

UFMG/ICEx/DQ.1096<sup>a</sup>  
D. 499<sup>a</sup>

**VANESSA GREGÓRIO RODRIGUES**

**ESTUDO FITOQUÍMICO, BIOLÓGICO E DE ATIVIDADES  
ANTIOXIDANTE E INIBITÓRIA DA ACETILCOLINESTERASE  
DE *Salacia crassifolia* E *Maytenus imbricata***

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

**Belo Horizonte**  
**2015**

Rodrigues, Vanessa Gregório  
ESTUDO FITOQUÍMICO, BIOLÓGICO E DE ATIVIDADES  
ANTIOXIDANTE E INIBITÓRIA DA ACETILCOLINESTERASE DE  
*Salacia crassifolia* E *Maytenus imbricata*  
/ Vanessa Gregório Rodrigues. 2015.  
182f.: il.

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

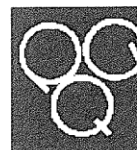
Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Minas  
Gerais. Departamento de Química.

1 - Química orgânica. 2 - Fitoquímica. 3 -  
Celastraceae. 4 - *Maytenus imbricata*. 5 - *Salacia  
crassifolia*.

I - Título II - Orientador

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, Biológico e de Atividades Antioxidante e Inibitória da  
Acetilcolinesterase de *Salacia crassifolia* e *Maytenus imbricata*"

Vanessa Gregório Rodrigues

Tese aprovada pela banca examinadora constituída pelos Professores:

Prof. Lucienir Pains Duarte - Orientadora  
UFMG

Prof. Gracia Divina de Fátima Silva - Coorientadora  
UFMG

Prof. Henriete da Silva Vieira  
UFMG

Prof. Antônio Flávio de Carvalho Alcântara  
UFMG

Prof. Dâmaris Silveira  
UnB

Prof. Antônio Jacinto Demuner  
UFV

Belo Horizonte, 24 de julho de 2015.

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



O trabalho descrito nesta tese foi desenvolvido sob a colaboração do professor Doutor Sidney Augusto Vieira Filho.

Dedico este trabalho aos meus pais Antônio e Jadna, e ao meu marido Félix Júnior.

Lembre da minha ordem: “Seja forte e corajoso! Não fique desanimado, nem tenha medo, porque eu, o Senhor, Seu Deus, estarei com você em qualquer lugar para onde você for!” (Josué 1, 1-9)

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço a Deus e a Nossa Senhora, pela minha vida e por guiar meus passos. “O Senhor é meu Pastor e Nada me Faltará”!

Aos meus pais pelo amor, carinho, confiança e religiosidade que me impulsiona sempre a ficar mais perto de Deus. Vocês são exemplos de Fé e sabedoria! É me abastecer de energia positiva, visitá-los. Que Deus proteja vocês! Obrigada por tudo!!! Saibam que meu amor por vocês é inexplicável!

Ao meu marido Félix pelos momentos juntos, que são tão especiais e felizes! Estar ao seu lado, é diversão, risada e alegria... é a melhor parte do dia! Obrigada por me tornar uma pessoa melhor, por ser tão maravilhoso. Meu grande companheiro, eu te amo demais e agradeço por tudo que faz por mim.

À minha orientadora Dr<sup>a</sup>. Lucienir Pains Duarte, pelos ensinamentos, dedicação e amizade. Lu é uma excelente pessoa, que preocupa com os alunos, ajudando-os a superar os problemas. Orientadora como você, é difícil de encontrar! Obrigada pelo incentivo que tem me dado para eu dar aula, pois hoje estou muito feliz em finalizar mais uma etapa da minha vida, defendendo a tese, e ao mesmo tempo em confirmar que quero mesmo ser professora e estou me espelhando em você!

À minha coorientadora Dr<sup>a</sup>. Grácia Divina de Fátima Silva, pela orientação, pela ajuda e tranquilidade que nos proporciona. Agradeço também por cuidar de mim quando alguns problemas surgiram.

Ao meu colaborador Professor Dr. Sidney Augusto Vieira Filho (Bibo), pela amizade, ajuda, ensinamentos e por ser tão generoso.

Ao retratinho, meu padrinho Fernando Silva, pelas bênçãos, carinho e abraços. Obrigada pela grande amizade, paciência e contribuir para minha formação acadêmica. Você é muito importante na minha vida.

Aos meus irmãos Patrícia, Fabiana e Breno pela alegria dos nossos momentos juntos!!! Essa união de amor, cumplicidade e confiança me torna abençoada! Obrigada por existirem e serem presentes! Amo vocês irmãos!

## Agradecimentos

---

Aos meus sobrinhos Ana Luísa, Bernardo, Bianca, Brenda e Isabela, pelo carinho que têm com a Tia Vanessa. Amores da minha vida, é uma alegria imensa estar com vocês!

Aos cunhados Cristiano, Joana e Leonardo, por completar nossa família e amar e cuidar dos meus queridos irmãos.

Aos meus sogros Matilde e Felix, e minha querida cunhada (Laura), agradeço por serem a minha nova e linda família, pelos carinhos, cuidados e atenção. Vocês são demais e agradeço a Deus por ter colocado vocês em minha vida para sempre! Amo vocês!

À toda minha família Gregório e Rodrigues pelo carinho, palavras motivadoras e sempre me mostrarem como a fé em Deus é importante.

À minha madrinha Dorli, pelo carinho e ser tão presente em minha vida e ao meu padrinho Coimbra (*in memoriam*) que se foi a pouco tempo para junto de Deus e me deixou ensinamentos e a lembrança de ser um super homem, engraçado e divertido, com piadas mesmo nos momentos tristes. Amo vocês!

Aos meus queridos amigos: Aline (Tirelli), Dé (André), Má (Maíra), Marília e Tê (Stefânia), que sempre estão presentes no meu coração. “A amizade, nem mesmo a força do tempo irá destruir”. Amo vocês, lindos! É muito bom lembrar os nossos momentos juntos e melhor ainda encontrarmos para matar a saudade.

À minha amiga Roqueline, pela amizade e ajuda profissional. Você, não está mais presente diariamente, mas nossa amizade continua com muitos assuntos para contar, dicas e trocas de figurinhas. Sinto sua falta e sempre que der irei te visitar.

Às lindas amigas: Bárbara, Brilliam, Isabella e Luana pelos momentos juntas e os encontros de muito carinho e diversão.

Às divertidas amigas: Bela (madrinha especial), Thalitinha (Dede querida), Mayara e Barbarela pela alegria e diversão nos nossos encontros (Quintanessa).

Aos amigos que começaram pela orgânica e continuaram pela grande afinidade, Débora, Babs (Bruno), Laura, Gisele e Lucas (Peloto) pelas risadas e dicas compartilhadas, carinho e ajuda e apoio.

Aos amigos do NEPLAM: Aline, Carol (Nascimento), Carolina Gabriela, Dani, Fernando, Fernanda (e os anjinhos Bernardo e Sofia), Giovanni, Grasi, Izadora, Jeff, Jojô (Josana), Larissa, Mariana, Nathany, Rafa e Vinícius pelos conhecimentos compartilhados, lanches e festinhas de aniversário e fim de ano, sempre ótimas.

## Agradecimentos

---

As minhas filhinhas Carol, Dani e Izadora, obrigada pela ajuda e carinho. Que vocês tenham um futuro brilhante.

Ao Rafa, que em pouco tempo no NEPLAM me conquistou com seu jeito divertido, prestativo e inteligente. Obrigada pelos favores concedidos sempre com muita boa vontade.

Aos colegas do CEFET/MG pela ajuda e ótima convivência. Já me aperta o peito pensar no momento de sair.

À Dr<sup>a</sup>. Ivana Silva Lula do Laboratório de Ressonância Magnética de Alta Resolução, pela grande contribuição na obtenção dos espectros de RMN e parceria nos compostos de inclusão e também, diversão nas festinhas do NEPLAM.

Às minhas colaboradoras, Professoras Dr<sup>a</sup>. Jacqueline Takahashi, Dr<sup>a</sup>. Lúcia Pimenta, Dr<sup>a</sup>. Maria Aparecida (Cidinha), Dr<sup>a</sup>. Andrea Perez pela realização dos testes biológicos e grande contribuição para o trabalho.

A Dr<sup>a</sup>. Maria Olívia Mercadante pela parceria na coleta da planta.

Às Professoras Rosemeire e Rossimíriam pelo aprendizado nas aulas de orgânica e diversão nas festinhas NEPLAM/LABSINTO.

Ao professor Dr. Rubén por ceder o laboratório aos testes iniciais de obtenção de macromoléculas e Dr. Joel Passos pela colaboração na realização do experimento.

Aos parceiros dos testes biológicos, Bibiane, Samuel Fávero e em especial a Clarice e Thaísa, que muito contribuíram para essa tese.

À Aura pela ajuda no programa utilizado no teste antioxidante.

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

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

Aos membros das bancas de qualificação e de defesa pelas diversas contribuições, Antônio Flávio (Tininha), Henriete Vieira, Maria Amélia, Dâmaris Silveira, Antônio Demuner e Adriana Akemi.

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

A CAPES/Reuni e FAPEMIG pelo apoio financeiro.

A todos que rezaram para que eu conseguisse mais essa vitória!

## SUMÁRIO

ÍNDICE DE FIGURAS .....	i
ÍNDICE DE TABELAS .....	iv
ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS .....	vii
RESUMO.....	ix
ABSTRACT.....	xi
1 - INTRODUÇÃO .....	1
1.1 - Família Celastraceae.....	2
1.2 - <i>Maytenus imbricata</i> .....	4
1.3 - <i>Salacia crassifolia</i> .....	7
1.4 - Estudo de biodisponibilidade: Complexos de triterpenos e flavonoides com Ciclodextrina .....	10
2 - OBJETIVOS.....	15
3 - ESTUDO FITOQUÍMICO .....	16
3.1 - Parte Experimental.....	16
3.1.1 - Métodos cromatográficos .....	16
3.1.2 - Solventes e reagentes .....	16
3.1.3 - Instrumentos .....	17
3.1.4 - Atividade biológica .....	17
3.1.5 - Coleta e identificação do material vegetal .....	18
3.1.6 - Preparação dos extratos das folhas de <i>Salacia crassifolia</i> .....	19
3.1.6.1 - Elaboração do extrato hexânico (EHS) de <i>Salacia crassifolia</i> .....	20

## Sumário

---

3.1.6.2 - Elaboração do extrato clorofórmico (ECS) de <i>Salacia crassifolia</i> .....	36
3.1.6.3 - Elaboração do extrato acetato etílico (EAS) de <i>Salacia crassifolia</i> .....	40
3.1.6.4 - Elaboração do extrato etanólico (EES) de <i>Salacia crassifolia</i> .....	48
3.1.7 - Preparação dos extratos de raízes de <i>Maytenus imbricata</i> .....	53
3.1.7.1 - Elaboração do extrato hexano/éter etílico (1:1) (SEH e FSEH) de <i>Maytenus imbricata</i> .....	53
3.1.7.2 - Elaboração do extrato acetato etílico (FSEAT) de <i>Maytenus imbricata</i>	54
3.1.7.3 - Elaboração do extrato metanólico (SEM) de <i>Maytenus imbricata</i> .....	57
4 - DETERMINAÇÃO ESTRUTURAL DAS SUBSTÂNCIAS ISOLADAS .....	58
4.1 - S1: Esqualeno .....	59
4.2 - S2: Guta-percha .....	61
4.3 - S3: 3 $\beta$ -Palmitiloxi-urs-12-eno.....	63
4.4 - S4: 3-Oxofriedelano (friedelina).....	66
4.5 - S5: 3 $\beta$ -Hidroxifriedelano.....	68
4.6 - S6: $\alpha$ -Amirina (I) e $\beta$ -amirina (II).....	70
4.7 - S7: $\beta$ -Sitosterol.....	72
4.8 - S8: 3-Oxo-28-hidroxifriedelano .....	74
4.9 - S9: 3-Oxo-29-hidroxifriedelano .....	77
4.10 - S10: Ácido 3,4-seco-friedelan-3-oico.....	79
4.11 - S11: 3 $\beta$ -Hidroxi-olean-9(11):12-dieno.....	81
4.12 - S12: 28,29-Di-hidroxifriedelan-3-ona (Confertiflorol) .....	83
4.13 - S13: 3-O- $\beta$ -D-glicosil- $\beta$ -sitosterol.....	85
4.14 - S14: $\alpha$ -Ftalato de bis(2-etilexila) .....	89



## Sumário

---

4.15 - S15: Naringenina .....	91
4.16 - S16: Ácido <i>p</i> -hidroxibenzoico .....	94
4.17 - S17: Epicatequina (3,3',4',5,7-penta-hidroxi-flavanona) .....	95
4.18 - S18 e S19: $\epsilon$ -Caprolactama e Epigallocatequina .....	97
4.19 - M10: 4'-O-metilepigallocatequina .....	99
5 - COMPOSTOS DE INCLUSÃO COM CICLODEXTRINAS .....	102
5.1 - Preparação do composto de inclusão .....	103
5.2 - Resultados e Discussão .....	104
6 - ESTUDO DA ATIVIDADE BIOLÓGICA .....	110
6.1 - Introdução Geral .....	110
6.2 - Atividade Antiparasitária .....	111
6.2.1 - Introdução .....	111
6.2.2 - Metodologia do <i>Screening</i> .....	112
6.2.3 - Resultado do <i>Screening</i> .....	115
6.2.4 - Metodologia do teste antiparasitário completo .....	115
6.2.5 - Resultado do teste antiparasitário completo (CI <sub>50</sub> ) .....	116
6.3 - Atividade antibacteriana e antifúngica .....	117
6.3.1 - Introdução .....	117
6.3.2 - Metodologia do teste antibacteriano e antifúngico .....	119
6.3.3 - Resultado do teste antibacteriano e antifúngico .....	122
6.4 - Atividade inibitória da enzima acetilcolinesterase (AChE) .....	123
6.4.1 - Introdução .....	123

## Sumário

---

<b>6.4.2 - Metodologia do teste de inibição da AChE qualitativo .....</b>	<b>124</b>
<b>6.4.3 - Resultado do teste de inibição da AChE qualitativo.....</b>	<b>126</b>
<b>6.4.4 - Metodologia do teste de inibição da AChE quantitativo.....</b>	<b>127</b>
<b>6.4.5 - Resultado do teste de inibição da AChE quantitativo .....</b>	<b>128</b>
<b>6.5 - Bioensaio para determinação da atividade antioxidante.....</b>	<b>129</b>
<b>6.5.1 - Introdução.....</b>	<b>129</b>
<b>6.5.2 - Metodologia do teste antioxidante .....</b>	<b>130</b>
<b>6.5.3 - Resultado do teste antioxidante .....</b>	<b>131</b>
<b>6.6 - Atividade antinociceptiva .....</b>	<b>133</b>
<b>7 - CONCLUSÃO .....</b>	<b>136</b>
<b>8 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>138</b>
<b>9 - ANEXO .....</b>	<b>155</b>

**ÍNDICE DE FIGURAS**

Figura 1: Estrutura química de substâncias isoladas de algumas espécies da Família Celastraceae. ....	3
Figura 2: Imagem de raízes, folhas e frutos de <i>Maytenus imbricata</i> . ....	5
Figura 3: Substâncias isoladas de raízes de <i>Maytenus imbricata</i> . ....	6
Figura 4: Exemplos de substâncias isoladas de <i>Salacia beddomei</i> . ....	7
Figura 5: Imagem de folhas e frutos de <i>Salacia crassifolia</i> . ....	9
Figura 6: Estrutura química e forma toroidal da molécula de $\beta$ -ciclodextrina. ....	11
Figura 7: Estrutura química do lupeol, ácido betulínico e betulina. ....	12
Figura 8: Estrutura química do sericosídeo. ....	13
Figura 9: Estrutura química de flavonoides e do Trolox, poderosos antioxidantes. ....	14
Figura 10: Preparação dos extratos das folhas de <i>Salacia crassifolia</i> . ....	19
Figura 11: Fracionamento do extrato EHS de folhas de <i>Salacia crassifolia</i> . ....	35
Figura 12: Fracionamento do extrato ECS de folhas de <i>Salacia crassifolia</i> . ....	39
Figura 13: Fracionamento do extrato EAS de folhas de <i>Salacia crassifolia</i> . ....	47
Figura 14: Fracionamento do extrato EES de folhas de <i>Salacia crassifolia</i> . ....	53
Figura 15: Fracionamento do extrato FSEAT de raízes de <i>Maytenus imbricata</i> . ....	57
Figura 16: Espectro e expansão de RMN de $^{13}\text{C}$ de S1 ( $\text{CDCl}_3$ , 50 MHz). ....	60
Figura 17: Espectro e expansões de RMN de $^1\text{H}$ de S2 ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz). ....	62
Figura 18: Espectro e expansão de RMN de $^{13}\text{C}$ de S4 ( $\text{CDCl}_3$ , 100 MHz). ....	67
Figura 19: Espectro e expansões de RMN de $^1\text{H}$ de S5 ( $\text{CDCl}_3 + \text{Py-d}_5$ , 400 MHz). ..	69
Figura 20: Espectro de RMN de $^1\text{H}$ de S7 ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz). ....	73

Índice de Figuras

Figura 21: Espectro e expansões de RMN de $^1\text{H}$ (400 MHz) de S8 em $\text{CDCl}_3$ . .....	75
Figura 22: Espectro e expansão de RMN de $^{13}\text{C}$ (100 MHz) de S8 em $\text{CDCl}_3$ .....	75
Figura 23: Subespectro DEPT-135 e expansão (100 MHz) de S8 em $\text{CDCl}_3$ . .....	76
Figura 24: Espectro e expansões de RMN de $^1\text{H}$ (400 MHz) de S9 em $\text{CDCl}_3$ . .....	78
Figura 25: Espectro e expansões de RMN de $^1\text{H}$ (400 MHz) de S10 em $\text{CDCl}_3$ . .....	80
Figura 26: Espectro e expansões de RMN de $^1\text{H}$ (400 MHz) de S11 em $\text{CDCl}_3$ . .....	82
Figura 27: Espectro e expansões de RMN de $^1\text{H}$ de S12 ( $\text{CDCl}_3 + \text{Py-d}_5$ , 400 MHz)	84
Figura 28: Espectro na região do IV de S13 (KBr). .....	85
Figura 29: Espectro de RMN de $^1\text{H}$ (400 MHz) de S13 em $\text{CDCl}_3 + \text{Py-d}_5$ . .....	86
Figura 30: Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ (100 MHz) de S13 em $\text{CDCl}_3 + \text{Py-d}_5$ .....	87
Figura 31 Subespectro DEPT-135 (100 MHz) de S13 em $\text{CDCl}_3 + \text{Py-d}_5$ . .....	87
Figura 32: Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ (100 MHz) de S14 em $\text{CDCl}_3$ . .....	90
Figura 33: Espectro de RMN de $^1\text{H}$ de S15 ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 400 MHz). .....	92
Figura 34: Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ de S15 ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 100 MHz). .....	92
Figura 35: Subespectro DEPT-135 de S15 ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 100 MHz).....	93
Figura 36: Espectro de RMN de $^1\text{H}$ de S17 ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 400 MHz). .....	96
Figura 37: Espectro de RMN de $^1\text{H}$ de S18 + S19 ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 400 MHz). .....	98
Figura 38: Espectro de RMN de $^1\text{H}$ de M10 ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 400 MHz).....	100
Figura 39: Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ de M10 ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 100 MHz). .....	100
Figura 40: Subespectro DEPT-135 e expansão de M10 ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 100 MHz).....	101
Figura 41: Estruturas químicas das substâncias utilizadas para formação de complexo com ciclodextrina. ....	102

---

Figura 42: Espectro de RMN de $^1\text{H}$ e expansões da $\beta$ -ciclodextrina ( $\text{D}_2\text{O}$ , 400 MHz). .....	106
Figura 43: Espectro de RMN de $^1\text{H}$ do complexo NARIBCD ( $\text{D}_2\text{O}$ , 400 MHz). .....	106
Figura 44: Mapa de contornos ROESY do complexo NARIBCD ( $\text{D}_2\text{O}$ , 400 MHz). .	107
Figura 45: Representação do anel C da naringenina na cavidade da $\beta$ CD.....	107
Figura 46: Espectro de RMN de $^1\text{H}$ de tingenona ( $\text{CDCl}_3$ , 400MHz). .....	108
Figura 47: Espectro de RMN de $^1\text{H}$ de TNGBCD (DMSO, 400MHz).....	109
Figura 48: Mapa de contornos ROESY de TNGBCD (DMSO, 400 MHz).....	109
Figura 49: <i>Entamoeba histolytica</i> , <i>Giardia lamblia</i> e <i>Trichomonas vaginalis</i> . .....	113
Figura 50: Microscópio utilizado e Câmara de Neubauer.....	114
Figura 51: Membrana esterilizante de nitrocelulose e os tubos com as amostras. .	115
Figura 52: Fotos dos micro-organismos avaliados. ....	120
Figura 53: Exemplos representativos de fármacos usados no tratamento de mal de Alzheimer. ....	123
Figura 54: Estrutura química da cafeína (I) e eserina (II). ....	125
Figura 55: Reação ocorrida no teste pelo método de Ellman.....	125
Figura 56: Bioautograma das amostras testadas (esquerda) e da cafeína, padrão utilizado no teste. ....	126
Figura 57: Leitora de placa de Elisa e placas com amostras. ....	127
Figura 58: Estrutura do DPPH antes e depois da reação com o antioxidante.....	129
Figura 59: Curva dose-resposta da antinocicepção induzida pela administração intraplantar de diferentes doses de tingenona sobre a hiperalgesia induzida por $\text{PGE}_2$ . ....	135

---

## ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1: Ordem de eluição da coluna AH e grupos relacionados.....	21
Tabela 2: Ordem de eluição da coluna BH e subgrupos relacionados.....	23
Tabela 3: Ordem de eluição da coluna CH e subgrupos relacionados.....	25
Tabela 4: Ordem de eluição da coluna DH e subgrupos relacionados.....	26
Tabela 5: Ordem de eluição da coluna EH e subgrupos relacionados.....	27
Tabela 6: Ordem de eluição da coluna FH e subgrupos relacionados.....	29
Tabela 7: Ordem de eluição da coluna GH e subgrupos relacionados.....	30
Tabela 8: Ordem de eluição da coluna HH e subgrupos relacionados.....	32
Tabela 9: Ordem de eluição da coluna IH e subgrupos relacionados.....	33
Tabela 10: Ordem de eluição da coluna AC e grupos relacionados.....	36
Tabela 11: Ordem de eluição da coluna AA e subgrupos relacionados.....	40
Tabela 12: Ordem de eluição da coluna BA e subgrupos relacionados.....	42
Tabela 13: Ordem de eluição da coluna CA e subgrupos relacionados.....	44
Tabela 14: Subgrupos relacionados a Coluna DA.....	45
Tabela 15: Ordem de eluição da coluna EA e subgrupos relacionados.....	46
Tabela 16: Ordem de eluição da coluna AE e subgrupos relacionados.....	48
Tabela 17: Ordem de eluição da coluna BE e subgrupos relacionados.....	49
Tabela 18: Subgrupos relacionados à coluna CE.....	50
Tabela 19: Subgrupos relacionados à coluna DE.....	51
Tabela 20: Ordem de eluição da coluna EE e subgrupos relacionados.....	52
Tabela 21: Ordem de eluição da coluna AAE e subgrupos relacionados.....	54

Tabela 22: Ordem de eluição da coluna BAE e subgrupos relacionados.....	55
Tabela 23: Ordem de eluição da coluna CAE e subgrupos relacionados .....	56
Tabela 24: Ordem de eluição da coluna DAE e subgrupos relacionados .....	57
Tabela 25: Substâncias e misturas isoladas de <i>S. crassifolia</i> e <i>M. imbricata</i> .....	58
Tabela 26: Dados de RMN de $^{13}\text{C}$ de S1 e da literatura para esqualeno .....	60
Tabela 27: Dados de RMN de $^{13}\text{C}$ de S2 e da literatura para guta-percha .....	62
Tabela 28: Dados de RMN de $^{13}\text{C}$ de S3 e da literatura para $3\beta$ -palmitiloxi-urs-12-eno .....	65
Tabela 29: Dados de RMN de $^{13}\text{C}$ de S4 e da literatura para 3-oxofriedelano.....	67
Tabela 30: Dados de RMN de $^{13}\text{C}$ de S5 e da literatura para $3\beta$ -hidroxifriedelano ...	69
Tabela 31: Dados de RMN de $^{13}\text{C}$ de S6 e da literatura para $\alpha$ -amirina (I) + $\beta$ -amirina (II).....	71
Tabela 32: Dados de RMN de $^{13}\text{C}$ de S7 e da literatura para $\beta$ -sitosterol .....	73
Tabela 33: Dados de RMN de $^{13}\text{C}$ de S8 e da literatura para 3-oxo-28-hidroxifriedelano .....	76
Tabela 34: Dados de RMN de $^{13}\text{C}$ de S9 e da literatura para 3-oxo-29-hidroxifriedelano .....	78
Tabela 35: Dados de RMN de $^{13}\text{C}$ de S10 e da literatura para o ácido 3,4-seco-friedelan-3-oico.....	80
Tabela 36: Dados de RMN de $^{13}\text{C}$ de S11 e da literatura para $3\beta$ -hidroxi-olean-9(11):12-dieno .....	82
Tabela 37: Dados de RMN de $^{13}\text{C}$ de S12 e da literatura para 28,29-dihidroxifriedelan-3-ona.....	84
Tabela 38: Dados de RMN de $^{13}\text{C}$ de S13 e da literatura para 3-O- $\beta$ -D-glicosil- $\beta$ -sitosterol .....	88
Tabela 39: Dados de RMN de $^{13}\text{C}$ de S14 e da literatura para o-ftalato de bis(2-etilexila) .....	90

Tabela 40: Dados de RMN de $^{13}\text{C}$ de S15 e da literatura para naringenina.....	93
Tabela 41: Dados de RMN de $^{13}\text{C}$ de S16 e do programa ACDLABS para o ácido <i>p</i> -hidroxibenzoico. ....	94
Tabela 42: Dados de RMN de $^{13}\text{C}$ de S17 e da literatura para epicatequina .....	96
Tabela 43: Dados de RMN de $^{13}\text{C}$ de S18 + S19 e da literatura para $\epsilon$ -caprolactama e epigallocatequina .....	98
Tabela 44: Dados de RMN de $^{13}\text{C}$ de M10 e da literatura para 4'- <i>O</i> -metilepigallocatequina.....	101
Tabela 45: Quantidades utilizadas de cada composto e da $\beta\text{CD}$ , solventes utilizados e dias de agitação .....	104
Tabela 46: Concentrações preparadas para as amostras.....	116
Tabela 47: Concentração inibitória - $\text{CI}_{50}$ ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) das amostras frente aos parasitos .....	116
Tabela 48: $\text{CIM}_{50}$ das amostras frente aos micro-organismos testados .....	122
Tabela 49: Resultados do teste de inibição da enzima AChE em placa de Elisa....	128
Tabela 50: Porcentagem de inibição de radicais livres em diferentes concentrações e $\text{CI}_{50}$ de amostras de <i>M. imbricata</i> .....	131
Tabela 51: Porcentagem de inibição de radicais livres em diferentes concentrações e $\text{CI}_{50}$ de amostras de <i>S. crassifolia</i> .....	131



**ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS**

$\delta$  - Deslocamento químico

AcOEt - Acetato de etila

COMe<sub>2</sub> – Acetona

ATCC - *American Type Culture Collection*

ATP - Adenosina Trifosfato

$\beta$ CD -  $\beta$ -ciclodextrina

BHI - *Broth Heart Infusion*

CC - Cromatografia em Coluna

CCD - Cromatografia em Camada Delgada de sílica

CG - Cromatografia a Gás

CIM<sub>50</sub> - Concentração Inibitória Mínima para inibir 50% dos indivíduos

d - duplete

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

DQ - Departamento de Química

EAS - Extrato acetato etílico de *Salacia crassifolia*

ECS - Extrato clorofórmico de *Salacia crassifolia*

EES - Extrato etanólico de *Salacia crassifolia*

EHS - Extrato hexânico de *Salacia crassifolia*

IES-EM - Espectrometria de massas com ionização por eletrospray

FDA - *Food and Drug Administration*

FSEH - Extrato hexano/éter etílico (1:1) de *Maytenus imbricata*

FSEAT - Extrato acetato etílico de *Maytenus imbricata*

Hex - Hexano

HIV - *Human immunodeficiency virus*

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

ICB - Instituto de Ciências Biológicas

IV - Infravermelho

*J* - Constante de acoplamento

LAREMAR - Laboratório de Ressonância Magnética de Alta Resolução

LB - Liebermann Burchard

NEPLAM - Núcleo de Estudo de Plantas Medicinais

OMS - Organização Mundial da Saúde

p. - página

Py - piridina

RMN - Ressonância Magnética Nuclear

RMN de <sup>13</sup>C - Ressonância Magnética Nuclear de Carbono-13

RMN de <sup>1</sup>H - Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio

s - simpleto

SEH - Sólido do extrato em hexano/éter etílico (1:1) de *Maytenus imbricata*

SEAT - Sólido do extrato em acetato de etila de *Maytenus imbricata*

SEM - Sólido do extrato em metanol de *Maytenus imbricata*

TNGBCD - Complexo de tingenona com  $\beta$ -ciclodextrina

T<sub>r</sub> – Tempo de retenção

TTPC - Triterpeno pentacíclico

TMS - Tetrametilsilano

## RESUMO

Este trabalho apresenta o estudo fitoquímico dos extratos hexânico (EHS), clorofórmico (ECS), acetato etílico (EAS) e etanólico (EES) de folhas de *Salacia crassifolia* (Figura 5, p. 9) e do extrato acetato etílico (FSEAT) de raízes de *Maytenus imbricata* (Figura 2, p. 5), bem como a avaliação da atividade biológica e antioxidante dos extratos e substâncias isoladas.

O estudo fitoquímico de *S. crassifolia* resultou no isolamento e caracterização de 10 triterpenos pentacíclicos (TTPC), quatro flavonoides e dois esteroides, além de outros cinco compostos. Do extrato acetato etílico de *M. imbricata* obteve-se um flavonoide. As substâncias isoladas e misturas tiveram suas estruturas elucidadas por métodos espectrométricos (IV, RMN de  $^1\text{H}$  e de  $^{13}\text{C}$  e massas).

Foram realizadas tentativas para obtenção de complexos supramoleculares de TTPCs e flavonoides com a  $\beta$ -ciclodextrina, na busca por promissores fármacos com maior biodisponibilidade e solubilidade em água. Para isso foram utilizadas três condições diferentes onde foram variadas as proporções dos reagentes e do solvente.

Todos os extratos e algumas substâncias de *S. crassifolia* e de *M. imbricata* foram testados quanto à atividade inibitória da enzima acetilcolinesterase. As amostras foram ativas, exceto o esteroide 3-O- $\beta$ -D-glicosil- $\beta$ -sitosterol. O resultado apresenta perspectiva para a realização de testes mais precisos para comprovar a atividade dessas amostras frente à doença de Alzheimer.

Todos os extratos e algumas substâncias de *S. crassifolia* foram testados quanto a atividade contra *Salmonella typhimurium*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Listeria monocytogenes*, *Streptococcus sanguinis* e *Candida albicans*, sendo que dois TTPCs e os extratos apresentaram atividade antimicrobiana.

Os extratos acetato etílico (FSEAT) e metanólico (SEM) de *M. imbricata*, e os extratos acetato etílico (EAS) e etanólico (EES) de *S. crassifolia* e os flavonoides isolados desses extratos, foram submetidos ao teste antioxidante. Todos os extratos e substâncias apresentaram alta atividade frente ao DPPH.

O extrato hexano/éter etílico (1:1) (SEH) de raízes de *M. imbricata* e o composto majoritário deste extrato, a tingenona, apresentaram atividade antiparasitária sobre *Entamoeba histolytica*, *Giardia lamblia* e *Trichomonas vaginalis*.

Os extratos hexano/éter etílico (1:1) (FSEH), acetato etílico (FSEAT) e metanólico (SEM) de *M. imbricata* e a tingenona apresentam atividade antinociceptiva *in vivo* quando testados em camundongos, podendo ser promissores analgésicos.

**Palavras-chave:** Celastraceae, *Salacia crassifolia*, *Maytenus imbricata*, triterpeno, ciclodextrina.

**ABSTRACT****Phytochemical study, biological, antioxidant and acetylcholinesterase inhibitory activities of *Salacia crassifolia* and *Maytenus imbricata***

In this work is presented the phytochemical study of the hexane (EHS), chloroform (ECS), ethyl acetate (EAS), and ethanolic (EES) extracts from leaves of *Salacia crassifolia*, and of the ethyl acetate extract (FSEAT) from roots of *Maytenus imbricata*, as well as the evaluation of the biological and antioxidant activity from these extracts and the isolated substances.

The phytochemical study of *S. crassifolia* leads to the isolation and characterization of ten pentacyclic triterpenes (TTPCs), four flavonoids, two steroids, and other five compounds. Only one flavonoid was obtained from the ethyl acetate extract of *M. imbricata*. The isolated substances and mixtures had their structures elucidated by spectrometric methods (IR,  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR and mass).

Attempts were made to obtain supramolecular complexes of the TTPCs and flavonoids with the  $\beta$ -cyclodextrin, in the pursuit for promising drugs with higher bioavailability and water solubility. In order to achieve that, three different conditions, varying the reactants and solvents proportions, were utilized.

All the extracts and some substances of *S. crassifolia* and *M. imbricata* were tested for the inhibitory activity of the acetylcholinesterase enzyme. The samples were active, except by the steroid 3-O- $\beta$ -D-glucosil- $\beta$ -sitosterol. This result presents a perspective for more precise tests to prove the activity from these samples against Alzheimer's disease.

The extracts and some substances of *S. crassifolia* were tested against *Salmonella typhimurium*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Listeria monocytogenes*, *Streptococcus sanguinis*, and *Candida albicans*. Two triterpenes and all extracts presented antimicrobial activity.

The ethyl acetate (FSEAT) and methanolic (SEM) extract from *M. imbricata*, and the ethyl acetate (EAS) and ethanolic (EES) extract from *S. crassifolia*, as well as the flavonoids isolated from these extracts, were submitted to the antioxidant test. All extracts and substances presented high activity in DPPH tests.

The hexane/ethyl ether extract (1:1) (SEH) from roots of *M. imbricata* and the major compound from this extract, tingenone, presented antiparasitic activity against *Entamoeba histolytica*, *Giardia lamblia* e *Trichomonas vaginalis*.

The hexane/ethyl ether (1:1) (FSEH), ethyl acetate (FSEAT) and methanolic (SEM) extract of *M. imbricata* and tingenone presented antinociceptive activity *in vivo* when tested in mice, making them probable promising analgesics.

**Keywords:** Celastraceae, *Salacia crassifolia*, *Maytenus imbricata*, triterpene, cyclodextrin.

## 1 - INTRODUÇÃO

Os produtos naturais são fontes de diferentes tipos de compostos químicos que podem levar ao isolamento e identificação de substâncias ativas, contribuindo para o desenvolvimento de muitas áreas terapêuticas (CABRAL et al., 2009).

A literatura apresenta um grande número de pesquisas que relatam o uso de produtos naturais com atividades biológicas e há fármacos úteis obtidos a partir de fonte vegetal, como, por exemplo, a digoxina, obtida de extratos de dedaleira (*Digitalis lanata*) usada na medicina no tratamento de insuficiência cardíaca (KATZUNG et al., 2013).

Outro exemplo é o eugenol, obtido do óleo essencial de cravo-da-india (*Syzygium aromaticum* L.), amplamente utilizado na medicina odontológica, como antimicrobiano (RODRÍGUEZ et al., 2014), antinociceptivo (WLADMIR, 2012), anestésico, analgésico, anti-inflamatório, antioxidante e anticancerígeno (Revisado por KONG et al., 2014). Pesquisa recente relata o eugenol também como larvicida contra *Aedes aegypti* (MEDEIROS et al., 2013).

O primeiro medicamento envolvendo pesquisa e desenvolvimento 100% nacional, chamado Acheflan®, foi elaborado de fonte vegetal e o componente principal é o  $\alpha$ -humuleno. Este composto foi obtido a partir de folhas de *Cordia verbenacea*, uma planta nativa brasileira, popularmente conhecida como “erva-baleeira” ou “maria-milagrosa”. O medicamento foi aprovado pela Anvisa em 2012 e é comercialmente usado como cicatrizante, analgésico e anti-inflamatório, principalmente em contusões esportivas (FERNANDES et al., 2007; OLIVEIRA et al., 2014; ACHÉ LABORATÓRIOS FARMACÊUTICOS, 2015).

Também, são relatados usos de produtos naturais na busca por fontes alternativas de drogas antiparasitárias no tratamento da giardíase (SILVA et al., 2012a) amebíase (FONSECA, 2012) e tricomoníase (BATISTA et al., 2014). O grande incentivo se deve ao fato das vacinas, existentes no mercado, não funcionarem na maioria dos casos e os parasitas se tornarem cada vez mais resistentes às terapias sintéticas disponíveis, podendo haver relação com interferências no DNA dos parasitas ou na integridade de suas membranas (WINK, 2012).

A resistência é um problema em praticamente todas as áreas de doenças infecciosas, como as virais, bacterianas, fúngicas e doenças parasitárias, e a falta de novas classes de drogas é uma consequência da dificuldade na descoberta de novos compostos, sendo necessária a busca por substâncias com essas propriedades (WEBER e COURVALIN, 2005).

Há relatos também de extratos e substâncias isoladas de diferentes espécies de plantas brasileiras com excelentes resultados em relação à inibição da enzima acetilcolinesterase (BARBOSA FILHO et al., 2006), podendo ser novos fármacos no tratamento da doença de Alzheimer, por aumentar o nível de acetilcolina no cérebro (SCHNEIDER, 2001).

Recentemente, têm-se noticiado metabólitos secundários com atividade antiviral, principalmente para o combate do vírus HIV, como por exemplo, derivados do ácido betulínico (metabólito secundário isolado de diversas plantas) atuando na inibição da maturação deste vírus, sendo estes metabólitos promissores no tratamento da AIDS (QIAN et al., 2012).

Dentre as fontes vegetais para obtenção de produtos naturais, destacam-se os membros da família Celastraceae. Há vários trabalhos publicados apresentando as diversas propriedades farmacológicas atribuídas a espécies dessa família, como 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). Apesar dos muitos relatos de estudos com espécies da família Celastraceae devido às inúmeras atividades biológicas atribuídas a membros dessa família, há poucos trabalhos envolvendo as espécies *Maytenus imbricata* e *Salacia crassifolia*, objetos desse trabalho.

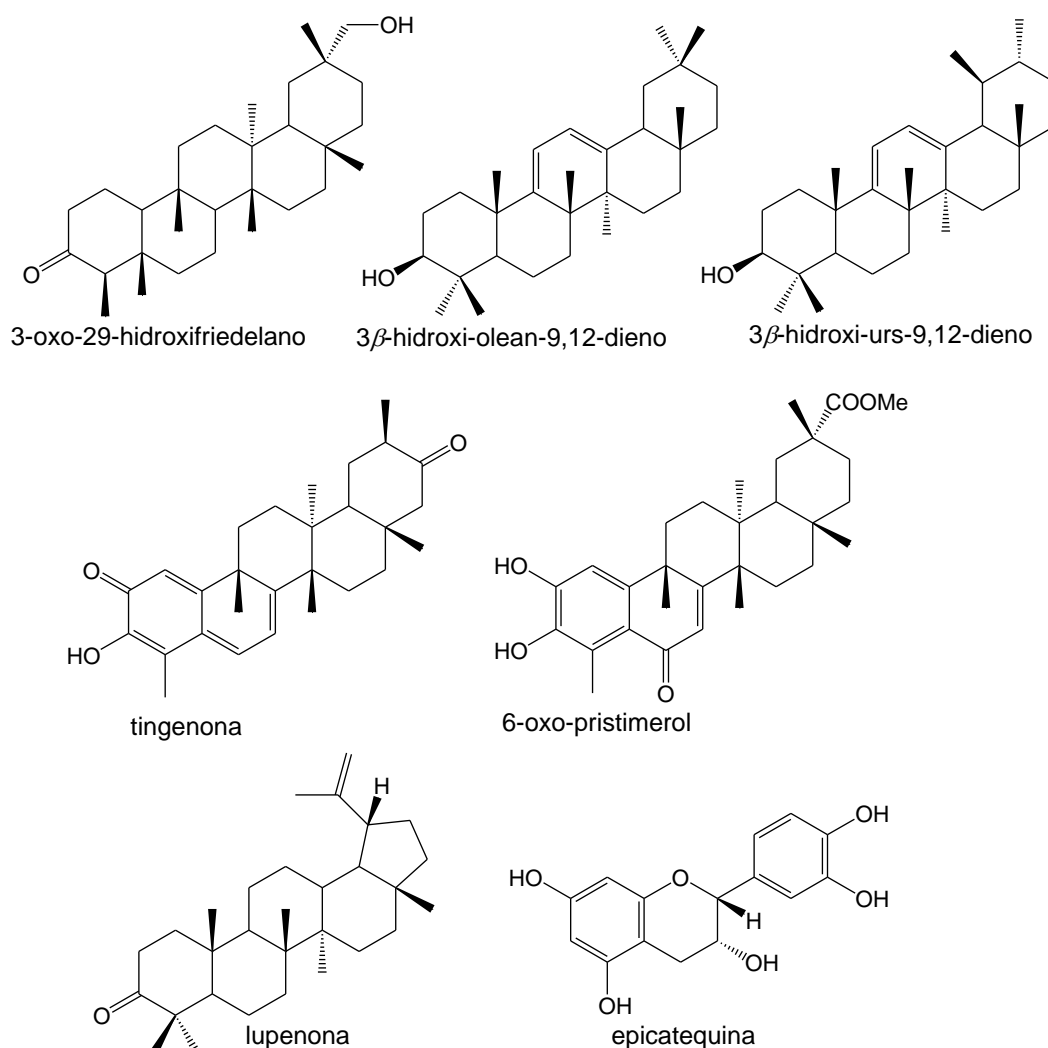
## 1.1 - Família Celastraceae

A família Celastraceae encontra-se distribuída em toda região tropical e subtropical, incluindo Norte da África, América do Sul e países da Ásia, particularmente na China. É constituída por 98 gêneros e, aproximadamente, 1200 espécies, sendo que, no Brasil, essa família é representada por quatro gêneros: *Maytenus* Juss., *Austroplenckia* Lund., *Franhofera* Mart. e *Salacia* Mart. (SIMMONS



et al., 2008). Nas plantas dessa família foram encontrados diversos triterpenos pentacíclicos (TTPC) das classes: friedelano, oleanano, lupano, ursano e quinonametídeo, que apresentam atividades citotóxica, antibiótica e antioxidante, dentre outras (GONZÁLEZ et al., 2000).

Como representantes dos TTPCs isolados da família Celastraceae, citam-se, os friedelanos, friedelina e 3-oxo-29-hidroxifriedelano (TORRES-ROMERO et al., 2010); oleananos, 3 $\beta$ -hidroxi-olean-9,12-dieno; ursanos, 3 $\beta$ -esteariloxi-urs-12-eno (MIRANDA et al., 2006); quinonametídeos, tingenona, pristimerina e celastrol; aromáticos, 6-oxo-pristimerol e 3-metil-6-oxo-tingenol (MORITA et al., 2008) e lupanos, lupenona (SOSA et al., 2007). Também, são encontrados compostos de outras classes, tais como esteroides ( $\beta$ -sitosterol) (SOSA et al., 2007) e flavonoides (epicatequina e proantocianidina) (SILVA, 2007a). A estrutura química de alguns dos compostos acima citados são apresentadas na Figura 1.



**Figura 1:** Estrutura química de substâncias isoladas de algumas espécies da Família Celastraceae.

Ressalta-se assim a importância do estudo com *Maytenus imbricata* e *Salacia crassifolia* para o isolamento de compostos biologicamente ativos.

## 1.2 - *Maytenus imbricata*

O gênero *Maytenus* é um dos mais importantes da família Celastraceae, contendo cerca de 80 espécies distribuídas em todo território brasileiro (SANTOS et al., 2007). Espécies do gênero *Maytenus* têm apresentado diversas atividades biológicas, que foram atribuídas a vários grupos de metabólitos secundários, como triterpenos, quinonametídeos e flavonoides. Este gênero é importante pelas atividades biológicas e, também, por ser utilizado na medicina popular como antisséptico, antiasmático, antitumoral, antiviral, anti-inflamatório e no tratamento de problemas gástricos.

Encontram-se inúmeros estudos na literatura com a espécie *Maytenus ilicifolia*, popularmente conhecida como “espinheira santa”. É uma planta muito conhecida por suas diversas propriedades medicinais e é comercializada para o tratamento de úlceras gástricas (MESSIAS et al., 2015; SANTOS-OLIVEIRA, 2009).

*Maytenus imbricata* Mart, ex. Reissek (Figura 2, p. 5) é um arbusto de porte inferior a 1,20 m de altura ou subarbusto com até 0,50 m e se encontra distribuída por toda a região de cerrado nos Estados de Minas Gerais e Bahia.

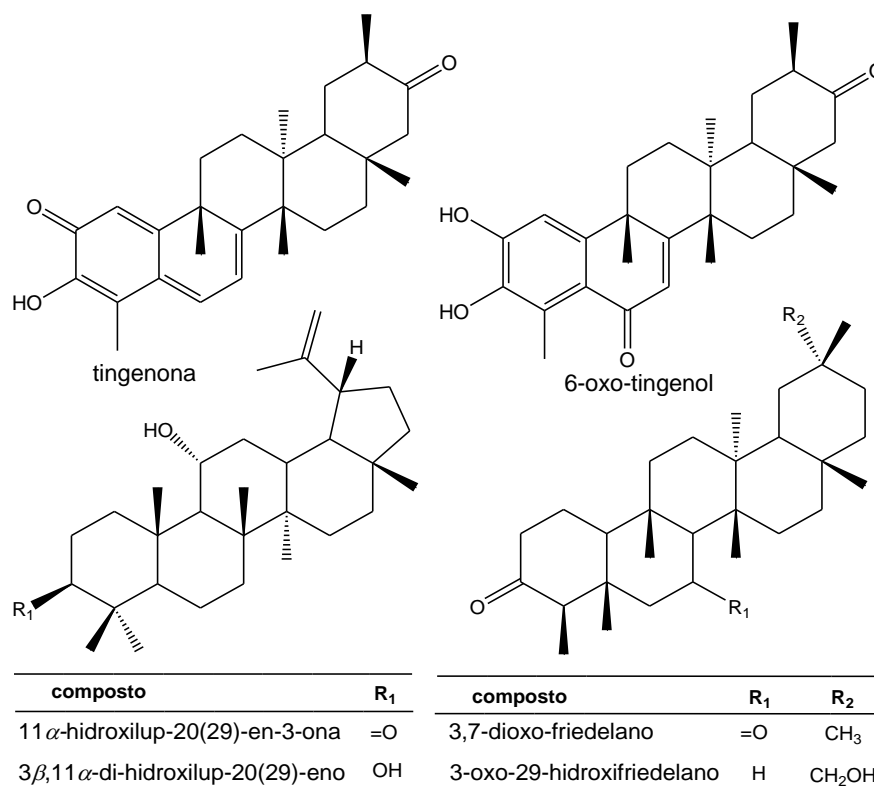
A descrição botânica foi apresentada por Carvalho-Okano (1992) e estudos anatômicos desta espécie foram feitos por Silva (2007a).



**Figura 2:** Imagem de raízes, folhas e frutos de *Maytenus imbricata* (Fotos da autora).

As folhas, galhos e caules desta espécie foram estudados fitoquimicamente por Silva (2007a). Os extratos acetato etílico, etanólico e clorofórmico das folhas, o extrato hidroalcoólico de raízes, o extrato acetato etílico de galhos e a epicatequina isolada a partir das folhas, apresentaram atividade antioxidante (SILVA, 2007a; SILVA et al., 2009). O ácido 3,4-seco-friedelan-3-oico apresentou atividade inibitória na síntese de ATP, podendo indicar que poderá ser utilizado no desenvolvimento de herbicidas naturais (SILVA et al., 2007b; SILVA et al., 2009).

O estudo do extrato hexano/éter etílico (1:1) das raízes de *Maytenus imbricata* resultou no isolamento e caracterização de sete TTPC, três pertencentes à classe dos lupanos (11 $\alpha$ -hidroxilup-20(29)-en-3-ona, 30-hidroxilup-20(29)-en-3-ona, 3 $\beta$ ,11 $\alpha$ -di-hidroxilup-20(29)-eno), dois pertencentes à classe dos friedelanos (3,7-dioxofriedelano, 3-oxo-29-hidroxifriedelano), um quinonametídeo (tingenona) e um aromático (6-oxo-tingenol) (Figura 3, p. 6), além de um ácido graxo de cadeia longa (ácido palmítico) e uma mistura de hidrocarbonetos (C-27 a C-32) (RODRIGUES, 2011; RODRIGUES et al., 2012).



**Figura 3:** Substâncias isoladas de raízes de *Maytenus imbricata* (RODRIGUES et al., 2012).

O sólido do extrato hexano/éter etílico, o extrato hexano/éter etílico, o sólido do extrato acetato etílico, o extrato acetato etílico e o extrato metanólico, e também as substâncias 11 $\alpha$ -hidroxilup-20(29)-en-3-ona, tingenona, 6-oxo-tingenol e a mistura de 11 $\alpha$ -hidroxilup-20(29)-en-3-ona e 30-hidroxilup-20(29)-en-3-ona apresentaram atividade contra as bactérias Gram-positivas *Staphylococcus aureus* e *Bacillus cereus* e contra a levedura *Candida albicans*. Os resultados mais expressivos foram encontrados para o sólido do extrato hexano/éter etílico, o extrato hexano/éter etílico e para a tingenona (RODRIGUES et al., 2012).

As substâncias 11 $\alpha$ -hidroxilup-20(29)-en-3-ona, 3,7-dioxofriedelano e 3-oxo-29-hidroxifriedelano foram ativas na inibição da enzima acetilcolinesterase pelo método de bioautografia (RODRIGUES et al., 2012).

Todos os extratos e as substâncias testadas apresentaram potencial tóxico por meio da atividade larvídica sobre *Artemia salina*, apresentando baixas DL<sub>50</sub> (RODRIGUES et al., 2012).

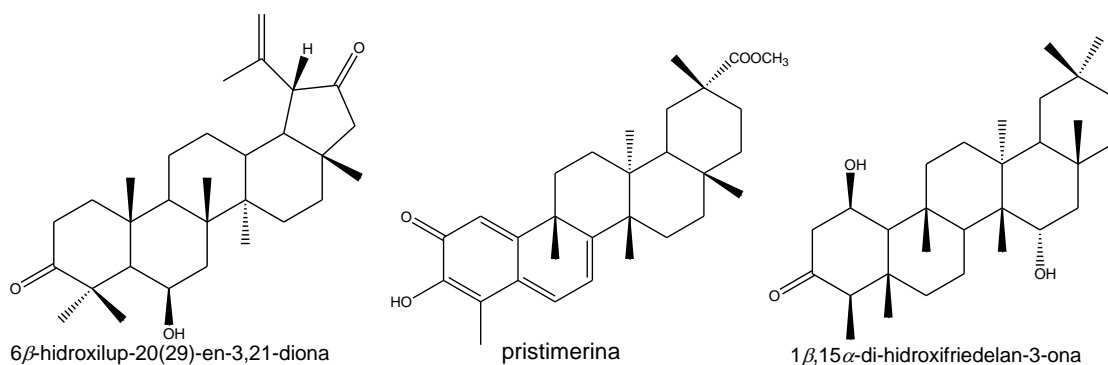
Estes resultados ressaltaram a importância da continuidade do estudo fitoquímico com essa espécie, bem como a realização de outros testes biológicos com os extratos e substâncias isoladas.

### 1.3 - *Salacia crassifolia*

O gênero *Salacia* é encontrado no Brasil e em outros países da América do Sul e possui 21 espécies brasileiras. Espécies de *Salacia* são utilizadas em muitos países como remédio tradicional contra diabetes e como anti-inflamatório (VELLOSA et al., 2009). São conhecidas por apresentarem TTPCs das séries dos friedelanos (TRAN et al., 2010), lupanos (YOSHIKAWA et al., 2008), oleananos, ursanos (DUARTE et al., 2010) e quinonametídeos (DHANABALASINGHAM et al., 1996).

Através de estudos fitoquímicos de *Salacia elliptica* foram isolados vinte constituintes do extrato hexânico de folhas e/ou de galhos, sendo onze deles, triterpenos pentacíclicos (DUARTE et al., 2010). De raízes de *Salacia kraussi*, foram isolados sete quinonametídeos, que apresentaram atividade antimalarial (FIGUEIREDO et al., 1998).

Dos extratos em hexano e em acetato de etila, de caules de *Salacia beddomei*, foram isolados 20,29-epoxilup-3,21-diona, 6 $\beta$ -hidroxilup-20(29)-en-3,21-diona, 3 $\beta$ ,28-di-hidroxilup-20(29)-eno e 2 $\alpha$ ,3 $\beta$ -di-hidroxilup-20(29)-eno (HISHAM et al., 1995b), lup-20(29)-en-3,21-diona (salacianona), 21 $\beta$ -hidroxilup-20(29)-en-3-ona (salacianol), lup-20(29)-en-3-ona, friedelan-3-ona, 15 $\alpha$ -hidroxifriedelan-3-ona, 15 $\alpha$ -hidroxifriedelan-1,3-diona, pristimerina,  $\beta$ -sitosterol (HISHAM et al., 1995a) e 1 $\beta$ ,15 $\alpha$ -di-hidroxifriedelan-3-ona (HISHAM et al., 1996). A estrutura química de alguns destes se apresentam na Figura 4.



**Figura 4:** Exemplos de substâncias isoladas de *Salacia beddomei*.

Através de estudos fitoquímicos, Kishi e colaboradores (2003) isolaram vários TTPCs a partir de folhas de *Salacia chinensis* e, dentre os constituintes isolados, 10 apresentaram atividade antioxidante. No extrato etanólico bruto e em quinonametídeos isolados das raízes de *S. campestris* foi mostrada a propriedade antioxidante (VELLOSA et al., 2009; CARVALHO et al., 2005).

Espécies do gênero *Salacia* têm sido utilizadas no Japão, EUA e em outros países como um suplemento alimentar, considerado adequado na prevenção de diabetes e obesidade. Exames clínicos têm demonstrado que a administração por via oral de extratos de plantas deste gênero, em ratos, tem diminuído significativamente os níveis de glicose no sangue, mesmo após uma refeição rica em carboidratos (SOMA et al., 1990). Ressalta-se que outros estudos não demonstraram efeito toxicológico sobre os animais (JIHONG et al., 2011).

Dados de pesquisas com diferentes espécies do gênero *Salacia* mostraram atividade antidiabética, associada à capacidade de inibição da enzima  $\alpha$ -glicosidase (ESKANDARI et al., 2010).

Pelas inúmeras atividades observadas em espécies deste gênero, *Salacia crassifolia* foi escolhida para pesquisa por apresentar apenas o relato de isolamento de um composto impuro, em 1972 (DE LIMA et al., 1972).

*Salacia crassifolia* (Mart.) G. Don é conhecida popularmente como “bacupari”, “bacupary de caapuêra” ou “saputá” (CORRÊA, 1984) (Figura 5, p. 9). É uma árvore frutífera nativa da região do cerrado e seus frutos são utilizados na nutrição humana, embora seja muito atacado pelas moscas-das-frutas, o que constitui uma limitação para o seu consumo (BRAGA FILHO et al., 2001).



**Figura 5:** Imagem de folhas e frutos de *Salacia crassifolia* (Foto de Maria Olívia Mercadante-Simões).

Na medicina popular as folhas, caules, sementes e frutos desta espécie são utilizados para tratar pediculose, doença renal, úlceras gástricas, câncer de pele, malária, tosse crônica, obesidade e dores de cabeça. Os frutos frescos também são utilizados para o consumo e para fins industriais (CARNEIRO et al., 2013).

Os poucos relatos desta espécie se referem ao extrato etanólico da casca do caule que apresentou atividade antifúngica sobre *Trichophyton rubrum* e *T. mentagrophytes* (THEODORO, 2009). De Lima e colaboradores (1972) isolaram uma substância e compararam a temperatura de fusão e o espectro no IV obtido, com os dados da pristimerina padrão (Figura 4, p. 7). Essa análise sugeriu que se tratava de uma pristimerina impura. O material impuro foi submetido a testes de atividade antibacteriana e observou-se uma notável diferença dos resultados do teste entre o material isolado e o padrão.

## 1.4 - Estudo de biodisponibilidade: Complexos de triterpenos e flavonoides com Ciclodextrina

Um princípio bioativo precisa apresentar certas características para que a sua formulação seja viável. Precisa ser solúvel em água e também ser capaz de atravessar uma membrana celular de caráter hidrofóbico. A reduzida solubilidade de um fármaco origina problemas de biodisponibilidade oral, principalmente quando essa é a fase limitante do processo de absorção.

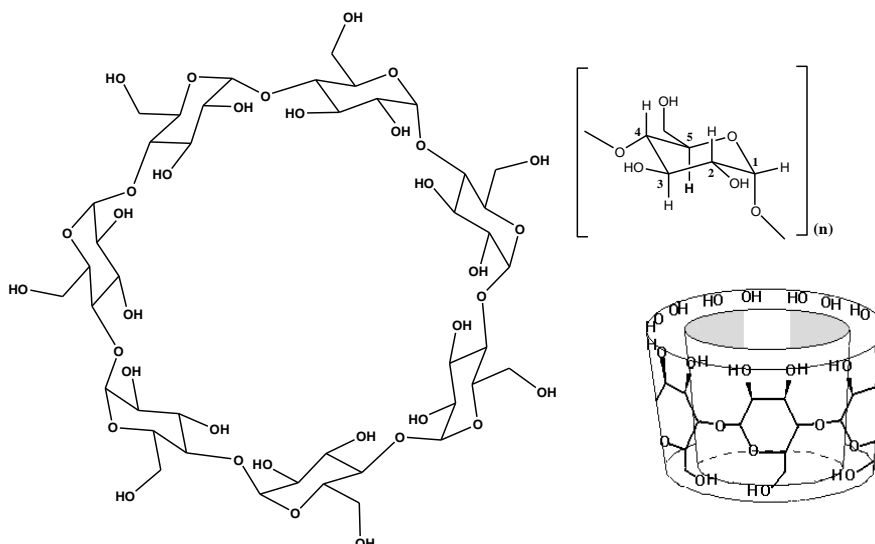
As formulações tradicionais para princípios de baixa solubilidade envolvem processos como a combinação com solventes orgânicos e/ou surfactantes e, em alguns casos, até mesmo o uso de condições extremas de pH. Este tipo de manipulação pode ter efeitos negativos de reações adversas prejudiciais ao usuário (THOMPSON, 1997).

Muitos processos têm sido desenvolvidos para a obtenção de formulações mais eficientes e menos tóxicas para o tratamento de doenças, possibilitando o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas e um maior conhecimento das ações fisiológicas que estas substâncias provocam nos organismos (LOFTSSON, 1988; LOFTSSON e MASSON, 2001).

O maior problema em se realizar testes biológicos com TTPC e flavonoides é a baixa solubilidade em água, condições em que enzimas fisiológicas exercem sua atividade. Uma maneira de diminuir este problema é realizar a preparação de complexos entre TTPC e flavonoides com ciclodextrina (CD) (CUNHA-FILHO e SÁ-BARRETO, 2007).

As CDs são constituídas por unidades de D-glicopiranosose, unidas por ligações do tipo  $\alpha(1,4)$ , contendo uma cavidade central com características hidrofóbicas e uma superfície externa com caráter hidrofílico e, devido à restrição de rotação ao redor das ligações entre as unidades de glicopiranososes, as ciclodextrinas não são totalmente cilíndricas, são estruturas cíclicas tronco-cônicas, ou seja, tem a forma de um cone truncado (Figura 6, p. 11) (CUNHA-FILHO e SÁ-BARRETO, 2007).





**Figura 6:** Estrutura química e forma toroidal da molécula de  $\beta$ -ciclodextrina.

As ciclodextrinas são produtos resultantes da degradação do amido pela ação da enzima amilase ciclodextrina glicosiltransferase (CGTase), produzidas por micro-organismo que é capaz de romper um segmento da hélice do amido e unir as duas porções terminais deste fragmento em uma única molécula cíclica (SAENGER, 1980). Por modificação enzimática é possível obter a ciclização de seis, sete ou oito unidades de glicose, sendo denominadas de  $\alpha$ -ciclodextrina ( $\alpha$ CD),  $\beta$ -ciclodextrina ( $\beta$ CD) e  $\gamma$ -ciclodextrina ( $\gamma$ CD), respectivamente (CUNHA-FILHO e SÁ-BARRETO, 2007).

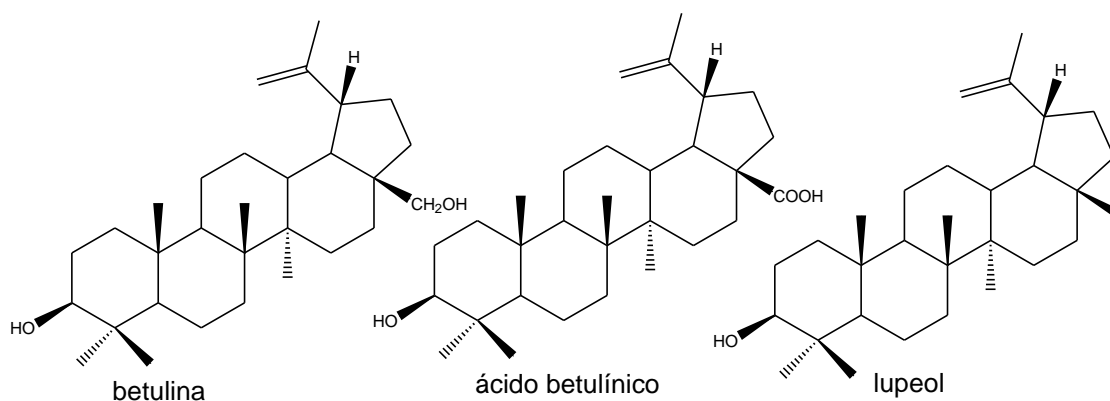
A estrutura espacial cônica e a orientação dos grupos hidroxílicos para o exterior conferem a estes açúcares cíclicos, propriedades físico-químicas únicas, sendo capazes de solubilizar-se em meio aquoso e, ao mesmo tempo, no interior da sua cavidade, interagir com moléculas hidrofóbicas (CUNHA-FILHO e SÁ-BARRETO, 2007).

As CDs constituem uma classe de excipientes farmacêuticos com capacidade para formar complexos de inclusão com moléculas pouco polares. A habilidade das CDs em incluir fármacos tem conseguido melhoras na solubilidade, biodisponibilidade e estabilidade de inúmeras fórmulas farmacêuticas comercializadas (CUNHA-FILHO e SÁ-BARRETO, 2007), como por exemplo, a capacidade de incrementar a liberação de fármacos através da pele sem afetar a sua função barreira, pois aumenta a permeação transdérmica, promovendo a absorção do fármaco.

A incorporação das CDs em sistemas farmacêuticos constitui uma realidade consolidada. Segundo as estatísticas, essas associações com CDs já foram estudadas com 515 princípios ativos, melhorando sua biodisponibilidade, estabilidade e segurança (SZEJTLI, 2005). Diversos medicamentos comercializados no mercado mundial contam com a presença deste excipiente em suas fórmulas (CUNHA-FILHO e SÁ-BARRETO, 2007).

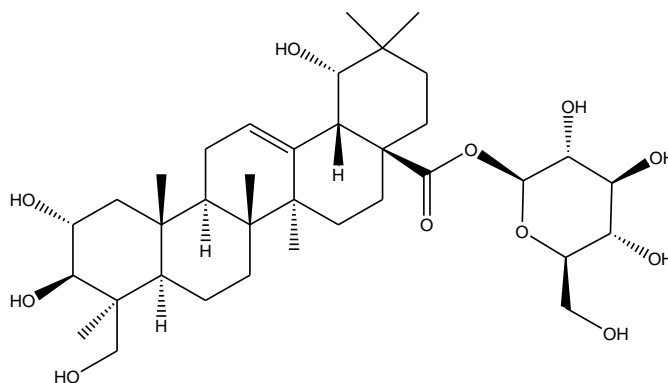
As  $\beta$ CDs são as dextrinas cíclicas mais largamente utilizadas para a complexação com várias classes de drogas, como: agentes antitumorais, como a doxorubicina (KIRCHMEIER et al., 2001), antidiabético, como a tolbutamida (VEIGA et al., 2000) e anti-inflamatórios, como o piroxicam (DALMORA et al., 2001), que podem ser administradas por diversas vias como muscular, peridural, oral, nasal e dérmica (CUNHA-FILHO e SÁ-BARRETO, 2007).

Há patentes de ciclodextrinas complexadas com TTPCs da classe dos lupanos, como o lupeol, ácido betulínico, betulina e outros derivados, que os tornam candidatos a anticancerígenos. A interação entre o TTPC e a CD ocorre entre os grupos funcionais (OH) dos TTPCs com a cavidade da CD (FALAMAS et al., 2011).



**Figura 7:** Estrutura química do betulina, ácido betulínico e lupeol.

O sericosídeo, um TTPC da classe oleanano, é empregado na formulação de cosméticos e produtos dermatológicos que se encontram no mercado, como produtos da marca Biotherm®, Eucerim® e Natura (Figura 8, p. 13). Uma patente relata a combinação desse TTPC com  $\gamma$ CD (RASCHKE et al., 2001). A formulação tópica contendo essa combinação apresentou maior penetração na pele (72% de absorção) e maior solubilidade em água (18,4 mmol/L) do que o sericosídeo na forma pura (31,2 % de absorção e solubilidade em água de 3,4 mmol/L) (RASCHKE et al., 2001; RODE et al., 2003).

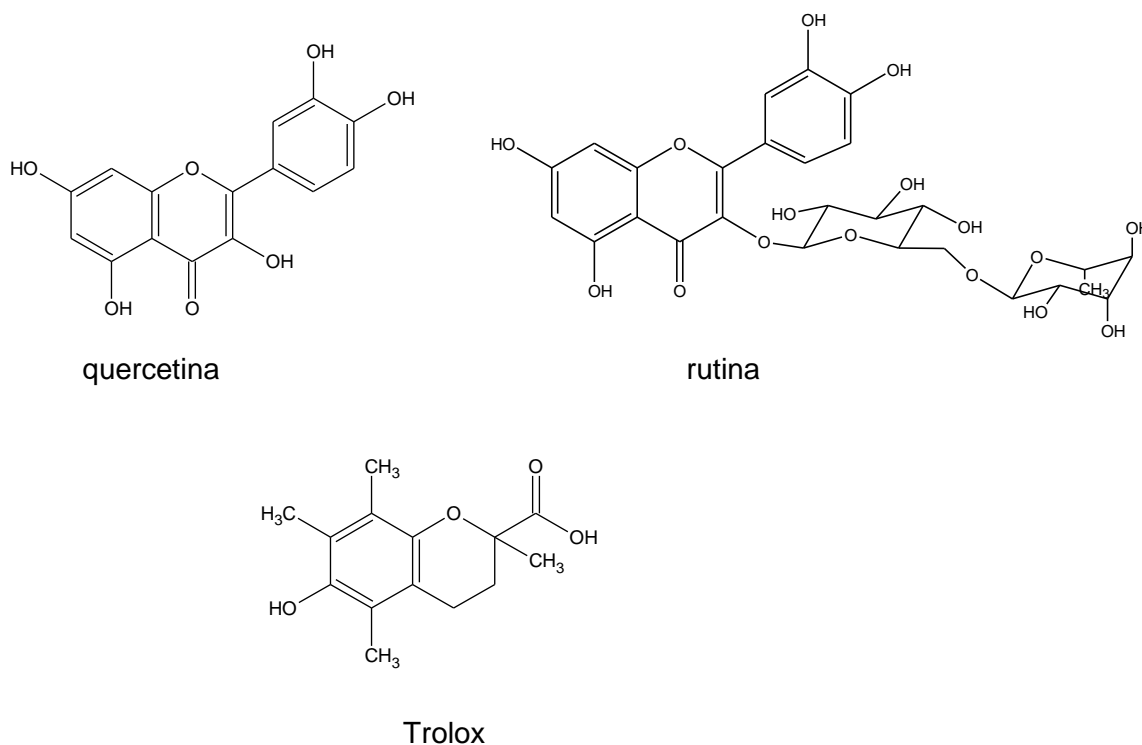


**Figura 8:** Estrutura química do sericosídeo.

De acordo com Soica e colaboradores (2008), a hidroxipropil- $\gamma$ -ciclodextrina (HPGCD, um derivado da CD), é capaz de formar complexos de inclusão com ácido betulínico e com a betulina (Figura 7, p. 12), apresentando tamanho e interação satisfatória, pois ocorre o encaixe desses TTPCs na cavidade da HPGCD. O complexo formado resultou no aumento da solubilidade e apresentou atividade antitumoral *in vitro* e *in vivo*, quando testado em camundongos (SOICA, et al., 2008).

Recentemente, Soica e colaboradores (2012) observaram que o complexo da betulina (Figura 7, p. 12) com ciclodextrina mostrou-se mais ativo *in vitro* e *in vivo* do que apenas a betulina, ou seja, a complexação demonstra uma melhoria importante na atividade antitumoral (SOICA et al., 2008).

Flavonoides, como a quercetina (Figura 9, p. 14), um poderoso antioxidante, quando incluídos em  $\beta$ CDs modificadas apresentaram um significativo aumento na solubilidade (DONG et al., 2013). A rutina (um flavonoide glicosilado) apresentou maior atividade antioxidante quando incluída em CD, com um valor de  $Cl_{50}$  (concentração para eliminar 50% de radicais livres) próximo ao Trolox, padrão usado no teste. Este complexo apresenta também maior estabilidade ao calor (45 °C) e à luz UV, indicando um maior efeito protetor do flavonoide quando complexado, já que a rutina pura degrada facilmente (NGUYEN et al., 2013).



**Figura 9:** Estrutura química de flavonoides e do Trolox, poderosos antioxidantes.

Schwingel e colaboradores (2008) inseriram um flavonoide, 3-O-metilquercetina, na cavidade da  $\beta$ CD e este produto apresentou como resultado um aumento da permeação do produto na pele de orelha de porco.

A naringenina, um flavonoide anticancerígeno, anti-inflamatório e antioxidante, está presente em abundância em frutas cítricas (“grapefruit”) e no mercado se encontra em formulações de produtos faciais, corporais, medicamentos e bebidas. O complexo desta substância com ciclodextrina apresenta um aumento na solubilidade em água, portanto, um fármaco com esse composto de inclusão se torna mais biodisponível no organismo (YANG et al., 2013).

Portanto, é de interesse o preparo de compostos de inclusão com TTPCs e flavonoides, que venham a ser mais solúveis, biodisponíveis e estáveis, possibilitando o desenvolvimento de produtos inovadores com atividades biológicas.

## 2 - OBJETIVOS

O objetivo geral deste trabalho foi dar continuidade às pesquisas de espécies da família Celastraceae, buscando comprovar suas propriedades biológicas. Neste contexto, há um grande interesse pelas espécies *Salacia crassifolia* e *Maytenus imbricata*.

Como objetivos específicos pretendeu-se:

Realizar o estudo fitoquímico das folhas de *Salacia crassifolia*.

Preparar e caracterizar sistemas de liberação controlada de triterpenos pentacíclicos e flavonoides, com base em ciclodextrinas visando aumentar a solubilidade.

Estudar a atividade biológica dos extratos e substâncias isoladas de *Salacia crassifolia* e *Maytenus imbricata* e também do complexo com ciclodextrina, realizando testes antimicrobiano (bactéria e fungo), antiparasitário (giardia, ameba e tricomonas), antioxidante e inibitório da enzima acetilcolinesterase.

## **3 - ESTUDO FITOQUÍMICO**

### **3.1 - Parte Experimental**

#### **3.1.1 - Métodos cromatográficos**

Nas cromatografias em camada delgada de sílica (CCD) foi utilizada sílica gel 60G (Merck ou Vetec) em placa de vidro de 0,25 mm de espessura (CCD analítica) ativadas a 100 °C em estufa. As colunas cromatográficas clássicas foram preparadas com fase estacionária de sílica gel 60 de tamanho de partícula 0,063-0,200 mm (70-230 Mesh) e 0,040-0,063 mm (230-400 Mesh).

Utilizou-se também o equipamento Isolera One (Biotage®) para cromatografia líquida de média pressão, utilizando colunas de sílica SNAP Ultra®. Para empacotamento utilizou-se velocidade constante de 12 mL/min e a eluição foi realizada a 8 mL/min.

Para o preparo de colunas cromatográficas de exclusão foi utilizado Sephadex LH-20, partículas de 25-100 µm de diâmetro.

#### **3.1.2 - Solventes e reagentes**

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

Solventes deuterados, como  $\text{CDCl}_3$ ,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ,  $\text{Py-d}_5$ ,  $\text{DMSO-d}_6$  e  $\text{D}_2\text{O}$  foram utilizados para análise de RMN e estão indicados em cada caso.

Como revelador de cromatoplasas utilizou-se solução 1:1 de ácido perclórico a 3% em água e vanilina a 1% em etanol. No teste de Liebermann-Burchard (MATOS, 1980) foram utilizados  $\text{CHCl}_3$ , para solubilizar a amostra e, após completa solubilização, 1 mL de anidrido acético e duas gotas de ácido sulfúrico, ambos concentrados.

### 3.1.3 - Instrumentos

As faixas de fusão foram determinadas em aparelho digital da Microquímica Equipamentos LTDA (MQAPF-302). Para correção das proporções das misturas foram utilizados o refratômetro Abbe de bancada (marca Biobrix) e as massas das substâncias isoladas medidas em balança analítica AB104 Mettler Toledo e os extratos medidos em balança eletrônica semi-analítica Marte AL 500C, do NEPLAM no DQ da UFMG.

Para obtenção dos espectros na região do IV, algumas amostras foram feitas em pastilhas de KBr ou filme, em espectrômetro Shimadzu IR408 pertencente ao DQ da UFMG. Outras análises foram obtidas utilizando-se aparelho modelo Spectrum One Perkin Elmer do Laboratório de Química Farmacêutica da Faculdade de Farmácia da UFMG, com dispositivo ATR.

Os espectros de RMN foram obtidos em espectrômetros Bruker *Avance* DPX-200 e DRX-400 do LAREMAR no DQ da UFMG, operando a 300 K. Os deslocamentos químicos ( $\delta$ ) foram registrados em ppm, usando tetrametilsilano (TMS) como padrão de referência interna. As constantes de acoplamento ( $J$ ) foram dadas em Hz.

Os espectros de massas foram obtidos utilizando o equipamento LC-MS-IT-TOF Shimadzu do Departamento de Química da UFMG. O gás de arraste foi o argônio com 1,5 L/mim, temperatura a 200 °C, voltagem de detecção 1,63 kV e área de vácuo ( $1,1 \times 10^{-4}$ ).

### 3.1.4 - Atividade biológica

A avaliação da atividade inibitória da enzima acetilcolinesterase e atividades antibacteriana e antifúngica foram realizadas em colaboração com a professora Jacqueline A. Takahashi no Laboratório de Biotecnologia e Bioensaios, do Departamento de Química (DQ) da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG). As atividades giardicida, tricomonocida e amebicida foram realizadas pela doutoranda Thaisa Helena Silva Fonseca e a professora Maria Aparecida Gomes no Laboratório de Parasitologia do Instituto De Ciências Biológicas (ICB) da UFMG. A atividade antioxidante foi realizada por Samuel Fávero e a Professora Lúcia Pinheiro Santos Pimenta no Laboratório de Químico e Bioprospecção de Plantas do Cerrado do DQ/

UFMG. A atividade antinociceptiva foi realizada pela Dra. Clarice de Carvalho Veloso e a Professora Andrea de Castro Perez no Laboratório de Dor e Analgesia do Departamento de Farmacologia, do ICB/UFMG.

### 3.1.5 - Coleta e identificação do material vegetal

Folhas de *Salacia crassifolia* (Mart.) G. Don. (Celastraceae) foram coletadas pela Professora Doutora Maria Olívia Mercadante-Simões, em Montes Claros, Minas Gerais. Uma exsicata do material encontra-se depositada no Herbário BHCB do Departamento de Botânica, no ICB/UFMG, sob o número 144624.

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

A preparação dos extratos de *M. imbricata* foi realizada previamente e se encontra descrita em Rodrigues (2011) e Rodrigues e colaboradores (2012).

A indicação dos solventes usados na preparação dos extratos de folhas de *S. crassifolia* e a eluição das colunas foram feitas empregando: Hex, CHCl<sub>3</sub>, AcOEt, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, COMe<sub>2</sub>, EtOH e MeOH para os solventes: hexano, clorofórmio, acetato de etila, diclorometano, acetona, etanol e metanol, respectivamente.



### 3.1.6 - Preparação dos extratos das folhas de *Salacia crassifolia*

Após a secagem e moagem em moinho de martelos, obteve-se 1,35 kg de folhas de *S. crassifolia*. A amostra foi submetida a maceração, com solventes em ordem crescente de polaridade: Hex,  $\text{CHCl}_3$ , AcOEt e EtOH. Após filtração e remoção do solvente por destilação a pressão reduzida, foram obtidos os respectivos extratos: EHS, ECS, EAS e EES.

A Figura 10 apresenta o esquema utilizado para preparação dos extratos das folhas de *Salacia crassifolia*.

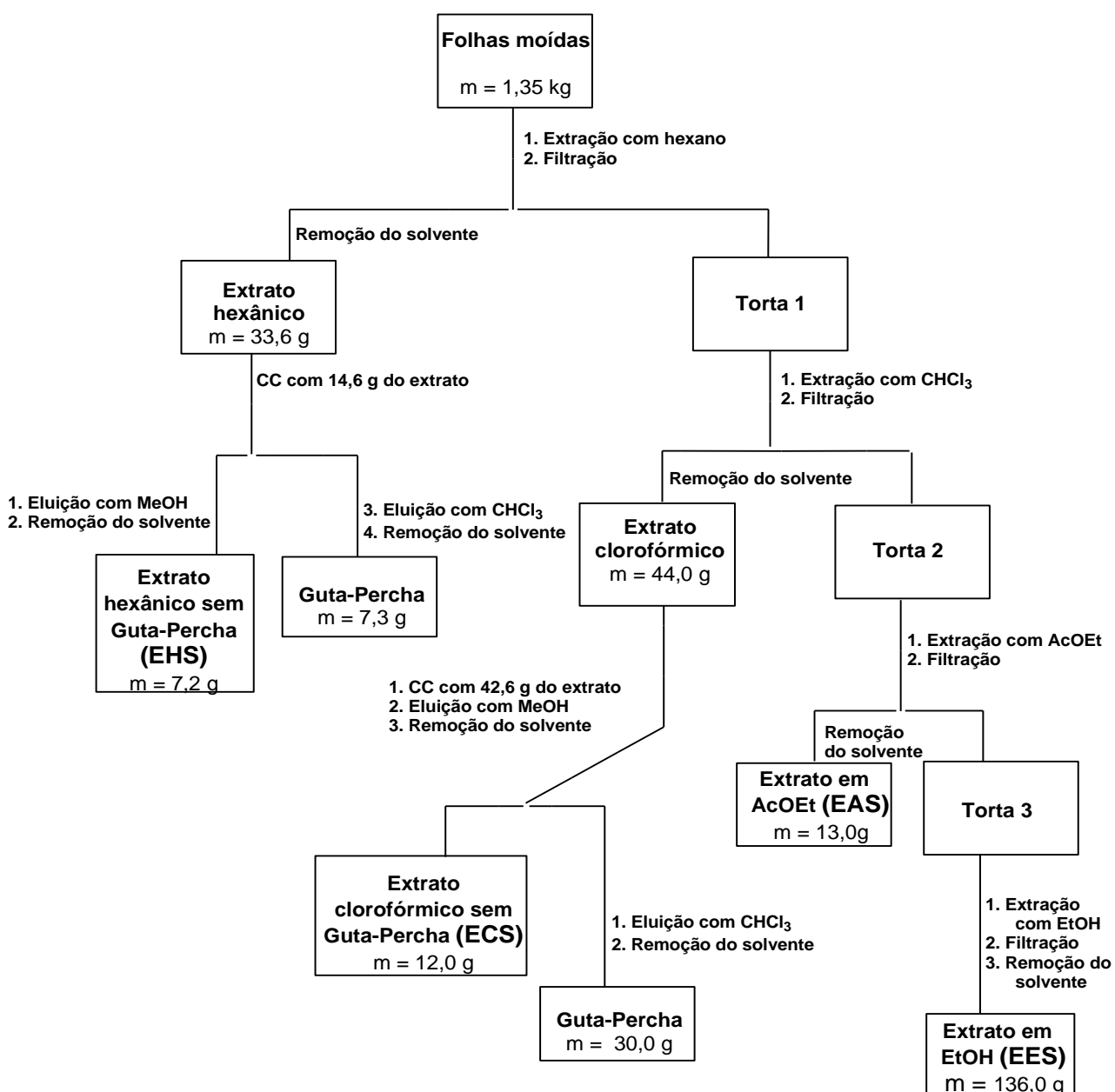


Figura 10: Preparação dos extratos das folhas de *Salacia crassifolia*.

