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

MARIA DA LUZ BARRETO

ESTUDO FITOQUÍMICO DE *Maytenus rigida* E ENSAIOS FARMACOLÓGICOS DE EXTRATOS DE *M. rigida*, *M. truncata* E *M. acanthophylla (CELASTRACEAE)*

JEQUIÉ – BA
2018

MARIA DA LUZ BARRETO

ESTUDO FITOQUÍMICO DE *Maytenus rigida* E ENSAIOS FARMACOLÓGICOS DE EXTRATOS DE *M. rigida*, M. *truncata E M. 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 Mestra em Química. Área de concentração: Química Analítica.

Orientador: Prof. Dr. Djalma Menezes de Oliveira

JEQUIÉ – BA

2018

TERMO DE APROVAÇÃO

MARIA DA LUZ BARRETO

ESTUDO FITOQUÍMICO DE *Maytenus rigida* E ENSAIOS FARMACOLÓGICOS DE EXTRATOS DE M. *rigida, M. truncata E M. 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 Mestra em Química.

COMISSÃO EXAMINADORA

_____
Prof. Dr. Djalma Menezes de Oliveira (UESB)
(Orientador)

_____
Profª. Drª. Rosane Moura Aguiar (UESB)
(Parecerista)

_____
Profª. Drª. Julita Maria Pereira Borges (UESB)
(Parecerista)

Dissertação aprovada pelo Colegiado do Curso de Pós-Graduação em Química em 31 / 10 / 2018

À minha família, fonte de apoio, amor incondicional!

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, pois sem ele eu não teria forças, conhecimento espiritual e profissional para seguir essa longa jornada. Como disse o nosso Pai: “Faça a sua parte que eu te ajudarei”. E como tem me ajudado!

Este trabalho não é fruto apenas de um esforço individual, é o resultado de contribuições que obtive durante a trajetória da minha formação profissional, acadêmica e como cidadã, ao lidar com pessoas capacitadas para a arte de lecionar, construindo juntamente um longo caminho de conhecimentos;

Um agradecimento especial ao meu orientador, o professor Dr. Djalma Menezes de Oliveira, o qual dedicou parte do seu tempo na orientação da pesquisa e desenvolvimento do trabalho com paciência, compreensão, dedicação e confiança na minha capacidade de desenvolver essa importante tarefa. Sem essa orientação e paciência não seria capaz de concluir o trabalho. O Sr é um verdadeiro “PAIFESSOR”! Muito obrigada!

À professora Dr.ª Rosane Aguiar pela co-orientação e disponibilidade de colaborar na realização desse trabalho;

À minha mãe, D. Rosa, por suas histórias de muita luta, garra e superação para a criação e educação de seus filhos, diante de todas as adversidades dificuldades encontradas ao longo de sua trajetória;

A meu querido esposo, Paulo Lago, pela paciência e cumplicidade durante toda minha trajetória acadêmica;

Aos meus filhos, Júnior e Fabiana, motivo de entusiasmo e luta por mais essa vitória alcançada;

Aos meus irmãos, que mesmo à distância, incentivou e deram-me forças para que eu pudesse continuar nessa luta;

Ao professor Dr. Raphael Queiroz e a mestra Camila Ferraz, juntamente com a equipe da Fundação Osvaldo Cruz, pelo auxilio na realização dos testes de citotoxicidade em linhagens de células tumorais *in vitro*;

Aos estudantes de Iniciação científica Luan e Vilisaimon pela disponibilidade e boa vontade de colaborar com as diferentes tarefas dentro do laboratório de óleos essenciais, sendo meus “co-orientadores”;

Aos mestres Rafael, Adonias e Márcio pela ajuda no processamento das análises no EM e IV;

À colega e mestra Rosângela por diversas vezes desenvolver tarefas juntas, sentindo nas “costas o verdadeiro peso” de uma coluna, pelas trocas de informações e pelas amostras cedidas para a realização de alguns testes;

Ao “Quarteto Fantástico” pela amizade, companheirismo e pelo “produto de destilação”;

Ao meu querido “G6 do Coração” pela antiga amizade onde tudo começou, pelas trocas de conhecimentos, ideias, informações, e até mesmo o ombro amigo nas horas mais difíceis;

À professora Msc. Delane Tigre pela ajuda no desenvolvimento dos testes de atividades microbiológicas;

Aos colaboradores do Laboratório de Produtos Naturais, em nome da professora Dr.ª Vanderlúcia de Paula, pelo empréstimo constante de materiais e equipamentos para a realização de procedimentos laboratoriais;

Ao Professor Dr. Daniel Melo por ceder diversas vezes material do Laboratório de Farmacognosia;

Aos técnicos de laboratório Gabriel e Diogo pela disponibilidade de ajudas nas tarefas pertinentes;

A todos os professores que de alguma forma contribuíram na minha formação acadêmica;

Aos professores do Programa de Pós-graduação em Química (PGQUI), que contribuíram com meu aprendizado e no desenvolvimento dessa pesquisa;

À Fundação de Apoio à Pesquisa do Estado da Bahia (FAPESB) pelo apoio financeiro;

À Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, na qual iniciei a graduação e adquirir o grau de bacharel em farmácia, e desta vez concluindo a pós-graduação stricto sensu na área de química analítica.

Aos colegas do Curso de Pós-graduação em Química pela amizade e troca de conhecimento;

A todos, muito obrigada!

“Viver é como andar de bicicleta: É preciso estar em constante movimento para manter o equilíbrio.”

Albert Einstein

ESTUDO FITOQUÍMICO DE *Maytenus rigida* E ENSAIOS FARMACOLÓGICOS DE EXTRATOS DE *M. rigida, M. truncata E M. acanthophylla* (CELASTRACEAE)

Autor: Maria da Luz Barreto

Orientador: Prof. Dr. Djalma Menezes de Oliveira (UESB)

RESUMO:

Introdução: Este trabalho mostra o estudo fitoquímico e a avaliação das atividades microbiológicas, toxicidade e genotoxicidade de extratos da espécie *Maytenus rígida,* planta utilizada na medicina popular na região sudoeste da Bahia. Para efeito de comparação, foram desenvolvidos também testes biológicos com extratos de *M. acanthophylla* e *M. truncata*, outras duas espécies que também ocorrem na Bahia. **Objetivo:** realizar o estudo fitoquímico e a realização dos ensaios farmacológicos para as espécies em estudo. **Metodologia:** No estudo fitoquímico foram aplicados métodos de cromatográficos (CCD, cromatografia líquida e gasosa) e técnicas espectrométricas (RMN de ^{1}H E ^{13}C, IV e CG-EM). Os ensaios farmacológicos foram conduzidos mediante protocolos baseados em modelos para genotoxicidade (*Allium cepa),* inibição de crescimento de células tumoraes (HepG2 e HL-60), ação antimicrobiana (*staphylococus aureus, Proteusmirabilis, Klebisiellapeneumoniae, Pseudomonas aeruginosa, Escherricchia coli e Salmonela Typhi*) e toxicidade aguda (*Artemia salina*). **Resultados**: Onze constituintes fitoquímicos foram identificados do extrato de folha de *M. rigida* com EtoAc: (1) fitol, (2) acetato de fitol, (3) esqualeno, (4) octacosano, (5) α-tocoferol, (6)hentriacontano, (7) β-amirina, (8) lupeol, (9) siiarenol, (10) β-friedelinol e (11) friedelina. O extrato etanólico da casca da raiz de *M rigida* mostrou ação antitumoral de 68,2± 15,5 para as linhagens celulares HepG2(carcinoma hepatocelular humano) e 65,07 ± 6,41 para HL60 (leucemia humana). O extrato hexânico de casca da raiz de M. rigida (50 a 200 mg.mL^{-1}) não apresentaram ação genotóxica nos testes de Alium cepa. Extratos polares e apolares de *M. rígida, M. acanthophylla* e *M. truncaca* não produziram mortalidade nas Artemis salinas, bem como foram inativos contra os microrganismos testados. **Conclusão:** Estes testes permitiram propor que o uso das *Maytenus* estudadas apresenta um significativo grau de segurança devido à ausência de toxicidade aguda, entretanto testes de toxidez crônica precisam ser desenvolvidos para estabelecer a total

segurança do uso de fitoterápicos que contenham partes das plantas das espécies estudadas.

Palavras-chave: Maytenus, fitoquimica, toxicidade, genotoxicidade.

PHYTOCHEMICAL STUDY OF Maytenus rigida AND BIOLOGICAL TESTS OF EXTRACTS OF M. rigida, M. truncata AND M. acanthophylla (CELASTRACEAE)

Author: Maria da Luz Barreto
Advisor: Prof. Dr. Djalma Menezes de Oliveira

ABSTRACT:

Introduction: This work shows the phytochemical study and the evaluation of microbiological activities, toxicity and genotoxicity of extracts of Maytenus rigida, a plant used in popular medicine in the southwestern region of Bahia. For the purpose of comparison, biological tests with extracts of M. acanthophylla and M. truncata were also carried out, two other species also occurring in Bahia. **Methodology:** In the phytochemical study, chromatographic methods (CCD, liquid and gas chromatography) and spectrometric techniques (1H and 13C NMR, IV and GC-MS) were applied. Biological assays were conducted using protocols based on models for genotoxicity (Allium cepa), inhibition (Staphylococcus aureus, Proteusmirabilis, Klebisiellapeneumoniae, Pseudomonas aeruginosa, Escherichia coli and Salmonella Typhi) and acute toxicity (Artemia salina). **Results:** Eleven phytochemical constituents were identified from the M. rigida leaf extract with EtoAc: (1) phytol, (2) phytol acetate, (3) squalene, (4) octacosan, (5) α-tocopherol, (6) hentriacontane, 7) β-amirine, (8) lupeol, (9) sialenol, (10) β-friedelinol, and (11) friedelin. The ethanolic extract from the bark of the rigid M root showed antitumor action of 68.2 ± 15.5 for the HepG2 cell lines (human hepatocellular carcinoma) and 65.07 ± 6.41 for HL60 (human leukemia). The hexanic extract of bark of the M. rigida root (50 to 200 mg.mL-1) did not present genotoxic action in the tests of Alium strain. Polar and apolar extracts of M. rigida, M. acanthophylla and M. truncaca did not produce mortality in the Artemis salinas, as well as were inactive against the tested microorganisms. **Conclusion:** These tests allowed to propose that the use of the studied Maytenus present a significant degree of safety due to the absence of acute toxicity, however chronic toxicity tests must be developed to establish the total safety of the use of herbal products containing parts of the plants of the species studied.

Key words: Maytenus, phytochemical, toxicity, genotoxicity.

DE FIGURAS

FIGURA 1- Estrutura química de alguns dos compostos químicos identificados no gênero *Maytenus*(OLIVEIRA, 2011). 16
FIGURA 2- (A) Ilustração botânica de *Maytenus ilicifolia*; (B) foto de *M. ilicifolia* (NASCIMENTO, 2018). 17
FIGURA 3- (A) Ilustração botânica de *Maytenus acanthophylla*; (B) foto de *M. acanthophylla* (OLIVEIRA,2012). 17
FIGURA 4- Compostos isolados de *M.acanthophylla;* (OLIVEIRA, 2012; PEREIRA, 2015). 18
FIGURA 5-(A) Ilustração botânica de *M. truncata;* (B) Foto de *M. truncata* (SALAZAR, 2005). 19
FIGURA 6-Compostos isolados *M. truncata*; (SALAZAR, 2005; NIERO, 2011; PEREIRA 2015). 20
FIGURA 7-(A) Ilustração botânica de *M. rigida*; (B) Foto de *M. rigida* (LORENZO, 2017). 21
FIGURA 8- Compostos isolados de *M. rígida;* (OLIVEIRA, 2012; PEREIRA, 2015). 22
FIGURA 9- Esquema do processo de coleta e extração dos extratos da *Maytenus.* 26
FIGURA 10- Esquema do processo da cromatografia líquida C1. Fonte própria. 28
FIGURA 11- (A) C1 e (B) fração F8 de C1. Fonte: própria....29
FIGURA 12- Esquema do processo da cromatografia líquida C2. Fonte própria. 30
FIGURA 13- Coluna cromatográfica de baixa pressão (C2). Fonte própria. 30
FIGURA 14- Esquema da coleta de M. rigida à HRGC – MS....32
FIGURA 15**-** (A) Processo de extração no funil de separação, (B) separação das frações do extrato de MR em EtoAc e (C) frações coletadas. Fonte Própria. 33
FIGURA 16- Cromatografia em camada delgada. CCD de ext. hexânico de folhas de *M. rigida* das F30- F42 em HEX:MEOH. Fonte: própria. 34
FIGURA 17 – Espectro de S1 de C1 na região do Infravermelho (IV) 34
FIGURA 18 - (A) cromatograma de F8-C1 HFMR, através de CG-EM, utilizando $CHCl_3$ como solvente dispersor, (B) EM do esqualeno. 35
FIGURA 19 Espectro de RMN de ^{1}H de **11** ($CDCl_3$ e gotas de piridina d_5, 400 MHz). 36
FIGURA 20-Espectros RMN de DEPT-135 (A) e ^{13}C (B) de **11** ($CDCl_3$, 100 MHz)...37
FIGURA 21- Espectro IV para F19 C1 extratos da *Maytenus.* 39

FIGURA 22- Liebermann - Burchard de F19 (A) e (B) F20 de c1, respectivamente. Fonte Própria.....39
FIGURA 23**-** (A) CCD de F7 – F11 de C2 e (B) Teste de Liebermann - Burchard para G1 deC2,respectivamente. Fonte própria. 40
FIGURA 24 -TIC do extrato de M. rígida, através de CG-EM, utilizando $CHCl_3$ como solvente dispersor. 41
FIGURA 25- (A) Placa de Petri com as sementes de *Allium cepa* germinadas e (B) os meristemas coletados e conservados em álcool 70%. Fonte Própria. 47
FIGURA 26- Esquema dos tubos de ensaio com ext. hexânico de raiz de *M. rígida,* controle positivo e controle negativo. 48
FIGURA 27- (A) Aquário com água, sal marinho e os cistos para eclosão; (B) fotografia microscópica das *Artemias salinas* com aumento de 40x. Fonte própria.....49
FIGURA 28 **-** Culturas bacterianas utilizadas no experimento. Fonte: própria. 50
FIGURA 29 - Discos de papel filtro impregnados com os extratos utilizados no experimento. Fonte: própria. 51
FIGURA 30- Fotografia microscópica de esfregaço do material vegetal com aumento de 40x, (A) 50 $mg.mL^{-1}$, (B) 100 $mg.mL^{-1}$, (C) 150 $mg.mL^{-1}$, (D) 200 $mg.mL^{-1}$, (E) DMSO e (F) água. Fonte: própria.....53
FIGURA 31- Placas de Petri com a cultura e os extratos testados, (A) EMT, (B) HRMR e (C) HFMA. Fonte: Própria.....55

LISTA DE TABELAS

TABELA 1- compostos ativos do gênero *Maytenus,* utilizados na Bahia. 23
TABELA 2-Proporção dos solventes utilizados em C1.....28
TABELA 3- Comparação entre os valores de δ de ^{13}C de **11** ($CDCl_3$, 100 MHz) e os respectivos valores publicados (Salazar, 2005) para o β-friedelinol (CDCl3, 100 MHz) 38
TABELA 4- Compostos químicos identificados no extrato de EtoAc de folha de *M. rigida* através da analise do cromatograma TIC obtido por CG-EM. 41
TABELA 5**-** Concentrações dos extratos utilizados no teste de *Artemis salinas* 48
TABELA 6**–** Porcentagem de inibição da proliferação celular em linhagens de células tumorais.....52
TABELA 7 -Valores de IC_{50} para a atividade citotóxica em linhagens de células tumorais versus não tumorais. 52
TABELA 8- Atividade antimicrobiana dos extratos de espécies de *Maytenus*.....55

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Ac_2O	Anidrido Acético
AMH	Ágar Mueller Hinton
ATCC	American TypeCulture Collection
CCD	Cromatografia em camada delgada
CG-EM	Cromatografia gasosa acoplada ao espectrômetro de massa
$CHCl_3$	Clorofórmio
CIM	Concentração inibitória mínima
DMSO	Dimetilsulfóxido
DOX	Doxorrubicina
EM	Espectroscopia de massa
EtoAc	Acetato de Etila
EtOH	Metanol
Ext	Extrato
FID	Flame Ionization Detector
FM	Fase móvel
H_2SO_4	Ácido sulfúrico
HCL	Ácido clorídrico
HCT116	Carcinoma de cólon humano
HepG2	Carcinoma hepatocelular humano
Hex	Hexano
HFMR	Extrato Hexânico das raízes de Maytenu srigida
HL-60	Leucemia promielocítica humana
HMA	Extrato Hexânico de Maytenus acanthophylla
HRMR	Extrato Hexânico das folhas de Maytenu srigida
HUESB	Herbário da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia
IC_{50}	Concentração inibitória média
IV	Infravermelho
KOH	Hidróxido de potássio
LB	Liebrmann – Burchard
MCF7	Carcinoma de mama humano
MeOH	Metanol

MPLC	Cromatografia líquida de média pressão
NCBI	National Center for Biotechnology Information
NIST	National Institute of Standards and Technology
ϕ	Diâmetro interno de uma coluna cromatográfica
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
SUS	Sistema Único de Saúde
TIC	Cromatograma de Íons Totais
TTPC	Triterpenopentaciclíco
UFC	Unidade formadora de colônias

Sumário

2 INTRODUÇÃO 13

CAPÍTULO 1- ESTUDO FITOQUÍMICO DE *Maytenus rigida* 15

3 A FAMÍLIA CELASTRACEAE 15
3.1 Gênero *Maytenus* 15

3.1.1 Maytenus ilicifolia *16*
3.1.2 Maytenus acanthophylla Reissek *17*
3.1.3 Maytenus truncata *19*
3.1.4 Maytenus rígida *21*

4 OBJETIVOS 24
4.1 Objetivo geral 24

4.1.1 Objetivos específicos *24*

5 PARTE EXPERIMENTAL 25
5.1 MÉTODOS GERAIS 25

5.1.1 Coleta e identificação do material vegetal *25*
5.1.2 Preparo dos extratos de Maytenus rigida *25*
5.2 ESTUDO FITOQUÍMICO 26

5.2.1 Levantamento do perfil cromatográfico dos extratos através de Cromatografia em camada delgada (CCD) *26*
5.2.2 Fracionamento do extrato HFMR por cromatografia líquida (CL) *27*

6 Identificação de *constituintes* de baixa polaridade de folhas de *M. rigida* por GC-EM 31

7 RESULTADOS E DISCUSSÃO 33
7.1 Cromatografia líquida do extrato HFMR 33

7.2 Mistura de hidrocarbonetos alifáticos, S1 34

7.3 Esqualeno (3) 34

7.4 3*β*-Friedelinol (11) 35

7.5 Mistutra de Friedelina (10) e 3β-Friedelinol (11) 38

7.6 Identificação dos compostos extraídos por extração ELL 40

7.7 Simiarenol (9) 43

CAPÍTULO 2 -TESTES BIOLÓGICOS DE EXTRATOS DE M. rigida, M. truncata E M. acanthophylla (CELASTRACEAE) 45

8 TESTES BIOLÓGICOS 45
8.1 Estudo da citotoxicidade em linhagens de células tumorais *in vitro* 45

8.1.1 Preparo das amostras 45
8.1.2 Células 45
8.1.3 Ensaio de citotoxicidade 46
8.2 Teste de genotoxicidade utilizando o protocolo de *Alium cepa* 47
8.2.1 Preparo e coloração das lâminas 48
8.3 Teste de toxicidade utilizando o protocolo de *Artemias salinas* 48
8.4 Teste de atividade microbiológica 49
8.4.1 Manutenção dos microrganismos 50
8.4.2 Preparo das placas de Petri 50
8.4.3 Preparo das amostras dos extratos 50
8.4.4 Testes de sensibilidade das linhagens microbianas aos extratos 51
9 RESULTADOS E DISCUSSÃO 51
9.1 Estudo da citotoxicidade em linhagens de células tumorais *in vitro* 51
9.2 Teste de genotoxicidade utilizando o protocolo de *Alium cepa* 53
9.3 Teste de toxicidade utilizando o protocolo de *Artemias salinas* 54
9.4 Teste de atividade microbiológica 55
10 CONCLUSÃO 56
11 PERSPECTIVAS 57
12 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 58

2 INTRODUÇÃO

O uso de plantas como atividade medicinal tem sido desde a antiguidade, pelos nossos ancestrais. Fato que tem elevado o interesse pelo avanço nas pesquisas envolvendo plantas de uso na medicina popular (VELOSO; et al, 2017). Os vegetais possuem constituintes químicos com várias substâncias que são utilizadas no metabolismo para sua nutrição ou até mesmo como defesas do seu próprio organismo (FIRMO; et al. 2011).

