Universidade Federal de Minas Gerais
Instituto de Ciências Exatas
Departamento de Química

GRASIELY FARIA DE SOUSA

ESTUDO FITOQUÍMICO E ATIVIDADE BIOLÓGICA DE CONSTITUINTES DAS FOLHAS E GALHOS DE *MAYTENUS ROBUSTA* (CELASTRACEAE)

Belo Horizonte
2016

UFMG/ICEx/DQ. 1133
T. 510

GRASIELY FARIA DE SOUSA

ESTUDO FITOQUÍMICO E ATIVIDADE BIOLÓGICA DE CONSTITUINTES DAS FOLHAS E GALHOS DE *MAYTENUS ROBUSTA* (CELASTRACEAE)

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

Belo Horizonte
2016

S725e
2016
T

Sousa, Grasiely Faria de
Estudo fitoquímico e atividade biológica de constituintes das folhas e galhos de Maytenus robusta (Celastraceae) [manuscrito] / Grasiely Faria de Sousa. 2016.
[iv], 232 f. : il.

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

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Minas Gerais – Departamento de Química.
Inclui bibliografia.

1. Química Orgânica – Teses 2. Matéria médica vegetal – Teses 3. Produtos naturais – Teses 4. Maytenus – Brasil – Teses 3. Flavonoides – Teses I. Duarte, Lucienir Pains, Orientadora II. Silva, Grácia Divina de Fátima, Coorientadora III. Título.

CDU 043

"Estudo Fitoquímico e Atividade Biológica de Constituintes das Folhas e Galhos de *Maytenus robusta* (Celastraceae)"

Grasiely Faria de Sousa

Tese aprovada pela banca examinadora constituída pelos Professores:

Profa. Lucienir Pains Duarte - Orientadora
UFMG

Profa. Grácia Divina de Fátima Silva - Coorientadora
UFMG

Profa. Dorila Piló Veloso
UFMG

Profa. Rosemeire Brondi Alves
UFMG

Profa. Sílvia Ribeiro de Souza
UNB

Prof. Antonio Jacinto Demuner
UFV

Belo Horizonte, 17 de fevereiro de 2016.

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

O trabalho descrito nesta tese foi desenvolvido sob a colaboração do Professor Doutor Sidney Augusto Vieira Filho (UFOP)

“Um cientista em seu laboratório não é um mero técnico: é também uma criança que confronta os fenômenos naturais que o impressionam como faziam os contos de fada.”

Marie Currie

Dedico este trabalho aos meus queridos pais, Reni Flávio de Sousa e Eva de Faria de Sousa, e ao meu marido João Paulo Rodrigues de Aquino.

AGRADECIMENTOS

A Deus pelo dom da vida, por me guiar por bons caminhos e se fazer presente em todos os momentos.

Aos meus queridos pais, Reni e Eva, pelo amor, pelo esforço para a educação dos filhos e por serem exemplos de vida.

Ao meu amor, João Paulo, pelo carinho, companheirismo, compreensão e apoio em todos os momentos.

À minha querida orientadora Dra. Lucienir Pains Duarte, por ter me recebido em seu laboratório e contribuir para minha formação desde a época da graduação. Além do conhecimento técnico, sua cordialidade e preocupação com o crescimento do próximo foram excelentes exemplos.

Ao Bibo, Professor Dr. Sidney Augusto Vieira Filho, por compartilhar seu conhecimento e, principalmente, pela amizade e generosidade.

À Professora Dra. Grácia Divina de Fátima Silva, pelo apoio e por suas contribuições para tornar o grupo NEPLAM tão especial e acolhedor.

Aos meus queridos irmãos, Flávio e Paulo Henrique, e minhas cunhadas, Camila e Luana, pelo carinho e incentivo constante.

Aos meus queridos sobrinhos, Marco Túlio e Otávio, por tornarem os dias mais alegres.

Aos meus sogros, Maria Aparecida e Otaviano, e meus cunhados, Vanessa e Marcos, pelo carinho e apoio.

Aos colegas de trabalho do grupo NEPLAM, Aline, Fernando, Vinícius, Rafa, Débora, Tiago, Mariana, Nana, Jeferson, Shirley, Josana, Vanessa, Anny, Layla,

Larissa, Dani, Fernanda, Carol, Nathany, Daphine, Cássia, Roqueline e Daniel pela troca de conhecimentos e por tornarem os dias mais agradáveis.

À Aline, Fernando, Débora, Josana, Rafael e Vinícius pela amizade e pelas valiosas contribuições.

Aos meus alunos de Iniciação Científica, em especial Mariana e Nana, pelo empenho e contribuição para o desenvolvimento do trabalho.

Aos colegas do departamento, Gisele, Fernanda Lira, Luiza, Keler, Clináscia, Bruno, Breno, Aretha, Juliana e Laura, pelo apoio e pelos momentos de descontração.

Aos professores do Departamento de Química da UFMG, pelos conhecimentos transmitidos.

Aos funcionários do DQ, pela assistência e apoio técnico.

À Dra. Ivana Silva Lula, pela eficiência na obtenção e processamento dos espectros de RMN.

Aos professores Dra. Jacqueline Aparecida Takahashi, Dr. Daniel Crístian Ferreira Soares, Dra. Danielle Ferreira Dias e Dra. Tânia Maria de Almeida Alves pela realização dos testes biológicos.

Aos Professores da banca de qualificação, Dr. Antônio Flávio de Carvalho Alcântara, Dra. Rosemeire Brondi Alves e Dra. Lúcia Pinheiro Santos Pimenta pelas contribuições.

Às professoras Dra. Rosemeire Brondi Alves e Dra. Dorila Piló Veloso, por aceitarem participar da pré-banca e pelas valiosas considerações.

Aos Professores da banca, Dra. Silvia Ribeiro de Souza, Dr. Antônio Jacinto Demuner, Dra. Rosemeire Brondi Alves e Dra. Dorila Piló Veloso pelas contribuições.

À secretaria do Programa de Pós-Graduação em Química do Departamento de Química da UFMG.

Às amigas Natália Dantas, Izabela, Larissa e Raquel, pelo apoio e incentivo.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de doutorado.

Enfim, a todos que, de alguma forma, contribuíram para a realização desta Tese, agradeço de coração!

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS..... i
RESUMO..... iii
ABSTRACT..... iv

INTRODUÇÃO..... 01

OBJETIVOS..... 10

CAPÍTULO 1: ESTUDO FITOQUÍMICO

1.1 – Parte Experimental..... 11
1.1.1 – Métodos gerais..... 11
1.1.2 – Coleta e identificação do material vegetal..... 13
1.1.3 – Preparação dos extratos das folhas e galhos de *Maytenus robusta*..... 13
1.1.4 – Elaboração de SECF..... 15
1.1.5 – Elaboração de ECF..... 17
1.1.6 – Elaboração de EAF..... 19
1.1.7 – Elaboração de EMF..... 20
1.1.8 – Elaboração de SEHG..... 25
1.1.9 – Elaboração de EHG..... 28
1.1.10 – Elaboração de ECG..... 30
1.1.11 – Elaboração de EAG..... 35
1.1.12 – Elaboração de EMG..... 37
1.2 – Determinação Estrutural..... 38
1.2.1 – MR01: 3-oxofriedelano, MR02: 3β-hidroxifriedelano, MR03: 3β,11β-di-hidroxifriedelano e MR05: β-sitosterol..... 38
1.2.2 – MR04: 3β-hidroxi-D-friedoolean-14-eno (taraxerol)..... 40
1.2.3 – MR06: Canferol..... 42
1.2.4 – MR07: Canferol-3-*O*-β-D-glicopiranosil-(1→3)-α-L- ramnopiranosil-(1→2)-β-D-glicopiranosídeo..... 44
1.2.5 – MR08: Quercetina-3-*O*-β-D-glicopiranosil-(1→3)-α-L- ramnopiranosil (1→2)-β-D-glicopiranosídeo..... 50
1.2.6 – MR09: 3,16-dioxofriedelano..... 56
1.2.7 – MR10: 3-oxo-29-hidroxifriedelano..... 58
1.2.8 – MR11: 3,16-dioxo-12α-hidroxifriedelano..... 60
1.2.9 – MR12: 3,16-dioxo-29-hidroxifriedelano..... 62
1.2.10 – MR13: friedelan-1-en-3,16-diona..... 69
1.2.11 – MR14: 3-oxo-16β,29-di-hidroxifriedelano..... 75
1.2.12 – MR15: 1α,29-di-hidroxi-3-oxofriedelano..... 82

1.2.13 – MR16: 3-oxo-12α,29-di-hidroxifriedelano..... 88
1.2.14 – MR17: 3-oxo-16β,28,29-tri-hidroxifriedelano..... 90
1.3 – Considerações Finais..... 96

CAPÍTULO 2: REDUÇÃO DE TRITERPENOS PENTACÍCLICOS COM $NaBH_4$

2.1 – Introdução..... 99
2.2 – Parte Experimental..... 99
2.2.1– Métodos gerais..... 99
2.2.2 – Redução dos triterpenos..... 100
2.3 – Resultados e Discussão..... 100
2.3.1 – Redução de 3-oxo-29-hidroxifriedelano (MR10)..... 103
2.3.2 – Redução de 3,16-dioxofriedelano (MR09)..... 104
2.3.3 – Redução de 3,16-dioxo-29-hidroxifriedelano (MR12)..... 109
2.3.4 – Redução de 3-oxo-16β,29-di-hidroxifriedelano (MR14)..... 113
2.3.5 – Redução de 3-oxo-12α,29-di-hidroxifriedelano (MR16)..... 115

CAPÍTULO 3: ESTUDO DA ATIVIDADE BIOLÓGICA

3.1 – Introdução Geral..... 119
3.2 – Teste de Citotoxicidade *in vitro*..... 119
3.2.1– Introdução..... 119
3.2.2 – Metodologia..... 121
3.2.3 – Resultados e discussão..... 123
3.3 – Avaliação da Atividade Anti-inflamatória: Edema de Pata Induzido por Carragenina..... 125
3.3.1– Introdução..... 125
3.3.2 – Metodologia..... 127
3.3.3 – Resultados e discussão..... 128
3.4 – Avaliação da Atividade Antimicrobiana..... 132
3.4.1– Introdução..... 132
3.4.2 – Avaliação das atividades antibacteriana e antifúngica..... 132
3.4.2.1 – Metodologia..... 133
3.4.2.2 – Resultados e discussão..... 134
3.4.3 – Avaliação da atividade leishmanicida..... 135
3.4.3.1 – Metodologia..... 136
3.4.2.1 – Resultados e discussão..... 137
3.5 – Avaliação da Inibição da Enzima Acetilcolinesterase 138
3.5.1– Introdução..... 138
3.5.2 – Metodologia..... 139

3.5.3 – Resultados e discussão..... 141

CONCLUSÃO..... 142

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... 145

APENDICE A: ESPECTROS CAPÍTULO 1..... 154

APENDICE B: ESPECTROS CAPÍTULO 2..... 190

APENDICE C: ESTRUTURA QUÍMICA DOS COMPOSTOS ISOLADOS..... 232

ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

δ - Deslocamento químico

[α] – rotação óptica

1D – Uma dimensão

2D – Duas dimensões

ACh – Acetilcolina

AChE – Enzima Acetilcolinesterase

APCI – *Atmospheric Pressure Chemical Ionization* (Ionização Química à Pressão Atmosférica)

ATCC – *American Type Culture Collection* (Coleção de Cultura Americana)

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

CC – Cromatografia em Coluna

CCD – Cromatografia em Camada Delgada

CGen – Conselho de Gestão do Patrimônio Genético

COSY – *Correlation Spectroscopy* (Espectroscopia de Correlação)

DA –Doença de Alzheimer

DEMEM – *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (Meio Eagle Modificado por Dulbecco)

DEPT – *Distortionless Enhancement by Polarization Transfer* (Intensificação sem Distorção por Transferência de Polarização)

DTA – *Differential Thermal Analysis* (Análise Térmica Diferencial)

DTG – *Differencial Thermogravimetry* (Termogravimetria Derivada)

FDA – *Food and Drug Administration*

ESI – *Electrospray*

HMBC – *Heteronuclear Multiple Bond Correlation Spectroscopy* (Espectroscopia de Correlação Heteronuclear a Múltiplas Ligações)

HSQC – *Heteronuclear Single Quantum Coherence Spectroscopy* (Espectroscopia de Correlação Heteronuclear de Quantum Único)

IC_{50} – *Half maximal inhibitory concentration* (concentração inibitória para 50% das células)

INPI – Instituto Nacional de Propriedade Industrial

IT – *Ion Trap* (Armadilha de Íons)

IV – Infravermelho

J – Constante de acoplamento

LCMS – *Liquid Chromatography Mass Spectrometry* (Cromatografia Líquida Acoplada à Espectrometria de Massas)

NOESY – *Two Dimensional Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy* (Espectroscopia do Efeito Nuclear de Overhauser)

Rf – *Retention Factor* (Fator de Retenção)

RMN – Ressonância Magnética Nuclear

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

RMN de ^{1}H – Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio

SNC – Sistema Nervoso Central

TG – *Thermogravimetry* (Termogravimetria)

TMS – Tetrametilsilano

TOF – *Time-of-Flight* (Tempo de Voo)

UV – Ultravioleta

RESUMO

O estudo fitoquímico de folhas e galhos de *M*aytenus *robusta* resultou no isolamento de 13 triterpenos pentacíclicos: 3-oxofriedelano (MR01), 3β-hidroxifriedelano (MR02), 3β,11β-di-hidroxifriedelano (MR03), taraxerol (MR04), 3,16-dioxofriedelano (MR09), 3-oxo-29-hidroxifriedelano (MR10), 3,16-dioxo-12α-hidroxifriedelano (MR11), 3,16-dioxo-29-hidroxifriedelano (MR12), 3,16-dioxo-friedelan-1-eno (MR13), 3-oxo-16β,29-di-hidroxifriedelano (MR14), 1α,29-di-hidroxi-3-oxofriedelano (MR15), 3-oxo-12α,29-di-hidroxifriedelano (MR16) e 3-oxo-16β,28,29-tri-hidroxifriedelano (MR17). Também foram isolados o esteroide β-sitosterol (MR05) e os flavonoides canferol (MR06), canferol-3-*O*-β-D-glicopiranosil-(1→3)-α-L-ramnopiranosil-(1→2)-β-D-glicopiranosídeo (MR07) e quercetina-3-*O*-β-D-glicopiranosil-(1→3)-α-L-ramnopiranosil-(1→2)-β-D-glicopiranosídeo (MR08). Os triterpenos MR12, MR13, MR14, MR15 e MR17 e os flavonoides MR07 e MR08 são inéditos. Os triterpenos MR09, MR10, MR12, MR14 e MR16 foram submetidos a reações de redução empregando boroidreto de sódio como agente redutor e foi possível obter compostos novos com potencial atividade biológica. O estudo da atividade biológica de extratos e compostos isolados consistiu da avaliação da citotoxicidade *in vitro*, da atividade anti-inflamatória, da atividade antimicrobiana (antibacteriana, antifúngica e leishmanicida) e da atividade de inibição da enzima acetilcolinesterase (AChE). Os triterpenos MR01, MR02, MR09, MR10, MR12 e MR14 apresentaram atividade citotóxica *in vitro* frente a células 4T1. No ensaio de atividade anti-inflamatória MR09, MR10, MR12 e MR14 foram capazes de reduzir o edema de pata de camundongos produzido por carragenina. Os extratos metanólicos de folhas e galhos também apresentaram atividade anti-inflamatória. O estudo fitoquímico e biológico de *M. robusta* contribuiu para conhecer mais sobre a família Celastraceae e mostrar o potencial biológico da espécie.

Palavras-chave: Celastraceae, *Maytenus robusta*, triterpenos, flavonoides.

ABSTRACT

Phytochemical study and biological activity of constituents of the leaves and branches from *Maytenus Robusta* Reiss (Celastraceae)

The phytochemical study of the leaves and branches from *Maytenus robusta* resulted in the isolation of thirteen pentacyclic triterpenes: 3-oxofriedelane (MR01), 3β-hydroxyfriedelane (MR02), 3β,11β-dihydroxyfriedelane (MR03), taraxerol (MR04), 3,16-dioxofriedelane (MR09), 3-oxo-29-hydroxyfriedelane (MR10), 3,16-dioxo-12α-hydroxyfriedelane (MR11), 3,16-dioxo-29-hydroxyfriedelane (MR12), 3,16-dioxo-friedelan-1-ene (MR13), 3-oxo-16β,29-di-hydroxyfriedelane (MR14), 1α,29-di-hydroxy-3-oxofriedelane (MR15), 3-oxo-12α,29-dihydroxyfriedelane (MR16) and 3-oxo-16β,28,29-trihydroxyfriedelane (MR17). The steroid sitosterol and the flavonoids kaempferol (MR06), kaempferol-3-*O*-β-D-glucopyranosyl-(1→3)-α-L- rhamnopyranosyl-(1→2)-β-D-glucopyranoside (MR07) and quercetin-3-*O*-β-D-glucopyranosyl-(1→3)-α-L-rhamnopyranosyl-(1→2)-β-D-glucopyranoside (MR08) were also isolated. The triterpenes MR12, MR13, MR14, MR15 and MR17 and the flavonoids MR07 and MR08 are new compounds. The triterpenes MR09, MR10, MR12, MR14 and MR16 were submitted to reduction reaction using sodium borohydride as reducing agent and it was possible to obtain new compounds with biological potential. The study of the biological activity of crude extracts and isolated compounds consisted of the evaluation of *in vitro* cytotoxic property, anti-inflammatory, antimicrobial (antibacterial, antifungal and leishmanicidal) and acetylcholinesterase inhibitory activities. The triterpenes MR01, MR02, MR09, MR10, MR12 and MR14 presented *in vitro* cytotoxicity activity against 4T1 cells. In the anti-inflammatory activity study, MR09, MR10, MR12 and MR14 were able to reduce the carrageenan-induced paw edema in rats. The methanolic extracts from leaves and branches also exhibit anti-inflammatory activity. The phytochemical and biological studies of the *M. robusta* contributed to know more about Celastraceae family and show the biological potential of this species.

Keywords: Celastraceae, *Maytenus robusta*, triterpenes, flavonoids.

INTRODUÇÃO

Diversas fontes de produtos naturais têm sido utilizadas em pesquisas para a obtenção de novos medicamentos incluindo plantas, micro-organismos terrestres, organismos marinhos, vertebrados e invertebrados terrestres (NEWMAN et al., 2000). Os produtos naturais representam estruturas promissoras para a descoberta de novos fármacos. Isso se deve ao fato desses compostos serem estruturalmente favorecidos para se ligarem a enzimas ou proteínas receptoras, uma vez que durante a biossíntese eles se ligam a enzimas para serem formados e posteriormente, possivelmente, se ligarão a receptores para desempenharem suas funções inerentes nos organismos de origem (LI e VEREDAS, 2009). Nas plantas os metabólitos secundários estão relacionados a funções ecológicas e são importantes na adaptação das espécies. Além de outras atuações, essas substâncias conferem proteção contra herbívoros e infecções microbianas (CROTEAU et al., 2000).

A maioria dos medicamentos atualmente disponíveis apresenta alguma relação com produtos naturais. De acordo com Newman e Cragg (2012), entre 1981 e 2010 foram aprovados 1355 novos medicamentos pelo FDA e outras agências reguladoras. Destes, 24% apresentam fármacos baseados em produtos naturais e obtidos por síntese total, 26% contêm produtos naturais, 21% são vacinas e peptídeos, e 29% contêm fármacos totalmente sintéticos. Assim, no período analisado, a maioria dos medicamentos aprovados (71%) está de alguma forma relacionada aos produtos naturais. Newman e Cragg (2012) também avaliaram todos os medicamentos aprovados para o tratamento do câncer entre 1940 e 2010. Nesse período foram aprovados 206 novos medicamentos e 23% deles apresentam fármacos sintéticos baseados em produtos naturais, 41% contêm produtos naturais ou produtos naturais com pequenas modificações estruturais, 15% são vacinas e peptídeos e 21% apresentam fármacos totalmente sintéticos. Desconsiderando as vacinas e os peptídeos, foram aprovados 175 novos medicamentos para o tratamento do câncer e 75% deles contêm fármacos que apresentam alguma relação com produtos naturais.

A descoberta de novas classes de fármacos é extremamente importante e a diversidade estrutural encontrada nos metabólitos secundários é útil na pesquisa para atingir diferentes alvos biológicos. Ainda existem doenças para as quais os tratamentos não são adequados, a AIDS, o Mal de Alzheimer e diversos tipos de câncer são alguns exemplos. Assim, a exploração da diversidade química dos produtos naturais na busca de novos medicamentos pode trazer bons resultados (LI e VEDERAS, 2009).

Entre os fármacos baseados em produtos naturais introduzidos na terapêutica, o antitumoral eribulina (Figura 1, pág. 3), aprovado em 2010 pelo FDA para o tratamento de estágios avançados do câncer de mama metastático (HONG, 2014), apresenta uma história de desenvolvimento que exemplifica o quanto pode ser desafiador e compensatório trabalhar com produtos naturais. A halicondrina B, que serviu de modelo para a obtenção da eribulina, é um metabólito produzido pela esponja do mar *Halichondria okadai*. Na década de 1980, pesquisadores do Instituto Nacional do Câncer dos Estados Unidos conseguiram isolar e identificar a halicondrina B (Figura 1, pág. 3). Esse composto apresenta potente atividade antitumoral, mas é biossintetizado em baixa quantidade, o que inviabiliza a sua extração para a produção de um medicamento em escala industrial. Além disso, a halicondrina B apresenta uma estrutura química bastante complexa, o que torna a síntese total economicamente inviável para obtenção do composto em larga escala. Em 1992, um grupo de pesquisadores da Universidade de Harvard conseguiu desenvolver uma rota de síntese total para a halicondrina B (BAUER e BRÖNSTRUP, 2014). Em parceria com a indústria farmacêutica Eisai foram realizados estudos da atividade de análogos simplificados da halicondrina B. Felizmente descobriu-se que uma porção da estrutura química, quase a metade do composto, é a responsável pela atividade antitumoral, ou seja, o farmacóforo da halicondrina B. Obteve-se, assim, o fármaco eribulina (BAUER e BRÖNSTRUP, 2014; HONG, 2014).

A medicina popular pode ser útil no processo de descoberta de novos fármacos. A etnofarmacologia é uma ciência multidisciplinar que estuda a diversidade cultural e biológica e lida com os usos que comunidades tradicionais fazem das espécies vegetais para fins terapêuticos (FERNANDES, 2005). A descoberta de fármacos antimaláricos é um exemplo da contribuição da medicina

popular para o desenvolvimento de novos medicamentos. Cascas de espécies de plantas do gênero *Cinchona* são utilizadas por grupos indígenas da Amazônia para o tratamento da febre. No séc. XVII foram introduzidas espécies desse gênero na Europa para o tratamento da malária e em 1820 pesquisadores franceses conseguiram isolar o antimalárico quinina (Figura 2, pág. 4) a partir de *Cinchona officinalis* e outras espécies do gênero (CRAGG e NEWMAN, 2013). A quinina foi substituída por seus análogos sintéticos cloroquina e mefloquina (Figura 2, pág. 4) no tratamento da malária no séc. XX e com o surgimento de resistência a seus análogos, a *Artemisia annua*, planta usada no tratamento da febre na medicina tradicional chinesa, ganhou destaque. O estudo de *A. annua* por cientistas chineses levou ao isolamento e identificação do antimalárico artemisinina (BAUER e BRÖNSTRUP, 2014; CRAGG e NEWMAN, 2013). Esse fármaco e seus análogos (Figura 3, pág. 4) são atualmente os mais eficazes no tratamento da malária (MAUDE et al., 2010). Em 2015, o prêmio Nobel de Fisiologia ou Medicina foi concedido à farmacologista Youyou Tu, a pesquisadora membro da Academia de Medicina Tradicional Chinesa foi reconhecida por suas contribuições para a descoberta da artemisinina (KONG e TAN, 2015).

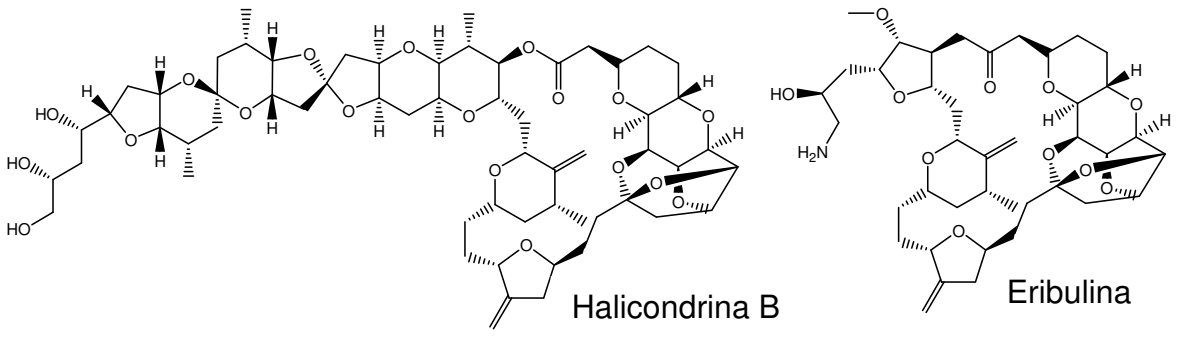


Figura 1: Estrutura da halicondrina B e da eribulina.

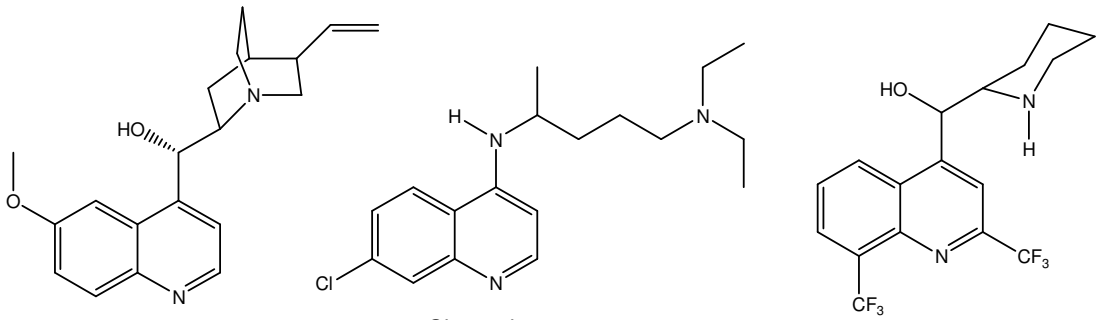


Figura 2: Quinina e alguns análogos.

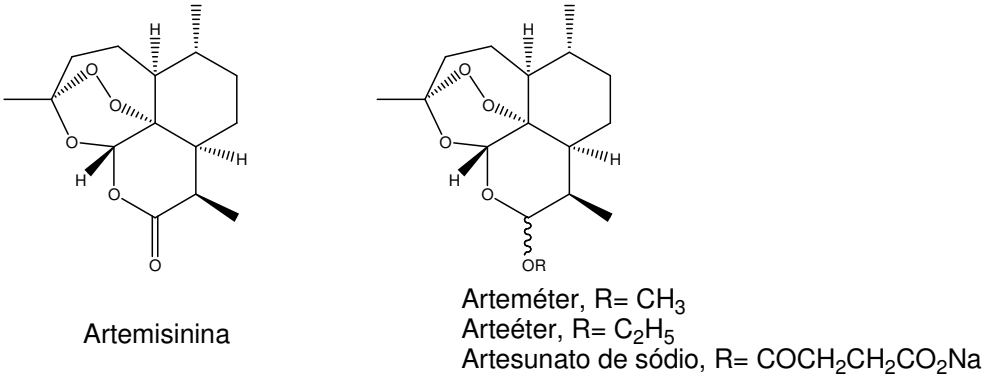


Figura 3: Artemisinina e alguns análogos.

O Brasil é privilegiado em relação ao número de fontes de produtos naturais disponíveis em seu território. O país possui uma riqueza biológica quase imensurável e abriga grande biodiversidade, contendo de 10 a 20% dos seres vivos conhecidos, distribuídos em seis grandes biomas: Amazônia, Caatinga, Mata Atlântica, Cerrado, Pantanal e Pampa (VALLI et al., 2012). A biodiversidade brasileira representa um grande potencial econômico a ser explorado para a identificação de novos compostos bioativos. Entretanto, poucos produtos naturais isolados de espécies brasileiras levaram à obtenção de medicamentos (BOLZANI et al., 2012). Um exemplo é o peptídeo bradicinina isolado do veneno da jararaca (*Bothrops jararaca*), o qual foi importante para o desenvolvimento do anti-hipertensivo captopril, considerado uma inovação terapêutica (BARREIRO e FRAGA, 2008). Outro exemplo é a pilocarpina, fármaco utilizado no tratamento do

glaucoma e isolado de espécies brasileiras *Pilocarpus* sp., popularmente conhecidas como jaborandi (BOLZANI et al., 2012).

Recentemente, o Brasil alterou a legislação referente à exploração da sua biodiversidade, com o objetivo de desburocratizar o processo e estimular o desenvolvimento sustentável e a pesquisa científica no país. Em 2000 foi realizado um contrato entre a Organização Social BioAmazônia e a indústria farmacêutica multinacional Novartis. O objetivo da indústria seria isolar e identificar micro-organismos para a produção de extratos e isolamento de compostos de interesse terapêutico. A BioAmazônia receberia 1% em *royaties* por produto criado, entretanto houve uma repercussão negativa do contrato, principalmente por não haver previsão de transferência de tecnologia. A parceria entre a BioAmazônia e a Novartis foi suspensa pelo Ministério do Meio Ambiente e o ocorrido levou à criação da Medida provisória n° 2.186-16, de 23 de agosto de 2001(SACCARO JUNIOR, 2013). Essa medida provisória mostrou-se pouco efetiva em função do conjunto de restrições e burocracias que dificultavam o acesso ao patrimônio genético para a pesquisa e/ou desenvolvimento tecnológico de novos produtos. Gastava-se um grande tempo para conseguir as autorizações de acesso ao patrimônio e caso houvesse interesse econômico, um contrato de repartição de benefícios deveria ser assinado mesmo sem saber se haveria um produto final (SACCARO JUNIOR, 2013). Em 20 de maio de 2015 foi aprovada a Lei Federal nº 13.123 que entrou em vigor em 17 de novembro de 2015 e revogou a Medida provisória n° 2.186-16, de 23 de agosto de 2001. A nova lei visa desburocratizar o acesso ao patrimônio genético e ao conhecimento tradicional, com a substituição da autorização prévia do CGen (Conselho de Gestão do Patrimônio Genético) por um cadastro de pesquisa. Essa lei, também, legaliza e incentiva a pesquisa, estimula a inovação e obtenção de novos produtos, facilita o depósito de patentes no INPI (Instituto Nacional de Propriedade Industrial) e aumenta a participação das populações indígenas, comunidades e agricultores tradicionais nas decisões (Brasil. Lei nº 13.123 de 20 de maio de 2015).

Entre os diversos tipos de organismos que podem ser explorados na busca de agentes terapêuticos existe um enorme interesse nas plantas. Isso se deve ao elevado número de fármacos derivados de plantas que deram origem a medicamentos (KINGHORN et al., 2011).

As plantas da família Celastraceae são agrupadas em 98 gêneros, compreendendo cerca de 1260 espécies encontradas principalmente nas regiões tropicais (DUARTE, 2000). Vários compostos biologicamente ativos foram obtidos de espécies dessa família. Entre eles, sesquiterpenos, triterpenos e quinonametídios (ALVARENGA e FERRO, 2006). No Brasil, os gêneros da família Celastraceae mais conhecidos são *Maytenus* Juss., *Goupia* Reiss., *Austroplenckia* Lund. e *Franhofera* Mart. (BARROSO et al., 1984; CARVALHO-OKANO, 1992). Algumas plantas da família Celastraceae são utilizadas na medicina popular, principalmente para o tratamento de úlceras gástricas. *Maytenus ilicifolia*, popularmente conhecida como “espinheira santa”, é uma dessas espécies. No Brasil, há no mercado medicamentos fitoterápicos produzidos a partir do extrato seco de *M. ilicifolia* e que são utilizados como protetores gástricos. O gênero *Maytenus* é um dos maiores da família Celastraceae com aproximadamente 300 espécies, distribuídas ao redor do mundo em regiões tropicais e subtropicais (MCKENNA et al., 2011). No Brasil, são reconhecidas 76 espécies de *Maytenus* (NIERO et al., 2011). Em estudos fitoquímicos de espécies desse gênero foram identificados compostos de várias classes, entre eles flavonoides, triterpenos pentacíclicos, taninos condensados e alcaloides (DE ANDRADE et al., 2008; NIERO et al., 2011).

M. robusta (Figura 4, pág. 7) também é utilizada na medicina popular para o tratamento de úlceras estomacais e é bem adaptada ao sul do Brasil. A espécie pode ser encontrada tanto na vegetação de restinga dos Estados de Santa Catarina, Paraná e São Paulo, como no interior da floresta (CARVALHO-OKANO, 1992). Em Minas Gerais, existem exemplares no Parque Estadual do Itacolomi, situado na cidade de Ouro Preto. *M. robusta* também é conhecida popularmente como espinheira santa ou cancerosa e, morfologicamente, é similar à *M. ilicifolia* (NIERO et al., 2011). A espécie apresenta de 6 a 12 m de altura e devido ao seu porte, tem utilização ornamental e, pelo interesse pela fauna, é também recomendada para a composição de reflorestamentos heterogêneos destinados ao repovoamento de áreas degradadas (BERKENBROCK e PAULILO, 1999). *M. robusta* é uma fonte rica em triterpenos pentacíclicos. Niero e colaboradores (2001) relataram que a espécie apresenta o triterpeno friedelina em quantidade três vezes maior do que a encontrada em *M. ilicifolia*. Em um estudo prévio

(SOUSA et al., 2012) das folhas de *M. robusta* foram isolados, do extrato hexânico e do sólido obtido durante a preparação desse extrato, sete triterpenos pentacíclicos: 3-oxofriedelano, 3β-hidroxifriedelano, 3-oxo-11β-hidroxifriedelano, 3-oxo-29-hidroxifriedelano, 3β,11β-di-hidroxifriedelano, 3-oxo-21β-*H*-hop-22(29)-eno e 3β-hidroxi-21β-*H*-hop-22(29)-eno (Figura 5, pág. 8). Foram isolados ainda, dois triterpenos de esqueleto *seco*-friedelano, 3,4-*seco*-friedelan-3,11β-olídeo e ácido 3,4-*seco*-friedelan-3-óico, e o triterpeno de esqueleto seco hopânico ácido 3,4-*seco*-21β-*H*-hop-22(29)-en-3-óico (Figura 5, pág. 8). Triterpenos pentacíclicos de esqueleto hopano não são comuns em membros da família Celastraceae e ainda não havia relatos desses compostos para o gênero *Maytenus*.



Figura 4: *Maytenus robusta*, exemplar do Parque Estadual do Itacolomi, Ouro Preto – MG (Fotos: autora).

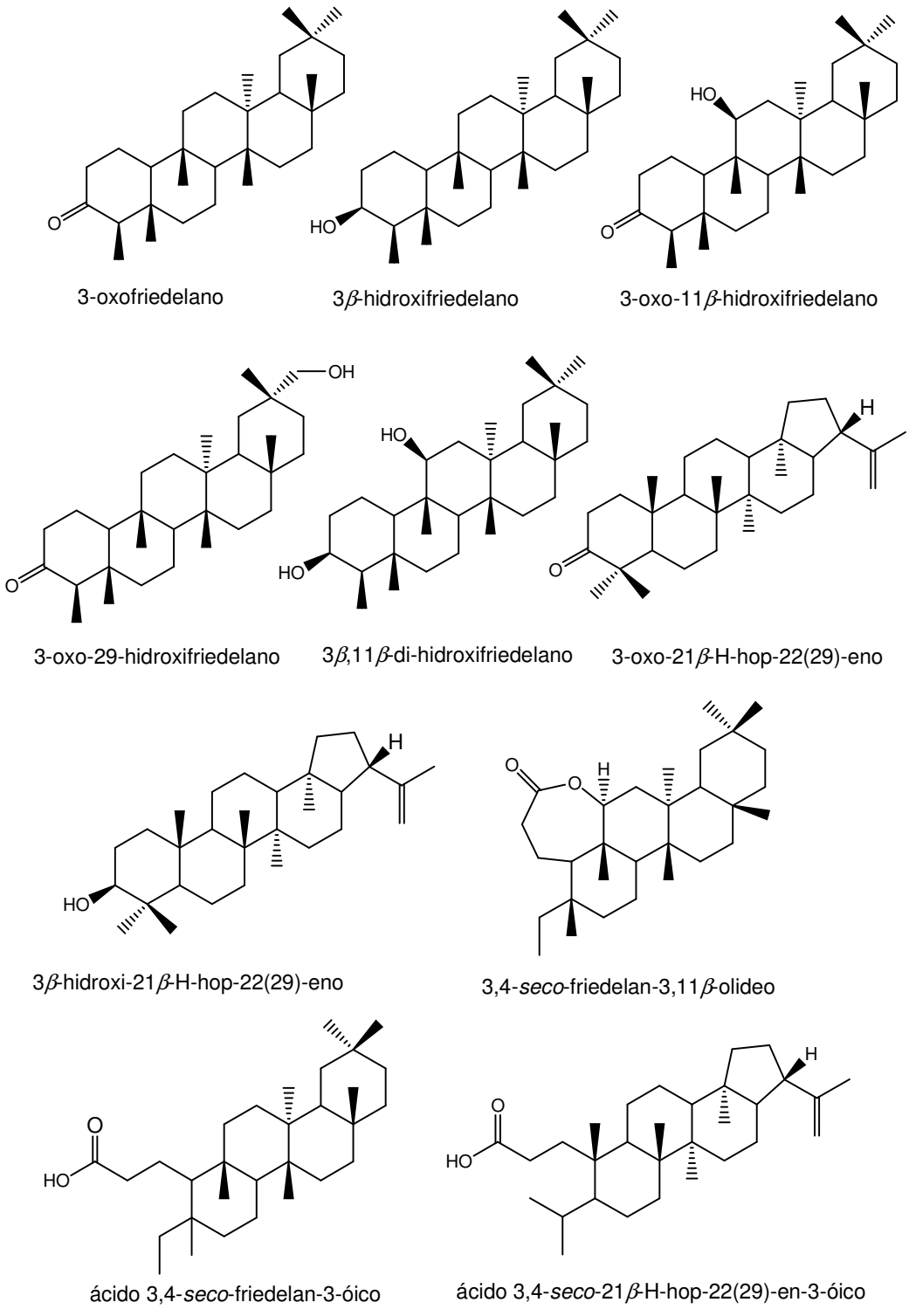
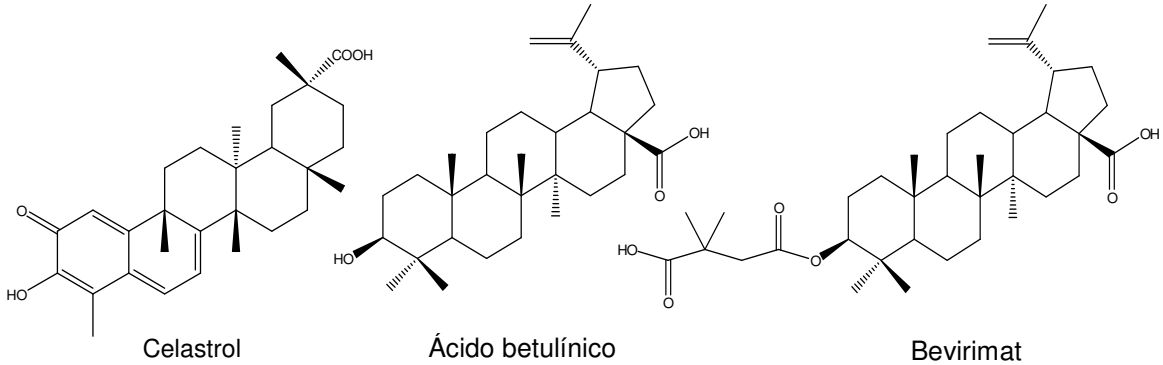


Figura 5: Triterpenos previamente isolados de folhas de *Maytenus robusta*.

Triterpenos pentacíclicos são compostos que apresentam 30 átomos de carbono compreendendo cinco anéis fundidos de seis membros cada ou quatro

anéis de seis membros e o último de cinco (XU et al., 2004). Foram relatados na literatura vários tipos de atividade biológica para diferentes compostos dessa classe de substâncias e seus derivados. Nesse contexto, atividade anti-inflamatória foi atribuída à friedelina (ANTONISAMY et al., 2011), atividade antitumoral frente a várias linhagens de células cancerígenas foi atribuída ao celastrol (SHAN et al., 2013) e atividade anti-HIV foi relatada para o bevirimat (LEE, 2010) que é um derivado do ácido betulínico (Figura 6).



Celastrol Ácido betulínico Bevirimat

Figura 6: Estrutura do celastrol, ácido betulínico e bevirimat.

Considerando os diferentes tipos de triterpenos previamente obtidos a partir de *M. robusta* e a possibilidade de isolamento de compostos de outras classes, a continuidade do estudo fitoquímico das folhas e o estudo de galhos da espécie pode levar à descoberta de novos compostos bioativos e contribuir para o estudo quimiotaxonômico da família Celastraceae.

OBJETIVOS

O principal objetivo deste trabalho foi dar continuidade às pesquisas com os membros da família Celastraceae, especificamente a espécie *Maytenus robusta*. Neste contexto, o presente trabalho envolveu os seguintes objetivos específicos:

- realizar estudo fitoquímico de folhas e galhos de *Maytenus robusta*;
- realizar um estudo detalhado de confirmação estrutural dos metabólitos secundários isolados, utilizando métodos espectroscópicos e espectrométricos;
- estabelecer relações fitoquímicas entre espécies da família Celastraceae;
- realizar estudos de atividade biológica de extratos e das substâncias isoladas;
- submeter alguns triterpenos pentacíclicos isolados a reações de redução empregando boroidreto de sódio para a obtenção de derivados inéditos com potencial atividade biológica.

1 – ESTUDO FITOQUÍMICO

1.1 – Parte Experimental

1.1.1 – Métodos gerais

Na preparação das cromatoplacas para cromatografia em camada delgada (CCD) utilizou-se suspensão de sílica gel 60 G em água (7 g de sílica para cada 15 mL de água), formando uma camada de 0,25 mm de espessura sob suporte de vidro. Após secagem parcial a temperatura ambiente, as placas foram ativadas em estufa a 100 ºC por pelo menos 30 minutos. Para revelação da maioria das cromatoplacas pulverizou-se sobre elas uma mistura recém-preparada na proporção de 1:1 v/v de soluções de vanilina em álcool etílico (1:99) e ácido perclórico em água (3:97). Em seguida, essas placas foram aquecidas em estufa a 100 °C. Em algumas análises por CCD as cromatoplacas foram reveladas com o reagente NP/PEG composto pela solução metanólica de difenilboriloxietilamina a 2% (solução A) e pela solução etanólica de polietileno glicol-4000 a 5% (solução B). Pulverizaram-se a solução A e a solução B sobre as cromatoplacas que foram, em seguida, observadas sob luz UV.

Para o preparo de colunas cromatográficas (CC) utilizou-se sílica gel 60 (70-230 ou 230-400 Mesh) e Sephadex LH-20. Os solventes empregados nas análises cromatográficas foram hexano, clorofórmio, acetato de etila e metanol. A reutilização desses solventes, quando em mistura e para a mesma coluna, foi realizada após correção das proporções das misturas usando refratômetro modelo Biobrix.

As análises por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) foram realizadas em cromatógrafo SHIMADZU, equipado com duas bombas LC- 20AT, detector UV/VIS SPD-20A, programa LCsolution v.1.21 (SHIMADZU) e coluna Supelco-54919 (Nucleosil®, C-18, partículas de 5 µm, dimensão 250 x 3,2 mm).

Nos fracionamentos por cromatografia líquida de média pressão utilizou-se o equipamento Isolera One Biotage® equipado com detector UV/VIS e coluna de fase reversa (Biotage®, KP-C-18-HS, 120 g).

A liofilização foi realizada empregando liofilizador de bancada L202 Liotop.

As faixas de fusão, sem correção, foram determinadas em aparelho Microquímica MQAPF-302. Também foram utilizados os métodos de análises térmicas: termogravimetria (TG) e análise térmica diferencial (DTA). O equipamento empregado foi DTG-60 Shimadzu.

Espectros de absorção na região do infravermelho foram obtidos utilizando, quando necessário, pastilhas de KBr [1% (m/m)]. Os equipamentos usados foram espectrômetro Shimadzu IR-408 e Spectrum One Perkin Elmer com dispositivo ATR.

Os espectros de RMN de 1D e 2D foram obtidos em espectrômetros Bruker *AVANCE* DPX-200 e DRX-400. Os solventes deuterados utilizados encontram-se indicados em cada caso. Os deslocamentos químicos (δ) foram registrados em ppm usando tetrametilsilano (TMS) como padrão de referência interna e as constantes de acoplamento (*J*) apresentadas em Hz.

Espectros de massas de alta resolução dos triterpenos pentacíclicos foram adquiridos utilizando um espectrômetro de massas acoplado a cromatógrafo líquido de alta resolução. Utilizou-se o cromatógrafo Prominence LC-20 AD, Shimadzu, equipado com uma bomba binária e um amostrador automático SIL 20 AC, Shimadzu. O espectrômetro de massas IT-TOF, Shimadzu, foi equipado com uma fonte de ionização química a pressão atmosférica (APCI) operando nos modos positivo e negativo. O gás nebulizador (N_2) foi ajustado para uma taxa de fluxo de 2,5 mL/min. A voltagem do detector foi 1,70 kV e a temperatura da interface 400 °C. Fez-se varredura na faixa de 50 a 1000 *m/z*. As análises foram realizadas por infusão direta utilizando amostrador automático. As amostras foram solubilizadas em gotas de clorofórmio e, em seguida, diluídas em metanol. Água e metanol foram empregados como fase móvel em um fluxo de 0,2 mL/min. Espectros de massas de alta resolução dos flavonoides foram adquiridos utilizando um espectrômetro de massas acoplado a cromatógrafo líquido de ultra performance (UHPLC). Utilizou-se o cromatógrafo Nexera, Shimadzu, acoplado ao espectrômetro de massas maXis ETD ESI-QTOF, Bruker, controlado pelo programa Compass 1.5, Bruker. As amostras foram injetadas em uma coluna de fase reversa Sepulco Titan Shimadzu (C18, 1,9 *m*m, 2,1 X 100 mm) em um fluxo de 200 μL/min. As fases móveis A (0,1% de ácido fórmico em água) e B (acetonitrila) foram empregadas em eluição por gradiente: 5% de B de 0 a 0,5 min, gradiente linear até 100% de B de 0,5 a 12,5 min, 100% de B até 13,5 min.

Foram adquiridos cromatogramas no UV em 214 e 254 nm. Espectros de massas foram adquiridos no modo positivo. Os parâmetros da fonte de ionização foram: voltagem do capilar 4500 V, pressão de nebulização 2,0 Bar, gás de secagem com fluxo de 8,0 mL/min a 200 °C. A energia de colisão para as fragmentações foi 30 eV. Fez-se varredura na faixa de 40 a 1000 *m/z*.

1.1.2 – Coleta e identificação do material vegetal

Folhas e galhos de *Maytenus robusta* (Celastraceae) foram coletados no Parque Estadual do Itacolomi, situado no município de Ouro Preto – MG, em junho de 2010 pelo Prof. Dr. Sidney Augusto Vieira Filho da Escola de Farmácia da Universidade Federal de Ouro Preto (UFOP).

O material vegetal foi identificado pela Profa. Maria Cristina Teixeira Braga Messias do Departamento de Biodiversidade, Evolução e Meio Ambiente do Instituto de Ciências Exatas e Biológicas (ICEB) da UFOP. Uma exsicata do *especimen* (Nº. OUPR 25559) encontra-se depositada no Herbário Professor José Badini do ICEB da UFOP.

1.1.3 – Preparação dos extratos das folhas e galhos de *Maytenus robusta*

Após secagem a temperatura ambiente, as folhas e galhos foram pulverizados em moinho de martelos e obtiveram-se 864,40 g de pó das folhas e 888,80 g de pó dos galhos. Os extratos das folhas e galhos pulverizados foram preparados empregando-se extração exaustiva por maceração a temperatura ambiente por, aproximadamente, 72 h. Foram utilizados hexano, clorofórmio, acetato de etila e metanol puros. O processo de maceração foi repetido por três vezes para cada solvente. Após filtração, a remoção dos solventes por destilação sob pressão reduzida forneceu os respectivos extratos. Durante a remoção parcial do solvente de alguns extratos ocorreu precipitação de sólidos que foram separados por filtração sob pressão reduzida. A preparação dos extratos está esquematizada nas Figuras 7 e 8, páginas 14 e 15.

A nomenclatura dos extratos foi feita da seguinte forma: letra E, para extrato; H para hexânico; C para clorofórmico; A para acetato etílico; M para metanólico, F para folhas e G para galhos. Para os sólidos, foi incluída a letra S no início da sigla. A notação empregada para codificar as substâncias ou misturas isoladas no estudo fitoquímico de folhas e galhos de *Maytenus robusta* tem as iniciais da planta seguida por ordem de isolamento das mesmas. No Apêndice C (pág. 232) estão apresentadas as estruturas químicas dos compostos isolados.

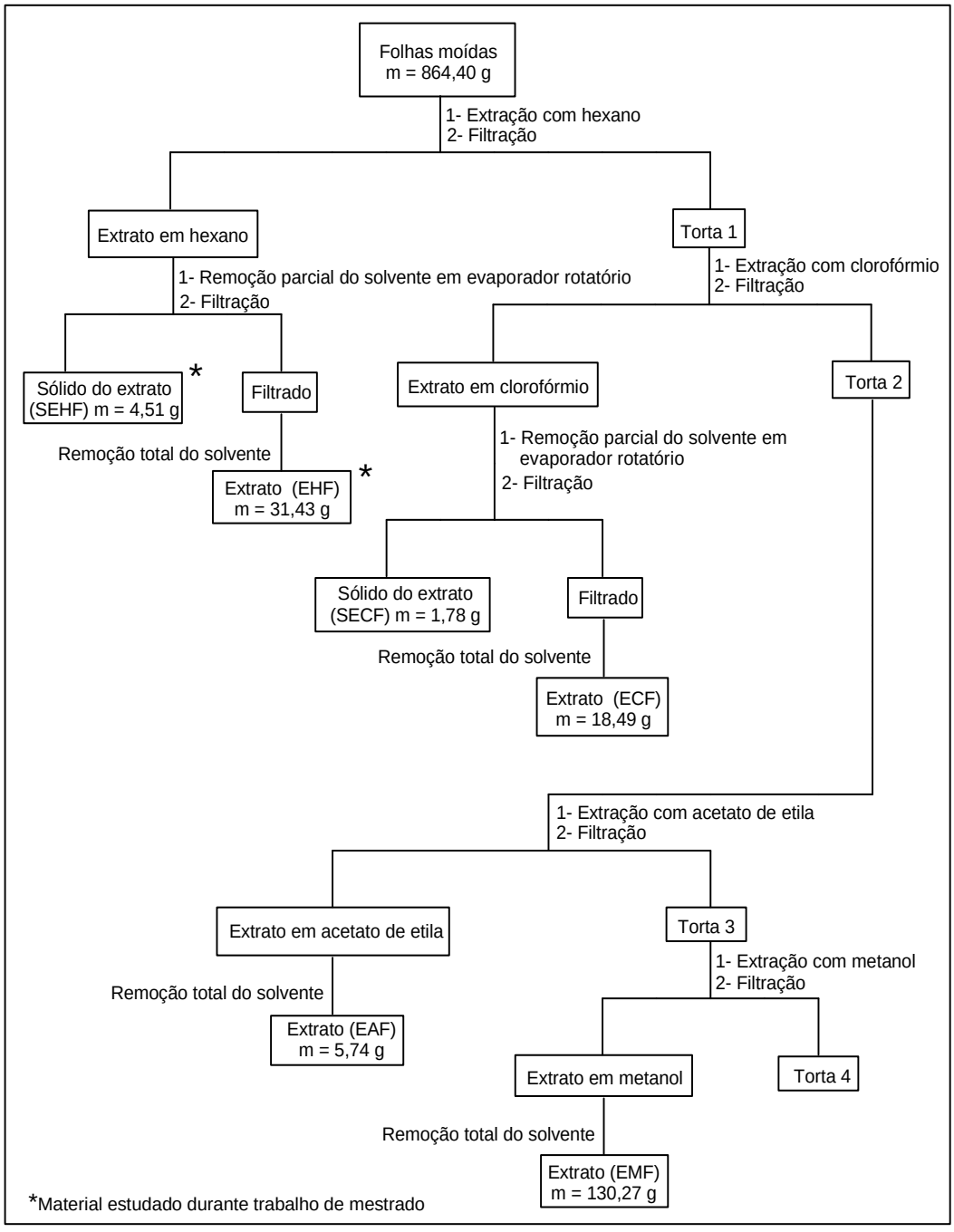


Figura 7: Esquema da obtenção dos extratos de folhas de *M. robusta*.

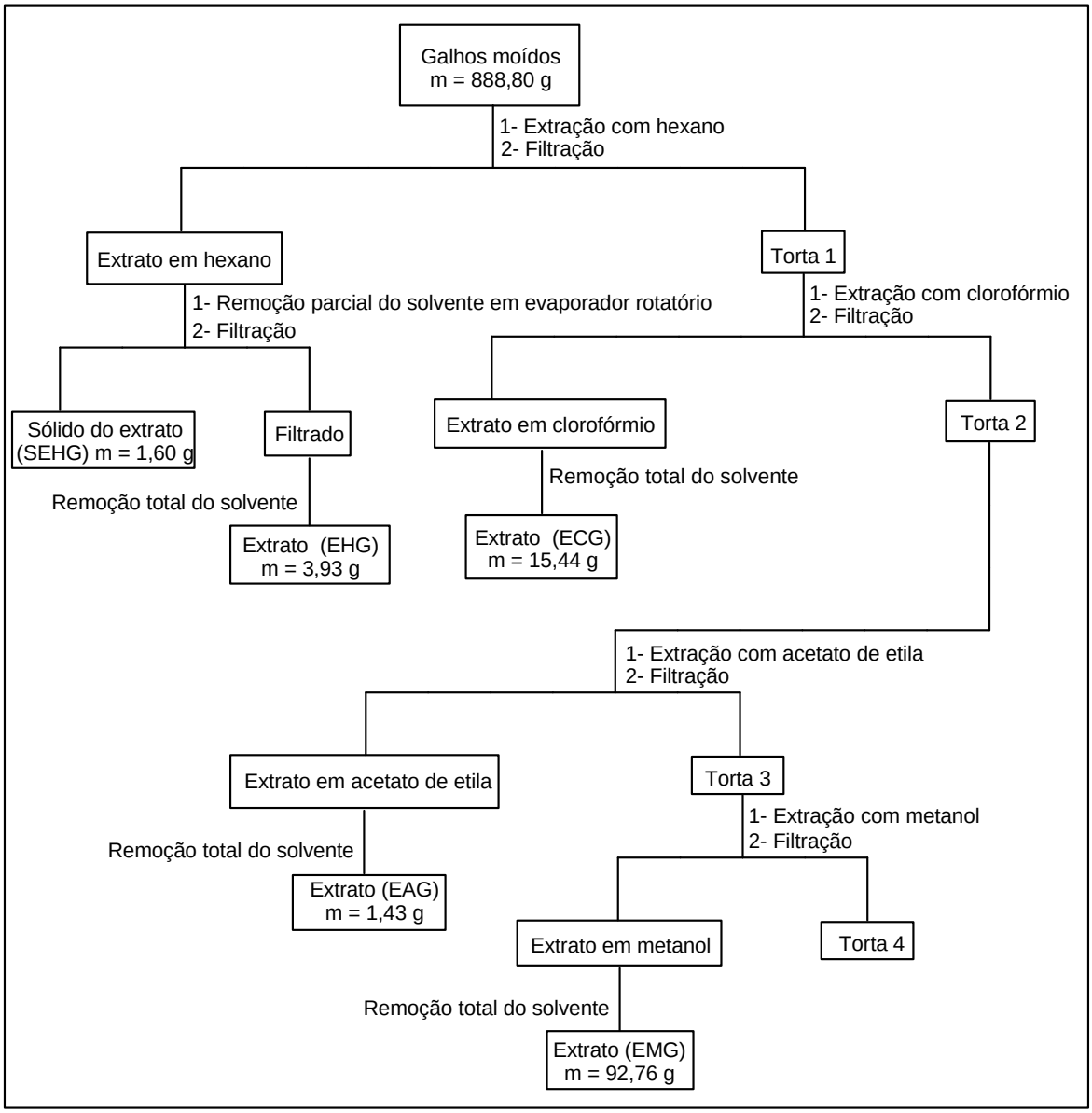


Figura 8: Esquema da obtenção dos extratos de galhos de *M. robusta*.

1.1.4 – Elaboração de SECF

SECF (1,78 g) foi obtido como um sólido de coloração verde durante a preparação do extrato clorofórmico. Realizou-se análise por CCD de SECF utilizando padrões dos triterpenos pentacíclicos friedelina e β-friedelinol e observou-se que as manchas mais intensas na cromatoplaca apresentaram os mesmos valores de Rf verificados para a friedelina e o β-friedelinol. SECF foi submetido à CC (Coluna **A**) utilizando-se 1,56 g da amostra e 123,50 g de sílica gel 60. Os eluentes empregados foram clorofórmio, acetato de etila e metanol,

puros ou em misturas, em ordem crescente de polaridade. Foram coletadas 156 frações de aproximadamente 50 mL cada.

Algumas frações foram consideradas mais promissoras de acordo com a massa e análise por CCD e foram reunidas em quatro grupos (Figura 9, pág. 17). Frações com massas muito pequenas e que apresentaram várias manchas em CCD não foram trabalhadas.

Grupo A1 (frações 11 a 14 – $CHCl_3$). Foi obtido como um sólido branco (67,7 mg) com faixa de fusão de 252-255 ºC. Fez-se análise por CCD comparando o grupo A1 com uma amostra autêntica de 3-oxofriedelano e ambos apresentaram o mesmo valor de Rf. Foram obtidos espectros no IV e de RMN de ^{1}H e de ^{13}C, os quais permitiram concluir que o sólido trata-se de 3-oxofriedelano (friedelina) **(MR01).**

Grupo A2 (frações 15 a 17 – $CHCl_3$). Esse grupo foi obtido como um sólido branco (241,6 mg). A análise por CCD empregando amostras autênticas de 3-oxofriedelano e 3β-hidroxifriedelano (β-friedelinol) e os experimentos de RMN de ^{1}H e de ^{13}C indicaram tratar-se da mistura desses dois compostos codificados como **MR01** e **MR02**.

Grupo A3 (frações 18 a 29 – $CHCl_3$). Foi obtido como um sólido branco não cristalino (1,08 g) com faixa de fusão de 271-274 ºC. O sólido foi submetido à cromatografia em camada delgada e comparado a amostra autêntica de 3β-hidroxifriedelano, indicando tratar-se dessa mesma substância. Espectros no IV e RMN de ^{1}H e de ^{13}C foram obtidos e confirmou-se tratar de 3β-hidroxifriedelano **(MR02)**.

Grupo A4 (frações 91 a 127 – $CHCl_3$/AcOEt 9:1 → 7:3). O grupo foi obtido como um sólido verde não cristalino (11,0 mg). Após a adição de hexano na amostra houve precipitação de um sólido branco que foi separado por filtração sob pressão reduzida, obtendo-se 4,3 mg. Não foi possível determinar o ponto de fusão, o sólido degradou a partir de 160 °C, antes de fundir. A análise dos espectros de RMN de ^{1}H e de ^{13}C indicou tratar-se de 3β,11β-di-hidroxifriedelano **(MR03)**.

Do sólido obtido durante a preparação do extrato clorofórmico das folhas de *M. robusta* foi possível isolar três compostos puros, sendo que **MR02** corresponde a 69,2% do total desse sólido (Figura 9, pág. 17).

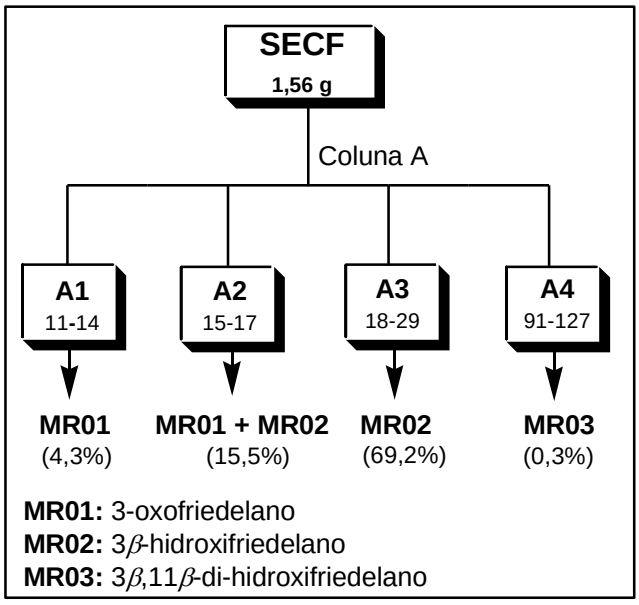


Figura 9: Esquema do fracionamento de SECF.

1.1.5 – Elaboração de ECF

O extrato clorofórmico das folhas de *Maytenus robusta* (ECF) foi submetido à CC (coluna **B**) utilizando-se 17,00 g da amostra e 237,00 g de sílica gel 60 (70-230 Mesh). Os eluentes foram hexano, clorofórmio, acetato de etila e metanol, puros ou em misturas, em ordem crescente de polaridade. Foram obtidas 46 frações de aproximadamente 400 mL cada. Após análise por CCD, algumas frações foram reunidas em quatro grupos (Figura 10, pág. 19). Frações com massas muito pequenas e que apresentaram várias manchas em CCD não foram trabalhadas.

Grupo B1 (frações 3 a 6 – Hexano/$CHCl_3$ 2:8). Foi obtido como um sólido branco (14,7 mg). Fez-se CCD comparando o sólido com amostra autêntica de 3-oxofriedelano e ambos apresentaram o mesmo perfil na cromatoplaca. Espectros de RMN de ^{1}H e de ^{13}C permitiram identificar o composto como 3-oxofriedelano **(MR01)**.

Grupo B2 (frações 7 a 9 – Hexano/$CHCl_3$ 1:9). O grupo foi obtido como um sólido verde não cristalino. Ocorreu a precipitação de um sólido branco (1,11 g) após adição de hexano, esse sólido foi isolado por filtração a vácuo e utilizando a técnica de CCD foi comparado a amostras autênticas de 3-oxofriedelano e 3β-hidroxifriedelano. A cromatoplaca obtida permitiu inferir que o

grupo B2 trata-se de uma mistura de 3-oxofriedelano **(MR01)** e 3β-hidroxifriedelano **(MR02)**.

Grupo B3 (frações 10-12 – $CHCl_3$ → $CHCl_3$/AcOEt 9:1). Foi obtido como um sólido verde (762,0 mg) e submetido à purificação em coluna de sílica gel 60 (70-230 Mesh) (coluna **C**). Utilizaram-se 36,90 g de fase estacionária e os eluentes foram hexano, clorofórmio, acetato de etila e metanol, puros ou em misturas em ordem crescente de polaridade. Obtiveram-se 51 frações de aproximadamente 250 mL. As frações 19 a 30 e 37 a 43 foram reunidas em dois subgrupos. Frações com massas muito pequenas e que apresentaram várias manchas em CCD não foram trabalhadas.

Subgrupo C1 (frações 19 a 30 – Hex/$CHCl_3$ 1:1). Esse subgrupo (487,6 mg) foi submetido à análise por CCD utilizando amostras autênticas de 3-oxofriedelano e 3β-hidroxifriedelano e o perfil em cromatoplaca indicou tratar-se de uma mistura de **MR01 e MR02**.

Subgrupo C2 (frações 37 a 43 – $CHCl_3$ → $CHCl_3$/AcOEt 1:1). Foi obtido como um sólido branco (23,6 mg) e apresentou uma única mancha em CCD. Espectros no IV e de RMN de ^1H e de ^{13}C permitiram identificar o composto como taraxerol **(MR04)**. O composto decompôs próximo a 210 ºC e não foi possível determinar a faixa de fusão.

Grupo B4 (fração 15 – $CHCl_3$/AcOEt 8:2). Esse grupo foi obtido com aspecto de graxa de coloração verde (279,8 mg). Procedeu-se à purificação em CC (coluna **D**) utilizando 20,85 g de sílica gel 60 (70-230 Mesh) como fase estacionária. Os eluentes foram hexano, clorofórmio e metanol, puros ou em misturas em ordem crescente de polaridade. Obtiveram-se 44 frações de aproximadamente 20 mL cada. As frações 15 a 19 foram agrupadas. Frações com massas muito pequenas e que apresentaram várias manchas em CCD não foram trabalhadas.

Subgrupo D1 (frações 15 a 19 – $CHCl_3$ → $CHCl_3$/AcOEt 8:2). Foi obtido como um sólido branco não cristalino (9,0 mg) com faixa de fusão de 138-143 ºC. Espectros no IV e de RMN de ^1H e de ^{13}C foram obtidos e permitiram identificar o composto como β-sitosterol **(MR05)**.

Do extrato clorofórmico das folhas foi possível obter três compostos puros, sendo que a mistura de **MR01** e **MR02** corresponde a 9,4% desse extrato (Figura

10, pág. 19).

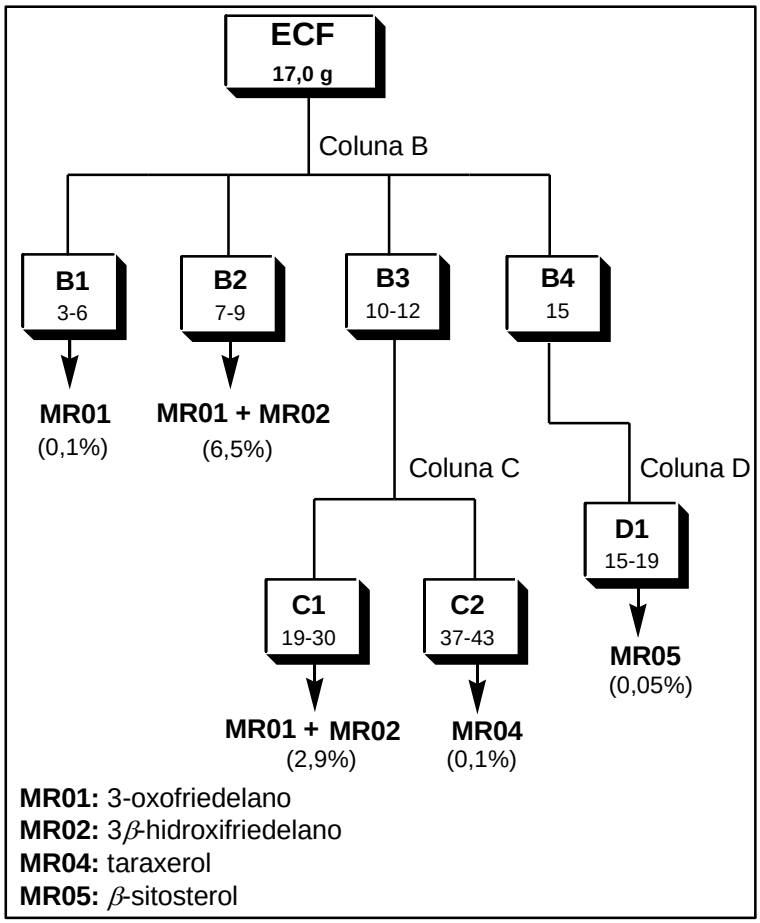


Figura 10: Esquema do fracionamento de ECF.

1.1.6 – Elaboração de EAF

O extrato acetato etílico das folhas de *Maytenus robusta* (EAF) foi submetido à CC (coluna **E**) utilizando-se 2,60 g da amostra e 275 mL de Sephadex LH20 suspenso em metanol. A eluição foi isocrática empregando metanol. Obtiveram-se 70 frações de aproximadamente 20 mL cada. As frações 14 a 20 foram reunidas em um subgrupo. Em relação às outras frações, algumas não foram trabalhadas por apresentarem massas muito pequenas e várias manchas em CCD, enquanto outras foram trabalhadas, mas não levaram ao isolamento e identificação de compostos.

Grupo E1 (frações 14 a 20). Foi obtido como um sólido verde (1,54 g) e submetido à purificação em CC (Coluna **F**). Utilizaram-se 76,43 g de sílica gel (70-230 Mesh) e os eluentes foram clorofórmio e metanol, puros ou em misturas, em ordem crescente de polaridade. Foram obtidas 101 frações de aproximadamente 20 mL cada. As frações 60-69 foram agrupadas (**Subgrupo F1**) e levaram ao isolamento e identificação de um sólido branco (6,7 mg). A partir da análise de espectros de RMN de ^{1}H e de ^{13}C o composto foi identificado como β-sitosterol **(MR05)**.

Não foi possível isolar e identificar compostos a partir de outras frações da coluna **E1**. Do extrato acetato etílico das folhas foi possível obter um composto puro (Figura 11).

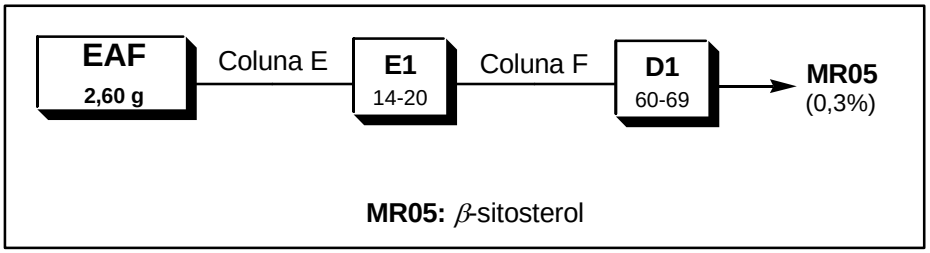


Figura 11: Esquema do fracionamento de EAF.

1.1.7 – Elaboração de EMF

EMF (130,27 g) foi obtido como um sólido de coloração marrom. Realizou-se análise por CCD de EMF e a cromatoplaca foi revelada utilizando solução NP/PEG e analisada sob luz UV (365 nm). Observaram-se várias manchas fluorescentes de colorações alaranjada e verde, o que é um indicativo da presença de flavonoides da classe dos flavonóis (WAGNER e BLADT, 1996). A 42,12 g de EMF foi adicionado metanol, não houve solubilização completa e após filtração foram obtidos 9,50 g de sólido e a parte solúvel. À parte de EMF solubilizada em metanol adicionou-se etanol e ocorreu a precipitação de mais sólido, o qual foi separado por filtração (7,40 g). Após a evaporação do solvente do sobrenadante final obtido restaram 25,01 g de extrato o qual foi submetido à CC (Coluna **G**). Utilizaram-se 609,60 g de sílica gel 60 (70-230 Mesh). Os eluentes foram clorofórmio e metanol, puros ou em misturas em ordem crescente de polaridade. As frações 15 a 22 e 36 a 58 foram reunidas em dois subgrupos.

Em relação às outras frações, algumas não foram trabalhadas por apresentarem massas muito pequenas e várias manchas em CCD, enquanto outras foram trabalhadas, mas não levaram ao isolamento e identificação de compostos.

Grupo G1 (frações 15 a 22 – $CHCl_3$/MeOH 9:1 → 8:2). O grupo foi obtido como um sólido marrom não cristalino (355,6 mg) e submetido à purificação em CC (Coluna **H**). Utilizaram-se 50 mL de Sephadex LH20 suspenso em metanol. A eluição foi isocrática empregando metanol. As frações 20 a 24 foram reunidas em um subgrupo.

Subgrupo H1 (frações 20 a 24). Foi obtido como um sólido amarelo não cristalino (3,0 mg). Apresentou uma única mancha de cor amarelo-esverdeada em cromatoplaca revelada com NP/PEG e observada sob luz UV (365 nm). Espectros no IV e de RMN de ^{1}H e de ^{13}C permitiram inferir que o composto trata-se do canferol **(MR06)**.

Grupo G2 (frações 36 a 58 – $CHCl_3$/MeOH 6:4 → 3:7). O grupo foi obtido como um sólido marrom não cristalino (6,30 g) e submetido à purificação em CC (Coluna **I**). Utilizaram-se 400 mL de Sephadex LH20 suspenso em metanol. A eluição foi isocrática empregando metanol. As frações 14 a 18 e 19 a 26 foram reunidas em dois subgrupos.

Subgrupo I1 (frações 14 a 18). Foi obtido como um sólido marrom não cristalino (2,71 g), que exibiu várias manchas amarelas em cromatoplaca revelada com NP/PEG e observada sob luz UV (365 nm). O subgrupo foi analisado por CLAE analítica. Empregou-se uma coluna de fase reversa Supelco-54919 (Nucleosil®, C-18, partículas de 5 µm, dimensão 250 x 3,2 mm). O detector foi operado nos comprimentos de onda 270 e 350 nm. Fez-se eluição por gradiente utilizando as fases móveis A (MeOH) e B (0,1% de ácido fórmico em H_2O) e fluxo de 0,7 mL/min. A porcentagem da fase B variou linearmente de 65 a 55% entre 0,01 e 10 min, de 55 a 50% entre 10 e 20 min e de 50% a 0 entre 20 e 30 min. A amostra foi solubilizada em solução 1:1 de MeOH/H_2O. No cromatograma obtido (Figura 12, pág. 23) observaram-se os picos A, B e C referentes a compostos que absorvem em 270 e 350 nm, o que é um indicativo da presença de flavonoides. O **Subgrupo I1** foi submetido ao fracionamento por cromatografia de média pressão (Coluna **I1**). Utilizou-se o equipamento Isolera One, coluna de fase reversa (Biotage®, KP-C-18-HS, 120 g) e 1,00 g de amostra. O detector foi

operado nos comprimentos de onda 270 e 350 nm. Fez-se eluição por gradiente utilizando as fases móveis A (MeOH) e B (0,1% de ácido fórmico em H_2O). A porcentagem da fase A variou de 10 a 100%. Foram coletadas 190 frações de 20 mL cada, as quais foram agrupadas de acordo com o cromatograma obtido (Figura 13, pág. 24). Após a retirada do metanol em evaporador rotatório, as frações foram liofilizadas. As frações 159 a 169 foram agrupadas (**Subgrupo I1.1**) e levaram ao isolamento e identificação de um sólido amarelo (15,1 mg) com faixa de fusão 186 a 190 ºC. Esse sólido apresentou uma única mancha de cor amarelo-esverdeada em cromatoplaca revelada com NP/PEG e observada sob luz UV (365 nm). Espectros no IV, de RMN de ^{1}H e de ^{13}C (1D/2D) e de massas de alta resolução permitiram elucidar a estrutura química do composto que trata-se do canferol-3-*O*-β-D-glicopiranosil-(1→3)-α-L-ramnopiranosil-(1→2)-β-D-glicopiranosídeo **(MR07)**.

Não foi possível isolar e identificar compostos a partir de outras frações da coluna **I1**.

Subgrupo I2 (frações 19 a 26). Foi obtido como um sólido marrom não cristalino (2,11 g) e apresentou várias manchas amarelas em cromatoplaca revelada com NP/PEG e observada sob luz UV (365 nm). O subgrupo foi analisado por CLAE analítica. Empregou-se uma coluna de fase reversa Supelco-54919 (Nucleosil®, C-18, partículas de 5 µm, dimensão 250 x 3,2 mm). O detector foi operado nos comprimentos de onda 270 e 350 nm. Fez-se eluição por gradiente utilizando as fases móveis A (MeOH) e B (0,1% de ácido fórmico em H_2O) e fluxo de 0,7 mL/min. A porcentagem da fase B variou linearmente de 65 a 55% entre 0,01 e 10 min, de 55 a 40% entre 10 e 20 min e de 40% a 0 entre 20 e 30 min. A amostra foi solubilizada em solução 1:1 de MeOH/H_2O. No cromatograma obtido (Figura 14, pág. 24) observaram-se os picos A, B, C e D referentes a compostos que absorvem em 270 e 350 nm, o que é um indicativo da presença de flavonoides. O **Subgrupo I2** foi submetido ao fracionamento por cromatografia de média pressão (Coluna **I2**). Utilizou-se o equipamento Isolera One, coluna de fase reversa (Biotage®, KP-C-18-HS, 120 g) e 1,00 g de amostra. O detector foi operado nos comprimentos de onda 270 e 350 nm. Fez-se eluição por gradiente utilizando as fases móveis A (MeOH) e B (0,1% de ácido fórmico em H_2O). A porcentagem da fase A variou de 20 a 100%. Foram coletadas 83 frações de 20 mL cada, as quais foram agrupadas de acordo com o cromatograma obtido

(Figura 15, pág. 25). Após a retirada do metanol em evaporador rotatório, as frações foram liofilizadas. As frações 22 a 27 e 49 a 62 foram agrupadas em dois subgrupos e levaram ao isolamento e identificação de flavonoides.

Subgrupo I2.1 (frações 22 a 27). Foi obtido como um sólido amarelo (22,9 mg) com faixa de fusão 186 a 189 ºC e apresentou uma única mancha de cor amarela em cromatoplaca revelada com NP/PEG e observada sob luz UV (365 nm). Espectros no IV, de RMN de ^{1}H e de ^{13}C (1D/2D) e de massas de alta resolução permitiram elucidar a estrutura química do composto, que foi identificado como quercetina-3-*O*-β-D-glicopiranosil-(1→3)-α-L-ramnopiranosil-(1→2)-β-D-glicopiranosídeo **(MR08)**.

Subgrupo I2.2 (frações 49 a 62). Foi obtido como um sólido amarelo (54,1 mg) e apresentou uma única mancha de cor amarelo-esverdeada em cromatoplaca revelada com NP/PEG e observada sob luz UV (365 nm). Espectros de RMN de ^{1}H e de ^{13}C e a comparação com os espectros obtidos para **MR07** permitiram identificar o composto como canferol-3-*O*-β-D-glicopiranosil-(1→3)-α-L-ramnopiranosil-(1→2)-β-D-glicopiranosídeo **(MR07)**.

O procedimento foi repetido para mais 1,10 g do subgrupo **I2**, o que permitiu obter mais 59,1 mg de **MR07** e 26,0 mg de **MR08**. Não foi possível isolar e identificar compostos a partir das demais frações da coluna **I2**.

De EMF obtiveram-se três flavonoides conforme está representado no diagrama da Figura 16, página 26.

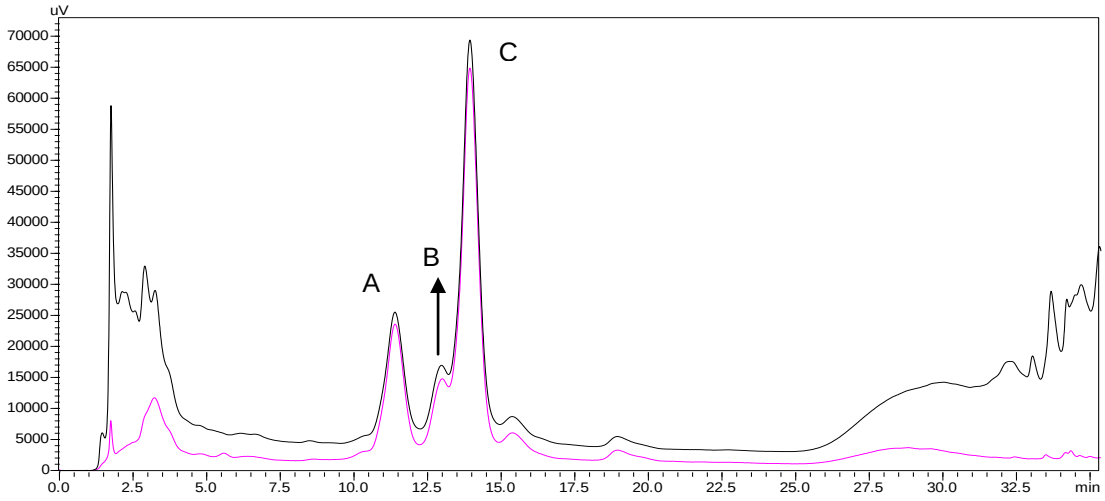


Figura 12: Cromatograma obtido por CLAE para o **Subgrupo I1**.

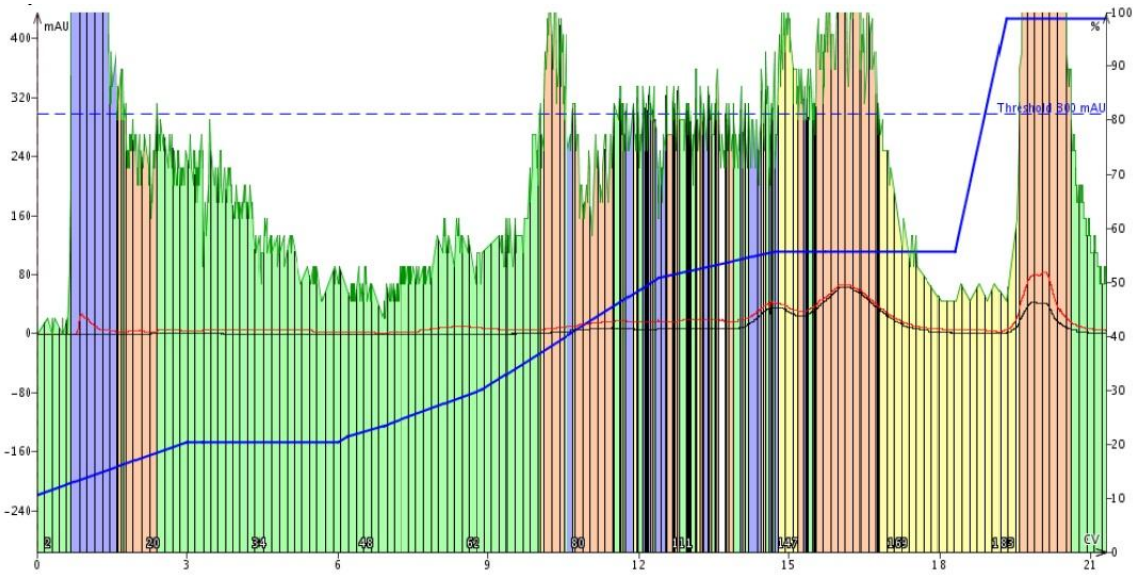


Figura 13: Cromatograma obtido a média pressão para o **Subgrupo I1.** Cada CV (*Column volume*) equivale a 132 mL.

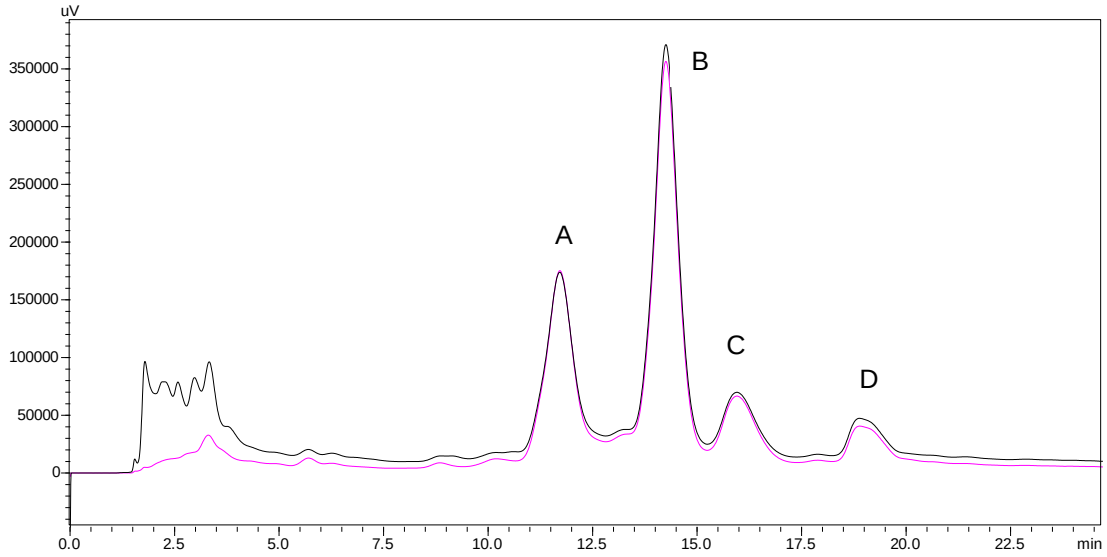


Figura 14: Cromatograma obtido por CLAE para o **Subgrupo I2**.

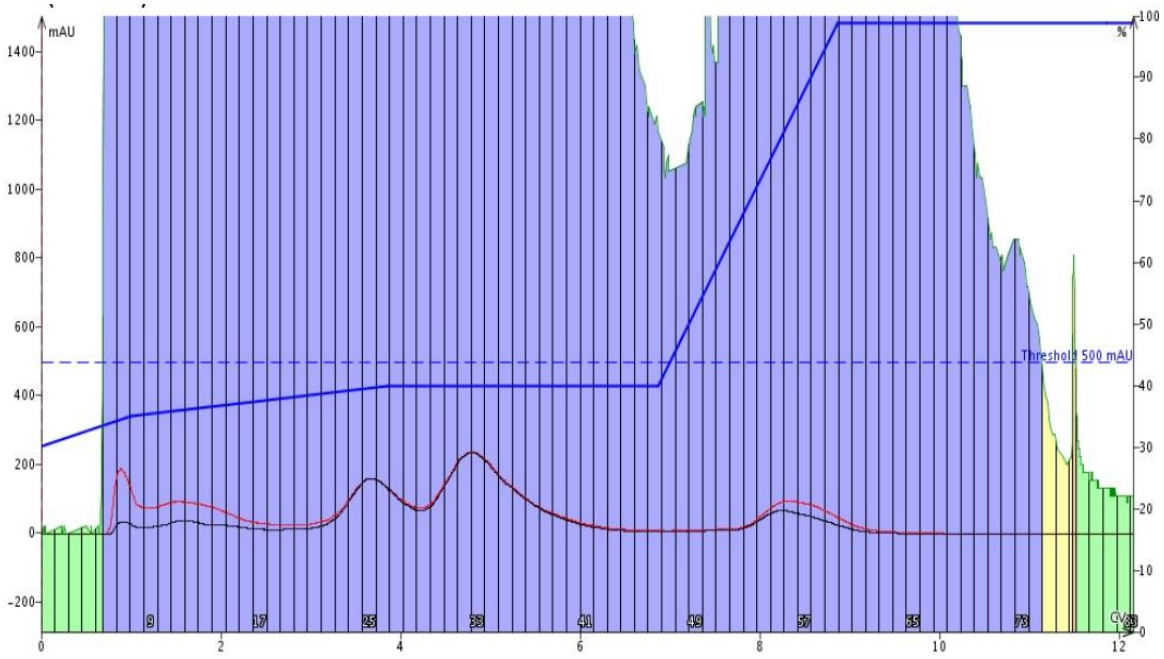


Figura 15: Cromatograma obtido a média pressão para o **Subgrupo I2**. Cada CV (*Column volume*) equivale a 132 mL.

1.1.8 – Elaboração de SEHG

O sólido do extrato hexânico dos galhos de *Maytenus robusta* (SEHG) foi submetido à CC (coluna **J**) utilizando-se 1,60 g da amostra e 143,00 g de sílica gel 60 (70-230 Mesh). Os eluentes utilizados foram hexano, clorofórmio, acetato de etila e metanol, puros ou em misturas, em ordem crescente de polaridade. Foram obtidas 199 frações de aproximadamente 20 mL cada. Após análise por CCD, algumas frações foram reunidas em cinco grupos (Figura 17, pág. 29). Frações com massas muito pequenas e que apresentaram várias manchas em CCD não foram trabalhadas.

Grupo J1 (frações 62 a 68 – Hex/$CHCl_3$ 2:8). Esse grupo foi obtido como um sólido branco (13,5 mg). Após comparação por CCD empregando amostra autêntica de 3-oxofriedelano e obtenção de espectro no IV concluiu-se tratar-se de 3-oxofriedelano **(MR01)**.

Grupo J2 (frações 69 a 80 – $CHCl_3$). O grupo foi obtido como um sólido branco (20,0 mg) e a análise por CCD indicou tratar-se de uma mistura de 3-oxofriedelano **(MR01)** e 3β-hidroxifriedelano **(MR02)**.

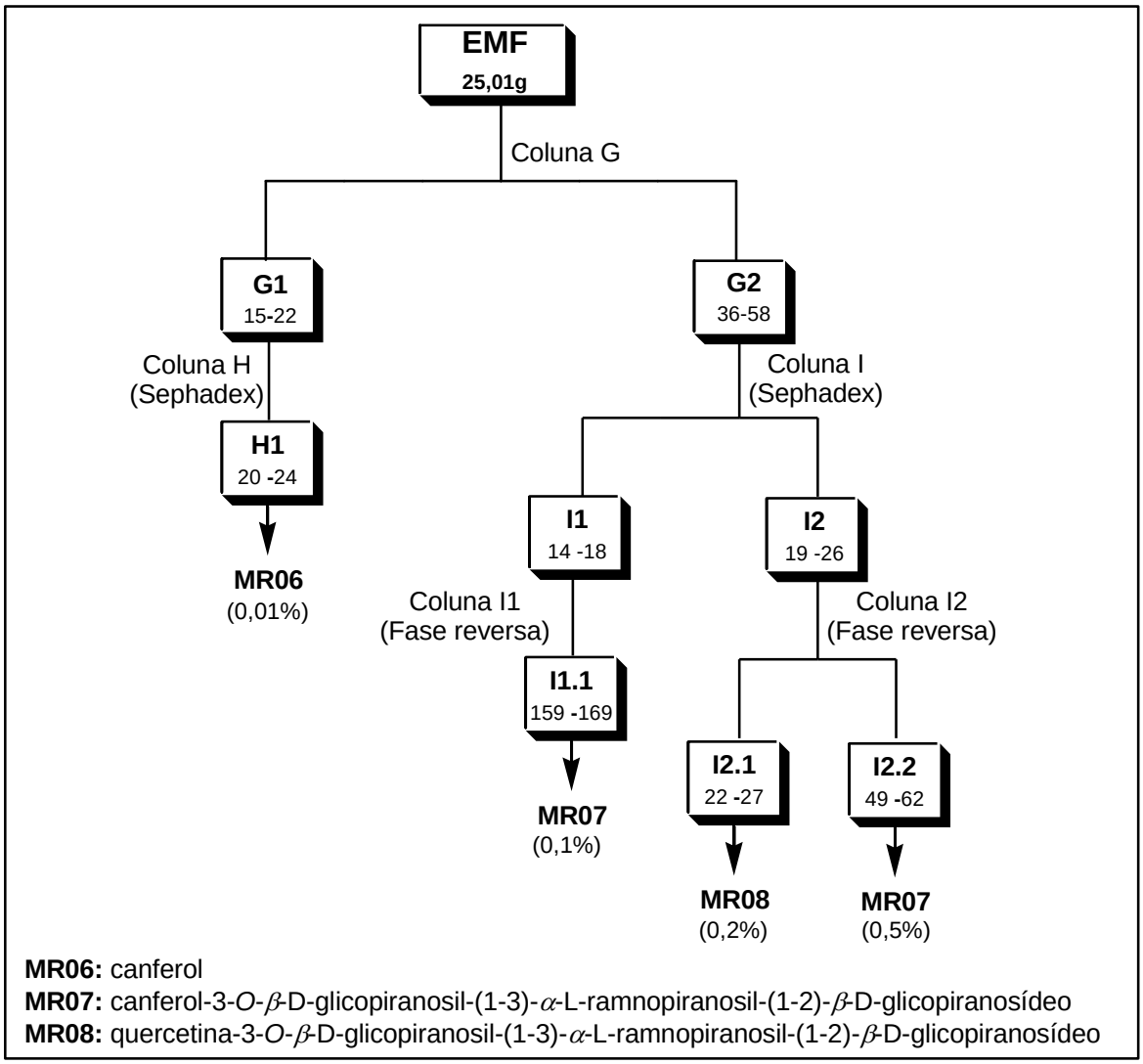


Figura 16: Esquema do fracionamento de EMF.

Grupo J3 (frações 91 a 102 – $CHCl_3$). Foi obtido como um sólido branco não cristalino (494,4 mg). Obtiveram-se espectros no IV e de RMN de ^{1}H e de ^{13}C, os quais permitiram concluir que o grupo trata-se de 3,16-dioxofriedelano **(MR09)**. O composto sofreu decomposição antes de fundir. A partir de 223 ºC, o sólido adquiriu coloração amarela e não foi possível determinar a faixa de fusão.

Grupo J4 (frações 103 a 118 – $CHCl_3$). Esse grupo foi obtido como um sólido verde não cristalino (808,8 mg) e submetido ao fracionamento em CC (coluna **K**). Utilizaram-se 102,42 g de sílica gel (70-230 Mesh) como fase estacionária. Os eluentes foram clorofórmio, acetato de etila e metanol, puros ou em misturas em ordem crescente de polaridade. Obtiveram-se 264 frações de aproximadamente 10 mL cada. As frações 93 a 116, 117-123, 128-143, 144 a 150

e 189 a 197 foram reunidas em cinco subgrupos. Frações com massas muito pequenas e que apresentaram várias manchas em CCD não foram trabalhadas.

Subgrupo K1 (frações 93 a 116 – $CHCl_3$/AcOEt 9:1). Foi obtido como um sólido branco não cristalino (46,4 mg). Espectros no IV e de RMN de ^{1}H e de ^{13}C foram obtidos e permitiram identificar o composto como 3,16-dioxofriedelano **(MR09)**.

Subgrupo K2 (frações 117 a 123 – $CHCl_3$/AcOEt 9:1). Foi obtido como um sólido verde (162,3 mg) e sumetido à purificação em CC (coluna **K2**). Utilizaram-se 16,13 g de sílica gel (70-230 Mesh) como fase estacionária. Os eluentes foram clorofórmio, acetato de etila e metanol, puros ou em misturas em ordem crescente de polaridade. Obtiveram-se 78 frações de aproximadamente 10 mL cada. As frações 23 a 29 foram reunidas em um subgrupo e as demais frações não foram trabalhadas por apresentarem pouca massa e várias manchas em CCD.

Subgrupo K2.1 (frações 23 a 29 – $CHCl_3$). Foi obtido como um sólido branco (87,4 mg). Após comparação por CCD empregando amostra autêntica de 3,16-dioxofriedelano e obtenção de espectro no IV concluiu-se que o composto trata-se de **MR09**.

Subgrupo K3 (frações 128 a 143 – $CHCl_3$/AcOEt 9:1). Foi obtido como um sólido verde (266,6 mg) e sumetido à purificação em CC (coluna **K3**). Utilizaram-se 19,92 g de sílica gel (70-230 Mesh) como fase estacionária. Os eluentes foram hexano, acetato de etila e metanol, puros ou em misturas em ordem crescente de polaridade. Obtiveram-se 112 frações de aproximadamente 10 mL cada. As frações 52 a 79 foram reunidas em um subgrupo e as demais frações não foram trabalhadas por apresentarem pouca massa e várias manchas em CCD.

Subgrupo K3.1 (frações 52 a 79 – Hex/AcOEt 8:2). Foi obtido como um sólido branco (55,9 mg) com faixa de fusão de 242-246 ºC. Espectros no IV e de RMN de ^{1}H e de ^{13}C permitiram inferir que o composto trata-se de 3-oxo-29-hidroxifriedelano **(MR10)**.

Subgrupo K4 (frações 144 a 150 – $CHCl_3$/AcOEt 9:1). Esse grupo foi obtido como um sólido branco (83,6 mg). Após comparação por CCD empregando amostra autêntica de 3-oxo-29-hidroxifriedelano e obtenção de espectro no IV concluiu-se que o composto trata-se de **MR10**.

Subgrupo K5 (frações 189 a 197 – $CHCl_3$/AcOEt 9:1). Obtiveram-se 17,6 mg de um sólido branco não cristalino com faixa de fusão de 285-290 ºC. A partir da análise de espectros no IV e de RMN de ^1H e de ^{13}C concluiu-se que o grupo trata-se de 3,16-dioxo-12α-hidroxifriedelano **(MR11)**.

Grupo J5 (frações 119 a 154 – $CHCl_3$ → $CHCl_3$/AcOEt 9:1). Foi obtido como um sólido verde não cristalino (66,4 mg) e sumetido à purificação em CC (coluna **L**). Utilizaram-se 6,42 g de sílica gel (70-230 Mesh) como fase estacionária. A eluição foi isocrática empregando mistura de clorofórmio e acetato de etila (7:3). Obtiveram-se 14 frações de aproximadamente 5 mL cada. As frações 4 e 5 foram agrupadas. Frações com massas muito pequenas e que apresentaram várias manchas em CCD não foram trabalhadas.

Subgrupo L1 (frações 4 e 5 – $CHCl_3$/AcOEt 9:1). Foi obtido como um sólido branco (32,8 mg). Espectros no IV e de RMN de ^1H e de ^{13}C (1D/2D) permitiram inferir que o composto trata-se de 3,16-dioxo-29-hidroxifriedelano **(MR12)**. O composto decompôs antes de fundir.

Do sólido obtido durante a remoção de solvente do extrato hexânico dos galhos foram identificados e isolados cinco compostos puros conforme está representado na Figura 17, pág. 29. Observou-se que **MR09** corresponde a 39% desse sólido.

1.1.9 – Elaboração de EHG

O extrato hexânico dos galhos de *Maytenus robusta* (EHG) foi fracionado em CC (coluna **M**) utilizando-se 3,67 g da amostra e 284,06 g de sílica gel 60 (70-230 Mesh). Os eluentes empregados foram hexano, clorofórmio, acetato de etila e metanol, puros ou em misturas em ordem crescente de polaridade. Foram obtidas 213 frações de aproximadamente 200 mL cada. Após análise por CCD, algumas frações foram reunidas em quatro grupos (Figura 18, pág. 30). Frações com massas muito pequenas e que apresentaram várias manchas em CCD não foram trabalhadas.

Grupo M1 (frações 26 a 31 – Hex/$CHCl_3$ 2:8). O grupo (7,5 mg) foi obtido como um sólido branco. A comparação a partir de CCD empregando amostra autêntica de 3-oxofriedelano e a análise do espectro no IV permitiram concluir que o sólido obtido trata-se de 3-oxofriedelano **(MR01)**.

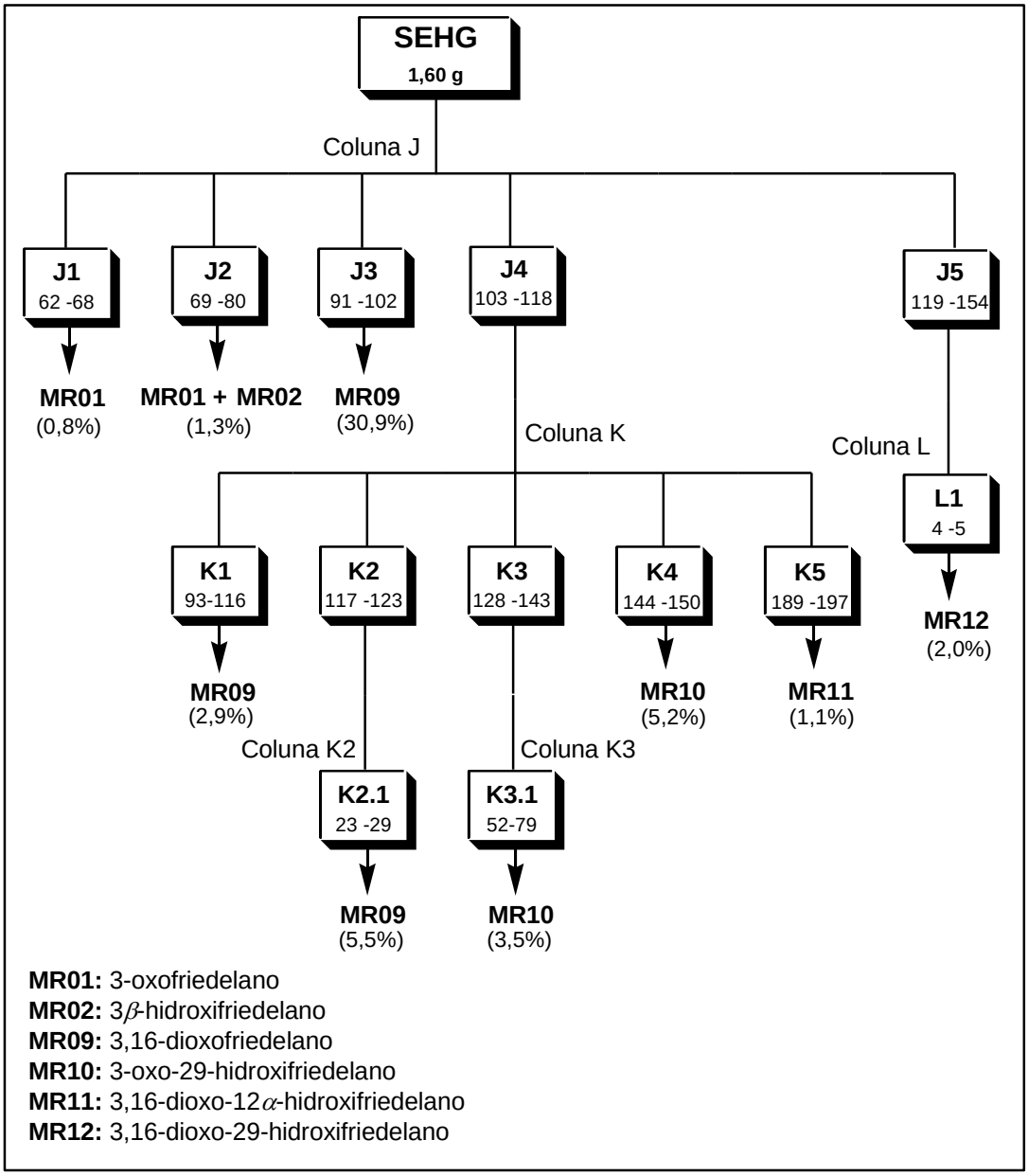


Figura 17: Esquema do fracionamento de SEHG.

Grupo M2 (frações 96 a 108 – $CHCl_3$/AcOEt 9:1). O grupo foi obtido como um sólido branco (131,5 mg). A comparação por CCD com amostra autêntica de 3,16-dioxofriedelano e a análise do espectro no IV permitiram concluir que o sólido trata-se de 3,16-dioxofriedelano **(MR09)**.

Grupo M3 (frações 109 a 131). Foi obtido como um sólido verde não cristalino (706,3 mg) e submetido à purificação em CC (coluna **N**). Utilizaram-se 64,09 g de sílica gel 60 (70-230 Mesh) e os eluentes foram diclorometano, acetato de etila e metanol, puros ou em misturas em ordem crescente de polaridade.

Obtiveram-se 104 frações de aproximadamente 10 mL cada. Após análise por CCD, as frações 20 e 21 foram reunidas em um subgrupo. As demais frações mostraram-se muito complexas e/ou com massas muito pequenas e não foram trabalhadas.

Subgrupo N1 (frações 20 e 21 – CH_2Cl_2/AcOEt 9:1). Foi obtido como um sólido branco (11,8 mg). A comparação por CCD com amostra autêntica de 3-oxo-29-hidroxifriedelano e o espectro no IV permitiram concluir que o sólido trata-se de 3-oxo-29-hidroxifriedelano **(MR10)**.

Grupo M4 (frações 132 a 140 – $CHCl_3$/AcOEt 8:2). O grupo foi obtido como um sólido branco (22,2 mg). A comparação por CCD com amostra autêntica de 3-oxo-29-hidroxifriedelano e a análise do espectro no IV permitiram concluir que o sólido trata-se de 3-oxo-29-hidroxifriedelano **(MR10)**.

Do extrato hexânico dos galhos obtiveram-se três compostos puros, sendo que **MR09** corresponde a 3,6 % desse extrato (Figura 18).

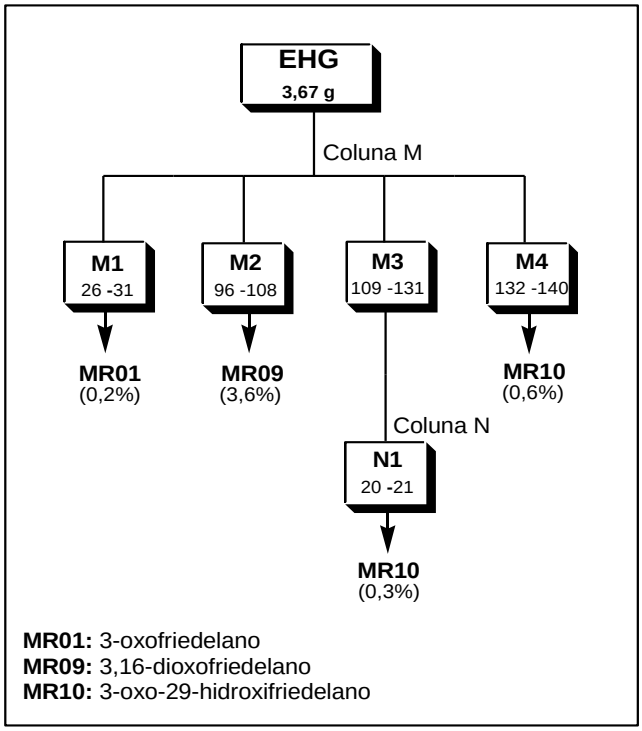


Figura 18: Esquema do fracionamento de EHG.

1.1.10 – Elaboração de ECG

O extrato clorofórmico dos galhos de *Maytenus robusta* (ECG) foi

fracionado em CC (coluna **O**) utilizando-se 14,01 g da amostra e 852,56 g de sílica gel 60 (70-230 Mesh). Os eluentes utilizados foram clorofórmio, acetato de etila e metanol, puros ou em misturas em ordem crescente de polaridade. Foram obtidas 94 frações de aproximadamente 200 mL cada. Após análise por CCD, algumas frações foram reunidas em oito grupos (Figura 19, pág. 36).

Grupo O1 (frações 3 a 5 – $CHCl_3$/AcOEt 8:2). O grupo foi obtido como um sólido verde (2,40 g) e apresentou várias manchas em CCD. Realizou-se a purificação em CC (Coluna **P**). Utilizaram-se 124,40 g de sílica gel 60 (70-230 Mesh) e os eluentes foram clorofórmio, acetato de etila e metanol, puros ou em misturas em ordem crescente de polaridade. Obtiveram-se 184 frações de aproximadamente 10 mL cada. Após análise por CCD, as frações 26 a 31 e 32 a 106 foram reunidas em dois subgrupos.

Subgrupo P1 (frações 26 a 31 – $CHCl_3$). O grupo foi obtido como um sólido branco não cristalino (49,6 mg). A comparação por CCD empregando amostras autênticas de 3-oxofriedelano e 3β-hidroxifriedelano permitiu identificar o sólido como uma mistura de **MR01** e **MR02**.

Subgrupo P2 (frações 32 a 106 – $CHCl_3$). O grupo foi obtido como um sólido verde (657,6 mg). Após a adição de hexano ocorreu a precipitação de um sólido (448,5 mg) que foi separado por filtração a vácuo. A comparação por CCD empregando amostra autêntica de 3,16-dioxofriedelano permitiu identificar o sólido como **MR09**.

Grupo O2 (fração 6 a 8 – $CHCl_3$/AcOEt 8:2). O grupo foi obtido como um sólido verde não cristalino (1,42 g) e apresentou várias manchas em CCD. Fez-se a purificação em CC (Coluna **Q**). Foram utilizados 45,22 g de sílica gel 60 (70-230 Mesh) e os eluentes foram clorofórmio, acetato de etila e metanol, puros ou em misturas, em ordem crescente de polaridade. Obtiveram-se 153 frações de aproximadamente 10 mL cada. Após análise por CCD, as frações 14 a 39 e 64 a 102 foram reunidas em dois subgrupos.

Subgrupo Q1 (frações 14 a 39 – $CHCl_3$). Foi obtido como um sólido branco (92,7 mg). Comparação por CCD empregando amostra autêntica de 3,16-dioxofriedelano permitiu identificar o sólido como **MR09**.

Subgrupo Q2 (frações 64 a 102 – $CHCl_3$). Foi obtido como um sólido verde (459,7 mg). Após adição de hexano ocorreu a precipitação de um sólido (360,3 mg) que foi separado por filtração a vácuo. A comparação por CCD

empregando amostra autêntica de 3-oxo-29-hidroxifriedelano permitiu identificar o sólido como **MR10**.

Grupo O3 (fração 9 – $CHCl_3$/AcOEt 8:2). O grupo foi obtido como um sólido verde não cristalino (448,1 mg) e apresentou várias manchas em CCD. Fez-se a purificação em CC (Coluna **R**). Foram utilizados 62,25 g de sílica gel 60 (70-230 Mesh) e os eluentes foram clorofórmio, acetato de etila e metanol, puros ou em misturas, em ordem crescente de polaridade. Obtiveram-se 175 frações de aproximadamente 10 mL cada. Após análise por CCD, as frações 43 a 49 foram reunidas em um subgrupo.

Subgrupo R1 (frações 43 a 49 – $CHCl_3$). Foi obtido como um sólido branco não cristalino (173,7 mg). Comparação a partir de CCD empregando amostra autêntica de 3-oxo-29-hidroxifriedelano e análise do espectro no IV permitiram identificar o sólido como **MR10**.

Grupo O4 (frações 10 a 12 – $CHCl_3$/AcOEt 8:2). O grupo foi obtido como um sólido verde não cristalino (214,0 mg) e submetido à purificação em CC (Coluna **S**). Foram utilizados 10,70 g de sílica gel 60 (230-400 Mesh) e os eluentes foram hexano, clorofórmio, acetato de etila e metanol, puros ou em misturas em ordem crescente de polaridade. Foram obtidas 58 frações de aproximadamente 10 mL cada. As frações 10 a 14 e 20 a 22 foram reunidas em dois subgrupos.

Subgrupo S1 (frações 10 a 14 – $CHCl_3$). Foi obtido como um sólido branco não cristalino (50,1 mg). A comparação por CCD empregando amostra autêntica de 3-oxo-29-hidroxifriedelano e análise do espectro no IV permitiram identificar o sólido como **MR10**.

Subgrupo S2 (frações 20 a 22 – $CHCl_3$). Foi obtido como um sólido branco não cristalino (30,3 mg). A comparação por CCD empregando amostra autêntica de 3,16-dioxo-12α-hidroxifriedelano e análise do espectro no IV permitiram identificar o sólido como **MR11**.

Grupo O5 (frações 16 a 26 – $CHCl_3$/AcOEt 8:2). O grupo foi obtido como um sólido verde não cristalino (1,12 g) e submetido à purificação em CC (Coluna **T**). Foram utilizados 107,65 g de sílica gel 60 (70-230 Mesh) e os eluentes foram clorofórmio, acetato de etila e metanol, puros ou em misturas em ordem crescente de polaridade. As frações 29 a 55 e 65 a 103 foram reunidas em dois subgrupos.

Subgrupo T1 (frações 29 a 55 – $CHCl_3$/AcOEt 8:2). Foi obtido como um

sólido verde (167,0 mg) e submetido à purificação em CC (Coluna **T1**). Foram utilizados 16,34 g de sílica gel 60 (70-230 Mesh) e os eluentes foram clorofórmio, acetato de etila e metanol, puros ou em misturas em ordem crescente de polaridade. As frações 22 e 23 foram reunidas em um subgrupo.

Subgrupo T1.1 (frações 22 e 23 – $CHCl_3$/AcOEt 9:1). Foi obtido como um sólido verde (28,6 mg). Após a adição de acetona ocorreu a precipitação de um sólido branco (7,6 mg), o qual foi separado por filtração a vácuo. Espectros no IV e de RMN de ^{1}H e de ^{13}C (1D/2D) permitiram inferir que o composto trata-se de friedelan-1-en-3,16-diona **(MR13)**. O composto decompôs a partir de 214 °C, antes de fundir.

Subgrupo T2 (frações 65 a 103 – $CHCl_3$/AcOEt 8:2 → 6:4). Foi obtido como um sólido verde (383,0 mg) e, após adição de éter etílico, ocorreu precipitação de um sólido branco não cristalino (242,4 mg), o qual foi separado por filtração sob pressão reduzida. Comparação a partir de CCD empregando amostra autêntica de 3,16-dioxo-29-hidroxifriedelano e análise do espectro no IV permitiram identificar o sólido como **MR12**.

Grupo O6 (frações 42 a 51 – $CHCl_3$/AcOEt 7:3). O grupo foi obtido como um sólido verde (751,8 mg). Após adição de acetona ocorreu precipitação de um sólido branco (213,1 mg), o qual foi separado por filtração a vácuo. Espectros no IV e de RMN de ^{1}H e de ^{13}C (1D/2D) permitiram inferir que o composto trata-se de 3-oxo-16β,29-di-hidroxifriedelano **(MR14)**. O composto decompôs a partir de 200 °C, antes de fundir.

Grupo O7 (frações 67 a 75 – $CHCl_3$/AcOEt 1:1). O grupo foi obtido como um sólido verde (1,69 g) e submetido à purificação em CC (Coluna **U**). Foram utilizados 56,71 g de sílica gel 60 (70-230 Mesh) e os eluentes foram clorofórmio, acetato de etila e metanol, puros ou em misturas em ordem crescente de polaridade. As frações 37 a 63 foram reunidas em um subgrupo.

Subgrupo U1 (frações 37 a 63 - $CHCl_3$/AcOEt 1:1). O grupo foi obtido como um sólido verde (534,4 mg) e submetido à purificação em CC (Coluna **U1**). Foram utilizados 51,73 g de sílica gel 60 (70-230 Mesh) e os eluentes foram clorofórmio, acetato de etila e metanol, puros ou em misturas em ordem crescente de polaridade. As frações 85 a 100, 105 a 150 e 151 a 164 foram reunidas em três subgrupos.

Subgrupo U1.1 (frações 85 a 100 - $CHCl_3$/AcOEt 1:1). O grupo foi obtido

como um sólido verde não cristalino (56,2 mg). Após a adição de acetona, ocorreu precipitação de um sólido branco que foi separado por filtração a vácuo (37,2 mg). Espectros no IV e de RMN de ^{1}H e de ^{13}C (1D/2D) permitiram inferir que o composto trata-se de 3-oxo-1α,29-di-hidroxifriedelano **(MR15)**. Não foi possível determinar o ponto de fusão, o sólido decompôs a partir de 221°C, antes de fundir.

Subgrupo U1.2 (frações 105 a 150 - $CHCl_3$/AcOEt 1:1). O grupo foi obtido como um sólido verde não cristalino (141,2 mg) e submetido à purificação em CC (Coluna **P1.2**). Foram utilizados 23,86 g de sílica gel 60 (70-230 Mesh) e os eluentes foram hexano, acetato de etila e metanol, puros ou em misturas em ordem crescente de polaridade. As frações 125 a 142 e 170 a 179 foram reunidas em dois subgrupos.

Subgrupo U1.2.1 (frações 125 a 142 - $CHCl_3$/AcOEt 1:1). O grupo foi obtido como um sólido branco não cristalino (11,2 mg). Após comparação por CCD empregando amostra autêntica de 3-oxo-1α,29-di-hidroxifriedelano concluiu-se que o composto trata-se de **MR15**.

Subgrupo U1.2.2 (frações 170 a 179 - $CHCl_3$/AcOEt 1:1). O grupo foi obtido como um sólido branco não cristalino (7,2 mg). Espectros no IV e de RMN de ^{1}H e de ^{13}C permitiram inferir que o composto trata-se de 3-oxo-12α,29-di-hidroxifriedelano **(MR16)**.

