UNIVERSIDADE ESTADUAL DO SUDOESTE DA BAHIA PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

ROSÂNGELA SANTOS PEREIRA

Avaliação do potencial químico e farmacológico de extratos de folhas de *Maytenus acanthophylla* (Celastraceae)

Jequié – Bahia MAIO – 2018

ROSÂNGELA SANTOS PEREIRA

Avaliação do potencial químico e farmacológico de extratos de folhas de *Maytenus acanthophylla* (Celastraceae)

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Química.

Área de concentração: Química Analítica.

Orientador: Prof. Dr. Djalma Menezes de Oliveira

JEQUIÉ – BA MAIO/2018 P436a Pereira, Rosângela Santos.

Avaliação do potencial químico e farmacológico de extratos de folhas de *Maytenus acanthophylla* (Celastraceae) / Rosângela Santos Pereira.- Jequié, 2018. 97f.

(Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia - UESB, sob orientação do Prof. Dr. Djalma Menezes de Oliveira)

1.Maytenus acanthophylla 2.Triterpernos pentaciclicos 3.Flavonoides 4.Atividade antimicrobiana 5.Atividade anticolinesterásica I. Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia II.Título

CDD - 547

Rafaella Câncio Portela de Sousa - CRB 5/1710. Bibliotecária – UESB - Jequié



UNIVERSIDADE ESTADUAL DO SUDOESTE DA BAHIA – UESB Recredenciada pelo Decreto Estadual Nº 9.996, de 02.05.2006 Programa de Pós-Graduação em Química



Rosângela Santos Pereira

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Química.

DISSERTAÇÃO APROVADA EM 03/05/2018.

Comissão Examinadora:

Prof. Dr. Djalma Menezes de Oliveira (UFMG, Belo Horizonte-MG, 2012) (Orientador)

Robane Moura Anuar Profa. Dra. Rosane Moura Aguiar

(UFBA, Salvador-BA, 2008)

Profa. Dra. Betania Barros Cota

(FIOCRUZ, Belo Horizonte-MG, 2007)

Rua José Moreira Sobrinho, s/n – Jequiezinho CEP: 45.208-091 - Jequié - Bahia Telefone: (73) 3528-9630 Email: ppgquimica@uesb.edu.br



Dedico este trabalho:

À Deus todo poderoso pela fé e força. À meu orientador pela amizade, incentivo e por sempre acreditar no meu potencial. Àminha família pelo amor. Aos amigos pelo apoio e compreensão. E a todos que contribuíram de alguma forma nesta trajetória tão importante da minha vida.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

Primeiramente a Deus pela fé, força, companhia, esperança, equilíbrio e por sempre caminhar comigo nos dias de alegria, tristeza, dificuldades, enfim por todos os dias. Gratidão imensa a Deus em ter me ajudado a chegar até aqui e que de agora em diante seja simplesmente assim, como disse o Senhor Jesus: "Que seja feita a tua vontade".

A minha família, especialmente minha mãe e meus irmãos pelo amor, cuidado, apoio e por também acreditar junto comigo em meus sonhos e conquistas.

Aos meus amigos de coração, cada um sabe da sua importância para mim "sem citar nomes", por estarem comigo mesmo em meio à distância "alguns" ouviram meus choros nos momentos de tristezas e sorrisos nos momentos de alegrias, e ainda nos momentos de aborrecimentos, estresse (que não foram poucos rsrs). Onde em cada um desses momentos sempre ouvia uma dessas frases: - "Vai dar tudo certo"; -"Você consegue"; "- Deus está no controle"; "- Fica calma"; "- Tudo tem seu tempo, não é a hora de acontecer"; "- Relaxa, você precisa descansar"; "- Deixa as coisas acontecerem"; "-Se quiser conversar estou aqui"; "- Estou muito feliz por você; -"Eu já sabia". Foram estas e muitas outras palavras que me incentivaram a caminhar sempre com mais força.

A todas as pessoas que compartilharam comigo esta trajetória, me ajudando com uma palavra, gesto ou atitude de carinho. E, as pessoas que quiseram me atrapalhar, pois a sua maldade, falta de consideração ou má vontade me trouxe mais força de vontade para continuar a buscar minhas metas e sempre a fazer o meu melhor no âmbito profissional e pessoal.

Ao meu orientador Professor Dr. Djalma Menezes de Oliveira, meu sincero agradecimento pela paciência, amizade, incentivo, apoio, confiança, cobranças e por me estimular a desenvolver a minha capacidade e habilidade de ser um bom profissional. Ainda sou grata por sempre me ouvir nos momentos de angústias (Como eu faço isso?; Não está dando certo!; Qual sua opinião?) durante todo o desenvolvimento da pesquisa. Além disso, muito obrigada por todo o aprendizado e quero que saiba o quanto te admiro como profissional e pessoa, pois você faz realmente o papel de um verdadeiro ORIENTADOR.

À todos os companheiros e colegas do Laboratório de Óleos Essenciais que contribuíram de alguma forma com minha pesquisa, especialmente a Luan

(eletrotécnico Djatech do rota evaporador) que sempre estava disposto a dar uma mãozona quando eu precisava.

À meu irmão Rafael por sofrer junto comigo as dores de realizar uma coluna cromatográfica.

Á colega Maria da Luz por participar das dores de colunas compartilhadas.

À minha turma de mestrado pelo companheirismo, resenhas e muitas horas compartilhadas de estudos acompanhadas de farofa de josefina e cuscuz salgado kkk...

Ao LQPN pelas vezes em que precisei, sempre esteve ali para dar um suporte.

Ao professor Dr. Marcos Bezerra por ceder seu laboratório para análises de ultravioleta.

Ao Professor Dr. Paulo Afonso por ceder o *freezer* – 80°C para o congelamento do extrato aquoso.

Aos professores do Programa de Pós-graduação em Química da UESB pelo conhecimento transmitido e pelo comprometimento com o ensino.

Ao Programa de Pós-graduação em Química da UFMG pelo financiamento da moradia universitária e suporte de laboratórios do programa de mobilidade da CAPES em que participei.

Agradeço especialmente a professora Dr^a. Lucienir Duarte Pains e a Dr^a. Grasiely F. de Sousa por ter aceitado realizar essa orientação de um mês e meio em seu laboratório, obrigada pela parceria estabelecida com a UESB, pela recepção, aprendizado, confiança, amizade e apoio durante este período. Também agradeço a todos que fazem parte do NEPLAM por todo carinho e ajuda, especialmente a Josana, Mariana e Rafael.

Ao anjo Bibo agradeço por toda contribuição e todos os ensinamentos, pois vou levar sempre comigo.

À Ivana agradeço pela disposição, atenção e colaboração nas análises das amostras no aparelho de RMN.

À Dr^a. Betânia Barros Cota pelas análises no espectrômetro de massas de alta resolução.

À Dr^a. Jaqueline Aparecida Takahashi pela realização dos testes biológicos.

À UESB pela estrutura fornecida durante todo esse período de mestrado.

À CAPES pelo apoio financeiro.

A vida é uma verdadeira entropia então busque o equilíbrio do corpo, da mente e da alma para viver. Com isso, você será fonte de luz e conhecimento na vida daqueles que estão ao seu redor.

Rosângela Pereira

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Maytenus acanthophylla. A) Ilustração de um ramo de folhas, destacando
um conjunto de flores, cedida por Carvalho-Okano e B) foto de um espécime (Fonte:
própria)25
Figura 2. Esquema do processo de obtenção dos extratos de folhas de Maytenus
acanthophylla32
Figura 3. Sistema utilizado para preparação do extrato aquoso por decocção sob
refluxo (folhas de <i>Maytenus acanthophylla</i>) (Fonte: própria)
Figura 4. Extração do polímero do extrato ECMA
Figura 5. Comparação dos cromatogramas de íons totais (TIC) do padrão de
hidrocarbonetos com a amostra G1-C1. Condições: Coluna SPBtm5, capilar, 30 m x
0,25 mm de diâmetro interno ()48
Figura 6. Espectro de RMN 1H e expansão da região de hidrogênios de ligações
duplas (CDCl ₃ , 400 MHZ)49
Figura 7. Cromatograma de íons totais (TIC) obtido por CG-EM do esqualeno isolado.
Condições: Condições: Coluna SPBtm5, capilar, 30 m x 0,25 mm de diâmetro interno,
filme de 0,25 μm ()
Figura 8. Espectro de RMN ¹³ C (CDCl ₃ , 400 MHz) da amostra G3-C151
Figura 9 Cromatograma de íons totais (TIC) obtido por CG-EM de G10-C1.
Condições: Coluna SPBtm5, capilar, 30 m x 0,25 mm de diâmetro interno, filme de
0,25 μm ()
Figura 10. Cromatograma de íons totais (TIC) obtido por CG-EM de G61-C1,
mostrando a eluição do α -tocoferol em T _R =43,43 min. Condições: Coluna SPBtm5,
capilar, 30 m x 0,25 mm de diâmetro interno()53
Figura 11 . EM referente ao pico em T_R : 43,43 min do TIC de G61-C153
Figura 12. Proposta de fragmentação do α-tocoferol por espectrometria de massas
utilizando ionização por impacto eletrônico (EM-IE). Legenda: (I) setas com linhas
cheias; (II) setas com linhas tracejadas54
Figura 13. Cromatograma de íons totais (TIC) obtido por CG-EM de G4-C1.
Condições: Condições: Coluna SPBtm5, capilar, 30 m x 0,25 mm de diâmetro interno,
filme de 0,25 µm dimetilpolisiloxano (95%), ()

Figura 14. Cromatograma de íons totais (TIC) obtido por CG-EM de G5-C1. Condições: Condições: Coluna SPBtm5, capilar, 30 m x 0,25 mm de diâmetro interno, Figura 15. Ampliação do espectro de RMN 13C de G5-C1 (CDCI3, 400 MHz)......58 Figura 16. Espectro de Infravermelho do polímero gutta-percha isolado do ECMA. 60 Figura 17. Comparação dos cromatogramas de íons totais (TIC) do padrão de hidrocarbonetos com a amostra G1-C3. Condições: Coluna SPBtm5, capilar, 30 m x 0,25 mm de diâmetro interno (...).61 Figura 18. 1A: Cromatograma de íons totais (TIC) obtido por CG-EM (coluna capilar OV-5) da G5-C3 do extrato ECMA. 1B: Espectro de massas referente ao pico em TR: Figura 19. Cromatograma de íons totais (TIC) obtido por CG-EM de G11-C3. Condições: Coluna SPB-tm5, capilar, 30 m x 0,25 mm de diâmetro interno, filme de 0,25 µm dimetilpolisiloxano (95%),(...).64 Figura 20. Cromatograma de íons totais (TIC) obtido por CG-EM de G9-C3. Condições: Coluna SPB-tm5, capilar, 30 m x 0,25 mm de diâmetro interno, filme de Figura 21. Cromatograma de íons totais (TIC) obtido por CG-EM de G11-C4. Condições: Coluna SPB-tm5, capilar, 30 m x 0,25 mm de diâmetro interno, filme de Figura 22. Cromatograma de íons totais (TIC) obtido por CG-EM de G22-C4. Condições: Condições: Coluna SPBtm5, capilar, 30 m x 0,25 mm de diâmetro interno, Figura 23. Fotografia da cromatoplaca CCD em sílicagel 60G, eluente: acetato de etila : metanol : agua acidulada (8:8:1), revelador: NP-PEG seguida de visualização na câmara de UV-Vis em 365 nm.68 Figura 24. Espectro de absorção na região do IV (ATR)......69 Figura 25. Ampliação do espectro de RMN ¹³C e DEPT-135 (CD₃OD, 400MHz) do dulcitol......70 Figura 26. Cromatograma obtido por CLAE/EM-ESI, modo negativo, da fração solúvel em etanol (95%) do extrato aquoso de folhas de M. acanthophylla (EAMA). Foi

Figura 27. Espectro de absorção nas concentrações de 100µg/mL PG7G1 e PG7G3 obtido por varredura na região do UV na faixa de comprimento de onda de 200-600 Figura 28. Espectro de RMN ¹H (CD₃OD, 400 MHZ) e expansão dos dupletos aromáticos de PG7G1......75 Figura 29. Seção de mapa de contornos HSQC de PG7G1, referente aos hidrogênios e carbonos anoméricos (CD₃OD, 400MHz) (F1: δ de DEPT-135 96,0-125,0 x F2: δ de Figura 30. Seção do mapa de contornos HMBC de PG7G1, relativos as ligações glicosídicas (CD₃OD, 400MHz) (F1: δ de ¹³C 65,0-200,0 x F2: δ de ¹H 0,90-8,5).77 Figura 31. Seção do mapa de contornos NOESY de PG7G1, relativos as posições espaciais dos hidrogênios da aglicona (CD₃OD, 400MHz) (F1: δ de ¹H 6,0-8,0 x F2: Figura 32. Seção do mapa de contornos NOESY de PG7G1, relativos as posições espaciais dos hidrogênios glicosídicos (CD₃OD, 400MHz) (F1: δ de ¹H 4,5-5,5 x F2: Figura 33. Espectro de RMN ¹H (CD₃OD, 400MHz) e expansão dos dupletos aromáticos de PG7G3......82 Figura 34. Seção do mapa de contornos HSQC de PG7G3, referente aos hidrogênios e carbonos anoméricos (CD₃OD, 400MHz) (F1: δ de DEPT-135 20-130 x F2: δ de ¹H Figura 35. Seção do mapa de contornos HMBC de PG7G3, relativo a confirmação da Figura 36. Ampliação do mapa de contornos COSY de PG7G3, relativo a aglicona

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Frações obtidas da cromatografia em coluna C-1 do extrato EHMA de folhas
de <i>M. acanthophylla</i> 34
Tabela 2. Agrupamento das frações obtidas na coluna C-1 do extrato EHMA de folhas
de <i>M. acanthophylla</i> , procedimentos de purificação e métodos de análises34
Tabela 3. Resumo das substâncias isoladas da coluna flash (coluna C1-1). 36
Tabela 4. Resumo das substâncias isoladas da CL do extrato EHMA (C-1)37
Tabela 5. Fracionamento da fração em MeOH por CL (C-3). 39
Tabela 6. Agrupamento das frações obtidas por CL (C-3) do extrato ECMA de folhas
de <i>M. acanthophylla</i> , procedimentos de purificação e métodos de análises40
Tabela 7. Agrupamento das frações obtidas por coluna flash (C3-1) do extrato ECMA
de folhas de <i>M. acanthophylla</i> , procedimentos de purificação e métodos de análises.
Tabela 8. Resumo das substâncias isoladas da coluna flash do G24 (C3-1). 42
Tabela 9. Fracionamento do extrato EAEMA por CL (C-4)43
Tabela 10. Agrupamento das frações obtidas por CL (C-4) do extrato EAEMA de
folhas de M. acanthophylla, procedimentos de purificação e métodos de análises43
Tabela 11. Resumo das substâncias isoladas da CL (C-4) do EACMA44
Tabela 12. Fracionamento do extrato EAMA por coluna filtrante (C-5)45
Tabela 13. Agrupamento das frações obtidas de C-5 conforme perfil CCD. 46
Tabela 14. Grupos submetidos ao processo de purificação por MPLC do EAMA47
Tabela 15. Análise de comparação entre os valores de δ_C obtidos no espectro de
RMN ¹³ C da amostra G3-C1 com valores relatados para o esqualeno50
Tabela 16. Análise de comparação entre os valores de δ_C obtidos no espectro de
RMN ¹³ C com valores relatados para o β -friedelinol
Tabela 17. Análise de comparação entre os valores de δ_c obtidos no espectro de
RMN ¹³ C com valores relatados para o lupeol
Tabela 18. Dados do cromatograma obtido por CG-EM de G1C3 e de padrões
hidrocarbonetos (HCs) – C ₁₅ a C ₃₂ 61
Tabela 19. Constituintes químicos do extrato EAMA identificados por RMN e CL-EM.

Tabela 20. Comparação dos valores atribuídos de δ ¹ H de PG7G1 com os valores
relatados por de Oliveira (2012)74
Tabela 21. Comparação dos valores atribuídos de δ ¹³ C de PG7G1 com os valores
relatados por de Oliveira (2012)76
Tabela 22. Comparação dos valores atribuídos de δ ¹ H de PG7G3 com os valores
relatados por Semmar (2002) e Bedir (2000)81
Tabela 23. Comparação dos valores atribuídos de δ ¹³ C de PG7G3 com os valores
relatados por Semmar (2002) e Bedir (2000)83
Tabela 24. Percentagem de inibição das amostras testadas na concentração de 250
µg/mL frente a micro-organismos89
Tabela 25. Valores de percentagem de inibição da acetilcolinesterase

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ATCC	American Type Culture Collection, distribuidora de microoganismos
	biologicamente padronizados
CL	Cromatografia liquida
CG-EM	Cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas
EAEMA	Extrato acetato de etila de Maytenus acanthophylla
EAMA	Extrato aquoso de Maytenus acanthophylla
ECMA	Extrato clorofórmico de Maytenus acanthophylla
EHMA	Extrato hexânico de Maytenus acanthophylla
NIST	National Institute of Standards and Technology
UV-Vis	Ultravioleta visível
RMN	Ressonância magnética nuclear
T _R	Tempo de retenção em cromatografia liquida e gasosa
min.	Minutos
CI ₅₀	Concentração inibitória de 50%
CLAE	Cromatografia liquida de alta eficiência
CLAE-EM	Cromatografia liquida de alta eficiência acoplada a espectrometria
	de massas
EM	Espectrometria de massas
CCD	Cromatografia em camada delgada
COSY	Homonuclear Correlelation Spectroscopy
d	Dupleto
dd	Duplo dupleto
DEPT	Distortionless Enhancement by Polarization Transfer
EM-IES	Espectrometria de Massas com Ionização por Eletrospray (EM-IES)
HMBC	Heteronuclear Multiple-Bond Correlation
HSQC	Heteronuclear Single-Quantum Correlation
IV	Infravermelho
Lit.	Literatura
m	Multipleto
m/z	Razão entre a massa e carga elétrica de um íon
MeOH	Metanol

CD3OD	Metanol deuterado
CDCl₃	Clorofórmio deuterado
MPLC	Cromatografia líquida de média pressão
NEPLAM	Núcleo de pesquisas de plantas medicinais – DQ/UFMG
NP-PEG	Borato de 2-aminoetoxidifenila - Polietilenoglicol
S	Singleto
TTPC	Triterpeno pentacíclico
UV	Ultravioleta
BHI	O caldo BHI (brain heart infusion) é um meio de cultura utilizado
	para cultivo de microrganismos.
UFC	Unidade de formação de colônias
DMSO	Dimetilsulfóxido
AChE	Acetilcolinesterase
DTNB	2-nitrobenzoico

LISTA DE SIMBOLOS

0 ⁰ C	Grau Celsius
Ø	Diâmetro interno do tubo de vidro utilizado para processos de
	cromatografia em coluna
δ	Deslocamento químico em espectroscopia de ressonância magnética
	nuclear (Delta)
λ	Comprimento de onda (Lambda)
υ	Deformação axial (estiramento) ou frequência
J	Constante de acoplamento escalar em espectroscopia de ressonância
	magnética nuclear (Joule)
MHz	Mega Hertz

