajano, V. N.; Lima, I. O. ; Souza, E. L.; Toledo, M. S.; Silva-Filho, R. N.. Estudo da interferência de óleos essenciais sobre a atividade de alguns antibióticos usados na clínica. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, **16** (1), p. 77-82, 2006b.

Orabi, K. Y.; Al-Qasoumi, S. I.; El-Olemy, M. M.; Mossa, J. S.; Muhammad, I.. Dihydroagarofuran alkaloid and triterpenes from *Maytenus heterophylla* and *Maytenus arbutifolia*, *Phytochemistry*, **58**, p. 475-480, 2001.

Orhan, I.; Sener, B.; Chouldhary, M. I.; Khalid, A.. Acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase inhibitory activity of some Turkish medicinal plants. *Journal of Ethnopharmacology*, **91**, p. 57-60, 2004.

Pacheco, A. G.; Silva, T. M.; Manfrini, R. M.; Sallum, W. S. T.; Duarte, L. P.; Piló-Veloso, D.; Alcântara, A. F. C.; Knupp, V. F. Estudo químico e atividade antibacteriana do caule de *Aristolochia esperanzae* Kuntze (Aristolochiaceae). *Química Nova*, **33** (8), p. 1649-1652, 2010.

Pavia, D. L.; Lampman, G. M.; Kriz, G. S. Introduction to Spectroscopy: a guide for students of Organic Chemistry. 3^a Edition. Thomson Learning, United States of America, 2001, 578 p.

Pereira, A. A.; Cardoso, M. G.; Abreu, L. R.; Moraes, A. R.; Guimarães, L. G. L.; Salgado, A. P. S. P.. Caracterização química e efeito inibitório de óleos essenciais sobre o crescimento de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*. *Ciência e Agrotecnologia*, **32**, p. 887-893, 2008.

- Pereira, I. A.; Soares, L. C.; Coelho, S. M. O.; Balbino, F. A.; Pribul, B. R.; Souza, M. M. S.. Suscetibilidade à azitromicina de agentes bacterianos isolados de processos infecciosos em diferentes sítios de animais de companhia. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, **61** (3), p. 577-584, 2009.
- Peres, M. T. L. P.; Simionatto, E.; Hess, S. C.; Bonani, V. F. L.; Candido, A. C. S.; Castelli, C.; Poppi, N. R.; Honda, N. K.; Cardoso, C. A. L.; Faccenda, O.. Estudos químicos e biológicos de *Microgramma vacciniifolia* (Langsd. e Fisch.) Copel (Polypodiaceae). *Química Nova*, **22** (4), p. 897-901, 2009.
- Perestelo, N. R.; Jiménez, I. A.; Tokuda, H.; Hayashi, H.; Bazzocchi, I. L.. Sesquiterpenes from *Maytenus jelskii* as potential cancer chemopreventive agents. *Journal of Natural Products*, **73**, p. 127–132, 2010.
- Pessuto, M. B.; Costa, I. C.; Souza, A. B.; Nicoli, F. M.; Mello, J. C. P.; Petereit, F.; Luftmann, H.. Atividade antioxidante de extratos e taninos condensados das folhas de *Maytenus* Mart. Ex Reiss. *Química Nova*, **32** (2), p. 412-416, 2009.
- Pimenta, L. P. S.; Pinto, G. B.; Takahashi, J. A.; Silva, L. G. F.; Boaventura, M. A. D.. Biological screening of *Annonaceous* Brazilian medicinal plants using *Artemia salina*. *Phytomedicine*, **10**, p. 209-212, 2003.
- Ravelo, A. G.; Braun, A. E.; Orellana, H. C.; Sarau, E. P.; Siverio, D. M.. Recent studies on natural products as anticancer agents. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, **4**, p. 241-265, 2004.
- 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 and Medicinal Chemistry*, **14**, p. 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**, p. 217-223, 2001.
- Rodrigues, K. L.; Gomes, J. P.; Conceição, R. C.; Brod, C. S.; Carvalhal, J. B.; Aleixo, J. A. G.. Condições higiênico-sanitárias no comércio ambulante de alimentos em Pelotas-RS. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, **23** (3), p. 447-452. 2003.
- Rojas, R.; Bustamante, B.; Bauer, J.; Fernandez, I.; Alban, J.; Lock, O.. Antimicrobial activity of selected Peruvian plants. *Journal of Ethnopharmacology*, **88**, p. 199-204, 2003.
- Rufino, J. L.; Weinert, P. L.; Pezza, H. R.; Pezza, L.. Flow-injection spectrophotometric determination of tetracycline and doxycycline in pharmaceutical formulations using chloramine-T as oxidizing agent. *Química Nova*, **32** (7), p. 1764-1769, 2009.
- Sannomiya, M.; Vilegas, W.; Rastrelli, L.; Pizza, C.. A flavonoid glycoside from *Maytenus aquifolium*. *Phytochemistry*, **49**, p. 237-239, 1998.
- Santos, E. L.; Costa, E. V.; Marques, F. A.; Vaz, N. P.; Maia, B. H. L. N. S.; Magalhães, E. G.; Tozzi, A. M. A.. Toxicidade e atividade antioxidantes de flavonóides das cascas das raízes de *Lonchocarpus filipes*. *Química Nova*, **32** (9), p. 225-2258, 2009.
- Santos, J. C.; Oliveira, C. A. N.; Varella, L.; Matos, A. P.; Tereza, A. P.; Leite, A. C.; Fernandes, J. B.; Vieira, P. C.; Graças, M. F.; Pirani, J. R.. Constituintes químicos e atividade antimicrobiana dos extratos de *Dilodendron bipinnatum* (Sapindaceae). *Química Nova*, **33** (10), p. 2080-2082, 2010.

