

UFMG-ICEx/DQ.1026^a

D. 559^a

FERNANDA LOPES FERREIRA

**ESTUDO FITOQUÍMICO E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE
BIOLÓGICA DE EXTRATOS E CONSTITUINTES DAS FOLHAS
DE *Maytenus distichophylla* (CELASTRACEAE)**

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

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

Belo Horizonte

2014

F368e Ferreira, Fernanda Lopes
2014 Estudo fitoquímico e avaliação da atividade
D biológica de extratos e constituintes das folhas de
Maytenus distichophylla (Celastraceae) [manuscrito] /
Fernanda Lopes Ferreira. 2014.
[xii], 119 f. : il.

Orientadora: Lucienir Pains Duarte.
Coorientadora: Grácia Divina de Fátima Silva.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de
Minas Gerais - Departamento de Química.
Inclui bibliografia.

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

CDU 043

UFMG


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



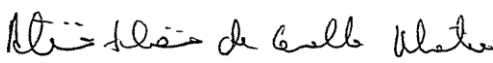
"Estudo Fitoquímico e Avaliação da Atividade Biológica de Extratos e Constituintes das Folhas de *Maytenus distichophylla* (Celastraceae)"

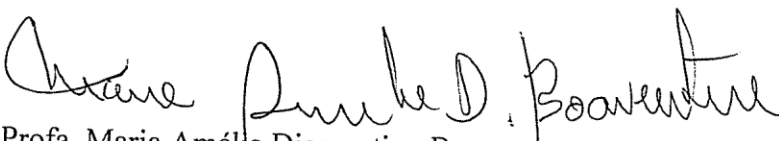
Fernanda Lopes Ferreira

Dissertação aprovada pela banca examinadora constituída pelos Professores:


Prof. Lucienir Pains Duarte - Orientadora
UFMG


Prof. Grácia Divina de Fátima Silva - Coorientadora
UFMG


Prof. Antônio Flávio de Carvalho Alcântara
UFMG


Prof. Maria Amélia Diamantino Boaventura
UFMG

Belo Horizonte, 25 de julho de 2014.

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 com a colaboração do professor Doutor Sidney Augusto Vieira Filho (UFOP).

“Quando amamos e acreditamos, do fundo de nossa alma, em algo, nos sentimos mais fortes que o mundo, e somos tomados de uma serenidade que vem da certeza de que nada poderá vencer a nossa fé. Essa força estranha faz com que sempre tomemos a decisão certa, na hora exata, e quando atingimos nossos objetivos ficamos surpresos com nossa própria capacidade.”
(Paulo Coelho)

Dedico este trabalho a minha mãe Zu pela imensa dedicação e amor. A meu querido esposo Rodrigo pela colaboração e paciência durante a realização desse trabalho. Aos meus filhinhos, Sofia e Bernardo, pelo amor e alegria em todos os momentos.

AGRADECIMENTOS

À Deus, pela grande benção da vida. Como ela é frágil e vulnerável... Obrigada "Pai", por cada dia vivido e cada momento ao lado das pessoas que mais amo.

À minha querida orientadora Prof^a Lucienir, uma das pessoas mais especiais que conheci, minha grande mestre, mãe, amiga... Uma pessoa maravilhosa que conquistou o meu coração e minha gratidão. Obrigada, "Lu", por sua dedicação, carinho, paciência e por tanto conhecimento que me transmitiu, os quais vão muito além da Química Orgânica e desse trabalho. Obrigada por tantos bons exemplos de simplicidade, amizade, alegria associados a tanta competência. Obrigada por estar comigo desde os primeiros semestres da graduação, na pós graduação, por estar junto nos meus melhores momentos e nos piores em que mais precisei. Obrigada por tudo!!!

Ao meu querido esposo Rodrigo, por caminhar ao meu lado, pela preciosa colaboração em minhas ausências, durante o mestrado, cuidando com amor dos filhinhos que Deus nos enviou. Pelo amor e cumplicidade.

À minha mãe, que tem se dedicado tanto a minha vida, mais do que a dela própria, nos momentos em que mais necessitei. Esse trabalho não teria se concluído sem a sua ajuda. Ao meu pai, pela compreensão e carinho. Ao meu irmão, por ser tão carinhoso.

Aos meus filhinhos, meus grandes presentes da vida, a alegria de vocês é a minha felicidade. Meus anjinhos... cada esforço nesse trabalho foi pensando muito em vocês!!!

À toda minha família, em especial minhas tias Andreia, Maria José e Marilha por muitas vezes terem cuidado de meus bebês para que eu pudesse vir à faculdade.

Às minhas queridas amigas Mariana, Alessandra e Karen por serem companhias preciosas. A amizade de vocês é muito especial, cada dia que estivemos e estamos juntas é uma alegria e me sinto prestigiada por terem vocês como amigas, irmãs. Obrigada pelo carinho, dentro e fora da faculdade.

Agradecimentos

Às minhas queridas estagiárias Anne Velloso e Michelle Duarte, pela grande ajuda no isolamento das substâncias, divisão de tarefas e pela convivência tão harmoniosa. Os dias foram mais alegres na companhia de vocês!!!

À minha co-orientadora Dr^a. Grácia Divina de Fátima Silva pelo conhecimento transmitido, serenidade e conselhos. Obrigada pelo acolhimento no NEPLAM.

Ao colega Djalma Menezes pela coleta da planta e envio do material vegetal.

À querida professora Dr^a. Roqueline Miranda, sempre tão alegre, obrigada pelo apoio no trabalho e conversas amigas e divertidas.

Ao nosso grande colaborador professor Dr. Sidney Augusto Vieira Filho (Bibo), pelo apoio e sugestões no trabalho.

Às professoras Dr^a. Jacqueline Aparecida Takahashi, Dr^a. Lúcia Pinheiro dos Santos Pimenta pelo apoio e execução dos testes biológicos.

À doutoranda Thaisa Helena Silva Fonseca e à professora Dr^a Maria Aparecida Gomes pela execução dos testes de atividades antiparasitárias.

À professora Dr^a. Rosemeire Brondi Alves, uma das professoras mais dedicadas e prestativas que tive o prazer de conhecer. Obrigada por ter tirado tantas dúvidas em Química Orgânica Avançada, mesmo sem ter sido a professora da disciplina e por ser minha professora da disciplina de RMN, adorei ter sido sua aluna.

Aos professores Dr. Antônio Flávio de Alcântara (Tininha), Dr^a Maria Amélia Diamantino Boaventura e Dr^a Adriana Akemi Okuma pela participação na banca do mestrado e pelas importantes contribuições.

À Dr^a. Ivana Silva Lula do Laboratório de Ressonância Magnética de Alta Resolução, pela execução dos experimentos de RMN.

À Dr^a. Vanny Ferraz pela obtenção dos espectros de massa.

Aos meus professores da pós-graduação Dr^a. Rossimirian de Freitas, Dr. Adão Aparecido, Dr. Ângelo de Fátima e Dr. Humberto Stumpf pela contribuição à minha formação acadêmica.

Aos meus tios, primos, cunhados e cunhados, sobrinhos e afilhadinhas por serem minha grande família.

À amiga Márcia Chaves, funcionária do Departamento de Química, por tanto carinho e cuidado comigo, você é extensão da minha família. Nunca me esquecerei de você.

Agradecimentos

Aos colegas do NEPLAM pela convivência harmoniosa e tantos momentos divertidos, as festinhas, os congressos e tantas trocas de conhecimento. À amiga Vanessa Gregório e Fernando César por tantas conversas sérias e as “fiadas”, pelo carinho.

À Paulete e Lílian, funcionárias da secretaria da pós-graduação, pela disponibilidade em atender minhas necessidades e esclarecimento de dúvidas.

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

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

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

A todos que de alguma forma contribuíram para a realização desse trabalho.

SUMÁRIO

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

1- INTRODUÇÃO

1.1 NEPLAM.....	1
1.2 O papel dos produtos naturais no desenvolvimento de fármacos	2
1.3 Família Celastraceae.....	8
1.4 <i>Maytenus distichophylla</i>	10

2 - PARTE EXPERIMENTAL

2.1 Métodos gerais	13
2.2 Coleta e identificação do material vegetal	14
2.3 Preparo dos extratos das folhas de <i>Maytenus distichophylla</i>	14
2.3.1 Elaboração de EHE	16
2.3.2 Elaboração de SHE	30
2.3.3 Elaboração de ECL	31
2.3.4 Elaboração de SEC	40

3 - DETERMINAÇÃO ESTRUTURAL

3.1 MD01: Esqualeno.....	43
3.2 MD02 e MD03: 3 β -esteariloxi-urs-12-eno e 3 β -esteariloxi-olean-12-eno.....	46
3.3 MD04: 3-oxofriedelano (friedelina)	51
3.4 MD05: 3 β -hidroxifriedelano (friedelinol).....	55
3.5 MD06: Mistura de álcoois graxos	59

3.6	MD07: 3 β -urs-12-eno e MD08: 3 β -olean-12-eno.....	62
3.7	MD09: β -sitosterol	67
3.8	MD10: 3-oxo-3 α -hidroxifriedelano	71
3.9	MD11: 3 β ,24-dihidroxifriedelano.....	80
3.10	MD12: Acetato de sódio	84
3.11	MD13: 1,4- <i>trans</i> -poli-isopreno (guta-percha).....	87
3.12	MD14: Ácido tritriacontanóico.....	90
3.13	MD15: 3-O- β -D-glicosil- β -sitosterol	94

4 - ESTUDO DA ATIVIDADE BIOLÓGICA

4.1	Atividade antimicrobiana	98
4.1.1	Método da mínima concentração inibitória	99
4.1.1.1	Metodologia.....	99
4.1.1.2	Discussão dos resultados.....	100
4.2	Bioensaio de inibição da acetilcolinesterase em microplaca empregando reagente de Ellman	101
4.2.1	Metodologia.....	102
4.2.2	Discussão dos resultados.....	103
4.3	Bioensaio para determinação da atividade antioxidante	104
4.3.1	Metodologia.....	105
4.3.2	Discussão dos resultados.....	106
4.4	Atividade antiparasitária	108
4.4.1	Metodologia.....	108
4.4.2	Resultado do screening.....	109

CONCLUSÃO	110
------------------------	-----

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	112
-----------------------------------------	-----

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Estrutura da pilorcapina.	2
Figura 2: Fontes dos compostos utilizados na produção de novos medicamentos por ano (NEWMAN E CRAGG, 2012).	4
Figura 3: Fontes dos compostos utilizados na produção de novos medicamentos de 1981 a 2010 (NEWMAN E CRAGG, 2012)	4
Figura 4: Porcentagem de N/NB/ND por ano, de 1981 a 2010 (NEWMAN E CRAGG, 2012)	4
Figura 5: Exemplos de produtos naturais com propriedade inibidora de AChE (VIEGAS <i>et al.</i> , 2011)	8
Figura 6: Estruturas químicas de TTPC's com importantes atividades biológicas ...	10
Figura 7: Fotografia de <i>Maytenus distichophylla</i>	11
Figura 8: Estruturas químicas de TTPC's isolados de <i>M. distichophylla</i>	12
Figura 9: Esquema utilizado na preparação dos extratos das folhas de <i>M. distichophylla</i>	15
Figura 10: Esquema utilizado no fracionamento de EHE.	29
Figura 11: Esquema utilizado no fracionamento de ECL.	40
Figura 12: Espectro de RMN de ^1H de MD01 (400 MHz) em CDCl_3	44
Figura 13: Espectro de RMN de ^{13}C de MD01 (100 MHz) em CDCl_3	44
Figura 14: Subespectro DEPT-135 de MD01 (100 MHz) em CDCl_3	45
Figura 15: Espectro na região do IV da mistura de MD02 e MD03 (KBr).	46
Figura 16: Espectro de RMN de ^1H (400 MHz) da mistura de MD02 e MD03 em CDCl_3	47
Figura 17: Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz) da mistura de MD02 e MD03 em CDCl_3	48
Figura 18: Expansão do espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz) da mistura de MD02 e MD03, em CDCl_3 ...	48
Figura 19: Subespectro DEPT135 (100 MHz) da mistura de MD02 e MD03 em CDCl_3	49

Figura 20: Expansão do subespectro de RMN de ^{13}C (100 MHz) da mistura de MD02 e MD03, em CDCl_3	49
Figura 21: Espectro na região do IV de MD04 (KBr).....	51
Figura 22: Espectro de RMN de ^1H de MD04 (400 MHz) em CDCl_3	52
Figura 23: Espectro de RMN de ^{13}C de MD04 (100 MHz) em CDCl_3	53
Figura 24: Expansão do espectro de RMN de ^{13}C de MD04 (100 MHz) em CDCl_3	53
Figura 25: Subespectro DEPT135 (100 MHz) de MD04 em CDCl_3	53
Figura 26: Espectro na região do IV de MD05 (KBr).....	55
Figura 27: Espectro de RMN de ^1H (400 MHz) de MD05 em CDCl_3 + Piridina- d_5	56
Figura 28: Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz) de MD05 em CDCl_3 + Piridina- d_5	57
Figura 29: Subespectro DEPT135 (100 MHz) de MD05 em CDCl_3 + Piridina- d_5	57
Figura 30: Espectro na região do IV de MD06 (KBr).....	59
Figura 31: Espectro de RMN de ^1H (400 MHz) de MD06 em CDCl_3	60
Figura 32: Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz) de MD06 em CDCl_3	60
Figura 33: Subespectro DEPT135 (100 MHz) de MD06 em CDCl_3	60
Figura 34: Cromatograma de Íons Totais (IE) de MD06 sililado.....	61
Figura 35: Espectro na região do IV da mistura de MD07 e MD08 (KBr).....	62
Figura 36: Espectro de RMN de ^1H (400 MHz) da mistura de MD07 e MD08 em CDCl_3	63
Figura 37: Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz) da mistura de MD07 e MD08 em CDCl_3	64
Figura 38: Expansão do espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz) da mistura de MD07 e MD08 em CDCl_3	64
Figura 39: Subespectro DEPT135 (100 MHz) da mistura de MD07 e MD08 em CDCl_3	65
Figura 40: Espectro na região do IV de MD09 (KBr).....	67
Figura 41: Espectro de RMN de ^1H (200 MHz) de MD09 em CDCl_3	68

Figura 42: Espectro de RMN de ^{13}C (50 MHz) de MD09 em CDCl_3	69
Figura 43: Subespectro DEPT135 (50 MHz) de MD09 em CDCl_3	69
Figura 44: Espectro na região do IV de MD10 (KBr).....	71
Figura 45: Espectro de RMN de ^1H (400 MHz) de MD10 em $\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$	72
Figura 46: Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz) de MD10 em $\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$	73
Figura 47: Expansão do espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz) de MD10 em $\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$	73
Figura 48: Subespectro DEPT135 (100 MHz) de MD10 em $\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$	73
Figura 49: Expansão do mapa de contornos HSQC (400 MHz) de MD10 em $\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$	75
Figura 50: Mapa de contornos HMBC (400 MHz) de MD10 em $\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$	76
Figura 51: Expansão do mapa de contornos HMBC (400 MHz) de MD10 em $\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$	76
Figura 52: Expansão do mapa de contornos HMBC (400 MHz) de MD10 em $\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$	77
Figura 53: Expansão do mapa de contornos HMBC (400 MHz) de MD10 em $\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$	77
Figura 54: Mapa de contornos COSY (400 MHz) de MD10 em $\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$	78
Figura 55: Espectro na região do IV de MD11 (KBr).....	80
Figura 56: Espectro de RMN de ^1H (400 MHz) de MD11 em CDCl_3 + piridina d_5	81
Figura 57: Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz) de MD11 em CDCl_3 + piridina d_5	82
Figura 58: Subespectro DEPT135 (100 MHz) de MD11 em CDCl_3 + piridina d_5	82
Figura 59: Espectro na região do IV de MD12 (KBr).....	84
Figura 60: Espectro de RMN de ^1H (400 MHz) de MD12 em D_2O	85
Figura 61: Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz) de MD12 em D_2O	85
Figura 62: Subespectro DEPT135 (100 MHz) de MD12 em D_2O	85
Figura 63: Espectro de RMN de ^1H (400 MHz) de MD13 em CDCl_3	87
Figura 64: Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz) de MD13 em CDCl_3	88

Figura 65: Subespectro DEPT135 (100 MHz) de MD13 em CDCl_3	88
Figura 66: Espectro na região do IV de MD14 (KBr).....	90
Figura 67: Espectro de RMN de ^1H (400 MHz) de MD14 em CDCl_3 + piridina d_5	91
Figura 68: Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz) de MD14 em CDCl_3 + piridina d_5	92
Figura 69: Subespectro DEPT135 (100 MHz) de MD14 em CDCl_3 + piridina d_5	92
Figura 70: Espectro na região do IV de MD15 (KBr).....	94
Figura 71: Espectro de RMN de ^1H (400 MHz) de MD15 em CDCl_3	95
Figura 72: Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz) de MD15 em CDCl_3 + piridina d_5	96
Figura 73: Subespectro DEPT135 (100 MHz) de MD15 em CDCl_3 + piridina d_5	96
Figura 74: Reações químicas que ocorrem no Teste de Ellman.....	102
Figura 75: Estrutura do DPPH antes e depois da reação com o antioxidante.....	105
Figura 76: Gráfico da atividade antioxidante de EAE e padrões.	107
Figura 77: Gráfico da atividade antioxidante de ECL e padrões.	107

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1. Origem de fármacos antimicrobianos (bacteriano, fúngico, parasitário e viral) de 1981-2010.....	5
Tabela 2. Ordem de eluição da coluna A	16
Tabela 3. Grupos relacionados da coluna A.....	17
Tabela 4. Ordem de eluição da coluna B	18
Tabela 5. Ordem de eluição da coluna D	19
Tabela 6. Ordem de eluição da coluna E	20
Tabela 7. Ordem de eluição da coluna F	21
Tabela 8. Ordem de eluição da coluna G	22
Tabela 9. Ordem de eluição da coluna H	23
Tabela 10. Ordem de eluição da coluna I.....	24
Tabela 11. Ordem de eluição da coluna J.....	25
Tabela 12. Ordem de eluição da coluna K	26
Tabela 13. Ordem de eluição da coluna L.....	27
Tabela 14. Ordem de eluição da coluna M.....	28
Tabela 15. Ordem de eluição da coluna N	30
Tabela 16. Ordem de eluição da coluna Q.....	31
Tabela 17. Grupos relacionados da coluna Q	32
Tabela 18. Ordem de eluição da coluna R	33
Tabela 19. Ordem de eluição da coluna S	34

Tabela 20. Ordem de eluição da coluna T	35
Tabela 21. Ordem de eluição da coluna U	36
Tabela 22. Ordem de eluição da coluna V	37
Tabela 23. Ordem de eluição da coluna W	38
Tabela 24. Ordem de eluição da coluna Z	41
Tabela 25: Comparação dos dados de RMN de ^{13}C de MD01 com os dados da literatura para o esqualeno (OLIVEIRA, 2012)	45
Tabela 26: Comparação dos dados de RMN de ^{13}C de MD02 e MD03 com os dados da literatura para 3β -esteariloxi-urs-12-eno e 3β -esteariloxi-olean-12-eno, respectivamente	50
Tabela 27: Comparação dos dados de RMN de ^{13}C de MD04 com os dados da literatura para 3-oxofriedelano (QUEIROGA <i>et al.</i> , 2000)	54
Tabela 28: Comparação dos dados de RMN de ^{13}C de MD05 com os dados da literatura para 3β -hidroxifriedelano (SALAZAR <i>et al.</i> , 2000).....	58
Tabela 29: Comparação dos dados de RMN de ^{13}C de MD06 com os dados da literatura para álcool graxo de cadeia alifática (OLIVEIRA, 2012).....	61
Tabela 30: Comparação dos dados de RMN de ^{13}C de MD07 e MD08 com os dados da literatura para 3β -hidroxi-urs-12-eno (α -amirina) e 3β -hidroxi-olean-12-eno (β -amirina) (MAHATO E KUNDU, 1994).....	66
Tabela 31: Comparação dos dados de RMN de ^{13}C de MD09 com os dados da literatura para o β -sitosterol (SALAZAR, 2005)	70
Tabela 32: Dados de RMN 1D e 2D (400 MHz) de MD10 em CDCl_3	79
Tabela 33: Comparação dos dados de RMN de ^{13}C de MD11 com os dados da literatura para o $3\beta,24$ -dihidroxifriedelano (OLIVEIRA, 2012)	83
Tabela 34: Comparação dos dados de RMN de ^{13}C de MD12 com os dados da literatura para acetato de sódio (SOUSA, 2012)	86
Tabela 35: Comparação dos dados de RMN de ^{13}C de MD13 com os dados da literatura para a guta-percha (OLIVEIRA, 2012)	89

Tabela 36: Comparação dos dados de RMN de ^{13}C de MD14 com os dados da literatura para (SOUZA, 2012).....	93
Tabela 37: Comparação dos dados de RMN de ^{13}C de MD15 com os dados da literatura para 3-O- β -D-glicosil- β -sitosterol (RAI <i>et al.</i> , 2006).....	97
Tabela 38: Resultados dos testes antimicrobianos para os extratos (EHE e ECL) e substâncias testadas.....	100
Tabela 39: Resultados do teste de inibição da enzima AChE em microplaca.....	103
Tabela 40: Resultados do teste antioxidante	106

ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

δ – Deslocamento químico

1D – Uma dimensão

2D – Duas dimensões

AChE – acetilcolinesterase

AcOEt – Acetato de etila

ATCC – *American Type Culture Collection*

BHI – *Broth Heart Infusion*

BSTFA – N-O-bis(trimetilsilil)trifluoroacetamida

CC – Cromatografia em Coluna

CCD – Cromatografia em Camada Delgada

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

CI – Concentração Inibitória

DA – Doença de Alzheimer

DEPT 135 – *Distortionless Enhancement by Polarization Transfer 135*

DTNB – 5,5'-ditiobis-(ácido 2-nitrobenzóico)

DMSO – Dimetilsulfóxido

DPPH – 2,2-difenil-1-picrilhidrazil

EAE – Extrato em acetato de etila

ECL – Extrato clorofórmico

EHE – Extrato hexânico

EME – Extrato metanólico

Hex – hexano

HMBC – *Heteronuclear Multiple Bond Correlation Spectroscopy*

HPLC – *High-performance liquid chromatography*

HSQC – *Heteronuclear Single Quantum Coherence Spectroscopy*

IV – Infravermelho

J – Constante de acoplamento

LAREMAR – Laboratório de Ressonância Magnética de Alta Resolução

MeOH – Metanol

MCI – Mínima concentração inibitória

NEPLAM – Núcleo de Estudo de Plantas Medicinais

OMS – Organização Mundial da Saúde

p. – página

R_f – Fator de retenção

RMN – Ressonância Magnética Nuclear

RMN de ¹³C – Ressonância Magnética Nuclear de Carbono-13

RMN de ¹H – Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio

SEC – Sólido do extrato clorofórmico

SEH – Sólido do extrato hexânico

TMS – Tetrametilsilano

TNB – 5-tio-2-nitrobenzoato

TTPC – triterpeno pentacíclico

UESB – Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia

UFC – Unidades Formadoras de Colônias

UFMG – Universidade Federal de Minas Gerais

RESUMO

Este trabalho consiste do estudo fitoquímico dos extratos hexânico e clorofórmico das folhas de *Maytenus distichophylla* e da avaliação da atividade biológica dos extratos e substâncias isoladas.

O estudo fitoquímico resultou no isolamento de 3-oxofriedelano, 3 β -hidroxifriedelano, 3-oxo-30-hidroxifriedelano, 3 β ,24-dihidroxifriedelano, mistura de 3 β -hidroxi-urs-12-eno e 3 β -hidroxi-olean-12-eno, β -sitosterol, 3-O- β -D-glicosil- β -sitosterol, mistura de 3 β -esteariloxi-urs-12-eno e 3 β -esteariloxi-olean-12-eno, esqualeno, guta-percha, ácido tritriacontanóico, mistura de álcoois graxos e acetato de sódio. As estruturas químicas das substâncias foram determinadas utilizando métodos espectroscópicos (IV, RMN de ^1H e de ^{13}C , HSQC, HMBC e COSY) e espectrométrico (CG-EM).

O estudo da atividade biológica consistiu da avaliação da atividade antimicrobiana (antibacteriana e antifúngica), atividade antiparasitária, da capacidade de inibição da enzima acetilcolinesterase e atividade antioxidante.

O extrato em acetato de etila apresentou atividade antioxidante e nenhum dos extratos e substâncias isoladas apresentou atividade antiparasitária.

O extrato hexânico foi ativo frente à *Bacillus cereus*. O extrato clorofórmico, mistura de 3 β -esteariloxi-urs-12-eno e 3 β -esteariloxi-olean-12-eno, mistura de 3 β -hidroxi-urs-12-eno e 3 β -hidroxi-olean-12-eno, 3 β -hidroxifriedelano e 3 β ,24-dihidroxifriedelano apresentaram atividade biológica frente à *Staphylococcus aureus*.

Todos os extratos e as substâncias 3-oxofriedelano, 3 β -hidroxifriedelano, 3-oxo-30-hidroxifriedelano, 3 β ,24-dihidroxifriedelano, mistura de 3 β -esteariloxi-urs-12-eno e 3 β -esteariloxi-olean-12-eno, mistura de 3 β -hidroxi-urs-12-eno e 3 β -hidroxi-olean-12-eno e β -sitosterol apresentaram alta capacidade de inibição da enzima acetilcolinesterase.

Palavras-chave: Produto Natural, *Maytenus distichophylla*, Celastraceae, triterpeno

ABSTRACT

This work consists of the phytochemical study of the hexane and chloroform extracts from leaves of *Maytenus distichophylla* and biological activity evaluation of extracts and isolated compounds.

The phytochemical study resulted in the isolation of 3-oxofriedelane, 3 β -hydroxyfriedelane, 3-oxo-30-hydroxyfriedelane, 3 β ,24-dihydroxyfriedelane, mixture of 3 β -hydroxy-urs-12-ene and 3 β -hydroxy-olean-12-ene, β -sitosterol, 3-O- β -D-glucosyl- β -sitosterol, mixture of 3 β -stearoxy-urs-12-ene and 3 β -stearoxy-olean-12-ene, squalene, 1,4-*trans*-polyisoprene (gutta-percha), mixture of fatty alcohol, tritriacontanoic acid and sodium acetate. The chemical structure of the compounds was determined by spectroscopy (IR, ^1H NMR, ^{13}C NMR, HSQC, HMBC and COSY) and spectrometric methods (CG-MS).

The biological activity study consisted of the evaluation of antimicrobial activity (antibacterial and antifungal), antiparasitic activity, capacity of inhibition property of the enzyme acetylcholinesterase and antioxidant activity.

The ethyl acetate extract showed antioxidant activity and none of the extracts and isolated compounds showed antiparasitic activity.

The hexane extract was active against *Bacillus cereus*. The chloroform extract, mixture of 3 β -stearoxy-urs-12-ene and 3 β -stearoxy-olean-12-ene, mixture of 3 β -hydroxy-urs-12-ene and 3 β -hydroxy-olean-12-ene, 3 β -hydroxyfriedelane and 3 β ,24-dihydroxyfriedelane showed biological activity against *Staphylococcus aureus*.

All extracts and the compounds 3-oxofriedelane, 3 β -hydroxyfriedelane, 3-oxo-30-hydroxyfriedelane, 3 β ,24-dihydroxyfriedelane, mixture of 3 β -hydroxy-urs-12-ene and 3 β -hydroxy-olean-12-ene, mixture of 3 β -stearoxy-urs-12-ene and 3 β -stearoxy-olean-12-ene and β -sitosterol showed high capacity to inhibit the enzyme acetylcholinesterase.

Keywords: Natural Product, *Maytenus distichophylla*, Celastraceae, triterpene

OBJETIVOS

Objetivos do trabalho

O objetivo geral deste trabalho é a realização do estudo fitoquímico de *Maytenus distichophylla* e avaliação de seu potencial biológico, para encontrar novas atividades ou comprovar as propriedades biológicas relatadas pela medicina popular. Poucos estudos foram encontrados para essa espécie e, portanto, tem-se como objetivos específicos:

- Realizar estudo fitoquímico de extratos orgânicos das folhas de *Maytenus distichophylla*.
- Determinar a estrutura química das substâncias isoladas, através de um estudo detalhado utilizando métodos espectroscópicos, como infravermelho, ressonância magnética nuclear (RMN) de ^1H e ^{13}C , incluindo experimentos DEPT, HMQC, HMBC, COSY, e massas.
- Estabelecer relações fitoquímicas entre espécies da família Celastraceae, contribuindo para o estudo quimiotaxonômico da mesma.
- Realizar testes biológicos para avaliação do potencial farmacológico dos extratos e dos metabólitos isolados.

1- INTRODUÇÃO

1.1 NEPLAM

Este trabalho faz parte de um dos projetos desenvolvidos pelo Núcleo de Estudos de Plantas Mediciniais (NEPLAM), do Departamento de Química da UFMG.

O NEPLAM surgiu na década de 90 e é constituído por pesquisadores do Departamento de Química da UFMG e de outras instituições. O NEPLAM está inserido na Química de Produtos Naturais com linha de pesquisa principal em Fitoquímica. O grupo possui linha de pesquisa também em síntese orgânica, principalmente para modificação estrutural de metabólitos secundários com potencial propriedade farmacológica. Outros grupos de pesquisa da UFMG e outras instituições mantêm colaboração com o NEPLAM, especialmente aqueles de estudos de atividade biológica.

Desde seu surgimento, o NEPLAM tem focado seus projetos de pesquisa em plantas da família Celastraceae. Foram estudadas as espécies *Maytenus floribunda*, *M. myrsinoides*, *M. guianensis*, *M. acanthophylla*, *M. gonoclada*, *M. salicifolia*, *M. truncata*, *M. imbricata* e *Austroplenckia populnea*. Além dessas espécies, alguns trabalhos foram realizados com *Talinum patens* (Portulacaceae). Estão em estudo *M. robusta*, *M. gonoclada*, *Salacia crassifolia*, *M. distichophylla*, *Tontelea micranta*, *Cheilocladium cognatum* e *Psychotria viridis* (Rubiaceae). Uma grande quantidade de substâncias foi isolada dessas espécies, especialmente triterpenos pentacíclicos e flavonoides, e muitas apresentam um amplo potencial farmacológico. Diversas substâncias isoladas no grupo apresentam alguma atividade biológica comprovada, estando algumas em estudos para o tratamento de doenças como AIDS e câncer.

Muitas espécies de Celastraceae, incluindo algumas usadas pela medicina popular, ainda não foram estudadas fitoquimicamente. Sendo assim, o NEPLAM continua realizando pesquisas com plantas dessa família. Até o momento, 10 teses de doutorado e 18 dissertações de mestrado foram concluídas, e mais de 60 artigos foram publicados. Atualmente, três doutorados e três mestrados estão em andamento. Neste trabalho será apresentado o estudo fitoquímico das folhas de *Maytenus distichophylla* e a avaliação de algumas atividades biológicas de extratos e constituintes isolados.

1.2 O papel dos produtos naturais no desenvolvimento de fármacos

O uso de plantas medicinais pela população é uma prática muito antiga devido à grande variedade de propriedades terapêuticas que essas fontes apresentam. 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 (SOUZA-MOREIRA *et al.*, 2010) e mais de 100 países têm regulamento para o uso de medicamentos à base de plantas (SAVOIA, 2012). No entanto, muitas plantas utilizadas frequentemente por comunidades locais, não foram estudadas ainda e seus princípios ativos não foram identificados. Dessa forma, muitas delas não foram validadas ainda cientificamente para serem utilizadas pela indústria farmacêutica. O Brasil é o país “campeão” da biodiversidade, o que torna a flora brasileira em uma das mais ricas fontes de novos produtos farmacêuticos, cosméticos e nutracêuticos (BRANDÃO *et al.*, 2010). Sendo assim, o estudo fitoquímico é muito importante para desenvolvimento de novos fármacos.

A biodiversidade brasileira forneceu várias substâncias muito importantes como medicamentos. A pilocarpina, extraída das folhas de árvores do gênero *Pilocarpus*, encontrada na Floresta Atlântica, foi usada por décadas pela Merck para a preparação de medicamento indicado no tratamento de glaucoma. A pilocarpina estimula a secreção da saliva e é empregada também para aliviar a “boca seca” (xerostomia), efeito colateral da radioterapia contra o câncer (BRANDÃO *et al.*, 2010).

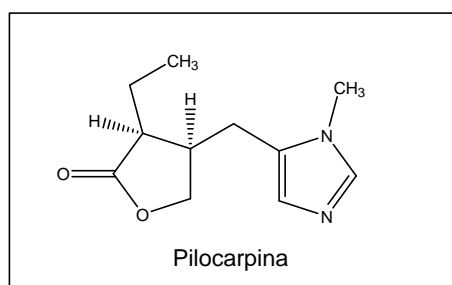


Figura 1: Estrutura da Pilocarpina.

Compostos naturais apresentam uma ampla diversidade estrutural com estereoquímica complexa e com diversos grupos funcionais, fornecendo uma variedade química inimaginável e servindo como protótipos para processos de síntese (McCHESNEY *et al.*, 2007). Dessa forma, produtos naturais fornecem uma

contribuição valiosa para o desenvolvimento de novas drogas. Uma série de novos medicamentos comercializados é obtida a partir de fontes naturais, por modificação estrutural de compostos naturais ou pela síntese de novos compostos “inspirados” em um composto natural. Os processos de semi-sínteses, através de modificação estrutural de grupos funcionais podem gerar análogos estruturais com maior atividade biológica e com menor efeito colateral (GORDALIZA, 2007).

Newman e Cragg (2012) publicaram um artigo que apresenta a contribuição de produtos naturais, seus derivados e produtos sintéticos na produção de novos medicamentos aprovados entre 1981 e 2010. Os dados se referem a todas as doenças em todo o mundo.

Os compostos que servem de princípio ativo para os medicamentos foram classificados de acordo com sua fonte:

- **N** (Produto Natural): molécula pequena obtida a partir de fonte natural.
- **B** (Biológico): peptídeos, proteínas ou produto isolado a partir de uma linha de organismo/célula ou produzido a partir de processos de biotecnologia.
- **NB** (Produto Natural botânico): produtos recentemente aprovados pelo FDA e outras organizações similares como agentes de drogas.
- **ND** (Derivado de produto natural): produto de modificação estrutural a partir de semi-síntese.
- **S** (Sintético): produto totalmente sintético.
- **S*** (Sintético): totalmente sintético, no entanto o grupo farmacofórico foi inspirado a partir de um produto natural.
- **Vacina**.

Tem-se ainda a “subcategoria” **NM** que designa os produtos mimetizados de produtos naturais e podem ser usadas juntamente com as categorias acima.

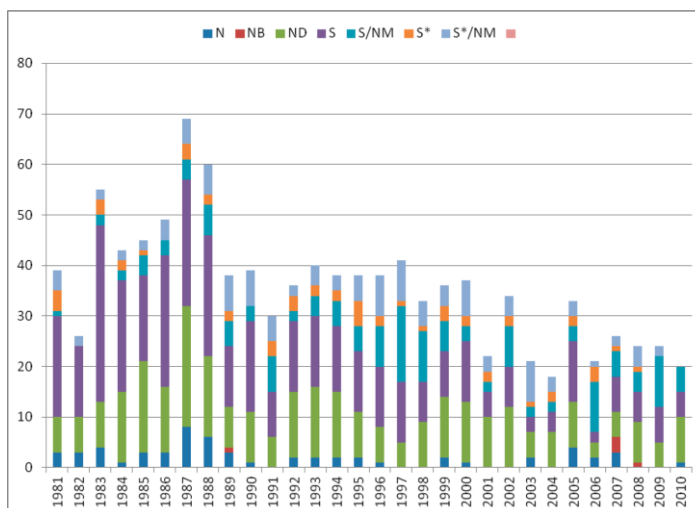


Figura 2: Fontes dos compostos utilizados na produção de novos medicamentos por ano (NEWMAN E CRAGG, 2012).

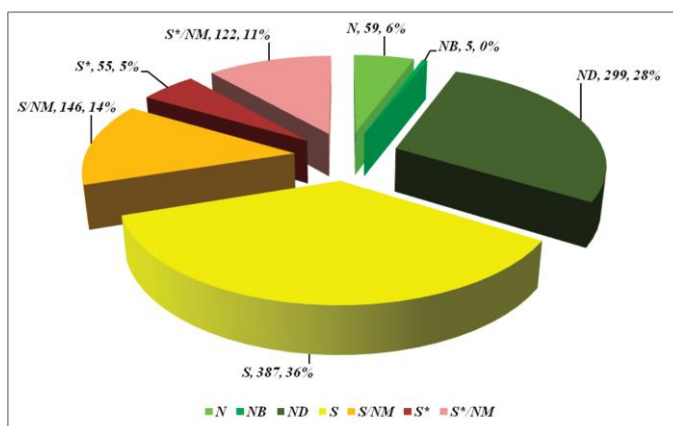


Figura 3: Fontes dos compostos utilizados na produção de medicamentos de 1981 a 2010 (NEWMAN E CRAGG, 2012).

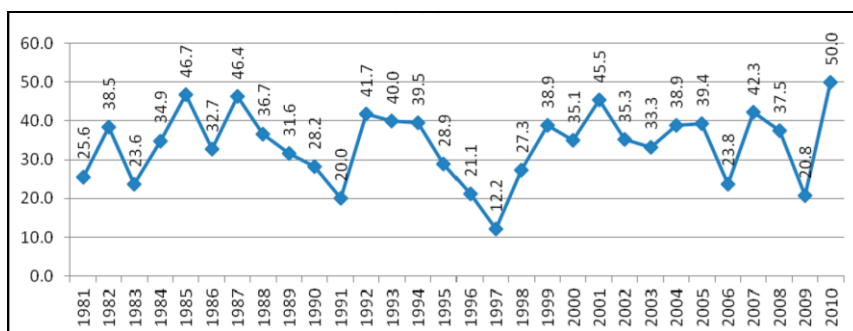


Figura 4: Porcentagem de N/NB/ND por ano, de 1981 a 2010 (NEWMAN E CRAGG, 2012).

Os gráficos apresentados nas Figuras 2, 3 e 4 (p.4) mostram o papel “contínuo” que os produtos naturais e estruturas derivadas ou relacionadas a eles têm desempenhado no desenvolvimento de novos fármacos. A Figura 3 mostra que apenas 36% de todas as substâncias utilizadas na produção de medicamentos, em 30 anos, são de fontes exclusivamente sintéticas, sem relações com produtos naturais. A Figura 4 indica que, mesmo em 2010, os produtos naturais continuam a ter uma grande importância, sendo responsáveis por 50% dos novos fármacos, valor que não inclui ainda os compostos “inspirados” em produtos naturais (S*, S*/NM e S/NM).

As doenças mais investigadas pela indústria farmacêutica são as microbianas (bacterianas, fúngicas, parasitárias e virais) e tumorais. A Tabela 1 mostra que apenas 31,6% de todos os fármacos antimicrobianos são de origem totalmente sintética, sendo o restante originado a partir de produtos naturais ou de compostos relacionados a eles. Para o caso de antibacterianos, pouco menos de 75% são de fontes naturais (N) ou derivados naturais (ND).

Tabela 1: Origem de fármacos antimicrobianos (bacteriano, fúngico, parasitário e viral) de 1981-2010 (NEWMAN E CRAGG, 2012).

Indicação	Total	N	ND	S	S/NM	S*	S*/NM
Antibacteriana	104	10	67	26			1
Antifúngico	28		3	22	3		
Antiparasitário	13	2	5	4		2	
Antiviral	48		4	9	2	23	10
Total	193	12	79	61	5	25	11
Porcentagem	100	6,2	40,9	31,6	2,6	13	5,7

Os dados apresentados por Newman e Cragg (2012) indicam que os produtos naturais desempenham um papel preponderante no desenvolvimento de novos fármacos, sendo a principal fonte de substâncias bioativas no tratamento de todas as doenças do mundo.

No entanto, com o avanço das técnicas de triagem robotizadas de grande porte (*High Throughput Screening*), associadas à disponibilidade de volumosos

bancos de moléculas resultantes da química combinatória e genômica, além da modelagem molecular (McCHESNEY *et al.*, 2007; GORDALIZA, 2007), ocorreu um declínio na busca de novos antibióticos a partir de fontes naturais, ao mesmo tempo em que houve um aumento na incidência de resistência bacteriana (GUIMARÃES *et al.*, 2010; TAKAHASHI E LUCAS, 2008).

O tema do Dia Mundial da Saúde em 2011 foi "Resistência antimicrobiana: nenhuma ação hoje, nenhuma cura amanhã" (SAVOIA, 2012), demonstrando a preocupação da sociedade científica com este problema. Algumas estratégias podem ser adotadas para evitar o desenvolvimento de resistência bacteriana: prevenção de infecções com o uso de vacinas, uso racional de antibióticos, controle e prevenção da disseminação de micro-organismos resistentes, descoberta e desenvolvimento de novos antibióticos (GUIMARÃES *et al.*, 2010).

Além da resistência dos micro-organismos aos antibióticos já utilizados, outros fatores importantes têm levado a um retorno ao interesse em novas classes de substâncias com atividades antimicrobianas, especialmente aquelas obtidas a partir de produtos naturais. Alguns desses fatores são a evolução de doenças infecciosas nos últimos vinte anos, a toxicidade de alguns antibióticos em uso clínico e a demanda de novas classes de pacientes como indivíduos imunossuprimidos, portadores do vírus HIV, idosos, recém-nascidos, alérgicos etc (TAKAHASHI E LUCAS, 2008).

De acordo com a OMS, as doenças infecciosas são responsáveis por aproximadamente um terço das causas de mortalidade no mundo e quando se trata das populações de baixa renda, especialmente em países da Ásia e África, elas ocupam a primeira posição (GUIDO *et al.*, 2010). Essas doenças são um grave problema de saúde pública, pois afetam uma parte significativa da população mundial. As doenças infecciosas são causadas por diversos micro-organismos além das bactérias, como os fungos, protozoários e vírus. Existem estimativas que mostram que cerca de 40% de todas as mortes por infecções hospitalares nos últimos vinte anos tenham sido causadas por fungos e que infecções fúngicas sejam uma das principais causas de mortalidade, principalmente em indivíduos imunossuprimidos (TAKAHASHI E LUCAS, 2008).

As doenças causadas por protozoários afetam principalmente a população de baixa renda, influenciando no padrão de vida das pessoas e causando muitas mortes em todo o mundo (CUNHA *et al.*, 2010). A giardíase é uma infecção intestinal

causada pela *Giardia lamblia* e provoca náuseas, dor de estômago e diarreia (CUNHA *et al.*, 2010), sendo a causa mais frequente de diarreia parasitária em pacientes imunossuprimidos (BALDI *et al.*, 2009). A tricomoníase, causada pelo protozoário *Trichomonas vaginalis*, é uma doença sexualmente transmissível que leva ao quadro de vaginite e pode contribuir para o parto prematuro, baixo peso de recém-nascidos e pode facilitar a aquisição do vírus HIV (KIRKCALDY *et al.*, 2012). *Entamoeba histolytica* é um protozoário que causa a amebíase, provocando diarreia, disenteria e dores abdominais (CUNHA *et al.*, 2010). A amebíase é uma das doenças parasitárias mais agressivas e aproximadamente 500 milhões de pessoas em todo o mundo são infectadas, resultando em 40.000 a 100.000 mortes anuais (LEOS-RIVAS *et al.*, 2011). Apesar da infecção de milhões de pessoas por ano, há um número escasso de fármacos para o tratamento de doenças parasitárias e as drogas atuais apresentam muitas limitações, levando algumas vezes a um tratamento ineficaz da doença e ao favorecimento da resistência dos parasitas aos medicamentos (MACIEL *et al.*, 2004).

Assim, há uma demanda clara pela busca de novos agentes antimicrobianos e as moléculas encontradas em plantas podem ser utilizadas diretamente para o desenvolvimento de novos fármacos (SAVOIA, 2012).

