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

RAFAEL SANTOS PEREIRA

Estudo fitoquímico e avaliação da atividade biológica de extratos alcoólicos de espécies do gênero *Maytenus* (Celastraceae) que ocorrem na região de Jequié

> JEQUIÉ – BA SETEMBRO/2015

RAFAEL SANTOS PEREIRA

Estudo fitoquímico e avaliação da atividade biológica de extratos alcoólicos de espécies do gênero *Maytenus* (Celastraceae) que ocorrem na região de Jequié

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

Área de concentração: Química Analítica.

Orientador: Prof. Dr. Djalma Menezes de Oliveira Coorientadora: Prof^a. Dr^a. Rosane Moura Aguiar

JEQUIÉ – BA SETEMBRO/2015 Pereira, Rafael Santos.

P495 Estudo fitoquímico e avaliação da atividade biológica de extratos alcoólicos de espécies do gênero Maytenus Celastraceae) que ocorrem na região de Jequié/Rafael Santos Pereira.- Jequié, UESB, 2015.

87 f: il.; 30cm. (Anexos)

Dissertação de Mestrado (Pós-graduação em Química,)-Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, 2015. Orientador: Profº. Drº. Djalma Menezes de Oliveira.

 Maytenus acanthophylla (folhas) na região de Jequié/Bahia – Estudo fitoquímico e farmacológico 2. Maytenus rigida (folhas e raízes) na região de Jequié/Bahia – Estudo fitoquímico e farmacológico 3. Maytenus truncata (folhas) na região de Jequié/Bahia – Estudo fitoquímico e farmacológico 4. Antiácida (ação) – Folhas de Maytenus acanthophyllao 5. Antioxidante – Folhas e raízes de Maytenus I. Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia II. Título.

CDD - 543

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO SUDOESTE DA BAHIA - UESB PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUIMICA-PGQUI

Rafael Santos Pereira

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

DISSERTAÇÃO APROVADA EM 28/09/2015. Comissão Examinadora:

Prof. Dr. Djalma Menezes de Oliveira (UFMG, Belo Horizonte/MG, 2012) (orientador)

Peiscoto Coruz.

·16: 《使心理制》:

Profa. Dra. Mariluze Peixoto Cruz (UFBA, Salvador/BA, 2013)

011012 20

Prof. Dr. Jeferson Chagas do Nascimento (UFBA, Salvador/BA, 2011)

À meu orientador, pela sua dedicação, compreensão, amizade, sinceridade, disposição em ajudar e incansável orientação neste trabalho.

•

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus, por me dar forças para alcançar mais uma conquista e por ter proporcionado tantas outras alegrias e vitórias.

Aos meus pais, aos meus avós, aos meus irmãos pelo amor e dedicação e incentivo nos momentos difíceis para conseguir superá-lo, agradeço por tudo que fizeram por mim, desde meu nascimento até aqui.

A minha esposa pela compreensão, amor, paciência e carinho, em que nos momentos de angústia sempre estava disposta a ajudar.

Agradeço especialmente ao meu orientador Prof. Dr. Djalma Menezes de Oliveira pela paciência, compreensão, dedicação, pelas horas extras de orientação em finais de semanas e feriados, pela sua constante transferência de conhecimentos, meu muito obrigado.

Aos alunos de IC Carla Larissa, Ohana, Fernando e Rosângela por terem contribuído para a realização deste estudo.

Aos caros colegas Adílio, Marcio, Ivana e Diego pela sua parceria na concretização deste trabalho.

A coorientadora Prof^a. Dr^a. Rosane Moura Aguiar pela disponibilidade em ajudar sempre.

A Prof^a. Dr^a. Vanderlúcia Fonseca de Paula pelo apoio e empréstimos de materiais e reagentes.

Ao Prof. Dr. Cleber Galvão Novaes pela inestimável ajuda nas analises por ICP OES.

Ao Prof. Dr. Luiz Borges Bispo da Silva da Universidade Federal de Uberlândia pela atenção e disponibilidade para realizar ensaios biológicos que enriqueceu este trabalho.

Ao Prof. Dr. Valfredo Azevedo Lemos por disponibilizar o equipamento ICP OES.

A Universidade Federal da Bahia pelas analises de RMN.

Ao governo da Bahia, através da FAPESB, pelo suporte financeiro.

Por fim, agradeço a todos os professores do programa de pós-graduação em química.

A todos muito obrigado!

Só se pode alcançar um grande êxito quando nos mantemos fiéis a nós mesmos. Friedrich Nietzsche

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Ilustração botânica de Maytenus acanthophylla (a) e foto de M.
acanthophylla (b). Fonte: própria15
Figura 2. Compostos isolados de raiz de Maytenus acanthophylla REISSEK16
Figura 3. Ilustração botânica de Maytenus rigida (a) e espécime Maytenus rigida (b).
Fonte: própria17
Figura 4. Constituintes químicos isolados de Maytenus rigida18
Figura 5. Ilustração botânica de Maytenus truncata (a). Foto de M. truncata (b).
Fonte: própria19
Figura 6. Compostos isolados de Maytenus truncata REISSEK
Figura 7. Diagrama simplificado demonstrando as etapas da DLLME, adaptado de
Berijani21
Figura 8. Esquema da preparação do extrato de <i>M. rigida</i> e fracionamento de EMR
Figura 9. Definição dos escores para a classificação das lesões gástricas e cálculo
do índice de úlcera33
Figura 10. TIC de EMA obtido por DLLME/CG-EM, utilizando metanol como solvente
dispersor
Figura 11. TIC de EMA obtido por DLLME/CG-EM, utilizando acetona como solvente
dispersor
Figura 12. TIC de EMT obtido por DLLME/CG-EM, utilizando metanol como solvente
dispersor40
Figura 13. TIC de EMT obtido por DLLME/CG-EM, utilizando acetona como solvente
dispersor41
Figura 14. TIC de EMR obtido por DLLME/CG-EM, utilizando metanol como solvente
dispersor42
Figura 15. TIC de EMR obtido por DLLME/CG-EM, utilizando acetona como solvente
dispersor44
Figura 16. TIC de EMRR obtido por DLLME/CG-EM, utilizando Metanol como
solvente dispersor45
Figura 17. TIC de EMRR obtido por DLLME/CG-EM, utilizando acetona como
solvente dispersor46