Santos, R. I. Metabolismo Básico e Origem dos Metabólitos Secundários, 2001. In: Simões, C. M. O.; Schenkel, E. P.; Gosmann, G.; Mello, J. C. P.; Mentz, L. A.; Petrovick, P. R.. *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. 5ª Edição. Porto Alegre, RS: Ed. da UFSC, 2004. 1102p.

Santos, V. L.; Costa, V. B. M.; Agra, M. F.; Silva, B. A.; Batista, L. M.. Pharmacological studies of ethanolic extracts of *Maytenus rigida* Mart (Celastraceae) in animal models. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*, **17** (3), p. 336-342, 2007.

Santos, V. L.; Souza, M. F. V.; Batista, L. M.; Silva, B. A.; Lima, M. S.; Souza, A. M. F.; Barbosa, F. C.; Catão, R. M. R.. Avaliação da atividade antimicrobiana de *Maytenus rígida* Mart. (Celastraceae). *Revista Brasileira de Plantas Medicinai, Botucatu*, **13** (1), p. 68-72, 2011.

Schneider, L. J. Treatment of Alzheimer's disease with cholinesterase inhibitors. *Clinical Geriatric Medicine*, **17**, p. 337-339, 2001.

Shinohara, N. K. S.; Barros, V. B.; Jimenez, S. M. C.; Machado, E. C. L.; Dutra, R. A. f.; Filho, J. L. L.. *Salmonella* spp., importante agente patogênico veiculado em alimentos. *Ciência and Saúde Coletiva*, **13** (5), p. 1675-1683, 2008.

Shirota, O.; Tamemura, T.; Morita, H.; Takeya, K.; Itokawa, H.. Triterpenes from Brazilian medicinal plant chuchuhausi (*Maytenus krukovii*). *Journal of Natural Products*, **59**, p. 1072–1075, 1996.

Silva, F. C. Estudo fitoquímico e da atividade biológica do extrato hexânico de galhos de *Maytenus gonoclada* (Celastraceae). Belo Horizonte, Departamento de Química, ICEx, UFMG, Dissertação de Mestrado, 2011, 136p.

Silva, G. D. F.; Silva, S. R. S.; Barbosa, L. C. A.; Duarte, L. P.; Ribeiro, S. M. R.; Queiroz, J. H.; Vieira Filho, S. A.; Oliveira, M. L. R.. Antioxidant activity of *Maytenus imbricata* Mart. Celastraceae. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, **19** (2B), p. 530-536, 2009.

Silva, S. R. S. Estudo químico e avaliação do potencial farmacológico e herbicida de *Maytenus imbricata* Mart. ex. Reissek. Belo Horizonte, Departamento de Química, ICEx, UFMG, Tese de Doutorado, 2007a, 226p.

Silva, S. R. S.; Silva, G. D. F.; Barbosa, L. C. A.; Duarte, L. P.; King-Diaz, B.; Archundia-Camacho, F.; Lotina-Hennsen, B.. Uncoupling and inhibition properties of 3,4-seco-friedelan-3-oic acid isolated from *Maytenus imbricata*. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, **87**, p. 109-114, 2007b.

Silva, V. A.; Freitas, A. F. R.; Pereira, M. S. V.; Siqueira Júnior, J. P.; Pereira, A. V.; Higino, J. S.. Avaliação in vitro da atividade antimicrobiana do extrato da *Lippia sidoides* Cham. sobre isolados biológicos de *Staphylococcus aureus*. *Revista Brasileira de Plantas Medicinais*, **12** (4), p. 452-455, 2010.

Silverstein, R. M.; Bassler, G. C.; Morrill, T. C.. Identificação Espectrométrica de Compostos Orgânicos, 5ª Edição. Rio de Janeiro, Editora Guanabara-Koogan, 1994.

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**, p. 745-757, 2008.

Simões, C. M. O.; Schenkel, E. P.. A pesquisa e a produção brasileira de medicamentos a partir de plantas medicinais: a necessária interação da indústria com a academia. *NEXUS Ciência e Tecnologia*, **1** (1), p. 24-27, 2001.

Simões, C. M. O.; Schenkel, E. P.; Gosmann, G.; Mello, J. C. P.; Mentz, L. A.; Petrovick, P. R.. *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. 5ª Edição. Porto Alegre, RS: Ed. da UFSC, 2004. 1102p.