Apesar da grande utilização de plantas com atividade medicinal, muitas são utilizadas sem fazer testes prévios de toxicidade para o organismo humano. Porém tem algumas plantas com estudos publicados confirmando a eficácia terapêutica, como por exemplo, as conhecida popularmente como espinheira santa, espinheira divina, cancerosa (JESUS; CUNHA, 2012).

De fato, as plantas medicinais são amplamente utilizadas para o tratamento de diversas patologias, seguindo princípios e conhecimentos passados de gerações anteriores, são utilizadas desde simples resfriado até para o tratamento do câncer, apesar das evidências científicas sobre seus efeitos anticancerígenos ainda são escassas para a maioria das plantas descritas (SILVA; ROMANE; EFFERT, 2017).

Mesmo com a grande biodiversidade dos recursos naturais da flora brasileira, o número de produtos à base de ervas medicinais nativas ainda é muito baixo, devido à dificuldade na avaliação da segurança dessas plantas. A segurança e a eficácia destes produtos vegetais precisam ser testadas de acordo com as diretrizes e normas das agências nacionais e internacionais, afim de que as pessoas que utilizarem com maior segurança e eficácia, minimizando os riscos de efeitos adversos indesejáveis (BRASIL, 2013).

Desde o final da década de 70 que a Organização Mundial da Saúde reconheceu oficialmente o uso de ervas medicinal pela população para o tratamento de diversas doenças. A partir daí foram publicadas diversas portarias pelo ministério da saúde relacionadas ao uso de fitoterápicos na medicina popular (BRASIL, 2011). De acordo com a Instrução Normativa 02/2014 foi publicada uma lista de medicamentos fitoterápicos tradicionais de registro simplificado (BRASIL, 2014).

CAPÍTULO 1

CAPÍTULO 1- ESTUDO FITOQUÍMICO DE *Maytenus rigida*

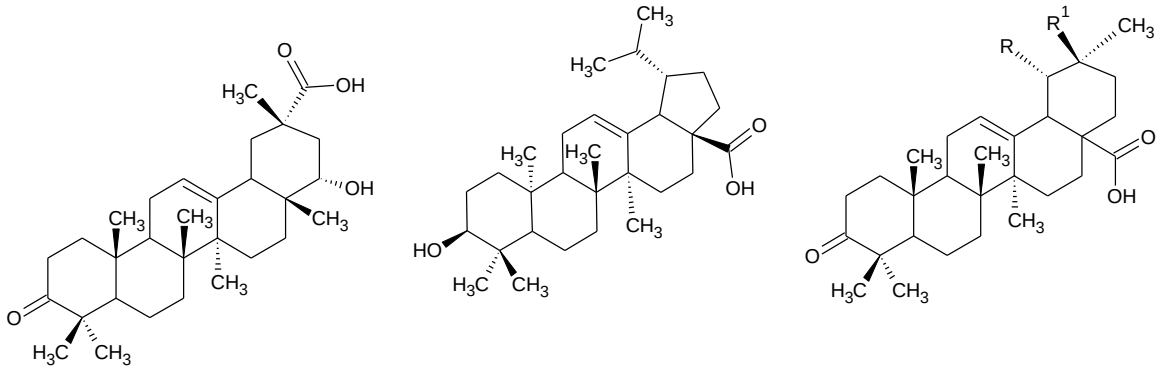
3 A FAMÍLIA CELASTRACEAE

É uma família do reino vegetal com aproximadamente 100 gênero e 1260 espécies, distribuída geograficamente nas regiões tropicai e subtropical, dos continentes (SIMMONS; et al, 2012).São árvores de pequeno porte, geralmente arbustos e algumas vezes trepadeiras; possuem folhas simples, opostas e dentadas; flores não vistosas e pequenas, verdes claras ou brancas; frutos encapsulados e adocicados, sendo *Maytenus* o gênero representante, com várias espécies, conhecidas popularmente como espinheira-santa, cancerosa, cancerosa-de-sete-espinhos, maiteno, dentre outros nomes. (FERREIRA; et al, 2017).

3.1 Gênero *Maytenus*

No Brasil, já foram reconhecidas e catalogadas 76 espécies de *Maytenus*, as quais foram encontradas em diferentes habitat como mata atlântica, floresta amazônica e caatinga (NIERO; ANDRADE; FILHO, 2011). Na medicina popular é comum o uso das *Maytenus* como antiinflamatório, no tratamento de ulceras gástrico, atividade antiparasitária, antitumoral, entre outras indicações (MENEGUETTI; et al, 2016).

O uso de vegetais desse gênero como fitoterápico, o qual confere a atividade medicinal, é devido à presença de metabólitos secundários como alcalóides, terpenos, flavonóides, esteróides e glicosídeos(SILVA; DUARTE; FILHO, 2014).Existem também Relatos de compostos químicos como os polifenóis que funcionam como captadores de radicais livres, o que confere a atividade antiinflamatória e as arabinogalactanas que possuem atividade imunológica (OLIVEIRA; et al, 2011; OLIVEIRA; CUNHA; COLAÇO, 2009). Na FIGURA 1 estão representadas estruturas químicas de alguns dos constituintes fotoquímicos já identificados e estudados por pesquisadores, no gênero *Maytenus*.



Ácido triptotriterpenóico A (Oleanano)

Ácido betulínico (Lupano)

Ác. oleanólico R= H; R1 = CH3
Ác. ursólico R= CH3; R1 = H (ursanos)

FIGURA 1- Estrutura química de alguns dos triterpenos identificados no gênero *Maytenus* (OLIVEIRA, 2011).

3.1.1 *Maytenus ilicifolia*

É uma espécie nativa da mata atlântica, na região sul do Brasil, conhecida popularmente como espinheira santa, utilizada para o tratamento de úlceras gástricas e outras indicações. Tem sido explorada com muita intensidade, levando ao extrativismo predatório (MARIOT; BARBIERE, 2007).

Esta é uma das espécies de fitoterápicos que está na lista de ervas medicinal indicadas para uso no Sistema Único de Saúde, e cultivada de para o extrativismo vegetal (VITÓRIA; et al, 2013;BRASIL, 2013).A *M. ilicifolia* é um dos fitoterápicos que consta na lista publicada na Instrução Normativa 02 / 2014, como medicamentos a base de plantas medicinais, com o nome popular de “espinheira santa” (BRASIL, 2014).

De acordo com a literatura, extrato aquoso *M. ilicifolia* mostrou eficácia no tratamento de úlceras gástricas induzidas em ratos, quando comparado com o tratamento padrão a base de indometacina. Embora diversos estudos que comprovam a eficácia da espinheira santa como agente antiulcerativo, poucos avaliam sua segurança, possivelmente pela sua baixa toxicidade em animais (TABACH; ALMEIDA; CARLINI, 2017). De acordo com a FIGURA 2 pode ser observados as características físicas na ilustração botânica e na fotografia da espécie de *M. ilicifolia*.

(A) (B)

FIGURA 2- (A) Ilustração botânica de *Maytenus ilicifolia*; (B) foto de *M. ilicifolia* (NASCIMENTO, 2018).

3.1.2 *Maytenus acanthophylla* Reissek

Esta é uma espécie arbustiva com aproximadamente 3 metros de altura, com os galhos finos e espinhos, tanto nos ramos como na lateral de suas folhas.Encontrada facilmente na chapada diamantina, na Bahia e no norte de minas gerais,sendo usada na medicina popular no tratamento de ulceras gástrico e infecções genitais (OLIVEIRA, 2012).

É comumente encontrada nas feiras livres na Bahia, sendo suas folhas a parte do vegetal mais utilizada na medicina popular. O material seco é preparado em forma de infusões e ingerido com finalidade terapêutica. A FIGURA 3 apresenta a ilustração botânica e a fotografia da M. acanthophylla, e na FIGURA 4 estão representados alguns constituintes fitoquímicos isolados da mesma espécie.

(A) (B)

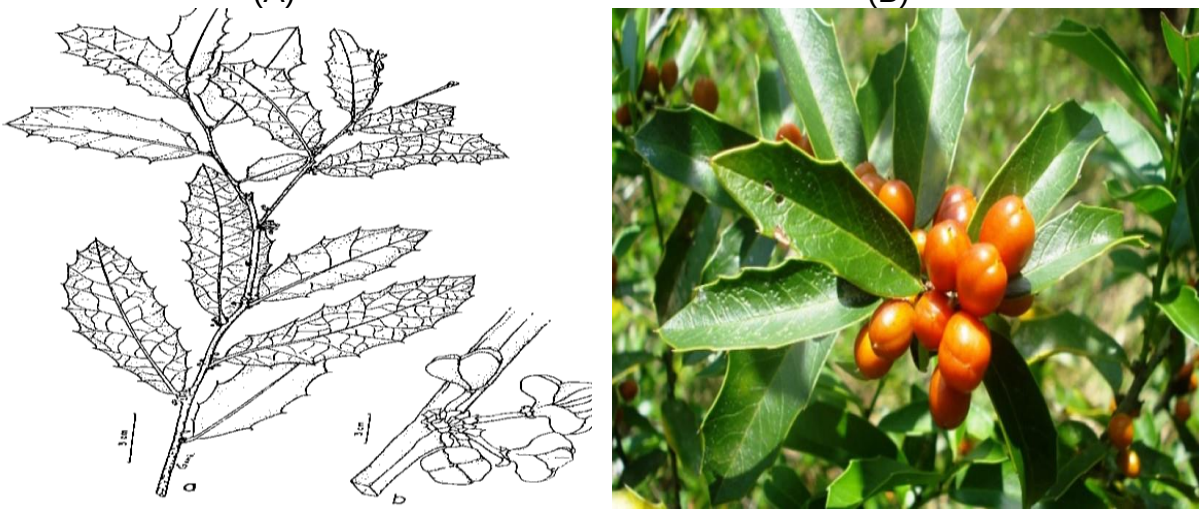
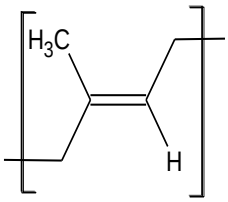
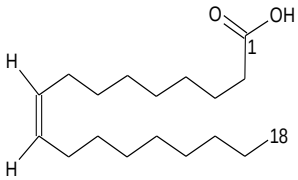


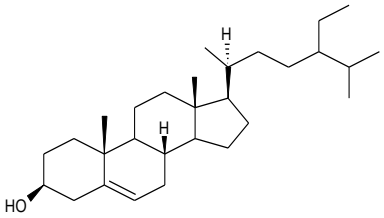
FIGURA 3- (A) Ilustração botânica de *Maytenus acanthophylla*; (B) foto de *M. acanthophylla (OLIVEIRA, 2012).*



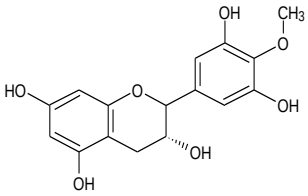
1,4 - transpoliisopreno



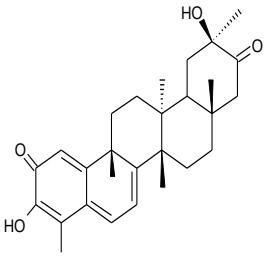
ácido oléico



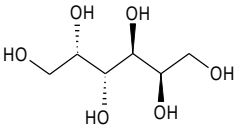
β-sitosterol



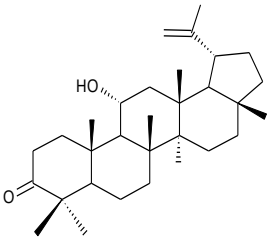
4'-O-metil-(-)-epigalocatequina



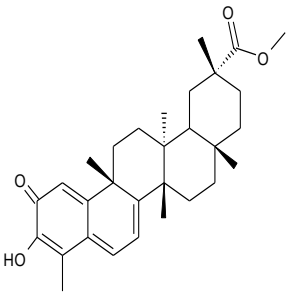
20-hidroxi-20-*epi*-tingenona



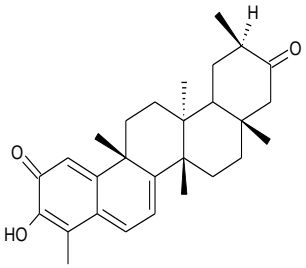
galactitol



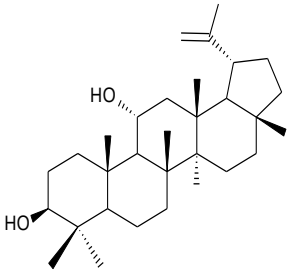
rigidenol



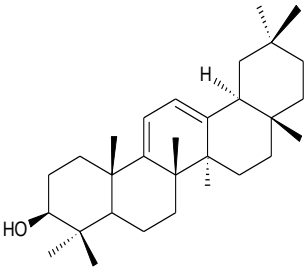
pristimerina



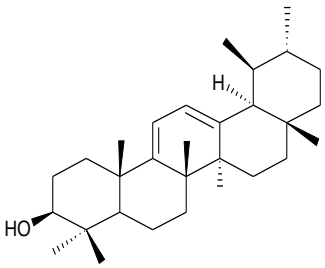
tingenona



nepeticina



olean-9(11):12-dien-3β-ol



ursa-9(11):12-dien-3β-ol

FIGURA 4- Compostos isolados de *M.acanthophylla*; (OLIVEIRA, 2012; PEREIRA, 2015).

3.1.3 *Maytenus truncata*

Conhecida popularmente como “espinheira santa”, é muito comum na região do sudoeste da Bahia, em meio à caatinga, no município de Jequié. Utilizada pelos nativos no tratamento de ulceras gástricas e como antiinflamatório, segundo relatos da população que fazem uso do chá dessa planta. (FONSECA; et al, 2007; SALAZAR, 2005). Na FIGURA 5 pode ser observada a ilustração botânica e a fotografia dessa espécie, seguida da FIGURA 6 que representa alguns fitoconstituintes isolados por pesquisadores que estudaram a *M. truncata*.

(A) (B)

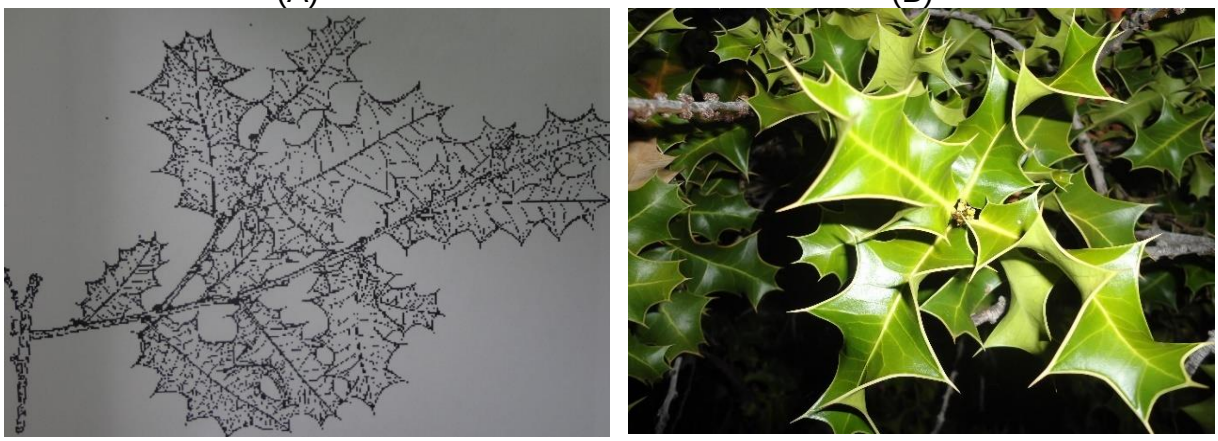


FIGURA 5-(A) Ilustração botânica de *M. truncata*; (B) Foto de *M. truncata* (SALAZAR, 2005).