Figura 18. Fotografia da cromatoplaca CCD em sílicagel 60G, eluente: CHCl₃:Hexano (9:1), revelador: solução hidroalcoólica ácida (H₃PO₄ 1,5 %) de Figura 19. Espectro de absorção de 11 e 13 na região do IV......49 **Figura 20.** (a) gráfico de dispersão entres os valores de δ de¹³C de **11** e 3 β friedelinol. (b) de **13** e friedelina......50 Figura 23. Espectro de RMN de ¹³C de 11 e 13 (CDCl₃, 125 MHz)......52 Figura 24. Cromatograma de íons totais (TIC). Nota: obtido por CG-EM de 11 e 13. Condições: Coluna SPB-tm5, capilar, 30 m x 0,25 mm de diâmetro interno, filme de **Figura 25.** EM associado ao pico em t_R = 32,70 min do TIC do 3β -Friedelinol......53 Figura 27. Cromatograma de íons totais (TIC) obtido por CG-EM de 7. Nota: Condições: Coluna SPB-tm5, capilar, 30 m x 0,25 mm de diâmetro interno, filme de Figura 29. Proposta de fragmentação do esqualeno com base no EM de 7......55 **Figura 30.** Gráfico de dispersão entre os valores de δ de ¹³C de **11** e os respectivos **Figura 33.** Comparação gráfica da dispersão entre os valores de δ de ¹³C de **9** (a) e **10** (b) e os respectivos valores da literatura para a mistura de lupeol e β -amirina....61 Figura 34. Espectro de RMN de ¹H de 9 e 10 (CDCl₃, 500 MHz)......62 **Figura 36.** Gráfico de dispersão entre os valores de δ de ¹³C de **23** e os respectivos Figura 38. Espectro de RMN DEPT-135 de 23 (CDCl₃, 125 MHz)......65 Figura 39. Espectro de RMN de ¹³C de 23 (CDCl₃, 125 MHz)......65

Figura 40. Comparação gráfica da dispersão entre os valores de δ de ¹³ C de 8 (a) e
23 (b) e os respectivos valores da literatura para a mistura de 3β -sitosterol e o ácido
3,4-seco-friedelan-3-óico67
Figura 41. Espectro de RMN de ¹ H d 8 e 23 (CDCl ₃ , 500 MHz)68
Figura 42. Espectro de RMN de ¹³ C de 8 e 23 (CDCI ₃ , 125 MHz)68
Figura 43. Gráfico de dispersão entre os valores de δ de ¹³ C de 8 e os respectivos
valores publicados para o 3β -sitosterol
Figura 44. Espectro de RMN de ¹ H de 8 (CDCl ₃ , 500 MHz)71
Figura 45. Espectro de RMN de ¹³ C de 8 (CDCl ₃ , 125 MHz)71
Figura 46. Percentual de inibição de radicais livres de DPPH73
Figura 47. (a) Imagens representativas das lesões induzidas na mucosa gástrica
pela administração de HCI/etanol em animais. (b) índices de úlcera (I.U.) em mm ²
obtidos nos diferentes grupos experimentais ()
Figura 48. Gráfico da avaliação in vitro da atividade antiácida de AMA76

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Frações obtidas de C-1
Tabela 2. Agrupamentos e constituintes isolados das frações de C-3, amostra G4/C-
2
Tabela 3. Condições de operação do espectrômetro de emissão óptica com plasma
indutivamente acoplado34
Tabela 4. Elementos estudados e suas respectivas linhas analíticas
Tabela 5. Micro e macroelementos determinados por ICP OES e os parâmetros da
curva analítica
Tabela 6. Constituintes de EMA identificados por DLLME/CG-EM, tendo MeOH
como solvente dispersor
Tabela 7. Constituintes de EMA identificados por DLLME/CG-EM, tendo acetona
como solvente dispersor
Tabela 8. Constituintes de EMT identificados por DLLME/CG-EM, tendo MeOH
como solvente dispersor40
Tabela 9. Constituintes de EMT identificados por DLLME/CG-EM, tendo acetona
como solvente dispersor42
Tabela 10. Constituintes de EMR identificados por DLLME/CG-EM, tendo MeOH
como solvente dispersor43
Tabela 11. Constituintes de EMR identificados por DLLME/CG-EM, tendo acetona
como solvente dispersor
Tabela 12. Constituintes de EMRR identificados por DLLME/CG-EM, tendo MeOH
como solvente dispersor46
Tabela 13. Constituintes de EMRR identificados por DLLME/CG-EM, tendo acetona
como solvente dispersor46
Tabela 14. Comparação entre os valores de δ de ¹³ C de 11 e 13 (CDCl ₃ , 125 MHz) e
os respectivos valores publicados para a mistura 3β -friedelinol e friedelina (CDCI ₃ ,
100 MHz)50
Tabela 15. Comparação entre os valores de δ de ¹³ C de 11 (CDCl ₃ , 125 MHz) e os
respectivos valores publicados para o 3β -friedelinol (CDCI ₃ , 100 MHz)57

Tabela 16. Comparação entre os valores de δ de ¹³C de **9** e **10** (CDCl₃, 125 MHz) com os respectivos valores publicados para os compostos lupeol e β -amirina (CDCl₃, 100 MHz)......61 **Tabela 17.** Comparação entre os valores de δ de ¹³C de **23** (CDCl₃, 125 MHz) e os respectivos valores publicados para o ácido 3,4-seco-friedelan-3-óico (CDCl₃, 100 MHz)......64 **Tabela 18.** Comparação entre os valores de δ de ¹³C de **8** e **23** (CDCl₃, 125 MHz) com os respectivos valores publicados para os compostos 3^β-sitosterol e o ácido *3,4*-seco-friedelan-*3*-óico (CDCl₃, 100 MHz)......67 **Tabela 19.** Comparação entre os valores de δ de ¹³C de **8** (CDCl₃, 125 MHz) com os respectivos valores publicados para 3β-sitosterol (CDCl₃, 100MHz)70 Tabela 20. Percentual médio de inibição do radical DPPH frente aos padrões quercetina e ácido gálico e aos extratos de *M. acanthophylla, M. truncata* e *M. rigida*. Tabela 21. Concentrações (µg/g) dos elementos estudados nas amostras de folhas de M. rigida, M. truncata e M. acanthophylla e na raiz M. rigida detectada por ICP

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AcOEt	Acetato de etila
AG	Ácido Gálico
AMA	Extrato aquoso das folhas de Maytenus acanthophylla
AMT	Extrato aquoso das folhas de Maytenus truncata
BSTFA	N, O-bis-(trimetilsilil)-trifluroacetamida
CCD	Cromatografia em camada delgada
CDCl ₃	Clorofórmio deuterado
CG-EM	Cromatografia em fase gasosa acoplada à espectrometria de massas
CLMP	Cromatografia líquida de média pressão
DCM	Diclorometano
DLLME	Microextração Líquido-Líquido Dispersiva
DPPH	2,2,-difenil-1-picril-hidrazila
EMA	Extrato etanólico das folhas de Maytenus acanthophylla
EM	Espectrometria de massas
EM-IE	Espectrometria de massas por impacto eletrônico
EMT	Extrato etanólico das folhas de Maytenus truncata
EMR	Extrato metanólico das folhas de Maytenus rigida
EMRR	Extrato etanólico das raízes de Maytenus rigida
HUESB	Herbário da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia
IC _{cal}	Índices cromatográficos calculados
IC _{lit}	Índice cromatográfico da literatura
ICP-OES	Espectrometria de emissão óptica com plasma acoplado indutivamente
I.U.	Índice de úlcera
IV	Infravermelho
MAF	Maytenus acanthophylla folha
MATCH-5	Banco de dados de espectros de RMN de ¹³ C de TTPC's
MeOH	Metanol
MRF	Maytenus rigida folha
MRR	Maytenus rigida raiz
MTF	Maytenus truncata folha
m/z	Razão entre a massa e carga elétrica de um íon
Q	Quercetina

