

ESTUDO QUÍMICO, FARMACOLÓGICO E APLICAÇÃO
DE MÉTODOS COMPUTACIONAIS NA ELUCIDAÇÃO
ESTRUTURAL DE CONSTITUINTES QUÍMICOS DE
FOLHAS DE *Maytenus acanthophylla* REISSEK
(CELASTRACEAE)

DJALMA MENEZES DE OLIVEIRA

UFMG-ICE_x/DQ. 906^a

T. 398^a

DJALMA MENEZES DE OLIVEIRA

**ESTUDO QUÍMICO, FARMACOLÓGICO E APLICAÇÃO DE MÉTODOS
COMPUTACIONAIS NA ELUCIDAÇÃO ESTRUTURAL DE CONSTITUINTES
QUÍMICOS DE FOLHAS DE *Maytenus acanthophylla* REISSEK (CELASTRACEAE)**

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

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

Belo Horizonte

2012

Oliveira, Djalma Menezes de
O48e *ESTUDO QUÍMICO, FARMACOLÓGICO E APLICAÇÃO DE MÉTODOS*
2012 *COMPUTACIONAIS NA ELUCIDAÇÃO ESTRUTURAL DE CONSTITUINTES*
T *QUÍMICOS DE FOLHAS DE Maytenus acanthophylla REISSEK*
 (CELASTRACEAE)/ Djalma Menezes de Oliveira.

Belo Horizonte: UFMG, ICEX, DQ, 2012.

286f. : il.

Orientadora: Grácia Divina de Fátima Silva.

Colaboradores: Tania M. de Almeida Alves, Lucienir
Pains Duarte e Sidney Augusto Vieira Filho.

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

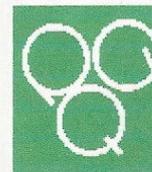
Bibliografia p.286.

1 - Química Orgânica. 2 - Fitoquímica. 3 -
Celastraceae. 4 - *Maytenus acanthophylla*. 5 -
Triterpenos pentacíclicos. I - Título II - Orientador

CDU 043



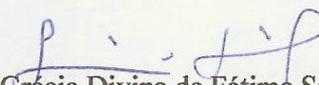
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA - ICEx
31270-901 - BELO HORIZONTE - MG
TEL.: 031 - 3499-5732
FAX: 031 - 3499-5700
E-MAIL: pgquimic@zeus.qui.ufmg.br



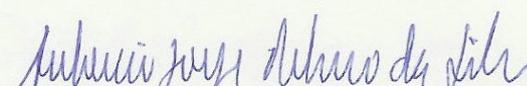
**"Estudo Químico, Farmacológico e Aplicação de Métodos Computacionais na
Elucidação Estrutural de Constituintes Químicos de Folhas de *Maytenus
acanthophylla* REISSEK (CELASTRACEAE)"**

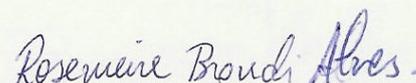
Djalma Menezes de Oliveira

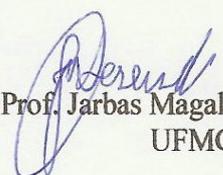
Tese aprovada pela banca examinadora constituída pelos Professores:


Profa. Grácia Divina de Fátima Silva - Orientadora
UFMG


Prof. Marcelo Henrique dos Santos
UNIFAL


Prof. Antonio Jorge Ribeiro da Silva
UFRJ


Profa. Rosemeire Brondi Alves
UFMG


Prof. Jarbas Magalhães Resende
UFMG

Belo Horizonte, 02 de maio de 2012.

O trabalho descrito nesta tese foi realizado sob a orientação da Professora Doutora Grácia Divina de Fátima Silva.

O trabalho descrito nesta tese foi realizado com as colaborações dos Professores Doutores Tânia Maria de Almeida Alves (CPQRR/FIOCRUZ), Lucienir Pains Duarte (UFMG) e Sidney Augusto Vieira Filho (UFOP).

Dedico este trabalho à minha família, pela paciência e apoio nesta difícil tarefa e grande realização. A Isabel, Renata, Carol, esposa e filhas, e a Rafael, filho e químico como eu.

∴ Ordo ab Chao ∴

*Cada planta é uma coluna solar que contribui para
sustentar o Planeta.*

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

À Profa. Dra. Grácia Divina de Fátima Silva, orientadora, pela transferência de conhecimento fitoquímico e acolhimento da minha proposta de estudo e, principalmente pela sua poderosa capacidade administrativa e senso de justiça.

À Profa. Dra. Lucienir Pains Duarte, por muito do que aprendi sobre interpretação de dados de RMN, pela amizade e bondade.

Ao Bibó, o que nunca diz não, pelo inestimável apoio, um verdadeiro frater. As suas ideias e conselhos contribuíram muito para desenvolver os trabalhos e inocular doses de incentivos contra o inevitável desânimo de alguns momentos abstrusos.

Agradeço aos membros da pré-banca, os professores Jarbas Resende e Rosemeire Brondi, pela inestimável contribuição que deram para melhorar essa tese.

À Vany Ferraz, por suas verdadeiras aulas de cromatografia, simpatia, amizade e cumplicidade na compreensão ao demasiado humano.

Ao dileto casal André Ferraz e Tuane, pelo rancho e apoio nas minhas vindas a BH na etapa final de correções.

Ao inestimável apoio e colaboração dos pesquisadores chefes do LQPN no Centro de Pesquisas René Rachou, Dra Tânia Alves e Dr. Carlos Zani. A eles devo a possibilidade de ter obtido substâncias novas.

A todo o pessoal com quem trabalhei e hoje me orgulho de cooperar no LQPN/CPQRR. Ao Ezequias (irmão nordestino). A Betânia Cota e Carolina Moreira. À Patrícia, Daniela e Susana pela realização de ensaios e amizade. A Marcinha pela simpática atenção e suporte administrativo.

À Luciana Guimarães pela valorosa parceria na representação dos alunos no colegiado da pós e pelos seus primorosos dotes para executar cálculos quânticos e físico-químicos.

Ao professor Hélio por acreditar na proposta de parceria que deu fruto, um excelente artigo científico.

Ao amigo e parceiro de moradia em BH, Rodrigo Lassarote Lavall. Grande na estatura, mas, maior ainda no companheirismo e sensatez.

À Roqueline, pela amizade e na contribuição de idéias para seguir aproveitando o tudo das mínimas quantidades e obter o máximo de moléculas novas.

Ao Professor Marcelo Henrique dos Santos pelos testes biológicos e ideias, e acima de tudo, pela amizade sincera.

À Dra. Ivana, competência e simpatia do LAREMAR da UFMG.

À Ana Cristina Morgado, pela amizade, simpatia, atenção e dicas preciosas que resultaram em excelentes espectros no IV.

À Professora Dorila Pilo Veloso pelas motivadoras conversas nos entremeses das horas extras realizadas em fins de semana e feriados.

À Professora Rute Figueiredo por suas “doces” e importantes dicas de como lidar com carboidratos.

A Professora Elaine do DCB pela atenção e disponibilidade para realizar ensaios que valorizam este trabalho.

À colega, Perpétua, pela amizade e pelas deliciosas pamonhas trazidas de Patos de Minas.

A Ana Paula Fontes pela amizade e simpatia. Também portadora de deliciosos quitutes Patenses.

À colega Glória Meléndez pela preocupação com o progresso dos trabalhos e incentivo.

Ao colega Fernando, que avia o melhor café de laboratório, um elixir para as funções cerebrais debilitadas pela “leseira” de pós-almoço.

Ao professor Rochel, homem de ciência e empreendedorismo, pela atenção e exemplo.

Aos professores Fernando Carazza pela amizade, prosa e sinceridade em suas acertadas análises de contratempos do cotidiano.

À Paulette, pelo cuidado e prontidão com que atende aos pós-graduandos.

Ao Professor Dr. Wagner Mussel pela parceria no desafiante estudo de um triterpeno por difração de raios-X de pó que, felizmente, rendeu um relato científico que muito me orgulha neste estudo.

À Profa. Dra. Vanderlúcia (UESB), pela amizade, pelo apoio e esforços para a minha vinda à UFMG.

À professora Maria Irene Yoshida pelas aulas teóricas e análises térmicas experimentais que muito aqueceram este estudo de conhecimento e informações.

Ao Sr. Antenor Lima (Maracás, Bahia) pela coleta e localização da planta, a musa *Maytenus*, inspiradora deste estudo.

À professora Rita Maria Carvalho-Okano, da UFV, pela paciência e identificação da planta.

A Dra Cristina, botânica da UFOP, que confirmou a identidade botânica de um espécime da planta.

À Professora Esperanza Cortez da Faculdade de Odontologia pela parceria e brilhante coordenação de estudos que culminaram em um invento com pedido de patente.

Ao Sr. Romário, mestre da arte da hialotécnica, decano servidor da infraestrutura da UFMG e seu pupilo Wladimir.

Ao amigo Anderson, mecânico fantástico, antes de tudo pela amizade e descontração, depois, pela atenção profissional. Enfim, a todo pessoal da infraestrutura, uma grande família competente do DQ da UFMG.

Aos estagiários e alunos de IC Juliana, Sara, Graziely, Leonardo Taffas, Vivian, Priscilla, Eric, Karina, Isabel, Daniel, Salomão, Débora, Paulo (que calma!), Lorena, Isabela e Tatiana, Elaine, por terem contribuído com tanto para com o nosso trabalho de pós-graduandos. Aos amigos do curso de pós-graduação, Daniel, Luis Cláudio (Bituca), Maurício, Ênio, Jonas, Jarbas (agora Prof. Dr. Jarbas), Géssy, Humberto, Fred, Mauro, Erúzia, Alexandre, Mara, Idelfonso, Lilian, Luciano, Fernando, Silmara, José Luis, Goiano, Esperanza Burgos, Ana Mena, Gustavo, Jackson Lamonier, Érica, Maria Meneses, Gallota, Zaqueu, Joabe, Herusa, Anayive, Cláudia e Cláudia (Manaus), Paulo, Marcos, João, Angélica, Paterson, Frank, Fabiano, Flávia, Luis, Ângelo, Rogério, Patrícia, Kelly, Daniele, Alessandra, Luíza e Rodrigo. À colega Silmara (UESB). A todos pela simpatia e sinergia.

A todos os professores do Departamento de Química que contribuíram para a conclusão desse trabalho.

Ao governo da Bahia, através da PPG-UESB, pelo suporte financeiro.

O ser humano é ao mesmo tempo singular e múltiplo. (...) Devemos ver também que todo ser, mesmo aquele fechado na mais banal das vidas, constitui ele próprio um Cosmo. Traz em si multiplicidades interiores, personalidades virtuais (...). Cada qual contém em si galáxias de sonhos e de fantasmas... (Edgar Morin).

Muito obrigado a todos!

SUMÁRIO

ÍNDICE DE FIGURAS.....	i
ÍNDICE DE TABELAS.....	xii
ÍNDICE DE ESQUEMAS	xvii
ABREVIATURAS, ACRÔNIMOS, SIGLAS E SÍMBOLOS	xviii
OBJETIVO	xxi
RESUMO.....	xxii
ABSTRACT	xxiii

CAPÍTULO 1

INTRODUÇÃO	1
Química dos Produtos Naturais: 50 anos de pesquisas	2
A Família Celastraceae.....	4
Constituintes Químicos do gênero <i>Maytenus</i>	5
<i>Maytenus acanthophylla</i> Reissek	8
Classificação Botânica.....	10
Constituintes químicos isolados de raiz de <i>M. acanthophylla</i>	11

CAPÍTULO 2

PARTE EXPERIMENTAL.....	12
Materiais e Métodos	13
Estudo Fitoquímico.....	16
Preparo dos extratos das folhas	17
Extrato das sementes (HESMA).....	17
Preparo do extrato rico em guta-percha (GHEMA).....	18
Fracionamento do extrato FHEMA.....	18
Resumo do fracionamento de FHEMA	23
Isolamento de 1,4 <i>trans</i> -poliisopreno de GHEMA	24
Fracionamento do extrato SHEMA.....	25
Resumo do fracionamento de SHEMA	32
Fracionamento do extrato FAEMA.....	32
Resumo do fracionamento de FAEMA	37
Estudo fitoquímico do extrato SEMA	38

Identificação dos monossacarídeos de SEMA por CGAR.....	39
Derivatização de monossacarídeos a acetatos de alditóis	40
Per- <i>O</i> -acetilação de SEMA	41
Resumo do estudo fitoquímico de SEMA	42
Estudo analítico de SEMA, FOMMA e FAMMA por CLAE	42
Análise por CLAE em escala semi-preparativa de FAMMA	43
Estudo por difratometria de raios X	44

CAPÍTULO 3

RESULTADOS E DISCUSSÃO	45
Métodos aplicados na Elucidação Estrutural dos Constituintes Isolados	46
MATCH-5 – Um banco de dados de espectros de RMN de ¹³ C de TTPC's	48
DETERMINAÇÕES ESTRUTURAIS DOS COMPOSTOS OBTIDOS	50
Mistura de hidrocarbonetos (1).....	51
Esqualeno (2)	53
1,4–trans-poliisopreno (3)	59
Álcool graxo (4)	68
Revisão da elucidação estrutural da friedelina (5)	72
Estudo conformacional de 5 por difração de raios-X de pó	82
Mistura de friedelina (5) e 3β-friedelinol (6)	87
3β-friedelinol (6)	89
3α-friedelinol (7).....	93
Lupeol (8)	97
3β- <i>O</i> -Acetato de lupeóla (9)	102
Mistura de 3β-esteariloxi-Olean-12-eno (10) e 3β-esteariloxi-urs-12-eno (11)	107
3β-esteariloxi-urs-12-eno (11)	111
β-Amirina, 3β-esteariloxi-Olean-12-eno (12)	116
28-Hidroxi-3-Oxo-friedelano (canofilol, 13).....	120
3β,16β-Dihidroxifriedelano (pachysandiol B, 14).....	124
3β,24- <i>di</i> -Hidroxifriedelano (15) e 3β,24- <i>di</i> -acetoxifriedelano (15a).....	141
3β-sitosterol (16)	148
Ácido graxo eicosanóico (17)	152
Mistura de monossacarídeos (18)	154
Galactitol (19) e hexa-acetato de galactitol (19a)	159
Identificação de Flavonoides Glicosídicos em SEMA por CLAE/IES-EM	167
3- <i>O</i> -{[α-L-ramnopiranosila(1→6)][α-L-ramnopiranosila(1→2)]}-β-D-galactopirano-sídeo de quercetina (20)	172

3-O-[[α -L-ramnopiranosil(1→6)]-O-[β -D-xilopiranosil(1→3)-O- α -L-ramnopiranosil-(1→2)]]- β -D-galactopiranosídeo de quercetina (21).....	181
3-O-[[α -L-ramnopiranosil(1→6)]-O-[β -D-xilopiranosil(1→3)-O- α -L-ramnopiranosil-(1→2)]]- β -D-galactopiranosídeo de canferol (22).....	202
3-O-[[α -L-ramnopiranosil(1→6)]-O-[β -D-xilopiranosil(1→3)-O- α -L-ramnopiranosil-(1→2)]]- β -D-galactopiranosídeo de isoramnetina (23).....	219
 CAPÍTULO 4	
DADOS FÍSICO-QUÍMICOS DOS COMPOSTOS	231
 CAPÍTULO 5	
ENSAIOS BIOLÓGICOS	245
ENSAIOS DE AÇÃO ANALGÉSICA EM COBAIAS	246
CAPACIDADE ANTIOXIDANTE DOS COMPOSTOS 21 e 22	248
ENSAIOS BACTERIOLÓGICOS DO EXTRATO HIDROMETANÓLICO DE FOLHAS DE <i>M. acanthophylla</i>	250
ENSAIO DE TOXICIDADE DE EXTRATOS PARA CÉLULAS TUMORAIS HUMANAS	252
ENSAIOS PARA AVALIAÇÃO DE ATIVIDADE LEISHMANICIDA DOS EXTRATOS FHEMA, FAEMA, FOMMA E SEMA.....	255
ENSAIO PARA ATIVIDADE FUNGICIDA DOS EXTRATOS FHEMA, FAEMA, FOMMA E SEMA.....	258
ENSAIO DA PROLIFERAÇÃO DE CÉLULAS MONONUCLEARES DO SANGUE PERIFÉRICO HUMANO (<i>PBMC</i>)	259
ENSAIOS DE INIBIÇÃO DE SÍNTESE DE ATP	262
 CONCLUSÃO	265
 Referências Bibliográficas	268

ÍNDICE DE FIGURAS

Capítulo 1 - Introdução

<u>Figura</u>	<u>Título</u>	<u>pp.</u>
Figura 1.1:	Funções ecológicas do metabolismo secundário de plantas, adaptada do artigo escrito por Hartmann.	2
Figura 1.2:	Quantidades relativas de TTPC's isolados de <i>Maytenus</i> no NEPLAM/ICEx/UFMG. Fontes: Teses do NEPLAM/ICEx/UFMG (1990-2009) e site: zeus.qui.ufmg.br/~neplam/celastraceae.html.	5
Figura 1.3:	Estruturas químicas de alguns TTPC's bioativos isolados de <i>Maytenus</i> sp.	6
Figura 1.4:	Flavonoides isolados de espécies <i>Maytenus</i> (Brasil).	7
Figura 1.5:	Aspecto da morfologia externa dos ramos e frutos de <i>M. acanthophylla</i> (ilustração gentilmente cedida por Carvalho-Okano).	8
Figura 1.6:	Aspectos das folhas ((a) e (b)) e dos frutos (c) de <i>M. acanthophylla</i> . Aspectos das folhas ((d) e (e)) e dos frutos (f) de <i>M. ilicifolia</i> . Fotos: (a) e (d): florabrasiliensis.cria.org.br (25/08/2009); (b), (c), e (e): próprias; (f): Fernanda Marques/Ciencia Hoje online (19/08/09).	9
Figura 1.7:	Classificação botânica de <i>Maytenus acanthophylla</i> Reissek segundo os sistemas de Cronquist e Takhtajan.	10
Figura 1.8:	Constituintes químicos isolados de raiz de <i>M. acanthophylla</i> Reissek.	11

Capítulo 2 - Experimental

<u>Figura</u>	<u>Título</u>	<u>pp.</u>
Figura 2.1:	Reação de per- <i>O</i> -acetilação do galactitol (19), componente principal de SEMA, a hexa-acetato de galactitol (19a).	41
Figura 2.2:	Sistema de refluxo utilizado para conduzir a reação de per- <i>O</i> -acetilação do extrato SEMA.	41

Capítulo 3 - Resultados e Discussão

<u>Figura</u>	<u>Título</u>	<u>pp.</u>
Figura 3.1:	Fluxograma simplificado dos passos seguidos na elucidação estrutural de compostos isolados no estudo fitoquímico de <i>Maytenus acanthophylla</i> . Notas: BD: banco de dados; CASE: Computer-Aided Structure Elucidation (Elucidação Estrutural Assistida por Computador).	47
Figura 3.2:	Representação esquemática da redução de posto da matriz de dados (MD) de MATCH-5.	49

- Figura 3.3: Espelho da planilha de entrada de dados e consulta de valores de δ de RMN de ^{13}C de TTPC's em um BD do programa MATCH-5 construído com dados da literatura. Versão 5 para planilha eletrônica (tipo Excel). 50
- Figura 3.4: Cromatograma obtido por CGAR de **1** e padrões de HC ($\text{C}_{31}\text{-C}_{36}$). Coluna: SE-30, 30 m, 0,25 mm DI, 0,25 μm (capilar) de metilpolisiloxano; Temperaturas: rampa de 200 a 320 $^{\circ}\text{C}$, razão de 5 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$, isotérmica por 1 min a 320 $^{\circ}\text{C}$. Injetor a 280 $^{\circ}\text{C}$ e detector (FID) a 300 $^{\circ}\text{C}$. 51
- Figura 3.5: Espectro de absorção de **1** na região do IV (KBr). 52
- Figura 3.6: Cromatograma de análise por CGAR de **2**. Condições: Coluna SE-30, capilar, 30 m x 0,25 mm de diâmetro interno, filme de 0,25 nm de metilpolisiloxano, Alltech, USA. Temperaturas: coluna: Inicial a 200 $^{\circ}\text{C}$, final até 320 $^{\circ}\text{C}$ por 1 min, a uma taxa de 5 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$. Detector e injetor operaram a 320 $^{\circ}\text{C}$. O índice de retenção (I) foi igual a 2689, calculado com base no cromatograma de uma série homóloga (C-22 a C-33) de HC (padrões). 53
- Figura 3.7: Cromatograma de íons totais (TIC) obtido por CGAR-EM de **2**. Condições: Coluna HP-1, capilar, 30 m x 0,25 mm de diâmetro interno, filme de 0,25 nm de metilpolisiloxano, Agilent, USA. Temperaturas: coluna: Inicial a 200 $^{\circ}\text{C}$, final até 320 $^{\circ}\text{C}$ por 1 min, a uma taxa de 5 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$. Detector e injetor operaram a 280 $^{\circ}\text{C}$. 54
- Figura 3.8: EM associado ao pico em $T_R = 12,14$ min do TIC de **2**. 54
- Figura 3.9: Fragmentograma do esqualeno com base no EM de **2**. 55
- Figura 3.10: Espectro de absorção de **2** obtido na região do infravermelho (filme de NaCl). 57
- Figura 3.11: Espectro de RMN de ^1H de **2** (CDCl_3 , 400 MHz). 57
- Figura 3.12: Espectro de RMN de (a) ^{13}C e (b) DEPT-135 de **2** (CDCl_3 , 100 MHz). 58
- Figura 3.13: (A) Termograma DSC de uma amostra de **3** (1,06 mg), obtida em um aparelho Shimadzu DSC-50 (UFMG), em uma célula de alumínio e atmosfera de gás hélio (He, 50 mL/min), com varredura entre os valores de temperatura de 25 a 100 $^{\circ}\text{C}$, mantido a 100 $^{\circ}\text{C}$ por 10 min e taxa de aquecimento de 20 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$; (B) Termograma DSC de uma amostra de **3** (reaquecimento), com varredura entre os valores de temperatura de -100 a 200 $^{\circ}\text{C}$ e taxa de aquecimento de 20 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$.. 60
- Figura 3.14: Termograma DSC de uma amostra de **3** (1,00 mg), obtida em um aparelho Shimadzu DSC-50 (UFMG), utilizando uma célula de alumínio e atmosfera de gás hélio (He, 50 mL/min), com varredura entre os valores de temperatura de -110 a 200 $^{\circ}\text{C}$ e taxa de aquecimento de 20 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$. 60
- Figura 3.15: Curvas TGA (linha contínua) e DTGA (linha pontilhada) de uma amostra de **3** (1,0 mg), obtida em um aparelho Shimadzu TGA-50H (UFMG), em uma célula de alumínio e atmosfera de ar (50 mL/min), com varredura entre os valores de temperatura de 0,00 a 800,00 $^{\circ}\text{C}$ e taxa de 61

	aquecimento de 20 °C/min.	
Figura 3.16:	Estruturas das formas cristalinas α e β do biopolímero natural 1,4- <i>trans</i> -poliisopreno.	61
Figuras 3.17:	Curva de calibração obtida pela eluição de padrões de poliestireno (PS, à esquerda) e o cromatograma de 3 , sobreposto à curva ajustada dos padrões de PS (à direita). Os cromatogramas GPC foram obtidos em um cromatógrafo Shimadzu, mediante a injeção de uma amostra de 3 , dissolvida em THF (20 μ L). Coluna HRC-SIL 5 μ m, 250 x 4,6 mm (Shimadzu), utilizando THF como fase móvel (fluxo de 0,5 mL min ⁻¹) e registro de dados em um detector de UV (λ 230 nm).	63
Figura 3.18:	Proposta de rota auto-catalítica simplificada e o ciclo para representação do mecanismo de degradação oxidativa de 3 , deduzidos com base nas análises espectrométricas e em dados da literatura para poliisoprenos (PI).	64
Figura 3.19:	Cromatograma obtido por GPC do produto de degradação oxidativa de 3 (linha contínua). Curva de calibração (ajustada) de padrões de poliestireno, PS (linha e quadrados). Os cromatogramas GPC foram obtidos em um cromatógrafo Shimadzu, mediante a injeção da amostra dissolvida em THF (20 μ L), utilizando uma Coluna HRC-Sil 5 μ m, 250 x 4,6 mm (Shimadzu), tendo THF como fase móvel (fluxo de 0,5 mL min ⁻¹) e registro de dados dotado de um detector de UV (λ 230 nm).	65
Figura 3.20:	Espectros de absorção 3 na região do infravermelho (NaCl). (A): Início do processo de degradação. (B): Após degradação de 3 por auto-oxidação.	66
Figura 3.21:	Espectro de RMN de ¹ H de 3 (CDCl ₃ , 400 MHz).	67
Figura 3.22:	Figura 3.22: Espectro de RMN de (a) ¹³ C e (b) DPT-135 de 3 (CDCl ₃ , 100 MHz).	67
Figura 3.23:	Espectro de absorção de 4 na região do infravermelho (filme de NaCl).	70
Figura 3.24:	Espectro de RMN de ¹ H de 4 (CDCl ₃ , 400 MHz).	70
Figura 3.25:	Espectro de RMN de ¹³ C de 4 (CDCl ₃ , 100 MHz).	71
Figura 3.26:	Espectro de DEPT-135 de 4 (CDCl ₃ , 100 MHz).	71
Figura 3.27:	Estrutura da friedelina (5) com as indicações (setas) das principais correlações observadas no mapa de contornos NOESY (CDCl ₃ 400 MHz, Figuras 3.37 e 3.38, p.81).	75
Figura 3.28:	Espectro de absorção de 5 na região do IV (KBr).	76
Figura 3.29:	Espectro de RMN de ¹ H de 5 (CDCl ₃ , 400 MHz).	77
Figura 3.30:	Espectro de RMN de (a) ¹³ C e (b) DEPT-135 de 5 (CDCl ₃ , 100 MHz).	77
Figura 3.31:	Mapa de contornos HSQC de 5 (CDCl ₃ , 400 MHz).	78
Figura 3.32:	Mapa de contornos COSY de 5 (CDCl ₃ , 400 MHz).	78

Figura 3.33:	Expansão do mapa de contornos COSY de 5 (F1: δ 0,70-1,85 x F2: δ 0,95-1,85, CDCl ₃ , 400 MHz).	79
Figura 3.34:	Mapa de contornos HMBC de 5 (CDCl ₃ , 400 MHz).	79
Figura 3.35:	Expansão do mapa de contornos HMBC de 5 (F1: δ 5,0-65,0 x F2: δ 0,5-2,35, CDCl ₃ , 400 MHz).	80
Figura 3.36:	Expansão do mapa de contornos HMBC de 5 (F1: δ 26,0-46,0 x F2: δ 0,70-1,65, CDCl ₃ , 400 MHz).	80
Figura 3.37:	Mapa de contornos NOESY de 5 (CDCl ₃ , 400 MHz).	81
Figura 3.38:	Expansão do mapa de contornos NOESY de 5 (F1 = δ 0,60-1,70 ppm e F2 = δ 0,70-1,26 ppm, CHCl ₃ , 400 MHz).	81
Figura 3.39:	Gráfico Rietveld de 5 . Os dados observados estão representados por pontos (●) e o padrão calculado por uma linha sólida (-). A diferença entre os dados observados e calculados estão marcados embaixo (x); as barras verticais indicam as posições das reflexões de Bragg ().	83
Figura 3.40:	Estruturas otimizadas de 5 por DFT-B3LYP/6-31G(d,p): (esquerda) confômero de baixa energia na forma cadeira-cadeira-cadeira-barco-barco (<i>cccb</i>); (direita) confômero de alta energia na forma cadeira-cadeira-cadeira-cadeira (<i>cccc</i>).	85
Figura 3.41:	Estrutura ORTEP3 (Burnett and Johnson, 1996) de 5 obtida por SDPD. Os átomos C são apresentados como elipsoides de 50% de probabilidade e os átomos de H como pequenas esferas de raios arbitrários.	86
Figura 3.42:	Espectro de absorção da mistura de 5 e 6 na região do IV (KBr).	88
Figura 3.43:	Espectros de RMN de (a) ¹³ C e (b) DEPT-135 da mistura de 5 e 6 (CDCl ₃ e piridina- <i>d</i> ₅ , 100 MHz).	88
Figura 3.44:	Espectro de absorção de 6 na região do IV (KBr).	91
Figura 3.45:	Espectro de RMN de ¹ H de 6 (CDCl ₃ , 400 MHz).	91
Figura 3.46:	Espectros RMN de (a) ¹³ C e (b) DEPT-135 de 6 (CDCl ₃ , 100 MHz).	92
Figura 3.47:	Espectro de absorção de 7 na região do IV (KBr).	95
Figura 3.48:	Espectro de RMN de ¹ H de 7 (CDCl ₃ , 400 MHz).	95
Figura 3.49:	Espectros de RMN de (a) ¹³ C e (b) DEPT-135 de 7 (CDCl ₃ , 100 MHz).	96
Figura 3.50:	Espectro absorção de 8 na região do IV (KBr).	99
Figura 3.51:	Espectro de RMN de ¹ H de 8 (CDCl ₃ , 400 MHz).	100
Figura 3.52:	Espectros de RMN de (a) ¹³ C e (b) DEPT-135 de 8 (CDCl ₃ , 100MHz).	101
Figura 3.53:	Espectro de absorção de 9 na região do IV (KBr).	104
Figura 3.54:	Espectro de RMN de ¹ H de 9 (CDCl ₃ , 400 MHz).	105
Figura 3.55:	Espectros de RMN (a) de ¹³ C e (b) DEPT-135 de 9 (CDCl ₃ , 100MHz).	106
Figura 3.56:	Espectro de absorção de 10 e 11 na região do infravermelho (Csl).	109

Figura 3.57:	Espectro de RMN de ^1H de 10 e 11 (CDCl_3 , 400 MHz).	109
Figura 3.58:	Espectro de RMN de ^{13}C de 10 e 11 (CDCl_3 , 100 MHz).	110
Figura 3.59:	Espectro de RMN DEPT-135 de 10 e 11 (CDCl_3 , 100 MHz).	110
Figura 3.60:	Espectro de absorção de 11 na região do IV (NaCl).	113
Figura 3.61:	Espectro de RMN de ^1H de 11 (CDCl_3 , 400 MHz).	114
Figura 3.62:	Espectros de RMN de (a) ^{13}C e de (b) DEPT-135 de 11 (CDCl_3 , 100MHz).	115
Figura 3.63:	Espectro de absorção de 12 na região do infravermelho.	118
Figura 3.64:	Espectro de RMN de ^1H de 12 (CDCl_3 , 200 MHz).	118
Figura 3.65:	Espectro de RMN de ^{13}C de 12 (CDCl_3 , 50 MHz).	119
Figura 3.66:	Espectro de RMN DEPT-135 de 12 (CDCl_3 , 50 MHz).	119
Figura 3.67:	Espectro de absorção de 13 na região do IV (KBr).	122
Figura 3.68:	Espectro de RMN de ^1H de 13 (CDCl_3 , 400 MHz).	122
Figura 3.69:	Espectro de RMN de ^{13}C de 13 (CDCl_3 , 100MHz).	123
Figura 3.70:	Espectro de RMN DEPT-135 (CDCl_3 , 100MHz).	123
Figura 3.71:	Estruturas otimizadas por DFT de 14 : (a) confômero <i>cccbb</i> de menor energia e (b) confômero <i>ccccc</i> de maior energia. Os átomos de carbono são representados em azul, os de oxigênio em vermelho e os de hidrogênio em branco.	126
Figura 3.72:	Correlações entre os valores experimentais (τ_{exp}) dos ângulos torcionais endocíclicos (raios-X) para 3 β -acetil-16 β -O- <i>p</i> -bromobenzoila-pachysandiol-B e os calculados (τ_{calc}) por DFT/B3LYP/6-31(d,p) para o confômero <i>cccbb</i> de 14 .	126
Figura 3.73:	Análises de dispersão entre os dados de RMN experimentais de 14 (δ de ^{13}C e δ de ^1H) e os valores obtidos por DFT-B3LYP/6-311++G(2d,p) de (a) δ_{calc} de ^{13}C do confômero <i>cccbb</i> , (b) δ_{calc} de ^{13}C do confômero <i>ccccc</i> , (c) δ_{calc} de ^1H do confômero <i>cccbb</i> , (d) δ_{calc} de ^1H do confômero <i>ccccc</i> .	130
Figura 3.74	Seção expandida do mapa de contornos HMBC de 14 na região entre δ_{H} 0,8-1,8 e δ_{C} 72-76 (CDCl_3 , 400 MHz).	132
Figura 3.75:	Seção expandida do mapa de contornos HMBC de 14 na região entre δ de ^1H 0,5-2,3 e δ de ^{13}C 10-25 (CDCl_3 , 400 MHz).	132
Figura 3.76:	Seção expandida do mapa de contornos HMBC de 14 na região entre δ de ^1H 0,6-2,0 e δ de ^{13}C 48-65 (CDCl_3 , 400 MHz).	133
Figura 3.77:	Seção expandida do mapa de contornos HMBC de 14 na região entre δ de ^1H 0,8-1,8 e δ de ^{13}C 26-55 (CDCl_3 , 400 MHz).	133
Figura 3.78:	Expansão do mapa de contornos NOESY na região entre δ de ^1H 3,7-4,05 e δ 0,95-1,90 (CDCl_3 , 400 MHz) de 14 .	134
Figura 3.79:	Expansão do mapa de contornos NOESY na região entre δ de ^1H δ 0,93-	135

	3,00 e δ 1,63-1,90 (CDCl ₃ , 400 MHz) de 14 .	
Figura 3.80:	Estrutura de 14 com as indicações das principais correlações de NOE (CDCl ₃ , 400 MHz).	135
Figura 3.81:	Correlações NOESY observadas entre os sinais de H-25 e H-26, H-28 e H-30, e entre H-29 e H α -19 (CDCl ₃ , 400 MHz) de 14 .	136
Figura 3.82:	Espectro de absorção de 14 na região do infravermelho (KBr).	138
Figura 3.83:	Espectro de RMN de ¹ H de 14 (CDCl ₃ , 400 MHz).	138
Figura 3.84:	Espectro de RMN de ¹³ C de 14 : (CDCl ₃ , 100 MHz).	139
Figura 3.85:	Espectro de RMN DEPT-135 de 14 (CDCl ₃ , 100 MHz).	139
Figura 3.86:	Mapa de contornos HSQC de 14 (CDCl ₃ , 400 MHz).	140
Figura 3.87:	Expansão do mapa de contornos HMBC de 15a (CDCl ₃ , 400 MHz): Correlação ³ J _{C-4/H-24a} (F2: δ 4,30-4,50 x F1: δ 47,0-49,5).	142
Figura 3.88:	Espectro de absorção de 15 na região do infravermelho (KBr).	145
Figura 3.89:	Espectro de RMN de ¹ H de 15 (CDCl ₃ , 400 MHz).	145
Figura 3.90:	Espectros de RMN de (a) ¹³ C e (b) DEPT-135 de 15 (CDCl ₃ , 100 MHz).	146
Figura 3.91:	Espectro de RMN de ¹ H de 15a (CDCl ₃ , 400 MHz).	146
Figura 3.92:	Espectros de RMN de (a) ¹³ C e (b) DEPT-135 de 15a (CDCl ₃ , 100 MHz).	147
Figura 3.93:	Espectro de absorção de 16 na região do infravermelho (KBr).	149
Figura 3.94:	Espectro de RMN de ¹ H de 16 (CDCl ₃ , 400 MHz).	150
Figura 3.95:	Espectros de RMN de (a) ¹³ C e de (b) DEPT-135 de 16 (CDCl ₃ , 100 MHz).	151
Figura 3.96:	Espectro de RMN de ¹ H de 17 (CDCl ₃ , 400 MHz).	153
Figura 3.97:	Espectro de RMN de (a) ¹³ C e (b) DEPT-135 de 17 (CDCl ₃ , 100 MHz).	153
Figura 3.98:	Projeções de Harworth das estruturas dos monossacarídeos (18) identificados nas folhas de <i>M. acantophylla</i> por CCD, CGAR e CG-EM.	154
Figura 3.99:	Placas CCD (a) eluída com CHCl ₃ -MeOH-H ₂ O-CH ₃ COOH (6:4:1:1 v/v/v/v), revelada com anisaldeído sulfúrico. Aplicações: extrato SEMA não hidrolisado (1), fase aquosa resultante da hidrólise de SEMA (2) e padrões de: galactitol (3), D-glicose (4) e D-galactose (5); (b) eluída com clorofórmio-metanol-água (100:13,5:1 v/v/v), revelada com KMnO ₄ básico (EtOH, NaOH 0,1 mol.L ⁻¹). Aplicações: fase aquosa resultante da hidrólise de SEMA (5), e padrões de: glicose (G) e galactitol (D).	155
Figura 3.100:	Cromatogramas obtidos por CGAR de (A) padrões de ramnose (S1, t _r = 2,68 min), fucose (S2, t _r = 2,73 min), ribose (S3, t _r = 2,91 min), arabinose (S4, t _r = 3,01 min), xilose (S5, t _r = 3,36 min), manose (S6, t _r = 5,56 min), galactose (S7, t _r = 5,86) e glicose (S8, t _r = 6,06 min), que foram derivatizados a alditóis-acetatos, (B) extrato SEMA hidrolisado, reduzido e acetilado, e, (C) extrato SEMA não hidrolisado, apenas reduzido e acetilado. As amostras foram analisadas (injeção de 2 μ L) em uma coluna capilar BP10 (cianopropil fenil dimetil siloxano 14%, 30	156

- m x 0,25 mm x 0,25 μ m), divisão de fluxo de 1:80 (split), pressão de 15 psi (H₂) e temperatura programada inicial de 200 °C, seguindo a 5 °C/min até a temperatura final de 250 °C em 10 minutos em um CG Varian CP-3800.
- Figura 3.101: Cromatograma de ions totais (TIC) obtido por CG-EM de SEMA hidrolisado, reduzido e acetilado e os respectivos EM de monossacarídeos identificados na forma de acetatos de alditóis. Condições: coluna capilar DB-5 (5% fenilmetilsilicone, 30 m x 0,25 mm x 0,25 μ m de d.i.), divisão de fluxo de 1:27, arraste por He_(g) (189,2 kPa), temperaturas (T) de 120 °C a 7 °C/min até 280 °C em \approx 23 minutos, mantida por 7 minutos, até 30 minutos. Injetor, T = 280 °C; interface, T = 250 °C, em aparelho Shimadzu, modelo GCMS QP-5000, dotado de detetor EM por impacto eletrônico (70 eV). 158
- Figura 3.102: Cromatogramas obtido por CGAR de padrões de alditóis acetilados (B) das seguintes aldoses: ramnose (1, t_r = 2,89 min), ribose (2, t_r = 3,11 min), arabinose (3, t_r = 3,22 min), xilose (4, t_r = 3,57 min), manose (5, t_r = 5,94 min), galactose (6, t_r = 6,22) e glicose (7, t_r = 6,41 min); e o cromatograma CGAR do extrato SEMA acetilado (A). As amostras foram analisadas (injeção de 2 μ L) em uma coluna capilar BP10 (cianopropil fenil-dimetilsiloxano 14%, 30 m x 0,25 mm x 0,25 μ m), divisão de fluxo de 1/80, pressão de 15 psi (H₂) e temperatura inicial de 200 °C, seguindo a 5 °C/min até a temperatura final de 250 °C em 10 minutos, utilizando um cromatógrafo CG Varian CP-3800. 160
- Figura 3.103: Seção do mapa de contornos COSY de **19a** (CDCl₃, 200 MHz). 162
- Figura 3.104: Espectro de absorção de **19** na região do infravermelho. 163
- Figura 3.105: Espectro de absorção de **19a** na região do infravermelho. 163
- Figura 3.106: Espectro de RMN de ¹H de **19** (CD₃OD, 400 MHz). 164
- Figura 3.107: Espectro de RMN de ¹H de **19a** (CDCl₃, 200 MHz). 164
- Figura 3.108: : Espectros de RMN de (a) ¹³C e (b) DEPT-135 de **19** (CD₃OD, 100 MHz). 165
- Figura 3.109: Espectro de RMN de ¹³C e de **19a** (CDCl₃, 50 MHz). 165
- Figura 3.110: Espectro de RMN de DEPT-135 de **19a** (CDCl₃, 50 MHz). 166
- Figura 3.111: Espectro EM de **19a**. Obtido por CG-EM nas condições: coluna capilar DB-5 (5% fenilmetilsilicone, 30 m x 0,25 mm x 0,25 μ m de d.i.), divisão de fluxo de 1:27 (split), arraste por He_(g) (189,2 kPa), temperaturas (T) de 120 °C a 7 °C/min até 280 °C em aproximadamente 23 min., mantida por 7 min., até 30 min.. Injetor, T = 280 °C; interface, T = 250 °C, em um CG-EM Shimadzu, modelo GCMS QP5000. Detetor IE, 70 eV. 166
- Figura 3.112: Solução de SEMA (MeOH) em (a) pH 13 e em (b).pH 1,0 167
- Figura 3.113: Cromatograma obtido por CLAE da fração solúvel em etanol (95%) dos extratos SEMA e FAMMA, com a fase móvel no seguinte gradiente (taxa de eluição de 1 mL min⁻¹): iniciado com 10% de B; depois, com 10-30% de B em cinco minutos; em seguida, foi mantido em 30% de B por 15 minutos, depois com 30-50% de B em 5 minutos e, para 168

- completar 30 minutos de análise, com 50-100% de B por 5 minutos. Onde A = ácido fórmico 0,5% em água (v/v) e B = ácido fórmico a 0,5% em acetonitrila:metanol (50:50 v/v). Foi utilizada uma coluna Shimadzu, C18 (ODS), 15 x 0,46 cm, partículas de 3 μm .
- Figura 3.114: Nomenclatura utilizada nos fragmentos de flavonoides glicosídicos. 169
- Figura 3.115: Espectros de massas (EM-IES, *offline*, modo negativo) relacionados a constituintes flavonoides glicosídicos de SEMA. 171
- Figura 3.116: Fotografia da cromatoplaça CCD em sílicagel 60G de **20**, eluente: acetato de etila:metanol: água-ácido acético 0,5% (8:2:1); revelador: NP-PEG 4000 sob luz UV λ 366 nm, $R_f = 0,25$. 172
- Figura 3.117: Espectro de absorção de **20** obtido por varredura na região do UV na cela do detector de fotodiodo, modelo SPD-M10A, acoplado à bomba LC-10AD, módulo de comunicação CBM 10A do equipamento para CLAE (Shimadzu). 173
- Figura 3.118: Seção do mapa de contornos HSQC de **20** (CD_3OD , 400 MHz) relativa aos hidrogênios e carbonos anoméricos (F2: δ de ^1H 4,50-5,80 x F1: δ de ^{13}C 99,5-104,0). 174
- Figura 3.119: Espectro de absorção de **20** na região do infravermelho. 177
- Figura 3.120: Espectro de RMN de ^1H de **20** (CD_3OD , 400 MHz). 178
- Figura 3.121: Mapa de contornos HSQC de **20** (CD_3OD , 400 MHz). 179
- Figura 3.122: Seções do mapa de contornos HMBC de **20** (CD_3OD , 400 MHz): (a) região entre δ de ^1H 1,00-8,00 e δ de ^{13}C 70-180; (b) região entre δ de ^1H 6,00-7,80 e δ de ^{13}C 90-165. 180
- Figura 3.123: Fotografia eletrônica (2.4 Mpixels), sob luz UV (lâmpada λ 366 nm), da cromatoplaça CCD em sílicagel 60G de **21**, utilizando o eluente acetato de etila-metanol-água (8:4:1 v/v/v) e revelador NP-PEG 4000, $R_f = 0,43$. 181
- Figura 3.124: Espectro de absorção de **21** obtido por varredura na região do UV na cela do detector de fotodiodo, modelo SPD-M10A, acoplado à bomba LC-10AD e módulo de aquisição de dados CBM 10A do equipamento para CLAE (Shimadzu). 182
- Figura 3.125: Seção do mapa de contornos HSQC de **21** (CD_3OD , 400 MHz) relativa aos hidrogênios e carbonos anoméricos (F2: δ de ^1H 4,5-5,90 x F1: δ de ^{13}C 100,0-107,0). 184
- Figura 3.126: Seção do Mapa de contornos COSY de **21** (CD_3OD , 400 MHz) relativa às correlações entre os sinais dos hidrogênios anoméricos e dos hidrogênios vicinais (F2: δ de ^1H 4,45-5,85 x F1: δ de ^1H 3,20-4,20). 185
- Figura 3.127: Região do mapa de contornos HMBC com as correlações atribuídas às ligações glicosídicas de **21**: (a): [- β 1-D-Gal(1 \rightarrow 3)-O-quercetina]; (b): [-Ram(1 α \rightarrow 2)Gal-]; (c): [Ram(1 α \rightarrow 6)Gal-]; (d): [Xil(1 β \rightarrow 3)Ram-]. 186
- Figura 3.128: Ampliações (A-C) do mapa de contornos NOESY de **21** (CD_3OD , 400 MHz) que mostram correlações interglicosídica conforme apresentada pelas linhas verdes tracejadas na estrutura (abaixo) racionalizada por 187

- correlações NOE e otimizada por MMFF-94 Merck.
- Figura 3.129: Curvas características de absorvância em UV de **21** obtidas em soluções de (a) MeOH, MeOH + AlCl₃, MeOH + AlCl₃ + HCl_(aq.) (b) MeOH, MeOH + NaOMe, e (c) MeOH, MeOH, MeOH + NaOAc, MeOH + NaOAc + H₃BO₃. Os dados espectrais foram registrados em um espectrômetro UV/Vis Beckman DU-600 (CPQRR, BH), ajustado para duas varreduras/amostra na faixa de comprimento de onda (λ) de 200-500 nm a 600 nm/min. 193
- Figura 3.130: Espectro de absorção de **21** na região do infravermelho. 194
- Figura 3.131: Espectro de RMN de ¹H de **21** (CD₃OD, 400 MHz). 194
- Figura 3.132: Espectro de RMN de (a) ¹³C e (b) DEPT-135 de **21** (CD₃OD, 100 MHz). 195
- Figura 3.133: Mapa de contornos HSQC de **21** (CD₃OD, 400 MHz). 196
- Figura 3.134: Mapa de contornos COSY de **21** (CD₃OD, 400 MHz). 197
- Figura 3.135: Mapa de contornos HMBC de **21** (CD₃OD, 400 MHz). 198
- Figura 3.136: Mapa de contornos NOESY de **22** (CD₃OD, 400 MHz). 199
- Figura 3.137: Espectros EM-IES de **21** no modo negativo a partir do íon-radical molecular de **21** em *m/z* 888 (C₃₈H₄₈O₂₄). 200
- Figura 3.138: Espectros de massas EM-IES' de **21** obtido em modo positivo de detecção com a identificação e o isolamento (MS/MS) do íon precursor em *m/z* 911 [M + Na]⁺. 201
- Figura 3.139: Fotografia da cromatoplaça CCD em sílicagel 60G de **22**, eluente: acetato de etila:metanol: água-ácido acético 0,5% (8:2:1); revelador: NP-PEG 4000 sob luz UV λ 366 nm, R_f = 0,29. 202
- Figura 3.140: Espectro de absorção de **22** obtido por varredura na região do UV na cela do detector com fotodiodo modelo SPD-M10A, acoplado à bomba LC-10AD e módulo de aquisição de dados CBM 10A do equipamento para CLAE (Shimadzu). 203
- Figura 3.141: Seção do mapa de contornos HSQC de **22** (CD₃OD, 400 MHz) relativa aos hidrogênios e carbonos anoméricos (F2: δ de ¹H 4,5-5,70 x F1: δ de ¹³C 100,0-108,0). 204
- Figura 3.142: Seção do Mapa de contornos COSY de **22** (CD₃OD, 400 MHz) relativa às correlações entre os sinais dos hidrogênios anoméricos com os hidrogênios vicinais (F2: δ de ¹H 4,50-5,50 x F1: δ de ¹H 3,20-4,20). 204
- Figura 3.143: Região do mapa de contornos HMBC apresentando as correlações atribuídas às ligações glicosídicas de **22**: (a): -Ram(1→2)Gal-; (b): Ram(1→6)Gal-; (c): Xil(1→3)Ram-. As linhas com setas representam as correlações ³J_{H,C}. 208
- Figura 3.144: Ampliações (A-D) do mapa de contornos NOESY (CD₃OD, 400 MHz), com as correlações que permitiram consistir a atribuição das ligações glicosídicas como mostrado na estrutura 3D de **22** abaixo. 209
- Figura 3.145: Espectro de absorção de **22** na região do infravermelho. 211

Figura 3.146:	Espectro de RMN de ^1H de 22 (CD_3OD , 400 MHz).	212
Figura 3.147:	Espectros de RMN de (a) ^{13}C e (b) DEPT-135 de 22 (CD_3OD , 100 MHz).	213
Figura 3.148:	Mapa de contornos COSY (CD_3OD , 400 MHz) de 22 e expansão da região entre $\delta 3,25$ e $4,25$ ppm (F2) x $\delta 3,25$ e $4,25$ ppm (F1).	214
Figura 3.149:	Mapa de contornos HSQC de 22 (CD_3OD , 400 MHz).	215
Figura 3.150:	Mapa de contornos HMBC de 22 da região entre $\delta 80$ e 170 ppm (F1) x $\delta 5,00$ e $8,00$ ppm (F2) (CD_3OD , 400 MHz).	216
Figura 3.151:	Mapa de contornos HMBC de 22 da região entre $\delta 67$ e $107,5$ ppm (F1) x $\delta 3,30$ e $4,70$ ppm (F2). (CD_3OD , 400 MHz).	216
Figura 3.152:	Mapa de contornos NOESY de 22 (CD_3OD , 400 MHz) da região entre $\delta 3,20$ - $4,20$ ppm (F2) x $\delta 3,20$ - $4,20$ ppm (F1).	217
Figura 3.153:	Mapa de contornos NOESY de 22 (CD_3OD , 400 MHz) da região das metilas, entre $\delta 3,20$ - $4,20$ ppm (F2) x $\delta 0,85$ - $1,25$ ppm (F1).	217
Figura 3.154:	Espectro de massas EM-IES de 22 obtido no modo negativo, com varredura de 100 a 1000 m/z.	218
Figura 3.155:	Espectro de absorção de 23 obtido por varredura na região do UV na cela do detector com fotodiodo modelo SPD-M10A acoplado a uma bomba LC-10AD em um equipamento CLAE (Shimadzu).	219
Figura 3.156:	Mapa de contornos HSQC de 23 (CD_3OD , 400 MHz) - Região relativa aos sinais de carbonos e hidrogênios anoméricos.	222
Figura 3.157:	Espectro de absorção de 23 na região do infravermelho.	226
Figura 3.158:	Espectro de RMN de ^1H de 23 (CD_3OD , 400 MHz).	227
Figura 3.159:	Mapa de contornos HSQC de 23 (CD_3OD , 400 MHz).	227
Figura 3.160:	Mapa de contornos COSY de 23 (CD_3OD , 400 MHz).	228
Figura 3.161:	Mapa de contornos HMBC de 23 (CD_3OD , 400 MHz).	228
Figura 3.162:	Espectros EM-IES de 23 obtidos no modo negativo.	229
Figura 3.163:	Espectro EM ² -IES obtido no modo positivo de 23 mostrando os fragmentos do íon <i>quasi</i> -molecular $[\text{M}+\text{Na}]^+$ em m/z 925.	230

Capítulo 5 – Ensaios Biológicos

<u>Figura</u>	<u>Título</u>	<u>pp.</u>
Figura 5.1:	Tempos de latência apresentados nas medições M1 (0 min), M2 (20 min) e M3 (60 min) durante teste de analgesia utilizando a solução aquosa do extrato FOMMA aplicado em cobaias (200 mg kg^{-1} , v.o.).	247
Figura 5.2:	Efeitos de captura de radicais livres de DPPH por 21 e 22 em metanol (controle: BHT).	249
Figura 5.3:	Atividade inibidora de soluções dos extratos de folhas de <i>Maytenus acanthophylla</i> (DMSO , $20 \mu\text{g.mL}^{-1}$) sobre o crescimento (%) de três	254

linhagens de células tumorais humanas: MCF-7, TK10 e UACC-62

- Figura 5.4: Atividade leishmanicida (%) de soluções de extratos de folhas de *M. acanthophylla* (DMSO, 20 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) sobre formas amastigotas (axênicas) do protozoário causador da leishmaniose. 257
- Figura 5.5: Efeito dos glicosídeos **20** e **23** na proliferação das Células Mononucleares do Sangue Periférico humano (PBMC) estimulado com PHA. PBMC (2×10^5 /poço) foram tratados com diferentes concentrações de **20** e **23** com PHA (5 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) por 72h. Os dados são expressos como média \pm erro padrão de sete experimentos independentes realizados em triplicata. *Estatisticamente diferente do controle (PHA, DMSO 0,01%), $p<0,05$. O controle de células sem estimulação está representado por CC. 261
- Figura 5.6: Efeitos dos compostos **8**, **9** e **19a** sobre a síntese de ATP em cloroplastos de *Spinacea oleracea* L. 263

ÍNDICE DE TABELAS

Capítulo 1 - Introdução

<u>Tabela</u>	<u>Título</u>	<u>pp.</u>
Tabela 1.1:	Plantas do gênero <i>Maytenus</i> utilizadas na etnomedicina brasileira	4

Capítulo 2 - Experimental

<u>Tabela</u>	<u>Título</u>	<u>pp.</u>
Tabela 2.1:	Colunas de cromatografia líquida desenvolvidas no fracionamento de FHEMA	19
Tabela 2.2:	Frações obtidas de C-1	20
Tabela 2.3:	Agrupamentos e constituintes isolados das frações de C-1 de FHEMA	20
Tabela 2.4:	Resumo das substâncias isoladas de FHEMA	24
Tabela 2.5:	Colunas de CL desenvolvidas no fracionamento de SHEMA	26
Tabela 2.6:	Frações coletadas de C-2, amostra A1 de SHEMA	27
Tabela 2.7:	Agrupamentos e constituintes isolados das frações de C-3, amostra A2	29
Tabela 2.8:	Agrupamentos e constituintes isolados das frações de C-4, amostra A3 de SHEMA	30
Tabela 2.9:	Agrupamentos e constituintes isolados das Frações de C-5, amostra A4 de SHEMA	32
Tabela 2.10:	Resumo das substâncias isoladas de SHEMA	32
Tabela 2.11:	Colunas de CL desenvolvidas no fracionamento de FAEMA	33
Tabela 2.12:	Agrupamentos e constituintes isolados das frações de C-6	35
Tabela 2.13:	Resumo das substâncias obtidas de FAEMA	37
Tabela 2.14:	Flavonoides identificados a partir das análises dos dados de IES/EM do extrato SEMA, modo negativo e varreduras na faixa de m/z 100-2000 Da	39
Tabela 2.15:	Resumo das substâncias obtidas de SEMA	42

Capítulo 3 – Resultados e Discussão

<u>Tabela</u>	<u>Título</u>	<u>pp.</u>
Tabela 3.1:	Dados do cromatograma obtido por CGAR de 1 e de padrões de <i>n</i> -alcanos	52
Tabela 3.2:	Comparação entre os valores de δ de ^{13}C e ^1H de 2 (CDCl_3 , 400 MHz) e	56

	os valores publicados para o esqualeno	
Tabela 3.3:	Absorções na região do infravermelho de 3 na forma cristalina β (NaCl)	62
Tabela 3.4:	Comparação dos valores de deslocamentos de RMN de ^1H e de ^{13}C de 3 (CDCl_3 , 400 MHz) com dados da literatura (CDCl_3 , 400 MHz)	63
Tabela 3.5:	Comparação entre os valores de δ de ^{13}C (CDCl_3 , 100 MHz) de 4 e os respectivos valores publicados para o octadecanol (CDCl_3)	69
Tabela 3.6:	Comparação entre os valores de δ de ^1H de 4 (CDCl_3 , 400 MHz) e os respectivos valores publicados para o octadecanol (CDCl_3)	69
Tabela 3.7:	Proposta de reatribuição dos dados de RMN* e estereoquímica de 5	74
Tabela 3.8:	Dados do pó constituído de microcristais de friedelina (5)	83
Tabela 3.9:	Coordenadas atômicas fracionárias x, y, z da célula unitária (dimensões em Å) e os parâmetros de deslocamentos isotrópicos (Å^2)	84
Tabela 3.10:	Valores dos ângulos de torção endocíclicos ($^\circ$) observados por SDPD e DFT calculados para friedelina	85
Tabela 3.11:	Comparação e análise de dispersão entre os valores de δ de ^{13}C de 6 (CDCl_3 , 100 MHz) e os respectivos valores publicados para o β -friedelinol (CDCl_3 , 100 MHz)	90
Tabela 3.12:	Comparação e análise de dispersão entre os valores de δ de ^{13}C de 7 (CDCl_3 , 100 MHz) com os respectivos valores publicados para o α -friedelinol (CDCl_3 , 100 MHz)	94
Tabela 3.13:	Absorções na região do infravermelho e modos de vibração de 8	97
Tabela 3.14:	Comparação e análise de dispersão entre os valores de δ de ^{13}C de 8 (CHCl_3 , 400 MHz) e os respectivos valores publicados para o lupeol (CHCl_3 , 500 MHz)	98
Tabela 3.15:	Absorções na região do infravermelho e modos de vibração de 9	102
Tabela 3.16:	Comparação e análise de dispersão entre os dados de RMN de 9 (CDCl_3 , 400 MHz) com os respectivos valores publicados para o 3-O-acetato de lupeoíla (CDCl_3 , 400 MHz)	103
Tabela 3.17:	Comparação e análise de dispersão entre os valores de δ de ^{13}C de 10 e 11 (CDCl_3 , 100 MHz) com os respectivos valores publicados para os compostos 3 β -esteariloxi-olean-12-eno e 3 β -esteariloxi-urs-12-eno (CDCl_3 , 100 MHz)	108
Tabela 3.18:	Absorções na região do infravermelho e modos de vibração de 11	111
Tabela 3.19:	Comparação e análise de dispersão entre os valores de δ de ^{13}C e ^1H de 11 (CDCl_3 , 400 MHz) com os respectivos valores publicados para 3 β -esteariloxi-urs-12-eno (CDCl_3 , 400 MHz)	112
Tabela 3.20:	Comparação e análise de dispersão entre os valores de δ de ^{13}C de 12 (CDCl_3 , 50 MHz) com os respectivos valores publicados para β -amirina (3 β -hidroxi-olean-12-eno) (CDCl_3 , 50 MHz)	117

Tabela 3.21: Comparação e análise de dispersão entre os dados de RMN de 13 (CDCl ₃ , 400 MHz) com os respectivos valores publicados para o canofilol (CDCl ₃ , 400 MHz)	121
Tabela 3.22: Comparação entre os valores de δ de ¹³ C de 14 e os valores calculados por B3LYP/6-311++G(2d,p) para as estruturas dos confômeros <i>ccccc</i> e <i>ccccbb</i> otimizadas por DFT	128
Tabela 3.23: Comparação entre os valores δ de ¹ H de 14 e os valores calculados por B3LYP/6-311++G(2d,p) para as estruturas dos confômeros <i>ccccc</i> e <i>ccccbb</i> otimizadas por DFT	129
Tabela 3.24: Atribuição dos dados de RMN de 14	137
Tabela 3.25: Comparação e análise de dispersão entre os valores de δ de ¹³ C de 15 e 15a (CDCl ₃ , 100 MHz) com os respectivos valores publicados para os compostos 3 β ,24-dihidroxifriedelano (piridina- <i>d</i> ₅ , 100 MHz) e 3 β ,24-diacetoxifriedelano (CDCl ₃ , 100 MHz)	143
Tabela 3.26: Comparação entre os valores de δ de ¹ H de 15 e 15a (CDCl ₃ , 400 MHz) com os respectivos valores publicados para os compostos 3 β ,24-dihidroxifriedelano (piridina- <i>d</i> ₅ , 400 MHz) e 3 β ,24-diacetoxifriedelano (CDCl ₃ , 400 MHz)	144
Tabela 3.27: Comparação e análise de dispersão entre os valores de δ de ¹³ C de 16 (CDCl ₃ , 100 MHz) com os respectivos valores publicados para β -sitosterol (CDCl ₃ , 100MHz)	149
Tabela 3.28: Comparação entre os valores de δ de ¹³ C de 17 (CDCl ₃ , 100 MHz) com os respectivos valores publicados para o ácido araquidônico (CDCl ₃ , 100 MHz)	152
Tabela 3.29: Monossacarídeos livres (FS) e ligados (BS) identificados no extrato SEMA através da análise do cromatograma CGAR (Figura 3.100 (A), (B) e (C), p.156)	157
Tabela 3.30: Comparação entre os valores de δ de ¹³ C observados de 19 (MeOH, 50 MHz) e 19a (CDCl ₃ , 50 MHz) e os respectivos valores publicados para o galactitol (D ₂ O, 400 MHz) ²⁵ e hexa-acetato de galactitol (CDCl ₃ , 15 MHz)	161
Tabela 3.31: Atribuição dos valores de δ de ¹ H de 19 (MeOH, 200 MHz) e 19a (CDCl ₃ , 200 MHz) e comparação com os dados da literatura para o galactitol (D ₂ O, 400 MHz)	161
Tabela 3.32: Análise do cromatograma obtido por CLAE de SEMA (Figura 3.113)	168
Tabela 3.33: Flavonoides glicosídicos detectados no extrato SEMA por EM-IES no modo negativo (<i>offline</i>)	170
Tabela 3.34: Comparação entre dos valores de δ de ¹³ C de 20 (CD ₃ OD, 100 MHz) com os valores encontrados na literatura para a 3- <i>O</i> -{[α -L-ramnopiranosila(1 \rightarrow 6)][α -L-ramnopiranosila(1 \rightarrow 2)]}- β -D-galactopiranosídeo de quercetina (δ , CD ₃ OD, 100 MHz) isolado de <i>M. ilicifolia</i> e <i>M. aquifolium</i>	175

Tabela 3.35: Comparação entre os valores de δ de ^1H de 20 (CD_3OD , 400 MHz) com os valores encontrados na literatura para 3- <i>O</i> -{[α -L-ramnopiranosila(1 \rightarrow 6)][α -L-ramnopiranosila(1 \rightarrow 2)]}- β -D-galactopiranosídeo de quercetina (δ , CD_3OD , 400 MHz) isolado de <i>M. ilicifolia</i> e <i>M. aquifolium</i>	176
Tabela 3.36: Dados espectrais de 21 na região do UV	182
Tabela 3.37: Atribuição dos valores de δ de ^{13}C de 21 (CD_3OD , 100 MHz) e a comparação com valores disponíveis da literatura	189
Tabela 3.38: Atribuição dos valores de δ de ^1H de 21 (CD_3OD , 400 MHz) de 21 e a comparação com os valores encontrados na literatura	190
Tabela 3.39: Proposta de fragmentação para o tetraglicosídeo 21 e a atribuição dos íons observados nos EM-IES negativo (Figura 3.137, p.200), de acordo com a nomenclatura de Domon e Costello	191
Tabela 3.40: Fragmentograma proposto para o tetraglicosídeo 21 e a atribuição dos íons (aductos do sódio) observados nos EM-IES, modo positivo, do íon precursor em m/z 912 (Figura 3.138, p.201)	192
Tabela 3.41: Atribuição dos valores de δ de ^{13}C de 22 (CD_3OD , 100 MHz) e a comparação com os valores disponíveis na literatura (δ , CD_3OD , 100 MHz) ^{38, 172}	206
Tabela 3.42: Atribuição dos valores de δ de ^1H (400 MHz) de 22 (CD_3OD , 400 MHz) e comparação com os valores encontrados na literatura (CD_3OD , 400 MHz)	207
Tabela 3.43: Fragmentação proposta para o tetraglicosídeo 22 e a atribuição dos íons observados no EM-IES, modo negativo	211
Tabela 3.44: Atribuição dos valores de δ de ^{13}C de 23 (CD_3OD , 100 MHz) e a comparação entre os valores encontrados na literatura (CD_3OD , 100/125 MHz)	221
Tabela 3.45: Atribuição dos valores de δ de ^1H de 23 (CD_3OD , 400 MHz) e a comparação com os valores encontrados na literatura referentes à genina e cadeia glicosídica (CD_3OD , 400/500 MHz)	223
Tabela 3.46: Fragmentação proposta para o tetraglicosídeo 23 e a atribuição dos íons observados nos EM-IES, modo negativo (Figura 3.162, p.229)	225
Tabela 3.47: Atribuição dos íons-fragmentos obtidos na detecção IES-EM de 23 no modo positivo (Figura 3.163, p.230)	225

Capítulo 5 – Ensaio Biológicos

<u>Figura</u>	<u>Título</u>	<u>pp.</u>
Tabela 5.1:	Potencial analgésico de FOMMA (%)*	247
Tabela 5.2:	Atividade antimicrobiana <i>in vitro</i> do extrato metanólico de folhas de <i>M. acanthophylla</i> , (FAMMA) frente a bactérias Gram-negativas e Gram-	251

positivas	
Tabela 5.3: Avaliação <i>in vitro</i> da atividade inibidora de soluções (DMSO, 20 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) de extratos de folhas de <i>M. acanthophylla</i> sobre o crescimento (%) das linhagens de células tumorais humanas MCF-7, TK10 e UACC-62	253
Tabela 5.4: Avaliação <i>in vitro</i> da atividade leishmanicida (M%) de soluções de extratos de folhas de <i>M. acanthophylla</i> (DMSO, 20 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$), sobre formas amastigotas e axênicas do protozoário causador da leishmaniose	257
Tabela 5.5: Concentração Inibitória Mínima de extratos de folhas de <i>M. acanthophylla</i> ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) contra espécies de <i>Candida</i> <i>C. albicans</i> , <i>C. krusei</i> e <i>C. glabrata</i>	259

ÍNDICE DE ESQUEMAS

Capítulo 2 – Experimental

<u>Figura</u>	<u>Título</u>	<u>pp.</u>
Esquema 2.1:	Preparação dos extratos de folhas de <i>M. acanthophylla</i> .	17
Esquema 2.2:	Roteiro para obtenção de extrato rico em guta-percha de folhas de <i>M. acanthophylla</i> (GHEMA).	18
Esquema 2.3:	Fracionamento do extrato FHEMA.	19
Esquema 2.4:	Elaboração da goma extraída de folhas de <i>M. acanthophylla</i> (GHEMA).	25
Esquema 2.5:	Fracionamento da amostra A1 de SHEMA.	26
Esquema 2.6:	Fracionamento das amostras A2 e A3 de SHEMA.	29
Esquema 2.7:	Fracionamento da amostra A4 de SHEMA.	31
Esquema 2.8:	Fracionamento de FAEMA.	34
Esquema 2.9:	Fracionamento do extrato SEMA.	38
Esquema 2.10:	Fracionamento do extrato FAMMA. CLAE-PREP: Purificação utilizando coluna CLAE semi-preparativa (Shimadzu, Shim-pack ODS, 5 μ m, 20 x 250 mm, fluxo 10 mL min ⁻¹ , FM = [A + 20-30% de B], A = solução aquosa de TFA (0,1%, v/v); B = ACN-metanol (1:1 v/v) acidulada com TFA (0,1%, v/v).	43

ABREVIATURAS, ACRÔNIMOS, SIGLAS E SÍMBOLOS

%T ou T(%)	Porcentagem de transmitância
ν	Deformação axial (estiramento) ou frequência
λ	Comprimento de onda
δ	Deformação angular assimétrica ou simétrica no plano em espectrometria na região do infravermelho. Deslocamento químico em espectroscopia de ressonância magnética nuclear
Acetona- d_6	Acetona deuterada
ACN	Acetonitrila
AcOEt	Acetato de etila
Ald-Ac	Reações de derivatização de monossacarídeos a alditóis-acetatos para análise por CGAR
ATP	Adenosina trifosfato
Ax	Axial
BD	Banco de Dados
BHI	O caldo BHI (brain heart infusion) é um meio de cultura utilizado para cultivo de microrganismos.
BHT	Butil-hidróxi-tolueno
CASE	<i>Computer-Aided Structure Elucidation</i>
CCD	Cromatografia em camada delgada
CCP	Cromatografia em camada delgada preparativa
CCF	Cromatografia "Flash" em coluna - sílica gel-60 (230-400 Mesh)
CCL ou CL	Coluna de cromatografia líquida
CGAR	Cromatografia em fase gasosa de alta resolução
CG-EM	Sistema de cromatografia em fase gasosa acoplada à espectrometria de massas
CI ₅₀	Concentração inibitória à 50%
CL	Cromatografia em fase líquida
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
CLAE-EM	Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas
COSY	<i>Correlation Spectroscopy</i>
CPQRR	Centro de Pesquisas René Rachou (Fiocruz) – Belo Horizonte, MG.
d	Dupleto
DCM	Diclorometano
dd	Dupleto duplo
ddd	Duplo dupleto duplo
DEPT	<i>Distortionless Enhancement by Polarization Transfer</i>
DFT	<i>Density functional theory (teoria funcional da densidade)</i>
DMSO	Dimetilsulfóxido
DQ	Departamento de Química da UFMG
dt	Dupleto triplo
EM	Espectrometria de massas
EM-IES	Espectrometria de Massas com Ionização por <i>Eletrospray</i> (EM-IES)

eq	Equatorial
EtOH	Etanol
ϕ	Diâmetro interno de uma coluna cromatográfica e de outros cilindros
FID	<i>Flame Ionization Detector</i> (detector de ionização de chama)
FM	Fase móvel
GPC	Cromatografia por permeação em gel ou por seleção por tamanho
HC	Hidrocarboneto
HF	Hartree–Fock (método)
HD	Desvio absoluto máximo (sigla mantida igual a do artigo publicado)
HMBC	<i>Heteronuclear Multiple-Bond Correlation</i>
HMQC	<i>Heteronuclear Multiple-Quantum Correlation</i>
HSQC	<i>Heteronuclear Single-Quantum Correlation</i>
i.p	Intraperitoneal
ICEx	Instituto de Ciências Exatas da UFMG
IE	Impacto eletrônico
iNOS	Enzima NO-sintase induzida
IV	Infravermelho
J	Constante de acoplamento escalar
LAREMAR	Laboratório de Ressonância Magnética Nuclear de Alta Resolução
LB(+)	Teste de Liebermann Burchard positivo
Lit.	Literatura
LQPN	Laboratório de Química de Produtos Naturais
m	Multiplete
m/z	Razão entre a massa e carga elétrica de um íon
MATCH-5	Banco de dados de espectros de RMN de ^{13}C de TTPC's
MCF-7	Células de tumor de mama humano
MD	Matriz de dados
Me_2CO	Acetona
MeOH	Metanol
MPLC	Cromatografia líquida de média pressão
NaOAc	Acetato de sódio
NaOMe	NaOCH_3 , Metóxido de sódio
NCI	National Cancer Institute (Organismo governamental dos EUA).
NEPLAM	Núcleo de pesquisas de plantas medicinais – DQ/UFMG
NMR-Covariance	- <i>Covariance nuclear magnetic resonance spectroscopy</i>
NP-PEG	Natural Products-Polietilenoglicol (revelador para CCD)
NUPRONAT	Núcleo de Produtos Naturais da Univ. Est. do Sudoeste da Bahia
OAc	Grupo acetilóxi
ODS	Octadecilsilano
p.	Página
PBMC	Peripheral Blood Mononuclear Cell
PCA	Análise por Componentes Principais (matemática)
PES	Superfícies de Energia Potencial
P.F.	Ponto de fusão
POP	Procedimento Operacional Padrão
ppm	Partes por milhão
PS	Poliestireno
q	Quarteto

QPN	Química de Produtos Naturais
recrist.	Recristalização
R _f	Fator de retenção em cromatografia em camada delgada
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
RMSD	Raiz do desvio médio quadrado
RPM	Rotações por minuto
RPMI-1640	Meio de cultura para cultura de leucócitos humanos normais e neoplásicos, desenvolvido por Moore e colaboradores no Roswell Park Memorial Institute (EUA)
s	Simpleto
σ	Constante de blindagem magnética
SDPD	Structure Determination from Powder Diffraction (Sigla em inglês para Determinação Estrutural por Difração de Pó, técnica cristalográfica internacionalmente conhecida.
sl	Simpleto largo
SG-CA	Mistura de Sílica gel-carvão ativo (10:1)
SQR	<i>Square root</i>
SRB	Sulforodamina B
t	Tripleto
T _g	Temperatura de transição vítrea (polímeros)
TK-10	Células tumorais renais humanas
TMS	Tetrametilsilano
t _R	Tempo de retenção
tt	Tripleto triplo
TTPC	Triterpeno pentacíclico
UACC-62	Células de melanoma humano
UNICAMP	Universidade Estadual de Campinas
UV	Ultravioleta
UV-Vis	Ultravioleta-visível
v.o.	Via oral

Codificação dos extratos de folhas da planta

FAEMA	Extrato em acetato de etila de folhas de <i>M. acanthophylla</i>
FAMMA	Extrato hidroalcoólico de folhas de <i>M. acanthophylla</i>
FHEMA	Extrato hexânico de folhas de <i>M. acanthophylla</i>
FHEQM	Extrato hexânico (quente) de folhas de <i>M. acanthophylla</i>
FOMMA	Extrato Metanólico de folhas de <i>M. acanthophylla</i>
GHEMA	Sólido precipitado do extrato FHEQM
SEMA	Sólido precipitado de FOMMA
SHEMA	Sólido precipitado do extrato FHEMA

OBJETIVO GERAL

O OBJETIVO GERAL DESSE ESTUDO FOI DAR CONTINUIDADE À EXPLORAÇÃO CIENTÍFICA DA PLANTA *Maytenus acanthophylla* REISSEK, POR MEIO DA INVESTIGAÇÃO SISTEMÁTICA DE SUAS POTENCIALIDADES QUÍMICAS, FARMACOLÓGICAS E A CAPACIDADE DE FORNECER MATERIAIS RENOVÁVEIS.

Objetivos específicos:

- ✚ Dar continuidade ao estudo fitoquímico de *Maytenus acanthophylla* Reissek, utilizando as partes aéreas, abordando o fracionamento, identificação e caracterização detalhada de constituintes químicos obtidos dos extratos em hexano, acetato de etila e metanol, para assim, obter o perfil e o potencial químico dessa planta.
- ✚ Realizar testes e ensaios biológicos, utilizando extratos e os constituintes isolados, visando avaliar o potencial farmacológico da planta.
- ✚ Obtenção e caracterização de polímero natural 1,4-*trans*-poliisopreno de *M. acanthophylla*.
- ✚ Investigar as propriedades e aplicações do polímero 1,4-*trans*-poliisopreno, tendo em vista a sua disponibilidade como um material plástico renovável em substituição a outros materiais derivados de combustíveis fósseis.

Resumo

Esta tese versa sobre o estudo químico e farmacológico de folhas de *Maytenus acanthophylla* Reissek (Celastraceae), uma planta medicinal da Bahia (espinheira-santa). O objetivo geral consistiu na investigação sistemática das potencialidades químicas, farmacológicas e a capacidade de fornecer materiais renováveis dessa planta. O material de estudo foi coletado de espécimes encontrados na Região da Chapada Diamantina no Estado da Bahia. No presente trabalho foram transcritos os métodos, filosofias de trabalho e os resultados obtidos no estudo fitoquímico, bem como, os resultados de ensaios biológicos feitos com alguns compostos isolados e extratos. As estruturas dos compostos obtidos foram elucidadas por técnicas espectroscópicas (RMN 1D e 2D, EM-IES, CG-EM, IV, UV e difração de raios-X) com o suporte de banco de dados e programas computacionais de cálculos *ab initio* e modelagem molecular. O estudo fitoquímico permitiu a obtenção de trinta compostos químicos, sendo 21 puros e nove constituindo misturas. Nos extratos em metanol e metanol/água foram isolados três flavonoides inéditos, o 3-*O*-{[α -L-ramnopiranosil(1 \rightarrow 6)]-*O*-[β -D-xilopiranosil(1 \rightarrow 3)-*O*- α -L-ramnopiranosil(1 \rightarrow 2)]}- β -D-galactopiranosídeo de quercetina (**21**), 3-*O*-{[α -L-ramnopiranosil(1 \rightarrow 6)]-*O*-[β -D-xilopiranosil(1 \rightarrow 3)-*O*- α -L-ramnopiranosil(1 \rightarrow 2)]}- β -D-galactopiranosídeo de canferol (**22**), 3-*O*-{[α -L-ramnopiranosil(1 \rightarrow 6)]-*O*-[β -D-xilopiranosil(1 \rightarrow 3)-*O*- α -L-ramnopiranosil(1 \rightarrow 2)]}- β -D-galactopiranosídeo de isoramnetina (**23**) e um flavonoide triglicosídico anteriormente isolado, o 3-*O*-{[α -L-ramnopiranosil(1 \rightarrow 6)][α -L-ramnopiranosil(1 \rightarrow 2)]}- β -D-galactopiranosídeo de quercetina (**20**). Nos extratos em hexano e acetato de etila, os constituintes isolados constam de uma mistura de hidrocarbonetos (**1**), esqualeno (**2**), 1,4-*trans*-poliisopreno (guta-percha, **3**), um álcool graxo (**4**); sete triterpenos pentacíclicos (TTPC) friedelanos: friedelina (**5**), 3 β -friedelinol (**6**), 3 α -friedelinol (**7**), 28-hidroxi-3-oxo-friedelano (canofilol, **13**), 3 β ,16 β -dihidroxifriedelano (pachysandiol B, **14**), 3 β ,24-di-hidroxifriedelano (**15**) e 3 β ,24-diacetoxifriedelano (**15a**). Os compostos **14** e **15** foram isolados pela primeira vez na família Celastraceae. Foram também isolados dois TTPC's lupanos: o 3 β -lup-20(29)-en-3-ol (lupeol, **8**) e o acetato de 3 β -lup-20(29)-en-3-ila (**9**); bem como a mistura dos isômeros 3 β -esteariloxi-olean-12-eno (**10**) e 3 β -esteariloxi-urs-12-eno (**11**). O TTPC **11**, a β -amirina (**12**), o β -sitosterol (**16**) e o ácido eicosanóico (**17**) também foram isolados puros nos extratos em hexano ou acetato de etila. Nos extratos em metanol/água foram detectadas por CG-EM as presenças de sete monossacarídeos (**18**) e o galactitol (**19**) foi isolado puro, o que permitiu a obtenção do derivado 1,2,3,4,5,6-hexa-acetato de galactitol (**19a**). O polímero **3** foi utilizado na formulação de um produto da classe dos antibióticos e antissépticos para uso odontológico, que gerou uma solicitação de registro de patente pela UFMG. Em testes biológicos, o extrato metanólico mostrou significativa atividade analgésica em camundongos, contudo, em ensaios microbianos e citotóxicos, os extratos das folhas não apresentaram ação tóxica ou inibidora contra células tumorais (MCF-7, TK10 e UACC-62), micro-organismos (bactérias e espécies de *Candida sp.*), ou sobre o protozoário da leishmaníase. Entretanto, em testes feitos com soluções de **19a** sobre cloroplastos de *Spinacea oleracea* L. foi observada a inibição da síntese de ATP, constituindo um indicativo de que **19a** pode servir de modelo para síntese de herbicidas. Os glicosídeos **21** e **22** apresentaram boas atividades em ensaios de captura de radicais livres de DPPH em solução, e **23** apresentou ação imunomoduladora em testes de proliferação de células mononucleares do sangue humano. À luz dos resultados obtidos, considerando a diversidade de constituintes químicos observados, foi possível constatar o grande potencial químico-farmacológico de *Maytenus acanthophylla* e reconhecer, por meio científico, a validade do uso de suas folhas na medicina popular.

Abstract

The aim of this work was to deal with the chemical and pharmacological studies *Maytenus acanthophylla* Reissek (Celastraceae) leaves, a medicinal plant of Bahia (holy thorn). The general objective was the systematic investigation of the plant's chemical and pharmacological potential and the ability to provide renewable materials. The study material was collected from specimens found in the region of Chapada Diamantina in the state of Bahia. In this study we transcribed methods, philosophies of work and results obtained in the phytochemical study, as well as the results of biological tests made with some isolated compounds and extracts. The structures of these compounds were elucidated by spectroscopic techniques (NMR 1D and 2D, IES-EM, GC-EM, IV, UV and X-rays diffraction) with the support of database and computer programs for *ab initio* calculations and molecular modeling. The phytochemical study allowed the isolation of thirty chemical compounds, including 21 pure and nine constituting mixtures. Three new flavonoids were isolated in methanol and methanol/water extracts: 3-*O*-{[α -L-rhamnopyranosyl(1 \rightarrow 6)]-*O*-[β -D-xylopyranosyl(1 \rightarrow 3)-*O*- α -L-rhamnopyranosyl(1 \rightarrow 2)]}- β -D-quercetin galactopyranoside (**21**), 3-*O*-{[α -L-rhamnopyranosyl(1 \rightarrow 6)]-*O*-[β -D-xylopyranosyl(1 \rightarrow 3)-*O*- α -L-rhamnopyranosyl(1 \rightarrow 2)]}- β -D-kaempferol galactopyranoside (**22**), 3-*O*-{[α -L-rhamnopyranosyl(1 \rightarrow 6)]-*O*-[β -D-xylopyranosyl(1 \rightarrow 3)-*O*- α -L-rhamnopyranosyl(1 \rightarrow 2)]}- β -D-isorhamnetin galactopyranoside (**23**); and one triglucoside flavonoid previously isolated: 3-*O*-{[α -L-rhamnopyranosyl(1 \rightarrow 6)]-*O*-[α -L-rhamnopyranosyl(1 \rightarrow 2)]}- β -D-quercetin galactopyranoside (**20**). In the hexane and ethyl acetate extracts, the isolated constituents consist of a mixture of hydrocarbons (**1**), squalene (**2**), 1,4-*trans*-polyisoprene (gutta-percha, **3**), a fatty alcohol (**4**); seven pentacyclic triterpenes (TTPC) friedelan: friedelin (**5**), 3 β -friedelinol (**6**), 3 α -friedelinol (**7**), 28-hydroxy-3-oxo-friedelan (canophyllol, **13**), 3 β ,16 β -dihydroxy friedelan (pachysandiol B, **14**), 3 β ,24-dihydroxyfriedelan (**15**) and 3 β ,24-diacetoxymfriedelan (**15a**). Compounds **14** and **15** were isolated for the first from the Celastraceae family. Two TTPC lupanes were also isolated: 3 β -lup-20(29)-en-3-ol (lupeol, **8**) and 3 β -lup-20(29)-en-3-yl acetate (**9**); as well as the isomer mixture 3 β -estearoxy-olean-12-eno (**10**) and 3 β -estearoxy-urs-12-eno (**11**). TTPC **11** a β -amyrin (**12**), β -sitosterol (**16**) and eicosanoic acid (**17**) were also isolated pure in hexane or ethyl acetate extracts. By means of GC-MS seven monosaccharides (**18**) were detected and galactitol (**19**) was isolated pure in methanol/water extracts, which allowed to obtain the derivative 1,2,3,4,5,6-hexa-galactitol acetate (**19a**). The polymer **3** was used to formulate antibiotic and antiseptic products for use in dentistry, which generated a request for patent registration by UFMG. In biological tests, the methanol extract showed significant analgesic activity in mice; however, in microbial and cytotoxic tests the extracts of leaves showed no toxic or inhibitory action against tumor cells (MCF-7, TK10 and UACC-62), micro-organisms (bacteria and *Candida* species), or the protozoan leishmaniasis. However, in tests with solutions of **19a** on chloroplasts from *Spinacia oleracea* L. we observed an inhibition of ATP synthesis which indicated that **19a** can be a model for herbicides synthesis. In capture tests of DPPH free radicals in solution, glycosides **21** and **22** showed good activity and **23** showed immunomodulating effects in tests of proliferation of mononuclear cells from human blood. In light of the results, considering the diversity of the obtained compounds, it was possible to visualize the great chemical and pharmacological potential of *Maytenus acanthophylla* and to recognize, through scientific means, the validity of using its leaves in popular medicine.

NEPLAM – DQ-ICEEx - UFMG

1

INTRODUÇÃO

Oliveira, DM

2012

QUÍMICA DE PRODUTOS NATURAIS: 50 ANOS DE PESQUISAS

Na tentativa de esclarecer o porquê das plantas sintetizarem uma imensa e rica diversidade de metabólitos secundários compreendendo mais de 200.000 substâncias, Hartmann¹ apresentou uma revisão bem estruturada sobre os avanços na área da pesquisa envolvendo o metabolismo secundário, ou melhor, o metabolismo especial das plantas. Hartmann, nesse artigo, nos conduz pelo caminho que culminou com uma importante mudança paradigmática ocorrida nos últimos 50 anos de intensa atividade de pesquisa científica envolvendo o estudo químico e fisiológico das plantas. Até 1980, os aspectos funcionais do metabolismo secundário das plantas foram amplamente ignorados por fitoquímicos e fisiologistas vegetais, pois eles achavam que os metabólitos secundários, aqueles que não eram utilizados pela planta no seu desenvolvimento individual, eram desnecessários, detritos do metabolismo principal. A ideia de que existia uma função ecológica para o metabolismo especial das plantas apareceu ainda no século 19 com Stahl.² Em 1959, o entomologista Fraenkel *apud* Hartmann, redescobriu o artigo de Stahl, e apresentou os resultados de experimentos sobre a proteção química exercida por plantas contra animais herbívoros, tais como, lesmas e caracóis (gastropodes). Nesse artigo, Stahl concluiu que os compostos químicos secundários das plantas se formavam gradativamente, conforme a pressão seletiva de herbívoros sobre as mesmas. Após a republicação do artigo de Stahl, houve um interesse crescente pelo estudo do metabolismo especial das plantas até que, em 1971, Swain e Harbone *apud* Hartmann¹, na Europa, organizaram o primeiro Simpósio da *Phytochemical Society* sobre o tema “Ecologia Fitoquímica” e, a partir desse evento, cresceram significativamente as pesquisas relacionadas a esta área. A Figura 1.1 ilustra os aspectos funcionais do metabolismo secundário das plantas em seu relacionamento ecológico natural.

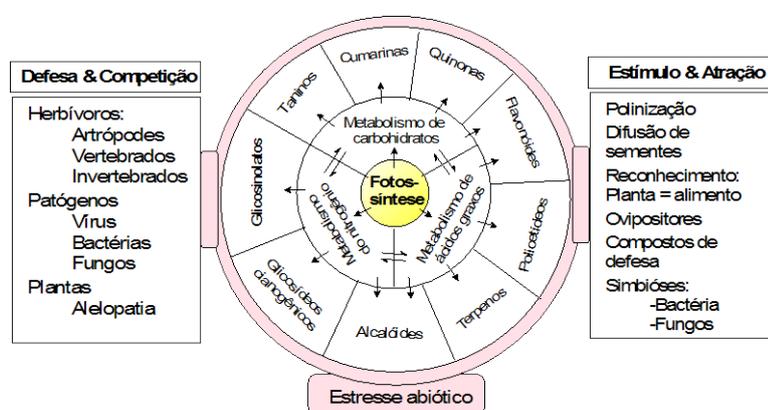


Figura 1.1: Funções ecológicas do metabolismo secundário de plantas, adaptada do artigo escrito por Hartmann.¹

No Brasil as pesquisas sobre o metabolismo de plantas e seus constituintes químicos teve como precursor o Professor Otto Gottlieb, cientista tcheco de nascimento, naturalizado brasileiro.³ Gottlieb figura como uma das mais influentes personalidades na Química Orgânica e na Química de Produtos Naturais no Brasil. A partir dos anos 60, esse cientista desenvolveu um intenso interesse na diversidade molecular da rica flora brasileira, e se tornou o pioneiro na introdução da Fitoquímica como uma das disciplinas mais importantes do contexto científico do Brasil. Por suas contribuições relevantes para o nosso conhecimento de ecogeografia, evolução e sistemática dos metabólitos secundários de plantas, foi agraciado com o prêmio *Pergamon Phytochemistry Prize* em 1992, além do que duas edições da revista *Phytochemistry* foram dedicadas a ele por ocasião do seu 80º aniversário no ano 2000. Um grande número de cientistas em atividade na área de Química dos Produtos Naturais no Brasil foi orientado, direta ou indiretamente, por ele. A influência de Gottlieb sobre a Ciência brasileira pode ser medida a partir da campanha realizada pela comunidade científica brasileira para promover sua indicação ao Prêmio Nobel em 1999.⁵ Após 50 anos de pesquisas científicas, a Química de Produtos Naturais (QPN) transformou-se em uma disciplina consistente e importante no cenário científico mundial, no qual o Brasil se acha inserido e satisfatoriamente representado. A QPN poderia estar em melhores condições caso não tivesse havido intervenções desastrosas do governo, na década de 70, a exemplo da extinção do antigo Instituto de Química Agrícola, IQA, fundado em 1918 no Rio de Janeiro, vinculado ao Ministério da Agricultura, Indústria e Comércio, órgão respeitado internacionalmente pela qualidade de suas pesquisas.⁶ Em entrevista à revista *Ciência Hoje*, publicada em outubro de 1988, Gottlieb comentou: “(...) Assistimos pasmos e indefesos, à evasão de nosso material vegetal para os EUA, Japão, Suíça e Alemanha.” e complementa, “Aqui (no Brasil) a Química de Produtos Naturais hoje é campo de treinamento de alunos de pós-graduação em busca de um título universitário”.⁶ Na verdade, raras as exceções, essas constatações são verdadeiras ainda hoje. Agora, encontramos-nos na eminência para uma nova mudança paradigmática que reformule o nosso modo de fazer Ciência e gerir o objeto de nossa atividade científica – os recursos naturais. Existe a necessidade de que essa mudança traga desenvolvimento sustentado, juntamente com a consolidação da Fitoquímica brasileira, não só para continuar a produzir conhecimento científico, mas sendo a um tempo aliada da preservação ambiental e do incentivo ao aparecimento de novos produtos químicos, farmacêuticos e tecnológicos.

A FAMÍLIA CELASTRACEAE

A família botânica Celastraceae é composta de 98 gêneros e cerca de 1300 espécies de hábitos arbustivos e arbóreos.⁷ Família cosmopolita cujas espécies são distribuídas nas regiões tropicais e subtropicais.⁸ No Brasil, foram relatados quatro gêneros da família Celastraceae: *Maytenus* Juss., *Goupia* Reissek, *Austroplenckia* Lund. e *Fraunhoferia* Mart. e mais recentemente, o gênero *Salacia* (subfamília Hippocrateaceae).⁹ As plantas desses gêneros ocorrem de norte a sul do país, principalmente na faixa territorial próxima ao litoral, havendo espécies endêmicas e outras de ocorrência mais generalizada.¹⁰ O gênero *Maytenus* Molina *emend* Molina é um dos maiores da família Celastraceae, abrangendo 200 espécies. Esse gênero é predominantemente sulamericano e muitas de suas espécies são usadas na medicina popular da América do Sul na forma de infusões ou decocções, devido às suas atividades analgésica, anti-inflamatória e antiulcerogênica. No Brasil é encontrado o maior centro de diversidade específica do gênero¹⁰ e algumas dessas plantas, utilizadas na etnomedicina brasileira encontram-se relacionadas na Tabela 1.1. Diversas espécies de *Maytenus* já foram estudadas e tiveram suas atividades farmacológicas comprovadas.¹⁴

Tabela 1.1: Plantas do gênero *Maytenus* utilizadas na etnomedicina brasileira

Espécie	Nome Popular	Parte	Forma/uso	Indicação/Ação	ref
<i>M. acanthophylla</i>	Espinheira santa	Folhas	Decocção/oral	Gastrite, úlcera.	13
	Pau-de-jararaca	Folhas	Infusão/oral	Digestivo, antisséptico, anti-inflamatória.	13
		Folhas	Decocção/banho	Infecções urogenitais.	13
<i>M. aquifolium</i>	Espinheira santa	Folhas	Decocção/oral	Analgésica e Antiulcerogênica.	14
<i>M. boaria</i>	Coração de bugre	Folhas	Chá/oral	Febre.	15
<i>M. ilicifolia</i>	Espinheira santa	Folhas	Decocção/oral	Gastrite, úlcera.	16, 17
	Espinheiros-de-deus	Folhas	Infusão ou decocção/oral	Reumatismo, febre, Distúrbios gastrointestinais.	18
		Folhas	Decocção/oral	Digestivo e antiespasmódico.	19
		Raiz	Decocção/oral	Contraceptivo.	20
		Folhas	Decocção/oral	Anticâncerígeno.	21
Flores	Decocção/oral	Anti-inflamatório.	22		
<i>M. obtusifolia</i>	Carne-de-anta; Carrancudo; Bom-nome	Folhas	Decocção/oral	Úlceras, inflamações. Câncer.	12
<i>M. rigida</i>	Bom-homem, Pau-de-colher	Casca do Caule	Decocção/oral	Anti-inflamatória, antiúlcera. Antidiarréica.	23
<i>M. robusta</i>	Piriquiteira ¹⁵	Folhas	Decocção/oral	Úlceras estomacais.	24
<i>M. salicifolia</i>	Cafezinho	Folhas	Decocção/banho	Pruridos e alergias cutâneas.	25
		Folhas	Decocção/oral	Úlceras estomacais.	25
<i>M. truncata</i>	Espinheira santa	Folhas	Decocção/oral	Gastrite, úlceras. Anti-inflamatória.	26, 27

Constituintes químicos do gênero *Maytenus*

Estudos fitoquímicos disponíveis na literatura mostram que o metabolismo secundário de espécies do gênero *Maytenus* possui uma grande variedade de compostos, vários destes pertencentes à classe dos sesquiterpenos agarofurânicos⁸, bem como à classe dos triterpenos pentacíclicos (TPPC), principalmente os das séries dos friedelanos, lupanos, ursanos, oleananos e quinonametídeos.²⁸⁻³⁶ Desse gênero, também foram isolados taninos condensados³⁷, flavonóides³⁸⁻⁴² e alcaloides sesquiterpênicos.^{20,43-46}

O conteúdo relativo de TPPC's isolados em espécies *Maytenus*, nos últimos 20 anos, por pesquisadores do grupo de pesquisa do NEPLAM/UFMG foi de aproximadamente 40% de friedelanos, 23% de lupanos, 15% de ursanos, 11% de oleananos, 6% de quinonametídeos, 2% de taraxaranos e 2,1% de dímeros de TPPC. Os TPPC's quinonametídeos isolados ocorreram exclusivamente nas raízes das plantas estudadas (Figura 1.2).

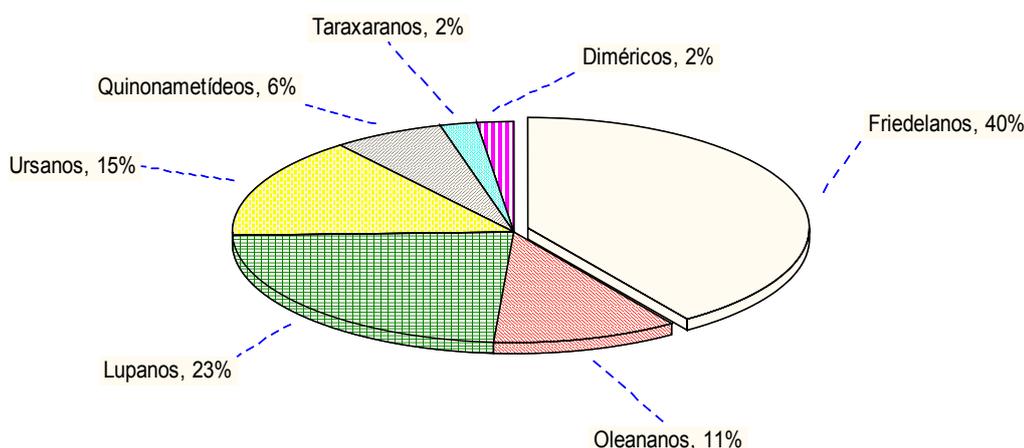


Figura 1.2: Quantidades relativas de TPPC's isolados de *Maytenus* no NEPLAM/ICEx/UFMG. Fontes: Teses do NEPLAM/ICEx/UFMG (1990-2009) e site: zeus.qui.ufmg.br/~neplam/celastraceae.html.

Diversos TPPC's apresentaram importantes atividades biológicas, a exemplo, o ácido 22α -hidroxi-olean-12-en-3-oxo-29-óico (ácido triptotriterpenóico A, Figura 1.3, pág. 6), isolado de *Maytenus macrocarpa*, com forte atividade anti-HIV (EC_{50} de 1 $\mu\text{g/mL}$ índice de seletividade de 35).⁴⁷ Derivados do lupano, a exemplo do ácido betulínico (Figura 1.3, pág. 6), apresentaram atividades contra o vírus HIV, citotóxica contra diversas células tumorais^{48,49} e anti-malária.⁵⁰ Alguns desses TPPC's lupanos, dentre eles o composto rigidol (11 α -hidroxilup-20(29)-en-3-ona), também isolado da raiz de *M. acanthophylla*, apresentaram potente atividade anti-inflamatória, inibindo a produção de óxido nítrico e prostaglandina E_2 em ratos.⁵¹ Dois TPPC's oleananos, os ácidos oleanólico e ursólico (Figura 1.3, pág. 6),

apresentaram um número surpreendente de ações farmacológicas. Esses ácidos, e alguns de seus derivados semi-sintéticos, foram ativos contra cerca de 15 linhagens de células tumorais humanas. Os pesquisadores observaram, através da relação estrutura/atividade, que esses TTPC's foram mais potentes quando apresentaram o esqueleto ursano associado a grupos formadores de ligações de hidrogênio nos carbonos C-3 e C-28.⁵² Os TTPC's quinonametídeos isolados de *Maytenus* também mostraram uma variedade de atividades farmacológicas, tais como antimicrobiana, antioxidante, antimalárica e citotóxica.^{53,54} Por exemplo, o TTPC quinonóide pristimerina (3-hidroxi-2-oxo-24-*nor*-friedelan-1-,10,3,5,7-tetraen-20 α -oato de metila), em baixas concentrações (CI₅₀: 0,2–0,3 $\mu\text{mol.L}^{-1}$), inibiu a ação da proteína NO-sintase induzida (iNOS), relacionada à produção de óxido nítrico em processos inflamatórios.⁵⁵ Em estudo mais recente, a pristimerina apresentou citotoxicidade frente às várias linhagens de células cancerosas e atividade antiploriferativa contra células tumorais humanas do tipo HL-60 (leucemia promielocítica).⁵⁶

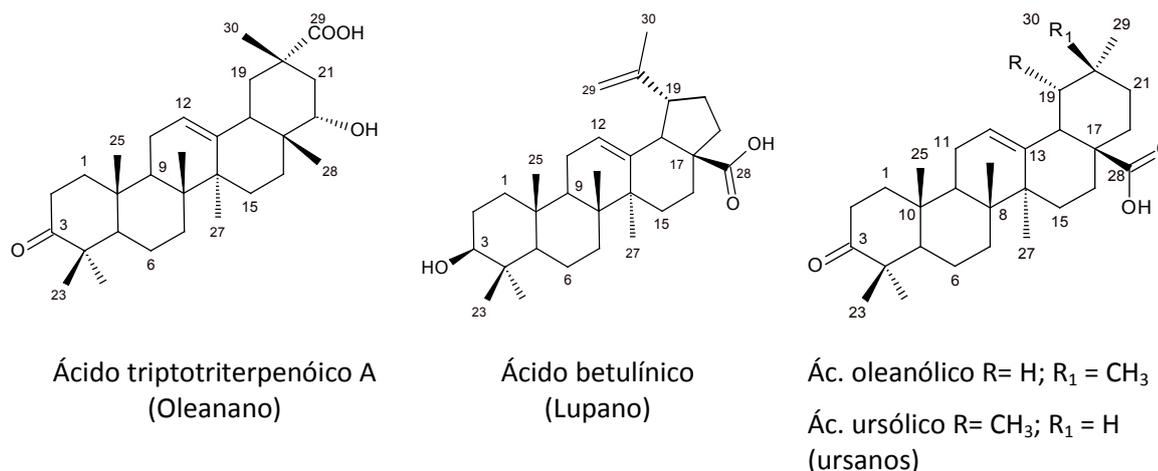


Figura 1.3: Estruturas químicas de alguns TTPC's bioativos isolados de *Maytenus sp.*

A partir de plantas do gênero *Maytenus* que ocorrem no Brasil, foram isolados vários compostos polifenólicos identificados como catequinas, proantocianidinas e alguns flavonóides glicosilados, que apresentam as geninas correspondentes ao canferol e à quercetina (Figura 1.4, p.7). De um modo geral, a literatura relata que todos esses flavonóides apresentaram propriedade antioxidante e outras, tais como anti-inflamatória, antibacteriana, antiviral, atividades antitumorais e contra lesões gástricas.⁵⁷⁻⁵⁹ Esses flavonóides conferem grande importância farmacológica às espécies desse gênero. A literatura apresenta os resultados de avaliações da atividade antiulcerogênica de partes aéreas das espécies brasileiras *Maytenus*, *M. truncata*, *M. aquifolium*, *M. ilicifolia*, *M. obtusifolia*, *M. rigida* e *M. robusta*,

em que, seus extratos aquosos ou hidroalcoólicos, ricos em flavonóides, exibem significativos efeitos de proteção antiúlceras ou cicatrizante em lesões da mucosa gástrica de animais de laboratório.^{12,14,24,26,40,60-63} Alguns desses estudos indicaram que os efeitos gastroprotetores das frações ricas em flavonóides das *Maytenus* envolvem a ativação de fatores de proteção e de redução da acidez da secreção gástrica.^{24,61,63} Os resultados desses estudos, sobre atividade antiúlceras, contribuem para a validação farmacológica e corroboram as indicações da etnomedicina dessas espécies.

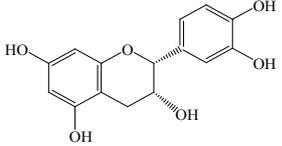
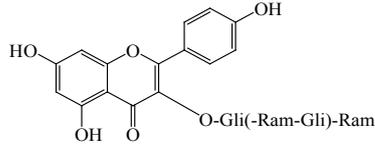
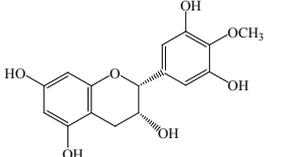
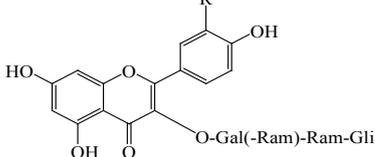
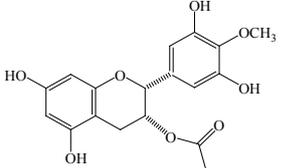
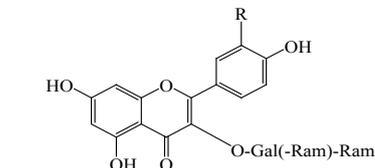
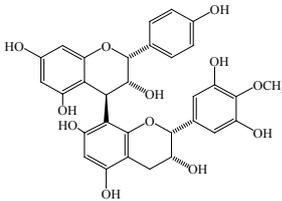
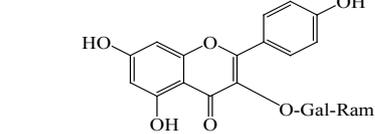
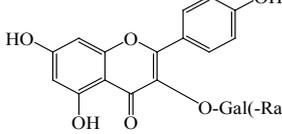
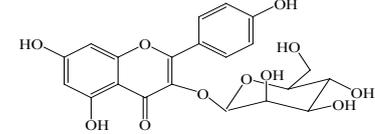
Flavonoide	Espécie ^{Ref}	Flavonoide	Espécie ^{Ref}
 <p>Epicatequina</p>	<p><i>M. aquifolium</i>⁵⁹ <i>M. imbricata</i>^{64,65}</p>	 <p>3-<i>O</i>-α-<i>L</i>-ramnopiranosil(1→6)-<i>O</i>-[α-<i>L</i>-glicopiranosil (1→3)-<i>O</i>-α-<i>L</i>-ramnopiranosil(1→2)]-<i>O</i>-β-<i>D</i>-glicopiranosídeo de canferol</p>	<p><i>M. salicifolia</i>²⁵</p>
 <p>4'-<i>O</i>-metilepigalocatequina</p>	<p><i>M. acanthophylla</i>²⁹ <i>M. aquifolium</i>⁵⁹ <i>M. obtusifolia</i>⁶⁶ <i>M. truncata</i>²⁷ <i>M. salicifolia</i>²⁵</p>	 <p>3-<i>O</i>-α-<i>L</i>-ramnopiranosil(1→6)-<i>O</i>-[β-<i>D</i>-glicopiranosil (1→3)-<i>O</i>-α-<i>L</i>-ramnopiranosil(1→2)]-<i>O</i>-β-<i>D</i>-galactopiranosídeo de canferol (R=H) e de quercetina (R=OH)</p>	<p><i>M. aquifolium</i>^{38,59} <i>M. ilicifolia</i>³⁸ <i>M. truncata</i>⁶⁷</p>
 <p>3-<i>O</i>-acetil-4'-<i>O</i>-metilepigalocatequina</p>	<p><i>M. truncata</i>²⁷</p>	 <p>3-<i>O</i>-α-<i>L</i>-ramnopiranosil(1→6)-<i>O</i>-[<i>L</i>-ramnopiranosil (1→2)]-<i>O</i>-β-<i>D</i>-galactopiranosídeo de canferol (R=H) e de quercetina (R=OH)</p>	<p><i>M. aquifolium</i>³⁸ <i>M. ilicifolia</i>³⁸</p>
 <p>Proantocianidina B</p>	<p><i>M. aquifolium</i>⁵⁹ <i>M. obtusifolia</i>⁶⁶ <i>M. truncata</i>²⁷ <i>M. salicifolia</i>²⁵</p>	 <p>3-<i>O</i>-α-<i>L</i>-ramnopiranosil(1→2)-<i>O</i>-β-<i>D</i>-galactopiranosídeo de canferol</p>	<p><i>M. aquifolium</i>³⁸ <i>M. ilicifolia</i>³⁸</p>
 <p>3-<i>O</i>-α-<i>L</i>-ramnopiranosil(1→6)-<i>O</i>-[α-<i>L</i>-arabinopiranosil(1→3)-<i>O</i>-α-<i>L</i>-ramnopiranosil (1→2)]-<i>O</i>-β-<i>D</i>-galactopiranosídeo de canferol</p>	<p><i>M. acanthophylla</i>⁶⁸ <i>M. aquifolium</i>³⁸ <i>M. ilicifolia</i>³⁸</p>	 <p>3-<i>O</i>-β-glicopiranosídeo de canferol</p>	<p><i>M. salicifolia</i>²⁵</p>

Figura 1.4: Flavonoides isolados de espécies *Maytenus* (Brasil).

Maytenus acanthophylla Reissek

M. acanthophylla (Figura 1.5) se apresenta como arbusto ou árvore de cerca de 3,0 m de altura. Os ramos novos são glabros e quadrangulares; as folhas são coriáceas de forma estreitamente elíptica ou oblongo-elíptica; limbo de 7,4 a 15,2 cm de comprimento e 2,3 a 4,2 cm de largura; margem com muitos espinhos, serrada. Inflorescência em fascículos com nodosidade.¹⁰ Carvalho-Okano relatou que *M. acanthophylla* ocorre na região do entorno e no interior da Chapada Diamantina na Bahia, e também no Norte de Minas Gerais.¹⁰ Na Bahia, *M. acanthophylla* não é uma planta domesticada, e a sua obtenção para uso na etnomedicina é baseada em extrativismo não comercial feito por comunidades rurais isoladas e vilarejos.

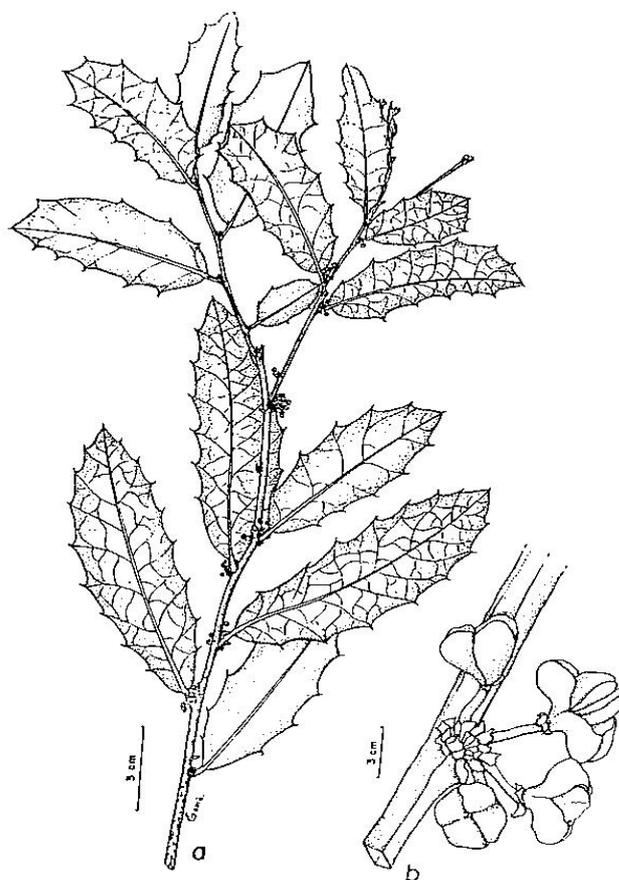


Figura 1.5: Aspecto da morfologia externa dos ramos e frutos de *M. acanthophylla* (ilustração gentilmente cedida por Carvalho-Okano).¹⁰

Atualmente, os espécimes do gênero *Maytenus* estão distribuídos por pequenas reservas de vegetação nativa em fazendas do Município de Maracás (conhecida popularmente como “espinheira-santa”) e na área inserida no perímetro da reserva natural do Parque Nacional da Chapada Diamantina, onde pode ser encontrada com o nome popular de “pau-de-jararaca”.¹⁰ Na lista de plantas ameaçadas, *M. acanthophylla* foi considerada vulnerável à extinção devido

à baixa frequência na área de ocorrência da Bahia e considerada extinta do ecossistema vegetal do Estado de Minas Gerais.⁶⁹

A infusão das folhas dessa planta é bastante utilizada na medicina popular no tratamento de úlceras, gastrites, tumores e como anti-inflamatório em “doenças de mulheres”.¹³ De modo semelhante, também ocorre na medicina tradicional do Sudeste e Sul no Brasil com as espécies *M. aquifolium* e *M. ilicifolia*. As espécies *M. acanthophylla* e *M. truncata* são também chamadas popularmente de “espinheira-santa” e têm similares aplicações na etnomedicina.²⁹ A espécie *M. acanthophylla* é a espinheira-santa do Nordeste brasileiro, que apresenta uma boa semelhança à *M. ilicifolia* (Figura 1.6). Carvalho-Okano¹¹ relatou que *M. acanthophylla* pode ser confundida com *M. ilicifolia* e que a distinção entre as duas espécies pode ser feita através dos frutos. Os de *M. acanthophylla* são tetrágonos e os de *M. ilicifolia* são orbiculares.

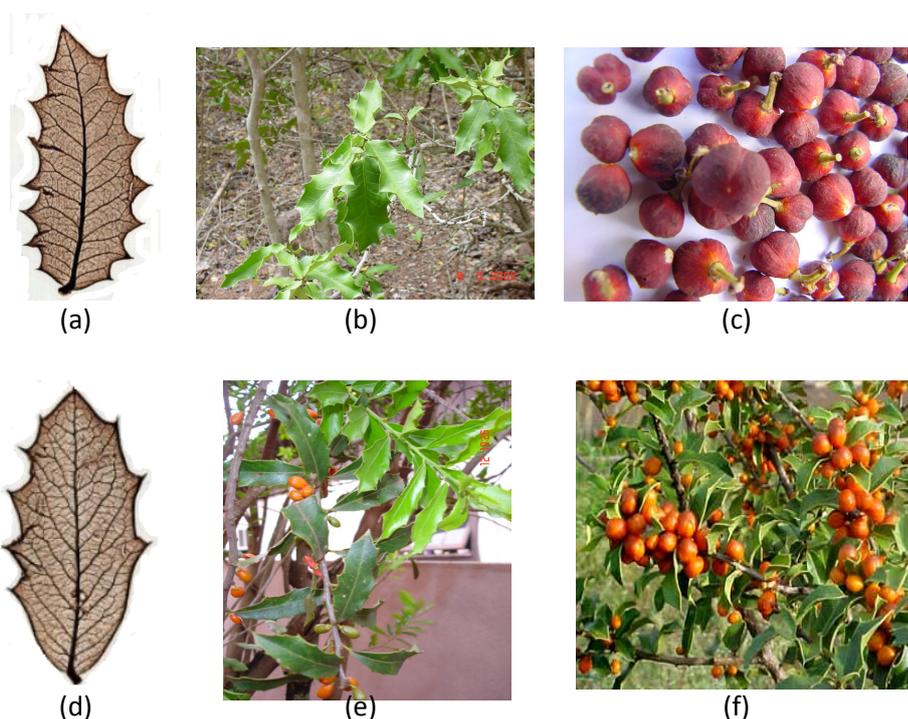


Figura 1.6: Aspectos das folhas [(a) e (b)] e dos frutos (c) de *M. acanthophylla*. Aspectos das folhas [(d) e (e)] e dos frutos (f) de *M. ilicifolia*. Fotos (a) e (d): florabrasiliensis.cria.org.br (25/08/2009); (b), (c), e (e): próprias; (f): Fernanda Marques/Ciencia Hoje online (19/08/09).

Classificação botânica

A classificação botânica da espécie *Maytenus acanthophylla* Rissek, mostrada na Figura 1.7 (abaixo), está de acordo com os sistemas taxonômicos de Cronquist (1988)⁷⁰ e Takhtajan (1967).⁷¹

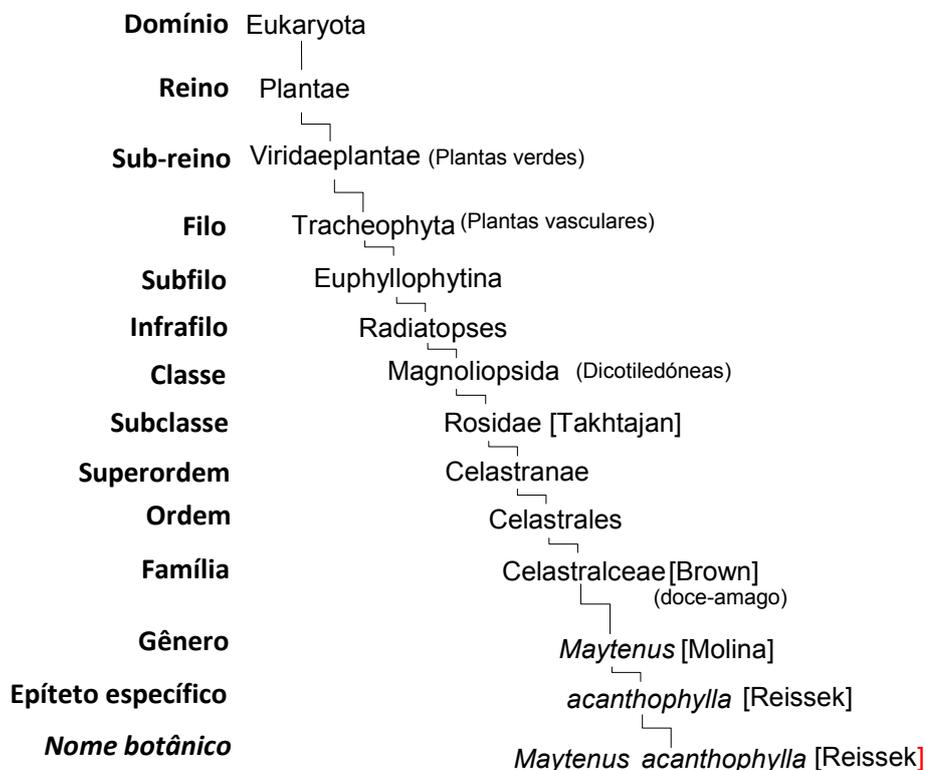


Figura 1.7: Classificação botânica de *Maytenus acanthophylla* Rissek segundo os sistemas de Cronquist e Takhtajan.^{70,71}

O estudo fitoquímico de raízes de *M. acanthophylla*⁵³, realizado previamente, revelou a presença de metabólitos, que normalmente ocorrem em plantas, como o composto β -sitosterol e o ácido graxo oléico; mostrou também constituintes comuns ao gênero *Maytenus*, como os TTPC's das classes lupanos, oleananos, ursanos e quinonametídeos e também o isolamento do biopolímero 1,4-*trans*-poliisopreno (guta-percha) (Figura 1.8, p.11).

O biopolímero gutta-percha, encontrado em *M. acanthophylla*, também foi identificado em outras espécies *Maytenus*, que apresentam folhas coriáceas e ocorrem em regiões tipicamente tropicais ou semi-áridas, a exemplo de *M. salicifolia* Rissek²⁵, *M. phyllanthoides* Benth (guttapercha-mayten ou *Maytenus texana*)⁷² e *Maytenus truncata* Rissek.²⁷ Com relação às espécies brasileiras *M. truncata* e *M. acanthophylla*, foi observado neste trabalho

que o grau de rigidez de suas folhas parece guardar alguma correlação com a ocorrência e a quantidade de guta-percha.

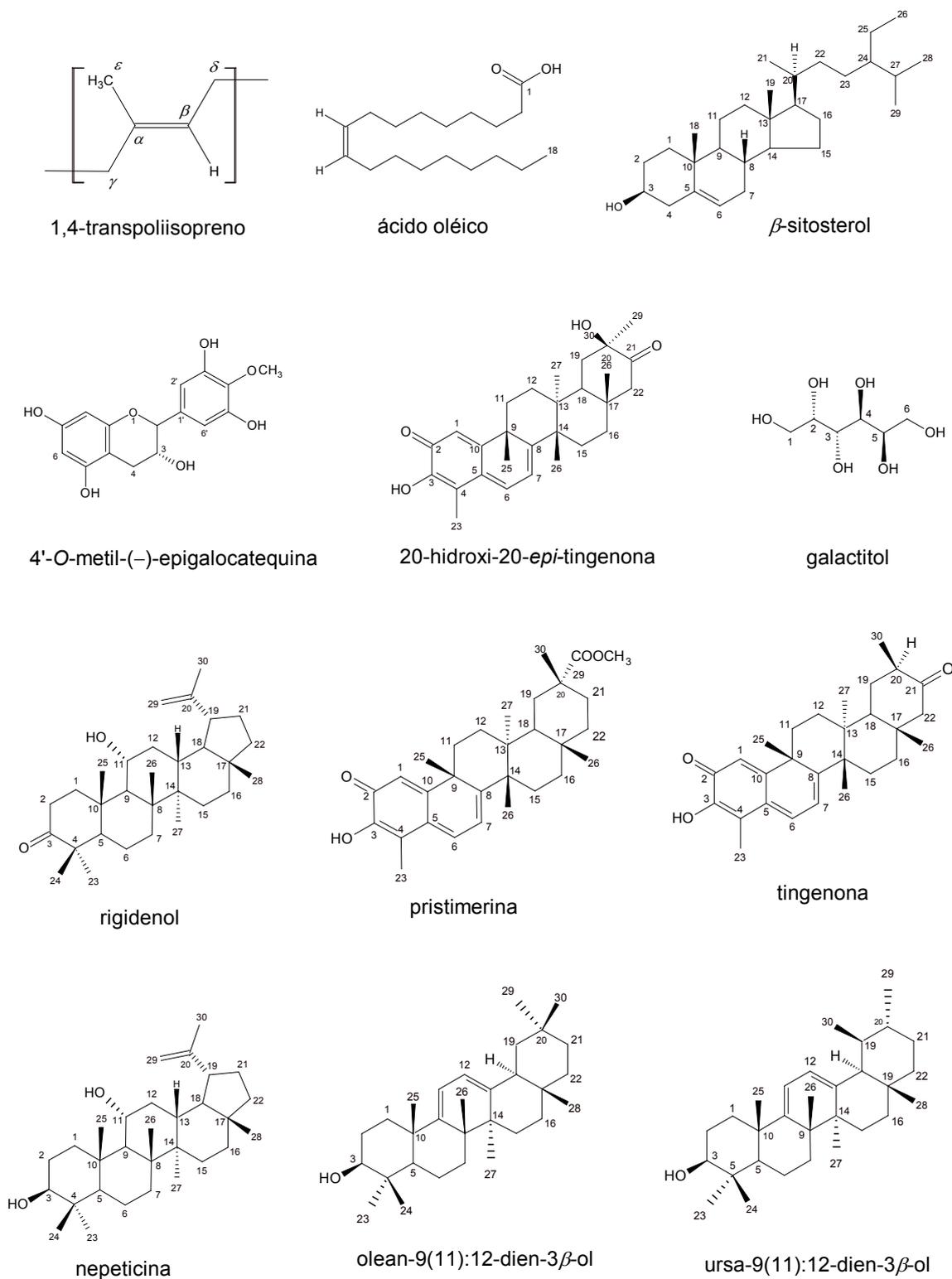


Figura 1.8: Constituintes químicos isolados de raiz de *M. acanthophylla* Reissek.²⁹

NEPLAM – DQ-ICE_x - UFMG

2

Parte Experimental

Oliveira, DM

2012

MATERIAIS E MÉTODOS

Foi adotada como critério de pureza a visualização de uma única mancha em cromatoplaça obtida por cromatografia em camada delgada (CCD), utilizando eluentes com diferentes polaridades e pelo menos dois tipos de reveladores. Na preparação das cromatoplaças utilizou-se suspensão de sílica gel Merck 60 G em água [7 g para 15 mL (p/v)], formando camada de 0,25 mm de espessura, sobre suporte de vidro. Após secagem parcial a temperatura ambiente, as placas foram ativadas em estufa a 100 °C por 60 minutos. Como reveladores de cromatoplaças utilizaram-se luz ultravioleta, iodo e pulverização com solução de vanilina em álcool etílico (1:99) com ácido perclórico em água (3:97), misturadas na proporção de 1:1 v/v, seguida de aquecimento em estufa a 100 °C. As placas de cromatografia em camada preparativa (CCP) de sílica gel foram preparadas com 0,5 mm de espessura. Algumas colunas especiais foram empacotadas com uma mistura de sílica gel 60 e nitrato de prata na proporção de 1-2% p/p (sílica-NP). A mistura sílica-NP foi preparada conforme protocolo encontrado na literatura.⁷³

Nos processos de cromatografia em coluna utilizando-se sílica gel Merck 60 (70-230 Mesh), foi adotada a proporção média de 1 g de extrato para 50 g de fase estacionária para as colunas de fracionamento do extrato. A proporção aproximada de 1 g de amostra até 100 g de fase estacionária foi utilizada na fase de purificação. A mesma proporção de 1/100 foi utilizada também em relação às colunas contendo Sephadex LH-20 Sigma e fluorisil Merck. Os solventes utilizados nos processos de cromatografia em coluna foram todos de grau analítico (P.A.) e previamente destilados quando necessário.

Os extratos das folhas obtidos com metanol foram filtrados em colunas de Sephadex LH 20 (Amersham Biosciences) eluídas com etanol ou misturas desses solventes com água; analisadas por CCD, concentradas em centrífuga a vácuo (*speed-vac*).

Na cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), as frações obtidas nas partições e processos de fracionamento foram analisadas em cromatógrafo Shimadzu (Princeton, NJ, USA), bomba LC10A, detector com fotodiodo SPD-M10A, CBM 10A, utilizando-se diferentes fases estacionárias, diversas misturas de solventes como eluente e diferentes comprimentos de onda (λ). Após a determinação das melhores condições de separação (fase estacionária, λ , tempo de análise e eluente), as amostras foram refractionadas no cromatógrafo Shimadzu, bomba LC 6AD, detector no UV SPD-10A em dois comprimentos de onda, λ , utilizando coluna semi-preparativa Shim-pack ODS (5 μ m, 20 x 250 mm). As frações foram coletadas por pico e por volume, de

modo que cada pico foi recolhido separadamente. As frações obtidas foram analisadas por CCD e reagrupadas segundo os perfis cromatográficos. Os equipamentos utilizados no processo de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) são pertencentes ao LQPN, do CPQRR/Fio Cruz-BH.

Pontos de fusão, obtidos em graus Celsius, foram determinados em aparelho Metler FP82 equipado com processador Metler FP800, pertencente ao DQ/ICEx da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG).

Foi utilizado um espectrômetro de massas com ionização por eletrospray com quadrupolo e armadilha de íons, modelo LCQ Advantage, Thermo-Finnigan (San Jose, CA, USA) pertencente ao LQPN, do CPQRR/Fio Cruz-BH. Os espectros de massas foram obtidos nos modos positivo e negativo, na faixa de m/z 100-2000 Da. Os parâmetros utilizados foram: solução das amostras 500 µg/mL; temperatura do capilar 200° C; voltagem do capilar 10 V; corrente do spray 1 µA; voltagem do spray 4,5 kV no modo positivo e 3,0 kV no modo negativo; fluxo de nitrogênio de 20 L/h; energia de colisão 20-50%; fluxo da infusão 2,5 µL/min.

Para a análise de CLAE-EM foi utilizado um cromatógrafo Shimadzu com detector UV-VIS e sistema eluente constituído de 30% ACN/H₂O com 0,1% de ácido fórmico em 40 min. do LQPN, CPQRR/Fio Cruz-BH. O sistema foi acoplado ao espectrômetro de massas descrito acima, utilizando método desenvolvido no LQPN. Nesse método o espectro de massas foi registrado, sendo os picos com intensidade superior a 105 aprisionados na armadilha de íons e fragmentados para obtenção de espectros de MS/MS até no máximo MS5. As soluções das amostras foram preparadas a 5 mg/mL, injetando-se 20 µL. Foram obtidos espectros nos modos positivo e negativo.

Para as análises na região de UV-visível, foi utilizado espectrofotômetro Beckman DU® Série 600, pertencente ao LQPN do CPQRR/Fio Cruz-BH. Foram preparadas soluções dos flavonoides obtidos a 1% m/v em MeOH grau espectroscópico.

Os reagentes para deslocamento foram preparados conforme proposto por Mabry e colaboradores (1970):⁷⁴

- * NaOMe: 2,5 g de sódio metálico foram adicionados cautelosamente em 100 mL de MeOH.
- * AlCl₃: 5 g de AlCl₃ anidro (amarelo-esverdeado) foram adicionados aos poucos a 100 mL de MeOH. Aguardou-se 24 h para utilização.

- * HCl: 50 mL de HCl concentrado foram adicionados lentamente a 100 mL de água destilada.
- * NaOAc: foi utilizado o pó anidro.
- * H₃BO₃: procedimento I – foi utilizado o pó anidro, procedimento II – utilizou-se 100 mL de MeOH espectroscópico seco saturado com H₃BO₃.

As etapas das análises foram realizadas também conforme proposto por Mabry e colaboradores (1970):⁷⁴

1. Ajustou-se a transmitância para 100% na presença exclusiva do solvente (MeOH); a absorvância da solução da amostra (flavonoide) foi ajustada para que o pico mais intenso entre λ_{250} e λ_{400} nm tenha uma densidade óptica entre 0,6 e 0,8.
2. O espectro de metanol foi obtido fazendo-se uma varredura de 200 a 400 nm com velocidade de 120 nm/min.
3. Adicionaram-se 3 gotas da solução de NaOMe à cubeta da amostra e imediatamente registrou-se o espectro. Depois de 5 minutos, um novo espectro foi obtido para verificar decomposição da amostra. Descartou-se o líquido da cubeta.
4. Foi colocada nova solução da amostra na cubeta e adicionadas 6 gotas da solução de AlCl₃, obtendo-se imediatamente o espectro.
5. À cubeta da etapa 5 foram adicionadas 3 gotas da solução de HCl e se obteve o espectro. O conteúdo da cubeta foi descartado.
6. Adicionou-se o pó anidro de NaOAc, agitou-se até a formação de uma camada de 2 mm de pó na borda da cubeta preenchida com a solução da amostra. Os espectros foram obtidos após 2 e 10 min do preparo.
7. (a) Se não foi observada decomposição da amostra na etapa 7, a cubeta foi saturada com H₃BO₃, agitada, o espectro obtido e a solução descartada; (b) se foi observada decomposição na etapa 7, foi colocada nova solução da amostra na cubeta, adicionadas 5 gotas da solução de H₃BO₃ e pó de NaOAc até saturação. O espectro foi obtido imediatamente após a adição do acetato de sódio.

Os espectros de absorção na região do infravermelho foram obtidos utilizando pastilhas de KBr [a 1 % (m/m)] ou em filme, quando necessário; em espectrômetro Shimadzu IR-408 do Departamento de Química, UFMG, ou em espectrômetro Perkin Elmer Spectrum one FTIR-

ATR da Faculdade de Farmácia da UFMG, por inserção direta da amostra, sem preparo de película ou pastilha de KBr.

Os espectros de RMN de ^1H e de ^{13}C foram obtidos em espectrômetro Bruker AVANCE DRX-400 ou em Bruker AVANCE DPX-200, do Laboratório de Ressonância Magnética Nuclear de Alta Resolução (LAREMAR) do Departamento de Química, UFMG. Nos experimentos de RMN, foi utilizado como referencial interno o sinal do tetrametilsilano (TMS). Os solventes deuterados utilizados encontram-se indicados em cada caso. Os deslocamentos químicos (δ) são expressos em partes por milhão (ppm) e as constantes de acoplamento (J), em Hertz (Hz).

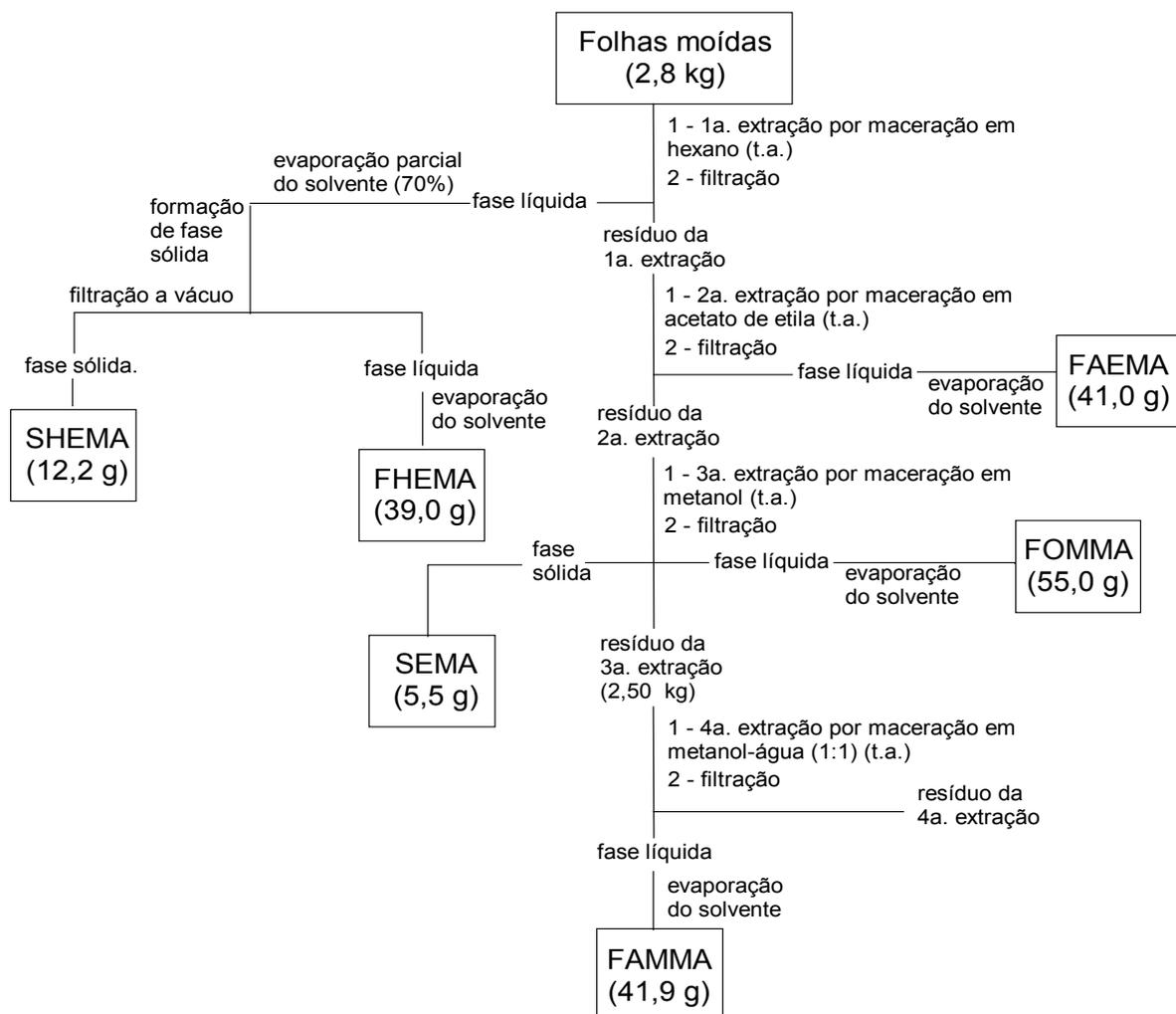
As análises por cromatografia gasosa foram realizadas utilizando equipamento Varian modelo CP-3380 do Departamento de Química, UFMG. As análises dos ésteres triterpênicos por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas foram realizadas em aparelho Shimadzu, modelo CG-17A-CG-MS QP5050, equipado com coluna cromatográfica DB-5 de 30 m de comprimento e 0,25 mm de diâmetro interno e 0,5 μm de espessura do filme, pertencentes ao LQPN, do CPQRR/Fio Cruz-BH. As condições usadas foram temperatura de 220 °C no injetor e 240 °C no detector. A programação da temperatura de realização das análises foi de 60 °C a 290 °C, aquecimento de 3 °C por minuto durante 25 min. O fluxo do gás foi de 1,0 mL/min. A faixa de análise do espectrômetro de massas foi de 30 a 700 Da. Situações onde foram utilizadas condições diferentes encontram-se especificadas em cada caso.

ESTUDO FITOQUÍMICO

Partes aéreas de *Maytenus acanthophylla*, incluindo folhas, frutos e caule foram coletados a partir de dois exemplares da planta encontrados na zona rural da localidade de Pé de Serra, no município de Maracás, Bahia. Amostras do material coletado foram identificadas pela Profa. Dra Rita Maria Carvalho-Okano, do Departamento de Botânica da Universidade Federal de Viçosa (UFV) e pela Profa. Maria Cristina Teixeira, do Departamento de Botânica da Universidade Federal de Ouro Preto (UFOP). Uma exsiccata foi depositada no herbário da UFV (VIC-27.182) e outra na UFOP (OUPR-15532). Após a coleta, as folhas foram separadas dos galhos e postas a secar juntamente com os frutos maduros em área ventilada, à temperatura ambiente. As folhas, depois de secas, foram moídas e renderam cerca de 4,0 kg. Os frutos secos foram separados das sementes e as cascas foram desprezadas. As sementes secas resultaram em 28,0 g.

Preparo dos extratos das folhas

A partir de 2,8 kg de folhas moídas, foram preparados extratos por macerações com solventes orgânicos, obedecendo à seguinte ordem: hexano, acetato de etila, metanol e metanol-água (1:1). As extrações processadas à temperatura ambiente (t.a.), durante sete dias, em média, as quais produziram os seguintes extratos: em hexano, FHEMA e SHEMA; em acetato de etila, FAEMA; em metanol, FOMMA e SEMA, e em metanol-água (1:1), FAMMA (Esquema 2.1).



Esquema 2.1: Preparação dos extratos de folhas de *M. acanthophylla*.

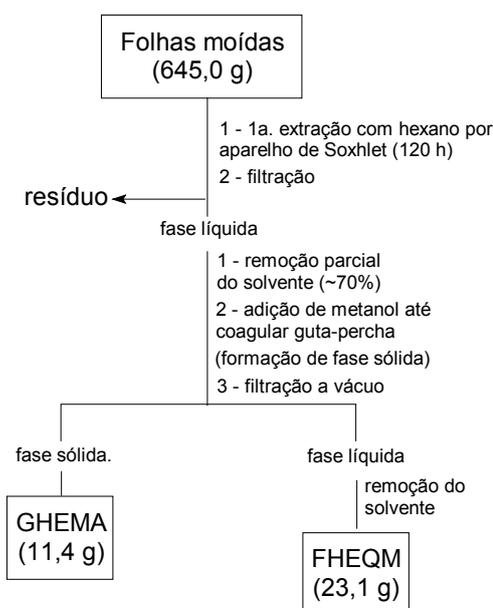
Extratos das sementes (HESMA)

Uma parte equivalente a 10,0 g de sementes de *M. acanthophylla* foi submetida à extração por maceração com hexano (t.a.), durante uma semana. Após a remoção do solvente por evaporação, o extrato obtido (HESMA 5,5 g) se apresentou como um óleo verde-amarelado como o de oliva (*Olea europaea* L.) e aroma imitando o óleo de sementes de amendoim (*Arachis hypogaea*). Na parte inferior dessa fase oleosa, uma porção de um sólido branco aparecia como

precipitado. O conteúdo em óleo foi medido em, aproximadamente, 37% (v/v) da massa inicial de sementes. O extrato foi analisado preliminarmente por CGAR e apresentou uma composição predominante em ácidos graxos comestíveis, guardando boa semelhança ao óleo de oliva, principalmente em relação a presença dos ácidos esteárico, oléico, e linoléico (C-18, C-18:1 e C-18:2). Este material oleaginoso foi reservado para estudo posterior.

Preparo do extrato rico em guta-percha (GHEMA)

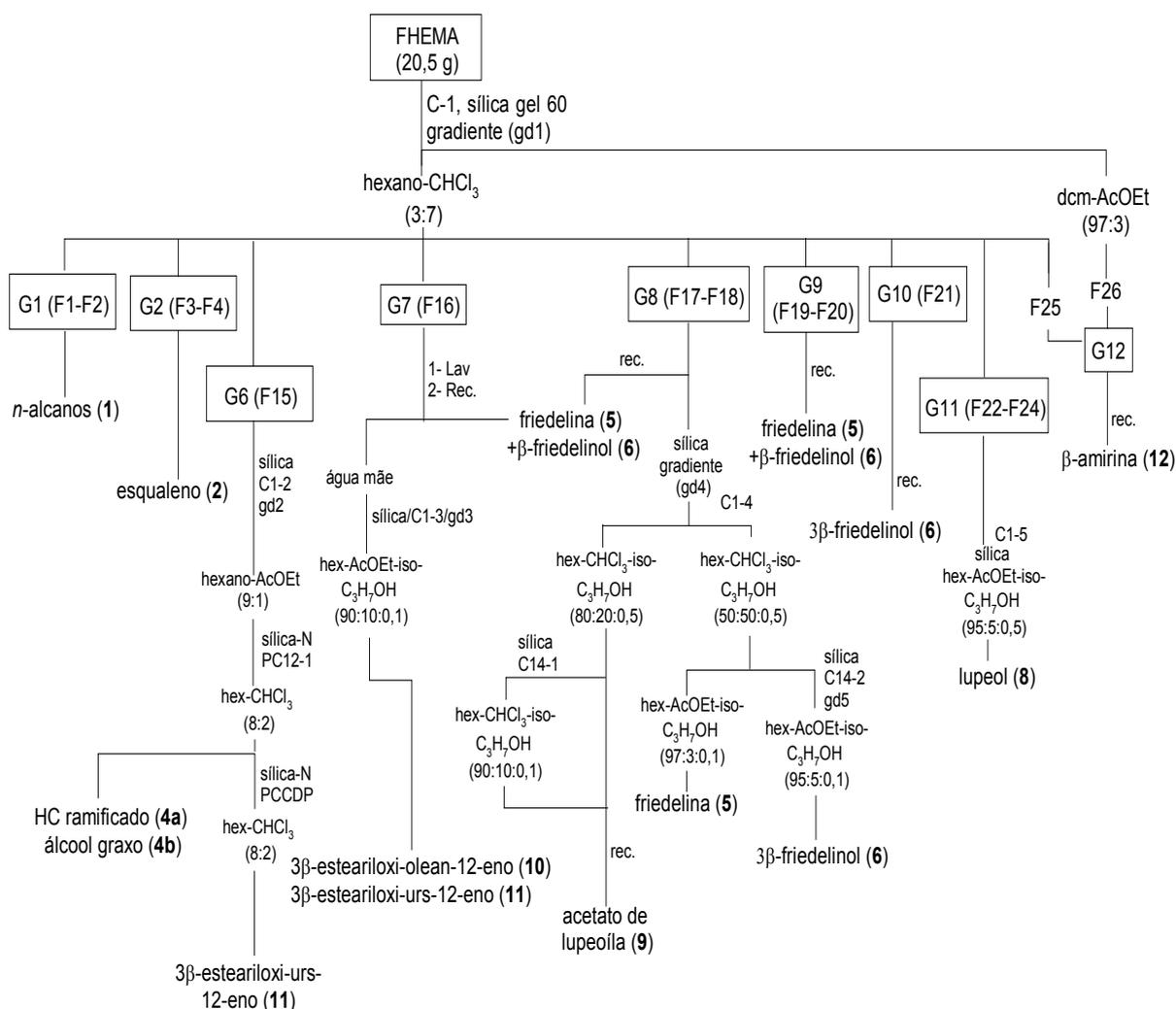
Visando a obtenção de uma quantidade maior do biopolímero 1,4-*trans*-poliisopreno (guta-percha, isolado anteriormente nas raízes)²⁹ para poder avaliar a distribuição de massa desse constituinte em *M. acanthophylla*, foi preparado o extrato GHEMA (11,4 g), rico em guta-percha. Esse extrato foi obtido pela extração sólido-líquido, sob-refluxo brando por 120 horas, utilizando um aparelho extrator de Soxhlet (Esquema 2.2). O extrato FHEQM foi reservado para estudo posterior.



Esquema 2.2: Roteiro para obtenção de extrato rico em guta-percha de folhas de *M. acanthophylla* (GHEMA).

Fracionamento do extrato FHEMA

O Esquema 2.3 sumaria as operações realizadas na elaboração fitoquímica do extrato hexânico das folhas de *M. acanthophylla* - FHEMA. No estudo fitoquímico do extrato FHEMA, foram elaboradas quatorze colunas cromatográficas, destas, oito resultaram em separações efetivas que levaram a isolamentos de constituintes químicos. A Tabela 2.1 (p. 20) mostra, sumariamente, o perfil das CCL utilizadas nos fracionamentos.



Esquema 2.3: Fracionamento do extrato FHEMA.

Tabela 2.1: Colunas de cromatografia líquida desenvolvidas no fracionamento de FHEMA

CCL	Tipo	OD (cm)	FE (massa, g)	Sistema eluente (FM)	Amostra (g)	N ^o . Frações (mL)
C1	G	10	SG (512)	Gradiente (gd1)	20,50	49 (200)
C1-2	G	5	SG (180)	Gradiente (gd2)	2,42	33 (50)
C12-1	F	3	SG-NP (89)	Isocrático (iso1)	0,55	38 (30)
C1-3	G	3	SG (106)	Gradiente (gd3)	0,54	139 (10)
C1-4	G	3,5	SG (140)	Gradiente (gd4)	2,01	117 (10)
C14-1	F	1	SG (23)	Isocrático (iso2)	0,11	128 (5)
C14-2	G	3,5	SG (120)	Gradiente (gd5)	0,95	120 (20)
C1-5	G	3	SG (104)	Gradiente (gd5)	0,88	53 (25)

G: eluída por gravidade; F: média pressão ou *flash*; OD: diâmetro externo da coluna; FE: fase estacionária, SG: sílica gel 60; NP: nitrato de prata 1-2%; FM: fase móvel; As eluições por gradiente (gd) foram feitas com os seguintes solventes puros ou combinados: gd1: hexano (hex), clorofórmio, diclorometano (DCM), acetato de etila (AcOEt) e metanol; gd2: ciclo-hexano, acetato de etila e metanol; iso1: hexano:clorofórmio (8:2); gd3: hexano, diclorometano:isopropanol; gd4: hexano, clorofórmio e isopropanol; iso2: hexano:clorofórmio:isopropanol (90:10:0,1); gd5: hexano, acetato de etila, isopropanol. As proporções das misturas de solventes utilizadas nas eluições por gradiente foram indicadas na descrição do fracionamento por coluna cromatográfica.

Eluição da Coluna C-1

Parte do extrato bruto hexânico FHEMA (20,5 g), obtido das folhas de *M. acanthophylla*, após análises por CCD, foi aplicada em uma coluna de cromatografia líquida, CCL ($\phi = 10$ cm) empacotada com 512 g de sílica gel 60 (C-1). Foram coletadas 49 frações de 200 mL cada. Os eluentes utilizados em C-1 foram hexano, clorofórmio, diclorometano, acetato de etila e metanol (gd1), em gradiente de polaridade (Tabela 2.2).