Avaliação do potencial químico e farmacológico de extratos de folhas de *Maytenus acanthophylla* (Celastraceae)

Autor: Rosângela Santos Pereira Orientador: Prof. Dr. Djalma Menezes de Oliveira

RESUMO: Esta dissertação aborda sobre o estudo químico e biológico de folhas de Maytenus acanthophylla Reissek (Celastraceae). O objetivo geral consistiu em isolar moléculas para conhecer a química a partir dos extratos de folhas de Maytenus acanthophylla (Celastraceae) de ocorrência na região de Jequié, Bahia. No capítulo 1 são apresentados o isolamento e a identificação de 14 substâncias, realizada através de técnicas cromatográficas e espectrométricas. Os extratos EHMA, ECMA, EAEMA foram isolados as seguintes substâncias: hidrocarbonetos, os TTPCs lupeol, βfriedelinol e esqualeno, α-tocoferol, éster graxo hexadecanoato de etila, éster graxo octadeca-9,12,15-trienoato de etila, friedelan-3-one, éster graxo octadeca-9,12-noato de metila, éster graxo tridecanoato de etila, fitol, polímero gutta-percha. No extrato EAMA foram isolados o açúcar dulcitol e dois flavonoides tetra-glicosilados: 3-O-{[a-L-ramnopiranosil(1 \rightarrow 6)]-O-[β -D-xilopiranosil(1 \rightarrow 3)-O- α -L-ramnopiranosil(1 \rightarrow 2)]}- β -D-3-O-{[α -L-ramnopiranosil(1 \rightarrow 6)]-O-[β -Dgalactopiranosídeo de quercetina е xilopiranosil(1 \rightarrow 3)-O- α -L-ramnopiranosil-(1 \rightarrow 2)]}- β -D-galactopiranosídeo de isoramnetina. No capítulo 2 são descritos os resultados dos ensaios farmacológicos in vitro, para avaliação das atividades antimicrobiana e anticolinesterásica de extrato e compostos isolados. A atividade antimicrobiana foi avaliada pelo método de microdiluição em placa, contra cepas ATCC de Candida albicans, Staphylococcus aureus, Bacillus cereus, Escherichia coli, Citrobacter freundii. As amostras mais promissoras frente aos microorganismos testados foram o extrato (EAMA) e o composto tretraglicosídeo de canferol. A atividade anticolinesterásica foi avaliada pelo ensaio espectrofotométrico usando o reagente DTNB. O extrato EAMA e os compostos isolados não atuaram como potentes inibidores da AChE. Compostos isolados e as atividades farmacológicas enriquece esse estudo e contribui para valorização da nossa biodiversidade e do uso popular das plantas medicinais. Palavras-chave: Maytenus acanthophylla, triterpernos pentaciclicos, flavonoides,

atividade antimicrobiana, atividade anticolinesterásica.

Evaluation of the chemical and pharmacological potential of leaf extracts of *Maytenus acanthophylla* (Celastraceae)

Autor: Rosângela Santos Pereira Orientador: Prof. Dr. Djalma Menezes de Oliveira

ABSTRACT: This dissertation addresses the chemical and biological study of Maytenus acanthophylla Reissek (Celastraceae) leaves. The general objective was to isolate molecules to know the chemistry from the leaf extracts of Maytenus acanthophylla (Celastraceae) occurring in the region of Jequié, Bahia. Chapter 1 presents the isolation and identification of 14 substances, performed through chromatographic and spectrometric techniques. The extracts EHMA, ECMA, EAEMA were isolated the following substances: hydrocarbons, the TTPCs lupeol, β -friedelinol and squalene, a-tocopherol, fatty ester hexadecanoate of ethyl, fatty ester octadeca-9,12,15-trienoate of ethyl, friedelan -3-one, methyl ester octadeca-9,12-noate, ethyl ester tridecanoate fatty acid, phytol, gutta-percha polymer. In the EAMA extract were isolated sugar dulcitol and two tetra-glycosylated flavonoids: 3-O - {[a-Lramnopyranosyl (1 \rightarrow 6)] - O- [β -D-xylopyranosyl (1 \rightarrow 3) -O- α (1 \rightarrow 2)] - β -Dgalactopyranoside of quercetin and 3-O - {[α -L-ramnopyranosyl (1 \rightarrow 6)] - O- [β -Dxylopyranosyl (1 \rightarrow 3) -O- α -L-ramnopyranosyl- (1 \rightarrow 2)] - β -D-galactopyranoside of isoramnetin. Chapter 2 describes the results of in vitro pharmacological tests for the evaluation of antimicrobial and anticholinesterase activity of extracts and isolated compounds. The antimicrobial activity was evaluated by the plaque microdilution method against ATCC strains of Candida albicans, Staphylococcus aureus, Bacillus cereus, Escherichia coli, Citrobacter freundii. The most promising samples against the microorganisms tested were the extract (EAMA) and the tretraglicoside compound of canferol. The anticholinesterase activity was evaluated by the spectrophotometric assay using the DTNB reagent. EAMA extract and isolated compounds did not act as potent inhibitors of AChE. Isolated compounds and pharmacological activities enriches this study and contributes to the valorization of our biodiversity and the popular use of medicinal plants.

Key words: *Maytenus acanthophylla*, pentacyclic triterpenes, flavonoids, antimicrobial activity, anticholinesterase activity.

SUMÁRIO

1	AP	RESENTAÇÃO2	21
	1.1	Plantas medicinais e sua importância2	21
С	APÍT	ULO 1: ESTUDO FITOQUÍMICO DE FOLHAS DE MAYTENU	IS
A	CANT	THOPHYLLA	24
	1.2	Família Celastraceae2	24
	1.3	Gênero Maytenus2	24
	1.4	Maytenus acanthophylla2	25
2	OB	JETIVOS2	27
	2.1	Objetivo geral2	27
	2.2	Objetivos específicos2	27
3	PA	RTE EXPERIMENTAL2	29
	3.1	Material vegetal	31
	3.2	Preparação dos extratos orgânicos	31
	3.3	Preparação do extrato aquoso	32
	3.4	Prospecção fitoquímica dos extratos	3
	3.5	Fracionamento dos extratos brutos	33
	3.6	Fracionamento do extrato hexânico de Maytenus acanthophylla	_
	EHM	1A3	34
	3.7	Isolamento dos constituintes químicos do extrato EHMA	34
	3.8 acar	Extração de <i>gutta-percha</i> do extrato clorofórmico de <i>Mayten</i> u athophylla – ECMA	ıs 37
	3.9	Fracionamento da fração metanólica do extrato ECMA	39
	3.10 ECM	Isolamento dos constituintes químicos da fração metanólica do extra 1A4	to IO
	3.11 – EA	Fracionamento do extrato acetato de etila de <i>Maytenus acanthophyl</i> EMA4	la 2

3.12 Identificação preliminar de flavonoides glicosídicos no extrato aquoso de <i>Maytenus acanthophylla</i> – EAMA45
3.13 Fracionamento do extrato aquoso de <i>Maytenus acanthophylla</i> – EAMA45
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO48
4.1 Estudo fitoquímico do extrato hexânico de <i>Maytenus acanthophylla</i> – EHMA
4.2 Estudo fitoquímico do extrato clorofórmico de <i>Maytenus acanthophylla</i> - ECMA
4.3 Estudo fitoquímico do extrato acetato de etila de Maytenus acanthophylla - EAEMA65
4.4 Estudo fitoquímico do extrato aquoso de <i>Maytenus acanthophylla</i> – EAMA
4.5 Identificação preliminar dos constituintes químicos do extrato EAMA70
4.6 Flavonoides glicosilados isolados do extrato EAMA71
CAPITULO 2: ATIVIDADES FARMACOLÓGICAS DE EXTRATO E COMPOSTOS ISOLADOS DE <i>MAYTENUS ACANTHOPHYLLA</i> 86 5 PARTE EXPERIMENTAL
5.1 Bioensaio da atividade antimicrobiana86
5.2 Bioensaio da atividade inibitória da enzima acetilcolinesterase (ACHE)
6 RESULTADOS E DISCUSSÃO88
6.1 Ensaios de atividades biológicas88
6.2 Avaliação da atividade antimicrobiana88
6.3 Avaliação da atividade da enzima acetilcolinesterase (AChE)90
7 CONCLUSÃO91
8 REFÊRENCIAS

1 APRESENTAÇÃO

1.1 Plantas medicinais e sua importância

A biodiversidade brasileira é uma das mais ricas do planeta: engloba de 15 a 25% de todas as espécies vegetais, com alta taxa de endemismo biológico, dispersa em biomas únicos (JOLY et al., 2011). No Brasil ocorre entre 170 mil e 210 mil espécies biológicas conhecidas, o que corresponde a cerca de 10% da biota mundial já estudada (LEWINSOHN e PRADO, 2005). Isso mostra o quanto à biodiversidade brasileira tem muito a ser explorada, principalmente em relação às plantas medicinais e seus benefícios.

A utilização da natureza para fins terapêuticos é tão antiga quanto a civilização humana e, por muito tempo, produtos minerais, de plantas e animais foram fundamentais para a área da saúde (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2012).

As plantas medicinais e seus derivados estão entre os principais recursos terapêuticos da Medicina Tradicional e da Medicina Complementar e Alternativa – MCA e vêm há muito sendo utilizados pela população brasileira nos seus cuidados com a saúde (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2012).

A Declaração de Alma Ata em 1978 representa um importante marco histórico na área de saúde, pois foi onde oficialmente se reconheceu o uso de plantas medicinais e de fitoterápicos com finalidade profilática, curativa e paliativa. A partir disso, a Organização Mundial da Saúde (OMS) passou a reconhecer as plantas medicinais e a fitoterapia como essenciais (IBIAPING et al., 2014).

No Brasil, o uso de fitoterápicos foi regulamentado em 2006 com a Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares (PNPIC) e a Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos (PNPMF) e, em 2009, com a Portaria Nº 2.960 que aprovou o Programa Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos, sendo os três importantes para introdução do uso de plantas medicinais e fitoterápicos no Sistema Único de Saúde (SUS) (MACEDO, 2016).

Com isso, percebeu-se o interesse governamental e profissional em associar o avanço tecnológico ao conhecimento popular e ao desenvolvimento sustentável visando a uma política de assistência em saúde eficaz, abrangente, humanizada e independente da tecnologia farmacêutica (FRANÇA et al., 2008). Rosa e colaboradores (2011) relata que 80% da população de países em desenvolvimento utilizam-se de práticas tradicionais na atenção primária à saúde e, desse total, 85% fazem uso de plantas medicinais.

Os fitoterápicos mais utilizados na rede pública são o guaco, a espinheira-santa e a isoflavona-de-soja, indicados como coadjuvantes no tratamento de problemas respiratórios, gastrite e úlcera e sintomas do climatério, respectivamente (PORTAL BRASIL, 2016).

O financiamento da pesquisa científica no Brasil diretamente advém da arrecadação de impostos e atualmente a ciência passa por um momento complexo relacionados ao corte de verbas pelo governo, assim é necessário mudar este cenário, começando a rever as prioridades, pois muito se questiona sobre a qualidade da ciência brasileira (BERLINCK et al., 2017). Ainda, segundo Berlinck e colaboradores (2017), com a diversificação e crescimento notável, no século XXI, da pesquisa de produtos naturais, relata que para o fortalecimento da ciência brasileira, tão desvalorizada, necessita-se da integração significativa da sociedade, indústria farmacêutica nacional e os pesquisadores acadêmicos que permita trazer inovações de processos, de produtos, de tecnologias, de educação e de formação profissional.

A importância da pesquisa na área de produtos naturais bioativos permite identificar novos compostos e também propõe novas estruturas moleculares para serem utilizadas como modelos para novos fármacos (NEWMAN e CRAGG, 2016). Além de, descobrir compostos com características físico-químicas, presença de centros estereogênicos e diversidade de grupos farmacofóricos adequadas para o desenvolvimento de fármacos (SUKURU et al., 2009).

Portanto, presente estudo é de grande importância, afim de favorecer o fortalecimento da pesquisa científica, e reforçar o laço entre a medicina popular e a ciência.

CAPÍTULO 1

CAPÍTULO 1: ESTUDO FITOQUÍMICO DE FOLHAS DE MAYTENUS ACANTHOPHYLLA

1.2 Família Celastraceae

A família Celastraceae é botânicamente reconhecida por suas folhas simples com estipulas inconspícuas, inflorescências cimosas, flores pequenas, esverdeadas, geralmente pentâmeras, isostênomes, com disco intra-estaminal e placentação axilar (CARVALHO-OKANO, 1992).

As Celastráceas são encontradas principalmente em regiões tropicais e subtropicais do mundo. A família é composta por cerca de 1300 espécies, sendo que várias de suas espécies já vem sendo estudadas. O uso medicinal das plantas da família celastráceas foi associado a compostos da classe dos sesquiterpenoides (SIMMONS et al., 2001; SPIVEY et al., 2002). Dentre os 98 gêneros pertencentes a essa família se destaca o gênero *Maytenus*.

1.3 Gênero Maytenus

Da família Celastraceae este gênero é um dos maiores com aproximadamente 227 espécies e distinguem-se pela presença de ramos inermes, frutos capsulares, bivalvares e de arilos completos em suas sementes (CARVALHO-OKANO, 1992).

Espécies de *Maytenus* são encontradas em vários países de clima predominantemente tropical, sendo muito utilizadas por pessoas de diferentes culturas. Popularmente são utilizadas principalmente em forma de infusões e decocções, como medicamento antirreumático, antibacteriano, antitumoral, imunossupressor, cicatrizante, anti-inflamatório, anti-ulcerogênico e anti-inseticida (SALAZAR et al., 1999; FONSECA et al., 2007; NIERO et al., 2011).

De espécies do gênero *Maytenus* já foram isolados taninos condensados, flavonoides, alcaloides sesquiterpênicos e triterpenos pentacíclicos (TTPCs) (de OLIVEIRA et al, 2006; NIERO et al., 2011; de OLIVEIRA, 2012). Os diversos TTPCs foram atribuídos propriedades biológicas, tais como ação anti-inflamatória (REYES et al., 2006), antimicrobiana (CHUNG et al., 2011) e hepatoprotetora (SUNITHA et al., 2001) e outras.

Dentre as espécies do gênero *Maytenus*, a *Maytenus acanthophylla* Reissek é uma planta considerada endêmica na região de Jequié, Bahia.

1.4 Maytenus acanthophylla

A planta *M. acanthophylla* é caracterizada como arbusto ou árvore de cerca de 3,0 m de altura, seus ramos novos são glabros e quadrangulares, as folhas são coriáceas de forma estreitamente elíptica ou oblongo-elíptica, com muitos espinhos e serrada (CARVALLHO-OKANO, 1992) (Figura 1).



Figura 1. *Maytenus acanthophylla*. A) Ilustração de um ramo de folhas, destacando um conjunto de flores, cedida por Carvalho-Okano e B) foto de um espécime (Fonte: própria).

Segundo Carvalho-Okano (1992) a distribuição da *M. acanthophylla* é apresentada nos estados de Minas Gerais e Bahia, podendo ser encontrada em solos areno-argilosos. Devido esta característica dos solos, essa espécie é bastante encontrada no Sudoeste da Bahia, região de Jequié e no interior da Chapada Diamantina.

A Maytenus acanthophylla, popularmente conhecida como "espinheira-santa" ou "pau-de-jararaca", a infusão das folhas é tradicionalmente utilizada na medicina popular no tratamento de gastrite, úlceras e outros distúrbios digestivos, como antisséptico, anti-inflamatório, e de infecções urogenitais (de OLIVEIRA, 2012).

De acordo com de Oliveira (2012) foram isolados em quantidades significativas das partes aéreas de *Maytenus acanthophylla:* TTPC's, lupeol e acetato de 3β-lup-20(29)-en-3-ila, que são portadores de atividade anti-inflamatória e anti-malárica. Foram isolados também o polímero denominado *gutta-percha*, flavonoides, oleanos, alditol, lupanos, ursanos, friedelina, friedelinol e quinonametídeos (de OLIVEIRA, 2006; de OLIVEIRA et al., 2012).

Maytenus ilicifolia e M. aquifolium ambas nativas do Brasil, conhecidas como espinheira-santa é um dos poucos fitoterápicos que possuem efeitos farmacológicos comprovados pela Central de Medicamentos (CEME) do Ministério da Saúde do Brasil, havendo assim total segurança de seu uso (DI STASI, 2004). São utilizadas para tratamento de úlceras, gastrites e outras afecções gastrointestinais (SILVA et al., 2014).

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Isolar moléculas para conhecer a química a partir dos extratos de folhas de *Maytenus acanthophylla* (Celastraceae) de ocorrência na região de Jequié, Bahia.

2.2 Objetivos específicos

- Coletar o material vegetal e obter extratos de folhas de Maytenus acanthophylla utilizando solventes de diferentes polaridades. Indicador: Adquirir o material vegetal e obter os extratos brutos;
- 2. Preparar o extrato aquoso. Indicador: Obter um extrato liofilizado;
- Realizar o fracionamento preliminar dos extratos brutos: hexânico, clorofórmico, acetato de etila e aquoso das folhas de Maytenus acanthophylla. Indicador: Obter as frações solúveis;
- Realizar o estudo químico dos extratos e frações das folhas de Maytenus acanthophylla por meio de cromatografia em camada delgada, de cromatografia em coluna à pressão atmosférica e de coluna flash em baixa pressão. Indicador: Obter o perfil cromatográfico dos extratos e frações;
- Separar e purificar compostos utilizando cromatografia liquida de média pressão (CLMP) e alta pressão (CLAE) analítico e cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG-EM) incluindo reação de derivatização por sililação para análise das amostras. Indicador: Obter compostos químicos com alto grau de pureza;
- Caracterizar a estrutura química dos compostos isolados de frações utilizando espectroscopia na região do infravermelho (IV), de ressonância magnética nuclear de hidrogênio de carbono em uma e duas dimensões (RMN de ¹H e de ¹³C, 1D/2D) e espectrometria de massas (EM) de alta resolução, Indicador: Identificar a estrutura química dos compostos isolados;
- Realizar bioensaio da atividade antibacteriana e bioensaio da atividade inibitória da enzima acetilcolinesterase. Indicador: Avaliar propriedades farmacológicas dos extratos, frações e compostos isolados;

8. Contribuir com produção científica, na forma de publicação de artigos em periódicos, para divulgação do conhecimento fitoquímico e quimiotaxonômico do gênero *Maytenus*.

3 PARTE EXPERIMENTAL

Na cromatografia em camada delgada (CCD), as cromatoplacas foram preparadas sob um suporte de vidro, utilizando suspensão de sílica gel Merck 60 G em água [7 g para 20mL (p/v)], camada de 0,25 mm de espessura. Após secas a temperatura ambiente, as placas foram ativadas em estufa a 100 °C por 60 minutos. As placas foram reveladas com luz ultravioleta e pulverização com vanilina perclórica - 1:1 v/v (solução de vanilina em álcool etílico (1%) + ácido perclórico em água (3%)), posteriormente aquecidas em estufa a 100 °C. O revelador utilizado na identificação dos flavonoides foi o reagente NP-PEG 4000. Esse revelador foi preparado da seguinte forma: NP chamado de borato 2-aminoetoxidifenila foi diluído em 1% de etanol (A) e PEG 4000 conhecido como polietilenoglicol diluído a 5% em etanol (B). A solução para aspersão nas cromatoplacas foram feitas em mistura de A:B (1:1).