Utilizaram-se para o isolamento e purificação, colunas cromatográficas e cromatografia em camada delgada. Todos os extratos **EHS**, **ECS**, **EAS**, **EES** e a maioria das substâncias isoladas foram testadas biologicamente.

As frações que foram recromatografadas posteriormente foram escolhidas baseando-se em dois critérios: quantidade e perfil da fração em CCD. As frações cujas massas foram pequenas e apresentaram muitas manchas não foram estudadas.

A notação empregada para codificar os grupos (frações agrupadas) obtidos das colunas realizadas no estudo fitoquímico, tem a inicial da letra da coluna, em ordem alfabética, seguida pela letra inicial do extrato correspondente: hexânico-H, clorofômico-C, acetato de etila-A, etanólico-E (*Salacia*) e acetato de etila-AE (*Maytenus*) e adicionado o número na ordem de obtenção, por exemplo Grupo AH1 foi o primeiro grupo obtido da primeira coluna (Coluna AH) do extrato hexânico. As substâncias isoladas de *Salacia* e *Maytenus* receberam as iniciais “S” e “M” respectivamente, seguidas por um número que indica a ordem de isolamento, por exemplo, S3 foi a 3ª substância isolada de *Salacia*.

### 3.1.6.1 - Elaboração do extrato hexânico (EHS) de *Salacia crassifolia*

O extrato hexânico apresentou uma grande quantidade de guta-percha, detectado pela consistência pastosa, característica desta substância e este fato foi confirmado comparando o perfil cromatográfico em CCD do extrato com guta-percha padrão. Para que esta substância não contaminasse todas as frações, foi necessária sua separação, realizando uma pré-purificação do extrato. Portanto, este foi submetido (14,6 g) a uma coluna de filtração. Eluiu-se a coluna primeiramente com MeOH para obtenção do extrato sem guta-percha **EHS** (7,2 g) e depois eluiu-se com CHCl<sub>3</sub> para a obtenção da guta-percha correspondendo a 50% do extrato (7,3 g), conforme metodologia empregada por Oliveira (2012).

**EHS** (7,2 g) foi submetido à coluna cromatográfica (Coluna **AH**: 4 cm/1,26 m), utilizando 420,0 g de sílica gel 60 com tamanho de partícula 0,063-0,200 mm (70-230 Mesh). Desta coluna foram obtidas 302 frações de 200 mL cada e utilizados como eluentes Hex, CHCl<sub>3</sub>, AcOEt e MeOH puros ou em misturas em gradiente de polaridade (Tabela 1).

**Tabela 1:** Ordem de eluição da coluna AH e grupos relacionados

Eluente	Fração de 200 mL	Eluente	Fração de 200 mL	Grupo	Massa (mg)
Hex	1-32	Hex/CHCl <sub>3</sub> (35:65)	136-138	<b>AH1 (1)</b>	<b>18,0</b>
Hex/CHCl <sub>3</sub> (96:4)	33-34	Hex/CHCl <sub>3</sub> (3:7)	139-140	<b>AH2 (2 - 3)</b>	<b>51,8</b>
Hex/CHCl <sub>3</sub> (94:6)	35-36	Hex/CHCl <sub>3</sub> (25:75)	141-170	AH3 (4 - 8)	3,6
Hex/CHCl <sub>3</sub> (92:8)	37-38	Hex/CHCl <sub>3</sub> (2:8)	171-181	AH4 (9 - 11)	8,2
Hex/CHCl <sub>3</sub> (90:10)	39-40	Hex/CHCl <sub>3</sub> (18:82)	182-192	AH5 (12 - 22)	28,0
Hex/CHCl <sub>3</sub> (86:14)	41	Hex/CHCl <sub>3</sub> (16:84)	193-209	AH6 (23 - 29)	2,1
Hex/CHCl <sub>3</sub> (84:16)	42	Hex/CHCl <sub>3</sub> (14:86)	210-213	AH7 (30 - 44)	1,2
Hex/CHCl <sub>3</sub> (8:2)	43-55	Hex/CHCl <sub>3</sub> (12:88)	214-217	<b>AH8 (45 - 51)</b>	<b>397,0</b>
Hex/CHCl <sub>3</sub> (78:22)	56-60	Hex/CHCl <sub>3</sub> (1:9)	218-224	<b>AH9 (52 - 64)</b>	<b>189,0</b>
Hex/CHCl <sub>3</sub> (76:24)	61-62	Hex/CHCl <sub>3</sub> (5:95)	225-234	<b>AH10 (65 - 71)</b>	<b>424,2</b>
Hex/CHCl <sub>3</sub> (74:26)	63-64	CHCl <sub>3</sub>	235-236	<b>AH11 (72 - 83)</b>	<b>262,8</b>
Hex/CHCl <sub>3</sub> (72:28)	65-66	CHCl <sub>3</sub> /AcOEt (98:2)	237-238	<b>AH12 (84)</b>	<b>72,2</b>
Hex/CHCl <sub>3</sub> (70:30)	67-69	CHCl <sub>3</sub> /AcOEt (95:5)	239-240	<b>AH13 (85-90)</b>	<b>370,0</b>
Hex/CHCl <sub>3</sub> (66:34)	70-71	CHCl <sub>3</sub> /AcOEt (9:1)	241-273	<b>AH14 (91)</b>	<b>113,0</b>
Hex/CHCl <sub>3</sub> (62:38)	72-75	CHCl <sub>3</sub> /AcOEt	274-276	<b>AH15 (92 - 103)</b>	<b>891,4</b>
Hex/CHCl <sub>3</sub> (58:42)	76-78	CHCl <sub>3</sub> /AcOEt (8:2)	277-278	<b>AH16 (104 - 149)</b>	<b>370,0</b>
Hex/CHCl <sub>3</sub> (56:44)	79-112	CHCl <sub>3</sub> /AcOEt (7:3)	279-281	<b>AH17 (150 - 242)</b>	<b>405,3</b>
Hex/CHCl <sub>3</sub> (52:48)	113-120	CHCl <sub>3</sub> /AcOEt (6:4)	282-284	<b>AH18 (243 - 270)</b>	<b>461,0</b>
Hex/CHCl <sub>3</sub> (1:1)	121-126	AcOEt	285-297	<b>AH19 (271)</b>	<b>230,4</b>
Hex/CHCl <sub>3</sub> (48:52)	127-129	AcOEt/MeOH (1:1)	298-299	<b>AH20 (272 - 283)</b>	<b>7,8</b>
Hex/CHCl <sub>3</sub> (43:57)	130-133	AcOEt/MeOH	300-301	<b>AH21 (284 - 291)</b>	<b>278,7</b>
Hex/CHCl <sub>3</sub> (38:62)	134-135	MeOH	302	<b>AH22 (292 - 301)</b>	<b>124,9</b>
				<b>AH23 (302)</b>	<b>1520,0</b>

As frações foram analisadas por CCD e reunidas em 23 grupos de acordo com o perfil observado nas cromatoplacas (Tabela 1). Algumas frações não foram trabalhadas por se tratarem de misturas complexas e/ou pequenas quantidades.

O fluxograma do isolamento de todas as substâncias de **EHS** encontra-se na Figura 11, p. 35.

**Grupo AH1 (fração 1):** apresentou-se como um óleo incolor (18,0 mg) solúvel em CHCl<sub>3</sub>. Observou-se uma única mancha de coloração roxa em CCD quando revelada com ácido perclórico/vanilina. A análise dos espectros na região do IV e RMN de <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C permitiu identificar o óleo como sendo o **esqualeno (S1)**.

**Grupo AH2 (frações 2-3):** apresentou-se como um sólido branco (51,8 mg), solúvel em  $\text{CHCl}_3$  e insolúvel em MeOH. Observou-se uma mancha de coloração roxa em CCD quando revelada com ácido perclórico/vanilina. A análise dos espectros na região do IV e RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  permitiu identificar o sólido como sendo **guta-percha (S2)**.

**Grupo AH8 (frações 45-51):** apresentou-se como um sólido pastoso incolor (397,0 mg). Observou-se uma única mancha de coloração roxa em CCD quando revelada com ácido perclórico/vanilina. A análise dos espectros na região do IV e RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  permitiu identificar o composto como sendo  **$3\beta$ -palmitiloxi-urs-12-eno (S3)**, um éster de  $\alpha$ -amirina. Este composto foi isolado pela primeira vez na família Celastraceae.

**Grupo AH9 (frações 52-64):** apresentou-se como um sólido pastoso amarelado (380,0 mg). O grupo A9 foi submetido à coluna cromatográfica, levando ao isolamento de quantidade adicional de  **$3\beta$ -palmitiloxi-urs-12-eno (S3)**.

**Grupo AH10 (frações 65-71):** apresentou-se como um sólido marrom (424,2 mg). O grupo **AH10** foi submetido à CC de sílica (Coluna **BH**) por apresentar muitas manchas bem definidas em CCD. Foram utilizados como eluentes Hex,  $\text{CHCl}_3$ , AcOEt e MeOH puros ou em misturas em gradiente de polaridade (Tabela 2, p. 23).

**Tabela 2:** Ordem de eluição da coluna BH e subgrupos relacionados

Eluente	Fração de 25 mL	Eluente	Fração de 25 mL	Grupo	Massa (mg)
Hex	1 - 2	Hex/CHCl <sub>3</sub> (4:6)	85-86	<b>BH1 (1 - 16)</b>	<b>4,8</b>
Hex/CHCl <sub>3</sub> (99:1)	3 - 4	Hex/CHCl <sub>3</sub> (3:7)	87 - 90	BH2 (17 - 41)	5,7
Hex/CHCl <sub>3</sub> (97:3)	5 - 6	Hex/CHCl <sub>3</sub> (2:8)	91 - 94	BH3 (42 - 44)	1,6
Hex/CHCl <sub>3</sub> (96:4)	7 - 8	Hex/CHCl <sub>3</sub> (15:85)	95 - 96	BH4 (45 - 49)	5,8
Hex/CHCl <sub>3</sub> (95:5)	9 - 10	Hex/CHCl <sub>3</sub> (1:9)	97 - 99	BH5 (50)	3,8
Hex/CHCl <sub>3</sub> (93:7)	11 - 12	Hex/CHCl <sub>3</sub> (5:95)	100 - 101	<b>BH6 (51 - 65)</b>	<b>94,8</b>
Hex/CHCl <sub>3</sub> (9:1)	13 - 16	CHCl <sub>3</sub>	102 - 105	<b>BH7 (66 - 70)</b>	<b>49,8</b>
Hex/CHCl <sub>3</sub> (88:12)	17 - 18	CHCl <sub>3</sub> /AcOEt (98:2)	106 - 107	<b>BH8 (71 - 75)</b>	14,5
Hex/CHCl <sub>3</sub> (85:15)	19 - 29	CHCl <sub>3</sub> /AcOEt (94:6)	108 - 116	BH9 (76 - 77)	4,1
Hex/CHCl <sub>3</sub> (82:18)	30 - 32	CHCl <sub>3</sub> /AcOEt (9:1)	117 - 118	BH10 (78)	1,9
Hex/CHCl <sub>3</sub> (8:2)	33 - 37	CHCl <sub>3</sub> /AcOEt	119 - 120	BH11 (79 - 86)	3,0
Hex/CHCl <sub>3</sub> (77:23)	38 - 46	CHCl <sub>3</sub> /AcOEt (8:2)	121 - 122	BH12 (87 - 96)	17,0
Hex/CHCl <sub>3</sub> (75:25)	47 - 49	CHCl <sub>3</sub> /AcOEt (7:3)	123 - 124	BH13 (97 - 109)	25,6
Hex/CHCl <sub>3</sub> (72:28)	50 - 52	CHCl <sub>3</sub> /AcOEt (6:4)	125 - 126	BH14 (110)	2,2
Hex/CHCl <sub>3</sub> (7:3)	53 - 56	CHCl <sub>3</sub> /AcOEt (1:1)	127 - 128	<b>BH15 (111 - 127)</b>	<b>100,0</b>
Hex/CHCl <sub>3</sub> (68:32)	57 - 58	CHCl <sub>3</sub> /AcOEt (4:6)	129 - 130	BH16 (128 - 133)	12,3
Hex/CHCl <sub>3</sub> (65:35)	59 - 61	CHCl <sub>3</sub> /AcOEt (3:7)	131 - 132	BH17 (134)	1,8
Hex/CHCl <sub>3</sub> (6:4)	62 - 63	CHCl <sub>3</sub> /AcOEt (2:8)	133 - 134	<b>BH18 (135 - 140)</b>	<b>39,0</b>
Hex/CHCl <sub>3</sub> (55:45)	64 - 65	AcOEt	135 - 136		
Hex/CHCl <sub>3</sub> (1:1)	66 - 80	MeOH	137 - 140		
Hex/CHCl <sub>3</sub> (45:55)	81- 84				

Foram recolhidas 140 frações de 25 mL cada. As frações foram analisadas por CCD e agrupadas de acordo com o perfil observado nas cromatoplasas (Tabela 2).

**Subgrupo BH1 (frações 1-16):** apresentou-se como um sólido amorfo pastoso (4,8 mg) e uma mancha azul em CCD quando revelada com ácido perclórico/vanilina. Este sólido foi analisado por RMN de <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C, indicando tratar-se de mistura de hidrocarbonetos.

**Subgrupo BH6 (frações 51-65):** apresentou-se como um sólido marrom (94,8 mg) que, por apresentar definidas manchas em CCD, foi submetido a uma outra coluna cromatográfica (coluna de 1,0 cm/30,0 cm e utilizaram-se 8,76 g de sílica gel). Após o empacotamento da coluna com Hex, utilizaram-se os eluentes Hex, CHCl<sub>3</sub>, AcOEt e MeOH puros ou em misturas em gradiente de polaridade.

Foram obtidas 111 frações de 20 mL, que foram agrupadas de acordo com o perfil cromatográfico, mas não foi possível o isolamento de nenhuma substância pura.

**Subgrupo BH7 (frações 66-70):** foi obtido como cristal branco (49,8 mg), com faixa de fusão 250-255 °C. Observou-se uma única mancha de coloração amarela em CCD quando revelada com ácido perclórico/vanilina e apresentou teste LB positivo para TTPC. A análise dos espectros na região do IV e RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  permitiu identificar o sólido como sendo **3-oxo-friedelano (S4)**.

**Subgrupo BH8 (frações 71-75):** foi obtido como cristal branco (14,5 mg), com faixa de fusão 270-274 °C. Observou-se uma única mancha de coloração roxa em CCD quando revelada com ácido perclórico/vanilina e apresentou teste LB positivo para TTPC. A análise dos espectros na região do IV e RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  permitiu identificar o sólido como sendo **3 $\beta$ -hidroxifriedelano (S5)**.

**Subgrupo BH15 (frações 111-127):** foi obtido um sólido esverdeado, recromatografado, mas não se isolou nenhuma substância pura.

**Subgrupo BH18 (frações 135-140):** foi obtido cristal branco (39,0 mg). Este composto foi solúvel apenas em água e, devido a ausência de sinal nos espectros de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ , foi possível concluir que se tratava de um composto inorgânico.

Os demais subgrupos da coluna B não foram trabalhados por se tratarem de misturas complexas e/ou com massa insuficiente para realização de outras colunas.

**Grupo AH11 (frações 72-83):** apresentou-se como um sólido branco amarelado (262,8 mg), que foi purificado usando MeOH, obtendo-se assim, cristal branco (204,0 mg). Este cristal apresentou uma única mancha de coloração roxa em CCD quando revelada com ácido perclórico/vanilina e apresentou teste LB positivo para TTPC. A análise dos espectros na região do IV e comparação por CCD do sólido com o padrão permitiu identificar o sólido como sendo **3 $\beta$ -hidroxifriedelano (S5)**.

**Grupo AH12 (fração 84):** apresentou-se como um sólido branco amarelado (72,2 mg) e obteve uma única mancha de coloração roxa em CCD quando revelada com ácido perclórico/vanilina. A análise em CCD desse sólido com padrão já isolado permitiu identificar o sólido como sendo **3 $\beta$ -hidroxifriedelano (S5)** impuro.

**Grupo AH13 (frações 85-90):** apresentou-se como um sólido amarelo (370,0 mg) e por apresentar várias manchas bem definidas em CCD, foi recromatografado

(coluna **CH**: 2,5 cm/61,0 cm com 43,3 g de sílica gel). Após o empacotamento da coluna com Hex, utilizaram-se os eluentes Hex, AcOEt e MeOH puros ou em misturas em gradiente de polaridade (Tabela 3).

**Tabela 3:** Ordem de eluição da coluna CH e subgrupos relacionados

Eluente	Fração de 20 mL	Subgrupo	Massa (mg)
Hex	1 – 10	CH1 (1 - 23)	–
Hex/AcOEt (99:1)	11 – 45	CH2 (24 - 31)	13,1
Hex/AcOEt (98:2)	46 – 65	CH3 (32 - 37)	9,6
Hex/AcOEt (97:3)	66– 69	CH4 (38 - 52)	24,8
Hex/AcOEt (96:4)	70 – 72	<b>CH5 (53 - 74)</b>	<b>198,0</b>
Hex/AcOEt (95:5)	73 – 78	CH6 (75 - 84)	11,0
Hex/AcOEt (94:6)	79 – 82	CH7 (85 - 87)	6,4
Hex/AcOEt (91:9)	83 – 86	CH8 (88 - 90)	2,2
Hex/AcOEt (7:3)	87 – 96	CH9 (91 - 92)	15,5
AcOEt	97 – 102	CH10 (93 – 97)	3,3
MeOH	103	<b>CH11 (98 – 103)</b>	<b>15,3</b>

Foram recolhidas 103 frações de 20 mL cada. As frações foram analisadas por CCD e agrupadas de acordo com o perfil observado nas cromatoplasmas (Tabela 3).

**Subgrupo CH5 (frações 53-74):** apresentou-se como um sólido branco amarelado (198,0 mg), que foi purificado usando hexano, obtendo assim um cristal branco (148,7 mg). Este cristal, com faixa de fusão 160-164 °C, apresentou uma única mancha de coloração roxa em CCD quando revelada com ácido perclórico/vanilina e teste LB positivo para TTPC. A análise dos espectros na região do IV e RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  permitiu identificar o sólido como sendo mistura de  $\alpha$ -amirina e  $\beta$ -amirina (**S6**).

**Subgrupo CH11 (frações 98-103):** apresentou-se como um sólido branco amarelado (15,3 mg) que foi purificado usando MeOH, obtendo-se assim, cristal branco (4,8 mg), com apenas uma única mancha de coloração roxa em CCD quando revelada com ácido perclórico/vanilina. A análise dos espectros na região do IV e RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  permitiu identificar o sólido como sendo álcool graxo.

**Grupo AH14 (fração 91):** apresentou-se como um sólido amarelo (113,0 mg), por apresentar várias manchas em CCD bem definidas, realizou-se uma coluna

cromatográfica (Coluna **DH**: 2,2 cm/58,0 cm) com 26,1 g de sílica gel. Após o empacotamento da coluna com Hex, utilizaram-se os eluentes Hex, CHCl<sub>3</sub>, AcOEt e MeOH puros ou em misturas em gradiente de polaridade (Tabela 4).

**Tabela 4:** Ordem de eluição da coluna DH e subgrupos relacionados

Eluente	Fração de 25 mL	Grupo	Massa (mg)
Hex	1 – 18	DH1 (0-21)	3,0
Hex/ AcOEt (99:1)	19 – 37	DH2 (22 - 23)	3,9
Hex/ AcOEt (98:2)	38 – 47	<b>DH3 (24)</b>	<b>2,7</b>
Hex/ AcOEt (97:3)	48 – 52	DH4 (25 - 28)	14,6
Hex/ AcOEt (95:5)	53 – 55	<b>DH5 (29 - 30)</b>	<b>2,1</b>
Hex/ AcOEt (94:6)	56 – 58	DH6 (31 - 36)	7,1
Hex/ AcOEt (93:7)	59 – 65	DH7 (37)	2,9
Hex/ AcOEt (92:8)	66 – 67	<b>DH8 (39 - 53)</b>	<b>25,1</b>
Hex/ AcOEt (9:1)	68 – 76	<b>DH9 (54 - 55)</b>	<b>2,2</b>
Hex/ AcOEt (8:2)	77 – 78	<b>DH10 (56 – 64)</b>	<b>21,0</b>
HEX/AcOEt (6:4)	79 – 80	DH11 (65 – 67)	2,7
AcOEt	81 – 82	DH12 (68 – 82)	5,3
MeOH	83	<b>DH13 (83)</b>	<b>2,0</b>

Foram recolhidas 83 frações de 25 mL cada. As frações foram analisadas por CCD e agrupadas de acordo com o perfil observado nas cromatoplasas (Tabela 4).

**Os Subgrupos DH3, DH5, DH9 e DH13** foram analisados por CCD e apresentaram apenas uma mancha, indicando que as frações estavam puras, mas não foi possível identificá-los devido a pequena quantidade. Já os outros subgrupos apresentaram muitas manchas em CCD e/ou pequena quantidade.

**Subgrupo DH8 (frações 39-53):** apresentou-se como um sólido branco amarelado (25,1 mg), que, após a purificação com hexano, obteve-se um sólido branco em forma de cristal (7,3 mg). Este composto apresentou uma única mancha de coloração roxa em CCD quando revelada com ácido perclórico/vanilina. A análise dos espectros na região do IV e RMN de <sup>1</sup>H permitiu identificar o sólido como sendo quantidade adicional de  **$\alpha$ -amirina e  $\beta$ -amirina (S6)**.

**Subgrupo DH10 (frações 56-64):** apresentou-se como um sólido amarelo (21,0 mg), que foi purificado com MeOH, obtendo cristais brancos (10,1 mg). Estes cristais com faixa de fusão 130-133 °C apresentam uma única mancha de coloração



roxa em CCD quando revelada com ácido perclórico/vanilina. A análise dos espectros na região do IV e RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  permitiu identificar o sólido como sendo  **$\beta$ -sitosterol (S7)**.

**Grupo AH15 (frações 92-103):** apresentou-se como um sólido amarelo (891,4 mg). Por apresentar várias manchas em CCD bem definidas, realizou-se uma cromatografia em coluna (Coluna **EH**: 3,0 cm/76,0 cm; com 100 g de sílica gel). Após o empacotamento da coluna com Hex, utilizaram-se os eluentes Hex,  $\text{CHCl}_3$ , AcOEt e MeOH puros ou em misturas em gradiente de polaridade (Tabela 5).

**Tabela 5:** Ordem de eluição da coluna EH e subgrupos relacionados

Eluente	Fração de 25 mL	Eluente	Fração de 25 mL	Grupo	Massa (mg)
Hex/ $\text{CHCl}_3$ (1:1)	1 – 3	$\text{CHCl}_3$ /AcOEt	88 – 90	EH1 (1)	1,7
Hex/ $\text{CHCl}_3$ (1:1)	4	$\text{CHCl}_3$ /AcOEt	91 – 102	EH2 (2)	6,1
Hex/ $\text{CHCl}_3$ (1:1)	5 – 6	$\text{CHCl}_3$ /AcOEt	103 – 105	<b>EH3 (3 – 5)</b>	<b>7,7</b>
Hex/ $\text{CHCl}_3$ (1:1)	7 – 9	$\text{CHCl}_3$ /AcOEt	106 – 108	<b>EH4 (6 – 14)</b>	<b>32,0</b>
Hex/ $\text{CHCl}_3$ (1:1)	10 – 13	$\text{CHCl}_3$ /AcOEt	109 – 115	<b>EH5 (15 – 29)</b>	<b>166,3</b>
Hex/ $\text{CHCl}_3$ (1:1)	14 – 25	$\text{CHCl}_3$ /AcOEt	116 – 118	<b>EH6 (30 – 65)</b>	<b>174,7</b>
Hex/ $\text{CHCl}_3$ (1:1)	26 – 52	$\text{CHCl}_3$ /AcOEt	119 – 120	<b>EH7 (66 – 68)</b>	<b>47,8</b>
$\text{CHCl}_3$	53 – 58	AcOEt	121 – 123	<b>EH8 (69 – 75)</b>	<b>101,4</b>
$\text{CHCl}_3$ /AcOEt (7:3)	59 – 84	AcOEt /MeOH	124 – 132	<b>EH9 (76 – 99)</b>	<b>112,7</b>
$\text{CHCl}_3$ /AcOEt (7:3)	85 – 87			EH10 (100 – 102)	22,4
				EH11 (103 – 125)	131,8
				EH12 (132)	33,0

Foram recolhidas 132 frações de 25 mL cada. As frações foram analisadas por CCD e agrupadas de acordo com o perfil observado nas cromatoplasas (Tabela 5).

**Subgrupo EH3 (frações 3-5):** apresentou-se como um sólido branco amarelado (7,7 mg) que, após purificação com EtOH, forneceu um sólido branco (6,1 mg), com apenas uma mancha de coloração roxa em CCD, quando revelada com ácido perclórico/vanilina. A análise dos espectros na região do IV e RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  permitiu identificar o sólido como sendo álcool graxo.

**Subgrupo EH4 (frações 6-14):** apresentou-se como um sólido branco amarelado (32,0 mg), que foi purificado usando hexano, obtendo-se, um cristal branco (23,2 mg), com uma única mancha de coloração roxa em CCD quando

revelada com ácido perclórico/vanilina e apresentou teste LB positivo para TTPC. A análise do espectro na região do IV e a comparação do cromatograma do sólido com padrão, permitiram identificar o sólido como sendo  **$\alpha$ -amirina +  $\beta$ -amirina (S6)**.

**Subgrupo EH5 (frações 15-29):** apresentou-se como um sólido amarelo (166,3 mg) que, por apresentar manchas em CCD bem definidas, foi recromatografado e obteve-se um ácido graxo, identificado por análise dos espectros de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ .

**Subgrupo EH6 (frações 30-65):** apresentou-se como um sólido branco amarelado (174,7 mg), a adição de MeOH e posterior filtração levou a obtenção de um sólido branco (71,2 mg), com uma única mancha de coloração roxa em CCD quando revelada com ácido perclórico/vanilina. A análise do espectro na região do IV e a comparação em CCD do sólido com o padrão permitiram identificar o sólido como sendo  **$\beta$ -sitosterol (S7)**.

**Subgrupo EH8 (frações 69-75):** apresentou-se como um sólido branco amarelado (101,4 mg), a adição de MeOH e posterior filtração levou a obtenção de um sólido branco (20,0 mg). Apresentou faixa de fusão 255-260  $^{\circ}\text{C}$ , apenas uma mancha de coloração roxa em CCD quando revelada com ácido perclórico/vanilina e teste LB positivo para TTPC. A análise dos espectros na região do IV e RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  permitiu identificar o sólido como sendo **3-oxo-28-hidroxifriedelano (S8)**.

**Subgrupo EH9 (frações 76-99):** apresentou-se como um sólido branco amarelado (112,7 mg). A adição de MeOH e posterior filtração levou a obtenção de um sólido branco (27,2 mg). Pôde-se observar apenas uma mancha de coloração roxa em CCD quando revelada com ácido perclórico/vanilina, teste LB positivo para TTPC e faixa de fusão 233-236  $^{\circ}\text{C}$ . A análise dos espectros na região do IV e RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  permitiu identificar o sólido como sendo **3-oxo-29-hidroxifriedelano (S9)**.

O subgrupo **EH7** e os filtrados das frações de **EH8** e **EH9** apresentaram perfis parecidos em CCD, sendo portanto agrupados (**EH7 + EH8 + EH9**) e submetidos à CC. Essa coluna levou à obtenção de mais quantidade de **S8** (9,6 mg) e **S9** (17,7 mg), além de ácido graxo.

**Grupo AH16 (frações 104-149):** apresentou-se como um sólido amarelo (370,0 mg). A adição de MeOH e posterior filtração forneceu um sólido branco (45,4 mg), que apresentou uma única mancha de coloração roxa em CCD quando

revelada com ácido perclórico/vanilina. A análise do espectro na região do IV e comparação em CCD do sólido com padrão isolado permitiu identificar o sólido como sendo **3-oxo-29-hidroxifriedelano (S9)**.

O filtrado do grupo **AH16** (313,0 mg) apresentou várias manchas em CCD, sendo portanto submetido a uma nova coluna cromatográfica (Coluna **FH**: 1,9 cm/53,0 cm). Utilizaram-se 33,25 g de Florisil e, após o empacotamento da coluna com Hex, utilizaram-se os eluentes Hex, CHCl<sub>3</sub>, AcOEt e MeOH puros ou em misturas em gradiente de polaridade (Tabela 6).

**Tabela 6:** Ordem de eluição da coluna FH e subgrupos relacionados

Eluente	Fração de 25 mL	Eluente	Fração de 25 mL	Grupo	Massa (mg)
Hex/CHCl <sub>3</sub> (4:6)	1 – 2	CHCl <sub>3</sub> /AcOEt (95:5)	25 – 27	<b>FH1 (1 - 20)</b>	<b>38,8</b>
Hex/CHCl <sub>3</sub> (36:64)	3 – 5	CHCl <sub>3</sub> /AcOEt (9:1)	28 – 29	<b>FH2 (21 – 40)</b>	<b>25,4</b>
Hex/CHCl <sub>3</sub> (32:68)	6 – 8	CHCl <sub>3</sub> /AcOEt (86:14)	30 – 33	<b>FH3 (41 – 47)</b>	<b>155,4</b>
Hex/CHCl <sub>3</sub> (28:72)	9 – 11	CHCl <sub>3</sub> /AcOEt (82:18)	34 – 36		
Hex/CHCl <sub>3</sub> (22:78)	12 – 13	CHCl <sub>3</sub> /AcOEt (78:22)	37 – 38		
Hex/CHCl <sub>3</sub> (16:84)	14 – 15	CHCl <sub>3</sub> /AcOEt (74:26)	39 – 41		
Hex/CHCl <sub>3</sub> (12:88)	16 – 18	CHCl <sub>3</sub> /AcOEt (1:1)	42 – 44		
Hex/CHCl <sub>3</sub> (5:95)	19 - 21	AcOEt	45 – 46		
CHCl <sub>3</sub>	22 – 24	MeOH	47		

Foram recolhidas 47 frações de 25 mL cada. As frações foram analisadas por CCD e agrupadas de acordo com o perfil observado nas cromatoplasas (Tabela 6).

**Subgrupo FH1 (frações 1-20):** apresentou-se como sólido branco (38,8 mg) com uma única mancha de coloração roxa em CCD quando revelada com ácido perclórico/vanilina. A comparação da análise em CCD do sólido com o padrão já isolado, permitiu identificar **FH1** como sendo **β-sitosterol (S7)**.

**Subgrupo FH2 (frações 21-40):** apresentou-se como cristal branco (25,4 mg). A análise dos espectros de RMN de <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C permitiu identificar o sólido como sendo uma mistura de **3-oxo-28-hidroxifriedelano (S8)**, **3-oxo-29-hidroxifriedelano (S9)** e mais um triterpeno não identificado.

**Subgrupo FH3 (frações 41-47):** Apresentou-se como um sólido marrom (155,4 mg) com um rastro marrom e uma mancha verde em CCD, portanto, a fração não foi trabalhada.

**Grupo AH17 (frações 150-242):** apresentou-se como um sólido amarelo (405,3 mg). Por apresentar várias manchas em CCD, realizou-se uma cromatografia em coluna (Coluna **GH**: 2,5 cm/60,0 cm) com 62,4 g de sílica gel 60. Após o empacotamento da coluna com Hex, utilizaram-se os eluentes Hex, CHCl<sub>3</sub>, AcOEt e MeOH puros ou em misturas em gradiente de polaridade (Tabela 7).

**Tabela 7:** Ordem de eluição da coluna GH e subgrupos relacionados

Eluente	Fração de 25 mL	Eluente	Fração de 25 mL	Grupo	Massa (mg)
Hex/CHCl <sub>3</sub> (35:65)	1 - 4	CHCl <sub>3</sub> /AcOEt (95:5)	117 - 119	<b>GH1 (1)</b>	<b>34,3</b>
Hex/CHCl <sub>3</sub> (3:7)	5 - 11	CHCl <sub>3</sub> /AcOEt (92:8)	120 - 131	GH2 (2 - 15)	13,4
Hex/CHCl <sub>3</sub> (28:72)	12 - 13	CHCl <sub>3</sub> /AcOEt (9:1)	132 - 134	GH3 (16 - 18)	0,6
Hex/CHCl <sub>3</sub> (25:75)	14 - 16	CHCl <sub>3</sub> /AcOEt (8:2)	135 - 136	GH4 (19 - 33)	9,3
Hex/CHCl <sub>3</sub> (22:78)	17 - 18	CHCl <sub>3</sub> /AcOEt (7:3)	137 - 138	<b>GH5 (34 - 52)</b>	<b>52,5</b>
Hex/CHCl <sub>3</sub> (2:8)	19 - 20	CHCl <sub>3</sub> /AcOEt (6:4)	139 - 140	GH6 (53 - 58)	3,9
Hex/CHCl <sub>3</sub> (15:85)	21 - 26	CHCl <sub>3</sub> /AcOEt (1:1)	141 - 143	GH7 (59 - 66)	5,8
Hex/CHCl <sub>3</sub> (1:9)	27 - 39	CHCl <sub>3</sub> /AcOEt (4:6)	144 - 145	<b>GH8 (67 - 77)</b>	<b>12,6</b>
Hex/CHCl <sub>3</sub> (5:95)	40 - 56	CHCl <sub>3</sub> /AcOEt (3:7)	146 - 147	GH9 (78 - 80)	11,6
Hex/CHCl <sub>3</sub> (2:98)	57 - 65	CHCl <sub>3</sub> /AcOEt (2:8)	148 - 149	GH10 (81 - 89)	14,6
Hex/CHCl <sub>3</sub> (1:99)	66 - 67	CHCl <sub>3</sub> /AcOEt (1:9)	150 - 151	GH11 (90 - 141)	128,7
CHCl <sub>3</sub>	68 - 72	AcOEt	152 - 156	GH12 (142 - 159)	57,8
CHCl <sub>3</sub> /AcOEt (99:1)	73 - 113	AcOEt/MeOH (1:1)	157 - 162	GH13 (160 - 161)	32,9
CHCl <sub>3</sub> /AcOEt (97:3)	114 - 116	MeOH	163	GH14 (162 - 163)	7,4

Foram recolhidas 163 frações de 25 mL cada. As frações foram analisadas por CCD e agrupadas de acordo com o perfil observado nas cromatoplasmas (Tabela 7).

**Subgrupo GH1 (fração 1):** apresentou-se como um líquido incolor (34,3 mg), que apresentou uma única mancha de coloração roxa em CCD quando revelada com ácido perclórico/vanilina. A análise dos espectros de RMN de <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C indicou tratar-se de mistura de hidrocarbonetos.

**Subgrupo GH5 (frações 34-52):** apresentou-se como um sólido branco amarelado (52,5 mg) que, após purificação com MeOH, resultou na obtenção de cristal branco em forma de agulha (25,7 mg). Este sólido apresentou faixa de fusão 142-145 °C e apenas uma mancha de coloração roxa em CCD quando revelada com

ácido perclórico/vanilina. A análise dos espectros na região do IV e RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  permitiu identificar o sólido como sendo **ácido 3,4-seco-friedelan-3-oico (S10)**.

**Subgrupo GH8 (frações 67-77):** apresentou-se como um sólido branco amarelado (12,6 mg), que foi purificado usando MeOH, obtendo-se, um cristal branco em forma de agulha (8,3 mg), que apresentou uma única mancha de coloração roxa em CCD quando revelada com ácido perclórico/vanilina e foi positivo no teste LB para TTPC. A análise dos espectros na região do IV e RMN de  $^1\text{H}$  permitiu identificar o sólido como sendo **3-oxo-29-hidroxifriedelano (S9)**.

**Grupo AH18 (frações 243-270):** apresentou-se como um sólido verde escuro (461,0 mg) que, por apresentar várias manchas em CCD, foi recromatografado (Coluna **HH**: 1,5 cm/30,0 cm) com 143,3 g de sílica gel 60. Após o empacotamento da coluna com Hex, utilizaram-se os eluentes Hex,  $\text{CHCl}_3$ , AcOEt e MeOH puros ou em misturas em gradiente de polaridade (Tabela 8, p. 32).

**Tabela 8:** Ordem de eluição da coluna HH e subgrupos relacionados

Eluente	Fração de 25 mL	Eluente	Fração de 25 mL	Grupo	Massa (mg)
Hex	1 – 3	CHCl <sub>3</sub> /AcOEt (9,5:0,5)	65 – 73	HH1 (1 - 6)	10,0
Hex/CHCl <sub>3</sub> (98:2)	4 – 5	CHCl <sub>3</sub> /AcOEt (9,3:0,7)	74 – 75	HH2 (7 – 9)	0,8
Hex/CHCl <sub>3</sub> (96:4)	6 – 7	CHCl <sub>3</sub> /AcOEt (9:1)	76 – 77	HH3 (10 - 12)	0,9
Hex/CHCl <sub>3</sub> (94:6)	8 – 9	CHCl <sub>3</sub> /AcOEt (8,5;1,5)	78 – 80	HH4 (13 - 19)	1,3
Hex/CHCl <sub>3</sub> (92:8)	10 – 13	CHCl <sub>3</sub> /AcOEt (8:2)	81 – 82	HH5 (20 - 21)	1,1
Hex/CHCl <sub>3</sub> (9:1)	14 – 15	CHCl <sub>3</sub> /AcOEt (7,5;2,5)	83 – 84	HH6 (22)	0,8
Hex/CHCl <sub>3</sub> (8,5:1,5)	16 – 17	CHCl <sub>3</sub> /AcOEt (7:3)	85 – 86	HH7 (23)	2,2
Hex/CHCl <sub>3</sub> (8:2)	18 – 20	CHCl <sub>3</sub> /AcOEt (6,5:3,5)	87 – 88	HH8 (24)	2,5
Hex/CHCl <sub>3</sub> (7,5:2,5)	21 – 25	CHCl <sub>3</sub> /AcOEt (6:4)	89 – 91	HH9 (25)	1,4
Hex/CHCl <sub>3</sub> (7:3)	26 – 28	CHCl <sub>3</sub> /AcOEt (5,5:4,5)	92 – 93	HH10 (26)	0,8
Hex/CHCl <sub>3</sub> (6,5:3,5)	29 – 31	CHCl <sub>3</sub> /AcOEt (1:1)	94 – 95	HH11 (27 - 32)	2,8
Hex/CHCl <sub>3</sub> (6:4)	32 – 35	CHCl <sub>3</sub> /AcOEt (4,5:5,5)	96 – 97	HH12 (33 - 39)	7,0
Hex/CHCl <sub>3</sub> (5,5:4,5)	36 – 40	CHCl <sub>3</sub> /AcOEt (4:6)	98 – 99	HH13 (40 – 49)	7,5
Hex/CHCl <sub>3</sub> (1:1)	41 – 42	CHCl <sub>3</sub> /AcOEt (3,5:6,5)	100 – 101	<b>HH14 (50 – 57)</b>	<b>9,8</b>
Hex/CHCl <sub>3</sub> (4,5:5,5)	43 – 44	CHCl <sub>3</sub> /AcOEt (3:7)	102 – 103	HH15 (58)	1,1
Hex/CHCl <sub>3</sub> (4:6)	45 – 46	CHCl <sub>3</sub> /AcOEt (2,5:7,5)	104 – 105	HH16 (59 – 62)	5,2
Hex/CHCl <sub>3</sub> (3,5:6,5)	47 – 48	CHCl <sub>3</sub> /AcOEt (2:8)	106 – 107	HH17 (63 – 79)	99,9
Hex/CHCl <sub>3</sub> (3:7)	49 – 50	CHCl <sub>3</sub> /AcOEt (1,5:8,5)	108 – 109	<b>HH18 (80 – 119)</b>	<b>267,2</b>
Hex/CHCl <sub>3</sub> (2,5:7,5)	51 – 52	CHCl <sub>3</sub> /AcOEt (1:9)	110 – 111		
Hex/CHCl <sub>3</sub> (2:8)	53 – 54	CHCl <sub>3</sub> /AcOEt (0,5:9,5)	112 – 113		
Hex/CHCl <sub>3</sub> (1,5:8,5)	55 – 56	AcOEt	114 – 115		
Hex/CHCl <sub>3</sub> (1:9)	57 – 58	AcOEt/MeOH (1:1)	116 – 118		
Hex/CHCl <sub>3</sub> (0,5:9,5)	59 – 60	MeOH	119		
CHCl <sub>3</sub>	61 – 64				

Foram recolhidas 119 frações de 25 mL cada. As frações foram analisadas por CCD e agrupadas de acordo com o perfil observado nas cromatoplaças (Tabela 8).

**Subgrupo HH14 (frações 50-57):** apresentou-se como um sólido branco (9,8 mg), com faixa de fusão 210-216 °C. Obteve-se apenas uma mancha de coloração roxa em CCD quando revelada com ácido perclórico/vanilina e teste LB positivo para TTPC. A análise dos espectros na região do IV e RMN de <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C permitiu identificar o sólido como sendo **3β-hidroxi-olean-9(11):12-dieno (S11)**.

**Subgrupo HH18 (frações 80-119):** apresentou-se como um sólido marrom (267,2 mg), com várias manchas em CCD. Este sólido foi submetido a uma coluna cromatográfica, mas não foi possível o isolamento de substâncias puras.

**Grupo AH19 (fração 271):** apresentou-se como um sólido marrom (230,4 mg), que, por apresentar várias manchas em CCD, foi recromatografado (coluna de 1,5 cm/46,0 cm; com 13,81 g de sílica gel 60). Após o empacotamento da coluna com Hex, foram utilizados como eluentes Hex, CHCl<sub>3</sub>, AcOEt e MeOH puros ou em misturas em gradiente de polaridade. Foram obtidas 24 frações de 25 mL. As frações foram analisadas por CCD e agrupadas de acordo com o perfil observado nas cromatoplasas e foi isolado apenas ácidos graxos (105,0 mg), caracterizados pela análise do espectro de RMN de <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C.

**Grupo AH20 (frações 272-283):** apresentou-se como um sólido branco (7,8 mg), com faixa de fusão 72-75 °C e apenas uma mancha de coloração roxa em CCD quando revelada com ácido perclórico/vanilina. A análise dos espectros na região do IV e RMN de <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C permitiu identificar o sólido como sendo ácido graxo.

**Grupo AH21 (frações 284-291):** apresentou-se como um sólido marrom (278,7 mg), que, por apresentar várias manchas em CCD, realizou-se uma coluna cromatográfica (Coluna IH: 2,0 cm/40,0 cm) com 23,77 g de sílica gel 60. Após o empacotamento da coluna com Hex, utilizaram-se os eluentes Hex, CHCl<sub>3</sub>, AcOEt e MeOH puros ou em misturas em gradiente de polaridade (Tabela 9).

**Tabela 9:** Ordem de eluição da coluna IH e subgrupos relacionados

Eluente	Fração de 25 mL	Eluente	Fração de 25 mL	Grupo	Massa (mg)
Hex/CHCl <sub>3</sub> (2:8)	1 – 2	CHCl <sub>3</sub> /AcOEt (7:3)	37 – 41	IH1 (1 - 8)	3,4
Hex/CHCl <sub>3</sub> (1:9)	3 – 6	CHCl <sub>3</sub> /AcOEt (65:35)	42 – 45	IH2 (9 - 11)	1,2
Hex/CHCl <sub>3</sub> (5:95)	7 – 8	CHCl <sub>3</sub> /AcOEt (6:4)	46 – 49	IH3 (12)	2,4
CHCl <sub>3</sub>	9 – 14	CHCl <sub>3</sub> /AcOEt (1:1)	50 – 51	<b>IH4 (13 - 37)</b>	<b>56,3</b>
CHCl <sub>3</sub> /AcOEt (98:2)	15 – 19	CHCl <sub>3</sub> /AcOEt (4:6)	52 – 57	<b>IH5 (38 - 42)</b>	<b>26,3</b>
CHCl <sub>3</sub> /AcOEt (96:4)	20 – 21	CHCl <sub>3</sub> /AcOEt (3:7)	58 – 59	IH6 (43 - 74)	55,6
CHCl <sub>3</sub> /AcOEt (94:6)	22 – 23	CHCl <sub>3</sub> /AcOEt (2:8)	60 – 65	IH7 (75)	38,9
CHCl <sub>3</sub> /AcOEt (9:1)	24 – 28	CHCl <sub>3</sub> /AcOEt (1:9)	66 – 67		
CHCl <sub>3</sub> /AcOEt (88:12)	29 – 30	AcOEt	68 – 71		
CHCl <sub>3</sub> /AcOEt (85:15)	31 – 32	AcOEt/MeOH (1:1)	72 – 74		
CHCl <sub>3</sub> /AcOEt (8:2)	33 – 34	MeOH	75		
CHCl <sub>3</sub> /AcOEt (7,5:2,5)	35 – 36				

Foram recolhidas 75 frações de 25 mL cada. As frações foram analisadas por CCD e agrupadas de acordo com o perfil observado nas cromatoplasas (Tabela 9, p. 33).

**Subgrupo IH4 (frações 13-37):** apresentou-se como sólido branco (56,3 mg) com apenas uma mancha de coloração roxa em CCD quando revelada com ácido perclórico/vanilina. A análise dos espectros RMN de  $^1\text{H}$  permitiu caracterizar o sólido como sendo ácido graxo.

**Subgrupo IH5 (frações 38-42):** apresentou-se como cristal branco em forma de agulha (26,3 mg), com apenas uma mancha de coloração roxa em CCD quando revelada com ácido perclórico/vanilina e faixa de fusão 281-284 °C. A análise dos espectros na região do IV e RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  permitiu identificar o sólido como sendo o **28,29-di-hidroxfriedelan-3-ona (S12)**. Este composto é inédito no gênero *Salacia*.

Os subgrupos IH6 e IH7 apresentaram rastros em CCD e nenhuma mancha bem definida, portanto, não foram trabalhados.

**Grupo AH22 (frações 292-301)** apresentou-se como um sólido marrom (124,9 mg). Na cromatoplasa apareceram várias manchas de coloração roxa, com perfil complexo quando revelada com ácido perclórico/vanilina. Mesmo assim, realizou-se cromatográfica em coluna (2,5 cm/35,0 cm) com 19,4 g de sílica gel 60. Após o empacotamento da coluna com Hex, utilizaram-se os eluentes Hex,  $\text{CHCl}_3$ , AcOEt e MeOH puros ou em misturas em gradiente de polaridade e coletaram-se frações de 10 mL. Na fração inicial da coluna obteve-se um sólido que apresentou uma mancha roxa em CCD, quando revelada com ácido perclórico e vanilina. O composto foi caracterizado pela análise do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  como sendo ácido graxo.

**Grupo AH23 (fração 302):** apresentou-se como um sólido branco (1520,0 mg), solúvel apenas em  $\text{H}_2\text{O}$ . Não apresentou mancha em CCD quando revelado com ácido perclórico e vanilina. Não apresentou nenhum sinal nos espectros de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ , indicando tratar-se de um composto inorgânico.

A Figura 11 (p. 35) resume o fracionamento do extrato **EHS** de folhas de *Salacia crassifolia*.



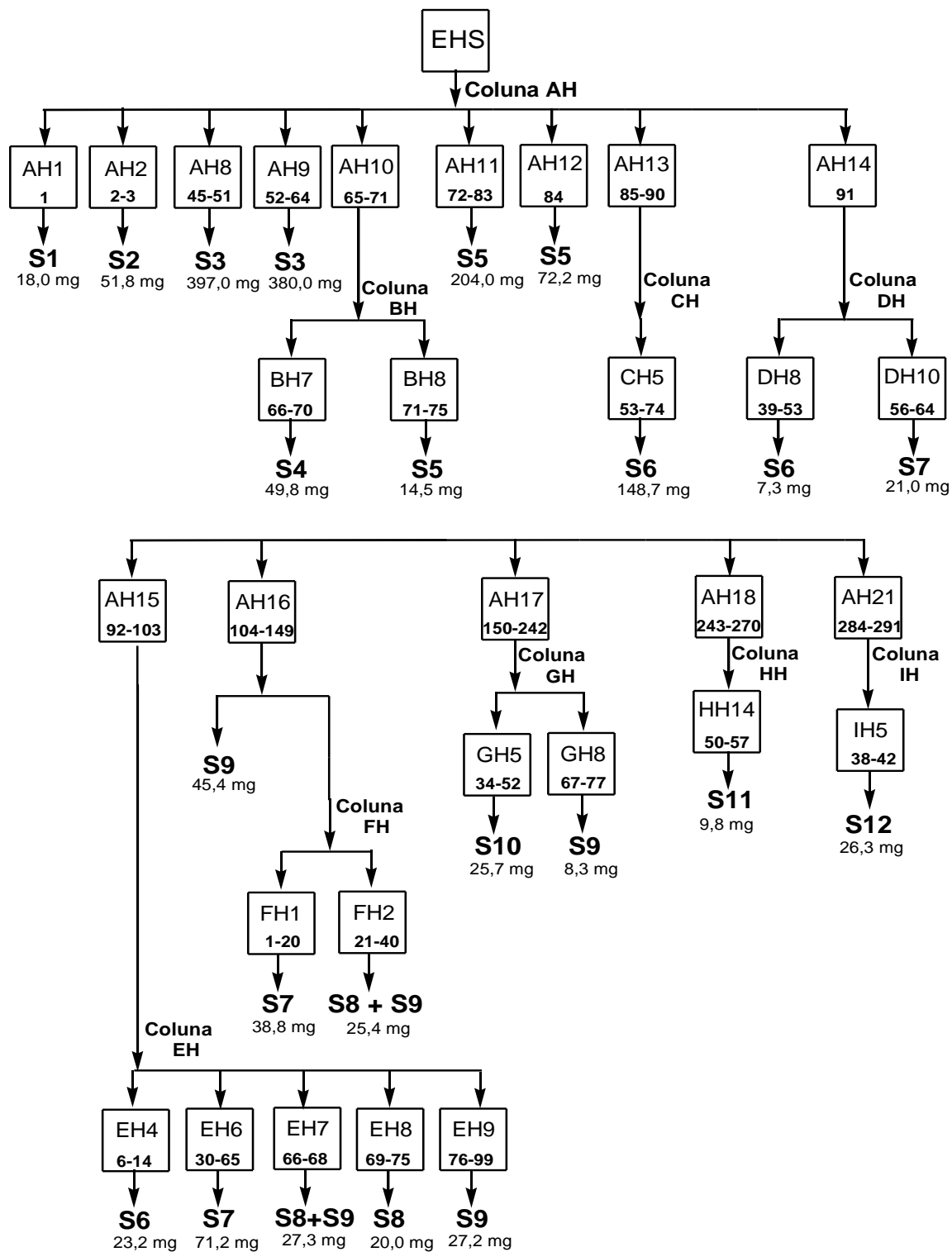


Figura 11: Fracionamento do extrato EHS de folhas de *Salacia crassifolia*.

### 3.1.6.2 - Elaboração do extrato clorofórmico (ECS) de *Salacia crassifolia*

O extrato clorofórmico apresentou também uma grande quantidade de guta-percha, detectada por comparação do perfil cromatográfico em CCD do extrato com guta-percha padrão já isolada no extrato hexânico. Portanto, o extrato (44,0 g) foi submetido a uma coluna de filtração, primeiramente com MeOH para obtenção do extrato sem guta-percha **ECS** (12,0 g) e, depois, com CHCl<sub>3</sub> para a obtenção da guta-percha (30,0 g).

Parte de **ECS** (9,0 g) foi submetida à coluna cromatográfica (Coluna **AC**: 4,5 cm/0,95 m), utilizando 371,0 g de sílica gel 60 com tamanho de partícula 0,063-0,200 mm (70-230 Mesh). A coluna foi empacotada com hexano e utilizaram-se os eluentes Hex, CHCl<sub>3</sub>, AcOEt e MeOH puros ou em misturas, em ordem crescente de polaridade. Foram obtidas 214 frações de 250 mL cada (Tabela 10).

**Tabela 10:** Ordem de eluição da coluna AC e grupos relacionados

Eluente	Fração de 200 mL	Eluente	Fração de 200 mL	Grupo	Massa* (mg)
Hex	1-2	CHCl <sub>3</sub>	40	<b>AC1 (1 - 12)</b>	<b>86,8</b>
Hex/CHCl <sub>3</sub> (95:5)	3-5	CHCl <sub>3</sub> /AcOEt (95:5)	41-91	<b>AC2 (13 - 14)</b>	<b>11,2</b>
Hex/CHCl <sub>3</sub> (90:10)	6-7	CHCl <sub>3</sub> /AcOEt (90:10)	92-102	<b>AC3 (15 - 24)</b>	<b>80,9</b>
Hex/CHCl <sub>3</sub> (85:15)	8-11	CHCl <sub>3</sub> /AcOEt (85:15)	103-110	<b>AC4 (25 - 30)</b>	<b>10,2</b>
Hex/CHCl <sub>3</sub> (80:20)	12-15	CHCl <sub>3</sub> /AcOEt (80:20)	111-116	<b>AC5 (31 - 32)</b>	<b>9,7</b>
Hex/CHCl <sub>3</sub> (75:25)	16	CHCl <sub>3</sub> /AcOEt (75:25)	117-122	<b>AC6 (33)</b>	<b>3,7</b>
Hex/CHCl <sub>3</sub> (70:30)	17	CHCl <sub>3</sub> /AcOEt (70:30)	123-127	AC7 (34 - 35)	6,2
Hex/CHCl <sub>3</sub> (65:35)	18	CHCl <sub>3</sub> /AcOEt (65:35)	128-133	<b>AC8 (36 - 41)</b>	<b>11,8</b>
Hex/CHCl <sub>3</sub> (60:40)	19	CHCl <sub>3</sub> /AcOEt (60:40)	134-138	<b>AC9 (42 - 66)</b>	<b>3,5</b>
Hex/CHCl <sub>3</sub> (55:45)	20-21	CHCl <sub>3</sub> /AcOEt (55:45)	139-143	<b>AC10 (67 - 93)</b>	<b>20,2</b>
Hex/CHCl <sub>3</sub> (50:50)	22	CHCl <sub>3</sub> /AcOEt (50:50)	144-150	AC11 (94 - 105)	3,9
Hex/CHCl <sub>3</sub> (45:55)	23	CHCl <sub>3</sub> /AcOEt (40:60)	151-161	AC12 (106 - 116)	5,2
Hex/CHCl <sub>3</sub> (40:60)	24	CHCl <sub>3</sub> /AcOEt (30:70)	162-172	<b>AC13 (117 - 136)</b>	<b>24,4</b>
Hex/CHCl <sub>3</sub> (30:70)	25	CHCl <sub>3</sub> /AcOEt (20:80)	173-185	AC14 (137 - 148)	18,7
Hex/CHCl <sub>3</sub> (25:75)	26	CHCl <sub>3</sub> /AcOEt (10:90)	186-188	AC15 (149 - 181)	8,6
Hex/CHCl <sub>3</sub> (20:80)	27-29	AcOEt	189-201	<b>AC16 (182 - 200)</b>	<b>167,3</b>
Hex/CHCl <sub>3</sub> (15:85)	30-32	AcOEt/MeOH (50:50)	202-213	AC17 (201 - 214)	8,0
Hex/CHCl <sub>3</sub> (10:90)	33-35	MeOH	214		
Hex/CHCl <sub>3</sub> (50:95)	36-39				

\*Massa após sucessivas purificações com acetona

Todas as frações apresentaram coloração verde, indicando alto teor de clorofila. A adição de acetona em cada uma, depois da evaporação do eluente, foi importante para a remoção da clorofila e tornou as frações com maior pureza. Devido a diversas lavagens com acetona, pouca massa restou nas frações, mas a purificação foi muito eficiente, levando a obtenção, em algumas frações, de cristais brancos. As frações, após lavagem com acetona, foram analisadas por CCD e reunidas em 17 grupos de acordo com o perfil cromatográfico (Tabela 10, p. 36).

Um fluxograma mostrando o isolamento das substâncias de **ECS** encontra-se na Figura 12, p. 39.

**Grupos AC1 (frações 1-12) e AC3 (frações 15-24):** apresentaram-se como sólidos brancos de massas 86,8 mg e 80,9 mg, respectivamente. Observou-se uma única mancha de coloração roxa em CCD quando revelada com ácido perclórico/vanilina com Rf ligeiramente diferente. A análise dos espectros na região do IV e RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  permitiu identificar os sólidos destes grupos como sendo mistura de hidrocarbonetos.

**Grupo AC2 (frações 13-14):** apresentou-se como um sólido pastoso incolor (11,2 mg). Observou-se uma única mancha roxa em CCD quando revelada com ácido perclórico/vanilina. A análise dos espectros na região do IV e RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  permitiu identificar o composto como sendo **3 $\beta$ -palmitiloxi-urs-12-eno (S3)**.

**Grupo AC4 (frações 25-30):** foi obtido cristal branco (10,2 mg), com uma única mancha de coloração amarela em CCD quando revelada com ácido perclórico/vanilina e apresentou teste LB positivo para TTPC. A análise dos espectros na região do IV e RMN de  $^1\text{H}$  e comparação em CCD do sólido com padrão já isolado, permitiram identificá-lo como sendo **3-oxo-friedelano (S4)**.

**Grupo AC5 (frações 31-32):** foi obtido cristal branco (9,7 mg), com apenas uma mancha de coloração roxa em CCD quando revelada com ácido perclórico/vanilina e apresentou teste LB positivo para TTPC. A análise dos espectros na região do IV e RMN de  $^1\text{H}$  e comparação em CCD do sólido com padrão já isolado permitiram identificá-lo como sendo **3 $\beta$ -hidroxifriedelano (S5)**.

**Grupo AC6 (fração 33):** apresentou-se como um cristal branco (3,7 mg) com uma única mancha de coloração roxa em CCD quando revelada com ácido perclórico/vanilina e teste LB positivo para TTPC. A análise dos espectros na região do IV e RMN de  $^1\text{H}$  e comparação em CCD de AC6 com padrão permitiram identificar o sólido como sendo mistura de  **$\alpha$ -amirina +  $\beta$ -amirina (S6)**.

**Grupo AC8 (fração 36-41):** apresentou-se como um sólido branco (11,8 mg), com uma mancha de coloração roxa em CCD quando revelada com ácido perclórico/vanilina e apresentou teste LB positivo para esteroide. A análise dos espectros na região do IV e RMN de  $^1\text{H}$  e comparação em CCD de AC8 com padrão permitiram identificar o sólido como sendo  **$\beta$ -sitosterol (S7)**.

**Grupo AC9 (frações 42-66):** apresentou-se como um sólido branco (3,5 mg) com uma mancha em cromatoplaça de coloração roxa, quando revelado com ácido perclórico/vanilina. A análise dos espectros de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  permitiu identificar este sólido como sendo ácido graxo.

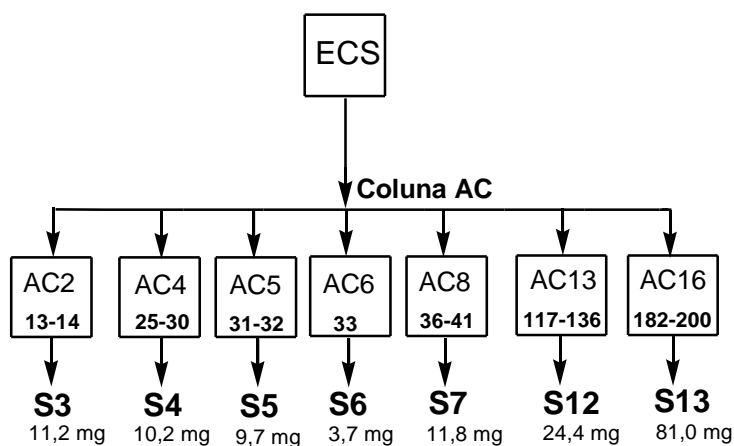
**Grupo AC10 (frações 67-93):** apresentou-se como um sólido branco (20,2 mg) com uma mancha em cromatoplaça de coloração roxa, quando revelado com ácido perclórico/vanilina. A análise dos espectros de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  permitiu identificar este sólido como sendo álcool graxo.

**Grupo AC13 (frações 117-136):** apresentou-se como cristal branco (24,4 mg), com apenas uma mancha de coloração roxa em CCD quando revelada com ácido perclórico/vanilina. A análise dos espectros na região do IV e RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ , permitiu identificar o sólido como sendo o **28,29-di-hidroxifriedelan-3-ona (S12)**.

**Grupo AC16 (frações 182-200):** apresentou-se como um sólido (167,3 mg) que, mesmo depois da adição de acetona, manteve-se esverdeado. Depois de sucessivas extrações com mais acetona, obteve-se um sólido branco (81,0 mg), com apenas uma mancha de coloração roxa em CCD quando revelada com ácido perclórico/vanilina e faixa de fusão 277,0-281,0 °C. A análise dos espectros na

região do IV e RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  permitiu identificar o sólido como sendo o **3-O- $\beta$ -D-glicosil- $\beta$ -sitosterol (S13)**.

A Figura 12 resume o fracionamento do extrato **ECS** de folhas de *Salacia crassifolia*.



**Figura 12:** Fracionamento do extrato **ECS** de folhas de *Salacia crassifolia*.

### 3.1.6.3 - Elaboração do extrato acetato etílico (EAS) de *Salacia crassifolia*

**EAS** (10,0 g) foi submetido à coluna cromatográfica (Coluna AA) de 61,0 cm de comprimento e 3,5 cm de diâmetro. Foram utilizados 182,0 g de sílica gel 60 (0,063 – 0,200 mm/ 70 – 230 Mesh).

**Tabela 11:** Ordem de eluição da coluna **AA** e subgrupos relacionados

Eluente	Fração de 200 mL	Eluente	Fração de 200 mL	Grupo	Massa (mg)
Hex	1	CHCl <sub>3</sub> /AcOEt (45:55)	66-67	AA1 (1-2)	15,6
Hex/CHCl <sub>3</sub> (95:5)	2-3	CHCl <sub>3</sub> /AcOEt (4:6)	68-69	<b>AA2 (3-6)</b>	<b>10,8</b>
Hex/CHCl <sub>3</sub> (9:1)	4	CHCl <sub>3</sub> /AcOEt (35:65)	70-71	AA3 (7)	0,8
Hex/CHCl <sub>3</sub> (85:15)	5	CHCl <sub>3</sub> /AcOEt (3:7)	72-74	AA4 (8-13)	23,2
Hex/CHCl <sub>3</sub> (8:2)	6	CHCl <sub>3</sub> /AcOEt (25:75)	75-76	AA5 (14-15)	2,9
Hex/CHCl <sub>3</sub> (75:25)	7	CHCl <sub>3</sub> /AcOEt (2:8)	77-85	<b>AA6 (16-19)</b>	<b>21,0</b>
Hex/CHCl <sub>3</sub> (7:3)	8	CHCl <sub>3</sub> /AcOEt (15:85)	86-87	<b>AA7 (20-24)</b>	<b>19,5</b>
Hex/CHCl <sub>3</sub> (65:35)	9	CHCl <sub>3</sub> /AcOEt (1:9)	88-89	AA8 (25)	2,1
Hex/CHCl <sub>3</sub> (6:4)	10	CHCl <sub>3</sub> /AcOEt (5:95)	90-92	AA9 (26)	3,0
Hex/CHCl <sub>3</sub> (55:45)	11-12	AcOEt	93-95	<b>AA10 (27-34)</b>	<b>21,4</b>
Hex/CHCl <sub>3</sub> (5:5)	13-14	AcOEt/MeOH (95:5)	96-97	<b>AA11 (35-38)</b>	<b>99,7</b>
Hex/CHCl <sub>3</sub> (45:55)	15-16	AcOEt/MeOH (9:1)	98-103	<b>AA12 (39)</b>	<b>6,7</b>
Hex/CHCl <sub>3</sub> (4:6)	17-18	AcOEt/MeOH (85:15)	104-106	AA13 (40-41)	9,2
Hex/CHCl <sub>3</sub> (35:65)	19-20	AcOEt/MeOH (8:2)	107-110	AA14 (42)	5,3
Hex/CHCl <sub>3</sub> (3:7)	21-22	AcOEt/MeOH (75:25)	111-112	AA15 (43)	8,4
Hex/CHCl <sub>3</sub> (25:75)	23-24	AcOEt/MeOH (7:3)	113-114	AA16 (44-45)	30,3
Hex/CHCl <sub>3</sub> (2:8)	25-26	AcOEt/MeOH (65:35)	115-116	AA17 (46)	7,8
Hex/CHCl <sub>3</sub> (15:85)	27-33	AcOEt/MeOH (6:4)	117-120	AA18 (47)	8,5
Hex/CHCl <sub>3</sub> (1:9)	34-37	AcOEt/MeOH (55:45)	121-122	AA19 (48-49)	8,2
Hex/CHCl <sub>3</sub> (5:95)	38-39	AcOEt/MeOH (5:5)	123-124	AA20 (50)	4,3
CHCl <sub>3</sub>	40-41	AcOEt/MeOH (45:55)	125-126	<b>AA21 (51-69)</b>	<b>111,8</b>
CHCl <sub>3</sub> /AcOEt (95:5)	42-43	AcOEt/MeOH (4:6)	127-128	<b>AA22 (70-77)</b>	<b>439,1</b>
CHCl <sub>3</sub> /AcOEt (9:1)	44-45	AcOEt/MeOH (35:65)	129-130	<b>AA23 (78)</b>	<b>10,0</b>
CHCl <sub>3</sub> /AcOEt (85:5)	46-48	AcOEt/MeOH (3:7)	131-132	AA24 (79-83)	602,0
CHCl <sub>3</sub> /AcOEt (8:2)	49-50	AcOEt/MeOH (25:75)	133-135	AA25 (84-93)	1010,5
CHCl <sub>3</sub> /AcOEt (75:25)	51-53	AcOEt/MeOH (2:8)	136-137	AA26 (94-97)	943,7
CHCl <sub>3</sub> /AcOEt (7:3)	54-55	AcOEt/MeOH(15:85)	138-139	AA27 (98-100)	3189,6
CHCl <sub>3</sub> /AcOEt (65:35)	56-57	AcOEt/MeOH (1:9)	140-141	AA28 (101-105)	1104,9
CHCl <sub>3</sub> /AcOEt (6:4)	58-60	AcOEt/MeOH (5:95)	142-143	AA29 (106-112)	607,9
CHCl <sub>3</sub> /AcOEt (55:45)	61-62	MeOH	144-157	AA30 (113-115)	102,1
CHCl <sub>3</sub> /AcOEt (5:5)	63-65	MeOH/H <sub>2</sub> O (9:1)	158	AA31 (116-158)	437,1

A coluna foi empacotada com hexano e utilizaram-se os eluentes Hex,  $\text{CHCl}_3$ , AcOEt, MeOH e  $\text{H}_2\text{O}$  puros ou em misturas, em ordem crescente de polaridade (Tabela 11, p. 40).

Foram recolhidas 158 frações de 200 mL cada. As frações foram analisadas por CCD e agrupadas de acordo com o perfil observado nas cromatoplasas e reunidas em 31 grupos (Tabela 11, pág 40). O fluxograma do isolamento de todas as substâncias de **EAS** encontra-se na Figura 13, p. 47.

**Grupo AA2 (frações 3-6):** apresentou-se como líquido incolor (10,8 mg) com uma mancha em cromatoplasa de coloração roxa quando revelada com ácido perclórico/vanilina. A análise dos espectros de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  permitiu identificar essa fração como sendo mistura de hidrocarbonetos.

**Grupo AA6 (frações 16-19):** apresentou-se como um sólido branco (21,0 mg) com uma mancha em cromatoplasa de coloração roxa quando revelada com ácido perclórico/vanilina. A análise dos espectros de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  permitiu identificar essa fração como sendo uma mistura de álcool graxo e ácido graxo.

**Grupo AA7 (frações 20-24):** apresentou-se como um sólido branco (19,5 mg) com uma mancha em cromatoplasa de coloração roxa quando revelada com ácido perclórico/vanilina. A análise do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  permitiu identificar essa fração como sendo álcool graxo.

**Grupo AA10 (frações 27-34):** apresentou-se como um sólido amarelo (21,4 mg) que, após purificação com MeOH, obteve-se um sólido branco em forma de agulha (16,0 mg). A análise dos espectros de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  permitiu identificar essa fração como sendo o  **$\beta$ -sitosterol (S7)**.

**Grupo AA11 (frações 35-38):** apresentou-se como um sólido amarelo (99,7 mg) com muitas manchas na cromatoplasa. Essa fração foi recromatografada, mas não foi possível isolar substâncias puras.

**Grupo AA12 (fração 39):** apresentou-se como um sólido amarelo (6,7 mg) que após purificação com acetona, obteve-se um sólido branco (4,0 mg). A análise dos espectros de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  permitiu identificar essa fração como sendo éster graxo.

**Grupo AA21 (frações 51-69):** apresentou-se como um sólido amarelo (111,8 mg) que foi submetido a uma coluna cromatográfica (Coluna BA) de 32,0 cm de comprimento e 1,5 cm de diâmetro. Foram utilizados 17,60 g de sílica gel 60 (0,063 – 0,200 mm/ 70 – 230 Mesh) e hexano para o empacotamento. Utilizaram-se os

eluentes Hex, CHCl<sub>3</sub>, AcOEt e MeOH puros ou em misturas, em ordem crescente de polaridade.

**Tabela 12:** Ordem de eluição da coluna **BA** e subgrupos relacionados

Eluente	Fração de 20 mL	Eluente	Fração de 20 mL	Grupo	Massa (mg)
Hex	1-3	CHCl <sub>3</sub> /AcOEt (75:25)	79-80	BA1 (1-2)	0,5
Hex/CHCl <sub>3</sub> (95:5)	4-7	CHCl <sub>3</sub> /AcOEt (7:3)	81-82	<b>BA2 (3-12)</b>	<b>6,0</b>
Hex/CHCl <sub>3</sub> (9:1)	8-10	CHCl <sub>3</sub> /AcOEt (65:35)	83-85	BA3 (13-14)	0,2
Hex/CHCl <sub>3</sub> (85:15)	11-13	CHCl <sub>3</sub> /AcOEt (6:4)	86-87	BA4 (15-16)	0,4
Hex/CHCl <sub>3</sub> (8:2)	14-16	CHCl <sub>3</sub> /AcOEt (55:45)	88-89	BA5 (17-25)	1,4
Hex/CHCl <sub>3</sub> (75:25)	17-19	CHCl <sub>3</sub> /AcOEt (5:5)	90-92	<b>BA6 (26-31)</b>	<b>3,6</b>
Hex/CHCl <sub>3</sub> (7:3)	20-21	CHCl <sub>3</sub> /AcOEt (45:55)	93-94	BA7 (32-41)	1,4
Hex/CHCl <sub>3</sub> (65:35)	22-23	CHCl <sub>3</sub> /AcOEt (4:6)	95-97	BA8 (42-51)	1,3
Hex/CHCl <sub>3</sub> (6:4)	24-26	CHCl <sub>3</sub> /AcOEt (35:65)	98-99	BA9 (52-60)	1,2
Hex/CHCl <sub>3</sub> (55:45)	27-28	CHCl <sub>3</sub> /AcOEt (3:7)	100-101	BA9 (61-65)	1,1
Hex/CHCl <sub>3</sub> (5:5)	29-30	CHCl <sub>3</sub> /AcOEt (25:75)	102-103	BA10 (66-67)	0,5
Hex/CHCl <sub>3</sub> (45:55)	31-32	CHCl <sub>3</sub> /AcOEt (2:8)	104-105	BA11 (68-70)	1,4
Hex/CHCl <sub>3</sub> (4:6)	33-34	CHCl <sub>3</sub> /AcOEt (15:85)	106-107	BA12 (71)	0,5
Hex/CHCl <sub>3</sub> (35:65)	35-37	CHCl <sub>3</sub> /AcOEt (1:9)	108-109	BA13 (72-74)	2,5
Hex/CHCl <sub>3</sub> (3:7)	38-41	CHCl <sub>3</sub> /AcOEt (5:95)	110-111	BA14 (75)	0,5
Hex/CHCl <sub>3</sub> (25:75)	42-45	AcOEt	112-113	BA15 (76-78)	1,1
Hex/CHCl <sub>3</sub> (2:8)	46-48	AcOEt/MeOH (95:5)	114-115	BA16 (79-80)	0,8
Hex/CHCl <sub>3</sub> (15:85)	49-51	AcOEt/MeOH (9:1)	116-117	BA17 (81-83)	1,7
Hex/CHCl <sub>3</sub> (1:9)	52-53	AcOEt/MeOH (85:15)	118-120	<b>BA18 (84-86)</b>	<b>2,6</b>
Hex/CHCl <sub>3</sub> (5:95)	54-56	AcOEt/MeOH (8:2)	121-122	BA19 (87-88)	2,9
CHCl <sub>3</sub>	57-60	AcOEt/MeOH (75:25)	123-124	<b>BA20 (89-91)</b>	<b>24,2</b>
CHCl <sub>3</sub> /AcOEt (97:3)	61-62	AcOEt/MeOH (7:3)	125-126	BA21 (92-97)	4,4
CHCl <sub>3</sub> /AcOEt (94:6)	63-70	AcOEt/MeOH (65:35)	127-128	BA22 (98-101)	7,4
CHCl <sub>3</sub> /AcOEt (91:9)	71-72	AcOEt/MeOH (6:4)	129	BA23 (102-104)	4,8
CHCl <sub>3</sub> /AcOEt (88:12)	73-74	AcOEt/MeOH (5:5)	130	BA24 (105-111)	4,1
CHCl <sub>3</sub> /AcOEt (85:15)	75-76	MeOH	131	BA25 (112-117)	2,9
CHCl <sub>3</sub> /AcOEt (8:2)	77-78			BA26 (118)	3,3
				BA27 (119-120)	4,0
				BA28 (121-128)	5,9
				BA29 (129-131)	2,1

Foram coletadas 131 frações de 20 mL cada e reunidas em 29 grupos de acordo com seu perfil cromatográfico (Tabela 12).



**Subgrupo BA2 (frações 3-12):** apresentou-se como um sólido branco (6,0 mg). A análise dos espectros de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  deste sólido permitiu identificar BA2 como sendo uma mistura de hidrocarbonetos.

**Subgrupo BA6 (frações 26-31):** apresentou-se como um sólido branco (3,6 mg). A análise dos espectros de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  deste sólido permitiu identificar esse composto como sendo **o-ftalato de bis(2-etilexila) (S14)**.

**Subgrupo BA18 (frações 84-86):** apresentou-se como um sólido amarelo claro (2,6 mg) com faixa de fusão 249,0-251,5 °C. A análise dos espectros no IV, RMN de  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  e DEPT-135 deste sólido permitiu identificar esse composto como sendo **naringenina (S15)**.

**Subgrupo BA20 (frações 89-91):** apresentou-se como um sólido branco (24,2 mg) e com faixa de fusão 211,0-216,4 °C. A análise dos espectros de RMN de  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  e DEPT-135 deste sólido permitiu identificar esse composto como sendo **ácido p-hidroxibenzoico (S16)**.

**Grupo AA22 (frações 70-77):** apresentou-se como um sólido marrom (439,1 mg) com muitas manchas na cromatoplaça. Esta fração foi submetida a uma coluna cromatográfica (Coluna CA). Utilizou-se uma coluna de 65,0 cm de comprimento e 1,5 cm de diâmetro com 42,7 g de sílica gel 60 (0,063 – 0,200 mm/ 70 – 230 Mesh). A coluna foi empacotada utilizando hexano e eluída com Hex,  $\text{CHCl}_3$ , AcOEt e MeOH puros ou em misturas, em ordem crescente de polaridade. Foram coletadas 157 frações de 20 mL, reunidas em 27 grupos (Tabela 13, p. 44).

**Tabela 13:** Ordem de eluição da coluna **CA** e subgrupos relacionados

Eluente	Fração de 20 mL	Eluente	Fração de 20 mL	Grupo	Massa (mg)
Hex	1-3	CHCl <sub>3</sub> /AcOEt (45:55)	93-94	CA1 (1-3)	0,6
Hex/CHCl <sub>3</sub> (95:5)	4-6	CHCl <sub>3</sub> /AcOEt (4:6)	95-96	CA2 (4-6)	2,3
Hex/CHCl <sub>3</sub> (9:1)	7-9	CHCl <sub>3</sub> /AcOEt (35:65)	97-98	CA3 (7-11)	1,4
Hex/CHCl <sub>3</sub> (85:15)	10-12	CHCl <sub>3</sub> /AcOEt (3:7)	99-101	CA4 (12-13)	0,1
Hex/CHCl <sub>3</sub> (8:2)	13-15	CHCl <sub>3</sub> /AcOEt (25:75)	102-103	CA5 (14-21)	1,0
Hex/CHCl <sub>3</sub> (75:25)	16-18	CHCl <sub>3</sub> /AcOEt (2:8)	104-106	CA6 (22-25)	0,6
Hex/CHCl <sub>3</sub> (7:3)	19-20	CHCl <sub>3</sub> /AcOEt (15:85)	107-108	CA7 (26-27)	0,2
Hex/CHCl <sub>3</sub> (65:35)	21-23	CHCl <sub>3</sub> /AcOEt (1:9)	109-110	CA8 (28-29)	0,1
Hex/CHCl <sub>3</sub> (6:4)	24-25	CHCl <sub>3</sub> /AcOEt (5:95)	111-112	CA9 (30-33)	0,6
Hex/CHCl <sub>3</sub> (55:45)	26-28	AcOEt	113-116	CA10 (34-44)	2,5
Hex/CHCl <sub>3</sub> (5:5)	29-31	AcOEt/MeOH (95:5)	117-118	CA11 (45-50)	2,3
Hex/CHCl <sub>3</sub> (45:55)	32-33	AcOEt/MeOH (9:1)	119-120	CA12 (51-54)	2,0
Hex/CHCl <sub>3</sub> (4:6)	34-35	AcOEt/MeOH (85:15)	121-122	CA13 (55-63)	3,3
Hex/CHCl <sub>3</sub> (35:65)	36-38	AcOEt/MeOH (8:2)	123-124	CA14 (64-73)	3,9
Hex/CHCl <sub>3</sub> (3:7)	39-44	AcOEt/MeOH (75:25)	125-126	CA15 (74-76)	1,8
Hex/CHCl <sub>3</sub> (25:75)	45-47	AcOEt/MeOH (7:3)	127-128	CA16 (77-79)	1,6
Hex/CHCl <sub>3</sub> (2:8)	48-50	AcOEt/MeOH (65:35)	129-130	CA17 (80-81)	1,0
Hex/CHCl <sub>3</sub> (15:85)	51-53	AcOEt/MeOH (6:4)	131-132	CA18 (82)	0,4
Hex/CHCl <sub>3</sub> (1:9)	54-57	AcOEt/MeOH (55:45)	133-134	CA19 (83-85)	3,2
Hex/CHCl <sub>3</sub> (5:95)	58-60	AcOEt/MeOH (5:5)	135-137	CA20 (86-88)	2,0
CHCl <sub>3</sub>	61-63	AcOEt/MeOH (45:55)	138-139	CA21 (89-91)	2,8
CHCl <sub>3</sub> /AcOEt (95:5)	64-66	AcOEt/MeOH (4:6)	140-141	<b>CA22 (92-93)</b>	<b>3,2</b>
CHCl <sub>3</sub> /AcOEt (9:1)	67-68	AcOEt/MeOH (35:65)	142-143	CA23 (94-97)	7,0
CHCl <sub>3</sub> /AcOEt (85:5)	69-72	AcOEt/MeOH (3:7)	144-145	<b>CA24 (98-115)</b>	<b>80,3</b>
CHCl <sub>3</sub> /AcOEt (8:2)	73-75	AcOEt/MeOH (25:75)	146-147	<b>CA25 (116-122)</b>	<b>139,8</b>
CHCl <sub>3</sub> /AcOEt (75:25)	76-78	AcOEt/MeOH (2:8)	148-149	<b>CA26 (123-138)</b>	<b>119,0</b>
CHCl <sub>3</sub> /AcOEt (7:3)	79-81	AcOEt/MeOH (15:85)	150-151	CA27 (139-157)	37,2
CHCl <sub>3</sub> /AcOEt (65:35)	82-83	AcOEt/MeOH (1:9)	152-153		
CHCl <sub>3</sub> /AcOEt (6:4)	84-85	AcOEt/MeOH (5:95)	154-155		
CHCl <sub>3</sub> /AcOEt (55:45)	86-90	MeOH	156-157		
CHCl <sub>3</sub> /AcOEt (5:5)	91-92				

**Subgrupo CA22 (frações 92-93):** apresentou-se como um sólido amarelo claro (3,2 mg) com uma mancha vermelha em CCD (revelador: ácido perclórico/vanilina). A análise do espectro no IV e comparação em CCD do sólido com composto já obtido, permitiram identificá-lo como sendo **naringenina (S15)**.