Muitos compostos com outras atividades importantes são encontrados em plantas, como as tradicionalmente usadas para tratar falhas na memória e prejuízos cognitivos associados à terceira idade (SILVA, 2009). A doença de Alzheimer (DA) é a causa mais comum de demência em pessoas acima de 65 anos, afetando cerca de 10% das pessoas acima desta faixa etária e 50% das pessoas acima de 85 anos (SEIDL, 2010). É uma doença neurodegenerativa, caracterizada pela diminuição progressiva da memória e declínio severo da cognição, associados com a degradação de neurônios colinérgicos e acompanhada por grande redução de neurotransmissores, dentre os quais a acetilcolina (ACh) que é o mais importante (VIEGAS *et al.*, 2011). Os principais fármacos utilizados para o tratamento da DA consistem de inibidores da enzima acetilcolinesterase (AChE), responsável pela hidrólise da ACh. Estudos revelaram que um aumento dos níveis de ACh pela inibição da AChE pode melhorar a insuficiência na função cognitiva em estágios prematuros de DA. No entanto, os fármacos usados no tratamento clínico da doença causam muitos efeitos colaterais, como náuseas, vômitos, perda de apetite, dor de cabeça, constipação, confusão e tontura (SEIDL, 2010). Muitos compostos

encontrados em produtos naturais possuem a propriedade de inibição da acetilcolinesterase, sendo assim potenciais fármacos para o tratamento da DA. Alguns exemplos são mostrados na Figura 5.

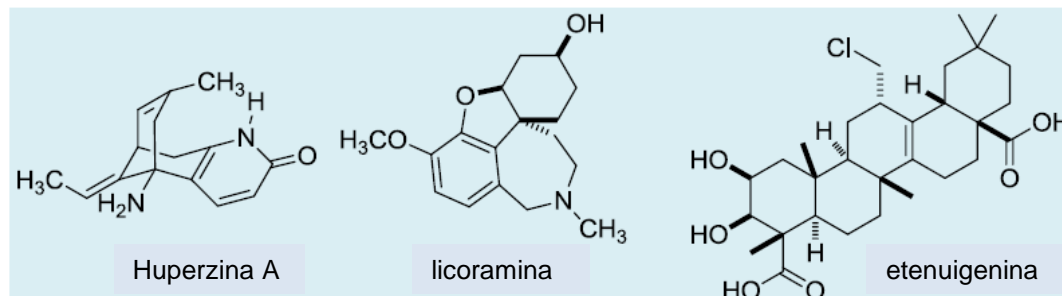


Figura 5: Exemplos de produtos naturais com propriedade inibidora de AChE (VIEGAS *et al.*, 2011).

A química de Produtos Naturais pode fornecer uma importante contribuição para o descobrimento de novos inibidores de AChE, capazes de interferir com melhores respostas no avanço da DA e menores efeitos colaterais, pelo fornecimento tanto de moléculas bioativas quanto de protótipos para processos de síntese.

1.3 A família Celastraceae

A família Celastraceae é composta por 98 gêneros e aproximadamente 1.264 espécies, apresentando-se geralmente como árvores ou arbustos (MEDEIROS *et al.*, 2010). As espécies estão distribuídas nas regiões tropical e subtropical, incluindo norte da África, América do Sul e Ásia (SPIVEY *et al.*, 2002). No Brasil são encontrados predominantemente quatro gêneros: *Maytenus* Juss., *Austroplenckia* Lund., *Franhofera* Mart. e *Salacia* Mart. (SIMMONS *et al.*, 2008). Várias espécies de plantas da família Celastraceae têm uma grande tradição na medicina popular para o tratamento de doenças como distúrbios estomacais, artrite reumatoide e câncer (SPIVEY *et al.*, 2002). Além disso, algumas espécies como *Celastrus angullatus*, *C. orbiculatus*, *Tripterygium wilfordii* e *T. hypoglaucum* são utilizadas na medicina chinesa como inseticidas (DEEPA E BAI, 2010). As espécies *Maytenus ilicifolia* e *M. aquifolium* constituem exemplos de plantas da família *Celastraceae* que são

utilizadas amplamente na medicina popular brasileira para o tratamento de úlceras gástricas e outras afecções intestinais (OLIVEIRA, 2004).

Plantas da família Celastraceae têm sido muito estudadas devido às suas propriedades farmacológicas. Vários trabalhos foram publicados atribuindo a algumas espécies atividade anti-inflamatória (SOSA *et al.*, 2007), anti-HIV (FERREIRA *et al.*, 2010), antitumoral (PERESTELO *et al.*, 2010), antibacteriana (ESTEVAM *et al.*, 2009), antifúngica (LUO *et al.*, 2005), larvicida (BOUZADA *et al.*, 2009) e antioxidante (SILVA *et al.*, 2009).

O gênero *Maytenus* é um dos maiores da família e abrange 225 espécies, com 76 espécies reconhecidas no Brasil, distribuídas em uma variedade de locais como florestas amazônica e tropical, cerrado e campos de altitude (NIERO *et al.*, 2011). Estudos fitoquímicos de plantas do gênero *Maytenus* têm mostrado a presença de muitas classes de substâncias, incluindo triterpenos pentacíclicos (TTPC's), especialmente da série dos friedelanos, ursanos, oleananos e lupanos (NIERO *et al.*, 2011), sesquiterpenos, alcaloides, flavonoides, glicosídeos fenólicos (RODRIGUES *et al.*, 2012) e esteroides glicosilados (DUARTE, 2000).

Os TTPC's apresentam importantes propriedades farmacológicas, por exemplo, o ácido betulínico, um derivado lupano (Figura 6, p. 10), exibe atividade anti-HIV, antitumoral e anti-inflamatória (XIONG *et al.*, 2010; QUIAN *et al.*, 2010). O rigidinol, epicalenduladiol e ácido populnônico apresentam atividade anti-inflamatória (REYES *et al.*, 2006; NIERO *et al.*, 2011; ANDRADE *et al.*, 2007). O 3,15-dioxo-21 α -hidroxifriedelano exibe atividades antiulcerogênica (SILVA *et al.*, 2011) e analgésica (NIERO *et al.*, 2011). O ácido oleanóico apresenta atividade antidiabética (CASTELLANO *et al.*, 2013). Diversos trabalhos publicados mostram que os TTPC's apresentam ainda atividades antibacteriana, antifúngica, antiviral, antiparasitária, antioxidante, analgésica, hepatoprotetora, neuroprotetora, anti-inseticida e outros efeitos (GONZÁLEZ-COLOMA *et al.*, 2011). Devido à grande variedade de propriedades farmacológicas apresentadas pelos TTPC's e outras classes de metabólitos secundários, é importante o estudo fitoquímico e farmacológico de espécies *Maytenus*, para a pesquisa de novos candidatos a fármacos para o tratamento de muitas doenças.

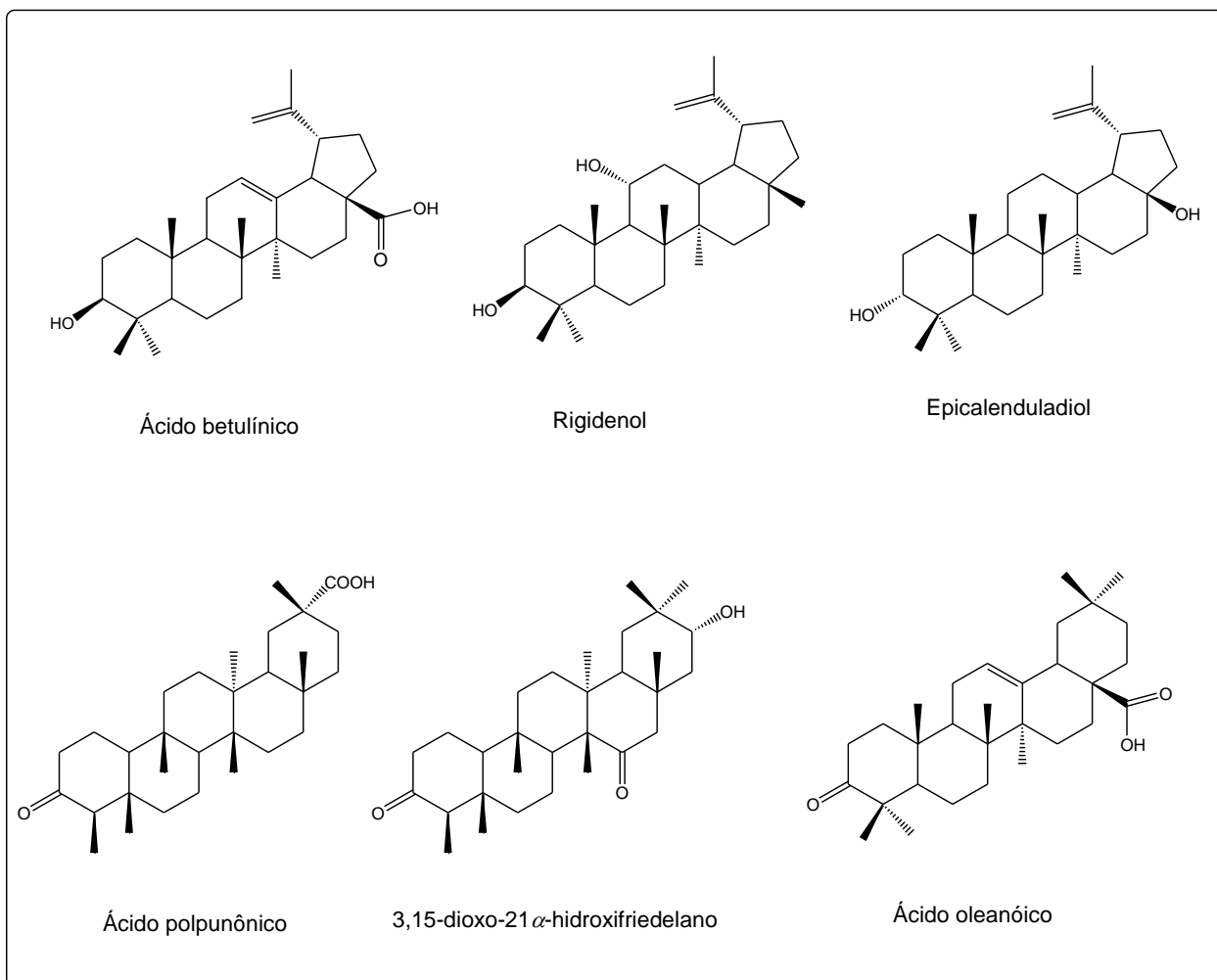


Figura 6: Estruturas químicas de TTPC's com importantes atividades biológicas.

1.4 *Maytenus distichophylla*

Maytenus distichophylla é encontrada no nordeste brasileiro, principalmente na Bahia (CARVALHO-OKANO, 2005). Essa planta tem uso popular como antiulcerogênica e é conhecida como “pau-colher”.

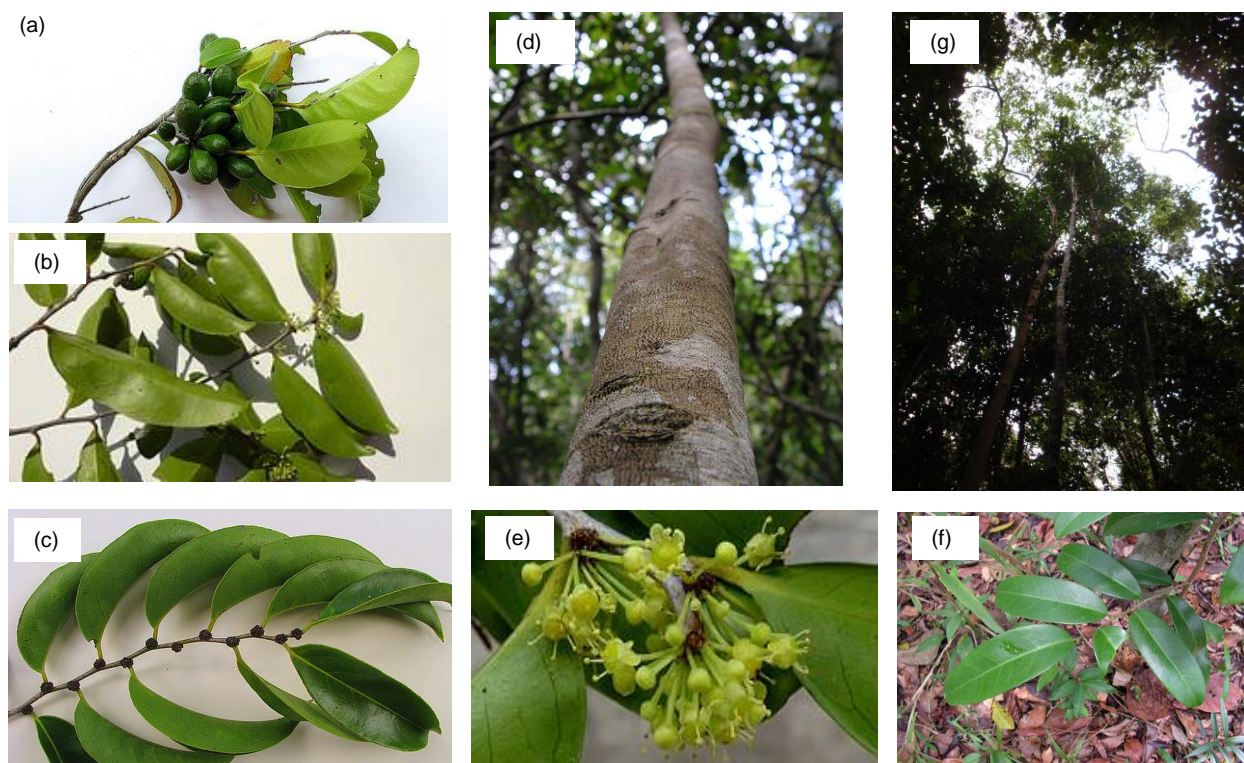


Figura 7: Fotografia de *Maytenus distichophylla*:

a (folhas e frutos), b, e (folhas e flores), c, f (folhas), d (tronco): <https://www.flickr.com/search/?q=maytenus+distichophylla>
g (espécime em seu habitat natural): foto da autora

Recentemente, um trabalho foi publicado por Duarte e colaboradores (2013) sobre um estudo fitoquímico das folhas de *Maytenus distichophylla*. A planta foi coletada na cidade Matureia no estado da Paraíba em junho de 2009 e os autores relataram o isolamento de sete triterpenos pentacíclicos: 3,16,21-trioxo-6 β ,12 α -dihidroxi-1-en-friedelano, 3-oxofriedelano, 3 β -hidroxifriedelano, 3,12-dioxofriedelano, 3-oxo-29-hidroxifriedelano, 3-oxo-30-hidroxifriedelano e 3-oxo-12 α -hidroxifriedelano (Figura 8, p. 12). Não foram encontrados trabalhos sobre estudo de atividade biológica desta espécie.

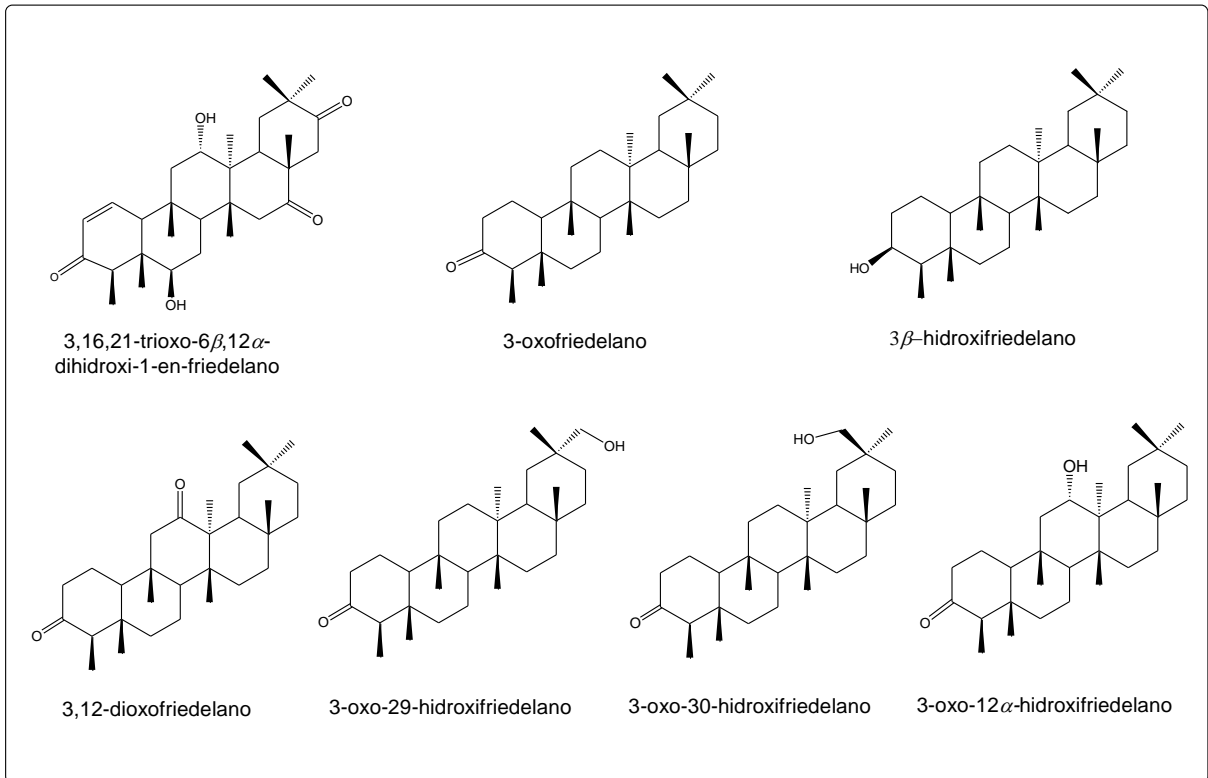


Figura 8: Estruturas químicas de TTPC's isolados de *M. distichophylla*.

2 – PARTE EXPERIMENTAL

2.1 Métodos gerais

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

Para cromatografia em camada delgada (CCD) foi utilizada suspensão de sílica gel 60G (7 g para 15 mL), em suporte de placa de vidro de 0,25 mm de espessura, ativada a 100 °C em estufa durante pelo menos 30 min. Como revelador das cromatoplaças utilizou-se solução 1:1 de ácido perclórico a 3% em água e vanilina a 1% em etanol, seguida por aquecimento em estufa a 100 °C. As colunas cromatográficas clássicas foram preparadas utilizando-se como fases estacionárias sílica gel 60 com tamanho de partícula 0,063-0,200 mm (70-230 Mesh), sílica flash 0,040-0,063 mm (230-400 Mesh) ou florisil (60-100 Mesh).

Os solventes utilizados nos métodos cromatográficos foram de pureza p.a.. A reutilização dos solventes, quando em mistura, foi feita após ajuste do índice de refração da luz, utilizando-se um refratômetro marca Briobrix, e correção das proporções das misturas. Solventes deuterados, CDCl_3 , CD_3OD e Piridina- d_5 , foram utilizados para obtenção dos espectros de RMN 1D e 2D.

Testes de Liebermann Burchard (MATOS, 1980) foram realizados utilizando-se CHCl_3 para solubilização completa da amostra, seguida pela adição de 1 mL de anidrido acético e 2 gotas de ácido sulfúrico, ambos concentrados.

As temperaturas das faixas de fusão foram medidas em aparelho digital de Ponto de Fusão da Microquímica Equipamentos LTDA (MQAPF-302). As massas de extratos, frações e substâncias foram medidas em balança analítica AB104 Mettler Toledo ou balança semi-analítica AL500C Marte.

Os espectros na região do IV foram obtidos utilizando-se espectrômetro Shimadzu IR408 em pastilhas de KBr.

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 temperatura de 300 K. Os

deslocamentos químicos (δ) foram registrados em ppm usando o tetrametilsilano (TMS) como padrão de referência interna, e as constantes de acoplamento (J) dadas em Hz.

As análises de Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massas (CG-EM) foram realizadas no Departamento de Química, em um equipamento GCMS-QP2010 ULTRA (Shimadzu), tendo Coluna: Rxi-1MS 30 m x 0,25 mm x 0,25 μ m (Restek); Temperatura da coluna de 150 °C (2 min), 12 °C/min, até 300 °C; Injetor a 300°C Split (1:20); Interface CG-MS a 300 °C; Detector MS (Impacto eletrônico a 70 eV) a 300 °C; Gás de arraste Hélio a 1,5 mL/min; Volume de injeção 1 μ L; Software de aquisição de dados GCMS Solution (Shimadzu); Biblioteca espectral NIST11. Quando necessário, a silição foi realizada utilizando reagente BSTFA (Supelco cat nº 3-3027) em forno de micro-ondas doméstico Panasonic, na potência 30% (420 w) por 5 min, em tubo de microcentrifuga (0,2 mg de amostra para 25 μ L de BSTFA).

2.2 Coleta e identificação do material vegetal

As folhas de *Maytenus distichophylla* foram coletadas em um local conhecido como “Brejo Novo”, no Município de Jequié, Bahia. A planta foi identificada pela Professora Dra. Guadalupe Licon de Macedo do Departamento de Botânica da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia (UESB). Uma exsicata do material encontra-se depositada no herbário do Departamento de Botânica da UESB, sob o número HUESB 2093.

2.3 Preparo dos extratos das folhas de *Maytenus distichophylla*

As folhas de *M. distichophylla* foram secas à temperatura ambiente e moídas em moinho de martelos. O material vegetal (1,0 Kg) foi submetido a extrações exaustivas com hexano (Hex), clorofórmio (CHCl_3), acetato de etila (AcOEt) e metanol (MeOH), em ordem crescente de polaridade. Após filtração e remoção do solvente, por destilação a pressão reduzida, foram obtidos os sólidos e extratos: **SEH** (sólido do extrato hexânico), **EHE** (extrato hexânico), **SEC** (sólido do extrato clorofórmico), **ECL** (extrato clorofórmico), **EAE** (extrato em acetato de etila) e **EME**

(extrato metanólico) (Figura 9). Os extratos **EAE** e **EME** não foram fracionados. Todos os demais extratos foram utilizados para o estudo fitoquímico da planta, bem como para a avaliação da atividade biológica.

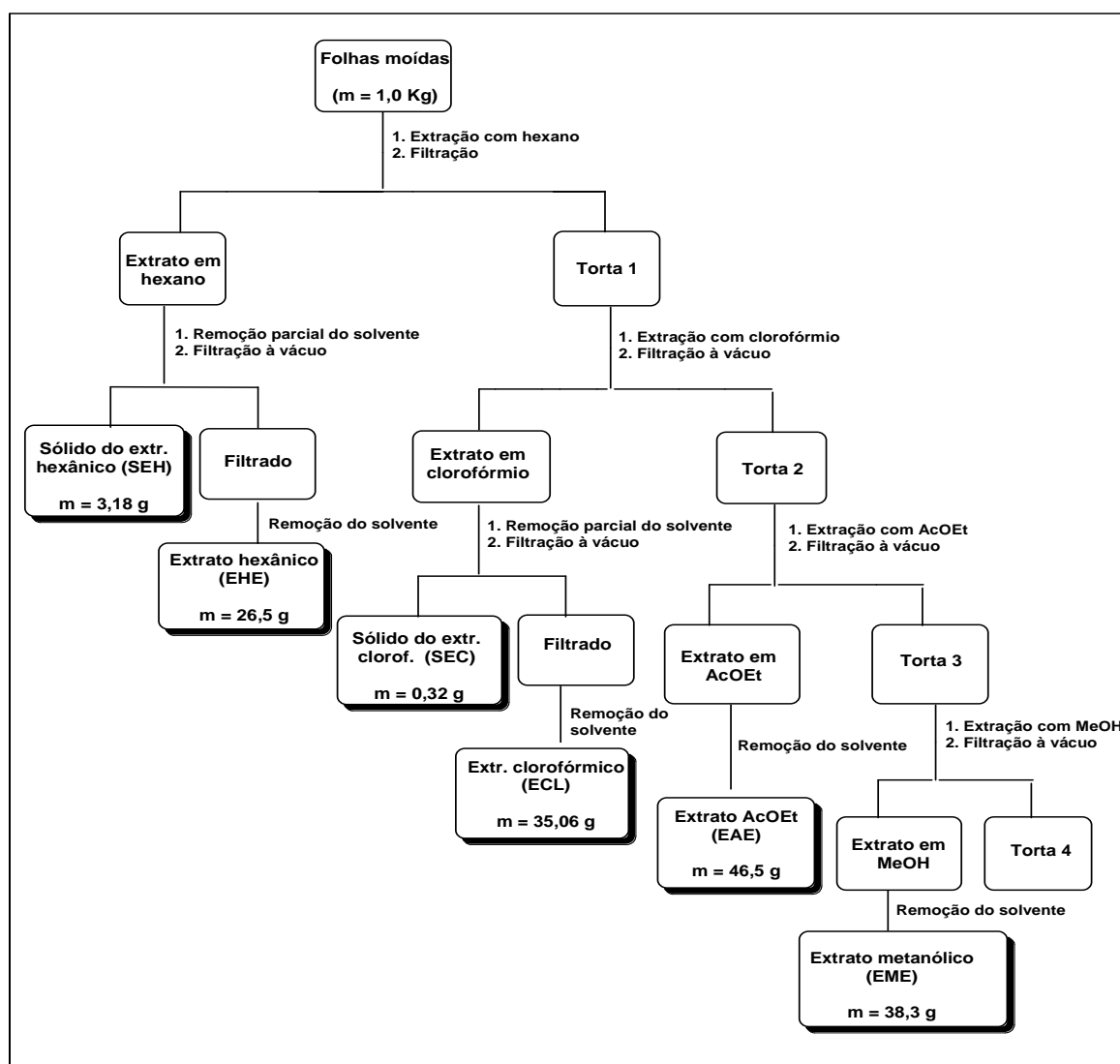


Figura 9: Esquema utilizado na preparação dos extratos das folhas de *M. distichophylla*.

Os extratos e sólidos, **EHE**, **SEH**, **ECL** e **SECL**, foram submetidos à cromatografia em coluna (CC) e o fracionamento foi acompanhado por CCD. As frações recromatografadas foram escolhidas de acordo com o perfil apresentado nas cromatoplas e massas obtidas. Frações que apresentavam perfil complexo (muitas manchas com pequena diferença de Rf's ou pequena quantidade, não foram trabalhadas.

A notação das frações foi dada de acordo com a letra da coluna seguida da ordem de eluição. Para codificar as substâncias isoladas utilizaram-se as letras M e D, iniciais de *Maytenus distichophylla*, seguida pela ordem de isolamento das mesmas.

2.3.1 Elaboração de EHE

Após remoção completa do solvente, parte de **EHE** (10,5 g) foi submetida à coluna cromatográfica (Coluna **A**: 4 cm/1,1 m), utilizando-se 406,4 g de sílica gel 60 com tamanho de partícula 0,063-0,200 mm (70-230 Mesh). Os eluentes utilizados nessa coluna foram Hex, CHCl₃, AcOEt e MeOH, puros ou em misturas em gradiente de polaridade. Foram obtidas 195 frações de 200 mL cada (Tabela 2), que tiveram o volume reduzido em rotavapor. Após análise por CCD, as frações foram reunidas em 20 grupos, de acordo com o perfil apresentado nas cromatoplasas (Tabela 3, p. 17).

Tabela 2. Ordem de eluição da coluna **A**

Eluente	Fração de 200 mL
Hex	1 – 34
Hex/CHCl ₃ (9:1)	35 - 44
Hex/CHCl ₃ (8:2)	45 - 58
Hex/CHCl ₃ (7:3)	59 – 85
Hex/CHCl ₃ (6:4)	86 – 109
Hex/CHCl ₃ (1:1)	110 – 137
Hex/CHCl ₃ (4:6)	138 – 143
Hex/CHCl ₃ (3:7)	144 – 153
Hex/CHCl ₃ (2:8)	154 – 160
Hex/CHCl ₃ (1:9)	161 – 166
CHCl ₃	167 – 174
AcOEt	175 – 185
MeOH	186 - 195

Tabela 3. Grupos relacionados da coluna **A**

Grupo	m (g)	Grupo	m (g)
A1 (1 - 3)	0,0479	A11 (102 - 106)	0,1273
A2 (4 - 6)	-	A12 (107 - 117)	0,3099
A3 (7 - 11)	0,1093	A13 (118 - 127)	0,6211
A4 (12 - 41)	-	A14 (128 - 140)	0,9898
A5 (42 - 56)	2,3236	A15 (141 - 144)	0,6062
A6 (57 - 68)	0,4795	A16 (145 - 153)	0,3230
A7 (69 - 75)	0,2479	A17 (154 - 168)	0,3340
A8 (76 - 79)	0,4513	A18 (169 - 178)	0,3578
A9 (80 - 94)	0,1634	A19 (179 - 180)	0,6043
A10 (95 - 101)	0,0832	A20 (181 - 195)	0,4567

Os grupos **A1**, **A2** e **A4** não foram trabalhados, pois não apresentaram massa significativa. Os grupos **A7**, **A10**, **A11**, **A13**, **A15** e **A20** não foram analisados por mostrarem perfis bastante complexos em CCD. Estas frações são materiais constituídos por grande quantidade de óleos e graxas.

Grupo A3 (frações 7-11): apresentou-se como um óleo de cor amarelada, que indicou a presença de uma única mancha de coloração azul em CCD. A análise dos espectros na região do IV e RMN de ^1H e ^{13}C permitiu identificar o óleo como sendo **esqualeno (MD01)**.

Grupo A5 (frações 42-56): apresentou-se como um material graxo alaranjado (2,3236 g), que mostrou duas manchas roxas em CCD. O grupo **A5** foi recromatografado (Coluna **B**: 3,0 cm/57,0 cm), utilizando 65,7 g de sílica gel. Foram recolhidas 144 frações de 20 mL cada (Tabela 4, p. 18), agrupadas de acordo com o perfil observado em CCD.

Tabela 4. Ordem de eluição da coluna **B**

Eluente	Fração de 20 mL
Hex/CHCl ₃ (9:1)	1 – 10
Hex/CHCl ₃ (8:2)	11 - 48
Hex/CHCl ₃ (7:3)	49 – 70
Hex/CHCl ₃ (6:4)	71 – 81
Hex/CHCl ₃ (1:1)	82 – 95
Hex/CHCl ₃ (4:6)	96 – 101
Hex/CHCl ₃ (3:7)	102 – 108
Hex/CHCl ₃ (2:8)	109 – 114
Hex/CHCl ₃ (1:9)	115 – 120
CHCl ₃	121 – 129
AcOEt	130 – 137
MeOH	138 – 144

O subgrupo **B5-24** apresentou-se como uma graxa transparente (1,304 g) e mostrou uma única mancha roxa em CCD (revelador: ácido perclórico/vanilina). A análise dos espectros na região do IV, RMN de ¹H e ¹³C permitiu sugerir que o material trata-se de uma **mistura de 3β-esteariloxi-urs-12-eno (MD02) e 3β-esteariloxi-olean-12-eno (MD03)**.

Na tentativa de separar os constituintes acima, o subgrupo **B5-24** (1,304 g) foi recromatografado, utilizando-se sílica (85,0 g) impregnada com nitrato de prata (2,0 g) como fase estacionária. Foram utilizados como fases móveis o hexano, diclorometano e acetato de etila, puros ou em mistura, em gradiente de polaridade. Foram recolhidas frações de 10,0 mL cada. A coluna foi coberta com papel de alumínio para evitar a oxidação do nitrato de prata. No entanto, não foi possível a separação dos constituintes.

Os demais subgrupos da coluna **B** não foram trabalhados por tratarem-se de misturas complexas com pequenas massas ou por tratarem-se de graxa.

Grupo A6 (frações 58-68): apresentou-se como um óleo alaranjado (0,48 g), indicando duas manchas roxas e uma amarela em CCD. O grupo **A6** foi recromatografado (Coluna **C**: 2,0 cm/28,0 cm), utilizando-se 25,7 g de sílica gel.

Foram recolhidas 120 frações de 10 mL, agrupadas de acordo com o perfil observado em CCD. Devido à complexidade das subfrações e das baixas massas não foi possível identificar nenhuma substância.

Grupo A8 (frações 76-79): apresentou-se como um material alaranjado composto por um sólido e graxa (0,4513 g) e mostrou três manchas em CCD, sendo uma amarela e duas roxas. O grupo **A8** foi recromatografado (Coluna **D**: 2,0 cm/50,0 cm), utilizando-se 35,3 g de sílica gel (Tabela 5). Foram recolhidas 103 frações de 20 mL cada, agrupadas de acordo com o perfil observado em CCD.

Tabela 5. Ordem de eluição da coluna **D**

Eluente	Fração de 20 mL
Hex/CHCl ₃ (9:1)	1 – 20
Hex/CHCl ₃ (8:2)	20 - 47
Hex/CHCl ₃ (7:3)	48 – 55
Hex/CHCl ₃ (6:4)	56 – 62
Hex/CHCl ₃ (1:1)	63 – 68
Hex/CHCl ₃ (4:6)	69 – 73
Hex/CHCl ₃ (3:7)	74 – 78
Hex/CHCl ₃ (2:8)	79 – 83
CHCl ₃	84 – 90
AcOEt	91 – 96
MeOH	97 – 103

O subgrupo **D47-55** apresentou-se como um sólido cristalino branco em mistura com um óleo amarelo. Após sucessivas lavagens com hexano separou-se o sólido branco (0,0820 g), que mostrou uma única mancha amarela em CCD. A análise dos espectros na região do IV e RMN de ¹H e ¹³C permitiu identificar o sólido como sendo **friedelina (MD04)**.

Os demais subgrupos da coluna **D** não foram trabalhados por tratarem-se de misturas complexas de pequena massa.

Grupo A9 (frações 80-94): apresentou-se como um material alaranjado composto por um sólido e óleo (0,4513 g) e mostrou quatro manchas em CCD. O material foi lavado sucessivas vezes com hexano e obteve-se um sólido branco. A comparação por CCD com amostras autênticas de friedelina e friedelinol indicou tratar-se de uma mistura dessas substâncias. O sólido de **A9** (0,2113 g) foi então recromatografado (Coluna **E**: 2,0 cm/28,0 cm), utilizando-se 19,9 g de sílica gel (Tabela 6). Foram recolhidas 95 frações de 20 mL cada, agrupadas de acordo com o perfil observado em CCD.

Tabela 6. Ordem de eluição da coluna **E**

Eluente	Fração de 20 mL
Hex	1 – 5
Hex/AcOEt (99:1)	6 – 12
Hex/AcOEt (98:2)	13 – 24
Hex/AcOEt (97:3)	25 – 30
Hex/AcOEt (96:4)	31 – 35
Hex/AcOEt (95:5)	36 – 38
Hex/AcOEt (94:6)	39 – 40
Hex/AcOEt (93:7)	41 – 44
Hex/AcOEt (92:8)	45 – 47
Hex/AcOEt (91:9)	48 – 50
Hex/AcOEt (90:10)	51 – 53
Hex/AcOEt (85:15)	54 – 56
Hex/AcOEt (80:20)	57 – 59
Hex/AcOEt (75:25)	60 – 64
Hex/AcOEt (70:30)	65 – 68
Hex/AcOEt (60:40)	69 – 71
Hex/AcOEt (50:50)	72 – 75
Hex/AcOEt (40:60)	76 – 78
Hex/AcOEt (20:80)	79 – 81
AcOEt	82 – 84
MeOH	85 – 95

O subgrupo **E11-13** apresentou-se como um sólido cristalino branco (15,2 mg), com única mancha amarela em CCD. A comparação em cromatoplaça com amostra autêntica de **friedelina** indicou tratar-se dessa substância.

O subgrupo **E14-22** apresentou-se com um sólido cristalino branco (32,0 mg) e a comparação por CCD com amostras autênticas indicou tratar-se de uma **mistura de friedelina (MD04) e friedelinol (MD05)**.

O subgrupo **E23-26** apresentou-se como um sólido cristalino branco (18,0 mg), que mostrou uma única mancha roxa em CCD. A análise dos espectros na região do IV, RMN de ^1H e ^{13}C permitiu identificar o sólido como sendo **friedelinol (MD05)**.

Grupo A11 (frações 102-106): apresentou-se como um material alaranjado oleoso (0,1273 g), com três manchas em CCD. O material foi recromatografado em CC (Coluna F: 2,0 cm/28,0 cm), utilizando-se 15,7 g de sílica gel (Tabela 7). Foram recolhidas 83 frações de 20 mL, agrupadas de acordo com o perfil observado em CCD.

Tabela 7. Ordem de eluição da coluna F

Eluente	Fração de 20 mL
Hex	1 – 4
Hex/CHCl ₃ (95:5)	5 – 7
Hex/CHCl ₃ (90:10)	8 – 10
Hex/CHCl ₃ (85:15)	11 – 31
Hex/CHCl ₃ (80:20)	32 – 35
Hex/CHCl ₃ (75:25)	36 – 40
Hex/CHCl ₃ (70:30)	41 – 43
Hex/CHCl ₃ (60:40)	44 – 67
Hex/CHCl ₃ (50:50)	68 – 71
CHCl ₃	72 – 74
CHCl ₃ / AcOEt (90:10)	75 – 76
CHCl ₃ / AcOEt (50:50)	77 – 79
AcOEt	80 – 81
MeOH	82 – 83

O subgrupo **F51-54** apresentou-se como um sólido cristalino branco (15,0 mg), que mostrou uma única mancha roxa em CCD. A análise dos espectros na região do IV, RMN de ^1H e ^{13}C e CG/EM permitiu identificar o sólido como sendo **mistura de álcoois graxos (MD06)**.

Grupo A12 (frações 107-117): apresentou-se como um material composto por um sólido e óleo alaranjado (0,3099 g) com três manchas em CCD, sendo uma bastante intensa em relação às demais. O grupo **A12** foi lavado sucessivas vezes com hexano e obteve-se um sólido branco (0,1115 g) com uma única mancha roxa em CCD. A análise dos espectros na região do IV e RMN de ^1H e ^{13}C permitiu identificar o sólido como sendo uma mistura de **3 β -hidroxi-urs-12-eno (MD07)** e **3 β -hidroxi-olean-12-eno (MD08)**.

Grupo A14 (frações 128-140): apresentou-se como um material oleoso alaranjado (0,9898 g) que mostrou quatro manchas em CCD. O grupo **A14** foi recromatografado (Coluna **G**: 2,5 cm/57,0 cm), utilizando-se 48,0 g de sílica gel (Tabela 8). Foram recolhidas 150 frações de 20 mL, agrupadas de acordo com o perfil observado em CCD.

Tabela 8. Ordem de eluição da coluna **G**

Eluente	Fração de 20 mL
Hex/ CHCl_3 (9:1)	1 – 17
Hex/ CHCl_3 (8:2)	18 - 34
Hex/ CHCl_3 (7:3)	35 – 59
Hex/ CHCl_3 (6:4)	60 – 87
Hex/ CHCl_3 (1:1)	88 – 100
Hex/ CHCl_3 (4:6)	101 – 107
Hex/ CHCl_3 (3:7)	108 – 114
Hex/ CHCl_3 (2:8)	115 – 121
CHCl_3	122 –133
AcOEt	134 – 142
MeOH	143 – 150

O subgrupo **G85-91** apresentou-se com um sólido cristalino branco em mistura com um resíduo de óleo alaranjado. O material foi lavado com hexano e foi separado o sólido puro (18,0 mg) mostrando uma única mancha roxa em CCD. A análise dos espectros na região do IV, RMN de ^1H e ^{13}C permitiu identificar o sólido como sendo **β -sitosterol (MD09)**.

O subgrupo **G92-95** apresentou-se como um material (0,4409 g) contendo um sólido juntamente com um óleo alaranjado, e mostrou três manchas em cromatoplaça. O material foi recromatografado (Coluna **H**: 2,0 cm/40,0 cm), utilizando-se 28,4 g de sílica (Tabela 9). Como eluentes foram utilizados o Hex, CHCl_3 , AcOEt e MeOH, puros ou em gradiente de polaridade. Foram recolhidas 142 frações de 10 mL, agrupadas de acordo com o perfil observado em CCD.

Tabela 9. Ordem de eluição da coluna **H**

Eluente	Fração de 10 mL
Hex	1 – 7
Hex/ CHCl_3 (90:1)	8 – 21
Hex/ CHCl_3 (85:15)	22 - 29
Hex/ CHCl_3 (80:20)	30 – 36
Hex/ CHCl_3 (70:30)	37 – 43
Hex/ CHCl_3 (60:40)	44 – 50
Hex/ CHCl_3 (50:50)	51 – 57
Hex/ CHCl_3 (40:60)	58 – 64
Hex/ CHCl_3 (30:70)	65 – 71
Hex/ CHCl_3 (20:80)	72 – 84
Hex/ CHCl_3 (10:90)	85 – 94
CHCl_3	95 –104
CHCl_3 /AcOEt (90:10)	105 –110
CHCl_3 /AcOEt (80:20)	111 –116
CHCl_3 /AcOEt (70:30)	117 –123
CHCl_3 /AcOEt (50:50)	124 –130
AcOEt	131 – 135
MeOH	136 – 142

O subgrupo **H56-60** apresentou-se com um sólido cristalino branco (35,1 mg), mostrando uma única mancha roxa em CCD. A análise dos espectros na região do IV e RMN de ^1H e ^{13}C permitiu identificar o sólido como sendo **β -sitosterol (MD09)**.

Grupo A16 (frações 145-153): apresentou-se como um material (0,3230 g) oleoso de coloração verde escura que apresentava um sólido. A análise em CCD indicou a presença de cinco manchas. O material foi lavado sucessivas vezes com hexano e obteve-se um sólido branco (0,1550 g), ainda com um resíduo verde oleoso. O sólido foi então recromatografado (Coluna I: 2,0 cm/37,0 cm), utilizando-se 24,2 g de sílica gel (Tabela 10). Foram recolhidas 82 frações de 20 mL, agrupadas de acordo com o perfil observado em CCD.

Tabela 10. Ordem de eluição da coluna I

Eluente	Fração de 20 mL
Hex/ CHCl_3 (6:4)	1 – 20
Hex/ CHCl_3 (1:1)	21 - 29
Hex/ CHCl_3 (4:6)	30 – 39
Hex/ CHCl_3 (3:7)	40 – 54
Hex/ CHCl_3 (1:9)	55 – 62
CHCl_3	63 – 68
AcOEt	69 – 74
MeOH	75 – 82

O subgrupo **I40-44** apresentou-se com um sólido cristalino branco (87,1 mg) que indicou uma única mancha roxa em CCD. A análise dos espectros na região do IV e RMN de ^1H e ^{13}C permitiu identificar o sólido como sendo **3-oxo-30-hidroxifriedelano (MD10)**.

Grupo A17 (frações 154-168): apresentou-se como um material graxo (0,3340 g) de coloração verde escura. Foram observadas três manchas em cromatoplaça. O material foi recromatografado (Coluna J: 2,0 cm/42,0 cm), utilizando-se 19,2 g de

florisil (Tabela 11). Foram recolhidas 65 frações de 20 mL, agrupadas de acordo com o perfil observado em CCD.

Tabela 11. Ordem de eluição da coluna J

Eluente	Fração de 20 mL
Hex/CHCl ₃ (75:25)	1 – 7
Hex/CHCl ₃ (73:27)	8 – 9
Hex/CHCl ₃ (70:30)	10 – 11
Hex/CHCl ₃ (67:33)	12 – 13
Hex/CHCl ₃ (64:36)	14 – 15
Hex/CHCl ₃ (61:39)	16 – 17
Hex/CHCl ₃ (58:42)	18 – 19
Hex/CHCl ₃ (55:45)	20 – 21
Hex/CHCl ₃ (52:48)	22 – 23
Hex/CHCl ₃ (49:51)	24 – 25
Hex/CHCl ₃ (45:55)	26 – 27
Hex/CHCl ₃ (40:60)	28 – 29
Hex/CHCl ₃ (35:65)	30 – 32
Hex/CHCl ₃ (25:75)	33 – 34
Hex/CHCl ₃ (20:80)	35 – 36
Hex/CHCl ₃ (15:85)	37 – 38
Hex/CHCl ₃ (10:90)	39 – 40
CHCl ₃	41 – 43
CHCl ₃ /AcOEt (9:1)	44 – 45
CHCl ₃ /AcOEt (7:3)	46 – 47
CHCl ₃ /AcOEt (1:1)	48 – 49
CHCl ₃ /AcOEt (3:7)	50 – 51
AcOEt	52 – 56
MeOH	57 – 65

O subgrupo **J25-30** foi lavado com hexano e obteve-se um sólido cristalino branco (12,1 mg). A comparação por CCD com amostra autêntica de 3-oxo-30-hidroxfriedelano indicou tratar-se dessa substância. A análise dos espectros na

região do IV e RMN de ^1H e ^{13}C confirmou a identidade do sólido como sendo **3-oxo-30-hidroxfriedelano (MD10)**.