Na cromatografia liquida em coluna utilizou-se sílica gel Merck 60 (70-230 Mesh), a quantidade de sílica utilizada foi de 30 a 50 vezes a massa da amostra. Já as colunas contendo sílica *flash* (250-400 mesh) a quantidade de sílica utilizada foi até 60 vezes a massa da amostra. Neste processo os solventes utilizados foram todos destilados.

O congelamento das amostras que foram submetidas ao processo de liofilização foi realizado no *freezer* – 80 °C, no Laboratório de Citogenética da UESB-BA. Para realização do processo de liofilização foi utilizado o aparelho liofilizador da marca Liotop, modelo K - 105.

A determinação do Ponto de Fusão foi realizada em aparelho Microquímica MQAPF-302, pertencente ao NEPLAM (Núcleo de Estudos e Pesquisas em Plantas Medicinais) da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG).

Para a cromatografia líquida de média pressão (CLMP) utilizou-se um cromatógrafo Biotage - Isolera One com detector UV-VIS, e coluna de fase reversa (Biotage®, SNAP ultra C-18-HS, 30 g e 120 g), e sistema eluente em gradiente, composto de uma solução de H₂O em 0,1% de ácido fórmico (A) e metanol (MeOH) (B), do NEPLAM/UFMG –BH. Partindo de combinação A:B em gradiente (10%:90% até 100%:0%).

As análises na região de UV-visível foram utilizadas espectrofotômetro CARRY, pertencente ao Laboratório de Química Analítica do professor Dr. Marcos Bezerra,

UESB-BA. Foram preparadas soluções dos flavonoides obtidos a 1% m/v em MeOH grau espectroscópico e também das substâncias identificadas.

Os espectros de absorção na região do infravermelho foram obtidos em um espectrômetro Perkin Elmer Spectrum one FTIR-ATR, instalado no laboratório de cromatografia Dr. Jailson Bittencourt do Departamento de Química da UESB e esse usa o método da reflectância atenuada (ATR) por inserção direta da amostra ao feixe de radiação do aparelho.

As análises por cromatografia em fase gasosa acoplada ao espectrômetro de massa (CG-EM) foram realizadas em um cromatógrafo SHIMADZU, modelo QP2010 SE instalado no laboratório de cromatografia Dr. Jailson Bittencourt do programa de pós-graduação em Química, dotado de biblioteca de espectros de massas NIST-11 e NIST-14. Para análises, foi utilizada uma coluna capilar SPB-tm5 de 30 m de comprimento e 0,25 mm diâmetro interno, fase estacionária composta por um filme de dimetilpolisiloxano (95%) e fenila (5%) com 0,25 µm de espessura. Temperatura do injetor 280 °C, fluxo de gás de 1,8 mL min⁻¹, aquecimento do forno/coluna na faixa de 100 °C (durante 1 min) a 285°C (durante 20 min) e programação linear de temperatura de 5 °C min-1. A temperatura da interface CG-EM foi ajustada para 290°C e a fonte de íons do detector para 260 °C. As identificações dos constituintes foram realizadas por comparação entre os índices retenção calculados versus aqueles disponíveis na biblioteca (NIST-EUA: http://www.nist.gov/), levando em consideração o percentual de similaridade (S \geq 90%) do provável constituinte identificado pela comparação experimental com o banco de dados ou site do NIST e pela análise do espectro de massas.

Espectros de RMN de ¹H e de ¹³C foram obtidos em espectrômetro Bruker AVANCE DRX-400 ou em Bruker AVANCE DPX-200, do Laboratório de Ressonância Magnética Nuclear de Alta Resolução (LAREMAR) do Departamento de Química, UFMG. Utilizou-se como padrão interno, o sinal do tetrametilsilano (TMS) nos experimentos de RMN. Os solventes deuterados foram utilizados de acordo com a característica de solubilidade de cada amostra.

Para as análises de cromatografia liquida acoplada espectrometria de massas (CLAE-EM) foi utilizado o espectrômetro de massas modelo LCQ Advantage, Thermo-Finnigan (San Jose, CA, USA), pertencente ao LQPN, do CPQRR, Fundação Oswaldo Cruz (FioCruz Minas), Belo Horizonte, equipado com ionização por eletrospray (ESI-MS) com quadrupolo e armadilha de íons. Os testes biológicos foram realizados pelo grupo da Professora Dr^a. Jacqueline Aparecida Takahashi no Laboratório de Biotecnologia e Bioensaios, do Departamento de Química da Universidade Federal de Minas Gerais.

3.1 Material vegetal

Folhas de *M. acanthophylla* foram coletadas no Morro do Castanhão, localizado a 20 km da cidade de Jequié, Bahia, próximo à rodovia BR 116, sentido a Vitória da Conquista (latitude -13°, 57'15.38" S, longitude -40°10'30.65" O). As exsicatas da *M. acanthophylla* estão depositadas no Herbário da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia (UESB) sob o número de registro HUESB-9311.

As folhas foram secas em temperatura ambiente e fragmentadas em moinho de facas (Solab, modelo SL-32).

3.2 Preparação dos extratos orgânicos

Folhas de *Maytenus acanthophylla* trituradas (1,0 Kg) foram utilizadas na preparação dos extratos por meio de percolações sucessivas com: hexano, clorofórmio e acetato de etila. As extrações foram realizadas a temperatura ambiente, por um período de 7 dias, em triplicata para cada solvente, resultaram nos extratos brutos: em hexano (EHMA); em clorofórmio (ECMA); em acetato etila (EACMA) (Figura 2). A recuperação de cada solvente extrator foi feita em temperatura ≤ 45°C, à pressão reduzida utilizando evaporador rotatório.



Figura 2. Esquema do processo de obtenção dos extratos de folhas de Maytenus acanthophylla.

3.3 Preparação do extrato aquoso

O extrato aquoso de folhas de *M. acanthophylla* trituradas (500 g) foi obtido por meio de decocção exaustiva, durante 5 horas sob refluxo em água destilada (Figura 3).





Figura 3. Sistema utilizado para preparação do extrato aquoso por decocção sob refluxo (folhas de *Maytenus acanthophylla*) (Fonte: própria).

O extrato obtido foi coado em tamis e em seguida filtrado em sistema de filtração a vácuo, a fim de separar o resíduo resultante do material vegetal. Após este processo, o extrato foi congelado no *feezer* – 80 °C, por aproximadamente 72 horas. Em seguida, o extrato congelado foi liofilizado e o extrato aquoso foi resultante da liofilização, rotulado como extrato aquoso de *Maytenus acanthophylla* (EAMA). O rendimento da preparação do extrato aquoso foi de 60%.

3.4 Prospecção fitoquímica dos extratos

A prospecção fitoquímica dos extratos, frações e compostos isolados de folhas de *Maytenus acanthophylla* foram direcionadas para a pesquisa de polifenóis, taninos condensados, flavonoides e triterpenos. Foram utilizados reagentes específicos, adequados para cada classe de compostos químicos (MATOS, 1988).

3.5 Fracionamento dos extratos brutos

Os extratos EHMA, ECMA e EACMA (Figura 2) foram submetidos a processos de fracionamento por meio de métodos cromatográficos.

3.6 Fracionamento do extrato hexânico de Maytenus acanthophylla – EHMA

A partir do perfil cromatográfico obtido por CCD do extrato EHMA, 15 g desse extrato foram submetidos à cromatografia em coluna (C-1) de sílica gel 60 (70-230 Mesh) (300 g) empacotada em tubo de vidro de diâmetro interno (ø) de 5,5 cm, e eluida com hexano e acetato de etila, em gradiente de polaridade (Tabela 1). Desta coluna, foram coletadas 38 frações de 100 mL cada.

Eluente	Proporção (%)	Frações coletadas
Hexano-EtoAc	90:10	F1 a F16
Hexano-EtoAc	80:20	F17 a F26
Hexano-EtoAc	70:30	F27 a F31
Hexano-EtoAc	50:40	F32 a F37
EtoAc	100	F38

Tabela 1. Frações obtidas da cromatografia em coluna C-1 do extrato EHMA de folhas de *M. acanthophylla.*

3.7 Isolamento dos constituintes químicos do extrato EHMA

O rendimento das frações obtidas pela cromatografia liquida em coluna foi de aproximadamente 65 %. As frações coletadas em C-1 foram agrupadas de acordo com a similaridade do perfil cromatográfico observado por CCD, após revelação com vanilina perclórica. Após os agrupamentos, os constituintes químicos das frações mais promissoras foram submetidos a técnicas cromatográficas e espectroscópicas. O resumo do processo de fracionamento, isolamento e purificação dos constituintes químicos do EHMA estão listados na Tabela 2.

Tabela 2.	Agrupamento	das	frações	obtidas	na	coluna	C-1	do	extrato	EHMA	de	folhas	de	М.
acanthophy	<i>Ila</i> , procedimen	ntos c	le purifica	ação e m	néto	dos de a	anális	ses.						

Frações	Grupo	Massa (mg)	Procedimentos de fracionamento e purificação	Métodos de análise
F1-F3	G1	123,2	CL	CCD, PF, CG-EM, RMN

Continuação	o da Tabe	ela 2		
F4-F6	G2	27,1	CL	CCD, CG-EM
F7	G7	189,5	CL	CCD, CG-EM
F8-F9	G3	2902,0	CL	CCD, CG-EM
F10	G10	1412,2	CL (Coluna <i>Flash)</i>	CCD, CG-EM
F11	G11	993,9	CL	CCD, CG-EM
F12-F13	G4	660,5	Lav. e recr. (hexano)	CCD, PF, CG-EM, RMN
F14	G14	344,0	Lav. e rec. (hexano)	CCD, PF, CG-EM, RMN
F15-F18	G5	1565,3	Lav. e rec. (hexano)	CCD, PF, CG-EM, RMN
F19-F22	G6	1448,4	Lav. e rec. (hexano)	CCD, PF, CG-EM, RMN
F23-F30	G7	1557,1	NE	CCD
F31	G31	225,6	NE	CCD
F32	G32	293,7	NE	CCD
F33-F34	G8	2898,8	NE	CCD
F35-F38	G9	553,3	CL e derivatização com TMS (sililação)	CCD, CG-EM

Legenda: Lav.: lavagem; Rec.: recristalização; NE: não estudado, reservado para análise posterior; TMS: Trimetilsilicio.

Grupo G1 de C-1: o material apresentou-se na forma de cristais pontiagudos, transparente e incolor, com faixa de fusão 56 – 59 °C, que foi caracterizado posteriormente por CG-EM como uma mistura de *n*-alcanos, conforme comparação com padrões de hidrocarbonetos da marca Sigma-Aldrich. A identidade de G1/C-1 confirmada por espectros de RMN de ¹H e de ¹³C.

Grupo G2, G3 e G7 de C-1: essas frações e grupo apresentaram-se como um óleo amarelo alaranjado, viscoso e solúvel em clorofórmio. Esse óleo foi submetido a análise por CG-EM, RMN 1D e 2D e identificado como um triterpeno de cadeia alifática acíclica, conhecido como esqualeno.

Grupo G10 de C-1: desse grupo foi obtido um material oleoso de coloração amarelo mais alaranjado, foi analisado por CG-EM e identificado como uma mistura de esqualeno (pico de maior intensidade), éster graxo hexadecanoato de etila e éster graxo octadeca-9,12,15-trienoato de etila.

Grupo G11 de C-1: Uma parte desse grupo (0,5g) foi purificado por cromatografia em coluna *flash* (C1-1), empacotada com sílica gel 60 (230-400 mesh) (30 g), utilizando sistema isocrático de polaridade com hexano:acetato de etila (95:5 v/v). Foram coletadas 56 frações. As frações obtidas foram agrupadas de acordo com

o perfil cromatográfico (CCD) e depois analisadas por CG-EM. Após o agrupamento das 56 frações foi obtido onze grupos destinados para análise por CG-EM. O grupo G76 apresentou um sólido (SG76) na forma de cristais de agulha transparentes, que foi purificado por lavagem e recristalização com hexano.

A partir da coluna *flash* grupo 11 de C1, foram identificadas as substâncias descritas na Tabela 3.

Frações	Grupo	Substâncias identificadas por CG-EM	Massa (mg)
F56	G56	Esqualeno	37,4
F57-F60	G57	Mistura de esqualeno e α-tocoferol	99,8
F61-F64	G61	a-tocoferol	75,7
F65-F68	G65	Não identificada	43
F69-F73	G72	Não identificada	16,6
F74-F77	SG76	Não identificada	4,6
F74-F77	G76	Mistura de hidrocarbonetos $C_{28} e C_{31} e > C_{31}$	16,7
F78-F79	G78	Não identificada	29,8
F80-F83	G80	Não identificada	17,7
F84-F89	G84	Não identificada	18,9
F90-F111	G91	Não identificada	15,4
F112	G112	Não identificada	25

Tabela 3. Resumo das substâncias isoladas da coluna flash (coluna C1-1).

Grupo G4, G6 e G14 de C-1: estes grupos apresentaram sólidos brancos que foram purificados por recristalização com hexano. O grupo G4 apresentou faixa de fusão entre 260°-268°C, o grupo G6 apresentou faixa de fusão entre 270°-278°C e grupo G14 apresentou faixa de fusão entre 160°-173°C. Ambos apresentaram resultado positivo para o teste de Liebermann-Buchard (MATOS, 1988). Posteriormente, as amostras dos sólidos G4, G6 e G14 foram analisados por espectroscopia de RMN ¹H e de ¹³C e CG-EM. A análise dos dados de RMN e CG-EM permitiram concluir que os sólidos se trata do β-friedelinol, um triterpeno pentaciclico.

Grupo G5 de C-1: o material desse grupo se apresentou como um sólido branco e glutinoso, com faixa de fusão entre 167°-177°C, foi obtido por lavagem e
recristalização com hexano. O material apresentou resultado positivo para o teste de Liebermann-Buchard (MATOS, 1988) e foram submetidos a análise por espectroscopia de RMN ¹H e de ¹³C (1D/2D) e CG-EM. A análise dos dados de CG-EM e RMN (1D/2D) permitiram identificar o solido G5 como sendo o TTPC lupeol.

Grupo G9 de C-1: esse grupo apresentou um óleo viscoso amarelado. Para análise por CG-EM este material foi submetido a reação derivatização por sililação, visto que este método substitui os grupos hidroxilas de caráter ácido da molécula por grupos TMS, gerando um produto mais volátil e apolar. O composto foi identificado como uma mistura do éster graxo hexadecanoato de etila e éster graxo octadeca-9,12,15-trienoato de etila.

Os constituintes químicos do extrato EHMA da coluna C-1 estão listados na tabela 4.

Grupos	Substâncias identificadas por CG-EM e RMN ¹ H e de ¹³ C	Massa (mg)
G1	mistura de hidrocarbonetos	54,3
G2, G3, G7	esqualeno	3289,4
G61	a-tocoferol	60,1
G10	esqualeno, éster graxo hexadecanoato de etila e éster graxo octadeca-9,12,15-trienoato de etila	999,3
G4, G6, G14	β-friedelinol	1998,7
G5	lupeol	986,6
G9	éster graxo hexadecanoato de etila e éster graxo octadeca- 9,12,15-trienoato de etila	353

Tabela 4. Resumo das substâncias isoladas da CL do extrato EHMA (C-1).

3.8 Extração de gutta-percha do extrato clorofórmico de Maytenus acanthophylla – ECMA

A partir do perfil cromatográfico definido por CCD foi observado a presença do biopolímero 1,4-*trans*-poliisopreno, denominado *gutta-percha*. Este polímero foi anteriormente isolado de raízes de *M. acanthophylla* por de Oliveira (2006). As análises por CCD com padrão mostrou que o extrato era constituído de elevado teor

de *gutta-percha*. Assim, se procedeu a remoção deste biopolímero com objetivo de facilitar a caracterização química dos constituintes restantes do extrato ECMA.

Cerca de 20 g do extrato ECMA (Figura 4) foi submetido a CL, Ø =5,5 cm, empacotada com 110 g de sílica gel 60 (70-230 Mesh) (C-2). A C-2 foi eluída inicialmente com 1L de hexano para eliminação de material graxo. Em seguida, foi utilizado 2,5L de metanol, pois o metanol tem a função de retirar os constituintes químicos do extrato, exceto a g*utta-percha* que resta coagulada e aderida a sílica na coluna. Por fim, a coluna foi eluida com 1,5L de clorofórmio, nessa fração continha o biopolímero g*utta-percha* puro. As três frações coletadas de C-2 foram concentradas em evaporador rotatório. A purificação da g*utta-percha* constitui na adição de acetona na fração clorofórmica a fim de precipitar o biopolímero, seguida de filtração a vácuo. Esse material (2,512 g) foi armazenado sob refrigeração num frasco de vidro âmbar, protegido da luz. A identificação do material elástico como sendo a g*utta-percha* foi realizada por meio de espectroscopia na região do infravermelho e análise por CCD com padrão autêntico.

A análise da fração hexânica foi realizada por CCD e CG-EM.



Figura 4. Extração do polímero do extrato ECMA.

3.9 Fracionamento da fração metanólica do extrato ECMA

Foi necessário a passagem do extrato liquido em MeOH por uma filtração com sulfato de sódio anidro por causa da umidade presente no metanol utilizado. Em seguida, cerca de 10 g dessa fração foi submetida a CL, ø=5,5 cm, empacotada com 280 g de sílica gel 60 (70-230 mesh) (C-3). O fracionamento de C-3 permitiu coletar 53 frações de 80mL cada. Os solventes clorofórmio e acetato de etila foram utilizados como eluentes em gradiente de polaridade (Tabela 5).

Sistema eluente	Frações
CHCl ₃ : Hexano [8:2]	F1 a F3
CHCl ₃ : Hexano [9:1]	F4 a F10
CHCl ₃ 100%	F11 a F22
CHCl ₃ : EtOAc [9:1]	F23 a F31
CHCl ₃ :EtOAc[8:2]	F32 a F39
CHCl₃ :EtOAc [1:1]	F40 a F46
CHCl ₃ :EtOAc [3:7]	F47 a F53

Tabela 5. Fracionamento da fração em MeOH por CL (C-3).

O rendimento das frações obtidas no fracionamento da CL de C-3 foi de aproximadamente 41 %. As frações coletadas em C-3 foram agrupadas de acordo com os perfis em CCD, reveladas com vanilina perclórica. Após os agrupamentos, foram identificados os constituintes químicos das frações de C-3 através de técnicas cromatográfica (CCD) e espectrométrica (CG-EM). A Tabela 6 mostra o resumo do fracionamento, purificação e isolamento dos constituintes químicos da fração metanólica de ECMA.