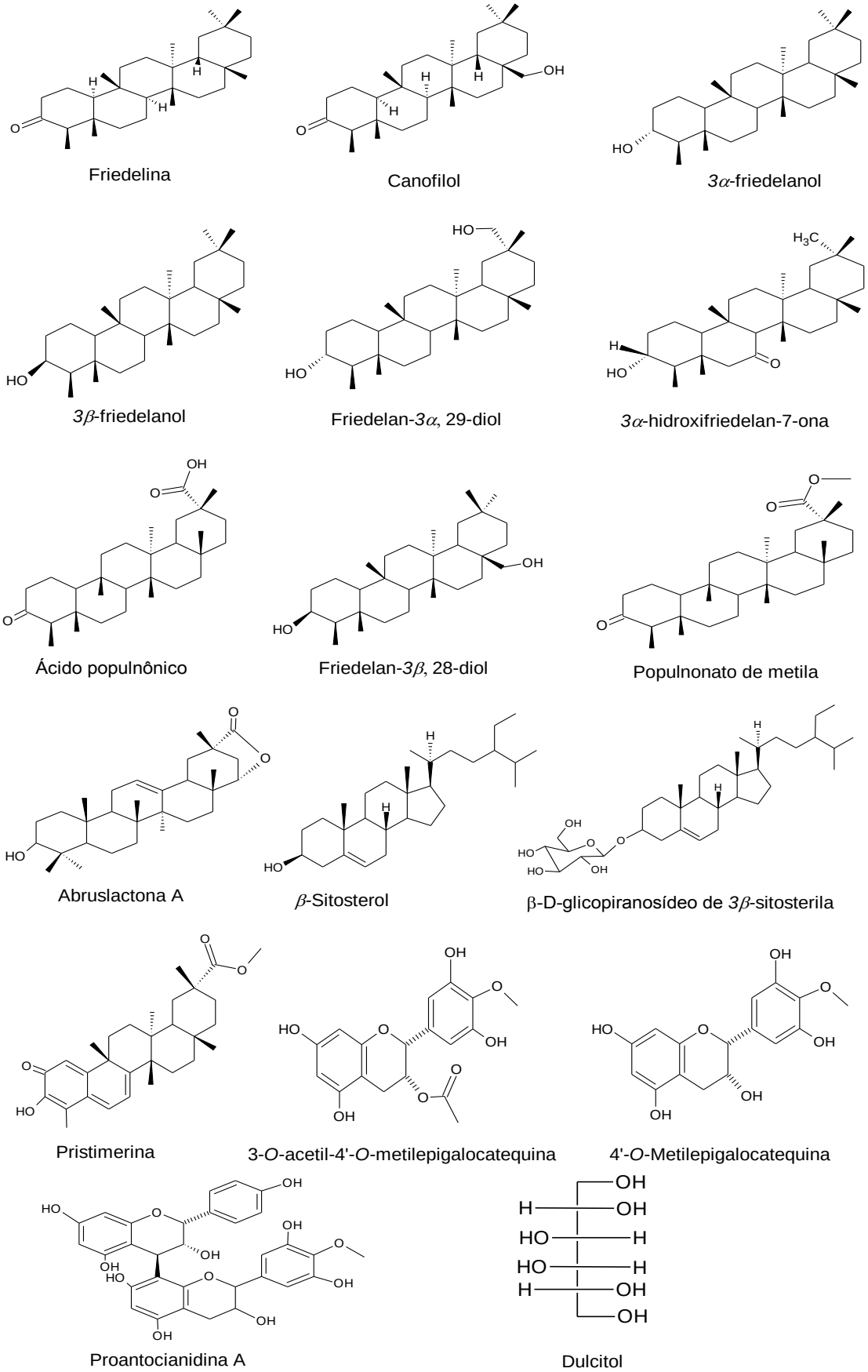


FIGURA 6-Compostos isolados *M. truncata*; (SALAZAR, 2005; NIERO, 2011; PEREIRA 2015).

3.1.4 *Maytenus rígida*

É uma espécie comum no nordeste brasileiro, nas áreas de caatinga, mede cerca de 3 a 8m de altura, FIGURA 7, cresce em terrenos pedregosos, compactos e secos, seus frutos são utilizados como alimentos pela fauna nativa da região, conhecida popularmente como “pau-de-colher”, “pau-de-arara” ou “chapéu de couro”. A parte do vegetal utilizada na etnomedicina é a entrecasca, sendo indicada para o tratamento de inflamações renais (LORENZO, 2017).

Uma pesquisa realizada por pesquisadores da Universidade Federal do Alagoas (UFAL), fazendo correlação do perfil fotoquímico do extrato da entrecasca da *M. rígida* com a atividade antimicrobiana, atribuiu à inibição de crescimento do microorganismo *E. Colli* devido à presença de terpenos, alcalóides e saponinas compostos químicos (FIGURA 8), já isolados no gênero *Maytenus* (ESTEVAM; et al, 2009).

De acordo com pesquisadores, o extrato etanólico da casca de *M. rígida* apresentou atividade antinociceptiva em um grupo de ratos, numa concentração de 100 $mg.kg^{-1}$, mostrou ação semelhante aos fármacos dipirona e indometacina. Esse trabalho foi desenvolvido na UFAL e a Universidade Federal de Sergipe (MARTINS; et al 2012). Na FIGURA 7 estão representadas a ilustração botânica e a fotografia da M. rigida, seguida da FIGURA 8 onde mostra alguns dos compostos fotoquímicos isolados e estudados por pesquisadores da área de produtos naturais.

(A) (B)

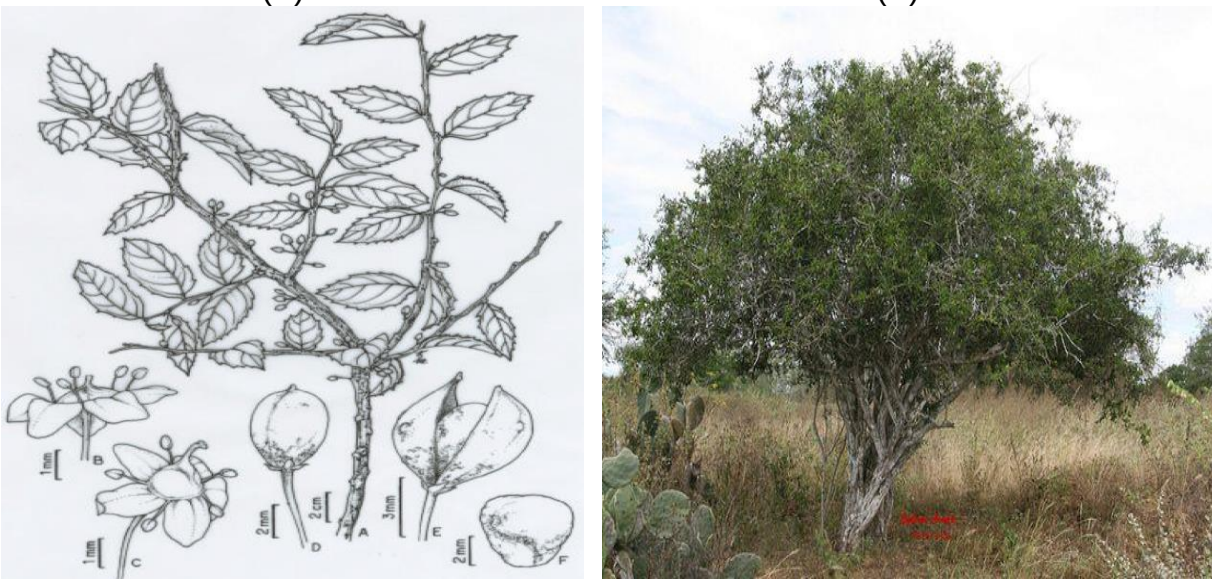
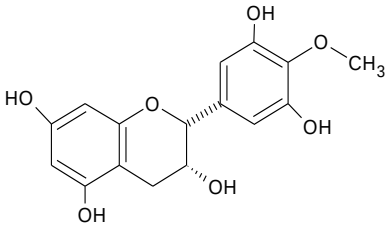
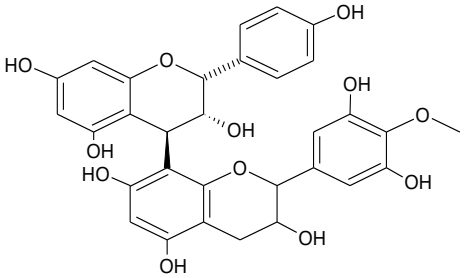


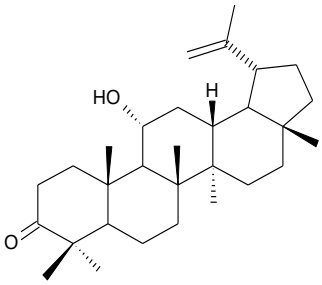
FIGURA 7-(A) Ilustração botânica de *M. rigida*; (B) Foto de *M. rigida* (LORENZO, 2017).



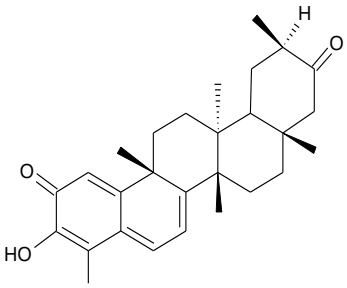
4′-*O*-metilepigalocatequina



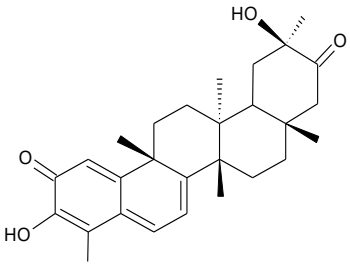
proantocianidina



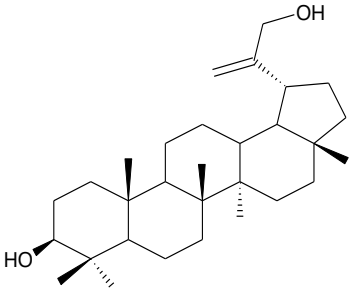
rigidenol



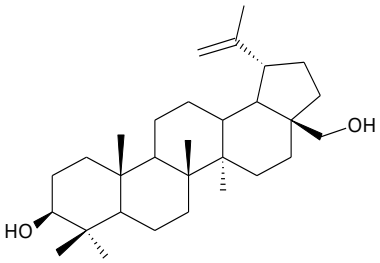
tingenona



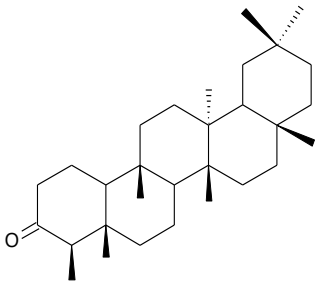
20-hidroxi-20-*epi*-tingenona



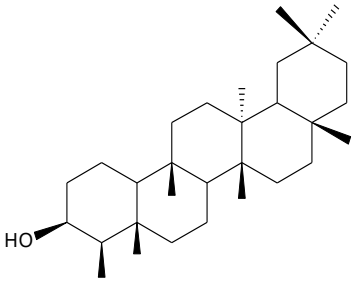
3β-lup-*20(29)*-en-*30*-diol



3β-lup-*20(29)*-en-*28*-diol



friedelina



3β-friedelinol

FIGURA 8- Compostos isolados de *M. rígida*; (OLIVEIRA, 2012; PEREIRA, 2015).

A TABELA 1 apresenta uma correlação do uso das diferentes espécies de *Maytenus* utilizadas com atividade medicinal, citando o nome popular, indicação terapêutica, parte da planta utilizada, modo de preparo, via de administração e quais literaturas relatam essas informações.

TABELA 1- compostos ativos do gênero *Maytenus*, utilizados na Bahia.

Espécie	**Nome popular**	**Indicação**	**Partes usadas, forma e via de administração**	**Referencia**
M. acanthophylla	Espinheira santa Pau-de-jararaca	Gastrite, úlcera digestiva antisséptico antiinflamatória infecções urogenitais.	Folhas Decocção Via oral	OLIVEIRA, 2012 SILVA, 2014
M. ilicifolia	Espinheira santa Espinhos-de-deus	Reumatismo febre, distúrbios gastrointestinais digestivos e antiespasmódico Contraceptivo Anticancerígeno	Folhas Decocção Via oral	JESUS, 2012
M. rigida	Casca-grossa Bom-homem Pau-de-colher	Anti-inflamatória antiúlcera. Antidiarréica.	Folhas e raízes Decocção Via oral	VELOSO, et al, 2017 ESTEVAM, 2009
M. Truncata	Todo lado Todo jeito árvore de natal	Anti-inflamatória antiúlcera.	Folhas Decocção Via oral	FONSECA, 2007
M. putterlickoides	Espinheira santa	Antileucêmica	Raízes Decocção Via oral	MUGWERU, 2016
M. aquifolium	Espinheira santa	Atividade antioxidante	Raízes Decocção Via oral	VELLOSA, 2007

4 OBJETIVOS

4.1 Objetivo geral

Desenvolver estudos fitoquímicos de folhas de *Maytenus rigida*, bem como, avaliar a atividade antitumoral, genotóxica, toxicidade aguda e antimicrobiana de *M. rigida, M. truncata* e *M. acanthophylla*, espécies de *Maytenus* encontradas nas diferentes microrregiões da Bahia.

4.1.1 Objetivos específicos

1. Coletar o material vegetal;
2. Preparar extratos orgânicos de folhas e raízes de *Maytenus rigida*;
3. Realizar estudos fitoquímicos e farmacológicos de extratos orgânicos das folhas e raízes de *M. rigida* buscando a obtenção de frações ricas em compostos biologicamente ativas;
4. Realizar o fracionamento de extratos brutos por cromatografia líquida de baixa pressão;
5. Obter os perfis cromatográficos dos extratos brutos e das frações solúveis.
6. Identificar e caracterizar as misturas e os produtos naturais obtidos por meio de métodos espectrométricos na região do infravermelho (IV), espectrometria de massas (EM) e espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN) de ^{1}He de ^{13}C;
7. Avaliar quanto à existência de citotoxicidade de compostos extratos e frações de *Maytenus sp* em culturas de células tumorais humanas;
8. Testar *in vivo* e avaliar a atividade de toxicidade aguda de diferentes frações e compostos de *Maytenus rigida* através dos protocolos de *Allium cepa* e *Arte mia salina*;
9. Testar a sensibilidade de bactérias gram-positivas egram-negativas frente a diferentes concentrações de extratos de *Maytenus sp*;
10. Contribuir para a ampliação dos conhecimentos sobre dados farmacológicos e os constituintes químicos com atividade biológica de *Maytenus sp*.

5 PARTE EXPERIMENTAL

5.1 MÉTODOS GERAIS

5.1.1 Coleta e identificação do material vegetal

As folhas e raízes de *Maytenus rigida* foram coletadas no bairro Cachoeirinha, perímetro urbano, na cidade de Jequié - BA. Exemplares da exsicata encontram-se depositados no Herbário da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia sob o número HUESB-9311 e HUESB-7056.

Após coletadas, as folhas foram secas em temperatura ambiente e trituradas em moinho de facas, modelo SL32, marca Solab. O processo de trituração da amostra foi repetido três vezes a fim de obter fragmentos cada vez menores, isso aumenta a superfície de contato do material com o solvente, facilitando a extração dos componentes do extrato do material vegetal. As raízes também foram secas em temperatura ambiente e em seguida moídas para posterior preparo dos extratos.

5.1.2 Preparo dos extratos de *Maytenus rigida*

Iniciou-se o processo de extração do material vegetal, utilizando 1,5 kg de massa seca e triturada das folhas, colocada em um balão de fundo redondo e foram acrescentado 3L de hexano como solvente extrator. Essa mistura foi deixada em repouso por um período de sete dias. Decorrido esse tempo, foi realizada filtração a vácuo e colocado o extrato hexânico no evaporador rotativo sob pressão reduzida para a retirada do solvente, restando apenas o extrato vegetal. A parte sólida do filtrado foi colocada de volta no mesmo balão e acrescentado o solvente recuperado do processo de rataevaporação. Repetiu-se todo esse processo por três vezes, sendo obtido um rendimento de 116g de extrato hexânico de folhas de *M. rígida* (HFMR).O mesmo processo foi repetido utilizado 1 kg das raízes trituradas o obteve 110 g de extrato hexânico de raiz de *M. rigida* (HRMR).A FIGURA 9 mostra um esquema da coleta do material vegetal e o processo de obtenção dos extratos.

O período de sete dias da extração por maceração é necessário para que ocorra o maior rendimento possível do extrato, esgotando ao máximo na extração dos compostos fitoquímicos presentes no material vegetal em estudo.

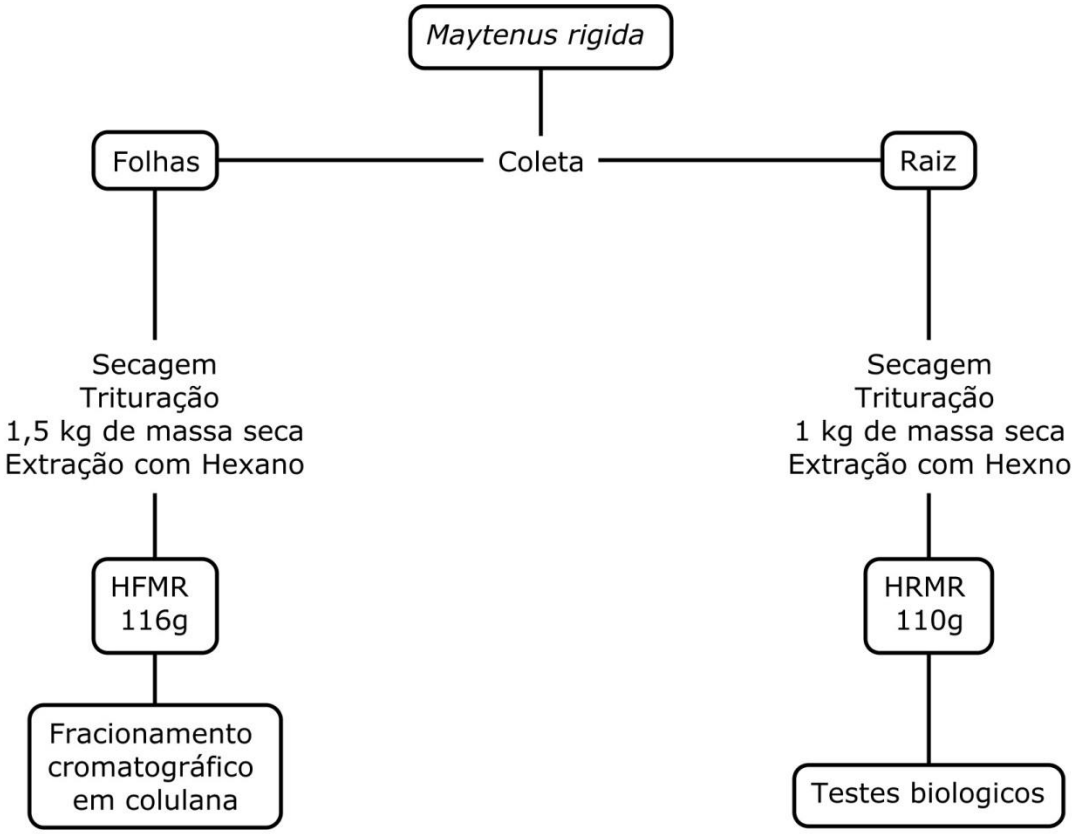


FIGURA 9- Esquema do processo de coleta e extração dos extratos da *Maytenus*.

5.2 ESTUDO FITOQUÍMICO

5.2.1 Levantamento do perfil cromatográfico dos extratos através de Cromatografia em camada delgada (CCD)

As cromatoplacas de CCD foram preparadas com uma suspensão de sílica gel Merck 60 G em água [7 g para 15 mL (p/v)] sobre suporte de vidro com 10x6cm, formando camada de 0,25 mm de espessura. Com o auxílio de um capilar de vidro era aplicada uma pequena quantidade da amostra, formando o spot, que após secagem em temperatura ambiente, as cromatoplacas foram reveladas através de pulverização com solução de vanilina em álcool etílico (1:99) com ácido perclórico em água (3:97), misturadas na proporção de 1:1 v/v. As placas de vidro foram ativadas em placa de aquecimento a 100°C por aproximadamente dois minutos, depois colocadas em câmara de luz ultravioleta e observada as manchas das substâncias que ficaram marcadas ao longo da eluição. Foram utilizados como solventes para eluição hexano e acetato de etila, ambos de grau analítico e previamente destilados para retirada de possíveis impurezas.