- Siqueira, J. M.; Bomm, M. D.; Pereira, N. F. G.; Garcez, W. S; Boaventura, M. A. D. Estudo fitoquímico de *Unonopsis lindmanii* – Annonaceae, biomonitorado pelo ensaio de toxicidade sobre a *Artemia salina* Leach. *Química Nova*, **21** (5), p. 557-559, 1998.
- Solomons, T. W. G.; Fryhle, C. B. Química Orgânica. 8ª Edição, LTC Editora, Rio de Janeiro, **2**, 2006, 542 p.
- Sosa, S.; Morelli, C. F.; Tubaro, A.; Cairolí, P.; Speranza, G.; Manitto, P.. Anti-inflammatory activity of *Maytenus senegalensis* root extracts and of maytenoic acid. *Phytomedicine*, **14**, p. 109–114, 2007.
- Sotanaphun, U.; Suttisri, R.; Lipipun, V.; Bavovada, R.. Quinone-methide triterpenoids from *Glyptopetalum sclerocarpum*. *Phytochemistry*, **49** (6), p. 1749-1755, 1998.
- Soto, F. R. M.; Dias, G. M. A.; Fonseca, Y. S. K.. Toxinfecção Alimentar por *Bacillus cereus*- Relato de caso. *Revista Higiene Alimentar*. **19** (130), p. 33-7, 2005.
- Souza, L. M.; Cipriani, T. R.; Sant’Ana, C. F.; Iacomini, M.; Gorin, P. A. J.; Sassaki, G. L.. Heart-cutting two-dimensional (size exclusion x reversed phase) liquid chromatography–mass spectrometry analysis of flavonol glycosides from leaves of *Maytenus ilicifolia*. *Journal of Chromatography A*, **1216**, p. 99–105, 2009.
- Souza, S. A. M.; Cattelan, L. V.; Vargas, D. P. V.; Piana, C. F. B.; Bobrowski, V. L.; Rocha, B. H. G.. Atividade alelopática e citotóxica do extrato aquoso de Espinheira-santa (*Maytenus ilicifolia* Mart. Ex Reiss.). *Publicatio UEPG. Ciências Biológicas e da Saúde*, **11** (3/4), p. 7-14, 2005.
- Souza-Moreira, T. M.; Salgado, H. R. N.; Pietro, R. C. L. R.. O Brasil no contexto de controle de qualidade de plantas medicinais. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, **20** (3), p. 435-440, 2010.

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

Tholl, D.; Lee, S. Terpene Specialized Metabolism in *Arabidopsis thaliana*. *American Society of Plant Biologists. The Arabidopsis book*, **9**, p. 2-28, 2011.

Tiberti, L. A.; Yariwake, J. H.; Ndjoko, K.; Hostettmann, K.. Short communication Identification of flavonols in leaves of *Maytenus ilicifolia* and *M. aquifolium* (Celastraceae) by LC/UV/MS analysis. *Journal of Chromatography B*, **846**, p. 378–384, 2007.

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**, p. 301-304, 2003.

Vasconcelos, J. N.; Lima, J. Q.; Lemos, T. L. G.; Oliveira, M. C. F.; Almeida, M. M. B.; Andrade-Neto, M.; Mafezoli, J.; Arriaga, A. M. C.; Santiago, G. M. P.; Braz-Filho, R.. Estudo químico e biológico de *Tephrosia toxicaria* Pers. *Química Nova*, **32** (2), p. 382-386, 2009.

Vazdekis, N. E. J.; Chávez, H.; Estévez-Braun, A.; Ravelo, A. G.. Triterpenoids and a lignan from the aerial parts of *Maytenus apurimacensis*. *Journal of Natural Products*, **72**, p. 1045-1048, 2009.

Veiga Júnior, V. F.; Pinto, A. C.; Maciel, M. A. M. Plantas Medicinais: cura segura? *Química Nova*, **28** (3), p. 519-528, 2005.

Velloso, J. C. R.; Khalil, N. M.; Formenton, V. A. F.; Ximenes, V. F.. Antioxidant activity of *Maytenus ilicifolia* root bark. *Fitoterapia*, **77**, p. 243-244, 2006.

Viegas Júnior, C. Bolzani, V. S.; Furlan, M.; Fraga, C. A. M.; Barreiro, E. J. Produtos naturais como candidatos a fármacos úteis no tratamento do Mal de Alzheimer. *Química Nova*, **27** (4), p. 655-660, 2004.

Voss-Rech, D.; Klein, C. S.; Techio, V. H.; Scheuermann, G. N.; Rech, G.; Fiorentin, L.. Antibacterial activity of vegetal extracts against serovars of *Salmonella*. *Ciência Rural*, **41** (2), p. 314-320, 2011.

Wang, T. Y. Follow-up observation on the therapeutic effects and remote reactions of artemisinin (Qinghaosu) and artemether in treating malaria in pregnant woman. *Journal of Traditional Chinese Medicine*, **9**, p. 28-30, 1989. In: McGready, R.; Cho, T.; Keo, N. K.; Thwai, K. L.; Villegas, L.; Looareesuwan, L.; White, N. J.; Nosten, F.. Artemisinin Antimalarials in Pregnancy: A prospective treatment study of 539 episodes of multidrug-resistant *Plasmodium falciparum*. *Clinical Infectious Diseases*, **33**, p. 2009-2016, 2001.

Xu, R.; Fazio, G. C.; Matsuda, S. P. T.. On the origins of triterpenoid skeletal diversity. *Phytochemistry*, **65**, p. 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**, p. 3257-3259, 2009.

Zacchino, A. S.; Gupta, M. P. Manual de técnicas in vitro para la detección de compuestos antifúngicos. Rosario: Corpus Editorial y Distribuidora, p. 85-99, 2007.

Zarotsky, V.; Sramek, J. J.; Cutler, N. R.. Galanthamine hydrobromide: an agent for Alzheimer's disease. *American Journal of Health - System Pharmacist*, **60**, p. 446-452, 2003.