Frações	Grupo	Massa (mg)	Procedimentos de fracionamento e purificação	Métodos de análises
F1	G1	20,6	CL	CCD, CG-EM
F2	G2	90,4	CL	CCD, CG-EM
F3-F4	G3	163,2	CL	CCD, CG-EM
F5	G5	85,9	CL	CCD, CG-EM
F6-F10	G6	300,9	CL, Lav. e rec. (hexano)	CCD, CG-EM
F11-F16	G11	340,2	CL, Lav. e rec. (hexano)	CCD, CG-EM
F17-F18	G17	134,7	CL, Lav. e rec. (hexano)	CCD, CG-EM
F19	G19	6,7	CL, Lav. e rec. (hexano)	CCD, CG-EM
F20-F21	G21	112,3	CL, Lav. e rec. (hexano)	CCD, CG-EM
F22-F23	G22	141,7	NE	CCD
F24-F27	G24	358,7	Coluna flash	CCD
F28-F35	G28	1200,1	NE	CCD
F36-F37	G36	181,6	NE	CCD
F38-F41	G38	224,6	NE	CCD
F42-F45	G42	120,7	NE	CCD
F46-F49	G46	351,2	NE	CCD
F50-F53	G50	164,0	NE	CCD

Tabela 6. Agrupamento das frações obtidas por CL (C-3) do extrato ECMA de folhas de *M. acanthophylla,* procedimentos de purificação e métodos de análises.

Legenda: Lav.: lavagem; Rec.: recristalização; NE: não estudado, reservado para análise posterior.

3.10 Isolamento dos constituintes químicos da fração metanólica do extrato ECMA

Grupo G1 e G2 de C-3: os materiais se apresentaram na forma pastosa e viscosa, apresentando coloração amarelo-esverdeado. As amostras foram analisadas por CG-EM, que permitiu identificar uma mistura de hidrocarbonetos.

Grupo G5 e G3 de C-3: os materiais obtidos nesses grupos se apresentaram na forma pastosa e viscosa, apresentando coloração amarelo-esverdeado. As amostras foram analisadas por CG-EM. O material analisado foi posteriormente identificado como sendo o ester graxo hexadecanoato de etila.

Grupo G6 de C-3: os materiais obtidos nesses grupos se apresentaram na pastosa e viscosa, coloração amarelo-esverdeado. As amostras foram purificadas através do processo de recristalização com hexano, apresentando um sólido transparentes em formato de cristais brilhantes transparentes. Não foi realizado o ponto de fusão do solido SG6-C3 devido massa insuficiente. O solido foi submetido a análise por CG-EM. O solido analisado foi identificado como uma mistura de éster graxo hexadecanoato de etila e α -tocoferol.

Grupo G11, G17, G19 e G21 de C-3: estes grupos se apresentaram na pastosa e viscosa, com coloração amarelo-esverdeado. As amostras foram purificadas através do processo de recristalização com hexano, apresentando um sólido transparentes em formato de cristais brilhantes transparentes. Os sólidos foram submetidos ao teste de Lierbermann-Buchard que apresentou resultado positivo. De acordo com o perfil CCD todos esses sólidos foram reunidos e analisado por CG-EM. A análise por CG-EM permitiu identificar como sendo uma mistura de friedelina e friedelanol.

Grupo G24 de C-3: desse grupo foi obtido um material pastoso. Cerca de 0,3g foi submetido a uma purificação através de uma coluna *flash* (C3-1), empacotada com sílica gel 60 (230-400 mesh), utilizando sistema de eluição por gradiente de polaridade utilizando clorofórmio:acetato de etila, nas proporções de [9:1]; [1:1]; [7:3], respectivamente. Foram coletadas 94 frações e o agrupamento das frações foram realizadas de acordo com perfil CCD. Após agrupamento foram obtidos doze grupos e seus métodos de análises, como mostrado na Tabela 7.

Frações	Grupo	Massa (mg)	Procedimentos de fracionamento e purificação	Métodos de análises
F1-F5	G1	8,2	CL	CCD, CG-EM
F6	G6	12,6	CL	CCD, CG-EM
F7	G7	10,2	CL	CCD, CG-EM
F8	G8	15,0	CL	CCD, CG-EM
F9-F10	G9	9,1	CL, Lav. e rec. (hexano)	CCD, CG-EM
F11-F12	G11	5,8	CL, Lav. e rec. (hexano)	CCD, CG-EM
F13	G13	4,0	CL, Lav. e rec. (hexano)	CCD, CG-EM
F14-F15	G14	134,1	NE	CCD

Tabela 7. Agrupamento das frações obtidas por coluna flash (C3-1) do extrato ECMA de folhas de *M. acanthophylla*, procedimentos de purificação e métodos de análises.

Continuação da Tabela 7					
F16-F17	G16	25,3	NE	CCD	
F18-F20	G18	18,4	NE	CCD	
F21-F23	G21	9,8	NE	CCD	
F24-F94	G24	55,0	NE	CCD	

Legenda: Lav.: lavagem; Rec.: recristalização; NE: não estudado, reservado para análise posterior.

As amostras G9, G11 e G13, após recristalização com hexano forneceram cristais transparentes na forma de agulha. Os constituintes químicos identificados por CG-EM da coluna *flash* do grupo G24 estão listados na Tabela 8.

Grupos	Substâncias identificadas por CG-EM	Massa (mg)
G1	Mistura de hidrocarbonetos e friedelanol	2,2
G6	Mistura de hidrocarbonetos e friedelanol	2,6
G7	Éster graxo octadeca-9,12-noato de metila	4,2
G8	Éster graxo octadeca-9,12-noato de metila	5,0
G9	Éster graxo octadeca-9,12-noato de metila	1,1
G11	Éster graxo octadeca-9,12-noato de metila	1,8
G13	Éster graxo octadeca-9,12-noato de metila	1,0

 Tabela 8. Resumo das substâncias isoladas da coluna flash do G24 (C3-1).

3.11 Fracionamento do extrato acetato de etila de *Maytenus acanthophylla* – EAEMA

Obtendo-se o perfil cromatográfico por CCD do extrato EAEMA, 15 g desse extrato foi aplicado à CL (C-4), de sílica gel 60 (70-230 Mesh) (300 g) empacotada em tubo de vidro de diâmetro interno (ø) de 5,5 cm, e eluída com hexano e clorofórmio, em gradiente de polaridade (Tabela 9). Desta coluna, foram coletadas 63 frações de 80 mL cada.

Sistema eluente	Frações
CHCl ₃ : Hexano [1:1]	F1 a F15
CHCl3: Hexano [7:3]	F16 a F24
CHCl ₃ : Hexano [9:1]	F25 a F34
CHCl ₃ 100%	F35 a F41
CHCl ₃ :EtOAc[9:1]	F42 a F51
CHCI3 :EtOAc [7:3]	F52 a F61
CHCl ₃ :EtOAc [1:1]	F62 a F63

Tabela 9. Fracionamento do extrato EAEMA por CL (C-4).

Aproximadamente 32 % foi o rendimento das frações obtidas pela CL de C-4. As frações que apresentaram sólidos (G1, G26, G33, G37 e G47) foram filtrados e recristalizados com o solvente hexano. Os agrupamentos das frações coletadas em C-4 foram conforme os perfis em CCD, reveladas com vanilina perclórica. Após agrupamento foram obtidos dezoito grupos e seus métodos de análises, como mostrado na Tabela 10. Identificou-se os constituintes químicos através de técnicas cromatográficas CCD e CG-EM.

Frações	Grupo	Massa (mg)	Procedimentos de fracionamento e purificação	Métodos de análises
F1-F2	G1	52,4	CL, Lav. e rec. (hexano)	CCD, CG-EM
F3	G3	3,6	CL	CCD, CG-EM
F4-F8	G4	8,8	CL	CCD, CG-EM
F9	G9	2,0	CL	CCD, CG-EM
F10	G10	11,2	CL	CCD, CG-EM
F11-F15	G11	163,7	CL	CCD, CG-EM
F16-F20	G16	175,3	CL	CCD, CG-EM
F21-F23	G22	49,0	NE	CCD
F24-F25	G24	11,2	NE	CCD
F26-F32	G26	119,3	CL, Lav. e rec. (hexano)	CCD, CG-EM
F33-F36	G33	70,7	CL, Lav. e rec. (hexano)	CCD, CG-EM

Tabela 10. Agrupamento das frações obtidas por CL (C-4) do extrato EAEMA de folhas de *M. acanthophylla*, procedimentos de purificação e métodos de análises.

Continuação	da Tabela	10		
F37-F46	G37	149,2	CL, Lav. e rec. (hexano)	CCD, CG-EM
F47-F48	G47	18,4	CL, Lav. e rec. (hexano)	CCD, CG-EM
F49-F50	G49	471,4	NE	CCD
F51-F56	G51	832,6	NE	CCD
F57	G57	202,6	CL	CCD, CG-EM
F58-F59	G58	361,7	NE	CCD
F60-F63	G60	341,8	NE	CCD

Legenda: Lav.: lavagem; Rec.: recristalização; NE: não estudado, reservado para análise posterior.

Os constituintes químicos identificados no fracionamento do EAEMA estão listados na Tabela 11.

Grupos	Substâncias identificadas por CG-EM	Massa (mg)
SG1, G1	Mistura de hidrocarbonetos	50,0
G3	Mistura de hidrocarbonetos	1,6
G4	Esqualeno	5,8
G9	Esqualeno	1,0
G10	Esqualeno	8,2
G11	Éster graxo tridecanoato de etila, éster graxo octadeca- 9,12,15-trienoato de etila e fitol	143,7
G16	Éster graxo tridecanoato de etila, éster graxo octadeca- 9,12,15-trienoato de etila e fitol	105,3
G22	Éster graxo tridecanoato de etila, éster graxo octadeca- 9,12,15-trienoato de etila, fitol, vitamina E, friedelanol	39,0
G24	Éster graxo tridecanoato de etila, éster graxo octadeca- 9,12,15-trienoato de etila, fitol, vitamina E, friedelanol	7,2
SG26	Friedelanol	2,0
SG33	Friedelanol	2,0
SG37	Friedelanol	2,0
SG47	Não identificado	2,5
F57	Mistura de hidrocarbonetos e friedelinol	1,9

 Tabela 11. Resumo das substâncias isoladas da CL (C-4) do EACMA.

3.12 Identificação preliminar de flavonoides glicosídicos no extrato aquoso de *Maytenus acanthophylla* – EAMA

A fração solúvel do extrato EAMA em etanol (95%) foi utilizado para injeção no aparelho CLAE/EM-ESI, modo analítico, afim de se obter o perfil químico do extrato aquoso das folhas de *Maytenus acanthophylla*.

3.13 Fracionamento do extrato aquoso de Maytenus acanthophylla – EAMA

Foi preparada uma coluna liquida filtrante (C-5) com uma alíquota do extrato EAMA utilizando como fase estacionária, sílica gel 60 (70-230 mesh) empacotada em tubo de vidro de diâmetro interno de 5,5 cm, com objetivo de obter filtrados em gradiente de polaridade. Para a coluna C-5 foi utilizado 90 g de EAMA, eluída com misturas de clorofórmio e metanol em gradiente de polaridade (Tabela 12), onde utilizou-se 700 mL de cada sistema de eluente. Foram coletadas 49 frações, sendo cada uma foi coletada no volume de 80 mL.

Sistema eluente	Frações
CHCI ₃ 100%	F1 a F2
CHCl ₃ : MeOH [8:2]	F3 a F9
CHCI3: MeOH [6:4]	F10 a F17
CHCl3: MeOH [5:5]	F18 a F24
CHCl ₃ :MeOH [2:8]	F25 a F31
MeOH 100%	F32 a F49

Tabela 12. Fracionamento do extrato EAMA por coluna filtrante (C-5).

Quando utilizado o evaporador rotatório para redução do solvente, as frações F34 a F49 formaram sólidos, os quais foram filtrados e recristalizados com o solvente metanol. Estes sólidos apresentaram coloração amarelo-amarronzado e foram submetidos a análise por ponto de fusão e CCD. As análises indicaram que todos os sólidos se tratavam de uma única substância. O material chamado de G48 foi analisado por IV e identificado como sendo o dulcitol.

As frações coletadas no fracionamento da coluna C-5 foram agrupadas (Tabela 13) de acordo com o perfil CCD, sendo que as respectivas cromatoplacas foram reveladas com NP-PEG 400 sob luz UV (254 e 365 nm).

Frações	Grupos	Códigos	Massa (mg)
F1 a F2	G2	EQMAG2	700,0
F4 a F16	G3	EAQMAG3	3094,0
F17 a F20	G4	EAQMAG4	1060,0
F21 a F28	G5	EAQMAG5	950,0
F29	G6	EAQMAG6	785,0
F30 a F32	G7	EAQMAG7	2109,0
F33	G8	EAQMAG8	659,0
F34 a F35	G9	EAQMAG9	999,0
F36 a F47	G10	EAQMAG10	2987,0

Tabela 13. Agrupamento das frações obtidas de C-5 conforme perfil CCD.

Cada agrupamento da coluna C-5 foi submetido a um fracionamento por cromatografia liquida de média pressão (CLMP) com detector (UV-Vis) ajustado em 254 e 350 nm, coletas de frações em modo preparativo no sistema. Posteriormente as amostras que obtiveram melhores absorções nos comprimentos de onda ajustado foram selecionadas para realização do processo de purificação realizado por MPLC (Tabela 14). As frações obtidas foram agrupadas de acordo com os respectivos espectros no UV-Vis registrado no aparelho e em seguida concentradas no evaporador rotatório, congeladas em N₂ liquido e liofilizadas em seguida. As amostras liofilizadas foram encaminhadas para análises de RMN unidimensionais e bidimensionais de ¹H e de ¹³C.

Grupos da coluna filtrante	Frações CLMP	Massa (mg)
EAQMA G3	G6, G7 e G8	190,0
EAQMA G4	G7, G8 e G9	263,0
EAQMA G5	G6, G7 e G8	204,0
EAQMA G6	G3 e G4	50,0
EAQMA G7	G2, G3 e G4	748,0
EAQMA G8	G7 e G8	65,0
EAQMA G9	G6, G7	220,0
EAQMA G10	G3	337,0

Tabela 14. Grupos submetidos ao processo de purificação por CLMP do EAMA.

Amostras que apresentaram espectros de RMN de ¹H com grau de pureza aceitável foram encaminhados para experimentos completo de RMN-2D e assim tornar possível a identificação e elucidação estrutural dos compostos isolados. Os constituintes químicos do EAMA foram identificados e elucidados pelas técnicas espectroscópicas e técnicas cromatográficas, e análise das características físico-químicas.

Neste estudo do extrato aquoso foram relatadas dois compostos isolados e o perfil químico do extrato aquoso. Com relação as outras amostras, elas serão utilizadas para estudos posteriores.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Estudo fitoquímico do extrato hexânico de Maytenus acanthophylla – EHMA

Mistura de n-alcanos

A mistura de *n*-alcanos alifáticos e insaturados foi obtida do grupo G1-C1 do extrato EHMA, em forma de cristais agulhas, transparente e incolor, com faixa de fusão entre 56-59 °C. A identificação por CG-EM foi realizada através da comparação entre os respectivos cromatogramas de uma amostra de G1-C1 e de padrões de hidrocarbonetos (Figura 5). Conclui-se que essa mistura se trata de HC's de cadeias longas acima de C₃₂, compostas possivelmente por ramificações, devido os tempos de retenção elevados.



Figura 5. Comparação dos cromatogramas de íons totais (TIC) do padrão de hidrocarbonetos com a amostra G1-C1. Condições: Coluna SPBtm5, capilar, 30 m x 0,25 mm de diâmetro interno, filme de 0,25 µm dimetilpolisiloxano (95%), e fenila (5%) SHIMADZU. Temperaturas: coluna: Inicial a 40 °C, final até 290 °C por 15 min, a uma taxa de 3 °C/min. Detector e injetor operaram a 280 °C.

Na análise do espectro de RMN ¹H (Figura 6) foi mostrado que as moléculas possuem cadeias abertas longas e alifáticas, podendo apresentar ramificações. Ligações duplas de H em sinal $\delta_{\rm H}$ 5,86 (dd, J=17.42,) indica a ocorrência de compostos com duplas em posição *trans.* A região de sinais de hidrogênio $\delta_{\rm H}$ 1,26 ppm indica presença de hidrogênios metilênicos a uma ligação dupla. Também foi analisado o RMN ¹³C e o DEPT-135 mostrando presença de grupos grupo metinicos, metílicos e metilênicos.



Figura 6. Espectro de RMN ¹H e expansão da região de hidrogênios de ligações duplas (CDCl₃, 400 MHZ).

Esqualeno

O esqualeno foi obtido do grupo G2, G3, G7 e G11 de C1 do extrato EHMA. Esse constituinte apresentou-se como óleo amarelo-alaranjado e viscoso. No cromatograma por CG-EM da amostra mais pura G3-C1 o pico em T_R: 37,99 min foi atribuído ao esqualeno (Figura 7). Foi identificado por comparação do espectro experimental com o banco de dados NIST 14 com boa similaridade (94%). O espectro de massas do pico detectado, mostrou íons fragmentos em *m*/*z* 410 (traços) atribuído ao íon radical-molecular ([M⁺⁺]); *m*/*z* 69 (pico base), *m*/*z* 41 (48%) e *m*/*z* 81 (57%). Estes íons coincidiram com os dados da literatura relatados por Barrero e colaboradores (2005) e assim, confirmam as identidades das amostras G2, G3, G7 e G11 de C1 como sendo 2,6,10,15,19,23-hexametil-(6E,10E,14E,18E)-tetracosa-2,6,10,18,22-hexaeno.



Figura 7. Cromatograma de íons totais (TIC) obtido por CG-EM do esqualeno isolado. Condições: Condições: Coluna SPBtm5, capilar, 30 m x 0,25 mm de diâmetro interno, filme de 0,25 µm dimetilpolisiloxano (95%), e fenila (5%) SHIMADZU. Temperaturas: coluna: Inicial a 100 °C, final até 285 °C por 1 min, a uma taxa de 5 °C/min. Detector e injetor operaram a 290 °C.

Os espectros de RMN de ¹H e ¹³C uni e bidimensionais foram analisados, confirmando que o composto isolado é o esqualeno. As atribuições foram realizadas através de comparação entre os valores de δ obtidos no espectro de RMN ¹³C da amostra G3-C1 com o da literatura (BARRERO et al., 2005) (Tabela 15). A correlação de Pearson entre os valores comparados foi R²=0,9994, indica uma ótima correlação entre os valores.

δ de ¹³ C					
Carbono	δ	Lit.			
27 e 30	16,66	16,1			
28 e 29	16,76	16,1			
24 e 26	17,17	17,8			
1 e 25	23,41	25,8			
8 e 17	27,49	26,7			
4 e 21	27,49	26,8			
12 e 13	28,9	28,3			

Tabela 15. Análise de comparação entre os valores de δ_c obtidos no espectro de RMN ¹³C da amostra G3-C1 com valores relatados para o esqualeno.