Tabela 2.2: Frações obtidas de C-1

Sistema eluente	Frações
Hexano 100%	F1 a F14
Hexano:CHCl ₃ [30:70]	F15 a F25
DCM:acetato de etila [97:3]	F26 a F32
Acetato de etila 100% puro	F33 a F42
MeOH 100% puro	F43 a F49

Agrupamento das frações de C-1

As frações coletadas em C-1 foram agrupadas segundo o perfil cromatográfico em CCD.

Tabela 2.3: Agrupamentos e constituintes isolados das frações de C-1 de FHEMA

Frações	Grupo	Massa (mg)	Procedimentos	Constituintes	Identificação
F1-F2	G1	700,0	Lav. com acetona	(1)	CGAR
F3-F4	G2	161,0	Isolado puro	(2)	CG-EM, RMN
F5-F7	G3	90,0	NE		
F8-F9	G4	950,0	NE	ND	
F10-F14	G5	235,0	NE	ND	
F15	G6	2420,0	C1-2, C12-1 e CCP C1-2 e C12-2	(11) (4a + 4b)	RMN
F16	G7	2870,0	Lav e rec com éter etílico C1-3	(5 e 6) (10 + 11)	CCD, RMN RMN
F17-F18	G8	2570,0	Lav e rec com éter etílico C1-4 e C14-2 C1-4 e C14-2 C1-4, C14-1	(5 + 6) (6) (5) (9)	CCD CCD, RMN CCD, RMN RMN
F19-F20	G9	100,0	Lav e rec com acetona	(5 + 6)	CCD
F21	G10	160,0	Lav e rec com acetona	(6)	CCD
F22-F24	G11	880,0	C1-5	(8)	CCD, RMN
F25-26	G12	302,0	Rec (acetona)	(12)	RMN
F27-F49	G13- G18	5938,0	NE	ND	

Lav: lavagem; Rec: recristalização; ND: não determinado; NE: não estudado; massa (mg). Mistura de *n*-alcanos (1); esqualeno (2); HC ramificado (4a); álcool graxo (4b); friedelina (5); β -friedelinol (6); lupeol (8); acetato de lupeóla (9); 3β -alcanoiloxi-olean-12-eno (10); 3β -alcanoiloxi-urs-12-eno (11); β -amirina (12).

A Tabela 2.3, mostra os agrupamentos e os respectivos constituintes químicos isolados por grupo, bem como, o sumário das operações de fracionamento por CL e operações para purificação e isolamento dos referidos constituintes. Todos constituintes isolados, posteriormente, foram identificados por técnicas cromatográficas e espectrométricas. Não foram trabalhadas as frações que apresentaram o valor da razão entre a massa e o número de constituintes (complexidade avaliada por CCD) menor do que 5 mg/constituente, ou quando as frações continham substâncias isoladas anteriormente em quantidades satisfatórias.

Grupo G1 de C-1 (F1-F2, hexano puro)

O material desse grupo (700 mg) foi dissolvido com hexano e, após precipitação com acetona, foi filtrado. O filtrado se apresentou como uma cera branca formada por escamas brilhantes (537,2 mg) que foi caracterizado por CGAR como uma mistura de *n*-alcanos (**1**), mediante a comparação com padrões de hidrocarbonetos isolados previamente da espécie *Maytenus gonoclada*.⁷⁵

Grupo G2 de C-1 (F3-F4, hexano puro)

Esse grupo apresentou um óleo amarelo esverdeado, bastante viscoso e solúvel em clorofórmio. Esse óleo, depois de analisado por CG-EM e RMN, foi identificado como sendo o triterpeno de cadeia aberta esqualeno (**2**; 161,0 mg).

Grupo G6 de C-1 [(F15, hexano:clorofórmio (3:7))]

O material desse grupo foi obtido como uma graxa amarelada (2,42 g), submetido a fracionamento cromatográfico por CCL (C1-2). As frações (F15-F18) (654,1 mg) coletadas de C1-2, quando eluídas com ciclo-hexano-acetato de etila (9:1), foram fracionadas em uma CCL tipo *flash* (C12-1), empacotada com sílica-AgNO₃ 2% (sílica-NP)⁷³ e eluída com hexano:clorofórmio (8:2). As frações de F1 a F11 de C12-1 foram coletadas na forma de uma cera amarela (6,4 mg; P.F. ~50 °C), identificada por RMN como uma mistura de um HC ramificado (**4a**), tipo pristano, e um álcool graxo (**4b**). O grupo de frações de F12 a F33 (120 mg) de C12-1 foram purificadas por CCD preparativa, em duas placas (20 x 20 cm) revestidas por sílica gel 60G + NP e eluídas com hexano:clorofórmio (8:2). A fração de menor R_f (~0,55), após elaboração, apresentou um material graxo, macio e branco, identificado por métodos espectrométricos e por comparação com uma amostra autêntica isolada de *M. salicifolia*³² como o éster triterpeno-oleanano, 3 β -esteariloxi-urs-12-eno (**11**; 9,3 mg).

Grupo G7 de C-1 [F16, hexano:clorofórmio (3:7)]

Esse grupo apresentou um sólido (2,87 g) amarelo, que foi lavado com éter etílico e depois filtrado; um sólido branco recuperado na filtração foi identificado por CCD e análises espectrométricas (IV e RMN) como uma mistura (840,0 mg) de friedelina (**5**) e 3 β -friedelinol (**6**). O respectivo sobrenadante da filtração de G7 (540,0 mg) foi fracionado por CCL (C1-3), empacotada com sílica gel 70-230 mesh (ASTM), utilizando gradiente de hexano:DCM:isopropanol. As frações 51 a 57, coletadas na eluição correspondente a 90:10:0,1 do eluente, apresentaram um material pastoso com resultado positivo para o teste de Liebermann-Burchard. Esse material foi identificado como uma mistura (28 mg) de dois ésteres TTPC's isômeros: 3 β -esteariloxi-olean-12-eno (**10**) e 3 β -esteariloxi-urs-12-eno (**11**).

Grupo G8 de C-1 [F17-F18, hexano:clorofórmio (3:7)]

O grupo G8 foi obtido como um material (2,52 g) amarelo e pastoso. Este material foi inicialmente lavado com acetato de etila e, após recristalização/filtração com acetona, foi obtido como um sólido cristalino (50,0 mg). A análise por CCD mostrou tratar-se de uma quantidade adicional da mistura de friedelina (**5**) e 3 β -friedelinol (**6**). O sobrenadante recolhido da filtração anterior, após a eliminação do solvente, formou um sólido branco (2,01 g) que foi submetido a CCL (C1-4). O grupo de frações F44-F90, coletadas de C1-4 com hexano:clorofórmio:isopropanol (80:20:0,5), foi obtido como um material pastoso e amarelado que, ao ser recristalizado com acetona, revelou um sólido branco com teste positivo para TTPC. Este sólido (P.F. de 192,2-199,5 °C) foi elucidado como sendo o acetato de lupeóila (**9**), 558,5 mg). O grupo de frações F91-F100 de C1-4 (189,5 mg), obtido com hexano:clorofórmio:isopropanol (80:20:0,5), mostrou perfil em CCD similar ao do grupo F44-F90 de C1-4, entretanto, as várias tentativas de recristalização desse material não foram efetivas à sua purificação. Então, o sólido remanescente (109,0 mg) foi recolhido e aplicado a uma CCL tipo *flash* (C14-1) eluída com hexano:clorofórmio:isopropanol (90:10:0,1). As frações F31-F38, reunidas de C14-1, apresentaram um sólido branco, identificado como uma quantidade adicional de acetato de lupeóila (**9**), 33,8 mg).

O grupo de frações F101-F116 de C1-4, coletado com o sistema eluente hexano:clorofórmio:isopropanol (50:50:0,5) foi obtido como um sólido amarelo-claro (947,6 mg). Este sólido foi fracionado por CCL (C14-2). O grupo de frações F66-F71, coletado de C14-2, com hexano:acetato de etila:isopropanol (97:3:0,1), após recristalização com acetato de etila, formou um sólido branco cristalino (P.F. de 237,4-243,6) com teste-positivo para TTPC.

Posteriormente, esse sólido foi identificado como sendo a friedelina (**5**; 18 mg). A partir do grupo de frações F82-F89 da coluna C14-2, coletado com hexano:acetato de etila:isopropanol (95:5:0,1), foi obtido um sólido branco (P.F. de 245,6-252,15 °C) depois de purificado por recristalização. Esse sólido foi caracterizado por CCD, usando uma amostra autêntica, como sendo β -friedelinol (**6**; 38,7 mg).

Grupo G9 de C-1 [F19-F20, hexano:clorofórmio (3:7)]

Esse grupo de C-1 apresentou um sólido branco que foi recristalizado com acetona. Essa operação levou à obtenção de um sólido branco cristalino (100 mg), identificado por CCD como uma quantidade adicional da mistura (70,5 mg) de friedelina (**5**) e friedelinol (**6**).

Grupo G10 de C-1 [F21, hexano:clorofórmio (3:7)]

Esse grupo foi obtido como um sólido branco (160,0 mg) que, após lavagem, seguida de recristalização com éter etílico e acetona, foi isolado como um sólido cristalino, identificado como sendo uma quantidade adicional de 3β -friedelinol (**6**; 116,8 mg).

Grupo G11 de C-1 [F22-F24, hexano:clorofórmio (3:7)]

Esse grupo de frações foi recuperado como um sólido branco-amarelado (880,0 mg) e foi submetido a fracionamento por CCL (C1-5). As frações F34-F37 de C1-5, coletadas com hexano:acetato de etila:isopropanol [95:5:0,5], depois de lavadas com éter de petróleo e recristalizadas com etanol, revelaram um sólido branco (P.F. de 182,4-187,1 °C) identificado como o TTPC lupeol (**8**; 87,8 mg).

Grupo G12 de C1 [F25, hexano:CHCl₃ (3:7) + F26, DCM:AcOEt (97:3)]

O grupo G12 foi obtido como um material sólido (302,0 mg) branco com uma fina camada superficial amarelada. Esse material foi lavado com acetona resfriada e, em seguida, recristalizado com acetona, formando um sólido branco (P.F. 197,0-204,2 °C), que foi identificado posteriormente com sendo o TTPC oleanano β -amirina (**12**, 149,9 mg).

Resumo do fracionamento de FHEMA

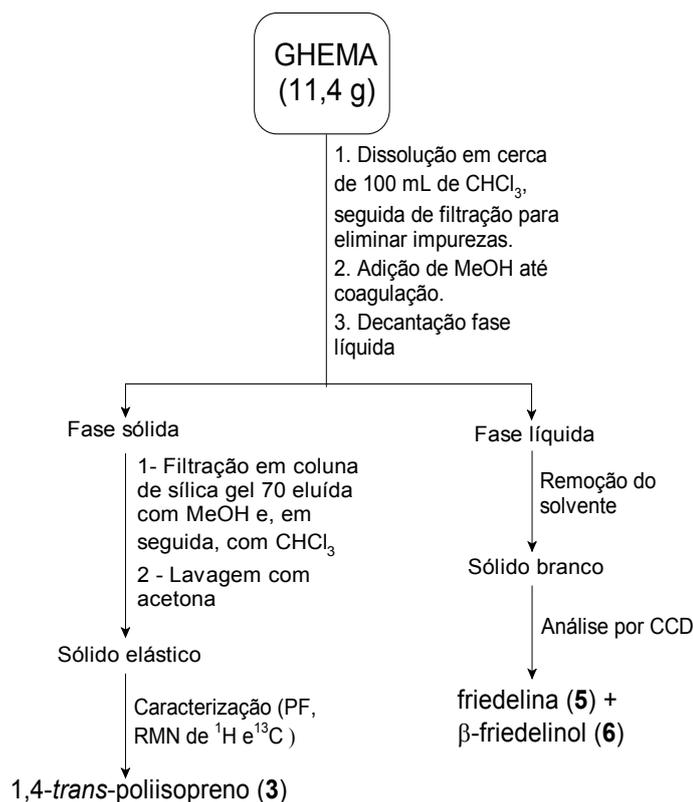
A partir do extrato em hexano das folhas de *M. acanthophylla*, foram isolados e descritos, sete compostos puros, três compostos em misturas binárias e uma mistura de seis constituintes pertencentes a uma série homóloga de *n*-alcanos (Tabela 2.4).

Tabela 2.4: Resumo das substâncias isoladas de FHEMA

Substância	Massa (mg)
Mistura de <i>n</i> -alcanos C-30 a C-35 (1)	537,2
Esqualeno (2)	161,0
Mistura de HC ramificado (4a) e álcool graxo (4b)	6,4
Mistura de friedelina (5) e 3 β -friedelinol (6)	960,5
Friedelina (5)	18,0
3 β -Friedelinol (6)	155,5
Lupeol (8)	87,8
Acetato de lupeoíla (9)	592,3
Mistura de 3 β -esteariloxi-olean-12-eno (10) e 3 β -esteariloxi-urs-12-eno (11)	28,0
3 β -Esteariloxi-urs-12-eno (11)	9,3
3 β -Amirina (12)	149,9

Isolamento de 1,4-*trans*-poliisopreno de GHEMA

O material obtido na preparação do extrato das folhas de *M. acanthophylla* (11,4 g) mediante uma extração sólido-líquido em aparelho de Soxhlet com hexano. A fração GHEMA foi dissolvida em 100 mL de clorofórmio e filtrada para eliminação de impurezas. Em seguida, ao sobrenadante recolhido foram adicionados cerca de 30 mL de metanol até a coagulação de uma goma (4,8 g), caracterizada como rica em 1,4-*trans*-poliisopreno (guta-percha), quando analisada por CCD com padrão. A solução de metanol:clorofórmio separada do material coagulado foi evaporada até a secura e forneceu um sólido branco, cristalino (4,24 g), identificado por CCD como uma quantidade adicional da mistura de friedelina (5), 3 β -friedelinol (6). O material da goma foi aplicado em uma coluna ($\phi = 5,0$ cm), preenchida com 20 cm de sílica gel 70 mesh. A primeira eluição foi feita com 150 mL de metanol e, em seguida, com 300 mL de clorofórmio. A fração em clorofórmio forneceu um sólido branco-esverdeado como uma goma elástica (3,55 g), que foi lavado com acetona e confirmado por métodos espectrométricos como sendo o 1,4-*trans*-poliisopreno (3). Esse material foi armazenado em frasco de vidro no armário do laboratório e, após cerca de quatro semanas, uma grande parte havia sido degradada, apresentando um material amarelo com odor ácido. A pesquisa na literatura e a análise por IV mostraram que a degradação da gutta-percha ocorreu devido à exposição desse material a impurezas, variações de temperatura e da luz ambiente. O fluxograma contido no Esquema 2.4 resume as operações descritas anteriormente na elaboração fitoquímica do sólido GHEMA para obtenção do biopolímero gutta-percha.



Esquema 2.4: Elaboração da goma extraída de folhas de *M. acanthophylla* (GHEMA).

Fracionamento do extrato SHEMA

A análise por cromatografia gasosa, usando padrões, mostrou que o extrato SHEMA se tratava de uma fração de conteúdo enriquecido dos TTPC's friedelina (5) e 3β -friedelinol (6). A análise do sólido SHEMA por CCD mostrou, além das manchas correspondentes aos TTPC's 5 e 6, outras três ou quatro de menores R_f , referentes a outros constituintes, que são possivelmente TTPC's ácidos ou di, tri-hidroxílicos. A composição química do sólido SHEMA incentivou a obtenção de maiores quantidades dos triterpenos friedelina e 3β -friedelinol. No NEPLAM, o estoque desses triterpenos, obtido a partir dos extratos em hexano de folhas de várias espécies de *Maytenus* estudadas, vem sendo utilizado para o suprimento de reagentes de partida em reações de síntese de derivados friedelânicos raros ou inéditos. No desenvolvimento do estudo do extrato SHEMA foram separadas quatro amostras desse material (18,5 g), as quais foram fracionadas em nove colunas cromatográficas empacotadas com sílica gel, que levaram a isolamentos de cinco (Tabela 2.10, p. 33) constituintes químicos puros de SHEMA. A Tabela 2.5 resume as principais características relativas às CCL's e as condições experimentais utilizadas nos procedimentos cromatográficos. Na procura de um adsorvente para CCL que apresentasse maior eficiência na separação dos TTPC's friedelina (5) e β -friedelinol (6), foram elaboradas CCL's utilizando alumina neutra 60 (Merck, 70-230 mesh ASTM) como fase estacionária.

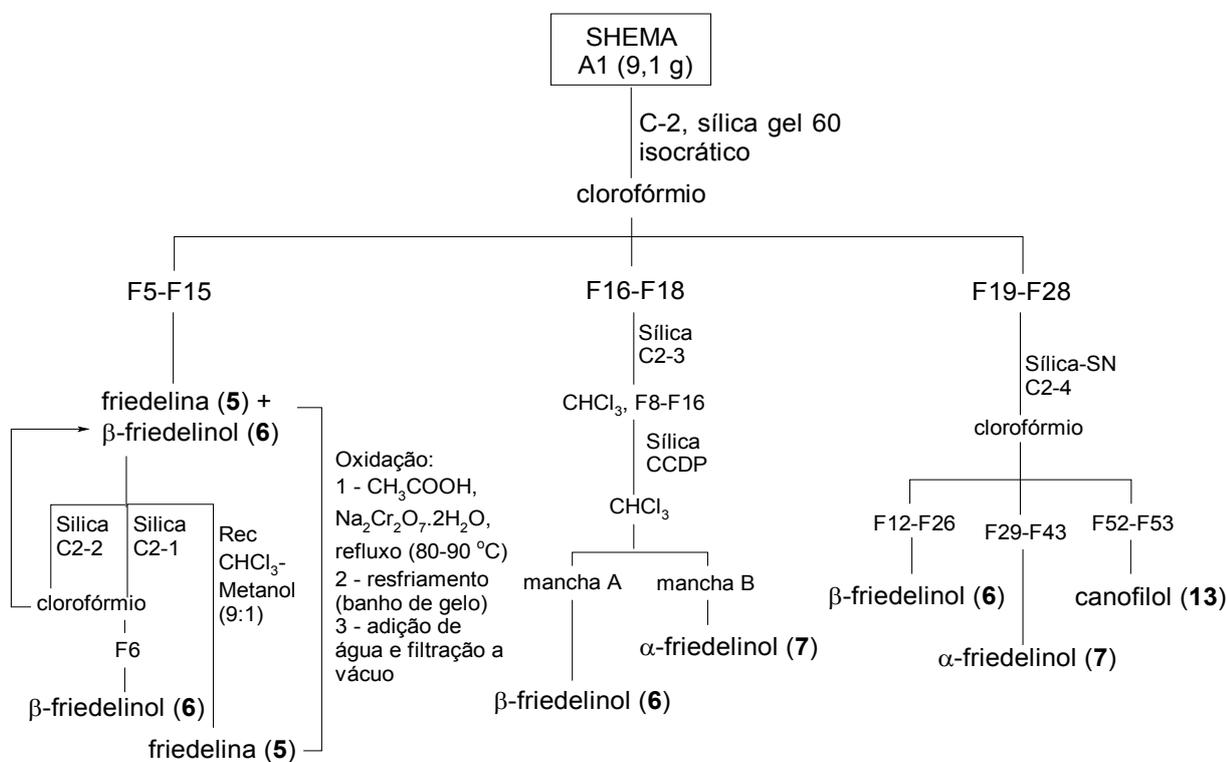
Tabela 2.5: Colunas de CL desenvolvidas no fracionamento de SHEMA

Amostra SHEMA	CCL	Tipo	OD (cm)	FE (massa, g)	Sistema eluente	Carga (g)	Frações (mL)
A1 (9,1 g)	C-2	G	5,5	SG (300)	Isocrático (iso1)	9,06	54 (100)
	C2-1	F	1,0	SG (30)	Isocrático (iso2)	0,16	20 (10)
	C2-2	F	1,0	SG (30)	Isocrático (iso2)	0,16	20 (10)
	C2-3	F	2,0	SG (65)	Isocrático (iso1)	0,30	18 (10)
	C2-4	F	0,8	SG-NP (25)	Isocrático (iso1)	0,10	53 (5)
A2 (4,4 g)	C-3	G	3,0	SG (146)	Isocrático (iso3)	4,10	129 (100)
A3 (4,1 g)	C-4	G	10,0	SG (130)	Isocrático (iso4)	4,40	106 (100)
	C4-1	G	0,8	Al-N (5)	Isocrático (iso5)	0,05	22 (5)
A4 (0,9 g)	C-5	G	3,0	SG (118)	Isocrático (iso1)	0,85	73 (30)

G: eluída por gravidade; F: média pressão ou *flash*; OD: diâmetro externo da coluna; FE: fase estacionária, SG: sílica gel 60; Al-N: alumina neutra; NP: nitrato de prata 1-2%; FM: fase móvel; iso1: clorofórmio puro; iso2: isopropanol (0,1%) em clorofórmio; iso3: hexano:clorofórmio (1:1); iso4: hexano:clorofórmio (1:2); iso5: hexano:clorofórmio (1:3).

Fracionamento da amostra A1, coluna C-2

Uma amostra do sólido SHEMA, A1 (9,1 g) foi submetida a uma CCL (C-2) para fracionamento com eluição por clorofórmio. Foram coletadas 50 frações de 100 mL cada. O Esquema 2.5 resume os procedimentos desenvolvidos na elaboração do sólido SHEMA, amostra A1, fracionada a partir da CCL C-2.



Esquema 2.5: Fracionamento da amostra A1 de SHEMA.

Agrupamento das frações de C-2, amostra A1

As frações de C-2 foram agrupadas de acordo com as semelhanças em CCD conforme mostra na Tabela 2.6 (p. 28).

Tabela 2.6: Frações coletadas de C-2, amostra A1 de SHEMA

Frações	Grupo	Massa (mg)	Procedimento	Constituinte	Identificação
F1 a F4	G1	189,0	NE	ND	
F5 a F15	G2	5170,0	Estoque	(5 + 6)	CCD
		640,0	Rec, estoque	(6)	CCD
		320,0	CCL (C2-1 e C2-2)	(5)	CCD
F16 a F18	G3	860,0	Estoque	(6 + 7 + 13)	CCD
		300,0	CCL (C2-3), CCP	(6) e (7)	CCD, IV, RMN
F19 a F28	G4	490,0	CCL (C2-4)	(6), (7) e (13)	CCD, IV, RMN
F29 a F36	G5	144,0	NE	ND	
F37 a F48	G6	63,0	NE	ND	
F46 a F50	G7	46,0	NE	ND	

NE: não estudado; CCL: fracionamento em coluna de cromatografia líquida; Lav: lavagem; Rec: recristalização; ND: não determinado; friedelina (5); β -friedelinol (6); α -friedelinol (7); 3-oxo-28-hidroxifriedelano, canofilol (13).

Grupo G2 de C-2 (F5-F15, clorofórmio)

O grupo G2 apresentou um sólido branco (6,13 g), inicialmente identificado por CCD como uma mistura de friedelina (5) e β -friedelinol (6). Parte do material de G3 (640 mg) foi recristalizado com a mistura clorofórmio:metanol (9:1) quente (50-60 °C), o filtrado, obtido sob resfriamento rápido em banho de gelo, foi identificado por CCD como sendo 6 (162,0 mg). Uma amostra (320 mg) do sólido do grupo G2 de C-2 foi dividida em partes iguais e aplicadas a duas CCL do tipo *flash* (C2-1 e C2-2), eluídas com uma solução de isopropanol (0,1% v/v) em clorofórmio, tendo sido coletadas 20 frações (10 mL cada) por CCL. Da fração F6 de C2-1 se isolou o TTPC 5 (20 mg) na forma pura (análise por CCD com padrões).

Uma amostra de G2 (1,5 g), contendo a mistura dos TTPC's 5 e 6, foi submetida a reação de oxidação com dicromato de sódio di-hidratado e ácido acético.⁷⁶ O produto foi recolhido como um sólido branco (1,4 g) e, após recristalização com clorofórmio:metanol (9:1), foi obtido um sólido cristalino (1,0 g) formado por pequenas agulhas, que foi caracterizado (CGAR) como constituído por friedelina (5) com grau de pureza maior que 98%. Esse material foi preparado

visando, posteriormente, determinar a estrutura da friedelina por difração de raios-X de pó. Uma amostra do sólido **5** foi reduzida a um pó fino e preparada em um ZFSH (Amostrador de Background Zero), composto por SiC polido, posicionado em um ângulo de 3° para evitar ruídos de fundo sobre as leituras de difração. O material foi inicialmente suspenso em álcool isopropílico e homogeneamente distribuído ao longo do amostrador. A amostra, assim preparada, foi deixada a secar à temperatura ambiente sob rotação constante. Os dados de difração de raios-X do pó de **5** foram coletados por um difratômetro Siemens D5000 (UFMG) operando a 40 KV, 30 mA, utilizando um tubo de Cu K α ($\lambda = 1.54056 \text{ \AA}$), monocromador de grafite e varredura na faixa angular $4\text{-}40^\circ$ (2θ), com ajuste do ângulo de passo de $0,01^\circ$ (2θ) e a constante de tempo de 15 s por passo. O amostrador contendo o pó de **5** foi submetido a uma rotação de 60 RPM para reduzir eventual tendência de orientação preferencial. Foram feitos três registros de varreduras, e a leitura final foi obtida por média.

Grupo G3 de C-2 (F16-F18, clorofórmio)

Esse grupo apresentou um sólido branco brilhante, caracterizado por CCD como uma mistura do TTPC **6** e outro não identificado de maior polaridade. Essa observação foi possível porque as cromatoplasmas apresentavam duas manchas, próximas, uma da outra ($\Delta R_f \sim 0,1$), ambas apresentando a coloração violácea característica para TTPC, quando pulverizadas e reveladas com vanilina-ácido perclórico.⁷⁷ Uma parte da amostra G3 (300 mg) foi fracionada, via CCL tipo *flash* (C2-3), em 18 frações eluídas com clorofórmio puro; as frações F8-F16 de C2-3 foram reunidas e apresentaram um sólido (85 mg) que foi purificado por CCP, eluída com clorofórmio. Foram coletadas duas frações nas cromatoplasmas que resultaram em dois sólidos brancos identificados por CCD e técnicas espectrométricas (IV e RMN), como sendo o primeiro uma quantidade adicional do composto **6** (10,0 mg) e o segundo, o 3α -friedelinol (**7**; 6,0 mg).

Grupo G4 de C-2 (F19-F28, clorofórmio)

O material referente à reunião das frações F19-F28 de C-2 foi submetido à análise por CCL tipo *flash* (C2-4) com sílica-NP 1% como adsorvente e clorofórmio como eluente em 53 frações de 5,0 mL cada. As frações F12-F26 de C2-4 se apresentaram como um sólido branco, identificado (CCD, IV) como uma quantidade adicional de **6** (12 mg). Um sólido branco cristalino recuperado das frações F29-F43 de C2-4 foi identificado (RMN e IV) como uma quantidade adicional do TTPC **7** (52,0 mg). A reunião de frações F52-F53 de C2-4 foi isolada como um sólido branco, com teste-positivo para TTPC's⁷⁸, identificado por meio de análises espectrométricas (IV e RMN) como sendo o composto 3-oxo-28-hidrofriedelano, canofilol (**13**; 6,0 mg).

Fracionamento da amostra A2 de SHEMA, coluna C-3

Uma amostra do sólido SHEMA, A2 (4,1 g) foi desenvolvida em CCL (C-3) com eluição por hexano:clorofórmio (1:1). Foram coletadas 129 frações de 100 mL cada. O Esquema 2.6 resume os procedimentos desenvolvidos na elaboração do sólido SHEMA, amostra A2, fracionado a partir da CCL C-3.

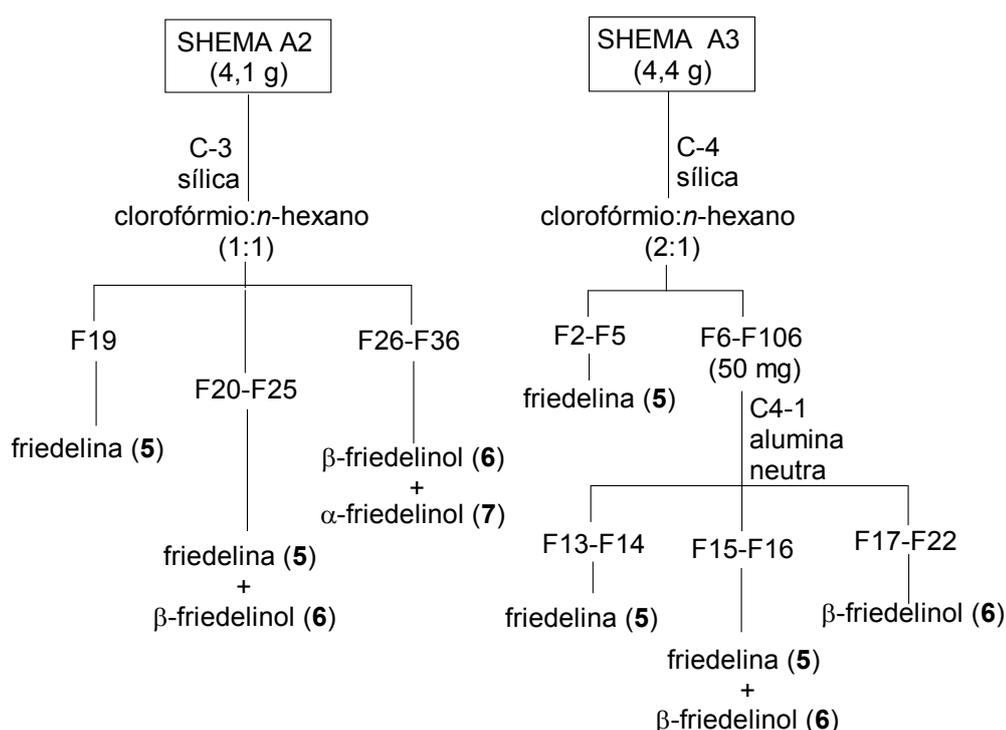
Agrupamento das frações de C-3, amostra A2

As frações de C-3 foram agrupadas de acordo com as semelhanças em CCD e são listadas na Tabela 2.7 abaixo.

Tabela 2.7: Agrupamentos e constituintes isolados das frações de C-3, amostra A2

Frações	Grupo	Massa (mg)	Procedimentos	Constituintes	Identificação
F1 a F18	G1	11,0	Descartado	NE	
F19	G2	45,0	Isolado puro	(5)	CCD, IV, RMN
F20-F25	G3	3450,0	Estoque	(5 + 6)	CCD
F26 a F36	G4	18,0	Estoque	(6 + 7)	CCD
F37 a F121	G6	63,0	NE	ND	
F122-F129	G7	12,0	NE	ND	

CCL: fracionamento em coluna de cromatografia líquida; NE: não estudado; massa (mg). Friedelina (5); β -friedelinol (6); α -friedelinol (7); ND: não determinado.



Esquema 2.6: Fracionamento das amostras A2 e A3 de SHEMA.

A fração F19 de C-3, isolada como uma substância pura, na forma de um sólido branco, com P.F. de 261,0-264,0 °C e teste-positivo para TTPC (Liebermann-Burchard), foi identificada por técnicas espectrométricas (IV e RMN) como sendo uma quantidade adicional do composto **5** (45,0 mg). As frações F20-F25 de C-3 foram coletadas como um sólido branco (3,45 g), identificado por CCD, utilizando amostras autênticas, como uma quantidade adicional da mistura dos constituintes **5** e **6**. As frações F26-F36 foram reunidas como um sólido branco (18,0 mg) identificado por CCD com padrões, como uma mistura dos TTPC's epiméricos 3 β -friedelinol (**6**) e 3 α -friedelinol (**7**).

Fracionamento da amostra A3 de SHEMA, coluna C-4

A amostra A3 do sólido SHEMA (4,1 g) foi aplicada em uma CCL (C-4) eluída por clorofórmio:hexano, sendo coletadas 106 frações de 100 mL cada. O Esquema 2.6 (p. 30) resume os procedimentos realizados na elaboração do sólido SHEMA, amostra A3, fracionado a partir da CCL C-4. As frações de C-4, foram agrupadas de acordo com as semelhanças em CCD, são listadas na Tabela 2.8 abaixo.

Tabela 2.8: Agrupamentos e constituintes isolados das frações de C-4, amostra A3 de SHEMA

Frações	Grupo	Massa (mg)	Procedimentos	Constituintes	Identificação
F2 a F5	G1	50,0	Isolado puro	(5)	CCD
F6-106	G2	3600,0	Estoque	(5 + 6)	CCD
		50,0	CCL (C4-1)	(5), (5 + 6) e (6)	CCD

CCL: fracionamento em coluna de cromatografia líquida; massa (mg). Friedelina (**5**); β -friedelinol (**6**).

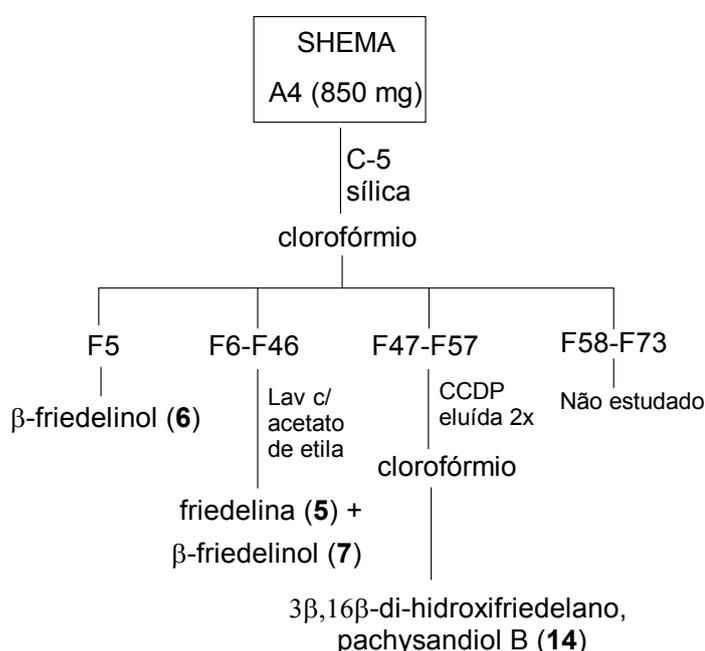
As frações F2-F5 de C-4, isoladas na forma de um sólido branco, apresentaram teste positivo para TTPC (Liebermann-Burchard). Esse sólido foi identificado, por CCD com padrões, como sendo uma quantidade adicional do TTPC **5** (50,0 mg).

A reunião das frações F6-F106, levou a um sólido branco identificado (CCD) como mais uma porção adicional da mistura de **5** e **6**. A dificuldade em resolver essa mistura por CCL, utilizando sílica gel em fase normal, motivou o teste com outro adsorvente. Então, uma amostra (50 mg) das frações F6-F106 de C-4 foi fracionada em uma CCL sob pressão (tipo *flash*, C4-1), empacotada com alumina neutra, eluída com hexano:clorofórmio (1:3) em 22 frações de 5 mL cada. As frações F13-F14 de C4-1 forneceram friedelina pura, **5** (3,8 mg) quando analisada por CCD e comparada com uma amostra autêntica. O grupo de frações F15-F16 de C4-1, após análise

por CCD com padrões, mostrou um sólido de composição similar à mistura de partida de **5** e **6** (15,0 mg). Segundo a análise por CCD com padrão, as frações F17-F22 de C4-1 apresentaram o TTPC **6** (20,8 mg) puro.

Estudo fitoquímico da amostra A4 de SHEMA, coluna C-5

Uma amostra do sólido SHEMA (A4; 850 mg) foi fracionada em uma CCL (C-5), empacotada com sílica gel, com eluição por clorofórmio. Foram coletadas 73 frações de 30 mL cada. O Esquema 2.7, abaixo, resume os procedimentos desenvolvidos na elaboração da amostra A4.



Esquema 2.7: Fracionamento da amostra A4 de SHEMA.

Agrupamento das frações de C-5, amostra A4

As frações de C-5, listadas na Tabela 2.9, foram agrupadas de acordo com as semelhanças dos seus perfis em CCD. A fração F5 de C-5, isolada na forma de um sólido branco cristalino, que apresentou teste-positivo para TTPC (Liebermann-Burchard), foi identificado por CCD e comparado com uma amostra autêntica de friedelina, sendo caracterizado como uma quantidade adicional do TTPC **6** (45,0 mg). O grupo G3 (F6-F46) de C-5 foi identificado como uma quantidade adicional (424,0 mg) da mistura dos TTPC **5** e **6**, quando comparado com padrões por CCD. O grupo G4 (F47-F57) de C-5 foi isolado como um sólido branco (10 mg), que foi submetido a uma CCP, constituída por uma cromatoplaça (20 x 20 cm) revestida de sílica gel G 60 (5 mm), eluída duas vezes com clorofórmio destilado. A fração coletada apresentou teste

positivo para triterpeno (Liebermann-Burchard). Após desorção da substância da sílica gel com clorofórmio:metanol (8:2), obteve-se um sólido branco identificado por técnicas espectrométricas (IV e RMN) como sendo o TTPC $3\beta,16\beta$ -di-hidroxifriedelano, pachysandiol B (**14**, 3,1 mg). A pesquisa bibliográfica mostrou que o TTPC **14** ainda não tinha sido isolado em plantas da família Celastraceae.

Tabela 2.9: Agrupamentos e constituintes isolados das Frações de C-5, amostra A4 de SHEMA

Frações	Grupo	Massa (mg)	Procedimentos	Constituintes	Identificação
F1 a F4	G1	2,0	NE	ND	
F5	G2	45,0	Isolado puro	(6)	CCD
F6 a F46	G3	424,0	Estoque	(5 e 6)	CCD
F47 a F57	G4	10,0	CCP	(14)	IV, NMR, PF
F58 a F73	G5	63,0	NE	ND	

CCP: cromatografia em camada delgada preparativa; NE: não estudado; ND: Não determinado; friedelina (**5**); β -friedelinol (**6**); $3\beta,16\beta$ -di-hidroxifriedelano, pachysandiol B (**14**).

Resumo do fracionamento de SHEMA

A partir do sólido (SHEMA) retirado do extrato em hexano das folhas de *M. acanthophylla*, foram isolados e caracterizados cinco constituintes TTPC's puros (**5**, **6**, **7**, **13** e **14**). O composto **14** foi isolado pela primeira vez na família Celastraceae. Foi isolada também uma mistura dos epímeros **6** e **7**, além de quantidades adicionais da mistura dos TTPC's **5** e **6** (Tabela 2.10).

Tabela 2.10: Resumo das substâncias isoladas de SHEMA

Substância	Massa (mg)
Friedelina (5)	118,8
3β -Friedelinol (6)	249,8
3α -Friedelinol (7)	58,0
3-Oxo-28-hidroxifriedelano, canofilol (13)	6,0
Mistura de friedelina (5) e 3β -friedelinol (6)	8519,0
Mistura de 3β -friedelinol (6) e 3α -friedelinol (7)	18,0
$3\beta,16\beta$ -di-hidroxifriedelano, pachysandiol B (14)	3,1

Fracionamento do extrato FAEMA

A análise do extrato FAEMA por CCD, utilizando revelação por irradiação de UV (254 e 366 nm) e luz visível, mostrou que esse extrato possuía uma alta concentração em pigmentos do tipo clorofila. Esses pigmentos foram detectados pela presença de manchas verdes, amarelas (luz visível) e em tons de vermelho (UV em 366 nm) relacionados à fluorescência das clorofilas.⁷⁷ No desenvolvimento do estudo fitoquímico do extrato FAEMA (178 g) inicialmente foi feito o fracionamento em uma coluna filtrante de sílica gel 60, seguido por fracionamentos por CL com mais seis colunas cromatográficas, também empacotadas com sílica gel 60. Essas partições levaram à obtenção de cinco constituintes químicos de FAEMA puros, três misturas e um derivado resultante da reação de peracetilação em um forno de micro-ondas (Tabela 2.13, p. 38). A Tabela 2.11 resume as principais características relativas às CCL's e as condições experimentais utilizadas nos procedimentos cromatográficos.

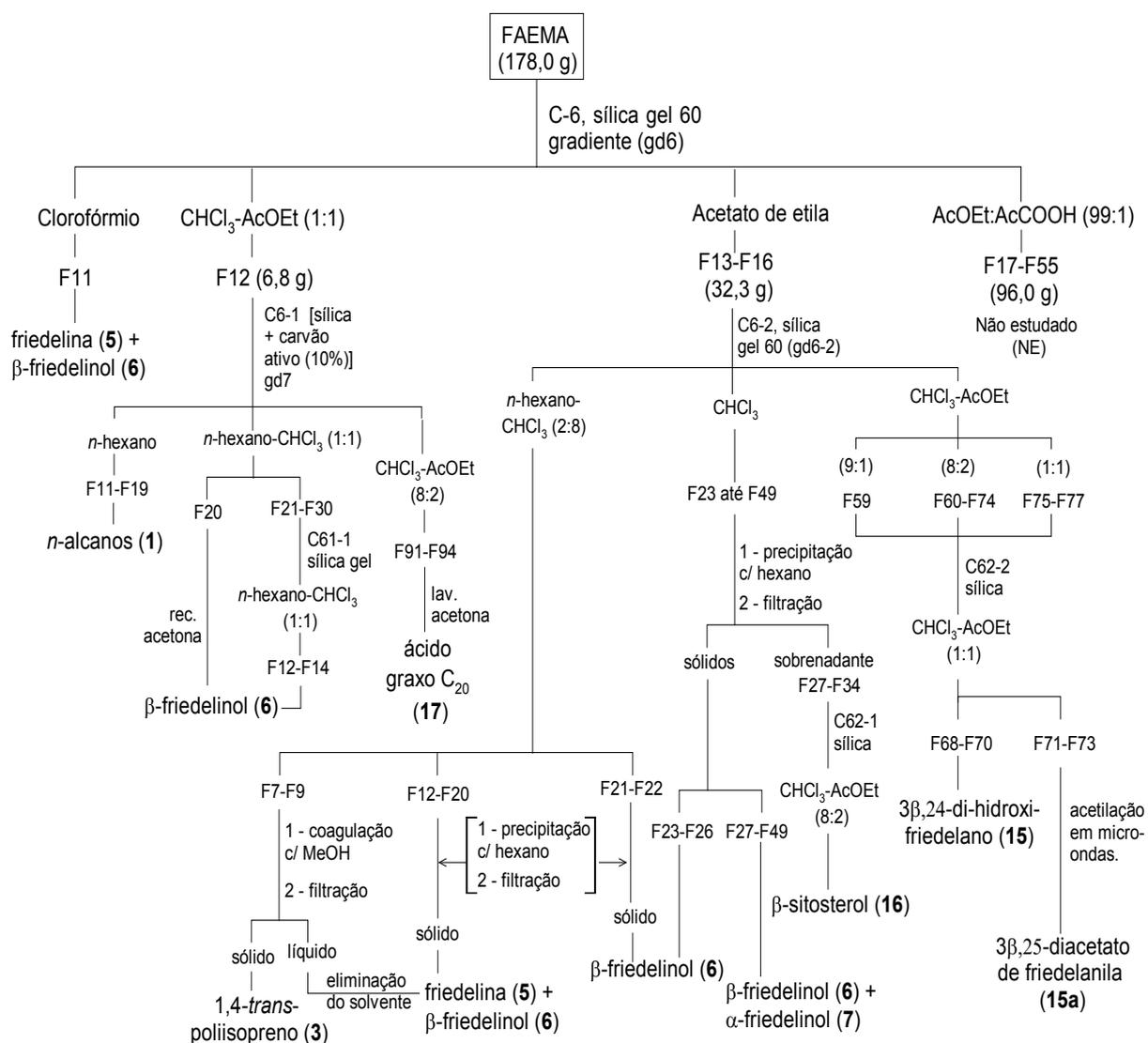
Tabela 2.11: Colunas de CL desenvolvidas no fracionamento de FAEMA

CCL	Tipo	OD (cm)	FE (massa, g)	Sistema eluente	Carga (g)	Frações (mL)
C-6	G	12,0	SG (284)	gradiente (gd6)	178,0	55 (150)
C6-1	G	3,0	SG-CA (220)	gradiente (gd6-1)	6,80	120 (10)
C61-1	F	1,0	SG (22)	Isocrático (iso61-1)	0,13	20 (5)
C6-2	G	5,0	SG (400)	gradiente (gd6-2)	32,3	120 (50)
C62-1	G	1,0	SG-NP (35)	gradiente (gd62-1)	0,17	81 (5)
C62-2	G	2,0	SG-NP (50)	gradiente (gd62-2)	0,30	90 (5)

G: eluída por gravidade; F: média pressão ou *flash*; OD: diâmetro externo da coluna; FE: fase estacionária, SG: sílica gel 60; SG-CA: sílica gel 60 + carvão ativo; Al-N: alumina neutra; FM: fase móvel; gd6: clorofórmio, clorofórmio:acetato de etila (1:1), etanol, etanol:ácido acético (1%); gd6-1: clorofórmio, clorofórmio:hexano (1:1), clorofórmio, clorofórmio:acetato de etila (20%); iso61-1: hexano:clorofórmio (1:1); gd6-2: hexano:clorofórmio (2:8), clorofórmio, clorofórmio:acetato de etila [(9:1), (8:2) e, (1:1)], acetato de etila, acetato de etila:metanol (1:1) e metanol; gd62-1: hexano:clorofórmio [(6:4), (1:1), (4:6) e (2:8)], clorofórmio, clorofórmio:acetato de etila (9:1), (8:2), (1:1), acetato de etila; gd62-2: clorofórmio, clorofórmio:acetato de etila [(95:5), (8:2) e (1:1)], acetato de etila, acetato de etila:metanol (85:15).

Na tentativa de se encontrar um adsorvente para CCL que apresentasse eficiência na remoção do conteúdo de pigmentos clorofílicos do extrato, foi preparada uma CCL (CC6-1) utilizando a mistura sílica-carvão ativo 10% (SG-CA) como fase estacionária. Entretanto, esse procedimento não levou a resultados satisfatórios devido à forte adsorção entre a fase estacionária e os componentes do extrato e à baixa resolução cromatográfica apresentada. O Esquema 2.8

(p.35) resume os procedimentos realizados na elaboração do sólido FAEMA, fracionado a partir da CCL C-6.



Esquema 2.8: Fracionamento de FAEMA.

Coluna C-6

O material do extrato FAEMA (178,0 g) foi submetido a uma CCL filtrante (C-6) com o fracionamento feito em gradiente de polaridade (gd6) com os seguintes eluentes: clorofórmio, clorofórmio:acetato de etila (1:1), acetato de etila, acetato de etila:ácido acético (99:1). Foram coletadas 55 frações de 100 mL cada e o perfil cromatográfico foi acompanhado por CCD mediante sistemas eluentes similares aos utilizados no fracionamento de C-6.

Agrupamento das frações de C-6

A Tabela 2.12 mostra os agrupamentos e os respectivos constituintes químicos isolados por grupo, bem como, o sumário das operações de fracionamento por CCL e operações aplicadas na purificação e isolamento dos referidos constituintes, tais como, (re)-dissoluções seletivas (lavagens), recristalizações, etc. Todos os constituintes isolados, posteriormente, foram identificados por técnicas cromatográficas e espectrométricas.

Tabela 2.12: Agrupamentos e constituintes isolados das frações de C-6

Frações	Grupo	Massa (g)	Procedimentos	Constituintes	Identificação
F1 a F10	G1	12,9	NE	ND	ND
F11	G2	1,8	Estoque	(5 + 6)	CCD
F12	G3	6,8	CCL: C6-1 e C61-1	(1), (6) e (17)	CCD, RMN
F13 a F16	G4	32,3	CCL: C6-2, C62-1 e C62-2	(3), (5 + 6), (6) (6 + 7), (15), (15a) e (16)	CCD, IV, RMN
F17a F55	G5	96,0	NE	ND	ND

NE: não estudado; CCL: fracionamento em coluna de cromatografia líquida; Lav: lavagem; Rec: recristalização; ND: não determinado; friedelina (5); β -friedelinol (6); α -friedelinol (7); 3 β ,24-dihidroxifriedelano (15); β -sitosterol (16); 3 β ,24-diacetoxifriedelano; ácido icosanóico (17).

Algumas frações de C-6 não foram estudadas (Tabela 2.12) quando o perfil cromatográfico (CCD) apresentou altas concentrações de pigmentos vegetais e a complexidade dessas frações (massa/número de constituintes) tornariam ou acarretariam em separações cromatográficas inviáveis.

Grupo G2 de C-6 (F11, clorofórmio)

O grupo G2 apresentou um sólido branco (1,12 g), identificado por CCD como uma quantidade adicional da mistura de friedelina (5) e β -friedelinol (6).

Grupo G3 de C-6 (F12, clorofórmio:acetato de etila, 1:1)

O grupo G3 foi obtido como um material heterogêneo, pastoso, esverdeado, contendo um sólido branco disperso. Esse material (6,8 g) foi submetido a uma coluna cromatográfica (C6-1) empacotada com sílica gel 60 e carvão ativo (10%). A eluição foi feita por gradiente (gd6-1) com os sistemas solventes hexano, hexano:clorofórmio (1:1), clorofórmio e clorofórmio:acetato de etila (8:2), tendo sido coletadas 120 frações de 10 mL cada. As frações F11-F19 de C6-1, eluídas com hexano, forneceram uma mistura de *n*-alcanos (138,0 mg, 1), identificada por CG como

similar a mistura de hidrocarbonetos anteriormente obtida no fracionamento do extrato em hexano (FHEMA). A fração F20 de C6-1, eluída com hexano:clorofórmio (1:1), forneceu um material que, após recristalização com acetona, resultou num sólido branco (3,8 mg), identificado por CCD como uma quantidade adicional de β -friedelinol (**6**). As frações F21-30 foram purificadas por CL tipo *flash* (C61-1) com sílica gel 60 (230-400 Mesh), eluída com hexano:clorofórmio (1:1). As frações F12-F14 de C61-1 produziram um sólido branco (17,3 mg) identificado por CCD e RMN como sendo uma quantidade adicional de **6**. Retornando à coluna C6-1, as frações F91-F94 produziram uma cera amarelada (19,8 mg), identificada por RMN como sendo o ácido icosanóico (5,0 mg, **17**), um ácido graxo C₂₀.

Grupo G4 de C-6 (F13-F16, clorofórmio:acetato de etila, 1:1)

O material do grupo G4 de C-6 (32,3 g) foi submetido à análise cromatográfica em CCL (C6-2) utilizando-se 400 g de sílica gel 60 (70-230 mesh) como fase estacionária. Foram coletadas 119 frações de 50 mL. Os eluentes utilizados em C6-2 foram hexano, clorofórmio, acetato de etila e metanol. Esses solventes foram utilizados puros, ou em misturas de ordem crescente de polaridade (gd6-2). A solução formada a partir das frações F7-F9 de C6-2, que foram coletadas com o eluente hexano:clorofórmio (2:8), quando precipitada com metanol, forneceu um material elástico, que foi identificado por CCD frente a uma amostra autêntica, como sendo uma quantidade adicional (30,2 mg) do biopolímero 1,4-*trans*-poliisopreno (**3**). Após a remoção do solvente do sobrenadante resultante dessa filtração, foi recuperado um sólido branco identificado por CCD como uma quantidade adicional da mistura dos constituintes **5** e **6** (241,5 mg). As frações F12-F20 foram coletadas como um sólido branco que, após precipitação com hexano e filtração, foi identificado por CCD como outra quantidade adicional da mistura de **5** mais **6** (468,5 mg). O sólido branco recuperado das frações F21-F22 da coluna C6-2 foi identificado por CCD como sendo mais uma quantidade do constituinte **6** (22,1 mg).

Todas as soluções das frações F23-F49 de C6-2 (particionadas com clorofórmio), após a adição de hexano, resultaram na precipitação de um sólido branco de aspecto cristalino. Após a coleta desses sólidos por filtração, ficou constatado por CCD que os sólidos oriundos das frações F23-F26 representam quantidades adicionais de **6** (~ 360,0 mg) e os sólidos obtidos a partir das frações F27-F49 continham quantidades adicionais da mistura dos epímeros **6** e **7** (132,6 mg). O agrupamento do material contido nos sobrenadantes das filtrações referentes às frações F27-F34 foi purificado por CL em sílica gel 60 (C62-1) com clorofórmio:acetato de etila (8:2), que levou à obtenção de um sólido branco (10,0 mg), reconhecido por CCD, frente a uma amostra autêntica, como sendo o esteróide β -sitosterol (**16**). As frações da coluna C6-2, eluídas com os sistemas

solventes clorofórmio:acetato de etila 9:1 (F59), 8:2 (F60-F74) e 1:1 (F75-F77), foram reunidas e o material total obtido (300 mg) foi fracionado em CL sílica-gel (C62-2). As frações F68-F70 de C6-2 eluídas com clorofórmio:acetato de etila (1:1) resultaram em um sólido (12,0 mg), que foi identificado por técnicas espectrométricas (IV e RMN) com sendo o TTPC diol $3\beta,24$ -dihidroxfriedelano (**15**). As frações F71-F73, também fracionadas com clorofórmio:acetato de etila (1:1), apresentaram, segundo as análises por CCD, um conteúdo rico no composto **15**, constituinte das frações F68-70. Posteriormente à elucidação estrutural de **15**, procedeu-se a peracetilação do material de F71-F73 (5,0 mg). A peracetilação foi conduzida mediante a aplicação de irradiação na região de micro-ondas (seis ciclos de 5 minutos com 10% da potencia máxima de um aparelho de micro-ondas Panasonic de 900 Watts) sobre o conteúdo da mistura das frações F71-F73 com anidrido acético (1 mL) e acetato de potássio anidro (100 mg). Após a irradiação, a mistura reagente foi esfriada, neutralizada com bicarbonato de sódio aquoso a 10% (20 mL) e a suspensão aquosa formada foi submetida a uma extração com acetato de etila (3 x 5 mL). A fração em acetato de etila foi secada com sulfato de sódio anidro (3 g) e, após a eliminação do solvente, o sólido branco e pastoso obtido (3,9 mg) foi identificado por RMN como sendo o derivado peracetilado de **15**, o TTPC $3\beta,24$ -diacetoxifriedelano (**15a**).

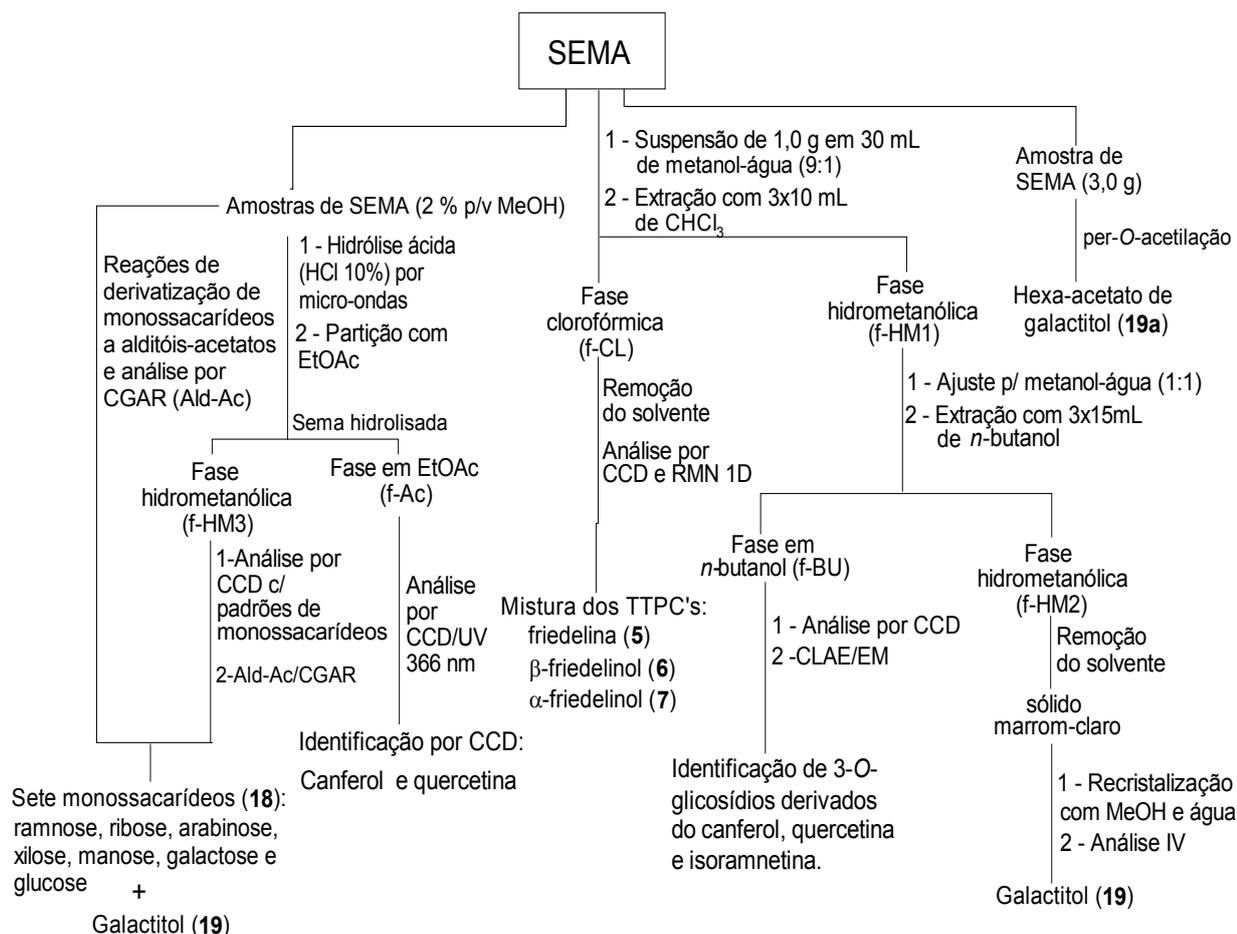
Resumo do fracionamento de FAEMA

A partir do extrato em acetato de etila das folhas de *M. acanthophylla* (FAEMA), as substâncias obtidas foram caracterizadas como uma mistura de hidrocarbonetos saturados (**1**), o 1,4-*trans*-poliisopreno (guta-percha) (**3**), três constituintes TTPC's puros (**6**, **15**, e **15a**), bem como, quantidades adicionais das misturas de **5** com **6**, e dos epímeros **6** e **7**, um esteroide (**16**). Foi isolado também um ácido graxo saturado (**17**) (Tabela 2.13).

Tabela 2.13: Resumo das substâncias obtidas de FAEMA

Substância	Massa (mg)
Mistura de <i>n</i> -alcanos (1)	138,0
1,4- <i>Trans</i> -poliisopreno (3)	30,2
3β -Friedelinol (6)	~390
Mistura de friedelina (5) e 3β -friedelinol (6)	1830,0
Mistura de 3β -friedelinol (6) e 3α -friedelinol (7)	132,6
$3\beta,24\beta$ -di-hidroxfriedelano (15)	12,0
$3\beta,24\beta$ -diacetoxifriedelano (15a)	3,9
β -sitosterol (16)	10,0
ácido icosanóico (17)	5,0

Estudo fitoquímico do extrato SEMA (Esquema 2.9)



Esquema 2.9: Fracionamento do extrato SEMA.

Uma amostra de SEMA (1,0 g) foi suspensa em metanol-água (30,0 mL, 9:1 v/v) e fracionada com clorofórmio, formando as fases clorofórmica (f-CL) e hidrometanólica (f-HM1) (Esquema 2.9). A fração f-CL, depois de seca, apresentou um sólido cristalino que foi analisado por CCD com padrões de TTPC, sendo identificada a presença de friedelina (5), β -friedelinol (6) e α -friedelinol (7) em mistura (12,0 mg). A fração aquosa f-HM1 teve ajustado o conteúdo metanol:água para (50/50 v/v) e foi submetida a uma nova extração com *n*-butanol (3 x 15 mL), formando as fases butanólica (f-Bu) e hidrometanólica (f-HM2). A fase f-HM2, após a remoção do solvente por evaporação, apresentou um material marrom-claro que, após ser recrystalizado com metanol:água, apresentou um sólido branco (70,0 mg), que foi identificado por análise de absorção no IV como sendo o galactitol (19). A fração f-Bu de SEMA foi analisada em placas CCD, eluídas com acetato de etila:metanol:ácido acético em água (0,5%) [8:3:1] e reveladas com reagente NP-PEG4000 sob luz UV (lâmpada 366 nm). As placas CCD reveladas apresentaram manchas amarelas e amarelo-esverdeadas, atribuídas à presença de glicosídeos derivados de

quercetina e canferol, respectivamente.⁷⁹ Amostras da fração f-Bu de SEMA (5 mg/mL) também foram submetidas a análises por CLAE com IES/EM acoplados. O equipamento CLAE-EM utilizado foi um cromatógrafo Shimadzu com detector UV-VIS e a fase móvel (50% v/v) de ACN/H₂O com 0,5% de ácido fórmico, utilizando uma coluna C18 (ODS), 15 x 0,46 cm, partículas de 3 µm, em 40 min. A análise dos espectros EM-IES de SEMA juntamente com os dados da literatura, permitiram identificar dez glicosídeos derivados de quercetina e canferol como constituintes do extrato SEMA (Tabela 2.14).

Tabela 2.14: Flavonoides identificados a partir das análises dos dados de IES/EM do extrato SEMA, modo negativo e varreduras na faixa de m/z 100-2000 Da

Aglicona	Identificação	Ref.
Miricetina	Pentose-di-(ramnose)-ramnosídeo de miricetina	PE
Metilquercetina	Pentose-ramnose-pentose-ramnosídeo de metilquercetina	PE
Quercetina	di-(Ram)-pentose-hexosídeo de quercetina ⁽²¹⁾	81
Quercetina	di-(Ramnose)-hexosídeo de quercetina ⁽²⁰⁾	80, 81
Canferol	di-(Ramnose)-pentose-hexosídeo de canferol ⁽²²⁾	80, 81
Canferol	di-(Ramnose)-hexosídeo de canferol	81, 82
Isoramnetina	Pentose-di-(ramno)-hexosídeo de isoramnetina ⁽²³⁾	81
Quercetina	Hexose-hexosídeo de trimetil-quercetina	PE
Miricetina	Pentose-ramnose-hexosídeo de miricetina	PE
Miricetina	di-(Ramnose)-hexosídeo de miricetina	81, 82

(PE): Glicosídeos identificados no presente estudo mediante a comparação entre os valores característicos dos íons EM-IES disponíveis na literatura e os observados nos espectros EM-IES (modo varredura) de SEMA.^(21, 22, 23) Glicosídeos inéditos (**21**, **22** e **23**) que foram isolados por CLAE semi-preparativa e caracterizados com os dados de análises de dados RMN e EM-IES⁽¹⁻³⁾.

Identificação dos monossacarídeos de SEMA por CGAR

Os monossacarídeos livres e totais de SEMA foram analisados por CGAR, utilizando o método alditol-acetato. Na análise para detecção dos açúcares livres, o extrato SEMA foi utilizado sem ser hidrolisado e, na identificação dos açúcares totais, foi utilizado o seu produto de hidrólise ácida.⁷⁴ As análises dos cromatogramas CGAR, obtidos por esse método, permitiram identificar um conjunto de sete monossacarídeos (L-ramnose, D-ribose, L-arabinose, D-xilose, D-manose, D-galactose e D-glicose, **18**) e o poliol galactitol (**19**). A hidrólise da solução metanólica do extrato SEMA (500 µL a 2% p/v) foi feita em um tubo de ensaio, tendo sido o solvente previamente eliminado com fluxo ar quente. O extrato seco obtido foi então redissolvido com 300 µL de ácido clorídrico (10%) aquoso e o tubo, após ser hermeticamente fechado, foi levado ao forno de micro-ondas doméstico, com potência ajustada em cerca de 160 W (20%). Após a irradiação, o material foi esfriado e, em seguida, neutralizado com KOH_(aquoso) a 10%. Os resíduos

de água/ácido resultantes da neutralização do extrato hidrolisado foram eliminados pela adição, seguida de evaporação, de duas porções consecutivas de 500 µL de metanol sob fluxo de N_{2(g)}. Uma alíquota desse extrato SEMA hidrolisado foi particionada com acetato de etila/água e as fases obtidas foram submetidas a análises em placas CCD de sílica gel. As placas que receberam a fase orgânica (F-Ac) foram eluídas com clorofórmio:metanol:água (100:13,5:1 v/v/v). Após a eluição, as cromatoplasmas foram reveladas com NP-PEG 4000⁷⁸ sob luz UV (λ 366 nm) apresentaram manchas amarelas e amarelo-esverdeadas, associadas à presença de flavonoides com esqueleto semelhante à quercetina e ao canferol, respectivamente. As placas CCD que receberam alíquotas da fração aquosa (f-HM3) foram eluídas com clorofórmio:metanol:água:ácido acético (6:4:1:1 v/v/v/v). Nessas placas, a revelação foi desenvolvida utilizando dois tipos de reveladores: anisaldeído sulfúrico⁷⁸ e solução etanólica (70%) de permanganato de potássio em meio básico (pH~12). As placas com a fração f-HM3 apresentaram manchas identificadas como galactose, galactitol e glicose. O conteúdo remanescente do extrato SEMA hidrolisado (cerca de 1 mg) foi utilizado como reagente de partida nas reações de derivatizações, que são necessárias para desenvolver o método alditol-acetato (Ald-Ac), para a análise dos monossacarídeos totais por CGAR.

Derivatização de monossacarídeos a acetatos de alditóis⁸³

Redução dos açúcares com a formação de seus respectivos alditóis – em um tubo de plástico de microcentrífuga, tipo *ependorff* de 1,5 mL, foram misturados 100-200 µL de uma suspensão aquosa (2%) de um padrão de monossacarídeo ou de SEMA (puro ou hidrolisado) com cerca de 10 mg de boroidreto de sódio, NaBH_{4(s)}. Essa mistura, em frasco aberto, foi posta a reagir por 30 minutos à temperatura ambiente. Após a reação foram adicionados 500 µL de ácido acético em metanol a 10% (v/v) para eliminar qualquer excesso de NaBH₄ existente. Em seguida, essa solução solvente foi evaporada com um fluxo de ar quente (~70 °C). Esse último procedimento foi repetido por mais duas vezes para permitir a eliminação completa de resíduos de água e ácido.

No processo de acetilação, o material, obtido na reação de redução descrita acima, depois de seco, foi mantido no *ependorff* e recebeu 200 µL de anidrido acético. Essa mistura foi agitada rapidamente em um agitador tipo *vortex* e homogeneizada em um banho de ultra-som por 1 minuto. Logo depois, com o frasco bem fechado (reforçado com fita adesiva crepe), a mistura foi colocada para reagir em um forno de micro-ondas com potência a 30% (240 W) por cinco minutos. A solução obtida após a irradiação teve o solvente totalmente eliminado. Para a completa remoção de sobras de anidrido acético, o material seco obtido foi redissolvido em 500

μL de tolueno, agitado em *vortex*, e novamente levado à *secura* por mais duas vezes consecutivas. Após a terceira e última operação de remoção de anidrido acético, o produto dessa reação foi particionado com água-acetato de etila (3 x 500 μL). A fração em acetato de etila foi evaporada até a *secura* para eliminar a água e o sólido obtido foi dissolvido em 200 μL de clorofórmio para, em seguida, ser injetado em um sistema para cromatografia a gás.

Per-O-acetilação de SEMA

A estratégia desta reação consistiu em realizar a *per-O-acetilação* dos carboidratos e polióis⁸³ presentes no extrato SEMA e assim isolar o carboidrato mais abundante na forma de *per-O-acetato*. A acetilação se deu através da reação com anidrido acético, que atuou como reagente em excesso e solvente, mais acetato de sódio anidro, que agiu como um catalisador básico. A Figura 2.1 mostra o esquema da reação de *per-O-acetilação* de galactitol, o principal polioli encontrado livremente no extrato SEMA, conforme foi identificado por CGAR.

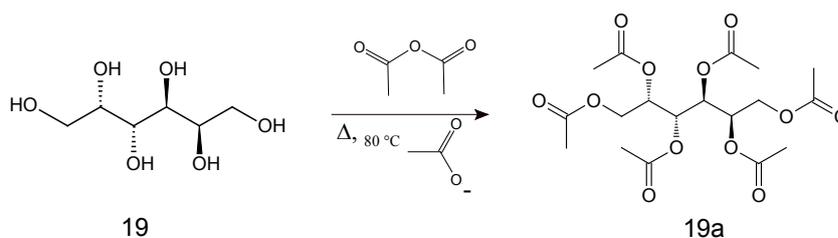


Figura 2.1: Reação de *per-O-acetilação* do galactitol (**19**), componente principal de SEMA, a hexa-acetato de galactitol (**19a**).

O procedimento seguido para promover a *per-O-acetilação* consistiu em adicionar uma parte do extrato SEMA (3,0 g) a um balão tritubulado (150 mL), contendo 60 mL de anidrido acético e 10 g de acetato de sódio anidro, montado com um condensador de refluxo (Figura 2.2). Essa mistura foi posta a reagir sob-refluxo (80 °C) e agitação magnética por 4 horas. Ao término da reação, a mistura foi posta a arrefecer em um banho de gelo e o meio, que se apresentava ácido (pH 4,8), foi então justado para pH 7,0 com adição de bicarbonato de sódio.

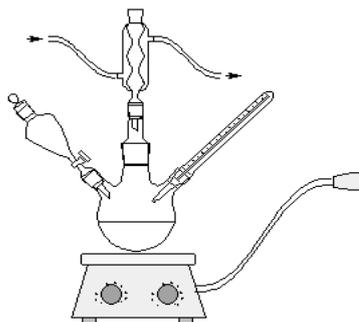


Figura 2.2: Sistema de refluxo utilizado para conduzir a reação de *per-O-acetilação* do extrato SEMA.

Após a neutralização do excesso de anidrido, o produto da reação foi particionado em um funil de separação (250 mL) com acetato de etila (3x ~30 mL), e a fase orgânica obtida teve a umidade removida com uma porção (~30 g) de sulfato de sódio anidro. Em seguida, o acetato de etila foi eliminado, formando um material sólido marrom. Esse sólido foi recristalizado com acetato de etila:metanol (5:1 v/v) e o produto final da per-*O*-acetilação de SEMA, um sólido amorfo branco-acinzentado (400 mg), foi caracterizado através da análise dos dados de RMN de ^1H e ^{13}C como sendo o composto 1,2,3,4,5,6-hexa-*O*-acetil-D-galactitol (hexa-acetato de galactitol, **19a**).

Resumo do estudo fitoquímico de SEMA

A partir do sólido separado do extrato em metanol das folhas de *M. acanthophylla* (SEMA), foram obtidos dois compostos puros, sendo um poliol e o seu derivado acetilado e uma mistura de três compostos triterpênicos, além da identificação de outros sete monossacarídeos e nove flavonóis glicosídicos (Tabela 2.15).

Tabela 2.15: Resumo das substâncias obtidas de SEMA

Substância	Massa (mg)
Mistura de friedelina (5), 3 β -friedelinol (6) e 3 α -friedelinol (7)	23,0
Mistura de monossacarídeos (18): (L-ramnose, D-ribose, L-arabinose, D-xilose, D-manose, D-galactose e D-glicose)	Anal. Qual.
Galactitol (19)	70,0
Hexa-acetato de galactitol (19a)	400
3- <i>O</i> -{[α -L-ramnopiranosil(1 \rightarrow 6)]-[α -L-ramnopiranosil(1 \rightarrow 2)]}- β -D-galactopiranosídeo de quercetina (20)	1,9
3- <i>O</i> -{[α -L-ramnopiranosil(1 \rightarrow 6)]- <i>O</i> -[β -D-xilopiranosil(1 \rightarrow 3)]- <i>O</i> - α -L-ramnopiranosil(1 \rightarrow 2)]}- β -D-galactopiranosídeo de quercetina (21)	14,0
3- <i>O</i> -{[α -L-ramnopiranosil(1 \rightarrow 6)]- <i>O</i> -[β -D-xilopiranosil(1 \rightarrow 3)]- <i>O</i> - α -L-ramnopiranosil(1 \rightarrow 2)]}- β -D-galactopiranosídeo de canferol (22)	12,2
3- <i>O</i> -{[α -L-ramnopiranosil(1 \rightarrow 6)]- <i>O</i> -[β -D-xilopiranosil(1 \rightarrow 3)]- <i>O</i> - α -L-ramnopiranosil(1 \rightarrow 2)]}- β -D-galactopiranosídeo de isoramnetina (23)	1,4

Anal. Qual.: análises qualitativas feitas por CCD e CGAR

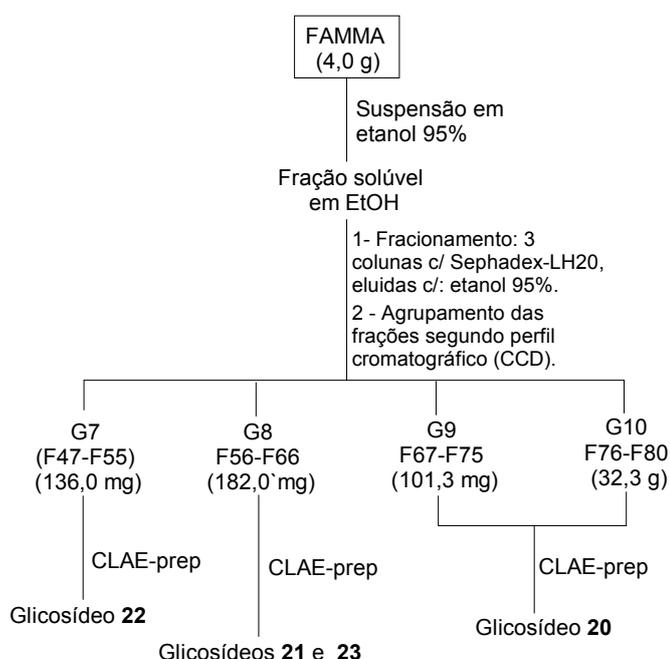
Estudo analítico de SEMA, FOMMA e FAMMA por CCD e CLAE

A análise comparativa por CCD das frações dos extratos metanólicos (SEMA e FOMMA) e hidrometanólicos (FAMMA), solúveis em *n*-butanol (f-Bu) ou em etanol (95%) (f-EtOH), mostrou que essas frações, contendo flavonoides glicosídicos, apresentaram qualitativamente, o mesmo perfil cromatográfico. Assim, o fracionamento por CLAE foi realizado com o extrato que apresentou a maior massa da fração solúvel em *n*-butanol (f-Bu), o extrato FAMMA (f-Bu \approx 41%). O extrato SEMA (f-Bu \approx 23%) foi utilizado na prospecção preliminar por CCD, na identificação de glicosídeos flavônicos por CL-EM e identificação de açúcares por CGAR. O

extrato FOMMA (f-Bu \approx 30%) foi reservado para testes biológicos. Os cromatogramas obtidos com as frações f-Bu e f-EtOH para os extratos citados se apresentaram bastante similares.

Análise por CLAE em escala semi-preparativa de FAMMA

O cromatograma de f-EtOH (p.164) em escala analítica, usando detector UV com $\lambda = 360$ nm, apresentou picos significativos que indicaram as presenças de substâncias relacionadas com flavonoides.⁷⁴ O fracionamento por CLAE em escala semi-preparativa (injeções de 50,0 mg) foi então conduzido com uma parte do extrato FAMMA (4,0 g) solúvel em etanol por ter apresentado semelhança cromatográfica com SEMA. A solução foi previamente filtrada em coluna de Sephadex LH-20 (Amersham Biosciences), utilizando três colunas (Büchi, 230 x 49 mm), em série, com eluição feita com etanol PA (95%, Vetec) utilizando uma bomba Shimadzu LC 8A (fluxo de 2,0 mL min⁻¹). Foram coletadas 120 frações (50 mL) que, após redução do solvente em evaporador rotativo, foram agrupadas segundo os perfis cromatográficos apresentados nas cromatoplasmas CCD de sílica gel, eluídas com acetato de etila:ácido:acético:ácido fórmico:água (100:11:11:26 v/v/v/v) e reveladas com reagente NP-PEG4000 sob luz UV (366 nm). Os agrupamentos de frações G7, G8, G9 e G10, que, nas análises por CCD, apresentaram manchas amarelas e amarelas esverdeadas, indicativas da presença de glicosídeos flavônicos, foram purificadas por CLAE em uma coluna semi-preparativa (Shimadzu, Shim-pack ODS, 5 μ m, 20 x 250 mm, fluxo 10 mL min⁻¹). As demais frações foram reservadas para estudo posterior.



Esquema 2.10: Fracionamento do extrato FAMMA. CLAE-PREP: Purificação utilizando coluna CLAE semi-preparativa (Shimadzu, Shim-pack ODS, 5 μ m, 20 x 250 mm, fluxo 10 mL min⁻¹, FM = [A + 20-30% de B], A = solução aquosa de TFA (0,1%, v/v); B = ACN-metanol (1:1 v/v) acidulada com TFA (0,1%, v/v).

O Esquema 2.10 (p.43) resume as operações realizadas no estudo cromatográfico do extrato hidrometanólico FAMMA. O material (100 mg) do grupo G7 foi purificada por CLAE semi-preparativa, utilizando a fase móvel constituída de uma mistura binária (A+B), sendo A (70%) = ácido trifluoroacético (TFA) a 0,1% em água deionizada e B (30%) = acetonitrila:metanol (50:50, v/v) contendo TFA a 0,1%. Esse experimento permitiu isolar um sólido ($T_r = 27,0-28,6$ min, 12,0 mg) na forma de um pó amorfo, amarelo, identificado por análise de dados de RMN (1D e 2D) e EM-IES, como sendo o glicosídeo inédito 3-*O*-{[α -L-ramnopiranosil($\alpha \rightarrow 6$)] [α -L-xilopiranosil($\alpha \rightarrow 3$)-*O*- α -L-ramnopiranosil($\alpha \rightarrow 2$)]}- β -D-galacto-piranosídeo de canferol (**22**). Parte do material (150 mg) do grupo G8, também purificada por CLAE preparativa, utilizando a fase móvel constituída de A(75%)+B(25%), permitiu isolar um sólido ($T_r = 18,5-20,3$ min, 14,0 mg) na forma de um pó amorfo, amarelo claro, identificado por análise de dados de UV, IV, RMN e EM-IES como sendo o glicosídeo 3-*O*-{[α -L-ramnopiranosil(1 \rightarrow 6)]-*O*-[β -D-xilopiranosil(1 \rightarrow 3)-*O*- α -L-ramnopiranosil(1 \rightarrow 2)]}- β -D-galacto-piranosídeo de quercetina (**21**), um composto inédito. Com as mesmas condições cromatográficas aplicadas na purificação de **21**, o grupo G8 forneceu o sólido ($T_r = 20,4-23,9$ min), um pó amarelo e amorfo, identificado na análise de dados espectrométricos (IV, RMN e EM-IES) como sendo 3-*O*-{[α -L-ramnopiranosil (1 \rightarrow 6)] [β -D-xilopiranosil(1 \rightarrow 3)- α -L-ramnopiranosil(1 \rightarrow 2)]}- β -D-galactopiranosídeo de isoramnetina (**23**), outro glicosídeo inédito. A purificação de G9 e G10, utilizando a fase móvel constituída de A(80%)+B(20%) forneceu um sólido ($T_r = 28,7-29,6$ min, 6,5 mg), na forma de um pó amorfo, amarelo claro, identificado por análise de dados de RMN (1D e 2D) como sendo o glicosídeo 3-*O*-{[α -L-ramnopiranosil($\alpha \rightarrow 6$)] [α -L-ramnopiranosil($\alpha \rightarrow 2$)]}- β -D-galactopiranosídeo de quercetina (**20**), flavonoide isolado anteriormente de *M. ilicifolia*.³⁸ O estudo das demais frações não levou à obtenção de substâncias puras.

CÁLCULOS TEÓRICOS E ESTUDO POR DIFRATOMETRIA DE RAIOS-X

Nas análises de difração de raios X, foi utilizado o difratômetro Siemens D5000, do DQ, UFMG, operado a 40 KV, 30 mA, com Cu K α ($\lambda = 1,54056$ Å), com grafite monocromador e escaneado na faixa angular de 4-40° (2 θ) com passo de 0,01° (2 θ) e constante de tempo de 15 s/passos. A amostra foi submetida a rotação de 60 ciclos/min. Os cálculos teóricos com os confôrmeros *ccccc* e *ccbb* de **5** foram realizados utilizando o programa Gaussian 03.¹³⁵ Na determinação estrutural de **5** e **14** foram utilizadas metodologias Hartree-Fock (HF)¹⁴⁷ e DFT/B3LYP¹⁵⁰⁻¹⁵¹ com aplicação dos conjuntos de bases 6-31G(d) e 6-31G(d,p), respectivamente.¹⁵²⁻¹⁵³ Na indexação dos dados de difração foi utilizado o programa DICVOL91.

NEPLAM – DQ-ICEX - UFMG

3

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Oliveira, DM

2012

Método Aplicado na Elucidação Estrutural dos Compostos Isolados

A técnica de elucidação estrutural aplicada neste estudo foi baseada no método heurístico, que consistiu em encontrar, entre estruturas geradas hipoteticamente, uma que apresentasse características espectroscópicas e físico-químicas (obtidas por simulação) idênticas, ou muito próximas, das características que foram obtidas experimentalmente para um dado composto a ser elucidado. Basicamente, a técnica seguiu uma rotina (Figura 3.1, p.48), na direção de identificar fragmentos moleculares presentes nos compostos estudados, através da comparação entre os dados espectroscópicos e físico-químicos obtidos experimentalmente e os dados contidos na literatura especializada. As fontes de dados utilizadas foram disponibilizadas, principalmente, pelo sistema CAPES⁸⁴, como a base de dados SciFinder (Chemical Abstracts). Foram consultadas, também, fontes de dados públicos na Web, como: SDBS-AIST⁸⁵, NIST⁸⁶, HMDB⁸⁷, JST-BIRD (MassBank)⁸⁸, NMRShiftDB⁸⁹, e sites de grandes universidades, a exemplo da Biblioteca Digital da UNICAMP⁹⁰.

Como pode ser visto na Figura 3.1 (p.48), no início da rotina para se descobrir a correlação exata entre os dados espectroscópicos de uma substância isolada durante o estudo fitoquímico e a sua estrutura química exata atribuída a esses dados, é necessário consultar informações de bancos de dados ou de publicações específicas para se verificar se essa substância é conhecida. A partir desse ponto, considerando que a substância isolada é inédita, a rotina das elucidações estruturais tem início com a identificação de um conjunto de fragmentos e subestruturas moleculares que mostrem correlações com os dados espectroscópicos (IV, RMN, UV, etc.) da substância isolada. A partir desses fragmentos e subestruturas são geradas as estruturas hipotéticas necessárias para simulações computacionais de otimização estrutural e dados de RMN, a fim de servir de apoio para resolver a estrutura real do composto isolado. No presente estudo as estruturas hipotéticas foram feitas utilizando programas computacionais que permitem o desenho de estruturas químicas tridimensionais e salvos em arquivos de modelagem tipo MDL (com extensão MOL), os quais são fornecidos gratuitamente pela internet (JMOL, ACD/ChemSketch, etc.). Seguindo com as estruturas hipotéticas desenhadas, procede-se a transferência destas para programas de modelagem molecular e depois para programas que simulam parâmetros de RMN. A maior parte das análises conformacionais foi feita com o uso do sistema de modelagem molecular da PERCH⁹³ com o programa MMS-Molecular Modeling Software da PERCH NMR TOOLS, Versão 2007.2. Foram utilizados também os programas Gaussian

V.03¹³⁷ e SPARTAN 4.1.3¹⁵⁵ nas otimizações de geometrias e simulação de parâmetros de RMN por meio de cálculos *ab initio* HF e DFT no estudo de elucidação estrutural e conformacional do composto **14** (p.120). Seguindo com o método de aproximação tentativa/erro, dito heurístico, a elucidação estrutural de um composto inédito foi feita pela comparação entre os dados simulados para cada estrutura hipotética e os dados experimentais. Essa etapa de comparação foi seguida por repetidas vezes, até que a correlação entre os dados calculados e experimentais apresentassem a melhor convergência possível e a enésima estrutura química testada permita a completa atribuição dos dados de RMN do composto isolado. O método de quantificação da proximidade de convergência foi feito mediante a avaliação dos índices de correlações de Pearson (R) e similaridade entre cossenos.^{91,92} Nos cálculos dessa quantificação são utilizados os dados de deslocamentos de RMN de ¹³C do composto isolado e simulados para a estrutura sob avaliação. Uma estrutura hipotética validada para representar um composto estudado deve apresentar o maior valor de similaridade entre cossenos (> 0,9800) ou o valor do quadrado do coeficiente de correlação (R²) deve maior que 0,9801. O método levou em consideração os erros, limitações e as aproximações intrínsecas aos programas utilizados para realizar as simulações.^{93,94}

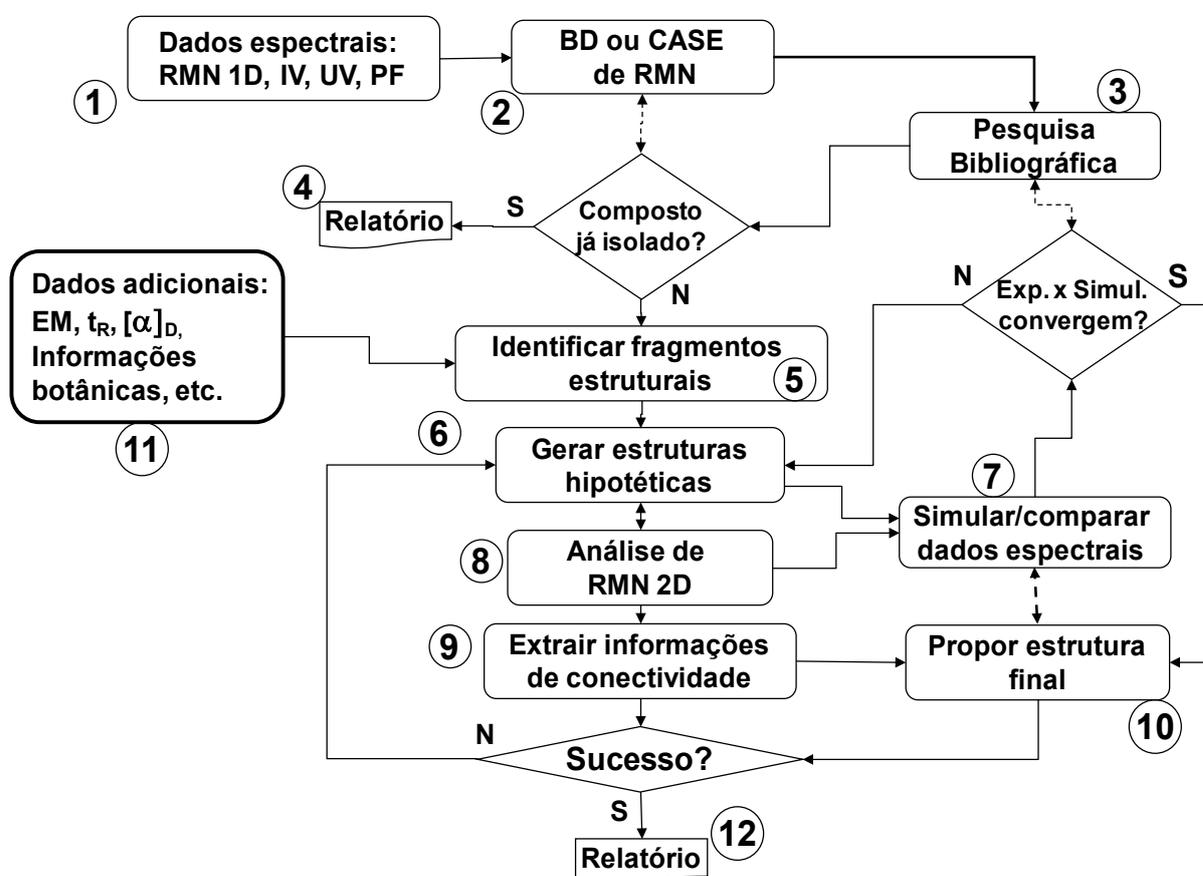


Figura 3.1. Fluxograma simplificado dos passos seguidos na elucidação estrutural de compostos isolados no estudo fitoquímico de *Maytenus acanthophylla*. Notas: BD: banco de dados; CASE: *Computer-Aided Structure Elucidation* (Elucidação Estrutural Assistida por Computador).⁹⁵

MATCH-5 – Um banco de dados de espectros de RMN de ^{13}C de TTPC's

Nesse estudo, devido à importância e à grande ocorrência de TTPC's na planta estudada, foi desenvolvido um interesse especial na elucidação estrutural desses compostos. Na maioria das vezes, a determinação estrutural de um TTPC, sem o apoio de técnicas computacionais, pode demandar muito tempo e ainda assim, permitir a duplicação de esforços associados com a recharacterização de TTPC's já isolados. Portanto, a etapa de eliminação de réplicas de TTPC's e apoio no desenho de estruturas hipotéticas para essa classe de compostos foi obtida em consulta a um banco de dados (BD) específico concebido neste trabalho, o MATCH-5. O cerne desse aplicativo computacional consistiu em gerar uma matriz de dados (MD, 812x30) com valores de RMN de ^{13}C de 812 espectros de RMN de TTPC's. Os 30 valores de δ de ^{13}C correspondentes aos sinais de carbono do esqueleto principal da molécula de um TTPC, constituíram um vetor-registro (1x30) de MD. Todos os dados dos TTPC's juntos totalizaram 24.360 deslocamentos químicos, compilados de artigos de revisão bibliográfica,^{96, 97} relatórios, dissertações e teses produzidas no NEPLAM/UFMG. A versão principal do MATCH-5 utilizada neste estudo foi escrita para Matlab. A construção da matriz de dados operacional para consulta ao banco de dados foi feita a partir de um algoritmo matemático utilizando recursos de álgebra linear⁹⁸, conforme as etapas abaixo:

1. Calcular os autovalores e correspondentes autovetores da matriz de dados bruta (MD).
2. Classificar os autovetores de MD pela magnitude de seus autovalores.
3. Escolher um novo posto para a matriz de dados operacional (M) por análise de componentes principais (redução de dimensionalidade).
4. Projetar os dados sobre esses autovetores.
5. Testar a posição de um vetor de dados desconhecido em M (consulta ao BD) e fornecer a resposta, que consiste no retorno dos correspondentes vetores de MD, que apresentam os maiores valores de similaridade (distância entre cossenos) em relação ao vetor de entrada.

À MD de MATCH-5, foi aplicado um método algébrico com a consequente redução da dimensão da matriz de dados original, sem perda das informações contidas nos dados armazenados. Esse recurso algébrico consistiu na decomposição dos valores singulares (DVS). A DVS de MD ($MD = USV^T$) levou à obtenção de uma nova matriz (M), aproximadamente igual a MD, porém, de posto (k) menor (Figura 3.2, p.50), $M_k = U_k(S_kV_k)$.

A entrada de um vetor-registro de consulta ao BD, constituído por 30 registros de δ de ^{13}C (Q_q), não contido em MD, pôde ser computada como $Q_q^T M_k = Q_q^T U_k(S_k V_k)$. Assim, foi possível calcular a posição desse vetor problema (Q_q) em relação aos vetores de M_k , mediante cálculo dos cossenos dos ângulos formados entre os módulos dos vetores Q_q e dos vetores de M_k (similaridade entre cossenos, S_c). A consulta termina com o retorno dos vetores-registros que apresentaram os cinco maiores valores de S_c (onde, $0 \leq S_c \leq 1$).

$$\boxed{\text{MD}} \approx \boxed{U_k} \begin{matrix} \boxed{S_k} \\ \boxed{V_k^T} \end{matrix} = U_k(S_k V_k)$$

Figura 3.2. Representação esquemática da redução de posto da matriz de dados (MD) de MATCH-5.

O posto ideal de M_k ($k = 18$) foi obtido pela análise por componentes principais (PCA), que reduziu significativamente ($\sim 40\%$) o espaço de armazenamento da matriz original (MD) e tornou mais dinâmica a consulta ao BD de MATCH-5 na versão para MATLAB. A operacionalização de MATCH-5 como um aplicativo para uso direto por outros estudantes e professores foi feita por meio de uma versão reduzida e otimizada para ser executada no Excel (Figura 3.3, p.51). A versão MATCH-5/Excel foi instalada em computadores no NEPLAM/UFMG e no NUPRONAT/UESB há mais de 24 meses e está sendo utilizado de maneira satisfatória na rotina de elucidação estrutural de TTPC's. Esta iniciativa mostrou que um banco de dados, semelhante ao MATCH-5, pode ser feito e servir à consulta automatizada de qualquer outro parâmetro quantitativo obtido em experimentos de laboratório.

Passos para a consulta de dados no MATCH-5/Excel:

1. Clicar no botão [**Limpar entrada**] para limpar a entrada de dados antiga.
2. Digitar os valores de entrada (valores de δ de ^{13}C) nas células da coluna **Entrada de Dados RMN** da planilha **Treinamento**. (Podem ser consultados entre 1 e 30 valores simultaneamente).
3. Clicar no botão [**Correlação**] para que os valores de entrada sejam organizados em ordem crescente.
4. Clicar na no botão [**Match TTPC**] para consulta e
5. Ler a resposta à consulta na **Tabela de Resultados** que aparece logo abaixo da coluna de entrada. Essa tabela mostrará os números/nomes e as referências dos três TTPC's

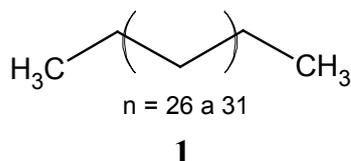
contido no BD de MATCH-5, que apresentam os valores de δ de ^{13}C mais próximos dos procurados. Na planilha **Treinamento** pode-se também consultar as estruturas dos TTPC's de saída,5 consultando o artigo intitulado (clicar em **Link =>**) “*¹³C NMR Spectra of Pentacyclic Triterpenoids-A Compilation and Some Salient Features* (Mahato et al, 1994),⁹⁶. A coluna **No.** (número), a primeira na **Tabela de Resultados**, apresenta o número da estrutura do composto conforme numeração no artigo.

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N	
1	TTPC MATCH 5.0		Entrada	TTPC Match 5.0 - 5ª versão, janeiro de 2007.						RMN					
2	Descrição:		Dados RMN	NC					Match 1						
3	Planilha EXPERTA para pesquisa de valores de δ_{C}		14.550	1					14.500						
4	químicos de RMN de triterpenos (TTPC)		16.010	2					15.300						
5			16.180	3	Link=>	F:\Match\Phy37_6_1517_34.pdf			16.200						
6	Baseada em programação especializada, comumente		16.590	4		Artigo de Mahato, 1994			16.600						
7	usada em inteligência artificial.		18.030	5					18.000						
8			18.240	6					18.200						
9	Créditos:		19.310	7					19.300						
10	Djalma Menezes de Oliveira - NEPLAM		20.390	8					20.300						
11			23.780	9					23.700						
12	Instruções:		25.150	10					25.100						
13	1. Entre com valores de RMN de ^{13}C na		27.480	11					27.400						
14	tabela ao lado. Se o TTPC apresentar dois		28.000	12					27.900						
15	ou mais carbonos funcionalizado ou		29.880	13					29.800						
16	característicos, digite apenas estes valores		34.270	14					34.200						
17	e faça uma pesquisa rápida.		35.650	15					35.500						
18			37.140	16					37.100						
19	2. Por fim, clique no botão "Match TTPC"		37.870	17					37.800						
20	para gerar a tabela de resultados atualizada.		38.110	18					38.000						
21	Compare os valores do match com os		38.430	19					38.300						
22	experimentais e identifique o TTPC match (BD).		40.030	20					40.000						
23			40.910	21					40.800						
24	Códigos da tabela de resultados:		42.880	22					42.800						
25	Número: Numeração código do composto		43.030	23					43.000						
26	Nome: Nomenclatura usual do TTPC		48.040	24					48.000						
27	Match: Probabilidade acerto (0 a 1) c/ o do BD.		48.350	25					48.300						
28	NC: Sinais de RMN de ^{13}C pesquisados (1-30)		50.400	26					50.300						
29	Observatio: Exibe comentário programado.		55.440	27					55.300						
30	BD: Banco de dados		80.650	28					80.600						
31	Nota: Não altere nada nas outras planilhas.		109.360	29					109.300						
32	O programa pode não funcionar.		150.960	30					151.000						
33	Run (click button) ==>														
34	Tabela de Resultados														
35	No.	Nome	3 Matchs	NC	Observação	Similaridade	Referências								
36	454	Lup20(29)-en-3b-O-hexanoate	99.78%	30	Similaridade ótima	0.99785	Phytochemistry 49 (4): 1127-1128, 1998								
37	454	Lup20(29)-en-3b-O-hexanoate	99.57%	30	Similaridade ótima	0.99566	Phytochemistry 49 (4): 1127-1128, 1998								
38	401	Acetato de lupeol	99.55%	30	Similaridade ótima	0.99551	Miranda, R. R. S., 2004 (Qualificação)								
39															
40															

Figura 3.3: Espelho da planilha de entrada de dados e consulta de valores de δ de RMN de ^{13}C de TTPC's em um BD do programa MATCH-5 construído com dados da literatura. Versão 5 para planilha eletrônica (tipo Excel).

Determinações estruturais dos compostos obtidos

Utilizando a metodologia descrita acima, neste estudo, foram identificadas e elucidadas as estruturas de 30 compostos, entre constituintes químicos e derivados obtidos das folhas de *M. acanthophylla*, sendo 21 compostos puros (19 isolados e dois derivados) e nove na forma de misturas. Foi feita também, por métodos cromatográficos e espectroscopia de massas, a identificação de seis glicosídeos flavônicos que não puderam ser isolados.

Mistura de Hidrocarbonetos (1)

A mistura de hidrocarbonetos (**1**) foi obtida das frações F1-2, isoladas por CC (CC-1) do extrato hexânico FHEMA, na forma de escamas brancas brilhantes, com faixa de fusão entre 58,7-63,5 °C. O espectro de absorção de **1**, na região do infravermelho (Figura 3.5, p.53), apresentou bandas que evidenciaram a natureza alifática do seu conteúdo, característica de hidrocarbonetos. Bandas de absorções intensas, devido a estiramento de ligações C-H de grupos metilas e metilenos (ν -CH), entre 2800-2950 cm^{-1} . Duas bandas de absorção, sendo uma banda de intensidade média em 1378 cm^{-1} e outra de forte intensidade centrada em 1471 cm^{-1} , foram atribuídas a deformações de ligações C-H (δ -CH). Uma banda intensa em 720 cm^{-1} foi associada à deformação de ligações C-H em fase de grupos metilênicos, onde o número desses grupos é maior que quatro unidades em uma única molécula⁹⁹.

A identificação foi possível pela comparação dos valores dos índices de retenção (I) calculados para a coluna SE-30, a partir dos tempos de retenção obtidos nos cromatogramas de F1-2 e os de uma série de hidrocarbonetos padrão (Figura 3.4), contendo principalmente os *n*-alcanos homólogos de cadeia entre C-31 a C-35.

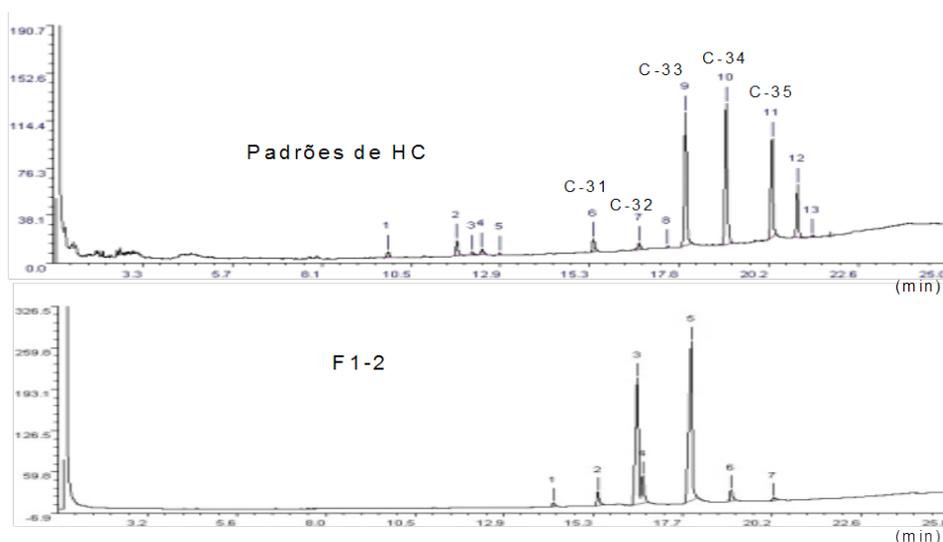


Figura 3.4: Cromatograma obtido por CGAR de **1** e padrões de HC (C₃₁-C₃₆). Coluna: SE-30, 30 m, 0,25 mm DI, 0,25 μm (capilar) de metilpolisiloxano; Temperaturas: rampa de 200 a 320 °C, razão de 5 °C/min, isotérmica por 1 min a 320 °C. Injetor a 280 °C e detector (FID) a 300 °C.

A mistura de hidrocarbonetos (**1**) foi identificada, por CGAR, como uma série de *n*-alcanos de cadeia longa (C-31 a C-35, os mais abundantes) (Tabela 3.1), onde a metade (50,4 %) da distribuição de massa total foi devida ao alcano linear C-33. Entretanto, o segundo componente mais abundante (38,7 %), possivelmente um HC ramificado, que apresentou o valor de índice de retenção ($I = 3185$) de um HC com o número de unidades metilênicas entre 31 e 32.

Tabela 3.1: Dados do cromatograma obtido por CGAR de **1** e de padrões de *n*-alcanos

Padrões <i>n</i> -alcanos				F1-2			
Pico	C _n	T _R (min)	I ^A	Pico	T _R (min)	I	Área pico (%)
	C ₃₀	-	-	1	14,25	3016	0,86
6	C ₃₁	15,46	3100	2	15,45	3100	2,84
	C _{31(B)}			3	16,53	3185	38,74
7	C ₃₂	16,69	3200	4	16,67	3196	3,66
9	C ₃₃	17,95	3300	5	17,99	3307	50,40
10	C ₃₄	19,04	3400	6	19,07	3400	2,77
11	C ₃₅	20,27	3500	7	20,22	3496	0,72
12		21,02					

(A) Na identificação através do índice de retenção (I) foi utilizada a faixa de variação de 20 unidades ($I \pm 20$), calculada com base na separação entre dois picos (C-34 e C-35) do cromatograma da série homóloga de *n*-alcanos (padrões). (B): HC ramificado; I = índice de retenção em coluna cromatográfica (SE-30); Coluna: SE-30, Alltech (EUA), 30 m, 0,25 mm DI, 0,25 μ m (capilar) de metilpolisiloxano; Temperaturas = rampa de 200 a 320 °C, razão de 5 °C/min, isotérmica por 1 min a 320 °C.

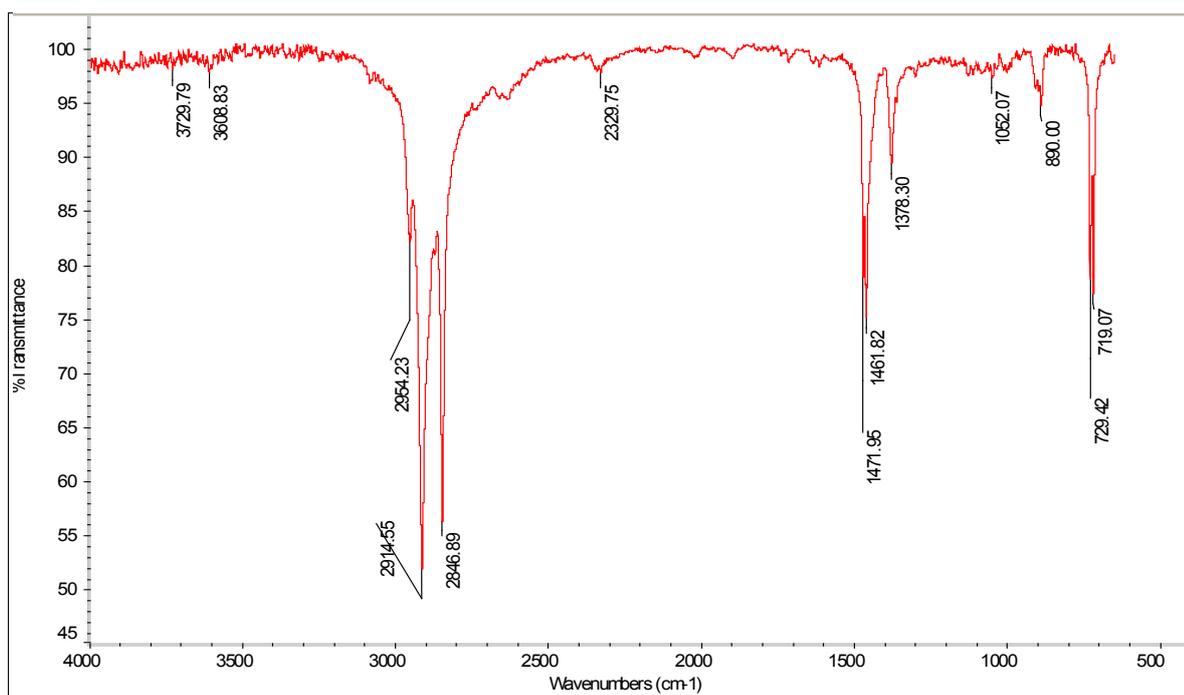
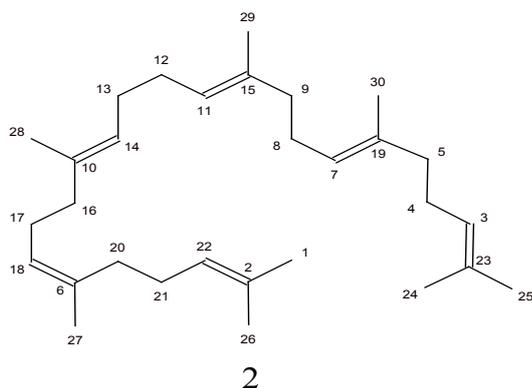


Figura 3.5: Espectro de absorção de **1** na região do IV.

2,6,10,15,19,23-Hexametil-(6e,10e,14e,18e)-tetracos-2,6,10,14,18,22-hexaeno, esqualeno, (2)



O constituinte **2** foi originado do fracionamento do extrato hexânico das folhas de *Maytenus acanthophylla* (FHEMA) e consistiu em um óleo de cor amarelo-esverdeada, viscoso, solúvel em clorofórmio. Em análise por CCD, **2**, usando hexano como eluente, apresentou uma única mancha azul (RF em ~ 0,60) abaixo da mancha observada para os hidrocarbonetos C-30 a C-33. No cromatograma CGAR de **2** (Figura 3.6), o pico 2 (t_R 11,69 min) foi atribuído a eluição do esqualeno, com base na comparação entre o valor do índice de retenção cromatográfico ($I = 2689$), calculado com os dados de tempo de retenção de uma série homóloga de HC's padrões (C-22 a C-33) isolados de plantas. O índice de retenção calculado foi comparado ao valor do índice de retenção publicado ($I = 2663$) para uma coluna HP-Ultra-1.¹⁰⁰ similar à coluna SE-30 utilizada neste estudo. A confirmação do isolamento do esqualeno foi feita através das análises dos dados de EM, IR e RMN de **2**.

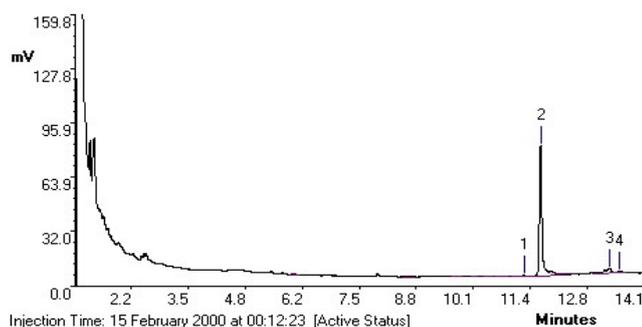


Figura 3.6: Cromatograma de análise por CGAR de **2**. Condições: Coluna SE-30, capilar, 30 m x 0,25 mm de diâmetro interno, filme de 0,25 nm de metilpolisiloxano, Alltech, USA. Temperaturas: coluna: Inicial a 200 °C, final até 320 °C por 1 min, a uma taxa de 5 °C/min. Detector e injetor operaram a 320 °C. O índice de retenção (I) foi igual a 2689, calculado com base no cromatograma de uma série homóloga (C-22 a C-33) de HC (padrões).

O cromatograma de íons totais (TIC, Figura 3.7), obtido através da análise CG-EM de **2**, apresentou o pico em t_R 12,14 min. A análise do EM associado a esse pico (Figura 3.8) mostrou que foram detectados íons fragmentos em m/z 69 (100%), m/z 81 (48%), 121(7%), 137(5%),

273(0,1%); 341(0,25%) e 409 (traços). A consulta ao banco de dados da biblioteca de EM's Wiley 138, residente na estação de trabalho do CG-EM, identificou o espectro de massas de **2** como sendo equivalente ao do esqualeno ($p = 0,91$). Os valores destes íons coincidiram com a literatura referente ao esqualeno¹⁰¹. Na Figura 3.9 (p.56) consta a proposta de fragmentação do esqualeno para os principais íons da EM-IE obtida de **2**.

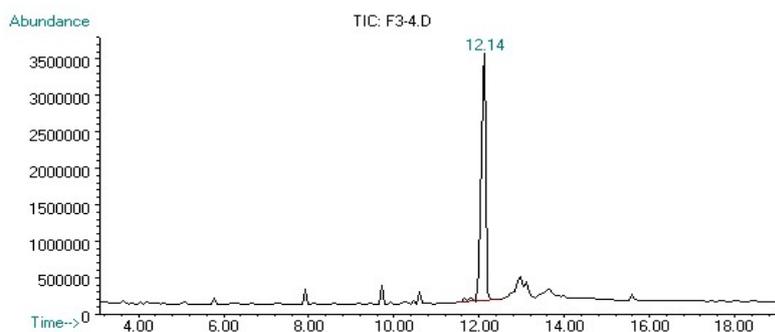


Figura 3.7: Cromatograma de íons totais (TIC) obtido por CGAR-EM de **2**. Condições: Coluna HP-1, capilar, 30 m x 0,25 mm de diâmetro interno, filme de 0,25 nm de metilpolisiloxano, Agilent, USA. Temperaturas: coluna: Inicial a 200 °C, final até 320 °C por 1 min, a uma taxa de 5 °C/min. Detector e injetor operaram a 280 °C.

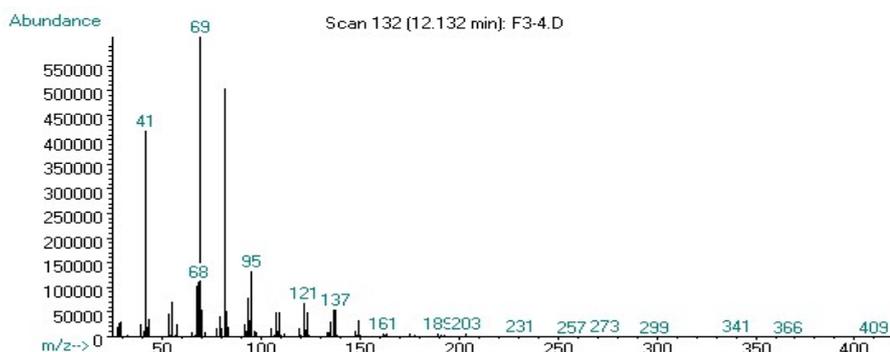


Figura 3.8: EM associado ao pico em $T_R = 12,14$ min do TIC de **2**.

O espectro de absorção na região do infravermelho de **2** (Figura 3.10, p.57) apresentou bandas características de hidrocarbonetos de cadeia insaturada com ramificações. Uma banda intensa em 2700 a 2870 cm^{-1} foi atribuída a estiramentos de ligações C-H de grupos CH_2 e CH_3 . As bandas fracas e conjugadas na região 1650-1680 foram atribuídas a alongamentos de ligações duplas carbono-carbono ($\text{C}=\text{C}$). A banda de absorção em 1450 cm^{-1} foi atribuída a deformações $\delta(\text{C-H})$ próprias de alcanos e alcenos ramificados. Uma banda forte em 1380 cm^{-1} foi atribuída a deformações $\delta(\text{C-H})$ de grupos metilas em cadeias laterais. A absorção em 830 cm^{-1} foi atribuída a deformações angulares fora do plano em ligações C-H de grupos $-\text{C}=\text{C}-\text{H}$. A banda em 3300 cm^{-1} foi atribuída a grupos hidroxilas, provavelmente surgidas devido à auto-oxidação do

esqualeno,¹⁰² ou relacionadas a um possível teor de umidade adsorvida na janela de amostragem do espectrômetro de IR.

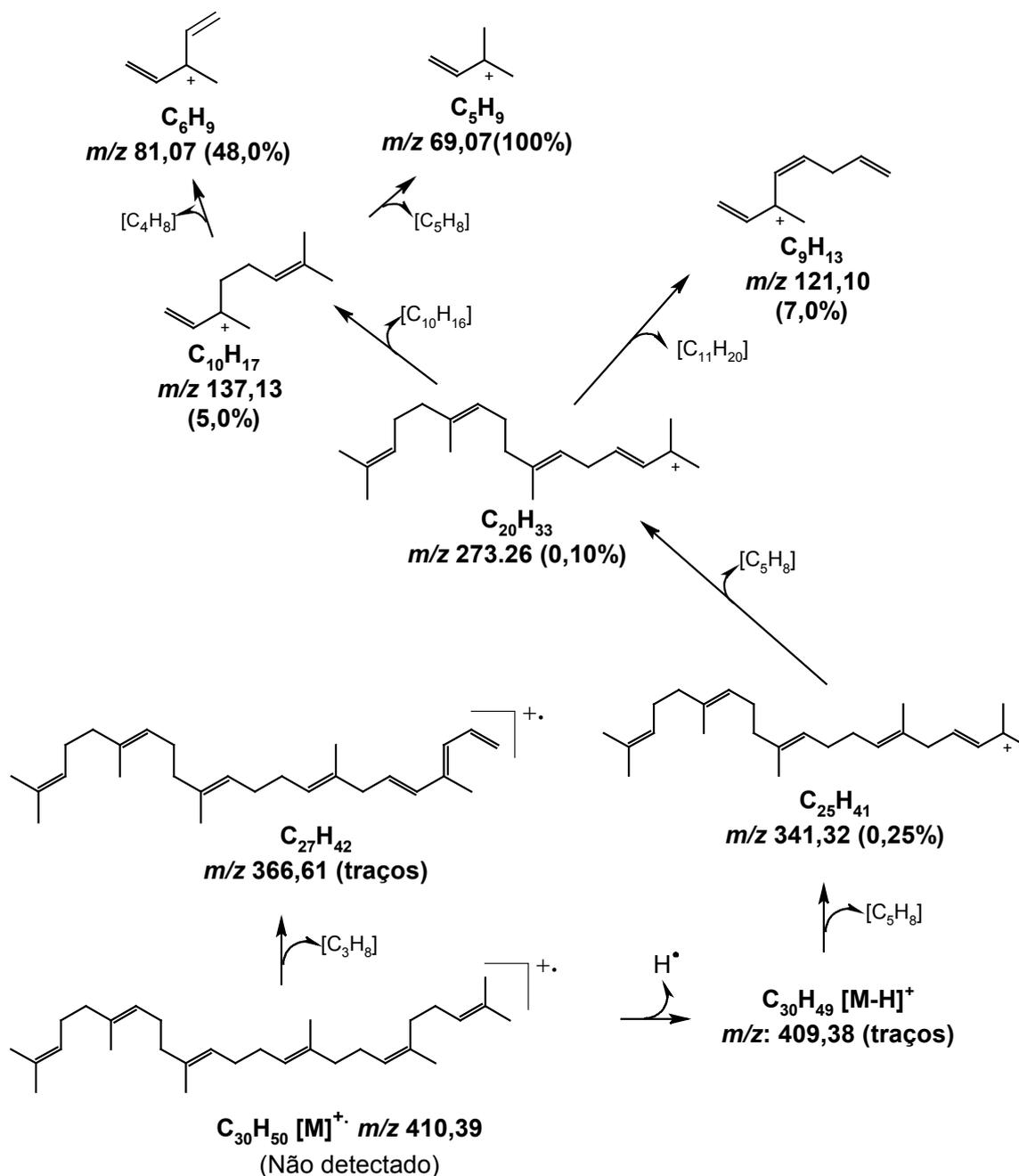


Figura 3.9: Fragmentograma do esqualeno com base no EM de 2.

Os espectros de RMN de 1H (Figura 3.11, p.57) e ^{13}C (Figura 3.12, p.58) de 2 apresentaram sinais de hidrogênios (δ 5,08-5,15) e de carbonos (δ 124,30-135,12) em regiões características de compostos com ligações duplas e foram indicativos da natureza olefínica de 2. Os valores referentes às integrações dos sinais de hidrogênios olefínicos (δ 5,05-5,20, 6H) e metilênicos (δ 1,93-2,12, 20H) foram condizentes com a estrutura proposta para 2. O espectro de RMN de ^{13}C

apresentou 15 sinais (Tabela 3.2), os quais foram atribuídos, inicialmente, a quatro grupos CH_3 na região de δ 16,01-25,69, quatro CH_2 na região de δ 26,69 a 39,77, quatro CH entre δ 124,30 a 124,44 e três carbonos não hidrogenados situados entre δ 131,26 a 135,12. Essas atribuições indicavam tratar-se de um composto com estrutura isoprenóide C-15, tipo farneseno. Entretanto, a comparação entre os dados de RMN encontrados na literatura para o esqualeno (Tabela 3.2), bem como as análises feitas mediante a integração dos sinais de RMN de ^1H e a EM mostrando a detecção dos íons em m/z 273, 341 e 409, contribuíram para a proposição de uma estrutura simétrica derivada de um grupo difarnesila (C-30), o esqualeno (**2**).^{101,103,104}

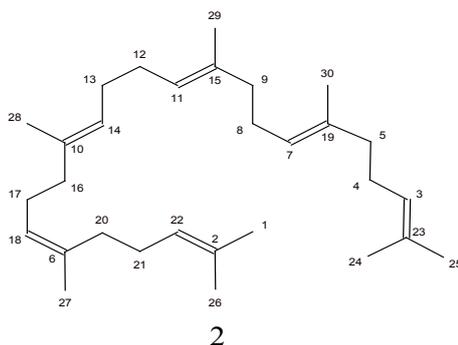


Tabela 3.2: Comparação entre os valores de δ de ^{13}C e ^1H de **2** (CDCl_3 , 400 MHz) e os valores publicados para o esqualeno^{101, 104}

C	$\delta^{13}\text{C}$		$\delta^1\text{H}$	
	2	Lit ^{101, 104}	2	Lit ^{101, 104}
27 e 30	16,01*	16,1	1,60 (s)	1,58 (s)
28 e 29	16,06*	16,1	1,60 (s)	1,58 (s)
24 e 26	- CH_3	17,8	1,60 (s)	1,58 (s)
1 e 25	25,69	25,8	1,68 (s)	1,67 (s)
8 e 17	26,69	26,7		
4 e 21	26,80	26,8		
12 e 13	- CH_2 -	28,3	1,97 – 2,09 (m)	1,90 – 2,10 (m)
5 e 20	39,75*	39,8		
9 e 16	39,77*	39,8		
7 e 18	124,30*	124,3		
3 e 22	- $\text{CH}=\text{C}$	124,4	5,08 – 5,15 (m)	5,03 – 5,17 (m)
11 e 14	124,44	124,5		
2 e 23	131,26	131,3		
10 e 15	= $\text{C}=\text{C}$	135,0		
6 e 19	135,12	135,2		

(*) Atribuições intercambiáveis.

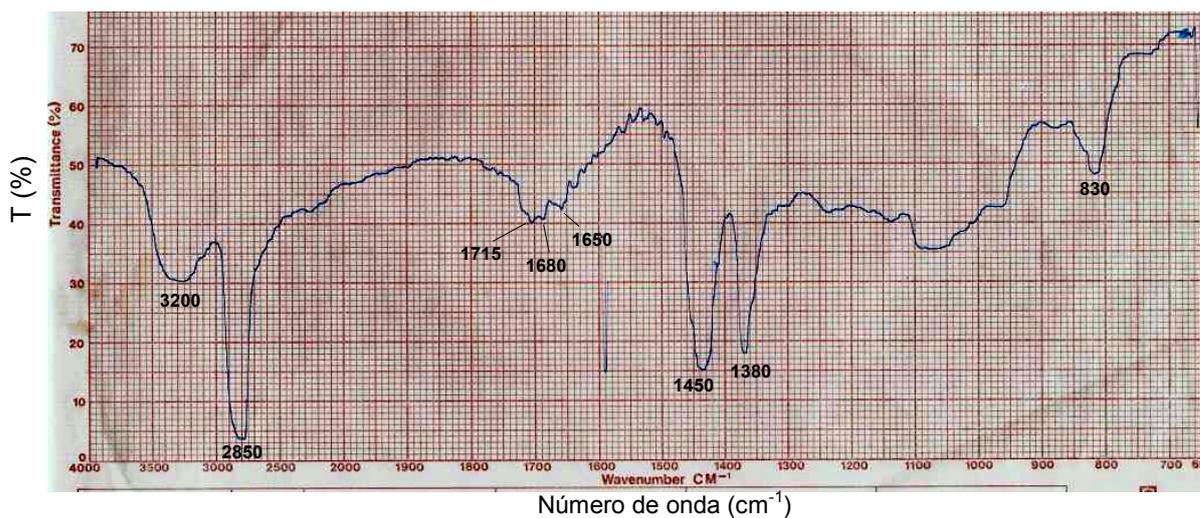


Figura 3.10. Espectro de absorção de **2** obtido na região do infravermelho (filme de NaCl).

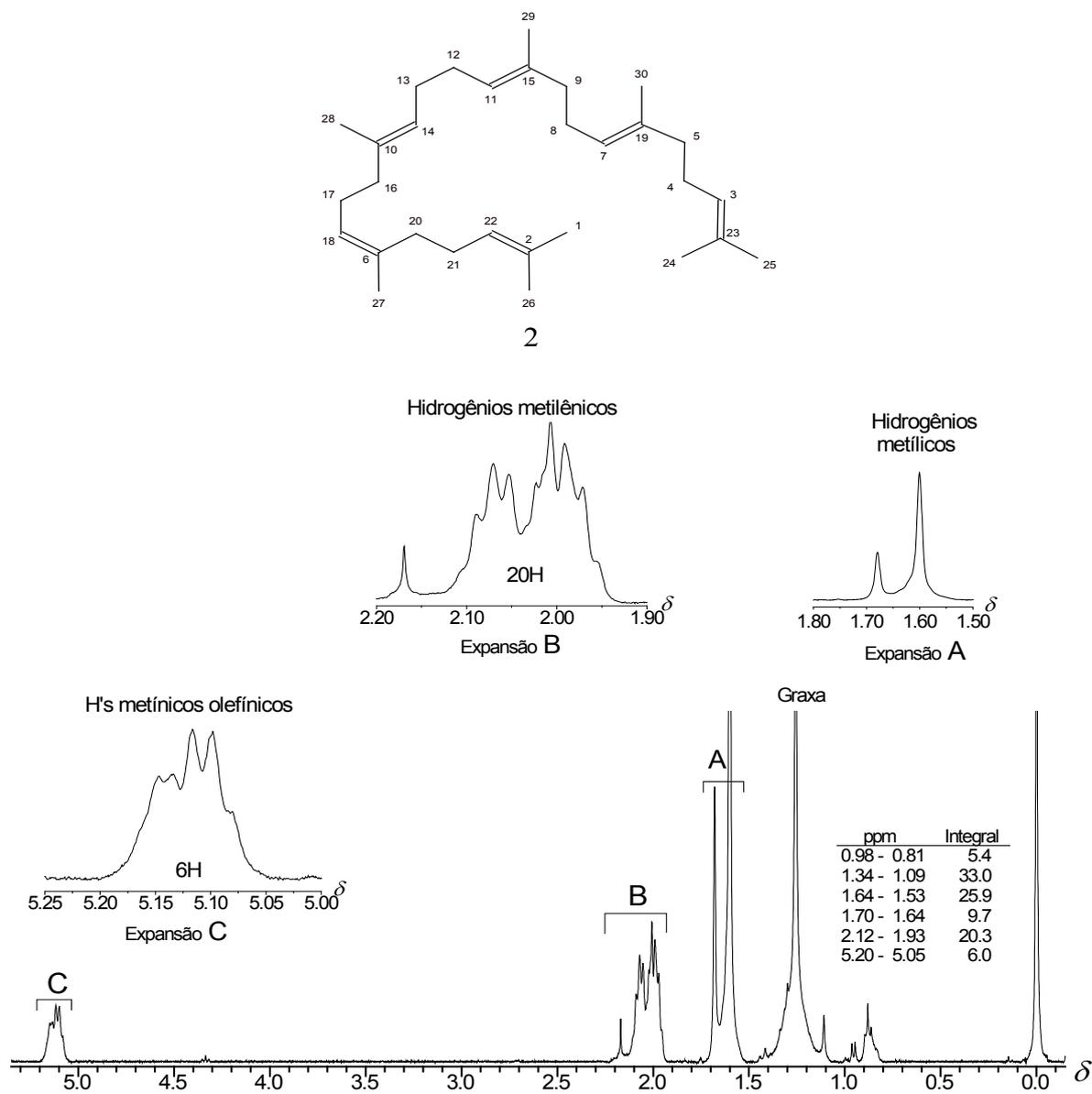


Figura 3.11. Espectro de RMN de ¹H de **2** (CDCl₃, 400 MHz).

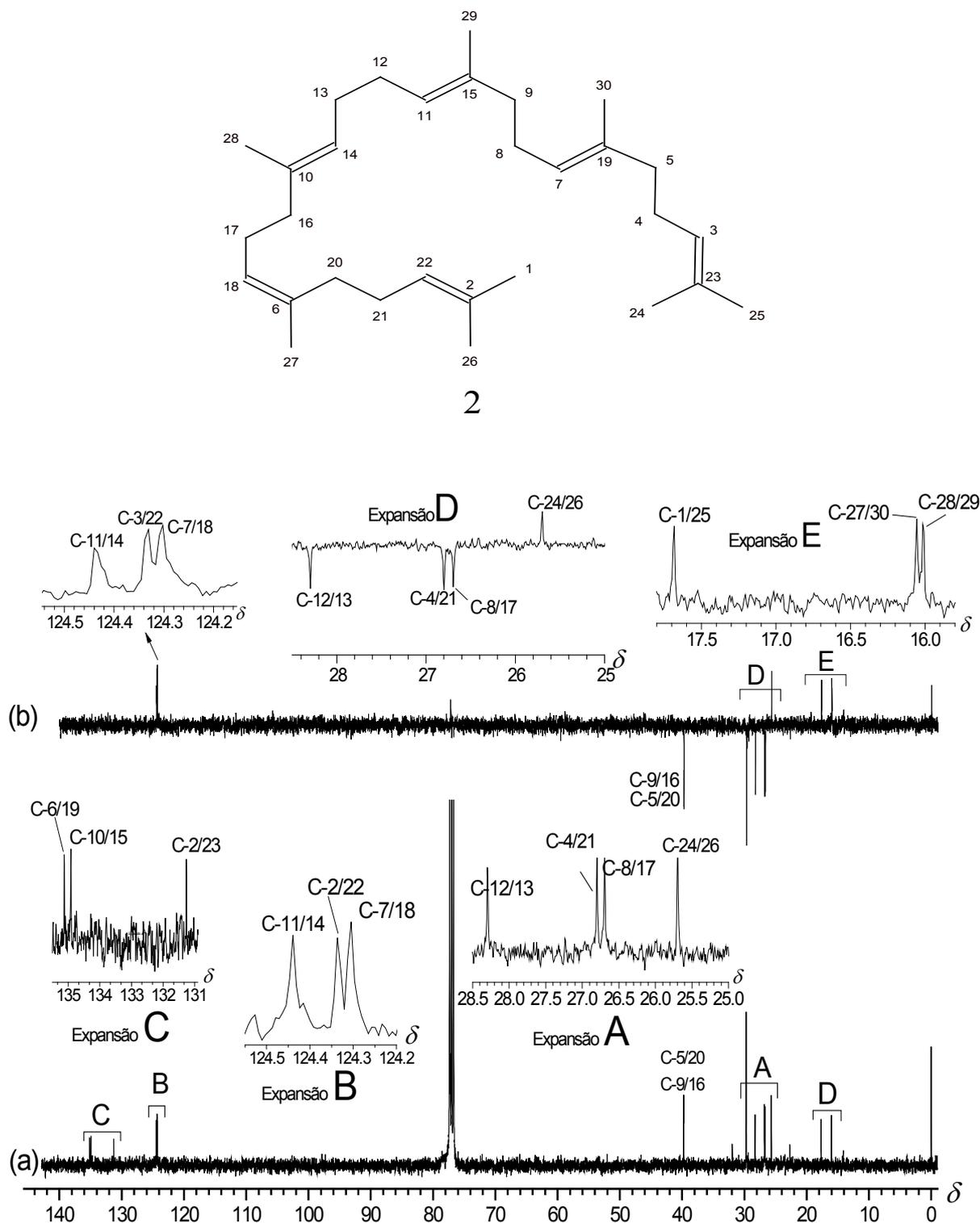
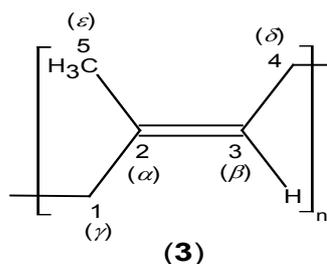
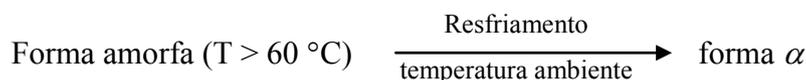
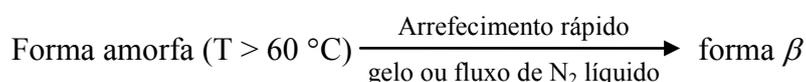
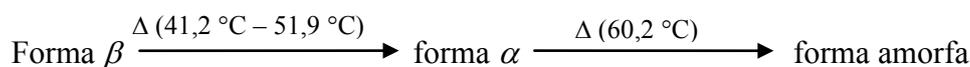


Figura 3.12: Espectro de (a) RMN de ^{13}C e (b) DEPT-135 de **2** (CDCl_3 , 100 MHz).

1,4-Trans-poliisopreno (guta-percha, 3)

O constituinte **3** foi obtido de extratos hexânicos a quente ($0,5 \pm 0,05$ %), por extração em aparelho Soxhlet (extratos GHEMA) a partir das folhas de *Maytenus acanthophylla*. Esse constituinte tinha a aparência uma goma branco-amarelada, semelhante ao que foi obtido anteriormente nas raízes dessa planta²⁹. A análise por CCD, com padrão de gutapercha, confirmou o isolamento do biopolímero e, posteriormente, análises espectrométricas (IV e RMN 1D) confirmaram a estrutura do composto 1,4-*trans*-poliisopreno (**3**).

O termograma de calorimetria exploratória diferencial (DSC) (Fig. 3.13A, p.61) de **3**, obtido no primeiro aquecimento (primeira varredura), apresentou dois picos endotérmicos em 51,9 e 60,2 °C e o termograma DSC, obtido durante o reaquecimento da amostra (segunda varredura, Figura 3.13B, p.61), registrou um pico endotérmico em 41,2 °C. Esse comportamento térmico indicou que **3**, de modo similar ao que ocorre com o 1,4-*trans*-poliisopreno (TPI), apresenta polimorfismo, sendo duas formas cristalinas α e β (Figura 3.16, p.62) e uma forma amorfa¹⁰⁵. O polimorfismo de **3** ficou evidente mediante a análise do termograma DSC na primeira varredura, através do pico endotérmico em 51,9 °C, que foi atribuído à mudança da forma β para a forma α . Nesse mesmo termograma foi observado um segundo pico endotérmico em 60,2 °C, que foi atribuído à transição da fase α para a fase amorfa. O segundo termograma (Figura 3.13B, p.61) apresentou um pico em 41,2 °C atribuído a transição de fases de **3** da forma β pura direto para a forma amorfa. Em resumo, comportamento térmico de **3** observado na preparação da amostra e análise por DSC pode ser simplificado como segue:



Os valores encontrados para as temperaturas de transição de fases do biopolímero **3** por DSC, bem como o caráter de reversibilidade entre as formas cristalinas e amorfas foram concordantes com os relatos encontrados na literatura para o TPI.^{105,106}

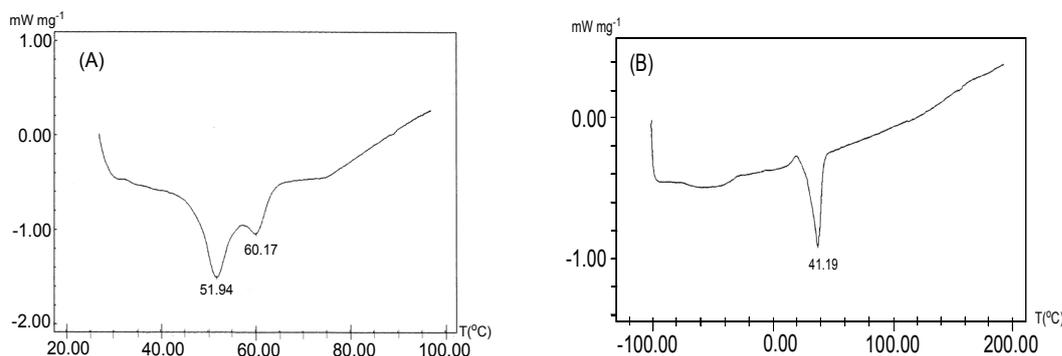


Figura 3.13: (A) Termograma DSC de uma amostra de **3** (1,06 mg), obtida em um aparelho Shimadzu DSC-50 (UFMG), em uma célula de alumínio e atmosfera de gás hélio (He, 50 mL/min), com varredura entre os valores de temperatura de 25 a 100 °C, mantido a 100 °C por 10 min e taxa de aquecimento de 20 °C/min; (B) Termograma DSC de uma amostra de **3** (reaquecimento), com varredura entre os valores de temperatura de -100 a 200 °C e taxa de aquecimento de 20 °C/min.

A temperatura de transição vítrea (T_g) de **3** foi calculada em -69,5 °C (203,67 K), conforme a termograma DSC (Figura 3.14), obtida com o aquecimento da amostra previamente resfriada abaixo de -100 °C, através de nitrogênio líquido. Esse valor de T_g foi encontrado bastante próximo do valor publicado para a guta-percha e para o polímero sintético *trans*-poliisopreno (TPI)¹⁰⁷.

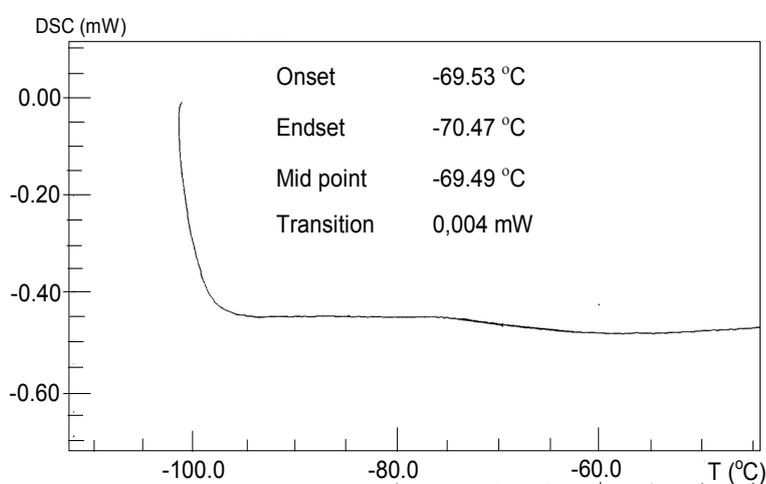


Figura 3.14: Termograma DSC de uma amostra de **3** (1,00 mg), obtida em um aparelho Shimadzu DSC-50 (UFMG), utilizando uma célula de alumínio e atmosfera de gás hélio (He, 50 mL/min), com varredura entre os valores de temperatura de -110 a 200 °C e taxa de aquecimento de 20 °C/min.

A curva termogravimétrica (TGA), obtida com o aquecimento de uma amostra de **3** (1,0 mg) sob fluxo de ar (50 mL/min) (Figura 3.15), mostrou que esse constituinte apresentou estabilidade térmica, sem significativa perda de material, até a temperatura de aproximadamente de 120 °C e entrou em processo de degradação rápida a partir de cerca de 260 °C.

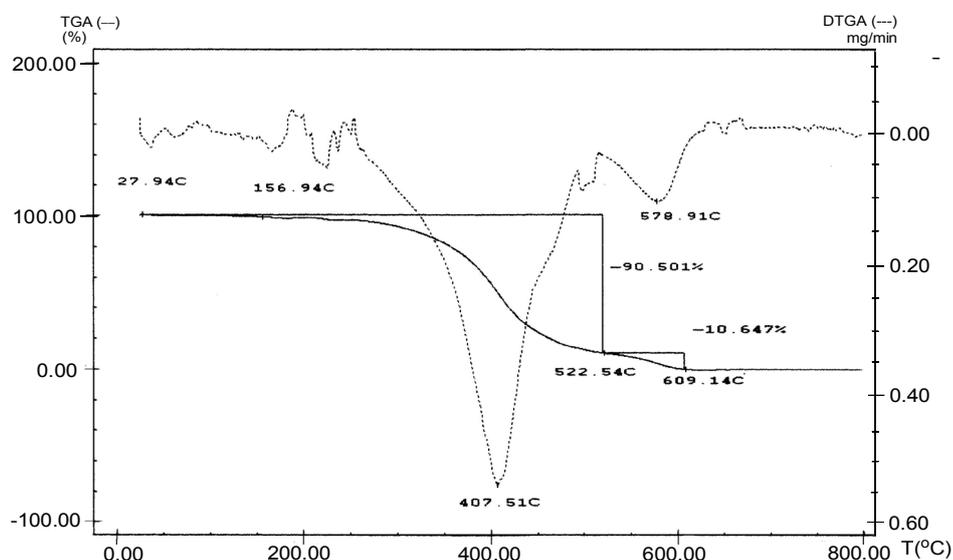


Figura 3.15: Curvas TGA (linha contínua) e DTGA (linha pontilhada) de uma amostra de **3** (1,0 mg), obtida em um aparelho Shimadzu TGA-50H (UFMG), em uma célula de alumínio e atmosfera de ar (50 mL/min), com varredura entre os valores de temperatura de 0,00 a 800,00 °C e taxa de aquecimento de 20 °C/min.

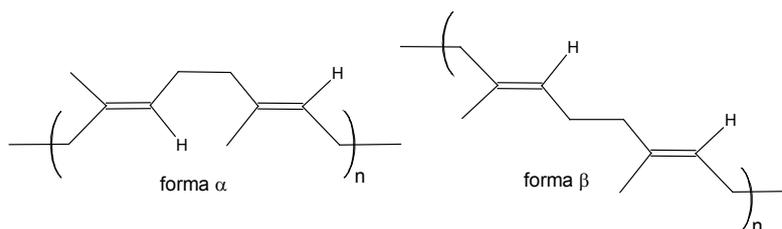


Figura 3.16: Estruturas das formas cristalinas α e β do biopolímero natural 1,4-*trans*-poliisopreno.

A taxa de perda de massa foi máxima em 407 °C e o material foi totalmente degradado quando a temperatura alcançou cerca de 600 °C. Na faixa de temperatura entre 130 a 255 °C ocorreu a liberação de compostos voláteis, resultantes da despolimerização da cadeia de **3**, possivelmente por cisões da cadeia polimérica, seguidas de reações radiculares, onde os mecanismos e rearranjos são análogos ou derivados dos que ocorrem na auto-degradação térmica de poliisoprenos (Figura 3.18, p.64), gerando, por exemplo, compostos como 4-metil-4-vinil-butirolactona e metilvinilcetona.^{108, 109}

O espectro de absorção na região do infravermelho de **3** (Figura 3.20A, p.66) mostrou um conjunto de frequências de absorções característico de um hidrocarboneto acíclico poli-insaturado. As bandas de absorção centradas em 2980, 2900, 1665, 1450, 1385 cm^{-1} e em 880 e 800 cm^{-1} indicaram que o constituinte **3** foi isolado na forma cristalina β (Tabela 3.3). A ausência de bandas de absorção em 1580, 1540, 860 e 780 cm^{-1} , reforçaram a proposição de que o composto **3** não se encontrava na forma α .¹¹⁰

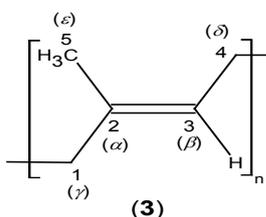


Tabela 3.3: Absorções na região do infravermelho de **3** na forma cristalina β (NaCl)

Nº de onda (cm^{-1})	Intensidade	Tipo de vibração
2980	Forte	$\nu(\text{=C-H})$
2920	Forte	$\nu_s(\text{CH}_3)$
2850	Forte	$\nu_s(\text{CH}_2)$
1665	Fraca	$\nu(\text{C=C})$
1450	Forte	$\delta(\text{CH}_2)$
1385	Forte	$\delta_s(\text{CH}_3)$
1215	Fraca	$\delta_{\text{np}}(\text{=C-H})$
1150	Fraca	$\gamma(\text{CH}_2)$
1110	Fraca	$\nu(\text{C-C})$
880	Média	$\delta_{\text{fp}}(\text{=C-H})$
800	Média	$\nu(\text{C-CH}_3)$
750	Fraca	$\gamma_r(\text{CH}_2)$

Abreviações: ν : estiramento; δ : dobramento ou deformação angular γ : torção ou oscilação; γ_r : rotação; as: assimétrico; s: simétrico; np: no plano; fp: fora do plano. Fonte: Espectro de **3** na região do infravermelho (Figura 3.20, p.67).

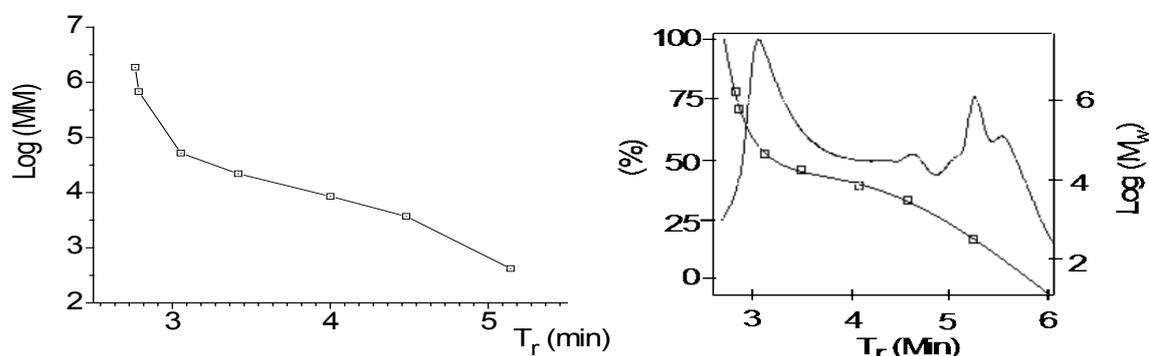
No espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3 , Figura 3.21, p.67), os sinais em δ 1,60 (sl, 3H) e 1,98 (m, 2H), 2,07 (m, 2H) foram atribuídos aos hidrogênios dos grupos metila (ϵ) e metilênicos (γ , δ), respectivamente. O pseudo tripleto (*like a triplet*) em δ 5,12 (pseudo t, $J = 6,3$ Hz, 1H) foi atribuído ao hidrogênio olefínico (β). Os valores normalizados das integrais desses sinais de RMN de ^1H foram equivalentes ao número de hidrogênios esperados na estrutura monomérica de **3**. As frequências dos sinais de RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3 , Figura 3.22, p.67) foram observadas em δ 16,05 (C-5), 26,77 (C-4), 39,77 (C-1), 124,29 (C-3)

e em δ 134,96 (C-2). A Tabela 3.4 apresenta a comparação entre os dados de RMN obtidos experimentalmente e os encontrados na literatura.²⁷

Tabela 3.4: Comparação dos valores de deslocamentos de RMN de ^1H e de ^{13}C de **3** (CDCl_3 , 400 MHz) com dados da literatura (CDCl_3 , 400 MHz)^{101, 104}

C	δ de ^{13}C			δ de ^1H	
	3	Lit ²⁷		3	Lit ²⁷
C-1(γ)	39,77	40,2	H-1a(γ)	1,98 (m)	2,04 (m)
C-2(α)	134,96	135,4	H-1b(γ)	1,98 (m)	2,04 (m)
C-3(β)	124,29	124,7	H-3(β)	5,12 (pseudo t, $J = 6,3$ Hz)	5,17 (m)
C-4(δ)	26,77	27,2	H-4a(δ)	2,07 (m)	2,12 (m)
			H-4b(δ)	2,07 (m)	2,12 (m)
C-5(ϵ)	16,05	16,5	H-5(ϵ)	1,60 (sl)	1,65 (s)

A cromatografia GPC (Figura 3.17), desenvolvida com poliestirenos padrões de massas molares variadas, foi utilizada para determinar a massa molar de **3**. A curva de eluição da Figura 3.17 (à direita) permitiu estimar os valores de massa molar ponderal média (M_w) em $4,48 \times 10^4$ e massa molar média numérica (M_n) igual a $3,05 \times 10^4$ g mol⁻¹ para esse biopolímero. Esses valores foram coerentes com valores de M_n e M_w encontrados para guta-percha natural como a que foi extraída de folhas de *Eucommia ulmoides* (Eucommiaceae).¹¹¹



Figuras 3.17: Curva de calibração obtida pela eluição de padrões de poliestireno (PS, à esquerda) e o cromatograma de **3**, sobreposto à curva ajustada dos padrões de PS (à direita). Os cromatogramas GPC foram obtidos em um cromatógrafo Shimadzu, mediante a injeção de uma amostra de **3**, dissolvida em THF (20 μL). Coluna HRC-SIL 5 μm , 250 x 4,6 mm (Shimadzu), utilizando THF como fase móvel (fluxo de 0,5 mL min⁻¹) e registro de dados em um detector de UV (λ 230 nm).