Anexo. Os resultados dos testes biológicos das amostras frente aos microorganismos (*Salmonella typhimurium*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus* e *Candida albicans*) estão apresentados nas Tabelas de A1 a A15.

Tabela A1: Porcentagens (média e desvio) de inibição de *Salmonella typhimurium* das amostras **M1**, **M2** e **M3** nas doses de 250 a 0,12 µg/mL

Concentração (µg/mL)	M1				M2				M3			
	% de Inibição	Média	Desvio		% de Inibição	Média	Desvio		% de Inibição	Média	Desvio	
250	59,73	53,13	56,43	4,67	85,60	85,61	0,01		52,40	52,40	0,00	
125	36,03	32,13	34,08	2,76	100	100	3,18E-14		60,03	63,13	4,38	
62,5	19,53	14,53	17,03	3,54	57,37	66,33	6,33		50,33	55,28	7,00	
31,3	18,63	10,33	14,48	5,87	25,27	39,66	10,17		47,53	53,28	8,13	
15,6	15,23	8,53	11,88	4,74	26,11	32,21	4,31		39,83	45,75	8,38	
7,81	15,33	6,83	11,08	6,01	26,86	24,59	1,60		33,13	33,13	0,00	
3,91	13,33	6,38	9,85	4,91	17,52	17,78	0,17		32,83	38,63	8,20	
1,95	17,73	11,23	14,48	4,60	20,55	15,76	3,39		36,13	36,13	0,00	
0,98	16,83	10,33	13,58	4,60	18,53	15,76	1,96		34,53	43,48	12,66	
0,49	18,33	11,58	14,95	4,77	21,31	15,42	4,16		34,83	41,00	8,73	
0,24	19,43	12,33	15,88	5,02	21,81	16,93	3,45		34,53	38,83	6,08	
0,12	23,03	16,53	19,78	4,60	25,10	17,86	5,11		34,63	36,93	3,25	

Tabela A2: Porcentagens (média e desvio) de inibição de *Salmonella typhimurium* das amostras **M1 + M5**, **SEH** e **FSEH** nas doses de 250 a 0,12 µg/mL

Concentração (µg/mL)	M1 + M5			SEH			FSEH					
	% de Inibição	Média	Desvio	% de Inibição	Média	Desvio	% de Inibição	Média	Desvio			
250	47,93	37,73	42,83	7,21	73,73	79,53	8,20	94,63	89,31	91,97	3,76	
125	31,53	25,68	28,60	4,14	52,23	52,23	0,00	52,33	60,93	56,63	6,08	
62,5	10,83	10,83	10,83	0,00	26,93	26,93	0,00	26,13	31,13	28,63	3,54	
31,3	15,33	11,38	13,35	2,79	22,93	20,43	1,77	23,53	22,83	23,18	0,49	
15,6	13,63	13,63	13,63	0,00	14,73	14,73	0,00	8,83	6,63	7,73	1,56	
7,81	13,83	11,83	12,83	1,41	4,43	8,73	6,58	3,04	20,73	19,53	20,13	0,85
3,91	13,93	9,83	11,88	2,90	9,83	7,83	8,83	1,41	16,63	14,23	15,43	1,70
1,95	18,63	13,93	16,28	3,32	13,93	15,73	14,83	1,27	16,63	12,13	14,38	3,18
0,98	15,83	11,13	13,48	3,32	11,63	12,03	11,83	0,28	18,63	12,63	15,63	4,24
0,49	17,93	10,33	14,13	5,37	13,73	14,03	13,88	0,21	20,43	19,63	20,03	0,57
0,24	17,33	14,13	15,73	2,26	9,53	13,13	11,33	2,55	21,43	16,03	18,73	3,82
0,12	21,13	19,43	20,28	1,20	22,38	20,13	21,25	1,59	26,03	23,33	24,68	1,91

Tabela A3: Porcentagens (média e desvio) de inibição de *Salmonella typhimurium* das amostras **SEAT**, **FSEAT** e **SEM** nas doses de 250 a 0,12 µg/mL

Concentração (µg/mL)	SEAT				FSEAT				SEM			
	% de Inibição	Média	Desvio		% de Inibição	Média	Desvio		% de Inibição	Média	Desvio	
250	94,23	82,83	8,06		70,83	76,73	4,17		100,00	79,28	89,64	14,65
125	74,23	64,88	6,61		41,33	42,93	1,13		51,19	51,19	51,19	0,00
62,5	47,63	43,23	3,11		21,73	21,63	0,07		42,65	33,12	37,89	6,74
31,3	27,03	24,03	2,12		20,43	19,33	0,78		26,44	6,02	16,23	14,44
15,6	7,63	5,53	1,48		14,83	12,03	1,98		7,20	7,20	7,20	0,00
7,81	16,63	14,23	1,70		12,73	8,93	2,69		8,37	21,73	15,05	9,44
3,91	11,13	11,93	0,57		14,53	9,43	3,61		19,08	16,92	18,00	1,53
1,95	14,03	14,03	0,00		18,23	10,53	5,44		28,21	15,94	22,07	8,68
0,98	15,43	17,13	1,20		16,03	10,83	3,68		26,94	17,61	22,27	6,60
0,49	18,03	19,13	0,78		12,03	9,93	1,48		30,37	22,32	26,35	5,69
0,24	17,53	20,73	2,26		18,33	13,63	3,32		24,78	20,95	22,86	2,71
0,12	22,43	26,73	3,04		22,43	16,93	3,89		32,93	25,86	29,39	5,00