Subgrupo U1.3 (frações 151 a 164 - $CHCl_3$/AcOEt 1:1). O grupo foi obtido como um sólido verde não cristalino (14,2 mg). Após a adição de acetona, ocorreu precipitação de um sólido branco que foi separado por filtração a vácuo (5,1 mg). Após comparação por CCD empregando amostra autêntica de 3-oxo-12α,29-di-hidroxifriedelano concluiu-se que o composto trata-se de **MR16**. Não foi possível determinar o ponto de fusão, o sólido decompôs a partir de 219°C, antes de fundir.

Grupo O8 (frações 76 a 78 – AcOEt). O grupo foi obtido como um sólido verde (729,5 mg) e submetido à purificação em CC (Coluna **V**). Foram utilizados 44,96 g de sílica gel 60 (70-230 Mesh) e os eluentes foram clorofórmio, acetato de etila e metanol, puros ou em misturas em ordem crescente de polaridade. As frações 84 a 122 e 140 a 151 foram reunidas em dois subgrupos.

Subgrupo V1 (frações 84 a 122 - $CHCl_3$/AcOEt 1:1). O grupo foi obtido

como um sólido verde não cristalino (89,2 mg). Após a adição de acetona, ocorreu precipitação de um sólido branco que foi separado por filtração a vácuo (62,4 mg). Após comparação por CCD empregando amostra autêntica de 3-oxo-12α,29-di-hidroxifriedelano concluiu-se que o composto trata-se de **MR16**.

Subgrupo V2 (frações 140 a 151 - $CHCl_3$/AcOEt 1:1 → 4:6). O grupo foi obtido como um sólido verde não cristalino (31,2 mg). Após a adição de acetona, ocorreu precipitação de um sólido branco que foi separado por filtração a vácuo (6,7 mg). Espectros no IV e de RMN de ^{1}H e de ^{13}C (1D/2D) permitiram inferir que o composto trata-se de 3-oxo-16β,28,29-tri-hidroxifriedelano **(MR17)**. Não foi possível determinar o ponto de fusão, o sólido decompôs a partir de 218°C, antes de fundir.

Do extrato clorofórmico dos galhos obtiveram-se nove compostos puros e uma mistura de dois compostos (Figura 19, pág. 36). As frações das colunas cromatográficas dos sólidos provenientes de ECG que não foram citadas, não foram trabalhadas por apresentarem massas muito pequenas e várias manchas em CCD.

1.1.11 – Elaboração de EAG

O extrato acetato etílico dos galhos de *Maytenus robusta* (EAG) foi fracionado em CC (coluna **W**) utilizando-se 1,30 g da amostra e 275 mL de Sephadex LH20 suspenso em metanol. A eluição foi isocrática empregando metanol. Obtiveram-se 51 frações de aproximadamente 20 mL cada. As frações 11 a 21 foram reunidas em um subgrupo (Figura 20, pág. 37) e as demais frações não foram trabalhadas por apresentarem massas muito pequenas e várias manchas em CCD, ou foram trabalhadas, mas não levaram ao isolamento e identificação de compostos.

Grupo W1 (frações 11 a 21). Foi obtido como um sólido verde (814,4 mg) e apresentou várias manchas em CCD. Realizou-se a purificação em CC (Coluna **X**). Utilizaram-se 48,05 g de sílica gel 60 (70-230 Mesh) e os eluentes foram clorofórmio, acetato de etila e metanol, puros ou em misturas em ordem crescente de polaridade. Obtiveram-se 79 frações de aproximadamente 10 mL cada. Após análise por CCD, as frações 9 a 11, 12 a 16 e 23 a 25 foram reunidas em três subgrupos.

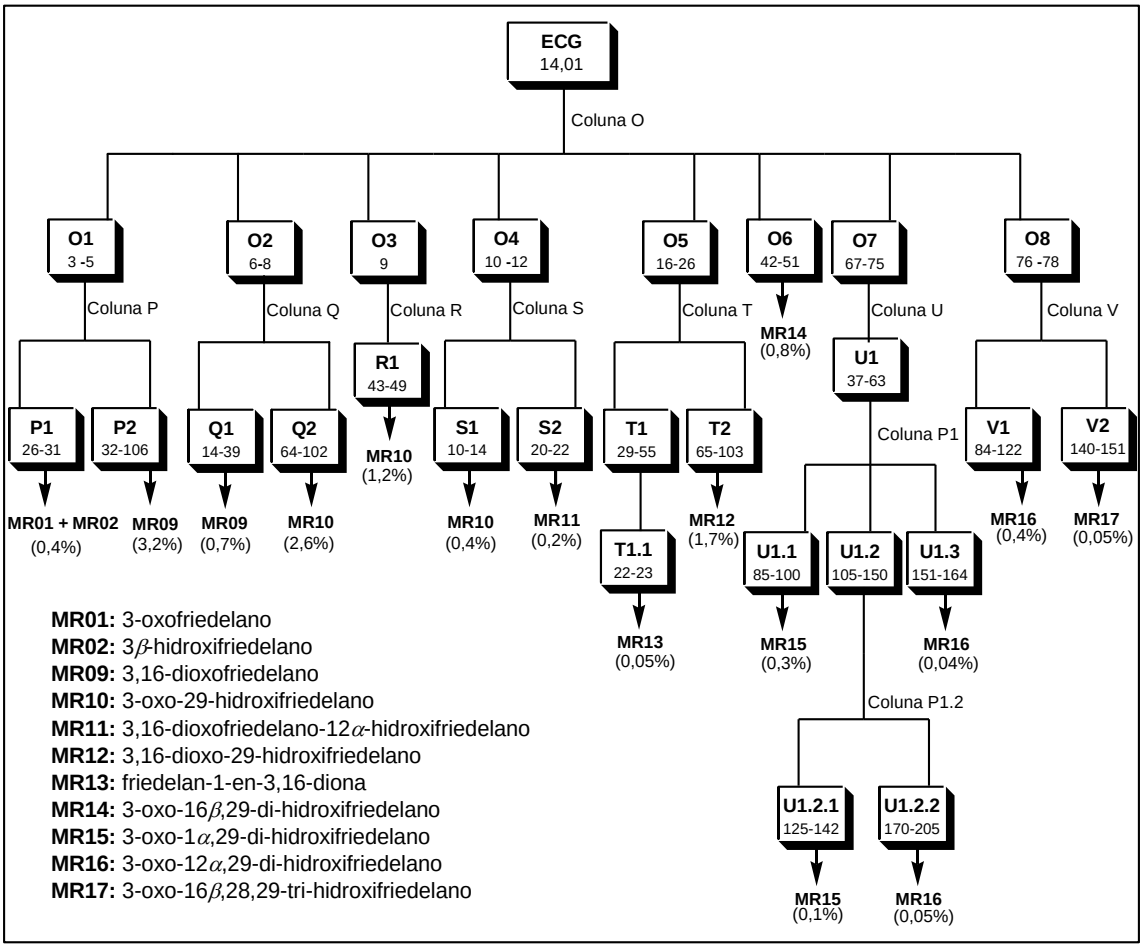


Figura 19: Esquema do fracionamento de ECG.

Subgrupo X1 (frações 9 a 11 - $CHCl_3$/AcOEt 9:1 → 7:3). O grupo foi obtido como um sólido branco não cristalino (10,6 mg). A comparação por CCD empregando amostra autêntica de 3-oxofriedelano (**MR01**) permitiu identificar o sólido como **MR01**.

Subgrupo X2 (frações 12 a 16 - $CHCl_3$/AcOEt 7:3). O grupo foi obtido como um sólido verde (36,7 mg). Após a adição de acetona ocorreu precipitação de um sólido branco (12,8 mg) que foi separado por filtração a vácuo. A partir de comparação por CCD empregando amostra autêntica de 3,16-dioxofriedelano (**MR09**) e análise do espectro no IV, o sólido foi identificado como **MR09**.

Subgrupo X3 (frações 23 a 25 - $CHCl_3$/AcOEt 4:6). Esse grupo também foi obtido como um sólido verde (59,0 mg) e após a adição de acetona ocorreu precipitação de um sólido branco (8,8 mg) que foi separado por filtração a vácuo. A partir de comparação por CCD empregando amostra autêntica de 3,16-dioxo-

29-hidroxifriedelano (**MR12**) e análise do espectro no IV, o sólido foi identificado como **MR12**.

Do extrato acetato etílico dos galhos obtiveram-se três compostos puros, conforme está apresentado na Figura 20.

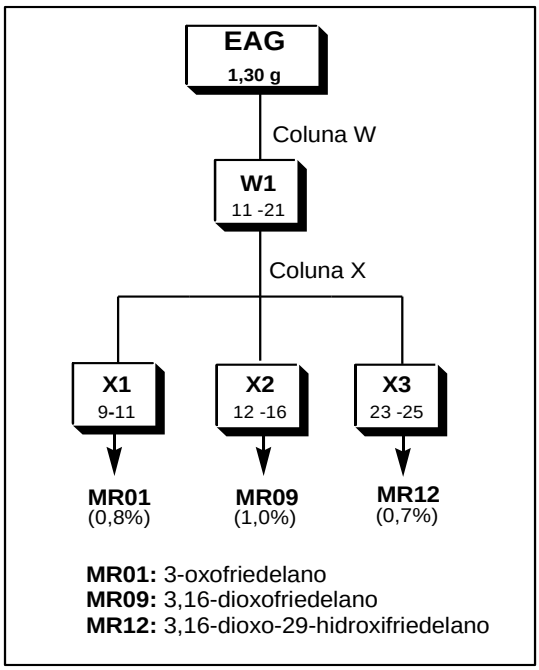


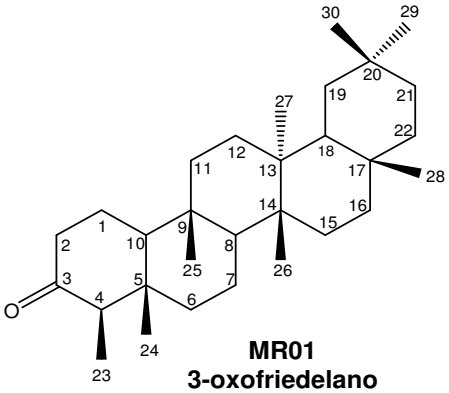
Figura 20: Esquema do fracionamento de EAG.

1.1.12 – Elaboração de EMG

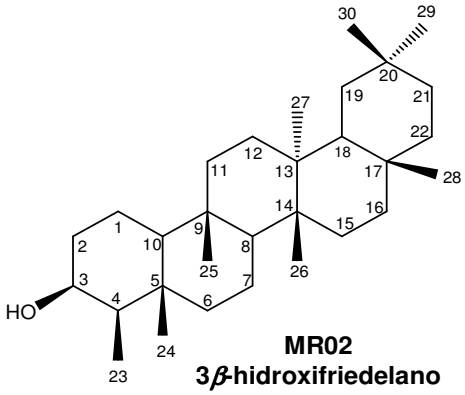
EMG (92,76 g) foi obtido como um sólido de coloração marrom. Realizou-se análise por CCD de EMG e não foram observadas manchas características de flavonoides em cromatoplaca revelada utilizando solução NP/PEG e analisada sob luz UV (365 nm). EMG foi submetido ao fracionamento em CC (Coluna **Y**). Utilizaram-se 10,11 g de amostra e 250,63 g de sílica gel 60 (70-230 Mesh). Os eluentes foram clorofórmio e metanol, puros ou em misturas em ordem crescente de polaridade. Foram coletadas 51 frações de aproximadamente 200 mL cada, que foram agrupadas de acordo com o perfil em CCD e algumas delas foram fracionadas em colunas de sílica gel, sephadex e sílica-C18. No entanto, nenhum composto foi isolado e identificado a partir de EMG.

z1.2 – Determinação Estrutural

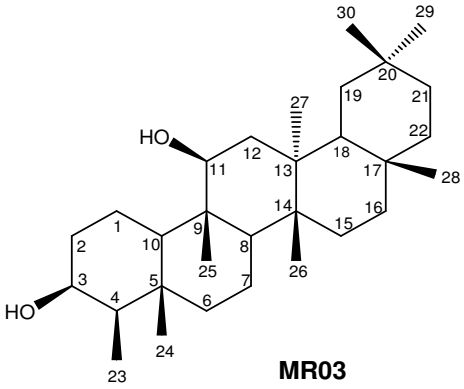
1.2.1 – MR01: 3-oxofriedelano, MR02: 3β-hidroxifriedelano, MR03: 3β,11β-di-hidroxifriedelano e MR05: β-sitosterol



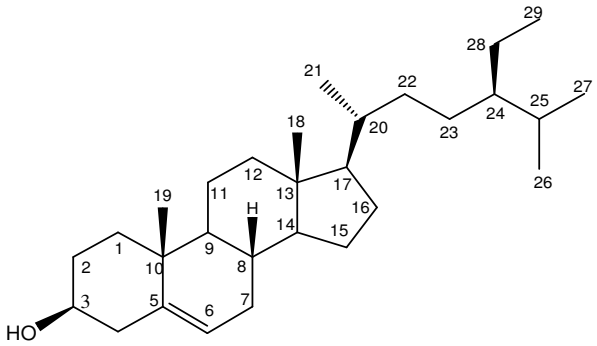
MR01
3-oxofriedelano



MR02
3β-hidroxifriedelano



MR03
3β,11β-di-hidroxifriedelano



MR05
β-sitosterol

MR01 e **MR02** foram obtidos, puros ou como mistura, a partir de SECF, ECF, SEHG, EHG, ECG e EAC (Figuras 9, 10, 17 e 18, 19, 20, pág. 17, 19, 20 e 30, 36, 37). **MR01** foi obtido como um sólido branco cristalino com faixa de fusão 252-255 ºC e **MR02** como cristais brancos em formato de agulha e faixa de fusão de 271-274 ºC. **MR03** foi obtido como um sólido branco não cristalino apenas a partir de SECF. **MR05**, por sua vez, também foi obtido como um sólido branco não cristalino e isolado a partir de ECF e EAF.

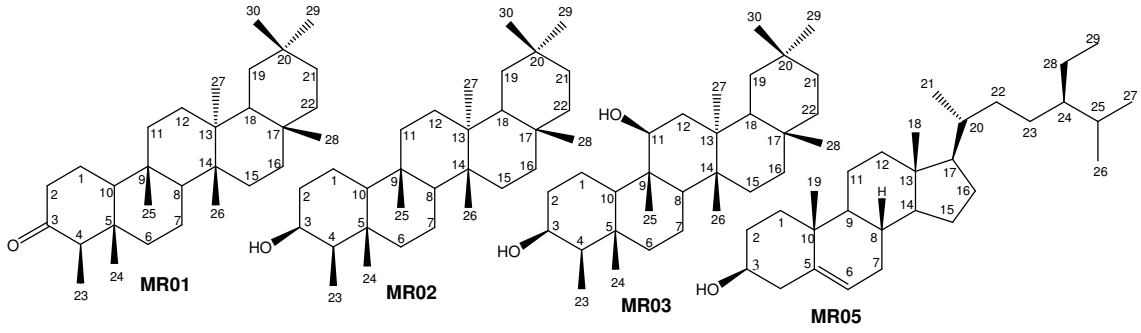
No trabalho de mestrado, os compostos **MR01**, **MR02**, **MR03** e **MR05** foram isolados do sólido obtido durante o preparo do extrato hexânico (SEHF) e do extrato hexânico das folhas de *M. robusta* (EHF). A estrutura química desses compostos foi determinada a partir da análise de espectros no IV e de RMN de ^{1}H

e RMN de ^{13}C (SOUSA, 2012). Os dados de RMN de ^{13}C de **MR01** (Figura A1, pág. 154), **MR02** (Figura A2, pág. 154), **MR03** (Figura A3, pág. 155) e **MR05** (Figura A4, pág. 155) são apresentados na Tabela 1.

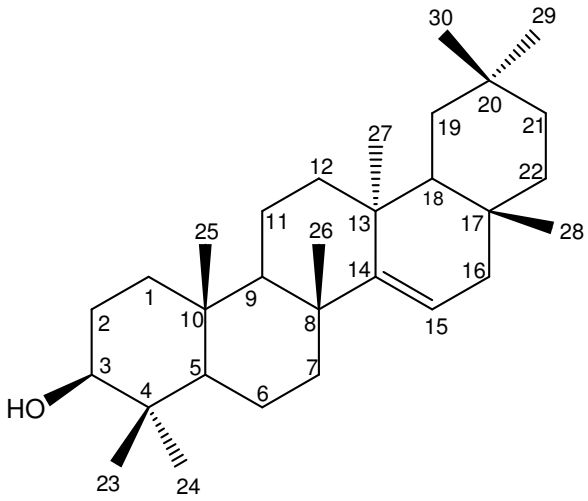
Tabela 1: Dados de RMN de ^{13}C de **MR01**, **MR02**, **MR03** e **MR05**

Carbono	δ_C MR01*	δ_C MR02*	δ_C MR03**	δ_C MR05*
1	22,3	15,8	18,6	37,3
2	41,5	36,1	35,4	31,7
3	213,1	72,7	72,0	71,8
4	58,2	49,1	49,4	42,3
5	42,1	37,8	38,3	140,8
6	41,3	41,7	41,9	121,7
7	18,2	17,5	17,5	31,9
8	53,1	53,2	52,9	31,9
9	37,5	37,1	43,9	50,2
10	59,5	61,3	62,3	36,5
11	35,6	35,3	76,6	21,1
12	30,5	30,6	42,0	39,8
13	39,7	38,3	38,5	42,3
14	38,3	39,6	40,9	56,8
15	32,4	32,3	32,3	24,3
16	36,0	35,5	36,0	28,3
17	30,0	30,0	30,0	56,1
18	42,8	42,8	42,6	11,9
19	35,3	35,2	35,7	19,4
20	28,2	28,2	28,1	36,2
21	32,8	32,8	32,8	18,8
22	39,3	39,3	39,2	34,0
23	6,9	11,6	12,1	26,1
24	14,7	16,4	16,7	45,9
25	17,9	18,2	13,5	29,2
26	20,3	20,1	19,9	19,8
27	18,7	18,6	19,5	19,1
28	32,1	32,1	32,0	23,1
29	35,0	35,0	35,0	12,0
30	31,8	31,8	31,7	-

*$CDCl_3$. **$CDCl_3$ + piridina-d_5.



1.2.2 – MR04: 3β-hidroxi-D-friedoolean-14-eno (taraxerol)



MR04 foi obtido como um sólido branco não cristalino a partir de ECF, conforme apresentado na Figura 10, pág. 19. O composto decompôs próximo a 210 ºC e não foi possível determinar a faixa de fusão.

No espectro na região do IV (Figura A5, pág. 156) de **MR04** observaram-se bandas de absorção em 3484 cm^{-1}, característica de estiramento de ligação OH de hidroxila, em 2917 cm^{-1}, característica de estiramento assimétrico da ligação CH de grupos CH_2 alifáticos, em 2851 cm^{-1}, característica de estiramento simétrico da ligação CH de grupos CH_2 e CH_3 de compostos alifáticos, em 1443 e 1384 cm^{-1}, características de deformação angular no plano de ligação simples CH de grupos alifáticos e em 815 cm^{-1}, característica de deformação angular fora do plano da ligação CH de grupos R_2C=CHR (BARBOSA, 2007).

No espectro de RMN de ^1H de **MR04** (Figuras A6 e A7, pág. 156 e 157) observaram-se sete simpletos referentes a oito grupos metila em δ_H 0,86 (3H), δ_H 0,92 (3H), δ_H 0,94 (3H), δ_H 0,95 (6H), δ_H 0,97 (3H), δ_H 1,09 (3H) e δ_H 1,10 (3H). Também foram observados um multipleto centrado em δ_H 1,99 (2H), característico de hidrogênio alílico, um multipleto centrado em δ_H 3,28 (1H) característico de hidrogênio ligado a carbono carbinólico e um multipleto centrado em δ_H 5,56 (1H) característico de hidrogênio vinílico.

O espectro de RMN de ^{13}C (Figura A8, pág. 157) e o subespectro DEPT135 (Figura A9, pág. 158) foram analisados e observaram-se 30 sinais de carbono, sendo oito sinais de carbono metílico, dez de carbono metilênico, cinco

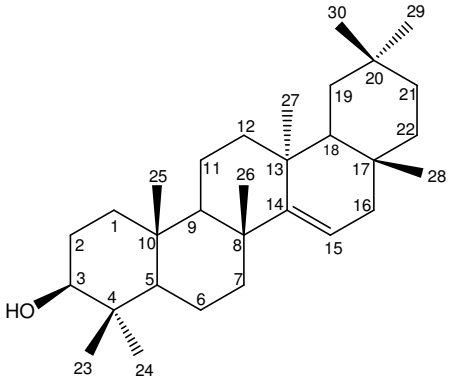
de carbono metínico e sete de carbono não hidrogenado. Os sinais em δ_C 158,1 (C) e 116,9 (CH) foram atribuídos a carbono olefínico e o sinal em δ_C 78,2 (C) atribuído a carbono carbinólico.

Os dados de RMN de ^{13}C obtidos para **MR04** foram comparados com dados da literatura (CHIEN *et al.*, 2004). Esses valores estão listados na Tabela 2. Concluiu-se que **MR04** trata-se de 3β-hidroxi-D-friedo-olean-14-eno (taraxerol).

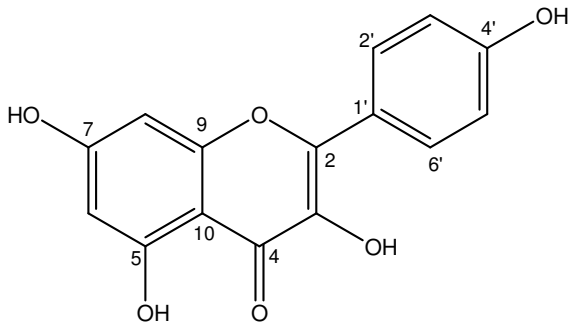
Tabela 2: Dados de RMN de ^{13}C de **MR04** e dados da literatura para 3β-hidroxi-D-friedo-olean-14-eno (CHIEN et al., 2004)

Nº	**Tipo de carbono**	**δ_C* de MR04**	**δ_C**** (CHIEN *et al.*, 2004)	**Nº**	**Tipo de carbono**	**δ_C* de MR04**	**δ_C**** (CHIEN et al., 2004)
1	CH_2	38,0	37,77	16	CH_2	37,8	37,77
2	CH_2	27,5	27,18	17	C	35,8	35,80
3	CH	78,2	79,08	18	CH	48,8	48,80
4	C	39,1	38,78	19	CH_2	36,7	36,70
5	CH	55,8	55,57	20	C	28,8	28,81
6	CH_2	18,9	18,82	21	CH_2	33,2	33,12
7	CH_2	41,4	41,36	22	CH_2	35,2	35,15
8	C	39,1	39,00	23	CH_3	28,3	28,01
9	CH	49,3	49,31	24	CH_3	15,5	15,43
10	C	37,6	37,59	25	CH_3	16,0	15,46
11	CH_2	17,6	17,52	26	CH_3	26,0	25,92
12	CH_2	33,8	33,73	27	CH_3	21,3	21,33
13	C	38,1	38,03	28	CH_3	29,9	29,85
14	C	158,1	158,12	29	CH_3	33,4	33,36
15	CH	116,9	116,89	30	CH_3	30,0	29,93

Solvente: *$CDCl_3$ + piridina-d_5, **$CDCl_3$



1.2.3 – MR06: Canferol



MR06 foi isolado a partir de EMF (Figura 16, pág. 26) e obtido como um sólido amarelo não cristalino com faixa de fusão 275 a 279 ºC.

No espectro na região do IV (Figura A10, pág. 158) de **MR06** observaram-se bandas de absorção em 3376 cm^{-1}, característica de estiramento da ligação OH de hidroxila, em 1658 cm^{-1}, característica de estiramento de ligação CO de carbonila de flavonas, em 1612 cm^{-1}, característica de estiramento de ligação C=C de compostos aromáticos, e em 1172 cm^{-1}, característica de estiramento de ligação C-O de fenóis (BARBOSA, 2007).

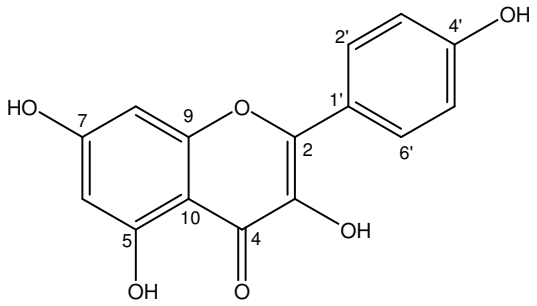
No espectro de RMN de ^{1}H (Figura A11, pág. 159) de **MR06** observaram-se dois sinais largos de núcleos de hidrogênio aromáticos em δ_H 6,23 (1H) e 6,46 (1H). Observaram-se, também, dois dupletos em δ_H 8,12 (2H, J = 8,8 Hz) e 6,96 (2H, J = 8,8 Hz), característicos de sinais de núcleos de hidrogênio aromáticos *orto*-acoplados. Esses sinais permitiram inferir que **MR06** poderia tratar-se de um flavonoide.

No espectro de RMN de ^{13}C e subespectro DEPT-135 (Figuras A12 e A13, pág. 159 e 160) de **MR06** observaram-se nove sinais de carbono não hidrogenado e quatro sinais de carbono metínico. Os sinais em δ_C 130,9 e 116,6 estão mais intensos, sugerindo que **MR06** apresenta 15 átomos de carbono. Os dados de RMN de ^{13}C de **MR06** foram comparados com dados descritos na literatura para o canferol (AGRAWAL, 1989) e concluiu-se que **MR06** trata-se desse flavonoide (Tabela 3, pág. 43).

Tabela 03: Comparação dos dados de RMN de ^{13}C (CD_3OD + DMSO-d_6) de **MR06** com dados da literatura para Canferol (AGRAWAL, 1989)

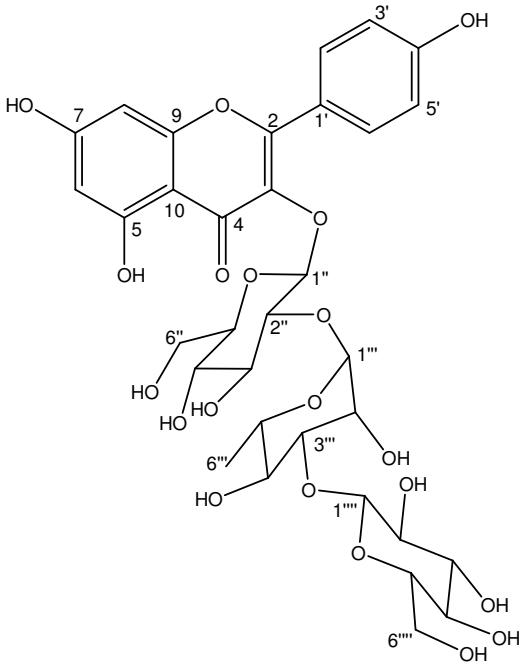
Nº	Tipo de carbono	δ_C de MR06	δ_C* (AGRAWAL, 1989)	Nº	Tipo de carbono	δ_C de MR06	δ_C* (AGRAWAL, 1989)
2	C	148,1	146,8	10	C	104,6	103,1
3	C	137,2	135,6	1’	C	123,7	121,7
4	C	177,4	175,9	2’	CH	130,7	129,5
5	C	162,4	160,7	3’	CH	116,6	115,4
6	CH	99,5	99,5	4’	C	160,7	159,2
7	C	165,6	163,9	5’	CH	116,6	115,4
8	CH	94,7	94,7	6’	CH	130,7	129,5
9	C	158,2	156,2	-	-	-	-

* DMSO-d_6



.

1.2.4 – MR07: Canferol-3-*O*-β-D-glicopiranosil-(1→3)-α-L-ramnopiranosil-(1→2)-β-D-glicopiranosídeo



MR07 foi isolado a partir de EMF e obtido como um sólido amarelo não cristalino com faixa de fusão 186 a 190 ºC (Figura 16, pág. 26).

No espectro na região do IV (Figura 21, pág. 45) de **MR07** observaram-se bandas de absorção em 3416 cm^{-1}, característica de estiramento da ligação OH de hidroxila, em 1656 cm^{-1}, característica de estiramento de ligação CO de carbonila de flavonas, em 1610 cm^{-1}, característica de estiramento de ligação C=C de compostos aromáticos, em 1178 cm^{-1}, característica de estiramento de ligação C-O de fenóis, e em 1074 cm^{-1}, característica de estiramento de ligação C-O de álcool secundário saturado (BARBOSA, 2007).

No espectro de RMN de ^1H (Figuras 22 e 23, pág. 45 e 46) de **MR07** observaram-se dois sinais, característicos de núcleos de hidrogênio aromáticos *meta*-acoplados, em δ_H 6,19 (1H, d, J = 2,0 Hz) e 6,38 (1H, d, J = 2,0 Hz). Observaram-se, também, dois sinais, característicos de núcleos de hidrogênio aromáticos *orto*-acoplados, em δ_H 6,89 (2H, d, J = 8,8 Hz) e 8,04 (2H, d, J = 8,8 Hz), além de vários sinais na região entre δ_H 3,3 e 5,7, característicos de núcleos de hidrogênio de grupos H-C-O. Esses sinais permitiram inferir que **MR07** poderia tratar-se de um flavonoide glicosilado.

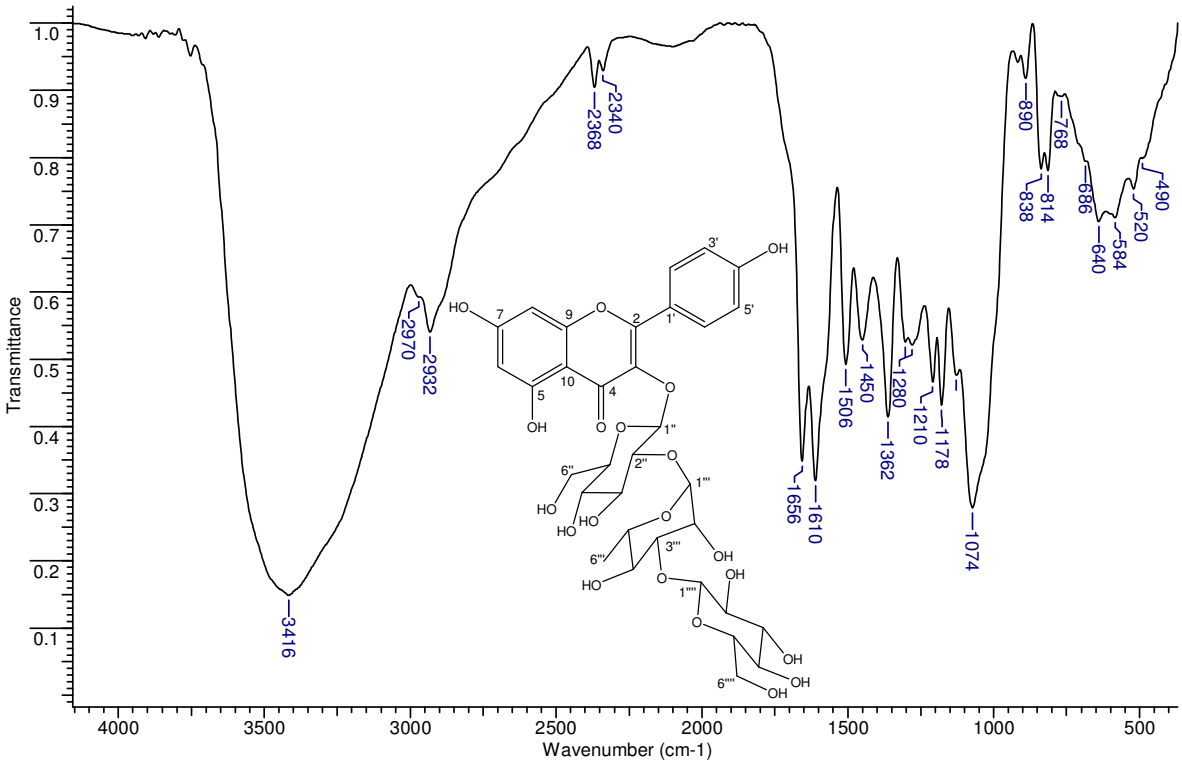


Figura 21: Espectro na região do IV de **MR07** (KBr).

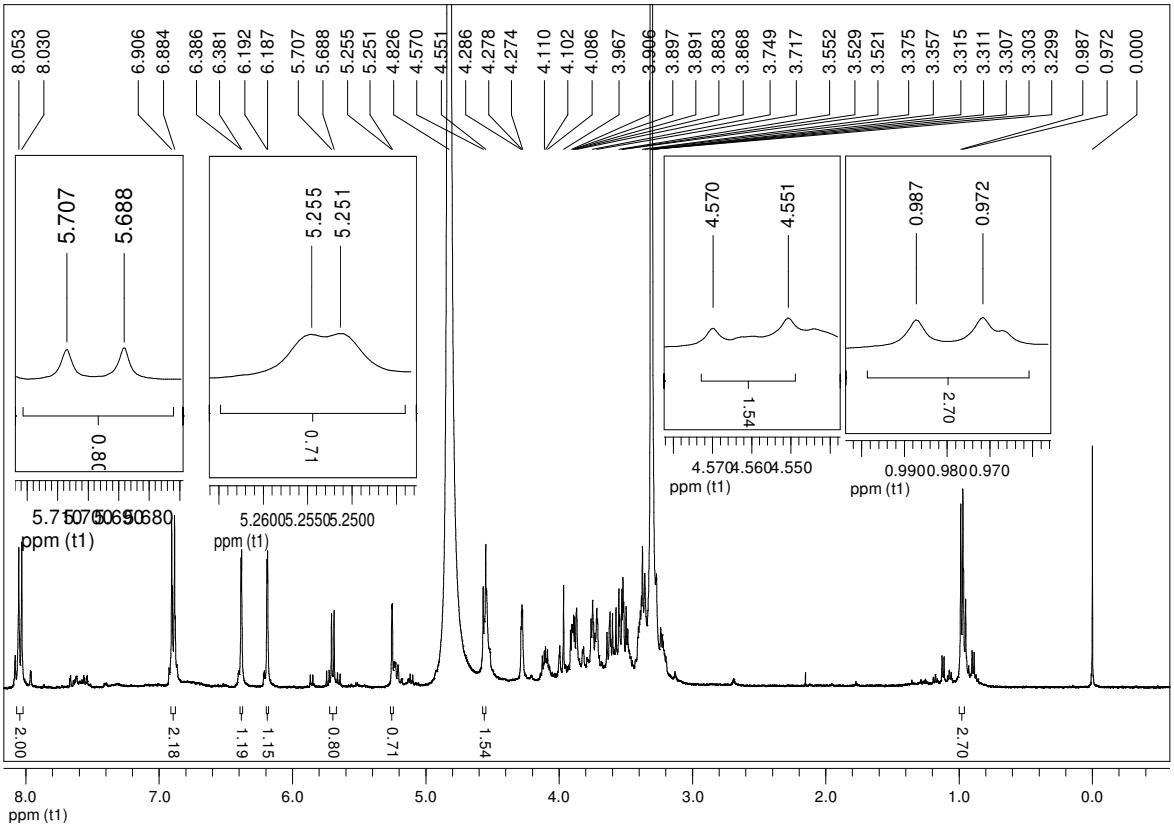


Figura 22: Espectro de RMN de ^{1}H (400 MHz, CD_3OD) de **MR07**.

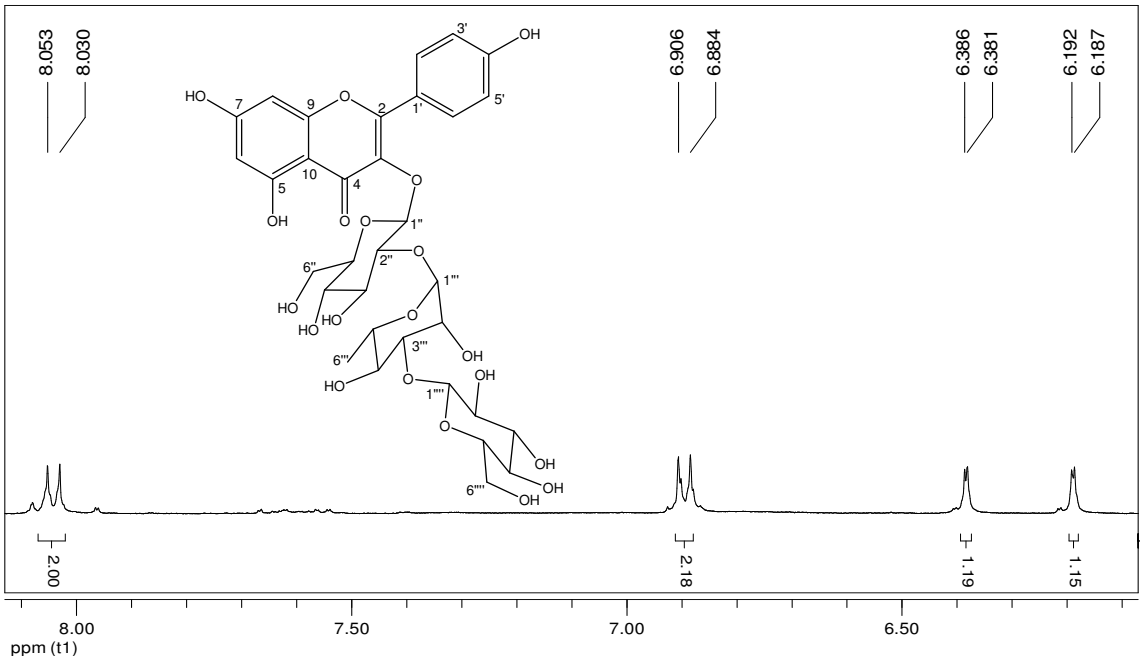


Figura 23: Expansão do espectro de RMN de ^{1}H (400 MHz, CD_3OD) de **MR07**.

No espectro de RMN de ^{13}C e subespectro DEPT-135 (Figuras 24 e 25, pág. 46 e 47) de **MR07** observaram-se vários sinais de núcleos de carbono aromáticos na região entre δ_C 116 e 166, um sinal em δ_C 179,5, característico de carbonila de esqueleto flavonóidico (AGRAWAL, 1989), e três sinais de carbono anomérico em δ_C 100,4, 102,4 e 105,8.

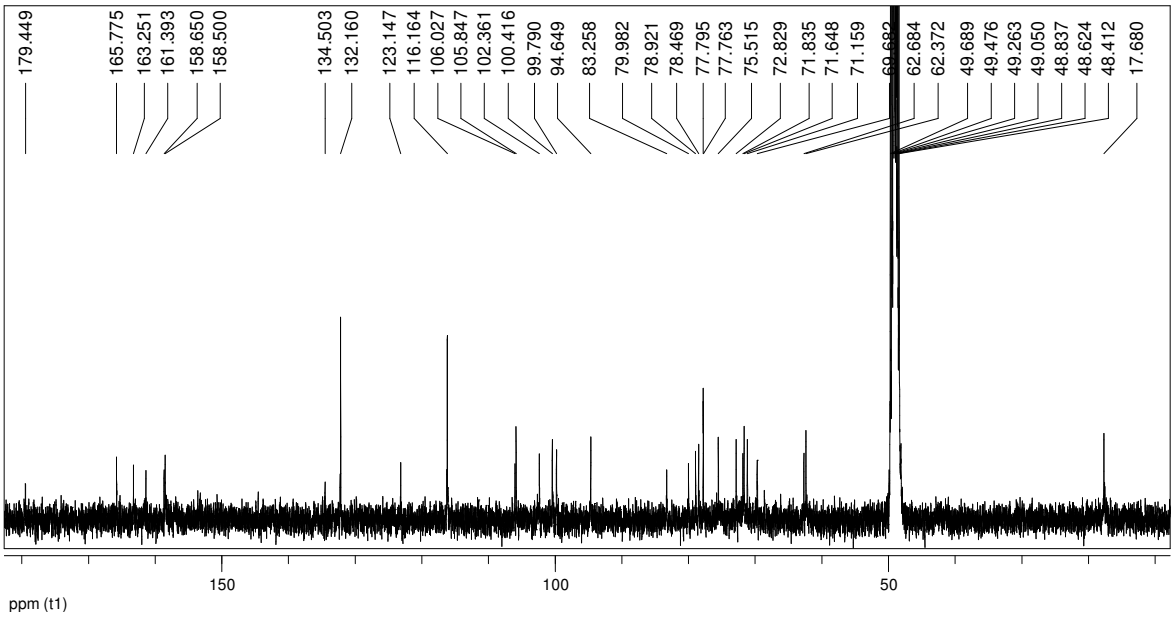


Figura 24: Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, CD_3OD) de **MR07**.

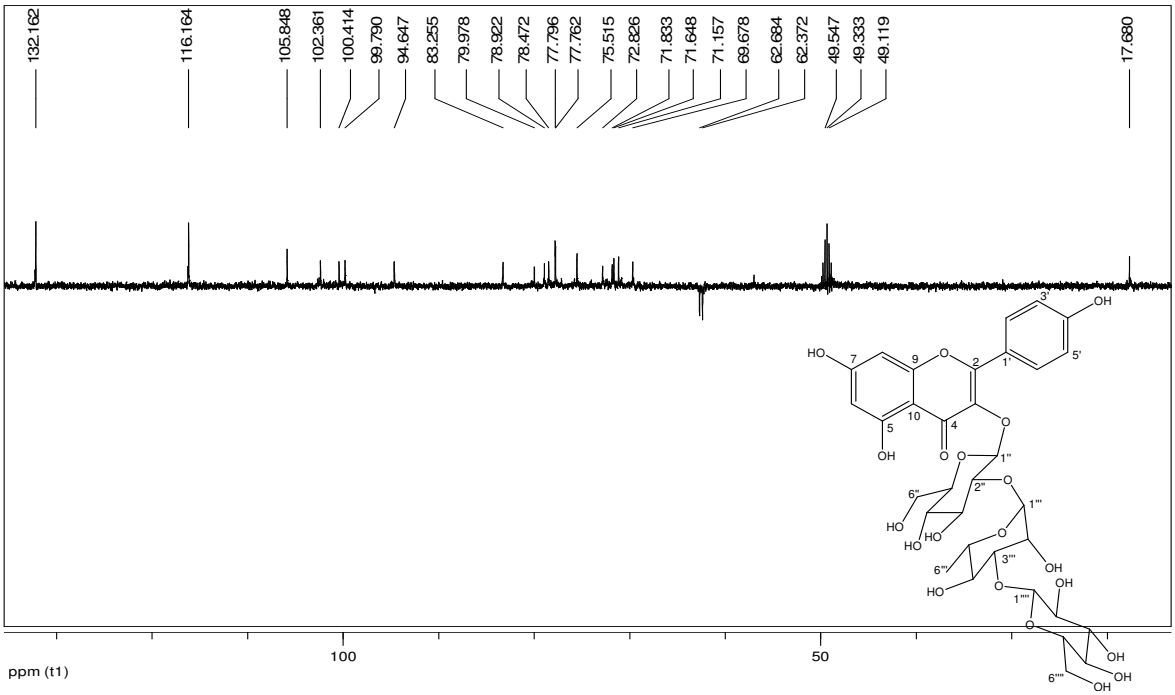


Figura 25: Subespectro DEPT135 (100 MHz, CD_3OD) de **MR07**.

Os dados de RMN de ^{13}C de **MR07** foram comparados com dados descritos na literatura para flavonoides glicosilados isolados de *Allium porrum* (FATTORUSSO et al., 2001) e concluiu-se que **MR07** trata-se de um trissacarídeo derivado do canferol, com a sequência de açúcares ligada ao oxigênio de C-3.

Realizou-se uma análise detalhada dos mapas de contornos de RMN 2D (HSQC, HMBC, HSQC-TOCSY e COSY) de **MR07** (Figuras A14 a A17, pág. 160 a 162) para elucidar as unidades glicosídicas e seu padrão de ligação. No mapa de contornos HSQC (Figura A14, pág. 160) observaram-se correlações entre os sinais em δ_C 100,4 e δ_H 5,70 (d, J = 7,6 Hz), δ_C 102,4 e δ_H 5,25 (d, J = 1,5 Hz) e δ_C 105,8 e δ_H 4,55 (d, J = 7,9 Hz), referentes aos sinais de carbono e hidrogênio anoméricos, os quais foram nomeados por 1'', 1''' e 1'''', respectivamente. Essas correlações foram utilizadas como pontos de partida para a análise do mapa de contornos HSQC-TOCSY de **MR07** (Figura A16, pág. 161). A partir da análise das constantes de acoplamento dos núcleos de hidrogênio anoméricos, os açúcares de **MR07** foram identificados como β-D-glicose (H-1'', δ_H 5,70, d, J = 7,6 Hz), α-L-ramnose (H-1''', δ_H 5,23, sinal largo, d, J = 1,5 Hz) e β-D-glicose (H-1'''', δ_H 4,55, d, J = 7,8 Hz) (FURUSAWA et al., 2005). A análise em conjunto dos mapas de contornos HSQC e HSQC-TOCSY permitiram identificar os deslocamentos

químicos dos núcleos de carbono e hidrogênio presentes em cada uma das três unidades glicosídicas. No mapa de contornos HMBC de **MR07** (Figura A15, pág. 161) observaram-se correlações entre H-1'''' (δ_H 4,55) e C-3''' (δ_C 83,3) e entre H-1''' (δ_H 5,25) e C-2'' (δ_C 80,0). Essas correlações permitiram identificar o padrão de ligação das unidades glicosídicas. Os dados de RMN de ^{1}H, de ^{13}C, HSQC, HMBC e HSQC-TOCSY observados a partir dos espectros obtidos para **MR07** estão descritos na Tabela 4, pág. 49. Concluiu-se que **MR07** trata-se do canferol-3-*O*-β-D-glicopiranosil-(1→3)-α-L-ramnopiranosil-(1→2)-β-D-glicopiranosídeo, um composto inédito na literatura.

A fórmula molecular de **MR07**, $C_{33}H_{40}O_{20}$, foi confirmada por HR-ESI-MS. No espectro de massas de **MR07** (Figura 26) observou-se o pico *m/z* 757,2185 referente ao cátion $[M+H]^+$ (*m/z* calc. 757,2191). No espectro de massas MS^2 (Figura 27) obtido a partir da fragmentação do íon *m/z* 757,2183 observaram-se os íons filhos *m/z* 449,1080 (*m/z* calc. 449,1084), referente à perda de uma unidade de glicose e ramnose $[(M+H) - 146 - 162]^+$, *m/z* 287,0551 (*m/z* calc. 287,0556), referente à aglicona $[(M+H) - 162 - 146 - 162]^+$, e *m/z* 163,0601 (*m/z* calc. 163,0606), referente a uma unidade de glicose $[(M+H) - 594]^+$. Na Figura A18, pág. 162 é apresentada a proposta de fragmentação de **MR07**.

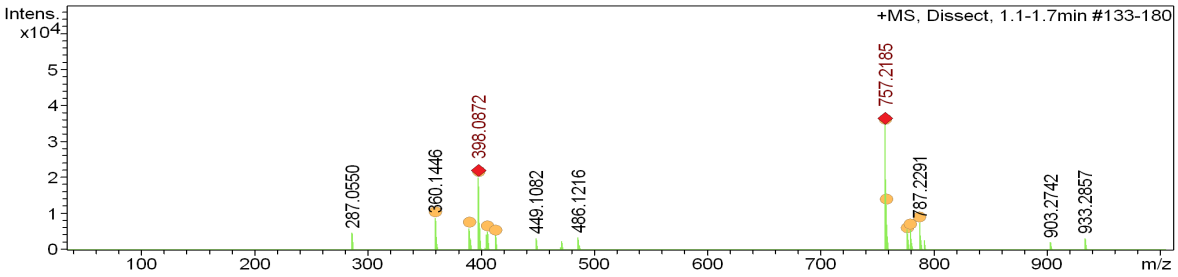


Figura 26: Espectro de massas (HR-ESI, modo positivo) de **MR07**.

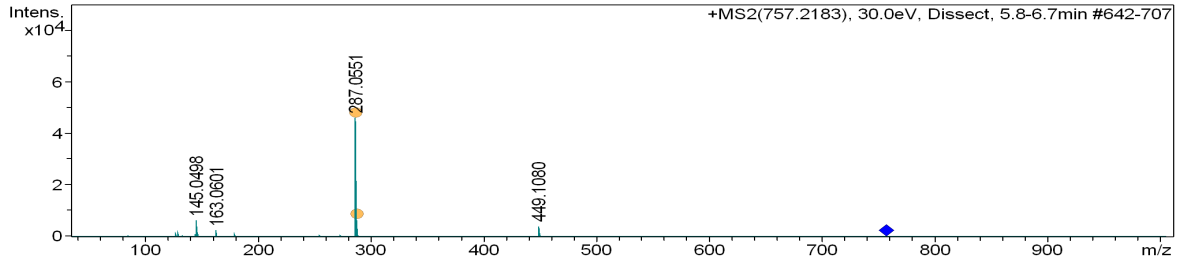
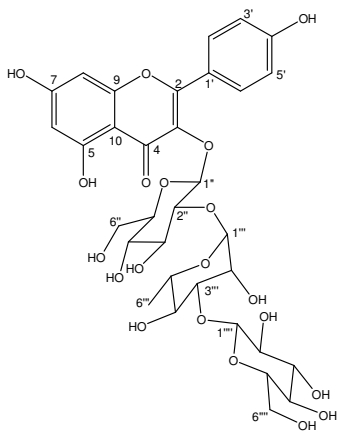


Figura 27: Espectro de massas MS^2 obtido a partir da fragmentação do íon *m/z* = 757,2183.

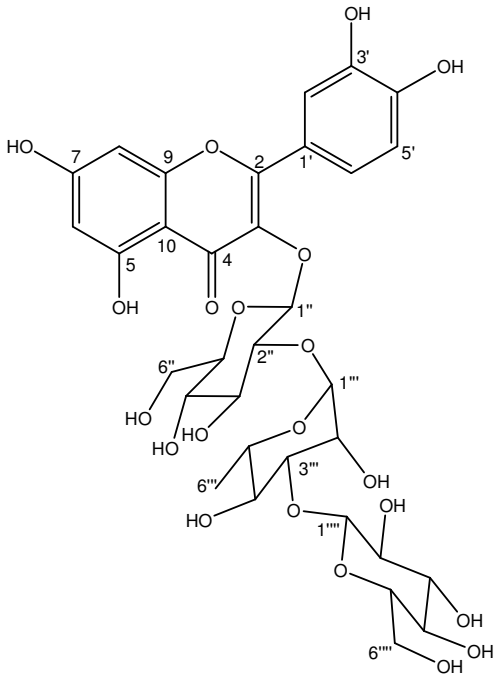
Tabela 04: Dados de RMN (CD_3OD) de **MR07**

Nº	δ_C de MR07	Tipo de carbono	** δ_H	HMBC	HSQC-TOCSY
2	158,6	C			
3	134,5	C			
4	179,5	C			
5	163,3	C			
6	99,8	CH	6,19; d; J = 2,0	5, 7, 8, 10	8
7	165,8	C			
8	94,6	CH	6,38; d; J = 2,0	6, 7, 9,10	6
9	158,5	C			
10	106,0	C			
1’	123,1	C			
2’	132,2	CH	8,04; d; J = 8,8	2, 4’, 6’	3’
3’	116,2	CH	6,89; d; J = 8,8	1’, 4’, 5’	2’
4’	161,4	C			
5’	116,2	CH	6,89; d; J = 8,8	1’, 3’, 4’	6’
6’	132,2	CH	8,04; d; J = 8,8	2, 2’, 4’	5’
1’’	100,4	CH	5,70; d; J = 7,6		2’’, 3’’, 4’’, 5’’
2’’	80,0	CH	*3,61	1’’, 3’’	
3’’	78,9[a]	CH	*3,57[a]		
4’’	71,6	CH	*3,28	5’’	
5’’	78,5[a]	CH	*3,22[a]		4’’, 6’’
6’’	62,7	CH_2	*3,50 *3,72		
1’’’	102,4	CH	5,25; d; J = 1,5	2’’, 3’’’, 2’’’, 5’’’	2’’’
2’’’	71,6	CH	4,27 - 429; m		1’’’
3’’’	83,3	CH	*3,89		
4’’’	72,8	CH	*3,51	5’’’	
5’’’	69,7	CH	4,08 - 4,13; m		
6’’’	17,7	CH_3	0,98; d, J = 6,3	4’’’, 5’’’	3’’’, 4’’’, 5’’’
1’’’’	105,8	CH	4,55; d, J = 7,8	3’’’	2’’’’, 3’’’’, 4’’’’, 5’’’’
2’’’’	75,5	CH	*3,28	3’’’’	
3’’’’	77,8	CH	*3,36		1’’’’, 4’’’’
4’’’’	71,2	CH	*3,36		
5’’’’	77,8	CH	*3,36		1’’’’, 4’’’’
6’’’’	62,4	CH_2	*3,59 *3,87		

* Sinais sobrepostos no espectro de RMN de ^1H e determinados por HSQC. ** Os valores de J estão em Hz. [a]Os sinais podem estar trocados.



1.2.5 – MR08: Quercetina-3-*O*-β-D-glicopiranosil-(1→3)-α-L-ramnopiranosil-(1→2)-β-D-glicopiranosídeo



MR08 foi isolado a partir de EMF e obtido como um sólido amarelo não cristalino com faixa de fusão 186 a 189 ºC (Figura 16, pág. 26).

No espectro na região do IV (Figura 28, pág. 51) de **MR08** observaram-se bandas de absorção em 3418 cm^{-1}, característica de estiramento da ligação OH de hidroxila, em 1658 cm^{-1}, característica de estiramento de ligação CO de carbonila conjugada, em 1610 cm^{-1}, característica de estiramento de ligação C=C de compostos aromáticos, em 1204 cm^{-1}, característica de estiramento de ligação C-O de fenóis, e em 1074 cm^{-1}, característica de estiramento de ligação C-O de álcool secundário saturado (BARBOSA, 2007).

No espectro de RMN de ^1H (Figura 29, pág. 51) de **MR08** observaram-se na região de núcleos de hidrogênio aromático dois sinais largos em δ_H 6,25 (1H) e 6,45 (1H), dois dupletos em δ_H 6,93 (1H, d, J = 8,2 Hz) e 7,66 (1H, d, J = 1,6 Hz) e um dupleto duplo em 7,63 (1H, d, J = 1,6 e 8,8 Hz). Também se observaram vários sinais na região entre δ_H 3,3 e 5,7, que são característicos de núcleos de hidrogênio de grupos H-C-O.

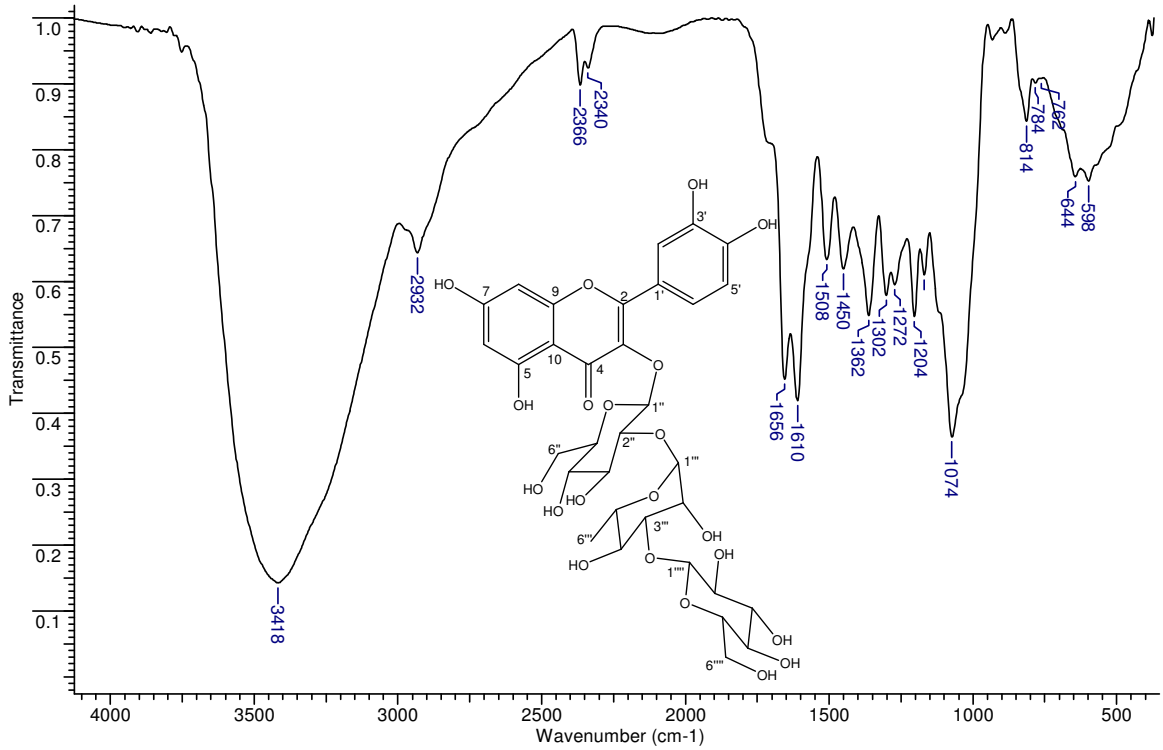


Figura 28: Espectro na região do IV de **MR08** (KBr).

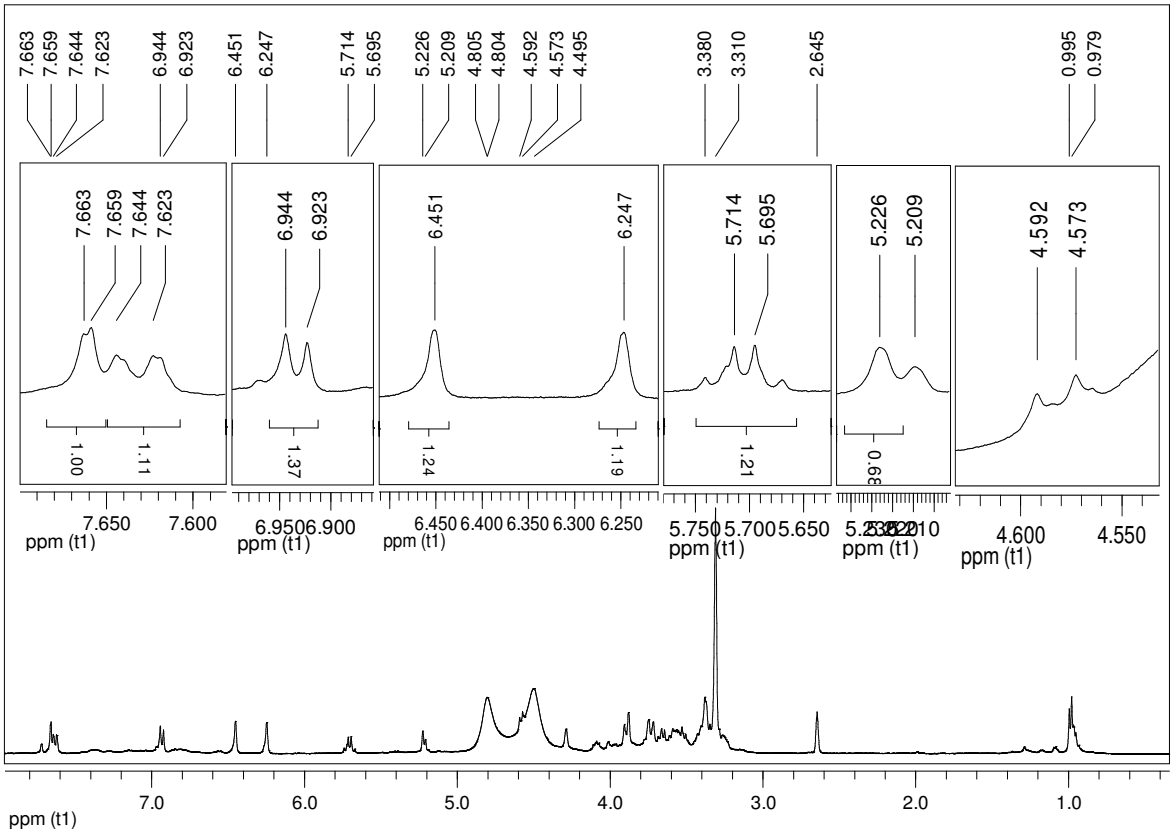


Figura 29: Espectro de RMN de ^{1}H (400 MHz, CD_3OD + DMSO-d_6) de **MR08**.

No espectro de RMN de ^{13}C e subespectro DEPT-135 (Figuras 30 e 31, pág. 53) de **MR08** observaram-se vários sinais de núcleos de carbono aromáticos na região entre δ_C 116 e 166, um sinal em δ_C 179,3, característico de carbonila de esqueleto flavonoídico (AGRAWAL, 1989), e três sinais de carbono anomérico em δ_C 100,3, 102,2 e 105,9.

Nos espectros de RMN de ^{1}H e de ^{13}C de **MR08** foram observados sinais característicos de flavonoides glicosilados. Os dados de RMN de ^{13}C de **MR08** foram comparados com dados descritos na literatura para vários flavonoides glicosilados (KAZUMA et al., 2003, KIM et al., 2004) e concluiu-se que **MR08** trata-se de um trissacarídeo derivado da quercetina, com a sequência de açúcares ligada ao oxigênio de C-3. A partir da análise da região entre δ_C 106 e 17 dos espectros de RMN de ^{13}C e subespectro DEPT-135 (Figuras 30 e 31, pág. 53) observaram-se que os valores dos sinais de carbono referentes aos açúcares de **MR08** são muito semelhantes aos de **MR07**, assim ambos os compostos poderiam apresentar os mesmos tipos e a mesma sequência de açúcares. Realizou-se uma análise detalhada dos mapas de contornos de RMN 2D (HSQC, HMBC, HSQC-TOCSY e COSY) de **MR08** (Figuras A19 a A22, pág. 163 a 164) para elucidar as unidades glicosídicas e seu padrão de ligação. No mapa de contornos HSQC (Figura A19, pág. 163) observaram-se correlações entre δ_C 100,3 e δ_H 5,70 (d, J = 7,6 Hz), δ_C 102,2 e δ_H 5,23 (sinal largo) e δ_C 105,9 e δ_H 4,56 (d, J = 7,9 Hz), referentes aos sinais de carbono e hidrogênio anoméricos. Essas correlações foram utilizadas como pontos de partida para a análise do mapa de contornos HSQC-TOCSY de **MR08** (Figura A21, pág. 164). A partir da análise dos sinais dos núcleos de hidrogênio anoméricos no espectro RMN de ^{1}H, os açúcares de **MR08** foram identificados como β-D-glicose (H-1'', δ_H 5,70, d, J = 7,6 Hz), α-L-ramnose (H-1''', δ_H 5,23, sinal largo) e β-D-glicose (H-1'''', δ_H 4,56, d, J = 7,9 Hz) (FURUSAWA et al., 2005). A análise em conjunto dos mapas de contornos HSQC e HSQC-TOCSY permitiram identificar os deslocamentos químicos dos núcleos de carbono e hidrogênio presentes em cada uma das três unidades glicosídicas. No mapa de contornos HMBC de **MR08** (Figura A20, pág. 163) observaram-se correlações entre H-1'''' (δ_H 4,56) e C-3''' (δ_C 83,4) e entre H-1''' (δ_H 5,21) e C-2'' (δ_C 79,7). Essas correlações permitiram confirmar que **MR08** apresenta a mesma sequência de açúcares de **MR07**. A única diferença entre os

dois compostos está na aglicona, a de **MR07** trata-se do canferol e de **MR08** da quercetina. Portanto, **MR08** trata-se da quercetina-3-*O*-β-D-glicopiranosil-(1→3)-α-L-ramnopiranosil-(1→2)-β-D-glicopiranosídeo. Não foram encontrados relatos na literatura de uma quercetina com os mesmos tipos e perfil de ligação dos açúcares observados para **MR08**, portanto trata-se de um composto inédito. Os dados de RMN de ^{1}H, de ^{13}C, HSQC, HMBC e HSQC-TOCSY observados a partir dos espectros obtidos para **MR08** estão descritos na Tabela 5, pág. 55.

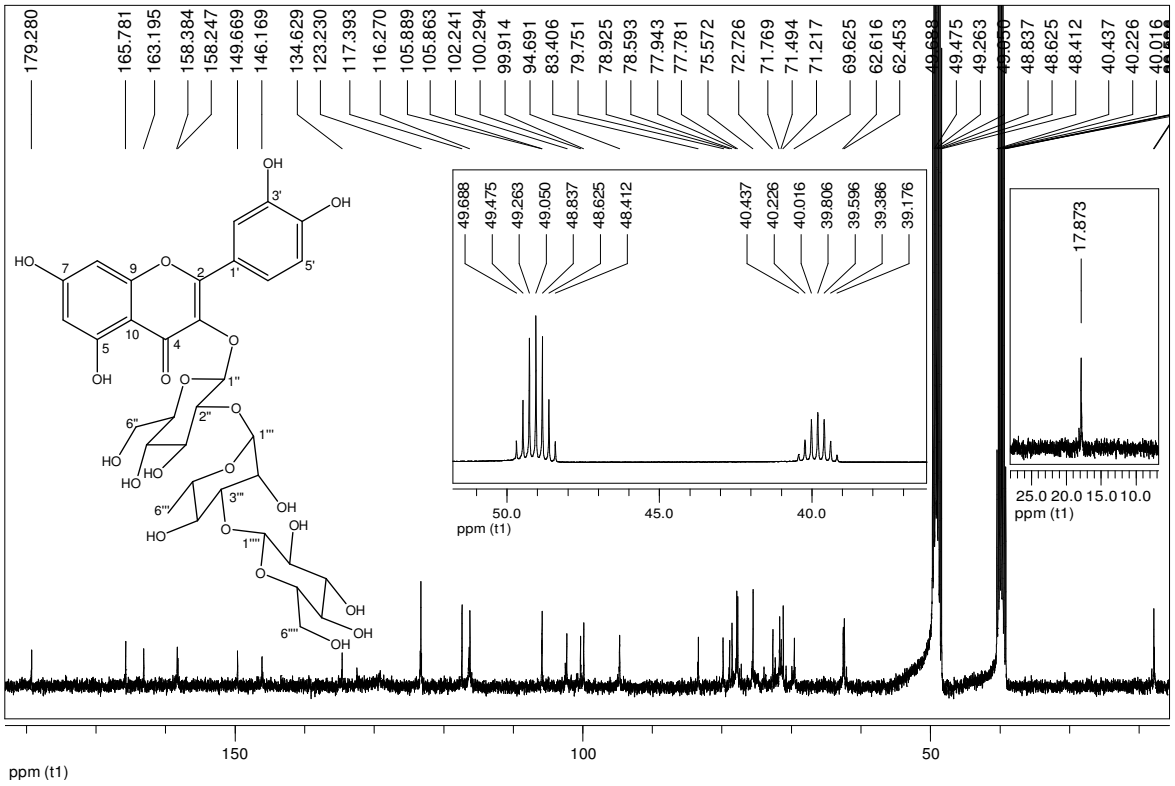


Figura 30: Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, CD_3OD + DMSO-d_6) de **MR08**.

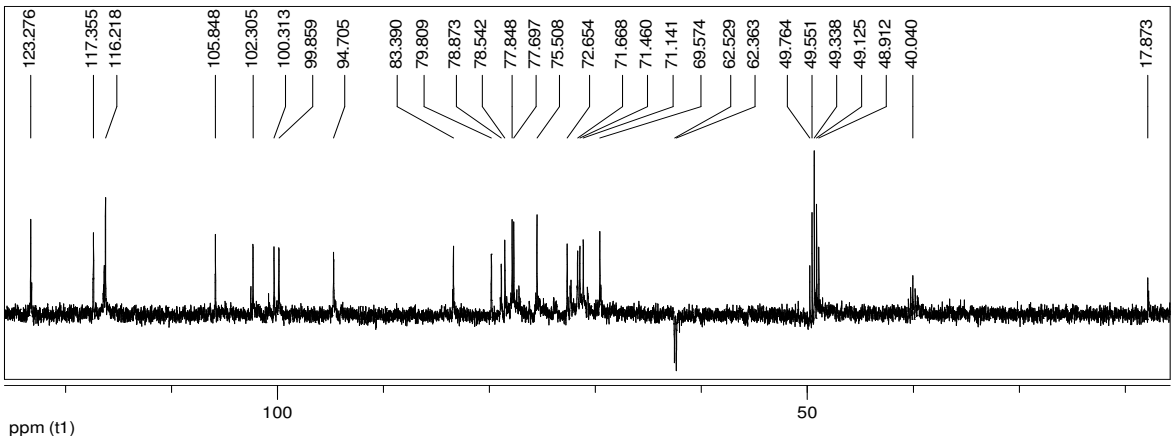


Figura 31: Subespectro DEPT135 (100 MHz, CD_3OD + DMSO-d_6) de **MR08**.

A fórmula molecular de **MR08**, $C_{33}H_{40}O_{21}$, foi confirmada por HR-ESI-MS. No espectro de massas de **MR08** (Figura 32) observou-se o pico *m/z* 773,2134 referente ao cátion $[M+H]^+$ (*m/z* calc. 773,2140). Certificou-se de que **MR08** apresenta 16 unidades de massa a mais em relação a **MR07**, o que corresponde ao grupo hidroxila ligado a C-3' em **MR08** ao invés de um átomo de H. No espectro de massas MS^2 (Figura 33) obtido a partir da fragmentação do íon *m/z* 773,2134 observaram-se os íons filhos *m/z* 465,1038 (*m/z* calc. 465,1033), referente à perda de uma unidade de glicose e ramnose $[(M+H) - 146 - 162]^+$, *m/z* 303,0499 (*m/z* calc. 303,0505), referente à aglicona $[(M+H) - 162 - 146 - 162]^+$, e *m/z* 163,0603 (*m/z* calc. 163,0606), referente a uma unidade de glicose $[(M+H) - 594]^+$. Na Figura A23, pág. 165 é apresentada a proposta de fragmentação de **MR08**.

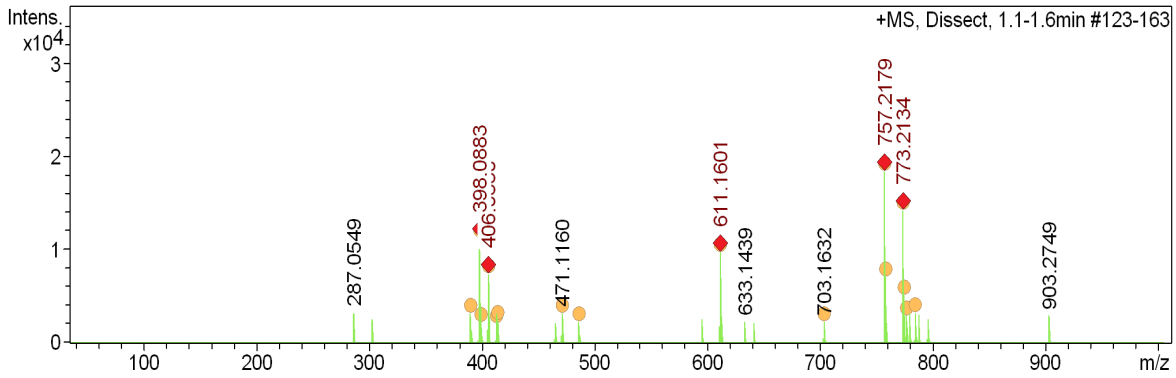


Figura 32: Espectro de massas (HR-ESI, modo positivo) de **MR08**.

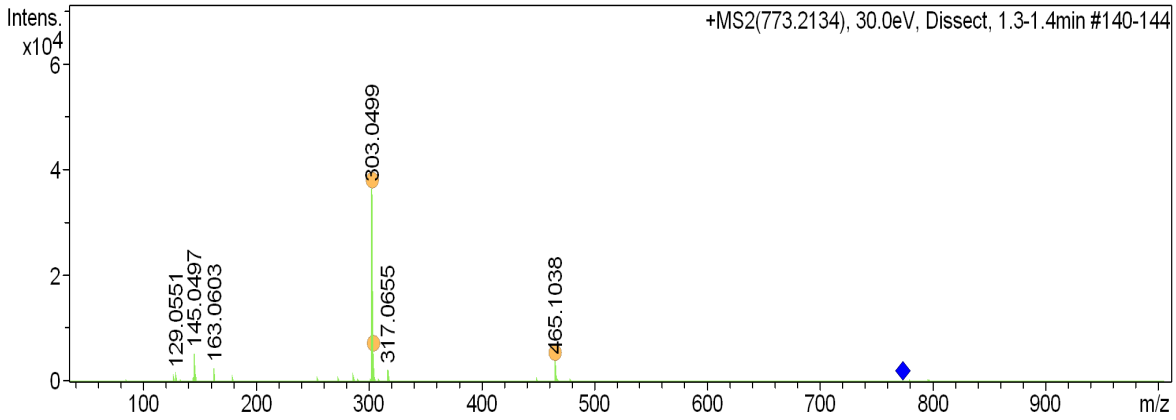
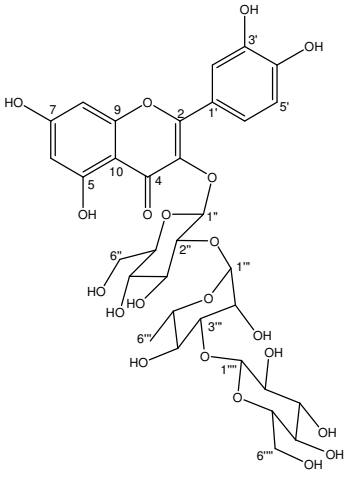


Figura 33: Espectro de massas MS^2 obtido a partir da fragmentação do íon *m/z* = 773,2134.

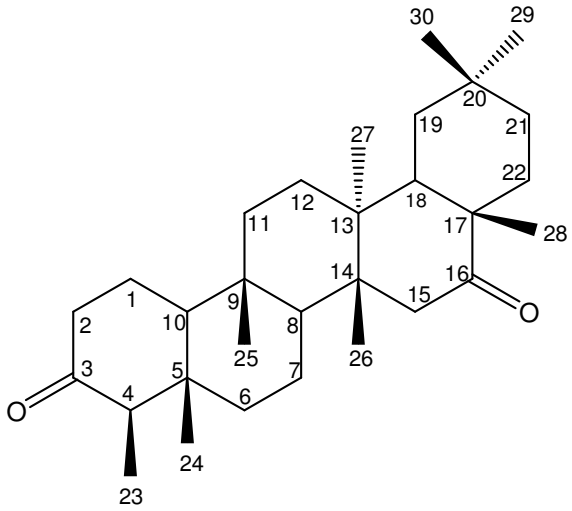
Tabela 5: Dados de RMN (CD_3OD + DMSO-d_6) de **MR08**

Nº	δ_C de MR08	Tipo de carbono	**δ_H	HMBC	HSQC-TOCSY
2	158,2	C			
3	134,6	C			
4	179,3	C			
5	163,2	C			
6	99,9	CH	6,25; sl	5, 7, 8, 10	8
7	165,8	C			
8	94,7	CH	6,45; sl	6, 7, 9, 10	6
9	158,4	C			
10	105,9	C			
1’	123,2	C			
2’	117,3	CH	7,66; d, J = 1,6	1’, 3’, 4’, 6’	
3’	146,2	C			
4’	149,7	C			
5’	116,3	CH	6,93; d; J = 8,4	1’, 3’, 4’, 6’	6’
6’	123,2	CH	7,63, dd J = 1,6 e 8,4	2, 1’, 4’, 2’	5’
1’’	100,3	CH	5,70; d; J = 7,6		2’’, 5’’
2’’	79,7	CH	*3,65	1’’, 3’’, 1’’’	1’’
3’’	78,9[a]	CH	*3,58[a]		1’’
4’’	71,8	CH	*3,36		
5’’	78,6[a]	CH	*3,24[a]		
6’’	62,6	CH_2	*3,56[b] *3,74[b]		
1’’’	102,2	CH	5,23; sl	2’’, 3’’’, 2’’’, 5’’’	2’’’
2’’’	71,4	CH	4,29; sl		
3’’’	83,4	CH	*3,88		6’’’
4’’’	72,7	CH	*3,51		6’’’
5’’’	69,6	CH	4,07 - 4,11; m		6’’’
6’’’	17,9	CH_3	0,98; d; J = 6,1	4’’’, 5’’’	
1’’’’	105,9	CH	4,58; d; J = 7,9	3’’’	2’’’’, 3’’’’, 4’’’’, 5’’’’
2’’’’	75,6	CH	*3,29	1’’’’, 3’’’’	1’’’’
3’’’’	77,9	CH	*3,37	4’’’’	1’’’’
4’’’’	71,2	CH	*3,32		1’’’’
5’’’’	77,8	CH	*3,42		
6’’’’	62,4	CH_2	*3,74[b] *3,88[b]		

*Sinais sobrepostos no espectro de RMN de ^1H e determinados por HSQC. **Os valores de J estão em Hz.
[a,b]Os sinais podem estar trocados.



1.2.6 – MR09: 3,16-dioxofriedelano



MR09 foi isolado a partir de SEHG, EHG, ECG e EAG e obtido como um sólido branco cristalino (Figuras 17, 18, 19 e 20, pág. 29, 30, 36 e 37). A análise por CCD desse sólido utilizando diferentes eluentes evidenciou a existência de uma única mancha após revelação com solução de ácido perclórico e vanilina.

O espectro na região do IV (Figura A24, pág. 165) de **MR09** apresenta banda de absorção em 2925 cm^{-1} característica de estiramento assimétrico da ligação CH de grupos CH_2 de grupos alifáticos. A banda de absorção em 2871 cm^{-1} é característica de estiramento simétrico da ligação CH de grupos CH_2 e CH_3 de grupos alifáticos. As bandas de absorção em 1461 e 1392 cm^{-1} são características de deformação angular no plano de ligação simples CH de grupos alquila. As bandas de absorção em 1714 e 1686 cm^{-1} são características de estiramento de ligação CO de carbonila de cetona.

O espectro de RMN de ^1H (Figura A25, pág. 166) apresenta sete simpletos referentes a grupos metila em δ_H 0,74, 0,89, 0,91, 0,96, 1,05, 1,20 e 1,30. Outro sinal referente a grupo metila foi observado em δ_H 0,88 (J = 6,6 Hz) e trata-se de um dupleto que é característico da metila C-23 de triterpenos com esqueleto friedelano (MAHATO e KUNDU, 1994). Não foram observados sinais com deslocamento químico maior que δ_H 3,00, indicando ausência de hidroxila ou ligações duplas entre átomos de carbono.

O espectro de RMN de ^{13}C de **MR09** (Figura A26, pág. 166) apresenta 30 sinais. A partir da análise do subespectro DEPT-135 (Figura A27, pág. 167),

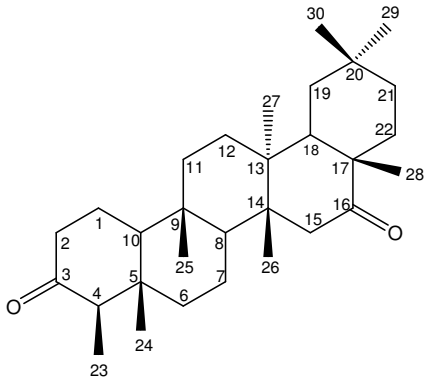
concluiu-se que o composto apresenta oito átomos de carbono metílico, 10 de carbono metilênico, quatro de carbono metínico e oito de carbono não hidrogenado. Os sinais observados em δ_C 212,7 e 219,1 são característicos de carbonos carbonílicos.

A comparação dos dados de RMN de ^{13}C obtidos para **MR09** com aqueles da literatura para 3,16-dioxofriedelano (MAHATO e KUNDU, 1994) permitiu concluir que **MR09** trata-se desse triterpeno. Os dados de RMN de ^{13}C de **MR09** e de 3,16-dioxofriedelano estão apresentados na Tabela 6.

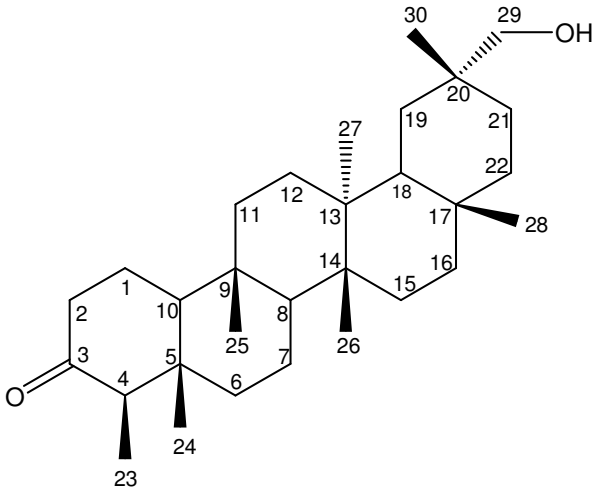
Tabela 6: Dados de RMN de ^{13}C ($CDCl_3$) de **MR09** e dados da literatura para 3,16-dioxofriedelano (MAHATO e KUNDU, 1994)

Nº	Tipo de carbono	δ_C de MR09	δ_C* (MAHATO e KUNDU, 1994)	Nº	Tipo de carbono	δ_C de MR09	δ_C* (MAHATO e KUNDU, 1994)
1	CH_2	22,2	22,2	16	C	219,1	218,8
2	CH_2	41,4	41,4	17	C	45,3	45,3
3	C	212,7	212,5	18	CH	43,9	44,0
4	CH	58,1	58,2	19	CH_2	35,4	35,5
5	C	42,1	42,1	20	C	27,6	27,6
6	CH_2	41,0	41,0	21	CH_2	31,6	31,7
7	CH_2	18,6	18,6	22	CH_2	30,7	30,8
8	CH	52,3	52,4	23	CH_3	6,8	6,8
9	C	37,6	37,7	24	CH_3	14,6	14,7
10	CH	59,2	59,4	25	CH_3	17,3	17,3
11	CH_2	35,3	35,4	26	CH_3	20,3	20,3
12	CH_2	29,0	29,1	27	CH_3	16,2	16,2
13	C	39,1	39,2	28	CH_3	27,3	27,4
14	C	40,4	40,5	29	CH_3	31,1	31,1
15	CH_2	50,1	50,2	30	CH_3	35,2	35,2

*$CDCl_3$



1.2.7 – MR10: 3-oxo-29-hidroxifriedelano



MR10 foi obtido como um sólido branco cristalino com faixa de fusão 242-246 ºC. O composto foi isolado a partir de SEHG, EHG e ECG (Figuras 17, 18 e 19, pág. 29, 30 e 36). A análise por CCD desse sólido utilizando diferentes eluentes evidenciou a existência de uma única mancha após revelação com solução de ácido perclórico e vanilina.

O espectro na região do IV (Figura A28, pág. 167) de **MR10** apresenta banda de absorção em 3496 cm^{-1} característica de estiramento da ligação OH de hidroxila. A banda de absorção em 2924 cm^{-1} é característica de estiramento assimétrico da ligação CH de grupos CH_2 de compostos alifáticos. A banda de absorção em 2869 cm^{-1} é característica de estiramento simétrico da ligação CH de grupos CH_2 e CH_3 de grupos alifáticos. As bandas de absorção em 1459 e 1388 cm^{-1} são características de deformação angular no plano de ligação simples CH de grupos alquila. A banda de absorção em 1703 cm^{-1} é característica de estiramento de ligação CO de carbonila de cetona.

O espectro de RMN de ^1H de **MR10** (Figura A29, pág. 168) apresenta seis simpletos referentes a grupos metila em δ_H 0,73, 0,87, 1,03, 1,04, 1,05 e 1,22. Além disso, um dupleto referente a grupo metila foi observado em δ_H 0,88 (J = 5,6 Hz). Esse sinal é característico da metila C-23 de triterpenos pentacíclicos de esqueleto friedelano (MAHATO e KUNDU, 1994). Observaram-se também dois dupletos em δ_H 3,25 (1H, J = 10,4 Hz) e δ_H 3,29 (1H, J = 10,4 Hz), sinais característicos de núcleos de hidrogênio ligados a carbono metilênico hidroxilado.

O espectro de RMN de ^{13}C de **MR10** (Figura A30, pág. 168) apresenta 30 sinais. A partir da análise do subespectro DEPT-135 (Figura A31, pág. 169), inferiu-se que o composto possui sete átomos de carbono metílico, doze de carbono metilênico, quatro de carbono metínico e sete de carbono não hidrogenado. Os sinais observados em δ_C 74,8 e 213,2 são, respectivamente, característicos de núcleos de carbono metilênico hidroxilado e carbonílico.

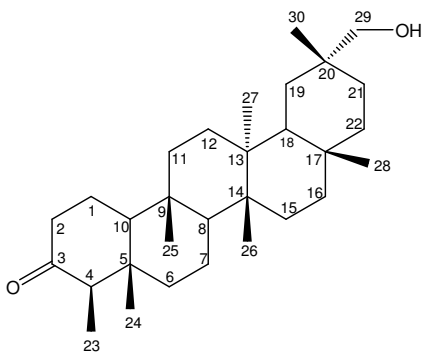
A partir da comparação dos dados de RMN de ^{13}C de **MR10** com os da literatura para 3-oxo-29-hidroxifriedelano (MAHATO e KUNDU, 1994) concluiu-se que **MR10** trata-se desse composto. Os dados de RMN de ^{13}C de **MR10** e de 3-oxo-29-hidroxifriedelano estão apresentados na Tabela 7.

MR10 foi anteriormente isolado a partir do sólido obtido durante o preparo do extrato hexânico das folhas de *M. robusta* (SEHF) (SOUSA, 2012), mas foi obtido em mistura com 3-oxo-11β-hidroxifriedelano.

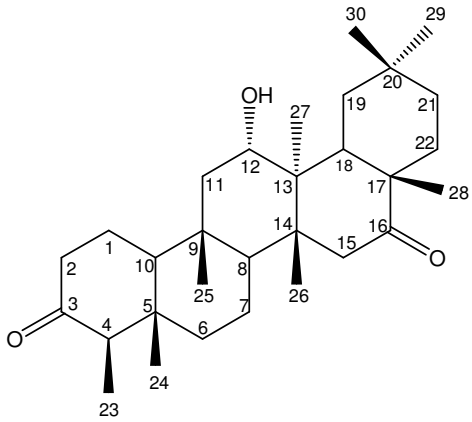
Tabela 7: Dados de RMN de ^{13}C ($CDCl_3$) de **MR10** e dados da literatura para 3-oxo-29-hidroxifriedelano (MAHATO e KUNDU, 1994)

Nº	Tipo de carbono	δ_C de MR10	δ_C* (MAHATO e KUNDU, 1994)	Nº	Tipo de carbono	δ_C de MR10	δ_C* (MAHATO e KUNDU, 1994)
1	CH_2	22,3	22,3	16	CH_2	35,9	36,0
2	CH_2	41,5	41,6	17	C	29,8	29,8
3	C	213,2	212,2	18	CH	41,9	42,0
4	CH	58,2	58,3	19	CH_2	30,6	30,6
5	C	42,2	42,2	20	C	33,1	33,2
6	CH_2	41,3	41,4	21	CH_2	27,8	27,9
7	CH_2	18,2	18,3	22	CH_2	39,5	39,6
8	CH	53,4	53,5	23	CH_3	6,8	6,8
9	C	37,4	37,5	24	CH_3	14,7	14,7
10	CH	59,5	59,6	25	CH_3	17,9	17,9
11	CH_2	35,6	35,7	26	CH_3	18,4	18,4
12	CH_2	29,8	29,8	27	CH_3	20,8	20,8
13	C	40,0	40,0	28	CH_3	32,1	32,1
14	C	38,2	38,3	29	CH_2	74,8	74,8
15	CH_2	32,7	32,8	30	CH_3	25,8	25,9

*$CDCl_3$



1.2.8 – MR11: 3,16-dioxo-12α-hidroxifriedelano



MR11 foi obtido como um sólido branco amorfo com faixa de fusão de 285-290 ºC. O composto foi isolado a partir de SEHG e ECG (Figuras 17 e 19, pág. 29 e 36). A análise por CCD desse sólido utilizando diferentes eluentes evidenciou a existência de uma única mancha após revelação com solução de ácido perclórico e vanilina.

O espectro na região do IV (Figura A32, pág. 169) de **MR11** apresenta uma banda de absorção em 3442 cm^{-1} característica de estiramento da ligação OH de hidroxila. A banda de absorção em 2940 cm^{-1} é característica de estiramento assimétrico da ligação CH de grupos CH_2 de compostos alifáticos. A banda de absorção em 2852 cm^{-1} é característica de estiramento simétrico da ligação CH de grupos CH_2 e CH_3 de compostos alifáticos. As absorções em 1458 e 1390 cm^{-1} são características de deformação angular no plano de ligação simples CH de compostos alifáticos. A absorção em 1698 cm^{-1} é característica de estiramento de ligação CO de carbonila de cetona.

O espectro de RMN de ^1H (Figura A33, pág. 170) apresenta sete simpletos referentes a grupos metila em δ_H 0,73, 0,90, 0,97, 0,99, 1,06, 1,22 e 1,32. Além disso, um dupleto referente a grupo metila foi observado em δ_H 0,88 (J = 9,0 Hz). Esse sinal é característico da metila C-23 de triterpenos pentacíclicos de esqueleto friedelano (MAHATO e KUNDU, 1994). Observou-se, ainda, um dupleto duplo em δ_H 3,98 (J = 4,0 e 11,2 Hz; 1H) característico de hidrogênio ligado a carbono carbinólico. O valor da constante de acoplamento de 4,0 Hz está relacionado com a presença de um hidrogênio vicinal acoplado a esse hidrogênio em um ângulo de aproximadamente 60º. A constante de acoplamento de 11,2 Hz

sugere a existência de acoplamento com um hidrogênio vicinal em um ângulo de aproximadamente 180º. Assim, pode-se concluir que o hidrogênio em δ_H 3,98 encontra-se na posição axial.

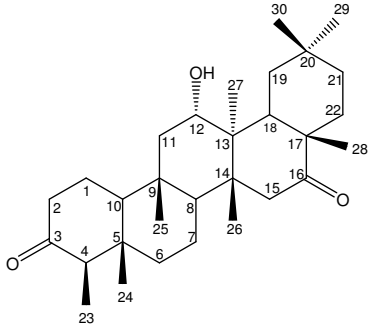
Observaram-se no espectro de RMN de ^{13}C (Figuras A34 e A35, pág. 170 e 171) 30 sinais. A análise em conjunto do espectro de RMN de ^{13}C e do subspectro DEPT135 (Figura A36, pág. 171) permitiu identificar cinco sinais de carbono metínico, 10 de carbono metilênico, oito de carbono metílico e oito de carbono não hidrogenado. Foram observados dois sinais característicos de carbono carbonílico em δ_C 212,3 e δ_C 218,3 e um sinal característico de carbono carbinólico em δ_C 71,1. O sinal em δ_C 29,7 no espectro de RMN de ^{13}C foi atribuído a contaminação de natureza graxa.

A partir da comparação dos dados de RMN de ^{13}C de **MR11** com os da literatura para 3,16-dioxo-12α-hidroxifriedelano (SILVA et al., 2011) conclui-se que **MR11** trata-se desse composto. Os dados de RMN de ^{13}C de **MR11** e de 3,16-dioxo-12α-hidroxifriedelano estão apresentados na Tabela 8.

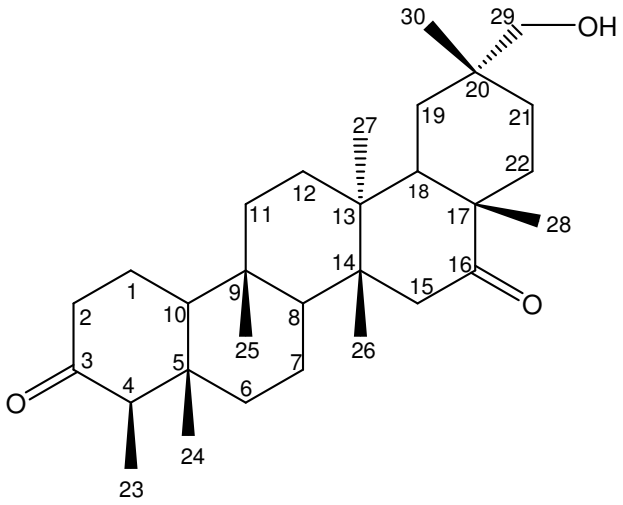
Tabela 8: Dados de RMN de ^{13}C ($CDCl_3$) de **MR11** e dados da literatura para 3,16-dioxo-12α-hidroxifriedelano (SILVA et al., 2011)

Nº	Tipo de carbono	δ_C de MR11	δ_C* (SILVA *et al*, 2011)	Nº	Tipo de carbono	δ_C de MR11	δ_C* (SILVA *et al.* , 2011)
1	CH_2	22,2	22,3	16	C	218,3	218,3
2	CH_2	41,2	41,2	17	C	45,7	45,7
3	C	212,3	212,3	18	CH	45,4	45,4
4	CH	58,0	58,0	19	CH_2	38,5	38,5
5	C	41,8	41,8	20	C	27,7	27,8
6	CH_2	40,7	40,8	21	CH_2	31,5	31,5
7	CH_2	18,3	18,4	22	CH_2	30,7	30,7
8	CH	52,0	52,0	23	CH_3	6,8	6,8
9	C	38,1	38,1	24	CH_3	14,6	14,6
10	CH	59,1	59,1	25	CH_3	18,7	18,7
11	CH_2	47,3	47,3	26	CH_3	20,4	20,5
12	CH	71,1	71,2	27	CH_3	9,0	9,0
13	C	45,7	45,7	28	CH_3	27,3	27,3
14	C	40,7	40,8	29	CH_3	31,3	31,3
15	CH_2	50,3	50,3	30	CH_3	35,0	35,0

*$CDCl_3$ + piridina-d_5.



1.2.9 – MR12: 3,16-dioxo-29-hidroxifriedelano



MR12, proveniente do sólido obtido do extrato hexânico (SEHG) e do extrato clorofórmico dos galhos (ECG) de *Maytenus robusta* (Figuras 17, 19 e 20, pág. 29, 36 e 37), foi obtido como um sólido branco amorfo parcialmente solúvel em clorofórmio. A análise de **MR12** por CCD sugeriu a presença de apenas um componente. A cromatoplaca foi revelada com solução de vanilina em ácido perclórico e apresentou apenas uma mancha de cor lilás. Não foi possível determinar o ponto de fusão, pois a amostra decompôs antes de fundir. Foram obtidas curvas de TG, DTG e DTA (Figura 34, pág. 63) para o composto. De acordo com as curvas de TG e DTG, observa-se o início de perda de massa por decomposição próximo a 200 ºC. A partir da curva de DTA observam-se picos de processos endotérmicos em 327,09 e 377,58 ºC, os quais estão relacionados com absorção de calor e fusão de produtos de decomposição de **MR12**.

O espectro na região do IV (Figura 35, pág 63) de **MR12** apresenta uma banda de absorção em 3470 cm^{-1} característica de estiramento da ligação OH de hidroxila. A banda de absorção em 2934 cm^{-1} é característica de estiramento assimétrico da ligação CH de grupos CH_2 de compostos alifáticos. A banda de absorção em 2844 cm^{-1} é característica de estiramento simétrico da ligação CH de grupos CH_2 e CH_3 de compostos alifáticos. As bandas de absorção em 1446 e 1392 cm^{-1} são características de deformação angular no plano de ligação simples

CH de compostos alifáticos. As bandas de absorção em 1718 e 1671 cm^{-1} são características de estiramento de ligação dupla CO de cetonas.

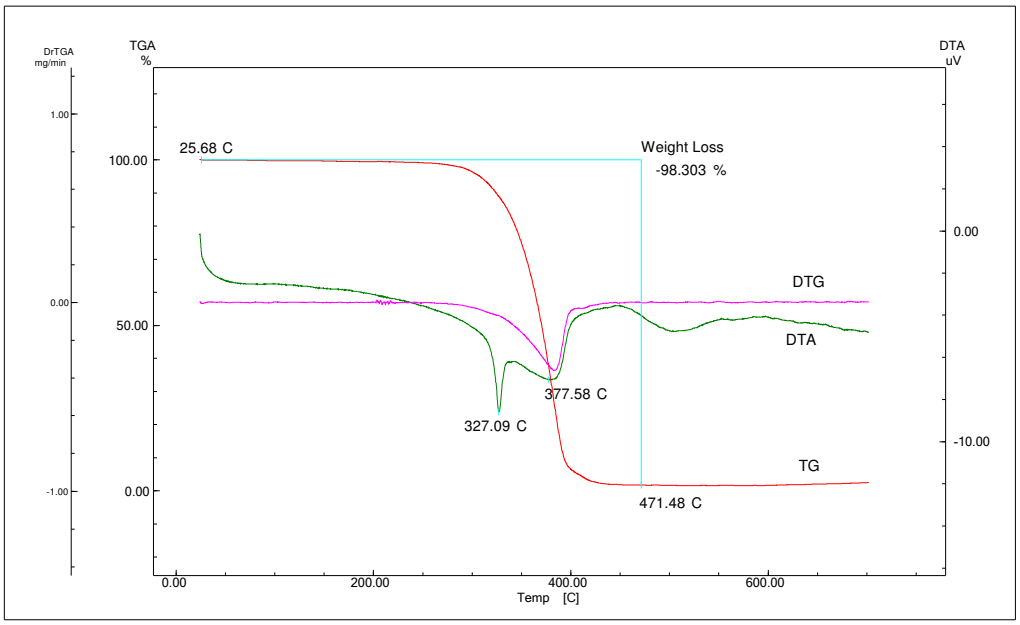


Figura 34: Curvas de TG, DTG e DTA de **MR12**, obtidas em atmosfera dinâmica de N_2 (fluxo de 100 mL min^{-1}; razão de aquecimento 10 °C min^{-1}; cadinho de α-Al_2O_3).

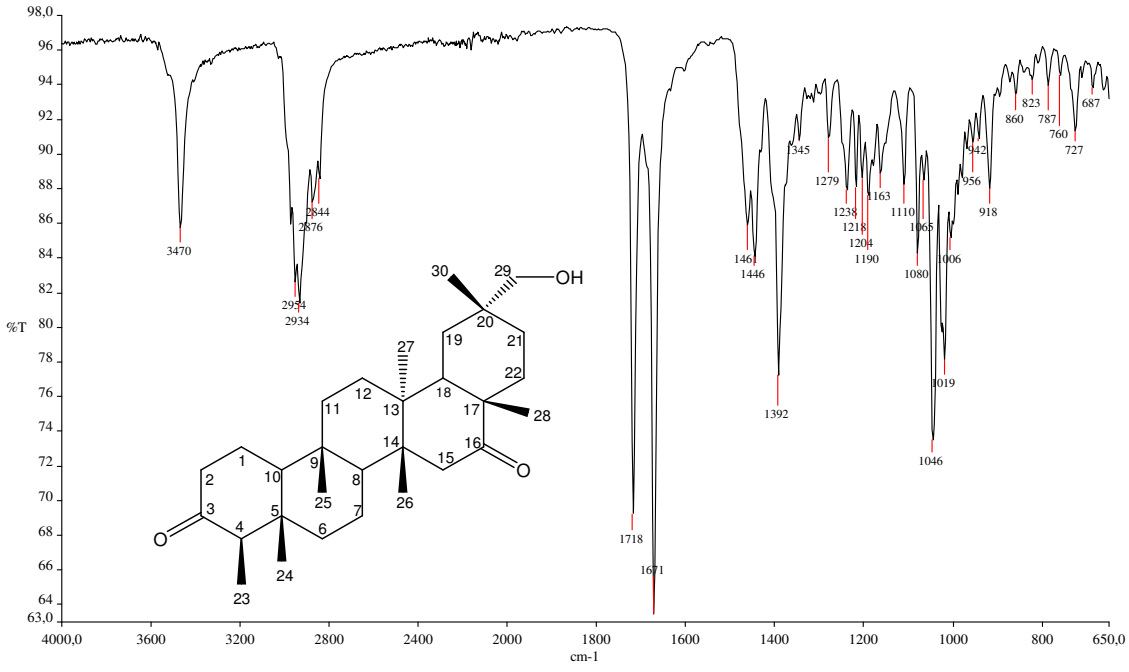


Figura 35: Espectro na região do IV de MR12 (ATR).

No espectro de RMN de ^{1}H (Figura 36) observaram-se seis simpletos em δ_H 0,70, 0,85, 0,87, 1,13, 1,18 e 1,33 e um dupleto em δ_H 0,89 (J = 6,8 Hz) correspondentes a sete grupos metila. O dupleto na região de metilas ocorre para a metila C-23 de triterpenos de esqueleto friedelano (MAHATO e KUNDU, 1994), indicando que **MR12** trata-se de uma substância desse tipo. Observaram-se dois dupletos em δ_H 3,33 (1H, J = 10,6 Hz) e δ_H 3,36 (1H, J = 10,6 Hz) característicos de núcleos de hidrogênio ligados a carbono hidroxilado, o que permitiu inferir a presença de uma hidroxila na estrutura do composto.

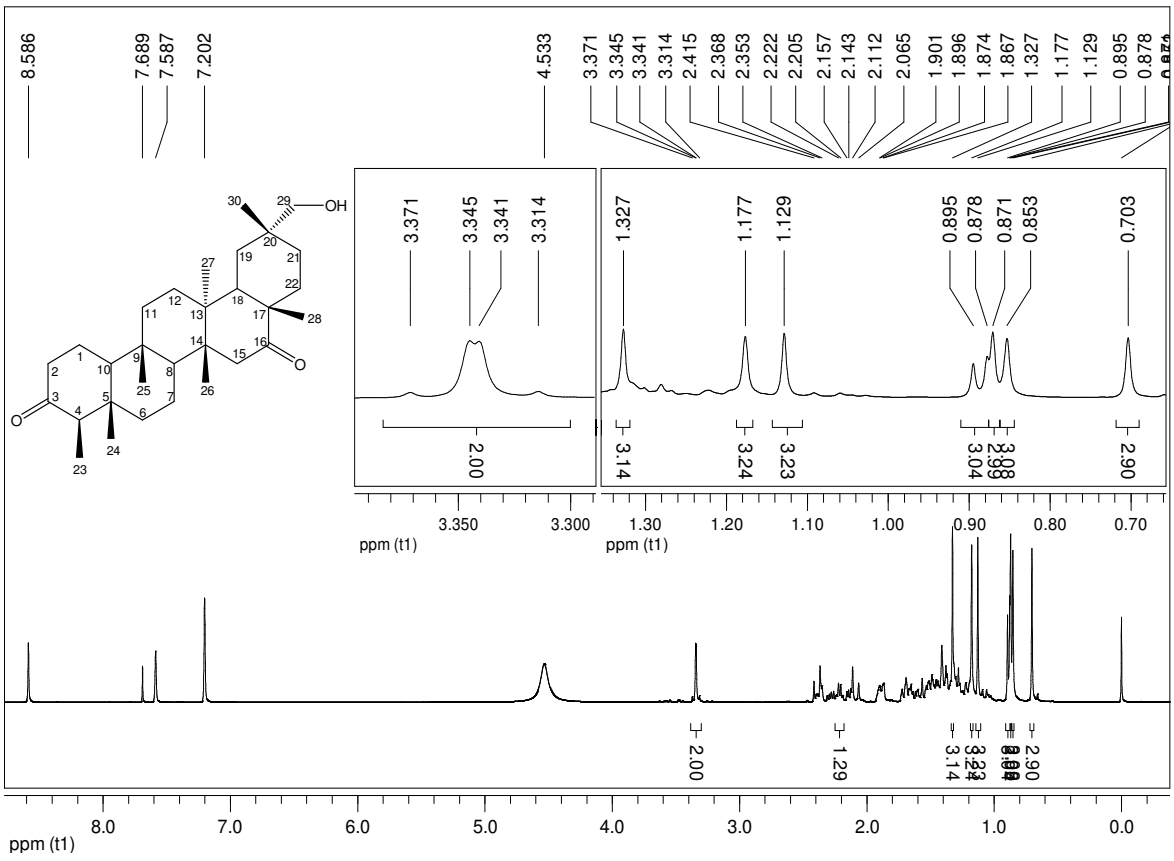


Figura 36: Espectro de RMN de ^{1}H (400 MHz) de **MR12** em $CDCl_3$ + piridina-d_5.

A análise do espectro de RMN de ^{13}C e subespectro DEPT135 (Figuras 37 e 38, pág. 65 e 66) indicou a presença de 30 sinais, sendo quatro referentes a átomos de carbono metínico, 11 a átomos de carbono metilênico, sete a átomos de carbono metílico e oito a átomos de carbono não hidrogenado. Observaram-se dois sinais de carbono carbonílico em δ_C 212,2 e δ_C 218,4 e um sinal de carbono metilênico hidroxilado em δ_C 74,1.

Os sinais de RMN de ^{13}C de **MR12** foram comparados com valores descritos na literatura para 3,16-dioxofriedelano e 3-oxo-29-hidroxifriedelano (MAHATO e KUNDU, 1994) e observou-se que **MR12** poderia tratar-se de 3,16-dioxo-29-hidroxifriedelano, um composto inédito (Tabela 9, pág. 68). Procedeu-se, então, a uma análise detalhada dos espectros de RMN 1D e 2D de **MR12** a fim de comprovar a estrutura química do composto.

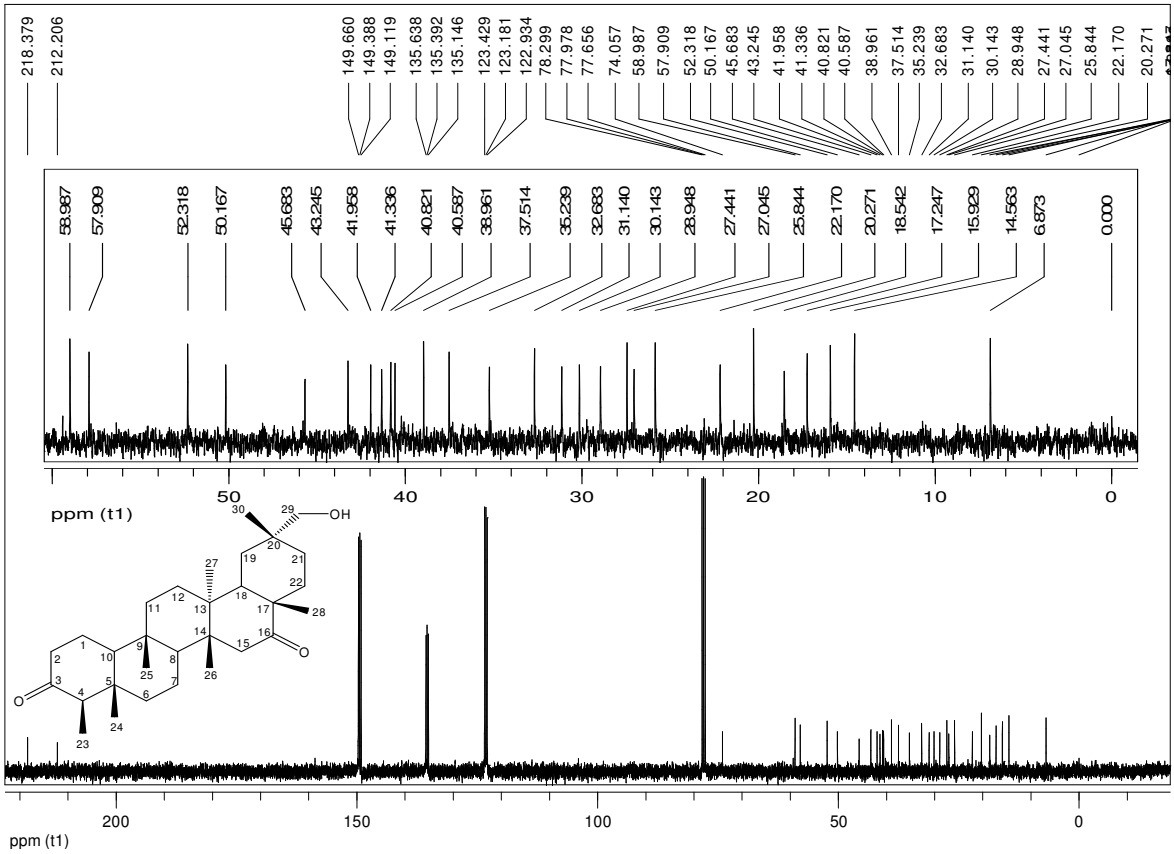


Figura 37: Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz) de **MR12** em $CDCl_3$ + piridina-d_5.

A análise do mapa de contornos HSQC (Figura A37, pág. 172) de **MR12** permitiu correlacionar o sinal de carbono C-23 em δ_C 6,9 com H-23 em δ_H 0,89 e o sinal de C-29 em δ_C 74,1 com H-29a em δ_H 3,33 e H-29b em δ_H 3,36. Após análise do mapa de contornos HMBC, outros sinais foram correlacionados aos respectivos átomos de hidrogênio no mapa de contornos HSQC. Utilizando os valores de C-29, H-29, C-23 e H-23 como pontos de partida, procedeu-se a análise do mapa de contornos HMBC (Figuras A38 e A39, pág. 172 e 173) a fim de atribuir os demais sinais aos átomos de carbono e hidrogênio do composto.

Observaram-se correlações dos sinais em δ_H 3,33 e 3,36 (H-29) com os sinais em δ_C 25,8 (CH_3), 27,0 (CH_2), 30,1 (CH_2) e 32,7 (C). Estes foram atribuídos a C-30, C-21, C-19 e a C-20, respectivamente, o que confirma a posição da hidroxila em C-29. No mapa de contornos HMBC observaram-se correlações dos sinais em δ_C 31,1 (C-22) e 45,7 (C-17) com o sinal em δ_H 1,33 (H-28) (Figura A38, pág. 172). Além de apresentar correlações com C-22 e C-17, H-28 mostra correlações com os sinais em δ_C 43,2 (CH), atribuído a C-18, e 218,4, atribuído a C-16 (Figuras A38 e A39, pág. 172 e 173), confirmando a presença de uma carbonila ligada a esse carbono.

No mapa de contornos HMBC observaram-se correlações do sinal de hidrogênio em δ_H 0,89 (H-23, d) com os sinais em δ_C 42,0 (C-5), 57,9 (C-4) e 212,2 (C-3). Essas correlações permitiram confirmar a presença de uma carbonila em C-3 (Figuras A38 e A39, pág. 172 e 173).

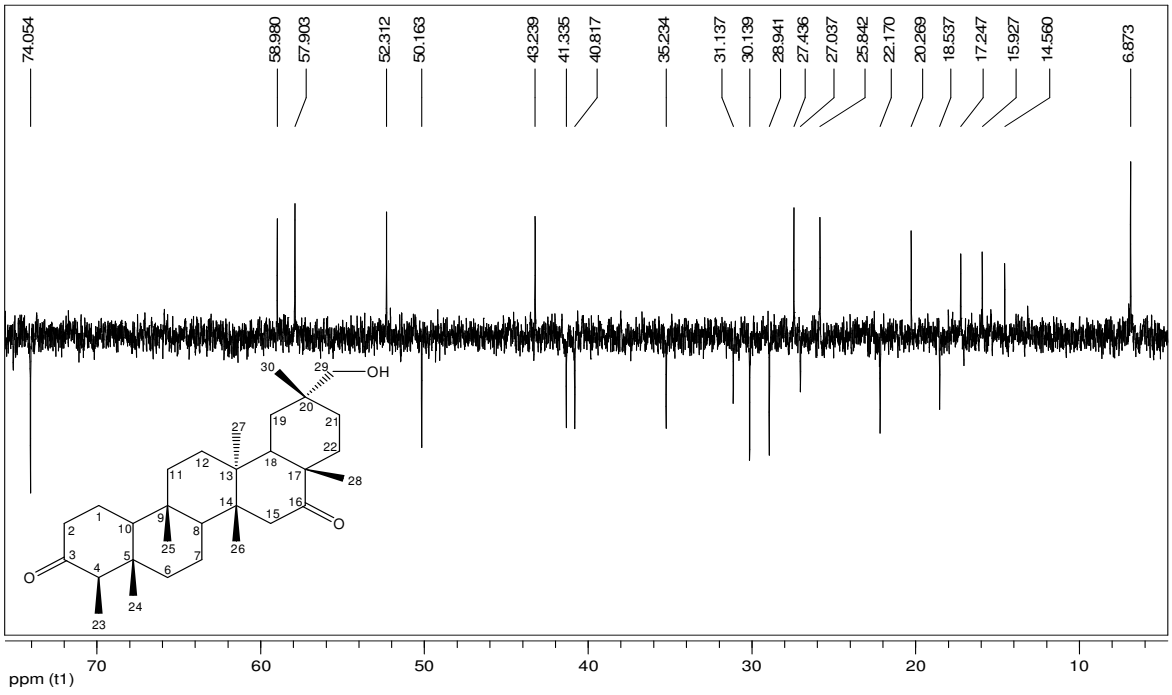


Figura 38: Expansão do subespectro DEPT135 (100 MHz) de **MR12** em $CDCl_3$ + piridina-d_5.

No mapa de contornos NOESY (Figura A41, pág. 174) observaram-se correlações dos sinais em δ_H 3,33 e 3,36 (H-29) com os sinais em δ_H 1,13 (H-30), 1,58 (H-19α), 1,30 (H-19β) e 1,68 (H-21β). Também foram observadas

correlações entre H-18 (δ_H 2,14) e H-30. Essas correlações permitiram inferir que o anel E encontra-se na conformação em barco (Figura 39). Além disso, não se observou correlação entre H-29 e H-27, o que corrobora a afirmação anterior.

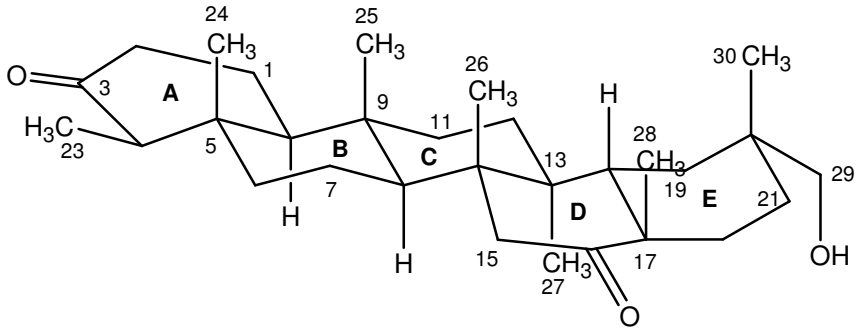


Figura 39: Estrutura tridimensional de **MR12**.

As análises dos mapas de contornos HSQC, HMBC, COSY e NOESY (Figuras A37 a A41, pág. 172 e 174) permitiram atribuir todos os deslocamentos químicos de H e C para **MR12** (Tabela 9, pág. 68), bem como definir sua estereoquímica. **MR12** é uma substância inédita, sua fórmula molecular $C_{30}H_{48}O_2$ foi confirmada por HR-APCIMS. No espectro de massas de **MR12** (Figura 40) observou-se o pico *m/z* 439,3561 referente ao cátion $[M+H-H_2O]^+$ (*m/z* calc. 439,3576).