Parte do material de **3**, após ser exposto à luz e temperatura ambiente por duas ou mais semanas, tornou-se uma pasta amolecida, amarela e de odor rançoso. Após análises por IV (Figura 3.20 B, p.66) e comparação com os dados da literatura, ficou constatado que todo

conteúdo de **3** havia sofrido uma degradação oxidativa. As duplas ligações alternadas e ramificações por grupos metilas de poliisoprenos (PI) favorecem a reação de degradação por oxidação. Entretanto, a degradação do PI pode ocorrer por fatores físicos, como defeitos provocado por choques e contusões, luz, calor, bem como por fatores químicos e ambientais, como oxigênio, ozônio do ar atmosférico, impurezas metálicas e também por fatores biológicos como a presença de enzimas e microrganismos.^{109,112,113} Nas condições em que o material original de **3** degradou, ficou evidente que pode ter ocorrido uma oxidação autocatalítica ou auto-oxidação. O mecanismo da auto-oxidação é radicalar e se inicia com a abstração de hidrogênios α -metilênicos para formar radicais alquila ($R\bullet$). Na fase de propagação, os radicais alquila são peroxidados pelo ar e formam os radicais peroxilas ($ROO\bullet$). Nessa etapa da fase de propagação, os radicais peroxilas abstraem hidrogênios e se transformam em hidroperóxidos ($ROOH$) que formam os radicais alcóxilas e, além de poderem formar mais radicais peroxila e hidroxila, desencadeiam a expansão da cadeia oxidativa e a multiplicação de espécies radicalares (Figura 3.18).^{102,108,113}

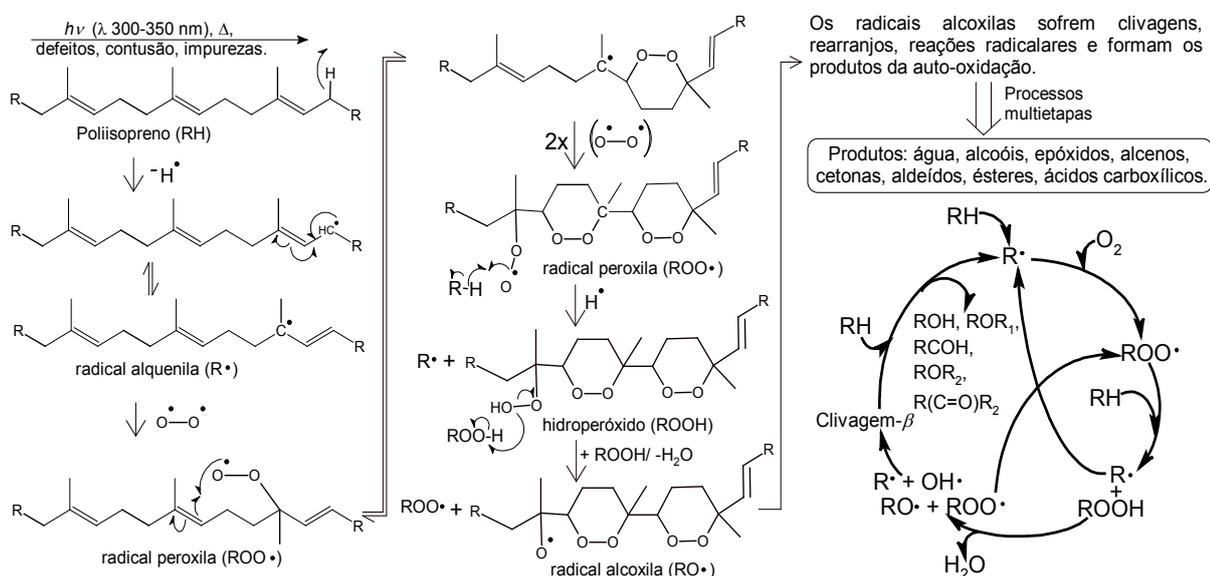


Figura 3.18: Proposta de rota auto-catalítica simplificada e o ciclo para representação do mecanismo de degradação oxidativa de **3**, deduzidos com base nas análises espectrométricas e em dados da literatura para poliisoprenos (PI).^{102,108,198,113}

Na terceira e última etapa ocorre a terminação, quando acontecem reações de adição, despolimerização por clivagens- β , rearranjos e recombinações entre radicais. Nesse processo multi-etapas ($RH \rightarrow R\bullet + O_2 \rightarrow ROO\bullet \rightarrow RO\bullet \rightarrow$ clivagens- β), podem ser formados compostos fixos e voláteis de diversas classes, tais como alcenos, alcoóis, éteres, aldeídos, cetonas e ácidos carboxílicos.¹¹⁴ Entretanto durante a auto-oxidação de PI, foi visto que os alcoóis e éteres são os principais produtos e o mecanismo de formação dos produtos envolve

preferencialmente os radicais alcóxilas.¹¹³ As análises dos espectros no IV (Figura 3.20, p.66) e a cromatografia por GPC de **3** (Figura 3.19), antes e depois da degradação oxidativa, permitiram avaliar qualitativamente as principais mudanças que ocorreram na estrutura do polímero e concluir que os grupos funcionais identificados foram consistentes com os produtos da degradação oxidativa de PI's.

O espectro de absorção na região do infravermelho do material auto-oxidado de **3** (Figura 3.20B, p.66) apresentou um aspecto geral característico de uma mistura complexa de com múltiplos compostos orgânicos. Foi observada uma banda forte e larga centrada em 3380 cm^{-1} , atribuída a grupos hidroxilas de alcoóis e ácidos. Foram observadas também bandas sobrepostas entre $1680\text{-}1800\text{ cm}^{-1}$, indicativas da presença de cetonas, ácidos carboxílicos e possivelmente de ésteres. As múltiplas bandas sobrepostas entre $1000\text{ e }1300\text{ cm}^{-1}$, foram atribuídas a alcoóis (C-O) secundários e terciários, éteres (C-O-C), ésteres e epóxidos (C-O-C). As bandas em $2850, 2950\text{ cm}^{-1}$ e em $1430\text{ e }1365\text{ cm}^{-1}$ foram atribuídas às deformações axiais das ligações C-H (CH_2 e CH_3) da porção alifática dos compostos de despolimerização, bem como, a observação de um ombro em 1660 cm^{-1} atribuído às deformações axiais das duplas ligações (-C=C-) em compostos olefínicos. Portanto, os valores observados de absorções no espectro no IV da mistura de compostos que resultou da degradação auto-oxidativa de **3** está de acordo com as absorções relatadas para compostos resultantes de processos de degradação oxidativa de poliisoprenos.^{102,109,112}

O cromatograma GPC da mistura de compostos obtidos após a auto-oxidação fortuita de **3** (Figura 3.19) mostrou que houve uma redução profunda na massa molecular do composto original, após o processo de auto-oxidação.

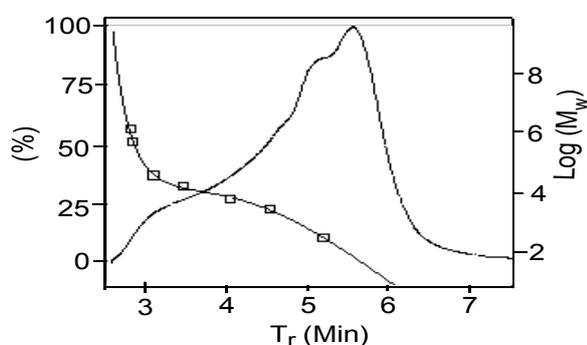


Figura 3.19: Cromatograma obtido por GPC do produto de degradação oxidativa de **3** (linha contínua). Curva de calibração (ajustada) de padrões de poliestireno, PS (linha e quadrados). Os cromatogramas GPC foram obtidos em um cromatógrafo Shimadzu, mediante a injeção da amostra dissolvida em THF ($20\ \mu\text{L}$), utilizando uma Coluna HRC-Sil $5\ \mu\text{m}$, $250 \times 4,6\text{ mm}$ (Shimadzu), tendo THF como fase móvel (fluxo de $0,5\text{ mL min}^{-1}$) e registro de dados dotado de um detector de UV ($\lambda\ 230\text{ nm}$).

A curva de eluição GPC (Figura 3.19, p.66) permitiu estimar o valor de massa molar ponderal média (M_w) em $239,6 \text{ g mol}^{-1}$ e massa molar média numérica (M_n) igual a $122,6 \text{ g mol}^{-1}$ para a mistura de compostos resultante da auto-oxidação de **3**. Esses valores de massas molares encontrados indicam que houve um alto grau de despolimerização¹⁰⁹ de (**3**) e que os compostos finais, obtidos após a degradação oxidativa de **3**, provavelmente apresentam cadeias com comprimentos relativos situados entre C-5 e C-15.

O processo de degradação oxidativa de TPI pode ser retardado por meio de aditivos, tais como óxidos metálicos redutores e substâncias antioxidantes. Cones odontológicos, preparados com gutta-percha (15-22%), ZnO (37-84%), BaSO₄ (0-31%) mais graxas (1-10%) ou resinas, são os materiais mais utilizados para obturação de canais em endodontia.¹¹⁵ Dados publicados mostram que a gutta-percha de preenchimento de um canal dentário pode diferir para se degradar muito lentamente durante mais de 15 anos após a obturação²⁷. A gutta-percha vem sendo utilizada para fins odontológicos por mais de um século e, atualmente, existem poucos materiais sintéticos que podem substituí-la, a exemplo do material Resilon®¹¹⁶, com o mesmo índice para a relação entre custos e benefícios.

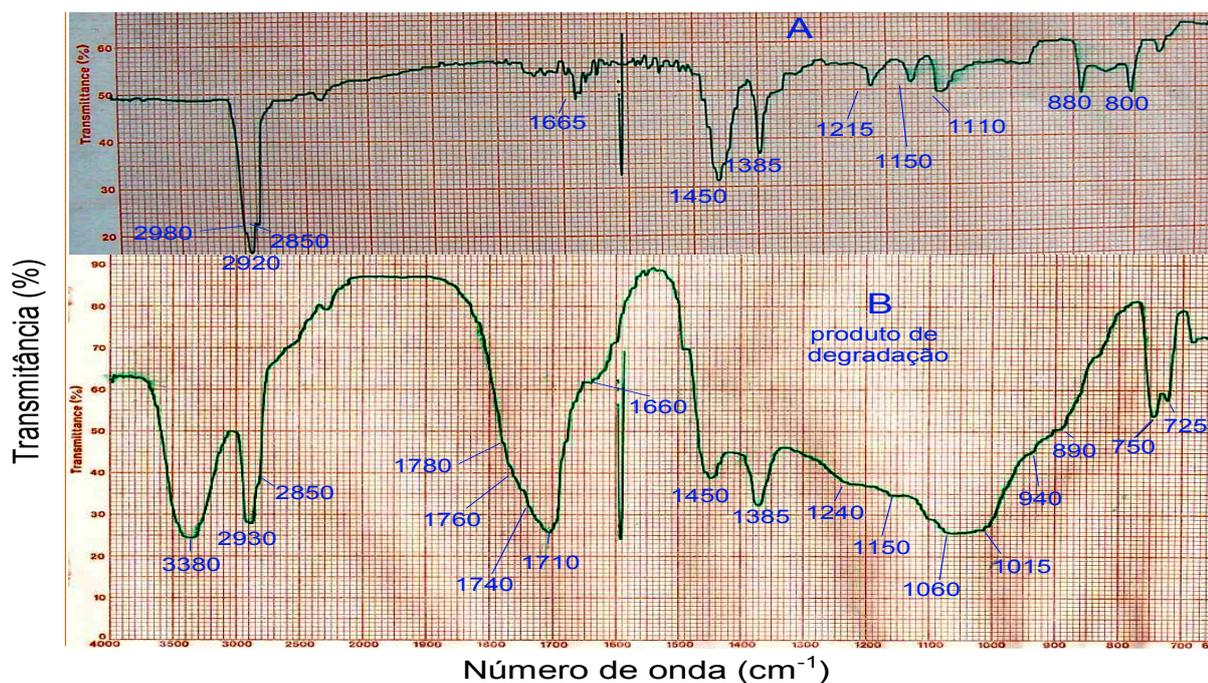
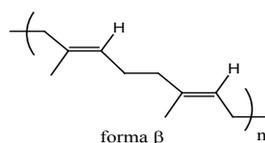


Figura 3.20: Espectros de absorção **3** na região do infravermelho (NaCl). (A): Início do processo de degradação. (B): Após degradação de **3** por auto-oxidação.

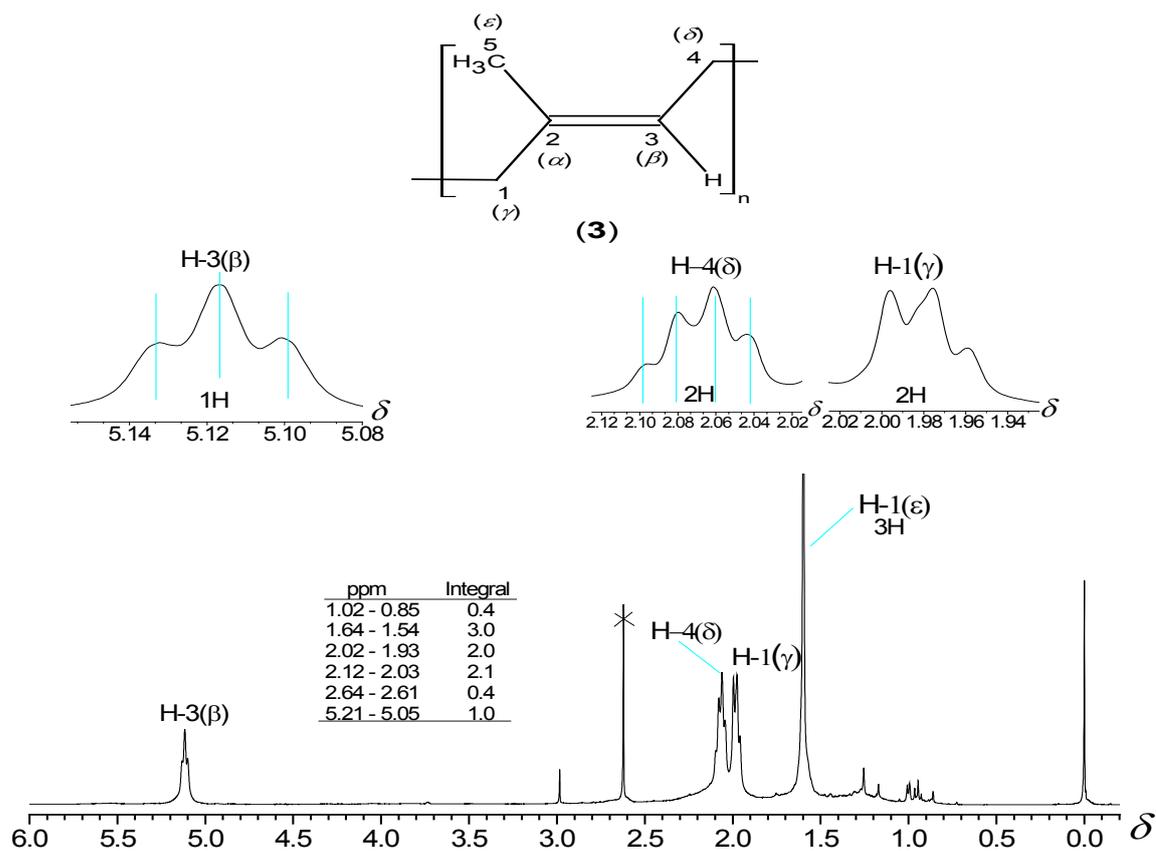


Figura 3.21: Espectro de RMN de ^1H de 3 (CDCl_3 , 400 MHz).

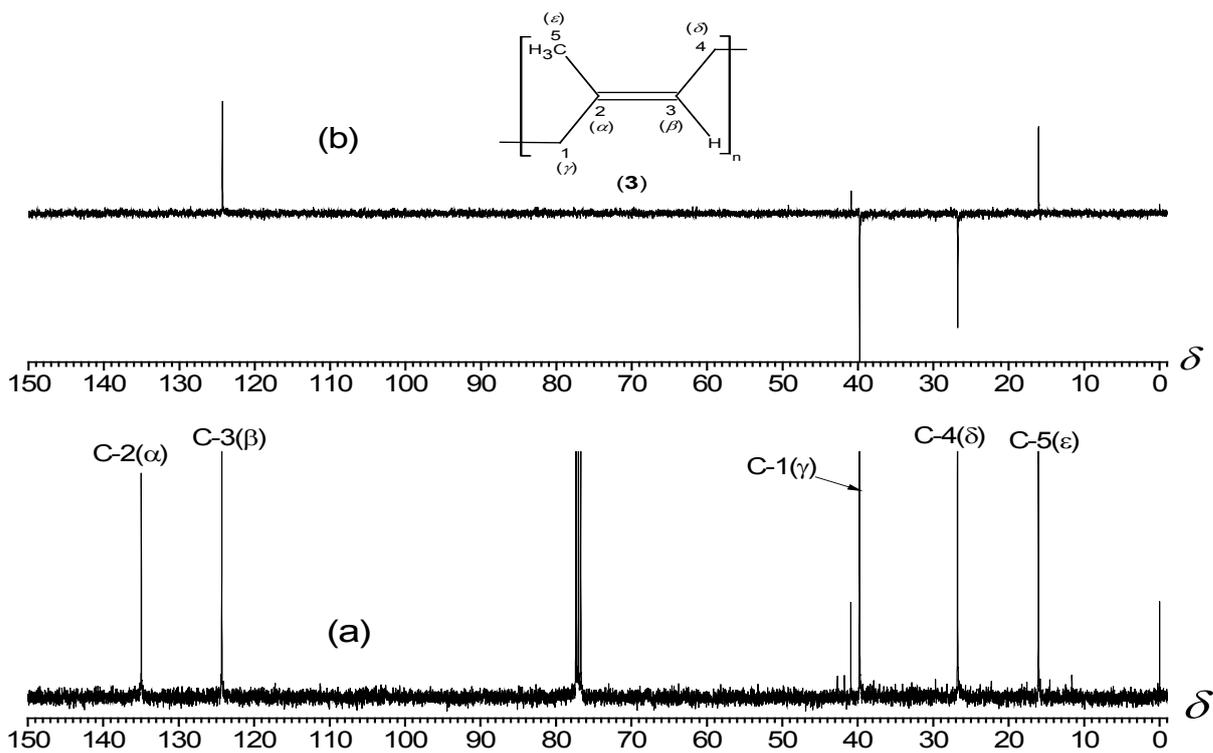
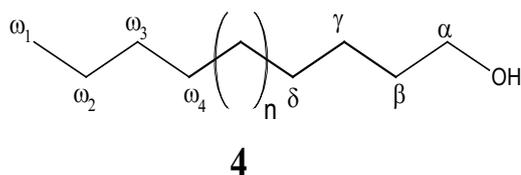


Figura 3.22: Espectro de RMN de (a) ^{13}C e (b) DEPT-135 de 3 (CDCl_3 , 100 MHz).

Álcool graxo (4)

A fração F15 de C-1, que deu origem a **4** (6,4 mg), uma cera amarela, com ponto de fusão de cerca de 50 °C.

O espectro de absorção na região do infravermelho de **4** (Figura 3.23, p.70) apresentou bandas características de uma mistura de hidrocarbonetos e de hidrocarbonetos hidroxilados, semelhantes a alcoóis graxos¹¹⁷. A banda larga e intensa na região de 3200-3700 cm⁻¹ foi atribuída a estiramentos das ligações O-H de grupos hidroxilas. A banda de média intensidade entre 2870 e 2920 cm⁻¹ (B) foi atribuída a estiramentos de ligações C-H de grupos CH₃ e CH₂, respectivamente. O aparecimento ombros de bandas de absorção com picos em 1470 e 1380 e em 1010-1200 cm⁻¹ indicaram a possibilidade de ocorrência de bandas de absorção sobrepostas de uma mistura de constituintes com cadeia alifática e grupo hidroxila de álcool. A existência de uma cadeia longa de grupos CH₂ ficou também evidenciada pela banda de absorção em 800 cm⁻¹.

No espectro de RMN de ¹³C (Figura 3.25, p.71) apresentou um conjunto de sinais mais intensos em δ 14,12; 22,72; 25,97; 29,32; 29,67; 29,71; 31,93; 33,04 e 62,40 que foi relacionado a um álcool graxo de alifático cuja cadeia carbônica é formada com mais de nove átomos de carbonos.¹¹⁸ Mostrou também um grupo de sinais bem menos intensos em δ 19,8; 24,5; 27,1; 28,0; 30,05; 31,84; 32,8; 34,4; 37,1; entre 37,4-37,5 e em 39,4 que foi atribuído a impurezas, possivelmente de um composto alifático ramificado.^{119,120} Nos espectro de RMN de ¹³C e DEPT-135 (Figuras 3.25 e 3.26, p.71), o sinal em δ 62,4 e o no espectro de RMN de ¹H (Figura 3.24, p.71), o correspondente sinal de hidrogênio em δ _H 3,65 (t, $J = 6,7$ Hz) foi atribuído a um carbono metilênico de álcool primário (C- α). O sinal em δ 0,88 (m) foi atribuído ao grupo metílico terminal (ω) de um álcool graxo.⁹⁹ O simpleto intenso e largo em δ _H 1,27 e os correspondentes sinais de carbono-13 na região de δ 29,32-29,71 foram atribuídos aos grupos metilênicos em cadeias alifáticas. Os deslocamentos químicos na faixa de δ 1,1 a 1,60 ppm, foram atribuídos a hidrogênios metínicos e metilênicos. A integração dos sinais de hidrogênios correspondeu a cerca de 80 hidrogênios, sendo 21 localizados na região

das metilas, o que sugeriu a presença de impureza constituída de um hidrocarboneto com cadeia alifática contendo grupos metilas em ramificações.

A literatura apresenta relatos da identificação de hidrocarbonetos ramificados, tipo isoprenóides e alcoóis de cadeia longa em material graxo extraído de cutículas vegetais e em grãos, a exemplo de plantas úteis e comestíveis, a exemplo das frutíferas, *Cucumis melo* (melão), *Lycopersicon esculentum* (tomate) e *Diospiro kaki* (caqui).¹²¹⁻¹²⁵ As Tabelas 3.5 e 3.6 apresentam a comparação entre os valores experimentais de RMN de ^1H e RMN de ^{13}C do álcool graxo de 4 os valores obtidos na literatura para o octadecanol.¹²⁰

Tabela 3.5: Comparação entre os valores de δ de ^{13}C (CDCl_3 , 100 MHz) de 4 e os respectivos valores publicados para o octadecanol (CDCl_3)¹²⁰

Carb.	(4)	Octadecanol ¹²⁰
α	62,40	62,97
β	31,93	32,86
γ	25,97	25,85
δ	29,44	29,55
$(\text{CH}_2)_n$	29,67-29,71	29,78
ω	14,12	14,13
ω_2	22,72	22,75
ω_3	31,93	32,01
ω_4	29,32	29,44

Tabela 3.6: Comparação entre os valores de δ de ^1H de 4 (CDCl_3 , 400 MHz) e os respectivos valores publicados para o octadecanol (CDCl_3)¹²⁰

δ_{H}		
Hid.	4b	Octadecanol ¹²⁰
ω	0,88 (m)	0,88 (t, 7,0)
α	3,65 (t, 6,7)	3,64 (t, 6,4)
β	1,59 (m)	1,57 (m)
CH_2	1,27	1,26

Baseado nas análises espectrométricas apresentadas, pode-se sugerir que (4) se trata de um álcool graxo de cadeia longa do tipo $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_n\text{CH}_2\text{OH}$, $n > 9$, contendo impureza referente a um hidrocarboneto alifático ramificado.

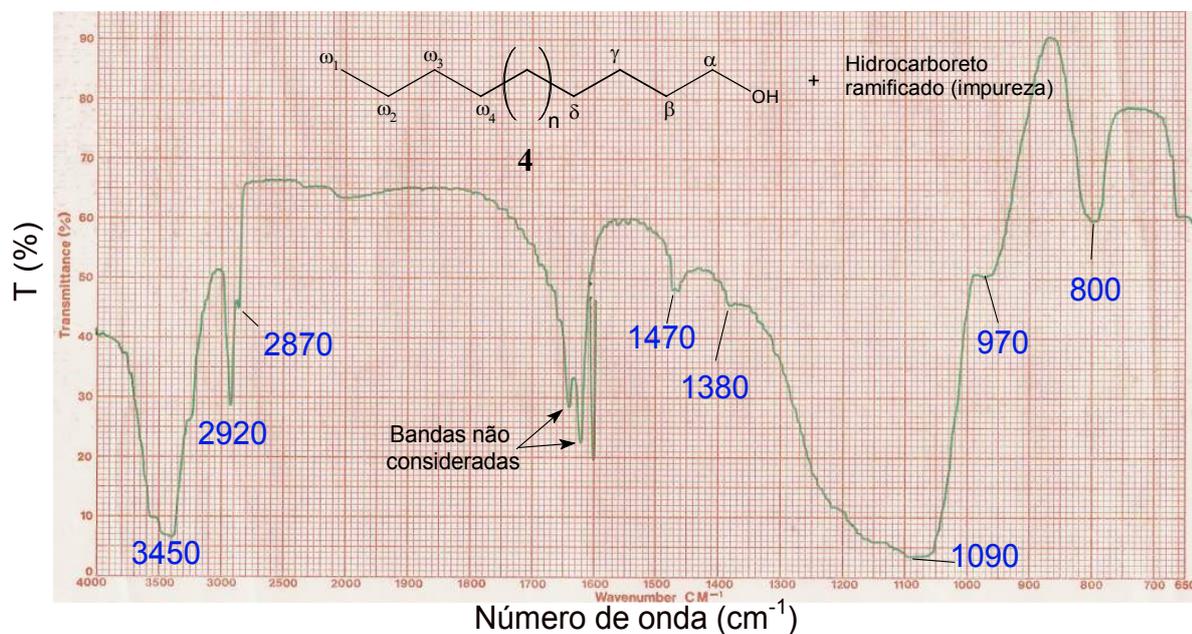


Figura 3.23: Espectro de absorção de 4 na região do infravermelho (filme de NaCl).

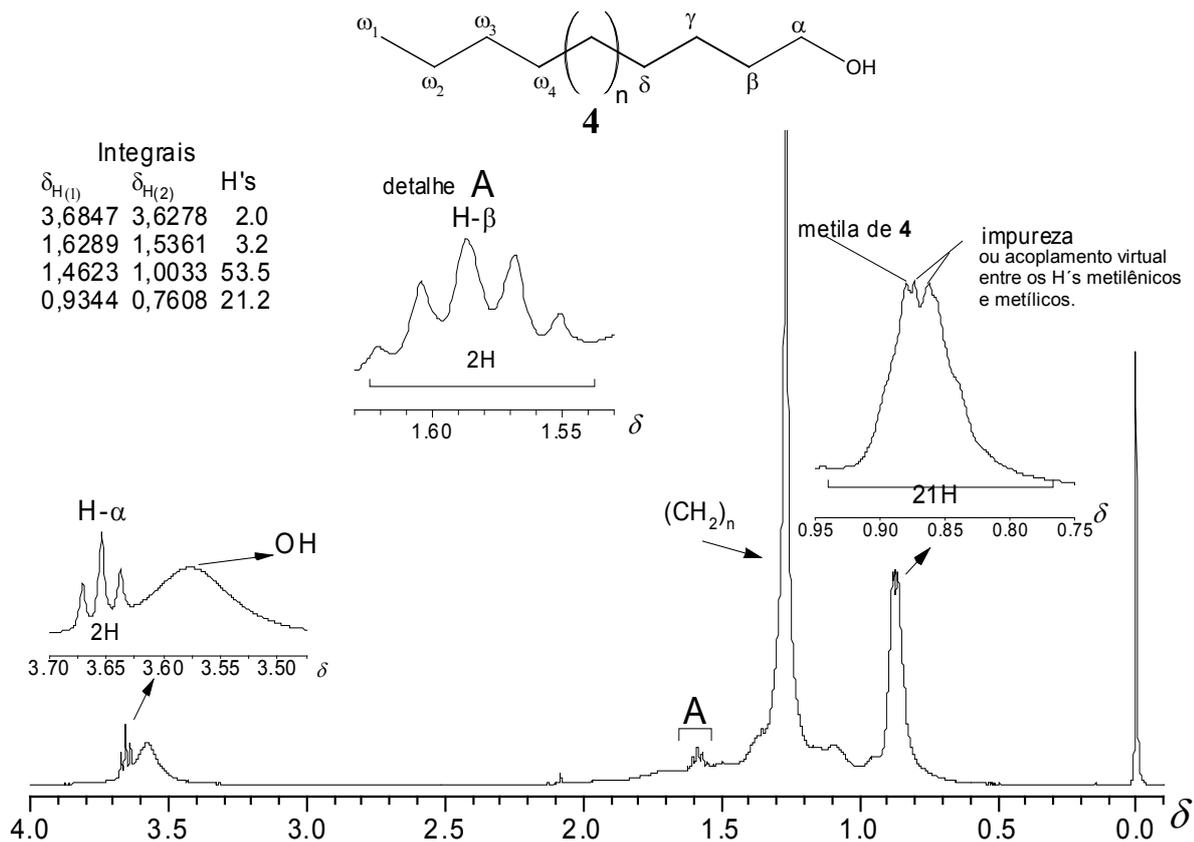


Figura 3.24: Espectro de RMN de ^1H de 4 (CDCl_3 , 400 MHz).

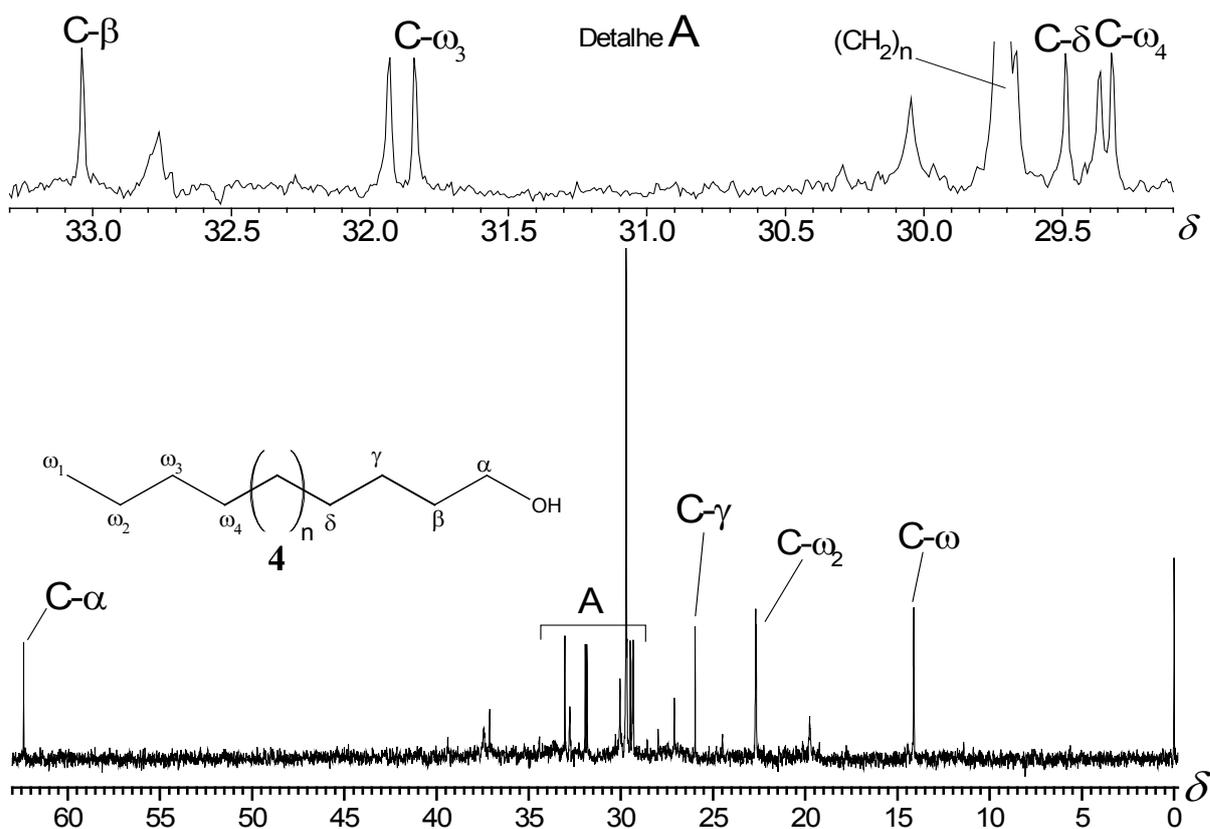


Figura 3.25: Espectro de RMN de ^{13}C de **4** (CDCl_3 , 100 MHz).

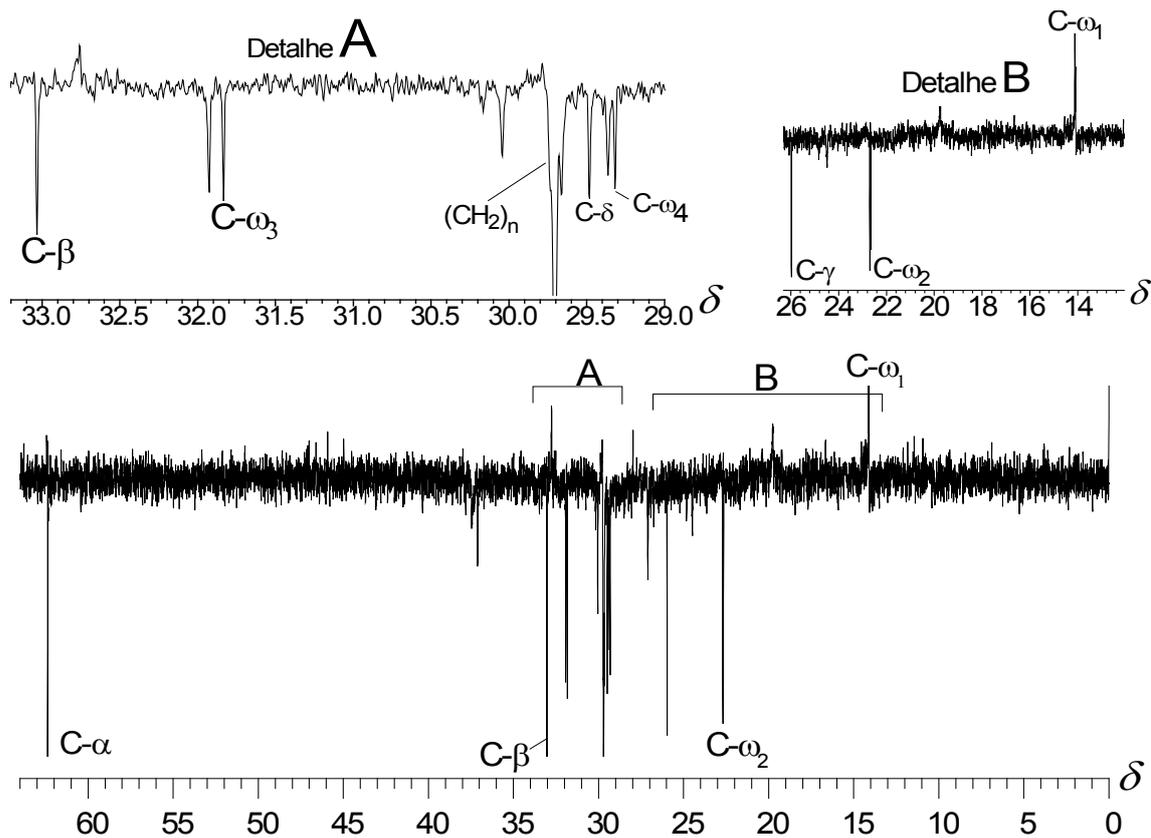
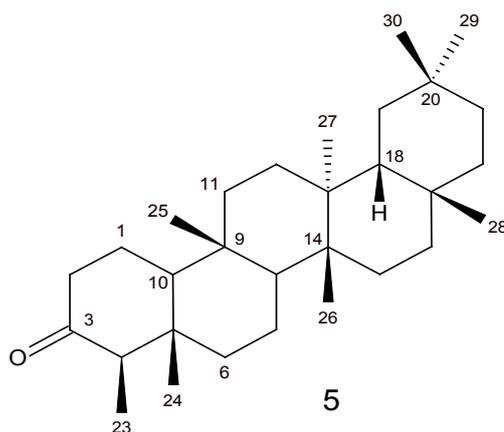


Figura 3.26: Espectro de DEPT-135 de **4** (CDCl_3 , 100 MHz).

Revisão da elucidação estrutural de 5

A friedelina (**5**) foi obtida pura no fracionamento do extrato em hexano das folhas de *Maytenus acanthophylla* (Celastraceae). O material de **5** se apresentou na forma de um sólido branco cristalino que fundiu na faixa de temperatura de 259,7-262,1 °C (260-263,0 °C)¹²⁶ e forneceu resultado positivo para TTPC mediante o teste de Liebermann-Burchard (LB+). A identidade de **5** foi confirmada através de CCD por comparação com amostra autêntica.

O espectro de absorção de **5**, no IV (Figura 3.28, p.76), de modo geral, mostrou bandas em, 2925, 2860, 1710, 1456, 1388, 1175, 987 cm^{-1} , típicas de triterpenos pentacíclicos da classe dos friedelanos.^{31, 127-130} As bandas em 2860 cm^{-1} e em 2950 cm^{-1} foram atribuídas a estiramentos da ligação C-H (ν C-H) de grupos CH_3 e CH_2 , bem como as bandas centradas em 1456 e 1388 cm^{-1} foram atribuídas a deformações (δ C-H) nesses grupos. Essas bandas evidenciaram a natureza alifática de **5**. A banda em 1710 cm^{-1} foi atribuída a estiramentos da ligação C=O de cetona alifática e saturada.⁹⁹

Os resultados do estudo conformacional do TTPC pachysandiol B (**14**, p.124) foram conclusivos para determinar a revisão da elucidação estrutural da friedelina (**5**) baseada em dados de RMN, considerando a possibilidade de esses dois TTPC's friedelanos apresentarem estruturas com geometrias comparáveis. A análise do espectro de RMN de ^1H de **5** (Figura 3.29, p.77) indicou, na região de valores de deslocamentos químicos dos hidrogênios alifáticos, a ocorrência de sete simpletos em δ 0,73, 0,87, 0,96, 1,00, 1,01, 1,05 e 1,18, atribuídos aos grupos metila. O sinal em 0,88 (d, 6,8 Hz, 3H) foi atribuído aos hidrogênios do grupo metila C-23 ligado em C-4. Foi observado também o sinal em δ 2,39 (ddd, 13,0, 5,0, 2,5 Hz, 1H), atribuído ao hidrogênio $\text{H}_{\beta-2(\text{equatorial})}$, e o sinal em δ 2,31 (dd, 13,0, 7,0 Hz, 1H) atribuído ao hidrogênio $\text{H}_{\alpha-2(\text{axial})}$, bem como um quarteto em δ 2,25 (q, 6,8 Hz, 1H), atribuído ao hidrogênio metínico ligado a C-4. As demais atribuições dos sinais de RMN de ^1H de **5**

foram revistas por análise dos dados de RMN 2D (COSY, HSQC, HMBC e NOESY) e comparadas com os valores os valores da literatura (Tabela 3.7, p.74).^{126,127}

O espectro de RMN de ^{13}C (Figura 3.30, p.77) apresentou um sinal em δ 213,22, típico de carbono sp^2 ligado a oxigênio. A análise conjunta dos espectros DEPT-135 (Figura 3.30, p.77) e de RMN de ^{13}C permitiu a identificação de oito sinais em δ 6,83, 14,67, 17,96, 18,67, 20,26, 31,79, 32,11 e 35,03 atribuídos aos carbonos dos grupos metila. Foram atribuídos também os sinais de onze carbonos metilênicos em δ 18,25, 22,29, 30,52, 32,44, 32,80, 35,36, 35,65, 36,03, 39,27, 41,31 e 41,54. Os seis sinais em δ 28,18, 30,01, 37,47, 38,32, 39,72 e 42,16 foram atribuídos a carbonos não hidrogenados e a atribuição de quatro grupos CH em δ 42,82, 53,13, 58,38 e 59,51. Foram encontradas correlações $^1J_{\text{H,C}}$ no mapa de contornos HSQC (Figura 3.31, p.78) que permitiram atribuir os sinais de RMN de ^1H e ^{13}C relativos a quatro grupos metínicos, onze metilênicos e oito metílicos de **5**.

O mapa de contornos COSY (Figura 3.32 e 3.33, p. 78-79) mostrou correlações associadas aos acoplamentos $^3J_{\text{H/H}}$ entre sinais de hidrogênios em δ 0,88 (d, 6,8 Hz)/2,25 (q, 6,8 Hz), δ 0,94 (m)/1,27 (m), δ 1,01 (s)/1,21 (m), δ 1,26 (m)/1,35 (m), δ 1,27 (m)/1,50 (m), δ 1,27 (m)/1,01 (s), 1,57 (dd, $J = 5,0, 12,0$ Hz)/1,21(m), δ 1,68 (dd, 5,0, 13,0 Hz)/2,31 (dd, 13,0, 7,0 Hz) e δ 1,97 (m)/2,39 (ddd, 2,5, 5,0, 13,0 Hz). Essas correlações foram atribuídas a acoplamentos entre os hidrogênios vicinais $\text{H}\beta$ -23/ $\text{H}\alpha$ -4, $\text{H}\alpha$ -22/ $\text{H}\beta$ -21, $\text{H}\alpha$ -19/ $\text{H}\beta$ -30, $\text{H}\alpha$ -11/ $\text{H}\beta$ -12, $\text{H}\alpha$ -6/ $\text{H}\beta$ -7, $\text{H}\beta$ -21/ $\text{H}\beta$ -30, $\text{H}\beta$ -18/ $\text{H}\alpha$ -19, $\text{H}\beta$ -1/ $\text{H}\alpha$ -2 e $\text{H}\alpha$ -1/ $\text{H}\beta$ -2, respectivamente. Os acoplamentos $^2J_{\text{H/H}}$ observados no mapa de contornos COSY (apresentados na Tabela 3.7, p.74) foram atribuídos às correlações entre os hidrogênios geminais dos grupos metilênicos de **5**.

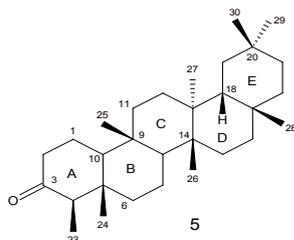


Tabela 3.7: Proposta de reatribuição dos dados de RMN* e estereoquímica de 5

RMN de ^1H , ^{13}C , DEPT-135 e HSQC			COSY	HMBC	NOESY
C tipo	δ de ^{13}C	δ de ^1H [m, J (Hz)]			
C-5	42,16			H α -1, H α -4, H β -6, H-23, H-24	
C-9	37,47			H-25	
C-13	39,72			H-26, H-27	
C-14	38,32			H-26, H-27	
C-17	30,01			H-28	
C-20	28,18			H-29, H-30	
O=C-3	213,22			H α -1, H-2, H α -4, H-23	
HC-4	58,25	H α -4: 2,25 (q, 6,8)	H β -23	H-23, H-24	H α -10, H β -23
HC-8	53,13	H α -8: 1,40 (m)	H β -7	H β -6, H α -10, H α -11, H-25, H-26	H α -10, H α -27
HC-10	59,51	H α -10: 1,53 (m)	H α -1, H β -1	H β -1, H α -4, H β -6, H- 8, H-24, H-25	H α -1, H α -4, H α -8
HC-18	42,82	H β -18: 1,57 (m)	H α -19, H β -28	H β -19, H-27, H-28	H β -21, H β -28, H β -30
H ₂ C-1	22,30	H α -1: 1,97 (m) H β -1: 1,68 (dd, 5,0, 13,0)	H β -1, H α -2, H β -2, H α -10, H α -1, H α -2, H α -10	H β -2, H α -10	H β -1, H α -2, H β -2, H α -10, H β -11 H α -1
H ₂ C-2	41,54	H α -2: 2,31 (dd, 7,0, 13,0) H β -2: 2,39 (ddd, 2,5, 5,0, 13,0)	H α -1, H β -1, H β -2 H β -1, H α -2, H α -4		H α -1, H β -2 H α -1, H α -2
H ₂ C-6	41,32	H α -6: 1,26 (m) H β -6: 1,76 (m)	H β -6, H β -7 H α -6	H-24	H α -4, H β -6, H β -23 H β -6, H α -7, H β -7, H β -23, H β -25
H ₂ C-7	18,25	H α -7: 1,40 (m) H β -7: 1,50 (m)	H β -7 H α -6, H α -7, H α -8		H β -6, H β -7 H β -6, H α -7, H β -24
H ₂ C-11	35,65 ^a	H α -11: 1,26 (m) H β -11: 1,48 (m)	H β -11, H β -12 H α -11,	H-25	H α -8, H β -11, H α -27 H α -1, H β -11, H β -12, H β - 25
H ₂ C-12	30,52	H α -12: 1,18(m) H β -12: 1,35 (m)	H β -12 H α -12, H α -11	H-27	H α -27 H β -11, H β -25
H ₂ C-15	32,44 ^a	H α -15: 1,28 (m) H β -15: 1,50 (m)	H β -15 H α -15		H β -15, H β -16, H α -22, H α - 27 H α -15, H β -28
H ₂ C-16	36,03	H α -16: 1,34 (m) H β -16: 1,56 (m)	H β -16 H α -16	H-28	
H ₂ C-19	35,36 ^a	H α -19: 1,21 (m) H β -19: 1,38 (m)	H β -19, H β -18, H β -30 H α -19	H β -18, H β -29	H β -19, H α -27, H α -29 H α -19, H β -28, H α -29
H ₂ C-21	32,78 ^a	H α -21: 1,54 (m) H β -21: 1,27 (m)	H β -21, H β -22 H α -21, H α -22, H β -30	H-22, H-29	H β -21, H α -22, H α -27 H α -21, H β -18, H α -22, H β - 28
H ₂ C-22	39,27	H α -22: 0,94 (m) H β -22: 1,50 (m)	H β -21, H β -22 H α -22, H α -21	H-28	H β -22, H α -21, H β -21, H α - 27 H α -22, H β -28
H ₃ C-23	6,83	H β -23: 0,88 (d, J = 6,8)	H α -4	H α -4, H-24	H β -1, H α -4, H α -6, H β -6, H β -24
H ₃ C-24	14,67	H β -24: 0,73 (s)		H α -4, H β -6, H α -10, H- 23	H β -7, H β -23, H β -25, H β -26
H ₃ C-25	17,96	H β -25: 0,87 (s)			H β -11, H β -12, H β -24, , H β -26
H ₃ C-26	20,28	H β -26: 1,00 (s)			H β -7, H β -25, H β -28
H ₃ C-27	18,67	H α -27: 1,05 (s)			H α -8, H α -12, H α -15, H α - 16, H α -19, H α -22, H β -29
H ₃ C-28	32,10	H β -28: 1,18 (s)	H β -18	H-16	H β -15, H β -18, H β -19, H β - 21, H β -22, H β -26, H β -30
H ₃ C-29	35,03	H α -29: 0,95 (s)		H β -21, H-30	H α -19, H β -19, H α -27
H ₃ C-30	31,79	H β -30: 1,01(s)	H α -19, H β -21	H-29	H β -18, H β -21, H β -28

^a sinais intercambiáveis. * ^1H (CDCl_3 , 400 MHz) and ^{13}C (CDCl_3 , 100 MHz), TMS usado como padrão interno.

O mapa de contornos HMBC (Figura 3.34-3.36, pág. 79-80) apresentou importantes correlações $^2J_{H,C}$ e $^3J_{H,C}$, principalmente, as que foram observadas entre os sinais dos hidrogênios dos grupos metilas com os átomos de carbonos vicinais a esses grupos. O sinal de RMN de ^{13}C em δ 213,22 (C-3) apresentou correlação com os sinais de hidrogênio de H-23 em δ 0,88 (d, $J = 6,8$ Hz) e também com ambos os de H-2 em δ 2,31 (dd, 7,0, 13,0 Hz) e 2,39 (ddd, 2,5, 5,0 e 13,0 Hz); bem como com o sinal de H-4, em 2,25 (q, 6,8 Hz). Os sinais em δ 58,25 (C-4) e δ 42,16 (C-5) apresentaram correlações com o sinal de H-23 e com um sinal em δ 0,73 (s), atribuído a H-24. O sinal em δ 53,13 (C-8) correlacionou com os sinais em δ 0,87 (s, H-25), e 1,00 (s, H-26). O sinal de C-10 (δ 59,51) também apresentou correlações com os sinais de H-24 e H-25; o sinal de C-18 (δ 42,82) mostrou correlação com os sinais de H-27 (1,05, s) e H-28 (1,18, s) e o sinal de C-20 (δ 28,18) apresentou correlação com os sinais em δ 0,95 (s) e 1,01 (s), atribuídos a H-29 e H-30, respectivamente. A análise completa do mapa de contornos HMBC confirmou as atribuições dos dados de RMN de **5**, os quais são apresentados na Tabela 3.7 (p.74). Como se observa na Tabela 3.7, a reanálise dos dados de RMN de **5** permitiu a atribuição completa dos sinais, bem como corrigir as atribuições dos deslocamentos químicos de ^{13}C e 1H relativos à C-29 e C-30, neste caso, apresentados trocados na literatura citada.

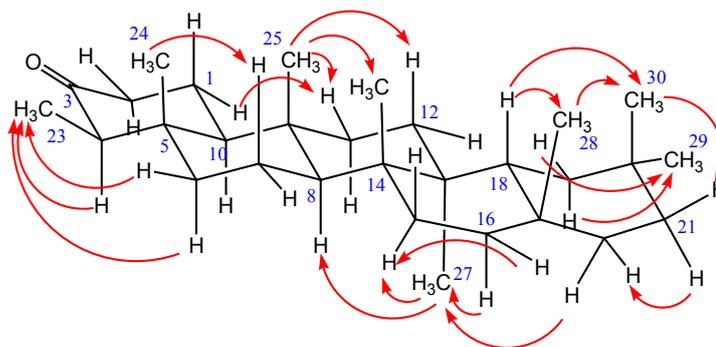


Figura 3.27: Estrutura da friedelina (**5**) com as indicações (setas) das principais correlações observadas no mapa de contornos NOESY (CDCl₃ 400 MHz, Figuras 3.37 e 3.38, p.81).

No mapa de contornos NOESY (Figuras 3.37 e 3.38, p.81) as correlações observadas entre os sinais de hidrogênios do grupo metila 23, na posição β -equatorial, em δ 0,88 (d, $J = 6,8$ Hz) e o sinal de H β -6 (1,76, dt, $J = 2,5, 5,0$ Hz), bem como, entre os sinais de H α -1 (δ 1,97, tdd, 2,5, 7,0, 13,0 Hz) e H β -11 (δ 1,48, m) permitiram estabelecer que os anéis A, B e C apresentam a conformação de cadeira-cadeira-cadeira, respectivamente (Tabela 3.7, p.74). As correlações NOE intercruzadas, observadas entre os sinais de H α -15 (δ 1,28, m) e H β -16

(δ 1,56, m) e entre os sinais de H β -15 (δ 1,50, m) e H α -16 (δ 1,34, m), associadas à observação de que o sinal de H α -16 e os de H α -27 (δ 1,05, s) apresentaram correlações entre si, indicaram que o hidrogênio H α -16 se localiza na parte inferior (curvatura) de um barco no anel D. No anel E, a conformação de barco foi atribuída mediante a observação das correlações entre os sinais dos dois hidrogênios metilênicos de H-19, em δ 1,21, (m, H α -19) e δ 1,38, (m, H β -19), com os sinais metílicos em δ 0,95 (H α -29), bem como a correlação entre os sinais de H β -18 (δ 1,57, dd, $J = 5,0, 12,0$ Hz) e H β -21 (δ 1,30, m). Através das correlações COSY, HMBC e NOESY citadas e as apresentadas na Tabela 3.7, p.74 e Figura 3.27, p.75, pode-se concluir que a friedelina, em solução de CDCl₃ na temperatura ambiente, apresenta a conformação preferencial cadeira-cadeira-cadeira-barco-barco (*cccbb*) de modo semelhante ao pachysandiol-B (**14**).⁵³

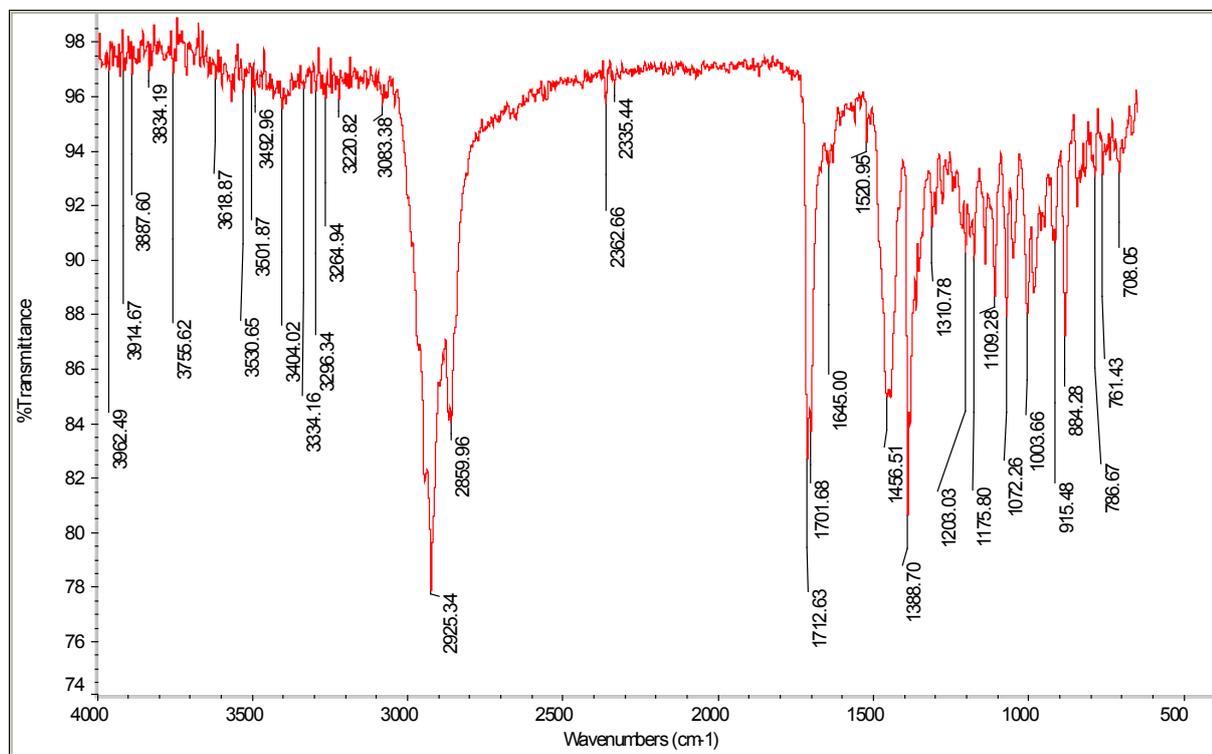
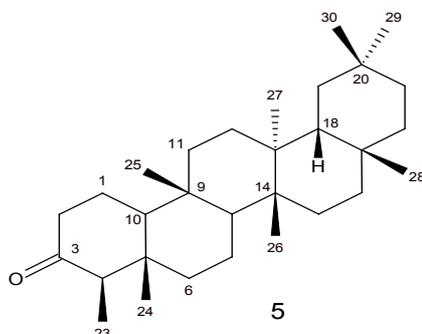


Figura 3.28: Espectro de absorção de **5** na região do IV.

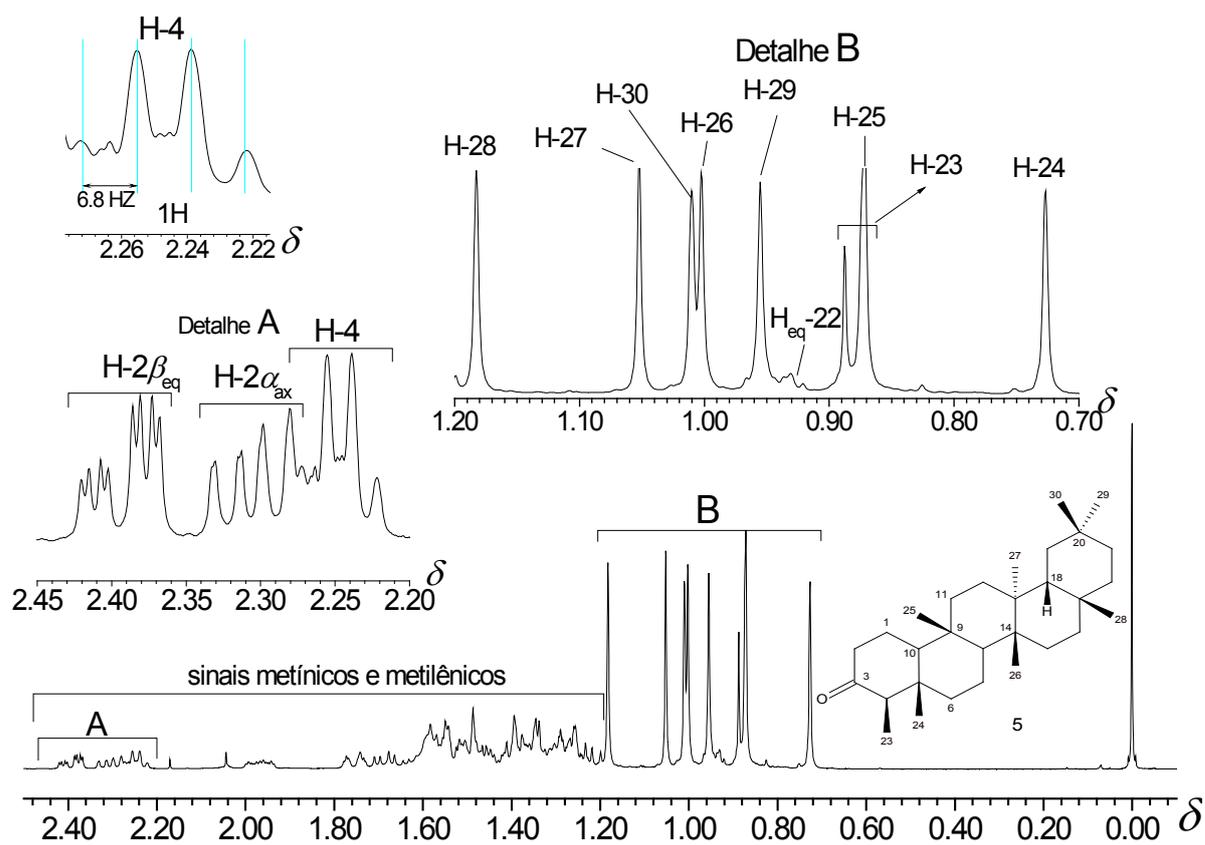


Figura 3.29: Espectro de RMN de ^1H de 5 (CDCl_3 , 400 MHz).

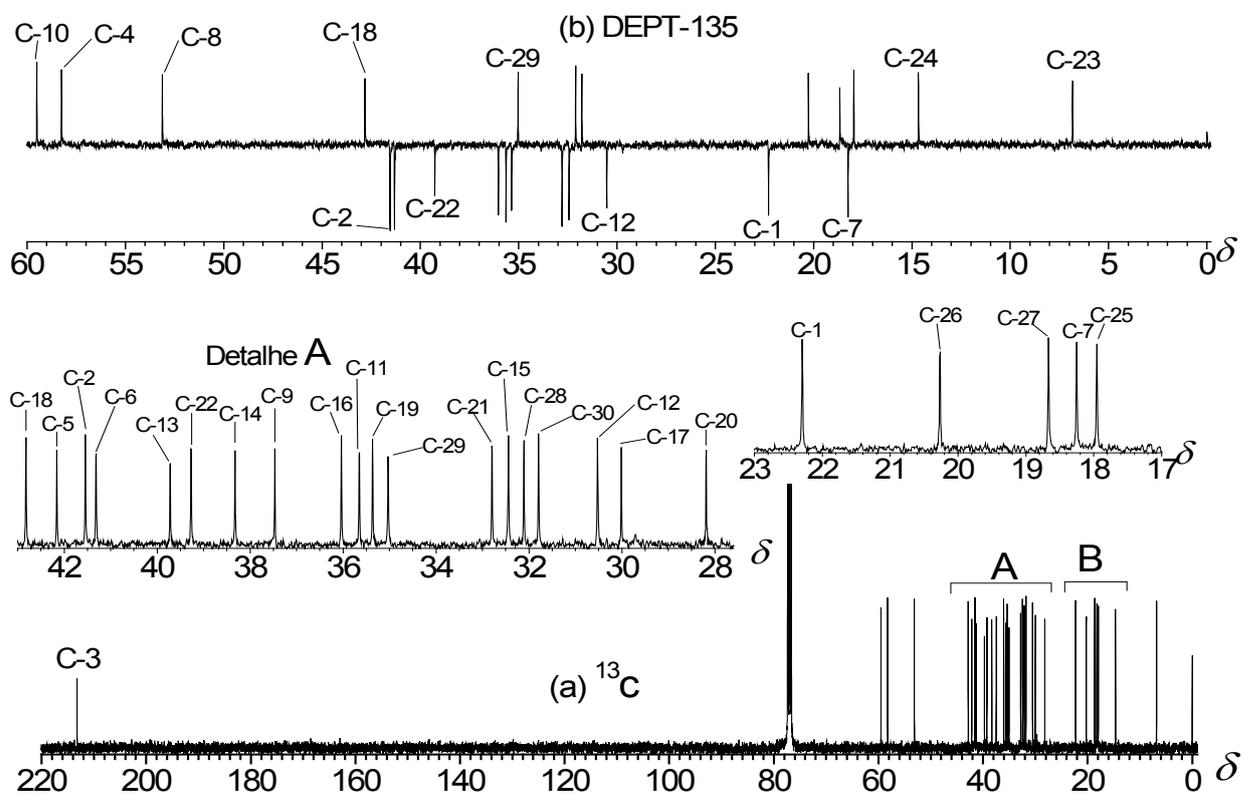


Figura 3.30: Espectro de RMN de (a) ^{13}C e (b) DEPT-135 de 5 (CDCl_3 , 100 MHz).

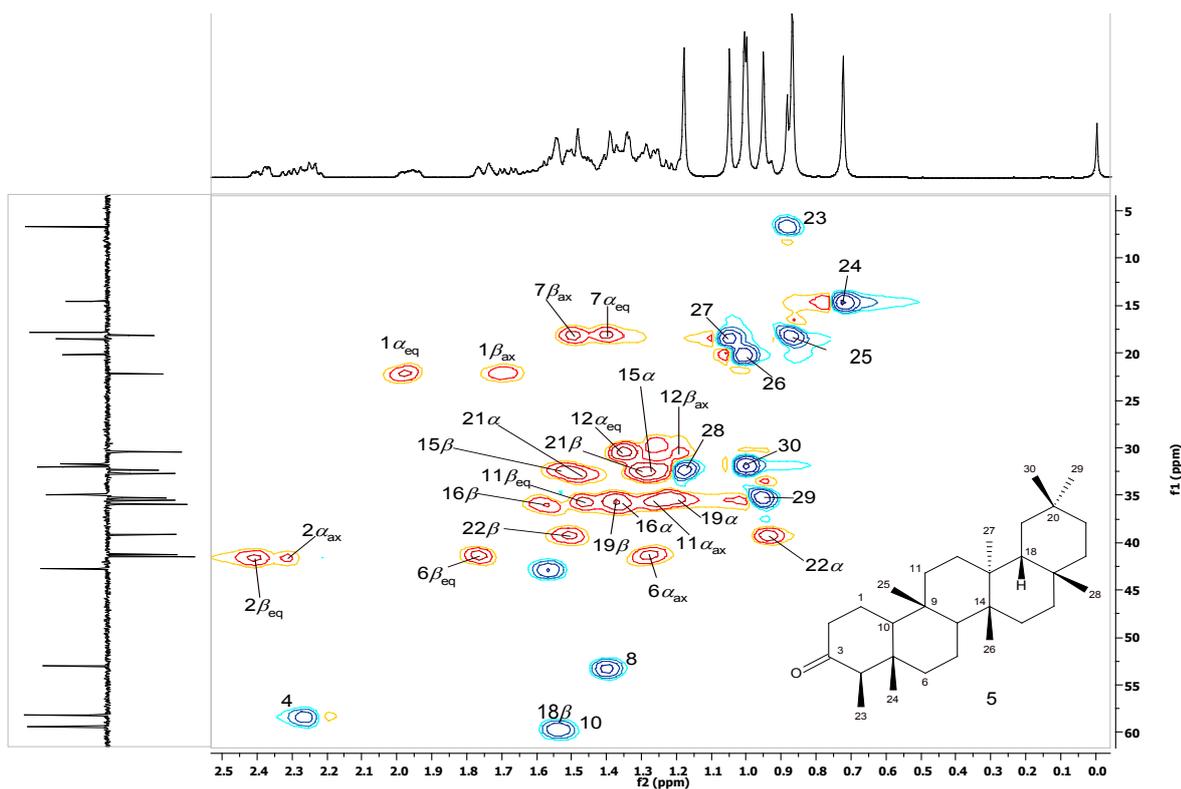


Figura 3.31: Mapa de contornos HSQC de 5 (CDCl₃, 400 MHz).

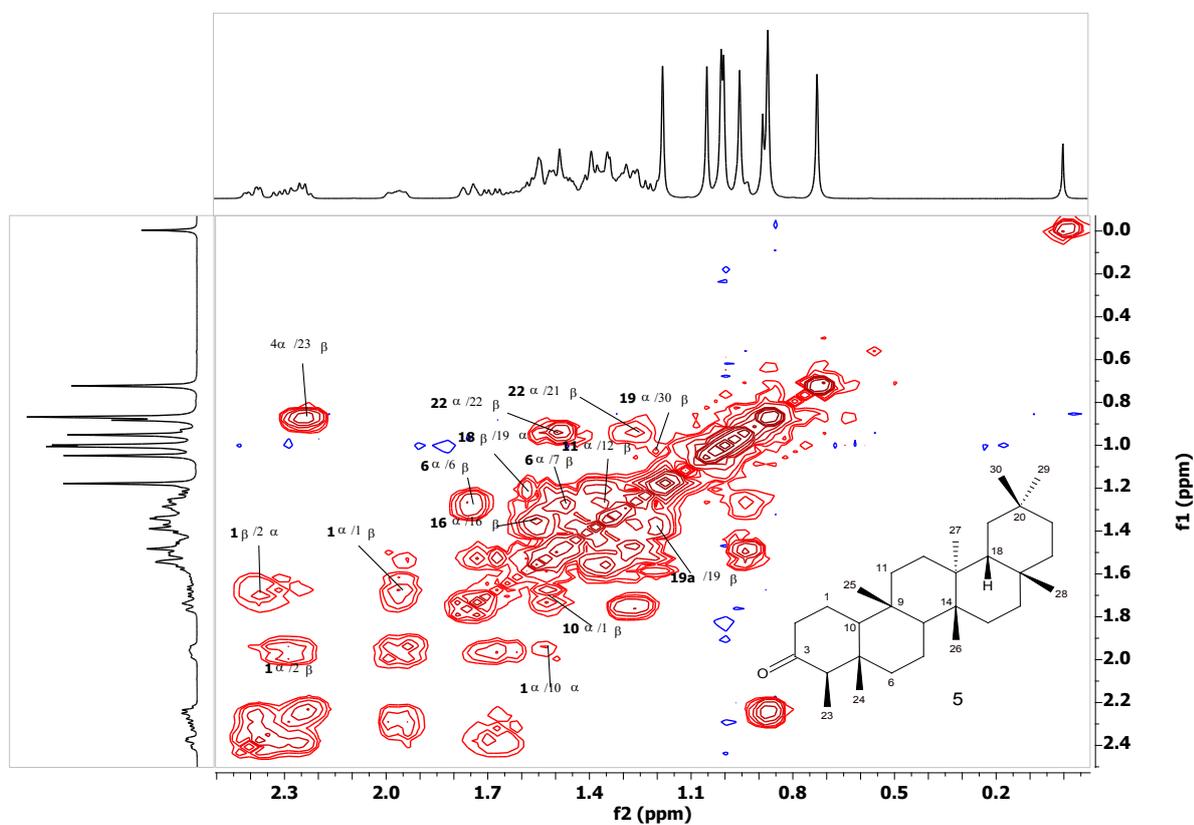


Figura 3.32: Mapa de contornos COSY de 5 (CDCl₃, 400 MHz).

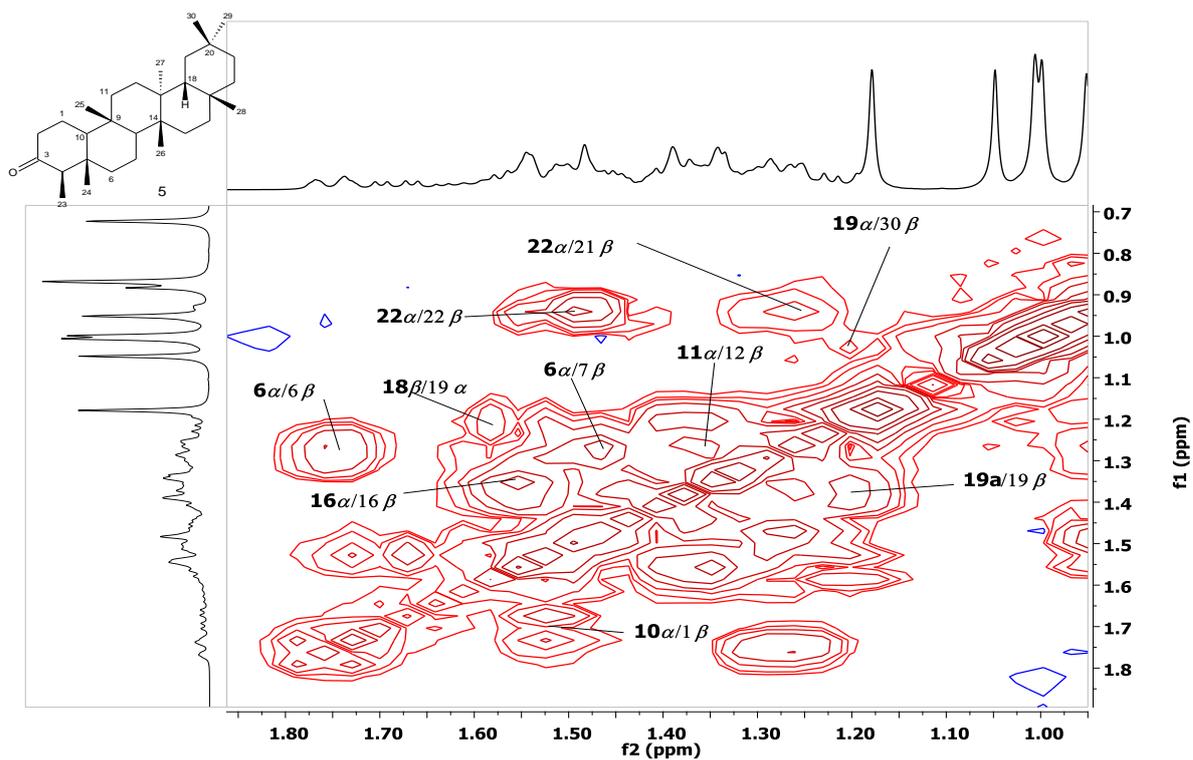


Figura 3.33: Expansão do mapa de contornos COSY de 5 (F1: δ 0,70-1,85 x F2: δ 0,95-1,85, CDCl₃, 400 MHz).

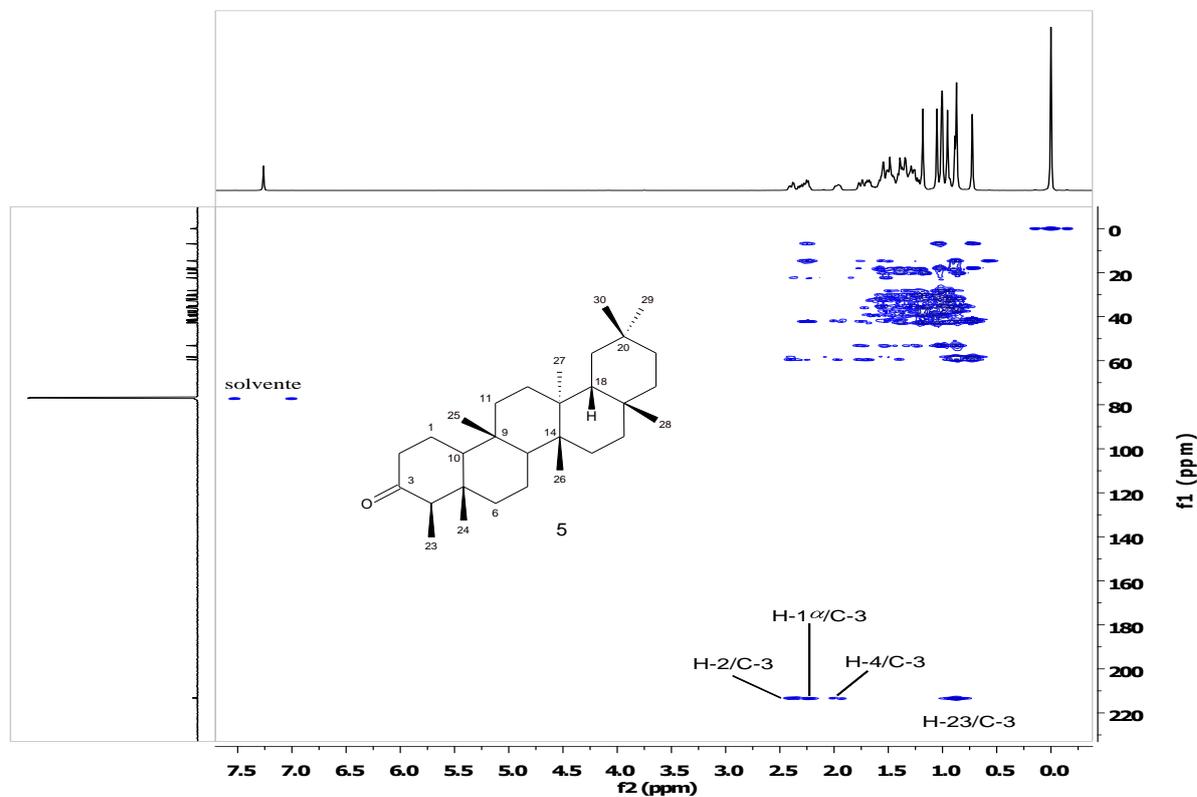


Figura 3.34: Mapa de contornos HMBC de 5 (CDCl₃, 400 MHz).

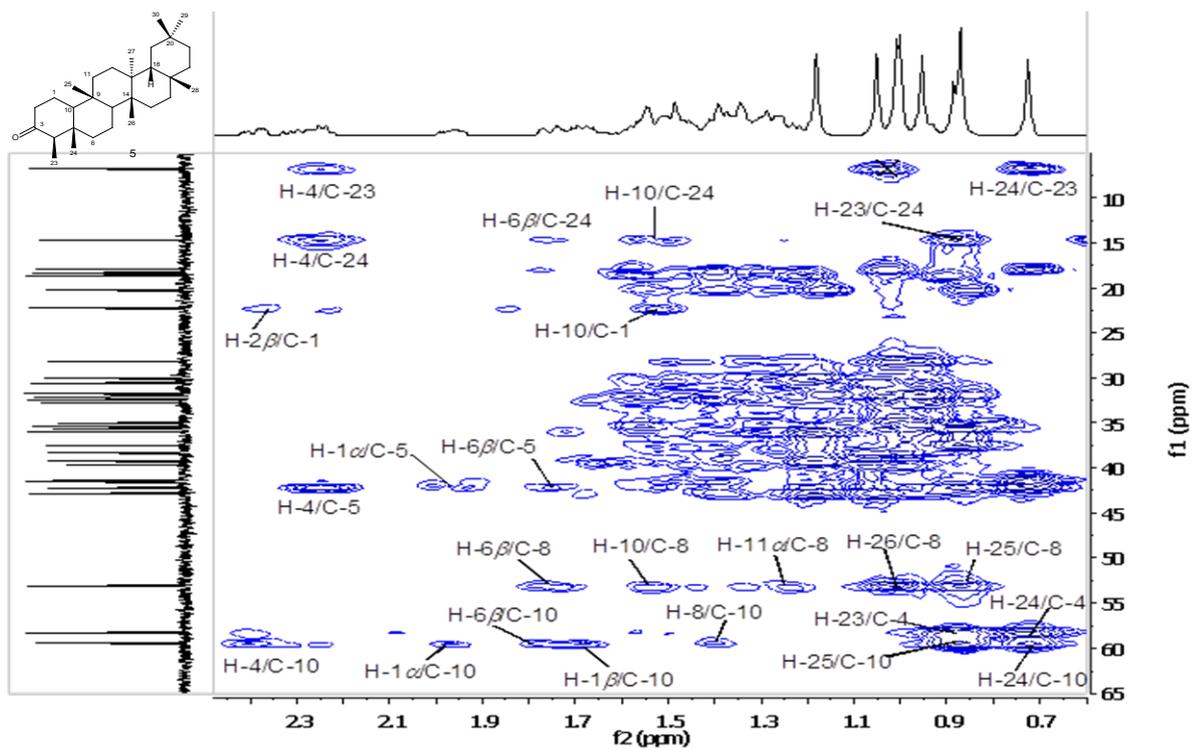


Figura 3.35: Expansão do mapa de contornos HMBC de **5** (F1: δ 5,0-65,0 x F2: δ 0,50-2,35, CDCl₃, 400 MHz).

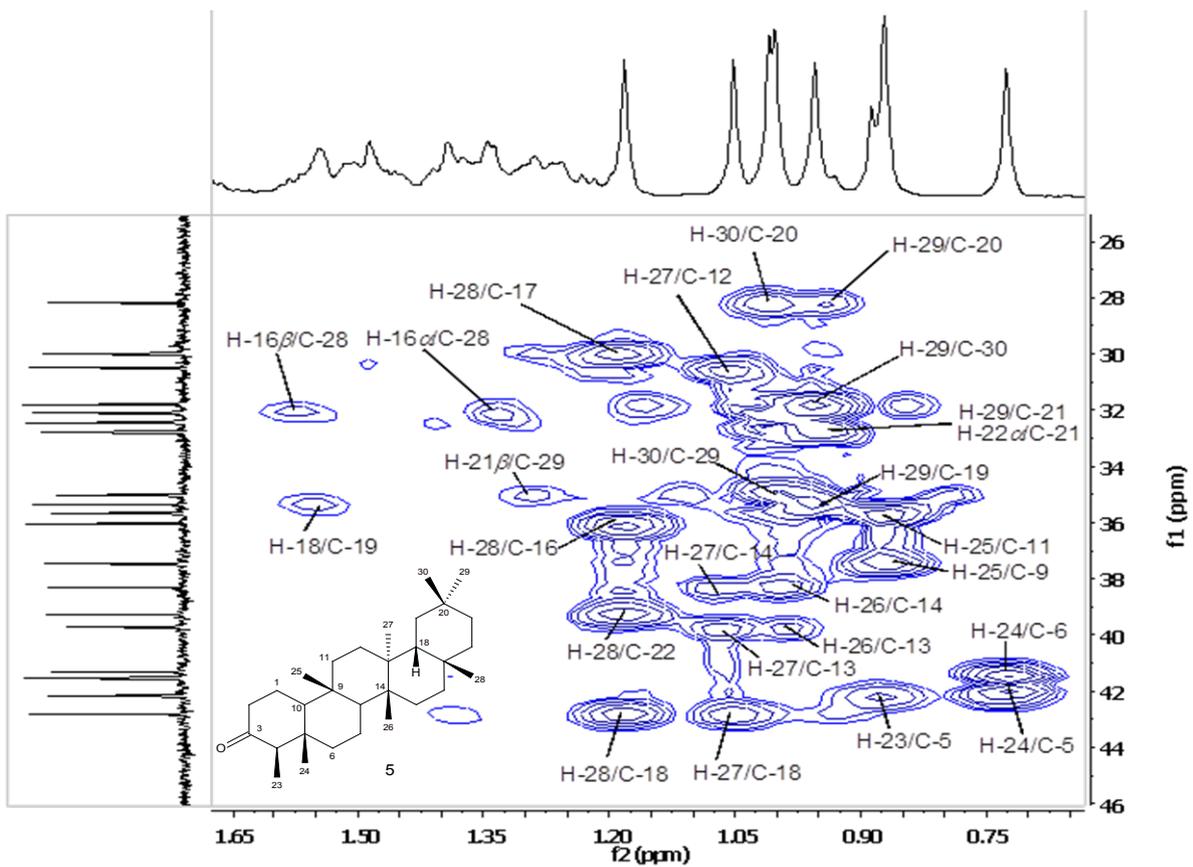


Figura 3.36: Expansão do mapa de contornos HMBC de **5** (F1: δ 26,0-46,0 x F2: δ 0,70-1,65, CDCl₃, 400 MHz).

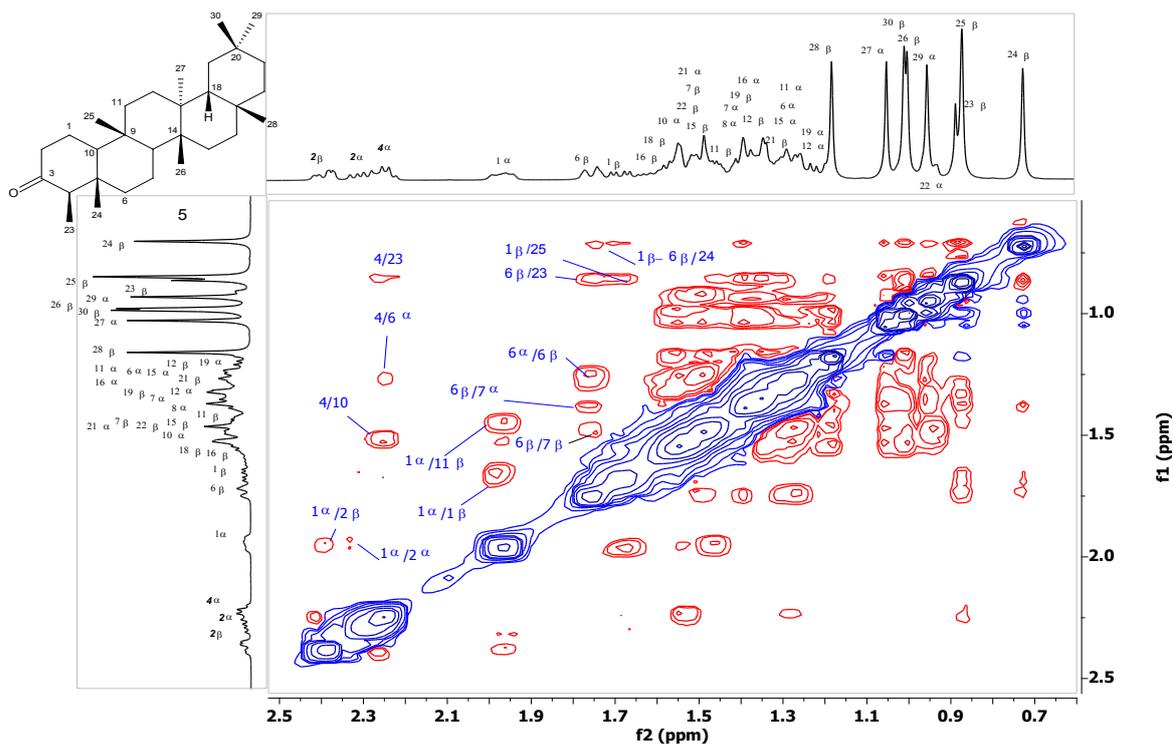


Figura 3.37: Mapa de contornos NOESY de 5 (CDCl₃, 400 MHz).

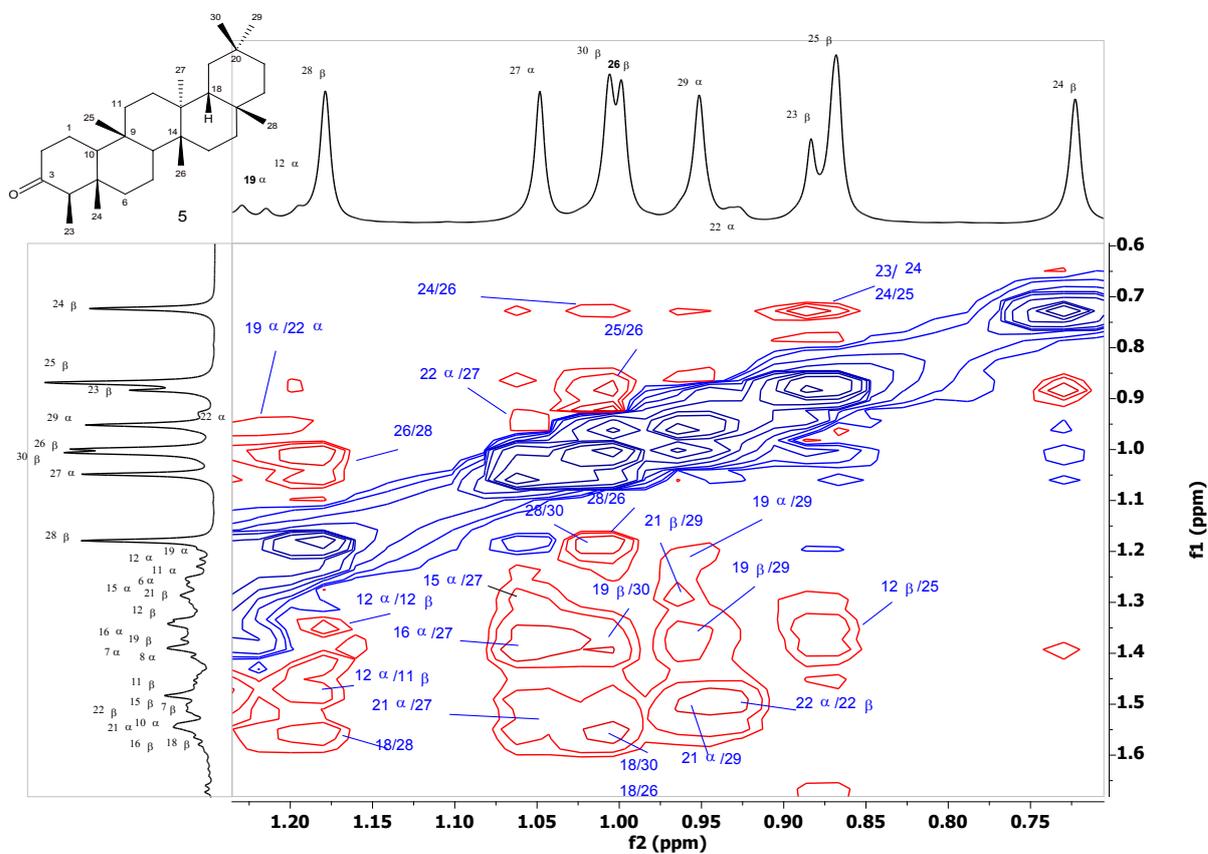


Figura 3.38: Expansão do mapa de contornos NOESY de 5 (F1 = δ0,60-1,70 ppm x F2 = δ0,70-1,26 ppm, CHCl₃, 400 MHz).

*Estudo conformacional de **5** por difração de raios X de pó*

Nesse estudo, a estrutura do TTPC friedelina, **5**, isolada foi estudada com base na análise de dados de difração de raios-X de seu pó, a partir do sólido microcristalino (~1,2 g) obtido com grau de pureza maior que 98% (CGAR). O sólido **5** cristalizou no grupo espacial $P_{21}P_{21}P_{21}$ ortorrômbico com $a = 3,371$, $b = 13,943$, $c = 28,456$, $\alpha = \beta = \gamma = 90^\circ$, $Z = 4$, $R_{WP} = 0,1153\%$, $R_{WP(w/obck)} = 0,1426\%$, $R_p = 0,0638\%$. A estrutura molecular e a estereoquímica relativa de **5** foram anteriormente estabelecidas por meio de técnicas de RMN^{126, 127} e rediscutidas nesta tese por meio de uma nova abordagem utilizando experimentos 2D atualizados (p.72).

O preparo de monocristais dotados de tamanho, qualidade e estabilidade, suficientes, é uma limitação intrínseca do estudo por difração de raios-X. A dificuldade é ainda maior quando se tratam de amostras de produtos naturais, tais como TTPC's isolados de plantas, devido à presença de impurezas e, além disso, essas substâncias são isoladas em pequenas quantidades.¹³¹ Por essas razões, neste trabalho, foi procurada a resolução da estrutura da friedelina a partir da difração de raios X de seu pó e de cálculos por Teoria do Funcional de Densidade (DFT),¹³² visando a otimização e aplicação dessa abordagem, a fim de poder estender a outros TTPC's. Atualmente, a elucidação estrutural através da análise difratométrica de pó (SDPD) tem sido largamente utilizada com sucesso no âmbito de compostos inorgânicos e organometálicos e também, especificamente nos últimos anos, em diversos compostos orgânicos, especialmente fármacos. Além do mais, o procedimento SDPD para uma molécula orgânica é dependente de muitos fatores relacionados com a sua cristalinidade, pureza, tamanho, preferência conformacional, grupo espacial, polimorfismo e outras informações químicas adicionais¹³¹ e, portanto, se torna um desafio na área de fitoquímica. Os dados cristalográficos de um monocristal de friedelina foram anteriormente relatados na literatura¹³³ e foram usados para validar os resultados deste trabalho.

A estrutura de **5** foi otimizada por cálculos DFT/B3LYP/6-31G(d,p) e a indexação dos dados de difração do pó foi feita usando o programa DICVOL91,¹³⁴ o que possibilitou identificar os picos experimentais, estabelecer o padrão deles e determinar o grupo espacial dos microcristais do pó. A Figura 3.39, p.83, mostra o gráfico representando o ajuste final obtido entre os padrões de difração observados e calculados. Os picos de difração, classificados e ajustados ao perfil Pseudo-Voight, foram submetidos aos refinamentos modificados de Pawley e Rietveld.

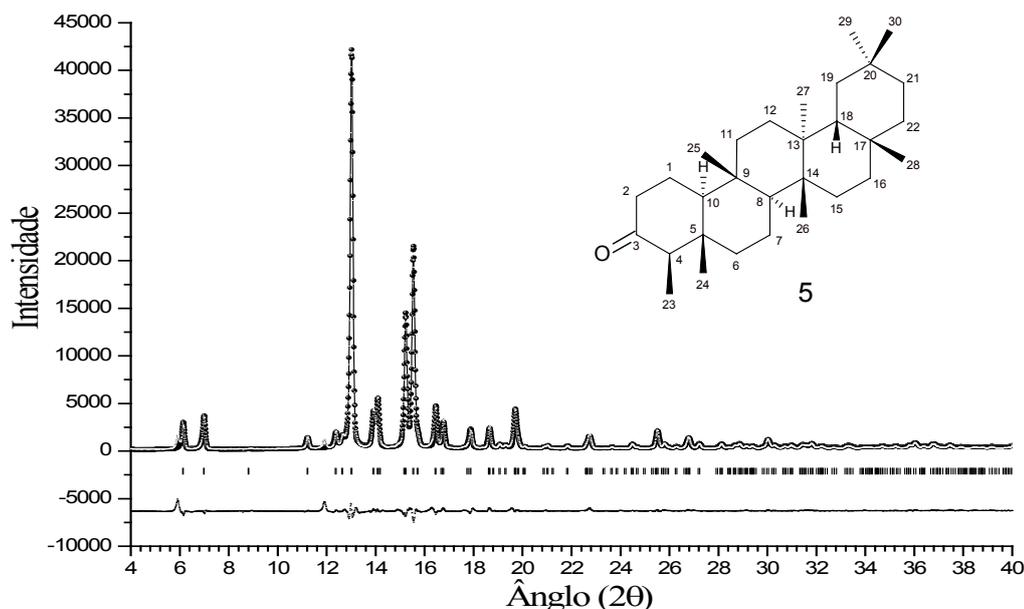


Figura 3.39: Gráfico Rietveld de **5**. Os dados observados estão representados por pontos (●) e o padrão calculado por uma linha sólida (-). A diferença entre os dados observados e calculados estão marcados embaixo (x); as barras verticais indicam as posições das reflexões de Bragg ().

Tabela 3.8: Dados do pó constituído de microcristais de friedelina (**5**)

Dados do cristal	
Fórmula química	C ₃₀ H ₅₀ O
M _r	426,70
Ajuste da célula unitária, grupo espacial	Ortorrômbico, P2 ₁ P2 ₁ P2 ₁
Temperatura (K)	298(1)
a, b, c (Å)	6.371, 13.943, c=28.456
α=β=γ	90
V Final (Å ³)	2527,77
Z	4
D _x (Mg m ⁻³)	1.121
Radiação, comprimento de onda (Å)	Cu Kα ₁ , 1.54056

O resumo dos dados referentes aos microcristais de **5** são mostrados na Tabela 3.8. Os parâmetros posicionais referentes a geometria da friedelina são apresentados na Tabela 3.9 (p.84). Os resultados dos cálculos por DFT mostraram que as formas dos cinco anéis de seis membros, nos dois confôrmeros desse triterpeno, se encontram nas formas cadeira-cadeira-cadeira-barco-barco (*cccbb*) e cadeira-cadeira-cadeira-cadeira-cadeira (*ccccc*), respectivamente, e em fase gasosa, apresentam valores de energia muito próximos, $\Delta G^{total}_{ccccc} - \Delta G^{total}_{cccbb} = 1,4 \text{ kJ mol}^{-1}$ no nível teórico B3LYP/6-31G(d,p).¹³² Os valores dos ângulos de torção endocíclicos calculados por DFT apresentaram uma boa correlação ($R^2 = 0,999$) com valores dos ângulos equivalentes da estrutura final do refinamento Rietveld. As estruturas otimizadas dos confôrmeros *cccbb* e *ccccc* estão apresentadas na Figura 3.40, p.85. O estudo realizado mostrou que o confôrmero *cccbb* é mais estável que confôrmero *ccccc*, sendo que a diferença de energia livre total entre eles foi de apenas $-1,4 \text{ kJ mol}^{-1}$ no nível de

teoria B3LYP/6-31G(d,p). A diferença de energia encontrada entre as duas estruturas é pequena e pode sofrer alterações dependendo da metodologia dos cálculos realizados. Por exemplo, o estudo utilizando diferentes intensidades de campo de força, realizado por Mo *et al.*(1989)¹³³, indicou que essas espécies são praticamente degeneradas em fase gasosa. Segundo o relato desses autores, o confômero preferido pela molécula de **5**, no estado cristalino, depende de forças intermoleculares relacionadas com o empacotamento, processos de solvatação e solubilidade. Outros cálculos utilizando funções de base maiores e diferentes funcionais de troca-correlação não foram realizados devido ao tamanho do sistema, o que demandaria um maior custo computacional.

Tabela 3.9: Coordenadas atômicas fracionárias x, y, z da célula unitária (dimensões em Å) e os parâmetros de deslocamentos isotrópicos (Å²)

Átomo	x	y	z	U _{iso} *
O(1)	0,0859	0,2123	0,5126	0,05000
C(1)	0,2208	0,2771	0,4003	0,05000
C(2)	0,0671	0,2970	0,4401	0,05000
C(3)	0,0466	0,2104	0,4702	0,05000
C(4)	-0,0091	0,1184	0,4457	0,05000
C(5)	0,1634	0,0964	0,4077	0,05000
C(6)	0,0918	0,0074	0,3786	0,05000
C(7)	0,2163	-0,0085	0,3340	0,05000
C(8)	0,2059	0,0801	0,3018	0,05000
C(9)	0,2956	0,1711	0,3266	0,05000
C(10)	0,1703	0,1840	0,3727	0,05000
C(11)	0,2699	0,2577	0,2949	0,05000
C(12)	0,3415	0,2417	0,2443	0,05000
C(13)	0,2294	0,1559	0,2202	0,05000
C(14)	0,2713	0,0637	0,2496	0,05000
C(15)	0,1375	-0,0195	0,2278	0,05000
C(16)	0,0992	-0,0124	0,1746	0,05000
C(17)	0,2528	0,0472	0,1441	0,05000
C(18)	0,3258	0,1421	0,1695	0,05000
C(19)	0,2881	0,2319	0,1392	0,05000
C(20)	0,3632	0,2236	0,0862	0,05000
C(21)	0,2804	0,1314	0,0645	0,05000
C(22)	0,1390	0,0723	0,0987	0,05000
C(23)	0,6093	0,2258	0,0862	0,05000
C(24)	0,2843	0,3121	0,0606	0,05000
C(25)	0,4410	-0,0177	0,1313	0,05000
C(26)	0,0008	0,1822	0,2172	0,05000
C(27)	0,5049	0,0328	0,2480	0,05000
C(28)	0,5415	0,1628	0,3377	0,05000
C(29)	0,3705	0,0751	0,4321	0,05000
C(30)	-0,0579	0,0381	0,4813	0,05000

(*)Para o número reduzido de reflexões independentes obtidas (284), os deslocamentos foram fixados em 0,05000 Å² (átomos de carbono e oxigênio) e 0,06000 Å² (átomos de hidrogênio).

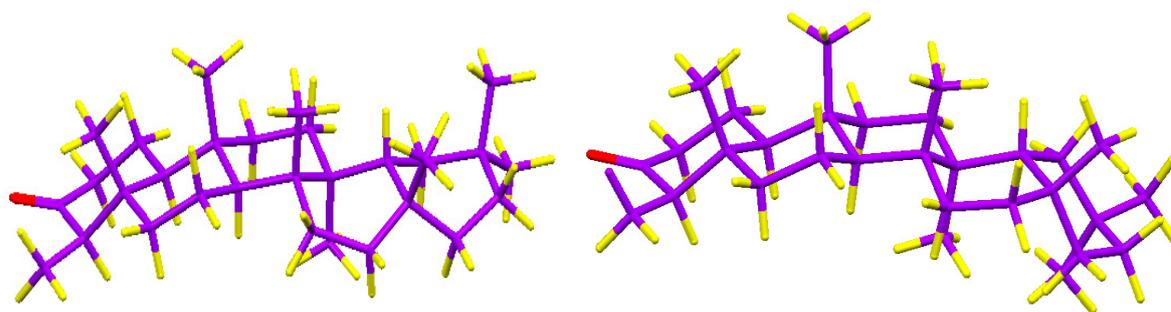


Figura 3.40: Estruturas otimizadas de **5** por DFT-B3LYP/6-31G(d,p): (esquerda) confômero de baixa energia na forma cadeira-cadeira-cadeira-barco-barco (*cccbb*); (direita) confômero de alta energia na forma cadeira-cadeira-cadeira-cadeira-cadeira (*ccccc*). Os átomos de carbono estão representados em púrpura, os de oxigênio em vermelho e os de hidrogênio em amarelo.

Na Tabela 3.10 são apresentados os valores dos ângulos de torção endocíclicos dos anéis de **5**, calculados (*calc*) por DFT e determinados por SDPD, onde se observa que esses valores mostraram boa concordância entre ambos. O maior desvio (*rmsd*) entre os valores dos ângulos de torção experimentais e os calculados (DFT) foi de 2,8° e desvio global de $\pm 1,5^\circ$. A correlação entre os valores experimentais e calculados foi significativa ($R^2 = 0,999$), indicando que a geometria molecular do cristal de friedelina foi reproduzida em excelente concordância por cálculos DFT.

Tabela 3.10: Valores dos ângulos de torção endocíclicos (°) determinados por SDPD e obtidos por DFT para friedelina

Anel A	Calc	Obs	ε^a	Anel D	Calc	Obs	ε^a
C(1)-C(2)-C(3)-C(4)	-50,8	-53,7	2,9	C(18)-C(13)-C(14)-C(15)	-64,8	-67,8	3,0
C(2)-C(3)-C(4)-C(5)	57,1	58,5	1,4	C(13)-C(14)-C(15)-C(16)	27,3	30,5	3,2
C(3)-C(4)-C(5)-C(10)	-59,8	-58,5	1,3	C(14)-C(15)-C(16)-C(17)	24,5	23,0	1,5
C(4)-C(5)-C(10)-C(1)	60,6	58,6	2,0	C(15)-C(16)-C(17)-C(18)	-38,7	-39,0	0,3
C(2)-C(1)-C(10)-C(5)	-56,0	-56,4	0,4	C(16)-C(17)-C(18)-C(13)	0,0	0,4	0,4
C(10)-C(1)-C(2)-C(3)	49,0	51,4	2,4	C(14)-C(13)-C(18)-C(17)	51,1	52,4	1,3
Anel B				Anel E			
C(6)-C(5)-C(10)-C(9)	-49,0	-51,8	2,9	C(17)-C(18)-C(19)-C(20)	-46,5	-47,2	0,7
C(10)-C(5)-C(6)-C(7)	48,0	51,1	3,1	C(22)-C(17)-C(18)-C(19)	-7,5	-7,1	0,4
C(5)-C(6)-C(7)-C(8)	-56,9	-57,6	0,7	C(18)-C(17)-C(22)-C(21)	57,9	58,7	0,8
C(6)-C(7)-C(8)-C(9)	63,2	59,6	3,6	C(20)-C(21)-C(22)-C(17)	-55,4	-57,0	1,6
C(7)-C(8)-C(9)-C(10)	-60,2	-56,1	4,1	C(19)-C(20)-C(21)-C(22)	1,3	2,2	0,8
C(8)-C(9)-C(10)-C(5)	54,9	55,0	0,0	C(18)-C(19)-C(20)-C(21)	49,8	49,5	0,3
Anel C				Anel		r^b	
C(8)-C(9)-C(11)-C(12)	-48,6	-47,7	0,9	A		1,9	
C(14)-C(8)-C(9)-C(10)	165,3	167,1	1,8	B		2,8	
C(9)-C(8)-C(14)-C(13)	-54,5	-51,4	3,1	C		1,6	
C(12)-C(13)-C(14)-C(8)	55,2	54,1	1,1	D		2,0	
C(11)-C(12)-C(13)-C(14)	-58,4	-58,1	0,3	E		0,9	
C(9)-C(11)-C(12)-C(13)	57,3	56,5	0,8			1,5 ^c	

(a) $\varepsilon = |\text{calc} - \text{obs}|;$

(b) $r = [1/n(\sum_{i=1}^n \varepsilon_i^2)]^{1/2}$ $n = 6;$

(c) $1/n(\sum_{i=1}^n r_i)$ $n = 5$

A estrutura resultante da aplicação do método de refinamento de Rietveld, mostrada na Figura 3.41 (p.86), foi racionalizada através dos dados de difração disponíveis na literatura.¹³³ Os parâmetros atômicos finais da estrutura de **5**-SDPD são mostrados Na Tabela 3.9 (p.84). É importante ressaltar que o sucesso desta análise de dados de difração de pó SDPD foi atribuído ao alto grau de pureza (>98%) do composto analisado.

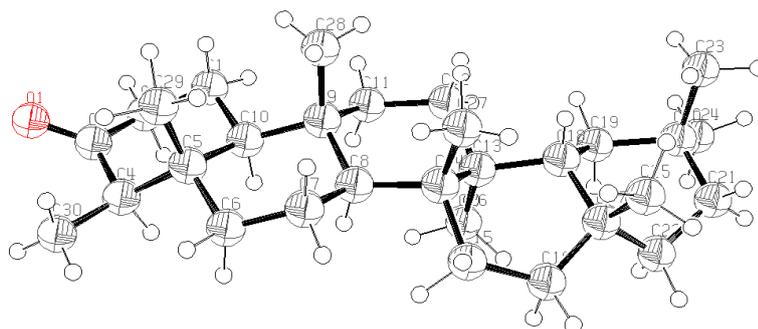
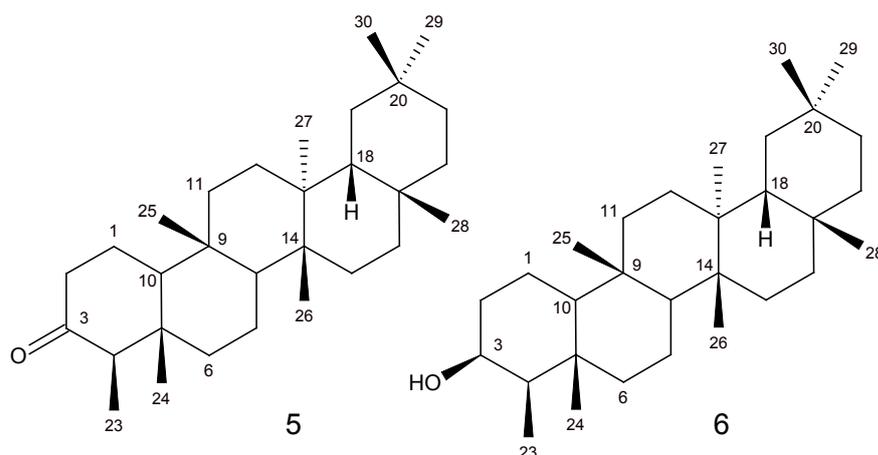


Figura 3.41: Estrutura ORTEP3 (Burnett and Johnson, 1996)¹³⁸ de **5** obtida por SDPD. Os átomos de C são apresentados como elipsoides de 50% de probabilidade e os átomos de H como pequenas esferas de raios arbitrários.

Concordante com a estrutura previamente conhecida de **5**,¹³³ a estrutura da friedelina encontrada pelo método descrito apresentou os anéis A, B e C adotando a forma de cadeira e o sistema *cis*-decalina, formado pelos anéis D e E, apresentaram a conformação barco-barco. A conformação barco-barco sugere repulsões menores entre os grupos metílicos ligados nesses dois anéis. A conformação encontrada para a friedelina também está coerente com a que foi relatada para o TTPC friedelano pachysandiol B (**14**). Os resultados obtidos nesse trabalho permitiram resolver a estrutura da friedelina, através de cálculos por DFT, bem como por análise dos dados obtidos por difração de raios X de pó. A técnica desenvolvida nesse estudo pode, alternativamente, ser utilizada quando a disponibilidade de amostras de TTPC's, em quantidade e pureza exigidas, for suficiente e as condições experimentais não permitirem a aplicação do método clássico de difração de raios X utilizando monocristais.

Mistura de friedelina (5) e 3β-friedelinol (6)

A mistura dos constituintes **5** e **6** foi obtida em várias frações dos extratos em hexano e acetato de etila, bem como, de forma residual, no extrato em metanol das folhas. A mistura foi isolada na forma de um sólido branco cristalino, que fundiu na faixa de temperatura de 234,8 a 252,8 °C. Uma amostra da mistura de **5** e **6** forneceu resultado positivo para o teste de Liebermann-Burchard e a composição da mistura foi identificada por CCD de sílica gel, junto com padrões autênticos de friedelina e 3β-friedelinol, utilizando CHCl₃ como eluente e revelação utilizando uma solução hidroalcoólica ácida (H₃PO₄ 1,5 %) de vanilina (1,5%).⁷⁸

O espectro da mistura de **5** e **6**, no IV (Figura 3.42, p.88), apresentou bandas centradas em 2840 e 2950 cm⁻¹, devido a deformações axiais de ligações C-H de grupos metila e metileno (ν-CH), que evidenciaram a natureza alifática dos compostos. O espectro apresentou uma centrada em 1700 cm⁻¹ e outra em 3400 cm⁻¹, as quais são características de deformações axiais de carbonila de cetona e de hidroxila de álcool, respectivamente, em compostos alifáticos saturados.⁹⁹ Além disso, o espectro apresentou bandas em 1440, 1380, 1360, 1170 e 980 cm⁻¹, típicas de triterpenos pentacíclicos da série dos friedelano.¹²⁷⁻¹²⁹

No espectro de RMN de ¹³C (Figura 3.43, p.88), os sinais em δ_C 212,99 e δ_C 72,17, foram atribuídos aos carbonos oxigenados (C-3) da friedelina e do 3β-friedelinol, respectivamente. A confirmação desses dois sinais de carbono-13, bem como dos outros demais, foram feitas por comparação, com os dados da literatura.^{31, 96} O perfil espectroscópico permitiu propor a mistura de friedelina (**5**) e 3β-friedelinol (**6**) como os constituintes dessa mistura. As integrais dos sinais de RMN de ¹H de H-18 (obtidos por transformação lorentz/gaussiana) de **5** (δ 1,18 (s)) e **6** (δ 1,17(s)) mostraram uma proporção de cerca de 3:7 na mistura, respectivamente.

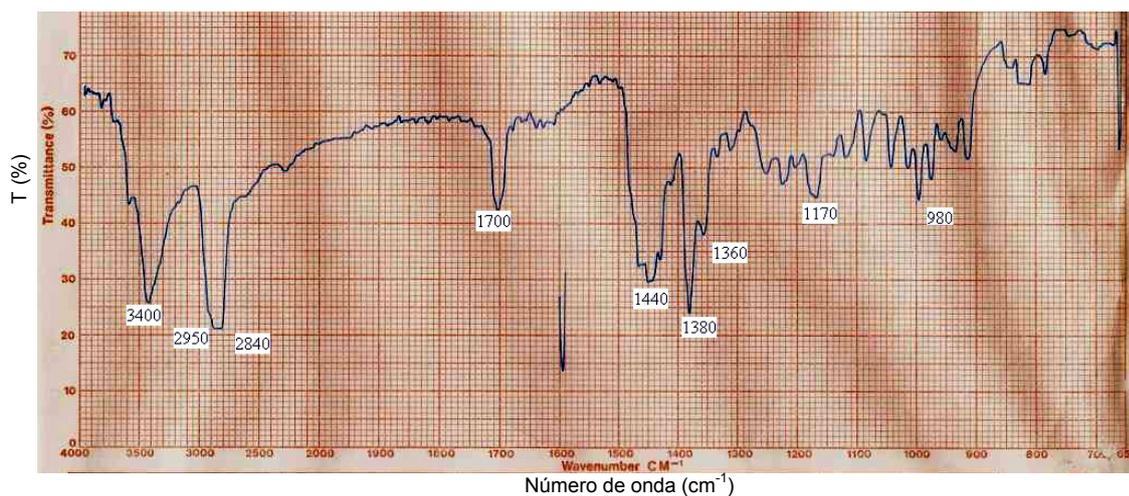


Figura 3.42: Espectro de absorção da mistura de 5 e 6 na região do IV (KBr).

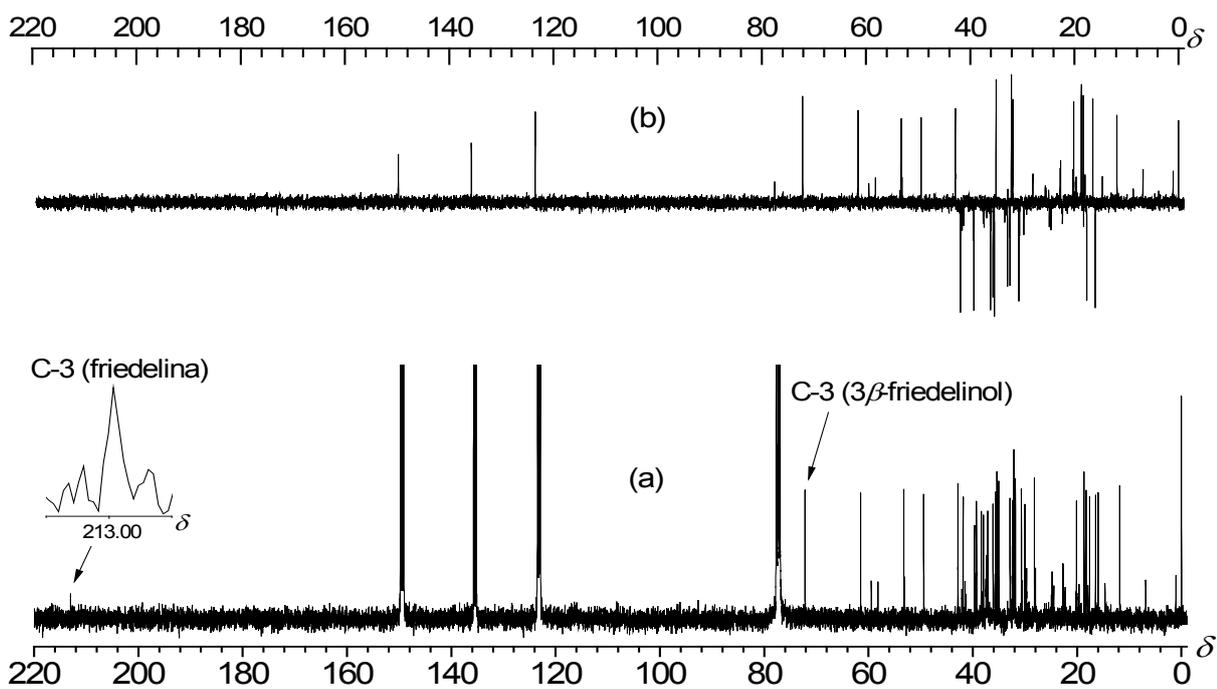
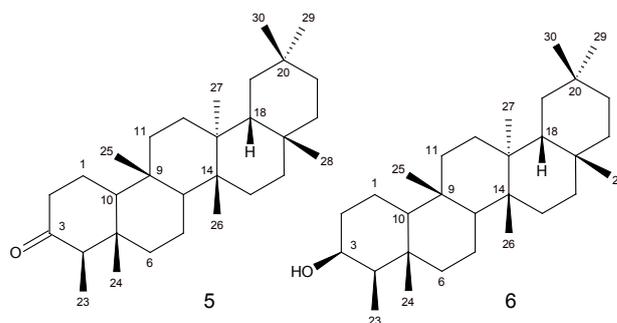
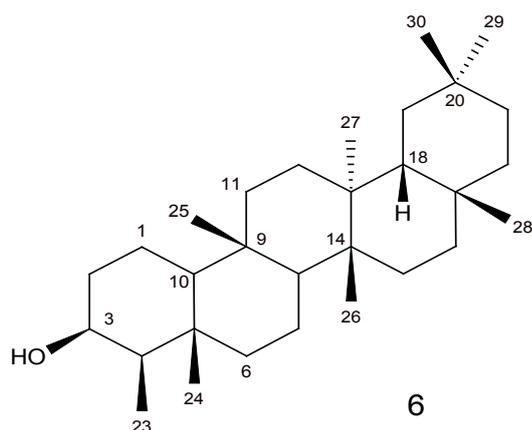


Figura 3.43: Espectros de RMN de (a) ¹³C e (b) DEPT-135 da mistura de 5 e 6 (CDCl₃ e piridina-d₅, 100 MHz).

3β-Friedelinol (6)

O composto **6** foi obtido de várias frações de extratos em hexano (FHEMA e SHEMA). As frações F82-F89 da coluna C14-2 foram coletadas como um sólido branco cristalino, que fundiu na faixa de temperatura de 286,7-289,3 °C (recrist. em acetona) (260,0-262).²⁵ Uma amostra desse sólido forneceu resultado de LB(+) para TTPC. A comparação do sólido **6** com uma amostra autêntica através de CCD confirmou a identidade desse sólido com o composto *3β*-friedelinol.

O espectro de **6** na região do infravermelho (Figura 3.44, p.91) apresentou bandas de absorção centradas em 2840 e 2966 cm^{-1} , devido a deformações axiais de ligações C-H de grupos metilas e metilenos (ν -CH), as quais evidenciaram a natureza alifática de **6**. Apresentou também uma banda em 3405 cm^{-1} , vibração característica de deformação axial de grupos hidroxilas (δ -OH) de álcool em compostos alifáticos saturados. De modo geral, o perfil do espectro no IV, composto de bandas de absorção em 3622, 3474, 2942, 2866, 142, 1386, e 1362, 1176, 1008 e em 1000 cm^{-1} , é típico de alcoóis de triterpenos pentacíclicos.^{31,127} A comparação entre os espectros no IV de **6** com o de uma amostra autêntica de *3β*-friedelinol mostrou a mesma identidade espectrométrica para ambos.²⁵

Através do espectro de RMN de ^{13}C (Figura 3.46, p.92) e do espectro DEPT-135 (Figura 3.46, p.92) foram observados seis sinais de carbonos quaternários, cinco metínicos, onze metilênicos e oito metílicos, característicos de triterpeno pentacíclico da série friedelano. O espectro apresentou também sinal em δ 72,77; referente a carbono ligado a hidroxila (Tabela 3.11, p.90).^{96,128,129}

O espectro de RMN de ^1H (Figuras 3.45, p.91) mostrou um multipeto entre δ 3,76 a δ 3,71, que foi atribuído ao hidrogênio carbinólico (H-3). Na região de valores de

deslocamentos químicos dos hidrogênios alifáticos foram observados sete simpletos atribuídos aos hidrogênios de grupos metila em δ 0,86 (H-25), 0,95 (H-29), 0,97 (H-24), 0,99 (H-26), 1,00 (H-30), 1,01 (H-27) e 1,17 (H-28) e um duplete, observado no mapa de contornos COSY em δ 0,93 (d, \sim 7,0 Hz, H-23). As demais atribuições foram feitas mediante a comparação entre os valores de δ obtidos no espectro de RMN de ^1H de **6** e na literatura.^{31,128}

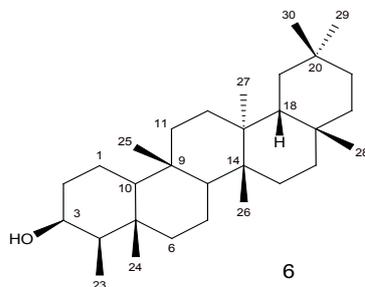
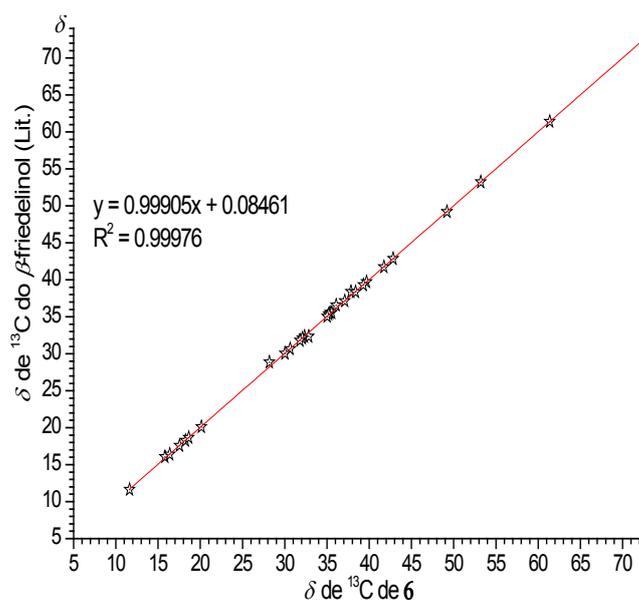


Tabela 3.11: Comparação e análise de dispersão entre os valores de δ de ^{13}C de **6** (CDCl_3 , 100 MHz) e os respectivos valores publicados para o β -friedelinol (CDCl_3 , 100 MHz)¹²⁸

Carbono	δ de ^{13}C	
	6	Lit. ¹²⁸
1	15,81	16,05
2	36,10	36,56
3	72,77	72,76
4	49,20	49,19
5	37,85	38,38
6	41,75	41,74
7	17,56	17,56
8	53,22	53,21
9	37,12	37,12
10	61,38	61,39
11	35,36	35,56
12	30,65	30,65
13	39,70 ^a	38,36
14	38,39 ^a	39,69
15	32,35	32,34
16	35,58	35,56
17	30,04	30,03
18	42,85	42,84
19	35,21	35,35
20	28,19	28,84
21	32,84	32,34
22	39,30	39,29
23	11,62	11,62
24	16,40	16,40
25	18,26	18,25
26	20,13	20,12
27	18,65	18,65
28	32,10	32,09
29	35,03	35,03
30	31,80	31,80

^a sinais intercambiáveis



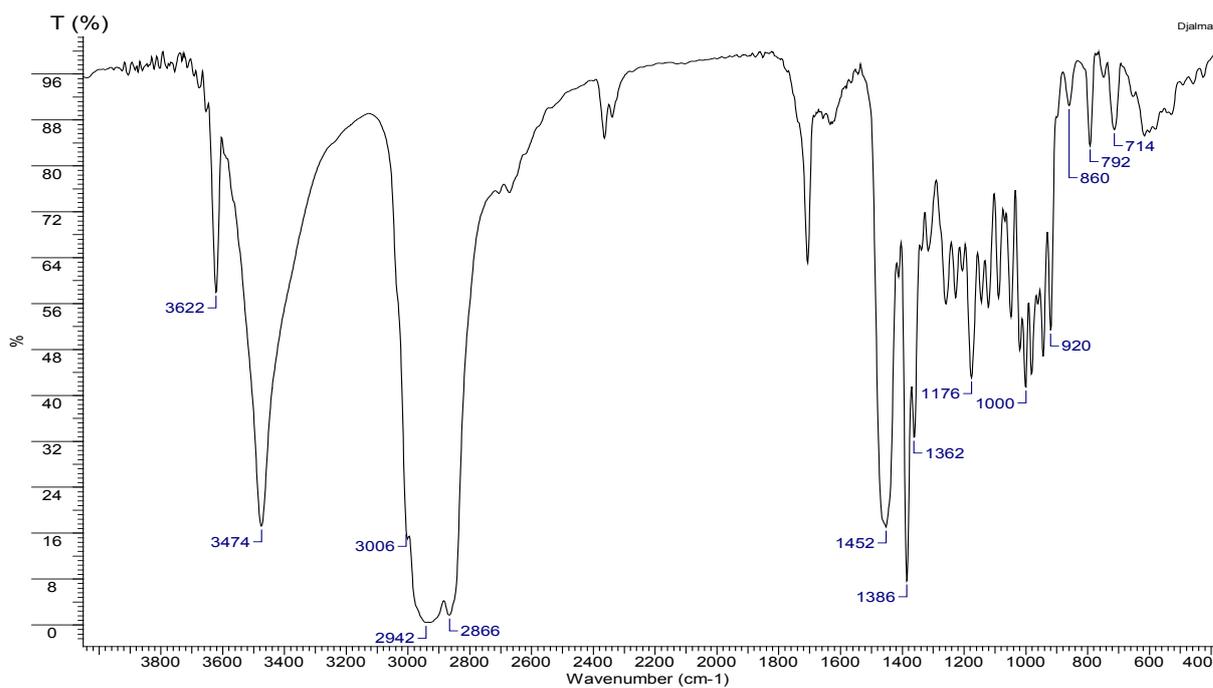


Figura 3.44: Espectro de absorção de 6 na região do IV (KBr).

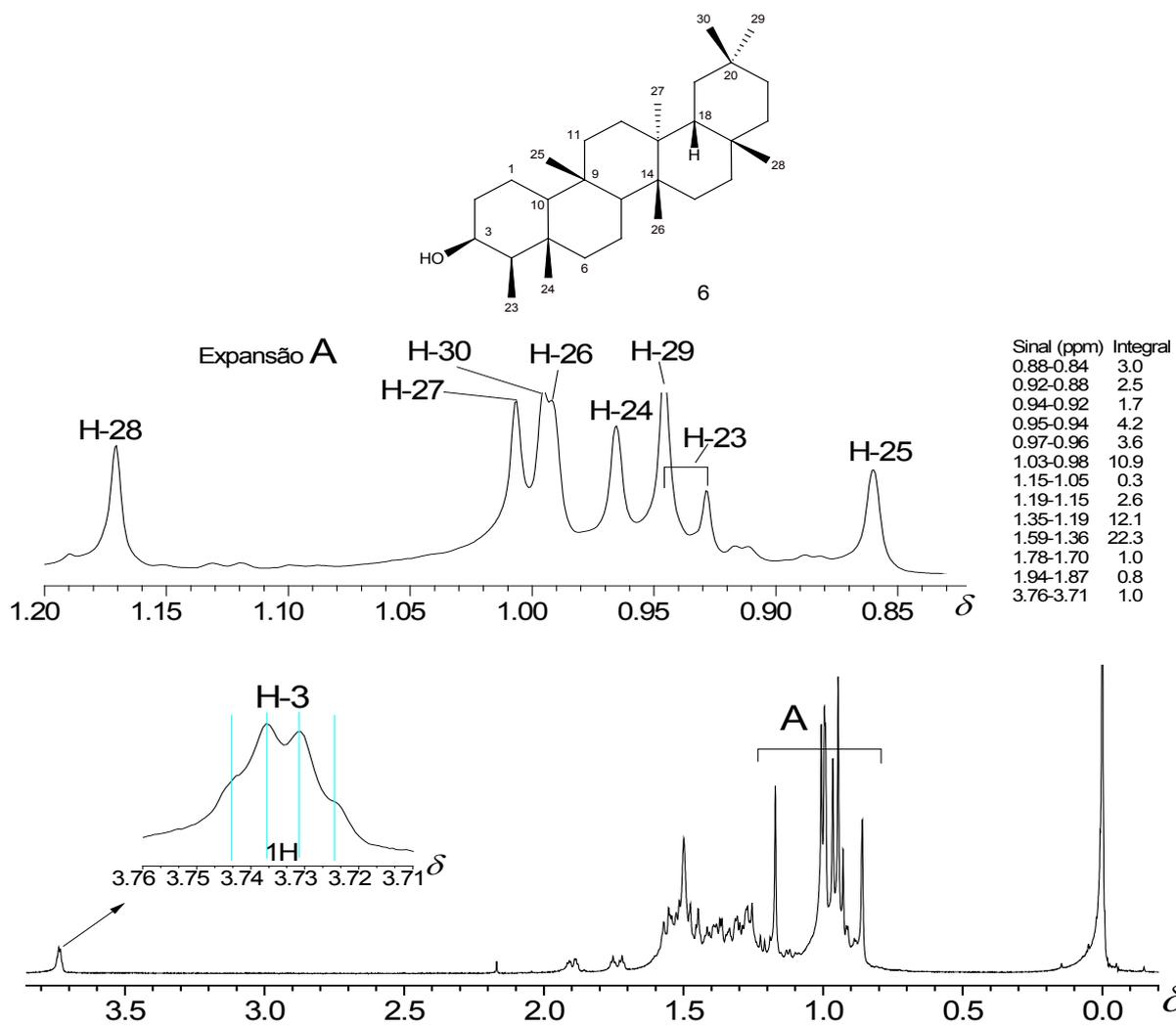


Figura 3.45: Espectro de RMN de ¹H de 6 (CDCl₃, 400 MHz).

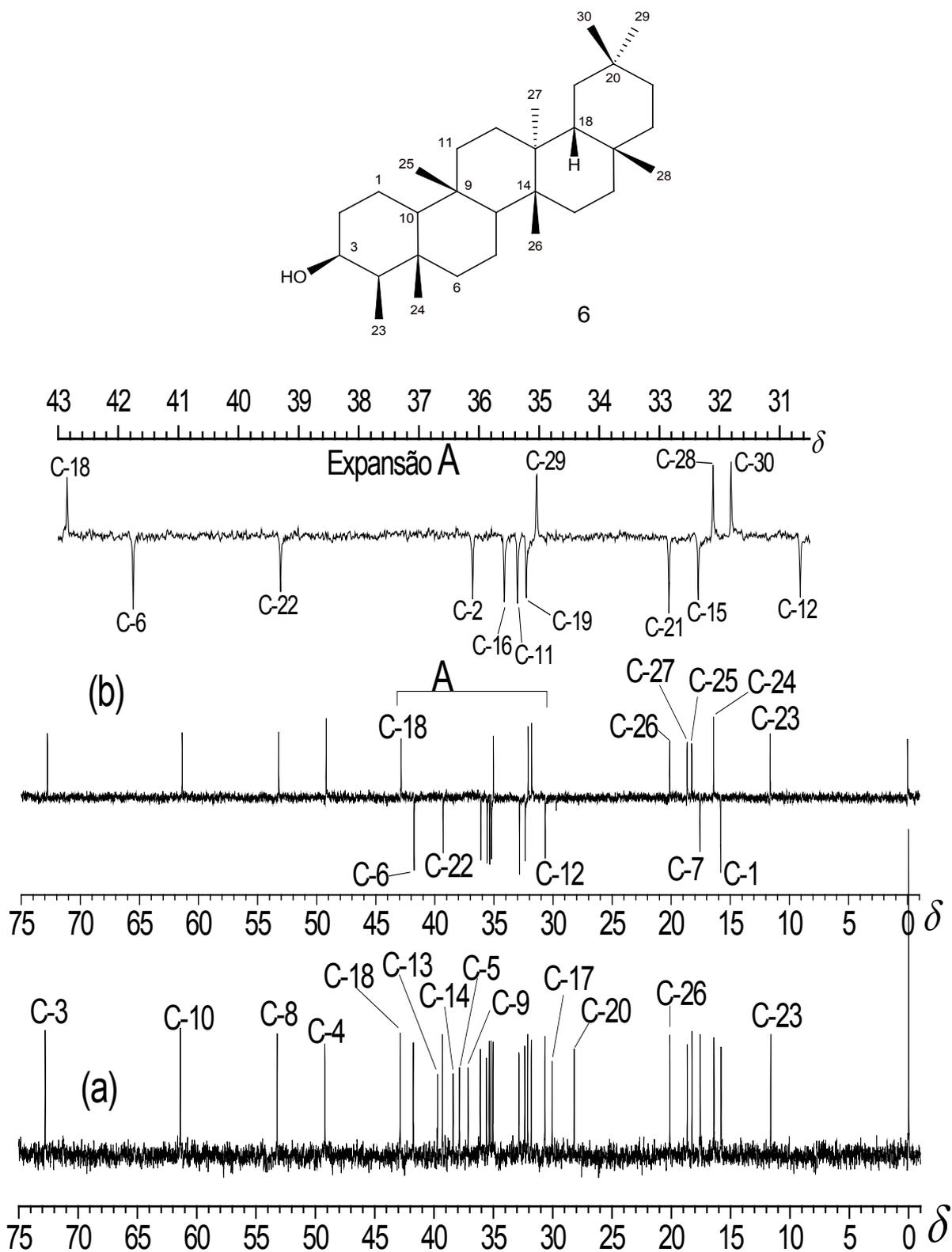
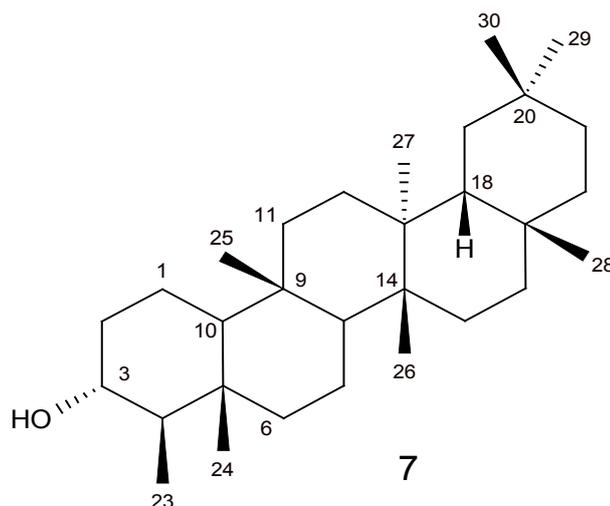


Figura 3.46: Espectros RMN de (a) ^{13}C e (b) DEPT-135 de **6** (CDCl_3 , 100 MHz).

3 α -Friedelinol (7)

O composto 3 α -friedelinol (7), foi isolado do extrato SHEMA como um sólido branco cristalino, que apresentou temperatura de fusão na faixa de 295,9 a 300 °C (298-300 °C).³¹ Uma amostra de 7 forneceu resultado LB(+) positivo para TTPC (solução de coloração rósea) e apresentou comportamento cromatográfico (CCD) similar ao de uma amostra autêntica de 3 α -friedelinol.

O espectro de absorção de 7, na região do infravermelho (Figura 3.47, p.95), apresentou bandas centradas em 2868 e 2928 cm⁻¹, devido a deformações axiais de ligações C-H de grupos metila e metileno (ν -CH), as quais evidenciaram a natureza alifática de 7. Bandas características de dimetilas geminadas foram observadas em 1360 e 1386 cm⁻¹. Apresentou também bandas de absorções em 3230 e 3550 cm⁻¹, as quais são características de deformações axiais de hidroxila (ν -OH) de álcool em compostos alifáticos. O conjunto de bandas em 3488, 3408, 2928, 2868, 1456, 1386, 1360, 1178, 1032 e 1002 cm⁻¹, como um todo, é típico de TTPC's hidroxilados.^{31,130} A comparação entre as bandas de absorção do espectro no IV de 7 com as de um espectro no IV de uma amostra autêntica de 3 α -friedelinol³¹ apresentou a mesma identidade espectrométrica.

O espectro de RMN de ¹H (Figura 3.48, p.95) mostrou um sinal de duplete triplo em δ 3,37 (dt, $J = 5,0; 10,0$ Hz) atribuído ao hidrogênio H-3. Na região característica de ressonância de hidrogênios alifáticos foram observados sete simpletos, atribuídos aos hidrogênios correspondentes aos grupos metila em δ 0,78 (H-24), 0,81 (H-25), 0,95 (H-29), 0,99 (H-26), 1,00 (H-27), 1,01 (H-30), 1,17 (H-28) e um duplete em δ 0,94 (d = 6,2 Hz, H-23). Essas atribuições foram feitas mediante a comparação entre os valores de δ obtidos no espectro de RMN de ¹H de 7 e os valores do 3 α -friedelinol da literatura.³¹

Através do espectro de RMN de ^{13}C e do espectro DEPT-135 (Figuras 3.49 (a) e (b), p.96) foram observados seis sinais de carbonos quaternários, cinco metínicos, onze metilênicos e oito metílicos, característicos de triterpeno pentacíclico da série friedelano. Os espectros apresentaram também sinais em δ 71,42; referentes ao carbono (C-3) ligado a hidroxila (Tabela 3.12).⁹⁶

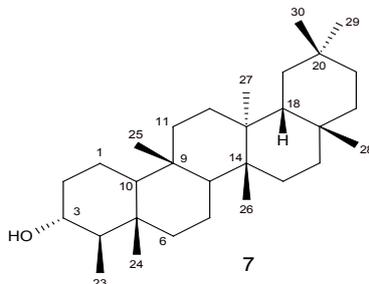
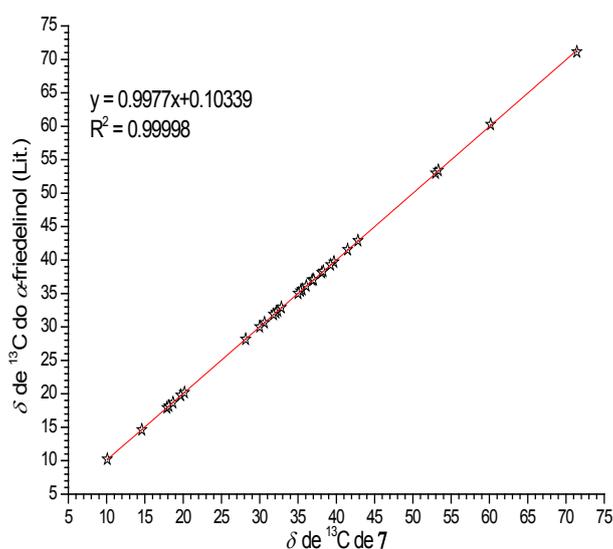


Tabela 3.12: Comparação e análise de dispersão entre os valores de δ de ^{13}C de 7 (CDCl_3 , 100 MHz) com os respectivos valores publicados para o α -friedelinol (CDCl_3 , 100 MHz)³¹

Carbono	δ de ^{13}C	
	7	Lit. ³¹
1	19,69	19,76
2	36,86	37,00
3	71,42	71,11
4	52,98	53,00
5	38,10	38,12
6	41,48	41,53
7	17,88	17,92
8	53,32	53,41
9	37,04	37,05
10	60,16	60,25
11	35,54	35,57
12	30,62	30,64
13	39,69 ^a	38,31
14	38,30 ^a	39,70
15	32,36	32,38
16	36,08	36,12
17	30,00	30,01
18	42,84	42,88
19	35,34	35,36
20	28,17	28,16
21	32,83	32,88
22	39,26	39,27
23	10,09	10,22
24	14,60	14,63
25	18,15	18,17
26	20,17	20,18
27	18,67	18,68
28	32,11	32,13
29	35,02	35,02
30	31,82	31,86

^a Sinais intercambiáveis



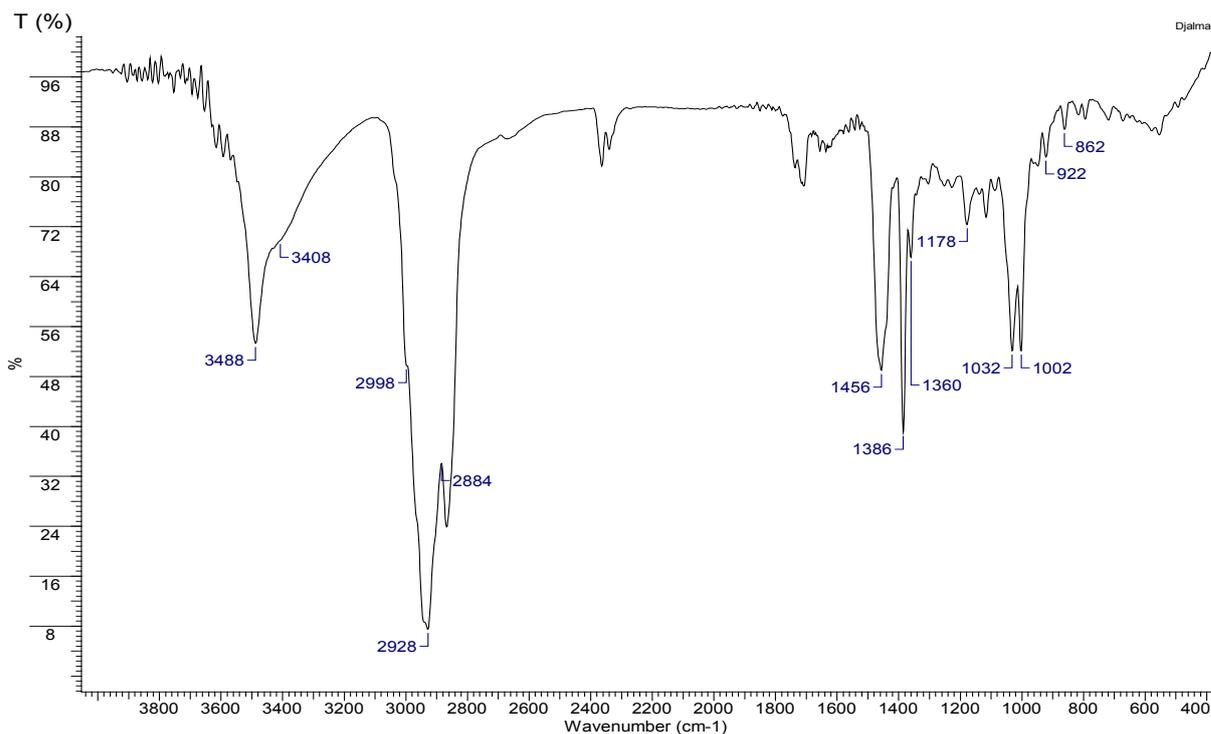


Figura 3.47: Espectro de absorção de **7** na região do IV (KBr).

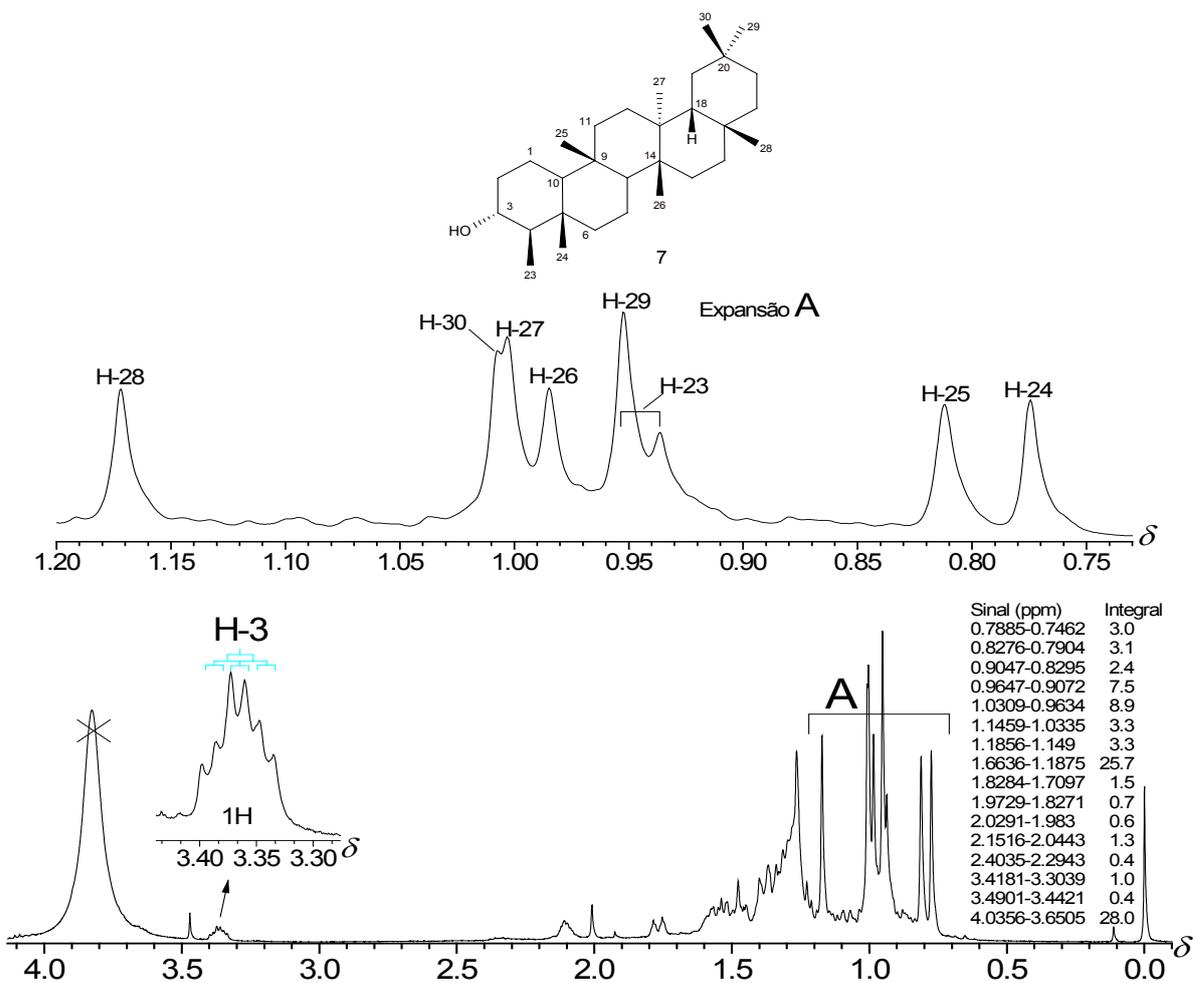


Figura 3.48: Espectro de RMN de ^1H de **7** (CDCl_3 , 400 MHz).