5.2.2 Fracionamento do extrato HFMR por cromatografia líquida (CL)

A CL é um processo de separação de misturas utilizado quando se quer separar grandes quantidades de substâncias. Prepara-se uma coluna de vidro utilizando sílica gel como fase estacionária em seguida, adiciona-se a mistura a ser separada, em seguida o solvente (fase móvel), aos poucos. Os diversos componentes da mistura são transportados pelo solvente com diferentes velocidades, sendo recolhidos à medida que atingem a extremidade inferior da coluna.

No processo de separação, está relacionada tanto a afinidade da substância para com o solvente utilizado, quanto à afinidade da substância em relação ao adsorvente. Os solventes empregados não devem reagir entre si ou com as substâncias a serem separadas. Além disso, não devem apresentar muita afinidade em relação ao adsorvente, pois de modo contrário ficariam retidos nele.

5.2.2.1 Preparação da cromatografia em coluna de sílica gel (C1)

Na preparação de todos os processos cromatográficos desse estudo, todos os solventes utilizados para o fracionamento dos compostos, foram ambos de grau analítico e previamente destilados para retirada de possíveis impurezas, que pudessem causar contaminação nas amostras da pesquisa.

Foi utilizado sílica gel Merck 60 (70-230 Mesh) como fase estacionária, sendo adotada a proporção média de 1 g de extrato para 20 g de fase estacionária para as colunas de fracionamento do extrato. Para C1 foi utilizado 20g de HFMR para 300g de sílica gel, com leito 27 cm e d.i. (ϕ) 5,5cm. O volume da coluna foi calculado, de acordo com os dados mostrados na equação 1.

$$\text{Volume da coluna } = \frac{\text{massa da sílica}}{\text{densidade da sílica}} = \frac{300\text{g}}{0{,}5\text{g/mL}} = 600 \text{ mL.}$$

O volume morto, que é volume de solvente necessário para preencher o volume de porosidade da sílica, foi calculado como 400mL. Foram coletadas50 frações de aproximadamente 80mL cada uma, as quais foram passadas pelo processo de rotaevaporação para retirada do excesso de solvente, depois colocadas na capela de exaustão para evaporação do resíduo do solvente.A massa total das amostras foi15 g. A coluna apresentou um rendimento 75%.

A TABELA 2 mostra os solventes utilizados em C1 com suas respectivas proporções e volumes.

TABELA 2-Proporção dos solventes utilizados em C1

Eluente	proporção	Volume (mL)
HEX:EtoAC	9:1	700
HEX:EtoAC	8:2	500
HEX:EtoAC	7,5:2,5	300
HEX:EtoAC	7:3	200
HEX:EtoAC	6:4	200
HEX:EtoAC	1:1	300
EtoAc	100%	700
MeOH	100%	700

Na FIGURA 10 está representado o esquema de fracionamento do extrato hexânico das folhas de *Maytenus rigida,* bem como a fase movél utilizada no processo de separação pro cromatografia líquida com as respectivas procoções e volumes de cada extração.

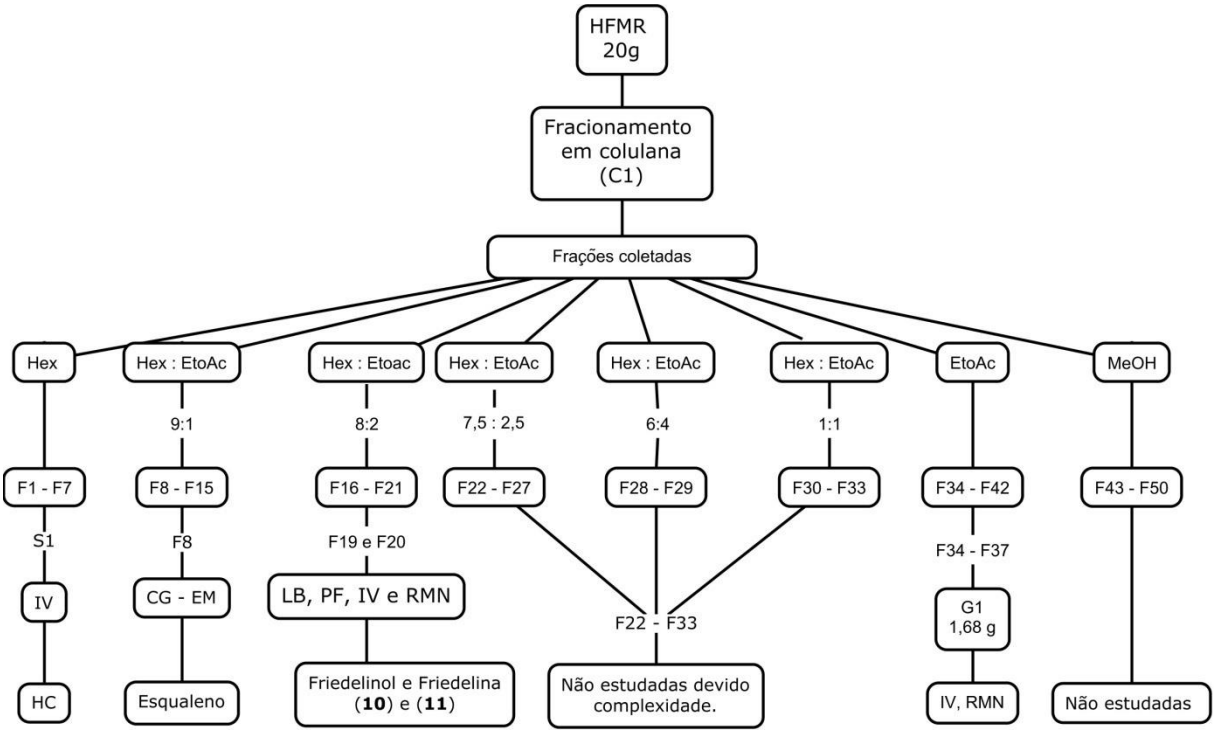


FIGURA 10- Esquema do processo da cromatografia líquida C1. Fonte própria.

As frações F1 a F7 de C1 foram reunidas por CCD, as quais geraram um sólido branco amorfo. Este sólido foi deminado S1 e analisado por infravermelho. A análise

posterior do espectro no IV de S1 mostrou que o mesmo era constituído por uma mistura de hidrocarbonetos alifáticos. AFIGURA 11 mostra fotografias dacromatografia em coluna (C1) utilizada da sepraração da mistura dos fitocontituintes no HFMR e a fração coletada F8, posteriormente identificada como esqualeno.

(A) (B)

FIGURA 11- (A) C1 e (B) fração F8 de C1. Fonte: própria

Realizou-se o teste de LB para as frações F19 e F20 de C1, colocando uma pequena porção da amostra em um tubo de ensaio e adicionou 0,5 mL de $CHCl_3$, 0,5 mL de Ac_2O e 3 gotas de H_2SO_4.

5.2.2.2 Preparação da segunda Coluna (C2)

C2 foi realizada como colunaa baixa pressão (coluna flash), utilizando 0,68g, das frações F34-F37 de C1, empacotada com 28 g de sílica gel, bed 27 cm, ϕ2 cm e volume 56 mL.

Foram coletadas67 frações, utilizando 550 mL de solvente, modo isocrático, Hex :MeOH 8:2. O volume morto calculado foi de 25 mL e cada fração coletada teve aproximadamente 8 mL, as quais foram colocadas na capela de exaustão para a evaporação do solvente. A massa total das amostras foi de 0,512 g. A coluna apresentou um rendimento 74,5%.

Na FIGURA 12 está representado o esquema de fracionamento aplicado no procedimento da coluna flash, em seguida, a FIGURA 13 mostra a fotografia da mesma.

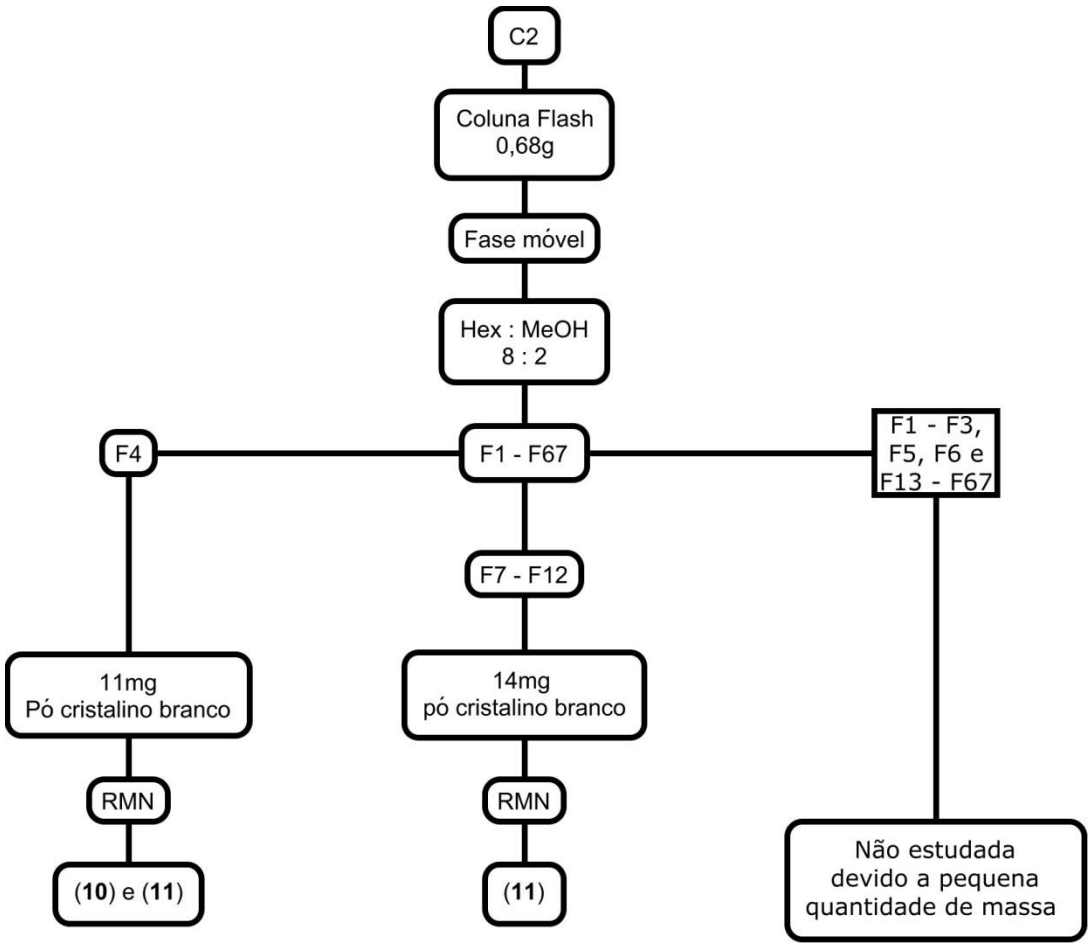


FIGURA 12- Esquema do processo da cromatografia líquida C2. Fonte própria.

FIGURA 13- Coluna cromatográfica de baixa pressão (C2). Fonte própria.

6 Identificação de *constituintes* de baixa polaridade de folhas de *M. rigida* por GC-EM

Foi realizada uma nova coleta de folhas *Maytenus rigida,*na mesma localidade da primeira coleta. Foi utilizado 20 g de material vegetal triturado e 200 mL de EtoAc em um balão de fundo chato e deixou em maceração durante 15 dias,para e extração dos fitocontituintes , em seguida foi feita filtração a vácuo e obtido o extrato de *M. rígida* em EtoAc.

Realizou-se uma extração líquido-líquido (ELL) com 10 mL da fração de EtoAc e 10 mL de KOH a 5%, em um funil de separação (FIGURA 16-A), sendo retirada a fase aquosa e acrescentado mais 10 mL de KOH na fase orgânica. Esse procedimento foi realizado três vezes utilizando a solução básica para a retirada de compostos ácidos presentes no extrato. Em seguida, adicionou-se 10 ml de HCL a 5% na fase orgânica e repetiu-se o procedimento por três vezes, desta vez utilizando a solução ácida para a retirada dos compostos básicos.

Depois do processo de extração ELL, a fase orgânica obtida teve o solvente evaporado em evaporador rotativo, em seguida, o extrato seco foi passado por uma coluna de sílica gel, FIGURA 16-B, (C3), eluida com $CHCl_3$:Hex 1:5, para remoção da clorofila.Foram coletadas cinco frações (FIGURA 16-C), sedo estas agrupadas em G1-C3 devido à similaridade cromatográfica em CCD, dedo analisada por CG-EM; a amostra também foi analisada através do método de FID, onde foi injetada 1µL para identificação dos compostos; as condições de análise foi de split1:10, com temperatura inicial: 40ºC/ 2min., taxa de aquecimento: 3ºC.min.-1, Temperatura final: 150ºC por 5 min. A vazão de gás de arraste (N_2) foi de 3 mL.min.$^{-1}$, e temperatura de injetor de a 290ºC, a temperatura da interface de 300º C, a pressão na coluna de 14 psi. Gás de makeup: ar sintético, N_2 e H_2.

A FIGURA 15 mostra a representação do esquema desde a obtenção do extrato bruto de folhas de M. rigida utilizando EtoAc como solvente extrator,à separação de mistura ELL, utilizando $HCl_{(aq)}$ e $KOH_{(aq)}$.

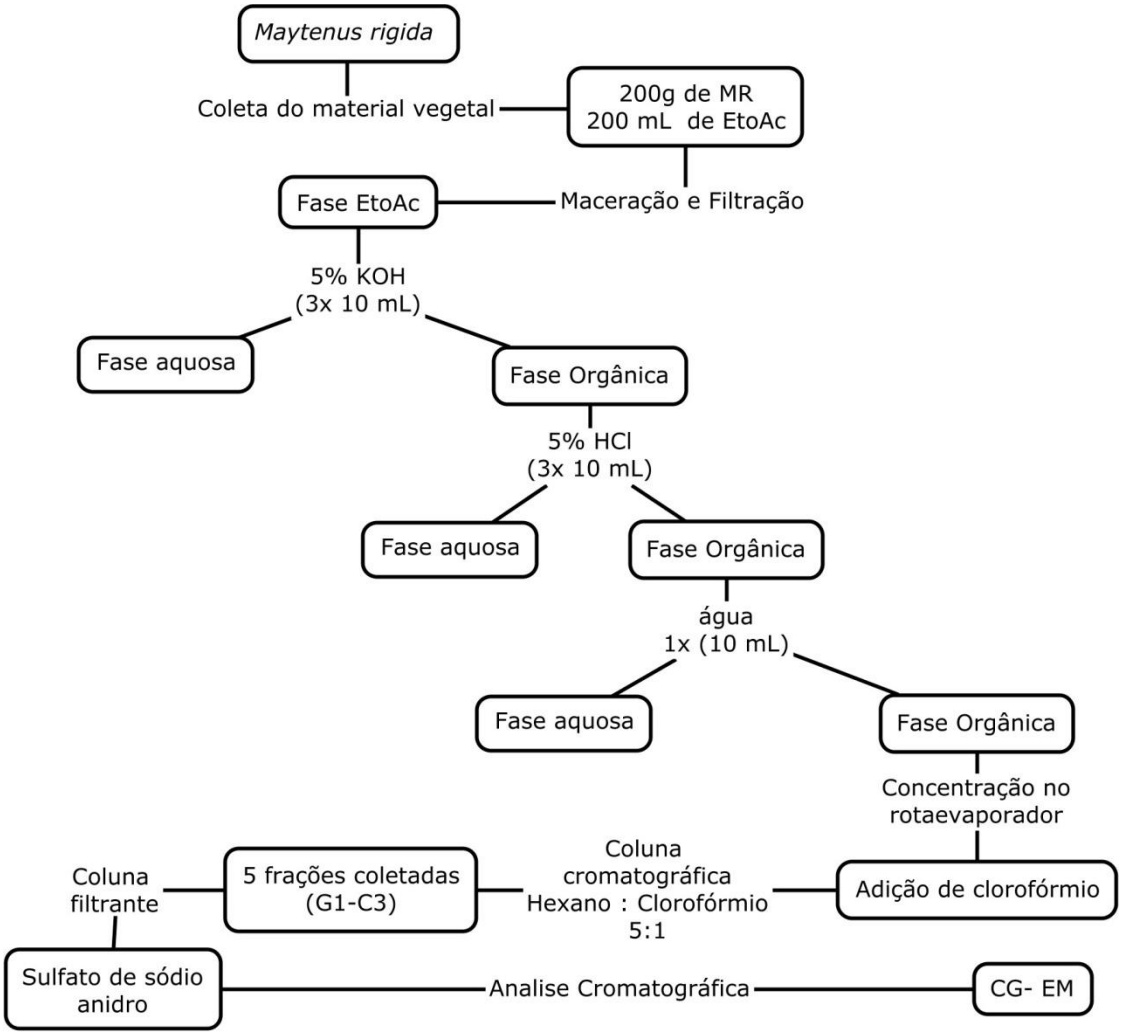


FIGURA 14- Esquema da coleta de *M. rigida* à HRGC – MS

A análise da amostra utilizando cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa (CG-EM) foi realizada no laboratório de cromatografia Dr. Jailson Bittencourt do programa de pós-graduação em Química da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, utilizado em um cromatógrafo SHIMADZU, modelo QP2010 SE, o qual dispõe de uma biblioteca de espectros de massas NIST-11 e NIST-14. Nesta análise foi utilizada uma coluna capilar SBL-5, com 30 m de comprimento e 0,25 mm diâmetro interno, fase estacionária composta por um filme fenila a 5% em dimetilpolisiloxano, e com 0,25 µm de espessura do filme. A temperatura do injetor foi de 290 °C, com um fluxo do gás He de 1,8 $mL.min^{-1}$, temperatura do detetor 269°C e interface 300°C; aquecimento do forno: temperatura inicial de 150 °C (mantida por 2 minutos) até 300ºC (30 minutos) a uma razão de 5 $°C.min^{-1}$,

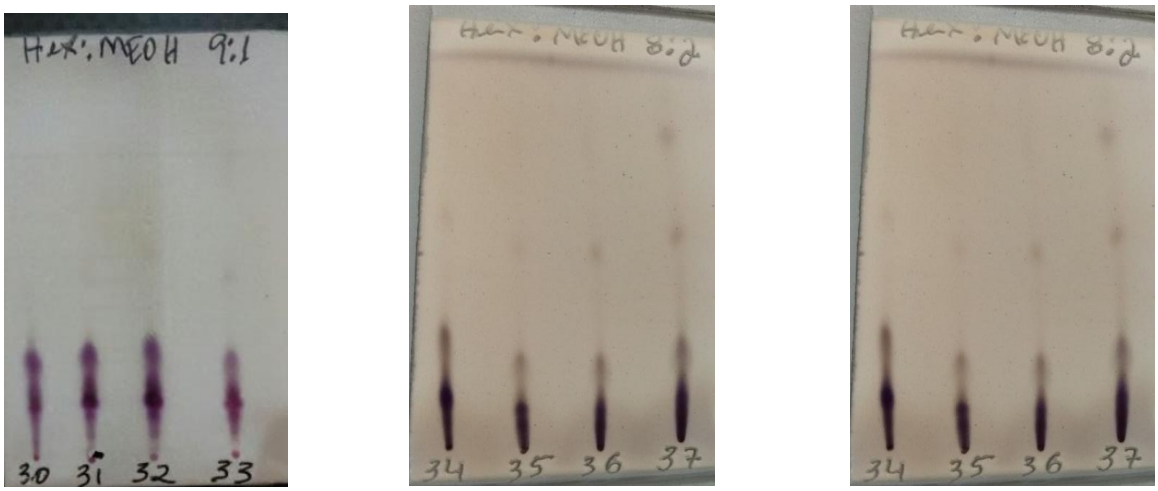
(A) (B) (C)

FIGURA 15**-** (A) Processo de extração no funil de separação, (B) separação das frações do extrato de MR em EtoAc e (C) frações coletadas. Fonte Própria.