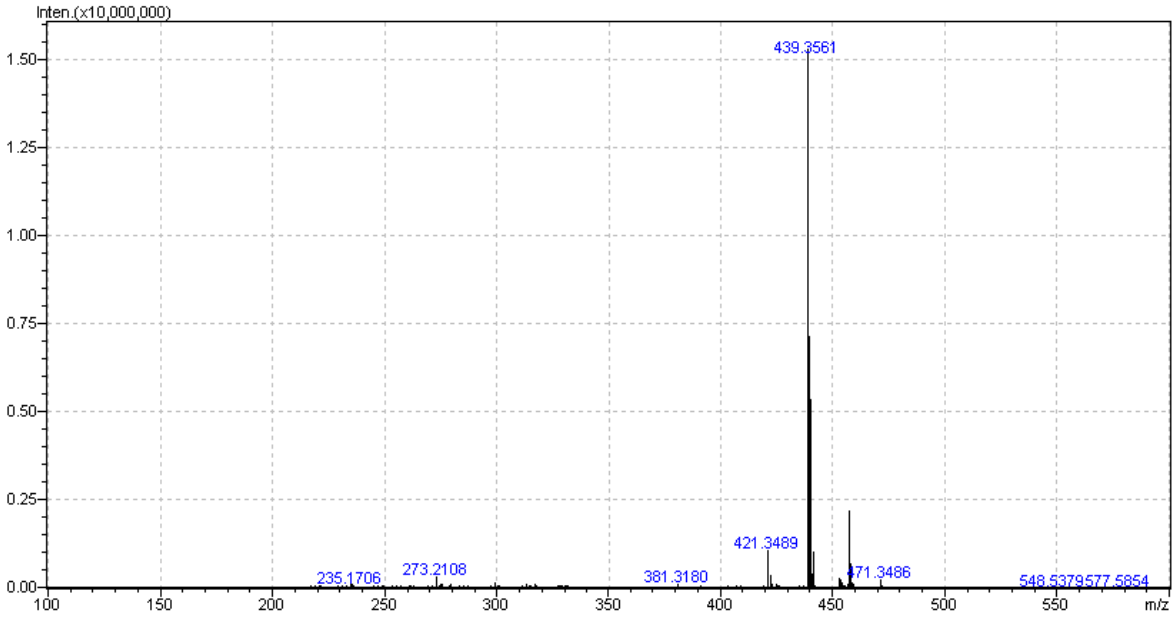
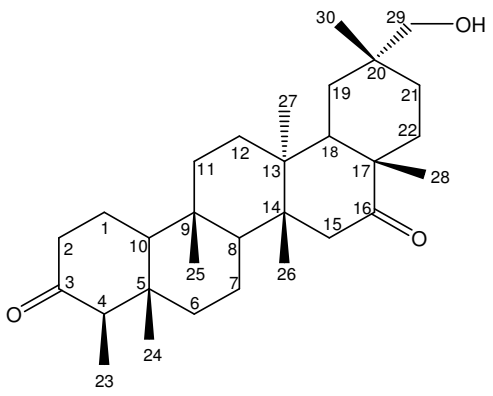


Figura 40: Espectro de massas (HR-APCI, modo positivo) de **MR12**.

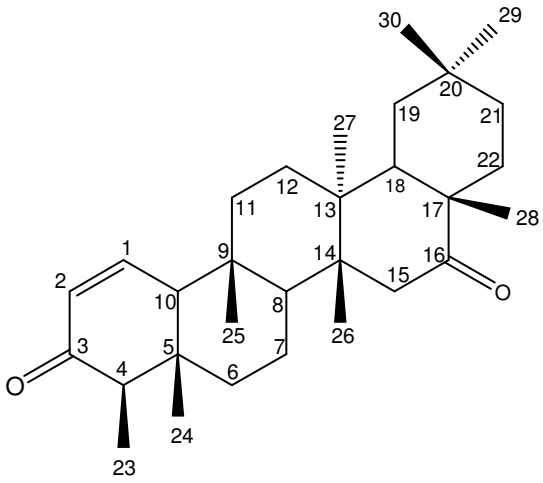
Tabela 9: Dados de RMN 1D e 2D (400 MHz, $CDCl_3$ + piridina-d_5) de **MR12**

Nº	δ_C MR12	Tipo de C	**δ_H MR12	HMBC	COSY	NOESY	***δ_C 3,16-di-oxofriede-lano	***δ_C 3-oxo-29-hidroxifrie-delano
1	22,2	CH_2	*1,89β *1,62α	3, 10	2 2	10	22,2	22,3
2	41,3	CH_2	*2,28 *2,38	3, 10 3, 10	1β 1α		41,4	41,6
3	212,2	C					212,5	212,2
4	57,9	CH	*2,22α	5, 23, 24	23	23, 6 α, 10	58,2	58,3
5	42,0	C					42,1	42,2
6	40,8	CH_2	*1,21α *1,70β	5, 7, 8, 10	6α, 7α, 7β	23, 24	41,0	41,4
7	18,5	CH_2	*1,40β *1,30α			24, 25, 26	18,6	18,3
8	52,3	CH	*1,40α				52,4	53,5
9	37,5	C					37,7	37,5
10	59,0	CH	*1, 50α				59,4	59,6
11	35,2	CH_2	*1,19α *1,46β			26	35,4	35,7
12	29,0	CH_2	*1,38β *1,38α				29,1	29,8
13	39,0	C					39,2	40,0
14	40,6	C					40,5	38,3
15	50,2	CH_2	*2,09α *2,40β	8, 13, 14, 16, 26 13, 14, 16, 26	15	27 26, 28	50,2	32,8
16	218,4	C		15, 17, 18, 22, 28			218,8	36,0
17	45,7	C					45,3	29,8
18	43,2	CH	*2,14β		19α, 19β	12, 28, 30	44,0	42,0
19	30,1	CH_2	*1,58α *1,30β			27	35,5	30,6
20	32,7	C					27,6	33,2
21	27,0	CH_2	*1,36α *1,68β	17, 22	22	28	31,7	27,9
22	31,1	CH_2	*1,52β *1,91α		21, 22	21	30,8	39,6
23	6,9	CH_3	0,89; d; J = 6,8	3, 4, 5			6,8	6,8
24	14,6	CH_3	0,70; s	4, 5, 6, 10			14,7	14,7
25	17,2	CH_3	0,85; s	8, 9, 10, 11			17,3	17,9
26	20,3	CH_3	1,18; s	8, 13, 14, 15		25	20,3	18,4
27	15,9	CH_3	0,87; s	12, 13, 14, 18			16,2	20,8
28	27,4	CH_3	1,33; s	16, 17, 18, 22			27,4	32,1
29	74,1	CH_2	3,33a; d, J = 10,6 3,36b; d, J = 10,6	19, 20, 21, 30		19α, 19β, 21, 30	31,1	74,8
30	25,8	CH_3	1,13; s	19, 20, 21, 29			35,2	25,9

*Sinais sobrepostos no espectro de RMN de ^1H e determinados por HSQC. **Os valores de J são dados em Hz. ***MAHATO e KUNDO, 1994.



1.2.10 – MR13: friedelan-1-en-3,16-diona



MR13 foi isolado a partir do extrato clorofórmico dos galhos (ECG) de *M. robusta* (Figura 19, pág. 36) e foi obtido como um sólido branco não cristalino parcialmente solúvel em clorofórmio. Não foi possível determinar o ponto de fusão, o sólido decompôs antes de fundir e adquiriu coloração amarela a partir de 214 °C.

No espectro na região do IV de **MR13** (Figura 41, pág 70) observaram-se bandas de absorção em 2944 cm^{-1}, característica de estiramento assimétrico da ligação CH de grupos CH_2 alifáticos, em 2860 cm^{-1}, característica de estiramento simétrico da ligação CH de grupos CH_2 e CH_3 de compostos alifáticos, em 1682 cm^{-1}, característica de estiramento de ligação CO de carbonila de cetona, e em 1466 e 1388 cm^{-1}, características de deformação angular no plano de ligação simples CH de grupos alifáticos. A banda de absorção em 3448 cm^{-1}, característica de estiramento de ligação OH de hidroxila, está relacionada com a presença de água na amostra, provavelmente proveniente do KBr empregado na análise.

No espectro de RMN de ^1H de **MR13** (Figura 42, pág. 71) observaram-se seis simpletos em δ_H 0,81 (3H), 0,89 (3H), 0,97 (6H), 1,06 (3H), 1,20 (3H), e 1,31 (3H) e um dupleto (δ_H 1,00, J = 6,7 Hz) correspondentes a oito grupos metila. Observaram-se, também, os sinais em δ_H 6,06 (1H, dd, J = 3,2 e 10,2 Hz) e 6,90 (1H, dd, J = 1,5 e 10,2 Hz) correspondentes a núcleos de hidrogênio ligados a carbono olefínico.

No espectro de RMN de ^{13}C e subespectro DEPT135 de **MR13** (Figuras 43 e 44, pág. 71 e 72) observaram-se oito sinais de carbono metílico, nove metilênicos, seis metínicos e oito não hidrogenados, totalizando 31 sinais. O sinal em δ_C 29,7 pode tratar-se de contaminação de natureza graxa. Os sinais em δ_C 130,4 e 148,2 apresentam deslocamentos químicos característicos de núcleos de carbono olefínico e os sinais em δ_C 201,5 e 218,7 são característicos de núcleos de carbono carbonílico.

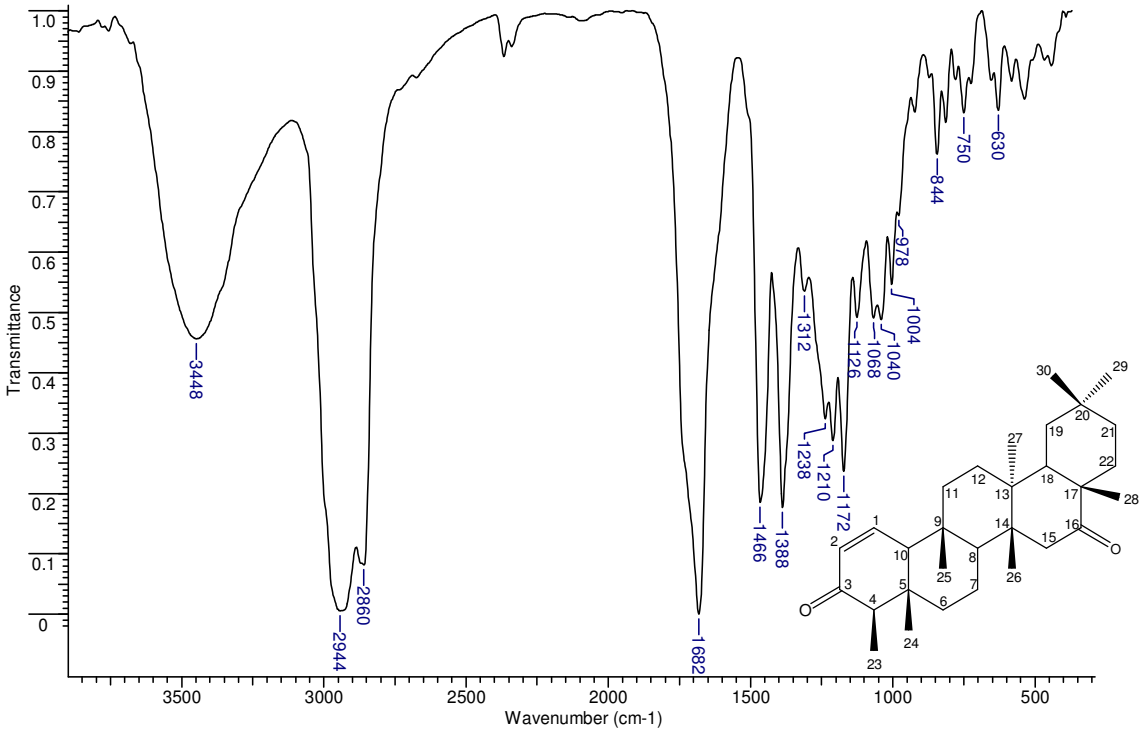


Figura 41: Espectro na região do IV de **MR13** (KBr).

Os dados de RMN de ^{13}C de **MR13** foram comparados com os dados descritos na literatura para 3,16-dioxofriedelano (MAHATO e KUNDU, 1994) e observou-se que a maioria dos sinais apresentam valores muito próximos. Fez-se uma análise detalhada de mapas de contornos RMN 2D (HSQC, HMBC, COSY e NOESY) de **MR13** (Figuras A42 a A48, pág. 174 a 177) para elucidar a estrutura química do composto.

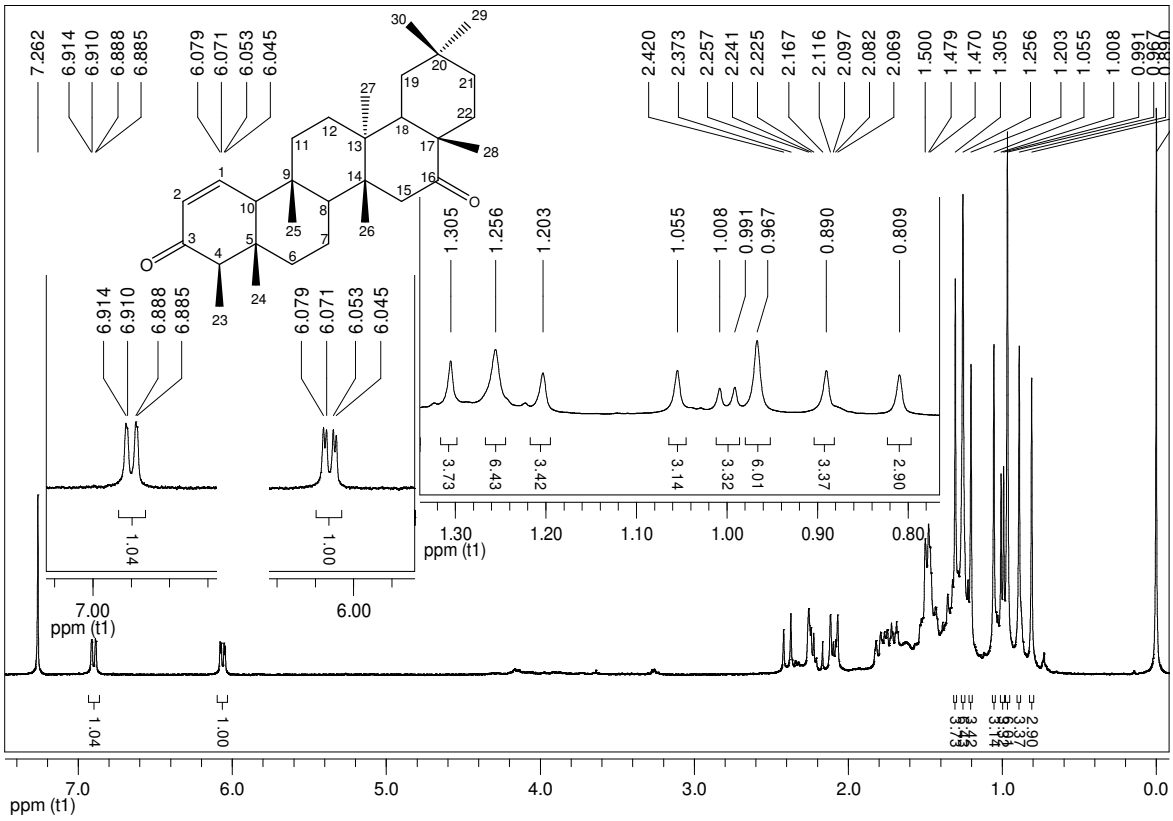


Figura 42: Espectro de RMN de ^{1}H (400 MHz, $CDCl_3$) de **MR13.**

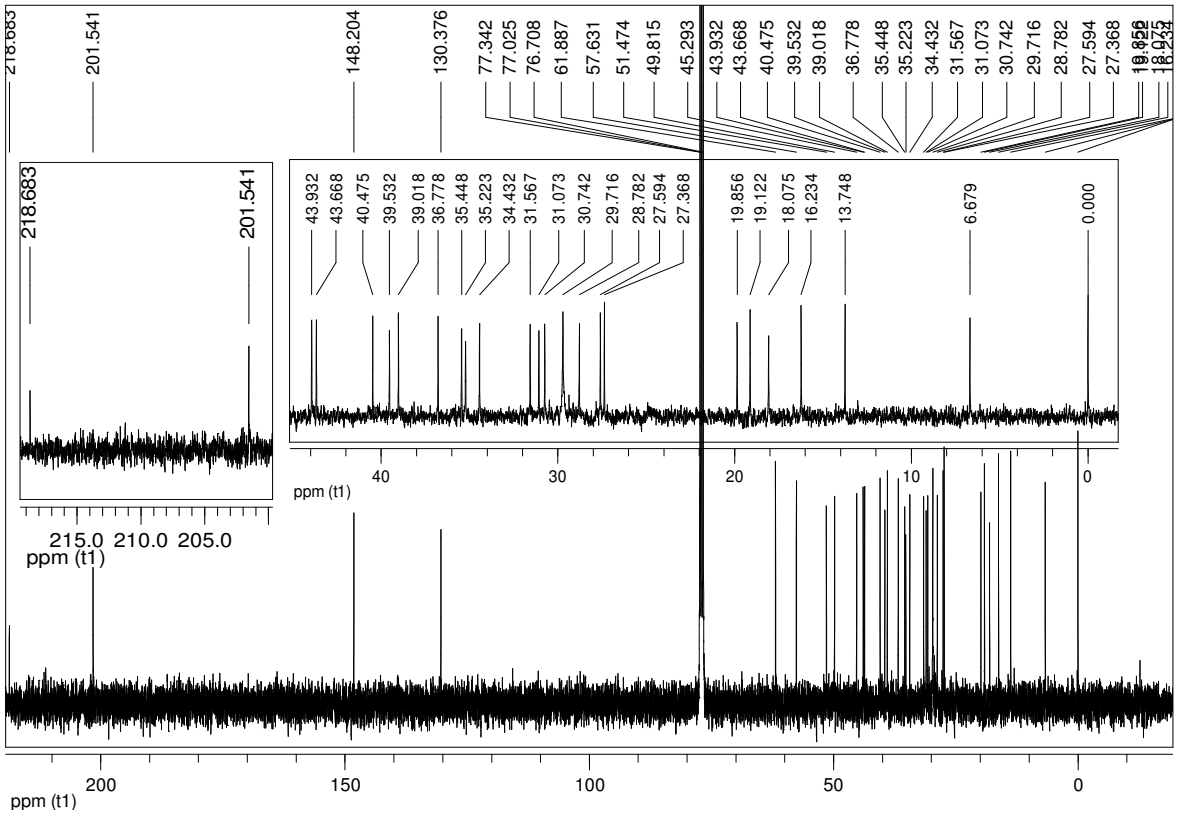


Figura 43: Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, $CDCl_3$) de **MR13**.

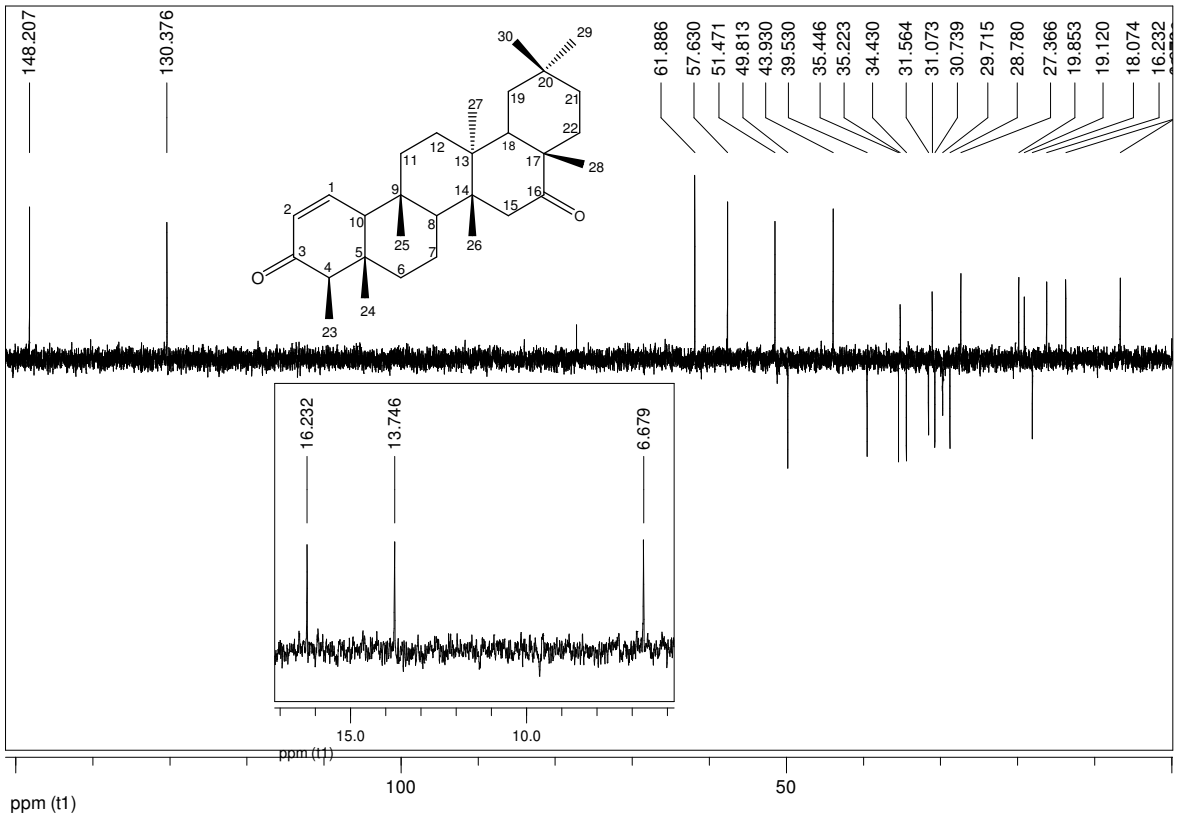


Figura 44: Expansão do subespectro DEPT135 (100 MHz, $CDCl_3$) de **MR13.**

No mapa de contornos HMBC (Figuras A44 e A45, pág. 175 e 176) observaram-se correlações entre o sinal em δ_H 1,00 (d, 3H) atribuído a H-23 e os sinais de C-3 (δ_C 201,5), C-4 (δ_C 57,6) e C-5 (δ_C 43,7). Essas correlações permitiram confirmar a presença de um grupo carbonila ligado a C-3. No mapa de contornos HMBC observaram-se correlações entre o sinal em δ_H 6,90 e os sinais de C-3, C-5, C-9 (δ_C 36,8) e C-10 (δ_C 61,9). A partir dessas correlações atribuiu-se o sinal em δ_H 6,90 a H-1 e identificou-se a posição da dupla ligação entre C-1 e C-2. O sinal em δ_H 6,06 apresentou correlação com o sinal de C-10 no mapa de contornos HMBC e foi atribuído a H-2. No mapa de contornos HSQC (Figura A43, pág. 175) observaram-se correlações entre H-2 e C-2 (δ_C 130,4) e entre H-1 e C-1 (δ_C 148,2). No mapa de contornos COSY (Figura A46, pág. 176) observaram-se correlações entre o sinal de H-1 e os sinais de H-2 e H-10 (δ_H 2,24) e no mapa de contornos NOESY (Figura A47, pág. 177) foram observadas correlações entre o sinal de H-1 e os sinais de H-2, H-10, H-11eq e H-25. De acordo com dados da literatura (MAHATO e KUNDU, 1994) inferiu-se que o segundo grupo carbonila

está localizado em C-16. A confirmação foi obtida a partir da análise do mapa de contornos HMBC (Figuras A44 e A45, pág. 175 e 176), onde foram observadas correlações entre H-28 (δ_H 1,30) e os sinais de C-16 (δ_C 218,7), C-17 (δ_C 45,3), C-18 (δ_C 43,9) e C-22 (δ_C 30,7). No mapa de contornos NOESY (Figura A48, pág. 177) observou-se correlação entre H-18 e H-30, o que permitiu inferir que os anéis D e E encontram-se na conformação barco (Figura 45).

Após análise dos espectros de RMN 1D e 2D concluiu-se que **MR13** trata-se de friedelan-1-en-3,16-diona, um composto inédito (Tabela 10, pág. 74). A fórmula molecular de **MR13**, $C_{30}H_{47}O_2$, foi confirmada por HR-APCI-MS (Figura 46). No espectro de massas de **MR13** observou-se o pico *m/z* 439,3514 referente ao cátion $[M+H]^+$ (*m/z* calc. 439,3571).

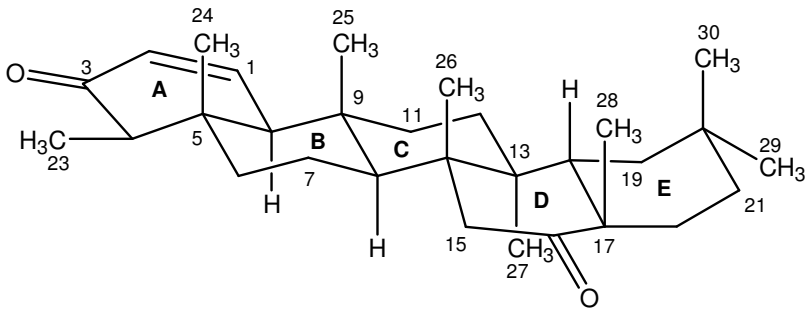


Figura 45: Estrutura tridimensional de **MR13**.

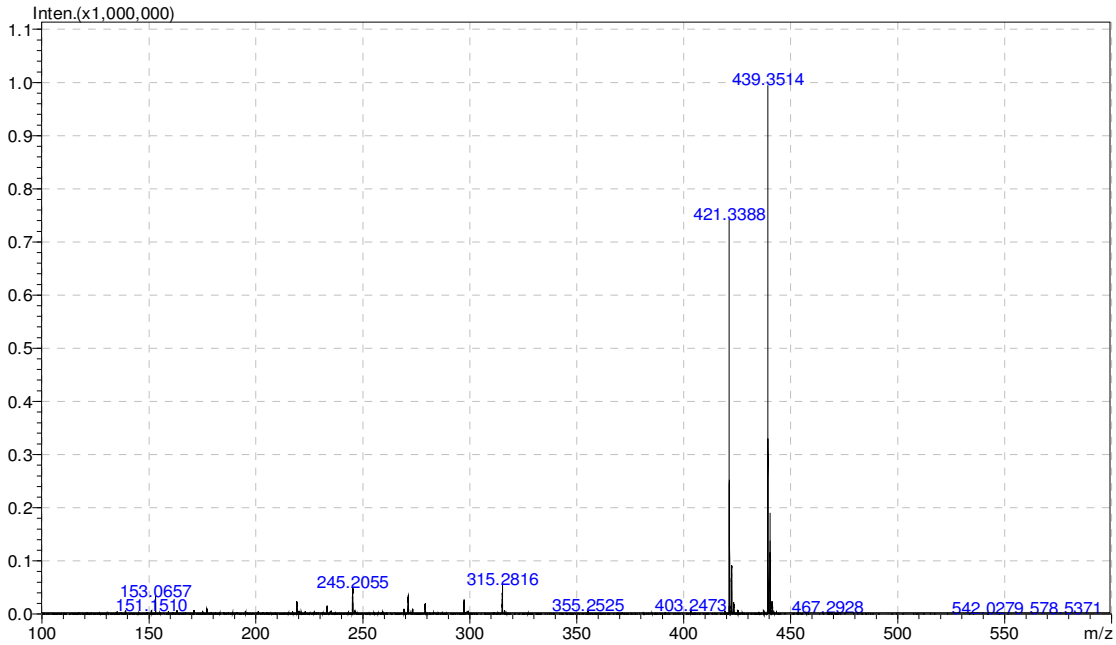
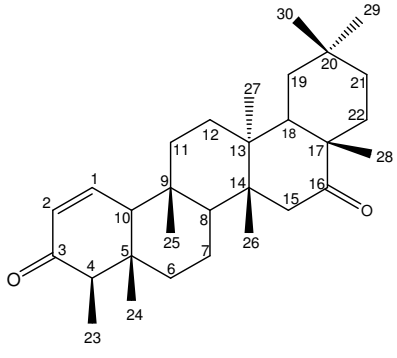


Figura 46: Espectro de massas (HR-APCI, modo positivo) de **MR13**.

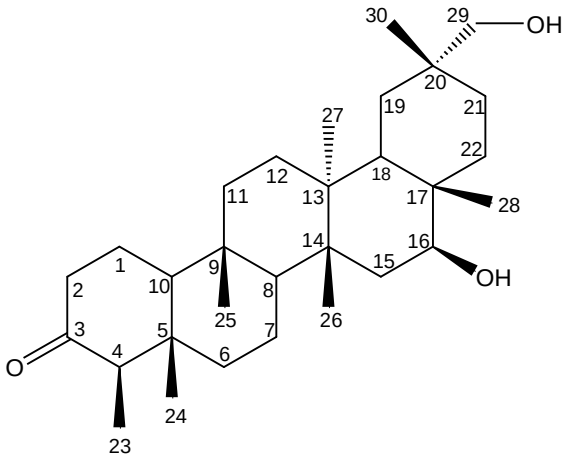
Tabela 10: Dados de RMN 1D e 2D ($CDCl_3$, 400 MHz) de **MR13**

Nº	δ_C	Tipo de carbono	**δ_H	HMBC	COSY	NOESY
1	148,2	CH	6,90; dd; *J* = 1,5 e 10,2	3, 5, 9, 10	2, 10	2, 10, 11eq, 25
2	130,4	CH	6,06; dd; *J* = 3,2 e 10,2	10	1, 10	
3	201,5	C				
4	57,6	CH	*2,21 ax (α)	3, 5, 23, 24	23	23
5	43,7	C				
6	39,5	CH_2	*1,78 eq (β) *1,33 ax (α)		7	6ax, 23
7	18,1	CH_2	*1,41 eq (α) *1,47 ax (β)			24, 25, 26
8	51,5	CH	*1,48 ax			11ax, 27
9	36,8	C				
10	61,9	CH	*2,24 ax (α)	1, 2, 24, 25		6ax, 8, 11ax
11	34,4	CH_2	*1,26 ax (α) *1,70 eq (β)		11, 12β	11ax
12	28,8	CH_2	*1,44 eq (α) *1,28 ax (β)		11, 12	
13	39,0	C				
14	40,5	C				
15	49,8	CH_2	*2,38β *2,08α		15	7ax, 15α
16	218,7	C				
17	45,3	C				
18	43,9	CH	*2,08β		19α e β	12ax, 21, 26, 30
19	35,4	CH_2	*1,22β *1,33α			19β, 27, 29
20	27,6	C				
21	31,6	CH_2	*1,46α e β			29, 30
22	30,7	CH_2	*1,47α *1,74β		21	27 22
23	6,7	CH_3	1,00; d; *J* = 6,8	3, 4, 5		
24	13,7	CH_3	0,81; s	4, 5, 6, 10		
25	19,1	CH_3	0,97; s	8, 9,10, 11		24
26	19,8	CH_3	1,20; s	8, 13, 14, 15		25
27	16,2	CH_3	0,89; s	12,13,14,18		
28	27,4	CH_3	1,30; s	16, 17,18, 22		
29	35,2	CH_3	0,97; s	19, 20, 21, 30		
30	31,1	CH_3	1,05; s	19, 20, 21, 29		

*Sinais sobrepostos no espectro de RMN de ^1H e determinados por HSQC. **Valores de *J* são dados em Hz.



1.2.11 – MR14: 3-oxo-16β,29-di-hidroxifriedelano



MR14 foi isolado a partir de ECG conforme representado na Figura 19, pág. 36. Foi obtido como um sólido branco não cristalino, parcialmente solúvel em clorofórmio. O composto decompôs antes de fundir. Foram obtidas curvas de TG, DTG e DTA (Figura 47, pág 76). De acordo com as curvas de TG e DTG, observou-se que o composto apresenta estabilidade térmica até próximo a 200 ºC, acima dessa temperatura ocorre perda de massa por decomposição.

No espectro na região do IV (Figura 48, pág. 76) de **MR14** observaram-se bandas de absorção em 3390 cm^{-1}, característica de estiramento de ligação OH de hidroxila, em 2918 cm^{-1}, característica de estiramento assimétrico da ligação CH de grupos CH_2 de compostos alifáticos, em 2850 cm^{-1}, característica de estiramento simétrico da ligação CH de grupos CH_2 e CH_3 de compostos alifáticos, em 1450 e 1388 cm^{-1}, características de deformação angular no plano de ligação simples CH de grupos alquilas, e em 1712 cm^{-1}, característica de estiramento de ligação CO de carbonila de cetona (BARBOSA, 2007).

No espectro de RMN de ^{1}H de **MR14** (Figura 49, pág. 77) observaram-se seis simpletos em δ_H 0,70, 0,85, 1,02, 1,11, 1,13 e 1,32 e um dupleto em δ_H 0,88 (J = 6,6 Hz) correspondentes a sete grupos metila. O dupleto na região de metilas é característico da metila C-23 de triterpenos de esqueleto friedelano (MAHATO e KUNDU, 1994). Observaram-se, ainda, dois dupletos (sistema de *spin* AB) em δ_H 3,35 (1H, J = 10,8) e 3,38 (1H, J = 10,8) e um tripleto em δ_H 4,12 (J = 8,8 Hz, 1H).

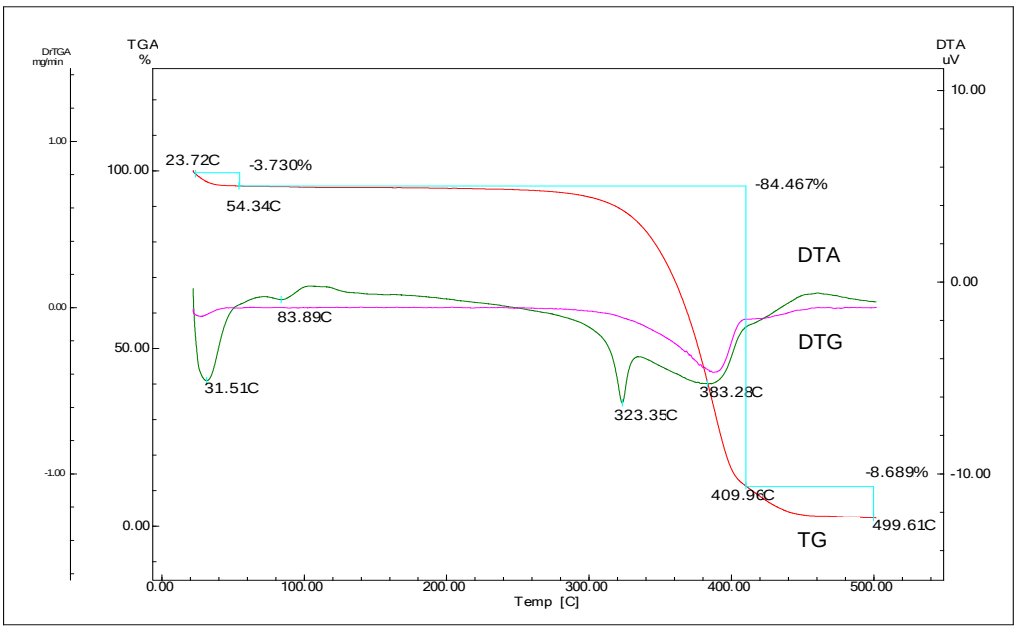


Figura 47: Curvas de TG, DTG e DTA de **MR14**, obtidas em atmosfera dinâmica de N_2 (fluxo de 100 mL min^{-1}; razão de aquecimento 10 ^oC min^{-1}; cadinho de α-Al_2O_3).

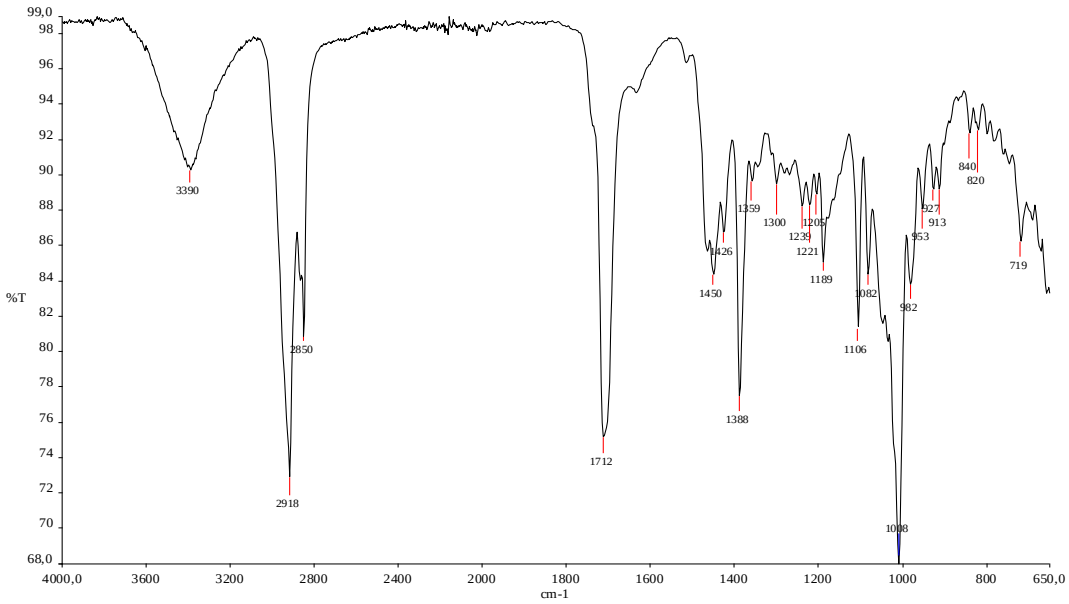


Figura 48: Espectro na região do IV de **MR14** (ATR).

A análise do espectro de RMN de ^{13}C (Figura 50, pág. 78) e do subespectro DEPT135 (Figuras 51, pág. 78) de **MR14** indicaram a presença de 30 sinais de carbono, sendo sete metílicos, onze metilênicos, cinco metínicos e sete

não hidrogenados. Os sinais em δ_C 74,4 e δ_C 74,5 foram atribuídos a átomos de carbono ligado a hidroxila e o sinal em δ_C 212,8 a carbono carbonílico.

Os dados de RMN de ^{13}C de **MR14** foram comparados com dados descritos na literatura para Celasdin-A (3-oxo-16α,30-di-hidroxifriedelano) (KUO e KUO, 1997) e ambos apresentam os mesmos tipos de sinais, mas observam-se algumas discrepâncias entre os valores de C-16, C-19, C-21, C-22, C-29 e C-30 (Tabela 11, pág. 81). Procedeu-se, então, a uma análise detalhada dos espectros de RMN 1D e 2D de **MR14** para elucidar a estrutura química do composto.

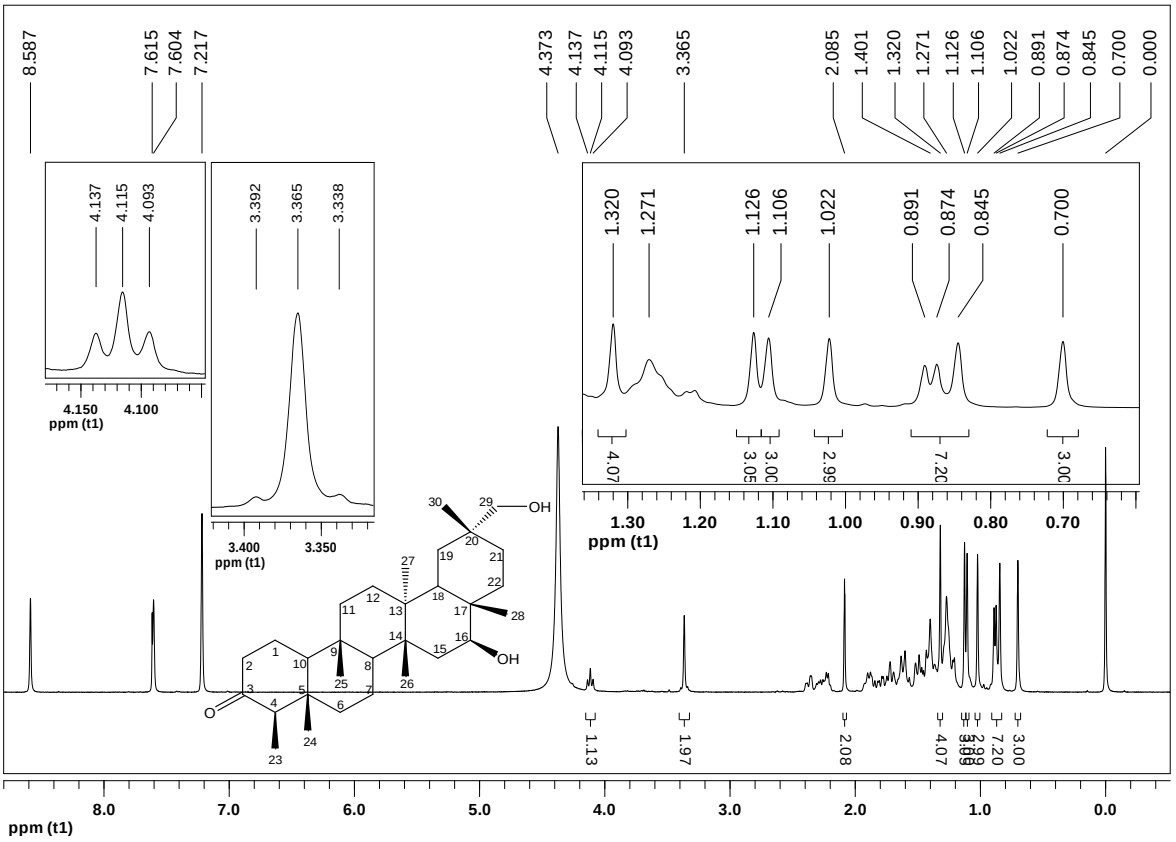


Figura 49: Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, $CDCl_3$ + piridina- d_5) de **MR14**.

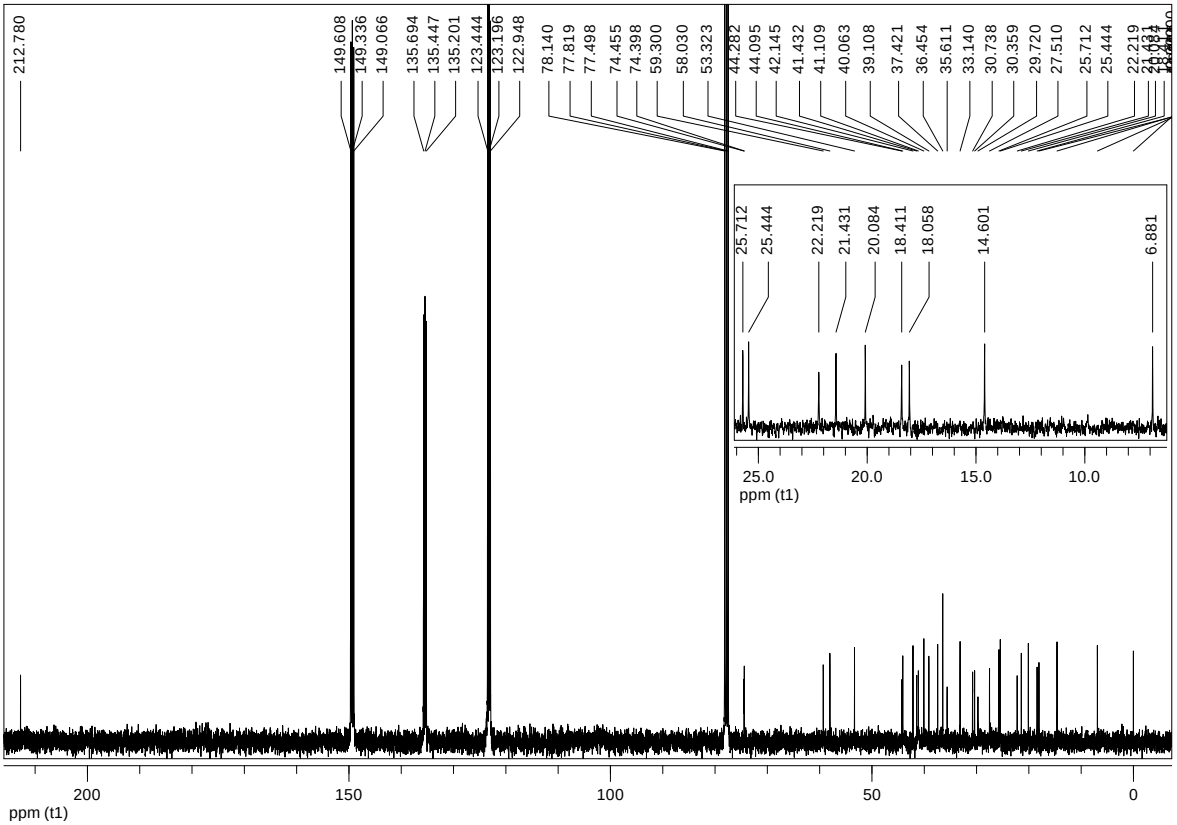


Figura 50: Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, $CDCl_3$ + piridina-d_5) de **MR14**.

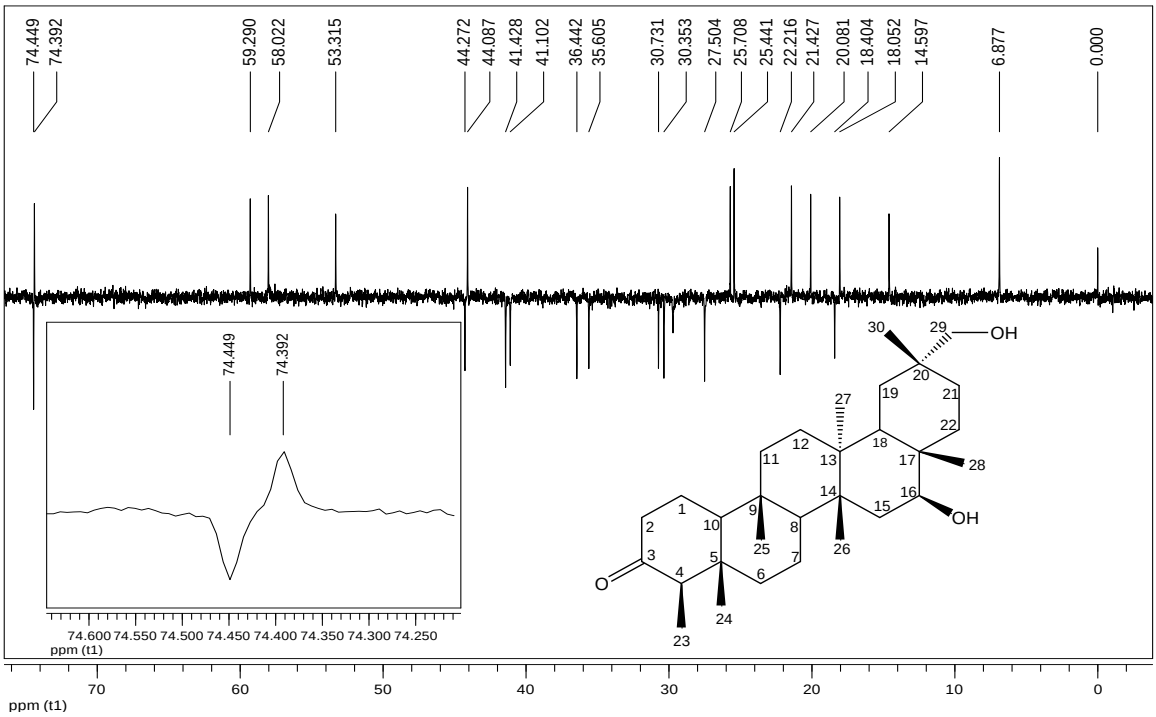


Figura 51: Expansão do subespectro DEPT135 (100 MHz, $CDCl_3$ + piridina-d_5) de **MR14**.

No mapa de contornos HSQC (Figura A49, pág. 178) observou-se correlação entre o sinal em δ_H 4,12 e o sinal em δ_C 74,4. Esses valores foram atribuídos a H-16 e C-16 após comparações com dados de RMN do composto Celasdin-A (KUO e KUO, 1997). Outros sinais de hidrogênio foram atribuídos aos seus respectivos átomos de carbono no mapa de contornos HSQC (Figuras A49 e A50, pág. 178) após análise do mapa de contornos HMBC (Figuras A51 a A53, pág. 179 e 180). No mapa de contornos HMBC observaram-se correlações entre o sinal em δ_H 4,12 (H-16) e os sinais em δ_C 25,4 (C-28), 36,5 (C-17 e C-22), 44,1 (C-18) e 44,3 (C-15) (Figura A51, pág. 179). No mapa de contornos COSY (Figura A54, pág. 180) observaram-se correlações do sinal em δ_H 4,12 (H-16) com os sinais em δ_H 1,48 (H-15β) e 1,86 (H-15α). Essas correlações permitiram confirmar a presença de uma hidroxila ligada a C-16. No mapa de contornos NOESY (Figuras A55 e A56, pág. 181) observaram-se correlações do sinal em δ_H 4,12 (H-16) com os sinais em δ_H 1,02 (H-27), 1,45 (H-22 α), 1,47 (H-7 eq) e 1,86 (H-15 α). A correlação entre H-16 e H-27 no mapa de contornos NOESY permitiu inferir que o hidrogênio H-16 encontra-se em posição α e, portanto, a hidroxila ligada a C-16 está em posição β. No mapa de contornos HMBC foram observadas correlações entre o sinal de H-23 (δ_H 0,88, d, 3H) e os sinais de C-5 (δ_C 42,1), C-4 (58,0) e C-3 (δ_C 212,8). (Figuras A52 e A53, pág. 179 e 180). Essas correlações permitiram confirmar a presença de uma carbonila em C-3. No mapa de contornos HMBC observaram-se correlações dos sinais em δ_H 1,13 (3H), 3,35 (1H) e 3,38 (1H) com os sinais em δ_C 27,5 (CH_2), 30,4 (CH_2) e 33,1 (C) (Figuras A51 e A52, pág. 179). O sinal em δ_H 1,13 foi atribuído a H-30 e os sinais em δ_H 3,35 e 3,38 atribuídos a H-29a e H-29b. Os sinais em δ_C 27,5, 30,4 e 33,1 foram atribuídos, respectivamente, a C-21, C-19 e C-20 (Figuras A49 e A50, pág. 178). Essas correlações permitiram sugerir que **MR14** apresenta uma hidroxila ligada a C-29 (δ_C 74,5). No mapa de contornos NOESY observaram-se correlações entre H-18 (δ_H 1,78) e H-30 (δ_H 1,13), o que permitiu confirmar que há uma hidroxila ligada a C-29 e inferir que os anéis D e E apresentam conformação em barco (Figura 52, pág. 80).

Após análise dos espectros de RMN 1D e 2D concluiu-se que **MR14** trata-se de 3-oxo-16β,29-di-hidroxifriedelano, um composto inédito na literatura. A

fórmula molecular de **MR14**, $C_{30}H_{50}O_2$, foi confirmada por HR-APCIMS (m/z: 441,3737 $[M+H-18]^+$, calc. 441,3733) (Figura 53).

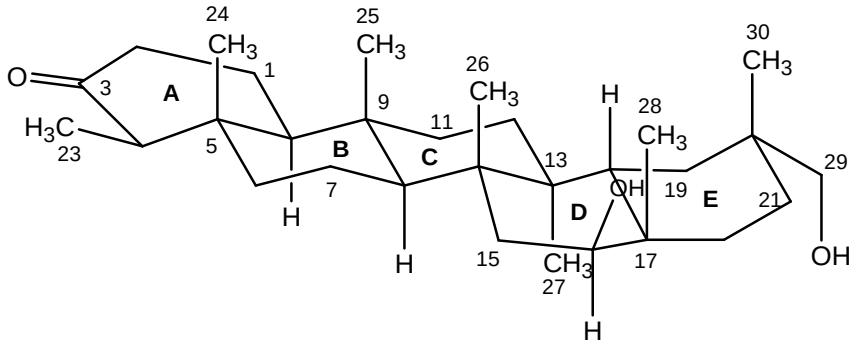


Figura 52: Estrutura tridimensional de **MR14**.

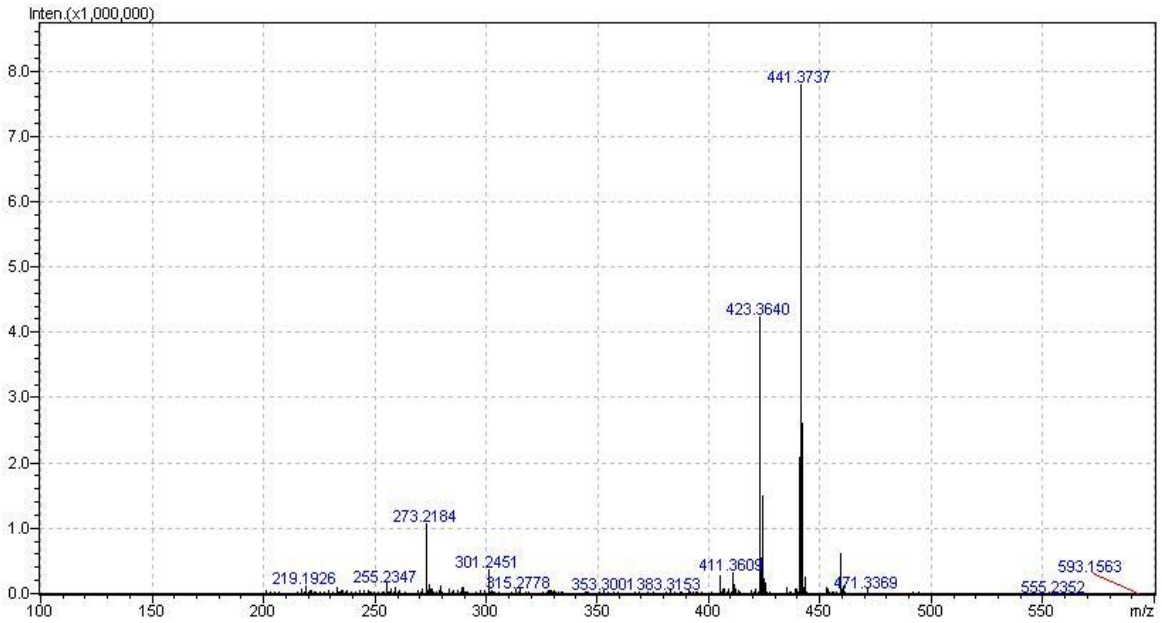
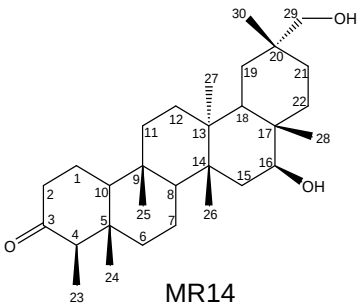


Figura 53: Espectro de massas (HR-APCI, modo positivo) de **MR14**.

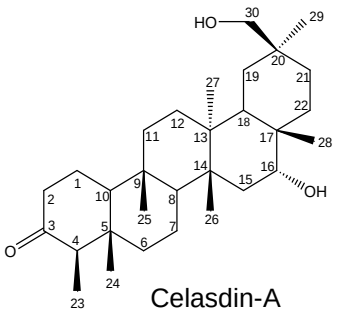
Tabela 11: Dados de RMN 1D e 2D ($CDCl_3$ + piridina-d_5, 400 MHz) de **MR14** e comparação com dados do Celasdin-A (KUO e KUO, 1997)

Nº	δ_C MR14	Tipo de C	**δ_H MR14	HMBC	COSY	NOESY	***δ_C Celasdin-A
1	22,2	CH_2	*1,59β *1,84α		1 β	25	22,20
2	41,4	CH_2	*2,23α *2,33β			1α, 1β	41,40
3	212,8	C					213,0
4	58,0	CH	*2,18α		23	23, 7eq	58,10
5	42,1	C					42,20
6	41,1	CH_2	*1,16 ax (α) *1,61 eq (β)		6ax, 7ax	23, 24, 25	41,10
7	18,4	CH_2	*1,36 ax (β) *1,46 eq (α)			25	18,40
8	53,3	CH	*1,37 ax (α)			27	53,30
9	37,4	C					37,40
10	59,3	CH	*1,43 ax (α)			27	59,40
11	35,6	CH_2	*1,37 ax (α) *1,18 eq (β)			27	35,60
12	30,7	CH_2	*1,25 ax (β) *1,61eq (α)		11ax	27	30,70
13	40,1	C					40,10
14	39,1	C					39,10
15	44,3	CH_2	*1,86α *1,48β		15β		44,10
16	74,4	CH	4,12α; t, J = 8,8	15, 17, 18, 22, 28	15α, 15β	27, 22α, 7eq, 15α	75,30
17	36,5	C					35,60
18	44,1	CH	*1,78β			26, 30, 12ax, 21β	44,50
19	30,4	CH_2	*1,63β *1,33α			12ax, 21β	27,54
20	33,1	C					33,30
21	27,5	CH_2	*1,40β *1,65α				29,63
22	36,5	CH_2	*1,45α *1,76β		21β		35,00
23	6,9	CH_3	0,88; d, J = 6,6	3, 4, 5			6,80
24	14,6	CH_3	0,70; s	4, 5, 6, 10			14,60
25	18,1	CH_3	0,85; s	8, 9,10, 11			18,10
26	20,1	CH_3	1,11; s	8, 13, 14, 15			19,90
27	21,4	CH_3	1,02; s	12, 13, 14,18			21,30
28	25,4	CH_3	1,32; s	16, 17,18, 22		26	25,09
29	74,5	CH_2	3,35a; d, J = 10,8 3,38b; d, J = 10,8	19, 20, 21, 30		30, 21α	29,30
30	25,7	CH_3	1,13; s	19, 20, 21, 29			70,60

*Sinais sobrepostos no espectro de RMN de ^1H e determinados por HSQC. **Os valores de J são dados em Hz. ***$CDCl_3$.

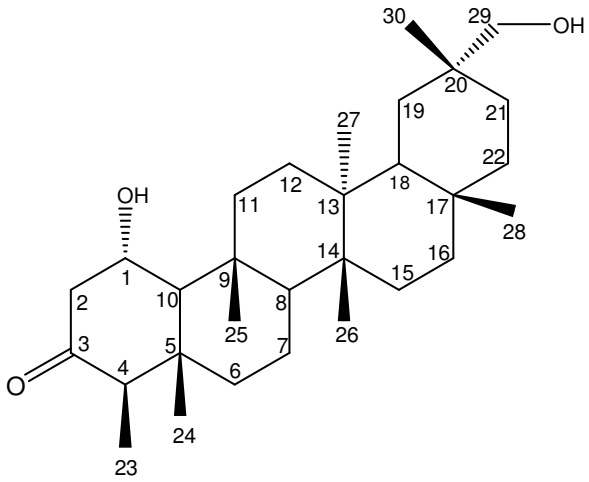


MR14



Celasdin-A

1.2.12 – MR15: 1α,29-di-hidroxi-3-oxofriedelano



MR15 foi isolado a partir do extrato clorofórmio dos galhos (ECG) de *M. robusta* (Figura 19, pág. 36) e foi obtido como um sólido branco não cristalino parcialmente solúvel em clorofórmio. Não foi possível determinar o ponto de fusão, o sólido decompôs a partir de 221 °C e tornou-se amarelo.

No espectro na região do IV de **MR15** (Figura 54, pág. 83) observaram-se bandas de absorção em 3518 e 3237 cm^{-1}, características de estiramento da ligação OH de hidroxila, em 2925 cm^{-1}, característica de estiramento assimétrico da ligação CH de grupos CH_2 de compostos alifáticos, em 2865 cm^{-1}, característica de estiramento simétrico da ligação CH de grupos CH_2 e CH_3 de compostos alifáticos, em 1454 e 1389 cm^{-1}, características de deformação angular no plano de ligação simples CH de grupos alquila e em 1709 cm^{-1}, característica de estiramento de ligação CO de carbonila de cetona (BARBOSA, 2007).

No espectro de RMN de ^1H de **MR15** (Figura 55, pág. 83) observaram-se cinco simpletos em δ_H 0,72, 1,05, 1,06, 1,08 e 1,23, os quais foram integrados para 18 átomos de hidrogênio e correspondem a seis grupos metila. Observou-se, também, um dupleto em δ_H 0,90 (J = 6,6 Hz), característico da metila C-23 de triterpenos de esqueleto friedelano (MAHATO e KUNDU, 1994). Observaram-se, ainda, um sinal largo em δ_H 3,30 (2H) e um multipleto centrado em δ_H 4,28 (1H).

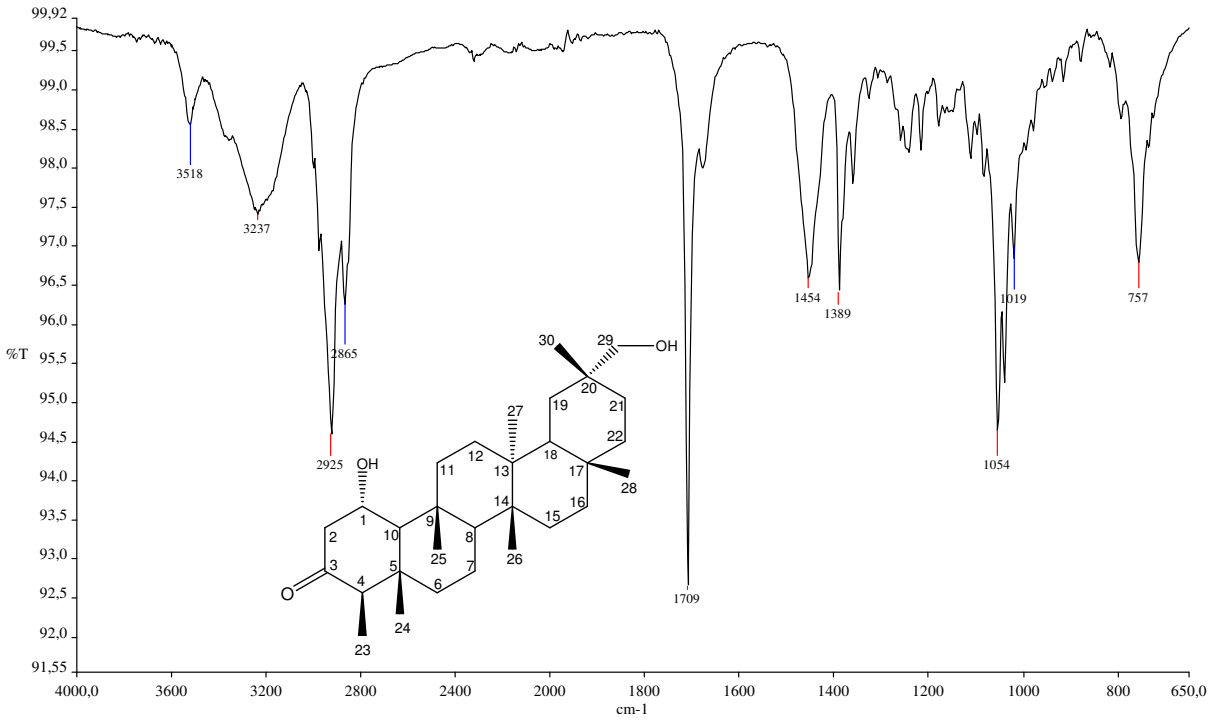


Figura 54: Espectro na região do IV de **MR15** (ATR).

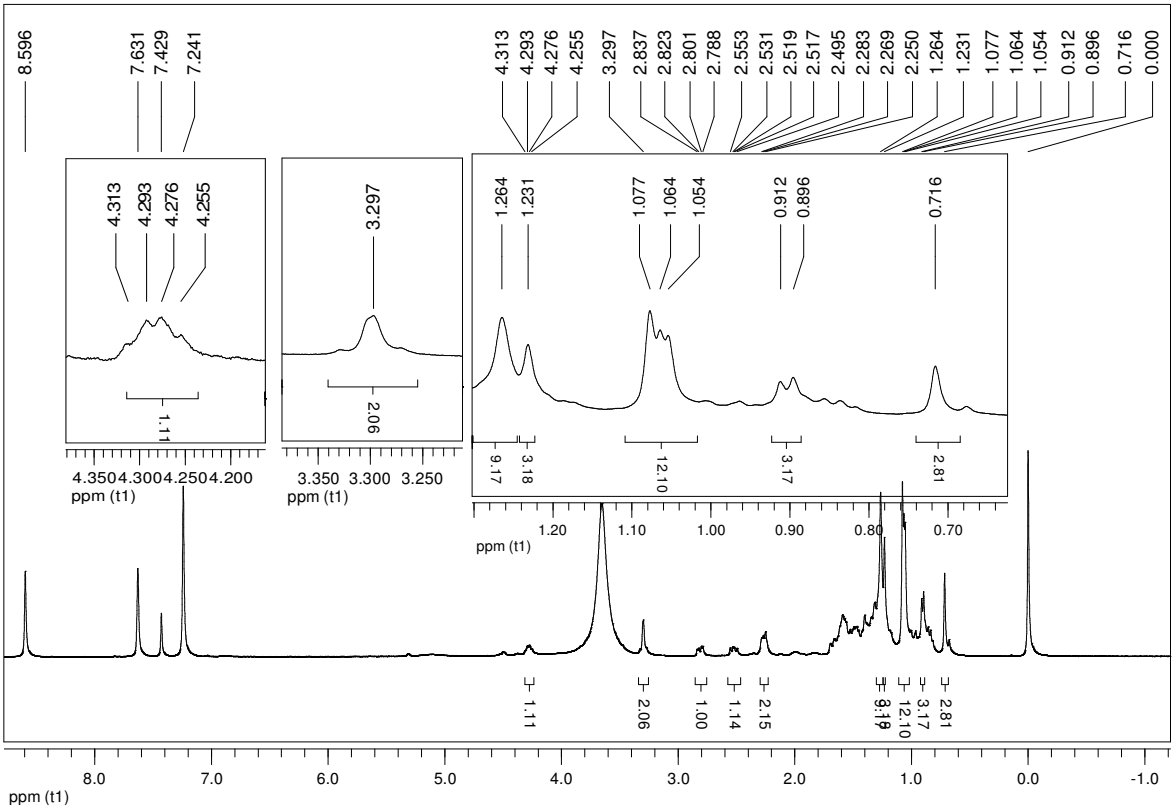


Figura 55: Espectro de RMN de ^{1}H (400 MHz, $CDCl_3$ + piridina-d_5) de **MR15.**

No espectro de RMN de ^{13}C e subespectro DEPT135 de **MR15** (Figuras 56 e 57, pág. 85) observaram-se sete sinais de carbono metílico, doze metilênicos, cinco metínicos e sete não hidrogenados, totalizando 31 sinais. O sinal em δ_C 29,7 pode tratar-se de contaminação de natureza graxa. Os sinais em δ_C 68,8 e 74,5 são característicos de carbono hidroxilado e o sinal em δ_C 210,4 é característico de carbono carbonílico. Para determinar a estrutura de **MR15** realizou-se uma análise detalhada dos mapas de contornos de RMN 2D (HSQC, HMBC, COSY e NOESY) (Figuras A57 a A61, pág. 182 a 184).

No mapa de contornos HSQC (Figura A57, pág. 182) observou-se correlação entre o sinal em δ_C 74,5 e o sinal em δ_H 3,30 (2H). No mapa de contornos HMBC (Figura A59, pág. 183) observaram-se correlações entre o sinal em δ_H 3,30 e os sinais em δ_C 25,9 (C-30), 27,8 (C-21) e 30,8 (C-19). Observaram-se, também, correlações do sinal em δ_H 1,06 (H-30) com os sinais de C-21, C-19, C-20 (δ_C 33,2) e C-29 (δ_C 74,5) e constatou-se que **MR15** apresenta um grupo hidroxila ligado a C-29. No mapa de contornos HSQC observou-se correlação entre o sinal em δ_C 7,1 (C-23) e o sinal de H-23 em δ_H 0,90 (d, J = 6,6 Hz). No mapa de contornos HMBC (Figuras A58 e A59, pág. 182 e 183) observaram-se correlações entre H-23 e os sinais de C-3 (210,4), C-4 (57,5) e C-5 (39,4). Observaram-se, ainda, correlações de ambos os sinais em δ_H 2,53 e 2,81 com os sinais em δ_C 68,8 e 210,4 (C-3) (Figuras A58 e A59, pág. 182 e 183), o sinal em δ_H 2,81 também apresentou correlação com o sinal em δ_C 64,8 (C-10). Constatou-se que os sinais em δ_H 2,53 e 2,81 são devidos a H-2 e que o sinal em δ_C 68,8 é referente a C-1. Portanto, **MR15** apresenta um grupo carbonila ligado a C-3 e um grupo hidroxila ligado a C-1. No mapa de contornos HSQC observaram-se correlações dos sinais de H-2 com o sinal em δ_C 51,9 (C-2) e do sinal de C-1 com o sinal em δ_H 4,28 (H-1) (Figura A57, pág. 182). No mapa de contornos COSY (Figura A60, pág. 183) observaram-se correlações entre H-1 e os sinais de H-2 e H-10 (δ_H 1,57). No mapa de contornos NOESY (Figura A61, pág. 184) observaram-se correlações de H-1 com H-24 (δ_H 0,72) e H-25 (δ_H 1,08). Concluiu-se que a H-1 está na posição beta e o grupo OH ligado a C-1 encontra-se na posição alfa. No mapa de contornos NOESY observou-se correlação entre H-29 e H-27 (δ_H 1,08), o que permitiu propor que o anel E de **MR15** encontra-se na conformação cadeira (Figura 58, pág. 86).

Após análise dos espectros de RMN 1D e 2D concluiu-se que **MR15** trata-se de 1α,29-di-hidroxi-3-oxofriedelano, um composto inédito (Tabela 12, pág. 87). A fórmula molecular de **MR15**, $C_{30}H_{50}O_3$, foi confirmada por HR-APCI-MS. No espectro de massas de **MR15** (Figura 59, pág. 86) observou-se o pico *m/z* 441,3666 referente ao cátion $[M+H-H_2O]^+$ (*m/z* calc. 441,3728).

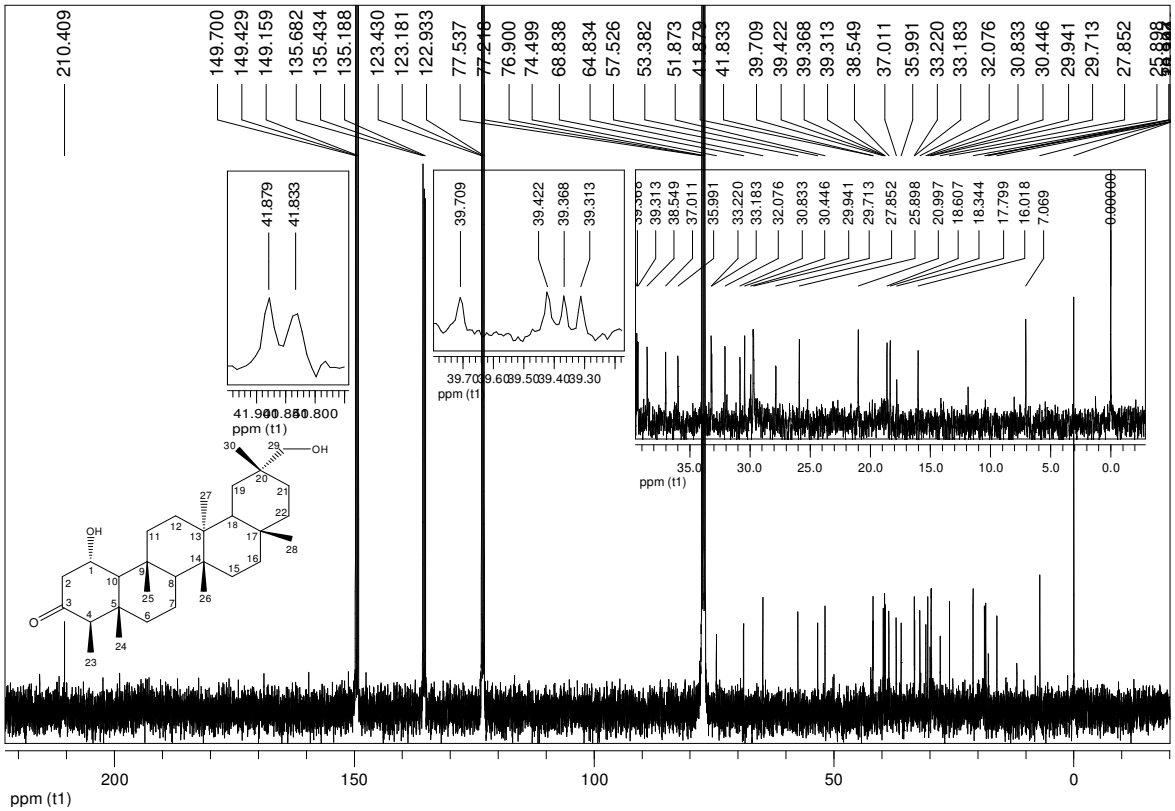


Figura 56: Espectro de RMN de ^{13}C (400 MHz, $CDCl_3$ + piridina-d_5) de **MR15.**

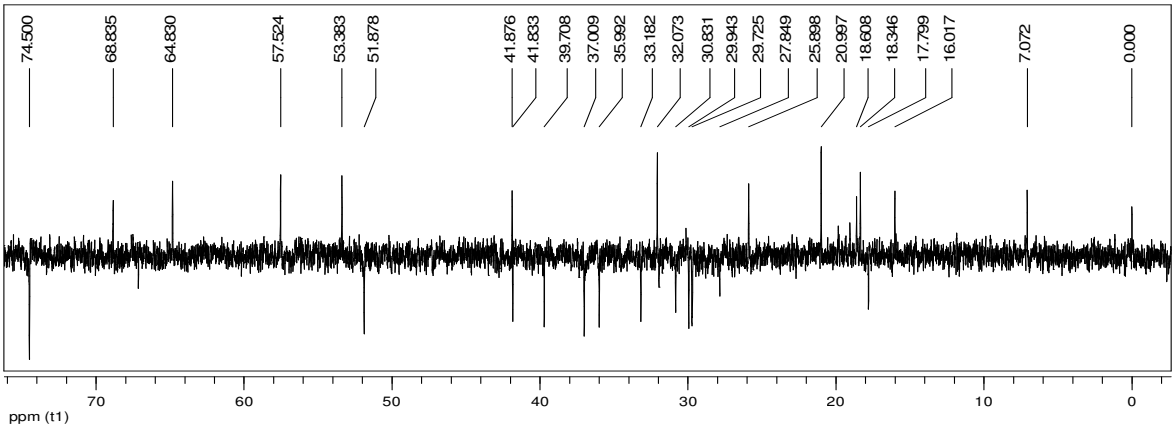


Figura 57: Expansão do subespectro DEPT135 (100 MHz, $CDCl_3$ + piridina-d_5) de **MR15.**

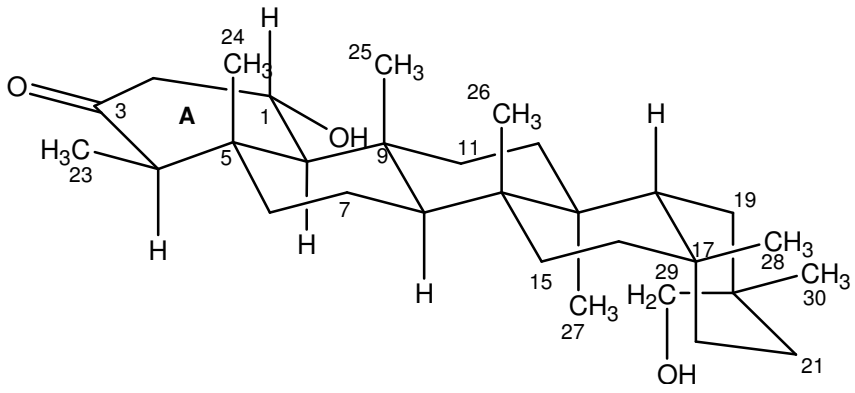


Figura 58: Estrutura tridimensional de **MR15**.

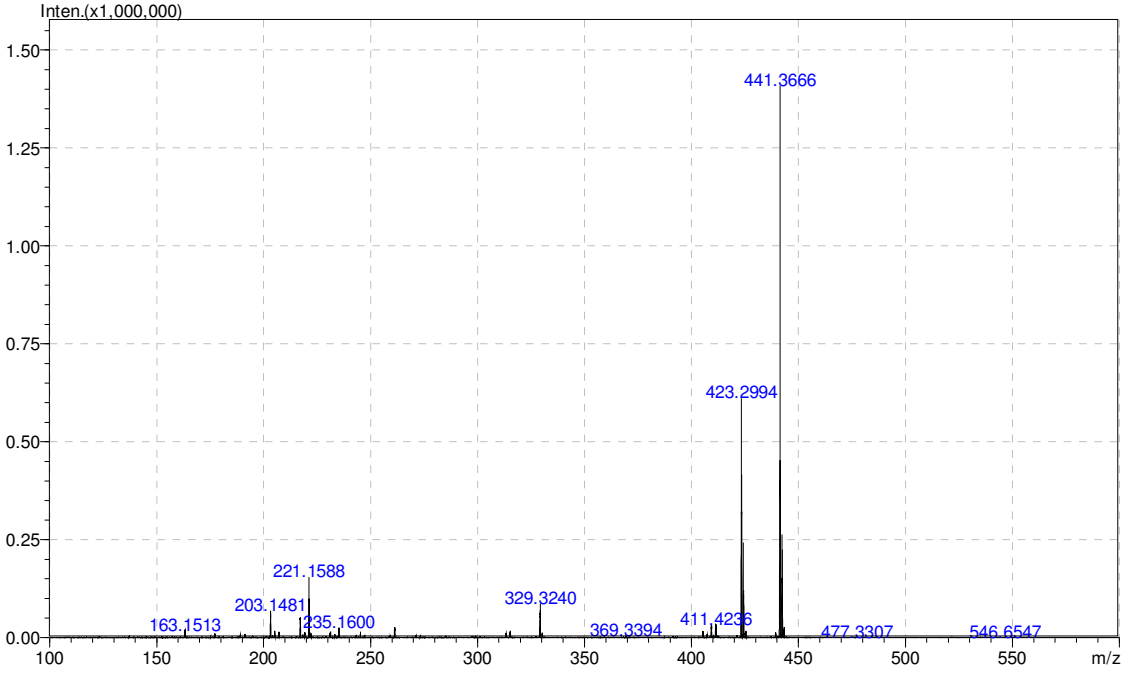
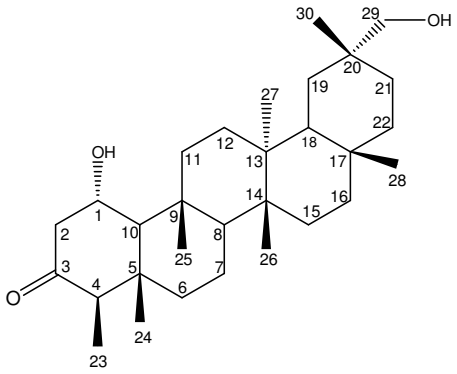


Figura 59: Espectro de massas (HR-APCI, modo positivo) de **MR15**.

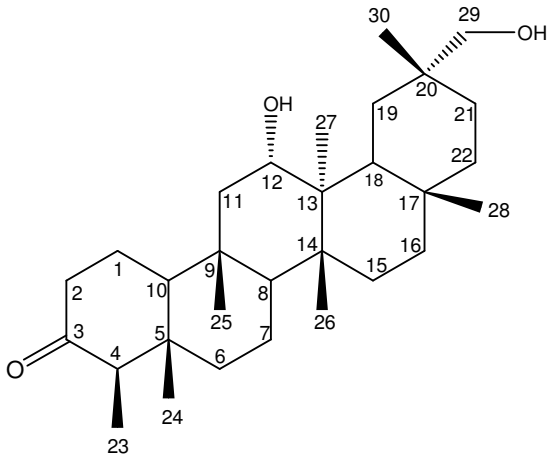
Tabela 12: Dados de RMN 1D e 2D ($CDCl_3$ + piridina-d_5, 400 MHz) de **MR15**

Nº	δ_C	Tipo de carbono	δ_H	HMBC	COSY	NOESY
1	68,8	CH	4,25 - 4,31; m, β		2α, 2β, 10	2α, 2β, 11β, 24, 25
2	51,9	CH_2	*2,81β *2,53α	1, 3, 10 1, 3	2α	2α 4, 10
3	210,4	C				
4	57,5	CH	*2,26α	5, 24	23	6α, 8, 10, 23
5	39,4	C				
6	41,8	CH_2	*1,64 eq (β) *1,25 ax (α)		6α	6α, 7, 23, 24
7	17,8	CH_2	*1,40 *1,47			
8	53,4	CH	*1,40 ax (α)			27
9	36,6	C				
10	64,8	CH	*1,57 ax (α)			15α, 27
11	37,0	CH_2	*2,26 ax (α) *1,57 eq (β)		12α, 12β	27, 12α
12	29,9	CH_2	*1,30 eq (α) *1,54 ax (β)			
13	39,4	C				
14	39,3	C				
15	33,2	CH_2	*1,56 eq (β) *1,31 ax (α)		16β	27
16	36,0	CH_2	*1,60 eq (α) *1,32 ax (β)			
17	30,4	C				
18	41,9	CH	*1,65β			16β, 19β, 28
19	30,8	CH_2	*1,38 ax (β) *1,27 eq (α)			
20	33,2	C				
21	27,8	CH_2	*1,47 eq (α) *1,37 ax (β)			
22	39,7	CH_2	*1,43 ax (α) *0,99 eq (β)		22β	22β
23	7,1	CH_3	0,90; d; J = 6,6 Hz	3, 4, 5		
24	16,0	CH_3	0,72; s	4, 5, 6, 10		
25	18,4	CH_3	1,08; s	8, 9, 10, 11		24
26	18,6	CH_3	1,05; s	8, 13, 14, 15		
27	21,0	CH_3	1,08; s	12, 13, 14, 18		
28	32,1	CH_3	1,23; s	16, 17,18, 22		
29	74,5	CH_2	3,30; sl	19, 21, 30		19α, 21α, 22α, 27
30	25,9	CH_3	1,06; s	19, 20, 21, 29		

*Sinais sobrepostos no espectro de RMN de ^1H e determinados por HSQC.



1.2.13 – MR16: 3-oxo-12α,29-di-hidroxifriedelano



MR16 foi isolado a partir de ECG (Figura 19, pág. 36) e obtido como um sólido branco não cristalino. O composto decompôs próximo de 219 ºC e não foi possível medir a faixa de fusão.

No espectro na região do IV (Figura A62, pág. 184) de **MR16** observaram-se bandas de absorção em 3496 e 3416 cm^{-1}, características de estiramento da ligação OH de hidroxila, em 2928 cm^{-1}, característica de estiramento assimétrico da ligação CH de grupos CH_2 de grupos alifáticos, em 2854 cm^{-1}, característica de estiramento simétrico da ligação CH de grupos CH_2 e CH_3 de grupos alifáticos, em 1462 e 1386 cm^{-1}, características de deformação angular no plano de ligação simples CH de grupos alquila e em 1712 cm^{-1}, característica de estiramento de ligação CO de carbonila de cetona.

No espectro de RMN de ^1H de **MR16** (Figura A63, pág. 185) observaram-se seis simpletos referentes a grupos metila em δ_H 0,69, 0,93, 0,97, 1,02, 1,18 e 1,19. Outro sinal referente a grupo metila foi observado em δ_H 0,87 (J = 6,9 Hz) e trata-se de um dupleto que é característico para a metila C-23 de triterpenos de esqueleto friedelano (MAHATO e KUNDU, 1994). Observaram-se, ainda, dois dupletos em δ_H 3,13 (J = 11,0 Hz) e 3,64 (J = 11,0 Hz) e um dupleto duplo em δ_H 3,94 (J = 4,4 e 11,1 Hz). Esses sinais são característicos de núcleos de H ligados a carbono hidroxilado.

Nos espectros de RMN de ^{13}C e subespectro DEPT-135 de **MR16** (Figuras A64 e A65, pág. 185 e 186) observaram-se sete sinais de carbono metílico, doze sinais de carbono metilênico, cinco sinais de carbono metínico e sete sinais de

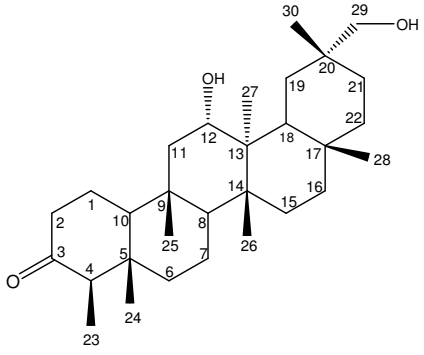
carbono não hidrogenado. O sinal em δ_C 212,5 é característico de carbono carbonílico e os sinais em δ_C 71,7 e 72,0 são característicos de carbono hidroxilado. O sinal em δ_C 29,7 foi atribuído a contaminação de natureza graxa.

A comparação dos dados de RMN de ^{13}C de **MR16** com aqueles da literatura para 3-oxo-12α,29-di-hidroxifriedelano (SILVA et al, 2011) permitiu concluir que **MR16** trata-se desse triterpeno. Os dados de RMN de ^{13}C de **MR16** estão apresentados na Tabela 13.

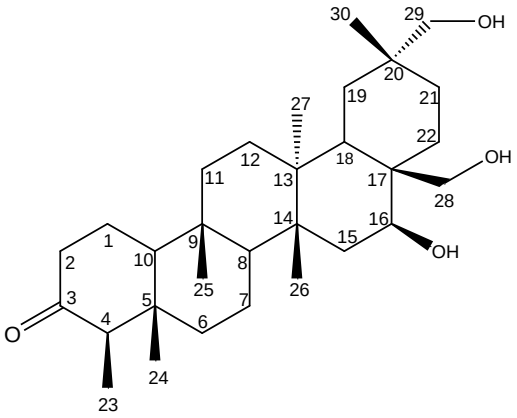
Tabela 13: Dados de RMN de ^{13}C ($CDCl_3$ + piridina-d_5) de **MR16** e comparação com dados da literatura para 3-oxo-12α,29-di-hidroxifriedelano (SILVA et al, 2011)

Nº	Tipo de carbono	δ_C de MR16	δ_C* (SILVA et al, 2011)	Nº	Tipo de carbono	δ_C de MR16	δ_C* (SILVA et al, 2011)
1	CH_2	22,3	22,3	16	CH_2	35,9	35,9
2	CH_2	41,3	41,3	17	C	31,3	31,3
3	C	212,5	212,7	18	CH	44,3	44,3
4	CH	58,1	58,1	19	CH_2	31,8	31,7
5	C	41,8	41,8	20	C	33,4	33,3
6	CH_2	41,1	41,1	21	CH_2	29,8	29,9
7	CH_2	18,3	18,3	22	CH_2	38,2	38,1
8	CH	51,3	51,3	23	CH_3	6,8	6,8
9	C	38,3	38,3	24	CH_3	14,6	14,6
10	CH	59,3	59,3	25	CH_3	19,2	19,2
11	CH_2	47,0	47,0	26	CH_3	18,7	18,7
12	CH	72,0	72,1	27	CH_3	11,6	11,6
13	C	44,8	44,8	28	CH_3	31,8	31,7
14	C	41,1	41,1	29	CH_2	71,7	71,6
15	CH_2	31,6	31,5	30	CH_3	29,2	29,2

*$CDCl_3$ + piridina-d_5



1.2.14 – MR17: 3-oxo-16β,28,29-tri-hidroxifriedelano



MR17 foi isolado a partir do extrato clorofórmico dos galhos (ECG) de *M. robusta* (Figura 19, pág. 36) e foi obtido como um sólido branco não cristalino, parcialmente solúvel em clorofórmio. Não foi possível determinar o ponto de fusão, o sólido decompôs a partir de 218 °C e tornou-se amarelo.

No espectro na região do IV de **MR17** (Figura 60, pág 91) observaram-se bandas de absorção em 3470 e 3364 cm^{-1}, características de estiramento de ligação OH de hidroxila, em 2928 cm^{-1}, característica de estiramento assimétrico da ligação CH de grupos CH_2 alifáticos, em 2858 cm^{-1}, característica de estiramento simétrico da ligação CH de grupos CH_2 e CH_3 de compostos alifáticos, em 1460 e 1388 cm^{-1}, características de deformação angular no plano de ligação simples CH de grupos alifáticos, e em 1716 cm^{-1}, característica de estiramento de ligação CO de carbonila de cetona.

No espectro de RMN de ^{1}H de **MR17** (Figuras 61 e 62, pág. 91 e 92) observaram-se cinco simpletos (δ_H 0,68, 0,80, 1,05, 1,07 e 1,21) e um dupleto (δ_H 0,90, J = 6,7 Hz) correspondentes a seis grupos metila. Observaram-se, também, os sinais em δ_H 3,47 (1H, d, J = 9,8 Hz), δ_H 3,51 (1H, d, J = 9,8 Hz), 3,79 (1H, d, J = 11,0 Hz), 4,37 (1H, t, J = 8,6 Hz) e 4,59 (1H, d, J = 11,0 Hz) correspondentes a núcleos de hidrogênio ligados a carbono hidroxilado.

No espectro de RMN de ^{13}C e subespectro DEPT135 de **MR17** (Figuras 63 e 64, pág. 92 e 93) observaram-se seis sinais de carbono metílico, doze metilênicos, quatro metínicos e sete não hidrogenados. Observou-se que o sinal em δ_C 40,5 corresponde a dois núcleos de carbono (CH e C) e que o composto apresenta 30 átomos de carbono. Os sinais em δ_C 66,7, 74,0 e 75,7 apresentam

deslocamentos químicos característicos de núcleos de carbono hidroxilado e o sinal em δ_C 211,2 é característico de carbono carbonílico.

Os dados de RMN de ^{13}C de **MR17** foram comparados com dados descritos na literatura para 3-oxo-28,29-di-hidroxifriedelano (MAHATO e KUNDU, 1994). Observou-se que a maioria dos sinais apresentam valores muito próximos, mas havia discrepâncias entre os valores de C-15, C-16 e C-17. Procedeu-se a uma análise detalhada de mapas de contornos de RMN 2D (HSQC, HMBC, COSY e NOESY) de **MR17** (Figuras A66 a A71, pág. 186 a 189) para elucidar a estrutura química do composto.

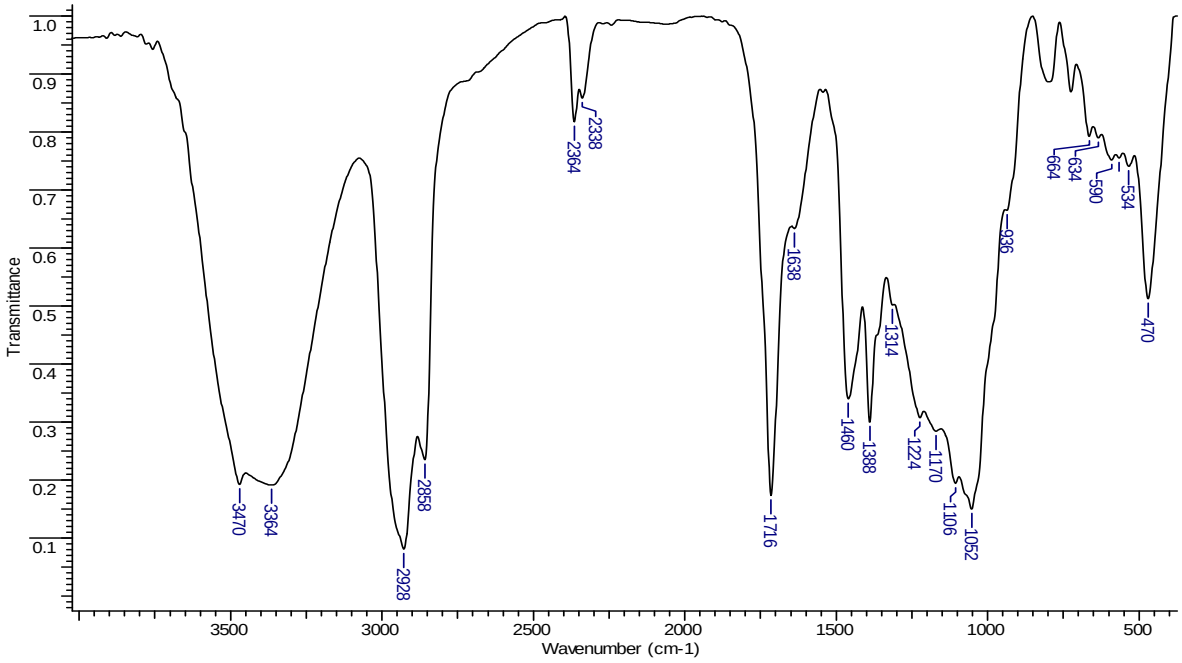


Figura 60: Espectro na região do IV de **MR17** (KBr).

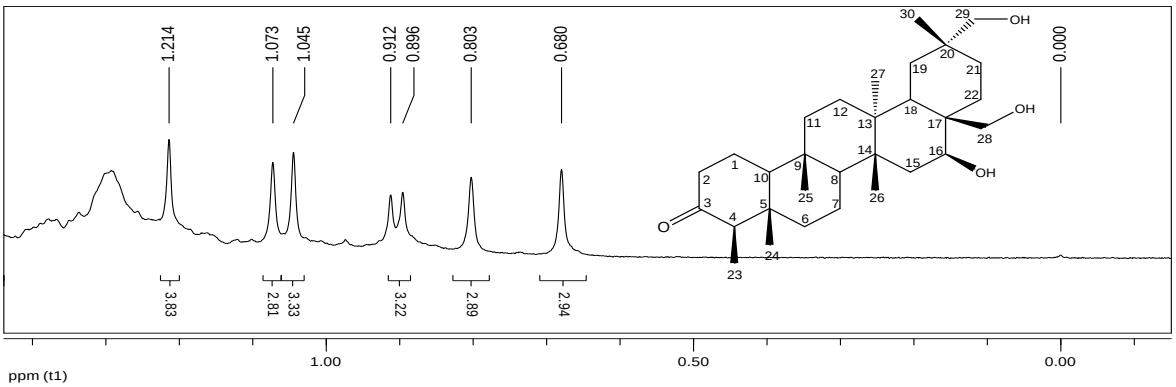


Figura 61: Expansão do espectro de RMN de ^1H (400 MHz, $CDCl_3$ + piridina-d_5) de **MR17**.

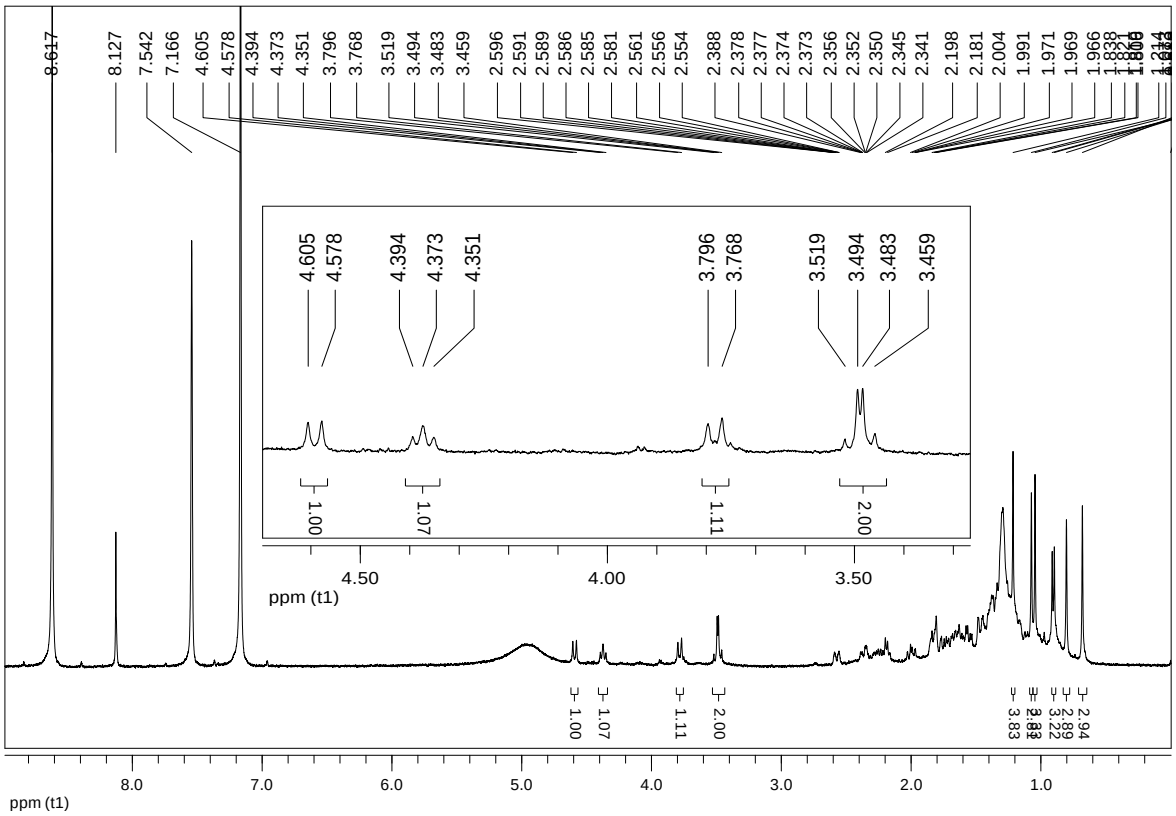


Figura 62: Espectro de RMN de ^{1}H (400 MHz, $CDCl_3$ + piridina-d_5) de **MR17.**

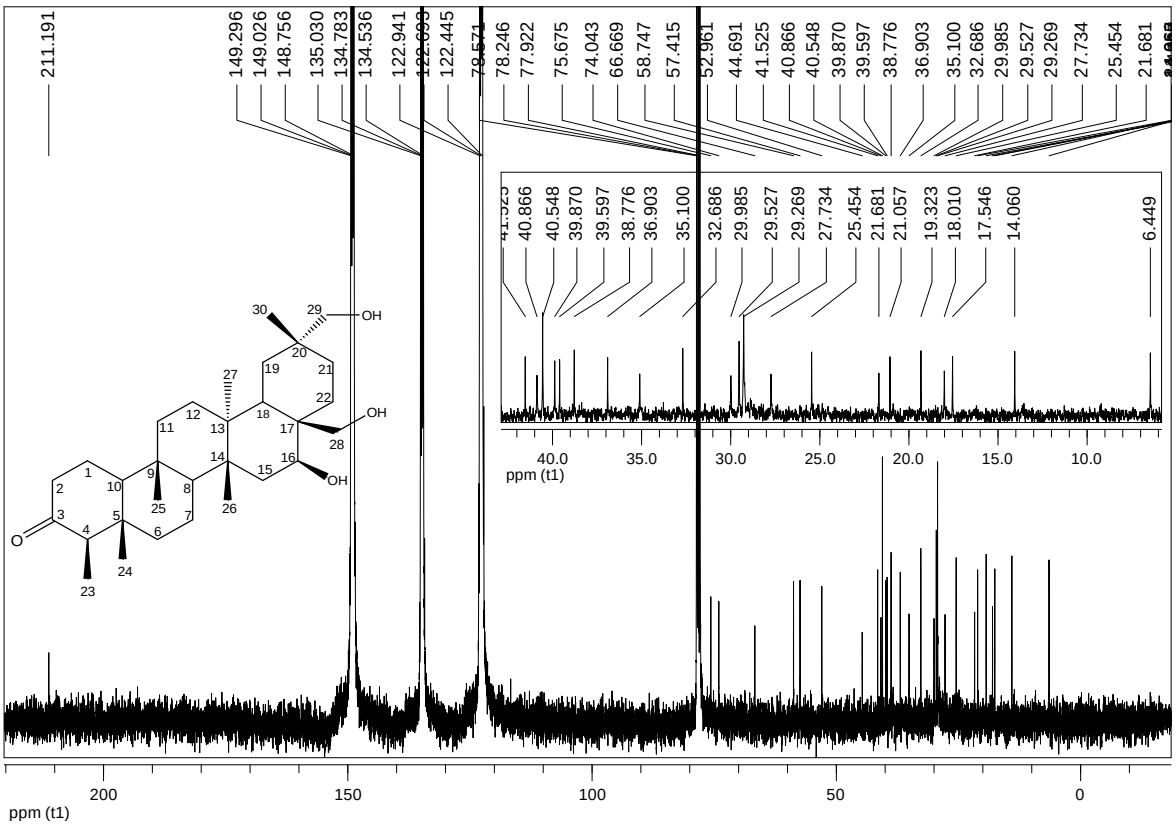


Figura 63: Espectro de RMN de ^{13}C (400 MHz, $CDCl_3$ + piridina-d_5) de **MR17.**

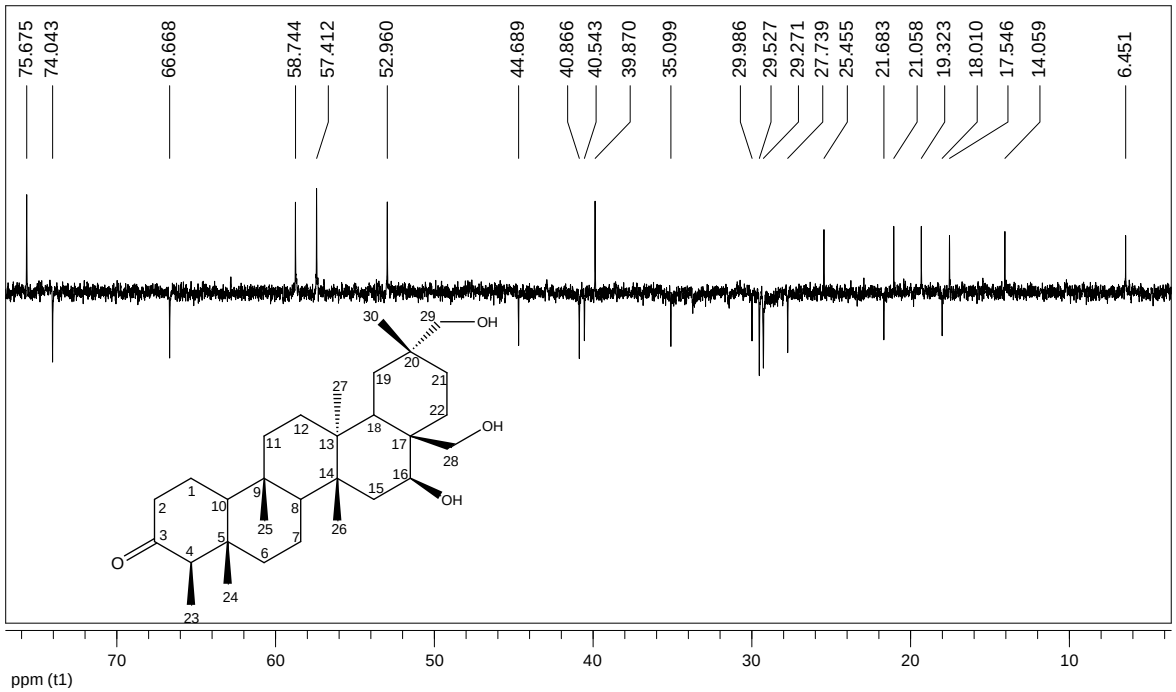


Figura 64: Expansão do subespectro DEPT135 (100 MHz, $CDCl_3$ + piridina-d_5) de **MR17**.

No mapa de contornos HSQC de **MR17** (Figura A66, pág. 186) observou-se correlação entre o sinal em δ_H 0,90 (d) e o sinal em δ_C 6,4, o que permitiu concluir que o composto é um triterpeno pentacíclico de esqueleto friedelânico contendo um grupo carbonila ligado a C-3 (MAHATO e KUNDU, 1994). Correlações entre o sinal de H-23 (δ_H 0,90) e os sinais de C-3 (δ_C 211,2), C-4 (δ_C 57,4) e C-5 (δ_C 41,5) foram observadas no mapa de contornos HMBC de **MR17** (Figuras A67 e A68, pág. 187). No mapa de contornos HSQC observou-se correlação dos sinais em δ_H 3,47 e 3,51 com o sinal de C-29 (δ_C 74,0). Correlações dos sinais de H-29a (δ_H 3,47, d) e H-29b (δ_H 3,51, d) com os sinais de C-19 (δ_C 29,3), C-20 (δ_C 32,7), C-21 (δ_C 27,7) e C-30 (δ_C 25,4) foram observadas no mapa de contornos HMBC (Figura A69, pág. 188). No mapa de contornos HSQC observaram-se correlações dos sinais em δ_H 3,79 (1H, d) e δ_H 4,59 (1H, d) com o sinal em δ_C 66,7 (C-28). No mapa de contornos HMBC observaram-se correlações do sinal em δ_H 3,79 (H-28a) com os sinais de C-16 (δ_C 75,7) e C-18 (δ_C 39,9) e do sinal em δ_H 4,59 (H-28b) com os sinais de C-16 e C-22 (δ_C 29,5). No mapa de contornos HSQC observaram-se correlações do sinal em δ_H 4,37 (1H, t)

com o sinal de C-16. No mapa de contornos HMBC observaram-se correlações entre o sinal de H-16 (δ_H 4,37) e os sinais de C-22 e C-28. Observaram-se, ainda, correlações entre C-16 e os sinais em δ_H 1,74 (1H) e 2,01 (1H), os quais foram atribuídos a H-15. No mapa de contornos HMBC, também foram observadas correlações entre o sinal de H-15 em δ_H 1,74 com os sinais de C-13 (δ_C 39,6), C-14 (δ_C 38,8), C-16 e C-26 (δ_C 21,1). Observaram-se, ainda, no mapa de contornos HMBC correlações entre o sinal de H-15 em δ_H 2,01 com os sinais de C-8 (δ_C 53,0), C-16, C-17 (δ_C 40,5) e C-26 (Figura A68, pág. 187). No mapa de contornos NOESY, a correlação entre H-16 e H-27 (δ_H 1,04) permitiu constatar que a hidroxila ligada a C-16 está em posição β (Figura A71, pág. 189). No mapa de contornos NOESY, também, se observou correlação entre H-29 e H19β e não se observaram correlações entre H-16 e H-28 e entre H-29 e H27, isso permite inferir que os anéis D e E apresentam conformação em barco (Figura 65).

Após análise dos espectros de RMN 1D e 2D concluiu-se que **MR17** trata-se de 3-oxo-16β,28,29-tri-hidroxifriedelano, um composto inédito (Tabela 14, pág. 95).

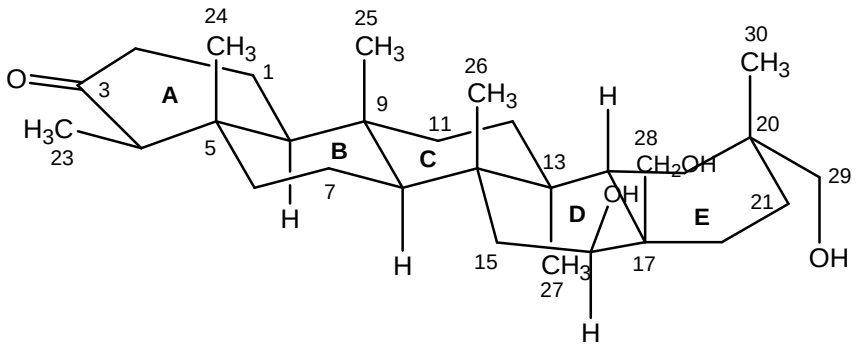
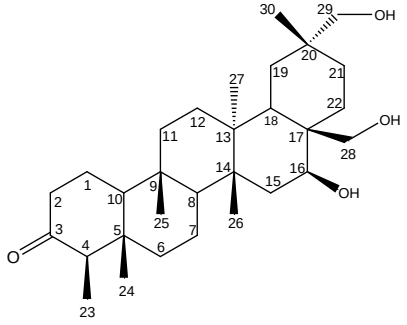


Figura 65: Estrutura tridimensional de **MR17**.

Tabela 14: Dados de RMN 1D e 2D ($CDCl_3$ + piridina-d_5, 400 MHz) de **MR17**

Nº	δ_C	Tipo de carbono	**δ_H	HMBC	COSY	NOESY
1	21,7	CH_2	*1,83α *1,58β		10	 25
2	40,9	CH_2	*2,36β *2,24α	3 3	1α 1β	1β
3	211,2	C				
4	57,4	CH	*2,19α	3, 23, 24	23	6α, 10
5	41,5	C				
6	40,5	CH_2	*1,66 eq (β) *1,20 ax (α)			6, 23, 24
7	18,0	CH_2	*1,38 eq (α) *1,47 ax (β)			
8	53,0	CH	*1,38 ax (α)			
9	36,9	C				
10	58,7	CH	*1,47 ax (α)			
11	35,1	CH_2	*1,25 ax (α) *1,37 eq (β)			25
12	30,0	CH_2	*1,30α, β			
13	39,6	C				
14	38,8	C				
15	44,7	CH_2	*2,01α *1,74β	8, 16, 17, 26 13, 14,16, 26	15	7α, 15, 10, 27
16	75,7	CH	4,37α, t, J = 8,6	22, 28	15α e 15β	15α, 22α, 27
17	40,5	C				
18	39,9	CH	*1,55β	13, 17, 27, 28	19α	
19	29,3	CH_2	*1,33α *1,80β			
20	32,7	C				
21	27,7	CH_2	*1,69β *1,83α	20, 29, 30		
22	29,5	CH_2	*1,41α *2,58β		21β e α, 22	22α
23	6,4	CH_3	0,90; d; J = 6,7	3, 4, 5		
24	14,0	CH_3	0,68; s	4, 5, 6, 10		
25	17,5	CH_3	0,80; s	8, 9,10, 11		
26	21,1	CH_3	1,07; s	8, 13, 14, 15		
27	19,3	CH_3	1,04; s	12,13,14		
28	66,7	CH_2	3,79a; d; J = 11,0 4,59b; d; J = 11,0	16, 18 16, 22	28	18, 21β, 30 26, 28a
29	74,0	CH_2	3,47a; d; J = 9,8 3,51b; d; J = 9,8	19, 20, 21, 30		19β, 30
30	25,4	CH_3	1,21; s	19, 20, 21, 29		

*Sinais sobrepostos no espectro de RMN de ^1H e determinados por HSQC. **Os valores de J são dados em Hz.



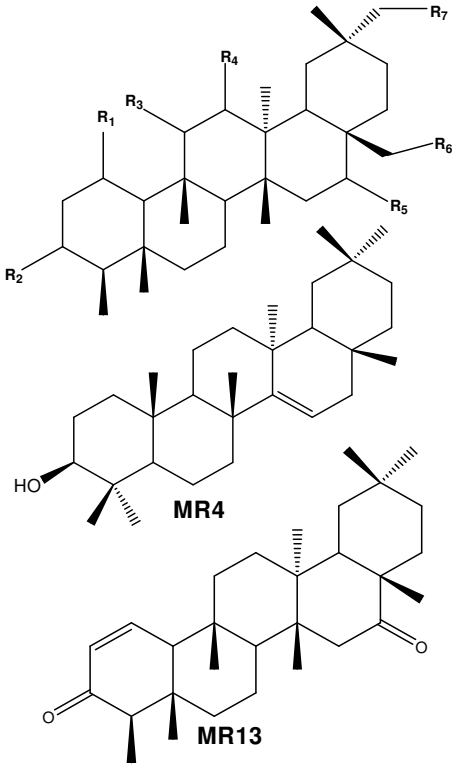
1.3 – Considerações Finais

Do estudo fitoquímico de folhas e galhos de *Maytenus robusta* foram isolados e identificados 17 compostos. Entre eles treze triterpenos pentacíclicos, doze da classe dos friedelanos e um taraxarano, o esteroide β-sitosterol e três flavonoides da classe dos flavonóis. Durante o trabalho de mestrado (SOUSA, 2012), o sólido obtido a partir do extrato hexânico (SEHF) e o extrato hexânico (EHF) das folhas de *M. robusta* foram fracionados e levaram ao isolamento e identificação de triterpenos da classe dos friedelanos e hopanos (Figura 5, pág. 8). Triterpenos hopânicos não foram isolados a partir de outros extratos das folhas e nem dos galhos de *M. robusta*. O isolamento de triterpenos pentacíclicos está de acordo com o perfil químico de outras espécies do gênero *Maytenus.* Porém, triterpenos de esqueleto hopano não são comuns em membros da família Celastraceae e não havia relatos para o gênero *Maytenus*. Esses compostos, portanto, podem ser considerados marcadores químicos para *M. robusta*.

Entre os compostos isolados, os triterpenos pentacíclicos 3,16-dioxo-29-hidroxifriedelano (**MR12**), 3,16-dioxo-friedelan-1-eno (**MR13**), 3-oxo-16β,29-di-hidroxifriedelano (**MR14**), 1α,29-di-hidroxi-3-oxofriedelano (**MR15**), 3-oxo-16β,28,29-tri-hidroxifriedelano (**MR17**), canferol-3-*O*-β-D-glicopiranosil-(1-3)-α-L-ramnopiranosil-(1-2)-β-D-glicopiranosídeo (**MR07**) e quercetina-3-*O*-β-D-glicopiranosil-(1-3)-α-L-ramnopiranosil-(1-2)-β–D-glicopiranosídeo (**MR08**) são inéditos. **MR01** (113,4 mg), **MR02** (1,07 g), **MR07** (128,3 mg), **MR09** (1,43 g), **MR10** (757,6 mg), **MR12** (284,0 mg), **MR14** (213,1 mg) e **MR16** (74,7 mg) foram isolados em quantidades apreciáveis. Obtiveram-se, ainda, 1,90 g de mistura de **MR01** e **MR02**.

Os triterpenos isolados a partir dos galhos (**MR01**, **MR02**, **MR09**, **MR10**, **MR11**, **MR12**, **MR13**, **MR14**, **MR15**, **MR16**, **MR17**) são, em geral, mais funcionalizados e contêm maior número de grupo hidroxila e carbonila do que os isolados das folhas de *M. robusta* (Tabela 15, pág. 98 e Figura 66, pág. 97). Por outro lado, as folhas apresentaram compostos de esqueleto hopânico que não foram isolados dos galhos, isto justifica a importância de se trabalhar separadamente as partes aéreas da planta.

Durante o preparo de ECF e EHG ocorreu precipitação de sólidos (SECF e SEHG) na etapa de remoção do solvente desses extratos. Os sólidos foram separados por filtração a pressão reduzida e fracionados isoladamente. Os triterpenos obtidos a partir de SECF e SEHG correspondem a 89 e 53% desses materiais, respectivamente (Figuras 9 e 17, pág. 17 e 29). De SECF isolou-se um triterpeno não obtido a partir de ECF e de SEHG isolaram-se dois triterpenos não obtidos a partir de EHG (Tabela 15, pág. 98). Portanto, pode-se concluir que é vantajoso trabalhar com esses sólidos separadamente do restante dos extratos.



Triterpeno	R_1	R_2	R_3	R_4	R_5	R_6	R_7
MR01	H	=O	H	H	H	H	H
MR02	H	OH	H	H	H	H	H
MR03	H	OH	OH	H	H	H	H
MR09	H	=O	H	H	=O	H	H
MR10	H	=O	H	H	H	H	OH
MR11	H	=O	H	OH	=O	H	H
MR12	H	=O	H	H	=O	H	OH
MR14	H	=O	H	H	OH	H	OH
MR15	OH	=O	H	H	H	H	OH
MR16	H	=O	H	OH	H	H	OH
MR17	H	=O	H	H	OH	OH	OH

Figura 66: Estrutura química de triterpenos de *M. robusta*.

Tabela 15: Triterpenos obtidos a partir de SECF, ECF, SEHG, EHG, ECG, EAG

Triterpeno	Folhas		Galhos			
	SECF	ECF	SEHG	EHG	ECG	EAG
MR01	+	+	+	+	+	+
MR02	+	+	+		+	
MR03	+					
MR04		+				
MR09			+	+	+	+
MR10			+	+	+	
MR11			+		+	
MR12			+		+	+
MR13					+	
MR14					+	
MR15					+	
MR16					+	
MR17					+	

2 – REDUÇÃO DE TRITERPENOS PENTACÍCLICOS COM $NaBH_4$

2.1 – Introdução

Alguns dos triterpenos pentacíclicos isolados de folhas e galhos de *Maytenus robusta* foram avaliados em relação à atividade citotóxica contra células tumorais 4T1 (Capítulo 3, pág. 120). Os compostos testados apresentaram atividade considerável e o mais efetivo (**MR14**) apresentou concentração inibitória média (IC_{50}) de 1,23 μmol/L. Diante da potencial atividade desses triterpenos e considerando a possibilidade de obtenção de compostos inéditos para a realização de ensaios biológicos, triterpenos isolados de folhas e galhos de *M. robusta*, em quantidade apreciável, foram submetidos à reação de redução empregando boroidreto de sódio.