Continuação da Tabela 15						
5 e 20	40,01	39,8				
9 e 16	39,11	39,8				
7 e 18	125,02	124,3				
3 e 22	125,02	124,4				
11 e 14	125,02	124,5				
2 e 23	135,62	131,3				
10 e 15	135,62	135				
6 e 19	135,62	135,2				

O esqualeno possui 30 átomos de carbonos, porém, por ser uma molécula simétrica, apresentou 15 sinais no seu espectro de RMN ¹³C (Figura 8).



Figura 8. Espectro de RMN ¹³C (CDCl₃, 400 MHz) da amostra G3-C1.

Mistura de esqualeno, éster graxo hexadecanoato de etila e éster graxo octadeca-9,12,15-trienoato de etila

Essa mistura foi obtida da fração G10-C1 do EHMA. A característica da amostra apresentou-se como um material oleoso de coloração amarelo-alaranjado. No cromatograma CG-EM de G10-C1 (Figura 9), o pico 1 foi atribuído ao éster graxo hexadecanoato de etila T_R : 23,54 min, com excelente similaridade (96%) pela biblioteca NIST 14. O espectro de massas apresentou os íons fragmentos em *m/z* 284

(15%) atribuído ao íon radical-molecular ($[M^{+*}]$); *m/z* 88 (pico base) (100%), *m/z* 101 (50%) e *m/z* 43 (45%). No mesmo cromatograma, o pico 2 foi atribuído ao éster graxo octadeca-9,12,15-trienoato de etila T_R: 26,92 min, com boa similaridade (90%) pela biblioteca NIST 14. O espectro de massas apresentou os íons fragmentos em *m/z* 306 (traços) atribuído ao íon radical-molecular ($[M^{++}]$); *m/z* 79 (pico base) (100%), *m/z* 67 (90%), *m/z* 41 (92%), *m/z* 55 (90%) e *m/z* 95 (88%). Na Figura 9, o pico 3 foi atribuído ao esqualeno identificado com boa similaridade (90%), T_R: 37,75 min e o EM já foi descrito acima. Estes íons coincidiram com os dados da literatura disponíveis no NIST WebBook. O éster graxo hexadecanoato de etila e o éster graxo octadeca-9,12,15-trienoato de etila são relatos inéditos na espécie *Maytenus acanthophylla*.



Figura 9 Cromatograma de íons totais (TIC) obtido por CG-EM de G10-C1. Condições: Coluna SPBtm5, capilar, 30 m x 0,25 mm de diâmetro interno, filme de 0,25 µm dimetilpolisiloxano (95%), e fenila (5%) SHIMADZU. Temperaturas: coluna: Inicial a 100 °C, final até 285 °C por 1 min, a uma taxa de 5 °C/min. Detector e injetor operaram a 290 °C.

Vitamina E

A vitamina E foi obtida no grupo G61 de C1-1 do extrato EHMA. Esse constituinte foi apresentado como óleo amarelo claro e viscoso. No cromatograma CG-EM de G61-C1 o pico T_R: 43,43 min foi atribuído ao α -tocoferol (Figura 10). Apresentou excelente similaridade (97%) pela biblioteca do aparelho NIST 14. O espectro de massas (Figura 11) apresentou os íons fragmentos em *m/z* 430 (100%) atribuído ao íon radical-molecular ([M⁺⁺]); *m/z* 165 (pico base) (93%), *m/z* 205 (20%) e *m/z* 164 (15%). Na Figura 12 consta a proposta de fragmentação da molécula montada através do EM. Segundo Cordeiro e colaboradores (1999) o α -tocoferol foi identificado no extrato acetato de etila das plantas *Maytenus ilicifolia* e *Maytenus aquifolium*. A

identificação foi realizada por CG-EM, utilizando uma coluna de metilpolisiloxano, apresentando um pico com tempo de retenção T_R: 42,42 min. Na espécie *M. acanthophylla* a vitamina E conhecida como α -tocoferol é inédita sua descrição neste trabalho.



Figura 10. Cromatograma de íons totais (TIC) obtido por CG-EM de G61-C1, mostrando a eluição do α -tocoferol em T_R=43,43 min. Condições: Coluna SPBtm5, capilar, 30 m x 0,25 mm de diâmetro interno, filme de 0,25 µm dimetilpolisiloxano (95%), e fenila (5%) SHIMADZU. Temperaturas: coluna: Inicial a 100 °C, final até 285 °C por 5 min, a uma taxa de 5 °C/min. Detector e injetor operaram a 290 °C.



Figura 11. EM referente ao pico em T_R: 43,43 min do TIC de G61-C1.



Figura 12. Proposta de fragmentação do α-tocoferol por espectrometria de massas utilizando ionização por impacto eletrônico (EM-IE). **Legenda:** (I) setas com linhas cheias; (II) setas com linhas tracejadas.

<u>β-friedelinol</u>

O β-friedelinol foi obtida do grupo G4, G6 e G14 de C-1 do EHMA. No grupo A faixa de temperatura média de fusão desses sólidos foi obtida entre 269±4°C, valor compatível por se situar entre os valores relatados na literatura (MIRANDA, 2007). Esse constituinte apresentou-se como óleo amarelo claro e viscoso. No cromatograma de CG-EM (Figura 13) o pico apresentou T_R: 40,45 min, excelente similaridade (95%) pela biblioteca do aparelho NIST 14. O espectro de massas mostrou íons fragmentos: m/z 428 (45%) atribuído ao íon radical-molecular ([M⁺⁺]); m/z 69 (pico base), m/z 95 (97%) e m/z 123 (60%).



Figura 13. Cromatograma de íons totais (TIC) obtido por CG-EM de G4-C1. Condições: Condições: Coluna SPBtm5, capilar, 30 m x 0,25 mm de diâmetro interno, filme de 0,25 µm dimetilpolisiloxano (95%), e fenila (5%) SHIMADZU. Temperaturas: coluna: Inicial a 100 °C, final até 285 °C por 1 min, a uma taxa de 5 °C/min. Detector e injetor operaram a 290 °C.

A análise dos espectros de RMN 1D e 2D de uma amostra do do grupo G4-C1 confirmaram que o composto isolado em G4-C1 foi o TTPC β -friedelinol. Foram realizadas atribuições através de comparação entre os valores de δ obtidos no espectro de RMN ¹³C de G4-C1 com o da literatura de Oliveira (2012) (Tabela 16). A correlação de Pearson entre os valores comparados foi R²=0,9998, indica correlação excelente, confirmando que foi isolado o β -friedelinol.

	δ de ¹³ C	;		δ de ¹³ 0	;
Carbono	δ	Lit.	Carbono	δ	Lit.
1	15,82	15,81	16	35,46	35,58
2	35,86	36,10	17	29,76	30,04
3	71,57	72,77	18	42,59	42,85
4	49,27	49,20	19	35,09	35,21
5	37,77	37,85	20	27,92	28,19
6	41,66	41,75	21	32,59	32,84
7	17,39	17,56	22	39,03	39,30
8	52,99	53,22	23	11,71	11,62
9	36,89	37,12	24	16,26	16,40
10	61,32	61,38	25	18,07	18,26

Tabela 16. Análise de comparação entre os valores de δ_C obtidos no espectro de RMN ¹³C com valores relatados para o β -friedelinol.

Continuação da Tabela 16						
11	35,37	35,36	26	19,88	20,13	
12	30,42	30,65	27	18,43	18,65	
13	39,42	39,70	28	31,86	32,10	
14	38,12	38,39	29	34,78	35,03	
15	32,08	32,35	30	31,59	31,80	

Lupeol



O lupeol foi isolado no grupo G5-C1 do EHMA. Este constituinte foi isolado como um sólido branco e pegajoso, com faixa de fusão entre $172\pm5^{\circ}$ C. A análise do cromatograma de ions totais (TIC) e os espectros CG-EM permitiram identificar a substância isolada como sendo o TTPC lupeol (Figura 14). O pico relativo a G5-C1 foi observado no TIC no tempo de retenção (T_R: 40,59 min), boa similaridade (90%) confirmada pela biblioteca NIST 14 e o espectro de massas correspondente apresentou os seguintes íons fragmentos em *m*/*z* 426 (18%) atribuído ao íon radical-molecular ([M⁺⁺]); *m*/*z* 95 (pico base), *m*/*z* 135 (90%), *m*/*z* 121 (92%), *m*/*z* 107 (95%), *m*/*z* 81 (90%) e *m*/*z* 55 (77%). Os valores quando comparados com o banco de dados NIST WebBook confirmam com base nos dados discutidos acima podemos concluir a identidade do lupeol. O composto isolado se trata do TTPC lup-20(29)-en-3β-ol (Lupeol), já relatado na literatura em diversos estudos e na espécie *M. acanthophylla*.



Figura 14. Cromatograma de íons totais (TIC) obtido por CG-EM de G5-C1. Condições: Condições: Coluna SPBtm5, capilar, 30 m x 0,25 mm de diâmetro interno, filme de 0,25 µm dimetilpolisiloxano (95%), e fenila (5%) SHIMADZU. Temperaturas: coluna: Inicial a 100 °C, final até 285 °C por 1 min, a uma taxa de 5 °C/min. Detector e injetor operaram a 290 °C.

Os espectros de RMN ¹H e ¹³C uni e bidimensionais confirmaram que o composto isolado é o TTPC lupeol. Foram realizadas atribuições através de comparação entre os valores de δ obtidos no espectro de RMN ¹³C com o da literatura (Tabela 17). A correlação de Pearson entre os valores comparados foi R²=1, indica excelente correlação linear confirmando o composto isolado lup-20(29)-en-3β-ol.

δ de ¹³ C		δ de ¹³ C
arbono δ Lit.	Carbono	δ
1 38,6 38,73	16	35,35
2 27,21 27,43	17	42,74
3 78,32 79,01	18	48,08
4 38,72 38,87	19	47,73
5 55,17 55,32	20	150,62
6 18,13 18,33	21	29,61
7 34,09 34,30	22	39,75
8 40,61 40,85	23	27,86
9 50,23 50,46	24	15,29
10 36,94 37,19	25	15,88
11 20,69 20,95	26	15,74

Tabela 17. Análise de comparação entre os valores de δ_C obtidos no espectro de RMN ¹³C com valores relatados para o lupeol.

Continuaçã	o da Tabela 17	7				
12	24,94	25,17		27	14,3	14,56
13	37,83	38,07		28	17,76	18,01
14	42,57	42,85		29	109,09	109,32
15	27,24	27,46	_	30	19,07	19,32

O lupeol possui 30 átomos de carbonos, destes sete carbonos são sinais de grupos metilas, seis metinos, onze metilenos e seis sinais de carbonos não hidrogenados como mostrado no espectro de RMN ¹³C (Figura 15).



Figura 15. Ampliação do espectro de RMN ¹³C de G5-C1 (CDCl₃, 400 MHz).

<u>Éster graxo hexadecanoato de etila e éster graxo octadeca-9,12,15-trienoato de etila</u>

Essa mistura foi obtida do grupo G9-C1 do EHMA. A característica da amostra se apresentou como um óleo viscoso amarelado. Estes constituintes já foram identificados na amostra G10-C1, e sua descrição já foi realizada. O cromatograma de CG-EM da amostra G9-C1 apresentou boa similaridade (94%) para ambos os compostos identificados em mistura.

4.2 Estudo fitoquímico do extrato clorofórmico de *Maytenus acanthophylla* - ECMA

<u>Esqualeno</u>

Uma parte adicional de esqualeno foi isolada na 2ª fração hexânica do extrato ECMA. A descrição da identificação do esqualeno foi citada no estudo fitoquímico do extrato EHMA.

Gutta-percha



O polímero foi obtido da fração clorofórmica do extrato ECMA. O material branco-amarelado tinha característica de goma e elástico. Esse constituinte foi identificado através espectroscopia na região do infravermelho (Figura 16). Verificouse no espectro a presença de bandas características de hidrocarboneto alifático com insaturações, podendo-se destacar as bandas de absorção em 1669 cm⁻¹ (°C=C), ^δCH₃ (1381 cm⁻¹), °CH₂ (882 cm⁻¹) e °CH₃ e CH₂ (3000 cm⁻¹ – 2800 cm⁻¹). A banda em ^δ801 cm⁻¹ deve estar relacionada com deformações angulares fora do plano de ligações C-H em alquenos (SILVERSTEIN et al., 2000).

Ao comparar os dados de infravermelho com aqueles descritos na literatura (de OLIVEIRA et al., 2006), foi possível identificar o polímero como sendo o 1,4-transpoliisopreno, um polímero natural, chamado de *gutta-percha*, de ocorrência comum em espécies do gênero *Maytenus*.



Figura 16. Espectro de Infravermelho do polímero gutta-percha isolado do ECMA.

Mistura de hidrocarbonetos

A mistura de hidrocarbonetos foi isolada do grupo G1, G2 de C3 do ECMA. Apresentou um aspecto pastoso amarelo alaranjado, após a retirada por precipitação com acetona da *gutta-percha*.

A identificação por CG-EM (Figura 17) foi possível pela comparação dos índices de retenção calculados para coluna capilar OV-5, composta de metilpolixilosano em 5% de fenila, a partir dos tempos de retenção obtidos no cromatograma dos grupos G1- C3 e os do padrão de hidrocarbonetos (Tabela 18), contendo os *n*-alcanos de cadeia entre C_{15} a C_{32} . A mistura de hidrocarbonetos de cadeia longa mais abundantes foram C_{16} (20,6%) e C_{18} (9,1%). A identificação foi também confirmada com a biblioteca do NIST 14.



Figura 17. Comparação dos cromatogramas de íons totais (TIC) do padrão de hidrocarbonetos com a amostra G1-C3. Condições: Coluna SPBtm5, capilar, 30 m x 0,25 mm de diâmetro interno, filme de 0,25 µm dimetilpolisiloxano (95%), e fenila (5%) SHIMADZU. Temperaturas: coluna: Inicial a 40 °C, final até 290 °C por 15 min, a uma taxa de 3 °C/min. Detector e injetor operaram a 280 °C.

G1C3				Pac	drões HCs		
Pico	T _R (min.)	IC	Area pico %	Pico	Cn	T _R (min.)	
1	4.853	1500	2,40	1	C ₁₅	4.843	
2	6.229	1600	20,62	2	C ₁₆	6.218	
4	7.911	1700	1,96	4	C ₁₇	7.907	
6	9.512	1800	9,14	6	C ₁₈	9.675	
-	-	-	-	7	C ₁₉	11.265	
8	13.066	2000	5,77	8	C ₂₀	13.049	
9	14.828	2100	5,88	9	C ₂₁	14.814	
10	16.559	2200	5,74	10	C ₂₂	16.540	
11	18.239	2300	3,05	11	C ₂₃	18.218	
				12	C ₂₄	19.843	
				13	C ₂₅	21.415	
				14	C ₂₆	22.931	
				15	C ₂₇	24.398	
				16	C ₂₈	25.816	

Tabela 18. Dados do cromatograma obtido por CG-EM de G1C3 e de padrões hidrocarbonetos (HCs) - C₁₅ a C₃₂.

Continuação da Tabela 18					
	17	C ₂₉	27.186	2900	
	18	C ₃₀	28.514	3000	
	19	C ₃₁	29.799	3100	
	20	C ₃₂	31.132	3200	
	-				_

Éster graxo hexadecanoato de etila

O material foi isolado como um solido pastoso amarelado foi isolado do grupo G5, G3 de C3 do ECMA. O cromatograma de íons totais (TIC) (Figura 18) mostrou o pico 1 (T_R :12,98 min). A análise do espectro de massas (Figura) associado ao pico 1 (T_R :12,98 min) mostrou os seguintes íons fragmentos: m/z 284 atribuído ao íon radical-molecular ([M^{++}]); m/z 88 (pico base) atribuído ao rearranjo de MCLafferty envolvendo a carbonila de um éster etílico graxo; m/z 101 ([M - 183]⁺) associado a perda de um grupo metila e doze grupos metilenos e em m/z 239 fragmento atribuído a perda do grupo etoxila ([M-45]⁺⁺). As fragmentações observadas foram relatadas anteriormente na literatura e isso confirma que a amostra se trata de um éster graxo hexadecanoato de etila ($C_{18}H_{36}O_2$). Não foi encontrado relatos de isolamento e identificação deste composto na espécie *Maytenus acanthophylla*.





Figura 18. 1A: Cromatograma de íons totais (TIC) obtido por CG-EM (coluna capilar OV-5) da G5-C3 do extrato ECMA. 1B: Espectro de massas referente ao pico em TR: 12,98 min do TIC. Condições: Coluna SPBtm5, capilar, 30 m x 0,25 mm de diâmetro interno, filme de 0,25 µm dimetilpolisiloxano (95%), e fenila (5%) SHIMADZU. Temperaturas: coluna: Inicial a 100 °C, final até 285 °C por 1 min, a uma taxa de 5 °C/min. Detector e injetor operaram a 290 °C.

<u>Éster graxo hexadecanoato de etila e α-tocoferol</u>

O solido chamado SG6-C3 foi obtido do grupo G6-C3 do ECMA. Este solido apresentou cristais transparentes e brilhantes obtidos após de processo de recristalização por hexano. A análise do TIC do solido SG6-C3 por CG-EM permitiu identificar o éster graxo hexadecanoato de etila ($C_{18}H_{36}O_2$), apresentando $T_R=12,97$ min, com excelente similaridade espectral (97%) na biblioteca NIST 14 e o α -tocoferol ($C_{29}H_{50}O_2$) $T_R=30.38$ min, com similaridade espectral de 94% na biblioteca NIST 14. Ambos já foram descritos no extrato EHMA.

Mistura de friedelina e friedelanol

Essa mistura foi obtida do grupo *G11, G17, G21*, *G19 de C-3* do ECMA. Esta mistura apresentou na forma de cristais transparentes e brilhantes obtido por recristalização com hexano. A análise do cromatograma TIC (Figura 19) permitiu identificar a substância friedelan-3-one conhecida como friedelina ($C_{30}H_{50}O$) com pico 1 em T_R=37.67 min, boa similaridade espectral (92%) pela biblioteca NIST 14. O espectro de massas da friedelina apresentou os íons fragmentos em *m/z* 426 (40%) atribuído ao íon radical-molecular ([M⁺⁺]); *m/z* 69 (pico base), *m/z* 109 (90%), *m/z* 125 (80%), *m/z* 81 (60%), *m/z* 205 (40%) e *m/z* 273 (35%), estes íons fragmentos foram confirmados no estudo por Igoli e Gray (2008). A análise do TIC pico 2 também permitiu identificar a substância friedelanol (C₃₀H₅₂O) T_R=39.05 min, boa similaridade

espectral (90%) pela biblioteca NIST 14. Ambos já foram identificados e isolados na espécie *Maytenus acanthophylla* no estudo de Oliveira (2012).



Figura 19. Cromatograma de íons totais (TIC) obtido por CG-EM de G11-C3. Condições: Coluna SPBtm5, capilar, 30 m x 0,25 mm de diâmetro interno, filme de 0,25 µm dimetilpolisiloxano (95%), e fenila (5%) SHIMADZU. Temperaturas: coluna: Inicial a 190 °C, final até 290 °C por 5 min, a uma taxa de 5 °C/min. Detector e injetor operaram a 280 °C. Legenda: Pico 1: friedelina; Pico 2: friedelinol.