**Subgrupo CA24 (frações 98-115):** Apresentou-se como um sólido marrom (80,3 mg) com muitas manchas em CCD, sendo submetido a cromatografia em coluna (Coluna DA) de 32,0 cm de comprimento e 1,0 cm de diâmetro. Foram adicionados 85,9 cm<sup>3</sup> de sephadex, empacotada e eluída com CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/COEt<sub>2</sub> (3:2). Coletaram-se 71 frações de 20 mL, que foram reunidas em 9 grupos (Tabela 14).

**Tabela 14:** Subgrupos relacionados a Coluna DA

Grupo	Massa (mg)
DA1 (1-3)	0,5
DA2 (4-10)	16,9
DA3 (11-24)	21,3
DA4 (25-47)	8,1
<b>DA5 (48-53)</b>	<b>3,0</b>
<b>DA6 (54-60)</b>	<b>3,3</b>
DA7 (61-67)	7,2
DA8 (68-69)	2,9
DA9 (70-71)	1,2

**Subgrupo DA5 (frações 48-53):** apresentou-se como um sólido amarelo claro (3,0 mg) com uma mancha vermelha em CCD (revelador: ácido perclórico/vanilina). A análise do espectro de RMN de <sup>1</sup>H e comparação em CCD com composto já obtido permitiram identificá-lo como sendo **naringenina (S15)**.

**Subgrupo DA6 (frações 54-60):** apresentou-se como um sólido amarelo claro (3,3 mg) com uma mancha vermelha em CCD (revelador: ácido perclórico/vanilina). A análise do espectro de RMN de <sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C e DEPT-135 deste sólido permitiu identificar esse composto como sendo **epicatequina (S17)**.

**Subgrupo CA25 (frações 116-122):** apresentou-se como um sólido marrom (139,8 mg) que, após purificação com MeOH, obteve-se um sólido amarelo claro com uma mancha vermelha em CCD (revelador: ácido perclórico/vanilina) e com faixa de fusão 226-228 °C. A análise dos espectros no IV e RMN de <sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C e DEPT-135, permitiu identificar esse sólido (20,0 mg) como sendo quantidade adicional de **epicatequina (S17)**.

**Subgrupo CA26 (frações 123-138):** apresentou-se como um sólido marrom (119,0 mg) que por possuir muitas manchas em CCD, foi recromatografado (Coluna

EA). Utilizou-se uma coluna de 70,0 cm de comprimento e 2,0 cm de diâmetro e adicionaram-se 9,82 g de poliamida. A coluna foi empacotada com CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/AcOEt (1:1) e coletaram-se 75 frações de 20 mL cada, reunidas em 13 grupos (Tabela 15).

**Tabela 15:** Ordem de eluição da coluna EA e subgrupos relacionados

Eluente	Fração de 20 mL	Eluente	Fração de 20 mL	Grupo	Massa (mg)
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> /AcOEt (1:1)	1-5	AcOEt/MeOH	45-46	EA1 (1-3)	1,4
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> /AcOEt (45:55)	6-9	AcOEt/MeOH (4:6)	47-48	EA2 (4-7)	11,6
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> /AcOEt (4:6)	10-11	AcOEt/MeOH	49-50	EA3 (8-21)	6,9
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> /AcOEt (3:7)	12-13	AcOEt/MeOH (3:7)	51-52	EA4 (22-28)	2,6
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> /AcOEt (2:8)	14-15	AcOEt/MeOH	53-54	EA5 (29-30)	2,5
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> /AcOEt (1:9)	16-18	AcOEt/MeOH (2:8)	55-56	<b>EA6 (31-32)</b>	<b>2,0</b>
AcOEt	19-21	AcOEt/MeOH	57-59	EA7 (33-37)	4,1
AcOEt/MeOH (95:5)	22-23	AcOEt/MeOH (1:9)	60-63	<b>EA8 (38-40)</b>	<b>2,6</b>
AcOEt/MeOH (9:1)	24-25	AcOEt/MeOH (5:95)	64-65	EA9 (41-46)	6,5
AcOEt/MeOH (85:15)	26-28	MeOH	66-73	<b>EA10 (47-54)</b>	<b>27,9</b>
AcOEt/MeOH (8:2)	29-31	MeOH/H <sub>2</sub> O (1:1)	74-76	EA11 (55-57)	6,0
AcOEt/MeOH (75:25)	32-34	H <sub>2</sub> O	77-78	<b>EA12 (58-70)</b>	<b>18,5</b>
AcOEt/MeOH (7:3)	35-36			<b>EA13 (71-75)</b>	<b>7,1</b>
AcOEt/MeOH (65:35)	37-38				
AcOEt/MeOH (6:4)	39-40				
AcOEt/MeOH (55:45)	41-42				
AcOEt/MeOH (5:5)	43-44				

**Subgrupo EA6 (frações 31-32):** apresentou-se como um sólido amarelo claro (2,0 mg) com apenas uma mancha vermelha em CCD (revelador: ácido perclórico/vanilina). A comparação por CCD deste composto com o da **naringenina** permitiu inferir que tratava dessa substância (**S15**).

**Subgrupo EA8 (frações 38-40):** apresentou-se como um sólido amarelo claro (2,6 mg) com apenas uma mancha vermelha em CCD (revelador: ácido perclórico/vanilina). Foi feita a comparação por CCD deste composto com o da **epicatequina** e concluiu-se que se tratava dessa substância (**S17**).

**Subgrupo EA10 (frações 47-54):** apresentou-se como um sólido amarelo claro (27,9 mg) com uma mancha vermelha em CCD. A análise dos espectros de RMN de <sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C e DEPT-135 permitiu identificar esse sólido como sendo uma mistura de **epicatequina (S17)** e **ε-caprolactama (S18)**.

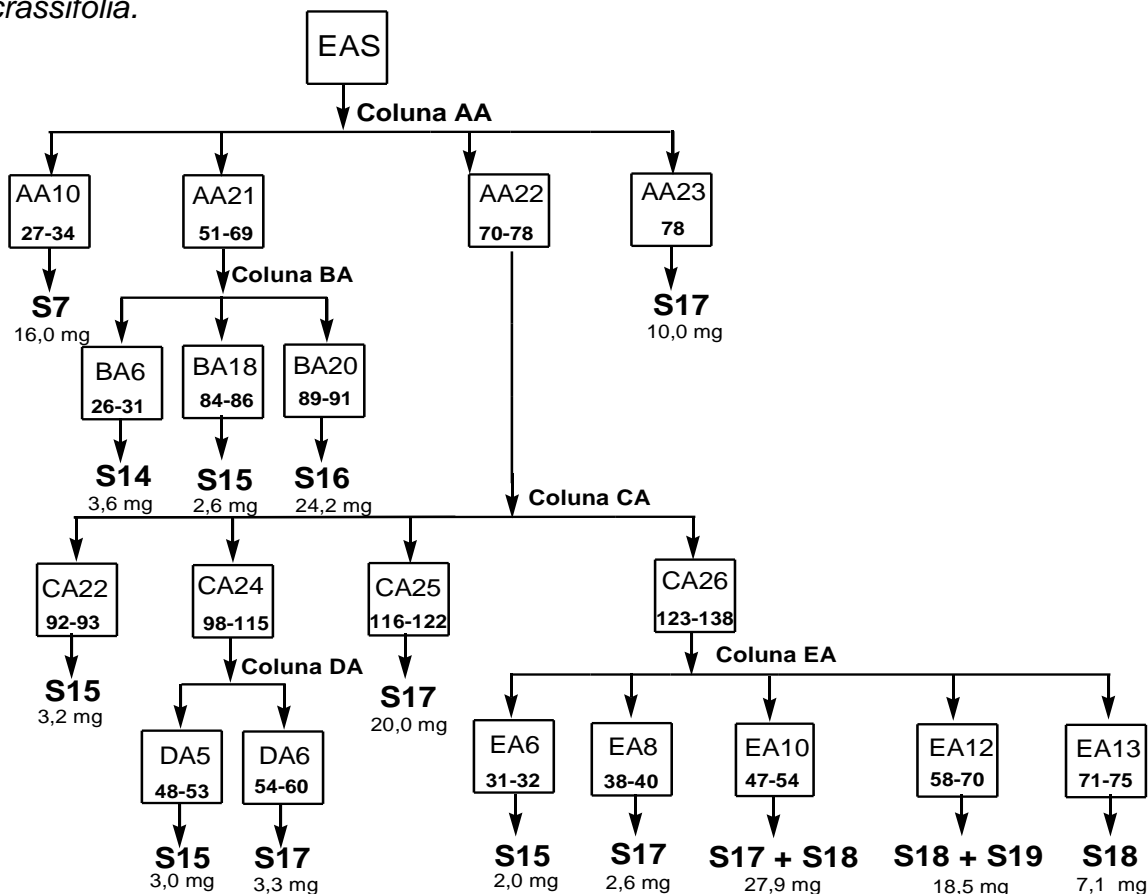
**Subgrupo EA12 (frações 58-70):** apresentou-se como um sólido amarelado (18,5 mg) com uma mancha vermelha em CCD (revelador: ácido perclórico/vanilina). A análise dos espectros de RMN de  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  e DEPT-135 permitiu identificar esse sólido como sendo uma mistura de  $\epsilon$ -caprolactama (**S18**) e epigalocatequina (**S19**).

**Subgrupo EA13 (frações 71-75):** apresentou-se como um sólido branco (7,1 mg) com uma mancha em CCD (revelador: ácido perclórico/vanilina) e com faixa de fusão 70-74 °C. A análise dos espectros de RMN de  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  e DEPT-135 permitiu identificar esse sólido como sendo  $\epsilon$ -caprolactama (**S18**).

**Grupo AA23 (fração 78):** apresentou-se como um sólido amarelado (10,0 mg) com uma mancha vermelha em CCD (revelador: ácido perclórico/vanilina). A análise dos espectros de IV e RMN de  $^1\text{H}$  e comparação em CCD com composto obtido permitiram identificar esse sólido como sendo a epicatequina (**S17**).

Os grupos mais polares apresentaram sólidos de coloração marrom escura, com rastros em CCD sem nenhuma definição, portanto, não foram trabalhados.

A Figura 13 resume o fracionamento do extrato **EAS** de folhas de *Salacia crassifolia*.



**Figura 13:** Fracionamento do extrato **EAS** de folhas de *Salacia crassifolia*.

### 3.1.6.4 - Elaboração do extrato etanólico (EES) de *Salacia crassifolia*

O EES (25,6 g) foi submetido à coluna cromatográfica de sílica (Coluna AE: 4,0 cm/85,0 cm), utilizando-se 250,0 g de sílica gel 60 (0,063 – 0,200 mm/ 70 – 230 Mesh). Após o empacotamento da coluna com CHCl<sub>3</sub>, utilizaram-se os eluentes CHCl<sub>3</sub>, AcOEt e MeOH, puros ou em misturas, em gradiente de polaridade (Tabela 16). Apenas as frações mais promissoras dessa coluna foram trabalhadas na tentativa de obtenção de metabólitos secundários.

**Tabela 16:** Ordem de eluição da coluna AE e subgrupos relacionados

Eluente	Fração de 150 mL	Eluente	Fração de 150 mL	Grupo	Massa (mg)
CHCl <sub>3</sub>	1-5	AcOEt/MeOH (7:3)	50-52	AE1 (1 - 8)	16,4
CHCl <sub>3</sub> /AcOEt (9:1)	6-8	AcOEt/MeOH (6,5:3,5)	53-55	<b>AE2 (9 - 18)</b>	<b>11,3</b>
CHCl <sub>3</sub> /AcOEt (8:2)	9-11	AcOEt/MeOH (6:4)	56-58	AE3 (19 - 22)	4,0
CHCl <sub>3</sub> /AcOEt (7:3)	12-14	AcOEt/MeOH (5:5)	59-60	AE4 (23 - 28)	4,7
CHCl <sub>3</sub> /AcOEt (6:4)	15-17	AcOEt/MeOH (4,5:5,5)	61-63	AE5 (29 - 33)	8,0
CHCl <sub>3</sub> /AcOEt (1:1)	18-20	AcOEt/MeOH (4:6)	64-66	AE6 (34 - 35)	4,7
CHCl <sub>3</sub> /AcOEt (4:6)	21-23	AcOEt/MeOH (3,5:6,5)	67-69	AE7 (36 - 37)	1,2
CHCl <sub>3</sub> /AcOEt (3:7)	24-26	AcOEt/MeOH (3,7)	70-72	AE8 (38 - 40)	9,6
CHCl <sub>3</sub> /AcOEt (2:8)	27-29	AcOEt/MeOH (2,5:7,5)	73-75	AE9 (41 - 43)	509,0
AcOEt/MeOH (1:1)	30-32	AcOEt/MeOH (2:8)	76-78	<b>AE10 (44)</b>	<b>620,8</b>
AcOEt	33-36	AcOEt/MeOH (1,5:8,5)	79-81	<b>AE11 (45)</b>	<b>768,2</b>
AcOEt/MeOH (9:1)	37-43	AcOEt/MeOH (1:9)	82-84	<b>AE12 (46)</b>	<b>1871,0</b>
AcOEt/MeOH (8,5:1,5)	44-45	AcOEt/MeOH (0,5:9,5)	85-88	AE13 (47 - 50)	5214,0
AcOEt/MeOH (8:2)	46-47	MeOH	89	AE14 (51 - 56)	5324,8
AcOEt/MeOH (7,5:2,5)	48-49			AE15 (57 - 63)	722,2
				AE16 (64 - 65)	378,3
				AE17 (66 - 69)	261,7
				AE18 (70 - 84)	577,5
				AE19 (85 - 86)	98,5
				AE20 (87- 89)	215,3

Foram recolhidas 89 frações de 150 mL cada, reunidas em 20 grupos de acordo com o perfil observado nas cromatoplacas (Tabela 16). O fluxograma do isolamento das substâncias de EES encontra-se na Figura 14, p. 53.

**Grupos AE2 (9-18):** apresentaram como sólido branco (11,3 mg) com uma única mancha em cromatoplaça de coloração roxa (revelador: ácido perclórico/vanilina). A análise dos espectros de RMN de  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  e DEPT-135 permitiu identificar essas frações como sendo **o-ftalato de bis(2-etilexila) (S14)**.

**Grupo AE10 (fração 44):** apresentou-se como um sólido marrom (620,8 mg) com várias manchas vermelhas em CCD (revelador: ácido perclórico/vanilina). Parte do grupo **AE12** (77,7 mg) foi recromatografado (Coluna **BE**: 4,0 cm/41,0 cm) utilizando 15,90 g de sílica gel 60 (0,063 – 0,200 mm/ 70 – 230 Mesh). O empacotamento da coluna foi realizado com  $\text{CHCl}_3$  e a eluição com  $\text{CHCl}_3$ , AcOEt, MeOH e  $\text{H}_2\text{O}$ , puros ou em misturas, em gradiente crescente de polaridade (Tabela 17).

**Tabela 17:** Ordem de eluição da coluna **BE** e subgrupos relacionados

Eluente	Fração de 30 mL	Eluente	Fração de 30 mL	Grupo	Massa (mg)
$\text{CHCl}_3$	0 – 3	$\text{CHCl}_3/\text{AcOEt}$ (1:9)	32 – 43	BE1 (1-3)	0,1
$\text{CHCl}_3/\text{AcOEt}$ (95:5)	4 – 5	AcOEt	44 – 47	BE2 (4-5)	8,1
$\text{CHCl}_3/\text{AcOEt}$ (9:1)	6 – 9	AcOEt/MeOH (95:5)	48 – 50	BE3 (28-29)	1,6
$\text{CHCl}_3/\text{AcOEt}$ (85:5)	10 – 13	AcOEt/MeOH (9:1)	51 – 59	BE4 (30-31)	3,0
$\text{CHCl}_3/\text{AcOEt}$ (8:2)	14 – 16	AcOEt/MeOH	60 – 61	<b>BE5 (32-47)</b>	<b>7,5</b>
$\text{CHCl}_3/\text{AcOEt}$ (85:25)	17 – 18	AcOEt/MeOH (8:2)	62 – 66	BE6 (51-59)	6,4
$\text{CHCl}_3/\text{AcOEt}$ (7:3)	19 – 20	AcOEt/MeOH	67 – 68	BE7 (60-61)	14,2
$\text{CHCl}_3/\text{AcOEt}$ (6:4)	21 – 23	AcOEt/MeOH (7:3)	69 – 71	<b>BE8 (72-73)</b>	<b>8,9</b>
$\text{CHCl}_3/\text{AcOEt}$ (5:5)	24 – 25	AcOEt/MeOH (5:5)	72 – 73	<b>BE9 (74-78)</b>	<b>4,7</b>
$\text{CHCl}_3/\text{AcOEt}$ (4:6)	26 – 27	MeOH	74 – 78	<b>BE10 (79-86)</b>	<b>6,3</b>
$\text{CHCl}_3/\text{AcOEt}$ (3:7)	28 – 29	MeOH/ $\text{H}_2\text{O}$ (1:1)	79 – 86	<b>BE11 (87)</b>	<b>2,4</b>
$\text{CHCl}_3/\text{AcOEt}$ (2:8)	30 – 31	$\text{H}_2\text{O}$	87		

Foram recolhidas 87 frações de 30 mL cada. As frações foram analisadas por CCD e reunidas em 11 grupos de acordo com o perfil observado nas cromatoplaças (Tabela 17).

**Subgrupo BE5 (frações 32-47):** apresentou-se como um sólido amarelo claro (7,5 mg) com uma única mancha em CCD de coloração vermelha (revelador: ácido perclórico/vanilina). A análise dos espectros de RMN de  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  e DEPT-135 permitiu identificar **BE5** como sendo a **epicatequina (S17)**.

**Subgrupos BE8, BE9, BE10 e BE11:** apresentaram-se como sólidos de coloração marrom escura, que, após lavagem com metanol, apresentaram um rastro vermelho em CCD (revelador: ácido perclórico/vanilina). A análise de RMN não foi possível, pois estes foram insolúveis em todos solventes deuterados testados.

**Grupo AE11 (fração 45):** apresentou-se como um sólido marrom (768,2 mg) com várias manchas em CCD. Foi feita uma coluna cromatográfica isocrática (Coluna **CE**: 2,8 cm/80,0 cm) com um volume total de 185,0 cm<sup>3</sup> de Sephadex e MeOH (Tabela 18).

**Tabela 18:** Subgrupos relacionados à coluna **CE**

Grupo	Massa (mg)	Grupo	Massa (mg)
C1 (1-3)	2,0	CE10 (40)	5,1
C2 (4-5)	3,4	CE11 (41-47)	38,6
C3 (6-10)	65,8	CE12 (48)	4,7
<b>C4 (11-14)</b>	<b>23,0</b>	CE13 (49-53)	18,1
<b>C5 (15-19)</b>	<b>88,3</b>	CE14 (54-55)	4,7
<b>C6 (20)</b>	<b>28,8</b>	CE15 (56-63)	27,9
C7 (21-25)	78,7	CE16 (64-66)	6,8
C8 (26-32)	45,7	CE17 (67-71)	37,7
C9 (33-39)	77,2	CE18 (72)	5,4

Foram recolhidas 72 frações de 30 mL cada e observaram-se quantidades significativas restante na coluna que não eluíram com metanol. As frações foram analisadas por CCD e reunidas em 18 grupos de acordo com o perfil observado nas cromatoplacas (Tabela 18).

**Subgrupo CE4 (frações 11-14):** apresentou-se como um sólido marrom (23,0 mg), com uma mancha vermelha em CCD (revelador: ácido perclórico/vanilina). A comparação em CCD permitiu identificar essa fração como sendo a **epicatequina (S17) impura**.

**Subgrupo CE5 (frações 15-19):** apresentou-se como um sólido amarelo claro (88,3 mg), com uma mancha vermelha em CCD (revelador: ácido perclórico/vanilina). A comparação em CCD permitiu identificar essa fração como sendo a **epicatequina (S17)**.



**Subgrupo CE6 (fração 20):** apresentou-se como um sólido marrom claro (28,8 mg), com uma mancha vermelha com rastro em CCD (revelador: ácido perclórico/vanilina). A análise dos espectros de RMN de  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  e DEPT-135 permitiu identificar essa fração como sendo uma mistura da **epicatequina (S17)** e **epigallocatequina (S19)**.

**Grupo AE12 (fração 46):** apresentou-se como um sólido marrom (1871,0 mg) várias manchas em CCD. Parte deste grupo (994,0 mg) foi submetido a uma coluna isocrática (Coluna **DE**: 2,8 cm/80,0 cm), utilizando-se 215,4 cm<sup>3</sup> de Sephadex e MeOH puro como eluente (Tabela 19).

**Tabela 19:** Subgrupos relacionados à coluna **DE**

Grupo	Massa (mg)	Grupo	Massa (mg)
DE1 (1)	2,4	DE7 (13-19)	146,6
DE2 (2)	23,4	DE8 (20-22)	23,9
DE3 (3-4)	53,4	<b>DE9 (23-41)</b>	<b>205,2</b>
DE4 (5-6)	45,9	DE10 (42)	2,0
<b>DE5 (7-11)</b>	<b>166,4</b>	DE11 (43-52)	76,2
DE6 (12)	33,2	DE12 (53-54)	31,4

Foram recolhidas 53 frações de 30 mL cada. As frações foram analisadas por CCD e reunidas em 12 grupos de acordo com o perfil observado nas cromatoplaças (Tabela 19).

**Subgrupo DE5 (frações 7-11):** apresentou-se como um sólido marrom (166,4 mg) que, por CCD, apresentou um rastro principal de coloração vermelha (revelador: ácido perclórico/vanilina) e algumas manchas vermelhas com maior Rf. Essa fração foi recromatografada (coluna **EE**: 2,8 cm/40,0 cm) utilizando-se 9,25 g de sílica gel 60 (0,063 – 0,200 mm/ 70 – 230 Mesh). Após o empacotamento com  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , utilizaram-se os eluentes  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , AcOEt e MeOH, puros ou em misturas, em gradiente crescente de polaridade. Foram recolhidas 65 frações de 30 mL cada, reunidas em 11 grupos (Tabela 20, p. 52).

**Tabela 20:** Ordem de eluição da coluna **EE** e subgrupos relacionados

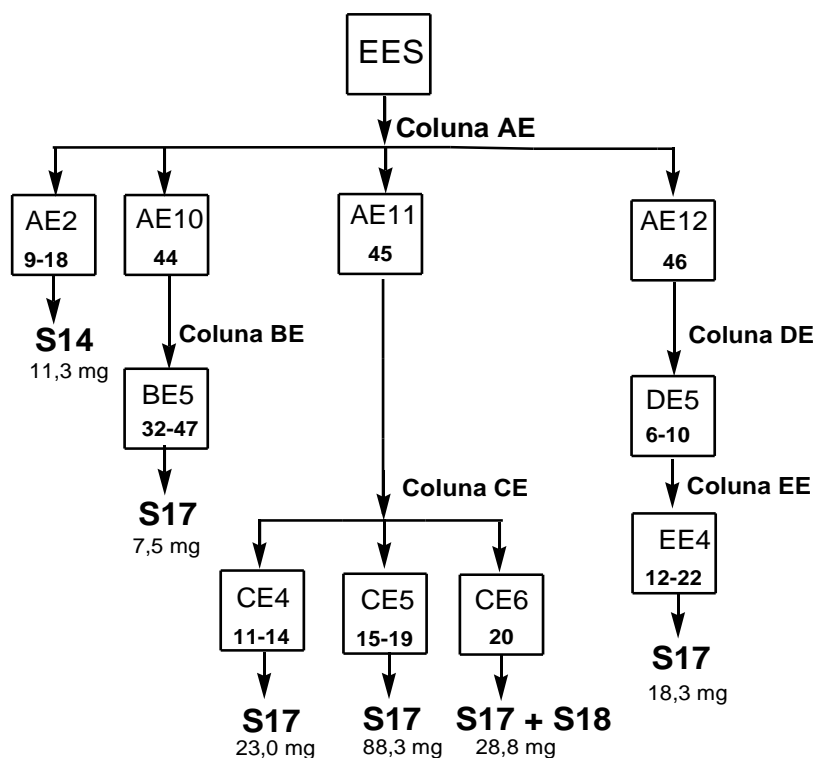
Eluente	Fração de 30 mL	Eluente	Fração De 30 mL	Grupo	Massa (mg)
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	1	AcOEt/MeOH (9:1)	23-26	EE1 (1)	0,3
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> /AcOEt (9:1)	2	AcOEt/MeOH (8:2)	27-31	EE2 (2-7)	2,8
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> /AcOEt (8:2)	3	AcOEt/MeOH (7:3)	32-33	EE3 (8-11)	0,2
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> /AcOEt (7:3)	4-8	AcOEt/MeOH (6:4)	34-35	<b>EE4 (12-22)</b>	<b>18,3</b>
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> /AcOEt (6:4)	9-10	AcOEt/MeOH (5:5)	36	<b>EE7 (23-32)</b>	<b>82,6</b>
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> /AcOEt (5:5)	11	AcOEt/MeOH (4:6)	37-39	EE8 (33-43)	3,9
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> /AcOEt (4:6)	12-14	AcOEt/MeOH (3:7)	40-45	EE9 (44-52)	2,6
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> /AcOEt (3:7)	15	AcOEt/MeOH (2:8)	46-48	EE10 (53-58)	1,4
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> /AcOEt (2:8)	16-19	AcOEt/MeOH (1:9)	49-54	EE11 (59-65)	2,1
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> /AcOEt (1:9)	20-21	MeOH	55-65		
AcOEt	22				

**Subgrupos EE4 (frações 12-22):** apresentou-se como sólido amarelo claro (18,3 mg) com apenas uma mancha vermelha em CCD (revelador: ácido perclórico/vanilina). A amostra foi identificada como a **epicatequina (S17)** através da comparação do perfil em CCD.

**Subgrupo EE7 (frações 23-32):** apresentou-se como um sólido marrom (82,6 mg), que por CCD, apresentou um rastro vermelho e uma mancha de coloração amarela (revelador: ácido perclórico/vanilina). Essa fração foi recromatografada, mas não foi possível o isolamento de nenhuma substância.

**Subgrupo DE9 (frações 23-41):** apresentou-se como um sólido marrom (205,2 mg) com manchas avermelhadas com rastros em CCD (revelador: ácido perclórico/vanilina). A fração foi recromatografada, mas não houve obtenção de nenhuma substância.

A Figura 14 (p. 53) resume o fracionamento do extrato **EES** de folhas de *Salacia crassifolia*.



**Figura 14:** Fracionamento do extrato **EES** de 20,0 mg folhas de *Salacia crassifolia*.

### 3.1.7 - Preparação dos extratos de raízes de *Maytenus imbricata*

As raízes de *Maytenus imbricata* (Celastraceae) secas e moídas foram submetidas a extrações exaustivas em aparelho Soxhlet, com solventes em ordem crescente de polaridade, obtendo-se os extratos hexano/éter etílico (1:1) (SEH e FSEH), acetato etílico (SEAT e FSEAT) e metanólico (SEM). Estes extratos foram obtidos durante o mestrado (RODRIGUES, 2011; RODRIGUES et al., 2012).

#### 3.1.7.1 - Elaboração do extrato hexano/éter etílico (1:1) (SEH e FSEH) de *Maytenus imbricata*

Os extratos SEH e FSEH de raízes de *M. imbricata* foram trabalhados durante o mestrado (RODRIGUES, 2011; RODRIGUES et al., 2012) levando ao isolamento de nove compostos (M1-M9). No presente trabalho os triterpenos pentacíclicos **M1** (11 $\alpha$ -hidroxilup-20(29)-en-3-ona), **M2** (tingenona), **M3** (6-oxo-tingenol), **M6** (3,7-dioxo-friedelano), **M8** (3-oxo-29-hidroxifriedelano) e **M9** (3 $\beta$ ,11 $\alpha$ -di-hidroxilup-20(29)-eno) foram testados quanto ao potencial biológico (Figura 3, p. 6).

### 3.1.7.2 - Elaboração do extrato acetato etílico (FSEAT) de *Maytenus imbricata*

Parte do extrato em acetato etílico das raízes de *M. imbricata* (10,0 g; FSEAT) foi submetido à coluna cromatográfica (Coluna AAE) utilizando-se uma coluna de 61,0 cm de comprimento e 3,5 cm de diâmetro com 216,0 g de sílica gel 60 (0,063 – 0,200 mm/ 70 – 230 Mesh). A coluna foi empacotada com CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> e eluída com CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, AcOEt e MeOH, puros ou em misturas, em ordem crescente de polaridade (Tabela 21).

**Tabela 21:** Ordem de eluição da coluna **AAE** e subgrupos relacionados

Eluente	Fração de 200 mL	Eluente	Fração de 200 mL	Grupo	Massa (mg)
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	1-4	AcOEt/MeOH (95:5)	50-51	AAE1 (1-4)	17,4
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> /AcOEt (95:5)	5-6	AcOEt/MeOH (90:10)	52-56	AAE2 (5-10)	10,3
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> /AcOEt (90:10)	7-8	AcOEt/MeOH (85:15)	57-58	AAE3 (11)	4,4
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> /AcOEt (85:15)	9-10	AcOEt/MeOH (80:20)	59-60	AAE4 (12-13)	10,4
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> /AcOEt (80:20)	11-12	AcOEt/MeOH (75:25)	61-62	AAE5 (14-15)	1,5
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> /AcOEt (75:25)	13-14	AcOEt/MeOH (70:30)	63-64	AAE6 (16-23)	12,3
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> /AcOEt (70:30)	15-16	AcOEt/MeOH (65:35)	65-67	<b>AAE7 (24-33)</b>	<b>512,1</b>
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> /AcOEt (65:35)	17-18	AcOEt/MeOH (60:40)	68-69	<b>AAE8 (34-53)</b>	<b>5063,6</b>
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> /AcOEt (60:40)	19-20	AcOEt/MeOH (55:45)	70-71	<b>AAE9 (54-68)</b>	<b>3872,5</b>
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> /AcOEt (55:45)	21-22	AcOEt/MeOH (50:50)	72-73	AAE10 (69-74)	50,3
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> /AcOEt (50:50)	23-24	AcOEt/MeOH (45:55)	74-75	AAE11 (75-92)	30,3
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> /AcOEt (45:55)	25-27	AcOEt/MeOH (40:60)	76-77		
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> /AcOEt (40:60)	28-30	AcOEt/MeOH (35:65)	78-79		
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> /AcOEt (35:65)	31-34	AcOEt/MeOH (30:70)	80-81		
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> /AcOEt (30:70)	35-36	AcOEt/MeOH (25:75)	82-83		
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> /AcOEt (25:75)	37-38	AcOEt/MeOH (20:80)	84-85		
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> /AcOEt (20:80)	39-40	AcOEt/MeOH (15:85)	86-87		
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> /AcOEt (15:85)	41-42	AcOEt/MeOH (10:90)	88-89		
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> /AcOEt (10:90)	43-44	AcOEt/MeOH (5:95)	90-91		
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> /AcOEt (5:95)	45-46	MeOH	92		
AcOEt	47-49				

Foram coletadas 92 frações de 200 mL cada, reunidas em 11 grupos de acordo com perfil cromatográfico (Tabela 21). O fluxograma do isolamento das substâncias de **FSEAT** encontra-se na Figura 15, p. 57.

**Grupo AAE7 (frações 24-33):** apresentou-se como um sólido marrom (512,1 mg) com várias manchas roxas e vermelhas bem definidas em CCD (no eluente  $\text{CHCl}_3/\text{AcOEt}$  6:4 e gotas de ácido fórmico, com revelador ácido perclórico/vanilina). Parte deste grupo (200,0 mg) foi submetido a cromatografia líquida de média pressão (Coluna BAE) utilizou-se neste caso o equipamento Isolera, com coluna de sílica SNAP® Ultra 10 g. Inicialmente foi empacotada com clorofórmio, na vazão de 12 mL/min e depois eluída com  $\text{CHCl}_3$ , AcOEt e MeOH puros ou em misturas, em ordem crescente de polaridade. A velocidade da eluição foi de 8 mL/min e coletaram-se 35 frações de aproximadamente 10 mL cada (Tabela 22).

**Tabela 22:** Ordem de eluição da coluna **BAE** e subgrupos relacionados

Eluente	Frações	Grupo	Massa (mg)	Grupo	Massa (mg)
$\text{CHCl}_3$ 100%	1-5	BAE1 (1-3)	11,0	<b>BAE6 (17-18)</b>	<b>79,9</b>
$\text{CHCl}_3/\text{AcOEt}$ 0-100%	6-12	BAE2 (4)	14,4	<b>BAE7 (19-20)</b>	<b>4,0</b>
AcOEt 100%	13-20	BAE3 (5-14)	29,5	BAE8 (21-24)	1,8
AcOEt/MeOH 0-100%	21-29	BAE4 (15)	13,1	BAE9 (25-26)	3,1
MeOH 100%	30-35	BAE5 (16)	14,7	BAE10 (27-30)	2,3
				BAE11 (31-35)	1,0

As frações foram analisadas por CCD e reunidas em 11 grupos de acordo com o perfil cromatográfico (Tabela 22).

**Subgrupo BAE6 (frações 17-18):** apresentou-se como um sólido marrom (79,9 mg) e em CCD apresentou um rastro vermelho (revelador: ácido perclórico/vanilina). Essa fração foi recromatografada, mas não foi possível o isolamento de substâncias.

**Subgrupo BAE7 (frações 19-20):** apresentou-se como um sólido marrom claro (4,0 mg), com uma mancha vermelha em CCD utilizando como eluente AcOEt e gotas de ácido fórmico (revelador: ácido perclórico/vanilina) e com faixa de fusão 136,7-140,0 °C. A análise dos espectros de RMN de  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  e DEPT-135 permitiu identificar esse sólido como sendo o flavonoide **4'-O-metilepigalocatequina (M10)**.

**Grupo AAE8 (frações 34-53):** apresentou-se como um sólido marrom (5,06 g) com várias manchas vermelhas não muito bem definidas por CCD. Parte dessa fração (1,47 g) foi recromatografada em coluna cromatográfica (Coluna CAE). Utilizou-se o equipamento Isolera, com coluna SNAP® Ultra 50 g. Inicialmente foi

empacotada com clorofórmio a 50 mL/min e, depois, eluída com CHCl<sub>3</sub>, AcOEt e MeOH puros ou em misturas, em ordem crescente de polaridade, a velocidade constante de 30 mL/min. Foram coletadas 71 frações de aproximadamente 18 mL cada (Tabela 23).

**Tabela 23:** Ordem de eluição da coluna CAE e subgrupos relacionados

Eluente	Frações	Grupo	Massa (mg)	Grupo	Massa (mg)
CHCl <sub>3</sub> 100%	1-4	CAE1 (1-22)	26,1	CAE7 (46-47)	4,6
CHCl <sub>3</sub> /AcOEt 0-100%	5-23	CAE2 (23-24)	24,1	CAE8 (48-55)	3,9
AcOEt 100%	24-37	<b>CAE3 (25-31)</b>	<b>1214,8</b>	CAE9 (56-71)	5,4
AcOEt/MeOH 0-50%	38-50	<b>CAE4 (32-38)</b>	<b>77,0</b>		
AcOEt/MeOH 50-50%	51-71	CAE5 (39-43)	16,4		
AcOEt/MeOH 50-100%		CAE6 (44-45)	19,7		

As frações foram analisadas por CCD e reunidas em 9 grupos de acordo com o perfil cromatográfico (Tabela 23).

**Subgrupo CAE3 (frações 25-31):** apresentou-se como um sólido marrom claro (1214,8 mg), com uma mancha vermelha em CCD (revelador: ácido perclórico/vanilina), utilizando-se como eluente AcOEt e gotas de ácido fórmico e revelada com ácido perclórico e vanilina. A análise dos espectros de RMN de <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C e comparação em CCD permitiram identificar esse sólido como sendo **4'-O-metilepigalocatequina (M10)**.

**Subgrupo CAE4 (frações 32-38):** apresentou-se como um sólido marrom claro (77,0 mg). Em CCD, apresentou uma mancha vermelha definida, semelhante ao subgrupo CAE3, mas com rastro vermelho mais polar. A análise em CCD permitiu identificar esse sólido como sendo **4'-O-metilepigalocatequina (M10)** impuro.

Frações mais polares não apresentaram manchas definidas em CCD, apenas rastros.

**Grupo AAE9 (frações 54-68):** apresentou-se como um sólido marrom (3872,5 mg) e manchas de coloração vinho com rastro na cromatografia em camada delgada (revelador: ácido perclórico/vanilina). Parte desta fração (200,0 mg) foi submetida a coluna cromatográfica (Coluna DAE) utilizando-se o equipamento Isolera, com Coluna SNAP® Ultra 10 g de sílica. Inicialmente foi empacotada com

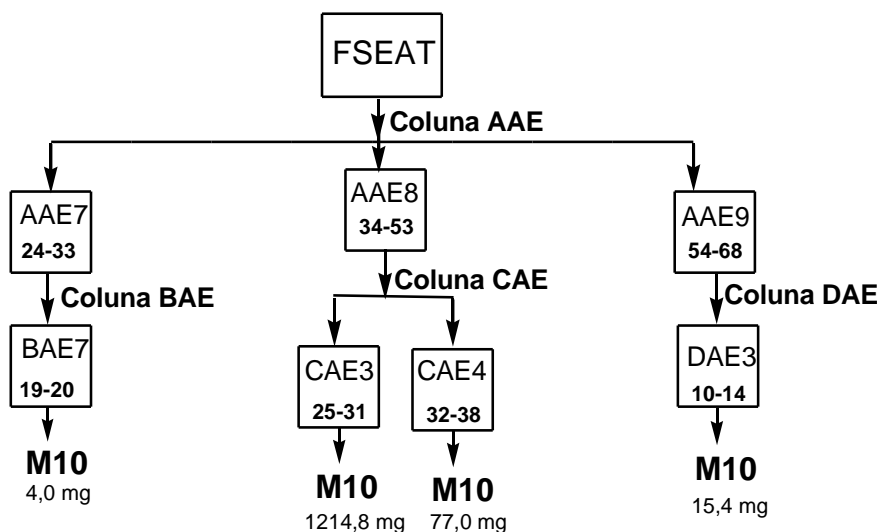
clorofórmio a 12 mL/min e depois eluída com CHCl<sub>3</sub>, AcOEt e MeOH, puros ou em misturas, em ordem crescente de polaridade a velocidade constante de 8 mL/min. Foram coletadas 28 frações de aproximadamente 10 mL cada (Tabela 24).

**Tabela 24:** Ordem de eluição da coluna DAE e subgrupos relacionados

Eluente	Fração de 20 mL	Grupo	Massa (mg)	Grupo	Massa (mg)
CHCl <sub>3</sub> /AcOEt de 0% até 100%	1-9	DAE1 (1-8)	1,0	DAE4 (15-20)	49,4
AcOEt 100%	10-17	DAE2 (9)	2,0	DAE5 (21-25)	10,6
AcOEt/MeOH de 0% até 100%	18-28	<b>DAE3 (10-14)</b>	<b>15,4</b>	DAE6 (26-28)	98,9

As frações foram analisadas por CCD e reunidas em 6 grupos de acordo com o perfil cromatográfico (Tabela 24).

**Subgrupo DAE3 (frações 10-14):** apresentou-se como sólido marrom claro (15,4 mg) e apenas uma mancha de coloração vermelha em CCD (revelador: ácido perclórico/vanilina). A análise dos espectros de RMN de <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C deste sólido permitiu identificar esse composto como sendo **4'-O-metilepigalocatequina (M10)**.



**Figura 15:** Fracionamento do extrato FSEAT de raízes de *Maytenus imbricata*.

### 3.1.7.3 - Elaboração do extrato metanólico (SEM) de *Maytenus imbricata*

A elaboração do extrato metanólico de raízes de *Maytenus imbricata* (SEM) é tema do trabalho de conclusão de curso de Carolina Nascimento (a ser apresentado no curso de Farmácia no 2º semestre/2015). Neste extrato (10,0 g) foi possível o isolamento apenas do flavonoide **4'-O-metilepigalocatequina (M10)** (228,0 mg).

#### 4 - DETERMINAÇÃO ESTRUTURAL DAS SUBSTÂNCIAS ISOLADAS

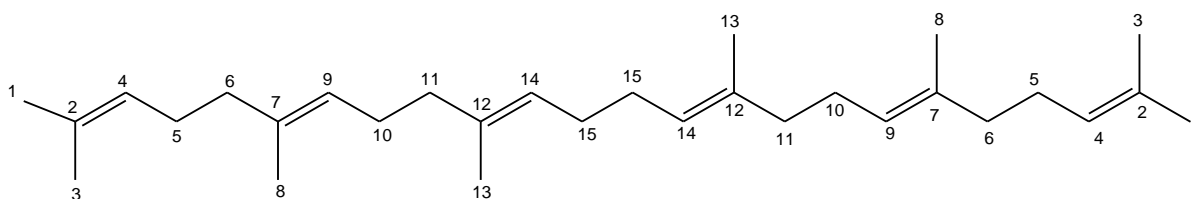
As substâncias isoladas nos extratos hexânico EHS, ECS, EAS, EES e FSEAT tiveram suas estruturas determinadas por métodos espectroscópicos e espectrométricos (massas) e estão listados na Tabela 25.

**Tabela 25:** Substâncias e misturas isoladas de *S. crassifolia* e *M. imbricata*

Código das amostras	Substâncias	Discussão (página)
S1	Esqualeno	59
S2	Guta-Percha	61
S3	3 $\beta$ -Palmitiloxi-urs-12-eno	63
S4	3-Oxofriedelano	66
S5	3 $\beta$ -Hidroxifriedelano	68
S6	$\alpha$ -Amirina (I) e $\beta$ -amirina (II)	70
S7	$\beta$ -Sitosterol	72
S8	3-Oxo-28-hidroxifriedelano	74
S9	3-Oxo-29-hidroxifriedelano	77
S10	Ácido 3,4-seco-friedelan-3-oico	79
S11	3 $\beta$ -Hidroxi-olean-9(11):12-dieno	81
S12	28,29-Di-hidroxifriedelan-3-ona	83
S13	3-O- $\beta$ -D-glicosil- $\beta$ -sitosterol	85
S14	o-ftalato de bis(2-etilexila)	89
S15	Naringenina	91
S16	Ácido <i>p</i> -hidroxibenzoico	94
S17	Epicatequina	95
S18 e S19	$\epsilon$ -Caprolactama e epigalocatequina	97
M10	4'-O-metilepigalocatequina	99



#### 4.1 - S1: Esqualeno



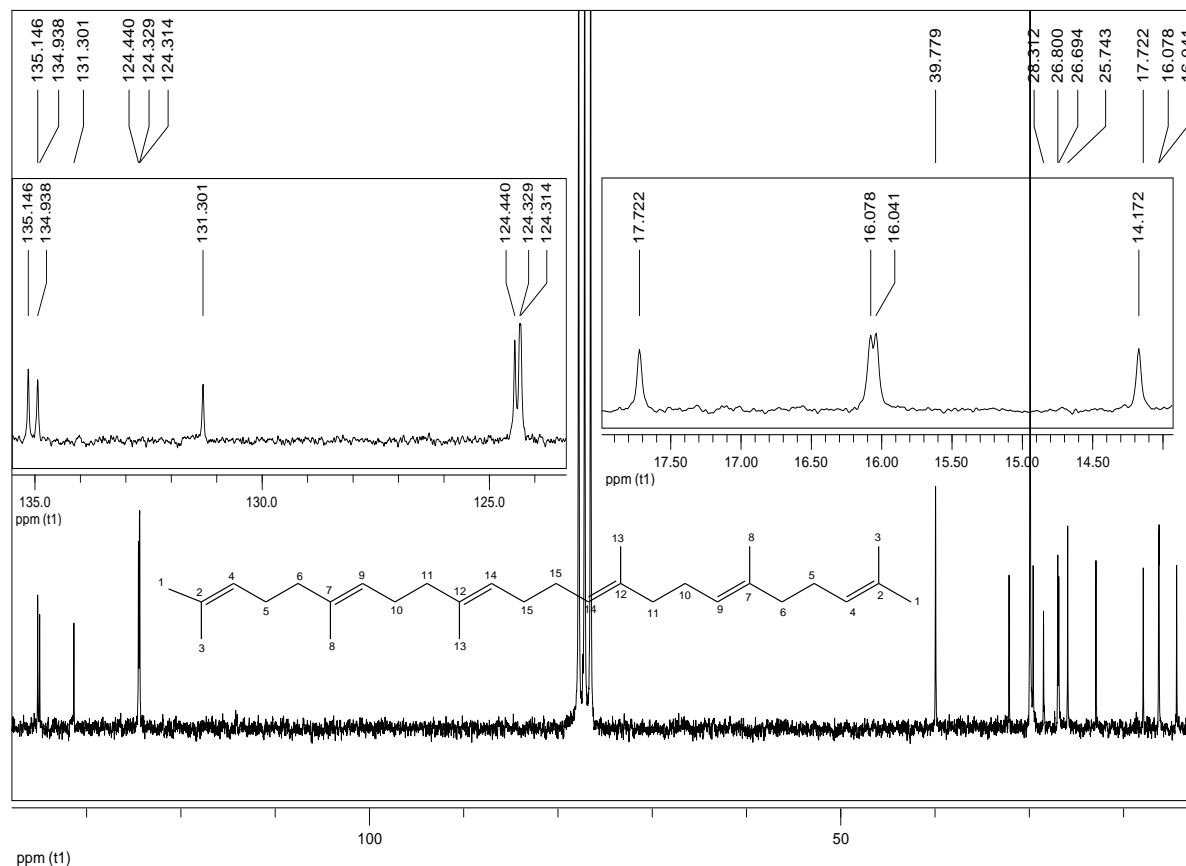
**S1** foi isolado do extrato **EHS** das folhas de *Salacia crassifolia* e se apresentou como um óleo incolor miscível em  $\text{CHCl}_3$ . Em análise por CCD, usando hexano como eluente, apresentou uma única mancha roxa (revelador: ácido perclórico/vanilina).

O espectro de absorção na região do infravermelho de **S1** (Figura A1, p. 155) apresenta bandas intensas entre  $2954\text{-}2848\text{ cm}^{-1}$  que foram atribuídas aos estiramentos de ligações C-H de compostos alifáticos. A banda fraca na região entre  $1667\text{-}1640\text{ cm}^{-1}$  foi atribuída a estiramento de ligação C=C de olefinas. As bandas de absorção entre  $1472\text{-}1450\text{ cm}^{-1}$  foram atribuídas a deformação angular de ligação C-H. A banda em  $834\text{ cm}^{-1}$  foi atribuída a deformação angular fora do plano de ligações C-H de grupos  $\text{-C=C-H}$ . A banda em  $730\text{-}720\text{ cm}^{-1}$  refere-se a absorção de grupo  $(\text{CH}_2)_n$ , onde  $n \geq 4$ , indicando contaminação de S1 com hidrocarboneto graxo (PAVIA, 2005).

Os espectros de RMN de  $^1\text{H}$  (Figura A2, p. 155) e de  $^{13}\text{C}$  (Figura 16, p. 60) apresentam sinais de átomos de hidrogênio ( $\delta$  5,12; 6H) e de carbono ( $\delta$  124,31 e 135,15) em regiões características de compostos com ligações duplas e foram indicativos de natureza olefínica do composto. Os valores referentes às integrações dos sinais de átomos de hidrogênio olefínicos ( $\delta$  5,12, 6H), metilênicos ( $\delta$  2,01, 20H) e metílicos (1,60, 1,68, 24H) foram condizentes com a estrutura do esqueleto para **S1**.

O espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  juntamente com o espectro de DEPT-135 (Figura A3, p. 156) apresentam sinais atribuídos a quatro grupos  $\text{CH}_3$ , na região  $\delta$  16,04 a 25,74, a cinco grupos  $\text{CH}_2$  na região de  $\delta$  26,69 a 39,78, três CH entre  $\delta$  124,31 e 124,44 e três átomos de carbono não hidrogenados situados entre  $\delta$  131,30 e 135,15 (Tabela 26, p. 60). O sinal em aproximadamente  $\delta$  29,0 refere-se a impureza graxa.

A partir da comparação dos dados do espectro de RMN de  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  e subespectro DEPT-135, foi possível identificar **S1** como sendo o **esqualeno** (MIRANDA et al., 2012).

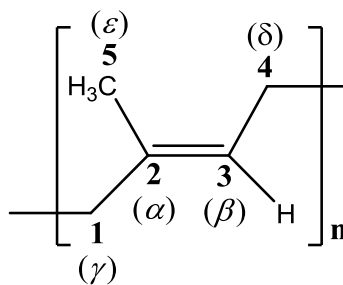


**Figura 16:** Espectro e expansão de RMN de  $^{13}\text{C}$  de **S1** ( $\text{CDCl}_3$ , 50 MHz).

**Tabela 26:** Dados de RMN de  $^{13}\text{C}$  de **S1** e da literatura para esqualeno (MIRANDA et al., 2012)

C	Tipo de carbono	$\delta_{\text{C}}^*$ de S1	$\delta_{\text{C}}^*$ (MIRANDA et al., 2012)	C	Tipo de carbono	$\delta_{\text{C}}^*$ de S1	$\delta_{\text{C}}^*$ (MIRANDA et al., 2012)
1	$\text{CH}_3$	25,74	25,60	9	CH	124,33	124,30
2	C	131,30	131,20	10	$\text{CH}_2$	26,70	26,60
3	$\text{CH}_3$	17,72	17,60	11	$\text{CH}_2$	39,78	39,70
4	CH	124,44	124,40	12	C	135,15	135,00
5	$\text{CH}_2$	26,80	26,70	13	$\text{CH}_3$	16,04	15,90
6	$\text{CH}_2$	39,78	39,80	14	CH	124,31	124,20
7	C	134,94	134,80	15	$\text{CH}_2$	28,31	28,20
8	$\text{CH}_3$	16,08	16,00				

## 4.2 - S2: Guta-percha

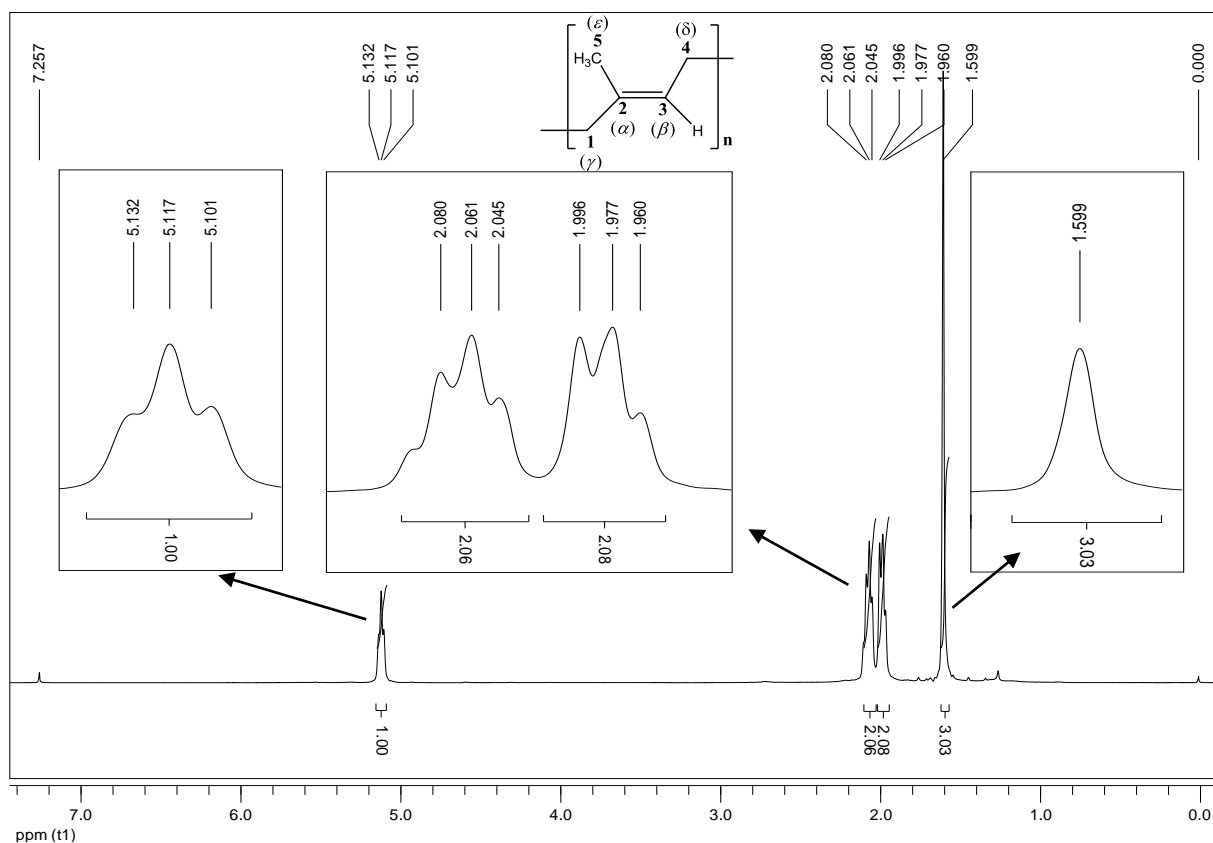


**S2** foi isolado a partir dos extratos **EHS** e **ECS**, apresentou-se como um sólido branco, solúvel em  $\text{CHCl}_3$  e insolúvel em MeOH. A análise por CCD deste composto evidenciou uma mancha roxa bem peculiar (revelador: ácido perclórico/vanilina (1:1)). **S2** corresponde a 50% do extrato hexânico e 68,2% do extrato clorofórmico de folhas. Esse composto é um material semelhante a borracha, mas sem propriedades elásticas.

O espectro de absorção na região do IV (Figura A4, p. 156) de **S2** apresenta bandas de absorção características de um hidrocarboneto acíclico poli-insaturado. As bandas em  $2915$  e  $2848\text{ cm}^{-1}$  são características de estiramento de ligação C-H de compostos alifáticos, em  $1669\text{ cm}^{-1}$  de estiramento de ligação C=C e as bandas em  $1445$  e  $1381\text{ cm}^{-1}$  de deformação angular da ligação C-H.

O espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (Figura 17, p. 62) apresenta sinais em  $\delta$  1,60 (s, 3H) de átomos de hidrogênio de grupo metílico (H5) e  $\delta$  1,98 (m, 2H) e  $\delta$  2,06 (m, 2H) de hidrogênio metilênico de H4 e H1, respectivamente. O pseudo triplete em  $\delta$  5,12 (pseudo t,  $J = 6,3\text{ Hz}$ , 1H) foi atribuído ao hidrogênio olefínico (H3). Os valores relativos de integral desses sinais de RMN de  $^1\text{H}$  foram equivalentes ao número de átomos de hidrogênio esperados na estrutura monomérica da guta-percha (*trans*-isopreno).

O espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (Figura A5, p. 157) apresenta 5 sinais de carbono e a análise deste espectro juntamente com o subespectro de DEPT-135 (Figura A6, p. 157) possibilitou a identificação de um carbono metílico (C5;  $\delta$  16,03), dois metilênicos (C1;  $\delta$  39,75 e C4;  $\delta$  26,75), um metínico (C3;  $\delta$  124,26) e um não hidrogenado (C2;  $\delta$  134,93).



**Figura 17:** Espectro e expansões de RMN de  $^1\text{H}$  de **S2** ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz).

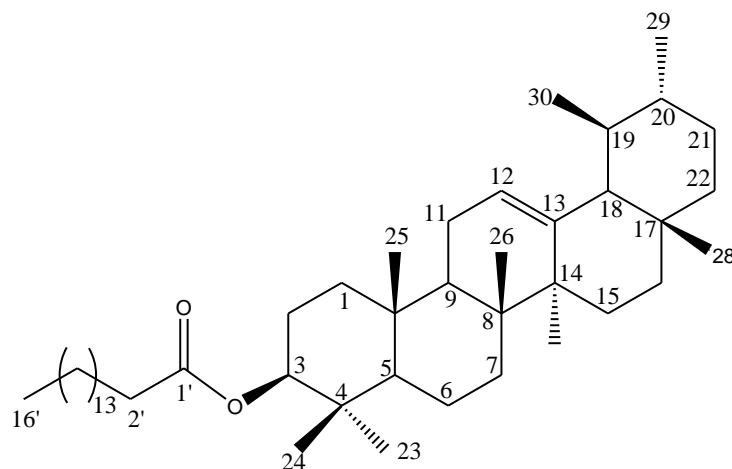
Os valores de deslocamento químico de carbono de **S2** foram comparados com a literatura (DE LA TORRE et al., 2010) (Tabela 27) e permitiram identificar este composto como sendo **guta-percha**.

**Tabela 27:** Dados de RMN de  $^{13}\text{C}$  de **S2** e da literatura para **guta-percha** (DE LA TORRE et al., 2010)

$\delta$ de $^{13}\text{C}$				$\delta$ de $^1\text{H}$		
Nº	Tipo de carbono	$\delta_{\text{C}}^*$ de S2	$\delta_{\text{C}}^*$ (DE LA TORRE et al., 2010)	Nº	$\delta_{\text{H}}^*$ de S2	$\delta_{\text{H}}^*$ (DE LA TORRE et al., 2010)
<b>C1 (<math>\gamma</math>)</b>	$\text{CH}_2$	39,75	39,71	<b>H1a (<math>\gamma</math>)</b>	1,98	1,99 (m)
<b>C2 (<math>\alpha</math>)</b>	C	134,93	134,88	<b>H1b (<math>\gamma</math>)</b>	1,98	1,99 (m)
<b>C3 (<math>\beta</math>)</b>	$=\text{CH}-$	124,26	124,21	<b>H3 (<math>\beta</math>)</b>	5,12 (pseudo t, $J= 6,3$ Hz)	5,12 (1H,s)
<b>C4 (<math>\delta</math>)</b>	$\text{CH}_2$	26,75	26,63	<b>H4 (<math>\delta</math>)</b>	2,06	2,07 (4H,d)
<b>C5 (<math>\epsilon</math>)</b>	$\text{CH}_3$	16,03	15,99	<b>H5 (<math>\epsilon</math>)</b>	1.60	1,60 (3H,s)

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

### 4.3 - S3: 3 $\beta$ -Palmitiloxi-urs-12-eno



**S3** foi isolado a partir do extrato **EHS** e se apresenta como sólido pastoso incolor, solúvel em clorofórmio. A análise por CCD deste composto usando diferentes eluentes evidenciou a existência de uma mancha roxa (revelador: ácido perclórico/vanilina). **S3** apresentou o teste de Liebermann-Burchard positivo para TTPC.

O espectro na região do IV (Figura A7, p. 158) de **S3** apresenta bandas de absorção em 2928-2852  $\text{cm}^{-1}$  característica de estiramento de ligação C-H de compostos alifáticos, 1736  $\text{cm}^{-1}$  característica de estiramento de ligação C=O de éster, 1464 e 722  $\text{cm}^{-1}$  de deformação angular de ligação C-H. As bandas em 1380 e 1364  $\text{cm}^{-1}$  são de deformação angular de grupo metila geminado. As bandas na região entre 1300-1000  $\text{cm}^{-1}$  referem-se a estiramento de ligação C-O de éster saturado e em 986 e 972  $\text{cm}^{-1}$  de deformação angular de ligação C=C-H.

O espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (Figura A8, p. 158) apresenta um sinal em  $\delta$  5,13 (t,  $J = 3,6$  Hz) que se refere aos átomos de hidrogênio da ligação dupla de TTPC's da classe dos ursanos. Apresenta sinal em  $\delta$  4,50 (m) que caracteriza hidrogênio ligado a carbono de um grupo éster (H-C-O), apresenta também sinais em  $\delta$  1,07, 1,01, 0,98, 0,87 e 0,80 que correspondem a seis grupos metila e mais dois sinais em  $\delta$  0,88 e 0,91, típicos de átomos de hidrogênio de metilas 29 e 30 em TTPC da série ursano (MAHATO E KUNDU, 1994). Os sinais destes átomos de hidrogênio (H29 e H30) são dupletos com sobreposição de sinais, não permitindo observar a multiplicidade e a constante de acoplamento.

O sinal tripleto em  $\delta$  2,29 ( $J = 7,4$  Hz), característico de grupo  $\text{CH}_2$  alfa a carbonila, juntamente com um intenso sinal em  $\delta$  1,26, sugere a presença de uma cadeia lateral ligada a carbonila.

A análise do espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  e subespectro DEPT-135 (Figuras A9-A10, p. 159) indica a presença de 30 sinais de carbono, sendo oito de carbono metílicos, nove metilênicos, seis metínicos e sete não hidrogenados para a parte triterpênica, além de 16 sinais referentes à cadeia lateral.

O espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  apresenta sinais em  $\delta$  124,34 (CH) e 139,63 (C) que se referem aos átomos de carbono da ligação dupla de TTPC's da classe dos ursanos. Em relação à cadeia lateral, o espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  apresenta sinais em  $\delta$  173,68 (característico de  $\text{C}=\text{O}$  de éster), um sinal em  $\delta$  80,60 que se refere ao carbono C3 e sinais entre  $\delta$  29,47 e 29,18 de átomos de carbono metilênicos. Estes dados comparados com dados da literatura para o  $3\beta$ -esterealoxi-urs-12-eno, composto semelhante, mas com 18 átomos de carbono na cadeia lateral, sugeriram que **S3** trata-se de um triterpeno do tipo ursano, a  $\alpha$ -amirina, com um grupo éster ligado ao carbono 3 (Tabela 28, p. 65).

O espectro de massas (IES-EM) (Figuras A11-A12, p. 160) é característico de triterpeno da série ursano, pela presença de fragmento em  $m/z$  409,3852 (modo positivo) (calculado 409,3834), devido à protonação do oxigênio e fragmentação na ligação C-O, indicando perda da cadeia lateral. O pico em  $m/z$  255,2314 (modo negativo) (calculado 255,2324) corresponde a massa da cadeia lateral, indicando a presença de 16 átomos de carbono.

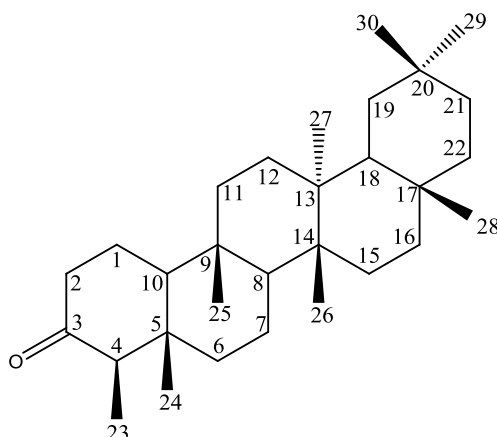
O tamanho da cadeia do grupo éster também foi confirmado pela análise do espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  quantitativo com delay de 100 s para que todos os átomos de carbono pudessem relaxar completamente. A integração referentes à cadeia lateral indica 14 átomos de carbono, mais o sinal da carbonila e uma metila detectada com auxílio de subespectro DEPT-135. Portanto, a estrutura de **S3** foi proposta como sendo  **$3\beta$ -palmitiloxi-urs-12-eno**. Este composto foi isolado pela primeira vez na família Celastraceae.

**Tabela 28:** Dados de RMN de  $^{13}\text{C}$  de **S3** e da literatura para **3 $\beta$ -palmitiloxi-urs-12-eno** (MIRANDA et al., 2006)

C	Tipo de carbono	$\delta_{\text{C}}^*$ de S3	$\delta_{\text{C}}^*$ (MIRANDA et al., 2006)	Tipo de carbono	C	$\delta_{\text{C}}^*$ de S3	C	$\delta_{\text{C}}^*$ (MIRANDA et al., 2006)
1	CH <sub>2</sub>	38,46	38,51	C	1'	173,70	1'	173,68
2	CH <sub>2</sub>	23,64	23,68	CH <sub>2</sub>	2'	34,88	2'	34,87
3	CH	80,60	80,64	CH <sub>2</sub>	3'	25,20	3'	25,20
4	C	37,75	37,77	CH <sub>2</sub>	4'	29,20	4'	29,20
5	CH	55,27	55,32	CH <sub>2</sub>	5'	29,28	5'	29,28
6	CH <sub>2</sub>	18,25	18,29	CH <sub>2</sub>	6'	29,38	6'	29,38
7	CH <sub>2</sub>	32,88	32,92	CH <sub>2</sub>	7'	29,60	7'	29,60
8	C	40,04	40,09	CH <sub>2</sub>	8'	29,67	8'	29,68
9	CH	47,64	47,69	CH <sub>2</sub>	9'	29,70	9'	29,71
10	C	36,81	36,85	CH <sub>2</sub>	10'	29,72	10'	29,72
11	CH <sub>2</sub>	23,38	23,41	CH <sub>2</sub>	-	-	11'	29,72
12	CH	124,33	124,38	CH <sub>2</sub>	-	-	12'	29,72
13	C	139,63	139,66	CH <sub>2</sub>	11'	29,70	13'	29,72
14	C	42,08	42,13	CH <sub>2</sub>	12'	29,65	14'	29,66
15	CH <sub>2</sub>	26,61	26,65	CH <sub>2</sub>	13'	29,48	15'	29,49
16	CH <sub>2</sub>	28,10	28,14	CH <sub>2</sub>	14'	31,94	16'	31,95
17	C	33,75	33,78	CH <sub>2</sub>	15'	22,69	17	22,70
18	C	59,08	59,13	CH <sub>3</sub>	16'	14,11	18	14,12
19	CH	39,62	39,65					
20	CH	39,66	39,70					
21	CH <sub>2</sub>	31,25	31,29					
22	CH <sub>2</sub>	41,54	41,58					
23	CH <sub>3</sub>	28,10	28,13					
24	CH <sub>3</sub>	16,81	16,84					
25	CH <sub>3</sub>	15,72	15,75					
26	CH <sub>3</sub>	16,87	16,91					
27	CH <sub>3</sub>	23,24	23,27					
28	CH <sub>3</sub>	28,74	28,77					
29	CH <sub>3</sub>	17,50	17,52					
30	CH <sub>3</sub>	21,39	21,40					

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

#### 4.4 - S4: 3-Oxofriedelano (friedelina)



**S4** foi isolado a partir **EHS** e apresenta-se como um sólido branco cristalino em forma de placas, parcialmente solúvel em clorofórmio e com faixa de fusão 250-255 °C. O teste LB foi positivo para triterpeno pentacíclico. A análise por CCD deste composto, utilizando diferentes eluentes, apresentou apenas uma mancha amarela (revelador: ácido perclórico/vanilina).

O espectro na região do IV (Fig. A13, p. 161) de **S4** apresenta bandas de absorção em 2925-2860  $\text{cm}^{-1}$  de estiramento simétrico e assimétrico de ligação CH de compostos alifáticos, em 1715  $\text{cm}^{-1}$  característica de estiramento de ligação C=O de carbonila de cetona. Também se observa bandas em 1454 e 1388  $\text{cm}^{-1}$  que se referem à deformação angular no plano de ligação simples de C-H de compostos alifáticos.

O espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (Figura A14, p. 161) apresenta seis sinais que correspondem a oito grupos metila, com sinais em  $\delta$  1,18 (3H), 1,05 (3H), 1,01 (6H), 0,95 (3H), 0,87 (6H) e 0,73 (3H).

A análise do espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (Figura 18, p. 67) indica um total de 30 sinais de átomos de carbono e pelo subespectro DEPT-135 (Figura A15, p. 162), classificam-se como sendo 8  $\text{CH}_3$ , 11  $\text{CH}_2$ , 4 CH e 7 C, característicos de triterpeno da série friedelano. O sinal em  $\delta$  213,21 foi atribuído ao carbono da carbonila.

Estas informações aliadas à comparação com os dados de RMN de  $^{13}\text{C}$  da literatura (Tabela 29, p. 67) (MAHATO E KUNDU, 1994) permitiram identificar **S4** como sendo **3-oxofriedelano**.



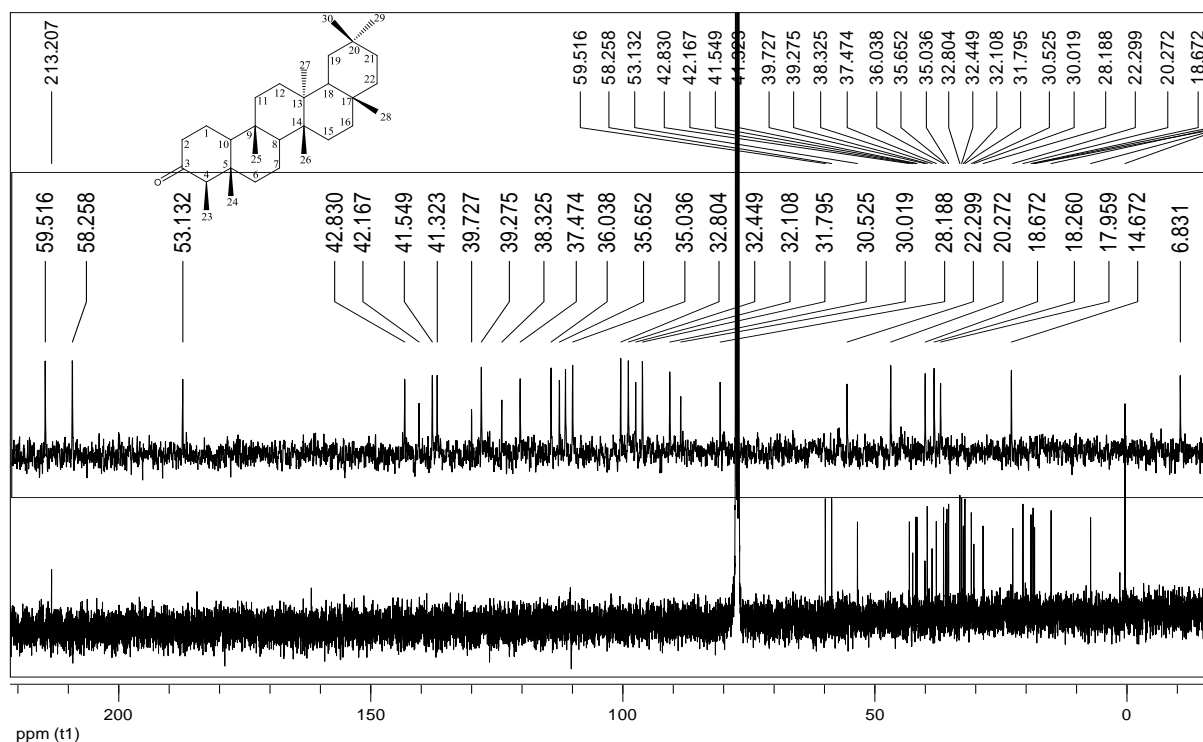


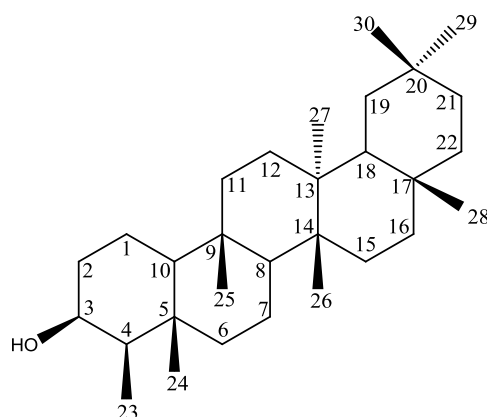
Figura 18: Espectro e expansão de RMN de  $^{13}\text{C}$  de **S4** ( $\text{CDCl}_3$ , 100 MHz).

Tabela 29: Dados de RMN de  $^{13}\text{C}$  de **S4** e da literatura para **3-oxofriedelano** (MAHATO E KUNDU, 1994)

Nº	Tipo de carbono	$\delta_c^*$ de S4	$\delta_c^*$ (MAHATO E KUNDU, 1994)	Nº	Tipo de carbono	$\delta_c^*$ de S4	$\delta_c^*$ (MAHATO E KUNDU, 1994)
1	CH <sub>2</sub>	22,30	22,30	16	CH <sub>2</sub>	36,04	36,00
2	CH <sub>2</sub>	41,55	41,50	17	C	30,02	30,00
3	C	213,22	213,20	18	CH	42,83	42,80
4	CH	58,26	58,20	19	CH <sub>2</sub>	35,65	35,30
5	C	42,17	42,10	20	C	28,19	28,10
6	CH <sub>2</sub>	41,32	41,30	21	CH <sub>2</sub>	32,81	32,70
7	CH <sub>2</sub>	18,26	18,20	22	CH <sub>2</sub>	39,28	39,20
8	CH	53,13	53,10	23	CH <sub>3</sub>	6,83	6,80
9	C	37,47	37,40	24	CH <sub>3</sub>	14,67	14,60
10	CH	59,52	59,40	25	CH <sub>3</sub>	17,96	17,90
11	CH <sub>2</sub>	35,65	35,60	26	CH <sub>3</sub>	20,27	20,20
12	CH <sub>2</sub>	30,53	30,50	27	CH <sub>3</sub>	18,67	18,60
13	C	39,73	39,70	28	CH <sub>3</sub>	32,11	32,10
14	C	38,33	38,30	29	CH <sub>3</sub>	35,04	35,00
15	CH <sub>2</sub>	32,45	32,40	30	CH <sub>3</sub>	31,80	31,80

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

#### 4.5 - S5: 3 $\beta$ -Hidroxifriedelano

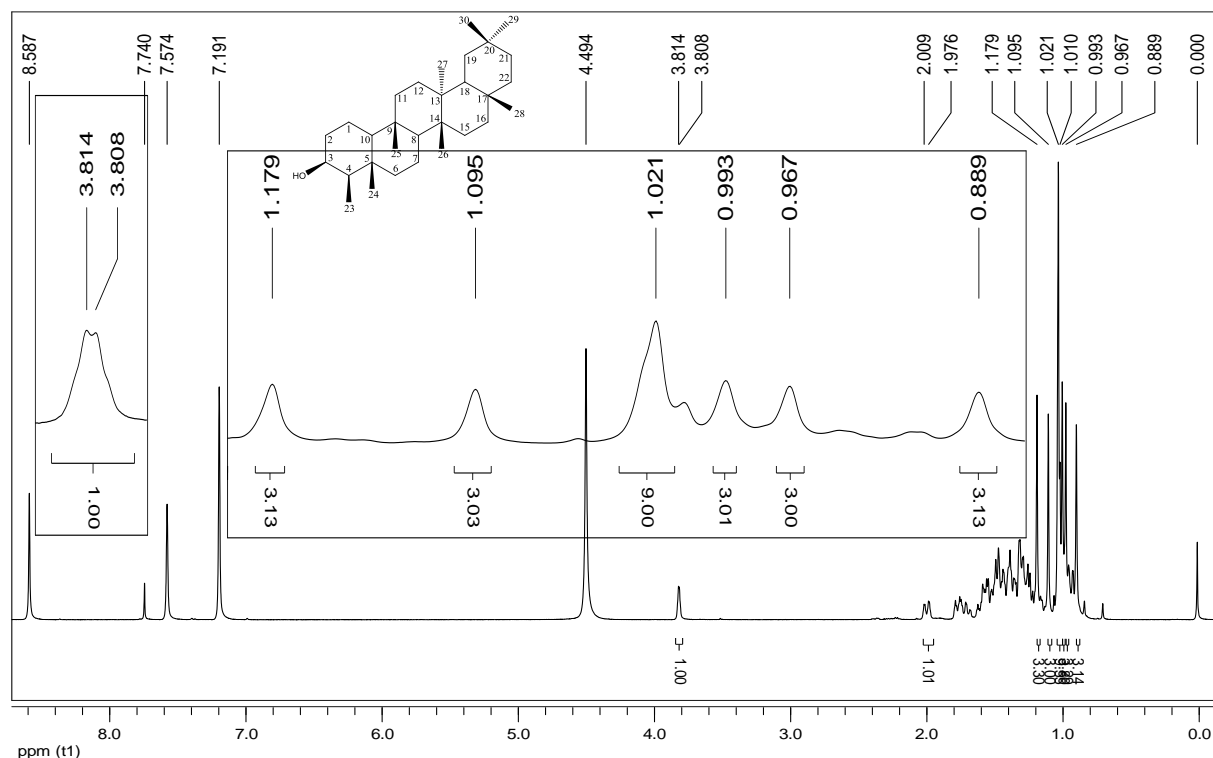


**S5** foi isolado a partir de **EHS** e apresenta-se como um sólido branco cristalino em forma de placas, parcialmente solúvel em clorofórmio e com faixa de fusão 270-274 °C. O teste LB foi positivo para triterpeno pentacíclico. A análise por CCD desta amostra utilizando diferentes eluentes apresentou apenas uma mancha lilás (revelador: ácido perclórico/vanilina).

O espectro na região do IV (Fig. A16, p. 162) de **S5** apresenta uma banda de absorção em 3474 cm<sup>-1</sup>, que corresponde a estiramento de ligação O-H de álcool e perfil característico de  $\beta$ -friedelinol. Também pode se observar bandas em 1458 e 1384 cm<sup>-1</sup> que se referem à deformação angular no plano de ligação simples de C-H de compostos alifáticos.

O espectro de RMN de <sup>1</sup>H (Figura 19, p. 69) apresenta seis simpletos que correspondem a oito metilas com sinais em  $\delta$  1,18, 1,10, 1,02 (9H), 0,99, 0,97 e 0,89. Também foi possível observar um multiplete em  $\delta$  3,81, referente a hidrogênio ligado a carbono hidroxilado (H3).

A análise do espectro de RMN de <sup>13</sup>C e subespectro DEPT-135 (Figuras A17-A19, p. 163-164) indica presença de 8 CH<sub>3</sub>, 11 CH<sub>2</sub>, 5 CH e 6 C, característicos de triterpeno da série friedelano, com total de 30 sinais de carbono. O sinal em  $\delta$  71,59 é atribuído ao carbono ligado à hidroxila. Estas informações aliadas à comparação com os dados de RMN de <sup>13</sup>C da literatura (Tabela 30, p. 69) (SALAZAR et al., 2000) permitiram identificar **S5** como sendo o **3 $\beta$ -hidroxifriedelano**.



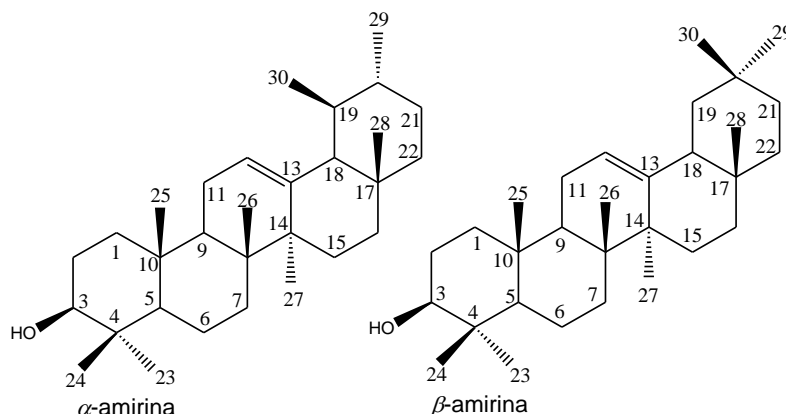
**Figura 19:** Espectro e expansões de RMN de  $^1\text{H}$  de **S5** ( $\text{CDCl}_3 + \text{Py-d}_5$ , 400 MHz).

**Tabela 30:** Dados de RMN de  $^{13}\text{C}$  de **S5** e da literatura para **3 $\beta$ -hidroxifriedelano** (SALAZAR et al., 2000)

Nº	Tipo de carbono	$\delta_{\text{C}}^*$ de S5	$\delta_{\text{C}}^*$ (SALAZAR et al., 2000)	Nº	Tipo de carbono	$\delta_{\text{C}}^*$ de S5	$\delta_{\text{C}}^*$ (SALAZAR et al., 2000)
1	CH <sub>2</sub>	16,17	16,18	16	CH <sub>2</sub>	35,90	35,90
2	CH <sub>2</sub>	36,14	36,14	17	C	30,03	30,03
3	CH	71,58	71,59	18	CH	42,88	42,89
4	CH	49,63	49,63	19	CH <sub>2</sub>	35,36	35,37
5	C	38,10	38,10	20	C	28,17	28,18
6	CH <sub>2</sub>	41,98	41,99	21	CH <sub>2</sub>	32,88	32,88
7	CH <sub>2</sub>	17,69	17,70	22	CH <sub>2</sub>	39,29	39,29
8	CH	53,27	53,27	23	CH <sub>3</sub>	12,08	12,09
9	C	37,18	37,18	24	CH <sub>3</sub>	16,59	16,59
10	CH	61,65	61,65	25	CH <sub>3</sub>	18,36	18,36
11	CH <sub>2</sub>	35,66	35,67	26	CH <sub>3</sub>	20,14	20,14
12	CH <sub>2</sub>	30,70	30,70	27	CH <sub>3</sub>	18,69	18,70
13	C	38,39	38,39	28	CH <sub>3</sub>	32,12	32,13
14	C	39,70	39,70	29	CH <sub>3</sub>	35,03	35,04
15	CH <sub>2</sub>	32,34	32,35	30	CH <sub>3</sub>	31,86	31,86

Solvente:  $^*\text{CDCl}_3 + \text{Py-d}_5$

#### 4.6 - S6: $\alpha$ -Amirina (I) e $\beta$ -amirina (II)



**S6** foi isolado de **EHS** e apresentou-se como cristais brancos, solúvel em clorofórmio e com faixa de fusão 160-164 °C. O teste de LB foi positivo para triterpeno pentacíclico. Na placa cromatográfica, este sólido, apresentou apenas uma mancha roxa após revelação com ácido perclórico/vanilina.