2.2 – Parte Experimental

2.2.1 – Métodos gerais

O acompanhamento das reações foi realizado por CCD. Para revelação das cromatoplacas utilizou-se vanilina perclórica. A purificação dos produtos obtidos foi realizada por CC utilizando sílica gel 60 (230-400 Mesh) como fase estacionária. Os solventes empregados nas separações cromatográficas foram clorofórmio, acetato de etila e metanol, puros ou em misturas em ordem crescente de polaridade. As temperaturas de fusão, não corrigidas, foram determinadas em aparelho Microquímica MQAPF-302. Para a determinação estrutural foram obtidos espectros de absorção na região do infravermelho, espectros de RMN de 1D e 2D e espectros de massas de alta resolução. Os dados dos equipamentos e condições empregadas nas análises estão descritos nas páginas 11 e 12.

2.2.2 – Redução dos triterpenos

Em um balão de fundo redondo de 25 mL adicionaram-se o triterpeno, uma mistura de tetraidrofurano-água (THF-H_2O) e boroidreto de sódio ($NaBH_4$) em excesso (Tabela 16, pág. 101). O balão foi acoplado a um condensador de refluxo e a mistura mantida sob agitação magnética e refluxo. Após o consumo do material de partida, adicionou-se água destilada à mistura reacional e manteve-se a agitação magnética à temperatura ambiente por mais 5 minutos. Nas reações empregando compostos que apresentam duas carbonilas (**MR09** e **MR12**), após o consumo do material de partida a reação foi mantida por mais 24 h antes da elaboração. A mistura foi extraída com três porções de clorofórmio, de 30 a 40 mL cada. A fase orgânica foi secada com Na_2SO_4 anidro, filtrada e concentrada em evaporador rotatório. O sólido obtido foi purificado por CC e o rendimento calculado (Tabela 16, pág. 101).

2.3 – Resultados e Discussão

Para a obtenção dos derivados de triterpenos de esqueleto friedelânico utilizou-se o agente redutor $NaBH_4$. A metodologia de síntese e purificação utilizada está de acordo com Reyes et al., 2010. Na Figura 67, pág. 102 está apresentado o mecanismo para a redução de cetonas com o $NaBH_4$ (COSTA et al., 2003). Ocorre complexação entre o oxigênio carbonílico e o cátion Na^+, levando ao aumento da eletrofilia do carbono. Depois, há a transferência de hidreto e formação do alcóxido **A**. Em seguida, há formação do alcoxiboroidreto **B** que também é um agente redutor e pode reduzir outras moléculas de $R_2C{=}O$ até formar o tetra-alcoxiboroidreto **C**, que é solvolizado ou hidrolizado liberando o álcool.

Os triterpenos submetidos à redução (**MR09**, **MR10**, **MR12**, **MR14** e **MR16**) apresentam uma carbonila no carbono C-3 e dois deles possuem uma segunda carbonila em C-16. Nesses compostos os grupos carbonila estão inseridos em um ambiente quiral devido à presença de centros assimétricos em outros sítios dos compostos. Nos compostos usados, os grupos carbonila apresentam faces diastereotópicas, ou seja, a reação de adição de um nucleófilo aquiral produz uma

mistura de diastereoisômeros que são obtidos, a não ser por coincidência, em quantidades diferentes (COSTA et al., 2003). A face menos impedida estericamente reagirá mais rapidamente e levará ao produto majoritário.

O ataque nucleofílico do hidreto à face endo (côncava) da carbonila na posição 3 ocorre preferencialmente em relação ao ataque à face exo (convexa). O impedimento estérico causado pela metila C-23 desfavorece o ataque pela face exo (Figura 68, pág. 102). O produto majoritário apresenta uma hidroxila ligada a C-3 em posição beta. Nas reações envolvendo os triterpenos contendo um grupo carbonila em C-16, **MR09** e **MR12**, não houve redução da carbonila nessa posição. Para esses compostos, além de estereosseletivas, as reações foram regiosseletivas. Os grupos metila C-26, C-27 e C-28 e os hidrogênios ligados a C-15, C-22 e C-18 promovem um bloqueio estérico impedindo o ataque nucleofílico às faces exo e endo da carbonila na posição 16. Na Figura 68, pág. 102 estão assinaladas as faces exo e endo dos grupos carbonila nas posições C-3 e C-16 de 3,16-dioxo-29-hidroxifriedelano.

Tabela 16: Derivados friedelânicos hidroxilados obtidos utilizando $NaBH_4$

Substrato	Quant. (mg; mmol)	THF-H_2O (mL)	$NaBH_4$ (mmol)	Tempo (h)	Produto majoritário	Rend (%)	Massa (mg)
3-oxo-29-hidroxifriedelano **(MR10)**	332; 0,76	12:0,4	1,5	3	3β,29-di-hidroxi-friedelano **(P1a)**	73	243
					3α,29-di-hidroxi-friedelano **(P1b)**	10	33
3,16-dioxofriedelano **(MR09)**	336; 0,76	12:0,4	3,8	3*	3β-hidroxi-16-oxofriedelano **(P2a)**	66	224
					3α-hidroxi-16-oxofriedelano **(P2b)**	23	78
3,16-dioxo-29-hidroxifriedelano **(MR12)**	252; 0,55	8:0,25	2,7	4*	3β,29-di-hidroxi-16-oxofriedelano **(P3a)**	51	130
					3α,29-di-hidroxi-16-oxofriedelano **(P3b)**	16	40
3-oxo-16β,29-di-hidroxifriedelano **(MR14)**	65; 0,14	3:0,1	0,28	9	3β,16β,29-tri-hidroxifriedelano **(P4a)**	54	35
3-oxo-12α,29-di-hidroxifriedelano **(MR16)**	50; 0,11	3:0,1	0,26	8	3β,12α,29-tri-hidroxifriedelano **(P5a)**	50	25
					3α,12α,29-tri-hidroxifriedelano **(P5b)**	12	6

*Após consumo do material de partida, a reação foi mantida por mais 24 h.

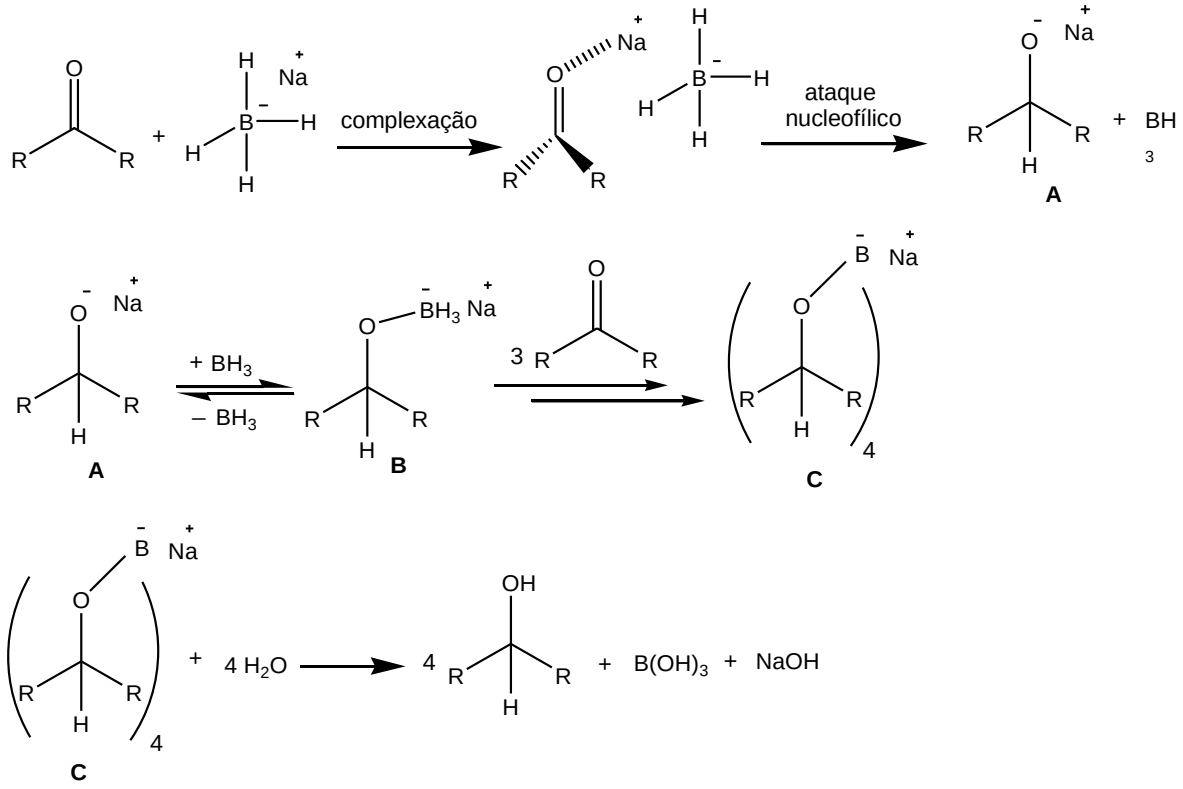


Figura 67: Mecanismo da reação com $NaBH_4$ (COSTA et al., 2003).

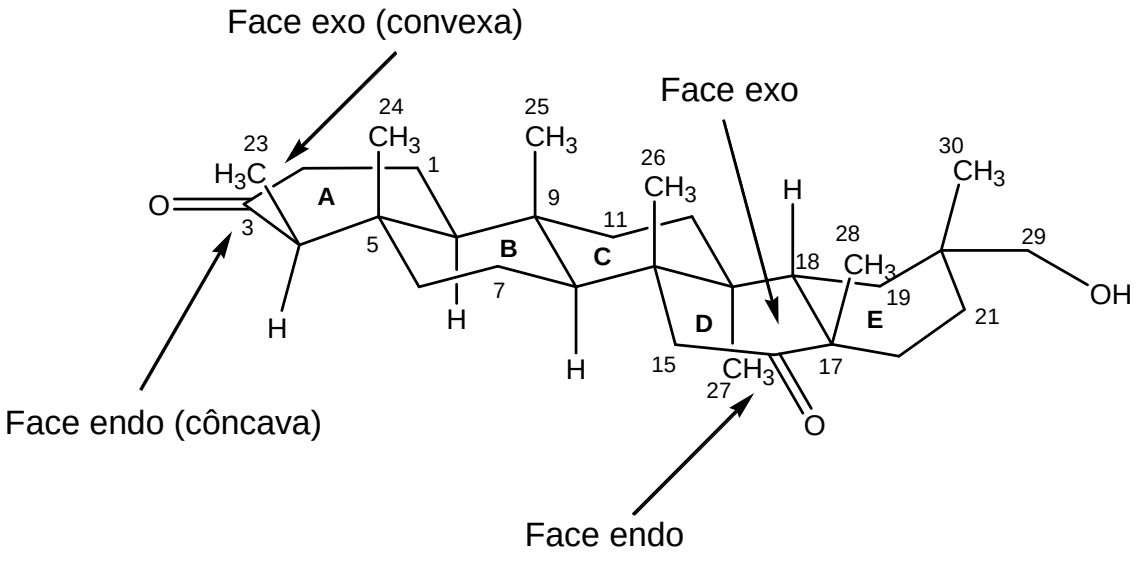
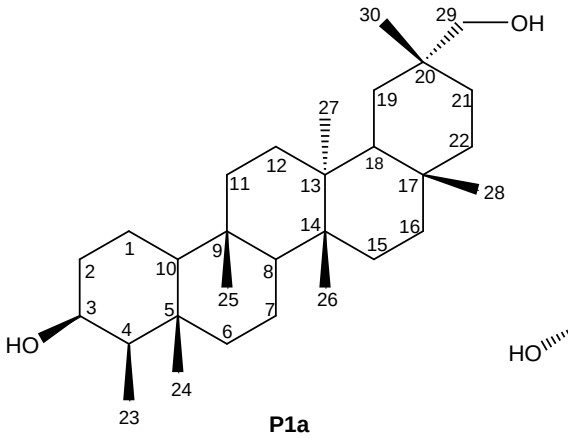
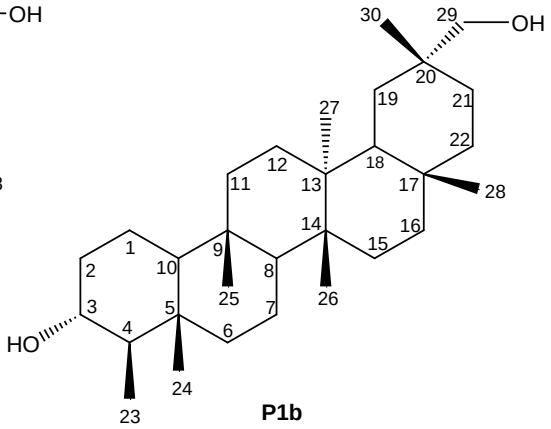


Figura 68: Faces exo e endo dos grupos carbonila de 3,16-dioxo-29-hidroxifriedelano.

2.3.1 – Redução de 3-oxo-29-hidroxifriedelano (MR10)



P1a



P1b

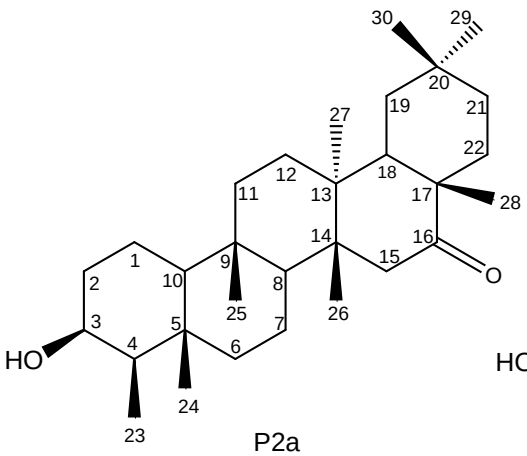
Após 3 h de reação todo o substrato foi consumido. O produto majoritário foi 3β,29-di-hidroxifriedelano (**P1a**, 243 mg; 73%). Também obteve-se 3α,29-di-hidroxifriedelano (**P1b**, 33 mg; 10%). A reação foi estereosseletiva, **P1a** e **P1b** foram obtidos, aproximadamente, na proporção 88/12 (**P1a** + **P1b** = 276 mg, **P1a** e **P1b** equivalem a 88 e 12% dessa quantidade, respectivamente) e o excesso diastereoisomérico (% de produto majoritário - % de produto minoritário) foi 76%.

P1a foi obtido como um sólido branco não cristalino, com Rf menor que o do substrato e faixa de fusão 291-294 ºC. No espectro na região do IV (Figura B1, pág. 190) de **P1a** observou-se uma banda de absorção em 3395 cm^{-1}, característica de estiramento da ligação OH de hidroxila, e não foi observada nenhuma banda de absorção correspondente a estiramento de carbonila. No espectro de RMN de ^{1}H de **P1a** (Figura B2, pág. 190) observaram-se dois dupletos em δ_H 3,38 (1H, *J* = 10,2 Hz) e δ_H 3,42 (1H, *J* = 10,2 Hz), característicos de núcleos de hidrogênio ligados a carbono metilênico hidroxilado. Observou-se, também, um sinal largo em δ_H 3,84 (1H), o qual é característico de hidrogênio carbinólico e permitiu confirmar a redução da carbonila na posição 3. No espectro de RMN de ^{13}C e subespectro DEPT135 (Figuras B3 e B4, pág. 191) de **P1a** observaram-se sinais em δ_C 71,5 (CH) e 74,2 (CH_2), que são característicos de átomos de carbono hidroxilado e foram atribuídos a C-3 e a C-29, respectivamente. Não se observou sinal em torno de 200 ppm correspondente a carbono carbonílico. Os dados de RMN de ^{13}C de **P1a** foram comparados com os da literatura para 3β,29-di-hidroxifriedelano (DUARTE, 2000) e concluiu-se que

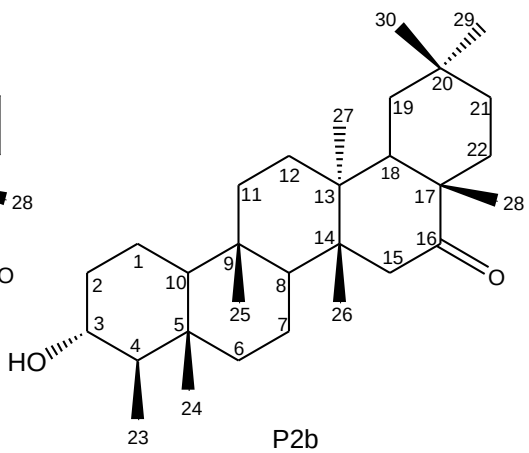
P1a trata-se desse composto (Tabela B1, pág. 231). A fórmula molecular de **P1a**, $C_{30}H_{52}O_2$, foi confirmada por HR-APCI-MS. No espectro de massas de **P1a** (Figura B5, pág. 192) observou-se o pico *m/z* 427,3867 referente ao cátion $[M+H-H_2O]^+$ (*m/z* calc. 427,3934).

P1b foi obtido como um sólido branco não cristalino, com Rf menor que o de **P1a** e faixa de fusão 299-303 ºC. No espectro na região do IV (Figura B6, pág. 192) de **P1b** observaram-se bandas de absorção em 3486 e 3266 cm^{-1}, características de estiramento da ligação OH de hidroxila. Não se observou nenhuma banda de absorção correspondente a estiramento de carbonila. No espectro de RMN de ^1H de **P1b** (Figura B7, pág. 193) observaram-se dois dupletos em δ_H 3,33 (1H, *J* = 10,4 Hz) e δ_H 3,37 (1H, *J* = 10,4 Hz), atribuídos a H-29a e H-29b. Também se observou um multipleto centrado em δ_H 3,42 (1H), o qual foi atribuído a H-3. Nos espectros de RMN de ^{13}C e DEPT135 (Figuras B8 e B9, pág. 193 e 194) de **P1b** observaram-se sinais em δ_C 71,0 (CH) e 74,2 (CH_2), os quais foram atribuídos a C-3 e a C-29, respectivamente. Não se observou sinal em torno de 200 ppm correspondente a carbono carbonílico. Os dados de RMN de ^{13}C de **P1b** foram comparados com os da literatura para 3α,29-di-hidroxifriedelano (DUARTE, 2000) e concluiu-se que **P1b** trata-se desse composto (Tabela B1, pág. 231). A fórmula molecular de **P1b**, $C_{30}H_{52}O_2$, foi confirmada por HR-APCI-MS. No espectro de massas de **P1b** (Figura B10, pág. 194) observou-se o pico *m/z* 427,3859 referente ao cátion $[M+H-H_2O]^+$ (*m/z* calc. 427,3934).

2.3.2 – Redução de 3,16-dioxofriedelano (MR09)



P2a



P2b

Após 3 h de reação o substrato foi totalmente consumido. O produto majoritário foi 3β-hidroxi-16-oxofriedelano (**P2a**, 224 mg; 66%) e o minoritário 3α-hidroxi-16-oxofriedelano (**P2b**, 78 mg; 23%). A reação foi estereosseletiva e regiosseletiva, **P2a** e **P2b** foram obtidos na proporção 74/26, aproximadamente, e o excesso diastereoisomérico foi 48%.

P2a foi obtido como um sólido branco não cristalino com faixa de fusão 257-260 ºC. No espectro na região do IV de **P2a** (Figura B11, pág. 195) observaram-se as bandas de absorção em 3619 e 3472 cm^{-1}, características de estiramento da ligação OH de hidroxila. Também se observou uma banda de absorção em 1692 cm^{-1} correspondente a estiramento de carbonila. No espectro de RMN de ^{1}H de **P2a** (Figura B12, pág. 195) observou-se um multipleto de hidrogênio carbinólico centrado em δ_H 3,78 (1H). No espectro de RMN de ^{13}C e subespectro DEPT135 de **P2a** (Figuras B13 e B14, pág. 196) observou-se um sinal em δ_C 72,6, característico de átomo de carbono metínico hidroxilado. Observou-se, também, um sinal característico de átomo de carbono carbonílico em δ_C 219,5. Concluiu-se que ocorreu a redução de apenas uma das carbonilas de **MR09**. Os dados de RMN de ^{13}C de **P2a** foram comparados com os da literatura para 3β-hidroxi-16-oxofriedelano (CASTAÑEDA et al., 1992) e confirmou-se que **P2a** trata-se desse composto (Tabela 17, pág. 107). Observaram-se, após análise do subespectro DEPT135 e mapas de contornos HSQC, HMBC, COSY e NOESY obtidos para **P2a** (Figuras B14 a B19, pág. 196 a 199) que os sinais de C-1, C-2, C-4, C-5, C-6, C-9, C-10, C-13, C-14, C-19, C-24, C-25, C-29 e C-30 estão trocados na atribuição realizada por Castañeda e colaboradores (1992). A fórmula molecular de **P2a**, $C_{30}H_{50}O_2$, foi confirmada por HR-APCI-MS. No espectro de massas de **P2a** (Figura B20, pág. 199) observou-se o pico *m/z* 425,3729 referente ao cátion $[M+H-H_2O]^+$ (*m/z* calc. 425,3778).

P2b foi obtido como um sólido branco não cristalino com faixa de fusão 280-283 ºC. No espectro na região do IV de **P2b** (Figura B21, pág. 200) observaram-se uma banda de absorção em 3488 cm^{-1}, característica de estiramento da ligação OH de hidroxila, e em 1691 cm^{-1}, característica de estiramento de ligação dupla CO de cetonas. No espectro de RMN de ^{1}H de **P2b** (Figura B22, pág. 200) verificou-se um tripleto duplo em δ_H 3,34 (1H, *J*= 4,8 e 10,5 Hz), o qual foi atribuído a H-3, hidrogênio carbinólico na posição axial. No

espectro de RMN de ^{13}C e subespectro DEPT135 de **P2b** (Figuras B23 e B24, pág. 201) observaram-se um sinal em δ_C 72,1, característico de núcleo de carbono metínico hidroxilado, e um sinal em δ_C 219,4, característico de núcleo de carbono carbonílico. Verificou-se que houve redução de apenas uma das carbonilas de 3,16-dioxofriedelano e que **P2b** trata-se de 3α-hidroxi-16-oxofriedelano. Por se tratar de um composto inédito foi realizada a análise detalhada dos espectros 1D e 2D de **P2b** (Figuras B25 a B29, pág. 202 a 204) para se atribuir inequivocadamente os deslocamentos químicos de ^{13}C e ^{1}H. Os dados de RMN 1D e 2D de **P2b** estão descritos na Tabela 18, pág. 108. A fórmula molecular de **P2b**, $C_{30}H_{50}O_2$, foi confirmada por HR-APCI-MS. No espectro de massas de **P2b** (Figura B30, pág. 204) observou-se o pico *m/z* 425,3733 referente ao cátion $[M+H-H_2O]^+$ (*m/z* calc. 425,3778).

Tabela 17: Dados de RMN 1D e 2D (400 MHz) de **P2a**

Nº	*δ_C	Tipo de carbono	**δ_H	HMBC	COSY	NOESY	***δ_C
1	15,8	CH_2	1,42 1,66		1β, 10	25	**17,6**
2	35,4	CH_2	1,96 eq (β) 1,57ax (α)	3, 10	1β, 1α, 2α	1α, 1β , 2α	**40,3**
3	72,6	CH	3,76 - 3,79; m, eq (α)	1, 4, 5, 23	2α, 2β, 4	2α ,2β, 4, 23	72,5
4	49,1	CH	1,23 α		23	23	**61,9**
5	37,8	C					**41,3**
6	41,4	CH_2	0,98 ax (α) 1,79 eq (β)		6 α, 7α, 7β	6α, 7α, 7β	**39,1**
7	17,9	CH_2	1,47 eq (α) 1,25 ax (β)				17,9
8	52,4	CH	1,35 ax (α)			10	52,3
9	37,3	C					**35,3**
10	61,1	CH	0,94 ax (α)				**49,0**
11	35,3	CH_2	1,52 1,13		11		35,2
12	29,2	CH_2	1,40 β, α				29,6
13	40,4	C					**37,2**
14	39,2	C					**37,8**
15	50,1	CH_2	2,37 β 2,06 α	13, 14, 16, 26 8, 13, 14,16, 26	15α	7ax, 18, 26, 28	50,1
16	219,5	C					219,3
17	45,3	C					45,2
18	43,9	CH	2,06 β	12, 17, 19, 22, 27, 28	19α, 19β	12, 26, 28, 30	43,8
19	35,1	CH_2	1,23 1,32				**31,5**
20	27,6	C					27,5
21	31,6	CH_2	1,45 β,α				31,0
22	30,7	CH_2	1,47 1,79		21		30,7
23	11,6	CH_3	0,98; d; J = 7,2	3, 4, 5			11,6
24	16,3	CH_3	1,05; s	4, 5, 6, 10			**15,8**
25	17,6	CH_3	0,90; s	8, 9,10, 11			**16,3**
26	20,1	CH_3	1,16; s	8, 13, 14, 15			20,1
27	16,2	CH_3	0,85; s	12,13,14,18			16,1
28	27,3	CH_3	1,28; s	16, 17,18, 22			27,3
29	35,2	CH_3	0,96; s	19, 20, 21, 30			**29,1**
30	31,1	CH_3	1,05; s	19, 20, 21, 29			**35,1**

*$CDCl_3$ + piridina-d_5, **os valores de J são dados em Hz, ***dados de Castañeda e colaboradores (1992) para 3β- hidroxi-16-oxofriedelano ($CDCl_3$)

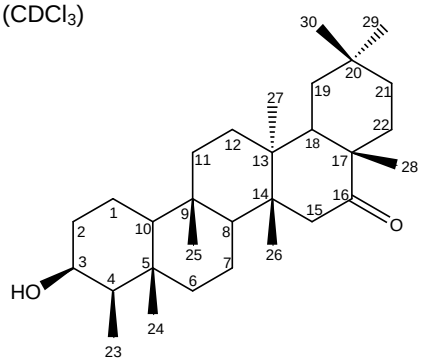
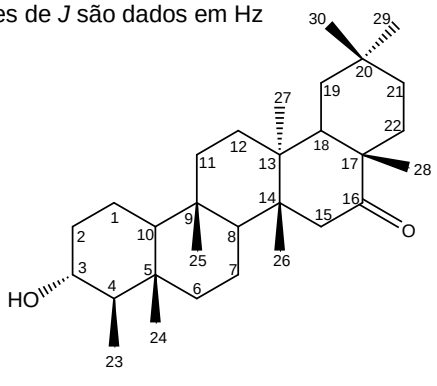


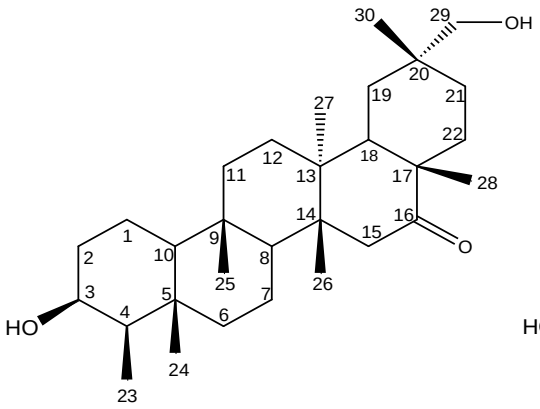
Tabela 18: Dados de RMN 1D e 2D (400 MHz) de **P2b**

Nº	*δ_C	Tipo de carbono	**δ_H	HMBC	COSY	NOESY
1	19,6	CH_2	1,35 ax (β) 1,61 eq (α)		10 1β, 2α, 10	1β,10,11α
2	36,6	CH_2	2,07 eq (β) 1,21 ax (α)		1β, 1α	
3	72,1	CH	3,34 ax (β); td, J = 4,8 e 10,5		2α, 2β, 4	1β ,2β, 23, 24, 25
4	53,1	CH	1,04 α		23	
5	38,1	C				
6	41,0	CH_2	1,02 ax (α) 1,80 eq (β)			23, 24, 25, 6ax, 7α, 7β
7	18,2	CH_2	1,43 ax (β) 1,30 eq (α)			
8	52,2	CH	1,33 ax (α)			
9	37,2	C				
10	59,9	CH	0,94 ax (α)			
11	35,3	CH_2	1,47 ax (α) 1,14 eq (β)			
12	29,1	CH_2	1,39 β, α			
13	39,1	C				
14	40,4	C				
15	50,2	CH_2	2,37 β 2,06 α	16, 26 16, 26	15α	18, 26, 28
16	219,4	C				
17	45,3	C				
18	43,9	CH	2,06 β		19α, 19β	24, 25, 26, 28, 30, 12ax
19	35,4	CH_2	1,22 1,33			
20	27,6	C				
21	31,6	CH_2	1,45 β, α			
22	30,7	CH_2	1,45 α 1,74 β			22α, 28
23	9,91	CH_3	0,90; d; J = 6,6	3, 4, 5		
24	14,6	CH_3	0,79; s	4, 5, 6, 10		
25	17,5	CH_3	0,85; s	8, 9,10, 11		
26	20,2	CH_3	1,17; s	8, 13, 14, 15		
27	16,2	CH_3	0,85; s	12,13,14,18		
28	27,3	CH_3	1,29; s	16, 17,18, 22		
29	35,2	CH_3	0,96; s	19, 20, 21, 30		
30	31,1	CH_3	1,04; s	19, 20, 21, 29		

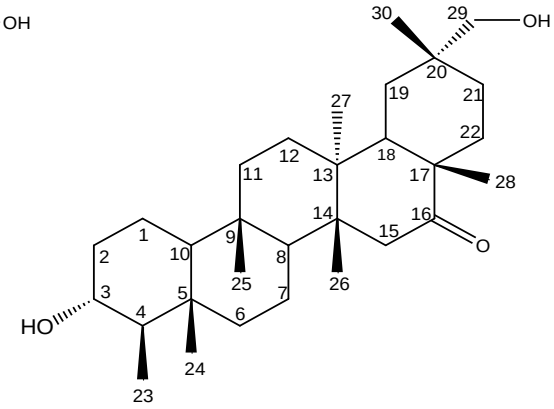
*$CDCl_3$ + piridina-d_5, **Os valores de J são dados em Hz



2.3.3 – Redução de 3,16-dioxo-29-hidroxifriedelano (MR12)



P3a



P3b

Após 4 h de reação todo o substrato foi consumido. O produto majoritário obtido foi 3β,29-di-hidroxi-16-oxofriedelano (**P3a**, 130 mg) e o produto minoritário 3α,29-di-hidroxi-16-oxofriedelano (**P3b**, 40 mg). A reação foi estereosseletiva e regiosseletiva. **P3a** e **P3b** foram obtidos na proporção 76/24, aproximadamente, e o excesso diastereoisomérico foi 52%.

P3a foi obtido como um sólido branco não cristalino com faixa de fusão 295-299 ºC. No espectro na região do IV de **P3a** (Figura B31, pág. 205) observaram-se uma banda de absorção em 3343 cm^{-1}, característica de estiramento da ligação OH de hidroxila, e em 1685 cm^{-1}, característica de estiramento da ligação CO de carbonila. No espectro de RMN de ^{1}H de **P3a** (Figura B32, pág. 205) observaram-se dois dupletos em δ_H 3,30 (1H, *J* = 10,4 Hz) e δ_H 3,33 (1H, *J* = 10,4 Hz), atribuídos a H-29a e H-29b. Também se observou um multipleto centrado em δ_H 3,78 (1H), sinal característico de núcleo de H ligado a carbono hidroxilado. No espectro de RMN de ^{13}C e subespectro DEPT135 de **P3a** (Figuras B33 e B34, pág. 206) observaram-se sinais característicos de núcleos de carbono hidroxilado em δ_C 71,6 (CH) e 74,1 (CH_2). Observou-se, também, um sinal de núcleo de carbono carbonílico em δ_C 219,0. Portanto, ocorreu a redução de apenas uma das carbonilas de 3,16-dioxo-29-hidroxifriedelano. Procedeu-se a uma análise dos espectros de RMN 1D e 2D (Figuras B35 a B39, pág. 207 a 209) de **P3a** para atribuir todos os valores de deslocamentos químicos de ^{1}H e ^{13}C para o composto. Confirmou-se que **P3a** trata-se de 3β,29-di-hidroxi-16-

oxofriedelano, um composto inédito na literatura. Os dados de RMN 1D e 2D de **P3a** estão descritos na Tabela 19, pág. 111. A fórmula molecular de **P3a**, $C_{30}H_{50}O_3$, foi confirmada por HR-APCI-MS. No espectro de massas de **P3a** (Figura B40, pág. 209) observou-se o pico *m/z* 441,3650 referente ao cátion $[M+H-H_2O]^+$ (*m/z* calc. 441,3727).

P3b também foi obtido como um sólido branco não cristalino com faixa de fusão 293-297 ºC. No espectro na região do IV de **P3b** (Figura B41, pág. 210) observaram-se uma banda de absorção em 3456 cm^{-1}, característica de estiramento da ligação OH de hidroxila, e em 1670 cm^{-1}, característica de estiramento da ligação CO de carbonila. No espectro de RMN de ^1H de **P3b** (Figura 42, pág. 210) observaram-se dois multipletos entre δ_H 3,30 e 3,50, esses sinais foram integrados para 3H e são característicos de núcleos de H ligados a carbono hidroxilado. No espectro de RMN de ^{13}C e subespectro DEPT135 de **P3b** (Figuras B43 e B44, pág. 211) observaram-se sinais característicos de núcleos de carbono hidroxilado em δ_C 70,9 (CH) e 74,1 (CH_2). Observou-se, também, um sinal de núcleo de carbono carbonílico em δ_C 218,4. Para atribuir inequivocadamente todos os valores de deslocamentos químicos de ^1H e ^{13}C fez-se uma análise dos espectros de RMN 2D (Figuras B45 a B49, pág. 212 a 214) obtidos para **P3b**. Os dados de RMN 1D e 2D de **P3b** estão descritos na Tabela 20, pág. 112. A fórmula molecular de **P3b**, $C_{30}H_{50}O_3$, foi confirmada por HR-APCI-MS. No espectro de massas de **P3b** (Figura B50, pág. 214) observou-se o pico *m/z* 441,3669 referente ao cátion $[M+H-H_2O]^+$ (*m/z* calc. 441,3727).

Tabela 19: Dados de RMN 1D e 2D (400 MHz) de **P3a**

Nº	*δ_C	Tipo de C	**δ_H	HMBC	COSY	NOESY
1	16,1	CH_2	1,43 eq (α) 1,65 ax (β)		10	
2	35,7	CH_2	1,96 eq (β) 1,59 ax (α)		1α, 1β, 2α	1α, 1β, 2α 1α, 4, 6α, 10
3	71,6	CH	3,78 – 3,80; m, β	1, 5	2α, 2β	2α ,2β, 4, 23
4	49,4	CH	1,26 α		23	23
5	37,3	C				
6	41,6	CH_2	0,98 ax (α) 1,79 eq (β)		6ax, 7α, 7β	23, 24, 25, 7α, 7β
7	18,0	CH_2	1,47 ax (β) 1,26 eq (α)			24
8	52,6	CH	1,36 ax (α)			10, 27
9	38,0	C				
10	61,3	CH	0,92 ax (α)	1		
11	35,3	CH_2	1,10 eq (β) 1,51 ax (α)			4, 10, 11 β
12	29,1	CH_2	1,45 β, α			
13	39,1	C				
14	40,6	C				
15	50,2	CH_2	2,39 β 2,08 α	16, 26, 14 8, 13,16, 26		18, 26, 28 27, 26, 28
16	219,0	C				
17	45,7	C				
18	43,3	CH	2,14 β		19α, 19β	26, 28, 30, 19α,19β
19	30,1	CH_2	1,49 α 1,28 β		19β	27
20	32,7	C				
21	27,0	CH_2	1,41 α 1,63 β	17, 29	21 α, 22 α	28
22	31,1	CH_2	1,47 α 1,84 β	20	21 α, 21 β, 22 α	21 α, 21 β, 28
23	12,0	CH_3	0,99; d, J = 7,1	3, 4, 5		
24	16,4	CH_3	1,06; s	4, 5, 6, 10		
25	17,6	CH_3	0,90; s	8, 9,10, 11		
26	20,2	CH_3	1,18; s	8, 13, 14, 15		25
27	15,9	CH_3	0,83; s	12,13,14,18		
28	27,4	CH_3	1,32; s	16, 17,18, 22		26, 30
29	74,1	CH_2	3,30a; d, J = 10,4 3,33b; d, J = 10,4	19, 20, 30		19α, 19β, 21α, 21β, 30
30	34,2	CH_3	1,11; s	19, 20, 21, 29		

*$CDCl_3$ + piridina-d_5, **os valores de J são dados em Hz

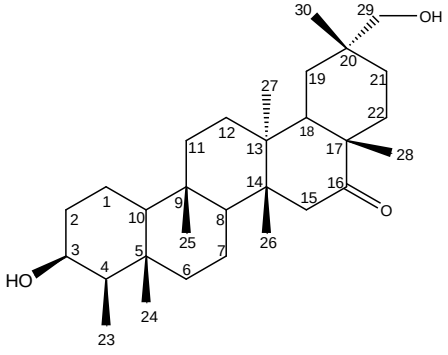
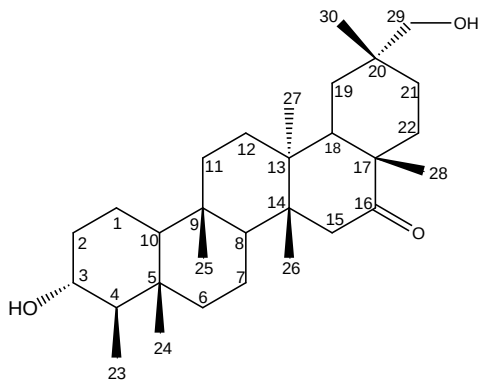


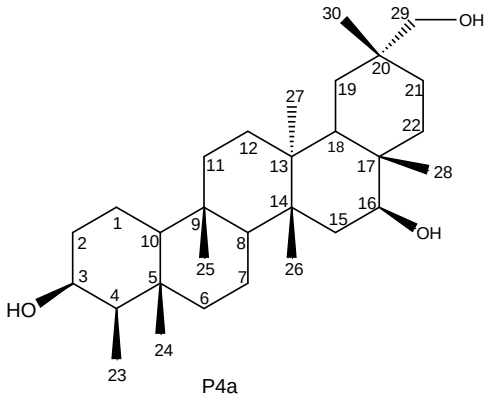
Tabela 20: Dados de RMN 1D e 2D (400 MHz) de **P3b**

Nº	*δ_C	Tipo de carbono	**δ_H	HMBC	COSY	NOESY
1	19,8	CH_2	1,32 ax (β) 1,56 eq (α)		10	
2	37,1	CH_2	2,18 eq (β) 1,40 ax (α)			
3	70,9	CH	3,39 – 3,47; m, β		2α, 2β, 4	1β ,2β, 23, 24
4	53,5	CH	1,15 α			10
5	38,1	C				
6	41,2	CH_2	1,00 eq (β) 1,77 ax (α)		6eq, 7α, 7β	4, 7α, 6β, 27
7	18,2	CH_2	1,38 ax (β) 1,24 eq (α)			
8	52,3	CH	1,30 ax (α)			
9	37,2	C				
10	60,0	CH	0,95 ax (α)			
11	35,2	CH_2	1,40 ax (α) 1,07 eq (β)			10, 27
12	29,1	CH_2	1,30 eq (α) 1,38 ax (β)			10, 27
13	39,0	C				
14	40,6	C				
15	50,2	CH_2	2,36 β 2,06 α	13, 14, 16, 26 8, 13, 16, 26	15 α	7ax, 15 α , 18, 26 7eq, 8, 27, 26
16	218,4	C				
17	45,7	C				
18	43,3	CH	2,12 β	14, 17, 19, 27, 28	19 α, 19 β	
19	30,2	CH_2	1,56 α 1,28 β	13, 18, 20, 21, 30		27, 19β
20	32,7	C				
21	27,1	CH_2	1,36 β 1,69 α		21 β, 22 α	
22	31,2	CH_2	1,50 α 1,89 β		21 α, 21 β, 22α	21 β, 22 α
23	10,2	CH_3	1,02; d; J = 6,6	3, 4, 5		
24	14,6	CH_3	0,80; s	4, 5, 6, 10		
25	17,5	CH_3	0,82; s	8, 9,10, 11		
26	20,2	CH_3	1,16; s	8, 13, 14, 15		
27	15,9	CH_3	0,82; s	12, 18		
28	27,4	CH_3	1,32; s	16, 17,18, 22		
29	74,1	CH_2	3,32 - 3,38; m	19, 20, 30		8, 19α, 21α, 30
30	25,9	CH_3	1,14; s	19, 20, 21, 29		

*$CDCl_3$ + piridina-d_5, **os valores de J são dados em Hz



2.3.4 – Redução de 3-oxo-16β,29-di-hidroxifriedelano (MR14)



P4a

Após 9 h de reação o substrato foi totalmente consumido. O produto obtido foi 3β,16β,29-tri-hidroxifriedelano (**P4a**, 35 mg; 54%). Nas cromatoplacas obtidas por CCD havia uma mancha com Rf menor do que o obtido para **P4a** e, possivelmente, ocorreu a formação de 3α,16β,29-tri-hidroxifriedelano em pequena quantidade, mas não foi possível isolá-lo e caracterizá-lo.

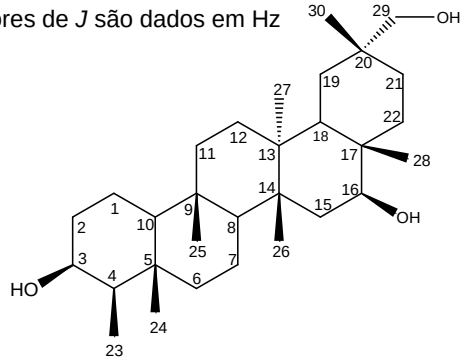
P4a foi obtido como um sólido branco não cristalino. Não foi possível determinar o ponto de fusão, o sólido decompôs antes de fundir e adquiriu coloração amarela a partir de 257 °C. No espectro na região do IV de **P4a** (Figura B51, pág. 215) observou-se uma banda de absorção característica de estiramento da ligação OH de hidroxila em 3362 cm^{-1}. Não se observou nenhuma banda de estiramento da ligação CO de carbonila. No espectro de RMN de ^{1}H de **P4a** (Figura B52, pág. 215) observaram-se dois sinais largos em δ_H 3,37 (2H) e 3,80 (1H) e um tripleto em δ_H 4,10 (1H, *J* = 9,0). Esses sinais são característicos de núcleos de H ligados a carbono hidroxilado. No espectro de RMN de ^{13}C e subespectro DEPT135 de **P4a** (Figuras B53 e B54, pág. 216) observaram-se sinais característicos de núcleos de carbono hidroxilado em δ_C 71,6 (CH), 74,5 (CH_2) e 74,6 (CH). Esses dados de RMN permitiram confirmar que houve redução da carbonila na posição 3. Procedeu-se a uma análise dos espectros de RMN 1D e 2D (Figuras B55 a B59, pág. 217 a 219) de **P4a** para atribuir todos os valores de deslocamentos químicos de ^{1}H e ^{13}C, uma vez que o 3β,16β,29-tri-hidroxifriedelano é um composto inédito na literatura. Os dados de RMN 1D e 2D de **P4a** estão descritos na Tabela 21, pág. 114. A fórmula molecular de **P4a**, $C_{30}H_{52}O_3$, foi confirmada por HR-APCI-MS. No espectro de massas de **P4a**

(Figura B60, pág. 219) observou-se o pico *m/z* 425,3692 referente ao cátion $[M+H-2H_2O]^+$ (*m/z* calc. 425,3778).

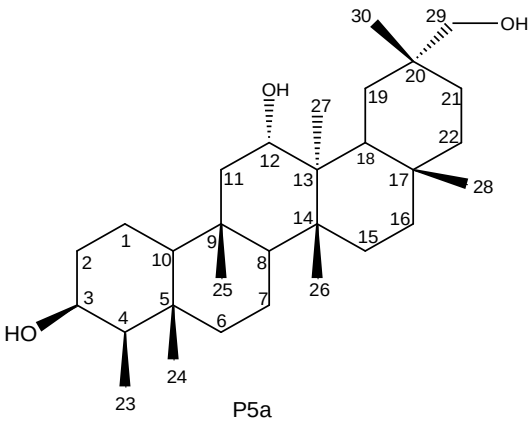
Tabela 21: Dados de RMN 1D e 2D (400 MHz) de **P4a**

Nº	*δ_C	Tipo de carbono	**δ_H	HMBC	COSY	NOESY
1	16,1	CH_2	1,44 ax (β) 1,70 eq (α)		10	24, 25 1
2	35,7	CH_2	1,98 1,60		1α, 1β	2
3	71,6	CH	3,80; sl, α		2α, 2β, 4	2, 4, 6α
4	49,6	CH	1,27 α		23	10, 23
5	38,2	C				
6	41,9	CH_2	1,03 ax (α) 1,79 eq (β)			6α, 7
7	17,9	CH_2	1,46 α e β			
8	53,6	CH	1,34 ax (α)			6α, 10
9	37,2	C				
10	61,6	CH	0,95 ax (α)			
11	35,8	CH_2	1,47 1,15			
12	30,9	CH_2	1,29 1,40			
13	40,1	C				
14	39,3	C				
15	44,4	CH_2	1,87 α 1,43 β	8, 16, 17, 26 13, 16, 26	15β	
16	74,6	CH	4,10; t, α, *J* = 9,0	17, 22, 28	15α, 15β	15α, 22β, 27
17	36,5	C				
18	44,2	CH	1,81 β		19	
19	30,4	CH_2	1,60 1,24			19
20	33,2	C				
21	27,6	CH_2	1,40 1,62			
22	36,5	CH_2	1,43 1,71			
23	12,0	CH_3	1,00; d; *J* = 7,0	3, 4, 5		
24	16,6	CH_3	1,08; s	4, 5, 6, 10		
25	18,5	CH_3	0,89; s	8, 9,10, 11		
26	21,3	CH_3	1,11; s	8, 13, 14, 15		25
27	20,1	CH_3	0,99; s	12, 13, 14, 18		
28	25,4	CH_3	1,33; s	16, 17,18, 22		
29	74,5	CH_2	3,37; sl	19, 20, 21, 30		21, 30
30	25,8	CH_3	1,13; s	19, 20, 21, 29		

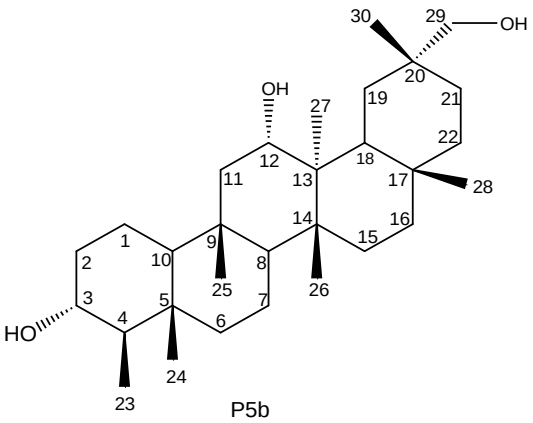
*$CDCl_3$ + piridina-d_5, **os valores de *J* são dados em Hz



2.3.5 – Redução de 3-oxo-12α,29-di-hidroxifriedelano (MR16)



P5a



P5b

Após 8 h de reação o substrato foi totalmente consumido. O produto majoritário obtido foi 3β,12α,29-tri-hidroxifriedelano (**P5a**, 25 mg; 50%) e o produto minoritário 3α,12α,29-tri-hidroxifriedelano (**P5b**, 6 mg; 12%). A reação foi estereosseletiva, **P5a** e **P5b** foram obtidos na proporção 81/19, aproximadamente, e o excesso diastereoisomérico foi 62%.

P5a foi obtido como um sólido branco não cristalino. Não foi possível determinar o ponto de fusão, o sólido decompôs antes de fundir e adquiriu coloração amarela a partir de 260 °C. No espectro na região do IV de **P5a** (Figura B61, pág. 220) observou-se uma banda de absorção em 3362 cm^{-1}, característica de estiramento da ligação OH de hidroxila. Não se observou nenhuma banda de estiramento da ligação CO de carbonila. No espectro de RMN de ^{1}H de **P5a** (Figura B62, pág. 220) observaram-se dois dupletos em δ_H 3,17 (1H, *J* = 11,0 Hz) e 3,66 (1H, *J* = 11,0 Hz), sinais referentes aos núcleos de H ligados a C-29. Observaram-se, também, um dupleto duplo em δ_H 3,96 (1H, *J* = 4,1 e 11,1 Hz), sinal referente ao núcleo de hidrogênio ligado a C-12, e um sinal largo em δ_H 3,79 (1H) referente ao núcleo de hidrogênio ligado a C-3. No espectro de RMN de ^{13}C e subespectro DEPT135 de **P5a** (Figuras B63 e B64, pág. 221) observaram-se sinais característicos de núcleos de carbono hidroxilados em δ_C 71,2 (CH), 71,5 (CH_2) e δ_C 71,9 (CH). Não se observou sinal referente a núcleo de carbono carbonílico. Procedeu-se a uma análise dos espectros de RMN 1D e 2D de **P5a** (Figuras B65 a B70, pág. 222 a 224) para a atribuição inequívoca dos valores de

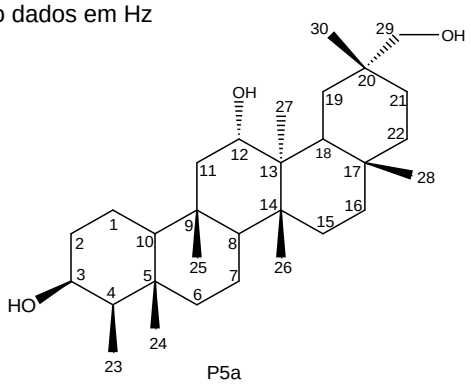
deslocamentos de ^{1}H e ^{13}C, pois **P5a** trata-se de um composto inédito na literatura. Os dados de RMN 1D e 2D de **P5a** estão descritos na Tabela 22, pág. 117. A fórmula molecular de **P5a**, $C_{30}H_{52}O_3$, foi confirmada por HR-APCI-MS. No espectro de massas de **P5a** (Figura B71, pág. 225) observou-se o pico *m/z* 425,3720 referente ao cátion $[M+H-2H_2O]^+$ (*m/z* calc. 425,3778).

P5b foi obtido como um sólido branco não cristalino. Não foi possível medir o ponto de fusão, o sólido decompôs antes de fundir e adquiriu coloração amarela a partir de 220 °C. No espectro na região do IV de **P5b** (Figura B72, pág. 225) observou-se uma banda de absorção em 3420 cm^{-1}, característica de estiramento da ligação OH de hidroxila. Não se observou nenhuma banda de estiramento da ligação CO de carbonila. No espectro de RMN de ^{1}H de **P5b** (Figura B73, pág. 226) observaram-se dois dupletos em δ_H 3,11 (1H, *J* = 11,0 Hz) e 3,65 (*J* = 11,0 Hz), sinais referentes aos núcleos de H ligados a C-29, e um dupleto duplo em δ_H 3,92 (*J* = 4,3 e 11,0 Hz), sinal referente ao núcleo de hidrogênio ligado a C-12. Observou-se, também, um multipleto centrado em δ_H 3,36 (1H) referente ao núcleo de H ligado a C-3. No espectro de RMN de ^{13}C e subespectro DEPT135 de **P5b** (Figuras B74 e B75, pág. 226 e 227) observaram-se os sinais em δ_C 71,2 (CH), 71,7 (CH_2) e δ_C 72,2 (CH), característicos de núcleos de carbono hidroxilado. Não se observou sinal referente a núcleos de carbono carbonílico. Procedeu-se a uma análise dos espectros de RMN 1D e 2D de **P5b** (Figuras B76 a B80, pág. 227 a 229) para atribuição inequívoca dos valores de deslocamentos químicos de ^{1}H e ^{13}C para o 3α,12α,29-tri-hidroxifriedelano, um composto inédito na literatura. Os dados de RMN 1D e 2D de **P5b** estão descritos na Tabela 23, pág. 118. No espectro de massas de **P5b** (Figura B81, pág. 230) observou-se o pico *m/z* 425,3739 referente ao cátion $[M+H-2H_2O]^+$ (*m/z* calc. 425,3778).

Tabela 22: Dados de RMN 1D e 2D (400 MHz) de **P5a**

Nº	*δ_C	Tipo de carbono	**δ_H	HMBC	COSY	NOESY
1	16,0	C H_2	1,70 ax (β) 1,39 eq (α)		1α, 10	
2	35,4	CH_2	0,94 eq (β) 1,95 ax (α)		2β, 1α	1α, 2α, 6α, 8, 23
3	71,2	CH	3,79; sl, α	1, 5	2α, 2β	
4	51,3	CH	1,27 α	23	23	
5	37,7	C				
6	41,5	CH_2	1,76 eq (β) 0,98 ax (α)	4, 5, 24	6α, 7	
7	17,4	CH_2	1,39 α, β		6α	
8	49,2	CH	1,21 ax (α)	25, 13		10
9	37,5	C				
10	61,3	CH	0,92 ax (α)	1, 2, 25		
11	46,9	CH_2	1,25 ax (α) 1,76 eq (β)	12, 13		11α
12	71,9	CH	3,96 β, dd J = 4,2 e 11,0	18, 27	11β, 11α	11β, 18, 26
13	44,6	C				
14	40,8	C				
15	31,5	CH_2	1,33 eq (β) 1,49 ax (α)	17 14,16, 17		16α
16	38,1	CH_2	0,94 eq (α) 1,72 ax (β)		16	16α, 15β, 28
17	31,0	C				
18	44,0	CH	1,96 β	12, 13, 14, 17, 20, 22, 27, 28		
19	31,4	CH_2	2,31 ax (β) 1,86 eq (α)		19α, 28	19α, 28
20	33,1	C				
21	29,4	CH_2	1,27 ax (β) 1,37 eq (α)			
22	35,7	CH_2	1,72 α, β			
23	11,7	CH_3	1,00; d; J = 7,1	3, 4, 5		
24	19,3	CH_3	0,95; s	4, 5, 6, 10		
25	16,2	CH_3	1,06; s	8, 9,10, 11		
26	18,5	CH_3	0,97; s	8, 13, 14, 15		
27	11,3	CH_3	1,17; s	12,13,14,18		
28	31,5	CH_3	1,19; s	16, 17,18, 22		
29	71,5	CH_2	3,17a; d; J = 11,0 3,66b; d; J = 11,0	19, 20, 21, 30	29a	21α, 30 27
30	28,8	CH_3	1,06; s	19, 20, 21, 29		

*$CDCl_3$ + piridina-d_5, **os valores de J são dados em Hz

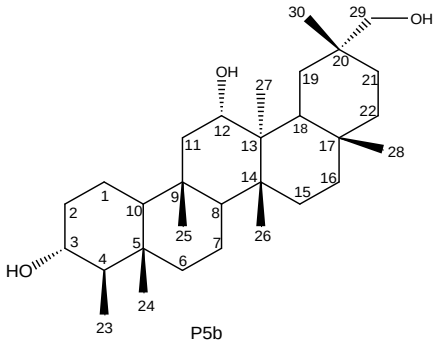


P5a

Tabela 23: Dados de RMN 1D e 2D (400 MHz) de **P5b**

Nº	*δ_C	Tipo de carbono	**δ_H	HMBC	COSY	NOESY
1	19,9	CH_2	1,30 ax (β) 1,56 eq(α)		10	1
2	36,7	CH_2	2,09 eq (β) 1,29 ax (α)		1β	10
3	71,2	CH	3,34 - 3,39; m, β		2α, 2β, 4	1β ,2β, 23, 24
4	53,3	CH	1,07 ax (α)		23	23
5	37,9	C				
6	41,3	CH_2	1,76 ax (α) 1,04 eq (β)		7	6, 10
7	18,0	CH_2	1,41 α, β			
8	51,2	CH	1,24 α			
9	38,0	C				
10	60,1	CH	0,94 ax (α)			
11	47,0	CH_2	1,23 eq (β) 1,66 ax (α)			11
12	72,2	CH	3,92 β, dd J = 4,3 e 11,0	18, 27	11α, 11β	18, 26, 25
13	44,8	C				
14	41,1	C				
15	29,8	CH_2	1,27 eq (β) 1,38 ax (α)		16	
16	38,2	CH_2	0,93 eq (α) 1,73 ax (β)		15	16α, 15β, 28
17	31,3	C				
18	44,3	CH	1,93 β	12, 13, 16, 17, 19, 20, 27	19	26, 28
19	31,6	CH_2	2,23 ax (β) 1,75 eq (α)	13, 17, 20, 29, 30 13, 17, 18, 20, 29, 30	18, 19	19α, 28
20	33,4	C				
21	31,7	CH_2	1,40 α, β			
22	36,0	CH_2	1,50 α, β			
23	10,1	CH_3	0,94; d; J = 5,8	3, 4, 5		
24	14,5	CH_3	0,76; s	4, 5, 6, 10		
25	19,4	CH_3	0,88; s	8, 9,10, 11		
26	18,6	CH_3	0,95; s	8, 13, 14, 15		
27	11,6	CH_3	1,13; s	12,13,14,18		
28	31,8	CH_3	1,17; s	16, 17,18, 22		
29	71,6	CH_2	3,11; d; J = 11,0 3,65; d; J = 11,0	19, 20, 21, 30		30 27
30	29,9	CH_3	1,01; s	19, 20, 21, 29		

*$CDCl_3$ + piridina-d_5, **os valores de J são dados em Hz



P5b

3 – ESTUDO DA ATIVIDADE BIOLÓGICA

3.1 – Introdução Geral

Alguns extratos e compostos obtidos a partir de folhas e galhos de *Maytenus robusta* foram submetidos aos seguintes estudos de atividade biológica:

- citotoxicidade *in vitro*;
- atividade anti-inflamatória;
- atividade antimicrobiana (antibacteriana, antifúngica e leishmanicida);
- atividade de inibição da enzima acetilcolinesterase.

Nos testes realizados não foram avaliadas as atividades de todos os extratos e compostos obtidos a partir de *M. robusta*, uma vez que os ensaios foram realizados de acordo com a disponibilidade dos laboratórios parceiros. Assim, muitas substâncias ainda não haviam sido isoladas e/ou caracterizadas, e por isso não foram enviadas para os estudos de atividade biológica.

As estruturas dos compostos testados estão apresentadas no Apêndice C (pág. 231).

3.2 – Teste de Citotoxicidade *in vitro*

3.2.1– Introdução

O câncer é uma doença relacionada à proliferação incontrolada de células e à perda de padrões normais de comportamento celular. Estima-se que, em 2016, apenas no Brasil ocorrerão cerca de 600 mil novos casos de câncer. O câncer de pele não melanoma (para ambos os sexos), o de próstata e o de mama serão os principais tipos da doença que acometerão os brasileiros (INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER, 2015). A descoberta de novos fármacos anticancerígenos pode contribuir para a cura ou o aumento da expectativa de vida dos pacientes afetados pela doença.

Metabólitos secundários de organismos terrestres e aquáticos podem apresentar utilidade no tratamento de doenças e serem promissores tanto em suas formas naturais quanto como protótipos para a química medicinal (VALLI et al., 2012). O paclitaxel (taxol) e os alcaloides vincristina e vimblastina (Figura 69) são exemplos clássicos de fármacos anticancerígenos descobertos a partir de plantas.

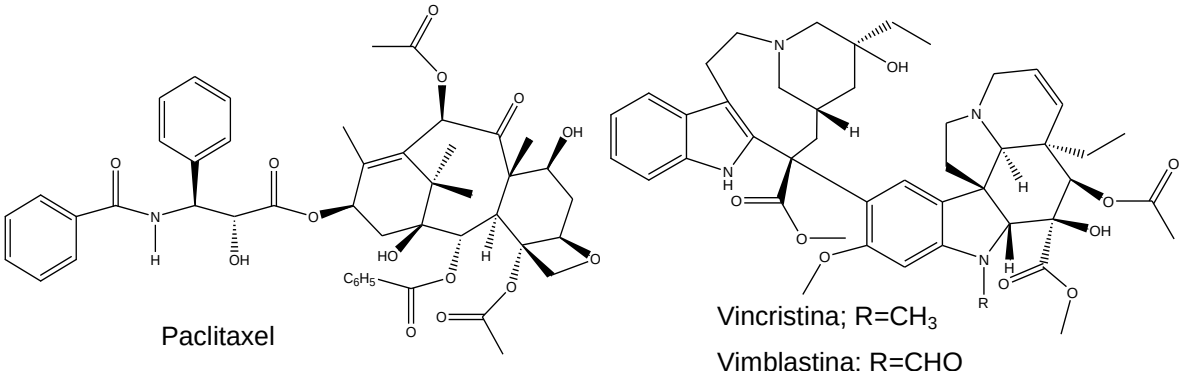


Figura 69: Estrutura do paclitaxel, vincristina e vimblastina.

Vários triterpenos pentacíclicos (Figura 70, pág. 121) foram relatados na literatura como potenciais agentes antitumorais. Entre eles, o ácido maslínico apresenta significativa atividade contra células humanas de câncer de colo Caco-2 (REYES-ZURITA et al., 2013). O ácido acetil aleuritólico é ativo contra células cancerígenas do sistema nervoso central (REYES et al., 2010). Os compostos ácido 3β,23-epoxi-friedelan-28-óico e ácido 3-oxo-friedelan-28-óico mostraram efeito antiproliferativo em células leucêmicas humanas HL-60 (LI et al., 2010). Os derivados semi-sintéticos do ácido oleanóico, bardoxolone e metil bardoxolone foram avaliados como fármacos anticancerígenos de administração intravenosa e oral, respectivamente, em pacientes com metástase (MOSES et al., 2013). Além disso, triterpenos pentacíclicos da série dos lupanos e seus derivados semi-síntéticos são conhecidos por apresentarem atividade citotóxica contra diferentes linhagens de células tumorais (CSUK et al., 2012; SOROKINA et al., 2013; WU et al., 2013; CSUK et al., 2011). Martucciello e colaboradores (2010) relataram que o triterpeno pentacíclico 3-oxo-friedelano apresenta atividade antiproliferativa e pro-apopitótica contra células de sarcoma de Kaposi.

Diante do exposto, os triterpenos pentacíclicos de esqueleto friedelânico **MR01**, **MR02**, **MR09**, **MR10**, **MR12** e **MR14** (Figura 71, pág. 122) foram submetidos ao teste de atividade citotóxica *in vitro* contra células tumorais 4T1 (carcinoma mamário murino). Essas células são altamente tumorigênicas e invasivas. Os experimentos foram realizados em colaboração com o Professor Dr Daniel Crístian Ferreira Soares, da Universidade Federal de Itajubá, Campus Itabira.

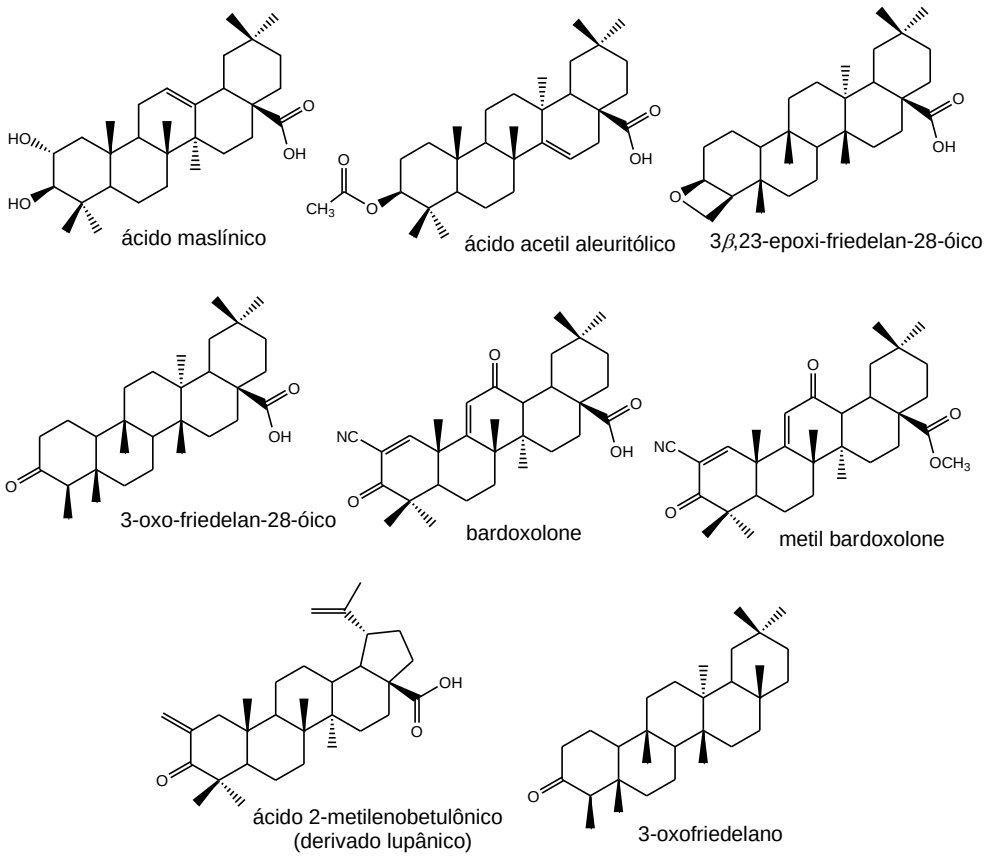


Figura 70: Alguns triterpenos pentacíclicos com atividade citotóxica.

3.2.2– Metodologia

O meio essencial de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM), meio de cultura celular Gibco®, foi utilizado para manter as células metastáticas de câncer de mama murino 4T1 (obtidas da *American Type Culture Collection*). Essas células foram descongeladas, submetidas à replicação, e, depois de terem atingido uma confluência adequada, foram colocadas em três placas de

microtitulação de 96 poços, em um total de 120.000 células. Os triterpenos foram solubilizados e diluídos utilizando uma mistura aquecida de DMSO/EtOH 1:9 até atingirem concentrações que variaram de 1 x 10^{-3} a 1 x 10^{-7} mol/L. Em um volume de 100 μL, as células foram tratadas com solução de triterpeno, por 48 h em DMEM suplementado com bicarbonato de sódio (3,7 g/L), penicilina (5000 UI/mL) e soro fetal bovino estéril 10%. A cultura foi mantida a 37 °C em uma atmosfera humidificada contendo 5% de CO_2. O experimento foi realizado em quintuplicata para uma avaliação estatística adequada. A viabilidade celular foi avaliada através do método MTT (brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio), o qual se baseia na medida da atividade da enzima desidrogenase mitocondrial. Essa enzima quando ativa é capaz de metabolizar o reagente MTT em um composto colorido denominado formazan. Os resultados foram traçados com base na percentagem de morte celular em função da concentração molar de triterpeno (Figura 72, pág. 123). Utilizou-se o software Prism 6.0 para o tratamento dos dados. Um modelo de regressão não-linear (curva de dose-resposta sigmoidal) foi utilizado para determinar os valores de IC_{50}. Células 4T1 tratadas com 2% de Triton X-100 foram usadas como controle positivo de danos às celulas 4T1. Para o controle negativo, as células foram tratadas com solução de MTT adicionada a 100 μL de meio. A análise espectrofotométrica foi realizada em um leitor de ELISA a uma absorvância de 600 nm.

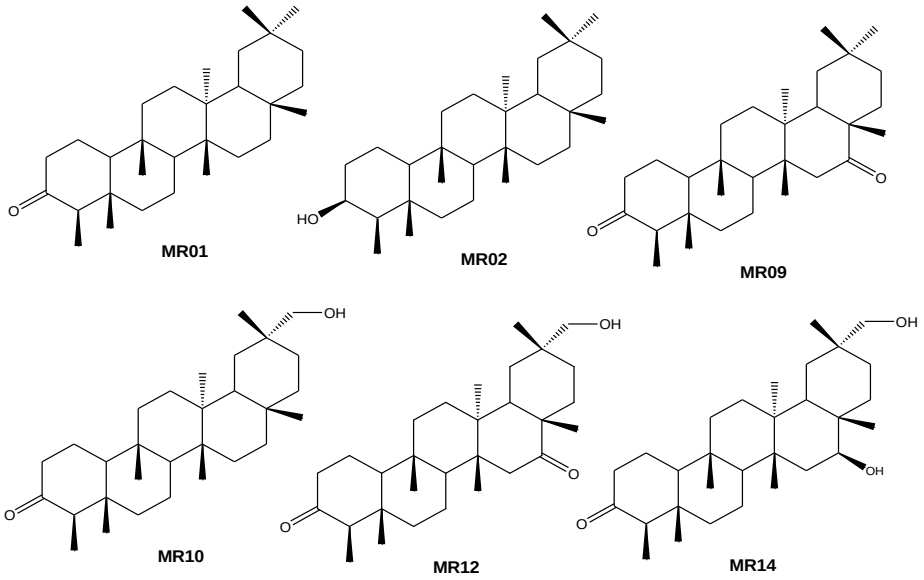


Figura 71: Estrutura dos compostos submetidos ao teste de atividade citotóxica.

3.2.3 – Resultados e discussão

Todos os compostos testados apresentaram atividade citotóxica. Os resultados estão apresentados na Figura 72 e na Tabela 24, pág. 124. **MR14** foi mais efetivo que os outros compostos e apresentou concentração inibitória média (IC_{50}) de 1,23 μmol/L. Em um estudo conduzido por Lu e colaboradores (2008), células tumorais 4T1 foram tratadas com doxorrubicina e a IC_{50} observada foi de 3,27 μmol/L. **MR14** apresentou IC_{50} de 1,23 μmol/L, esse valor é 2,6 vezes menor do que a IC_{50} induzida pela doxorrubicina em células 4T1. Considerando que as células testadas em ambos os trabalhos provêm de uma mesma linhagem e que a doxorubicina é um fármaco amplamente utilizado na terapia humana do câncer, pode-se inferir que **MR14** é um potencial agente antitumoral. Para **MR12** e **MR10** também se observou significativa atividade citotóxica contra células 4T1, os valores de IC_{50} foram 9,8 μmol/L e 11,0 μmol/L, respectivamente.

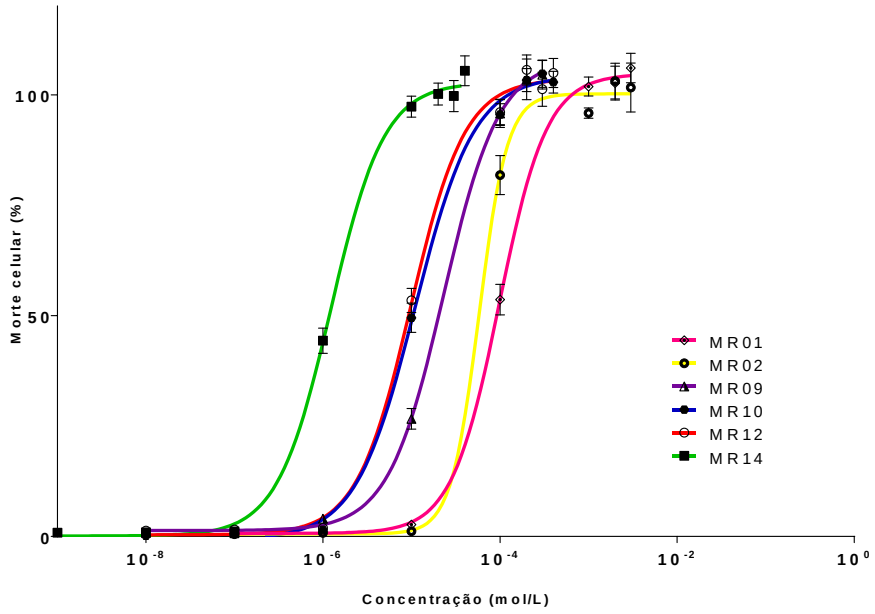


Figura 72: Curvas representativas da sobrevivência de células 4T1 *versus* o log da concentração molar dos compostos testados. O valor de IC_{50} foi determinado através de regressão não linear (n = 5).

Tabela 24: Valores de IC_{50} para a inibição do crescimento de células 4T1

Composto	IC_{50} (μmol/L)
MR01	98,10
MR02	58,10
MR09	23,10
MR10	11,00
MR12	9,80
MR14	1,23

MR01, **MR02**, **MR09**, **MR10**, **MR12** e **MR14** possuem em comum um esqueleto triterpênico do tipo friedelânico. O composto com maior capacidade citotóxica (**MR14**) possui uma carbonila ligada ao carbono 3, uma hidroxila ligada ao carbono 16 e outra ligada a C-29. **MR12**, que apresentou atividade citotóxica aproximadamente dez vezes menor que **MR14**, difere deste somente por apresentar uma carbonila em C-16 ao invés de uma hidroxila, sugerindo que no sítio de ação uma provável ligação de hidrogênio entre a hidroxila e o sítio ativo contribui para uma maior atividade citotóxica do que uma ligação mais fraca do tipo dipolo-dipolo possivelmente estabelecida entre o grupo carbonila de **MR12** e o sitio ativo.

Essa discussão pode ser ampliada comparando-se as atividades de **MR14** e **MR10**, que diferem entre si somente pela substituição da hidroxila em C-16 por um átomo de hidrogênio, respectivamente. Nesse caso, o grupo metilênico não permite o estabelecimento de ligação de hidrogênio com o sítio ativo, conferindo, portanto, uma atividade citotóxica cerca de 10 vezes menor do que aquela observada para **MR14** que possui um grupo hidroxila em C-16.

A atividade citotóxica dos compostos testados sob as células 4T1 parece também estar relacionada com C-29. **MR09** difere de **MR12** por apresentar um átomo de hidrogênio em C-29 ao invés do grupo hidroxila observado em **MR12**. Uma possível ligação de hidrogênio do grupo hidroxila (**MR12**) e o sítio ativo permitiu uma melhoria na atividade citotóxica da ordem de 10 vezes em relação a **MR09**. Por fim, **MR01** difere de **MR14** por apresentar as hidroxilas em C-16 e C-

29 substituídas por átomos de hidrogênio. Esta configuração reduz a atividade citotóxica em cerca de 100 vezes.

De acordo com os resultados obtidos, pode-se inferir que hidroxilas ligadas a C-16 e C-29 contribuem para o aumento da citotoxicidade de triterpenos com esqueleto friedelânico sob células 4T1. Além disso, grupo hidroxila ligado a C-3 também contribui para o aumento da citotoxicidade. **MR02** difere de **MR01** por apresentar uma hidroxila ligada a C-3 ao invés de uma carbonila. **MR02** foi aproximadamente duas vezes mais potente do que **MR01**, indicando que um aumento no volume dessa região da molécula ou uma possível ligação de hidrogênio com o sítio ativo contribui para o aumento da atividade citotóxica.

Em um estudo (MARTUCCIELLO et al., 2010) no qual avaliou-se a atividade antitumoral de 3-oxofriedelano (**MR01**) empregando uma linhagem celular de sarcoma de Kaposi, concluiu-se que o composto apresenta atividade antiproliferativa e pró-apopitótica relacionada à ativação da enzima caspase-3. Embora a linhagem celular testada no trabalho citado seja diferente da utilizada no teste com os compostos isolados de *Maytenus robusta*, ambos os estudos avaliaram o mesmo triterpeno. Assim, os compostos **MR01**, **MR02**, **MR09**, **MR10**, **MR12** e **MR14** possivelmente também apresentam atividade antiproliferativa e pró-apopitótica relacionada à ativação da enzima caspase-3. Os resultados obtidos no presente estudo juntamente com estudos mais detalhados dos mecanismos de morte celular (necrose e apoptose) podem contribuir para uma avaliação mais adequada das potencialidades desses compostos no tratamento do câncer.

3.3 – Avaliação da Atividade Anti-inflamatória: Edema de Pata Induzido por Carragenina

3.3.1– Introdução

A inflamação é uma função crucial e necessária do sistema imunológico inato, pois protege o hospedeiro contra patógenos e inicia as respostas de imunidade específicas. Assim, a inflamação é um processo complexo e geralmente associado à dor (LONGHI-BALBINOT et al., 2012). O processo

inflamatório inclui uma série de fenômenos que podem ser desencadeados por diversos estímulos tais como agentes infecciosos, isquemia, interações antígeno-anticorpo, e lesões térmicas ou físicas de outra natureza. O estímulo provoca o desencadeamento de uma resposta, que a nível macroscópico leva aos sinais e sintomas característicos da inflação: calor, rubor, edema e dor (ROBERTS II E MORROW, 2005).

As doenças inflamatórias são tratadas empregando anti-inflamatórios esteroidais e anti-inflamatórios não esteroidais. Os agentes anti-inflamatórios não esteroidais são os mais prescritos para o tratamento de várias doenças inflamatórias. A atividade desses fármacos é mediada, principalmente, pela inibição da biossíntese de prostaglandinas, que exercem uma variedade de efeitos sobre os vasos sanguíneos, as terminações nervosas e as células envolvidas na inflamação. A via da ciclo-oxigenase do metabolismo do araquidonato produz prostaglandinas. Os anti-inflamatórios não esteroidais atuam nessa via inibindo as isoformas da ciclo-oxigenase (COX-1 e COX-2), o que resulta em diminuição da dor e interrupção do processo responsável pela lesão tecidual (WAGNER et al., 2005).

A toxicidade gastrointestinal, renal e cardiovascular associadas aos anti-inflamatórios não esteroidais limitam seus usos (MAKHIJA et al., 2013). O uso dos esteroides, também, está associado a uma série de efeitos adversos resultantes de suas ações hormonais que ocasionam efeitos metabólicos (CHROUSOS, 2005). Diante disso, existe um grande interesse na descoberta de novos anti-inflamatórios. O estudo de produtos naturais pode levar a obtenção de novos fármacos dessa classe (SOUZA et al., 2014).

Alguns triterpenos pentacíclicos apresentam atividade anti-inflamatória (Figura 73, pág. 128). A friedelina foi relatada com o efeito de inibir a síntese ou a liberação de mediadores da inflamação (ANTONISAMY et al., 2011). O 3β,6β,16β-tri-hidroxilup-20(29)-eno apresentou significativo efeito antinociceptivo e anti-inflamátorio em um modelo, em camundongos, de nocicepção visceral induzida por ácido acético e peritonite causada por carragenina (LONGHI-BALBINOT et al., 2012). Também foi relatada atividade anti-inflamatória para os triterpenos lupeol, betulina, ácido oleanoico e ácido ursólico (NSONDE-NTANDOU et al., 2010) (Figura 73, pág. 128).

Os triterpenos pentacíclicos de esqueleto friedelânico **MR09**, **MR10**, **MR12** e **MR14** (Figura 74, pág. 128) e os extratos **EMF** e **EMG** foram submetidos ao teste de atividade anti-inflamatória empregando o estudo de edema de pata em camundongos. Nesse teste utiliza-se o agente inflamatório carragenina, o qual estimula a expressão de enzimas relacionadas à formação de metabólitos que contribuem para a ocorrência do processo inflamatório, incluindo a COX-2 (MOHSIN E KURUP, 2011). Os experimentos foram realizados no Laboratório de Fitoquímica e Química Medicinal da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Alfenas, em colaboração com a Professora Dra Danielle Ferreira Dias.

3.3.2– Metodologia

Os triterpenos testados foram suspensos em solução de carboximetilcelulose (CMC; 0,5% p/V). A indometacina, empregada como controle positivo, foi solubilizada em tampão TRIS e solução salina na proporção 1:1.

Foram utilizados camundongos Swiss (25-35g) obtidos no biotério da Universidade Federal de Alfenas (UNIFAL-MG) e concedidos após aprovação do trabalho pelo Comitê de Ética dessa Instituição (Protocolo CEUA 561/2014). Os animais foram tratados com ração comercial e água "*ad libitum*", durante todo o experimento, garantida sua adaptação por sete dias em sala climatizada a 23 ± 2 ºC, com ciclo claro-escuro de 12 h, e em caixas de polipropileno adequadas à sua manutenção. Ao término dos experimentos, os animais foram sacrificados por inalação de isoflurano.

O edema de pata foi induzido pela injeção de 40 µL de carragenina (2% p/v) em salina estéril, administrada na região subplantar da pata direita de camundongos swiss machos (n = 6). Uma hora antes da injeção de carragenina os animais foram tratados por via oral com os triterpenos (**MR09**, **MR10**, **MR12** e **MR14**, Figura 74, pág. 128) nas doses de 10 e 20 mg/Kg, ou com os extratos (**EMF** e **EMG**) nas doses de 30, 100 e 300 mg/Kg, ou indometacina (10 mg/kg), ou veículo (10 mL/kg). O volume da pata direita do animal foi determinado antes da administração da carragenina, e após uma, duas, três e quatro horas da administração da carragenina, pela imersão da pata até a região tíbio-társica, com o uso de um pletismômetro.

Os resultados foram apresentados através da média e erro padrão da média. Análise de variância (ANOVA) seguida do teste Newman-Keuls foram utilizados para medir o grau de significância ($p < 0,05$).

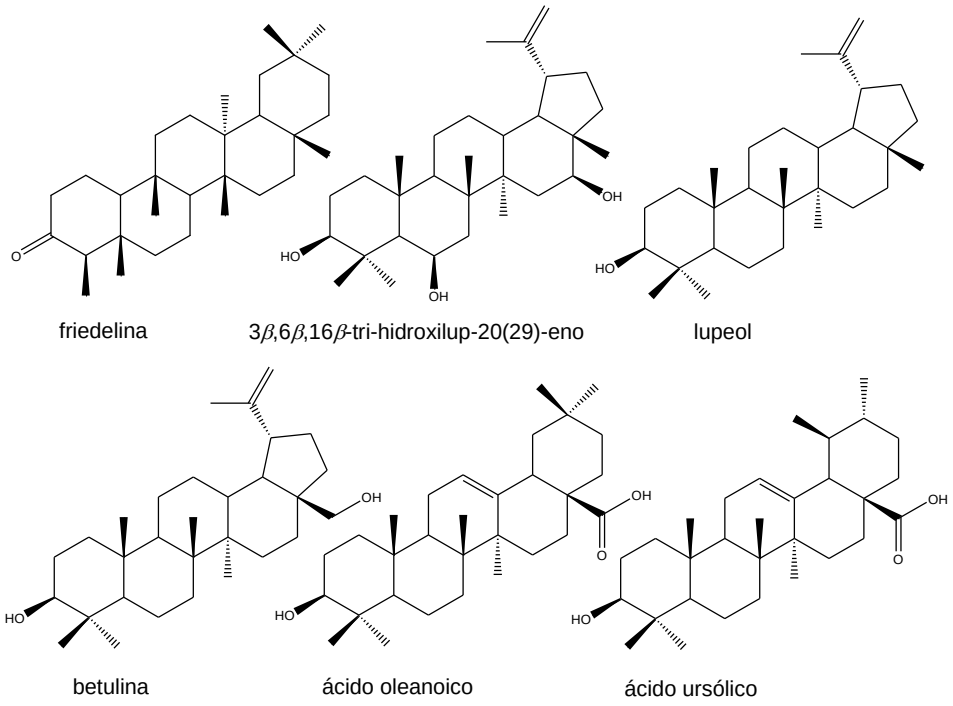


Figura 73: Alguns triterpenos pentacíclicos com atividade anti-inflamatória.

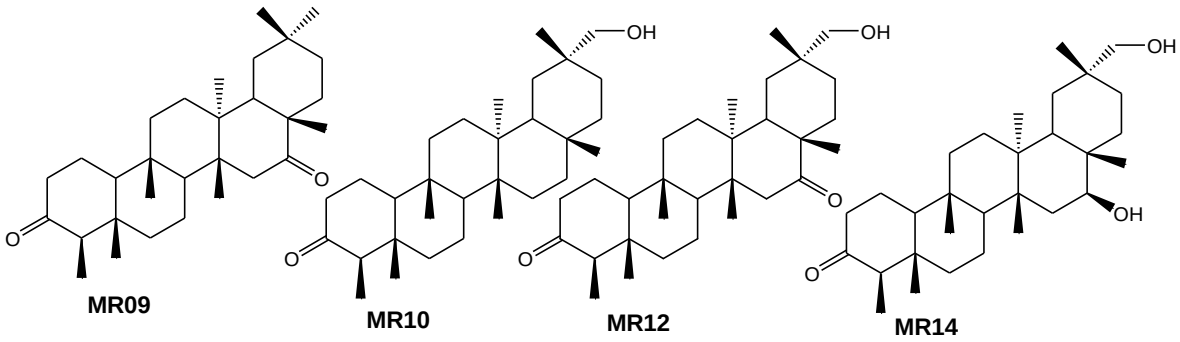


Figura 74: Estrutura dos compostos submetidos ao teste de atividade anti-inflamatória.

3.3.3 – Resultados e discussão

A resposta edematogênica está relacionada ao processo inflamatório, decorrente do aumento da permeabilidade vascular associada à ação dos

mediadores liberados (SCHOTTENFELD E BEEBE-DIMMER, 2006). A carragenina é um polissacarídeo extraído de algas, que induz resposta inflamatória local mensurável. É o modelo de edema de pata mais utilizado para se avaliar o efeito anti-inflamatório de drogas. Apresenta duas fases inflamatórias e uma terceira não característica. Na primeira hora, logo após injeção da carragenina, há aumento da permeabilidade vascular mediada por histamina e serotonina. Na segunda hora, o aumento da permeabilidade é resultado da liberação de cininas. Na terceira hora, o aumento da permeabilidade vascular ocorre devido à ação das prostaglandinas (DI ROSA et al., 1971).

Na Tabela 25 pág. 130 e Figura 75, pág. 131 estão apresentados os resultados do edema induzido por carragenina. O extrato **EMG** foi mais ativo que **EMF**, pois apresentou atividade em menores concentrações. **EMF** foi ativo na dose de 300 mg/Kg na terceira e quarta hora. O **EMG** foi ativo em todas as doses na terceira e quarta hora. **EMF** e **EMG** foram analisados por cromatografia em camada delgada empregando NP/PEG e luz UV como reveladores. **EMF** apresentou várias manchas fluorescentes características de flavonoides e **EMG** não apresentou tais manchas. O fracionamento de **EMF** por cromatografia levou ao isolamento e identificação de três flavonoides. De acordo com Nijveldt e colaboradores (2001), alguns compostos dessa classe apresentam atividade anti-inflamatória. Assim, os flavonoides presentes em **EMF** podem estar relacionados com sua ação anti-inflamatória.

Entre os triterpenos friedelanos testados, **MR10** e **MR14** foram capazes de reduzir significativamente o edema produzido por carragenina na terceira hora e na dose de 20 mg/Kg, onde observa-se o máximo de efeito do agente inflamatório. A redução do edema na terceira hora está relacionada com um mecanismo de ação baseado no envolvimento de metabólitos do ácido araquidônico (DI ROSA et al., 1971). De acordo com essas observações, pode-se supor que **MR10** e **MR14** foram capazes de inibir a síntese de prostaglandinas, indicando ação anti-edematogênica. **MR10** e **MR14** apresentaram 42 e 57% de inibição ($p<0,05$), respectivamente. Entretanto, o efeito antiedematogênico desses compostos foi inferior ao observado para o fármaco de referência indometacina (81%, $p<0,001$), utilizado na dose de 10 mg/Kg. **MR09**, **MR12** e **MR14** apresentaram atividade na quarta hora em ambas as doses, porém **MR09** e **MR12**

não foram ativos na terceira hora, fase onde observa-se o máximo de efeito do agente inflamatório empregado no ensaio (carragenina).

Tabela 25: Percentual de inibição do volume da pata nos tempos de medição em relação ao controle negativo (P<0,05) no teste de edema induzido por carragenina

Tratamento	% inibição			
	1h	2h	3h	4h
EMF 30 mg/Kg	-	-	-	-
EMF 100 mg/Kg	-	-	-	44*
EMF 300 mg/Kg	-	-	43**	55**
EMG 30 mg/Kg	-	-	74***	81***
EMG 100 mg/Kg	-	-	63***	80***
EMG 300 mg/Kg	-	-	64***	69***
MR09 10 mg/Kg	-	-	-	71***
MR09 20 mg/Kg	-	-	-	68***
MR10 10 mg/Kg	-	-	-	-
MR10 20 mg/Kg	-	-	42*	-
MR12 10 mg/Kg	-	-	-	75***
MR12 20 mg/Kg	-	-	-	77***
MR14 10 mg/Kg	-	-	-	59**
MR14 20 mg/Kg	-	-	57*	61**
Indometacina 10 mg/Kg	-	-	81***	79***

*p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001

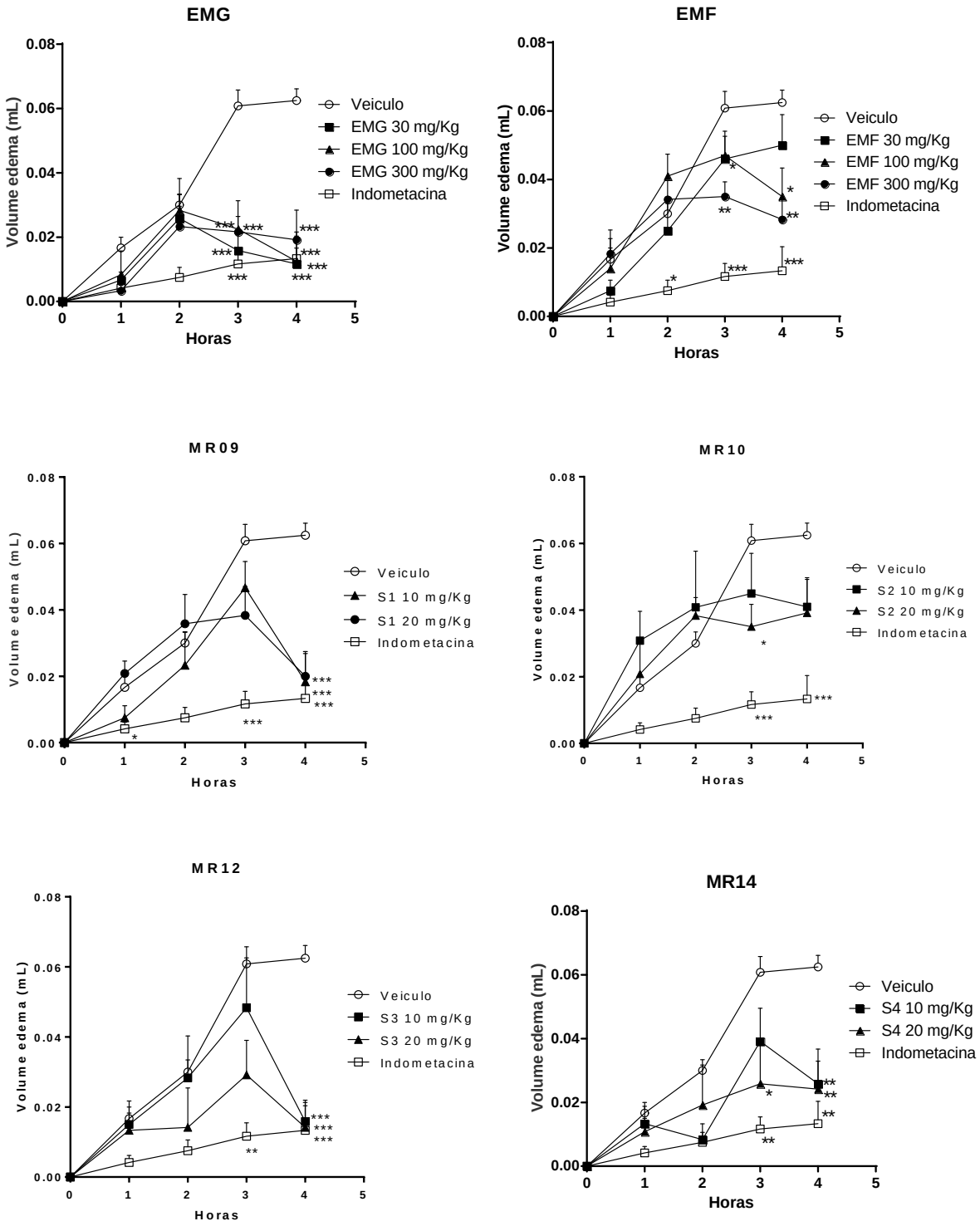


Figura 75: Edema de pata induzido por carragenina (2%; 0,04 mL, i.pl.). Grupo controle negativo tratado com veículo (10 mL/Kg), grupo controle positivo tratado com indometacina 10 mg/Kg, **EMF** e **EMG** (30, 100 e 300 mg); **MR09**, **MR10**, **MR12** e **MR14** (10 e 20 mg). Cada ponto representa média ± EPM (erro padrão da média) de n = 6 animais/ grupo. *** p<0,001; ** p<0,01 * p<0,05.

3.4 – Avaliação da Atividade Antimicrobiana

3.4.1– Introdução

Antimicrobianos são fármacos empregados no tratamento de infecções causadas por bactérias, parasitas, vírus e fungos. Durante várias décadas, a resistência antimicrobiana tem sido uma ameaça crescente para o tratamento efetivo de uma gama cada vez maior de infecções (WHO, 2014). Embora a seleção de micro-organismos resistentes possa ser minimizada com o uso racional de antimicrobianos, esse problema é inevitável (WEBER e COURVALIN, 2005). A resistência de micro-organismos às drogas trata-se de um fenômeno evolutivo natural, o qual é acelerado pela pressão seletiva exercida pelo uso e abuso de antimicrobianos em humanos e animais (WHO, 2014). Assim, a necessidade de novos antimicrobianos é constante (HARBARTH E SAMORE, 2005).

3.4.2– Avaliação das atividades antibacteriana e antifúngica

O número de infecções causadas por bactérias multirresistentes tem aumentado globalmente e infecções intratáveis vêm se tornando uma realidade (BLAIR et al., 2015). O uso de antibióticos é extremamente importante na medicina moderna e está associado à redução da mortalidade infantil e ao aumento da expectativa de vida, além de ser crucial em cirurgias invasivas e em alguns tratamentos como a quimioterapia (BLAIR et al., 2015). A resistência aos antibióticos está se espalhando mais rápido do que a introdução de novos compostos para a prática clínica, provocando uma crise na saúde pública (LING et al., 2015).

As infecções fúngicas invasivas provocam morbidade e mortalidade em pacientes com imunossupressão e estão associadas ao aumento dos custos com a saúde. Doenças fúngicas invasivas estão cada vez mais prevalentes e as espécies dos gêneros *Aspergillus* e *Candida*, ainda, são os maiores responsáveis por essas enfermidades (DRGONA et al., 2014).

Buscando a identificação de novas substâncias com atividade antimicrobiana e antifúngica, extratos e compostos obtidos a partir de folhas de *Maytenus robusta* foram submetidos a testes frente a diferentes micro-organismos. O teste foi realizado pelo grupo da Professora Dra Jacqueline Aparecida Takahashi no Laboratório de Biotecnologia e Bioensaios, do Departamento de Química da Universidade Federal de Minas Gerais. As amostras testadas foram os extratos acetato etílico (**EAG**) e metanólico dos galhos (**EMG**) de *M. robusta*, além dos compostos isolados **MR14**, **MR15**, **MR07** e **MR08**. Os demais compostos puros isolados de folhas e galhos de *M. robusta* não foram avaliados porque não solubilizaram em DMSO na concentração de 12,5 mg/mL.

3.4.2.1– Metodologia

Para a realização dos experimentos foram utilizadas culturas das bactérias *Gram*-positivas *Staphylococcus aureus* (*ATCC* 29212) e *Listeria monocytogenes* (*ATCC* 15313), das bactérias *Gram*-negativas *Pseudomonas aeruginosa* (*ATCC* 27853) e *Citrobacter freundii* (*ATCC* 8090), e do fungo leveduriforme *Candida albicans* (*ATCC* 18804).

Preparou-se uma solução estoque a partir das amostras pesadas e solubilizadas em dimetilsulfóxido (DMSO) (12,5 mg/mL para compostos puros e 50 mg/mL para extratos). Foi preparado um pré-inóculo no qual as bactérias estocadas em tubos de ensaio foram transferidas com alça de platina e inoculadas em tubos de ensaios contendo 3,0 mL de meio de cultura BHI (*Brain Heart Infusion*, Infuso de cérebro e coração). Em seguida, os tubos foram incubados em estufa a 37 ºC por 24 h. Com o auxílio de uma micropipeta, 500 µL do pré-inóculo bacteriano foram transferidos para tubos de ensaios contendo água destilada estéril (inicialmente, 4,0 mL). Os tubos foram homogeneizados e a concentração ajustada a 600 nm até atingir uma transmitância entre 74-75% (correspondente a 0,5 da escala de McFarland de turbidez padrão, ou seja, 10^8 bactérias/mL), obtendo-se assim, os inóculos bacterianos utilizados no teste.

Preparou-se a solução teste pipetando 40 µL da solução estoque para 960 µL de meio de cultura.

Os testes foram realizados, em triplicata, em placas de 96 micropoços, contendo 100 µL de meio de cultura BHI por poço. Nos primeiros poços foram

adicionados 200 µL da solução teste. Em seguida, realizou-se a micro diluição, na qual 100 µL são retirados dos primeiros poços e adicionados nos poços seguintes e assim por diante, por oito poços, resultando em oito diferentes concentrações. Os extratos foram testados em concentrações de 1000 a 7,81 µg/mL e as substâncias puras em concentrações de 250 a 1,95 µg/mL.

Quatro controles foram feitos. Um para controle de crescimento do micro-organismo, para verificar a viabilidade celular; o branco, em que não se adicionou o inóculo bacteriano para eliminar o efeito da coloração da solução da substância teste; um controle de qualidade do ensaio, substituindo a solução-trabalho por um fármaco; e o controle de esterilidade do meio de cultura, contendo 100 µL de meio de cultura BHI e 100 µL de água destilada estéril. As microplacas foram incubadas em estufa a 37 ºC e após 24 h foi realizada a leitura do teste em leitor tipo Elisa (490 nm).

O mesmo procedimento foi realizado para a levedura, porém o meio de cultura utilizado foi o Caldo Sabouraud, e a concentração do micro-organismo foi ajustada a 530 nm até a transmitância entre 75-76%.

Os fármacos utilizados para o controle de qualidade do ensaio foram a ampicilina para as bactérias e o miconazol para a levedura.

O grau de resistência ou sensibilidade das bactérias e da levedura frente às amostras testadas foi determinado pela presença ou ausência de inibição. Quanto maior a inibição, menor a turbidez do meio. A percentagem de inibição das amostras foi calculada a partir da comparação das médias de absorção das amostras com o branco. O software origin 8.0 foi utilizado para o cálculo da IC_{50} para as amostras que apresentaram percentagem de inibição maior do que 50%.

3.4.2.2– Resultados e discussão

Os resultados encontrados para as amostras testadas, na maior concentração (1000 µg/mL para extratos e 250 µg/mL para compostos puros), estão apresentados na Tabela 26, pág. 135.

As amostras **EAG** e **EMG** foram as mais promissoras frente aos micro-organismos testados. **EAG** apresentou 73% de inibição contra *Staphylococcus aureus*, 72% de inibição contra *Pseudomonas aeruginosa*, 84% de inibição contra *Listeria monocytogenes* e 78% de inibição contra *Citrobacter freundii*. **EMG**

apresentou 53% de inibição contra *Candida albicans* e 88% de inibição contra *Listeria monocytogenes*. **MR14**, **MR15**, **MR07** e **MR08** não mostraram atividade antimicrobiana significativa frente aos micro-organismos testados. Para **EAG** e **EMG**, os quais apresentaram percentagem de inibição maior do que 50%, calcularam-se o IC_{50} (Tabela 27).

Tabela 26: Percentagens de inibição para cada micro-organismo na maior concentração de extratos e compostos testados

Micro-organismo	EAG	EMG	MR14	MR15	MR07	MR08	Controle
Candida albicans	(40,4 ± 0,1)	(52,8 ± 0,0)	0	(42 ± 5)	0	0	(99,1 ± 0,7)
Staphylococcus aureus	(73,4 ± 0,4)	(42 ± 4)	(5,6 ± 0,4)	(22,6± 0,6)	(7± 3)	(31,1 ± 0,2)	(99,1 ± 0,5)
Pseudomonas aeruginosa	(71,8 ± 1,7)	(48 ± 2)	(8 ± 3)	(34,0 ± 0,6)	(7,8 ± 0,8)	(20,6 ± 0,5)	(97 ± 1)
Listeria monocytogenes	(83,9 ± 1,2)	(88 ± 5)	0	(22 ± 4)	(16 ± 4)	(19 ± 3)	(97 ± 1)
Citrobacter freundii	(78 ± 2)	(48 ± 1)	0	(24 ± 1)	(7 ± 2)	(14 ± 3)	(99,2 ± 0,8)

Tabela 27: Valores de IC_{50} para a inibição do crescimento dos micro-organismos

Amostra	IC_{50} (μg/mL)				
	C. albicans	***S. aureus***	***P. aeruginosa***	***L. monocytogenes***	***C. freundii***
EAG	-	686,58	736,56	733,02	680,51
EMG	959,39	-	-	799,97	-

3.4.3– Avaliação da atividade leishmanicida

Protozoários são micro-organismos que podem provocar várias doenças, entre elas ambíase, malária, doença de Chagas e leishmaniose. Essas enfermidades são classificadas como doenças tropicais negligenciadas, pois afetam principalmente a população mais pobre do mundo e os investimentos mundiais para conter e tratar tais doenças são considerados insatisfatórios (BELLOZE, 2013). A leishmaniose compreende um conjunto de doenças que variam entre a forma cutânea, muco-cutânea, cutânea difusa e visceral. Essas doenças podem levar à morte, principalmente a forma visceral (ALVAR et al.,

2012). Os fármacos mais empregados no tratamento da leishmaniose são os antimoniais pentavalentes (Sb^{5+}), mas o surgimento de cepas resistentes tem limitado a sua utilidade. Outros fármacos utilizados são a anfotericina B lipossomal, pentamidina, miltefosina e paromomicina, os quais apresentam uso limitado devido à toxicidade e alto custo do tratamento (CHAWLA E MADHUBALA, 2010).

Buscando a identificação de novas substâncias com atividade leishmanicida, os extratos **ECF**, **EAF**, **EMF**, **ECG**, **EAG**, **EMG** e os compostos **MR09** e 3β-hidroxi-21β-H-hop-22(29)-eno obtidos a partir de *M. robusta* foram submetidos à avaliação da atividade leishmanicida *in vitro*. O 3β-hidroxi-21β-H-hop-22(29)-eno foi isolado do extrato hexânico das folhas de *M. robusta* durante o trabalho de mestrado (SOUSA, 2012). O teste foi realizado em parceria com a Professora Dra. Tânia Maria de Almeida Alves do Laboratório de Química de Produtos Naturais do Centro de Pesquisas René Rachou - FIOCRUZ.

3.4.3.1– Metodologia

Formas promastigotas de *Leishmania amazonensis* (linhagem IFLA/BR/196/PH-8) foram obtidas a partir de lesões de hamsters experimentalmente infectados. Os parasitas foram incubados durante 9 dias, a 26 ºC, em meio Schneider's tamponado (pH 7,2). Os promastigotas foram estimulados a se diferenciar em formas amastigota-*like* pelo aumento da temperatura de incubação para 32 ºC e baixando o pH do meio para 6,0. Após 7 dias sob essas condições, 90% dos parasitas encontravam-se na forma amastigota-*like*. A concentração de parasita foi ajustada para 1 x 10^8 células mL^{-1} e 90 μL da suspensão foram adicionados em cada poço da placa de 96 poços. As amostras testadas foram solubilizadas em DMSO na concentração de 5 mg/mL. Adicionaram-se aos poços 10 μL das soluções contendo as amostras e o fármaco controle (0,2 μg mL^{-1}, anfotericina B, Fungizone®, Bristol-Myers Squibb). As placas foram incubadas a 32 ºC por 72 h e o número de parasitas estimado usando o ensaio colorimétrico MTT (brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio). Os resultados foram calculados a partir da absorvância mensurada utilizando a fórmula [1 - (Abs_{exp}/Abs_{contr})] x 100, a qual expressa a percentagem de parasitas mortos em

relação ao controle sem amostra. Todas as amostras foram testadas em duplicata e os experimentos repetidos pelo menos uma vez.

3.4.3.2– Resultados e discussão

As amostras testadas e as percentagens de morte dos parasitas estão listados na Tabela 28. Nenhuma das amostras apresentou percentagem elevada de morte do parasita. Todos os resultados estão abaixo do obtido para o fármaco controle (ANF, 83%). **MR09** foi o composto que apresentou maior percentagem de morte celular (60%). O ensaio trata-se de uma triagem, feito com dose única de 500 µg/mL das amostras. Assim, como **MR09** e o 3β-hidroxi-21β-H-hop-22(29)-eno não mostraram atividade maior que 70%, não foi realizado outro teste para avaliar o IC_{50} (concentração que causa a morte de 50% dos parasitas). Considerando que os extratos também não mostraram atividade maior que 70%, os compostos isolados desses extratos não foram avaliados em relação à atividade leishmanicida.

Tabela 28: Efeito de extratos de folhas e galhos de *M. robusta* e triterpenos sobre o crescimento de amastigotas de *Leishmania* amazonensis

Amostra	Morte parasita (%)	CV (%)
ECF*	29	1
EAF*	23	2
EMF*	30	1
ECG*	58	1
EAG*	47	0
EMG*	44	1
MR09*	60	1
3β-hidroxi-21β-H-hop-22(29)-eno*	35	9
ANF**	83	1

*0,5 µg mL^{-1}.**Anfotericina B: controle positivo do teste (0,2 µg mL^{-1}).

3.5 – Avaliação da Inibição da Enzima Acetilcolinesterase

3.5.1– Introdução

A doença de Alzheimer (DA) é uma das principais causas de morbidade e mortalidade no mundo. Estimativas sugerem que ocorrência da doença tende a aumentar. Para o ano de 2050 são esperados mais de 100 milhões de casos de DA no mundo (GUPTA e IADECOLA, 2015). A DA é a forma mais comum de demência em idosos e caracteriza-se por degeneração cerebral crônica manifestada por diversos sintomas, os quais incluem quadro depressivo, perda progressiva e irreversível de funções cognitivas, agitação e outras manifestações neuropsiquiátricas (WANNMACHER, 2005).

A DA é caracterizada por uma complexa desordem neurodegenerativa do sistema nervoso central (SNC) e está relacionada com a perda de neurônios colinérgicos e com a redução dos níveis do neurotransmissor acetilcolina (ACh) no processo sináptico (KWON *et al*., 2007). Outras alterações observadas no cérebro são a deposição extracelular do peptídeo β-amilóide em plaquetas senis e a formação errática de neurofibrilas intracelulares contendo uma forma anormal, fosforilada, de uma proteína associada à microtúbulos (VIEGAS JUNIOR *et al*., 2004).

Os medicamentos disponíveis para o tratamento da DA contribuem para o bem-estar do paciente, mas não alteram o curso ou a evolução da doença. A principal abordagem farmacológica envolve o uso de fármacos colinomiméticos. Os inibidores da enzima acetilcolinesterase (AChE), a qual degrada a ACh, demonstraram resultados clínicos satisfatórios no tratamento da DA, ocorrendo melhoria nos sintomas cognitivos da doença. A donezepila, a rivastigmina e galantamina são os mais utilizados na prática clínica (Figura 76, pág. 139) (STANDAERT e YOUNG, 2010). A galantamina, além de inibir a AChE, se liga a receptores nicotínicos e atua como potencializador alostétrico da atividade desses receptores, aumentando a transmissão colinérgica (GEERTS, *et al*., 2005). Outra abordagem para o tratamento da DA consiste no uso da memantina (Figura 76, pág. 139) que evita a morte de neurônios. O fármaco é um antagonista dos receptores de NMDA-glutamato. O excesso de glutamato promove a entrada

maciça de cálcio no interior do neurônio levando-o a morte (REISBERG *et al*., 2003).

Alguns extratos e compostos obtidos a partir de folhas e galhos de *M. robusta* foram submetidos à avaliação da atividade de inibição da AChE empregando reagente de Ellman. O teste foi realizado pelo grupo da Professora Dra Jacqueline Aparecida Takahashi no Laboratório de Biotecnologia e Bioensaios, do Departamento de Química da Universidade Federal de Minas Gerais. As amostras testadas foram os extratos acetato etílico (**EAG**) e metanólico dos galhos (**EMG**) de *M. robusta*, além dos compostos isolados **MR14**, **MR15**, **MR07** e **MR08**. Outros extratos obtidos a partir de *M. robusta* foram avaliados em relação à atividade de inibição da AChE durante o trabalho de mestrado (SOUSA, 2012).

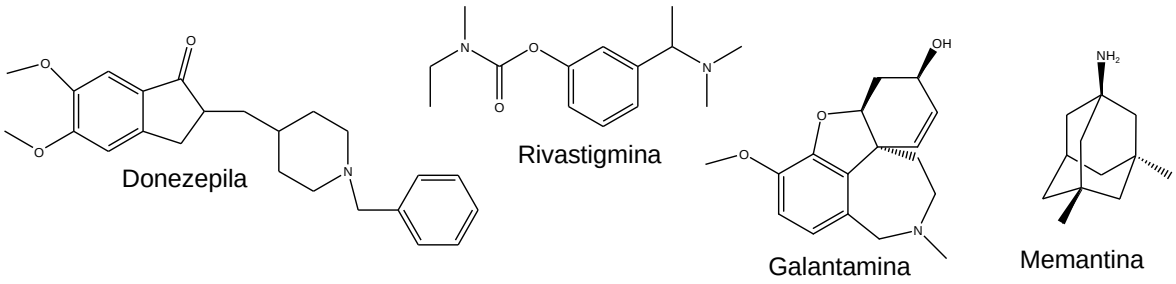


Figura 76: Fármacos empregados no tratamento da doença de Alzheimer.

3.5.2– Metodologia

Foram adicionados aos poços da placa de microtitulação 25 μL de solução de iodeto de acetiltiocolina 15 mmol/L em água (3,75 x 10^{-7} mol) e 125 μL de ácido 5,5'-ditiobis(2-nitrobenzóico) 3 mmol/L (3,75 x 10^{-7} mol) em solução tampão (Tris/HCl 50 mmol/L, pH 8, contendo 0,1 mol/L de NaCl e 0,02 mol/L de $MgCl_2.6H_2O$). Adicionaram-se, ainda, 50 μL de Tris/HCl 50 mmol/L, pH 8, com albumina sérica bovina 0,1% (p/v) e 25 μL da amostra testada na concentração de 10 mg/mL (solubilizada em DMSO) correspondendo a 0,25 mg/poço. No preparo do branco ao invés da adição de 25 μL da solução da amostra, adicionaram-se 25 μL de DMSO. O controle positivo utilizado foi eserina (25 μL) solubilizada em tampão Tris/HCl pH 8,0, na concentração de 10 mg/mL. Aos

poços contendo o controle positivo adicionaram-se 25 µL do solvente usado para a diluição das amostras. Os testes foram feitos em quintuplicata. A absorvância foi medida na faixa de 405 nm a cada 1 min por 8 vezes (8 min no total), utilizando um leitor de microplaca TP-reader (Thermoplate, Brasil). Posteriormente, adicionaram-se aos poços 25 µL da solução de acetilcolinesterase a 0,226 U/mL em Tris/HCl 50 mmol/L, pH 8, com albumina sérica bovina 0,1% (p/v). A absorvância foi medida novamente a 405 nm a cada 1 min por 10 vezes. O aumento da absorvância devido à hidrólise espontânea do substrato foi corrigido fazendo a subtração da média dos valores da primeira medida da média dos valores após a adição da enzima (média 2ª medida - média 1ª medida). A percentagem de inibição foi calculada a partir da comparação da absorvância média das amostras com a absorvância média do branco.

No ensaio empregando a metodologia de Ellman (ELLMAN *et al*., 1961) utilizam-se soluções do reagente de Ellman ou DTNB [ácido 5,5'-ditiobis(2-nitrobenzóico)] e iodeto de acetiltiocolina em tampão e, ao final do ensaio, aplica-se a enzima AChE. Pelo método, a acetiltiocolina é hidrolisada pela AChE e a tiocolina produzida reage com o DTNB, levando a formação do ânion 5-tio-2-nitrobenzoato (TNB), que apresenta coloração amarela (Figura 77).

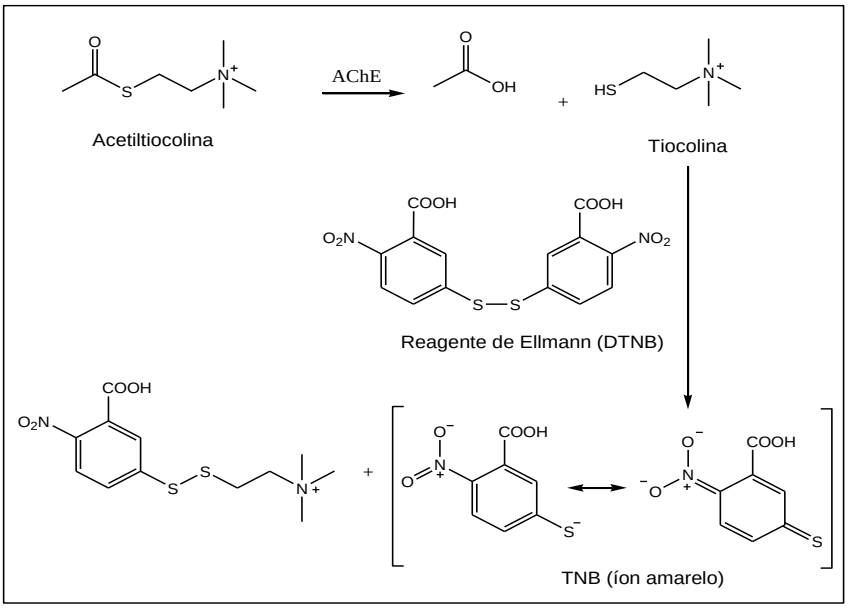


Figura 77: Sequência de reações propostas no método de Ellman (Figura adaptada de MARSTON, 2011).

3.5.3– Resultados e discussão

EAG (extrato acetato etílico dos galhos), **MR07** e **MR08** foram as amostras que apresentaram expressiva atividade de inibição da AChE (Tabela 29). **EAG** apresentou 72% de inibição da enzima. De acordo com Trevisan e colaboradores (2003), extratos cuja inibição à AChE é maior ou igual a 50% são considerados promissores e candidatos a futuros fracionamentos. **MR07** e **MR08** apresentaram 66 e 80% de inibição da enzima, respectivamente. Ambos são flavonoides da classe dos flavonóis. Há relatos na literatura da atividade de inibição da AChE para flavonoides de várias classes incluindo os flavonóis (URIARTE-PUEYO e CALVO, 2011). Os flavonoides são considerados produtos naturais promissores para o desenvolvimento de fármacos multipotentes contra a DA, pois além de inibir a AChE, apresentam baixa toxicidade, elevada atividade antioxidante e capacidade de complexação de metais. Todas essas qualidades dos flavonoides podem ser úteis no tratamento da DA (URIARTE-PUEYO e CALVO, 2011).