Mistura de hidrocarbonetos e friedelanol

Essa mistura foi obtida do grupo G1, G6 da coluna *flash* de C-3 do extrato ECMA. A análise por CG-EM foi identificado uma mistura de hidrocarbonetos de C₁₅ a C₃₂ e friedelanol T_R=38.92 min, boa similaridade espectral (90%) pela biblioteca NIST 14. Ambos já foram descritos no extrato EHMA.

Éster graxo octadeca-9,12-noato de metila

Essa mistura foi obtida do grupo G9, SG11, G7, G8, G13 da coluna *flash* C-3 do extrato ECMA. A análise do CG-EM (Figura 20) permitiu identificar o éster graxo octadeca-9,12-noato de metila (C₁₉H₃₄O₂) em T_{R=}14,99 min, apresentou boa similaridade espectral (92%) pela biblioteca do aparelho NIST 14. Os íons fragmentos do EM foram: m/z 294 (traços) atribuído ao íon radical-molecular ([M⁺⁺]); m/z 67 (pico base) (100%), m/z 41 (88%), m/z 55 (94%) e m/z 81 (90%), coincidem com os dados do NIST WebBook. Não foi encontrado relatos de isolamento e identificação deste composto na espécie *Maytenus acanthophylla*, sendo assim considerado inédito na espécie.



Figura 20. Cromatograma de íons totais (TIC) obtido por CG-EM de G9-C3. Condições: Coluna SPBtm5, capilar, 30 m x 0,25 mm de diâmetro interno, filme de 0,25 µm dimetilpolisiloxano (95%), e fenila (5%) SHIMADZU. Temperaturas: coluna: Inicial a 150 °C, final até 295 °C por 5 min, a uma taxa de 5 °C/min. Detector e injetor operaram a 290 °C.

4.3 Estudo fitoquímico do extrato acetato de etila de Maytenus acanthophylla - EAEMA

Mistura de hidrocarbonetos

Essa mistura foi obtida do grupo G1, G3 de C4 do extrato EAEMA. A descrição dos hidrocarbonetos foi realizada no extrato ECMA e EHMA.

Esqualeno

O esqualeno foi obtida do grupo G4, G9, G10 de C4 do EAEMA. A descrição deste constituinte foi realizada no extrato EHMA.



<u>Éster graxo tridecanoato de etila (1), éster graxo octadeca-9,12,15-trienoato de</u> etila (2) e fitol (3)

Essa mistura foi obtida do grupo G11, G16 de C4 do extrato EAEMA. Os constituintes foram identificados através da biblioteca NIST 14, disponível no CG-EM. A análise do cromatograma (Figura 21) mostrou que o pico 1 apresentou T_R=16,32 min, identificado com boa similaridade (91%) foi atribuído ao éster graxo tridecanoato de etila e os íons fragmentos do EM foram: m/z 242 (traços) atribuído ao íon radical-molecular ([M⁺⁺]); m/z 88 (pico base) (100%), m/z 43 (55%), m/z 101 (50%), coincidem com os dados do NIST WebBook. No mesmo cromatograma o pico 2 apresentou T_R=19,75 min, identificado com boa similaridade (90%) foi atribuído ao éster graxo octadeca-9,12,15-trienoato de etila. Na Figura 17, o pico 3 apresentou T_R=20,69 min, identificado com boa similaridade espectral (90%) foi atribuído ao fitol e os íons fragmentos do EM foram: m/z 296 (traços) atribuído ao íon radical-molecular ([M⁺⁺]); m/z 71 (pico base) (100%), m/z 43 (90%), m/z 57 (70%), coincidem com os dados do NIST WebBook. Não foi encontrado relatos de isolamento e identificação do fitol na espécie *Maytenus acanthophylla*, sendo assim considerado inédito na espécie.



Figura 21. Cromatograma de íons totais (TIC) obtido por CG-EM de G11-C4. Condições: Coluna SPBtm5, capilar, 30 m x 0,25 mm de diâmetro interno, filme de 0,25 µm dimetilpolisiloxano (95%), e fenila (5%) SHIMADZU. Temperaturas: coluna: Inicial a 150 °C, final até 295 °C por 5 min, a uma taxa de 5 °C/min. Detector e injetor operaram a 290 °C.

<u>Éster graxo tridecanoato de etila (1), éster graxo octadeca-9,12,15-trienoato de</u> etila (2), fitol (3), α-tocoferol (4) e friedelanol (5)

Essa mistura foi obtida do grupo G22, G24 de C4 do EAEMA. Os constituintes foram identificados através da biblioteca NIST 14, disponível no CG-EM. A análise do cromatograma (TIC) (Figura 22) apresentou o pico 1 com T_R=16,28 min, identificado com excelente similaridade (97%) atribuído ao éster graxo tridecanoato de etila. No mesmo cromatograma o pico 2 apresentou T_R=19,68 min, identificado com boa similaridade (90%) atribuído ao éster graxo octadeca-9,12,15-trienoato de etila. Na Figura 18, o pico 3 apresentou T_R=20,57 min, identificado com boa similaridade (90%) atribuído ao fitol. Na mesma Figura 18, o pico 4 apresentou T_R=34,90 min, identificado excelente similaridade (96%) atribuída ao α -tocoferol. O pico 5 apresentou T_R=42,78 min, identificado com boa similaridade (90%) atribuído ao fitol.



Figura 22. Cromatograma de íons totais (TIC) obtido por CG-EM de G22-C4. Condições: Condições: Coluna SPBtm5, capilar, 30 m x 0,25 mm de diâmetro interno, filme de 0,25 µm dimetilpolisiloxano

(95%), e fenila (5%) SHIMADZU. Temperaturas: coluna: Inicial a 100 °C, final até 285 °C por 1 min, a uma taxa de 5 °C/min. Detector e injetor operaram a 290 °C.

Mistura de hidrocarbonetos e Friedelanol

As substâncias friedelanol e a mistura de hidrocarbonetos foi obtido da fração de grupo SG26, SG33, SG37 de C-4 do extrato EAEMA. A análise do cromatograma por CG-EM apresentou um pico em T_R 42,78 min, com boa similaridade (90%) pela biblioteca NIST 14. A mistura de hidrocarbonetos foi comparada com o padrão de nalcanos de C₁₅ a C₃₂, como já descrito no extrato EHMA.

4.4 Estudo fitoquímico do extrato aquoso de Maytenus acanthophylla – EAMA

O extrato aquoso de folhas de *M. acanthophylla* foi preparado com o objetivo de obter um produto de composição química similar a dos chás que são utilizados na medicina popular também obtidos por decocção. Para que a caracterização química validasse o uso na medicina popular.

O perfil cromatográfico do EAMA foi obtido por CCD (Figura 23), com a presença de manchas amarelas fluorescentes na luz UV (λ 365 nm). O que indicou o extrato ser rico em flavonoides, podendo esses compostos estarem na forma livre ou glicosilados.



Figura 23. Fotografia da cromatoplaca CCD em sílicagel 60G, eluente: acetato de etila : metanol : agua acidulada (8:8:1), revelador: NP-PEG seguida de visualização na câmara de UV-Vis em 365 nm.

Os solidos apresentados nas frações do extrato EAMA (1° fracionamento) foram reunidas de acordo com o perfil CCD e análises de ponto de fusão. Este solido agrupado (G48) se apresentou como um solido amorfo amarronzado e pouco solúvel em metanol. O espectro de G48 na região do IV (Figura 24) mostrou bandas características de composto polihidroxilado, podendo-se destacar uma faixa entre

3200-3420 cm⁻¹ atribuída a deformação axial de ligação O-H de polióis, mostra também bandas de absorção em 2940 cm⁻¹ e 1403 cm⁻¹ relacionadas a estiramentos de ligações C-H em grupos CH e CH₂ (^vC-H). A banda em 1592 cm⁻¹ foi atribuída a vibrações H-OH em ligações de hidrogênios e as bandas entre 1031-1098 cm⁻¹ foram atribuídas a deformações angular de ligações C-O de álcool. O composto trata-se de um açúcar de cadeia simples chamado dulcitol (galactitol).



Figura 24. Espectro de absorção na região do IV (ATR)

A estrutura do dulcitol foi confirmada pelo RMN de ¹³C e DEPT-135. Ambos mostraram três sinais devido a simetria da molécula. O espectro de RMN DEPT-135 mostrou 2 sinais de grupos metinicos e 1 sinal de grupo metilênico. Como a estrutura da molécula é simétrica os três sinais de RMN apresentados corroboram a informação sobre a estrutura química do composto isolado (Figura 25). Os mesmos sinais de RMN foram relatados por de Oliveira (2012) e Miranda (2007).



Figura 25. Ampliação do espectro de RMN ¹³C e DEPT-135 (CD₃OD, 400MHz) do dulcitol.

4.5 Identificação preliminar dos constituintes químicos do extrato EAMA

O cromatograma (Figura 26) obtido por CLAE da fração solúvel em etanol (95%) do EAMA, em escala analítica, apresentou 5 picos majoritários relacionados a flavonoides glicosilados. Na Tabela 19 está descrito os possíveis flavonoides glicosídicos 1, 2, 3, 4 e 5 que foram identificados por LC-MS nas frações PG7G1, 5G8, PG7G3, 8G9 e 9G4 do extrato EAMA.

Pico	Amostra	T (min)	m/z	Flavonoides identificados	Método
1	PG7G1	7,70 - 8,10	887	Tretraglicosídeo de quercetina ^a	RMN 1D e 2D e CL- EM
2	5G9	8,94 - 9,25	871	Tretraglicosídeo de canferol ^b	RMN 1D e CL-EM
3	PG7G3	9,41 - 9,72	901	Tetraglicosídeo de metil- quercetina ^a	RMN 1D e 2D e CL- EM
4	8G9	14,46-14,79	742	Triglicosídeo de canferol ^b	RMN 1D e CL-EM
5	9G4	15,94-16,27	787	Triglicosídeo de quercetinab	RMN 1D e CL-EM

Tabela 19. Constituintes químicos do extrato EAMA identificados por RMN e CL-EM.

Legenda: ^(a)Compostos elucidados completamente como sendo 3-O-{[α -L-ramnopiranosil(1 \rightarrow 6)]-O-[β -D-xilopiranosil(1 \rightarrow 3)-O- α -L-ramnopiranosil(1 \rightarrow 2)]}- β -D-galactopiranosideo de quercetina, 3-O-{[α -L-ramnopiranosil(1 \rightarrow 6)]-O-[β -D-xilopiranosil(1 \rightarrow 3)-O- α -L-ramnopiranosil-(1 \rightarrow 2)]}- β -D-galactopiranosideo de isoramnetina, respectivamente; ^(b)Compostos elucidados parcialmente por identificação da genina (RMN 1D) e da constituição genérica da cadeia glicosídica (CL-EM).



Figura 26. Cromatograma obtido por CLAE/EM-ESI, modo negativo, da fração solúvel em etanol (95%) do extrato aquoso de folhas de *M. acanthophylla* (EAMA). Foi utilizado um espectrômetro de massas modelo LCQ Advantage, Thermo-Finnigan (San Jose, CA, USA).

4.6 Flavonoides glicosilados isolados do extrato EAMA

Os dados de RMN das frações mostraram que duas frações estavam em grau de pureza para possibilitar a elucidação estrutural de seus constituintes. Foram isolados dois compostos flavônicos tetra-glicosilados que já foram relatados na literatura, mas que ambos foram relatados no extrato hidrometanólico. O espectro do UV (Figura 27) das frações PG7G1 e PG7G3 isoladas no EAMA, mostraram bandas de absorções máximas na região do UV-Vis do anel A e B característicos de flavonóis, como quercetina e metil-quercetina.

As análises dos sinais de RMN 1D permitiram identificar as geninas dos glicosídeos constituintes das amostras 5G8, 8G9 e 9G4, como mostrado na Tabela 19. As análises dos dados de CLAE-EM possibilitaram identificar a constituição da cadeia glicosídica.



Figura 27. Espectro de absorção nas concentrações de 100µg/mL PG7G1 e PG7G3 obtido por varredura na região do UV na faixa de comprimento de onda de 200-600 nm.

<u>Composto isolado 1:</u> 3-O-{[α -L-ramnopiranosil(1 \rightarrow 6)]-O-[β -D-xilopiranosil(1 \rightarrow 3)-O- α -L-ramnopiranosil(1 \rightarrow 2)]}- β -D-galactopiranosídeo de quercetina (**PG7G1**)


O composto PG7G1 foi isolado como um sólido amarelo-amarronzado e cristalizado (32,4 mg), obtido do extrato aquoso das folhas de *M. acanthophylla*, sendo um composto inédito na espécie e no gênero estudado. Ele foi isolado pela primeira vez no extrato em metanol-água (1:1) das folhas de *M. acanthophylla* por de Oliveira (2012).

O espectro de absorção do UV (Figura 27), mostrou duas bandas com picos de absorção máxima em λ_{max} 366 e 257 nm, corrobora a presença de um flavonoide do tipo flavonol, dados estes confirmados por Agrawal e Jain (1992).

Os dados de RMN (Tabela 20) referentes a aglicona e os glicosídeos foram comparados aos valores relatados por de Oliveira (2012). No espectro de RMN de ¹H (Figura 28) observaram-se dois sinais de dupletos de hidrogênios aromáticos *meta*-acoplados em δ 6,26 (d, J=2,0) e em δ 6,46 (d, J=2,0), correspondentes aos H-6 e H-8 da aglicona. Os hidrogênios H-2', H-5' e H-6' foram atribuídos aos sinais em δ 7,71 (d, J=2,0), δ 6,94 (d, J=8,5), δ 7,68 (d, J=8,6), respectivamente. Também foram observados os sinais dos quatro hidrogênios anoméricos em **1**) δ 5,68 (d, J=7,8), **2**) δ 5,22 (d, J=1,6), **3**) δ 4,53 (br, d, J=1,6), **4**) δ 4,52 (m). Esses hidrogênios anoméricos foram observados no mapa de contornos HSQC (Figura 29) de PG7G1, fazendo correlações com os sinais de carbonos em **1**) δ 101,12, **2**) δ 102,29, **3**) δ 101,92, **4**) δ 106,94. As correlações do HSQC mostraram dois dupletos acoplados em δ 0,97 (d, J=6,0) e δ 1,20 (d, J=6,0) correlacionando com os carbonos δ 18,1 e δ 18,65 que foram atribuídos aos hidrogênios das ramnoses (H-6''' e H-6''''), respectivamente.

H-n	1H	Literatura	NOESY
		Genina	
H-6	6,26 (d, J=2,0)	6,19 (d, J=2,0)	
H-8	6,46 (d, J=2,0)	6,37 (d, J=2,0)	
H-2'	7,71 (d, J=2,0)	7,71 (d, J=2,0)	H-5'
H-5'	6,94 (d, J=8,5)	6,88 (d, J=8,5)	H-6'
H-6'	7,68 (d, J=8,6)	7,57 (d, J=8,5; 2,0)	H-5'
		Os dais Olia se filia s	
3-Gal		Cadela Glicosidica	
5-Gai	5 60 (d I_7 0)	5 62 (d 1-7 9)	Ц ?''' Ц Б'' Ц ?''
□-1 □ 2"	3,00 (U, J=7,0)	3,02 (u, $J=7,0$)	п-3,п-3,п-3
⊡-2 ⊔ 2''	3,97 (uu, $J=9,3,7,0$)	3,97 (uu, $J=9,5,7,0$)	[]-1
H-3 H-∕/''	3,75 (III) 3,81 (d. 1–3,0)	3,74 (III) 3,81 (dl 1–3,0)	
11-4 H_5''	3,01 (0, 3-3,0)	3,61 (ul, $3=3,0$) 3,66 (tl. $1-6,5$)	
H-6-2"	3,09 (III) 3,47 (m)	3,00 (ii, $3-0,3$) 3,47 (m)	Н_Б'''
H-6-6"	3,47 (III) 3,75 (m)	3,47 (III) 3.75 (m)	H_60"
(2-1)Pam	5,75 (III)	5,75 (III)	11-04
(∠ - <i>1)</i> /(an) H_1'''	5 22 (d. l-1 6)	5 23 (d. 1-1 5)	H-2" H-2" H-3" H-4""
H-2'''	3,22 (d, $3-1,0$) 15 (dd $1-30$ 15)	3,23 (d, $3-1,3)$	H-3"' H-1"'
H-3‴	3.94 (br. dd. $1-9.5$; 3.0)	3.94 (dd, $J=9.0, 1, 0$)	H-2'''
H-4'''	3 51 (m)	3,52 (m)	112
H-5'''	4.09 (br dd $I-9.6.60$)	4 12 (m)	H-6'''
H-6'''	0.97 (d. l=6.0)	0.97 (d. l=6.0)	H-4''' H-3''' H-5'''
(6-1)Ram	0,01 (d, 0-0,0)	0,01 (0,0-0,0)	
H-1'''	4.53 (br. d. J=1.6)	4.54 (d. J=1.5)	H-2'''', H-6a''/b''
H-2'''	3.57 (dd. J=3.5: 1.5)	3.58 (dd. J=3.5; 1.5)	H-1"". H-4""
H-3''''	3.51 (dd, J=4.6; 2.7)	3.51 (m)	H-6''''
H-4''''	3,27 (d, J=3,9)	3,27 (m)	H-6''''
H-5''''	3,54 (d, J=2,4)	3,53 (m)	H-6''''
H-6''''	1,20 (d, J=6,1)	1,18 (d, J=6,0)	H-4'''', H-5''''
(3-1)Xil			
H-1""	4,52 (m)	4,52 (d, J=7,5)	H-3''''', H-5a''''', H-4''''', H-3'''
H-2'''''	3,29 (m)	3,29 (m)	H-5b''''
H-3'''''	3,35 (br. d, J=8,6)	3,35 (t, J=9,0)	H-1''''
H-4''''	3,52 (m)	3,52 (m)	H-5b''''
H-5a'''''	3,26 (m)	3,26 (m)	H-5b''''', H-1'''''
H-5b'''''	3,89 (m)	3,89 (m)	H-4''''', H-5a'''''

Tabela 20. Comparação dos valores atribuídos de δ ¹H de PG7G1 com os valores relatados por de Oliveira (2012).



Figura 28. Espectro de RMN ¹H (CD₃OD, 400 MHZ) e expansão dos dupletos aromáticos de PG7G1.



Figura 29. Seção de mapa de contornos HSQC de PG7G1, referente aos hidrogênios e carbonos anoméricos (CD₃OD, 400MHz) (F1: δ de DEPT-135 96,0-125,0 x F2: δ de ¹H 4,50-8,0).

No espectro de ¹³C (Tabela 21) foi observado também os sinais dos carbonos anoméricos, e um sinal em δ 179,17 atribuído ao carbono carbonílico. Além, dos sinais em δ 105,9, δ 158,32 atribuídos aos carbonos cabeça de ponte, C-10 e C-9 da aglicona. Ainda, na Tabela 21 que também referencia o DEPT-135 foi observado dois sinais de carbonos metilênicos em δ 67,22 e δ 67,12, correspondente ao C-6" que une duas cadeias glicosídicas e C-5"" referente a uma pentose, respectivamente.