7 RESULTADOS E DISCUSSÃO

7.1 Cromatografia líquida do extrato HFMR

A FIGURA 16 mostra o perfil cromatográfico, através de CCDs de F30 – F42 coletadas em C1. Pode ser observado que ambas as frações apresenta características de uma mistura, já que no percurso da eluição deixam caldas e/os manchas sobrepostas. A cromatoplaca 16A foi eluida com Hex:MeOH na proporção de 9:1, enquanto que 16B e 16C foram utilizadas o mesmo eluente na proporção de 8:2. As frações analisadas mostram perfil de misturas de baixa polaridade, ficando boa parte retida na fase fixa.



(A) (B) (C)

FIGURA 16- Cromatografia em camada delgada. CCD de ext. hexânico de folhas de M. rigida *das F30-F42 em HEX:MEOH. Fonte: própria.*

7.2 Mistura de hidrocarbonetos alifáticos, S1

S1

O sólido S1 de C1 foi obtido das frações F1-F7 da coluna C1 do extrato hexânico das folhas (HFMR).O espectro de S1 na região do infravermelho(IV), representada na FIGURA 17,mostrou bandas típicas de hidrocarbonetos alifáticos. As bandas centrada em 2955, 2916, 2872 e 2848 cm^{-1} foram atribuídas a estiramentos de ligações C-H de grupos metinicos, metilênicos e metílicos em compostos alifáticos; apresentou também bandas em 1473,1463 e 1378 cm^{-1} características de deformação angular das ligações CH de grupos alifáticos. O espectro no IV também apresentou uma bandas em 729 e 719 cm^{-1}associadas a deformações fora do plano de grupos CH_2em cadeia.

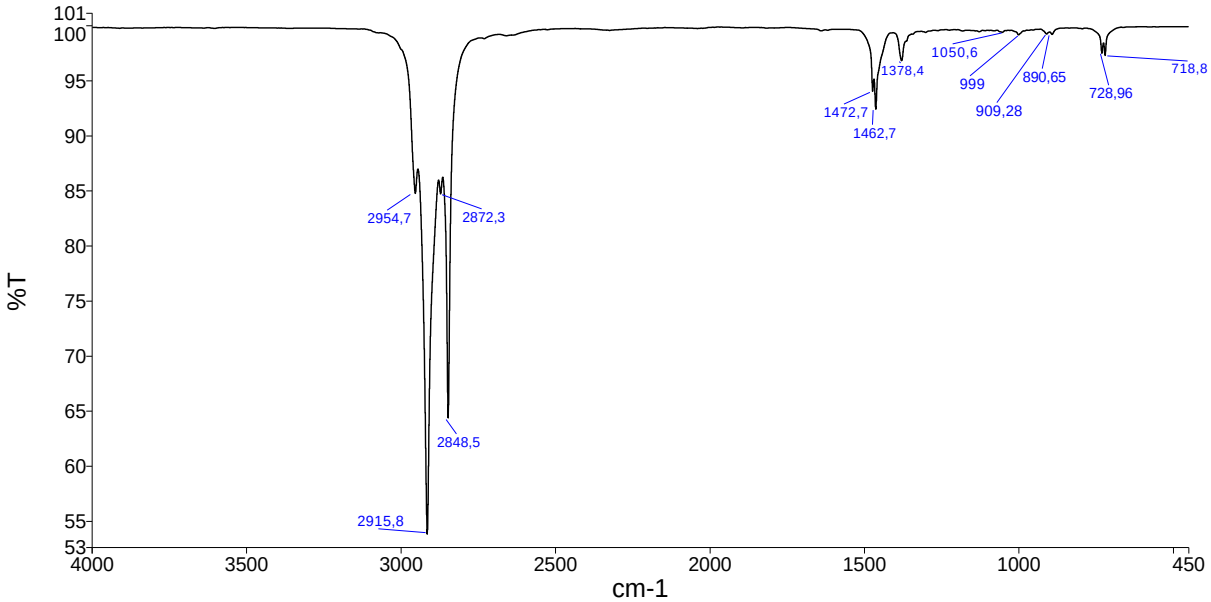


FIGURA 17 – Espectro de S1 de C1 na região do Infravermelho (IV)

7.3 Esqualeno (3)

O esqualeno foi isolado puro da fação F8 de C1, extrato HFMR, como um líquido amarelo-alaranjado e viscoso. Este composto foi analisado por CG-EM. Nesta análise o esqualeno foi identificado com 94% de similaridade com BD-NIST. O espectro de

massas, referente ao pico registrado no cromatograma de íons totais (TIC, FIGURA 18A) em 26,23 minutos, mostrou íons fragmentos em *m/z* 410 (traços), atribuído ao íon radical-molecular ([M+•]); *m/z* 69 (pico base), entre outros, de acordo com a FIGURA 18B. Estes dados corroboram com os dados encontrados por extração líquido-líquido (ELL) a partir do extrato em acetato de etila das folhas de *M. rígida*.

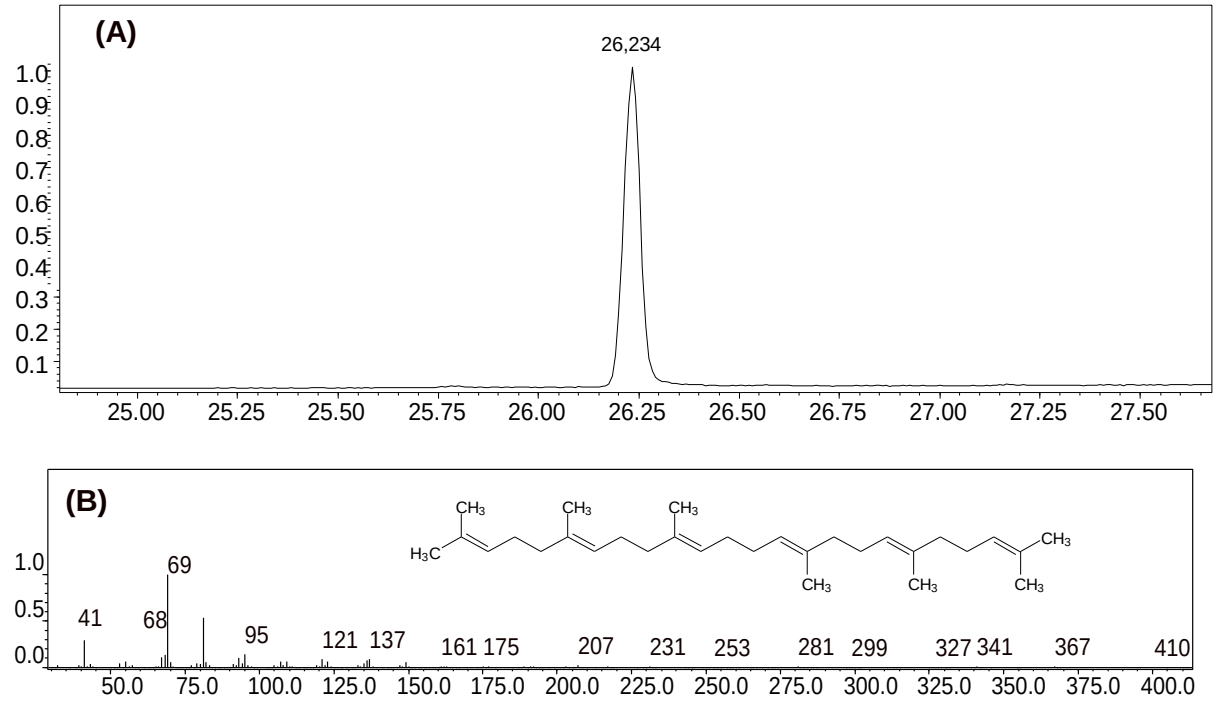
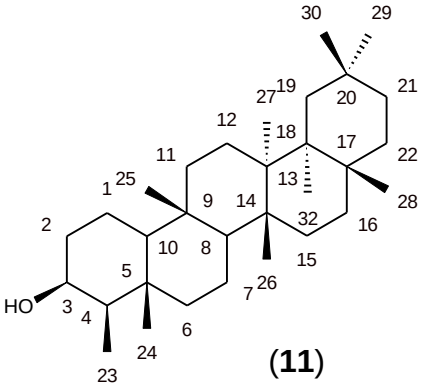


FIGURA 18 - (A) cromatograma de F8-C1 HFMR, através de CG-EM, utilizando $CHCl_3$ como solvente dispersor, (B) EM do esqualeno.

7.4 3*β*-Friedelinol (11)



O composto **11** foi isolado por recristalização como um sólido branco da fração F-19/C1, obtida do extrato em hexano das folhas de *M. rígida*. Este sólido apresentou

temperatura de fusão entre 230-235 ºC (hexano). Uma amostra desse sólido forneceu resultado de Liebermann-Burcahard positivo (cor castanho) para TTPC.

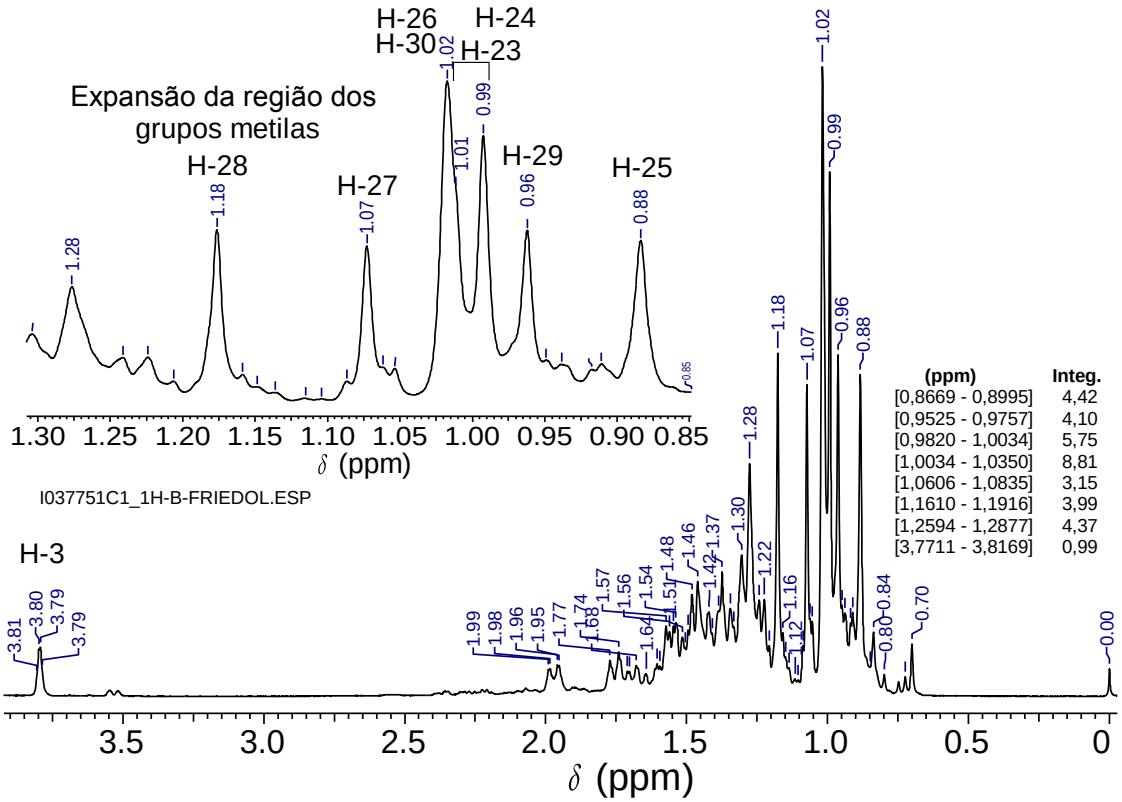


FIGURA 19 Espectro de RMN de ^{1}H de **11** ($CDCl_3$ e gotas de piridina d_5, 400 MHz).

O espectro de RMN de ^{1}H (FIGURA 19) mostrou um multipleto (dd, 7,5 Hz) entre δ 3,81 a δ 3,79, que foi atribuído ao hidrogênio hidroxilado (H-3). Na região de valores de deslocamentos químicos dos hidrogênios alifáticos foram observados sete simpletos atribuídos aos hidrogênios de grupos metila em δ 0,88 (H-25), 0,96 (H-29), 0,99 (H-24), 1,01 (H-26), 1,02 (H-30), 1,07 (H-27) e 1,18 (H-28) e um sinal dupleto (7,5 Hz), observado em δ 1,0 ppm, atribuído a H-23 [Tese Salazar, 2005].

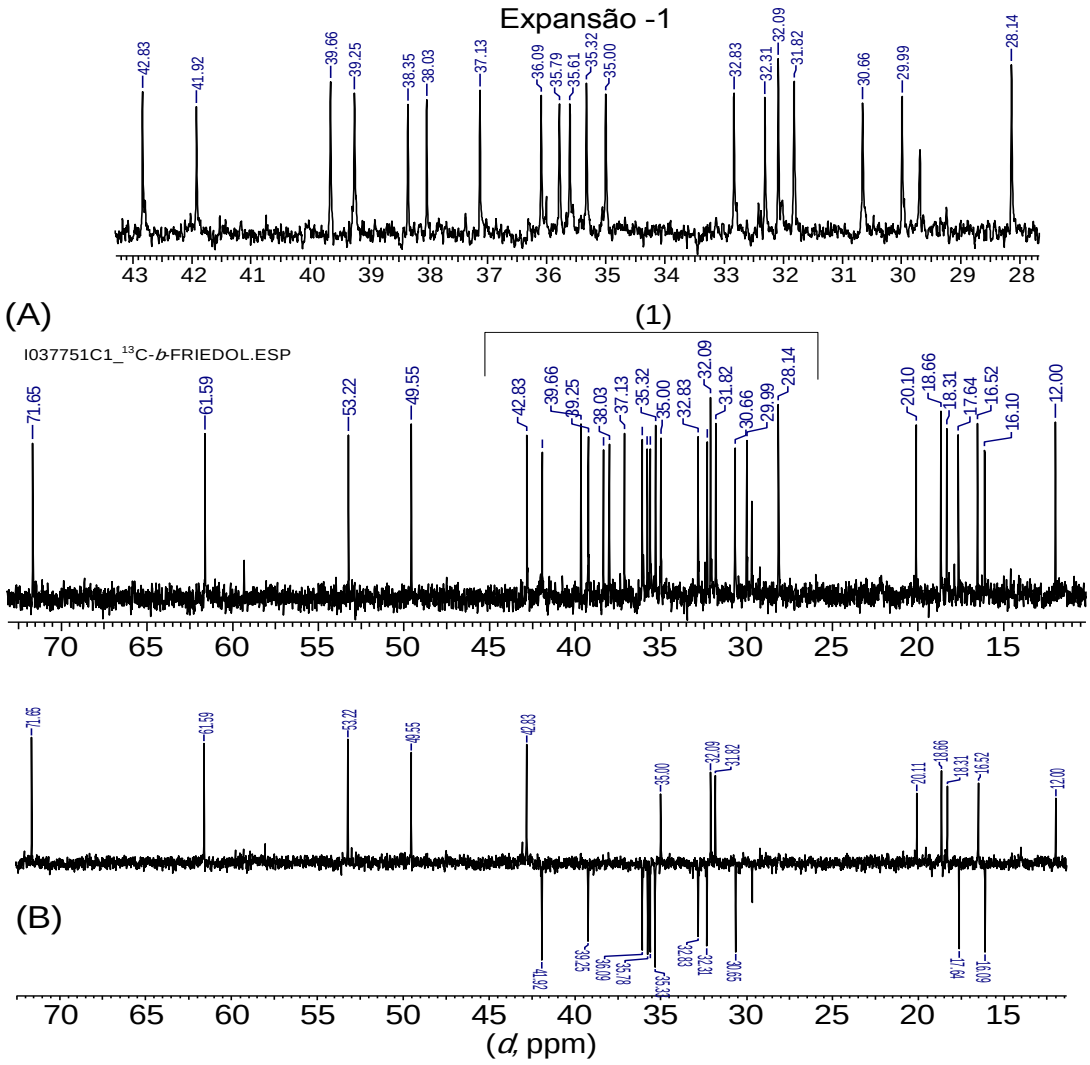


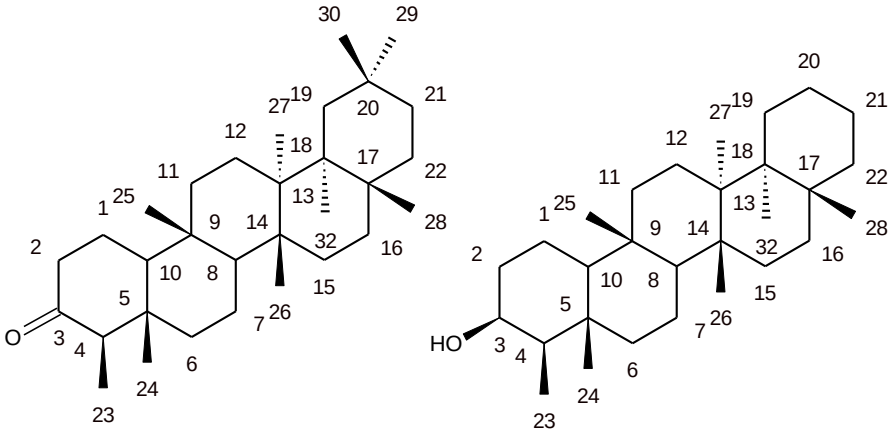
FIGURA 20-Espectros RMN de DEPT-135 (A) e ^{13}C (B) de **11** ($CDCl_3$, 100 MHz).