Tabela 29: Resultados do teste de inibição da enzima AChE

Amostra	% Média de inibição	*DP	**CV
Eserina	93,3	0,6	0,006
EAG	71,5	0,5	0,007
EMG	38,03	0,06	0,002
MR14	27	2	0,06
MR15	32,3	0,2	0,005
MR07	66	3	0,04
MR08	80	2	0,03

*DP: Desvio Padrão, **CV: Coeficiente de Variação

CONCLUSÃO

No estudo fitoquímico e da atividade biológica de constituintes das folhas e galhos de *Maytenus robusta* (Celastraceae) fracionaram-se, empregando cromatografia, o extrato clorofórmico das folhas (ECF) e o sólido obtido durante a preparação desse extrato (SECF), o extrato acetato etílico das folhas (EAF), o extrato metanólico das folhas (EMF), o extrato hexânico dos galhos (EHG) e o sólido obtido durante a preparação desse extrato (SEHG), o extrato clorofórmico dos galhos (ECG), o extrato acetato etílico dos galhos (EAG), além do extrato metanólico dos galhos (EMG). Foram isolados e identificados vários compostos utilizando métodos espectroscópicos tais como: infravermelho e ressonância magnética nuclear de hidrogênio e de carbono-13 (incluindo HSQC, HMBC, COSY, NOESY e HSQC-TOCSY). Espectrometria de massas de alta resolução foi utilizada para confirmação da fórmula molecular dos compostos inéditos obtidos. Alguns triterpenos isolados de folhas e galhos de *M. robusta* foram submetidos à reação de redução para a obtenção de derivados friedelânicos hidroxilados com potencial atividade biológica. Testes de atividade biológica foram realizados utilizando extratos e compostos obtidos a partir das folhas e galhos de *M. robusta*. Foram avaliadas a citotoxicidade *in vitro*, atividade anti-inflamatória, atividade antimicrobiana e a atividade de inibição da enzima acetilcolinesterase.

Foram isolados e identificados 17 compostos: 3-oxofriedelano (**MR01**), 3β-hidroxifriedelano (**MR02**), 3β,11β-di-hidroxifriedelano (**MR03**), taraxerol (**MR04**), o esteroide β-sitosterol (**MR05**), 3,16-dioxofriedelano (**MR09**), 3-oxo-29-hidroxifriedelano (**MR10**), 3,16-dioxo-12α-hidroxifriedelano (**MR11**), 3,16-dioxo-29-hidroxifriedelano (**MR12**), 3,16-dioxo-friedelan-1-eno (**MR13**), 3-oxo-16β,29-di-hidroxifriedelano (**MR14**), 1α,29-di-hidroxi-3-oxofriedelano (**MR15**), 3-oxo-12α,29-di-hidroxifriedelano (**MR16**), 3-oxo-16β,28,29-tri-hidroxifriedelano (**MR17**), canferol (**MR06**), canferol-3-*O*-β-D-glicopiranosil-(1→3)-α-L-ramnopiranosil-(1→2)-β-D-glicopiranosídeo (**MR07**) e quercetina-3-*O*-β-D-glicopiranosil-(1→3)-α-L-ramnopiranosil-(1→2)-β-D-glicopiranosídeo (**MR08**). Os triterpenos pentacíclicos **MR12**, **MR13**, **MR14**, **MR15** e **MR17** e os flavonoides **MR07** e **MR08**, são inéditos na literatura.

Dos compostos isolados nesse trabalho, apenas **MR01**, **MR02**, **MR03**, **MR05** e **MR10** haviam sido identificados na espécie *M. robusta*. O isolamento de triterpenos pentacíclicos e flavonoides estão de acordo com o perfil químico de outras espécies do gênero *Maytenus*. **MR02** correspondeu a 69,2% de SECF, a mistura de **MR01** e **MR02** a 9,4% de ECF e **MR09** a 39,3% de SEHG e a 3,6% de EHG.

Diante da possibilidade de obtenção de novos compostos para a realização de ensaios biológicos, alguns triterpenos isolados de folhas e galhos de *M. robusta* em quantidade apreciável (**MR09**, **MR10**, **MR12**, **MR14** e **MR16**) foram submetidos à reação de redução empregando boroidreto de sódio para a obtenção de derivados friedelânicos hidroxilados. As reações foram estereosseletivas e para os compostos **MR09** e **MR12** foram, também, regiosseletivas. Obtiveram-se seis compostos inéditos (**P2b**, **P3a**, **P3b**, **P4a**, **P5a**, **P5b**) com potencial atividade biológica.

No teste de atividade citotóxica *in vitro* contra células 4T1 todos os triterpenos pentacíclicos avaliados (**MR01**, **MR02**, **MR09**, **MR10**, **MR12** e **MR14**) apresentaram atividade. **MR14** foi mais efetivo que os outros compostos e apresentou concentração inibitória média (IC_{50}) de 1,23 μM. **MR12**, **MR10** e **MR09** também apresentaram significativa atividade citotóxica com IC_{50} de 9,80, 11,00 e 23,10 μM, respectivamente. Na avaliação da atividade anti-inflamatória **MR10** e **MR14** foram capazes de reduzir significativamente, na terceira hora, o edema de pata de camundongos induzido por carragenina. Esses compostos apresentaram 42 e 57% de inibição ($p<0,05$), respectivamente. Os extratos metanólicos de folhas e galhos, **EMF** e **EMG**, também apresentaram atividade anti-inflamatória, com redução do edema de pata, na terceira hora e dose de 300 mg/Kg, de 43 e 64%, respectivamente. Na avaliação da atividade antibacteriana e antifúngica os extratos acetato etílico e metanólico dos galhos, **EAG** e **EMG**, foram as amostras mais promissores frente aos micro-organismos testados. **EAG** apresentou 73% de inibição frente a *Staphylococcus aureus*, 72% de inibição frente a *Pseudomonas aeruginosa*, 84% de inibição frente a *Listeria monocytogenes* e 78% de inibição frente a *Citrobacter freundii*. **EMG** apresentou 53% de inibição frente a *Candida albicans* e 88% de inibição frente a *Listeria monocytogenes*. No ensaio de avaliação de inibição da enzima acetilcolinesterase **EAG**, **MR07** e **MR08** foram as amostras mais ativas. **EAG** apresentou 72% de inibição da enzima. Os

flavonoides **MR07** e **MR08** apresentaram 66 e 80% de inibição da acetilcolinesterase, respectivamente. Compostos dessa classe são considerados produtos naturais promissores para o desenvolvimento de fármacos multipotentes contra a doença de Alzheimer.

Maytenus robusta mostrou ser uma fonte rica de triterpenos pentacíclicos que apresentam diversas atividades biológicas. O estudo realizado com suas folhas e galhos permitiu contribuir para o conhecimento da espécie e enriquecimento dos dados disponíveis para a quimiotaxonomia da família Celastraceae.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Agrawal, P. K (Ed.). Carbon-13 NMR of flavonoids. New York: Ed. Elsevier, **1989**. 564p.

Alvar, J.; Vélez, I. D.; Bern, C.; Herrero, M.; Desjeux, P.; Cano, J.; Jannin, J.; den Boer, M. Leishmaniasis Worldwide and Global Estimates of Its Incidence. *PLoS One*, 7(5), e35671, **2012**.

Alvarenga, N.; Ferro, E. A. Bioactive triterpenes and related compounds from Celastraceae. *Stud. Nat. Prod. Chem.*, 33, 239-307, **2006**.

Antonisamy, P.; Duraipandiyan, V.; Ignacimuthu, S. Anti-inflamatory, analgesic and antipyretic effects of friedelin isolated from Azima tetracanha Lam. in mouse and rat models. *J. Pharm. Pharmacol.*, 63, 1070-1077, **2011**.

Barbosa L. C. A. Espectroscopia no infravermelho na caracterização de compostos orgânicos. Viçosa: Ed. UFV, **2007**. 189p.

Barreiro, E. J.; Fraga, C. A. M. Química medicinal : As bases moleculares da ação dos fármacos. 2 ed. Porto Alegre: Editora Artmed, **2008**. 243p.

Barroso, G. M.; Peixoto, A.L; Ichaso, C. L.; Costa, C. G.; Guimarães, E. F.; Lima, H. C. "Sistemática das Angiospermas do Brasil", V.2. Imprensa Universitária. Universidade Federal de Viçosa. **1984**.

Bauer, A.; Brönstrup, M. Industrial natural product chemistry for drug discovery and development. *Nat. Prod. Rep.*, 31, 35-60, **2014**.

Belloze, K. T. "Priorização de alvos para fármacos no combate a doenças tropicais negligenciadas causadas por protozoários". Tese de Doutorado. Instituto Oswaldo Cruz. Ministério da Saúde. Rio de Janeiro-RJ. **2013**.

Berkenbrock, I. S.; Paulilo, M. T. S. Efeito da luz na germinação e no crescimento inicial de *Maytenus robusta* Reiss. e *Hedyosmum brasiliense* Mart. *Rev. Bras. Sementes*, 21, 243-248, **1999**.

Blair, J. M. A.; Webber, M. A.; Baylay, A. J.; Ogbolu, D. O.; Piddock, L. J. V. Molecular mechanisms of antibiotic resistance. *Nature Rev. Microbiol.* 13, 42-51, **2015**.

Bolzani, V. S.; Valli, M.; Pivatto, M.; Viegas Jr, C. Natural products from Brazilian biodiversity as a source of new models for medicinal chemistry. *Pure* Appl. *Chem.*, 84, 1837-1846, **2012**.

Brasil. Lei nº 13.123 de 20 de maio de 2015. Dispõe sobre o acesso ao patrimônio genético, sobre a proteção e o acesso ao conhecimento tradicional associado e sobre a repartição de benefícios para conservação e uso sustentável da biodiversidade. Disponível em: <http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_Ato2015-2018/2015/Lei/L13123.htm>. Acesso em: 13 novembro 2015.

Carvalho-Okano, R. M. "Estudos Taxonômicos do Gênero *Maytenus* Mol.*emend*.Mol (*Celastraceae*) do Brasil Extra Amazônico". Tese de Doutorado. Instituto de Biologia. Universidade de Campinas. Campinas SP. **1992**.

Castañeda, P.; Garcia, M. R.; Hernandez, B. E.; Torres, B. A.; Anaya, A. L.; Mata, R. Effects of some compounds isolated from *Celaenodendron mexicanum* standl (Euphorbiaceae) on seeds and phytopathogenic fungi. *J. Chem. Ecol.*, 18, 1025-137 **1992**.

Chawla, B.; Madhubala, R. Drug targets in *Leishmania*. *J. Parasit. Dis.,* 34, 1-13, **2010**.
Chien, N. Q.*;* Hung, N. V.; Sung, T. V. Nghien cuu thanh phan hoc cay *Kydia glabrescens*. *Tap chí Hóa hoc*, 42, 71-75, **2004**.

Chrousos, G. P. Adrenocorticosteroides e Antagonistas Córtico-supra-renais. In: Katzung, B. G. Farmacologia: Básica & Clínica/[revisão de conteúdo Penildon Silva]. 9 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S. A., 2005. 991p.

Costa, P.; Pilli, R.; Pinheiro, S.; Vasconcellos, M. Substâncias carboniladas e derivados.Poto Alegre: Ed. Bookman, **2003**. 412p.

Cragg, M. G.; Newman, J. D. Natural products: A continuing source of novel drug leads. *Biochim. Biophys. Acta*, 1830, 3670-3695, **2013**.

Croteau, R.; Kutchan, T. M.; Lewis, N. G. Natural Products (Secondary Metabolites). In: Buchanan, B.B.; Gruissem, W.; Jones, R.L. Biochemistry and molecular biology of plants. Rockville: American Society of Plant Physiologists, **2000**. 1367p.

Csuk, R.; Barthel, A.; Sczepek, R.; Siewert, B.; Schwarz, S. Synthesis, encapsulation and antitumor activity of new betulin derivatives. *Arch. Pharm. Chem. Life Sci*. 1, 37-49, **2011**.

Csuk, R.; Stark, S.; Nitsche, C.; Barthel, A.; Siewert, B. Alkylidene branched lupane derivatives: Synthesis and antitumor activity. *Eur. J. Med. Chem*., 53, 337-345, **2012**.

De Andrade, S. F., Lemos, M.; Comunello, E.; Noldin, V. F.; Delle Monache, F.; Cechinel Filho, V., Niero, R. Antiulcerogenic activity of fractions and 3,15-dioxo-21α–hydroxy friedelane isolated from *Maytenus robusta* (Celastraceae). *Arch. Pharm. Res*., 31, 41-46, **2008**.

Di Rosa, M.; Giroud, J. P.; Willoughby, D. A. Studies of the mediators of the acute inflammatory response induced in rats in different sites by carrageenan and turpentine. *J. Pathol*., 104, 15-29, **1971**.

Drgona, L.; Khachatryan, A.; Stephens, J.; Charbonneau, C.; Kantecki, M.; Haider, S.; Barnes, R. Clinical and economic burden of invasive fungal diseases in Europe: focus on pre-emptive and empirical treatment of *Aspergillus* and *Candida* species. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis*., 33, 7-21, **2014**.

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

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

Fattorusso, E.; Lanzotti, V.; Taglialatela-Scafati, O.; Cicala, C. The flavonoids of leek, *Allium porrum*. *Phytochemistr*y, 57, 565-569, **2001**.

Fernandes, P. C. “Etnofarmacologia como ferramenta para a educação ambiental”. Tese de Doutorado. Instituto de Biologia. Universidade Estadual de Campinas. Campinas, SP. **2005**.

Furusawa, M.; Tanaka, T.; Ito, T.; Nakaya, K.-I.; Iliya, I.; Ohyama, M.; Iinuma, M.; Murata, H.; Inatomi, Y.; Inada, A.; Nakanishi, T.; Matsushita, S.; Kubota, Y.; Sawa, R.; Takahashi, Y. Flavonol Glycosides in Leaves of Two *Diospyros* Species. *Chem. Pharm. Bull.*, 53, 591-593, **2005**.

Geerts, H.; Guillaumat, O-P.; Grantham, C.; Bode, W.; Anciaux, K.; Sachak, S. Brain levels and acetylcholinesterase inhibition with galantamine and donepezil in rats, mice, and rabbits. *Brain Res.*, 1033, 186–193, **2005**.

Gupta, A.; Iadecola, C. Impaired Aβ clearance: a potential link between atherosclerosis and Alzheimer’s disease. *Front. Aging Neurosci.*, 7, 1-8, **2015**.

Harbarth, S.; Samore, M. H. Antimicrobial Resistance Determinants and Future Control. *Emerg. Infect. Dis.*,11, 794-801, **2005**.

Hong, J. Natural Product Synthesis at the Interface of Chemistry and Biology. *Chem. Eur. J.*, 20, 1-10, **2014**.

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER (INCA). ESTIMATIVA 2016 Incidência de Câncer no Brasil. Rio de Janeiro, 2015. Disponível em: <http://www.inca.gov.br/wcm/dncc/2015/index.asp>. Acesso em: 27 nov. **2015**.

Kazuma, K.; Noda, N.; Suzuki, M. Malonylated flavonol glycosides from the petals of Clitoria ternatea. Phytochemistry, 62, 229-237, **2003**.

Kim, H. Y.; Moon, H. B.; Lee, H. J.; Choi, D. H. Flavonol glycosides from the leaves of *Eucommia ulmoides* O. with glycation inhibitory activity. *J. Ethnopharmacol.*, 93, 227-230, **2004**.

Kinghorn, A. D.; Pan, L.; Fletcher, J. N.; Chai, H. The Relevance of Higher Plants in Lead Compound Discovery Programs. *J. Nat. Prod.*, 74, 1539-1555, **2011**.

Kong, L. Y.; Tan, R. X. Artemisinin, a miracle of traditional Chinese medicine. *Nat. Prod. Rep.,* Advance Article, **2015**.

Kuo, Y. H.; Kuo, L. M. Y. Antitumour and anti-AIDS triterpenes from *Celastrus hindsii*. *Phytochemistry*, 44, 1275-1281, **1997**.

Kwon, Y. E.; Park, J. Y.; Tai No, K.; Shin, J.H.; Lee, S. K.; Eun, J. S.; Yang, J. H.; Shin, T. Y.; Kim, D. K.; Chae, B. S.; Leem, J-Y.; Kim, K. H. Synthesis, *in vitro* assay, and molecular modeling of new piperidine derivatives having dual inhibitory potencyagainst acetylcholinesterase and $A\beta_{1-42}$ aggregation for Alzheimer's disease therapeutics. *Bioorg. Med. Chem.*,15, 6596–6607, **2007**.

Lee, K. H. Discovery and developmente of natural product-derived chemotherapeutic agents based on a medicinal chemistry approach. *J. Nat. Prod.* 73, 500-516, **2010**.

Li, J. W.-H.; Vederas, J. C. Drug Discovery and Natural Products: End of an Era or an Endless Frontier? *Science*, 325, 161-165, **2009**.

Li, Y.-Z.; Li, Z.-L.; Yin, S.-L.; Shi, G; Liu, M.-S.; Jing, Y.-K.; Hua, H.-M. Triterpenoids from *Calophyllum inophyllum* and their growth inhibitory effects on human leukemia HL-60 cells. *Fitoterapia*, 81, 586-589, **2010**.

Ling, L. L.; Schneider, T.; Peoples, A. J.; Spoering, A. L.; Engels, I.; Conlon, B. P.; Mueller, A. A new antibiotic kills pathogens without detectable resistance. *Nature*, 517, 455-459, **2015**.

Longhi-Balbinot, D.; Lanznaster, D.; Baggio, C. H.; Silva, M. D.; Cabrera, C. H.; Facundo, V. A.; Santos, A. R. S. Anti-inflammatory effect of triterpene 3β,6β,16β-trihydroxylup-20(29)-ene obtained from *Combretum leprosum* Mart & Eich in mice. *J. Ethnopharmacol*., 142, 59-64, **2012**.

Lu, D. X.; Wen, X. T.; Liang, J.; Zhang, X. D.; Gu, Z. W.; Fan, Y.-J. Novel pH-sensitive drug delivery system based on natural polysaccharide for doxorubicin release. *Chin. J. Polym. Sci.* 26, 369-374, **2008**.

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

Makhija, D. T.; Somani, R. R.; Chavan, A.V. Synthesis and pharmacological evaluation of antiinflammatory mutual amide prodrugs. Indian J. Pharm. Sci. 75, 353-357, **2013**.

Marston, A. Thin-layer chromatography with biological detection in phytochemistry. *J. Chromatogr. A*, 1218, 2676-2683, **2011**.

Martucciello, S.; Balestrieri, M. L.; Felice, F.; Estevam, C. S.; Sant'Ana, A. E. G.; Pizza, C.; Piacente, S. Effects of triterpene derivatives from *Maytenus rigida* on VEGF-induced Kaposi's sarcoma cell proliferation. *Chem. Biol. Interac.*, 183, 450-454, **2010**.

Maude, R. J.; Woodrow, C. J.; White, L. J. Artemisinin Antimalarials: Preserving the ''Magic Bullet''. *Drug Develop. Res.*, 71, 12-19, **2010**.

McKenna, M. J.; Simmons, M. P.; Bacon, C. D.; Lombardi, J. A. Delimitation of the Segregate Genera of *Maytenus* s. l. (Celastraceae) Based on Morphological and Molecular Characters. *Syst. Bot.*, 36, 922-932, **2011**.

Mohsin, S.; Kurup, G. M. Mechanism underlying the anti-inflammatory effect of sulphated polysaccharidefrom *Padina tetrastromatica* against carrageenan induced paw edema in rats. *Biomed. Prev. Nutr.*, 1, 294-301, **2011**.

Moses, T.; Pollier, J.; Thevelein, J. M.; Goossens, A. Bioengineering of plant (tri)terpenoids: from metabolic engineering of plants to synthetic biology in vivo and in vitro. *New Phytologist*, 200, 27-43, **2013**.

Newman, D. J.; Cragg, G. M.; Snader, K. M. The influence of natural products upon drug discovery. *Nat Prod Rep.*, 17, 215-234, **2000**.

Newman, J. D.; Cragg, M. G. Natural Products As Sources of New Drugs over the 30 Years from 1981 to 2010. *J. Nat. Prod.*, 75, 311-335, **2012**.

Niero, R.; Moser, R.; Busato, A. C. B.; Yunes, R. A.; Reis, A.; Cechinel Filho, V. A comparative chemical estudy of *Maytenus ilicifolia* Mart. Reiss and *Maytenus robusta* Reiss (Celastraceae). *J. Biosci.*, 56, 158-161, **2001**.

Niero, R.; Andrade, S. F.; Cechinel Filho, V. A Review of the ethnopharmacology, phytochemistry and pharmacology of plants of the *Maytenus* Genus. *Curr. Pharm. Des*., 17, 1851-1871, **2011**.

Nijveldt, R. J.; van Nood, E.; van Hoorn, D. E. C.; Boelens, P. G.; van Norren, K. van Leeuwen, P. A. M. Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential applications. *Am. J. Clin. Nutr.,* 74, 418-25, **2001**.

Nsonde-Ntandou, G. F.; Banzouzib, J. T.; Mbatchi, B.; Elion-Itou, R. D. G.; Etou-Ossibi, A. W.; Ramos, S.; Benoit-Vical, F.; Abena, A. A.; Ouamba, J. M. Analgesic and anti-inflammatory effects of *Cassia siamea* Lam. Stem bark extracts. *J. Ethnopharmacol*., 127, 108-111, **2010**.

Reisberg, B.; Doody, R.; Stöffler, A.; Schmitt, F.; Ferris, S.; Möbius, H. J. Memantine in Moderate-to-Severe Alzheimer's Disease. *N. Engl. J. Med*., 348,1333-41, **2003**.

Reyes, B.M.; Ramírez-Apan, M.T.; Toscano, R.A.; Delgado, G. Triterpenes from *Garcia parviflora.* Cytotoxic Evaluation of Natural and Semisynthetic Friedelanes. *J. Nat. Prod. 73,* 1839-1845, **2010**.

Reyes-Zurita, F. J.; Rufino-Palomare, E. E.; Medina, P .P.; García-Salguero, E. L.; Peragón, J.; Cascante, M.; Lupiáñez, J. A. Antitumour activity on extrinsic apoptotic targets of the triterpenoid maslinic acid in p53-deficient Caco-2 adenocarcinoma cells. *Biochimie*, 95, 2157-2167, **2013**.

Roberts II, L. J.; Morrow, J. D. Analgésicos-antipiréticos, Agentes Anti-inflamatórios e Fármacos utilizados no Tratamento da Gota. In: Gilman, A. G. Goldman & Gilman As Bases Farmacológicas da Terapêutica. 10 ed. Rio de Janeiro: McGraw-Hill Interamericana do Brasil Ltda., **2005**. 1647 p.

Saccaro Junior, N. L. A regulação do acesso a recursos genéticos no Brasil: sugestões para um novo cenário. *Sustentabilidade em Debate - Brasília*, 4, 194-214, **2013**.

Schottenfeld, D.; Beebe-Dimmer, J. Chronic Inflammation: A Common and Important Factor in the Pathogenesis of Neoplasia. *CA Cancer J. Clin*., 56, 69-83, **2006**.

Shan, W.-G.; Zhang, L.-W.; Xiang, J.-G.; Zhan, Z.-J. Natural Friedelanes. *Chem. Biodiv.*, 10, 1392-1434, **2013**.

Silva, F. C.; Rodrigues, V. G.; Duarte, L. P.; Silva, G. D. F.; Miranda, R. R. S.; Filho, S. A. V. A new friedelane triterpenoid from the branches of *Maytenus gonoclada* (Celastraceae). *J. Chem. Res.*, 35, 555-557, **2011**.

Sorokina, I.V.; Mainagashev, I.Ya.; Zhukova, N.A.; Korchagina, D.V.; Tolstikova, T.G.; Nikolin, V.P.; Popova, N.A.; Pokrovskii, M.A.; Pokrovskii, A.G.; Salakhutdinov, N.F. Antitumor Activity of Amides of Dihydrobetulonic Acid in vitro and *in vivo*. *Russ. J. Bioorg. Chem.*, 39, 194-201, **2013**.

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

Sousa, G. F.; Duarte, L. P.; Alcântara, A. F. C.; Silva, G. D. F.; Vieira-Filho, S. A.; Silva, R. R.; Oliveira, D. M.; Takahashi, J. A. New Triterpenes from *Maytenus robusta*: Structural Elucidation Based on NMR Experimental Data and Theoretical Calculations. *Molecules 17*, 13439-13456, **2012**.

Souza, M. T. S.; Almeida, J. R. G. S.; Araujo, A. A. S.; Duarte, M. C.; Gelain, D. P.; Moreira, J. C. F.; Santos, M. R. V.; Quintans-Júnior, L. J. Structure–Activity Relationship of Terpenes with Anti-Inflammatory Profile – A Systematic Review. *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.*, 115, 244-256, **2014**.

Standaert, D. G.; Young, A. B. Tratamento dos distúrbios degenerativos do sistema nervoso central. In: Brunton, L. L. (Ed.); Lazo, J. S. (Ed.); Parker, K. L. (Ed.). GOODMAN & GILMAN, As bases farmacológicas da terapêutica/[revisão de conteúdo Almir Lourenço da Fonseca]. Santana: AMGH Editora Ltda., **2010**. 1615p.

Trevisan, M. T. S.; Macedo, F. V. V. Seleção de plantas com atividade anticolinasterase para tratamento da doença de Alzheimer. *Quím. Nova*, 26, 301-304, **2003**.

Uriarte-Pueyo, I.; Calvo, M. I. Flavonoids as Acetylcholinesterase Inhibitors. *Curr. Med. Chem.*, 18, 5289-5302, **2011**.

Valli, M.; Pivatto, M.; Danuello, A.; Castro-Gamboa, I.; Siqueira Silva, D. H.; Cavalheiro, A. J.; Araújo, A. R.; Furlan, M.; Lopes, M. N.; Bolzani, V. S. Tropical biodiversity: has it been a potential source of secondary metabolites useful for medicinal chemistry? *Quim. Nova,* 35, 2278-2287, **2012**.

Viegas Junior, C.; Bolzani, V. S.; Furlan, M.; Fraga, C. A. M.; Barreiro, E. J. Produtos naturais como candidatos a fármacos úteis no tratamento do mal de Alzheimer. *Quim. Nova,* 27, 655-660, **2004**

Wagner, H.; Bladt, S. Plant Drugs Analysis – A Thin Layer Chromatography atlas. 2.ed. Berlin: Ed. Springer, **1996**. 384p.

Wagner, W.; Khanna, P.; Furst, D. E. Anti-inflamatórios Não-esteroides, Fármacos Antirreumáticos Modificadores da Doença, Analgésicos Não-opioides e Fármacos Utilizados na Gota. In: Katzung, B. G. Farmacologia: Básica & Clínica/[revisão de conteúdo Penildon Silva]. 9 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S. A., 2005. 991p.

Wannmacher, L. Demencia: evidencias contemporâneas sobre a eficácia dos tratamentos. In: *OPAS. Uso Racional de Medicamentos: Temas Selecionados. Brasilia*, Vol. 2, Nº4, **2005**.

Weber, J. T.; Courvalin, P. An Emptying Quiver: Antimicrobial Drugs and Resistance. *Emerg. Infect. Dis.*,11,791-793, **2005**.

WORLD HEALTH ORGANIZATION-WHO. ANTIMICROBIAL RESISTANCE: Global Report on Surveillance. Disponível em: < http://apps.who.int/iris/handle/10665/112642>. Acesso em: 24 nov. 2014.

Wu, X.T.; Liu, J.Q.; Lu, X.T.; Chen, FX; Zhou, ZH; Wang, T; Zhu, SP; Fei, SJ. The enhanced effect of lupeol on the destruction of gastric cancer cells by NK cells. *Int. Immunopharmacol.*, 16, 332-340, **2013**.

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

APÊNDICE A: ESPECTROS CAPÍTULO 1

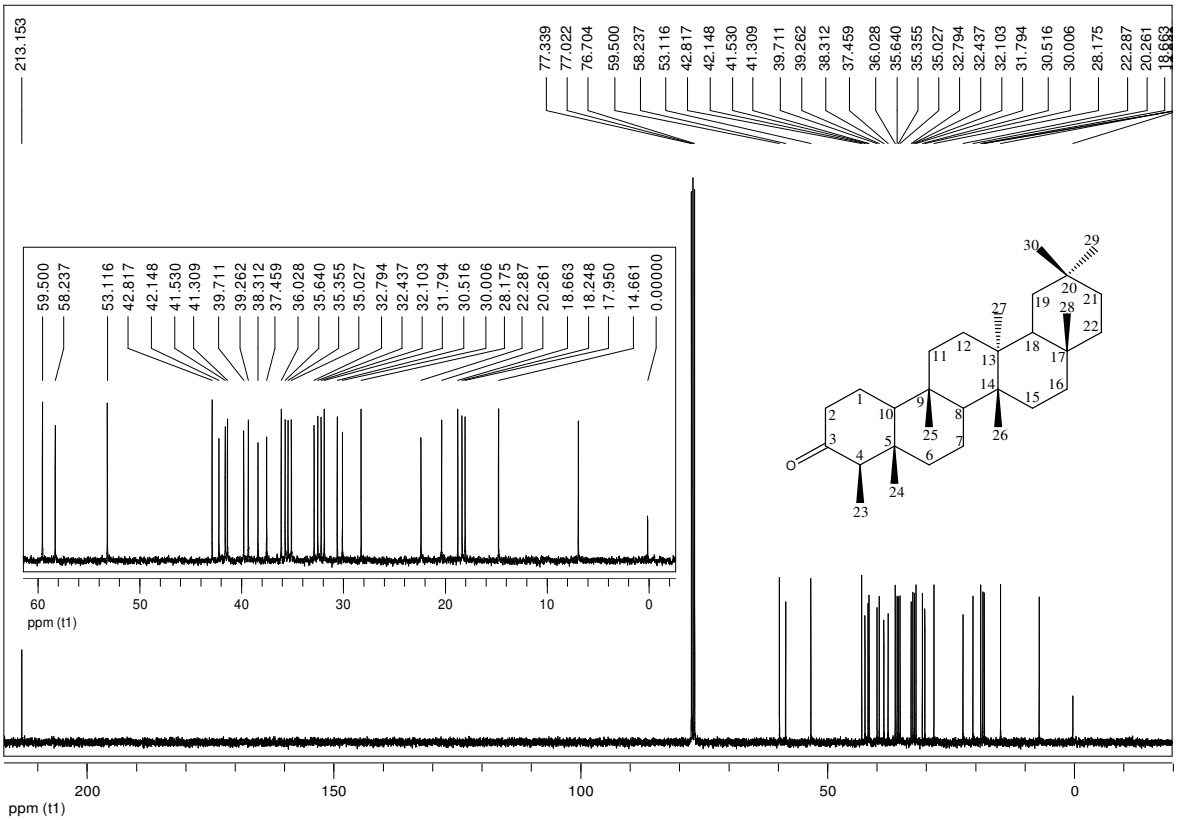


Figura A1: Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, $CDCl_3$) de **MR01**.

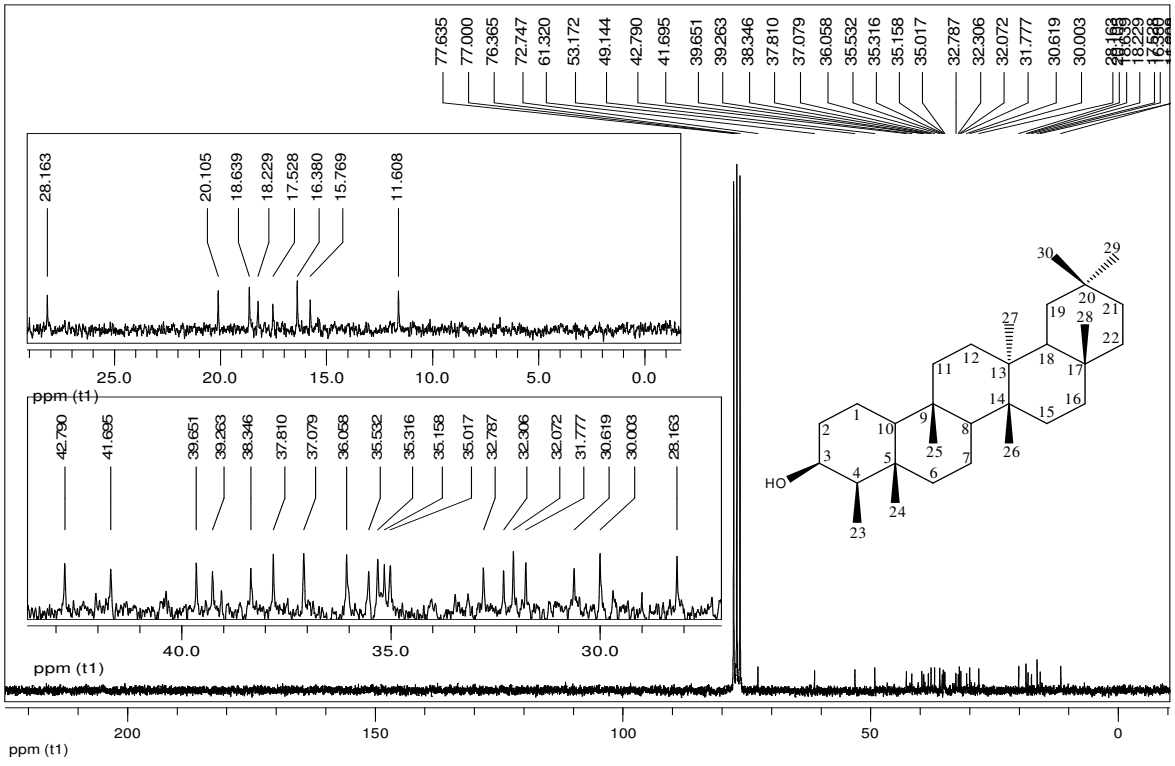


Figura A2: Espectro de RMN de ^{13}C (50 MHz, $CDCl_3$) de **MR02**.

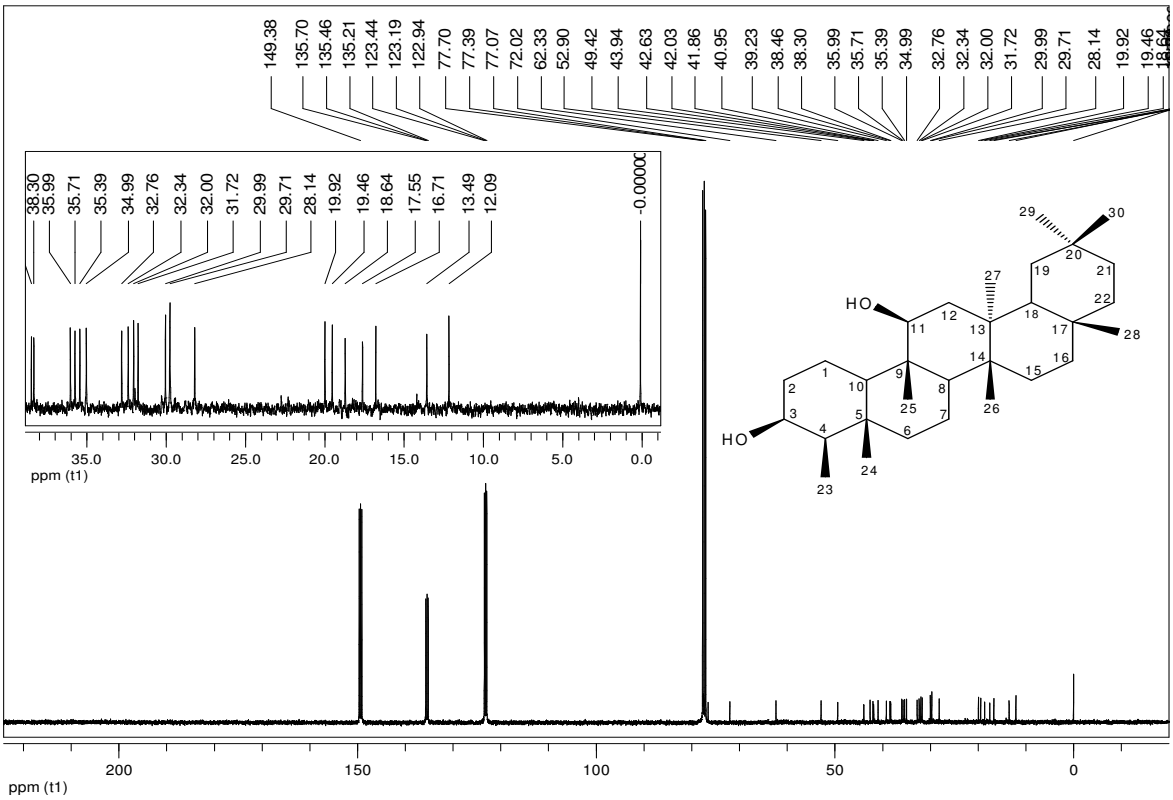


Figura A3: Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, $CDCl_3$ + piridina-d_5) de **MR03**.

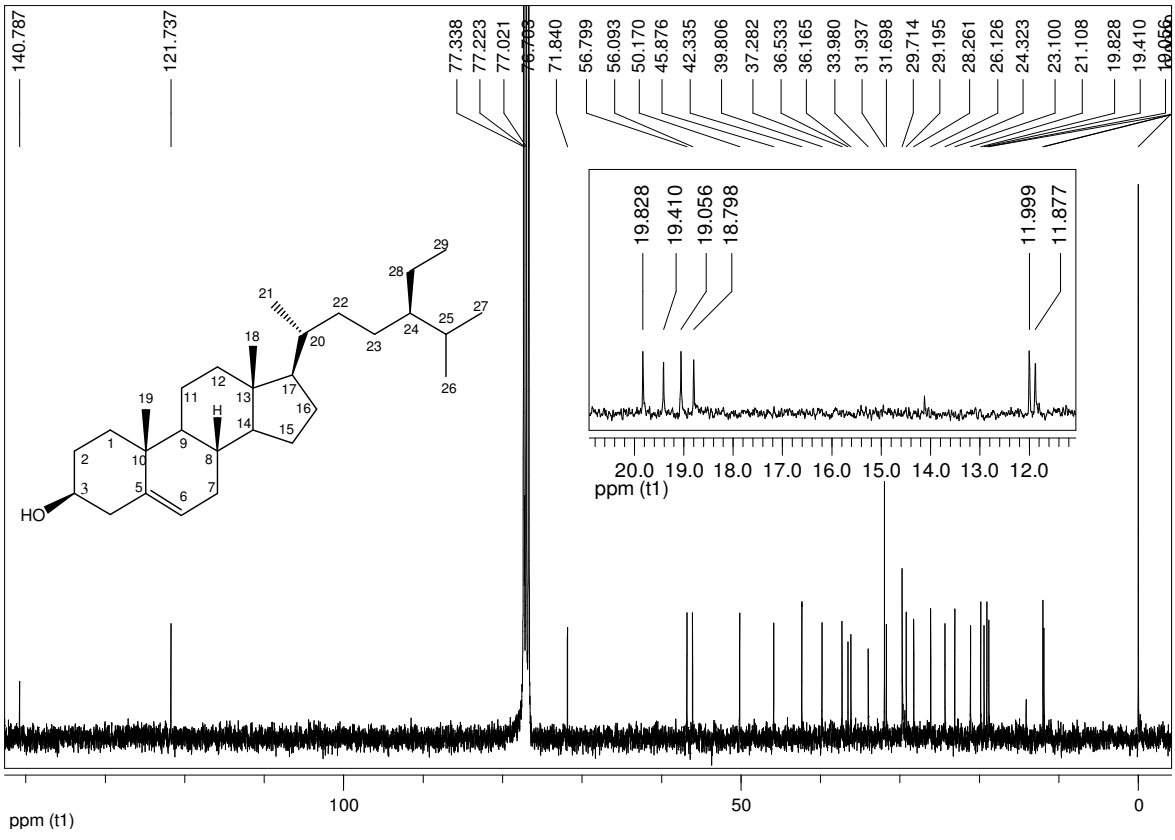


Figura A4: Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, $CDCl_3$) de **MR05**.

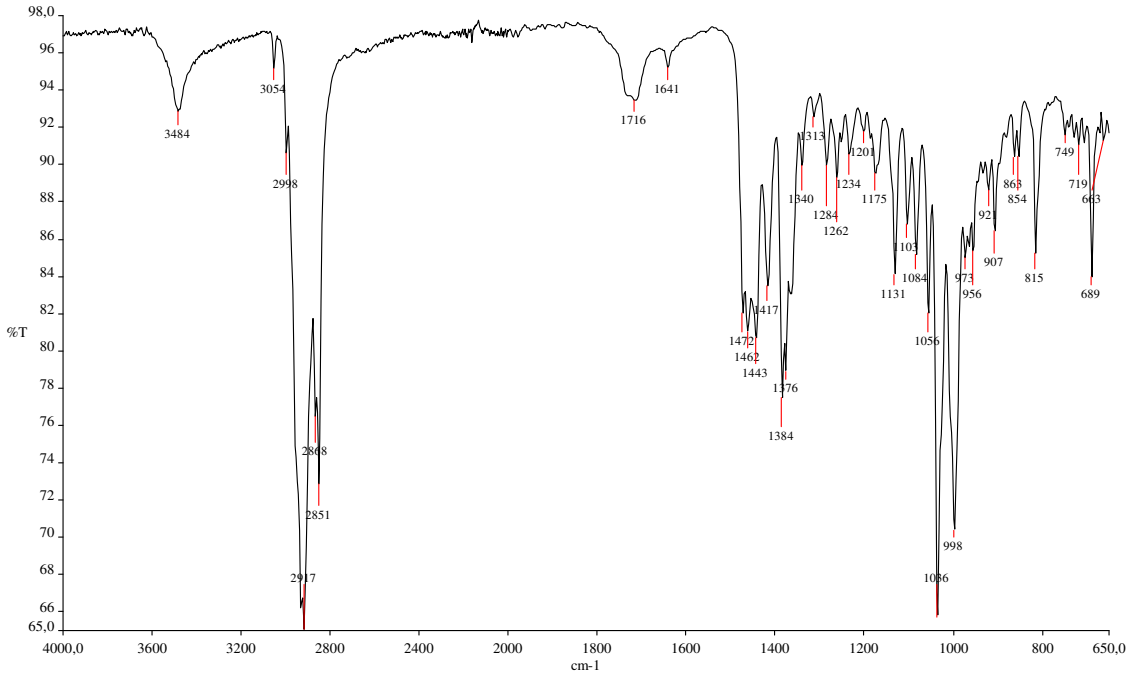


Figura A5: Espectro na região do IV de **MR04** (ATR).

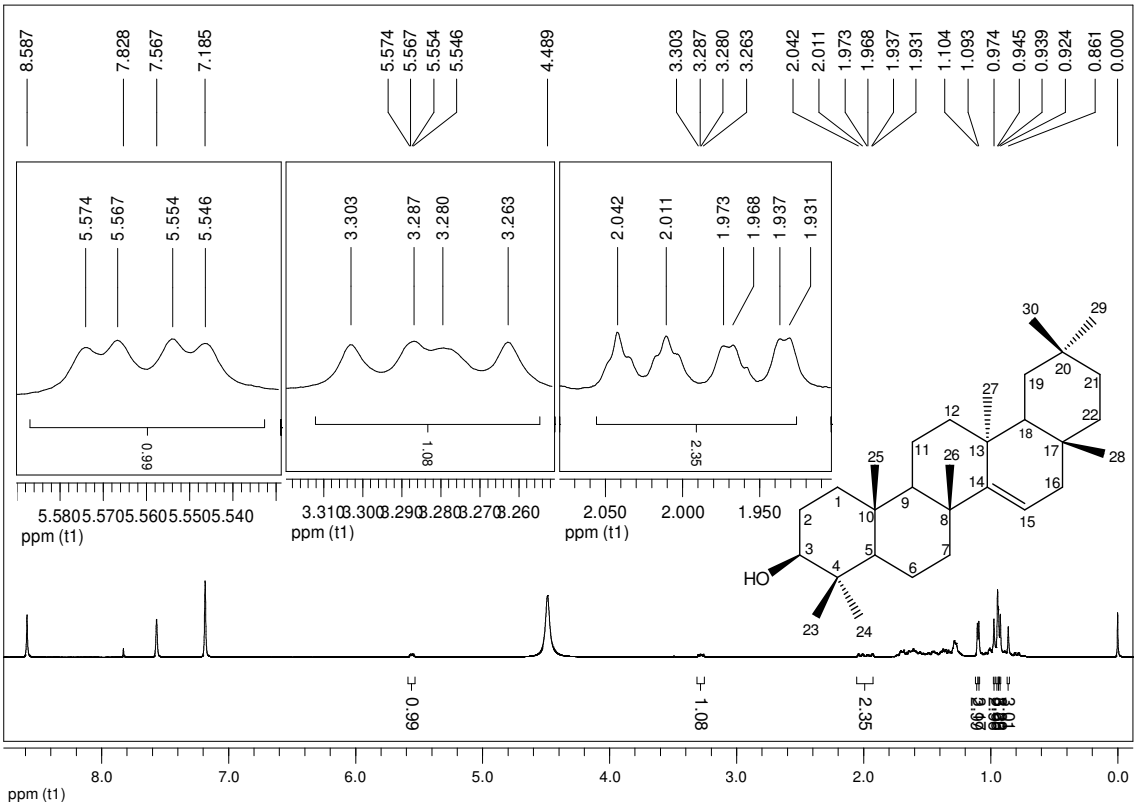


Figura A6: Espectro de RMN de ^{1}H (400 MHz, $CDCl_3$ + piridina-d_5) de **MR04**.

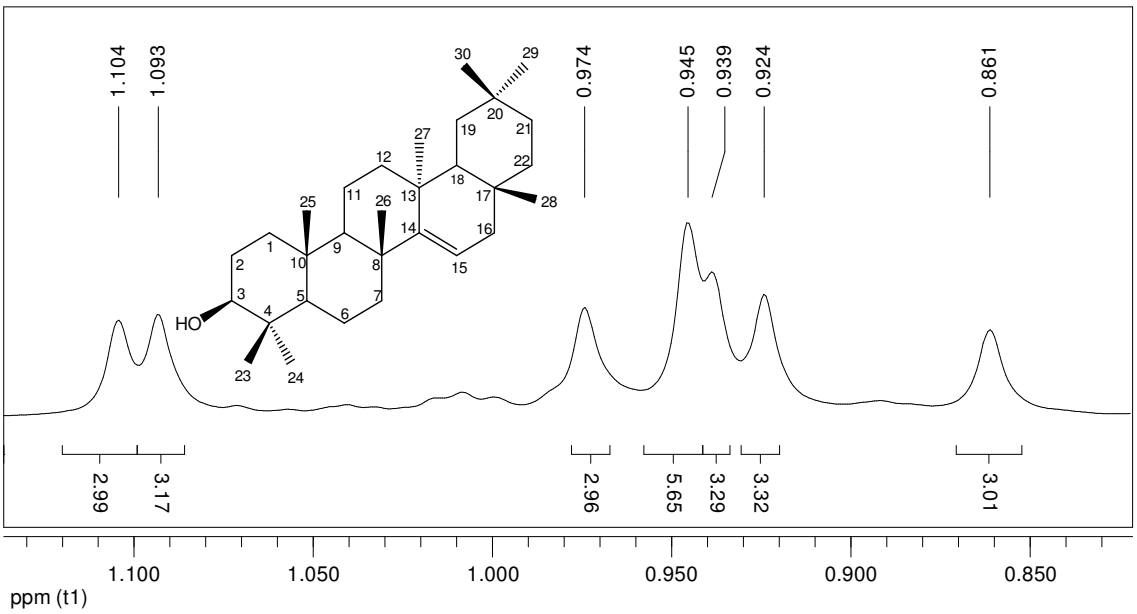


Figura A7: Expansão do espectro de RMN de ^{1}H (400 MHz, $CDCl_3$ + piridina-d_5) de **MR04**.

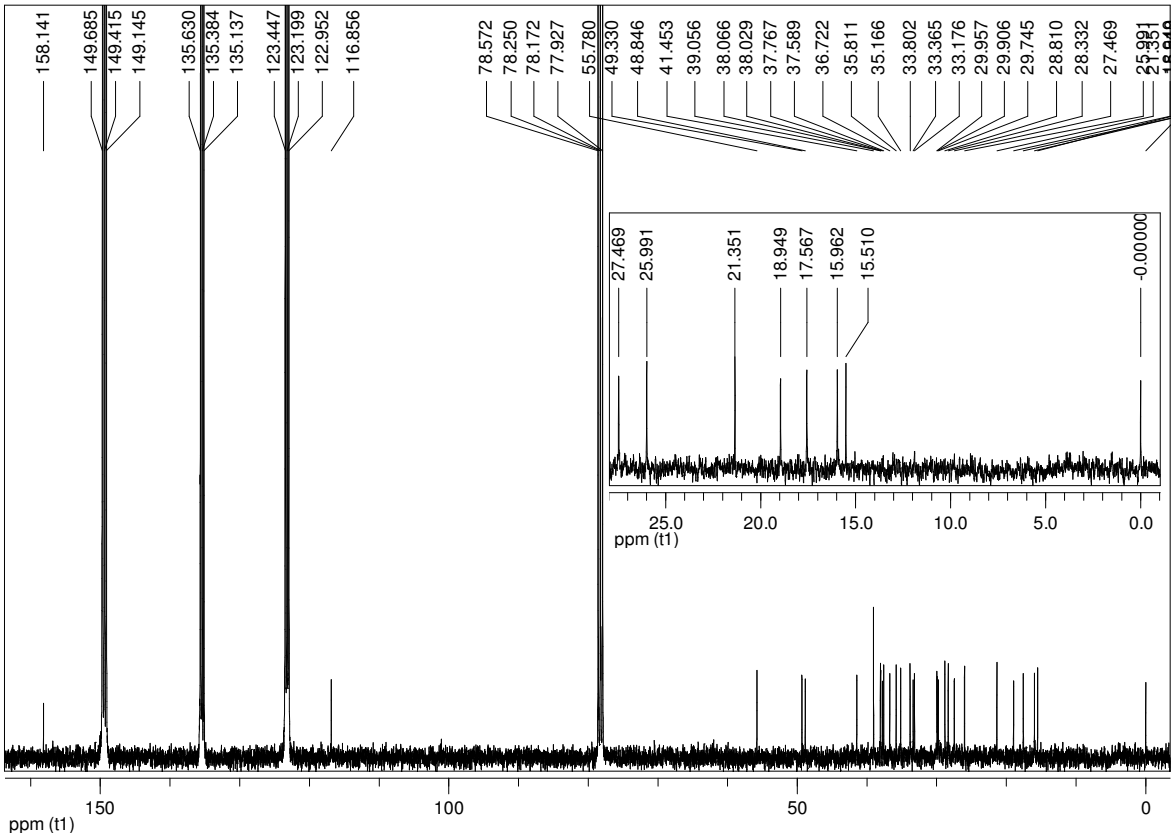


Figura A8: Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, $CDCl_3$ + piridina-d_5) de **MR04**.

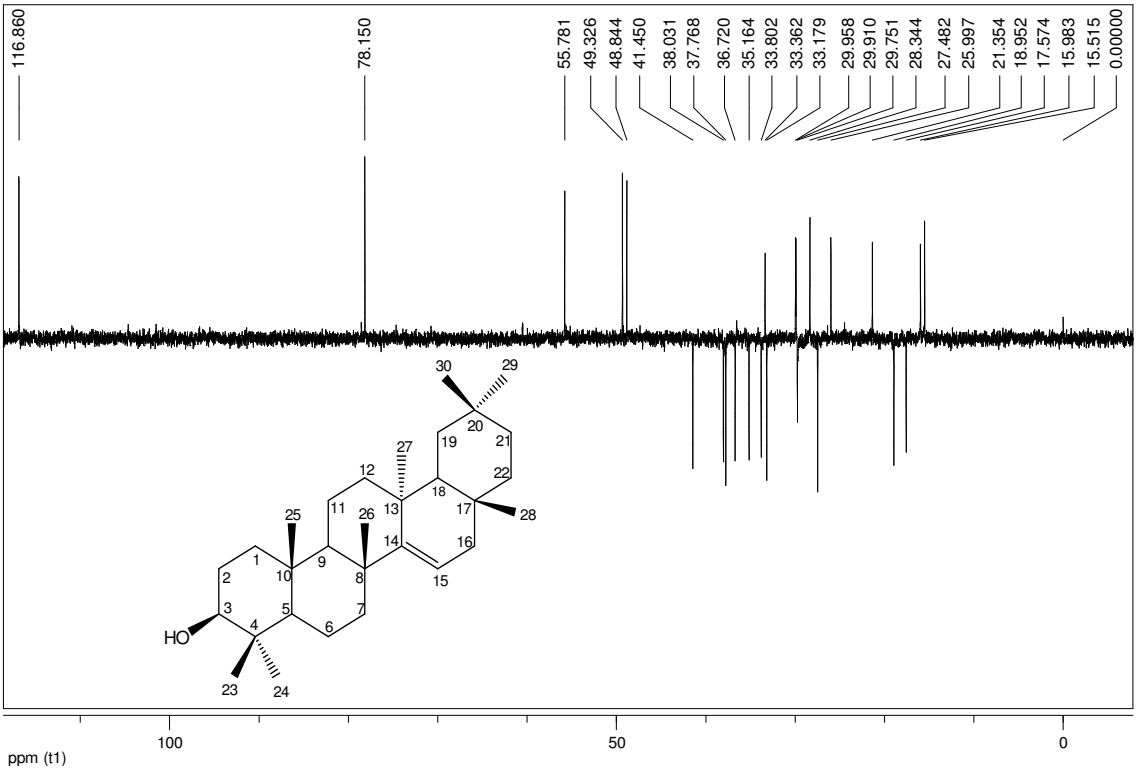


Figura A9: Subespectro DEPT135 (100 MHz, $CDCl_3$ + piridina-d_5) de **MR04**.

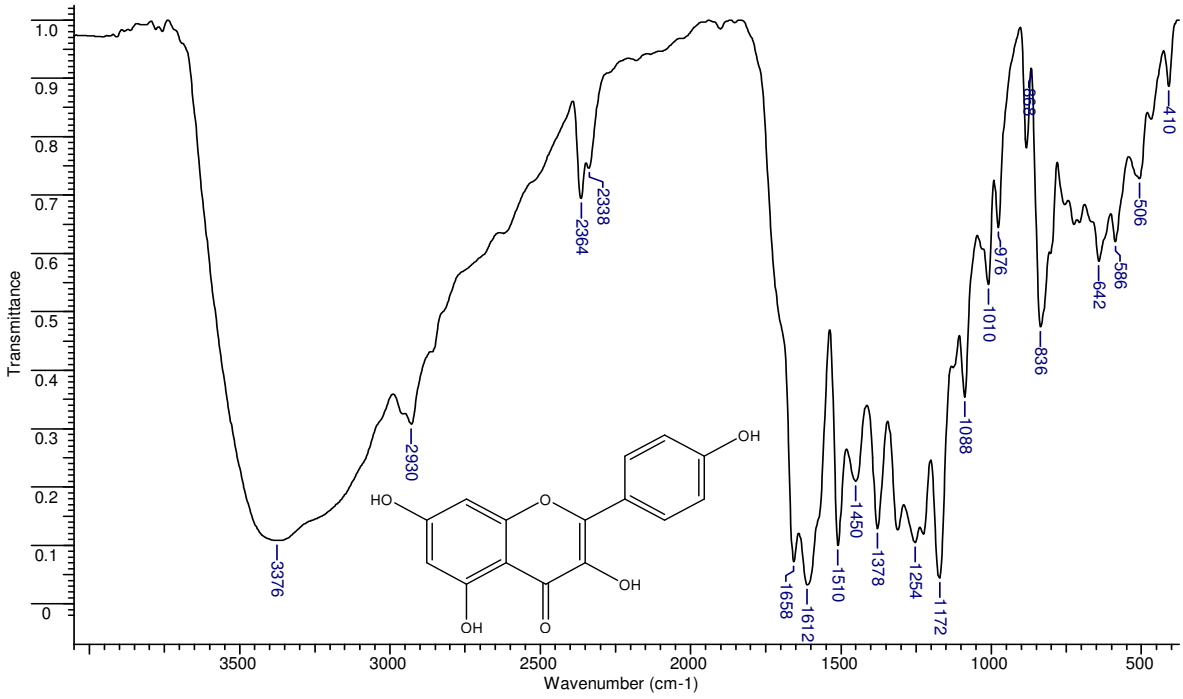


Figura A10: Espectro na região do IV de **MR06** (KBr).

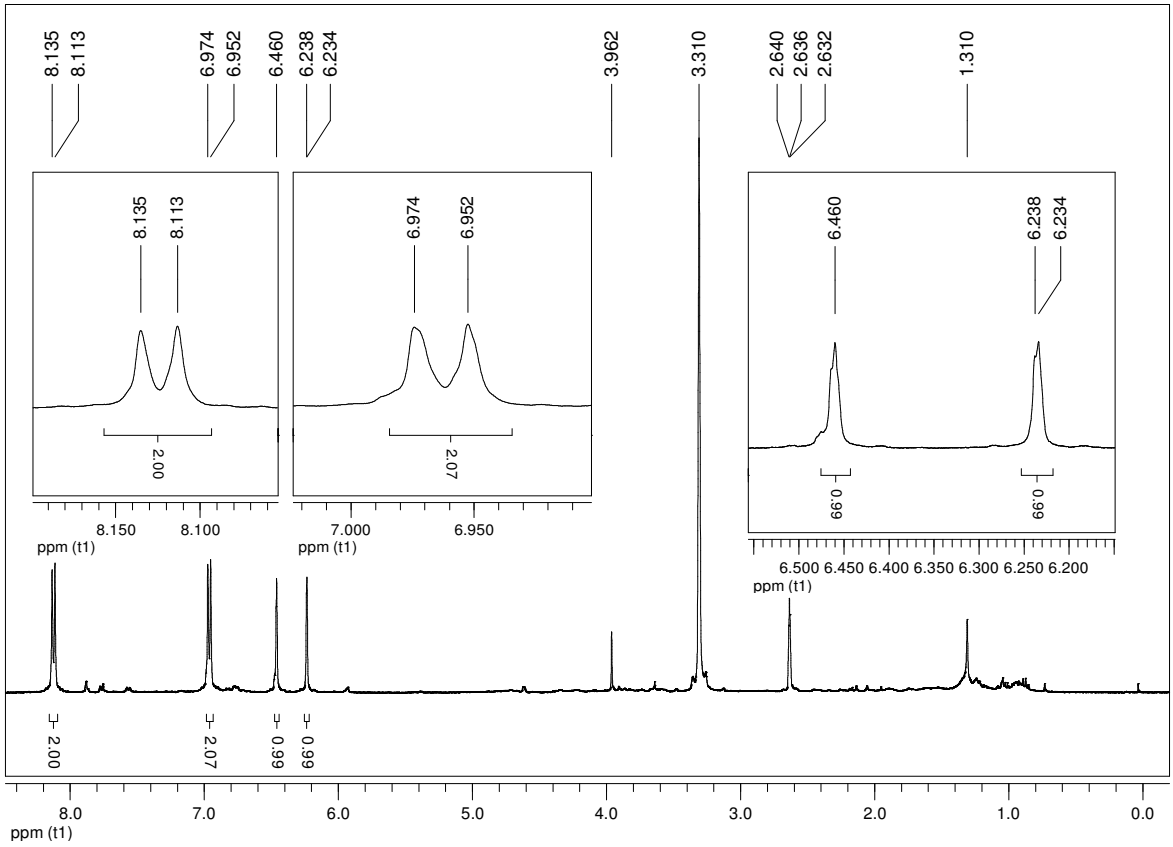


Figura A11: Espectro de RMN de ^{1}H (400 MHz, CD_3OD + DMSO-d_6) de **MR06**.

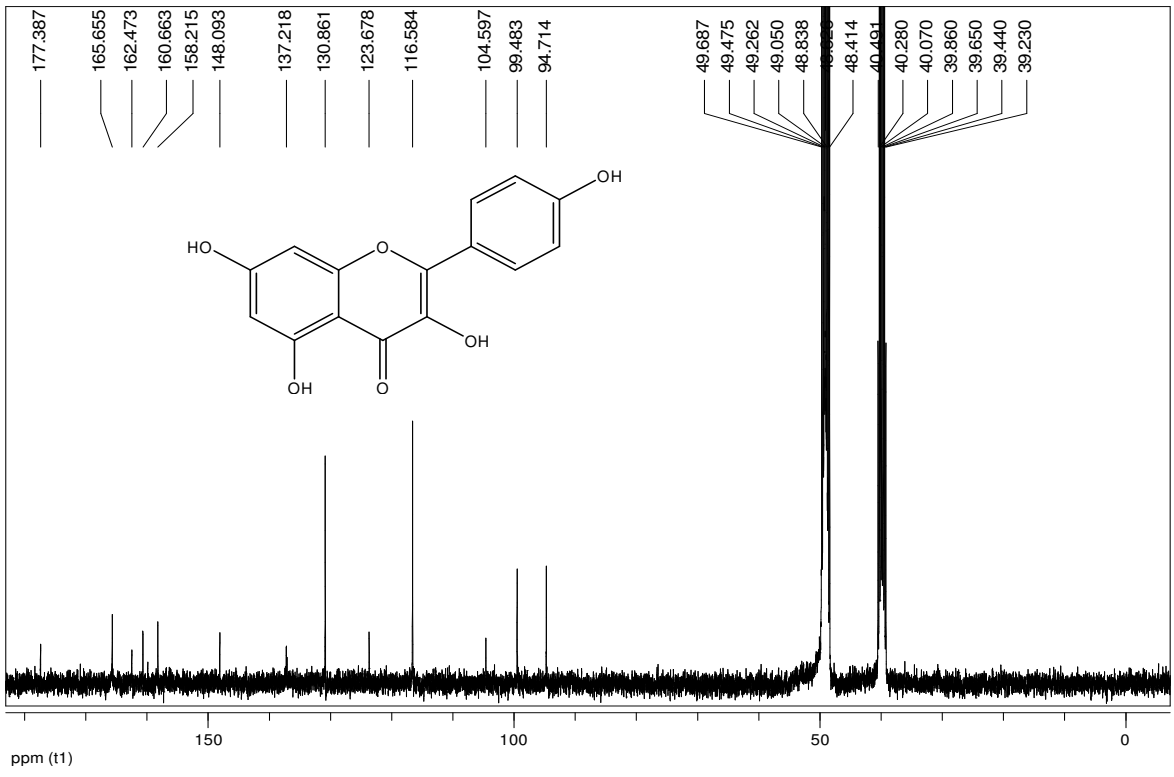


Figura A12: Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, CD_3OD + DMSO-d_6) de **MR06**.

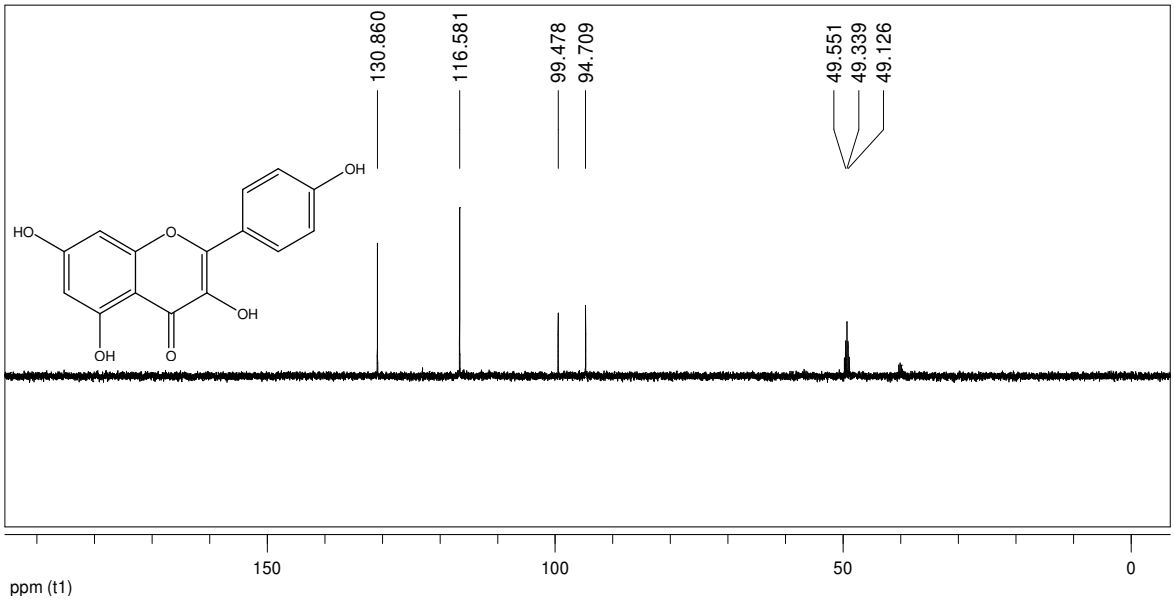


Figura A13: Subespectro DEPT135 (100 MHz, CD_3OD + DMSO-d_6) de **MR06**.

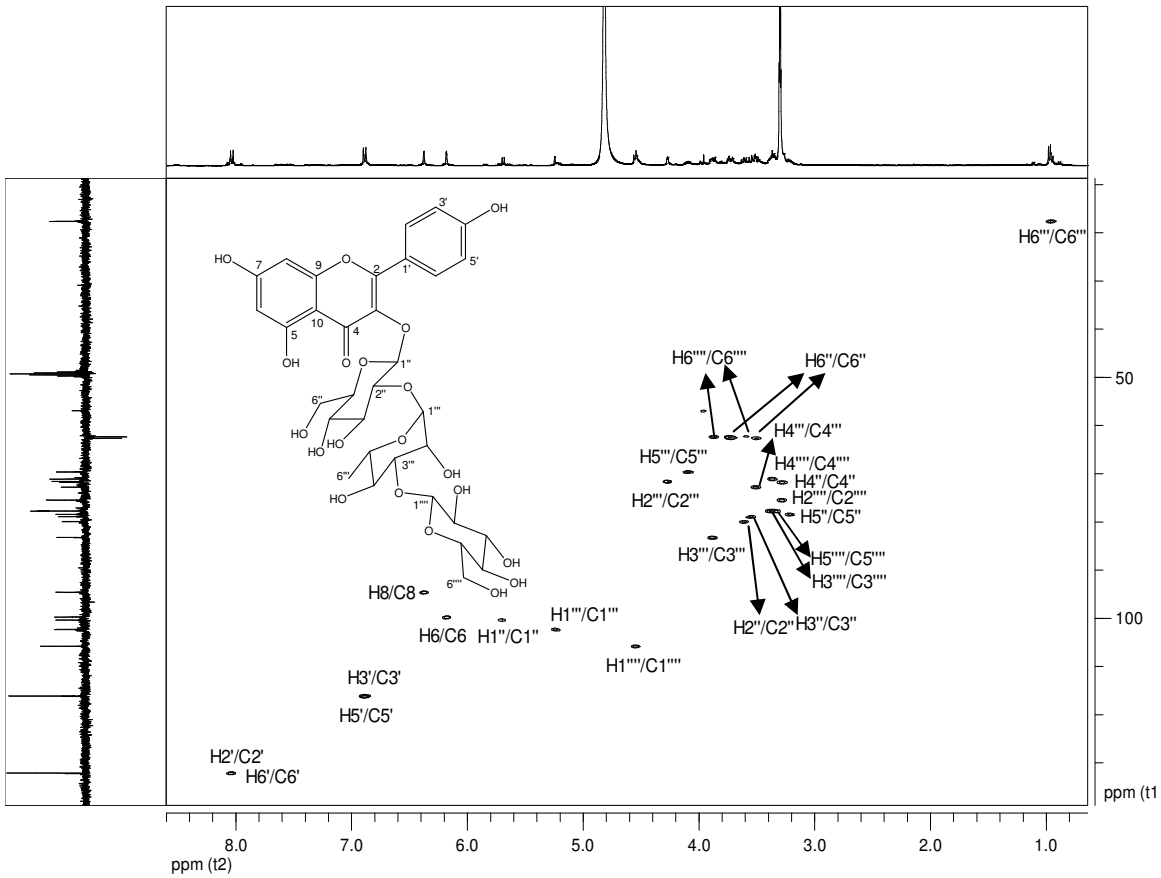


Figura A14: Expansão do mapa de contornos HSQC (400 MHz, CD_3OD) de **MR07**.

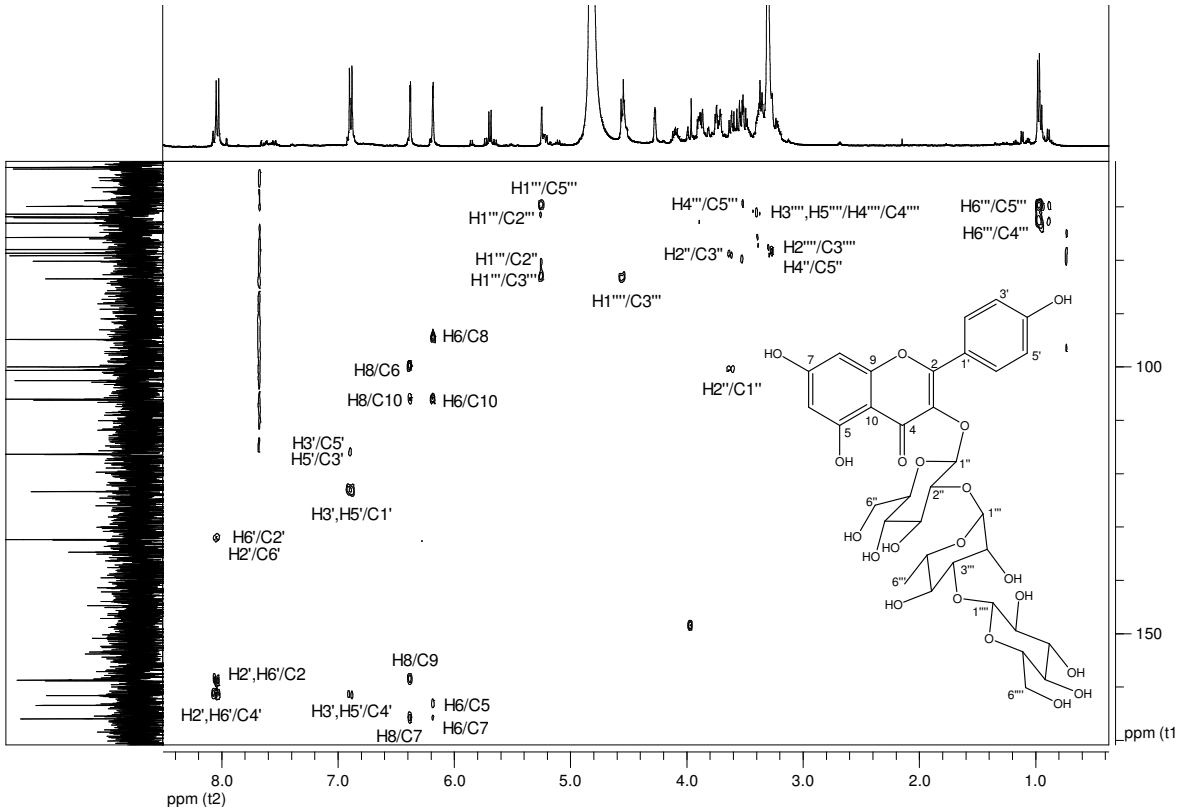


Figura A15: Expansão do mapa de contornos HMBC (400 MHz, CD_3OD) de **MR07**.

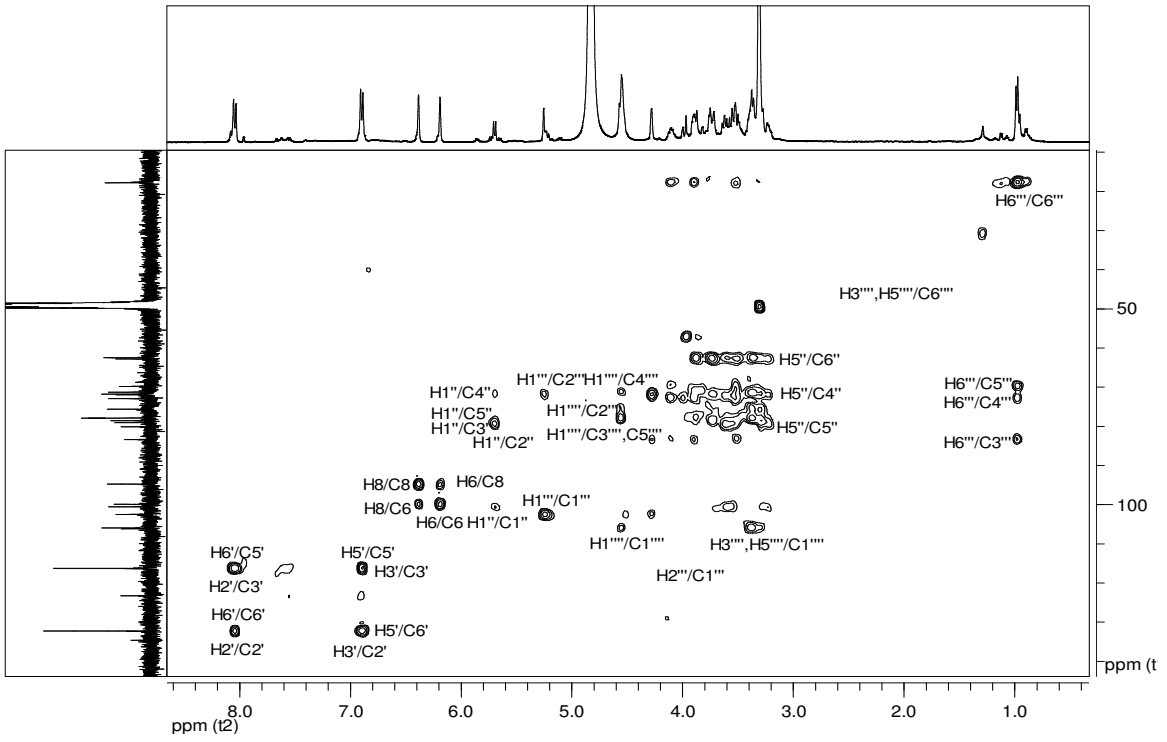


Figura A16: Expansão do mapa de contornos HSQC-TOCSY (400 MHz, CD_3OD) de **MR07**.

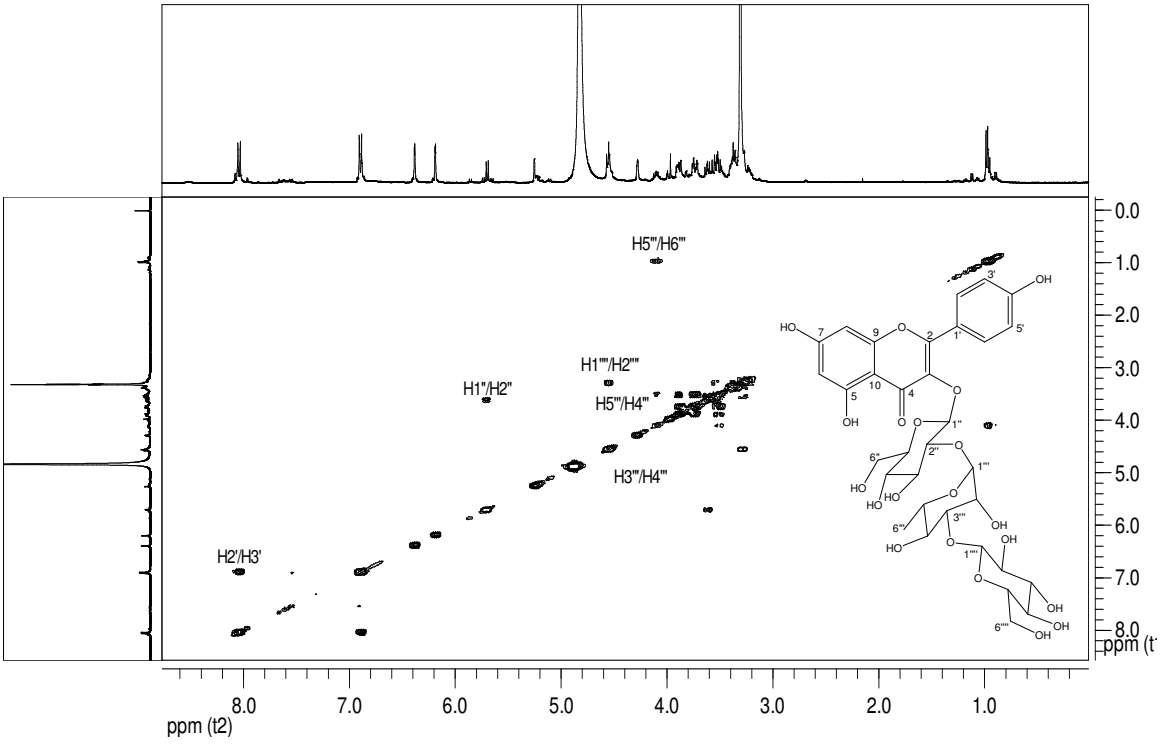


Figura A17: Expansão do mapa de contornos COSY (400 MHz, CD_3OD) de DMSO-d_6) de **MR07**.

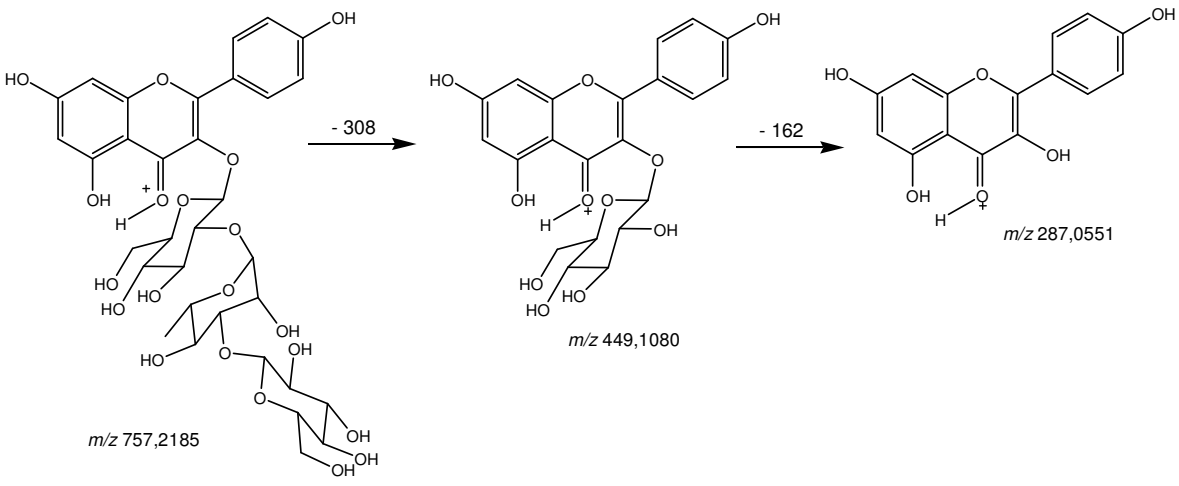


Figura A18: Proposta de fragmentação para o composto **MR07**.

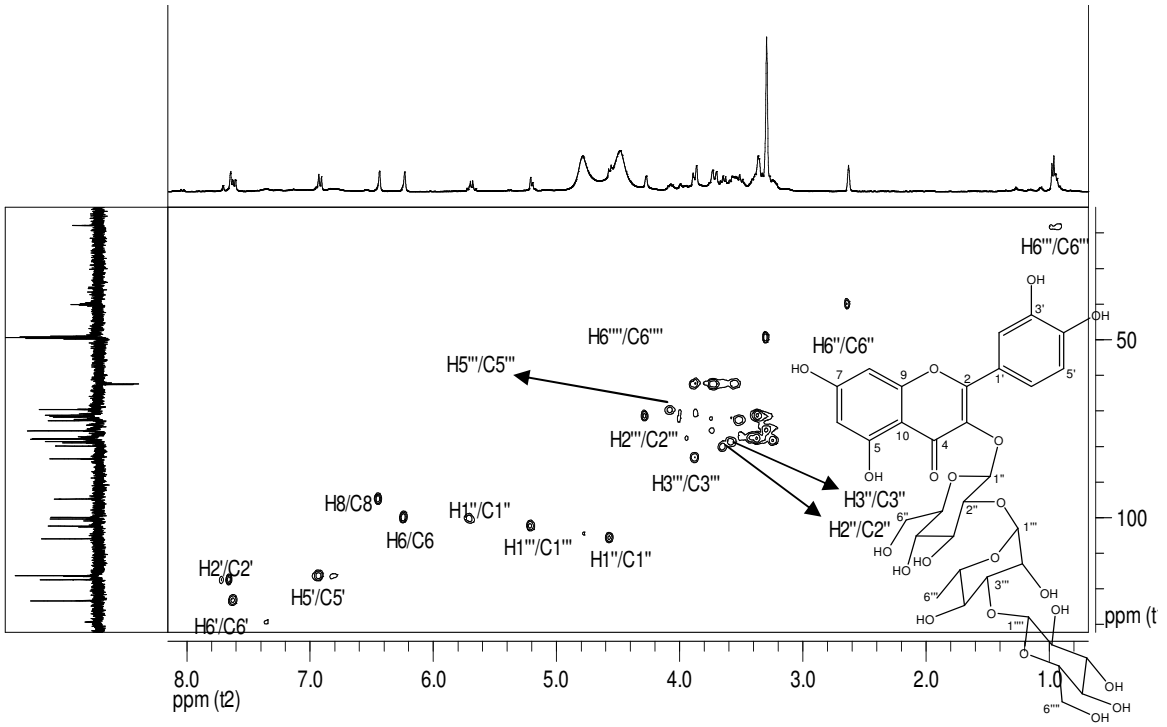


Figura A19: Expansão do mapa de contornos HSQC (400 MHz, CD_3OD + DMSO-d_6) de **MR08**.

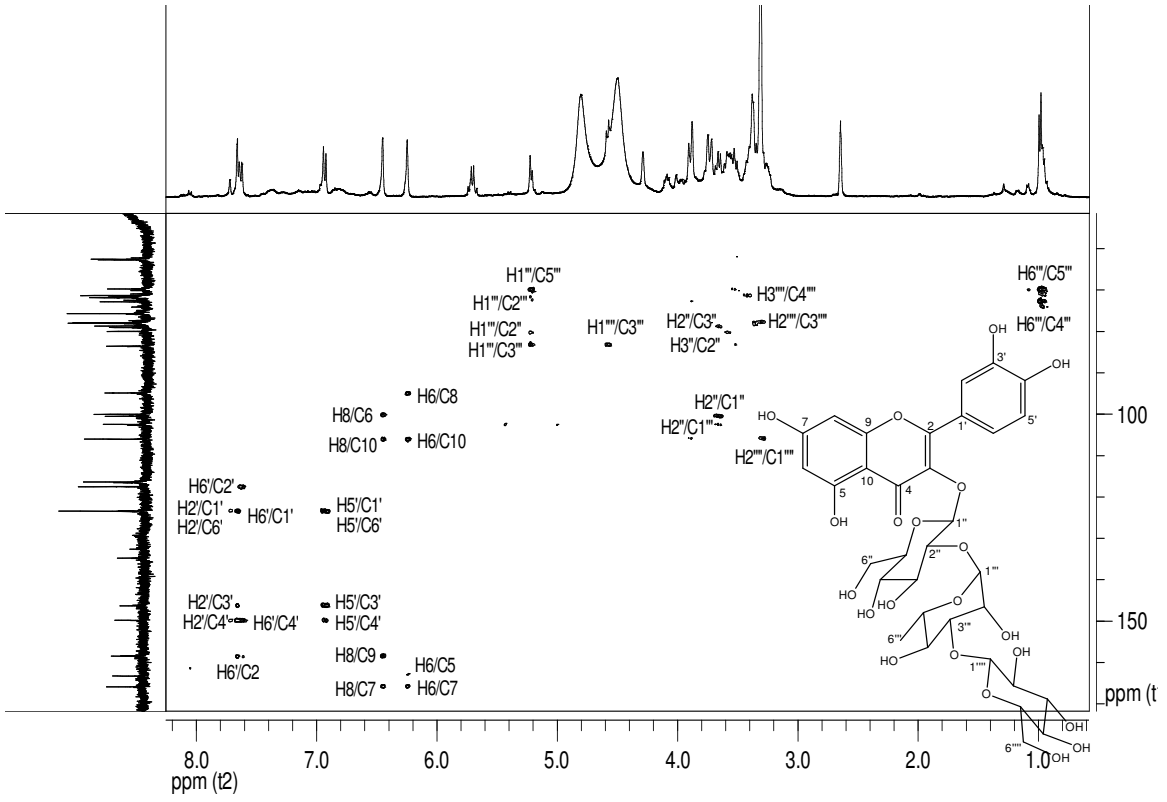


Figura A20: Expansão do mapa de contornos HMBC (400 MHz, CD_3OD + DMSO-d_6) de **MR08**.

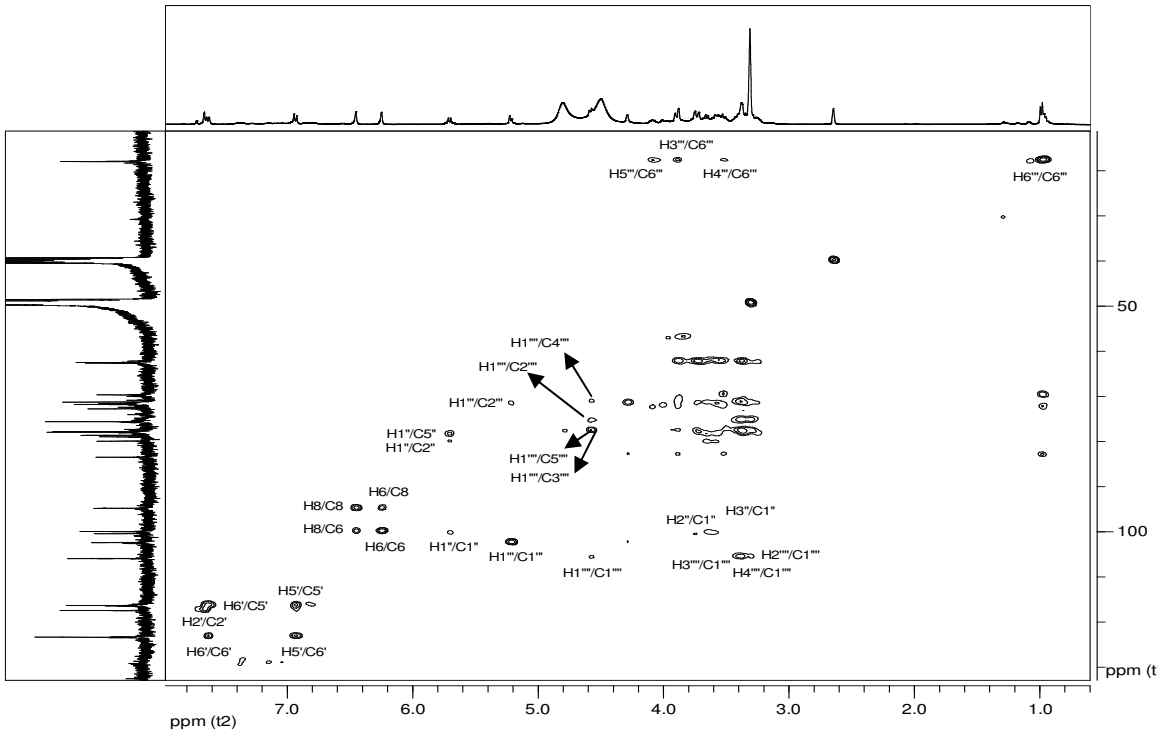


Figura A21: Expansão do mapa de contornos HSQC-TOCSY (400 MHz, CD_3OD + DMSO-d_6) de **MR08**.

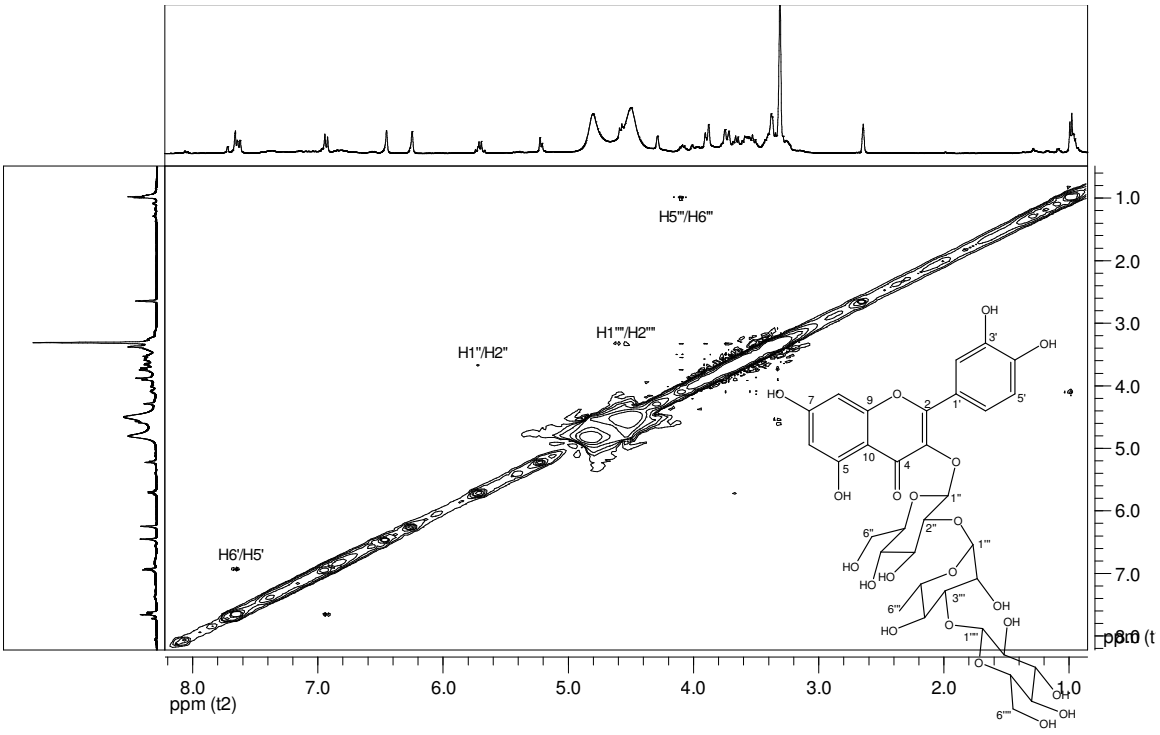


Figura A22: Expansão do mapa de contornos COSY (400 MHz, CD_3OD + DMSO-d_6) de **MR08**.

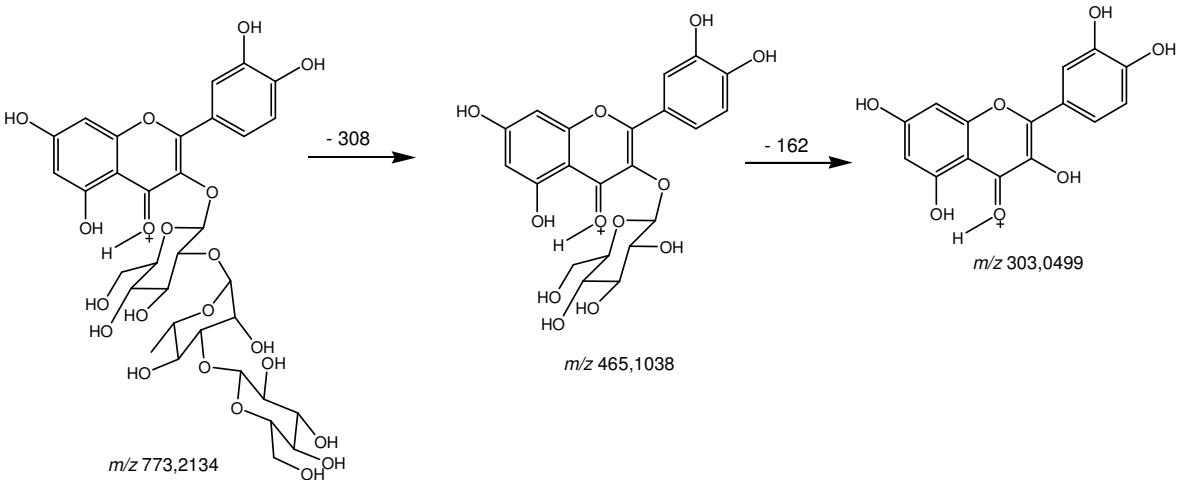


Figura A23: Proposta de fragmentação para o composto **MR08**.

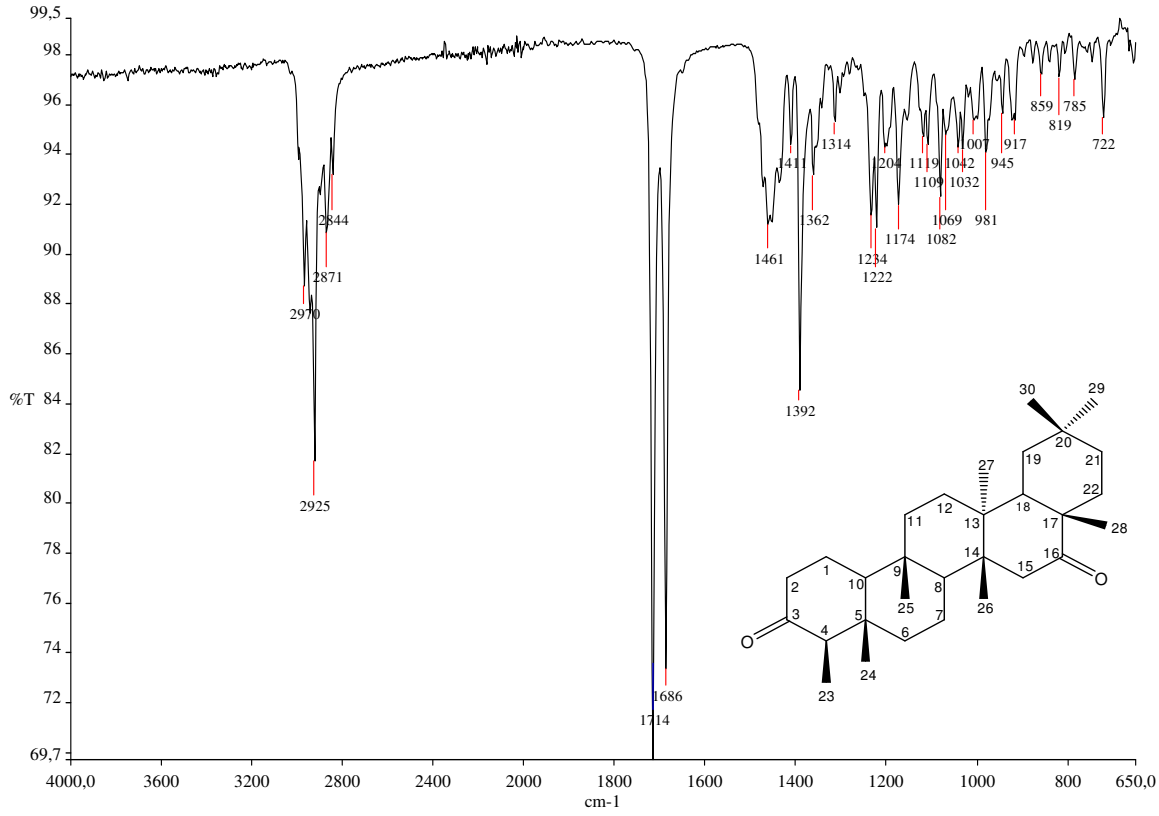


Figura A24: Espectro na região do IV de **MR09** (ATR).

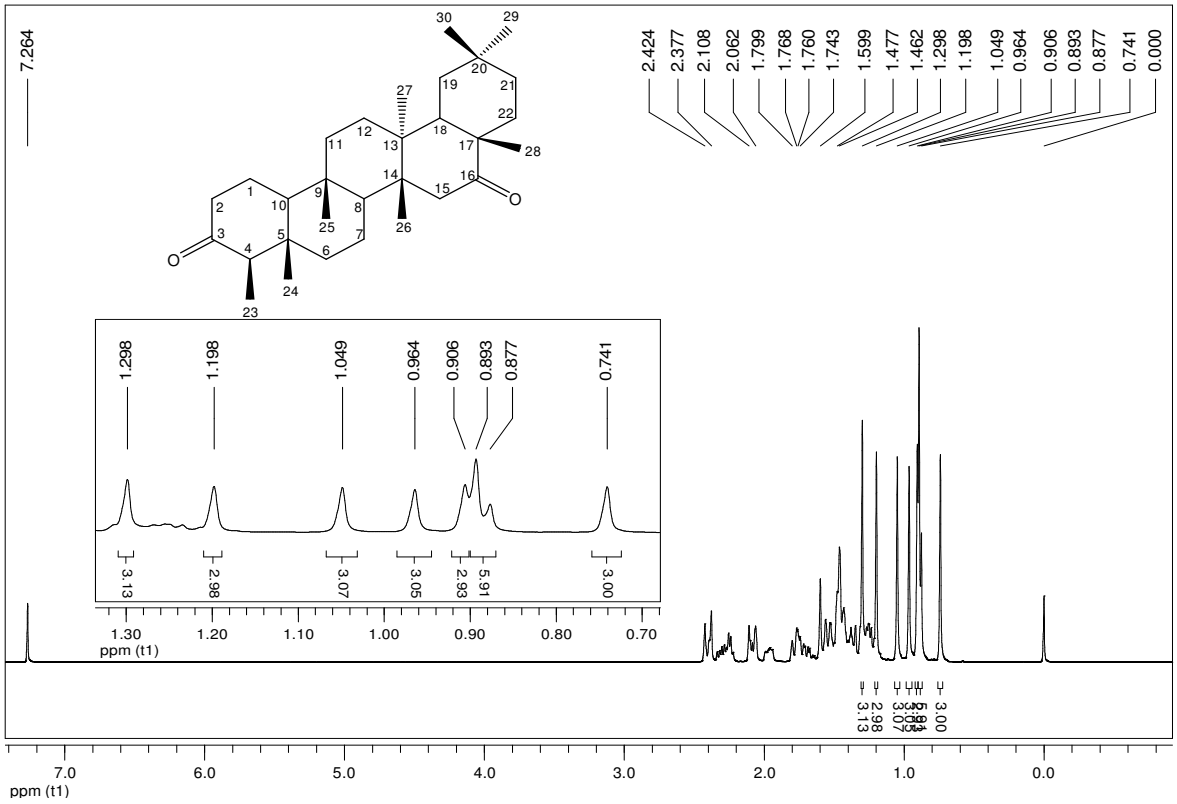


Figura A25: Espectro de RMN de ^{1}H (400 MHz, $CDCl_3$) de **MR09**.

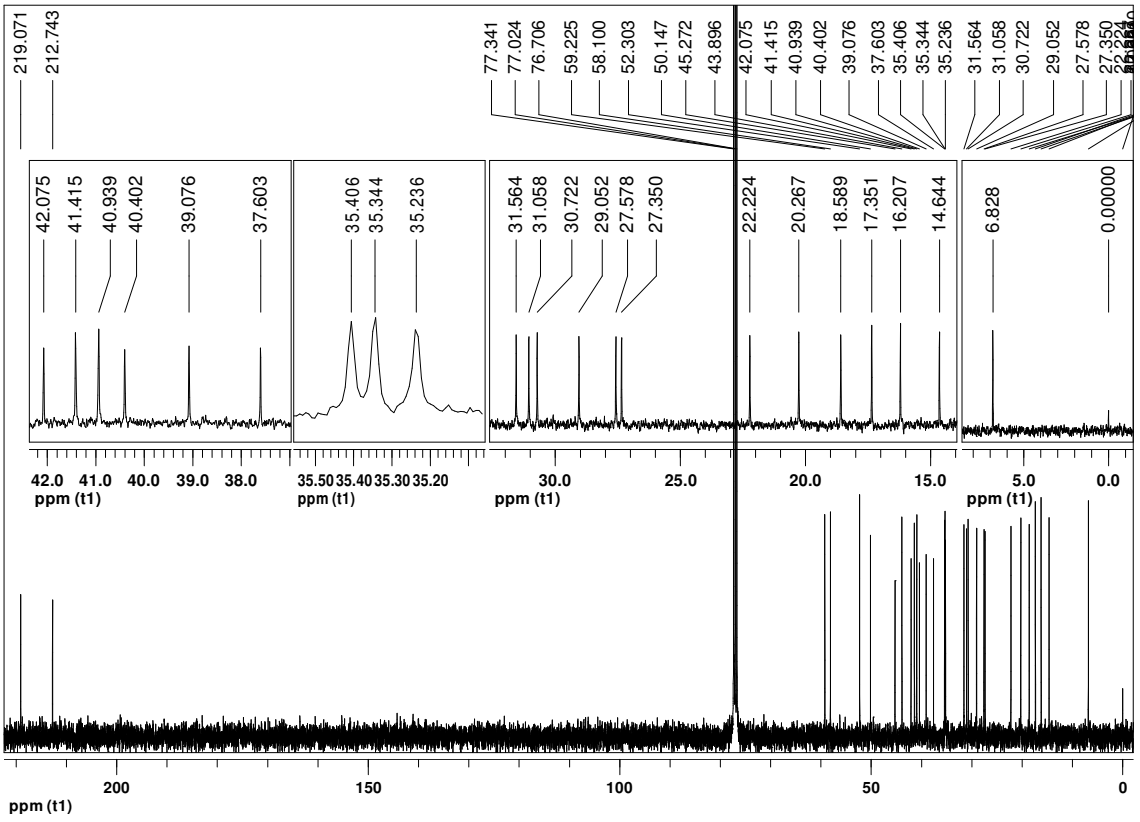


Figura A26: Espectro e expansão de RMN de ^{13}C (100 MHz, $CDCl_3$) de **MR09**.

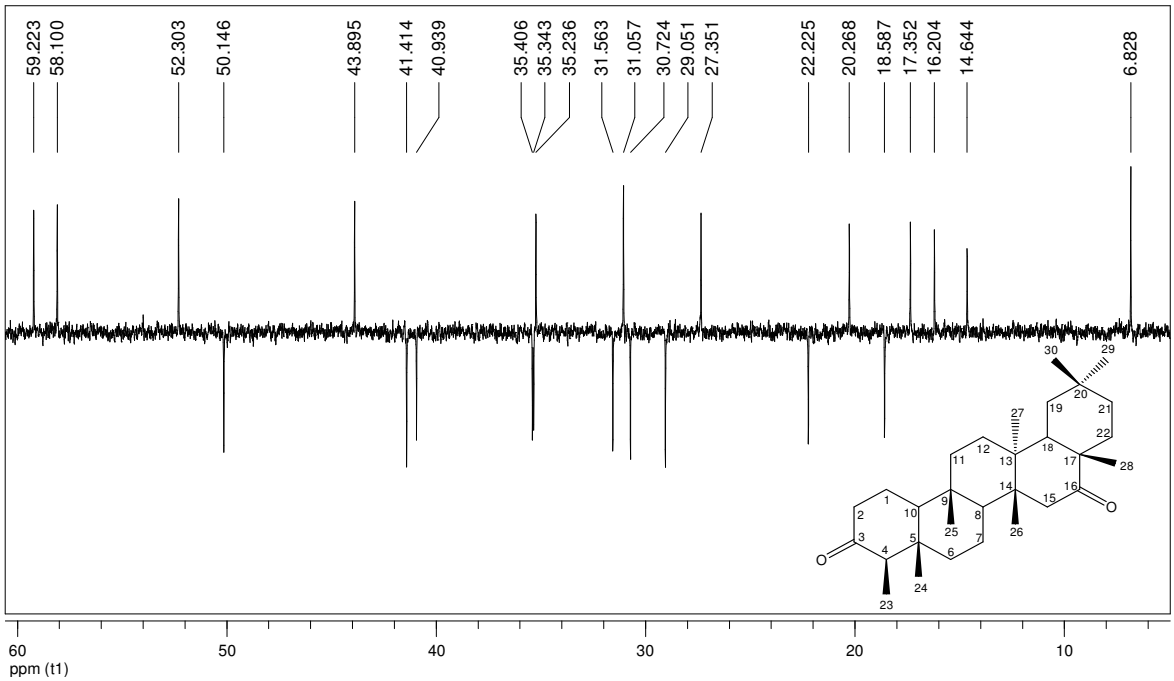


Figura A27: Subespectro DEPT135 (100 MHz, $CDCl_3$) de **MR09**.

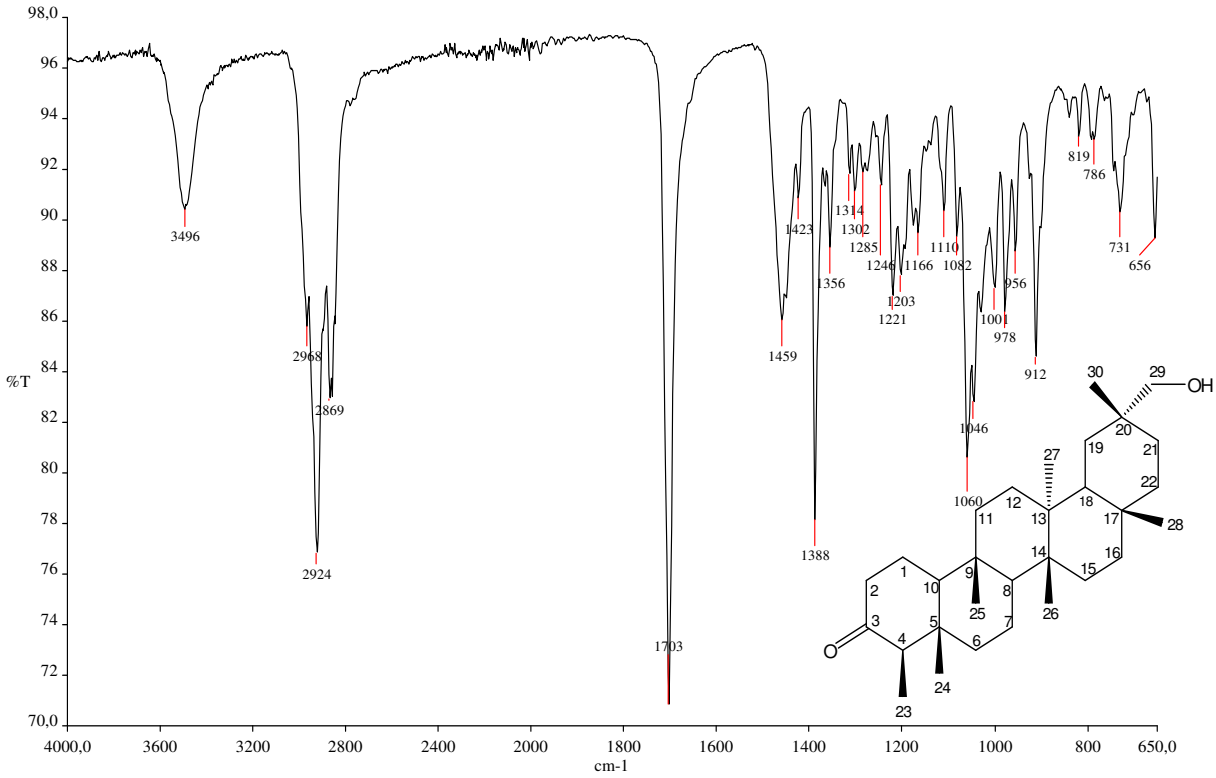


Figura A28: Espectro na região do IV de **MR10** (ATR).

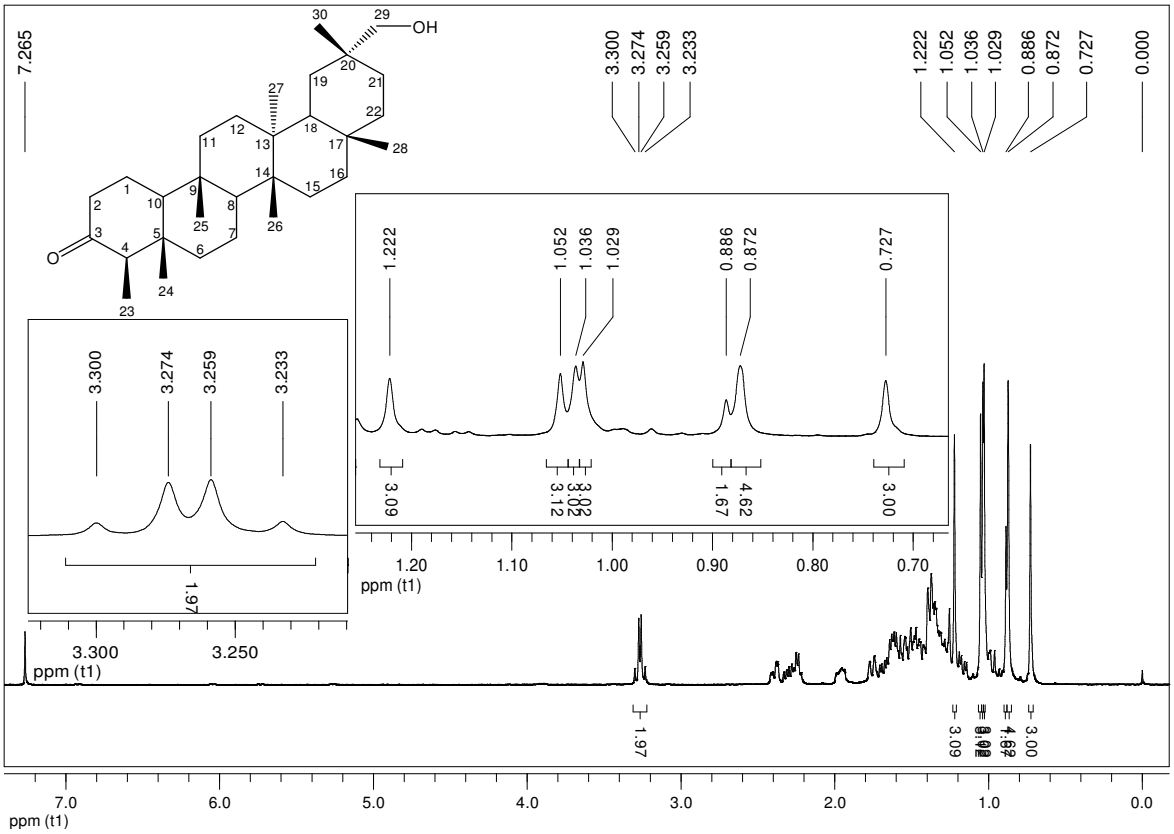


Figura A29: Espectro de RMN de ^{1}H (400 MHz, $CDCl_3$) de **MR10**.

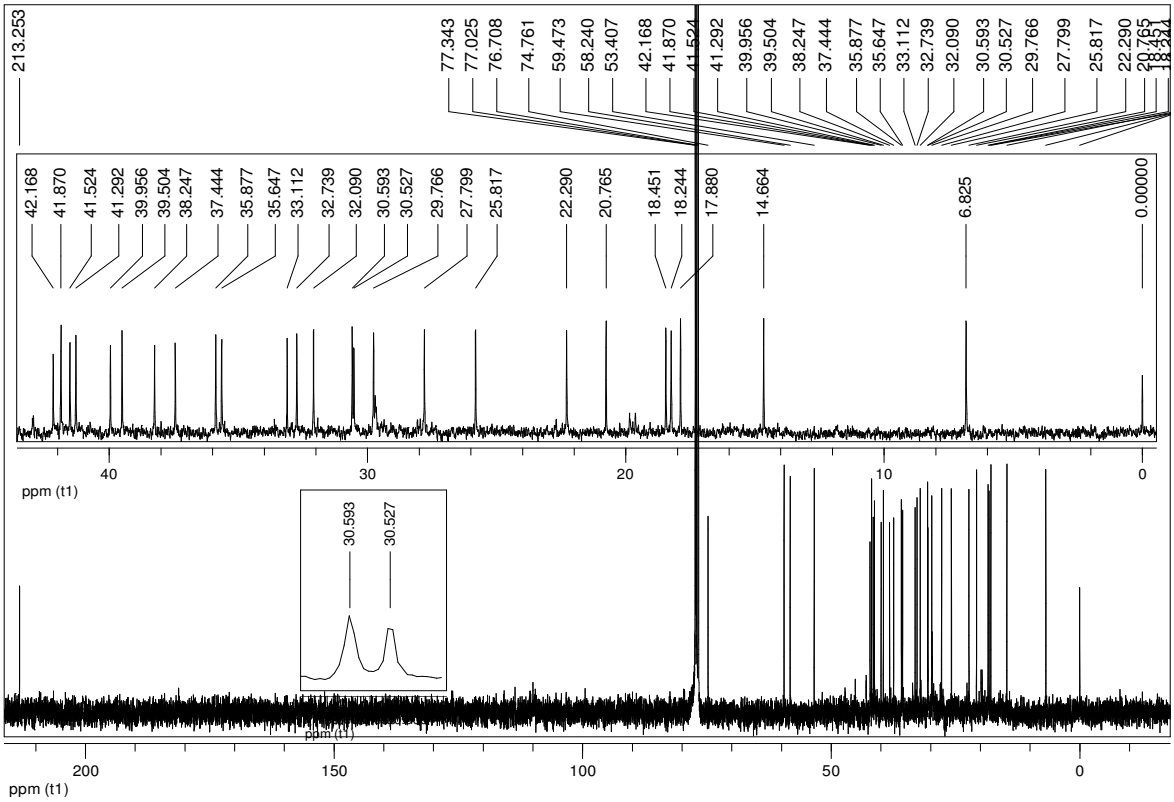


Figura A30: Espectro e expansão de RMN de ^{13}C (100 MHz, $CDCl_3$) de **MR10**.

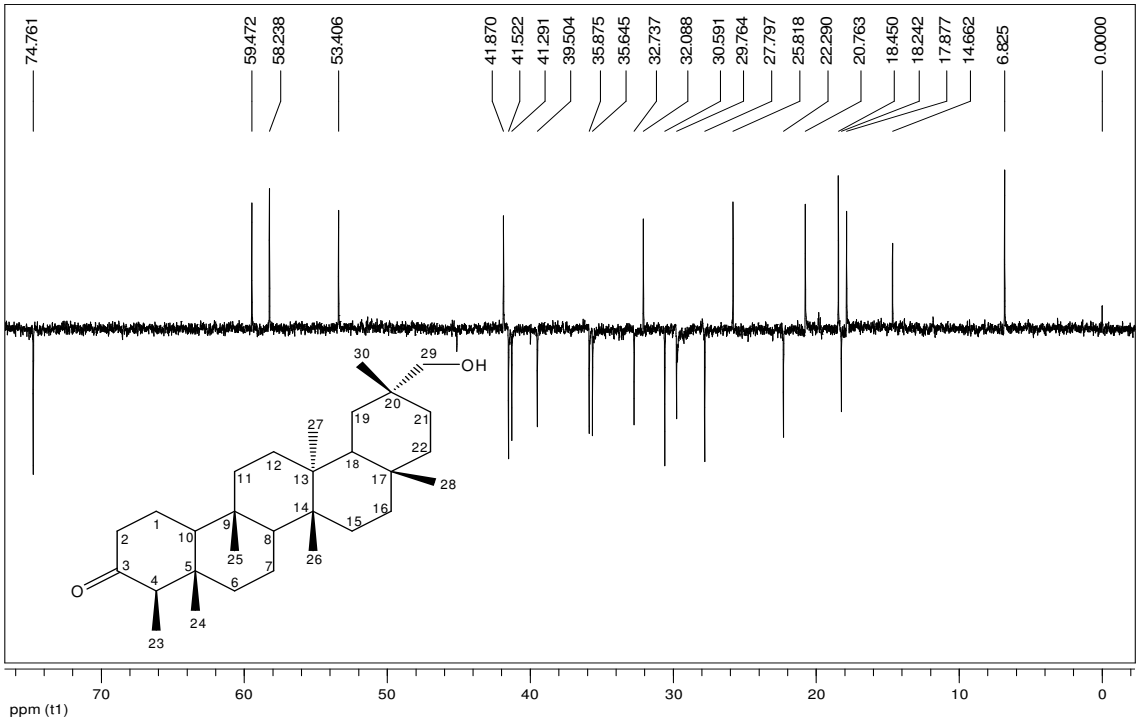


Figura A31: Subespectro DEPT135 (100 MHz, $CDCl_3$) de **MR10**.