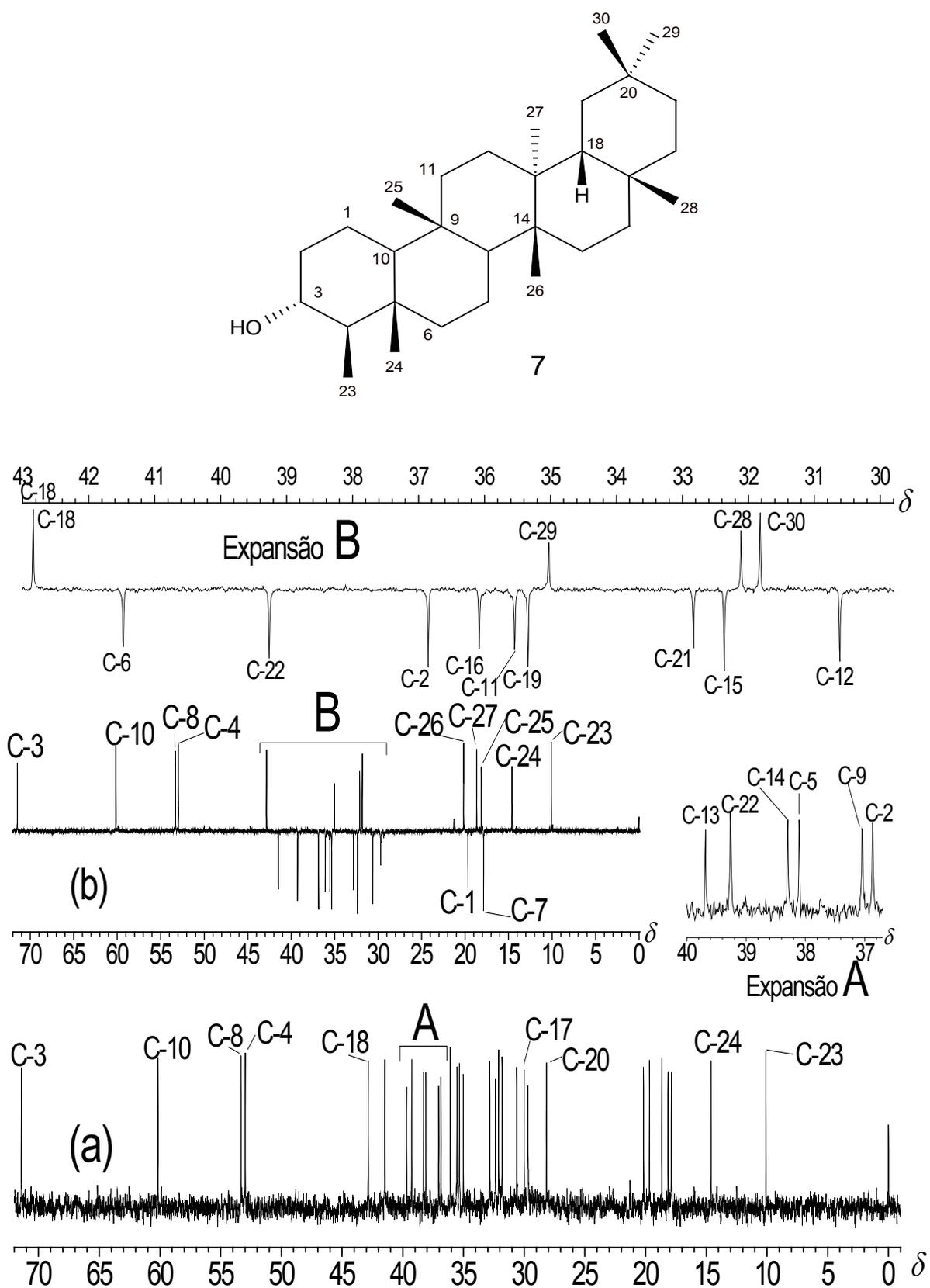
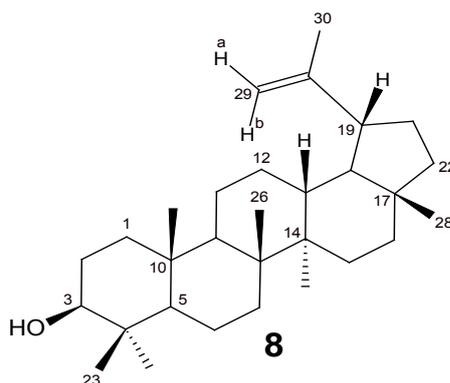


Figura 3.49: Espectros de RMN de (a) ^{13}C e (b) DEPT-135 de **7** (CDCl_3 , 100 MHz).

3β-Lup-20(29)-en-3-ol (lupeol, 8)

O constituinte **8** foi obtido do extrato hexânico (FHEMA) na forma de um sólido branco amorfo, que fundiu na faixa de temperatura de 213,8 a 216,7 °C* (184,4-186,4 °C)²⁵. O sólido **8** apresentou resultado positivo para TTPC quando submetido ao teste químico de Liebermann-Burchard.⁷⁸

A análise do espectro de **8**, na região do IV (Figura 3.50, p.99) permitiu a identificação de um conjunto de bandas características de um triterpeno-álcool de esqueleto lupano. Na Tabela 3.13 são apresentadas as bandas, os modos de vibração e os respectivos fragmentos moleculares atribuídos. O conjunto de bandas observadas no espectro de IV em 3550, 3400, 3295, 2850, 2920, 1630 (fraca intensidade), 1470, 1455, 1440, 1380, 1360, 1140, 1110, 1040, 985 e em 880 cm⁻¹, como um todo, foram caracterizadas como bandas do lupeol.⁶⁴ A comparação do espectro no IV de **8** com o de uma amostra autêntica de lup-20(29)-en-3β-ol²⁵ confirmou a identidade de ambos os espectros.

Tabela 3.13: Absorções na região do infravermelho e modos de vibração de **8**

Nº de onda, (cm ⁻¹)	Grupo/fragmento molecular	Modo de vibração
3550-3450	R-OH	ν O-H
3400-3250	-CH ₂ -COH-CH ₂ -	ν O-H
2920-2850	-CH ₂ -; -CH ₃	ν C-H
1620-1640(*)	RC=CH ₂	ν C=C
1470-1455	-CH ₂ -; -CH ₃	δ C-H
1380-1360	<i>gem</i> -dimetila	δ C-H
1190-1140	<i>gem</i> -dimetila	ν C-H
1110	-CH ₂ -OH	ν C-OH
1040-1015	R-OH de álcois	ν C-OH
880	RC=CH ₂	γ C=C-H

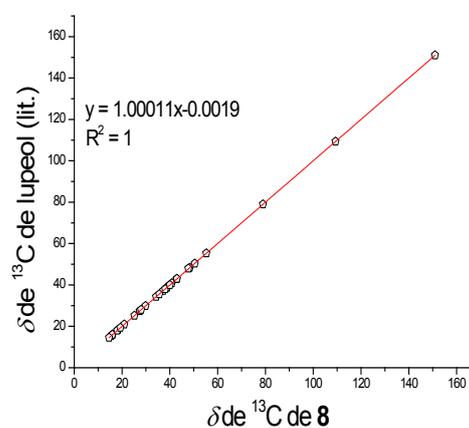
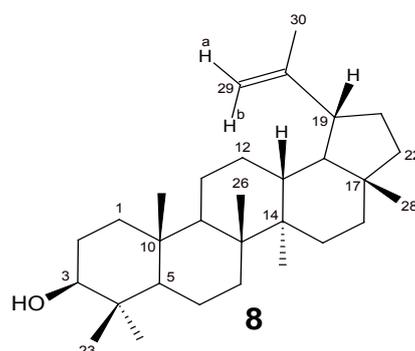
(*) Esta banda nos TTPC lupanos, normalmente, é registrada nos espectros com baixa intensidade.

* Na análise térmica da fração **5** por DSC foi observado um pico de fusão em 216,5 °C atribuído ao do lupeol.

O espectro de RMN de ^1H de **8** (Figura 3.51, p.100) registrou um duplete duplo em δ 3,19 (dd, $J = 11,0$ e $5,0$ Hz), atribuído ao hidrogênio carbinólico (H-3) vizinho a um grupo metileno em um sistema ABX. Foi também observado um duplete triplo em δ 2,38 (dt, $J = 11,0$ e $5,8$ Hz), atribuído ao hidrogênio metínico H_{ax} -19 em um sistema ABX_2 com H_{ax} -18, H_{eq} -21 e H_{ax} -21.⁹⁹

Tabela 3.14: Comparação e análise de dispersão entre os valores de δ de ^{13}C de **8** (CHCl_3 , 400 MHz) e os respectivos valores publicados para o lupeol (CHCl_3 , 500 MHz).¹³⁹

8			Lupeol (Lit.) ¹³⁹	
NC	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}^*$
1	38,73		38,72	
2	27,43		27,43	
3	79,01	3,19 (dd, 11,0 e 5,0 Hz)	79,02	3,19
4	38,87		38,87	
5	55,32		55,31	
6	18,33		18,33	
7	34,30		34,29	
8	40,85		40,84	
9	50,46		50,35	
10	37,19		37,18	
11	20,95		20,94	
12	25,17		25,16	
13	38,07		38,07	
14	42,85		42,85	
15	27,46		27,46	
16	35,60		35,60	
17	43,01		43,01	
18	48,33		48,32	
19	47,78	2,38 (dt, 11,0 e 5,8 Hz)	48,00	
20	150,96		150,98	
21	29,87		29,86	
22	40,02		40,02	
23	28,00	0,97 (s)	28,00	0,97
24	15,37	0,76 (s)	15,38	0,76
25	16,12	0,83 (dl, 0,5 Hz)	16,13	0,83
26	15,99	1,03 (s)	15,99	1,03
27	14,56	0,94 (dl, 0,8 Hz)	14,56	0,95
28	18,01	0,79 (s)	18,02	0,79
29	109,32	(a): 4,57(qd, 2,5 e 1,5 Hz) (b): 4,69(m)	109,32	4,56 4,69
30	19,32	1,68 (m)	19,32	1,68



(*) Os valores dos acoplamentos escalares (J) e as multiplicidades não foram apresentados pela literatura. Os valores de δ de ^{13}C de **8** (X) mostraram excelente correlação linear com os dados da literatura ($Y = 1,00011X - 0,0019$, $R^2 = 1,0000$).

O espectro de RMN de ^1H de **8** registrou também um sinal em δ 4,57 (qd, $J = 2,5$ e $1,5$ Hz) que foi atribuído ao hidrogênio (H-29a), em posição *cis* em relação aos hidrogênios do

grupo metila H-30 e um multipeto em δ 4,69 (m) atribuído a H-29b. O multipeto observado em 1,68 (m) foi atribuído aos hidrogênios H-30. A Tabela 3.14 (p.93) mostra a comparação entre alguns valores de δ de ^1H de **8** com os correspondentes valores encontrados na literatura para o lupeol.¹³⁹

Os espectros de RMN de ^{13}C e DEPT-135 de **8** (Figuras 3.52 (a) e (b), p.101) apresentaram trinta sinais de carbono referentes a sete carbonos de grupos metilas, seis metinos, onze metilenos e seis sinais de carbonos não hydrogenados. Mostrou também dois sinais de carbonos de um grupo alquênico em δ 159,96 (C-20), em δ 109,50 (C-29) e um sinal de carbono carbinólico em 79,01 (C-3). A comparação entre os valores δ de ^{13}C de **8** com os do lupeol¹³⁵ mostrou uma excelente correlação linear ($R^2 = 1,000$).

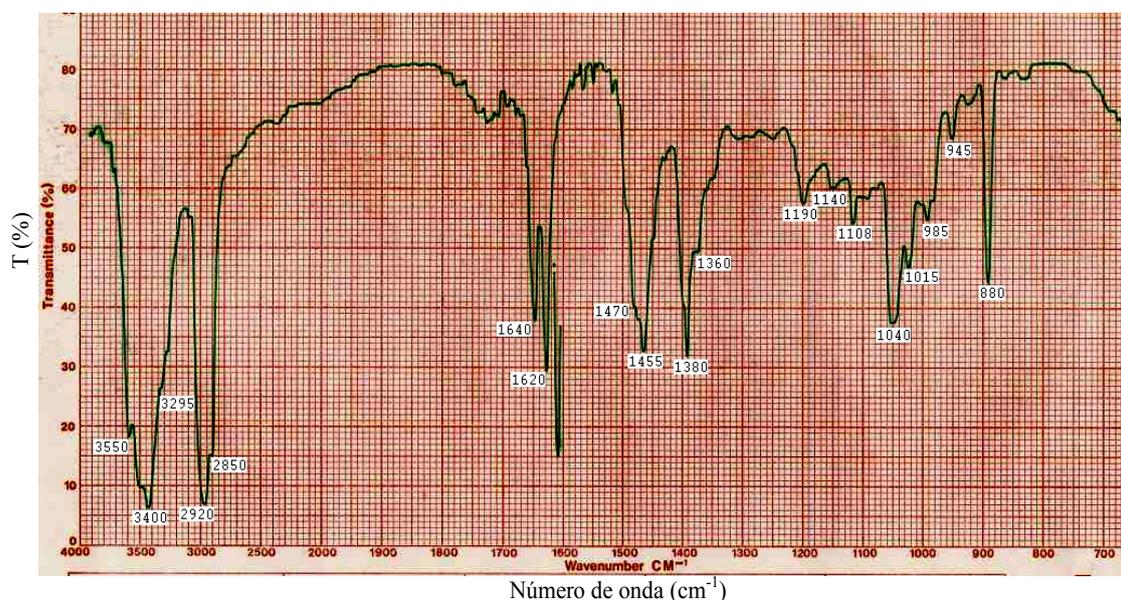
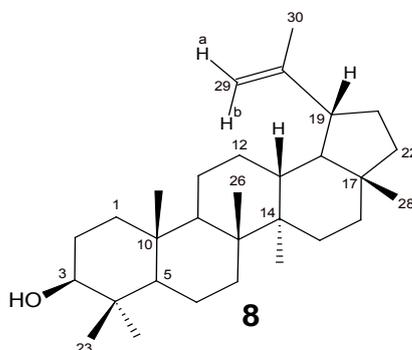


Figura 3.50: Espectro absorção de **8** na região do IV (KBr).

Alguns espectros no IV apresentaram, sistematicamente, bandas intensas em 1620-1630 e 1640-1650 cm^{-1} , as quais podem ser atribuídas produtos de limpeza e/ou solvente. Essas bandas possivelmente se sobrepuseram às bandas mais fracas, que ocorrem na mesma região do espectro de IV, relativas às ligações duplas no composto isolado (**8**).

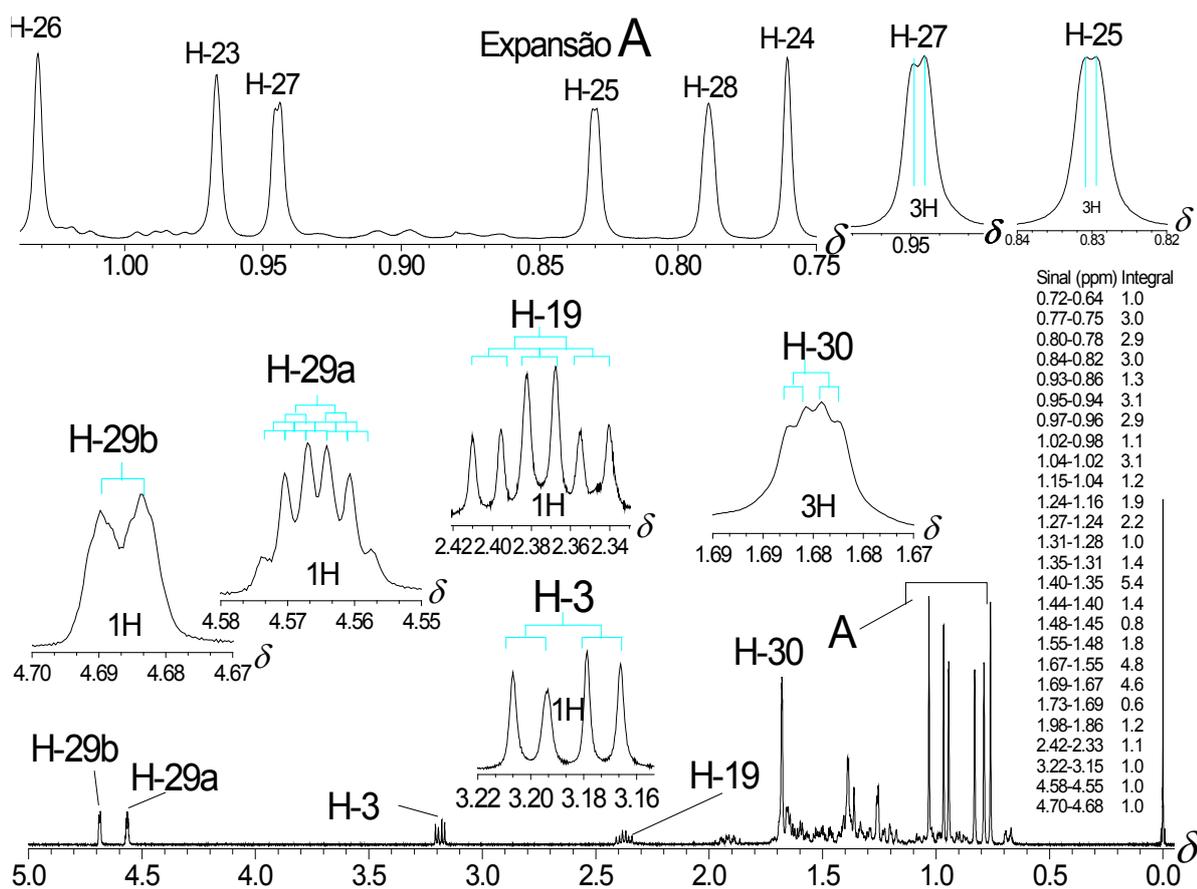
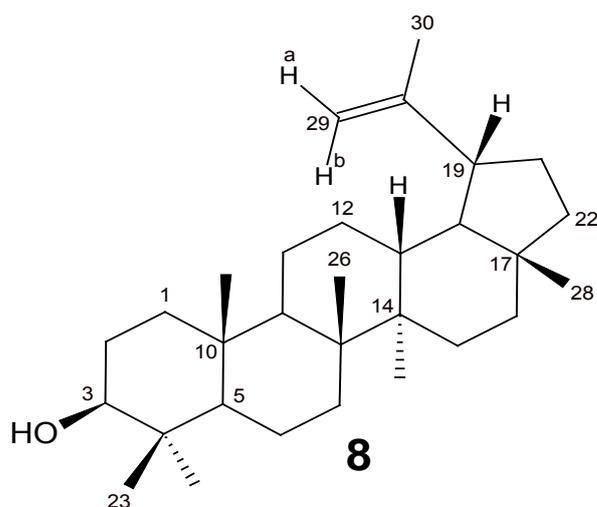


Figura 3.51: Espectro de RMN de ¹H de 8 (CDCl₃, 400 MHz).

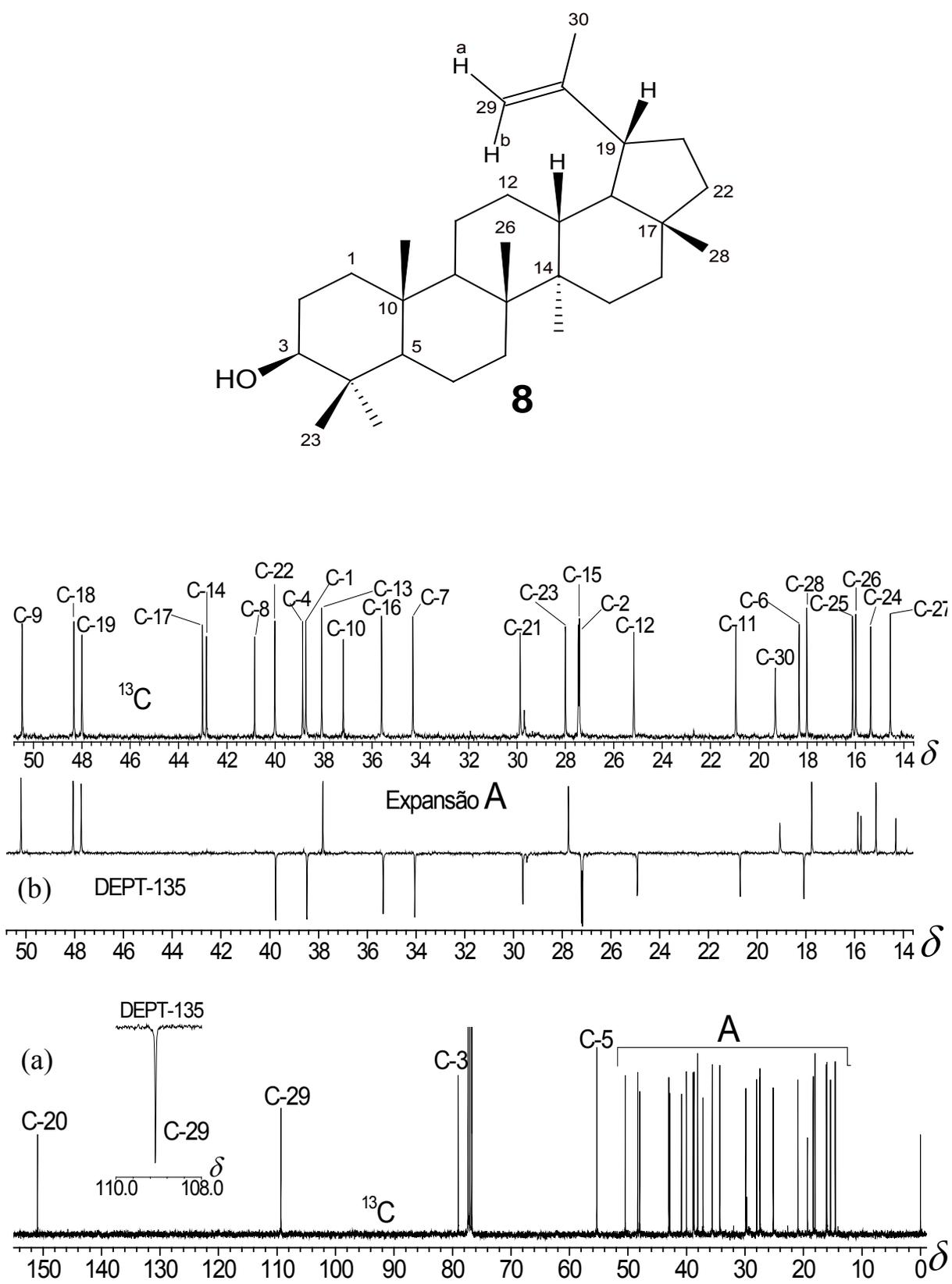
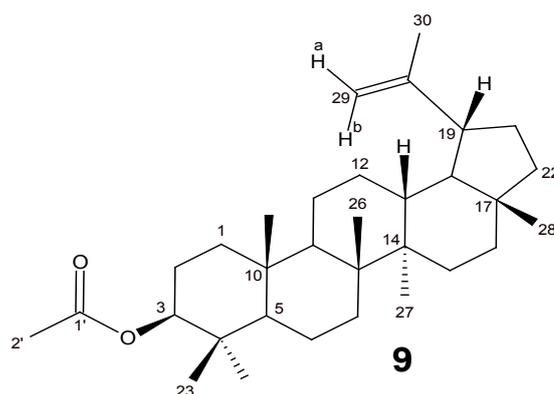


Figura 3.52: Espectros de RMN de (a) ^{13}C e (b) DEPT-135 de **8** (CDCl_3 , 100MHz).

Acetato de 3 β -lup-20(29)-en-3-ila (9)

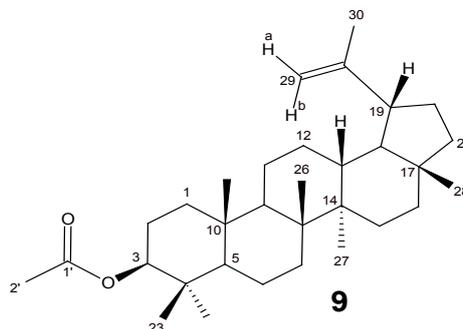
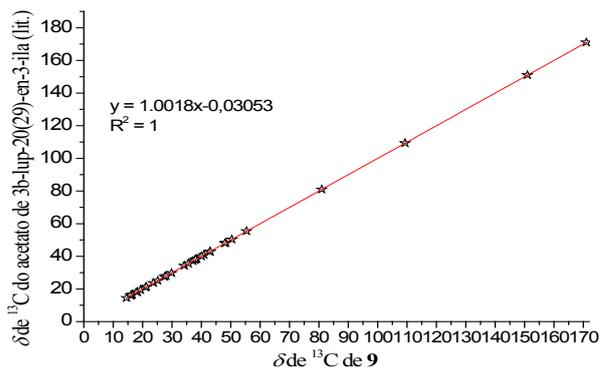


O composto **9** foi isolado de frações do extrato hexânico (FHEMA) na forma de um sólido branco amorfo que, após recristalização com metanol, fundiu na faixa de temperatura de 198,4 a 199,6 °C (172,0-174,9 °C)²⁵ e forneceu resultado positivo para TTPC quando submetido ao teste químico de Liebermann-Burchard.⁷⁸ Foi observado na literatura que o valor do ponto de fusão de um mesmo TTPC, isolado de plantas distintas, varia muito de um relato para outro. Isso provavelmente ocorre devido ao grau e à composição de impurezas que normalmente são isoladas juntamente com o TTPC no processo fitoquímico.

Tabela 3.15: Absorções no infravermelho e modos de vibração de **9**

Nº de onda, (cm ⁻¹)	Grupo/fragmento molecular	Modo de vibração
3070	RC=CH ₂	ν C-H
2920-2850	-CH ₂ -; -CH ₃	ν C-H
1735	R-COOR ₁	ν C=O
1640	RC=CH ₂	ν C=C
1455	-CH ₂ -; -CH ₃	δ C-H
1380-1370	Gem-dimetila	δ C-H
1250	R-COOR ₁	ν O-C
1150	R-COOR ₁	ν C-O
880	RC=CH ₂	γ C=C-H

A análise do espectro de **9** na região do infravermelho (Figura 3.53, p.104), permitiu a identificação de um conjunto de bandas características de um éster de triterpeno. As bandas em 1735 e 1250 cm⁻¹ foram atribuídas a estiramentos de carbonila (C=O) e de ligação C-O de éster, respectivamente.⁹⁹ A Tabela 3.15 mostra as bandas observadas e as atribuições de fragmentos moleculares. O conjunto de bandas observadas no espectro do IV em 3070, 2850, 2920, 1735, 1640, 1455, 1380, 1370, 1250, 1150, 1010, 1030, 980 e em 880 cm⁻¹, como um todo, foram confirmadas como bandas características do TTPC 3-O-acetato de lupeóila.²⁵ Mediante a comparação entre os espectros no IV de uma amostra de **9** e de amostra autêntica de 3-O-acetato de lupeóila²⁵ foi constatada a identidade entre ambos os espectros.

Tabela 3.16: Comparação e análise de dispersão entre os dados de RMN de 9 (CDCl₃, 400 MHz) com os respectivos valores publicados para o 3-O-acetato de lupeóla (CDCl₃, 400 MHz)²⁵

9			Acetato de lupeol ²⁵	
NC	δ de ¹³ C	δ de ¹ H	δ de ¹³ C	δ de ¹ H
1	38,42		38,39	1,63 ax, m; 0,98 eq, m
2	23,73		23,71	1,66, m
3	81,00	4,47 (m)	80,98	4,47, m
4	37,82		37,80	
5	55,41		55,00	0,78, m
6	18,23		18,20	1,38 ax, m; 1,50 eq, m
7	34,25		34,21	1,39, m
8	40,88		40,85	
9	50,38		50,34	1,28, m
10	37,11		37,08	
11	20,97		20,94	1,39 ax, m; 1,20 eq, m
12	25,14		25,10	1,64 ax, m; 1,09 eq, m
13	38,08		38,04	1,62, m
14	42,85		42,83	
15	27,46		27,43	1,65 ax, m; 0,99 eq, m
16	35,60		35,57	1,38 ax, m; 1,42 eq, m
17	43,02		43,00	
18	48,32		48,29	1,36, m
19	48,03	2,37 (dt, 5,8 e 11,0)	48,01	2,36 (dt, 5,8 e 10,9)
20	150,97		150,97	
21	29,87		29,83	1,91 ax, m, 1,33 eq, m
22	40,02		40,00	1,19 ax, m; 1,31 eq, m
23	27,96	0,85 (s)	27,95	0,84 (s)
24	16,19	0,84 (s)	16,18	0,83 (s)
25	16,51	0,86 (s)	16,49	0,85 (s)
26	16,00	1,03 (s)	15,97	1,03 (s)
27	14,52	0,94 (s)	14,50	0,93 (s)
28	18,02	0,79 (s)	18,00	0,78 (s)
29	109,36	a: 4,57 (m) b: 4,69 (m)	109,35	a: 4,57 (m) b: 4,68 (m)
30	19,31	1,68 (sl)	19,29	1,68 (s)
1'	171,01		171,02	
2'	21,32	2,04 (s)	21,33	2,03 (s)

Os espectros de RMN de ^1H , de ^{13}C e DEPT-135 de **9** (Figuras 3.55 (a) e (b), p.106), registraram um conjunto de sinais em δ 4,57 (m, H-29a), δ 4,69 (m, H-29b), δ 109,36 (C-29), δ 150,97 (C-20), os quais foram atribuídos aos átomos de carbonos e hidrogênios do grupo isopropilideno do esqueleto do lupeol.¹³⁵ Foram observados também sinais de carbono em δ 171,01 (C=O) e δ 21,32 (CH_3), bem como o sinal de hidrogênio em δ 2,04 (Me-2'), atribuídos a um grupo acetila esterificado em C-3. O espectro de RMN de ^1H (Figuras 3.54, p.105) também apresentou um sinal em δ 4,47 (m, H-3), atribuído ao hidrogênio carbinólico da molécula. As ressonâncias dos hidrogênios de sete grupos metilas de um esqueleto lupânico foram observadas em δ 0,79 (s, Me-28); 0,84 (s, Me-24); 0,85 (s, Me-23); 0,86 (s, Me-25); 0,94 (s, Me-27); 1,03 (s, Me-26) e 1,68 (sl, Me-30). Múltiplos sinais na região de δ 1,2 a 1,9 foram atribuídos a hidrogênios de grupos metilenos e metinos pertencentes à estrutura de um triterpeno pentacíclico lupânico.¹³⁹ O espectro de RMN de ^{13}C e DEPT-135 de **9** (Figuras 3.55 (a) e (b), p.106) apresentaram trinta e dois sinais de carbono-13, sendo oito metilas, seis metinos, onze metilenos e sete sinais de carbonos não hidrogenados. A comparação entre valores observados dos espectros de RMN de ^{13}C de **9** e os valores relatados na literatura (Tabela 3.16, p.103) apresentaram coeficiente de correlação unitária ($R = 1$).²⁵

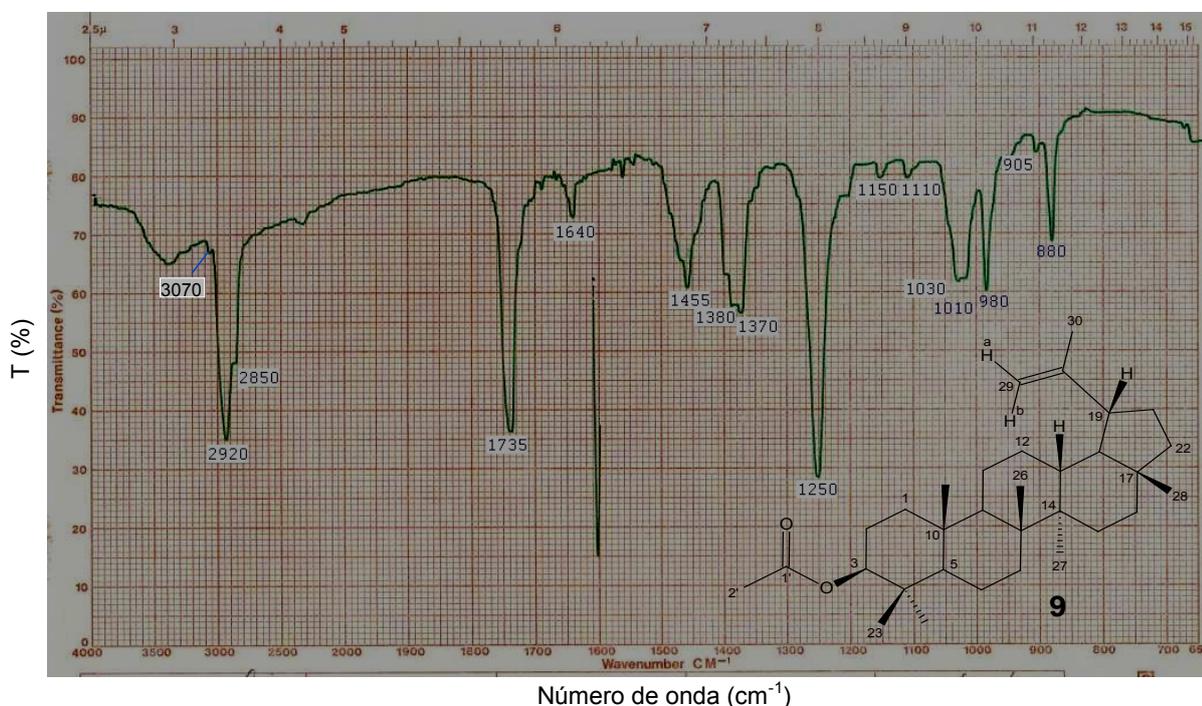


Figura 3.53: Espectro de absorção de **9** na região do IV (KBr).

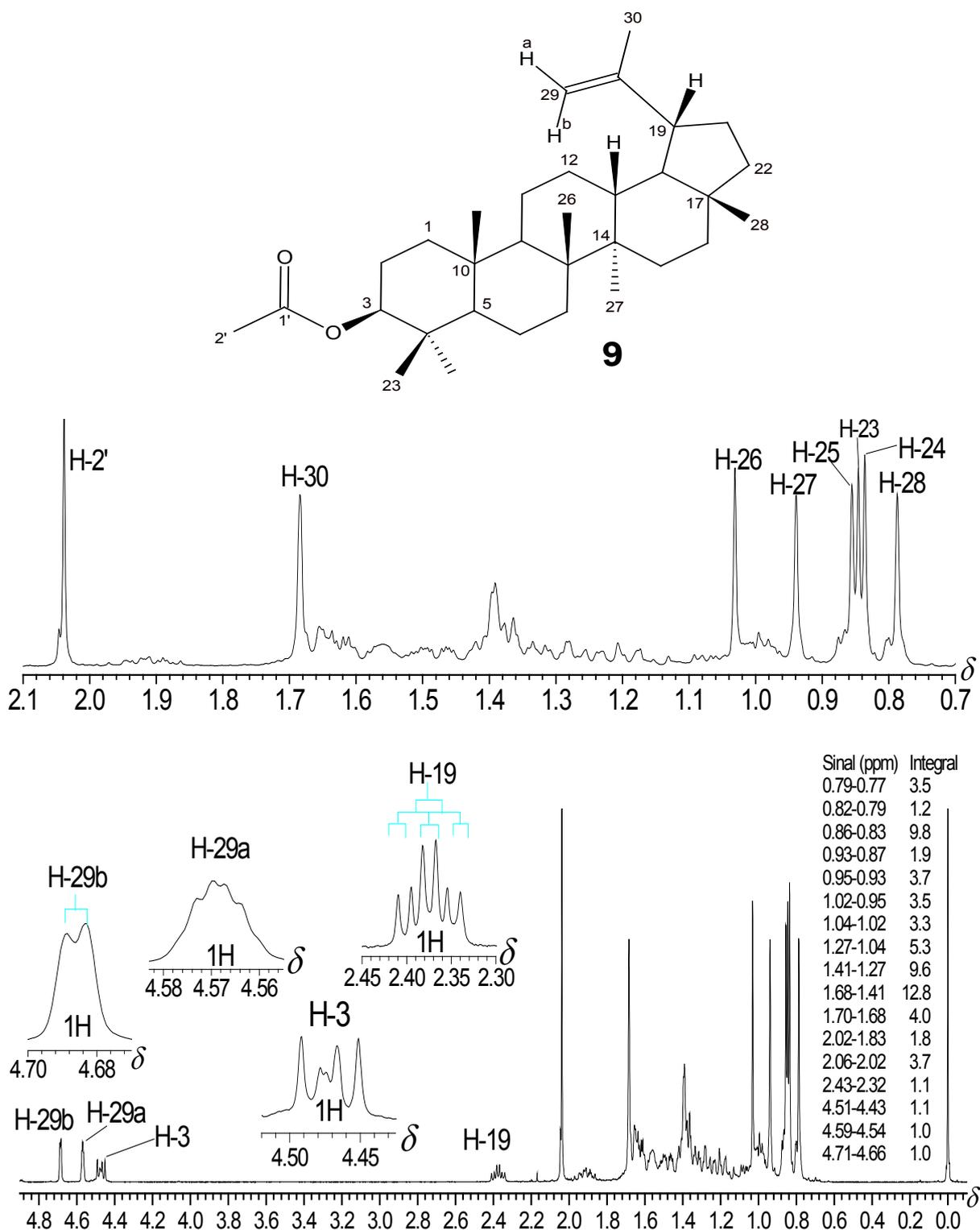


Figura 3.54: Espectro de RMN de ^1H de **9** (CDCl_3 , 400 MHz).

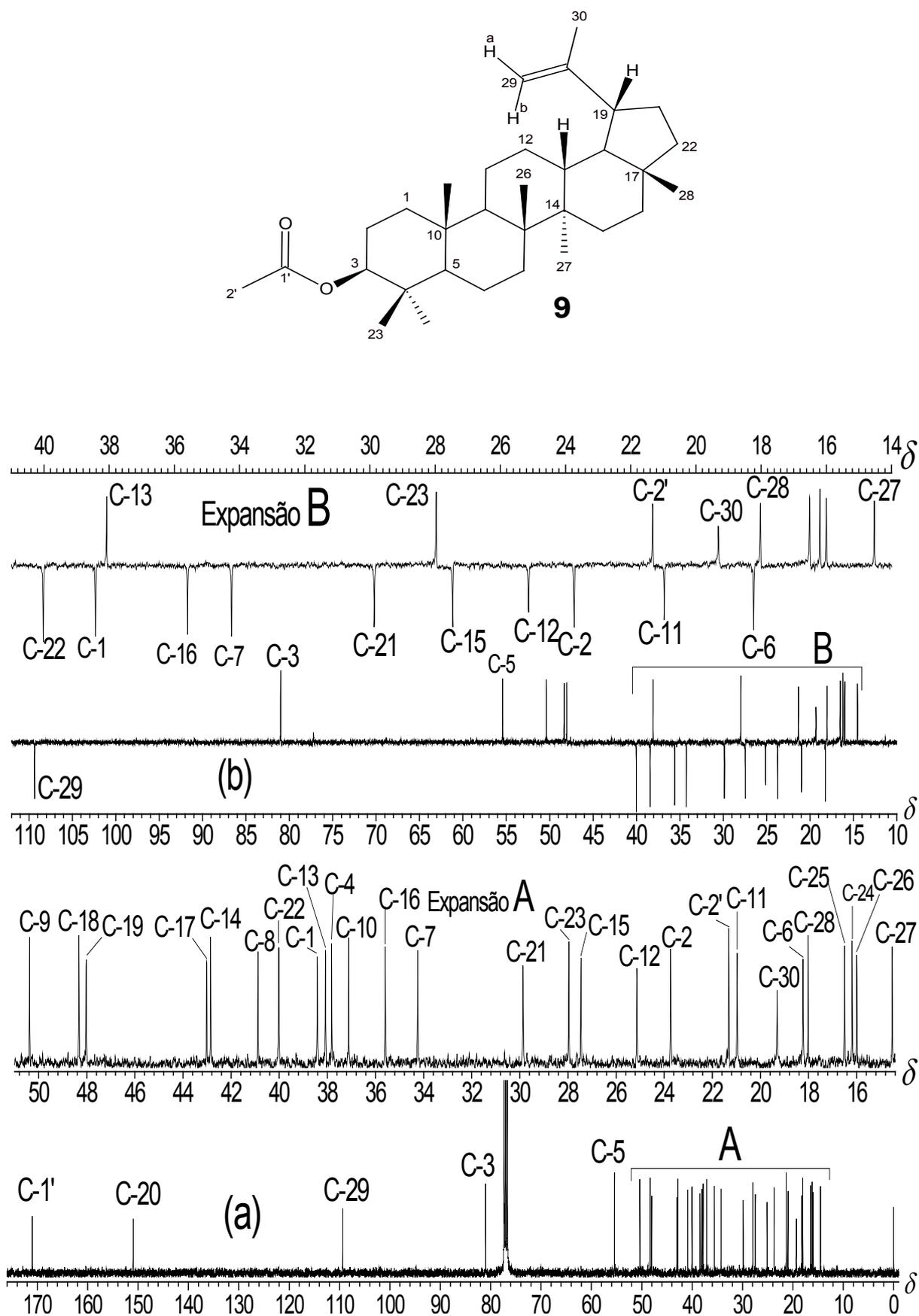
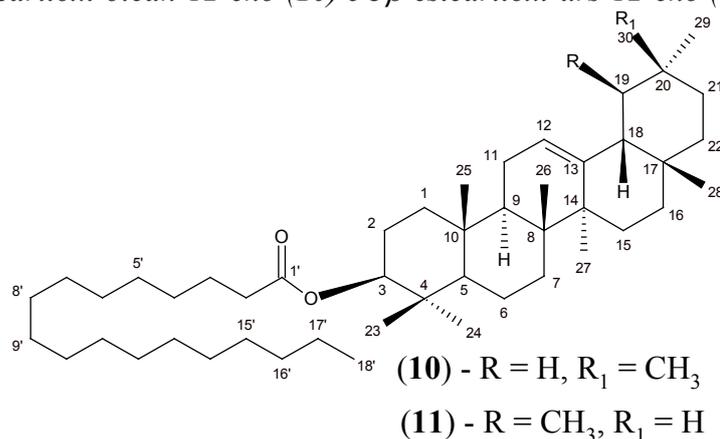


Figura 3.55: Espectros de RMN (a) de ^{13}C e (b) DEPT-135 de **9** (CDCl_3 , 100MHz).

Mistura de 3β-esteariloxi-olean-12-eno (10) e 3β-esteariloxi-urs-12-eno (11)

A fração (F16) que originou a mistura dos constituintes **10** e **11** foi isolada do extrato FHEMA como um material branco transparente, pastoso, com resultado positivo no teste para TTPC's (Liebermann-Burchard).⁷⁸ Subseqüentemente, esse material foi identificado como uma mistura dos compostos 3β-esteariloxi-olean-12-eno (**10**) e 3β-esteariloxi-urs-12-eno (**11**).

O espectro na região do infravermelho da mistura (Figura 3.56, p.109) apresentou bandas em 2900 e 2850 cm⁻¹, que são características de deformações axiais de C-H de grupos CH₂ e CH₃, respectivamente. A ausência de uma banda de forte intensidade na região de 3200-3700 cm⁻¹ e a ocorrência de bandas em 1260 e 1734 cm⁻¹, referentes às deformações axiais de C=O e C-O-C, respectivamente, indicaram a presença de éster alifático. As bandas em 1470 e 1380 cm⁻¹ foram atribuídas à deformação angular de C-H de grupos metilas e gem-dimetilas, respectivamente.⁹⁹

Os espectros de RMN de ¹³C (Figura 3.58, p.110) e DEPT-135 (Figura 3.59, p.110) apresentaram quatro sinais de carbonos olefinicos, típicos das ligações duplas endocíclicas (Δ¹²) da β-amirina (δ de ¹³C 121,65 e 145,19) e da α-amirina (δ de ¹³C 124,33 e 139,62).⁹⁶ Os correspondentes sinais de hidrogênios olefinicos em δ 5,13 (t, J=3,35 Hz, 1H) e 5,18 (t, J=3,40 Hz, 1H) foram detectados no espectro de RMN de ¹H (Figura 3.57, p.109). No espectro de RMN de ¹³C o sinal em δ 173,66 e outro em δ 80,57, foram atribuídos a carbonos carbonílicos e a carbonos hidroxilados, respectivamente. O sinal de carbono mais intenso, em δ C 29,71, foi atribuído a carbonos metilênicos de cadeias alifáticas longas. As semelhanças entre os dados de RMN de **10** e **11** e os dados publicados por Vieira Filho¹²⁸ e Miranda³³ permitiram caracterizar como uma mistura constituída pelos ésteres 3β-esteariloxi-olean-12-eno (**10**) e 3β-esteariloxi-urs-12-eno (**11**). A Tabela 3.17 (p.108) apresenta as atribuições dos

dados experimentais de RMN de ^{13}C para esses dois ésteres triterpênicos, e os gráficos de dispersão entre os valores de δ de ^{13}C observados e os valores da literatura.^{33, 128} Os gráficos de dispersão apresentaram valores de correlação próximos da unidade ($R^2_{(10)} \approx R^2_{(11)} = 1$), o que indicou que os dados de RMN de ^{13}C de **10** e **11** e os respectivos valores apresentados na literatura apresentam identidade.

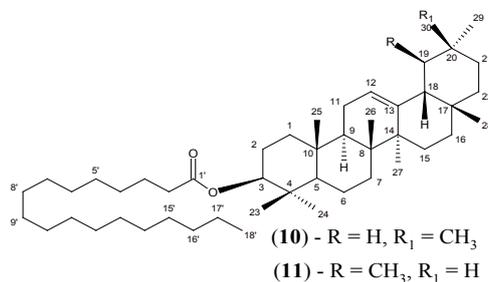


Tabela 3.17: Comparação e análise de dispersão entre os valores de δ de ^{13}C de **10** e **11** (CDCl_3 , 100 MHz) com os respectivos valores publicados para os compostos 3β -esteariloxi-olean-12-eno e 3β -esteariloxi-urs-12-eno (CDCl_3 , 100 MHz)^{33, 128}

C	δ de ^{13}C		δ de ^{13}C		CL estearila		
	10	11	10	11			
1	38,26	38,45	16	26,94	26,61	1'	173,66
2	23,37	23,64	17	32,48	33,74	2'	34,85
3	80,58	80,57	18	47,56	59,07	3'	25,17
4	37,75	37,75	19	46,79	39,62	4'	29,18
5	55,27	55,23	20	31,08	39,65	C	29,26
6	18,25	18,25	21	34,72	31,25	6'	29,36
7	32,60	32,87	22	37,15	41,54	7'	29,58
8	39,81	40,03	23	28,06	28,09	8'	29,67
9	47,64	47,64	24	16,77	16,81	9'	29,67
10	36,85	36,80	25	15,54	15,72	10'	29,83
11	23,53	23,64	26	16,87	16,81	11'	29,70
12	121,65	124,33	27	25,95	23,24	12'	29,70
13	145,19	139,62	28	28,39	28,74	13'	29,70
14	41,72	42,08	29	33,33	17,49	14'	29,66
15	26,14	26,59	30	23,69	21,38	15'	29,47
						16'	31,92
						17'	22,69
						18'	14,11

CL: cadeia lateral. Fonte: Espectros de RMN ^{13}C /DEPT-135 (p.110)

No espectro de RMN de ^1H (Figura 3.57, p.109), a integração dos sinais de hidrogênio na região entre δ 0,77 e 1,10, na qual predominam os sinais dos hidrogênios de grupos metilas, o valor relativo da integral foi de 69 H's, enquanto que o valor da integral na região

entre 1,10 e 1,28, onde predominam os sinais dos hidrogênios metilênicos da cadeia lateral, foi de 66 H's. Esses valores da integração dos sinais foram comparáveis ao número de hidrogênios metílicos e metilênicos das moléculas dos TTPC's 3β -esteariloxi-olean-12-eno (**10**) e 3β -esteariloxi-urs-12-eno (**11**), isômeros de fórmula $C_{48}H_{84}O_2$. As integrais dos respectivos sinais de H-12 de **10** e **11** mostraram que a mistura foi obtida na proporção aproximada de 0,4/1 entre o TTPC **10** e **11**.

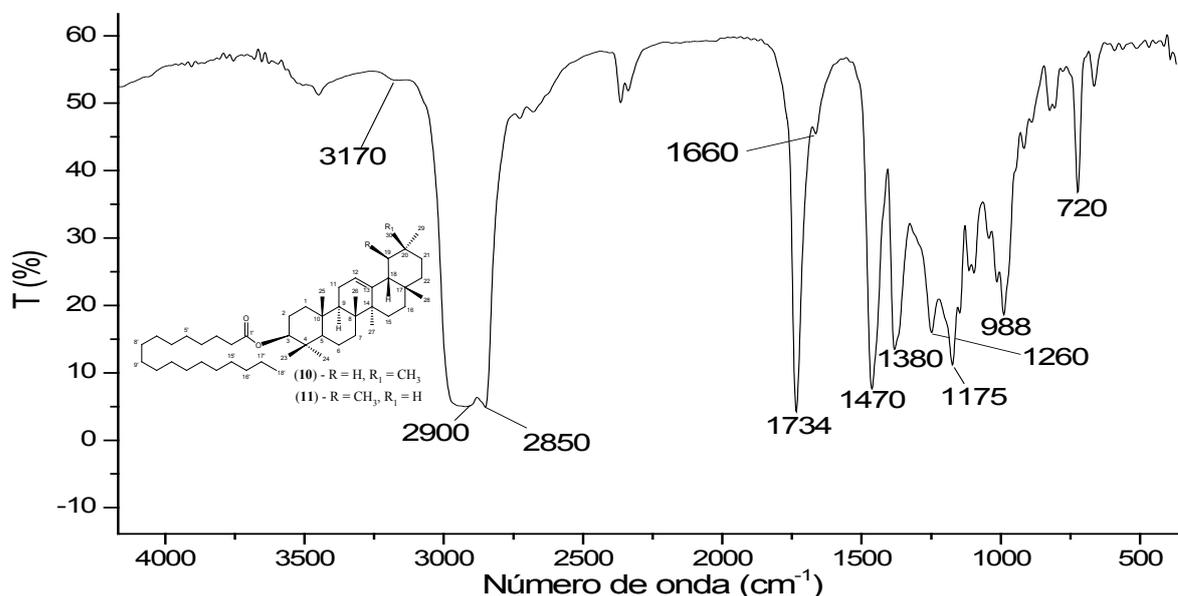


Figura 3.56: Espectro absorção de **10** e **11** na região do infravermelho (Csl).

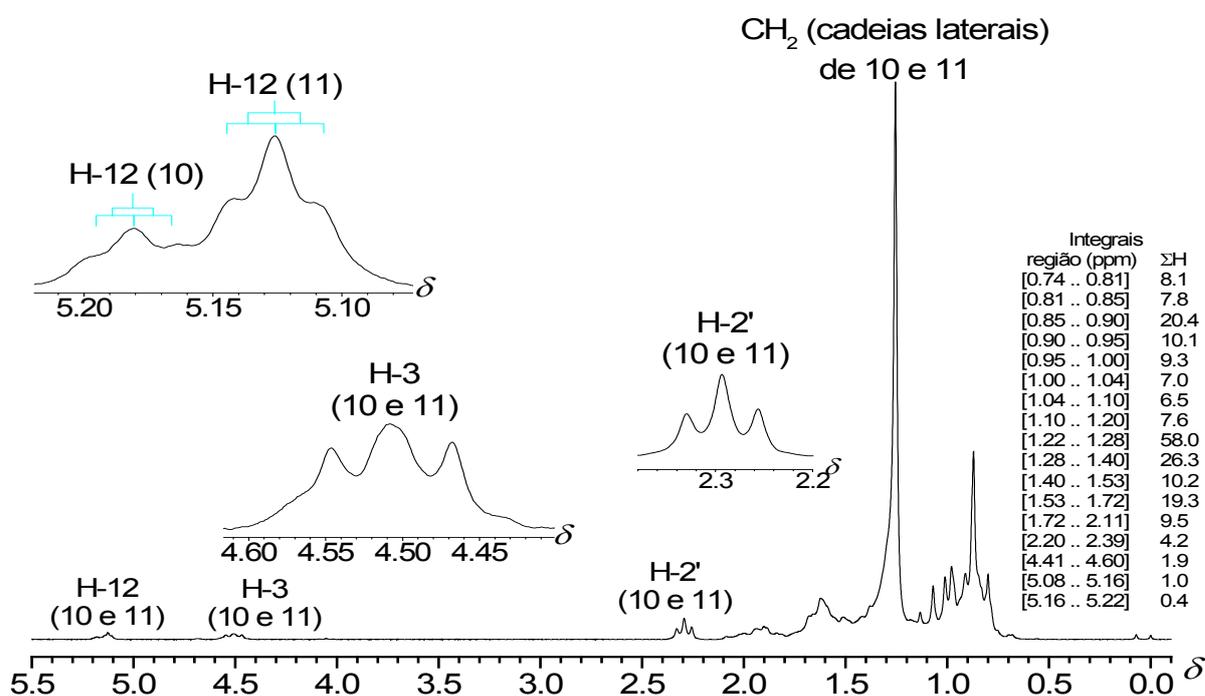


Figura 3.57: Espectro de RMN de ^1H de **10** e **11** (CDCl_3 , 400 MHz).

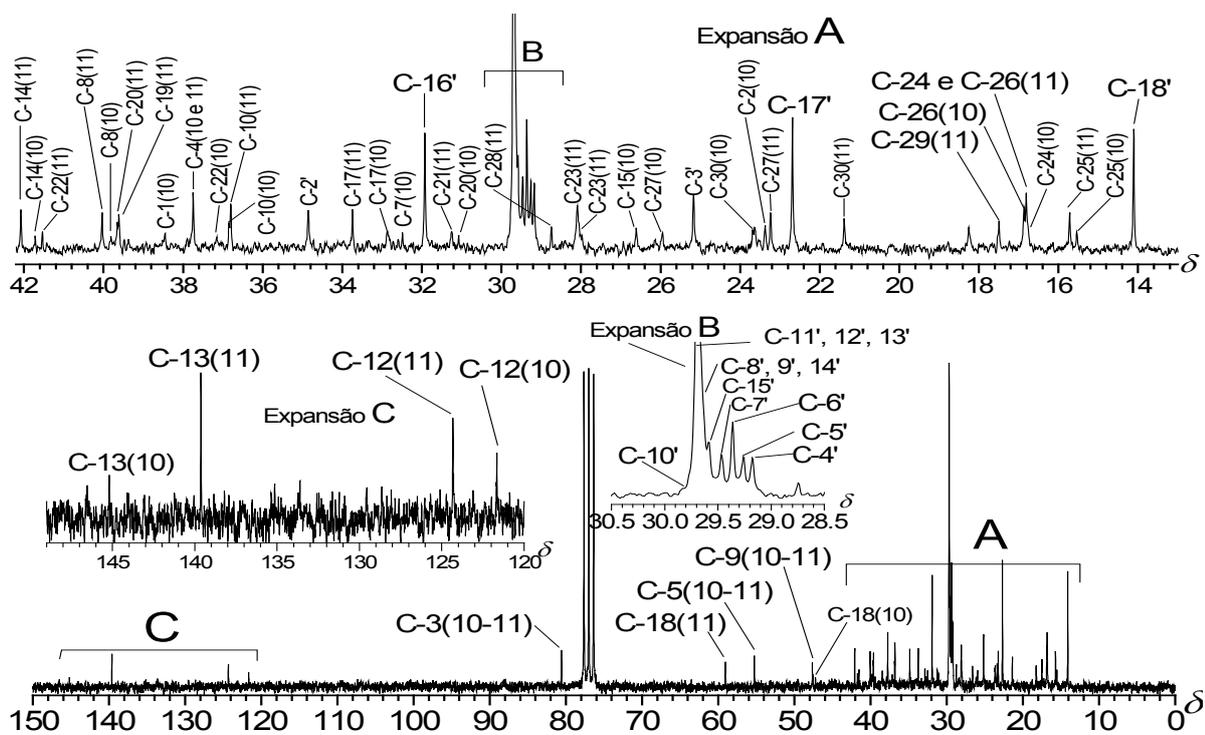


Figura 3.58: Espectro de RMN de ¹³C de **10** e **11** (CDCl₃, 100 MHz).

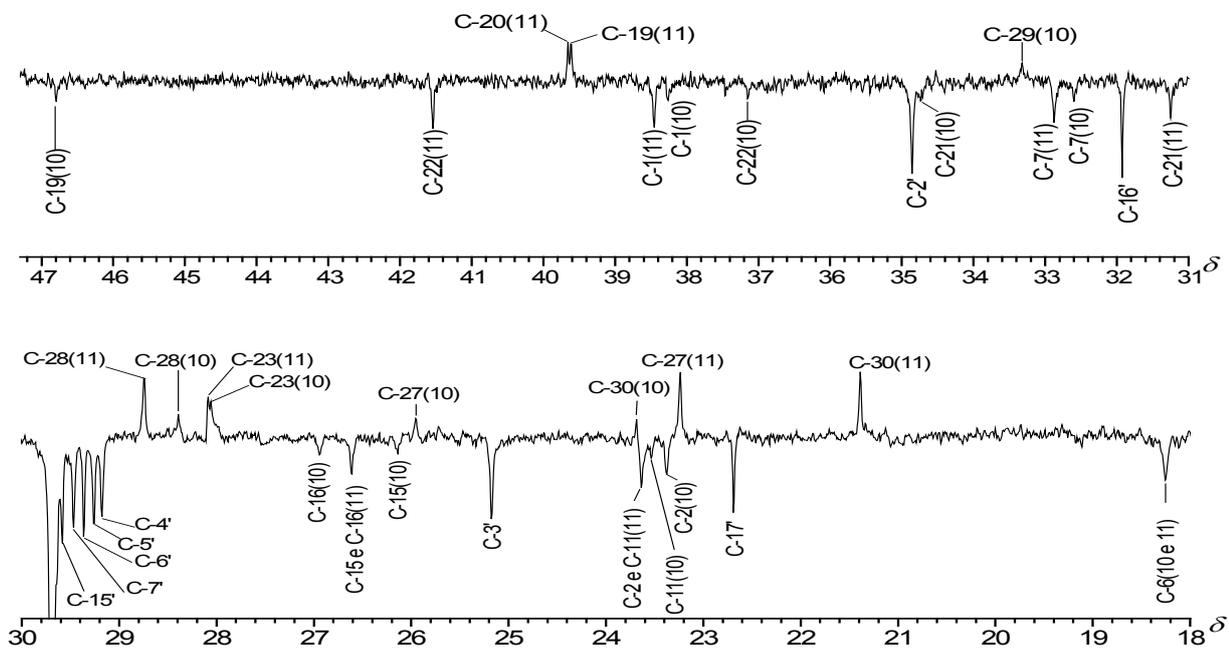
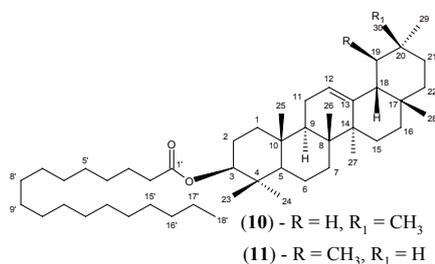
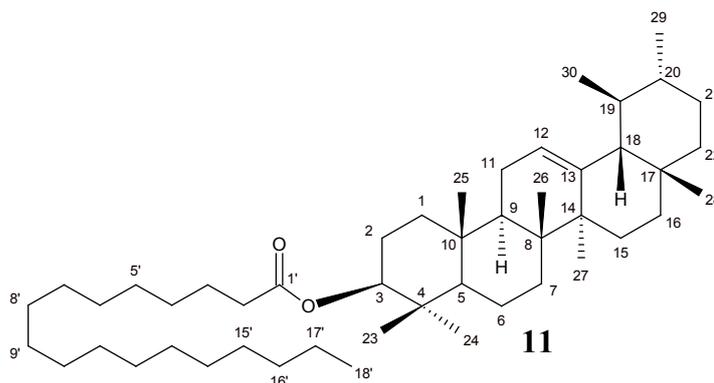


Figura 3.50: Espectro de RMN DEPT-135 de **10** e **11** (CDCl₃, 100 MHz).

3β-esteariloxi-urs-12-eno (11)

O constituinte **11** foi obtido do extrato hexânico (FHEMA) como uma graxa branca (4,3 mg), **11** forneceu resultado positivo para o teste de Liebermann-Burchard⁷⁸ para TTPC (coloração rósea). O espectro de **11** na região do infravermelho (Figura 3.60, p.113) indicou que a amostra analisada se tratava de um éster triterpênico. A presença de uma banda em 1732 cm^{-1} , acompanhada de outra na região entre $1248\text{-}1255\text{ cm}^{-1}$ ($\nu\text{ C-O}$) de baixa intensidade, evidenciaram que **11** se tratava de um TTPC éster derivado de ácido de cadeia longa. Visto que, os ésteres de triterpenos de grupos alcanoílas graxos apresentam as bandas de absorções relacionadas com a vibração da ligação C-O menos intensas do que as bandas correspondentes observadas nos acetatos.⁹⁹

Tabela 3.18: Absorções na região do infravermelho e modos de vibração de **11**

Nº de onda, ν (cm^{-1})	Grupo/fragmento molecular	Modo de vibração
2900-2840	$-\text{CH}_2-$; $-\text{CH}_3$	$\nu\text{ C-H}$
1732	R-COOR_1	$\nu\text{ C=O}$
1470	$-\text{CH}_2-$; $-\text{CH}_3$	$\delta\text{ C-H}$
1380-1370	Dimetil geminal	$\delta\text{ C-H}$
1255	R-COOR_1	$\nu\text{ O-C}$
1175	R-COOCH_2-	$\delta\text{ H-C}$
995-970	$-\text{C=C-H}$	$\gamma\text{ C=C-H}$

Fonte: Espectro no IV de **11** (p.)

A Tabela 3.18 mostra as bandas e os modos de vibração com os respectivos fragmentos moleculares que foram atribuídos a **11**. O espectro no IV de **11** apresentou bandas em 2840, 2900, 1732, 1460, 1380, 1370, 1255, 1100, 995 e 970 cm^{-1} . Ao ser comparado com o espectro de uma amostra autêntica do éster *3β*-alcanoiloxi-urs-12-eno, uma excelente concordância é observada, principalmente na região de impressão digital.²⁵

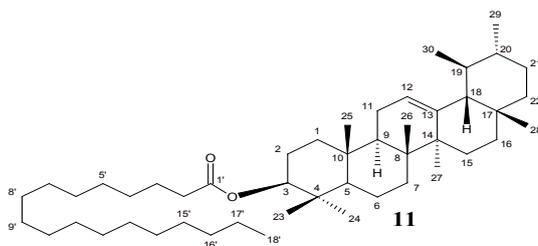
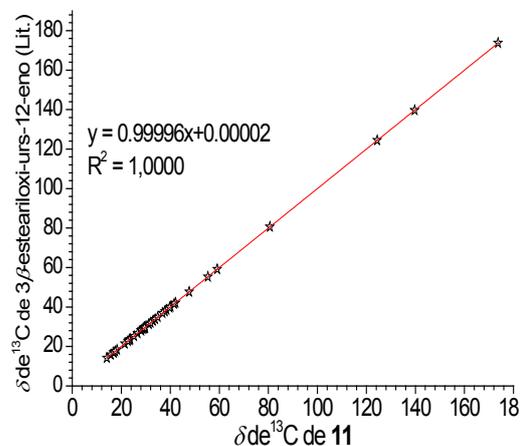


Tabela 3.19: Comparação e análise de dispersão entre os valores de δ de ^{13}C e ^1H de **11** (CDCl_3 , 400 MHz) com os respectivos valores publicados para 3 β -esteariloxi-urs-12-eno (CDCl_3 , 400 MHz)^{25, 33}

C	δ de ^{13}C		δ de ^1H		C	δ de ^{13}C		δ de ^1H	
	11	lit. ²⁵	11	lit. ²⁵		11	lit. ²⁵	11	lit. ²⁵
1	38,50	38,51		1,13 ax (m), 1,67 eq (m)	1'	173,70	173,68		
2	23,68	23,68		1,60 (m)	2'	34,90	34,87	2,29 (t: 7,6)	2,29; dd: 7,4; 7,8
3	80,63	80,64	4,51 (m)	4,51, (dd, 10,2; 5,9)	3'	25,20	25,20	1,63 (m)	1,64 (m)
4	37,79	37,77			4'	29,20	29,20	1,25 (m)	1,25 (m)
5	55,32	55,32		0,87 (m)	5'	29,28	29,28	1,25 (m)	1,25 (m)
6	18,29	18,29		1,41 eq (m) 1,52 ax (m)	6'	29,38	29,38	1,25 (m)	1,25 (m)
7	32,92	32,92		1,33 eq (m) 1,55 ax (m)	7'	29,61	29,60	1,25 (m)	1,25 (m)
8	40,09	40,09							
9	47,69	47,69		1,55 (m)					
10	36,85	36,85							
11	23,41	23,41		1,91 (m)	11'	29,66 - 29,66 -			
12	124,38	124,38	5,13 (t, 3,5)	5,12 (t, 3,5)	12'	29,72	29,72	1,25 (m)	1,25 (m)
13	139,67	139,67							
14	42,13	42,13							
15	26,65	26,65		0,96 eq (m) 1,83 ax, (m)	15'	29,49	29,49	1,25 (m)	1,25
16	28,14	28,14		0,87 eq (m) 1,83 ax, (m)	16'	31,95	31,95	1,25 (m)	1,25
17	33,78	33,78			17'	22,71	22,70	1,25 (m)	1,25
18	59,13	59,13		1,31 (m)	18'	14,12	14,12	0,88 (m)	0,87
19	39,69	39,65		0,93 (m)					
20	39,65	39,70		1,31 (m)					
21	31,29	31,29		1,31 eq (m), 1,39 ax (m)					
22	41,58	41,58		1,29 eq (m), 1,46 ax (m)					
23	28,14	28,13	0,87 (s)	0,87 (s)					
24	16,84	16,84	0,87 (s)	0,87 (s)					
25	15,75	15,75	0,98 (s)	0,98 (s)					
26	16,91	16,91	1,01 (s)	1,01 (s)					
27	23,27	23,27	1,07 (s)	1,07 (s)					
28	28,77	28,77	0,80 (m)	0,80 (s)					
29	17,52	17,52	0,80 (m)	0,81 (d)					
30	21,41	21,40	0,91 (d: 7,0)	0,90 (d)					



Fonte: Espectros de RMN 1D de **11** (p.109-110).

Os espectros de RMN 1D (^1H e $^{13}\text{C}/\text{DEPT-135}$) de **11**, mostrados nas Figuras 3.62 (a) e (b), p.115), registraram sinais de deslocamentos químicos de ^{13}C em δ 124,38, δ 139,67 e de ^1H em δ 5,13 (t, $J = 3,5$ Hz), atribuídos aos carbonos e hidrogênios da ligação dupla de TTPC's da classe dos ursanos.^{25, 96} Nesses espectros, também foram observados os sinais de carbono carbonílico em δ 173,70 (C=O), bem como o sinal de carbono carbinólico em δ 80,64 (-O-CH-) e o respectivo sinal do hidrogênio em δ 4,51 (m), que caracterizam um grupo éster.²⁵ Multipletos observados na região de δ 1,2 a 1,9, indicaram a presença de hidrogênios metilênicos e metínicos pertencentes à estrutura de um triterpeno pentacíclico. O espectro de RMN de ^{13}C de **11** (Figura 3.61, p.114) apresentou quarenta e cinco sinais de carbono, sendo identificados os sinais de carbono-13 de oito metilas, seis metínicos, vinte e três metilênicos e sete de carbonos não hydrogenados. A comparação entre os valores dos deslocamentos químicos do espectro de RMN de ^{13}C de **11** com os valores relatados na literatura apresentou índice de correlação unitário ($R^2 = 1$) que permitiu concluir que **11** se tratava do composto 3β -esterariloxi-urs-12-eno, isolado anteriormente por Miranda e colaboradores (Tabela 3.19, p.112).²⁵

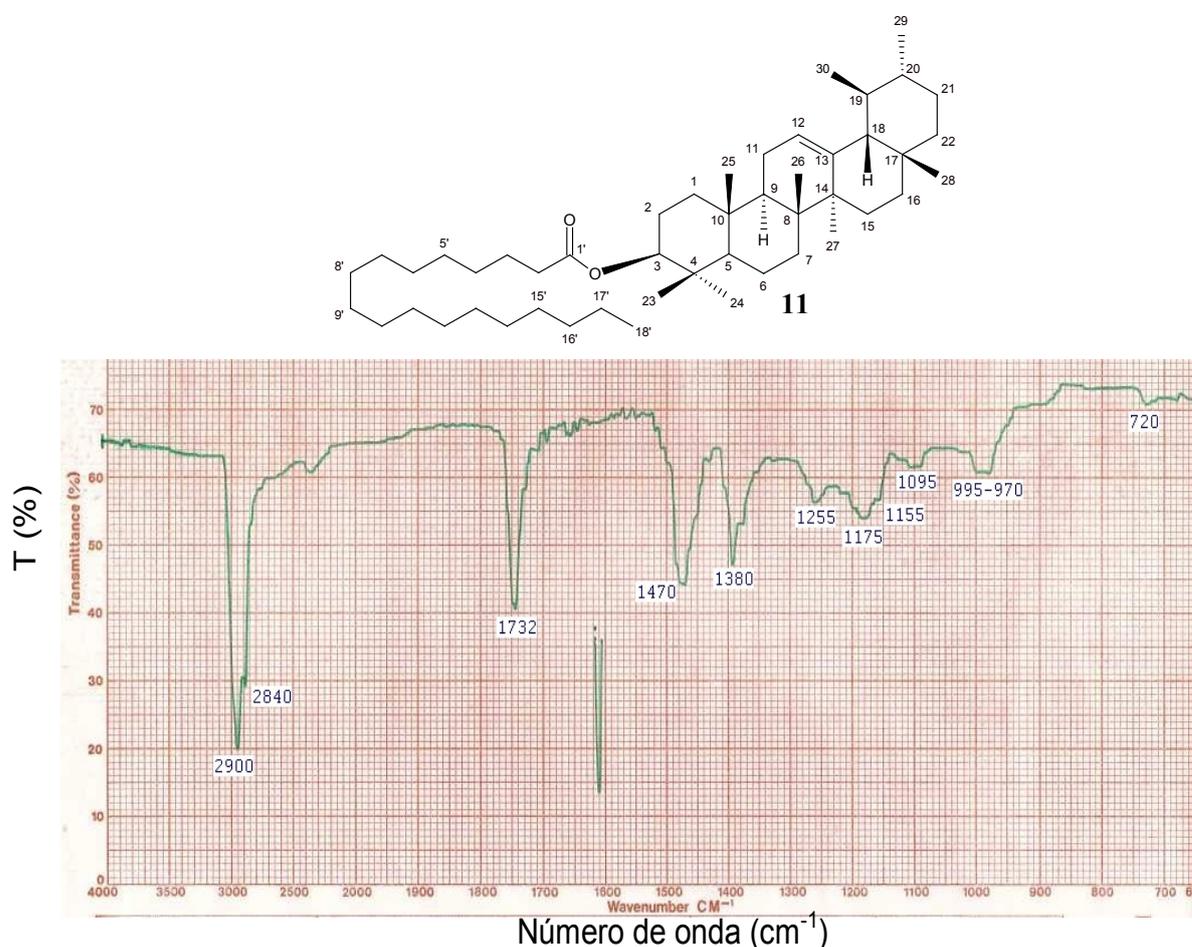


Figura 3.60: Espectro de absorção de **11** na região do IV (NaCl).

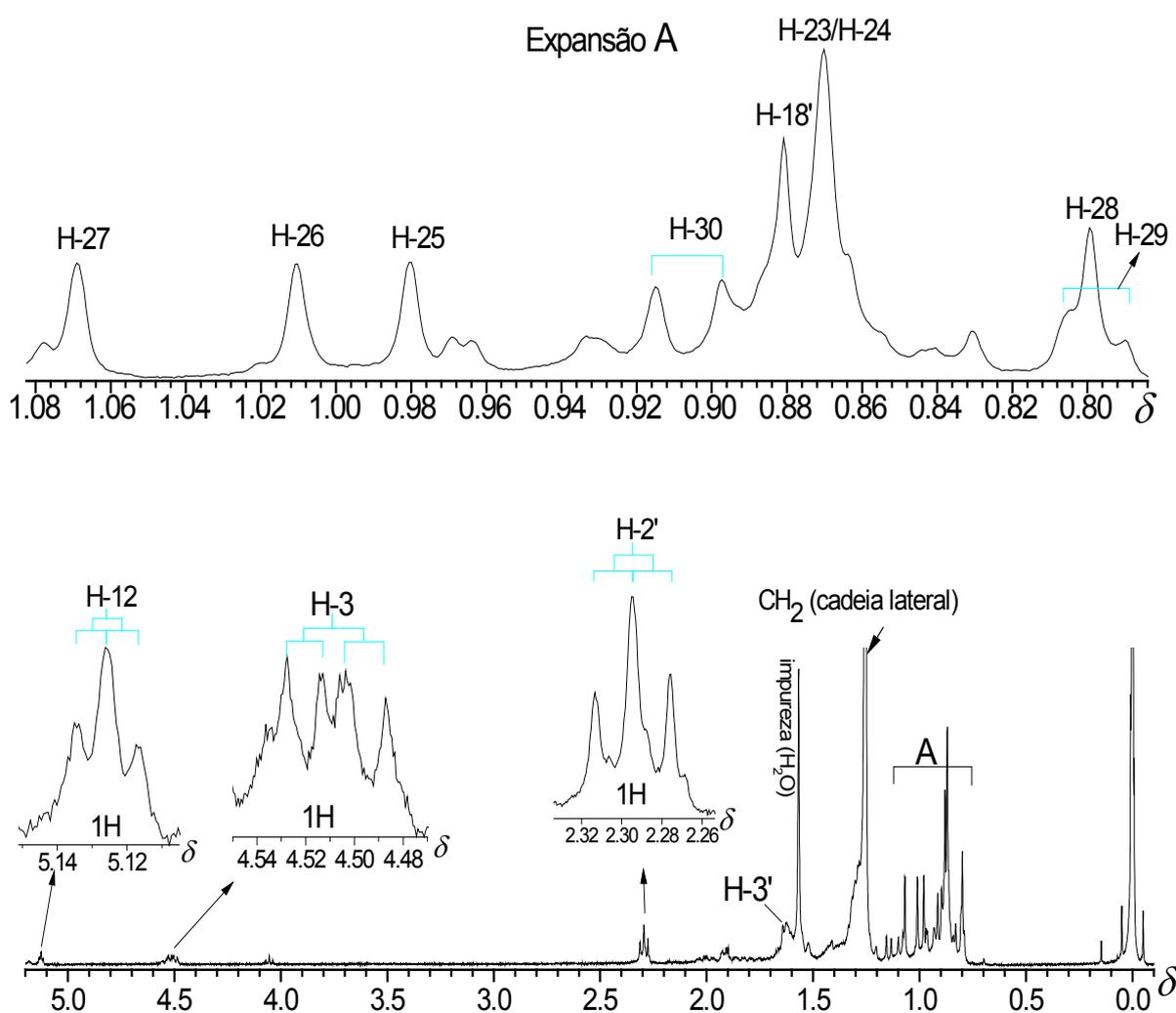
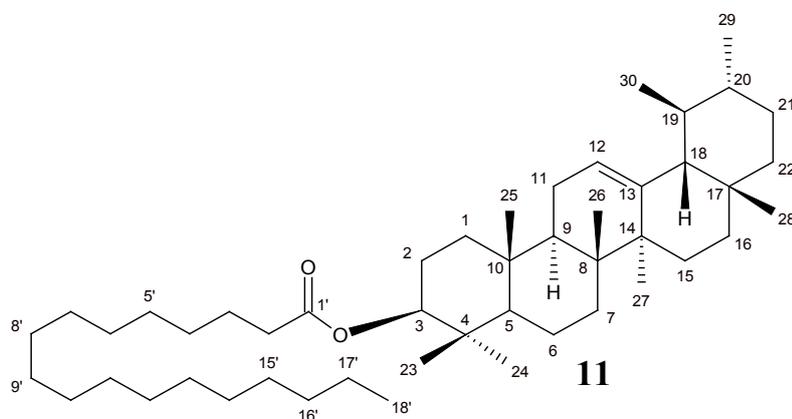


Figura 3.61: Espectro de RMN de ^1H de **11** (CDCl_3 , 400 MHz).

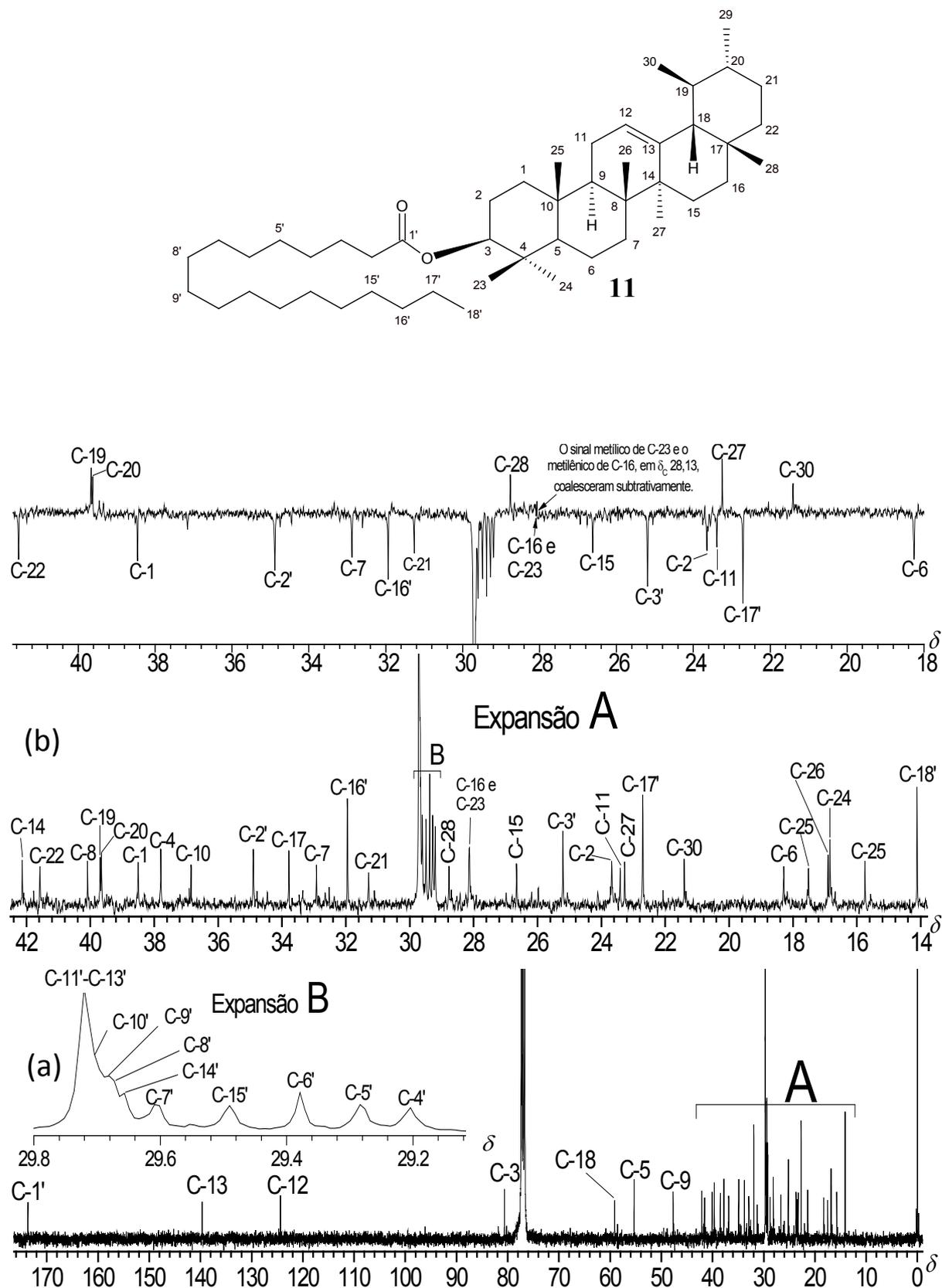
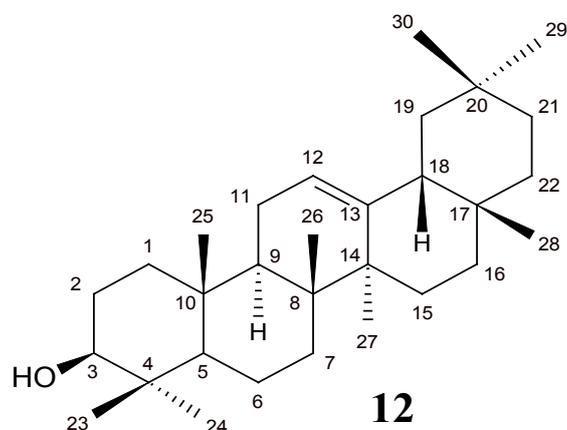


Figura 3.62: Espectros de RMN de (a) ^{13}C e de (b) DEPT-135 de **11** (CDCl_3 , 100MHz).

*β -amirina, 3 β -hidroxi-olean-12-eno (**12**)*

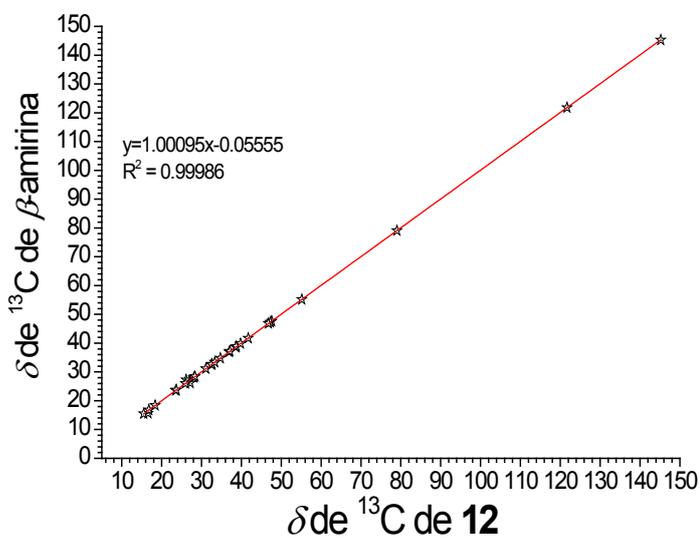
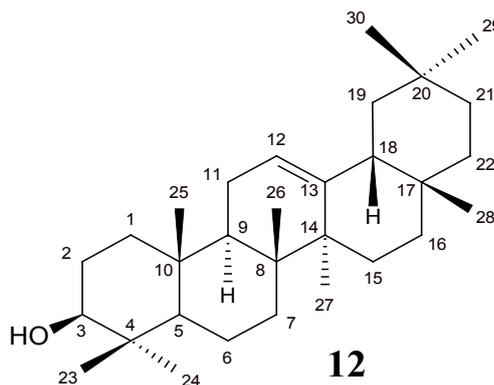
O sólido branco **12** (28,0 mg) foi isolado do extrato FHEMA, apresentou de ponto de fusão entre 189,1-194,6 °C* (196,5-199,0 °C)¹²⁹ e teste positivo para TTPC's (LB+).⁷⁸ Subsequentemente, esse sólido foi identificado como sendo o composto 3 β -hidroxi-olean-12-eno (β -amirina). No espectro na região do infravermelho de **12** (Figura 3.63, p.118), a banda na região entre 3200-3700 foi atribuída a deformações axiais de ligações O-H; as bandas em 2930 e 2850 cm⁻¹, foram atribuídas a deformações axiais de C-H de grupos CH₂ e CH₃, respectivamente. As bandas em 1455 e 1375 cm⁻¹ foram relacionadas à deformações angulares de C-H de grupos metilas e *gem*-dimetila, respectivamente.⁹⁹ Os dados na região do infravermelho e o teste de LB sugeriram a presença de um álcool triterpênico.

Nos espectros de RMN de ¹³C e DEPT-135, Figuras 3.65 e 3.66, p.119, respectivamente, os sinais de carbonos olefínicos em δ 121,72 (CH) e δ 145,19 (C) sugeriram a estrutura do TTPC da série oleanano Δ^{12} , a β -amirina. O correspondente sinal de hidrogênio olefínico em δ 5,18 (t, 3,4 Hz, ¹H) foi registrado no espectro de RMN de ¹H (Figura 3.64, p. 118). A boa correlação entre os dados obtidos e os dados publicados por Duarte,¹²⁹ permitiram caracterizar **12** como a β -amirina (3 β -hidroxi-olean-12-eno, **12**). A Tabela 3.20 (p. 117) apresenta as atribuições dos dados de RMN de ¹³C de **12** e os gráficos de dispersão entre os valores de δ de ¹³C observados e os valores relatados para **12** (coeficiente de correlação R²₍₁₂₎ = 0,99986).

* P.F. diferente da literatura porque a fração foi isolada com impureza de material graxo, como se pode observar nos espectros de RMN (p.113-114).

Tabela 3.20: Comparação e análise de dispersão entre os valores de δ de ^{13}C de **12** (CDCl_3 , 50 MHz) com os respectivos valores publicados para β -amirina (3 β -hidroxi-olean-12-eno) (CDCl_3 , 50 MHz)¹²⁹

δ de ^{13}C			
C	12	C	β -amirina ¹²⁹
1	38,59	1	38,60
2	26,93	2	26,95
3	79,05	3	79,05
4	38,78	4	38,80
5	55,17	5	55,18
6	18,38	6	18,39
7	32,65	7	32,66
8	39,79	8	39,80
9	47,63	9	47,65
10	36,94	10	36,96
11	23,53	11	23,55
12	121,73	12	121,74
13	145,20	13	145,22
14	41,71	14	41,73
15	27,22	15	26,17
16	26,16	16	27,25
17	32,49	17	32,51
18	47,23	18	47,24
19	46,79	19	46,84
20	31,08	20	31,11
21	34,73	21	34,75
22	37,14	22	37,15
23	28,10	23	28,11
24	16,60	24	15,60
25	15,50	25	15,52
26	16,81	26	16,82
27	26,00	27	26,01
28	28,39	28	28,42
29	33,35	29	33,36
30	23,69	30	23,71



Fonte: Espectros de RMN ^{13}C e DEPT-135 (Figuras 3.65 e 3.66, p.119)

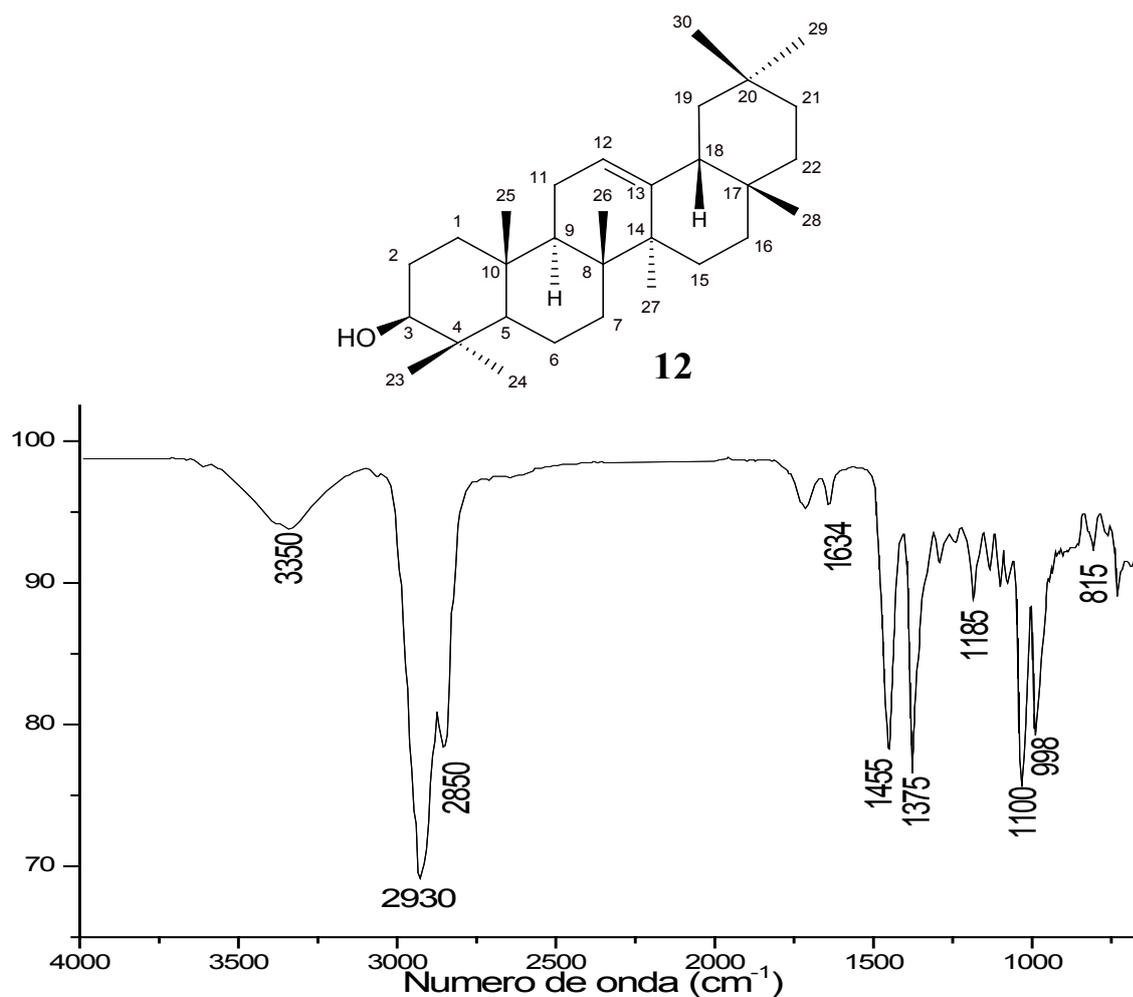


Figura 3.63: Espectro de absorção de **12** na região do infravermelho.

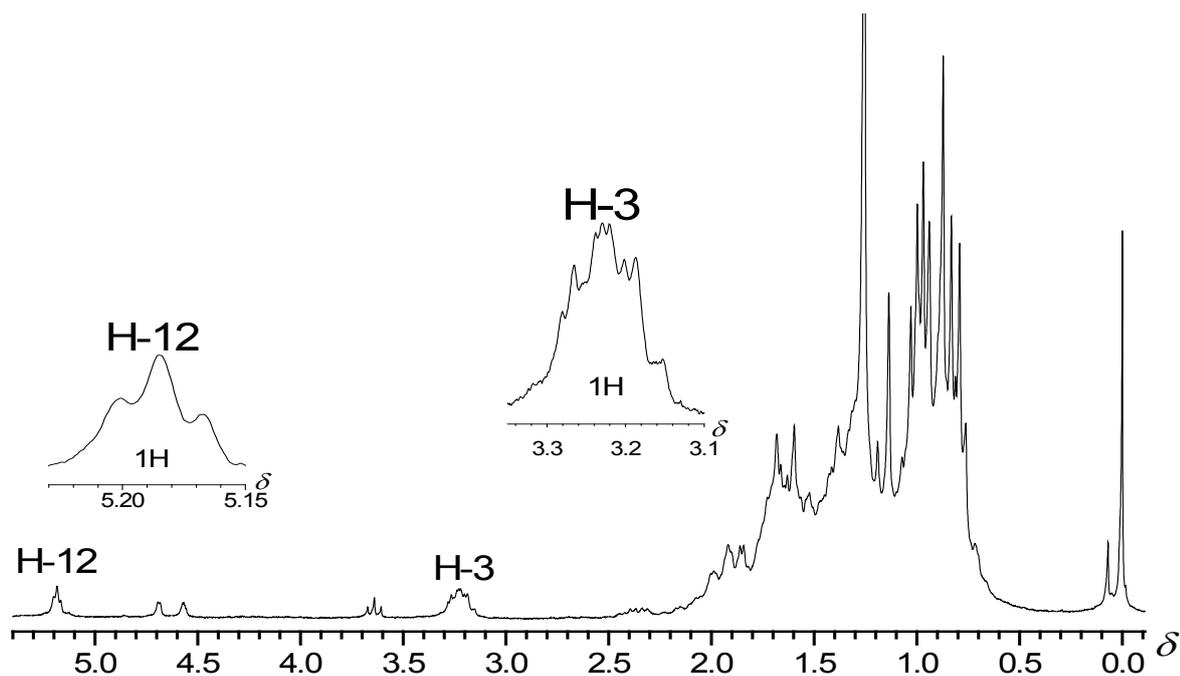


Figura 3.64: Espectro de RMN de ^1H de **12** (CDCl_3 , 200 MHz).

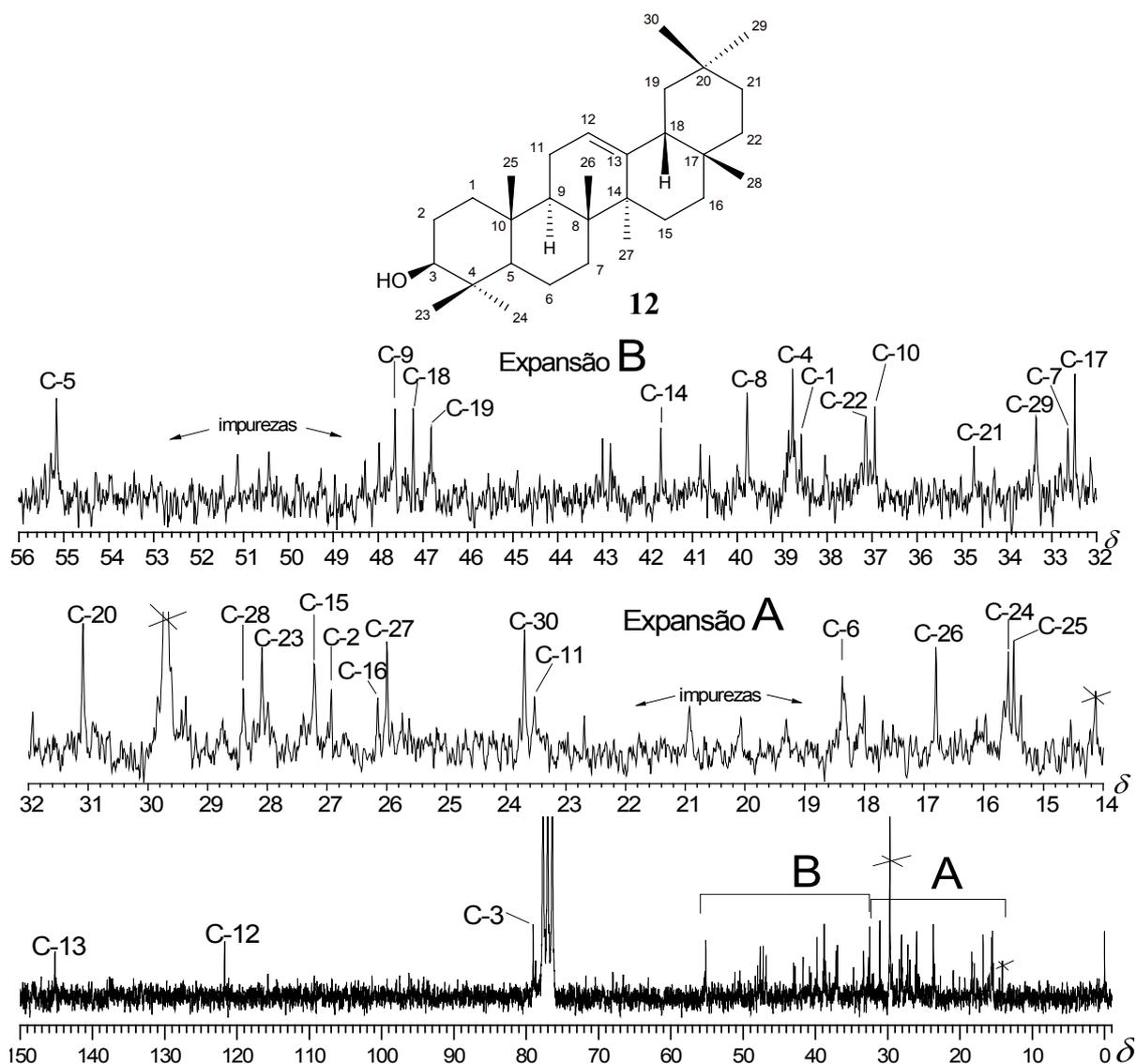


Figura 3.65: Espectro de RMN de ^{13}C de **12** (CDCl_3 , 50 MHz).

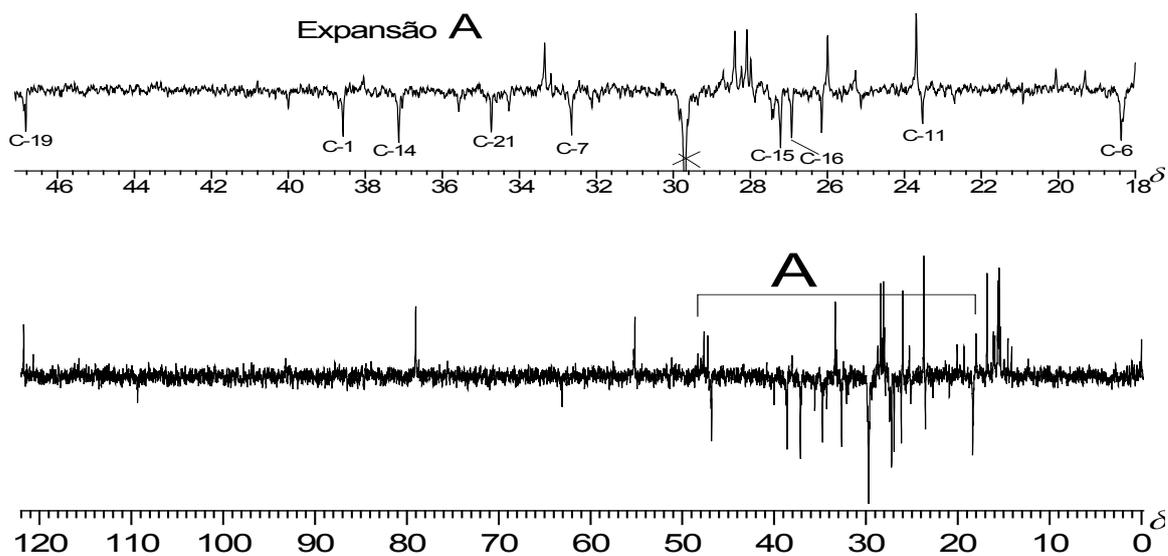
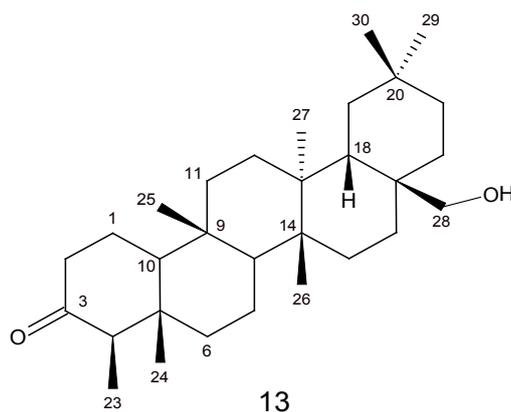


Figura 3.66: Espectro de RMN DEPT-135 de **12** (CDCl_3 , 50 MHz).

28-Hidroxi-3-oxo-friedelano (canofilol, 13)

O material de **13** foi isolado do extrato SHEMA como um sólido branco e amorfo, apresentando temperatura de fusão de 271,6 a 275,9 °C (272-275 °C).¹²⁸ Uma amostra de **13** forneceu resultado positivo para TTPC quando submetida ao teste químico de Liebermann-Burchard.⁷⁸

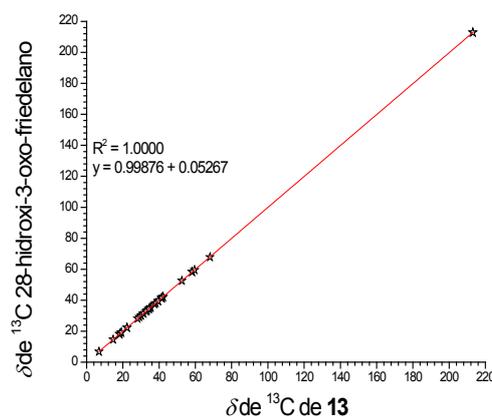
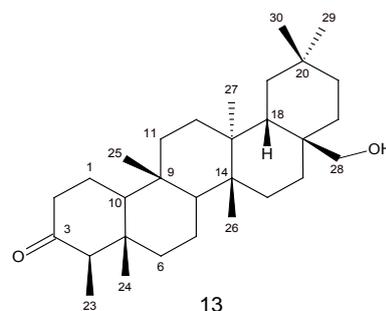
A análise do espectro de **13**, na região do infravermelho (Figura 3.67, p.122), permitiu a identificação de bandas características de um triterpeno pentacíclico duplamente funcionalizado, um TTPC ceto-álcool. Uma banda intensa, centrada em 3400 cm⁻¹ foi atribuída a absorções próprias de estiramentos de ligação O-H de grupo hidroxila de álcool. A evidência da presença de grupo hidroxila de álcool primário foi observada no espectro pela ocorrência de banda em 1055 cm⁻¹. Bandas intensas, em 2860 e 2930 cm⁻¹, associadas às bandas em 1460 e 1390 cm⁻¹, foram atribuídas a estiramentos e deformações, respectivamente, em ligações C-H de grupos metila e metileno. Uma banda de forte intensidade, em 1710 cm⁻¹, foi correlacionada com a absorção característica de carbonila de cetonas cíclicas semelhante a que ocorre na friedelina (**5**). O conjunto de bandas observadas no espectro no IV em 3550, 3400, 3220, 2860, 2930, 1710, 1470, 1460, 1440, 1390, 1365, 1225, 1125 e em 1055 cm⁻¹, foram caracterizadas como bandas do TTPC canofilol.²⁷ A comparação entre as bandas do espectro no IV de **13** com as de um espectro no IV de uma amostra autêntica de 28-hidroxi-3-oxo friedelano (canofilol)¹²⁸ mostrou a mesma identidade espectrométrica.

O espectro de RMN de ¹H de **13** (Figura 3.68, p.122) apresentou seis simpletos em δ 0,72, 0,87, 0,91, 0,98, 0,99, 1,13 e um multipletto em δ 0,88, atribuídos a sete sinais de hidrogênios de grupos metila. Apresentou também um sinal largo em δ 3,63 (sl), atribuído aos hidrogênios diastereotópicos do grupo -CH₂-OH em C-28. A Tabela 3.21 (p.121) mostra a

comparação entre os valores de δ de ^{13}C observados para **13** e os valores relatados para o canofilol isolado por Vieira Filho.¹²⁸

Tabela 3.21: Comparação e análise de dispersão entre os dados de RMN de **13** (CDCl_3 , 400 MHz) com os respectivos valores publicados para o canofilol (CDCl_3 , 400 MHz)¹²⁸

C	13		Literatura ¹²⁸	
	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$
1	22,27		22,27	1,65; 1,98
2	41,51		41,49	2,35
3	213,09		212,88	
4	58,24		58,23	2,28
5	42,11		42,09	
6	41,26		41,29	1,73
7	18,25		18,26	1,50
8	52,51		52,53	1,45
9	37,48		37,49	
10	59,51		59,53	1,53
11	35,45		35,49	1,10
12	30,11		30,13	1,39
13	39,38		39,41	
14	38,17		38,19	
15	31,27		31,44	1,43
16	29,14		29,17	1,93
17	35,18		35,25	
18	39,47		39,49	1,38
19	34,51		34,58	1,05
20	28,16		28,13	
21	31,41		31,50	1,45
22	33,39		33,41	1,42
23	6,82	0,88 (m)	6,80	0,87 d (6,8)
24	14,67	0,72	14,67	0,71
25	18,08	0,87	18,07	0,85
26	19,08	0,91	19,06	0,91
27	19,20	1,13	19,20	1,13
28	68,07	3,63 (sl, w/2 = 3,0 Hz)	67,82	3,65
29	32,84	0,98	32,87	0,97
30	34,26	0,99	34,29	0,99



O espectro de RMN de ^{13}C (Figura 3.69, p.123) apresentou o sinal em δ 68,07, típico de carbono funcionalizado com grupo hidroxila em álcoois alifáticos primários.⁹⁹ Observou-se também o sinal em δ 213,09 de carbono funcionalizado com grupo carbonila, sinal típico de C-3 na estrutura dos ceto-TTPC (cetonas biogénicas).⁹⁶ A análise conjunta dos espectros DEPT-135 (Figura 3.70, p.123) e de RMN de ^{13}C permitiu a identificação de sete sinais de carbono em δ 6,82, 14,67, 18,08, 19,08, 19,20, 32,84 e 34,26, atribuídos a grupos metila; de onze sinais de grupos metilênicos em δ 18,25, 22,27, 29,14, 30,11, 31,26, 31,41, 33,38,

34,51, 35,44, 41,26 e 41,51, e de seis sinais de carbonos não hidrogenados em δ 28,16; 35,18; 37,47; 38,17; 39,38 e 42,17. Foi possível também, a atribuição de mais quatro sinais de carbonos metínicos em δ 39,46, 52,50, 58,23 e 59,56. A Tabela 3.21 (p.121) mostra a comparação entre os sinais de δ de ^{13}C observados de **13** e os valores relatados na literatura para o canofilol¹²⁸ (coeficiente de correlação, $R^2 = 1$).

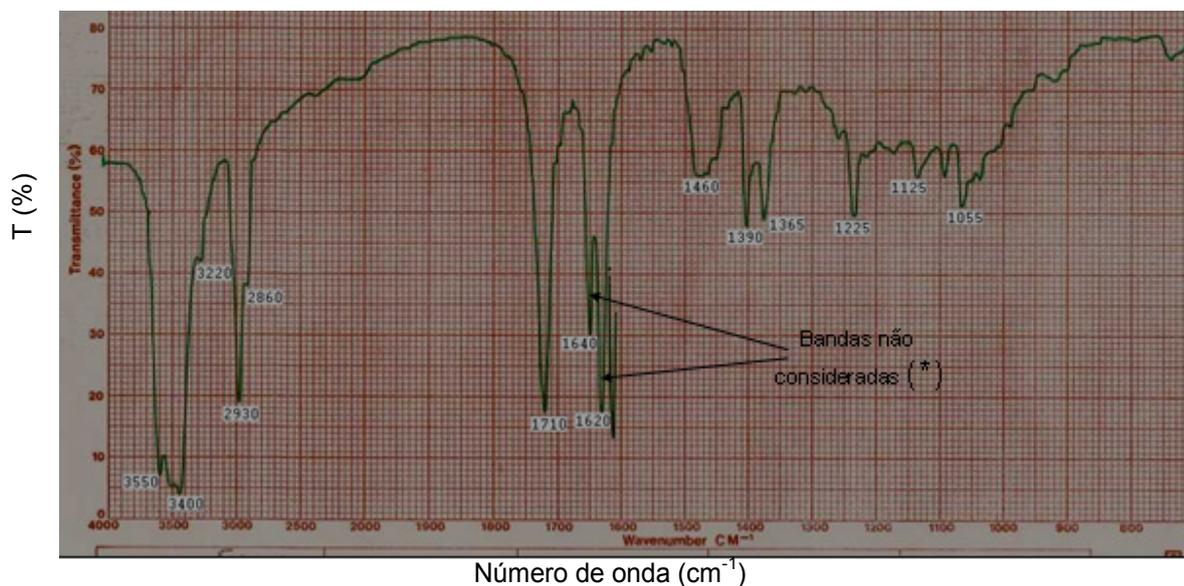


Figura 3.67: Espectro de absorção de **13** na região do IV (KBr).

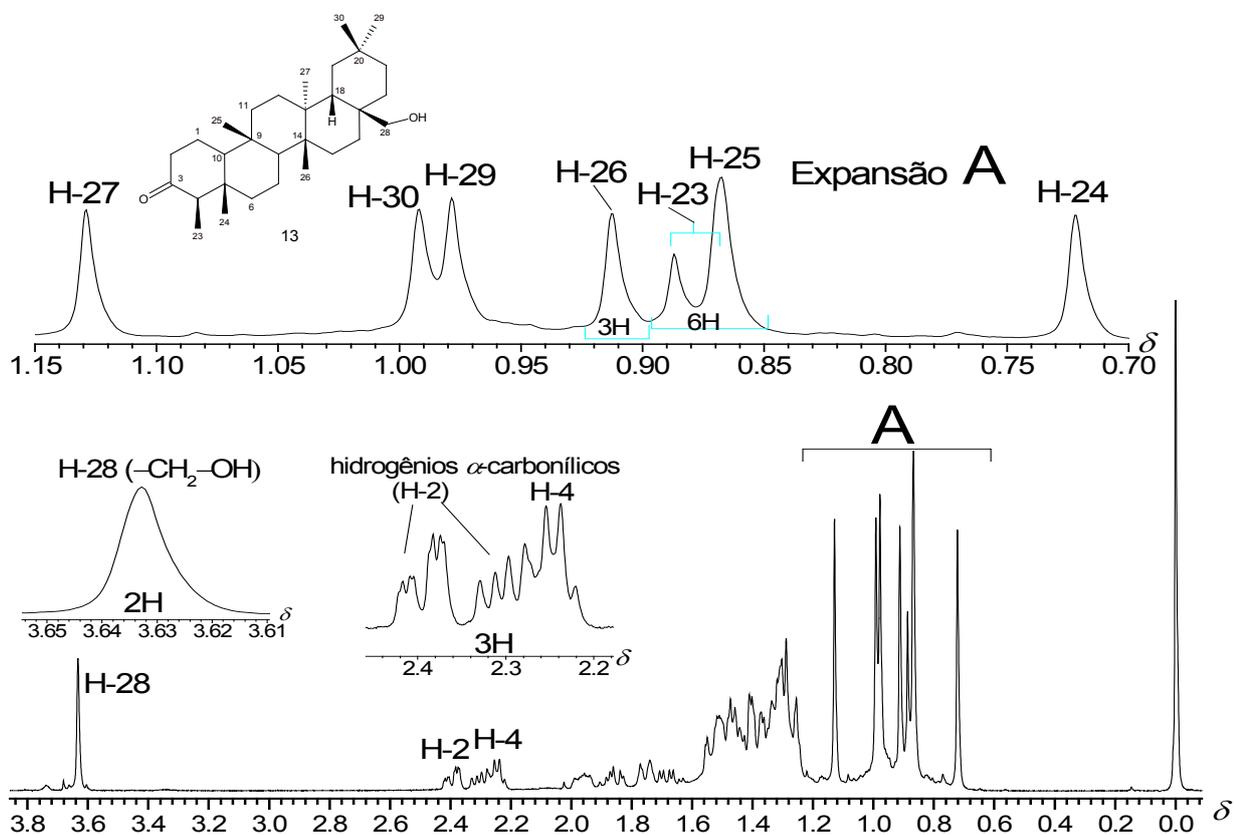


Figura 3.68: Espectro de RMN de ^1H de **13** (CDCl_3 , 400 MHz).

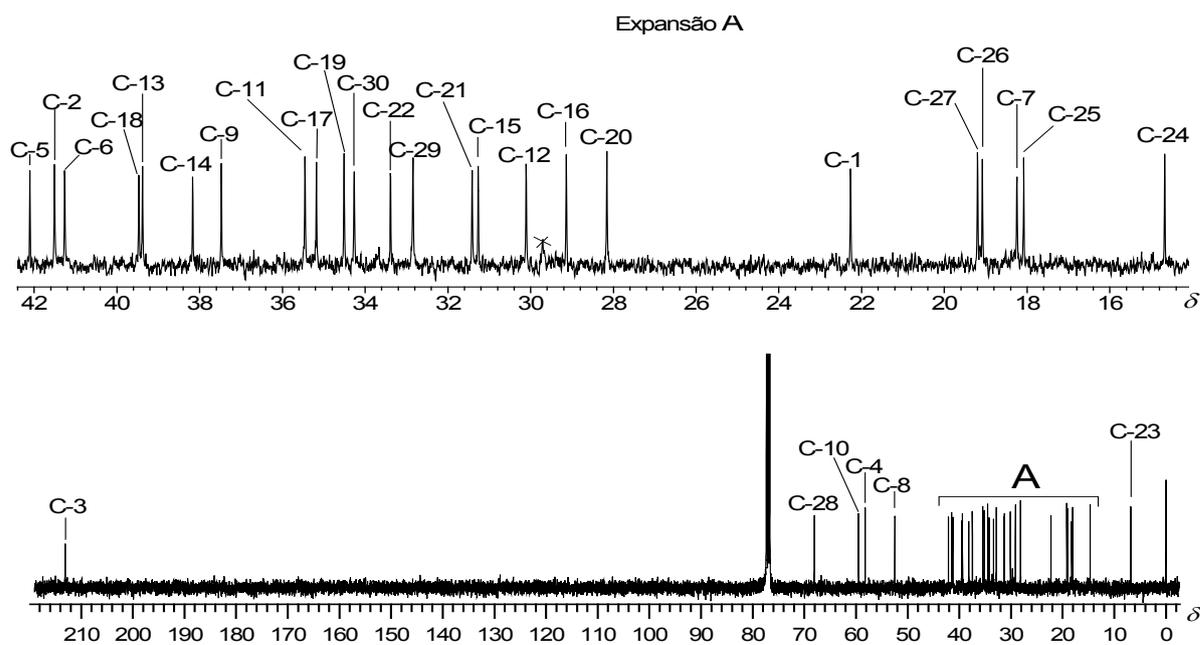


Figura 3.69: Espectro de RMN de ^{13}C de **13** (CDCl_3 , 100 MHz).

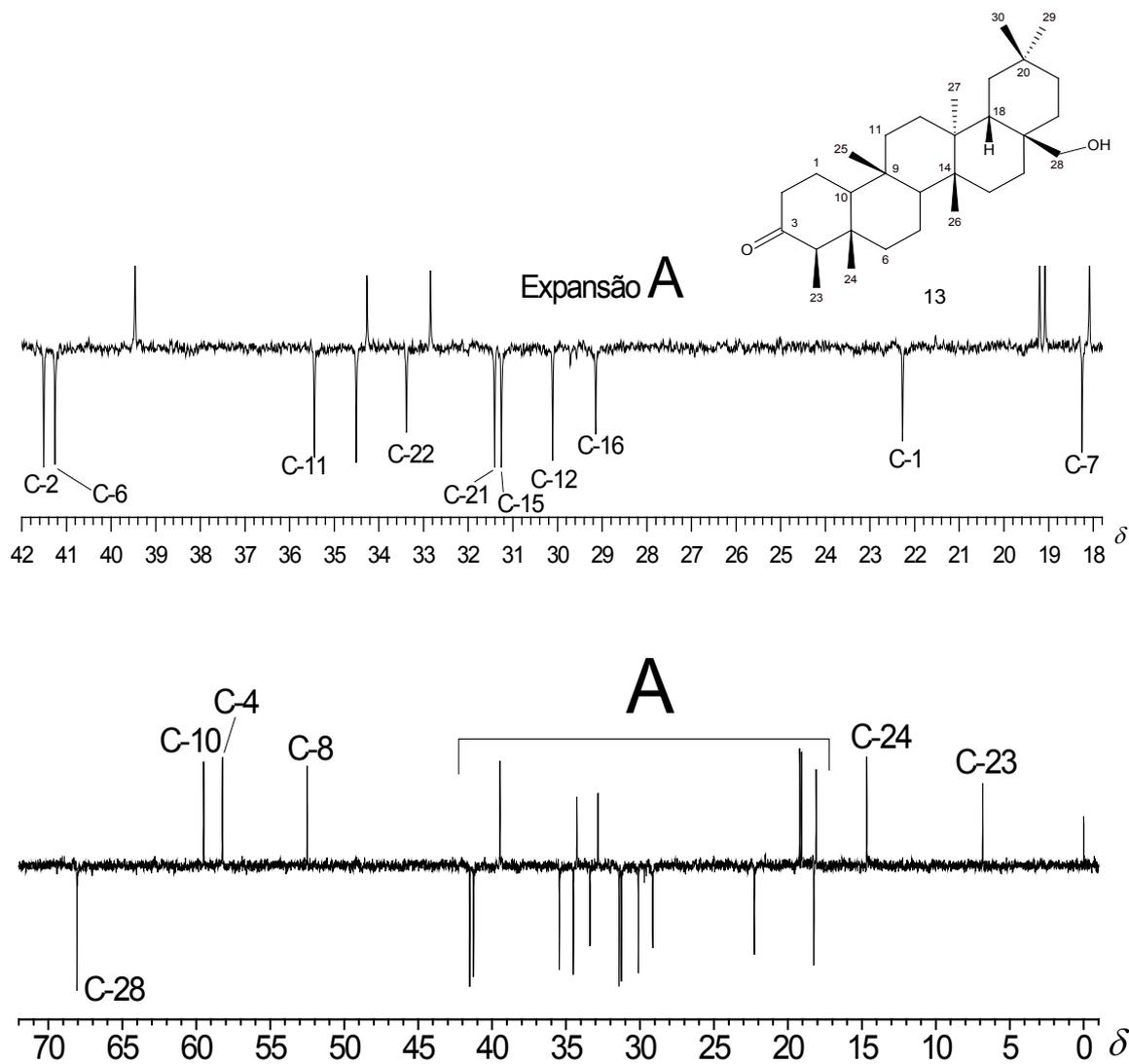
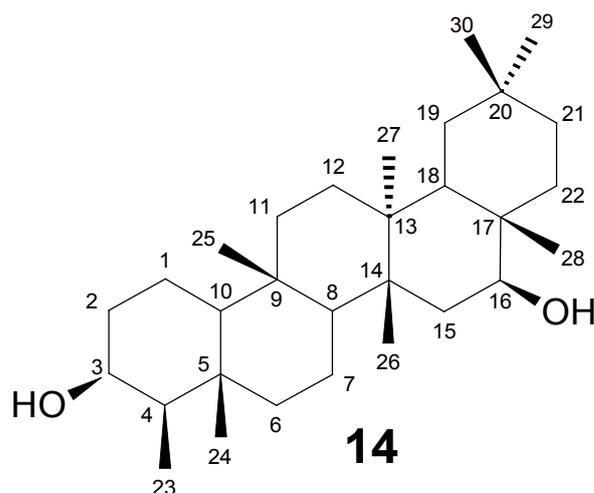


Figura 3.70: Espectro de RMN, DEPT-135 (CDCl_3 , 100 MHz).

3β,16β-di-Hidroxifriedelano (pachysandiol B, 14).

A completa atribuição dos deslocamentos químicos de ^1H e ^{13}C de pachysandiol-B (em solução de CDCl_3) foi realizada com base em dados espectrais RMN 1D (^1H , ^{13}C e DEPT-135) e 2D (HSQC, HMBC e NOESY). A análise conformacional da molécula de pachysandiol B foi baseada em dados de RMN e cálculos HF/6-31G(d) e DFT-B3LYP/6-31G(d,p). Em apoio à interpretação dos dados experimentais de RMN foram calculados os deslocamentos químicos de ^{13}C e ^1H por DFT/6-311++G(2d,p). Combinando cálculos *ab initio* Hartree-Fock [HF/6-31G(d)] e Teoria Funcional de Densidade [DFT/B3LYP/6-31G(d,p)] com dados dos espectros de RMN, foi possível estabelecer a predominância da conformação cadeira-cadeira-cadeira-barco-barco (*cccbb*) para o sistema pentacíclico de **14**, formado por cinco anéis de seis átomos. Os resultados da elucidação estrutural e o estudo conformacional da molécula pachysandiol-B foram publicados na revista científica *Structural Chemistry*.¹⁴⁰

A literatura apresenta vários estudos sobre a elucidação estrutural e conformacional de muitos compostos orgânicos complexos mediante a aplicação de técnicas de RMN combinadas com cálculos *ab initio* HF e DFT. Esses métodos permitem explorar as superfícies de energia potencial (PES) das moléculas e estimar os deslocamentos químicos úteis na interpretação de resultados experimentais. O TTPC *3β,16β-di-hidroxifriedelano* (pachysandiol-B) aqui estudado foi isolado do extrato em hexano das folhas de *Maytenus acanthophylla* Reissek (Celastraceae). Esse composto foi isolado pela primeira vez de *Pachysandra terminalis* (Buxaceae) e os dados referentes ao espectro de RMN de ^1H foram parcialmente atribuídos.¹⁴¹ Os TTPC's da serie friedelano são comumente descritos por possuírem duas conformações preferenciais: um confômero na forma dobrada (F), no qual, todos os cinco anéis estão na conformação de cadeira (*ccccc*); e o confômero estirado (S), no

qual os anéis A, B e C estão em conformação de cadeira, e os anéis D and E estão na conformação de barco (*cccbb*, Figura 3.71, p. 126). De acordo com o modelo de Dreiding, a forma estirada (S) deveria predominar para pachysandiol-B, talvez como consequência do resultado da interação 1,3-diaxial da hidroxila 16 β com a metila vicinal H β -26.¹⁴²⁻¹⁴⁵

Cálculos teóricos: Parâmetros e condições aplicadas

As estruturas de partida dos confôrmeros *cccbb* e *ccccc* do pachysandiol-B foram montadas usando parâmetros geométricos experimentais do 3 β -friedelinol¹³⁶ e metil-3-oxofriedelan-20 α -oato,¹³⁷ respectivamente. As geometrias foram caracterizadas por meio da região de mínimo da curva PES, quando todos os modos vibracionais se tornaram reais, no nível de teoria B3LYP/6-31G(d,p). A diferença de energia entre os dois confôrmeros (ΔG^{total}) foi calculada pela soma de duas partes: energia eletrônica mais energia de repulsão nuclear (ΔE^{ele}), bem como, a correção térmica para a energia livre de Gibbs (ΔG^{therm}). A contribuição térmica na fase gasosa foi avaliada usando formalismo canônico a 298 K.¹⁵⁴ O cálculo de frequências vibracionais harmônicas foi usado para estimar a correção da energia do ponto zero (ZPE) e a correção devido a população térmica dos níveis vibracionais. Os cálculos teóricos dos deslocamentos químicos de hidrogênio e carbono (δ de ^1H e de ^{13}C) foram desenvolvidos por DFT/B3LYP/6-311++G(2d,p), os valores de δ foram obtidos em relação aos correspondentes valores das constantes de blindagem de RMN, calculadas para permitir o ajuste em relação ao valor do TMS (σ de ^1H 31,59 e σ de ^{13}C 177,82). As correlações entre os ângulos de torção endocíclicos (τ_{exp}) dos anéis, obtidas previamente para o cristal de 3 β -acetil-16 β -O-p-bromobenzoilpachysandiol-B¹⁴⁵ e os correspondentes valores calculados (τ_{calc}) para estrutura otimizada por DFT do confôrmero *cccbb*, foram representadas no gráfico de dispersão τ_{exp} versus τ_{calc} na Figura 3.72, p. 126.

Otimizações geométricas e valores de δ de ^1H e δ de ^{13}C calculados

As estruturas otimizadas dos confôrmeros *cccbb* e *ccccc* de pachysandiol-B são mostradas na Figura 3.71, p.126. As diferenças energéticas, ΔE^{ele} , entre os confôrmeros *cccbb* e *ccccc* foram de -9,41 e -8,6 kJ mol⁻¹, nos níveis de teoria B3LYP/6-31G(d,p) e HF/6-31G(d), respectivamente.

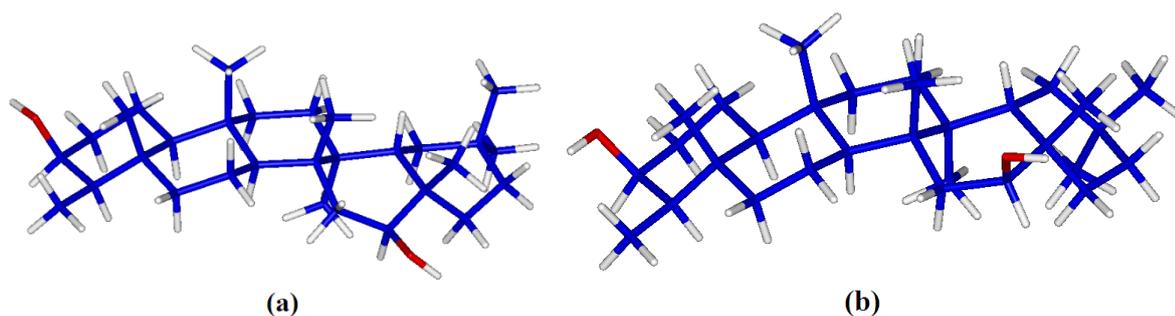


Figura 3.71: Estruturas otimizadas por DFT de **14**: (a) confômero *cccb* de menor energia e (b) confômero *cccc* de maior energia. Os átomos de carbono são representados em azul, os de oxigênio em vermelho e os de hidrogênio em branco.

No entanto, a investigação da conformação predominante no equilíbrio a 298,15 K considerou a correção termal (ΔG^{therm}) para a energia livre Gibbs e, como resultado, o valor calculado (ΔG^{total}) mostrou que o confômero *cccb* era o mais estável em $-15,48 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ do que o confômero *cccc*, no nível B3LYP/6-31G(d,p).

O gráfico de dispersão τ_{exp} versus τ_{calc} (Figura 3.72) indicou que os valores calculados dos ângulos endocíclicos torcionais para a estrutura DFT-otimizada do confômero *cccb* de pachysandiol-B foram bastante concordantes ($R^2 = 0,9956$) com os dados cristalográficos, confirmando que o cálculo, utilizando DFT/B3LYP/6-31G(d,p), consistiu em um método adequado para estudar a geometria das moléculas semelhantes às de esteroides e PCTT's.

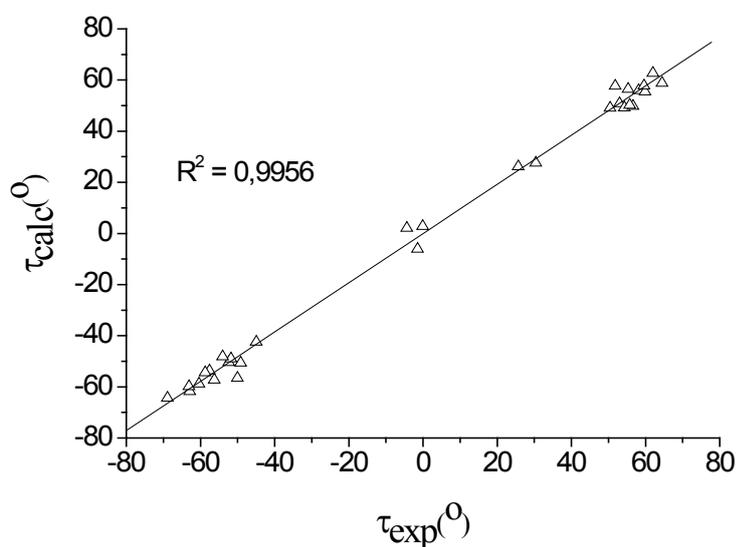


Figura 3.72: Correlações entre os valores experimentais (τ_{exp}) dos ângulos torcionais endocíclicos (raios X) para 3β -acetil- 16β -O-*p*-bromobenzoila-pachysandiol-B e os calculados (τ_{calc}) por DFT/B3LYP/6-31(d,p) para o confômero *cccb* de **14**.

Previsões teóricas de valores de deslocamentos químicos de RMN têm sido aplicadas em análises conformacionais de compostos orgânicos.^{143, 155-156} A estrutura e os arranjos

espaciais elucidados por dados espectrais de RMN mostraram que, em solução de CDCl_3 , à temperatura ambiente, as moléculas de pachysandiol-B preferencialmente adotam a conformação *ccbb*. Deste modo, ficou evidente que a elucidação estrutural, baseada em RMN e apoiada por cálculos *ab initio*, constituíram uma estratégia adequada para o estudo conformacional do pachysandiol-B, podendo ser aplicada para resolver a geometria e estereoquímica relativa de outros TTPC's.

As comparações entre os valores de deslocamentos químicos de ^{13}C e ^1H experimentais (δ_{exp}) e calculados por B3LYP/6-311++G(2d,p) (δ_{calc}) de pachysandiol-B, são mostradas nas Tabelas 3.22 (p.128) e 3.23 (p.129). As análises por meio de gráficos de dispersão entre os valores de δ_{exp} de ^{13}C e de ^1H em função dos valores de δ_{calc} para ambos os conformeros *cccc* e *ccbb* podem ser vistas na Figura 3.73, p.130.

A comparação entre os valores escalonados (δ_{scaled}) e os valores experimentais (δ_{exp}) mostrou que os menores desvios médios foram obtidos para o conformero *ccbb*. Os valores de δ_{calc} para ^{13}C e ^1H para o conformero *ccbb* foram mais bem correlacionados ($R^2 = 0,9790$ e $0,9668$) com os valores de δ_{exp} do que os valores δ_{calc} do conformero *cccc* ($R^2 = 0,9533$ e $0,8839$), respectivamente. As comparações entre os deslocamentos químicos experimentais e os calculados de ^{13}C e ^1H nos anéis A-C, em ambos conformeros *cccc* e *ccbb*, mostraram valores de correlações muito próximos. Os valores médios dos coeficientes foram de $R^2 = 0,9832$ ($\delta^{13}\text{C}$) e de $R^2 = 0,9524$ ($\delta^1\text{H}$). Entretanto, as correlações encontradas para os valores de deslocamentos químicos nos anéis D e E foram muito mais favoráveis no conformero *ccbb* [R^2 ($\delta^{13}\text{C}$) = $0,9605$ e R^2 ($\delta^1\text{H}$) = $0,9837$] do que no conformero *cccc* [R^2 ($\delta^{13}\text{C}$) = $0,8936$ e R^2 ($\delta^1\text{H}$) = $0,8085$]. Os maiores desvios absolutos (HD) entre os valores experimentais e calculados (δ_{exp} e δ_{calc}) foram encontrados para o conformero *cccc* ($\text{HD}_{\delta^{13}\text{C}} = 8,88$ e $\text{HD}_{\delta^1\text{H}} = 0,78$) (Tabelas 3.22, p.128 e 3.23, p.129). O conformero *ccbb* apresentou, em média, desvios 42% menores ($\text{HD}_{\delta^{13}\text{C}} = 4,71$ e $\text{HD}_{\delta^1\text{H}} = 0,53$) do que o conformero *cccc*. De um modo geral, os maiores desvios ocorreram em valores de deslocamentos químicos de carbonos β e γ -vicinais em relação aos dois grupos hidroxilas de **14** (C-1, C-2, C-4, C-13 e C-14, C-15 e C-17) e nos átomos de carbono de grupos metila. Cabe ressaltar, que as previsões teóricas de RMN foram realizadas no vácuo a zero Kelvin, enquanto os experimentos de RMN foram executados em solução a 300 K.

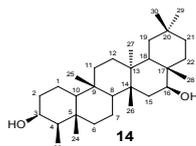


Tabela 3.22: Comparação entre os valores de δ de ^{13}C de **14** e os valores calculados por B3LYP/6-311++G(2d,p) para as estruturas dos confômeros *ccccc* e *cccbb* otimizadas por DFT

$\delta_{\text{exp}}^{13}\text{C}$		$\delta_{\text{C}}(\text{cccbb})$			$\delta_{\text{C}}(\text{ccccc})$		
C	δ_{exp}	δ_{calc}	$\delta_{\text{scaled}}^{\text{a}}$	$\epsilon_{\text{calc}}^{\text{b}}$	δ_{calc}	$\delta_{\text{scaled}}^{\text{a}}$	$\epsilon_{\text{calc}}^{\text{b}}$
1	15,84	14,88	16,80	0,96	15,89	18,81	0,05
2	35,19	38,25	38,23	3,06	32,48	33,39	2,72
3	72,71	73,77	70,79	1,06	74,51	70,36	1,80
4	49,17	51,30	50,20	2,13	53,09	51,52	3,92
5	37,99	42,70	42,31	4,71	40,35	40,32	2,36
6	41,68	42,25	41,90	0,57	41,34	41,19	0,34
7	17,81	17,49	19,20	0,32	17,34	20,08	0,47
8	53,48	53,61	52,31	0,13	50,15	48,94	3,33
9	37,21	40,46	40,26	3,25	40,22	40,20	3,01
10	61,41	61,91	59,92	0,50	62,36	59,68	0,95
11	35,67	34,61	34,89	1,06	34,30	35,00	1,37
12	30,87	31,24	31,81	0,37	29,84	31,08	1,03
13	39,34	42,83	42,43	3,49	43,12	42,76	3,78
14	39,97	41,32	41,04	1,35	42,58	42,28	2,61
15	44,25	39,80	39,65	4,45	36,21	36,68	8,04
16	75,63	77,30	74,03	1,67	78,53	73,90	2,90
17	35,76	39,01	38,93	3,25	43,51	43,09	7,75
18	44,68	45,49	44,86	0,81	46,56	45,78	1,88
19	35,62	34,16	34,48	1,46	31,25	32,32	4,37
20	27,97	31,58	32,11	3,61	31,10	32,19	3,13
21	31,98	29,88	30,56	2,10	34,09	34,82	2,11
22	35,96	36,03	36,19	0,07	35,55	36,10	0,41
23	11,63	9,46	11,83	2,17	6,92	10,91	4,71
24	16,42	12,54	14,66	3,88	12,82	16,10	3,60
25	18,46	16,04	17,87	2,42	15,61	18,55	2,85
26	21,28	17,55	19,25	3,73	13,60	16,79	7,68
27	20,08	16,75	18,52	3,33	16,36	19,22	3,72
28	24,82	23,17	24,41	1,65	21,84	24,04	2,98
29	35,46	31,92	32,42	3,54	26,58	28,21	8,88
30	30,73	26,18	27,17	4,55	34,08	34,80	3,35
HD				4,71 ^c			8,88 ^c
rms				2,21 ^d			3,30 ^d
R ²				0,9790 ^e			0,9533 ^e

^a δ_{scaled} valores obtidos por ajuste linear de δ_{exp} versus δ_{calc} .

^b $E_{\text{calc}} = |\delta_{\text{calc}} - \delta_{\text{exp}}|$.

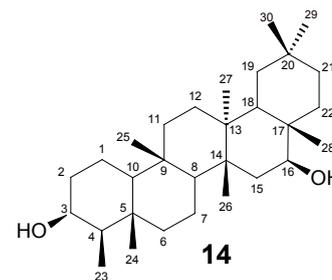
^c HD = Maior desvio absoluto, obtido entre os valores experimentais e calculado.

^d
$$\text{rms} = \sqrt{\left[\frac{1}{n} \sum_{i=1}^n |\epsilon_{\text{scaled}}|^2 \right]}$$

^e Coeficiente de correlação de Pearson ao quadrado (R^2) obtido por ajuste linear.

Tabela 3.23: Comparação entre os valores δ de ^1H de **14** e os valores calculados por B3LYP/6-311++G(2d,p) para as estruturas dos confôrmeros cccc e cccbb otimizadas por DFT.

$\delta_{\text{exp}}^1\text{H}$		$\delta^1\text{H}(\text{ccbb})$			$\delta^1\text{H}(\text{cccc})$		
H	δ_{exp}	δ_{calc}	δ_{scaled}^a	ϵ_{calc}^b	δ_{calc}	δ_{scaled}^a	ϵ_{calc}^b
1 β	1,56	1,45	1,70	0,11	1,39	1,65	0,17
1 α	1,43	0,94	1,24	0,49	1,00	1,30	0,43
2 β	1,90	1,37	1,63	0,53	1,86	2,08	0,04
2 α	1,56	1,31	1,57	0,25	1,08	1,37	0,48
3 α	3,74	3,55	3,62	0,19	3,52	3,60	0,22
4 α	1,25	0,77	1,08	0,48	0,82	1,13	0,43
6 β	1,75	1,82	2,04	0,07	1,48	1,74	0,27
6 α	0,98	0,69	1,00	0,29	0,63	0,96	0,35
7 α	1,38	1,14	1,42	0,24	1,12	1,41	0,26
7 β	1,42	1,21	1,48	0,23	1,45	1,70	0,01
8 α	1,29	1,06	1,34	0,23	0,86	1,17	0,43
10 α	0,89	0,57	0,90	0,32	0,47	0,81	0,42
11 α	1,17	0,78	1,09	0,39	0,78	1,09	0,39
11 β	1,44	1,06	1,35	0,38	1,08	1,37	0,36
12 β	1,35	1,24	1,51	0,10	1,14	1,43	0,20
12 α	1,31	0,94	1,23	0,37	1,23	1,51	0,08
15 β	1,21	1,15	1,43	0,08	1,66	1,89	0,43
15 α	1,83	1,41	1,67	0,42	1,21	1,49	0,62
16 α	4,00	4,02	4,05	0,02	3,47	3,55	0,53
18 β	1,69	1,43	1,68	0,26	1,32	1,59	0,37
19 α	1,35	1,02	1,31	0,33	1,31	1,58	0,04
19 β	1,10	0,88	1,18	0,22	1,21	1,49	0,11
21 α	1,38	0,97	1,27	0,41	0,90	1,20	0,48
21 β	1,45	1,02	1,31	0,43	1,57	1,81	0,12
22 α	1,48	1,10	1,39	0,38	1,39	1,65	0,09
22 β	1,37	1,02	1,31	0,35	0,59	0,92	0,78
23 β	0,94	0,74	1,05	0,20	0,59	0,93	0,35
24 β	0,97	0,77	1,08	0,20	0,59	0,93	0,38
25 β	0,87	0,58	0,91	0,29	0,53	0,87	0,34
26 β	1,07	0,79	1,10	0,28	0,67	1,00	0,40
27 α	0,96	0,79	1,10	0,17	0,71	1,03	0,25
28 β	1,18	0,91	1,21	0,27	0,75	1,07	0,43
29 α	0,96	0,65	0,97	0,31	0,69	1,01	0,27
30 β	1,03	0,74	1,05	0,29	0,61	0,94	0,42
HD				0,53 ^c			0,78 ^c
rms				0,12 ^d			0,22 ^d
R ²				0,9668 ^e			0,8839 ^d



^a δ_{scaled} valores obtidos por ajuste linear de δ_{exp} versus δ_{alc} .

^b $\epsilon_{\text{alc}} = |\delta_{\text{calc}} - \delta_{\text{exp}}|$.

^c HD = Maior desvio absoluto, obtido entre os valores experimentais e calculado.

^d $rms = \sqrt{[(1/n) \sum_1^n \epsilon_{\text{scaled}}^2]}$

^e Coeficiente de correlação de Pearson ao quadrado (R^2) obtido por ajuste linear.

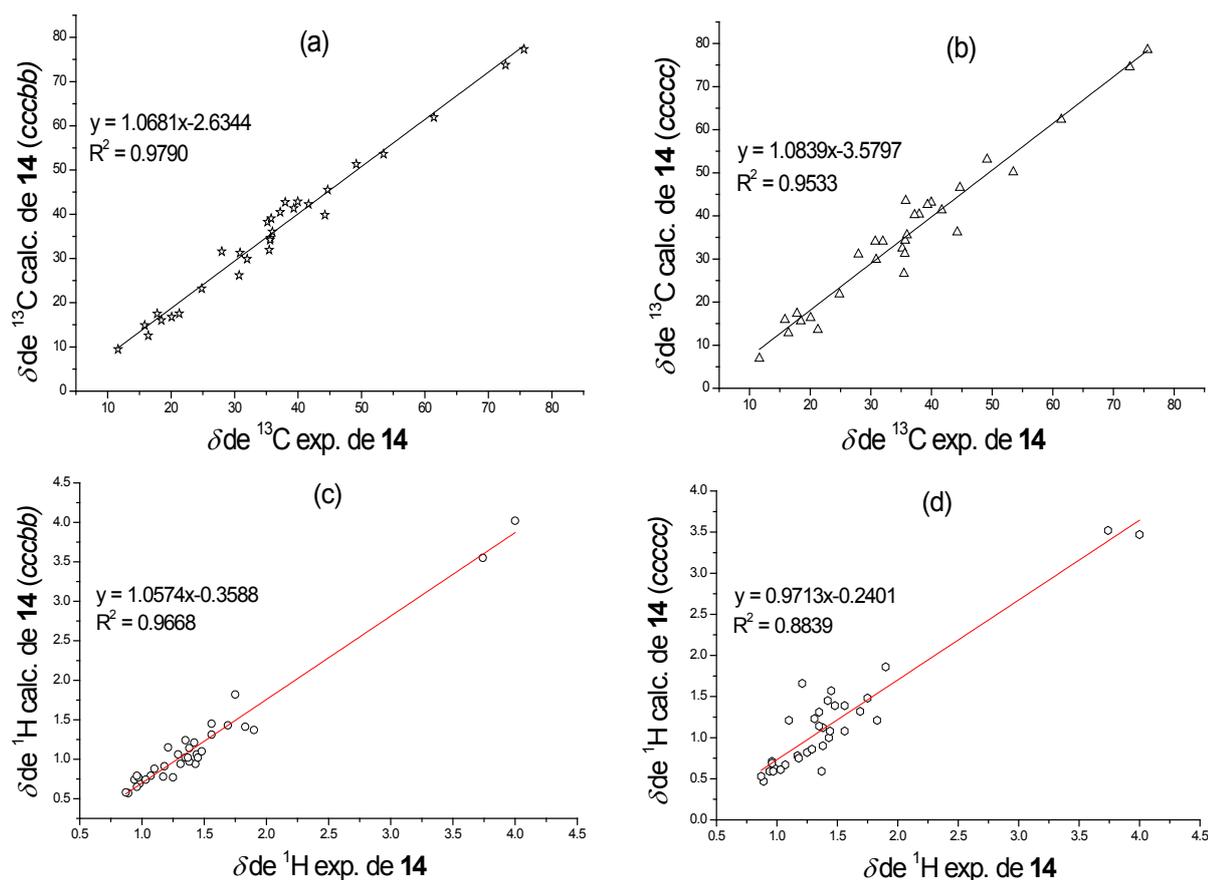


Figura 3.73: Análises de dispersão entre os dados de RMN experimentais de **14** (δ de ^{13}C e δ de ^1H) e os valores obtidos por DFT-B3LYP/6-311++G(2d,p) de (a) $\delta_{\text{calc.}}$ de ^{13}C do conformero cccbb, (b) $\delta_{\text{calc.}}$ de ^{13}C do conformero cccc, (c) $\delta_{\text{calc.}}$ de ^1H do conformero cccbb, (d) $\delta_{\text{calc.}}$ de ^1H do conformero cccc.

Análise dos espectros RMN 1D e 2D de **14**

Os espectros de RMN de ^{13}C (Figura 3.84, p. 139) e DEPT-135 (Figura 3.85, p. 139) permitiram a identificação dos deslocamentos químicos de 30 sinais de pachysandiol-B: 8 CH_3 , 10 CH_2 , 6 CH e 6 carbonos não-hidrogenados. No espectro de RMN de ^1H (Figura 3.83, p. 138), o sinal em δ 3,74 (m), também observado no espectro de RMN de ^1H de 3 β -friedelinol³¹, e o sinal em δ 4,00 (t, $J = 9,0$ Hz), foram atribuídos a H-3 e H-16 respectivamente e indicaram a ocorrência de um friedelano-diol. O mapa de contornos HSQC (Figura 3.86, p. 140) permitiu obter a correlação entre 24 sinais de carbono e seus hidrogênios diretamente ligados (Tabela 3.24, p.137). Os seis carbonos não hidrogenados restantes foram atribuídos com o auxílio do mapa de contornos HMBC. O sinal do carbono hidroxilado (C-3), em δ 72,71, foi referido como ponto de partida para as atribuições dos demais deslocamentos químicos. As intensidades dos sinais relativos aos acoplamentos C-H ao longo de três ligações ($^3J_{\text{C,H}}$), registradas no mapa de contornos HMBC, guardaram estreita proporcionalidade com os valores teóricos de $^3J_{\text{C,H}}$ calculados pela expressão de Karplus a seguir:

$${}^3J_{C,H} = A + B \cos \varphi + C \cos 2\varphi$$

Onde φ é o ângulo diedro, obtido da estrutura do TTPC elucidada por RMN e otimizada energeticamente por DFT, no nível B3LYP/6-31G(d,p) ou pelo método MMFF94-Merck.⁹³ Os parâmetros A, B e C dependem da classe do composto e das condições experimentais.¹⁵⁷ Valores médios para A, B e C foram estimados em 6,90, -0,75 e 5,68, respectivamente, a partir de valores de ${}^3J_{C,H}$ (Hz) observados experimentalmente no estudo dos TTPC's friedelanos e friedo-oleananos **5**, **6**, **7**, **10**, **11**, **12**, **13**, **14**, **15** e **15a** isolados de *M. acanthophylla*. Os valores calculados de ${}^3J_{C,H}$ para o confômero *cccbb* de **14** orientaram as atribuições das correlações do mapa de contornos HMBC e, juntamente com a análise do mapa de contornos NOESY foi possível propor a geometria e a estereoquímica relativa desse TTPC.