O espectro de RMN de^{13}C (FIGURA 20) apresentou seis sinais de carbonos não oxigenados, cinco metínicos, onze metilênicos e oito metílicos, registrados geralmente em triterpenos pentacíclicos (TTPC) friedelanos. O espectro apresentou também sinal em δ 71,65; referente a carbono oxigenado (C-3) Mediante comparação com os dados da literatura [SALAZAR, 2005] (TABELA Y) foi possível identificar esse composto como 3*β*−friedelinol (**11**). A comparação entre os valores de δ de ^{13}C de 11 com os da literatura mostrou uma excelente correlação linear (R^2 = 0,9995).

TABELA 3- Comparação entre os valores de δ de ^{13}C de **11** ($CDCl_3$, 100 MHz) e os respectivos valores publicados (Salazar, 2005) para o β-friedelinol (CDCl3, 100 MHz)

NC	11	Lit [a]	NC	11	Lit [a]
1	16,10	16,05	16	35,79	35,56
2	36,09	36,56	17	29,99	30,03
3	71,65	72,76	18	42,83	42,84
4	49,55	49,19	19	35,32	35,35
5	38,03	38,38	20	28,14	28,84
6	41,92	41,74	21	32,09	32,34
7	17,64	17,56	22	39,25	39,29
8	53,22	53,21	23	12,00	11,62
9	37,13	37,12	24	16,52	16,40
10	61,59	61,39	25	18,31	18,25
11	35,61	35,56	26	20,10	20,12
12	30,66	30,65	27	18,66	18,65
13	38,35	38,36	28	32,83	32,09
14	39,66	39,69	29	35,00	35,03
15	32,31	32,34	30	31,82	31,80

7.5 Mistutra de Friedelina (10) e 3β-Friedelinol (11)



(**10**) (**11**)

A mistura dos constituintes **10** e **11** a partir dos extratos em hexano e acetato de etila, das folhas de *M. rigida*. A mistura foi isolada na forma de um sólido branco cristalino, que fundiu na faixa de temperatura de 220 a 235 ºC. Uma amostra da mistura de **10** e **11** forneceu resultado positivo para o teste de Liebermann-Burchard. O espectro da mistura no IV (FIGURA 21) apresentou bandas entre 3472,6 cm^{-1} característica de estiramento de ligação OH (hidroxila de álcool), e em 2924,8 cm^{-1}, característica de estiramento assimétrico da ligação CH de grupos CH_2 alifáticos; em

2870 cm^{-1}, característica de estiramento simétrico da ligação CH de grupos CH_2 e CH_3 alifáticos; apresentou também bandas em 149,8 e 1385,2 cm^{-1}, características de deformação angular no plano de ligação simples CH de grupos alifáticos. O espectro no IV também apresentou uma banda em 1705,7 cm^{-1} característica de deformações axiais de carbonila de cetona, informações estas que corroboram com os dados de RMN (não mostrados), características típicas de triterpenos pentacíclicos da série dos friedelano.

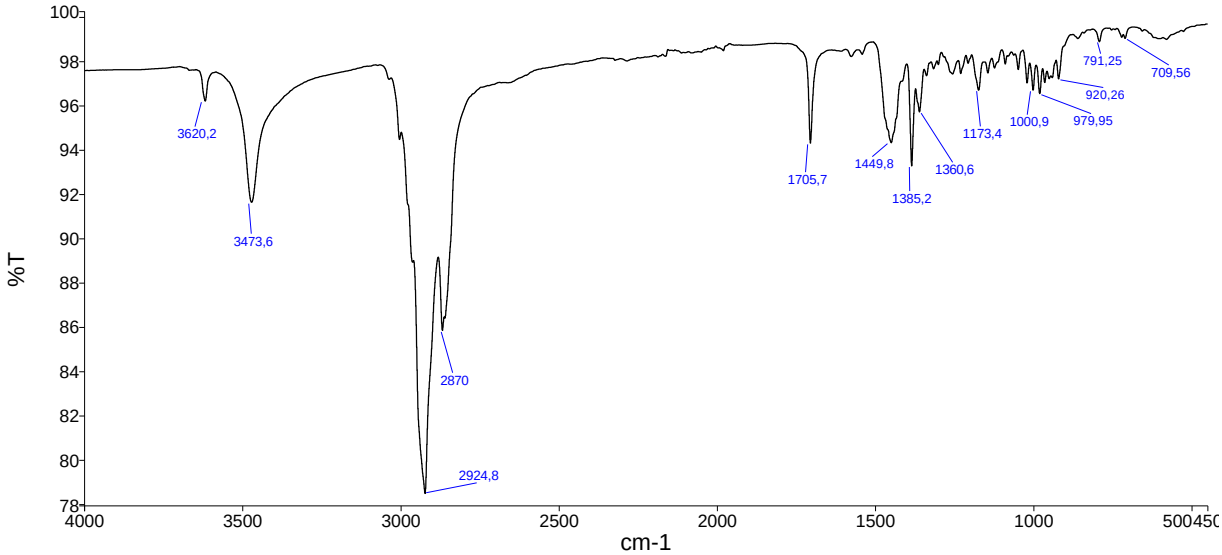


FIGURA 21- Espectro IV para F19 C1 extratos da Maytenus.

As frações F19 e F20 de C1 apresentaram resultados positivos para LB, de acordo mostrado na FIGURA 19A e 19B, sendo observado uma coloração castanha o que indica possivelmente a presença de um éster triterpênico.

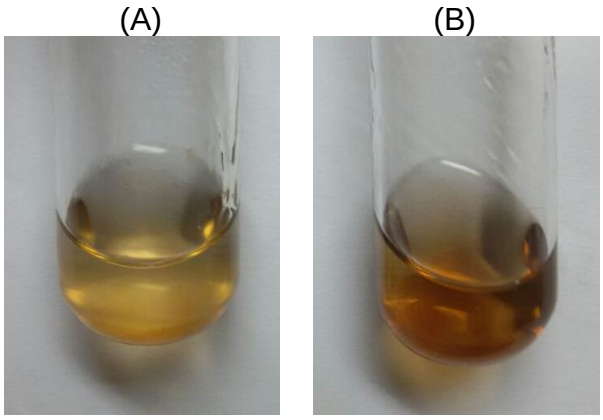


FIGURA 22- Liebermann - Burchard de F19 (A) e (B) F20 de c1, respectivamente. Fonte Própria.

Foi feita ainda uma recristalização das frações acima, utilizando hexano gelado sendo obtido 100mg, Sólido de F19 (SF19-C1), de um sólido branco, cristalino, com

ponto de fusão entre 220 e 253ºC, e na segunda fração, 120mg, Sólido de F 20 (SF20-C1), branco, cristalino, com ponto de fusão entre 192 e 220ºC.

As frações F7 - F11 de C2 foram agrupadas com G1, dado sua semelhança quanto ao perfil cromatográfico, FIGURA 23A. G1 foi purificado com hexano gelado, obtendo 26 mg de um precipitado, sólido de G1-C2 (SG1-C2), branco, cristalino,em seguida realizou-se também o teste de LB,FIGURA 23B, os quais repetiram os mesmos resultados de F19 e F20 de C1,sendo possivelmente amostras de ésteres triterpênicos. Foi realizado também análise de RMN.

(A) (B)

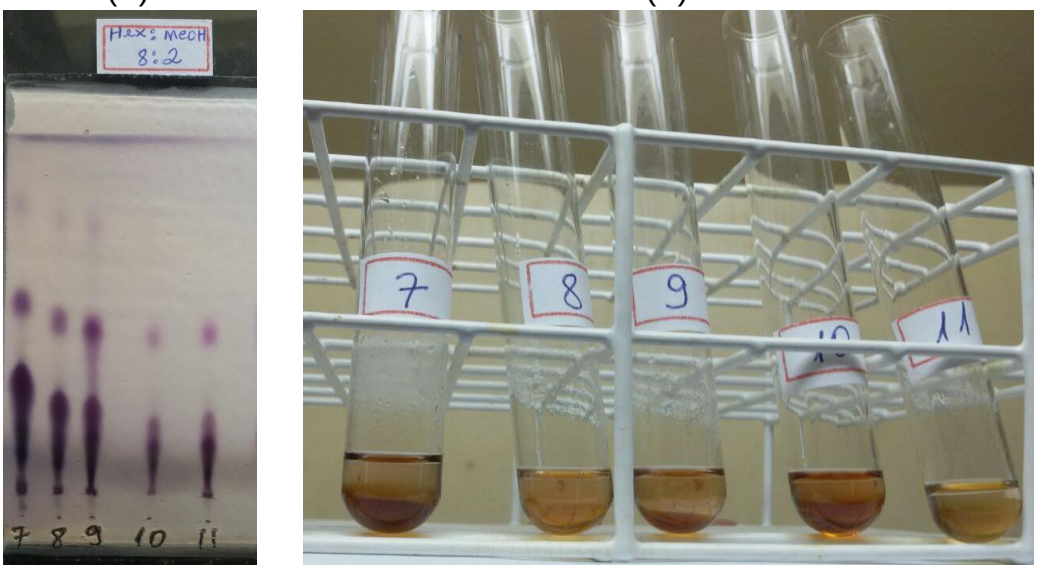


FIGURA 23- (A) CCD de F7 – F11 de C2 e (B) Teste de Liebermann - Burchard para G1 de C2,respectivamente. Fonte própria.

7.6 Identificação dos compostos extraídos por extração ELL

A análise da fração purificada por ELL, obtida do extrato bruto de *M. rígida* em EtoAc, feita utilizando CG-EM permitiu identificar onze compostos químicos, de acordo com o cromatograma de íons totais (TIC), FIGURA 24. A identificação foi feita por comparação espectral com os dados da biblioteca National Institute of Standards and Technology (NIST) residente no workstation do CG-EM e no banco de dados NIST online. As identificações foram aceitas quando apresentavam acertos de similaridade espectral maior que 90%.

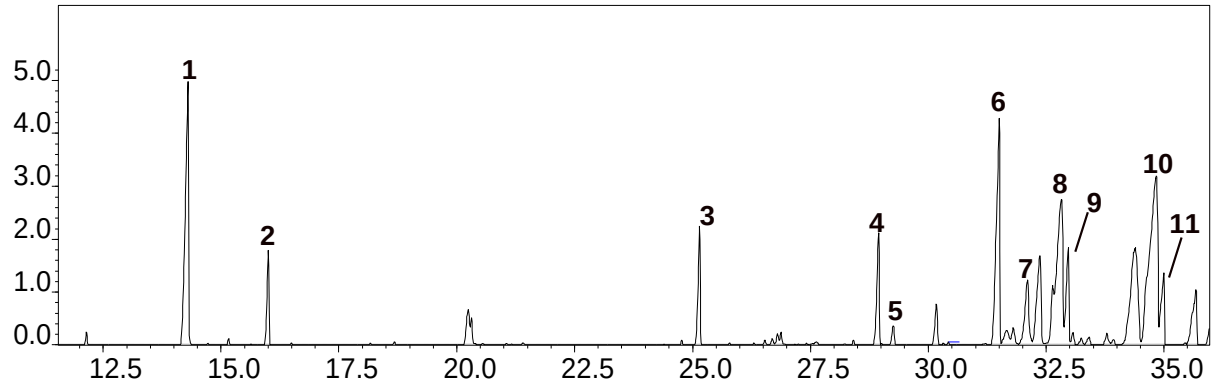


FIGURA 24 -TIC do extrato de *M. rígida*, através de CG-EM, utilizando $CHCl_3$ como solvente dispersor.

Na TABELA 4 estão listados os compostos químicos identificados da extração liquido liquido, bem como o tempo de retenção, a área e os principais íons com as respectivas porcentagens de cada um, obtidos da fragmentação por meio da CG-EM.

TABELA 4- Compostos químicos identificados no extrato de EtoAc de folha de *M. rigida* através da analise do cromatograma TIC obtido por CG-EM.

Pico	Classe	Nome	TR	Área %	Principais íons / em (m/z %)
1	T	Fitol	14,305	11,22	57(52), 67(23), 71(100), 81(39,4), 83(24,2), 95(30,8), 109(9,5) e 123(20,4)
2	T	Fitol acetato	16.006	2,58	57(79,2), 68(100), 69(63,9), 82(72,9), 95(61,9), 109, (17,6) 123(34,6) e 124(10,4)
3	TT	Esqualeno	25,148	3,50	55(6,7), 69(100), 81(52,5), 95(13), 109(5,1), 121(6,1), 149(2,6) e 410 (traços)
4	HC	Octacosano	28,948	3,57	55(23), 69(15)57(100), 113(7) 127(4)
5	TTP	*α*-tocoferol	29,256	0,61	57(24,8), 165(100), 166(8,1), 205(4,3) e 430(6,6 M)
6	HC	Hentriacontano	31,501	9,54	55(17) 57(100), 71(70), 85(46), 97(11), 99(15), 113(8), 127(5) e 169(1)

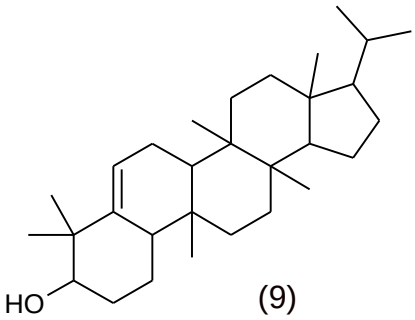
7	TTPC	*β*-amirina	32,106	3,64	55(56), 69(63,2), 79(34,1), 81(30,5), 95(77), 107(40,2), 203(65,7) e 218(100)
8	TTPC	lupeol	32,828	10,60	95(100), 55(87), 69(85), 109(77), 189(41), 207(280), 203(23).
9	esteróide	Simiarenol	32,967	3,62	55(75), 69(83), 81(71,2), 95(100), 109(72,1), 121(54,2), 134(59,5), 259(61,5) e 274(42,1)
10	TTPC	Fridelina	34,84	18,24	426([M+•]), 69(100), 109(64), 123(45), 121(33), 133(19), 411(15), 393(7) e 273(8).
11	TTPC	*3-β*-Fridelinol	35,000	3	411(42), 95(100), 109(58), 123(30), 121(41), 133(31), 411(15), 393(7) e 259(55).

*TTerpenos, TT Triterpenos, HC Hidrocarbonetos, TTP Tetraterpeno e TTPC Triterpenospentaciclícos.

Foram identificados 11 constituintes químicos no extrato em acetato de etila das folhas de m rigida, sendo dois hidrocarbonetos de peso molecular relativamente alto, o octacosano ($C_{28}H_{58}$, 4) e o hentriacontano ($C_{31}H_{64}$, 6) e nove constituintes triterpênicos, sendo dois diterpenos, o fitol (1) e acetato de fitol (2); um triterpeno de cadeia aberta, o esqualeno (3); um esteróide, o simiarenol (9); quatro triterpenospentacíclicos, a *β*-amirina (7), lupeol (8), (10) friedelina e 3*β*-friedelinol(11), por fim um tetraterpeno, o *α*-tocoferol, conhecido como vitamina E.

Dentre os compostos identificados por CG-EM, destacam-se também a fridelina (10) e o 3-*β*-friedelinol(11), os quais pertencem ao grupos dos TTPC, sendo já identificados em várias outra espécies de Maytenus (OLIVEIRA 2012).

7.7 Simiarenol (9)



(9)

Composto inédito identificado no extrato da folhas de M. rigida com acetato de etila por ELL, porém não foi isolado devido à pequena quantidade material trabalhado nesse processo, sendo apena 20 g de material vegetal em 200 mL de acetato de etila. O composto 9 já foi isolado em outras espécies de *Maytenus*, como a *M. aquifolium* (ROCHA, 20030).

CAPÍTULO 2

CAPÍTULO 2 -TESTES BIOLÓGICOS DE EXTRATOS DE M. rigida, M. truncata E M. acanthophylla (CELASTRACEAE)

8 TESTES BIOLÓGICOS

8.1 Estudo da citotoxicidade em linhagens de células tumorais *in vitro*

Foi realizado o teste de citotoxicidade em células tumorais com o objetivo de Verificar o potencial citotóxico *in vitro* de novas moléculas em linhagens de células tumorais. Essa análise fez parte de um *screening* inicial para determinação do potencial anticâncer de alguns extratos e frações de *Maytenus rígida* e *Maytenus acanthophylla*. As amostras de extrato e frações de *M. acanthophylla* foram gentilmente doadas pela Mestra Rosângela Pereira.

8.1.1 Preparo das amostras

As amostras foram diluídas em DMSO puro estéril na concentração de $10mg.mL^{-1}$ (para extratos) ou 5mg/mL (para compostos puros). As amostras foram testadas em concentrações que variaram de 0,19-50µg/mL

8.1.2 Células

Em um primeiro experimento, foram utilizadas células tumorais HepG2 (carcinoma hepatocelular humano) e HL-60 (leucemia promielocítica humana) doadas pelo Hospital A.C. Camargo, São Paulo, SP, Brasil. As células foram cultivadas em garrafas para cultura de células (75 cm^3, volume de 250 mL), os meios utilizados foram RPMI1640 (meio de cultura desenvolvido pelo Instituto Memorial do Roswell Park para cultura de células leucêmicas humanas em suspensão) e suplementados com 10% de soro bovino fetal. As células foram mantidas em incubadoras com atmosfera de 5 % de CO_2 a 37 ºC. Diariamente acompanhava-se o crescimento celular com a utilização de microscópio de inversão. O meio foi trocado sempre que o crescimento celular atingia confluência necessária para renovação de nutrientes. Para a manutenção de células aderidas utilizou-se tripsina (0,25%) para que as células despregassem-se das paredes das garrafas. As culturas de células apresentaram-se negativas para micoplasma, conforme avaliado pela coloração com Hoechst (Mycoplasma Stain Kit, Cat. MYC1, Sigma-Aldrich®, St Louis, MO, USA).

No segundo experimento foram utilizadas células MCF7 (carcinoma de mama humano), HCT116 (carcinoma de cólon humano), HepG2 (carcinoma hepatocelular humano) e HL-60 (leucemia promielocítica humana) obtidas da ATCC. As células foram cultivadas em garrafas para cultura de células (75 cm^3, volume de 250 mL), os meios utilizados foram RPMI 1640 e suplementados com 10% de soro bovino fetal. As células foram mantidas em incubadoras com atmosfera de 5 % de CO_2 a 37 ºC. Diariamente acompanhava-se o crescimento celular com a utilização de microscópio de inversão. O meio foi trocado sempre que o crescimento celular atingia confluência necessária para renovação de nutrientes. Para a manutenção de células aderidas utilizou-se tripsina (0,25%) para que as células despregassem-se das paredes das garrafas. As culturas de células apresentavam negativas para microplasma, conforme avaliado pela colocação com Hoechst (Mycoplasma Stain Kit, Cat. MYC1, Sigma-Aldrich®, St Louis, MO, USA).