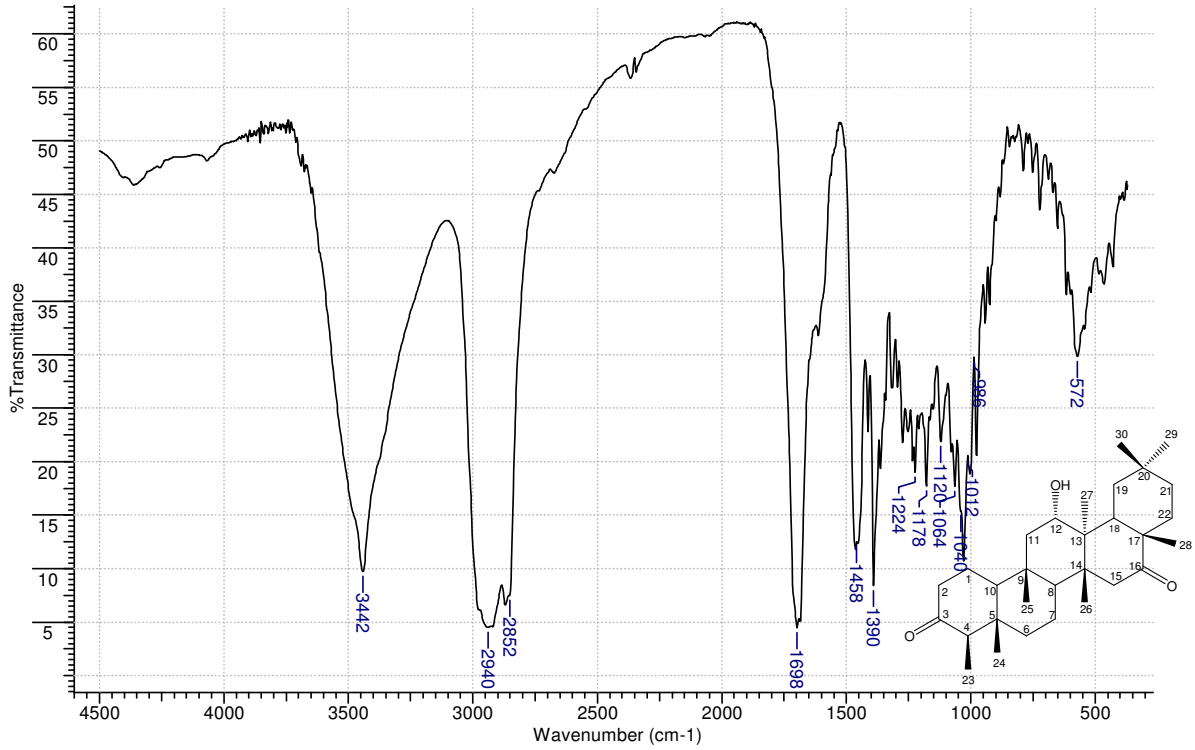


Figura A32: Espectro na região do IV de **MR11** (KBr).

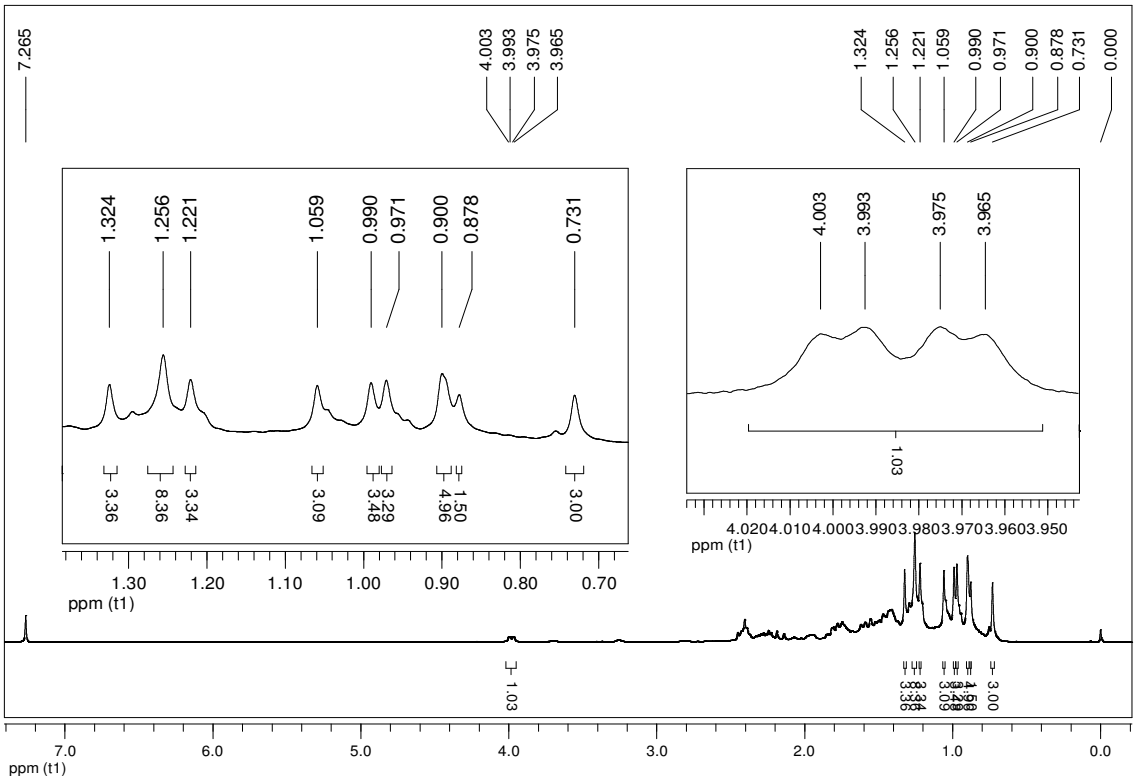


Figura A33: Espectro de RMN de ^{1}H (400 MHz) de **MR11** em $CDCl_3$.

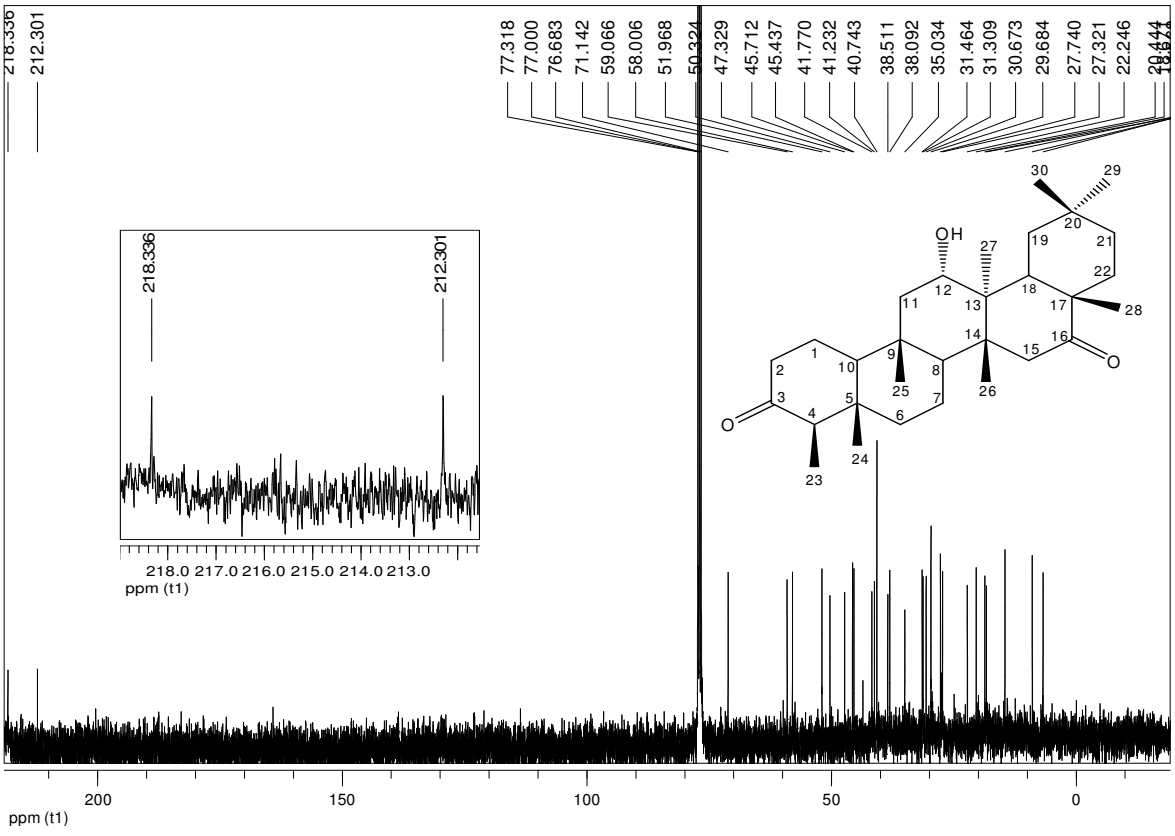


Figura A34: Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz) de **MR11** em $CDCl_3$.

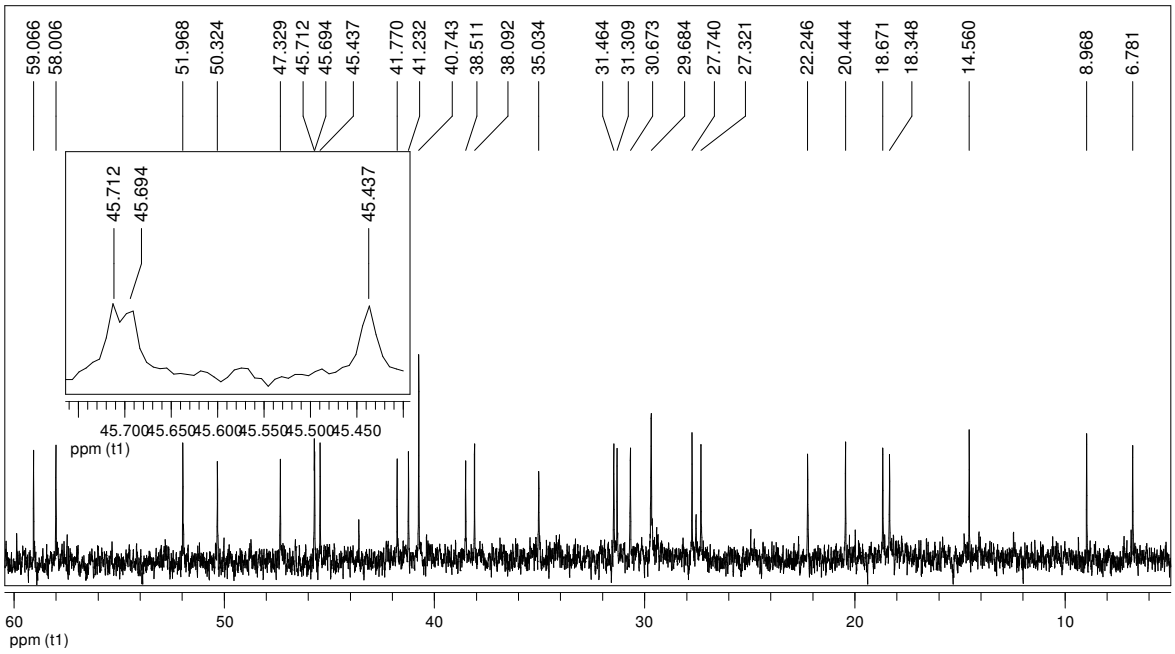


Figura A35: Expansão do espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz) de **MR11** em $CDCl_3$.

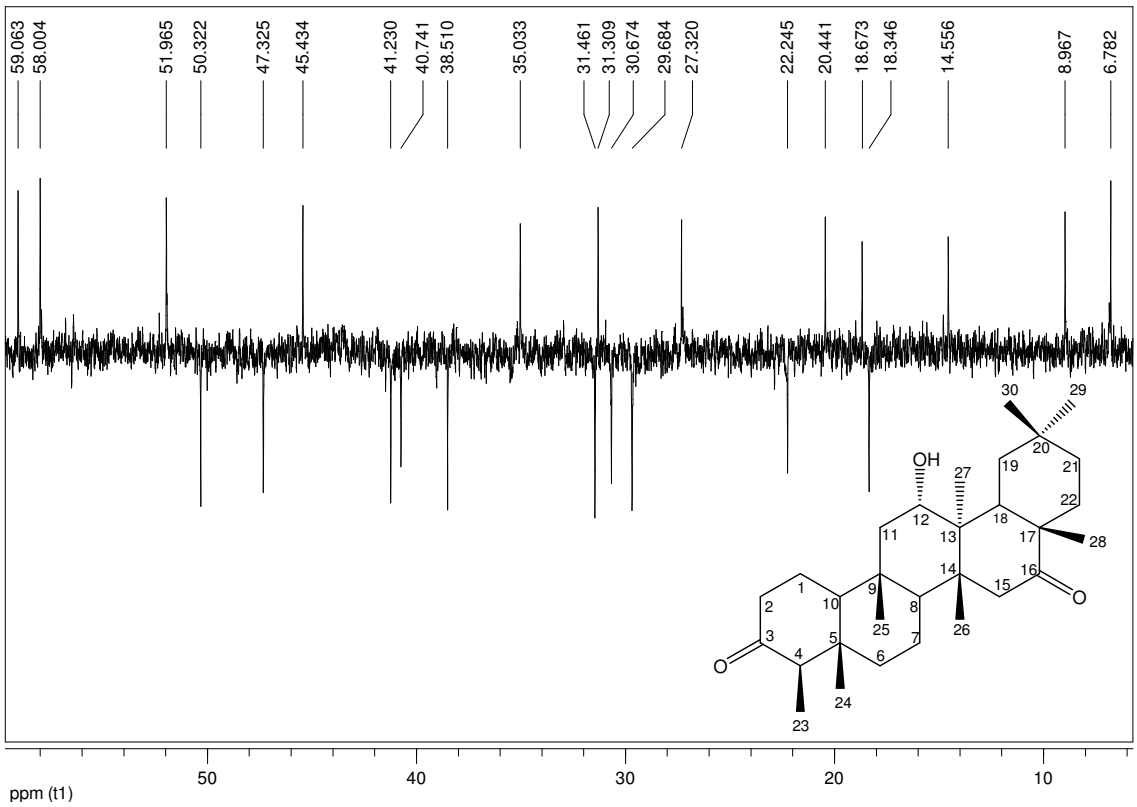


Figura A36: Subespectro DEPT135 (100 MHz) de **MR11** em $CDCl_3$.

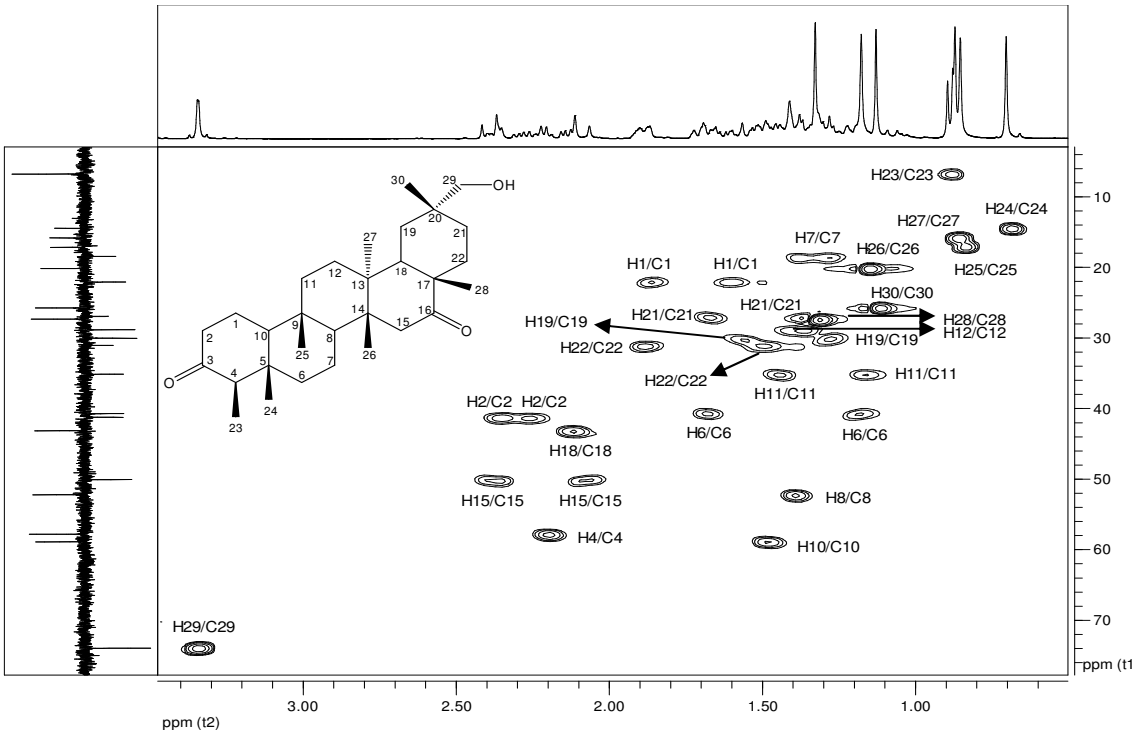


Figura A37: Expansão do mapa de contornos HSQC (400 MHz, $CDCl_3$ + piridina-d_5) de **MR12**.

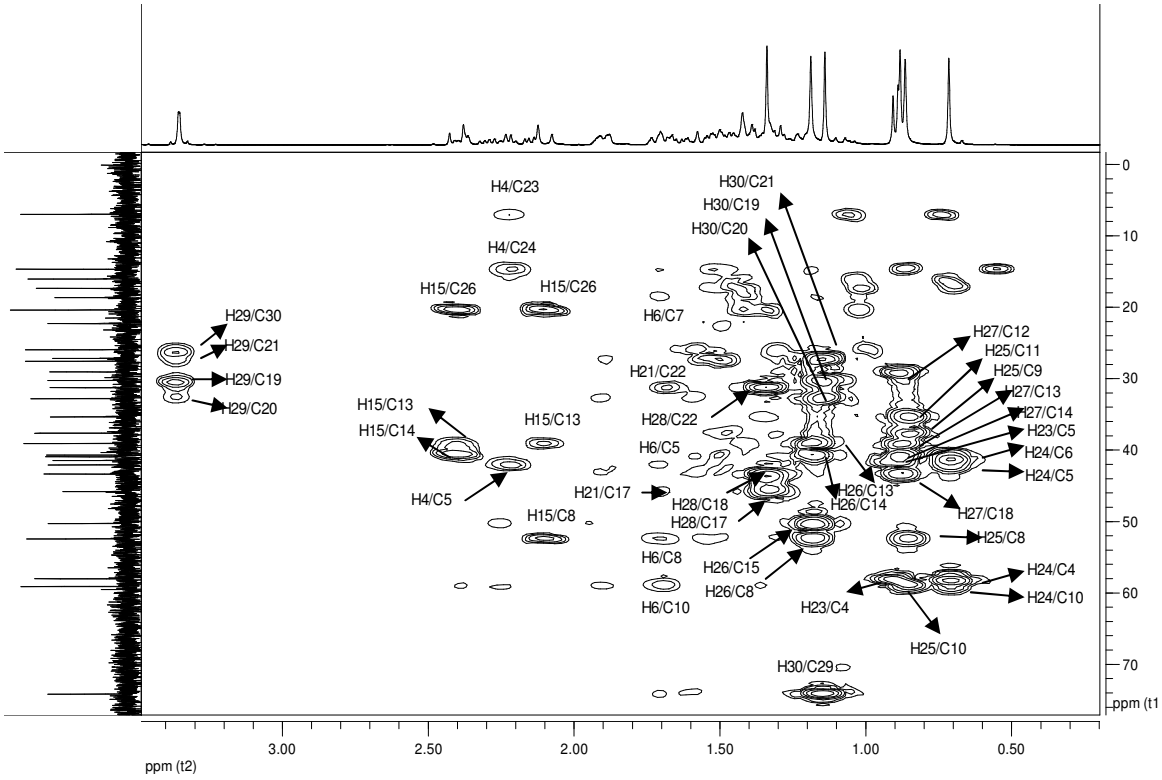


Figura A38: Expansão do mapa de contornos HMBC (400 MHz, $CDCl_3$ + piridina-d_5) de **MR12**.

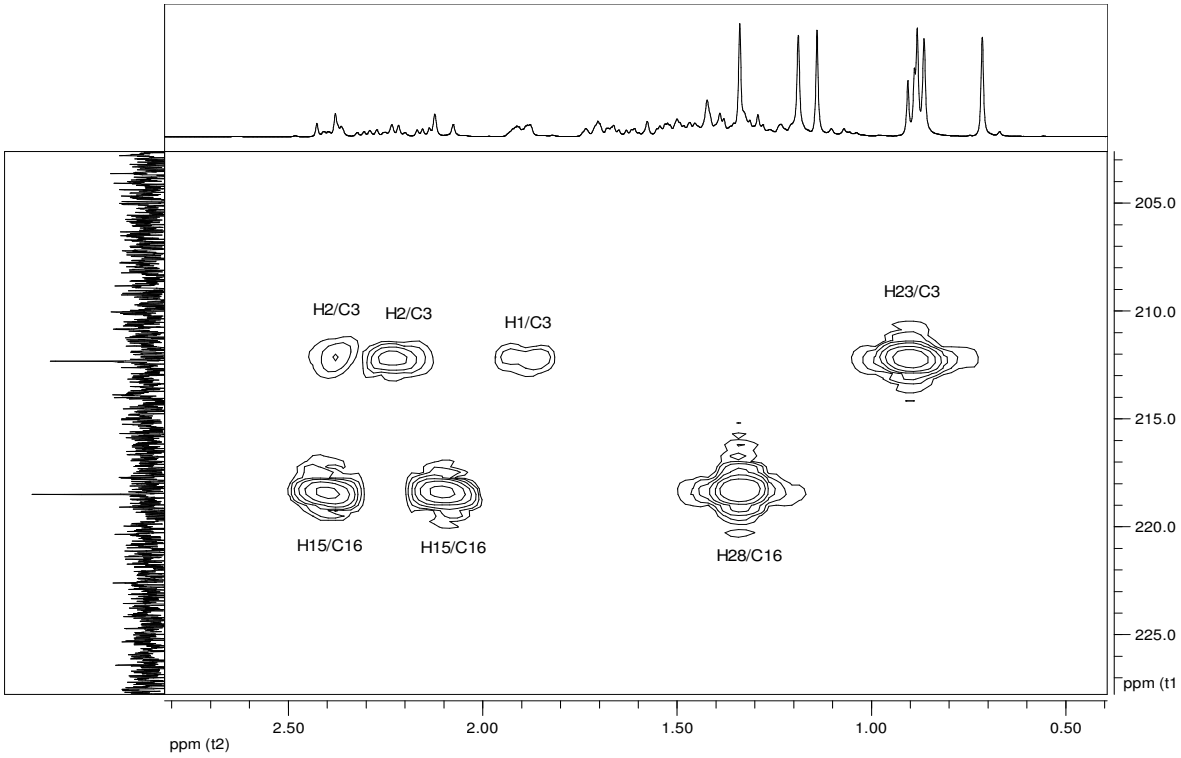


Figura A39: Expansão do mapa de contornos HMBC (400 MHz, $CDCl_3$ + piridina-d_5) de **MR12**.

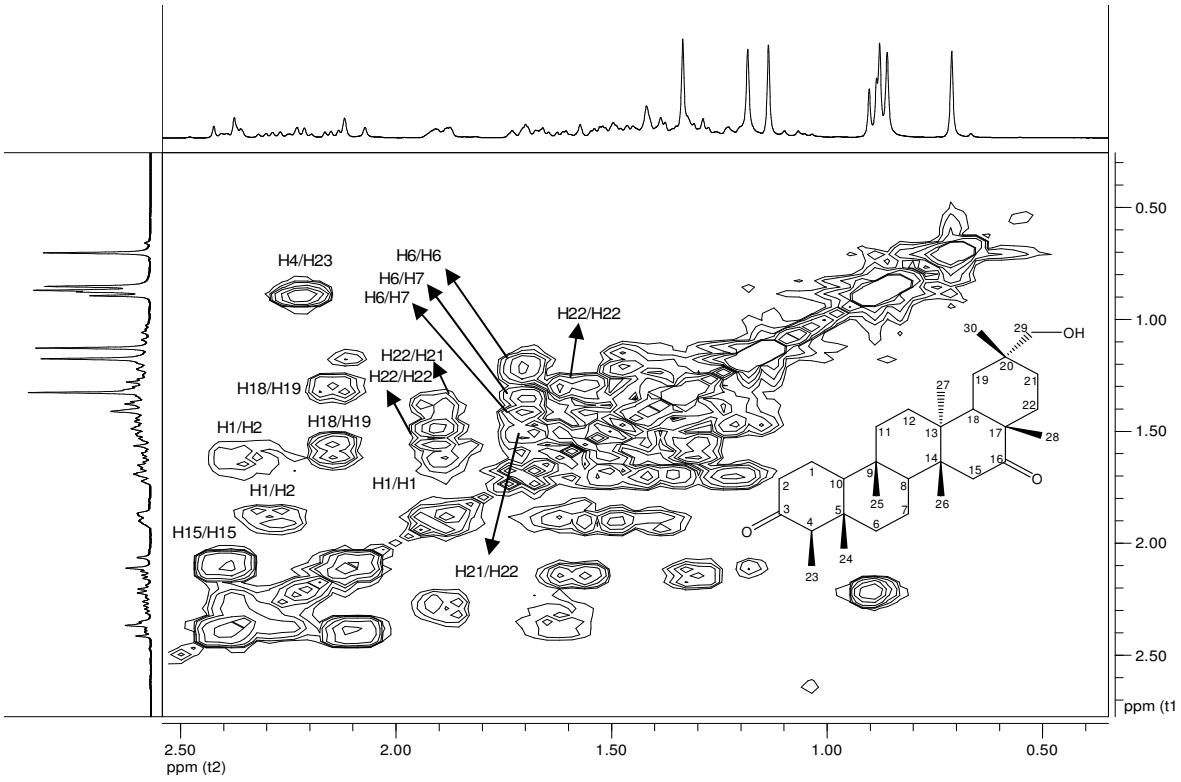


Figura A40: Expansão do mapa de contornos COSY (400 MHz, $CDCl_3$ + piridina-d_5) de **MR12**.

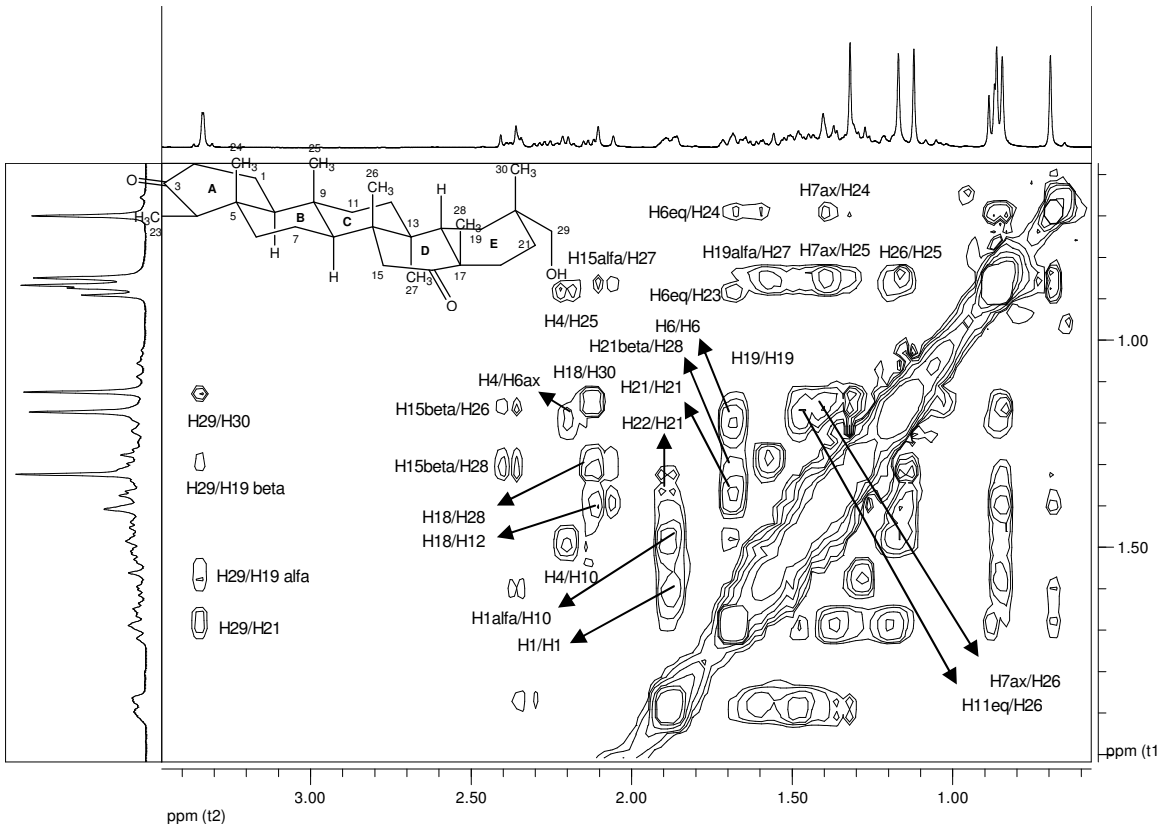


Figura A41: Expansão do mapa de contornos NOESY (400 MHz, $CDCl_3$ + piridina-d_5) de **MR12**.

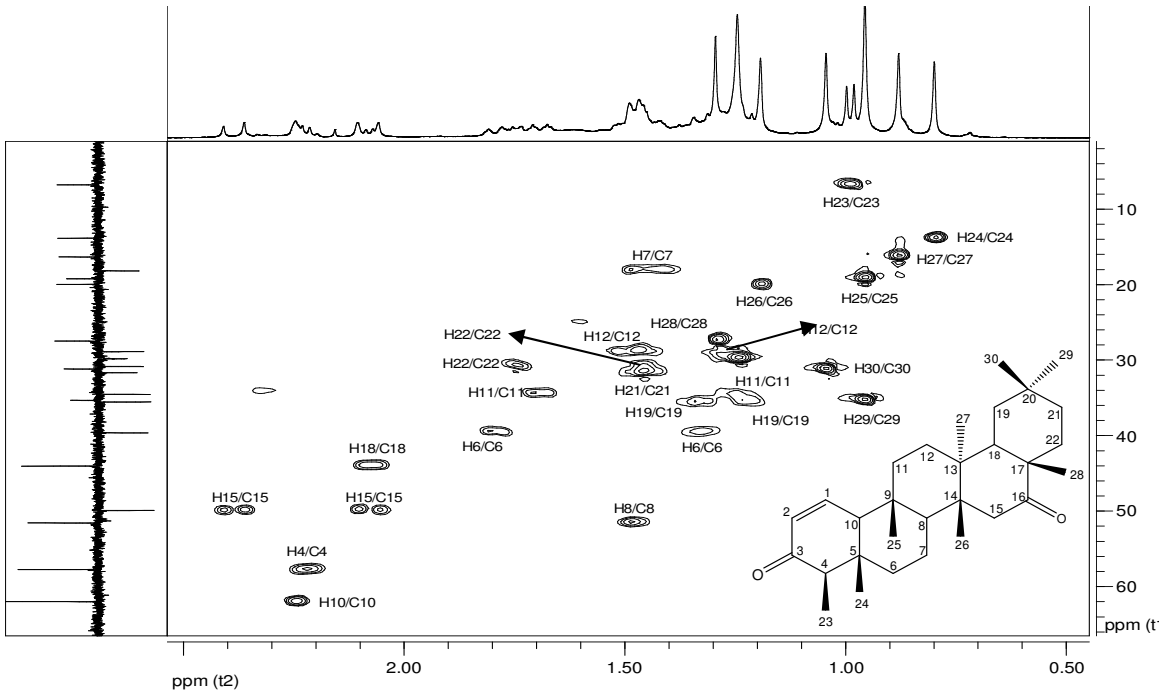


Figura A42: Expansão do mapa de contornos HSQC (400 MHz, $CDCl_3$) de **MR13**.

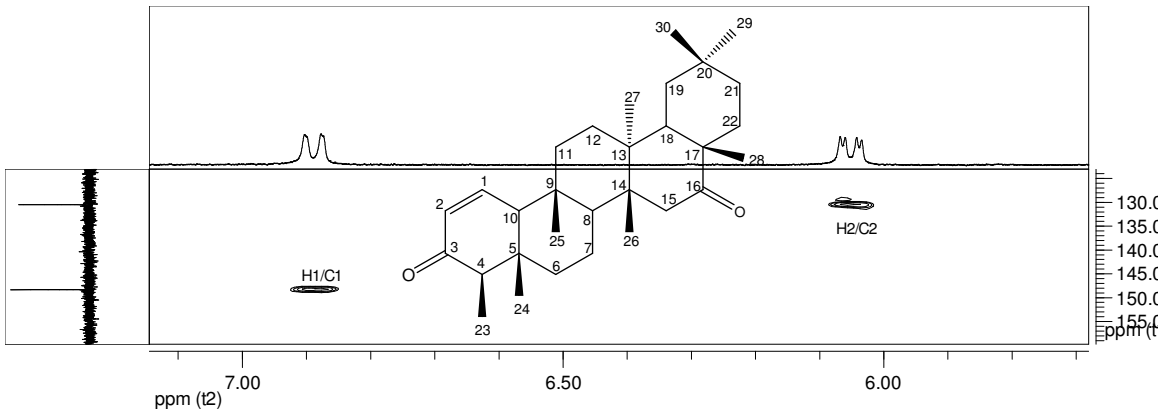


Figura A43: Expansão do mapa de contornos HSQC (400 MHz, $CDCl_3$) de **MR13**.

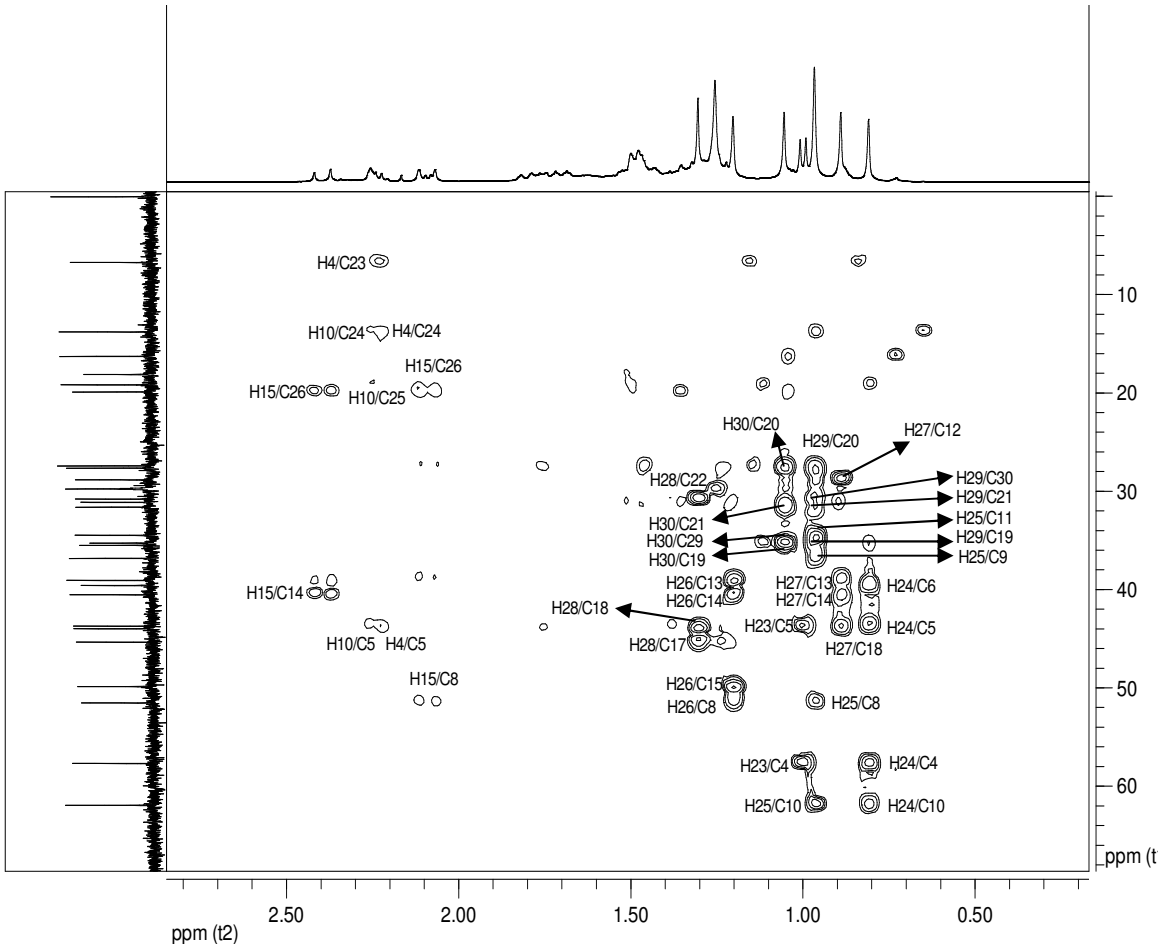


Figura A44: Expansão do mapa de contornos HMBC (400 MHz, $CDCl_3$) de **MR13**.

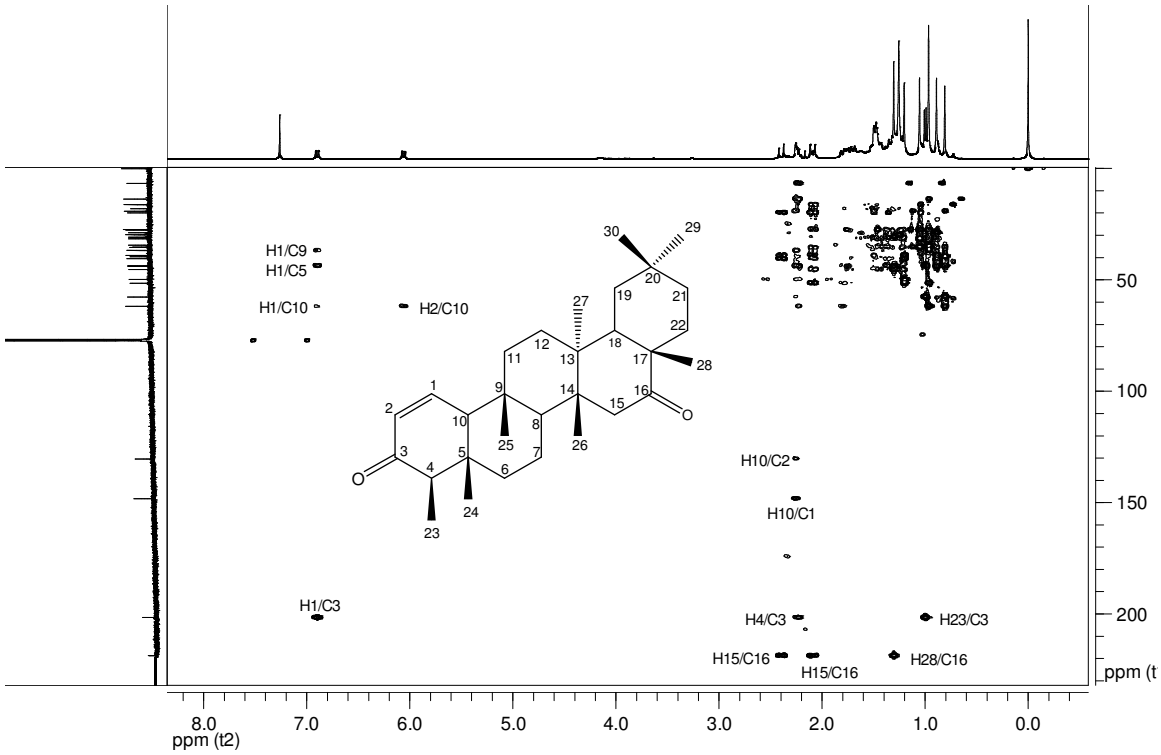


Figura A45: Expansão do mapa de contornos HMBC (400 MHz, $CDCl_3$) de **MR13**.

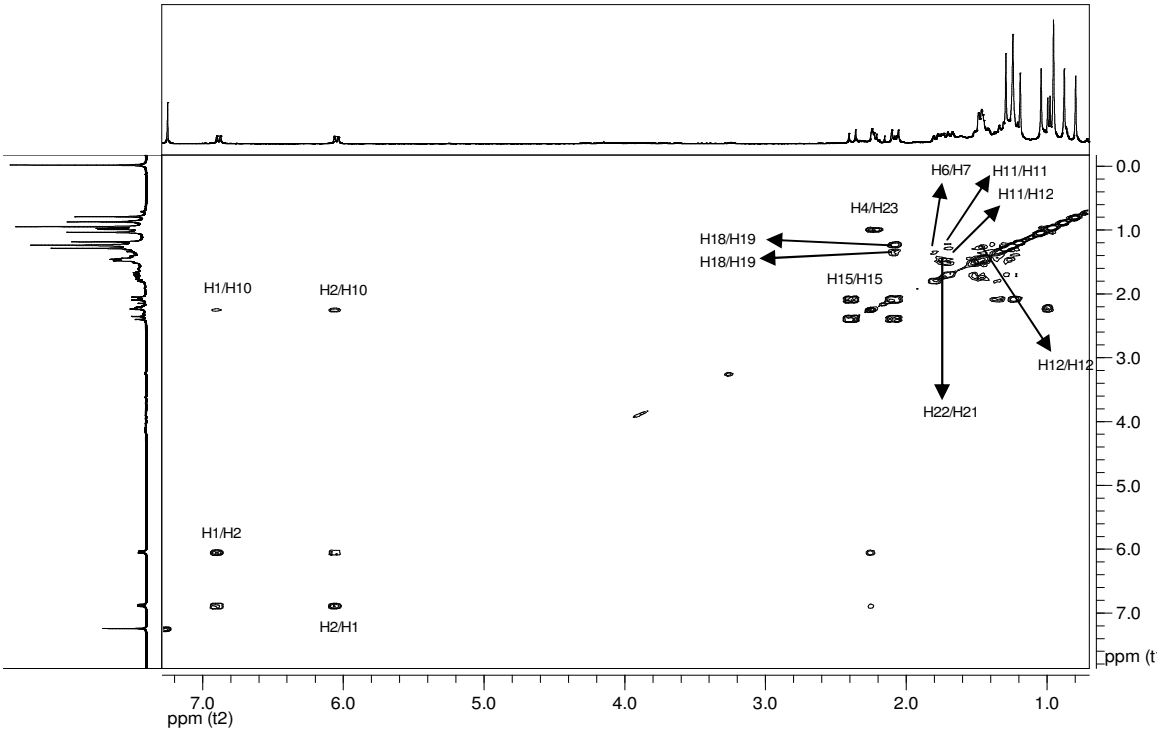


Figura A46: Expansão do mapa de contornos COSY (400 MHz, $CDCl_3$) de **MR13**.

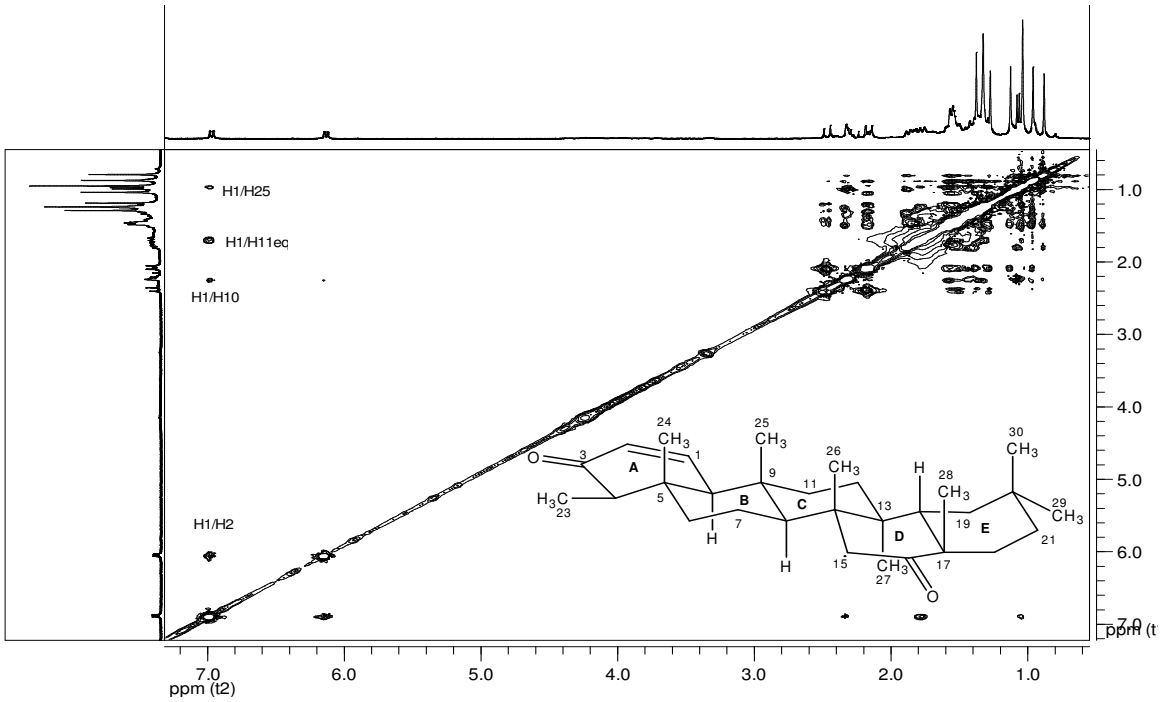


Figura A47: Expansão do mapa de contornos NOESY (400 MHz, $CDCl_3$) de **MR13**.

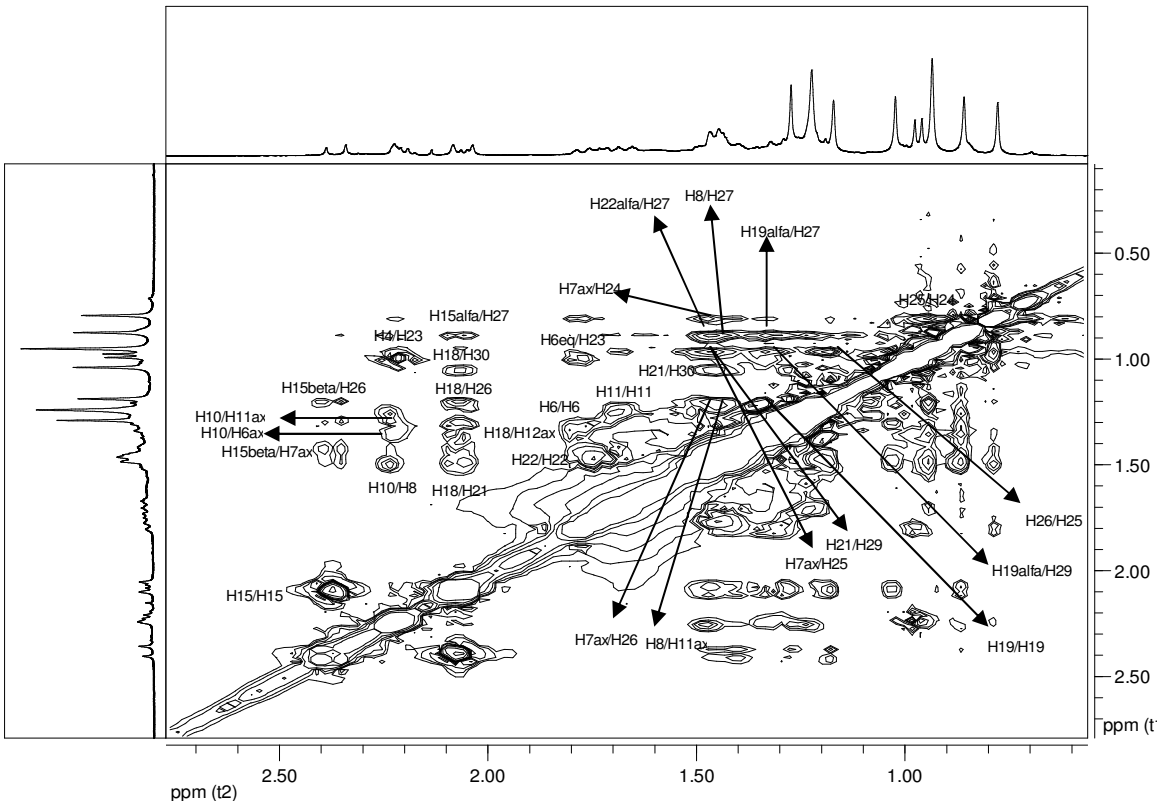


Figura A48: Expansão do mapa de contornos NOESY (400 MHz, $CDCl_3$) de **MR13**.

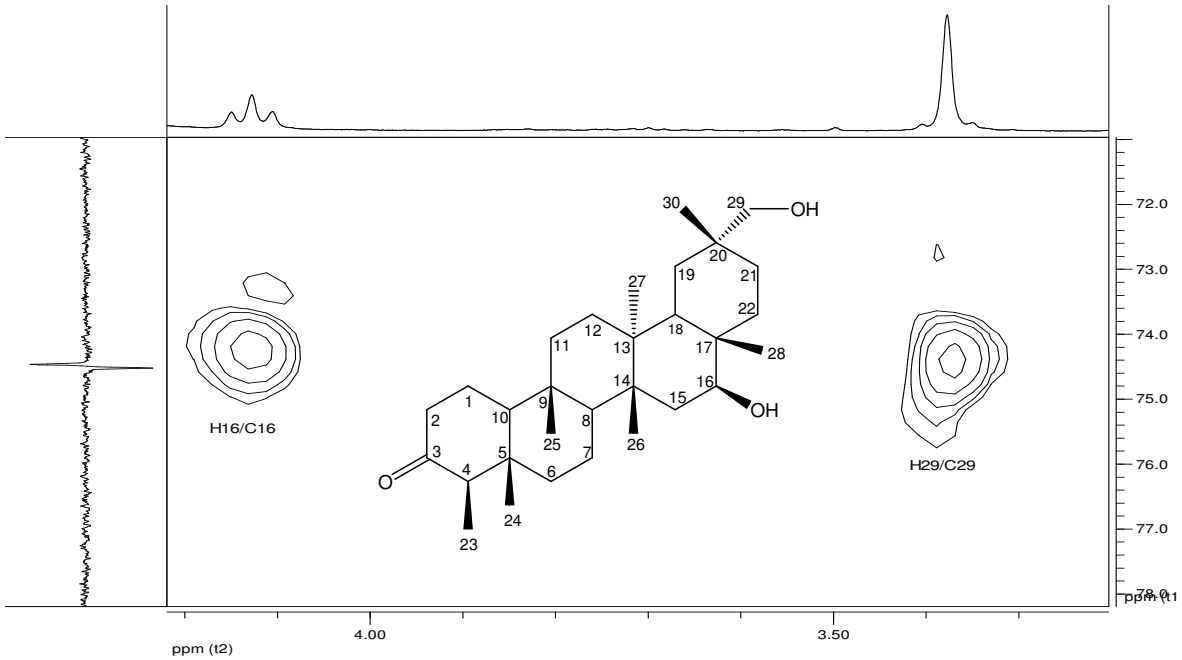


Figura A49: Expansão do mapa de contornos HSQC (400 MHz, $CDCl_3$ + piridina-d_5) de **MR14**.

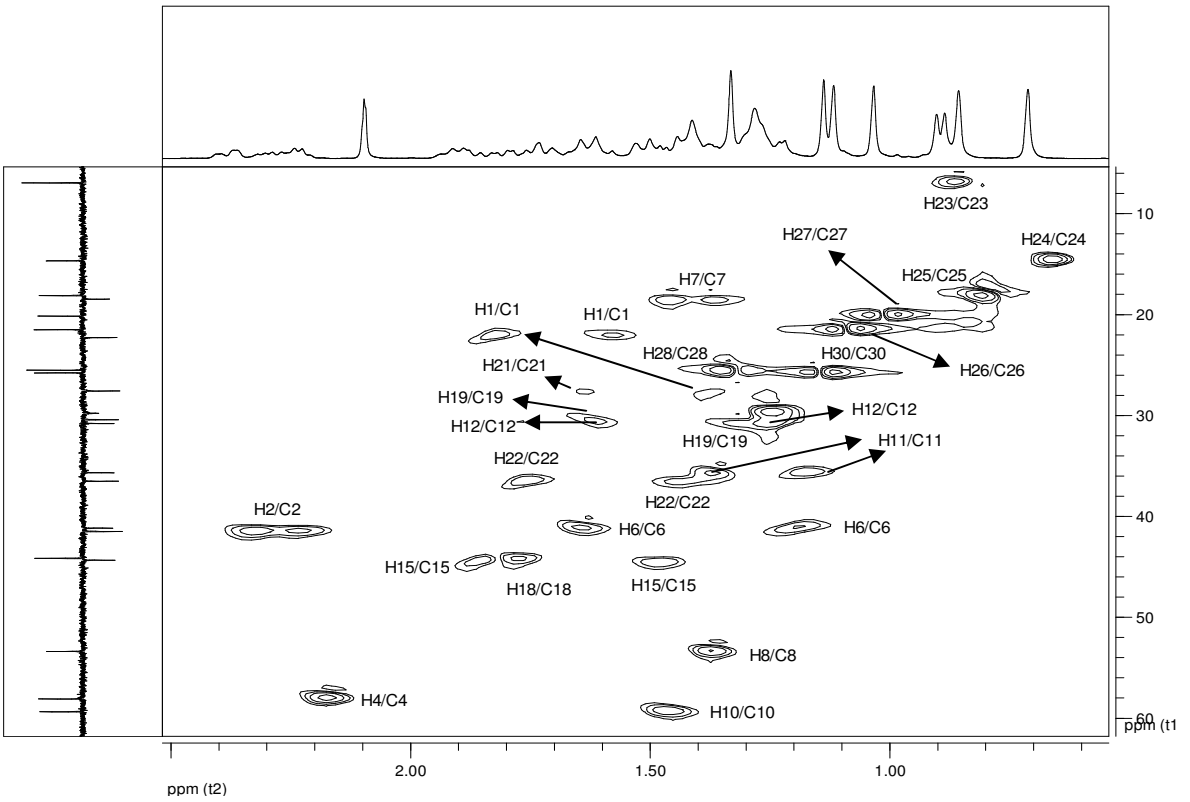


Figura A50: Expansão do mapa de contornos HSQC (400 MHz, $CDCl_3$ + piridina-d_5) de **MR14**.

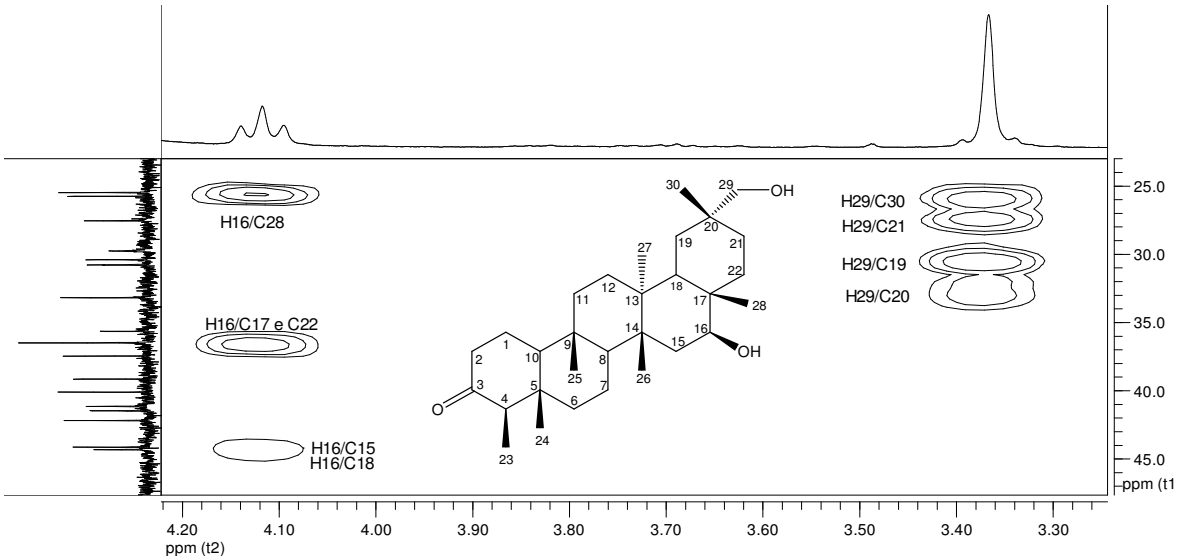


Figura A51: Expansão do mapa de contornos HMBC (400 MHz, $CDCl_3$ + piridina-d_5) de **MR14**.

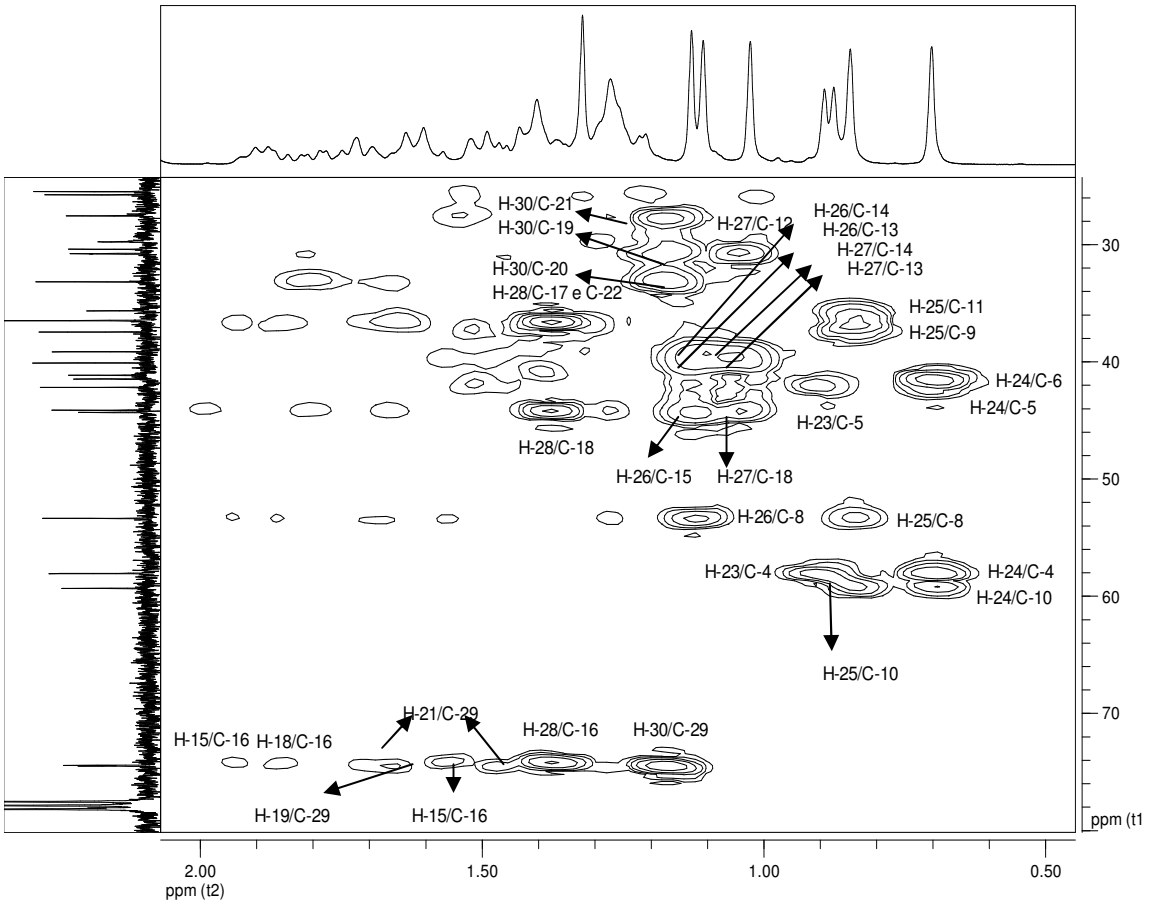


Figura A52: Expansão do mapa de contornos HMBC (400 MHz, $CDCl_3$ + piridina-d_5) de **MR14**.

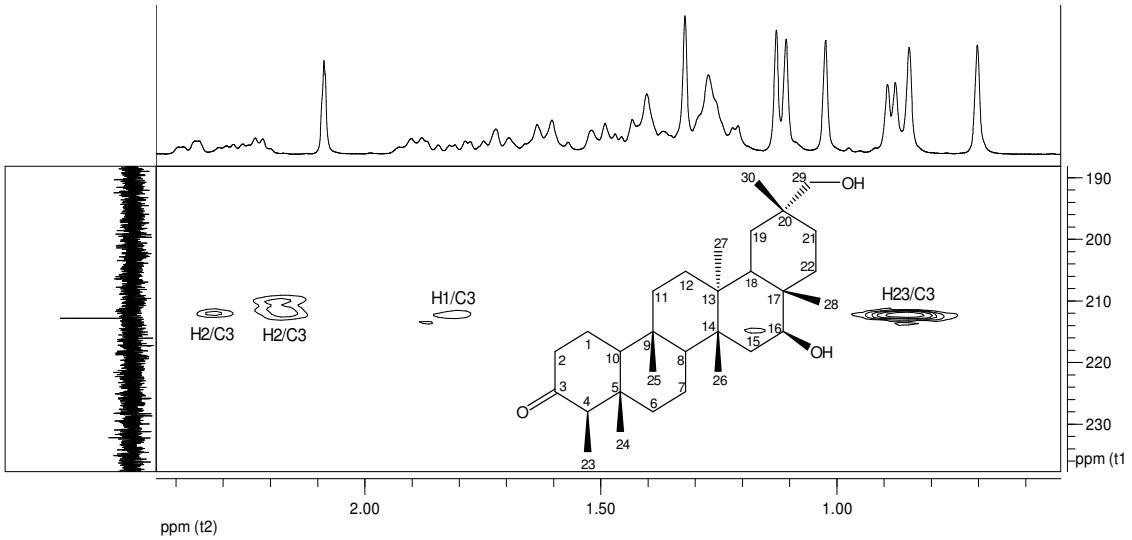


Figura A53: Expansão do mapa de contornos HMBC (400 MHz, $CDCl_3$ + piridina-d_5) de **MR14**.

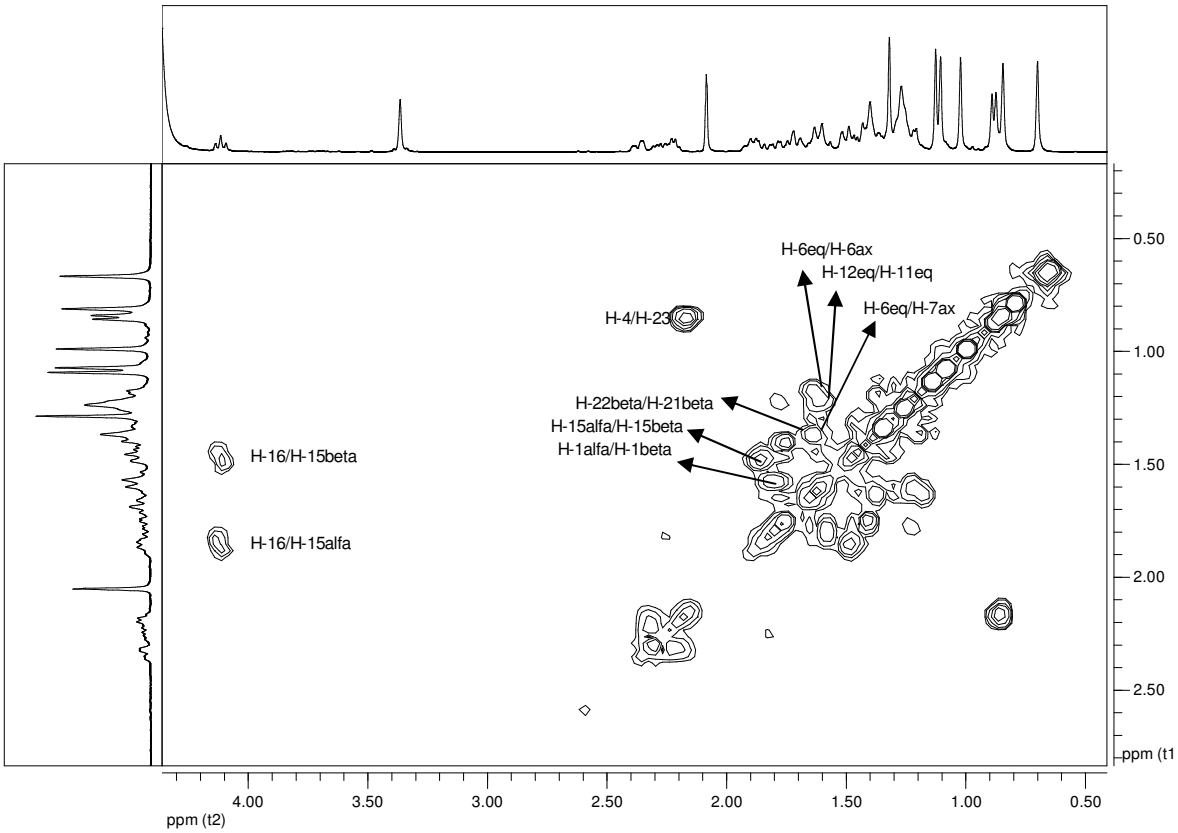


Figura A54: Mapa de contornos COSY (400 MHz, $CDCl_3$ + piridina- d_5) de **MR14**.

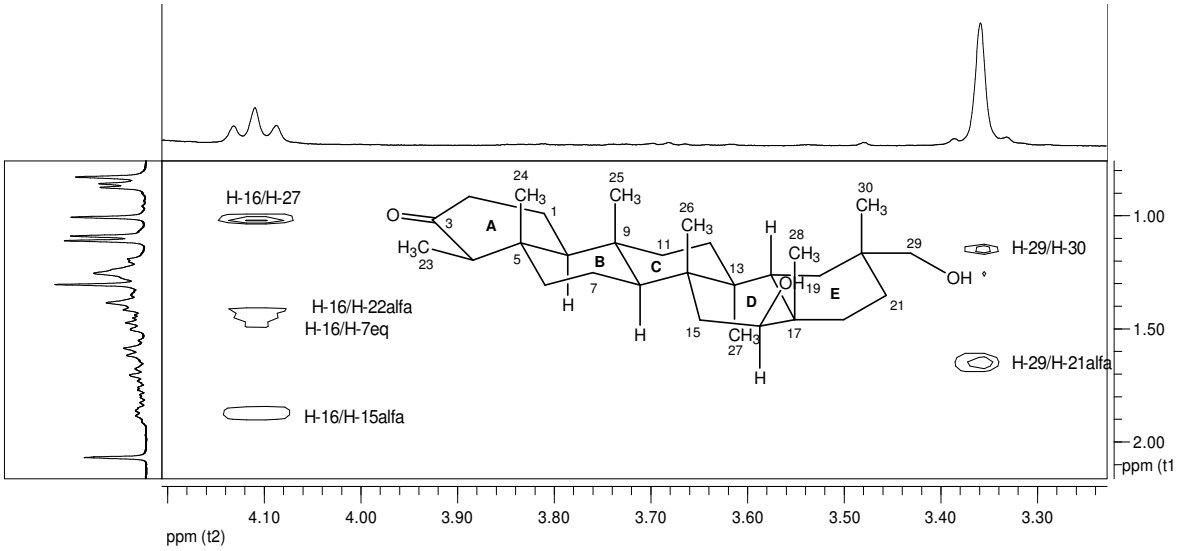


Figura A55: Expansão do mapa de contornos NOESY (400 MHz, $CDCl_3$ + piridina-d_5) de **MR14**.

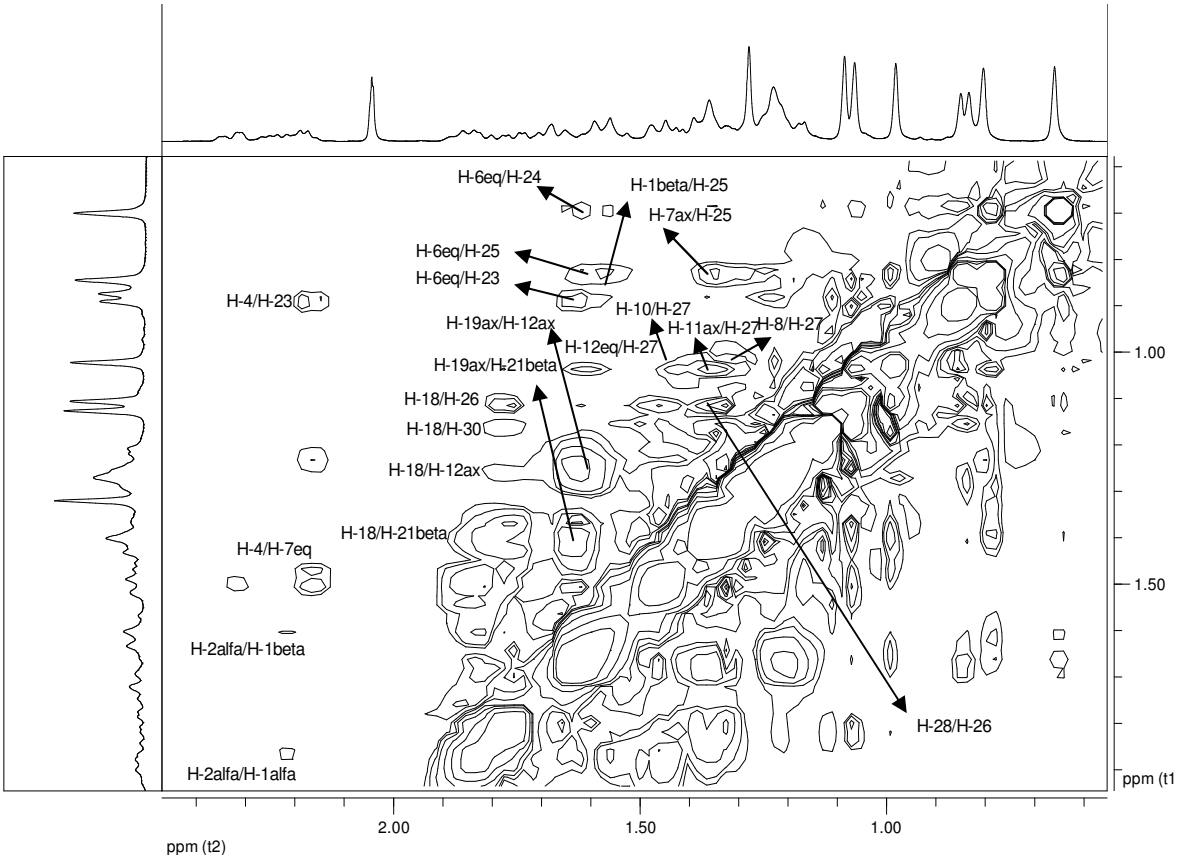


Figura A56: Expansão do mapa de contornos NOESY (400 MHz, $CDCl_3$ + piridina-d_5) de **MR14**.

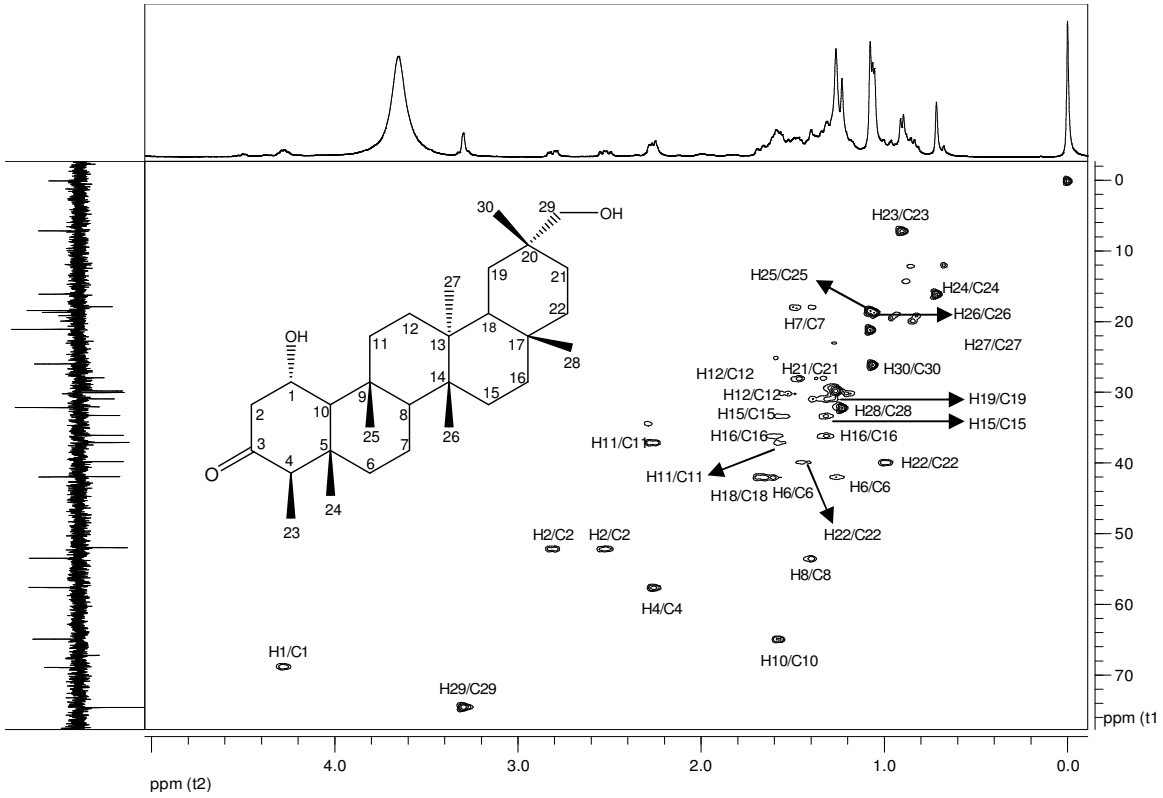


Figura A57: Expansão do mapa de contornos HSQC (400 MHz, $CDCl_3$ + piridina-d_5) de **MR15**.

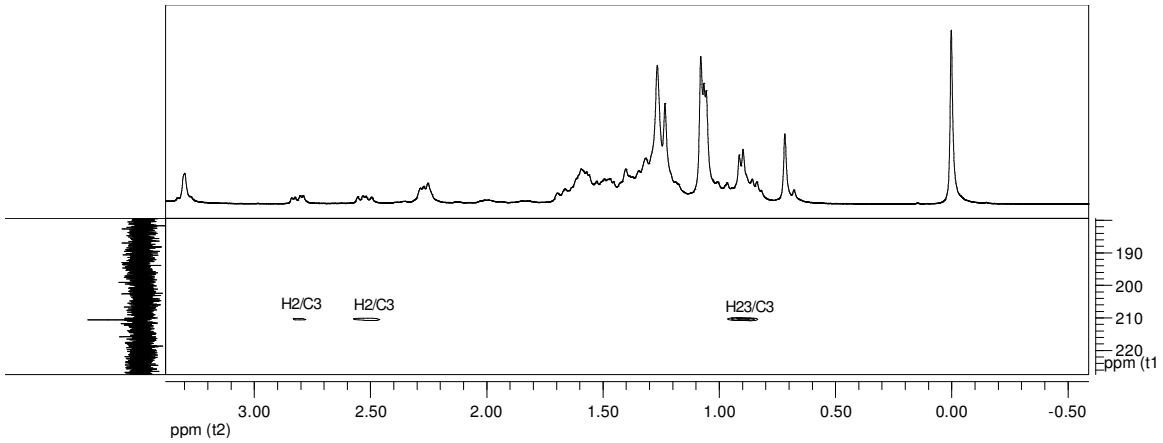


Figura A58: Expansão do mapa de contornos HMBC (400 MHz, $CDCl_3$ + piridina-d_5) de **MR15**.

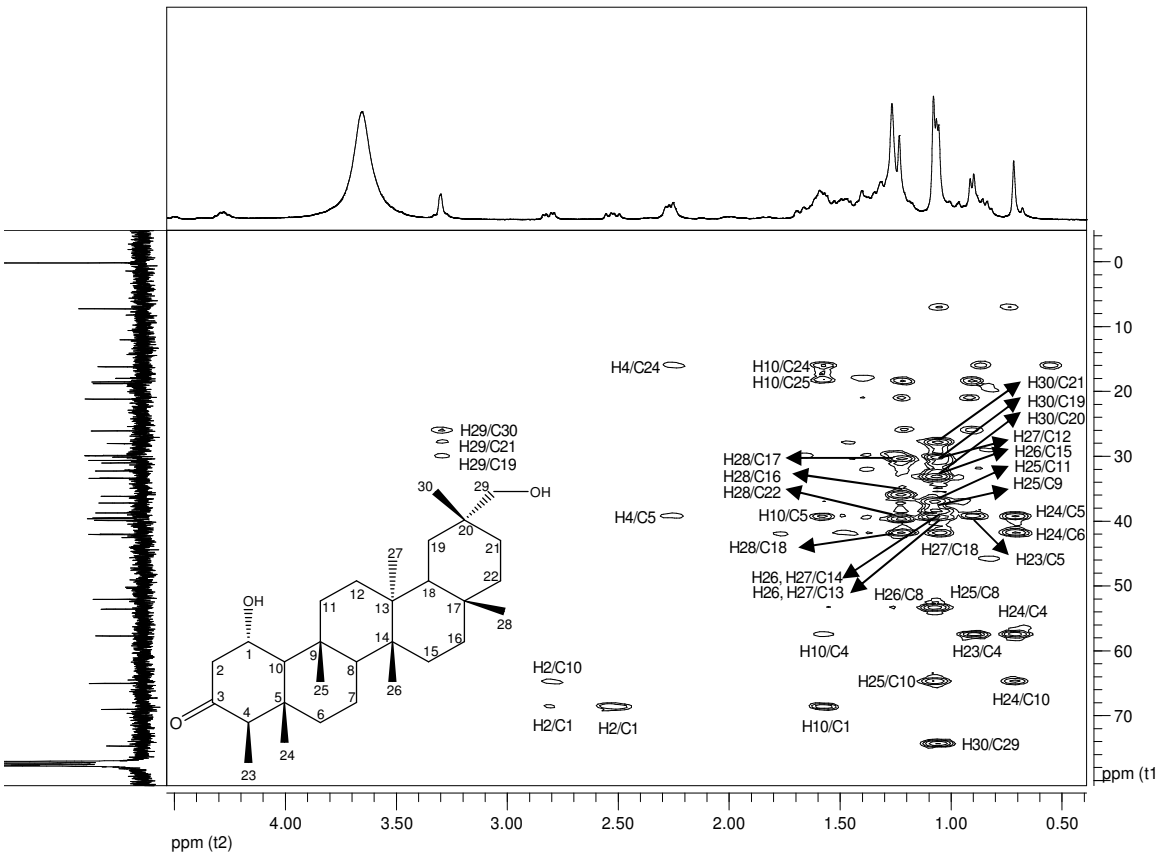


Figura A59: Expansão do mapa de contornos HMBC (400 MHz, $CDCl_3$ + piridina-d_5) de **MR15**.

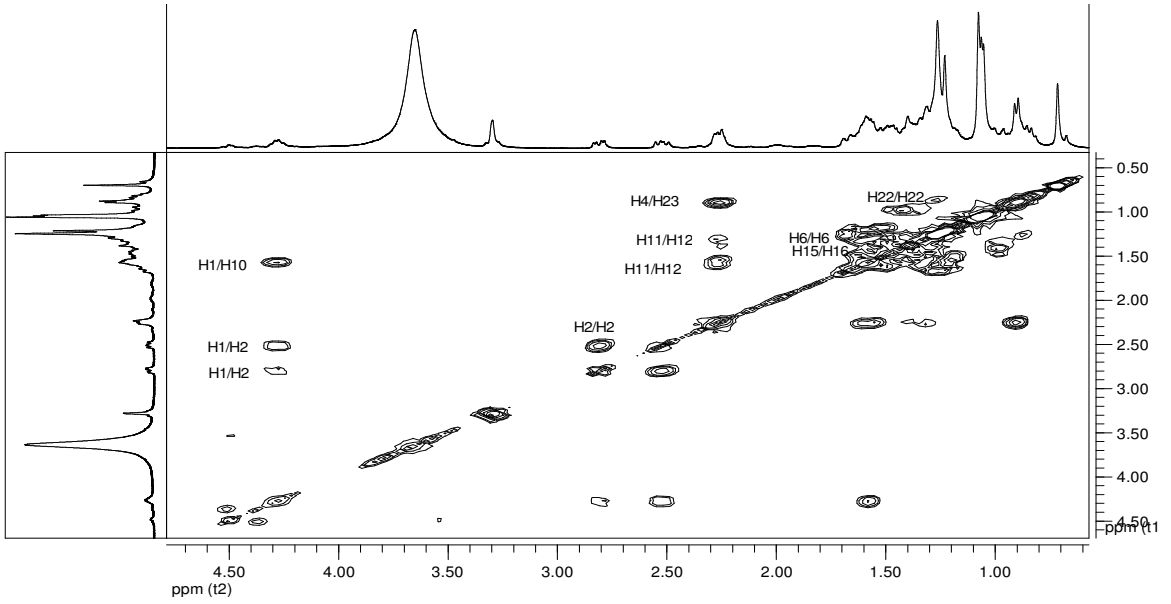


Figura A60: Expansão do mapa de contornos COSY (400 MHz, $CDCl_3$ + piridina-d_5) de **MR15**.

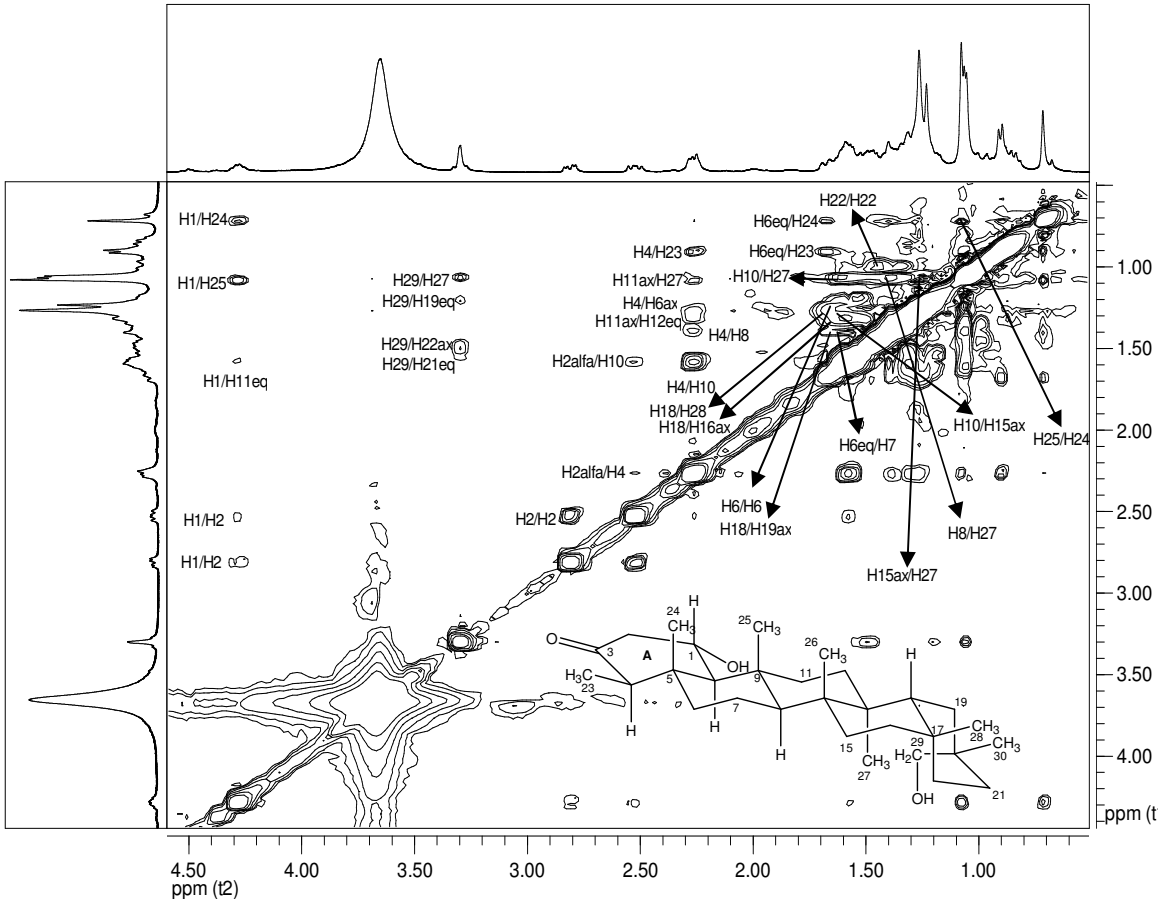


Figura A61: Expansão do mapa de contornos NOESY (400 MHz, $CDCl_3$ + piridina-d_5) de **MR15**.

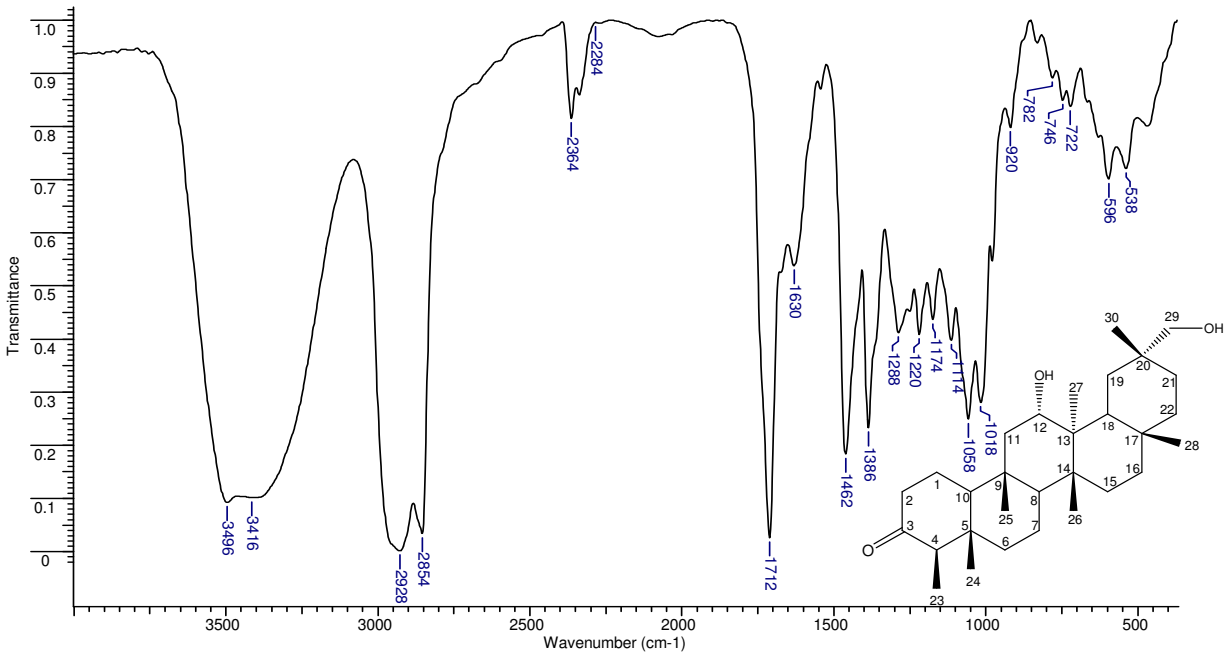


Figura A62: Espectro na região do IV de **MR16** (KBr).

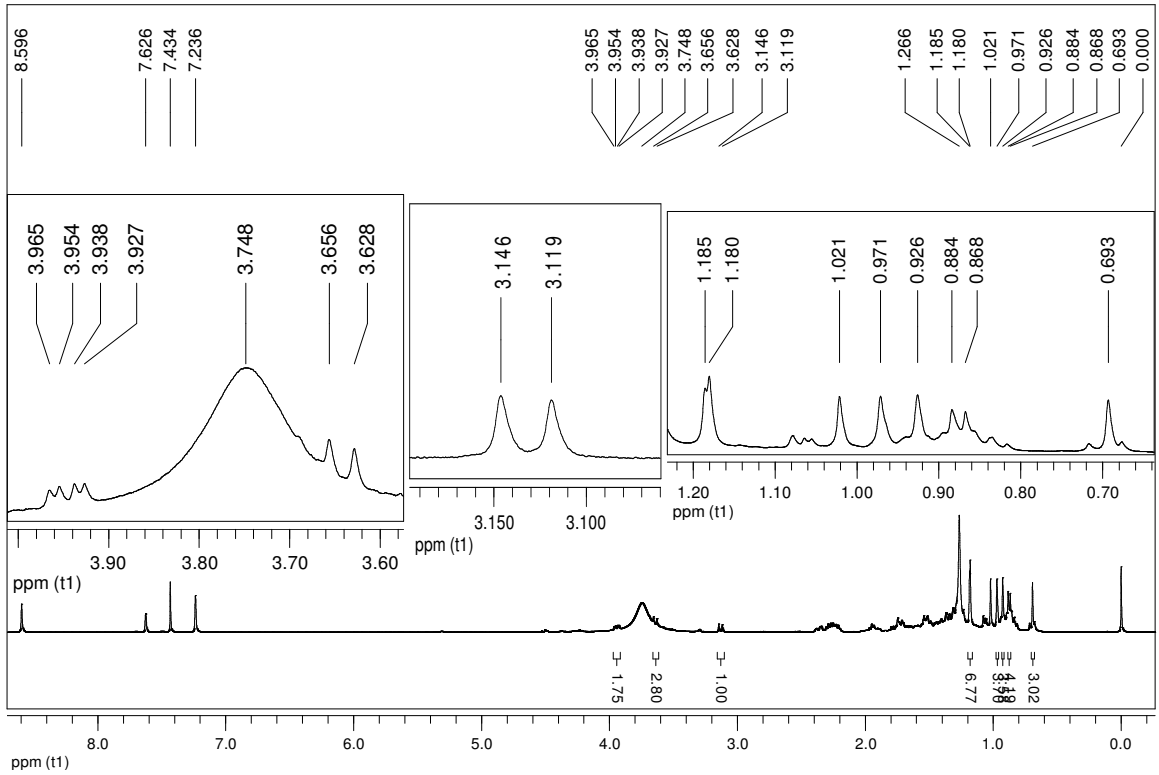


Figura A63: Espectro de RMN de ^{1}H (400 MHz, $CDCl_3$ + piridina-d_5) de **MR16.**

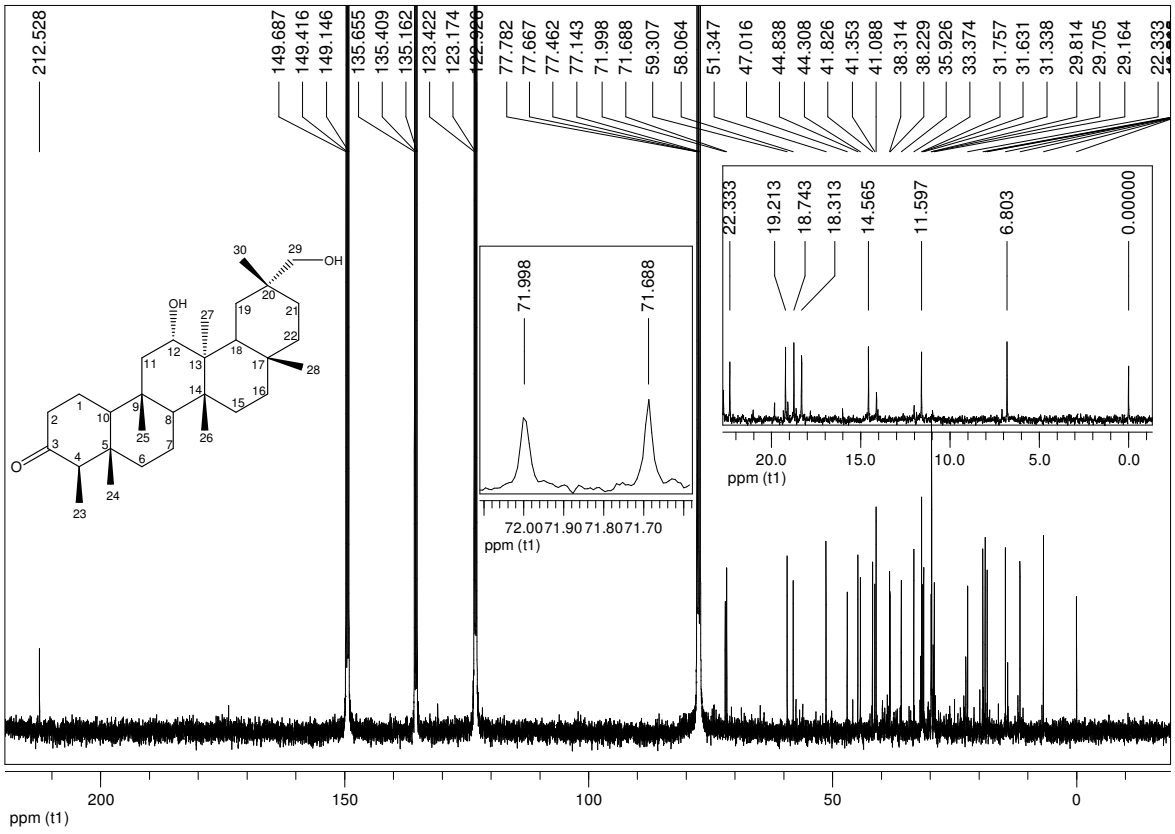


Figura A64: Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, $CDCl_3$ + piridina-d_5) de **MR16.**

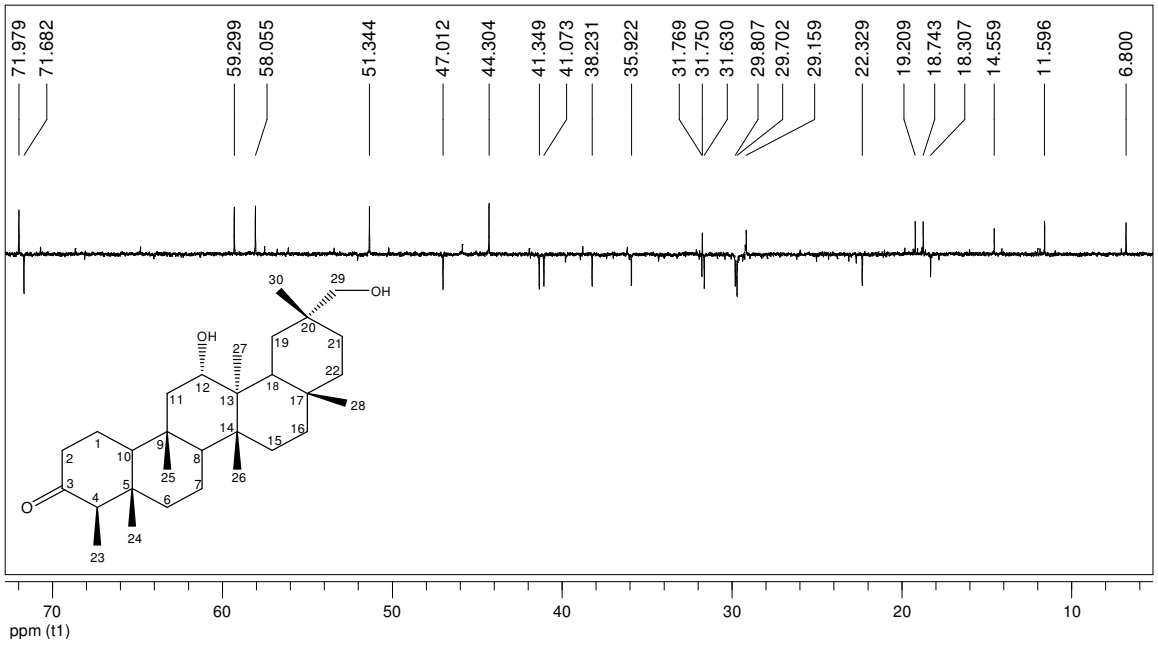


Figura A65: Expansão do subespectro DEPT135 (100 MHz, $CDCl_3$ + piridina-d_5) de **MR16.**

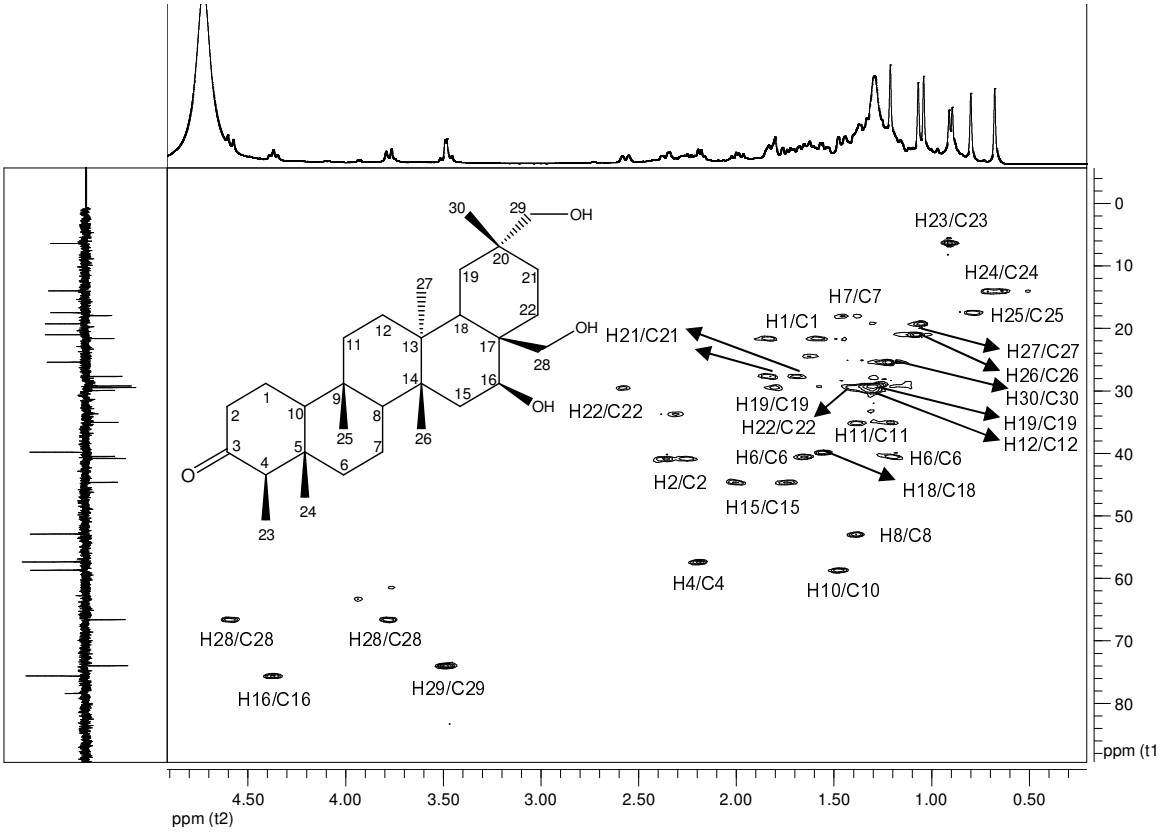


Figura A66: Expansão do mapa de contornos HSQC (400 MHz, $CDCl_3$ + piridina-d_5) de **MR17.**

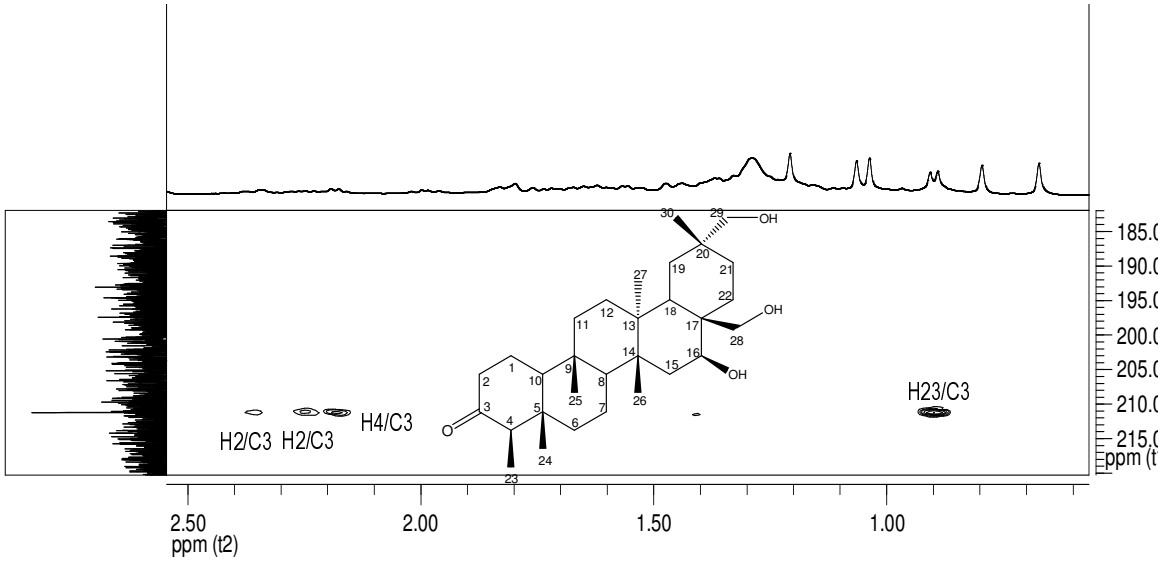


Figura A67: Expansão do mapa de contornos HMBC (400 MHz, $CDCl_3$ + piridina-d_5) de **MR17**.

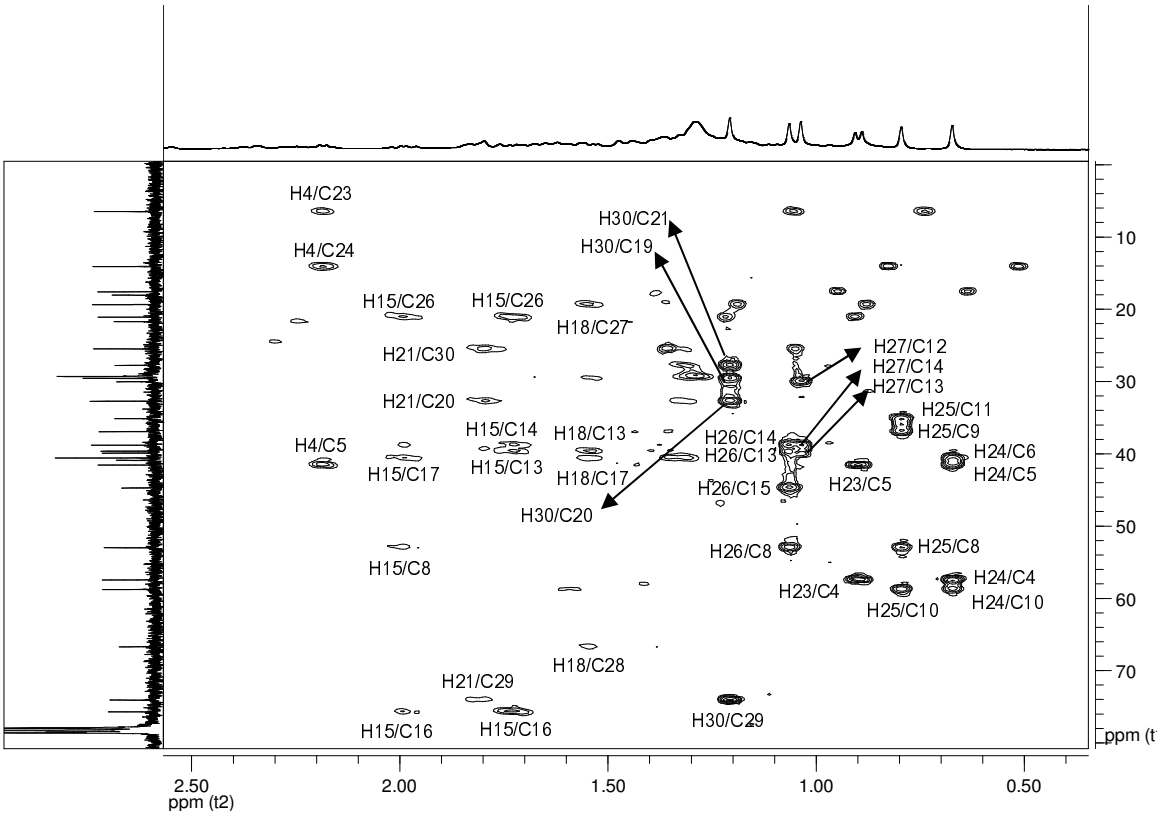


Figura A68: Expansão do mapa de contornos HMBC (400 MHz, $CDCl_3$ + piridina-d_5) de **MR17**.

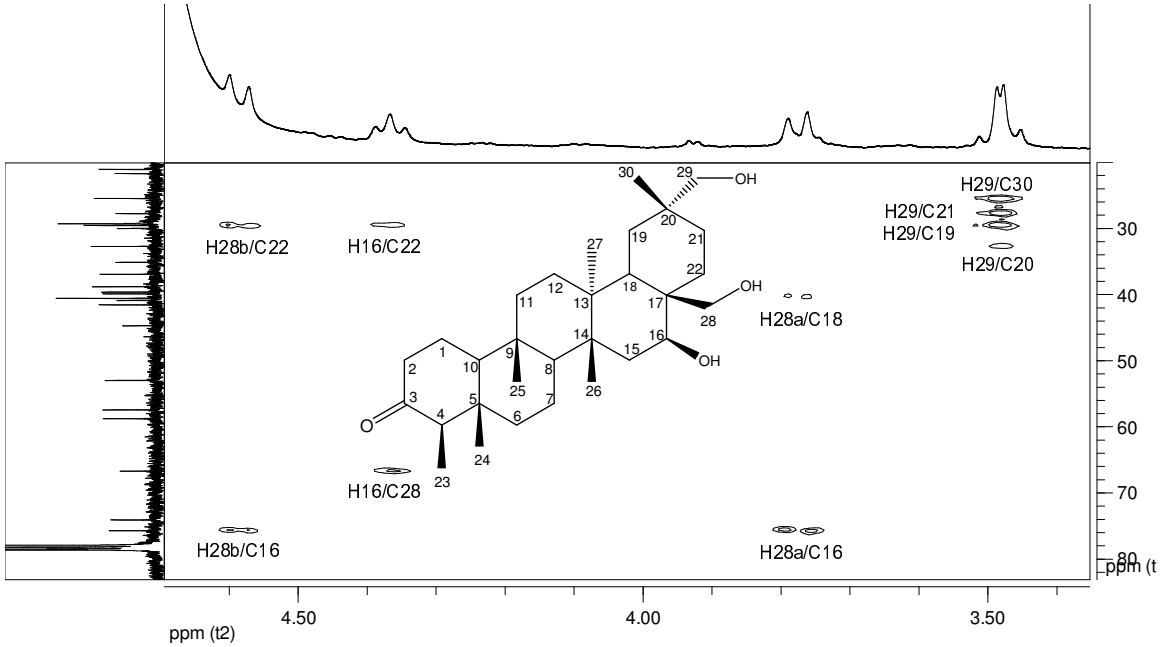


Figura A69: Expansão do mapa de contornos HMBC (400 MHz, $CDCl_3$ + piridina-d_5) de **MR17**.

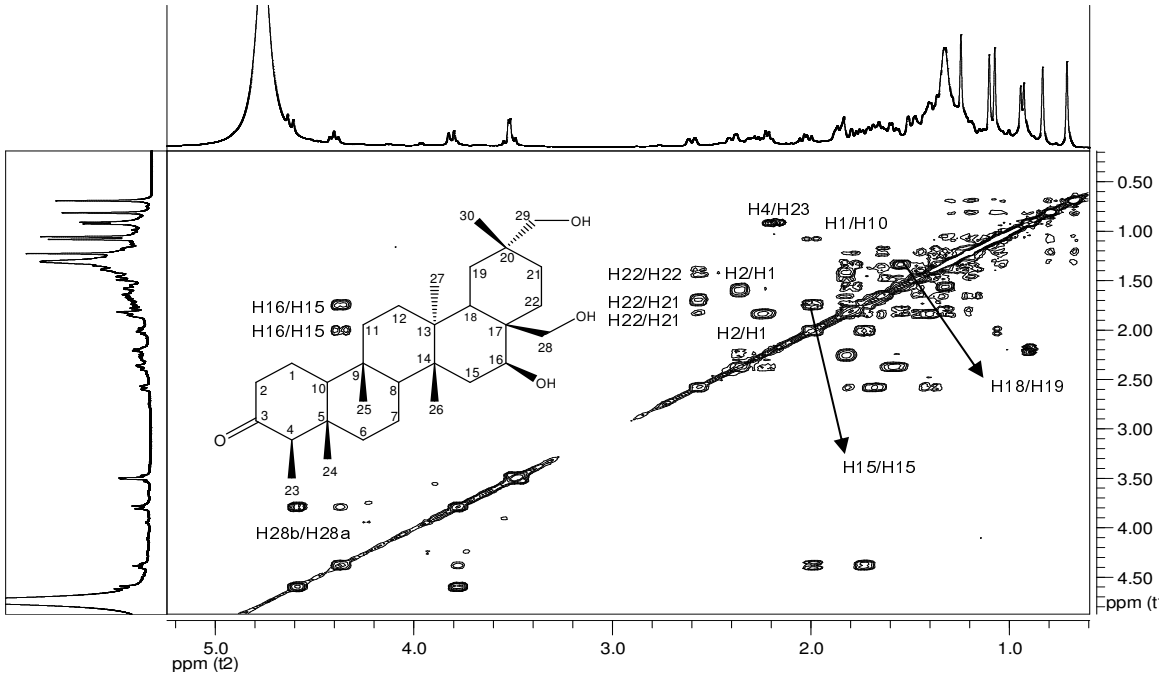


Figura A70: Expansão do mapa de contornos COSY (400 MHz, $CDCl_3$ + piridina-d_5) de **MR17**.

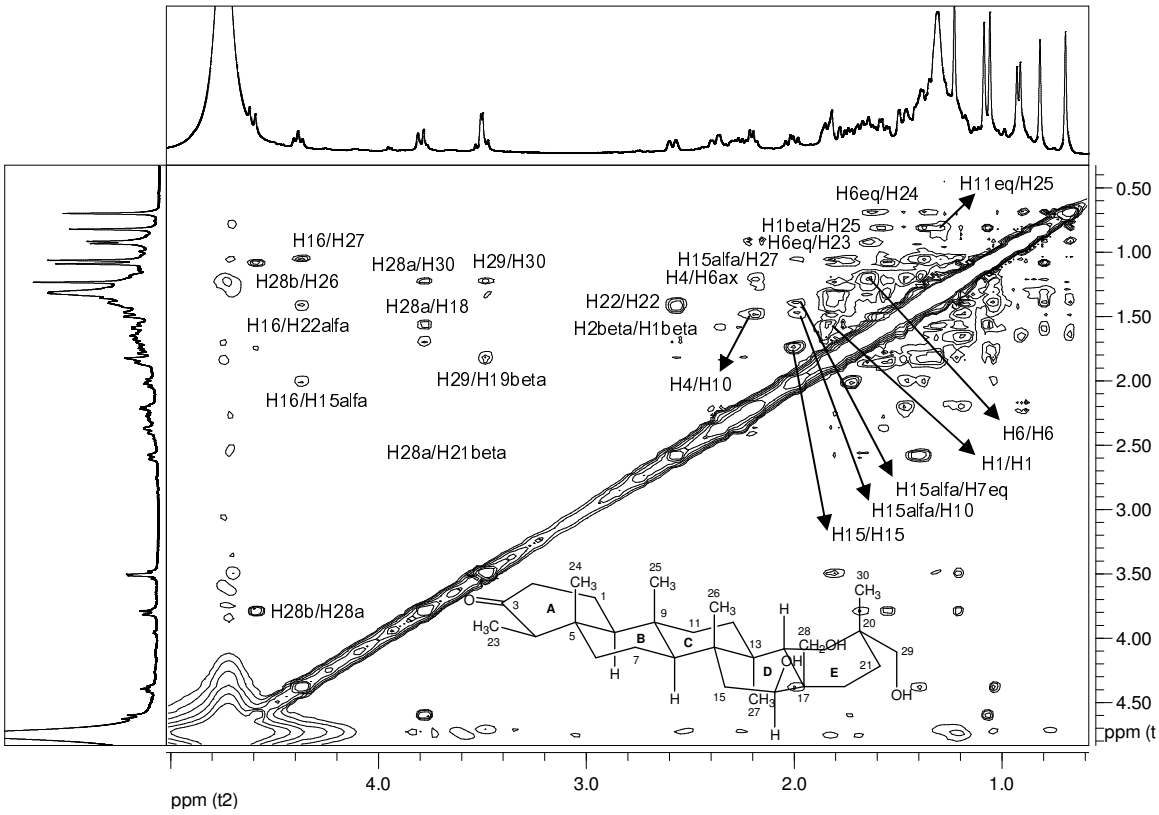


Figura A71: Expansão do mapa de contornos NOESY (400 MHz, $CDCl_3$ + piridina-d_5) de **MR17**.

APENDICE B: ESPECTROS CAPÍTULO 2

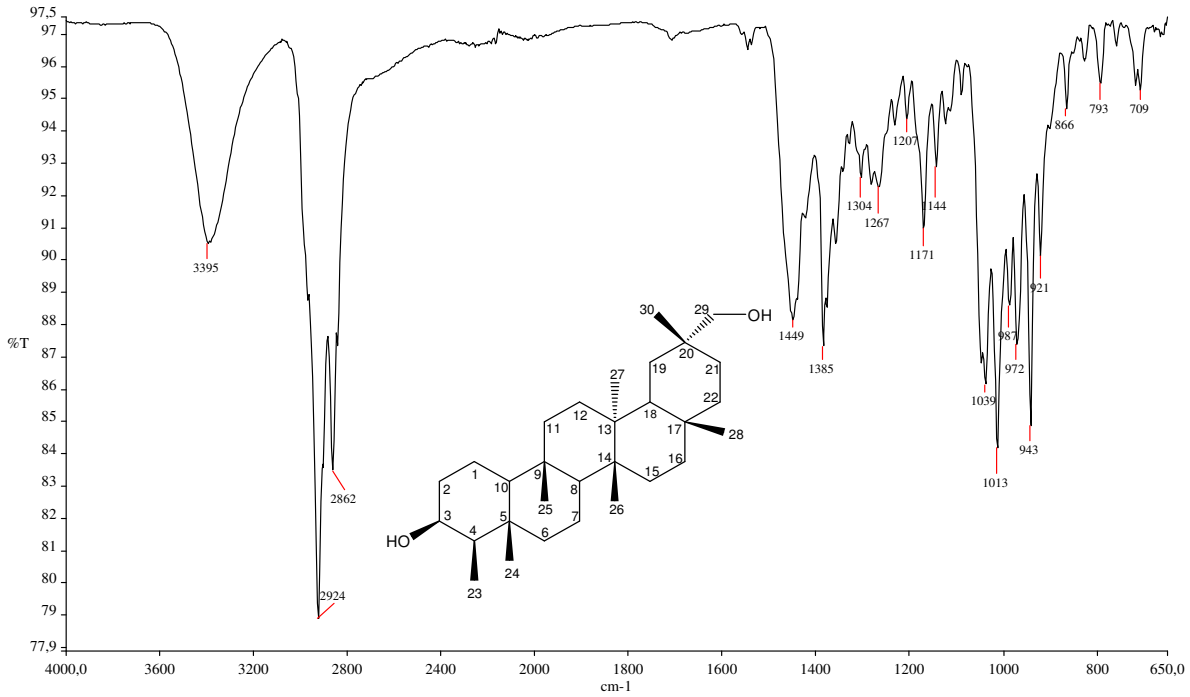


Figura B1: Espectro na região do IV de **P1a** (ATR).