Grupo A18 (frações 169-178): apresentou-se como um material (0,3578 g) graxo de coloração verde escura. Foram observadas cinco manchas em cromatoplaça. O material foi submetido à CC (Coluna **K**: 2,0 cm/42,0 cm), utilizando-se 29,5 g de sílica gel (Tabela 12). Foram recolhidas 180 frações de 25 mL, agrupadas de acordo com o perfil observado em CCD.

Tabela 12. Ordem de eluição da coluna **K**

Eluente	Fração de 25 mL
Hex/ CHCl_3 (8:2)	1 – 20
Hex/ CHCl_3 (1:1)	21– 100
Hex/ CHCl_3 (4:6)	101 – 127
Hex/ CHCl_3 (3:7)	129 – 136
Hex/ CHCl_3 (2:8)	137 – 140
CHCl_3	141 – 160
AcOEt	161 – 170
MeOH	170 –180

O subgrupo **K60-76** apresentou-se como uma graxa verde com um sólido (0,200 g) e análise de CCD mostrou duas manchas em cromatoplaça. O material foi recromatografado (Coluna **L**: 2,0 cm/42,0 cm), utilizando-se 31,2 g de florisil (Tabela 13, p. 27). Foram recolhidas 122 frações de 20 mL, agrupadas de acordo com o perfil observado em CCD.

Tabela 13. Ordem de eluição da coluna L

Eluente	Fração de 20 mL
Hex/CHCl ₃ (8:2)	1 – 5
Hex/CHCl ₃ (78:22)	6 – 10
Hex/CHCl ₃ (75:25)	11 – 15
Hex/CHCl ₃ (72:28)	16 – 20
Hex/CHCl ₃ (69:31)	21 – 25
Hex/CHCl ₃ (66:34)	26 – 30
Hex/CHCl ₃ (60:40)	31 – 35
Hex/CHCl ₃ (57:43)	36 – 40
Hex/CHCl ₃ (54:46)	41 – 45
Hex/CHCl ₃ (1:1)	46 – 50
Hex/CHCl ₃ (47:53)	51 – 55
Hex/CHCl ₃ (43:57)	56 – 60
Hex/CHCl ₃ (4:6)	61 – 65
Hex/CHCl ₃ (37:63)	66 – 70
Hex/CHCl ₃ (34:66)	71 – 75
Hex/CHCl ₃ (3:7)	76 – 80
Hex/CHCl ₃ (25:75)	81 – 85
Hex/CHCl ₃ (15:85)	86 – 90
Hex/CHCl ₃ (5:95)	91 – 95
CHCl ₃	95 – 100
CHCl ₃ /AcOEt (1:1)	101 – 105
AcOEt	105 – 110
MeOH	111 – 122

O subgrupo **L35-72** apresentou-se como um sólido branco com um resíduo oleoso. O material foi lavado com hexano e o sólido (12,0 mg) foi cuidadosamente separado. Análise de CCD indicou duas manchas de R_f's diferentes das substâncias isoladas na planta até o momento. As análises de RMN de ¹H e ¹³C não permitiram identificar a mistura, devido à complexidade dos espectros pela presença de impureza e baixa massa.

As demais subfrações da coluna **K** e **L** não foram trabalhadas por tratarem-se de misturas complexas ou com pequena massa.

Grupo A19 (frações 179-180): apresentou-se como um material (0,7043 g) graxo de coloração verde escura. Foram observadas cinco manchas em cromatoplaça. O material foi submetido à CC (Coluna **M**: 2,0 cm/42,0 cm), utilizando-se 52,5 g de florisil (Tabela 14). Foram recolhidas 65 frações de 25 mL, agrupadas de acordo com o perfil observado em CCD.

Tabela 14. Ordem de eluição da coluna **M**

Eluente	Fração de 25 mL
Hex/CHCl ₃ (75:25)	1 – 8
Hex/CHCl ₃ (72:28)	9 – 10
Hex/CHCl ₃ (69:31)	11 – 13
Hex/CHCl ₃ (66:34)	14 – 15
Hex/CHCl ₃ (63:37)	16 – 17
Hex/CHCl ₃ (60:40)	18 – 19
Hex/CHCl ₃ (57:43)	20 – 21
Hex/CHCl ₃ (54:46)	22 – 23
Hex/CHCl ₃ (1:1)	24 – 25
Hex/CHCl ₃ (45:55)	26 – 27
Hex/CHCl ₃ (42:58)	28 – 29
Hex/CHCl ₃ (38:62)	30 – 31
Hex/CHCl ₃ (35:65)	32 – 33
Hex/CHCl ₃ (30:70)	34 – 35
Hex/CHCl ₃ (25:75)	36 – 37
Hex/CHCl ₃ (20:80)	38 – 39
Hex/CHCl ₃ (15:85)	40 – 41
Hex/CHCl ₃ (10:90)	42 – 43
CHCl ₃	44 – 45
AcOEt	46 – 55
MeOH	56 – 65

O subgrupo **M15-38** apresentou-se como um sólido cristalino contaminado com um óleo amarelado. O material foi lavado com hexano e o sólido branco (23,5 mg) foi separado. A análise dos espectros na região do IV e RMN de ^1H e ^{13}C permitiu identificar o sólido como sendo **3 β ,24-dihidroxifriedelano (MD11)**.

O subgrupo **M45-60** apresentou-se como um material graxo de coloração verde escura com um sólido precipitado. O material foi lavado sucessivas vezes com acetona e um sólido cristalino (0,4870 g) foi separado. A análise dos espectros na região do IV e RMN de ^1H e ^{13}C permitiu identificar o sólido como sendo **acetato de sódio (MD12)**.

O esquema do fracionamento de **EHE** é mostrado na Figura 10.

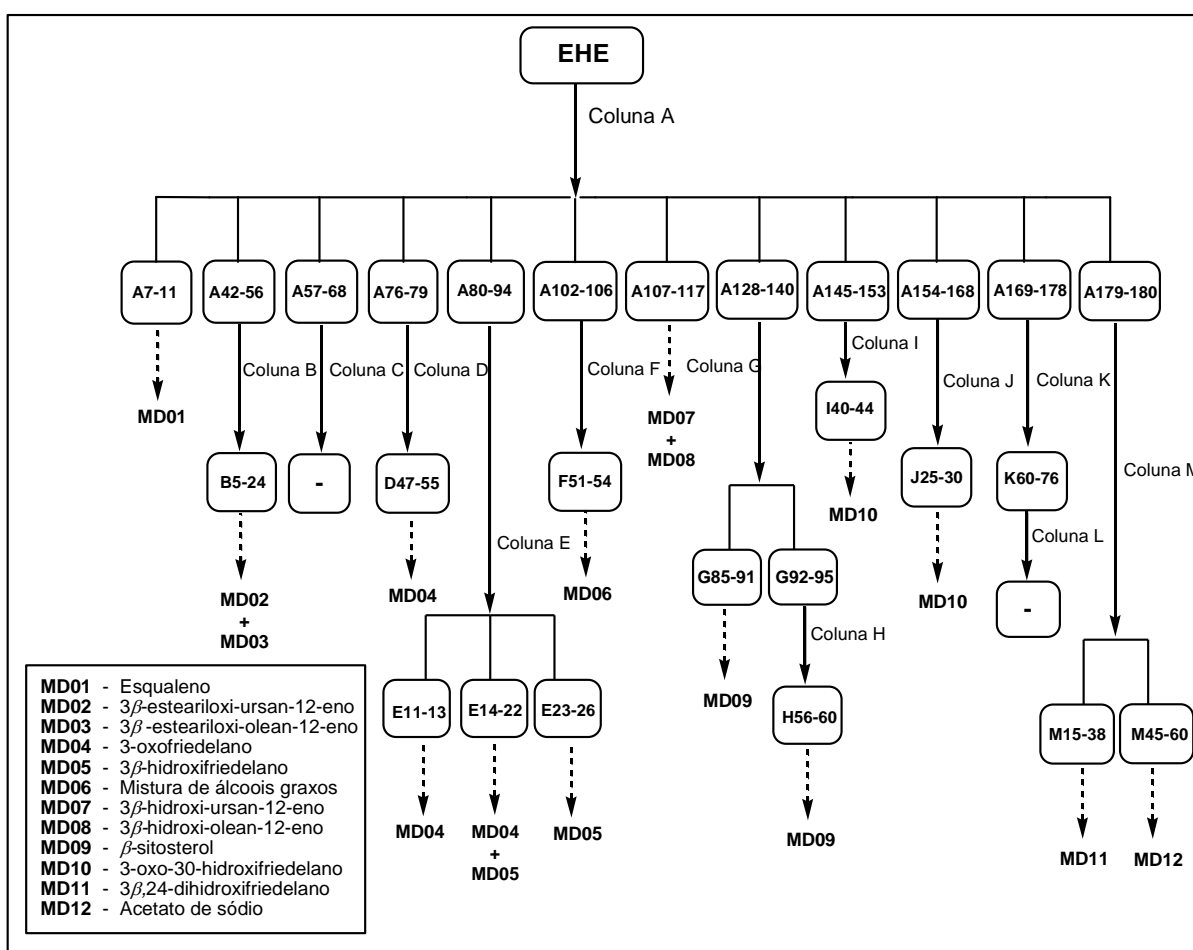


Figura 10: Esquema utilizado no fracionamento de **EHE**.

2.3.2 Elaboração de SEH

SEH foi obtido durante a remoção parcial do solvente do extrato hexânico. O sólido (3,80 g) foi separado através de filtração a vácuo e apresentou-se como um material borrachoso de coloração branco-amarelado. Análise de CCD comparada com padrão indicou presença de guta percha no sólido.

O material foi submetido a uma coluna cromatográfica prévia para separação da guta percha dos demais constituintes. Como fase estacionária utilizou-se sílica gel 60 com tamanho de partícula 0,063-0,200 mm (70-230 Mesh) e como fases móveis foram utilizados metanol e clorofórmio. A primeira eluição foi feita com metanol, para arraste dos constituintes de **SEH**, exceto a guta percha que é insolúvel nesse solvente. Na segunda eluição utilizou-se clorofórmio que, então, solubilizou e arrastou a guta percha (**MD13**), obtendo-se 2,90 g desse composto. A análise dos espectros na região do IV e RMN de ^1H e ^{13}C permitiu confirmar a identidade dessa substância.

SEH livre de guta percha (0,200 g) foi submetido à CC (Coluna **N**: 2,0 cm/42,0 cm), utilizando-se 25,4 g de sílica gel (Tabela 15). Foram utilizados como eluente Hex, CHCl_3 , AcOEt e MeOH puros ou em misturas em gradiente de polaridade. Foram recolhidas 69 frações de 25 mL, agrupadas de acordo com o perfil em CCD.

Tabela 15. Ordem de eluição da coluna **N**

Eluente	Fração de 25 mL	Eluente	Fração de 25 mL
Hex/ CHCl_3 (95:5)	1 – 5	Hex/ CHCl_3 (45:55)	40 – 42
Hex/ CHCl_3 (90:10)	6 – 11	Hex/ CHCl_3 (40:60)	43 – 44
Hex/ CHCl_3 (85:15)	12 – 15	Hex/ CHCl_3 (35:65)	45 – 46
Hex/ CHCl_3 (80:20)	16 – 19	Hex/ CHCl_3 (30:70)	47 – 48
Hex/ CHCl_3 (75:25)	20 – 23	Hex/ CHCl_3 (20:80)	49 – 50
Hex/ CHCl_3 (70:30)	24 – 27	Hex/ CHCl_3 (10:90)	51 – 52
Hex/ CHCl_3 (65:35)	28 – 30	Hex/ CHCl_3 (5:95)	53 – 54
Hex/ CHCl_3 (60:40)	31 – 33	CHCl_3	55 – 58
Hex/ CHCl_3 (55:45)	34 – 36	AcOEt	59 – 63
Hex/ CHCl_3 (50:50)	37 – 39	MeOH	64 – 69

A fração **N38-40** apresentou-se como um sólido branco (20,3 mg) que indicou uma única mancha em CCD. A análise dos espectros na região do IV, RMN de ^1H e ^{13}C e CG/EM permitiu identificar o sólido como sendo **mistura de álcoois graxos (MD06)**.

As demais frações não foram trabalhadas por tratarem-se de misturas complexas com pequena quantidade.

2.3.3 Elaboração de ECL

Após remoção completa do solvente, **ECL** (35,06 g) foi submetido à CC prévia para separação da guta percha presente no extrato, utilizando-se sílica gel 60 como fase estacionária. Foram utilizados como fases móveis o metanol e o clorofórmio puros, eluídos nessa ordem. Dessa coluna foram obtidos 6,06 g de guta percha.

ECL livre de guta (26,5 g) foi então fracionado em coluna cromatográfica (Coluna **Q**: 4,0 cm/1,1 m), utilizando 471,3 g de sílica gel 60 (70-230 Mesh) e os eluentes hexano, acetato de etila e metanol puros ou em misturas em gradiente de polaridade (Tabela 16). Foram obtidas 172 frações de 100 ou 200 mL, que tiveram seus volumes reduzidos em rotavapor. Após análise de CCD, as frações foram agrupadas de acordo com o perfil apresentado nas cromatoplaças (Tabela 17, p. 32).

Tabela 16. Ordem de eluição da coluna **Q**

Eluente	Fração	Eluente	Fração
Hex/AcOEt (80:20)	1 – 15	Hex/AcOEt (45:55)	83 – 88
Hex/AcOEt (78:22)	16 – 26	Hex/AcOEt (40:60)	89 – 93
Hex/AcOEt (75:25)	27 – 35	Hex/AcOEt (35:75)	94 – 100
Hex/AcOEt (73:27)	36 – 40	Hex/AcOEt (30:70)	101 – 107
Hex/AcOEt (70:30)	41 – 47	Hex/AcOEt (25:75)	108 - 115
Hex/AcOEt (68:32)	48 – 52	Hex/AcOEt (20:80)	116 – 122
Hex/AcOEt (65:35)	53 – 59	Hex/AcOEt (15:85)	123 - 129
Hex/AcOEt (62:38)	60 – 65	Hex/AcOEt (10:90)	130 – 135
Hex/AcOEt (60:40)	66 – 70	Hex/AcOEt (5:95)	136 – 144
Hex/AcOEt (55:45)	71 – 77	AcOEt	145 – 159
Hex/AcOEt (50:40)	78 – 82	MeOH	160 - 172

Tabela 17. Grupos relacionados da coluna **Q**

Grupo	Massa (g)
Q1 (1 - 5)	2,0557
Q2 (6 - 8)	2,4618
Q3 (9 - 24)	1,3224
Q4 (25 - 28)	1,9797
Q5 (29 - 45)	0,6220
Q6 (46 - 53)	0,1615
Q7 (54 - 81)	0,5038
Q8 (82 - 95)	0,1481
Q9 (96 - 113)	0,3246
Q10 (114 - 125)	0,5283
Q11 (126 - 145)	0,1094
Q12 (146 - 169)	0,5041
Q13 (170 - 172)	1,6274

Os grupos **Q3**, **Q6**, **Q8** e **Q10**, **Q11** e **Q13** não foram analisados por mostrarem perfis bastante complexos em CCD ou por tratarem-se de um material constituído por grande quantidade de clorofila.

Grupo Q1 (frações 1-5): apresentou-se como um material graxo de coloração verde escura, com quatro manchas em CCD. Esse grupo (2,0557 g) foi submetido à CC (Coluna **R**: 3,0 cm/57,0 cm), utilizando-se 130,7 g de sílica gel (Tabela 18, p.33). Foram recolhidas 184 frações de 35 mL, agrupadas de acordo com o perfil observado em CCD.

Tabela 18. Ordem de eluição da coluna R

Eluente	Fração de 35 mL
Hex	1 – 17
Hex/CHCl ₃ (99:1)	18 – 25
Hex/CHCl ₃ (98:2)	26 - 30
Hex/CHCl ₃ (96:4)	31 – 35
Hex/CHCl ₃ (94:6)	36 – 59
Hex/CHCl ₃ (92:8)	60 – 63
Hex/CHCl ₃ (90:10)	64 – 65
Hex/CHCl ₃ (85:15)	66 – 67
Hex/CHCl ₃ (80:20)	68 – 69
Hex/CHCl ₃ (75:25)	70 – 71
Hex/CHCl ₃ (70:30)	72 – 73
Hex/CHCl ₃ (60:40)	74 – 75
Hex/CHCl ₃ (50:50)	76 – 78
Hex/CHCl ₃ (40:60)	79 – 95
Hex/CHCl ₃ (30:70)	96 – 102
Hex/CHCl ₃ (20:80)	103 – 107
Hex/CHCl ₃ (10:90)	108 – 112
CHCl ₃	113 – 137
CHCl ₃ /AcOEt (95:5)	138 – 146
CHCl ₃ /AcOEt (90:10)	147 – 161
CHCl ₃ /AcOEt (80:20)	162 – 163
CHCl ₃ /AcOEt (70:30)	164 – 165
CHCl ₃ /AcOEt (50:50)	166 – 167
AcOEt	168 – 169
MeOH	170 – 184

O subgrupo **R69-76** apresentou-se como uma graxa esverdeada (0,5927 g) e a CCD mostrou quatro manchas roxas após revelação. O material foi submetido à CC (Coluna **S**: 1,5 cm/40,0 cm) utilizando-se 62,65 g de sílica gel e Hex, CHCl₃, AcOEt e MeOH, puros ou em gradiente de polaridade, como eluentes (Tabela 19, p.34).

Tabela 19. Ordem de eluição da coluna **S**

Eluente	Fração de 20 mL
Hex	1 – 15
Hex/CHCl ₃ (95:5)	16 – 25
Hex/CHCl ₃ (90:10)	26 – 30
Hex/CHCl ₃ (85:15)	31 – 35
Hex/CHCl ₃ (80:20)	36 – 40
Hex/CHCl ₃ (75:25)	41 – 48
Hex/CHCl ₃ (70:30)	49 – 54
Hex/CHCl ₃ (60:40)	55 – 60
Hex/CHCl ₃ (50:50)	61 – 65
Hex/CHCl ₃ (40:60)	66 – 72
Hex/CHCl ₃ (30:70)	73 – 75
Hex/CHCl ₃ (20:80)	76– 79
Hex/CHCl ₃ (10:90)	80 – 82
CHCl ₃	83 – 88
AcOEt	89 – 110
MeOH	111 – 120

A partir do subgrupo **S50-55** foi isolada uma mistura identificada como sendo composta por **3 β -esteariloxi-urs-12-eno (MD02)** e **3 β -esteariloxi-olean-12-eno (MD03)** (0,1780 g). Essa mistura, isolada anteriormente de **EHE**, teve sua estrutura confirmada através de seus espectros de RMN de ¹H e ¹³C.

O subgrupo **R98-115** apresentou-se como um sólido contendo um resíduo de material graxo (0,1030 g), com três manchas roxas em CCD. O material foi submetido à CC (Coluna **T**: 1,0 cm/27,0 cm) utilizando-se 8,428 g de sílica gel e Hex, CHCl₃, AcOEt e MeOH, puros ou em gradiente de polaridade, como eluentes (Tabela 20, p.35).

Tabela 20. Ordem de eluição da coluna **T**

Eluente	Fração de 10 mL
Hex/CHCl ₃ (70:30)	1 – 11
Hex/CHCl ₃ (68:32)	12 – 15
Hex/CHCl ₃ (66:34)	16 – 18
Hex/CHCl ₃ (64:38)	19 – 21
Hex/CHCl ₃ (60:40)	22 – 25
Hex/CHCl ₃ (55:45)	26 – 28
Hex/CHCl ₃ (50:50)	29 – 31
Hex/CHCl ₃ (40:60)	32 – 34
Hex/CHCl ₃ (30:70)	35 – 38
Hex/CHCl ₃ (20:80)	39 – 41
CHCl ₃	42 – 50
AcOEt	51 – 60
MeOH	61 – 70

O subgrupo **T12-17** levou ao isolamento de **3-oxofriedelano (MD04)** (12,0 mg) e o subgrupo **T18-24** forneceu uma mistura (23,3 mg) de **3-oxofriedelano** e **3 β -hidroxifriedelano (MD05)**. As substâncias, isoladas também de **EHE**, tiveram suas estruturas confirmadas através de seus espectros de RMN de ¹H e ¹³C.

As demais frações da coluna **R**, **S** e **T** não foram trabalhadas por tratarem-se de misturas complexas com pequena quantidade.

Grupo Q2 (frações 6-8): apresentou-se como um material graxo de coloração verde escura, com cinco manchas em CCD. Esse grupo (2,4618 g) foi submetido à CC (Coluna **U**: 3,0 cm/57,0 cm), utilizando-se 150,1 g de sílica gel (Tabela 21, p. 36). Foram recolhidas 190 frações de 25 mL, agrupadas de acordo com o perfil observado em CCD.

Tabela 21. Ordem de eluição da coluna **U**

Eluente	Fração de 25 mL
Hex/CHCl ₃ (80:20)	1 – 8
Hex/CHCl ₃ (75:25)	9 – 10
Hex/CHCl ₃ (70:30)	11 – 12
Hex/CHCl ₃ (65:35)	13 – 14
Hex/CHCl ₃ (60:40)	15 – 18
Hex/CHCl ₃ (55:45)	19 – 20
Hex/CHCl ₃ (50:50)	21 – 22
Hex/CHCl ₃ (45:55)	23 – 25
Hex/CHCl ₃ (40:60)	26 – 27
Hex/CHCl ₃ (35:65)	28 – 32
Hex/CHCl ₃ (30:70)	33 – 40
Hex/CHCl ₃ (25:75)	41 – 44
Hex/CHCl ₃ (20:80)	45 – 51
Hex/CHCl ₃ (15:85)	52 – 87
Hex/CHCl ₃ (10:90)	88 – 90
Hex/CHCl ₃ (5:95)	91 – 94
CHCl ₃	95 – 100
CHCl ₃ /AcOEt (95:5)	101– 112
CHCl ₃ /AcOEt (90:10)	113 – 144
CHCl ₃ /AcOEt (80:20)	145 – 147
CHCl ₃ /AcOEt (70:30)	148 – 149
CHCl ₃ /AcOEt (50:50)	150 – 152
CHCl ₃ /AcOEt (40:60)	153 – 154
CHCl ₃ /AcOEt (30:70)	155 – 156
CHCl ₃ /AcOEt (20:80)	157 – 158
CHCl ₃ /AcOEt (10:90)	159 – 161
AcOEt	162 – 165
AcOEt/MeOH (50:50)	166 – 175
MeOH	176 – 190

O subgrupo **U12-15** apresentou-se como um sólido branco (43,5 mg), que mostrou uma única mancha amarela em cromatoplaça. A comparação em CCD com

amostra autêntica de **friedelina (MD04)**, indicou tratar-se dessa substância, já isolada de **EHE**.

O subgrupo **U66-83** apresentou-se como um sólido branco contendo um resíduo oleoso. O material foi lavado com hexano e um sólido branco (35,0 mg) foi separado. A comparação por CCD com amostra autêntica de mistura de **3 β -hidroxi-urs-12-eno (MD07)** e **3 β -hidroxi-olean-12-eno (MD08)** e análise de RMN de ^1H e ^{13}C indicou que o sólido tratava-se da mistura dessas substâncias, isolada também a partir de **EHE**.

O subgrupo **U104-117** apresentou-se como um sólido branco (18,0 mg) e a comparação em CCD com amostra autêntica de **β -sitosterol (MD09)** indicou tratar-se dessa substância, isolada também a partir de **EHE**.

O subgrupo **U118-128** (0,3947 g) foi submetido à CC (Coluna **V**: 1,5 cm/42,0 cm), utilizando-se sílica gel (39,7 g) como fase estacionária (Tabela 22). Foram utilizados como eluentes o Hex, CHCl_3 , AcOEt e MeOH, puros ou em gradiente de polaridade.

Tabela 22. Ordem de eluição da coluna **V**

Eluente	Fração de 20 mL
Hex/ CHCl_3 (50:50)	1 – 10
Hex/ CHCl_3 (45:55)	11 – 14
Hex/ CHCl_3 (40:60)	15 – 20
Hex/ CHCl_3 (35:65)	21 – 25
Hex/ CHCl_3 (30:70)	26 – 30
Hex/ CHCl_3 (20:80)	31 – 35
CHCl_3	36 – 40
CHCl_3 /AcOEt (95:5)	41 – 50
CHCl_3 /AcOEt (90:10)	51 – 56
CHCl_3 /AcOEt (80:20)	57 – 65
CHCl_3 /AcOEt (50:50)	66 – 76
AcOEt	77 – 87
MeOH	88 – 95

A partir do subgrupo **V44-48** foi isolado um sólido branco (35,0 mg) que apresentou padrão em CCD diferente das substâncias anteriormente isoladas. A

análise de IV e RMN de ^1H e ^{13}C indicou tratar-se do **ácido tritriacontanóico (MD14)**.

Grupo Q4 (frações 25-28): apresentou-se como um material graxo de coloração verde escura, com três manchas em CCD. Esse grupo (1,9797 g) foi submetido à CC (Coluna **W**: 2,0 cm/49,0 cm), utilizando-se 134,6 g de sílica gel (Tabela 23). Foram recolhidas 130 frações de 25 mL, agrupadas de acordo com o perfil observado em CCD. Foram utilizados como eluentes o Hex, CHCl_3 , AcOEt e MeOH, puros ou em gradiente de polaridade.

Tabela 23. Ordem de eluição da coluna **W**

Eluente	Fração de 25 mL
Hex	1 – 14
Hex/ CHCl_3 (98:2)	15 – 19
Hex/ CHCl_3 (95:5)	20 – 25
Hex/ CHCl_3 (90:10)	26 – 31
Hex/ CHCl_3 (85:15)	32 – 49
Hex/ CHCl_3 (80:20)	50 – 55
Hex/ CHCl_3 (75:25)	56 – 62
Hex/ CHCl_3 (65:35)	63 – 68
Hex/ CHCl_3 (50:50)	69 – 74
Hex/ CHCl_3 (30:70)	75 – 78
Hex/ CHCl_3 (10:90)	79 – 81
CHCl_3	82 – 83
CHCl_3 /AcOEt (90:10)	84 – 88
CHCl_3 /AcOEt (80:20)	89 – 95
CHCl_3 /AcOEt (70:30)	96 – 102
CHCl_3 /AcOEt (60:40)	103 – 110
CHCl_3 /AcOEt (50:50)	111 – 112
CHCl_3 /AcOEt (40:60)	113 – 114
CHCl_3 /AcOEt (30:70)	115 – 116
AcOEt	117 – 118
AcOEt/MeOH (50:50)	119 – 122
MeOH	123 – 130

O subgrupo **W98-103** apresentou-se como um sólido branco contaminado com clorofila. O material foi lavado com acetona e o sólido foi separado (115,0 mg). Análise comparativa de CCD e dados obtidos a partir dos espectros de RMN de ^1H e ^{13}C permitiu identificar a substância como sendo **3 β ,24-dihidroxifriedelano (MD11)**, isolado também de **EHE**.

Grupo Q5 (frações 29-45): apresentou-se como um material sólido graxo de coloração verde escura (0,6220 g). Foram realizadas sucessivas lavagens com acetato de etila até a obtenção de um sólido branco (0,1570 g), que indicou uma única mancha roxa em CCD. A análise comparativa com amostra autêntica de **3 β ,24-dihidroxifriedelano (MD11)** indicou tratar-se dessa substância. A análise de RMN de ^1H e ^{13}C confirmou a estrutura química do sólido.

Grupo Q7 (frações 54-81): apresentou-se como um material graxo de coloração verde escura, que mostrou padrão complexo em CCD devido à grande presença de clorofila. O material (0,5038 g) foi submetido à CC (Coluna **X**: 2,0 cm/40,0 cm), utilizando-se 25,6 g de sílica gel. Foram utilizados como eluentes o Hex, CHCl_3 , AcOEt e MeOH, puros ou em gradiente de polaridade. Foram recolhidas 115 frações de 20 mL, agrupadas de acordo com o perfil observado em CCD. Não foi possível isolar e identificar nenhuma substância a partir desse grupo.

Grupo Q9 (frações 96-113): apresentou-se como um sólido contendo um resíduo de óleo esverdeado (0,3246 g). O material foi lavado com acetona até a obtenção de um sólido branco (0,0873 g), que mostrou uma única mancha roxa em CCD. A análise dos espectros no IV e RMN de ^1H e ^{13}C permitiu identificar o sólido como sendo **3-O- β -D-glicosil- β -sitosterol (MD15)**.

Grupo Q12 (frações 146-169): apresentou-se como um material graxo de coloração verde escura que apresentou um perfil complexo em CCD, devido à presença de um rastro contínuo na cromatoplaça. Diversos eluentes foram testados a fim de melhorar a visualização das manchas, no entanto não foi obtido sucesso. O material foi então submetido à CC (Coluna **Y**: 2,0 cm/ 45,0 cm) utilizando-se 32,5 g de sílica gel. Como eluentes foram utilizados Hex, CHCl_3 , AcOEt e MeOH, puros ou em gradiente de polaridade. Foram recolhidas 104 frações de 20 mL, agrupadas de acordo com o

perfil observado em CCD. Não foi possível isolar e identificar nenhuma substância a partir desse grupo.

O esquema do fracionamento de **ECL** é mostrado na Figura 11.

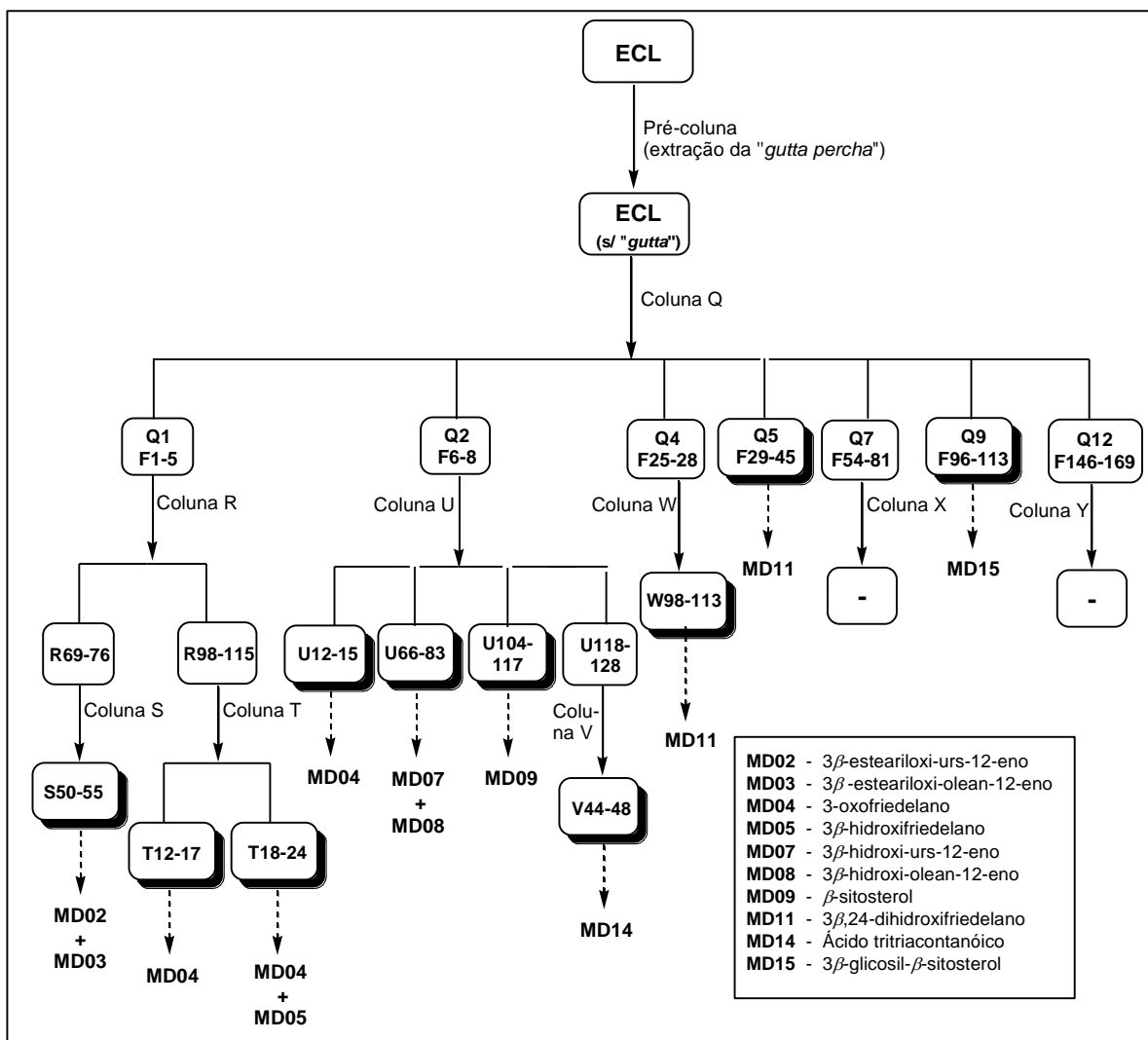


Figura 11: Esquema utilizado no fracionamento de **ECL**.

2.3.4 Elaboração de SEC

SEC foi obtido durante a remoção parcial do solvente do extrato clorofórmico e apresentou-se como um sólido branco (0,310 g). Este sólido foi submetido à CC (Coluna **Z**: 2,0 cm/70,0 cm), utilizando-se 74,2 g de sílica gel 60 (70-230 Mesh) e os eluentes diclorometano, acetato de etila e metanol puros ou em misturas em gradiente de polaridade (Tabela 24). Foram obtidas 140 frações de 25 mL, agrupadas de acordo com o perfil apresentado nas cromatoplacas.

Tabela 24. Ordem de eluição da coluna Z

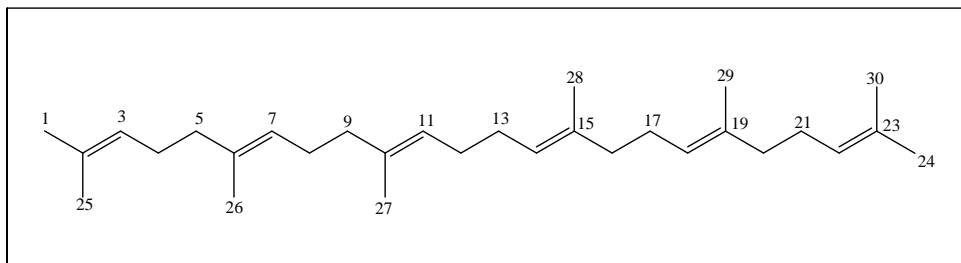
Eluente	Fração de 25 mL
CH ₂ Cl ₂	1 – 4
CH ₂ Cl ₂ /AcOEt (95:5)	5 – 8
CH ₂ Cl ₂ /AcOEt (92:8)	9 – 11
CH ₂ Cl ₂ /AcOEt (90:10)	12 – 14
CH ₂ Cl ₂ /AcOEt (88:12)	15 – 17
CH ₂ Cl ₂ /AcOEt (86:14)	18 – 20
CH ₂ Cl ₂ /AcOEt (84:16)	21 – 23
CH ₂ Cl ₂ /AcOEt (82:18)	24 – 26
CH ₂ Cl ₂ /AcOEt (80:20)	27 – 30
CH ₂ Cl ₂ /AcOEt (75:25)	31 – 34
CH ₂ Cl ₂ /AcOEt (70:30)	35 – 38
CH ₂ Cl ₂ /AcOEt (65:35)	39 – 42
CH ₂ Cl ₂ /AcOEt (60:40)	43 – 46
CH ₂ Cl ₂ /AcOEt (55:45)	47 – 50
CH ₂ Cl ₂ /AcOEt (50:50)	51 – 53
CH ₂ Cl ₂ /AcOEt (45:55)	54 – 57
CH ₂ Cl ₂ /AcOEt (40:60)	58 – 61
CH ₂ Cl ₂ /AcOEt (30:70)	62 – 65
CH ₂ Cl ₂ /AcOEt (20:80)	66 – 69
CH ₂ Cl ₂ /AcOEt (10:90)	70 – 73
AcOEt	74 – 77
AcOEt/MeOH (90:10)	78 – 84
AcOEt/MeOH (80:20)	85 – 91
AcOEt/MeOH (70:30)	92 – 98
AcOEt/MeOH (60:40)	99 – 105
AcOEt/MeOH (50:50)	106 – 111
AcOEt/MeOH (30:70)	112 – 121
AcOEt/MeOH (10:90)	122 – 131
MeOH	132 - 140

O grupo **Z30-98** apresentou-se como um sólido branco (0,1010 g) com uma única mancha roxa em CCD. O sólido foi insolúvel nos principais solventes

orgânicos como hexano, éter etílico, clorofórmio, acetona, acetato de etila, metanol, água, DMSO, piridina, e por essa razão não foi possível determinar sua estrutura química através dos seus espectros de IV e RMN ^1H e ^{13}C .

3 – DETERMINAÇÃO ESTRUTURAL

3.1 MD01: Esqualeno



MD01 foi isolado de **EHE** e apresentou-se como um óleo de cor amarelada, viscoso e solúvel em clorofórmio. A análise de CCD indicou a presença de uma única mancha de coloração azul, usando-se hexano como eluente (revelador: ácido perclórico/vanilina).

O espectro de RMN de ^1H (Figura 12, p. 44) apresenta um sinal entre δ_{H} 5,10 e 5,15, que foi atribuído aos átomos de hidrogênio olefínicos da estrutura de **MD01**. Os sinais na região entre δ_{H} 1,97 e 2,09 são referentes aos átomos de hidrogênio dos grupos metilênicos. Além disso, os simpletos em δ_{H} 1,60 e 1,68 foram atribuídos aos átomos de hidrogênio dos grupos metila. Os valores das integrais referentes aos sinais de hidrogênio são coerentes com a estrutura proposta para **MD01**. O sinal em δ_{H} 1,26 pode ser atribuído à graxa presente no composto.

A análise do espectro de RMN de ^{13}C e subespectro DEPT135 (Figuras 13 e 14, p. 44 e 45) indica a presença de 14 sinais de carbono, que foram classificados como sendo 4 CH_3 , 4 CH_2 , 3 CH e 3 C . Os sinais nas regiões de δ_{C} 124,30-124,43 e δ_{C} 131,25-135,12 foram atribuídos aos átomos de carbono olefínicos da estrutura de **MD01**.

Os dados de RMN de ^{13}C foram comparados com os da literatura (OLIVEIRA, 2012) (Tabela 25, p. 45) e foi possível identificar **MD01** como sendo **esqualeno**. O esqualeno é um precursor dos diversos tipos de triterpenos pentacíclicos e foi isolado pela primeira vez de *Maytenus distichophylla*.

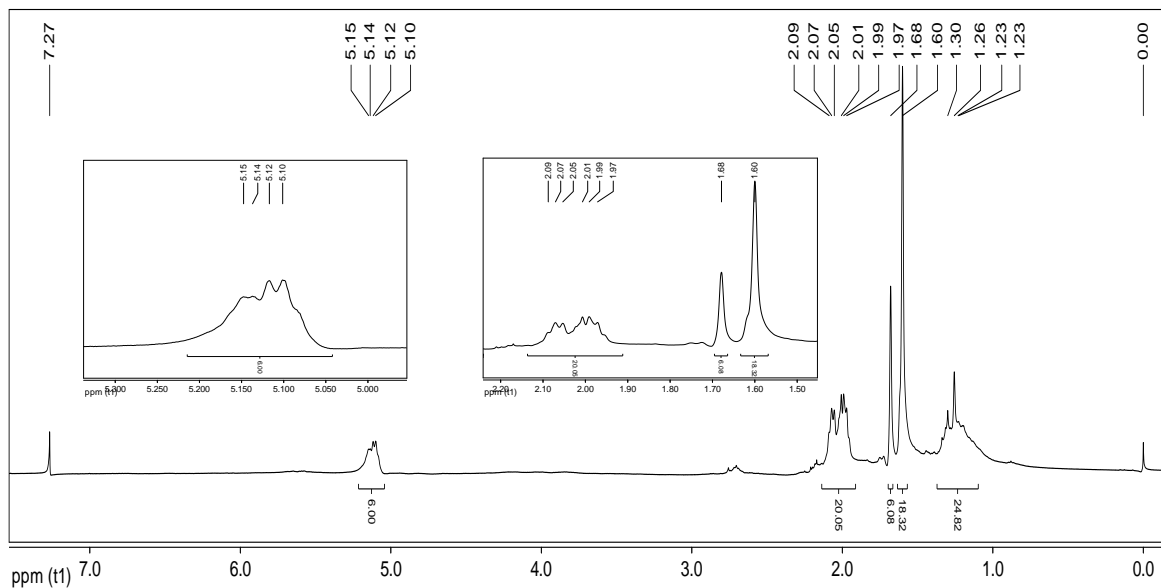


Figura 12: Espectro de RMN de ^1H (400 MHz) de MD01 em CDCl_3 .

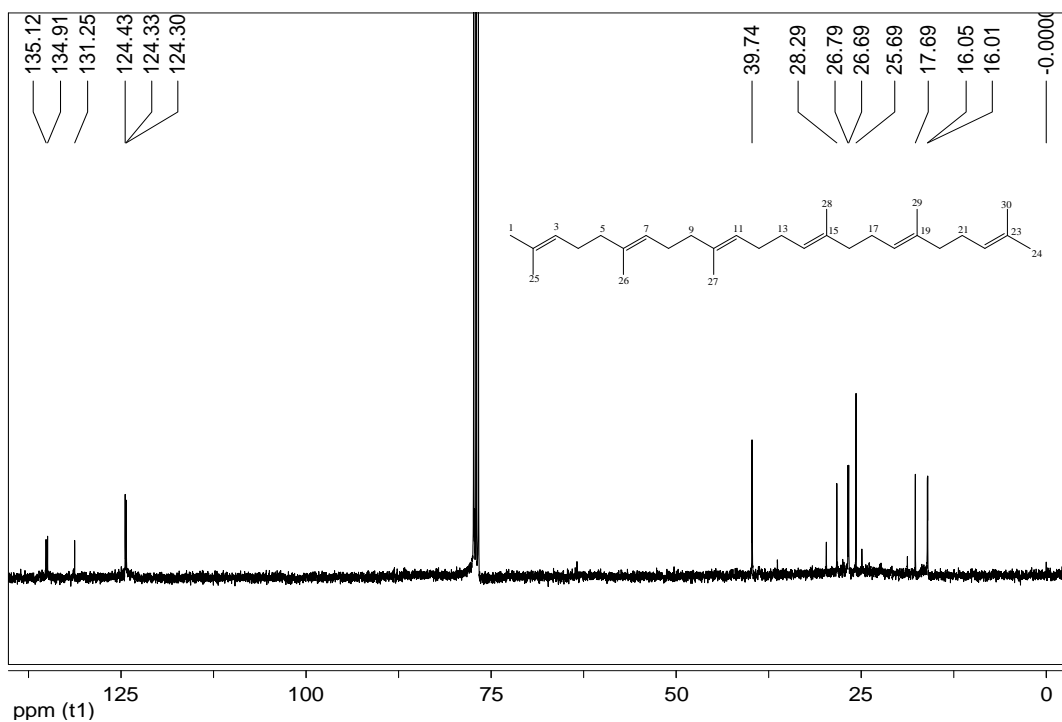


Figura 13: Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz) de MD01 em CDCl_3 .