C-n	13C	Literatura	НМВС		
Genina					
2	158,34	158,64	H-2', H-6'		
3	134,75	134,72	H-1"		
4	179,17	179,42	-		
5	163,11	163,24	H-6		
6	99,83	99,8	H-8		
7	165,91	165,71	H-6, H-8		
8	94,97	94,66	H-6		
9	158,32	158,44	H-8		
10	105,9	106	H-6, H-8		
1'	123,38	123,36	H-2', H-6'		
2'	117,57	117,49	H-6'		
3'	146,13	145,9	H-2', H-5'		
4'	149,82	149,73	H-2', H-5', H-6'		
5'	116,57	116,21	-		
6'	123,28	123,11	H-2', H-5'		
	Cá	adeia glicosídica			
3-Gal	13C	Literatura	НМВС		
1"	101,12	101,35	H-2''		
2''	77,14	77,25	H-3", H-4"		
3''	75,61	75,74	H-2", H-4"		
4''	70,7	70,95	H-5''		
5''	75,32	75,37	H-6a''		
6''	67,22	67,18	H-5''		
(2-1)Ram					
1'''	102,29	102,25	H-2''		
2'''	71,98	72,13	-		
3'''	82,93	82,59	H-1''', H-2''', H-4''', H-1'''''		
4'''	72,83	73,02	-		
5'''	69,62	69,69	-		
6'''	18,1	17,52	H-4'''		
(6-1)Ram					
1''''	101,92	101,96	H-6a''		
2''''	72,16	72,16	H-3''''		
3''''	72,35	72,35	H-1'''', H-2'''', H-4''''		
4''''	73,86	73,94	-		
5''''	69,88	69,79	H-1'''', H-4'''', H-6''''		
6''''	18,65	18,01	H-4''''		
(3-1)Xil					
1''''	106,94	106,66	H-3''', H-2''''', H-5a'''''		
2'''''	75,46	75,42	H-3''''', H-4'''''		
3'''''	77,74	77,71	H-4''''', H-5a''''', H-5b'''''		
4'''''	71,2	71,2	H-3''''', H-5a'''''		
5'''''	67,12	67,07	-		

Tabela 21. Comparação dos valores atribuídos de δ ¹³C de PG7G1 com os valores relatados por de Oliveira (2012).

Conforme mapa de contornos HMBC (Figura 30) de PG7G1 mostrou como a aglicona e a cadeia glicosídica estão ligadas e como as cadeias glicosídicas estão ligadas entre si, bem como a confirmação da própria aglicona do tipo quercetina. A correlação em δ 123,28 (C-6') com os hidrogênios H-2' e H-5', permitiu confirmar a elucidação do anel B do flavanol. A ligação da quercetina entre a galactose foi atribuída ao sinal em δ 5,68 (d, J=7,8) correlacionado com o sinal δ 134,75 (C-3). O sinal em δ 4,52 (m) (H-1"") correlacionado ao sinal em δ 82,93 (C-3""), permitiu atribuir a ligação glicosídica entre uma xilose e uma ramnose.



Figura 30. Seção do mapa de contornos HMBC de PG7G1, relativos as ligações glicosídicas (CD₃OD, 400MHz) (F1: δ de ¹³C 65,0-200,0 x F2: δ de ¹H 0,90-8,5).

No mapa de contornos NOESY de PG7G1 apresentou informações importantes sobre a estereoquímica da aglicona e das cadeias glicosídicas. Os hidrogênios da quercetina H-2', H-5' e H-6' mostraram sinais de correlações entre si (Figura 31). Os sinais de hidrogênios anoméricos e suas correlações foram apresentados na Figura 32. A correlação do sinal em δ 5,68 com δ 5,22 mostra que a posição do hidrogênio H-1''' da raminose interna é axial. O hidrogênio (H-1''') da ramnose interna apresentou correlações entre os hidrogênios (H-5b'''',H-2'''') da xilose e também com os hidrogênios (H-5'', H-6a'') da galactose. A xilose apresentou que o hidrogênio (H-1'''') teve correlação com o hidrogênio (H-5b''''') dela mesma. Essas correlações descritas

acima foram as quais se apresentaram diferentes da descrita por de Oliveira (2012), mostrando uma estereoquimica inédita nesta mesma molécula.



Figura 31. Seção do mapa de contornos NOESY de PG7G1, relativos as posições espaciais dos hidrogênios da aglicona (CD₃OD, 400MHz) (F1: δ de ¹H 6,0-8,0 x F2: δ de ¹H 7,0-8,0).



Figura 32. Seção do mapa de contornos NOESY de PG7G1, relativos as posições espaciais dos hidrogênios glicosídicos (CD₃OD, 400MHz) (F1: δ de ¹H 4,5-5,5 x F2: δ de ¹H 4,5-6,0).

<u>Composto isolado 2</u>: 3-O-{[α -L-ramnopiranosil(1 \rightarrow 6)]-O-[β -D-xilopiranosil(1 \rightarrow 3)-O- α -L-ramnopiranosil-(1 \rightarrow 2)]}- β -D-galactopiranosídeo de isoramnetina (PG7G3).



O composto PG7G3 é um composto inédito na espécie e no gênero *Maytenus*, foi isolado como um sólido amarelo amarronzado e cristalizado (28,7 mg), obtido do extrato aquoso das folhas de *M. acanthophylla*. A proposta da estrutura deste flavonoide tetra-glicosilado foi identificada pela primeira vez do extrato em metanolágua (1:1) das folhas de *M. acanthophylla* por de Oliveira (2012), porém os valores de atribuição do RMN ¹H e ¹³C relatou alguns dados indeterminados. A atribuição completa e inequívoca está sendo apresentada neste trabalho.

O espectro de absorção do UV (Figura 27), mostrou duas bandas com picos de absorção máxima em λ_{max} 364 e 252 nm, corrobora a presença de um flavonoide do tipo flavonol, dados estes confirmados por Agrawal e Jain (1992).

O composto PG7G3 tem a sequência da cadeia glicosídica semelhante ao composto PG7G1, comprovado na análise dos dados de RMN. Os dados de RMN (Tabela 22) referentes a aglicona foram comparados por Semmar (2002) que trata de um flavonoide glicosídico análogo 3-O- β -D-apiofuranosil-(1 \rightarrow 2)-[α -L-ramnopiranosil-

 $(1\rightarrow 6)$]- β -D-galactopiranosídeo de isoramnetina. Porém, as correlações das unidades sacarídeas foram comparados aos valores relatados por Bedir (2000) relacionados a molécula 3-O-[β -D-xilopiranosil(1 \rightarrow 3)-O- α -L-ramnopiranosil(1 \rightarrow 6)][α -Lramnopiranosil-(1 \rightarrow 2)]}- β -D-galactopiranosídeo de canferol.

Diante do espectro de RMN de ¹H (Figura 33) observaram-se dois sinais de dupletos de hidrogênios aromáticos em δ 6,28 (d, J=1,5) e em δ 6,49 (d, J=1,5), correspondentes aos H-6 e H-8 do anel A da aglicona. Os sinais em δ 8,14 (d, J=1,5), δ 6,97 (m), δ 7,60 (dd, J=8,5; 2,0) foram atribuídos aos hidrogênios H-2', H-5' e H-6', respectivamente. Um sinal importante em δ 4,04 (s) foi atribuído ao grupo metoxila que determinou a aglicona ser do tipo metilquercetina, entretanto a posição em que esse grupo está ligado foi observado no mapa de contorno HMBC e no COSY. Sinais observados dos quatro hidrogênios anoméricos apresentaram-se em **1**) δ 5,80 (d, J=7,8), **2**) δ 5.17 (sl), **3**) δ 4,57 (m), **4**) δ 4,52 (br. d, J=7,3). A observação desses hidrogênios anoméricos no mapa de contornos HSQC (Figura 34) de PG7G3, mostraram correlações com os sinais de carbonos em **1**) δ 101,22, **2**) δ 101,81, **3**) δ 101,46, **4**) δ 106,32. Sinais de dois dupletos acoplados em δ 0,89 (d, J=6,3) e δ 1,20 (d, J=6,7) correlaciona-se com os carbonos δ 17,38 e δ 18,06, atribuídos aos hidrogênios das ramnoses (H-6''' e H-6'''').

H-n	1H	Literatura	COSY		
Genina					
H-6	6,28 (d, J=1,5)	6,22 (d, J=1,5)	H-8		
H-8	6,49 (d, J=1,5)	6,43 (d, J=1,5)	H-6		
H-2'	8,14 (d, J=1,5)	8,00 (d, J=1,5)	H-5', H-6'		
H-5'	6,97 (m)	6,93 (d, J=7,5)	H-2', H-6'		
H-6'	7,60 (dd, J=8,5; 2,0)	7,61 (dd, J=7,5; 1,5)	H-2', H-5'		
OCH3	4,04 (s)	4,00 (s)	H-2'		
	Cadeia (Glicosídica			
3-Gal					
H-1"	5,80 (d, J=7,8)	5,57 (d, J=7,8)			
H-2''	3,90 (br. dd, J=9,4; 7,8)	3,93 (dd, J=9,4; 7,8)			
H-3''	3,71 (br. dd, J=9,4, 3,5)	3,71 (dd, J=9,4; 3,0)	H-4''		
H-4''	3,75 (m)	3,76 (dd, J=3,6; 1,0)	H-2''		
H-5''	3,57 (m)	3,66 (m)			
H-6a''	3,50 (m)	3,50 (t, J=12,2)	H-4''		
H-6b''	3,78 (m)	3,68 (m)	H-6a''		
(2-1)Ram					
H-1'''	5.17 (sl)	5,22 (d, J=1,4)			
H-2'''	3,81 (m)	3,80 (dd, J=3,3; 1,5)			
H-3'''	4,01 (m)	4,00 (m)			
H-4'''	3,50 (m)	3,35 (t, J=9,8)			
H-5'''	4,04 (m)	4,07 (dd, J=9,8; 6,2)	H-4'''		
H-6'''	0,89 (d, J=6,3)	0,99 (d, J=6,3)	H-5'''		
(6-1)Ram					
H-1'''	4,57 (m)	4,54 (d, J=2,0)			
H-2''''	3,74 (m)	3,72 (m)			
H-3""	3,52 (m)	3,55 (dd, J=9,4; 3,0)			
H-4''''	3,27 (m)	3,42 (t, J=9,4)	H-3'''		
H-5''''	3,55(m)	3,55 (dd, J=10,5; 6,7)			
H-6''''	1,20 (d, J=6,7)	1,16 (d, J=6,7)	H-5''''		
(3-1)Xil					
H-1''''	4,52 (br. d, J=7,3)	4,32 (d, J=7,3)			
H-2'''''	3,26 (m)	3,22 (m)			
H-3'''''	3,29 (m)	3,30 (t, J=8,6)			
H-4'''''	3,49 (br. dd, J=7,5; 3,1)	3,48 (dd, J=6,7; 2,7)	H-5b'''''		
H-5a'''''	3,28 (m)	3,00 (t, J=12,2)	H-5b'''''		
H-5b'''''	3,92 (m)	3,77 (dd, J=12,2; 5,4)	H-5a''''		

Tabela 22. Comparação dos valores atribuídos de δ ¹H de PG7G3 com os valores relatados por Semmar (2002) e Bedir (2000).



Figura 33. Espectro de RMN ¹H (CD₃OD, 400MHz) e expansão dos dupletos aromáticos de PG7G3.



Figura 34. Seção do mapa de contornos HSQC de PG7G3, referente aos hidrogênios e carbonos anoméricos (CD₃OD, 400MHz) (F1: δ de DEPT-135 20-130 x F2: δ de ¹H 1,0-8,5).

Na Tabela 23 referente ao espectro de ¹³C foi observado esses sinais dos carbonos anoméricos, e sinais em δ 105,63, δ 157,69 foram atribuídos aos carbonos cabeça de ponte, C-10 e C-9 da metilquercetina. O DEPT-135 (Tabela 23) apresentou

dois sinais de carbonos metilênicos em δ 77,04 e δ 66,85, relacionado ao C-6" que une uma galactose a uma ramnose e C-5"" característico de uma xilose, respectivamente.

C-n	13C	Literatura	НМВС
		Genina	
2	157,71	158,9	H-2', H-6'
3	131,74	135,5	H-1'', H-2'
4	178,75	179,5	
5	163,04	163	H-6
6	99,55	99,8	H-8
7	165,75	161,1	H-6, H-8
8	94,45	94,9	H-6
9	157,69	158,5	H-8
10	105,63	105,5	H-6, H-8
1'	122,55	123	H-2'
2'	114,31	114,6	H-6'
3'	147,88	148,4	H-2', H-5', OCH3
4'	150,35	150,9	H-2', H-5', H-6'
5'	115,86	116	
6'	122,73	123,8	H-2', H-5'
7' (OCH3)	56,75	57	
		Cadeia glicosídica	
3-Gal	13C	Literatura	НМВС
1''	101,22	101,35	H-2''
2"	77,04	77,25	H-3'', H-4''
3"	74,75	75,74	H-2'', H-4''
4''	70,61	70,95	H-5''
5''	74,82	75,37	H-6a''
6''	67,14	67,18	H-5''
(2-1)Ram			
1'''	101,81	102,25	H-2''
2'''	71,19	72,13	
3'''	82,75	82,59	H-1''', H-2''', H-4''', H-1''''
4'''	71,98	73,02	
5'''	69,19	69,79	H-1''', H-4''', H-6'''
6'''	17,38	17,52	H-4'''
(6-1)Ram			
1''''	101,46	101,96	H-6a''
2''''	71,44	72,16	H-3''''
3''''	71,66	72,35	H-1'''', H-2'''', H-4''''
4''''	73,14	73,94	
5''''	69,72	69,79	H-1'''', H-4'''', H-6''''
6''''	18,06	18,01	H-4''''
(3-1)Xil			
1''''	106,32	106,66	H-3''', H-2''''', H-5a'''''
2'''''	75,44	75,42	H-3''''', H-4'''''
3'''''	77,65	77,71	H-4''''', H-5a''''', H-5b'''''
4'''''	70,49	71,2	H-3''''
5'''''	66,85	67,07	

Tabela 23. Comparação dos valores atribuídos de δ ¹³C de PG7G3 com os valores relatados por Semmar (2002) e Bedir (2000).

O mapa de contornos HMBC (Figura 35) de PG7G3 mostrou a correlação em δ 122,73 (C-6') com os hidrogênios H-2' e H-5' que confirmou a estrutura do anel B da genina. O sinal em δ 147,88 (C-3') apresentou correlação com os hidrogênios do grupo metoxila δ 4,04 que confirma a aglicona ser metilquercetina. A ligação entre C-3 da metilquercetina e C-1" da galactose foi atribuída ao sinal em δ 5,80 (d, J=7,8) correlacionado com o sinal δ 131,74. Esse carbono C-3 também apresentou correlação com o H-2' da aglicona. O sinal em δ 4,52 (br. d, J=7,3) do H-1""" correlacionado ao sinal em δ 82,74 (C-3"") da ramnose, foi atribuído a ligação glicosídica.



Figura 35. Seção do mapa de contornos HMBC de PG7G3, relativo a confirmação da aglicona (CD₃OD, 400MHz) (F1: δ de ¹³C 140-155 x F2: δ de ¹H 3,90-4,20).

No mapa de contornos COSY (Figura 36) de PG7G3 reintera a informação que a posição do grupo metoxila é em C-3', visto que há uma correlação entre os hidrogênios da metoxila com o H-2'. As correlações dos sinais de hidrogênios H-6 e H-8 confirmam o arranjo do anel A.



Figura 36. Ampliação do mapa de contornos COSY de PG7G3, relativo a aglicona (CD₃OD, 400MHz) (F1: δ de ¹H 4-6,5 x F2: δ de ¹H 5,0-8,5).

CAPÍTULO 2

CAPITULO 2: ATIVIDADES FARMACOLÓGICAS DE EXTRATO E COMPOSTOS ISOLADOS DE *MAYTENUS ACANTHOPHYLLA*

5 PARTE EXPERIMENTAL

5.1 Bioensaio da atividade antimicrobiana

O ensaio foi realizado testando as amostras contra os seguintes micro-organismos:

- ✓ Candida albicans: ATCC 18804 (levedura)
- ✓ Staphylococcus aureus: ATCC 29212 (bactéria Gram-positiva)
- ✓ Bacillus cereus: ATCC 11778 (bactéria Gram-positiva)
- ✓ Escherichia. coli: ATCC 25922 (bactéria Gram-negativa)
- ✓ Citrobacter freundii: ATCC 8090 (bactéria Gram-negativa)

Inicialmente, preparou-se um pré-inóculo, no qual os micro-organismos foram transferidos a partir do meio de cultura onde estavam conservados para tubos de ensaios contendo 3,0 mL de meio de cultura (BHI para bactérias e Sabouraud para levedura). Em seguida, os tubos foram incubados em estufa a 37 °C por 36 h. Com o auxílio de uma micropipeta, 500 µL deste pré-inóculo foram transferidos para tubos de ensaio contendo água destilada estéril. Os tubos foram homogeneizados e a concentração ajustada a 600 nm (bactérias) e 530 nm, (levedura), até atingir uma transmitância entre 74-75% (bactérias) e 75-76% (levedura), correspondente à escala 0,5 de McFarland de turbidez padrão, ou seja, 10⁵ UFC/mL, obtendo-se assim, as suspenções dos inóculos utilizados no bioensaio.

Para o preparo da solução-trabalho as amostras foram previamente solubilizadas em dimetilsulfóxido (DMSO) na concentração de 12,5 mg/mL. A partir desta solução, retirou-se uma alíquota de 40 µL, a qual foi adicionada a 960 µL do meio de cultura utilizado no bioensaio, obtendo-se a solução de trabalho na concentração de 500 µg/mL.

Os bioensaios foram realizados em placas de 96 micropoços, em triplicata. No primeiro poço foram adicionados 200 µL da solução de trabalho na concentração de 500 µg/mL. Nos poços seguintes, adicionou-se 100 µL de meio de cultura por poço, em seguida, foi realizada a microdiluição seriada (1:1) da solução da amostra, desta

forma as concentrações variaram de 250 a 0,98 μg/mL. Em seguida, foram adicionados 100 μL do inóculo do micro-organismo padronizado em cada poço.

Utilizou-se quatro controles: controle de crescimento do micro-organismo (para verificar a viabilidade celular); o branco, que consiste na solução da amostra nas mesmas concentrações avaliadas, substituindo o inóculo por água destilada estéril; controle positivo (substitui-se a solução-trabalho por um antibiótico comercial) e o controle de esterilidade do meio de cultura, contendo 100 µL de meio de cultura e 100 µL de água destilada estéril. As microplacas foram incubadas em estufa a 37 °C e após 24 horas foi realizada a leitura em leitor de placas, a 490 nm.