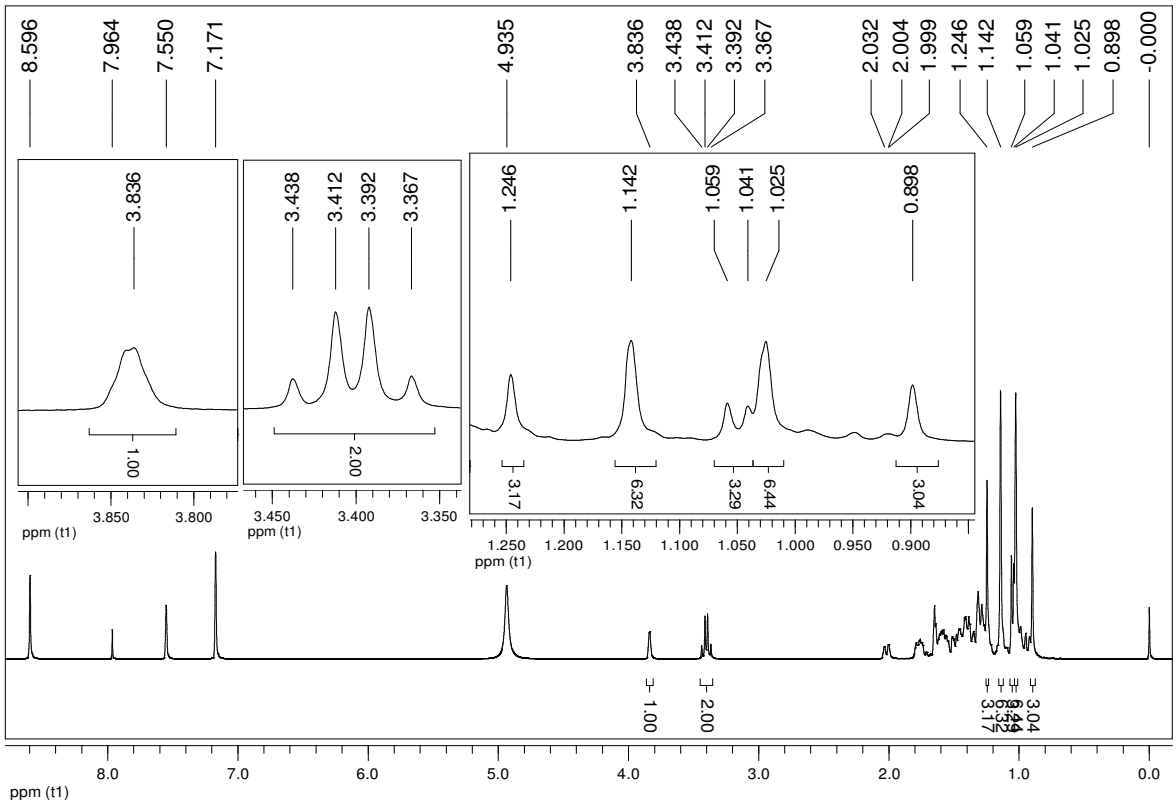


Figura B2: Espectro de RMN de ^{1}H (400 MHz, $CDCl_3$ + piridina-d_5) de **P1a**.

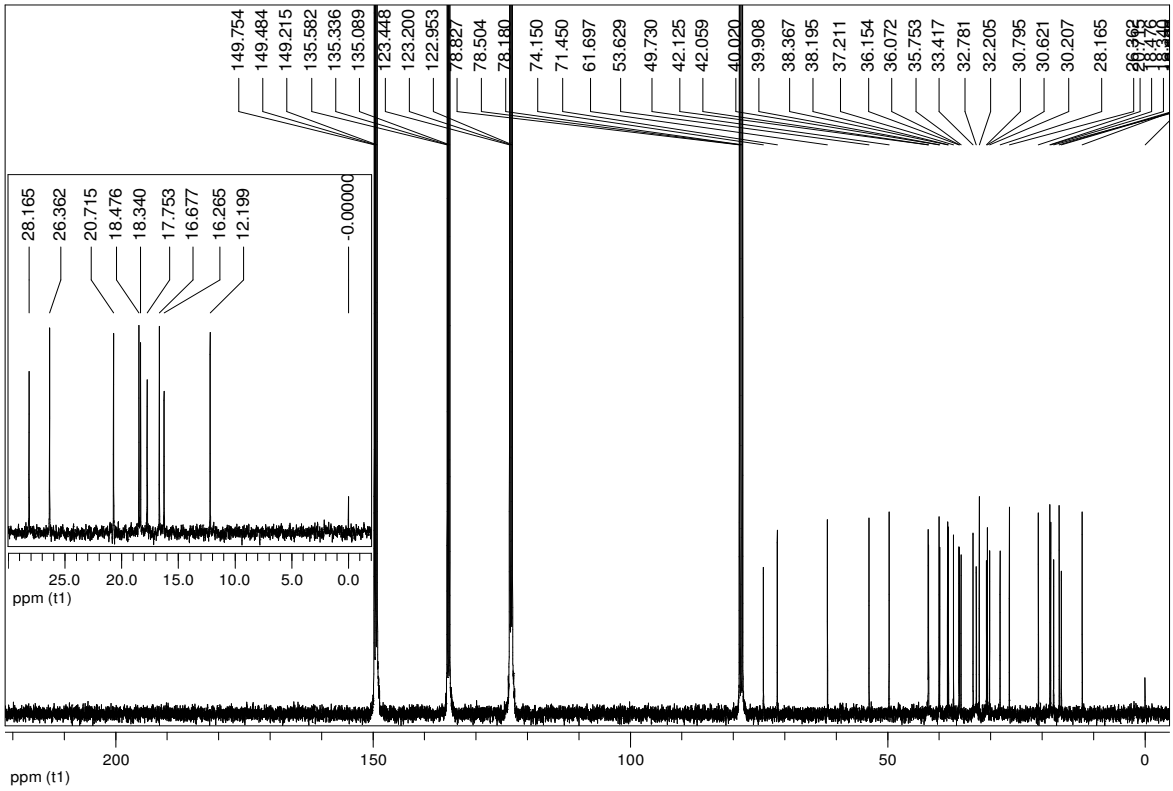


Figura B3: Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, $CDCl_3$ + piridina-d_5) de **P1a**.

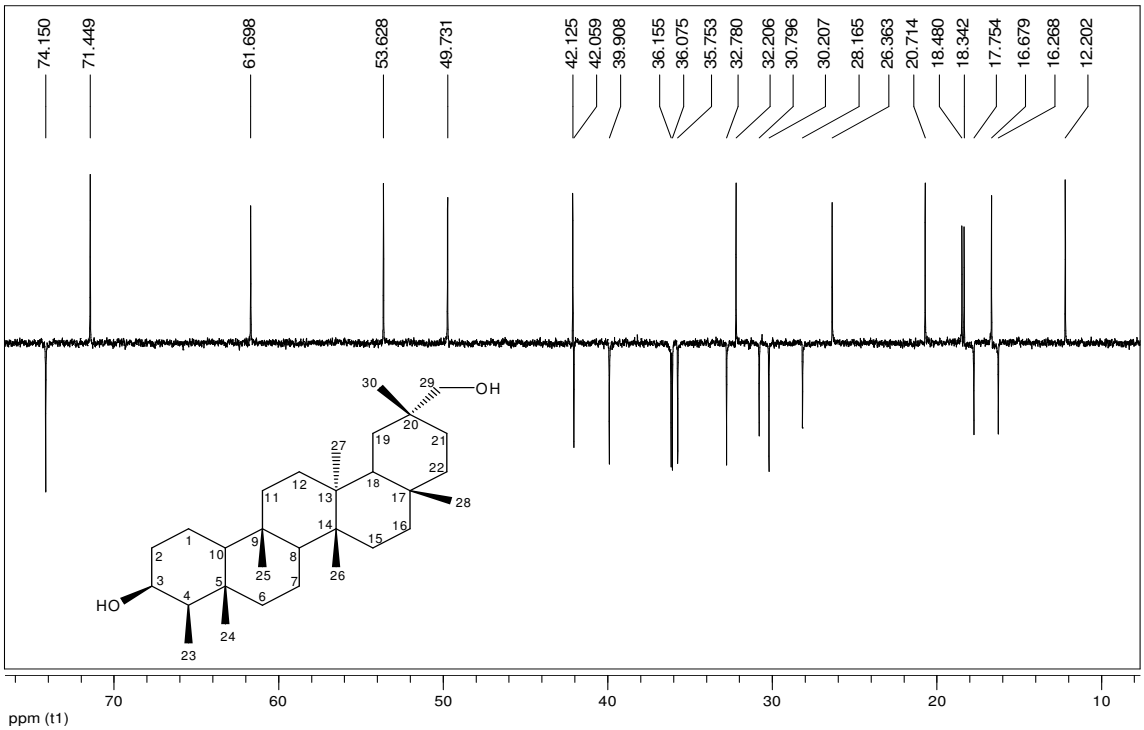


Figura B4: Expansão do subespectro DEPT135 (100 MHz, $CDCl_3$ + piridina- d_5) de **P1a**.

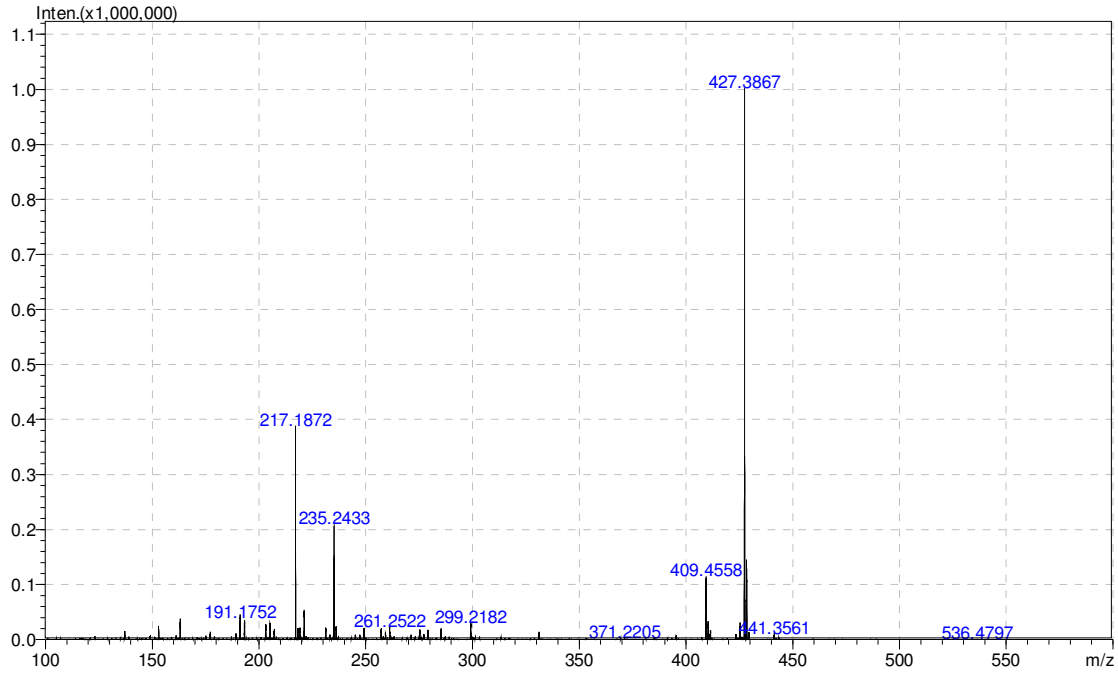


Figura B5: Espectro de massas (HR-APCI, modo positivo) de **P1a**.

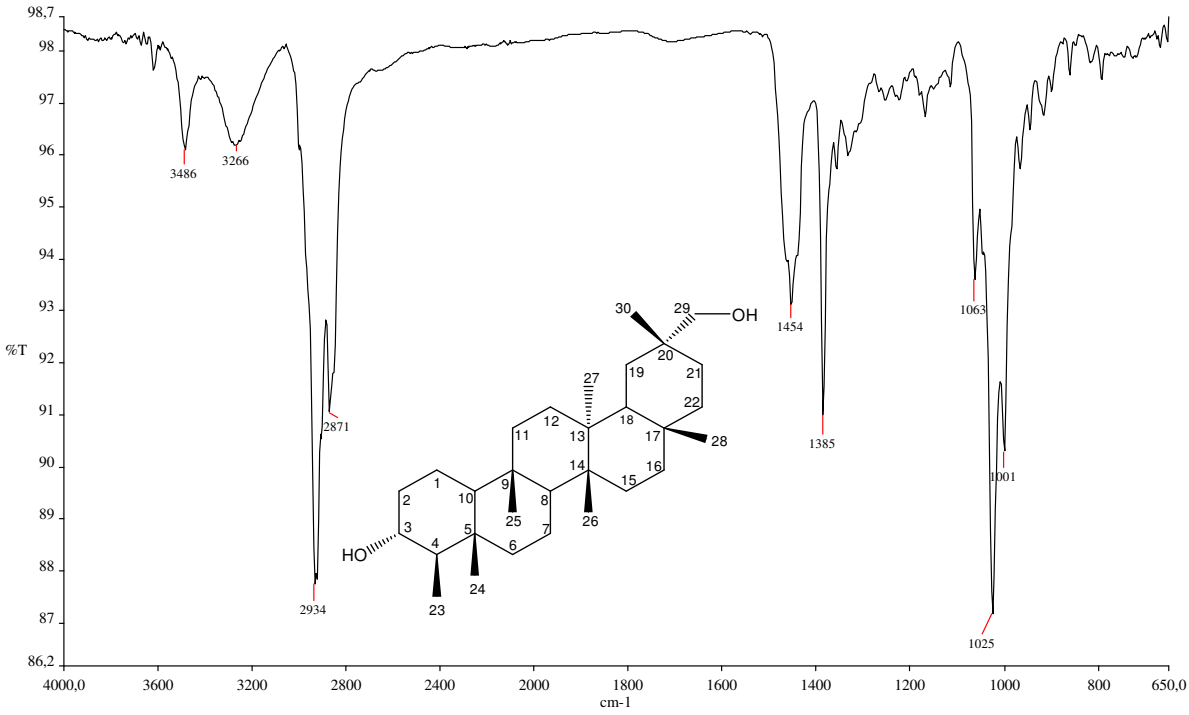


Figura B6: Espectro na região do IV de **P1b** (ATR).

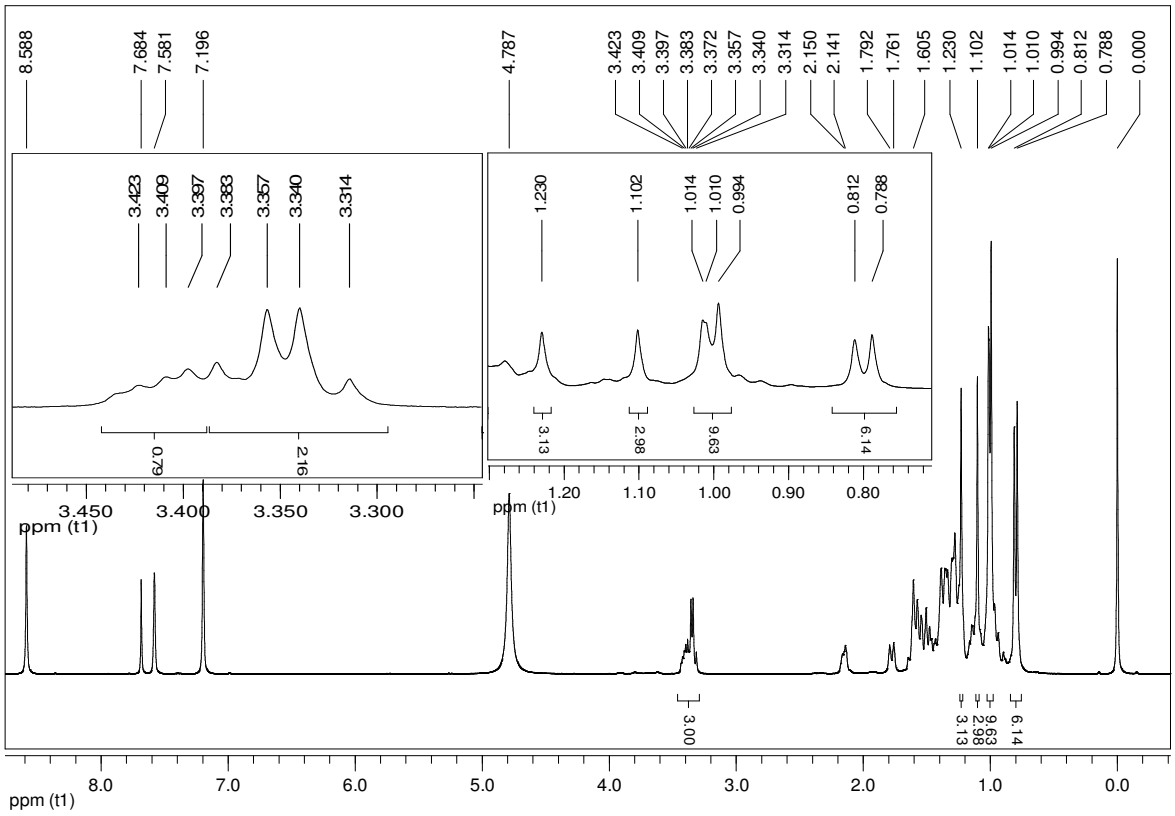


Figura B7: Espectro de RMN de ^{1}H (400 MHz, $CDCl_3$ + piridina-d_5) de **P1b**.

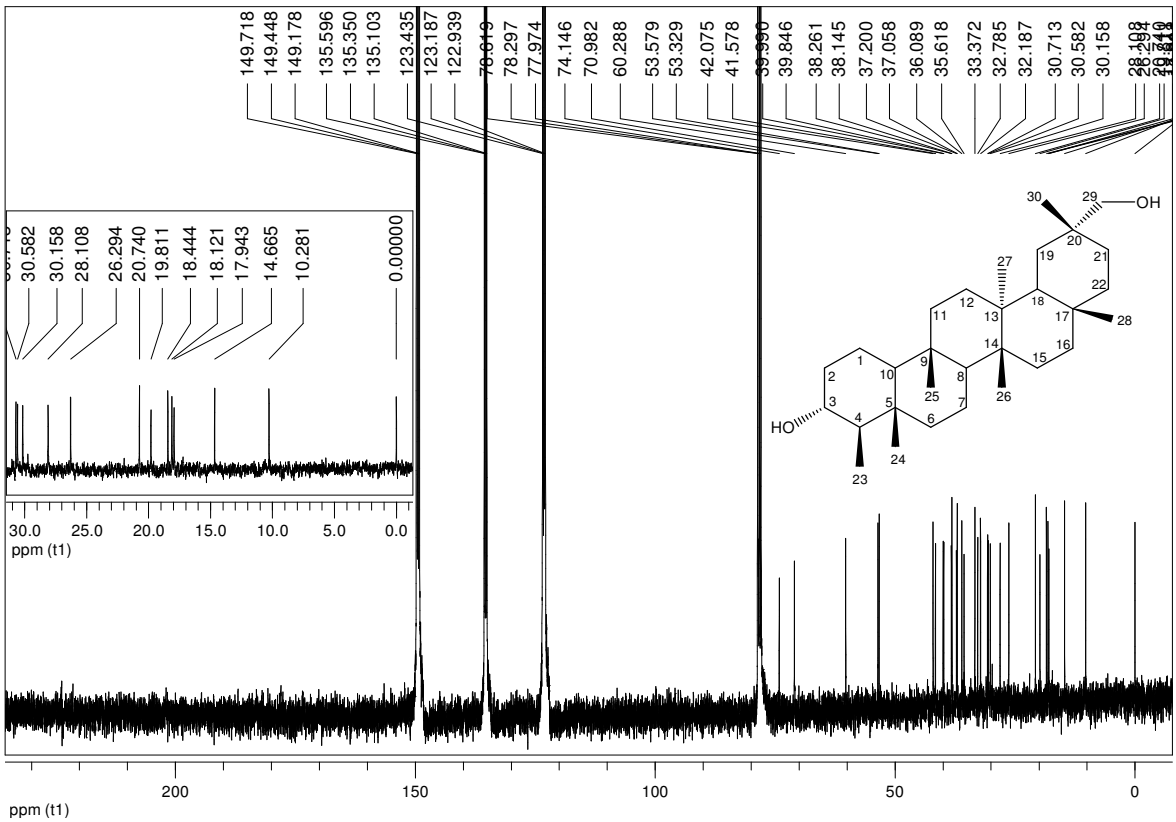


Figura B8: Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, $CDCl_3$ + piridina-d_5) de **P1b**.

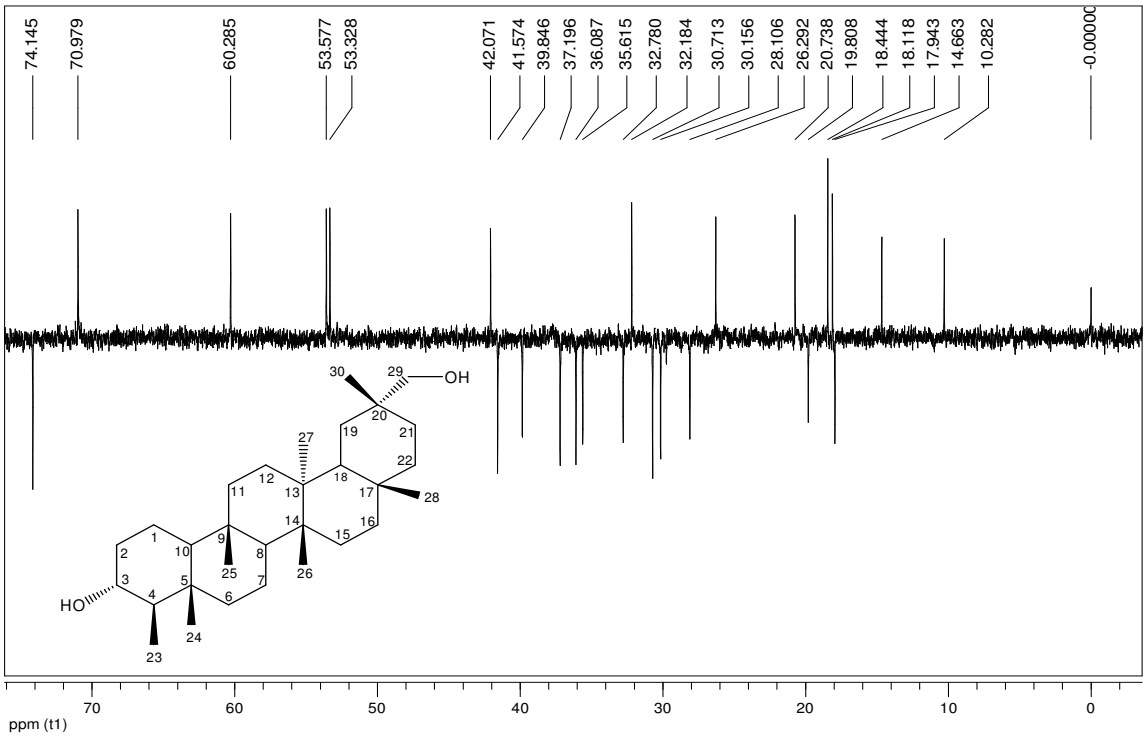


Figura B9: Expansão do subespectro DEPT135 (100 MHz, $CDCl_3$ + piridina-d_5) de **P1b**.

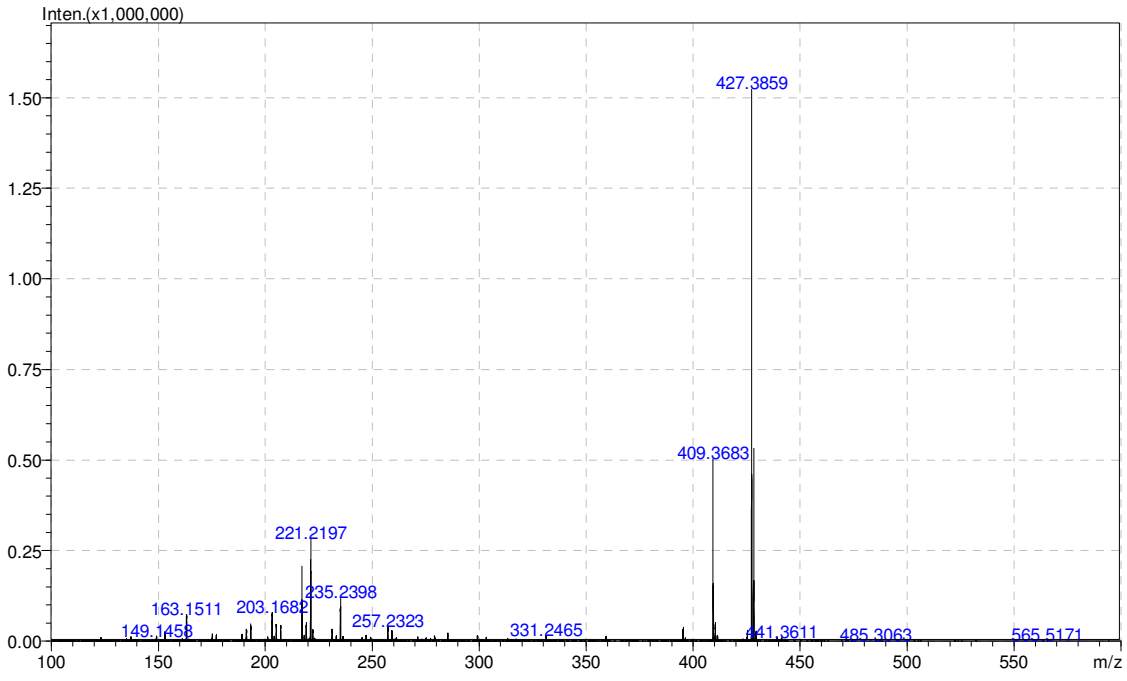


Figura B10: Espectro de massas (HR-APCI, modo positivo) de **P1b**.

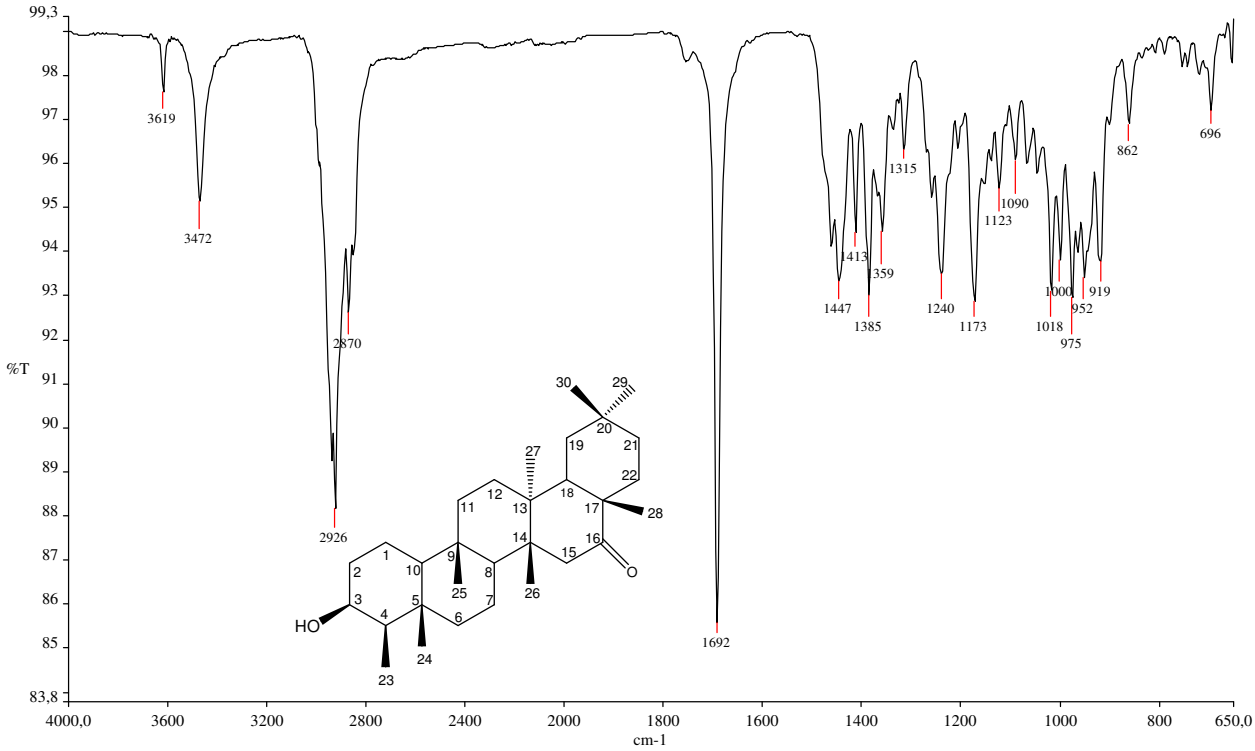


Figura B11: Espectro na região do IV de **P2a** (ATR).

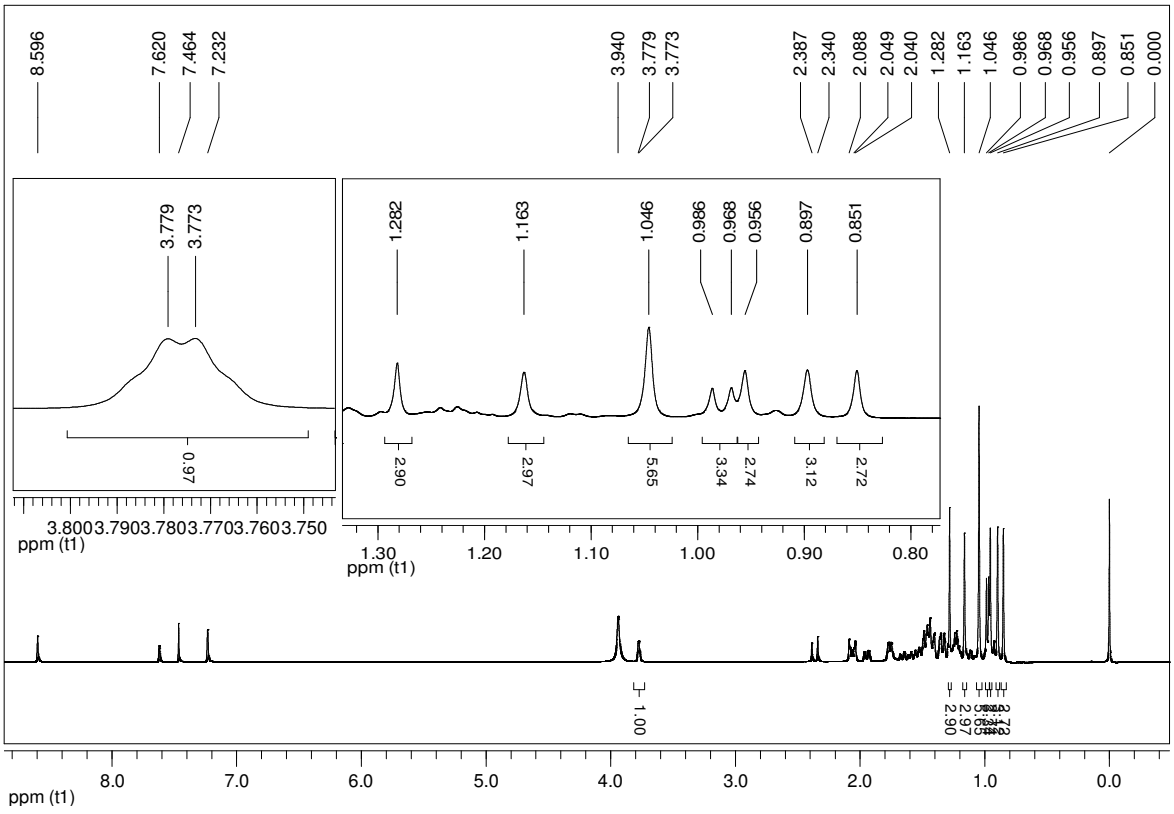


Figura B12: Espectro de RMN de ^{1}H (400 MHz, $CDCl_3$ + piridina-d_5) de **P2a**.

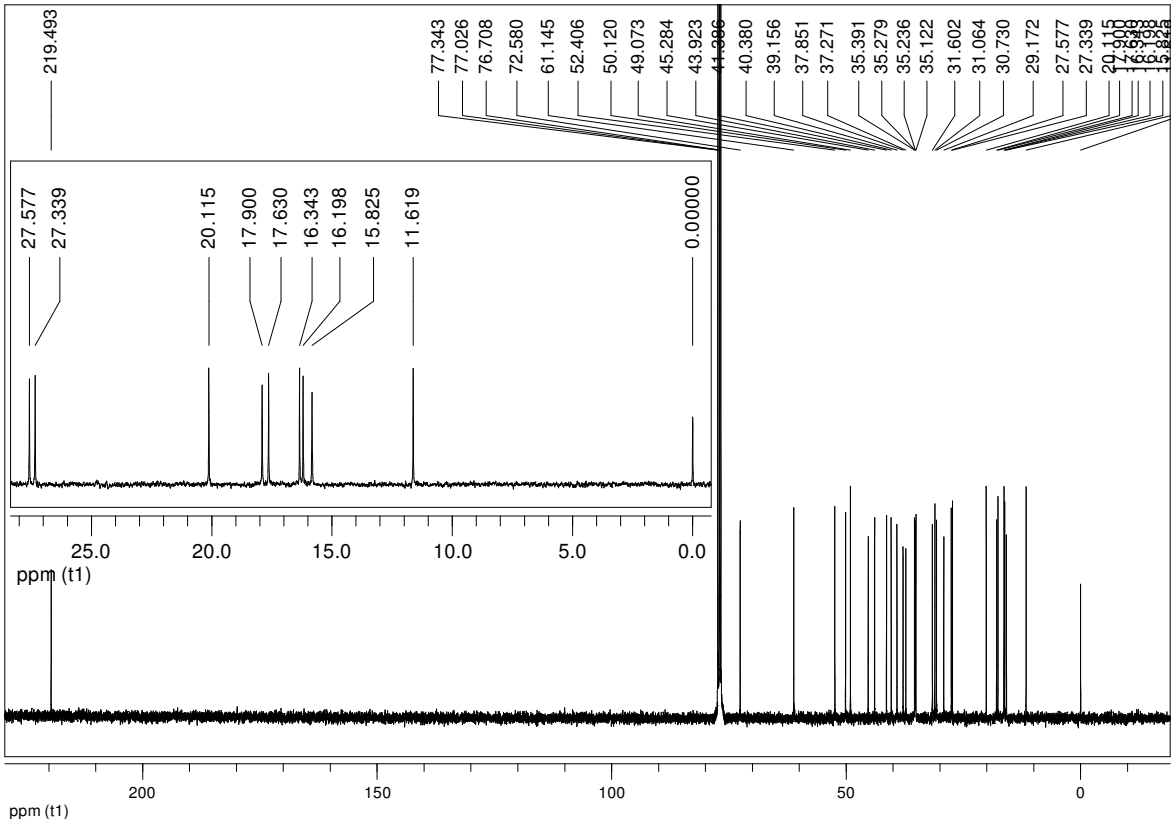


Figura B13: Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, $CDCl_3$ + piridina-d_5) de **P2a**.

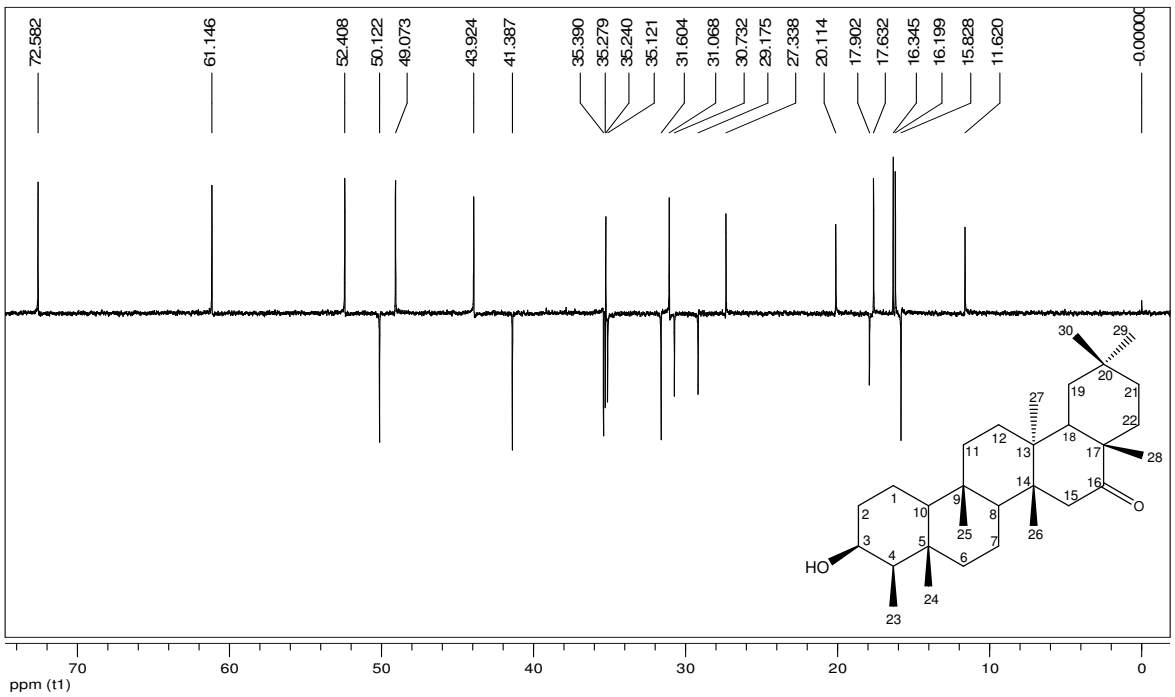


Figura B14: Expansão do subespectro DEPT135 (100 MHz, $CDCl_3$ + piridina-d_5) de **P2a**.

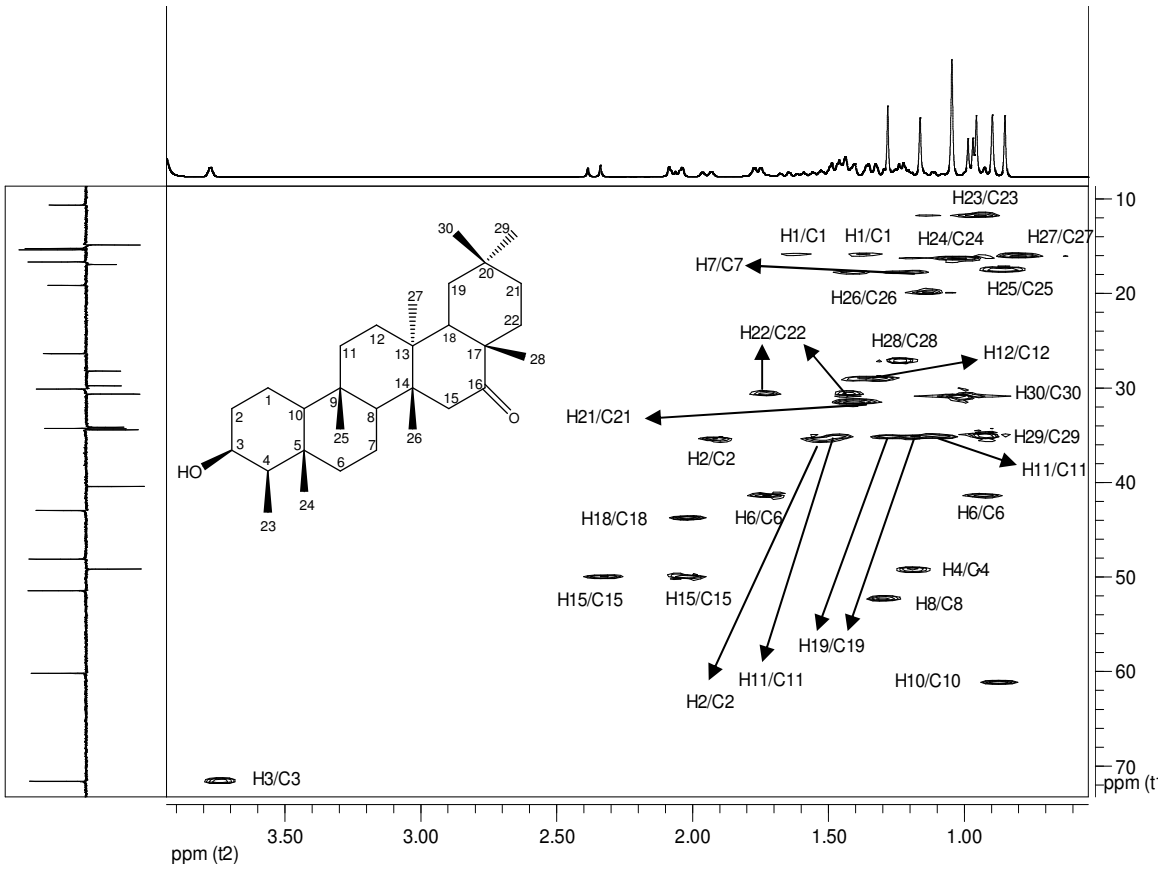


Figura B15: Expansão do mapa de contornos HSQC (400 MHz, $CDCl_3$ + piridina-d_5) de **P2a**.

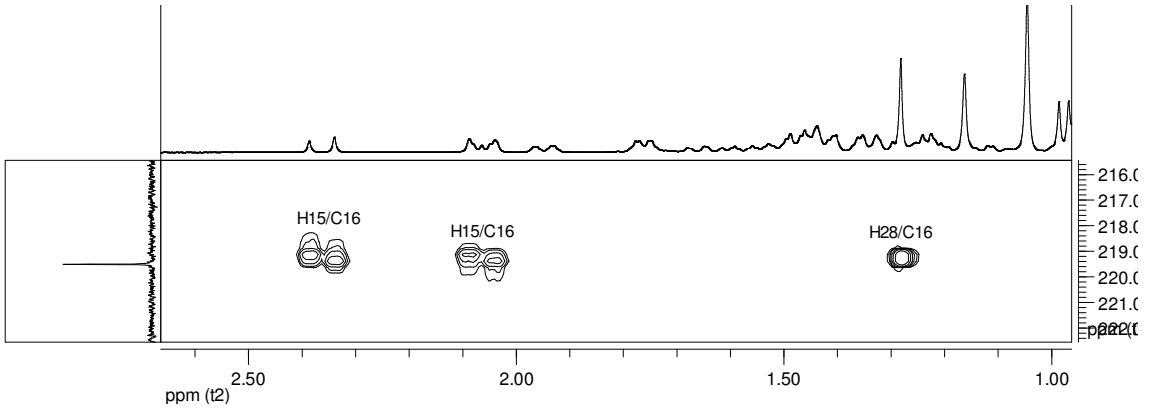


Figura B16: Expansão do mapa de contornos HMBC (400 MHz, $CDCl_3$ + piridina-d_5) de **P2a**.

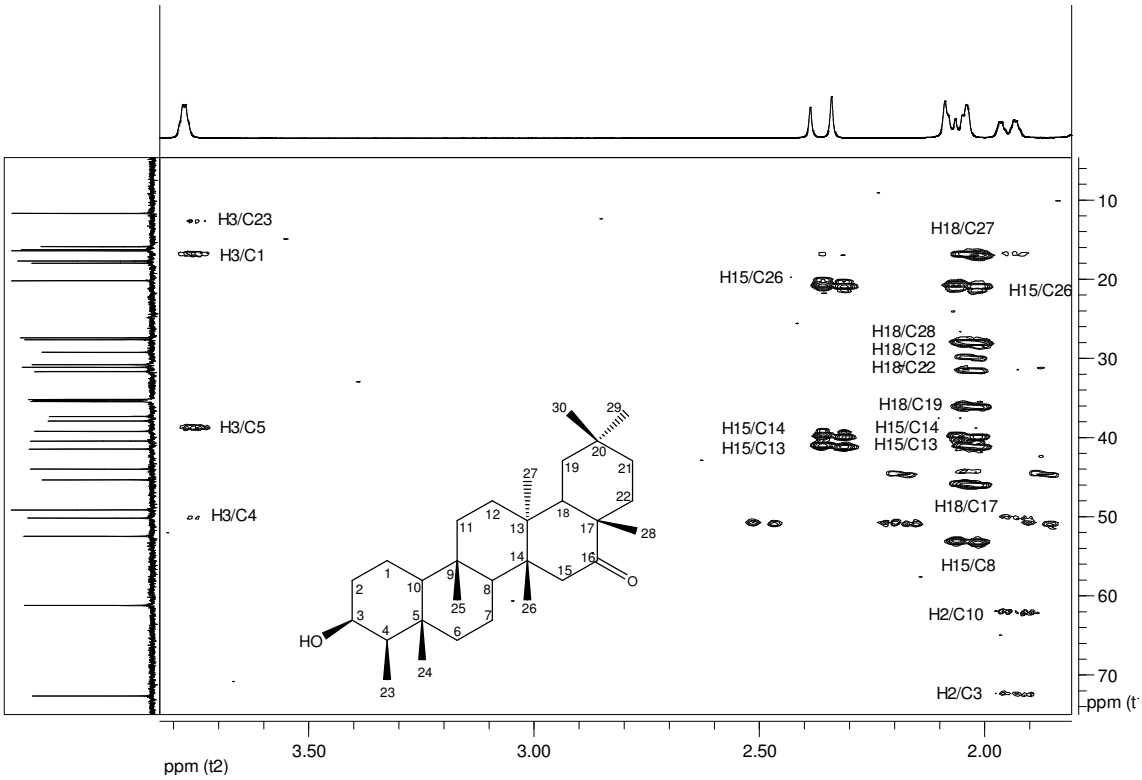


Figura B17: Expansão do mapa de contornos HMBC (400 MHz, $CDCl_3$ + piridina -d_5) de **P2a**.

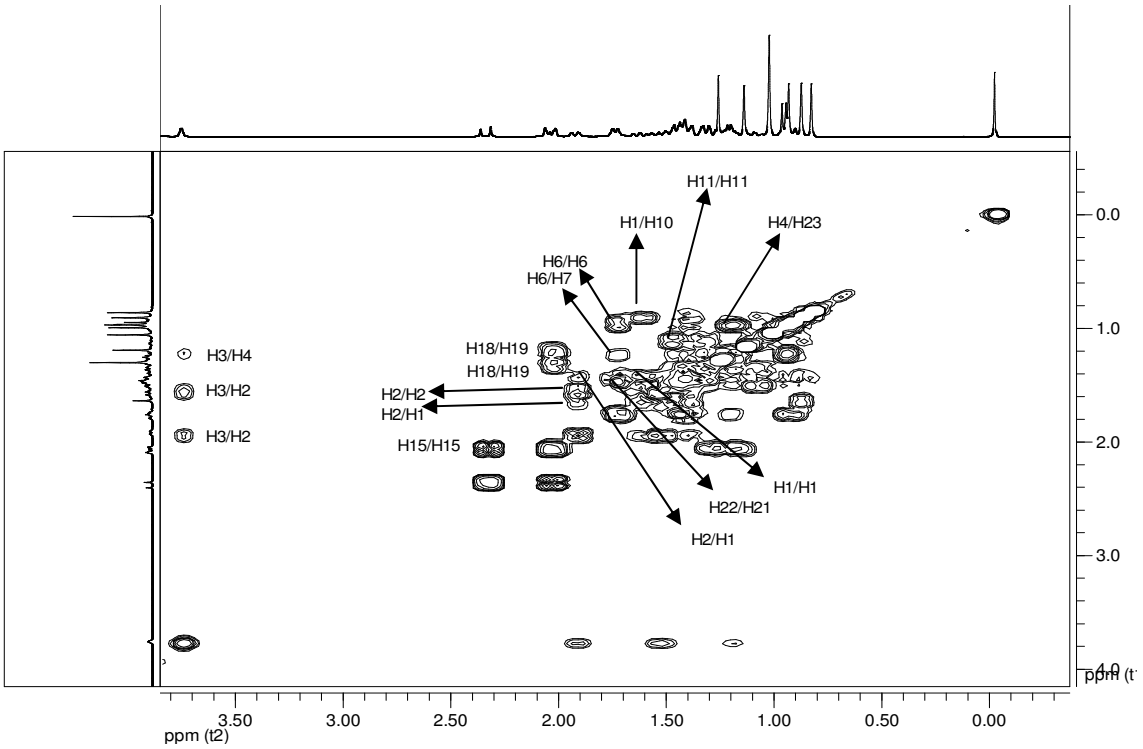


Figura B18: Expansão do mapa de contornos COSY (400 MHz, $CDCl_3$ + piridina-d_5) de **P2a**.

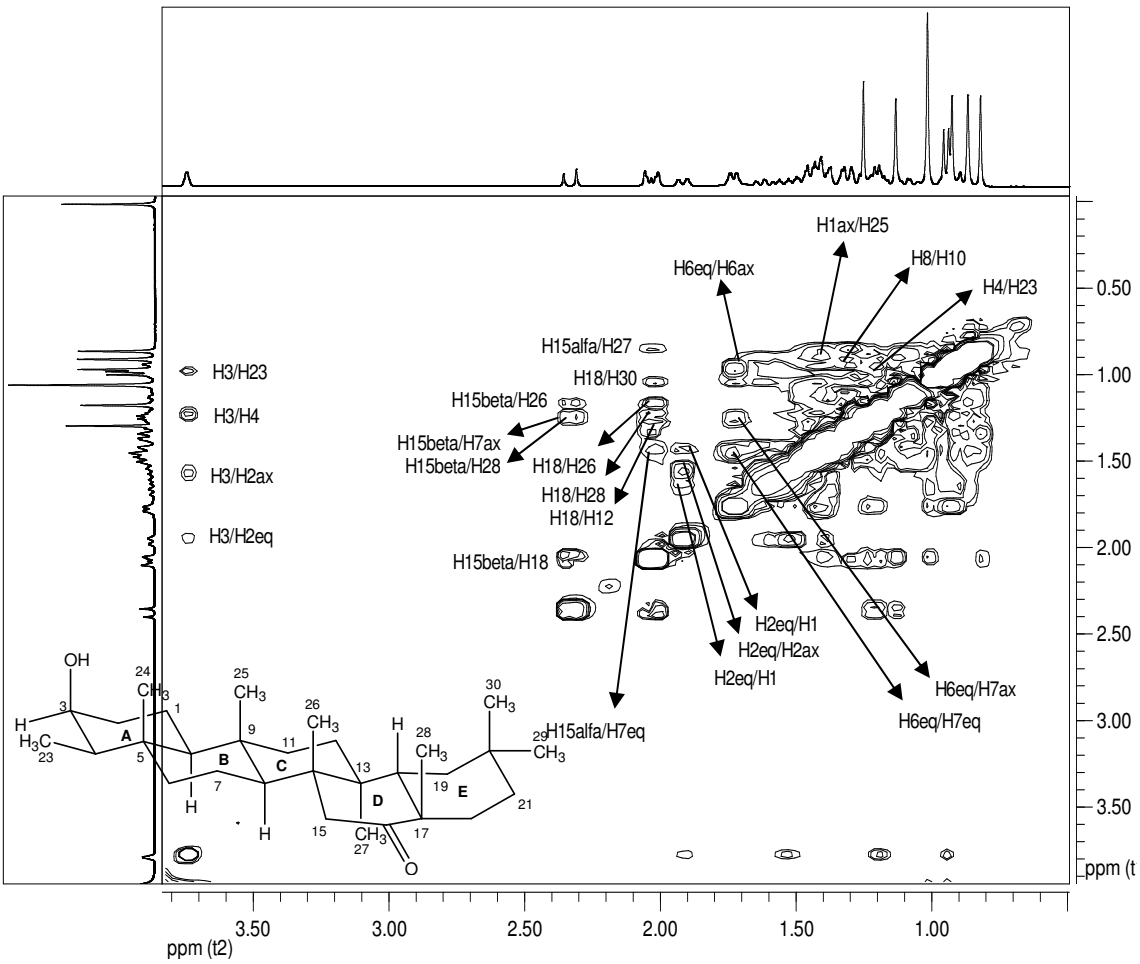


Figura B19: Expansão do mapa de contornos NOESY (400 MHz, $CDCl_3$ + piridina-d_5) de **P2a**.

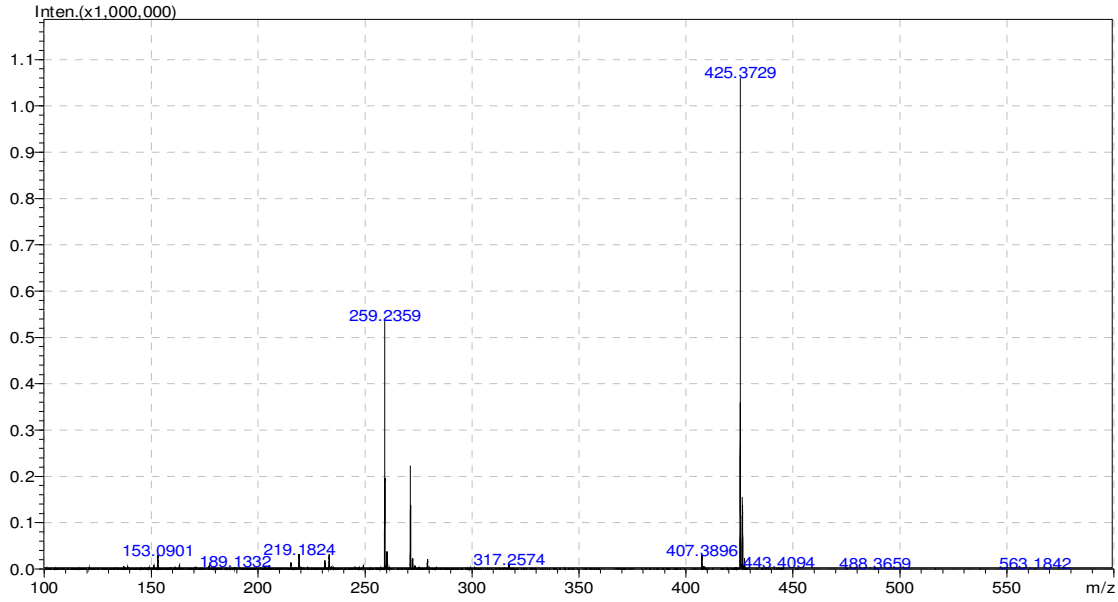


Figura B20: Espectro de massas (HR-APCI, modo positivo) de **P2a**.

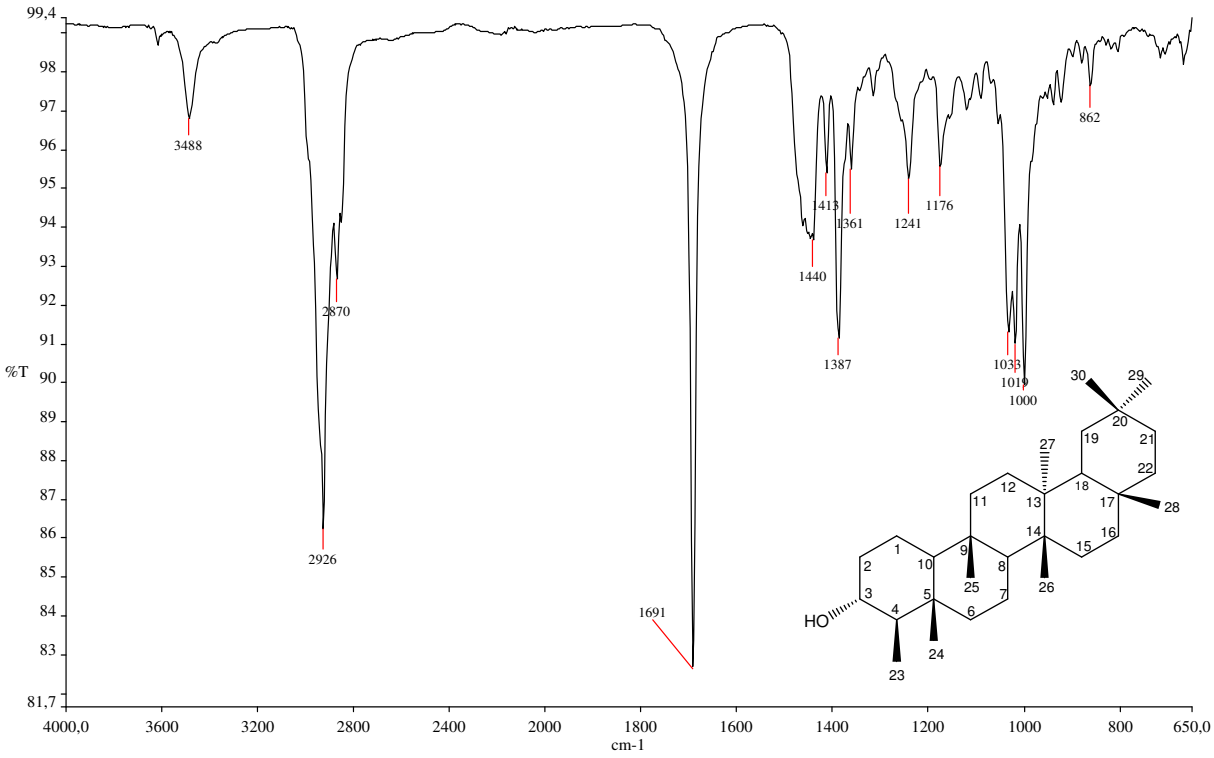


Figura B21: Espectro na região do IV de **P2b** (ATR).

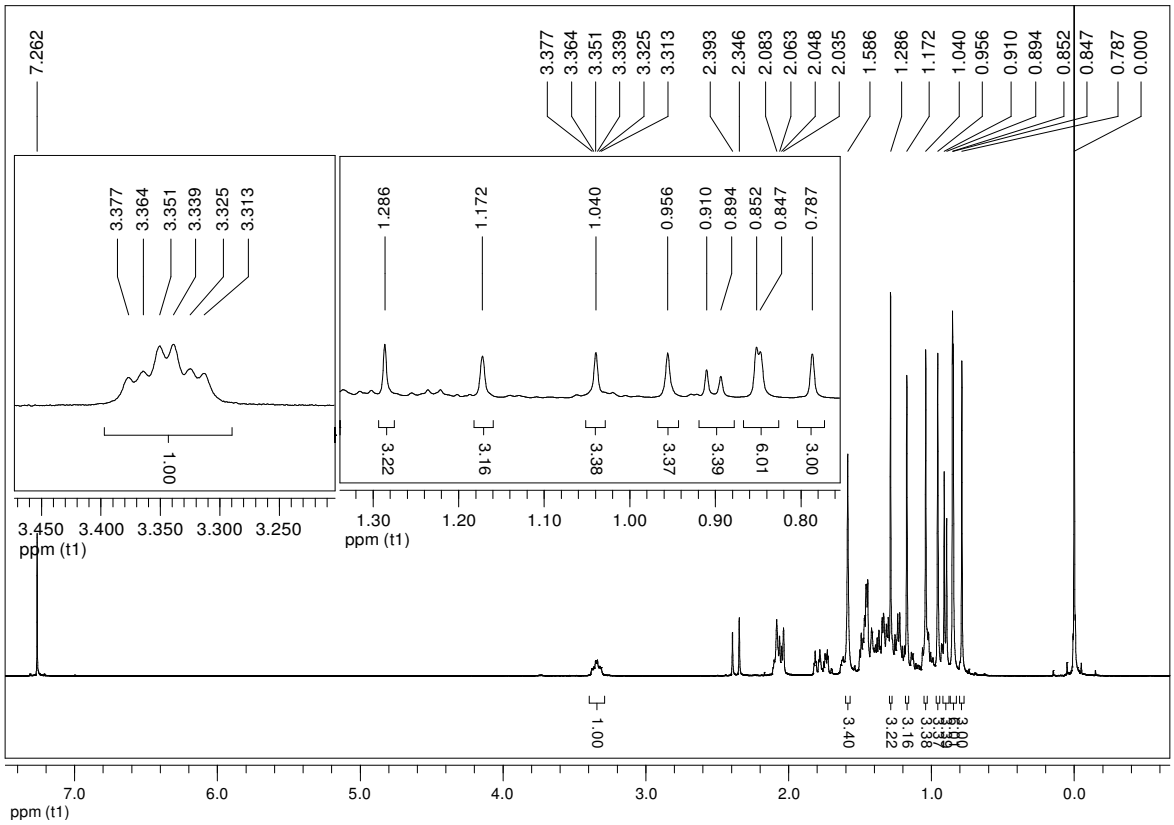


Figura B22: Espectro de RMN de ^{1}H (400 MHz, $CDCl_3$ + piridina-d_5) de **P2b**.

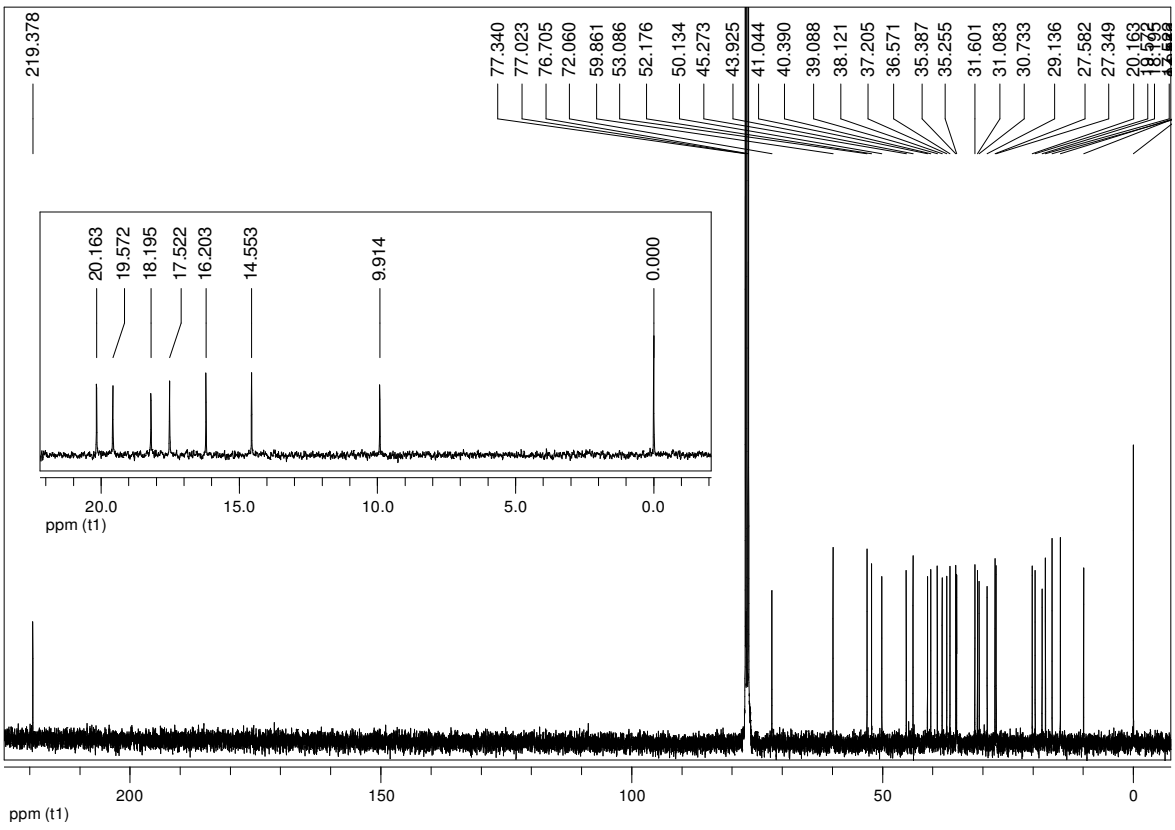


Figura B23: Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, $CDCl_3$ + piridina-d_5) de **P2b**.

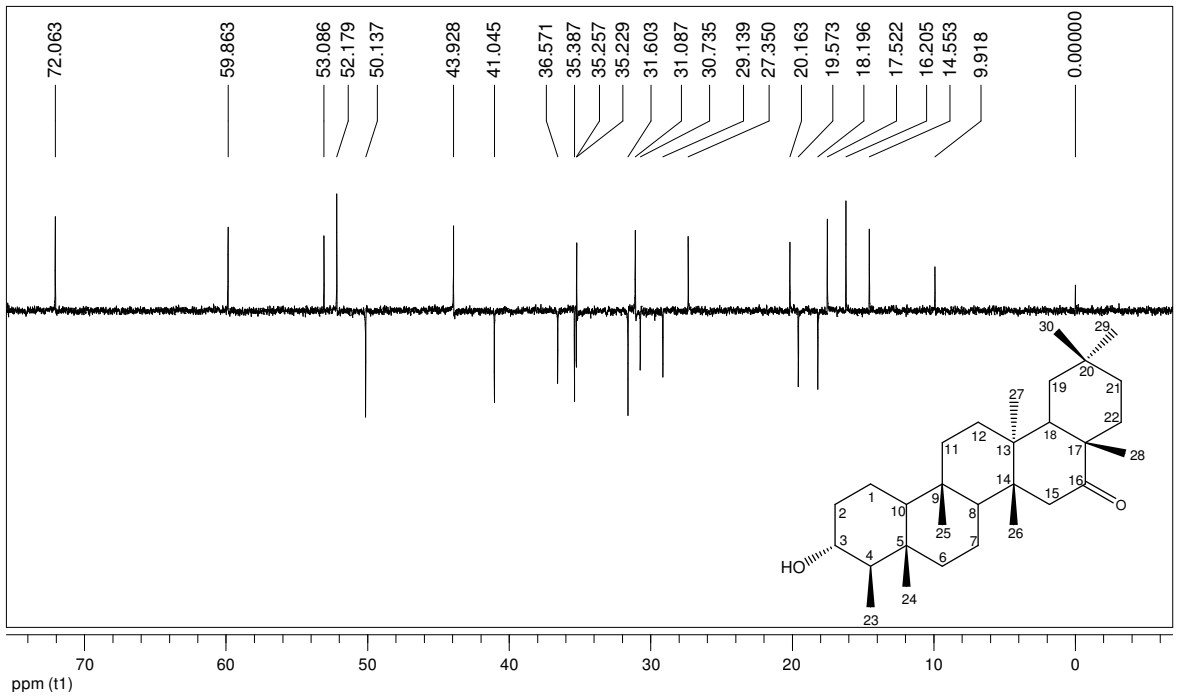


Figura B24: Expansão do subespectro DEPT135 (100 MHz, $CDCl_3$ + piridina- d_5) de **P2b**.

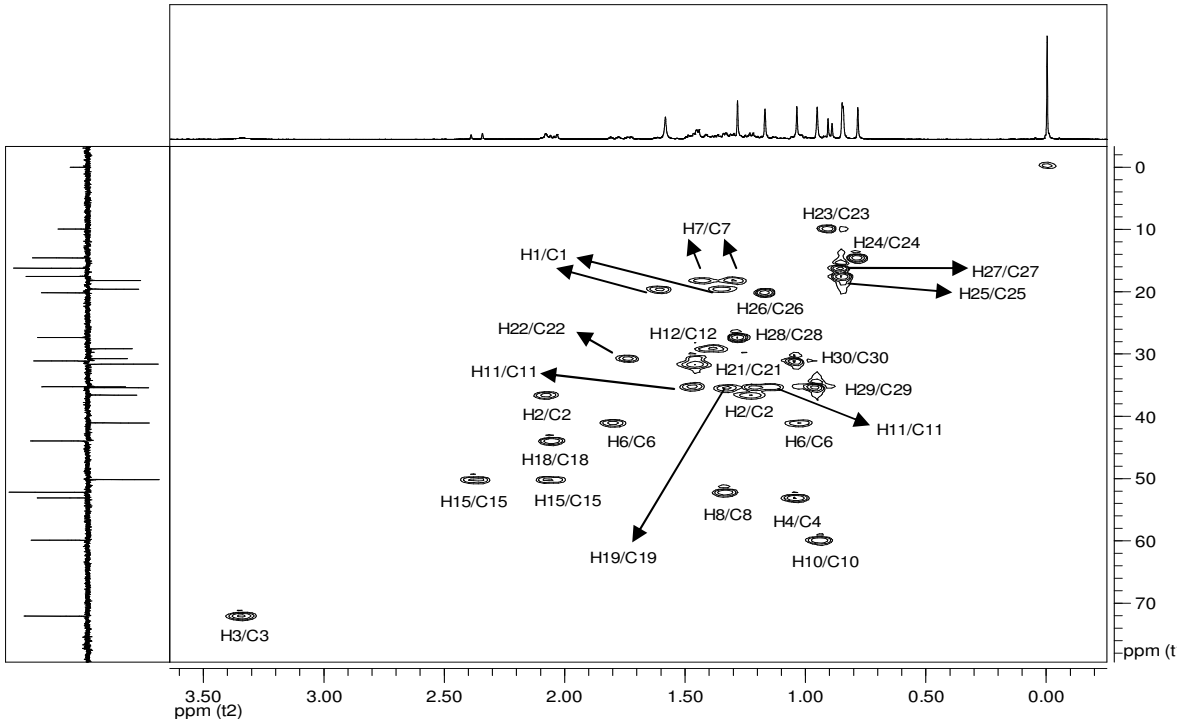


Figura B25: Expansão do mapa de contornos HSQC (400 MHz, $CDCl_3$ + piridina-d_5) de **P2b**.

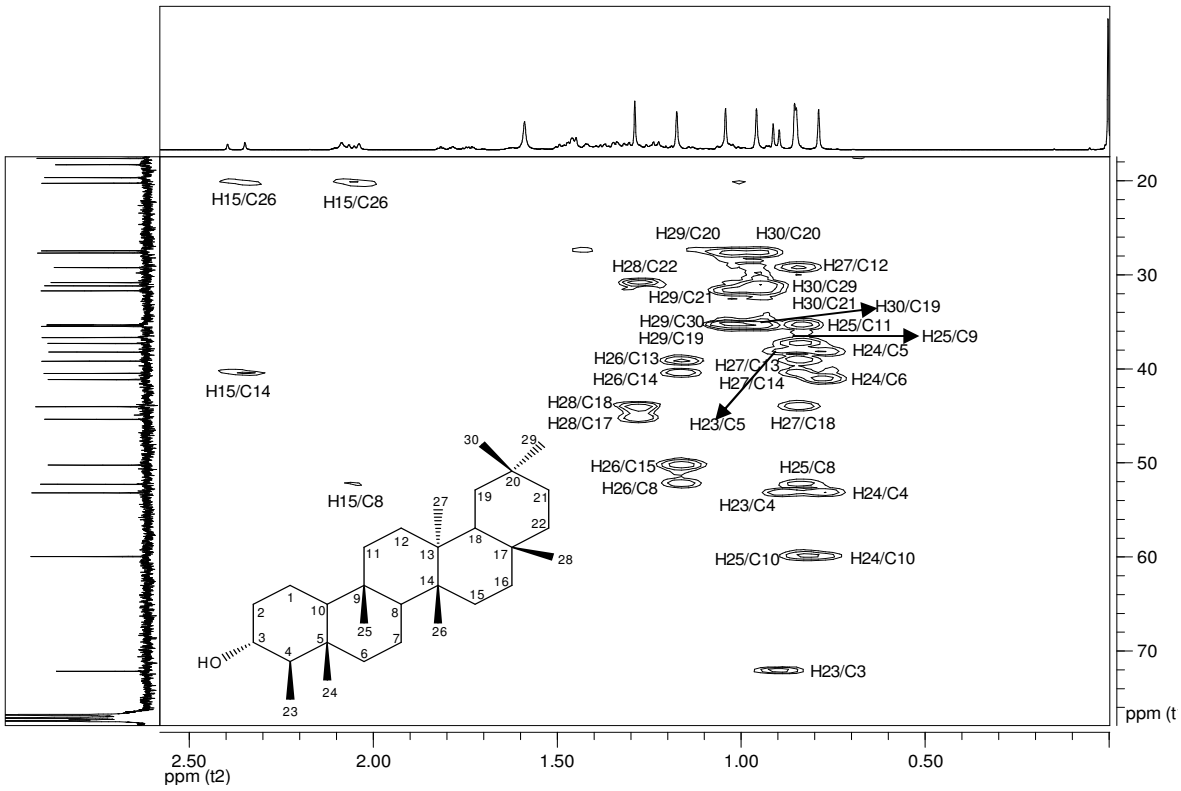


Figura B26: Expansão do mapa de contornos HMBC (400 MHz, $CDCl_3$ + piridina-d_5) de **P2b**.

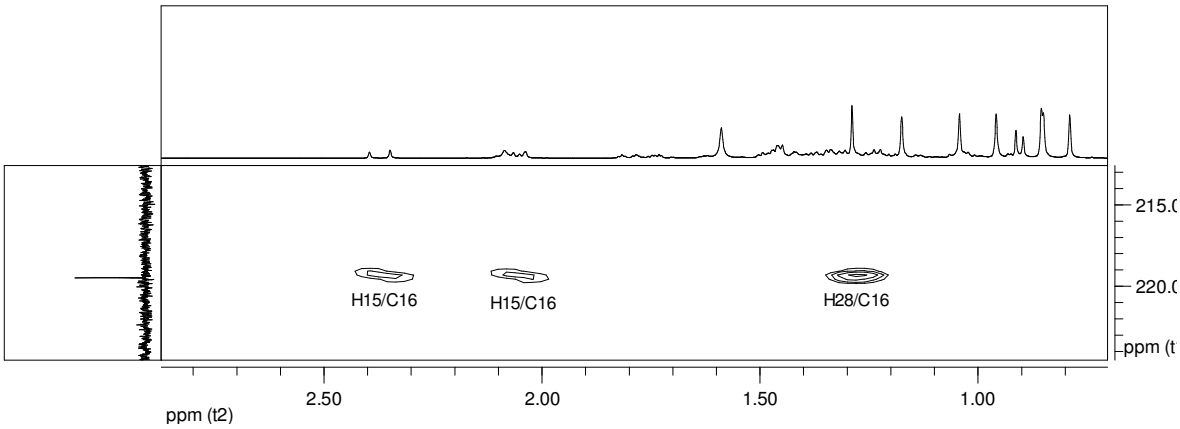


Figura B27: Expansão do mapa de contornos HMBC (400 MHz, $CDCl_3$ + piridina-d_5) de **P2b**.

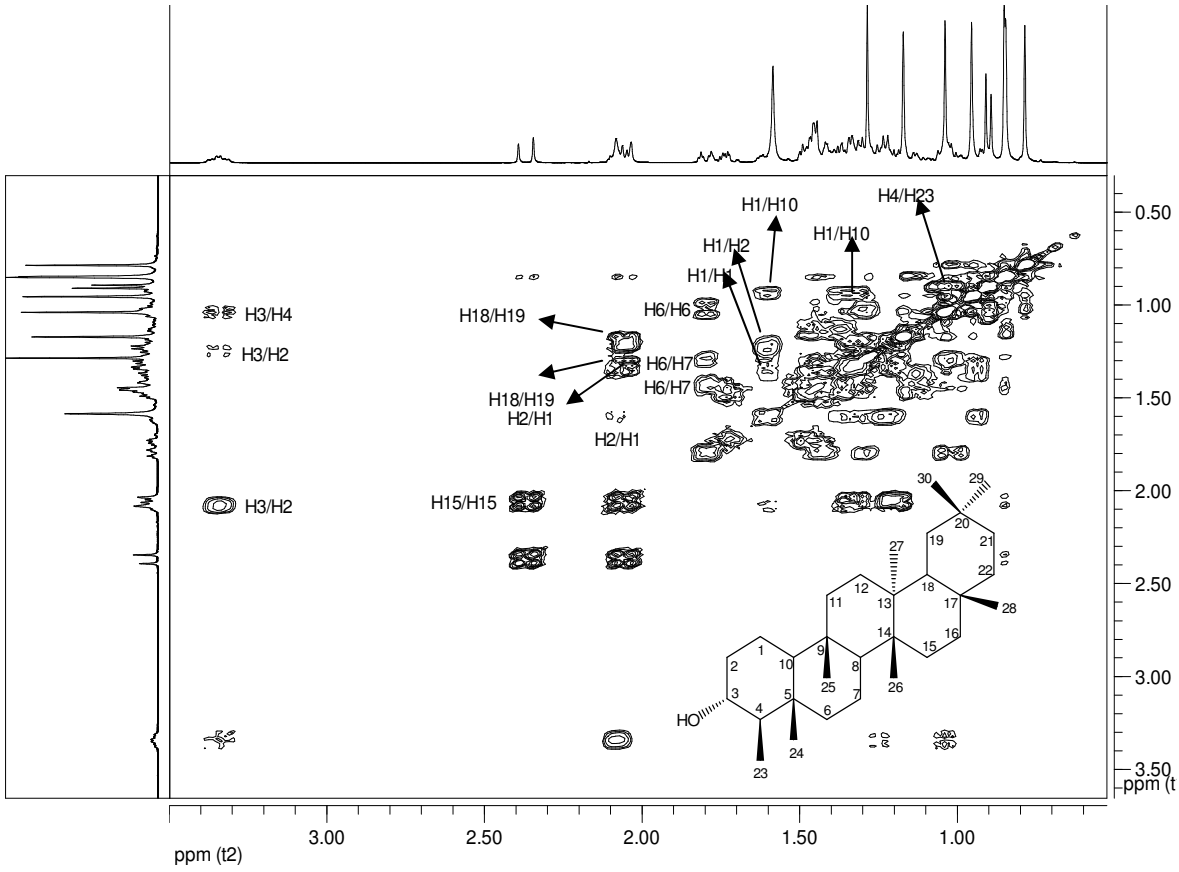


Figura B28: Expansão do mapa de contornos COSY (400 MHz, $CDCl_3$ + piridina-d_5) de **P2b**.

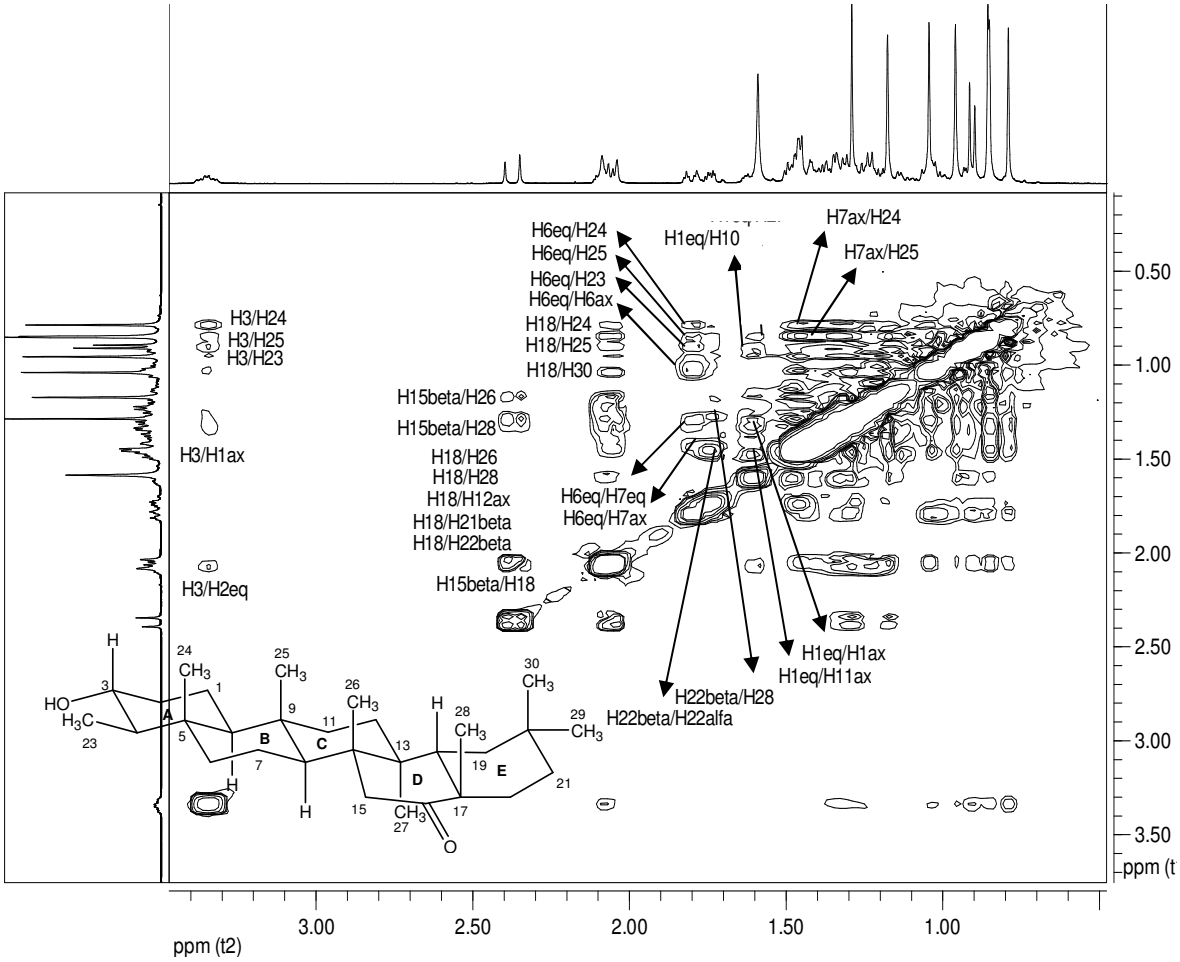


Figura B29: Expansão do mapa de contornos NOESY (400 MHz, $CDCl_3$ + piridina- d_5) de **P2b**.

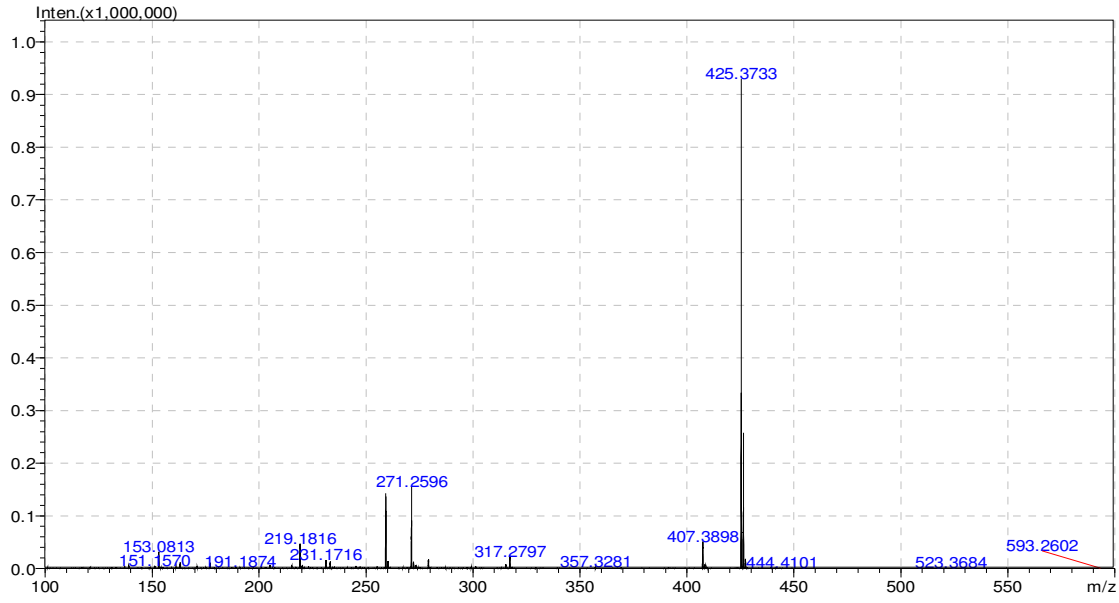


Figura B30: Espectro de massas (HR-APCI, modo positivo) de **P2b**.

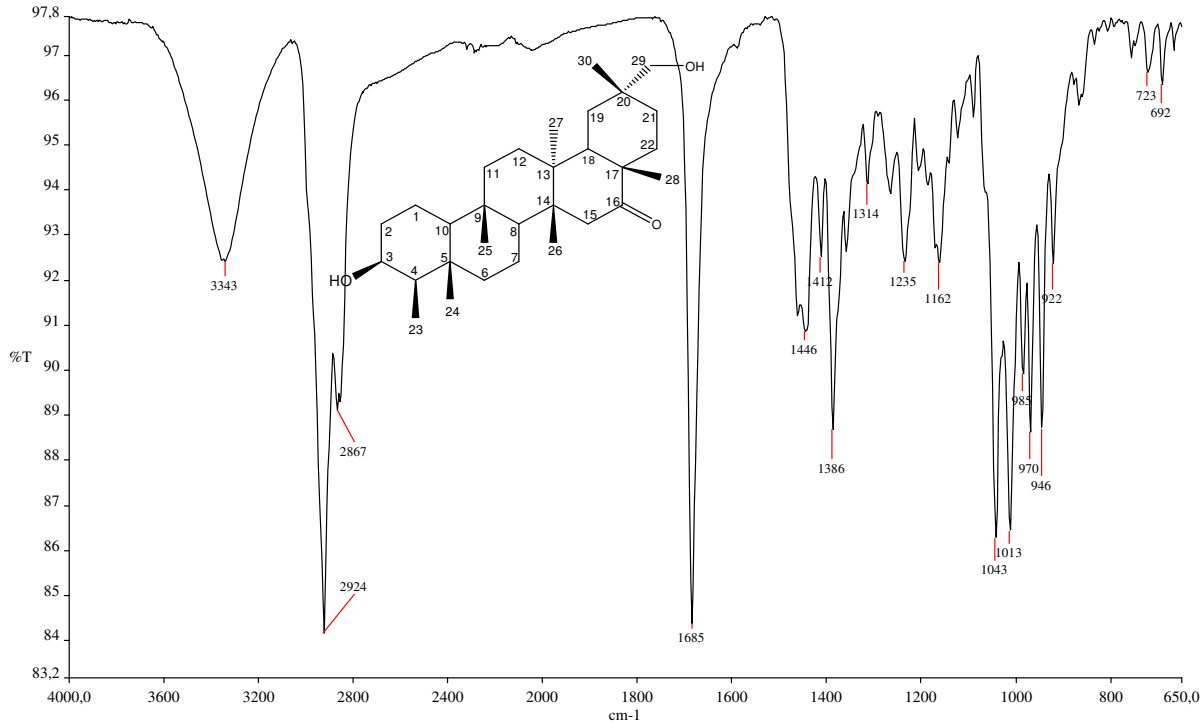


Figura B31: Espectro na região do IV de **P3a** (ATR).

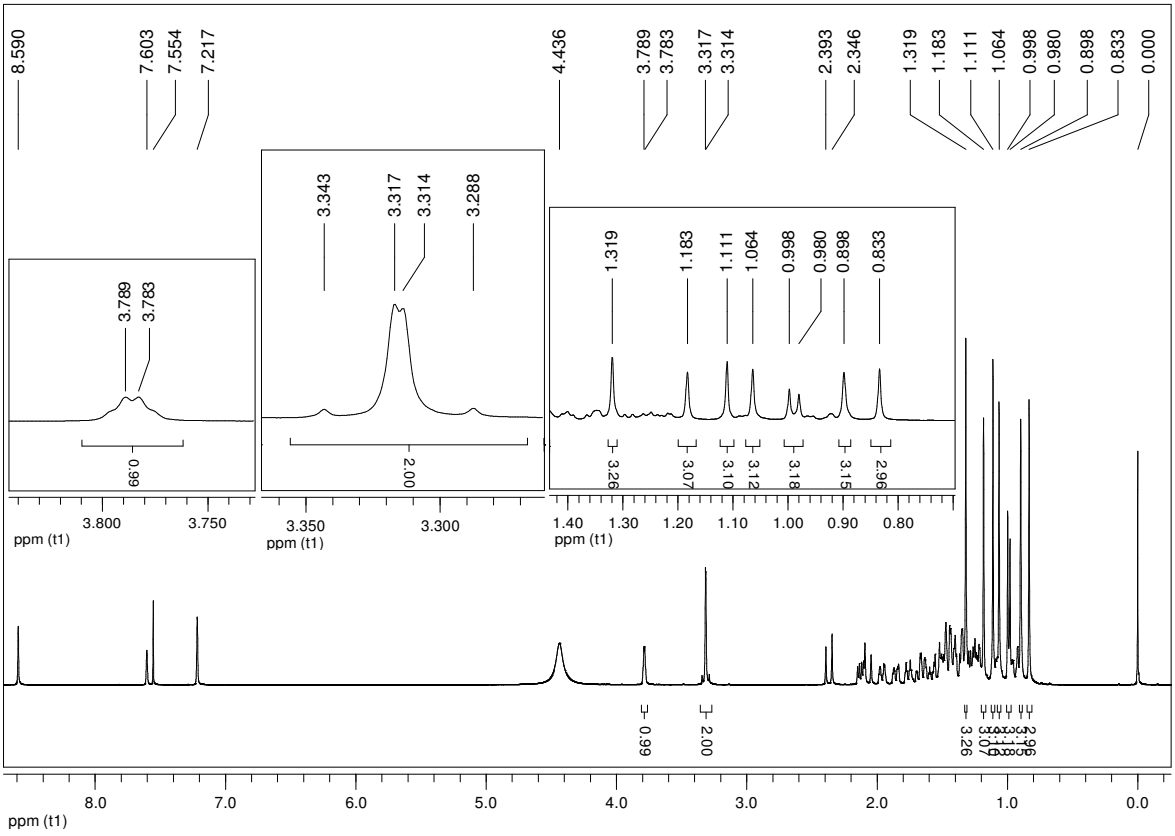


Figura B32: Espectro de RMN de ^{1}H (400 MHz, $CDCl_3$ + piridina-d_5) de **P3a**.

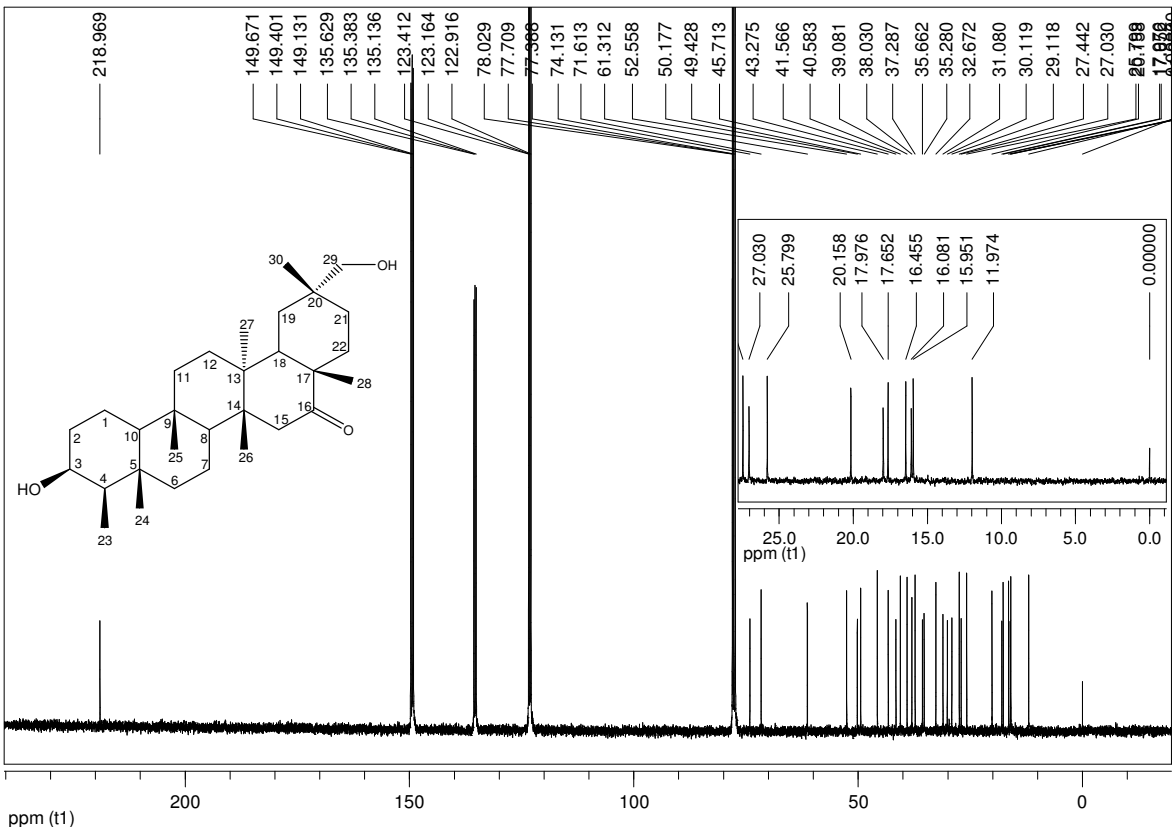


Figura B33: Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, $CDCl_3$ + piridina-d_5) de **P3a**.

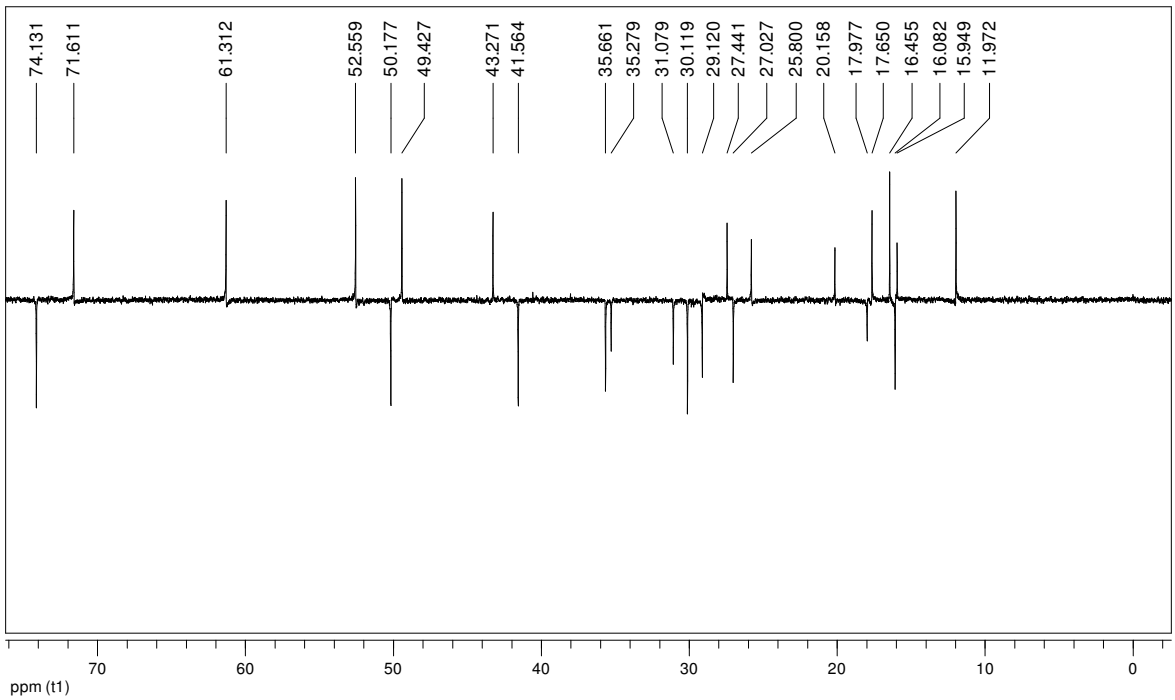


Figura B34: Expansão do subespectro DEPT135 (100 MHz, $CDCl_3$ + piridina- d_5) de **P3a**.

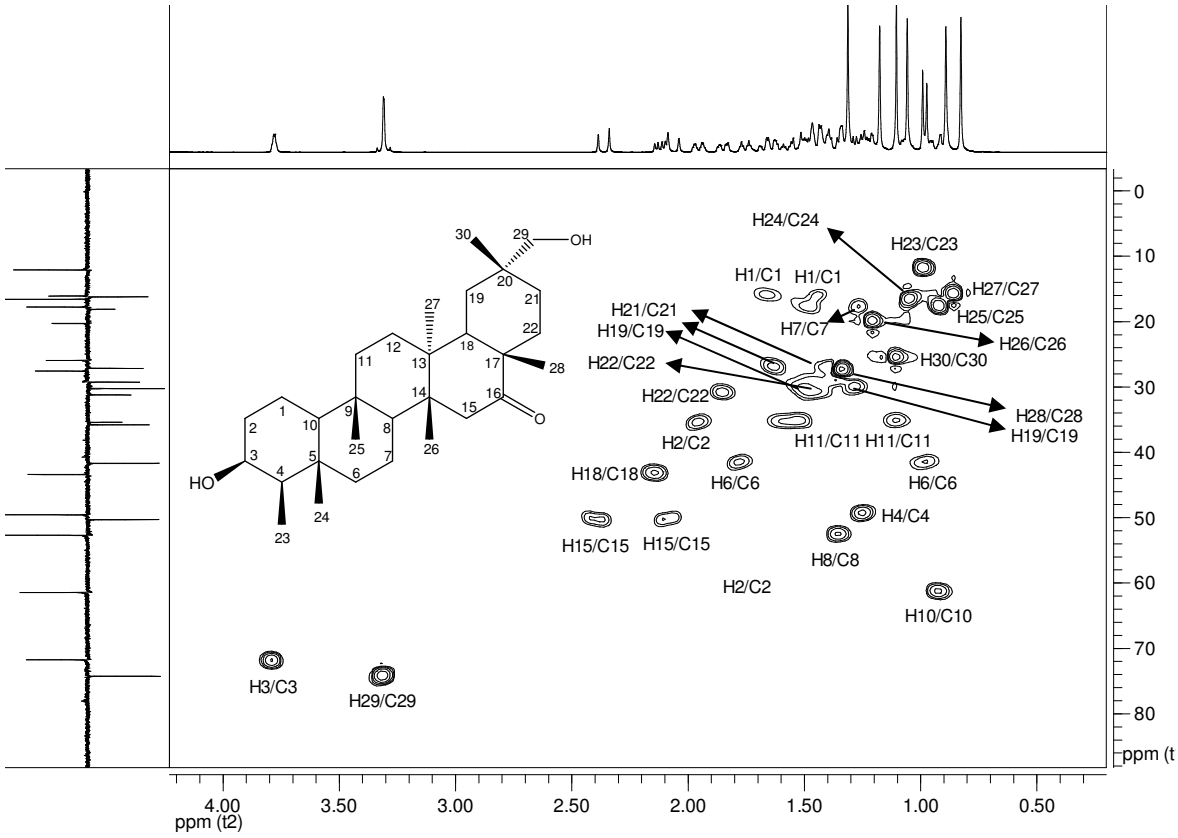


Figura B35: Expansão do mapa de contornos HSQC (400 MHz, $CDCl_3$ + piridina-d_5) de **P3a**.

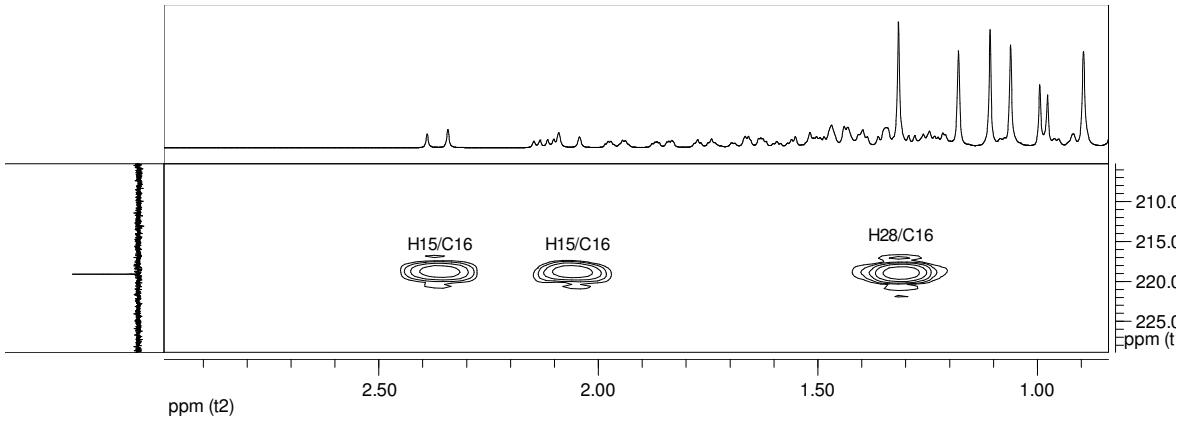


Figura B36: Expansão do mapa de contornos HMBC (400 MHz, $CDCl_3$ + piridina-d_5) de **P3a**.

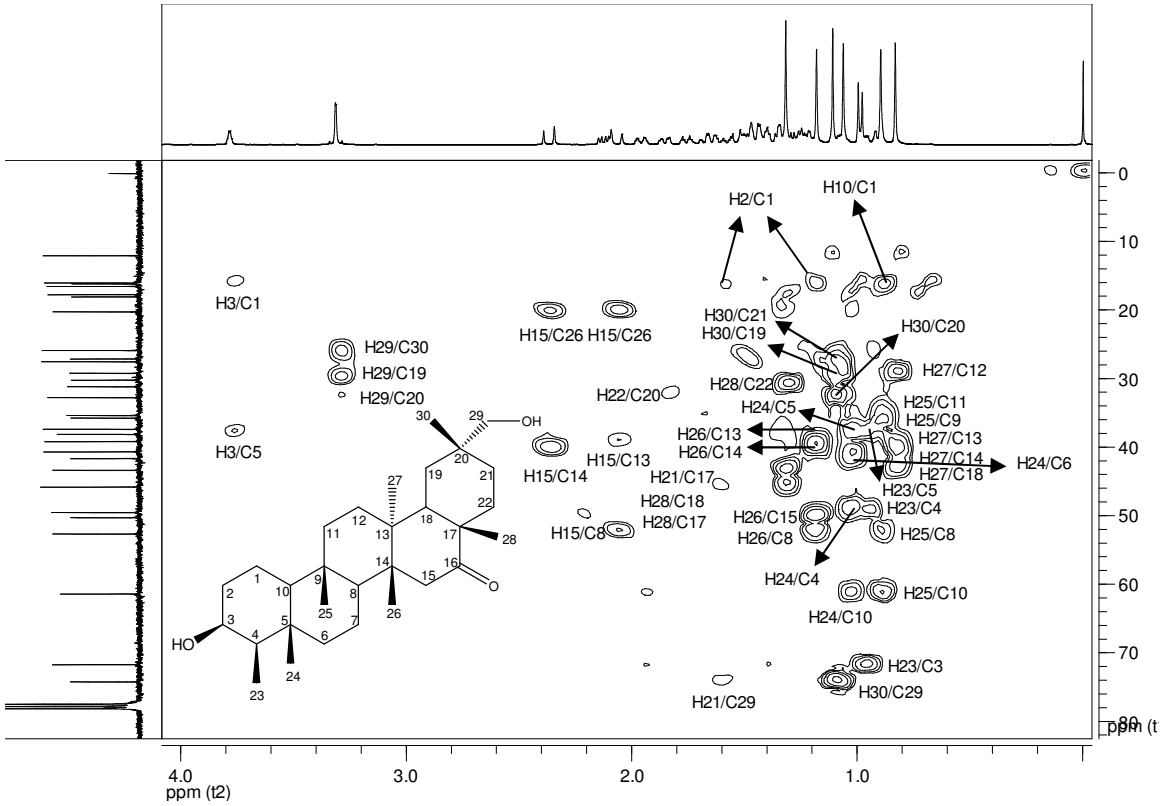


Figura B37: Expansão do mapa de contornos HMBC (400 MHz, $CDCl_3$ + piridina-d_5) de **P3a**.

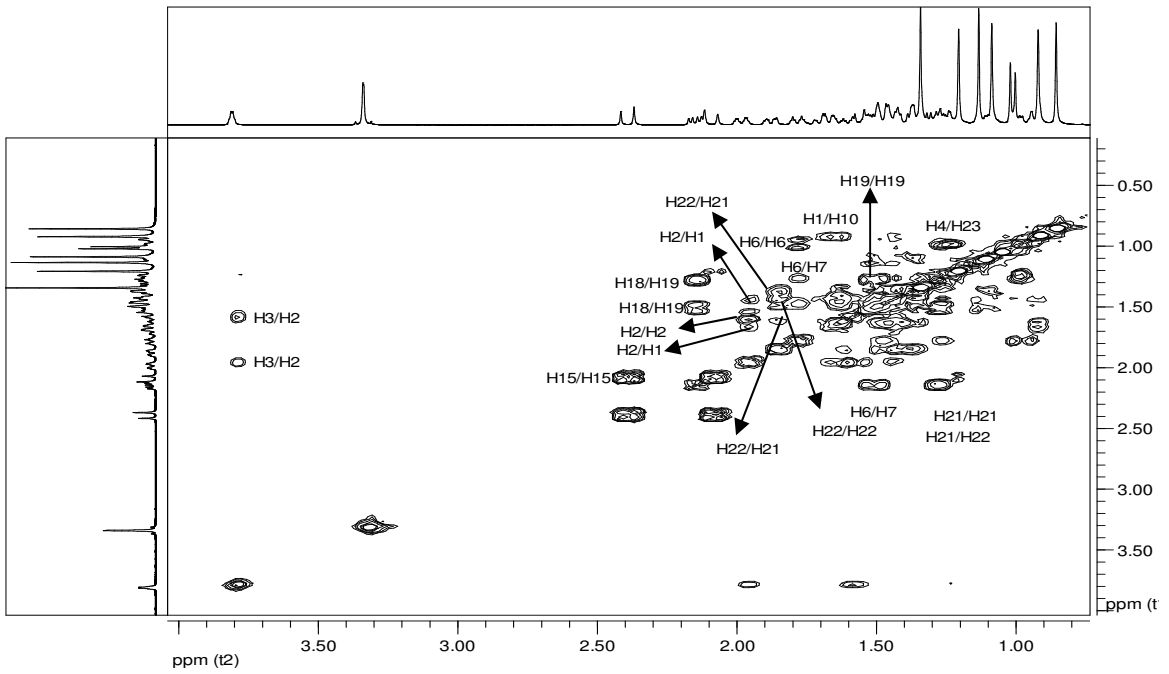


Figura B38: Expansão do mapa de contornos COSY (400 MHz, $CDCl_3$ + piridina-d_5) de **P3a**.

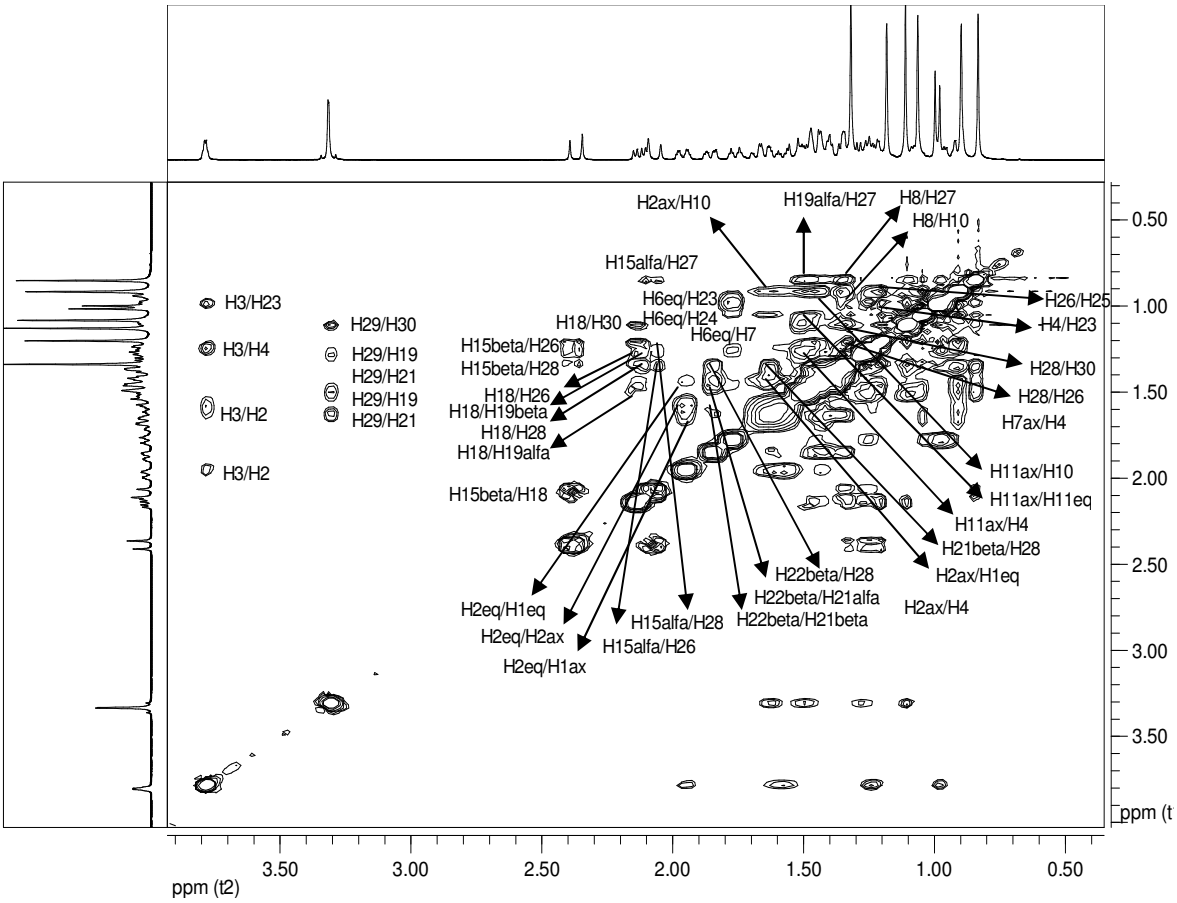


Figura B39: Expansão do mapa de contornos NOESY (400 MHz, $CDCl_3$ + piridina- d_5) de **P3a**.

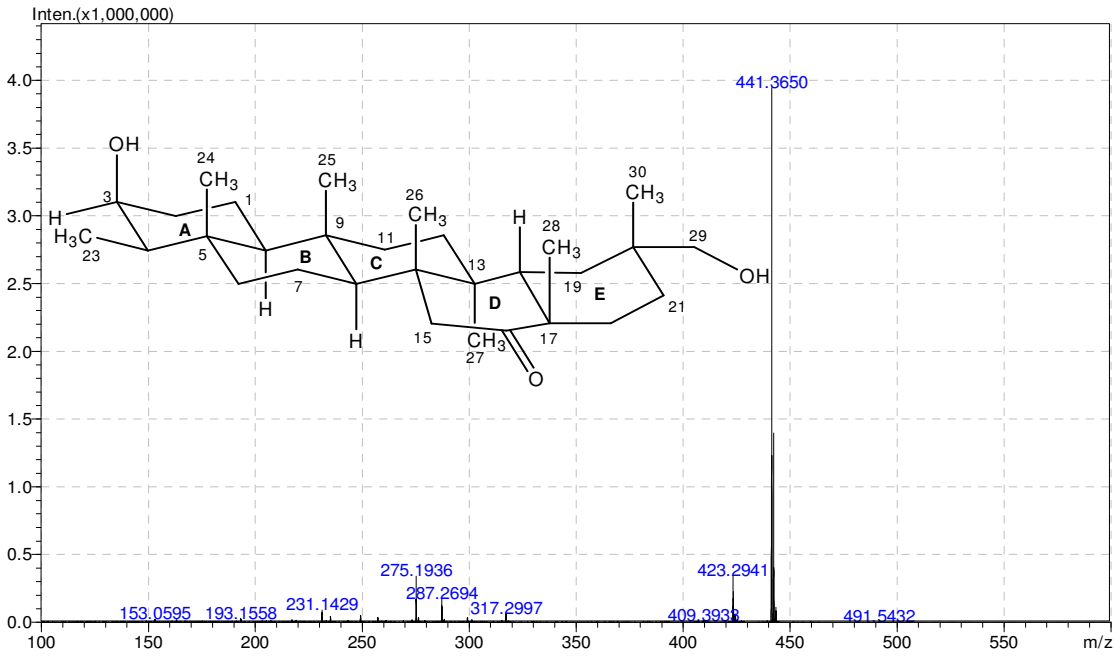


Figura B40: Espectro de massas (HR-APCI, modo positivo) de **P3a**.

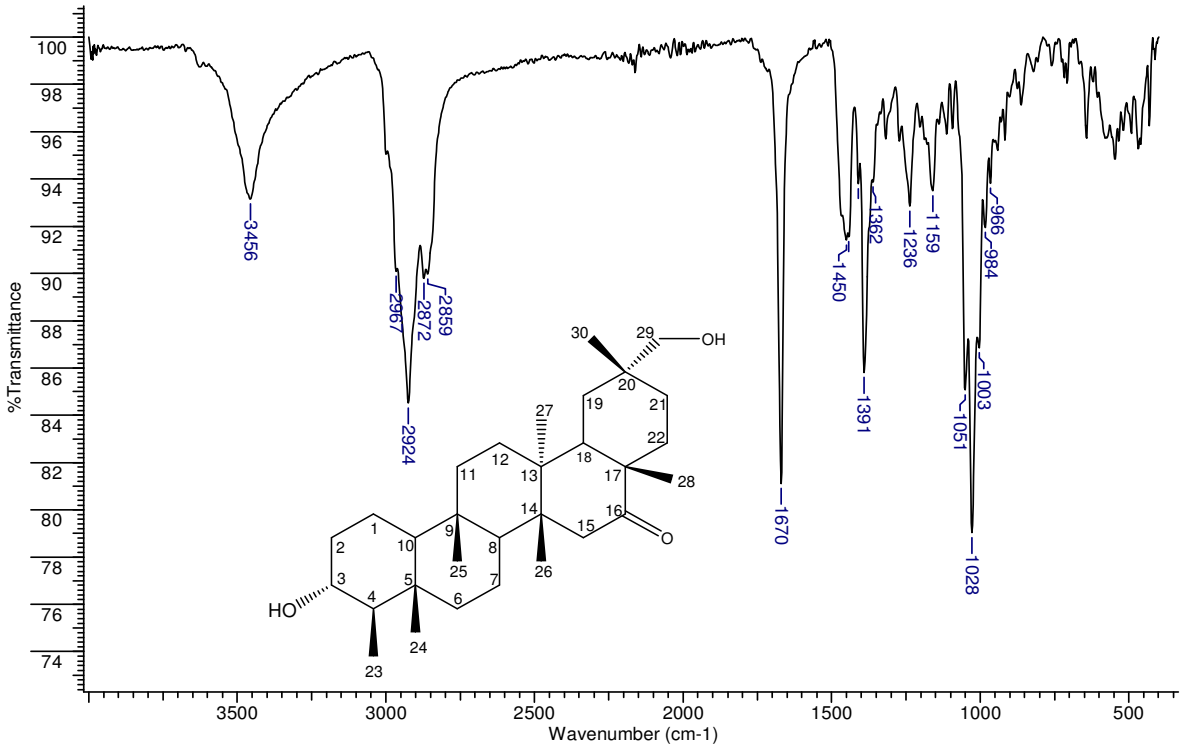


Figura B41: Espectro na região do IV de **P3b** (ATR).