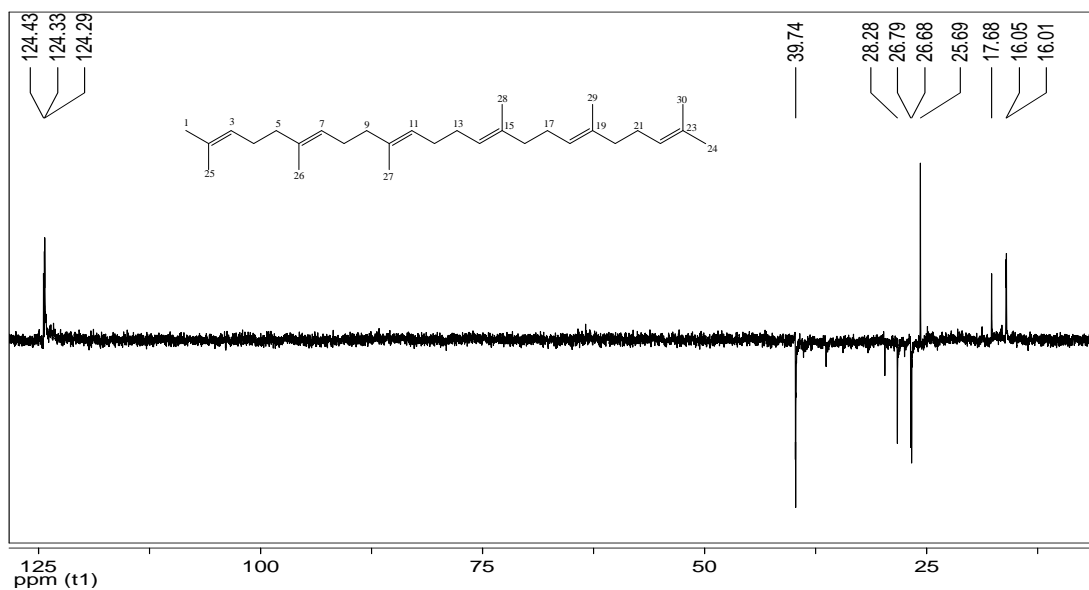


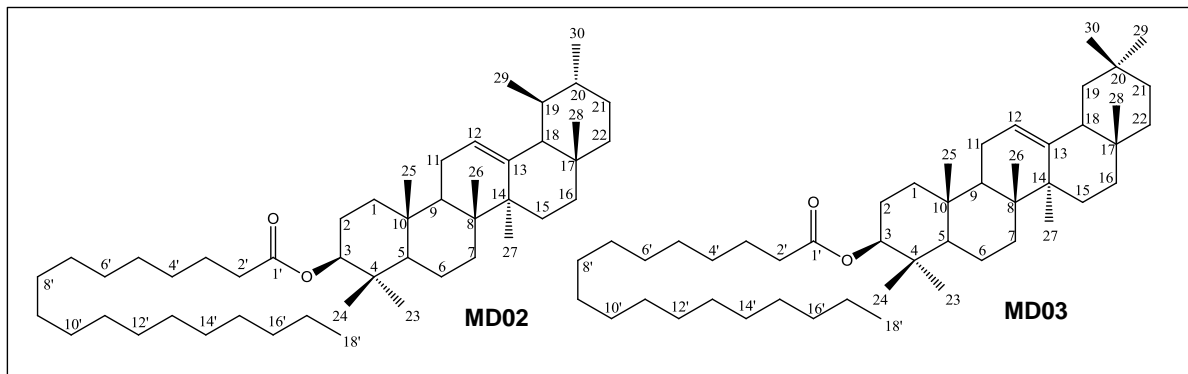
Figura 14: Subespectro DEPT135 (100 MHz) de MD01 em CDCl₃.

Tabela 25: Comparação dos dados de RMN de ¹³C de MD01 com os dados da literatura para o esqualeno (OLIVEIRA, 2012)

Carbono	Tipo de carbono	δ_c^* de MD01	δ_c^* (OLIVEIRA, 2012)
1 e 30	CH ₃	25,69	25,69
2 e 23	C	131,25	131,26
3 e 22	CH	124,33	124,34
4 e 21	CH ₂	26,79	26,80
5 e 20	CH ₂	39,74	39,75
6 e 19	C	135,12	135,12
7 e 18	CH	124,30	124,30
8 e 17	CH ₂	26,69	26,69
9 e 16	CH ₂	39,74	39,77
10 e 15	C	134,91	134,91
11 e 14	CH	124,43	124,44
12 e 13	CH ₂	28,29	28,30
24 e 25	CH ₃	17,69	17,68
26 e 29	CH ₃	16,01	16,01
27 e 28	CH ₃	16,05	16,06

Solvente: *CDCl₃

3.2 MD02 e MD03: Mistura de 3 β -esteariloxi-urs-12-eno e 3 β -esterealoxi-olean-12-eno



A mistura de **MD02** e **MD03** foi isolada de **EHE** e **ECL** e apresentou-se como uma graxa transparente, solúvel em hexano e clorofórmio. A análise por CCD desta mistura evidenciou a existência de uma única mancha rosa (revelador: ácido perclórico/vanilina).

O espectro na região do IV (Figura 15) da mistura de **MD02** e **MD03** apresenta bandas de absorção em 2920-2850, 1464 e 1380 cm^{-1} , características de ligação simples CH. A banda em 1732 cm^{-1} é atribuída à deformação axial de ligação C=O de éster alifático.

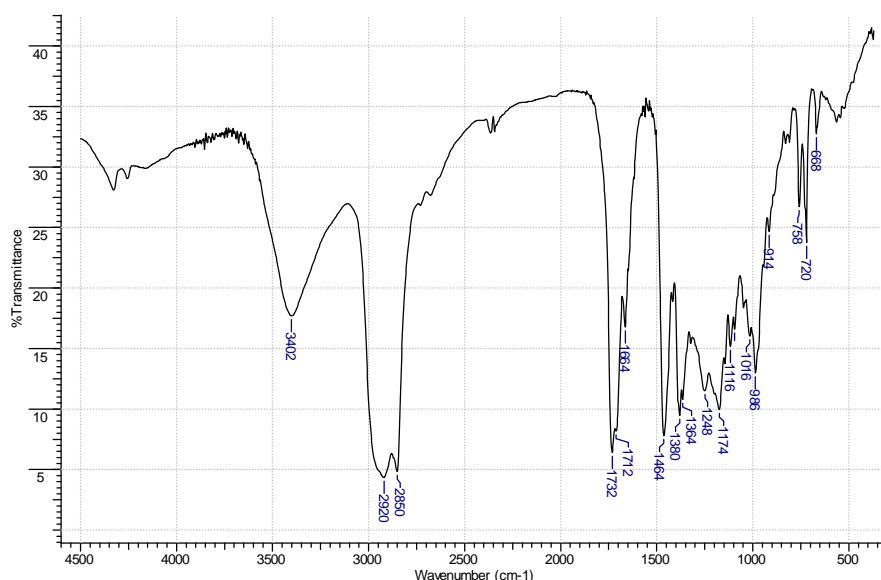


Figura 15: Espectro na região do IV da mistura de **MD02** e **MD03** (KBr).

O espectro de RMN de ^1H (Figura 16) indica a presença de dois tripletos, em δ_{H} 5,18 ($J = 3,4$ Hz) e δ_{H} 5,13 ($J = 3,4$ Hz), referentes aos átomos de hidrogênio olefínico de **MD02** e **MD03**, respectivamente. O sinal entre δ_{H} 4,51-4,49 foi atribuído ao hidrogênio ligado ao carbono carbinólico de éster. Um tripleto em δ_{H} 2,29 ($J = 7,4$ Hz), atribuído aos átomos de hidrogênio H-2', e um sinal intenso em δ_{H} 1,25 indicaram a presença de uma cadeia lateral longa ligada ao grupo carbonila.

O espectro de RMN de ^{13}C (Figuras 17 e 18, p. 48) apresenta sinais referentes a átomos de carbono olefínicos, característicos de 3β -hidroxi-urs-12-eno (δ_{C} 124,35 e δ_{C} 139,65) e 3β -hidroxi-olean-12-eno (δ_{C} 121,67 e δ_{C} 145,23). Um sinal em δ_{C} 80,61 foi atribuído ao carbono carbinólico em C-3 e um sinal em δ_{C} 173,69 ao carbono carbonílico de éster. Um sinal intenso em δ_{C} 29,72 foi atribuído aos átomos de carbono metilênico da cadeia lateral ligada à carbonila. Esses sinais de RMN de ^{13}C , juntamente com os sinais de RMN de ^1H , sugeriram tratar-se de uma mistura de ésteres graxos derivados dos TTPC citados acima. A partir do subspectro DEPT-135 (Figuras 19 e 20, p. 49) classificaram-se os átomos de carbono como metínico, metilênico, metílico ou não hidrogenado.

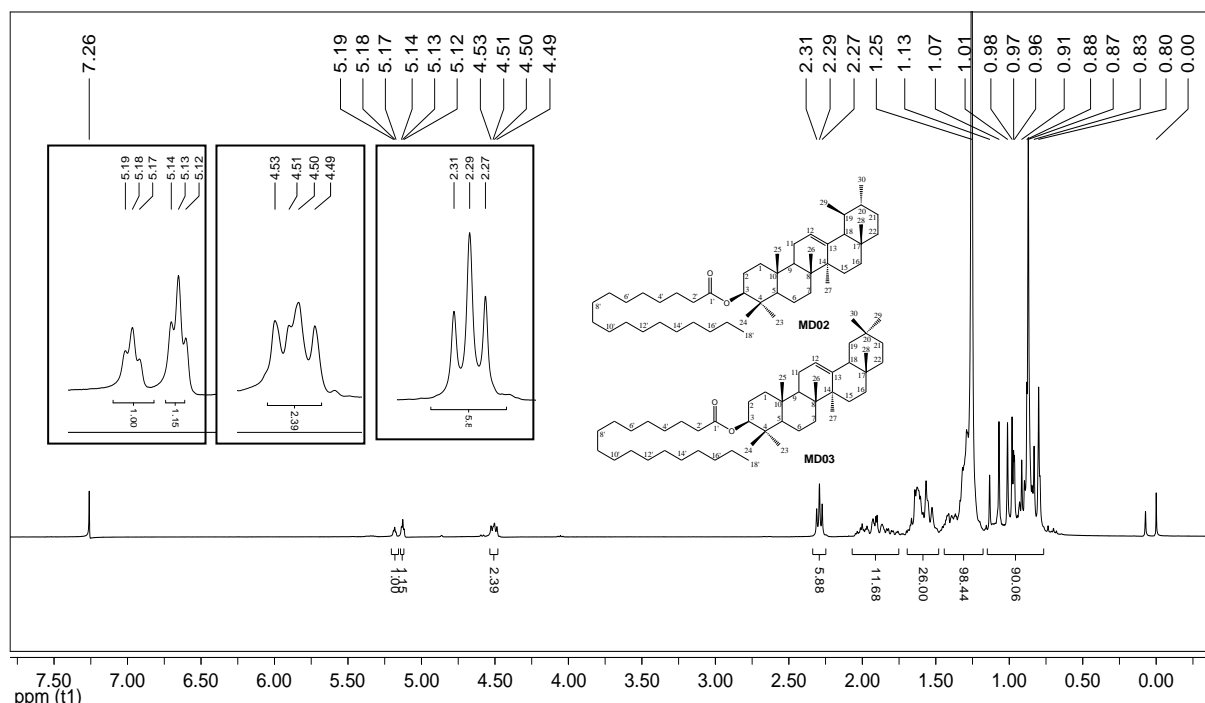


Figura 16: Espectro de RMN de ^1H (400 MHz) da mistura de **MD02** e **MD03** em CDCl_3 .

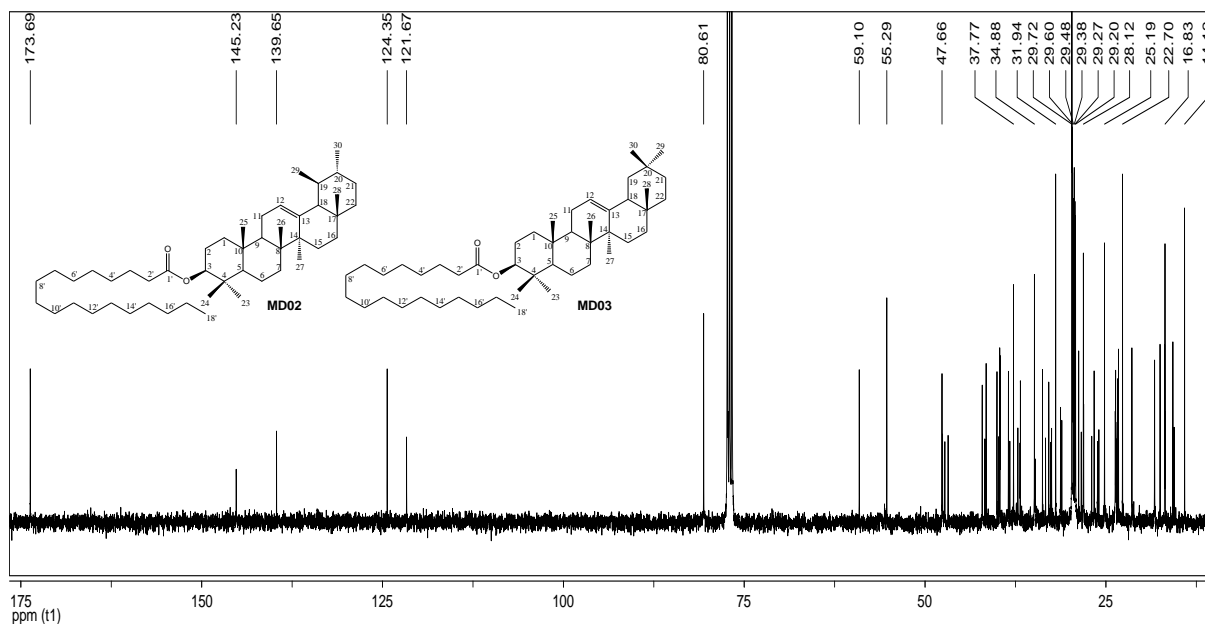


Figura 17: Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz) da mistura de **MD02** e **MD03** em CDCl_3 .

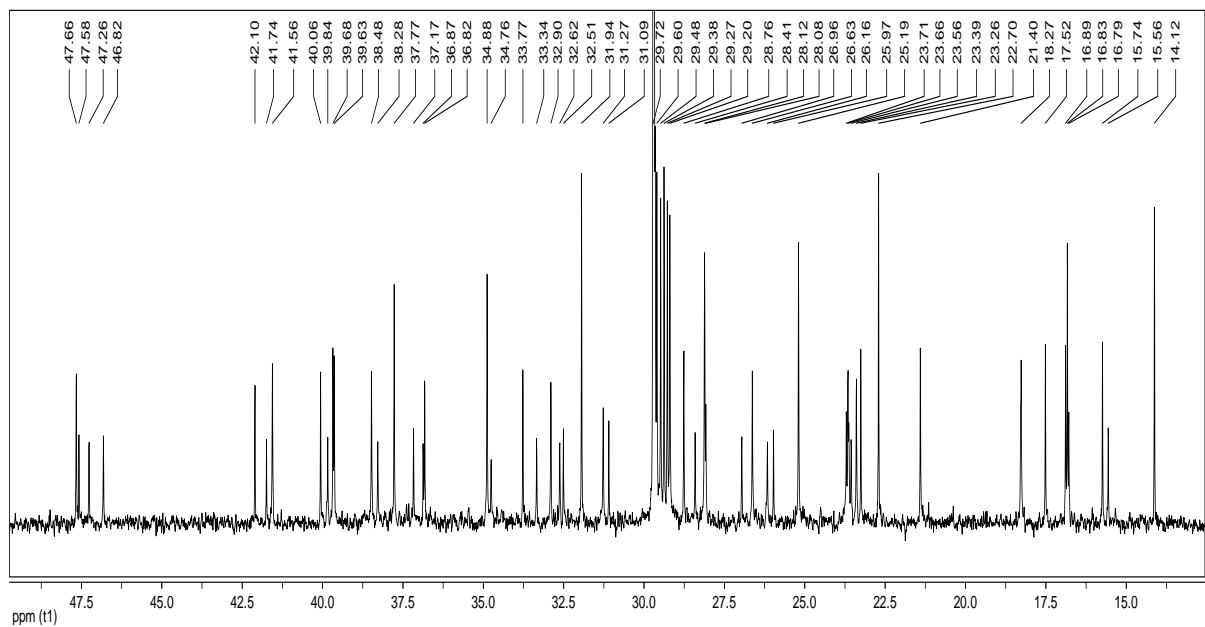


Figura 18: Expansão do espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz) da mistura de **MD02** e **MD03**, em CDCl_3 .

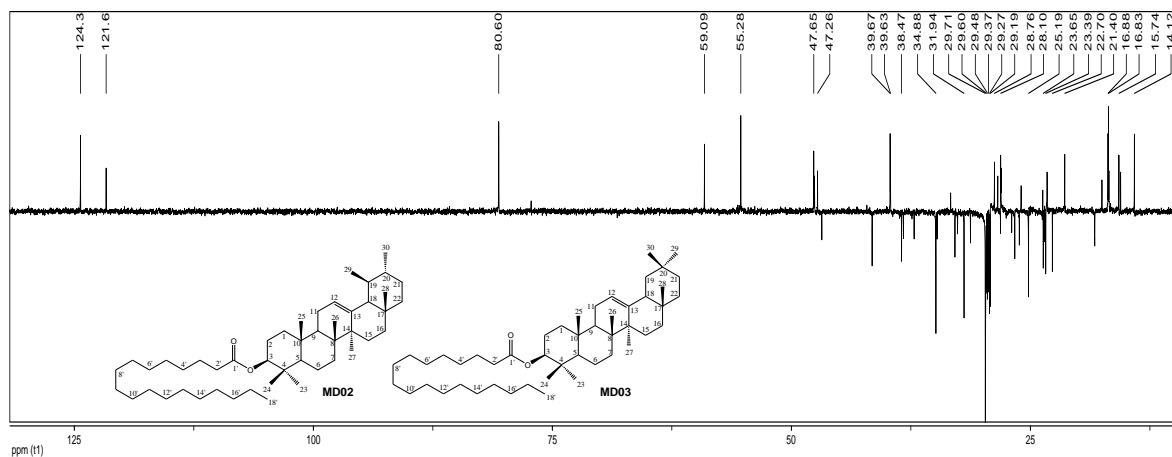


Figura 19: Subespectro DEPT135 (100 MHz) da mistura de **MD02** e **MD03** em CDCl_3 .

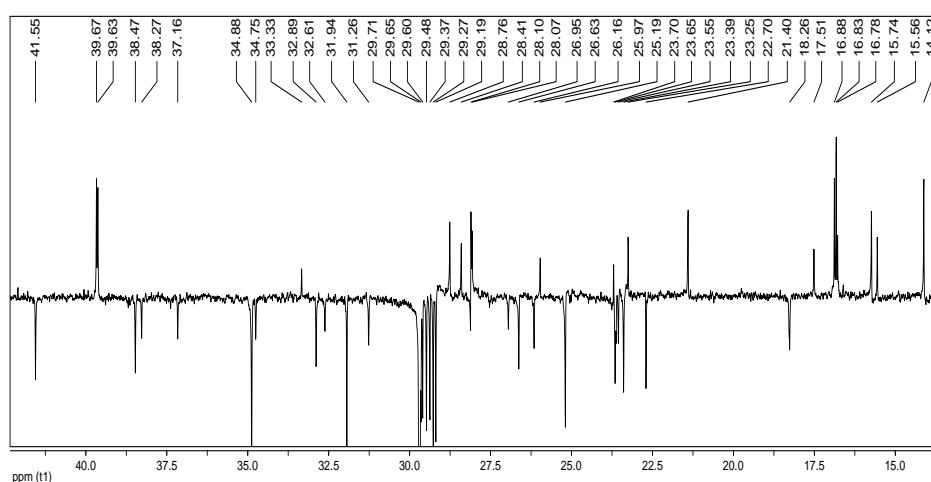


Figura 20: Expansão do subespectro DEPT135 (100 MHz) da mistura de **MD02** e **MD03** em CDCl_3 .

Foram realizadas análises de CG-EM e espectrometria de massas com ionização por “eletrospray” da mistura de **MD02** e **MD03**, para determinação do tamanho da cadeia lateral de carbono, no entanto o resultado não foi conclusivo.

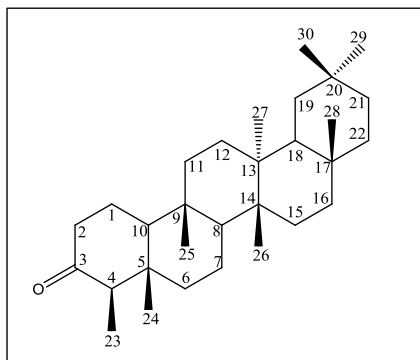
Os dados obtidos de RMN de ^{13}C foram comparados com os da literatura (OLIVEIRA, 2012) (Tabela 26, p. 50) e permitiram sugerir que a mistura seja composta por **3β-esteariloxi-urs-12-eno (MD02)** e **3β-esteariloxi-olean-12-eno (MD03)**. Essa mistura é frequentemente isolada de espécies de *Maytenus*, e a grande “coincidência” dos sinais de RMN de ^{13}C de **MD02** e **MD03** corroboram para essa sugestão. Essa mistura foi isolada pela primeira vez de *Maytenus distichophylla*.

Tabela 26: Comparação dos dados de RMN de ^{13}C de **MD02** e **MD03** com os dados da literatura para 3β -esteariloxi-urs-12-eno e 3β -esteariloxi-olean-12-eno, respectivamente

Carbono	Tipo de carbono	δ_{C}^* de MD02	δ_{C}^{**} (OLIVEIRA, 2012)	Tipo de carbono	δ_{C}^* de MD03	δ_{C}^{**} (OLIVEIRA, 2012)
1	CH ₂	38,48	38,45	CH ₂	38,28	38,26
2	CH ₂	23,66	23,64	CH ₂	23,39	23,37
3	CH	80,61	80,57	CH	80,61	80,58
4	C	37,77	37,75	C	37,77	37,75
5	CH	55,29	55,23	CH	55,29	55,27
6	CH ₂	18,27	18,25	CH ₂	18,27	18,25
7	CH ₂	32,90	32,87	CH ₂	32,62	32,60
8	C	40,06	40,03	C	39,84	39,81
9	CH	47,66	47,64	CH	47,66	47,64
10	C	36,87	36,80	C	36,82	36,85
11	CH ₂	23,39	23,64	CH ₂	23,56	23,53
12	CH	124,35	124,33	CH	121,67	121,65
13	C	139,65	139,62	C	145,23	145,19
14	C	42,10	42,08	C	41,74	41,72
15	CH ₂	26,63	26,59	CH ₂	26,16	26,14
16	CH ₂	26,63	26,61	CH ₂	26,96	26,94
17	C	33,77	33,74	C	32,51	32,48
18	CH	59,10	59,07	CH	47,58	47,56
19	CH	39,63	39,62	CH ₂	46,82	46,79
20	CH	39,68	39,65	C	31,09	31,08
21	CH ₂	31,27	31,25	CH ₂	34,76	34,72
22	CH ₂	41,56	41,54	CH ₂	37,17	37,15
23	CH ₃	28,12	28,09	CH ₃	28,08	28,06
24	CH ₃	16,83	16,81	CH ₃	16,79	16,7
25	CH ₃	15,74	15,72	CH ₃	15,56	15,54
26	CH ₃	16,89	16,81	CH ₃	16,83	16,87
27	CH ₃	23,26	23,24	CH ₃	25,97	25,95
28	CH ₃	28,76	28,74	CH ₃	28,41	28,39
29	CH ₃	17,52	17,49	CH ₃	33,34	33,33
30	CH ₃	21,40	21,38	CH ₃	23,71	23,69
1'	C	173,69	173,66	C	173,69	173,66
2'	CH ₂	34,88	34,85	CH ₂	34,88	34,85
3'	CH ₂	25,19	25,17	CH ₂	25,19	25,17
4'	CH ₂	29,20	29,18	CH ₂	29,20	29,18
5'	CH ₂	29,27	29,26	CH ₂	29,27	29,26
6'	CH ₂	29,38	29,36	CH ₂	29,38	29,36
7'	CH ₂	29,60	29,58	CH ₂	29,60	29,58
8' – 13'	CH ₂	29,72	29,67- 29,70	CH ₂	29,72	29,67- 29,70
14'	CH ₂	29,65	29,66	CH ₂	29,65	29,66
15'	CH ₂	29,48	29,47	CH ₂	29,48	29,47
16'	CH ₂	31,94	31,92	CH ₂	31,94	31,92
17'	CH ₂	22,70	22,69	CH ₂	22,70	22,69
18'	CH ₃	14,12	14,11	CH ₃	14,12	14,11

Solvente: *CDCl₃

3.3 MD04: 3-oxofriedelano (friedelina)



MD04 foi obtido a partir do fracionamento de **EHE** e **ECL** e consistiu de um sólido branco, solúvel em clorofórmio e de faixa de fusão 243,4-244,4 °C. Análise de CCD deste sólido mostrou a presença de uma única mancha amarela, usando mistura de hexano e clorofórmio (1:1) como eluente (revelador: ácido perclórico/vanilina).

O espectro na região do IV (Figura 21), de **MD04** apresenta bandas de absorção em 2926 e 2869 cm^{-1} , característica de estiramento simétrico e assimétrico de ligação CH de grupos alifáticos, 1463 e 1389 cm^{-1} , características de deformação angular no plano de ligação simples CH de grupos alifáticos e uma banda intensa em 1715 cm^{-1} , característica de estiramento de ligação CO de carbonila de cetona.

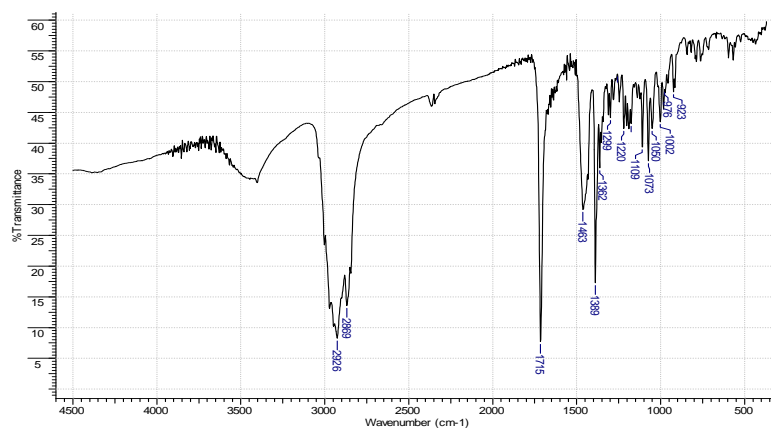


Figura 21: Espectro na região do IV de **MD04** (KBr).

O espectro de RMN de ^1H (Figura 22) apresenta sete simpletos em δ_{H} 1,18, δ_{H} 1,05, δ_{H} 1,01, δ_{H} 1,00, δ_{H} 0,96, δ_{H} 0,87 e δ_{H} 0,73 relativos a sete grupos metila e

um duplete em δ_H 0,88 ($J = 6,0$ Hz), associado à outra metila (C-23). Este último sinal, característico de triterpenos de esqueleto friedelano (MAHATO E KUNDU, 1994), apresenta-se sobreposto ao simpleto em δ_H 0,87, conforme indicado pela integral destes sinais.

O espectro de RMN de ^{13}C (Figuras 23 e 24, p. 53) apresenta 30 sinais de carbono. A partir da análise do subespectro DEPT135 (Figura 25, p. 53) foi possível classificar os átomos de carbono como sendo 8 CH_3 , 11 CH_2 , 4 CH e 7 C . O sinal em δ_C 213,20 é referente ao carbono carbônico C-3 e o sinal em δ_C 6,83 foi atribuído à metila C-23. Estes sinais são característicos de triterpenos friedelanos.

Os dados de RMN de ^{13}C obtidos foram comparados com os da literatura (QUEIROGA *et al.*, 2000) (Tabela 27, p. 54) e permitiram identificar **MD04** como sendo **3-oxofriedelano (friedelina)**. **MD04** foi isolado anteriormente de *Maytenus distichophylla* (DUARTE *et al.*, 2013).

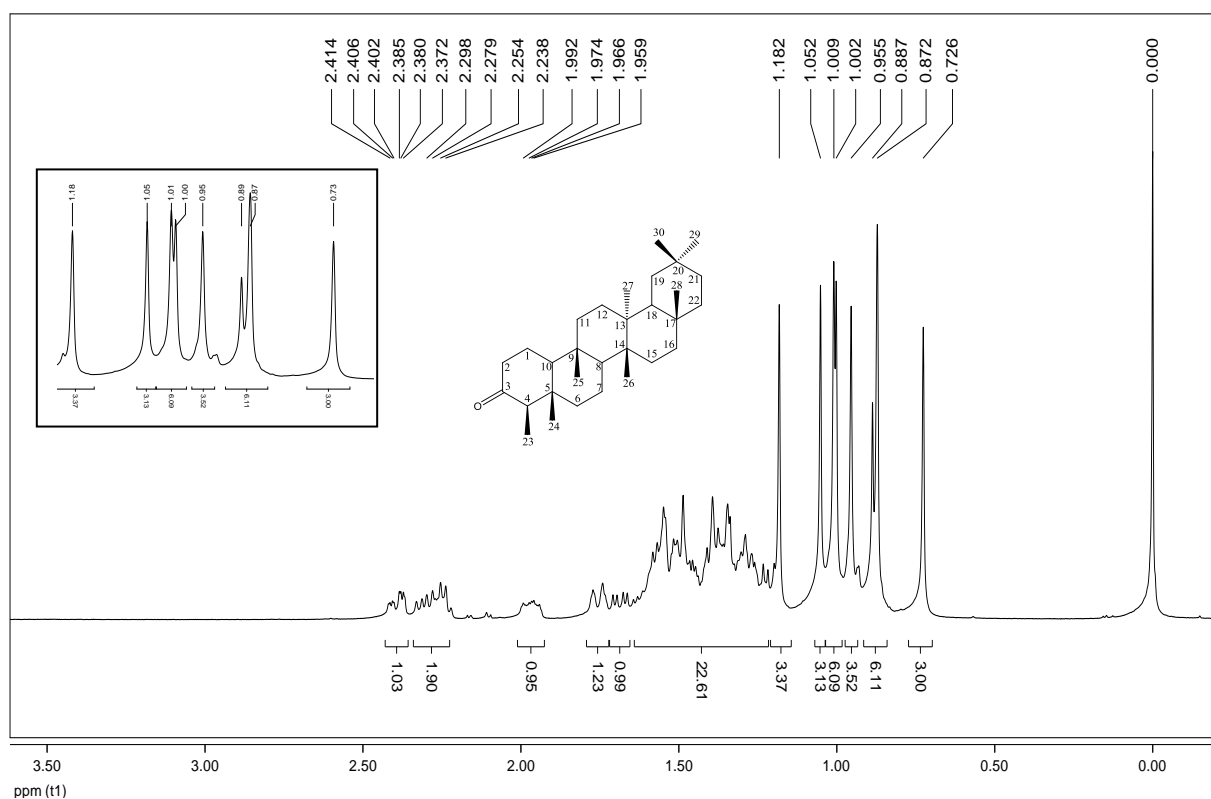


Figura 22: Espectro de RMN de 1H (400 MHz) de **MD04** em $CDCl_3$.

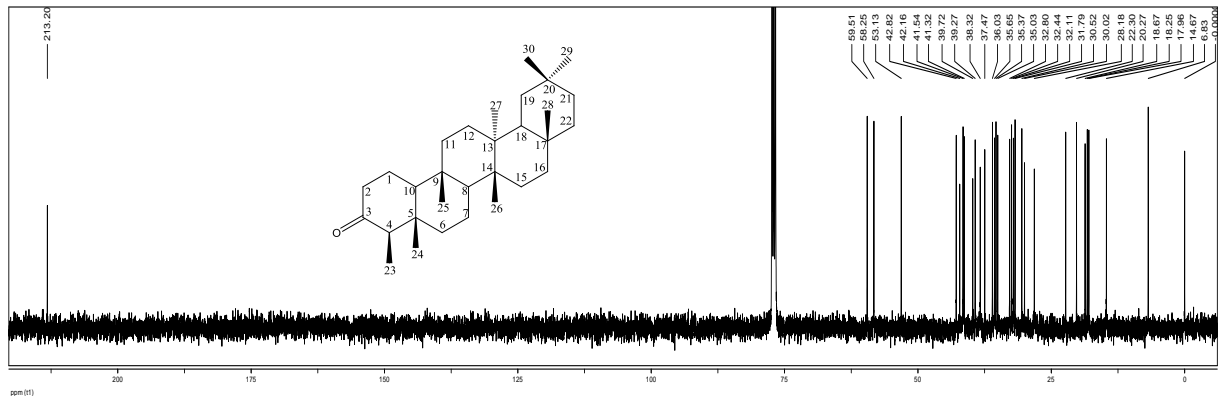


Figura 23: Espectro de RMN de ¹³C (100 MHz) de MD04 em CDCl₃.

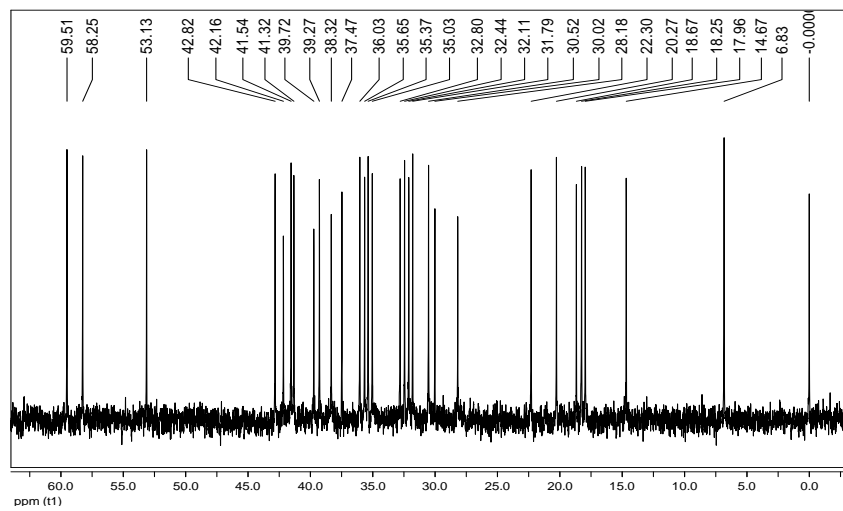


Figura 24: Expansão do espectro de RMN de ¹³C (100 MHz) de MD04 em CDCl₃.

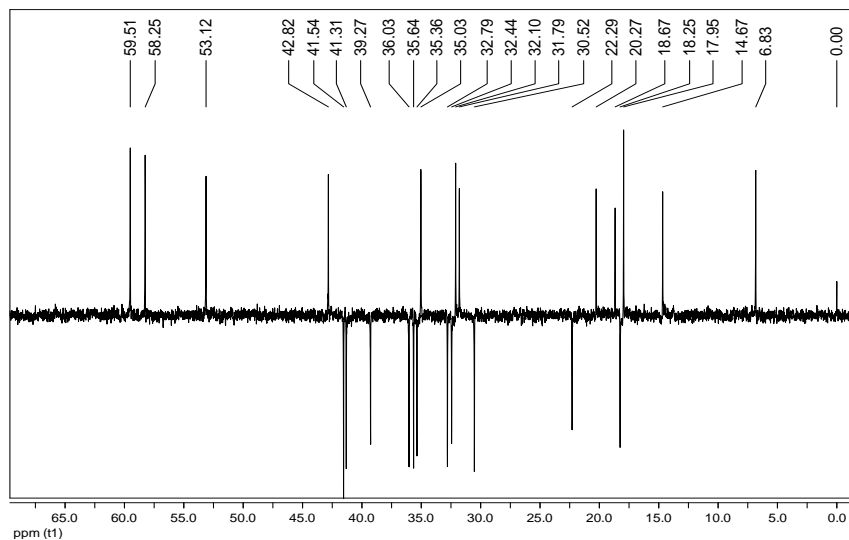
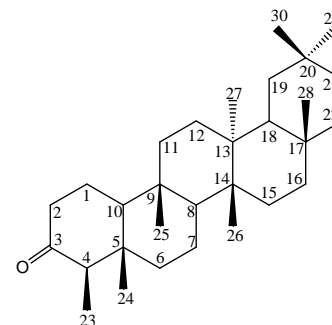


Figura 25: Subespectro DEPT135 (100 MHz) de MD04 em CDCl₃.

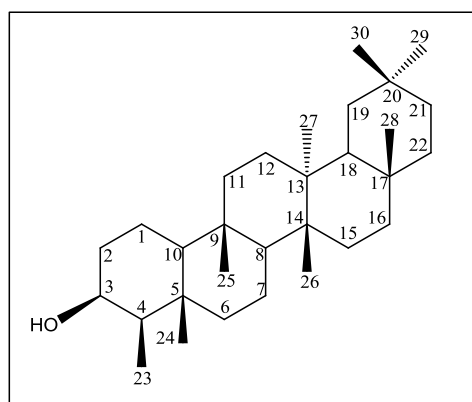
Tabela 27: Comparação dos dados de RMN de ^{13}C de **MD04** com os dados da literatura para 3-oxofriedelano (QUEIROGA *et al.*, 2000)

Carbono	Tipo de carbono	δ_c de MD04	δ_c (QUEIROGA <i>et al.</i> , 2000)
1	CH ₂	22,30	22,3
2	CH ₂	41,54	41,5
3	C	213,20	213,2
4	CH	58,25	58,3
5	C	42,16	42,1
6	CH ₂	41,32	41,3
7	CH ₂	18,25	18,2
8	CH	53,13	53,1
9	C	37,47	37,4
10	CH	59,51	59,4
11	CH ₂	35,65	35,6
12	CH ₂	30,52	30,5
13	C	39,72	39,7
14	C	38,32	38,3
15	CH ₂	32,44	32,4
16	CH ₂	36,03	36,0
17	C	30,02	30,0
18	CH	42,82	42,8
19	CH ₂	35,37	35,3
20	C	28,18	28,1
21	CH ₂	32,80	32,7
22	CH ₂	39,27	39,2
23	CH ₃	6,83	6,8
24	CH ₃	14,67	14,6
25	CH ₃	17,96	17,9
26	CH ₃	20,27	20,2
27	CH ₃	18,67	18,6
28	CH ₃	32,11	32,1
29	CH ₃	35,03	35,0
30	CH ₃	31,79	31,8



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

3.4 MD05: 3 β -hidroxifriedelano (friedelinol)



MD05 foi isolado de **EHE**, apresentando-se como um sólido branco cristalino, parcialmente solúvel em clorofórmio e de faixa de fusão 278,2-281,0 °C. A análise por CCD deste sólido mostrou uma única mancha roxa (revelador: ácido perclórico/vanilina).

O espectro na região do IV (Figura 26) de **MD05** apresenta bandas de absorção em 3618 e 3474 cm^{-1} , características de estiramento de ligação OH de hidroxila. As absorções em 2932-2868, 1448 e 1384 cm^{-1} são características de ligação simples CH de grupos alifáticos.

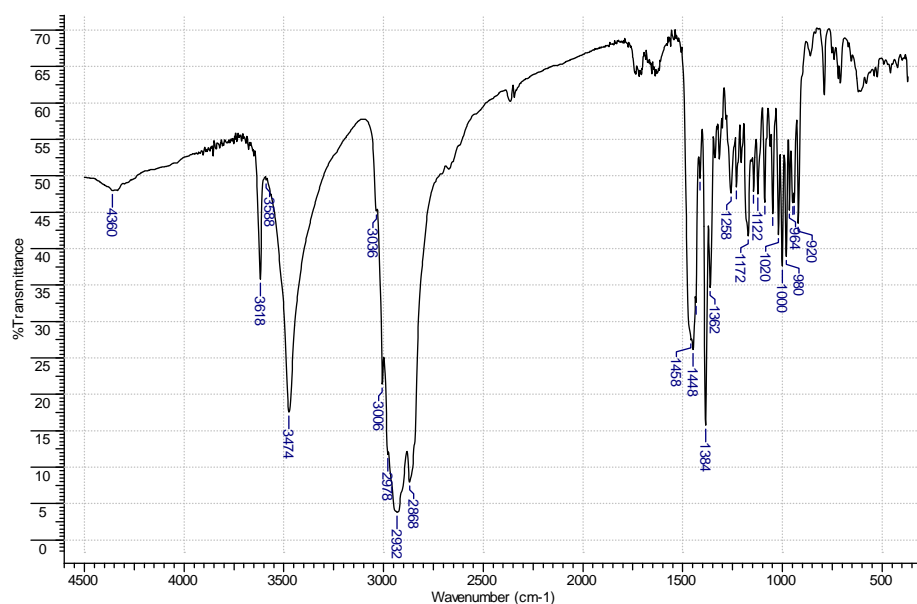


Figura 26: Espectro na região do IV de **MD05** (KBr).

O espectro de RMN de ^1H (Figura 27) mostra a presença de sinais em δ_{H} 1,17, δ_{H} 1,01, δ_{H} 1,00, δ_{H} 0,99, δ_{H} 0,96, δ_{H} 0,95, δ_{H} 0,94 e δ_{H} 0,87 que foram atribuídos a oito grupos metila. O sinal entre δ_{H} 3,75-3,74 é referente ao hidrogênio ligado ao carbono hidroxilado.

A análise do espectro de RMN de ^{13}C (Figura 28, p. 57) indica a presença de 30 sinais de carbono. O sinal em δ_{C} 11,75 foi atribuído ao carbono metílico em C-23 e o sinal em δ_{C} 72,38 foi atribuído ao carbono hidroxilado em C-3. Estes sinais são bastante característicos de triterpeno de esqueleto friedelano e determinantes para a identificação da estrutura. O subspectro DEPT135 (Figura 29, p. 57) permitiu a classificar os átomos de carbono como quaternários, metínicos, metilênicos e ou metílicos.

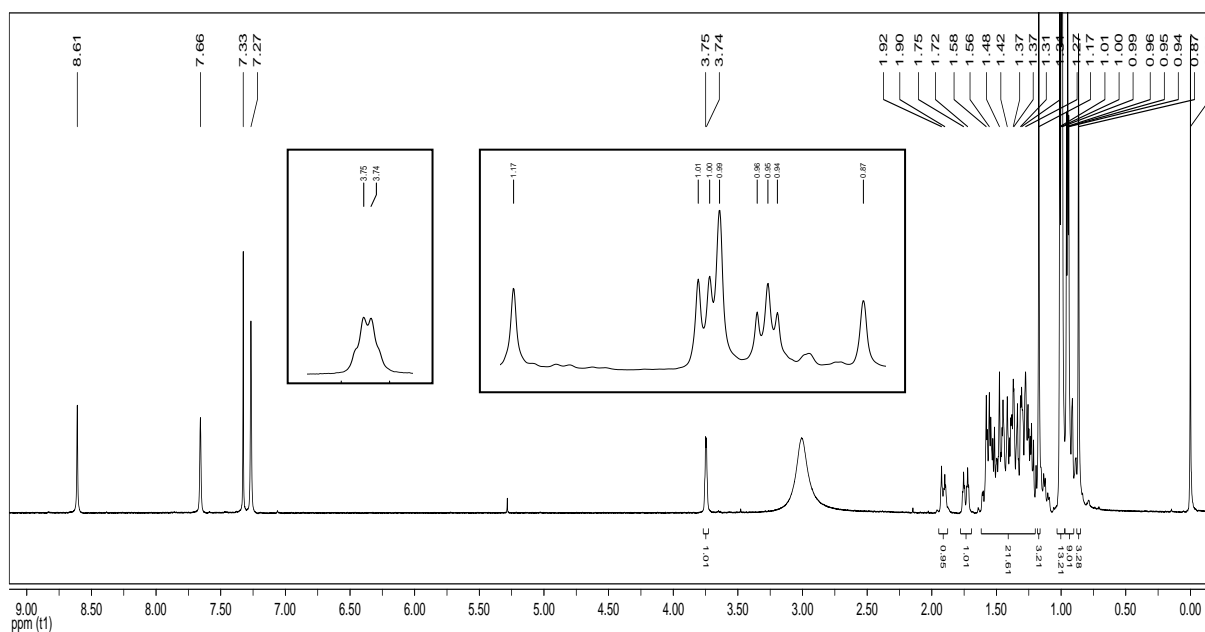
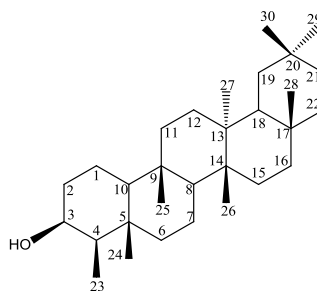


Figura 27: Espectro de RMN de ^1H (400 MHz) de **MD05** em CDCl_3 + Piridina- d_5 .