O espectro na região do IV (Figura A20, p. 164) de **S6** apresenta bandas de absorção em 3294  $\text{cm}^{-1}$  característica de estiramento de ligação O-H de álcool, 1464  $\text{cm}^{-1}$  de deformação angular de ligação C-H ( $\text{CH}_2$ ), absorção em 1386-1360  $\text{cm}^{-1}$  característica de deformação angular de grupo metila. O espectro apresenta também bandas entre 1190 e 1036  $\text{cm}^{-1}$  que se referem a estiramento de ligação C-O de álcoois, além de bandas em 996 e 660  $\text{cm}^{-1}$  de deformação angular de C=C de alceno.

O espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (Figura A21, p. 165) apresenta dois sinais tripletos em  $\delta$  5,18 e 5,13 ( $J = 3,6$  Hz), que se referem a H12 de ligação C=C, de  $\beta$ -amirina e  $\alpha$ -amirina, respectivamente. Os sinais em  $\delta$  3,24 e 3,21 são característicos de H3 ligado a carbono hidroxilado (C3) e se referem aos átomos de hidrogênio dos compostos  $\beta$ -amirina e  $\alpha$ -amirina, respectivamente. A presença de grande número de sinais entre  $\delta$  2,0 e 0,7 confirma que **S6** não se trata de apenas um triterpeno.

A análise do espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  e subespectro DEPT-135 (Figuras A22-A24, p. 165-166) indica um total de 60 sinais de carbono, que foram classificados como sendo 16  $\text{CH}_3$ , 19  $\text{CH}_2$ , 16  $\text{CH}$  e 13 C. Os sinais de átomos de carbono em  $\delta$  124,43 (CH) e  $\delta$  139,60 (C) referem-se aos átomos de carbono olefínicos da estrutura do TTPC da série ursano, a  $\alpha$ -amirina e os sinais em  $\delta$  121,74 (CH) e  $\delta$  145,20 (C) referem-se aos átomos de carbono olefínico da estrutura do TTPC da série oleanano, a  $\beta$ -amirina. Estas informações aliadas à comparação com os

dados de RMN de  $^{13}\text{C}$  da literatura (Tabela 31) (MAHATO E KUNDU, 1994) permitiram identificar **S6** como sendo  $\alpha$ -amirina (I) +  $\beta$ -amirina (II).

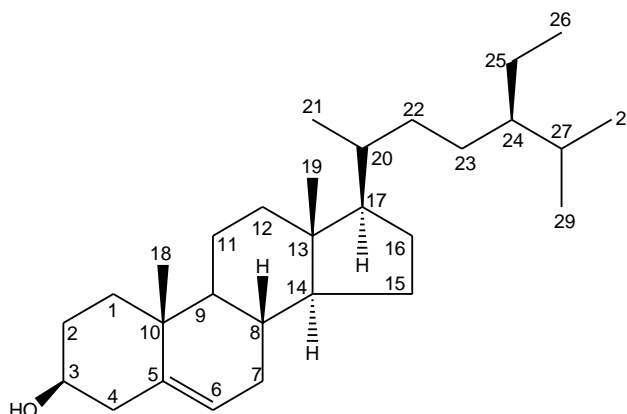
**Tabela 31:** Dados de RMN de  $^{13}\text{C}$  de **S6** e da literatura para  $\alpha$ -amirina (I) +  $\beta$ -amirina (II) (MAHATO E KUNDU, 1994)

Nº	Tipo de carbono	$\delta_{\text{C}}^*$ de S6	$\delta_{\text{C}}^*$ de $\alpha$ -amirina (I)	Tipo de carbono	$\delta_{\text{C}}^*$ de S6	$\delta_{\text{C}}^*$ de $\beta$ -amirina (II)
1	CH <sub>2</sub>	38,80	38,70	CH <sub>2</sub>	38,60	38,70
2	CH <sub>2</sub>	27,25	27,20	CH <sub>2</sub>	27,29	27,30
3	CH	79,04	78,30	CH	79,06	79,00
4	C	38,78	38,70	C	38,67	38,80
5	CH	55,20	55,20	CH	55,20	55,30
6	CH <sub>2</sub>	18,36	18,30	CH <sub>2</sub>	18,38	18,50
7	CH <sub>2</sub>	32,95	32,90	CH <sub>2</sub>	32,67	32,80
8	C	40,02	40,00	C	38,80	38,80
9	CH	47,73	47,70	CH	47,65	47,70
10	C	36,96	36,90	C	37,15	37,60
11	CH <sub>2</sub>	23,37	23,30	CH <sub>2</sub>	23,54	23,60
12	CH	124,43	124,30	CH	121,74	121,80
13	C	139,60	139,30	C	145,20	145,10
14	C	42,09	42,00	C	41,73	41,80
15	CH <sub>2</sub>	28,10	28,70	CH <sub>2</sub>	26,17	26,20
16	CH <sub>2</sub>	26,63	26,60	CH <sub>2</sub>	26,95	27,00
17	C	33,76	33,70	C	32,50	32,50
18	CH	59,09	58,90	CH	47,25	47,40
19	CH	39,67	39,60	CH <sub>2</sub>	46,84	46,90
20	CH	39,62	39,60	C	31,08	31,10
21	CH <sub>2</sub>	31,26	31,20	CH <sub>2</sub>	34,74	34,80
22	CH <sub>2</sub>	41,54	41,50	CH <sub>2</sub>	37,15	37,20
23	CH <sub>3</sub>	28,13	28,10	CH <sub>3</sub>	28,40	28,20
24	CH <sub>3</sub>	15,62	15,60	CH <sub>3</sub>	15,50**	15,50
25	CH <sub>3</sub>	15,68	15,60	CH <sub>3</sub>	15,58**	15,60
26	CH <sub>3</sub>	16,81	16,80	CH <sub>3</sub>	16,87	16,90
27	CH <sub>3</sub>	23,27	23,30	CH <sub>3</sub>	25,99	26,00
28	CH <sub>3</sub>	28,09	28,10	CH <sub>3</sub>	28,75	28,40
29	CH <sub>3</sub>	17,47	17,40	CH <sub>3</sub>	33,33	33,30
30	CH <sub>3</sub>	21,39	21,30	CH <sub>3</sub>	23,69	23,70

Solvente: \*CDCl<sub>3</sub>

\*\*podem estar trocados

#### 4.7 - S7: $\beta$ -Sitosterol



**S7** foi obtido a partir de **EHS** e apresentou-se como um sólido branco, solúvel em clorofórmio e de faixa de fusão 130-133 °C. O teste LB foi positivo para esteroide (coloração esverdeada). A análise por CCD deste sólido evidenciou a existência de apenas uma mancha roxa (revelador: ácido perclórico/vanilina).

O espectro na região do IV (Figura A25, p. 167) apresenta bandas de absorção em 3434  $\text{cm}^{-1}$  características de estiramento de ligação O-H de álcool, 2960-2868, 1460 e 1370  $\text{cm}^{-1}$ , características de ligação C-H, evidenciando a natureza alifática da substância e 1054  $\text{cm}^{-1}$  de estiramento de ligação C-O de álcool.

O espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (Figura 20, p. 73) apresenta sinais em 1,01 (s, 3H), 0,92 (d,  $J = 6,4$  Hz, 3H), sobrepostos entre  $\delta$  0,85 e 0,81 (9H) e 0,68 (s, 3H) que correspondem a sinais de átomos de hidrogênio metílico. Os sinais com valores entre  $\delta$  1,25 e 2,28 foram atribuídos a átomos de hidrogênio de grupos  $\text{CH}_2$  e CH. Foi observado também um multiplete em  $\delta$  3,52 (m, 1H) atribuído a hidrogênio carbinólico e o sinal em  $\delta$  5,36 (1H) atribuído a hidrogênio olefínico, sugerindo tratar-se do  $\beta$ -sitosterol.

A análise do espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  e subespectro DEPT-135 (Figuras A26-A27, p. 167-168) indica a presença de 28 sinais, sendo 6  $\text{CH}_3$ , 10  $\text{CH}_2$ , 8 CH e 4 C, sendo que o sinal em  $\delta$  31,94 está intenso por ser relativo a mais de um átomo de carbono. O sinal em  $\delta$  42,33 foi atribuído aos átomos de carbono C4. O sinal em  $\delta$  71,84 foi atribuído ao carbono hidroxilado (C3) e os sinais em  $\delta$  121,73 (CH) e  $\delta$  140,79 (C) foram atribuídos a átomos de carbono olefínico (C6 e C7). A comparação entre os valores dos sinais de RMN de  $^{13}\text{C}$  com os da literatura (DE-EKNAMKUL E POTDUANG, 2003), descritos na Tabela 32, p. 73, permitiu identificar **S7** como sendo  **$\beta$ -sitosterol**.

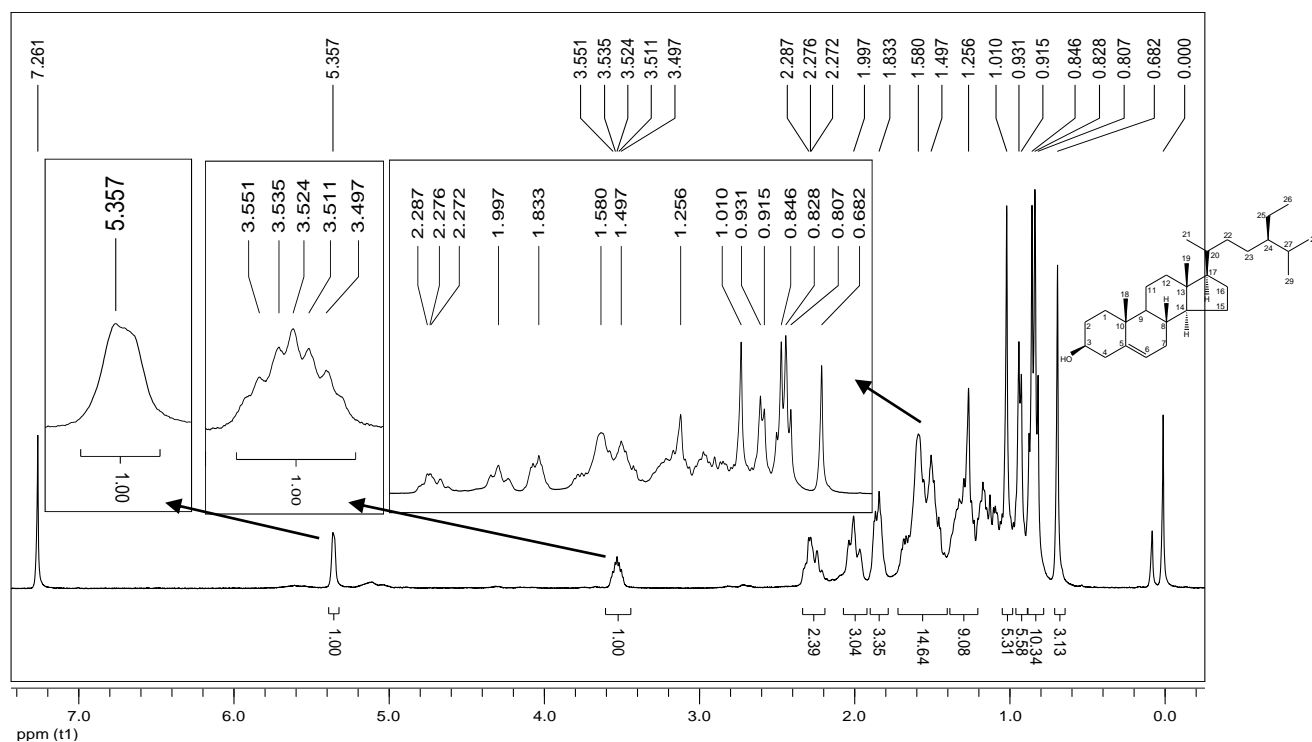


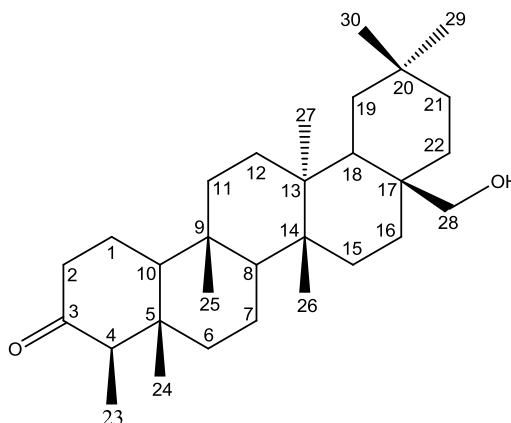
Figura 20: Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de **S7** ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz).

Tabela 32: Dados de RMN de  $^{13}\text{C}$  de **S7** e da literatura para  $\beta$ -sitosterol (DE-EKNAMKUL E POTDUANG, 2003)

Nº	Tipo de carbono	$\delta_c^*$ de S7	$\delta_c^*$ (DE-EKNAMKUL E POTDUANG, 2003)	Nº	Tipo de carbono	$\delta_c^*$ de S7	$\delta_c^*$ (DE-EKNAMKUL E POTDUANG, 2003)
1	CH <sub>2</sub>	37,28	37,22	16	CH <sub>2</sub>	28,26	28,22
2	CH <sub>2</sub>	31,70	31,63	17	CH	56,09	56,02
3	CH	71,84	71,80	18	CH <sub>3</sub>	11,87	11,84
4	CH <sub>2</sub>	42,33	42,19	19	CH <sub>3</sub>	19,41	19,39
5	C	140,79	140,72	20	CH	36,16	36,12
6	CH	121,73	121,71	21	CH <sub>3</sub>	18,80	18,76
7	CH <sub>2</sub>	31,94	31,87	22	CH <sub>2</sub>	33,98	33,91
8	CH	31,94	31,87	23	CH <sub>2</sub>	26,13	26,02
9	CH	50,17	50,10	24	CH	45,88	45,81
10	C	36,53	36,48	25	CH <sub>2</sub>	29,19	29,11
11	CH <sub>2</sub>	21,11	21,07	26	CH <sub>3</sub>	19,83	19,80
12	CH <sub>2</sub>	39,81	39,74	27	CH	19,06	19,01
13	C	42,33	42,26	28	CH <sub>3</sub>	23,10	23,04
14	CH	56,80	56,73	29	CH <sub>3</sub>	12,00	11,97
15	CH <sub>2</sub>	24,32	24,29				

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

#### 4.8 - S8: 3-Oxo-28-hidroxifriedelano



**S8** foi obtido a partir de **EHS** e apresentou-se como cristais brancos, solúvel em clorofórmio e de faixa de fusão 255-260 °C. O teste LB foi positivo para triterpeno pentacíclico. A análise por CCD deste sólido indicou apenas uma mancha roxa (revelador: ácido perclórico/vanilina).

O espectro na região do IV (Figura A28, p. 168) de **S8** apresenta bandas de absorção em 3544  $\text{cm}^{-1}$  correspondente a estiramento da ligação O-H de álcool, 1706  $\text{cm}^{-1}$  de estiramento de ligação C=O de cetona e 1466 e 1388  $\text{cm}^{-1}$  de deformação angular de ligação C-H de compostos alifáticos. Apresentou também bandas em torno de 1054  $\text{cm}^{-1}$ , correspondente a estiramento de ligação C-O de álcool primário.

O espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (Figura 21, p. 75) apresenta seis simpletos em  $\delta$  1,13, 0,99, 0,98, 0,91, 0,87 e 0,72 relativos a seis metilas e um duplete em  $\delta$  0,87 ( $J = 7,6$  Hz) associado à outra metila (H23) características de TTPC da série dos friedelanos. A presença de um sinal em  $\delta$  3,63, característico de hidrogênio ligado a carbono hidroxilado, confirmou a presença do grupo hidroxila.

A análise do espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (Figura 22, p. 75) indica a presença de 30 sinais. Com o auxílio do subespectro DEPT-135 (Figura 23, p. 76) estes sinais foram classificados como sendo 7  $\text{CH}_3$ , 12  $\text{CH}_2$ , 4 CH e 7 C indicando que uma das metilas se apresenta hidroxilada. O sinal em  $\delta_c$  6,83 foi atribuído ao carbono metílico C23 característico de esqueleto friedelânico (MAHATO E KUNDU, 1994). Apresentou também sinais em  $\delta$  213,13, relativo a carbono de carbonila (C3) e  $\delta$  68,07 relativo a carbono ligado a hidroxila (C28). A comparação dos dados de RMN de  $^{13}\text{C}$  com a literatura (MAHATO E KUNDU, 1994) (Tabela 33, p. 76), permitiu identificar **S8** como sendo **3-oxo-28-hidroxifriedelano**.



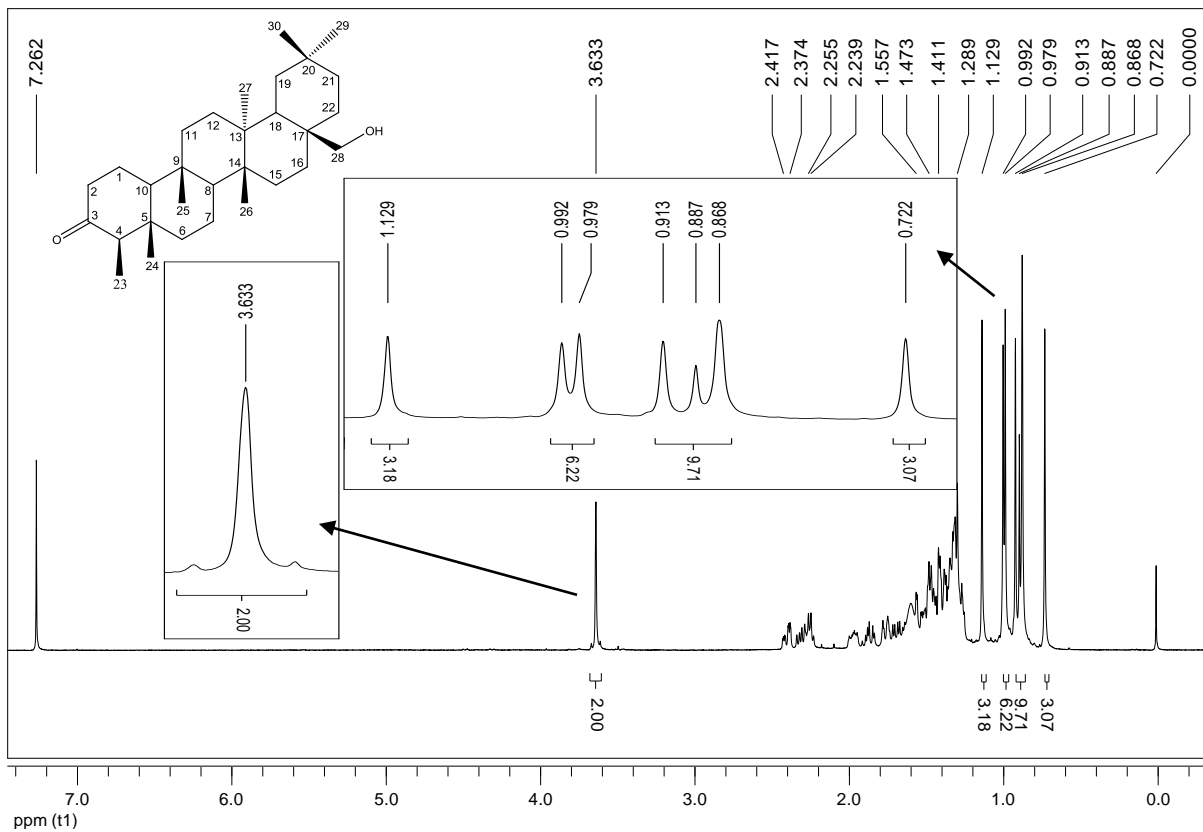


Figura 21: Espectro e expansões de RMN de <sup>1</sup>H (400 MHz) de S8 em CDCl<sub>3</sub>.

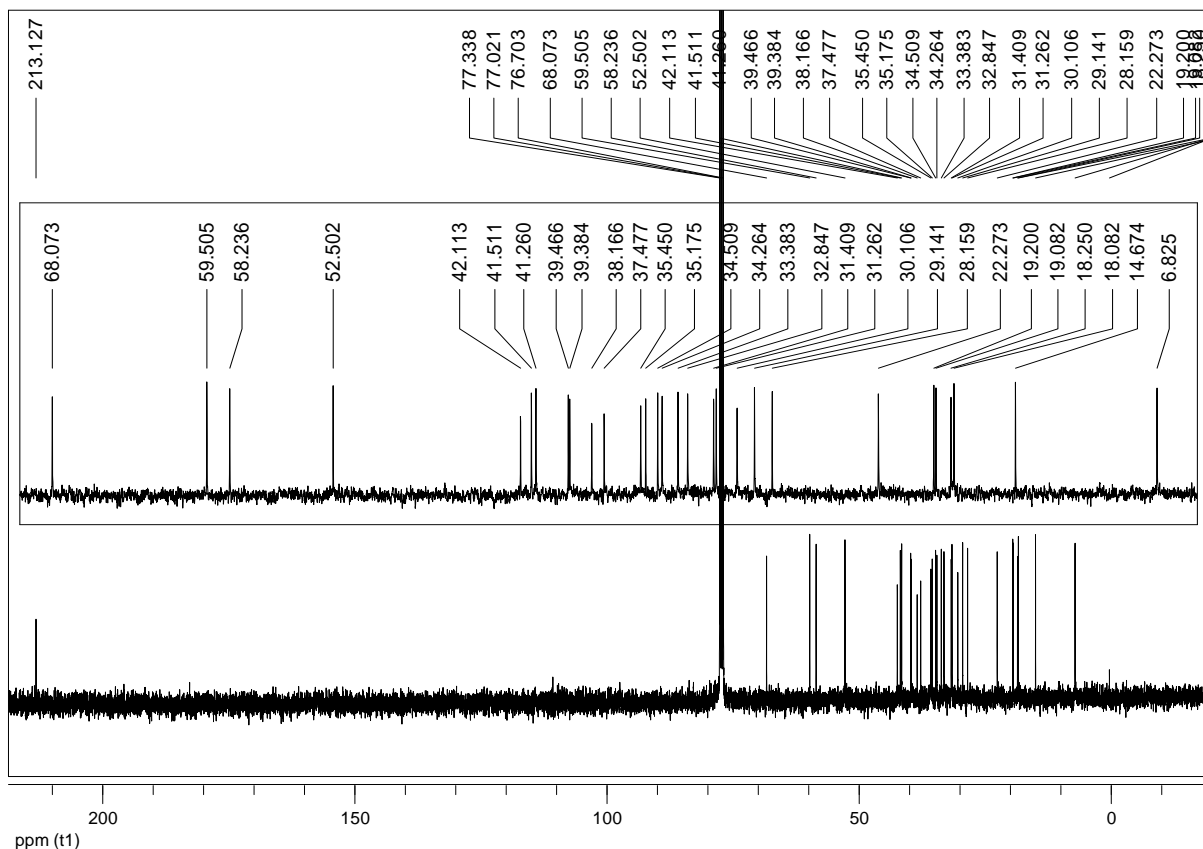
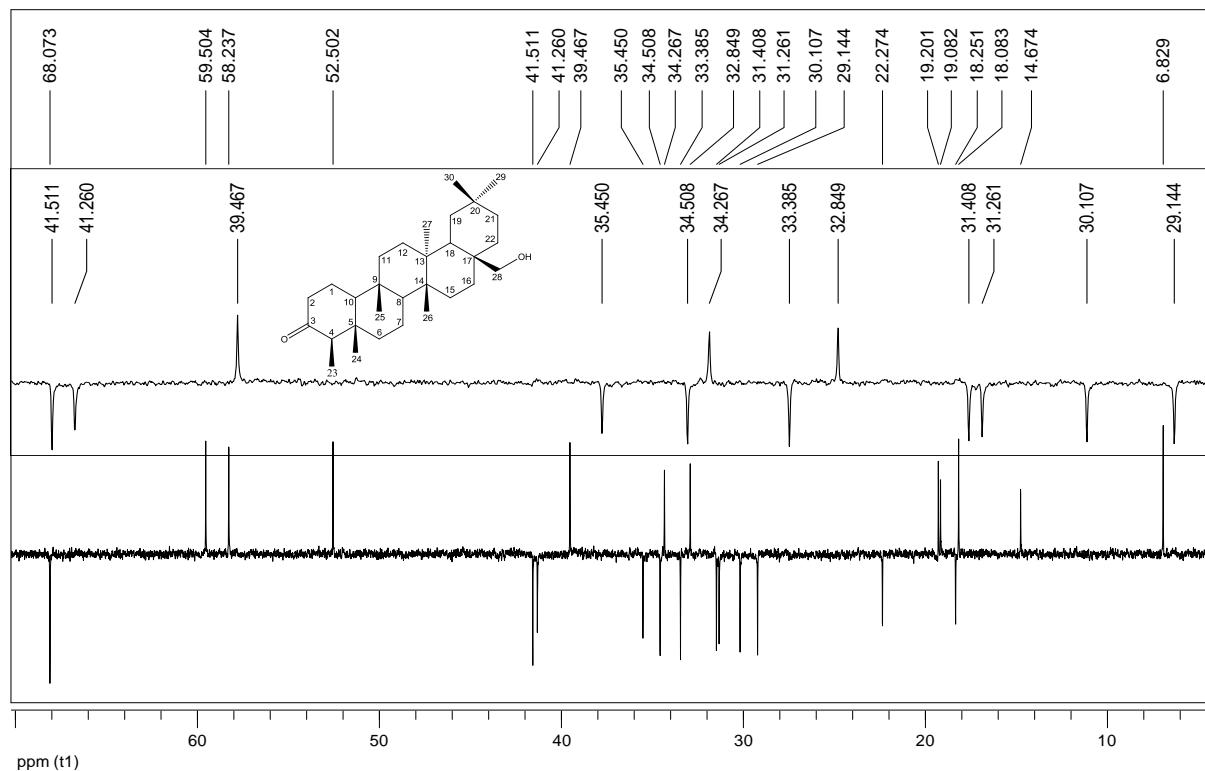


Figura 22: Espectro e expansão de RMN de <sup>13</sup>C (100 MHz) de S8 em CDCl<sub>3</sub>.



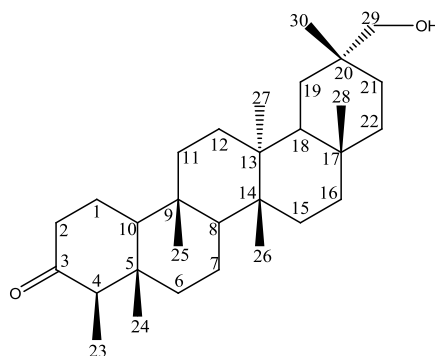
**Figura 23:** Subespectro DEPT-135 e expansão (100 MHz) de **S8** em  $\text{CDCl}_3$ .

**Tabela 33:** Dados de RMN de  $^{13}\text{C}$  de **S8** e da literatura para **3-oxo-28-hidroxifriedelano** (MAHATO E KUNDU, 1994)

Nº	Tipo de carbono	$\delta_{\text{C}}^*$ de S8	$\delta_{\text{C}}^*$ (MAHATO E KUNDU, 1994)	Nº	Tipo de carbono	$\delta_{\text{C}}^*$ de S8	$\delta_{\text{C}}^*$ (MAHATO E KUNDU, 1994)
1	CH <sub>2</sub>	22,27	22,10	16	CH <sub>2</sub>	29,14	29,00
2	CH <sub>2</sub>	41,51	41,30	17	C	35,18	35,10
3	C	213,13	212,60	18	CH	39,47	39,20
4	CH	58,24	57,80	19	CH <sub>2</sub>	34,51	34,40
5	C	42,11	41,90	20	C	28,16	27,90
6	CH <sub>2</sub>	41,26	41,00	21	CH <sub>2</sub>	31,41	31,40
7	CH <sub>2</sub>	18,25	18,10	22	CH <sub>2</sub>	33,38	33,20
8	CH	52,50	52,20	23	CH <sub>3</sub>	6,83	6,70
9	C	37,48	37,30	24	CH <sub>3</sub>	14,67	14,50
10	CH	59,50	59,10	25	CH <sub>3</sub>	18,08	18,00
11	CH <sub>2</sub>	35,45	35,30	26	CH <sub>3</sub>	19,08	18,90
12	CH <sub>2</sub>	30,11	29,90	27	CH <sub>3</sub>	19,20	19,10
13	C	39,38	39,10	28	CH <sub>2</sub>	68,07	67,00
14	C	38,17	38,00	29	CH <sub>3</sub>	32,85	32,90
15	CH <sub>2</sub>	31,26	31,30	30	CH <sub>3</sub>	34,26	34,20

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

#### 4.9 - S9: 3-Oxo-29-hidroxifriedelano

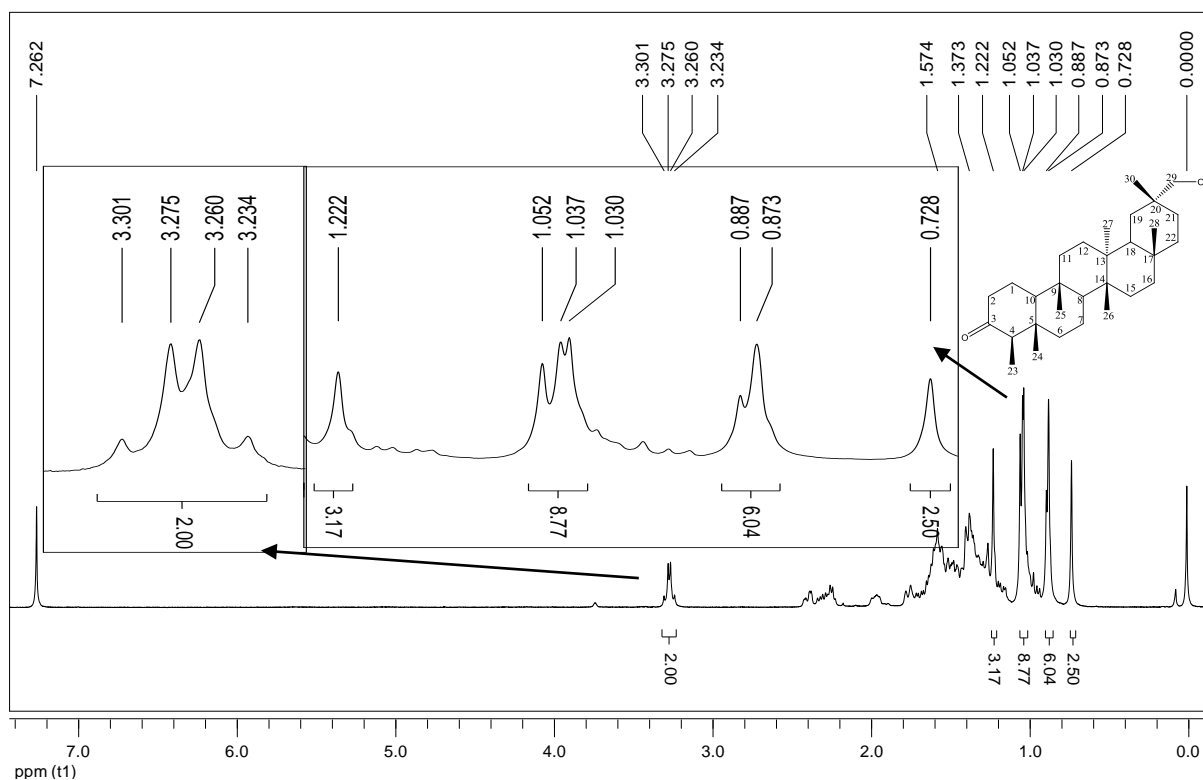


**S9** foi obtido a partir de **EHS** e apresentou-se como cristais brancos, solúvel em clorofórmio e de faixa de fusão 233-236 °C. O teste LB foi positivo para triterpeno pentacíclico. A análise por CCD deste sólido indicou apenas uma mancha roxa (revelador: ácido perclórico/vanilina).

O espectro na região do IV (Figura A29, p. 169) de **S9** apresenta bandas de absorção centrada em 3488  $\text{cm}^{-1}$  correspondente a estiramento da ligação O-H de álcool, 1706  $\text{cm}^{-1}$  característica de estiramento de ligação C=O de cetona e bandas em torno de 1050  $\text{cm}^{-1}$  correspondente a estiramento de ligação C-O de álcool primário.

O espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (Figura 24, p. 78) apresenta seis sinais simpletos entre  $\delta$  0,7 e 1,3 relativos a seis metilas,  $\delta$  1,22, 1,05, 1,04, 1,03, 0,87 e 0,73, um duplete em  $\delta$  0,88 ( $J = 5,6$  Hz) associado à outra metila (H23) características de TTPC da série dos friedelanos. A presença de um multiplete em  $\delta$  3,27, que é característico de hidrogênio ligado a carbono hidroxilado, confirmou que o composto contém o grupo hidroxila.

A análise do espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (Figura A30, p. 169) indica a presença de 30 sinais. Com o auxílio do subespectro DEPT-135 (Figura A31, p. 170) estes sinais foram classificados como sendo 7  $\text{CH}_3$ , 12  $\text{CH}_2$ , 4  $\text{CH}$  e 7  $\text{C}$ , indicando a presença de grupo metileno hidroxilado. O sinal em  $\delta_{\text{c}}$  6,82 foi atribuído ao carbono metílico C23 típico de esqueleto friedelânico (MAHATO E KUNDU, 1994). O espectro apresenta também sinais característicos em  $\delta$  213,19 relativo a carbono de grupo carbonila (C3) e  $\delta$  74,77 ( $\text{CH}_2$ ) relativo a carbono metilênico ligado a hidroxila (C29). A comparação dos dados de RMN de  $^{13}\text{C}$  com a literatura (RODRIGUES et al., 2012) (Tabela 34, p. 78), permitiu identificar **S9** como sendo **3-oxo-29-hidroxifriedelano**.



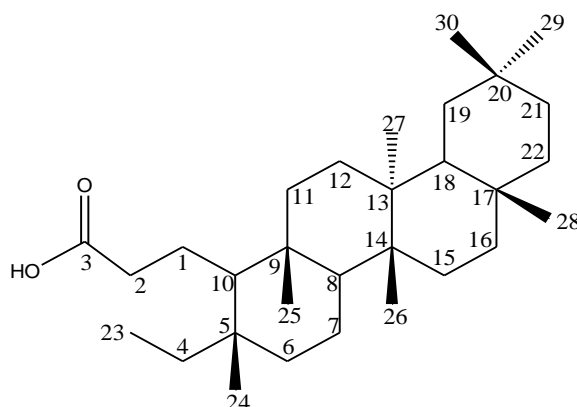
**Figura 24:** Espectro e expansões de RMN de <sup>1</sup>H (400 MHz) de **S9** em CDCl<sub>3</sub>.

**Tabela 34:** Dados de RMN de <sup>13</sup>C de **S9** e da literatura para **3-oxo-29-hidroxifriedelano** (RODRIGUES et al., 2012)

Nº	Tipo de carbono	δ <sub>c</sub> * de S9	δ <sub>c</sub> * (RODRIGUES et al., 2012)	Nº	Tipo de carbono	δ <sub>c</sub> * de S9	δ <sub>c</sub> * (RODRIGUES et al., 2012)
1	CH <sub>2</sub>	22,29	22,29	16	CH <sub>2</sub>	35,88	35,89
2	CH <sub>2</sub>	41,53	41,53	17	C	29,77	29,77
3	C	213,20	213,18	18	CH	41,88	41,88
4	CH	58,24	58,25	19	CH <sub>2</sub>	30,60	30,60
5	C	42,16	42,17	20	C	33,12	33,12
6	CH <sub>2</sub>	41,30	41,30	21	CH <sub>2</sub>	27,81	27,81
7	CH <sub>2</sub>	18,25	18,25	22	CH <sub>2</sub>	39,51	39,51
8	CH	53,41	53,42	23	CH <sub>3</sub>	6,83	6,83
9	C	37,45	37,45	24	CH <sub>3</sub>	14,67	14,67
10	CH	59,48	59,49	25	CH <sub>3</sub>	17,88	17,89
11	CH <sub>2</sub>	35,65	35,65	26	CH <sub>3</sub>	18,45	18,46
12	CH <sub>2</sub>	29,77	29,71	27	CH <sub>3</sub>	20,77	20,77
13	C	39,96	39,97	28	CH <sub>3</sub>	32,09	32,09
14	C	38,25	38,25	29	CH <sub>2</sub>	74,78	74,78
15	CH <sub>2</sub>	32,74	32,75	30	CH <sub>3</sub>	25,82	25,82

Solvente: \*CDCl<sub>3</sub>

#### 4.10 - S10: Ácido 3,4-seco-friedelan-3-oico



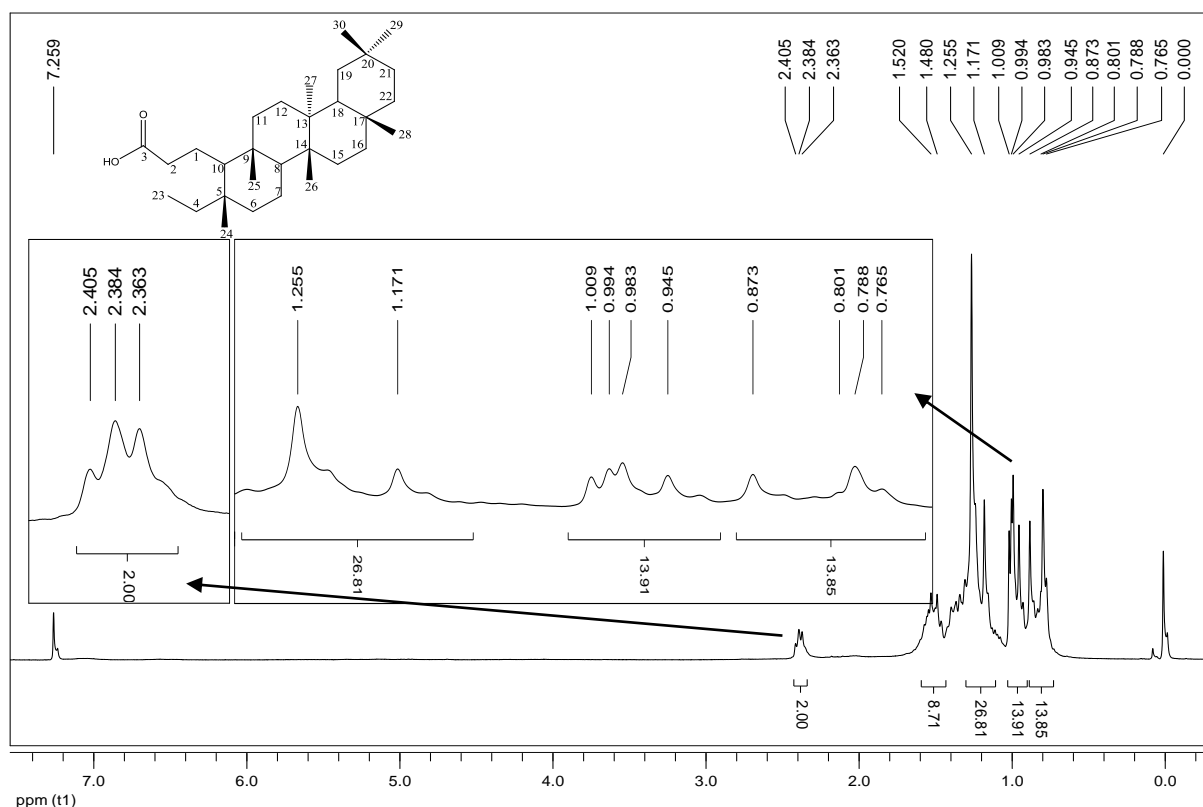
**S10** foi obtido a partir de EHS e apresentou-se como cristais brancos, solúvel em clorofórmio e de faixa de fusão 142-145 °C. A análise por CCD deste sólido indicou apenas uma mancha roxa (revelador: ácido perclórico/vanilina).

O espectro na região do IV (Figura A32, p. 170) de **S10** apresenta bandas de absorção centrada em 3432  $\text{cm}^{-1}$  correspondente a estiramento da ligação O-H de ácido carboxílico e 1704  $\text{cm}^{-1}$  característica de estiramento de ligação C=O. Apresentou também bandas em 1462 e 1388  $\text{cm}^{-1}$  referente à deformação angular no plano de ligação simples C-H de compostos alifáticos e bandas em 1282-1212  $\text{cm}^{-1}$  de estiramento de ligação C-O.

O espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (Figura 25, p. 80) apresenta sete simpletos referentes à metilas em  $\delta$  1,26, 1,17, 1,01, 0,99, 0,98, 0,95 e 0,87 e um tripleto em  $\delta$  0,79. Observou-se também a presença de um sinal em  $\delta$  2,38, correspondente a dois átomos de hidrogênio vizinhos à carbonila.

A análise do espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (Figura A33, p. 171) indica a presença de 30 sinais. Com o auxílio do subespectro DEPT-135 (Figura A34, p. 171) estes sinais foram classificados como sendo 8  $\text{CH}_3$ , 12  $\text{CH}_2$ , 3  $\text{CH}$  e 7  $\text{C}$ . O sinal em  $\delta_{\text{C}}$  178,72 foi atribuído ao carbono da carboxila (C3). Estes dados sugerem o esqueleto de um seco-friedelano para **S10**. Pode se observar um sinal intenso em  $\delta$  29,71, referente à contaminação graxa da amostra.

A comparação dos dados de RMN de  $^{13}\text{C}$  com a literatura (DAVID et al., 2003) (Tabela 35, p. 80), permitiu identificar **S10** como sendo o **ácido 3,4-seco-friedelan-3-oico**.



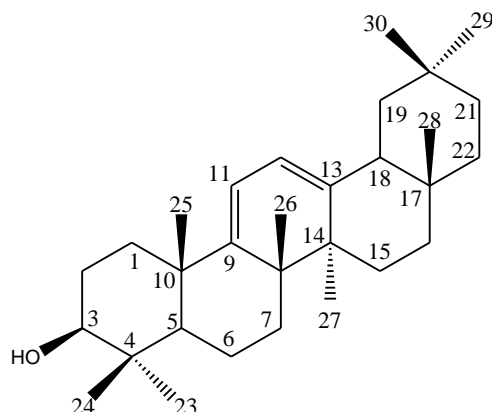
**Figura 25:** Espectro e expansões de RMN de  $^1\text{H}$  (400 MHz) de **S10** em  $\text{CDCl}_3$ .

**Tabela 35:** Dados de RMN de  $^{13}\text{C}$  de **S10** e da literatura para o ácido 3,4-secos-friedelan-3-oico (DAVID et al., 2003)

Nº	Tipo de carbono	$\delta_{\text{C}}^*$ de <b>S10</b>	$\delta_{\text{C}}^*$ (DAVID et al., 2003)	Nº	Tipo de carbono	$\delta_{\text{C}}^*$ de <b>S10</b>	$\delta_{\text{C}}^*$ (DAVID et al., 2003)
1	$\text{CH}_2$	21,07	21,00	16	$\text{CH}_2$	36,06	36,00
2	$\text{CH}_2$	35,18	35,10	17	C	30,01	29,91
3	C	178,72	178,20	18	CH	42,84	42,79
4	$\text{CH}_2$	35,18	35,07	19	$\text{CH}_2$	35,32	35,23
5	C	38,94	38,97	20	C	28,17	28,05
6	$\text{CH}_2$	39,06	39,19	21	$\text{CH}_2$	32,85	32,78
7	$\text{CH}_2$	18,10	18,01	22	$\text{CH}_2$	39,30	39,49
8	CH	52,99	52,91	23	$\text{CH}_3$	7,60	7,51
9	C	37,84	37,74	24	$\text{CH}_3$	19,38	19,27
10	CH	59,81	59,73	25	$\text{CH}_3$	17,94	17,82
11	$\text{CH}_2$	36,06	35,95	26	$\text{CH}_3$	20,15	20,03
12	$\text{CH}_2$	30,21	30,11	27	$\text{CH}_3$	18,76	18,61
13	C	39,64	39,54	28	$\text{CH}_3$	32,12	32,01
14	C	38,32	38,23	29	$\text{CH}_3$	34,98	34,86
15	$\text{CH}_2$	32,29	32,21	30	$\text{CH}_3$	31,85	31,74

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

#### 4.11 - S11: 3 $\beta$ -Hidroxi-olean-9(11):12-dieno



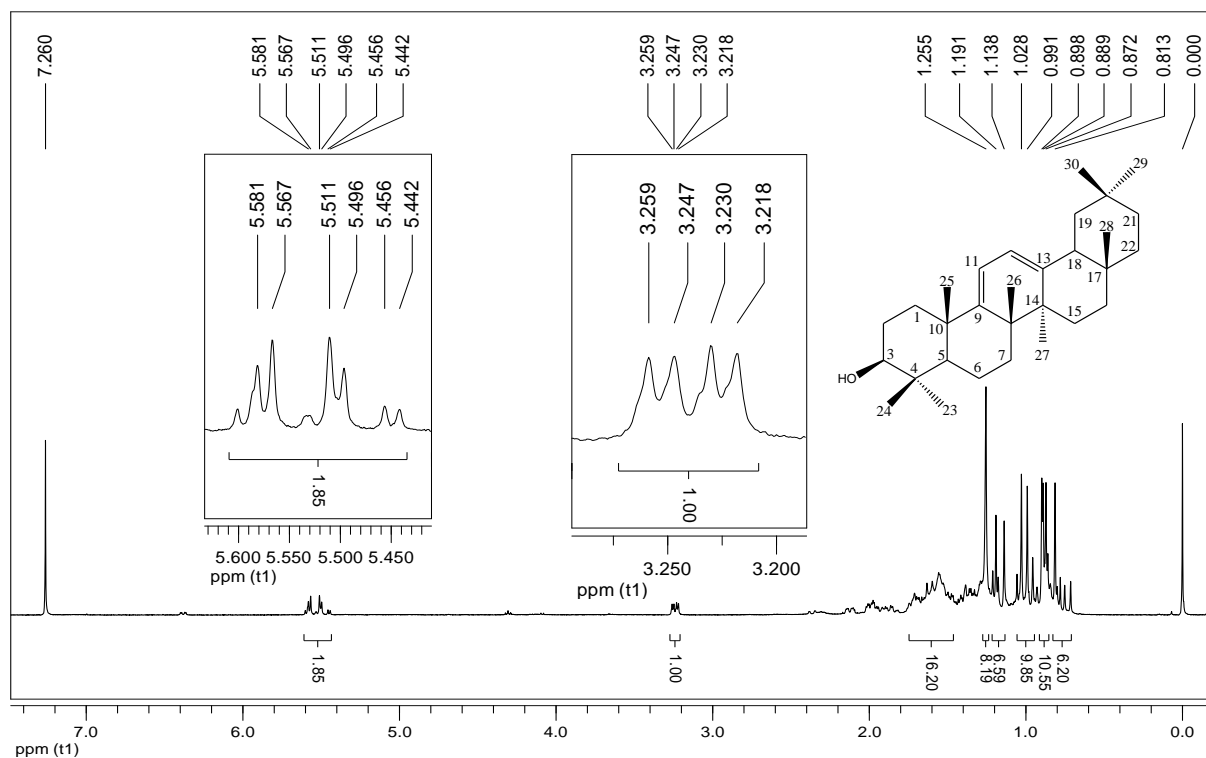
**S11** foi isolado a partir de **EHS** e apresentou-se como cristais brancos, solúvel em clorofórmio e de faixa de fusão 210-216 °C. O teste LB foi positivo para triterpeno pentacíclico e apresentou apenas uma mancha roxa em CCD (revelador: ácido perclórico/vanilina).

O espectro na região do IV (Figura A35, p. 172) de **S11** apresenta bandas de absorção em 3400  $\text{cm}^{-1}$  característica de estiramento de ligação O-H de álcool, 1650-1680  $\text{cm}^{-1}$  (banda fraca) de estiramento de ligação C=C, 1458  $\text{cm}^{-1}$  de deformação angular de grupo  $\text{CH}_2$ , 1376-1364  $\text{cm}^{-1}$  de deformação angular de metila, 1034  $\text{cm}^{-1}$  de ligação C-O de álcoois e 990  $\text{cm}^{-1}$  de deformação angular de C=C de alceno.

O espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (Figura 26, p. 82) apresenta simpletos entre  $\delta$  0,81 e 1,26 relativos às metilas do composto, dupletos em  $\delta$  5,57 ( $J = 5,6$  Hz) e 5,50 ( $J = 6,0$  Hz) de átomos de hidrogênio ligados a carbono  $\text{sp}^2$ , H11 e H12, respectivamente e duplo duplete em  $\delta$  3,24 ( $J = 11,6; 4,8$  Hz) característico de hidrogênio (H3) ligado a carbono hidroxilado (C3) (PAVIA et al., 2005).

A análise do espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  e subespectro DEPT-135 (Figuras A36-A38, p. 172-173) indica um total de 30 sinais de carbono, que foram classificados como sendo 8  $\text{CH}_3$ , 9  $\text{CH}_2$ , 5  $\text{CH}$  e 8  $\text{C}$ . Os sinais de átomos de carbono olefínicos em  $\delta$  154,30 (C9), 115,70 (C11), 120,67 (C12) e 147,11 (C13) referem-se a estrutura do TTPC da série oleanano com duas duplas ligações.

Estas informações aliadas à comparação com os dados de RMN de  $^{13}\text{C}$  da literatura (Tabela 36, p. 82) (MAHATO E KUNDU, 1994) permitiram identificar **S11** como sendo **3 $\beta$ -hidroxi-olean-9(11):12-dieno**. Esse composto foi isolado pela primeira vez no gênero *Salacia*.



**Figura 26:** Espectro e expansões de RMN de  $^1\text{H}$  (400 MHz) de **S11** em  $\text{CDCl}_3$ .

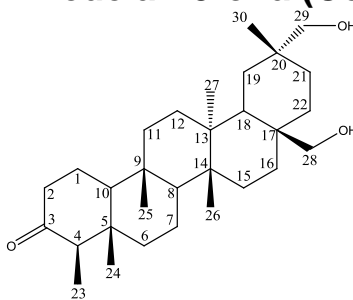
**Tabela 36:** Dados de RMN de  $^{13}\text{C}$  de **S11** e da literatura para  **$3\beta$ -hidroxi-olean-9(11):12-dieno** (MAHATO E KUNDU, 1994)

Nº	Tipo de carbono	$\delta_c^*$ de S11	$\delta_c^*$ (MAHATO E KUNDU, 1994)	Nº	Tipo de carbono	$\delta_c^*$ de S11	$\delta_c^*$ (MAHATO E KUNDU, 1994)
1	CH <sub>2</sub>	38,73	38,80	16	CH <sub>2</sub>	27,20	27,30
2	CH <sub>2</sub>	27,88	27,90	17	C	32,14	32,20
3	CH	78,70	78,60	18	CH	45,54	45,60
4	C	38,91	38,90	19	CH <sub>2</sub>	46,87	46,90
5	CH	51,12	51,20	20	C	31,11	31,10
6	CH <sub>2</sub>	18,33	18,40	21	CH <sub>2</sub>	34,59	34,70
7	CH <sub>2</sub>	32,11	32,20	22	CH <sub>2</sub>	37,11	37,20
8	C	37,04	37,00	23	CH <sub>3</sub>	28,71	28,80
9	C	154,30	154,30	24	CH <sub>3</sub>	15,66	15,10
10	C	40,62	40,70	25	CH <sub>3</sub>	20,06	20,10
11	CH	115,70	115,80	26	CH <sub>3</sub>	20,94	21,00
12	CH	120,67	120,80	27	CH <sub>3</sub>	25,28	25,30
13	C	147,11	147,10	28	CH <sub>3</sub>	28,23	28,30
14	C	42,74	42,80	29	CH <sub>3</sub>	23,69	23,70
15	CH <sub>2</sub>	25,62	25,70	30	CH <sub>3</sub>	33,19	33,20

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



#### 4.12 - S12: 28,29-Di-hidroxifriedelan-3-ona (Confertiflorol)



**S12** foi obtido a partir de **EHS** apresentando-se como cristais brancos em forma de agulha, parcialmente solúveis em clorofórmio e de faixa de fusão 281-284 °C. A análise por CCD deste sólido indicou apenas uma mancha roxa (revelador: ácido perclórico/vanilina).

O espectro na região do IV (Figura A39, p. 174) de **S12** apresenta bandas de absorção centrada em  $3400\text{ cm}^{-1}$  correspondente a estiramento da ligação O-H de álcool,  $1712\text{ cm}^{-1}$  de estiramento de ligação C=O de cetona e  $1054\text{ cm}^{-1}$  de C-O de álcool primário. Além de bandas  $1458$  e  $1386\text{ cm}^{-1}$  de deformação angular de ligação C-H.

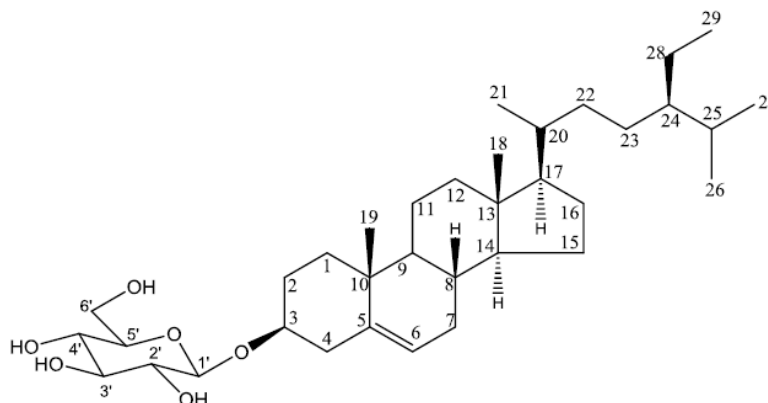
O espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (Figura 27, p. 84) apresenta cinco simpletos relativos a cinco metilas em  $\delta$  1,12, 1,02, 0,95, 0,85 e 0,72 e um duplete em  $\delta$  0,87 ( $J = 6,8\text{ Hz}$ ) associado à outra metila (C23) característica de TTPC da série dos friedelanos. Os dois dupletos em  $\delta$  3,65 ( $J = 10,8\text{ Hz}$ ) e  $\delta$  3,76 ( $J = 10,8\text{ Hz}$ ) referem-se aos átomos de hidrogênio metilênicos ligados a carbono hidroxilado de C28, já os 2 dupletos em 3,35 ( $J = 10\text{ Hz}$ ) e 3,28 ( $J = 10\text{ Hz}$ ) referem-se aos átomos de hidrogênio H29.

A análise do espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (Figura A40-A41, p. 174-175) indica a presença de 30 sinais. Com o auxílio do subespectro DEPT-135 (Figura A42, p. 175) estes sinais foram classificados como sendo 6  $\text{CH}_3$ , 13  $\text{CH}_2$ , 4 CH e 7 C indicando que duas das metilas do esqueleto básico de um friedelano se apresentam hidroxiladas. O sinal em  $\delta$  6,83 foi atribuído ao carbono metílico C23 de esqueleto friedelânico (MAHATO E KUNDU, 1994). Observam-se sinais em  $\delta$  213,07, relativo a carbono ligado a carbonila (C3) e aos átomos de carbono metilênicos ligados a hidroxilas em  $\delta$  73,87 (C29) e 66,97 (C28).

A comparação dos dados de RMN de  $^{13}\text{C}$  com a literatura (MAHATO e KUNDU, 1994) (Tabela 37, p. 84), permitiu identificar **S12** como sendo **28,29-di-hidroxifriedelan-3-ona**. **S12** foi isolado pela primeira vez no gênero *Salacia*.

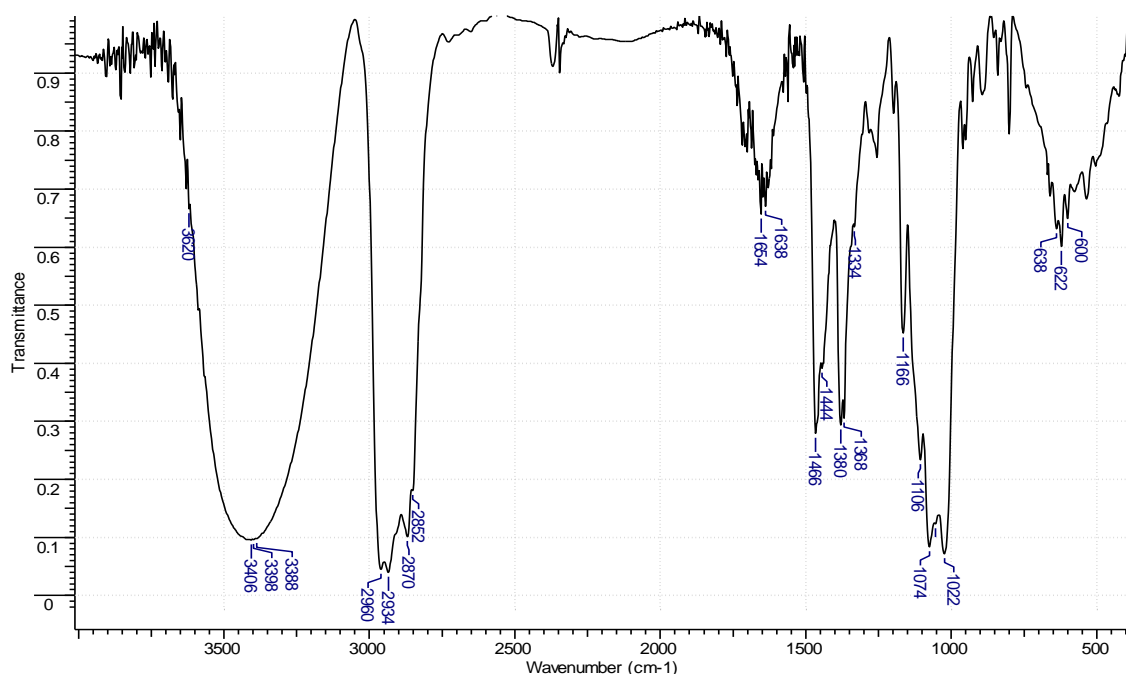


#### 4.13 - S13: 3-O- $\beta$ -D-glicosil- $\beta$ -sitosterol



**S13** foi isolado de **ECS**, apresentando-se como um sólido branco cristalino, parcialmente solúvel em clorofórmio e faixa de fusão 277,0-281,0 °C.

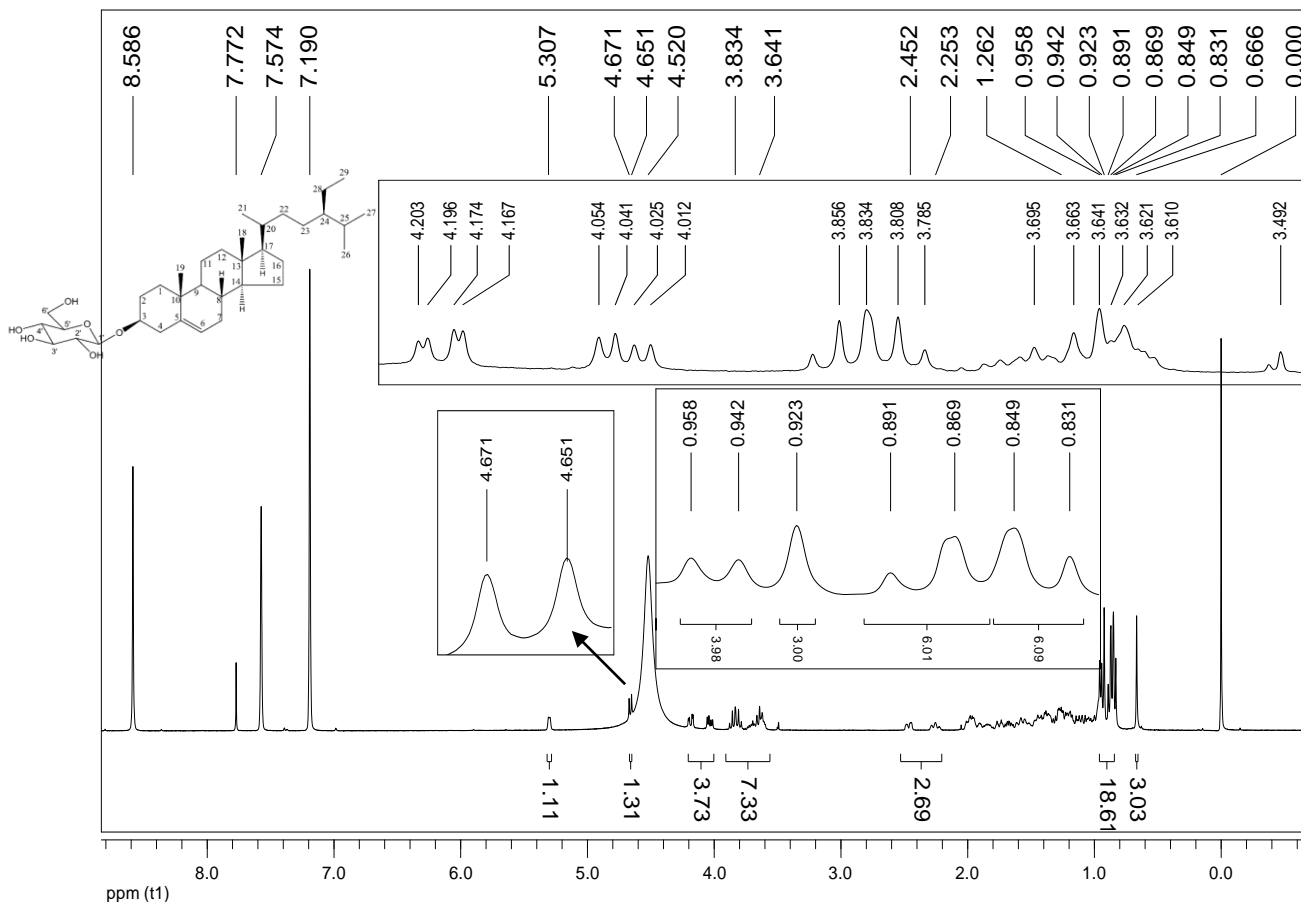
O espectro na região do IV (Figura 28) de **S13** mostra bandas de absorção em 3406  $\text{cm}^{-1}$ , características de estiramento de ligação O-H de álcool, 2960-2852, 1466 e 1380  $\text{cm}^{-1}$ , características de ligação simples C-H, evidenciando a natureza alifática da substância. Uma banda fraca em 1638  $\text{cm}^{-1}$  é característica de ligação dupla e bandas em 1166-1022  $\text{cm}^{-1}$  de estiramento de ligação C=O de álcool.



**Figura 28:** Espectro na região do IV de **S13** (KBr).

O espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (Figura 29) apresenta sinais entre  $\delta_{\text{H}}$  0,96 e  $\delta_{\text{H}}$  0,67 atribuídos a seis grupos metila. Sinais entre  $\delta_{\text{H}}$  4,52 e  $\delta_{\text{H}}$  3,61 indicam a presença de vários átomos de hidrogênio metínicos e 1 metilênico de carbono hidroxilado na estrutura, sendo que o duplete em  $\delta_{\text{H}}$  4,66 ( $J = 8,0$  Hz) foi atribuído ao hidrogênio anomérico de glicose ( $\text{H}1'$ ). O sinal em  $\delta_{\text{H}}$  5,31 foi atribuído ao hidrogênio olefínico  $\text{H}_6$  do esteroide. O espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (Figura 30, p. 87) mostra a presença de 36 sinais, sendo que seis deles se encontram na região de carbono hidroxilado (62,7 a 78,3), sugerindo uma estrutura glicosilada. O sinal em  $\delta_{\text{C}}$  101,99 foi atribuído ao carbono anomérico  $\text{C}1'$ . O sinal em  $\delta_{\text{C}}$  78,35 foi atribuído ao carbono ligado a oxigênio e os sinais em  $\delta_{\text{C}}$  121,74 e  $\delta_{\text{C}}$  140,58 foram atribuídos aos átomos de carbono olefínico  $\text{C}_6$  e  $\text{C}_5$  do esteroide, respectivamente. A partir da análise do subespectro DEPT-135 (Figura 31, p. 87) foi possível realizar a classificação dos átomos de carbono.

Os dados obtidos de RMN de  $^{13}\text{C}$  foram comparados com os da literatura (RAI et al., 2006) (Tabela 38, p. 88) e permitiram identificar **S13** como sendo **3-O- $\beta$ -D-glicosil- $\beta$ -sitosterol**.



**Figura 29:** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (400 MHz) de **S13** em  $\text{CDCl}_3 + \text{Py-d}_5$ .

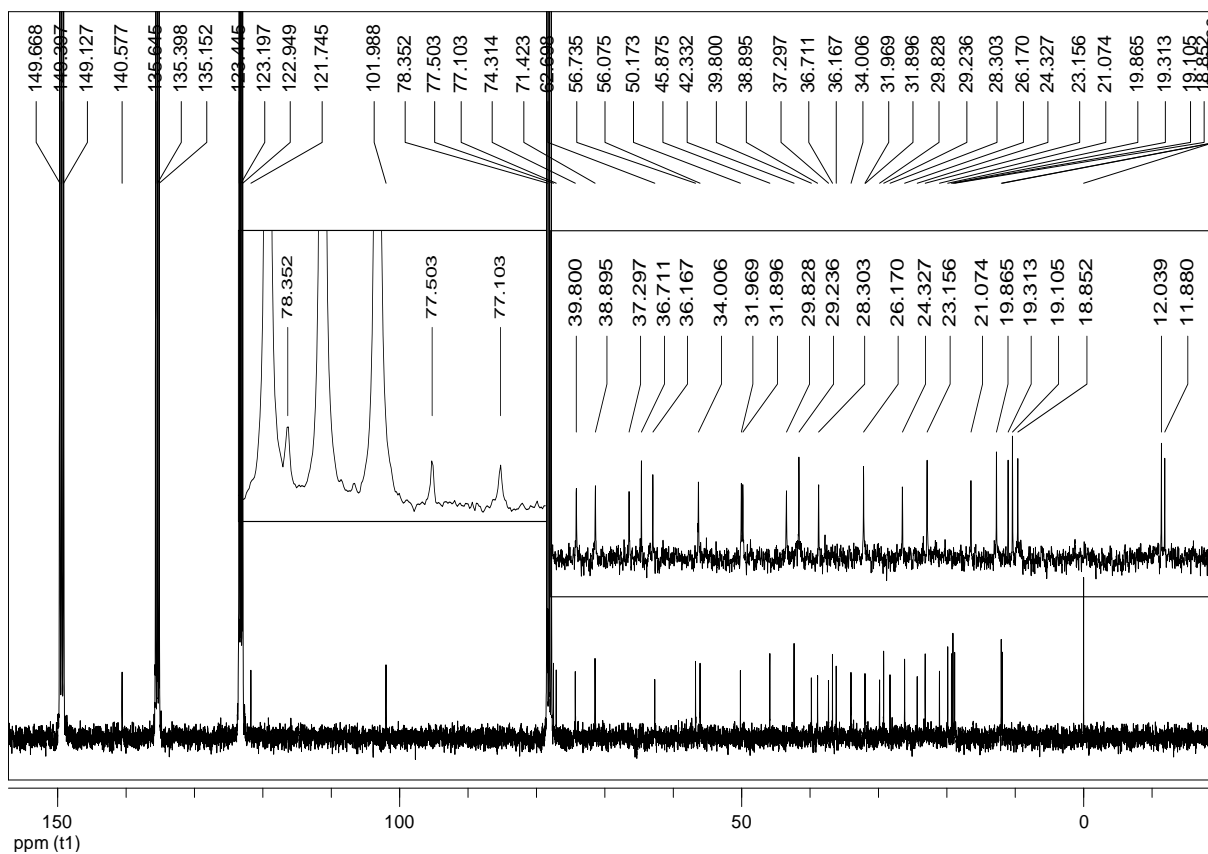


Figura 30: Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (100 MHz) de **S13** em  $\text{CDCl}_3 + \text{Py-d}_5$ .

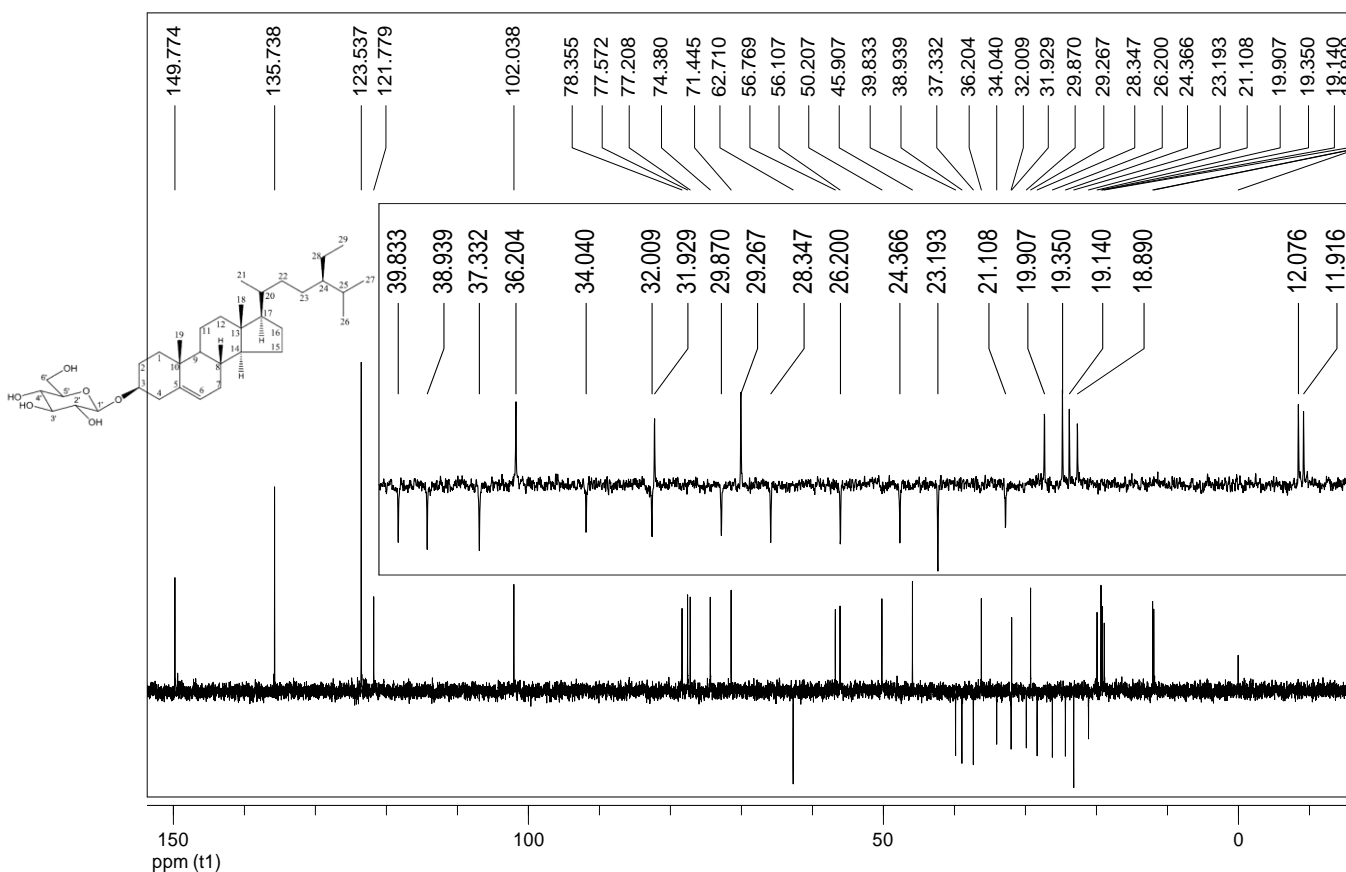
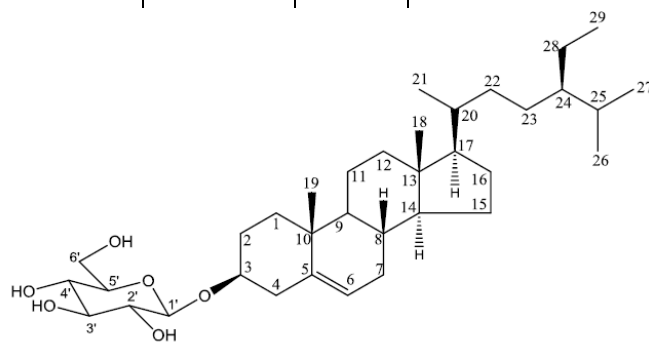


Figura 31 Subespectro DEPT-135 (100 MHz) de **S13** em  $\text{CDCl}_3 + \text{Py-d}_5$ .

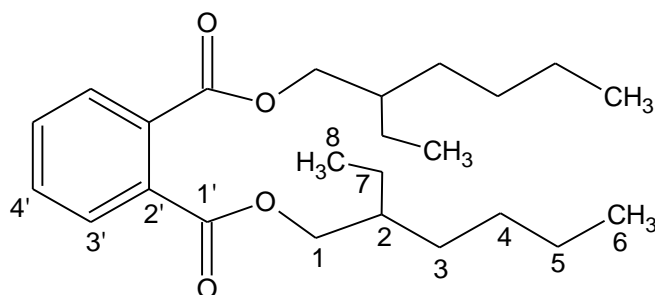
**Tabela 38:** Dados de RMN de  $^{13}\text{C}$  de **S13** e da literatura para 3-O- $\beta$ -D-glicosil- $\beta$ -sitosterol (RAI et al., 2006)

Carbono	Tipo de carbono	$\delta_{\text{C}}^*$ de S13	$\delta_{\text{C}}^{**}$ (RAI et al., 2006)	Carbono	Tipo de carbono	$\delta_{\text{C}}^*$ de S13	$\delta_{\text{C}}^{**}$ (RAI et al., 2006)
1	CH <sub>2</sub>	37,30	37,47	1'	CH	101,99	102,54
2	CH <sub>2</sub>	29,83	30,23	2'	CH	74,31	75,29
3	CH	78,35	78,57	3'	CH	77,50	78,45
4	CH <sub>2</sub>	39,80	39,94	4'	CH	71,42	71,64
5	C	140,58	140,88	5'	CH	77,10	78,05
6	CH	121,74	121,91	6'	CH <sub>2</sub>	62,70	62,80
7	CH <sub>2</sub>	31,97	32,17				
8	CH	31,90	32,05				
9	CH	50,17	50,33				
10	C	36,71	36,92				
11	CH <sub>2</sub>	21,07	21,28				
12	CH <sub>2</sub>	38,89	39,32				
13	C	42,33	42,47				
14	CH	56,73	56,82				
15	CH <sub>2</sub>	24,33	24,50				
16	CH <sub>2</sub>	28,30	28,55				
17	CH	56,07	56,23				
18	CH <sub>3</sub>	11,88	11,99				
19	CH <sub>3</sub>	19,31	19,43				
20	CH	36,17	36,39				
21	CH <sub>3</sub>	18,85	19,02				
22	CH <sub>2</sub>	34,00	34,19				
23	CH <sub>2</sub>	26,17	26,35				
24	CH	45,87	46,03				
25	CH	29,24	29,44				
26	CH <sub>3</sub>	19,10	19,22				
27	CH <sub>3</sub>	19,86	20,00				
28	CH <sub>2</sub>	23,16	23,38				
29	CH <sub>3</sub>	12,04	12,12				



Solvente: \*CDCl<sub>3</sub> + Py-d<sub>5</sub> \*\*Py-d<sub>5</sub>

#### 4.14 - S14: *o*-Ftalato de bis(2-etilexila)

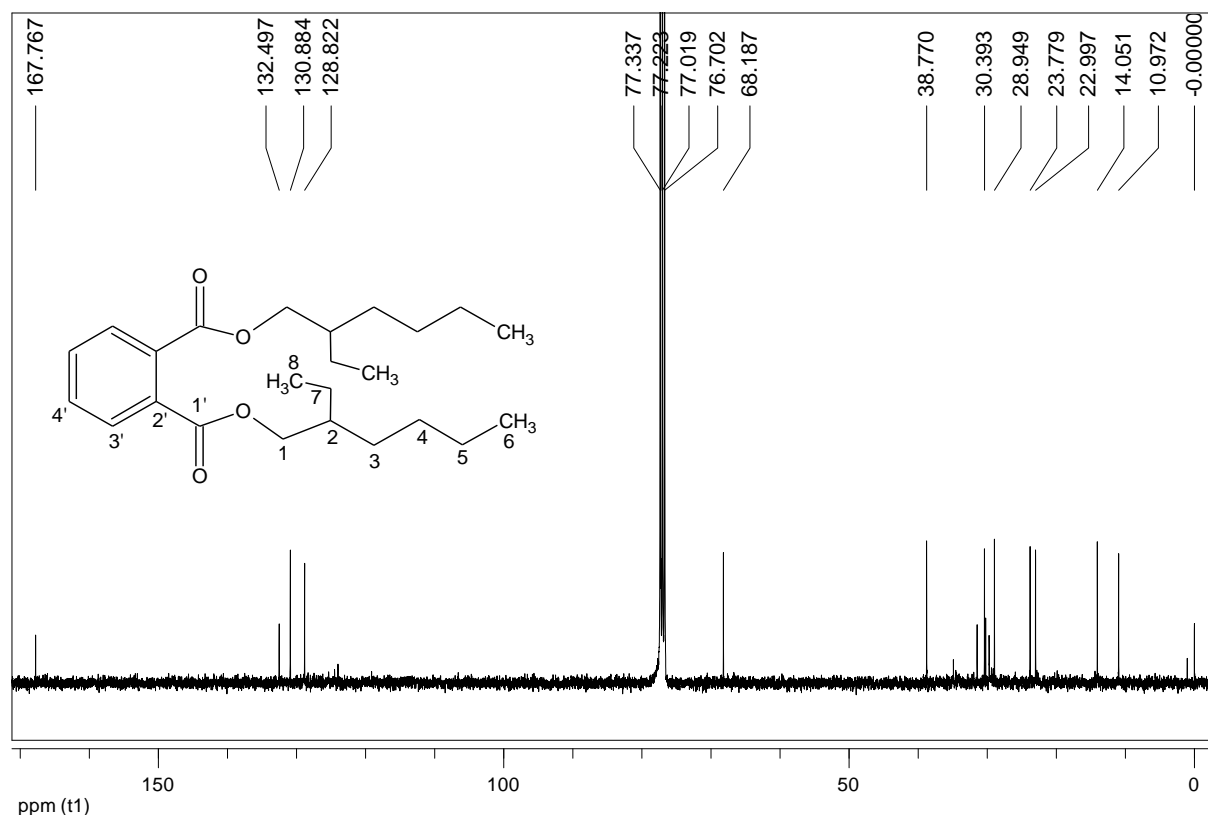


**S14** foi isolado do extrato **EAS** e **EES** das folhas de *Salacia crassifolia* e se apresentou como um sólido branco solúvel em clorofórmio. Apresentou uma única mancha roxa em CCD (revelador: ácido perclórico/vanilina).

O espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de **S14** (Figura A43, p. 176) apresenta dois sinais na região de aromáticos  $\delta_{\text{H}}$  7,71 (H3') e  $\delta_{\text{H}}$  7,52 (H4'), multipletos em  $\delta_{\text{H}}$  4,22 para os quatro átomos de hidrogênio H1 que se sobrepuseram pela proximidade do deslocamento químico. Apresenta também multipletos em  $\delta_{\text{H}}$  1,68 (H2),  $\delta_{\text{H}}$  1,55 (H3), entre  $\delta_{\text{H}}$  1,26-1,33 (H4, H5 e H7) dos átomos de hidrogênio metilênicos e sinal entre  $\delta_{\text{H}}$  0,88-0,94 (H6 e H8) (KATADE et al., 2006).

O espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (Figura 32, p. 90) e o subespectro DEPT-135 de **S14** (Figura A44, p. 176) apresentam um sinal em  $\delta_{\text{C}}$  167,77 atribuído a carbonila de éster,  $\delta_{\text{C}}$  132,50; 130,88 e 128,82 de carbono aromático e sinal em  $\delta_{\text{C}}$  68,19 ( $\text{CH}_2$ ) atribuídos a átomos de carbono metilênico ligado a oxigênio (Tabela 39, p. 90). Estes dados indicam que **S14** trata-se de um éster derivado do ácido ftálico (Programa ACDLABS e KATADE et al., 2006).

Há relato na literatura do *o*-ftalato de bis(2-etilexila) isolado da planta *Sterculia guttata* e este apresenta atividade sobre larvas de mosquito *Aedes aegypti* e *Culex quinquefasciatus* (KATADE et al., 2006).