- RMN Ressonância Magnética Nuclear
- TIC Cromatograma de íons totais
- t_R Tempo de retenção
- TTPC Triterpeno pentacíclico
- UV-Vis Ultravioleta-visível
- v.o. Via oral

Estudo fitoquímico e avaliação da atividade biológica de extratos alcoólicos de espécies do gênero *Maytenus* (Celastraceae) que ocorrem na região de Jequié

Autor: Rafael Santos Pereira Orientador: Prof. Dr. Djalma Menezes de Oliveira Coorientadora: Prof^a. Dr^a. Rosane Moura Aguiar (UESB)

RESUMO:

Esta dissertação relata o estudo fitoquímico e farmacológico de três espécies Maytenus utilizadas na medicina tradicional da região de Jequié, Bahia: M. acanthopylla (folhas), *M. truncata* (folhas) e *M. rigida* (folhas e raízes). Foram utilizados métodos de cromatografia líquida e gasosa, bem como técnicas espectrométricas (UV-Vis, IR, CG-EM, RMN e ICP OES) para o isolamento e identificação de constituintes químicos presentes nos extratos. Os potenciais antioxidantes dos extratos foram avaliados por meio de protocolo que utiliza radicais livres DPPH. A avaliação da atividade gastroprotetora in vivo do extrato aquoso de folhas de M. acanthophylla foi conduzida com camundongos Swiss machos, utilizando metodologia descrita por Prado [29]. Prospecções por DLLME/CG-EM em extratos de *Maytenus* permitiram identificar 22 compostos, dentre eles, o composto 2,4-di-terc-butil-fenol (2), inédito no gênero. O fracionamentos cromatográficos dos extratos de folhas de M. rigida permitiram o isolamento e a elucidação estrutural de sete constituintes químicos: esqualeno, β sitosterol, β -amirina, lupeol, β -friedelinol, friedelina e ácido 3,4-seco-friedelan-3-óico. O triterpeno pentacíclico seco-friedelano é inédito na espécie *M. rigida.* São inéditos os resultados das determinações de micro e macroelementos nas folhas ou raízes de Maytenus por ICP OES. Os estudos biológicos mostraram que as folhas e raízes das Maytenus estudadas apresentam significativos potenciais antioxidantes e o extrato aquoso de folhas de M. acanthophylla apresentou mecanismo de ação antiácida, contudo, não foi capaz de proteger às mucosas gástricas lesionadas de camundongos Swiss machos.

Palavras-chave: Maytenus acanthophylla, Maytenus rigida, Maytenus truncata, Ação Antiácida, Antioxidantes

Phytochemical study and evaluation of the biological activity of alcoholic extracts of the genus *Maytenus* (Celastraceae) occurring in the region Jequié

Author: Rafael Santos Pereira Advisor: Prof. Dr. Djalma Menezes de Oliveira Co-Advisor: Prof^a. Dr^a. Rosane Moura Aguiar (UESB)

ABSTRACT:

This study reports the phytochemical and pharmacological potentials of three Mavtenus species plants used in folk medicine from micro-region of Jequié, Bahia: M. acanthopylla (leaves), M. truncata (leaves) and M. rigida (leaves and roots). Chromatographic and spectroscopic methods were used to isolation and identification of chemical constituents in their extracts. The antioxidant potential of these extracts was evaluated through DPPH free radical scavenging method. In vivo evaluation of the gastroprotective activity of aqueous extract of M. acanthophylla leaves was performed with male Swiss mice, provided by the Federal University of Uberlândia (CE-BEA/UFU), in which gastric lesions were provoked, to then be treated with extract doses and Carbenoxolone (positive control). Prospecting by DLLME/GC-MS with Maytenus extracts allowed the identification of 22 volatile and semi-volatile compounds, including the 2,4-di-tert-butyl-phenol, which was for the first time identified in this genus. Chromatographic fractionating and the use of spectroscopic methods (UV-Vis, IR, GC-MS and NMR) with *M. ridida* leaves extracts allowed the isolation and structural elucidation of seven following chemical constituents: squalene, β sitosterol, β -amyrin, lupeol, β -friedelinol, friedelin and 3,4-seco-friedelan-3-oic acid. Isolation of seco-friedelan in M. rigida is new. Are novel the results of measurements by ICP OES of the micro and macronutrients in leaves or roots of Maytenus. Biological studies demonstrated that the leaves and roots of Maytenus showed significant potential as antioxidants and the *M. acanthophylla* leaves aqueous extract showed antacid action, however, not shown gastroprotective activity for lesions in gastric mucosal of Swiss male mice.

Keywords: Maytenus, Gastroprotective activity, Antioxidants, GC-MS, PCTT

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
2 2.1 2.1.1 2.1.2 2.1.3	A FAMÍLIA CELASTRACEAE O gênero <i>Maytenus</i> <i>Maytenus acanthophylla</i> Reissek <i>Maytenus rigida</i> Mart. <i>Maytenus truncata</i> Reissek.	14 14 14 17 19
3	Microextração Líquido-Líquido Dispersiva (DLLME)	21
4 4.1 4.1.1	OBJETIVOS Objetivo geral Objetivos específicos	22 22 22
5 5.1 5.1.1 5.2 5.3 5.3.1 5.3.2 5.3.3 5.3.3	PARTE EXPERIMENTAL Métodos gerais. Coleta e identificação do material vegetal Preparação dos extratos das três espécies de <i>Maytenus</i> . Prospecção fitoquímica por DLLME dos extratos, EMA, EMT, EMR e EMRR Estudo fitoquímico do extrato EMR. Coluna filtrante. Fracionamento da fração F4. Fracionamento da amostra G4/C-2, coluna C-3 Ensaios biológicos	23 23 24 24 25 26 26 27 27 30
5.4 5.4.1 5.4.2	Avaliação antioxidante Atividade gastroprotetora do extrato aquoso de folhas de <i>Mayten</i>	30 30 US 31
5.4.2.	2 Avaliação do efeito da administração de AMA sobre as lesões gástric	as
5.4.3 5.5	Induzidas por HCI/etanol Avaliação <i>in vitro</i> da atividade antiácida de AMA Determinação de micro e macroelementos nas folhas do gênero <i>Mayten</i> (celastraceae), tais como <i>M. rigida</i> , <i>M. truncata</i> e <i>M. acanthophylla</i> e n raízes <i>M. rigida</i> por ICP OES.	31 32 us as 34
5.5.1 5.5.2 5.5.3 5.5.4	Instrumentação Preparo de soluções Preparo das amostras Análise das amostras	34 35 35 36
6 6.1 6.1.1 6.1.2 6.1.3	RESULTADOS E DISCUSSÃO Prospecção por DLLME/CG-EM de Extratos de Folhas de <i>Maytenus</i> Extrato alcoólico das folhas de <i>Maytenus acanthophylla</i> (EMA) Prospecção fitoquímica de EMT (extrato etanólico das folhas de <i>Mayten</i> <i>truncata</i>) feita por DLLME Prospecção fitoquímica de EMR (extrato metanólico das folhas de <i>Mayten</i> <i>rigida</i>) feita por DLLME	37 37 37 40 40 42
6.1.4	Prospecção fitoquímica de EMRR (extrato etanólico das raízes <i>M. rigida</i>) fe por DLLME	ita 45