O espectro de HMBC mostrou correlações entre os sinais em $\delta 72,71$ (C-3) e os sinais em $\delta 0,94$ (d, $J = 7,33$ Hz, H-23) e em $\delta 1,43$ (m, H α -1) (Figura 3.74, p.132). O sinal de C-23 ($\delta 11,63$) correlacionou com o sinal em $\delta 1,25$ (m) atribuído a H α -4 (Figura 3.75, p. 132). O sinal do duplete correspondente ao H β -23 apresentou correlação com os sinais de C-4 ($\delta 49,17$) e C-5 ($\delta 37,99$); o sinal de C-5 correlacionou com os sinais em $\delta 0,93$ - $0,97$ atribuídos a H β -23/24, e o sinal de H β -24 correlacionou com um sinal de carbono metínico em $\delta 61,41$ (C-10), bem como com um sinal de carbono metilênico em $\delta 41,68$ (C-6) (Figuras 3.76 e 3.77, p. 133). A correlação entre o sinal de C-10 com um simpleto em $\delta 0,87$ (H β -25) também foi observada (Figura 3.76, p.133). O sinal de H β -25 mostrou acoplamento com o sinal de carbono não hidrogenado em $\delta 37,21$ (C-9), com um sinal metínico em $\delta 53,48$ (C-8) e com um sinal metilênico em $\delta 35,67$ (C-11) (Figuras 3.76 e 3.77, p.133). Correlações do mapa de contornos HMBC foram observadas, também, entre os sinais de C-8 com um sinal de hidrogênio em $\delta 1,07$ (H β -26), e esse último com os sinais em $\delta 44,25$ (C-15), $\delta 39,34$ (C-13) e $\delta 39,97$ (C-14). Tanto o sinal C-13 quanto o de C-14 apresentaram correlações com o sinal de H α -27 ($\delta 0,96$), igualmente correlacionado com os sinais de C-12 ($\delta 30,87$) e C-18 ($\delta 44,68$), sendo que, esse último (C-18) mostrou acoplamento com os sinais em $\delta 1,45$ (Ha-19), $\delta 1,18$ (H β -28) e $\delta 1,48$ (H β -22) (Figura 3.77, p.133).

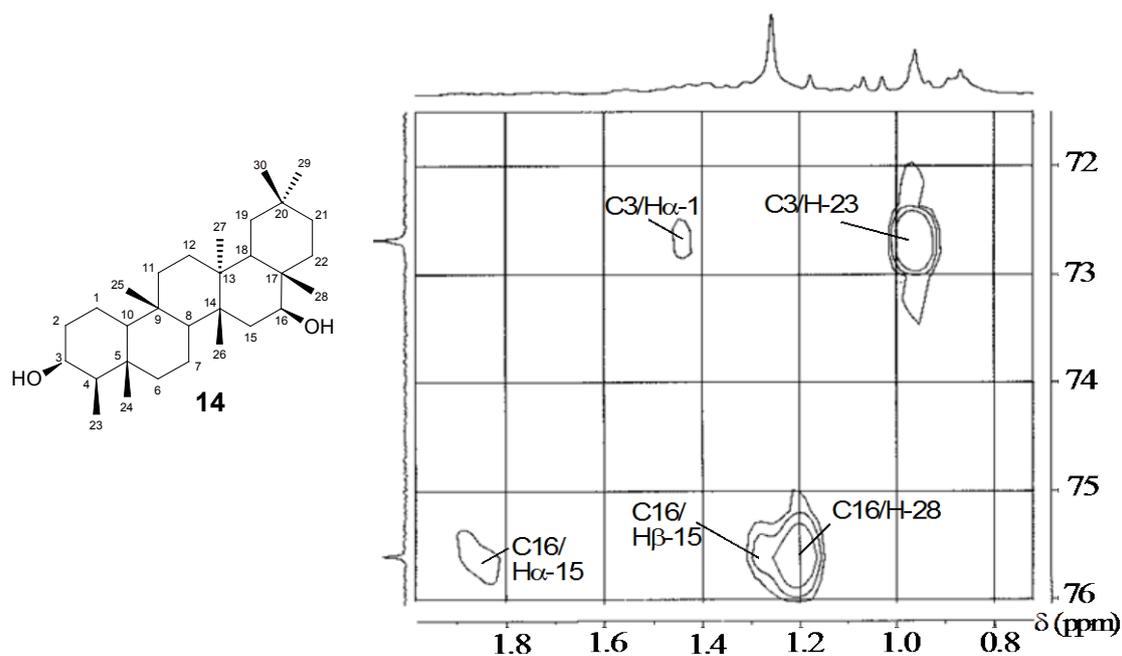


Figura 3.74: Seção expandida do mapa de contornos HMBC de **14** na região entre δ_{H} 0,8-1,8 e δ_{C} 72-76 (CDCl_3 , 400 MHz).

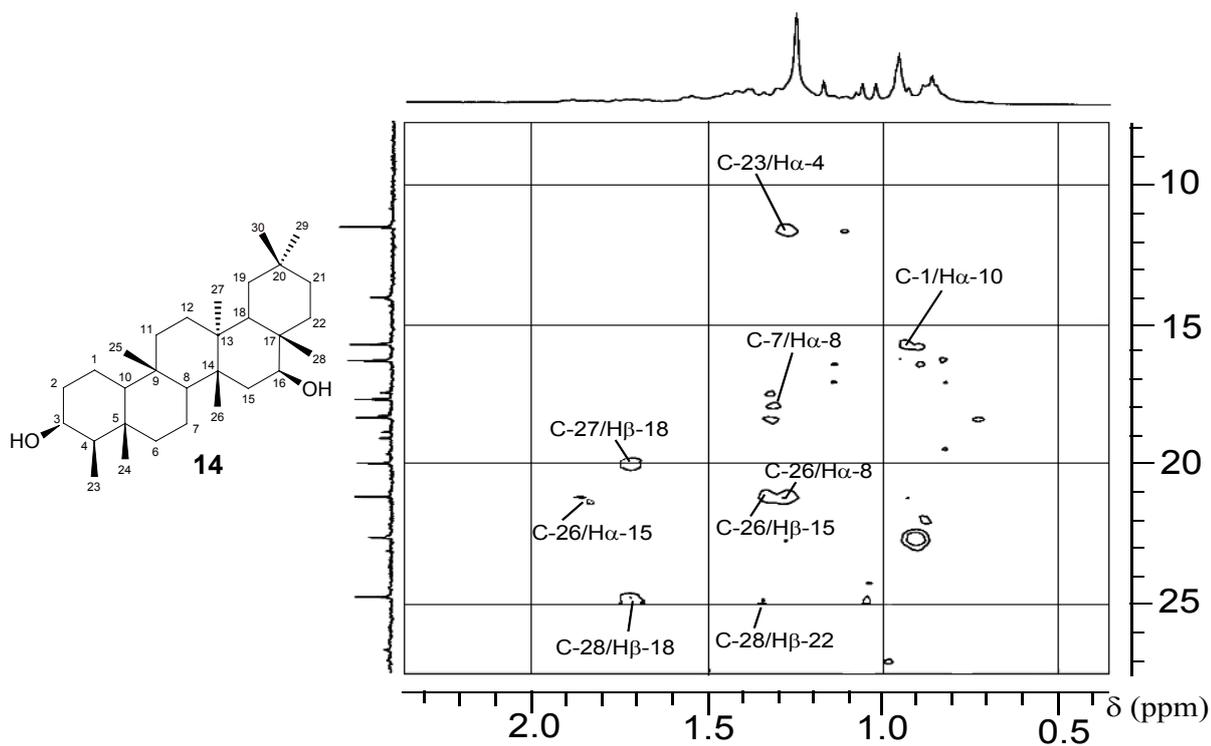


Figura 3.75: Seção expandida do mapa de contornos HMBC de **14** na região entre δ de ^1H 0,5-2,3 e δ de ^{13}C 10-25 (CDCl_3 , 400 MHz).

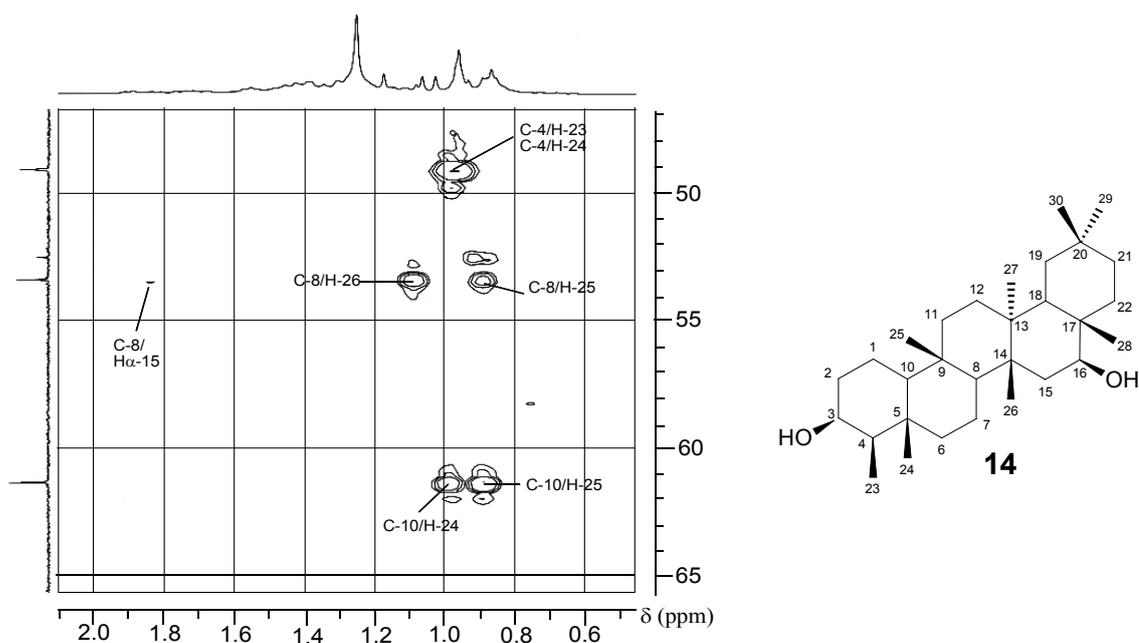


Figura 3.76: Seção expandida do mapa de contornos HMBC de **14** na região entre δ de ^1H 0,6-2,0 e δ de ^{13}C 48-65 (CDCl_3 , 400 MHz).

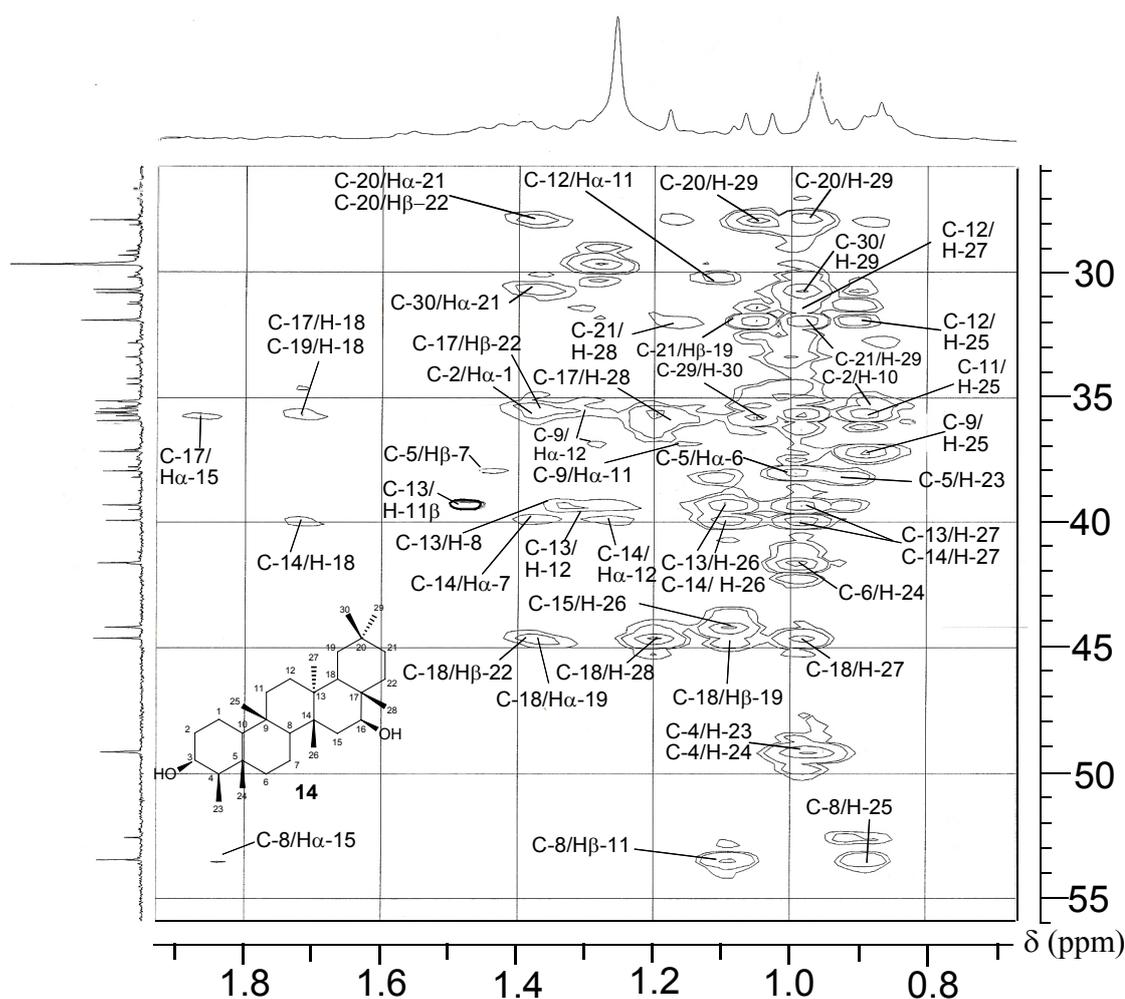


Figura 3.77: Seção expandida do mapa de contornos HMBC de **14** na região entre δ de ^1H 0,8-1,8 e δ de ^{13}C 26-55 (CDCl_3 , 400 MHz).

Os sinais de ressonância de H-15 em δ 1,21 (m) e δ 1,83 (m) correlacionaram com o sinal em 75,25 (C-16). Por meio das multiplicidades de H-15, foi possível deduzir a posição α -axial de H-16 e a ocorrência de um grupo hidroxila, em posição β , ligado em C-16 do anel D (Figura 3.74, p. 132). O sinal de C-20 (δ 27,97) foi correlacionado com os sinais de hidrogênio de um grupo *gem*-dimetila em δ 1,03 (H-30) e δ 0,96 (H-29), e esses sinais metílicos mostraram interação com os sinais de C-21 (δ 31,98) (Figura 3.77, p.133). Na comparação com os dados de RMN do epifriedelinol³¹, os valores de ressonância de 24 átomos de carbonos (C-1 a C-14, C-19 a 21, C-23 a C-25, C-26, C-27, C-29 e C-30) foram observados próximos dos seus homólogos no pachysandiol-B. No entanto, no pachysandiol-B, a presença de um grupo de hidroxila β -equatorial em C-16 desprotege os carbonos C-16 ($\Delta\delta = +39,73$), C-15 ($\Delta\delta = +11,91$), C-17 ($\Delta\delta = +5,74$), C-18 ($\Delta\delta = +1,80$), e blinda os carbonos C-22 ($\Delta\delta = -3,32$), C-28 ($\Delta\delta = -7,30$) nas posições α -, β -, γ -*anti* e γ -*gauche*, respectivamente.^{158, 159} Além disso, ocorreram deslocamentos significativos para maiores valores de δ nas ressonâncias dos hidrogênios H α -16 ($\Delta\delta = +2,54$), H α -15 ($\Delta\delta = +0,30$) e H β -22 ($\Delta\delta = +0,44$). As correlações de NOE observadas entre os sinais em δ 1,75 (H β -6) e δ 1,56 (H β -1) e entre δ 1,75 (H β -6) e δ 1,90 (H β -2), suscitadas no mapa de contornos NOESY, foram importantes para estabelecer a completa atribuição dos deslocamentos químicos dos anéis A e B (Tabela 3.24, p.137). A correlação entre o sinal H α -16 com o sinal de H α -27 confirmou a hidroxila em C-16 na posição β -equatorial no anel D (Figuras 3.78, p.134 e 3.79, p.135).

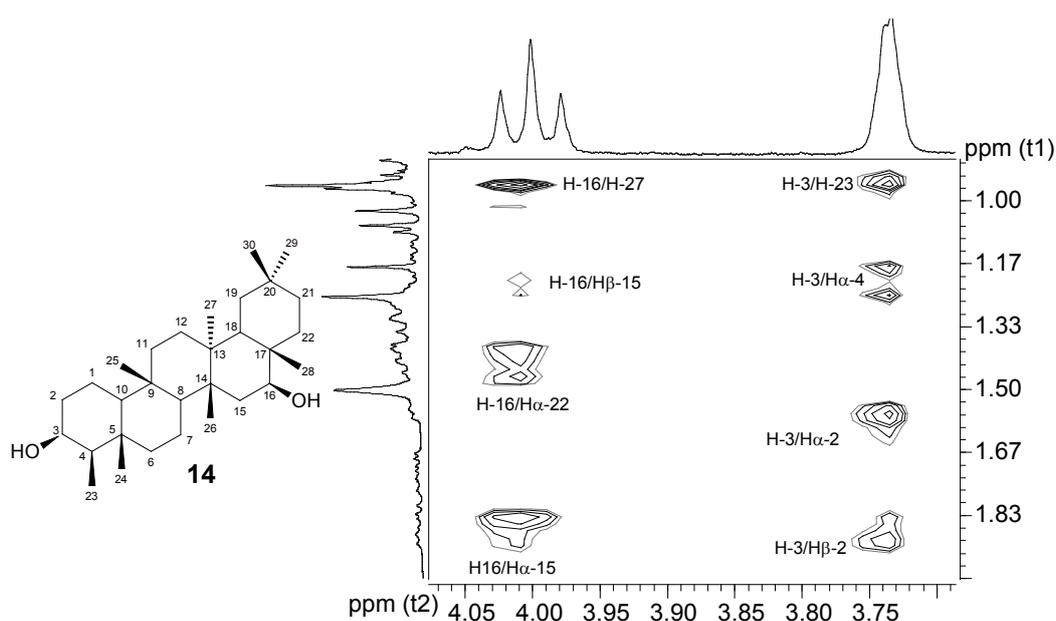


Figura 3.78: Expansão do mapa de contornos NOESY de **14** (F2: δ 3,70-4,05 x F1: δ 0,95-1,90; CDCl₃, 400 MHz).

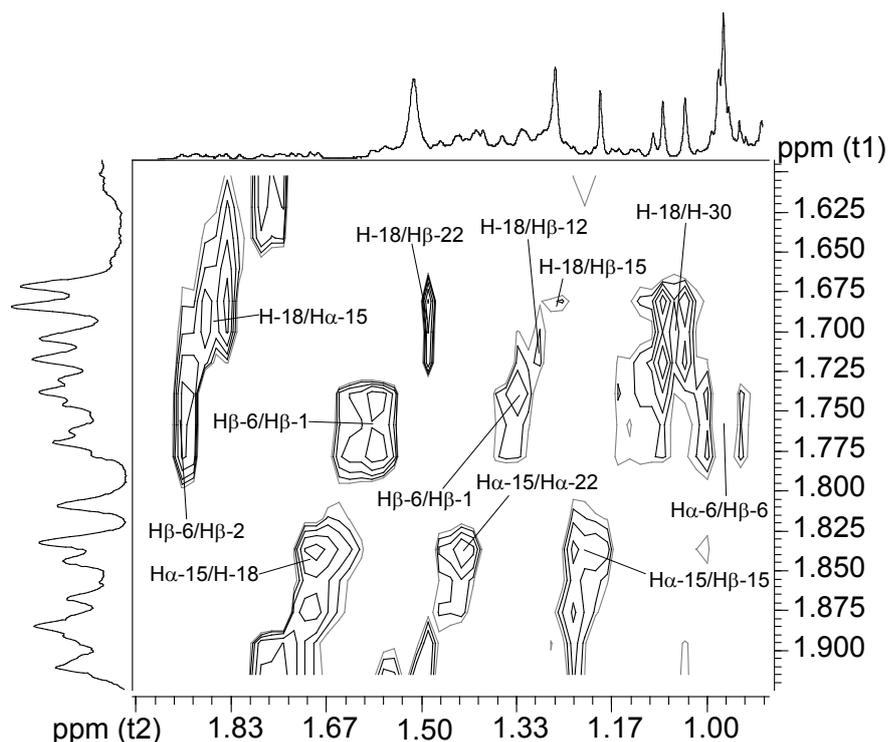


Figura 3.79: Expansão do mapa de contornos NOESY de **14** (F1: δ 1,63-1,90 x F2: δ 0,93-3,00; CDCl_3 , 400 MHz).

O mapa de contornos NOESY (Figuras 3.78, p. 134 e 3.79 e 3.81, p.136) mostra correlações entre o sinal de $\text{H}\alpha$ -3 e os de $\text{H}\beta$ -23 (δ 0,94), $\text{H}\alpha$ -4 (δ 1,25), e $\text{H}\alpha$ -2 (δ 1,56), e entre o sinal de $\text{H}\alpha$ -16 com os sinais de $\text{H}\alpha$ -19 (δ 1,35), $\text{H}\alpha$ -22 (δ 1,48) e com ambos os sinais de H-15 (α e β) em δ 1,83 e δ 1,21, respectivamente (Figura 3.78, p.134). Foram observadas também, correlações NOE entre o sinal de $\text{H}\beta$ -18 (δ 1,69) com os de $\text{H}\beta$ -15 (δ 1,21), $\text{H}\beta$ -30 (δ 1,03) e $\text{H}\beta$ -26 (δ 1,07) (Figura 3.79). O mapa de contornos NOESY mostrou também que o sinal de H-29 (δ 0,96) estava correlacionado com os sinais em δ 1,35 ($\text{H}\alpha$ -19) e δ 1,38 ($\text{H}\beta$ -21), ao passo que o sinal de $\text{H}\beta$ -28 (δ 1,18) correlacionou com os sinais $\text{H}\beta$ -30 em δ 1,03 (Figura 3.81, p.136).

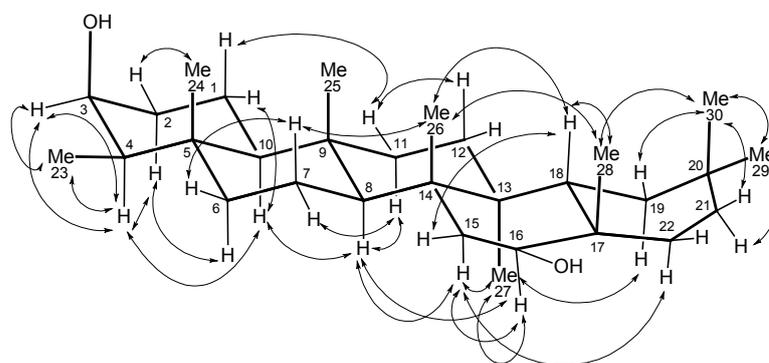


Figura 3.80: Estrutura de **14** com as indicações das principais correlações de NOE (CDCl_3 , 400 MHz).

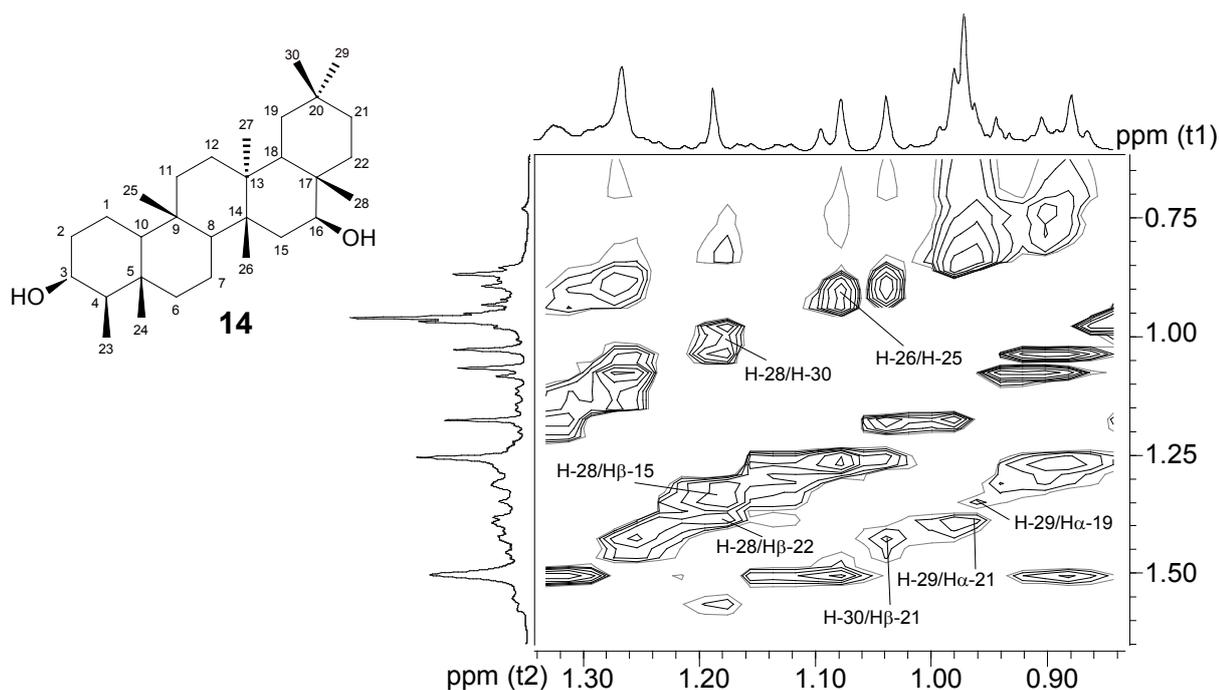
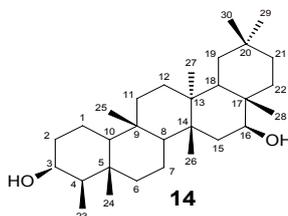


Figura 3.81: Correlações de NOE observadas entre os sinais de H-25 e H-26, H-28 e H-30, e entre H-29 e H α -19 (CDCl₃, 400 MHz) de **14**.

À luz desses argumentos, foi possível sugerir as conformações em barco para os anéis D e E. Corroborando com as análises por RMN, os dados obtidos a partir da geometria da estrutura otimizada por DFT forneceu valores de ângulos diedros (φ_{calc}) de 31,0° (φ_1) e 143,5° (φ_2) entre os átomos H α 16-C16-C15-H α 15 e H α 16-C16-C15-H β 15, respectivamente. Esses valores de φ_{calc} permitiram calcular os valores das constantes de acoplamento escalar ($^3J_{H-C-H}$) para o tripleto H α -16, através da equação de Karplus, utilizando valores de A, B e C obtidos experimentalmente (p.131).^{157,160} Os valores calculados de J_{φ_1} (8,9 Hz) e J_{φ_2} (9,2 Hz) foram concordantes com os valores observados experimentalmente no espectro de RMN de ¹H para o sinal de H-16 (4,0, t, $J_{\varphi_1} = J_{\varphi_2} = 9$ Hz). Os dados espectrais completos de RMN de pachysandiol-B estão listados na Tabela 3.24, p.137.

Os deslocamentos químicos de ¹H e ¹³C atribuídos para o constituinte pachysandiol-B (**14**) e o resultado das análises dos dados RMN indicam a estrutura do confôrmere *ccbb* (forma estirada S) como a estrutura preferida para este composto. Os cálculos teóricos mostraram que o confôrmere *ccbb* seria, pelo menos, 9 kJ/mol, mais estável do que o confôrmere *cccc*, em boa concordância com os resultados experimentais. Além disso, os valores dos deslocamentos químicos calculados para o confôrmere *ccbb* apresentaram correlações significativas com os dados experimentais. Os espectros de RMN 2D permitiram mostrar que os anéis D e E estão na forma barco corroborando com as demais observações

experimentais e teóricas. Os cálculos DFT e *ab initio* combinados com os dados experimentais de RMN mostraram-se valiosos e eficazes na elucidação estrutural de TTPC's.

Tabela 3.24: Atribuição dos dados de RMN de **14**

¹³ C/DEPT-135	¹ J(¹ H - ¹³ C) - HSQC	²⁻³ J(¹³ C - ¹ H) HMBC	¹ H- ¹ H NOESY
C tipo	δ de ¹³ C	δ de ¹ H	
C-5	37,99		Hα-6, Hα-7, Hβ-23, Hβ-24, Hα-1
C-9	37,21		Hα-11, Hα-12, Hβ-25
C-13	39,97 ^a		Hβ-26, Hα-27, Hβ-11, Hα-12, Hβ-15
C-14	39,34 ^a		Hα-7, Hα-12, Hβ-26, Hα-27, Hβ-18
C-17	35,76		Hβ-15, Hβ-19, Hβ-22, Hβ-28, Hβ-18
C-20	27,97		Hα-21, Hβ-22, Hα-29, Hβ-30, Hβ-19
OHC-3	72,71	Hα-3: 3,74 (m)	Hα-1, Hβ-23
OHC-16	75,63	Hα-16: 4,00 (t, J = 9,0 Hz)	Hα-15, Hβ-15, Hβ-28
HC-4	49,17	Hα-4: 1,25 (m)	Hβ-23, Hβ-24
HC-8	53,48	Hα-8: 1,29 (m)	Hβ-11, Hα-15, Hβ-25, Hβ-26
HC-10	61,41	Hα-10: 0,89 (m)	Hβ-24, Hβ-25
HC-18	44,68	Hβ-18: 1,69 (dd, J = 13,0, 5,0 Hz)	Hα-19, Hβ-22, Hβ-27, Hβ-28
H ₂ C-1	15,84	Hα-1: 1,43 (m) Hβ-1: 1,56 (m)	Hα-10
H ₂ C-2	35,19	Hα-2: 1,56 (m) Hβ-2: 1,90 (m)	Hα-10, Hα-1
H ₂ C-6	41,68	Hα-6: 0,98 (m) Hβ-6: 1,75 (td, 12,6, 3,0)	Hβ-24
H ₂ C-7	17,81	Hα-7: 1,38 (m) Hβ-7: 1,42 (m)	Hα-8
H ₂ C-11	35,67 ^a	Hα-11: 1,17 (dd, J = 13,5, 5,0 Hz) Hβ-11: 1,44 (m)	Hβ-25, Hβ-12
H ₂ C-12	30,87	Hα-12: 1,31 (m) Hβ-12: 1,35 (m)	Hα-27, Hα-11
H ₂ C-15	44,25	Hα-15: 1,83 (m) Hβ-15: 1,21 (m)	Hβ-26
H ₂ C-19	35,62 ^a	Hα-19: 1,35 (m) Hβ-19: 1,10 (m)	Hβ-18, Hα-21, Hα-29, Hβ-30
H ₂ C-21	31,98	Hα-21: 1,38 (m) Hβ-21: 1,45 (m)	Hβ-19, Hα-28, Hβ-29, Hβ-30
H ₂ C-22	35,96	Hα-22: 1,48 (m) Hβ-22: 1,37 (m)	Hβ-28
H ₃ C-23	11,63	Hβ-23: 0,94 (d, J = 7,33 Hz)	Hα-4
H ₃ C-24	16,42	Hβ-24: 0,97 (s)	Hα-4, Hα-10
H ₃ C-25	18,46	Hβ-25: 0,87 (s)	Hα-8, Hα-11
H ₃ C-26	21,28	Hβ-26: 1,07 (s)	Hα-8, Hα-15, Hβ-15
H ₃ C-27	20,08	Hα-27: 0,96 (s)	Hβ-18
H ₃ C-28	24,82	Hβ-28: 1,18 (s)	Hβ-18, Hα-22
H ₃ C-29	35,46	Hα-29: 0,96 (s)	Hβ-29
H ₃ C-30	30,73	Hβ-30: 1,03 (s)	Hα-30
			Hβ-1, Hα-3, Hα-4, Hβ-6
			Hβ-25
			Hβ-1, Hβ-24
			Hβ-7, Hβ-12, Hβ-15, Hβ-18, Hβ-25
			Hα-8, Hα-16, Hα-19
			Hβ-15, Hβ-21, Hβ-22, Hβ-26, Hβ-30
			Hα-19, Hα-21, Hβ-30
			Hβ-18, Hβ-21, Hβ-28, Hβ-29

^a sinais intercambiáveis

* ¹H (CDCl₃, 400 MHz) e ¹³C (CDCl₃, 100 MHz), TMS usado como padrão interno.

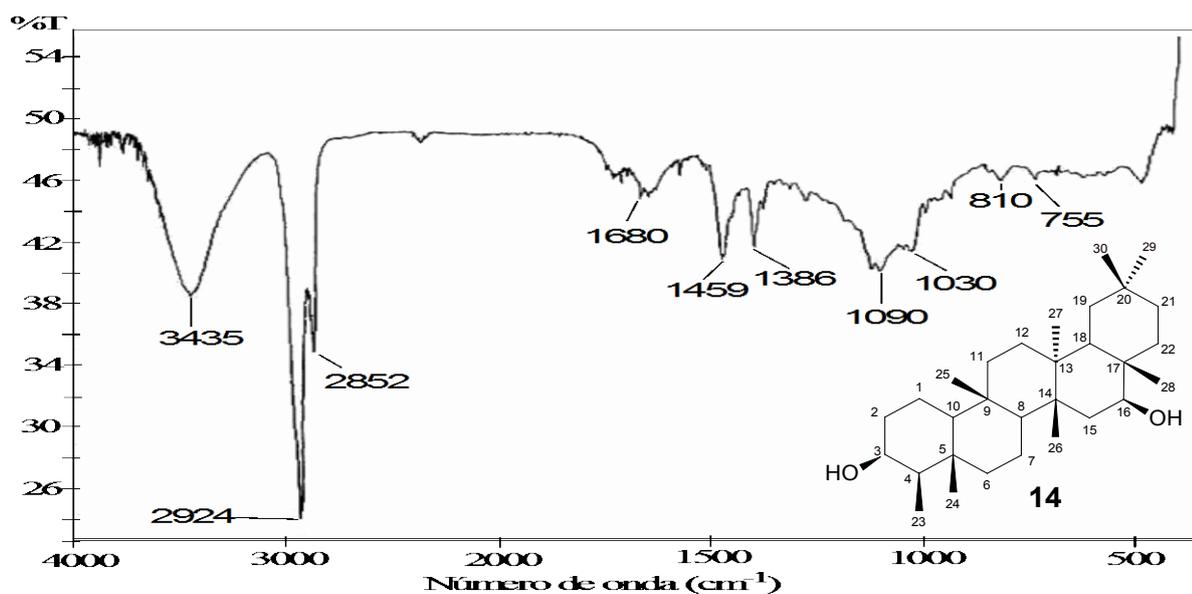


Figura 3.82: Espectro de absorção de **14** na região do infravermelho (KBr).

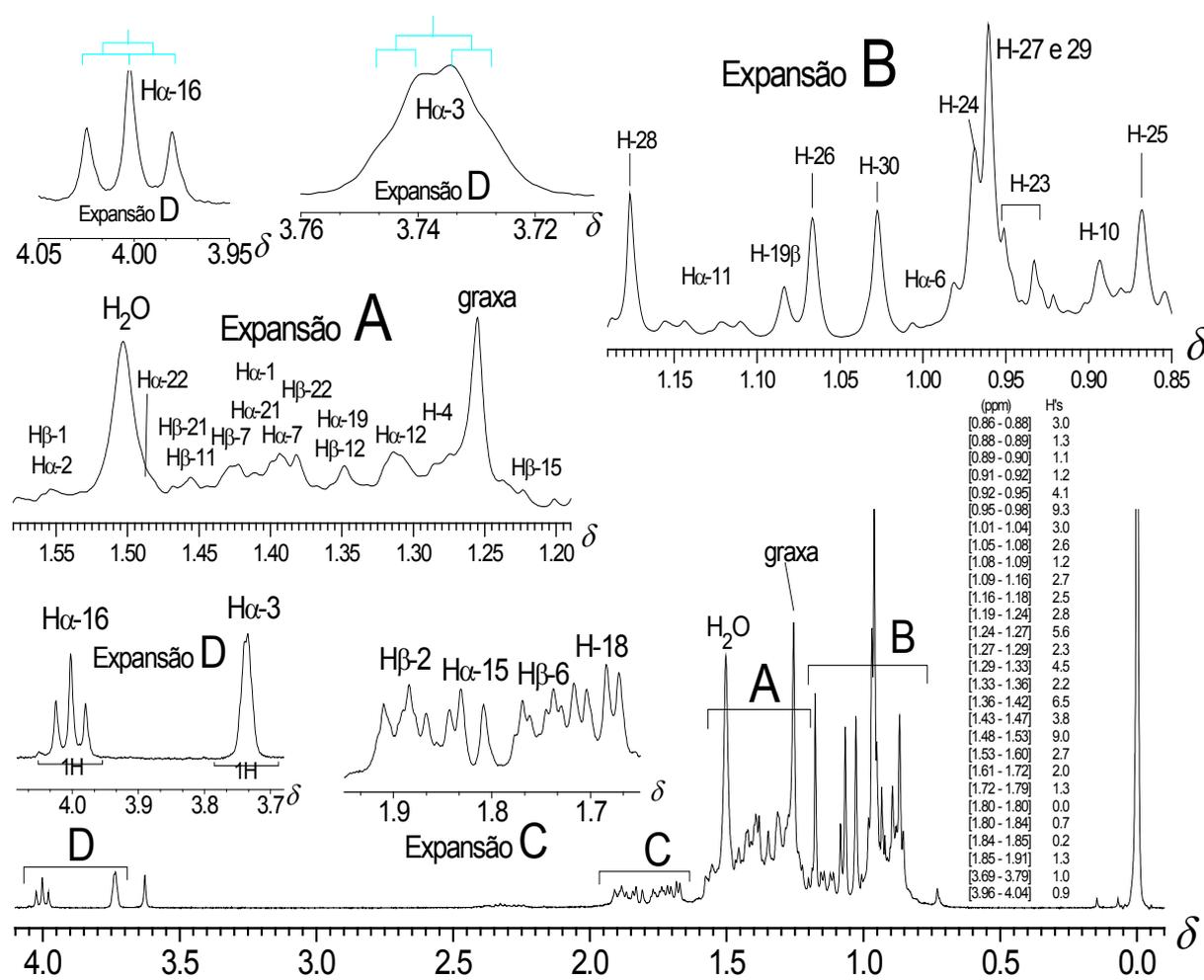


Figura 3.83: Espectro de RMN de ^1H de **14** (CDCl_3 , 400 MHz).

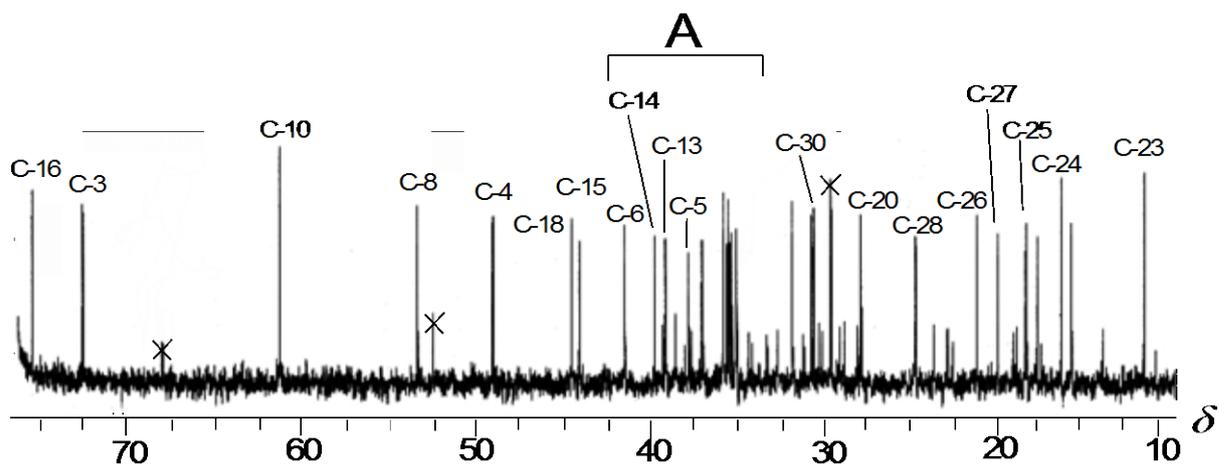
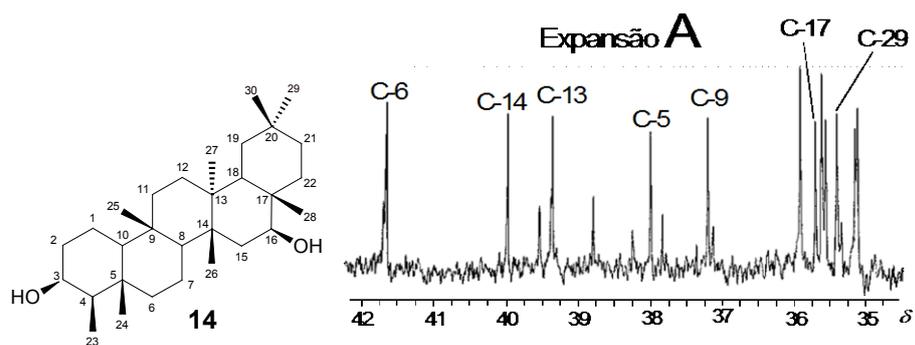


Figura 3.84: Espectro de RMN de ^{13}C de **14**: (CDCl_3 , 100 MHz).

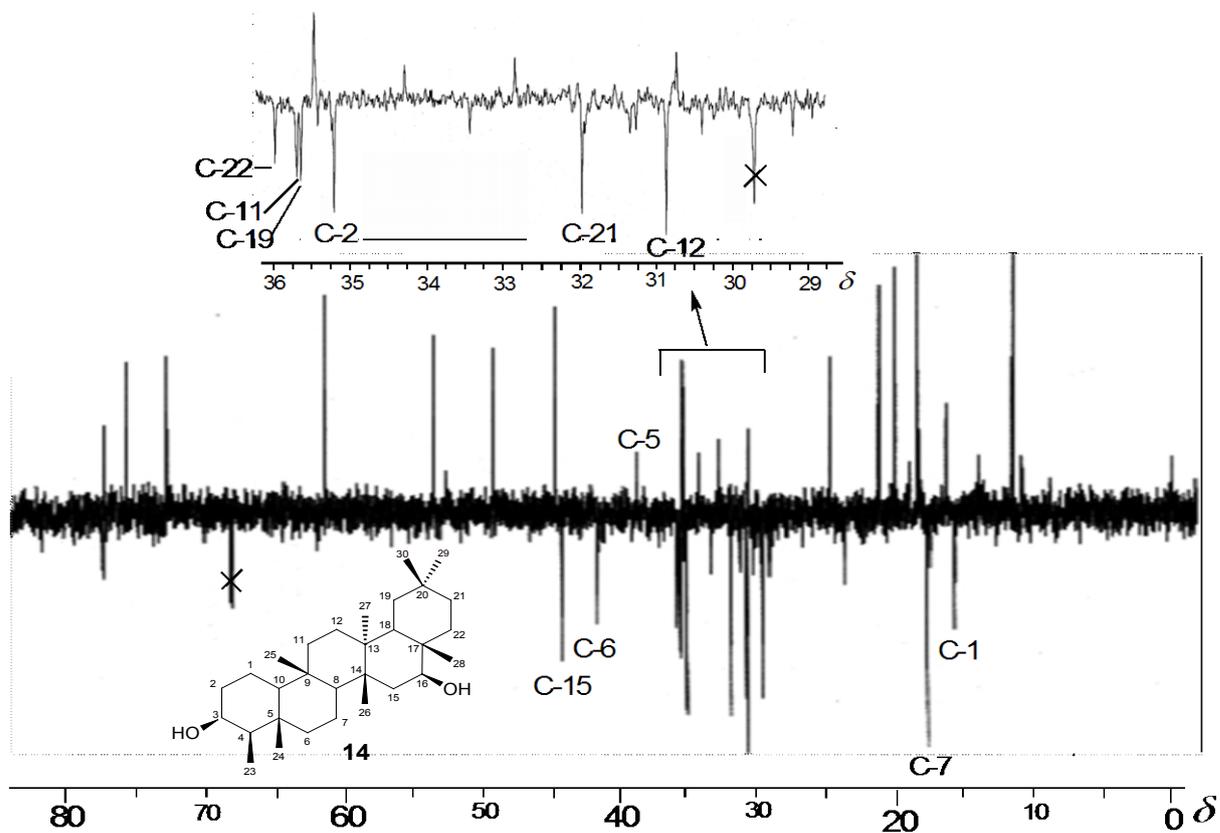
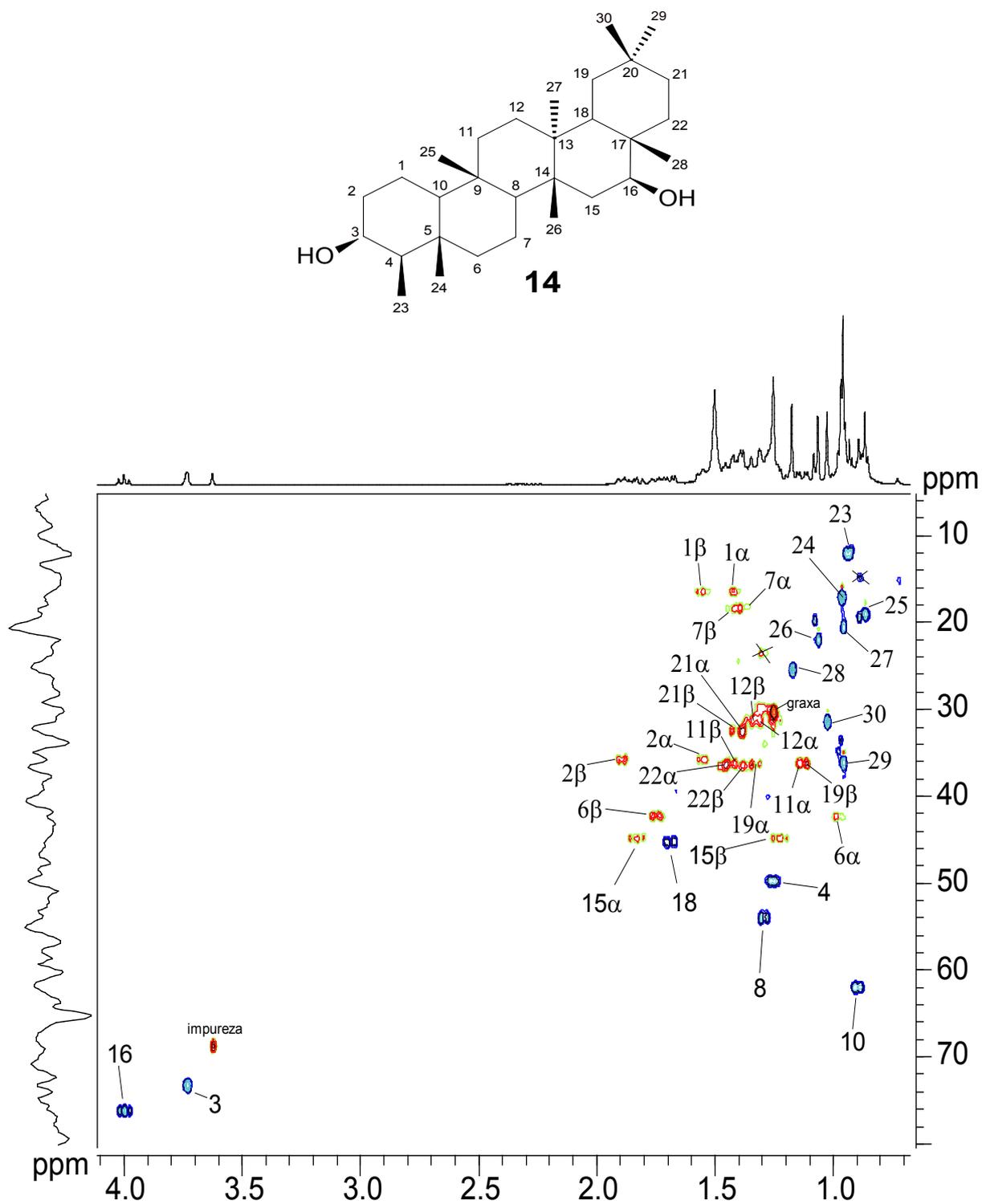
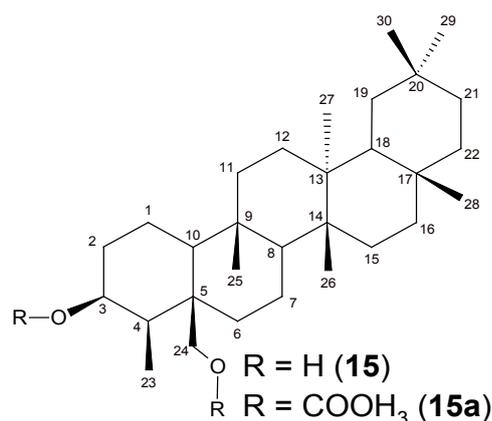


Figura 3.85: Espectro de RMN DEPT-135 de **14** (CDCl_3 , 100 MHz).

44

Figura 3.86: Mapa de contornos HSQC de **14** (CDCl₃, 400 MHz).

3β,24-di-Hidroxifriedelano (15) e 3β,24-di-acetoxifriedelano (15a)

O composto **15**, um sólido branco (12,0 mg) de ponto de fusão de 272,3-273,3 °C, foi obtido do fracionamento do extrato FAEMA. Uma parte deste sólido foi posteriormente acetilada e o derivado, um sólido branco pastoso (3,9 mg, **15a**) foi utilizado na elucidação da estrutura de **15**. O composto *3β,24-di-hidroxifriedelano* é um triterpeno raro, isolado anteriormente de *Eschweilera longipes* (Lecythidaceae)¹⁶¹ e pela primeira vez em uma espécie da família Celastraceae.

O espectro na região do IV (Figura 3.88, p.145) de **15** apresentou uma banda na região de 3420-3040 cm^{-1} e uma mais intensa em 1036 cm^{-1} , que indicaram a presença de grupos hidroxilas. Além dessas, as absorções intensas em 1450, 1470, 2870 e 2940 cm^{-1} foram relacionadas a grupos CH_2 e CH_3 e sugeriram a ocorrência de um TTPC contendo mais de um grupo hidroxila na estrutura. Geralmente as absorções relacionadas aos estiramentos da ligação O-H que ocorrem entre 3200-3550 cm^{-1} são atribuídas a grupos hidroxílicos envolvidos em ligações de hidrogênio intermoleculares.¹¹⁷

Os espectros de RMN de ^{13}C e DEPT-135 (Figura 3.90, p.146) de **15** permitiram atribuir os deslocamentos químicos de trinta e quatro sinais, sendo nove CH_3 , doze CH_2 , cinco CH , e oito C (carbonos não hidrogenados). O espectro de RMN de 1H de **15** (Figura 3.89, p.145) apresentou sinais típicos de um TTPC friedelano com seis simpletos de metilas ligadas a carbonos terciários, um duplete de um grupo metila ligado a um carbono secundário (H-23) e um multiplete em δ 3,79 (m) atribuído ao hidrogênio carbinólico ligado a C-3. Nos espectros de RMN de ^{13}C e de 1H de **15**, o aparecimento das ressonâncias correspondentes ao de um grupo hidroximetilênico: δ de ^{13}C em 63,3; δ de 1H em 3,64 (d, $J = 12,5$ Hz) e 3,97 (d, $J = 12,5$ Hz). Adicionalmente, considerando a ausência dos sinais correspondentes aos do grupo metila Me-24 (δ 14,6 e δ 0,78), como ocorre no β -friedelinol,³¹ foi sugerido que **15** se tratava de um TTPC friedelan-*3β,24*-diol.

A análise do mapa de contornos HMBC de **15a** (Figura 3.87, abaixo), através da correlação $^3J_{C-4/H-24a}$ entre o sinal de carbono C-4 (δ 48,66) com o sinal de hidrogênio de H-24a (δ 4,44), confirmou a localização do segundo grupo oxigenado em C-24. As Tabelas 3.25 (p.143) e 3.26 (p.144) mostram os dados de RMN ^{13}C e 1H obtidos a partir de experimentos 1D (1H , ^{13}C , DEPT, Figuras 3.89 a 3.92, p.145-147), bem com os de 2D (HSQC, COSY, HMBC e NOESY) de **15** e do seu derivado acetilado (**15a**), respectivamente. A maioria dos valores de deslocamentos químicos observados para **15** e **15a** teve uma boa correlação com os valores publicados, exceto para alguns valores de **15** em que esta análise encontrou inconsistências nos dados da literatura.

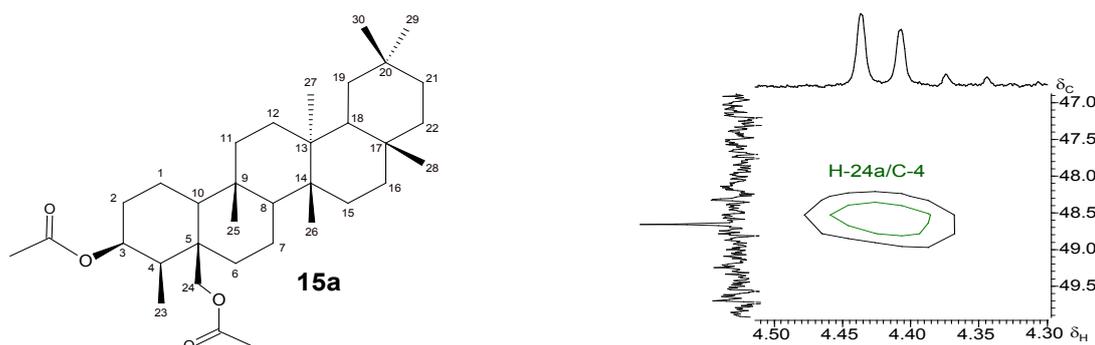


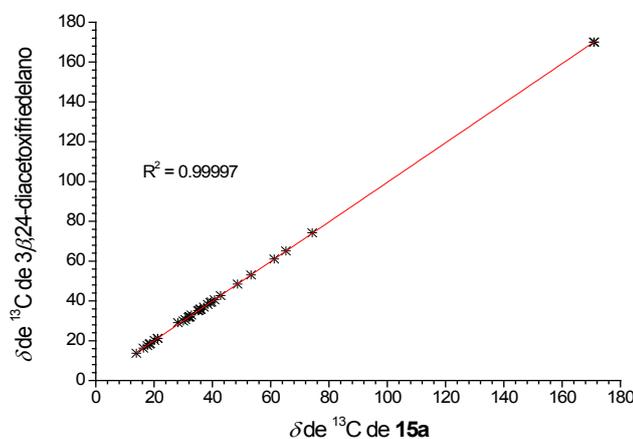
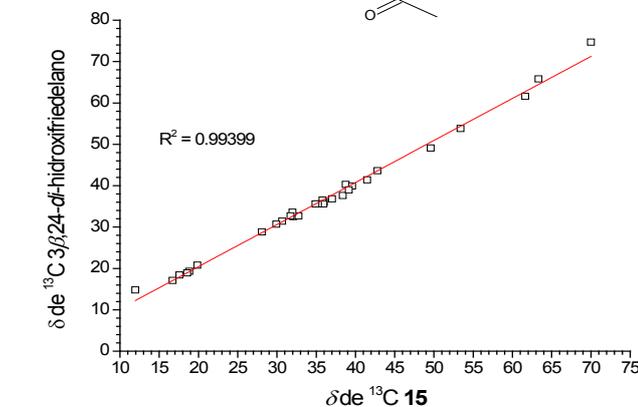
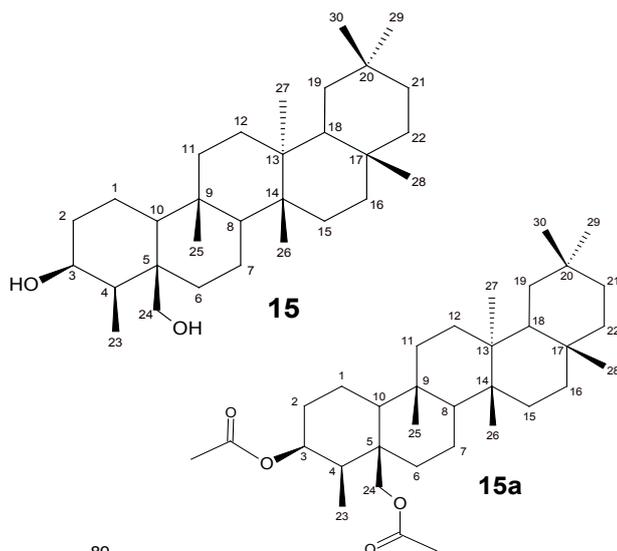
Figura 3.87: Expansão do mapa de contornos HMBC de **15a** ($CDCl_3$, 400 MHz): Correlação $^3J_{C-4/H-24a}$ (F2: δ 4,30-4,50 x F1: δ 47,0-49,5).

As discrepâncias entre os valores de deslocamentos químicos de **15** e os relatados por Costa,¹⁶¹ foram atribuídas, em parte, à utilização de solventes distintos nos experimentos de RMN e, principalmente, porque os valores relatados para C-3 e C-24 foram considerados inconsistentes. Geralmente, a acetilação de um grupo -COH provoca uma maior desblindagem do átomo de carbono sp^3 ligado ao átomo de oxigênio (efeito α). Nos TTPC's acetatos e derivados, os valores de δ de ^{13}C e δ de 1H de átomos na posição α -oxi, normalmente são registrados em maiores valores de δ que nos alcoóis ($\Delta\delta$ de $^{13}C = +2,5 \pm 1,40$ ppm e $\Delta\delta$ de $^1H = +1,05 \pm 0,32$ ppm).^{96,158} Os dados de RMN dos TTPC's isolados neste estudo mostraram que átomos na posição α -oxi nos acetatos apresentam valores de δ de ^{13}C entre +1,5-4,6 ppm e $\Delta\delta$ de 1H entre 0,6-1,3 ppm mais elevados do que nos alcoóis correspondentes. Por exemplo, o constituinte lupânico **9** (acetato de lupeoíla) mostrou valores de $\Delta\delta$ de ^{13}C e de $\Delta\delta$ de 1H de +2,0 e +1,28, respectivamente, em relação ao TTPC **8** (lupeol). O estearato de β -amirina (**10**) quando comparado à amirina (**12**), os valores de $\Delta\delta$ de ^{13}C e de $\Delta\delta$ de 1H foram de +1,5 e +1,28 ppm maiores no éster. Logo, comparando os valores de deslocamento químico das posições acetiladas de **15a** com o álcool corespondente **15**, verifica-se que o éster apresenta variações positivas. Essas variações nos valores de δ de ^{13}C foram de +4,2 (C-3) e de +1,9 ppm (C-24) e em δ de 1H foram de +1,20 (H-3), +0,80 (H-24a) e de +0,68 (H-24b), conforme mostra as Tabelas 3.25 e 3.26 (p.143-144). Com

base nos argumentos apresentados acima, podemos inferir que os deslocamentos químicos informados por Costa e colaboradores,¹⁶¹ principalmente para os sinais de carbono e hidrogênio do grupo carbinólico no TTPC 3 β ,24-dihidroxifriedelano, não estão condizentes com os valores normalmente observados.

Tabela 3.25: Comparação e análise de dispersão entre os valores de δ de ^{13}C de **15** e **15a** (CDCl_3 , 100 MHz) com os respectivos valores publicados para os compostos 3 β ,24-dihidroxifriedelano (piridina- d_5 , 100 MHz) e 3 β ,24-diacetoxifriedelano (CDCl_3 , 100 MHz)¹⁶¹

NC	15		15a	
	$\delta^{13}\text{C}$	Lit. ¹⁶¹	$\delta^{13}\text{C}$	Lit. ¹⁶¹
1	16,71	17,1	16,35	16,3
2	38,77	40,3	32,11	32,1
3	70,11	74,7	74,27	74,3
4	49,60	49,1	48,66	48,5
5	41,50	41,4	40,73	40,6
6	35,99	36	36,02	35,8
7	18,85	19,3	17,72	17,6
8	53,40	53,8	53,24	53,1
9	37,03	36,8	37,04	36,9
10	61,64	61,6	61,21	61,1
11	35,80	36,5	35,81	35,7
12	30,67	31,4	30,69	30,6
13	38,38	37,6	38,37	38,3
14	39,57	39,9	39,66	39,5
15	32,07	32,5	32,29	32,0
16	35,92	35,6	35,94	35,9
17	29,91	30,7	30,03	29,9
18	42,81	43,6	42,81	42,7
19	35,24	35,6	35,36	35,2
20	28,07	28,8	28,18	29,1
21	32,76	32,7	32,79	32,9
22	39,17	39,0	39,28	39,2
23	11,95	14,8	13,89	13,7
24	63,33	65,8	65,20	65,1
25	17,58	18,4	18,38	18,3
26	18,56	18,9	18,65	18,6
27	19,87	20,8	20,15	20,1
28	31,99	33,6	32,11	32,0
29	34,90	35,6	35,05	35,0
30	31,74	32,7	31,78	31,7
31	-	-	170,83	170,0
32	-	-	21,24	21,2
33	-	-	171,06	170,1
34	-	-	21,21	21,2



Fonte: Espectros de RMN ^{13}C e DEPT-135 (Figuras 3.89 e 3.92, p.145-147)



Tabela 3.26: Comparação entre os valores de δ de ^1H de **15** e **15a** (CDCl_3 , 400 MHz) com os respectivos valores publicados para os compostos 3 β ,24-di-hidroxifriedelano (piridina- d_5 , 400 MHz) e 3 β ,24-diacetoxifriedelano (CDCl_3 , 400 MHz)¹⁶¹

H	15	3,24-di-hidroxi-friedelano (lit.) ¹⁶¹	15a	3,24-di-acetoxi-friedelano (lit.) ¹⁶¹
Heq-3 α	3,79 (m)	5,25 sl	4,99 (m)	4,94 d (2,4 Hz)
Hax-4 α	1,42 (m)	NI	1,52 (m)	1,50 (m)
Hax-8 α	1,34 (m)	NI	1,33 (m)	1,30 (sl)
Hax-10 α	1,06 (m)	NI	1,09 (m)	1,10 (m)
Hax-18 β	1,56 (m)	NI	1,54 (m)	1,60 (m)
Hax-1 β	2,34 dq (3x13,5 e 4,0 Hz)	NI	1,47 (m)	1,45 (m)
Heq-1 α	1,46 (m)	NI	1,40 (m)	1,45 (m)
Hax-2 β	1,65 (m)	NI	1,96 (m)	1,90 (m)
Heq-2 α	0,88 (m)	NI	1,59 (m)	1,55 (m)
Hax-6 α	1,35 (m)	NI	1,35 (m)	1,50 (m)
Heq-6 β	2,04 (m)	2,3 d (14 Hz)	2,27 (m)	2,30 (sl)
Hax-7 β	1,45 (m)	NI	1,44 (m)	1,40 (m)
Heq-7 α	1,38 (m)	NI	1,32 (m)	1,40
Hax-11 α	1,14 (m)	NI	1,08 (m)	1,20(m)
Heq-11 β	1,48 (m)	NI	1,54 (m)	1,50 (m)
Hax-12 β	1,30 (m)	NI	1,32 (m)	NI
Heq-12 α	1,42 (m)	NI	1,40 (m)	NI
Hax-15 β	1,26 (m)	NI	1,31 (m)	NI
Heq-15 α	1,42 (m)	NI	1,49 (m)	NI
Hax-16 α	1,59 (m)	NI	1,42 (m)	1,4
Heq-16 β	1,56 (m)	NI	1,34 (m)	1,0
Hax-19 α	1,37 (m)	2,0 dd (14,1 e 2,4 Hz)	1,38 (m)	2,30 d (13 Hz)
Heq-19 β	1,22 (m)	NI	1,05 (m)	1,30 (m)
Hax-21 β	1,28 (m)	NI	1,27 (m)	1,30 (m)
Heq-21 α	1,46 (m)	NI	1,46 (m)	NI
Hax-22 α	0,91 (m)	NI	0,92 (m)	0,90 (d, 7 Hz)
Heq-22 β	1,51 (m)	NI	1,48 (m)	1,40 (m)
H-23	1,05 d (7,0 Hz)	1,09 d (7 Hz)	0,97 d (6,5 Hz)	0,92 d (7,0 Hz)
H-24a	3,64 d (12,5 Hz)	4,61 d (14,0 Hz)	4,44 d (12,0 Hz)	4,40 d (13,0 Hz)
H-24b	3,97 d (12,5 Hz)	4,90 d (14,0 Hz)	4,65 d (12,0 Hz)	4,60 d (13,0 Hz)
H-25	1,15 s	0,88 s	0,89 s	0,85 s
H-26	1,02 s	1,04 s	1,00 s	0,96 s
H-27	1,02 s	1,07 s	0,995 s	0,96 s
H-28	1,18 s	1,18 s	1,17 s	1,13 s
H-29	0,97 s	0,90 s	0,95 s	0,91 s
H-30	1,03 s	1,00 s	0,990 s	0,96 s
H-32			2,02 s	1,96 s
H-34			2,04 s	2,00 s

Lit.: literatura; Heq e Hax; hidrogênio equatorial e axial, respectivamente, NI: dado não informado.

Fonte: Espectros de RMN de ^1H (Figuras 3.89 e 3.91, p.145-146)

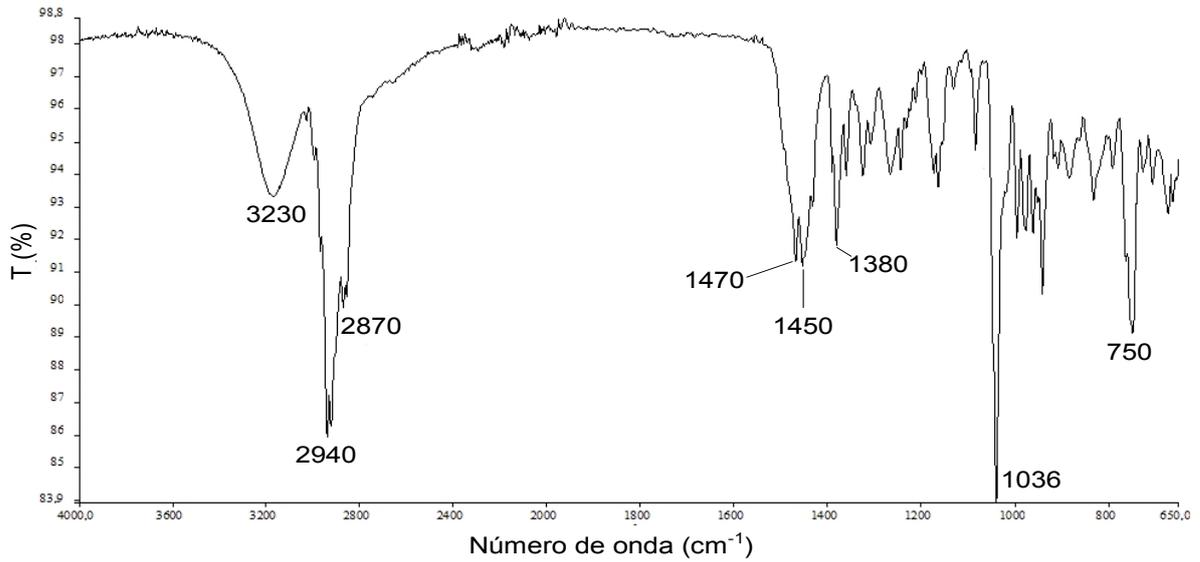


Figura 3.88: Espectro de absorção de **15** na região do infravermelho (KBr).

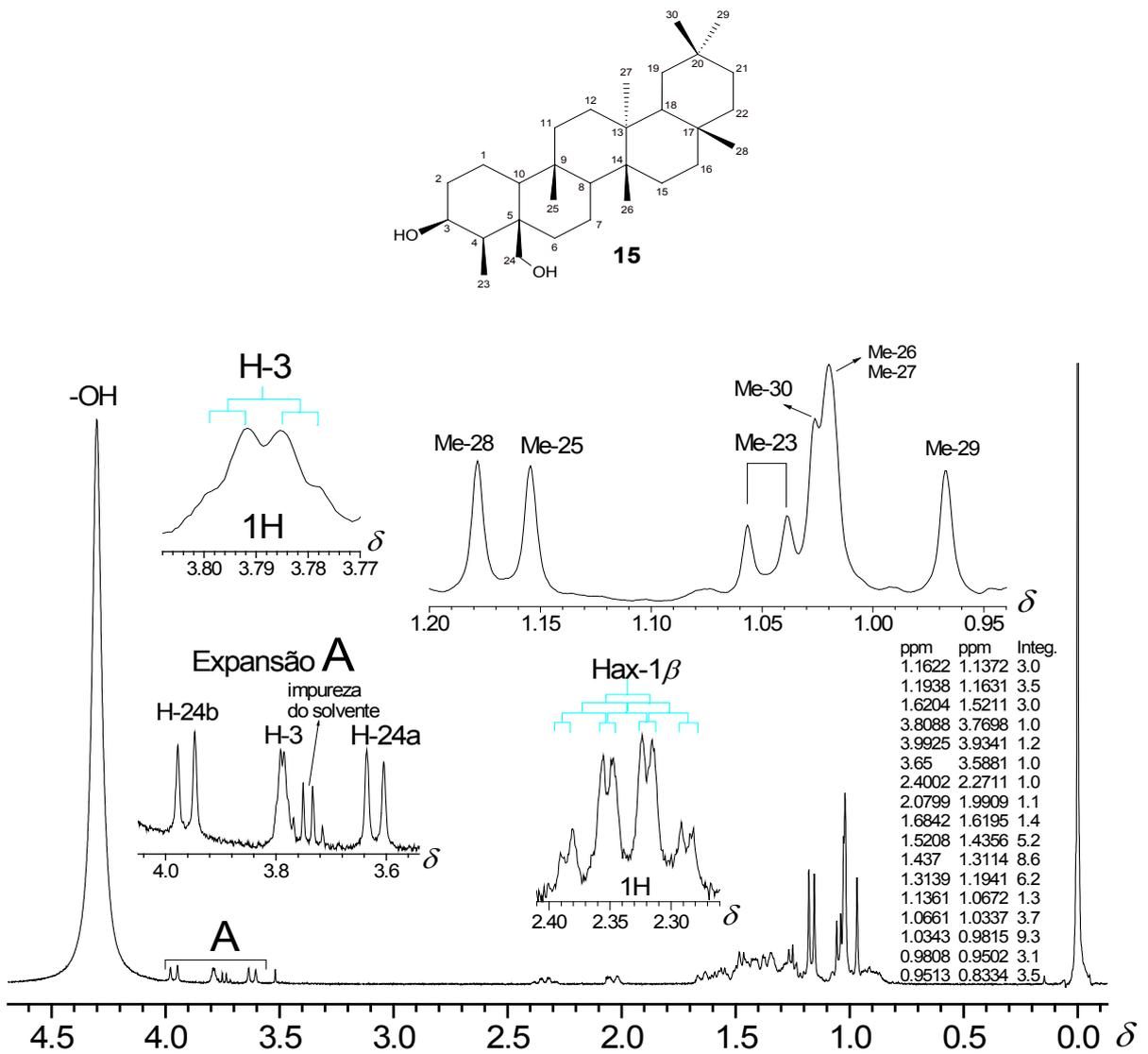


Figura 3.89: Espectro de RMN de ¹H de **15** (CDCl₃, 400 MHz).

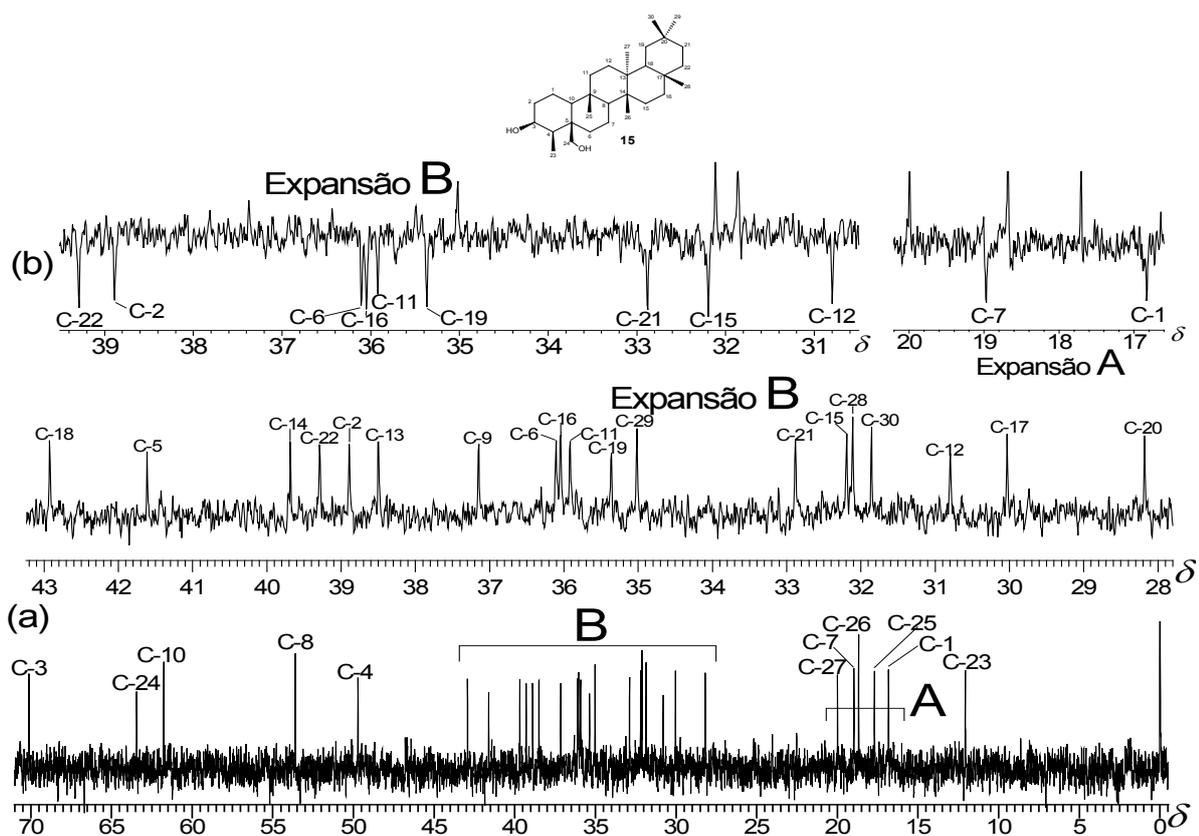


Figura 3.90: Espectros de RMN de (a) ^{13}C e (b) DEPT-135 de **15** (CDCl_3 , 100 MHz).

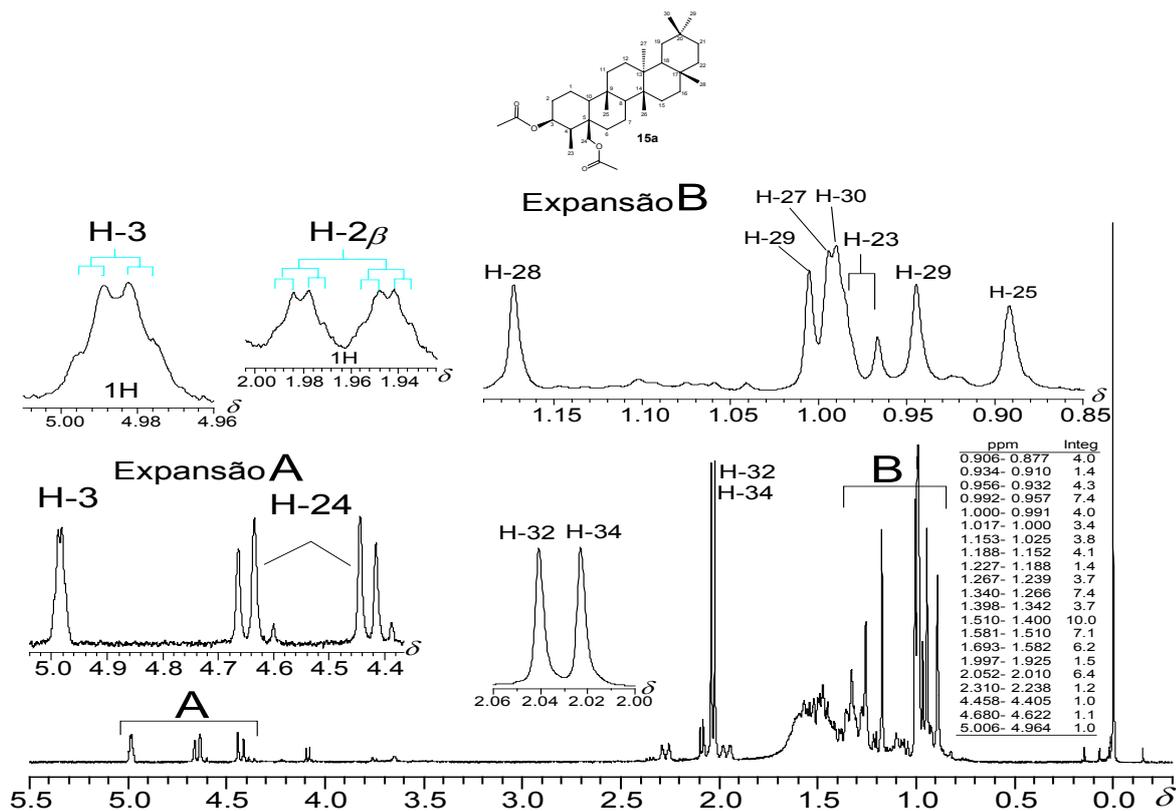


Figura 3.91: Espectro de RMN de ^1H de **15a** (CDCl_3 , 400 MHz).

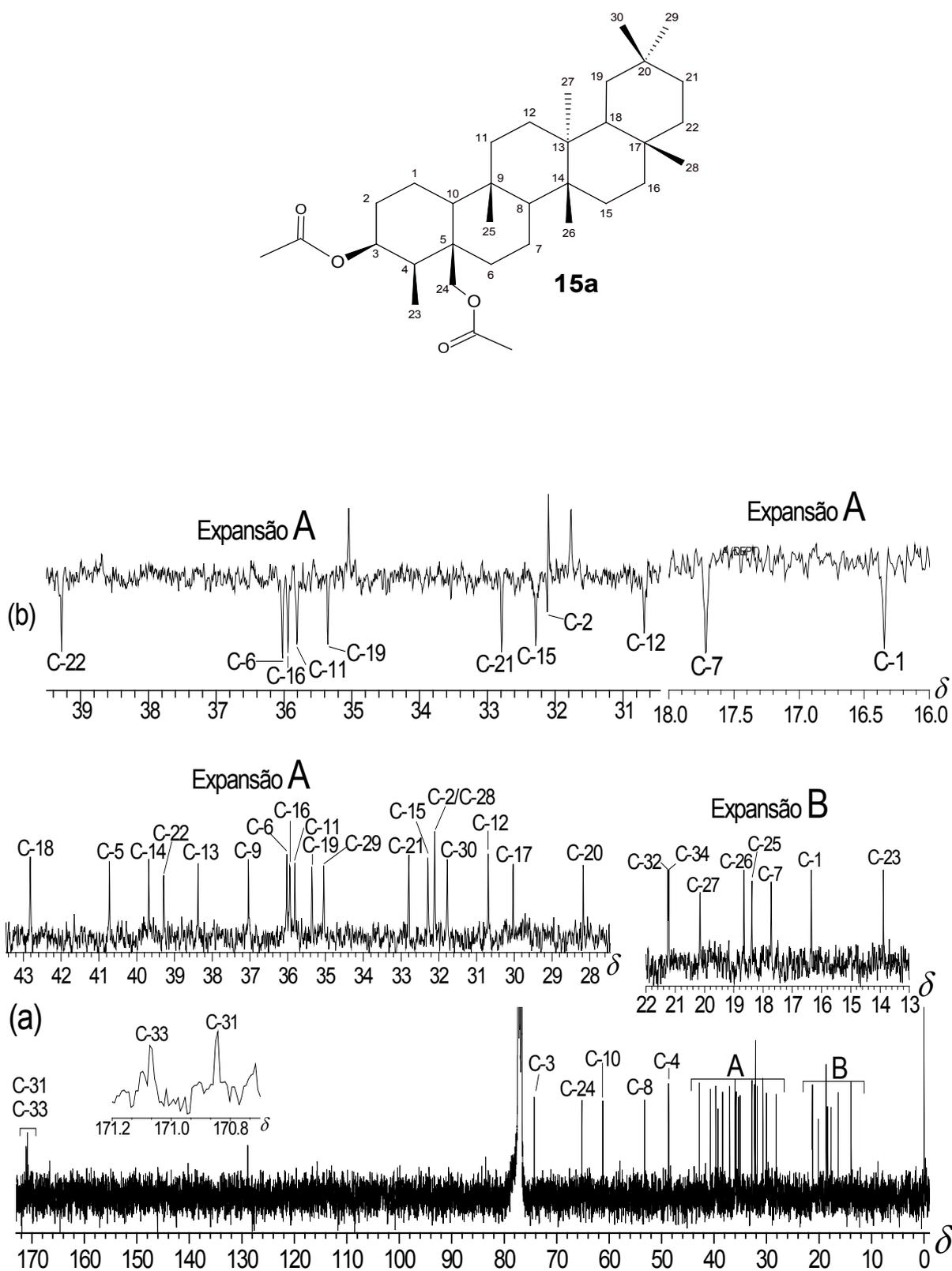
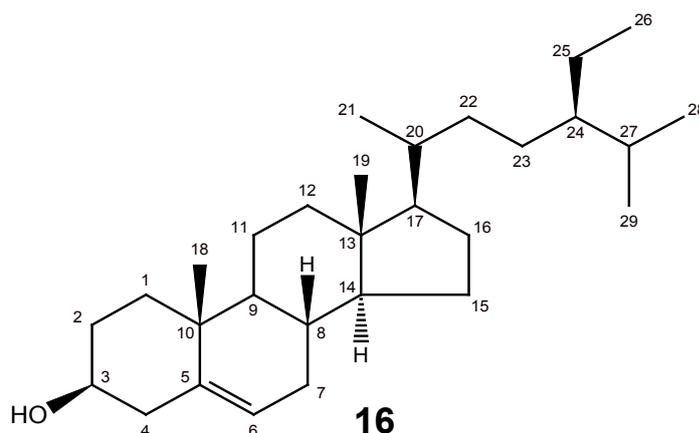


Figura 3.92: Espectros de RMN de (a) ¹³C e (b) DEPT-135 de **15a** (CDCl₃, 100 MHz).

3 β -Sitosterol (16)

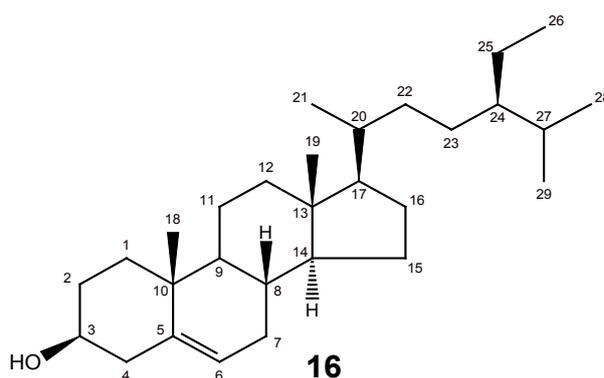
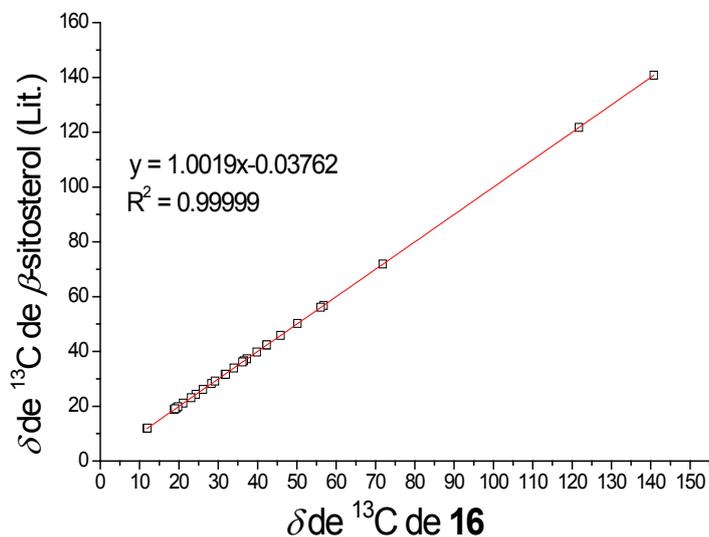
O constituinte **16** foi obtido do fracionamento do extrato FAEMA por cromatografia líquida. O material isolado, um sólido branco (P.F. = 132,3-134,3 °C)*, sob teste de Liebermann-Burchard apresentou coloração azul que imediatamente esmaeceu a verde, sendo considerado um resultado positivo para esteroides.¹³⁰

O espectro de absorção na região do infravermelho de **16** (Figura 3.93, p.150) apresentou características de composto alifático insaturado, através de bandas de absorção em 2960 cm⁻¹, 2840 cm⁻¹ (ν C-H), 1470 cm⁻¹ e 1380 cm⁻¹ (δ C-H). A banda de absorção em 3250-3400 cm⁻¹ (ν O-H) e em 1050 cm⁻¹ (ν C-O) indicou a presença de hidroxila de álcool⁹⁹. No espectro de RMN de ¹H (Figura 3.94, p.150) o sinal em δ 5,35 (m, 1H) foi atribuído ao hidrogênio olefínico H-6 e o sinal em δ 3,52 (tt, J = 11,0 e 4,5 Hz, 1H) foi atribuído ao hidrogênio carbinólico H-3. Os seis sinais em δ 0,68 (s, 3H), 0,82 (d, J = 7,0 Hz, 3H), δ 0,84 (d, J = 7,0 Hz, 3H), δ 0,85 (m, 3H), δ 0,92 (d, J = 6,5 Hz, 3H) e em δ 1,01 (s, 3H) foram atribuídos aos hidrogênios metílicos e os sinais múltiplos com valores entre δ 0,89 e δ 2,31 foram atribuídos aos hidrogênios dos grupos CH₂ e CH de **16**. No espectro de RMN de ¹³C (Figura 3.95, p.151), os sinais em δ 121,73 e δ 140,78, foram atribuídos aos carbonos olefínicos C-5 e C-6 e o sinal em δ 71,83 foi atribuído ao carbono carbinólico C-3. Os valores de deslocamentos químicos de carbono e hidrogênio apresentados corroboram com a caracterização do constituinte **16** como sendo o β -sitosterol. Além disso, a comparação entre os valores de RMN de ¹³C de **16** e os encontrados da literatura (Tabela 3.27, p.149) apresentou uma excelente correlação ($R^2 = 0,99999$).

* A Sigma-Aldrich fornece β -sitosterol (pureza \geq 95%) com temperatura de P.F. de 136-140 °C.

Tabela 3.27: Comparação e análise de dispersão entre os valores de δ de ^{13}C de **16** (CDCl_3 , 100 MHz) com os respectivos valores publicados para β -sitosterol (CDCl_3 , 100MHz)⁷⁵

C	16	Literatura ⁷⁵
1	37,28	37,28
2	31,70	31,69
3	71,83	71,84
4	42,34	42,33
5	140,78	140,79
6	121,73	121,74
7	31,93	31,94
8	31,93	31,94
9	50,17	50,17
10	36,53	36,54
11	21,11	21,11
12	39,80	39,81
13	42,33	42,35
14	56,80	56,80
15	24,32	24,33
16	28,26	28,26
17	56,09	56,09
18	11,87	11,88
19	19,41	19,41
20	36,16	36,17
21	18,80	18,80
22	33,98	33,98
23	26,13	26,13
24	45,88	45,88
25	29,20	29,20
26	19,82	19,83
27	19,05	19,06
28	23,10	23,10
29	12,00	12,00



Fonte: Espectros de RMN de ^{13}C /DEPT-135 (Figura 3.95, p.151).

Estudos publicados mostraram que o fitosterol β -sitosterol desempenha um papel importante na redução da hipertrofia benigna de próstata em tratamento baseado em fitoterapia¹⁶² e na inibição da absorção de colesterol no intestino.¹⁶³

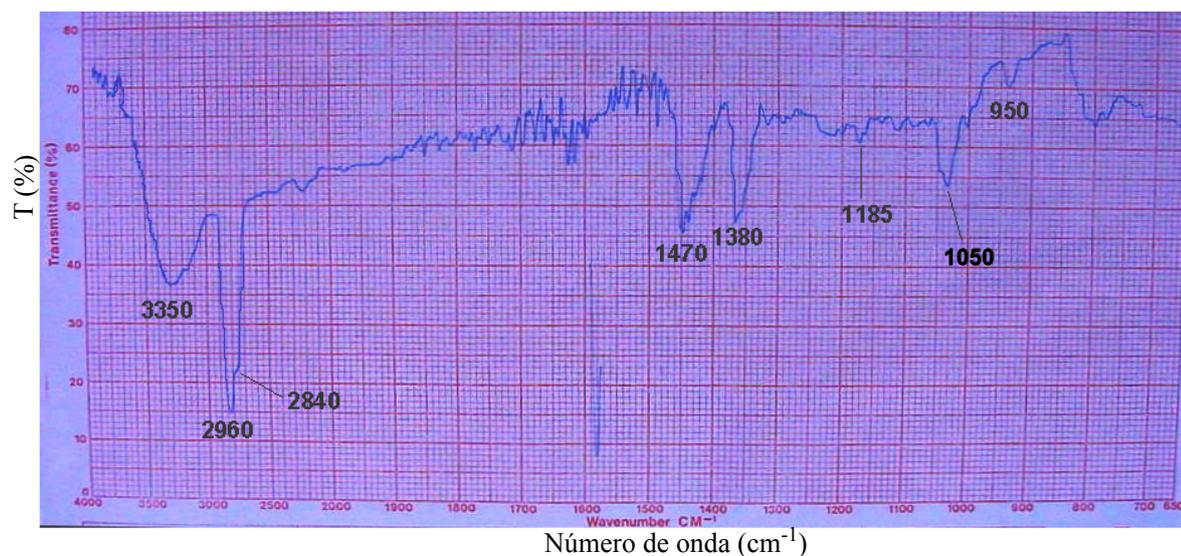


Figura 3.93: Espectro de absorção de **16** na região do infravermelho (KBr).

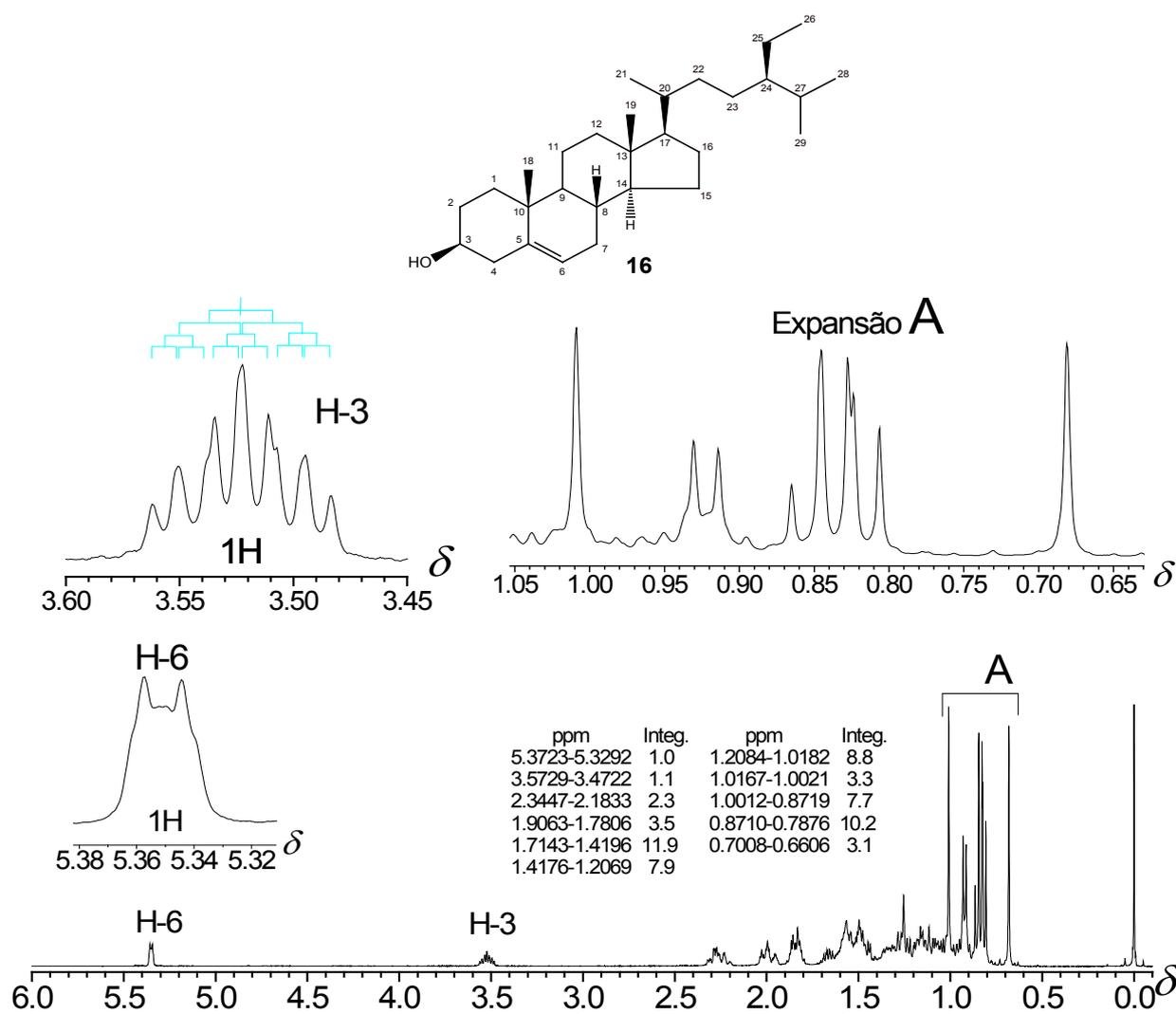


Figura 3.94: Espectro de RMN de ^1H de **16** (CDCl_3 , 400 MHz).

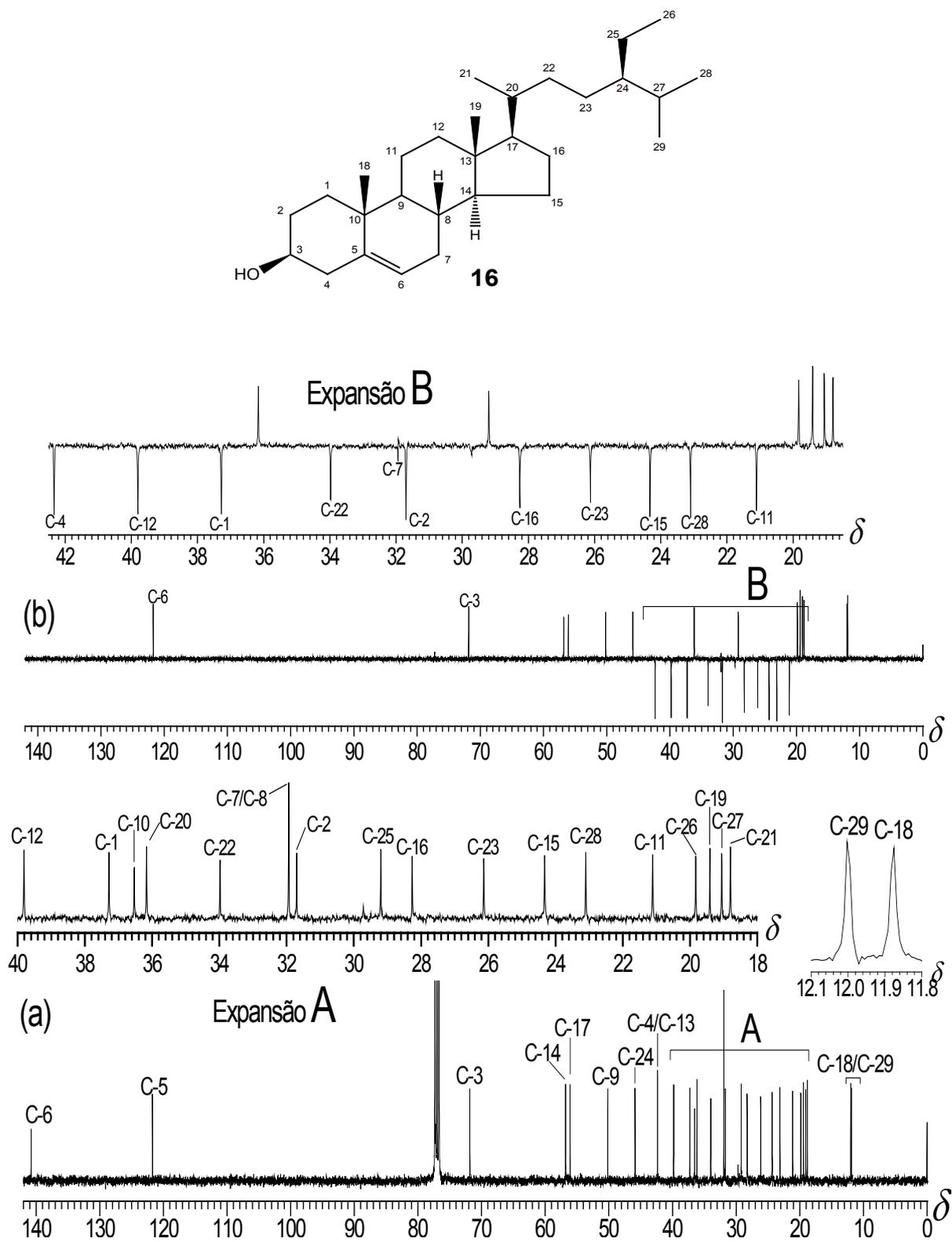
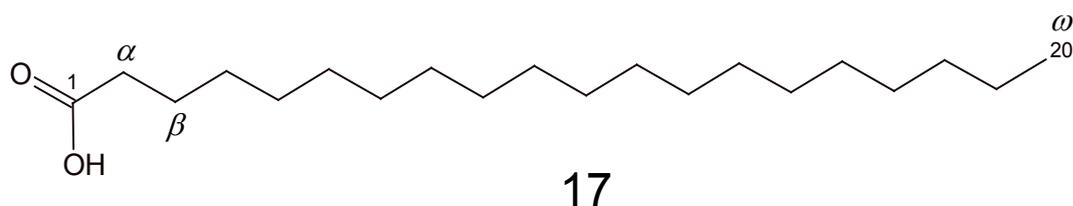


Figura 3.95: Espectros de RMN de (a) ^{13}C e de (b) DEPT-135 de **16** (CDCl_3 , 100 MHz).

Ácido graxo eicosanóico (17)

As frações que deram origem a **17** foram obtidas após fracionamento por cromatografia líquida do extrato em acetato de etila de folha de *M. acanthophylla*. A partir dessas frações foi isolado uma sólido ceroso e brilhante (5,0 mg) com ponto de fusão de 70 - 74 °C (76-78 °C).¹²⁹ O espectro de RMN de ¹³C (Figura 3.97, p.153) apresentou um conjunto de sinais em δ 14, 23, 29, 29,6 e 32 (Tabela 3.28) são característicos de compostos que apresentam cadeia linear com número de átomos de carbono superior a nove.¹¹⁸ No espectro de RMN de ¹H (Figura 3.96, p.153), o sinal em δ 0,88 (t, $J = 7,0$ Hz, 3H) foi atribuído aos hidrogênios do grupo metílico terminal. O simpleto muito intenso em δ 1,25 (m, 32H) e os correspondentes sinais de carbono-13 em torno de 29-30 ppm, incluindo o mais intenso em δ 29,72, foram atribuídos aos grupos metilênicos internos de uma longa cadeia alcânica de ácido graxo. Os hidrogênios metilênicos α e β -carboxílicos apresentaram os seus respectivos sinais em δ 2,37 (t, $J = 7,5$ Hz, 2H) e um quinteto em δ 1,64 (q, $J = 7,5$ Hz, 2H), respectivamente. A Tabela 3.28 apresenta a comparação entre os dados de RMN obtidos experimentalmente e os encontrados na literatura.

O ácido eicosanóico (**17**) foi isolado anteriormente de *Austroplenckia polpunea* por Duarte.¹²⁹ O ácido eicosanóico ou araquidônico, ocorre em pequenas quantidades em óleos vegetais como substâncias livres ou esterificadas, como por exemplo, no óleo de soja, amêndoas, amendoim e em outras plantas.¹⁶⁴⁻¹⁶⁵

Tabela 3.28: Comparação entre os valores de δ de ¹³C de **17** (CDCl₃, 100 MHz) com os respectivos valores publicados para o ácido araquidônico (CDCl₃, 100 MHz)^{85, 129}

Posição	17	Lit. ⁸⁵	Posição	17	Lit. ⁸⁵
1	177,65	179,83	7 - 15	29,72	29,72
2	33,47	34,03	16	29,36	29,40
3	24,72	24,72	17	29,44	29,40
4	29,07	29,10	18	31,92	31,96
5	29,24	29,28	19	22,69	22,71
6	29,59	29,48	20	14,11	14,11

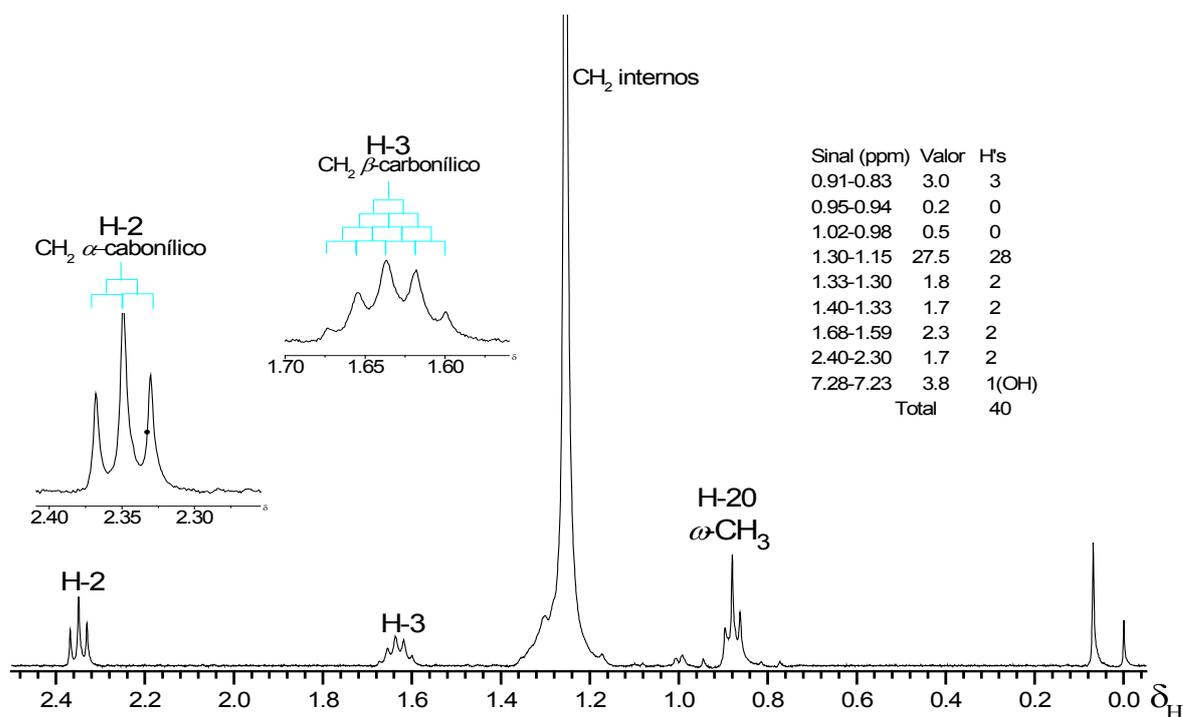


Figura 3.96: Espectro de RMN de ¹H de 17 (CDCl₃, 400 MHz).

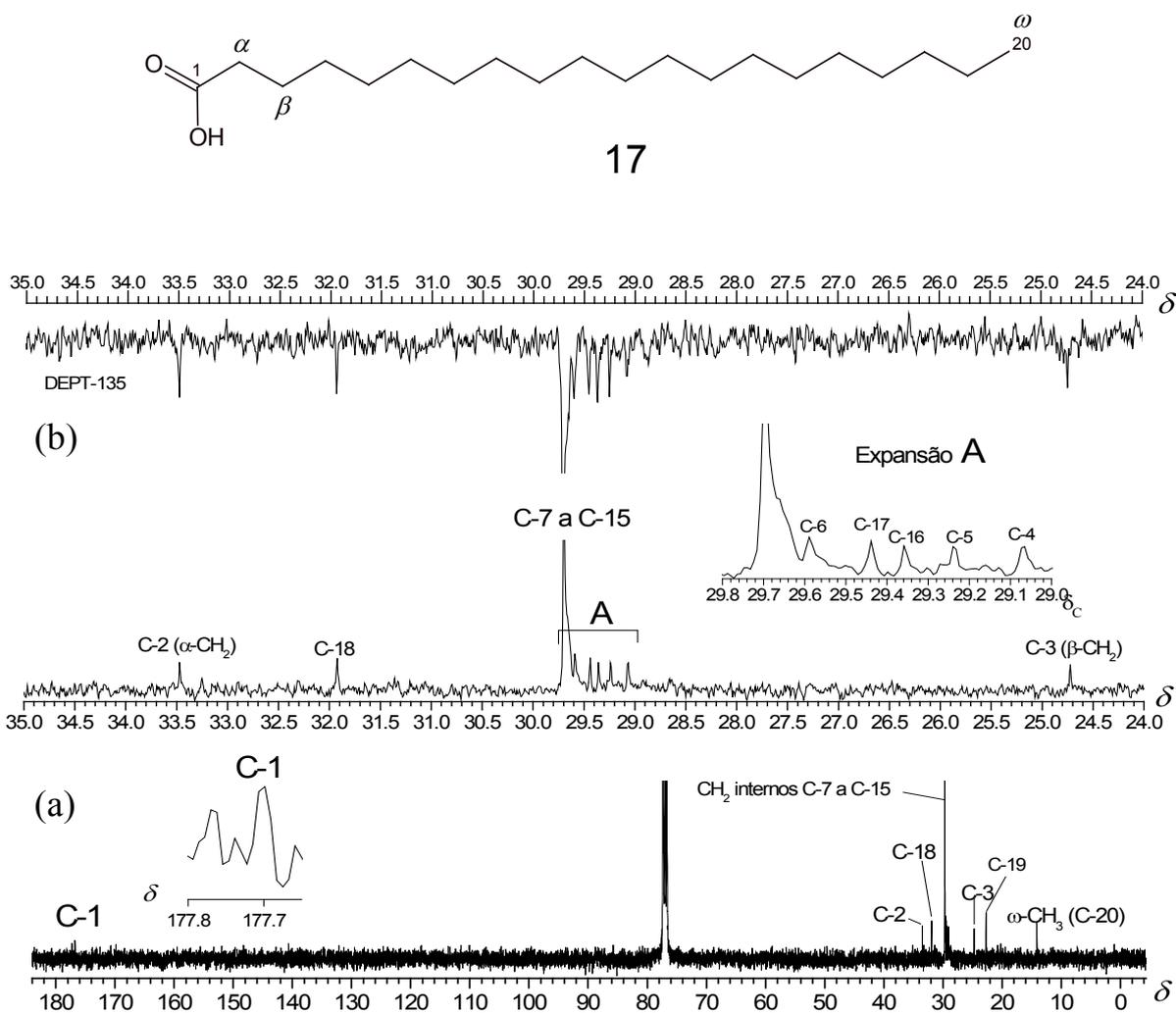


Figura 3.97: Espectro de RMN de (a) ¹³C e (b) DEPT-135 de 17 (CDCl₃, 100 MHz).

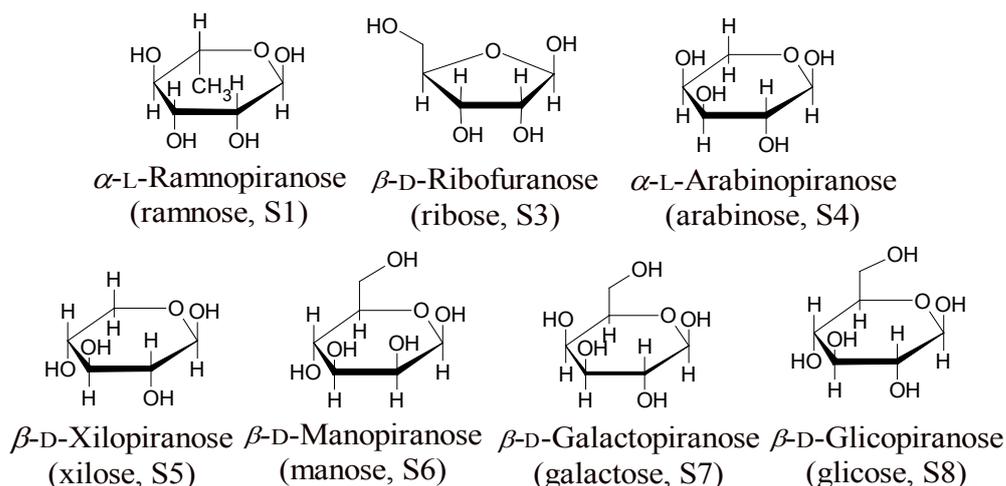
Mistura de monossacarídeos (18)

Figura 3.98: Projeções de Harworth das estruturas dos monossacarídeos (18) identificados nas folhas de *M. acantophylla* por CCD, CGAR e CG-EM.

Análise dos monossacarídeos do extrato SEMA por CCD

Uma amostra (50 mg) do extrato SEMA foi hidrolisada com HCl (10%, 15 mL) em um forno de microondas comum, médio (cerca de 800 W) com potência de operação ajustada em 160 W (20% da potência máxima) por 5 minutos, em frasco fechado. Em seguida à hidrólise, foi feita uma extração por partição com acetato de etila. Foram desenvolvidas placas CCD de alumínio recobertas com sílicagel 60, carregadas com alíquotas de 20 μ L das frações obtidas na fases orgânica e aquosa da partição e com amostras do extrato SEMA puro. As placas CCD carregadas com alíquotas da fração aquosa foram eluídas com clorofórmio-metanol-água-ácido acético (6:4:1:1 v/v/v/v), nessas placas, a revelação foi desenvolvida utilizando dois tipos de reveladores: anisaldeído sulfúrico e solução etanólica (70%) básica de permanganato de potássio. As placas da fração aquosa apresentaram manchas identificadas como galactose, dulcitol e glicose (Figuras 3.99 (a) e (b), p.155). As placas CCD carregadas com alíquotas da fração orgânica, foram eluídas com clorofórmio-metanol-água (87:12:1 v/v/v) e reveladas com NP-PEG 4000 sob luz UV (λ 366 nm). Nessas últimas foram detectadas duas manchas amarelo-esverdeadas e uma mancha amarela, que, com base na literatura, foram consideradas como indicativos da presença de flavonóis como quercetina (mancha amarela de menor R_f), canferol (mancha amarela-esverdeada e isoramnetina (segunda mancha amarela-esverdeada de maior R_f).⁷⁷

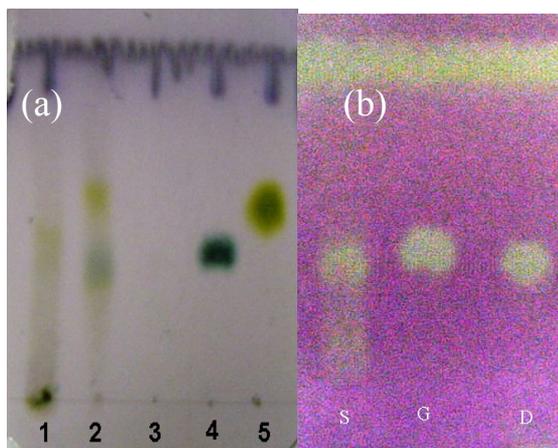
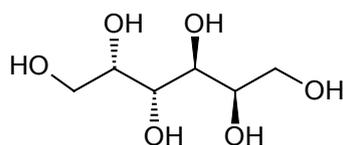


Figura 3.99: Placas CCD (a) eluída com $\text{CHCl}_3\text{-MeOH-H}_2\text{O-CH}_3\text{COOH}$ (6:4:1:1 v/v/v/v), revelada com anisaldeído sulfúrico. Aplicações: extrato SEMA não hidrolisado (1), fase aquosa resultante da hidrólise de SEMA (2) e padrões de: galactitol (3), D-glicose (4) e D-galactose (5); (b) eluída com clorofórmio-metanol-água (100:13,5:1 v/v/v), revelada com KMnO_4 básico (EtOH , NaOH $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$). Aplicações: fase aquosa resultante da hidrólise de SEMA (S), e padrões de: glicose (G) e galactitol (D).

Identificação de monossacarídeos constituintes do extrato SEMA por CGAR e CG-EM

O resultado da análise por CGAR do extrato SEMA hidrolisado (Tabela 3.29, p.157) permitiu identificar e avaliar a quantidade relativa de setes unidades monossacarídicas (Figura 3.98, p.154) constituintes desse extrato. Os padrões utilizados foram L-ramnose (S1), L-fucose (S2), D-ribose (S3), L-arabinose (S4), D-xilose (S5), D-manose (S6), D-galactose (S7) e D-glicose (S8), açúcares que normalmente são isolados de plantas, tais como S1, S3, S7 e S8, que constituem os flavonóis-3-*O*-glicosídeos de *Maytenus*.^{38-40,73}

A técnica utilizada para análise de açúcares por CGAR, conhecida como alditóis-acetatos,¹⁶⁶ para a derivatização das amostras, consistiu na redução dos açúcares livres do extrato e padrões com NaBH_4 , primeiro formando seus respectivos alditóis para, em seguida, submetê-los a reação de acetilação. As quantidades relativas, representadas pelas áreas dos picos cromatográficos (A_p), mostraram que o alditol galactitol (dulcitol) representava o constituinte majoritário do extrato SEMA, entretanto, a análise comparativa das áreas dos picos S7 nos cromatogramas CGAR (Tabela 3.29, p.157) indicou a ocorrência de β -D-galactose na forma ligada no extrato SEMA. Mediante as análises por CCD (Figura 3.99 (a) e (b)) e CGAR (Figuras 3.100 (A), (B) e (C), p.156) foi possível concluir que este carboidrato ocorre na forma livre como o galactitol (Figura 3.100 (C), p.156) e na forma ligada como a aldo-hexose cíclica β -D-galactopiranosose (S7, Figura 3.98, p.154).



Galactitol isolado de SEMA

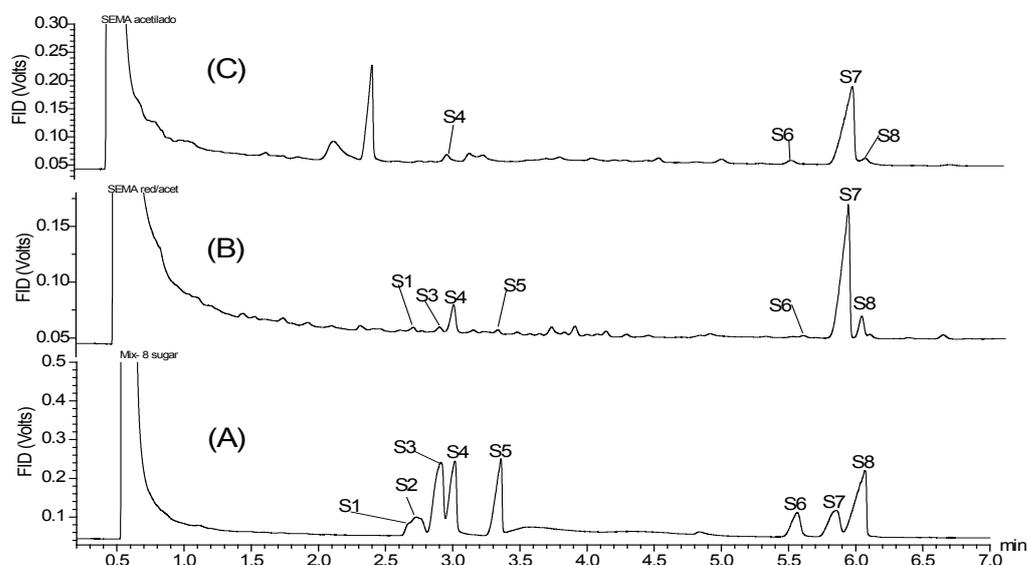


Figura 3.100: Cromatogramas obtidos por CGAR de (A) padrões de alditóis: ramnitol (S1, $t_r = 2,68$ min), fucitol (S2, $t_r = 2,73$ min), ribositol (S3, $t_r = 2,91$ min), arabinitol (S4, $t_r = 3,01$ min), xilitol (S5, $t_r = 3,36$ min), manitol (S6, $t_r = 5,56$ min), galactitol (S7, $t_r = 5,86$) e glicitol (S8, $t_r = 6,06$ min); (B) extrato SEMA hidrolisado, reduzido e acetilado, e, (C) extrato SEMA não hidrolisado, apenas reduzido e acetilado. As amostras foram analisadas (injeção de $2 \mu\text{L}$) em uma coluna capilar BP10 (cianopropil fenil dimetil siloxano 14%, $30 \text{ m} \times 0,25 \text{ mm} \times 0,25 \mu\text{m}$), divisão de fluxo de 1:80 (split), pressão de 15 psi (H_2) e temperatura programada inicial de $200 \text{ }^\circ\text{C}$, seguindo a $5 \text{ }^\circ\text{C}/\text{min}$ até a temperatura final de $250 \text{ }^\circ\text{C}$ em 10 minutos em um CG Varian CP-3800.

A análise dos cromatogramas obtidos por CGAR (Figura 3.100 e Tabela 3.29, p.157) mostrou que os monossacarídeos S4 e S8 foram detectados em ambas as formas, livre e ligada. Indicou também que S1, S3, S5 ocorrem exclusivamente na forma ligada, ou seja, ocorrem constituindo moléculas de glicosídeos, S6 ocorre apenas na forma livre e S2 não foi detectado no extrato. Os relatos da literatura mostram que o galactitol é um constituinte bastante comum nas plantas do gênero *Maytenus*^{25,29,27,64} e a maioria dos glicosídeos flavônicos isolados de plantas desse gênero apresentam unidades de galactose como o principal monossacarídeo constituinte de suas cadeias glicosídicas,^{38-40,74, 80-82} fato que está de acordo com a abundância relativa desse açúcar em SEMA, conforme os resultados apresentados neste estudo. Por outro lado, como foi observada, a disponibilidade desses sete monossacarídeos distintos (na forma ligada) nesse extrato (Figura 3.98, p.154) foi também um indicativo de que podem existir vários compostos flavonoides com cadeias formadas por mono, di, tri ou tetrassacarídeos nas folhas de *M. acanthophylla*.

Tabela 3.29: Monossacarídeos livres (FS) e ligados (BS) identificados no extrato SEMA através da análise do cromatograma CGAR (Figura 3.100 (A), (B) e (C), p.156)

Pico No.	Açúcar Nome	t_r (min)	A_p (C) FS (%)	A_p (B) (%) total	ΔA_p (B-C) BS (%)
S1	ramnose	2,69	0,00	1,65	1,65
S2	fucose	ND	ND	ND	ND
S3	ribose	2,90	0,00	2,03	2,03
S4	arabinose	2,98	2,89	9,29	6,40
S5	xilose	3,40	0,0	1,12	1,12
S6	manose	5,50	1,65	<0,05	ND
S7	galactose	5,90	*44,35	57,63	13,28
S8	glicose	6,01	1,04	6,48	5,44

ND: não detectado; t_r : tempo de retenção médio entre os cromatogramas B e C; $A_p(B)$: área do pico do cromatograma (B); (*): Nas folhas e raízes de *M. acanthophylla* foram isoladas quantidades significativas de galactitol (dulcitol). A técnica de derivatização utilizada na análise CGAR não faz distinção entre uma aldose/cetose e o seu poliol (alditol) correspondente após redução.

A confirmação da identificação dos monossacarídeos por CG-EM utilizando padrões (S1 a S8), na forma de alditóis-acetatos e uma amostra de SEMA hidrolisada, reduzida e acetilada, foi feita mediante a análise dos tempos de retenção (T_R) e da identidade/similaridade espectral (disponível na biblioteca do aparelho CG-EM utilizado). A análise do cromatograma de íons totais e espectros de massas obtidos (TIC, Figura 3.101, p.158), permitiram ratificar a identificação dos açúcares feitos por CGAR. Os picos dos açúcares S1, S6, S7 e S8 foram identificados em $T_R = 15,72, 21,83, 21,90$ e $22,05$ minutos. Os glicosídeos S3, S4 e S5 eluíram simultaneamente, onde os três respectivos picos se sobrepuseram na faixa de T_R de 17,98 a 18,05 minutos, apresentando um único pico no TIC. A eluição simultânea de S3, S4 e S5 provavelmente ocorreu porque as estruturas dos correspondentes acetatos-alditóis desses monossacarídeos são bastante semelhantes, apresentando tempos de retenção muito próximos e, portanto, indistinguíveis na análise por CG-EM nas condições utilizadas.

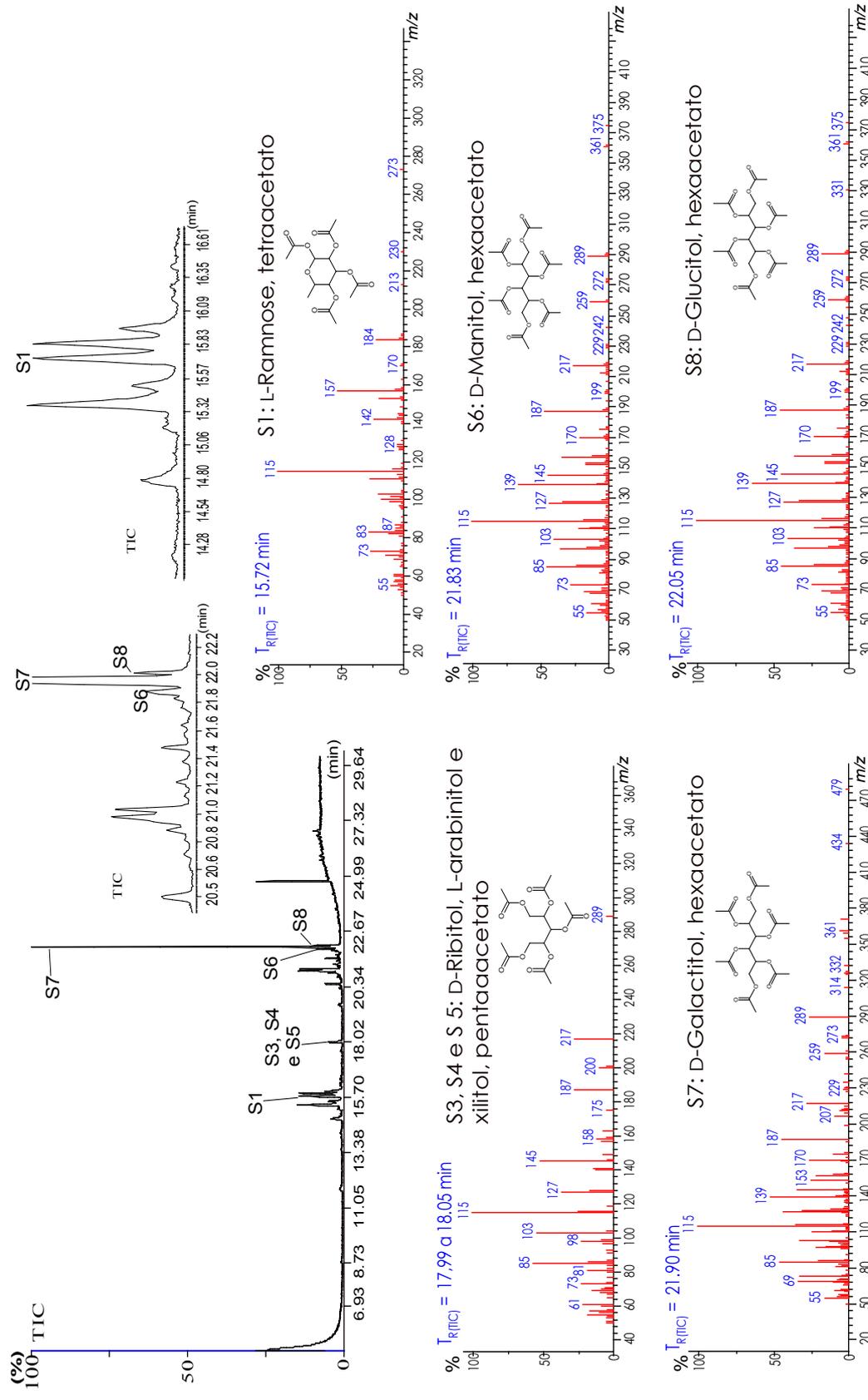
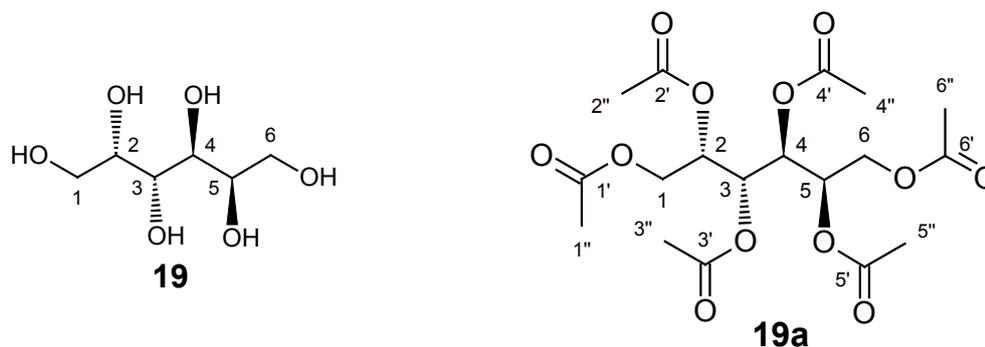


Figura 3.101: Cromatograma de ions totais (TIC) obtido por CG-EM de SEMA hidrolisado, reduzido e acetilado e os respectivos EM de monossacarídeos identificados na forma de acetatos de alditóis. Condições: coluna capilar DB-5 (5% fenilmetilsilicone, 30 m x 0,25 mm x 0,25 µm de d.i.), divisão de fluxo de 1:27, arraste por He_(g) (189,2 kPa), temperaturas (T) de 120 °C a 7 °C/min até 280 °C em ≈23 minutos, mantida por 7 minutos, injetor, T = 280 °C; interface, T = 250 °C, em aparelho Shimadzu, modelo GC-EM-QP5000, dotado de detector EM por impacto eletrônico (70 eV).

Galactitol (19) e hexa-acetato de galactitol (19a)

Galactitol (**19**) puro foi obtido, após recristalização com metanol-água (cerca de 8:2 v/v), a partir de uma amostra do extrato SEMA. Isolado como um sólido branco cristalino, com ponto de fusão de 185,8-188,1 °C (184,7-187,3 °C),²⁵ apresentando solubilidade moderada em metanol quente e solúvel em água. As frações solúveis em água e em água-metanol (50/50 v/v) preparadas a partir dos extratos SEMA, FOMMA e FAMMA apresentaram uma alta concentração de **19**, quando analisadas por CGAR, bem como por CCD (sílica gel), utilizando como eluente clorofórmio-metanol-água-ácido acético (6:4:1:1) e revelador preparado com KMnO₄ (5%) dissolvido em solução 1,0 mol L⁻¹ de KOH em etanol (95%). Uma amostra de **19**, analisada por RMN de ¹H e de ¹³C (Figuras 3.106, p.164 e 3.108, p.165), teve os dados comparados com os da literatura²⁵ e se concluiu que a mesma se tratava do galactitol (dulcitol).

O cromatograma CGAR do extrato SEMA (Figura 3.102, p.160), previamente acetilado, mostrou um pico atribuído ao galactitol acetilado, com área igual a 44,4 % da soma total relativa aos picos detectados. A peracetilação de outra alíquota do extrato SEMA (3,0 g), utilizando anidrido acético e acetato de sódio anidro, forneceu um sólido amorfo branco-acinzentado (400 mg), P.F. = 168,0-171,5 °C (168-169 °C), que foi identificado posteriormente, com base em análises de dados espectrais de IV, CG-EM e de RMN 1D (¹H e ¹³C), por comparação com dados publicados, como sendo o 1,2,3,4,5,6-hexa-acetato de galactitol (**19a**).¹⁶⁷

Ensaio biológico feito com amostras de **19a**, juntamente com os TTPC's **8** e **9**, para medir a capacidade de inibição da síntese de ATP em cloroplastos isolados de *Spinacea oleracea* L. (espinafre), revelaram que, na dose de 122,0 μmol L⁻¹ (I₅₀), **19a** pode provocar a completa inibição dessa atividade. Esse resultado foi considerado relevante e estimulou o desenvolvimento de um estudo mais completo para testar a capacidade e a seletividade de

8, **9** e **19a** como inibidores de reações fotossintéticas em outras espécies vegetais, utilizando técnicas eletroanalíticas e fluorimetrias. Os resultados desse último estudo foram publicados no periódico *Molecules* sob o título *The Triterpenes 3 β -Lup-20(29)-en-3-ol and 3 β -Lup-20(29)-en-3-yl Acetate and the Carbohydrate 1,2,3,4,5,6-Hexa-O-acetyl-dulcitolas Photosynthesis Light Reactions Inhibitors*.¹⁶⁸

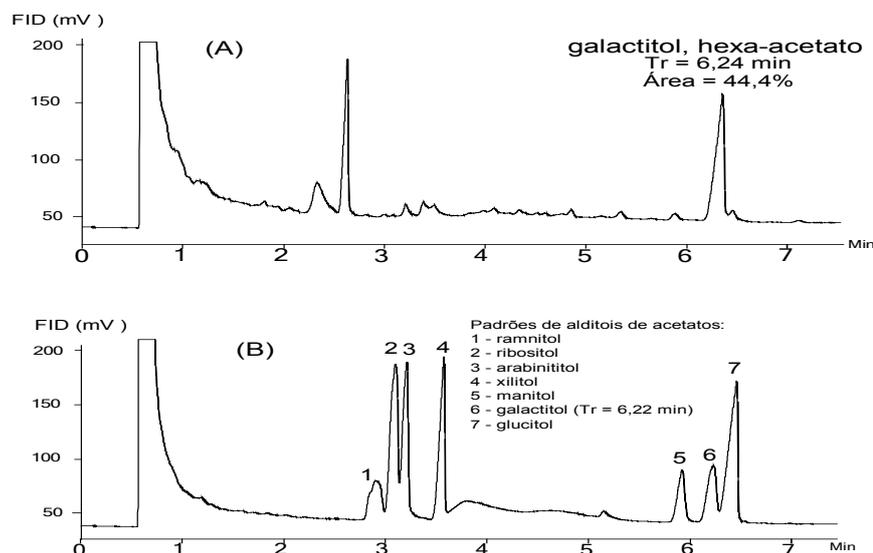


Figura 3.102: Cromatogramas obtido por CGAR de padrões de alditóis acetilados (B) das seguintes aldoses: ramnose (1, t_r = 2,89 min), ribose (2, t_r = 3,11 min), arabinose (3, t_r = 3,22 min), xilose (4, t_r = 3,57 min), manose (5, t_r = 5,94 min), galactose (6, t_r = 6,22) e glicose (7, t_r = 6,41 min); e o cromatograma CGAR do extrato SEMA acetilado (A). As amostras foram analisadas (injeção de 2 μ L) em uma coluna capilar BP10 (cianopropil fenil-dimetilsiloxano 14%, 30 m x 0,25 mm x 0,25 μ m), divisão de fluxo de 1/80, pressão de 15 psi (H_2) e temperatura inicial de 200 $^{\circ}$ C, seguindo a 5 $^{\circ}$ C/min até a temperatura final de 250 $^{\circ}$ C em 10 minutos, utilizando um cromatógrafo CG Varian CP-3800.

O espectro na região do IV de **19** (Figura 3.104, p.163) apresentou uma banda de absorção na faixa de 3200-3420 cm^{-1} , atribuída a deformação axial de ligação O-H, e também bandas em 1102, 1077, 1046 e 1028 cm^{-1} correspondentes a deformações axiais de ligação C-O de álcool e polióis. A análise do espectro de absorção de **19a** no IV (Figura 3.105, p.163) permitiu confirmar esse composto como um derivado acetilado de **19**, através principalmente das bandas intensas em 1747 cm^{-1} (C=O), 1376 cm^{-1} (CH_3 -C=O), 1243-1227 cm^{-1} , 1084 e em 1053 cm^{-1} (C-O), que são características de grupos ésteres como os dos acetatos alifáticos.⁹⁹

A elucidação estrutural de *meso*-alditóis e de seus derivados acetilados é relativamente simples, como nos casos de **19** e **19a**, porque os átomos de oxigênio de suas estruturas não ocupam posições a ponto de dobrar a molécula devido a efeitos estéricos de repulsão.¹⁶⁷ Além disso, as estruturas de **19** e **19a**, dotadas de um ponto de simetria (inversão, S_2) situado entre os carbonos C-3 e C-4, apresentam espectros de RMN em que os correspondentes núcleos de

^{13}C e ^1H simétricos possuem as mesmas frequências de ressonância. No espectro de RMN de ^1H de **19** (Figura 3.106, p.164) foi observado um tripleto largo em δ 3,97 (t, $J = 6,4$ 2H), atribuído aos hidrogênios H-2 e H-5. Os sinais relativos aos demais hidrogênios apareceram como dois multipletos justapostos entre δ 3,64-3,73 (6H), o sinal centrado em 3,67 (m) foi atribuído aos H's metínicos H-3/H-4, e o sinal centrado em 3,69 (m) foi atribuído aos hidrogênios metilênicos H-1/H-6 (Tabela 3.31). O espectro de RMN de ^{13}C de **19** (Figura 3.108, p.165) apresentou sinais em δ 63,18; 69,28 e em 70,10, atribuídos a C-1/C-6, C-3/C-4 e C-2/C-5, respectivamente²⁵. No espectro de RMN de ^{13}C e DEPT de **19a** (Figuras 3.109 e 3.110, pp.165-166) os sinais detectados em δ 62,19, δ 67,45 e em δ 67,54 (Tabela 3.30) foram atribuídos a C-1/C-6, C-3/C-4 e C-2/C-5, respectivamente¹⁶⁷.

Tabela 3.30: Comparação entre os valores de δ de ^{13}C observados de **19** (MeOH, 50 MHz) e **19a** (CDCl_3 , 50 MHz) e os respectivos valores publicados para o galactitol (D_2O , 400 MHz)²⁵ e hexa-acetato de galactitol(CDCl_3 , 15 MHz)¹⁶⁷

C	19	Galactitol ²⁵	19a	hexa-acetato de galactitol ¹⁶⁷
C-1/C-6	63,18	63,28	62,19	62,3
C-2/C-5	70,10	70,22	67,54	67,8
C-3/C-4	69,28	69,44	67,45	67,7
C-1'/C-6'(a)			170,46	NI
C-3'/C-4'(a)			169,78	NI
C-2'/C-5'(a)			170,30	NI
C-1''/C-6''(b)			20,72	NI
C-2''/C-5''(b)			20,65	NI
C-3''/C-4''(b)			20,58	NI

(a), (b) Sinais intercambiáveis; NI: não informado. Fontes: Espectros de RMN ^{13}C /DEPT-135 (Figuras 3.108-3.110, pp.165-166) e dados da literatura.^{25, 167}

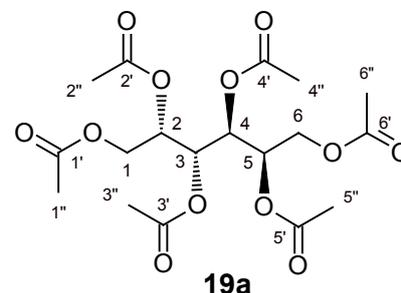
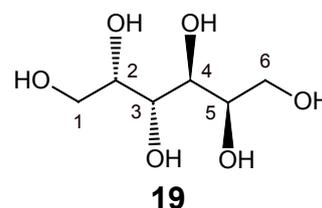


Tabela 3.31: Atribuição dos valores de δ de ^1H de **19** (MeOH, 200 MHz) e **19a** (CDCl_3 , 200 MHz) e comparação com os dados da literatura para o galactitol (D_2O , 400 MHz)²⁵

H	19	Galactitol ²⁵	19a
H-1a/H-6a	3,69 (m)	3,69 (d, 6,0 Hz)	4,28 (dd, $J = 11,4, 4,4$ Hz, 2H)
H-1b/H-6b	3,69 (m)	3,69 (d, 6,0 Hz)	3,84 (dd, $J = 11,4, 7,7$ Hz, 2H)
H-2/H-5	3,97 (t, $J = 6,4$ Hz, 2H)	3,97 (t, $J = 6,6$ Hz)	5,30 (m, 2H)
H-3/H-4	3,67 (m)	3,68 (d, $J = 2,0$ Hz)	5,36 (m, 2H)
H-1''/H-6''(*)			2,11 (s, 6H)
H-2''/H-5''(*)			2,02 (s, 6H)
H-3''/H-4''(*)			2,08 (s, 6H)

(*) Sinais intercambiáveis; Fontes: Espectros de RMN de ^1H (Figura 3.106-3.107, p.164) e dados da literatura.²⁵

O espectro de RMN de ^1H de **19a** (Figura 3.107, p.164), apresentou informações estruturais mais pormenorizadas do que o espectro de RMN de ^1H de seu precursor não acetilado (**19**). A análise do espectro de RMN de ^1H de **19a** apresentou valores distinguíveis para as ressonâncias dos H's metilênicos diastereotópicos (H_a e H_b) ligados em C-1/C-6, observadas como dois dupletos duplos em δ 4,28 (dd, $J=11,4, 4,4$ Hz, H-1a/H-6a) e em δ 3,84 (dd, $J=11,4, 7,7$ Hz, H-1b/H-6b). O multipletto em δ 5,30 (m, H-2/H-5) foi atribuído aos hidrogênios H-2/H-5 e outro sinal em δ 5,36 (m, 2H) foi atribuído aos hidrogênios H-3/H-4. Um dos três simpletos em δ 2,11 (s, 6H), δ 2,02 (s, 6H) e δ 2,08 (s, 6H) pode ser atribuído ao hidrogênios metílicos de H-1''/H-6'' ou aos de H-2''/H-5'', ou então aos de H-3''/H-4''.

As atribuições de RMN de ^1H de **19a** foram confirmadas no mapa de contornos COSY (Figura, 3.103), mediante a correlação do sinal de H-2 e H-5 (δ 5,36) com os sinais em δ 3,84 (H-1b/H-6b) e em δ 4,28 (H-1a/H-6a), e também através da correlação entre esses dois últimos sinais, atribuída aos acoplamentos geminais de H-1a com H-1b e de H-6a com H-6b.

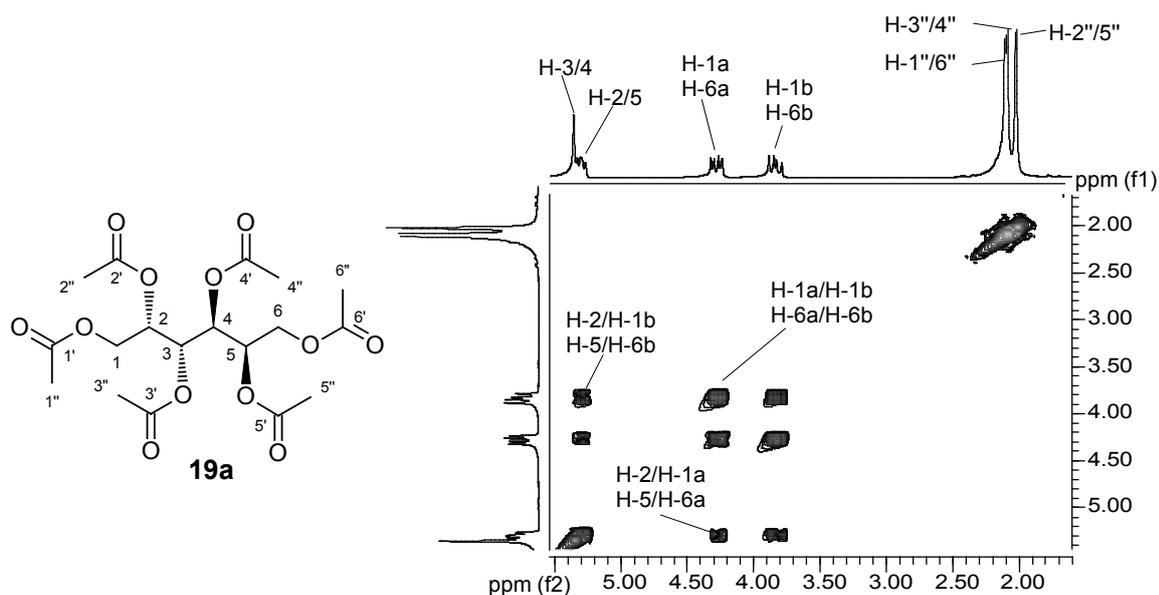


Figura 3.103: Seção do mapa de contornos COSY de **19a** (CDCl_3 , 200 MHz).

No espectro EM/EI de **19a** (Figura 3.103, p.162) foi detectado em m/z 434 ($\text{C}_{18}\text{H}_{26}\text{O}_{12}$) o íon-radical atribuído ao íon molecular $[\text{M}]^{+\bullet}$ de 1,2,3,4,5,6-hexa-acetato de galactitol, confirmando a identidade química de **19a**.

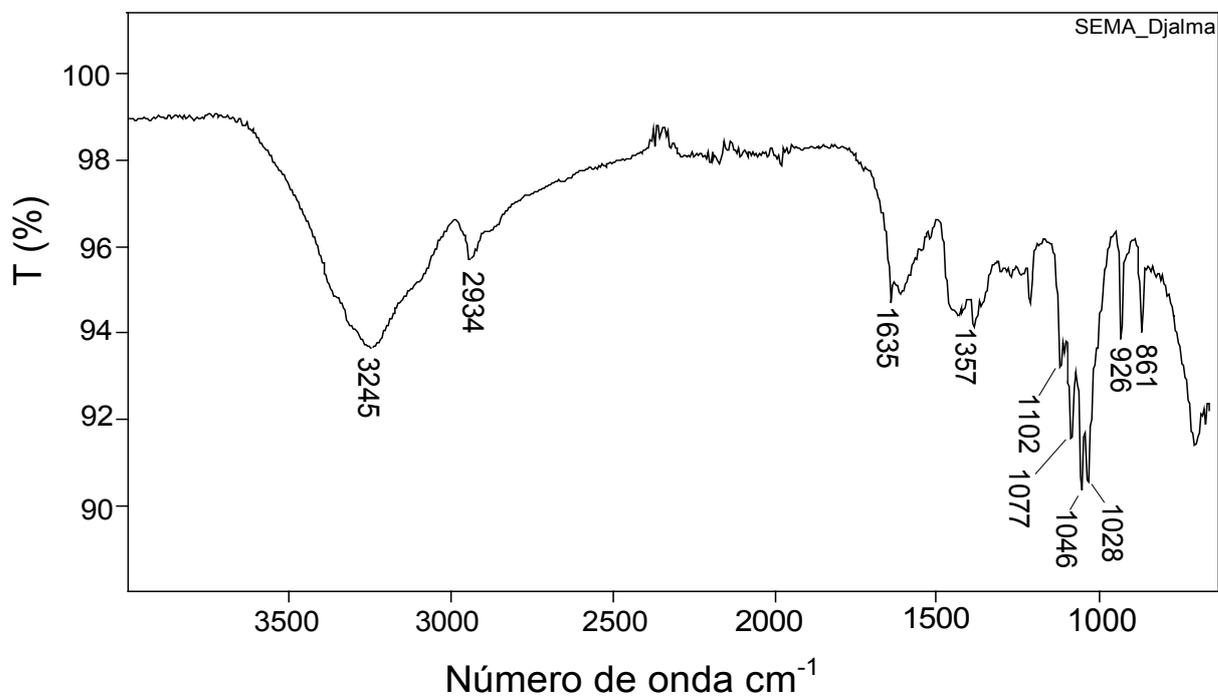
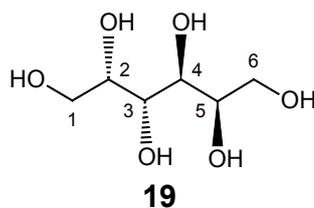


Figura 3.104: Espectro de absorção de **19** na região do infravermelho.