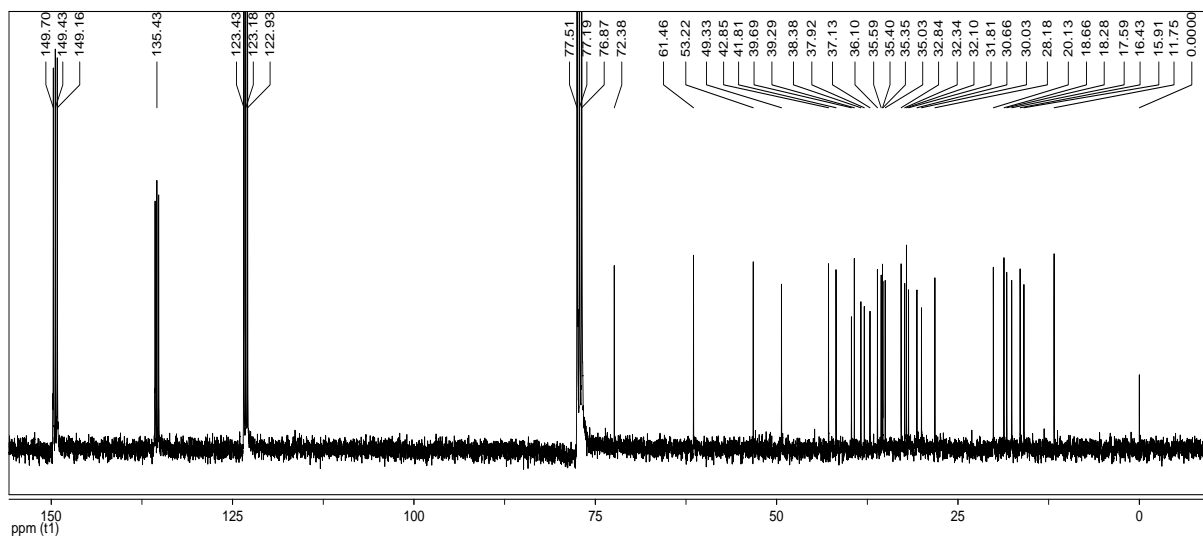


Figura 28: Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz) de **MD05** em CDCl_3 + Piridina- d_5 .

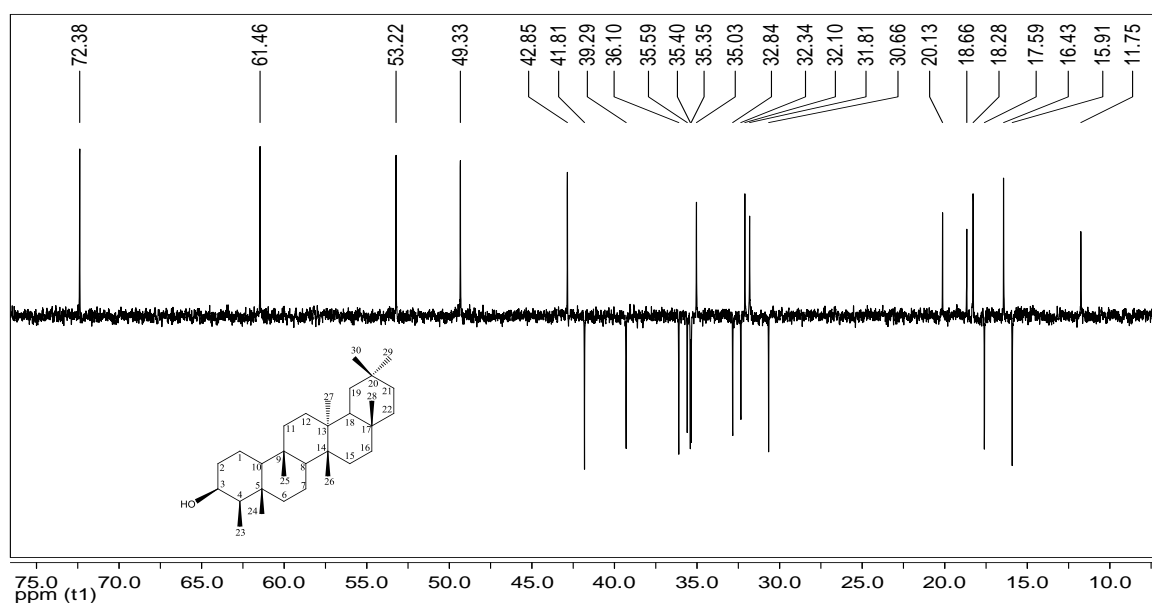
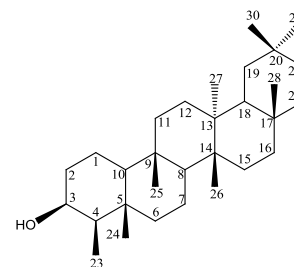


Figura 29: Subespectro DEPT135 (100 MHz) de **MD05** em CDCl_3 + Piridina- d_5 .

Os dados obtidos de RMN de ^{13}C foram comparados com os da literatura (SALAZAR, 2000) (Tabela 28, p. 58) e permitiram identificar **MD05** como sendo **3 β -hidroxifriedelano**. **MD05** já foi isolado anteriormente de *Maytenus distichophylla* (DUARTE *et al.*, 2013).

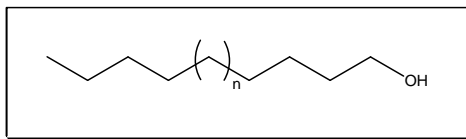
Tabela 28: Comparação dos dados de RMN de ^{13}C de **MD05** com os dados da literatura para 3 β -hidroxifriedelano (SALAZAR *et al.*, 2000)

Carbono	Tipo de carbono	δ_{C}^* de MD05	δ_{C}^* (SALAZAR <i>et al.</i> , 2000)
1	CH ₂	15,91	16,16
2	CH ₂	36,10	36,14
3	CH	72,38	71,59
4	CH	49,33	49,62
5	C	37,92	38,09
6	CH ₂	41,81	41,99
7	CH ₂	17,59	17,69
8	CH	53,22	53,27
9	C	37,13	37,18
10	CH	61,46	61,65
11	CH ₂	35,40	35,66
12	CH ₂	30,66	30,69
13	C	38,38	38,38
14	C	39,69	39,69
15	CH ₂	32,34	32,34
16	CH ₂	35,59	35,90
17	C	30,03	30,02
18	CH	42,85	42,88
19	CH ₂	35,35	35,36
20	C	28,18	28,17
21	CH ₂	32,84	32,88
22	CH ₂	39,29	39,28
23	CH ₃	11,75	12,09
24	CH ₃	16,43	16,58
25	CH ₃	18,28	18,35
26	CH ₃	20,13	20,13
27	CH ₃	18,66	18,69
28	CH ₃	32,10	32,12
29	CH ₃	35,03	35,02
30	CH ₃	31,81	31,85



Solvente: $^*\text{CDCl}_3$ + piridina d_5

3.5 MD06: Mistura de álcoois graxos



MD06 foi isolado de **EHE** e **SHE** e apresentou-se como um sólido branco cristalino de faixa de fusão 75,1-76,7 °C.

O espectro na região do IV (Figura 30) de **MD06** mostra uma banda larga de absorção em 3414 cm^{-1} , característica de estiramento de ligação OH. Bandas em 2918 e 2850 cm^{-1} foram atribuídas a estiramentos de ligação simples CH, evidenciando a natureza alifática da substância. Bandas fracas em 1474 e 1464 cm^{-1} foram atribuídas à deformação angular de ligação CH de cadeia longa. As bandas em 720 e 730 cm^{-1} são características de deformação de $(CH_2)_n$ de cadeia com “n” maior que quatro.

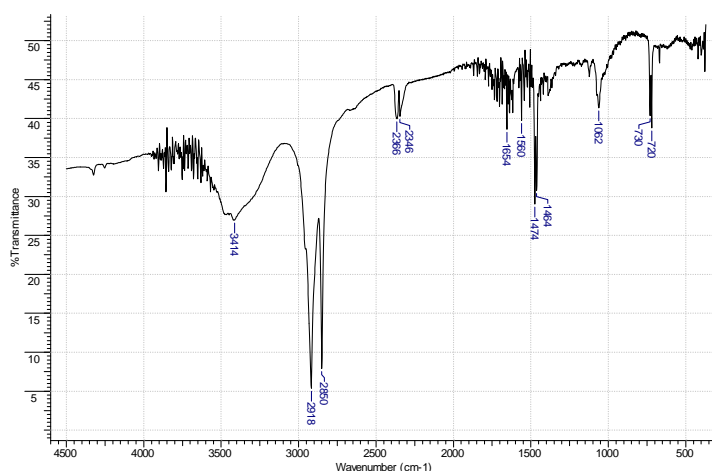


Figura 30: Espectro na região do IV de **MD06**.

O espectro de RMN de ^1H (Figura 31, p. 60) apresenta um tripleto em δ_{H} 3,65 ($J = 6,6\text{ Hz}$) que foi atribuído aos átomos de hidrogênio ligados ao carbono hidroxilado (C- α) de um álcool graxo. Um sinal entre δ_{H} 1,60-1,57 foi atribuído a átomos de hidrogênio ligados ao C-2 e um tripleto em δ_{H} 0,88 ($J = 6,6\text{ Hz}$) é referente ao grupo metílico. Um sinal intenso em δ_{H} 1,26 foi atribuído a grupos metilênicos da cadeia alifática do álcool.

Após silição (conforme p.14), **MD06** foi submetido à análise por CG/EM e o cromatograma de íons totais obtidos (Figura 34) mostra a presença de dois picos principais. A comparação com a biblioteca espectral NIST11 do programa Lab-Solution/CGMS Solution, versão 2.72, sugeriu a identificação de uma mistura composta por aproximadamente 67% de álcool octacosanol (92% de similaridade, tempo de retenção de 18,45 min) e 33% de álcool triacontanol (84% de similaridade, tempo de retenção de 20,38 min)

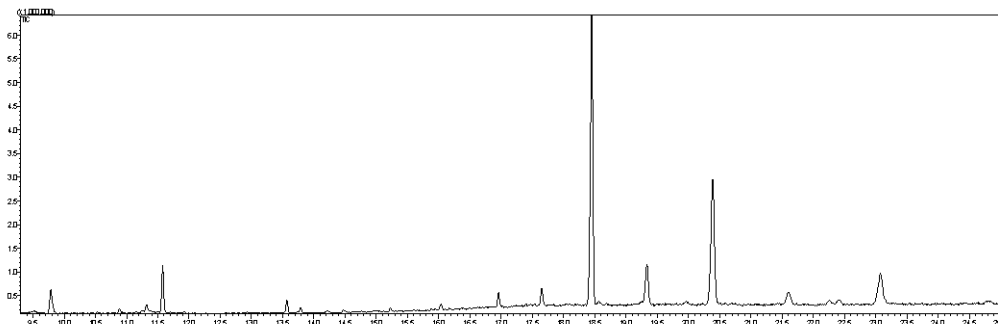


Figura 34: Cromatograma de Íons Totais (IE) de **MD06** siliado.

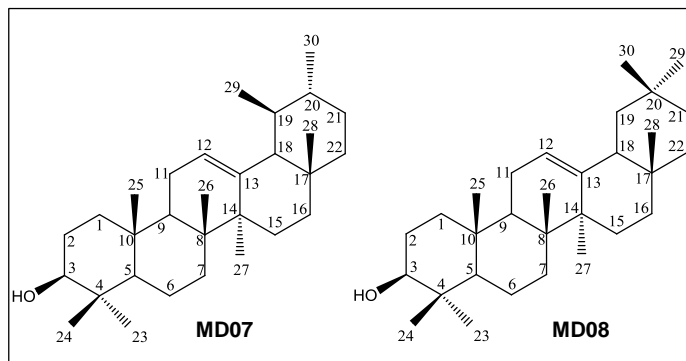
Os dados obtidos de RMN de ^{13}C foram comparados com os da literatura (OLIVEIRA, 2012) (Tabela 29) e, juntamente com os dados obtidos a partir de CG-EM, permitiram identificar **MD06** como sendo uma **mistura de álcoois graxos**.

Tabela 29: Comparação dos dados de RMN de ^{13}C de **MD06** com os dados da literatura para álcool graxo de cadeia alifática (OLIVEIRA, 2012)

Carbono	Tipo de carbono	δ_c^* de MD06	δ_c^* (OLIVEIRA, 2012)
1	CH ₂	62,43	62,40
2	CH ₂	33,03	33,04
3	CH ₂	25,97	25,97
4	CH ₂	29,54	29,44
5	CH ₂	29,71	29,67-29,71
6	CH ₂	29,36	29,32
7	CH ₂	31,93	31,93
8	CH ₂	22,69	22,72
9	CH ₃	14,12	14,12

Solvente: $^*\text{CDCl}_3$ + piridina- d_5

3.6 MD07: 3 β -hidroxi-urs-12-eno (α -amirina) e MD08: 3 β -hidroxi-olean-12-eno (β -amirina)



A mistura de **MD07** e **MD08** foi isolada de **EHE** e **ECL** e apresentou-se como um sólido branco, solúvel em clorofórmio. A análise de CCD desta mistura indicou a presença de uma única mancha roxa, sugerindo que o composto pudesse ser puro. O teste de LB foi positivo para triterpeno pentacíclico.

O espectro na região do IV (Figura 35) da mistura de **MD07** e **MD08** apresenta bandas de absorção em 3295 cm⁻¹, característica de estiramento de ligação OH de hidroxila. Absorções em 2946-2854, 1464 e 1382 cm⁻¹ são características de ligação CH de grupos alifáticos.

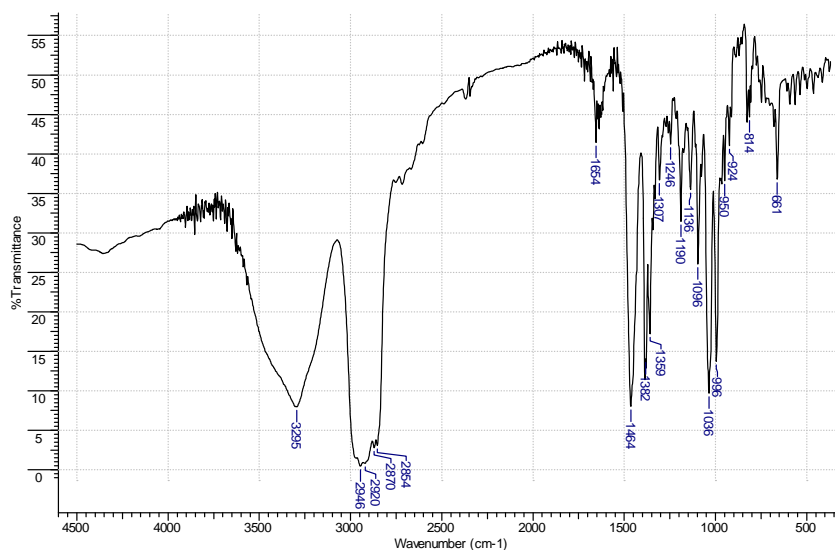


Figura 35: Espectro na região do IV da mistura de **MD07** e **MD08** (KBr).

O espectro de RMN de ^1H (Figura 36) mostra a presença de dois tripletos centrados em δ_{H} 5,13 ($J=3,6$ Hz) e δ_{H} 5,18 ($J = 3,6$ Hz), referentes aos átomos de hidrogênio olefínico de **MD07** e **MD08**, respectivamente. O sinal entre δ_{H} 3,25 e 3,21 é atribuído ao hidrogênio ligado ao carbono hidroxilado de ambas as substâncias.

A análise do espectro de RMN de ^{13}C (Figuras 37 e 38, p. 64) indica 4 sinais de carbono olefínico em δ_{C} 124,45 (CH); 139,61 (C); 121,75 (CH) e 145,21 (C). Estes sinais são característicos de α -amirina e β -amirina. As estruturas dessas substâncias são bastante similares e seus espectros de RMN de ^{13}C se diferenciam basicamente pelos deslocamentos químicos dos átomos de carbono olefínicos, C-12 e C-13, devido à posição dos grupos metila em C-19 e C-20. Na série urs-12-eno, com a junção do anel D e E na conformação cadeira-cadeira faz com que o grupo metila em C-19 (equatorial) esteja mais próximo da dupla ligação, em relação à série olean-12-eno, causando uma diferença de deslocamentos químicos, devido ao efeito estérico em C-12 e C-13 (Figura 37, p. 64) (Tabela 30, p.66). A proximidade da metila em C-19 na série urs-12-eno causa uma proteção em C-13 e uma desproteção em C-12. O subespectro DEPT135 (Figura 39, p. 65) permitiu a classificação dos átomos de carbono e indicou a diferença esperada no número de átomos de carbono não hidrogenado das substâncias (oleanano: 7 sinais e ursano: 6 sinais).

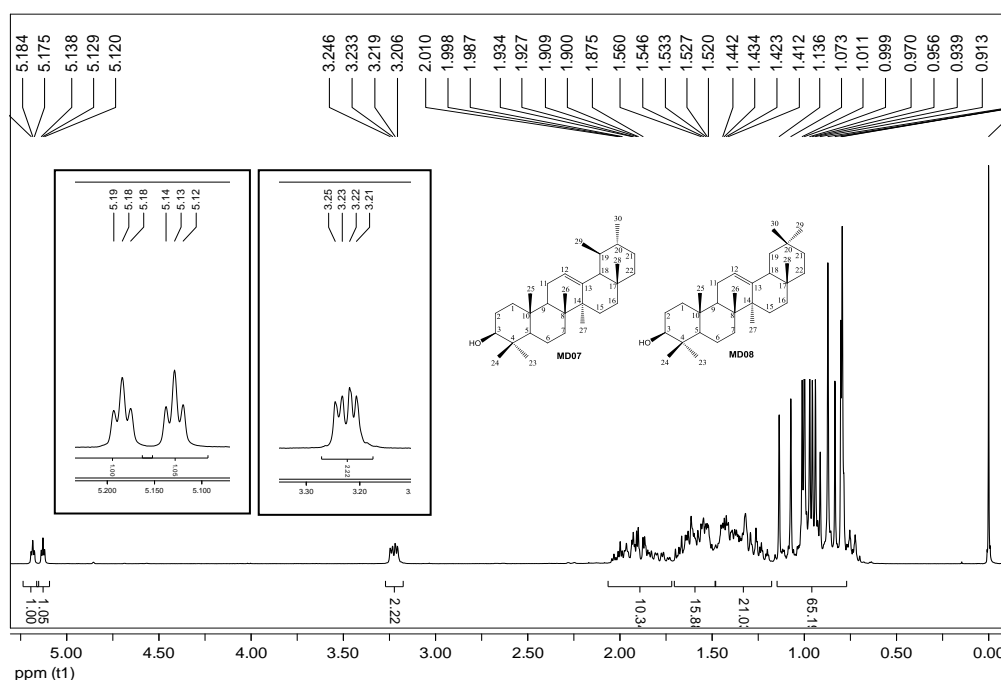


Figura 36: Espectro de RMN de ^1H (400 MHz) da mistura de **MD07** e **MD08** em CDCl_3 .

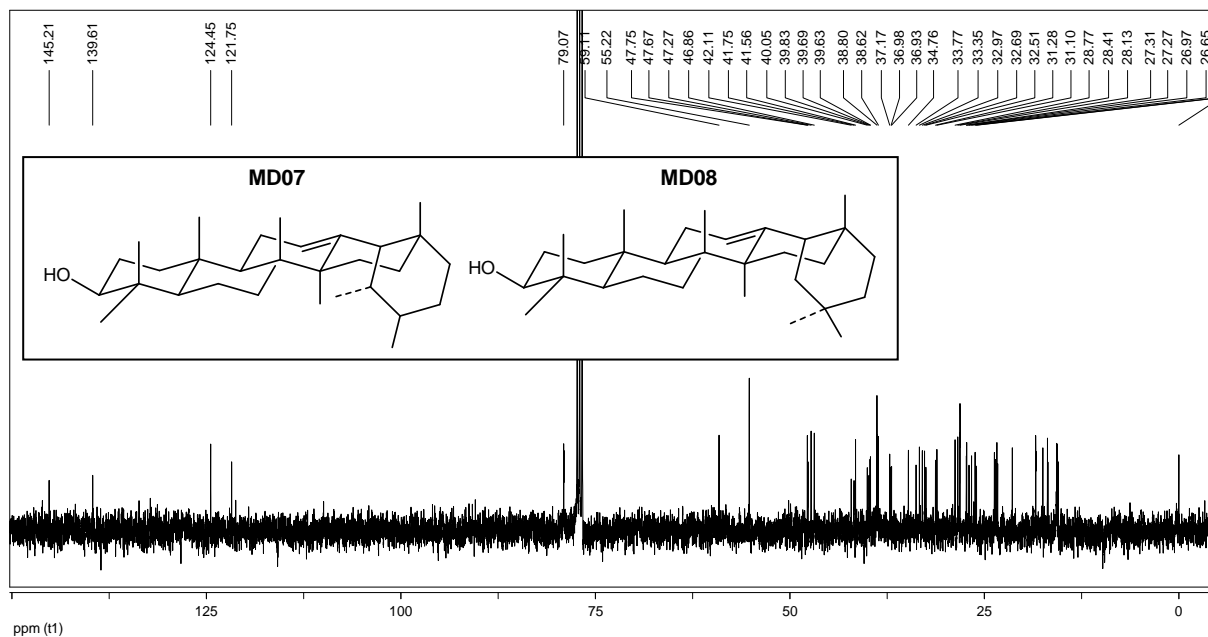


Figura 37: Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz) da mistura de **MD07** e **MD08** em CDCl_3 .

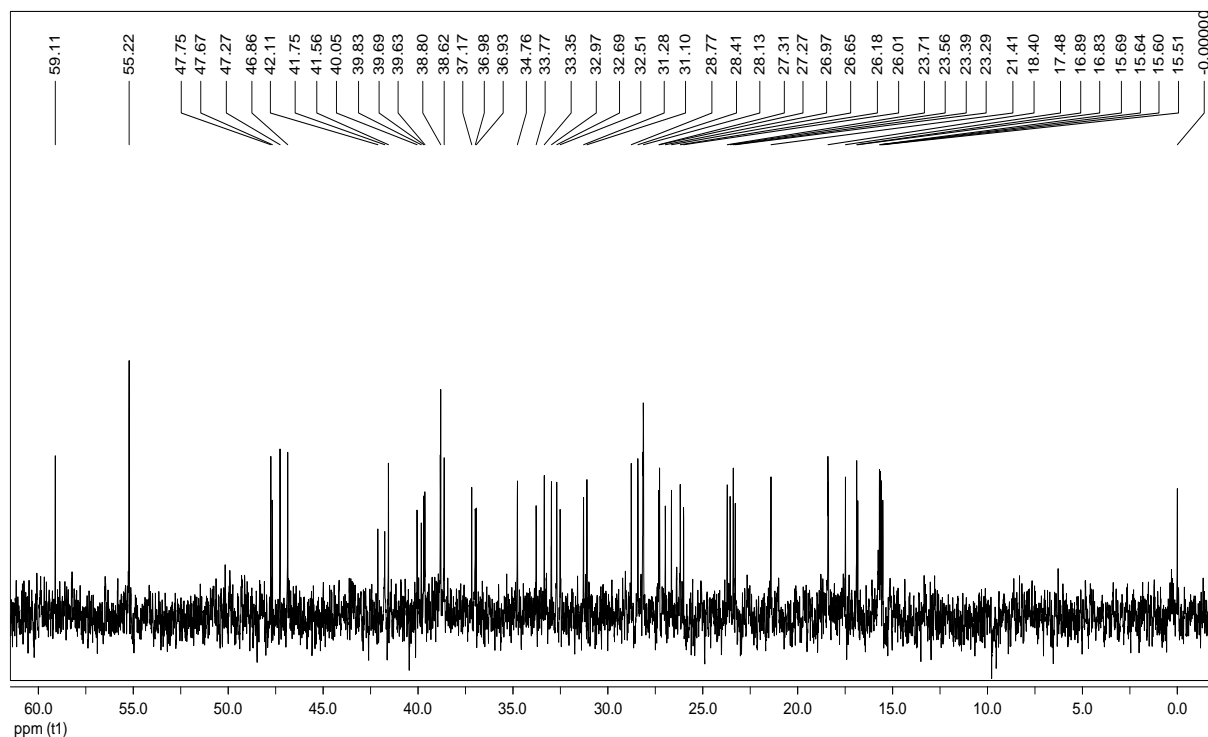


Figura 38: Expansão do espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz) da mistura de **MD07** e **MD08** em CDCl_3 .

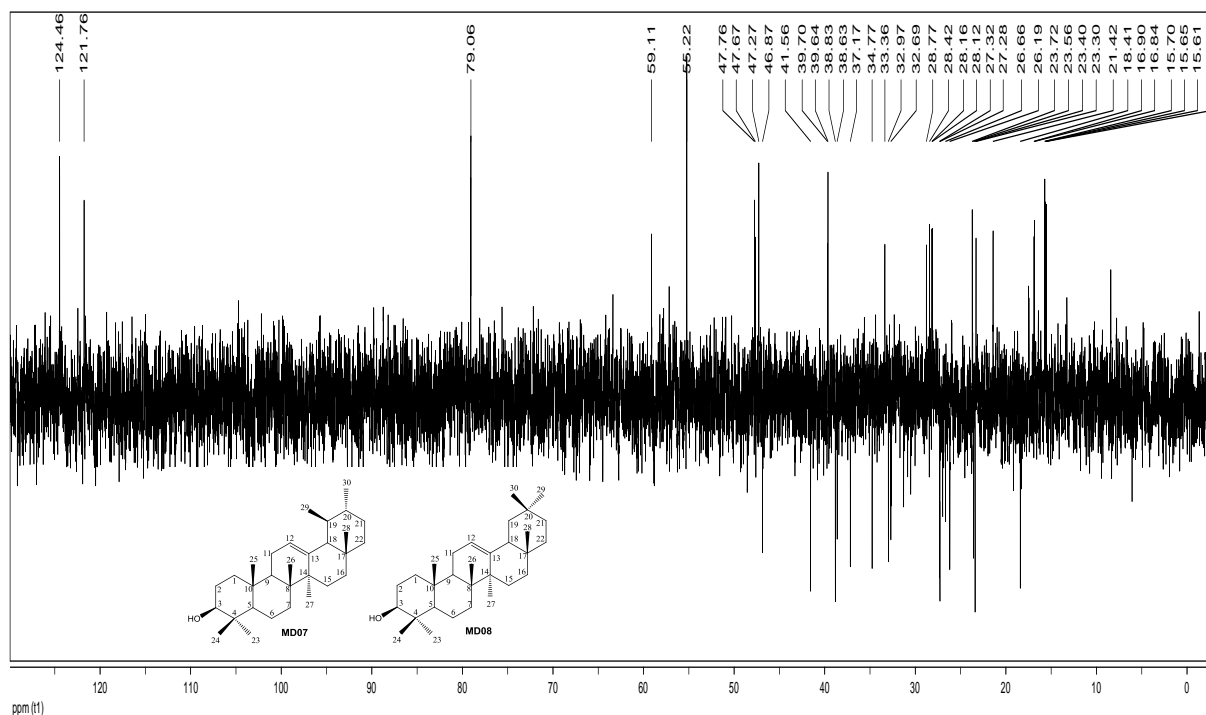


Figura 39: Subespectro DEPT135 (100 MHz) da mistura de **MD07** e **MD08** em CDCl₃.

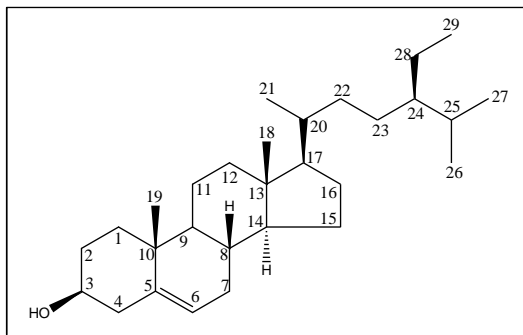
Os dados obtidos de RMN de ¹³C foram comparados com os da literatura (MAHATO E KUNDU, 1994) (Tabela 30, p.66) e permitiram identificar **MD07** como sendo 3β-hidroxi-urs-12-eno (α-amirina) e **MD08** como 3β-hidroxi-olean-12-eno (β-amirina). A mistura de **MD07** e **MD08** foi isolada pela primeira vez de *Maytenus distichophylla*.

Tabela 30: Comparação dos dados de RMN de ^{13}C de **MD07 e MD08** com os dados da literatura para 3 β -hidroxi-urs-12-eno (α -amirina) e 3 β -hidroxi-olean-12-eno (β -amirina) (MAHATO E KUNDU, 1994)

Carbono	Tipo de carbono	δ_{C}^* de MD07	δ_{C}^* (MAHATO E KUNDU, 1994)	Tipo de carbono	δ_{C}^* de MD08	δ_{C}^* (MAHATO E KUNDU, 1994)
1	CH ₂	38,62	38,7	CH ₂	38,62	38,6
2	CH ₂	27,31	27,2	CH ₂	27,27	27,3
3	C	79,07	78,3	C	79,07	79,0
4	C	38,80	38,7	C	38,80	38,8
5	CH	55,22	55,2	CH	55,22	55,3
6	CH ₂	18,40	18,3	CH ₂	18,40	18,5
7	CH ₂	32,97	32,9	CH ₂	32,69	32,80
8	C	40,05	40,0	C	38,80	38,8
9	CH	47,75	47,7	CH	47,67	47,7
10	C	36,93	36,9	C	36,98	37,6
11	CH ₂	23,39	23,3	CH ₂	23,56	23,6
12	CH	124,45	124,3	CH	121,75	121,8
13	C	139,61	139,3	C	145,21	145,1
14	C	42,11	42,0	C	41,75	41,8
15	CH ₂	28,41	28,7	CH ₂	26,18	26,2
16	CH ₂	26,65	26,6	CH ₂	26,97	27,0
17	C	33,77	33,7	C	32,51	32,5
18	CH	59,11	58,9	CH	47,27	47,4
19	CH	39,63	39,6	CH ₂	46,86	46,9
20	CH	39,69	39,6	C	31,10	31,1
21	CH ₂	31,28	31,2	CH ₂	34,76	34,8
22	CH ₂	41,56	41,5	CH ₂	37,17	37,2
23	CH ₃	28,13	28,1	CH ₃	28,13	28,2
24	CH ₃	15,64	15,6	CH ₃	15,51	15,5
25	CH ₃	15,69	15,6	CH ₃	15,60	15,6
26	CH ₃	16,83	16,8	CH ₃	16,89	16,9
27	CH ₃	23,29	23,3	CH ₃	26,01	26,0
28	CH ₃	28,13	28,1	CH ₃	28,41	28,4
29	CH ₃	17,48	17,4	CH ₃	33,35	33,3
30	CH ₃	21,41	21,3	CH ₃	23,71	23,7

Solvente: *CDCl₃

3.7 MD09: β -Sitosterol



MD09 foi isolado de **EHE** e **ECL**, apresentando-se como um sólido branco, de faixa de fusão 133,4-134,3 °C e solúvel em clorofórmio. O sólido apresentou teste LB positivo para esteroide e uma única mancha roxa na análise por CCD (revelador: ácido perclórico/vanilina). Comparação com amostra padrão sugeriu que **MD09** tratava-se de β -sitosterol.

O espectro na região do IV (Figura 40) de **MD09** apresenta bandas de absorção em 3403 cm^{-1} referente a estiramento da ligação OH de hidroxila, 2949-2867 cm^{-1} características de estiramento simétrico e assimétrico da ligação CH de grupos alifáticos, 1668-1637 cm^{-1} característica de estiramento de ligação dupla C=C, 1465 e 1379 cm^{-1} referente à deformação angular no plano de ligação simples CH de grupos alifáticos.

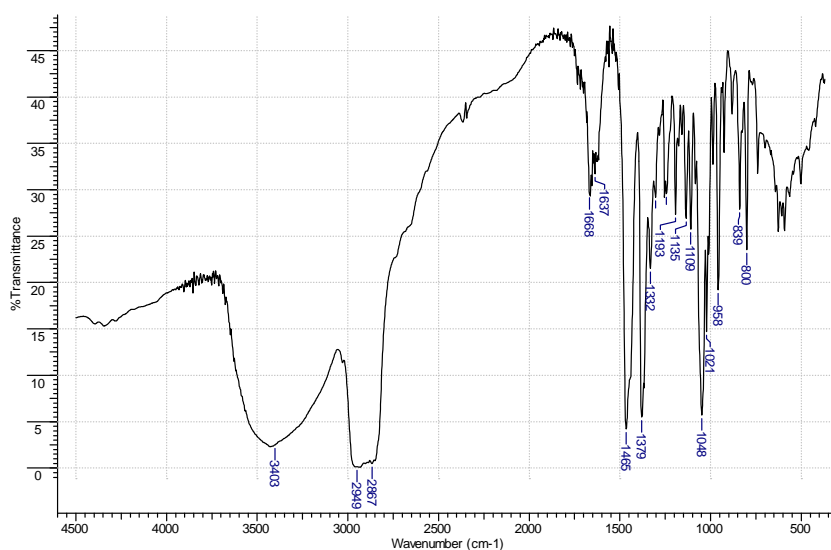


Figura 40: Espectro na região do IV de **MD09** (KBr).

O espectro de RMN de ^1H (Figura 41) apresenta um multipletto entre δ_{H} 3,56 e δ_{H} 3,48 que foi atribuído ao hidrogênio do carbono hidroxilado em C-3. O sinal em δ_{H} 5,35 foi atribuído ao hidrogênio olefínico H-6. Sinais múltiplos entre δ_{H} 0,68 e δ_{H} 2,29 são correspondentes aos demais átomos de hidrogênio do esqueleto do esteroide.

O espectro de RMN de ^{13}C (Figura 42, p. 69) mostra a presença de 27 sinais, sendo que dois apresentam maior intensidade, indicando sobreposição de sinais, totalizando, dessa forma, 29 sinais. A partir da análise do subspectro DEPT135 (Figura 43, p. 69) foi possível classificar os átomos de carbono, sendo 6 CH_3 , 11 CH_2 , 9 CH e 3 C . O sinal em δ_{C} 71,81 foi atribuído ao carbono hidroxilado e os sinais em δ_{C} 121,73 e δ_{C} 140,74 foram atribuídos aos átomos de carbono olefínicos em C-6 e C-5, respectivamente. O sinal em δ_{C} 42,31 foi atribuído aos átomos de carbono C-4 e C-13. O sinal em δ_{C} 29,12 foi atribuído aos átomos de carbono C-8 e C-25.

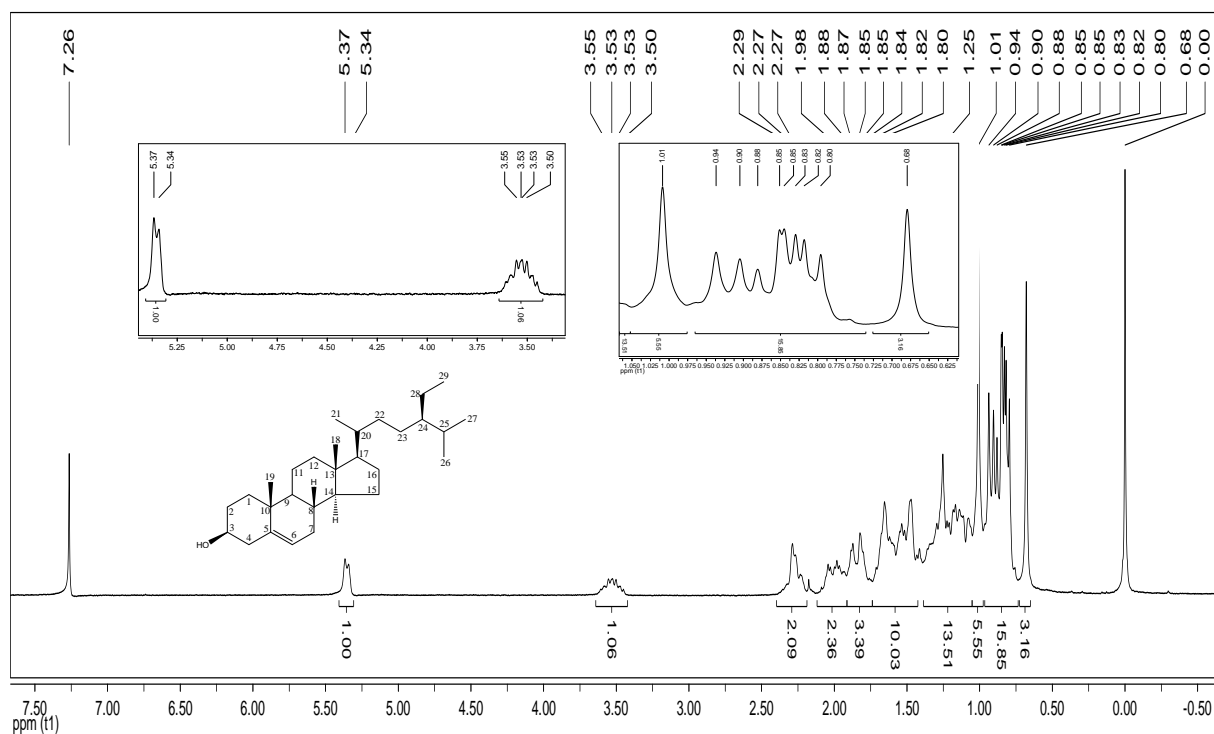


Figura 41: Espectro de RMN de ^1H (200 MHz) de MD09 em CDCl_3 .

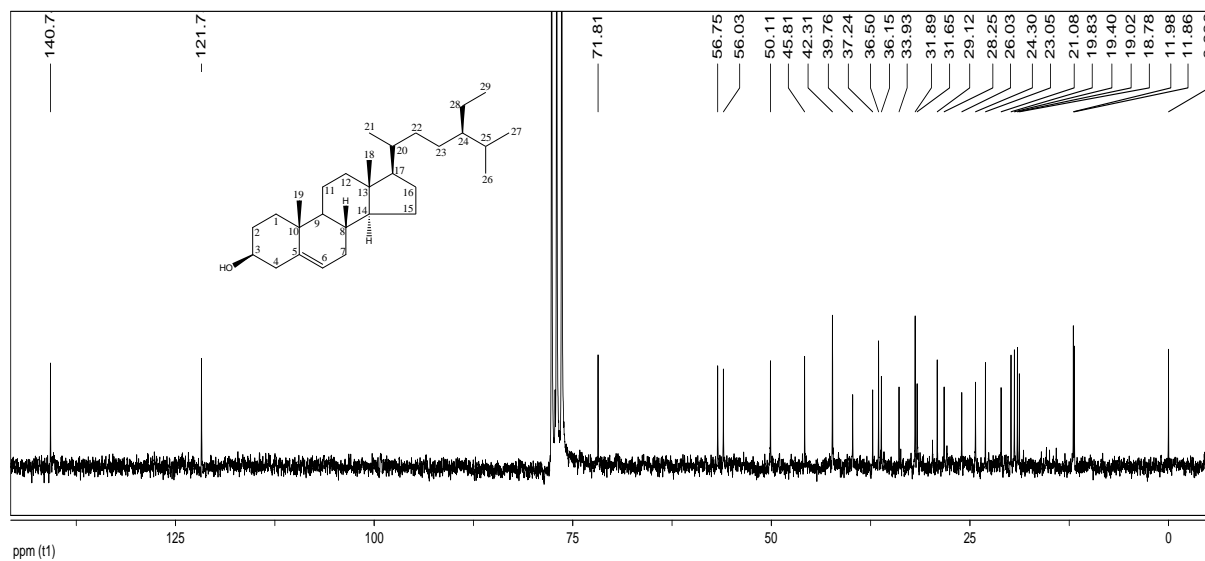


Figura 42: Espectro de RMN de ^{13}C (50 MHz) de MD9 em CDCl_3 .

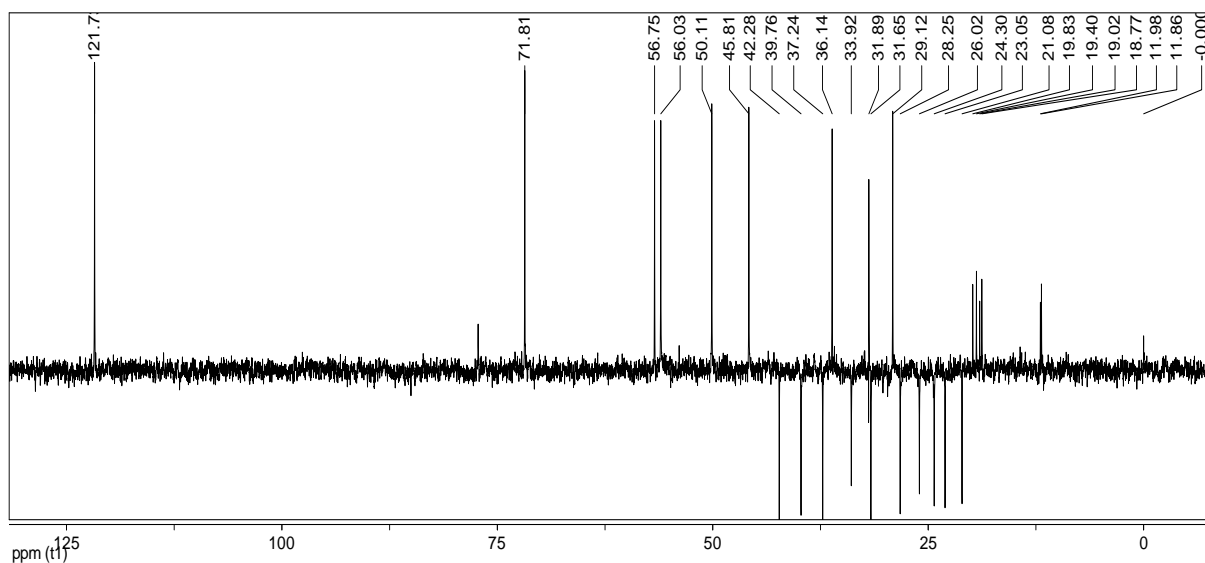
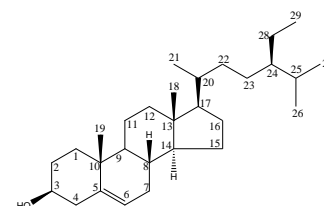


Figura 43: Subespectro DEPT135 (50 MHz) de MD9 em CDCl_3 .

Os dados obtidos a partir do espectro de RMN de ^{13}C e subespectro DEPT135 foram comparados com os da literatura (SALAZAR, 2005) (Tabela 31, p. 70) e permitiram confirmar que MD9 trata-se do β -sitosterol. MD9 foi isolado pela primeira vez de *Maytenus distichophylla*.