6.2	Estudo fitoquímico do extrato metanólico Maytenus rigida	47
6.2.1	Mistura de friedelina (13) e 3β-friedelinol (11)	47
6.2.2	esqualeno, (7)	54
6.2.3	3β-Friedelinol (11)	56
6.2.4	Mistura β-amirina, 3β -hidroxi-olean-12-eno (9) e 3β -Lup-20(29)-en-3-ol (lup (1 0)).	əol 59
6.2.5	Ácido 3.4-seco-friedelan-3-óico (23)	63
6.2.6	Mistura de 38-sitosterol (8) e ácido 3.4-seco-friedelan-3-óico (23)	66
6.2.7	3β-sitosterol (8)	69
6.3	Ensaios biológicos	71
631	Avaliação antioxidante	71
632	Avaliação do efeito gastroprotetor de AMA	74
633	Avaliação <i>in vitro</i> da atividade antiácida de AMA	75
64	Determinação de micro e macroelementos nas folhas do gênero Mavter	201
0.1	(celastraceae), tais como <i>M. rigida</i> , <i>M. truncata</i> e <i>M. acanthophylla</i> e n	as
	raízes <i>M. rigida</i> por ICP OES	76
_		
7	CONCLUSAO	78
8	PERSPECTIVAS	80
9	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	81
10	APÊNDICE A – TIC dos extratos sililados	84
11	ANEXO A- Análise da comissão de ética na utilização de animais e ensaios.	əm 87

1 INTRODUÇÃO

Desde antiguidade, o homem utiliza diversas plantas existentes na natureza para tratamento, cura e prevenção de doenças. O uso das plantas medicinais, em países em desenvolvimento, tem sido amplamente observado como a principal forma de acesso aos cuidados básicos de saúde [1].

O Brasil possui uma grande flora, com uma enorme biodiversidade, contando com plantas que contêm princípios ativos potencialmente úteis para a humanidade. Nesse contexto, estudos etnobotânicos evidenciam a existência de um grande acervo de plantas medicinais cujas propriedades são de conhecimento popular, o qual indiretamente tem contribuído para o avanço científico e para a valorização do conhecimento empírico [2, 3].

Pesquisas indicam que metabólitos secundários oriundas de espécies vegetais têm atividade biológica interessantes, sendo de grande importância na área farmacêutica. No Brasil, as plantas medicinais são consumidas com pouca ou nenhuma comprovação de suas propriedades farmacológicas. Esse fato gera um problema sério de saúde pública, sendo que existe uma parcela da população que utiliza plantas empregadas para fins medicinais diferentes daqueles empregados na etnobotânica difundidos por mercadores. Confrontada com fármacos empregados nos tratamentos convencionais, a toxicidade de plantas medicinais pode parecer banal, no entanto, a literatura relata casos de toxicidade que representam um risco em potencial para a saúde da população [1, 4].

Os fitoterápicos são produzidos a partir de plantas medicinais através do estudo dos componentes químicos demonstrados por meio de ensaios biológicos, apoiado na racionalidade biomédica, descrita por várias disciplinas, que compreendem desde a identificação botânica até a produção do fitofármaco [5].

Dessa forma, pesquisas nessa área são importantes, pois fornecem dados que auxiliam as instituições governamentais em suas políticas sobre o uso de plantas medicinais de forma consciente, no uso sustentável da biodiversidade e consequentemente, na aplicação de fitoterápicos em programas de promoção de saúde pública. Portanto esta pesquisa consiste em desenvolver o estudo químico via prospecção por CG-EM e o estudo fitoquímico de espécie de *Maytenus* (*M. acanthophylla, M. rigida e M. truncata*), bem como avaliar as atividades dos extratos quanto a ação antioxidante e antiulcerogênica.

2 A FAMÍLIA CELASTRACEAE

A família Celastraceae inclui cerca de 1300 espécies distribuídas em 98 gêneros, principalmente nos trópicos e subtrópicos [6, 7]. No Brasil a família Celastraceae é representada por cinco gêneros: *Maytenus* Juss., *Austroplenckia* Lund., *Goupia* Reissek, *Franhofera* Mart. e *Salacia* [6]. A estas espécies são atribuídos vários usos na medicina popular, especialmente na América do Sul, as diversas espécies pertencentes ao gênero *Maytenus* merecem destaque, sendo amplamente utilizadas, sobretudo no tratamento de doenças gástricas ingeridas por meio de infusões ou decocções [7, 9].

2.1 O gênero Maytenus

O gênero *Maytenus* é um dos maiores da família Celastraceae, compreendendo 225 espécies. Deste total, 77 espécies são endêmicas no Brasil [10].

Muita atenção têm sido dada às espécies deste gênero, devido ao seu amplo leque de atividades biológicas que vem sendo descritos na literatura como: anti-HIV, antimalária, anti-inflamatório, anti-nociceptiva, antimicrobiana, antioxidante, antiulcerogênica e cicatrizantes [7, 9].

Vários metabólitos secundário de classes diferentes já foram isolados de espécies do gênero *Maytenus*, como por exemplo: sesquiterpenos agarofurânicos, triterpenos pentacíclicos, especialmente os das séries dos friedelanos, lupanos, ursanos, oleananos, e quinonametídeos. Ainda foram isolados alcaloides sesquiterpênicos, flavonoides, e taninos condensados [7, 9, 10, 11].

2.1.1 Maytenus acanthophylla Reissek

A planta *Maytenus acanthophylla* apresenta na forma de arbustos ou árvores, conhecida popularmente como "espinheira-santa" ou "pau-de-jararaca", empregada popularmente no tratamento infecções urogenital e úlceras gástricas através de infusões ou decocções. Recentemente a espécie encontra-se extinta no Estado de Minas Gerais e ameaçada na Bahia, possuindo ainda poucos exemplares nos municípios de Jequié, Maracás e na reserva natural da chapada Diamantina [7].