Tabela A4: Porcentagens (média e desvio) de inibição de *Escherichia coli* das amostras **M1**, **M2** e **M3** nas doses de 250 a 0,12 µg/mL

Concentração (µg/mL)	M1			M2			M3				
	% de Inibição	Média	Desvio	% de Inibição	Média	Desvio	% de Inibição	Média	Desvio		
250	56,93	51,43	54,18	3,89	80,38	80,38	0,00	71,03	65,93	68,48	3,61
125	44,13	40,93	42,53	2,26	100,00	100,00	0,00	49,53	55,73	52,63	4,38
62,5	20,13	16,33	18,23	2,69	49,11	35,00	42,05	47,63	47,63	47,63	0,00
31,3	24,53	18,53	21,53	4,24	37,52	34,14	35,83	32,63	38,03	35,33	3,82
15,6	18,93	13,08	16,00	4,14	31,06	22,95	27,01	24,63	27,03	25,83	1,70
7,81	19,13	10,43	14,78	6,15	28,54	20,15	24,35	24,33	24,03	24,18	0,21
3,91	11,03	7,18	9,10	2,72	13,18	13,18	13,18	22,33	21,63	21,98	0,49
1,95	15,53	10,93	13,23	3,25	27,60	19,21	23,40	28,13	25,03	26,58	2,19
0,98	14,13	10,03	12,08	2,90	20,19	12,63	16,41	27,43	27,43	27,43	0,00
0,49	18,13	11,73	14,93	4,53	21,06	12,08	16,57	30,73	25,33	28,03	3,82
0,24	23,83	15,03	19,43	6,22	20,58	10,42	15,50	26,33	24,83	25,58	1,06
0,12	21,53	15,63	18,58	4,17	20,19	7,35	13,77	27,43	28,73	28,08	0,92

Tabela A5: Porcentagens (média e desvio) de inibição de *Escherichia coli* das amostras **M1 + M5, SEH e FSEH** nas doses de 250 a 0,12 µg/mL

Concentração (µg/mL)	M1 + M5				SEH				FSEH			
	% de Inibição	Média	Desvio		% de Inibição	Média	Desvio		% de Inibição	Média	Desvio	
250	50,83	44,03	47,43	4,81	74,04	74,04	0,00		91,33	81,73	86,53	6,79
125	43,83	39,78	41,80	2,86	79,03	79,03	0,00		58,43	62,83	60,63	3,11
62,5	22,93	18,53	20,73	3,11	24,05	30,50	4,56		37,73	42,53	40,13	3,39
31,3	20,53	16,93	18,73	2,55	28,27	27,69	0,41		42,43	47,33	44,88	3,46
15,6	21,53	15,53	18,53	4,24	23,42	16,24	5,08		20,83	21,03	20,93	0,14
7,81	18,93	16,93	17,93	1,41	5,75	13,32	5,35		15,63	13,43	14,53	1,56
3,91	17,03	11,43	14,23	3,96	10,51	13,13	1,85		17,73	17,73	17,73	0,00
1,95	16,03	13,13	14,58	2,05	11,87	12,16	0,21		20,73	24,73	22,73	2,83
0,98	17,53	13,43	15,48	2,90	11,38	17,98	4,67		25,23	19,73	22,48	3,89
0,49	20,03	15,03	17,53	3,54	11,09	14,39	2,33		26,93	24,83	25,88	1,48
0,24	19,33	16,43	17,88	2,05	10,02	14,59	3,23		22,73	18,93	20,83	2,69
0,12	18,53	16,13	17,33	1,70	9,73	12,06	1,65		23,63	16,73	20,18	4,88

Tabela A6: Porcentagens (média e desvio) de inibição de *Escherichia coli* das amostras **SEAT**, **FSEAT** e **SEM** nas doses de 250 a 0,12 µg/mL

Concentração (µg/mL)	SEAT			FSEAT			SEM					
	% de Inibição	Média	Desvio	% de Inibição	Média	Desvio	% de Inibição	Média	Desvio			
250	81,13	88,73	84,93	5,37	68,63	55,53	62,08	9,26	91,77	100,00	95,88	5,82
125	68,13	58,73	63,43	6,65	46,83	43,43	45,13	2,40	47,21	47,21	47,21	0,00
62,5	54,13	41,03	47,58	9,26	19,33	21,13	20,23	1,27	34,14	26,34	30,24	5,52
31,3	41,83	36,83	39,33	3,54	28,23	32,23	30,23	2,83	28,38	27,12	27,75	0,89
15,6	25,73	15,13	20,43	7,50	18,33	16,63	17,48	1,20	16,33	16,33	16,33	0,00
7,81	16,93	13,83	15,38	2,19	15,13	17,03	16,08	1,34	14,36	8,92	11,64	3,84
3,91	16,63	13,93	15,28	1,91	17,93	13,33	15,63	3,25	10,66	5,06	7,86	3,96
1,95	20,33	14,43	17,38	4,17	18,23	16,93	17,58	0,92	23,03	19,95	21,49	2,17
0,98	18,33	23,23	20,78	3,46	17,83	13,03	15,43	3,39	21,61	18,06	19,84	2,51
0,49	21,33	23,13	22,23	1,27	18,43	15,73	17,08	1,91	27,36	21,92	24,64	3,84
0,24	15,63	20,13	17,88	3,18	18,93	14,13	16,53	3,39	23,82	21,45	22,63	1,67
0,12	18,33	19,53	18,93	0,85	19,73	15,53	17,63	2,97	19,88	16,02	17,95	2,73