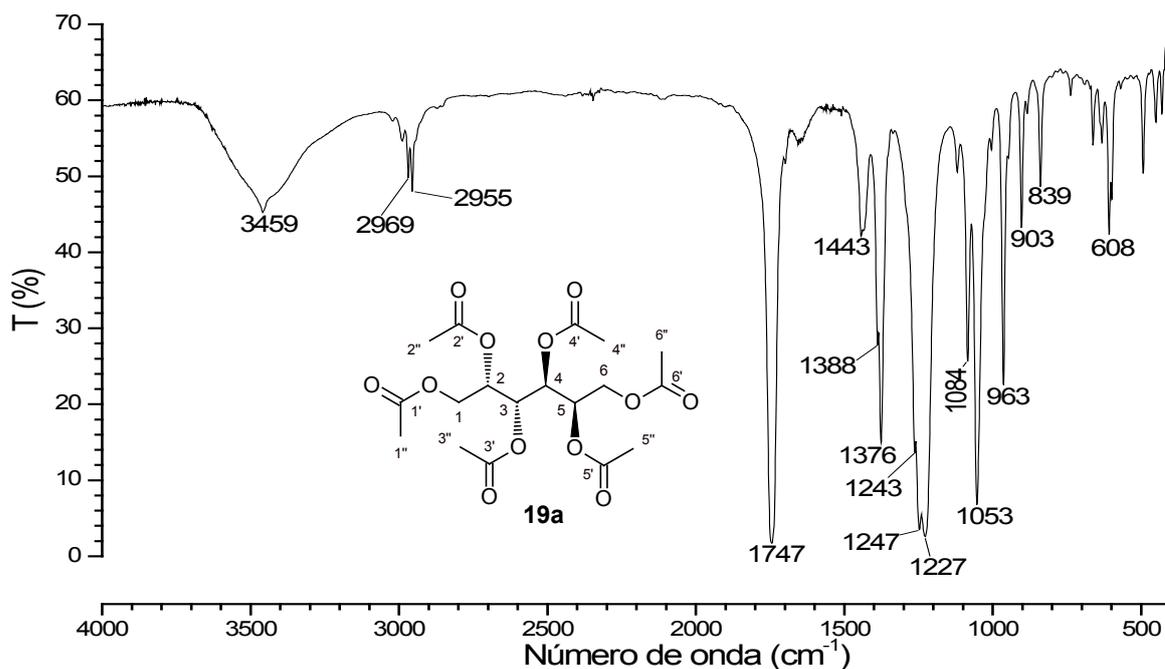


Figura 3.105: Espectro de absorção de **19a** na região do infravermelho.

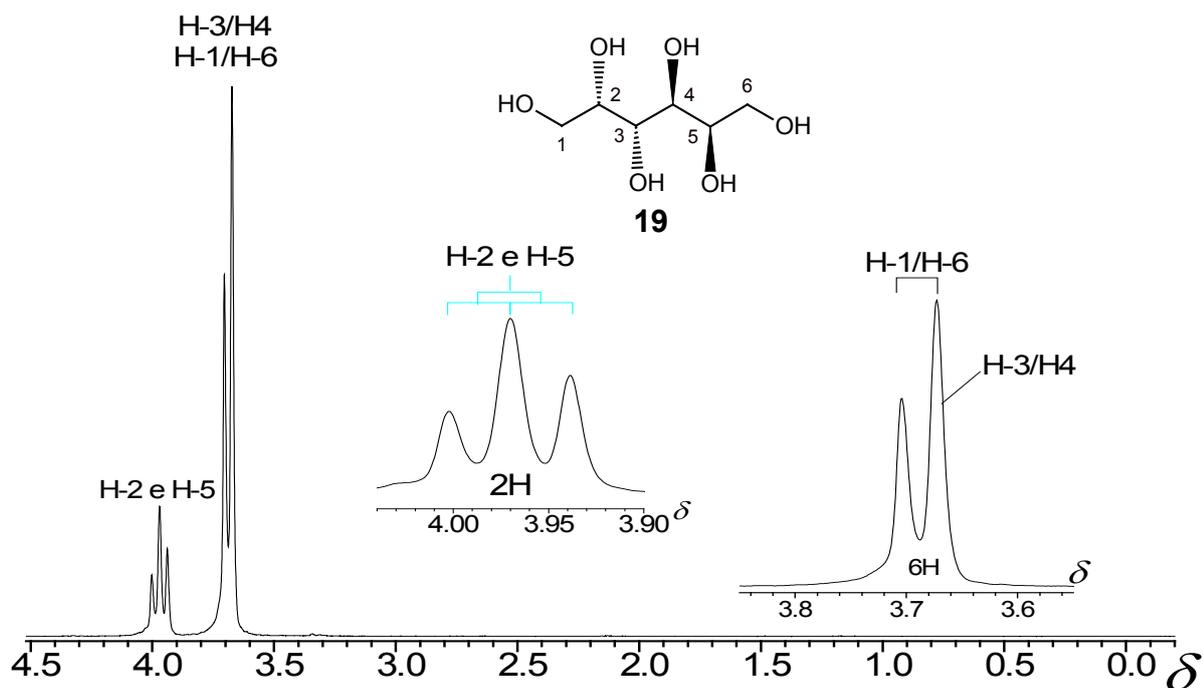


Figura 3.106: Espectro de RMN de ^1H de **19** (CD_3OD , 400 MHz).

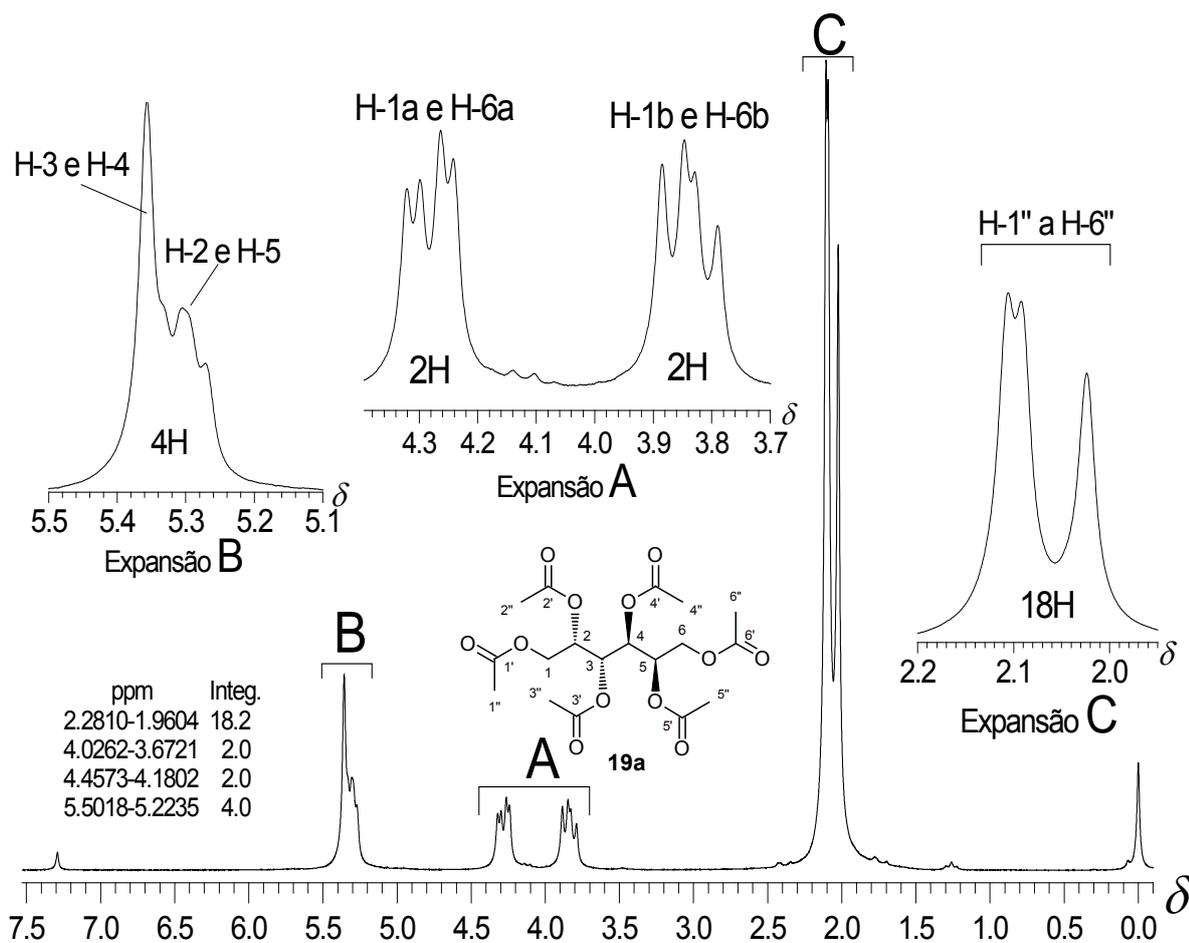


Figura 3.107: Espectro de RMN de ^1H de **19a** (CDCl_3 , 200 MHz).

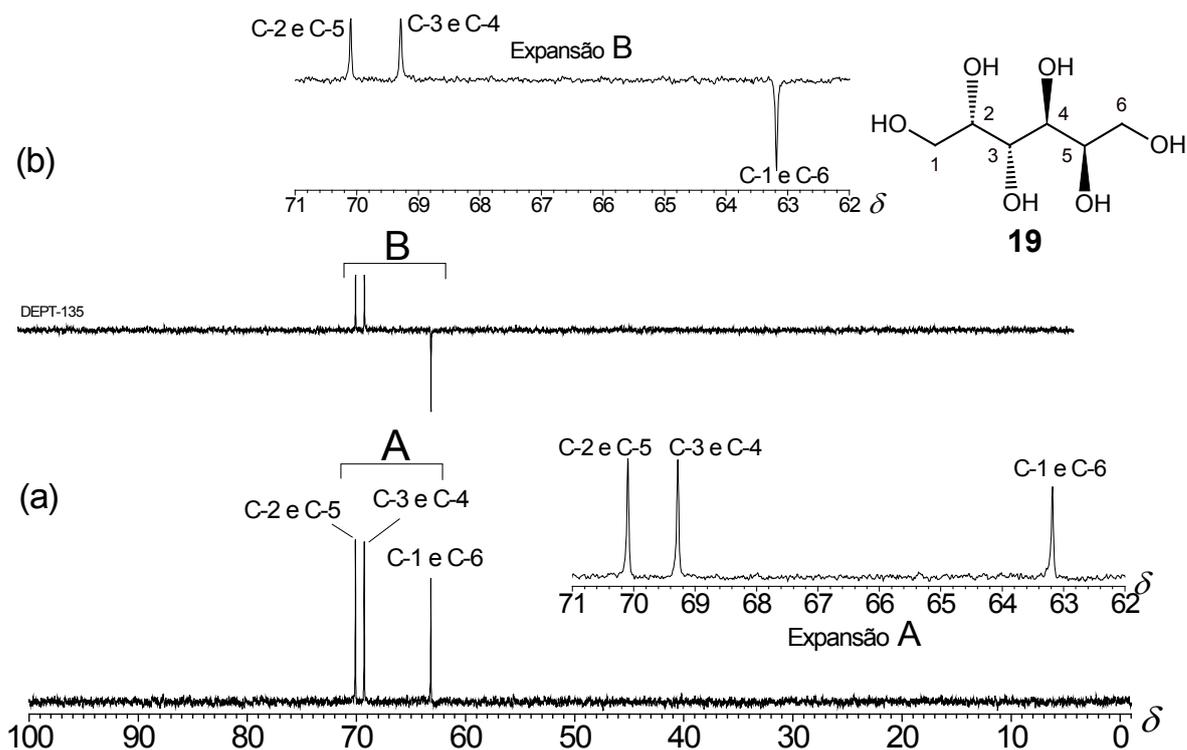


Figura 3.108: Espectros de RMN de (a) ^{13}C e (b) DEPT-135 de **19** (CD_3OD , 100 MHz).

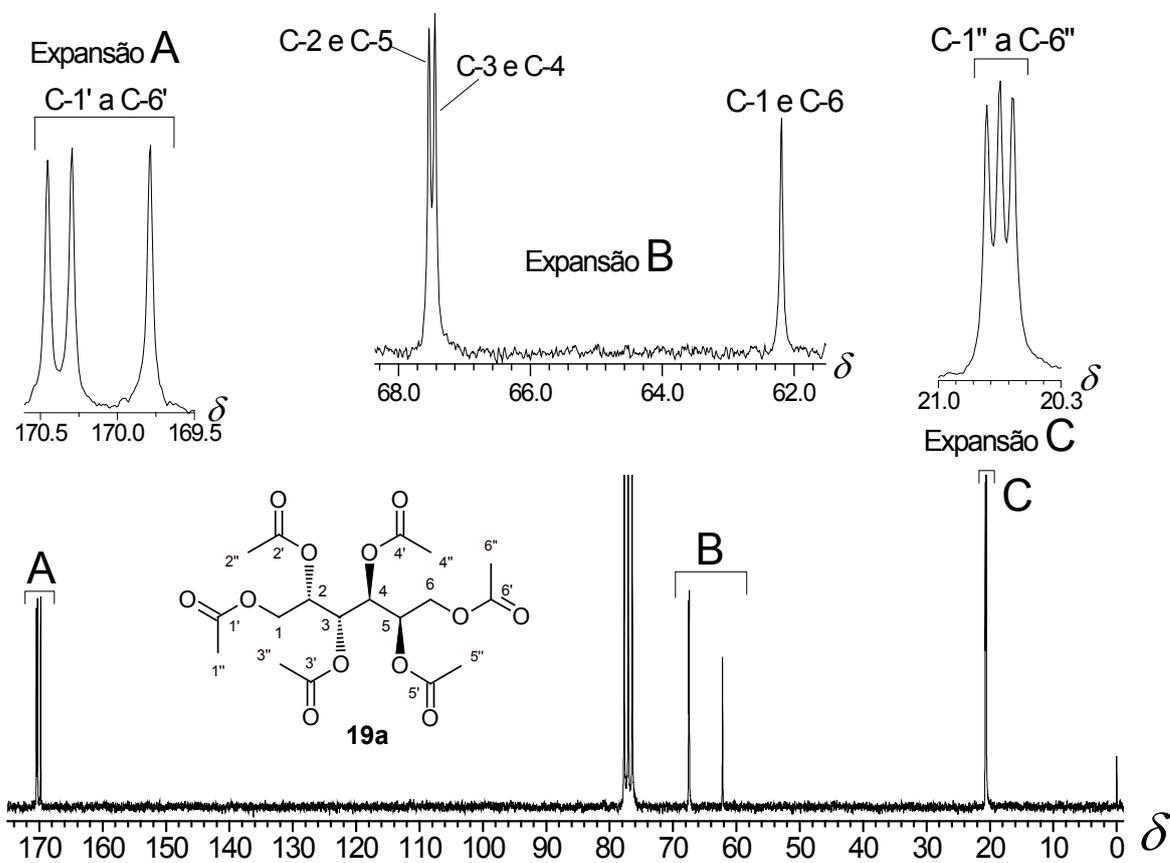


Figura 3.109: Espectro de RMN de ^{13}C de **19a** (CDCl_3 , 50 MHz).

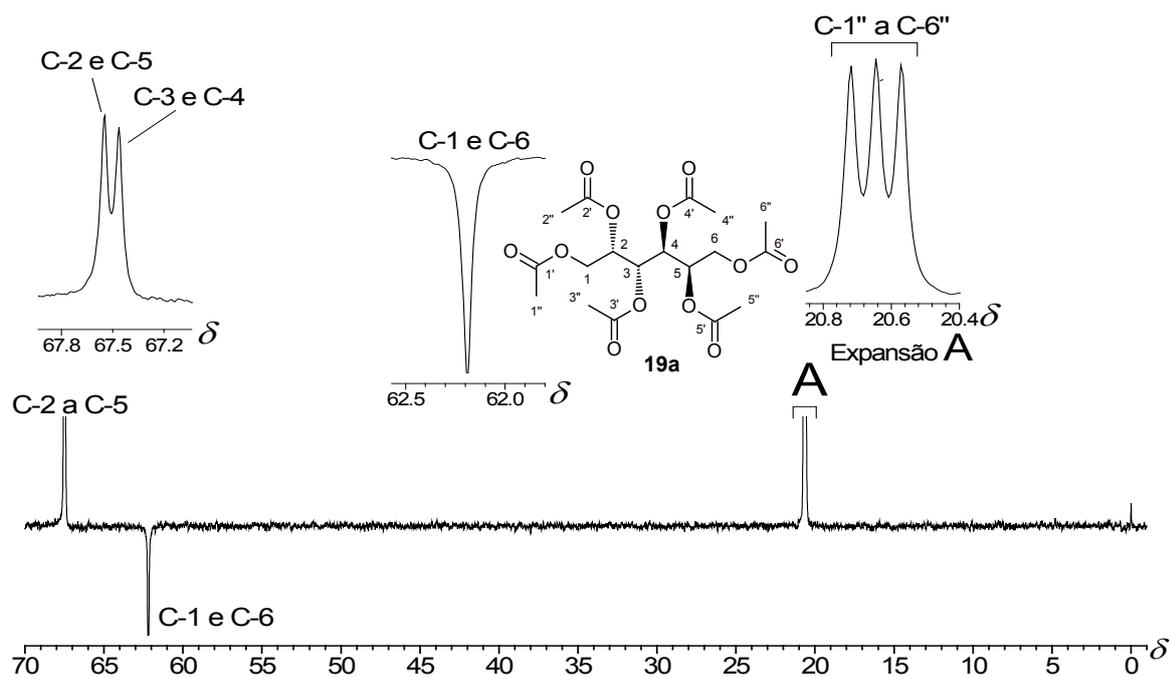


Figura 3.110: Espectro de RMN de DEPT-135 de **19a** (CDCl_3 , 50 MHz).

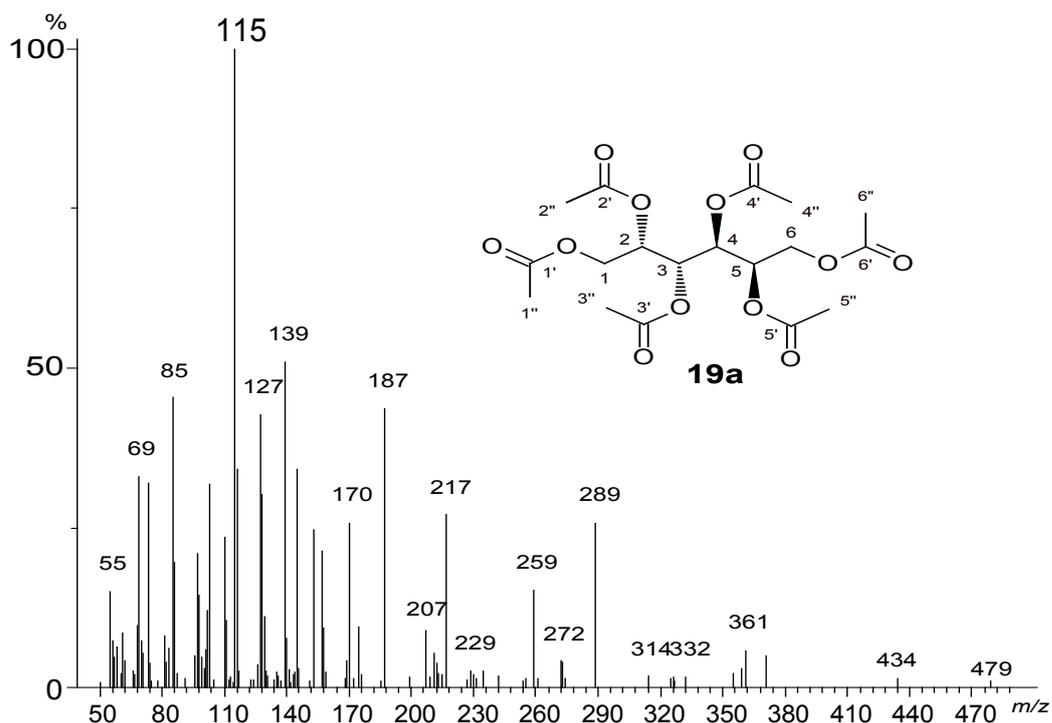


Figura 3.111: Espectro EM de **19a**. Obtido por CG-EM nas condições: coluna capilar DB-5 (5% fenilmetilsilicone, 30 m x 0,25 mm x 0,25 μm de d.i.), divisão de fluxo de 1:27 (split), arraste por $\text{He}_{(g)}$ (189,2 kPa), temperaturas (T) de 120 $^{\circ}\text{C}$ a 7 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ até 280 $^{\circ}\text{C}$ em \approx 23 minutos, mantida por 7 minutos, até 30 minutos. Injetor, T = 280 $^{\circ}\text{C}$; interface, T = 250 $^{\circ}\text{C}$, em um CG-EM Shimadzu, modelo GCMS-QP5000. Detetor IE, 70 eV.

Identificação de Flavonoides Glicosídicos em SEMA por CLAE/EM-IES

O extrato SEMA em metanol (5,5 g) foi obtido como uma goma marrom escura, lisa e quebradiça depois de seca, apresentando um aroma característico de doce de frutas; formou abundante espuma (>5 min) em água no teste de espuma a pH 1, entretanto, forneceu teste negativo para saponinas frente ao reagente de Komarovsky.⁷⁷ Uma amostra do extrato SEMA dissolvida em água-metanol (50/50 v/v) apresentou coloração avermelhada (Figura 3.112) em presença de $\text{HCl}_{(\text{aq})}$ 1 mol.L⁻¹ e amarela em $\text{NaOH}_{(\text{aq})}$ 0,1 mol.L⁻¹. Uma parte dessa solução também formou um precipitado verde-escuro com cloreto férrico (FeCl_3 em etanol, 10%). Essas reações indicaram a presença de compostos fenólicos, entre os quais provavelmente, flavonoides e proantocianidinas.⁷⁹ A fração de SEMA solúvel em *n*-butanol (f-Bu) foi analisada em placas CCD, eluídas com acetato de etila-metanol-ácido acético em água (0,5%) [8:3:1 v/v] e reveladas com reagente NP-PEG4000 sob luz UV (lâmpada 366 nm). As placas CCD assim reveladas apresentaram manchas amarelas e amarelo-esverdeadas, atribuídas à presença de glicosídeos derivados de quercetina (manchas amarelas) e canferol (manchas amarelo-esverdeadas).⁷⁷

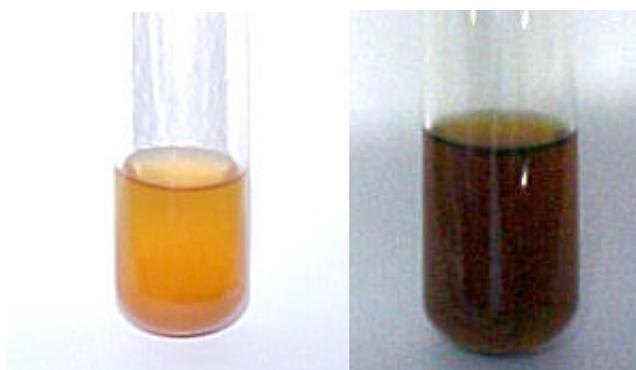


Figura 3.112: Solução de SEMA (MeOH) em (a) pH 13 e em (b).pH 1,0

Análise por CLAE dos extratos SEMA

O cromatograma obtido por CLAE da fração solúvel em etanol (95%) dos extratos FAMMA ou SEMA (f-EtOH) em escala analítica, apresentou dez picos significativos (picos 6-15) relacionados com flavonoides (Tabela 3.32, p.168) quando detectados a 360 nm (Figura 3.113, p.168). O perfil dos picos relacionados com flavonoides, detectados no cromatograma CLAE de f-EtOH (Figura 3.113, p.168), apresentou boa semelhança com o perfil dos picos correlatos detectados em análise por CLAE (UV, 360 nm) de amostras de extrato metanol:água (1:1 v/v) das folhas de *M. ilicifolia* e *M. aquifolium* relatado por Tiberti *et al.* (2007).⁸⁰

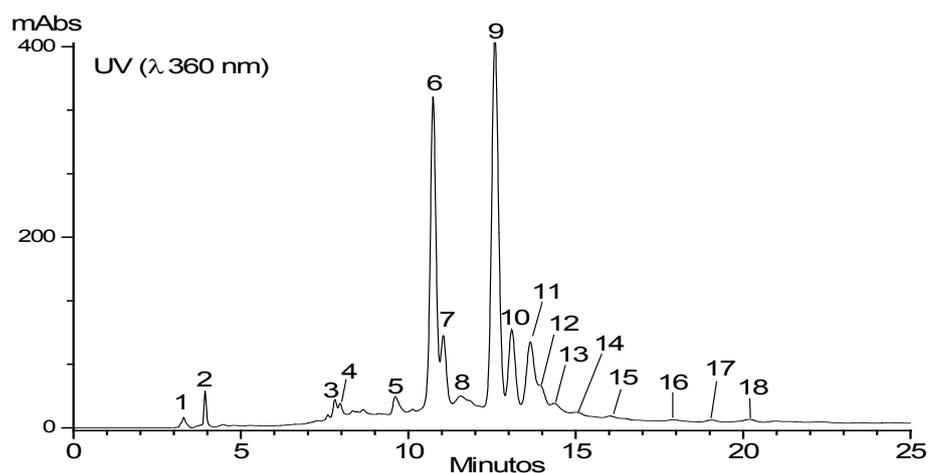


Figura 3.113: Cromatograma obtido por CLAE da fração solúvel em etanol (95%) dos extratos SEMA e FAMMA, com a fase móvel no seguinte gradiente (taxa de eluição de 1 mL min⁻¹): iniciado com 10% de B; depois, com 10-30% de B em cinco minutos; em seguida, foi mantido em 30% de B por 15 minutos, depois com 30-50% de B em 5 minutos e, para completar 30 minutos de análise, com 50-100% de B por 5 minutos. Onde A = ácido fórmico 0,5% em água (v/v) e B = ácido fórmico a 0,5% em acetonitrila:metanol (50:50 v/v). Foi utilizada uma coluna Shimadzu, C18 (ODS), 15 x 0,46 cm, partículas de 3 μ m.

Tabela 3.32: Análise do cromatograma obtido por CLAE de SEMA (Figura 3.113)

Pico	Tr	Área (mABS.min.10 ²)	A(%)	Compostos isolados
1	3,29	1,08835	0,5	
2	3,92	2,46509	1,1	
3	7,81	4,02332	1,8	
4	7,96	5,88303	2,6	
5	9,62	10,2582	4,5	
6	10,74	47,2972	20,6	(21)
7	11,05	15,7657	6,9	(20)
8	11,56	14,1041	6,1	
9	12,58	63,6989	27,8	(22)
10	13,09	16,3229	7,1	
11	13,64	14,5383	6,3	(23)
12	13,97	7,26915	3,2	
13	14,36	7,99607	3,5	
14	15,05	6,82991	3,0	
15	16,07	5,93905	2,6	
16	17,90	2,61069	1,1	
17	19,05	1,34559	0,6	
18	20,18	2,01707	0,9	
Total		1,08835	100,0	

No cromatograma obtido por CLAE de f-EtOH (Figura 3.113, p.168), os picos 6, 7, 9, e 11, detectados em $T_r = 10,74$ min, 11,05 min, 12,58 min e 13,64 min, respectivamente, foram atribuídos aos glicosídeos flavônicos que foram isolados **21**, **20**, **22** e **23** mediante operações concomitantes de fracionamento semipreparativo e purificação por Sephadex LH20 e CLAE, de uma amostra do extrato FAMMA (hidrometanólico) de composição similar ao de SEMA.

Espectrometria de massas (EM-IES)

Foram adquiridos espectros de massas (Figura 3.1115, p.171) com IES em espectrômetro de massa dotado de quadrupolo e armadilha de íons, modelo LCQ Advantage, Thermo-Finningar (USA) no laboratório LQPN do Centro de Pesquisas René Rachou. Os espectros de massa foram adquiridos usando a detecção de íons positivos e negativos e varreduras dentro da faixa de m/z 100-1000. A obtenção dos espectros EM/EM foi conduzida por aprisionamento e fragmentação dos íons de interesse por dissociação induzida via colisão (CID) utilizando partículas de gás He. Os fragmentos de massas de SEMA foram analisados com base na proposta de nomenclatura e fragmentação de glicosídeos utilizada por de Souza (2008)⁸² (Figura 3.114). Os fragmentos foram classificados nos tipos Y_i e B_i , onde i indica a quantidade de monossacarídeos. Os íons Y_i se referem aos fragmentos que contêm o núcleo da aglicona, assim, Y_0 significa o fragmento correspondente a aglicona não ligada; Y_1 representa o fragmento correspondente a aglicona ligada a uma unidade monossacarídica, e assim por diante. Os índices α e β indicam os fragmentos que se formaram tendo como referência a posição das clivagens ao longo da cadeia glicosídica. Os íons-fragmentos indicados com o índice α (alfa), tais como $Y_{3\alpha}$ e $Y_{2\alpha}$, foram aqueles que perderam um resíduo neutro de xilose (Xil) e, em seguida, uma ramnopiranosila, respectivamente; os íons-fragmentos indicados por beta ($Y_{3\beta}$ e $Y_{2\beta}$) foram os resultantes da saída sequencial de um grupo ramnopiranosil, seguido de um grupo xilipiranosil, respectivamente. Todos os EM-IES obtidos neste estudo foram executados e analisados conforme o método descrito acima.

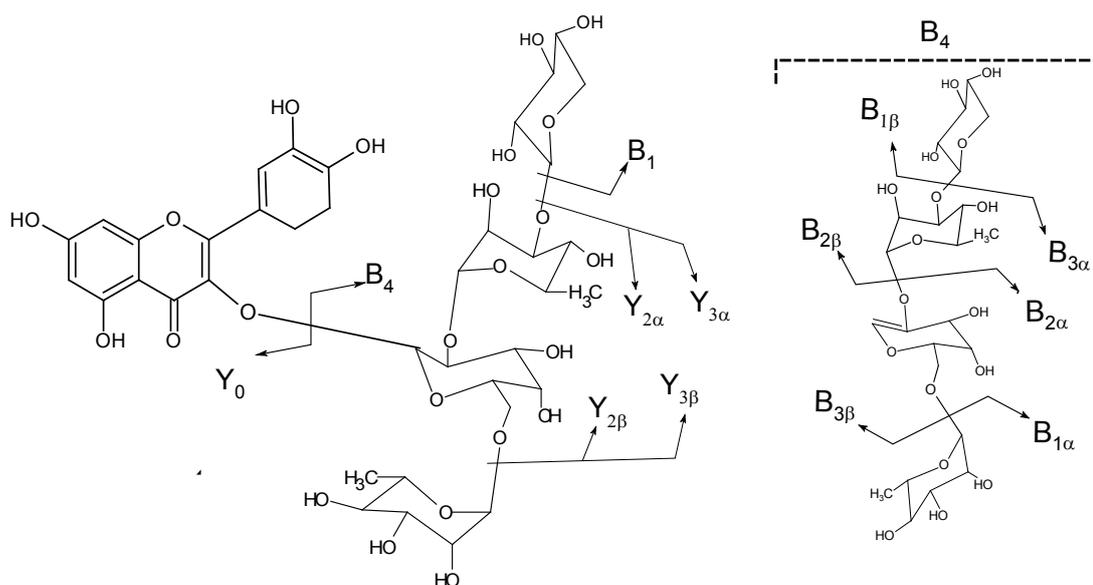


Figura 3.114: Nomenclatura utilizada nos fragmentos de flavonoides glicosídicos.⁸²

Tabela 3.33: Flavonoides glicosídicos detectados no extrato SEMA por EM-IES no modo negativo (*offline*)

T_R (min)	$[M-H]^-$ ou $[M]^\bullet$	$[Y_0-H]^-$ ou Y_0^\bullet	Y_2^-	$Y_{3\alpha}^- / Y_{3\beta}^-$	Identificação do composto	Ref
1,35	887	318	609	739/755	Pent-ram-ram-ramnopiranosídeo de miricetina	81
1,44	871	314	579	739	Pent-ram-pent-ramnopiranosídeo de metil- quercetina	81
5,85	887	301	609	739/755	Ram-ram-pent-hexapiranosídeo de quercetina ^a (21)	PE
5,90	755	301 ND	609		di-(Ram)- hexapiranosídeo de quercetina ^b (20)	80, 81, 87
6,16	871	285	593	739	Ram-ram-pent-hexapiranosídeo de canferol ^c (22)	PE
6,31	739	285	593		di-(Ram)- hexapiranosídeo de canferol	80
6,37	901	316	624	769	Pent-ram-ram- hexapiranosídeo de isoramnetina ^d (23)	PE
8,42	668	344	492*	620 [‡]	Hex-hexapiranosídeo de trimetil-quercetina	PE
17,99	757	317	625		Pent-ram-hexapiranosídeo de miricetina	PE
19,27	771	317 ND	639		Ram-Ram-hexapiranosídeo de miricetina	38, 81

* $[M-Hex+CH_3]^\bullet$; [‡] $[M-48(H_2O+2CH_3)]^\bullet$; PE: Presente estudo; hex = hexose; pent = pentose; ram = ramnose; ND: íon esperado mas não observado. Os compostos a, b, c, d, foram posteriormente isolados e caracterizados por métodos espectroscópicos como sendo os glicosídeos **21**, **20**, **22** e **23**, sendo **21**, **22** e **23** inéditos.

Amostras de f-Bu (5 mg/mL) foram submetidas a análises por CLAE com IES/EM acoplados. A análise dos espectros EM-IES de SEMA juntamente com os dados da literatura, e de repositórios públicos de espectros de massas disponibilizados na internet,^{85, 87, 169} permitiram identificar dez flavonoides glicosídicos derivados de quercetina, canferol, metil-quercetina, isoramnetina e miricetina entre os constituintes do extrato SEMA. A Tabela 3.33 (p.169) mostra os íons precursores $[M]^\bullet$ e $[M-H]^-$ que foram atribuídos a flavonóides glicosídicos, registrados no modo de varredura, bem como os fragmentos desses íons produzidos com a primeira perda neutra de um resíduo glicosídico (Y_2^- ou Y_3^-) e o fragmento correspondente à aglicona (Y_0^-). Os íons fragmentos que ocorreram em m/z 284-286, 300-302, 314-316, 316-318, são compostos derivados de canferol, quercetina, isoramnetina e miricetina. Essas quatro agliconas foram anteriormente identificadas por CLAE/EM-IES nas em folhas de *M. ilicifolia*.^{38, 80, 81} Entretanto, os fragmentos observados em m/z 342-344, gerados pelo precursor em m/z 668, indicaram que podem ocorrer flavonóis glicosídicos de *M. acanthophylla* com a aglicona do tipo trimetil-quercetina. Os íons em m/z em 668 $[M]^\bullet$ e 757 $[M-H]^-$ foram identificados e atribuídos a dois triglicosídeos flavônicos citados pela primeira vez neste estudo.

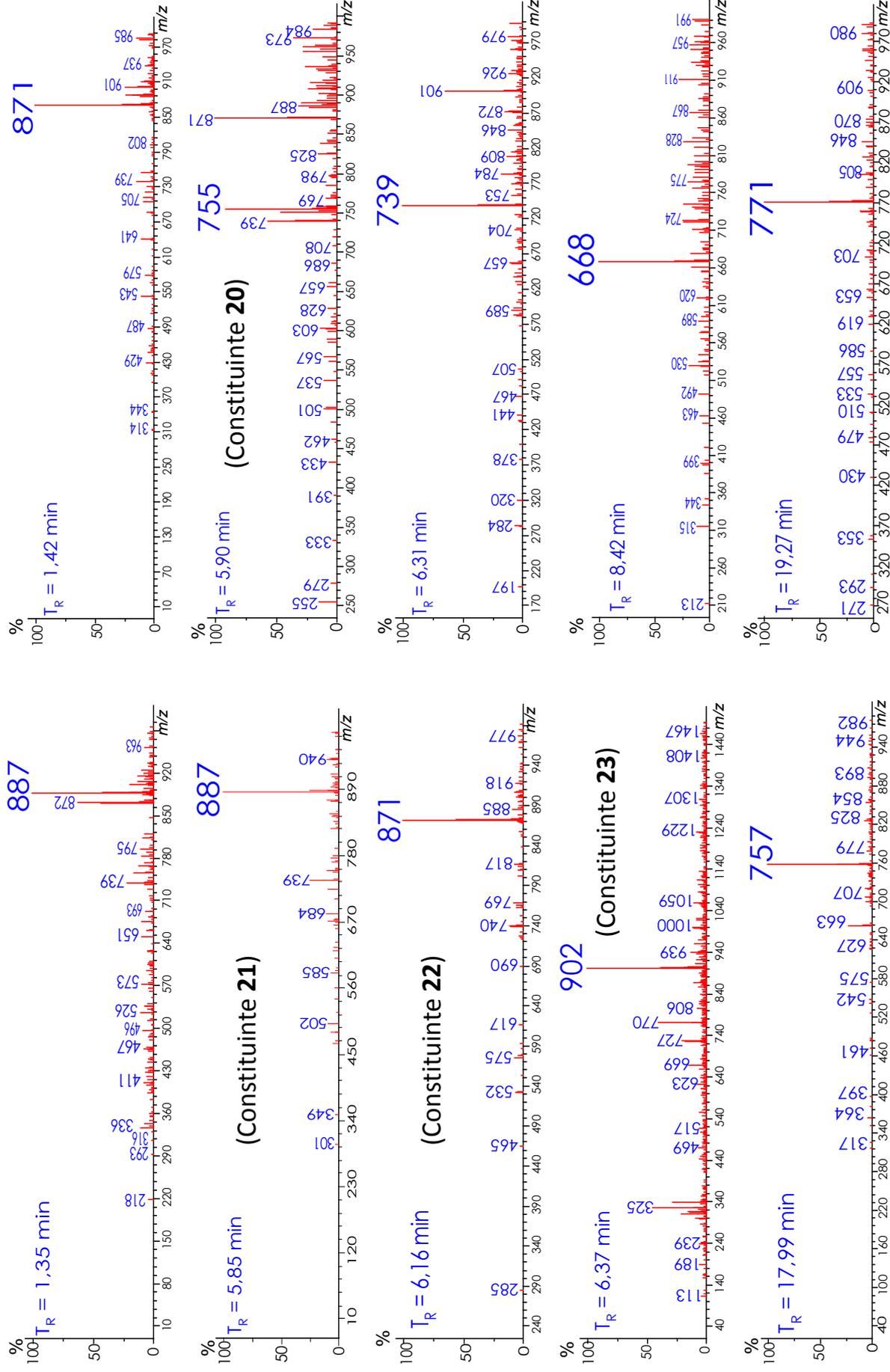
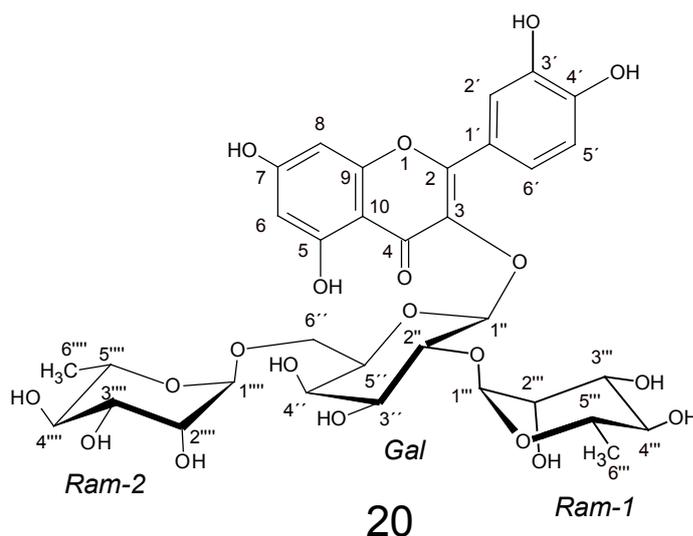


Figura 3.115: Espectros de massas (EM-IES, *offline*, modo negativo) relacionados a constituintes flavonoides glicosídicos do extrato SEMA.

3-O- $\{[\alpha\text{-L-ramnopyranosila}(1\rightarrow6)][\alpha\text{-L-ramnopyranosila}(1\rightarrow2)]\}$ - $\beta\text{-D-galactopiranosídeo de quercetina (20)}$.



O composto inédito **20** foi isolado como um sólido amorfo (1,9 mg), amarelo, obtido do extrato em hidrometanólico das folhas de *M. acanthophylla* (FAMMA) por fracionamento em coluna de cromatografia líquida com Sephadex LH-20 e purificação em coluna de CLAE em fase reversa (C-18). Na tentativa de determinar o ponto de fusão, uma amostra de **20** degradou antes de fundir. A análise de **20** por CCD revelada sob luz UV (366 nm), após revelar a cromatoplaça com o reagente NP/PEG-400, surgiu uma mancha amarelo-alaranjada brilhante, indicando a presença da genina do flavonóide 3,5,7,3',4'-*tetra*-hidroxiflavona, quercetina (Figura 3.116).⁷⁷ Esse resultado foi coerente com os relatos sobre a obtenção de flavonóides isolados de plantas do gênero *Maytenus* onde figuram compostos 3-*O*-glicosídeos da quercetina.^{38-39, 67}

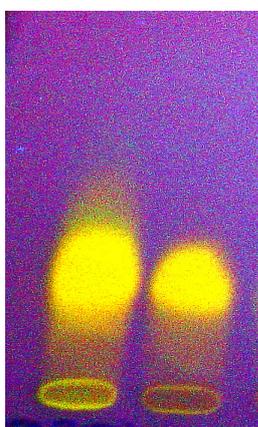


Figura 3.116: Fotografia da cromatoplaça CCD em sílicagel 60G de **20**, eluente: acetato de etila:metanol: água-ácido acético 0,5% (8:2:1); revelador: NP-PEG 4000 sob luz UV λ 366 nm, $R_f = 0,28$.

O espectro de absorção no UV de **20** (Figura 3.117), obtido através do detector com arranjo de fotodiodo do cromatógrafo CLAE, utilizando a mistura A + B (23%) como fase móvel, sendo A = ácido trifluoroacético (TFA) a 0,1% em água deionizada e B = TFA a 0,1% em acetonitrila:metanol (50:50, v/v), mostrou duas bandas com picos de absorção máxima em λ_{\max} 355 e 256 nm, que indicaram a presença de um flavonoide do tipo flavanol.^{80, 170}

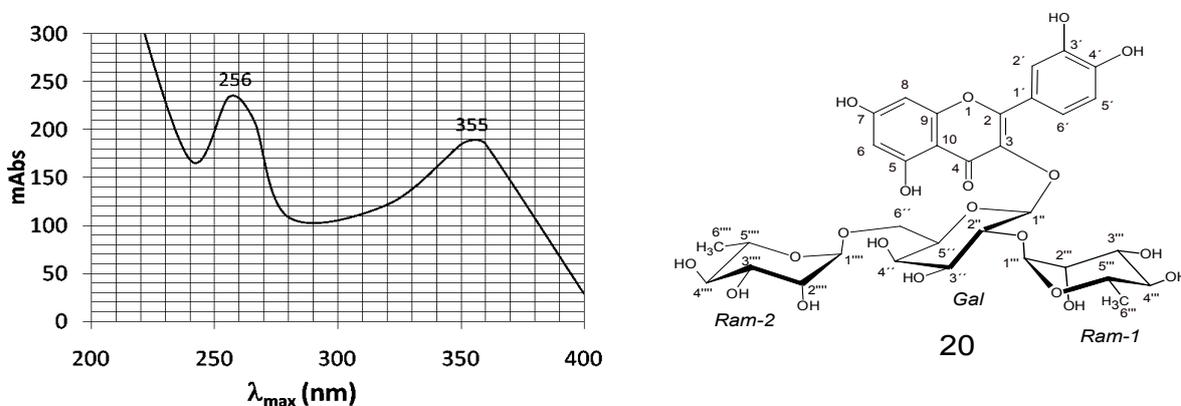


Figura 3.117: Espectro de absorção de **20** obtido por varredura na região do UV na cela do detector de fotodiodo, modelo SPD-M10A, acoplado à bomba LC-10AD, módulo de comunicação CBM 10A do equipamento para CLAE (Shimadzu).

O espectro de absorção na região do IV de **20** (Figura 3.119, p.177) apresentou uma banda na região de $3200\text{-}3550\text{ cm}^{-1}$ e outra intensa, com pico em 1050 cm^{-1} , que indicaram a presença de grupos hidroxilas. O espectro apresentou também uma banda em 1658 cm^{-1} característica de grupo carbonílico quelado.³⁹ Geralmente, as absorções relacionadas aos estiramentos da ligação O-H que ocorrem entre $3200\text{-}3550\text{ cm}^{-1}$ são atribuídas a grupos hidroxílicos envolvidos em ligações de hidrogênio intermoleculares.¹¹⁷ Essas absorções de **20** na região do infravermelho são condizentes com a estrutura dotada de grupos benzoíla e cinamoíla condensados como ocorre nos flavonóis. Com base nos dados cromatográficos, características espectrais na região do UV e IV, bem como os relatos sobre os flavonóides de *Maytenus*, foi possível propor o 3,5,7,3',4'-pentahidroxiflavona (quercetina) como a aglicona de **20**.

Dados espectrais de RMN semelhantes aos de **20** foram relatados para o composto triglicosídeo isolado anteriormente de *M. aquifolium*, o flavonóide 3-O- $\{[\alpha\text{-L-ramnopiranosila}(1\rightarrow6)][\alpha\text{-L-ramnopiranosila}(1\rightarrow2)]\}\text{-}\beta\text{-D-galactopiranosídeo}$ de quercetina.³⁸ O espectro de RMN de ^1H (Figura 3.120, p.178) compreendeu ressonâncias de hidrogênios aromáticos e glicosídicos e apresentou sinais de dois hidrogênios aromáticos *meta-acoplados* em $\delta 6,18$ (d, $J = 2,0$ Hz, H-6) e em $\delta 6,37$ (d, $J = 2,1$ Hz, H-8), que foram atribuídos a H-6 e H-8, respectivamente. Os sinais em $\delta 7,69$ (d, $J = 2,1$ Hz, H-2'), $6,87$ (d, $J = 8,6$ Hz, H-5') e $\delta 7,57$

(dd, $J = 8,5$ e $2,1$ Hz, H-6'), foram atribuídos a H-2', H-5' e H-6', respectivamente. O espectro de RMN de ^1H apresentou, também, sinais referentes às ressonâncias de três hidrogênios anoméricos em $\delta 5,66$ (d, $J = 7,8$), $\delta 5,21$ (d, $J = 1,6$) e $4,54$ (d, $J = 1,6$ Hz, 1H). No mapa de contornos de HSQC de **20** (Figura 3.121, p.179), os sinais referentes às ressonâncias dos hidrogênios anoméricos foram associados aos sinais dos respectivos sinais de carbono em $\delta 100,79$, $\delta 102,35$ e $\delta 101,75$ (Figura 3.118). No espectro de RMN de ^1H , os dois dupletos em $\delta 0,95$ e $1,18$ (6,2) foram atribuídos aos hidrogênios metilas C-6 de duas ramnopiranosilas,⁷⁴ os demais sinais de hidrogênios sacarídeos foram registrados na região entre $\delta 3,27$ - $4,20$. No mapa de contornos HMBC (Figura 3.122, p.180) foram detectadas importantes conectividades na estrutura de **20**, como por exemplo, a correlação entre o sinal de hidrogênio em $\delta 3,95$ (dd, $J = 9,5, 7,5$ Hz, H-2'') e o sinal de C-1''' em $\delta 102,34$. Através da comparação com os dados da literatura³⁸ e a inspeção dos mapas de contornos HMBC, HSQC e COSY (não mostrado) foram identificados os valores das ressonâncias dos hidrogênios e carbonos pertencentes a três unidades de açúcar (Tabela 3.35, p.176).

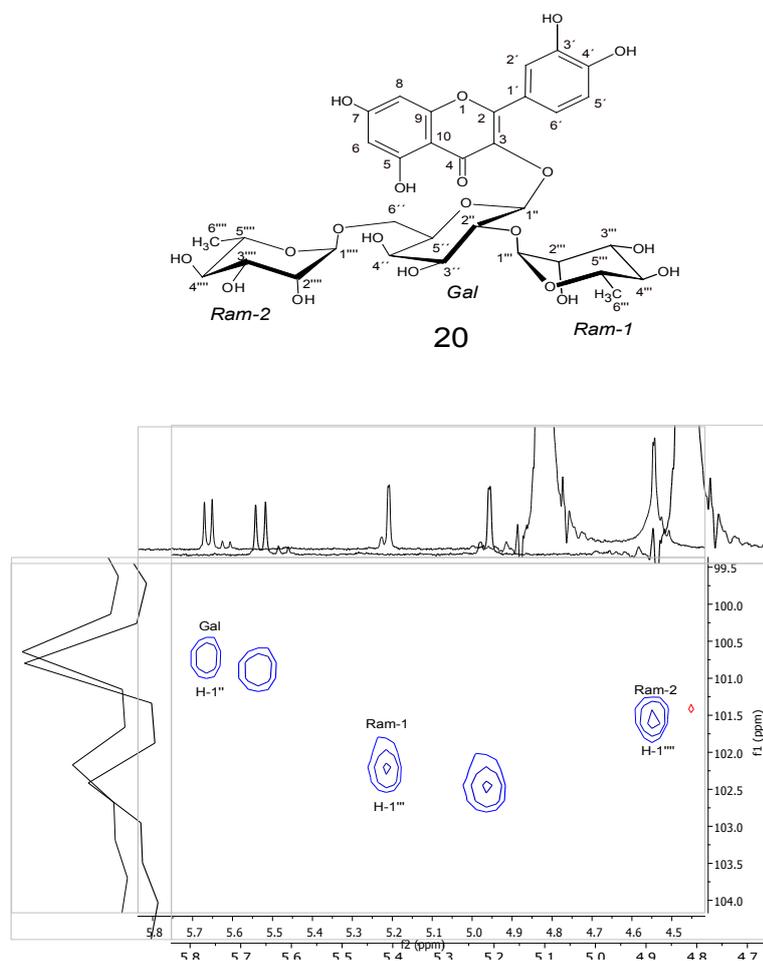


Figura 3.118: Seção do mapa de contornos HSQC de **20** (CD_3OD , 400 MHz) relativa aos hidrogênios e carbonos anoméricos (F2: δ de ^1H 4,50-5,80 x F1: δ de ^{13}C 99,5-104,0).

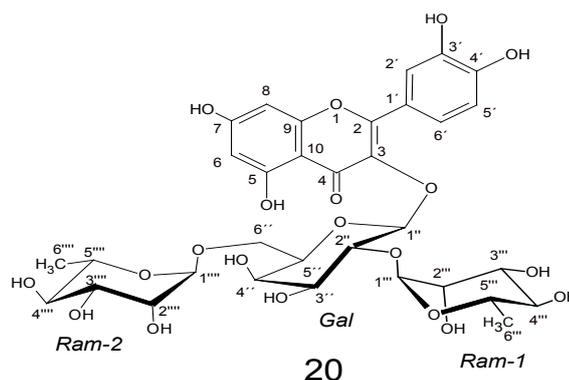


Tabela 3.34: Comparação entre dos valores de δ de ^{13}C de **20** (CD_3OD , 100 MHz) com os valores encontrados na literatura para a 3-O-[[α -L-ramnopyranosila(1 \rightarrow 6)] [α -L-ramnopyranosila(α 1 \rightarrow 2)]]- β -D-galactopiranosídeo de quercetina (δ , CD_3OD , 100 MHz) isolado de *M. ilicifolia* e *M. aquifolium*³⁸

δ de ^{13}C					
NC	20	lit ³⁸	NC	20	lit ³⁸
2	158,20	158,2	3-Gal		
3	ND	134,3	1''	100,79	102,4
4	ND	179,0	2''	77,30	77,3
5	163,18	163,4	3''	75,42	75,1
6	99,37	99,7	4''	70,66	70,7
7	165,21	165,8	5''	75,00	75,5
8	94,47	94,4	6''	66,75	66,8
9	158,15	158,2			
10	105,76	105,6	(2-1)Ram		
1'	123,14	123,1	1'''	102,34	100,8
2'	117,12	115,9	2'''	72,23	72,1
3'	145,59	145,6	3'''	71,94	72,2
4'	149,64	149,4	4'''	73,76	73,9
5'	116,08	117,1	5'''	69,59	69,6
6'	122,72	122,8	6'''	17,06	17,8
			(6-1)Ram		
			1'''	101,75	101,6
			2'''	71,83	71,9
			3'''	72,03	72,1
			4'''	73,59	73,7
			5'''	69,5	69,6
			6'''	17,65	17,1

Valores de δ de ^{13}C de **20** foram obtidos nos mapas de contornos dos espectros HSQC (Figura 3.121, p.179) e HMBC (Figura 2.122, p.180). ND: Valor não detectado.

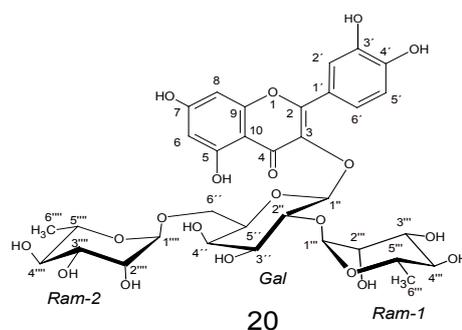
**20**

Tabela 3.35: Comparação entre os valores de δ de ^1H de **20** (CD_3OD , 400 MHz) com os valores encontrados na literatura para 3-O-[[α -L-ramnopiranosila(1 \rightarrow 6)]] [α -L-ramnopiranosila(1 \rightarrow 2)]]- β -D-galactopiranosídeo de quercetina (δ , CD_3OD , 400 MHz) isolado de *M. ilicifolia* e *M. aquifolium*³⁸

δ de ^1H (multiplicidade, J/Hz)		
H-n	20	Literatura ³⁸
H-6	6,18 (d, $J = 2,0$)	6,17 (d, $J = 1,5$)
H-8	6,37 (d, $J = 2,0$)	6,35 (d, $J = 1,5$)
H-2'	7,69 (d, $J = 2,0$)	7,72 (d, $J = 1,5$)
H-5'	6,87 (d, $J = 8,5$)	6,90 (d, $J = 8,5$)
H-6'	7,57 (dd, $J = 8,5, 2,0$)	7,61 (dd, $J = 1,5, 8,5$)
3-Gal		
H-1''	5,66 (d, $J = 7,5$)	5,63 (d, $J = 7,5$)
H-2''	3,95 (dd, $J = 9,5, 7,5$)	3,94 (dd, $J = 7,5; 9,7$)
H-3''	3,72 (dd, $J = 9,5, 3,0$)	3,75 (dd, $J = 7,5, 3,6$)
H-4''	3,80 (m)	3,50 (dd, $J = 3,5, 1,5$)
H-5''	3,66 (t, $J = 6,0$)	3,66 (ddd, $J = 1,5, 5,0, 7,0$)
H-6a''	3,48 (m)	3,45 (dd, $J = 12,0, 7,0$)
H-6b''	3,76 (m)	3,76 (dd, $J = 12,0, 5,0$)
(2-1)Ram		
H-1'''	5,21 (d, $J = 1,5$)	5,27 (d, $J = 1,5$)
H-2'''	3,99 (dd, $J = 3,5, 1,5$)	4,26 (dd, $J = 3,0, 1,5$)
H-3'''	3,79 (m)	3,81 (dd, $J = 9,5, 3,0$)
H-4'''	3,32(m)	3,34 (dd, $J = 9,5, 1,5$)
H-5'''	4,04 (m)	4,15 (qd, $J = 9,5, 6,0$)
H-6'''	0,95 (d, $J = 6,0$)	1,00 (d, $J = 6,0$)
(6-1)Ram		
1''''	4,54 (d, $J = 1,5$)	4,53 (d, $J = 1,5$)
2''''	3,57 (dd, $J = 3,5, 1,5$)	3,61 (dd, $J = 3,5, 1,5$)
3''''	3,51 (m)	3,54 (dd, $J = 9,5, 3,5$)
4''''	3,30 (m)	3,34 (t, $J = 9,5$)
5''''	3,53 (m)	3,58 (qd, $J = 9,5, 6,0$)
6''''	1,18 (d, $J = 6,2$)	1,22 (d, $J = 6,6$)

Fonte: Espectro de RMN de ^1H de **20** (Figura 3.120, p.178).

As Tabelas 3.34 (p.175) e 3.35 (p.176) mostram os deslocamentos químicos de RMN de ^{13}C e de ^1H (CD_3OD), obtidos a partir de experimentos de RMN de ^1H e 2D (HSQC, HMBC e COSY) de **20**. No espectro IES-EM do extrato SEMA, modo negativo, (Figura 3.115, p.171), o fragmento detectado em m/z 755 (100%) foi atribuído ao íon *quasi*-molecular $[\text{M}-\text{H}]^-$ de **20** ($\text{C}_{33}\text{H}_{40}\text{O}_{20}$).

Com base nos deslocamentos químicos, multiplicidades dos sinais e valores das constantes de acoplamento, os resíduos monossacarídeos foram identificados como uma β -galactopiranosila (Gal) e duas α -ramnopiranosilas (Ram-1 e Ram-2).¹⁷¹⁻¹⁷² A atribuição da configuração “D” foi atribuída para Gal e a configuração “L” foi atribuída para Ram-1 e Ram-2, de acordo com as predominâncias dessas configurações em glicosídeos de origem vegetal.⁷⁴ Os resultados obtidos nas análises dos dados espectrométricos de UV, IV, RMN, e a boa correlação desses com os dados encontrados na literatura,³⁸ permitiram propor a estrutura do glicosídeo 3-O- $\{[\alpha$ -L-ramnopiranosila(1 \rightarrow 6)] α -L-ramnopiranosila(1 \rightarrow 2)] $\}$ - β -D-galacto-piranosídeo de quercetina para o composto **20**.

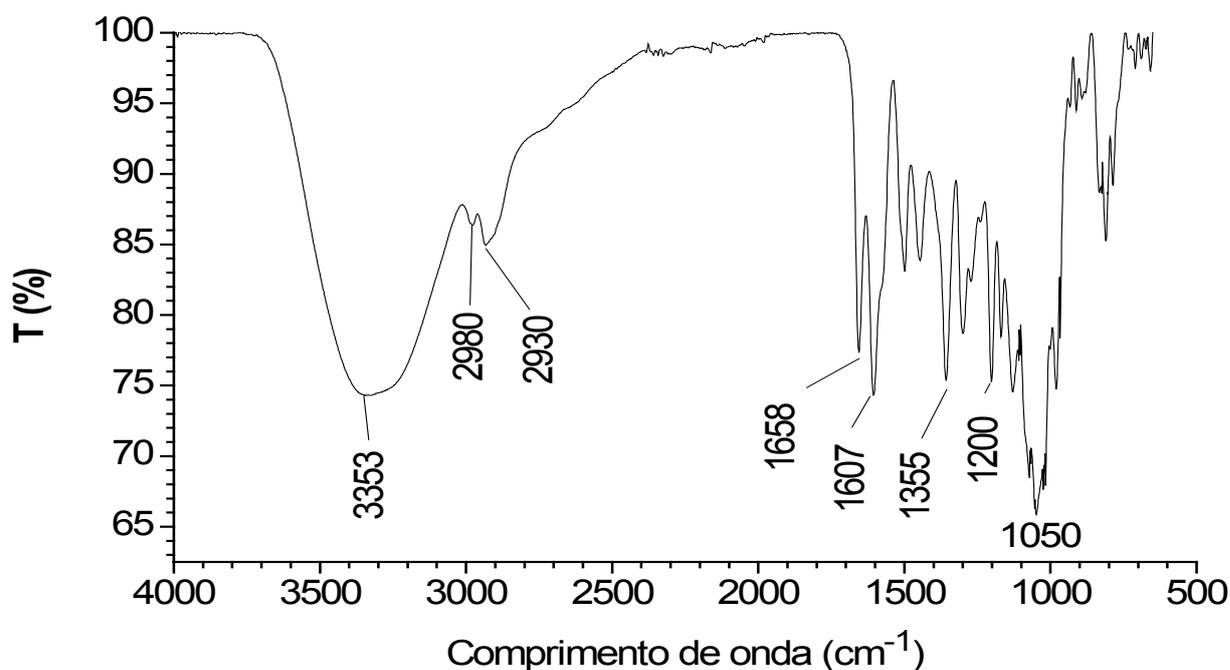
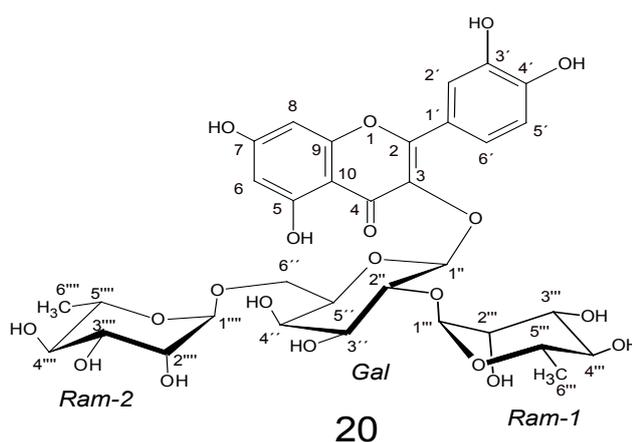


Figura 3.119: Espectro de absorção de **20** na região do infravermelho.

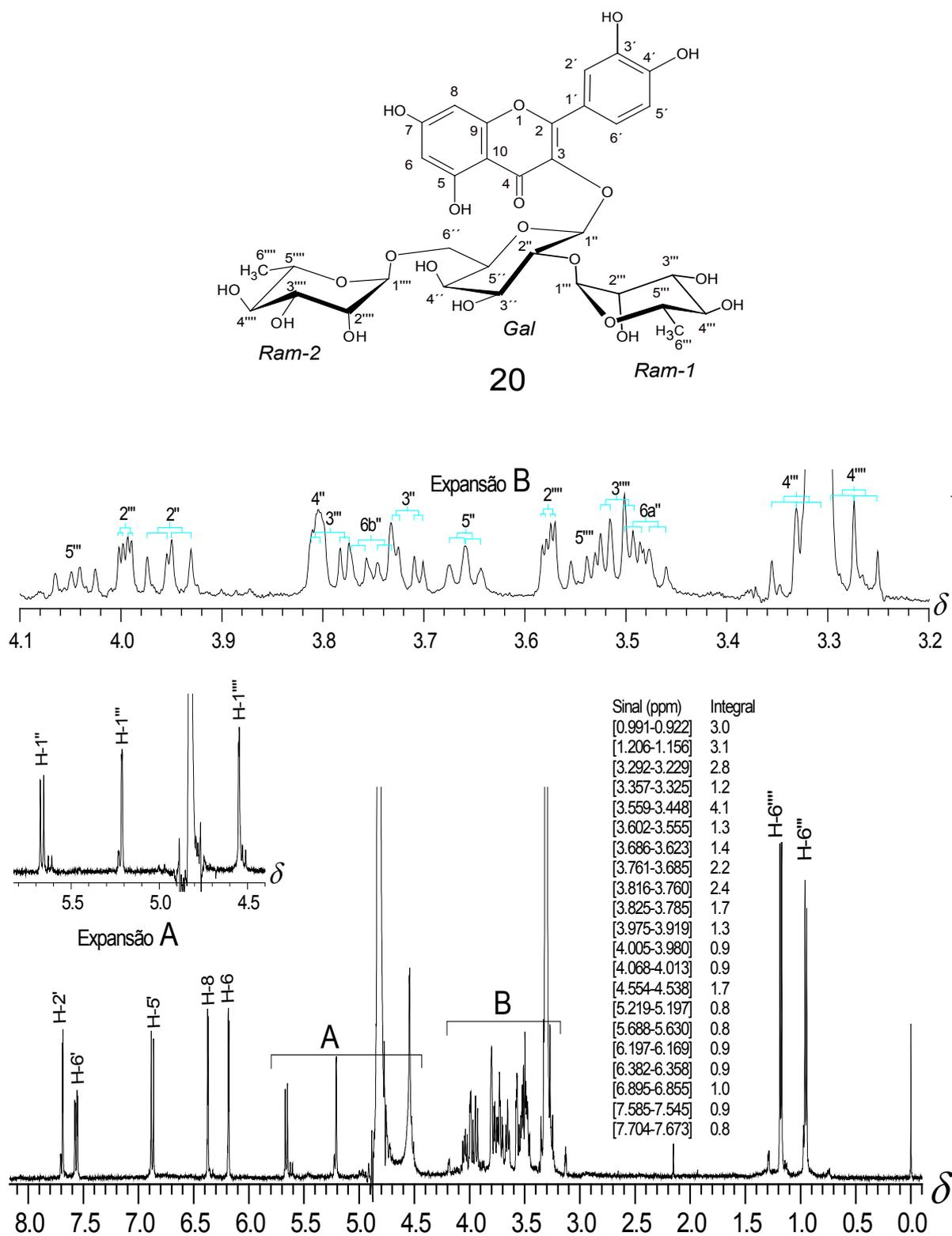


Figura 3.120: Espectro de RMN de ^1H de **20** (CD_3OD , 400 MHz).

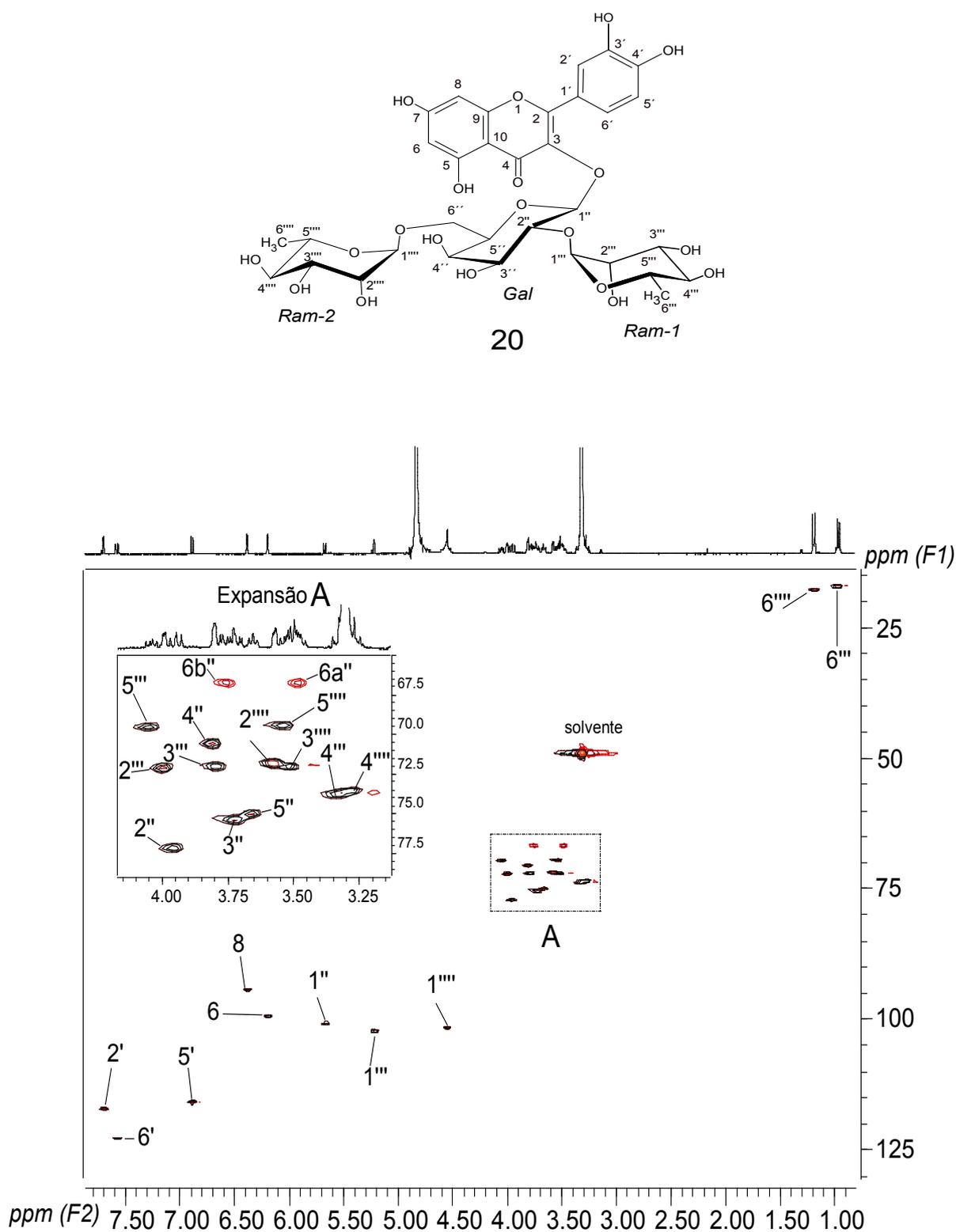


Figura 3.121: Mapa de contornos HSQC de **20** (CD_3OD , 400 MHz).

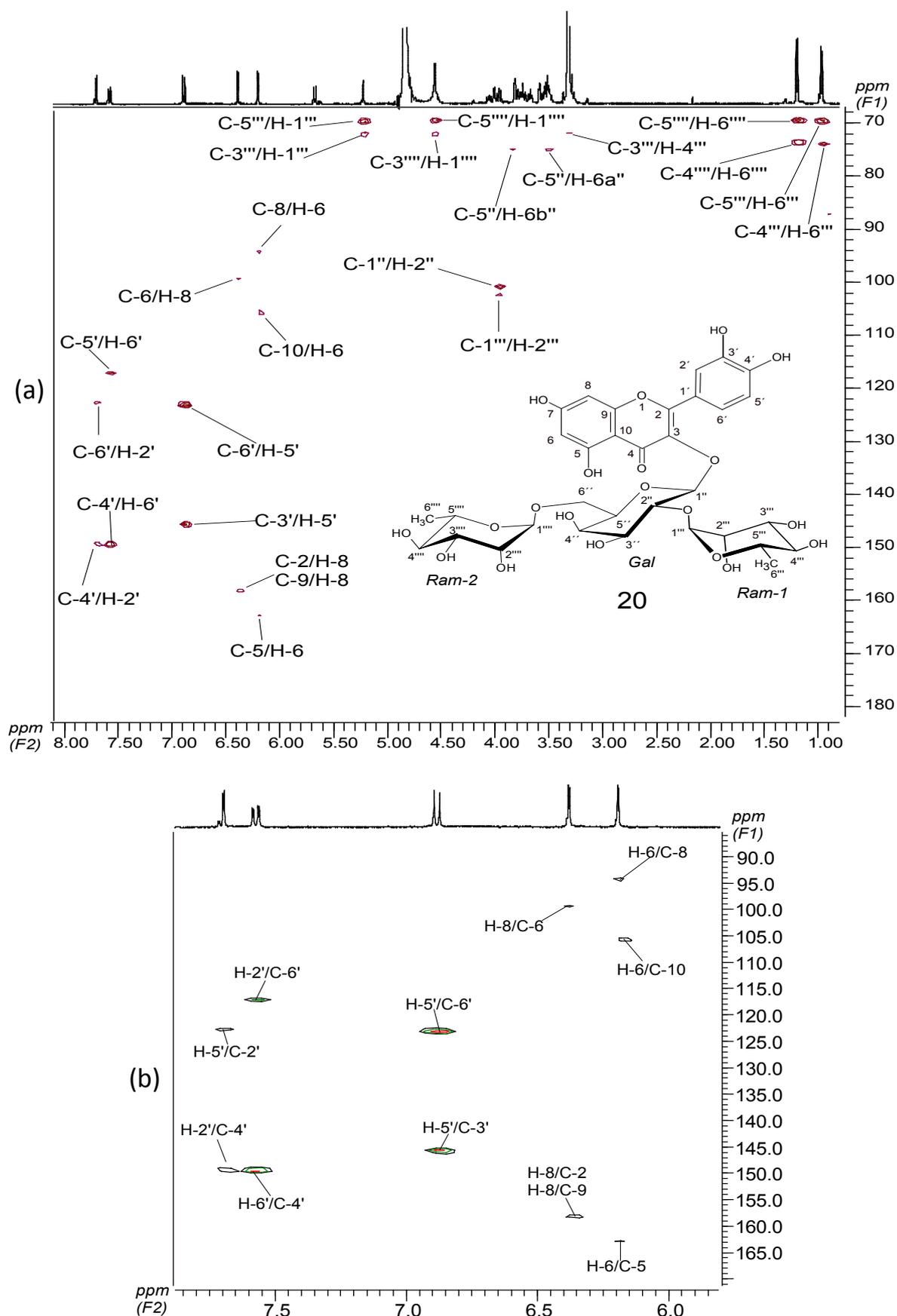
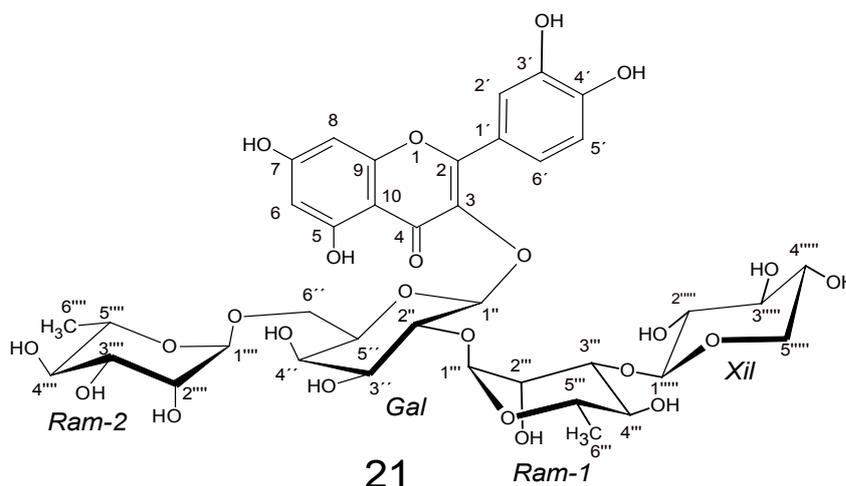


Figura 3.122: Seções do mapa de contornos HMBC de **20** (CD₃OD, 400 MHz): (a) região entre δ de ¹H 1,00-8,00 e δ de ¹³C 70–180; (b) região entre δ de ¹H 6,00-7,80 e δ de ¹³C 90–165.

3-*O*-{[α -*L*-ramnopiranosil(1 \rightarrow 6)]-*O*-[β -*D*-xilopiranosil(1 \rightarrow 3)]-*O*- α -*L*-ramnopiranosil(1 \rightarrow 2)]}- β -*D*-galactopiranosídeo de quercetina (**21**)



O composto inédito **21** foi isolado como um sólido amarelado e amorfo (14,0 mg), obtido do extrato em metanol-água (1/1) das folhas de *M. acanthophylla* (FAMMA). O ponto de fusão de **21** não foi obtido, pois a amostra degradou antes de fundir quando a temperatura atingiu cerca de 200 °C. Na análise de **21** por CCD sob luz UV (366 nm) e após revelação com o reagente NP/PEG-400, foi observado uma mancha amarelo-alaranjada brilhante, indicando a presença de um flavonol (Figura 3.123).⁷⁷ Esse resultado foi coerente com os relatos sobre a obtenção de flavonoides isolados de plantas do gênero *Maytenus* onde figuram compostos 3-*O*-glicosídeos do flavonoide 3,5,7,3',4'-*tetra*-hidroxiflavona, quercetina.^{38, 39, 67}



Figura 3.123: Fotografia eletrônica (2.4 Mpixels), sob luz UV (lâmpada λ 366 nm), da cromatoplaça CCD em sílicagel 60G de **21**, utilizando o eluente acetato de etila-metanol-água (8:4:1 v/v/v) e revelador NP-PEG 4000, $R_f = 0,26$.

O espectro de absorção no UV de **21**, registrado pelo detector com arranjo de fotodiodo do cromatógrafo CLAE, utilizando a mistura A + B (23%) como fase móvel, sendo A = ácido

trifluoroacético (TFA) a 0,1% em água deionizada e B = TFA a 0,1% em acetonitrila:metanol (50:50, v/v), mostrou duas bandas com picos de absorção máxima em λ_{\max} 356 e 257 nm, que indicaram a presença de um flavonoide do tipo flavanol (Figura 3.124).^{80, 170}

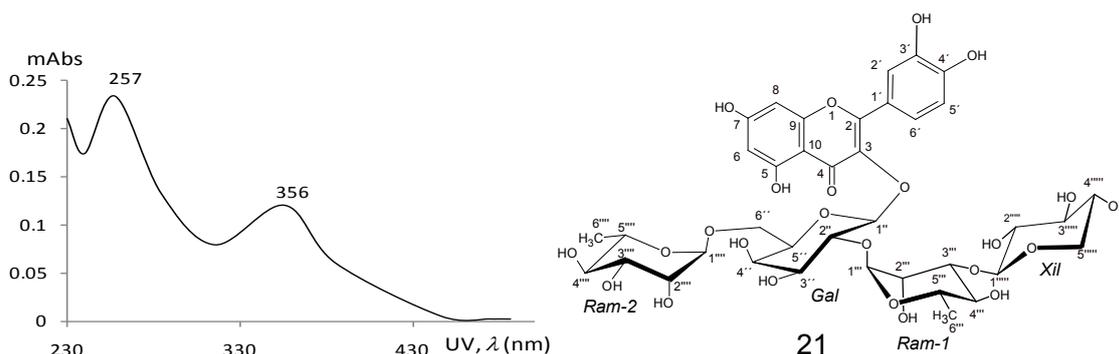


Figura 3.124: Espectro de absorção de **21** obtido por varredura na região do UV na cela do detector de fotiodo, modelo SPD-M10A, acoplado à bomba LC-10AD e módulo de aquisição de dados CBM 10A do equipamento para CLAE (Shimadzu).

A Tabela 3.36 mostra os valores de λ_{\max} (nm) contidos em espectros na região do UV de **21** (Figura 3.129, p.193), coletados utilizando um espectrofotômetro UV/Vis em solução de metanol e com os aditivos usuais na identificação sistemática de flavonoides.⁷⁴

Tabela 3.36: Dados espectrais de **21** na região do UV

Solução	λ_{\max} , (nm)
MeOH	258, 269 om, 356
NaOMe	261, 270 om, 396
AlCl ₃	273, 304 om, 360 om (Banda-Ib), 437 (Banda-Ia)
AlCl ₃ /HCl	268, 300 om, 362 (Banda-Ib), 394 (Banda-Ia)
NaOAc	267, 360 om, 394
NaOAc/H ₃ BO ₃	262, 372

Fonte: Espectros de UV de **21** (Figura 3.129, p.193); om: ombro.

O forte deslocamento batocrômico da Banda I (40 nm), sem diminuição de intensidade na absorbância, ocorrido com a adição de base forte, metóxido de sódio (NaOMe), foi atribuído à presença de um grupo hidroxila fenólica livre em C-4' (4'-OH) no anel B do núcleo de um flavanol; além disso, o espectro no UV de **21** em MeOH/NaOMe permaneceu estável por cerca de cinco minutos após o registro da varredura inicial, confirmando a ocorrência de substituintes em C-3. O deslocamento hipsocrômico (43 nm) observado na Banda Ia do espectro em AlCl₃ após a adição de HCl evidenciou a presença de um sistema *orto-di*-hidroxi no anel B, e o deslocamento batocrômico (38 nm) remanescente na Banda-I após a adição de ácido, em relação ao espectro em MeOH, evidenciou a presença de um grupo

-OH (C-5) quelante para Al^{3+} em posição *peri* à carbonila (C-4) no flavonoide. A base fraca acetato de sódio (NaOAc) ioniza somente grupos hidroxila ácidos em C-3, C-7 e C-4' de **21**, portanto, o efeito da adição de NaOAc sobre a absorção máxima da Banda-II ($\Delta\lambda = +9$ nm) sugeriu a existência de um grupo hidroxila livre em C-7. Em adição, foi observado que o espectro em NaOAc permaneceu estável após 5-10 minutos e o deslocamento batocrômico de 38 nm ocorrido na Banda-I, em relação ao espectro em MeOH, sustentaram as atribuições de substituição tipo (C(3)-O-R e de 4'-OH livre. A adição de ácido bórico na solução em NaOAc manteve um deslocamento batocrômico residual de +16 nm na Banda-I em relação ao espectro de **21** em MeOH, assim, como o H_3BO_3 é um agente quelante dos grupos *orto-di*-hidroxilas (exceto em C-5 e C-6), podemos sugerir a presença de 3',4'-*di*-hidroxi em **21**, o que confirma esse constituinte de *M. acantophylla* como um derivado 3-O-glicosídeo de um flavonol.⁷⁴

O espectro de absorção na região do IV de **21** (Figura 3.130, p.194) apresentou uma banda na região entre $3200-3550\text{ cm}^{-1}$ e outra estreita, muito intensa, com pico em 1049 cm^{-1} , que indicaram a presença de grupos hidroxilas. Observou-se também absorção em 1657 cm^{-1} , característica de grupo carbonílico quelado, geralmente, as absorções relacionadas aos estiramentos da ligação O-H que ocorrem entre $3200-3550\text{ cm}^{-1}$ são atribuídas a grupos hidroxílicos envolvidos em ligações de hidrogênio intermoleculares.^{99, 117} Assim, com base nos dados espectrais de UV e IV, a aglicona de **21** foi identificada como sendo a 3,5,7,3',4'-*penta*-hidroxiflavona (quercetina).

Os dados de RMN (Tabela 3.37, p.185) referentes aos grupos galctopiranosila e ramnopiranosila, bem como da aglicona de **21** (quercetina), puderam ser comparados aos valores correspondentes do glicosídeo, isolado de *M. aquifolium*, o flavonóide 3-O- $\{[\alpha\text{-L-ramnopiranosil}(1\rightarrow6)][\beta\text{-L-glucopiranosil}(1\rightarrow3)-\alpha\text{-L-ramnopiranosil}(1\rightarrow2)]\}$ - $\beta\text{-D-galactopiranosídeo}$ de quercetina.⁴⁰ Os dados de RMN referentes ao grupo xilopiranosila foram comparados como o tetraglicosídeo 3-O- $\{[\beta\text{-D-xilopiranosil}(1\rightarrow3)-\alpha\text{-L-ramnopiranosil}(1\rightarrow6)][\alpha\text{-L-ramnopiranosil}(1\rightarrow2)]\}$ - $\beta\text{-D-galactopiranosídeo}$ de canferol isolado de *Astragalus caprinus* (Fabaceae).¹⁷² O espectro de RMN de 1H (Figura 3.131, p.194) apresentou sinais de dois hidrogênios aromáticos *meta-acoplados* em $\delta 6,19$ (d, $J = 2,0$) e em $\delta 6,37$ (d, $J = 2,0$), que foram atribuídos a H-6 e H-8, respectivamente. Os sinais em $\delta 7,71$ (d, $J = 2,0$), $6,88$ (d, $J = 8,5$) e $\delta 7,57$ (dd, $J = 8,5$ e $2,0$), foram atribuídos a H-2', H-5' e H-6', respectivamente. O espectro de RMN de 1H apresentou, também, sinais referentes às ressonâncias de quatro hidrogênios anoméricos em $\delta 5,62$ (d, $J = 7,8$), $\delta 5,23$ (d, $J = 1,5$), δ

4,54 (d, $J = 1,5$) e δ 4,52 (d, $J = 7,5$). Na seção do mapa de contornos HSQC de **21** (Figura 3.125, p.184), os sinais desses hidrogênios foram observados e apresentaram correlações com os seus respectivos sinais de carbonos em δ 101,35, 102,25, 101,96 e 106,66. Dois dupletos detectados em δ 0,97 (d, $J = 6,0$) e 1,18 (d, $J = 6,0$) foram atribuídos às metilas de dois grupos ramnopiranosilas (H-6''' e H-6''').⁷⁴ Os demais sinais de hidrogênios glicosídeos foram registrados na região de δ 3,27-4,19 do espectro.

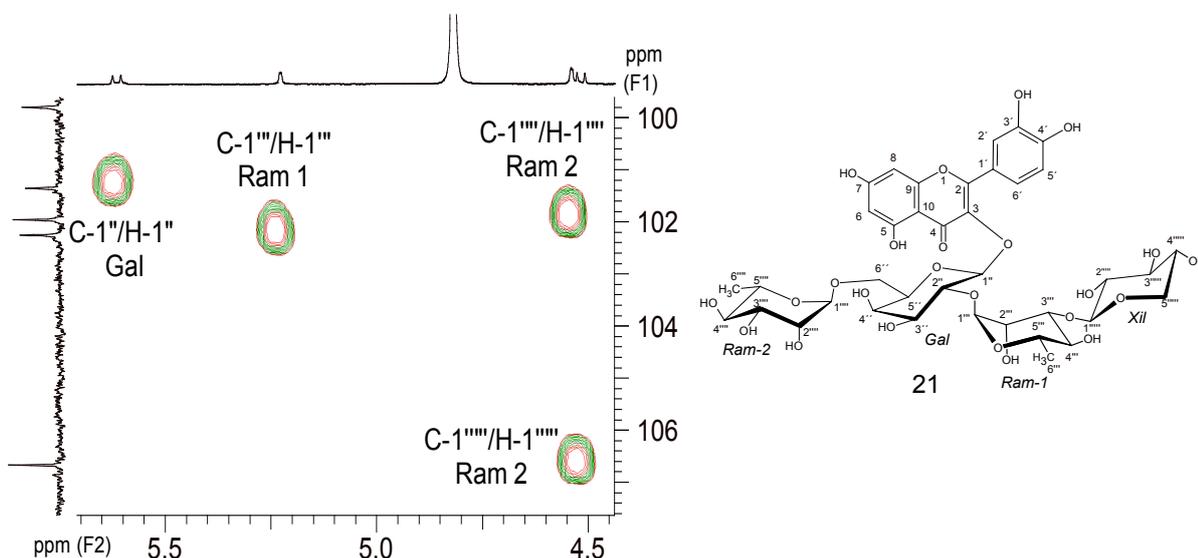


Figura 3.125: Seção do mapa de contornos HSQC de **21** (CD₃OD, 400 MHz) relativa aos hidrogênios e carbonos anoméricos (F2: δ de ¹H 4,5-5,90 x F1: δ de ¹³C 100,0-107,0).

Através da comparação entre os dados da literatura e a análise dos espectros de RMN de ¹H (Figura 3.131, p.194) e dos mapas de contornos COSY (Figura 3.134, p.197) e HMBC (Figura 3.135, p.198), tendo como ponto de partida os sinais dos hidrogênios anoméricos, foram atribuídas as ressonâncias de cada unidade de açúcar de **21**. A observação da correlação ³J_{H-H}, destacada na Figura 3.126, p.185, entre o sinal do hidrogênio em δ 5,62 (d, $J = 7,8$ Hz), atribuído ao hidrogênio anomérico H-1'', com o sinal em δ 3,97 (dd, $J = 9,5, 7,8$ Hz, H-2''), bem como o acoplamento de H-2'' com o sinal em δ 3,74 (m, H-3'') e de H-3'' com o sinal em δ 3,81 (dl, $J = 3,0$ Hz, H-4''), permitiram sugerir que H-1'' e H-2'' estavam em posição axial-axial em um anel de uma unidade β -D-galactopiranosila. Os dois sinais de hidrogênios metilênicos geminais em δ 3,26 (m, H-5a''''') e 3,89 (dd, $J = 11,5, 5,5$ Hz, H-5b'''''), juntamente com mais outros quatro sinais em δ 4,52 (d, $J = 7,5$ Hz, H-1'''''), 3,29 (m, H-2'''''), 3,35 (t, $J = 9,0$ Hz, H-3''''') e em 3,52 (m, H-4'''''), foram atribuídos aos hidrogênios de um anel β -D-xilopiranosila, uma pentose que apresenta a estrutura semelhante ao resíduo de uma D-glicose que teve o grupo -CH₂OH substituído por um hidrogênio em C-5 (Tabela

3.38, p.190). Os acoplamentos dos sinais dos hidrogênios anoméricos em δ 5,23 (d, $J = 1,5$ Hz, H-1''') e 4,54 (d, $J = 1,5$ Hz, H-1''''') com os seus respectivos hidrogênios vicinais em 4,19 (dd, $J = 3,0, 1,5$ Hz, H-2''') e 3,58 (dd, $J = 3,5, 1,5$ Hz, H-2'''''), foram característicos dos hidrogênios H-1 e H-2 (equatoriais) que ocorrem nos anéis de grupos α -L-ramopiranosilas (Figura 3.126). Assim, foi possível determinar a configuração relativa das quatro unidades de açúcares através do valor das constantes de acoplamentos entre H-1 e H-2, levando em consideração que os valores de $^3J_{H-H}$ situados em torno de 1,5 Hz caracterizam a configuração α , enquanto que valores na faixa entre 7-9 Hz indicam a configuração β .¹⁷⁰

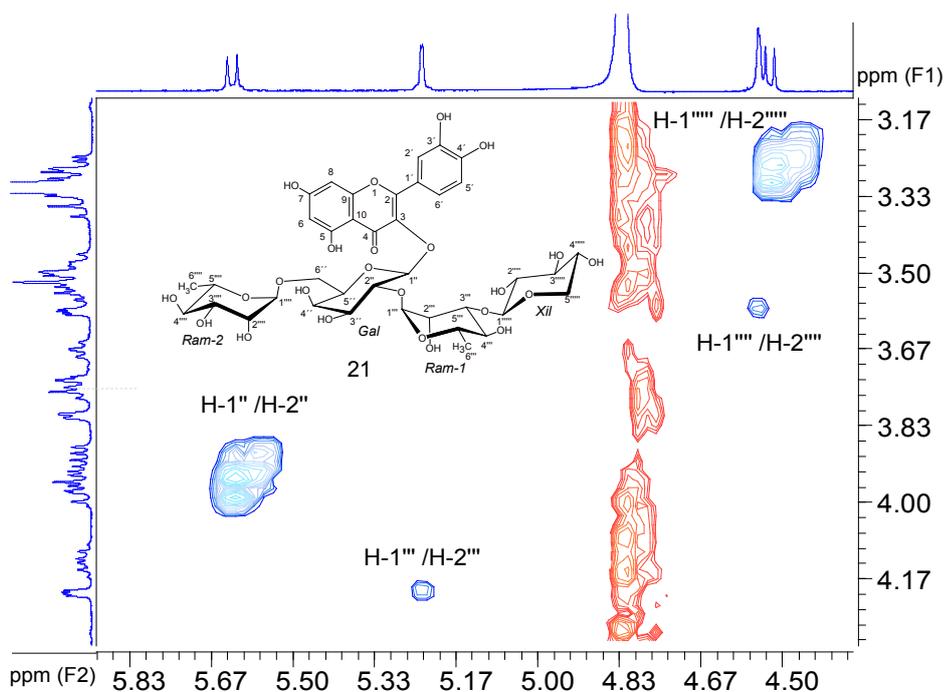


Figura 3.126: Seção do Mapa de contornos COSY de **21** (CD₃OD, 400 MHz) relativa às correlações entre os sinais dos hidrogênios anoméricos e dos hidrogênios vicinais (F2: δ de ^1H 4,45-5,85 x F1: δ de ^1H 3,20-4,20).

As Tabelas 3.37 e 3.38 (p.185-186) mostram os dados completos de RMN de ^{13}C e ^1H (CD₃OD, 400 MHz), obtidos a partir de experimentos 1D (^1H , ^{13}C , DEPT-135) e 2D (HSQC, COSY, HMBC e NOESY) de **21**. Com base nos deslocamentos químicos, multiplicidades dos sinais e valores das constantes de acoplamento, foram identificados os resíduos monossacarídeos como sendo, um grupo β -galactopiranosila (*Gal*), dois α -ramnopiranosilas (*Ram-1* e *Ram-2*) e um grupo β -xilopiranosila (*Xil*). A atribuição da configuração “D” foi feita para ambos resíduos de galactose e xilose, bem como, a configuração L foi atribuída para as duas unidades de ramnose, essa atribuição levou em consideração a predominância dessas configurações em glicosídeos de origem vegetal.¹⁷²

As atribuições dos sinais de hidrogênios da cadeia glicosídica de **21**, utilizando os espectros HMBC, COSY e RMN de ^1H (Tabela 3.38, p.186), permitiram, mediante a análise do mapa de contornos HSQC (Figura 3.133, p.196), a atribuir as ressonâncias dos átomos carbonos aos quais esses hidrogenios estão ligados. A análise dos mapas de contornos HMBC e NOESY forneceram outras informações importantes relacionadas à ligação da aglicona à cadeia glicosídica, bem como as correlações que evidenciaram as pertinências das ligações interglicosídicas.

O mapa de contornos HMBC (Figura 3.135, p.198) de **21** apresentou informações sobre as conexões entre as unidades monossacarídicas e entre a parte aglicona com a cadeia de carboidratos, via ligações glicosídicas. O sinal em δ 5,62 (d, $J = 7,8$) mostrou correlação com o sinal em δ 134,72 (C-3), permitindo estabelecer a conectividade entre C-1'' (galactopiranosila) e C-3 (aglicona), sendo atribuída à ligação entre a quercetina e o grupo galactopiranosila ($[-\beta\text{-D-galactopiranosil-(1}\rightarrow\text{3)-quercetina]$, Figura 3.127, correlação (a)). Através da observação da correlação entre o sinal de H-1''' em δ 5,23 (d, $J = 1,5$) com o sinal de carbono em δ 77,25 (C-2'') foi possível atribuir a existência da ligação glicosídica entre um grupo ramnopiranosila com o grupo galactopiranosila ($[-\alpha\text{-L-ramnopiranosil-(1}\rightarrow\text{2)-D-galactopiranosil-}]$, Figura 3.127, correlação (b)).

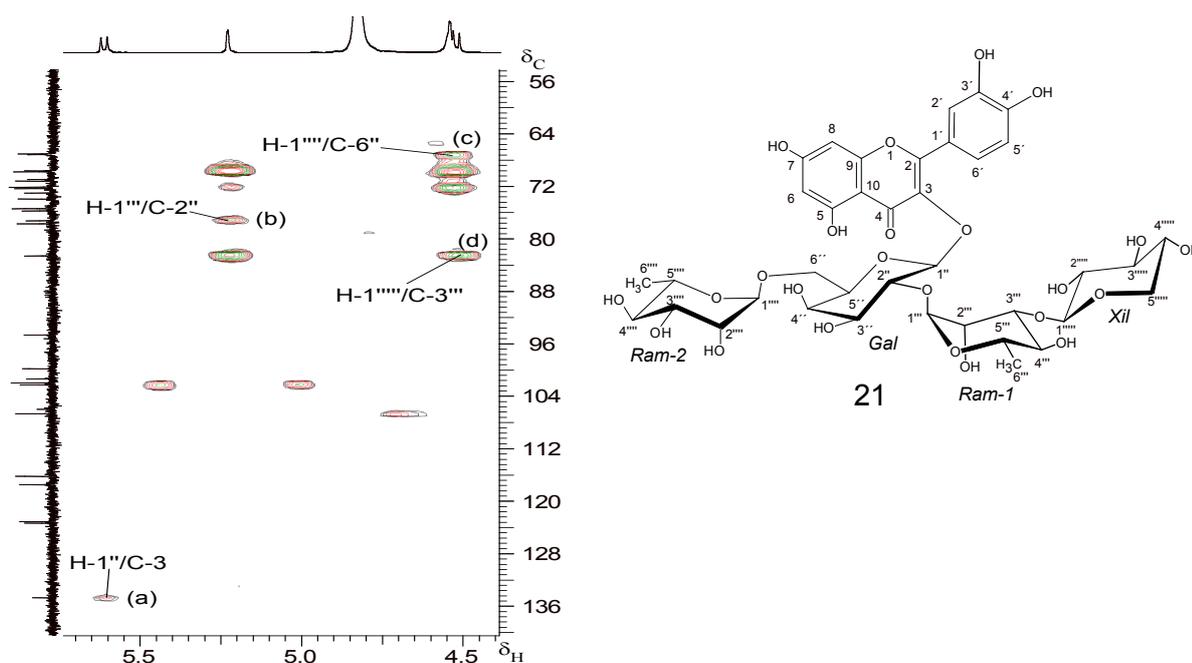


Figura 3.127: Região do mapa de contornos HMBC com as correlações atribuídas às ligações glicosídicas de **21**: (a): $[-\beta\text{-D-Gal(1}\rightarrow\text{3)-O-quercetina}]$; (b): $[-\text{Ram}(1\alpha\rightarrow\text{2)Gal-}]$; (c): $[\text{Ram}(1\alpha\rightarrow\text{6)Gal-}]$; (d): $[\text{Xil}(1\beta\rightarrow\text{3)Ram-}]$.

A correlação entre o sinal de H-1'''' em δ 4,54 (d, $J = 1,5$) e o sinal de carbono em δ 67,18 (C-6'') foi atribuída à ligação glicosídica entre um segundo grupo ramnopiranosila à galactopiranosila ($-\alpha$ -L-ramnopiranosil-(1 \rightarrow 6)-D-galactopiranosil]-, (Figura 3.127, correlação (c)) e, a correlação entre o sinal de H-1'''''' em δ 4,52 (d, $J = 2,0$) e o sinal de carbono em δ 82,59 (C-3''') foi atribuída à ligação glicosídica entre os grupos xilopiranosila e ramnopiranosila ($[\beta$ -D-xilopiranosil-(1 \rightarrow 3)-L-ramnopiranosil], (Figura 3.127, correlação (d), p.182). Os demais dados obtidos no mapa de contornos HMBC foram utilizados na elucidação das estruturas das unidades monossacarídeas juntamente com os mapa de contornos COSY e NOESY, ver Tabelas 3.37 e 3.38 (p.189 e 190).

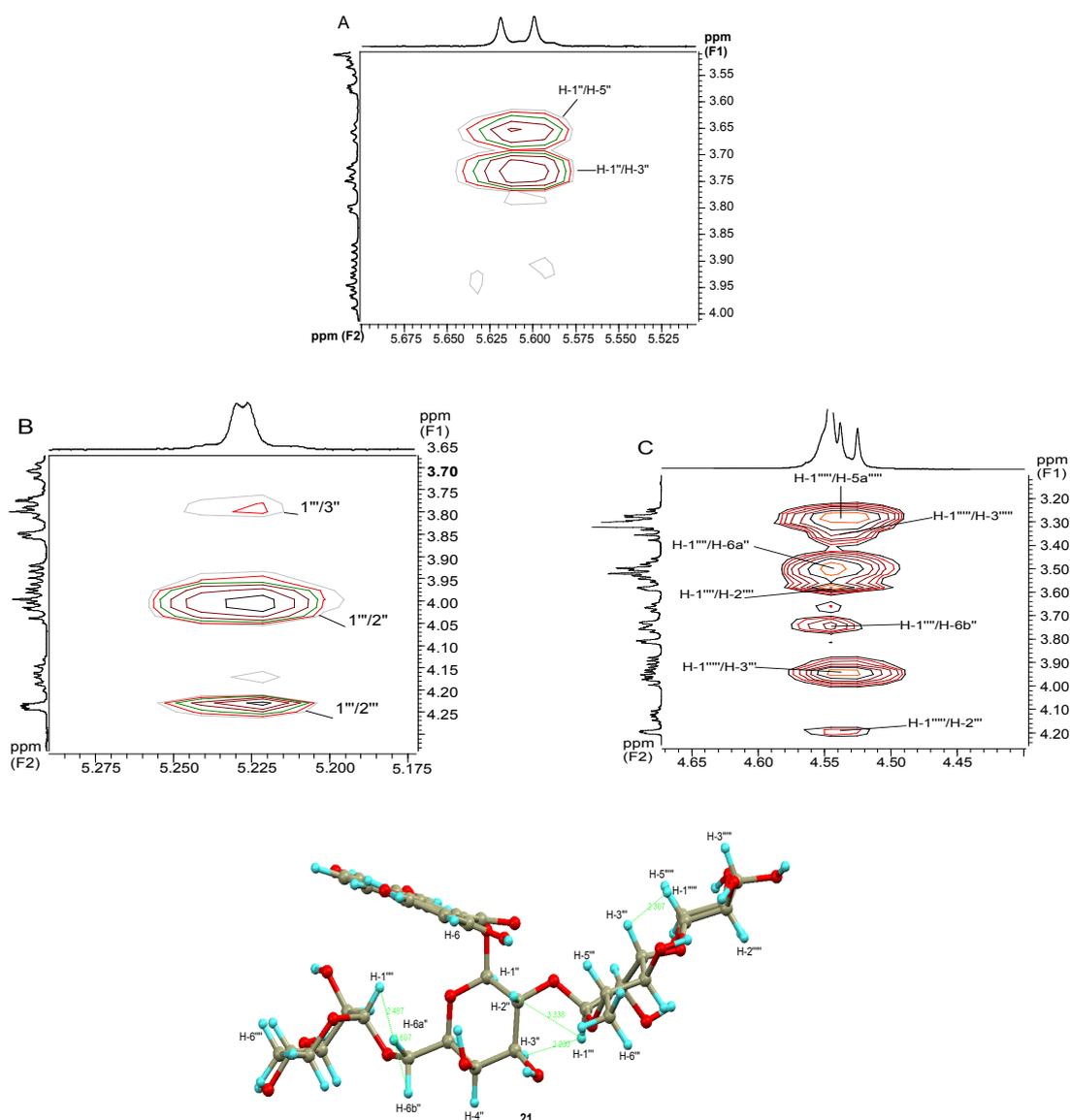


Figura 3.128: Ampliões (A-C) do mapa de contornos NOESY de **21** (CD₃OD, 400 MHz) que mostram correlações interglicosídicas, conforme indicadas pelas linhas verdes tracejadas na estrutura obtida por correlações NOE e otimizada por MMFF-94 Merck (abaixo).⁹³ Cores dos átomos: cinza (C), azul (H) e vermelho (O).

O mapa de contornos NOESY de **21** (Figura 3.136, p.199) mostrou importantes correlações NOE que contribuíram na elucidação da estereoquímica da porção glicosídica da molécula de **21**, principalmente as que envolveram hidrogênios anoméricos nas ligações interglicosídicas. As Figuras 3.128 (A), (B) e (C) (p.187) mostram as importantes correlações obtidas no mapa de contornos NOESY, que possibilitaram confirmar a presença de quatro ligações glicosídicas em **21**. O sinal de hidrogênio anomérico em δ 5,62 (d, $J = 7,8$, H-1'') apresentou correlações NOE com os sinais em δ 3,73 (H-3'') e 3,66 (H-5''), que permitiram confirmar as configurações 1,3-diaxial e 3,5-diaxial para os hidrogênios nas posições 1, 3 e 5 do resíduo galactopiranosila, respectivamente (Figura 3.128 (A), p.187). A ligação glicosídica [*Ram-1*(1 \rightarrow 2)-*O-Gal*] foi confirmada mediante as correlações observadas entre o sinal do hidrogênio anomérico em δ 5,23 (d, $J = 1,5$, H-1''') e os hidrogênios H-2'' e H-3'' em δ 3,97 e δ 3,73, respectivamente (Figura 3.128 (B), p.187). A confirmação de atribuição da ligação glicosídica [*Ram-2*(1 \rightarrow 6)-*O-Gal*]- foi feita através das correlações entre o sinal do hidrogênio anomérico em δ 4,54 (d, $J = 1,5$, H-1''''') do resíduo *Ram-2* e os sinais dos hidrogênios H-6a'' e H-6b'' da galactopiranosila (*Gal*) em δ 3,47 (m) e em δ 3,75 (m), respectivamente (Figura 3.128 (C), p.187). A ratificação da atribuição feita à ligação glicosídica [*Xil*(β 1 \rightarrow 3)*Ram-1*] se deu através da correlação entre o sinal do hidrogênio anomérico do resíduo da xilose (*Xil*) em δ 4,52 (H-1''''''') com o sinal em δ 3,94 (H-3''''') do resíduo da raminose-1 (*Ram-1*) (Figura 3.128 (D), p.187).

A pesquisa bibliográfica relacionada aos dados de RMN mostrou que **21** é um composto inédito. Souza e colaboradores^{81, 82} relataram a identificação e a caracterização por espectroscopia de massa de um composto similar a **21**, um tetraglicosídeo de quercetina a partir de extratos de folhas de *M. ilicifolia* e *M. aquifolium*. Entretanto, o composto isolado de *M. ilicifolia* e *M. aquifolium* possui a cadeia glicosídica diferente da cadeia de **21**. No tetraglicosídeo identificado por Souza, os dois grupos terminais da cadeia glicosídica foram α -L-ramnopiranosila e α -L-arabinopiranosila, enquanto que, na cadeia glicosídica de **21** os grupos terminais foram α -L-ramnopiranosila e β -D-xilopiranosila. Estruturalmente, a diferença entre os grupos arabinopiranosila e xilopiranosila está na posição relativa da hidroxila ligada em C-4, sendo portanto dois estereoisômeros ou epímeros. A comparação entre os dados de RMN de ^{13}C e de ^1H do resíduo de β -D-xilopiranosila de **21** com os correspondentes dados relativos ao resíduo de α -D-arabinopiranosila, presente no composto 3-*O*-{[α -L-ramnopiranosil(1 \rightarrow 6)]-*O*-[α -L-arabinopiranosil(1 \rightarrow 3)]-*O*- α -L-ramnopiranosil(1 \rightarrow 2)]}- β -D-galactopiranosídeo de canferol, também isolado de *M. ilicifolia* e

*M. aquifolium*⁴⁰, mostrou haver distinção significativa nos valores dos deslocamentos químicos, multiplicidades e constantes de acoplamento.

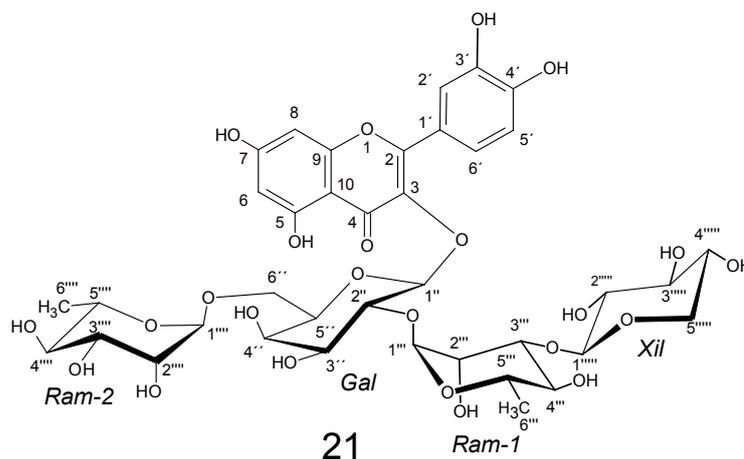
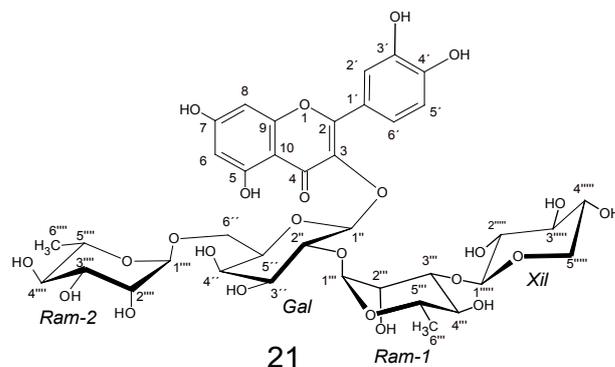


Tabela 3.37: Atribuição dos valores de δ de ^{13}C de **21** (CD_3OD , 100 MHz) e a comparação com valores disponíveis da literatura.^{40, 172}

C-n	21	Lit. ⁴⁰	HMBC	C-n	21	Lit. ⁴⁰	HMBC
<u>Genina</u> ⁴⁰							
2	158,64	158,3	H-2', H-6'	(2-1)Ram			
3	134,72	134,5	H-1''	1'''	102,25	102,1	H-2''
4	179,42	179,3		2'''	72,13	72,0	H-1'''
5	163,24	163,0	H-6	3'''	82,59	82,7	H-1''', H-2''', H-4''', H-1''''
6	99,80	99,7	H-8	4'''	73,02	72,9	H-2''', H-3''', H-5''', H-6'''
7	165,71	165,6	H-6, H-8	5'''	69,69	69,5	H-1''', H-4''', H-6'''
8	94,66	94,6	H-6	6'''	17,52	17,6	H-4'''
9	158,44	158,5	H-8	(6-1)Ram			
10	106,00	105,8	H-6, H-8	1''''	101,96	101,8	H-6a''
1'	123,36	123,2	H-2', H-5'	2''''	72,16	72,1	H-3''''
2'	117,49	117,4	H-6'	3''''	72,35	72,2	H-1'''', H-2'''', H-4''''
3'	145,90	145,8	H-2', H-5'	4''''	73,94	73,7	H-2'''', H-3'''', H-5'''', H-
4'	149,73	149,6	H-2', H-5', H-6'	5''''	69,79	69,6	H-1'''', H-4'''', H-6''''
5'	116,21	116,1		6''''	18,01	17,8	H-4''''
6'	123,11	123,0	H-2'	<u>Cadeia glicosídica</u>			
<u>3-Gal</u> 21 Lit. ³⁸ HMBC (3-1)Xil Lit. ¹⁷²							
1''	101,35	101,1	H-2''	1''''	106,66	106,4	H-3''', H-2''''', H-5a''''
2''	77,25	77,2	H-3'', H-4'', H-1'''	2''''	75,42	75,2	H-3''''', H-4''''
3''	75,74	75,7	H-2'', H-4''	3''''	77,71	77,5	H-4''''', H-5a''''', H-5b''''
4''	70,95	70,7	H-5''	4''''	71,20	71,1	H-2''''', H-3''''', H-5a''''
5''	75,37	75,3	H-6a''	5''''	67,07	66,9	H-1''''
6''	67,18	67,1	H-5'', H-1''''				

Fonte: Espectros de RMN de ^{13}C e DEPT-135 (Figura 3.132, p.195).

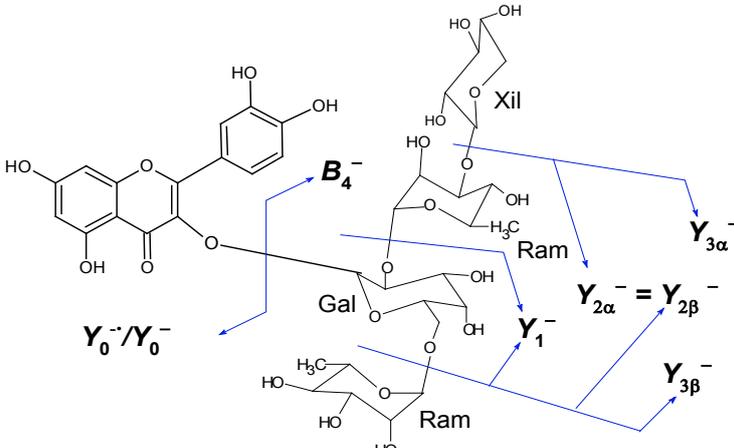
**21**Tabela 3.38: Atribuição dos valores de δ de ^1H de **21** (CD_3OD , 400 MHz) de **21** e a comparação com os valores encontrados na literatura^{40, 172}

H-n	δ (multiplicidade, J , Hz)		RMN 2D	
	21	Literatura (genina) ⁴⁰	COSY	NOESY
H-6	6,19 (d, $J = 2,0$)	6,22 (d, $J = 1,5$)	H-8	
H-8	6,37 (d, $J = 2,0$)	6,41 (d, $J = 1,5$)	H-6	
H-2'	7,71 (d, $J = 2,0$)	7,75 (d, $J = 1,5$)	H-5', H-6'	
H-5'	6,88 (d, $J = 8,5$)	6,94 (d, $J = 8,5$)	H-2', H-6'	H-6'
H-6'	7,57 (dd, $J = 8,5, 2,0$)	7,61 (dd, $J = 1,5, 8,5$)	H-2', H-5'	H-5'
3-Gal				
		Cadeia Glicosídica⁴⁰		
H-1''	5,62 (d, $J = 7,8$)	5,63 (d, $J = 7,5$)	H-2''	H-3'', H-5'', H-3'''
H-2''	3,97 (dd, $J = 9,5, 7,8$)	3,94 (dd, $J = 7,5; 9,7$)	H-1'', H-3''	H-1'''
H-3''	3,74 (m)	3,75 (dd, $J = 7,5, 3,6$)	H-2'', H-4''	H-1'''
H-4''	3,81 (dl, $J = 3,0$)	3,50 (dd, $J = 3,5, 1,5$)	H-3'', H-5''	–
H-5''	3,66 (tl, 6,5)	3,66 (ddd, $J = 1,5, 5,0, 7,0$)	H-4'', H-6a'', H-6b''	H-1'', H-6a''
H-6a''	3,47 (m)	3,45 (dd, $J = 12,0, 7,0$)	H-5'', H-6b''	H-5'', H-6b''
H-6b''	3,75 (m)	3,76 (dd, $J = 12,0, 5,0$)	H-5'', H-6a''	H-6a''
(2-1)Ram				
H-1'''	5,23 (d, $J = 1,5$)	5,27 (d, $J = 1,5$)	H-2'''	H-2''', H-2'' H-3'', H-4'''
H-2'''	4,19 (dd, $J = 3,0, 1,5$)	4,26 (dd, $J = 3,0, 1,5$)	H-1''', H-3'''	H-1''', H-3'''
H-3'''	3,94 (dd, $J = 9,5, 3,0$)	3,81 (dd, $J = 9,5, 3,0$)	H-2'''	H-2''', H-1''''
H-4'''	3,52 (m)	3,34 (dd, $J = 9,5, 1,5$)	H-3'''	H-5''', H-6'''
H-5'''	4,12 (m)	4,15 (qd, 9,5, 6,0)	H-6'''	H-3''', H-6'''
H-6'''	0,97 (d, $J = 6,0$)	1,00 (d, $J = 6,0$)	H-5'''	H-3''', H-4''', H-5'''
(6-1)Ram				
1''''	4,54 (d, $J = 1,5$)	4,53 (d, $J = 1,5$)	H-2''''	H-2''', H-6a/b''
2''''	3,58 (dd, $J = 3,5, 1,5$)	3,61 (dd, $J = 3,5, 1,5$)	H-1''''	H-1''', H-4'''
3''''	3,51 (m)	3,54 (dd, $J = 9,5, 3,5$)	H-4''''	H-6''''
4''''	3,27 (m)	3,34 (t, 9,5)	H-3''', H-5''''	H-6''''
5''''	3,53 (m)	3,58 (qd, $J = 9,5, 6,0$)	H-4''', H-6''''	H-6''''
6''''	1,18 (d, $J = 6,0$)	1,22 (d, $J = 6,6$)	H-5''''	H-4''', H-5''''
(3-1)Xil				
		Literatura¹⁷²		
1'''''	4,52 (d, $J = 7,5$)	4,32 (d, $J = 7,4$)	H-2'''''	H-3''''', H-4''''', H-5a''''', H-3''''
2'''''	3,29 (m)*	3,22 (dd, $J = 7,4, 9,0$)	H-1'''''	H-5b''''
3'''''	3,35 (t, 9,0)	3,30 (t, $J = 8,6$)	H-2''''', H-4'''''	H-1''''
4'''''	3,52 (m)	3,48 (dd, $J = 6,6, 2,8$)	H-3''''', H-5b'''''	H-5b''''
5a'''''	3,26 (m)	3,00 (t, $J = 12,2$)	H-5b'''''	H-1''''', H-5b''''
5b'''''	3,89 (m)	3,77 (dd, $J = 5,4, 12,2$)	H-4''''', H-5a'''''	H-5a''''', 4''''

dl: dupletto largo. (*) sinal sobreposto ao da impureza do solvente. Fonte: Espectros de RMN de ^1H (Figura 3.131, p.194) e mapas de contorno COSY e NOESY (Figuras 3.134, p.197 e 3.136, p.199).

Nos espectros de massas EM-IES de **21**, modo negativo com varredura de m/z 100-1000 (Figura 3.137, p.200), o sinal observado c m/z 888 (100%) foi atribuído ao íon-radical $[M]^\bullet$ ($C_{38}H_{48}O_{24}$), que permitiu propor a massa de **21** em 888 Da. Foi observado no espectro EM²-IES que o íon molecular $[M-H]^-$ em m/z 887, obtido após ser aprisionado e bombardeado com hélio, produziu os fragmentos principais em m/z 755 e 741, os quais foram atribuídos aos íons-fragmentos $Y_{3\beta}^-$ e $Y_{3\alpha}^-$, respectivamente. As perdas ocorridas nessas fragmentações foram correspondentes à saída de um resíduo de pentose ($[M-H-132]$) e de uma ramnose ($[M-H-146]$), respectivamente. Com base nos dados de RMN, o resíduo de pentose foi atribuído a um grupo xilopiranosil. O íon em m/z 609 ($Y_{2\beta}^-$ ou $Y_{2\alpha}^-$) pode ter sido originado por duas vias distintas: (i) mediante a fragmentação do íon em m/z 741 com a saída de um xilopiranosil $[Y_{3\beta}-132]^-$, ou (ii) via o íon em m/z 741 com a saída de um ramnopiranosil $[Y_{3\alpha}-146]^-$.

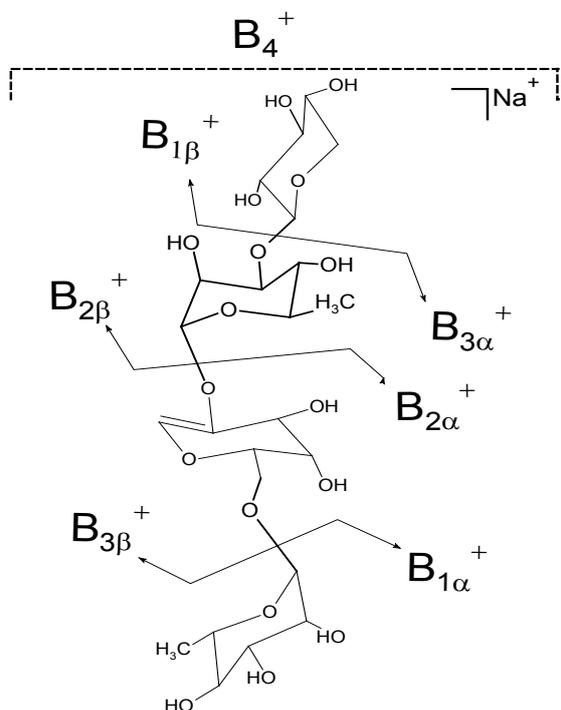
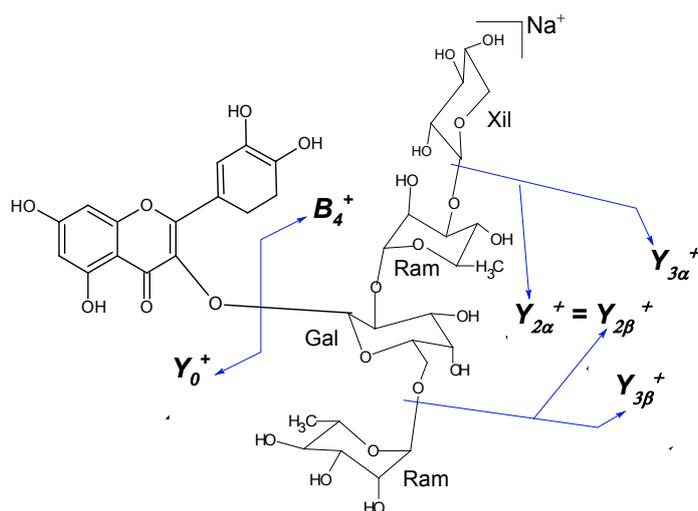
Tabela 3.39: Proposta de fragmentação para o tetraglicosídeo **21** e a atribuição dos íons observados nos EM-IES negativo (Figura 3.137, p.200), de acordo com a nomenclatura de Domon e Costello⁸¹.



EM-IES		Atribuição	
m/z	PN (Da)	Íon	PN
887		$[M-H]^-$	q-M
301	586	Y_0^-	B_4
463	424	Y_1^-	$B_{1\alpha} + B_{2\beta}$
609	278	$Y_{2\alpha}^-$	$B_{1\alpha} + B_{1\beta}$
609	278	$Y_{2\beta}^-$	$B_{2\beta} + B_{1\alpha}$
755	132	$Y_{3\alpha}^-$	$B_{1\beta}$

PN: perdas neutras, q-M: íon *quasi*-molecular

A formação do íon Y_1^- (m/z 463), atribuído ao íon do mono-heterosídeo [aglicona-3-*O*-hexose]⁻, ocorreu via fragmentação do íon em 609 ($Y_{2\beta}^-$ ou $Y_{2\alpha}^-$), após a eliminação de um segundo grupo ramnopiranosil, o que, resumidamente, equivale ao fragmento $[M - 2 \text{ Ram} - \text{ara} - H]^-$. Conseqüentemente, a formação do íon mais abundante, em m/z 301, atribuído a íon correspondente a aglicona (Y_0^-), resultou da fragmentação do íon em m/z 463 (Y_1^-) via eliminação do último resíduo sacarídeo equivalente a uma hexose (galactopiranosila, segundo dados de RMN), ligado à molécula de quercetina.

Tabela 3.40: Fragmentograma proposto para o tetraglicosídeo **21** e a atribuição dos íons (aductos do sódio) observados nos EM-IES, modo positivo, do íon precursor em m/z 912 (Figura 3.138, p.201).

EM-IES		Atribuição	
m/z	PN (Da)	Íon	PN
911/912		$[M + Na]^+$	
609	302	$[B_4]^+$	Y_0
634	146/132	$Y_{2\alpha}^+$	<i>Ram/Xil</i>
634	132/146	$Y_{2\beta}^+$	<i>Xil/Ram</i>
780	132	$Y_{3\alpha}^+$	<i>Xil</i>
766	146	$Y_{3\beta}^+$	<i>Ram</i>

EM-IES		Atribuição	
m/z	PN (Da)	Íon	PN
609		B_4^+	C. glic
ND	132	$B_{1\alpha}^+$	<i>Ara</i>
ND	146	$B_{1\beta}^+$	<i>Ram</i>
331	132/146	$B_{2\alpha}^+$	<i>Ara/Ram</i>
301	146/162	$B_{2\beta}^+$	<i>Ram/ara</i>
477	132	$B_{3\alpha}^+$	<i>Ara</i>
463	146	$B_{3\beta}^+$	<i>Ram</i>

PN: perdas neutras; ND: não detectado, a observação desses íons depende da energia de cone aplicada no método CID⁸². C. glic: íon-fragmento da cadeia glicosídica.

A Tabela 3.39 (p.187) mostra as atribuições dos íons observados, a proposta de fragmentação e as perdas neutras calculadas para o espectro EM-IES² no modo negativo. A diferença entre as massas dos íons $[M-H]^-$ e Y_0^- , igual a 586 Da, foi atribuída ao valor da massa da cadeia glicosídica de **21**, que correspondeu à soma das massas molares de uma xilopirranila, duas ramnopirranilas e uma galactopirranila. A análise do espectro EM³-IES mostrou que o íon Y_0^- em m/z 301 foi o precursor dos íons-radicaís em m/z 272 e em m/z 256. Esses íons foram atribuídos às perdas dos radicais neutros CHO (29 Da) e CHO₂ (45 Da) pelo íon precursor. O padrão de fragmentação da aglicona foi coincidente com aquele apresentado nos dados de espectroscopia de massas relatados para glicosídeos da quercetina identificados

em *Maytenus aquifolium* e *M. ilicifolia*⁸⁰. Nos espectros EM-IES com detecção no modo positivo (Figura 3.138, p.201), adquirido pelo aprisionamento do íon precursor em m/z 912, foi possível observar íons dos tipos Y_i^+ e B_i^+ como aductos do íon sódio (Na^+). Os íons-fragmentos do tipo B_i^+ detectados possibilitaram confirmar a constituição da cadeia glicosídica de **21**. As perdas neutras calculadas em 132, 146, 146 e 162 Da, juntamente com os dados de RMN, confirmaram a seqüência das unidades sacarídeas como sendo *Xil*→*Ram-1*→*Gal*→*Ram-2*. As Tabelas 3.39 e 3.40 (p.187-188) mostram as propostas de fragmentação da estrutura de **21**, bem como a atribuição dos íons observados nos modos de detecção positivos e negativos, os espectros de massas correspondentes encontram-se no anexo (Figuras 3.137-3.138, pp.200-201). Os resultados obtidos nas análises dos dados espectrocópicos de UV, IV, RMN e EM-IES permitiram elucidar a estrutura do glicosídeo **21** como sendo a do composto inédito 3-*O*-{[α -L-ramnopiranosil(1→6)]-*O*-[β -D-xilopiranosil(1→3)-*O*- α -L-ramnopiranosil(1→2)]]- β -D-galactopiranosídeo de quercetina.

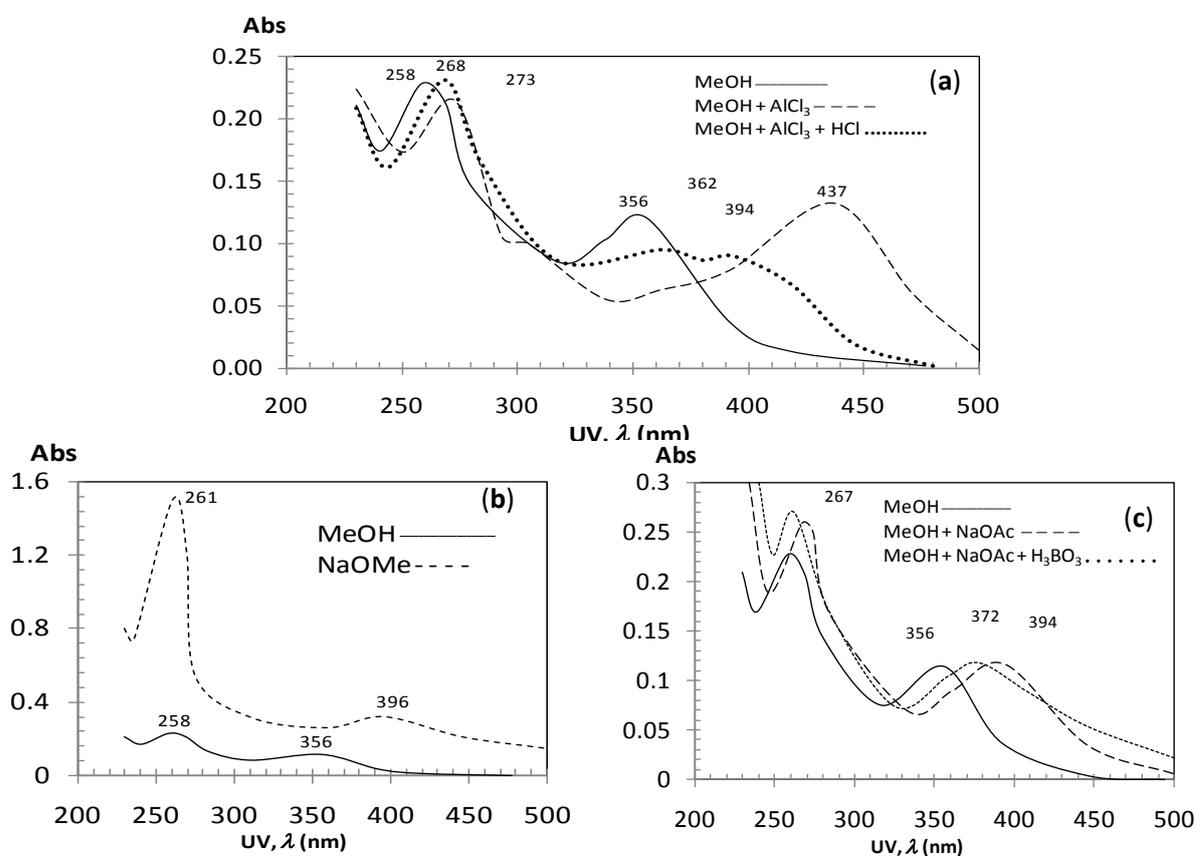


Figura 3.129: Curvas características de absorvância em UV de **21** obtidas em soluções de (a) MeOH, MeOH + AlCl₃, MeOH + AlCl₃ + HCl_(aq.) (b) MeOH, MeOH + NaOMe, e (c) MeOH, MeOH + NaOAc, MeOH + NaOAc + H₃BO₃. Os dados espectrais foram registrados em um espectrômetro UV/Vis Beckman DU-600 (CPQRR, BH), ajustado para duas varreduras/amostra na faixa de comprimento de onda (λ) de 200-500 nm a 600 nm/min.

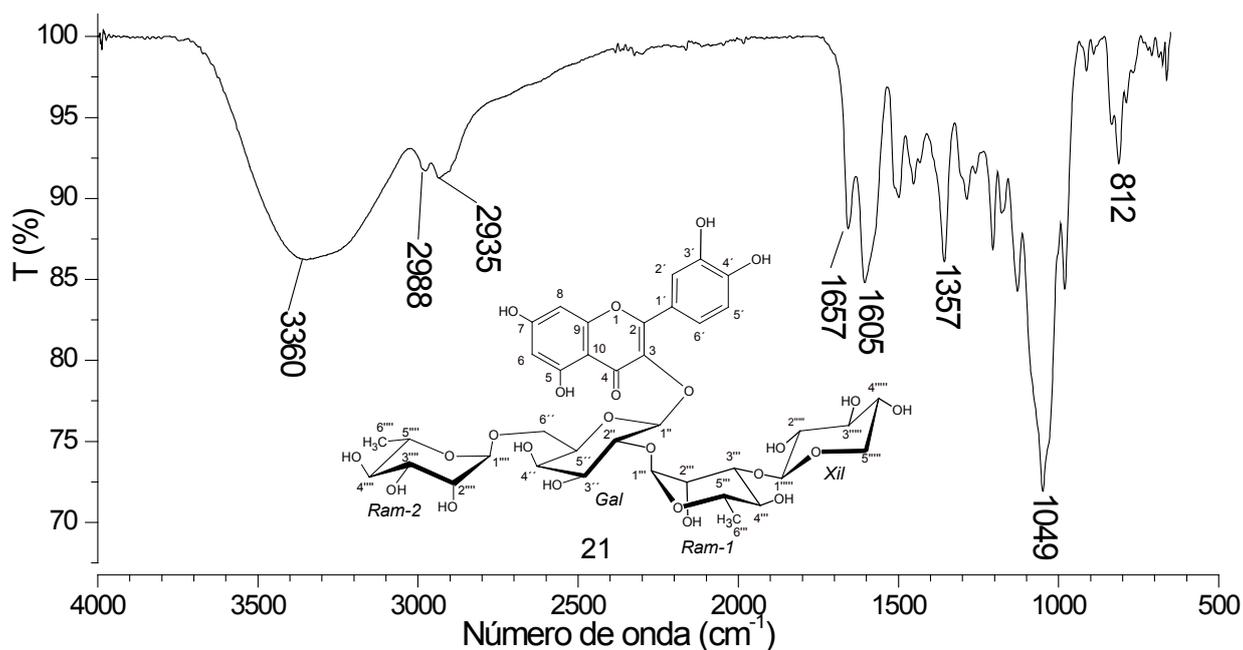


Figura 3.130: Espectro de absorção de **21** na região do infravermelho.

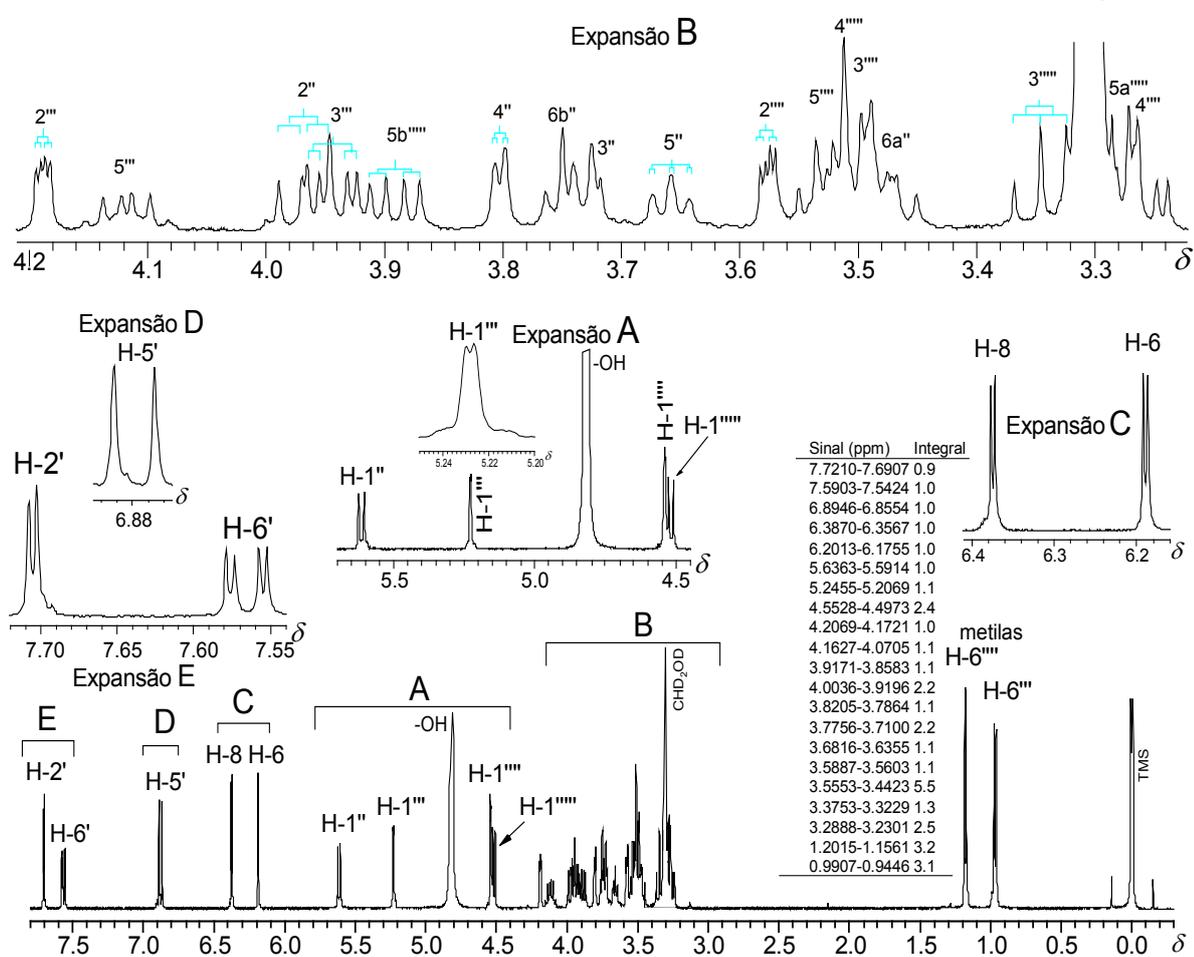


Figura 3.131: Espectro de RMN de ¹H de **21** (CD₃OD, 400 MHz).

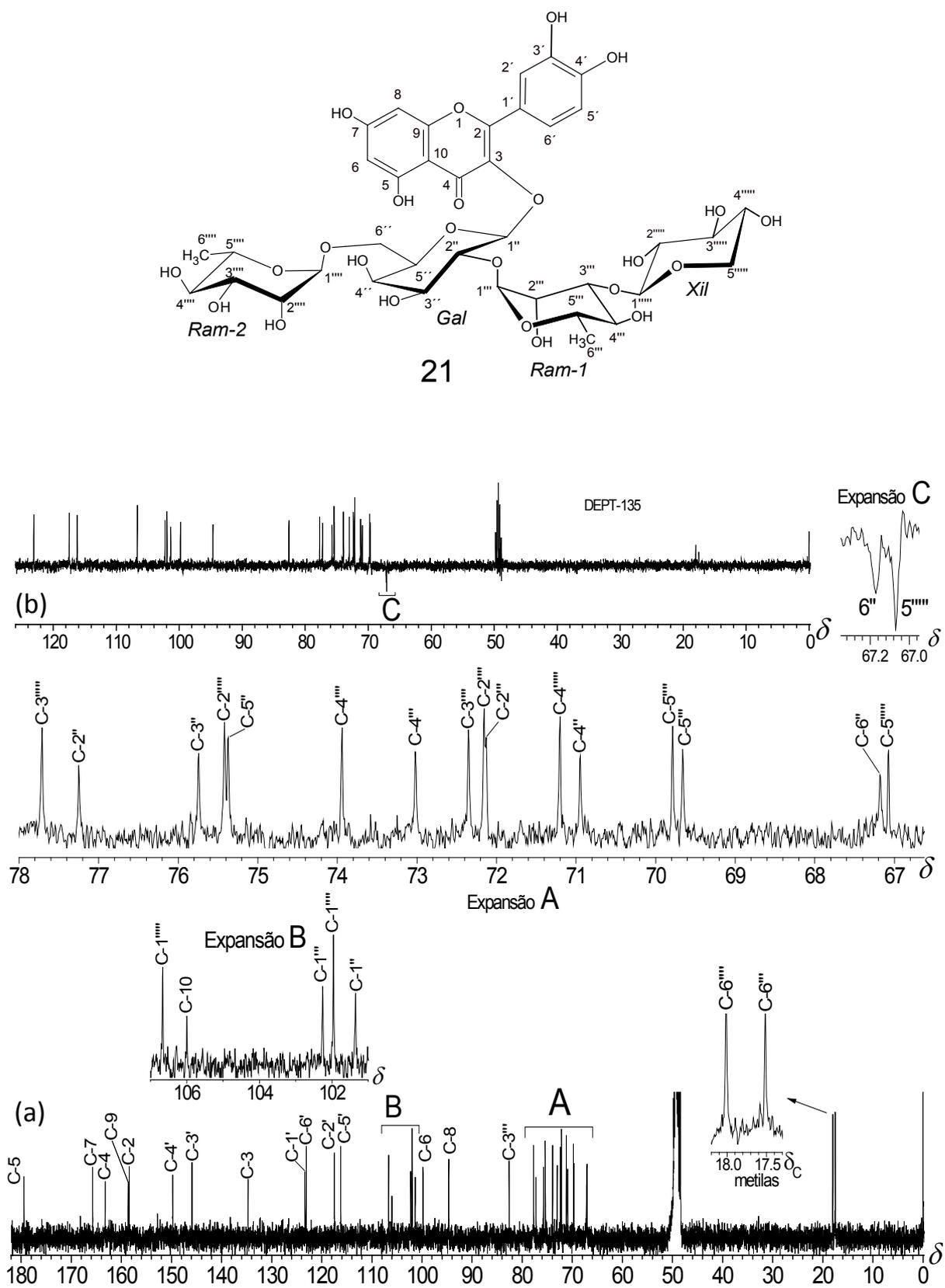


Figura 3.132: Espectro de RMN de (a) ^{13}C e (b) DEPT-135 de **21** (CD_3OD , 100 MHz).

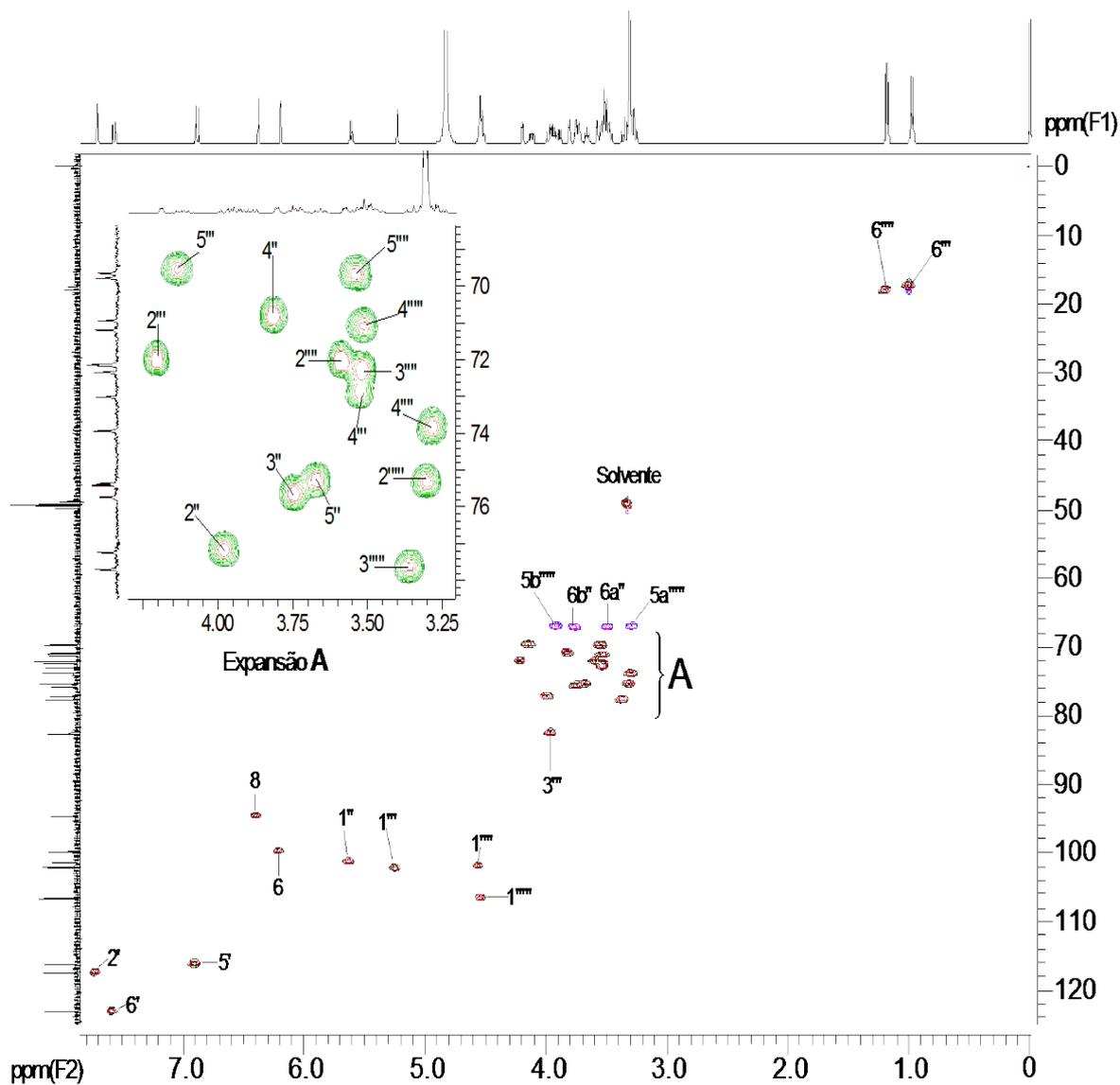
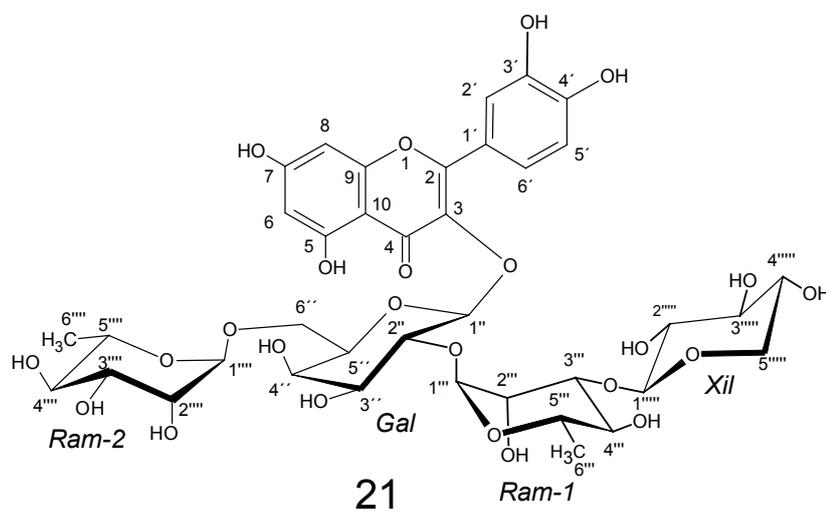


Figura 3.133: Mapa de contornos HSQC de **21** (CD₃OD, 400 MHz).