8.1.3 Ensaio de citotoxicidade

Para avaliar a citotoxicidade dos compostos, o ensaio do alamar blue foi realizado após 72 horas de exposição com os compostos testes. O alamar blue, recentemente identificado como resazurina (O'BRIEN *et al.,* 2000), é um indicador fluorescente/colorimétrico com propriedades redox. Como os sais de tetrazólio, o alamar blue reduz-se em células em proliferação. A forma oxidada é azul (não fluorescente/ célula não viável) e a forma reduzida é rósea (fluorescente/ célula viável). A redução do alamar blue, reflete a proliferação celular. Este, foi inicialmente utilizado para indicar crescimento e/ou viabilidade celular no monitoramento de proliferação de linfócitos (AHMED *et al.,* 1994) e atualmente apresenta várias aplicações.

Inicialmente, as células foram plaqueadas em placas de 96 poços (100 µL/poço de uma solução de 0,3 x 10^6 células/mL para células em suspensão e 0,7 x 10^5 células.mL^{-1} para células aderidas). Após 24 horas de incubação, os compostos testes dissolvidos em DMSO foram adicionados em cada poço e incubados por 72 horas. A doxorrubicina foi utilizada como controle positivo. O controle negativo recebeu a mesma quantidade de DMSO. Quatro horas antes do final do período de incubação, 20µL da solução estoque (0,312mg/mL) de alamar blue (resazurina) foram adicionados a cada poço. As absorbâncias foram mensuradas nos comprimentos de onda de 570 nm (reduzido) e 595 nm (oxidado) utilizando uma leitora de placa (AHMED *et al.,* 1994).

8.2 Teste de genotoxicidade utilizando o protocolo de *Alium cepa*

O teste foi realizado utilizando 80 sementes de *Alium cepa* da subespécie *Redcreole*, estas foram colocadas para germinar em uma placa de Petri com um papel filtro umedecido com água destilada. Decorrido oito dias as sementes já haviam germinado e o meristema radicular mediam cerca de 2 cm, FIGURA 25.

Foram preparados quatro tubos de ensaio com extratos hexânico de raiz de *M. rigida* em diferentes concentrações, um tubo com dimetilsulfóxido (DMSO), controle positivo e um tubo com água destilada, controle negativo, de acordo com a FIGURA 26, onde foram colocados cinco meristemas em cada tubo e deixado por um período de 48horas.

Após esse período, os meristemas radiculares foram retirados dos tubos que continham a solução do extrato e fixados em Carnoy modificado (uma solução de etanol e ácido acético, na concentração de 3:1), onde permaneceram por 24 horas, depois foram removidos para frascos contendo álcool 70% e conservadas no refrigerador em temperatura de 7ºC até o momento do preparo das lâminas para as análises de microscopia, FIGURA 30. Os meristemas foram escolhidos aleatoriamente para a realizaçãodo experimento.

(A) (B)

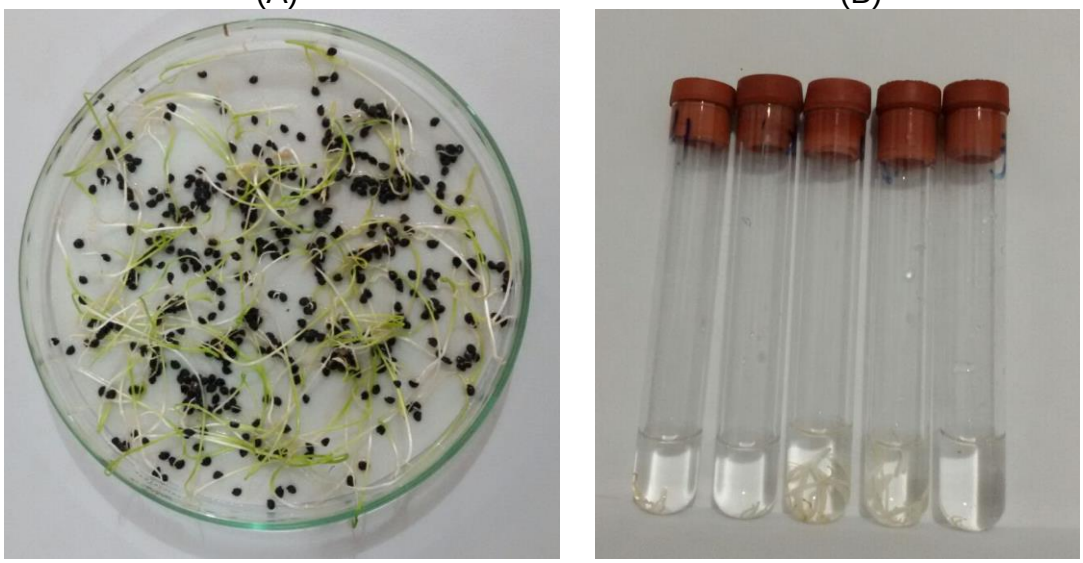


FIGURA 25- (A) Placa de Petri com as sementes de *Allium cepa* germinadas e (B) os meristemas coletados e conservados em álcool 70%. Fonte Própria.

50 mg.mL^{-1} 100 mg.mL^{-1} 150 mg.mL^{-1} 200 mg.mL^{-1} DMSO Água destilada

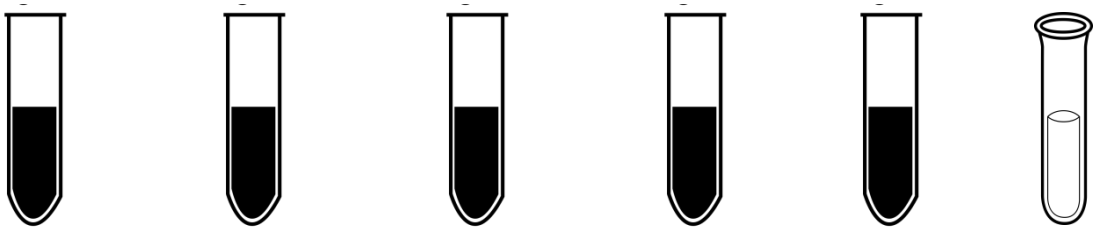


FIGURA 26- Esquema dos tubos de ensaio com ext. hexânico de raiz de *M. rígida*, controle positivo e controle negativo.

8.2.1 Preparo e coloração das lâminas

Foi preparada uma solução de corante utilizando 0,2g de orceína e 11 mL de água, aqueceu a mistura até a solubilização do sólido e posteriormente acrescentou 9 mL de ácido acético.

Após a coleta e tratamento dos meristemas de *A. cepa*, foram preparadas diversas lâminas utilizando um pequeno fragmento do meristema radicular (escolhido aleatoriamente), colocado sobre a lâmina junto com uma gota do corante e coberto com uma lamínula, fazendo uma pequena pressão com o polegar para esmagar o fragmento vegetal, de modo que o material genético ficasse exposto para ser observado no microscópio.

8.3 Teste de toxicidade utilizando o protocolo de *Artemias salinas*

O teste foi realizado utilizando 1,2 g de cistos de *Artemias salinas*, que foram colocados para eclodir em água com sal marinho, para posteriormente avaliar o potencial tóxico através da atividade larvicida no microcrustácio.

Preparou-se um aquário com e 3 L de água mineral da marca Indaiá e 99 g de sal marinho. O aquário continha uma parte escura, onde foram depositados os cistos, e no lado oposto foi colada uma luz incidente, pois as *Artemias* possuem fototropismo e ao eclodirem, migraram para o lado onde estava a luminosidade (FIGURA 27A). O período de eclosão durou 48 horas e foi mantida uma temperatura constante de 22ºC no laboratório de óleos essenciais, local onde foi realizado o experimento.

Foram preparados sete tubos de ensaio com as amostra que foram testadas, de acordo com a TABELA 5.

TABELA 5**-** Concentrações dos extratos utilizados no teste de Artemis salinas

Nº	EFMT	EEMR	HFMR	$K_2Cr_2O_7$
1	1000 µg.mL^{-1}	1000 µg.mL^{-1}	1000 µg.mL^{-1}	1000 µg.mL^{-1}
2	500 µg.mL^{-1}	500 µg.mL^{-1}	500 µg.mL^{-1}	500 µg.mL^{-1}
3	250 µg.mL^{-1}	250 µg.mL^{-1}	250 µg.mL^{-1}	250 µg.mL^{-1}
4	125 µg.mL^{-1}	125 µg.mL^{-1}	125 µg.mL^{-1}	125 µg.mL^{-1}
5	62,5 µg.mL^{-1}	62,5 µg.mL^{-1}	62,5 µg.mL^{-1}	62,5 µg.mL^{-1}
6	31,25 µg.mL^{-1}	31,25 µg.mL^{-1}	31,25 µg.mL^{-1}	31,25 µg.mL^{-1}
7	15,625 µg.mL^{-1}	15,625 µg.mL^{-1}	15,625 µg.mL^{-1}	15,625 µg.mL^{-1}
8	Água: controle negativo			

*EFMT extrato etanólicode folhas de *M. truncata*, EEMA extrato etanólicode folhas de *M. acanthophylla*, HFMR extrato hexânico de folhas de *M. rigida* e $K_2Cr_2O_7$ dicromato de potássio.

Após 48 horas que os cistos foram expostos na água para eclosão, já estavam em fase de larvas (nauplius), FIGURA 27B. Em cada tubo de ensaio contendo as concentrações dos estratos, $K_2Cr_2O_7$ (controle positivo) e a água (controle negativo) foram colocadas 10 larvas e deixado por 24 horas, para fazer a primeira observação e se houve atividade larvicida.

(A) (B)

FIGURA 27- (A) Aquário com água, sal marinho e os cistos para eclosão; (B) fotografia microscópica das *Artemias salinas* com aumento de 40x. Fonte própria.

8.4 Teste de atividade microbiológica

Foram utilizadas culturas isoladas de *Staphylococcus aureus (BAC-1), Proteus mirabilis (BAC-2), Bacillus cereus (BAC-3), Klebsiella pneumoniae (BAC-4), Pseudomonas aeruginosa (BAC-5), Escherichia coli (BAC-6) e Salmonela typhi (BACA-7)*, doadas pelo Laboratório de Microbiologia da Universidade Federal da Bahia (UFBA).

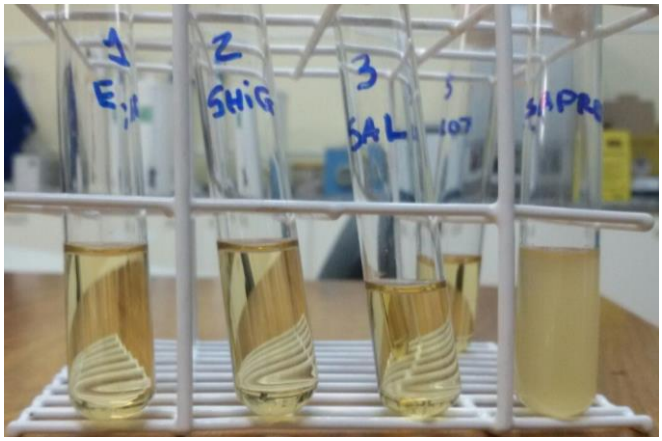


FIGURA 28 **-** Culturas bacterianas utilizadas no experimento. Fonte: própria.

8.4.1 Manutenção dos microrganismos

Os microrganismos foram mantidos em estufa bacteriológica, modelo Cienlab refrigeradora a 37 °C por 48 h em meio de cultura Brain Heart Infusion (BHI), que foram preparados de acordo com as instruções do fabricante Micromed e esterilizados em autoclave a 121 ºC durante 15 minutos.

8.4.2 Preparo das placas de Petri

Foi pesado 38g de Agar Mueller Hinton, colocou em um erlenmeyer de capacidade 2 L e adicionou água destilada para preparar 1 L com o meio de cultura. Colocou em uma placa de aquecimento e agitação magnética a 80 Cº durante 20 minutos, para dissolução total do meio de cultura na água. Decorrido esse período, foi colocado na autoclave para o processo de esterilização na temperatura de 121 ºC por 15 minutos. Após esse processo o meio de cultura foi distribuído em 30 placas de Petri, aproximadamente 20 mL em cada uma, aguardou cerca de 30 minutos para solidificar o ágar e foram colocadas na estufa a 37 Cº por 24 horas para conferir a prova de esterilidade. Foi observado que não houve contaminação das placas, então as mesmas foram retiradas e guardadas na geladeira para serem usadas posteriormente nos testes de crescimento microbiológico.

8.4.3 Preparo das amostras dos extratos

Foram preparados discos de papel filtros e impregnado com os seguintes extratos: hexânico de folhas de *M. acanthophylla (*HFMA), etanólico de folhas de *M. truncata* (EEMT) e hexânico de raízes de *M. rígida*(HRMR), todos nas concentrações de 100, 300 e 500 $mg.mL^{-1}$, FIGURA 29.

FIGURA 29 - Discos de papel filtro impregnados com os extratos utilizados no experimento.
Fonte: própria.

8.4.4 Testes de sensibilidade das linhagens microbianas aos extratos

Para avaliar a sensibilidade e resistência dos microrganismos frente aos extratos das *Maytenus* foi utilizado o método de disco-difusão. Esse teste foi descrito em 1966, por Bauer e Kirby, fornece resultados qualitativos, sendo um dos métodos de suscetibilidade mais simples, confiável e mais utilizado pelos laboratórios de microbiologia. O seu princípio básico é a difusão da substância em análise na superfície do ágar, a partir dos discos impregnados.

O teste foi realizado utilizando discos de papel-filtro, impregnados com extrato de *Maytenus* sp. em diferentes concentrações, sendo colocados sobre as placas de Petri com ágar, após a semeadura dos microrganismos, numa concentração de aproximadamente $1x10^8$ $UFC.mL^{-1}$. As placas foram acondicionadas em estufa bacteriológica a 37ºC para o crescimento dos microrganismos.

9 RESULTADOS E DISCUSSÃO

9.1 Estudo da citotoxicidade em linhagens de células tumorais *in vitro*

A TABELA 6 apresenta os resultados encontrados no ensaio de citotoxicidade das amostras testados em concentração única (50µg/mL para extratos). As amostras consideradas ativas são capazes de inibir a proliferação celular de pelo menos 75% da linhagem testada.

TABELA 6– Porcentagem de inibição da proliferação celular em linhagens de células tumorais.

Amostras	Porcentagem de inibição	
	HepG2	HL60
EXT.ETOH. *M. rigida* (casca da raiz)	68,2 ± 15,56	65,07 ± 6,41
EXT $CHCl_3$ *M.acanthophylla* (folha)	2,11 ± 2,96	10,74 ± 11,60
EXT. ETOH. *M. acanthophylla* (folha)	21,72 ± 12,35	31,42 ± 3,90
EXT. HEX. *M. acanthophylla* (folha)	12,09 ± 0,0	9,28 ± 9,75
EXT. HEX. *M. rigida* (folha)	5,46 ± 8,30	11,45 ± 12,69
F17-C2(HEX. *M.rigida* - folha)	2,93 ± 5,70	5,95 ± 3,76
F46-C2 (HEX. *M.rigida* - folha)	3,92 ± 2,79	13,27 ± 6,70
EXT. aq. *M.acanthophylla*(folha)	8,77 ± 0,69	7,25 ± 1,65

Foi observado que as porcentagens de inibição celular ± erro padrão da média de dois experimentos independentes realizados em triplicata pelo método do Alamar blue após 72 horas de exposição com as células HL60 (leucemia humana) e HepG2 (carcinoma hepatocelular humano). Todas as amostras foram testadas na concentração de 50µg/mL (extratos). Doxorrubicina (DOX) foi usada como controle positivo. Compostos com inibição acima de 75% são considerados ativos. Portanto nenhuma das amostras testadas foi considerada ativa para o estudo de toxicidade.

A TABELA 7 apresenta os dados de IC_{50} obtidos. Segundo o programa de triagem de drogas citotóxicas, extratos com valores de IC_{50}< 30 µg/mL e compostos puros com IC_{50}< 4 µg/mL são considerados promissores (SUFFNESS & PEZZUTO, 1990; BOIK, 2001).

TABELA 7 -Valores de IC_{50} para a atividade citotóxica em linhagens de células tumorais versus não tumorais.

Amostras	MCF7	HCT116	HepG2	HL-60	MCR5
Puras					
G4' C1 M.A	>25	>25	>25	>25	>25
G5' C1 M.A	>25	>25	>25	>25	>25

Todas as amostras que foram submetidas à atividade citotóxica não apresentaram atividade que comprovassem a inibição para as linhagens celulares supracitadas. De acordo com pesquisadores da Universidade Federal do Ceará, a pristimerina, uma substancia isolada de raízes de *Maytenus ilicifolia*, mostrou atividade

antiproliferativa para linhagens de celulares de câncer de leucemia HL-60, através do mecanismo de apoptose (COSTA, 2008).

9.2 Teste de genotoxicidade utilizando o protocolo de *Alium cepa*

Na análise microscópica, a partir das lâminas com o meristema de *Allium cepa* expostos em diferentes concentrações do extrato hexânico das raízes de *Maytenus rígida*, não foi observada a presença de ponte, micronúcleo e/ou mitose atípica durante o ciclo de divisão celular. Quando esses fatores estão presentes durantes a divisão celular, indicam genotoxicidade da substância testada frente ao *Alium cepa.*

A FIGURA 30 mostra as fotografias microscópicas obtidas através da observação celular do meristema radicular do *A. cepa* frente à exposição do extrato hexânico das raízes de *M. rígida*. As imagens foram capturadas na lente de um microscópio óptico Nikon, modelo eclipse E200 com luz de led.