Tabela A7: Porcentagens (média e desvio) de inibição de *Staphylococcus aureus* das amostras **M1**, **M2** e **M3** nas doses de 250 a 0,12 µg/mL

Concentração (µg/mL)	M1				M2				M3			
	% de Inibição	Média	Desvio		% de Inibição	Média	Desvio		% de Inibição	Média	Desvio	
250	80,38	100,00	90,19	13,87	100,00	100,00	0,00		100,00	100,00	0,00	
125	80,82	80,82	80,82	0,00	94,01	94,01	0,00		83,14	82,87	83,01	0,19
62,5	64,55	63,24	63,89	0,92	72,86	72,86	0,00		60,43	67,17	63,80	4,77
31,3	45,80	50,16	47,98	3,08	62,04	62,04	0,00		45,03	49,28	47,16	3,01
15,6	55,97	43,04	49,51	9,14	65,51	65,51	0,00		31,55	50,02	40,78	13,06
7,81	45,66	38,68	42,17	4,93	64,84	67,74	4,10		46,35	46,35	46,35	0,00
3,91	41,59	30,55	36,07	7,81	69,86	68,12	2,46		24,95	45,91	35,43	14,82
1,95	38,25	31,85	35,05	4,52	69,38	66,96	1,71		33,45	33,45	33,45	0,00
0,98	37,38	26,04	31,71	8,01	67,54	66,29	0,89		24,37	36,60	30,49	8,65
0,49	22,26	19,79	21,03	1,75	68,03	66,48	1,09		21,58	31,40	26,49	6,94
0,24	43,48	21,68	32,58	15,41	68,03	66,09	1,37		26,27	27,00	26,64	0,52
0,12	31,42	15,44	23,43	11,30	67,54	67,74	0,14		33,60	27,00	30,30	4,66

Tabela A8: Porcentagens (média e desvio) de inibição de *Staphylococcus aureus* das amostras **M1 + M5, SEH e FSEH** nas doses de 250 a 0,12 µg/mL

Concentração (µg/mL)	M1 + M5				SEH				FSEH			
	% de Inibição	Média	Desvio		% de Inibição	Média	Desvio		% de Inibição	Média	Desvio	
250	76,36	76,36	0,00		96,81	100,00	98,40	2,26	87,49	87,49	0,00	
125	77,68	77,68	0,00		94,76	94,76	94,76	0,00	100,00	100,00	0,00	
62,5	62,83	62,83	0,00		86,21	86,21	86,21	0,00	87,49	87,49	0,00	
31,3	64,00	53,27	58,64	7,59	94,76	80,28	87,52	10,24	82,85	91,70	87,28	6,26
15,6	52,83	46,65	49,74	4,37	93,96	82,79	88,37	7,90	88,05	92,27	90,16	2,98
7,81	42,83	40,33	41,58	1,77	74,12	77,54	75,83	2,42	91,28	95,78	93,53	3,18
3,91	35,33	32,09	33,71	2,29	83,36	78,00	80,68	3,79	95,64	97,61	96,63	1,39
1,95	35,92	31,50	33,71	3,12	80,16	78,68	79,42	1,05	96,34	96,48	96,41	0,10
0,98	35,92	31,65	33,78	3,02	79,14	77,66	78,40	1,05	96,20	98,17	97,19	1,39
0,49	46,65	40,48	43,56	4,37	79,59	77,88	78,74	1,21	97,33	99,86	98,59	1,79
0,24	33,12	33,12	33,12	0,00	78,57	63,07	70,82	10,96	97,05	97,47	97,26	0,30
0,12	19,45	15,92	17,68	2,50	75,95	64,66	70,30	7,98	96,63	96,63	96,63	0,00

Tabela A9: Porcentagens (média e desvio) de inibição de *Staphylococcus aureus* das amostras **SEAT**, **FSEAT** e **SEM** nas doses de 250 a 0,12 µg/mL

Concentração (µg/mL)	SEAT				FSEAT				SEM			
	% de Inibição	Média	Desvio		% de Inibição	Média	Desvio		% de Inibição	Média	Desvio	
250	92,68	92,68	0,00		65,92	54,30	60,11	8,21	95,03	95,03	0,00	
125	85,77	85,77	0,00		90,48	88,42	89,45	1,46	87,68	87,68	0,00	
62,5	98,27	98,27	0,00		66,21	70,77	68,49	3,22	62,98	69,74	66,36	4,78
31,3	51,65	54,30	52,98	1,87	58,27	55,33	56,80	2,08	56,21	52,53	54,37	2,60
15,6	38,56	46,65	42,61	5,72	49,00	41,06	45,03	5,62	47,24	47,24	47,24	0,00
7,81	39,74	39,74	39,74	0,00	45,92	35,62	40,77	7,28	44,30	43,12	43,71	0,83
3,91	37,39	37,24	37,31	0,10	40,92	36,36	38,64	3,22	42,39	39,45	40,92	2,08
1,95	34,45	38,56	36,50	2,91	39,15	38,12	38,64	0,73	41,21	37,83	39,52	2,39
0,98	35,33	39,15	37,24	2,70	37,98	39,59	38,78	1,14	39,30	35,18	37,24	2,91
0,49	33,71	36,21	34,96	1,77	42,24	38,42	40,33	2,70	39,74	36,36	38,05	2,39
0,24	36,21	36,21	36,21	0,00	40,62	40,18	40,40	0,31	36,65	34,45	35,55	1,56
0,12	35,77	26,50	31,14	6,55	19,74	19,74	19,74	0,00	30,03	28,86	29,45	0,83