Os fármacos utilizados para o controle de qualidade dos ensaios foram: ampicilina para bactérias e nistatina para levedura, cujas soluções de trabalho foram preparadas conforme descrito anteriormente para a as amostras testadas.

O percentual de inibição das amostras testadas foi calculado a partir da comparação das médias de absorção das amostras com o branco. Para o cálculo da concentração inibitória mediana (IC₅₀) induzida pelas substancias testadas que apresentaram percentagem de inibição maior do que 50% foi utilizado o *software* Origin 8.0.

5.2 Bioensaio da atividade inibitória da enzima acetilcolinesterase (ACHE)

O ensaio foi realizado em microplacas de 96 poços, aos quais foram adicionados 50 µL de tampão Tris-HCI (50 mM, pH 8,0), 125 µL de 5,5'-dithiobis (2nitrobenzoico) – DTNB (3 mM), 25 µL da solução da amostra (10mg/mL em DMSO) e 25 µL de iodeto de acetilcolina – ATCI (15 mM). DMSO foi utilizado como controle negativo e galantamina (10 mg/mL em DMSO) como controle positivo (inibidor padrão da enzima). A absorbância foi medida em 405 nm utilizando leitor de microplacas, com intervalos de 1 minuto por oito vezes. Após essas leituras foram adicionados aos poços 25 µL de solução da enzima acetilcolinesterase (0,22 U/mL em tampão). As absorbâncias foram medidas novamente com intervalos de 1 minuto por dez vezes a 405 nm. Os testes foram feitos em quintuplicata. Calculou-se a porcentagem de inibição através da comparação das absorbâncias das amostras com as absorbâncias do branco utilizando a fórmula a seguir: % de inibibição = 100 -

X 100

absorbância do controle negativo com enzima - absorbância do controle negativo sem enzima

A metodologia empregada foi a de Ellman (ELLMAN et al., 1961). Neste método, a acetiltiocolina é hidrolisada pela AChE, formando a tiocolina que reage com o DTNB, levando a formação do ânion 5-tio-2-nitrobenzoato (TNB), que apresenta coloração amarela.

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 Ensaios de atividades biológicas

As amostras utilizadas para o bioensaio da atividade antimicrobiana e o bioensaio da atividade da enzima acetilcolinesterase foram o extrato aquoso (EAMA) e as substâncias isoladas: triglicosídeo de canferol, triglicosídeo de quercetina e tetraglicosídeo de canferol. Os demais compostos isolados não foram testados devido a quantidade de massa insuficiente.

6.2 Avaliação da atividade antimicrobiana

Os resultados encontrados das amostras testadas para atividade antimicrobiana foram realizados na concentração de 250 µg/mL, os quais estão representados na Tabela 24. As amostras mais promissoras frente aos microorganismos testados foram o extrato (EAMA) e o composto isolado tetraglicosídeo de canferol. O extrato (EAMA) apresentou 60% de inibição contra *Staphylococcus aureus* e 67% de inibição contra *Bacillus cereus*. O tetraglicosídeo de canferol apresentou 72% de inibição contra o fungo *Candida albicans*.

Frente aos outros micro-organismos, as amostras testadas não mostraram atividade antimicrobiana significativa. O cálculo do IC₅₀ foi realizado apenas para as amostras que apresentaram percentagem de inibição maior do que 50%. O EAMA apresentou IC₅₀ 1,32 para *Staphylococcus aureus* e IC₅₀ 2,04 para *Bacillus cereus*. O 5G9 apresentou IC₅₀ 2,04 para *Candida albicans*.

A potencial atividade antimicrobiana apresentada pelo extrato (EAMA) pode-se inferir que foi seletiva, atuando somente nas bactérias gram-positivas, as quais possuem uma estrutura morfológica menos complexa em relação as bactérias gramnegativas. Porém, os compostos isolados não apresentaram atividades significativas contra as bactérias testadas.

Essa atividade apresentada pelo extrato (EAMA) em relação aos compostos isolados pode ser explicada através do sinergismo entre substancias. O EAMA possui uma complexidade de substancias que podem estar interagindo entre si, potencializando o efeito inibitório contra as bactérias gram-positivas, enquanto os compostos isolados são desprovidos desse mecanismo. Estudo recente aborda que o efeito sinérgico de substancias é importante para potencializar a atividade antimicrobiana de fármacos (WANG ET AL., 2018).

As amostras testadas são ricas em flavonoides e há relatos na literatura que compostos flavônicos do gênero *Maytenus* exibiram atividade antimicrobiana (SOUSA, 2016).

O composto tetraglicosídeo de canferol apresentou atividade contra o fungo *C. albicans,* quando comparado ao controle nistatina. Já os compostos triglicosídeo de canferol, triglicosídeo de quercetina e o extrato EAMA não apresentaram atividade significativa contra o fungo *C. albicans.*

	Micro-organismos				
Amostra	S. aureus	B. cereus	C. freundii	E. coli	C. albicans
8G9	18,97 ± 0,95	27,10 ± 1,88	2,34 ± 0,37	Não inibiu	58,76 ±9,80
9G4	24,12 ± 1,54	44,52 ± 3,87	0,40 ± 2,00	0,75 ± 2,63	46,81 ± 4,76
5G9	40,45 ± 2,84	28,07 ± 1,81	3,64 ± 2,01	Não inibiu	76,05 ± 3,26
Extrato (EAMA)	61,51 ± 0,92	71,38 ± 3,44	21,31 ± 1,99	28,66 ± 0,57	41,18 ± 7,56
Ampicilina	94,92 ± 0,84	94,45 ± 0,84	98,69 ± 0,19	99,00 ± 0,40	-
Nistatina	-	-	-	-	83,17 ± 2,42

Tabela 24. Percentagem de inibição das amostras testadas na concentração de 250 µg/mL frente a micro-organismos.

6.3 Avaliação da atividade da enzima acetilcolinesterase (AChE)

Na literatura é descrito que a inibição à AChE maior ou igual a 50% são considerados promissores e candidatos a futuros fracionamentos (Trevisan et al., 2003), porém as amostras testadas não apresentaram atividade significativa de inibição da enzima AChE (Tabela 25).

Tabela 25. Valores de percentagem de inibição da acetilcolinesterase

Amostra	5G9	9G4	8G9	Extrato (EAMA)	Eserina
Inibição (%)	35,29 ± 2,61	24,14 ± 1,48	16,31 ± 1,95	20,90 ± 0,25	96,12 ± 0,12
Coef. de variância	0,07	0,06	0,12	0,01	0,001

7 CONCLUSÃO

No estudo químico dos extratos EHMA, ECMA, EACMA foram identificados e isolados os seguintes compostos: hidrocarbonetos, os TTPCs lupeol, β -friedelinol e esqualeno, α -tocoferol, éster graxo hexadecanoato de etila, éster graxo octadeca-9,12,15-trienoato de etila, friedelan-3-one, éster graxo octadeca-9,12-noato de metila, éster graxo tridecanoato de etila, fitol, polímero gutta-percha. Os constituintes α -tocoferol, éster graxo hexadecanoato de etila, éster graxo octadeca-9,12,15-trienoato de etila, fitol, polímero gutta-percha. Os constituintes α -tocoferol, éster graxo hexadecanoato de etila, éster graxo octadeca-9,12,15-trienoato de etila, fitol, séter graxo octadeca-9,12,15-trienoato de etila, éster graxo octadeca-9,12,15-trienoato de etila, éster graxo octadeca-9,12,15-trienoato de etila, éster graxo tridecanoato de etila, fitol são inéditos na espécie de *Maytenus acanthophylla*.

No estudo químico dos extratos EAMA foram isolados e identificados os seguintes: o açúcar dulcitol, flavonoides tri e tetra glicosilados de genina identificadas como quercetina e canferol. Os flavonoides tetraglicosideos elucidados foram 3-O-{[α -L-ramnopiranosil(1 \rightarrow 6)]-O-[β -D-xilopiranosil(1 \rightarrow 3)-O- α -L-ramnopiranosil(1 \rightarrow 2)]}- β -D-galactopiranosídeo de quercetina e 3-O-{[α -L-ramnopiranosil(1 \rightarrow 6)]-O-[β -D-xilopiranosil-(1 \rightarrow 2)]}- β -D-galactopiranosídeo de quercetina e 3-O-{[α -L-ramnopiranosil(1 \rightarrow 6)]-O-[β -D-xilopiranosil-(1 \rightarrow 2)]}- β -D-galactopiranosídeo de quercetina e 3-O-{[α -L-ramnopiranosil(1 \rightarrow 6)]-O-[β -D-xilopiranosil-(1 \rightarrow 2)]}- β -D-galactopiranosídeo de quercetina e bidimensionais atribuídos completamente, inédito no gênero *Maytenus.*

Foi observado a prevalência de constituintes químicos alifáticos e triterpenos pentacíclicos nos extratos apolares e constituintes químicos da classe dos flavonoides ocorreu no extrato polar.

A potencial atividade antimicrobiana do extrato (EAMA) foi seletiva para bactérias gram-positivas, comparado aos compostos isolados que não apresentaram atividade significativa sobre as bactérias testadas. Possivelmente o mecanismo de ação do extrato apresentar essa atividade significativa se deve ao efeito de sinergismo entre as substâncias contidas no extrato. Portanto, o extrato EAMA é promissor na investigação de novos estudos sobre a atividade antimicrobiana frente a outras cepas de bactérias, podendo se tornar promissor um extrato padronizado de classe de metabolitos secundários com atividade terapêutica comprovada para a clínica. A amostra 5G9 testada frente ao fungo *Candida albicans* apresentou atividade significativa quando comparado ao controle nistatina.

Em relação a atividade da acetilcolinesterase as amostras 5G9, 9G4, 8G9 e o extrato EAMA não apresentaram atividade significativa de inibição da enzima AChE.

Neste estudo, concluímos que *Maytenus acanthophylla* é uma fonte rica de triterpenos pentacíclicos, flavonoides glicosídicos, além de outros constituintes tais como: dulcitol, ácidos graxos e seus ésteres, hidrocarbonetos de cadeia longa e álcoois como fitol que apresentam diversas atividades biológicas. O estudo realizado com suas folhas permitiu contribuir para o conhecimento da espécie e enriquecimento dos dados disponíveis para o gênero *Maytenus*.

- AGRAWAL, P. K.; JAIN, D. C. **13 C NMR spectroscopy of oleanane triterpenoids**. Elsevier: Oxford, Royaume-UNI, 1992; Vol. 24.
- BARRERO, A. F.; HERRADOR, M. M.; QUÍLEZ DEL MORAL, J. F.; ARTEAGA, P.; ARTEAGA, J. F.; PIEDRA, M.; SÁNCHEZ, E. M. Reductive Coupling of Terpenic Allylic Halides Catalyzed by Cp2TiCl: A Short and Efficient Asymmetric Synthesis of Onocerane Triterpenes. Organic Letters, 2005, 7, (12), 2301-2304.
- BEDIR, E.; CALIS, I.; PIACENTE, S.; PIZZA, C.; KHAN, I. A. A new flavonol glycoside from the aerial parts of Astragalus vulneraria. Chemical & Pharmaceutical Bulletin 2000, 48, (12), 1994-1995.
- CARVALHO-OKANO, R. Estudos taxonômicos do gênero *Maytenus* Mol. emend. Mol. (Celastraceae) do Brasil Extra-Amazônico. Tese de Doutorado, UNICAMP, Campinas, 1992.
- CHUNG, P. Y.; NAVARATNAM, P.; CHUNG, L. Y. Synergistic antimicrobial activity between pentacyclic triterpenoids and antibiotics against *Staphylococcus aureus* strains. An. Clin. Microbiol. Antimicrob., 10, p. 25-30, 2011.
- CORDEIRO, P.J.M.; VILEGAS, J.H.Y.; LANÇAS, F.M. HRGC-MS Analysis of Terpenoids from *Maytenus ilicifolia* and *Maytenus aquifolium* ("Espinheira Santa"). J. Braz. Chem. Soc., Vol. 10, No. 6, 523-526, 1999.
- DE OLIVEIRA, D. M.; Silva, G.; Duarte, L. P.; Vieira, S. A., Chemical constituents isolated from roots of *Maytenus acanthophylla* Reissek (Celastraceae). *Biochemical Systematics and Ecology*, 34, (8), 661-665, 2006.

- DE OLIVEIRA, D. M. Estudo químico, farmacológico e aplicação de métodos computacionais na elucidação estrutural de constituintes químicos de folhas de Maytenus acanthophylla REISSEK (CELASTRACEAE). Tese, UFMG, Belo Horizonte, MG, Brasil, 2012.
- DE OLIVEIRA, D. M.; MUSSEL, W. N.; DUARTE, L. P.; SILVA, G. D. F.; DUARTE, H. A.; GOMES, E. C. L. Combined experimental powder x-ray diffraction and DFT data to obtain the lowestenergy molecular conformation of friedelin. Quim. Nova, Vol. 35, No. 10, 1916-1921, 2012.
- DI STASI, L. C. Aspectos químicos e farmacológicos da espinheira-santa: uma análise da utilidade dos dados. In: REIS, M. S.; SILVA, S. R. (Org.). Conservação e uso sustentável de plantas medicinais e aromáticas: *Maytenus* spp., espinheira-santa. Brasília: Ibama. p. 67-92; 2004.
- FONSECA, A.P.N.D.; SILVA, G.D.F.; CARVALHO, J.J. *et al.* Estudo fitoquímico do decocto das folhas de *Maytenus truncata* Reissek e avaliação das atividades antinociceptiva, antiedematogênica e antiulcerogênica de extratos do decocto. Quím Nova, 30: 842-7; 2007.
- FRANÇA, I.S.X.; DE SOUZA, J.A.; BAPTISTA, R.S.; BRITTO, V.R.S. Medicina popular: benefícios e malefícios das plantas medicinais. Revista Brasileira de Enfermagem. 61(2):201, 2008.
- IBIAPINA, W.V.; LEITÃO, B.P.; BATISTA, M.M.; PINTO, D. S. Inserção da Fitoterapia na atenção primária aos usuários do SUS. Rev. Ciência Saúde Nova Esperança. Jun, 12(1): p.58-68, 2014.
- IGOLI, O.J.; GRAY, I. A. Friedelanone and other triterpenoids from Hymenocardia acida. International Journal of Physical Sciences Vol. 3 (6), pp. 156-158, June 2008.

- JOLY, C.A.; HADDAD, C.F.B.; VERDADE, L.M.; DE OLIVEIRA, M.C.; BOLZANI, V.S.; BERLINCK, R.G.S. **Diagnóstico da pesquisa em biodiversidade no Brasil.** Rev. USP, São Paulo, n. 89, maio 2011.
- LEWINSOHN, T. M.; PRADO, P. I. "How Many Species Are There in Brazil?". Conservation Biology 19, pp. 619-24, 2005.
- MATOS, F. J. A. Introdução à Fitoquímica Experimental. First ed. Editora da Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, p. 126, 1988.
- MACEDO, J.A.B. Plantas medicinais e fitoterápicos na atenção primária à saúde: contribuição para profissionais prescritores. Monografia: Rio de Janeiro, 2016.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Básica. Práticas integrativas e complementares: plantas medicinais e fitoterapia na Atenção Básica/Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Básica. Brasília: Ministério da Saúde, 2012. 156 p.(Série A. Normas e Manuais Técnicos) (Cadernos de Atenção Básica; n. 31).
- MIRANDA, R. R. S. Estudo fitoquímico e avaliação do potencial farmacêutico de Maytenus salicifolia Reissek (Celastraceae). Tese de Doutorado, Departamento de Química, UFMG, Belo Horizonte, MG, Brasil, 2007. 351 p.
- NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M.;. Natural Products as Sources of New Drugs from 1981 to 2014. J. Nat. Prod. 79, 629, 2016.
- NIERO, R.; FALONI, S. A.; CECHINEL-FILHO, V. A Review of the Ethnopharmacology, Phytochemistry and Pharmacology of Plants of the Maytenus Genus. Current Pharmaceutical Design, 17 (18) pp.1851-1871, 2011.

- PORTAL BRASIL. Uso de plantas medicinais e fitoterápicos sobe 161%. Governo do Brasil, 2016. Disponível em < http://www.brasil.gov.br/saude/201 6/06/uso-de-plantas-medicinais-efitoterapicos-sobe-161> Acesso em 17/01/2018.
- REYES, C. P.; NÚÑEZ, M. J.; JIMÉNEZ, I.A.; BUSSEROLLES, J.; ALCARAZ M. J.; BAZZOCCHI L. Activity of lupane triterpenoids from *Maytenus* species as inhibitors of nitric oxide and prostaglandin E2.Bioorg. Med. Chem. 14, p.1573-1579, 2006.
- ROSA, C. DA; CÂMARA, S. G.; BÉRIA, J. U. **Representações e intenção de uso da Fitoterapia na atenção básica à saúde.** Ciência & Saúde Coletiva, v. 16, n. 1, p.311-318, 2011.
- SALAZAR, G. DEL C. M.; SILVA, G. D. F.; DUARTE, L. P.; VIEIRA FILHO, S. A.; SUZUKI, R. Y.; FIGUEIREDO, R. C.; Resumos do 13° Encontro Regional da Sociedade Brasileira de Química.1999.
- SEMMAR, N.; FENET, B.; GLUCHOFF-FIASSON, K.; COMTE, G.; JAY, M. New Flavonol Tetraglycosides from Astragalus caprinus. Chemical & Pharmaceutical Bulletin. 50, (7), 981-984, 2002.
- SILVA, F.C.; DUARTE, L.P.; VIEIRA FILHO, S.A. Celastraceae: Fontes de Triterpenos Pentacíclicos com Potencial Atividade Biológica. Rev. Virtual Quim., Vol. 6, n. 5, p.1205-1220, 2014.
- SILVERSTEIN, R. M.; BASSLER, G. C.; MORRIL, T. C. Identificação Espectrométrica de Compostos Orgânicos. 6a ed.; LTC Editora: Rio de Janeiro, 2000.
- SIMMONS, M.P.; SAVOLAINEN, V.; CLEVINGER, C.C.; ARCHER, R.H.; DAVIS, J. I. Phylogeny of the Celastraceae Inferred from 26S Nuclear Ribosomal DNA, Phytochrome B, rbcL, atpB, and Morphology. Molecular Phylogenetics and Evolution, Vol. 19, p. 353–366, 2001.

- SPIVEY, A. C.; WESTON, M.; WOODHEAD, S. Celastraceae sesquiterpenoids: biological activity and synthesis. Chemical Society Reviews 2002, 31, (1), 43-59.
- SUKURU, S. C.; JENKINS, J. L.; BECKWITH, R. E.; SCHEIBER, J.; BENDER, A.;MIKHAILOV, D.; DAVIES, J. W.; GLICK, M. J.;.Plate-based diversity selection based on empirical HTS data to enhance the number of hits and their chemical diversity. Biomol. Screen. 14,690, 2009.
- SUNITHA, S.; NAGARAJ, M.; VARALAKSHMI, P. Hepatoptotective effect of lupeol and lupeol linoleate on tissue antioxidant defense system in cadmiuminduced hepatotoxicity in rats. Fitoterapia, 72, p. 516-523, 2001.
- 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.