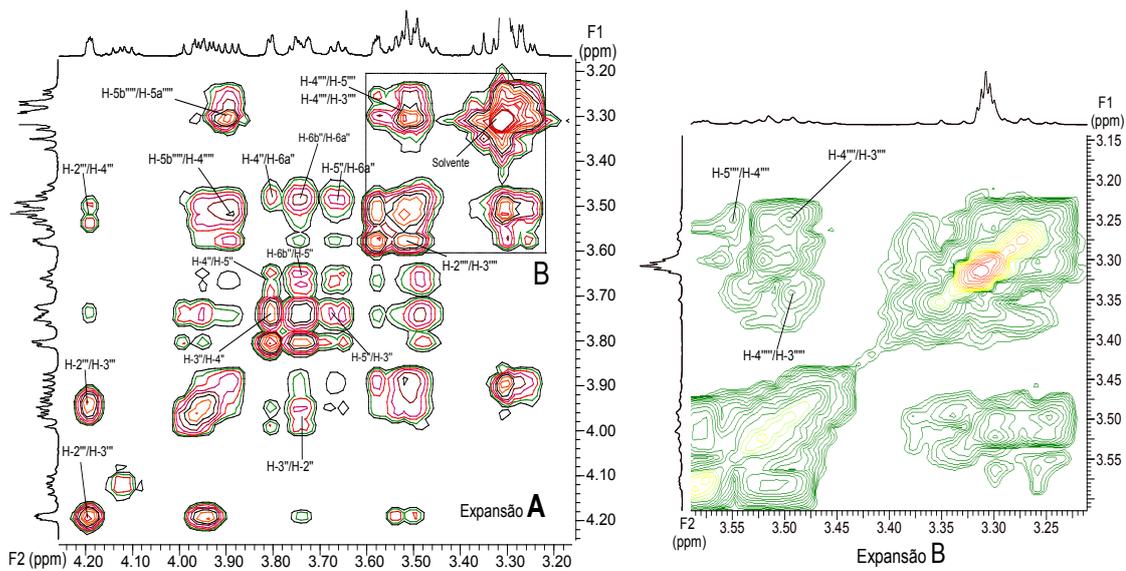
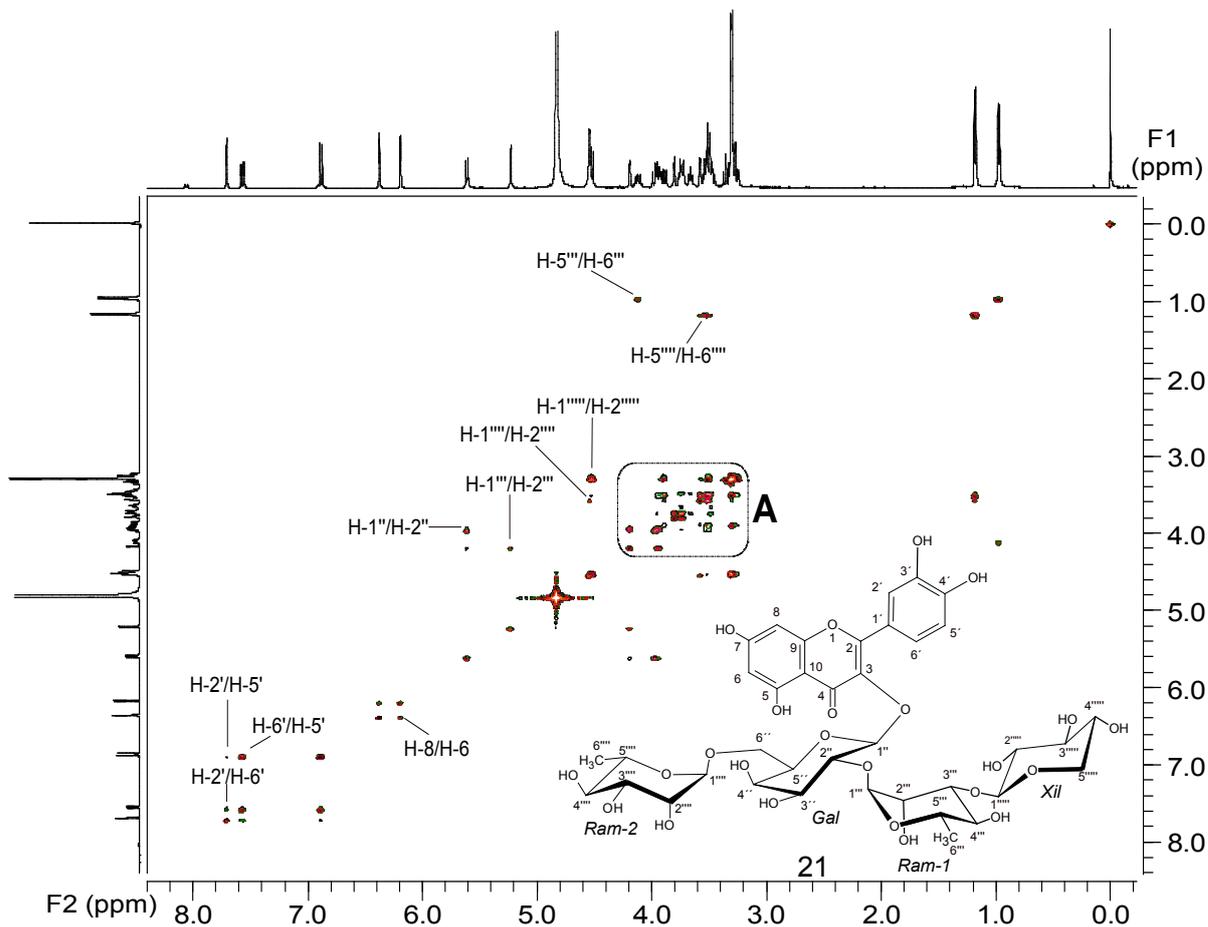


Figura 3.134: Mapa de contornos COSY de **21** (CD₃OD, 400 MHz).

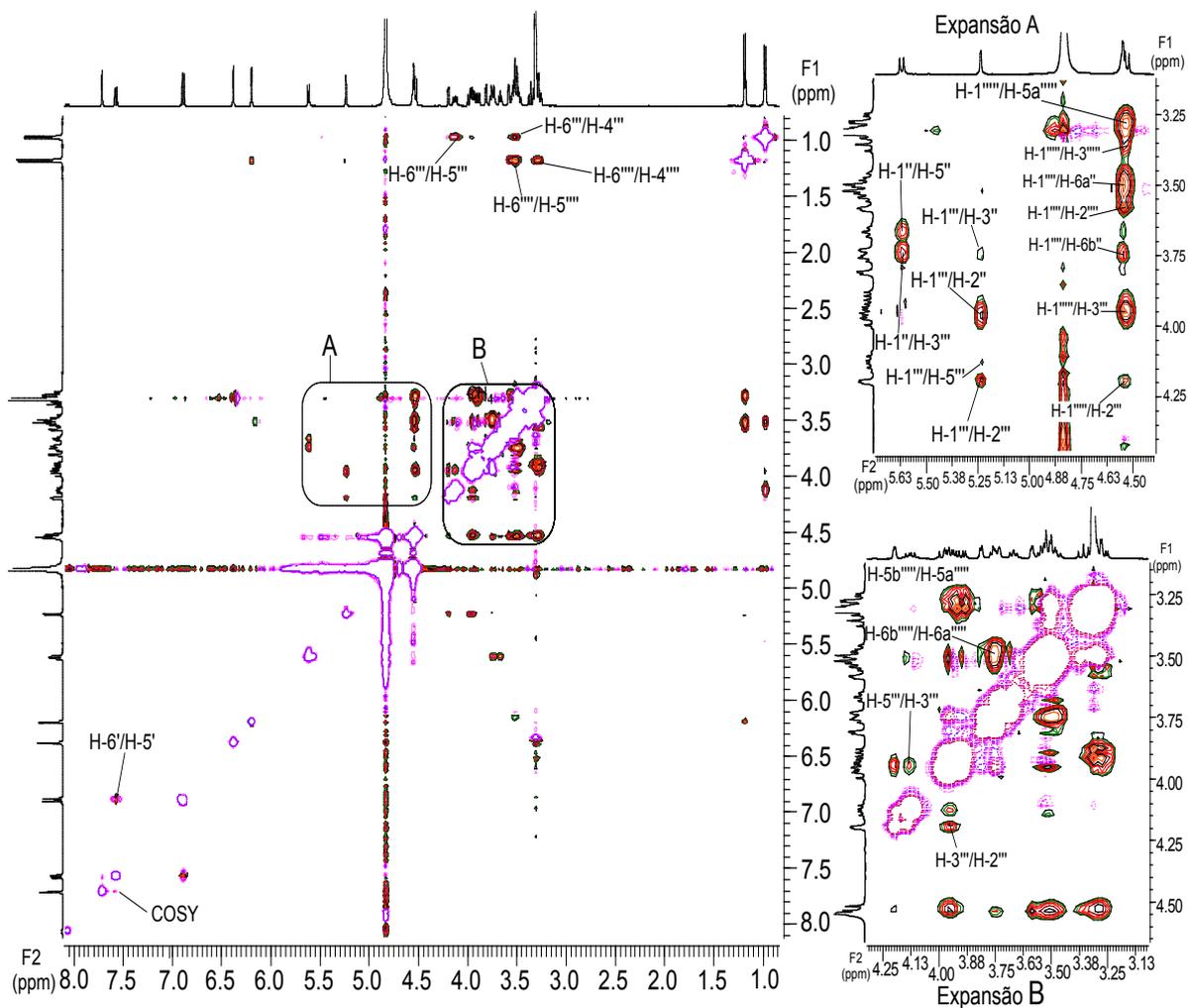
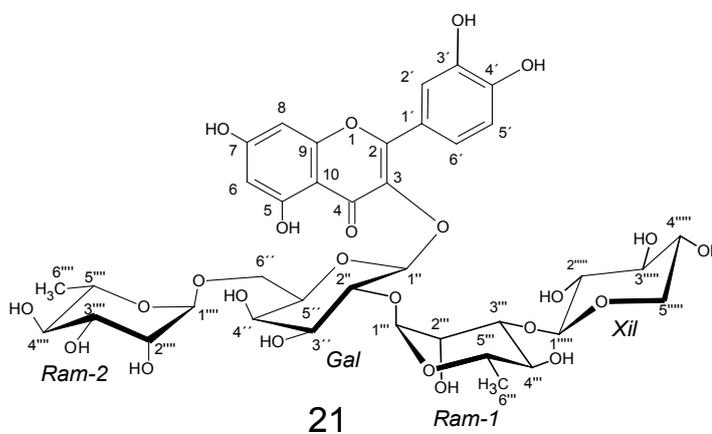


Figura 3.136: Mapa de contornos NOESY de 22 (CD₃OD, 400 MHz).



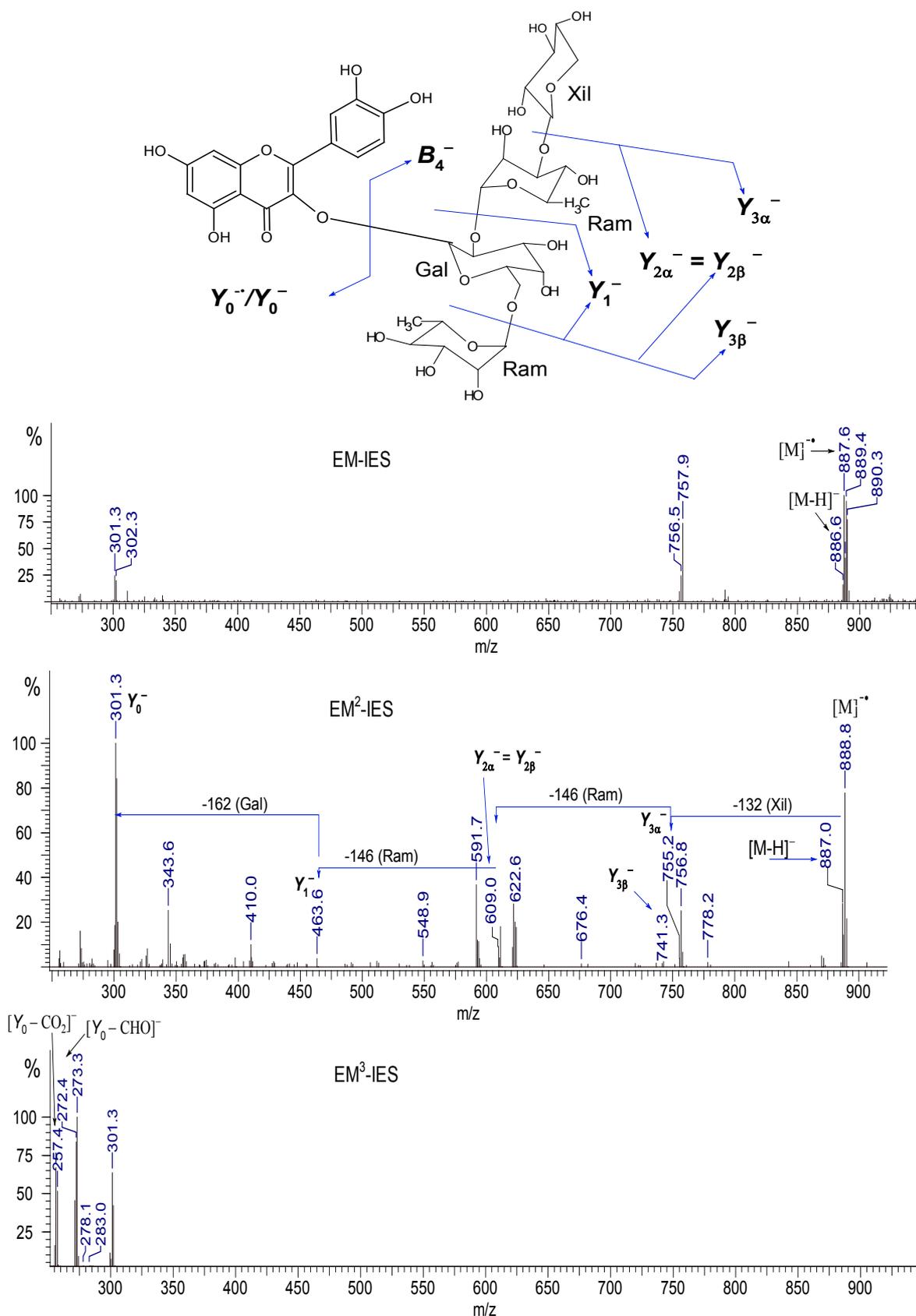


Figura 3.137: Espectros EM-IES de **21** no modo negativo a partir do íon-radical molecular de **21** em m/z 888 ($C_{38}H_{48}O_{24}$).

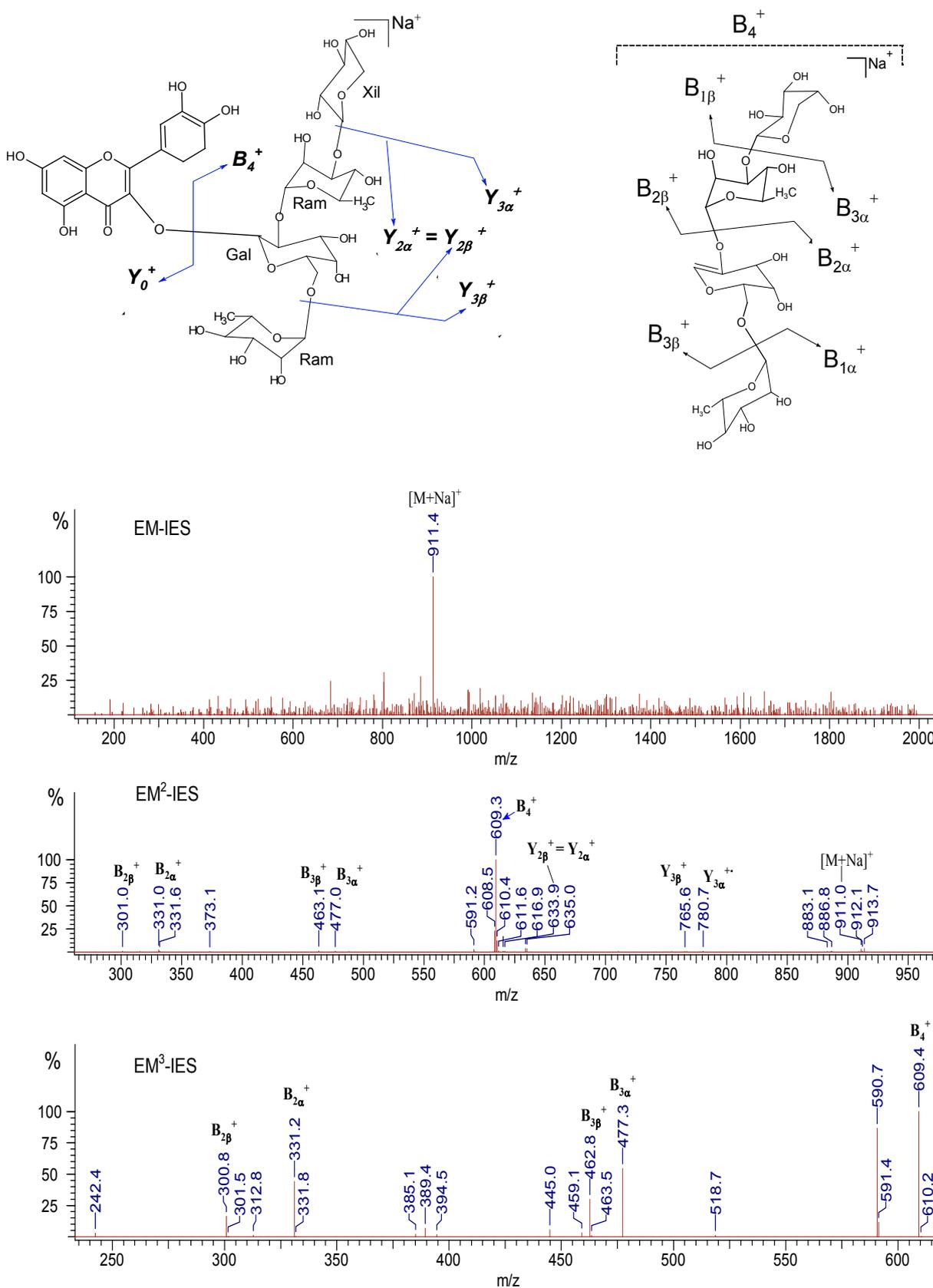
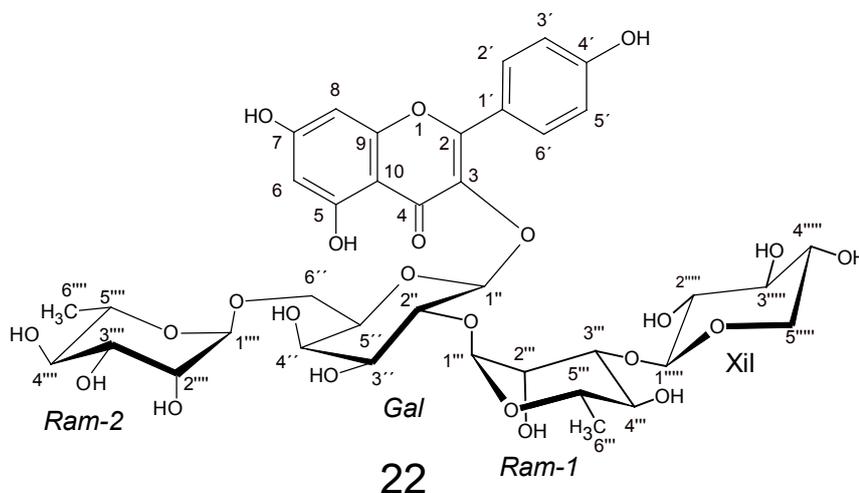


Figura 3.138: Espectros de massas EM-IES de **21** obtido em modo positivo de detecção com a identificação e o isolamento (MS/MS) do íon precursor em m/z 911 $[M + Na]^+$.

3-O- $\{[\alpha\text{-L-ramnopiranosil}(1\rightarrow6)]\text{-O-}[\beta\text{-D-xilopiranosil}(1\rightarrow3)\text{-O-}\alpha\text{-L-ramnopiranosil}(1\rightarrow2)]\}\text{-}\beta\text{-D-galactopiranosideo de canferol (22)}$



O composto inédito **22** foi isolado como um sólido amarelo-claro amorfo (12,2 mg) e apresentou ponto de fusão indefinido (houve degradação da amostra quando a temperatura atingiu cerca de 203 °C). Esta substância foi obtida do extrato em metanol das folhas de *M. acanthophylla* (FAMMA). Na análise de **22** por CCD revelada sob luz UV (366 nm), após borrifar a cromatoplaça com o reagente NP/PEG-400, foi observado uma mancha verde-amarelada brilhante (Figura 3.139), indicando a presença da genina do flavonóide 3,5,7,4'-tetra-hidroxiflavona, o canferol.⁷⁷ Esse resultado foi coerente com os relatos sobre a obtenção de flavonóides isolados de plantas do gênero *Maytenus* onde figuram compostos 3-O-glicosídeos do canferol.^{38, 39, 67}

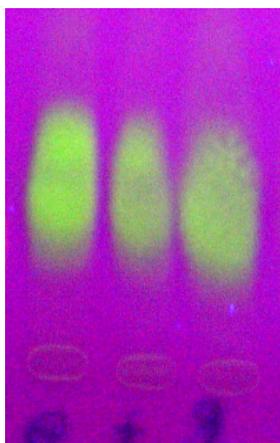


Figura 3.139: Fotografia da cromatoplaça CCD em sílicagel 60G de **22**, eluente: acetato de etila:metanol: água-ácido acético 0,5% (8:2:1); revelador: NP-PEG 4000 sob luz UV λ 366 nm, $R_f = 0,30$.

O espectro de absorção no UV de **22** (diluído na fase móvel), obtido por meio de varredura feita utilizando o detector de UV do cromatógrafo CLAE, shimadzu LC-10, mostrou bandas com máximos em λ_{\max} 350 e 268 nm correspondentes às bandas I e II de flavonoide, respectivamente. Esse padrão de absorção no UV indicou a presença de um flavonol com substituição em C-3-OH (Figura 3.140).^{80, 170}

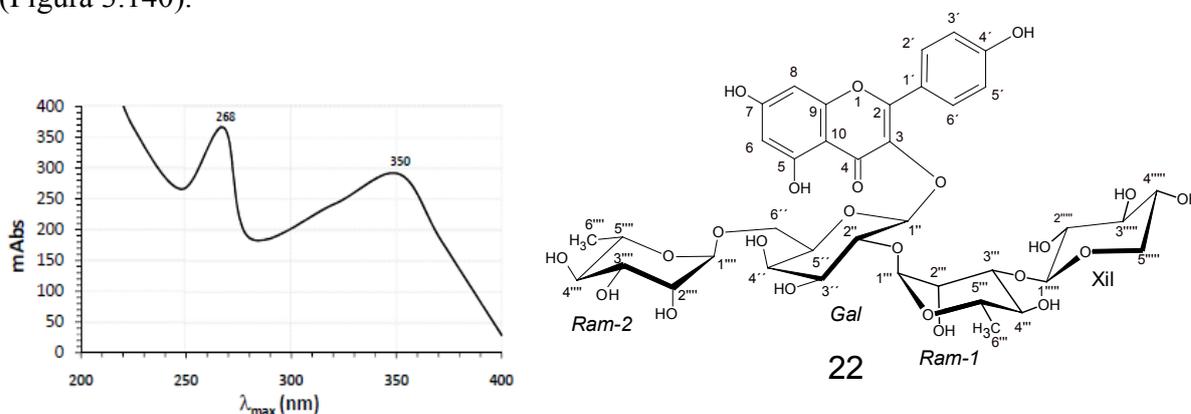


Figura 3.140: Espectro de absorção de **22** obtido por varredura na região do UV na cela do detector com fotodiodo modelo SPD-M10A, acoplado à bomba LC-10AD e módulo de aquisição de dados CBM 10A do equipamento para CLAE (Shimadzu).

O espectro de absorção na região do IV de **22** (Figura 3.145, p.211) apresentou uma banda de absorção na região de 3200-3550 cm^{-1} e outra estreita, porém intensa, com máximo em 1040 cm^{-1} , que indicaram a presença de grupos hidroxilas. Observou-se, também, uma banda em 1656 cm^{-1} característica de grupo carbonila quelado.³⁹ As absorções relacionadas aos estiramentos da ligação O-H foram observadas entre 3200-3550 cm^{-1} e foram atribuídas a hidroxílias envolvidos em ligações de hidrogênio intermoleculares.¹¹⁷ Essas absorções de **22** na região do infravermelho são condizentes com a estrutura de um flavonol. Com base nos dados cromatográficos, características espectrais na região do UV e IV, bem como os relatos sobre os flavonóides de *Maytenus*, foi possível propor o 3,5,7,4'-*tetra*-hidroxiflavona (canferol) como a aglicona de **22**.

O espectro de RMN de ^1H (Figura 3.146, p.212) compreendeu principalmente ressonâncias de hidrogênios aromáticos e glicosídicos. Para os primeiros, o espectro mostrou sinais de dois hidrogênios aromáticos em δ 6,20 (d, $J = 2,0$ Hz, H-6) e em δ 6,39 (d, $J = 2,0$ Hz, H-8) e dois dupletos aparentes em δ 8,06 (d, $J = 8,7$ Hz, H-2'/H-6') e δ 6,90 (d, $J = 8,7$ Hz, H-3'/H-5'). Observou-se também as ressonâncias de quatro hidrogênios glicosídicos anoméricos em δ 5,56 (d, $J = 7,7$ Hz), δ 5,23 (d, $J = 1,50$ Hz), δ 4,52 (m) e δ 4,53 (d, $J = 7,3$ Hz), no mapa de contornos HSQC (Figura 3.149, p.215) de **22**, os sinais dos hidrogênios anoméricos foram associados aos sinais dos respectivos carbonos em δ 101,12, δ 102,28, δ 102,01 e δ 106,65 (Figura 3.141, p.204).

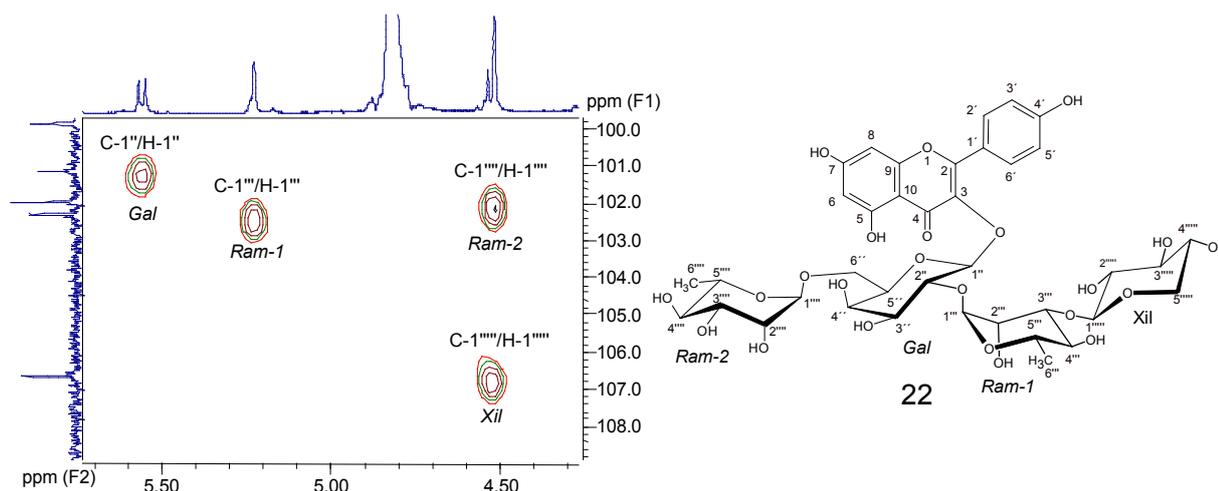


Figura 3.141: Seção do mapa de contornos HSQC de **22** (CD_3OD , 400 MHz) relativa aos hidrogênios e carbonos anoméricos (F2: δ de ^1H 4,5-5,70 x F1: δ de ^{13}C 100,0-108,0).

No espectro de RMN de ^1H dois dupletos em δ 0,99 (d, $J = 6,0$ Hz) e 1,17 (d, $J = 6,0$ Hz) indicaram a presença de dois grupos ramnopiranosilas,¹⁷³ os demais sinais de hidrogênios sacarídeos foram registrados na região de δ 3,26-4,19 ppm. Os dados de RMN relatados para o 3-*O*-tetraglicosídeo de canferol isolado de *M. ilicifolia* e *M. aquifolium*³⁸ (3-*O*-{[α -L-ramnopiranosil(1 \rightarrow 6)][α -L-arabinopiranosil(1 \rightarrow 3)-*O*- α -L-ramnopiranosil(1 \rightarrow 2)]}- β -D-galactopiranosídeo de canferol) serviram como base de comparação para os dados de RMN de **22** atribuídos à aglicona e para os grupos galactopiranosil e ramnopiranosil. Os dados de RMN referentes ao resíduo de xilopiranosila foram comparados aos que foram publicados para o 3-*O*-{[β -D-xilopiranosil(1 \rightarrow 3)- α -L-ramnopiranosil(1 \rightarrow 6)][α -L-ramnopiranosil(1 \rightarrow 2)]}- β -D-galactopiranosídeo de canferol, um isômero constitucional de **22**, isolado de *Astragalus caprinus* (Fabaceae).¹⁷²

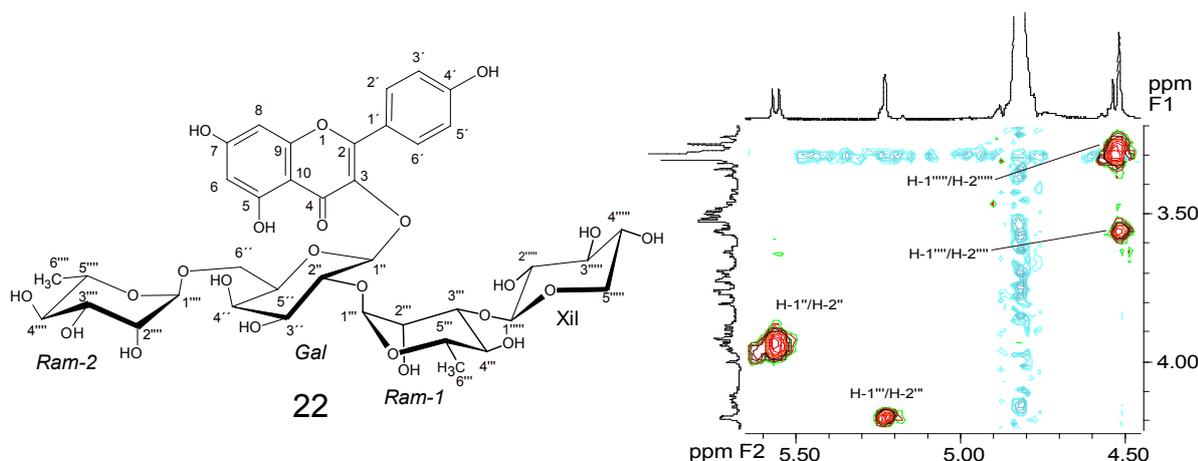


Figura 3.142: Seção do Mapa de contornos COSY de **22** (CD_3OD , 400 MHz) relativa às correlações entre os sinais dos hidrogênios anoméricos com os hidrogênios vicinais (F2: δ de ^1H 4,50-5,50 x F1: δ de ^1H 3,20-4,20).

Através da comparação entre os dados da literatura e a análise dos espectros de RMN de ^1H (Figura 3.146, p.212) e dos mapas de contornos COSY (Figura 3.148, p.214) e HMBC (Figuras 3.150 e 3.151, p.216), iniciando a partir dos sinais dos hidrogênios anoméricos, foram atribuídas as ressonâncias de cada unidade de açúcar de **22**. Na seção do mapa de contornos COSY (Figura 3.142, p.204), o sinal do hidrogênio anomérico da unidade galactopiranosila ($\text{H-1}''$), em $\delta 5,56$ (d, $J = 7,7$ Hz), mostrou intensa correlação com o sinal do hidrogênio vicinal $\text{H-2}''$ em $\delta 3,94$ (m, Hz), sendo atribuída a configuração 1,2-*trans*-diaxial entre esses hidrogênios. De modo semelhante, o sinal em $\delta 4,53$ (m) foi atribuído ao hidrogênio anomérico $\text{H-1}''''$ do resíduo xilopiranosila, acoplou com o hidrogênio vicinal ($\text{H-2}''''$) em $\delta 3,29$ (m) e ambos foram designados como hidrogênios axiais. Entretanto, os hidrogênios anoméricos atribuídos aos resíduos ramnopiranosilas, *Ram-1* e *Ram-2* em $\delta 5,23$ (dl, $J = 1,5$ Hz, $\text{H-1}'''$) e $4,52$ (m, $\text{H-1}''''$), apresentaram fracas correlações $^3J_{\text{H-1,H-2}}$ com os seus vizinhos, em $\delta 4,19$ (dd, $J = 3,0, 1,5$ Hz, $\text{H-2}'''$) e $3,56$ (dd, $J = 3,5, 1,5$ Hz, $\text{H-1}''''$), respectivamente, indicando que esses hidrogênios dos grupos ramnopiranosilas são equatoriais. As Tabelas 3.41 e 3.42 (pp.206-207) mostram os dados completos de RMN de ^{13}C e de ^1H (CD_3OD), obtidos a partir de experimentos 1D [RMN de ^1H (Figura 3.146, p.212), RMN de ^{13}C e DEPT-135 (Figura 3.147, p.213)], e 2D [HSQC (Figura 3.149, p.215), COSY (Figura 3.148, p.214), HMBC (Figuras 3.150 e 3.151, p.216) e NOESY (Figuras 3.152 a 3.153, pp.217-218)] de **22**. Com base nos deslocamentos químicos, multiplicidades dos sinais e valores das constantes de acoplamento, os resíduos monossacarídeos foram identificados como β -galactopiranosila (*Gal*), α -ramnopiranosilas (*Ram-1* e *Ram-2*) e β -xilopiranosila (*Xil*). A atribuição da configuração D foi atribuída para ambos *Gal* e *Xil*, bem como a configuração L foi atribuída para *Ram-1* e *Ram-2* de acordo com as predominâncias dessas configurações em glicosídeos de origem vegetal.¹⁷²

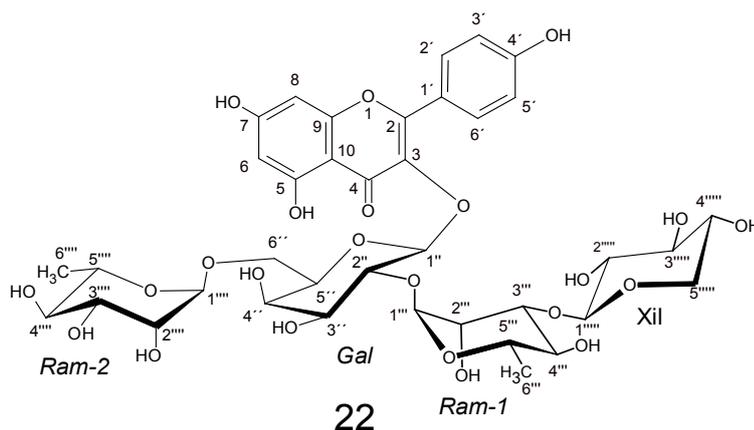
**22**

Tabela 3.41: Atribuição dos valores de δ de ^{13}C de **22** (CD_3OD , 100 MHz) e a comparação com os valores disponíveis na literatura (δ , CD_3OD , 100 MHz)^{38, 172}

C-n	22	Lit ³⁸	HMBC	C-n	22	Lit ³⁸	HMBC
2	158,90	158,5	H-2', H-6'	(2-1)Ram-1			
3	134,60	134,4	-	1'''	102,28	102,1	H-1'', H-3''', H-5'''
4	179,51	179,7	-	2'''	72,12	72,0	H-1'''
5	163,23	163,1	-	3'''	82,55	82,7	H-1''', H-2''', H-4''', H-
6	99,83	101,0	H-8	4'''	73,04	72,9	H-2''', H-3'''
7	165,70	167,5	H-8	5'''	69,65	69,5	H-1''', H-6'''
8	94,74	95,5	H-6	6'''	17,62	17,6	H-4'''
9	158,49	158,5	H-8	(6-1)Ram-2			
10	105,99	106,6	H-6, H-8	1''''	102,01	101,8	H-3''''
1'	123,09	122,9	H-3', H-5'	2''''	72,16	72,0	H-1''''
2'	132,28	132,2	H-6'	3''''	72,36	72,2	H-6''''
3'	116,25	116,2	H-5'	4''''	74,00	73,9	H-6''''
4'	161,37	161,0	H-2', H-3', H-5', H-6'	5''''	69,76	69,7	H-1''''', H-6''''
5'	116,25	116,2	H-3'	6''''	18,04	17,9	H-5''''
6'	132,28	132,2	H-2'	(3-1)Xil			
3-Gal				(δ , Lit ¹⁷²)			
1''	101,12	101,1	H-2''	1''''	106,65	106,4	H-5''''', H-3''''
2''	77,37	77,2	H-3'', H-1'''	2''''	75,42	75,2	H-3''''
3''	75,77	75,7	H-2''	3''''	77,71	77,5	H-2''''
4''	70,8	70,7	H-2''	4''''	71,20	71,1	H-2''''', H-3''''
5''	75,41	75,3	H-2'', H-6''	5''''	67,07	66,9	H-1''''
6''	67,31	67,1	H-5''				

Fonte: Espectros de RMN de ^{13}C e DEPT-135 (Figuras 3.147, p.213).

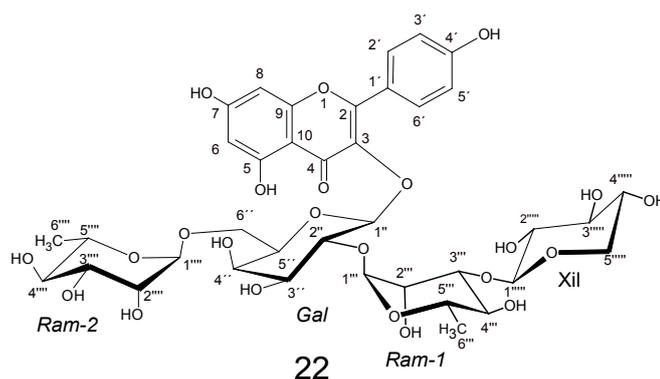


Tabela 3.42: Atribuição dos valores de δ de ^1H (400 MHz) de **22** (CD_3OD , 400 MHz) e comparação com os valores encontrados na literatura (CD_3OD , 400 MHz)^{38, 172}

H-n	δ de ^1H (multiplicidade, J , Hz)		COSY	RMN 2D NOESY
	22	Literatura ³⁸		
H-6	6,20 (d, $J=2,0$)	6,18 (d, $J=1,5$)	H-8	
H-8	6,39 (d, $J=2,0$)	6,35 (d, $J=1,5$)	H-6	
H-2'	8,06 (d*, $J=8,7$)	8,08 (d, $J=8,5$)	H-3'	H-3'
H-3'	6,90 (d*, $J=8,7$)	6,92 (d, $J=8,5$)	H-2'	H-2'
H-5'	6,90 (d*, $J=8,7$)	6,92 (d, $J=8,5$)	H-6'	H-6'
H-6'	8,06 (d*, $J=8,7$)	8,08 (d, $J=8,5$)	H-3'	H-5', H-2''
3-Gal				
H-1''	5,56 (d, $J=7,7$)	5,57 (d, $J=7,5$)	H-2''	H-3'', H-5''
H-2''	3,94 (m)	3,96 (dd, $J=7,5; 9,7$)	H-1'', H-3''	H-6'
H-3''	3,72 (m)	3,73 (dd, $J=7,5, 3,6$)	H-2''	H-1'''
H-4''	3,76 (dl, $J=3,0$)	3,51 (dd, $J=3,5, 1,5$)	H-3''	H-6a''
H-5''	3,63 (tl, $J=6,0$)	3,67 (ddd, $J=1,5, 5,0, 7,0$)	H-6a'', H-6b''	H-6'''
H-6a''	3,45 (dd, $J=10,0, 6,0$)	3,45 (dd, $J=12,0, 7,0$)	H-5'', H-6b''	H-6b''
H-6b''	3,72 (m)	3,76 (dd, $J=12,0, 5,0$)	H-6a''	H-6a''
(2-1)Ram-1				
H-1'''	5,23 (m)	5,27 (d, $J=1,5$)	H-2'''	H-2''', H-2'', H-3''
H-2'''	4,19 (dd, $J=3,0, 1,5$)	4,26 (dd, $J=3,0, 1,5$)	H-1''', H-3'''	H-3'''
H-3'''	3,94 (m)	3,95 (dd, $J=9,5, 3,0$)	H-2'''	H-1''', H-2'''
H-4'''	3,51 (m)	3,58 (t, $J=9,5, 9,5$)	H-5'''	H-6'''
H-5'''	4,13 (m)	4,17 (qd, $J=9,5, 6,0$)	H-4''', H-6'''	H-6'''
H-6'''	0,99 (d, $J=6,0$)	1,02 (d, $J=6,0$)	H-5'''	H-4''', H-5'''
(6-1)Ram-2				
1''''	4,52 (m)	4,55 (d, $J=1,5$)	H-2''''	H-2'''', H-6a''
2''''	3,56 (dd, $J=3,5, 1,5$)	3,60 (dd, $J=3,5, 1,5$)	H-1''''	H-1''''
3''''	3,53 (m)	3,55 (dd, $J=9,5, 3,5$)		H-6''''
4''''	3,26 (t, $J=9,5$)	3,31 (t, $J=9,5, 9,5$)	H-5''''	H-6''''
5''''	3,52 (m)	3,57 (qd, $J=9,5, 6,0$)	H-6''''	H-6''''
6''''	1,17 (d, $J=6,2$)	1,20 (d, $J=6,6$)	H-5''''	H-3''''', H-4''''', H-5''''
(3-1)Xil				
1'''''	4,53 (d, $J=7,3$)	4,32 (d, $J=7,4$)	H-2'''''	H-3'''''
2'''''	3,29** (m)	3,22 (dd, $J=7,4, 9,0$)	H-1'''''	H-4'''''
3'''''	3,35 (t, $J=9,0$)	3,30 (t, $J=8,6$)	H-4'''''	H-1'''''
4'''''	3,52 (m)	3,48 (m)	H-3''''', H-5b'''''	H-5b'''''
5a'''''	3,27 (t, $J=11,5$)	3,00 (t, $J=12,2$)		H-5b'''''
5b'''''	3,90 (m)	3,77 (dd 5,4, 12,2)	H-4''''', H-5a'''''	H-5a''''', H-4'''''

(**) sinal sobreposto ao do solvente (metanol- d_4). d*: duplete aparente; dl: duplete largo.

Informações estruturais relacionadas às ligações interglicosídicas e detalhes sobre a estereoquímica de **22** foram deduzidas pela análise dos dados obtidos nos experimentos HMBC¹⁷⁸ (Figuras 3.150 e 3.151, p.216) e NOESY (Figuras 3.152 a 3.153, p.217). Na seção do mapa de contornos HMBC de **22** (Figura 3.143), o sinal em δ 5,23 (d, $J = 1,5$ Hz), atribuído a H-1''' (*Ram*-1) mostrou correlação com o sinal de carbono em δ 77,37 (C-2''), essa correlação foi atribuída à ligação glicosídica $[-\alpha\text{-L-ramnopiranosil-(1}\rightarrow\text{2)-galactopiranosil-}]$ - (Figura 3.143, correlação (a)). A correlação entre o sinal de H-1'''' em δ 4,52 (m) e o sinal de carbono em δ 67,31 (C-6'') foi atribuída à ligação glicosídica $[-\alpha\text{-L-ramnopiranosil-(1}\rightarrow\text{6)-galactopiranosil-}]$ - (Figura 3.143, correlação (b)) e, a correlação entre o sinal de H-1'''' em δ 4,52 (m) e o sinal de carbono em δ 82,59 (C-3''') foi atribuída à ligação glicosídica $[\beta\text{-D-xilopiranosil-(1}\rightarrow\text{3)-ramnopiranosil-}]$ - (Figura 3.143, correlação (c)). Os demais dados obtidos no experimento HMBC, COSY e NOESY foram utilizados na elucidação das estruturas da aglicona e das unidades monossacarídeas, ver Tabelas 3.41 e 3.42 (p.206-207).

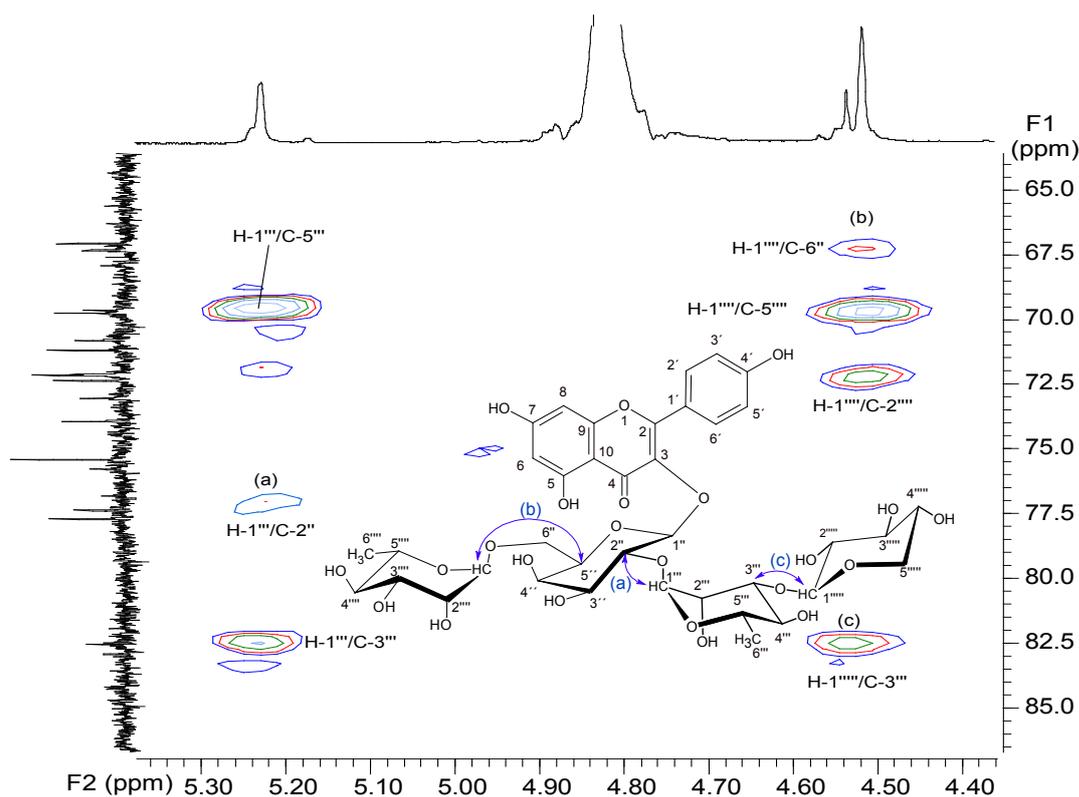


Figura 3.143: Região do mapa de contornos HMBC apresentando as correlações atribuídas às ligações glicosídicas de **22**: (a): $-\text{Ram}(1\rightarrow\text{2})\text{Gal-}$; (b): $\text{Ram}(1\rightarrow\text{6})\text{Gal-}$; (c): $\text{Xil}(1\rightarrow\text{3})\text{Ram-}$. As linhas com setas representam as correlações $^3J_{\text{H,C}}$.

O mapa de contornos NOESY de **22** (Figuras 3.152-3.153, p.217) mostrou importantes correlações para elucidação das unidades glicosídicas, principalmente as que envolveram

hidrogênios em posições 1,3-diaxiais nos anéis glicosídicos, como mostrado na Figura 3.144-A para o resíduo *Gal*. Foram também observadas correlações NOE entre os hidrogênios interglicosídicos, bem como entre a os sinais da genina (H-6') e os resíduos de galactose (H-2''). Essas correlações ajudaram na atribuição do sequenciamento das unidades monossacarídicas da cadeia glicosídica.

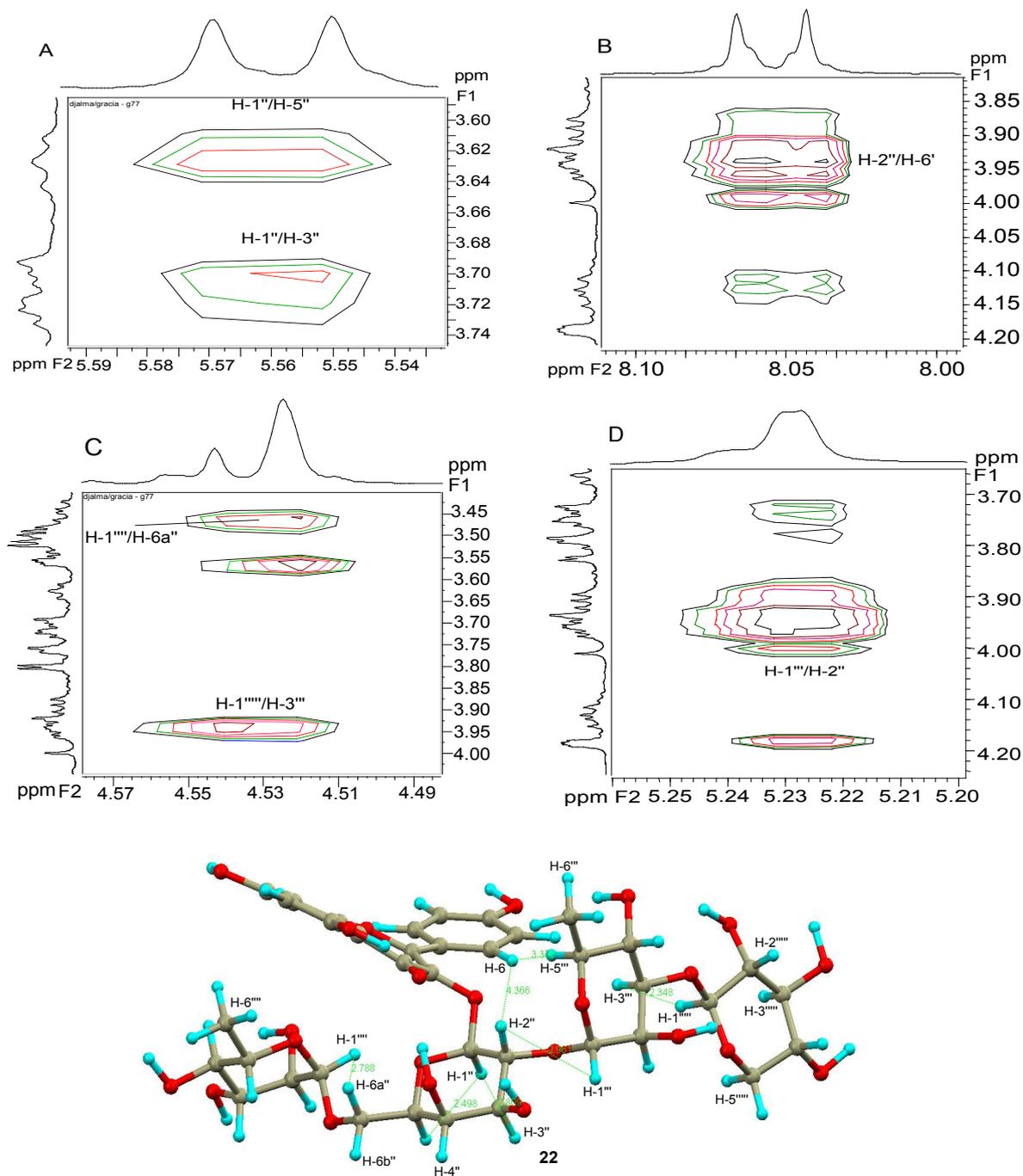
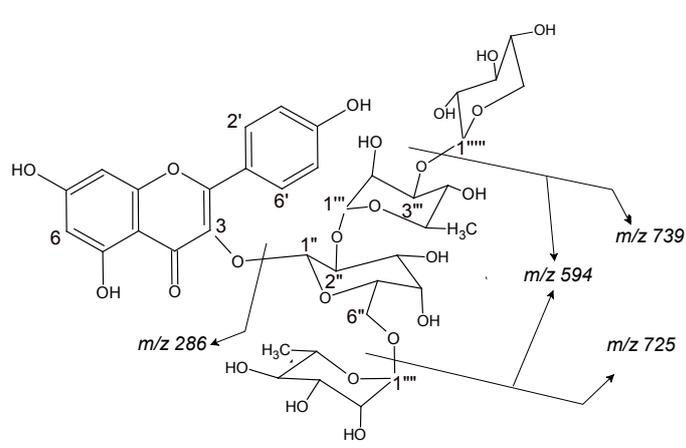


Figura 3.144: Ampliações (A-C) do mapa de contornos NOESY de **22** (CD₃OD, 400 MHz) que mostram correlações interglicosídicas, conforme indicadas pelas linhas verdes tracejadas na estrutura obtida por correlações NOE e otimizada por MMFF-94 Merck (abaixo).⁹³ Cores dos átomos: cinza (C), azul (H) e vermelho (O).

Foram observadas também correlações NOE entre o sinal anomérico da xilopiranosose em δ 4,53 (d, $J = 7,3$ Hz, H-1''') com o sinal em δ 3,94 (m, H-3'''), permitindo identificar a ligação glicosídica *Xil*(1 \rightarrow 3)*Ram*-1]- (Figura 3.144-C). O sinal anomérico de *Ram*-1 em δ 5,23 (d, $J = 1,5$ Hz, H-1''') acoplou com os sinais de H-2'' da galactopiranosose em δ 3,94 (m), indicando a existência da ligação *Ram*-1(1 \rightarrow 2)*Gal*- (Figura 3.144-D). A ligação glicosídica *Ram*-2(1 \rightarrow 6)*Gal*- foi detectada a partir da correlação entre o sinal do hidrogênio anomérico da *Ram*-2 [δ 4,52 (m), H-1''') e o sinal de um dos hidrogênios metilênicos de *Gal* [δ 3,45 (dd, $J = 10,0, 7,0$ Hz), H-6a''] (Figura 3.144-C). A ligação existente entre a aglicona e a cadeia glicosídica foi evidenciada pelas correlações entre um duplete aparente referente aos hidrogênios aromáticos H-6' em δ 8,06 (d, $J = 8,7$ Hz) e os sinais dos hidrogênios H-2'' em δ 3,94 (m) (Figura 3.144-B, p.209).

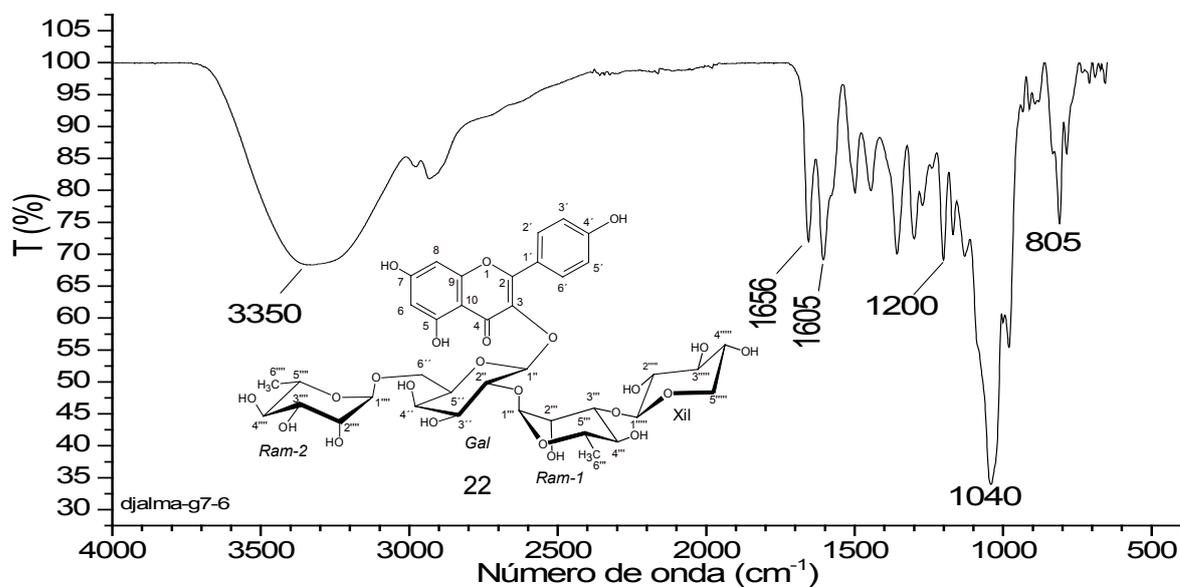
No espectro de massas com ionização por electrospray (EM-IES) no modo negativo com varredura de 100-1000 Da (Figura 3.154, p.219 e Tabela 3.43, p.211), o íon observado em m/z 871 (100%) foi atribuído ao fragmento $[M-H]^-$ e permitiu propor a fórmula $C_{38}H_{48}O_{23}$ (872 g mol⁻¹) para **22**. Os íons em m/z 725 e em m/z 739 foram atribuídos à fragmentação de $[M-H]^-$ após as perdas individuais de resíduos de um grupo ramnopiranosila ($[M-H-146]^-$, íon $Y_{3\beta}^-$) e perda de um pentopiranosila ($[M-H-132]^-$, íon $Y_{3\alpha}^-$), respectivamente. Esse padrão de fragmentação indicou que esses resíduos se localizam nas porções terminais da cadeia glicosídica. O resíduo de pentose foi atribuído por RMN a um resíduo de xilose. E assim, podemos inferir que a formação do íon-radical em m/z 594 (íons $Y_{2\alpha}^-/Y_{2\beta}^-$) é resultante de duas vias de fragmentação distintas que envolvem duas unidades ramnopiranosila. A primeira via levou a formação do íon $Y_{2\alpha}^-$ e foi deduzida considerando a fragmentação do íon precursor em m/z 739 (m/z 594: $[M-H-Xil-Ram]^-$), a segunda via levou ao íon $Y_{2\beta}^-$ pelo precursor em m/z 725 (m/z 594: $[M-H-Ram-Xil]^-$). O íon-radical em m/z 286 foi atribuído ao fragmento formado pelo núcleo da aglicona (canferol) após a saída da cadeia glicosídica (Tabela 3.43, p.211). A observação do íon pseudo-molecular e as perdas de fragmentos neutros possibilitou calcular o valor da massa molar da parte glicosídica em 586 Da, um valor de massa molar que corresponde a uma cadeia glicosídica composta de duas unidades ramnopiranosila, uma hexopiranosila e uma xilopiranosila; o resíduo de hexose, com base nos dados de RMN, foi ratificado como correspondente a um grupo galactopiranosila, confirmando o composto **22** como um tetraglicosídeo do canferol.

Tabela 3.43: Fragmentação proposta para o tetraglicosídeo **22** e a atribuição dos íons observados no EM-IES, modo negativo


Atribuição		
<i>m/z</i>	Fragmento	PN (Da)
871	$[(M+H)]^-$	-
286	Y_0^-	586
594	$Y_{2\alpha}^-$	132, 146
594	$Y_{2\beta}^-$	146/132
739	$Y_{3\alpha}^-$	132
725	$Y_{3\beta}^-$	146

PN: perdas neutras

Os resultados obtidos nas análises dos dados espectrométricos de UV, IV, RMN e EM-IES apresentados até aqui, permitem propor a estrutura do glicosídeo inédito 3-*O*-{[α -L-ramnopiranosil(1 \rightarrow 6)][α -L-xilopiranosil(1 \rightarrow 3)-*O*- α -L-ramnopiranosil(1 \rightarrow 2)]}- β -D-galactopiranosídeo de canferol para o constituinte **22** de *M. acanthophylla*.

Figura 3.145: Espectro de absorção de **22** na região do infravermelho.

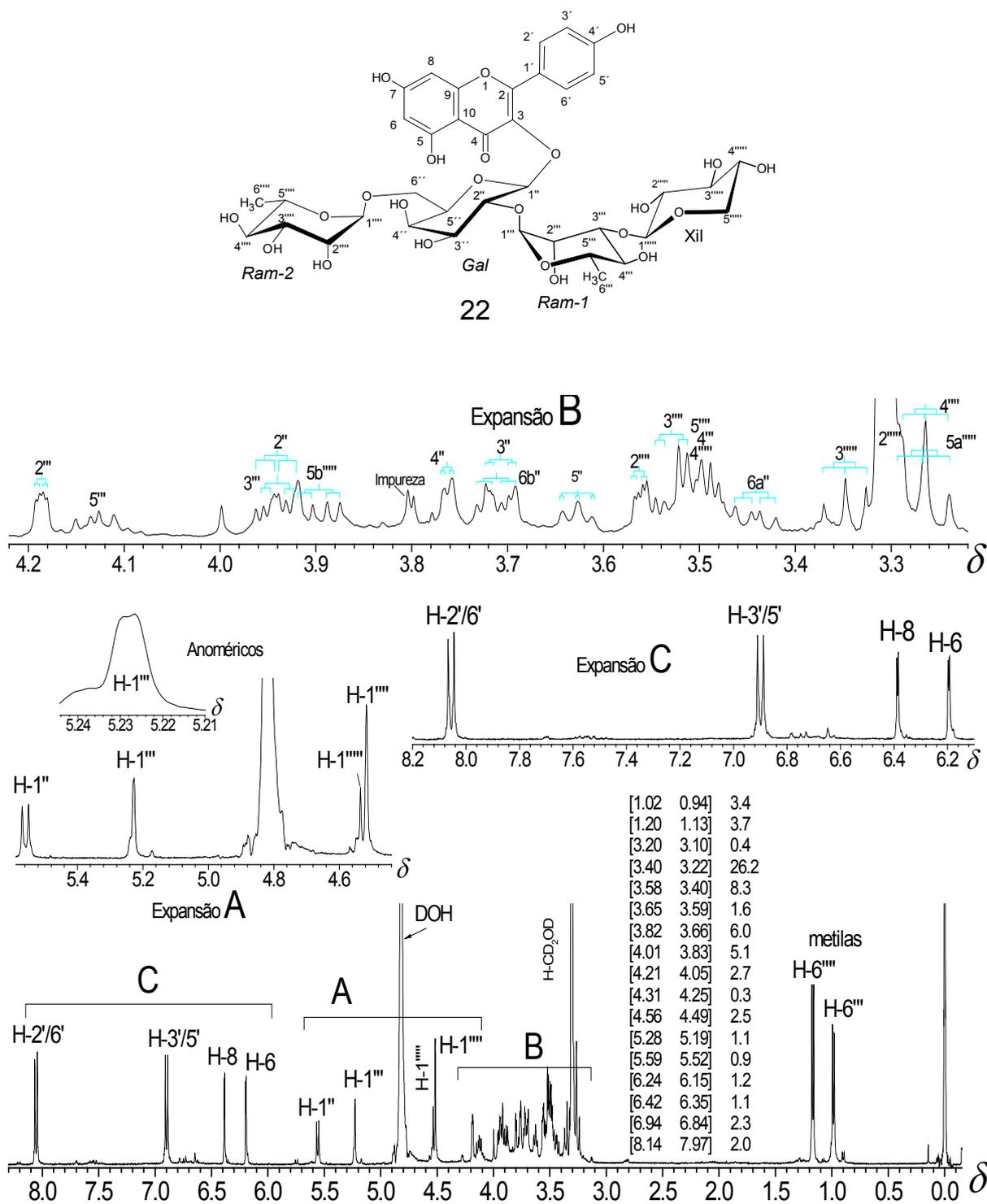


Figura 3.146: Espectro de RMN de ¹H de **22** (CD₃OD, 400 MHz).

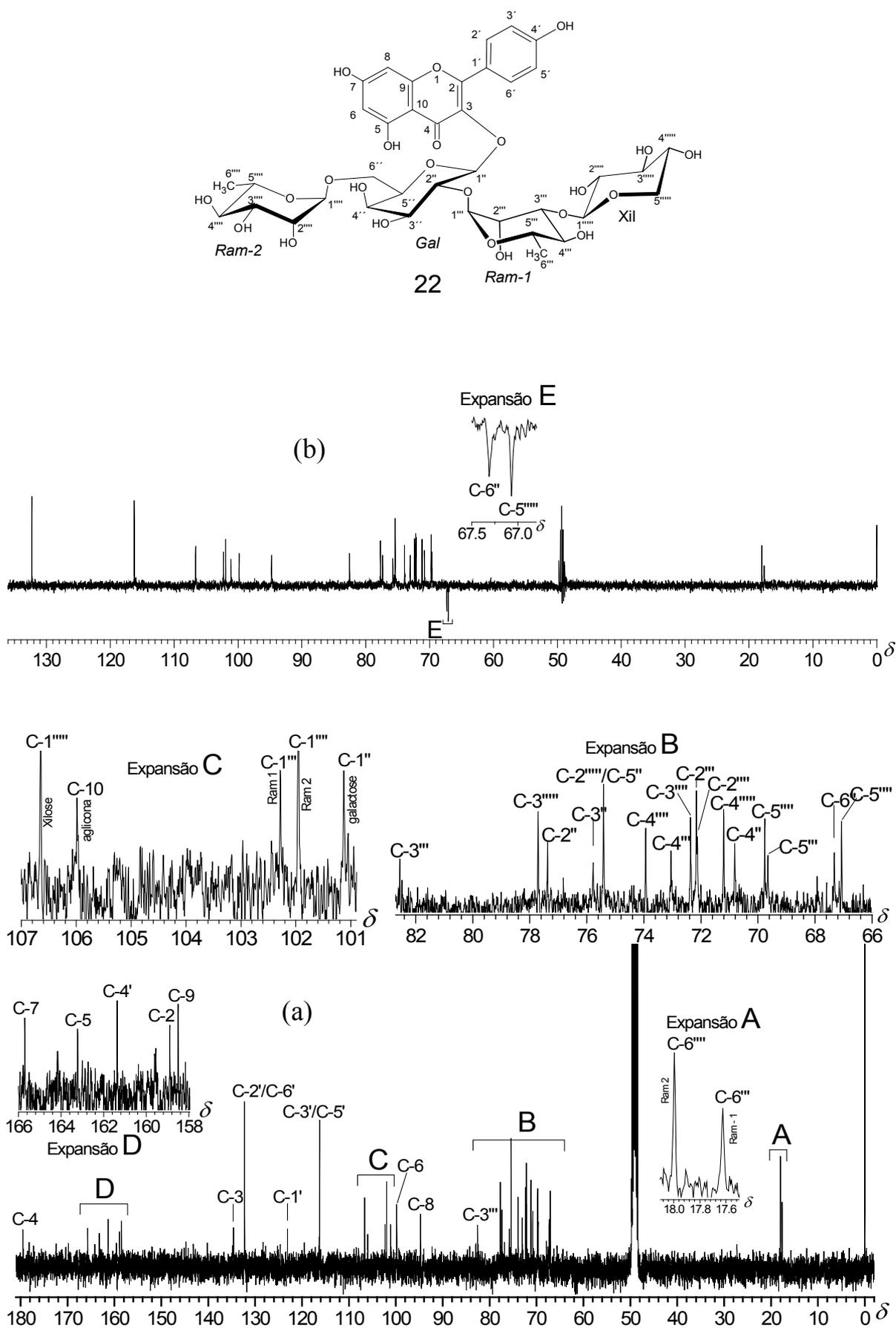


Figura 3.147: Espectros de RMN de (a) ^{13}C e (b) DEPT-135 de **22** (CD_3OD , 100 MHz).

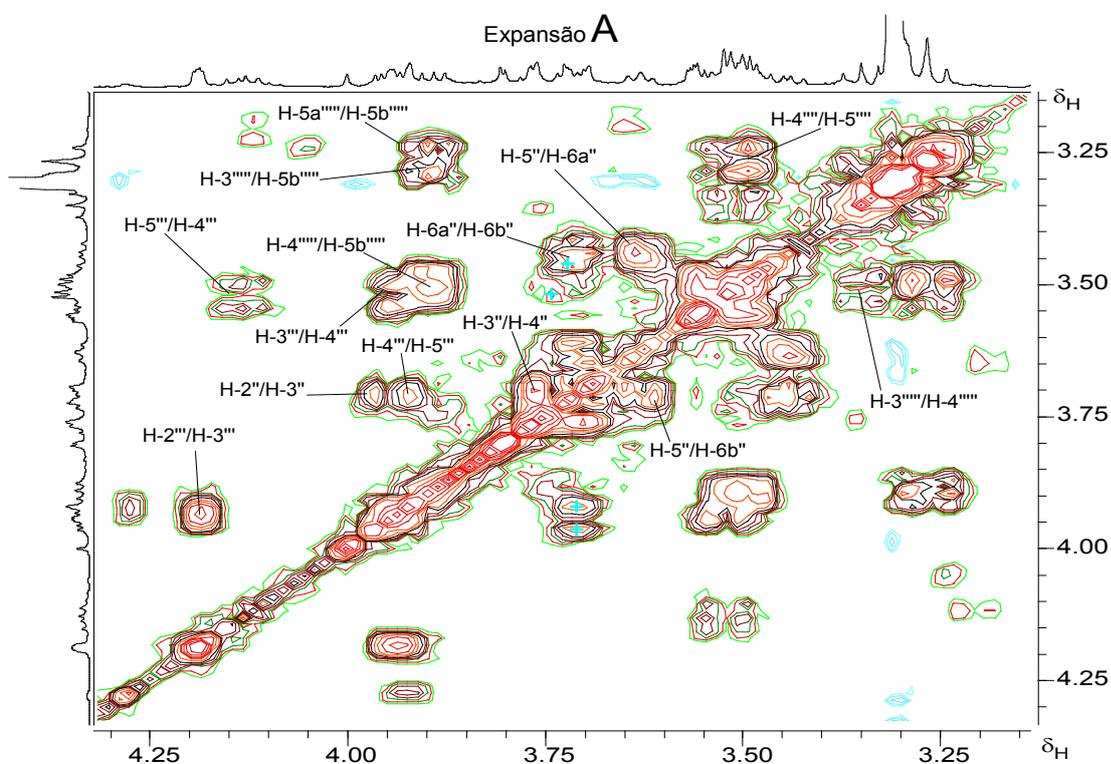
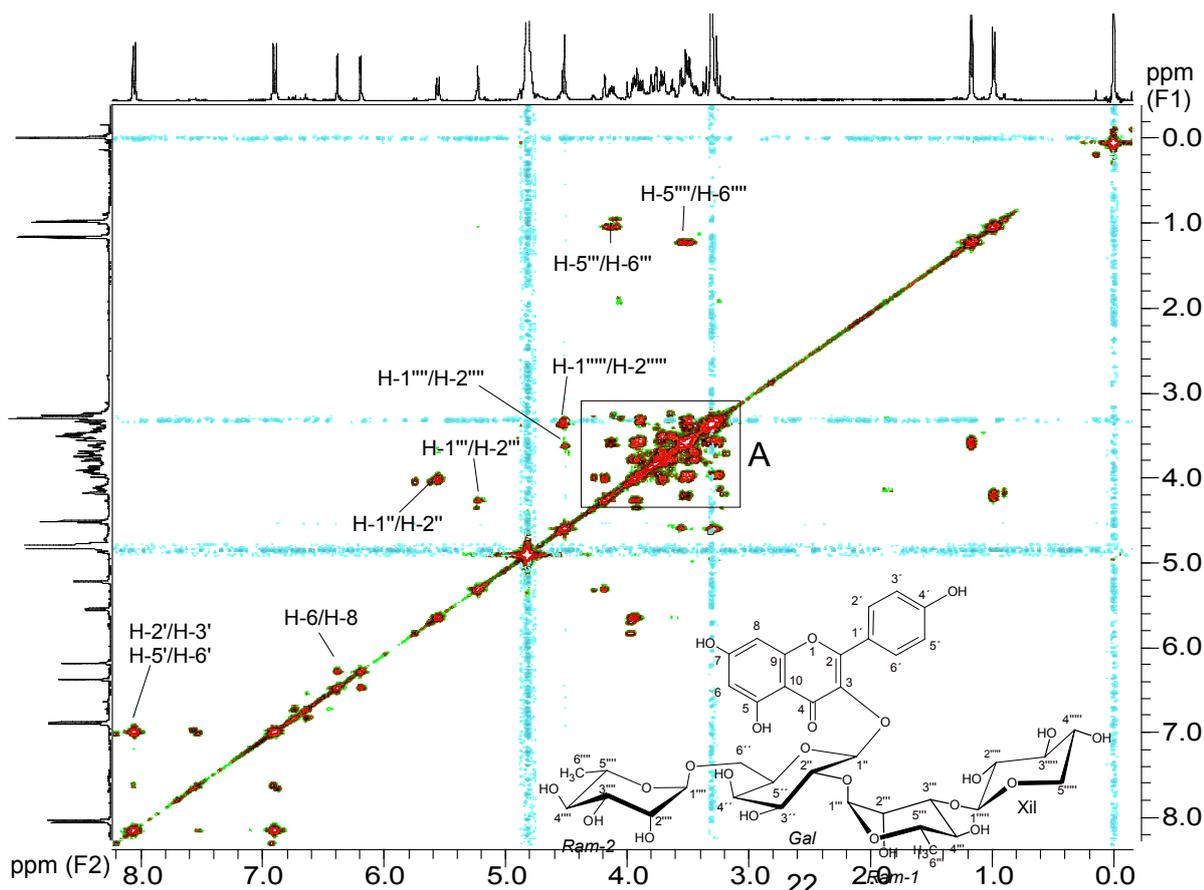


Figura 3.148: Mapa de contornos COSY (CD₃OD, 400 MHz) de **22** e expansão da região entre δ de ¹H 3,25 e 4,25 ppm (F2) x δ de ¹H 3,25 e 4,25 ppm (F1).

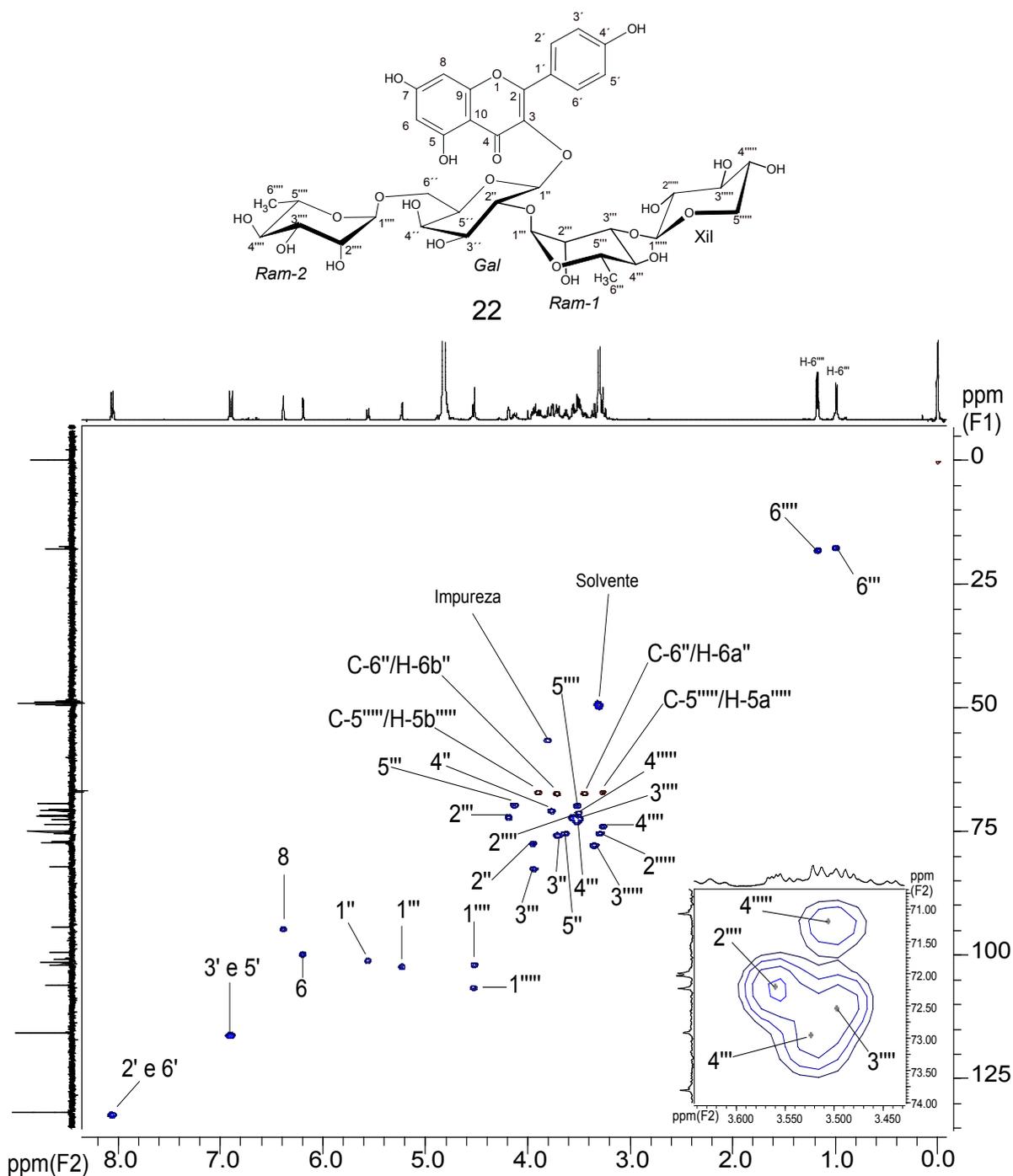


Figura 3.149: Mapa de contornos HSQC de **22** (CD₃OD, 400 MHz).

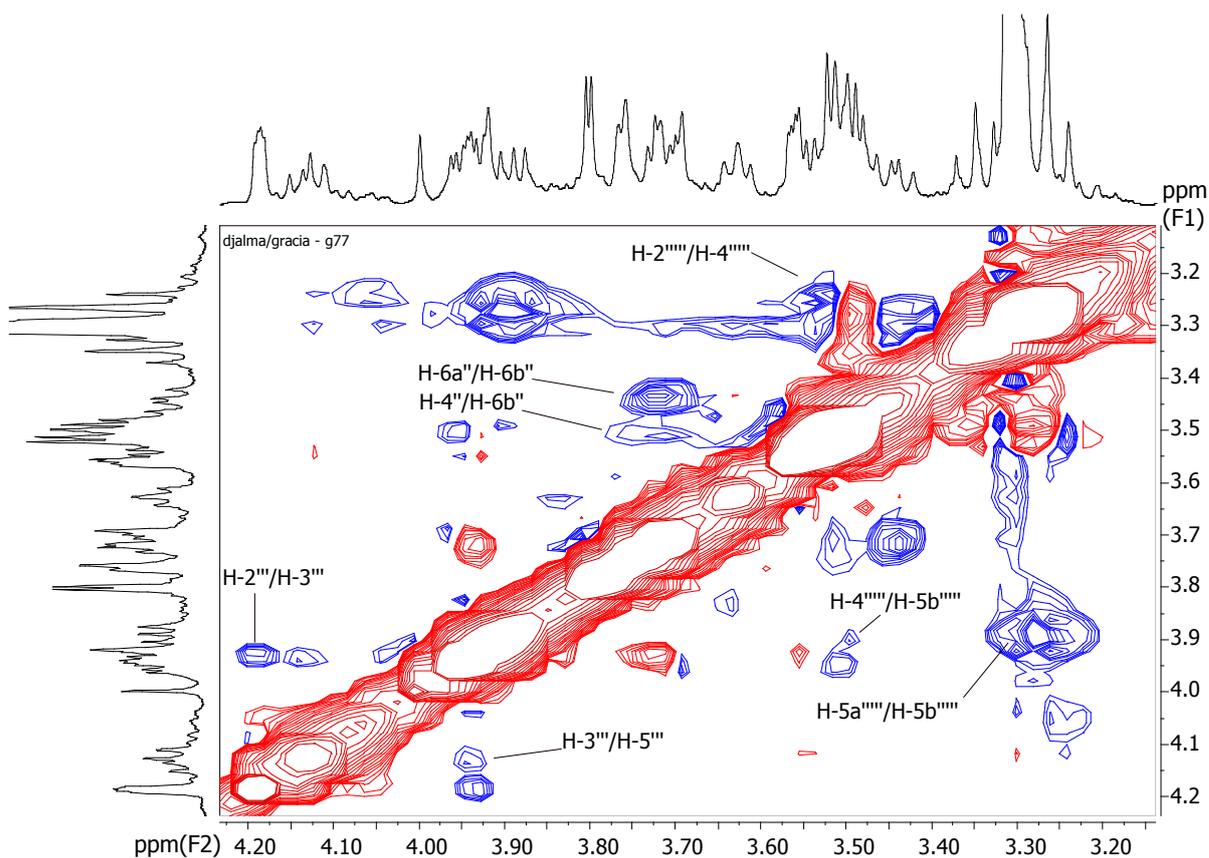


Figura 3.152: Mapa de contornos NOESY de **22** (CD₃OD, 400 MHz) da região entre δ de ¹H 3,20-4,20 ppm (F2) x δ ¹H 3,20-4,20 ppm (F1).

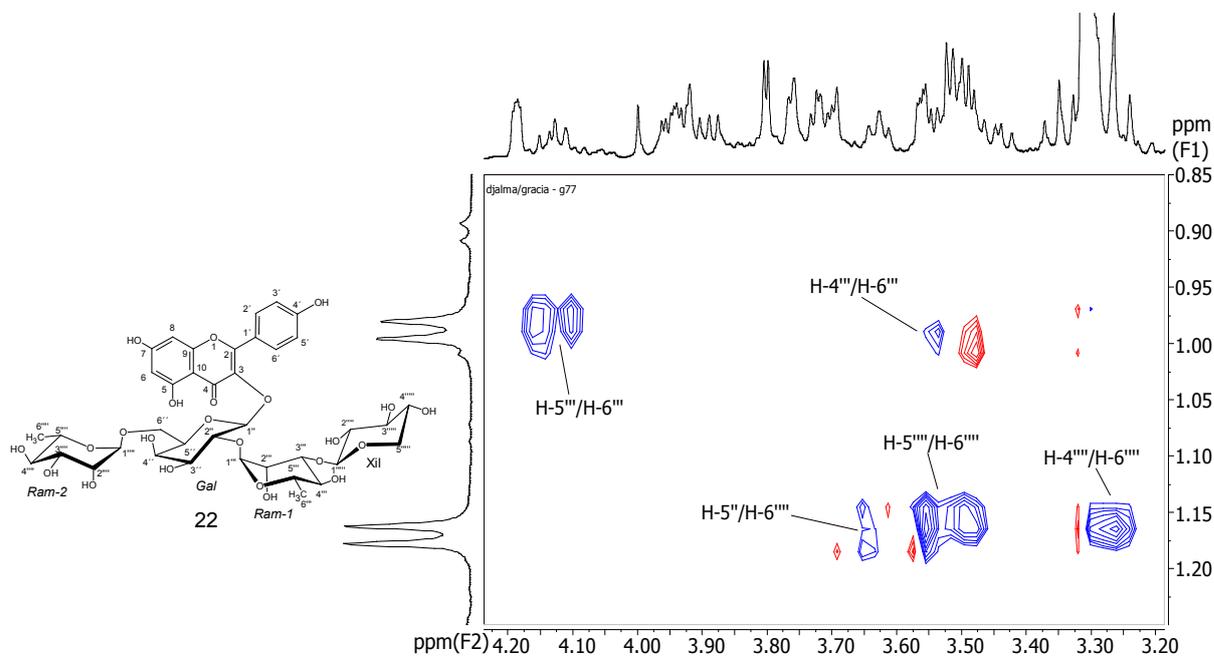


Figura 3.153: Mapa de contornos NOESY de **22** (CD₃OD, 400 MHz) da região das metilas, entre δ ¹H 3,20-4,20 ppm (F2) x δ ¹H 0,85-1,25 ppm (F1).

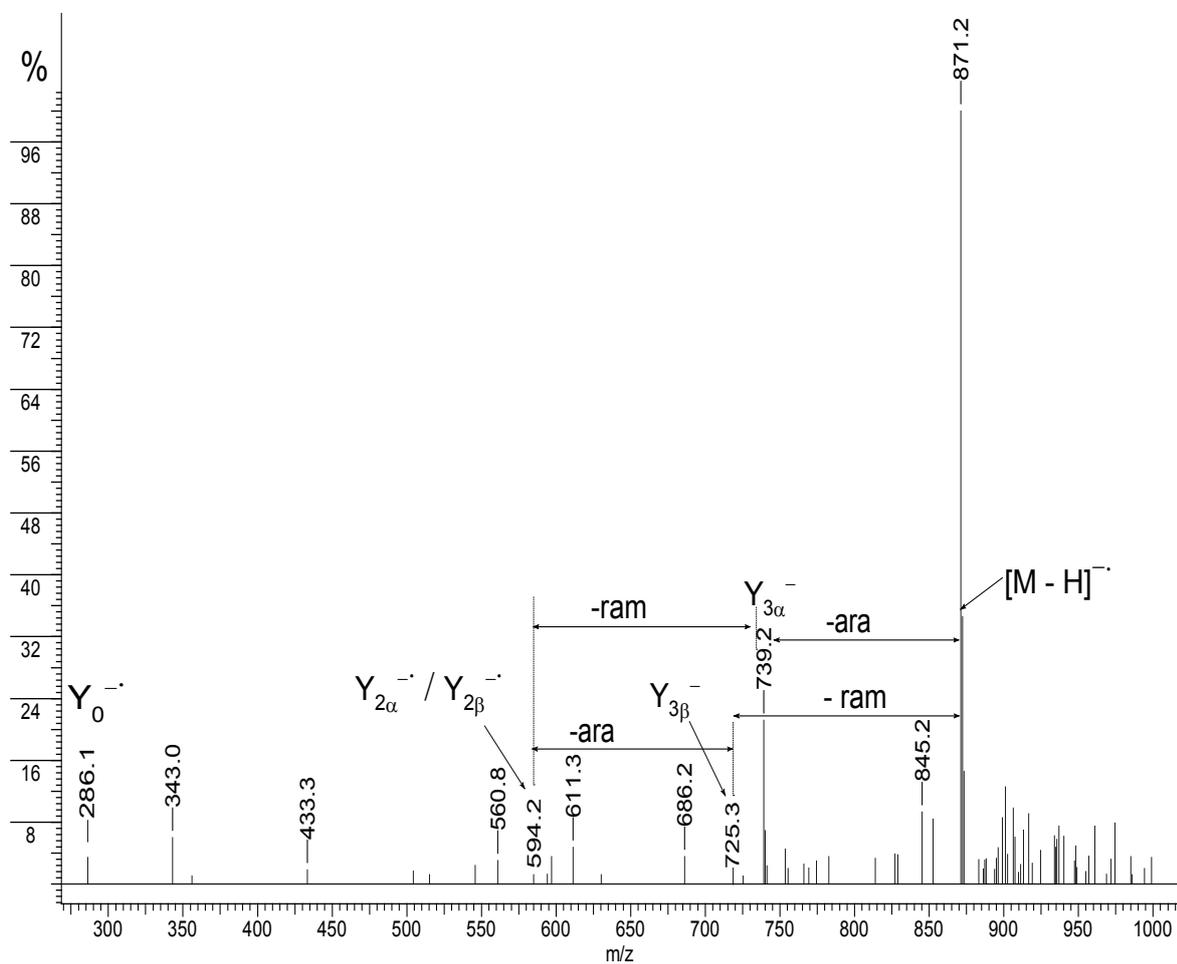
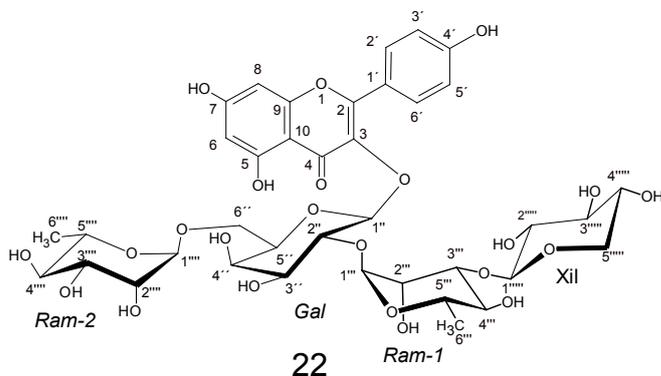
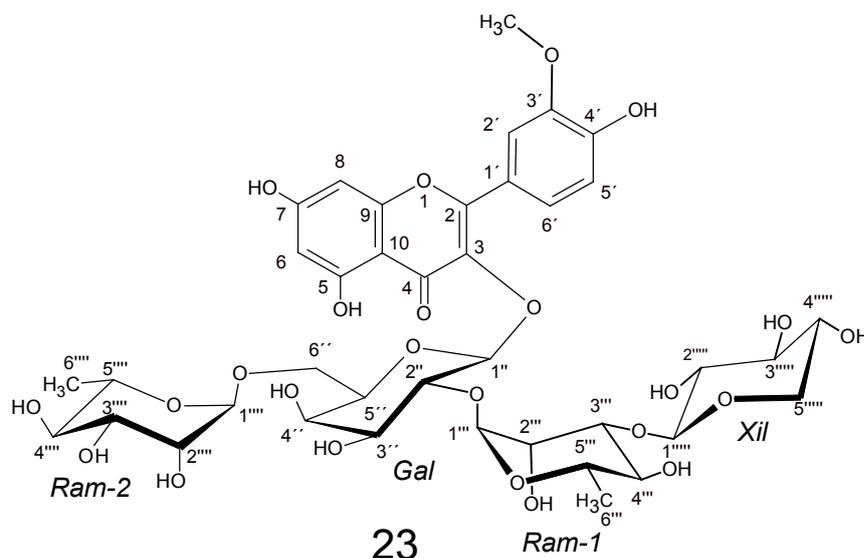


Figura 3.154: Espectro de massas EM-IES de **22** obtido no modo negativo, com varredura de 100 a 1000 m/z.

Proposta de estrutura para (**23**) como 3-*O*-{[α -*L*-ramnopiranosil(1 \rightarrow 6)]-*O*-[β -*D*-xilopiranosil(1 \rightarrow 3)]-*O*- α -*L*-ramnopiranosil-(1 \rightarrow 2)]}- β -*D*-galactopiranosídeo de isoramnetina.



O composto inédito **23** foi isolado como um sólido amorfo (1,4 mg), amarelo, obtido do extrato FAMMA. Na análise de **23** por CCD revelada sob luz UV (366 nm), a cromatoplaça borrifada com reagente NP/PEG-400, apresentou uma mancha amarelo-esverdeada brilhante, indicando a presença de um flavonol com estrutura similar a da quercetina.⁷⁷ Esse resultado foi coerente com os relatos sobre a obtenção de flavonoides isolados de plantas do gênero *Maytenus* onde figuram compostos derivados de flavonóis 3-*O*-glicosídeos.^{38, 39, 67}

O espectro de absorção no UV de **23** mostrou duas bandas com picos de absorções máximas em λ_{max} 359 e 259 nm que indicaram a presença de um flavonoide do tipo flavonol (Figura 3.155).^{80,170}

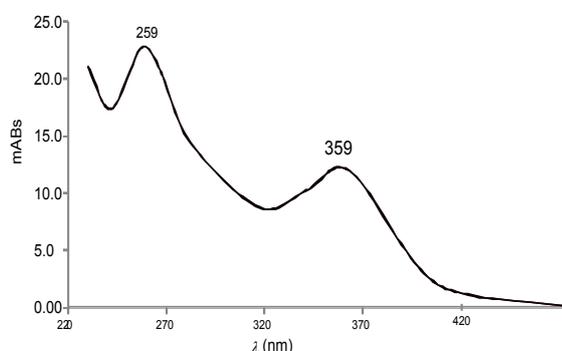


Figura 3.155: Espectro de absorção de **23** obtido por varredura na região do UV na cela do detector com fotodiodo modelo SPD-M10A acoplado a uma bomba LC-10AD em um equipamento CLAE (Shimadzu).

O espectro de absorção na região do IV de **23** (Figura 3.157, p.226) apresentou uma banda larga na região de 3200-3550 cm^{-1} e outra mais estreita e intensa entre 1100-1000 cm^{-1} , centrada em 1049 cm^{-1} , que indicaram a presença de vários grupos hidroxilas. Observou-se também uma banda em 1657 cm^{-1} característica de grupo carbonila quelado³⁹. Essas absorções de **23** na região do infravermelho são condizentes com a estrutura de um flavonol.¹¹⁷

A análise dos dados de RMN e de EM-IES revelou que a cadeia glicosídica de **23** tem a estrutura semelhante àquelas que foram encontradas nos constituintes **21** e **22**. Os valores dos deslocamentos químicos referentes aos sinais de carbono hidrogenados de **23** foram detectados no mapa de contorno HSQC (Figura 3.159, p.227). No mapa de contornos HMBC (Figura 3.161, p.228) foi registrado uma única correlação entre o sinal de carbono em δ 148,29, que foi atribuído ao carbono não hidrogenado C-3' e o sinal atribuído aos hidrogênios metoxílicos em 4,06 (s). Os valores dos δ de ^{13}C obtidos apresentaram boa correlação com os valores correspondentes à aglicona do glicosídeo similar 3-O- β -D-apiofuranosil-(1 \rightarrow 2)-[α -L-ramnopiranosil-(1 \rightarrow 6)]- β -D-galactopiranosídeo de isoramnetina¹⁷³ (Tabelas 3.44, p.221 e 3.45, p.223). Os deslocamentos químicos da cadeia glicosídica de **23** foram comparados com a do composto 3-O-[β -D-xilopiranosil(1 \rightarrow 3)-O- α -L-ramnopiranosil(1 \rightarrow 6)][α -L-ramnopiranosil-(1 \rightarrow 2)]- β -D-galactopiranosídeo de canferol disponíveis na literatura.¹⁷²

O espectro de RMN de ^1H (Figura 3.158, p.227) apresentou sinais de dois hidrogênios aromáticos em δ 6,36 (sl, H-6) e em δ 6,58 (sl, H-8), bem como em δ 8,17 (sl, H-2'), δ 7,66 (m) e δ 7.06 (m, H-5'), sinais estes atribuídos aos hidrogênios de um flavonoide com esqueleto semelhante ao da quercetina. O sinal de hidrogênios de um grupo metoxila em δ 4,06 (s, OCH_3) indicou que o composto **23** era portanto, um derivado da quercetina, a metilquercetina. A posição do grupo metoxila, localizada em C-3', foi deduzida a partir da correlação observada no mapa de contornos HMBC (Figura 3.161, p.228). A ocorrência do grupo metoxila em C-3' apresenta coerência biogenética de um produto natural e minimiza a possibilidade de uma reação de metilação acidental durante o processo fitoquímico, porque uma reação desse gênero, provavelmente envolveria os grupos hidroxilas com hidrogênios mais ácidos e lábeis. Posto que, uma reação de metilação feita considerando o glicosídeo **23** como nucleófilo, preferencialmente, ocorreria via substituição de hidrogênios hidroxílicos em C-4' e C-7.

As Tabelas 3.44 e 3.45 (p.221 e p.223) mostram a atribuição dos deslocamentos químicos de **23**, na Tabela 3.45 também constam as principais correlações registradas nos mapas de contornos dos espectros COSY. O espectro de RMN de ^1H apresentou dois dupletos em δ 0,92 (d,

$J = 6,0$ Hz) e 1,22 (d, $J = 6,2$ Hz) que foram atribuídos aos hidrogênios de dois grupos ramnopiranosilas (H-6''' e H-6''''').¹⁷² Mostrou também os sinais de dois hidrogênios anoméricos em δ 5,81 (d, $J = 7,6$ Hz, H-1'') e δ 5,17 (sl, H-1'''), no entanto, nesse espectro, não foram observados os sinais referentes aos hidrogênios H-1'''' e H-1''''', esperados para ocorrerem na região entre δ 4,5-4,7 ppm, provavelmente, devido a supressão do sinal de H-O da água. Todavia, as correlações referentes a esses sinais foram registradas em δ de ^1H 4,56 (H-1''''') e 4,53 (H-1''''') nos mapas de contornos COSY (Figura 3.160, p.228) e HSQC (Figura 3.159, p.227). Possivelmente, o desaparecimento desses sinais do espectro tenha ocorrido concomitantemente à supressão do sinal de hidrogênios da água (δ em torno de 4,87), que normalmente ocorre como impureza do solvente CD_3OD , durante a aquisição do espectro.

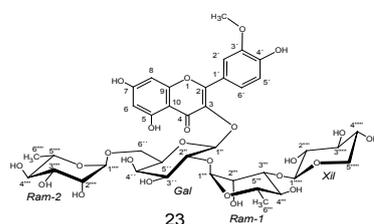


Tabela 3.44: Atribuição dos valores de δ de ^{13}C de **23** (CD_3OD , 100 MHz) e a comparação entre os valores encontrados na literatura (CD_3OD , 100/125 MHz)¹⁷²⁻¹⁷³

C-n	23	Lit. ¹⁷²⁻¹⁷³	C-n	23	Lit
2	ND	158,9	(2-1)Ram		
3	ND	135,5	1'''	102,07	102,25
4	ND	179,5	2'''	71,29	72,13
5	ND	163,0	3'''	82,71	82,59
6	99,85	99,8	4'''	72,00	73,02
7	ND	161,1	5'''	69,19	69,79
8	94,78	94,9	6'''	17,98	17,52
9	ND	158,5			
10	ND	105,5	(6-1)Ram		
1'	ND	123,0	1''''	101,34	101,96
2'	114,53	114,6	2''''	71,73	72,16
3'	148,29*	148,4	3''''	71,90	72,35
4'	ND	150,9	4''''	73,14	73,94
5'	116,18	116,0	5''''	69,48	69,79
6'	122,83	123,8	6''''	18,74	18,01
7' (OCH ₃)	57,03	57,0			
Cadeia glicosídica (Lit.) ¹⁷²			(3-1)Xil		
3-Gal	23	Lit.	1'''''	106,64	106,66
1''	100,30	101,35	2'''''	75,04	75,42
2''	76,71	77,25	3'''''	77,23	77,71
3''	74,82	75,74	4'''''	70,68	71,20
4''	69,73	70,95	5'''''	66,80	67,07
5''	74,81	75,37			
6''	66,55	67,18			

Dados: Mapas de contornos HSQC e HMBC (*), Figuras 3.159, p.227 e 3.161, p. 228.

No mapa de contornos do HSQC, os quatro sinais de hidrogênios anoméricos mostraram correlação com os respectivos sinais de carbonos em $\delta 100,30$ (C-1''), $\delta 102,07$ (C-1'''), $101,34$ (C-1''') e $106,64$ (C-1''') (Figura 3.156). Os demais sinais de hidrogênios sacarídeos foram registrados na região de $\delta 3,26$ - $4,12$ do espectro.

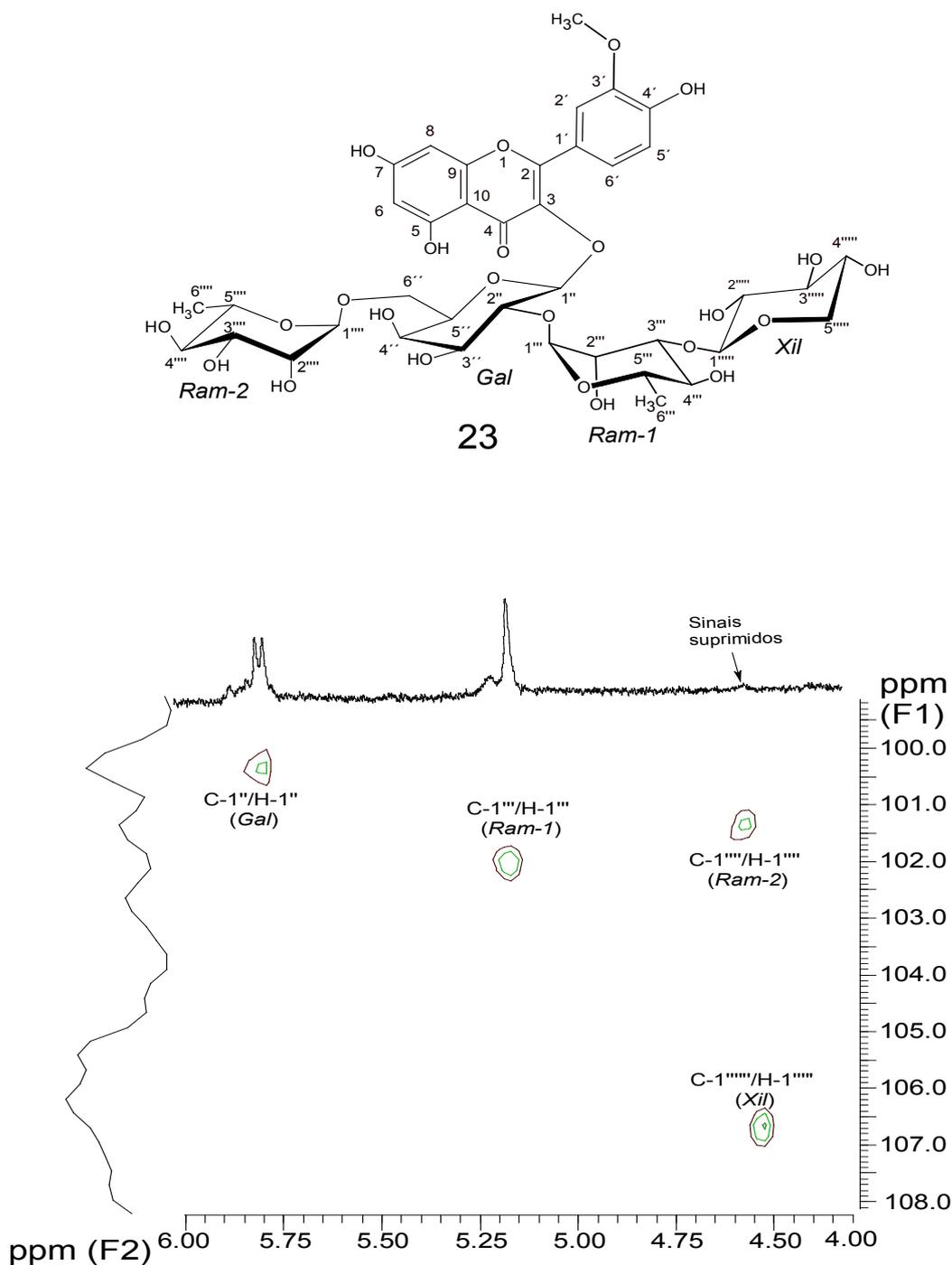


Figura 3.156: Mapa de contornos HSQC de **23** (CD₃OD, 400 MHz) - Região relativa aos sinais de carbonos e hidrogênios anoméricos.

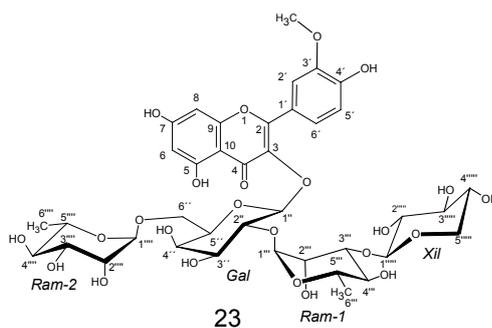


Tabela 3.45: Atribuição dos valores de δ de ^1H de **23** (CD_3OD , 400 MHz) e a comparação com os valores encontrados na literatura referentes à genina¹⁷³ e cadeia glicosídica (CD_3OD , 400/500 MHz)¹⁷²

H-n	δ de ^1H (multiplicidade, J, Hz)		2D
	23	Literatura	COSY
		Genina ¹⁷³	
H-6	6,36 (sl)	6,22 (d, 1,5)	H-8
H-8	6,58 (sl)	6,43 (d, 1,)	H-6
H-2'	8,17 (sl)	8,00 (d, 1,5	H-5', H-6'
H-5'	7,06 (m)	6,93 (d, 7,5)	H-2', H-6'
H-6'	7,66 (m)	7,61 (dd, 7,5, 1,5)	H-2', H-5'
OCH_3	4,06 (s)	4,00 (s)	
3-Gal		Cadeia Glicosídica ¹⁷²	
H-1''	5,81 (d, 7,6)	5,57 (d, 7,8)	H-2''
H-2''	3,97 (m)	3,93 (dd, 9,4, 7,8)	H-1''
H-3''	3,83 (m)	3,71 (dd, 9,4, 3,0)	H-4''
H-4''	3,81 (m)	3,76 (dd, 3,6 1,0)	H-2''
H-5''	3,77 (m)	3,66 (m)	H-6a''
H-6a''	3,49 (m)	3,50 (t, 12,2)	H-4''
H-6b''	3,77 (m)	3,68 (m)	H-6a''
(2-1)Ram			
H-1'''	5,17 (sl)	5,22 (d, 1,4)	H-2''', H-2''
H-2'''	4,11 (m)	3,80 (dd, 3,3, 1,5)	H-1''', H-3'''
H-3'''	3,81 (m)	4,00 (m)	H-1''', H-2'''
H-4'''	3,51 (m)	3,35 (t, 9,8)	H-3''', H-5'''
H-5'''	4,04 (m)	4,07 (dd, 9,8, 6,2)	H-4'''
H-6'''	0,92 (d, 6,0)	0,99 (d, 6,3)	H-5'''
(6-1)Ram			
1''''	4,56 (m)	4,54 (d, 2,0)	
2''''	3,57 (m)	3,72 (m)	
3''''	3,51 (m)	3,55 (dd, 9,4, 3,0)	
4''''	3,27 (m)**	3,42 (t, 9,4)	H-3''''
5''''	3,55 (m)	3,55 (dd, 10,5, 6,7)	H-1''''
6''''	1,22 (d, 6,2)	1,16 (d, 6,7)	H-5''''
(3-1)Xil			
1'''''	4,53 (m)	4,32 (d, 7,3)	H-2'''''
2'''''	3,29 (m)*	3,22 (m)*	H-2''''', H-3'''''
3'''''	3,31 (m)*	3,30 (t, 8,6)	H-4'''''
4'''''	3,48 (m)	3,48 (dd, 6,7, 2,7)	H-5b'''''
5a'''''	3,28 (m)	3,00 (t, 12,2)	H-5b'''''
5b'''''	3,92 (m)	3,77 (dd, 12,2, 5,4)	H-4'''''

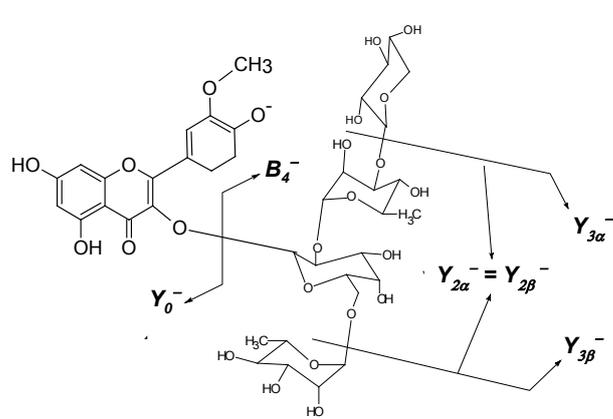
(*) sinais sobrepostos ao do solvente no (metanol- d_4) no espectro de RMN de ^1H ; sl: singlete largo; dl: duplete largo; (**) sinal encoberto parcialmente pelo do solvente.

O espectro de massas EM-IES, obtido no modo negativo com varredura de 100-1500 Da (Figura 3.162, p.229), levou a identificação dos fragmentos em m/z 902 (100%) e em m/z 901, atribuídos a $[M]^\bullet$ e $[M-H]^-$, respectivamente, sendo foi possível propor a massa de 902 Da para a molécula **23** ($C_{39}H_{50}O_{24}$). No espectro EM^2 -IES, obtido com o aprisionamento e fragmentação do íon em m/z 902, foram identificados os íons-fragmentos em m/z 770 e 769 resultantes da saída de um resíduo de pentose ($[M-132]^\bullet$ e $[M-H-132]^-$). Os íons em m/z 770 e 769 foram atribuídos aos fragmentos $Y_{3\alpha}^\bullet$ e $Y_{3\alpha}^-$, respectivamente. Com base nos dados de RMN podemos afirmar que o resíduo de pentose perdido correspondeu a um grupo xilopiranosila. A fragmentação do íon em m/z 770 (EM^3 -IES), resultante da perda de uma unidade ramnopiranosila ($[M-H-132-146]^-$), originou o íon-fragmento em m/z 623 ($Y_{2\beta}^-$ ou $Y_{2\alpha}^-$). O fragmento em m/z 476 foi atribuído ao íon-fragmento de um monoglicosídeo que se formou via o íon precursor em m/z 623 após a perda consecutiva de dois resíduos de ramnose $[M-H-132-146-146]^-$. Então, a formação do íon mais abundante em m/z 315, atribuído a Y_0^- ($[genina-H]^-$), ocorreu após a eliminação consecutiva dos resíduos de uma xilose, duas ramnosas e uma hexose (galactose, com base nos dados de RMN), o que também foi observado às cadeias glicosídicas dos constituintes **21** e **22**.

A diferença entre as massas do íon $[M-H]^-$ em m/z 901 e da aglicona em m/z 315 (Y_0^-) foi de 586 Da (B_4), valor esse correspondente à massa molar da cadeia glicosídica de **23**. A Tabela 3.46 (p.225) mostra as atribuições dos íons observados, a proposta de fragmentação e as perdas neutras calculadas para os espectros EM-IES no modo negativo (Figura 3.162, p.229). O espectro EM^3 -IES mostrou ainda que o íon em m/z 315, correspondente à molécula da aglicona desprotonada $[Y_0-H]^-$, atribuído como o íon precursor dos íons-fragmentos seguintes em m/z 300 e em m/z 272, que foram atribuídos às perdas dos radicais neutros CH_3 (15 Da) e CO (28 Da). Foi observado que o padrão de fragmentação apresentado pela aglicona de **23** era coincidente com os dados de espectroscopia de massas relatados para os glicosídeos derivados da isoramnetina em *Maytenus aquifolium* e *M. ilicifolia*.⁸⁰

À luz da análise dos dados espectroscópicos e cromatográficos disponíveis está se propondo um novo flavonoide com a estrutura do 3-*O*- $\{[\alpha$ -L-ramnopiranosil(1 \rightarrow 6)] $[\beta$ -D-xilopiranosil(1 \rightarrow 3)- α -L-ramnopiranosil(1 \rightarrow 2)] $\}$ - β -D-galactopiranosídeo de isoramnetina para o composto **23**. Ressaltamos que, para a confirmação inequívoca da estrutura acima proposta, os experimentos de RMN deverão ser repetidos para viabilizar a publicação em um periódico futuramente.

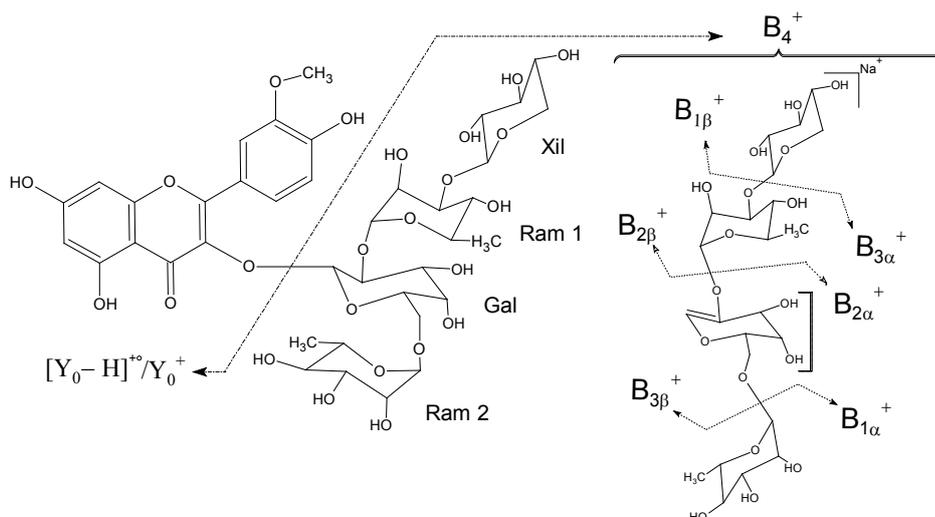
Tabela 3.46: Fragmentação proposta para o tetraglicosídeo **23** e a atribuição dos íons observados nos EM-IES, modo negativo (Figura 3.162, p.229)



Perdas		Atribuição	
m/z	(Da)	Íon	PN
902		$[M]^\bullet$	
901	1	$[M-H]^-$	
769	132	$Y_{3\alpha}^\bullet$	Xil
623	132+146	$Y_{2\beta}^-$	Xil+Ram
475	132+146 +146 +2	$[Y_{1\alpha}-H_2]^-$	Xil+2Ram+H ₂
315	586	Y_o^-	Xil+2Ram+Gal

PN: perdas neutras em relação a $[M-H]^-$, M: íon molecular.

Tabela 3.47: Atribuição dos íons-fragmentos obtidos na detecção IES-EM de **23** no modo positivo (Figura 3.163, p.230)



EM-IES ⁺ de 23		Atribuição
m/z	PN (Da)	Íon
925		$[M+Na]^+$
779	146	$Y_{3\beta}^+$
647	146+132	$Y_{2\alpha}^+, Y_{2\beta}^+$
609	316 (aglicona)	B_4^+
477	316+132	$B_{3\alpha}^+$
463	316+146	$B_{3\beta}^+$
331	316+132+146	$B_{2\beta}^+$
301	316+146+162	$B_{2\alpha}^+$

PN: perdas neutras em relação a $[M+Na]^+$, M: íon molecular.

Uma fração contendo **23** foi submetida à EM com detecção no modo positivo e varredura entre 100-1000 Da. No EM-IES obtido no modo positivo foi observado o íon *quasi*-molecular ($[M+Na]^+$) de **23** em m/z 925. A fragmentação desse íon *quasi*-molecular permitiu a detecção de íons Y_i^+ e B_i^+ e foram atribuídas as perdas neutras que se relacionaram com resíduos de açúcar. A detecção dos íons-fragmentos B_i^+ ($i = 1-3$) observados no EM²-IES (Figura 3.163, p.230), no modo positivo, forneceram informações sobre a cadeia glicosídica que confirmaram as atribuições feitas anteriormente para os EM-IES no modo negativo. O fragmento observado em m/z 609 (100%), obtido a partir do íon molecular, foi atribuído à cadeia glicosídica (B_4^+) após a saída do fragmento neutro equivalente à genina de **23**. As fragmentações de B_4^+ geraram os íons em m/z 477 e 463, atribuídos a $B_{3\alpha}^+$ e $B_{3\beta}^+$, na perda de um resíduo de xilose e outro de ramnose, respectivamente. Em seguida, as subseqüentes fragmentações de $B_{3\alpha}^+$ e $B_{3\beta}^+$ produziram os íons em m/z 331 ($B_{2\alpha}^+$) e em m/z 301 ($B_{2\beta}^+$) após as perdas consecutivas da segunda ramnose e de uma galactose. A Tabela 3.47 (p.225) mostra as atribuições EM²-IES de **23** no modo positivo. A pesquisa bibliográfica com base nos dados de RMN mostrou que o composto **23** é um flavonoide glicosídico inédito.

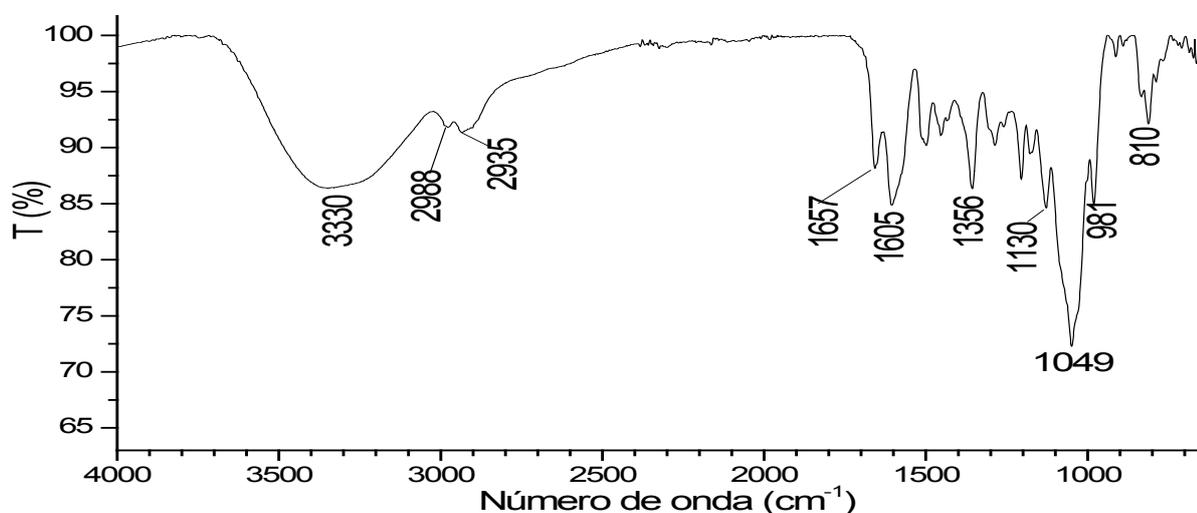
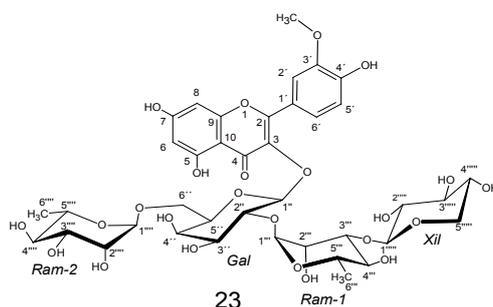


Figura 3.157: Espectro de absorção de **23** na região do infravermelho.

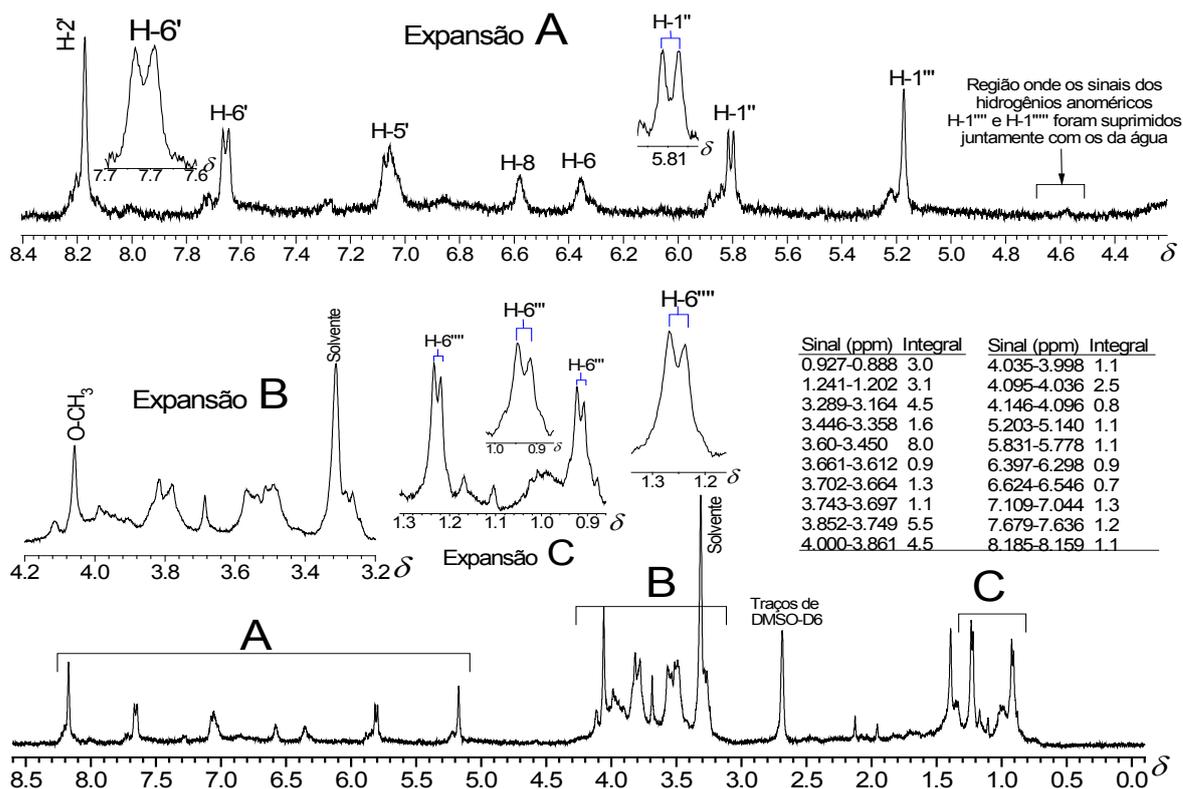


Figura 3.158: Espectro de RMN de ^1H de **23** (CD_3OD , 400 MHz).

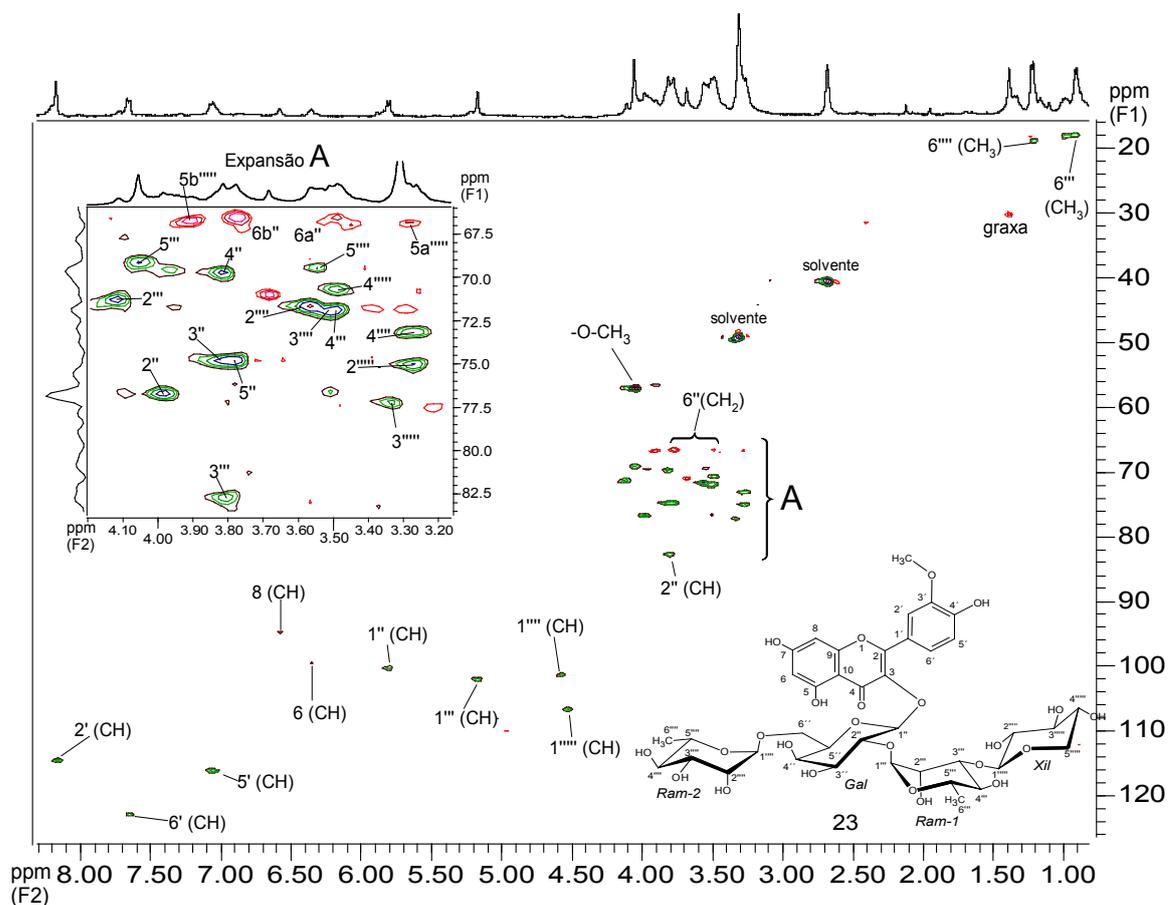


Figura 3.159: Mapa de contornos HSQC de **23** (CD_3OD , 400 MHz).

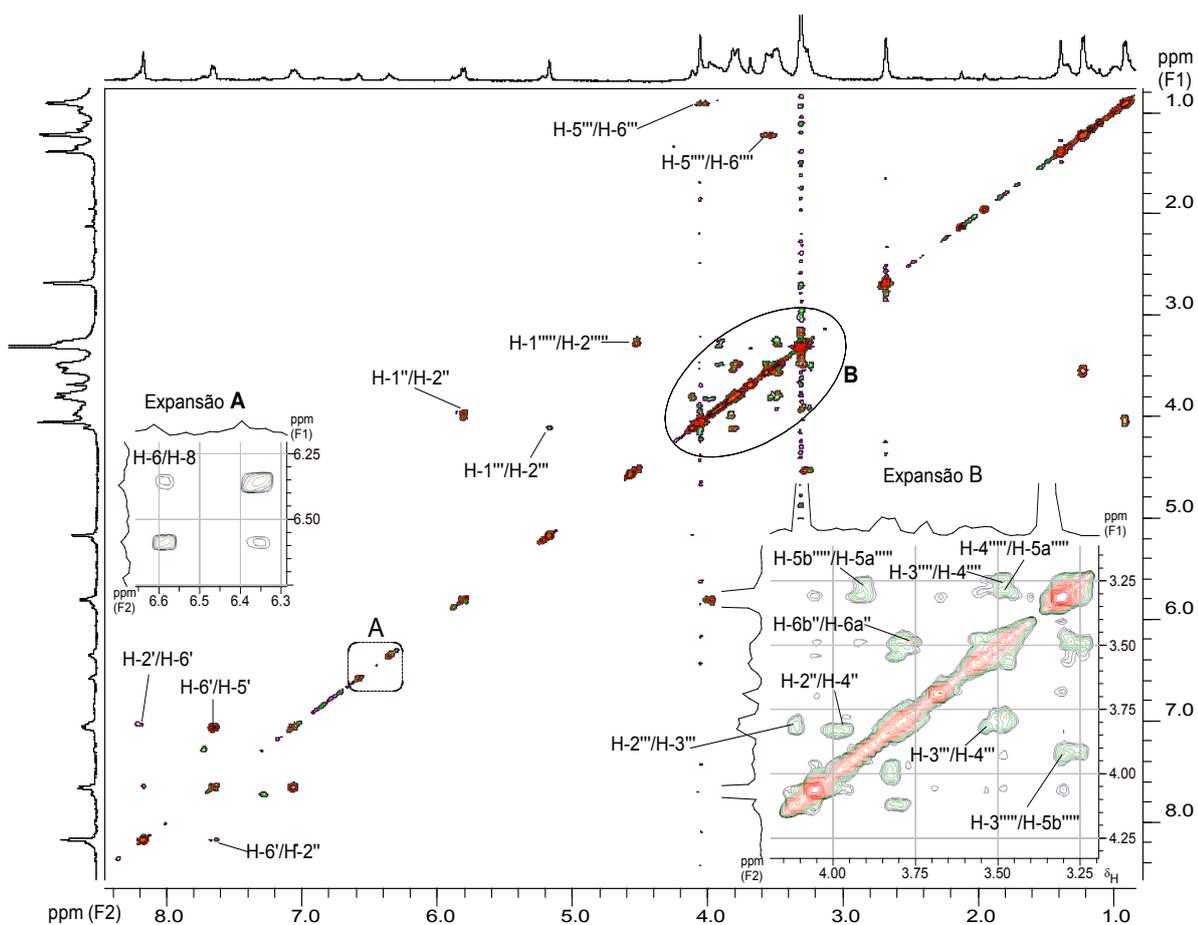


Figura 3.160: Mapa de contornos COSY de **23** (CD₃OD, 400 MHz).

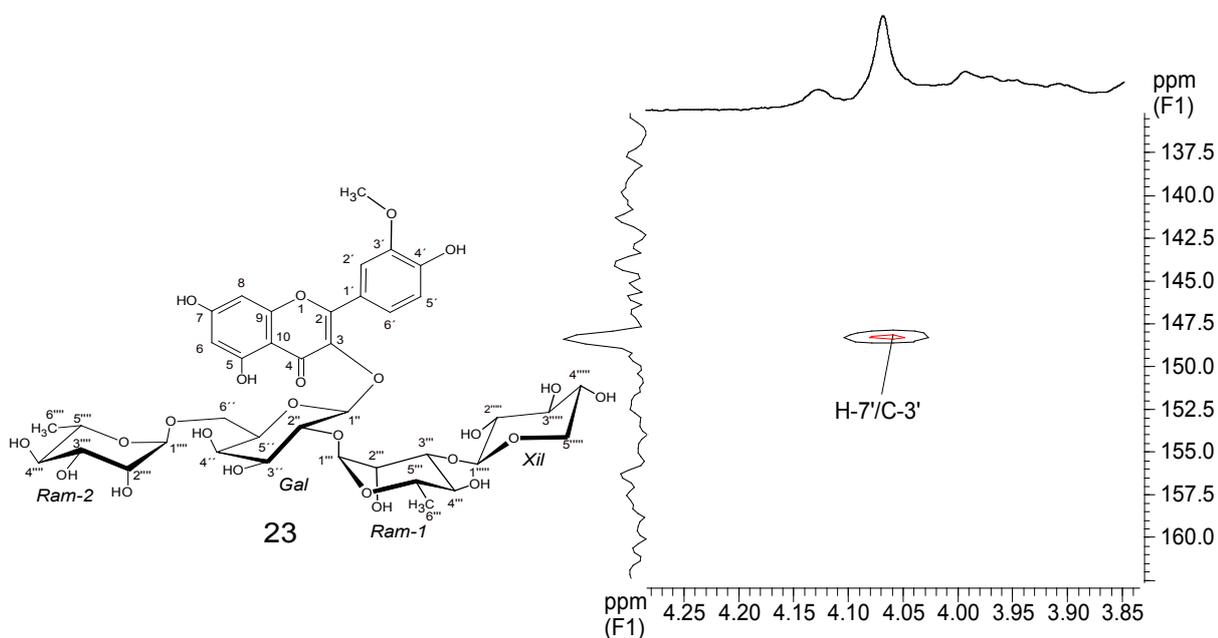


Figura 3.161: Mapa de contornos HMBC de **23** (CD₃OD, 400 MHz).

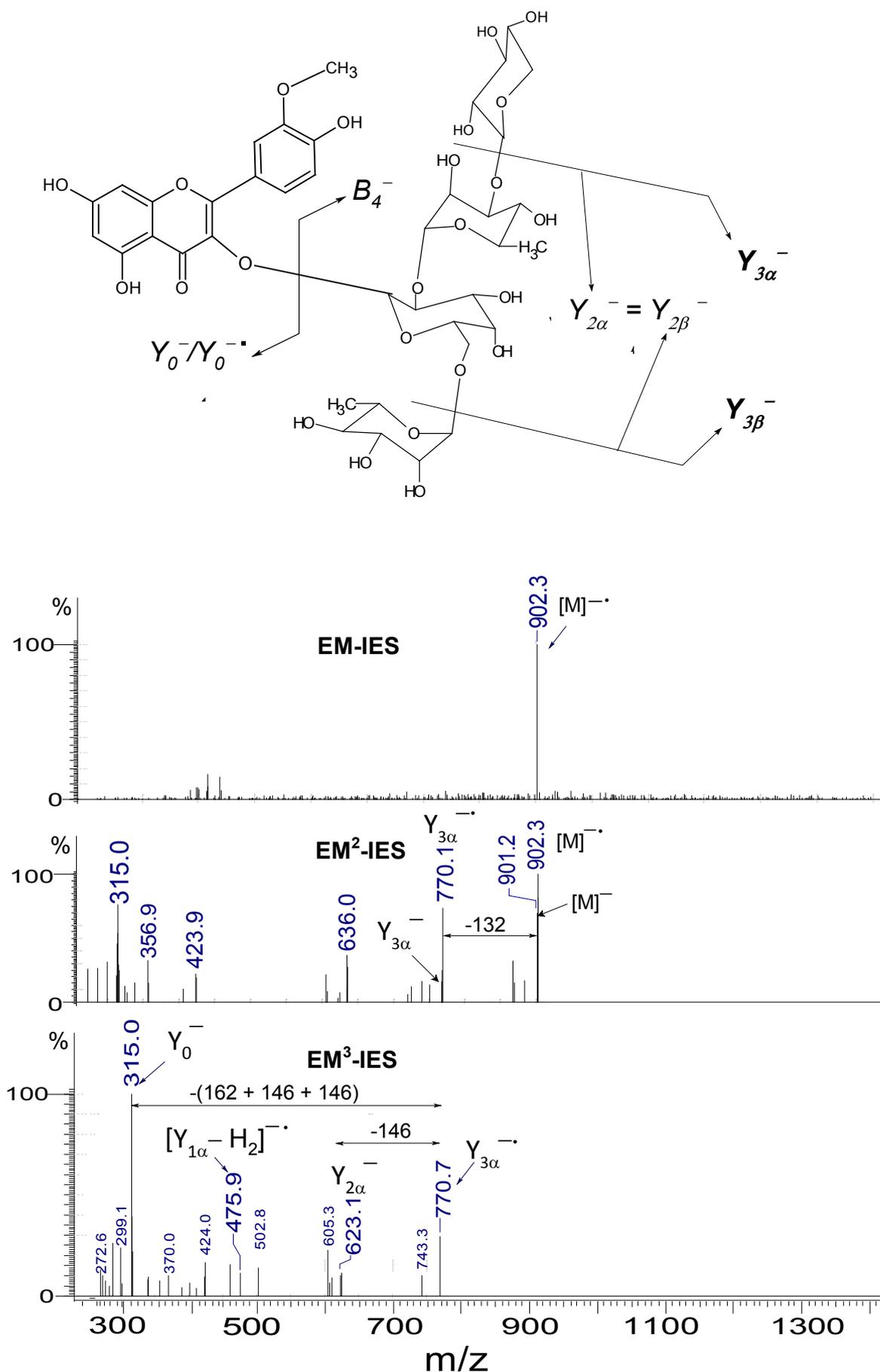


Figura 3.162: Espectros EM-IES de **23** obtidos no modo negativo.

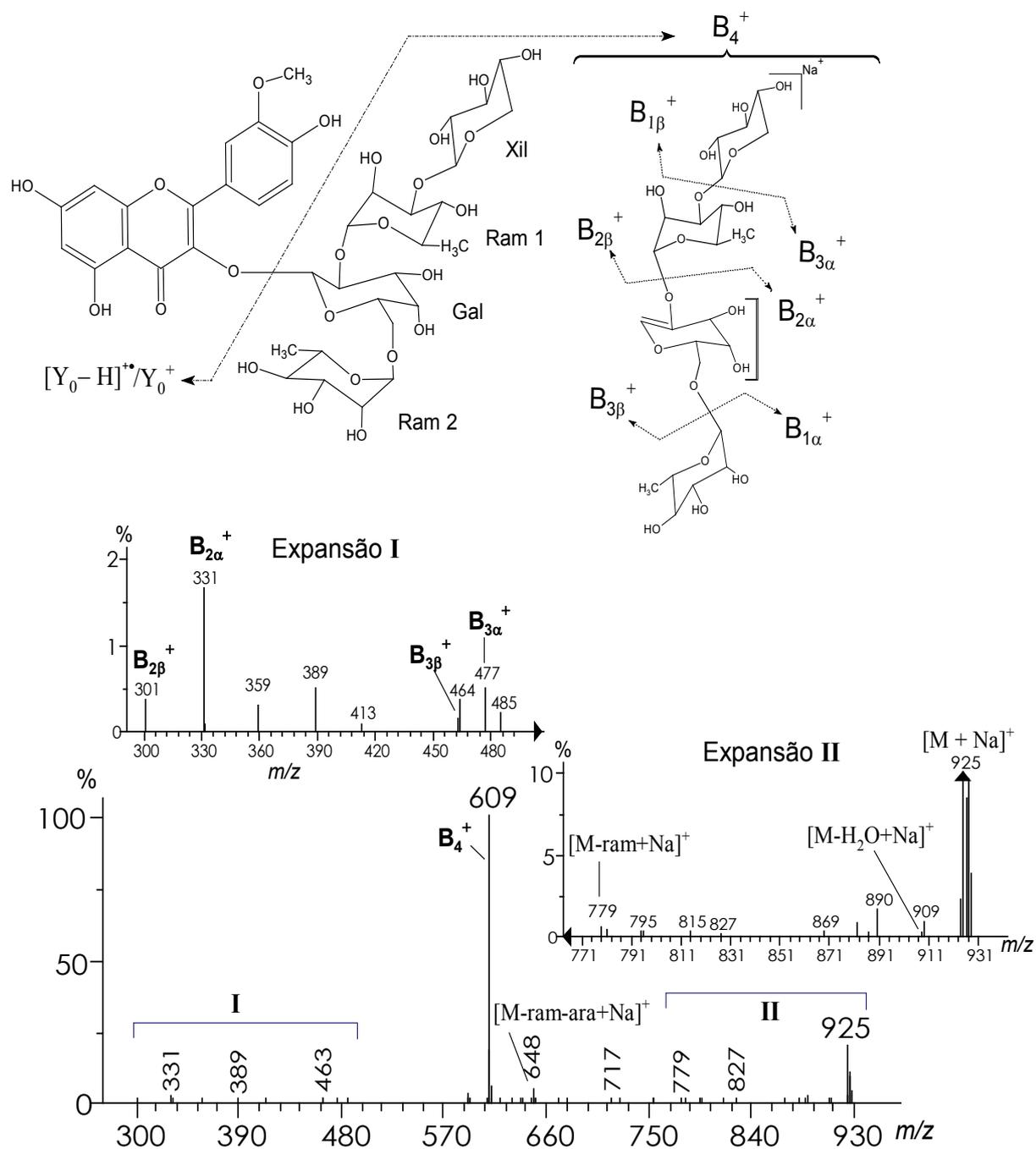


Figura 3.163: Espectro EM²-IES obtido no modo positivo de **23** mostrando os fragmentos do íon *quasi*-molecular $[M+Na]^+$ em m/z 925.

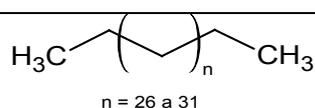
NEPLAM – DQ-ICEX - UFMG

4

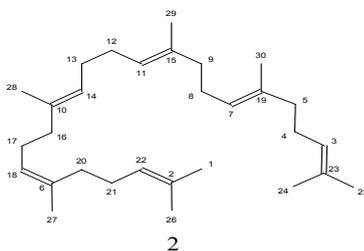
DADOS FÍSICO-QUÍMICOS DOS COMPOSTOS

Oliveira, DM

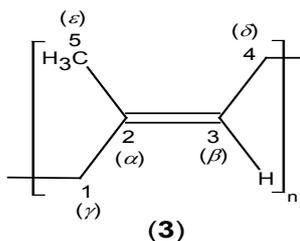
2012

DADOS FÍSICO-QUÍMICOS DOS COMPOSTOS**Mistura de Hidrocarbonetos (1)**

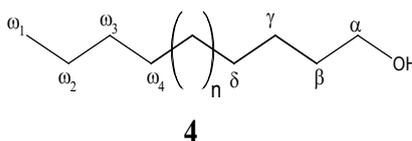
- **Aspecto:** Escamas brancas brilhantes
- **Ponto de fusão:** 59-67 °C (hexano)
- **Solubilidade:** Hexano e CHCl₃
- **Fórmula molecular:** HC's de C-30 a C-35 (maioria linear)
- **Massa molar:** 422-492 g mol⁻¹ (maioria)
- **IV (cm⁻¹):** 2750, 1450, 1360 e 710
- **CGAR:** Coluna SE-30, 30 m, 0,25 mm DI, 0,25 μm (capilar) de metilpolisiloxano; Temperaturas: rampa de 200 a 320 °C, razão de 5 °C/min, isotérmica por 1 min a 320 °C.
- **TR, minutos (HC lineares):** 14,25(C-30), 15,45(C-31), 16,67(C-32), 17,99(C-33), 19,07(C-34), 20,22(C-35).

Esqualeno (2)

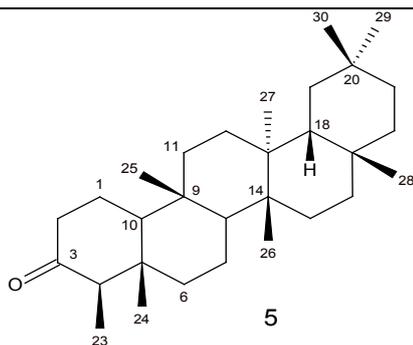
- **Aspecto:** Óleo de cor verde-amarelada
- **Solubilidade:** Hexano, CHCl₃, AcOEt
- **Fórmula molecular:** C₃₀H₅₀
- **Massa molar:** 410 g mol⁻¹
- **IV (cm⁻¹):** 3300, 2760, 1425, 1365, 815
- **CGAR:** Coluna SE-30, capilar, 30 m x 0,25 mm de diâmetro interno, filme de 0,25 nm de metilpolisiloxano, Alltech, USA. Temperaturas: coluna: Inicial a 200 °C, final até 320 °C por 1 min, a uma taxa de 5 °C/min. Detector e injetor operaram a 320 °C.
- **TR, minutos:** 11,69
- **RMN de ¹H (400 MHz; CDCl₃):** Tabela 3.2, p.65
- **RMN de ¹³C (100 MHz; CDCl₃):** Tabela 3.2, p.65
- **EM, m/z (%):** 409 (traços), 341 (0,3), 273 (0,1), 137 (5), 121 (7), 81 (48), 69 (100%).

1,4-Trans-poliisopreno (3)

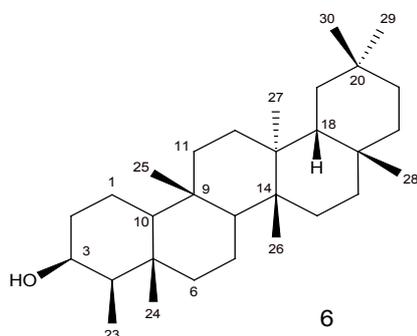
- Aspecto: Goma branco-amarelada
- Endotérmicas de fusão (DSC): 41,3 (β), 51,9 (amorfa) e 60,2 °C (α) (CHCl₃)
- Solubilidade: CHCl₃
- Transição vítrea (T_g): -69,5 °C (203,67 K)
- Fórmula molecular: (C₅H₈)_n
- Massa molar média (M_n): 3,05 x 10⁴
- Massa molar ponderal (M_w): 4,48 x 10⁴
- IV (cm⁻¹): 2960, 2900, 2850, 1665, 1430, 1215, 1110, 1385, 880, 800
- RMN de ¹H (400 MHz; CDCl₃): Tabela 3.4, p.72
- RMN de ¹³C (100 MHz; CDCl₃): Tabela 3.4, p.72

Álcool graxo (4)

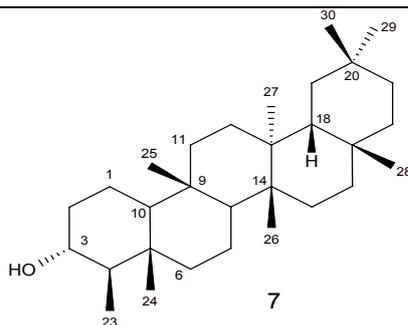
- Aspecto: Cera amarela
- Solubilidade: Hexano e CHCl₃
- Fórmulas moleculares estimadas: C₁₉H₄₀ e C₁₈H₃₈O
- Massa molar: 268 e 270 g mol⁻¹
- IV (cm⁻¹): 3450, 2920, 2870, 1470, 1380, 1090, 970, 800
- RMN de ¹H (400 MHz; CDCl₃): Tabela 3.6, p.80
- RMN de ¹³C (100 MHz; CDCl₃): Tabela 3.5, p.79

Friedelina (5)

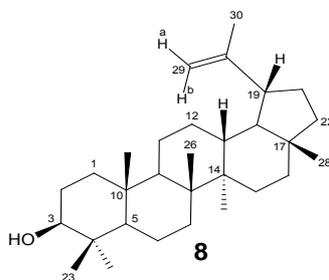
- Aspecto: Sólido branco cristalino (forma de agulhas)
- Ponto de fusão: 259,7-262,1 °C
- Solubilidade: CHCl₃ e DCM.
- Fórmula molecular: C₃₀H₅₀O
- Massa molar: 426 g mol⁻¹
- IV (cm⁻¹): 2925, 2860, 1710, 1456, 1388, 1360, 1175, 1004, 978, 884
- RMN de ¹H (400 MHz; CDCl₃): Figura 3.29, p.85
- RMN de ¹³C (100 MHz; CDCl₃): Tabela 3.7, p.84
- EM, *m/z* (%): 69(100); 95(86); 123(70); 109(59); 179(21); 207(26); 218(21); 246(19); 273(15); 302(5); 412(4); 426(9).

β-Friedelinol (6)

- Aspecto: Sólido branco cristalino
- Ponto de fusão: 286,7-289,3 °C (recrist. em acetona)
- Solubilidade: Levemente em CHCl₃, AcOEt e tolueno
- Fórmula molecular: C₃₀H₅₂O
- Massa molar: 428 g mol⁻¹
- IV (cm⁻¹): 3622, 3474, 2942, 2866, 1452, 1386, e 1362, 1176 e 1000
- RMN de ¹H (400 MHz; CDCl₃): Tabela 3.11, p.96
- RMN de ¹³C (100 MHz; CDCl₃): Tabela 3.11, p.96
- EM (IE) , *m/z* (%): 69(100); 95(59); 123(41); 107(21); 163(16); 207(12); 233(9); 218(14); 255(3); 273(10); 302(6); 411(3); 427(6).