(a)



Figura 1. Ilustração botânica de *Maytenus acanthophylla* (a) [12] e foto de *M. acanthophylla* (b). Fonte: própria.

O Ministério do Meio Ambiente do Brasil reconheceu que *Maytenus acanthophylla* encontra-se entre as espécies ameaçadas de extinção e com deficiência de dados. Essas espécies (Figura 1) constantes da lista do Anexo II a esta Instrução Normativa foram consideradas prioritárias para efeito de concessão de apoio financeiro à pesquisa pelo Governo Federal [13].

A literatura relata apenas um estudo fitoquímico de raízes de *Maytenus acanthophylla* que revelou a presença de constituintes químicos, como o β -sitosterol e o ácido graxo oleico, e também foram isolados constituintes triviais ao gênero *Maytenus* das seguintes classes: triterpenos pentacíclicos, lupanos, oleananos, ursanos e quinonametídeos e também o isolamento do biopolímero *1,4*-trans-poliisopreno (Figura 2, p.16) [9].



Figura 2. Compostos isolados de raiz de Maytenus acanthophylla REISSEK [7, 9].

2.1.2 Maytenus rigida Mart.

Maytenus rigida (Figura 3), conhecida popularmente por "Bom-homem", "Bom-nome", "Cabelo-de-negro", "Casca-grossa", "Pau-de-colher", é uma arvore de pequeno porte, com folhas coriáceas. É endêmica de áreas muito secas da caatinga (Região Nordeste) [14]. A planta empregada no uso terapêutico contra dores em geral, infecções e inflamações, é rica em metabólicos bioativos, que apresentam atividades: antimicrobiana [9, 14], antinociceptiva [9, 15], antioxidante [9, 16], antiulcerogênica [8, 17].



Figura 3. Ilustração botânica de Maytenus rigida (a) e (b): espécime Maytenus rigida. Fonte: própria.

Dados da literatura relatam os constituintes químicos (Figura 4, p.18) isolados de М. rigida das classes de compostos flavônicos como 4'-0-0 metilepigalocatequina, proantocianidina, os triterpenos pentacíclicos (TTPC) lupano, rigidenol, tingenona, e 20-hidroxitingenona [9]. Estudos relatam também a presença triterpenos com potencial citotóxico, o 3β-lup-20(29)-en-30-diol e 3β-lup-20(29)-eno-28-diol, juntamente com dois derivados friedelano, friedelina e 3β -friedelinol [9, 19].



Figura 4. Constituintes químicos isolados de Maytenus rigida [9].

2.1.3 Maytenus truncata Reissek

Maytenus truncata Reissek apresenta-se como arbusto com aproximadamente 2,0 m de altura, suas folhas são coriáceas. É nativa do médio Rio das Contas, região de Contendas do Sincorá que se estende até o município de Jequié, Bahia [20, 21].

Na Bahia a planta *Maytenus truncata* (Figura 5) é conhecida popularmente como "espinheira santa" (Jequié), "todo lado", "todo jeito", "árvore de natal" e "caminha de Nossa Senhora". Empregada na medicina popular na forma de infusão no tratamento de úlcera gástrica e doenças no útero. Entre os usos mais comuns, destaca-se predominantemente a utilização de caules e das folhas verdes ou secas, na forma de chás ou na forma de tintura de biotômico no tratamento das inflamações do estômago (gastrite), do aparelho reprodutor feminino, no equilíbrio do colesterol, como cicatrizante e no tratamento de úlceras [20, 21].



Figura 5. Ilustração botânica de Maytenus truncata (a) [20]. Foto de M. truncata (b). Fonte: própria.

Dessa espécie foram isolados triterpenos pentacíclicos (TTPC) friededooleanânicos como a friedelina; canofilol, $3\alpha e 3\beta$ –friedelanol, friedelan- 3α ,29-diol, 3α hidroxifriedelan-7-ona, ácido populnônico, friedelan- 3β ,28-diol, populnonato de metila e abruslactona A; os fito-hormônios: β -sitosterol, β -D-glicopiranosídeo de 3β sitosterila; o TTPC quinonametídeo, pristimerina; os flavonoides 3-O-acetil-4'-Ometilepigalocatequina, 4'-O-metilepigalocatequina; proantocianidina A, além do derivado de galactose dulcitol (Figura 6, p.20) [9, 20].



Proantocianidina A

Figura 6. Compostos isolados de Maytenus truncata REISSEK [9, 20].

3 Microextração Líquido-Líquido Dispersiva (DLLME).

A técnica de microextração líquido-líquido dispersiva (DLLME) apresenta uma gama de benefícios, como redução do tempo nas analises, o baixo custo devido a pouca quantidade de solvente utilizado, diminuindo também a poluição da natureza. A técnica utiliza dois solventes, um extrator e outro dispersor (Figura 7), metodologia descrita por Martins [22]. A técnica se mostra eficaz na obtenção da composição química de misturas constituída de compostos de baixo peso molecular, sendo útil na prospecção de extratos vegetais para dirigir o isolamento e elucidação estrutural de novos compostos.



Figura 7. Diagrama simplificado demonstrando as etapas da DLLME, adaptado de Berijani [22].

4 OBJETIVOS

4.1 Objetivo geral

Desenvolver o estudo químico via prospecção por CG-EM e o estudo fitoquímico de extratos alcoólicos de folhas, raízes, e extrato aquoso de folhas de três espécies de *Maytenus*, bem como, avaliar as atividades desses extratos quanto as ações: antioxidante e antiulcerogênica.

4.1.1 Objetivos específicos

 Identificar os constituintes químicos, voláteis e semivoláteis que ocorre nos extratos (EMA, EMT, EMR, EMRR) utilizando as técnicas de extração líquido-líquido dispersiva (DLLME) e análise por CG-EM incluindo reação de derivatização por compostos derivado do silício.

2. Desenvolver o estudo fitoquímico por cromatografia planar e líquida à pressão atmosférica e de media pressão (CLMP) dos extratos de folhas de *M. acanthophylla* e *M. truncata,* e de raízes de *M. rigida*.

3. Elucidar as estruturas dos compostos isolados ou identificados nos estudos fitoquímicos por técnicas espectrométricas (UV-Vis, IV, CG-EM e RMN).

4. Avaliar o potencial antioxidante dos extratos, utilizando o ensaio baseado no sequestro dos radicais livres 2,2-difenil-1-picril-hidrazila (DPPH):

(a) etanólicos das folhas de M. acanthophylla e M. truncata;

(b) aquosos liofilizados das folhas de M. acanthophylla e M. truncata

(c) metanólico das folhas de M. rigida

5. Avaliar atividade gastroprotetora *in vivo* (antiulcerogênica) e *in vitro* (antiácida) do extrato aquoso liofilizado das folhas de *M. acanthophylla*.