**Figura 32:** Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (100 MHz) de **S14** em  $\text{CDCl}_3$ .

**Tabela 39:** Dados de RMN de  $^{13}\text{C}$  de **S14** e da literatura para *o*-ftalato de bis(2-etilhexila) em KATADE et al., 2006 e no programa ACDLAB

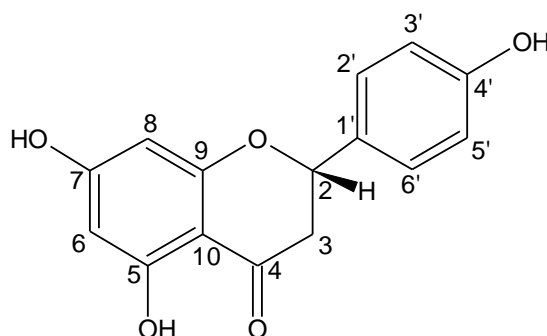
C	Tipo de C	$\delta_c$ de S14	$\delta_c$ (ACDLABS)	$\delta_c$ (KATADE et al., 2006)	C	Tipo de C	$\delta_c$ de S14	$\delta_c$ (ACDLBAS)	$\delta_c$ (KATADE et al., 2006)
1'	C	167,78	168,00	167,28	1	CH <sub>2</sub>	68,19	68,40	67,73
2'	C	132,50	130,95	132,19	2	CH	38,77	38,70	38,46
3'	CH	128,82	128,72	128,48	3	CH <sub>2</sub>	30,39	30,31	*
4'	CH	130,88	131,10	130,49	4	CH <sub>2</sub>	28,95	28,46	*
					5	CH <sub>2</sub>	23,00	22,57	*
					6	CH <sub>3</sub>	10,97	10,70	*
					7	CH <sub>2</sub>	23,78	23,68	*
					8	CH <sub>3</sub>	14,05	13,82	13,78

Solvente:  $\text{CDCl}_3$

\* Valores não apresentados no artigo de Katade et al., 2006



#### 4.15 - S15: Naringenina



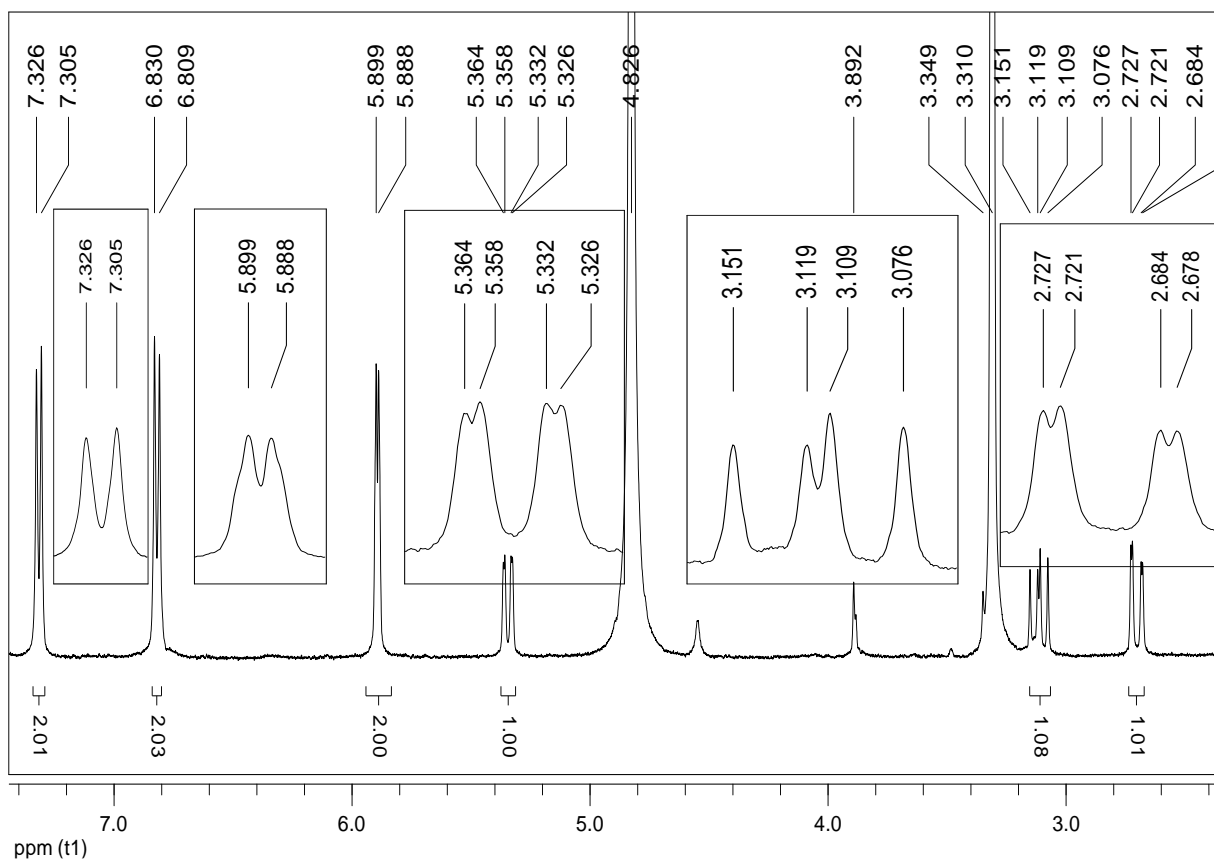
**S15** foi obtido a partir de **EAS** e **EES** apresentando-se como sólido amarelo claro com faixa de fusão 249,0-251,5 °C, solúvel em acetona e metanol. A análise por CCD deste sólido indicou apenas uma mancha vermelha (revelador: ácido perclórico/vanilina).

O espectro na região do IV (Figura A45, p. 177) de **S15** apresenta bandas de absorção entre 3284-3036  $\text{cm}^{-1}$  correspondente a estiramento de ligação O-H de fenol, bandas fracas entre 2976-2832  $\text{cm}^{-1}$  de estiramento de ligação C-H de compostos alifáticos e em 1638  $\text{cm}^{-1}$  de C=O de cetona conjugada. A banda 1602  $\text{cm}^{-1}$  se refere a estiramento da ligação C=C de compostos aromáticos e 1250-1064  $\text{cm}^{-1}$  de estiramento de ligação C-O de hidroxila. Também apresentam sinais em 832  $\text{cm}^{-1}$  que se referem à deformação angular de ligação C-H de aromáticos *para*-dissubstituídos (ANDRADE et al., 2010).

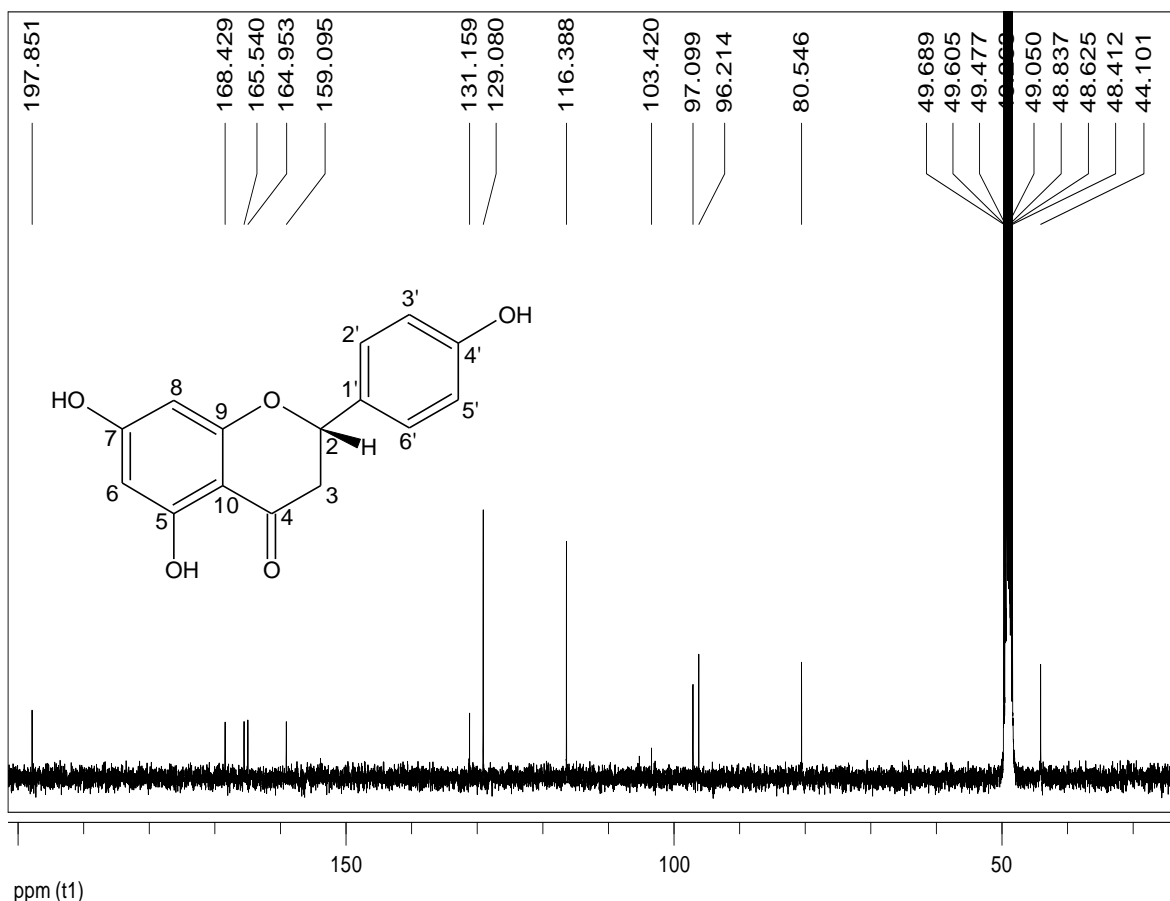
O espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (Figura 33, p. 92) apresenta sinais na região de átomos de hidrogênio aromáticos em  $\delta$  7,31 (d,  $J = 8,4$  Hz, H2' e H6'), em  $\delta$  6,82 (d,  $J = 8,4$  Hz, H3' e H5') e  $\delta$  5,90 (s, H6) e 5,89 (s, H8). Também os sinais dos átomos de hidrogênio H3, sendo um em  $\delta$  3,11 (dd,  $J = 13,2; 16,8$  Hz, H3 $\alpha$ ) e o outro em  $\delta$  2,70 (dd,  $J = 2,4; 17,2$  Hz, H3 $\beta$ ), além do sinal  $\delta$  5,34 referente a H2 $\beta$  (dd,  $J = 2,4; 12,8$  Hz) (ANDRADE et al., 2010). Estes dados sugerem a estrutura de um flavonoide para **S15**.

A análise do espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (Figura 34, p. 92) e do subespectro DEPT-135 (Figura 35, pág 93) permitiu identificar sinais de carbono, sendo sete não hidrogenados, um metilênico e sete metínicos. O sinal em  $\delta$  80,55 (C2) foi atribuído ao átomo de carbono metínico ligado a oxigênio.

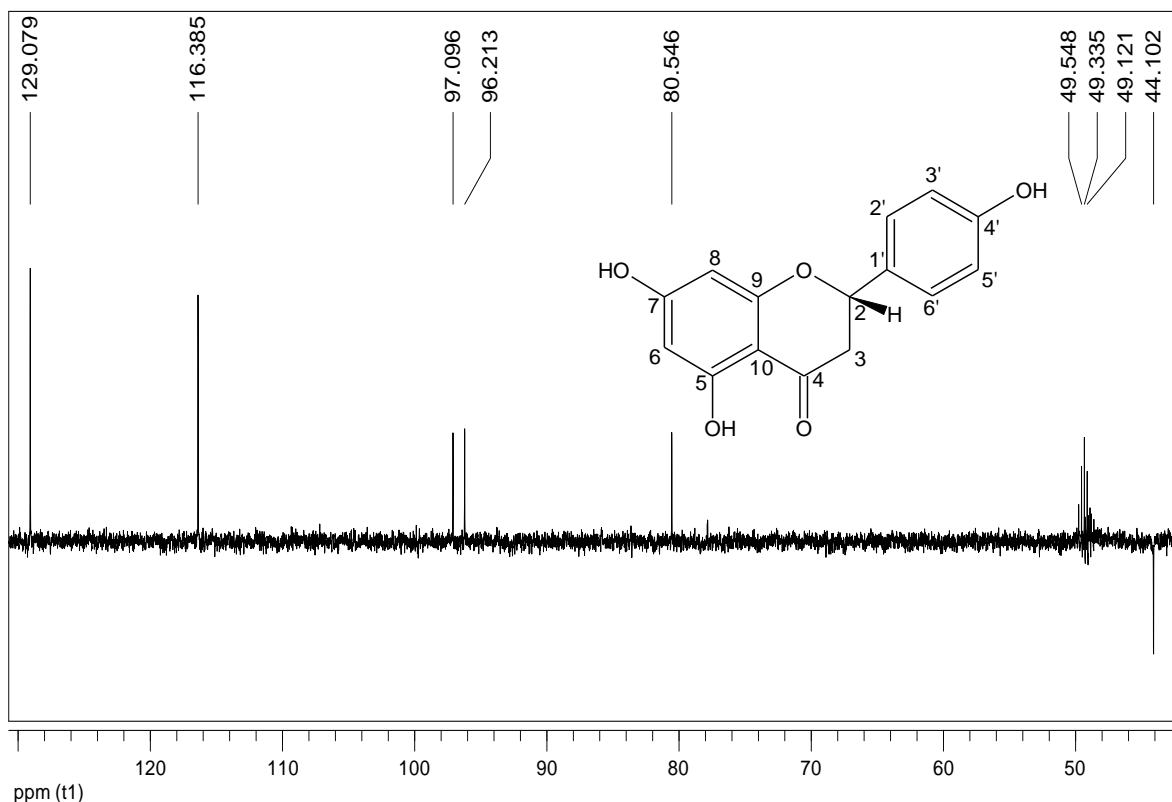
A comparação dos dados de RMN de  $^{13}\text{C}$  com a literatura (ANDRADE et al., 2010) (Tabela 40 p. 93), permitiu identificar **S15** como sendo **naringenina**.



**Figura 33:** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de **S15** ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 400 MHz).



**Figura 34:** Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  de **S15** ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 100 MHz).



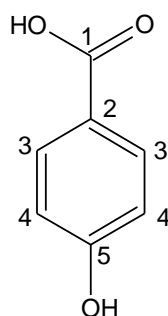
**Figura 35:** Subespectro DEPT-135 de **S15** (CD<sub>3</sub>OD, 100 MHz).

**Tabela 40:** Dados de RMN de <sup>13</sup>C de **S15** e da literatura para **naringenina** (ANDRADE et al., 2010)

Nº	Tipo de carbono	δ <sub>c</sub> de S15	δ <sub>c</sub> (ANDRADE, et al., 2010)	Nº	Tipo de carbono	δ <sub>c</sub> de S15	δ <sub>c</sub> (ANDRADE, et al., 2010)
2	CH	80,55	79,00	10	C	103,42	102,30
3	CH <sub>2</sub>	44,10	42,60	1'	C	131,16	129,40
4	C	197,85	196,40	2'	CH	129,08	128,70
5	C	165,54	163,70	3'	CH	116,39	115,70
6	CH	97,10	96,40	4'	C	159,09	158,10
7	C	168,43	166,90	5'	CH	116,39	115,70
8	CH	96,21	95,50	6'	CH	129,08	128,70
9	C	164,95	163,30				

Solvente: CD<sub>3</sub>OD

#### 4.16 - S16: Ácido *p*-hidroxibenzoico



**S16** foi isolado de **EAS**, apresentando-se como um sólido branco, solúvel em metanol e faixa de fusão 211,0-216,4 °C.

O espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (Figura A46, p. 177) apresenta dois dupletos em  $\delta_{\text{H}}$  7,87 ( $J = 8,8$  Hz) e  $\delta_{\text{H}}$  6,81 ( $J = 8,8$  Hz) atribuídos aos átomos de hidrogênio H3 e H4, respectivamente.

O espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (Figura A47, p. 178) apresenta sinais em  $\delta_{\text{C}}$  170,15 de carbono de ácido carboxílico aromático, em  $\delta_{\text{C}}$  163,39 de carbono hidroxilado e sinais em  $\delta_{\text{C}}$  133,04 (C3) e  $\delta_{\text{C}}$  116,08 (C4) dos átomos de carbono hidrogenados, que também foram observados no subespectro DEPT-135 (Figura A48, p. 178).

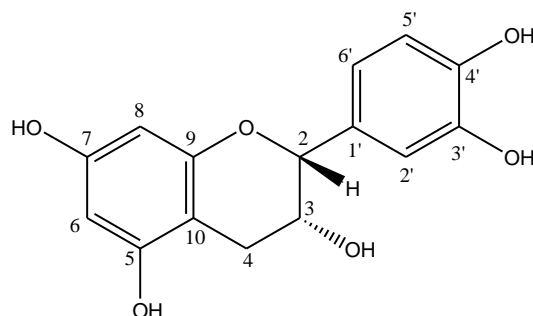
Os dados obtidos de RMN de  $^{13}\text{C}$  foram comparados com os valores do Programa ACDLABS (Tabela 41) e permitiram identificar **S16** como sendo o **ácido *p*-hidroxibenzoico**.

**Tabela 41:** Dados de RMN de  $^{13}\text{C}$  de **S16** e do programa ACDLABS para o ácido *p*-hidroxibenzoico.

Carbono	Tipo de carbono	$\delta_{\text{C}}^*$ de S16	$\delta_{\text{C}}$ (ACDLABS)
1	C	170,15	168,97
2	C	122,83	122,36
3	CH	133,04	132,49
4	CH	116,08	115,86
5	C	163,39	162,00

\*Solvente: MeOD

#### 4.17 - S17: Epicatequina (3,3',4',5,7-penta-hidroxi-flavanona)



**S17** foi obtido a partir de **EAS e EES** apresentando-se como sólido amarelo claro com faixa de fusão 226-228 °C, solúvel em acetona e metanol. A análise por CCD deste sólido indicou apenas uma mancha vermelha (revelador: ácido perclórico/vanilina).

O espectro na região do IV (Figura A49, p. 179) de **S17** apresenta uma banda larga de absorção entre 3400 e 3200  $\text{cm}^{-1}$  correspondente a estiramento da ligação O-H de álcool e fenol, bandas em 1608, 1522 e 1466  $\text{cm}^{-1}$  características de estiramento de ligação C=C de compostos aromáticos, em 1148  $\text{cm}^{-1}$  característica de estiramento de ligação C-O de éter alifático e bandas em 1058 e 1266  $\text{cm}^{-1}$  de ligação C-O de éter aromático. Também apresenta bandas em 782 e 800  $\text{cm}^{-1}$  que se referem, respectivamente, à deformação angular de ligação C-H de aromáticos.

O espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (Figura 36, p. 96) apresenta na região de átomos de hidrogênio aromáticos dupletos que se referem aos átomos de hidrogênio H6 em  $\delta$  5,91 ( $J = 2,4$  Hz), H8 em 5,94 ( $J = 2,4$  Hz), H2' em  $\delta$  6,97 ( $J = 1,6$  Hz) e atribuídos a H6' e H5' sinais entre  $\delta$  6,75 - 6,8. Também foram atribuídos a H4 dois duplos dupletos em  $\delta$  2,73 ( $J = 3,2$  e 16,8 Hz) e  $\delta$  2,86 ( $J = 4,4$  e 16,8 Hz) e a H3 e H2 sinais em  $\delta$  4,17 e  $\delta$  4,55, respectivamente. Estes sinais sugerem tratar-se de um flavonoide.

A análise do espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (Figura A50, p. 179) e do subespectro DEPT-135 (Figura A51, pág 180) permitiu identificar 15 sinais de carbono, sendo sete não hidrogenados, um metilênico e sete metínicos, sendo o sinal em  $\delta$  67,54 (C3) atribuído ao átomo de carbono ligado a hidroxila.

A comparação dos dados de RMN de  $^{13}\text{C}$  com a literatura (AGRAWAL, 1989) (Tabela 42, p. 96), permitiu identificar **S17** como sendo **epicatequina**.

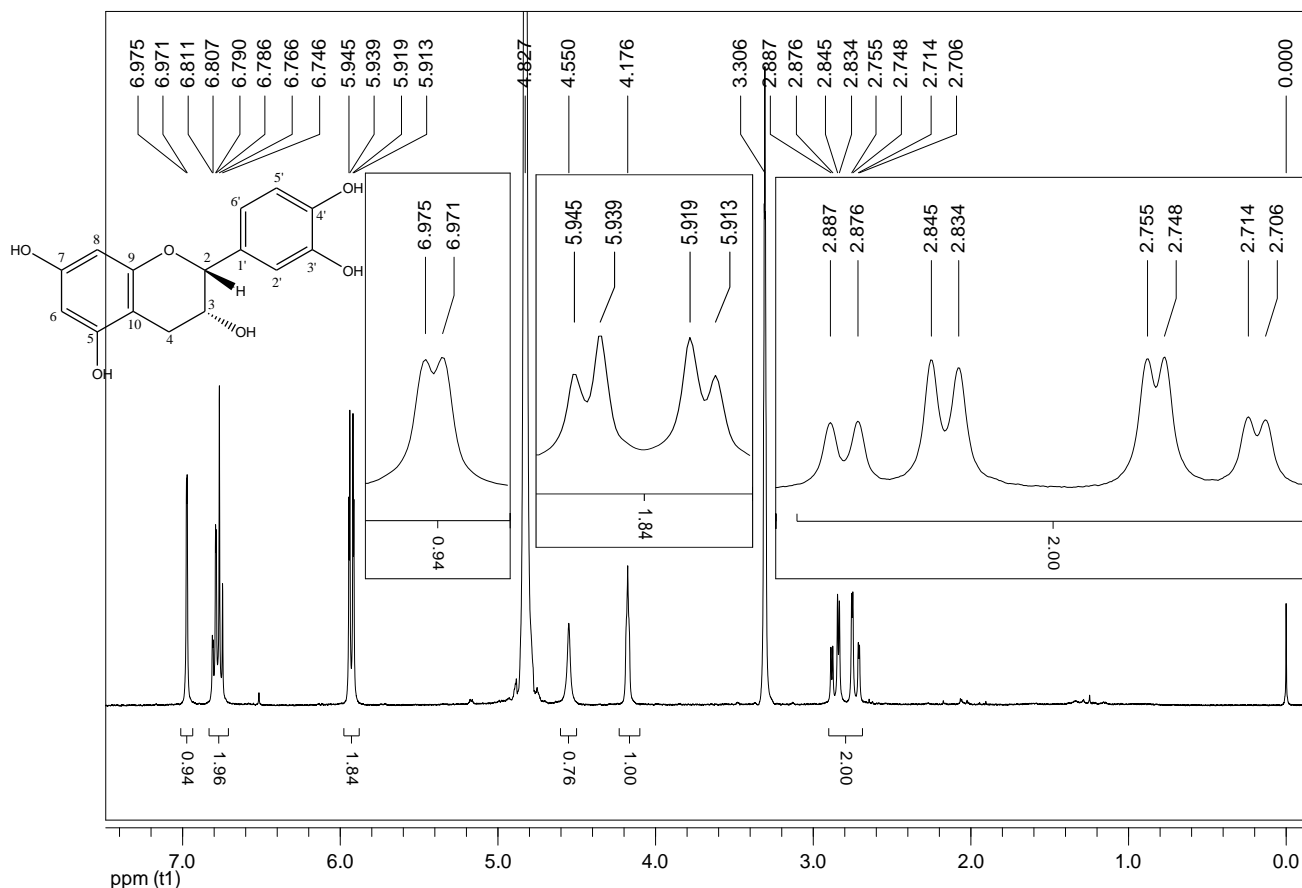


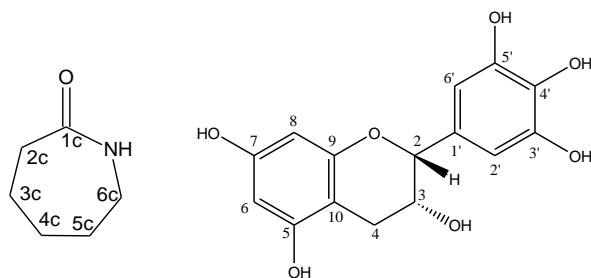
Figura 36: Espectro de RMN de <sup>1</sup>H de **S17** (CD<sub>3</sub>OD, 400 MHz).

Tabela 42: Dados de RMN de <sup>13</sup>C de **S17** e da literatura para **epicatequina** (AGRAWAL, 1989)

Nº	Tipo de carbono	δ <sub>c</sub> de S17	δ <sub>c</sub> (AGRAWAL, 1989)	Nº	Tipo de carbono	δ <sub>c</sub> de S17	δ <sub>c</sub> (AGRAWAL, 1989)
2	CH	79,94	79,40	10	C	100,15	99,70
3	CH	67,54	66,90	1'	C	132,45	132,10
4	CH <sub>2</sub>	29,30	29,10	2'	CH	115,39	115,20
5	C	158,05	157,40	3'	C	146,00	145,20
6	CH	96,48	96,20	4'	C	145,84	145,20
7	C	157,73	157,40	5'	CH	115,97	115,50
8	CH	95,96	95,70	6'	CH	119,47	119,40
9	C	157,42	157,00				

Solvente: CD<sub>3</sub>OD

#### 4.18 - S18 e S19: $\epsilon$ -Caprolactama e Epigalocatequina



A mistura **S18** e **S19** foi obtida a partir de **EAS** apresentando-se como sólido amarelo claro, solúvel em acetona e metanol. A análise por CCD deste sólido indicou apenas uma mancha vermelha (revelador: ácido perclórico/vanilina).

O espectro na região do IV (Figura A52, p. 180) de **S18 + S19** apresenta uma banda de absorção entre  $3251\text{ cm}^{-1}$  correspondente a estiramento de ligação O-H de fenol e álcool e a estiramento de ligação N-H de amidas. Apresenta também bandas em  $1604$  e  $1448\text{ cm}^{-1}$  característica de estiramento de ligação C=C de compostos aromáticos e  $1142$  e  $1087\text{ cm}^{-1}$  de estiramento de ligação C-O.

O espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (Figura 37, p. 98) apresenta na região de átomos de hidrogênio aromáticos dupletos que se referem ao hidrogênio H6 em  $\delta$  5,89, H8 em 5,91, H2' e H6' em  $\delta$  6,49. Foram atribuídos a H4 dois duplos dupletos em  $\delta$  2,70 ( $J = 2,4$  e  $16,8\text{ Hz}$ ) e  $\delta$  2,83 ( $J = 4,4$  e  $16,8\text{ Hz}$ ) e para H3 o sinal em  $\delta$  4,15 e H2 o sinal em  $\delta$  4,52. Estes sinais sugerem a presença do flavonoide **epigalocatequina (S19)** na mistura. O espectro de RMN de  $^1\text{H}$  também apresentou sinais em  $\delta$  3,16 (H6c), 2,15 (H2c), 1,60 (H4c), 1,40 (H5c) e 1,31 (H3c), todos de átomos de hidrogênio metilênico, que foram atribuídos a presença de uma outra substância identificada como sendo a  **$\epsilon$ -caprolactama (S18)**.

A análise do espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (Figura A53, p. 181) e do subespectro DEPT-135 (Figura A54, pág 181) permitiu identificar sinais em  $\delta$  176,09 (C1c) atribuído ao átomo de carbono da amida cíclica, e  $\delta$  37,05 (C2c),  $\delta$  26,77 (C3c),  $\delta$  27,54 (C4c),  $\delta$  30,18 (C5c) e  $\delta$  40,21 (C6c) dos grupos metilênicos desta amida. A comparação dos dados de RMN de  $^{13}\text{C}$  com a literatura (AIST) (Tabela 43, p. 98), permitiu detectar a presença da  **$\epsilon$ -caprolactama (S18)** na amostra analisada. Já os sinais atribuídos ao flavonoide são  $\delta$  79,97 (C2) atribuído ao átomo de carbono ligado a oxigênio e anel aromático,  $\delta$  67,58 (C3) carbono ligado a hidroxila, sinais  $\delta$  157,32 (C5), 157,38 (C7), 146,76 (C3' e C5') e 131,60 (C4') de átomos de carbono aromáticos ligados a hidroxilas e  $\delta$  96,45 (C6), 95,94 (C8) e 107,06 (C2' e C6') de

aromáticos hidrogenados. A comparação dos dados de RMN de  $^{13}\text{C}$  com a literatura (AGRAWAL, 1989) (Tabela 43, p. 98), permitiu identificar **S19** como sendo **epigalocatequina**. **S18** foi posteriormente isolado puro do extrato **EAS**.

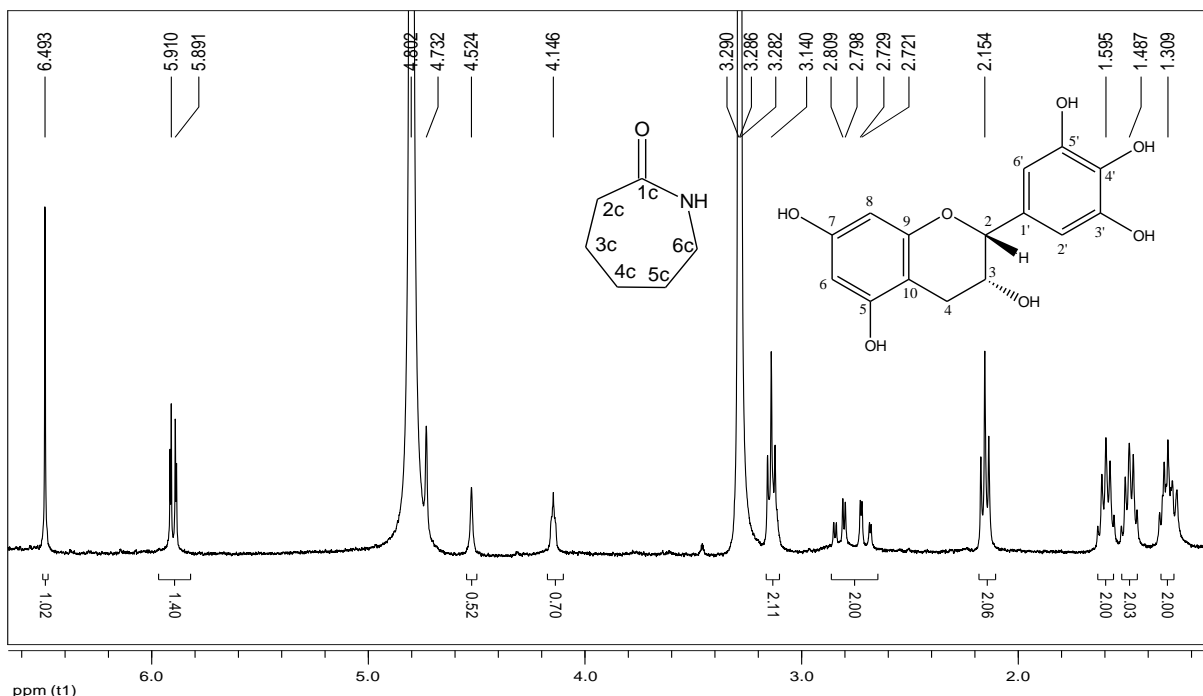


Figura 37: Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de **S18** + **S19** ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 400 MHz).

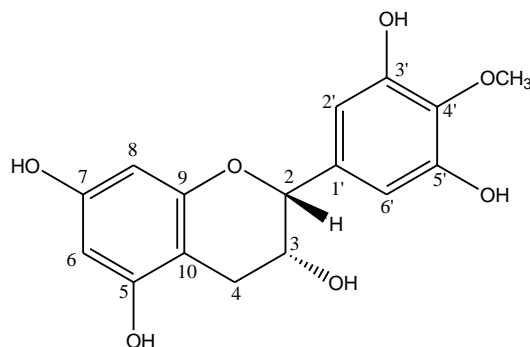
Tabela 43: Dados de RMN de  $^{13}\text{C}$  de **S18** + **S19** e da literatura para  $\epsilon$ -caprolactama (AIST) e epigalocatequina (AGRAWAL et al., 1989)

Nº	Tipo de carbono	$\delta_{\text{C}}^*$ de S19 (epigalocatequina)	$\delta_{\text{C}}^{**}$ (AGRAWAL, 1989)	Nº	Tipo de carbono	$\delta_{\text{C}}^*$ de S18 ( $\epsilon$ -caprolactama)	$\delta_{\text{C}}^{***}$ (AIST)
2	CH	79,97	79,40	1c	C	176,04	179,63
3	CH	67,58	67,00	2c	$\text{CH}_2$	37,05	36,81
4	$\text{CH}_2$	29,20	28,80	3c	$\text{CH}_2$	26,77	23,27
5	C	157,32	157,10	4c	$\text{CH}_2$	27,54	29,74
6	CH	96,45	96,30	5c	$\text{CH}_2$	30,18	30,62
7	C	157,38	157,50	6c	$\text{CH}_2$	40,21	42,65
8	CH	95,94	95,70				
9	C	157,76	157,50				
10	C	-	99,90				
1'	C	131,60	131,50				
2'	CH	107,06	107,00				
3'	C	146,76	146,10				
4'	C	131,60	132,90				
5'	C	146,76	146,10				
6'	CH	107,06	107,00				

Solventes: \* $\text{CD}_3\text{OD}$  \*\*  $\text{COMe}_2\text{-d}_6$  \*\*\* $\text{CDCl}_3$



#### 4.19 - M10: 4'-O-metilepigalocatequina



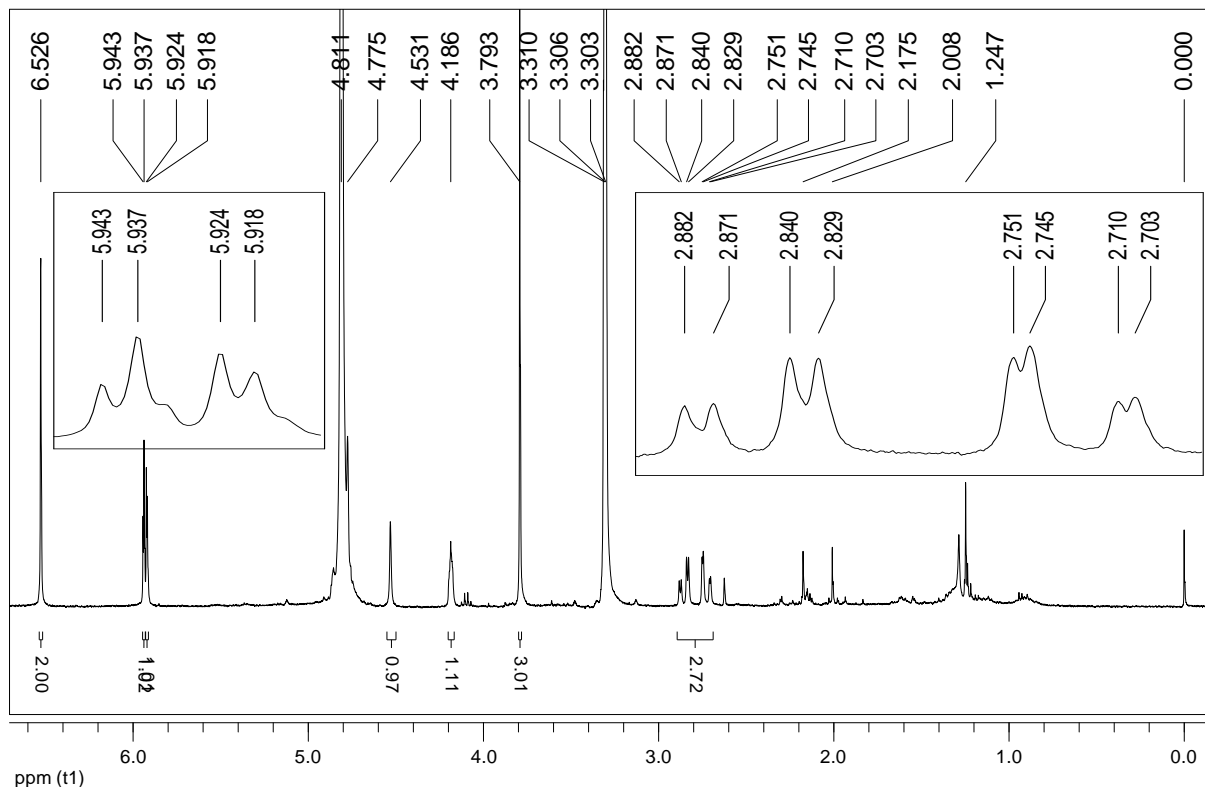
**M10** foi obtido a partir de **FSEAT** e **SEM**, apresentou-se como sólido amarelo claro de faixa de fusão 136,7-140,0 °C, solúvel em acetona e metanol. A análise por CCD deste sólido indicou apenas uma mancha vermelha (revelador: ácido perclórico/vanilina).

O espectro na região do IV (Figura A55, p. 182) de **M10** apresenta uma banda larga de absorção entre 3400 e 3200  $\text{cm}^{-1}$  correspondente a estiramento da ligação O-H, em 1605  $\text{cm}^{-1}$  característica de estiramento de ligação C=C de compostos aromáticos e em 1184  $\text{cm}^{-1}$  característica de estiramento de ligação C-O. Também apresenta duas bandas em 1273 e 1037  $\text{cm}^{-1}$  que se referem ao estiramento de ligação C-O de éteres aromáticos.

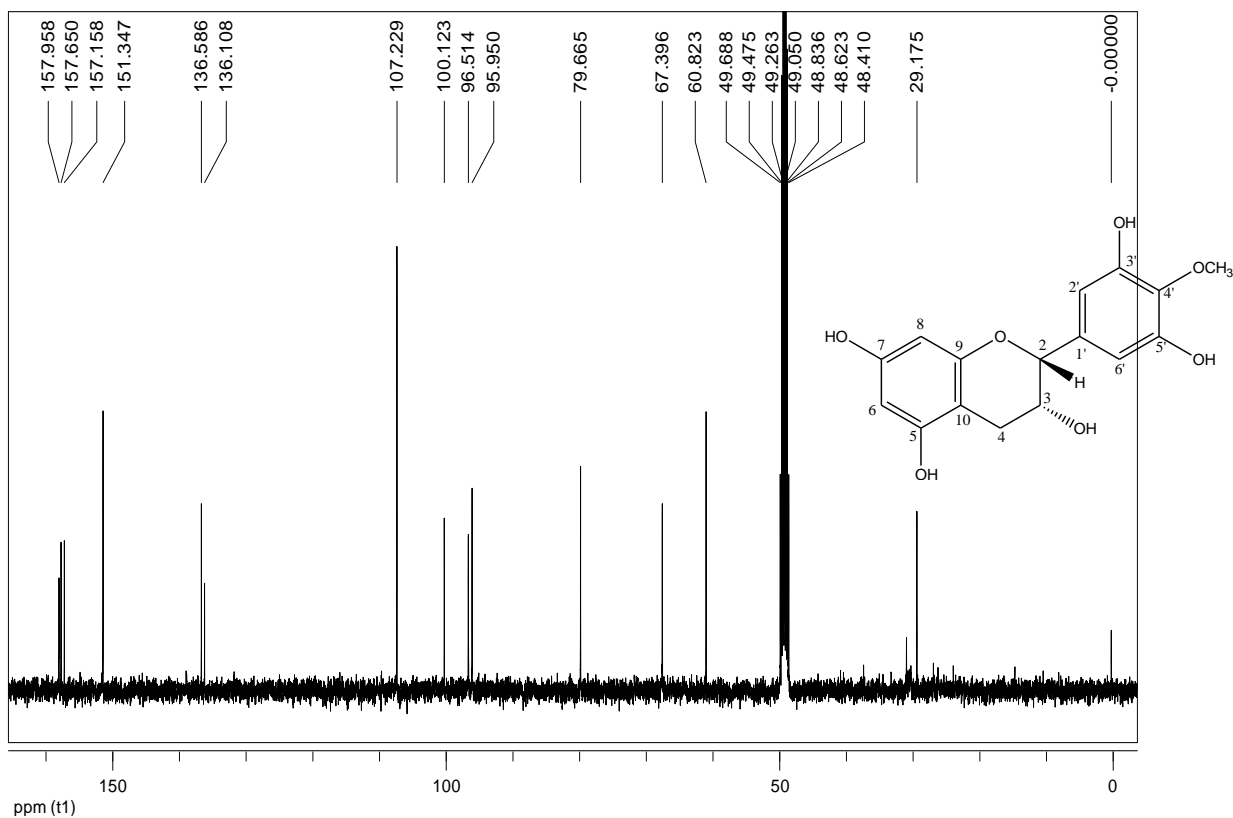
O espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (Figura 38, p. 100) apresenta na região de átomos de hidrogênio aromáticos dupletos que se referem a H6 em  $\delta$  5,92 ( $J = 2,4$  Hz), a H8 em 5,94 ( $J = 2,4$  Hz), e um simpleto em  $\delta$  6,53 referente a átomos de hidrogênio H2' e H6'. Também foram observados para H4 dois duplos dupletos em  $\delta$  2,86 ( $J = 4,4$ ; 16,8 Hz) e  $\delta$  2,73 ( $J = 3,2$ ; 16,8 Hz), e para H2 o sinal em  $\delta$  4,53, já para H3 observou-se o sinal em  $\delta$  4,19 e para os átomos de hidrogênio da metoxila observou-se o sinal em  $\delta$  3,79. Estes sinais sugerem tratar-se de um flavonoide.

A análise do espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (Figura 39, p. 100) e do subespectro DEPT-135 (Figura 40, pág 101) permitiu identificar sinais de carbono, sendo oito não hidrogenados, um metilênico e seis metínicos. O sinal em  $\delta$  67,40 (C3) foi atribuído ao átomo de carbono ligado a hidroxila, o sinal em  $\delta$  60,82 (OCH<sub>3</sub>) foi atribuído a metoxila e o sinal em  $\delta$  136,11 (C4') atribuído a carbono aromático ligado a oxigênio.

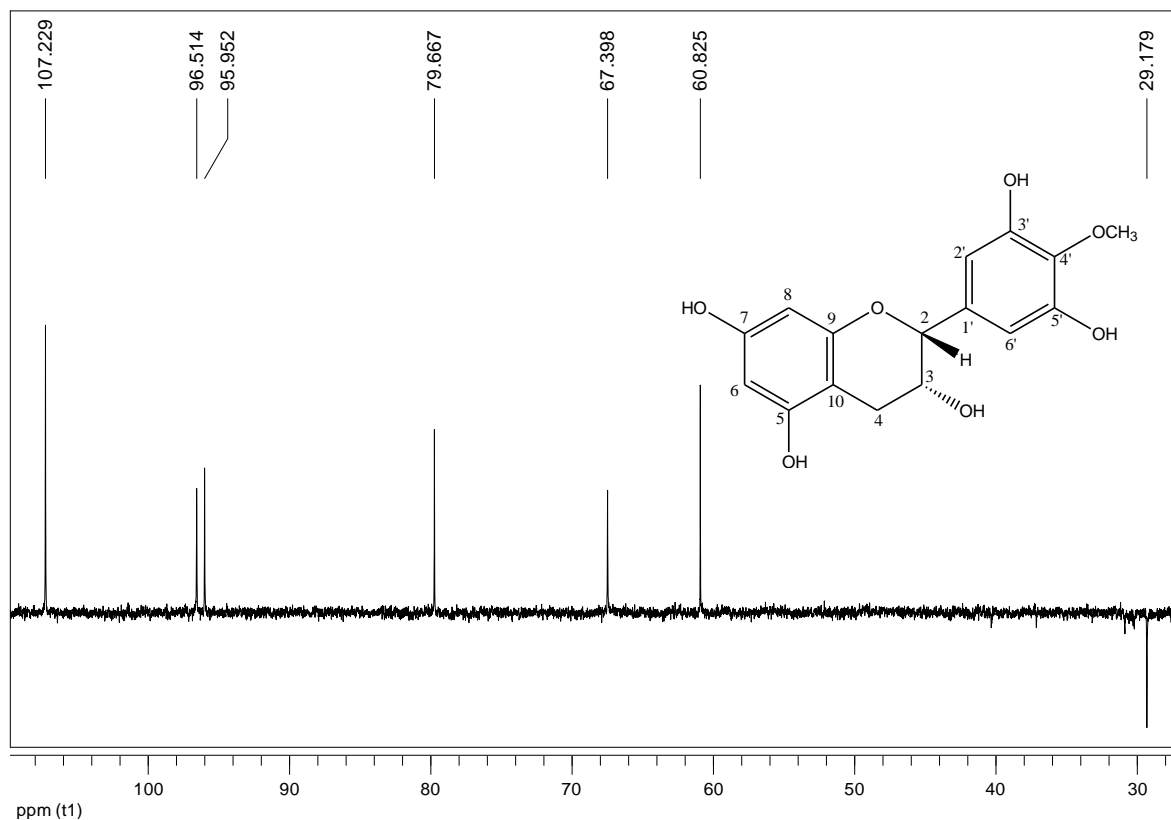
A comparação dos dados de RMN de  $^{13}\text{C}$  com a literatura (AGRAWAL, 1989) (Tabela 44, p. 101), permitiu identificar **M10** como sendo **4'-O-metilepigalocatequina**.



**Figura 38:** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de **M10** ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 400 MHz).



**Figura 39:** Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  de **M10** ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 100 MHz).



**Figura 40:** Subespectro DEPT-135 e expansão de **M10** (CD<sub>3</sub>OD, 100 MHz).

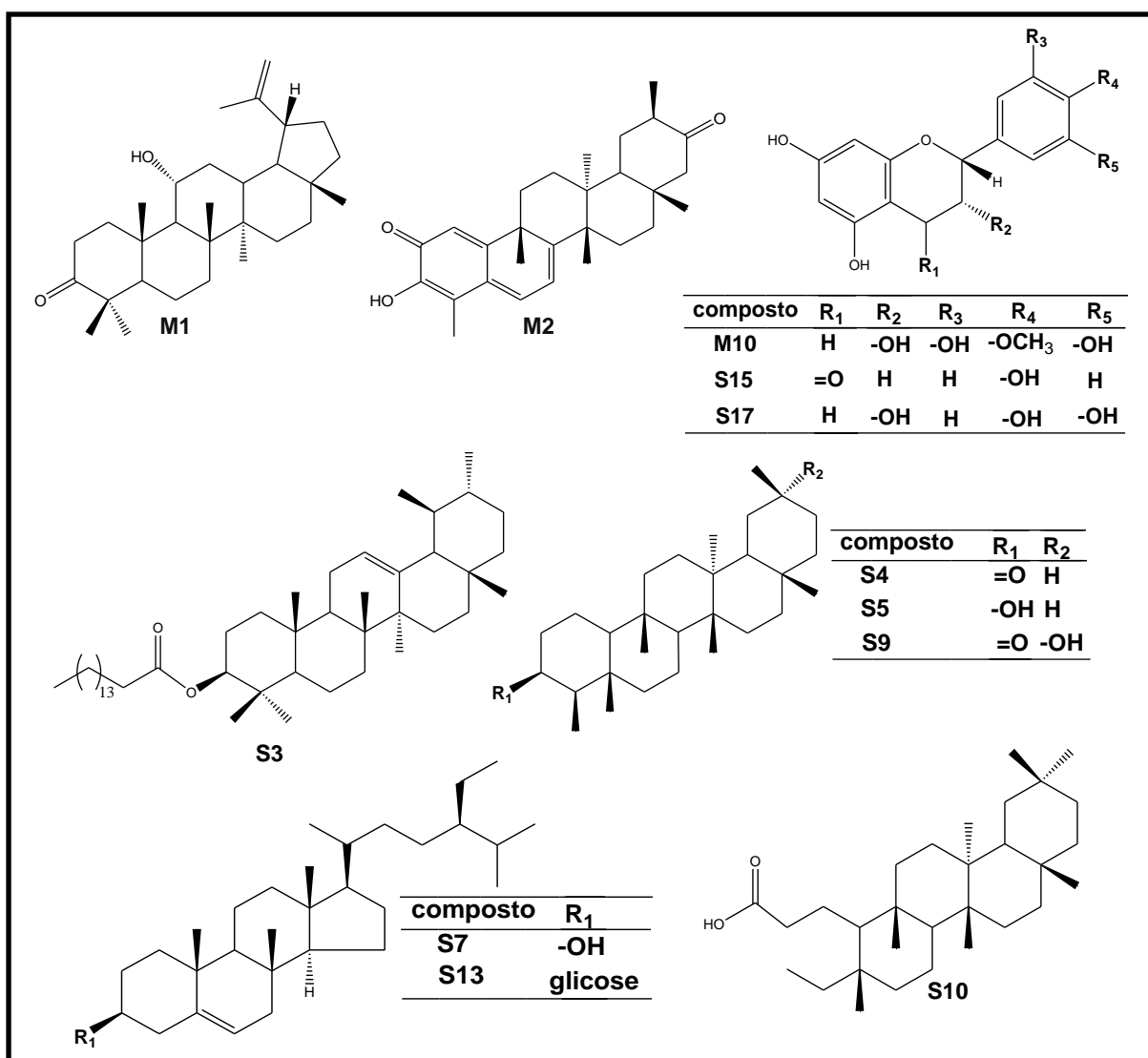
**Tabela 44:** Dados de RMN de <sup>13</sup>C de **M10** e da literatura para **4'-O-metilepigalocatequina** (AGRAWAL, 1989)

Nº	Tipo de carbono	δ <sub>c</sub> * de M10	δ <sub>c</sub> ** (AGRAWAL, 1989)	Nº	Tipo de carbono	δ <sub>c</sub> * de M10	δ <sub>c</sub> ** (AGRAWAL, 1989)
2	CH	79,67	79,80	10	C	157,96	157,40
3	CH	67,40	66,80	1'	C	136,59	136,10
4	CH <sub>2</sub>	29,18	28,80	2'	CH	107,23	106,90
5	C	100,12	99,60	3'	C	151,35	150,80
6	CH	157,16	156,80	4'	C	136,11	135,40
7	C	96,51	96,20	5'	CH	151,35	150,80
8	CH	157,65	157,40	6'	CH	107,23	106,90
9	C	95,95	95,60	OCH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	60,82	-

Solvente: \*CD<sub>3</sub>OD \*\*COEt<sub>2</sub>-d<sub>6</sub>

## 5 - COMPOSTOS DE INCLUSÃO COM CICLODEXTRINAS

As substâncias utilizadas para inclusão na cavidade da molécula de  $\beta$ -ciclodextrina (Figura 6, p. 11) e obtenção do complexo supramolecular foram: 11 $\alpha$ -hidroxilup-20(29)-en-3-ona (**M1**), tingenona (**M2**) e 4'-O-metilepigalocatequina (**M10**) isolados de *M. imbricata*; 3 $\beta$ -palmitiloxi-urs-12-eno (**S3**), 3-oxofriedelano (**S4**), 3 $\beta$ -hidroxifriedelano (**S5**),  $\beta$ -sitosterol (**S7**), ácido 3,4-seco-friedelan-3-oico (**S10**), 3-O- $\beta$ -D-glicosil- $\beta$ -sitosterol (**S13**), naringenina (**S15**) e epicatequina (**S17**) isolados de *S. crassifolia* e 3-oxo-29-hidroxifriedelano (**S9**) isolado de ambas espécies (Figura 41).



**Figura 41:** Estruturas químicas das substâncias utilizadas para formação de complexo com ciclodextrina.

## 5.1 - Preparação do composto de inclusão

A preparação dos complexos supramoleculares envolvendo ciclodextrinas foi realizada em colaboração com o Prof. Dr. Rubén D. Sinisterra Millán do Laboratório de Encapsulamento Molecular e Biomateriais/LEMB - UFMG, o pós-doutorando Joel José Passos e a Dra. Ivana Silva Lula (DQ/UFMG).

Para a preparação dos complexos supramoleculares foi empregada a metodologia de Soica et al. (2008) e Yang et al. (2013) com adaptações. As proporções, o tempo de agitação, bem como os solventes empregados em cada experimento estão apresentados na Tabela 45 (p. 104). Todas as preparações seguiram o mesmo procedimento padrão, descrito a seguir. Em um béquer foi preparada uma solução do composto em um solvente adequado (etanol ou acetona) e, em outro béquer, uma solução de  $\beta$ CD em água ultra pura (MiliQ®). O volume dessas soluções varia para cada composto trabalhado.

A solução de  $\beta$ CD foi adicionada lentamente à solução do composto, sob agitação magnética (2000 rpm) e a solução final foi mantida sob agitação a temperatura ambiente (25 °C), por x dias, para garantir a homogeneização (Tabela 45, pág 104). Depois da total evaporação do solvente orgânico a temperatura ambiente (tempo variando de 1 a 5 dias), a solução aquosa foi submetida a filtração simples e liofilização para remoção da água e obtenção do possível composto de inclusão.

**Tabela 45:** Quantidades utilizadas de cada composto e da  $\beta$ CD, solventes utilizados e dias de agitação

Composto	Composto		Composto: $\beta$ CD (mol)	Qde de $\beta$ CD* (mg)	Solvente		H <sub>2</sub> O da $\beta$ CD (mL)	Dias
	Qde (mg)	MM (g/mol)			Qde (mL)	Tipo		
<b>M1</b>	20,50	440,0	1:2	105,76	20	EtOH	20	5
<b>M2</b>	43,60	420,6	1:1	117,66	20	EtOH	20	5
<b>M2</b>	20,50	420,6	1:2	110,64	5	acetona	25	4
<b>M10</b>	19,14	319,0	3:1	22,70	4	EtOH	16	3
<b>S9</b>	10,25	442,0	1:2	52,88	10	EtOH	10	5
<b>S3</b>	20,50	668,0	1:2	69,23	5	acetona	15	3
<b>S4</b>	20,50	426,0	1:2	108,73	5	EtOH	20	3
<b>S5</b>	20,50	428,0	1:2	108,73	5	EtOH	20	3
<b>S7</b>	10,25	594,8	1:2	56,06	10	EtOH	10	5
<b>S10</b>	5,12	444,0	1:2	26,44	5	EtOH	5	3
<b>S13</b>	10,25	594,9	1:2	39,17	15	EtOH	15	5
<b>S15</b>	20,50	272,3	3:1	28,37	5	EtOH	20	4
<b>S15</b>	20,50	272,3	1:2	170,90	5	EtOH	20	4
<b>S17</b>	17,34	289,0	3:1	22,70	4	EtOH	16	3
<b>S17</b>	8,20	289,0	1:2	11,35	2	EtOH	8	1

\* MM da  $\beta$ CD = 1135 g/mol

## 5.2 - Resultados e Discussão

Todos os compostos após serem liofilizados, bem como a  $\beta$ CD pura, foram analisados por RMN. Foram obtidos os espectros de hidrogênio e os mapas de contornos ROESY.

Dos doze metabólitos secundários testados para inclusão na ciclodextrina, apenas a naringenina (**S15**) incluiu na  $\beta$ CD, formando o complexo **NARIBCD**. A inclusão foi observada tanto para a proporção de naringenina/ $\beta$ CD (3:1) quanto para proporção naringenina/ $\beta$ CD (1:2) (Tabela 45).

No espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da  $\beta$ CD (Figura 42, p. 106) observa-se um sinal duplete em  $\delta$  5,02 (H1), quatro sinais em 3,60 (H2), 3,92 (H3), 3,54 (H4) e 3,84 (H6), além de um sinal multiplete em 3,80 (H5). Esses valores são muito próximos aos

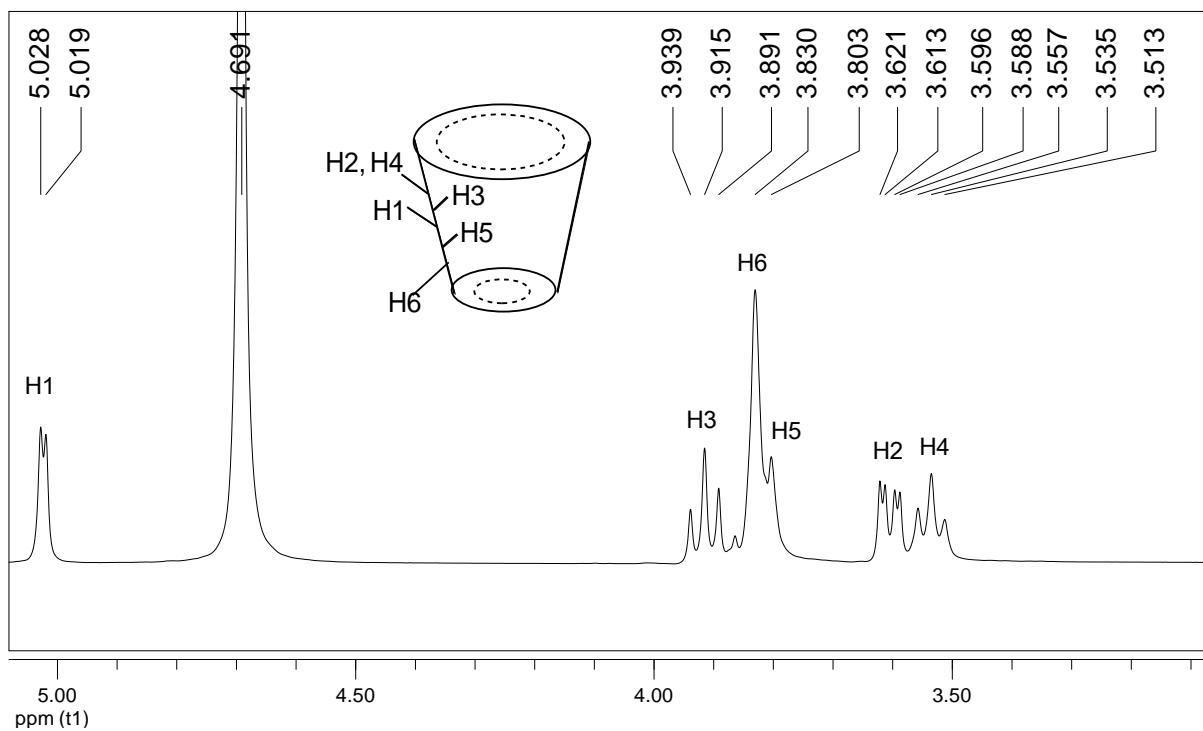
observados no espectro obtido para o complexo **NARIBCD** (Figura 43, p. 106), resultado semelhante foi relatado por Yang e colaboradores (2013). A diferença está no perfil do espectro e no deslocamento químico do átomo de hidrogênio H5 ( $\delta$  3,80 e  $\delta$  3,76), indicando inclusão da molécula de naringenina na ciclodextrina.

A inclusão do composto na cavidade da  $\beta$ CD pode ser melhor evidenciada analisando o mapa de contornos ROESY. A análise do mapa de contornos ROESY fornece informações importantes sobre a proximidade  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  através do espaço, podendo determinar a interação da molécula hospedeira e os átomos da cavidade da molécula hóspede ( $\beta$ CD), pois dois átomos de hidrogênio que estão intimamente localizados, com distância espacial no máximo de 0,4 Å, podem produzir um efeito observado no ROESY (SILVERSTEIN et al., 2007). Portanto, fez-se a análise do mapa de contornos ROESY do complexo **NARIBCD** (Figura 44, p. 107), neste mapa observaram-se correlações indicativas de acoplamento dipolar entre os átomos de hidrogênio (H3 e H5) pertencentes a parte interna da cavidade da  $\beta$ CD com os átomos de hidrogênio H2<sub>N</sub>, H2'<sub>N</sub>, H3'<sub>N</sub>, H5'<sub>N</sub> e H6'<sub>N</sub> (anel C) e a interação também de H3 com H6<sub>N</sub> (anel A) da **naringenina**, indicando inclusão do flavonoide mais pronunciada no anel C.

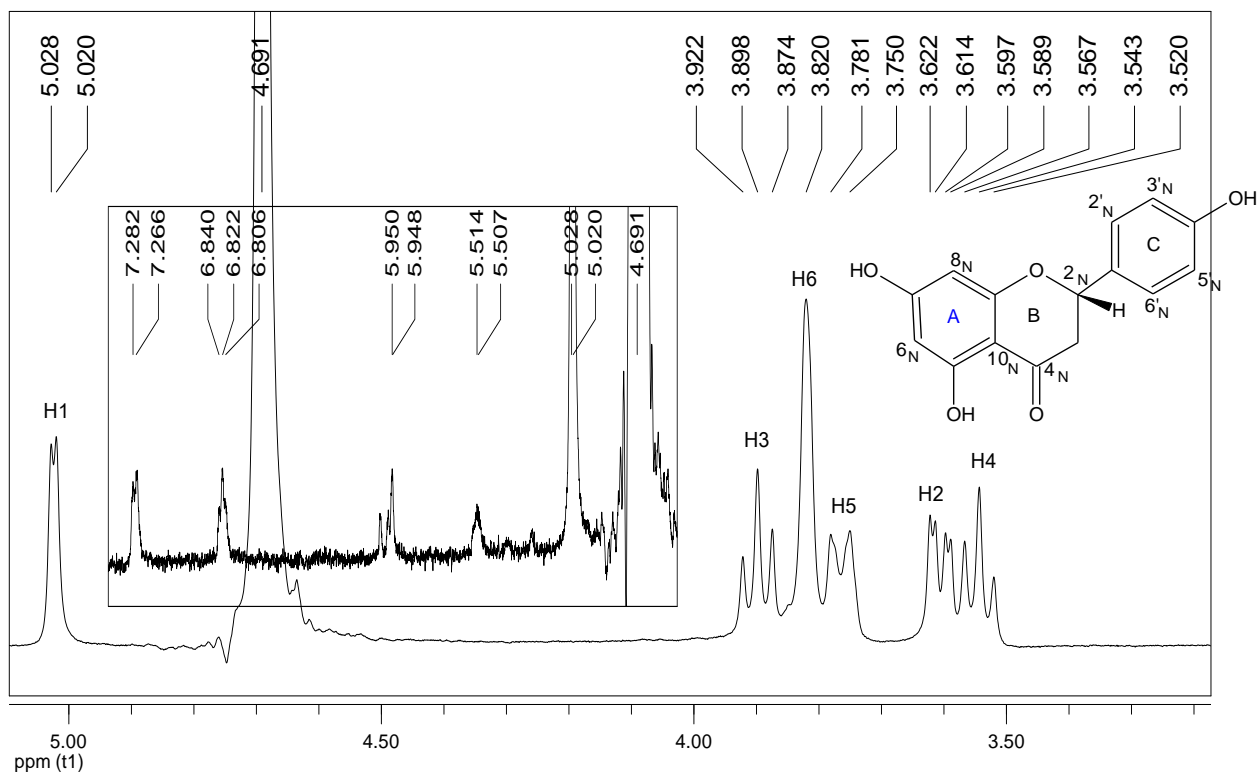
A preparação do complexo de inclusão entre naringenina e  $\beta$ CD já encontra-se relatado na literatura (YANG et al., 2013), e a inclusão do anel C na cavidade da  $\beta$ CD foi representada por estes autores, como apresentado na Figura 45 (p. 107).

Segundo Yang e colaboradores (2013), o complexo entre naringenina e  $\beta$ CD apresentou solubilidade maior em água do que somente a naringenina. Em água a naringenina apresenta solubilidade de 0,0044 mg/mL, e o complexo apresenta solubilidade de 6,9 mg/mL. Este resultado indica que fármacos contendo o complexo NARIBCD podem apresentar uma melhor biodisponibilidade do princípio ativo (naringenina), tornando-o potencialmente útil nas indústrias alimentícia, farmacêutica e de cosméticos.

Portanto, com o objetivo de testar o complexo NARIBCD em diversas atividades biológicas, este foi sintetizado, visto que até o momento não há relatos da atividade deste complexo.



**Figura 42:** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  e expansões da  $\beta$ -ciclodextrina ( $\text{D}_2\text{O}$ , 400 MHz).



**Figura 43:** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  do complexo NARIBCD ( $\text{D}_2\text{O}$ , 400 MHz).



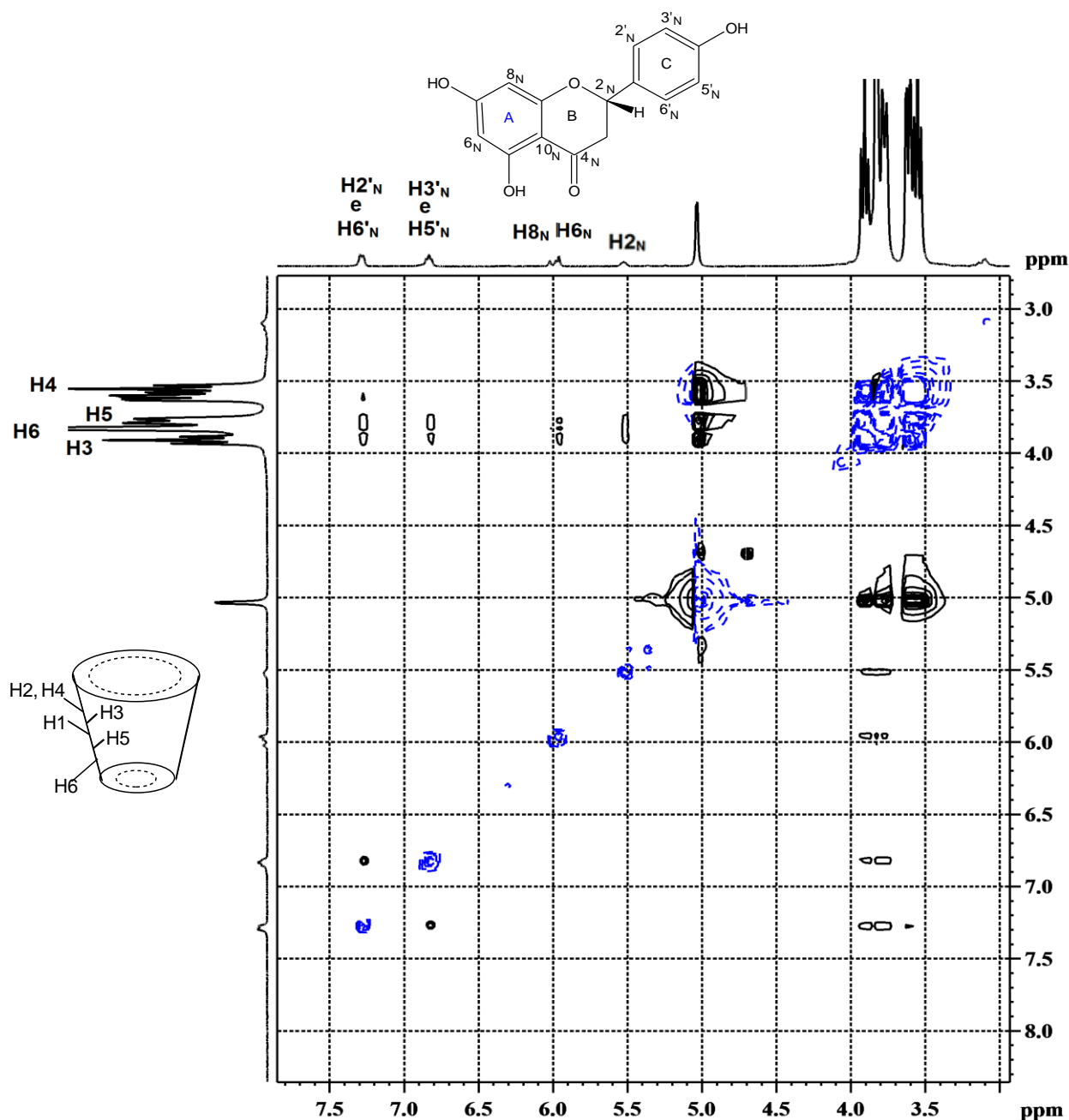


Figura 44: Mapa de contornos ROESY do complexo **NARIBCD** (D<sub>2</sub>O, 400 MHz).

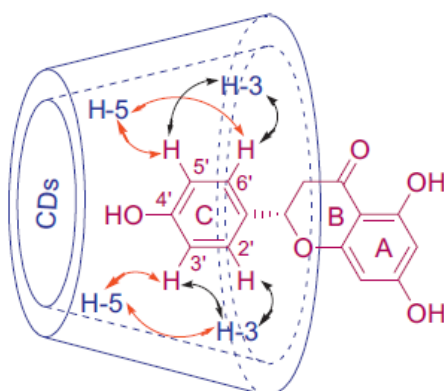


Figura 45: Representação do anel C da **naringenina** na cavidade da  $\beta$ CD (Imagem de Yang et al., 2013).

As demais substâncias utilizadas não apresentaram inclusão na cavidade da  $\beta$ CD. Observou-se que durante o processo de solubilização, do complexo de inclusão, para obtenção do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  em  $\text{D}_2\text{O}$ , alguns não foram solúveis e outros foram muito pouco solúveis. Os espectros obtidos da parte que solubilizou mostrou apenas sinais de  $\beta$ CD, indicando que somente este composto havia sido solubilizado. Outros solventes deuterados foram testados, como por exemplo,  $\text{DMSO-d}_6$ , e neste caso houve solubilização de alguns complexos preparados, mas observou-se no espectro de RMN de  $^1\text{H}$  sinais relativos ao composto hóspede e a  $\beta$ -ciclodextrina e nenhuma modificação ou correlação entre eles pode ser observada.

Como exemplo das tentativas de complexação, pode-se citar a **tingenona** e  $\beta$ CD para formar **TNGBCD**. No espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (Figura 47, p. 109) de **TNGBCD** podem ser observados os principais sinais da tingenona que são H6, H1, H7, H22, H20, H23, H25, H26, H28 e H30, que apresentaram os mesmos valores de deslocamento químico da molécula na forma pura (Figura 46). No espectro de **TNGBCD** observou-se também os sinais da  $\beta$ CD com deslocamentos químicos entre  $\delta$  5,72 e  $\delta$  3,33 (Figura A56, p. 182). Além de não haver diferença significativa nos deslocamentos químicos dos sinais de hidrogênio desses espectros, no mapa de contornos ROESY, não foram observadas correlações dos átomos de hidrogênio da tingenona com os da cavidade da molécula hóspede (H3 e H5) (Figura 48, p. 109), confirmando que realmente não houve inclusão da tingenona na  $\beta$ CD.

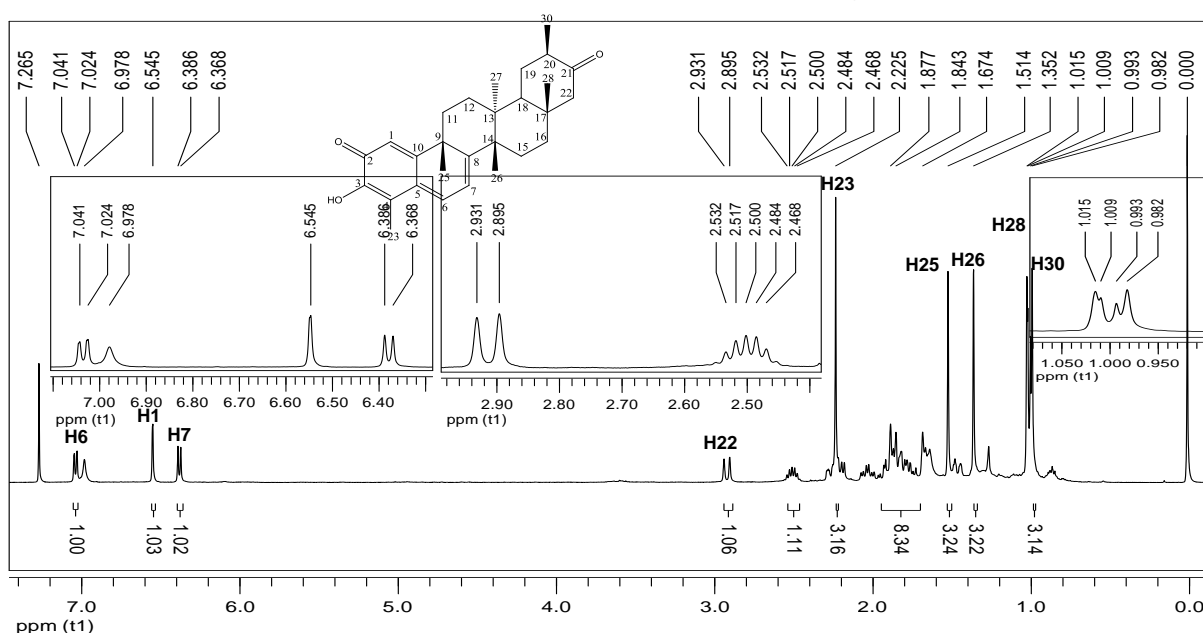


Figura 46: Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de tingenona ( $\text{CDCl}_3$ , 400MHz).

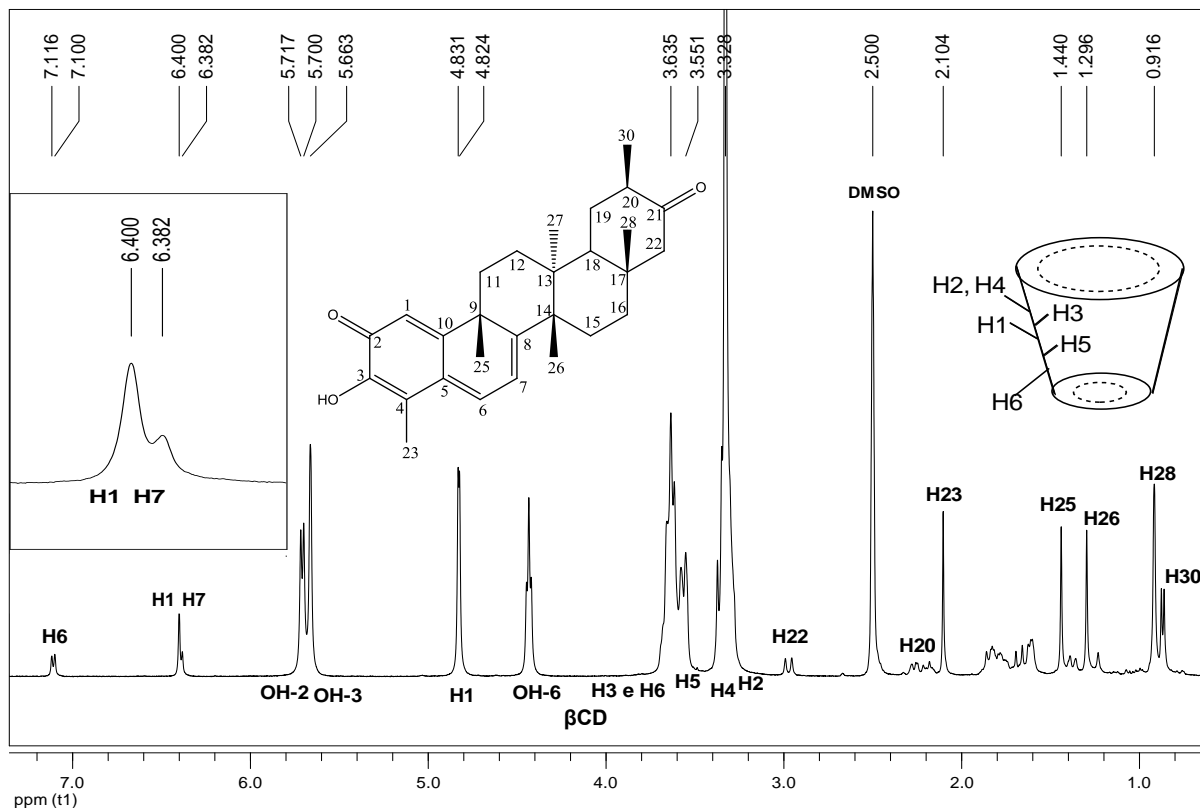


Figura 47: Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de TNGBCD ( $\text{DMSO-d}_6$ , 400MHz).

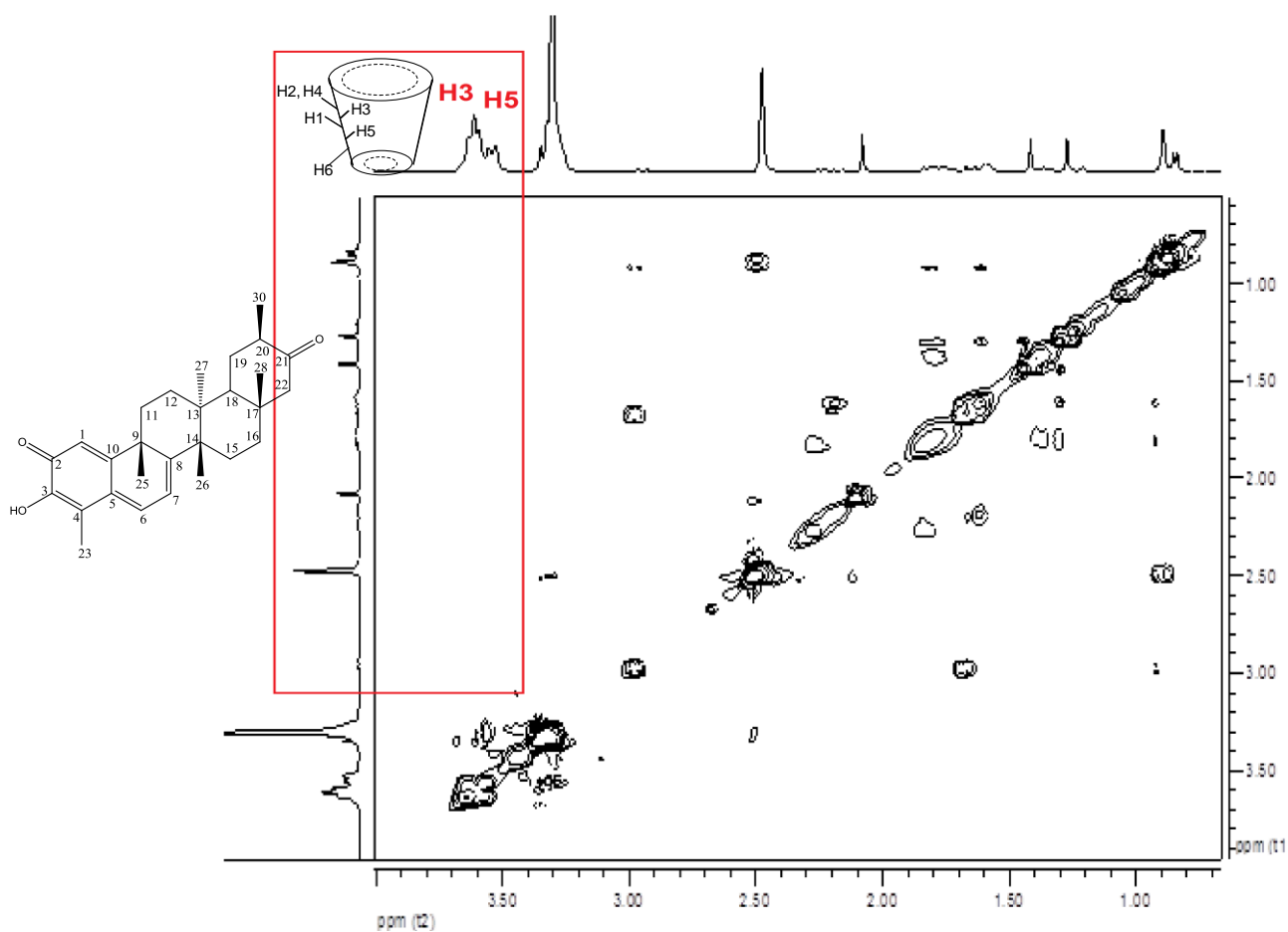


Figura 48: Mapa de contornos ROESY de TNGBCD ( $\text{DMSO-d}_6$ , 400 MHz).

## 6 - ESTUDO DA ATIVIDADE BIOLÓGICA

### 6.1 - Introdução Geral

O uso de plantas como medicamento é realizado desde tempos primordiais e os conhecimentos associados a estes usos foram passados de geração a geração, contribuindo para o desenvolvimento de estudos químicos e biológicos de plantas.

Pesquisas são desenvolvidas e direcionadas ao descobrimento de novos agentes antimicrobianos provenientes de extratos e/ou compostos isolados de produtos naturais, com a finalidade de serem aplicados em produtos farmacêuticos, nutracêuticos e cosméticos. Atualmente, existem vários métodos para a avaliação da atividade antibacteriana e antifúngica.

O uso indiscriminado de antimicrobianos tem proporcionado o surgimento de resistência dos micro-organismos aos fármacos de uso corrente, causando um problema inerente à terapia antimicrobiana, sendo de grande importância a busca por novas fontes terapêuticas para obter novos produtos.

Desse modo, os extratos e substâncias isoladas de raízes de *Maytenus imbricata* e de folhas de *Salacia crassifolia* foram submetidos aos seguintes estudos:

- Atividade giardicida, amebicida e tricomonocida,
- Atividade antibacteriana e antifúngica,
- Atividade de inibição da enzima acetilcolinesterase,
- Atividade antioxidante,
- Atividade antinociceptiva.