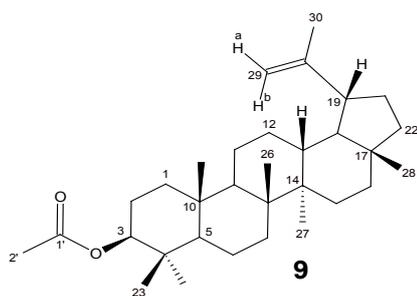
α-Friedelinol (**7**)

- Aspecto: Sólido branco cristalino
- Ponto de fusão: 295,9-300 °C (clorofórmio)
- Solubilidade: AcOEt e fracamente em CHCl₃
- Fórmula molecular: C₃₀H₅₂O
- Massa molar: 428 g mol⁻¹
- IV (cm⁻¹): 3488, 3400, 2920, 2850, 1470, 1458, 1440, 1387, 1365, 1180, 1035, 1005, 820 (fraca).
- RMN de ¹H (400 MHz; CDCl₃): Tabela 3.12, p.101
- RMN de ¹³C (100 MHz; CDCl₃): Tabela 3.12, p.101
- EM (IE), *m/z* (%): 69(100); 109(10); 107(16); 149(16); 207(12); 218(14); 255(8); 302(6); 413(2); 409(2); 428(2)

3β-Lup-20(29)-en-3-ol (lupeol, **8**)

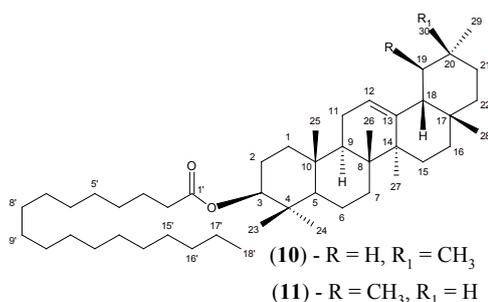
- Aspecto: Sólido branco amorfo
- Ponto de fusão: 213,8 - 216,7 °C (recrist. c/ etanol)
- Solubilidade: CHCl₃
- Fórmula molecular: C₃₀H₅₀O
- Massa molar: 426 g mol⁻¹
- IV (cm⁻¹): 3550, 3400, 3295, 2920, 2850, 1640 (fraca) 1470, 1455, 1440, 1380, 1360, 1140, 1110, 1040, 985, 880
- RMN de ¹H (400 MHz; CDCl₃): Tabela 3.14, p.107
- RMN de ¹³C (100 MHz; CDCl₃): Tabela 3.14, p.107
- EM, *m/z* (%): 69(100); 55(72); 41(64); 135(52); 133(34); 197(28); 203(26); 218(26); 121(44); 189(40); 409(1); 408(1); 426(1)

Acetato de 3β-lup-20(29)-en-3-ila (9)

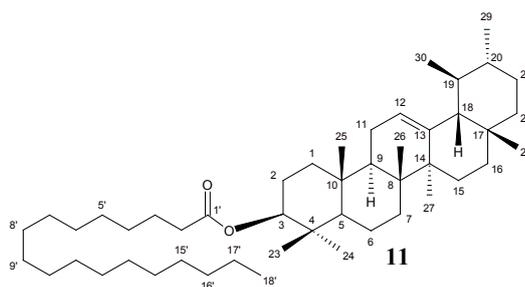


- **Aspecto:** Sólido branco amorfo
 - **Ponto de fusão:** 198,4 a 199,6 °C (clorofórmio-metanol)
 - **Solubilidade:** Hexano, CHCl₃
 - **Fórmula molecular:** C₃₂H₅₂O₂
 - **Massa molar:** 468 g mol⁻¹
 - **IV (cm⁻¹):** 2920, 2850, 1735, 1640 (fraca), 1455, 1380, 1370, 1250, 1150, 1010, 1030, 980, 880
 - **RMN de ¹H (400 MHz; CDCl₃):** Tabela 3.16, p.114
 - **RMN de ¹³C (100 MHz; CDCl₃):** Tabela 3.16, p.114
 - **EM, m/z (%):** 73(100), 109(55), 133(34), 197(28), 203(23), 218(15), 191(44), 189(44), 409(1), 408(2), 426(4), 468(3)
-

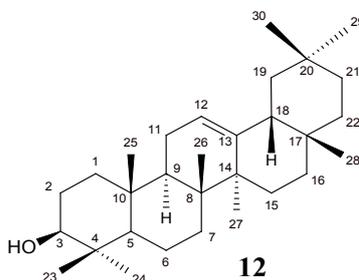
Mistura de 3β-esteariloxi-olean-12-eno (10) e 3β-esteariloxi-urs-12-eno (11)



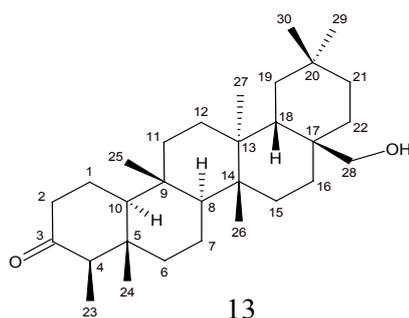
- **Aspecto:** Graxa branca, pastosa
 - **Solubilidade:** CHCl₃
 - **Fórmulas moleculares:** C₄₈H₈₆O₂ (**10** ou **11**)
 - **Massas molares:** 692 g mol⁻¹ (**10** ou **11**)
 - **IV (cm⁻¹):** 2900, 2840, 1732, 1470, 1380, 1255 (fraca), 1175, 1155
 - **RMN de ¹H (400 MHz; CDCl₃):** Figura 3.49, p.120
 - **RMN de ¹³C (100 MHz; CDCl₃):** Tabela 3.17, p.118
 -
-

3β-Esteariloxi-urs-12-eno (11)

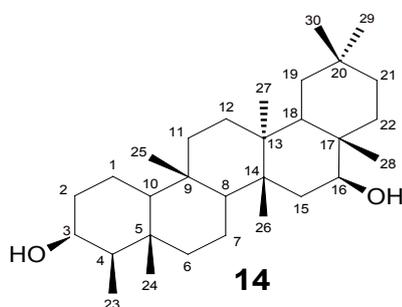
- Aspecto: Graxa branca
- Solubilidade: CHCl_3
- Fórmula molecular: $\text{C}_{48}\text{H}_{86}\text{O}_2$
- Massa molar: 692 g mol^{-1}
- IV (cm^{-1}): 2900, 2840, 1732, 1470, 1380, 1255 (fraca), 1175(fraca)
- RMN de ^1H (400 MHz; CDCl_3): Tabela 3.19, p.124
- RMN de ^{13}C (100 MHz; CDCl_3): Tabela 3.19, p.124

3β-Hidroxi-olean-12-eno, β-amirina (12)

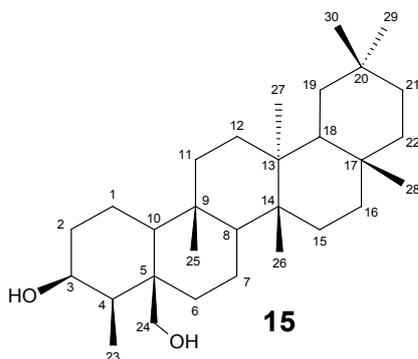
- Aspecto: Sólido branco
- Ponto de fusão: $189,1-194,6 \text{ }^\circ\text{C}$ (acetona)
- Solubilidade: CHCl_3
- Fórmula molecular: $\text{C}_{30}\text{H}_{50}\text{O}$
- Massa molar: 426 g mol^{-1}
- IV (cm^{-1}): 3440, 2930, 2850, 1455, 1380, 1100, 1000
- RMN de ^1H (400 MHz; CDCl_3): Figura 3.55, p.129
- RMN de ^{13}C (100 MHz; CDCl_3): Tabela 3.20, p.128
- EM (EI), m/z (%): 218 (100), 203 (40), 189 (21), 190 (19), 219 (17),

28-Hidroxi-3-oxo-friedelano (canofilol, 13)

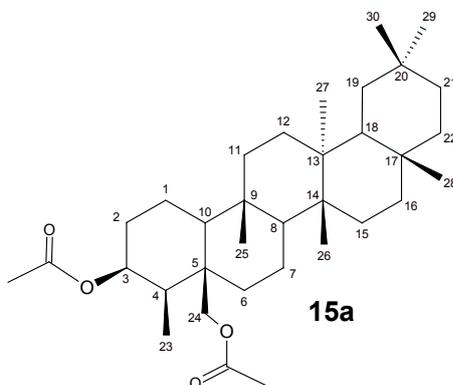
- Aspecto: Sólido branco e amorfo
- Ponto de fusão: 271,6 a 275,9 °C (metanol)
- Solubilidade: CHCl₃
- Fórmula molecular: C₃₀H₅₀O₂
- Massa molar: 442 g mol⁻¹
- IV (cm⁻¹): 3550, 3400, 3220, 2860, 2930, 1710, 1470, 1460, 1440, 1390, 1365, 1225, 1125, 1055
- RMN de ¹H (400 MHz; CDCl₃): Tabela 3.21, p.133
- RMN de ¹³C (100 MHz; CDCl₃): Tabela 3.21, p.133

3β,16β-Di-hidroxifriedelano (pachysandiol B, 14)

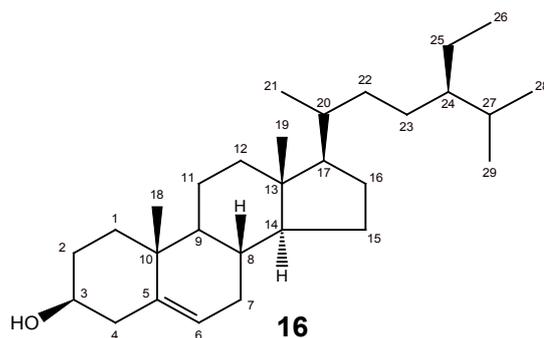
- Aspecto: Sólido branco e amorfo
- Ponto de fusão: 258,3–261,3 °C (CHCl₃/MeOH)
- Solubilidade: CHCl₃
- Fórmula molecular: C₃₀H₅₂O₂
- Massa molar: 444 g mol⁻¹
- IV (cm⁻¹): 3435, 2924 2852, 1680 (fraca), 1459, 1386, 1090, 1030
- RMN de ¹H (400 MHz; CDCl₃): Tabela 3.24, p.148
- RMN de ¹³C (100 MHz; CDCl₃): Tabela 3.24, p.148

3β,24-Di-hidroxifriedelano (15)

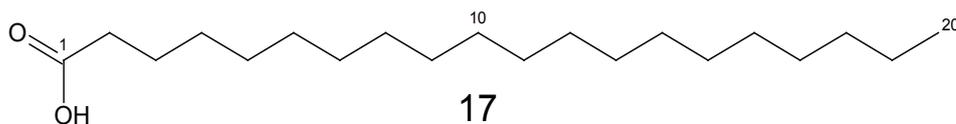
- Aspecto:: Sólido branco amorfo
- Solubilidade: CHCl₃
- Ponto de fusão: 272,3-273,3 °C
- Fórmula molecular: C₃₀H₅₂O₂
- Massa molar: 444 g mol⁻¹
- IV (cm⁻¹): 3230, 2940, 2870, 1470, 1450, 1380, 1036, 750
- RMN de ¹H (400 MHz; CDCl₃): Tabela 3.26, p.157
- RMN de ¹³C (100 MHz; CDCl₃): Tabela 3.25, p.156

3β,24-Diacetoxifriedelano(15a)

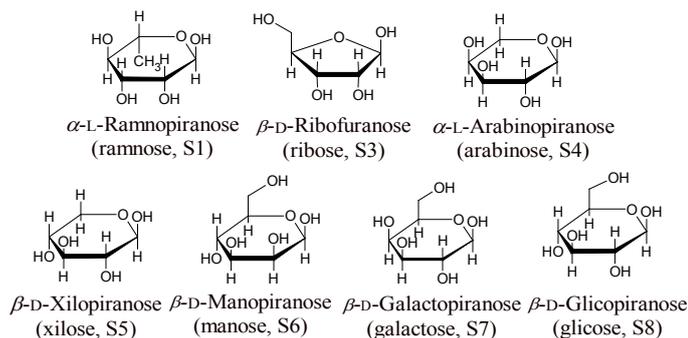
- Aspecto:: Graxa branca acinzentada
- Solubilidade: hexano e CHCl₃
- Fórmula molecular: C₃₀H₅₆O₄
- Massa molar: 528 g mol⁻¹
- IV (cm⁻¹): Valores calculados: 2970, 1724, 1445, 1365, 1295, 1210, 1165, 1102, 920
- RMN de ¹H (400 MHz; CDCl₃): Tabela 3.26, p.157
- RMN de ¹³C (100 MHz; CDCl₃): Tabela 3.25, p.156
-

3 β -Sitosterol (16)

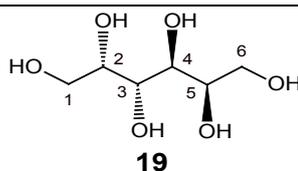
- Aspecto: Sólido branco amorfo
- Ponto de fusão: 132,3-134,3 °C (CHCl₃)
- Solubilidade: CHCl₃
- Fórmula molecular: C₂₉H₄₈O
- Massa molar: 412 g mol⁻¹
- IV (cm⁻¹): 3350, 2960, 2840, 1470, 1380, 1050
- RMN de ¹H (400 MHz; CDCl₃): Figura 3.85, p.163
- RMN de ¹³C (100 MHz; CDCl₃): Tabela 3.27, p.162
- EM, m/z (%): 55(100); 145(23); 133(23); 159(22); 135(21); 197(20); 312(15); 195(14); 143(11); 255(11); 134(5); 390(2); 309(2); 357(2); 399(1); 396 (1); 414(1).

Ácido graxo eicosanóico (17)

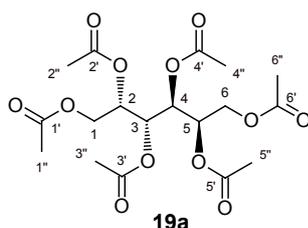
- Aspecto: Sólido branco céreo
- Ponto de fusão: 70 - 74 °C
- Solubilidade: CHCl₃
- Fórmula molecular: C₂₀H₄₀O₂
- Massa molar: 312 g mol⁻¹
- IV (cm⁻¹): Valores calculados: 3060, 2940, 2870, 1690, 1460, 1420, 930
- RMN de ¹H (400 MHz; CDCl₃): Figura 3.88, p.167
- RMN de ¹³C (100 MHz; CDCl₃): Tabela 3.28, p.166

Mistura de monossacarídeos (18)

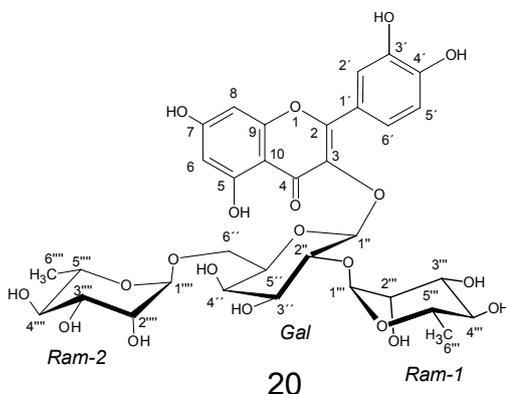
- **Aspecto:** Resina marrom-escuro (extrato metanólico de folhas)
- **Solubilidade:** Metanol-água (1:1), Moderadamente em EtOH
- **Fórmula molecular:** C₆H₁₂O₆ (Hexoses), C₆H₁₂O₅ (ramnose), C₆H₁₀O₅ (pentoses)
- **Massas moleculares:** 180, 164 e 150 g mol⁻¹, respectivamente (antes da derivatização).
- **CGAR dos acetatos de alditóis:** Coluna capilar BP10 (cianopropil fenil dimetil siloxano 14%, 30 m x 0,25 mm x 0,25 μm), divisão de fluxo de 1:80 (split), pressão de 15 *psi* (H₂) e temperatura programada inicial de 200 °C, seguindo a 5 °C/min até a temperatura final de 250 °C em 10 minutos em um CG Varian CP-3800.
- **TR, (minutos):** Ramnose (2,69), ribose (2,90), arabinose (2,98), xilose (3,40), manose (5,49), galactose (5,90) e glicose (6,01)
- **EM (IE), m/z (%):** Acetatos de alditóis de hexoses: 115 (100), 139(60), 127(45), 187(45), 289(30), 259(14), 361(3), 375(3), 434(1); ramnose: 115 (100), 157 (55), 184 (25), 142 (25), 213 (5), 230 (4), 273 (3); pentoses: 115 (100), 103 (60), 85 (60), 145 (53), 127(45), 187 (32), 217(32), 289 (5).

Galactitol (19)

- **Aspecto:** Sólido branco cristalino
- **Ponto de fusão:** 185,8-188,1 °C (metanol)
- **Solubilidade:** Moderadamente em metanol e etanol. Solúvel em água.
- **Fórmula molecular:** C₆H₁₄O₆
- **Massa molar:** 182 g mol⁻¹
- **CGAR do acetato de alditol:** Coluna capilar BP10 (cianopropil fenil dimetil siloxano 14%, 30 m x 0,25 mm x 0,25 μm), divisão de fluxo de 1:80 (split), pressão de 12 *psi* (H₂) e temperatura programada inicial de 200 °C, seguindo a 5 °C/min até a temperatura final de 250 °C em 10 minutos em um CG Varian CP-3800. (Tr = 6,2 minutos).
- **IV (cm⁻¹):** 3420-3200, 1102, 1077, 1046, 1028
- **RMN de ¹H (400 MHz; CDCl₃):** Tabela 3.31, p.175
- **RMN de ¹³C (100 MHz; CDCl₃):** Tabela 3.30, p.175

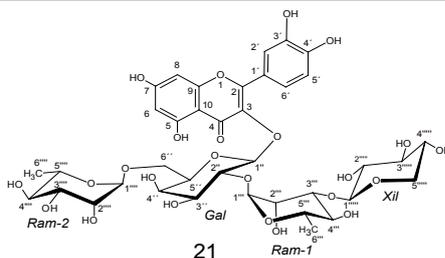
Hexa-acetato de galactitol (19a)

- Aspecto: Sólido branco acizentado
- Ponto de fusão: 168,0-171,5 °C (AcOEt)
- Solubilidade: CHCl₃
- Fórmula molecular: C₁₈H₂₆O₁₂
- Massa molar: 434
- CGAR: Condições: Idem **19** (Tr = 6,24 minutos)
- IV (cm⁻¹): 3459, 2969 e 2955 (fracas), 1747, 1376, 1247, 1227, 1084, 1053, 963, 608
- RMN de ¹H (200 MHz; CDCl₃): Tabela 3.31, p.175
- RMN de ¹³C (50 MHz; CDCl₃): Tabela 3.30, p.175
- EM, m/z (%): 115 (100), 85 (46), 139(52), 127(42), 187(43), 145(33), 289(25), 259(16), 361(6), 371(5), 434(2).

3-O-[[α-L-ramnopiranosila(1→6)][α-L-ramnopiranosila(1→2)]]-β-D-galactopiranosídeo de quercetina (20)

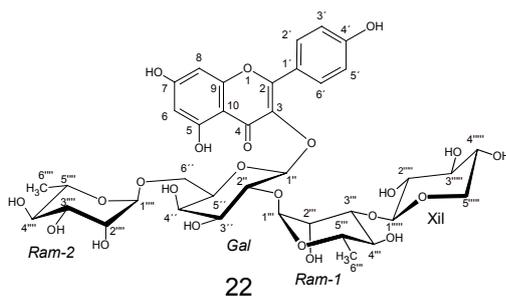
- Aspecto: Pó amorfo amarelado
- Ponto de fusão: Degradou a partir de 190,4 °C
- Solubilidade: Metanol
- Fórmula molecular: C₃₃H₄₀O₂₀
- Massa molar: 756 g mol⁻¹
- UV (λ_{max}, nm): 355 e 256
- IV (cm⁻¹): 3353, 2980 e 2930 (fracas), 1658, 1607, 1355, 1200, 1050, 810
- RMN de ¹H (400 MHz; CDCl₃): Tabela 3.35, p.191
- RMN de ¹³C (100 MHz; CDCl₃): Tabela 3.34, p.190
- IES-EM⁽¹⁾ negativo, m/z (%): 755 (91) [M-H]⁻, 756 (20) [M]^{-•}, 609 (5) [M-H-146], 462 (3) [M-2H-146-146] (modo scan).

3-O-[[α -L-ramnopiranosil(1→6)]-O-[β -D-xilopiranosil(1→3)-O- α -L-ramnopiranosil(1→2)]]- β -D-galactopiranosídeo de quercetina (21)



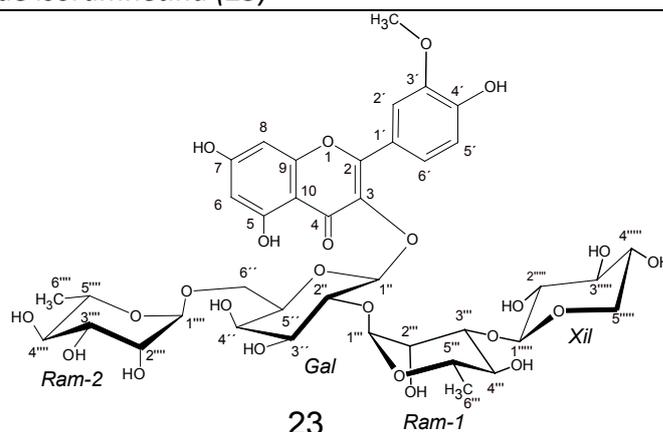
- Aspecto: Pó amorfo amarelado
- Ponto de fusão: Degradou a partir de 201,6 °C
- Solubilidade: Metanol
- Fórmula molecular: $C_{38}H_{48}O_{24}$
- Massa molar: 888 g mol⁻¹
- UV (λ_{max} , nm): 356 e 257
- IV (cm⁻¹): 3360, 2988 e 2935, 1657, 1605, 1357, 1049, 812
- RMN de ¹H (400 MHz; CDCl₃): Tabela 3.38, p.207
- RMN de ¹³C (100 MHz; CDCl₃): Tabela 3.37, p.206
- IES-EM⁽²⁾ negativo, *m/z* (%): 888 (100) [M]^{-•}, 887 (40) [M-H]⁻, 755 (20) [M-H-132]⁻, 609 (3) [M-H-132-146]⁻, 463 (4) [M-H-132-146-146]⁻, 301 (100) [aglicona-H]⁻
- IES-EM⁽²⁾ positivo, *m/z* (%): 911 (5) [M+Na]⁺, 779 (0,3) [M-132+Na]⁺, 765 (1) [M-146+Na]⁺, 633 (2) [M-132-146+Na]⁺, 609 (100) [M-302+Na]⁺, 477 (6) [M-302-132+Na]⁺, 463 (9) [M-302-146+Na]⁺, 331 (7) [M-302-132-146+Na]⁺, 301 (3) [M-302-146-162+Na]⁺

3-O-[[α -L-ramnopiranosil(1→6)]-O-[β -D-xilopiranosil(1→3)-O- α -L-ramnopiranosil(1→2)]]- β -D-galactopiranosídeo de canferol (22)



- Aspecto: Pó amorfo amarelado
- Ponto de fusão: Degradou a partir de 195,4 °C
- Solubilidade: Metanol
- Fórmula molecular: $C_{38}H_{48}O_{23}$
- Massa molar: 872 g mol⁻¹
- UV (λ_{max} , nm): 350 e 268
- IV (cm⁻¹): 3360, 2985 e 2935, 1655, 1605, 1355, 1040, 806
- RMN de ¹H (400 MHz; CDCl₃): Tabela 3.42, p.226
- RMN de ¹³C (100 MHz; CDCl₃): Tabela 3.41, p.225
- IES-EM⁽²⁾ negativo, *m/z* (%): 871 (100) [M-H]⁻, 739 (21) [M-H-132]⁻, 725 (3) [M-H-146]⁻, 594 (3) [M-132-146]^{-•}, 286 (3) [aglicona]^{-•}

3-O-[[α -L-ramnopiranosil(1 \rightarrow 6)]-O-[β -D-xilopiranosil(1 \rightarrow 3)-O- α -L-ramnopiranosil-(1 \rightarrow 2)]]- β -D-galactopiranosídeo de isoramnetina (**23**)



- **Aspecto:** Pó amorfo amarelado
- **Ponto de fusão:** Degradou a partir de 192,7 °C
- **Solubilidade:** Metanol
- **Fórmula molecular:** C₃₉H₅₀O₂₄
- **Massa molar:** 902 g mol⁻¹
- **UV (λ_{\max} , nm):** 359 e 259
- **IV (cm⁻¹):** 3330, 2988 e 2935, 1657, 1605, 1357, 1049, 981, 812
- **RMN de ¹H (400 MHz; CDCl₃):** Tabela 3.45, p.243
- **RMN de ¹³C (100 MHz; CDCl₃):** Tabela 3.44, p.242
- **IES-EM⁽²⁻³⁾ negativo, m/z (%):** 902 (77) [M][•], 901 (48) [M-H]⁻, 769 (19) [M-H-132]⁻, 623 (3) [M-H-132-146]⁻, 476 (14) [M-H-132-146-146]⁻, 315 (100) [aglicona-H]⁻
- **IES-EM⁽²⁾ positivo, m/z (%):** 925 (18) [M+Na]⁺, 779 (1) [M-132+Na]⁺, 647 (1) [M-132-146+Na]⁺, 609 (100) [M-316+Na]⁺, 477 (0,5) [M-316-132+Na]⁺, 463 (0,2) [M-316-146+Na]⁺, 331 (1,8) [M-316-132-146+Na]⁺, 301 (0,4) [M-316-146-162+Na]⁺

NEPLAM – DQ-ICEX - UFMG

5

Ensaio Biológicos

Oliveira DM,

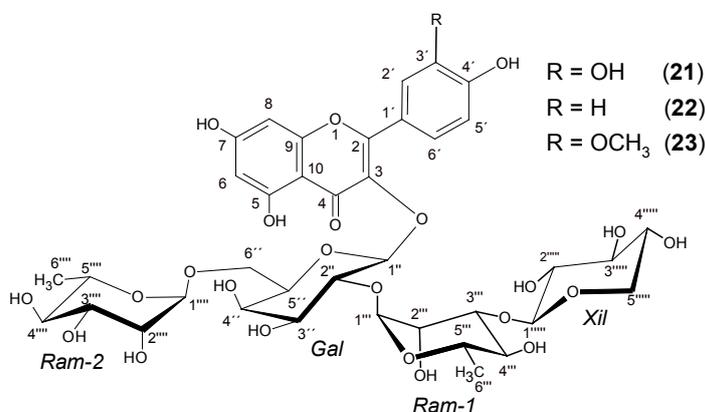
2012

1. ENSAIO DE AÇÃO ANALGÉSICA EM COBAIAS

Os ensaios de atividade analgésica foram realizados no Laboratório de Fisiologia da Universidade Federal de Alfenas – UNIFAL, Alfenas, MG, Departamento de Ciências Biomédicas. Os trabalhos foram executados por Cláudia Quintino da Rocha e coordenados pelo Professor Alexandre Giusti-Paiva (UNIFAL).

Para a realização dos ensaios de ação analgésica¹⁷⁴ a solução aquosa do extrato metanólico FOMMA (200mg/kg), obtido de folhas de *M. acanthophylla* (*Celastraceae*), foi administrada por via oral (v.o.) em dois grupos de cobaias (n=6). A um grupo de controle foi administrado o fármaco morfina pela via peritonal (7,5mg/kg, i.p.).

O extrato FOMMA foi caracterizado como rico em glicosídeos flavônicos, tais como: 3-*O*-{[α -L-ramnopiranosil(1→6)][β -D-xilopiranosil(1→3)- α -L-ramnopiranosil(1→2)]}- β -D-galactopiranosídeo de quercetina (**21**) e 3-*O*-{[α -L-ramnopiranosil(1→6)][α -D-xilopiranosil(1→3)- α -L-ramnopiranosil(1→2)]}- β -D-galactopiranosídeo de canferol (**22**) e 3-*O*-{[α -L-ramnopiranosil(1→6)]-*O*-[β -D-xilopiranosil(1→3)-*O*- α -L-ramnopiranosil(1→2)]}- β -D-galactopiranosídeo de isoramnetina (**23**).



Gal = β -D-galactopiranosil, Ram = α -L-ramnopiranosil, e Xil = β -D-xilopiranosil.

Foi instituído o tempo de 60 minutos, após o tratamento com volumes iguais de FOMMA aquoso ou de água destilada (controle negativo), para início dos testes na placa quente (tempo zero). O teste de placa quente consistiu em colocar as cobaias sobre uma placa de alumínio aquecida ($55 \pm 0,5$ °C) e observar a reação das cobaias ao calor. Para isso, foi medido, com um cronômetro digital, o tempo de latência (s) – o tempo gasto por cada animal para retirar uma pata traseira da placa e levá-la à boca. As medidas foram repetidas durante os períodos de zero, 20 e 60 minutos. Com o propósito de evitar danos às patas dos animais foi estabelecido um tempo de

corde de 20 segundos dentro dos períodos de testes. A morfina foi administrada 45 minutos antes do tempo zero.

Resultados e discussão

A solução aquosa do extrato FOMMA (200 mg kg^{-1}) obtido das folhas de *M. acanthophylla* apresentou significativa atividade analgésica em camundongos (Figura 4.1). Os tempos médios de latência foram de 1,12, 2,30 e 4,28 segundos para as medições realizadas em 0, 20 e 60 minutos, respectivamente. O extrato FOMMA mostrou um potencial analgésico crescente durante as medições (Tabela 5.1), atingindo 21,4 % após 60 minutos do tratamento das cobaias, podendo alcançar melhores resultados em tempos maiores ou com doses mais concentradas. Os resultados indicam que os constituintes de FOMMA, principalmente os compostos antioxidantes como os flavonoides **21**, **22** e **23**, devem ser estudados mais detidamente, pela realização de outros ensaios, quanto as suas propriedades analgésicas.

Tabela 5.1: Potencial analgésico de FOMMA (%)*

Tratamento	Dose (mg/kg)	0 min	21 min	60 min
FOMMA(aq.)	200	5,6	11,5	21,4
Morfina	7,5	1,6	35,1	90,1

(*) $p < 0.01$. Os valores comparados com o controle negativo (água destilada)

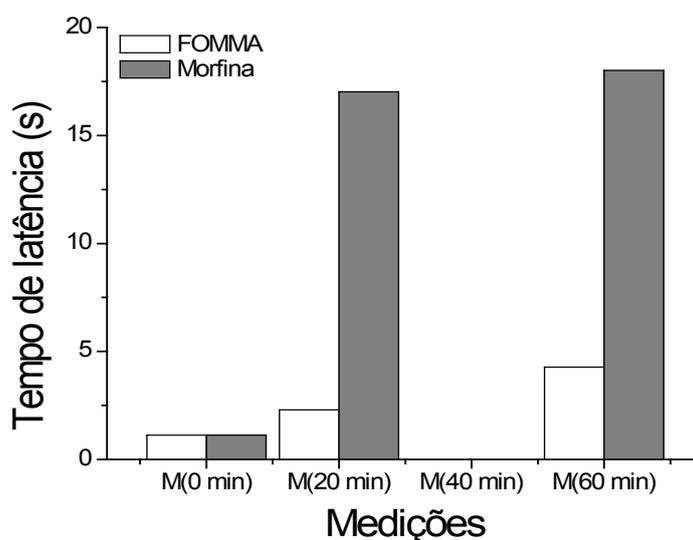


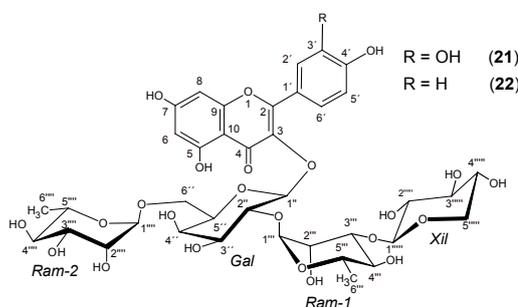
Figura 5.1: Tempos de latência apresentados nas medições M1 (0 min), M2 (20 min) e M3 (60 min) durante teste de analgesia utilizando a solução aquosa do extrato FOMMA aplicado em cobaias (200 mg kg^{-1} , v.o.).

2. CAPACIDADE ANTIOXIDANTE DOS COMPOSTOS **21** e **22**

As avaliações do potencial antioxidante dos constituintes de folhas de *M. acanthophylla*, foram realizadas mediante ensaios de captura de radicais livres em solução, utilizando um espectrofotômetro UV/VIS, HITACHI U-2010, pertencente ao Laboratório de Espectroscopia UV do Departamento de Química da UFMG. Foram testadas as soluções (metanol) dos seguintes constituintes isolados do extrato hidrometanólico (FAMMA) de folhas de *M. acanthophylla*:

(21) 3-O-[[α -L-ramnopiranosil(1 \rightarrow 6)]] β -D-xilopiranosil(1 \rightarrow 3)- α -L-ramnopiranosil(1 \rightarrow 2)]- β -D-galactopiranosídeo de quercetina.

(22) 3-O-[[α -L-ramnopiranosil(1 \rightarrow 6)]] β -D-xilopiranosil(1 \rightarrow 3)- α -L-ramnopiranosil(1 \rightarrow 2)]- β -D-galactopiranosídeo de canferol.



Glicosídeos flavônicos isolados do extrato FAMMA de *M. acanthophylla*.

Para estimar a atividade antioxidante dos constituintes **21** e **22**, foram feitos ensaios espectrométricos para medir a capacidade de captura de radicais 2,2-difenil-1-picril-hidrazila DPPH (0,002%) quando postos a reagir com os flavonoides **21** e **22** diluídos em metanol (1, 10 e 100 μ g/mL). O grau de descoloração da solução resultante da mistura de DPPH com uma determinada quantidade de amostra indica a eficiência na captura desses radicais dessa amostra. As descolorações foram avaliadas através do registro das absorvâncias das soluções de DPPH e das soluções das amostras 30 minutos depois da adição de DPPH. Foi feita também a leitura da absorvância do solvente utilizado (metanol). As medidas foram obtidas com o espectrofotômetro UV/VIS ajustado no comprimento de onda (λ) em 516 nm. Os valores de absorvância registrados foram relacionados com as concentrações das espécies reagentes e dos produtos, mediante a aplicação da lei de Lambert-Beer ($A_0 = -0,02383$; $A_1=28,8$)¹⁷⁵. O percentual de inibição de radicais DPPH foi determinado pela comparação indireta entre a concentração destes nas solução de referência (controle positivo) e nas soluções das amostras, através da seguinte expressão:

$$\% \text{ Redução de DPPH} = 100 \left\{ \left[1 - \frac{(A_x^{30} - A_b^0)}{A_r^0} \right] \right\}^{175-176}$$

Onde A_r^0 foi o valor da absorvância de referência medida na solução de DPPH em metanol (13-15 $\mu\text{g/mL}$), A_x^{30} foi o valor da absorvância, lida 30 minutos após da mistura de 0,75 mL de solução da amostra (1, 10 ou 100 $\mu\text{g/mL}$) mais 1,5 mL da solução estoque de DPPH (20 $\mu\text{g/mL}$) e A_b^0 foi o valor da absorvância do branco, constituído de solução metanólica da amostra pura nas três concentrações de ensaio. Para compor uma base de comparação, utilizando as mesmas condições de análises aplicadas às amostras de **21** e **22**, foram avaliadas as capacidades de captura de DPPH por de soluções de butil-hidróxi-tolueno (BHT).

Resultados e discussão

Os resultados mostraram que os constituintes **21** e **22** em solução na concentração de 100 $\mu\text{g/mL}$ apresentaram forte poder antioxidante, representado pela redução máxima de aproximadamente $64 \pm 2,8\%$ e $94 \pm 1,2\%$ de radicais livres (DPPH), respectivamente. Nessa concentração, o composto **21** foi mais eficaz na redução de radicais DPPH que o BHT ($83 \pm 1,5\%$). Nas concentrações de 1 e 10 $\mu\text{g/mL}$, tanto **21** ($35 \pm 1,1\%$ e $52 \pm 1,2\%$) como **22** ($36 \pm 1,1\%$ e $37 \pm 2\%$) apresentam percentuais de redução de DPPH superiores aos do BHT ($12 \pm 3,6\%$ e $22 \pm 1,9\%$), respectivamente.

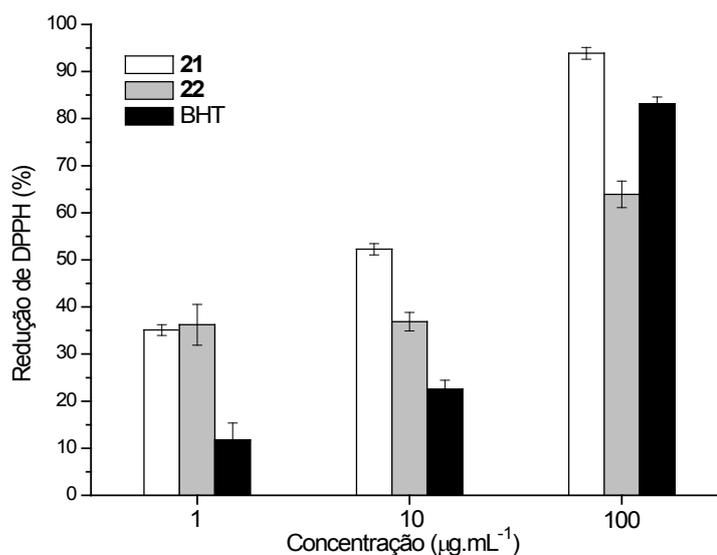
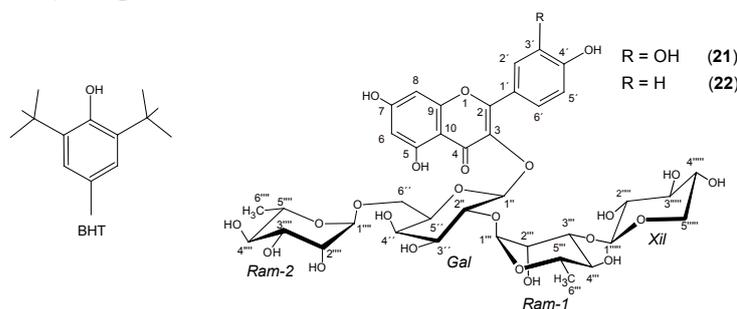


Figura 5.2: Efeitos de captura de radicais livres de DPPH por **21** e **22** em metanol (controle: BHT).

A atividade antioxidante apresentada pelos compostos **21** e **22** (Figura 5.2) foi atribuída à presença de grupos orto-dihidroxi, carbonila α,β -insaturada e grupos β -hidroxicetonas conjugados, os quais são responsáveis por propriedades quelantes que permitem a estabilização dos radicais livres e bloqueio dos processos oxidativos resultantes. A presença de dois grupos hidroxilas no anel B do flavonoide **21** pode justificar a sua melhor atividade antioxidante. Considerando os relatos recentes, os flavonoides antioxidantes também podem atuar no controle e inibição de expressões gênicas pró-inflamatórias *in vitro* e *in vivo*⁵⁹. Os relatos científicos informam que as moléculas de flavonoides, em breve, servirão como base para o desenvolvimento de uma nova classe de agentes anti-inflamatórios¹⁷⁷. A presença de flavonoides hidrossolúveis nas folhas da *M. acanthophylla*, apoiada nos relatos etnofarmacológicos²⁹, efetivamente, permite concluir que a esses constituintes antioxidantes legitima o uso popular do infuso de suas folhas contra úlceras, gastrites e outros distúrbios gastrintestinais. Não obstante a constatação da eficiência farmacológica, atualmente, a demanda potencial por antioxidantes naturais para substituir os atuais sintéticos, representada principalmente pela indústria alimentícia, consiste num incentivo adicional ao isolamento, pesquisa e melhoramento das propriedades de compostos antioxidantes como os flavonoides de origem natural.

3. ENSAIOS BACTERIOLÓGICOS DO EXTRATO HIDROMETANÓLICO DE FOLHAS DE *M. acanthophylla*

Ensaio bacteriológico utilizando o extrato metanólico de folhas de *M. acanthophylla*, Celastraceae (FAMMA) realizados no Laboratório de Biotecnologia do Departamento de Química da UFMG, sob a supervisão da Professora. Dra. Jacqueline Aparecida Takahashi. As amostras foram avaliadas em duplicata, empregando-se o método de difusão em placa.¹⁷⁸ Nesse método, discos de papéis estéreis, de 6 mm de diâmetro, foram impregnados com 1000 μL de solução de 2 mg da amostra em 10 mL de solvente adequado (água, etanol ou DMSO), sendo cerca de 200 μg de amostra/disco. Os ensaios envolveram oito espécies bacterianas, sendo: *Citrobacter freundii*, *Proteus mirabilis*, *Salmonella typhimurium*, *Shigella sonnei* e *Escherichia coli* pertencentes aos tipos Gram-negativos, bem como *Bacillus cereus*, *Listeria monocytogenes* e *Staphylococcus aureus* pertencentes aos tipos Gram-positivos. No ensaio de controle foram utilizados discos impregnados com antibióticos ativos para os micro-organismos testados: cloranfenicol (30 μg /disco) e ampicilina (10 μg /disco).

Para estabelecer a atividade antibacteriana do extrato FAMMA, suspensões salinas com micro-organismos foram preparadas a partir da transferência de uma pequena quantidade de cada cultura bacteriana para um tubo contendo 2 mL de caldo nutritivo BHI (infusão de cérebro e coração). Um tubo, contendo uma espécie de bactéria dispersa no meio de manutenção, foi então incubado em estufa, a 37 °C, durante 18 horas e uma alíquota de 0,5 mL transferida para um outro tubo contendo 4,5 mL de solução salina (diluição de 1:10). Para os ensaios de atividade, as placas foram preparadas adicionando-se 10 mL do meio sólido e, após solidificação desse, 5 mL do meio semi-sólido contendo os respectivos inóculos de bactérias (0,2 mL da suspensão salina do micro-organismo). Os discos foram depositados nas placas de Petri sobre os meios de cultura, previamente inoculados com o micro-organismo, e deixou-se difundir por 4 horas à temperatura ambiente. As placas foram, então incubadas à temperatura de 37 °C, por 24 horas. O grau de resistência ou sensibilidade das bactérias frente às amostras testadas foi observado pela presença ou ausência de halos de inibição após 24 horas de incubação. A leitura dos halos de inibição foi feita medindo-se o diâmetro dos mesmos e os resultados expressos em centímetros. O cloranfenicol e a ampicilina foram utilizados como controle na concentração de 30 µg e 10 µg, por discos, respectivamente.

Resultados e discussão

No ensaio bacteriológico foi medido o grau de resistência ou sensibilidade das bactérias, frente às amostras de extrato FAMMA testadas, sendo observada a presença ou ausência de halos de inibição após 24 horas de incubação. A leitura do grau de inibição foi feita através da medida do diâmetro dos halos, comparativamente aos halos das substâncias controles, que resultaram em diâmetros médios de 2,66 cm para o cloranfenicol e 2,70 cm para a ampicilina.

Tabela 5.2: Atividade antimicrobiana *in vitro* do extrato metanólico de folhas de *M. acanthophylla*, (FAMMA) frente a bactérias Gram-negativas e Gram-positivas

Micro-organismo	Resultado
<i>Citrobacter freundii</i>	(-) inativo
<i>Proteus mirabilis</i>	(-) inativo
<i>Salmonella typhimurium</i>	(-) inativo
<i>Shigella sonnei</i>	(-) inativo
<i>Escherichia coli</i>	(-) inativo
<i>Bacillus cereus</i>	(-) inativo
<i>Listeria monocytogenes</i>	(-) inativo
<i>Staphylococcus aureus</i>	(-) inativo

Os resultados obtidos (Tabela 5.2) indicaram a completa inatividade *in vitro* apresentada pelo extrato FAMMA frente às bactérias *Citrobacter freundii*, *Proteus mirabilis*, *Salmonella typhimurium*, *Shigella sonnei* e *Escherichia coli* pertencentes aos tipos Gram-negativos, e às bactérias *Bacillus cereus*, *Listeria monocytogenes* e *Staphylococcus aureus* pertencentes aos tipos Gram-positivos. Como base de comparação foram utilizadas as inibições causadas pelos antibióticos clorafenicol (halos médios de 2,66 cm) ou ampicilina (halos médios de 2,70 cm) nos respectivos micro-organismos.

4. ENSAIO DE TOXICIDADE DE EXTRATOS PARA CÉLULAS TUMORAIS HUMANAS¹⁷⁹

Os ensaios biológicos para monitoramento do fracionamento dos extratos de folhas de *M. acanthophylla* (FHEMA, FAEMA, FOMMA e SEMA) foram realizados pela equipe técnica do Laboratório de Química e Produtos Naturais - LQPN, do Instituto Renê Rachou (Belo Horizonte), coordenado pelo Dr. Carlos Zani. Para isso, as amostras testadas foram colocadas em placa de 96 poços, em quantidade suficiente para ensaio em triplicata e na concentração final de 20 µg/mL. Os técnicos do LQPN foram responsáveis pela diluição das amostras em solução de DMSO 1% em água e transferência do volume correto para a placa de ensaio, emitindo um laudo ao final do teste.

Foram utilizadas quatro amostras de extratos de folhas de *M. acanthophylla* (FHEMA, FAEMA, FOMMA e SEMA), para o ensaio de toxicidade para células tumorais humanas. Linhagens de células tumorais UACC-62 (melanoma), TK-10 (tumor renal) e MCF-7 (tumor de mama) foram utilizadas para avaliação da proliferação celular; para a contagem colorimétrica foi utilizado o corante Sulfarrodamina B (SRB) na concentração de 0,4% em ácido acético aquoso a 1%. Os controles positivos utilizados foram etoposídeo (16 µg/mL) e colchicina (8 µg/mL). Para avaliar o efeito dos extratos de folhas de *M. acanthophylla* (FHEMA, FAEMA, FOMMA e SEMA) sobre a proliferação celular, foram utilizadas as linhagens de células tumorais UACC-62 (melanoma), TK-10 (tumor renal) e MCF-7 (tumor de mama). De acordo com dados do NCI (sigla em inglês do instituto nacional de pesquisas do câncer dos EUA), estas linhagens seriam capazes de detectar 95% dos extratos que contiverem substâncias antitumorais. O método utilizado para avaliação da atividade antineoplásica (AA) está registrado no Sistema da qualidade do LQPN-Fiocruz. Descrevendo de forma breve, o protocolo foi assim executado: As suspensões celulares foram diluídas de modo que em cada poço de uma placa de 96 poços fossem colocadas

10.000 células das linhagens UACC-62 e MCF-7 e 15.000 células da linhagem TK-10. Os inóculos foram incubados por 24 h a 37 °C para estabilização. Em cada poço foi adicionada a solução do extrato de modo a se atingir a concentração final de 20 µg/mL. As células foram incubadas na presença dos extratos por 48 h em atmosfera de CO₂ (5%) e 100% de umidade. A multiplicação destas células foi medida pelo método colorimétrico (λ515 nm) empregando a sulfarrodamina B (SRB).

Resultados e discussão

SRB é um corante que se liga aos aminoácidos básicos das proteínas das células e pode ser utilizado para quantificar a proliferação das células tumorais. Portanto, quanto menos células, menor será a concentração de espécies do tipo célula-corante ligado e menor será absorção medida¹⁸⁰. Neste ensaio, resultados de 0 a 100% representam uma atividade denominada atividade citostática (AC). A atividade citostática é aquela exercida por frações que são capazes de inibir a proliferação das células presentes no inóculo inicial em relação ao controle sem droga. As frações que além de inibirem a proliferação celular ainda são capazes de matar as células presentes no inóculo inicial são denominadas citocidas, ou citotóxicas (AX), e apresentam valores de inibição de proliferação de 101 a 200%.

Tabela 5.3: Avaliação in vitro da atividade inibidora de soluções (DMSO, 20 µg.mL⁻¹) de extratos de folhas de *M. acanthophylla* sobre o crescimento (%) das linhagens de células tumorais humanas MCF-7, TK10 e UACC-62

Ensaio biológico	FHEMA	FAEMA	FOMMA	SEMA	CCH	ETP
Toxicidade para células MCF-7	8,0	7,0	8,0	2,0	67	74
CV%	3	1	2	15	4	5
Toxicidade para células TK-10	24	15	6	6	87	90
CV%	7	4	1	9	7	13
Toxicidade para células UACC-62	10	8	10	22	77	80
CV%	2	7	5	12	10	16
Atividade ³	AC.	AC	AC	AC	AC	AC

1 – CCH: colchicina (8 µg.mL⁻¹), substância controle de ação citostática (AC).

2 – ETP: etoposídeo (16 µg.mL⁻¹), substância controle de ação citotóxica (AX)

3 - Resultados de 0 a 100% = AC; de 101 a 200% = AX.

4 - Linhagens de células: MCF-7 (tumor de mama); TK-10 (tumor renal); UACC-62 (melanoma)

5 - CV%: coeficiente de variação percentual.

As avaliações dos efeitos dos extratos de folhas de *M. acanthophylla* (FHEMA, FAEMA, FOMMA e SEMA) sobre a proliferação de células tumorais humanas UACC-62 (melanoma), TK-10 (tumor renal) e MCF-7 (tumor de mama), resultaram apenas em atividades citostáticas moderadas ($AC \leq 100\%$). Não houve qualquer resultado de inibição, provocado por extrato, que pudesse ser considerado como de atividade citotóxica ($101 \leq AX \leq 200\%$), esses resultados estão condensados na Tabela 5.3 e na Figura 5.3. Os estudos fitoquímicos mostraram que os extratos testados são constituídos, basicamente, de substâncias do tipo de triterpenos pentacíclicos, carboidratos e flavonoides glicosilados.

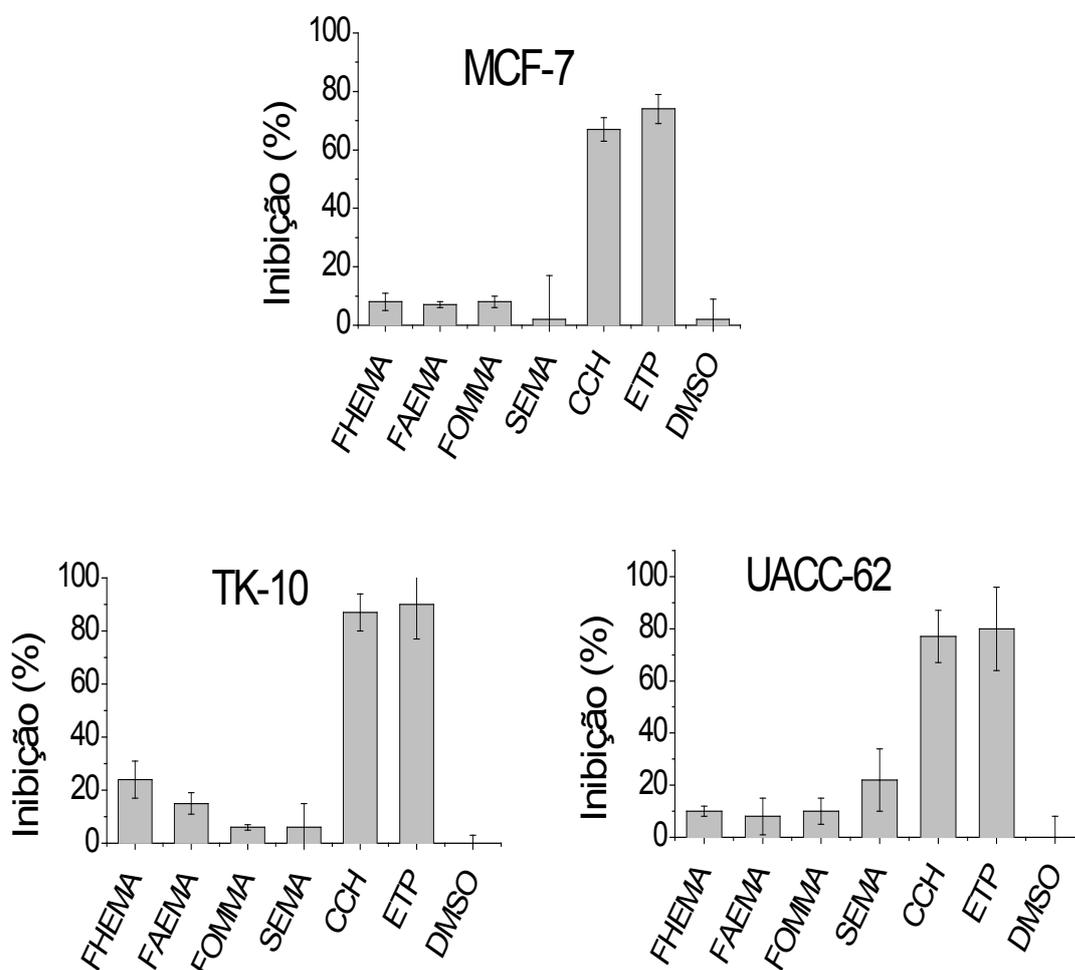


Figura 5.3: Atividade inibidora de soluções dos extratos de folhas de *Maytenus acanthophylla* (DMSO, $20 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) sobre o crescimento (%) de três linhagens de células tumorais humanas: MCF-7, TK10 e UACC-62

5. ENSAIOS PARA AVALIAÇÃO DE ATIVIDADE LEISHMANICIDA DOS EXTRATOS FHEMA, FAEMA, FOMMA E SEMA.

Os ensaios biológicos para avaliação de atividade leishmanicida dos extratos de folhas de *M. acanthophylla* (FHEMA, FAEMA, FOMMA e SEMA) foram realizados pela equipe técnica do Laboratório de Química e Produtos Naturais LQPN, do Instituto Renê Rachou (Fiocruz, Belo Horizonte), coordenado pelo Dr. Carlos Zani.

Inicialmente, as amostras testadas foram colocadas em placa de 96 poços, conforme procedimento seguido nos testes antitumorais (p. 251). Para a realização dos ensaios foi utilizado um protocolo adaptado no LQPN.^{181, 182} Formas promastigotas de *L. amazonensis*, retiradas de lesão de hamsters, foram cultivadas em meio de Schneider e estocadas em freezer a -70°C . Para transformação em formas amastigotas-axênicas, alíquotas do cultivo foram descongeladas e cultivadas em meio de Schneider, com pH 7,2 e temperatura de 26°C por 7 dias. Após esse período, a cultura foi centrifugada e re-suspendida em um novo meio de Schneider (pH 6,0) e incubada a 32°C durante 9 dias. A câmara de Neubauer (CB) foi utilizada para determinação da concentração das formas amastigotas da suspensão. Deste modo, foram obtidas cerca de 90% dos parasitos na forma amastigota-axênica.

Foram utilizadas quatro amostras dos extratos FHEMA, FAEMA, FOMMA e SEMA para os ensaios de atividade leishmanicida, desenvolvidos em triplicatas, sobre placas de microcultivo de 96 poços. Em cada poço-teste foram adicionados 90 μL de cultura na concentração de 1×10^8 parasitos mL^{-1} e 10 μL de soluções dos diferentes extratos, de forma que a concentração final do extrato no ensaio fosse 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Os meios utilizados como controles foram: a) 100 μL de cultura na 1×10^8 parasitos mL^{-1} ; b) 90 μL de cultura e 10 μL de anfotericina B (AMB), marca Fungison® Bristol-Myers Squibb, na concentração de 0,2 $\mu\text{g mL}^{-1}$; c) 100 μL de meio de cultivo; d) 90 μL de meio de cultivo mais 10 μL de extrato; para a contagem colorimétrica foi utilizado 10 μL de MTT (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazolil)-2,5-difeniltetrazólio). No prosseguimento dos ensaios da atividade leishmanicida das amostras dos extratos, primeiramente foi preparada a suspensão de amastigotas-axênicas, em que a cultura em transformação foi retirada de estufa BOD (*Biochemical Oxygen Demand*) a 32°C , homogeneizada e transferida para tubo cônico de 50 mL esterilizado. O tubo foi centrifugado por 10 minutos a 1000 RPM e 27°C . O sobrenadante foi desprezado e o sedimento suspenso em 10 mL de meio de Schneider (pH 6,0).

A determinação da concentração de amastigotas em CB foi feita em 10 μL da suspensão diluídos em 490 μL de tampão PBS (*Phosphate-Buffered Saline*). Com a lamínula colocada sobre a CB, foi adicionado por capilaridade um volume de aproximadamente 20 μL da diluição obtida e, em seguida, se fez a contagem das amastigotas no quadrante central da CB. Os amastigotas presentes foram contados e multiplicados pelo fator de diluição e por 104 (fator de correção da CB) para determinação da densidade de amastigotas (número amastigotas/mL) na cultura. A suspensão de amastigotas usada no ensaio tinha concentração do inóculo (CI) de 108 amastigotas/mL. Logo depois, se procedeu à homogeneização da suspensão de amastigotas em agitador tipo “vortex” e em seringa, e esta foi distribuída nas placas de teste. Aos poços de controle das placas foram adicionados 10 μL dos controles, AMB e DMSO e aos poços teste 10 μL das amostras (200 $\mu\text{g/mL}$ em água Milli-Q contendo 1% de DMSO). As placas foram seladas com lamina de parafilme e incubadas em estufa BOD a 32 °C, por 72 h. Após este período, 10 μL de MTT a 5 mg/mL foram adicionados a cada poço. Decorridas 4 h de incubação, foram adicionadas 100 μL de SDS (dodecilssulfato de sódio) 10% em isopropanol para interrupção da reação colorimétrica do MTT. Após 30 min à temperatura ambiente foi feita a leitura em espectrofotômetro de ultravioleta em $\lambda = 570 \text{ nm}$.

Resultados e discussão

O MTT é um corante que é reduzido enzimaticamente nas mitocôndrias dos parasitos vivos. A forma reduzida absorve a luz ultravioleta em 570 nm, permitindo a quantificação dos parasitos. A comparação da absorbância das frações com a absorbância do controle permite a expressão do percentual de morte dos parasitos¹⁸¹. Os resultados foram expressos como porcentagem de morte após 72 h de incubação. O cálculo da porcentagem de indivíduos mortos (M%) foi realizado com base na fórmula a seguir, onde: A é a média das densidades ópticas ou absorbâncias, A_{Cn} é a medida de controle e A_{Ex} representa o valor da absorbância do extrato e/ou fração testada.

$$M(\%) = 100 \left[\frac{(A_{Cn} - A_{Ex})}{A_{Cn}} \right]$$

As avaliações dos efeitos dos extratos FHEMA, FAEMA, FOMMA e SEMA sobre a proliferação celular tiveram como resultados atividades de inibição menores do que 80% em todos os testes. Os resultados são apresentados na Tabela 5.4 no gráfico da Figura 5.4.

Tabela 5.4: Avaliação *in vitro* da atividade leishmanicida (M%) de soluções de extratos de folhas de *M. acanthophylla* (DMSO, 20 mg.mL⁻¹), sobre formas amastigotas e axênicas do protozoário causador da leishmaniose

Ensaio biológico	FHEMA	FAEMA	FOMMA	SEMA	AMB ^I	DMSO ^{II}
Leishmanicida (<i>Leishmania amazonensis</i>)	21,5	17,8	17,6	17,9	57	16
CV%	1	1	1	4	3	5
Atividade ^{III}	Inativo	Inativo	Inativo	Inativo	Inativo	Inativo

^I AMB: Anfotericina B (0,2 mg.mL⁻¹), substância controle no teste leishmanicida

^{II} DMSO: dimetilsulfóxido foi utilizado como controle negativo

^{III} São consideradas ativas as substâncias que promoverem inibições de crescimento superiores a 80%.

Os testes para verificação de atividade leishmanicida contra formas amastigotas e axênicas do protozoário causador da leishmaniose, realizados com amostras de quatro extratos de folhas de *M. acanthophylla* apresentaram resultados negativos.

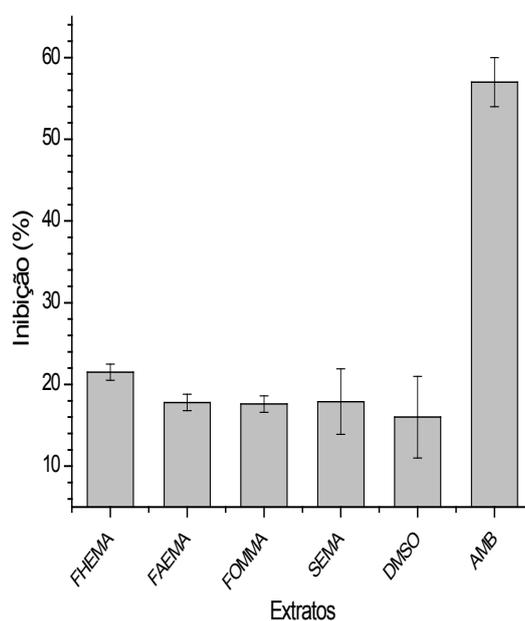


Figura 5.4: Atividade leishmanicida (%) de soluções de extratos de folhas de *M. acanthophylla* (DMSO, 20 µg.mL⁻¹) sobre formas amastigotas (axênicas) do protozoário causador da leishmaniose.

6. ENSAIO PARA ATIVIDADE FUNGICIDA DOS EXTRATOS FHEMA, FAEMA, FOMMA E SEMA

O ensaio para atividade fungicida¹⁸³ dos extratos de folhas de *M. acanthophylla* (FHEMA, FAEMA, FOMMA e SEMA) foi realizado no Laboratório de Micologia do Departamento de Microbiologia/ICB da Universidade Federal de Minas Gerais, sob a supervisão de Dra. Suzana Johann. As amostras foram avaliadas em oito concentrações.

Nos ensaios para atividade fungicida foram envolvidas três espécies de micro-organismos (fungos), sendo: *Candida albicans*, *Candida krusei* e *Candida glabrata*. Foram utilizados como controles o meio RPMI, um meio de cultura usado no crescimento de células e tecidos, desenvolvido no Roswell Park Memorial Institute-RPMI (EUA), e anfotericina B. Para estabelecer a atividade fungicida dos extratos, inicialmente, foi aplicado o método de microdiluição para a determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM), em que as substâncias foram testadas em oito concentrações que variaram de 1000 a 7,8 $\mu\text{g mL}^{-1}$. De cada diluição, alíquotas de 100 μL foram distribuídas em microplacas. Como controle de crescimento e de esterilidade foi usado somente o RPMI, sem adição dos extratos e solvente. Como controle de toxicidade do solvente foi usado o meio de cultura RPMI, juntamente com o solvente. Como controles positivos foram usados o RPMI adicionado de anfotericina B. As concentrações do antifúngico de referência usadas variaram, desta forma, de 0,12 a 62,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Após a montagem das placas, cada orifício teste e controle de crescimento receberam 100 μL do inóculo microbiano. As placas foram incubadas e lidas após 48 horas para as amostras de *Candida spp.*¹⁸³,¹⁸⁴ As CIM's foram consideradas como a menor concentração do produto natural, ou antifúngico, que inibiu totalmente o crescimento do micro-organismo, em relação ao RPMI, após a incubação. Os resultados foram expressos em $\mu\text{g mL}^{-1}$.

Resultados e discussão

No ensaio para estabelecer a atividade fungicida dos extratos de folhas de *M. acanthophylla* (*Celastraceae*) (FHEMA, FAEMA, FOMMA e SEMA) foi medido o grau de resistência ou sensibilidade da *Candida spp.*, frente às amostras testadas, mediante a determinação da CIM. Os resultados da atividade antifúngica para os extratos estão descritos na Tabela 5.5. Apenas o extrato FOMMA apresentou CIM de 250 $\mu\text{g mL}^{-1}$ contra o fungo *C. krusei*, um valor pouco

expressivo para se considerar esse extrato como fungicida, quando se compara o valor de CIM da anfotericina (controle) que foi 500 vezes superior.

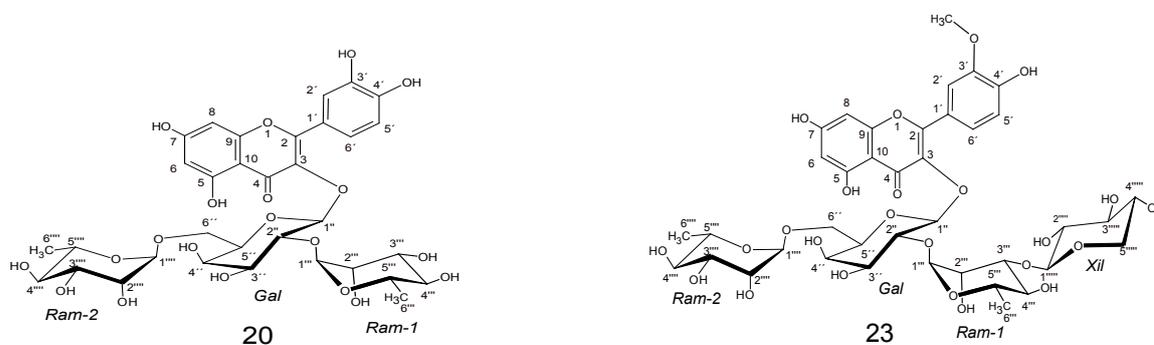
Tabela 5.5: Concentração Inibitória Mínima de extratos de folhas de *M. acanthophylla* ($\mu\text{g mL}^{-1}$) contra espécies de *Candida* *C. albicans*, *C. krusei* e *C. glabrata*

Extratos	<i>C. albicans</i>	<i>C. krusei</i>	<i>C. glabrata</i>
FHEMA	>500	>500	>500
FAEMA	>500	>500	500
FOMMA	>500	250	>500
SEMA	>500	>500	>500
Anfotericina B	1,0	0,5	1,0

($P < 0,05$); o valor >500 indica que na concentração de $500 \mu\text{g mL}^{-1}$ não ocorreu inibição do crescimento da *Candida spp.*, ou seja o extrato não foi ativo.

Os valores das CIM obtidos do teste para atividades fungicida mostraram que as amostras dos extratos de folhas de *M. acanthophylla* (*Celastraceae*) (FHEMA, FAEMA, FOMMA e SEMA) foram inativas frente às três espécies de *Candida* testadas, quando comparados aos valores registrados para o controle positivo (anfotericina B).

7. ENSAIO DA PROLIFERAÇÃO DAS CÉLULAS MONONUCLEARES DO SANGUE PERIFÉRICO HUMANO (*PBMC*)



O ensaio da proliferação das células mononucleares do sangue periférico humano (*PBMC*) para avaliação do potencial citotóxico e imunomodulador¹⁸⁵ dos glicosídeos 3-*O*-{[α -L-ramnopiranosil(1 \rightarrow 6)][α -L-ramnopiranosil(1 \rightarrow 2)]}- β -D-galactopiranosídeo de quercetina (**20**) e 3-*O*-{[α -L-ramnopiranosil(1 \rightarrow 6)][β -D-xilopiranosil(1 \rightarrow 3)- α -L-ramnopiranosil (1 \rightarrow 2)]}- β -D-galactopiranosídeo de isoramnetina (**23**), compostos obtidos do extrato metanólico das folhas de *M. acanthophylla* (*Celastraceae*) [FOMMA], foi realizado no Laboratório do Depto de Fisiologia e Biofísica ICB/UFMG, sob a supervisão da professora Dra. Elaine Maria de Souza Fagundes. As culturas das *PBMC* foram preparadas com base no protocolo descrito por Gazzinelli.¹⁸⁶ As

amostras foram avaliadas em diferentes concentrações, que variaram de 100 a 0,0001 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Brevemente, as *PBMC* foram obtidas de voluntários saudáveis, adultos de ambos os sexos, por centrifugação do sangue venoso heparinizado sobre um recipiente de centrifugação em gradiente de densidade Ficoll/Hypaque. As células mononucleares foram coletadas da interfase após a separação de Ficoll e lavadas três vezes em RPMI-1640. As suspensões celulares foram ajustadas para concentração de $2,0 \times 10^6 \text{ mL}^{-1}$ células e plaqueadas em matrizes de 96 poços (200.000 células por poço). Todas as culturas foram preparadas em meio RPMI-1640, suplementadas com 5% (v/v) esterilizada de soros AB e $2 \mu\text{mol L}^{-1}$ de L-glutamina e solução antibiótica/antimicótica contendo 1000 UI mL^{-1} de penicilina. Aliquotas de 1000 mg mL^{-1} de estreptomicina e 25 mg mL^{-1} de fungisona foram adicionadas ao controle de contaminação por fungos e bactérias (meio completo). Para estimulação dos linfócitos foi utilizada a fitohemaglutinina (PHA) a $2,5 \mu\text{g mL}^{-1}$. Células cultivadas em DMSO (0,01%) e estimuladas com PHA foram utilizadas como controle, bem como *PBMC* não estimuladas (CC).

A viabilidade e a proliferação das células foram determinadas pelo ensaio de MTT¹⁸⁷. Esse ensaio, resumidamente consistiu na incubação por 72 horas de *PBMC* com diferentes concentrações de **20** e **23** (100 até 0,0001 $\mu\text{g mL}^{-1}$) estimulados com $2,5 \mu\text{g mL}^{-1}$ de fitohaemaglutinina (PHA, ou fitohemaglutinina), $20 \mu\text{L}$ de solução MTT (5 mg mL^{-1} , filtrado em RPMI por meio de filtro com poro de $0,2 \mu\text{m}$) foram adicionadas às placas e incubadas a 37°C por 4h. O sobrenadante foi cuidadosamente removido, e $200 \mu\text{L}$ de HCl $0,04 \text{ mol.L}^{-1}$ em isopropanol foi adicionado para dissolver os cristais formados. A absorbância foi medida em $\lambda = 590 \text{ nm}$, com um leitor de microplacas VersaMax (Tunable Microplate Reader, Molecular Device, EUA). Os dados tiveram tratamento idêntico ao dispensado para as células cancerosas.

Resultados e discussão

Este ensaio foi conduzido para estabelecer a influência dos glicosídeos **20** e **23** sobre a proliferação de células mononucleares do sangue periférico humano (*PBMC*) estimuladas com PHA, bem como o potencial citotóxico desta substância. Para avaliação da proliferação/viabilidade celular foi utilizado o ensaio de MTT. Conforme demonstrado na Figura 5.5, os glicosídeos **20** e **23** em concentrações de 100 a 0,001 $\mu\text{g mL}^{-1}$ reduziram significativamente a proliferação *PBMC* estimuladas (proliferação $<70\%$), em relação as cultura controle (DMSO).

O glicosídeo **20** apresenta um efeito do tipo hormese, apresentando uma curva dose-resposta do tipo bifásica. Neste tipo de efeito, alguns xenobióticos (drogas, toxinas etc) têm

efeitos opostos em concentrações altas ou baixas. Esse efeito pode ser observado em concentrações de $0,01 \mu\text{g mL}^{-1}$ e $0,0001 \mu\text{g mL}^{-1}$, onde não se observa o efeito inibitório significativo sobre a proliferação de células mononucleares, induzida por PHA, quando comparado ao controle PHA e ao composto **23**. Entretanto nessa mesma concentração ($0,0001 \mu\text{g mL}^{-1}$) **23** mostrou um efeito inibitório significativo (redução $> 30\%$ das *PBMC*) na proliferação celular, demonstrando forte potencial imunomodulador na proliferação de linfócitos ativados. É importante enfatizar que, em nenhuma das concentrações testadas, foram observados efeitos citotóxicos, uma vez que os dois glicosídeos não apresentaram inibição da viabilidade/proliferação celular que fossem menores que o controle de células (CC) mantido nas mesmas condições.

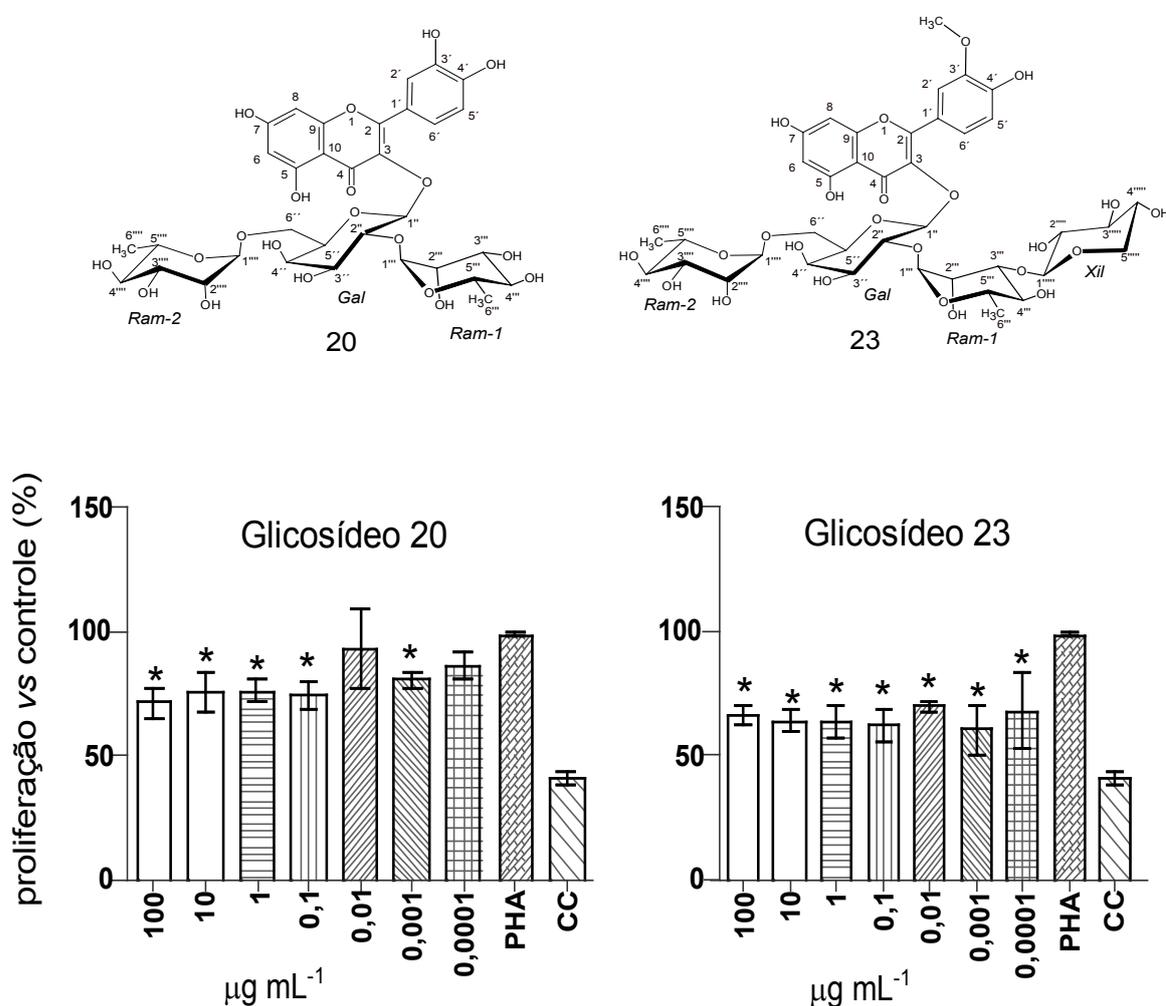


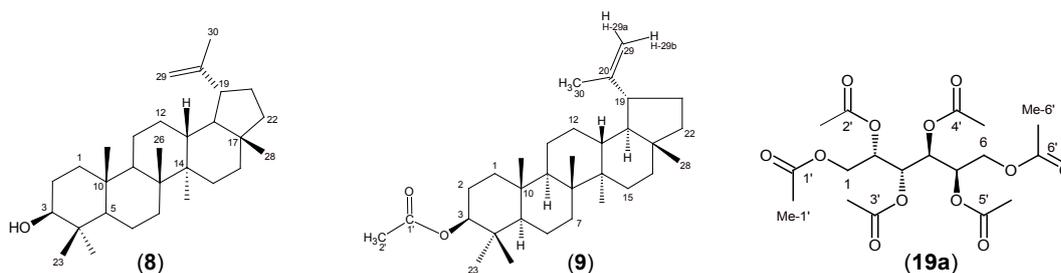
Figura 5.5: Efeito dos glicosídeos **20** e **23** na proliferação das Células Mononucleares do Sangue Periférico humano (*PBMC*) estimulado com PHA. *PBMC* (2×10^5 /poço) foram tratados com diferentes concentrações de **20** e **23** com PHA ($5 \mu\text{g mL}^{-1}$) por 72h. Os dados são expressos como média \pm erro padrão de sete experimentos independentes realizados em triplicata. *Estatisticamente diferente do controle (PHA, DMSO 0,01%), $p < 0,05$. O controle de células sem estimulação está representado por CC.

Estes resultados demonstram que **20** e **23** apresentaram potencial imunomodulador, suprimindo a proliferação celular. Contudo, os dois glicosídeos não desenvolveram citotoxicidade, uma vez que nas diferentes concentrações não houve redução da proliferação/viabilidade quando comparadas as culturas de *PBMC* sem estímulo (CC).

8. ENSAIOS DE INIBIÇÃO DE SÍNTESE DE ATP¹⁸⁸

Estudo realizado sob a coordenação do Dr. Blas Lotina-Hennsen, professor da Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico (Departamento de Bioquímica - Facultad de Química, UNAM).

Os ensaios foram realizados a partir de soluções em DMSO dos seguintes compostos obtidos das folhas de *M. acanthophylla*: lupeol (**8**), 3 β -acetato de lupeolila (**9**) e o derivado peracetilado do dulcitol, o peracetildulcitol (**19a**), nas concentrações de 50 100, 200 e 300 $\mu\text{mol L}^{-1}$.



Os cloroplastos foram isolados de folhas de espinafre (*Spinacea oleracea* L.) adquiridas no supermercado. Para extração dos cloroplastos as folhas livres da nervura central e das extremidades basal e apical (25 g) foram trituradas em liquidificador e submetidas à extração com 100 mL do seguinte meio: sacarose (400 $\mu\text{mol L}^{-1}$), MgCl_2 (5 $\mu\text{mol L}^{-1}$), KCl (10 $\mu\text{mol L}^{-1}$) e o sal de potássio do N-[tris(hidroximetil)metil]glicina ($\text{K}^+[\text{tricina}]^-$, 30 $\mu\text{mol L}^{-1}$) em pH 8,0 (1 mol L^{-1} KOH). O meio foi homogeneizado e filtrado com quatro camadas de gaze. O filtrado foi centrifugado e o sobrenadante descartado, o sólido resultante contendo os cloroplastos foi dissolvido em 1 mL de um meio constituído por: sorbitol (100 $\mu\text{mol L}^{-1}$), KCl (10 $\mu\text{mol L}^{-1}$), $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (5 $\mu\text{mol L}^{-1}$) e $\text{K}^+[\text{tricina}]^-$ (1 $\mu\text{mol L}^{-1}$) em pH 8,0 (1 mol L^{-1} KOH).

Para determinar a concentração da clorofila, foram pipetados 50 mL da solução de cloroplastos para um tubo de centrifuga contendo 3 mL de acetona. A amostra foi mantida no escuro por cinco minutos e depois submetida a uma centrifugação clínica. Foram feitas medidas

de absorvâncias do sobrenadante nos comprimentos de onda de 645 e 663 nm¹⁸⁹. A quantidade de clorofila foi obtida pela fórmula:

$$\text{Clorofila } (\mu\text{g mL}^{-1}) = 20,2 (\text{Abs}_{645}) + 8,02 (\text{Abs}_{663})$$

A síntese de ATP foi determinada utilizando-se um micro-eletrodo conectado a um potenciômetro com escala expandida, com pH ajustado em aproximadamente 8,0. Para esta determinação foi utilizado o seguinte meio reacional: clorofila (20 $\mu\text{g mL}^{-1}$), sacarose (100 $\mu\text{mol L}^{-1}$), $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (5 $\mu\text{mol L}^{-1}$), KCl (10 $\mu\text{mol L}^{-1}$) e $\text{K}^+[\text{tricina}]^-$ (1 $\mu\text{mol L}^{-1}$), pH 8 (1 $\mu\text{mol L}^{-1}$ KOH) na presença de ADP (1 $\mu\text{mol L}^{-1}$) e KH_2PO_4 (3 $\mu\text{mol L}^{-1}$). Como acceptor de elétrons para a síntese de ATP foi usado 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$ do herbicida dicloreto de 1,1'-dimetil-4,4'-bipiridínio (Paraquat). Para avaliar a ação dos compostos **8**, **9** e **19a** na inibição da síntese de ATP, soluções dos mesmos foram adicionadas ao meio reacional em concentrações 50, 100, 200 e 300 $\mu\text{mol L}^{-1}$ e as medidas comparadas com o controle [(1200 $\mu\text{mol L}^{-1}$ ATP) x (mg de clorofila) x (h⁻¹)] = 100% de atividade.

Resultados e discussão

Os compostos lupeol (**8**), acetato de lupeolila (**9**) e peracetildulcitol (**19a**), nas concentrações de 50, 100, 200 e 300 $\mu\text{mol L}^{-1}$ em soluções de DMSO, foram testados e tiveram seus efeitos medidos sobre a síntese de ATP em cloroplastos isolados de folhas de espinafre (*Spinacea oleracea* L.). Pela análise dos resultados, mostrados na Figura 4.6, foi possível observar que os compostos testados **8** e **19a** apresentaram significativos efeitos inibitórios sobre a síntese de ATP, em toda faixa de concentração (50-300 $\mu\text{mol L}^{-1}$) avaliada.

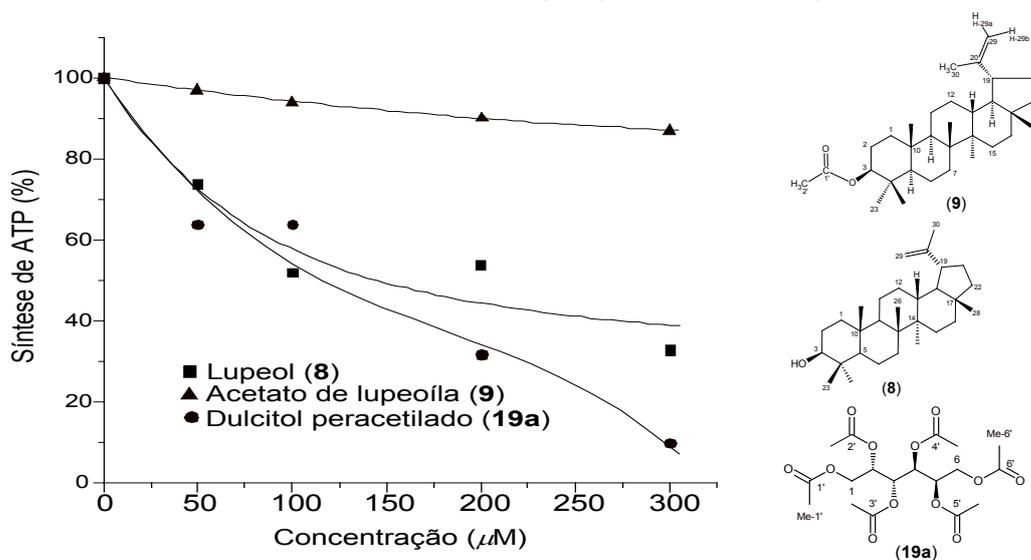


Figura 5.6: Efeitos dos compostos **8**, **9** e **19a** sobre a síntese de ATP em cloroplastos de *Spinacea oleracea* L.

Entretanto, o composto **9**, devido aos baixos efeitos de inibição, pode ser considerado inativo. Os valores de I_{50} calculados, representando a concentração requerida para provocar 50% de inibição (obtida por interpolação gráfica), para os compostos **8** e **19a** foram de 143 e 122 $\mu\text{mol L}^{-1}$, respectivamente. Os resultados apresentados para o composto **19a** mostraram que a maior atividade inibitória da síntese de ATP em cloroplastos de *Spicacea oleracea* pode alcançar a inibição completa (100%) quando aplicado (*in vitro*) em concentrações superiores a 325 μmol^{-1} . Assim, como o processo fotossintético é essencial para o desenvolvimento autotrófico das plantas, foi constatado que o composto **19a** apresenta um promissor potencial herbicida e agente ativo no processo de alelopatia da planta que o contém.

CONCLUSÃO

Os resultados obtidos no estudo químico-farmacológico de folhas de *Maytenus acanthophylla* contribuem com novas informações científicas a respeito dessa planta, na medida em que promove o incremento de dados e conhecimentos relativos a atividades biológicas, propriedades físico-químicas das substâncias isoladas, bem como, o fornecimento de detalhes sobre a estrutura e conformação de compostos novos e a revisão de outros conhecidos. Esta contribuição é significativa para as áreas de Farmácia, Química Orgânica, Química Analítica e de Materiais, bem como para a Quimiotaxonomia da planta estudada, porque três constituintes químicos identificados e isolados das folhas de *M. acanthophylla* são inéditos e vários ainda não foram descritos para a espécie, bem como para família Celastraceae.

Na obtenção e caracterização dos constituintes químicos da planta, foram utilizados diferentes técnicas cromatográficas e diversos métodos computacionais, espectroscópicos e espectrométricos (CGAR, IV, CG-EM, IES-EM, RMN 1D e 2D e raios-X). Durante o processo de elucidação estrutural foi criado um banco de dados inteligente (MATCH-5) contendo deslocamentos químicos de carbono-13 para ser utilizado na pesquisa e identificação de TTPC's isolados. Desde 2007 o programa Match-5 vem sendo utilizado no NEPLAM com ótima acessão pelos usuários.

Dos extratos hexânico e acetato-etílico das folhas foram isolados, identificados e caracterizados 12 TTPC's, sendo quatro alcoóis, dois dióis, quatro ésteres, uma cetona e um cetol álcool, pertencentes às séries dos friedelanos (**5**, **6**, **7**, **13**, **14**, **15** e **15a**), lupanos (**8** e **9**), oleananos (**10** e **12**) e ursanos (**11**). Os TTPC's friedelano-dióis pachisandiol B (**14**) e 3 β ,24-dihidroxfriedelano (**15**) ainda não tinham sido isolados em plantas da família Celastraceae. Os resultados do estudo conformacional de **14** foram publicados na revista *Strutural Chemistry*¹⁴⁵. Este artigo apresenta uma proposta metodológica, baseada em dados RMN e cálculos *ab initio* para se determinar a preferência conformacional do sistema pentacíclico, bem como, sobre a elucidação da geometria de estruturas de TTPC's semelhantes aos friedo-oleananos.

A literatura fornece resultados de vários estudos farmacológicos informando o quanto os TTPC's lupeol (**8**) e acetato de 3 β -lup-20(29)-en-3-ila (**9**) são portadores de atividades anti-inflamatória (antiartrite), antimalárica, entre outras. Neste estudo, os compostos **8** e **9** foram isolados em quantidades significativas das partes aéreas de *M. acanthophylla*, que consiste em mais um fato para mostrar a importância químico-farmacológica a essa planta. Em testes biológicos realizados neste estudo, voltados a medir a capacidade de substâncias atuarem como

inibidoras da fotossíntese de ATP em *Spinacea oleracea* L, **8** apresentou fraca atividade e **9** foi inativo.

O estudo dos extratos em hexano e em acetato de etila possibilitou o isolamento e a caracterização da estrutura de **3** (1,4-*trans*-poliisopreno), bem como propor um mecanismo para o processo químico de degradação espontânea que ocorre com esse biopolímero. O coroamento do conhecimento adquirido no estudo de **3** permitiu propor, em parceria com pesquisadores da Faculdade de Odontologia da UFMG, uma nova invenção/aplicação, que gerou um pedido de patente solicitado pela UFMG sob o título: “*Processo de preparação de um dispositivo de liberação controlada de agentes antibióticos ou antissépticos incluídos ou associados em ciclodextrina em uma base de guta-percha, produtos e usos*” (PI 0702738-9/UFMG). O estudo químico também possibilitou isolar e identificar o triterpeno esqualeno (**2**) e o ácido araquídico (**17**), um ácido graxo de relativa importância na indústria de cosméticos capilares. No extrato acetato-etílico também foi obtido o β -sitosterol (**16**), um fitoesteroide recentemente muito procurado e valorizado, devido a recentes descobertas de propriedades como protetor cardiovascular e regulador dos níveis de colesterol no sangue.

Os estudos dos extratos polares (metanólicos e hidrometanólicos) empregando CLAE e técnicas espectrométricas e espectrocópicas possibilitaram o isolamento e a caracterização de três novos flavonóis glicosilados: o 3-*O*-{[α -L-ramnopiranosil(1 \rightarrow 6)]-*O*-[β -D-xilopiranosil(1 \rightarrow 3)-*O*- α -L-ramnopiranosil(1 \rightarrow 2)]}- β -D-galactopiranosídeo de quercetina (**21**), 3-*O*-{[α -L-ramnopiranosil(1 \rightarrow 6)]-*O*-[β -D-xilopiranosil(1 \rightarrow 3)-*O*- α -L-ramnopiranosil(1 \rightarrow 2)]}- β -D-galactopiranosídeo de canferol (**22**) e 3-*O*-{[α -L-ramnopiranosil(1 \rightarrow 6)]-*O*-[β -D-xilopiranosil(1 \rightarrow 3)-*O*- α -L-ramnopiranosil(1 \rightarrow 2)]}- β -D-galactopiranosídeo de isoramnetina (**23**). O isolamento desses flavonoides contribuiu de forma significativa para a distinção de *M. acanthophylla* na área farmacológica e coloca-a ao lado de *M. aquifolium* e *M. ilicifolia* em importância nessa área. Os flavonoides **21** e **22** foram testados em soluções contendo radical livre (DPPH) e apresentaram excelentes níveis de neutralização dessa espécie. Corroborando com esses resultados, os estudos contidos na literatura indicam que os flavonoides antioxidantes isolados de espécies de *Maytenus* possuem comprovada atividade gastroprotetora. Os ensaios laboratoriais que mostraram o valor medicinal de plantas do gênero *Maytenus* concorrem para a validação do uso na medicina popular das mesmas.

O estudo por cromatografia gasosa do extrato metanólico identificou oito carboidratos (**18** e **19**) das folhas de *M. acanthophylla*. O alditol galactitol (**19**) foi o constituinte mais abundante

nesses extratos. O derivado peracetilado de **19**, o hexaacetato de galactitol (**19a**) apresentou boa atividade inibitória da síntese de ATP em cloroplastos de alface (*Spinea oleraceae* L.) e a estrutura desse composto poderá servir como modelo à síntese de novos compostos com ação herbicida.

Amostras dos extratos preparados das folhas de *M. acanthophylla*, em ensaios para medir ações citotóxicas contra as células tumorais, não foram ativas para MCF-7 (tumor de mama); TK-10 (tumor renal) e UACC-62 (melanoma). Esses extratos também foram inativos em testes de atividade fungicida com espécies de *Candida*, bem como, não apresentaram atividades leishmanicida e nem antibiórica em ensaios bacteriológicos contra várias bactérias Gram-positivas e Gram-negativas. Por outro lado, o extrato metanólico das folhas mostrou significativa atividade analgésica em camundongos e, no ensaio para estabelecer o potencial citotóxico e a influência dos glicosídeos **20** e **23** sobre a proliferação de células mononucleares do sangue periférico humano (*PBMC*), esses glicosídeos agiram reduzindo significativamente a proliferação dessas células. Nesse ensaio, glicosídeo **23** mostrou um efeito inibitório maior, demonstrando um potencial imunomodulador dos linfócitos ativados e, ambos os glicosídeos **20** e **23**, nas concentrações testadas, não apresentaram efeitos citotóxicos.

O estudo apresentado nesta tese foi abrangente, sistemático e atendeu satisfatoriamente aos objetivos traçados neste curso de doutorado. Entretanto, devido ao grande potencial químico-farmacológico apresentado nas folhas de *M. acanthophylla*, justifica-se a continuidade dos estudos dessa espécie, visando a obtenção de novos compostos químicos, a partir do preparo de maiores quantidades de extratos, principalmente dos mais polares, e assim possibilitar o isolamento de vários novos constituintes minoritários, a exemplo dos flavonoides glicosídicos que foram apenas detectados por este estudo.

Na área de Química dos Materiais, o constituinte **3** consiste em um biopolímero que pode servir como um polímero de engenharia, matéria prima para produção de terpenoides, bem como para a criação de novos plásticos dotados de propriedades biodegradáveis, resinas, colas, membranas inteligentes, condutores poliméricos, etc.

Os estudos de plantas com alto valor agregado de qualidades químico-farmacológicas, como se pôde observar em *M. acanthophylla*, se tornam viáveis, tanto por contribuir para o conhecimento da nossa flora, como por poder estimular um modelo de exploração econômica da biomassa baseado em sustentabilidade, devido à possibilidade de renovação desse recurso natural a partir do cultivo racional dessas plantas.

Referências Bibliográficas

- 1 Hartmann, T., From waste products to ecochemicals: Fifty years research of plant secondary metabolism. *Phytochemistry* **2007**, 68, (22-24), 2831-2846.
- 2 Stahl, C. E., Pflanzen und Schnecken. Eine Biologische Studie über die Schutzmittel der Pflanzen gegen Schneckenfraß. *Jenaer Zeitschrift für Medizin und Naturwissenschaften* **1888**, 22, 557-684.
- 3 Ramalho, R., Novos caminhos para a química: Pesquisas de Otto Gottlieb revelaram 'linguagem' das plantas da Amazônia. *Ciência Hoje* março/2001, **2001**.
- 4 Ramalho, R., Perfis: Otto Gottlieb: Um professor itinerante. *Ciencia Hoje* **2001**.
- 5 Bolzani, V. d. S.; Cragg, G. M., Professor Otto Richard Gottlieb - A Tribute. *Arquivoc* **2004**, vi, (Issue in Honor of Prof. Otto Gottlieb), 1-4.
- 6 MCT-Instituto Brasileiro de Informação em Ciência e Tecnologia, I. Otto Richard Gottlieb. <http://www.canalciencia.ibict.br/notaveis/txt.php?id=73> (27/08/2009),
- 7 Simmons, M. P.; Savolainen, V.; Clevinger, C. C.; Archer, R. H.; Davis, J. I., Phylogeny of the Celastraceae Inferred from 26S Nuclear Ribosomal DNA, Phytochrome B, rbcL, atpB, and Morphology. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **2001**, 19, (3), 353-366.
- 8 Spivey, A. C.; Weston, M.; Woodhead, S., Celastraceae sesquiterpenoids: biological activity and synthesis. *Chemical Society Reviews* **2002**, 31, (1), 43-59.
- 9 Lombardi, J. A., Three New Species of Celastraceae (Hippocrateoideae) from Southeastern Brazil, and a New Combination in Peritassa. *Novon* **2004**, 14, (3), 315-321.
- 10 Carvalho-Okano, R. Estudos taxonômicos do gênero *Maytenus* Mol. emend. Mol. (Celastraceae) do Brasil Extra-Amazônico. Tese de Doutorado, UNICAMP, Campinas, **1992**.
- 11 Carvalho-Okano, R. M. d., *Maytenus littoralis* Carvalho-Okano (Celastraceae), uma nova espécie para o Brasil. *Hoehnea* **2005**, 32, (3), 467-469.
- 12 Mota, K. S. D.; Pita, J.; Estevam, E. C.; Medeiros, V. M.; Tavares, J. F.; Agra, M. D.; Diniz, M.; da Silva, M. S.; Batista, L. M., Evaluation of the toxicity and antiulcerogenic activity of the ethanol extract of *Maytenus obtusifolia* Mart. leaves.

- Revista Brasileira de Farmacognosia-*Brazilian Journal of Pharmacognosy* **2008**, 18, (3), 441-446.
- 13 de Oliveira, D. M.; Salazar, G. d. C. M.; Sousa, S. B., Estudo Etnobotânico da Microregião de Jequié - Bahia - Etapa I (Painel). In III Jornada Paulista de Plantas Mediciniais-CBPQPA/Unicamp, 1997, Campinas. III Jornada Paulista de Plantas Mediciniais-CBPQPA/Unicamp e I Encontro Racine de Fitoterapia e Fitocosmética. UNICAMP: Campinas, **1997**.
- 14 Gonzalez, F. G.; Portela, T. Y.; Stipp, E. J.; Di Stasi, L. C., Antiulcerogenic and analgesic effects of *Maytenus aquifolium*, *Sorocea bomplandii* and *Zolernia ilicifolia*. *Journal of Ethnopharmacology* **2001**, 77, (1), 41-47.
- 15 UFSM - Inventário Florístico. <http://coralx.ufsm.br/ifcrs/index.php> (20/08/**2009**).
- 16 Carlini, E. A. M. L.; Braz, S., Efeito protetor do liofilizado obtido do abafado de *Maytenus sp.* (espinheira-santa) contra a úlcera gástrica experimental em ratos. In: Carlini, E. Estudo de ação antiúlcera gástrica de plantas brasileiras (*Maytenus ilicifolia* “espinheira-santa” e outras). In Programa de pesquisa de plantas medicinais, MS, Ed. CEME/AFIP: 1988.
- 17 Corrêa, M. P., Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas. Ministério da Agricultura: Rio de Janeiro, **1984**; Vol. 6, p 133-135.
- 18 Ohsaki, A.; Imai, Y.; Naruse, M.; Ayabe, S.; Komiyama, K.; Takashima, J., Four new triterpenoids from *Maytenus ilicifolia*. *Journal of Natural Products* **2004**, 67, (3), 469-471.
- 19 Balbach, A., A Flora Nacional na Medicina Doméstica. 11th ed.; São Paulo, **1980**; p 885.
- 20 Itokawa, H.; Shiota, O.; Morita, H.; Takeya, K.; Iitaka, Y., Isolation, structural elucidation and conformational-analysis of sesquiterpene pyridine alkaloids from *Maytenus-ebenifolia* Reiss - X-ray molecular-structure of ebenifoline-W-I. *Journal of the Chemical Society-Perkin Transactions I* **1993**, (11), 1247-1254.
- 21 Gutierrez, F.; Estevez-Braun, A.; Ravelo, A. G.; Astudillo, L.; Zarate, R., Terpenoids from the medicinal plant *Maytenus ilicifolia*. *Journal of Natural Products* **2007**, 70, (6), 1049-1052.
- 22 Alice, C. B.; Siqueira, N. C. S.; Mentz, L. A.; Brasil e Silva, G. A. A.; José, K. F. D.,

- Plantas medicinais de uso popular: atlas farmacognóstico. Ulbra: Canoas, **1995**; p 205.
- 23 Rocha, C. S. d.; Pimentel, R. M. d. M.; Randau, K. P.; Xavier, H. S., Morfoanatomia de Folhas de *Maytenus rigida* Mart. (Celastraceae); uma Espécie Utilizada Como Medicinal no Nordeste do Brasil. *Acta Farm. Bonaerense* **2004**, 23, (4), 472-6.
- 24 de Andrade, S. F.; Lemos, M.; Comunello, E.; Noldin, V. F.; Filho, V. C.; Niero, R., Evaluation of the antiulcerogenic activity of *Maytenus robusta* (Celastraceae) in different experimental ulcer models. *Journal of Ethnopharmacology* **2007**, 113, (2), 252-257.
- 25 Miranda, R. R. S. Estudo fitoquímico e avaliação do potencial farmacêutico de *Maytenus salicifolia* Reissek (Celastraceae). Tese de Doutorado, Departamento de Química, UFMG, Belo Horizonte, MG, Brasil, **2007**. 351 p
- 26 Silva, J. L.; Silva, R. P.; Jorge, R. M.; Silva, G. D. F.; Vieira Filho, S. A.; Fonseca, A. P. N. D.; Tagliati, C. A., Avaliação da atividade antiulcerogênica da *Maytenus truncata* Reiss (Celastraceae). *Revista Brasileira de Farmacognosia* **2005**, 15, 30-35.
- 27 Salazar, G. d. C. M. *Maytenus truncata* Reissek: Estudo Fitoquímico: Análise Histológica e da Capacidade Sortiva de Folhas e Avaliação de Atividade Biológica de Extratos. Tese de Doutorado, UFMG, Belo Horizonte, **2005**.
- 28 Oliveira, M. L. G.; Duarte, L. P.; Silva, G. D. F.; Vieira, S. A.; Knupp, V. F.; Alves, F. G. P., 3-Oxo-12- α -hydroxyfriedelane from *Maytenus gonoclada*: structure elucidation by H-1 and C-13 chemical shift assignments and 2D-NMR spectroscopy. *Magnetic Resonance in Chemistry* **2007**, 45, (10), 895-898.
- 29 de Oliveira, D. M.; Silva, G.; Duarte, L. P.; Vieira, S. A., Chemical constituents isolated from roots of *Maytenus acanthophylla* Reissek (Celastraceae). *Biochemical Systematics and Ecology* **2006**, 34, (8), 661-665.
- 30 Silva, S.; Silva, G. D. F.; Barbosa, L. C. A.; Duarte, L. P.; Filho, S. A. V., Lupane pentacyclic triterpenes isolated from stems and branches of *Maytenus imbricata* (Celastraceae). *Helvetica Chimica Acta* **2005**, 88, (5), 1102-1109.
- 31 Salazar, G. C. M.; Silva, G. D. F.; Duarte, L. P.; Vieira, S. A.; Lula, I. S., Two epimeric friedelane triterpenes isolated from *Maytenus truncata* Reiss: H-1 and C-13 chemical shift assignments. *Magnetic Resonance in Chemistry* **2000**, 38, (11), 977-

- 980.
- 32 de Miranda, R. R. S.; Silva, G.; Duarte, L. P.; Vieira, S. A., Triterpene esters isolated from leaves of *Maytenus salicifolia* Reissek. *Helvetica Chimica Acta* **2007**, 90, (4), 652-658.
- 33 de Miranda, R. R. S.; Silva, G. D. F.; Duarte, L. P.; Fortes, I. C. P.; Vieira, S. A., Structural determination of 3 β -stearyloxy-urs-12-ene from *Maytenus salicifolia* by 1D and 2D NMR and quantitative C-13 NMR spectroscopy. *Magnetic Resonance in Chemistry* **2006**, 44, (2), 127-131.
- 34 Silva, S.; Silva, G. D. D.; Barbosa, L. C. D.; Duarte, L. P.; King-Diaz, B.; Archundia-Camacho, F.; Lotina-Hennsen, B., Uncoupling and inhibition properties of 3,4-seco-friedelan-3-oic acid isolated from *Maytenus imbricata*. *Pesticide Biochemistry and Physiology* **2007**, 87, (2), 109-114.
- 35 Silva, G. D. F.; Duarte, L. P.; Vieira, S. A.; Doriguetto, A. C.; Mascarenhas, Y. P.; Ellena, J.; Castellano, E. E.; Cota, A. B., Epikatonic acid from *Austroplenckia populnea*: structure elucidation by 2D NMR spectroscopy and X-ray crystallography. *Magnetic Resonance in Chemistry* **2002**, 40, (5), 366-370.
- 36 Vieira Filho, S. A.; Duarte, L. P.; Santos, M. H.; Silva, G. D. F.; Lula, I. S.; Afonso, R., Complete assignment of the H-1 and C-13 NMR spectra of a new polyester sesquiterpene from *Austroplenckia populnea*. *Magnetic Resonance in Chemistry* **2000**, 38, (12), 1023-1026.
- 37 Mossi, A. J.; Mazutti, M.; Paroul, N.; Corazza, M. L.; Dariva, C.; Cansian, R. L.; Oliveira, J. V., Chemical variation of tannins and triterpenes in Brazilian populations of *Maytenus ilicifolia* Mart. Ex Reiss. *Brazilian Journal of Biology* **2009**, 69, 339-345.
- 38 Leite, J. P. V.; Rastrelli, L.; Romussi, G.; Oliveira, A. B.; Vilegas, J. H. Y.; Vilegas, W.; Pizza, C., Isolation and HPLC quantitative analysis of flavonoid glycosides from Brazilian beverages (*Maytenus ilicifolia* and *M-aquifolium*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2001**, 49, (8), 3796-3801.
- 39 Sannomiya, M.; Vilegas, W.; Rastrelli, L.; Pizza, C., A flavonoid glycoside from *Maytenus aquifolium*. *Phytochemistry* **1998**, 49, (1), 237-239.
- 40 Vilegas, W.; Sanommiya, M.; Rastrelli, L.; Pizza, C., Isolation and structure

- elucidation of two new flavonoid glycosides from the infusion of *Maytenus aquifolium* leaves. Evaluation of the antiulcer activity of the infusion. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **1999**, 47, (2), 403-406.
- 41 Vilegas, W.; Vilegas, J. H. Y.; Dachtler, M.; Glaser, T.; Albert, K., Application of on-line C-30 RP-HPLC-NMR for the analysis of flavonoids from leaf extract of *Maytenus aquifolium*. *Phytochemical Analysis* **2000**, 11, (5), 317-321.
- 42 Zheng, G. Q., Cytotoxic terpenoids and flavonoids from *Artemisia-annua*. *Planta Medica* **1994**, 60, (1), 54-57.
- 43 Shiota, O.; Sekita, S.; Satake, M.; Morita, H.; Takeya, K.; Itokawa, H., Two new sesquiterpene pyridine alkaloids from *Maytenus chuchuhuasca*. *Heterocycles* **2004**, 63, (8), 1891-1896.
- 44 Shiota, O.; Otsuka, A.; Morita, H.; Takeya, K.; Itokawa, H., Sesquiterpene pyridine alkaloids from *Maytenus-chuchuhuasca*. *Heterocycles* **1994**, 38, (10), 2219-2229.
- 45 Shiota, O.; Morita, H.; Takeya, K.; Itokawa, H., Sesquiterpene pyridine alkaloids from *Maytenus-ilicifolia*. *Heterocycles* **1994**, 38, (2), 383-389.
- 46 Kuo, Y. H.; Ou, J. C.; Lee, K. H.; Chen, C. F., A new triterpene lactone, maytenfolone, and a new sesquiterpene pyridine alkaloid, Emarginatine-H, from the leaves of *Maytenus-diversifolia*. *Journal of Natural Products-Lloydia* **1995**, 58, (7), 1103-1108.
- 47 Piacente, S.; Dos Santos, L. C.; Mahmood, N.; Pizza, C., Triterpenes from *Maytenus macrocarpa* and evaluation of their anti-HIV activity. *Natural Product Communications* **2006**, 1, (12), 1073-1078.
- 48 Cichewicz, R. H.; Kouzi, S. A., Chemistry, biological activity, and chemotherapeutic potential of betulinic acid for the prevention and treatment of cancer and HIV infection. *Medicinal Research Reviews* **2004**, 24, (1), 90-114.
- 49 Eiznhamer, D. A.; Xu, Z.-Q., Betulinic acid: A promising anticancer candidate. *I Drugs* **2004**, 7, (4), 359-373.
- 50 Ziegler, H. L.; Staalso, T.; Jaroszewski, J. W., Loading of erythrocyte membrane with pentacyclic triterpenes inhibits Plasmodium falciparum invasion. *Planta Medica* **2006**, 72, (7), 640-642.
- 51 Reyes, C. P.; Núñez, M. J.; Jiménez, I. A.; Busserolles, J.; Alcaraz, M. J.; Bazzocchi,

- I. L., Activity of lupane triterpenoids from *Maytenus* species as inhibitors of nitric oxide and prostaglandin E2. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **2006**, 14, (5), 1573-1579.
- 52 Dalla Vechia, L.; Gnoatto, S. C. B.; Gosmann, G., Derivados oleananos e ursanos e sua importância na descoberta de novos fármacos com atividade antitumoral, anti-inflamatória e antioxidante. *Química Nova* **2009**, 32, 1245-1252.
- 53 de Oliveira, D. M. Estudo fitoquímico de raízes de *Maytenus acanthophylla* Reissek (Celastraceae) e avaliação da atividade antibacteriana do extrato clorofórmico. Dissertação, UFMG, Belo Horizonte, MG, Brasil, **2004**.
- 54 Jeller, A. H.; Silva, D. H. S.; Liao, L. M.; Bolzani, V. D. S.; Furlan, M., Antioxidant phenolic and quinonemethide triterpenes from *Cheiloclinium cognatum*. *Phytochemistry* **2004**, 65, (13), 1977-1982.
- 55 Dirsch, V. M.; Kiemer, A. K.; Wagner, H.; Vollmar, A. M., The triterpenoid quinonemethide pristimerin inhibits induction of inducible nitric oxide synthase in murine macrophages. *European Journal of Pharmacology* **1997**, 336, (2-3), 211-217.
- 56 da Costa, P. M.; Ferreira, P. M. P.; Bolzani, V. D.; Furlan, M.; dos Santos, V.; Corsino, J.; de Moraes, M. O.; Costa-Lotufo, L. V.; Montenegro, R. C.; Pessoa, C., Antiproliferative activity of pristimerin isolated from *Maytenus ilicifolia* (Celastraceae) in human HL-60 cells. *Toxicology in Vitro* **2008**, 22, (4), 854-863.
- 57 Mota, K. S. L.; Dias, G. E. N.; Pinto, M. E. F.; Luiz-Ferreira, A. n.; Monteiro Souza-Brito, A. R.; Hiruma Lima, C. I. A.; Barbosa Filho, J. M.; Batista, L. n. M., Flavonoids with Gastroprotective Activity. *Molecules* **2009**, 14, (3), 979-1012.
- 58 Gordon, M. H., Dietary Antioxidants in Disease Prevention. *Natural Product Reports* **1996**, 13, (4), 265-273.
- 59 Corsino, J.; Silva, D. H. S.; Zanoni, M. V. B.; Bolzani, V. d. S.; França, S. C.; Pereira, A. M. S.; Furlan, M., Antioxidant flavan-3-ols and flavonol glycosides from *Maytenus aquifolium*. *Phytotherapy Research* **2003**, 17, (8), 913-916.
- 60 Jorge, R. M.; Leite, J. P. V.; Oliveira, A. B.; Tagliati, C. A., Evaluation of antinociceptive, anti-inflammatory and antiulcerogenic activities of *Maytenus ilicifolia*. *Journal of Ethnopharmacology* **2004**, 94, (1), 93-100.
- 61 Baggio, C. H.; Freitas, C. S.; Otofujii, G. D.; Cipriani, T. R.; de Souza, L. M.;

- Sasaki, G. L.; Iacomini, M.; Marques, M. C. A.; Mesia-Vela, S., Flavonoid-rich fraction of *Maytenus ilicifolia* Mart. ex. Reiss protects the gastric mucosa of rodents through inhibition of both H⁺,K⁺-ATPase activity and formation of nitric oxide. *Journal of Ethnopharmacology* **2007**, 113, 433-440.
- 62 Santos, V. L. d.; Costa, V. B. M.; Agra, M. d. F.; Silva, B. A. d.; Batista, L. M., Pharmacological studies of ethanolic extracts of *Maytenus rigida* Mart (Celastraceae) in animal models. *Revista Brasileira de Farmacognosia* **2007**, 17, 336-342.
- 63 Souza-Formigoni, M. L. O.; Oliveira, M. G. M.; Monteiro, M. G.; Da Silveira, N. G.; Braz, S.; Carlini, E. A., Antiulcerogenic effects of two *Maytenus* species in laboratory-animals. *Journal of Ethnopharmacology* **1991**, 34, (1), 21-27.
- 64 Silva, S. R. S. Estudo químico e avaliação do potencial farmacológico e herbicida de *Maytenus imbricata* Mart. Ex Reissek. Tese de Doutorado, Univ. Federal de Minas Gerais, UFMG, Belo Horizonte, MG, **2007**.
- 65 Silva, G. D. F.; Silva, S. R. S.; Barbosa, L. C. A.; Duarte, L. P.; Ribeiro, S. M. R.; Queiroz, J. H.; Vieira Filho, S. A.; Oliveira, M. L. R., Antioxidant activity of *Maytenus imbricata* Mart., Celastraceae. *Revista Brasileira de Farmacognosia* **2009**, 19, 530-536.
- 66 da Silva, M. S.; de Sousa, D. P.; de Medeiros, V. M.; Folly, M. A. B.; Tavares, J. F.; Barbosa-Filho, J. M., Alkaloid, flavonoids, and pentacyclic triterpenoids of *Maytenus obtusifolia* Mart. *Biochemical Systematics and Ecology* **2008**, 36, (5-6), 500-503.
- 67 Fonseca, A.; Silva, G. D. D.; Carvalho, J. D.; Salazar, G. D. M.; Duarte, L. P.; Silva, R. P.; Jorge, R. M.; Tagliati, C. A.; Zani, C. L.; Alves, T. M. D.; Peres, V.; Vieira, S. A., Phytochemical study of the decoct from the leaves of *Maytenus truncata* Reissek and the evaluation of the antinociceptive, antiedematogenic and antiulcerogenic activities of the decoct extracts. *Química Nova* **2007**, 30, (4), 842-847.
- 68 de Oliveira, D. M.; Duarte, L. P.; Silva, G. D. d. F.; Vieira Filho, S. A.; Dos Santos, M. H.; Vilela, F. C.; Rocha, C. Q.; Giusti-Paiva, A. In Atividade analgésica e antioxidante de extrato hidrometanólico e de flavonoides isolados de folhas de *Maytenus acanthophylla* (Celastraceae). II Congresso de Fitoterápicos do MERCOSUL e VI Reunião da Sociedade Latino-americana de Fitoquímica, Belo Horizonte, 03-06/12/2008, 2008; SLF, Ed. SLF: Belo Horizonte, **2008**; p 141.

- 69 Biodiversitas, F. Consulta à Revisão da Lista da Flora Brasileira Ameaçada de Extinção. <http://www.biodiversitas.org.br/floraBr/> (20/03/2009),
- 70 Cronquist, A., The evolution and classification of flowering plants. 2nd ed.; New York Botanical Garden: New York, **1988**; p 555.
- 71 Takhtajan, A., Outline of the classification of flowering plants (Magnoliophyta). *The Botanical Review* **1980**, 46, (3), 225-359.
- 72 Prakash, R.; Gopikrishna, V.; Kandaswamy, D., Gutta-percha – an untold story. *Endontology* **2005**, 17, (2), 32-36.
- 73 Williams, C. M.; Mander, L. N., Chromatography with silver nitrate. *Tetrahedron* **2001**, 57, (3), 425-447.
- 74 Mabry, T. J.; Markham, K. R.; Thomas, M. B., The Systematic Identification of Flavonoids. 1 ed.; Springer-Verlag: New York, **1970**; p 354.
- 75 de Oliveira, M. L. G. Estudo fitoquímico de folhas de *Maytenus gonoclada* Martius (Celastraceae) e obtenção de derivados nitrogenados da friedelina. Dissertação de mestrado. Departamento de Química, UFMG, Belo Horizonte, MG, Brasil, **2007**. 169 p.
- 76 Fieser, L. F., *Organic Syntheses*. 1963; Vol. IV, p 189. *ibid.*, p 195.
- 77 Wagner, H.; Bladt, S., A thin layer chromatography atlas. 2nd ed.; Springer Germany: New York, **1996**; p 384.
- 78 Matos, F. J. A., Introdução a fitoquímica experimental. 2a ed.; UFC Fortaleza, **1997**; p 141.
- 79 Xavier, H. S.; D'angelo, L. C. A., Perfil cromatográfico dos componentes polifenólicos de *Maytenus ilicifolia* Mart. (Celastraceae). *Rev. Brasileira de Farmacognosia* **1996**, 1, (1), 27-32.
- 80 Tiberti, L. A.; Yariwake, J. H.; Ndjoko, K.; Hostettmann, K., Identification of flavonols in leaves of *Maytenus ilicifolia* and *M. aquifolium* (Celastraceae) by LC/UV/MS analysis. *Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences* **2007**, 846, (1-2), 378-384.
- 81 de Souza, L. M.; Cipriani, T. R.; Sant'Ana, C. F.; Iacomini, M.; Gorin, P. A. J.; Sasaki, G. L., Heart-cutting two-dimensional (size exclusion x reversed phase) liquid chromatography-mass spectrometry analysis of flavonol glycosides from

- leaves of *Maytenus ilicifolia*. *Journal of Chromatography A* **2009**, 1216, (1), 99-105.
- 82 de Souza, L. M.; Cipriani, T. R.; Serrato, R. V.; da Costa, D. E.; Iacomini, M.; Gorin, P. A. J.; Sasaki, G. L., Analysis of flavonol glycoside isomers from leaves of *Maytenus ilicifolia* by offline and online high performance liquid chromatography-electrospray mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* **2008**, 1207, (1-2), 101-109.
- 83 Wolfrom, M. L.; Thompson, A., Acetylation. In *Methods in Carbohydrate Chemistry*, Whistler, R. L.; Wolfrom, M. L., Eds. Academic Press: New York, 1963; Vol. Vol. II.
- 84 CAPES/MEC Portal periodicos. CAPES <http://www.periodicos.capes.gov.br/> (12.02.2010).
- 85 AIST, Spectral Database for Organic Compounds - SDDBS: http://riodb01.ibase.aist.go.jp/sdbs/cgi-bin/direct_frame_top.cgi. In AIST: Tokyo, Japan, **2009**.
- 86 Linstrom, P. J.; Mallard, W. G. NIST Chemistry WebBook, NIST Standard Reference Database Number 69. <http://webbook.nist.gov> (jan-feb **2010**),
- 87 Wishart, D. S.; Tzur, D.; Knox, C.; Eisner, R.; Guo, A. C.; Young, N.; Cheng, D.; Jewell, K.; Arndt, D.; Sawhney, S.; Fung, C.; Nikolai, L.; Lewis, M.; Coutouly, M.-A.; Forsythe, I.; Tang, P.; Shrivastava, S.; Jeroncic, K.; Stothard, P.; Amegbey, G.; Block, D.; Hau, D. D.; Wagner, J.; Miniaci, J.; Clements, M.; Gebremedhin, M.; Guo, N.; Zhang, Y.; Duggan, G. E.; MacInnis, G. D.; Weljie, A. M.; Dowlatabadi, R.; Bamforth, F.; Clive, D.; Greiner, R.; Li, L.; Marrie, T.; Sykes, B. D.; Vogel, H. J.; Querengesser, L., HMDB: the Human Metabolome Database. *Nucl. Acids Res.* **2007**, 35, (suppl_1), D521-526.
- 88 The Mass Spectrometry Society of Japan. MassBank -high-resolution mass spectra database. <http://www.massbank.jp/en/database.html> (January **2010**),
- 89 Hull, W.; Krause, S.; Kuhn, S.; Schneider, G.; Steinbeck, C. NMRShiftDB - NMR database (web database) for organic structures and their Nuclear Magnetic Resonance (NMR) spectra. <http://www.ebi.ac.uk/nmrshiftdb/> (December, 17, **2009**),
- 90 UNICAMP Biblioteca Digital da UNICAMP. <http://libdigi.unicamp.br/> (Dezembro, **2010**),

- 91 Willett, P.; Barnard, J. M.; Downs, G. M., Chemical Similarity Searching. *Journal of Chemical Information and Computer Sciences* **1998**, 38, (6), 983-996.
- 92 Wallqvist, A.; Huang, R.; Thanki, N.; Covell, D. G., Evaluating Chemical Structure Similarity as an Indicator of Cellular Growth Inhibition. *Journal of Chemical Information and Modeling* **2005**, 46, (1), 430-437.
- 93 PERCH Solutions Ltd PERCH NMR software, v.2007.1; PERCH: Kuopio, Finland, **2007**. In: Cota, B. B.; Oliveira, D. M.; Siqueira, E. P. de; Souza-Fagundes E. M.; Pimenta, A. M.C.; Santos, D. M.; Rabello, A. and Zani, C. L., New cassane diterpenes from *Caesalpinia echinata*. *Fitoterapia*, **2011**, 82, 969-975.
- 94 Smurnyy, Y. D.; Elyashberg, M. E.; Blinov, K. A.; Lefebvre, B. A.; Martin, G. E.; Williams, A. J., Computer-aided determination of relative stereochemistry and 3D models of complex organic molecules from 2D NMR spectra. *Tetrahedron* **2005**, 61, (42), 9980-9989.
- 95 Elyashberg, M.; Blinov, K.; Molodtsov, S.; Smurnyy, Y.; Williams, A.; Churanova, T., Computer-assisted methods for molecular structure elucidation: realizing a spectroscopist's dream. *Journal of Cheminformatics* **2009**, 1, (1), 3.
- 96 Mahato, S. B.; Kundu, A. P., ¹³C NMR Spectra of pentacyclic triterpenoids--a compilation and some salient features. *Phytochemistry* **1994**, 37, (6), 1517-1575.
- 97 Agrawal; P, K.; Jain; D, C., [13]C NMR spectroscopy of oleanane triterpenoids. Elsevier: Oxford, Royaume-UNI, **1992**; Vol. 24.
- 98 Eldén, L., Numerical linear algebra in data mining. *Acta Numerica* **2006**, 15, (-1), 327-384.
- 99 Silverstein, R. M.; Bassler, G. C.; Morrill, T. C., Identificação Espectrométrica de Compostos Orgânicos. 6a ed.; LTC Editora: Rio de Janeiro, **2000**.
- 100 Tokuda, H.; Saitoh, E.; Kimura, Y.; Takano, S., Automated analysis of various compounds with a wide range of boiling points by capillary gas chromatography based on retention indices. *Journal of Chromatography A* **1988**, 454, 109-120.
- 101 Barrero, A. F.; Herrador, M. M.; Quílez del Moral, J. F.; Arteaga, P.; Arteaga, J. F.; Piedra, M.; Sánchez, E. M., Reductive Coupling of Terpenic Allylic Halides Catalyzed by Cp₂TiCl: A Short and Efficient Asymmetric Synthesis of Onocerane Triterpenes. *Organic Letters* **2005**, 7, (12), 2301-2304.

- 102 Adam, C.; Lacoste, J.; Lemaire, J., Photo-oxidation of polyisoprene. *Polymer Degradation and Stability* **1991**, 32, (1), 51-69.
- 103 Jautelat, M.; Grutzner, J. B.; Roberts, J. D., Natural-Abundance ¹³C Nuclear Magnetic Resonance Spectra of Terpenes and Carotenes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **1970**, 65, (2), 288-292.
- 104 He, H.-P.; Cai, Y.; Sun, M.; Corke, H., Extraction and Purification of Squalene from Amaranthus Grain. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2001**, 50, (2), 368-372.
- 105 Rootare, H. M.; Powers, J. M., Determination of Phase Transitions in Gutta-Percha by Differential Thermal Analysis. *Journal of Dental Research* **1977**, 56, (12), 1453-1462.
- 106 Maniglia-Ferreira, C.; Gurgel-Filho, E. D.; Silva Jr, J. B. A.; Paula, R. C. M. d.; Feitosa, J. P. A.; Gomes, B. P. F. d. A.; Souza-Filho, F. J. d., Brazilian gutta-percha points. Part II: thermal properties. *Brazilian Oral Research* **2007**, 21, 29-34.
- 107 Burfield, D. R.; Lim, K. L., Differential scanning calorimetry analysis of natural rubber and related polyisoprenes. Measurement of the glass transition temperature. *Macromolecules* **1983**, 16, (7), 1170-1175.
- 108 Silva-Júnior, J. B. A.; Paula, R. C. M. d.; Feitosa, J. P. A.; Gurgel-Filho, E. D.; Maniglia-Ferreira, C.; Filho, F. J. d. S., In vivo aging of gutta-percha dental cone. *Journal of Applied Polymer Science* **2006**, 100, (5), 4082-4088.
- 109 Silva-Júnior, J. B. A. d. Estudo da degradação térmica da guta-percha (1,4-trans-poliisopreno) e de cones de gutapercha utilizados em Endodontia. Tese de Doutorado, UFC, Fortaleza, **2007**.
- 110 Gavish, M.; Brennan, P.; Woodward, A. E., Infrared spectral correlations for crystalline and amorphous trans-1,4-polyisoprene. *Macromolecules* **1988**, 21, (7), 2075-2079.
- 111 Tangpakdee, J.; Tanaka, Y.; Shiba, K.-i.; Kawahara, S.; Sakurai, K.; Suzuki, Y., Structure and biosynthesis of trans-polyisoprene from *Eucommia ulmoides*. *Phytochemistry* **1997**, 45, (1), 75-80.
- 112 Maniglia-Ferreira, C.; Valverde, G. B.; Silva Jr, J. B. A.; Paula, R. C. M. d.; Feitosa,

- J. P. A.; Souza-Filho, F. J. d., Clinical relevance of trans 1,4-polyisoprene aging degradation on the longevity of root canal treatment. *Brazilian Dental Journal* **2007**, 18, 97-101.
- 113 Alam, T. M.; Celina, M.; Assink, R. A.; Clough, R. L.; Gillen, K. T.; Wheeler, D. R., Investigation of Oxidative Degradation in Polymers Using ^{17}O NMR Spectroscopy. *Macromolecules* **2000**, 33, (4), 1181-1190.
- 114 Paoli, M. A. D., Degradação e Estabilização de Polímeros - 2a versão online revisada. Chemkeys: **2008**.
- 115 Maniglia-Ferreira, C.; Silva Jr, J. B. A.; Paula, R. C. M. d.; Feitosa, J. P. A.; Cortez, D. G. N.; Zaia, A. A.; Souza-Filho, F. J. d., Brazilian gutta-percha points: Part I: chemical composition and X-ray diffraction analysis. *Brazilian Oral Research* **2005**, 19, 193-197.
- 116 Pinto de Oliveira, D.; Barbizam, V. B., J.; Trope, M.; Teixeira, F. B., Comparison Between Gutta-Percha and Resilon Removal Using Two Different Techniques in Endodontic Retreatment. *Journal of Endodontics* **2006**, 32, (4), 362-364.
- 117 Socrates, G., Infrared Characteristic Group Frequencies. 2nd ed.; John Wiley & Sons,: New York, **1994**; p 249.
- 118 Iglesias, M. J.; del Rio, J. C.; Laggoun-Défarge, F.; Cuesta, M. J.; Suárez-Ruiz, I., Chemical-structural characterization of solvent and thermal extractable material from perhydrous vitrinites. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis* **2003**, 68-69, 387-407.
- 119 Burns, C. J.; Field, L. D.; Hashimoto, K.; Ridley, D. D.; Petteys, B. J.; Rose, M., Synthesis of Stereoisomerically Pure Monoether Lipids. *Australian Journal of Chemistry* **1999**, 52, (5), 387-394.
- 120 Kapur, G. S.; Findeisen, M.; Berger, S., Analysis of hydrocarbon mixtures by diffusion-ordered NMR spectroscopy. *Fuel* **2000**, 79, (11), 1347-1351.
- 121 Chung, J. G.; Garrett, L. R.; Byers, P. E.; Cuchens, M. A., A survey of the amount of pristane in common fruits and vegetables. *Journal of Food Composition and Analysis* **1989**, 2, (1), 22-27.
- 122 Duke, J. A.; et al., Handbook of medicinal herbs. 2 ed.; CRC: **2002**.
- 123 Brieskorn, C. H.; Beck, K. R., Die kohlenwasserstoffe des blattwachses von

- rosmarinus officinalis. *Phytochemistry* 1970, 9, (7), 1633-1640.
- 124 Velcheva, M. P.; Donchev, C., Isoprenoid hydrocarbons from the fruit of extant plants. *Phytochemistry* **1997**, 45, (4), 637-639.
- 125 Lindeman, L. P.; Adams, J. Q., Carbon-13 nuclear magnetic resonance spectrometry. Chemical shifts for the paraffins through C9. *Analytical Chemistry* **1971**, 43, (10), 1245-1252.
- 126 Klass, J.; Tinto, W. F.; McLean, S.; Reynolds, W. F., Friedelane Triterpenoids from *Peritassa-Compta* - Complete H-1 and C-13 Assignments by 2D NMR-Spectroscopy. *Journal of Natural Products* **1992**, 55, (11), 1626-1630.
- 127 Gottlieb, H. E.; Ramaiah, P. A.; Lavie, D., C-13 NMR signal assignment of friedelin and 3- α -hydroxyfriedelan-2-one. *Magnetic Resonance in Chemistry* **1985**, 23, (8), 616-620.
- 128 Vieira Filho, S. A. Estudo fitoquímico em folhas e sâmaras de *Austroplenckia populnea*, avaliação da atividade antiespermatogênica do extrato hexânico das folhas e estudo fotoquímico em triterpenos pentacíclicos. Tese de Doutorado, UFMG, Belo Horizonte, **2002**.
- 129 Duarte, L. P. Estudo Químico, Estrutural e da Atividade Antibacteriana de Triterpenos Pentacíclicos isolados dos Galhos e Raízes de *Austroplenckia populnea*. Tese de Doutorado, UFMG, Belo Horizonte, Minas Gerais, **2000**.
- 130 Silva, G. D. d. F. Constituintes Químicos de *Austroplenckia populnea*: Estrutura Molecular e de Cristal e Ensaio Farmacológicos. Tese de Doutorado, UFMG, Belo Horizonte, **2000**.
- 131 David, W. I. F.; Shankland, K., Structure determination from powder diffraction data. *Acta Crystallographica Section A* **2008**, 64, (1), 52-64.
- 132 Becke, A. D., Density-functional exchange-energy approximation with correct asymptotic behavior. *Physical Review A* **1988**, 38, (6), 3098.
- 133 Mo, F.; Winther, S.; Scrimgeour, S. N., What is the favored conformation of the friedelane skeleton - a combined X-ray and molecular Force-Field study of friedelin, C₃₀H₅₀O. *Acta Crystallographica Section B-Structural Science* **1989**, 45, 261-270.
- 134 Boulton, A.; Louer, D., Indexing of powder diffraction patterns for low-symmetry lattices by the successive dichotomy method. *Journal of Applied Crystallography*

- 1991, 24, (6), 987-993.
- 135 Frisch, M. J. T., G. W.; Schlegel, H. B.; Scuseria, G. E.; Robb, M. A.; Cheeseman, J. R.; Montgomery, J., J. A.; Vreven, T.; Kudin, K. N.; Burant, J. C.; Millam, J. M.; Iyengar, S. S. T., J.; Barone, V.; Mennucci, B.; Cossi, M.; Scalmani, G.; Rega, N.; Petersson, G. A.; Nakatsuji, H.; Hada, M.; Ehara, M.; Toyota, K.; Fukuda, R.; Hasegawa, J.; Ishida, M.; Nakajima, T.; Honda, Y.; Kitao, O.; Nakai, H.; Klene, M.; Li, X.; Knox, J. E.; Hratchian, H. P.; Cross, J. B.; Bakken, V.; Adamo, C.; Jaramillo, J.; Gomperts, R.; Stratmann, R. E.; Yazyev, O.; Austin, A. J.; Cammi, R.; Pomelli, C.; Ochterski, J. W.; Ayala, P. Y.; Morokuma, K.; Voth, G. A.; Salvador, P.; Dannenberg, J. J.; Zakrzewski, V. G.; Dapprich, S.; Daniels, A. D.; Strain, M. C.; Farkas, O.; Malick, D. K.; Rabuck, A. D.; Raghavachari, K.; Foresman, J. B.; Ortiz, J. V.; Cui, Q.; Baboul, A. G.; Clifford, S.; Cioslowski, J.; Stefanov, B. B.; Liu, G.; Liashenko, A.; Piskorz, P.; Komaromi, I.; Martin, R. L.; Fox, D. J.; Keith, T.; Al-Laham, M. A.; Peng, C. Y.; Nanayakkara, A.; Challacombe, M.; Gill, P. M. W.; Johnson, B.; Chen, W.; Wong, M. W.; Gonzalez, C.; and Pople, J. A, Gaussian 03. Wallingford CT, **2004**.
- 136 Jiang, R.-W.; Ma, S.-C.; He, Z.-D.; Huang, X.-S.; But, P. P.-H.; Wang, H.; Chan, S.-P.; Ooi, V. E.-C.; Xu, H.-X.; Mak, T. C. W., Molecular structures and antiviral activities of naturally occurring and modified cassane furanoditerpenoids and friedelane triterpenoids from *Caesalpinia minax*. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **2002**, 10, (7), 2161-2170.
- 137 Cota, A. B.; Mascarenhas, Y. P.; Silva, G. D. F.; de Souza, J. R., Structure of a triterpene extracted from *Austroplenckia populnea* (Celastraceae), methyl-3-oxofriedelan-20[alpha]-oate. *Acta Crystallographica Section C* **1990**, 46, (2), 326-327.
- 138 Michael N. Burnett and Carroll K. Johnson, ORTEP-III: Oak Ridge Thermal Ellipsoid Plot Program for Crystal Structure Illustrations, *Oak Ridge National Laboratory Report ORNL-6895*, **1996**.
- 139 Burns, D.; Reynolds, W. F.; Buchanan, G.; Reese, P. B.; Enriquez, R. G., Assignment of spectra and investigation of hindered side-chain rotation in lupeol derivatives. *Magnetic Resonance in Chemistry* **2000**, 38, (7), 488-493.
- 140 de Oliveira, D.; de F. Silva, G.; Duarte, L.; Vieira Filho, S.; Guimarães, L.; Duarte,

- H.; de Souza, E., Conformational study of $3\beta,16\beta$ -dihydroxyfriedelane by NMR and *ab initio* calculations. *Structural Chemistry* **2009**, 20, (6), 1005-1011.
- 141 Kikuchi, T.; Takayama, M.; Toyoda, T.; Arimoto, M.; Niwa, M., Structures of pachysandiol-B and pachysonol. New triterpenes from *Pachysandra-terminalis* Sieb et Zucc .1. *Tetrahedron Letters* **1971**, 19, 1535.
- 142 Kikuchi, T.; Niwa, M.; Masaki, N., Structures of pachysandiol-B and pachysonol, new triterpenes from *pachysandra terminalis* Sieb et Zucc .2. New conformation of friedelin type triterpene derived by X-ray analysis. *Tetrahedron Letters* **1972**, (51), 5249-&.
- 143 Alcântara, A. F. C.; Piló-Veloso, D.; Almeida, W. B. D.; Maltha, C. R. A.; Barbosa, L. C. A., Conformational analysis of 8-oxabicyclo[3.2.1]oct-6-en-3-one derivatives by NMR and theoretical calculations. *Journal of Molecular Structure* **2006**, 791, (1-3), 180-185.
- 144 dos Santos, F.; Alcântara, A.; Ferreira-Alves, D.; Piló-Veloso, D., Theoretical and experimental NMR studies of the Swern oxidation of methyl 6 α , 7 β - dihydroxyvouacapan-17 β -oate. *Structural Chemistry* **2008**, 19, (4), 625-631.
- 145 Masaki, N.; Niwa, M.; Kikuchi, T., Studies on neutral constituents of *Pachysandra-terminalis* Sieb et Zucc. 4. X-ray structure of 3-O-acetyl-16-O-para-bromo-benzoylpachysandiol-B - new conformation of a friedelin-type triterpene. *Journal of the Chemical Society-Perkin Transactions 2* **1975**, (6), 610-614.
- 146 Spartan SGI 4.1.3 OpenGL Edition, Wavefunction, Inc: Irvine, CA, **1997**.
- 147 Binkley, J. S.; Pople, J. A.; Hehre, W. J., Self-consistent molecular orbital methods. 21. Small split-valence basis sets for first-row elements. *Journal of the American Chemical Society* **1980**, 102, (3), 939-947.
- 148 Parr, R. G.; Yang, W. T., Density-Functional Theory of the electronic-structure of molecules. *Annual Review of Physical Chemistry* **1995**, 46, 701-728.
- 149 Parr, R. G.; Yang, W., Density Functional Theory of Atoms and Molecules. Oxford University Press: New York., **1989**.
- 150 Emilio, T.; Giles, W. T.; Kenneth, D. M. H.; Roy, L. J.; Benson, M. K., Structure Determination of an Oligopeptide Directly from Powder Diffraction Data13. *Angewandte Chemie International Edition* **2000**, 39, (24), 4488-4491.

- 151 Lee, C.; Yang, W.; Parr, R. G., Development of the Colle-Salvetti correlation-energy formula into a functional of the electron density. *Physical Review B* **1988**, 37, (2), 785.
- 152 Hehre, W. J.; Radom, L.; Schleyer, P. v. R.; Pople, J. A., Ab Initio Molecular Orbital Theory. John Willey & Sons: New York, **1986**.
- 153 Hehre, W. J.; Yu, J.; and Klunzinger, P. E., A Guide to Molecular Mechanics and Molecular Orbital Calculations in Spartan. Irvine, CA, **1997**.
- 154 McQuarrie, D. A. S., J. D., Molecular Thermodynamics. University Science Books: Sausalito, CA, **1999**; p 656.
- 155 Freire, F.; Seco, J. M.; Quinoa, E.; Riguera, R., Determining the Absolute Stereochemistry of Secondary/Secondary Diols by ¹H NMR: Basis and Applications. *The Journal of Organic Chemistry* **2005**, 70, (10), 3778-3790.
- 156 Kaji, H.; Yamada, T.; Tsukamoto, N.; Horii, F., A combined experimental and theoretical study of the conformation of N,N'-diphenyl-N,N'-di(m-tolyl)benzidine using solid-state ¹⁵N NMR and DFT calculations. *Chemical Physics Letters* **2005**, 401, (1-3), 246-253.
- 157 Zeng, B.; Pollack, R. M.; Summers, M. F., Conformational analysis via heteronuclear correlation NMR spectroscopy. *The Journal of Organic Chemistry* **1990**, 55, (8), 2534-2536.
- 158 Mahato, S. B.; Kundu, A. P., ¹³C NMR Spectra of pentacyclic triterpenoids--a compilation and some salient features. *Phytochemistry* **1994**, 37, (6), 1517-1575.
- 159 Prakash, O.; Roy, R.; Garg, H. S.; Bhakuni, D. S., ¹³C NMR studies of the friedelane series of triterpenoids and the conformation of the D and E rings in friedelan-7-one. *Magnetic Resonance in Chemistry* **1987**, 25, (1), 39-41.
- 160 Honda, C.; Suwa, K.; Takeyama, S.; Kamisako, W., Relative Population of S-Form and F-Form Conformers of Bryonolic Acid and Its Derivatives in Equilibrium in CDCl₃ Solutions. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin* **2002**, 50, (4), 467-474.
- 161 Costa, P. M.; Carvalho, M. G. d., New triterpene isolated from *Eschweilera longipes* (Lecythidaceae). *Anais da Academia Brasileira de Ciências* **2003**, 75, 21-25.
- 162 Timothy, W.; Areef, I.; Roderick, M.; Gerold, S.; D, M. C.; Joseph, L., Beta-sitosterols for benign prostatic hyperplasia. Cochrane Database of Systematic

- Reviews **1999, 1999**, (3).
- 163 Matsuoka, K.; Nakazawa, T.; Nakamura, A.; Honda, C.; Endo, K.; Tsukada, M., Study of thermodynamic parameters for solubilization of plant sterol and stanol in bile salt micelles. *Chemistry and Physics of Lipids* **2008**, 154, (2), 87-93
- 164 Lima, J. R.; Gonçalves, L. A. G., Parametros de avaliação da qualidade de óleo de soja usado para fritura. *Química Nova* **1994**, 17, (5), 392-396.
- 165 Vianni, R.; Filho, R. B.-. Ácidos graxos naturais: Importância e ocorrência em alimentos. *Química Nova* **1995**, 19, (5), 400-407.
- 166 Stenutz, R.; Jansson, P.-E.; Widmalm, G. A practical guide to structural analysis of carbohydrates. <http://www.casperold.organ.su.se/sop/> - chro (29/01/2009),
- 167 Angyal, S. J.; Fur, R. L., The ¹³C-N.M.R. spectra of alditols. *Carbohydrate Research* **1980**, 84, (2), 201-209.
- 168 de Oliveira, D. M.; Aguilar, M. I.; Díaz, B. K.; Filho, S. A. V.; Duarte, L. P.; Silva, G. D. d. F.; Lotina-Hennsen, B., The Triterpenes 3 β -Lup-20(29)-en-3-ol and 3 β -Lup-20(29)-en-3-yl Acetate and the Carbohydrate 1,2,3,4,5,6-Hexa-O-acetyl-dulcitol as Photosynthesis Light Reactions Inhibitors. *Molecules* **2011**, 16, (12), 9939-9956.
- 169 Horai, H.; Arita, M.; Kanaya, S.; Nihei, Y.; Ikeda, T.; Suwa, K.; Ojima, Y.; Tanaka, K.; Tanaka, S.; Aoshima, K.; Oda, Y.; Kakazu, Y.; Kusano, M.; Tohge, T.; Matsuda, F.; Sawada, Y.; Hirai, M. Y.; Nakanishi, H.; Ikeda, K.; Akimoto, N.; Maoka, T.; Takahashi, H.; Ara, T.; Sakurai, N.; Suzuki, H.; Shibata, D.; Neumann, S.; Iida, T.; Tanaka, K.; Funatsu, K.; Matsuura, F.; Soga, T.; Taguchi, R.; Saito, K.; Nishioka, T., MassBank: a public repository for sharing mass spectral data for life sciences. *Journal of Mass Spectrometry* **2010**, 45, (7), 703-714.
- 170 Harborne, J. B., The Flavonoids - Advances in Research since **1980**. Chapman and Hall: London, **1988**.
- 171 Veitch, N. C.; Kite, G. C.; Lewis, G. P., Flavonol pentaglycosides of Cordyla (Leguminosae: Papilionoideae: Swartzieae): Distribution and taxonomic implications *Phytochemistry* **2008**, 69, (12), 2329-2335.
- 172 Semmar, N.; Fenet, B.; Gluchoff-Fiasson, K.; Comte, G.; Jay, M., New Flavonol Tetraglycosides from Astragalus caprinus. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin* **2002**, 50, (7), 981-984.

- 173 Bedir, E.; Calis, I.; Piacente, S.; Pizza, C.; Khan, I. A., A new flavonol glycoside from the aerial parts of *Astragalus vulneraria*. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin* **2000**, 48, (12), 1994-1995.
- 174 Anker, S. I., New hot plate tests to quantify antinociceptive and narcotic-antagonist activities. *Eur J Pharmacol* **1974**, 27, 4.
- 175 Ayres, M. C. C., M. H. Chaves, et al. Constituintes químicos e atividade antioxidante de extratos das folhas de *Terminalia fagifolia* Mart. et Zucc. *Química Nova* **2009**, 32, 1509-1512.
- 176 Burda, S.; Oleszek, W., Antioxidant and Antiradical Activities of Flavonoids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2001**, 49, (6), 2774-2779.
- 177 Kim, H. P.; Son, K. H.; Chang, H. W.; Kang, S. S., Anti-inflammatory Plant Flavonoids and Cellular Action Mechanisms. *Journal of Pharmacological Sciences* **2004**, 96, (3), 229-245.
- 178 GAVIN, J., Microbiological process report; analytical microbiological. II. The diffusion methods. *Journal of Applied Microbiology*, **1957**, v.5, p. 25-33.
- 179 Monks, A.; Scudiero, D.; Skehan, P.; Shoemaker, R.; Paull, K.; Vistica, D.; Hose, C.; Langley, J.; Cronise, P.; Vaigro-Wolff, A.; Gray-Goodrich, M.; Campbell, H.; Mayo, J.; Boyd, M., Feasibility of a High-Flux Anticancer Drug Screen Using a Diverse Panel of Cultured Human Tumor Cell Lines. *J. Natl. Cancer Inst.* **1991**, 83, (11), 757-766.
- 180 Houghton, J.; Morozov, A.; Smirnova, I.; Wang, T. C., Stem cells and cancer-review. *Seminars in Cancer Biology* **2007**, 17, (3), 191-203.
- 181 Callahan, H. L.; Portal, A. C.; Devereaux, R.; Grogl, M., An axenic amastigote system for drug screening. *Antimicrob Agents Chemother* **1997**, 41, (4), 818-822.
- 182 Siqueira, E. P. d.; Souza-Fagundes, E. M. d.; Sobral, M. E. G.; Alves, T. n. M. d. A.; Rabello, A.; Zani, C. L., Leishmanicidal activities of the extract from *Blepharocalyx salicifolius* (Kunth) O. Berg, Myrtaceae. *Revista Brasileira de Farmacognosia* **2010**, 20, 416-421.
- 183 Johann, S.; Silva, D.; Martins, C.; Zani, C.; Pizzolatti, M.; Resende, M., Inhibitory effect of extracts from Brazilian medicinal plants on the adhesion of *Candida albicans* to buccal epithelial cells. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*

- 2008**, 24, (11), 2459-2464.
- 184 National Committee for Clinical Laboratory Standards, Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts. Approved standard M27-A. In Third Edition ed.; Standards, N. C. F. C. L., Ed. Clinical and Laboratory Standards Institute: **1997**; Vol. 28, p 25.
- 185 Carfi, M.; Gennari, A.; Malerba, I.; Corsini, E.; Pallardy, M.; Pieters, R.; Loveren, H. V.; Vohr, H. W.; Hartung, T.; Gribaldo, L., In vitro tests to evaluate immunotoxicity: A preliminary study. *Toxicology* **2007**, 229, (1-2), 11-22.
- 186 Gazzinelli, G.; Katz, N.; Rocha, R. S.; Colley, D. G., Immune responses during human schistosomiasis mansoni. X. Production and standardization of an antigen-induced mitogenic activity by peripheral blood mononuclear cells from treated, but not active cases of schistosomiasis. *J Immunol* **1983**, 130, (6), 2891-2895.
- 187 Jiang, J.; Xu, Q., Immunomodulatory activity of the aqueous extract from rhizome of *Smilax glabra* in the later phase of adjuvant-induced arthritis in rats. *Ethnopharmacology* **2003**, 85, (1), 53-59.
- 188 Ribeiro de Souza e Silva, S.; Silva, G. D. d. F.; Barbosa, L. C. d. A.; Duarte, L. P.; King-Diaz, B.; Archundia-Camacho, F.; Lotina-Hennsen, B., Uncoupling and inhibition properties of 3,4-seco-friedelan-3-oic acid isolated from *Maytenus imbricata*. *Pesticide Biochemistry and Physiology* **2007**, 87, (2), 109-114.
- 189 Romagni, J. G.; Nanayakkara, N. P. D.; Rosell, R.; Dayan, F. E., Ecophysiological Roles of Selected Lichen Secondary Compounds. In *Recent Advances in Allelopathy - Volume 2*, Macias, F. A.; Galindo, J. C. G.; Molinillo, J. M. G.; Cutler, H. G., Eds. FL. CRC Press: Boca Raton, 2002; Vol. 2, pp 13-133.