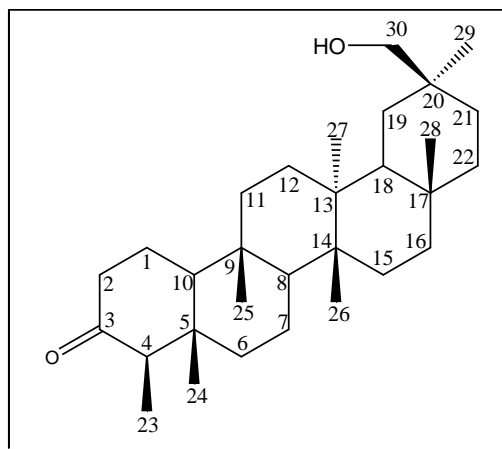
Tabela 31: Comparação dos dados de RMN de ^{13}C de **MD09** com os dados da literatura para o β -sitosterol (SALAZAR, 2005)

Carbono	Tipo de carbono	δ_{C}^* de MD09	δ_{C}^* (SALAZAR, 2005)
1	CH ₂	37,24	37,30
2	CH ₂	31,65	31,71
3	CH	71,81	71,84
4	CH ₂	42,31	42,34
5	C	140,74	140,80
6	CH	121,73	121,72
7	CH ₂	31,89	31,96
8	CH	29,12	29,14
9	CH	50,11	50,20
10	C	36,50	36,54
11	CH ₂	21,08	21,12
12	CH ₂	39,76	39,82
13	C	42,31	42,36
14	CH	56,75	56,81
15	CH ₂	24,30	24,33
16	CH ₂	28,25	28,25
17	CH	56,03	56,12
18	CH ₃	11,86	11,88
19	CH ₃	19,02	19,07
20	CH	36,15	36,17
21	CH ₃	18,78	18,81
22	CH ₂	33,93	34,01
23	CH ₂	26,03	26,18
24	CH	45,81	45,91
25	CH	29,12	29,20
26	CH ₃	19,83	19,82
27	CH ₃	19,40	19,41
28	CH ₂	23,05	23,12
29	CH ₃	11,98	12,00



Solvente: *CDCl₃

3.8 MD10: 3-oxo-30-hidroxifriedelano



MD10 foi isolado de **EHE**, apresentando-se como um sólido branco cristalino solúvel em clorofórmio e faixa de fusão entre 257,3-259,1 °C. Análise de CCD deste sólido mostrou a presença de uma única mancha roxa, usando mistura de hexano e clorofórmio (1:9) como eluente (revelador: ácido perclórico/vanilina).

O espectro na região do IV (Figura 44) de **MD10** apresenta bandas de absorção em 3534 cm^{-1} , característica de estiramento de ligação OH de hidroxila, $2933\text{-}2867\text{ cm}^{-1}$, referentes a estiramento simétrico e assimétrico da ligação CH de grupos alifáticos, 1713 cm^{-1} característico de estiramento de ligação CO de carbonila de cetona e 1450 e 1387 cm^{-1} correspondente a deformação angular no plano de ligação simples CH de grupos alifáticos.

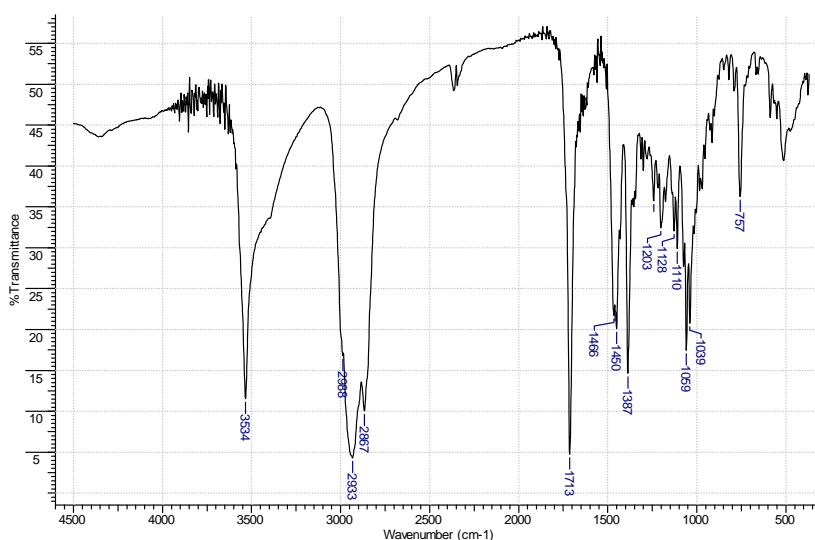


Figura 44: Espectro na região do IV de **MD10** (KBr).

O espectro de RMN de ^1H (Figura 45, p. 73) apresenta cinco simpletos em δ_{H} 1,15, δ_{H} 1,07, δ_{H} 0,99, δ_{H} 0,86 e δ_{H} 0,72 referentes a sete grupos metila, conforme indicado pela integração dos sinais. Os sinais em δ_{H} 3,36 sugerem a presença de dois átomos de hidrogênio (indicado pela integral) ligados a um carbono hidroxilado.

A análise do espectro de RMN de ^{13}C e subspectro DEPT 135 (Figuras 46, 47 e 48, p. 73 e 74) indica a presença de 29 sinais de carbono, que foram classificados como sendo 7 CH_3 , 11 CH_2 , 5 CH e 6 C . O sinal em δ_{C} 6,67 juntamente com δ_{C} 215,01 sugere uma estrutura triterpênica da série friedelano (MAHATO e KUNDU, 1994), que possui carbonila em C-3. O sinal em δ_{C} 71,77 indica a presença de um átomo de carbono hidroxilado na estrutura e, a partir do subspectro DEPT 135, esse átomo foi classificado com sendo um CH_2 .

Os dados obtidos de RMN de ^{13}C foram comparados com os da literatura (MAGALHÃES *et al.*, 2011) e sugeriram que **MD10** trata-se de **3-oxo-30-hidroxfriedelano**. No entanto, os valores de deslocamentos químicos para seis sinais foram inconsistentes com os apresentados pela literatura, sendo eles C-12, C-16, C-19, C-22, C-26 e C-27. Esse fato justifica a análise detalhada dos mapas de contornos HSQC, HMBC e COSY para confirmação da estrutura de **MD10**.

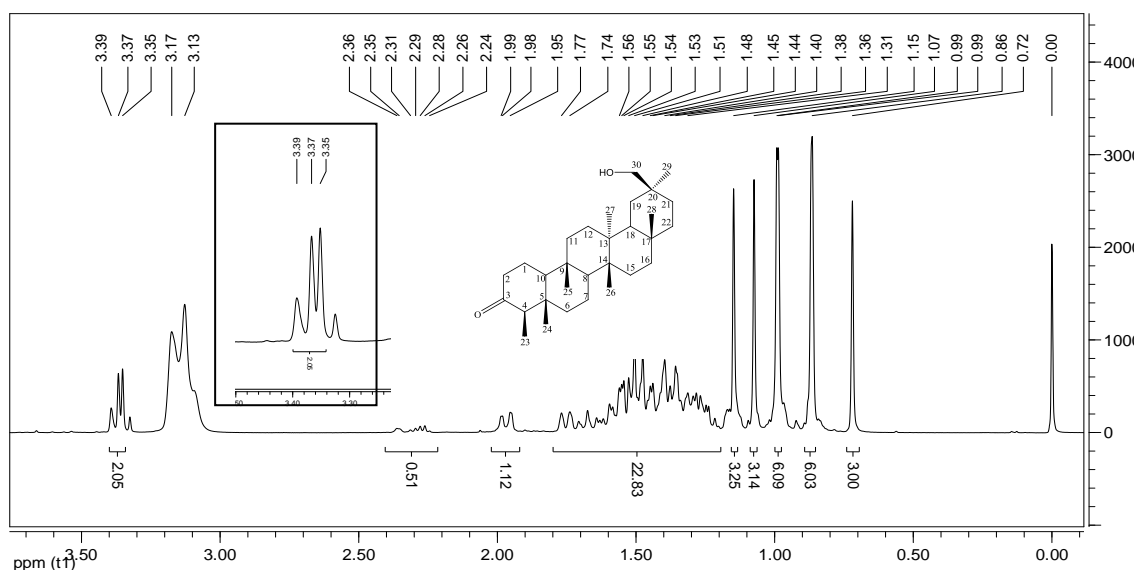


Figura 45: Espectro de RMN de ^1H (400 MHz) de **MD10** em $\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$.

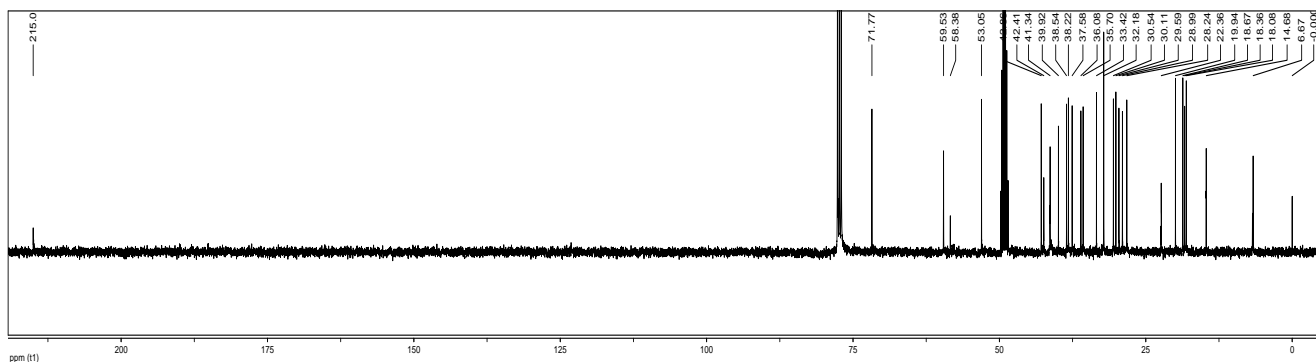


Figura 46: Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz) de **MD10** em $\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$.

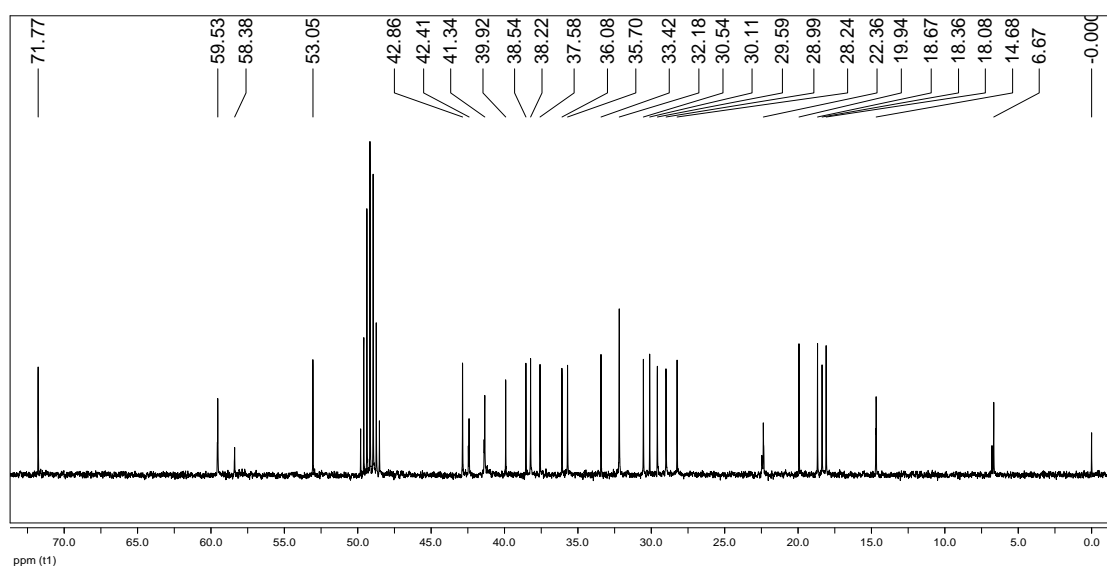


Figura 47: Expansão do espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz) de **MD10** em $\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$.

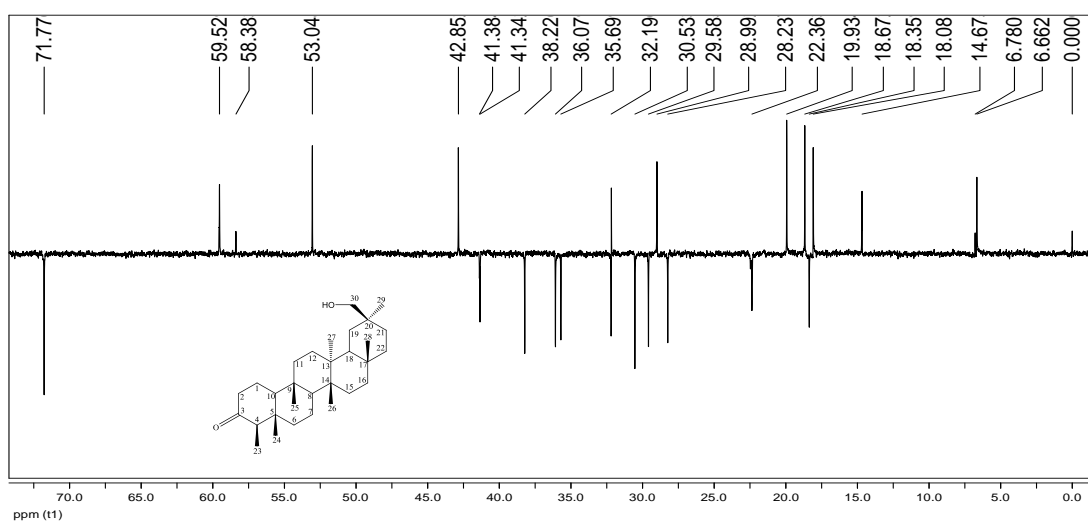


Figura 48: Subespectro DEPT135 (100 MHz) de **MD10** em $\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$.

A análise do mapa de contornos HSQC (Figura 49, p. 75) de **MD10** permitiu correlacionar o sinal do carbono C-23 em δ_C 6,67 com H-23 em δ_H 0,86. Outros sinais de carbono foram correlacionados aos seus respectivos átomos de hidrogênio, a partir dos mapas de contornos HSQC e HMBC.

Usando como ponto de partida os valores de C-23/H-23, procedeu-se, então, à análise do mapa de contornos HMBC (Figuras 50 a 53, p. 76 e 77)

O sinal de H-23 em δ_H 0,86 mostra correlação com os sinais de carbono em δ_C 215,01 (C-3), δ_C 42,41 (C-5) e em δ_C 58,38 (C-4) (Figuras 50, 52 e 53, p. 76 e 77). Pelo mapa de contornos HSQC foram atribuídos os valores dos sinais de hidrogênio para esses átomos de carbono.

No mapa de contornos HMBC, o sinal de hidrogênio H-4 em δ_H 2,28 mostra correlação com o sinal de carbono em δ_C 14,68 (C-24) (Figura 51, p. 76).

O sinal de C-24 em δ_C 14,68 mostra correlação com os sinais de hidrogênio em δ_H 1,27 e δ_H 1,75 (H-6), δ_H 1,47 (H-7) e δ_H 1,53 (H-10) (Figura 51, p. 76).

O sinal de H-10 em δ_H 1,53 mostra correlação com os sinais de carbono em δ_C 14,68 (C-24), δ_C 22,36 (C-1) e δ_C 53,05 (C-8) (Figuras 51 e 53, p. 76 e 77).

O sinal de C-8 em δ_C 53,05 mostra correlação com os sinais de hidrogênio em δ_H 0,86 (H-25), δ_H 0,98 (H-26), δ_H 1,27 (H-6) e δ_H 1,75 (H-6) e δ_H 1,43 (H-11) (Figura 53, p. 77).

O sinal de H-25 em δ_H 0,86 mostra correlação com os sinais de carbono em δ_C 35,70 (C-11), δ_C 37,58 (C-9), δ_C 53,05 (C-8) e δ_C 59,53 (C-10) (Figuras 52 e 53, p. 77).

O sinal de H-26 em δ_H 0,98 mostra correlação com os sinais de carbono em δ_C 32,18 (C-15), δ_C 38,54 (C-14), δ_C 39,92 (C-13) e δ_C 53,05 (C-8) (Figuras 52 e 53, p. 77).

O sinal de C-13 em δ_C 39,92 mostra correlação com os sinais de hidrogênio em δ_H 0,98 (H-26), δ_H 1,07 (H-27), δ_H 1,39 (H-8) e δ_H 1,47 (H-19) e δ_H 1,49 (H-15) (Figura 52, p. 77).

O sinal de H-27 em δ_H 1,07 mostra correlação com os sinais de carbono em δ_C 30,54 (C-12) e δ_C 39,92 (C-13) (Figura 52, p. 77).

O sinal de C-19 em δ_C 29,59 mostra correlação com os sinais de hidrogênio em δ_H 3,36 (H-30) e δ_H 0,98 (H-29) (Figuras 50 e 52, p. 76 e 77).

O sinal de H-29 em δ_H 0,98 mostra correlação com os sinais de carbono em δ_C 28,24 (C-21), δ_C 29,59 (C-19), δ_C 33,42 (C-20) e δ_C 71,77 (C-30) (Figuras 52 e 53, p. 77).

O sinal de C-20 em δ_C 33,42 mostra correlação com os sinais de hidrogênio em δ_H 0,98 (H-29) e δ_H 1,49 (H-18). Por sua vez, o sinal de C-18 em δ_C 42,86 correlaciona-se com o sinal de hidrogênio em δ_H 1,15 (H-28) (Figura 52, p. 77).

O sinal de H-28 em δ_H 1,15 mostra correlação com os sinais de carbono em δ_C 30,11 (C-17), δ_C 36,08 (C-16) e δ_C 38,22 (C-22) (Figura 52, p. 77).

No mapa de correlações COSY de **MD10** (Figura 54, p. 78), o sinal de hidrogênio H-23 em δ_H 0,86 mostrou correlação com o sinal de hidrogênio H-4 em δ_H 2,28. O sinal de hidrogênio H-2 em δ_H 2,36 mostrou correlação com os sinais de hidrogênio H-1 em δ_H 1,67 e δ_H 1,94. O sinal de hidrogênio H-1 em δ_H 1,67 mostrou correlação com o sinal de hidrogênio H-1 em δ_H 1,94. O sinal de hidrogênio H-6 em δ_H 1,27 mostrou correlação com o sinal de hidrogênio H-6 em δ_H 1,75. O sinal de hidrogênio H-22 em δ_H 0,96 mostrou correlação com o sinal de hidrogênio H-22 em δ_H 1,57.

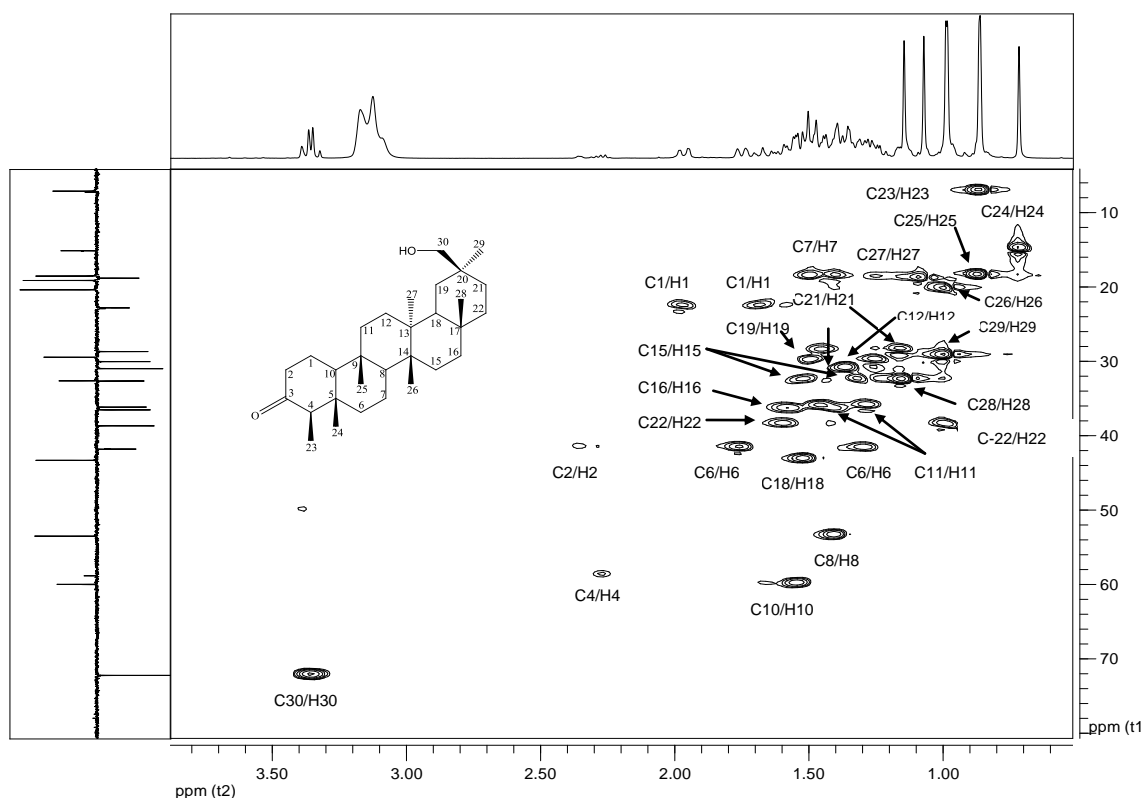


Figura 49: Expansão do mapa de contornos HSQC (400 MHz) de **MD10** em CDCl₃/CD₃OD.

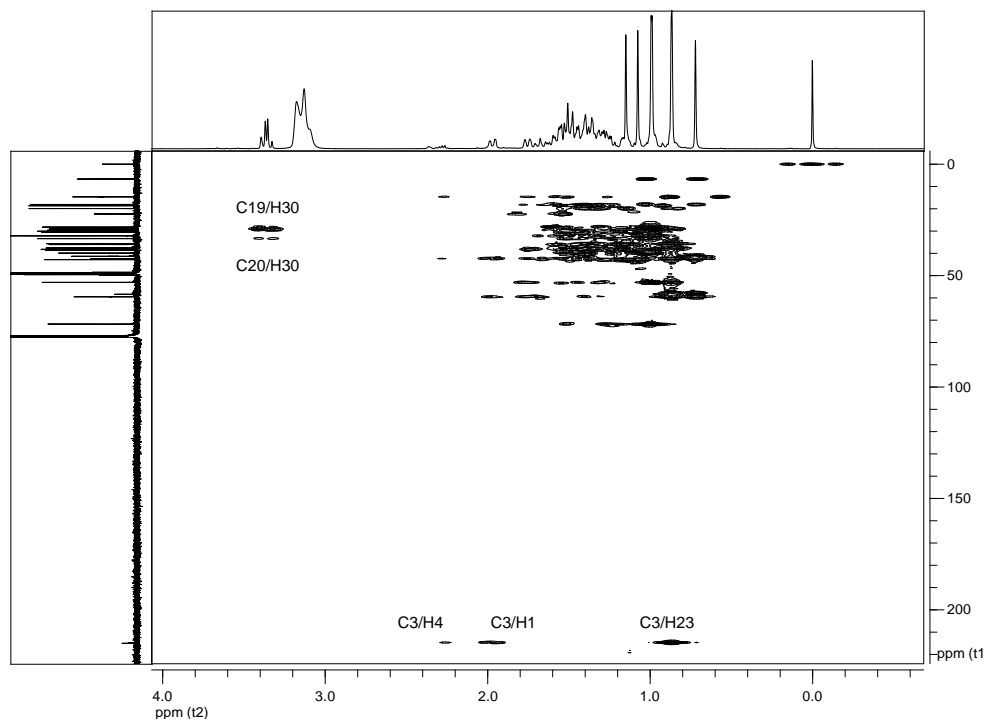


Figura 50: Mapa de contornos HMBC (400 MHz) de MD10 em CDCl₃/CD₃OD.

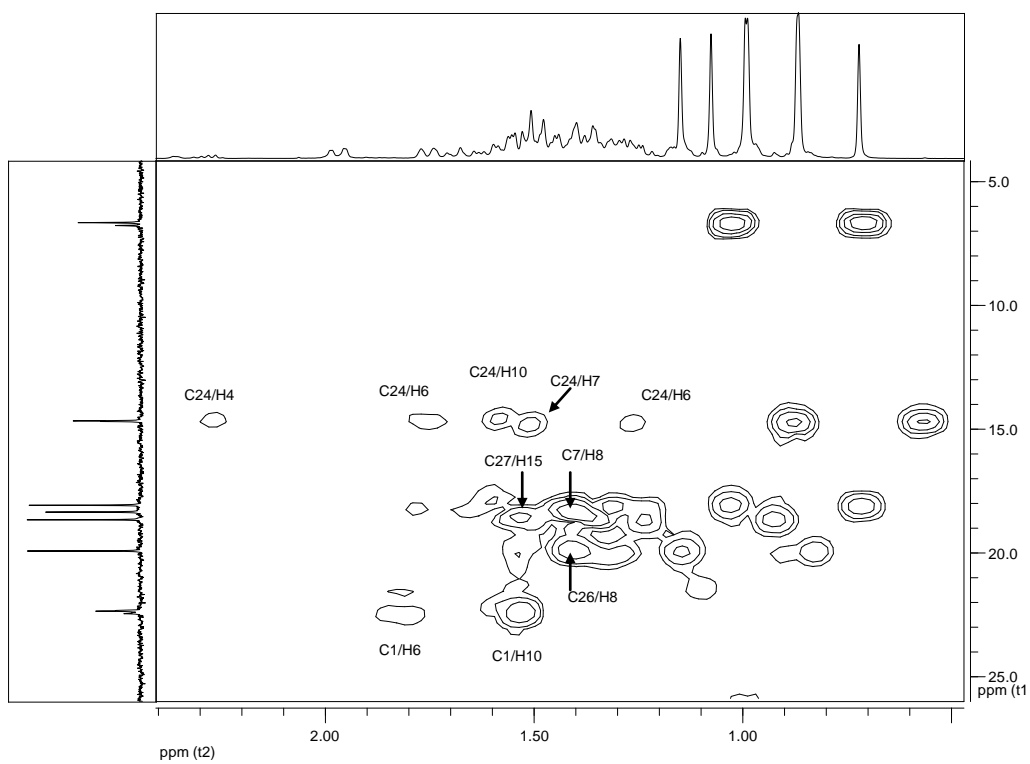


Figura 51: Expansão do mapa de contornos HMBC (400 MHz) de MD10 em CDCl₃/CD₃OD.

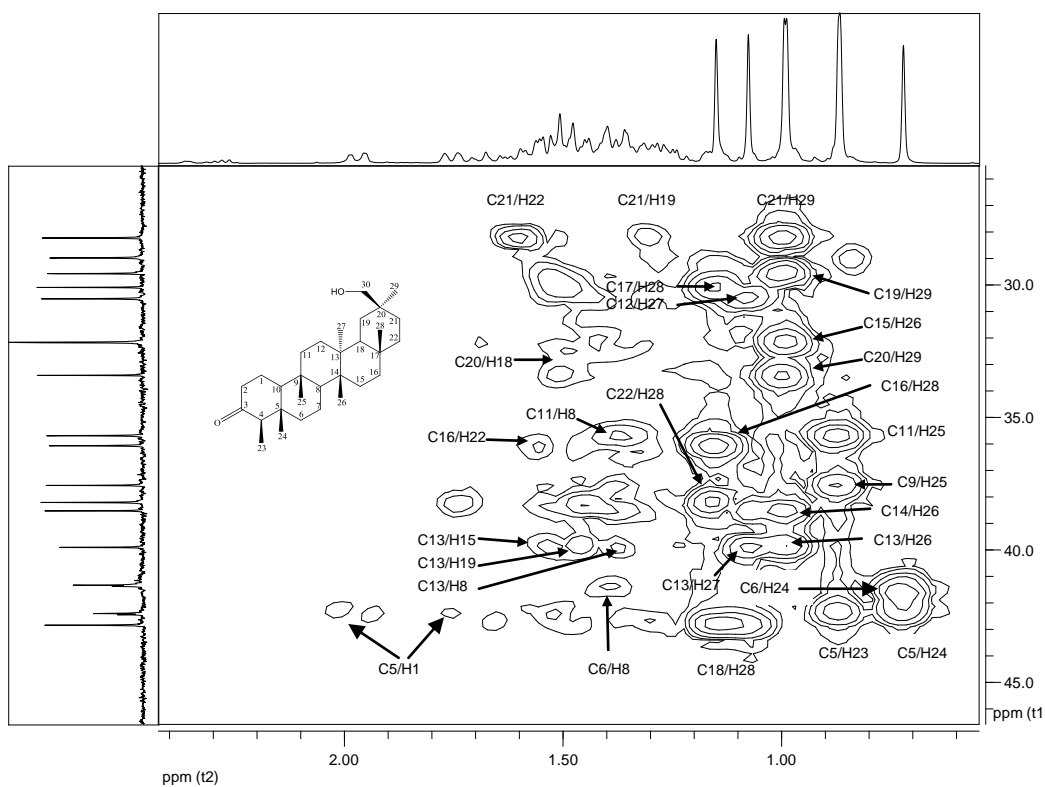


Figura 52: Expansão do mapa de contornos HMBC (400 MHz) de **MD10** em $\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$.

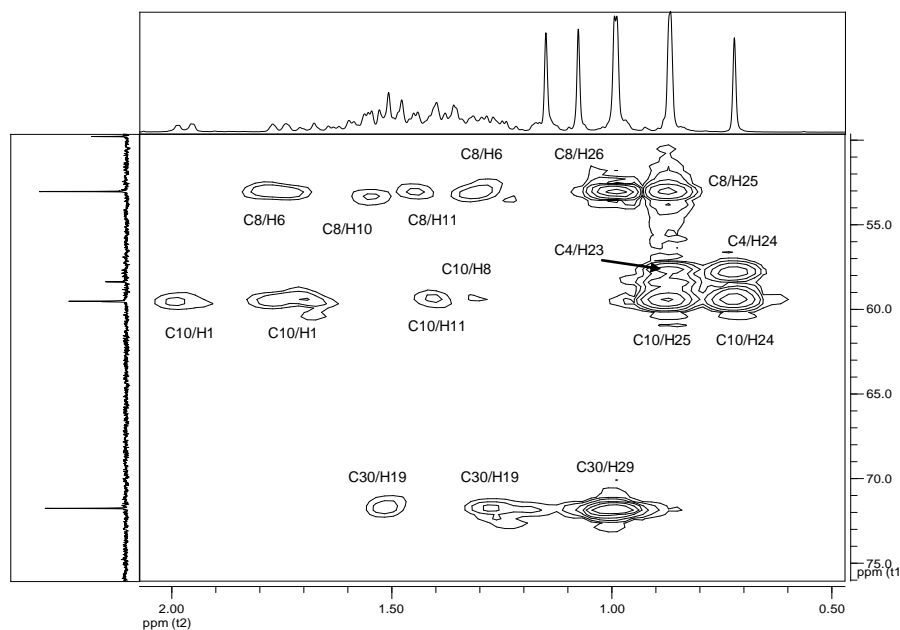


Figura 53: Expansão do mapa de contornos HMBC (400 MHz) de **MD10** em $\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$.

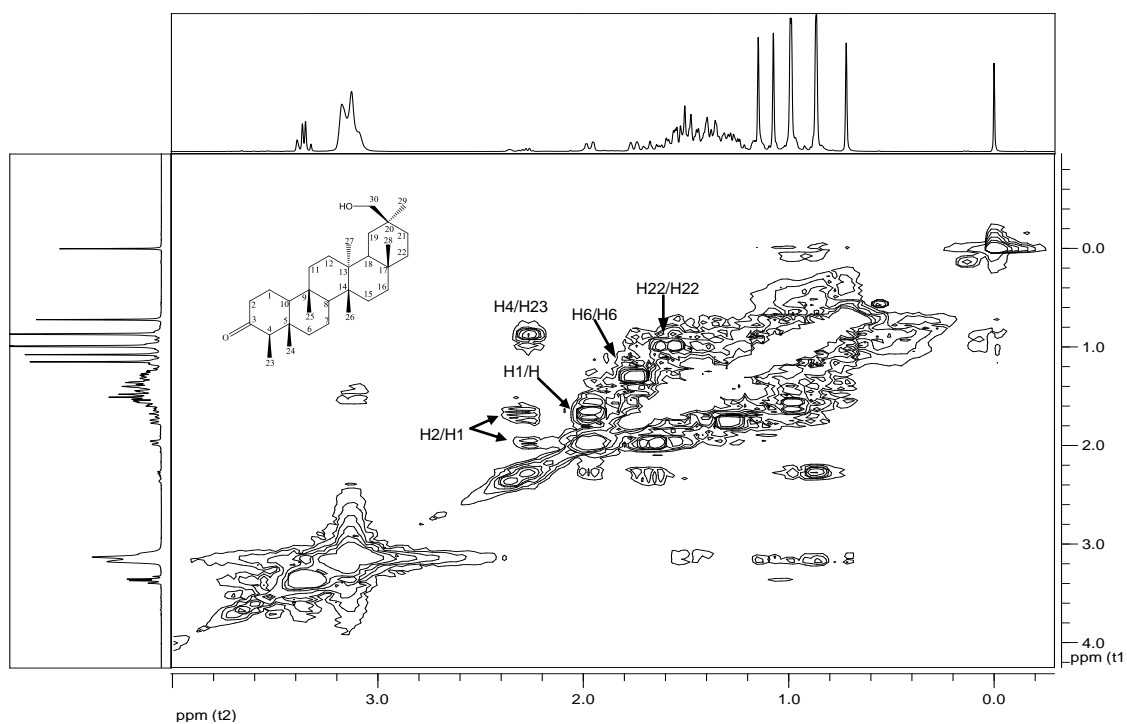


Figura 54: Mapa de contornos COSY (400 MHz) de **MD10** em $\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$.

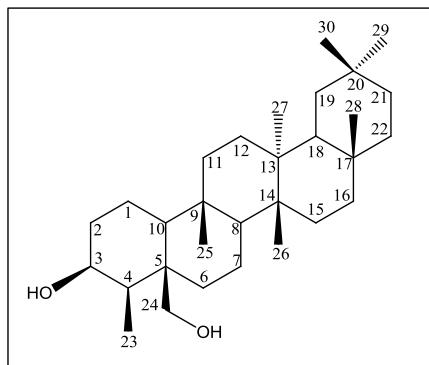
A análise dos espectros de RMN 1D e 2D permitiu atribuir os deslocamentos químicos de todos os átomos de hidrogênio e carbono confirmando que **MD10** trata-se de 3-oxo-30-hidroxifriedelano. **MD10** já foi isolado anteriormente de *Maytenus distichophylla* (DUARTE *et al.*, 2013). Os dados obtidos estão listados na Tabela 32, juntamente com os dados da literatura para o 3-oxo-30-hidroxifriedelano (MAGALHÃES *et al.*, 2011).

Tabela 32: Dados de RMN de ^1H e de ^{13}C (400 MHz) de **MD10** em $\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$

Átomo	δ_{C} de MD10	* δ_{C} (MAGA-LHÃES <i>et al.</i> , 2011)	Tipo de carbono	δ_{H} *	HMBC
1	22,36	22,27	CH_2	1,63-1,73 (m) e 1,94-2,02 (m)	6, 10
2	41,39	41,50	CH_2	2,24-2,39 (m)	-
3	215,01	213,3	C	-	1, 4, 23
4	58,38	58,19	CH	2,24-2,32 (m)	23, 24
5	42,41	42,15	C	-	1, 4, 23
6	41,34	41,24	CH_2	1,22-1,34 (m) e 1,71-1,81 (m)	8, 24
7	18,36	18,23	CH_2	1,34-1,43 (m) e 1,44-1,55 (m)	-
8	53,05	53,00	CH	1,36-1,48 (m)	6, 10, 11, 25, 27
9	37,58	37,42	C	-	25
10	59,53	59,44	CH	1,49-1,59 (m)	1, 2, 8, 11, 24, 25
11	35,70	35,55	CH_2	1,24-1,34 (m) e 1,42-1,51 (m)	8, 25
12	30,54	29,71	CH_2	1,31-1,42 (m)	26
13	39,92	39,77	C	-	8, 15, 19, 26, 27
14	38,54	38,38	C	-	27
15	32,18	32,12	CH_2	1,28-1,36 (m) e 1,46-1,57 (m)	8, 27
16	36,08	29,71	CH_2	1,53-1,65 (m)	22, 28
17	30,11	29,96	C	-	28
18	42,86	42,69	CH	1,48-1,57 (m)	28
19	29,59	30,50	CH_2	1,20-1,30 (m) e 1,44-1,53 (m)	29, 30
20	33,42	33,36	C	-	18, 29
21	28,24	28,15	CH_2	1,10-1,20 (m) e 1,40-1,49 (m)	19, 22, 29
22	38,22	39,77	CH_2	0,95-1,05 (m) e 1,53-1,65 (m)	19, 28
23	6,67	6,83	CH_3	0,86 (s)	-
24	14,68	14,65	CH_3	0,72 (s)	4, 6, 7, 10
25	18,08	18,01	CH_3	0,86 (s)	11
26	19,94	18,59	CH_3	0,98 (s)	8, 13, 14, 15
27	18,67	19,95	CH_3	1,07 (s)	12, 13
28	32,18	32,12	CH_3	1,15 (s)	-
29	28,99	28,93	CH_3	0,98 (s)	-
30	71,77	71,90	CH_2	3,36 (dd, $J = 10,4$ e $10,8$ Hz)	19, 29

* Faixa de deslocamento químico de multipletos foi atribuído a partir do mapa de contornos HSQC.

3.9 MD11: 3 β ,24-dihidroxifriedelano



MD11 foi isolado de **EHE** e **ECL**, apresentando-se como um sólido branco cristalino, parcialmente solúvel em clorofórmio e de faixa de fusão 291,0-292,4 °C. O teste LB foi positivo para triterpeno pentacíclico. A análise de CCD de **MD11** mostrou a presença de uma única mancha roxa, usando diferentes eluentes (revelador: ácido perclórico/vanilina).

O espectro na região do IV (Figura 55) de **MD11** apresenta bandas de absorção em 3368 cm^{-1} , característica de estiramento de ligação OH de hidroxila. Absorções em 2943-2869 cm^{-1} são características de estiramento simétrico e assimétrico da ligação CH de grupos alifáticos e bandas em 1448 e 1382 cm^{-1} são características de deformação angular no plano de ligação simples CH de grupos alifáticos. Uma banda de absorção em 1042 cm^{-1} é referente a estiramento de ligação C-O de álcool.

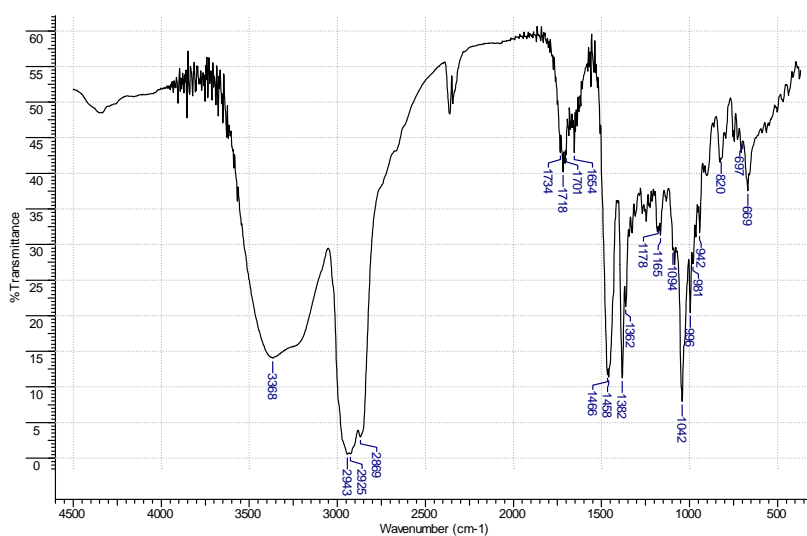


Figura 55: Espectro na região do IV de **MD11** (KBr).

O espectro de RMN de ^1H (Figura 56) mostra a presença de sinais em δ_{H} 1,18, δ_{H} 1,15, δ_{H} 1,09, δ_{H} 1,05, δ_{H} 1,02 e δ_{H} 0,97 referentes a sete grupos metila (conforme indicado pelas integrais). Apresenta, ainda, um sinal em δ_{H} 3,79 referente a um átomo de hidrogênio ligado a carbono hidroxilado e dois dupletos, em δ_{H} 3,96 ($J = 12,4$ Hz) e δ_{H} 3,62 ($J = 12,4$ Hz), referentes a dois átomos de hidrogênio ligados a carbono hidroxilado.

O espectro de RMN de ^{13}C (Figura 57, p. 82) apresenta 30 sinais de carbono, que foram classificados como sendo 7 CH_3 , 12 CH_2 , 5 CH e 6 C , a partir do subspectro DEPT 135 (Figura 58, p. 82), sugerindo tratar-se de um TTPC da série dos friedelanos. O sinal em δ_{C} 70,11 foi atribuído ao carbono hidroxilado C-3 e o sinal em δ_{C} 12,05 foi atribuído ao carbono metílico C-23. O sinal δ_{C} 63,43 indica um carbono metilênico hidroxilado.

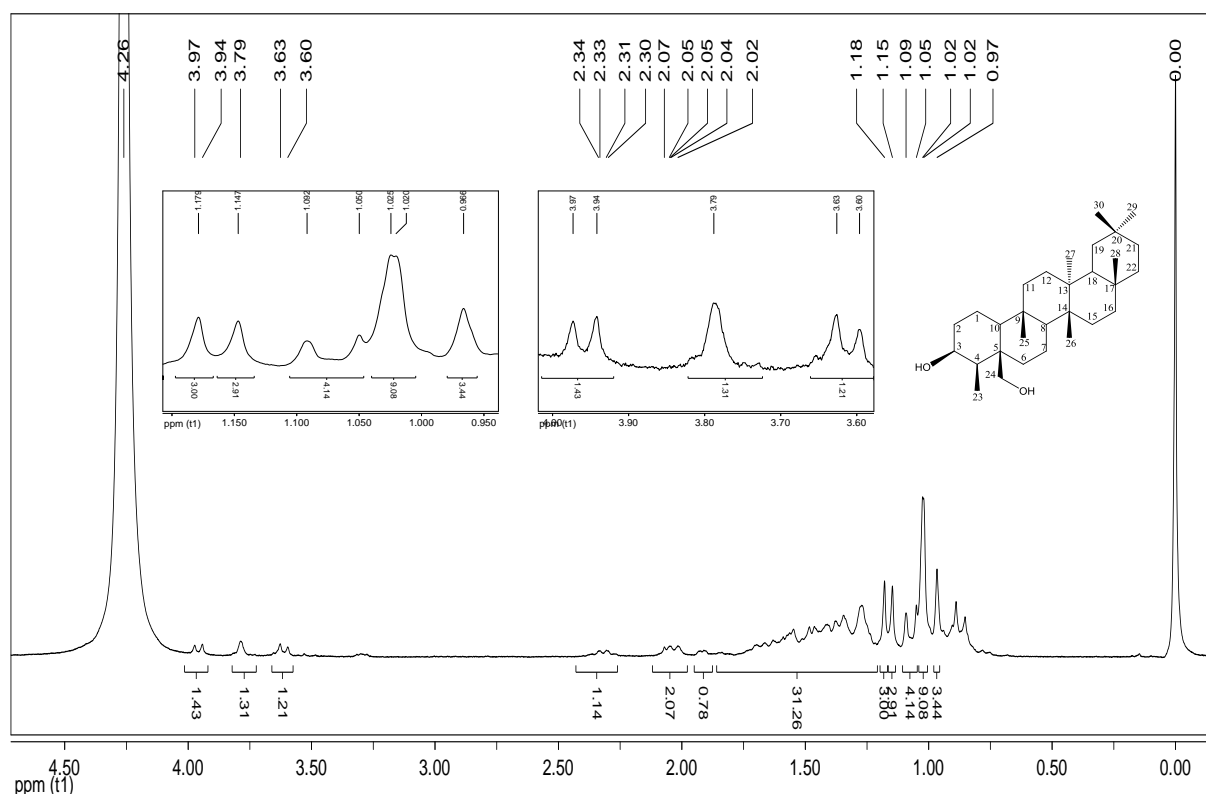


Figura 56: Espectro de RMN de ^1H (400 MHz) de **MD11** em CDCl_3 + piridina d_5 .