Tabela A10: Porcentagens (média e desvio) de inibição de *Bacillus cereus* das amostras **M1**, **M2** e **M3** nas doses de 250 a 0,12 µg/mL

Concentração (µg/mL)	M1				M2				M3			
	% de Inibição	Média	Desvio		% de Inibição	Média	Desvio		% de Inibição	Média	Desvio	
250	66,55	63,21	64,88	2,36	100,00	100,00	0,00		65,01	61,75	63,38	2,30
125	49,32	46,88	48,10	1,73	97,26	97,26	0,00		41,52	44,95	43,23	2,42
62,5	30,29	26,56	28,42	2,64	38,17	38,17	0,00		29,09	29,00	29,05	0,06
31,3	29,43	22,45	25,94	4,94	32,35	32,35	0,00		25,06	25,06	25,06	0,00
15,6	26,26	20,00	23,13	4,43	26,12	19,35	22,73	4,79	26,00	24,72	25,36	0,91
7,81	27,72	21,33	24,52	4,52	28,78	22,76	25,77	4,26	24,97	23,09	24,03	1,33
3,91	27,63	21,80	24,72	4,12	29,61	23,38	26,50	4,41	20,95	21,12	21,03	0,12
1,95	29,17	24,42	26,80	3,36	26,29	20,68	23,48	3,97	20,69	20,69	20,69	0,00
0,98	27,29	20,95	24,12	4,49	24,29	18,23	21,26	4,29	16,92	19,83	18,37	2,06
0,49	26,35	21,33	23,84	3,55	26,20	19,89	23,05	4,47	18,80	20,09	19,45	0,91
0,24	26,43	19,14	22,79	5,15	21,88	18,02	19,95	2,73	18,97	18,97	18,97	0,00
0,12	29,43	23,90	26,67	3,91	26,45	19,43	22,94	4,97	20,26	20,26	20,26	0,00

Tabela A11: Porcentagens (média e desvio) de inibição de *Bacillus cereus* das amostras **M1 + M5, SEH e FSEH** nas doses de 250 a 0,12 µg/mL

Concentração (µg/mL)	M1 + M5				SEH				FSEH			
	% de Inibição	Média	Desvio		% de Inibição	Média	Desvio		% de Inibição	Média	Desvio	
250	61,49	57,72	59,61	2,67	88,07	78,21	83,14	6,97	81,73	81,73	0,00	
125	44,35	39,55	41,95	3,39	67,67	58,75	63,21	6,30	42,21	51,38	6,49	
62,5	32,78	26,09	29,43	4,73	34,40	34,40	34,40	0,00	26,17	35,69	6,73	
31,3	29,60	23,69	26,65	4,18	41,18	34,53	37,85	4,70	31,75	28,57	2,24	
15,6	27,20	21,37	24,29	4,12	36,46	29,39	32,93	5,00	23,52	30,98	5,27	
7,81	26,09	22,92	24,50	2,24	18,54	18,89	18,72	0,24	22,23	20,17	1,45	
3,91	22,23	22,23	22,23	0,00	21,89	20,26	21,07	1,15	24,20	18,80	3,82	
1,95	23,95	20,17	22,06	2,67	24,50	21,63	23,07	2,03	22,83	17,17	4,00	
0,98	23,86	19,06	21,46	3,39	18,54	15,46	17,00	2,18	19,92	14,86	3,58	
0,49	23,47	20,17	21,82	2,33	21,12	15,37	18,24	4,06	20,60	16,83	2,67	
0,24	19,92	19,14	19,53	0,55	18,12	15,80	16,96	1,64	20,69	15,20	3,88	
0,12	22,40	23,69	23,05	0,91	16,14	16,74	16,44	0,42	25,57	22,91	1,89	

Tabela A12: Porcentagens (média e desvio) de inibição de *Bacillus cereus* das amostras **SEAT**, **FSEAT** e **SEM** nas doses de 250 a 0,12 µg/mL

Concentração (µg/mL)	SEAT			FSEAT			SEM		
	% de Inibição	Média	Desvio	% de Inibição	Média	Desvio	% de Inibição	Média	Desvio
250	80,40	80,40	0,00	77,87	75,64	1,58	100,00	88,24	8,32
125	79,16	62,54	11,75	58,49	55,75	1,94	57,46	57,46	0,00
62,5	53,86	38,48	10,88	26,77	30,29	2,49	34,75	28,15	4,67
31,3	34,51	28,31	4,39	30,80	29,78	0,73	28,66	26,52	1,52
15,6	22,52	18,88	2,57	30,20	26,60	2,55	24,63	24,63	0,00
7,81	22,68	13,01	6,84	24,29	23,26	0,73	27,03	23,17	2,73
3,91	8,63	11,85	2,28	24,89	22,62	1,61	27,20	20,69	4,61
1,95	13,75	10,61	2,22	20,77	19,40	0,97	25,40	22,06	2,36
0,98	17,89	17,89	0,00	20,09	20,17	0,06	25,57	19,40	4,36
0,49	18,30	18,30	0,00	20,43	18,46	1,39	23,43	19,23	2,97
0,24	15,90	16,81	0,64	21,20	18,76	1,73	19,57	17,00	1,82
0,12	15,24	19,87	3,27	23,09	20,60	1,76	26,00	25,15	0,61