Os esquemas de obtenção dos extratos e substâncias isoladas de *S. crassifolia* utilizadas no estudo da atividade biológica estão representados nas Figuras 10 (p. 19), 11 (p. 35), 12 (p. 39), 13 (p. 47) e 14 (p. 53). O isolamento de **M10** de *M. imbricata* está apresentada na Figura 15 (p. 57) e as demais substâncias desta espécie também testadas biologicamente nesse trabalho foram obtidas durante o trabalho de mestrado (RODRIGUES, 2011; RODRIGUES et al., 2012).

## 6.2 - Atividade Antiparasitária

### 6.2.1 - Introdução

O parasitismo intestinal ainda constitui um dos mais sérios problemas de saúde Pública no Brasil, principalmente pela sua correlação com o grau de desnutrição da população, afetando especialmente o desenvolvimento físico, psicossomático e social (FERREIRA E ANDRADE, 2005).

*Entamoeba histolytica* é um protozoário que causa a amebíase. Em relação às infecções causadas por protozoários, a amebíase constitui uma das doenças humanas mais agressiva. De acordo com estimativas recentes, a amebíase infecta aproximadamente 500 milhões de pessoas em todo o mundo, resultando em 40.000-100.000 mortes anuais, principalmente em países tropicais e subtropicais (LEOS-RIVAS et al., 2011).

A *Giardia lamblia* é um protozoário flagelado que nas etapas da sua vida alterna entre a fase trofozoíto (forma ativa, se alimenta e reproduz dentro do hospedeiro) e cisto (forma inativa, se encontra no meio externo ao hospedeiro) que causa a giardíase. Os sintomas dessa infecção intestinal são: diarreia, flatulência, constipação, câibras, azia, perda de peso, dor de cabeça, náuseas, vômitos, febres e calafrios (WOLFE, 1992; MENA-REJÓN et al., 2007; WISER, 2010; ZLOBL, 2001).

Amaral e colaboradores (2006) fizeram uma revisão da literatura com o objetivo de pesquisar os extratos de plantas, frações e compostos químicos com estudo *in vitro* de avaliação da atividade giardicida, confirmando que produtos naturais, especialmente de origem vegetal, representam excelentes fontes de pesquisas na busca de novos agentes terapêuticos no tratamento da giardíase. E realmente encontraram várias espécies ativas para este fim.

Pesquisas comprovaram a alta atividade dos quinonametídeos tingenona (Figura 3, p. 6) e pristimerina (Figura 4, p. 7), contra *G. lamblia*, com  $CI_{50} = 0,74$  e  $0,11 \mu\text{g/mL}$ , respectivamente. O metronidazol, fármaco utilizado para o tratamento contra este protozoário e padrão utilizado no teste, apresentou menor atividade, com  $CI_{50} = 1,23 \mu\text{g/mL}$  (MENA-REJÓN et al., 2007).

Silva e colaboradores (2012a) relataram o elevado potencial giardicida ( $CI_{50} = 1,02 \mu\text{g/mL}$ ) do extrato hexânico de galhos de *Maytenus gonoclada* (Celastraceae)

sobre culturas de *Giardia lamblia*. Tais resultados incentivaram a avaliação dessa atividade com outras espécies da mesma família, como *Maytenus imbricata* e *Salacia crassifolia*.

*Trichomonas vaginalis* é o protozoário flagelado causador da tricomoníase, que é uma das doenças sexualmente transmissíveis mais comuns em mulheres no mundo. A infecção apresenta várias manifestações clínicas, desde quadro assintomático à severa vaginite. A tricomoníase tem sido associada à transmissão do vírus da imunodeficiência humana (HIV), à doença inflamatória pélvica, ao câncer cervical, à infertilidade, ao parto prematuro e ao baixo peso de bebês nascidos de mães infectadas (MACIEL et al., 2004).

Em um estudo com 540 mulheres infectadas, a tricomoníase se apresentou também em 177 dos 256 parceiros masculinos estudados, dos quais 136 eram assintomáticos (SEÑA, et al., 2007). Passos e colaboradores (2006) analisaram 101 mulheres com queixas de corrimento vaginal e 12 estavam com tricomoníase.

Nitroimidazol é a classe de fármacos utilizada no tratamento dessa doença, sendo o metronidazol, o fármaco mais utilizado há várias décadas. Essa dependência de uma única classe de fármacos antimicrobianas para o tratamento de infecções por *T. vaginalis* aumenta a vulnerabilidade à resistência, portanto, é latente a importância da busca por outras opções de tratamento (KIRKCALDY et al., 2012).

Assim, foram feitos testes utilizando os parasitos *E. histolytica*, *G. lamblia* e *T. vaginalis* frente a alguns compostos isolados de *M. imbricata* e *S. crassifolia*.

### 6.2.2 - Metodologia do Screening

O teste foi realizado no Laboratório de Parasitologia, no Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, sob a coordenação da Professora Dr<sup>a</sup> Maria Aparecida Gomes e alunas Thaisa H. Silva Fonseca e Carla R. Álvares Batista.

Inicialmente foi realizado um teste tipo “screening” com todos os extratos, triterpenos e flavonoides, de ambas espécies, para determinar aqueles que possuíam efeitos sobre a viabilidade e/ou vitalidade dos trofozoítos de *E. histolytica*, *G. lamblia* e *T. vaginalis* (Figura 49, p. 113). Para os compostos que apresentaram

atividade contra algum parasito foi feito o teste mais completo para determinação da  $CI_{50}$ .



**Figura 49:** *Entamoeba histolytica*, *Giardia lamblia* e *Trichomonas vaginalis*.

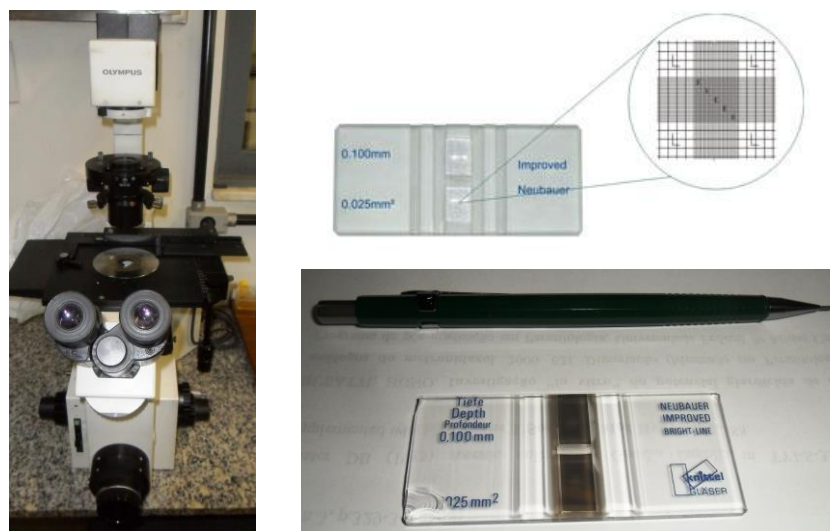
([http://www.dpd.cdc.gov/dpdx/HTML/ImageLibrary/Trichomoniasis\\_il.htm](http://www.dpd.cdc.gov/dpdx/HTML/ImageLibrary/Trichomoniasis_il.htm). Acesso: 12/01/2012)

Foram considerados em cada ensaio, controle negativo (apenas inóculo e meio de cultura); controle positivo (Metronidazol, Sigma®) e controle com DMSO. Todos os ensaios foram realizados em triplicatas e repetidos pelo menos duas vezes.

Para os ensaios de inibição,  $2,4 \times 10^5$  trofozoítos de *E. histolytica*, *G. lamblia* e *T. vaginalis*, em fase logarítmica de crescimento, foram distribuídos em tubos de vidro (Pyrex® 13x100 mm) contendo 5 mL de meio YI-S-32.

As amostras testadas foram adicionadas individualmente a estes tubos em concentrações crescentes e, posteriormente, incubados em estufa bacteriológica a 37 °C. A avaliação foi feita após 24 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 (Figura 50, p. 114), utilizando a técnica adaptada de contagem de leucócitos (CARVALHO e SILVA, 1988).



**Figura 50:** Microscópio utilizado e Câmara de Neubauer.

Para a realização da quantificação do número de trofozoítos/mL de suspensão, empregou-se a seguinte equação:

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

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

Realizou-se o *screening* com os seguintes extratos de raízes de *Maytenus imbricata*: extrato hexano/éter etílico (1:1) (**SEH e FSEH**), o extrato em acetato de etila (**SEAT e FSEAT**) e o extrato metanólico (**SEM**) e as substâncias isoladas de FSEH: **M1** (11 $\alpha$ -hidroxilup-20(29)-en-3-ona), **M2** (tingenona), **M6** (3,7-dioxo-friedelano), **M8** (3-oxo-29-hidroxifriedelano), **M9** (3 $\beta$ ,11 $\alpha$ -di-hidroxilup-20(29)-eno e o flavonoide de FSEAT e SEM: **M10** (4'-O-metilepigalocatequina).

Na literatura é relatada a atividade da tingenona contra *Entamoeba histolytica* (FONSECA, 2012), sendo de grande importância testar a tingenona contra os outros parasitas.

Também foram testados os extratos obtidos de folhas de *Salacia crassifolia*: **EHS, ECS, EAS e EES** e as substâncias: **S3, S4, S5, S6, S7, S8, S9, S10, S11, S12, S13, S15, S17** e o complexo **NARIBCD**.



### 6.2.3 - Resultado do *Screening*

As amostras **SEH** e **tingenona (M2)** apresentaram atividade inibitória durante o “*screening*” realizado contra os trofozoítos de *E. histolytica*, *G. lamblia* e *T. vaginalis*, portanto, foi realizado o estudo completo para essas amostras associando novamente aos parasitas em concentrações crescentes para determinação da  $CI_{50}$ .

### 6.2.4 - Metodologia do teste antiparasitário completo

O efeito sobre o crescimento dos trofozoítos foi avaliado *in vitro* por comparação com controles negativos (inóculo e meio de cultura) e controles positivos (inóculo e metronidazol). Todos os ensaios foram realizados separadamente, em triplicata e repetidos pelo menos duas vezes.

As amostras (**SEH** e **M2**) foram dissolvidas em DMSO e dessa solução, alíquotas foram diluídas, em meio de cultura YI-S-32, obtendo-se seis concentrações (mg/mL) para serem testadas em cada parasita (Tabela 46, p. 116).

A solução preparada foi filtrada em membrana esterilizante de nitrocelulose (0,2  $\mu\text{m}$ ) (Figura 51) e adicionada a tubos de vidro (Pyrex® 13x100 mm) contendo trofozoítos em cultura axênica que variam de acordo com o parasita, sendo  $2,4 \times 10^5$  trofozoítos de *E. histolytica*,  $1,2 \times 10^5$  trofozoítos de *G. lamblia* e  $6,0 \times 10^4$  trofozoítos de *T. vaginalis*, em fase logarítmica de crescimento, a fim de se obter diferentes concentrações ( $\mu\text{g/mL}$ ), em uma faixa de valores, em um volume final de 6 mL (Tabela 46, p. 116).



**Figura 51:** Membrana esterilizante de nitrocelulose e os tubos com as amostras.

Todos os tubos foram incubados em estufa bacteriológica a 37 °C durante 48 h. Após esse tempo de incubação, a viabilidade foi verificada qualitativamente observando a mobilidade e a aderência dos trofozoítos em microscópio invertido.

Para determinação da  $CI_{50}$  os trofozoítos foram quantificados através da técnica de contagem de leucócitos adaptada (CARVALHO e SILVA, 1988).

**Tabela 46:** Concentrações preparadas para as amostras

Amostra	<i>Entamoeba histolytica</i>		<i>Giardia lamblia</i>		<i>Trichomonas vaginalis</i>	
	Amostra em DMSO e Meio de Cultura (mg/mL)	Concentrações testadas ( $\mu\text{g/mL}$ )	Amostra em DMSO e Meio de Cultura (mg/mL)	Concentrações testadas ( $\mu\text{g/mL}$ )	Amostra em DMSO e Meio de Cultura (mg/mL)	Concentrações testadas ( $\mu\text{g/mL}$ )
<b>SEH</b>	0,9	5,0; 10,0; 20,0; 25,0; 40,0 e 60,0	0,9	0,16; 0,32; 0,64; 1,28; 2,56 e 5,12	0,3	0,43; 0,86; 1,71; 3,42; 6,84 e 13,68
<b>M2 (tingenona)</b>	0,38	0,42; 0,84; 1,68; 3,36; 6,72 e 13,44	0,12	0,17; 0,34; 0,68; 1,36; 2,72 e 5,44	0,1	0,08; 0,16; 0,32; 0,64; 1,28 e 2,56

### 6.2.5 - Resultado do teste antiparasitário completo ( $CI_{50}$ )

A partir de valores de inibição para diferentes concentrações foi encontrado o  $CI_{50}$ , pelo Programa Probitus de Análise para maioria dos testes, exceto para tingenona frente a *E. histolytica*, que foi usado o Programa de Análise “Minitab 15” (Tabela 47).

**Tabela 47:** Concentração inibitória -  $CI_{50}$  ( $\mu\text{g/mL}$ ) das amostras frente aos parasitos

Amostra	<i>Entamoeba histolytica</i>	<i>Giardia lamblia</i>	<i>Trichomonas vaginalis</i>	<i>T. vaginalis</i> resistente
<b>SEH</b>	19,19	0,53	1,09	1,57
<b>M2 (tingenona)</b>	1,71*	0,23	0,18	> 1000,00
<b>Metronidazol</b>	0,22	0,34	0,012	0,084

\* Programa de Análise usado foi o “Minitab 15” (FONSECA, 2012)

Pela Tabela 47 pode-se observar que o extrato **SEH** e a **tingenona (M2)** apresentaram atividade frente aos parasitas, em comparação com o padrão (metronidazol). Essa atividade do extrato pode ser, ao menos em parte, por **SEH**

conter 40% de tingenona que é um composto com comprovada atividade antimicrobiana (RODRIGUES et al., 2012).

Tanto o extrato **SEH**, quanto a **tingenona (M2)** apresentaram uma alta atividade frente a *G. lamblia*, sendo a tingenona melhor que o padrão. Essa substância é um promissor fármaco antiparasitário, visto que possui atividade frente aos três parasitas testados, apesar de não ter sido ativo frente a *T. vaginalis* resistente.

O  $CI_{50}$  de 1,57  $\mu\text{g/mL}$ , encontrado para o **SEH** frente a *T. vaginalis* resistente, apresenta-se como um resultado coerente, sendo um valor maior do que para o parasita não resistente ( $CI_{50}$  de 1,09  $\mu\text{g/mL}$ ), pois parasitas resistentes são mais difíceis de serem tratados. Este extrato se mostrou um promissor candidato para o desenvolvimento de medicamentos fitoterápicos.

## 6.3 - Atividade antibacteriana e antifúngica

### 6.3.1 - Introdução

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

*Listeria monocytogenes* é também um patógeno encontrado em alimentos contaminados, responsável por graves infecções fatais e causador da listeriose humana, tornando-se um problema de saúde pública (BURBANO et al., 2006).

Dentre as principais bactérias esporuladas, o gênero *Bacillus* é um dos mais

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

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

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

A bactéria *Pseudomonas aeruginosa* faz parte da microbiota humana e é o mais importante patógeno humano do gênero *Pseudomonas*. Apesar de raramente causar infecções em indivíduos saudáveis, ela torna-se um agente infeccioso importante, em ambientes hospitalares, principalmente em pacientes predispostos e/ou com baixa imunidade, como por exemplo, em unidades de terapia intensiva (UTI) e pacientes com caso de queimaduras (PAVIANI et al., 2003).

*Streptococcus sanguinis* é formador da placa dental e tem sido associado ao desenvolvimento de endocardite infecciosa, arterosclerose e isquemia depois de atingir a corrente sanguínea (SILVA et al., 2012b).

A segunda causa de morte em escala global é atribuída à diarreia infecciosa aguda, sendo que a primeira é a cardiovascular. A grande perda hidroeletrólítica que ocorre em pouco tempo, pode causar desidratação, acidose e hipopotassemia, sendo capaz de desencadear insuficiência renal aguda. Vírus, bactérias e parasitas são normalmente os responsáveis, mas estudos mostraram que as bactérias foram os patógenos mais frequentes de diarreias agudas em crianças, com alta predominância de *Escherichia coli*. A ocorrência de diarreia persistente, em doentes

de AIDS é de 95% e as causas se relacionam à própria infecção pelo vírus (MINCIS et al., 2008).

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

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

A grande incidência de doenças infecciosas e a resistência de micro-organismos patogênicos a múltiplas drogas têm aumentado devido ao uso indiscriminado de antibióticos. Isto exige uma contínua e indispensável busca por novos compostos antimicrobianos, com diferentes estruturas químicas e mecanismos de ação (ROJAS et al., 2003). Os produtos de origem vegetal surgem como uma alternativa promissora, uma vez que cerca de 70% dos novos antibióticos aprovados entre 1981 e 2002 pelo FDA (*Food and drug Administration*) foram de origem natural e as plantas constituem uma excelente fonte de substâncias para novas drogas antimicrobianas (NOVAIS et al., 2003; MURARI, 2007).

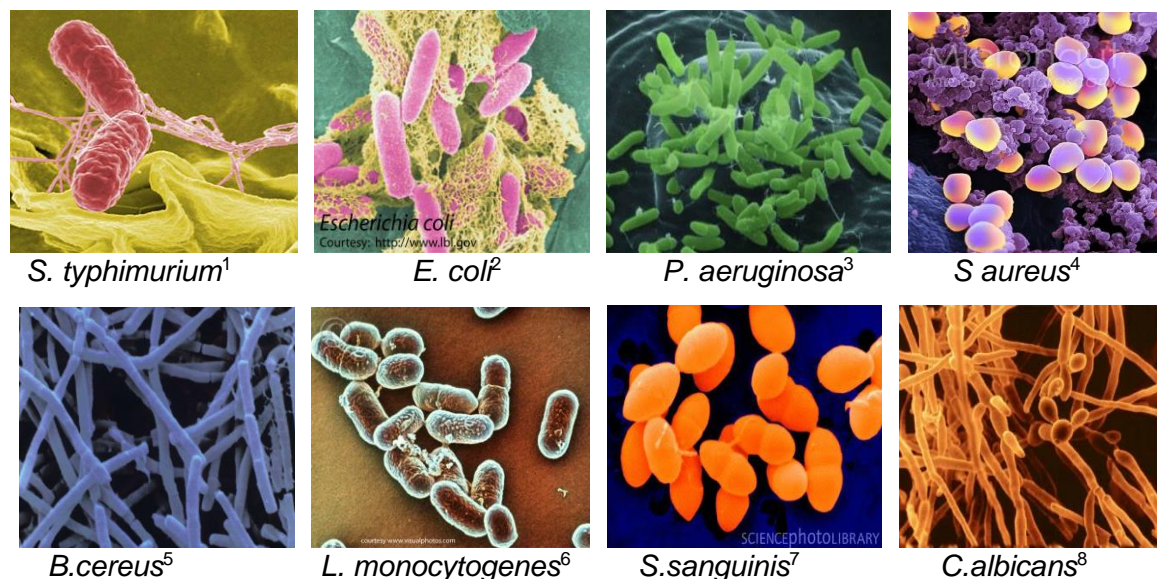
Portanto, é relevante o estudo de extratos e substâncias isoladas de folhas de *Salacia crassifolia* na descoberta de alternativas menos agressivas para o controle de micro-organismos que causam a deterioração dos alimentos e/ou são patogênicas para o homem.

### **6.3.2 - Metodologia do teste antibacteriano e antifúngico**

O teste foi realizado no Laboratório Biotecnologia e Bioensaios, no Departamento de Química da Universidade Federal de Minas Gerais, sob a coordenação da Professora Dr<sup>a</sup> Jacqueline Aparecida Takahashi.

As culturas de micro-organismos utilizadas neste experimento foram: três bactérias Gram-negativas: *Salmonella typhimurium* (S.T.) ATCC 13311, *Escherichia coli* (E.C.) ATCC 25723, *Pseudomonas aeruginosa* (P.A.) ATCC 27853, quatro bactérias Gram-positivas: *Staphylococcus aureus* (S.A.) ATCC 25923, *Bacillus cereus* (B.C.) ATCC 11778, *Listeria monocytogenes* (L.M.) ATCC 15313 e

*Streptococcus sanguinis* (S.S.) ATCC 49456 e um fungo, levedura *Candida albicans* (C.A.) ATCC 18804 (Figura 52).



**Figura 52:** Fotos dos micro-organismos avaliados.

Fonte: acesso: 20/02/2015

<sup>1</sup> <http://enfo.agt.bme.hu/drupal/node/12573>

<sup>2</sup> [http://www.vetmed.auburn.edu/e\\_coli](http://www.vetmed.auburn.edu/e_coli)

<sup>3</sup> <http://ausubellab.mgh.harvard.edu/cgi-bin/pa14/home.cgi>

<sup>4</sup> <http://www.micronaut.ch/shop/staphylococcus-aureus/>

<sup>5</sup> <http://pixshark.com/bacillus-cereus-on-food.htm>

<sup>6</sup> <http://www.vetmed.auburn.edu/molecular-diagnostics/assays/listeria-monocytogenes>

<sup>7</sup> <http://stomatitus.blogspot.com.br/>

<sup>8</sup> <http://energetic-mastery.com/the-candida-procrastination-connection/>

A Concentração Inibitória Mínima (CIM) é a menor concentração da amostra capaz de inibir o crescimento microbiano. Neste método, a CIM é determinada por uma sequência decrescente de concentrações da amostra em um meio nutriente (líquido), que é inoculado com a concentração padronizada do micro-organismo em teste. A leitura do teste é feita observando quais foram os sistemas que não houve crescimento do micro-organismo (ZACCHINO e GUPTA, 2007).

As amostras foram pesadas e solubilizadas em dimetilsulfóxido (DMSO), resultando em uma solução com concentração de 50 mg/mL (extratos) e 12,5 mg/mL (substâncias puras). Pipetaram-se 40 µL desta solução para um frasco contendo 960 µL de meio de cultura BHI (solução das amostras). Foi preparado um pré-inóculo no qual os micro-organismos estocados em tubos de ensaio foram transferidos e inoculados em tubos de ensaios contendo 3,0 mL de meio de cultura BHI (*Brain Heart Infusion*/Infuso de cérebro e coração). Em seguida, os tubos foram incubados

em estufa a 37 °C por 18 h. Com o auxílio de uma micropipeta, 500 µL do pré-inóculo microbiano 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 microbianos utilizados no teste.

Os testes foram realizados em placa de Elisa de 96 poços, em quintuplicata. Em cada poço foram adicionados 100 µL do meio de cultura BHI. No poço 1 foram adicionados também 100 µL da solução das amostras. Homogeneizou-se a solução e 100 µL foram transferidos para o próximo poço e, assim, sucessivamente. Desprezaram-se os 100 µL finais. Foram testadas de 6 até 9 concentrações, dependendo de cada amostra. A seguir, 100 µL do inóculo do micro-organismo a ser testado foi adicionado a cada poço. Foram realizados os controles: um controle para o crescimento do micro-organismo, no qual não houve adição da solução das amostras (para verificar a viabilidade celular), um controle é o branco em que não se adicionou o inóculo microbiano (para se eliminar o efeito da coloração da solução das amostras) e um controle dos padrões, usando a ampicilina sobre as bactérias e miconazol sobre o fungo. Um controle contendo 100 µL de meio de cultura BHI e 100 µL de água destilada estéril foi adicionada ao experimento como de controle de esterilidade do meio de cultura BHI.

As placas foram incubadas em estufa a 37 °C e, após 24 h, foi realizada a primeira leitura do teste em leitor de placa de Elisa (492 nm). Após 48 h foi realizada uma nova leitura finalizando o teste.

Os extratos de *Maytenus imbricata* **SEH**, **FSEH**, **SEAT**, **FSEAT**, **SEM** e as substâncias: **M1**, **M2** e **M3** foram testados durante a realização do mestrado e os resultados se encontram em Rodrigues et al. (2012). O flavonoide **M10** foi testado frente aos micro-organismos neste trabalho.

Os extratos de folhas de *Salacia crassifolia*: **EHS**, **ECS**, **EAS** e **EES**, as substâncias: **S3**, **S4**, **S5**, **S6**, **S7**, **S9**, **S10**, **S11**, **S12**, **S13**, **S15**, **S17** e o complexo **NARIBCD** também foram submetidos ao teste antimicrobiano.

### 6.3.3 - Resultado do teste antibacteriano e antifúngico

Os resultados do teste antimicrobiano para extratos e substâncias isoladas de *S. crassifolia* se encontram na Tabela 48.

**Tabela 48:** CIM<sub>50</sub> das amostras frente aos micro-organismos testados

Concentração inibitória mínima-CIM <sub>50</sub> (µg/mL)								
Amostras	S.T.	E.C.	P.A.	S.A.	B.C.	L.M.	S.S.	C.A.
EHS	25,00	25,00	0,19	0,19	0,19	50,00	0,19	25,00
ECS	25,00	25,00	0,19	0,19	0,19	25,00	0,19	25,00
EAS	25,00	25,00	0,19	0,19	0,19	25,00	0,19	25,00
EES	25,00	25,00	0,19	0,19	0,19	25,00	0,19	25,00
S3	-	-	-	-	-	-	-	-
S4	-	-	-	-	-	-	-	-
S5	-	-	-	-	-	-	-	-
S7	-	-	-	-	-	-	-	-
S9	-	-	-	-	-	-	-	-
S10	62,50	125,00	62,50	62,50	62,50	125,00	125,00	250,00
S11	250,00	500,00	500,00	500,00	500,00	500,00	500,00	500,00
S12	-	-	-	-	-	-	-	-
S13	-	-	-	-	-	-	-	-
S15	-	-	-	-	-	-	-	-
S17	-	-	-	-	-	-	-	-
M10	-	-	-	-	-	-	-	-
NARIBCD	-	-	-	-	-	-	-	-
Ampicilina	0,049	0,098	0,049	0,098	0,098	0,049	0,098	NT
Miconazol	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	3,32

NT = não testado, - não apresentou atividade, *S. typhimurium* (S.T.), *E. coli* (E.C.), *P. aeruginosa* (P.A.), *S. aureus* (S.A.), *B. cereus* (B.C.), *L. monocytogenes* (L.M.), *S. sanguinis* (S.S.), *C. albicans* (C.A.)

Os extratos obtidos de *S. crassifolia* apresentaram atividade antibacteriana e antifúngica sobre *P. aeruginosa* (P.A.), *S. aureus* (S.A.), *B. cereus* (B.C.) e *S. sanguinis* (S.S) (MIC<sub>50</sub> 0,19 µg mL<sup>-1</sup>). Os TTPCs **S10** e **S11** foram os únicos que apresentaram certa atividade antimicrobiana sobre todas bactérias e fungo.



## 6.4 - Atividade inibitória da enzima acetilcolinesterase (AChE)

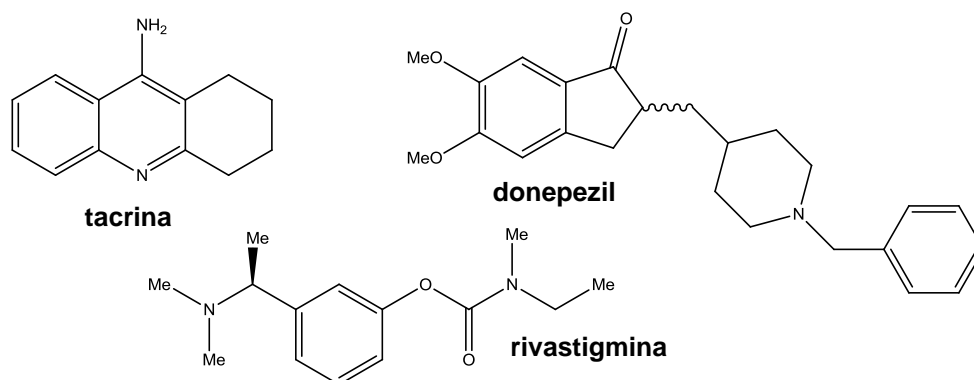
### 6.4.1 - Introdução

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

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

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

Vários inibidores da enzima acetilcolinesterase estão sendo investigados para o tratamento da Doença de Alzheimer, entretanto, poucas foram aprovadas pela *Food and Drug Administration* dos Estados Unidos, como a tacrina, donepezil e rivastigmina (Figura 53). Estas substâncias apresentam valores altos no mercado e alguns provocam diversos efeitos colaterais, como hepatotoxicidade e desarranjo gastrointestinal (SCHNEIDER, 2001; CARVALHO et al., 2013).



**Figura 53:** Exemplos representativos de fármacos usados no tratamento de mal de Alzheimer (BARBOSA FILHO et al., 2006).

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

Recentes estudos com extratos e substâncias isoladas de plantas de várias espécies brasileiras mostraram excelentes resultados como inibidores da enzima acetilcolinesterase (BARBOSA FILHO et al., 2006).

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

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

#### 6.4.2 - Metodologia do teste de inibição da AChE qualitativo

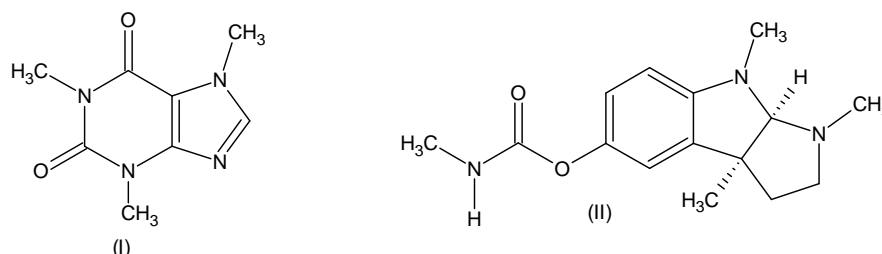
O teste foi realizado no Laboratório de Biotecnologia e Bioensaios, no Departamento de Química da Universidade Federal de Minas Gerais, sob a coordenação da Professora Dr<sup>a</sup> Jacqueline Aparecida Takahashi.

O teste foi realizado com os extratos de *Salacia crassifolia* **EHS, ECS, EAS e EES**, as substâncias **S3, S4, S5, S6, S7, S9, S10, S12, S13, S15, S17** e o complexo **NARIBCD**. De *M. imbricata*, apenas o **M10** foi utilizado nesse teste qualitativo, visto que os extratos e as demais substâncias já haviam sido testadas (RODRIGUES, 2011).

O ensaio para a avaliação qualitativa da atividade anticolinesterásica foi realizado seguindo-se a metodologia de Ellman (ELLMAN et al., 1961), adaptada por Rhee e colaboradores (2001). O teste é realizado utilizando-se placas cromatográficas de camada delgada de sílica gel. Aplicaram-se, na placa cromatográfica, 5 µL de amostra e também do padrão (cafeína), na concentração de 10 mg/mL, utilizando solventes apropriados para cada amostra.

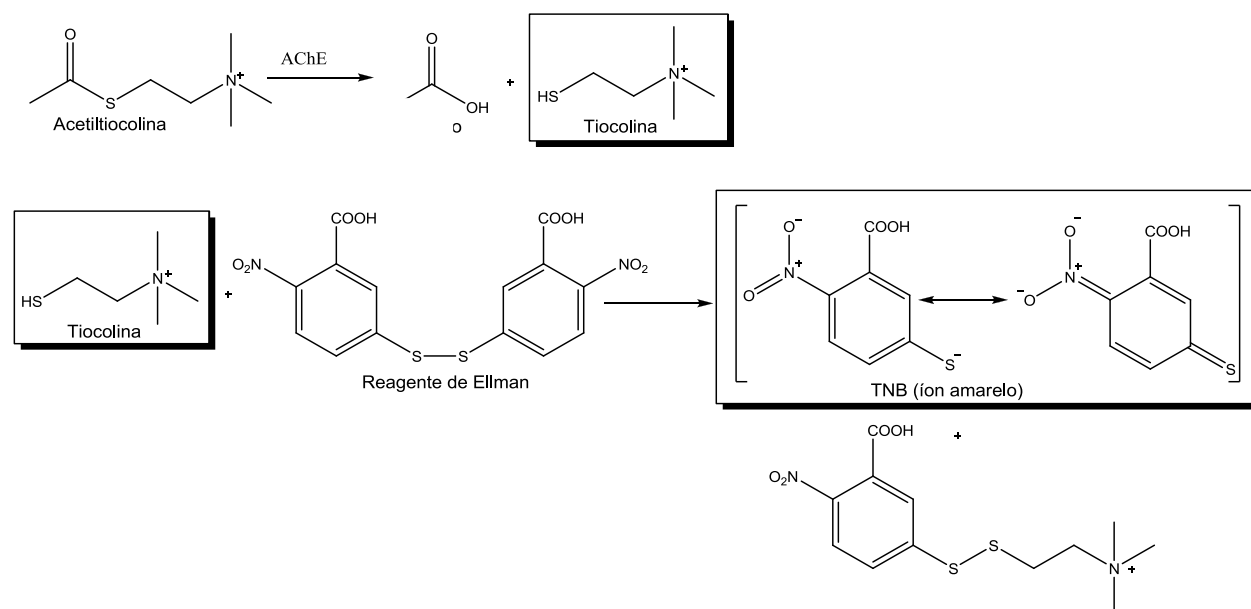
Após a secagem do solvente na placa, borrifou-se uma solução 1:1 de ácido 5,5'-ditiobis-[ácido 2-nitrobenzoico] (Reagente de Ellman ou DTNB) e iodeto de acetiltiocolina (ACTI). Em seguida, a placa foi borrifada com a enzima acetilcolinesterase (3 U/mL) em tampão Tris/HCl contendo albumina sérica bovina. A presença de halos brancos, após 10 min, em meio ao fundo amarelo indicou a

inibição da enzima acetilcolinesterase. Usou-se como padrões a cafeína (teste qualitativo) e eserina (teste quantitativo) (Figura 54).



**Figura 54:** Estrutura química da cafeína (I) e eserina (II).

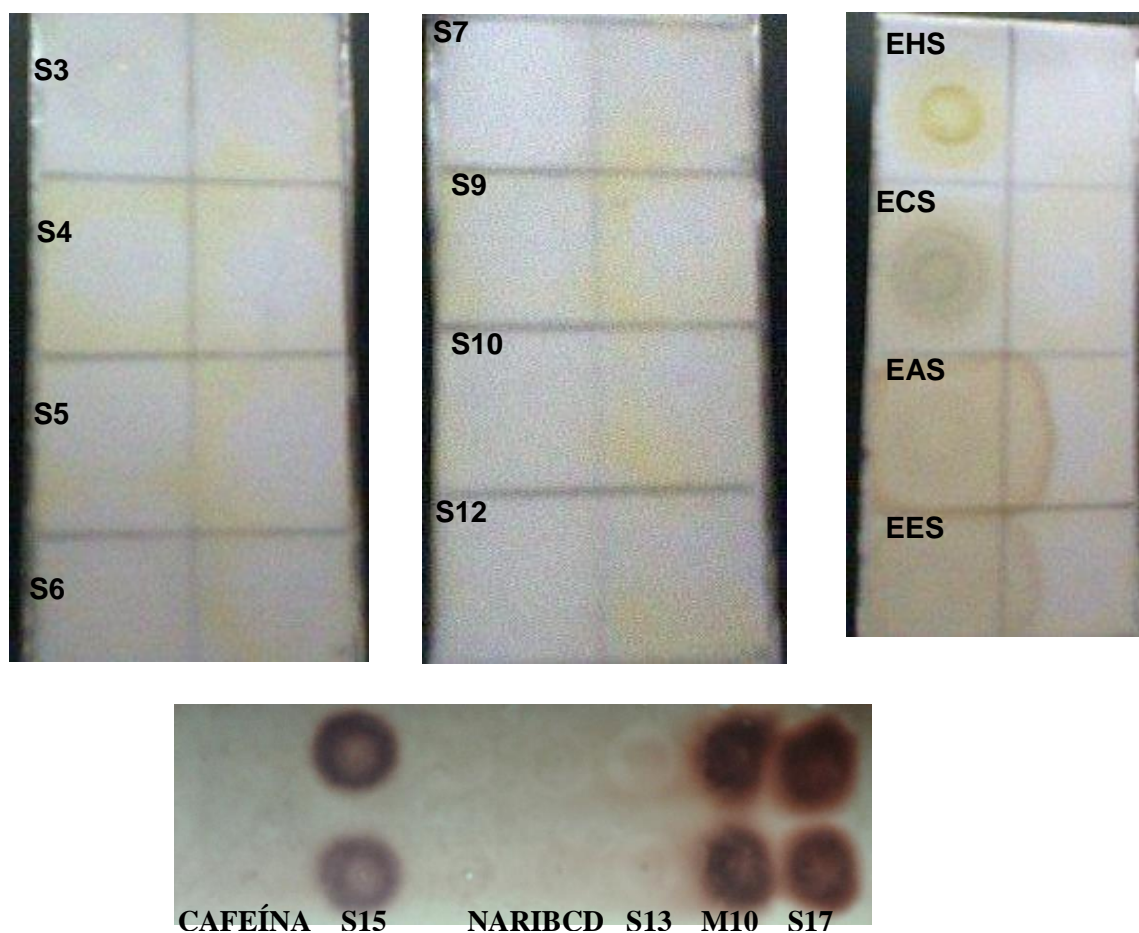
Pelo método, a acetiltiocolina é hidrolisada pela AChE e a tiocolina produzida reage com o DTNB, levando a formação do ânion ácido 2-nitro-5-tiobenzoico (TNB), que apresenta coloração amarela (Figura 55). Assim, na região da cromatoplaça em que se encontra um composto capaz de inibir a AChE é observado um halo branco devido a não formação de TNB.



**Figura 55:** Reação ocorrida no teste pelo método de Ellman (Figura adaptada de Ellman et al., 1961).

### 6.4.3 - Resultado do teste de inibição da AChE qualitativo

Na região da cromatoplaça em que se encontra um composto capaz de inibir a AChE é observado um halo branco, devido a não formação de TNB, portanto observa-se que os compostos **S3**, **S4**, **S5**, **S6**, **S7**, **S9**, **S10**, **S12** e **S13** apresentaram atividade (Figura 56), sendo apropriado o teste quantitativo para a confirmação desse resultado.



**Figura 56:** Bioautograma das amostras testadas (esquerda) e da cafeína, padrão utilizado no teste (Fotos: Bibiane L. G. Matildes e Amanda C. S. Coelho).

De acordo com Barbosa Filho e colaboradores (2006), a maioria dos inibidores é conhecida por conter átomo de nitrogênio na sua estrutura. Apesar das substâncias que apresentaram halo de inibição não conterem este elemento, podem mesmo assim, apresentar atividade frente à enzima acetilcolinesterase.

#### 6.4.4 - Metodologia do teste de inibição da AChE quantitativo

O teste foi realizado no Laboratório Biotecnologia e Bioensaios, no Departamento de Química da Universidade Federal de Minas Gerais, sob a coordenação da Professora Dr<sup>a</sup> Jacqueline Aparecida Takahashi.

Foram adicionados 25  $\mu$ L da solução das amostras a serem testadas solubilizadas em DMSO (10 mg/mL) aos poços da placa de Elisa (Figura 57) e os controles negativo e positivo. Nos cinco primeiros poços da coluna do controle positivo, adicionaram-se 25  $\mu$ L da solução de eserina (10 mg/mL em tampão Tris/HCl, pH 8,0). Adicionaram-se, a cada poço, 25  $\mu$ L de solução de Iodeto de Acetilcolina (ATCI), 125  $\mu$ L da solução de DTNB e 5  $\mu$ L de Tris/HCl com albumina sérica bovina. A absorbância foi medida a 405 nm a cada 1 min por 8 vezes (8 min no total). Adicionaram-se 25  $\mu$ L da solução de AChE (0,222 U/mL) em Tris/HCl ao poço. Mediu-se a absorbância novamente a 405 nm por 10 vezes (10 min no total) (ELLMAN et al., 1961).



**Figura 57:** Leitora de placa de Elisa e placas com amostras.

Realizou o teste quantitativo com as substâncias de *Maytenus imbricata* **M1**, **M2**, **M3**, **M4** e **M10** e de *Salacia crassifolia* foram testados os extratos: **EHS**, **ECS**, **EAS** e **EES**, as substâncias **S3**, **S4**, **S5**, **S6**, **S7**, **S9**, **S10**, **S11**, **S12**, **S13**, **S15**, **S17** e o complexo **NARIBCD**.

#### 6.4.5 - Resultado do teste de inibição da AChE quantitativo

O ensaio quantitativo da atividade inibitória da enzima AChE dos extratos e substâncias foi realizado em placa de Elisa e como padrão foi usada a eserina (Figura 54, p. 125). O resultado da porcentagem média de inibição da enzima AChE, desvio padrão e coeficiente de variação se encontram na Tabela 49.

**Tabela 49:** Resultados do teste de inibição da enzima AChE em placa de Elisa

Amostras	% média inibição	Desvio padrão	Coeficiente de Variação	Amostras	% média inibição	Desvio padrão	Coeficiente de Variação
<b>M1</b>	79,11	6,07	0,08	<b>S5</b>	93,33	1,79	0,02
<b>M2</b>	83,22	5,80	0,07	<b>S6</b>	93,60	1,98	0,02
<b>M6</b>	78,25	7,35	0,09	<b>S7</b>	90,00	1,51	0,02
<b>M8 = S9</b>	71,17	8,39	0,11	<b>S10</b>	98,49	0,19	0,01
<b>M10</b>	63,38	2,34	0,04	<b>S11</b>	82,40	7,39	0,09
<b>EHS</b>	61,40	6,72	0,11	<b>S12</b>	90,59	3,76	0,04
<b>ECS</b>	97,93	5,63	0,06	<b>S13</b>	0,00	0,00	0,00
<b>EAS</b>	96,92	2,37	0,02	<b>S15</b>	50,00	0,00	0,00
<b>EES</b>	90,66	4,06	0,04	<b>S17</b>	60,94	2,08	0,03
<b>S3</b>	94,90	1,47	0,02	<b>NARIBCD</b>	54,08	1,34	0,02
<b>S4</b>	89,77	4,19	0,05	<b>Eserina (padrão)</b>	93,94	2,10	0,02

Observa-se na Tabela 49 que os extratos **ECS**, **EAS**, **EES** e as substâncias **M2**, **S3**, **S4**, **S5**, **S6**, **S7**, **S10**, **S11** e **S12** apresentaram alta atividade inibitória da acetilcolinesterase em comparação com o padrão, a eserina, sendo que **ECS**, **EAS**, **S3** e **S10** apresentaram ainda uma porcentagem de inibição maior que a eserina.

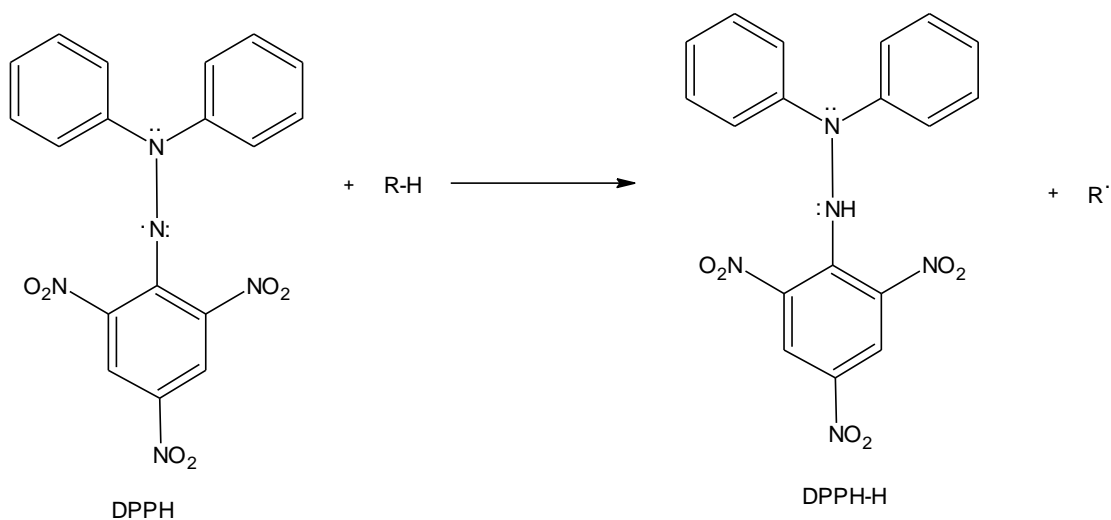
O complexo **NARIBCD** apresentou atividade um pouco maior que a **naringenina (S15)**, conferindo mais uma vantagem da inclusão de compostos, além do aumento da solubilidade.

As substâncias **M1**, **M6** e **M8** do extrato hexano/éter etílico de *M. imbricata*, apresentaram atividade anticolinesterásica no teste qualitativo e quantitativo. Estes resultados apresentam perspectivas para a realização de testes mais precisos para comprovar a atividade desta substância frente à doença de Alzheimer.

## 6.5 - Bioensaio para determinação da atividade antioxidante

### 6.5.1 - Introdução

O radical estável 2,2-difenil-1-picrilhidrazila (DPPH) tem sido muito usado para avaliar a capacidade de antioxidantes naturais em sequestrar radicais livres. Por ação de um antioxidante ou uma espécie radicalar, o DPPH (Figura 58), de coloração púrpura e que absorve em um comprimento de onda de 517 nm, é reduzido formando 2,2-difenilpicrilhidrazina (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 58:** Estrutura do DPPH antes e depois da reação com o antioxidante.

Foram submetidos ao teste antioxidante os extratos polares de *M. Imbricata*: **FSEAT**, **SEM** e o flavonoide **M10**. De *S. crassifolia* foram testados os extratos **EAS**, **EES**, os flavonoides **S15** e **S17**.

### 6.5.2 - Metodologia do teste antioxidante

O teste foi realizado no Laboratório de Químico e Bioprospecção de Plantas do Cerrado, no Departamento de Química da Universidade Federal de Minas Gerais, sob a coordenação da Professora Dr<sup>a</sup> Lúcia Pinheiro Santos Pimenta e o aluno Samuel Fávero.

A solução foi preparada diluindo 1,0 mg da amostra (extrato ou substância isolada) em 1,0 mL de metanol grau HPLC. A partir dessa solução foram realizadas microdiluições de forma a obter outras soluções de concentrações diferentes: 1000,0, 500,0, 250,0, 125,0, 62,5 e 31,2 µg/mL.

Foram adicionados 250 µL de solução metanólica de DPPH (0,004% p/v) e 10 µL de solução da amostra, em diferentes concentrações, em placas de 96 poços. Foram testadas 6 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, 2,6-di-terc-butil-4-metilfenol (BHT) e vitamina E (Vit-E), como controles positivos. Para o preparo do branco não houve adição da amostra e o metanol foi utilizado para correção da linha de base. O percentual de decréscimo na absorvância foi medido para cada concentração e a capacidade de sequestrar radicais livres foi calculada com base no decréscimo da absorvância 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: % inibição =  $(A_{DPPH} - A_{EXTR})/A_{DPPH} * 100$ . Onde,  $A_{DPPH}$  é a absorvância da solução de DPPH e  $A_{EXTR}$  é a absorvância da amostra em solução, calculado pela diferença com seu branco ( $A_{EXTR} = A_{Amostra} - A_{Branco}$ ) (SINGH et al., 2002).

A partir dos valores de porcentagem de inibição de radicais livres das seis concentrações de cada amostra ou padrão testado, determinou-se a  $CI_{50}$ , ou seja, a concentração da amostra que causa 50% de inibição da concentração inicial de DPPH. Os valores de  $CI_{50}$  foram obtidos por regressão não linear utilizando o programa GraphPad Prism® (CHEN et al., 2013).



### 6.5.3 - Resultado do teste antioxidante

Os resultados do teste antioxidante das amostras de *M. imbricata* estão apresentados na Tabela 50 e das amostras de *S. crassifolia* na Tabela 51.

**Tabela 50:** Porcentagem de inibição de radicais livres em diferentes concentrações e  $Cl_{50}$  de amostras de *M. imbricata*

Concentração ( $\mu\text{g/mL}$ )	FSEAT %	SEM %	M10 %	Vit-E %	Ácido gálico %	BHT %
31,2	14,7	5,3	50,8	2,2	51,1	31,4
62,5	20,1	13,3	52,1	20,4	97,1	23,4
125,0	31,4	33,4	77,6	37,4	97,4	32,7
250,0	35,2	47,5	90,6	92,2	97,7	57,1
500,0	42,2	84,5	90,7	97,5	96,5	84,3
1000,0	85,9	95,9	90,8	97,8	98,0	90,5
<b><math>Cl_{50}</math> (<math>\mu\text{g/mL}</math>)</b>	<b>NC</b>	<b>273,6</b>	<b>111,1</b>	<b>147,4</b>	<b>28,9</b>	<b>260,3</b>

\*NC = não conclusivo

O flavonoide, 4'-O-metilepigalocatequina (**M10**), isolado dos extratos **FSEAT** e **SEM** de *M. imbricata* apresenta atividade antioxidante, com concentração inibitória mínima de 50% de DPPH ( $Cl_{50}$ ) de 111,1  $\mu\text{g/mL}$ , sendo melhor que para **Vit-E** ( $Cl_{50}$  147,4  $\mu\text{g/mL}$ ) e **BHT** ( $Cl_{50}$  260,3  $\mu\text{g/mL}$ ).

**Tabela 51:** Porcentagem de inibição de radicais livres em diferentes concentrações e  $Cl_{50}$  de amostras de *S. crassifolia*

Concentração ( $\mu\text{g/mL}$ )	EAS %	EES %	S15 %	S17 %	Vit-E %	Ácido gálico %	BHT %
31,25	19,4	51,8	0,2	2,0	2,2	51,1	31,4
62,50	38,6	52,1	1,5	3,7	20,4	97,1	23,4
125,00	51,5	77,6	2,7	5,2	37,4	97,4	32,7
250,00	91,5	90,6	21,1	87,1	92,2	97,7	57,1
500,00	96,8	90,7	88,3	87,9	97,5	96,5	84,3
1000,00	97,5	90,8	89,9	87,2	97,8	98,0	90,5
<b><math>Cl_{50}</math> (<math>\mu\text{g/mL}</math>)</b>	<b>136,8</b>	<b>115,0</b>	<b>296,5</b>	<b>166,0</b>	<b>147,4</b>	<b>28,9</b>	<b>260,3</b>

Os extratos acetato etílico (**EAS**) e etanólico (**EES**) de *S. crassifolia* apresentam inibição de oxidação do radical com  $CI_{50}$  de 136,8  $\mu\text{g/mL}$  e 115,0  $\mu\text{g/mL}$ , respectivamente, sendo melhores antioxidantes que os padrões **Vit-E** e **BHT**.

O flavonoide, **epicatequina (S17)**, isolado dos extratos **EAS** e **EES** apresentou-se como um ótimo antioxidante com  $CI_{50}$  de 166,0  $\mu\text{g/mL}$ , sendo melhor que para o **BHT**.

Os flavonoides possuem estrutura química ideal para o sequestro de radicais livres, uma vez que apresentam grupos fenólicos. Os extratos testados apresentam estes compostos em sua constituição, e isto pode justificar a atividade antioxidante encontrada.

## 6.6 - Atividade antinociceptiva

Os extratos **FSEH**, **FSEAT** e **SEM** e também a tingenona (**M2**), composto isolado de **FSEH** de *M. imbricata*, induziram atividade antinociceptiva *in vivo*. Este resultado indica que *M. imbricata* é uma fonte útil para o isolamento de compostos a serem utilizados no tratamento de doenças inflamatórias dolorosas. Os experimentos de atividade antinociceptiva utilizando os extratos e a tingenona de *M. imbricata*, foram realizados por Clarice de Carvalho Veloso e constam da sua tese de doutorado intitulada “Avaliação farmacológica de extratos de *Maytenus imbricata* Mart. ex. Reissek em modelos de inflamação, dor e obesidade”, sob a orientação da Profa. Dra. Andrea de Castro Perez e coorientação da Profa. Dra. Adaliene Versiani e Matos Ferreira e do Prof. Dr. Andre Klein, do Laboratório de Dor e Analgesia, no Departamento de Farmacologia, ICB/UFMG.

O detalhamento dos testes de atividade antinociceptiva com extratos e substâncias de *M. imbricata*, e a respectiva análise e discussão encontram-se descritos em Veloso (2014) e Veloso e colaboradores (2014a, 2014b, 2015).

Para exemplificar, um dos testes realizados com a **tingenona** (M2) foi o método da retirada de pata, no qual a prostaglandina (PGE<sub>2</sub>) é utilizada como referencial para causar hiperalgesia. Este composto é um ácido graxo natural, de cadeia longa, produzido pela maior parte das células do organismo humano, sendo que algumas classes de prostaglandinas participam da indução de febre, inflamação e aumento na sensação de dor, como resposta de defesa do organismo.

Vários fármacos, que atuam na diminuição da concentração ou produção da prostaglandina, são utilizados para aliviar dores intensas, tais como alguns membros da classe dos opioides. Por outro lado, estes compostos provocam efeitos colaterais indesejáveis, como dependência física, náusea, tolerância e depressão respiratória. A busca por compostos que não apresentem tais efeitos colaterais vem estimulando o desenvolvimento de testes com produtos naturais, sendo eles, extratos e metabólitos secundários isolados, que atuam na diminuição da produção da prostaglandina, reduzindo conseqüentemente, inflamações dolorosas, com menor índice de efeitos colaterais.

Em resumo, por meio do método do teste de retirada de pata de camundongos é possível medir o limiar nociceptivo causado por estímulo mecânico,

através do aumento da compressão da pata do animal que encontra-se inserida na parte compressora de um aparelho algésimétrico.

A intensidade de compressão do aparelho, expressa em gramas (g) vai sendo aumentada a taxa de 16 g/s, com limite de 160,0 g para não causar lesão na pata dos camundongos. Ao observar a resposta nociceptiva do animal, ou seja, o reflexo da retirada da pata, o experimentador interrompe a pressão aplicada e o aparelho indica o último valor, que corresponde ao limiar nociceptivo. A medição é feita em triplicata, com intervalo mínimo de 10 segundos e o resultado final é expresso como sendo a média dessas medidas (VELOSO, 2014). Neste teste, a PGE<sub>2</sub> (2 µg, 20 µL) foi administrada por via intraplantar na pata posterior direita dos camundongos, *Swiss* machos com peso corpóreo variando entre 30 a 35 g.

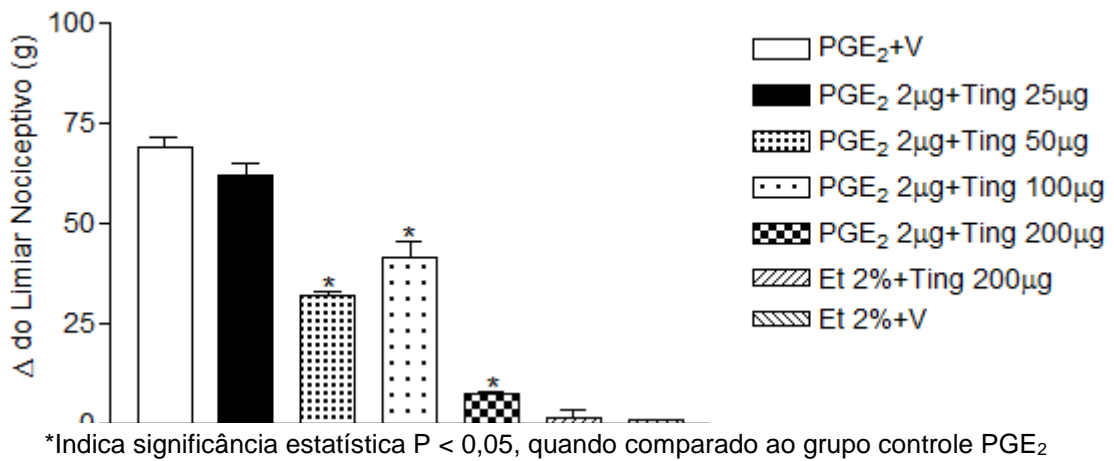
Após a indução de hiperalgesia, observada três horas após a aplicação da PGE<sub>2</sub>, foram administradas diferentes concentrações de tingenona dissolvida em DMSO 20,0 % + Tween 20 1,0 % em salina (VELOSO, 2014; VELOSO et al., 2014b).

A tingenona na dose de 200 µg/pata, apresentou efeito antinociceptivo, dez minutos após a aplicação quando comparado ao grupo controle. Esse grupo controle constitui o máximo de nocicepção, por possuir apenas prostaglandina e veículo (PGE<sub>2</sub> + V), portanto chamado de pico hiperalgésico. De acordo com Veloso (2014) os resultados encontrados para a tingenona, isolada de *M. imbricata*, foi considerado como ótimo e promissor.

As outras doses de tingenona (100 e 50 µg/pata), induziram efeito antinociceptivo parcial e, na dose de 25 µg/pata não foi detectado efeito antinociceptivo. Esses resultados estão graficamente representados na Figura 59 (p. 135), que foi construído em termos de massa de compressão realizada sobre a pata, sendo que, quanto maior o valor da coluna mais intenso é o efeito antinociceptivo induzido pela tingenona. O valor aproximado encontrado para cada coluna é estabelecido através da diferença entre a massa máxima suportável pelo camundongo (variável de 120 a 130 g) e a massa que este suportou durante o experimento.

Os grupos controles foram utilizados para comprovar que os solventes não causam hiperalgesia, e sim, a prostaglandina (o veículo utilizado para PGE<sub>2</sub> foi etanol 2%) + V (veículo de tingenona) e que o veículo usado para solubilizar a

tingenona não provoca nocicepção (etanol 2% + Tingenona 200 µg/pata). Os controles foram injetados isoladamente (VELOSO, 2014; VELOSO et al., 2014b).



**Figura 59:** Curva dose-resposta da antinocicepção induzida pela administração intraplantar de diferentes doses de tingenona sobre a hiperalgesia induzida por PGE<sub>2</sub>. Fonte: VELOSO (2014).

## 7 - CONCLUSÃO

Neste trabalho foram realizados o estudo fitoquímico do extrato hexânico, clorofórmico, acetato etílico e etanólico de folhas de *Salacia crassifolia* (Celastraceae), coletadas em Montes Claros, e o estudo fitoquímico do extrato acetato etílico de raízes de *Maytenus imbricata*, além da avaliação do potencial quanto a atividades biológicas, de inibição da acetilcolinesterase e antioxidante dos extratos e de constituintes, incluindo aqueles constituintes previamente isolados durante o trabalho de mestrado.

O estudo fitoquímico de *S. crassifolia* resultou no isolamento e caracterização de dez triterpenos pentacíclicos,  $3\beta$ -palmitiloxi-urs-12-eno, 3-oxofriedelano,  $3\beta$ -hidroxifriedelano, mistura de  $\alpha$ -amirina e  $\beta$ -amirina, 3-oxo-28-hidroxifriedelano, 3-oxo-29-hidroxifriedelano, ácido 3,4-seco-friedelan-3-oico,  $3\beta$ -hidroxi-olean-9(11):12-dieno e 28,29-di-hidroxifriedelan-3-ona, também isolaram-se três flavonoides, naringenina, epicatequina, epigalocatequina, dois esteroides  $\beta$ -sitosterol e 3-O- $\beta$ -D-glicosil- $\beta$ -sitosterol, além de outros cinco compostos, sendo eles, o esqualeno, guta-percha, *o*-ftalato de bis(2-etilexila), ácido *p*-hidroxibenzoico e  $\epsilon$ -caprolactama. Do extrato acetato etílico de *M. imbricata* obteve-se o flavonoide 4'-O-metilepigalocatequina. Todos compostos foram isolados pela primeira vez na espécie *S. crassifolia* e alguns são inéditos no gênero ou família. Os constituintes foram identificados por métodos espectroscópicos (IV e RMN de  $^1\text{H}$  e de  $^{13}\text{C}$ ) e espectrometria de massas.

Das doze substâncias utilizadas para formação de composto de inclusão, apenas naringenina obteve resultado satisfatório. Este composto foi devidamente caracterizado por ROESY e submetido a testes de atividade biológica.

As atividades biológicas testadas para os extratos e para as substâncias isoladas foram: amebicida, giardicida, tricomonocida, antibacteriana, antifúngica, capacidade inibitória da enzima acetilcolinesterase (teste qualitativo e quantitativo), atividade antioxidante e antinociceptiva.

No teste antiparasitário foram testados da *Maytenus imbricata*: os extratos hexano/éter etílico (SEH, FSEH), acetato etílico (SEAT, FSEAT) e metanólico (SEM) e as substâncias isoladas a partir de FSEH:  $11\alpha$ -hidroxilup-20(29)-en-3-ona, tingenona, 3,7-dioxofriedelano, 3-oxo-29-hidroxifriedelano,  $3\beta,11\alpha$ -di-hidroxilup-

20(29)-eno e obtidas a partir dos extratos FSEAT e SEM, 4'-O-metilepigalocatequina.

O teste antiparasitário foi realizado com todos os extratos e substâncias isoladas de *S. crassifolia* e *M. imbricata*. Dentre as amostras testadas, SEH e a tingenona, isolada desse extrato, apresentaram respectivamente,  $CI_{50}$  de 19,19  $\mu\text{g/mL}$  e 1,71  $\mu\text{g/mL}$  contra *Entamoeba histolytica*, 0,53  $\mu\text{g/mL}$  e 0,23  $\mu\text{g/mL}$  contra *Giardia lamblia*, 1,09 e 0,18  $\mu\text{g/mL}$  contra *Trichomonas vaginalis*, além de SEH apresentar  $CI_{50}$  de 1,57  $\mu\text{g/mL}$  para *T. vaginalis* resistente. Estas amostras apresentaram alta atividade, com valores de  $CI_{50}$  próximos a do metronidazol (padrão), podendo ser promissores antiparasitários.

Os extratos obtidos de *S. crassifolia* apresentaram alta atividade antibacteriana e antifúngica, principalmente sobre *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus* e *Streptococcus sanguinis*. O ácido 3,4-seco-friedelan-3-oico e  $3\beta$ -hidroxi-olean-9(11):12-dieno também apresentaram atividade antimicrobiana sobre todas bactérias e fungo testados.

Foi realizado o teste qualitativo e quantitativo da atividade inibitória da enzima acetilcolinesterase com os extratos e substâncias isoladas de *S. crassifolia*, com as substâncias isoladas de *M. imbricata* e com o complexo NARIBCD. A maioria das amostras apresentou alta porcentagem de inibição, sendo que as amostras mais promissoras foram os extratos clorofórmico (97,93%) e acetato etílico (96,92%) e as substâncias  $3\beta$ -palmitiloxi-urs-12-eno (94,90%) e ácido 3,4-seco-friedelan-3-oico (98,49%) apresentaram uma porcentagem de inibição maior que o padrão empregado (93,94%).

Os extratos acetato etílico e etanólico de *S. crassifolia* e acetato etílico e metanólico de *M. imbricata*, e os flavonoides, naringenina, epicatequina e 4'-O-metilepigalocatequina apresentam alta atividade antioxidante por inibir radicais livres em porcentagens elevadas.

Os extratos hexânico, acetato etílico e metanólico de *M. imbricata* e a tingenona apresentam atividade antinociceptiva *in vivo* testados em camundongos.

Este trabalho complementa o estudo fitoquímico da espécie *M. imbricata* e apresenta resultados novos da espécie *Salacia crassifolia*. Tanto os resultados fitoquímicos quanto os dos testes biológicos justificam a importância dos estudos em espécies da família Celastraceae.

## 8 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Aché Laboratórios Farmacêuticos S.A -

<http://www.ache.com.br/PressRoom/News.aspx?NewsId=156>. Acesso: 28/04/2015.

Agrawal, P. K., Carbon-13 NMR of Flavonoids, 1 Ed. Elsevier, New York, 1989, 564p.

Aist, Spectral Database for Organic Compounds – SDBS: [http://riodb01.ibase.aist.go.jp/sdbs/cgi-bin/direct\\_frame\\_top.cgi](http://riodb01.ibase.aist.go.jp/sdbs/cgi-bin/direct_frame_top.cgi). In Aist: Tokyo, Japan.

Alves, I. A.; Camargo, F. P.; Goulart, L. S.. Identificação por PCR e sensibilidade a antifúngicos de isolados clínicos vaginais de *Candida* sp. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, **43** (5), p. 575-579, 2010.

Amaral, F. M. M.; Ribeiro, M. N. S.; Barbosa-Filho, J. M.; Reis, A. S.; Nascimento, F. R. F.; Macedo, R. O. Plants and chemical constituents with giardicidal activity. *Rev. Bras. Farmacogn.*, **16**, p. 696-720, 2006.

Andrade, C. A.; Carvalho, J. L. S.; Cunico, M. M.; Lordello, A. L. L.; Higaskino, C. E. K.; Almeida, S. C. C.; Dias, J. F. G.; Kerber, V. A.; Miguel, M. D.; Miguel, O. G. Antioxidant and antibacterial activity of extracts, fractions and isolated substances from the flowers of *Acacia podalyriifolia* A. Cunn. ex G. Don. *Braz. J. Pharm. Sci.*, **46** (4), p. 715-721, 2010.

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

Barbosa Filho, J. M.; Medeiros, K. C. P.; Diniz, M. F. F. M.; Batista, L. M.; Athayde Filho, P. F.; Silva, M. S.; Da Cunha, E. V. L.; Almeida, J. R. G. S.; Quintans Junior, L.



J.. Natural products inhibitors of the enzyme acetylcholinesterase. *Rev. Bras. Farmacogn.*, **16** (2), p. 258-285, 2006.

Batista, C. R. A.; Fonseca, T. H. S.; Rodrigues, V. G.; Sousa, G. F.; Chacon, M. O.; Vieira Filho, S. A.; Duarte, L. P.; Gomes, M. A.. Trichomonocidal activity of *Maytenus imbricata* (Celastraceae). *Afr. J. Pharm. Pharmacol.*, **8** (19), p. 502-506, 2014.

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. *Pharm. Biol.*, **47** (1), p. 44-52, 2009.

Braga Filho, J. R.; Veloso, V. R. S.; Naves, R. V.; Ferreira, G. A.. Entomofauna associada aos frutos do bacupari, *Salacia crassifolia* (MART.) Peyr, nos cerrados do Brasil Central. *Pesq. Agropec. Trop.*, **31** (1), p. 47-54, 2001.

Burbano, E.; Sierra, S.; Torres, K.; Mercado, M.; Carrascal, A.; Poutou, R.. Rapid DNA extraction and PCR validation for direct detection of *Listeria monocytogenes* in raw milk. *Rev. MVZ Córdoba*, **11** (1), p. 715-724, 2006.

Cabral, I. S. R.; Oldoni, T. L. C.; Prado, A.; Bezerra, R. M. N.; De Alencar, S. M.. Composição fenólica, atividade antibacteriana e antioxidante da própolis vermelha brasileira. *Quim. Nova*, **32** (6), p. 1523-1527, 2009.

Carneiro, C. C.; Silva, C. R.; Menezes, A. C. S.; Pérez, C. N.; Chen-Chen, L. Assessment of genotoxic, cytotoxic, and protective effects of *Salacia crassifolia* (Mart. Ex. Schult.) G. Don. stem bark fractions in mice. *Genet. Mol. Res.*, **12** (3), p. 2167-2177, 2013.

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

Carvalho, P. R. F.; Silva, D. H. S.; Bolzani, V. S.; Furlan, M.. Antioxidant quinonemethide triterpenes from *Salacia campestris*. *Chem. Biodiv.*, **2** (3), p. 367-372, 2005.

Carvalho, R. B. F.; Almeida, A. A. C.; Freitas, R. M.; Lima, L. S.; David, J. P.; David, J. M.; Feitosa, C. M. Composição química e atividade anticolinesterásica de uma fração ativa do extrato de folhas de *Citrus limon* (L.) Burm. *Quim. Nova*, **36** (9), p. 1375-1379, 2013.

Carvalho-Okano, R. M. Estudos taxonômicos do gênero *Maytenus* Mol. Emend. Mol (Celastraceae) do Brasil Extra Amazônico. Tese de Doutorado. Instituto de Biologia. Universidade Estadual de Campinas. Campinas, São Paulo. 522p. 1992.

Chen, Z.; Bertin, R.; Frolidi, G. EC<sub>50</sub> estimation of antioxidant activity in DPPH assay using several statistical programs. *Food Chem.*, **138**, p. 414-420, 2013.

Corrêa, M. P.. *Dicionário das plantas úteis do Brasil*. 1ª Ed. Imprensa Nacional. Rio de Janeiro, 1984. In: Theodoro, P. N. E. T. Atividade *in vitro* de plantas da medicina tradicional do cerrado em dermatófitos e leveduras. Dissertação de Mestrado. Departamento de Química. Universidade de Brasília, UnB. 2009.

Cunha-Filho, M. S. S.; Sá-Barreto, L. C. L. Utilização de ciclodextrinas na formação de complexos de inclusão de interesse farmacêutico. *Rev. Ciênc. Farm. Básica Apl.*, **28** (1), p.1-9, 2007.

Dalmora, M. E.; Dalmora, S. L.; Oliveira, A. G. Inclusion complex of piroxicam with  $\beta$ -cyclodextrin and incorporation in cationic microemulsion. In vitro drug release and in vivo topical anti-inflammatory effect. *Int. J. Pharm.*, **222**, p. 45-55, 2001.

David, J. M.; Santos, F. A.; Guedes, M. L. S.; David, J. P. Flavonóide e triterpenos de *Stigmaphyllon paralias*. *Quim. Nova*, **26** (4), p. 484-487, 2003.

De la Torre, A. F.; Lima, C. N.; Carballo, C. R.; Palacios, J. R.; Chamizo, E. N.; Ramada, R. M.; Cruz, A. U. Estudio Fitoquímico preliminar y actividad fungicida de corteza de *Maytenus urquiolae* mory (Celastraceae). *Fitosanidad*, **14** (4), p. 247-252, 2010.

De Lima, O. G.; Coelho, J. S. B.; Maciel, G. M.; Heringer, E. P.; De Lima, C. G.. Substâncias antimicrobianas de plantas superiores. Comunicação XXXIX. Identificação de pristimerina como um componente ativo do “Bacupari” do Araguaia, *Salacia crassifolia* (Mart.) G. Don. (Hippocrateaceae). *Rev. Inst. Antib.*, Recife, **12** (1/2), 1972.

De-Eknamkul, W.; Potduang, B. Biosynthesis of  $\beta$ -sitosterol and stigmasterol in *Croton sublyratus* proceeds via a mixed origin of isoprene units. *Phytochemistry*, **62**, p. 389-398, 2003.

Dhanabalasingham, B.; Karunaratne, V. Tezuka, Y.; Kikuchi, T. Gunatilaka, A. A. L.. Biogenetically important quinonemethides and other triterpenoid constituents of *Salacia reticulata*. *Phytochemistry*, **42** (5), p. 1377-1385, 1996.

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

Dong, L.; Liu, M.; Chen, A.; Wang, Y.; Sun, D. Solubilities of quercetin in three  $\beta$ -cyclodextrin derivative solutions at different temperatures. *J. Mol. Liq.*, **177**, p. 204-208, 2013.

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

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

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

Eskandari, R.; Jayakanthan, K.; Kuntz, D. A.; Rose, D. R.; Mario Pinto, B.. Synthesis of a biologically active isomer of kotalanol, a naturally occurring glucosidase inhibitor. *Bioorg. Med. Chem.*, **18**, p. 2829-2835, 2010.

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). *Rev. Bras. Farmacogn.*, **19** (1B), p. 299-303, 2009.

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

Falamas, A.; Cinta Pinzaru, S.; Dehelean, C. A.; Peev, C. I.; Soica, C. Betulin and its natural resource as potential anticancer drug candidate seen by FT-Raman and FT-IR spectroscopy. *J. Raman Spectros.*, **42** (1), p. 97-107, 2011.

Fernandes, E. S.; Passos, G. F.; Medeiros, R.; Cunha, F. M.; Ferreira, J.; Campos, M. M.; Pianowski, L. F.; Calixto, J. B.. Anti-inflammatory effects of compounds alpha-humulene and (-)-*trans*-caryophyllene isolated from the essential oil of *Cordia verbenaceae*. *Eur. J. Pharmacol.*, **569** (3), p. 228–236, 2007. In: Oliveira, M. A.; Barreto, A. A. O.; Quintans Júnior, L. J.; Guimarães, A. G. Aplicação de terpenos como agentes analgésicos: uma prospecção tecnológica. *Revista GEINTEC*, **4** (4), p. 1292-1298, 2014.

Ferreira, C. F.; Andrade, C. F. S. Alguns aspectos socioeconômicos relacionados a parasitoses intestinais e avaliação de uma intervenção educativa em escolares de Estiva Gerbi, SP. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, **38** (5), p. 402-405, 2005.

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

Figueiredo, J. N.; Ráz, B.; Séquin, U.. Novel quinone methides from *Salacia kraussi* with *in vitro* antimalarial activity. *J. Nat. Prod.*, **61**, p. 718-723, 1998.

Fonseca, T. H. S. Avaliação *in vitro* do potencial amebicida de extratos brutos e triterpenos obtidos a partir de *Maytenus gonoclada* (Celastraceae), sobre *Entamoeba histolytica*. Belo Horizonte, Instituto De Ciências Biológicas, UFMG, Dissertação de Mestrado, 2012, 97p.

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

Hisham, A.; Kumar, G. J.; Fujimoto, Y.; Hara, N. Salacianone and salacianol, two triterpenes from *Salacia beddomei*. *Phytochemistry*, **40** (4), p. 1227-1231, 1995a.

Hisham, A.; Kumar, G. J.; Fujimoto, Y.; Hara, N. 20,29-epoxysalacianone and 6 $\beta$ -hidroxisalacianone, two lupane triterpenes from *Salacia beddomei*. *Phytochemistry*, **42** (3), 789-794, 1995b.

Hisham, A.; kumar, G, J.; Fujimoto, Y,; Hara, N. 1 $\beta$ ,15 $\alpha$ -dihydroxyfriedelan-3-one, a triterpene from *Salacia beddomei*. *Phytochemistry*, **43** (4), p. 843-845, 1996.

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

Jihong, Y.; Shaozhong, L.; Jingfeng, S.; Kobayashi, M.; Akaki, J.; Yamashita, K.; Tamesada, M.; Umemura, T.. Effects of *Salacia chinensis* extract on reproductive outcome in rats. *Food Chem. Toxicol.*, **49**, p. 57-60, 2011.

Katade, S. R.; Pawar, P. V.; Tungikar, V. B.; Tambe, A. S.; Kalal, K. M.; Wakharkar, R. D.; Deshpande, N. R.. Larvicidal activity of Bis(2-ethylhexyl) Benzene-1,2-

dicarboxylate from *Sterculia guttata* Seeds Against Two Mosquito Species. *Chem. Biodivers.*, **3**, p. 49-53, 2006.

Katzung, B. G.; Masters, S. B.; Trevor, A. J., Farmacologia básica e clínica (Lange), 12 Ed. McGraw-Hill, 2013, 1242p.

Kirchmeier, M. J.; Ishida, T.; Chevrette, J.. Correlations between the rate of intracellular release of endocytosed liposomal doxorubicin and cytotoxicity as determined by a new assay. *J. Liposome Res.*, **1** (1), p.15-29, 2001.

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 2009-2010. *Emerg. Infect. Dis.*, **18** (6), p. 939-943, 2012.

Kishi, A.; Morikawa, T.; Matsuda, H.; Yoshikawa, M.. Structures of new friedelane- and norfriedelane-type triterpenes and polyacylated eudesmane-type sesquiterpene from *Salacia chinensis* Linn. (*S. prinoides* DC., Hippocrateaceae) and radical scavenging activities of principal constituents. *Chem. Farm. Bull.*, **51** (9), 1051-1055, 2003.

Kong, X.; Liu, X.; Li J.; Yang, Y.. Advances in Pharmacological Research of Eugenol. *Curr. Opin. Complement. Alternat. Med.*, **1** (1), p. 8-11, 2014.

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*. *J. Med. Food*, **14** (7/8), p. 866-869, 2011.

Loftsson T., Masson, M.. Cyclodextrins in topic drug formulations: theory and practice. *Int. J. Pharm.*, **225**, p. 15-30, 2001.

Loftsson T., *Nordic Industrial Fund – a report*, Cyclodextrins in Pharmaceutical Formulations: The effects of polymers on their complexation efficacy and drug availability, 1988.

Luo, D. Q.; Wang, H.; Tian, X.; Shao, H. J.; Liu, J. K.. Antifungal properties of pristimerin and celastrol isolated from *Celastrus hypoleucus*. *Pest Manag. Sci.*, **6**, p. 85–90, 2005.

Maciel, G. P. ; Tasca, T. ; De Carli, G. A. Aspectos clínicos, patogênese e diagnóstico de *Trichomonas vaginalis*. *J. Bras. Patol. Med. Lab.*, **40** (3), p. 152-160, 2004.

Mahato, S. B.; Kundu, A. P. <sup>13</sup>C NMR spectra of pentacyclic triterpenoids – a compilation and some salient features. *Phytochemistry*, **37** (6), p. 1517-1575, 1994.

Marston, A. Thin-layer chromatography with biological detection in phytochemistry. *J. Chromatogr. A*, **1218**, p. 2676-2683, 2011.

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

Medeiros, E. S.; Rodrigues, I. B.; Litaiff-Abreu, E.; Pinto, A. C. S.; Tadei, W. P. Larvicidal activity of clove (*Eugenia caryophyllata*) extracts and eugenol against *Aedes aegypti* and *Anopheles darlingi*. *Afr. J. Biotechnol.*, **12** (8), p. 836-840, 2013.

Mena-Rejón, G. J.; Pérez-Espadas, A. R.; Moo-Puc, R. E.; Cedillo-Rivera, R.; Bazzochi, I. L.; Jiménez-Díaz, I. A.; Quijano, L. Antigiardial activity of triterpenoids from root bark of *Hippocratea excelsa*. *J. Nat. Prod.*, **70** (5), p.863-865, 2007.

Messias, M. C. T. B.; Menegatto, M. F.; Prado, A. C. C.; Santos, B. R.; Guimarães, M. F. M. Uso popular de plantas medicinais e perfil socioeconômico dos usuários: um estudo em área urbana em Ouro Preto, MG, Brasil. *Rev. Bras. Pl. Med.*, **17** (1), p.76-104, 2015.

Metan, G.; Zarakolu, P.; Unal, S. Rapid detection of antibacterial resistance in emerging Gram-positive cocci. *J. Hosp. Infec.*, **61**, p. 93-99, 2005.

Miranda, M. L. D.; Souza, A. F.; Rodrigues, E. D.; Garcez, F. R.; Garcez, W. S.; Abot, A. Constituintes químicos das folhas de *Riedeliella graciliflora* Harms (Leguminosae). *Quim. Nova*, **35** (7), p. 1306-1311, 2012.

Miranda, R. R. S.; Silva, G. D. F.; Duarte, L.P.; Fortes, I. C. P.; Vieira Filho, S. A. Structural determination os  $3\beta$ -stearyloxy-urs-12-ene from *Maytenus salicifolia* by 1D and 2D NMR and quantitative  $^{13}\text{C}$  spectroscopy. *Magn. Reson. Chem.*, **44**, p. 127-131. 2006.

Mincis, M.; Mincis, R.; Calichman, S.. Diarréias agudas: Atualização, diagnóstica e terapêutica. *Revista Prática Hospitalar*, **55**, p. 146-150, 2008.

Morita, H.; Hirasawa, Y.; Muto, A.; Yoshida, T.; Sekita, S.; Shirotab, O.. Antimitotic quinoid triterpenes from *Maytenus chuchuhuasca*. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **18**, p.1050-1052, 2008.

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

Nguyen, T. A.; Liu, B.; Zhao, J.; Thomas, D. S.; Hook, J. M. An investigation into the supramolecular structure, solubility, stability and antioxidant activity of rutin/cyclodextrin inclusion complex. *Food Chem.*, **136**, p. 186-192, 2013.

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

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. *Quim. 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). Belo Horizonte, Departamento de Química, ICEX, UFMG, Tese de Doutorado, 2012.

Oliveira, M. A.; Barreto, A. A. O.; Quintans Júnior, L. J.; Guimarães, A. G. Aplicação de terpenos como agentes analgésicos: uma prospecção tecnológica. *Revista GEINTEC*, **4** (4), p. 1292-1298, 2014.

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

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

Paviani, E. R.; Stadnik, C. B.; Heinek, I.. Estudo da epidemiologia e perfil de sensibilidade de *Pseudomonas aeruginosa*. *Infarma*, **15** (11-12), p. 66-70, 2003.

Passos, M. R. L.; Barreto, N. A.; Varella, R. Q.; Estudo comparativo da eficácia de esquema oral, vaginal e oral e vaginal combinados para tratamento de vulvovaginites. *Revi. Bras. Med.*, **63** (3), p. 163-173, 2006.

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

Perestelo, N. R.; Jiménez, I. A.; Tokuda, H.; Hayashi, H.; Bazzocchi, I. L.. Sesquiterpenes from *Maytenus jelskii* as potential cancer chemopreventive agents. *J. Nat. Prod.*, **73**, p. 127–132, 2010.

Qian, K.; Bori, I. D.; Chen, C-H.; Huang, L.; Lee, K-H. Anti-AIDS agents 90. Novel C-28 modified bevirimat analogues as potent HIV maturation inhibitors. *J. Med. Chem.*, **55** (18), p. 8128-8136, 2012.