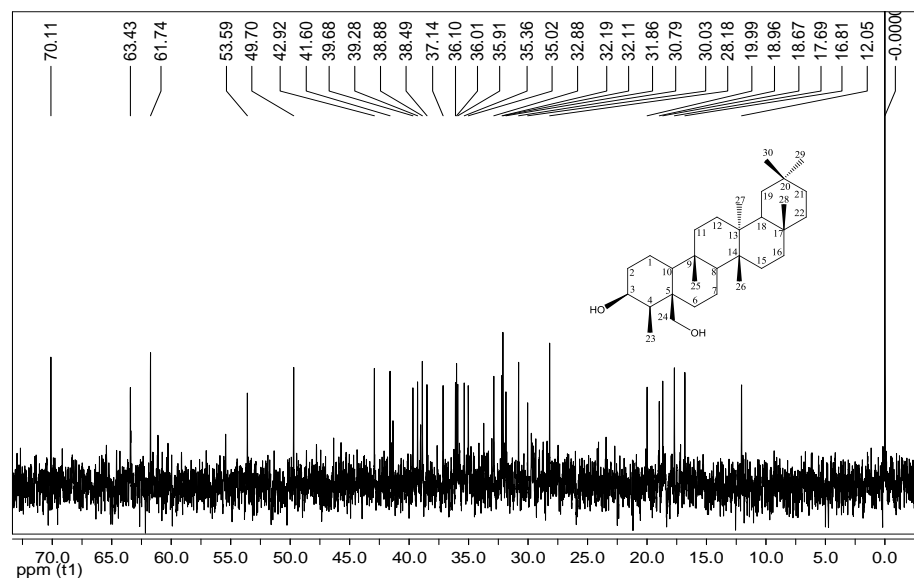


Figura 57: Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz) de **MD11** em CDCl_3 + piridina d_5 .

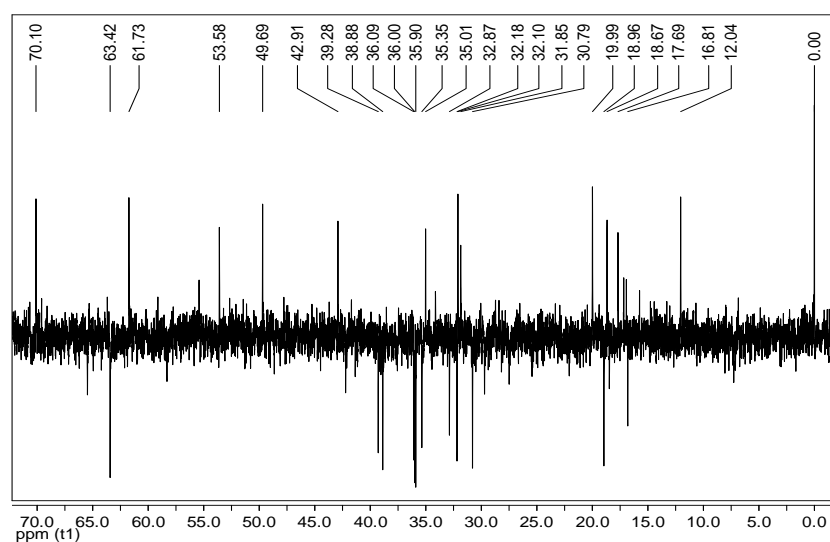
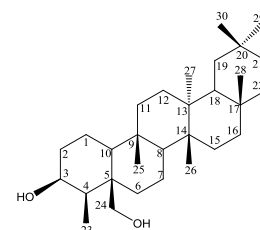


Figura 58: Subespectro DEPT135 (100 MHz) de **MD11** em CDCl_3 + piridina d_5 .

Os dados obtidos a partir do espectro de RMN de ^{13}C foram comparados com os da literatura (OLIVEIRA, 2012) (Tabela 33, p. 83) e permitiram identificar **MD11** como sendo $3\beta,24$ -dihidroxifriedelano. **MD11** foi isolado pela primeira vez de *Maytenus distichophylla* e é um TTPC raro, encontrado anteriormente apenas em *Eschweillera longipes* (Lecythidaceae) (COSTA E CARVALHO, 2003) e *Maytenus acanthophylla* (Celastraceae) (OLIVEIRA, 2012).

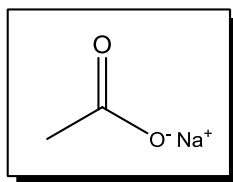
Tabela 33: Comparação dos dados de RMN de ^{13}C de **MD11** com os dados da literatura para o $3\beta,24$ -dihidroxifriedelano (OLIVEIRA, 2012)

Carbono	Tipo de carbono	δ_{C}^* de MD11	δ_{C}^* (OLIVEIRA, 2012)
1	CH ₂	16,81	16,71
2	CH ₂	38,88	38,77
3	CH	70,11	70,11
4	CH	49,70	49,60
5	C	41,60	41,50
6	CH ₂	36,10	35,99
7	CH ₂	18,96	18,85
8	CH	53,59	53,40
9	C	37,14	37,03
10	CH	61,74	61,64
11	CH ₂	36,01	35,80
12	CH ₂	30,79	30,67
13	C	38,49	38,38
14	C	39,68	39,57
15	CH ₂	32,19	32,07
16	CH ₂	35,91	35,92
17	C	30,03	29,91
18	CH	42,92	42,81
19	CH ₂	35,36	35,24
20	C	28,18	28,07
21	CH ₂	32,88	32,76
22	CH ₂	39,28	39,17
23	CH ₃	12,05	11,95
24	CH ₂	63,43	63,33
25	CH ₃	17,69	17,58
26	CH ₃	18,67	18,56
27	CH ₃	19,99	19,87
28	CH ₃	32,11	31,99
29	CH ₃	35,02	34,90
30	CH ₃	31,86	31,74



Solvente: $^*\text{CDCl}_3$ + piridina d_5

3.10 MD12: Acetato de sódio



MD12 foi isolado de **EHE** e apresentou-se como um sólido cristalino, completamente solúvel em água. Análise do ponto de fusão mostrou perda de água em aproximadamente 95 °C e fusão total em 322,2-324 °C.

O espectro na região do IV (Figura 59) de **MD12** apresenta bandas de absorção em 1590-1670 cm^{-1} , características de estiramento assimétrico de ligação CO de ânion carboxilato. Bandas em 1410 e 1446 cm^{-1} foram atribuídas a estiramentos simétricos da ligação CO (PAVIA *et al.*, 2005).

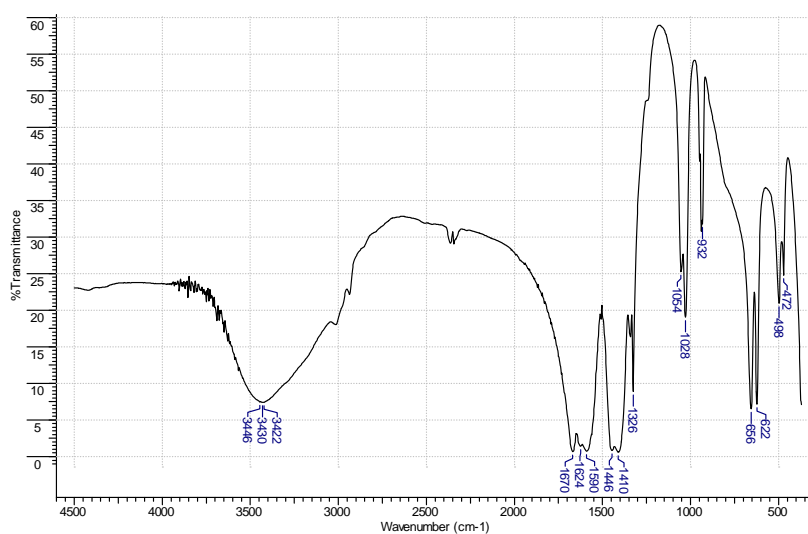


Figura 59: Espectro na região do IV de **MD12** (KBr).

O espectro de RMN de ^1H (Figura 60, p. 85) apresenta um sinal em δ_{H} 1,81 referente aos átomos de hidrogênio da metila. O sinal em δ_{H} 4,65 refere-se à água residual do solvente D_2O . O espectro de RMN de ^{13}C (Figura 61, p. 85) apresenta dois sinais, δ_{C} 181,49 e δ_{C} 23,27 atribuídos à carbonila e metila, respectivamente. Os átomos de carbono foram classificados a partir do subspectro DEPT135 (Figura 62, p.85).

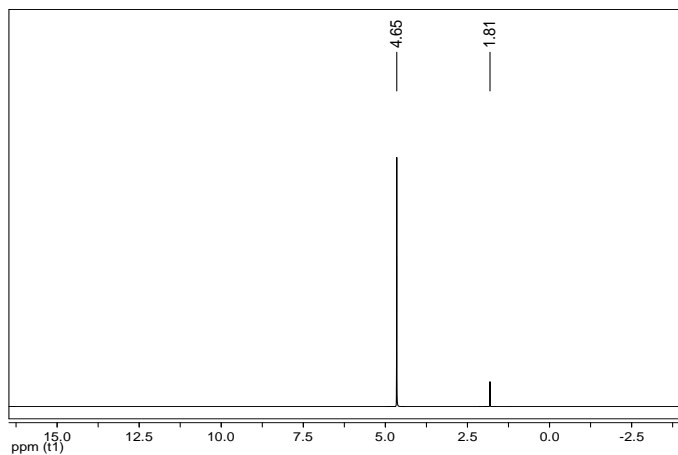


Figura 60: Espectro de RMN de ^1H (400 MHz) de **MD12** em D_2O .

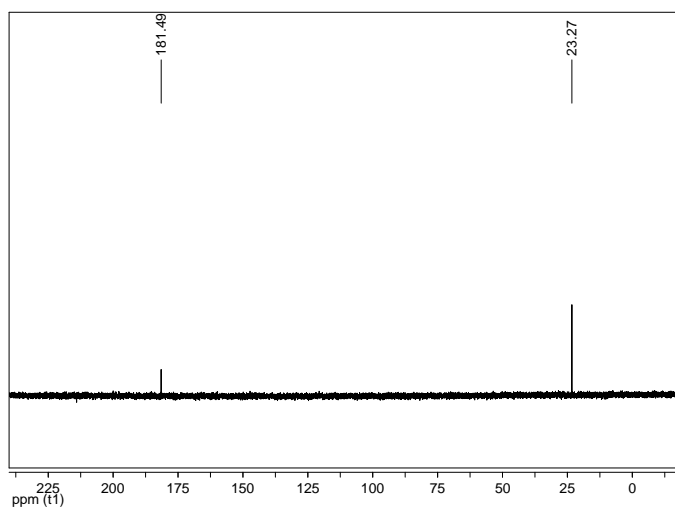


Figura 61: Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz) de **MD12** em D_2O .

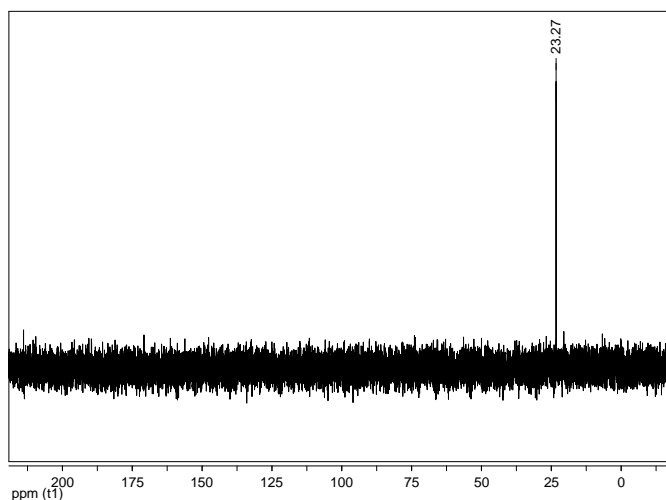


Figura 62: Subespectro DEPT135 (100 MHz) de **MD12** em D_2O .

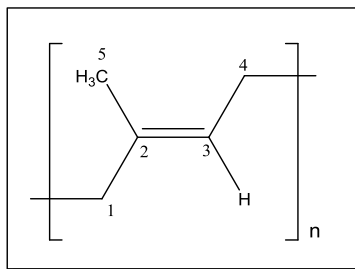
Os dados obtidos de RMN de ^{13}C foram comparados com os dados do software ACD/Labs (Tabela 34) e permitiram identificar **MD12** como sendo acetato de sódio, isolado pela primeira vez de *Maytenus distichophylla*.

Tabela 34: Comparação dos dados de RMN de ^{13}C de **MD12** com os dados obtidos a partir do software ACD/Labs (versão 6.00)

Tipo de carbono	δ_{C}^* de MD12	δ_{C}^* (ACD/Labs)
C	181,49	181,20
CH ₃	23,27	23,60

Solvente: *D₂O

3.11 MD13: 1,4-*trans*-poli-isopreno (guta-percha)



MD13 foi isolado do **SEH** e **ECL**, apresentando-se com aparência de uma goma branco amarelada solúvel em clorofórmio.

O espectro de RMN de ^1H (Figura 63) de **MD13** apresenta um tripleto em δ_{H} 5,12 ($J= 6,4$ Hz) característico de hidrogênio olefínico. Multipletos em δ_{H} 1,98 e δ_{H} 2,06 foram atribuídos aos grupos metilênicos C-1 e C-4, respectivamente. O simpleto em δ_{H} 1,60 é referente ao grupo metila C-5.

O espectro de RMN de ^{13}C (Figura 64, p. 88) apresenta 5 sinais de carbono que foram classificados como sendo 1 CH_3 , 2 CH_2 , 1 CH e 1 C , a partir do subespectro DEPT135 (Figura 65, p. 88). Os sinais em δ_{C} 124,25 e δ_{C} 134,93 são característicos de átomos de carbono olefínico e foram atribuídos a C-3 e C-2, respectivamente. Os sinais em δ_{C} 16,01, δ_{C} 26,74 e δ_{C} 39,74 foram atribuídos a C-5, C-4 e C-1, respectivamente (OLIVEIRA, 2012).

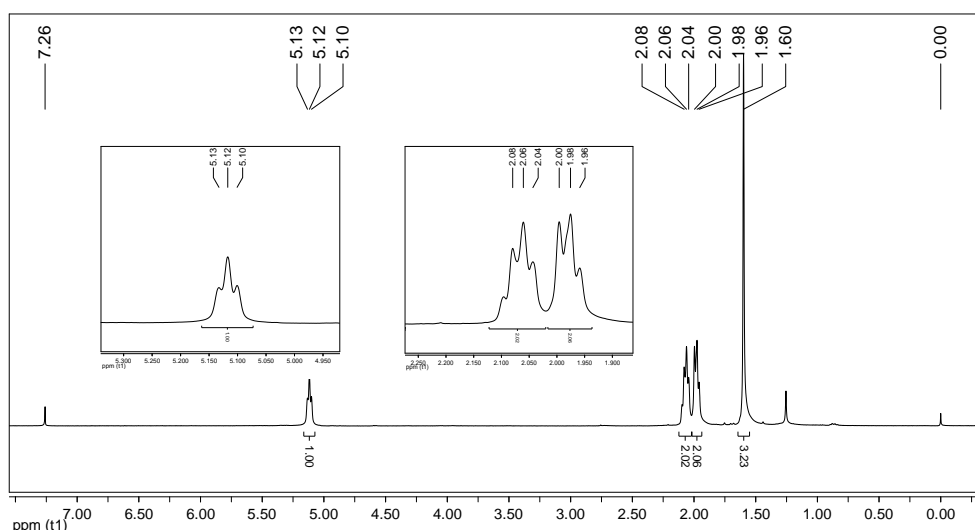


Figura 63: Espectro de RMN de ^1H (400 MHz) de **MD13** em CDCl_3 .

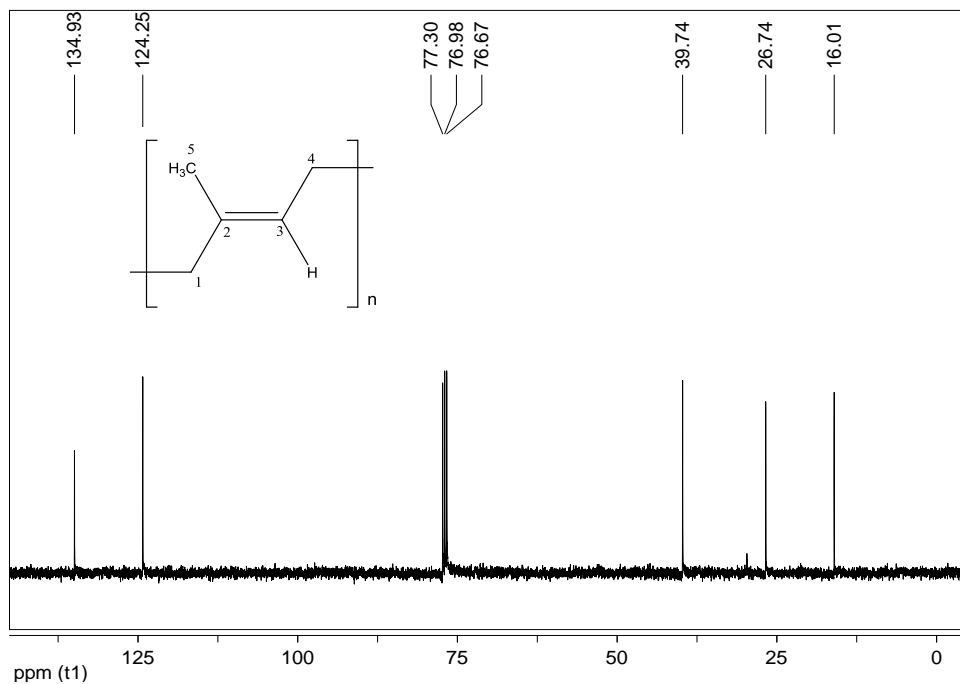


Figura 64: Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz) de MD13 em CDCl_3 .

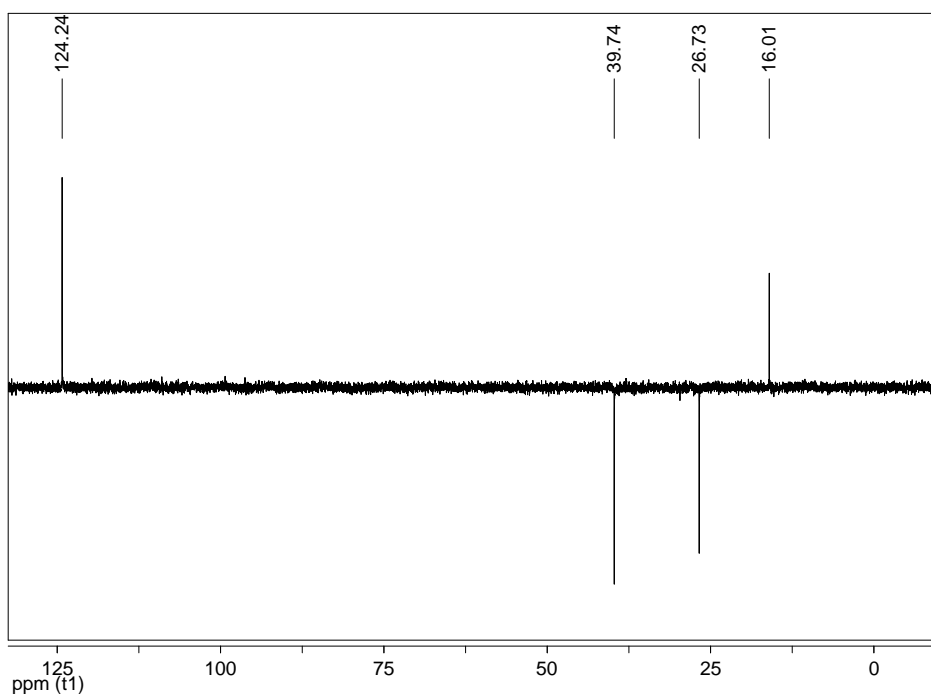


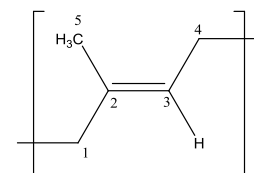
Figura 65: Subespectro DEPT135 (100 MHz) de MD13 em CDCl_3 .

Os dados obtidos de RMN de ^{13}C e DEPT135 foram comparados com a literatura (OLIVEIRA, 2012) (Tabela 35), e juntamente com o aspecto físico e padrão obtido em CCD permitiram identificar **MD13** como sendo 1,4-*trans*-poli-isopreno (guta-percha). **MD13** foi isolado pela primeira vez de *Maytenus distichophylla*.

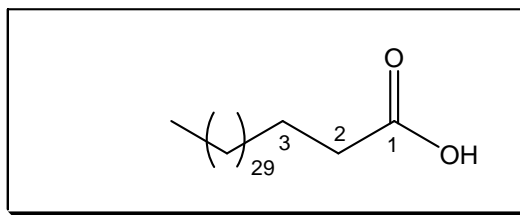
Tabela 35: Comparação dos dados de RMN de ^{13}C de **MD13** com os dados da literatura para a guta-percha (OLIVEIRA, 2012)

Carbono	Tipo de carbono	δ_{C}^* de MD13	δ_{C}^* (OLIVEIRA, 2012)
1	CH_2	39,74	39,77
2	C	134,93	134,96
3	CH	124,25	124,29
4	CH_2	26,74	26,77
5	CH_3	16,01	16,05

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



3.12 MD14: Ácido tritriacontanóico



MD14 foi isolado de **ECL**, apresentando-se como um sólido amorfo e faixa de fusão 80,3-82,1 °C.

O espectro na região do IV (Figura 66) de **MD14** apresenta bandas de absorção em 1708 cm^{-1} , característica de estiramento de ligação dupla CO de ácido carboxílico. Bandas em 2956-2850 cm^{-1} foram atribuídas a estiramentos de ligação simples CH, indicando a natureza alifática da substância. Bandas fracas em 1474, 1464 e 720 cm^{-1} foram atribuídas à deformação angular de ligação CH de cadeia longa. A banda de estiramento de ligação OH de ácidos carboxílicos que se encontram associados por meio de ligação de hidrogênio ficam sobrepostas às bandas em 2956-2850 cm^{-1} .

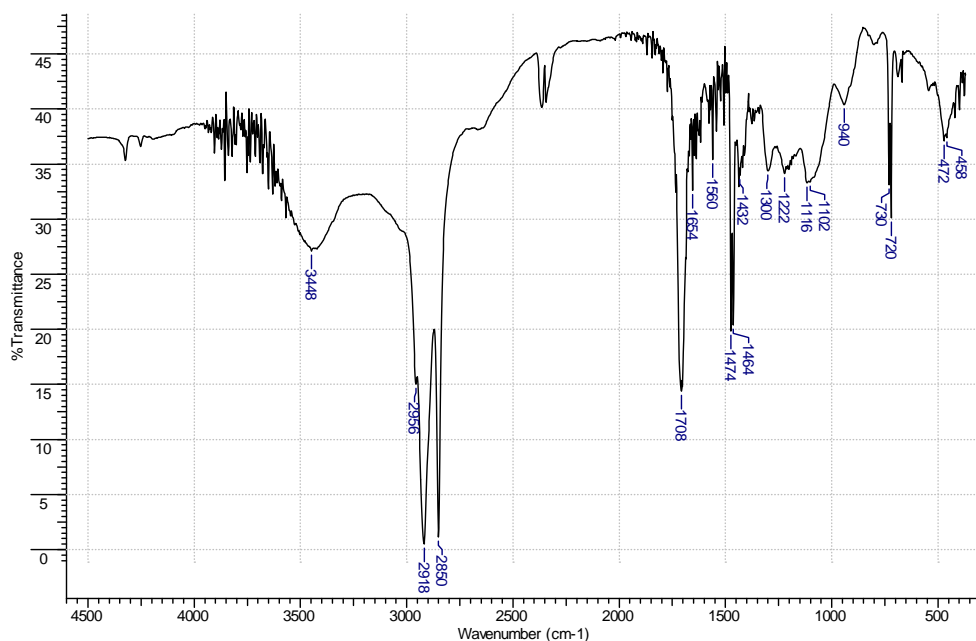


Figura 66: Espectro na região do IV de **MD14** (KBr).

O espectro de RMN de ^1H (Figura 67) apresenta um tripleto em δ_{H} 2,45 ($J=7,4$ Hz) que foi atribuído aos átomos de hidrogênio ligados ao carbono vizinho à carbonila (C-2) do ácido. Um multipletto entre δ_{H} 1,72 e δ_{H} 1,79 foi atribuído a átomos de hidrogênio ligados ao carbono C-3 e um tripleto em δ_{H} 0,88 é referente ao grupo metila. Um sinal intenso em δ_{H} 1,31 foi atribuído a grupos metilênicos da cadeia alifática.

O espectro de RMN de ^{13}C (Figura 68, p. 92) mostra a presença de dez sinais, que foram classificados como sendo uma metila, um carbono quartenário e oito grupos metilênicos, a partir do subspectro DEPT135 (Figura 69, p. 92). O sinal em δ_{C} 176,06 foi atribuído ao carbono carbonílico e o sinal em δ_{C} 14,12 foi atribuído à metila terminal do ácido. Os demais sinais são referentes aos grupos metilênicos da cadeia alifática de **MD14**.

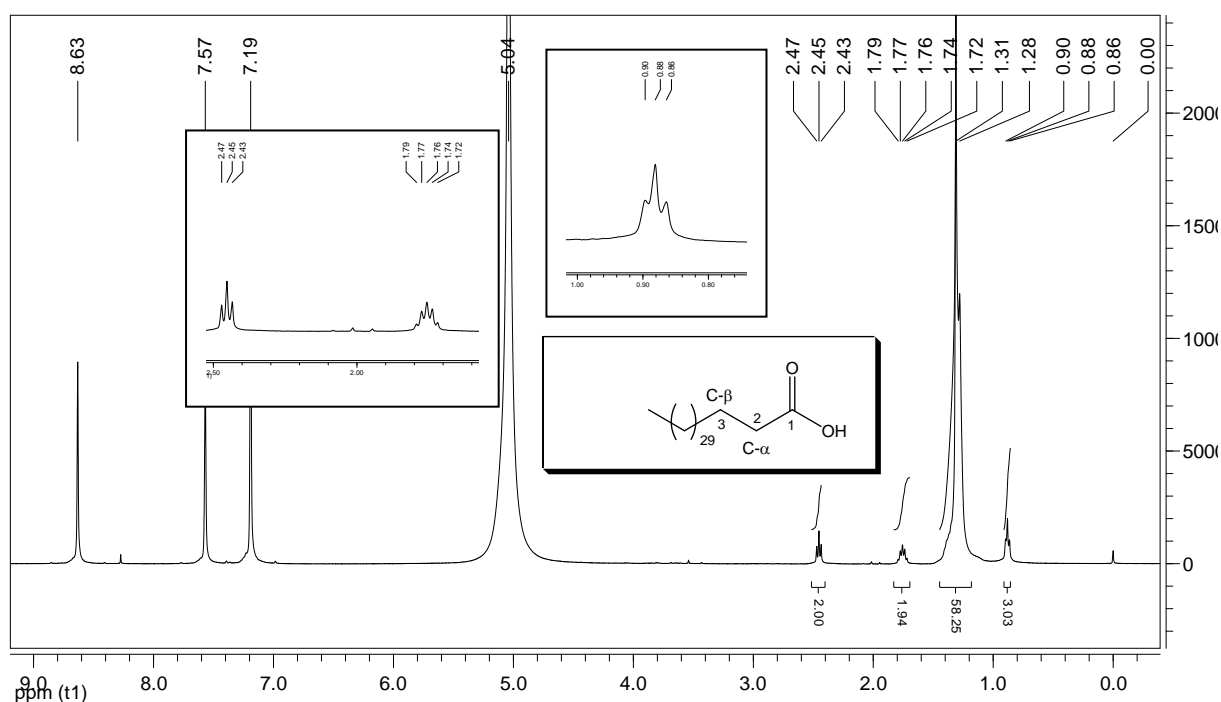


Figura 67: Espectro de RMN de ^1H (400 MHz) de **MD14** em CDCl_3 + piridina d_5 .

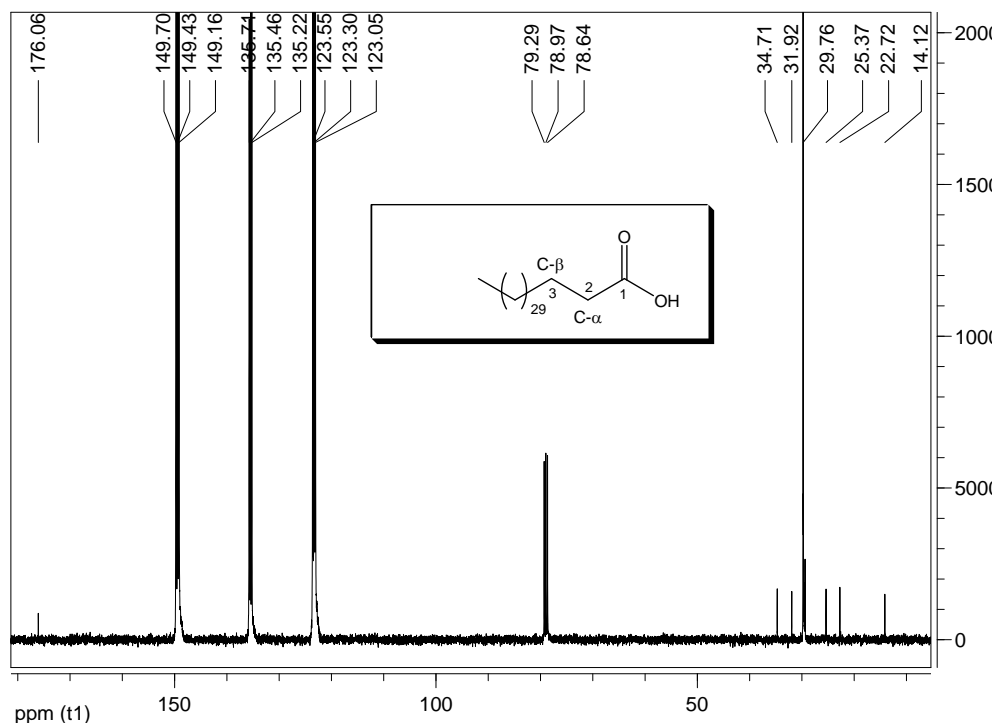


Figura 68: Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz) de **MD14** em CDCl_3 + piridina d_5 .

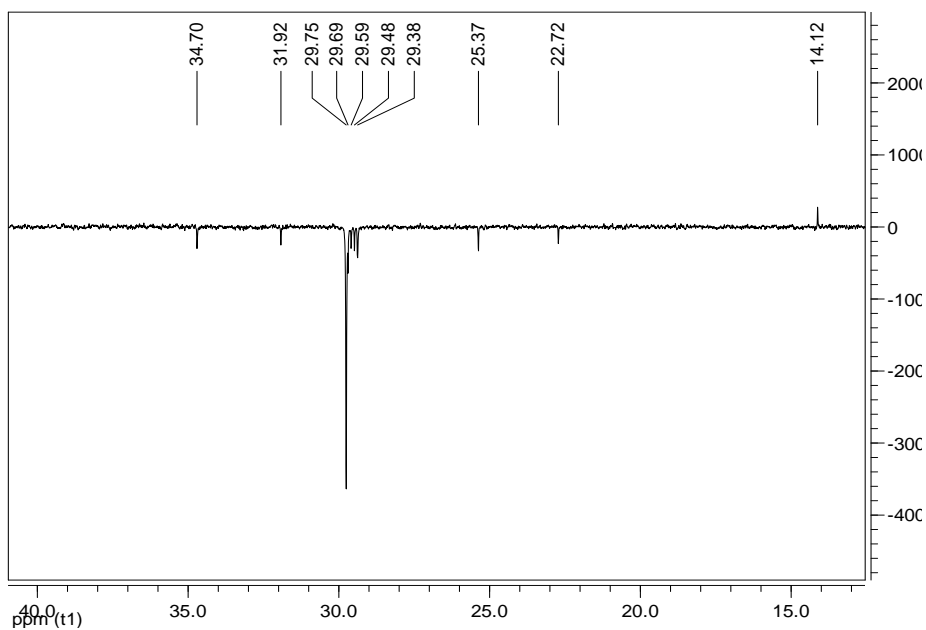


Figura 69: Subespectro DEPT135 (100 MHz) de **MD14** em CDCl_3 + piridina d_5 .

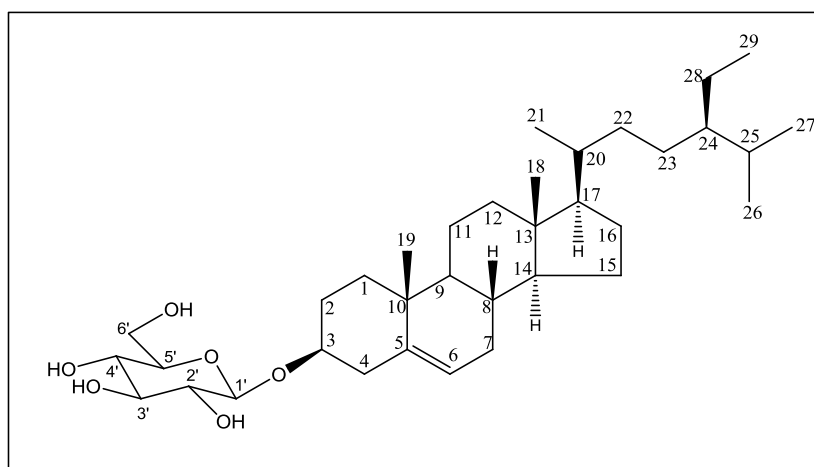
A partir da integração dos sinais de hidrogênio do espectro de RMN de ^1H foi possível sugerir que **MD14** possui uma cadeia alifática composta por 32 átomos de carbono. Os dados obtidos de RMN de ^{13}C foram comparados com os da literatura para o ácido hentriacontanóico ($\text{C}_{31}\text{H}_{62}\text{O}_2$) (SOUSA, 2012) (Tabela 37). Com os dados obtidos e baseando-se na integração do espectro de RMN de ^1H foi sugerido para **MD14** a estrutura do **ácido tritriacontanóico**.

Tabela 36: Comparação dos dados de RMN de ^{13}C de **MD14** com os dados da literatura para ácido hentriacontanóico (SOUSA, 2012)

Carbono	Tipo de carbono	δ_c^* de MD14	Carbono	δ_c^* (SOUSA, 2012)
1	C	176,06	1	176,05
2	CH_2	34,71	2	34,79
3	CH_2	31,92	3	32,03
4-30	CH_2	29,38-29,75	4-28	29,70
31	CH_2	25,37	29	25,48
32	CH_2	22,72	30	22,82
33	CH_3	14,12	31	14,22

Solvente: $^*\text{CDCl}_3$ + piridina- d_5

3.13 MD15: 3-O- β -D-glicosil- β -sitosterol



MD15 foi isolado de **ECL**, apresentando-se como um sólido branco cristalino, parcialmente solúvel em clorofórmio e faixa de fusão 278,6-280,2 °C.

O espectro na região do IV (Figura 70) de **MD15** mostra bandas de absorção em 3400 cm^{-1} , característica de estiramento de ligação OH de hidroxila, 2959-2850, 1463 e 1379 cm^{-1} , características de ligação simples CH, evidenciando a natureza alifática da substância. Uma banda fraca em 1630 cm^{-1} é característica de ligação dupla e bandas em 1165-1022 cm^{-1} foram atribuídas a estiramento de ligação CO de álcool.

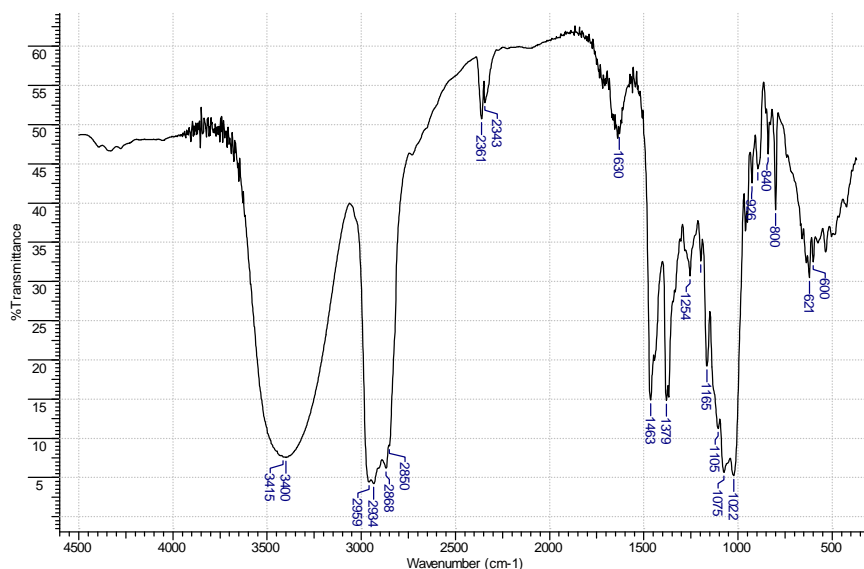


Figura 70: Espectro na região do IV de **MD15** (KBr).

O espectro de RMN de ^1H (Figura 71) apresenta sinais entre δ_{H} 0,95 e δ_{H} 0,66 atribuídos a seis grupos metila. Sinais entre δ_{H} 4,61 e δ_{H} 3,55 indicam a presença de várias hidroxilas na estrutura, sendo que o duplete em δ_{H} 4,61 ($J=7,6$ Hz) foi atribuído ao hidrogênio anomérico de glicose. O sinal em δ_{H} 5,30 foi atribuído ao hidrogênio olefínico H-6 do esteroide.

O espectro de RMN de ^{13}C (Figura 72, p. 96) mostra a presença de 36 sinais, sendo que seis deles se encontravam na região de carbono hidroxilado, sugerindo uma estrutura glicosilada. O sinal em δ_{C} 101,88 foi atribuído ao carbono anomérico C-1'. O sinal em δ_{C} 78,52 foi atribuído ao carbono do esteroide (C-3) ligado a oxigênio e os sinais em δ_{C} 121,78 e δ_{C} 140,53 foram atribuídos aos átomos de carbono olefínico em C-6 e C-5, respectivamente. A partir da análise do subespectro DEPT135 (Figura 73, p. 96) foi possível realizar a classificação dos átomos de carbono.

Os dados obtidos de RMN de ^{13}C foram comparados com os da literatura (RAI *et al.*, 2006) (Tabela 37, p. 97) e permitiram identificar **MD15** como sendo 3-O- β -D-glicosil- β -sitosterol. **MD15** foi isolado pela primeira vez de *Maytenus distichophylla*.

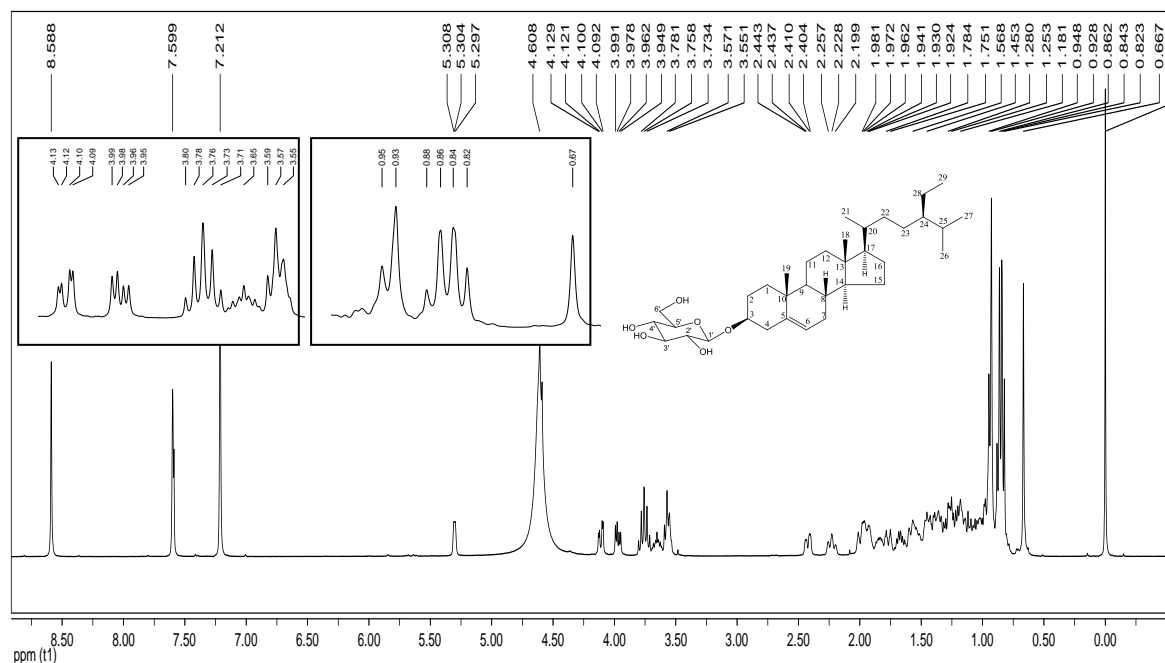


Figura 71: Espectro de RMN de ^1H (400 MHz) de **MD15** em CDCl_3 + piridina d_5 .

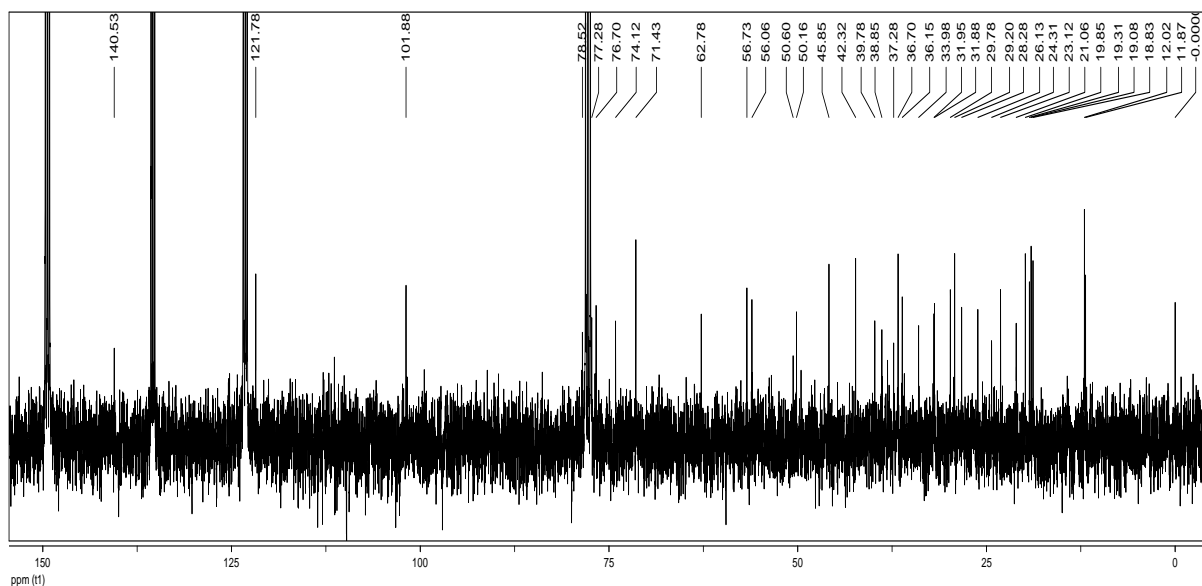


Figura 72: Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz) de **MD15** em CDCl_3 + piridina d_5 .

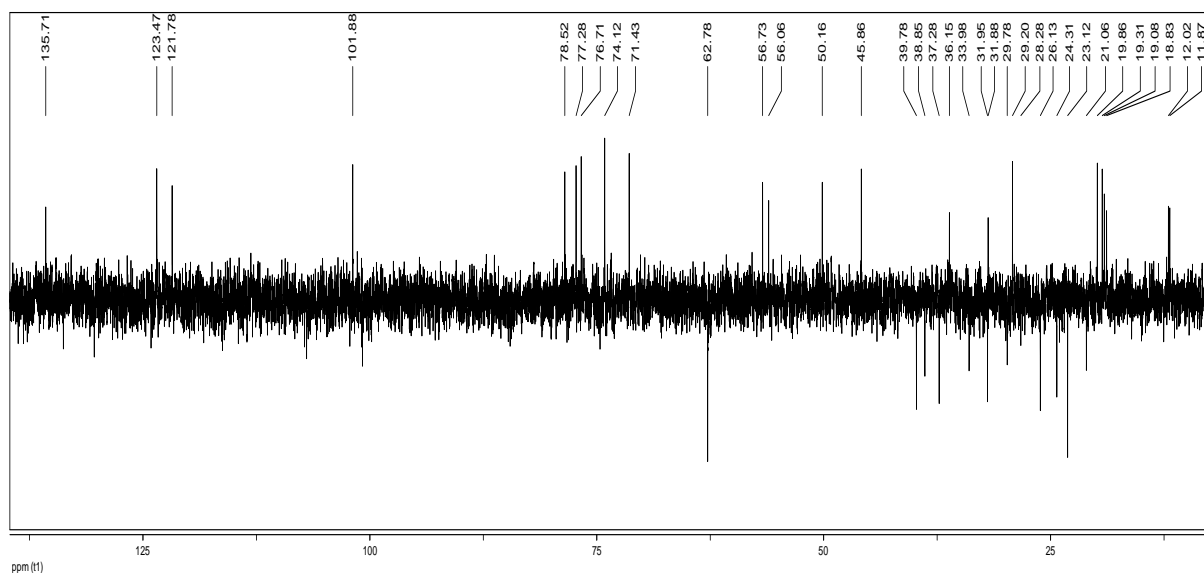


Figura 73: Subespectro DEPT135 (100 MHz) de **MD15** em CDCl_3 + piridina d_5 .