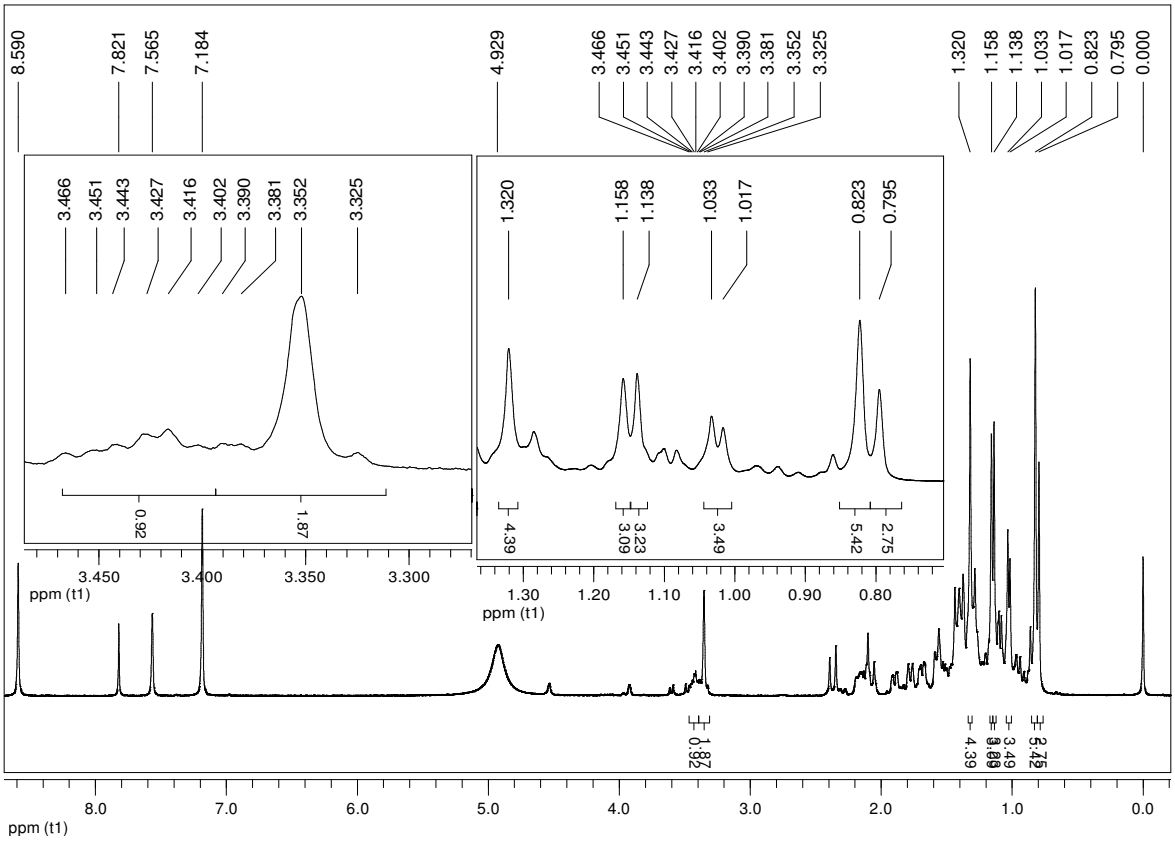


Figura B42: Espectro de RMN de ^{1}H (400 MHz, $CDCl_3$ + piridina-d_5) de **P3b**.

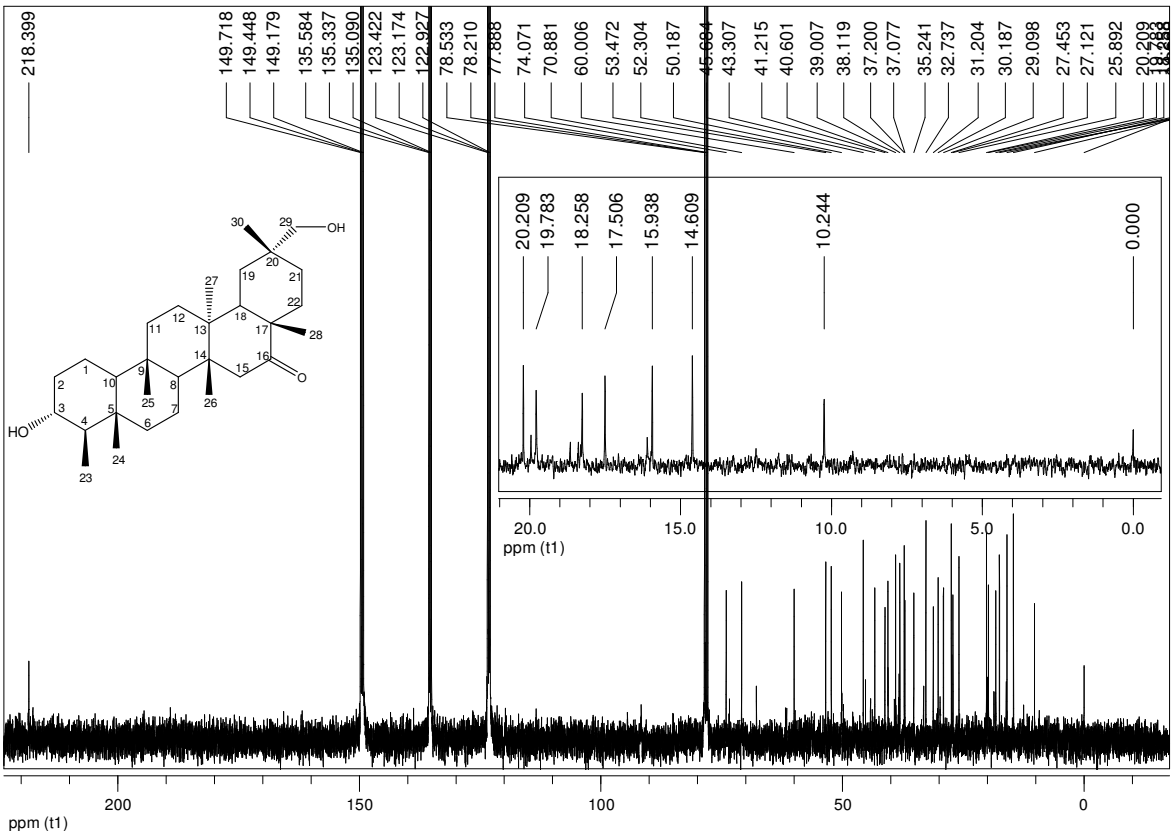


Figura B43: Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, $CDCl_3$ + piridina-d_5) de **P3b**.

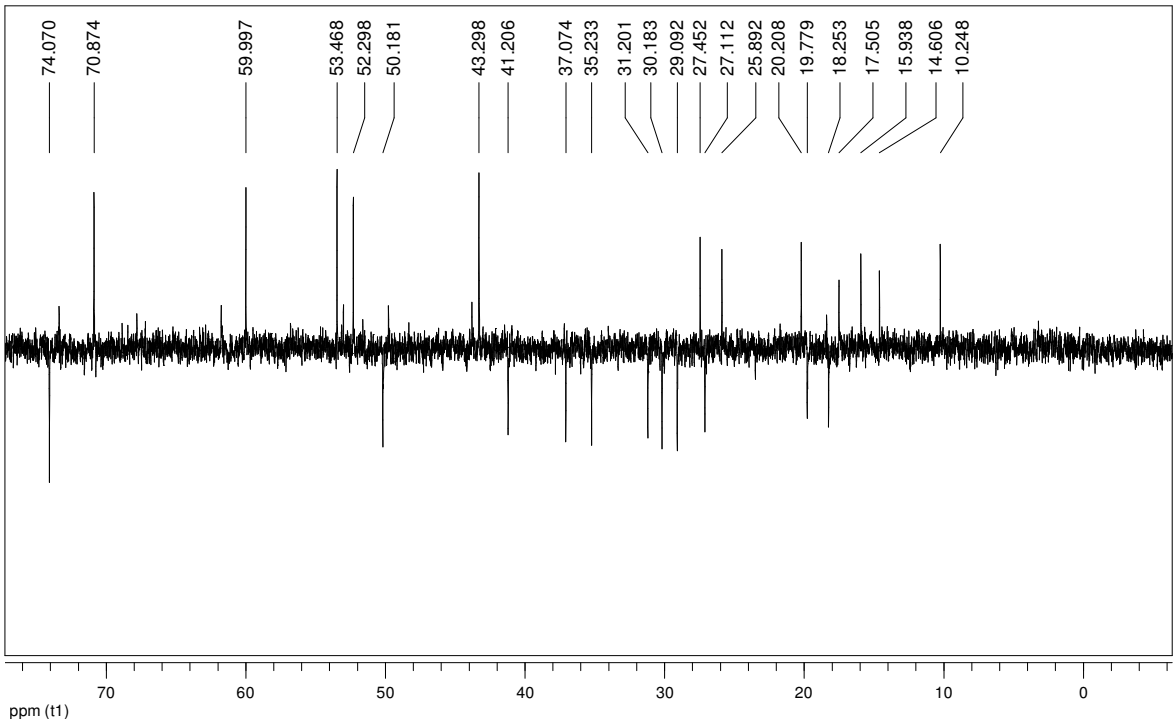


Figura B44: Expansão do subespectro DEPT135 (100 MHz, $CDCl_3$ + piridina- d_5) de **P3b**.

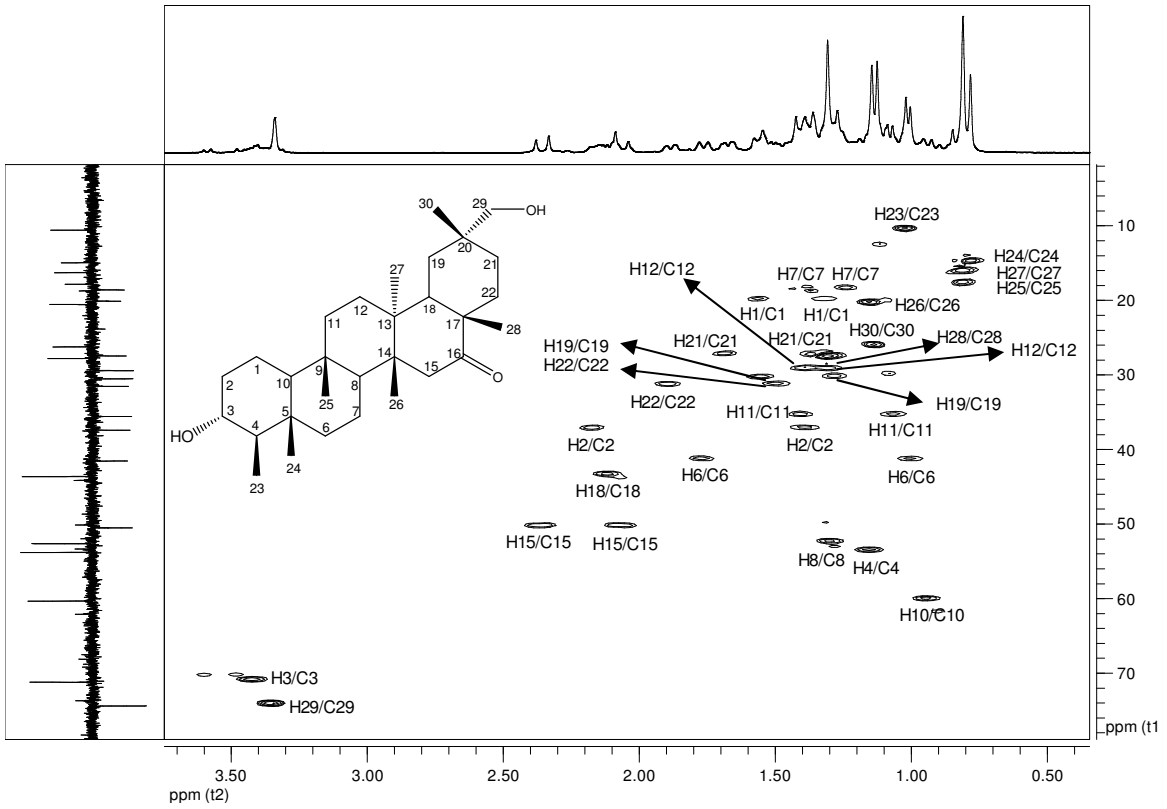


Figura B45: Expansão do mapa de contornos HSQC (400 MHz, $CDCl_3$ + piridina-d_5) de **P3b**.

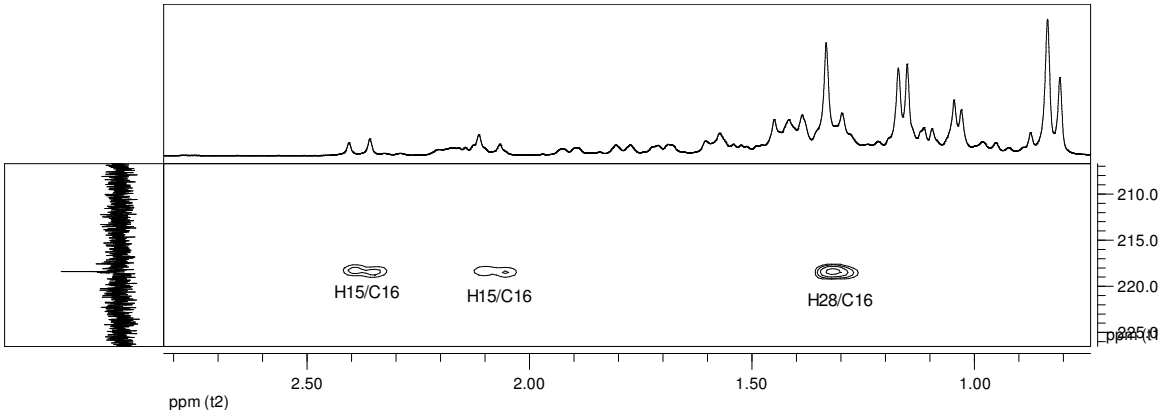


Figura B46: Expansão do mapa de contornos HMBC (400 MHz, $CDCl_3$ + piridina-d_5) de **P3b**.

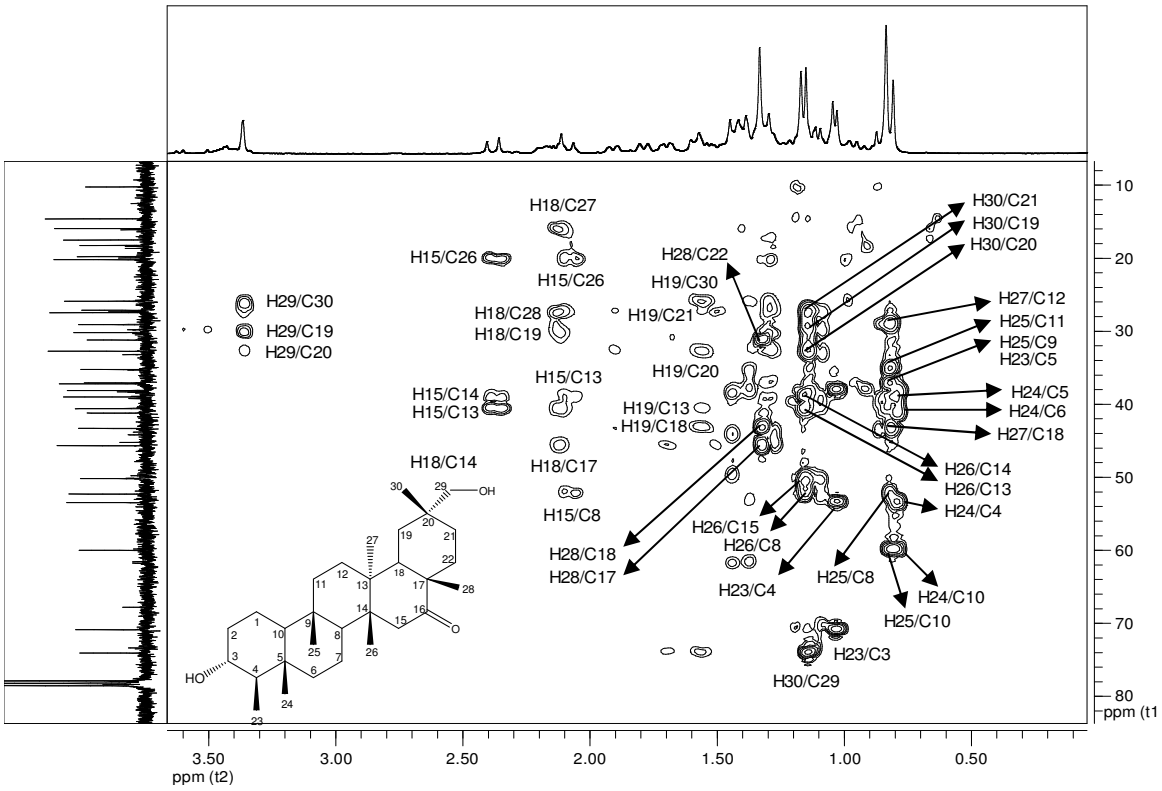


Figura B47: Expansão do mapa de contornos HMBC (400 MHz, $CDCl_3$ + piridina-d_5) de **P3b**.

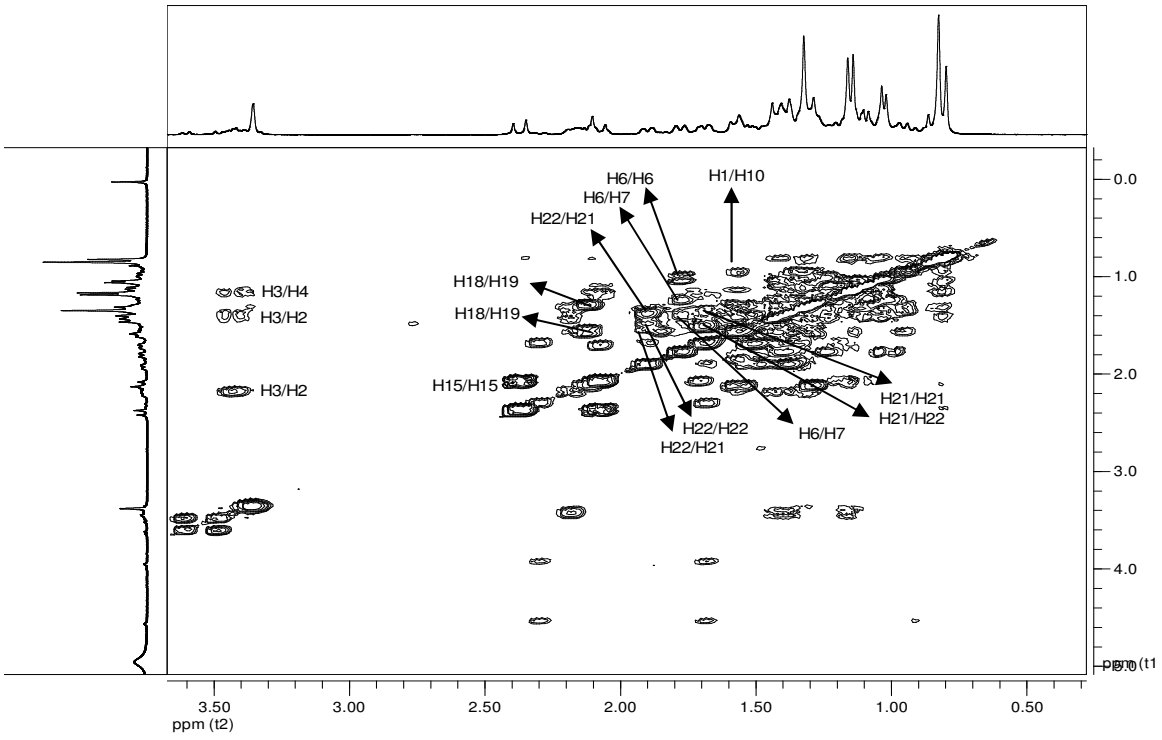


Figura B48: Expansão do mapa de contornos COSY (400 MHz, $CDCl_3$ + piridina-d_5) de **P3b**.

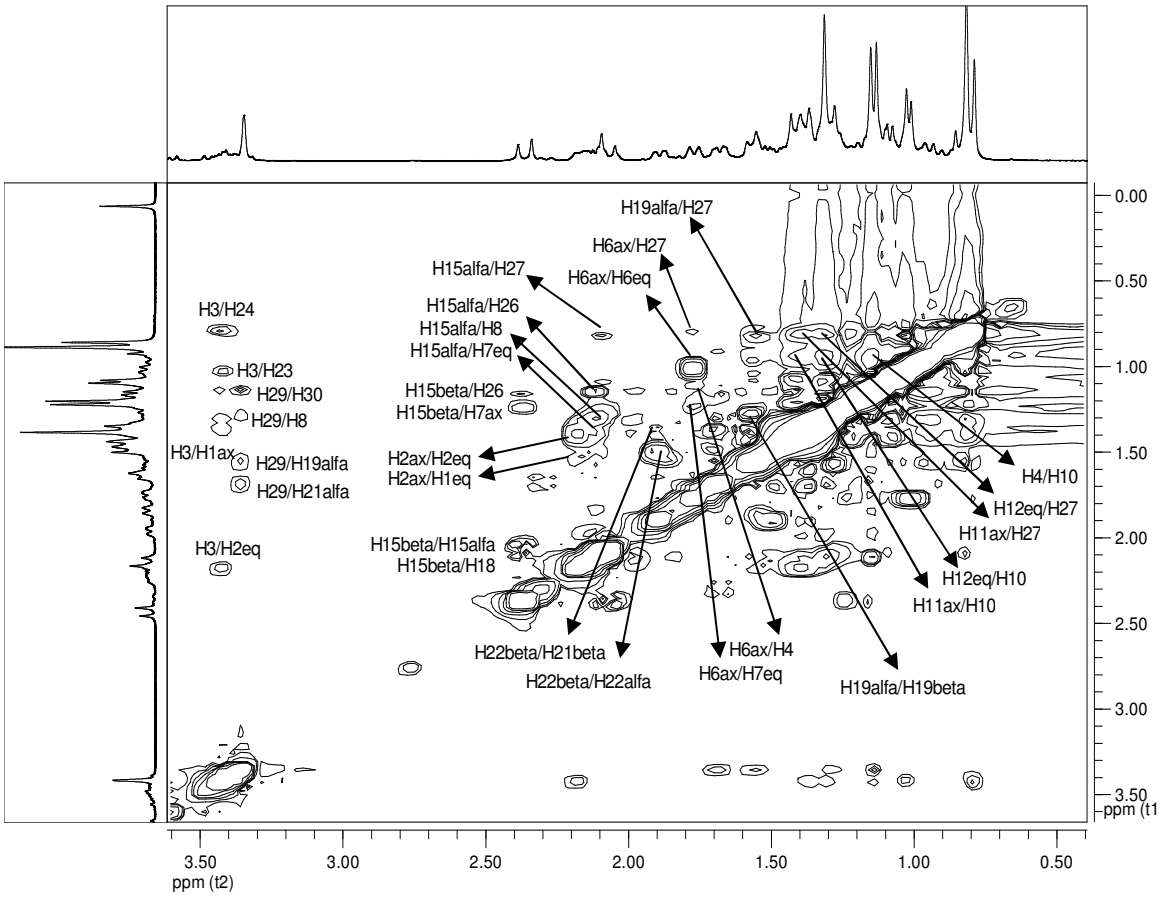


Figura B49: Expansão do mapa de contornos NOESY (400 MHz, $CDCl_3$ + piridina-d_5) de **P3b**.

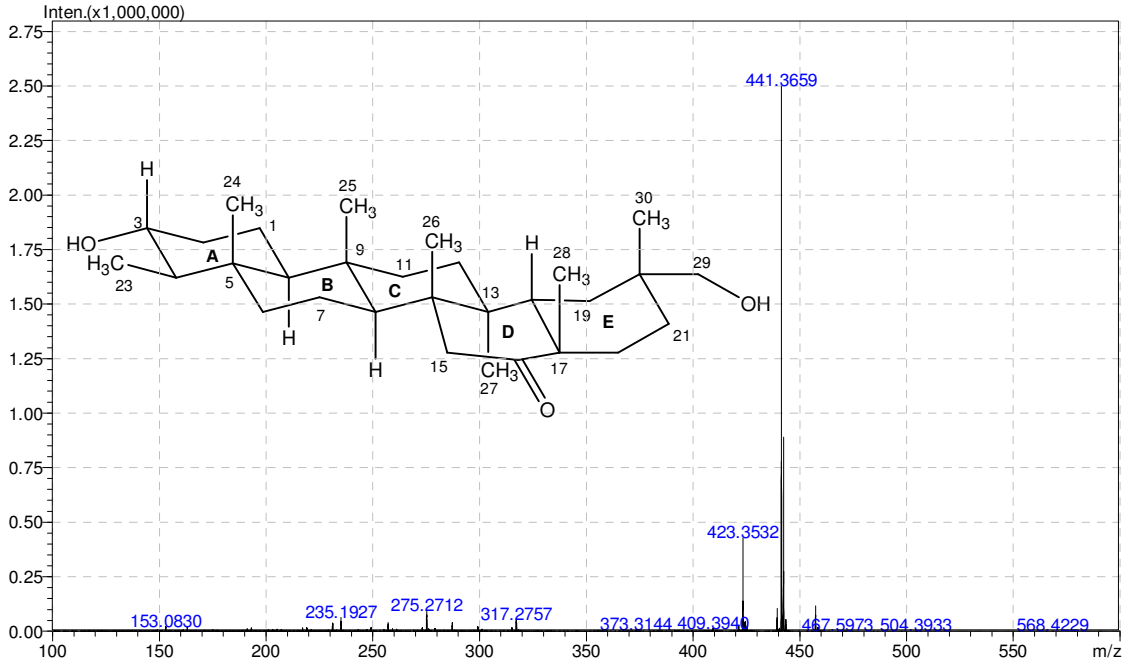


Figura B50: Espectro de massas (HR-APCI, modo positivo) de **P3b**.

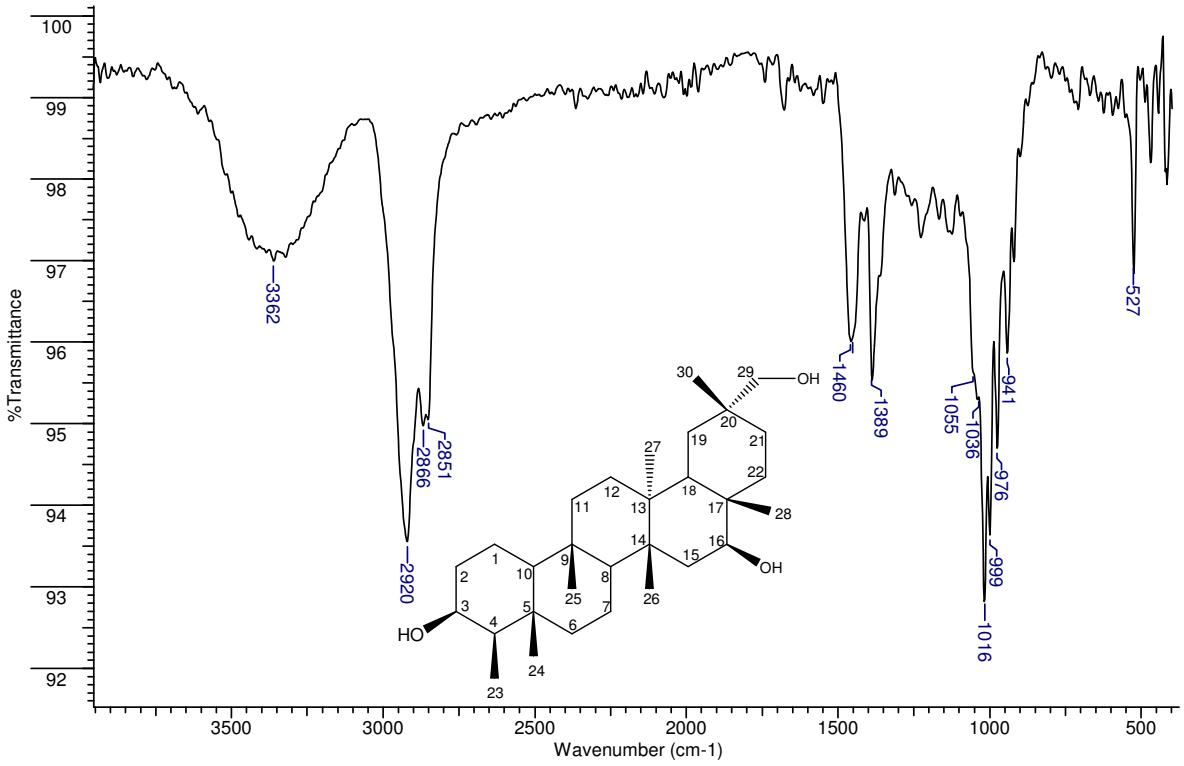


Figura B51: Espectro na região do IV de **P4a** (ATR).

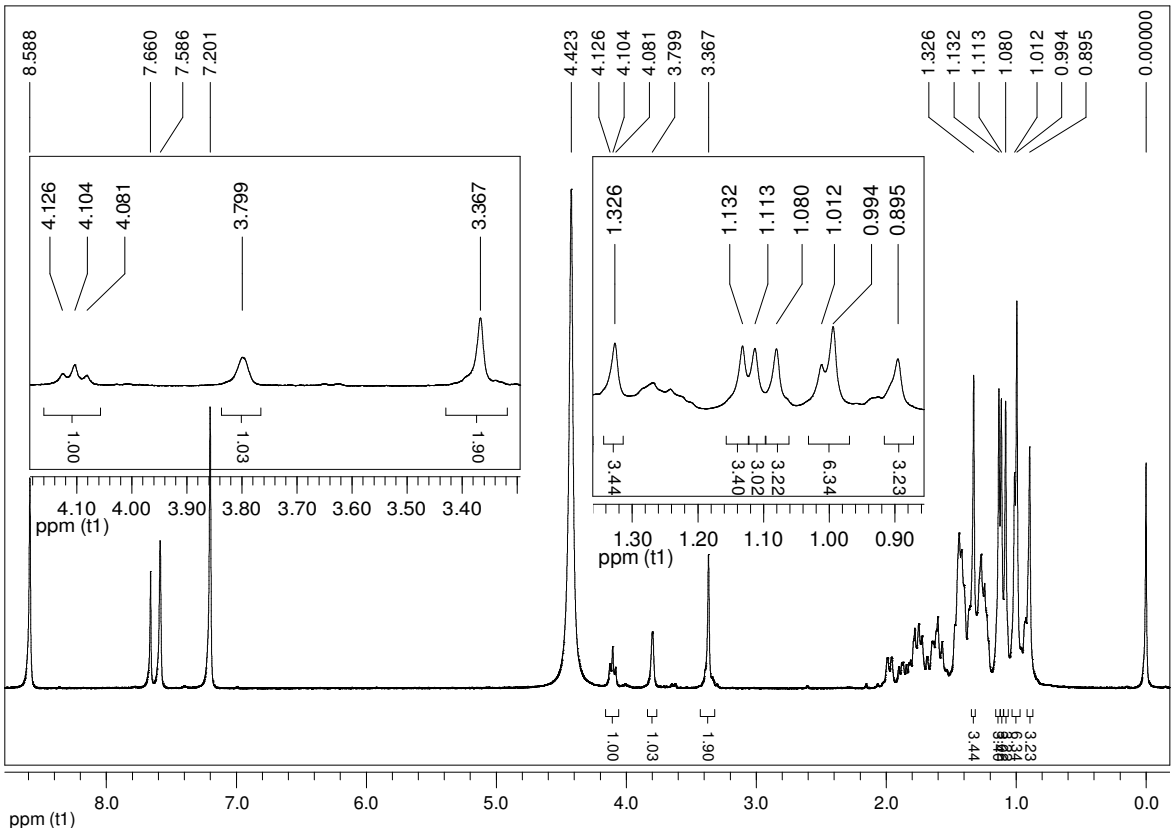


Figura B52: Espectro de RMN de ^{1}H (400 MHz, $CDCl_3$ + piridina-d_5) de **P4a**.

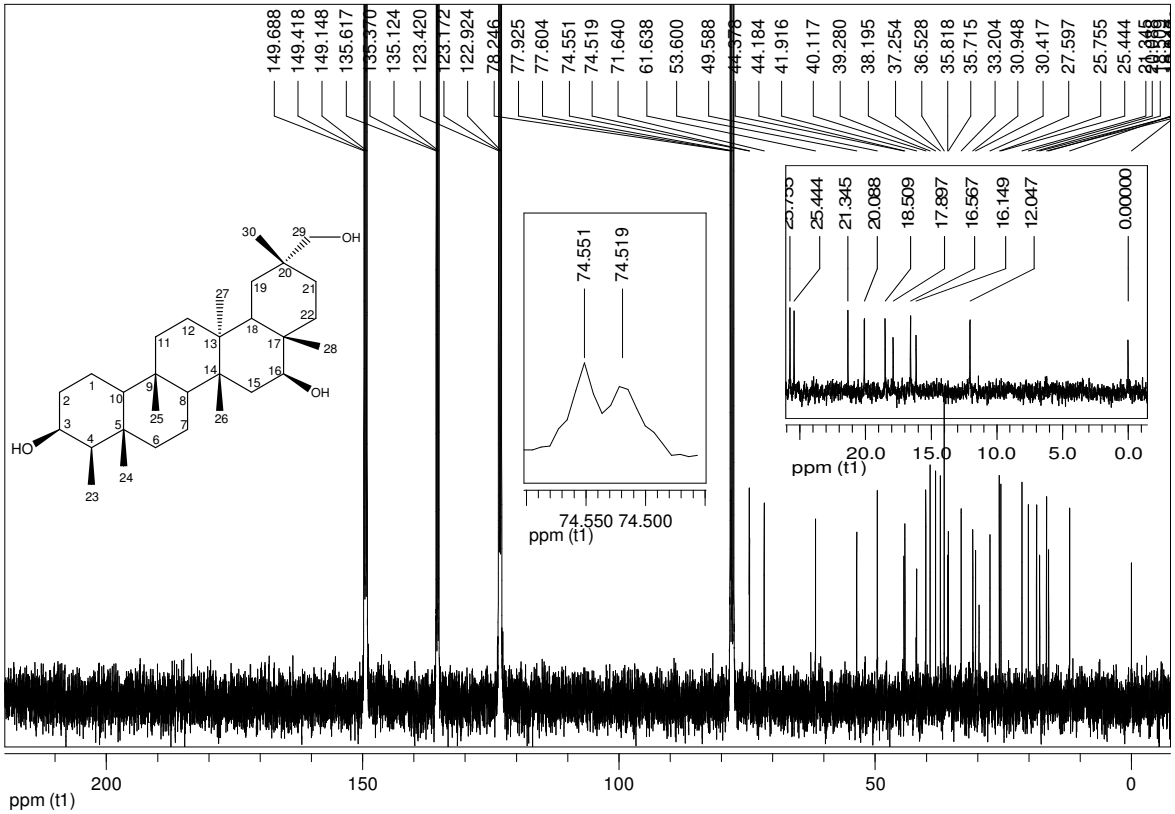


Figura B53: Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, $CDCl_3$ + piridina-d_5) de **P4a**.

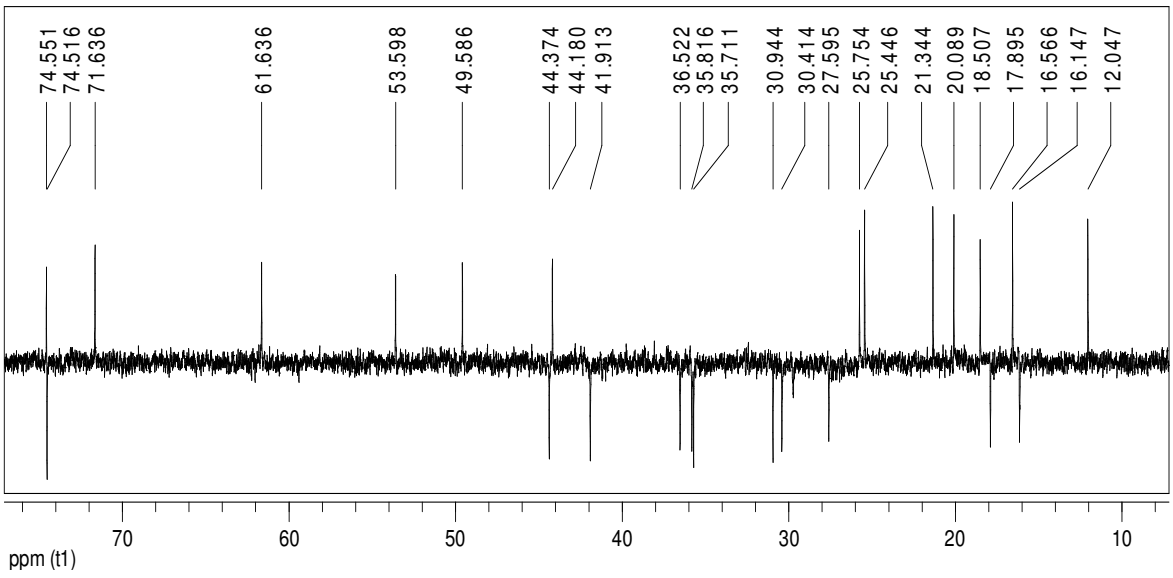


Figura B54: Expansão do subespectro DEPT135 (100 MHz, $CDCl_3$ + piridina-d_5) de **P4a**.

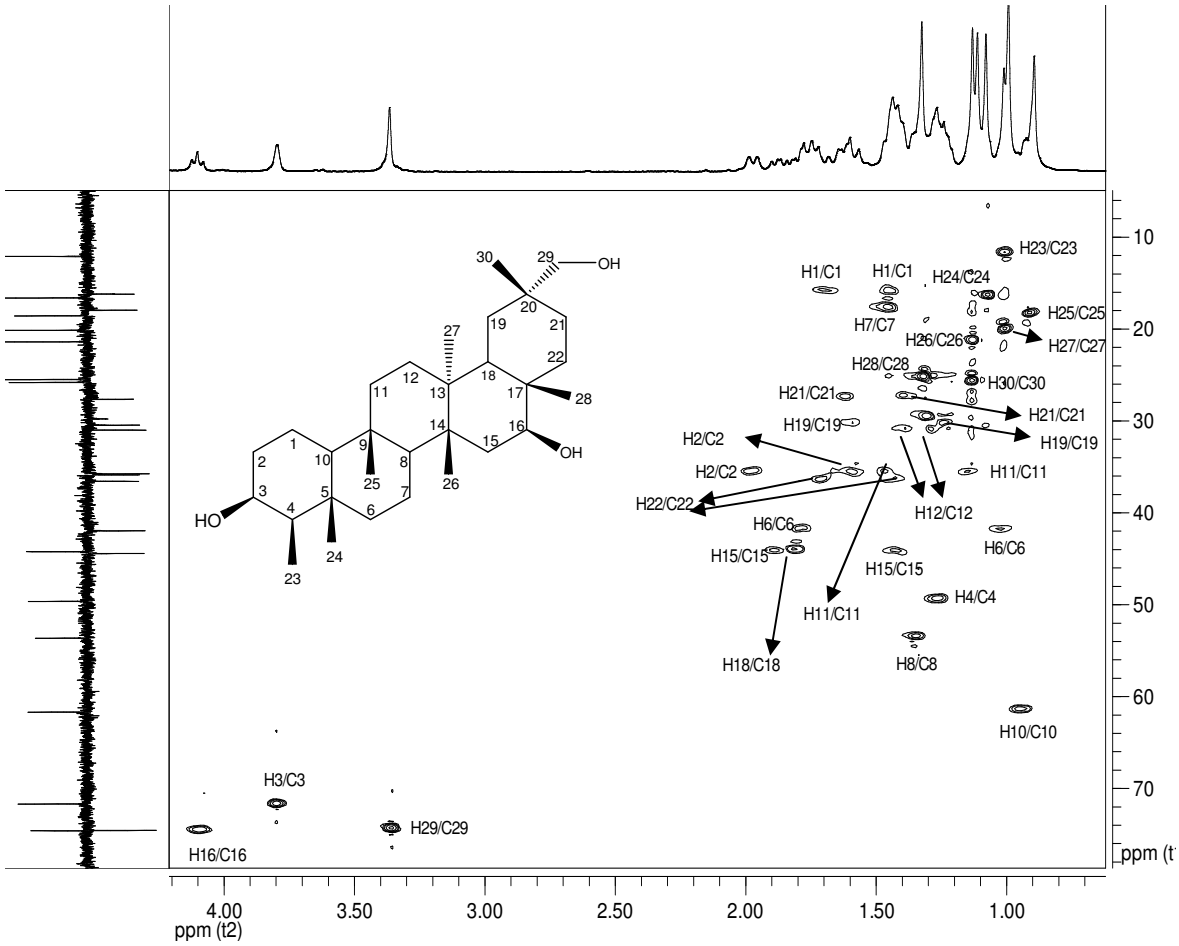


Figura B55: Expansão do mapa de contornos HSQC (400 MHz, $CDCl_3$ + piridina-d_5) de **P4a**.

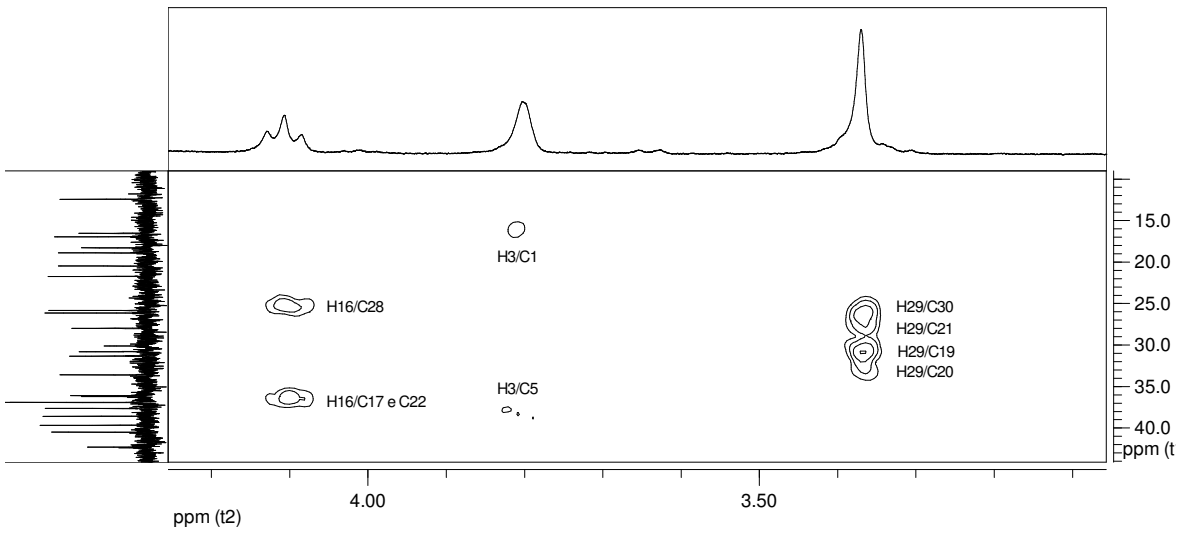


Figura B56: Expansão do mapa de contornos HMBC (400 MHz, $CDCl_3$ + piridina-d_5) de **P4a**.

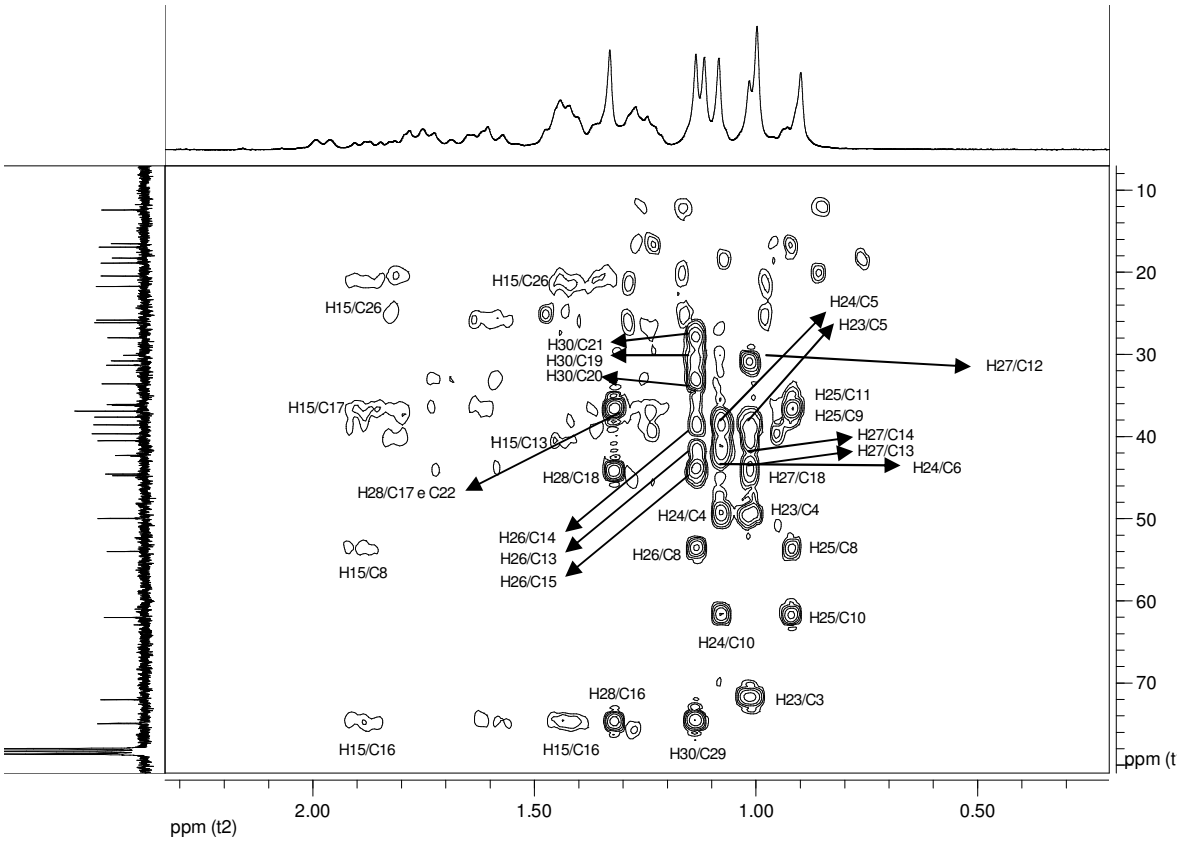


Figura B57: Expansão do mapa de contornos HMBC (400 MHz, $CDCl_3$ + piridina-d_5) de **P4a**.

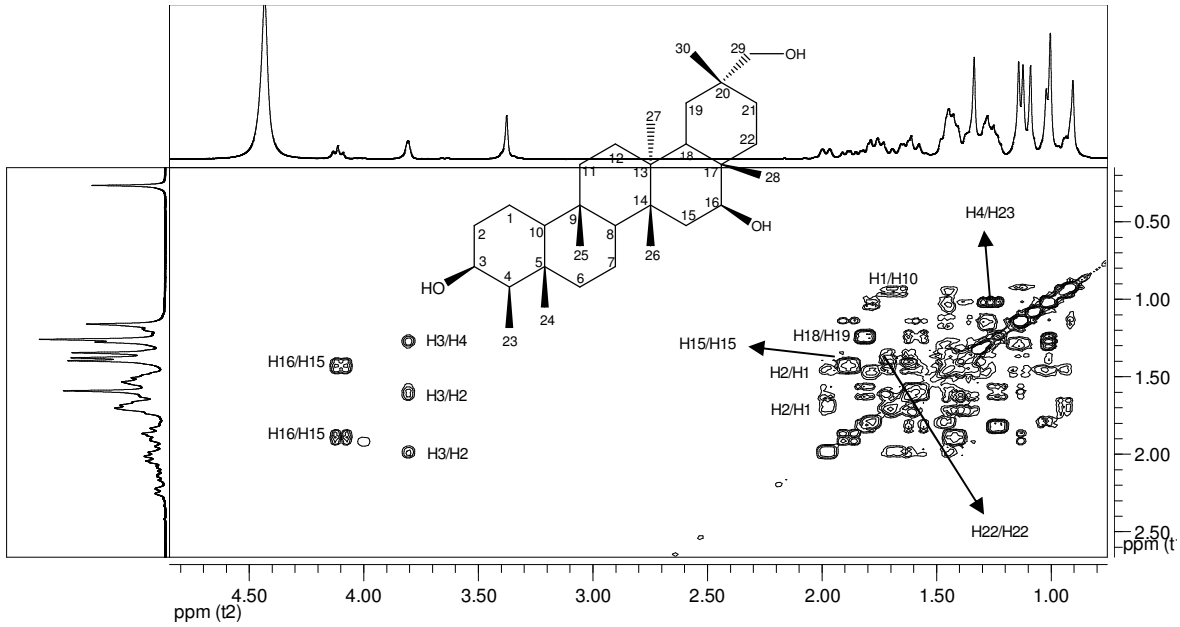


Figura B58: Expansão do mapa de contornos COSY (400 MHz, $CDCl_3$ + piridina-d_5) de **P4a**.

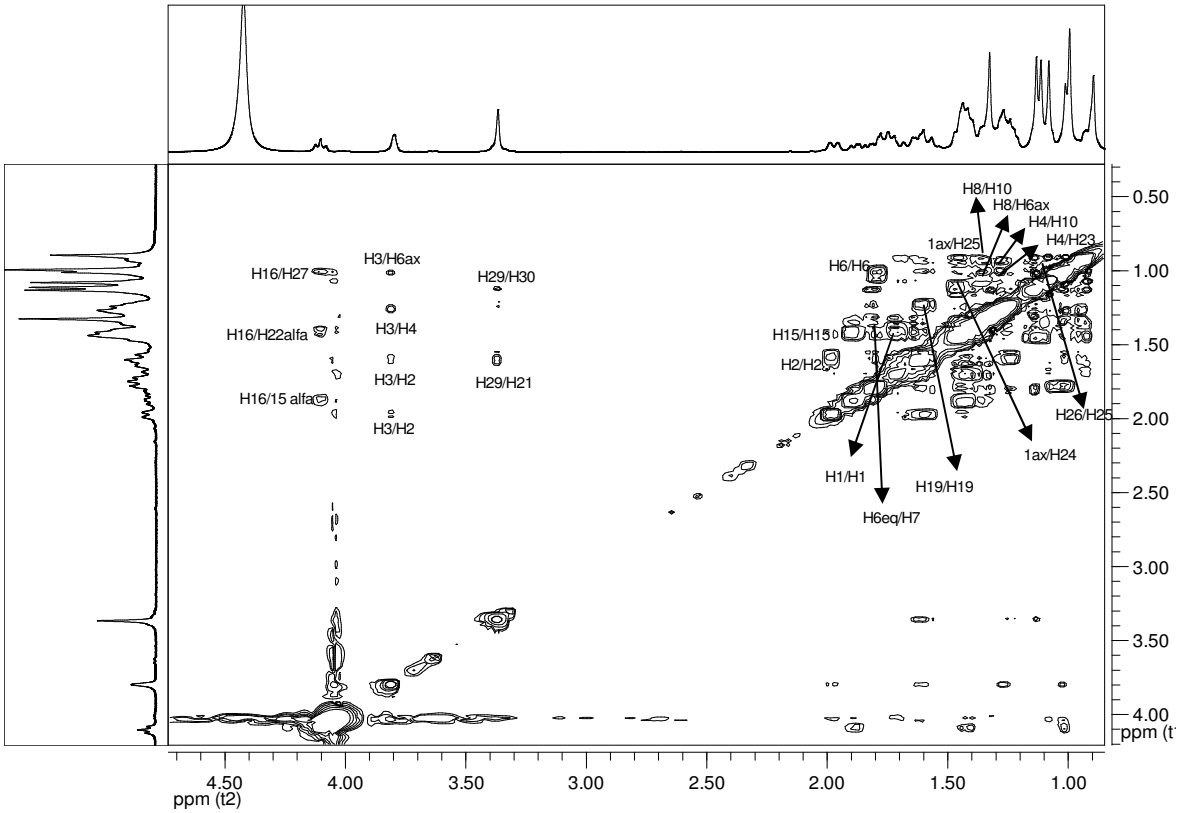


Figura B59: Expansão do mapa de contornos NOESY (400 MHz, $CDCl_3$ + piridina-d_5) de **P4a**.

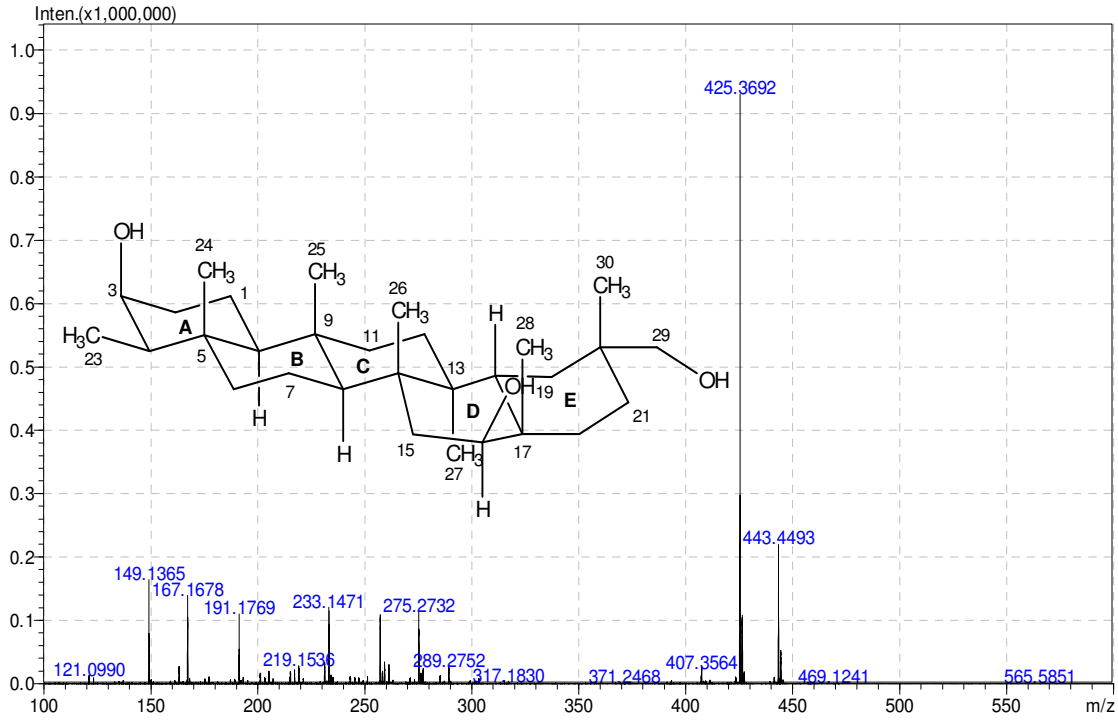


Figura B60: Espectro de massas (HR-APCI, modo positivo) de **P4a**.

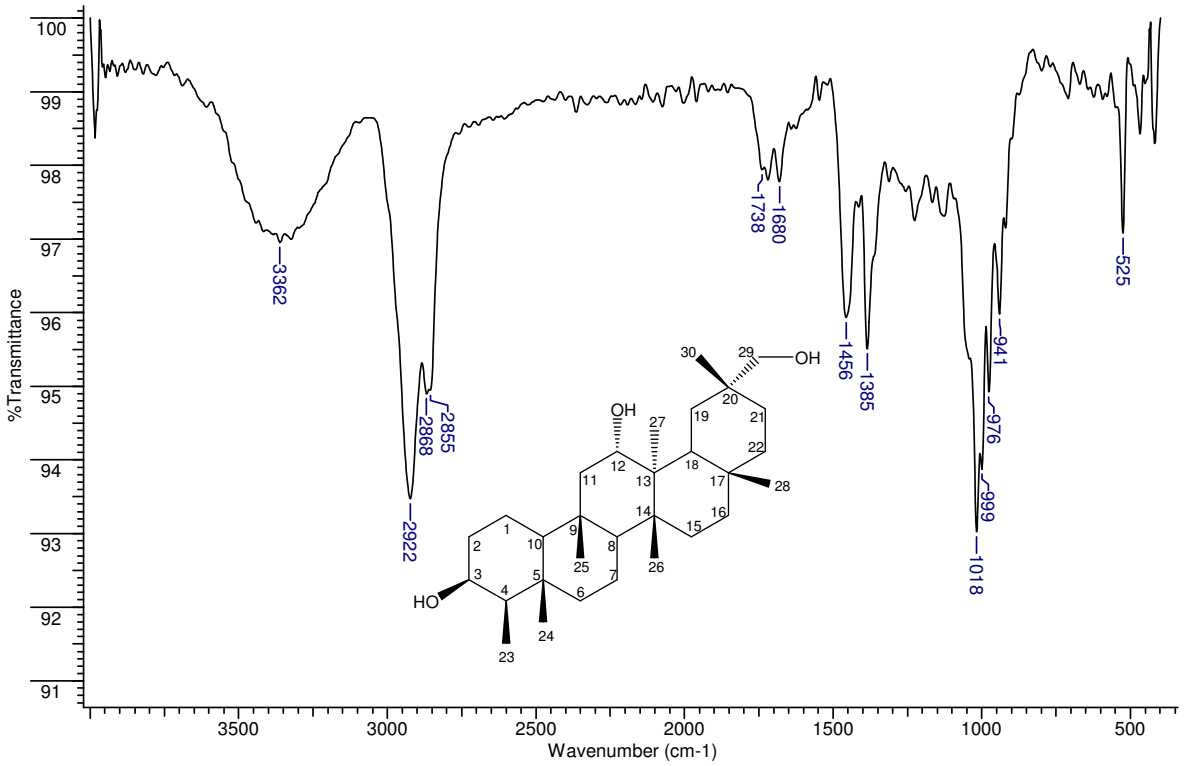


Figura B61: Espectro na região do IV de **P5a** (ATR).

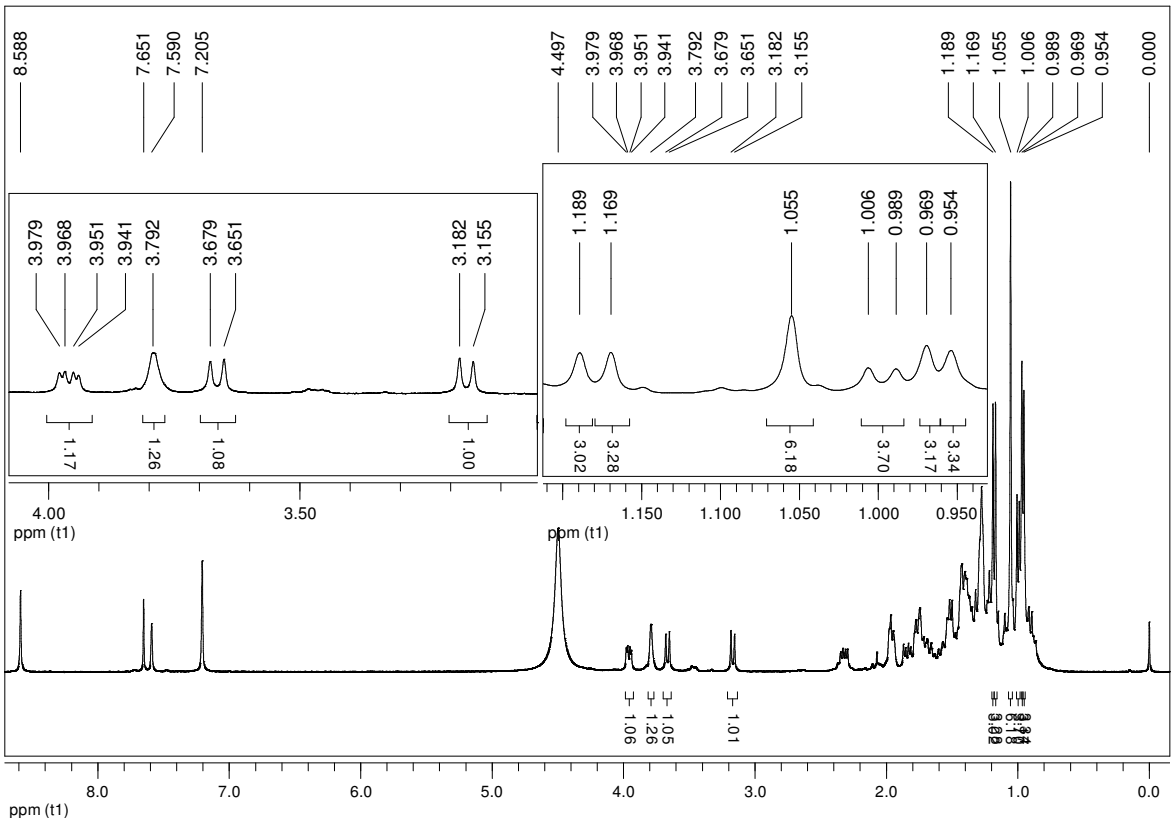


Figura B62: Espectro de RMN de ^{1}H (400 MHz, $CDCl_3$ + piridina-d_5) de **P5a**.

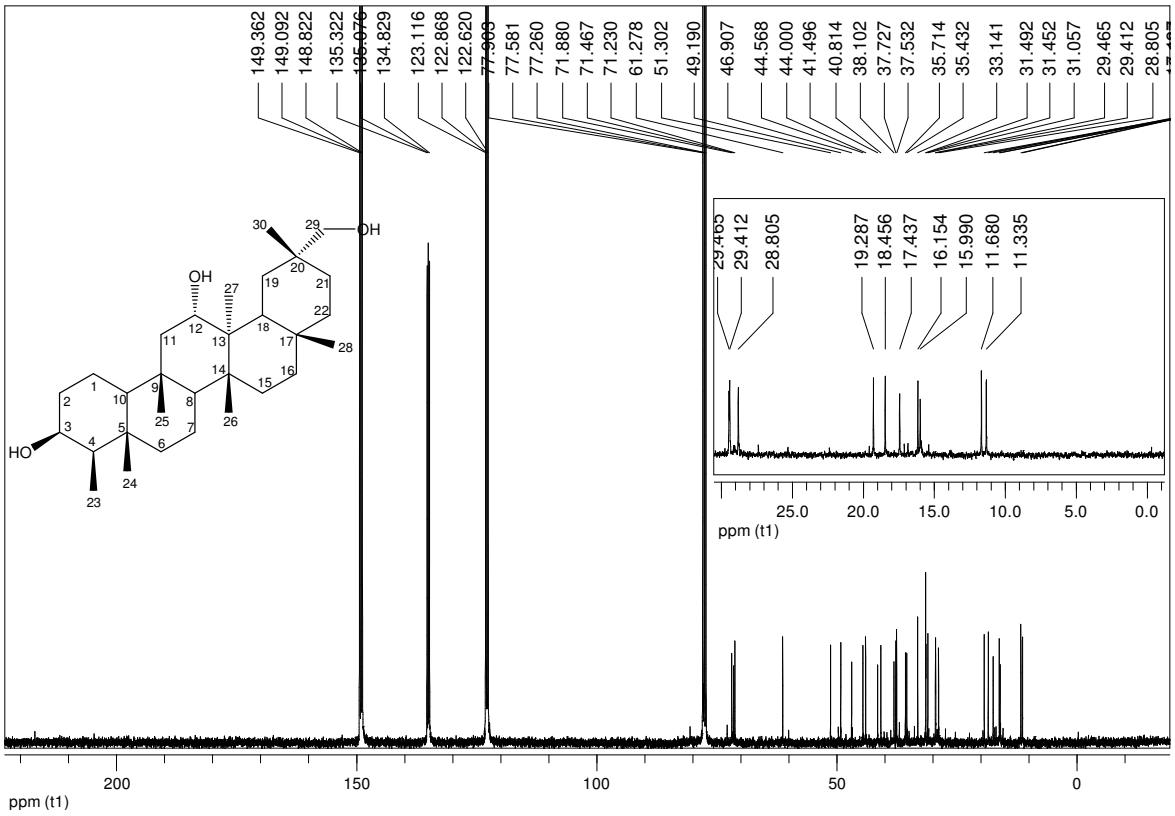


Figura B63: Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, $CDCl_3$ + piridina-d_5) de **P5a**.

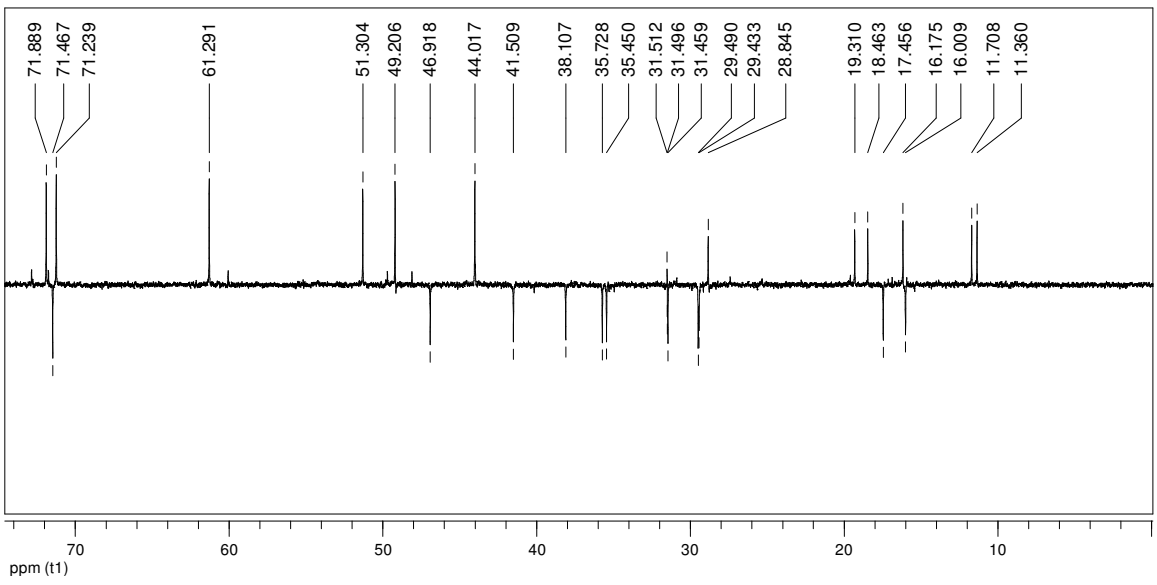


Figura B64: Expansão do subespectro DEPT135 (100 MHz, $CDCl_3$ + piridina-d_5) de **P5a**.

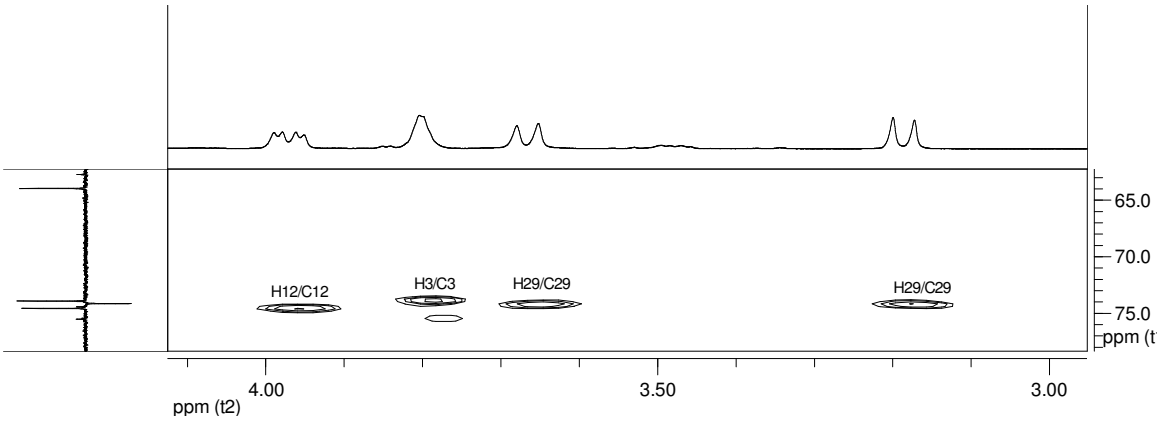


Figura B65: Expansão do mapa de contornos HSQC (400 MHz, $CDCl_3$ + piridina-d_5) de **P5a**.

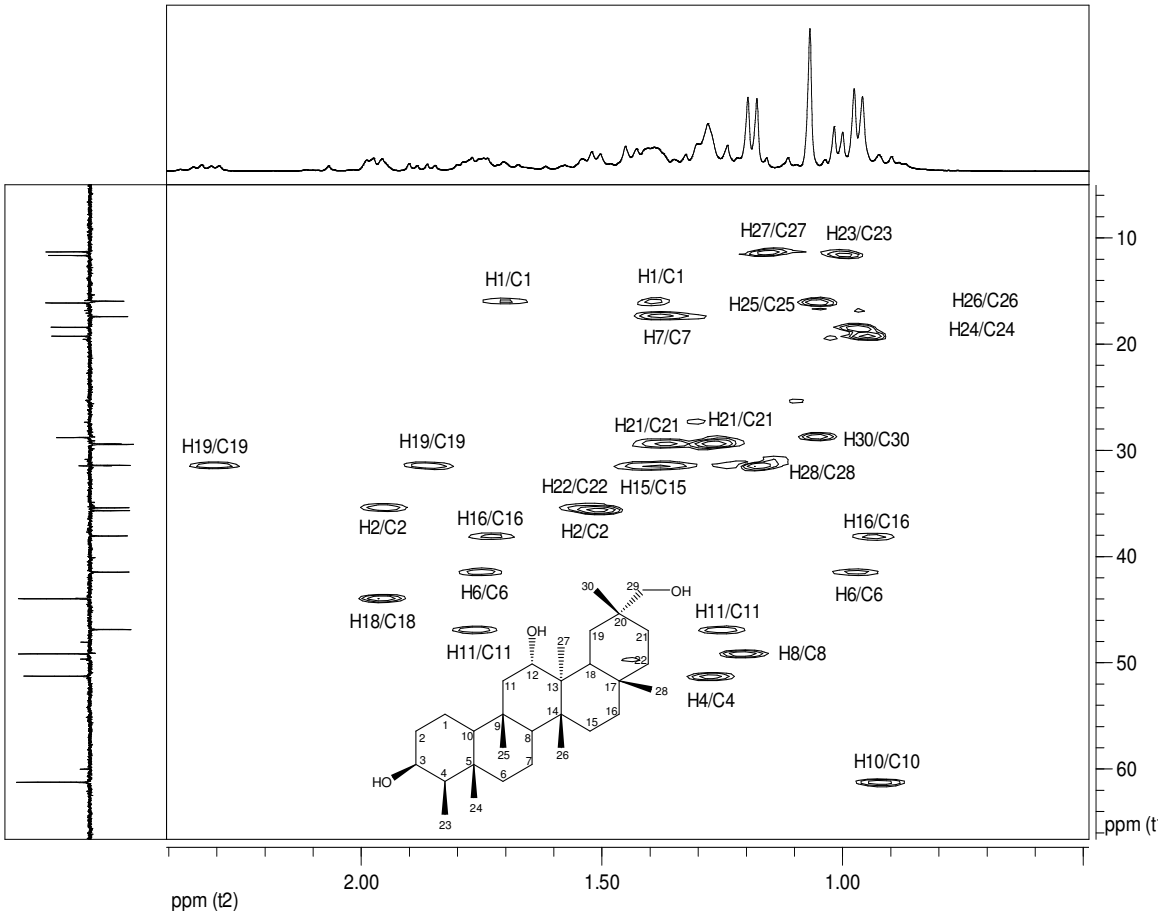


Figura B66: Expansão do mapa de contornos HSQC (400 MHz, $CDCl_3$ + piridina-d_5) de **P5a**.

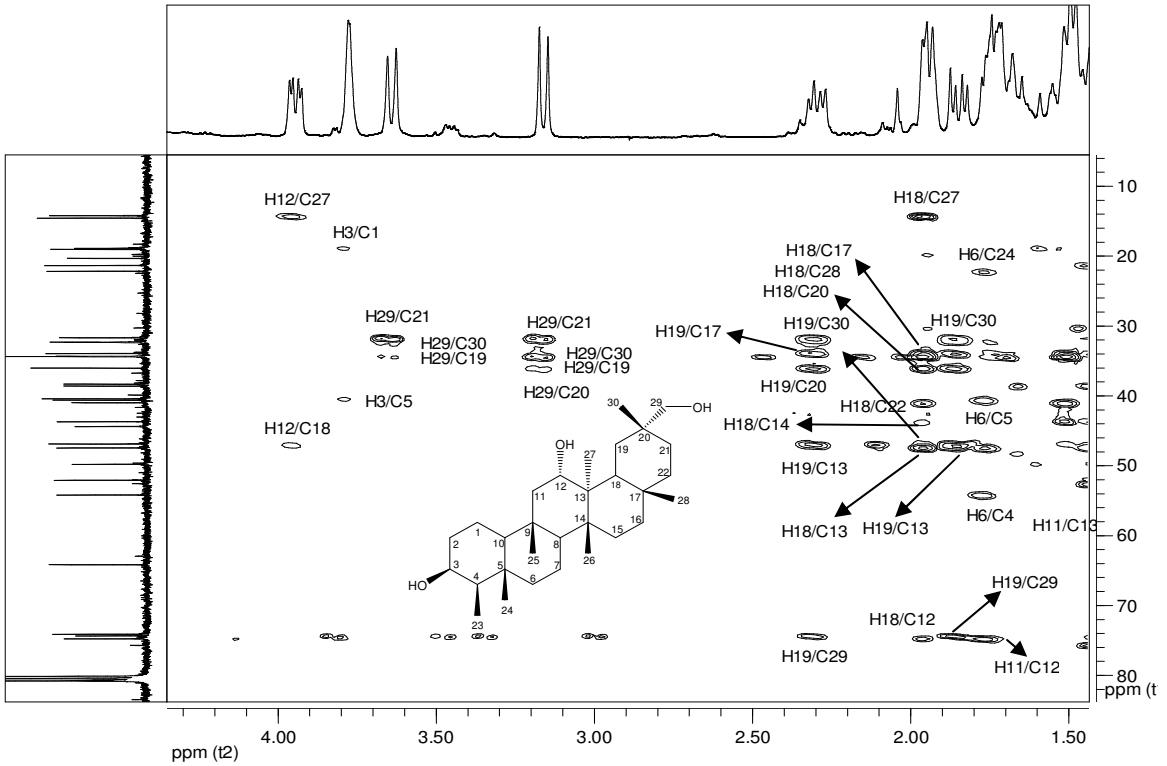


Figura B67: Expansão do mapa de contornos HMBC (400 MHz, $CDCl_3$ + piridina-d_5) de **P5a**.

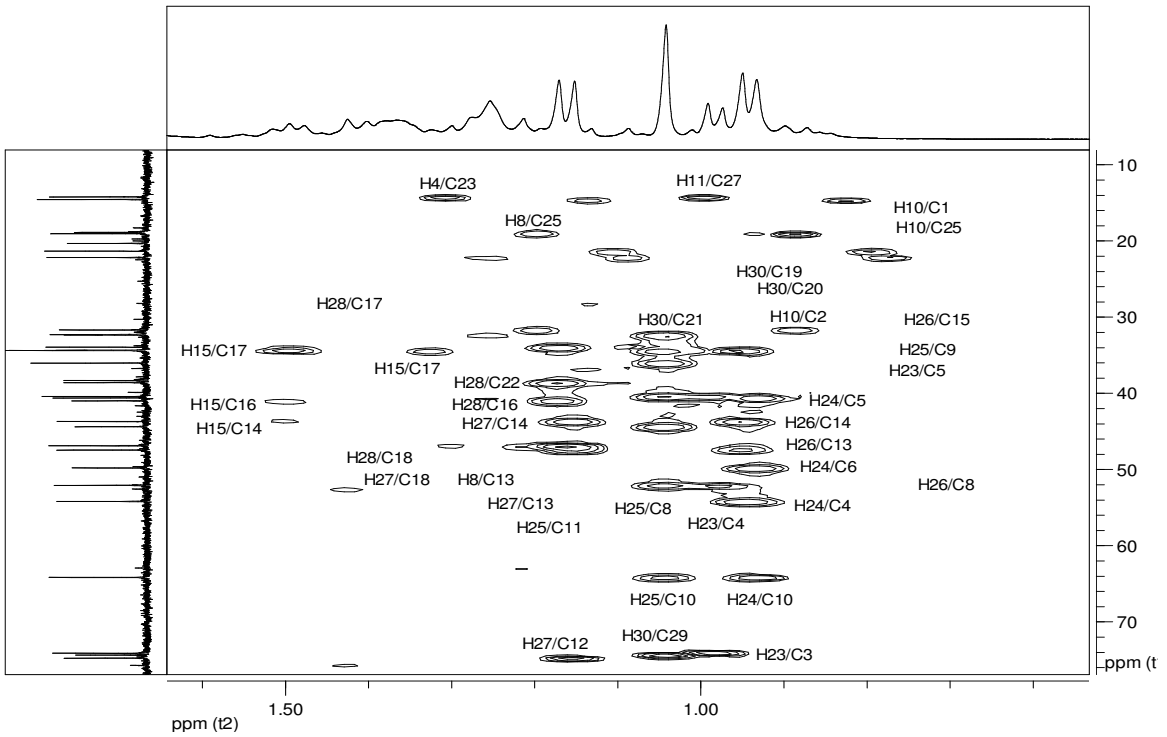


Figura B68: Expansão do mapa de contornos HMBC (400 MHz, $CDCl_3$ + piridina-d_5) de **P5a**.

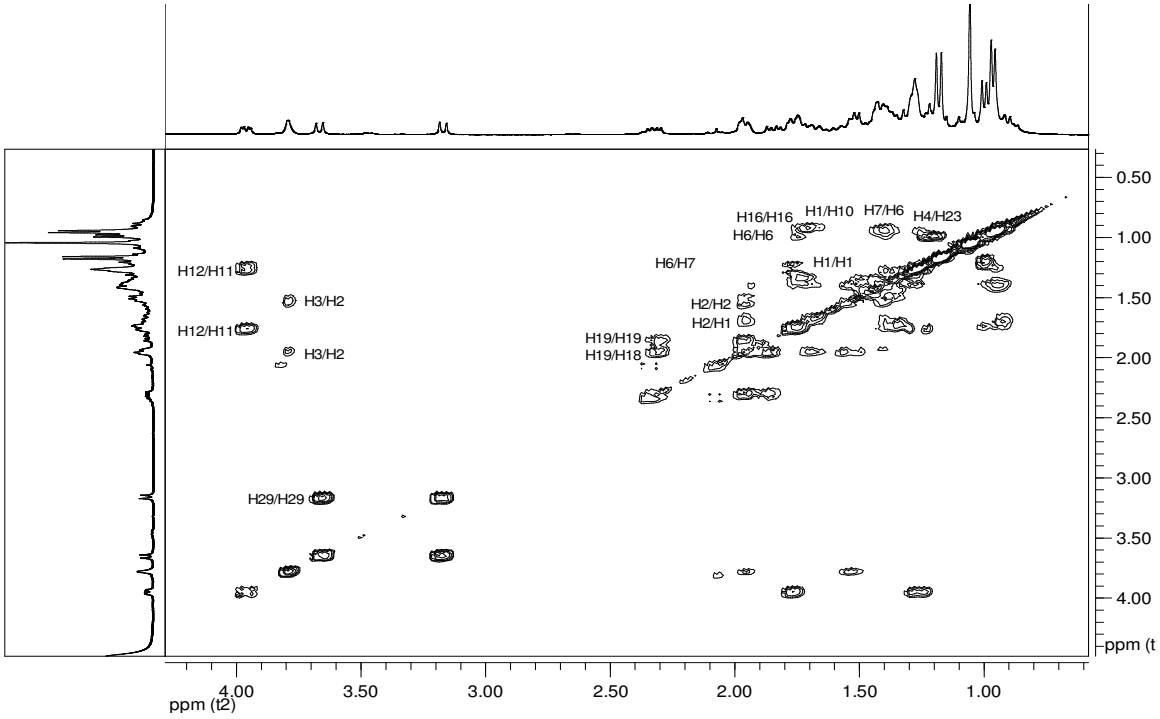


Figura B69: Expansão do mapa de contornos COSY (400 MHz, $CDCl_3$ + piridina-d_5) de **P5a**.

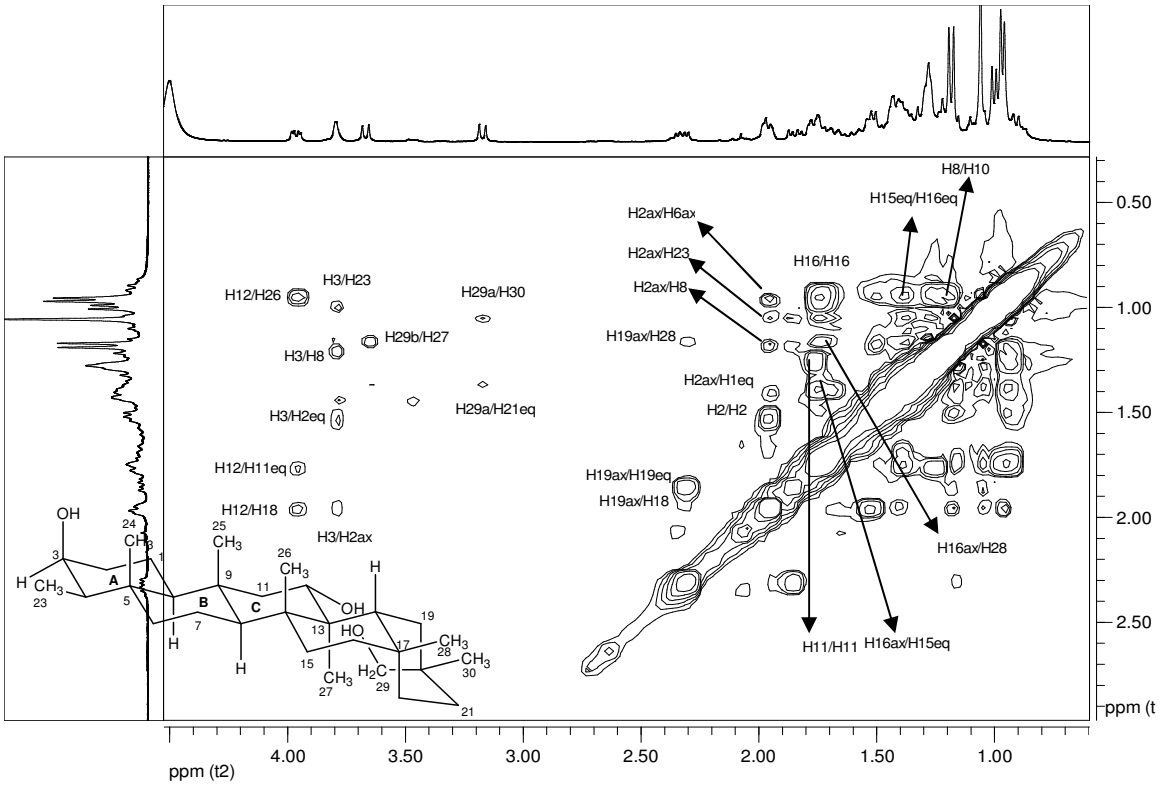


Figura B70: Expansão do mapa de contornos NOESY (400 MHz, $CDCl_3$ + piridina-d_5) de **P5a**.

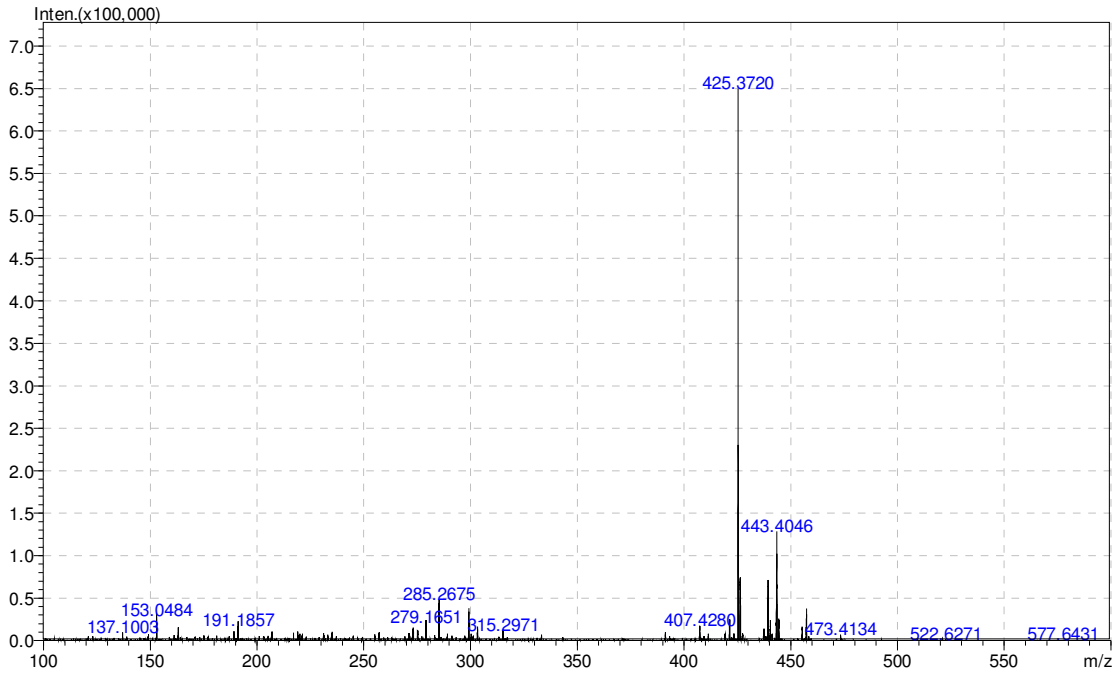


Figura B71: Espectro de massas (HR-APCI, modo positivo) de **P5a**.

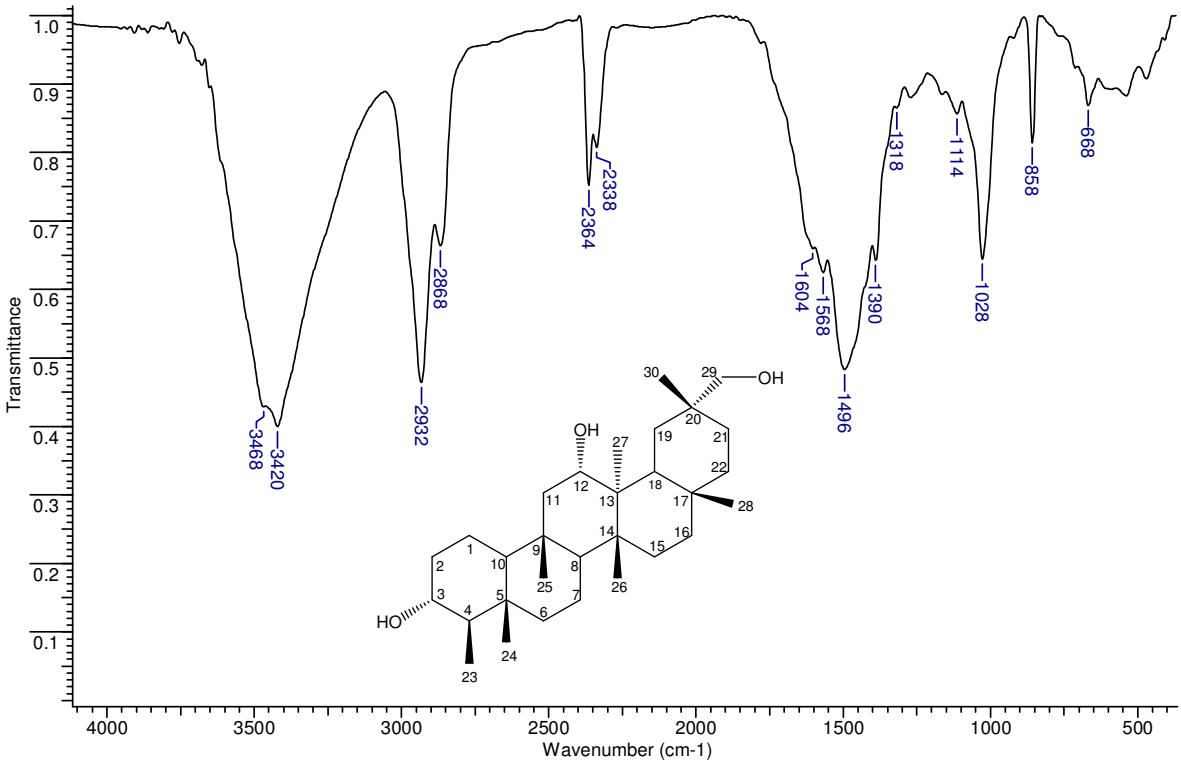


Figura B72: Espectro na região do IV de **P5b** (KBr).

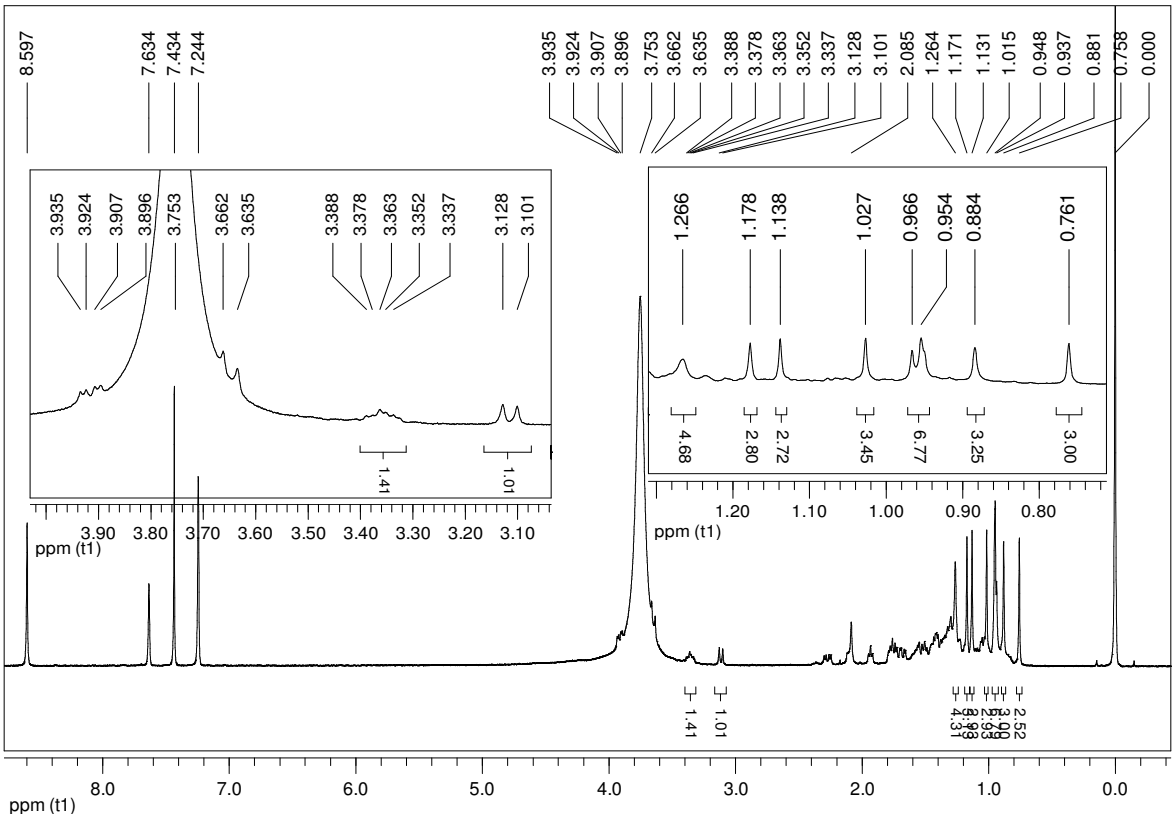


Figura B73: Espectro de RMN de ^{1}H (400 MHz, $CDCl_3$ + piridina-d_5) de **P5b**.

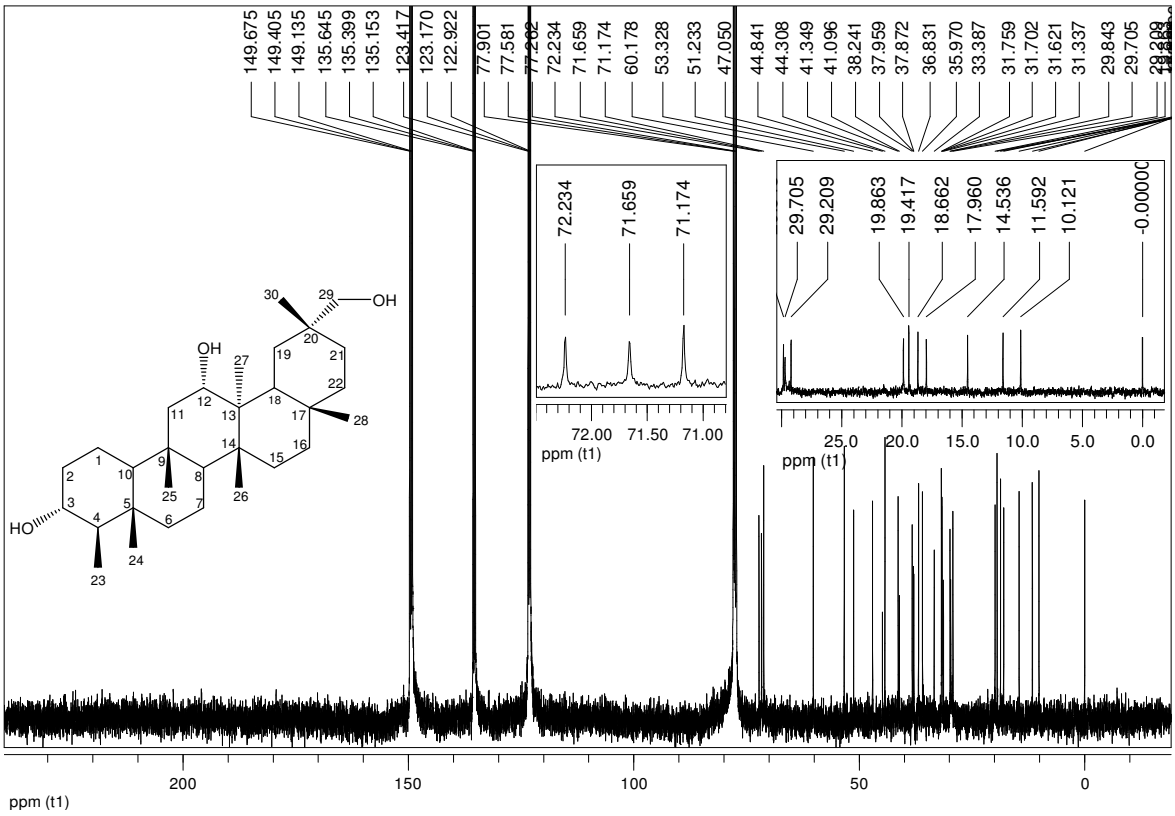


Figura B74: Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, $CDCl_3$ + piridina-d_5) de **P5b**.

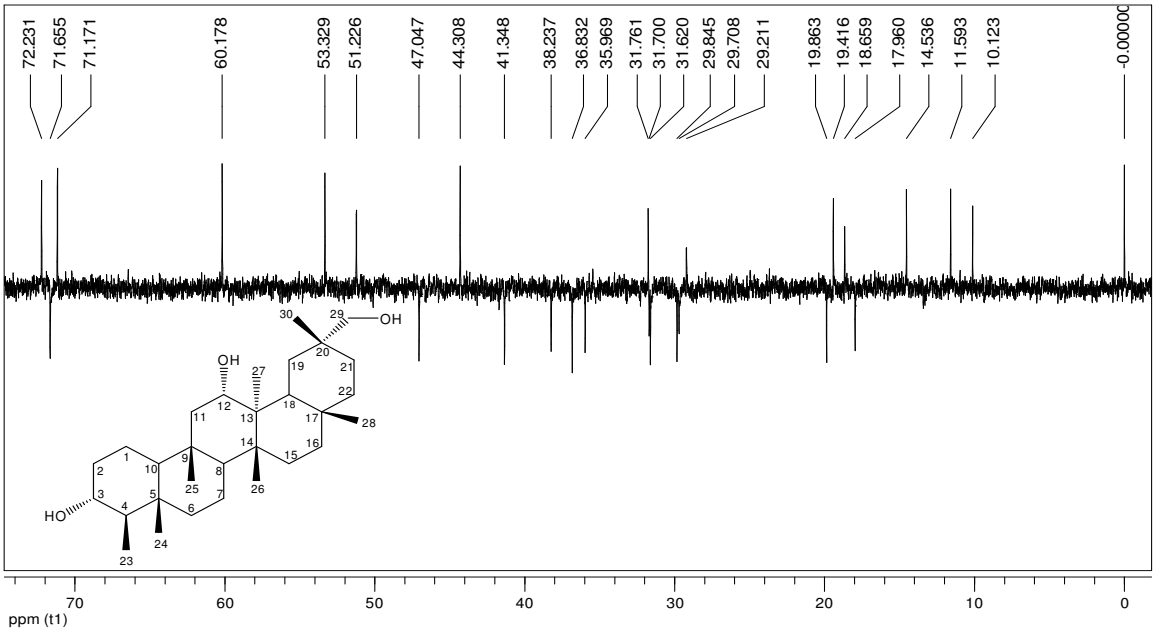


Figura B75: Expansão do subespectro DEPT135 (100 MHz, $CDCl_3$ + piridina-d_5) de **P5b**.

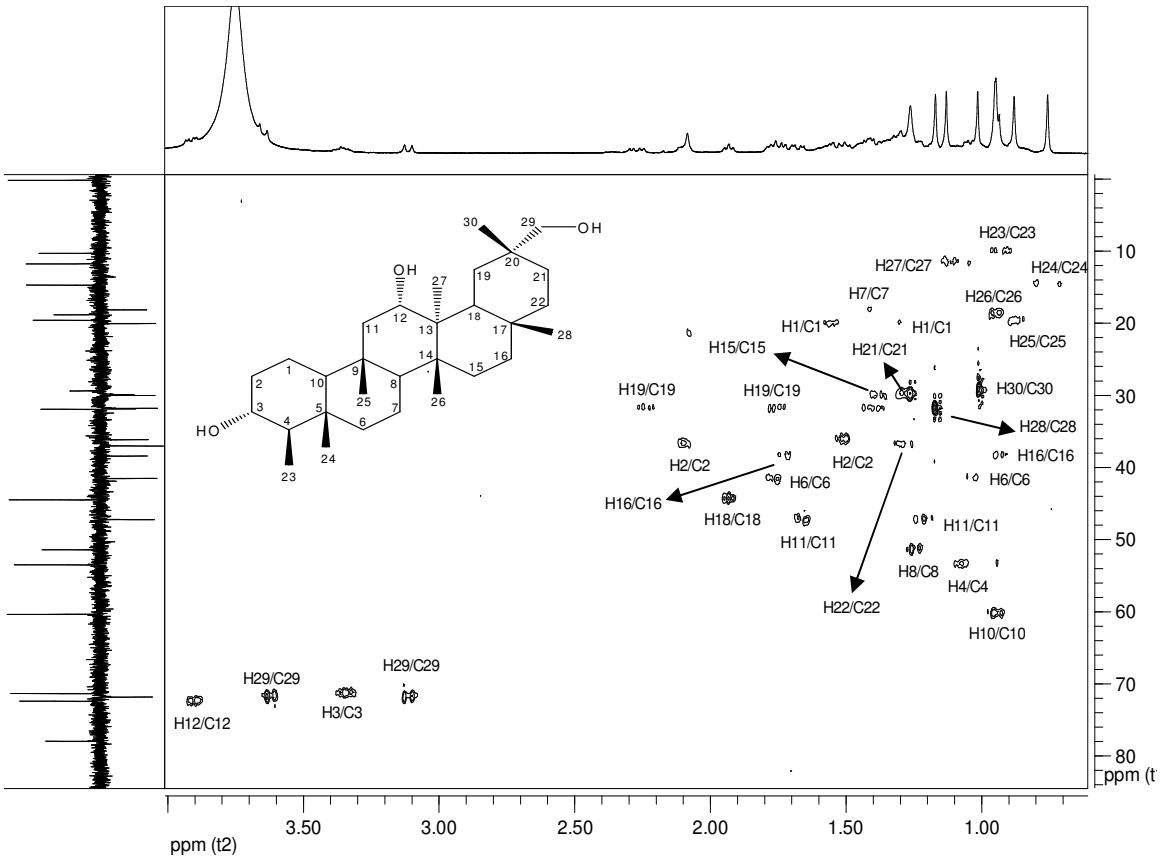


Figura B76: Expansão do mapa de contornos HSQC (400 MHz, $CDCl_3$ + piridina-d_5) de **P5b**.

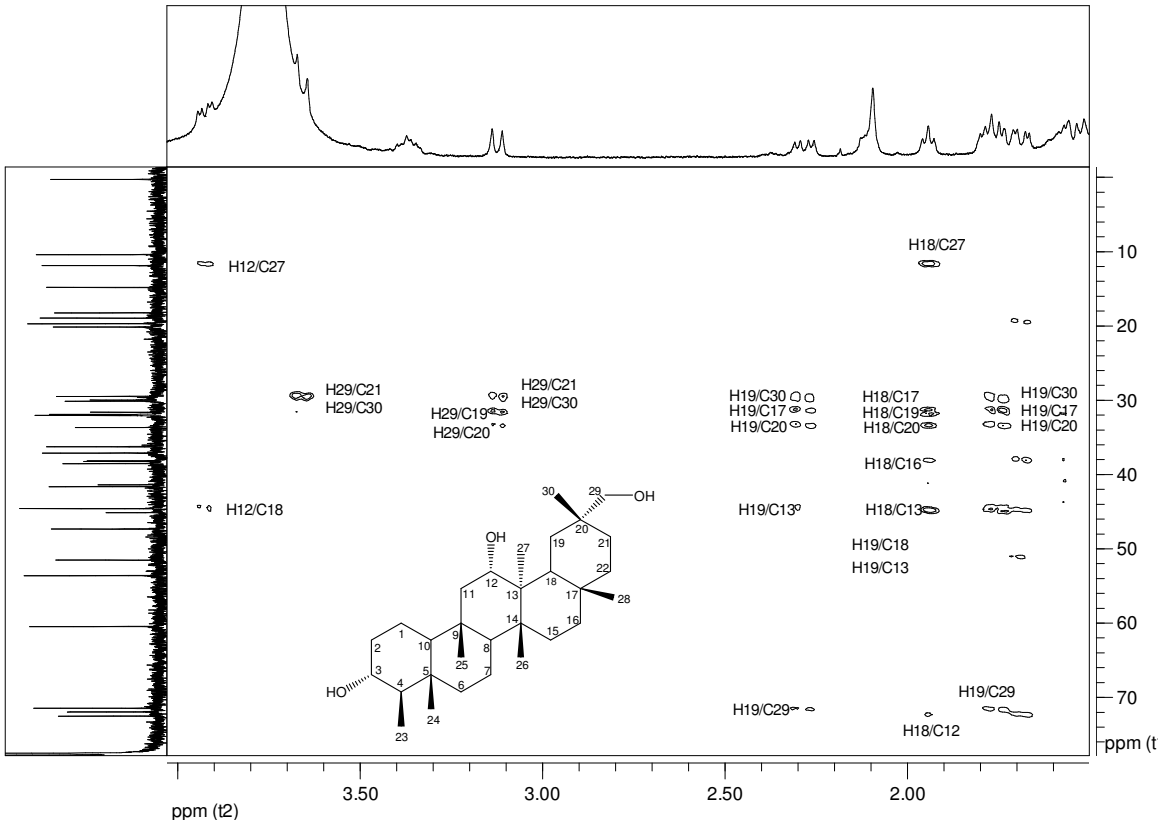


Figura B77: Expansão do mapa de contornos HMBC (400 MHz, $CDCl_3$ + piridina-d_5) de **P5b**.

.

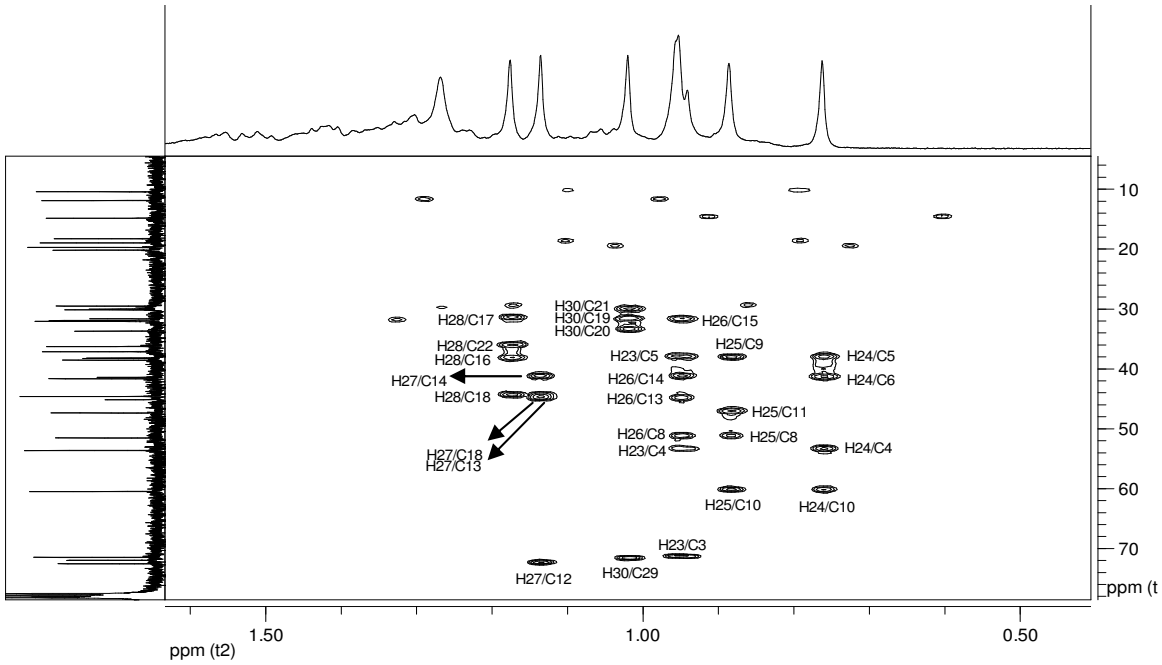


Figura B78: Expansão do mapa de contornos HMBC (400 MHz, $CDCl_3$ + piridina-d_5) de **P5b**.

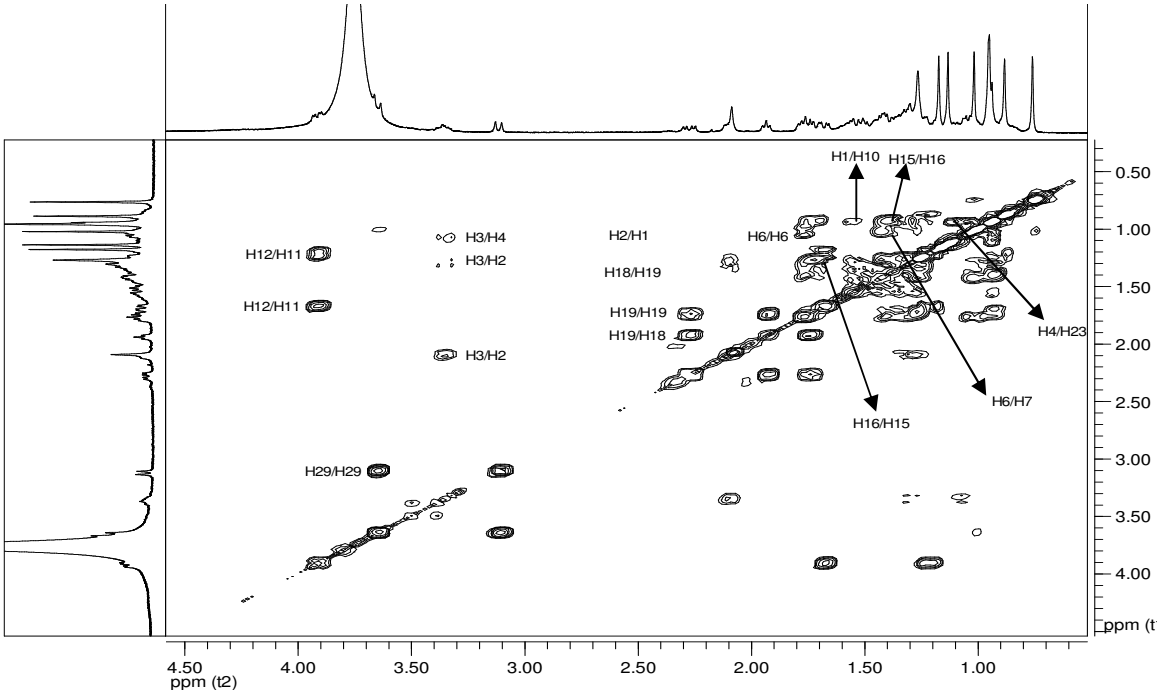


Figura B79: Expansão do mapa de contornos COSY (400 MHz, $CDCl_3$ + piridina-d_5) de **P5b**.

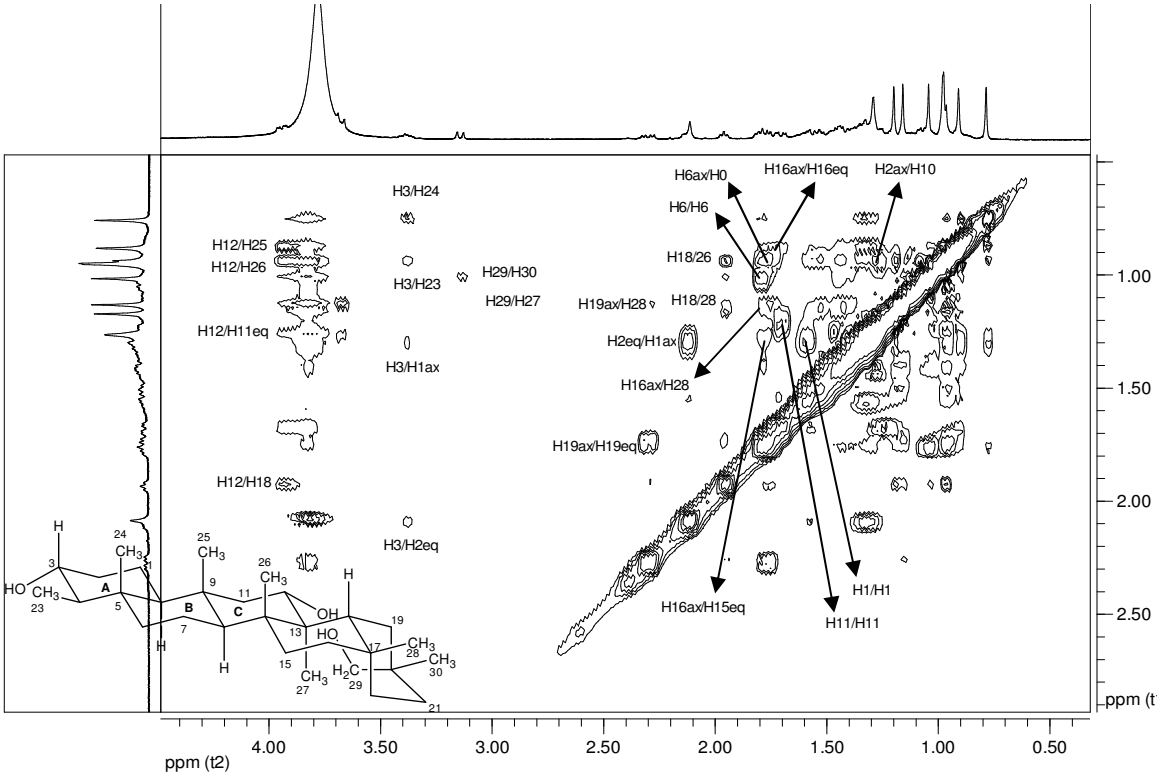


Figura B80: Expansão do mapa de contornos NOESY (400 MHz, $CDCl_3$ + piridina-d_5) de **P5b**.

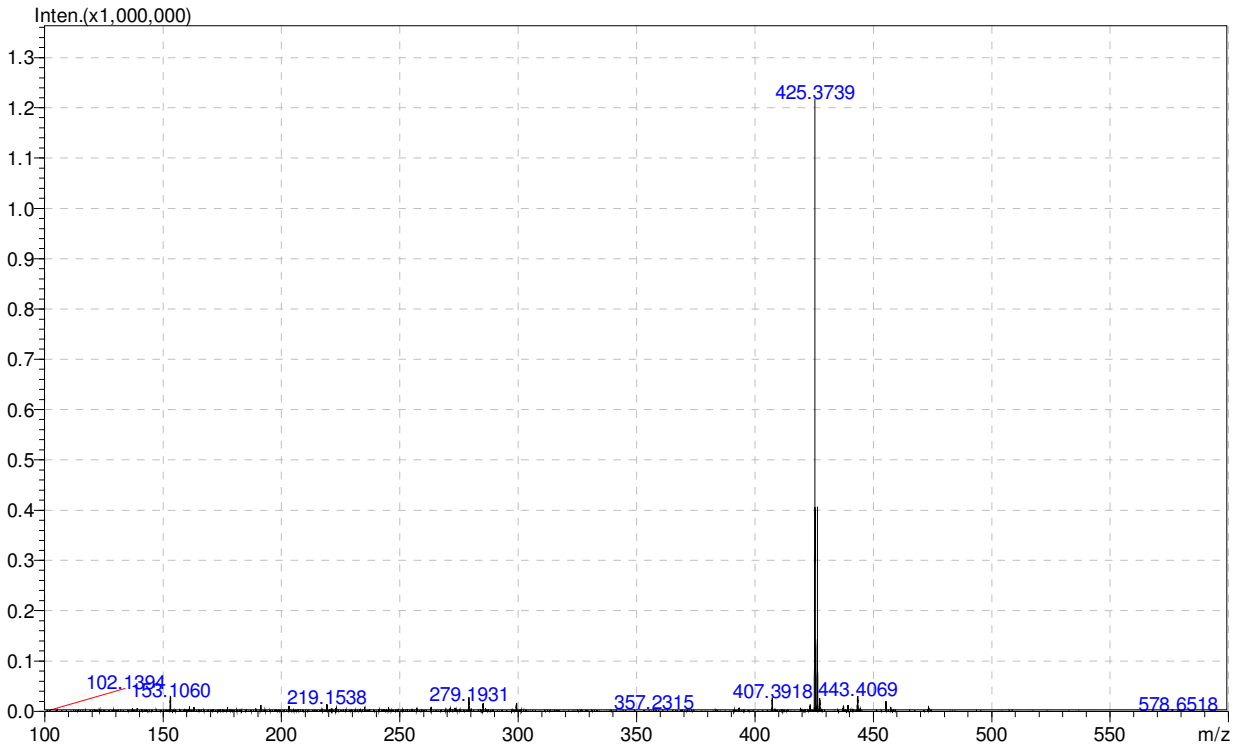


Figura B81: Espectro de massas (HR-APCI, modo positivo) de **P5a**.

Tabela B1: Dados de RMN de ^{13}C ($CDCl_3$ + piridina-d_5, 100 MHz) de **P1a** e **P1b** e comparação com dados da literatura (DUARTE, 2000) para 3β,29-di-hidroxifriedelano e 3α,29-di-hidroxifriedelano

Nº	Tipo de carbono	δ_C* de P1a	δ_C* de 3β,29-di-hidroxifriedelano	δ_C* de P1b	δ_C* de 3α,29-di-hidroxifriedelano
1	CH_2	16,3	16,1	37,2	37,2
2	CH_2	36,1	35,6	19,8	19,9
3	CH	71,4	71,8	71,0	71,0
4	CH	49,7	49,5	53,6	53,8
5	C	38,2	38,0	38,1	38,2
6	CH_2	42,0	41,9	41,6	41,7
7	CH_2	17,8	17,6	17,9	18,0
8	CH	53,6	53,6	53,3	53,4
9	C	37,2	37,1	37,0	37,4
10	CH	61,7	61,5	60,3	60,4
11	CH_2	36,2	35,7	35,6	35,7
12	CH_2	30,8	30,7	30,7	30,7
13	C	40,0	39,9	40,0	40,1
14	C	38,4	38,3	38,3	38,4
15	CH_2	32,8	32,7	32,8	32,9
16	CH_2	36,2	36,0	36,1	36,2
17	C	30,6	30,6	30,6	30,8
18	CH	42,1	42,0	42,1	42,2
19	CH_2	30,2	30,1	30,2	30,3
20	C	33,4	33,3	33,4	33,5
21	CH_2	28,2	28,0	28,1	28,3
22	CH_2	39,9	39,8	39,8	40,0
23	CH_3	12,2	12,0	10,3	10,4
24	CH_3	16,7	16,5	14,7	14,7
25	CH_3	18,3	18,2	18,1	18,2
26	CH_3	20,7	20,7	20,7	20,8
27	CH_3	18,5	18,4	18,4	18,5
28	CH_3	32,2	32,1	32,2	32,3
29	CH_2	74,2	74,2	74,1	74,2
30	CH_3	26,4	26,1	26,3	26,4

*$CDCl_3$ + piridina-d_5

APENDICE C: ESTRUTURA QUÍMICA DOS COMPOSTOS ISOLADOS