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. *J. Nepal Chem. Soc.*, **21**, 2006.

Raschke, T.; Rode, T.; Schonrock, U. Cosmetic and/or dermatological active ingredient combination of triterpenes and cyclodextrins. 2001. Número da patente: 2003/026603.

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

Rode, T.; Frauen, M.; Müller, B. W.; Düsing, H. J.; Schönrock, U.; Mundt, C.; Wenck, H. Complex formation of sericoside with hydrophilic cyclodextrins: improvement of solubility and skin penetration in topical emulsion based formulations. *European J. Pharm. Biopharm.* **55**, p. 191-198, 2003.

Rodrigues, K. L.; Gomes, J. P.; Conceição, R. C.; Brod, C. S.; Carvalhal, J. B.; Aleixo, J. A. G.. Condições higiênico-sanitárias no comércio ambulante de alimentos em Pelotas-RS. *Rev. Ciência e Tecnol. Alim.*, **23** (3), p. 447-452. 2003.

Rodrigues, V. G. Estudo químico e atividade biológica de raízes de *Maytenus imbricata* Mart. ex. Reissek. Belo Horizonte, Departamento de Química, ICEx, UFMG, Dissertação de Mestrado, 2011, 170p.

Rodrigues, V. G.; Duarte, L. P.; Silva, G. D. F.; Silva, F. C.; Góes, J. V.; Takahashi, J. A.; Pimenta, L. P. S.; Vieira Filho, S. A.. Evaluation of antimicrobial activity and toxic potential of extracts and triterpenes isolated from *Maytenus imbricata*. *Quim. Nova*, **35**, p. 1375-1380, 2012.

Rodríguez, O.; Sánchez, R.; Verde, M.; Núñez, M.; Ríos, R.; Chávez, A.. Obtaining the essential oil of *Syzygium aromaticum*, identification of eugenol and its effect on *Streptococcus mutans*. *J. Oral Res.*, **3** (4), p. 218-224, 2014.

Rojas, R.; Bustamante, B.; Bauer, J.; Fernandez, I.; Alban, J.; Lock, O.. Antimicrobial activity of selected Peruvian plants. *J. Ethnopharmacol.*, **88**, p. 199-204, 2003.

Saenger, W. Cyclodextrin inclusion-compounds in research and industry. *Angew. Chem. Int. Ed. Eng.*, **19**, p. 344-362, 1980.

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: <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C chemical shift assignments. *Magn. Reson. Chem.*, **38**, p. 977-980, 2000.

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

Santos-Oliveira, R.; Coulaud-Cunha, S.; Colaço, W. Revisão da *Maytenus ilicifolia* Mart. ex Reissek, Celastraceae. Contribuição ao estudo das propriedades farmacológicas. *Rev. Bras. Farmacogn.*, **19** (2B), p. 650-659, 2009.

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

Schneider, L. J. Treatment of Alzheimer's disease with cholinesterase inhibitors. *Clin. Geriatr. Med.*, **17**, p. 337-339, 2001.

Schwingel, L. Fasolo, D. Holzschuh, M. Lula, I. Sinisterra, R. Koester, L. Teixeira, H. Bassani, V. L. Association of 3-O-methylquercetin with  $\beta$ -cyclodextrin: complex preparation, characterization and ex vivo skin permeation studies. *J. Incl. Phenom. Macrocyc. I Chem.*, **62**, p.149–159, 2008.

Seña, A. C.; Miller, W. C.; Hobbs, M. M.; Schwebke, J. R.; Leone, P. A.; Swygard, H.; Atashili, J.; Cohen, M. S. *Trichomonas vaginalis* infection in male sexual partners: implications for diagnosis, treatment, and prevention. *Clin. Infect. Dis.* **44** (1), p. 12-22, 2007.

Silva, F. C.; Busatti, H. G. N. O.; Gomes, M. A.; Duarte, L. P.; Silva, G. D. F.; Vieira Filho, S. A. Antigiardial activity of the hexane extract of *Maytenus gonoclada* Mart. *Int. J. Pharm. Pharm. Sci.*, **4** (1), p. 638-639, 2012a.

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. *Rev. Bras. Farmacogn.*, **19** (2B), p. 530-536, 2009.

Silva, J. P. C.; Castilho, A. L.; Saraceni, C. H. C.; Díaz, I. E. C.; Suffredini, I. B. Anti-*Streptococcus sanguinis* activity of plants extracts. *Pharmacology online*, **3**, p. 42-49, 2012b.

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

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

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

Silverstein, R. M.; Webster, F. W.; Kiemle, D. J. Identificação Espectrométrica de Compostos Orgânicos, 7ª Edição. Rio de Janeiro, Editora: LTC-Livros Técnicos e Científicos Editora S.A., 2007.

Simmons, M. P.; Cappa, J. J.; Archer, R. H.; Ford, A. J.; Eichstedt, D.; Clevinger, C. C.. Phylogeny of the Celastreae (Celastraceae) and the relationships of *Catha edulis* (qat) inferred from morphological characters and nuclear and plastid genes. *Mol. Phylogenet. Evol.*, **48**, p. 745-757, 2008.

Singh, R. P.; Murthy, K. N. C.; Jayaprakasha, G. K. Studies on the antioxidant activity of Pomegranate (*Punica granatum*) peel and seed extracts using *in vitro* models. *J. Agric. Food Chem.*, **50**, p. 81-86, 2002.

Soica, C. M.; Dehelean, C. A.; Peev, C. I.; Coneac, G.; Gruia, A. T. Complexation with hydroxypropyl- $\gamma$ -cyclodextrin of some pentacyclic triterpenes. Characterisation of their binary products. *Farmácia*, **LVI** (2), p. 182-190, 2008.

Soica, C.; Dehelean, C.; Danciu, C.; Wang, H. M.; Wenz, G.; Ambrus, R.; Bojin, F.; Anghel, M. Betulin complex in  $\gamma$ -cyclodextrin derivatives: properties and antineoplastic activities in *in vitro* and *in vivo* tumor models. *Int. J. Mol. Sci*, **13**, p. 14992-15011, 2012.

Soma, S.; Palitha, S.; Hiromi, Y.; Keiko, N.; Francis, H.; Suehiro, N.; Kazuko, S.; Masao, H.; Tsuneo, N. *Phytotherapy research*, **4**, p. 205-206, 1990. In: Zandberg, W. F.; Mohan, S.; Kumarasamy, J.; Mario Pinto, B. Capillary zone electrophoresis method for the separation of glucosidase inhibitors in extracts of *Salacia reticulata*, a plant used in Ayurvedic treatments of type-2 diabetes. *Anal. Chem.*, **82**, p. 5323-5330, 2010.

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.

Soto, F. R. M.; Dias, G. M. A.; Fonseca, Y. S. K. Toxinfecção Alimentar por *Bacillus cereus*- Relato de caso. *Rev. Hig. Alim.*, **19** (130), p. 33-7, 2005.

Szejtli, K. Cyclodextrin complexed generic drugs are generally not bio-equivalent with the references products: therefore the increase in number of marketed

drug/cyclodextrin formulations is so slow. *J. Incl. Phenom. Macroc. Chem.*, **52** (1-2), p. 1-11, 2005. In: Cunha-Filho, M. S. S.; Sá-Barreto, L. C. L. Utilização de ciclodextrinas na formação de complexos de inclusão de interesse farmacêutico. *Rev. Ciênc. Farm. Básica Apl.*, **28** (1), p.1-9, 2007.

Theodoro, P. N. E. T. Atividade *in vitro* de plantas da medicina tradicional do cerrado em dermatófitos e leveduras. Dissertação de Mestrado. Departamento de Química. Universidade de Brasília, UnB. 2009.

Thompson, D. O.; Cyclodextrins – enabling excipients: Their present and future use in pharmaceuticals. *Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst.*, **14** (1), p. 1-104, 1997.

Torres-Romero, D.; King-Díaz, B.; Strasser, R. J.; Jiménez, I. A.; Lotina-Hennsen, B.; Bazzocchi, I. L. Friedelane Triterpenes from *Celastrus vulcanicola* as Photosynthetic Inhibitors. *J. Agric. Food Chem.*, **58** (20), p. 10847-10854, 2010.

Tran, T. M.; Nguyen, T. H. A.; Vu, D. T.; Tran, V, S. Study on chemical constituents and cytotoxic activities os *Salacia chinensis* growing in Vietnam. *J. Chem. Sci.*, **65** (10), p. 1284-1288, 2010.

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. *Quim. Nova*, **26**, p. 301-304, 2003.

Veiga, F.; Fernandes, C.; Teixeira, F. Oral availability and hypoglycaemic activity of tolbutamide/cyclodextrin inclusion complexes. *Int. J. Pharm.*, **202**, p.165-171, 2000.

Velloso, J. C R.; Khalil, N. M.; Gutierrez, V. O.; Santos, V. A. F. F. M.; Furlan, M.; Brunetti, I. L.; Oliveira, O. M. M. F. O. *Salacia campestris* root bark extract: peroxidase inhibition, antioxidant and antiradical profile. *Braz. J. Pharm. Sci.*, **45** (1), 2009.

Veloso, C. C.; Rodrigues, V. G.; Azevedo, A. O.; Oliveira, C. C.; Gomides, L. F.; Duarte, L. P.; Duarte, I. D.; Klein, A.; Perez, A. C.. Antinociceptive effects of

*Maytenus imbricata* Mart. Ex. Reissek (Celastraceae) roots extract and its tingenone constituent. *J. Med. Plants Res.*, **8** (1), p. 68-76, 2014a.

Veloso, C. C.; Rodrigues, V. G.; Ferreira, R. C. M.; Duarte, L. P.; Klein, A.; Duarte, I. D.; Romero, T. R. L.; Perez, A. C.. Tingenone, a pentacyclic triterpene, induces peripheral antinociception due to opioidergic activation. *Planta Medica*. **80**, p. 1615-1621, 2014b.

Veloso, C. C. Avaliação farmacológica de extratos de *Maytenus imbricata* Mart. Ex. Reissek em modelos de inflamação, dor e obesidade. Belo Horizonte, Instituto de Ciências Biológicas, UFMG, Tese de Doutorado, 2014, 158p.

Veloso, C. C.; Rodrigues, V. G.; Ferreira, R. C. M.; Duarte, L. P.; Klein, A.; Duarte, I. D.; Romero, T. R. L.; Perez, A. C. Tingenone, a pentacyclic triterpene, induces peripheral antinociception due to NO/cGMP and ATP-sensitive K<sup>+</sup> channels pathway activation in mice. *Eur. J. Pharmacol.*, **755**, p. 1-5, 2015.

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

Weber, J. T.; Courvalin, P. An emptying quiver: Antimicrobial drugs and resistance. *Emerg. Infect. Dis.*, **11** (6), p. 791-793, 2005.

Wiser, M. F. Entamoeba and Amebiasis. In: Protozoa and Human Disease, 1.Ed. Estados Unidos: Garland Science, 250p. 2010.

Wink, M. Medicinal Plants: A source of anti-parasitic secondary metabolites. *Molecules*, **17** (11), p. 12771-12791, 2012.

Wladimir, A. S. D. B. Efeito antinociceptivo do eugenol em um modelo de dor muscular orofacial em camundongos: participação dos receptores glutamatérgicos, TRPs e ASICs. Florianópolis, Centro de Ciências Biológicas, Tese de Doutorado, UFSC, 2012, 137p.

Wolfe, M. S. Giardiasis. *Clin. Microbiol. Rev.* **5** (1), p. 93-100, 1992.

Yang, L. J.; Ma, S. X.; Zhou, S. Y.; Chen, W.; Yuan, M. W.; Yin, Y. Q.; Yang, X. D. Preparation and characterization of inclusion complexes of naringenin with  $\beta$ -cyclodextrin or its derivative. *Carbohydr. Polym.*, **98** (1), p. 861-869, 2013.

Yoshikawa, M.; Zhang, Y.; Wang, T.; Nakamura, S.; Matsuda, H. New triterpene constituents foliasalacins A<sub>1</sub>-A<sub>4</sub>, B<sub>1</sub>-B<sub>3</sub>, and C, from the leaves of *Salacia chinensis*. *Chem. Farm. Bull.*, **56** (7), p. 915-920, 2008.

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

Zlobl, T. L. Amebiasis. *Primary Care Update for OB/GYNS*, **8** (2), p. 65-68, 2001.



## 9 - ANEXO

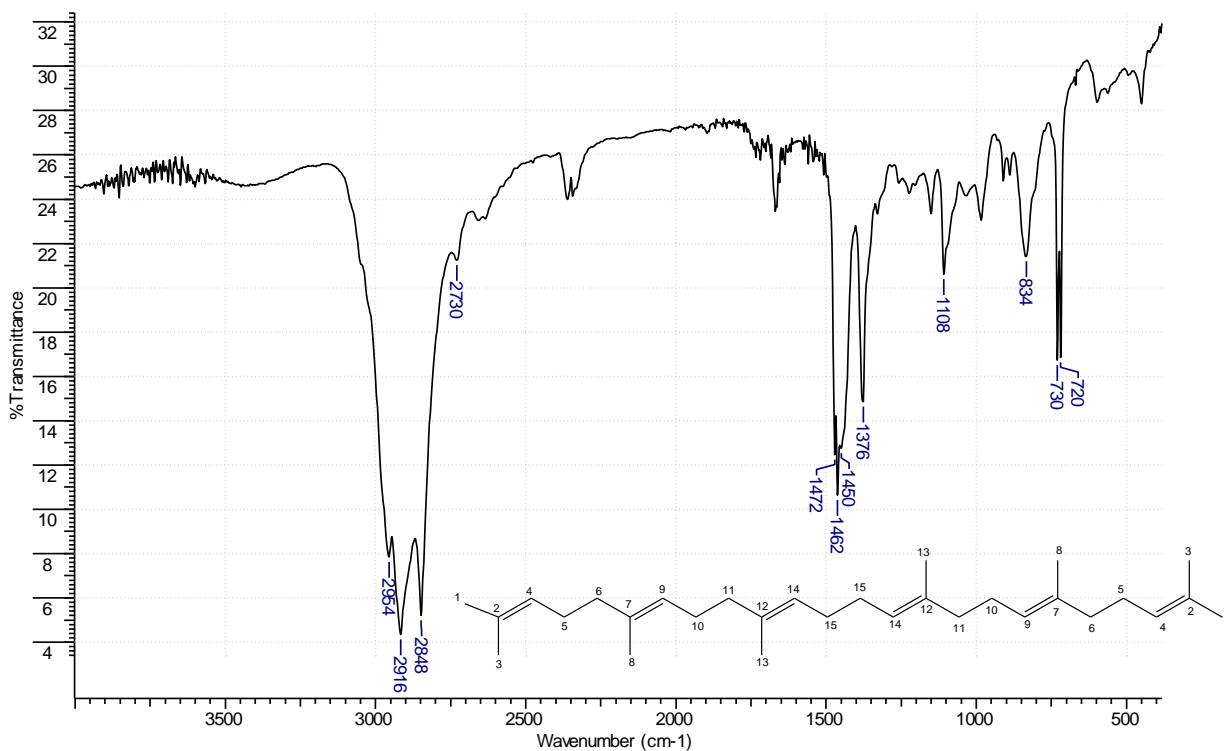


Figura A1: Espectro de S1 obtido na região do IV (KBr, cm<sup>-1</sup>).

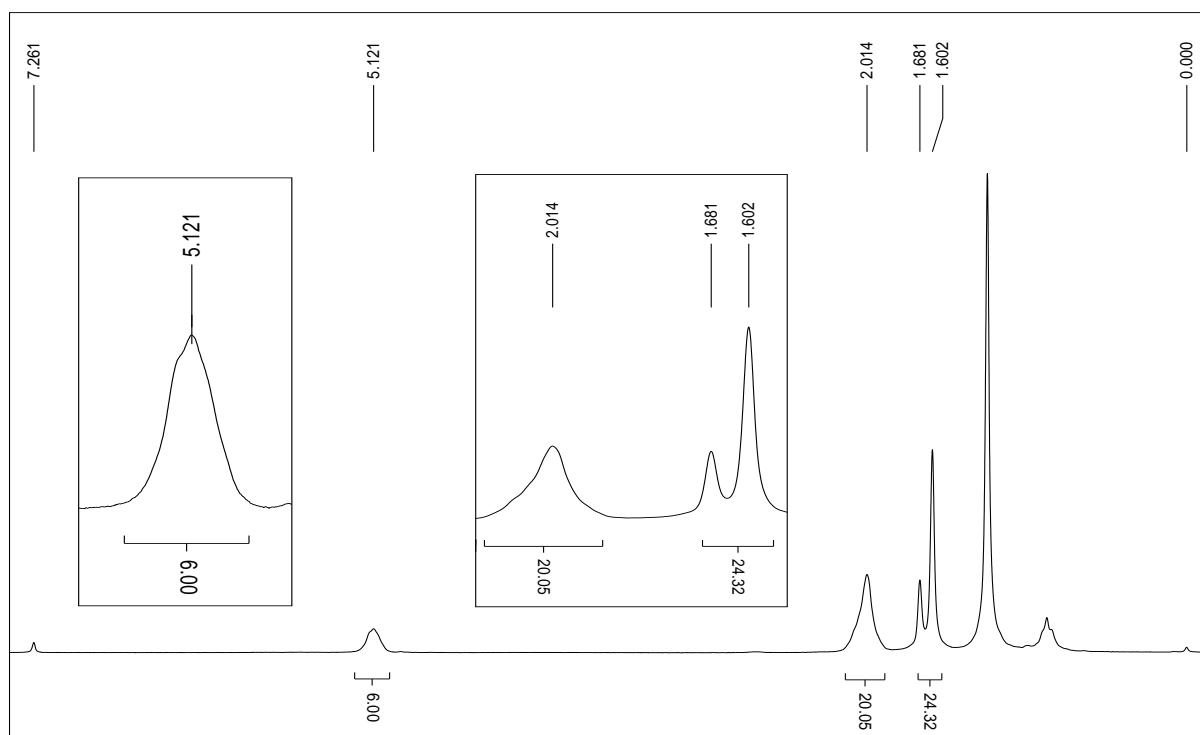


Figura A2: Espectro e expansões de RMN de <sup>1</sup>H de S1 (CDCl<sub>3</sub>, 200 MHz).

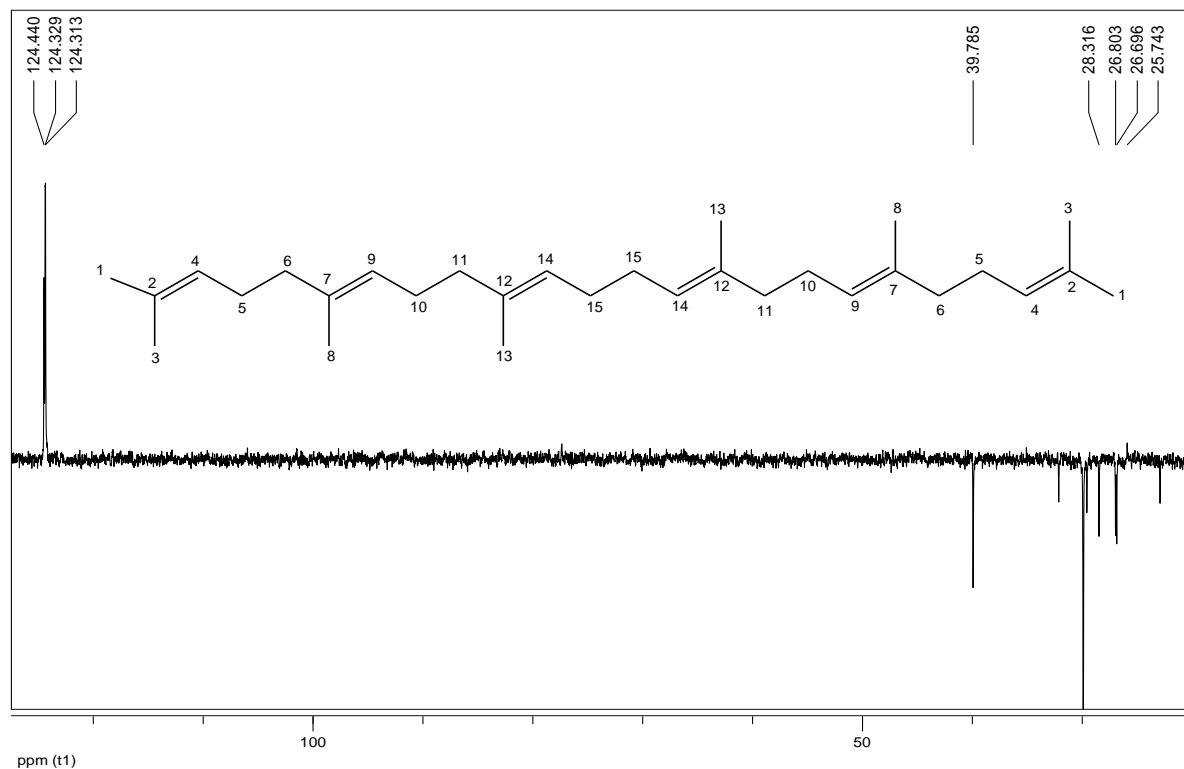


Figura A3: Subespectro de DEPT-135 de **S1** ( $\text{CDCl}_3$ , 50 MHz).

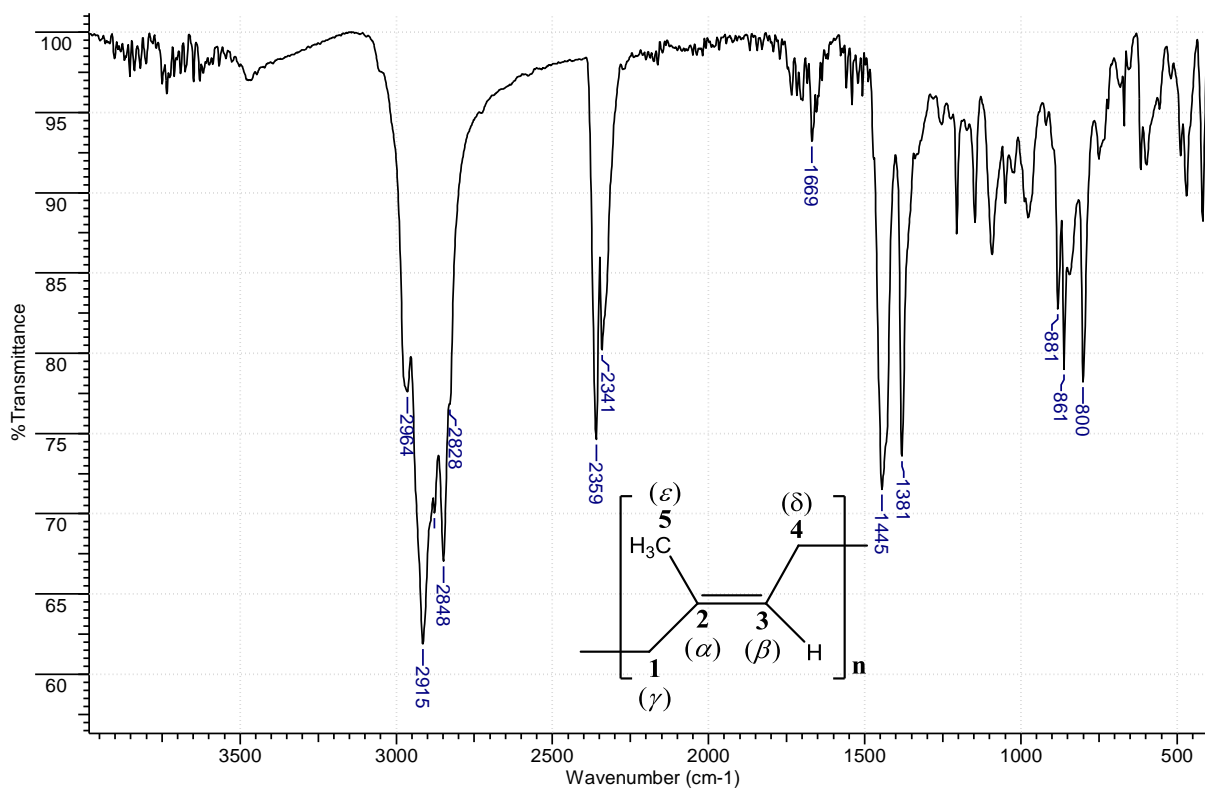


Figura A4: Espectro de **S2** obtido na região do IV (ATR,  $\text{cm}^{-1}$ ).





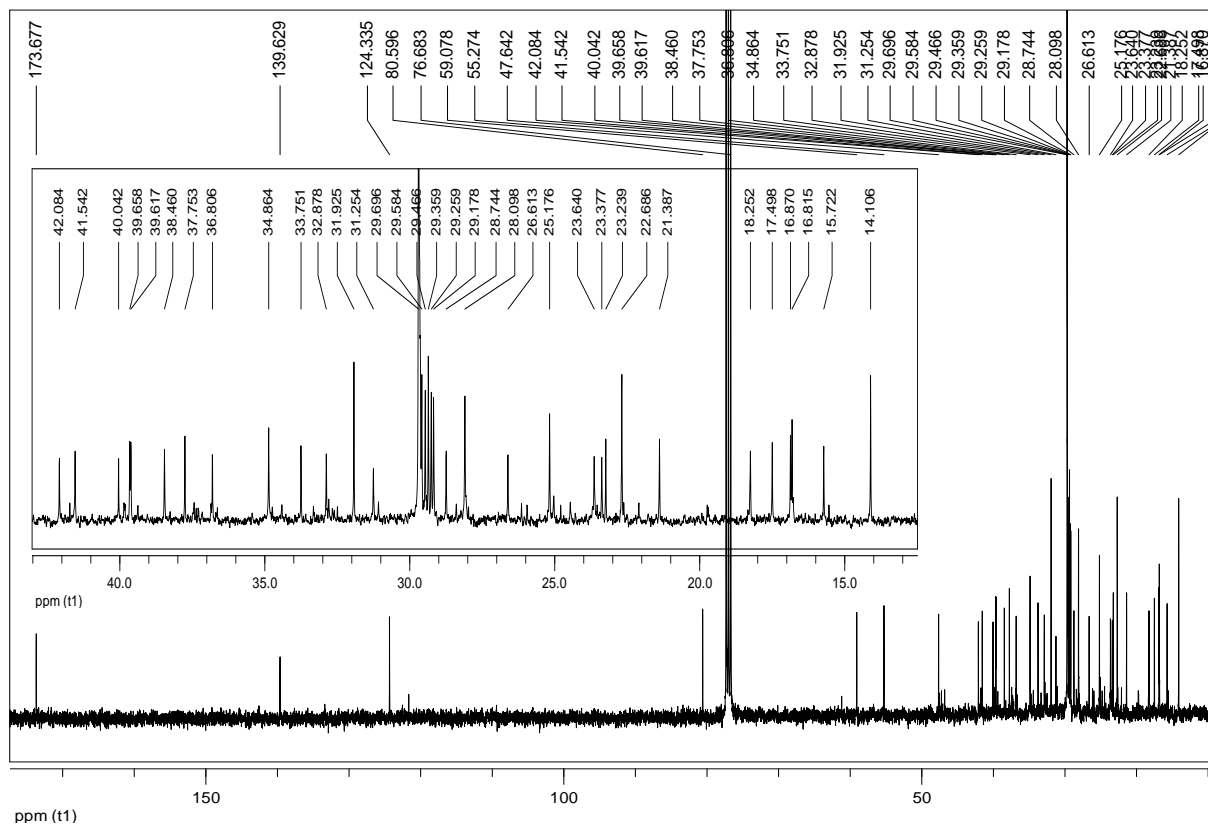


Figura A9: Espectro e expansão de RMN de  $^{13}\text{C}$  de **S3** ( $\text{CDCl}_3$ , 100 MHz).

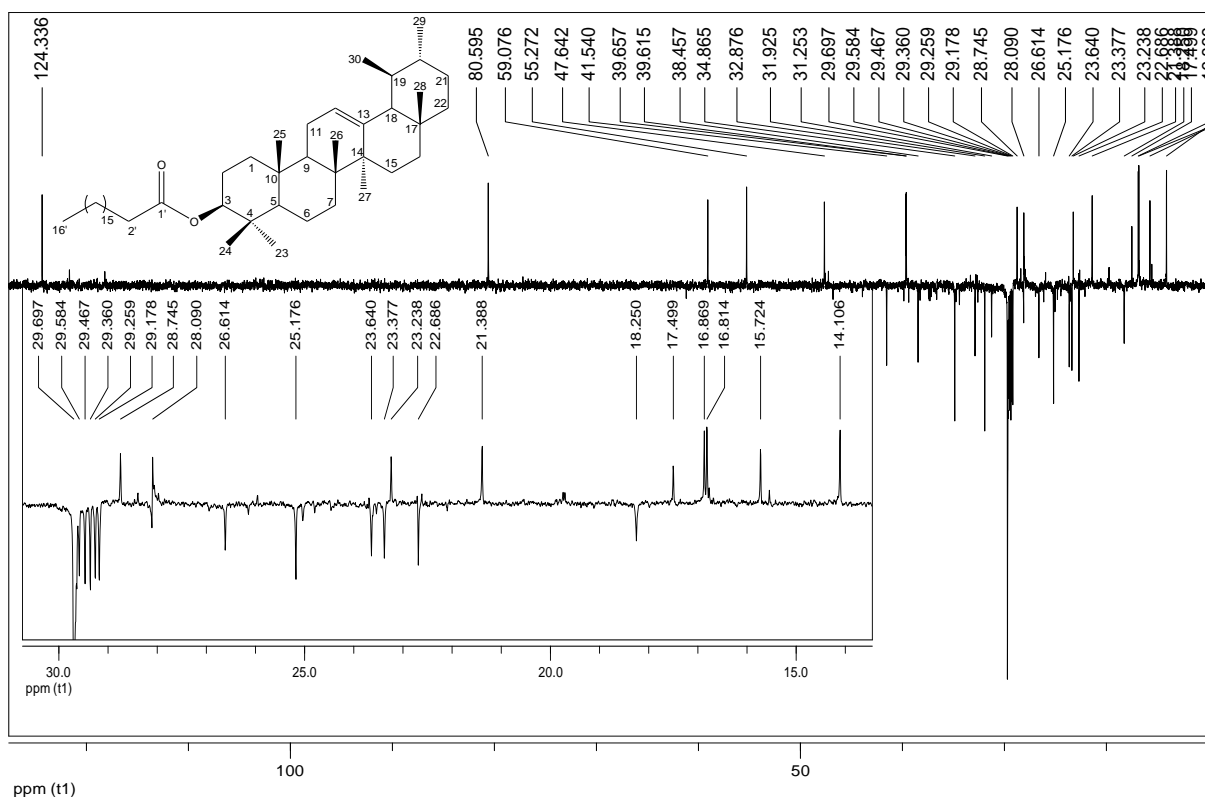
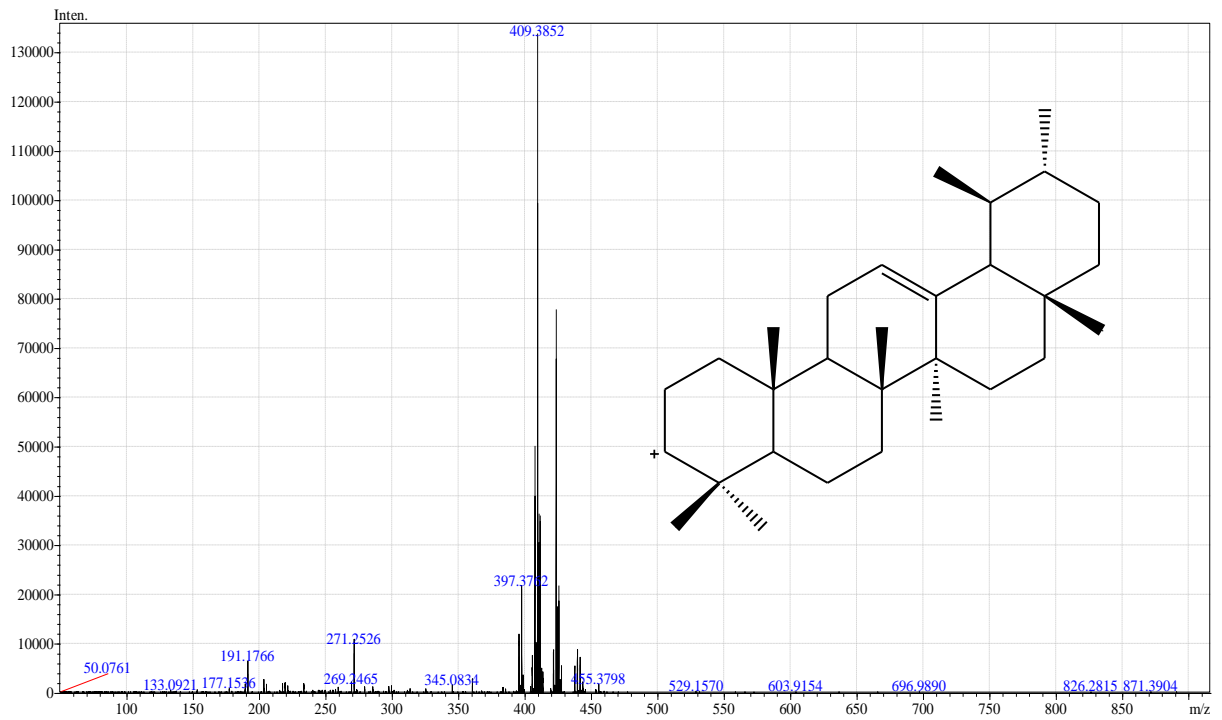
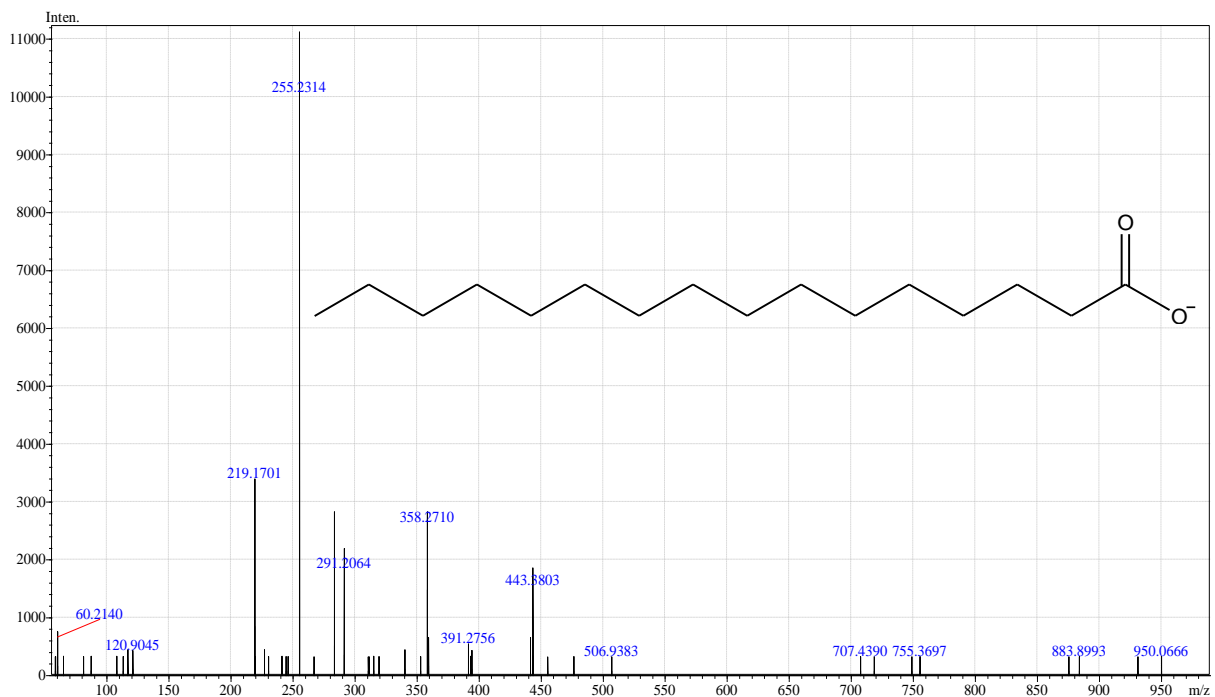


Figura A10: Subespectro e expansão de DEPT-135 de **S3** ( $\text{CDCl}_3$ , 100 MHz).



**Figura A11:** Espectro de massas (modo positivo) de **S3** com fragmento em m/z 409 (C<sup>+</sup>).



**Figura A12:** Espectro de massas (modo negativo) de **S3** com fragmento em m/z 255 (C<sup>-</sup>).

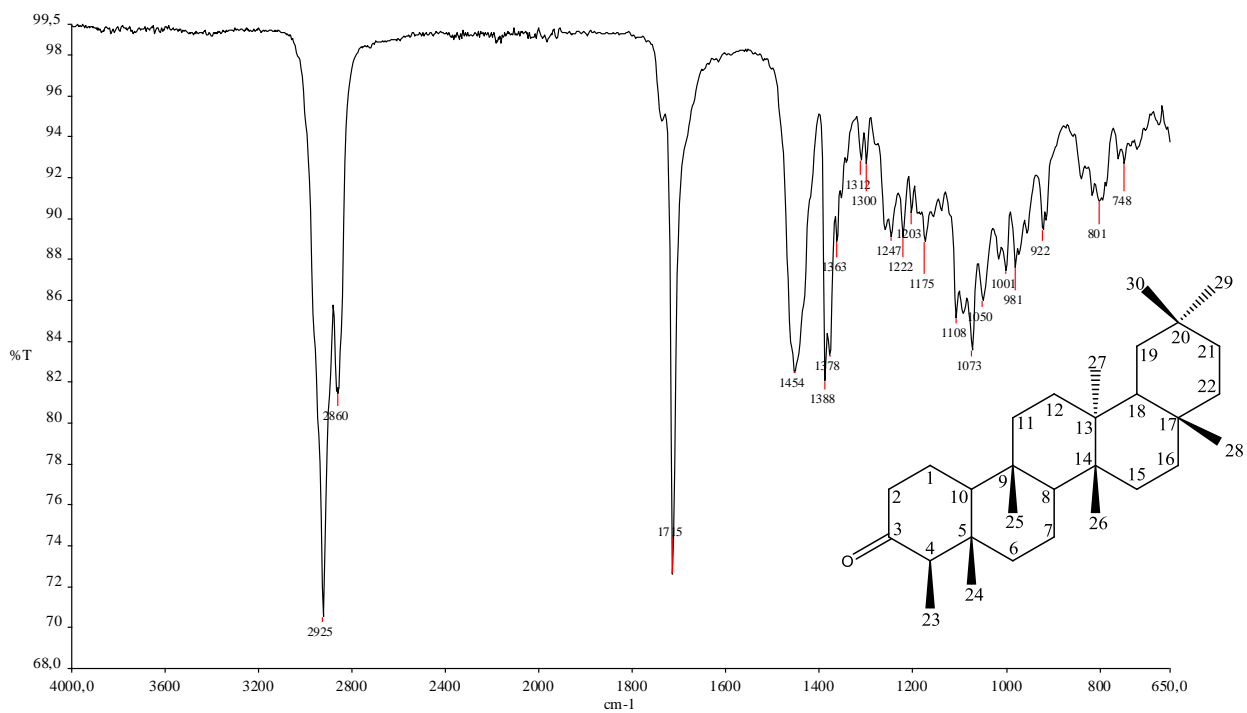


Figura A13: Espectro de **S4** obtido na região do IV (ATR, cm<sup>-1</sup>).

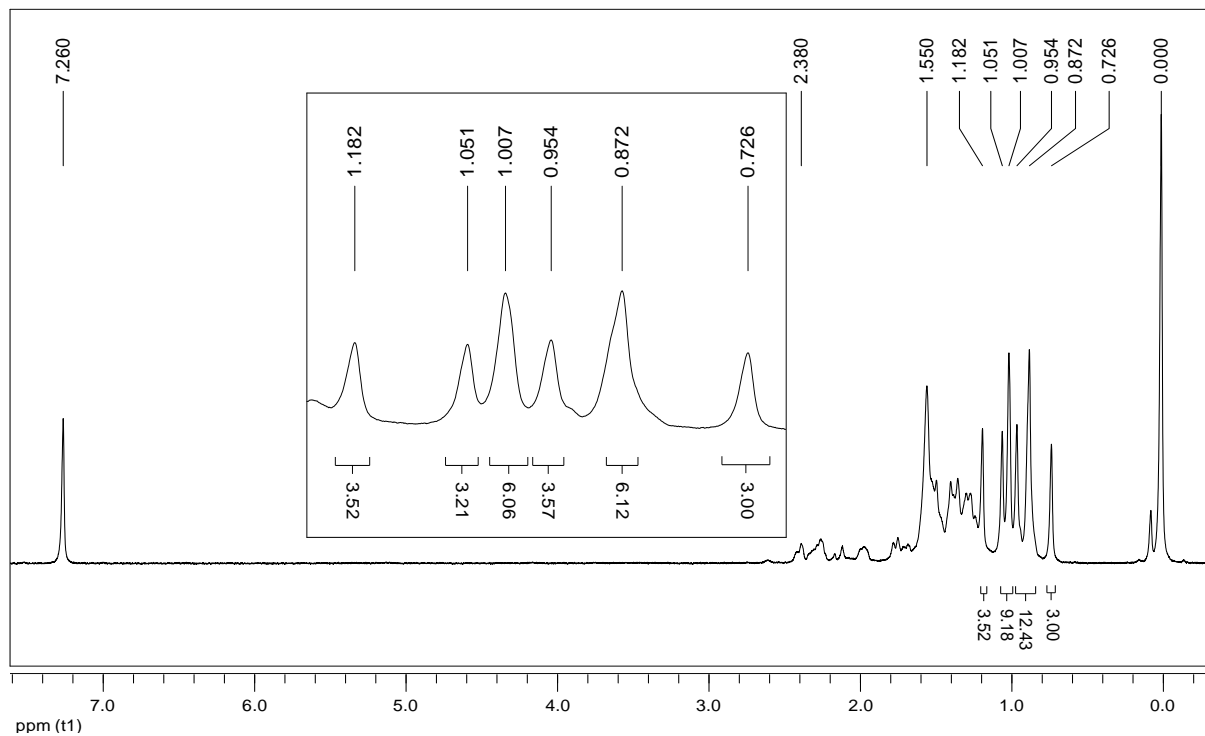


Figura A14: Espectro e expansão de RMN de <sup>1</sup>H de **S4** (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz).

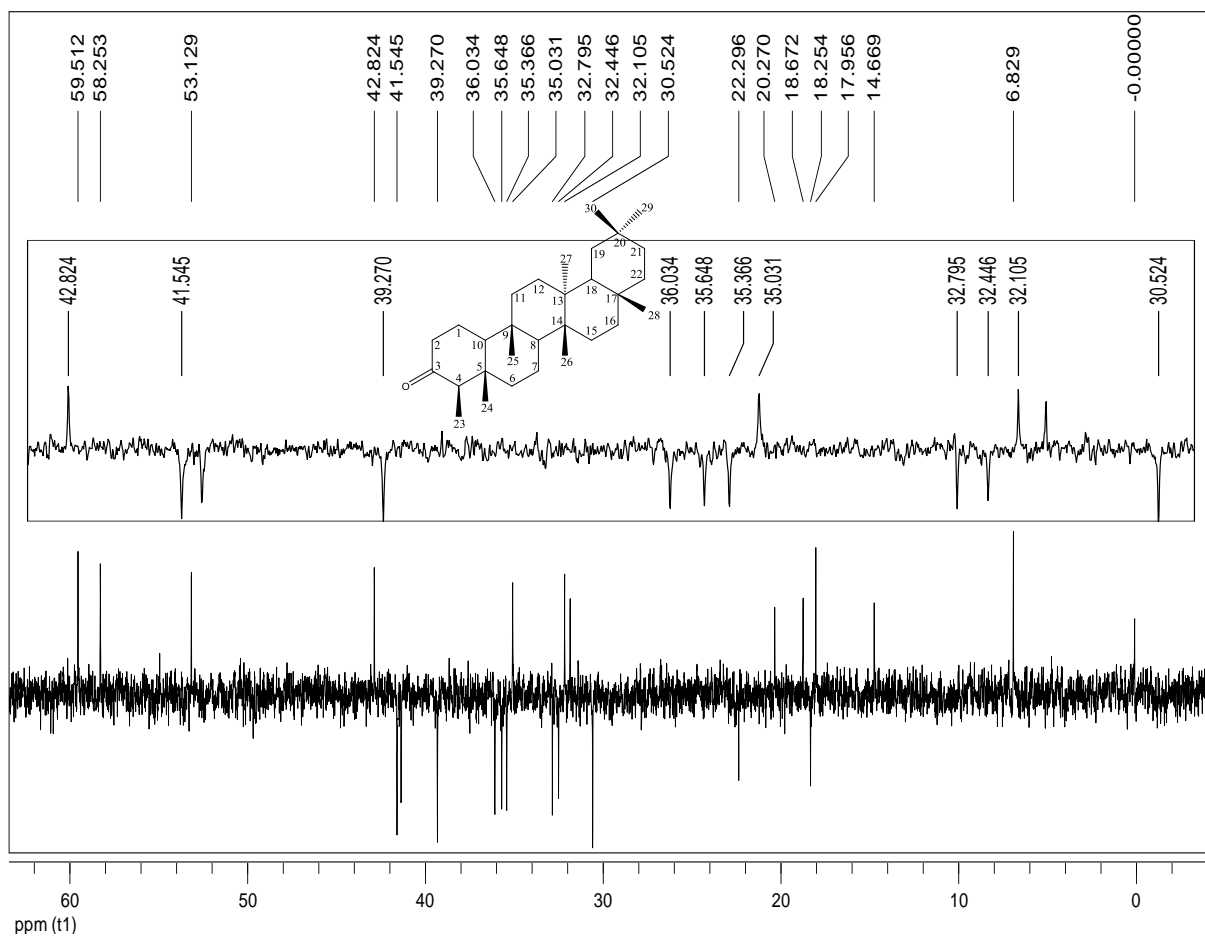


Figura A15: Subespectro DEPT-135 e expansão de **S4** ( $\text{CDCl}_3$ , 100 MHz).

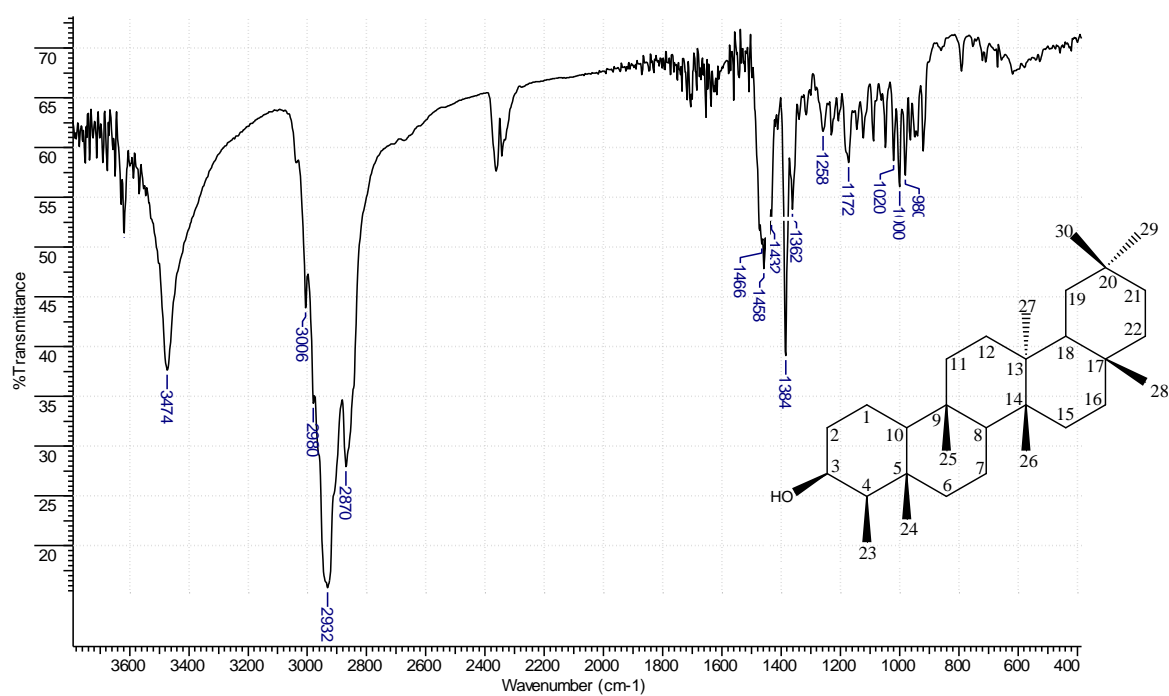


Figura A16: Espectro de **S5** obtido na região do IV ( $\text{KBr}$ ,  $\text{cm}^{-1}$ ).



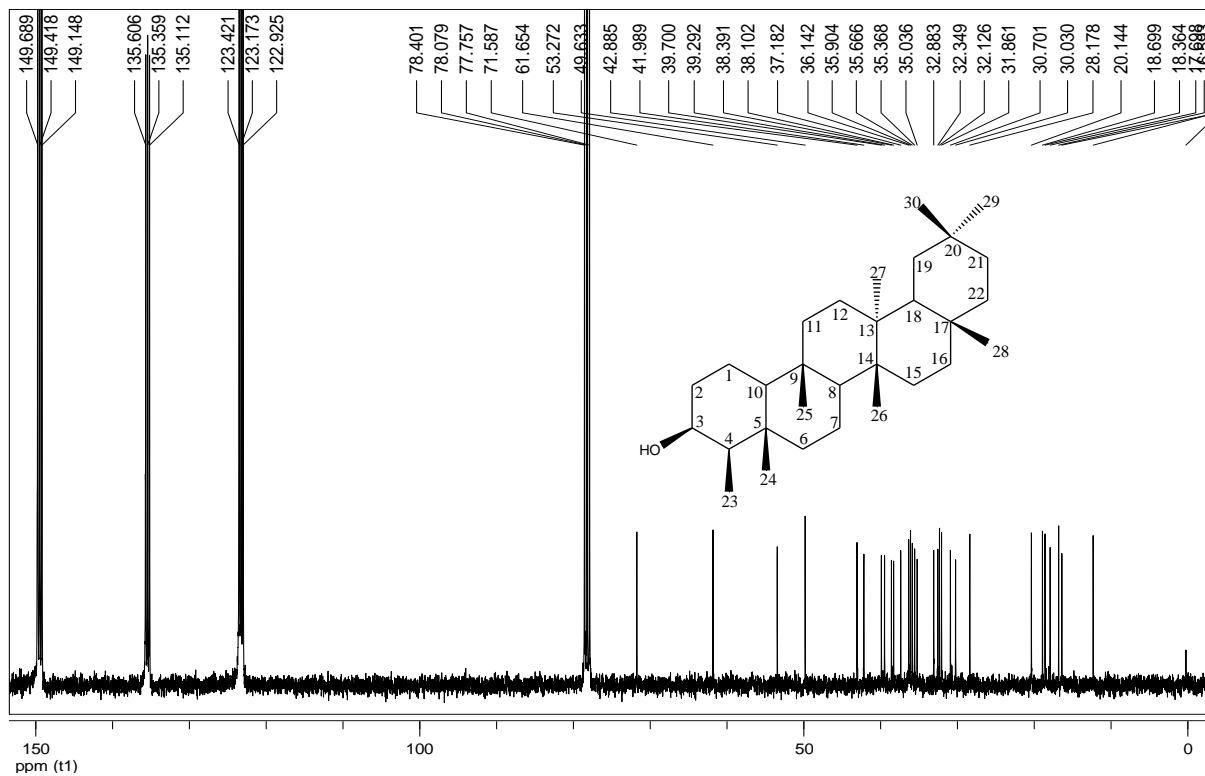


Figura A17: Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  de **S5** ( $\text{CDCl}_3 + \text{Py-d}_5$ , 100 MHz).

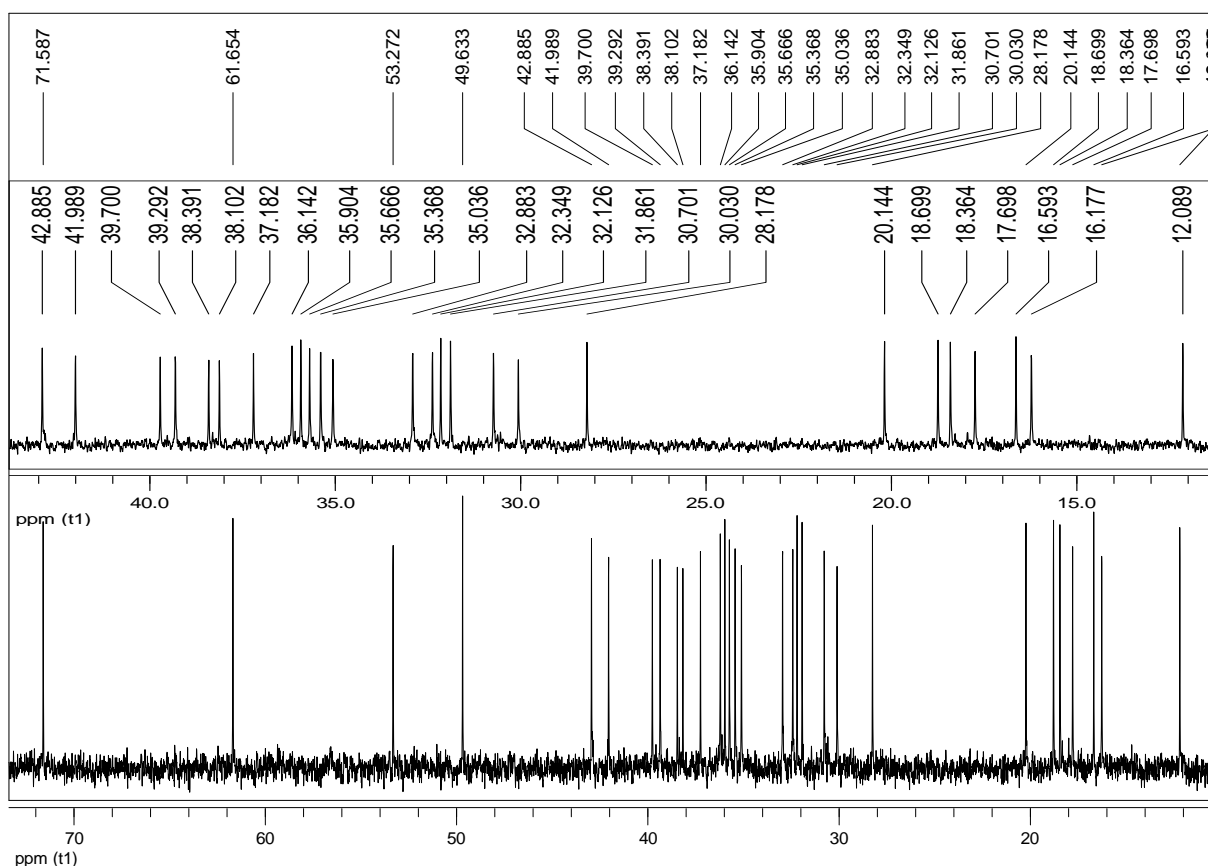
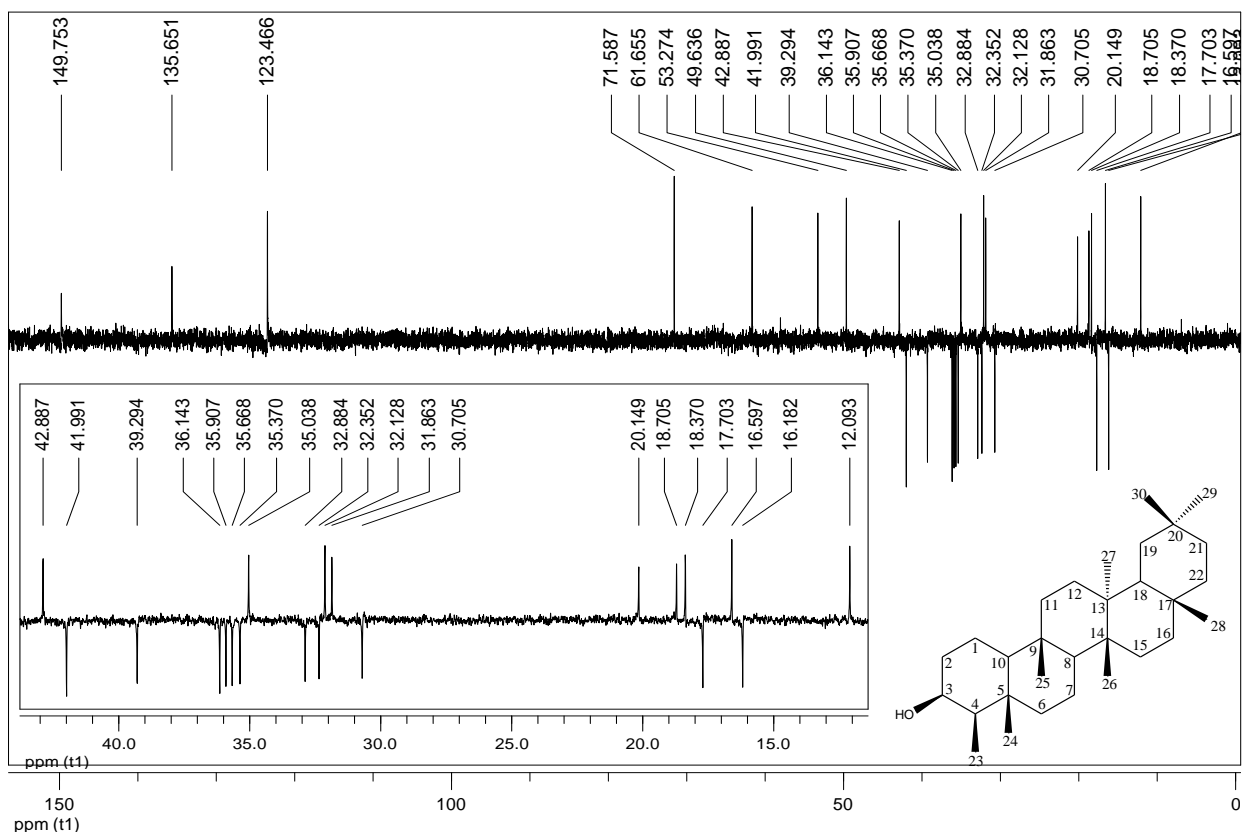
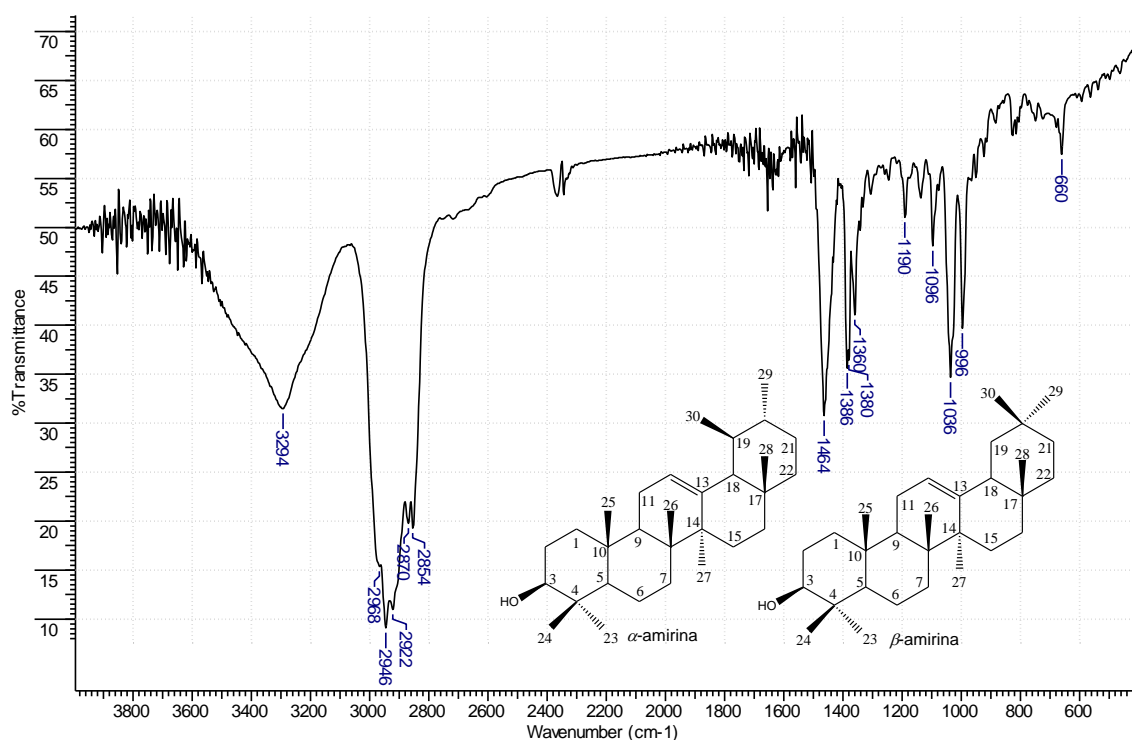


Figura A18: Expansão do espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  de **S5** ( $\text{CDCl}_3 + \text{Py-d}_5$ , 100 MHz).



**Figura A19:** Subespectro e expansão de DEPT-135 de **S5** ( $\text{CDCl}_3 + \text{Py-d}_5$ , 100 MHz).



**Figura A20:** Espectro de **S6** obtido na região do IV ( $\text{KBr}$ ,  $\text{cm}^{-1}$ ).

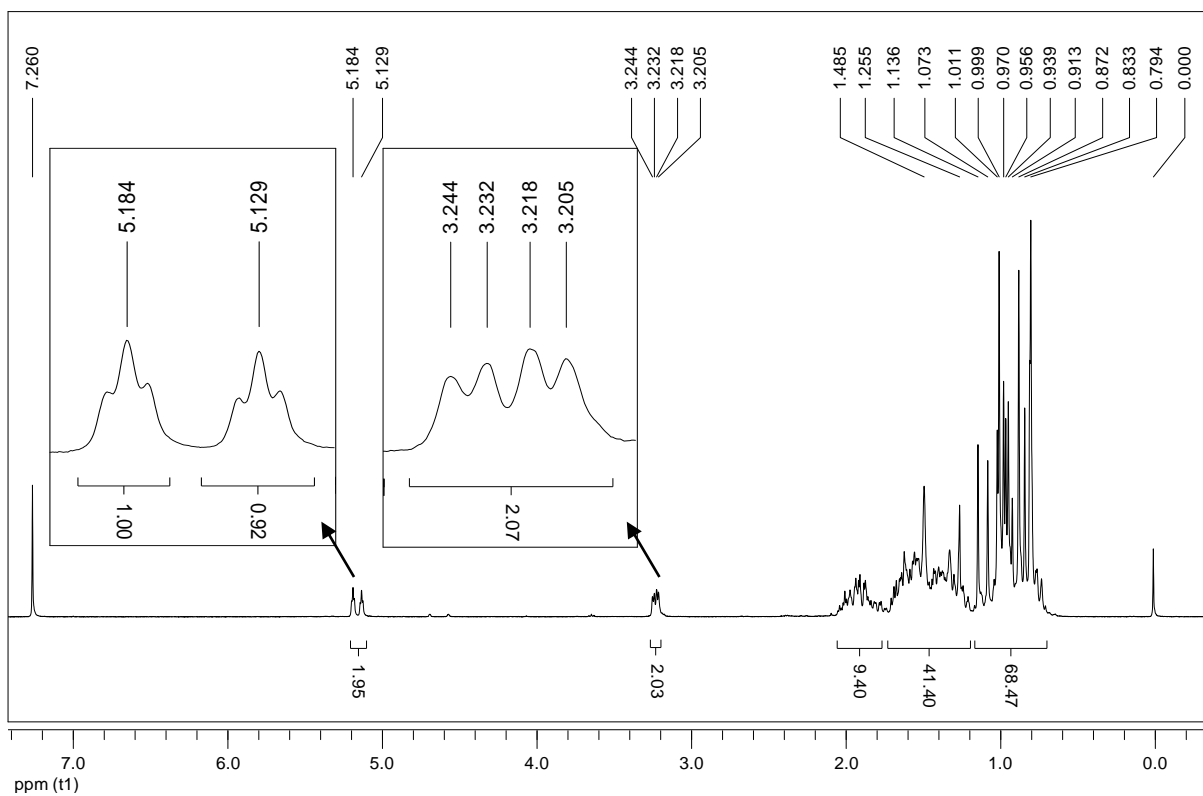


Figura A21: Espectro e expansões de RMN de  $^1\text{H}$  (400 MHz) de **S6** em  $\text{CDCl}_3$ .

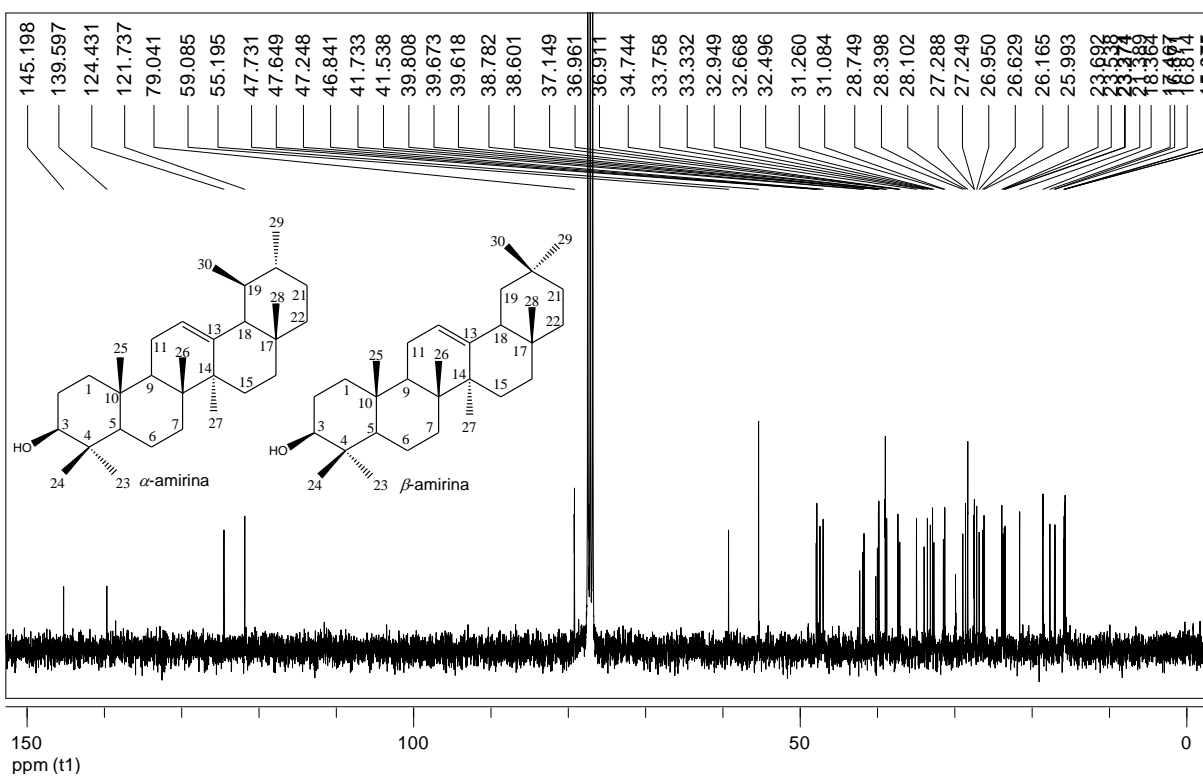


Figura A22: Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (100 MHz) de **S6** em  $\text{CDCl}_3$ .



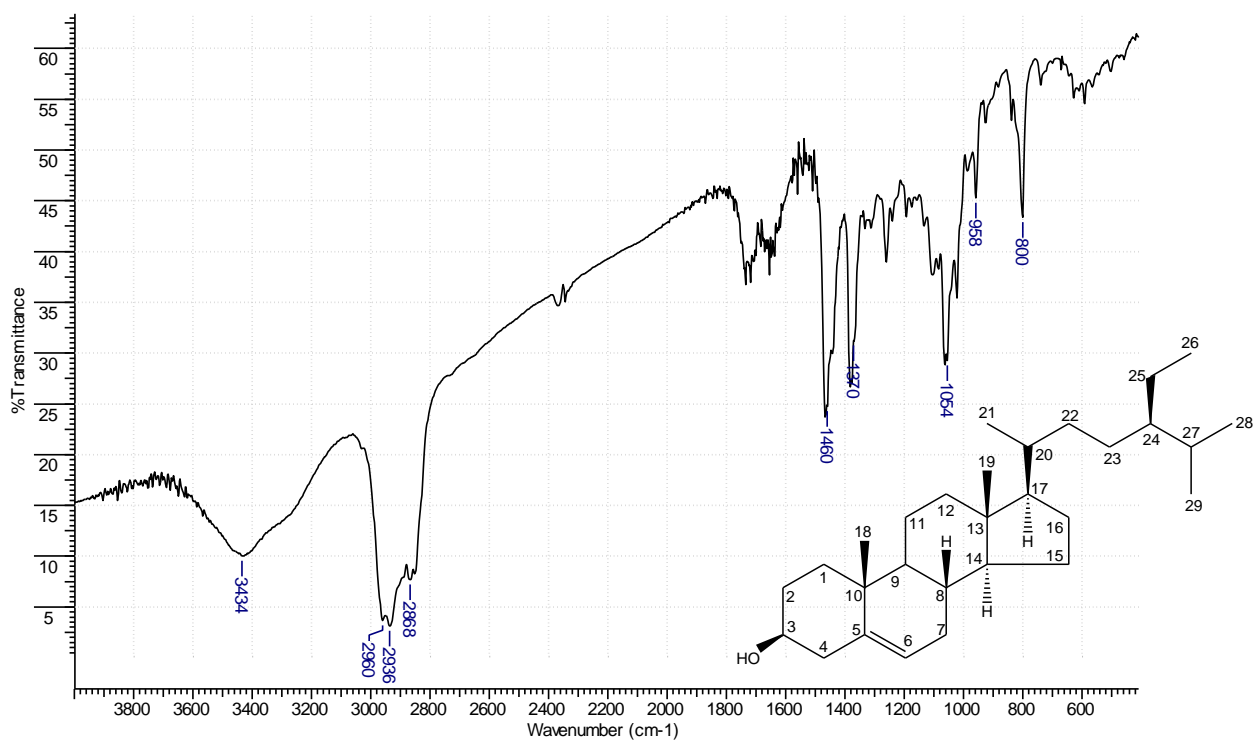


Figura A25: Espectro de **S7** obtido na região do IV (KBr).

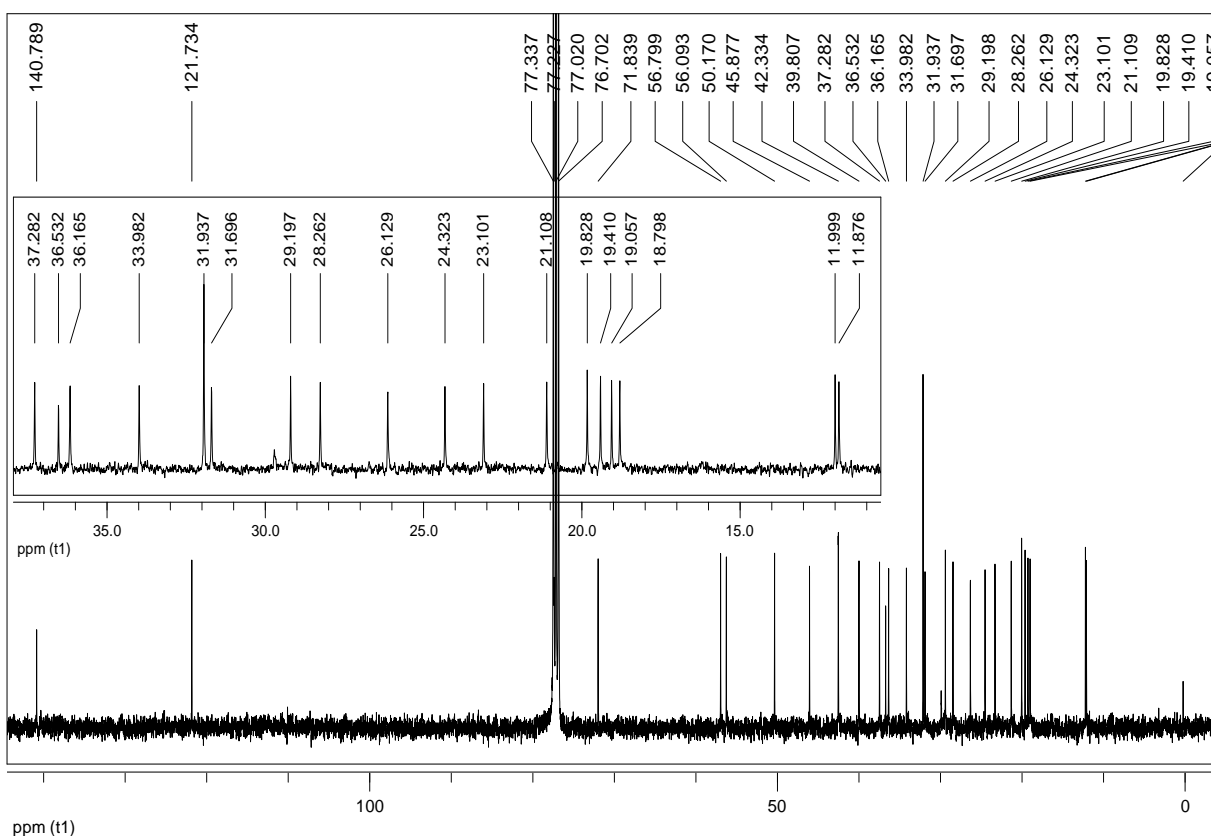


Figura A26: Espectro e expansão de RMN de <sup>13</sup>C de **S7** (CDCl<sub>3</sub>, 100 MHz).

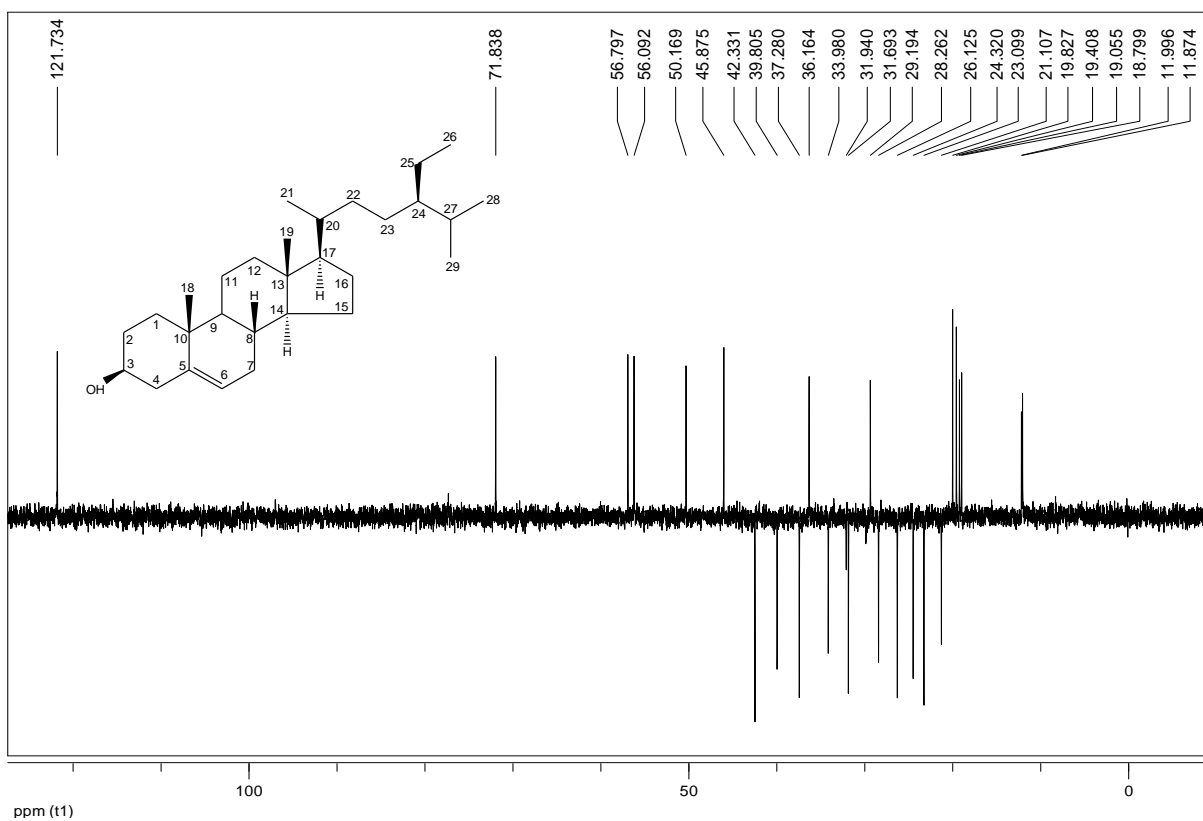


Figura A27: Subespectro DEPT-135 de **S7** ( $\text{CDCl}_3$ , 100 MHz).

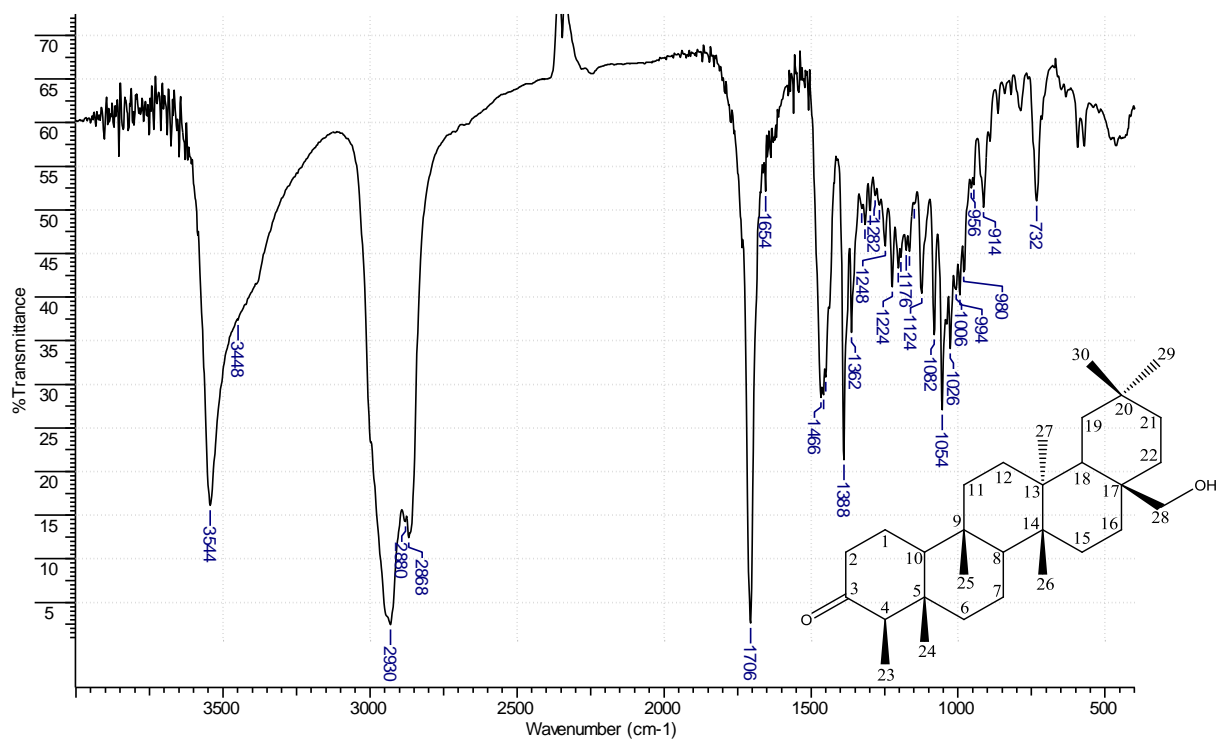


Figura A28: Espectro na região do IV de **S8** (KBr,  $\text{cm}^{-1}$ ).