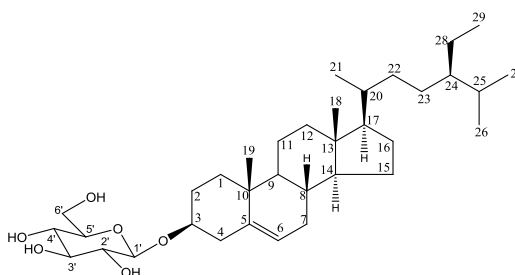
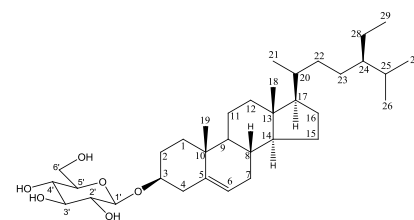


Tabela 37: Comparação dos dados de RMN de ^{13}C de **MD15** com os dados da literatura para 3-O- β -D-glicosil- β -sitosterol (RAI *et al.*, 2006)

Carbono	Tipo de carbono	δ_c^* de MD15	δ_c^{**} (RAI <i>et al.</i> , 2006)
1	CH ₂	37,28	37,47
2	CH ₂	29,78	30,23
3	CH	78,52	78,57
4	CH ₂	39,78	39,94
5	C	140,53	140,88
6	CH	121,78	121,91
7	CH ₂	31,95	32,17
8	CH	31,88	32,05
9	CH	50,16	50,33
10	C	36,70	36,92
11	CH ₂	21,06	21,28
12	CH ₂	38,85	39,32
13	C	42,32	42,47
14	CH	56,73	56,82
15	CH ₂	24,31	24,50
16	CH ₂	28,28	28,55
17	CH	56,06	56,23
18	CH ₃	11,87	11,99
19	CH ₃	19,31	19,43
20	CH	36,15	36,39
21	CH ₃	18,83	19,02
22	CH ₂	33,98	34,19
23	CH ₂	26,13	26,35
24	CH	45,85	46,03
25	CH	29,20	29,44
26	CH ₃	19,08	19,22
27	CH ₃	19,85	20,00
28	CH ₂	23,12	23,38
29	CH ₃	12,02	12,12
1'	CH	101,88	102,54
2'	CH	74,12	75,29
3'	CH	77,28	78,45
4'	CH	71,43	71,64
5'	CH	76,70	78,05
6'	CH ₂	62,78	62,80

Solvente: *CDCl₃ + piridina d₅ **piridina-d₅



4 – ESTUDO DA ATIVIDADE BIOLÓGICA

O estudo da atividade biológica neste trabalho compreende:

- Estudo da atividade antimicrobiana (antibacteriana e antifúngica)
- Estudo da atividade da capacidade de inibição da enzima acetilcolinesterase
- Estudo da atividade antioxidante
- Estudo da atividade antiparasitária

O teste antimicrobiano e o teste da capacidade de inibição da enzima acetilcolinesterase foram realizados no Laboratório de Biotecnologia e Bioensaios, no Departamento de Química da Universidade Federal de Minas Gerais, sob a coordenação da Professora Dr^a Jacqueline Aparecida Takahashi.

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

Os testes das atividades antiparasitárias (giardicida, tricomonocida e amebicida) foram realizados no Laboratório de Parasitologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, pela doutoranda Thaisa Helena Silva Fonseca e sob a coordenação da Professora Dr^a Maria Aparecida Gomes.

4.1 Atividade Antimicrobiana

Foram submetidos a testes de atividade antimicrobiana os extratos hexânico (EHE) e clorofórmico (ECL) e as substâncias isoladas: mistura de 3 β -esteariloxi-urs-12-eno (MD02) e 3 β -esteariloxi-olean-12-eno (MD03), 3-oxofriedelano (MD04), 3 β -hidroxifriedelano (MD05), mistura de 3 β -hidroxi-urs-12-eno (MD07) e 3 β -hidroxi-olean-12-eno (MD08), β -sitosterol (MD09), 3-oxo-30-hidroxifriedelano (MD10), 3 β ,24-dihidroxifriedelano (MD11) e 3-O- β -D-glicosil- β -sitosterol (MD15).

Os testes foram realizados com duas bactérias Gram-positivas, *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) e *Bacillus cereus* (ATCC 11778), duas bactérias Gram-negativas, *Escherichia coli* (ATCC 25922) e *Salmonella typhimurium* (ATCC 14028)

e a levedura *Candida albicans* (ATCC 18804). Os testes foram feitos utilizando o método da Concentração Inibitória Mínima (CIM).

4.1.1 Método da Mínima Concentração Inibitória

A Concentração Inibitória Mínima (CIM) é a menor concentração da amostra capaz de inibir pelo menos 50% do crescimento microbiano e é determinada pela medida da atividade de uma sequência decrescente de concentrações das amostras em um meio nutriente inoculado com a concentração padronizada do micro-organismo em teste.

4.1.1.1 Metodologia

Foi preparado um pré-inóculo no qual as bactérias e levedura estocadas foram transferidas, utilizando alça de platina, e inoculadas em tubo de ensaio contendo 3,0 mL de meio de cultura BHI (*Brain Heart Infusion*, Infuso de cérebro e coração). Os tubos foram então incubados em estufa a 37 °C por 18 h. Em seguida, 500 µL do pré-inóculo bacteriano foram transferidos para tubos de ensaio contendo 4,5 mL de água destilada estéril. Os tubos foram homogeneizados e a concentração ajustada comparando-se com o tubo 0,5 da escala de McFarland de turbidez padrão (10^8 UFC/mL), obtendo-se assim, os inóculos bacterianos utilizados no teste.

As amostras foram pesadas e solubilizadas em dimetilsulfóxido (DMSO), resultando em uma solução estoque com concentração de 50 mg/mL (extratos) e 12,5 mg/mL (constituintes isolados). As soluções de trabalho foram preparadas pela diluição de 40 µL da solução estoque em 960 µL de meio de cultura BHI.

Os testes foram realizados em placa de 96 micropoços, em duplicata. Em cada poço foram adicionados 100 µL do meio de cultura BHI. No primeiro poço foram adicionados também 100 µL da solução de trabalho. Após homogeneização 100 µL foram transferidos para o segundo poço e, assim, sucessivamente. Desprezaram-se os 100 µL finais do último poço. Essa microdiluição forneceu dez concentrações de cada amostra: 500,00, 250,00, 125,00, 62,500, 31,250, 15,625, 7,812, 3,900, 1,950 e 0,970 µg/mL. A seguir, 100 µL do inóculo do micro-organismo a ser testado foram adicionados a cada poço.

Foram realizados dois controles, um para controle de crescimento do micro-organismo, no qual não houve adição da solução de trabalho (para verificar a viabilidade celular) e o branco, em que não se adicionou o inóculo bacteriano (para se eliminar o efeito da coloração da solução de trabalho). Uma placa controle contendo 100 μ L de meio de cultura BHI e 100 μ L de água destilada estéril foi adicionada ao experimento como de controle de esterilidade do meio de cultura BHI. Para as bactérias, o controle positivo utilizado foi a ampicilina e para a levedura utilizou-se o miconazol.

As primeiras leituras das microplacas foram feitas após montagem do experimento (leitura a 0h) em leitor de placa de Elisa (492 nm). Em seguida as microplacas foram incubadas em estufa a 37 °C e, após 24 h, foi realizada nova leitura.

4.1.1.2 Discussão dos resultados

Tabela 38: Resultados dos testes antimicrobianos para os extratos (EHE e ECL) e substâncias testadas

Amostra	Mínima Concentração Inibitória (μ g/mL)				
	<i>S. aureus</i>	<i>B. cereus</i>	<i>S. typhimurium</i>	<i>E. coli</i>	<i>C. albicans</i>
EHE	> 500,0	62,5	> 500,0	> 500,0	> 500,0
ECL	0,97	> 500,0	> 500,0	> 500,0	> 500,0
MD02 + MD03	125,0	> 500,0	> 500,0	> 500,0	> 500,0
MD04	> 500,0	> 500,0	> 500,0	> 500,0	> 500,0
MD05	7,81	> 500,0	> 500,0	> 500,0	> 500,0
MD07 + MD08	0,97	> 500,0	> 500,0	> 500,0	> 500,0
MD09	> 500,0	> 500,0	> 500,0	> 500,0	> 500,0
MD10	> 500,0	> 500,0	> 500,0	> 500,0	> 500,0
MD11	500,0	> 500,0	> 500,0	> 500,0	> 500,0
MD15	> 500,0	> 500,0	> 500,0	> 500,0	> 500,0
Ampicilina	3,90	3,90	3,90	3,90	-
Miconazol	-	-	-	-	1,95

Os extratos e substâncias testadas não foram ativos frente aos micro-organismos *E. coli*, *S. typhimurium* e *C. albicans*, nas concentrações testadas.

O extrato **EHE** foi ativo frente *B. cereus* na concentração de 62,500 µg/mL. Nenhuma das substâncias, pura ou em mistura, foi ativa frente a essa bactéria, dessa forma a atividade de **EHE** pode ser devido a fatores sinérgicos.

O extrato **ECL** e a mistura de **MD07** e **MD08** apresentaram inibição frente à *S. aureus* na concentração 0,970 µg/mL, mais baixa que a menor concentração ativa da ampicilina (3,90 µg/mL). Esse micro-organismo teve seu crescimento inibido também pela mistura de **MD02** e **MD03** na concentração de 125,00 µg/mL, **MD05** na concentração 7,812 µg/mL e **MD11** na concentração de 500,00 µg/mL.

4.2 Bioensaio de inibição da acetilcolinesterase em microplaca empregando reagente de Ellman

A avaliação da atividade inibitória contra a enzima acetilcolinesterase pode ser realizada utilizando-se a metodologia de Ellman (ELLMAN *et al.*, 1961) adaptada por Rhee e colaboradores (2001). No ensaio utilizam-se a solução 5,5'-ditiobis-(ácido 2-nitrobenzóico), chamado de reagente de Ellman ou DTNB, iodeto de acetiltiocolina em tampão pH 8,00 e a enzima acetilcolinesterase. A acetiltiocolina é hidrolisada pela AChE produzindo tiocolina e ânion acetato. A tiocolina reage com o DTNB formando o composto TNB de coloração amarela, que pode ser detectado espectrometricamente (Figura 74, p.102). Quando um composto capaz de inibir a AChE está presente no meio reacional é observada variação da coloração amarela, devido a não formação ou diminuição da formação de TNB. O ensaio é feito em placas de 96 poços, utilizando-se um leitor de microplaca a 405 nm. Este método permite a avaliação quantitativa e determinação da porcentagem de inibição da AChE (TREVISAN *et al.*, 2006).

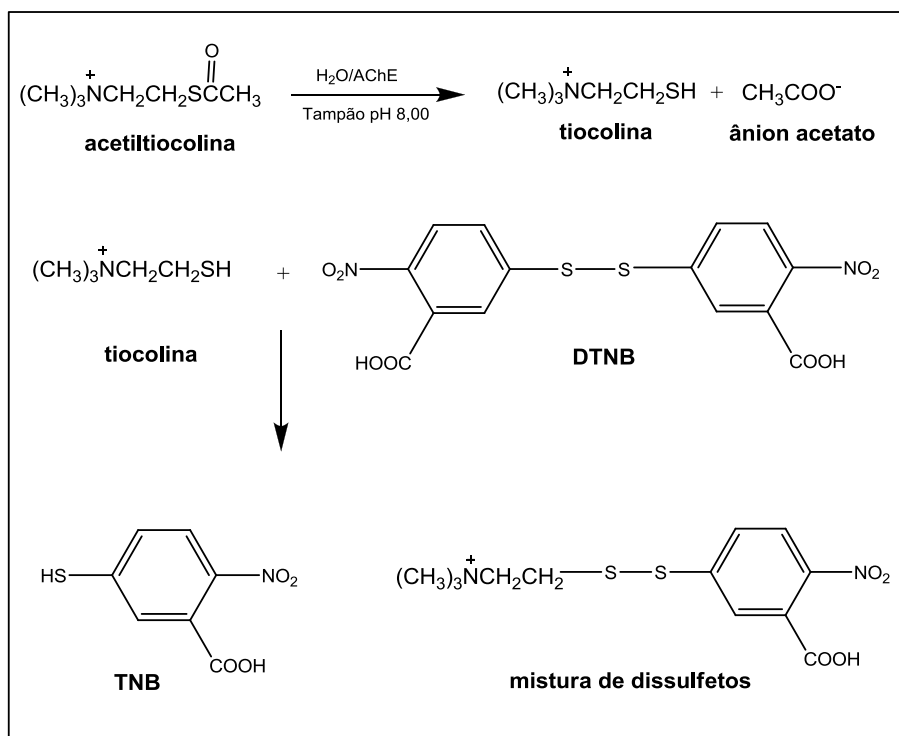


Figura 74: Reações químicas que ocorrem no Teste de Ellman.

Foram submetidos ao teste de inibição da acetilcolinesterase os extratos hexânico (**EHE**), clorofórmico (**ECL**) e o extrato de acetato de etila (**EAE**), e as substâncias isoladas: mistura de 3β -esteariloxi-urs-12-eno (**MD02**) e 3β -esteariloxi-olean-12-eno (**MD03**), 3-oxofriedelano (**MD04**), 3β -hidroxifriedelano (**MD05**), mistura de 3β -hidroxi-urs-1

2-eno (**MD07**) e 3β -hidroxi-olean-12-eno (**MD08**), β -sitosterol (**MD09**), 3-oxo-30-hidroxifriedelano (**MD10**), $3\beta,24$ -dihidroxifriedelano (**MD11**) e 3-O- β -D-glicosil- β -sitosterol (**MD15**).

4.2.1 Metodologia

Foram adicionados a cada poço da placa de Elisa 25 μL de solução de iodeto de acetiltiocholina 15 mmol/L, 125 μL da solução de DTNB 3 mmol/L em solução tampão (Tris/HCl 50 mmol/L, pH 8, contendo NaCl 0,1 mol/L e $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0,02 mol/L) e 50 μL de Tris/HCl 50 mmol/L com albumina sérica bovina 0,1% p/v. Adicionaram-se então 25 μL da solução da amostra testada (10 mg/mL) em DMSO. Para o preparo do branco adicionaram-se 25 μL da solução tampão Tris/HCl pH 8,0 ao invés da amostra testada. Da mesma forma, para o preparo do controle positivo

adicionaram-se 25 μ L da solução de eserina (10 mg/mL em tampão Tris/HCl pH 8,0). Cada teste foi realizado em quintuplicata. A absorbância foi medida a 405 nm a cada 1 min por 8 vezes (8 min no total). Adicionaram-se 25 μ L da solução de acetilcolinesterase (0,222 U/mL) em Tris/HCl aos poços. Mediu-se a absorbância a 405 nm por 10 vezes (10 min no total). O aumento da absorbância devido à hidrólise espontânea do substrato foi corrigido fazendo a subtração da média dos valores da primeira e segunda leitura (média 2ª medida – média 1ª medida).

4.2.2 Discussão dos resultados

Todas as amostras testadas, exceto **MD15**, apresentaram capacidade de inibição da enzima AChE (Tabela 39, p. 103). Os extratos **ECL** e **EHE**, e a substância **MD09** apresentaram 100% de inibição da enzima. **MD04**, **MD05**, **MD10** e **MD11** apresentaram porcentagens de inibição maiores que 95%. A mistura de **MD02** e **MD3** apresentou 90,86% de inibição, a mistura de **MD07** e **MD08** apresentou 83,73% e o extrato **EAE** mostrou 72,92% de inibição de AChE.

Tabela 39: Resultados do teste de inibição da enzima AChE em microplaca

Amostra	Média de inibição (%)	DP*	CV**
EHE	100,00	2,19	0,02
ECL	100,00	-	-
EAE	72,92	4,31	0,06
MD02 + MD03	90,86	1,20	0,01
MD04	97,03	1,58	0,02
MD05	98,51	2,11	0,02
MD07 + MD08	83,73	0,95	0,01
MD09	100,00	0,93	0,01
MD10	96,05	3,35	0,04
MD11	99,05	1,12	0,01
MD15	0,00	0,00	0,00
Eserina	92,18	0,89	0,01

* DP – Desvio padrão ** CV – Coeficiente de variação

Os resultados indicam que as amostras testadas, exceto **MD15**, são promissoras e devem ser submetidas a testes mais precisos para confirmação da capacidade de inibição da enzima AChE. Conforme Trevisan e colaboradores (2003), extratos que apresentam inibição maior do que 50% são considerados candidatos a novos testes, na busca de novos fármacos para o tratamento da doença de Alzheimer.

Os resultados das replicatas de **ECL** foram maiores do que 100% e apresentaram grande variância, entre 102,58 a 666,59%. Esses dados inviabilizam a quantificação da inibição, mas permitem concluir que **ECL** apresenta capacidade de inibição da enzima AChE. Torna-se necessária a reanálise desse extrato para a determinação quantificada de sua capacidade inibitória da enzima AChE.

4.3 Bioensaio para determinação da atividade antioxidante

O radical estável 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH) tem sido muito usado para avaliar a capacidade de antioxidantes naturais em sequestrar elétrons nos radicais livres. Por ação de um antioxidante ou uma espécie radicalar, o DPPH, de coloração púrpura e que absorve em um comprimento de onda de 517 nm, é reduzido formando 2,2-difenilpicril-hidrazina (DPPH-H), de coloração amarela, com consequente desaparecimento da banda de absorção, sendo a mesma monitorada pelo decréscimo da absorbância (OLIVEIRA *et al.*, 2009). A partir dos resultados obtidos, determina-se a porcentagem de atividade antioxidante (quantidade de DPPH consumida pelo antioxidante) ou sequestradora de radicais e/ou a porcentagem de DPPH remanescente no meio reacional. Este é um dos métodos mais usados para verificar a capacidade antioxidante.

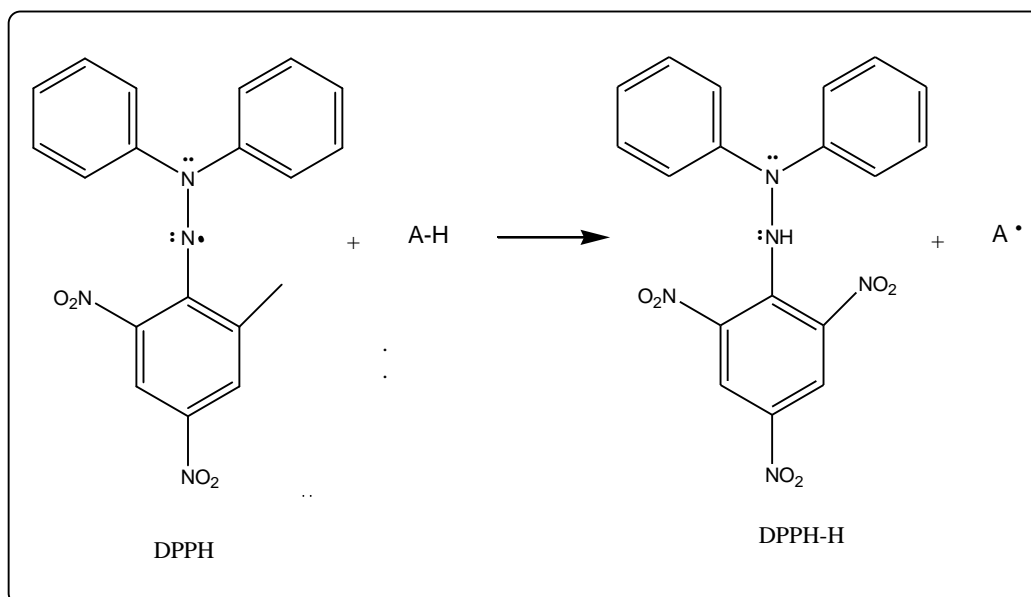


Figura 75: Estrutura do DPPH antes e depois da reação com o antioxidante.

Foram submetidos ao teste de atividade antioxidante o extrato clorofórmico (**ECL**) e o extrato em acetato de etila (**EAE**).

4.3.1 Metodologia

A solução de trabalho foi preparada pela diluição de 1,0 mg de extrato em 1,0 mL de metanol grau HPLC. A partir dessa solução foram realizadas diluições de forma a obter outras cinco soluções de concentrações diferentes: 500,00, 250,00, 125,00, 62,500 e 31,250 µg/mL.

Foram adicionados 250 µL de solução metanólica de DPPH (0,004% p/v) e 10 µL de solução do extrato, em diferentes concentrações, em placas de 96 micropoços. Foram testadas 5 concentrações e cada uma foi testada em triplicata. A placa foi incubada por 30 minutos à temperatura ambiente, na ausência de luz. O mesmo procedimento foi realizado para o ácido gálico, catequina e vitamina E, como controles positivos. Para o preparo do branco não houve adição do extrato e o metanol foi utilizado para correção da linha de base. A solução de DPPH foi preparada no dia do experimento, guardada em frasco coberto com folha de alumínio e mantida em ausência de luz à 4° C. O percentual de decréscimo na

absorbância foi medido para cada concentração e a capacidade de sequestrar radicais livres foi calculada com base no decréscimo da absorbância observada. As leituras foram feitas a 517 nm. A capacidade de sequestrar radicais livres foi expressa como percentual de inibição de oxidação do radical e calculado conforme a Equação 1:

$$\% \text{ inibição} = (A_{\text{DPPH}} - A_{\text{EXTR}}) / A_{\text{DPPH}} * 100 \quad (1)$$

onde A_{DPPH} é a absorbância da solução de DPPH e A_{EXTR} é a absorbância da amostra em solução, calculado pela diferença com seu branco ($A_{\text{EXTR}} = A_{\text{Amostra}} - A_{\text{Branco}}$).

4.3.2 Discussão dos resultados

Os resultados do teste antioxidante estão apresentados na Tabela 40 (p.106) e a comparação dos valores encontrados para os extratos e padrões é ilustrada nas Figuras 75 e 76, p.106 e 107.

Tabela 40: Resultados do teste antioxidante

Concentração ($\mu\text{g/mL}$)	Média de inibição (%)				
	ECL	EAE	Vit-E	Ác. gálico	Catequina
31,25	0,43	5,41	5,08	63,64	12,06
62,50	0,00	2,04	12,36	87,51	24,40
125,00	0,00	59,83	35,54	86,92	19,42
250,00	0,50	87,44	58,97	87,00	39,12
500,00	2,51	86,91	88,07	87,65	63,81
1000,00	4,52	86,65	87,52	86,60	86,46

O extrato em acetato de etila (**EAE**) apresentou atividade antioxidante (expressa como inibição de oxidação do radical) superior a 85% a partir da concentração 250 $\mu\text{g/mL}$. Esse resultado indica uma capacidade de inibição de

oxidação maior do que a vitamina E e catequina usados como padrões e, a partir da concentração de 250 $\mu\text{g/mL}$, apresenta valores bastante similares ao do ácido gálico, que apresenta as maiores porcentagens de inibição da oxidação.

O extrato clorofórmico não apresentou atividade antioxidante nas concentrações testadas.

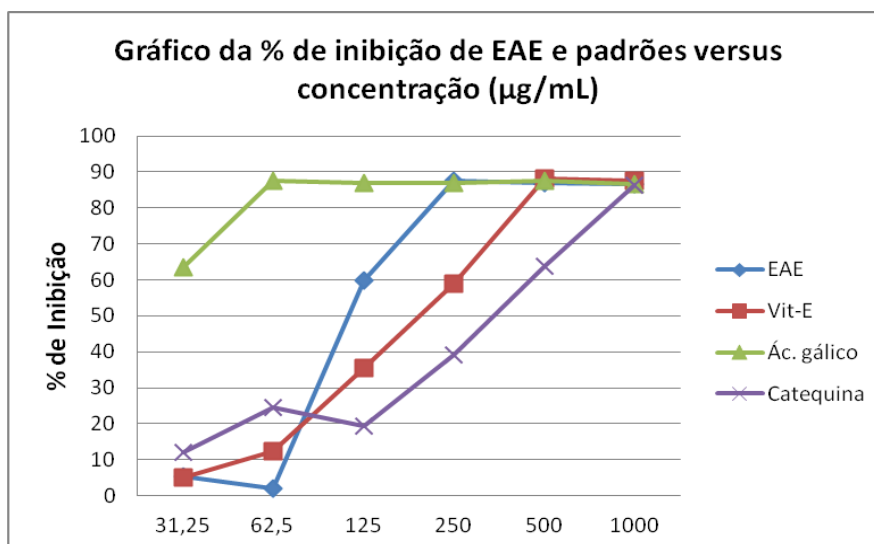


Figura 76: Gráfico da atividade antioxidante de **EAE** e padrões versus concentração.

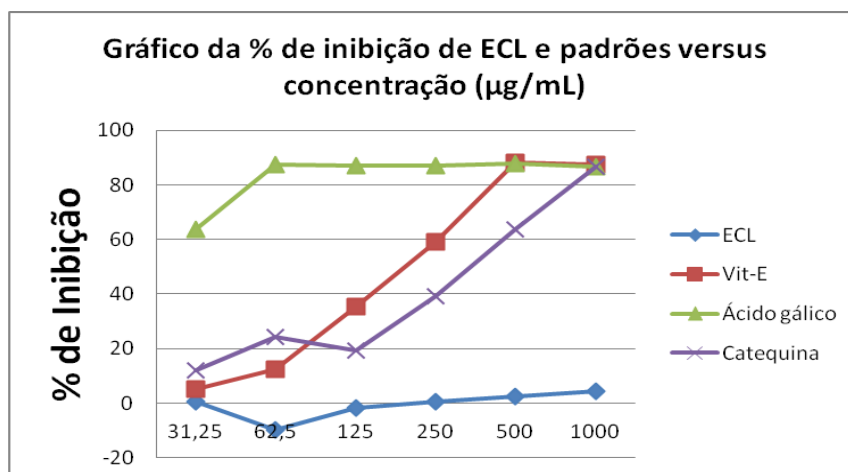


Figura 77: Gráfico da atividade antioxidante de **ECL** e padrões versus concentração.

4.4 Atividade antiparasitária

Foram submetidos a testes de atividade antiparasitária os extratos hexânico (EHE) e clorofórmico (ECL) e as substâncias isoladas: mistura de 3β -esteariloxi-urs-12-eno (MD02) e 3β -esteariloxi-olean-12-eno (MD03), 3-oxofriedelano (MD04), 3β -hidroxifriedelano (MD05), mistura de 3β -hidroxi-urs-12-eno (MD07) e 3β -hidroxiolean-12-eno (MD08), β -sitosterol (MD09), 3-oxo-30-hidroxifriedelano (MD10), $3\beta,24$ -dihidroxifriedelano (MD11) e 3-O- β -D-glicosil- β -sitosterol (MD15).

Os testes foram realizados utilizando-se os parasitas *Entamoeba histolytica*, *Giardia lamblia* e *Trichomonas vaginalis*, todos na fase trofozoíto. Foi realizado um teste tipo “screening” com os extratos brutos e substâncias isoladas para determinar quais possuíam efeitos sobre a viabilidade e/ou vitalidade dos protozoários. Os compostos que apresentassem atividade contra algum parasito seriam submetidos a um teste mais completo para determinação da IC50.

4.4.1 Metodologia

Os extratos e substâncias (1,0 a 5,0 mg) foram dissolvidas em 0,5 mL de DMSO obtendo-se soluções estoques de concentrações variando entre 0,12 e 0,40 mg/mL. Alíquotas de 200 μ L dessas soluções foram diluídas em 5,0 mL de meio de cultura YI-S-32, no caso de *Entamoeba histolytica* (cepa EGG) e *Trichomonas vaginalis* (cepa JT), e TYIS-33, para teste com *Giardia lamblia* (cepa BHR93). As soluções foram filtradas em uma membrana esterilizante de nitrocelulose de 0,2 μ m e, então, adicionadas aos tubos de vidro contendo trofozoítos em culturas axênicas.

Foram transferidos $2,4 \times 10^5$ trofozoítos de *E. histolytica*, $6,0 \times 10^4$ trofozoítos de *Trichomonas vaginalis* e $1,2 \times 10^5$ trofozoítos de *G. lamblia* em fase logarítmica de crescimento, separadamente, em tubos de vidro contendo meio para um volume final de 6 mL. Em seguida, foram adicionados os compostos, associados individualmente, na concentração de 50 μ mol/L. Os tubos foram incubados em estufa bacteriológica a 37 °C. A avaliação foi feita após 24 h e 48 h.

A viabilidade foi determinada qualitativamente observando-se a mobilidade e aderência dos trofozoítos em microscópio invertido e a vitalidade foi avaliada através

da quantificação em Câmara de Neubauer, utilizando a técnica de contagem de leucócitos adaptada (CARVALHO E SILVA, 1988).

Como controles negativos foram utilizados o meio de cultura e DMSO e, como controle positivo, foi utilizado o Metronidazol. Todos os ensaios foram realizados em triplicatas e repetidos pelo menos duas vezes.

Para a realização da quantificação do número de trofozoítos/mL de suspensão foi empregada a Equação 2:

$$Z = Fc \times Fd \times Y \quad (2)$$

onde:

Z = número de trofozoítos por mililitro (mL) de suspensão,

Fc = fator de correção da Câmara de Neubauer (2.500),

Fd = fator de diluição utilizado durante a contagem e

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

4.4.2 Resultado do screening

Nenhum dos extratos e substâncias testadas apresentou inibição frente aos protozoários *Entamoeba histolytica*, *Giardia lamblia* e *Trichomonas vaginalis*. É importante ressaltar que o teste realizado trata-se apenas de uma triagem inicial em que apenas uma concentração das substâncias foi testada.

CONCLUSÃO

Neste trabalho foi realizado o estudo fitoquímico dos extratos hexânico e clorofórmico das folhas de *Maytenus distichophylla* (Celastraceae), coletadas em Jequié, Bahia, Brasil. Os extratos e substâncias isoladas foram testados quanto ao potencial antimicrobiano frente às bactérias *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Escherichia coli* e *Salmonella typhimurium*, o fungo *Candida albicans* e os parasitas *Entamoeba histolytica*, *Giardia lamblia* e *Trichomonas vaginalis*. Além disso, foi realizado teste para avaliação do potencial de inibição da acetilcolinesterase. O extrato clorofórmico e acetato de etila foram testados quanto ao potencial antioxidante utilizando DPPH.

O estudo fitoquímico dos extratos levou ao isolamento e caracterização de treze substâncias puras e/ou misturas: mistura de 3β -esteariloxi-urs-12-eno e 3β -esteariloxi-olean-12-eno, 3-oxofriedelano, 3β -hidroxifriedelano, mistura de 3β -hidroxil-urs-12-eno e 3β -hidroxil-olean-12-eno, β -sitosterol, 3-oxo-30-hidroxifriedelano, $3\beta,24$ -dihidroxifriedelano, 3-O- β -D-glicosil- β -sitosterol, mistura de álcoois graxos, ácido tritriacontanóico, acetato de sódio, esqualeno e guta-percha. As substâncias e/ou misturas foram caracterizadas a partir de seus espectros no IV, RMN de 1D e 2D e por CG/EM. As substâncias $3\beta,24$ -dihidroxifriedelano, β -sitosterol, 3-O- β -D-glicosil- β -sitosterol, mistura de 3β -esteariloxi-urs-12-eno e 3β -esteariloxi-olean-12-eno, mistura de 3β -hidroxil-urs-12-eno e 3β -hidroxil-olean-12-eno, mistura de álcoois graxos, ácido tritriacontanóico, acetato de sódio, esqualeno e guta-percha foram descritos pela primeira vez como constituintes de *Maytenus distichophylla*.

O extrato em acetato de etila apresentou atividade antioxidante e nenhum dos extratos e substâncias isoladas apresentou atividade antiparasitária.

O teste antimicrobiano (antibacteriano e antifúngico) mostrou que o extrato hexânico foi ativo frente *B. cereus* e o extrato clorofórmico, mistura de 3β -esteariloxil-urs-12-eno e 3β -esteariloxil-olean-12-eno, mistura de 3β -hidroxil-urs-12-eno e 3β -hidroxil-olean-12-eno, 3β -hidroxifriedelano e $3\beta,24$ -dihidroxifriedelano apresentaram atividade biológica frente à *S. aureus*.

Os extratos e as substâncias 3-oxofriedelano, 3β -hidroxifriedelano, 3-oxo-30-hidroxifriedelano, $3\beta,24$ -dihidroxifriedelano, mistura de 3β -esteariloxil-urs-12-eno e

3β -esteariloxi-olean-12-eno, mistura de 3β -hidroxi-urs-12-eno e 3β -hidroxi-olean-12-eno e β -sitosterol apresentaram alta capacidade de inibição da enzima acetilcolinesterase.

Esse trabalho colabora para o estudo quimiotaxonômico de espécies da família Celastraceae e mostra como essas plantas são importantes fontes de metabólitos secundários com potencial atividade biológica, importantes para a busca e desenvolvimento de novos fármacos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

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

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, M. G. L.; Paula-Souza, J.; Graef, C. F. F.; Scalon, V.; Santos, A. C. P.; Salimena, M. F., Monte-Mor, R. L. M. Biodiversidade, uso tradicional de plantas medicinais e produção de fitoterápicos em Minas Gerais. **2010**.
www.cedeplar.ufmg.br/seminarios/seminario_diamantina/2010/D10A022.pdf

Carvalho, M. G.; Silva, M. B. S. Hematologia: técnicas laboratoriais e interpretação. Imprensa Universitária, Belo Horizonte, 139, **1988**.

Carvalho-Okano, R. M. *Maytenus littoralis* Carvalho-Okano (Celastraceae), uma nova espécie para o Brasil. *Hoehnea*, 32 (3), p. 467-469, **2005**.

Castellano, J. M.; Guinda, A.; Delgado, T.; Rada, M.; Cayuela, J. A.. Biochemical basis of the antidiabetic activity of oleanolic acid and related pentacyclic triterpenes. *Diabetes*, 62, p. 1791-1799, **2013**.

Costa, P. M.; Carvalho, M. G. New triterpene isolated from *Eschweilera longipes* (Lecythidaceae). *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, 75, p. 21-25, **2003**.

Cunha, E. F. F.; Ramalho T. C.; Mancini D. T.; Fonseca E. M. B.; Oliveira A. A. New approaches to the development of anti-protozoan drug candidates: a review of patents. *Journal Chemical Society*, 21 (10), p. 1787-1806, **2010**.

Deepa, M. A.; Bai, V. N. Bioinsecticidal compounds of Celastraceae-the spindle tree family. *International Journal of Botany*. 6(3), p. 220-227, **2010**.

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

Duarte, M. C.; Tavares, J. F.; Madeiro S. A. L.; Costa, V. C. O; Filho, J. M. B.; Agra, M. F.; Filho, R. B.; Silva, M. S. Maytensifolone, a new triterpene from *Maytenus distichophylla* Mart. ex Reissek. *Journal Brazilian Chemical Society*, 24 (10), p. 1697-1700, **2013**.

Ellman, G. L.; Courtney, K. D.; Andres, Jr., V.; Featherstone, R. M. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochemical Pharmacology*, 7, p. 88-95, **1961**.

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**.

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

González-Coloma, A.; López-Balboa, C.; Santana, O.; Reina, M.; Fraga, B. M.. Triterpene-based plant defenses. *Phytochemistry Reviews*, 10, p. 245–260, **2011**

Gordaliza, M. Natural products as leads to anticancer drugs. *Educational series – Clinical and Translation Oncology*, 9, p. 767-776, **2007**.

Guido, R. V. C; Andricopulo A.D.; Oliva, G. Planejamento de fármacos, biotecnologia e química medicinal: aplicações em doenças infecciosas. *Estudos Avançados*, 24 (70), p. 81-98, **2010**.

Guimarães, D. O.; Momesso, L. S.; Pupo, M. T. Antibióticos: importância terapêutica e perspectivas para a descoberta e desenvolvimento de novos agentes. *Química Nova*, 33(3), p. 667-679, **2010**.

Kirkcaldy, R. D.; Augostini, P.; Asbel, L. E.; Bernstein, K. T.; Kerani, R. P.; Mettenbrink, C. J.; Pathela, P.; Schwebke, J. R.; Secor, W. E.; Workowski, K. A.; Davis, D.; Braxton, J.; Weinstock, H. S. *Trichomonas vaginalis* antimicrobial drug resistance in 6 US cities, STD, Surveillance Network, p. 2009-2010. *Emerging Infectious*, 18(6), p. 939-943, **2012**.

Leos-Rivas, C.; Verde-Star, M. J.; Torres, L. O.; Oranday-Cardenas, A.; Rivas-Morales, C.; Barron-Gonzalez, M. P.; Morales-Vallarta, M. R.; Cruz-Veja, D. E. *In vitro* amoebicidal activity of borage (*Borago officinalis*) extract on *Entamoeba histolytica*. *Journal of Medicinal Food*, 14 (7/8), p. 866-869, **2011**.

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**.

Maciel, G. P. ; Tasca, T. ; De Carli, G. A. Aspectos clínicos, patogênese e diagnóstico d *Trichomonas vaginalis*. *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial*, 40 (3), p. 152-160, **2004**.

Magalhães, C. G.; Ferrari, F. C.; Guimarães, D. A. S.; Silva, G. D. F.; Duarte, L. P.; Figueiredo, R. C.; Filho, S. A. V.. *Maytenus salicifolia*: triterpenes isolated from stems and antioxidant property of extracts from aerial parts. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*, 21(3), p. 415-419, **2011**.

Mahato, S. B.; Kundu, A. P. ^{13}C NMR spectra of pentacyclic triterpenoids – a compilation and some salient features. *Phytochemistry*, 37, p. 1517-1575, **1994**.

Matos, F. J. A. Introdução a Fitoquímica Experimental. UFC, Fortaleza, 129, **1980**.

McChesney, J. D.; Venkataraman, S. K.; Henry, J. T. Plant natural products: Back to the future or into extinction? *Phytochemistry*, 68, p. 2015–2022, **2007**.

Medeiros, V. M.; Filho, J. G. S.; Lucio, A. S. S. C.; Tavares, J. F.; Maia, G. L. A.; Lima, E. O.; Barbosa-Filho, J. M.; Silva, M. S. Chemical composition and antimicrobial activity of essential oil from leaves of *Maytenus obtusifolia* Mart. (Celastraceae). *Journal of Essential Oil Research*, 22, p. 466-469, **2010**.

Newman, D. J.; Cragg, G. M. Natural products as sources of new drugs over the 30 years from 1981 to 2010. *Journal of Natural Products*, 75, p. 311–335, **2012**.

Niero, R.; Andrade, S. F.; Filho, V. C. A review of the ethnopharmacology, phytochemistry and pharmacology of plants of the *Maytenus Genus*. *Current Pharmaceutical Design*, 17, p. 1851-1871, **2011**.

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

Oliveira, 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**.

Oliveira, D. M.. Estudo químico, farmacológico e aplicação de métodos computacionais na elucidação estrutural de constituintes químicos de folhas de *Maytenus acanthophylla* REISSEK (CELASTRACEAE). Tese de Doutorado. Departamento de Química. Universidade Federal de Minas Gerais. Belo Horizonte, Minas Gerais. **2012**.

Pavia, D. L.; Lampman, G. M., Kriz, G. S. Introdução à espectroscopia, 4ª edição. Rio de Janeiro: Ed. Guanabara Koogan S.A. **2005**.

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**.

Qian, K.; Kuo, R. Y.; Chen, C. H.; Huang, L.; Morris-Natschke, S. L.; Lee, K. H.. Anti-AIDS Agents 81. Design, synthesis, and structure-activity relationship study of betulinic acid and moronic acid derivatives as potent HIV maturation inhibitors. *Journal of Medicinal Chemistry*, *53*, p. 3133–3141, **2010**.

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

Rai, N. P.; Adhikari, B. B.; Paudel, A.; Masuda, K.; Mckelvey, R. D.; Manandhar, M. D. Phytochemical constituents of the flowers of *Sarcococca coriacea* of Nepalese origin. *Journal of Nepal Chemical Society*, *21*, **2006**.

Reyes, C. P.; Núñez, M. J.; Jiménez, I. A.; Busserolles, J.; Alcaraz, M. J.; Bazzocchi, I. L.. Activity of lupane triterpenoids from *Maytenus* species as inhibitors of nitric oxide and prostaglandin E2. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, *14*(5), p. 1573-1579, **2006**.

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

Rodrigues, V. G.; Duarte, L. P.; Silva, G. D. F; Silva, F. C.; Góes, J. V.; Takahashi, J. A.; Pimenta, L. P. S. Evaluation of antimicrobial activity and toxic potential of extracts

and triterpenes isolated from *Maytenus imbricata*. *Quimica Nova*, 35(7), p. 1375-1380, **2012**.

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

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

Savoia, D. Plant-derived antimicrobial compounds: alternatives to antibiotics. *Future Microbiology*, 7(8), p. 979-990, **2012**.

Seidl, C. Pesquisa de substâncias naturais inibidoras da acetilcolinesterase. Dissertação de Mestrado. Ciências Farmacêuticas. Universidade Federal do Paraná. Curitiba, Paraná, **2010**.

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, M. S. S. Alcaloides de plantas da família Amaryllidaceae: isolamento, caracterização e testes de inibição de acetilcolinesterase. Tese de Doutorado. Instituto de Química. Universidade Estadual de Campinas. Campinas, São Paulo, **2009**.

Silva, F. C.; Duarte, L. P.; Silva, G. D. F.; Filho, S. A. V.; Lula, I. S.; Takahashi, J. A.; Sallum, W. S. T. Chemical constituents from branches of *Maytenus gonoclada* (Celastraceae) and evaluation of antimicrobial activity *Journal Brazilian Chemical Society*, 22(5), p. 943-949, **2011**.

Simmons, M. P.; Cappa, J. J.; Archer, R. H.; Ford, A. J.; Eichstedt, D.; Clevinger, C. C.. Phylogeny of the Celastraceae (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**.

Sosa, S.; Morelli, C. F.; Tubaro, A.; Cairoli, P.; Speranza, G.; Manitto, P.. Anti-inflammatory activity of *Maytenus senegalensis* root extracts and of maytenoic acid. *Phytomedicine*, 14, p. 109–114, **2007**.

Sousa, G. F. Estudo fitoquímico do extrato hexânico e da atividade biológica de constituintes de *Maytenus robusta* (Celastraceae). Dissertação de Mestrado. Departamento de Química. Universidade Federal de Minas Gerais. Belo Horizonte, Minas Gerais, **2012**.

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**.

Takahashi, J.; Lucas, E. M. F. Ocorrência e diversidade estrutural de metabólitos fúngicos com atividade antibiótica. *Química Nova*, 31(7), p. 1807-1813, **2008**.

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

Trevisan, M.T.S. et al. Atividades larvicida e anticolinesterásica de plantas do gênero *Kalanchoe*. *Química Nova*, 29, p. 415-418, **2006**.

Viegas, F. P. D.; Simões, M. C. R.; Rocha, M. D.; Castelli, M. R.; Moreira, M. S.; Viegas Junior, C. Doença de Alzheimer: caracterização, evolução e implicações do processo neuroinflamatório. *Revista Virtual de Química*, 3(4), p. 286-306, **2011**.

Xiong J.; Kashiwada Y.; Chen C.H., Qian K.; Natschke S. L. M., Lee K. H.; Takaishi Y.. Conjugates of betulin derivatives with AZT as potent anti-HIV agents. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 18, p. 6451–6469, **2010**.