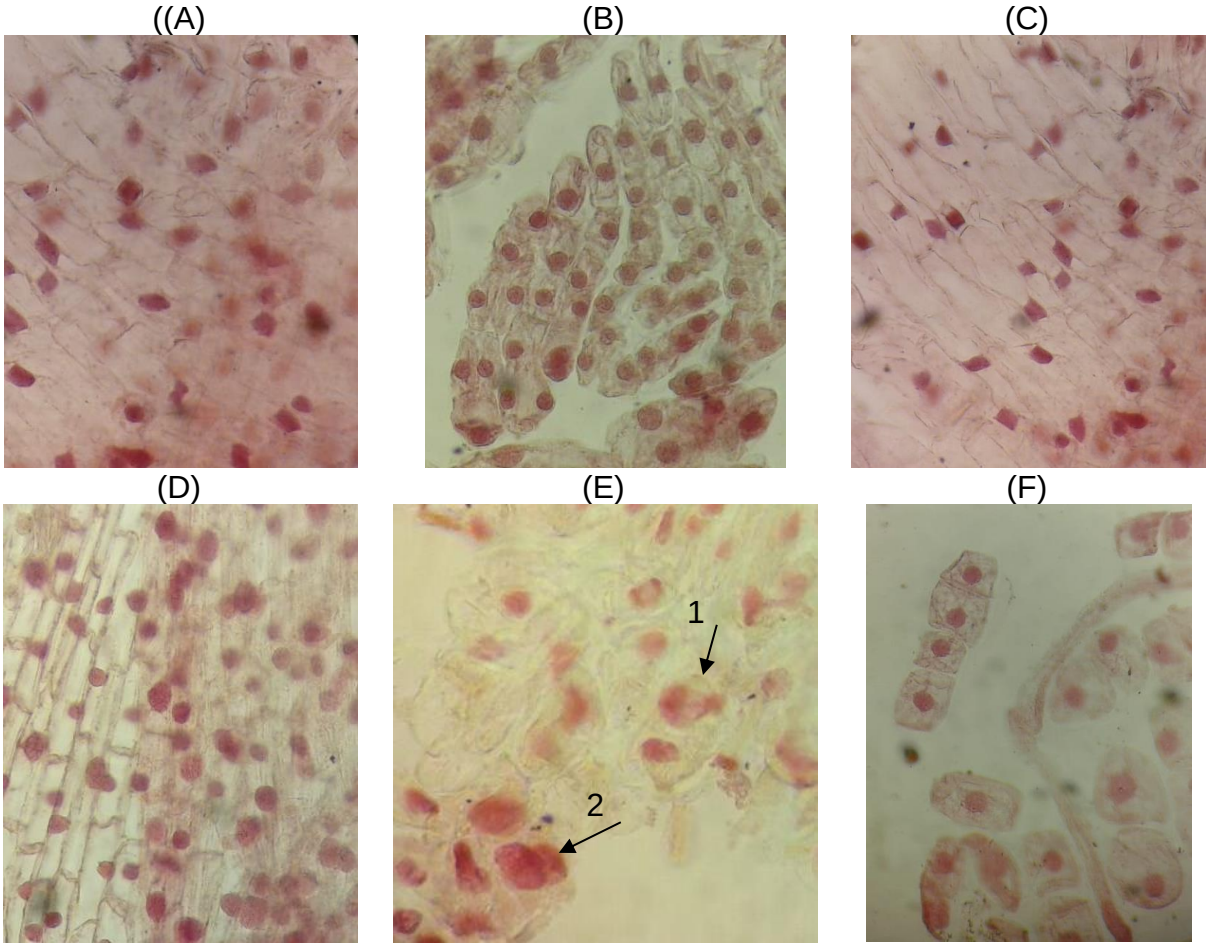


FIGURA 30- Fotografia microscópica de esfregaço do material vegetal com aumento de 40x, (A) 50 mg.mL^{-1}, (B) 100 mg.mL^{-1}, (C) 150 mg.mL^{-1}, (D) 200 mg.mL^{-1}, (E) DMSO e (F) água. Fonte: própria.

NA FIGURA 30-E pode ser observada uma mitose atípica com a formação de ponte (seta 1) durante o processo de divisão celular e uma célula com bi-nucleação (seta 2), esses dados foram observados no controle positivos utilizado DMSO.

De acordo com um estudo realizado na Universidade Federal de Sergipe, extrato aquoso das folhas de M. rígida apresentou genotoxicidade no meristema radicular de A. cepa, na concentração de 400 $mg.mL^{-1}$, sendo observado pelos pesquisadores a presença de micronúcleo durante a anáfase da divisão celular (MENDES; et al, 2012).

Uma pesquisa desenvolvida pela Universidade Estadual de Goiás mostrou genotoxicidade do A.cepa frente à exposição de infusão aquosa de M. ilicifolia, 3g do material vegetal em 10 mL de água, onde observaram a formação de pontes e micronúcleo durante a divisão celular no crescimento do meristema radicular (SILVA; et al, 2015).

Os resultados deste estudo, bem como os publicados por Mendes (2012) e Silva (2015) permitiu propor que os constituintes químicos que apresentam genotoxicidade estão presentes em frações polares obtidas de extratos aquosos de *M. rigida* em concentração acima de 300 $mg.mL^{-1}$.

9.3 Teste de toxicidade utilizando o protocolo de *Artemias salinas*

Decorrido 24 horas com as larvas em contato com os extratos extrato etanólico de folhas *M. truncata* (EFMT), extratoe tanólico de folhas de M. rigida (EEMR) extrato etanólico de folhas de *M. acanthophylla* (HFMR) foi observado que a sobrevivência das *Artemias* era mantida em condições normais, com os movimentos do microcrustáceo em todos os tubos que continham as soluções dos extratos vegetais, porém no tubo com $K_2Cr_2O_7$ a atividade larvicida foi total em todas as concentrações do controle positivo. Após 48 horas foi realizada mais uma observação e as larvas não apresentaram mortalidades frente aos extratos testados.

De acordo com uma pesquisa realizada na Universidade Federal de Minas Gerais, substancias que apresentam atividade larvicida à *A. salina,* tem maior probabilidade de apresentarem toxicidade frente a células tumorais humanas, o que sugere este bioensaio como uma avaliação prévia de atividade citotóxica (RODRIGUES, 2011). Ensaios clínicos realizados na Universidade Federal de ouro Preto, utilizando extrato Hexano/éter etílico das raízes de *Maytenus imbricata* apresentou atividade larvicida na concentração de 1000.00 a 0.06 µg/mL (RODRIGUES, 2012).

9.4 Teste de atividade microbiológica

A Concentração Inibitória Mínima (CIM) foi avaliada de acordo com a menor concentração do extrato em mg.mL^{-1}, capaz de impedir o crescimento dos microrganismos. As placas foram incubadas a 36ºC em estufa bacteriológica, após 24 e 48 horas foram feitas a primeira e a segunda leitura respectivamente. No experimento realizado não houve halo de inibição de crescimento em nenhuma das amostras testadas, de acordo com a FIGURA 31. Os ensaios de CIM foram realizados em triplicata, mantendo os mesmos resultados.

(A) (B) (C)

FIGURA 31- Placas de Petri com a cultura e os extratos testados, (A) EMT, (B) HRMR e (C) HFMA. Fonte: Própria.

Uma pesquisa realizada na Universidade Estadual da Paraíba apresentou atividade antimicrobiana para o microrganismo *Staphyloccocus aureus*, nos extratos etanólico e fase de acetato de etila de *M. rígida*, na concentração de 400mg.mL^{-1}, quando comparado ao controle positivo. Foram realizados também os mesmo testes para *Escherichia Coli*, e *Pseudomonas aeruginosa,* as quais não apresentaram inibição de crescimento frente aos extratos testados (SANTOS; et al, 2011).

Outra pesquisa realizada por pesquisadores da Universidade Federal do Alagoas mostrou atividade antibacteriana para Staphylococcus aureus, Escherichia coli e Pseudomonas aeruginosa frente aos estratos hidrometanólico, aquoso, fase de acetato de etila e de clorofórmio da entrecasca de *Maytenus rígida*, ambos com 200 mg.mL^{-1}. Porém os mesmos microrganismos quando expostos ao extrato hexânico da entrecasca da *Maytenus,* nas mesmas concentrações, não apresentaram inibição de crescimento microbiano (ESTEVAM; et al,2009), o que corroboram com os testes realizados aqui pela Universidade estadual do Sudoeste da Bahia.

A TABELA 8 mostra os resultados obtidos da análise de atividade antimicrobiana com o estudo dos extratos testados.

TABELA 8- Atividade antimicrobiana dos extratos de espécies de *Maytenus.*

Microrganismo	HRMR [mg.mL^{-1}]			EEMT [mg.mL^{-1}]			HFMA [mg.mL^{-1}]		
	100	300	500	100	300	500	100	300	500
	Halo de inibição (mm)								
Staphylococcus aureus	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Proteusmirabilis	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Bacilluscereus	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Klebsiellapneumoniae	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Pseudomonasaeruginosa	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Escherichia coli	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Salmonela typhi	-	-	-	-	-	-	-	-	-

*HRMR extrato hexânico de raiz de*M. rigida*, EEMT extrato etanólico de folhas de*M. truncata*, HFMA extrato hexânico de folhas de *M. acanthophylla*.

10 CONCLUSÃO

No estudo fitoquímico com os extratos de *M. rígida* foram identificados e isolados os seguintes compostos: os hidrocarbonetos, fitol, fitol acetato, esqualeno, octacosano, α-tocoferol, β-amirina, lupeol, simiarenol, fridelina, β-fridelinol. Os testes biológicos realizados com os extratos e frações de *Maytenus* não apresentaram atividades significativas de genotoxicidade, citotóxica, antitumoral e/ou antimicrobiana. Por tratar-se de um gênero amplamente utilizado na medicina popular, bem como produtos já registrados pela ANVISA, não são espécies que apresentam toxicidade, caso contrário, as Maytenus não seriam utilizadas na fitoterapia. Apesar desses dados, é pertinente que novas pesquisas sejam realizadas utilizados outros protocolos de investigação de novas pesquisas utilizando estudos fitoqúimico e/ou atividade biológicas. O estudo realizado permitiu aos pesquisadores contribuir para o conhecimento dessas espécies, assim como o enriquecimento dos dados já disponíveis para o gênero Maytenus.

11 PERSPECTIVAS

O extrato em etanol, obtido da casca da raiz de Maytenus rigida apresentou valores inibitórios para HepG2 (carcinoma hepatocelular humano) e HL-60 (leucemia promielocítica humana) acima de 60%, valores considerados não citotóxicos para compostos puros. Considerando tratr-se de extrato bruto, é importante a continuidades dos estudos para o isolamento do componente ou componentes químicos responsáveis pela resposta antitumoral observada.

12 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. AHMED, S.A.; GOGAL, R.M.; WALSH, J.E. A new rapid and simple non-radioactive assay to monitor and determine the proliferation of lymphocytes an alternative to [3H] thymidine incorporation assay. **Journal of immunologicalmethods**, v.170, p.211 - 224, 1994.

2. BOIK, J. Natural compounds in cancer therapy. Oregon Medical Press, Minnesota, USA, p. 25, 2001.

3. BRASIL, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Formulário de Fitoterápicos da Farmacopéia Brasileira / Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Brasília: Anvisa, 2011.

4. BRASIL, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Guia para Comprovação da Segurança de Alimentos e Ingredientes. Brasília: Anvisa, 2013.

5. BRASIL, Instrução Normativa N° 02 De 13 De Maio De 2014 Publica a“Lista de medicamentos fitoterápicos de registro simplificado” e a “Lista de produtos tradicionais fitoterápicos de registro simplificado”. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Disponível em: <http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/ anvisa/2014/int0002_13_05_2014.pdf> Acesso em: 06/12/2017.

6. BRASIL, Ministério da Saúde. Consolidado de normas da Coordenação de Fitoterápicos, Dinamizados e Notificados; **Agência Nacional de Vigilância Sanitária**; Brasília 2013.

7. COSTA, P. M.;et al. Antiproliferative activity of pristimerin isolated from *Maytenus ilicifolia* (Celastraceae) in human HL-60 cells. **Toxicology in Vitro,** v.22, p. 854-863, 2008.

8. ESTEVAM,C.S.; et al. Perfil fitoquímico e ensaio microbiológico dos extratos da entrecasca de *Maytenus rigida* Mart. (Celastraceae). **Brazilian Journal of Pharmacognosy** 19(1B): 299-303, Fev,. 2009.

9. FERREIRA, F. L.; et al. *Maytenus distichophylla* and Salacia crassifolia: source of products with potential acetylcholinesterase inhibition. **Revista Brasileira de Farmacognosia.** v. 7, p. 471–474, 2017.

10. FIRMO, W.C.A.;et al.Contexto histórico, uso popular e concepção científica sobre plantas medicinais. **Cad. Pesq., São Luís**, v. 18, 2011.

11. FONSECA, A.P.N.D.; SILVA G.D.F.; CARVALHO, J.J.; SALAZAR, G. D. C. M.; DUARTE, L.P. Estudo fitoquímico do decocto das folhas de *Maytenus truncata* Reissek e avaliação das atividades antinociceptiva, antiedematogênica e antiulcerogênicade extratos do decocto. **Quim. Nova**, vol.30, n.4, p.842-847, 2007.

12. JESUS, W. M. M.; CUNHA, T. N. C. Estudo das propriedades farmacológicas da espinheira-santa (*Maytenus ilicifolia* Mart. Ex Reissek) e de duas espécies adulterantes. **Revista Saúde e Desenvolvimento**. v. 1, 2012.

13. LORENZO, M. Arborização urbana com espécies nativas. Disponível em: <https://reinometaphyta.wordpress.com/2013/03/24/arborizacao-urbana-com-especies-nativas> Acessado em: 20dez. 2017.

14. MARIOT, M.P.; BARBIERI, R.L. Metabólitos secundários e propriedades medicinais da espinheira-santa (*Maytenus ilicifolia* Mart. exReiss. e *M. aquifolium* Mart.) **Rev. Bras. Pl. Med., Botucatu.** v.9, n.3, p.89-99, 2007.

15. Martins, V.M., et al. Antinociceptive effects of an extract, fraction and an isolated compound of the stem bark of *Maytenus rigida*. **Brazilian Journal of Pharmacognosy** 22(3): 598-603, May/Jun. 2012.

16. MENDES S. S.; et al. Genotoxicity test of *Maytenus rigida* and *Aristolochia birostris* in the radicular meristem of the onion, *Allium cepa. Brazilian Journal of Pharmacognosy. v. 22, N. 1, 2012.*

17. MENEGUETTI, D.U.O.; et. al. Screening of the in vitro antileishmanial activities of compounds and secondary metabolites isolated from *Maytenus guianensis* Klotzsch ex Reissek (Celastraceae) chichuá Amazon. **Rev Soc Bras Med Trop** v.49, n.5, p.579-585, 2016.

18. MUGWERU, F. G., et al. In Vivo Safety of Aqueous Extracts of *Maytemus putterlickoides*, Senna spectabilis and Olinia usambarensis on Mice Models. **J Clinic Toxicol**, v. 6, n. 3, 2016.

19. NASCIMENTO, D. Arte botânica, série plantas medicinais. Disponível em: <http://dilmanascimento.blogspot.com.br/2016/06/serie-plantas-medicinais.html> Acessado em: 04 de jan. 2018.

20. NIERO, R.; ANDRADE, S.F.; FILLHO, V.C. A review of the ethnopharmacology, phytochemistry and harmacology of plants of the Maytenus Genus. **Curren. Pharmac. Desig**. v.17, n.18, p.1851-71, 2011.

21. O'BRIEN, J.; WILSON, I.; ORTON, T.; POGNAN, F. Investigation of the Alamar Blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity. **European journal of biochemistry**, v.267, p.5421 - 5426, 2000.

22. OLIVEIRA, D. M.; et al; The Triterpenes 3β-Lup-20(29)-en-3-ol and 3β-Lup-20(29)-en-3-yl Acetate and the Carbohydrate 1,2,3,4,5,6-Hexa-O-acetyl-dulcitol as Photosynthesis Light Reactions Inhibitors; **Molecules,** v. *16*, n. 3, p. 9939-9956, 2011.

23. OLIVEIRA, D.M. **Estudo químico, farmacológico e aplicação de métodos computacionais na elucidação estrutural de constituintes químicos de folhas de *Maytenus acanthophylla* Reissek (Celastraceae)**. 286f. (Tese

Doutorado em Ciências-Química) - Universidade Federal de Minas Geais, Belo Horizante, 2012.

24. OLIVEIRA, R. S.; CUNHA, S. C.; COLAÇO, W.; Revisão da *Maytenusil icifolia* Mart. exReissek, Celastraceae. Contribuição ao estudo das propriedades farmacológicas; **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 19, n. 2, p. 650-659, 2009.

25. Pereira, R. S. Estudo fitoquímico e avaliação da atividade biológica de extratos alcoólicos de espécies do gênero *Maytenus* Celastraceae) que ocorrem na região de Jequié (dissertação de mestrado). Jequié, UESB, 2015.

26. ROCHA, C. S. (Estudo comparativo farmacognóstico e atividade biológica de *Maytenus rigida* Mart.e *Maytenus ilicifolia* mart. Ex. Reiss (Celastreceae), dissertação de mestrado, Universidade Federal de Pernambuco, 2003.

27. Rodrigues, V. G. Evaluation of antimicrobial activity and toxic potential of extracts and triterpenes isolated from *Maytenus imbricata* .***Quim. Nova****,* Vol. 35, n. 7, 2012.

28. RODRIGUES, V. G. Estudo fitoquímico e atividade biológica de raízes de *Maytenus imbricata* Mart. ex. Reissek. Belo Horizonte, UFMG, 2011.

29. SALAZAR, G. D. C. M. ***Maytenus truncata*** **REISSEK: Estudo fotoquímico, análises histológica e da capacidade sortiva de folhas e avaliação de atividade biológica de extratos**. 266f. Tese (Doutorado em Ciências-Química), Universidade Federal de Minas Geais, Belo Horizante, 2005.

30. SANTOS, V.L.; et al. Avaliação da atividade antimicrobiana de *Maytenus rigida*Mart. (Celastraceae). **Rev. Bras. Pl. Med., Botucatu**, v.13, n.1, p.68-72, 2011.

31. SILVA, F. C.; DUARTE, L. P.; VIEIRA FILHO, S. A. Celastráceas: Fontes de Triterpenos Pentacíclicos com Potencial Atividade Biológica. ***Rev. Virtual Quim****.* v. 6,n. 5, p.1205-1220, 2014.

32. SILVA, J. A. P.; et al. Uso do teste *allium cepa* na avaliação da citogenotoxicidade de infusões in natura de *maytenus ilicifolia* e *zingiber officinale*. Congresso de Ensino, pesquisa e extensão da UEG. *2015.*

33. SILVA, J. M. A.; ROMANE, A.; EFFERTH, T.; Salgueiro, L.; North African Medicinal Plants Traditionally Used in Cancer Therapy. **Frontiers in Pharmacology.** V.8, Article 383, 2017.

34. SIMMONS M. P.; et al. Phylogeny of Celastraceae tribe Euonymeae inferred from morphological characters and nuclear and plastid genes. **Molecular Phylogenetics and Evolution.** v. 62, p. 9-20, 2012.

35. SUFFNESS, M.; PEZZUTO, J.M. Assays related to cancer drug discovery. In: Hostettmann K. Editor. **Methods in Plant Biochemistry: Assays for Bioactivity.** London: Academic Press; 1990: 71–133.

36. Tabach, R.; Almeida, J. M. D.; Carlini, E. A. Pharmacological and Toxicological Study of *Maytenus ilicifolia* Leaf Extract. Part I – Preclinical Studies. PHYTOTHERAPY RESEARCH. 2017.

37. Vellosa, J. C. R., et al. Profile of *Maytenus aquifolium* action over free radicals and reactive oxygen species. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**v.43, n. 3, 2007.

38. VELOSO C. C. et al.; Pharmacological potential of Maytenus species and isolated constituents, especially tingenone, for treatment of painful inflammatory diseases **RevistaBrasileira de Farmacognosia.** V.27, p.533-540, 2017.

39. VITÓRIA, J. M.; ZACARIAS, F. M.; MARIOT, M. P.; BARBIERI, R. L.; PINTO, J. R.; Ocorrência de cochonilhas em espinheira-santa (*Maytenus ilicifolia* Mart. Ex Reissek); **Rev. Bras. Pl. Med.** Campinas; v. 15, n. 2, p. 176-179, 2013