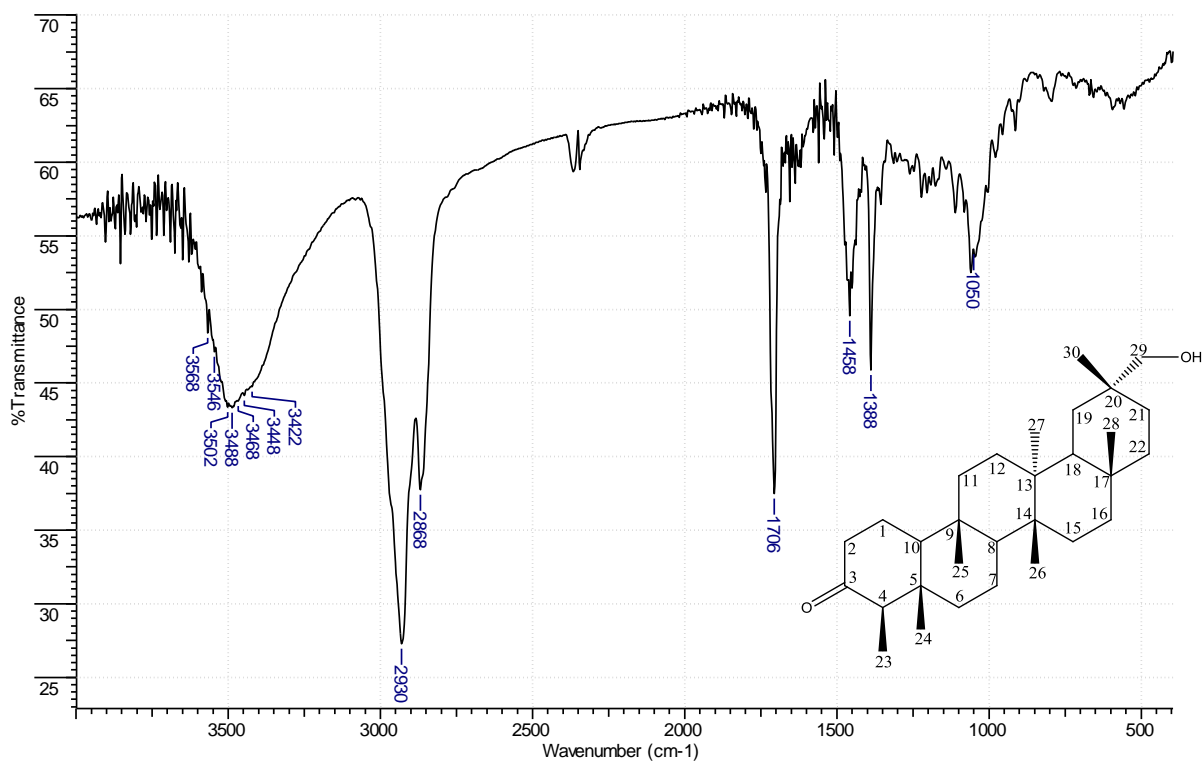


Figura A29: Espectro na região do IV de **S9** (KBr, cm<sup>-1</sup>).

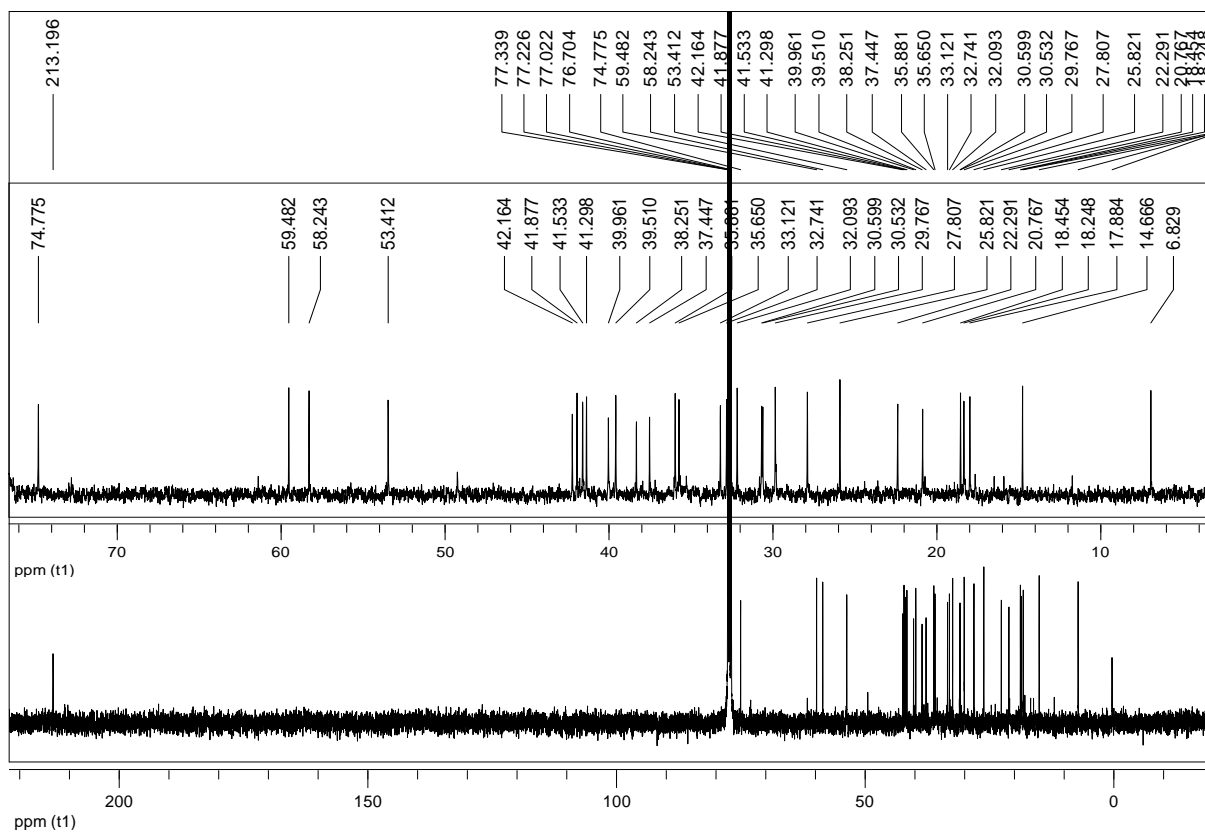


Figura A30: Espectro e expansão de RMN de <sup>13</sup>C (100 MHz) de **S9** em CDCl<sub>3</sub>.

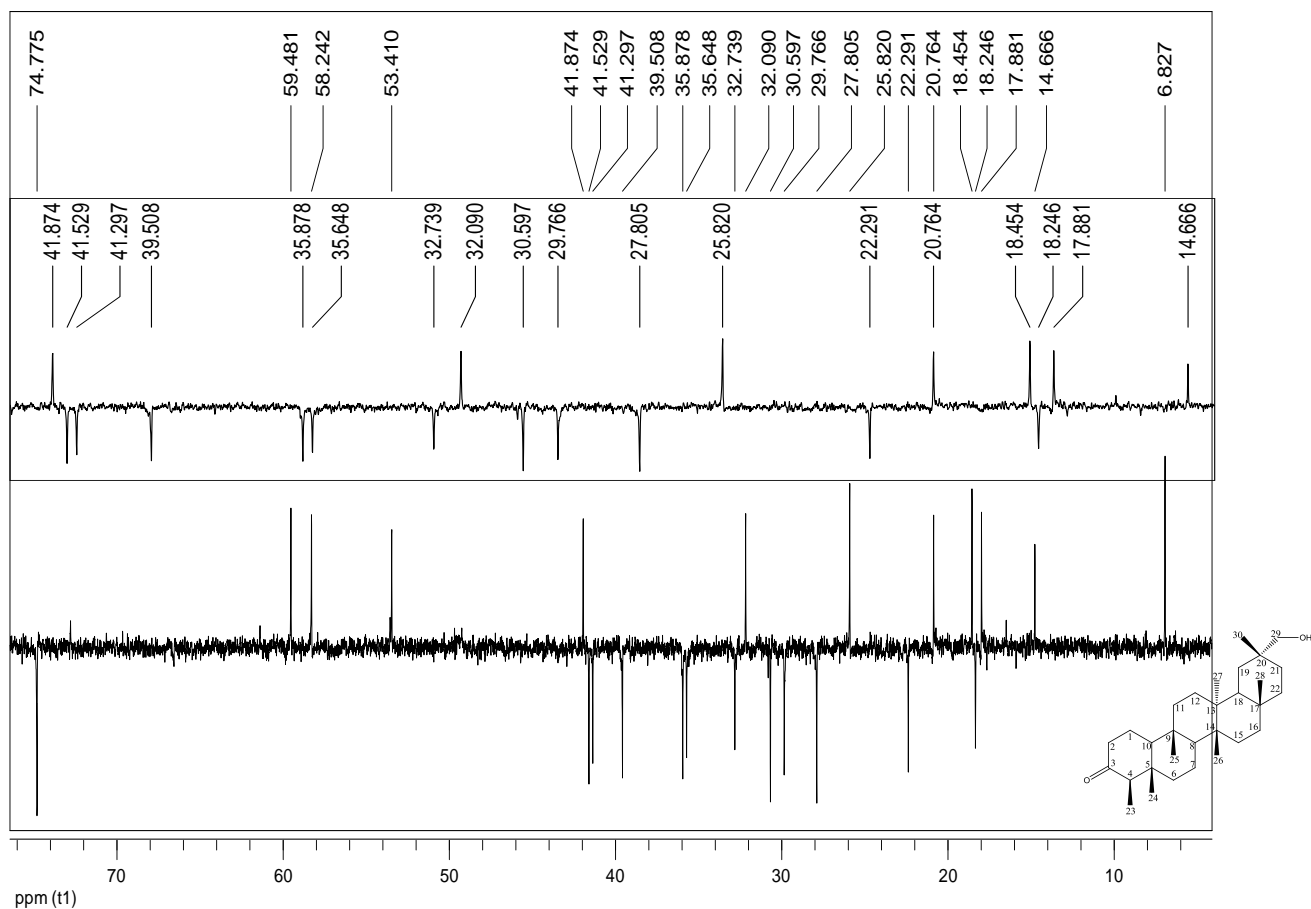


Figura A31: Subespectro DEPT-135 e expansão (100 MHz) de **S9** em  $\text{CDCl}_3$ .

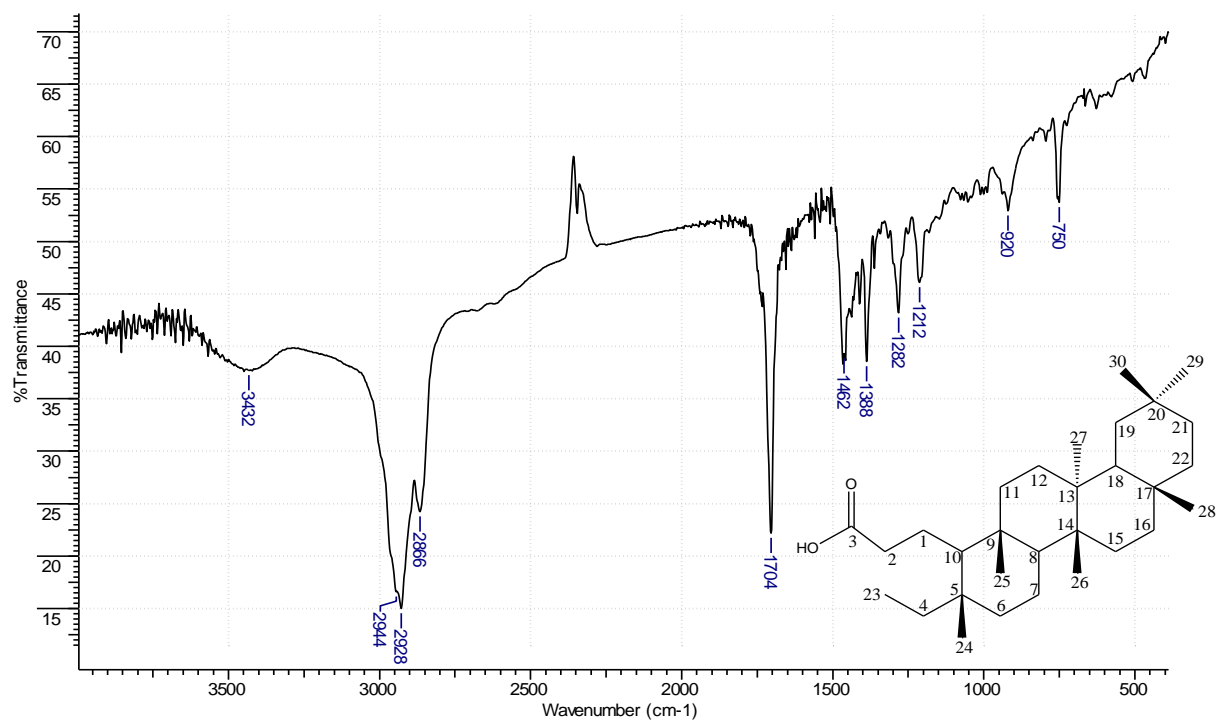


Figura A32: Espectro de **S10** obtido na região do IV ( $\text{KBr}$ ,  $\text{cm}^{-1}$ ).



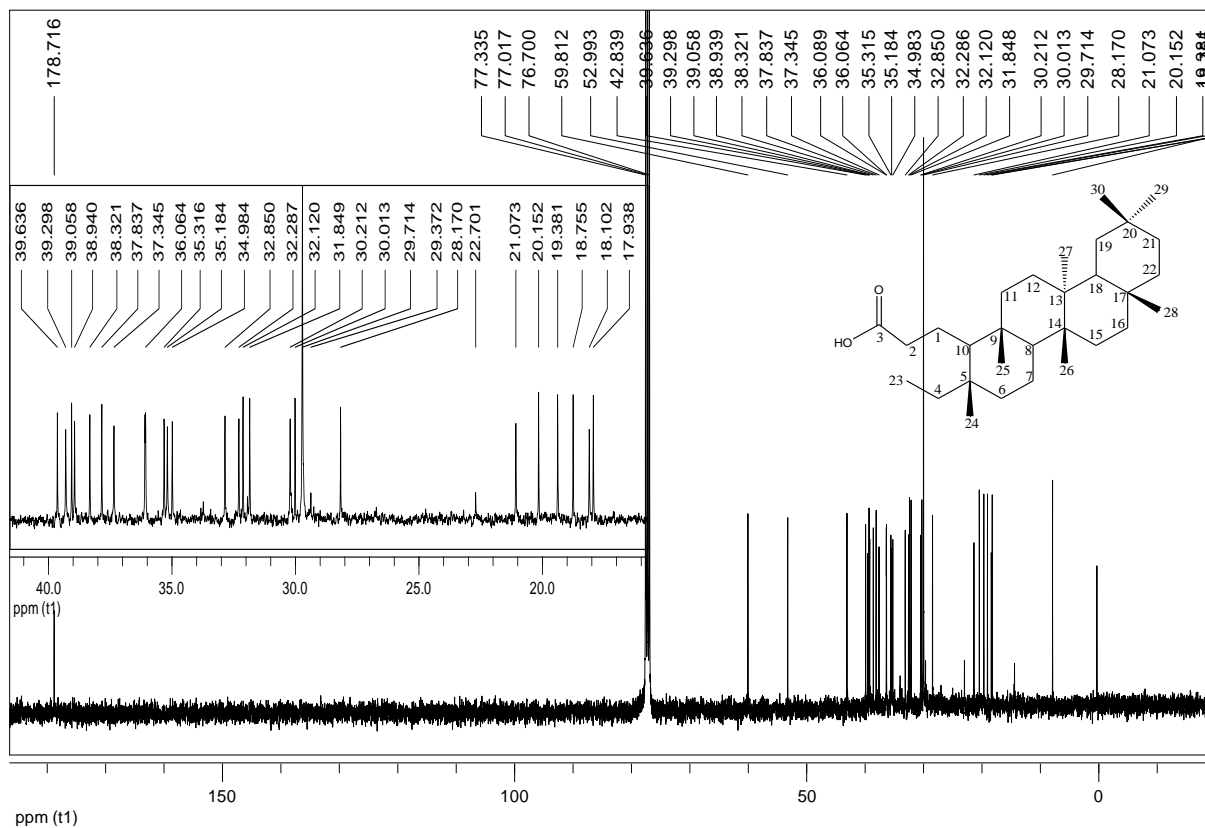


Figura A33: Espectro e expansão de RMN de  $^{13}\text{C}$  (100 MHz) de **S10** em  $\text{CDCl}_3$ .

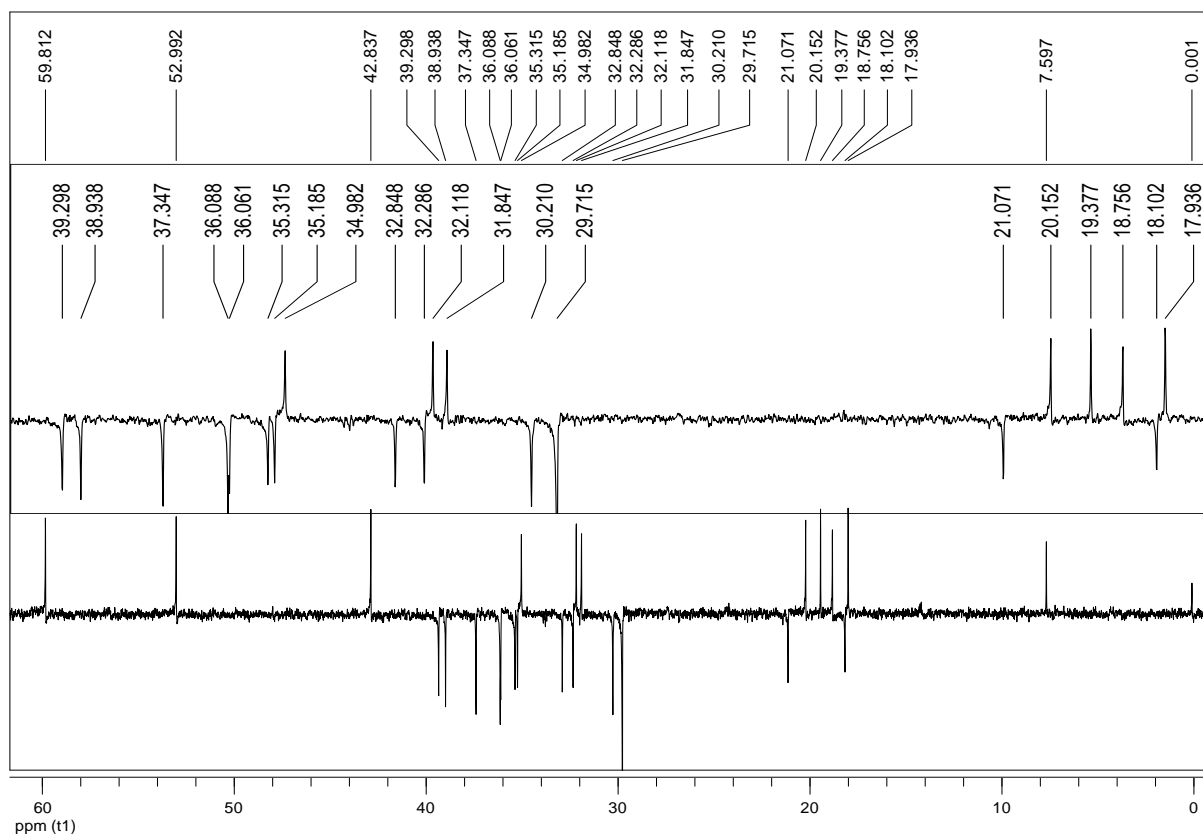


Figura A34: Subespectro DEPT-135 e expansão (100 MHz) de **S10** em  $\text{CDCl}_3$ .

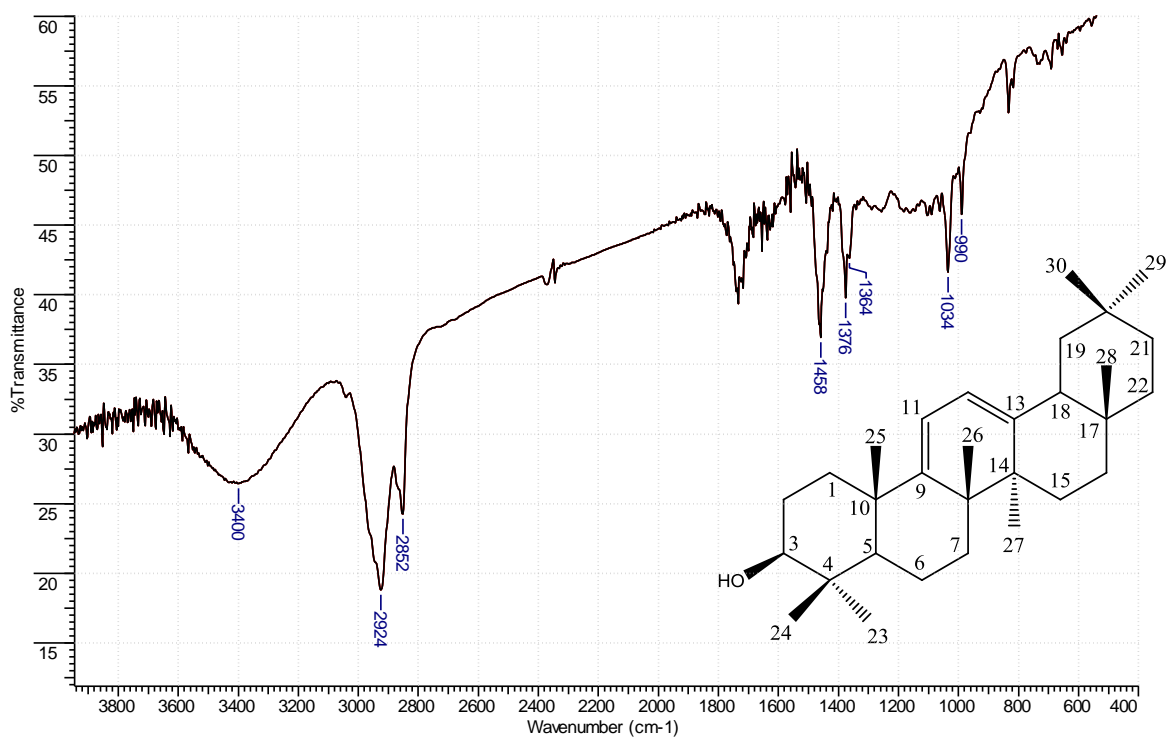


Figura A35: Espectro de S11 obtido na região do IV (KBr, cm<sup>-1</sup>).

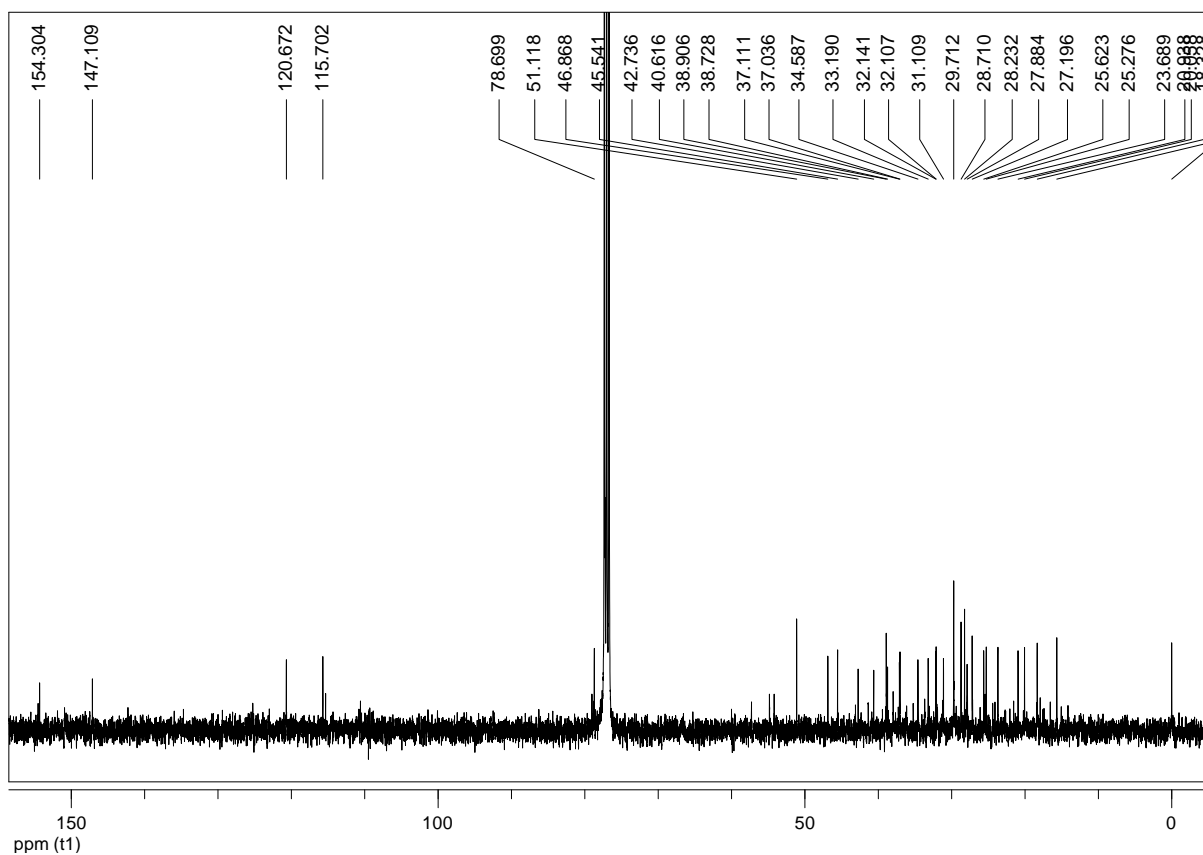


Figura A36: Espectro de RMN de <sup>13</sup>C (100 MHz) de S11 em CDCl<sub>3</sub>.

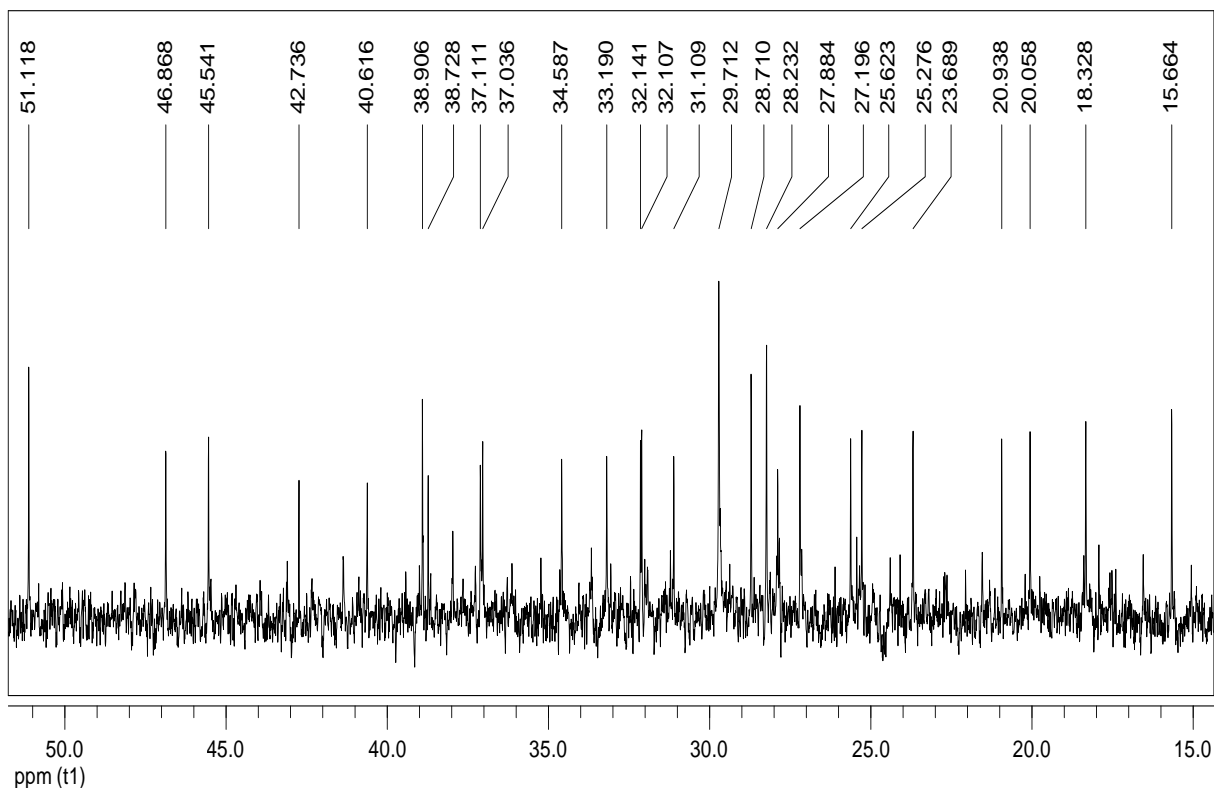


Figura A37: Expansão do espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (100 MHz) de **S11** em  $\text{CDCl}_3$ .

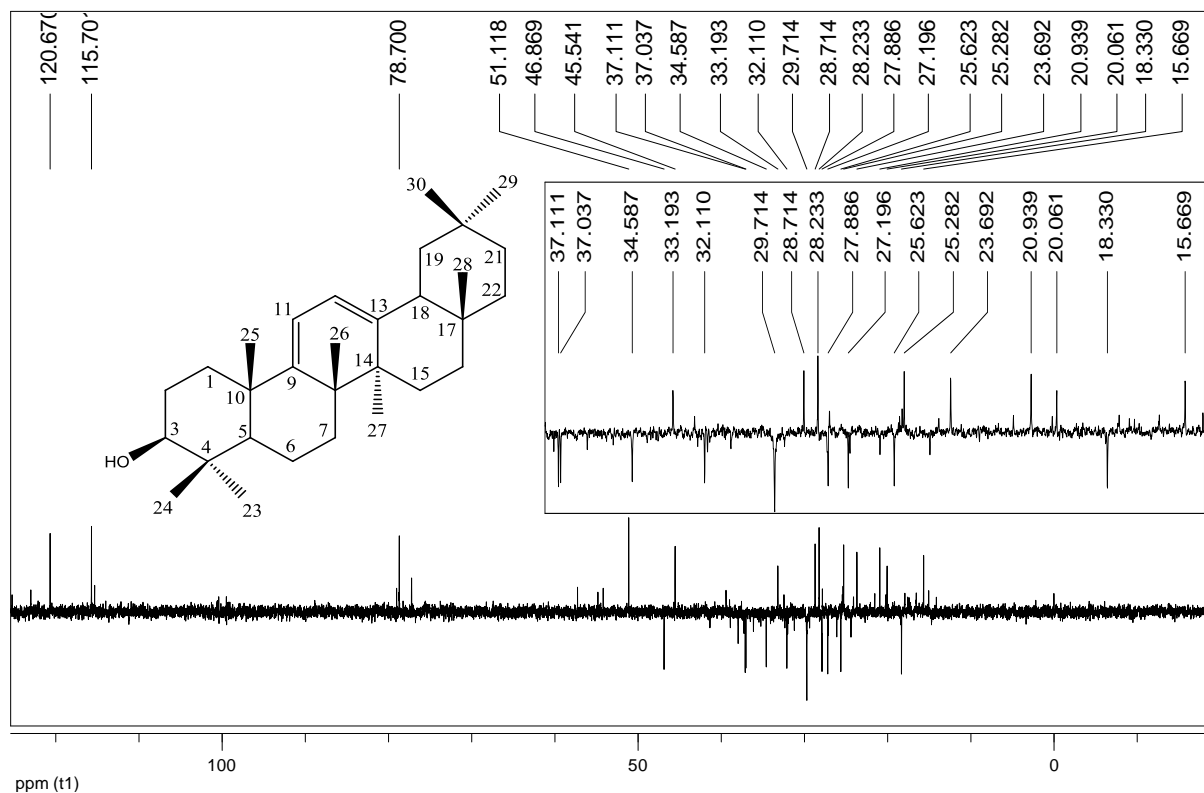


Figura A38: Subespectro DEPT-135 (100 MHz) de **S11** em  $\text{CDCl}_3$ .

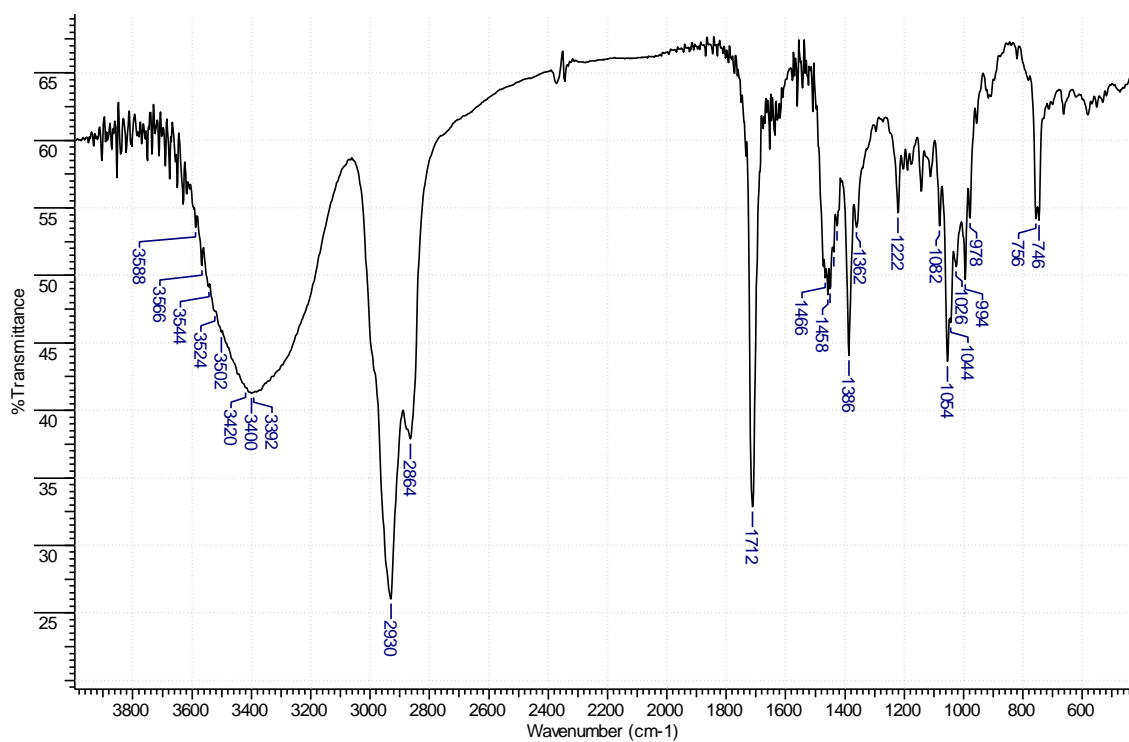


Figura A39: Espectro de S12 obtido na região do IV (KBr, cm<sup>-1</sup>).

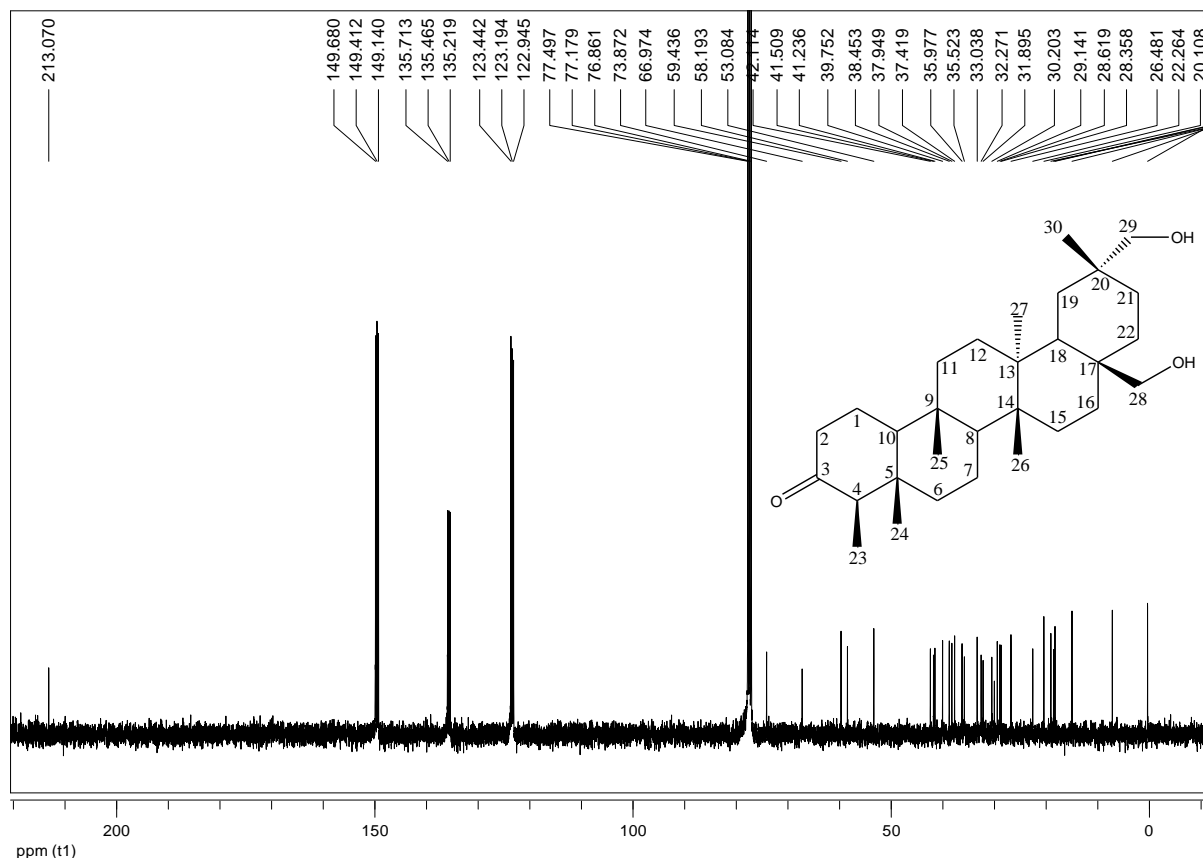


Figura A40: Espectro de RMN de <sup>13</sup>C de S12 (CDCl<sub>3</sub> + Py-d<sub>5</sub>, 100 MHz).

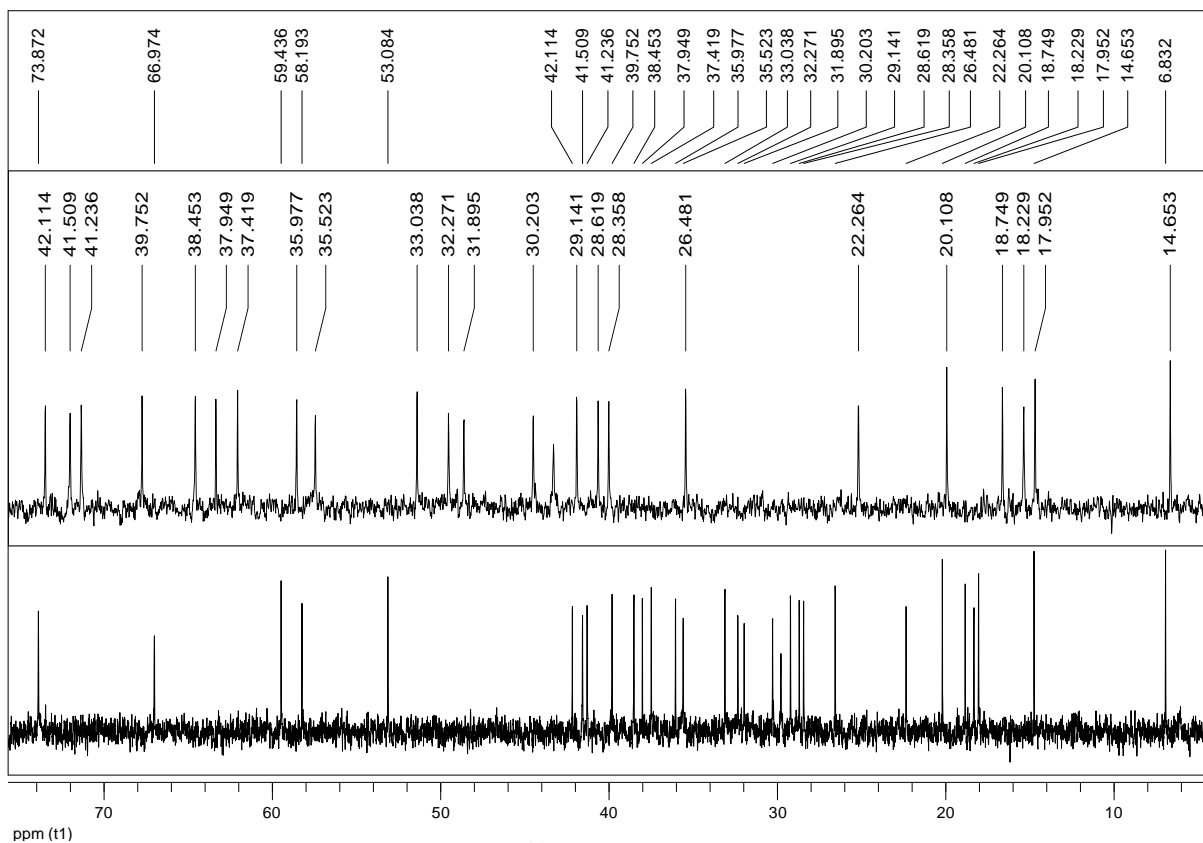


Figura A41: Expansões de RMN de  $^{13}\text{C}$  de **S12** ( $\text{CDCl}_3 + \text{Py-d}_5$ , 100 MHz).

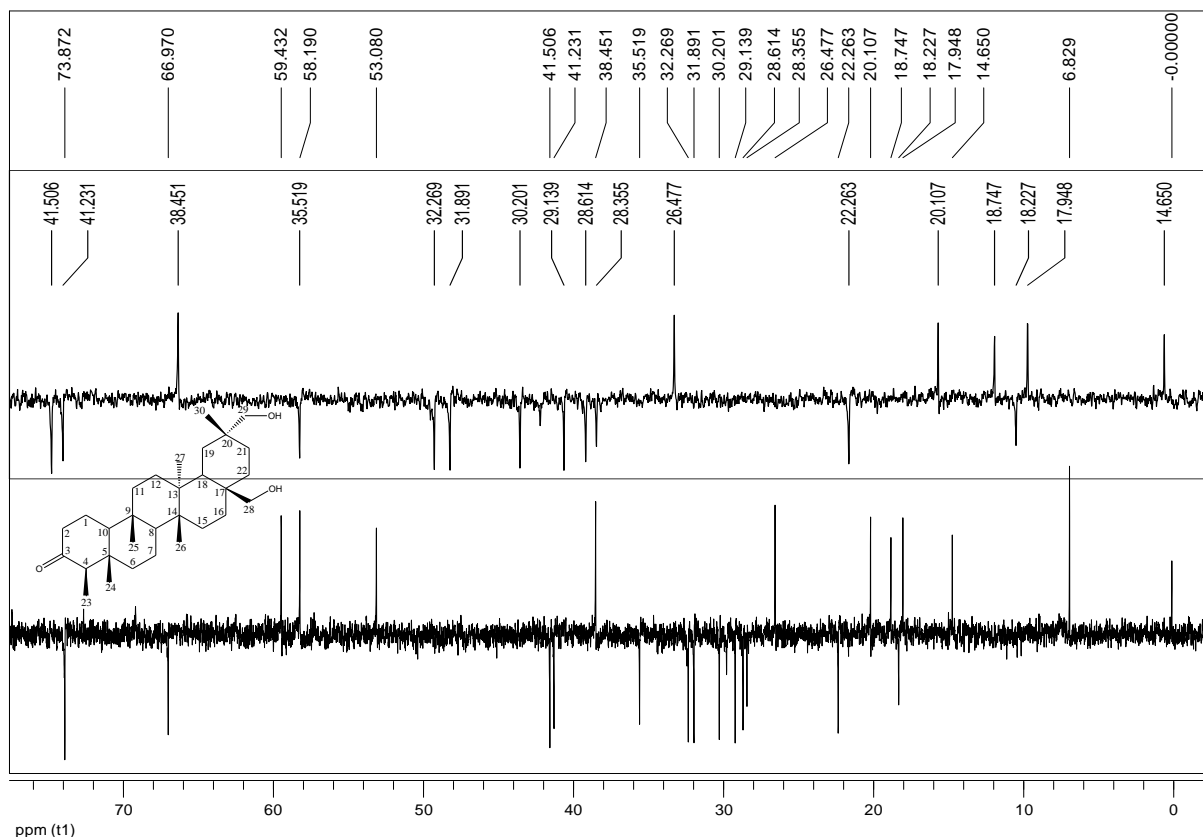
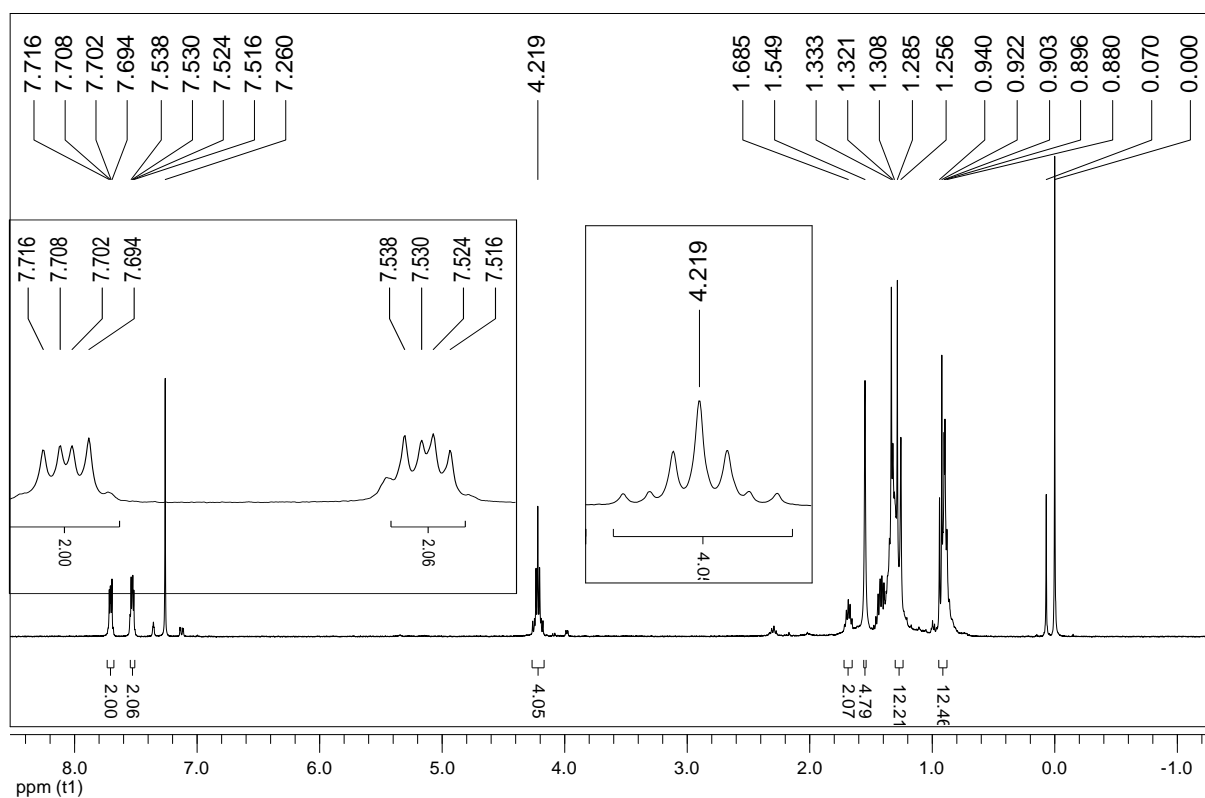
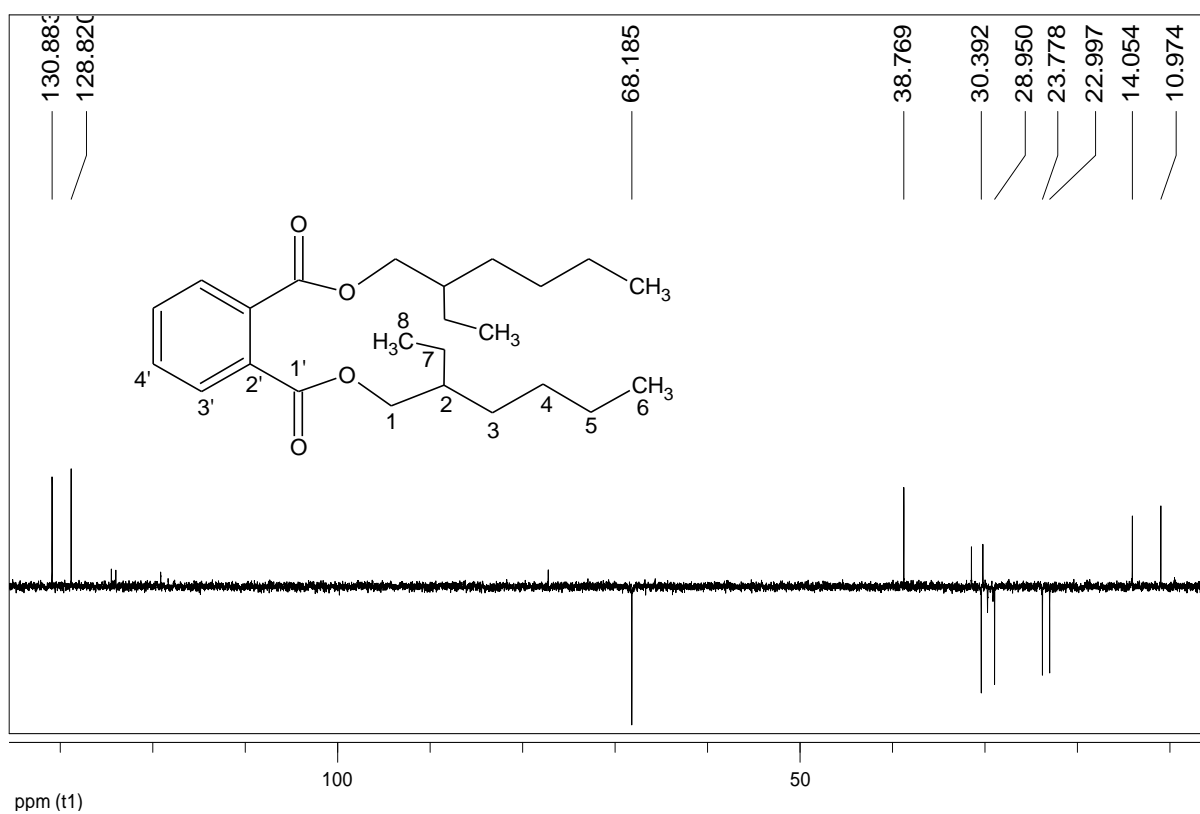


Figura A42: Subespectro DEPT-135 e expansão de **S12** ( $\text{CDCl}_3 + \text{Py-d}_5$ , 100 MHz).



**Figura A43:** Espectro e expansão de  $^1\text{H}$  (100 MHz) de **S14** em  $\text{CDCl}_3$ .



**Figura A44:** Subespectro DEPT-135 (100 MHz) de **S14** em  $\text{CDCl}_3$ .

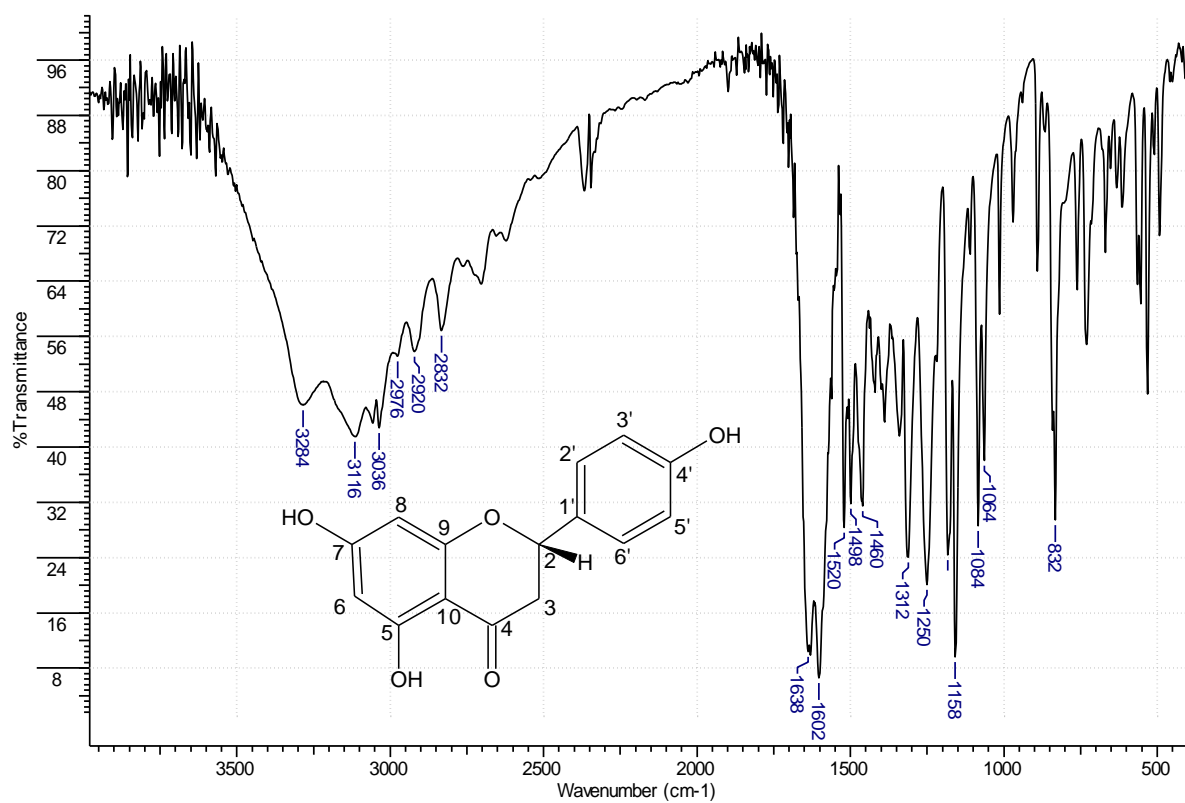


Figura A45: Espectro na região do IV de **S15** (KBr,  $\text{cm}^{-1}$ ).

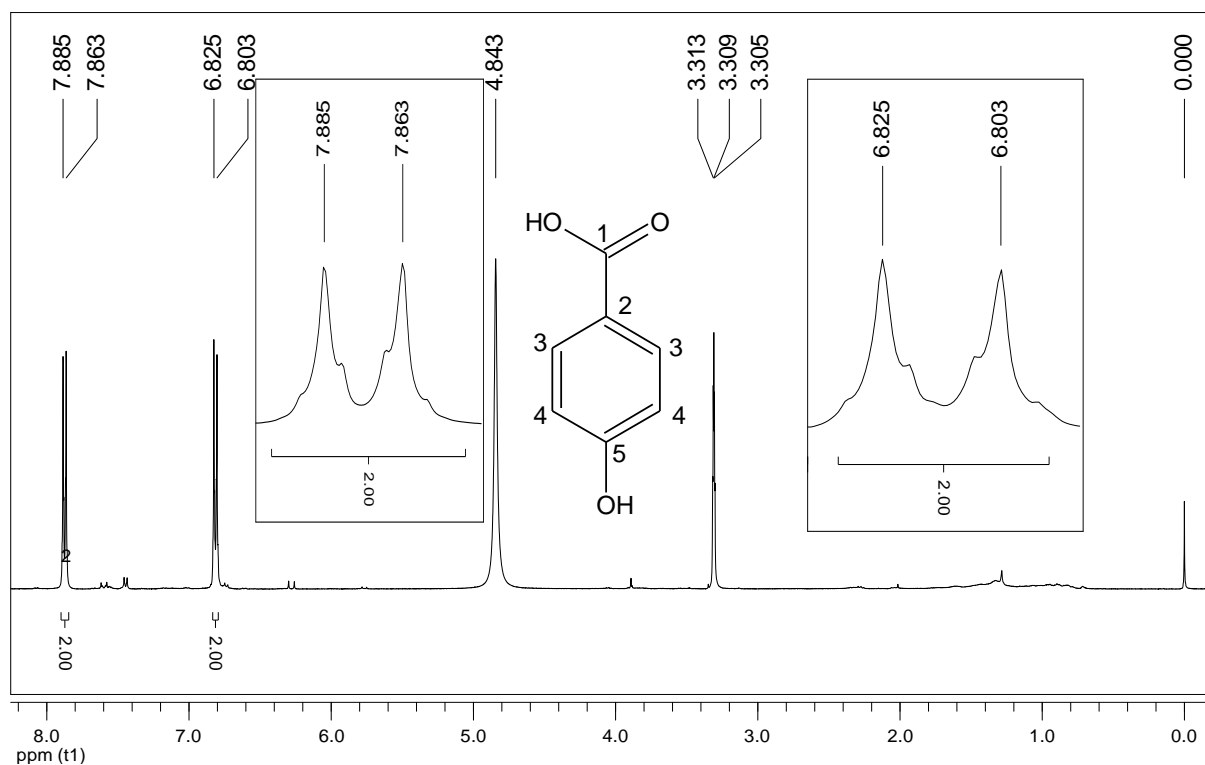
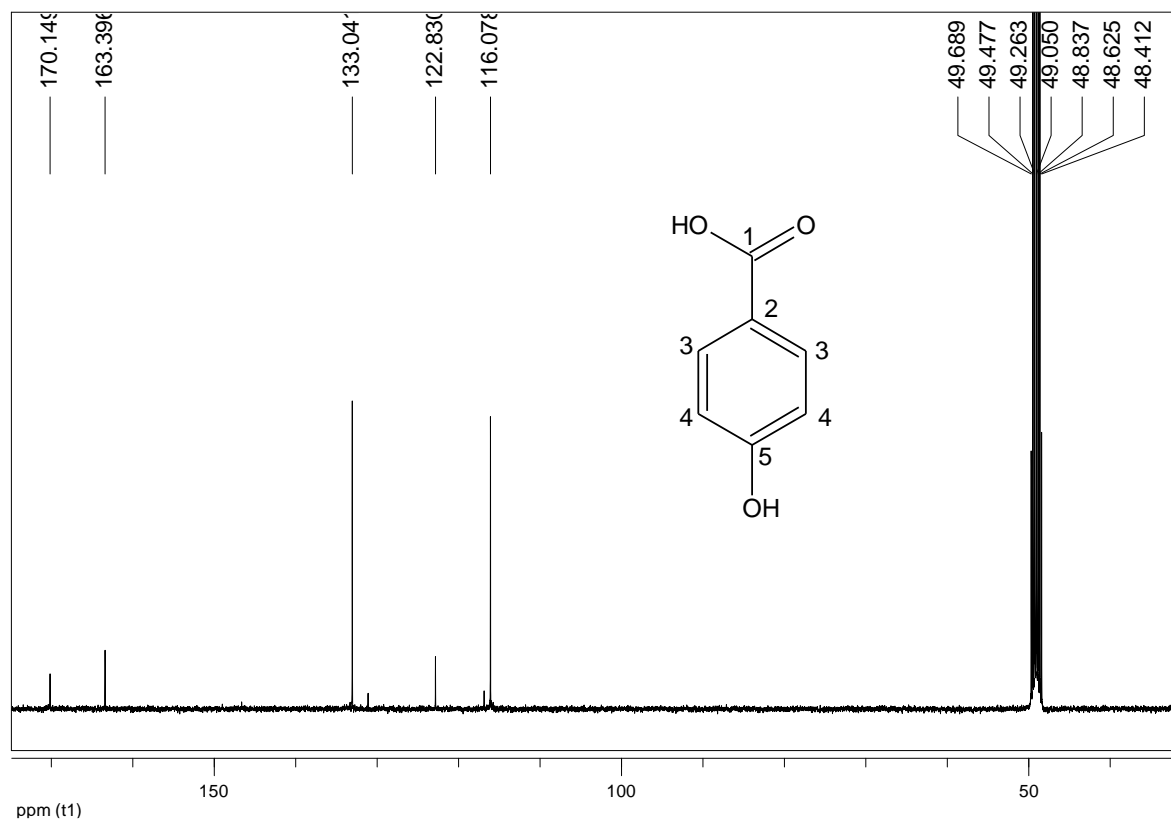
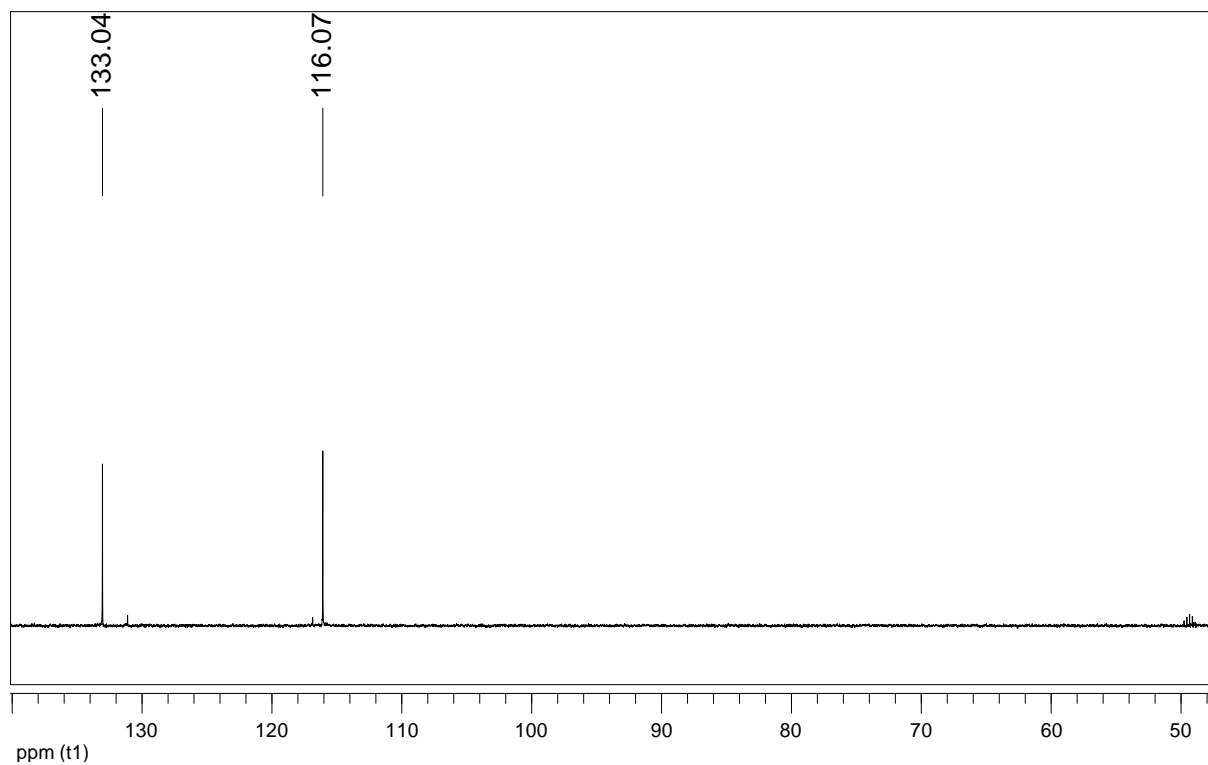


Figura A46: Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  e expansões (400 MHz) de **S16** em MeOD.



**Figura A47:** Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (100 MHz) de **S16** em MeOD.



**Figura A48:** Subespectro DEPT-135 (100 MHz) de **S16** em MeOD.



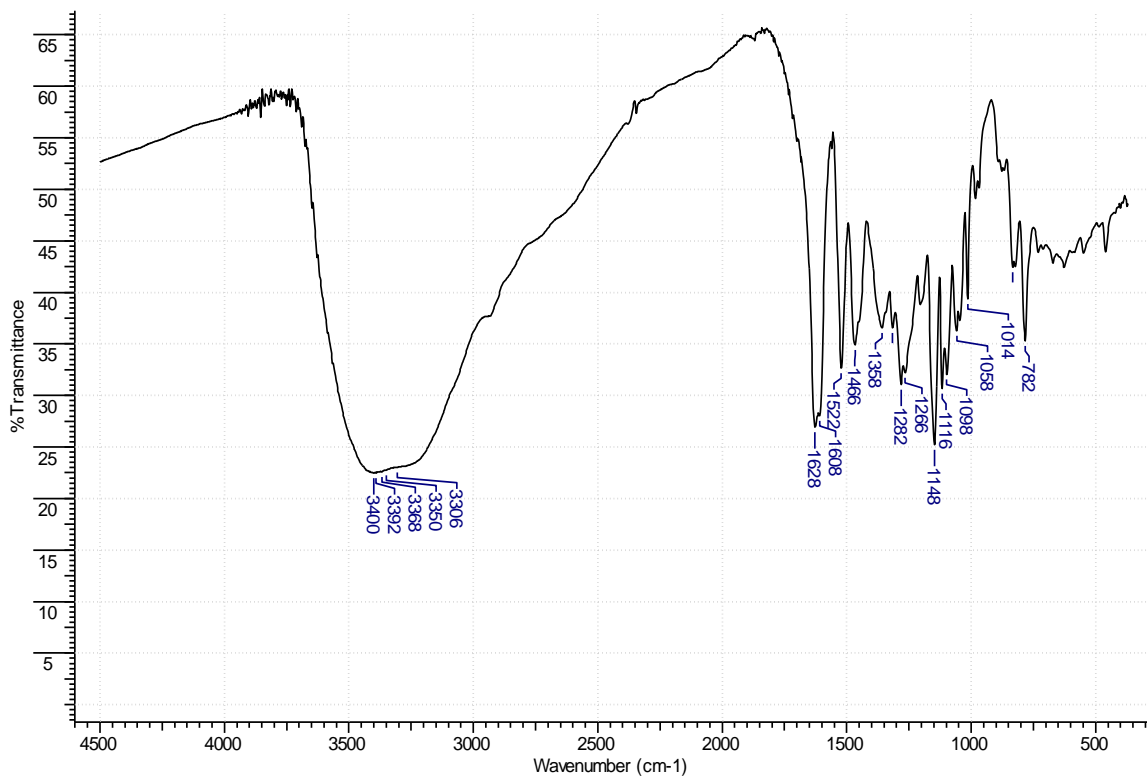


Figura A49: Espectro na região do IV de **S17** (KBr, cm<sup>-1</sup>).

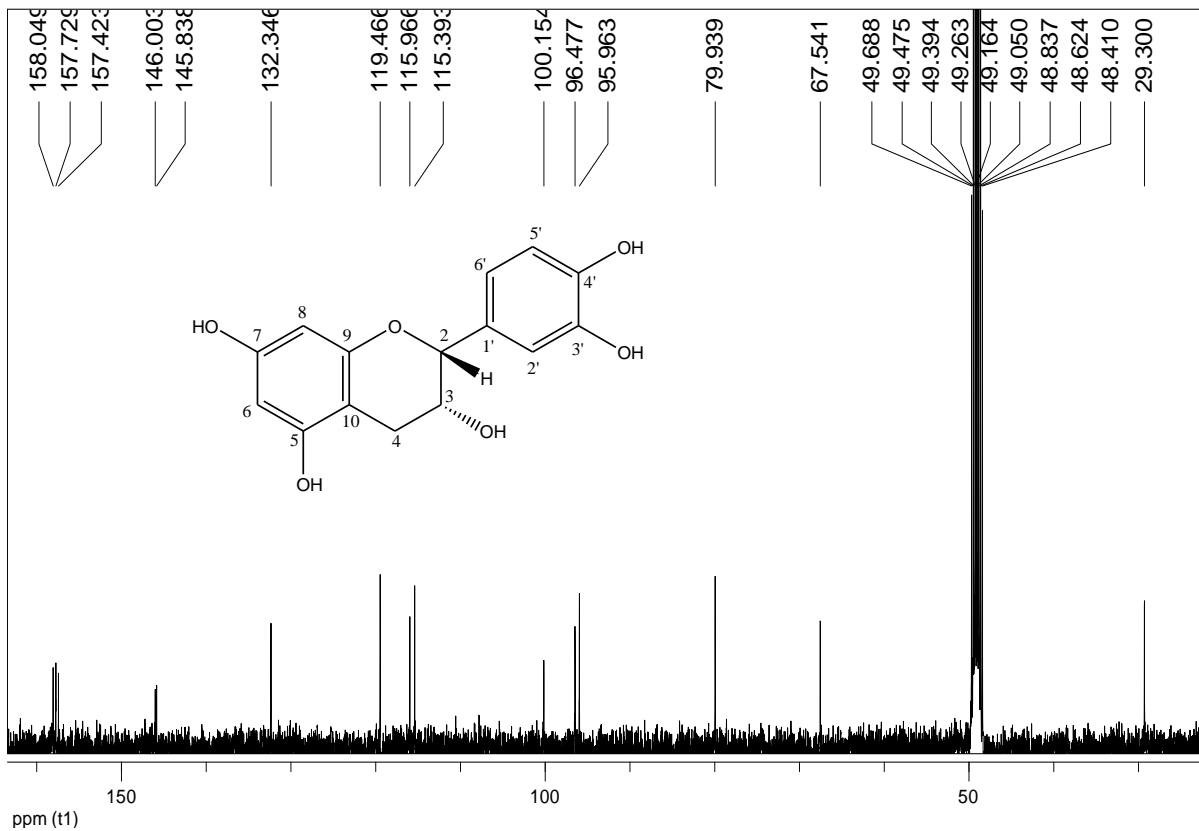


Figura A50: Espectro de RMN de <sup>13</sup>C de **S17** (CD<sub>3</sub>OD, 100 MHz).

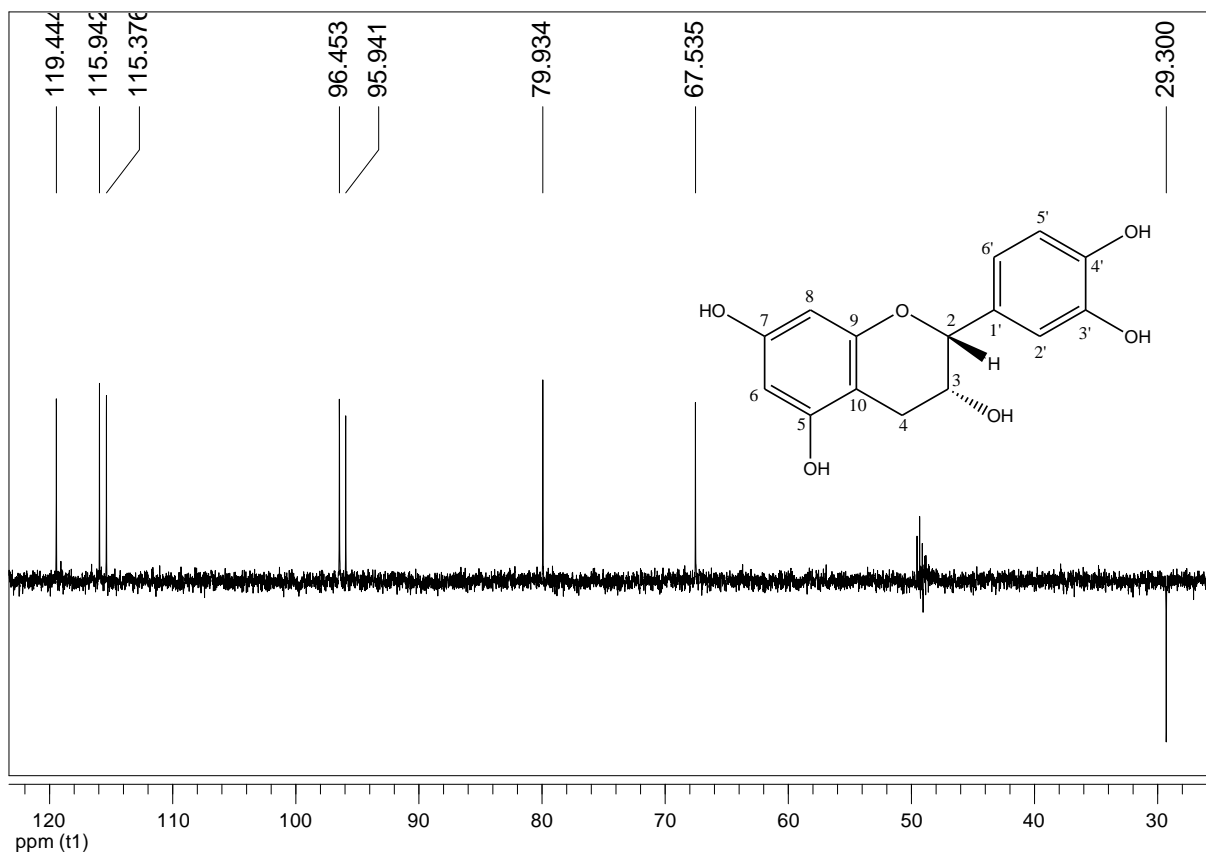


Figura A51: Subespectro DEPT-135 de **S17** (CD<sub>3</sub>OD, 100 MHz).

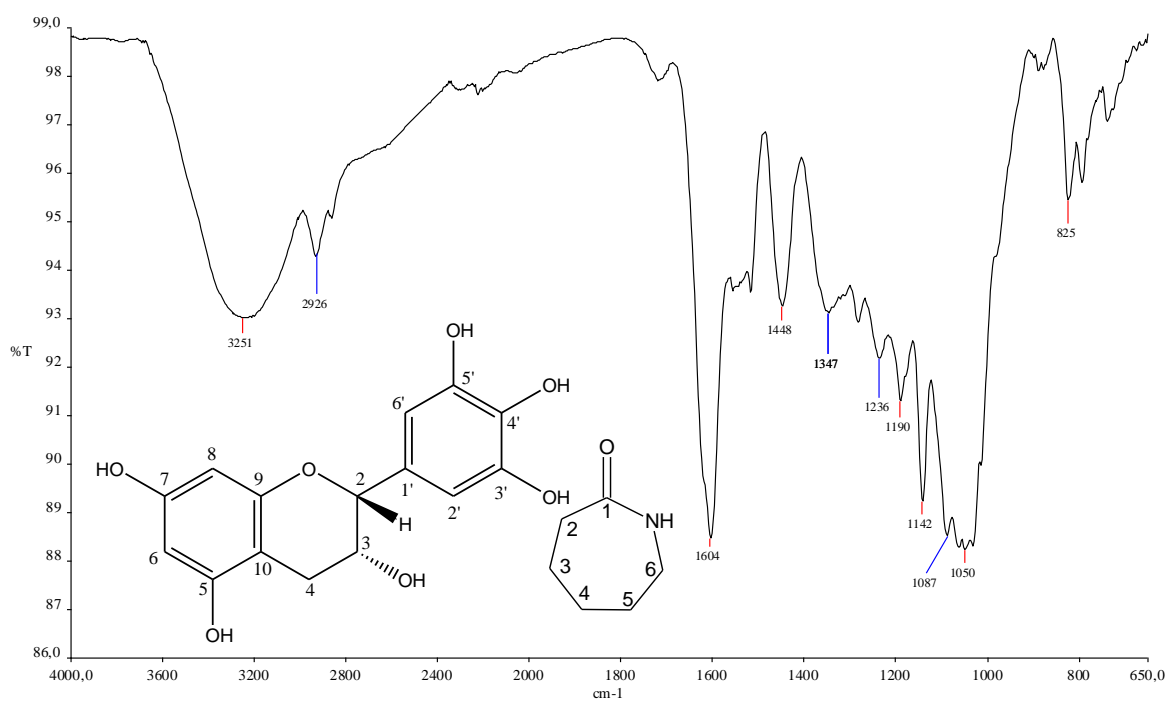


Figura A52: Espectro na região do IV de **S18 e S19** (ATR, cm<sup>-1</sup>).

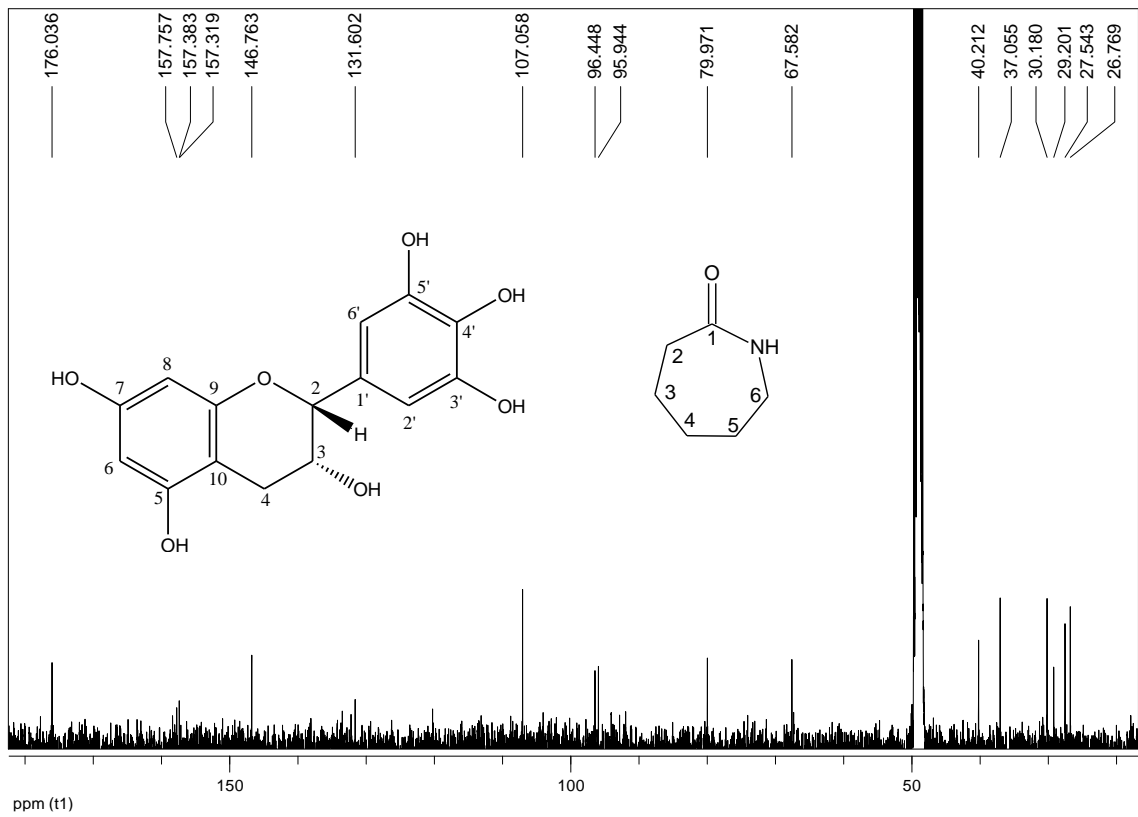


Figura A53: Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  de S18 e S19 ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 100 MHz).

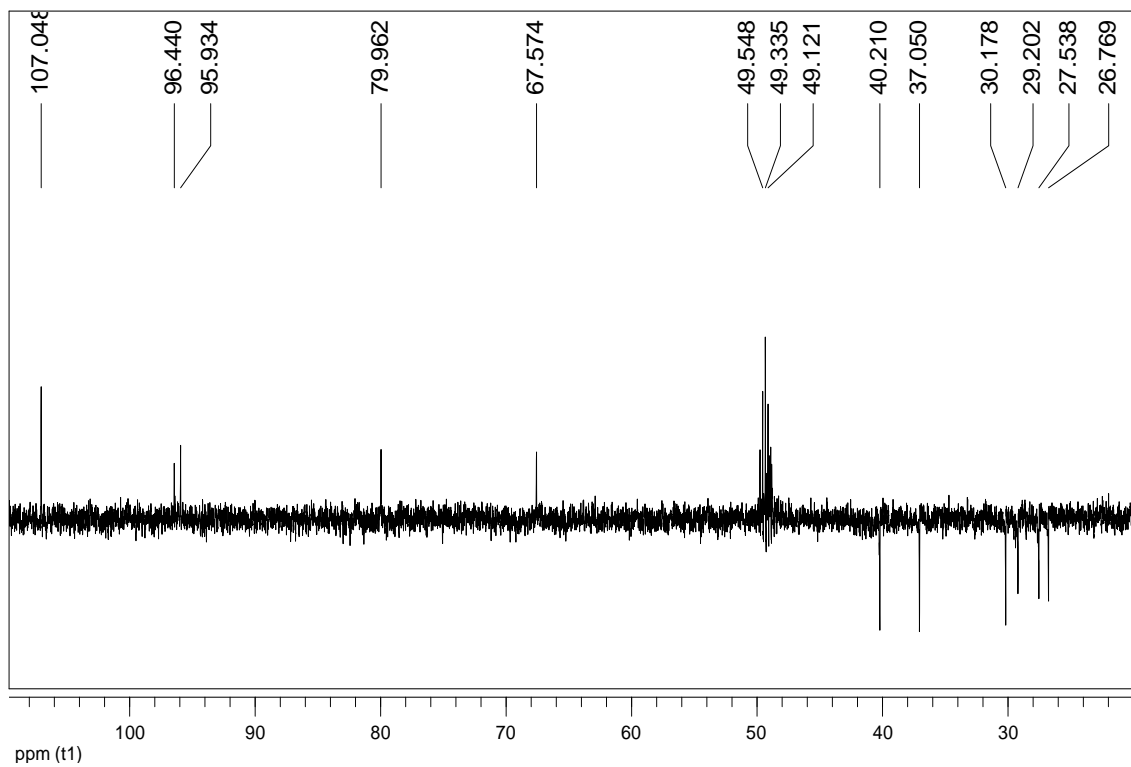


Figura A54: Subespectro DEPT-135 de S18 e S19 ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 100 MHz).