6. Determinar os constituintes micro e macroelementos (Ca, Co, Cu, Fe, K, Mg, Mn, Na e Zn) por ICP OES nas folhas de *M. rigida, M. truncata e M. acantho-phylla* e nas raízes de *M. rigida.*

5 PARTE EXPERIMENTAL

5.1 Métodos gerais

Na preparação das cromatoplacas para cromatografia em camada delgada (CCD), utilizou-se suspensão de sílica gel Merck 60 G em água [7 g para 15 mL (p/v)], formando camada de 0,25 mm de espessura, sobre suporte de vidro. Após secagem parcial a temperatura ambiente, as placas foram ativadas em estufa a 100°C por 60 minutos. Como reveladores de cromatoplacas utilizaram-se luz ultravioleta, iodo e pulverização com solução de vanilina em álcool etílico (1:99) com ácido perclórico em água (3:97), misturadas na proporção de 1:1 v/v, seguida de aquecimento em estufa a 100°C.

Na cromatografia líquida em coluna foi utilizada sílica gel Merck 60 (70-230 Mesh), adotando a proporção média de 1,0 g de extrato para 50 g de fase estacionária para as colunas de fracionamento do extrato. A proporção aproximada de 1 g de amostra até 100 g de fase estacionária foi utilizada na fase de purificação. A mesma proporção de 1/100 foi utilizada também em relação às colunas contendo sílica flash (250-400 mesh). Os solventes utilizados nos processos de cromatografia em coluna foram todos de grau analítico (P.A.) e previamente destilados quando necessário.

Espectro de absorção na região do infravermelho (IV) foi obtido utilizando o espectrômetro Perkin Elmer modelo Spectrum Two ATR-FTIR, instalado no laboratório de cromatografia Dr. Jailson Bittencourt do Departamento de Química da UESB. O dispositivo ATR permite que o espectro seja obtido diretamente da amostra sólida sem a necessidade do uso de pastilha. Esse espectro foi obtido pelo método da reflectância atenuada, submetendo 1,0 mg do cristal pulverizado ao feixe de radiação do aparelho.

Os espectros de RMN de ¹H e de ¹³C 1D foram obtidos em espectrômetros Varian Inova 500 do Laboratório Baiano de Ressonância Magnética Nuclear (LABA-REMN) do Departamento de Química, UFBA. Solventes deuterados utilizados encontram-se indicados em cada caso. Os deslocamentos químicos (δ) foram registrados em *ppm* usando tetrametilsilano (TMS) como padrão de referência interna.

As análises realizadas por cromatografia em fase gasosa acoplada ao espectrômetro de massa (CG-EM) foram desenvolvidas em um cromatógrafo SHIMADZU, modelo QP2010 SE instalado no laboratório de cromatografia Dr. Jailson Bittencourt do Departamento de Química da UESB, dotado de biblioteca de espectros de massas NIST-11. Foi empregada uma coluna capilar SPB-tm5 de 30 m de comprimento e 0,25 mm diâmetro interno, uma fase estacionária composta por um filme de dimetilpolisiloxano (95%) e fenila (5%) com 0,25 µm de espessura. Temperatura do injetor 280 °C, fluxo de gás de 1,8 mL min⁻¹, aquecimento do forno/coluna na faixa de 80° (durante 1 min) a 280°C (durante 5 min) e razão de aquecimento de 15 °C min⁻¹. As temperaturas da interface CG/EM e fonte de íons do detector foram ajustadas em 290 e 250 °C, respectivamente. Os constituintes detectados por CG-EM foram identificados por comparação entre os índices cromatográficos calculados versus publicados [24] e por similaridade (S≥90%) com os espectros do banco de dados NIST11 do cromatógrafo.

5.1.1 Coleta e identificação do material vegetal

As folhas de *Maytenus acanthophylla* foram coletadas no município de Jequié, Bahia, próximo à rodovia BR 116 (latitude -13°, 57'15.38" S, longitude -40°10'30.65" O). Um exemplar da exsicata encontra-se no Herbário da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, sob o número de registro HUESB - 7813. As folhas de *Maytenus truncata* e as raízes de *Maytenus rigida* foram coletadas no bairro Cachoeirinha, no perímetro urbano de Jequié, Bahia. Exemplares da exsicata encontram-se no Herbário da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia sob o número HUESB-9311 e HUESB-7056, respectivamente.

Após coletadas, as folhas foram secas em temperatura ambiente e moídas em liquidificador industrial (Skywsem, modelo LSB - 15). As raízes de *Maytenus rigi- da* foram secas em temperatura ambiente e em seguida moídas para posterior preparo dos extratos.

5.1.2 Preparação dos extratos das três espécies de Maytenus

Após secagem a temperatura ambiente, as folhas de *Maytenus rigida* foram pulverizadas em liquidificador industrial (Skywsem, modelo LSB - 15) e obtiveram-se 1,5 Kg. O extrato das folhas pulverizadas foi preparado empregando extração por maceração à temperatura ambiente no período de sete dias. O solvente utilizado foi metanol puro. Após filtração, a remoção dos solventes por destilação sob pressão

reduzida, obteve o extrato (200,00 g) que auferiu a seguinte nomenclatura EMR (extrato metanólico das folhas de *Maytenus rigida*).

Os extratos etanólicos de *M. acanthophylla e M. truncata* foram preparados com as folhas e as raízes de *M. rigida* através de extração contínua com álcool etílico (95%) a quente utilizando aparelho de Soxhlet, segundo metodologia descrita por Mendes [23]. Os extratos obtidos foram concentrados em evaporador rotatório a 60 °C e pressão reduzida. Os extratos etanólicos foram designados as seguintes siglas: EMA (extrato etanólico das folhas de *Maytenus acanthophylla*), EMT (extrato etanólico das folhas de *Maytenus truncata*) e EMRR (extrato etanólico das raízes de *Maytenus rigida*).

O extrato aquoso foi preparado somente com as amostras de folhas de *Ma-ytenus acanthophylla* e *Maytenus truncata* com o objetivo de obter um extrato que apresentasse composição química similar a dos chás da medicina popular que são feitos destas plantas por cocção. O preparo foi feito através da técnica da decocção sob refluxo.

As folhas moídas foram colocadas em um balão de fundo redondo com água destilada e mantidas em aquecimento numa manta aquecedora por um período de duas horas. Um condensador foi acoplado ao balão a fim de manter a água num constante refluxo, sem que houvesse a necessidade de estar repondo a água evaporada durante este período, proporcionando assim uma extração exaustiva. Em seguida, o extrato obtido foi coado em pano de algodão para separar o resíduo resultante do material vegetal e submetido a uma filtração à vácuo. Os extratos aquosos foram desidratados através da técnica de liofilização por um aparelho liofilizador da marca Terroni, Série LS, modelo 3000. Os extratos aquosos foram designados pelas iniciais AMA (extrato aquoso das folhas de *Maytenus acanthophylla*) e AMT (extrato aquoso das folhas de *Maytenus truncata*).