Tabela A13: Porcentagens (média e desvio) de inibição de *Candida albicans* das amostras **M1**, **M2** e **M3** nas doses de 250 a 0,12 µg/mL

Concentração (µg/mL)	M1				M2				M3			
	% de Inibição	Média	Desvio		% de Inibição	Média	Desvio		% de Inibição	Média	Desvio	
250	93,17	93,17	0,00		80,01	72,88	5,04		74,34	74,34	0,00	
125	64,93	69,43	6,36		90,45	90,45	0,00		50,33	55,52	3,67	
62,5	44,85	46,33	2,09		86,58	86,58	0,00		54,12	54,12	0,00	
31,3	38,25	32,63	7,95		85,20	93,92	6,17		45,41	43,73	1,19	
15,6	36,00	33,40	3,67		82,77	90,28	5,31		29,68	29,68	0,00	
7,81	37,41	37,41	0,00		82,33	83,10	0,55		25,33	27,43	1,49	
3,91	38,67	38,67	0,00		81,89	82,88	0,70		40,22	40,22	0,00	
1,95	41,90	38,95	4,17		79,68	82,00	1,64		44,15	44,15	0,00	
0,98	39,09	34,53	6,46		79,79	78,79	0,70		43,45	43,45	0,00	
0,49	39,93	33,75	4,37		80,12	76,03	2,89		44,71	44,71	0,00	
0,24	39,09	34,74	6,16		80,01	76,36	2,58		37,41	37,41	0,00	
0,12	24,34	22,03	3,28		79,12	80,89	1,25		24,77	24,77	0,00	

Tabela A14: Porcentagens (média e desvio) de inibição de *Candida albicans* das amostras **M1 + M5, SEH e FSEH** nas doses de 250 a 0,12 µg/mL

Concentração (µg/mL)	M1 + M5			SEH			FSEH		
	% de Inibição	Média	Desvio	% de Inibição	Média	Desvio	% de Inibição	Média	Desvio
250	73,50	73,50	0,00	76,18	84,50	5,88	88,51	88,51	0,00
125	61,42	61,42	0,00	96,24	100,00	2,66	100,00	100,00	0,00
62,5	43,73	32,49	7,95	90,54	90,54	0,00	97,80	97,80	0,00
31,3	31,37	30,52	0,60	91,91	83,70	5,80	83,01	88,51	3,89
15,6	25,61	25,33	0,20	91,22	88,26	2,10	86,19	90,22	2,85
7,81	27,72	20,83	4,87	77,55	82,90	3,79	88,15	88,88	0,52
3,91	43,02	37,69	3,77	86,89	83,59	2,34	89,74	89,49	0,17
1,95	45,69	40,50	3,67	83,93	83,93	0,00	88,15	88,02	0,09
0,98	40,36	41,06	0,50	82,56	81,99	0,40	88,15	87,78	0,26
0,49	46,25	39,93	4,47	50,76	49,39	0,97	87,90	88,15	0,17
0,24	40,50	35,72	3,38	41,07	45,40	3,06	83,99	84,97	0,69
0,12	11,00	13,11	1,49	38,11	27,34	7,62	85,34	86,31	0,69

Tabela A15: Porcentagens (média e desvio) de inibição de *Candida albicans* das amostras **SEAT**, **FSEAT** e **SEM** nas doses de 250 a 0,12 µg/mL

Concentração (µg/mL)	SEAT				FSEAT				SEM			
	% de Inibição	Média	Desvio		% de Inibição	Média	Desvio		% de Inibição	Média	Desvio	
250	100,00	100,00	0,00		100,00	92,73	96,37	5,14	74,63	77,72	76,17	2,18
125	98,92	98,92	0,00		58,54	61,16	59,85	1,85	94,57	94,57	94,57	0,00
62,5	65,51	55,95	60,73	6,76	63,24	62,24	62,74	0,71	100,00	100,00	100,00	0,00
31,3	31,70	25,64	28,67	4,29	63,78	63,78	63,78	0,00	97,80	97,80	97,80	0,00
15,6	21,06	23,48	22,27	1,71	24,34	23,39	23,87	0,67	53,00	53,00	53,00	0,00
7,81	22,41	26,04	24,23	2,57	27,20	25,77	26,49	1,01	37,69	37,69	37,69	0,00
3,91	32,51	35,74	34,13	2,29	36,38	28,75	32,57	5,39	30,52	30,52	30,52	0,00
1,95	27,93	29,82	28,87	1,33	39,24	35,54	37,39	2,61	25,75	25,75	25,75	0,00
0,98	23,35	23,35	23,35	0,00	37,57	36,02	36,80	1,10	28,14	28,14	28,14	0,00
0,49	24,02	24,02	24,02	0,00	39,36	36,74	38,05	1,85	27,58	27,58	27,58	0,00
0,24	20,52	19,85	20,18	0,48	43,05	34,59	38,82	5,98	20,13	20,13	20,13	0,00
0,12	13,25	16,21	14,73	2,10	11,00	12,91	11,95	1,35	10,02	10,02	10,02	0,00