5.2 Prospecção fitoquímica por DLLME dos extratos, EMA, EMT, EMR e EMRR

De um modo geral as microextrações líquido-líquido dispersiva (DLLME) foram feitas a partir de uma alíquota de 1,0 mg de cada extrato, o qual foi dissolvido em 1,0 mL de álcool metílico (MeOH, solvente dispersor), seguido de 5,0 mL de água destilada-deionizada. À solução hidroalcoólica do extrato foi adicionado 1,0 mL de diclorometano (DCM, solvente extrator), em seguida, a mistura bifásica obtida foi transferida para um tubo de fundo cônico e submetida à centrifugação (3000 rpm/10 min). Após centrifugação, a fase orgânica sedimentada foi separada, e então, levada a análise direta por CG-EM. Uma segunda extração DLLME foi realizada seguindo o procedimento acima, tendo como solvente dispersor a acetona para futura comparação dos resultados. Esse procedimento foi realizado em triplicata para todos os extratos (EMA, EMR, EMRR e EMT). Uma alíquota de 3,0 mg dos extrativos obtidos em DCM utilizando metanol (solvente dispersor) e outra em acetona (solvente dispersor) foram sililados adicionado 60,0 µL de piridina seca e 100,0 µL do reagente N,O-bis-(*trimetilsilil*)-trifluroacetamida (BSTFA) e em seguida Levado ao banho Maria por 30 minutos na temperatura de 70°C. e analisado por CG-EM.

5.3 Estudo fitoquímico do extrato EMR

5.3.1 Coluna filtrante

Parte do extrato metanólico das folhas de *Maytenus rigida* EMR (10,0 g) foi submetida a uma coluna filtrante, utilizando um sistema de filtração a vácuo, usando sílica gel 60 (C-1). Foram coletadas 5 frações de 200 mL cada. Os eluentes utilizados em C-1 foram hexano, clorofórmio, acetato de etila, acetona e metanol, em gradiente de polaridade (tabela 1).

Sistema eluente	Frações
Hexano	F1
Clorofórmio	F2
Acetato de etila	F3
Acetona	F4
Metanol	F5

Tabela	1.	Frações	obtidas	de	C-1.
--------	----	---------	---------	----	------

A partir da fração em hexano (F1) foi isolado um sólido branco cristalino (100 mg) que foi solubilizado em acetona e recristalizado. A análise por CCD eluída com CH₃CI:Hexano (9:1) e comparação com amostras autênticas de friedelina e 3β -friedelinol mais análises por técnicas de infravermelho (IV) e cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa (CG-EM), permitiram identificar como uma mistura dos triterpenos pentacíclicos 3β -friedelinol e friedelina (11) e (13).

Foi obtido também, a partir da fase líquida dessa fração (F1), um óleo amarelado e viscoso, solúvel em clorofórmio, que, após análise por CG-EM foi identificado como sendo o triterpeno acíclico esqualeno (**7**).

5.3.2 Fracionamento da fração F4

A amostra F4 (1,596 g) foi aplicada em uma coluna de cromatografia líquida, CCL (φ = 5,0 cm) empacotada com 150,0 g de sílica gel 60 (C-2). Foram coletadas 274 frações de 5 mL cada e eluída em gradiente de polaridade (Hexano:AcOEt (7:3), (1:1), (4:6), (3:7), (2:8) e (0:1)). Em seguida as frações de C-2 foram analisadas por CCD para a obtenção do perfil cromatográfico e agrupamento das frações. O grupo de frações G4 de C-2 foi obtido como um material seroso de coloração esverdeada (238 mg), que foi submetido a CCD, tendo como eluente hexano:acetato de etila (14:1). Na tentativa de isolar as substâncias identificadas na placa CCD o grupo de frações G4/C-2 foi submetida a uma coluna cromatográfica (C-3) de média pressão (CLMP) em modo isocrático (hexano:acetato de etila (14:1)), que se mostrou adequada à separação da mistura constituída por G4/C-2.

5.3.3 Fracionamento da amostra G4/C-2, coluna C-3

A amostra G4 (238 mg) foi aplicada em uma CLMP coluna cromatográfica (C-3) em modo isocrático (hexano:acetato de etila (14:1)) (ϕ = 2,0 cm) empacotada com 23,8 g de sílica flash (C-3). Foram coletadas 50 frações (2,5 mL), as quais foram agrupadas de acordo com semelhanças por CCD (Tabela 2).

Frações	Grupo	Massa (mg)	Constituintes	Identificação
F10 a F15	G1	8,0	11	CCD, RMN
F17 a F25	G2	14,0	9 + 10	CCD, RMN
F36 a F34	G3	9,0	23	CCD, RMN
F35 a F40	G4	15,0	8 + 23	CCD, RMN
F41 a F50	G5	25,0	8	CCD, RMN
	Frações F10 a F15 F17 a F25 F36 a F34 F35 a F40 F41 a F50	Frações Grupo F10 a F15 G1 F17 a F25 G2 F36 a F34 G3 F35 a F40 G4 F41 a F50 G5	FraçõesGrupoMassa (mg)F10 a F15G18,0F17 a F25G214,0F36 a F34G39,0F35 a F40G415,0F41 a F50G525,0	FraçõesGrupoMassa (mg)ConstituintesF10 a F15G18,011F17 a F25G214,09 + 10F36 a F34G39,023F35 a F40G415,08 + 23F41 a F50G525,08

Tabela 2. Agrupamentos e constituintes isolados das frações de C-3, amostra G4/C-2

A figura 8, p.29 apresenta as operações realizadas na elaboração do estudo fitoquímico do extrato das folhas *de M. rigida* (EMR).



Figura 8. Esquema da preparação do extrato de M. rigida e fracionamento de EMR

5.4 Ensaios biológicos

5.4.1 Avaliação antioxidante

A atividade antioxidante foi avaliada mediante medidas das capacidades de soluções de extratos das plantas em capturar radicais livres DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazila), através de método fotocolorimétrico quantitativo.

5.4.1.1 Análise qualitativa da atividade antioxidante

A capacidade antioxidante dos extratos foi avaliada qualitativamente através da técnica de cromatografia em camada delgada, segundo metodologia descrita por Souza [26] com alterações.

Os extratos etanólicos e aquosos foram solubilizados em metanol e aplicados em placa de sílica Gel 60 juntamente com os padrões quercetina e ácido gálico que também foram solubilizados em metanol. Foram utilizados dois sistemas de eluentes: acetato/hexano (1:1) para eluir as placas contendo alíquotas dos extratos etanólicos e padrões; e acetato/hexano (6:4) para eluir as placas contendo os extratos aquosos e os padrões. Após a eluição, as placas foram reveladas com solução de 2,2-difenil-1-picril-hidrazila (DPPH – Sigma-Aldrich) a 0,4 mmol/L.

5.4.1.2 Análise quantitativa da atividade antioxidante

As amostras foram solubilizadas com metanol em três concentrações diferentes (100, 10 e 1 µg/mL) através de diluições seriadas, sendo todas elas em triplicata. Uma solução estoque de DPPH (Sigma-Aldrich) foi preparada na concentração de 20 µg/mL com metanol. Para a realização da leitura no espectrofotômetro (VARIAN marca e modelo CARY 50), primeiramente, aplicou-se na cubeta uma alíquota de 0,75 mL da solução da amostra e 1,5 mL da solução de DPPH, procedendo-se dessa maneira para as três concentrações de todos os extratos. As cubetas contendo as soluções foram mantidas no escuro e em temperatura ambiente por um período de 30 minutos. A leitura das amostras foi realizada no comprimento de onda de 517 nm, utilizando-se como branco o metanol e como controle a solução de DPPH.
Os padrões antioxidantes utilizados para comparação foram a quercetina e o ácido gálico, ambos preparados em triplicata e nas mesmas concentrações das amostras. A leitura dos mesmos foi realizada da mesma maneira que a das amostras.

O cálculo da atividade antioxidante é realizado pela equação abaixo:

$$\% = \frac{\text{absorbância do controle} - \text{absorbância da amostra}}{\text{absorbância do controle}} X 100$$

Os resultados obtidos foram submetidos, aos pares, à análise estatística realizada pelo teste-t (Student), dentro do limite de 95% de confiança. A análise foi realizada no programa Microsoft Excel, 2007.

5.4.2 Atividade gastroprotetora do extrato aquoso de folhas de Maytenus acanthophylla (AMA).

5.4.2.1 Animais

Os experimentos foram realizados utilizando camundongos Swiss machos (n = 6-8) pesando entre 35-40 g, fornecidos pelo Centro de Bioterismo e Experimentação Animal da Universidade Federal de Uberlândia (CEBEA/UFU). Os animais foram mantidos no depositário de animais da Área de Ciências Fisiológicas do Instituto de Ciências Biomédicas da UFU (ARFIS/ICBIM/UFU) em condições controladas de temperatura (21°C) e luminosidade (ciclo claro escuro de 12 horas). Os animais tiveram livre acesso à água filtrada e ração comercial (Nuvilab®), exceto quando especificado. Todos os protocolos utilizados foram analisados e aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Uberlândia (CEUA/UFU; processo nº 103/14 – anexo A).

5.4.2.2 Avaliação do efeito da administração de AMA sobre as lesões gástricas induzidas por HCl/etanol.

Essa etapa do trabalho foi realizada em colaboração com o prof. Dr. Luiz Borges Bispo-da-Silva responsável pelo Laboratório de Farmacologia Geral do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade Federal de Uberlândia (ICBIM/UFU). Os experimentos foram conduzidos pelo Dr. Luiz Borges Bispo-da-Silva e pela Biomédica Ingrid Beatriz de Melo Morais. O modelo de lesão gástrica induzida por solução hidrocalcoólica acidificada [24] foi utilizado para avaliar a atividade gastroprotetora do extrato aquoso liofilizado das folhas de M. acanthophylla (AMA). Os camundongos foram divididos em 5 grupos (n = 6-8) e submetidos a jejum de 24 horas antes da realização dos experimentos. Após esse período, os animais receberam administrações intragástricas (via cânula de gavagem; volume: 0,5 mL) de solução salina (NaCl, 0,9%), carbenoxolona (250 mg/Kg; utilizada como controle positivo), ou extrato (100, 550, 1000 mg/Kg). Decorridos 50 minutos dos tratamentos, todos os animais receberam 0,26 mL de solução hidroalcoólica acidificada (0,3 M de HCI/etanol 60%). Depois de 1 hora, os animais foram anestesiados com tiopental sódico (60 mg/Kg, i.p.) e sacrificados por deslocamento cervical. Foram realizadas laparotomias para a remoção dos estômagos, os quais foram abertos através da curvatura maior, lavados em salina e montados entre duas placas de vidro. Imagens dos tecidos assim processados foram obtidas e digitalizadas utilizando-se o Scanner HP Scanjet 2400. O sofware imagej [25] foi utilizado para analisar as imagens dos estômagos e os resultados obtidos foram expressos como índice de úlcera (I.U.).

O índice de úlcera foi calculado de acordo com o descrito por Prado [26]. As lesões foram classificadas e receberam escores de acordo com a severidade das mesmas, da seguinte maneira: área de lesões hemorrágicas ou ulceração propriamente dita (3), área de hiperemia intensa (2) e área de hiperemia moderada/leve (1) (Figura 9, p.33). O I.U. foi então determinado utilizando-se a fórmula: I.U. = 3x área de lesão hemorrágica (mm²) + 2x área de hiperemia intensa (mm²) + 1x área de hiperemia moderada/leve (mm²).

5.4.3 Avaliação in vitro da atividade antiácida de AMA

Alíquotas de 0,1 mL de solução de AMA (40 mg/mL) ou água destilada foram adicionadas a 10,0 mL de solução de HCL (3,8 x 10⁻³ mol/L), pH 2,42. As alterações de pH foram então avaliado utilizando-se pHmetro (AD1000, Adwa). A concentração da solução de extrato utilizada nesse ensaio equivale à dose de 550 mg/Kg do mesmo utilizada nos ensaios *in vivo*, considerando um animal de 40 g de peso. Cabe ressaltar que nos ensaios *in vivo* os animais receberam 0,5 mL de solução de extrato, o que equivale à adição de 5 alíquota de 0,1 mL da mesma no experimento *in vitro*.

Os dados foram apresentados como média ± EPM e comparados através da análise de variância (ANOVA). A fim de identificar as diferenças entre os grupos foi utilizado o pós-teste de Dunnett. As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas quando P foi menor que 0,05.



Figura 9. Definição dos escores para a classificação das lesões gástricas e cálculo do índice de úlcera.

Classificação das lesões da mucosa gástrica induzidas pela administração oral de HCl/etanol de acordo com Prado [26]. A área de lesão hemorrágica ou ulcerativa recebeu o escore 3, enquanto que a área de hiperemia intensa e a área de hiperemia moderada/leve receberam o escore 2 e 1, respectivamente (Figura 9).

5.5 Determinação de micro e macroelementos nas folhas do gênero *Maytenus* (celastraceae), tais como *M. rigida*, *M. truncata* e *M. acanthophylla* e nas raízes *M. rigida* por ICP OES.

5.5.1 Instrumentação

Todas as medidas de intensidade de emissão foram realizadas utilizando-se o equipamento ICP-OES (espectrometria de emissão óptica com plasma acoplado indutivamente) modelo Optima™ 7000 DV (marca Perkin Elmer), que realiza medições sequencialmente e possui configuração com vista de observação axial/radial do plasma. O sinal analítico foi obtido por meio de um microcomputador equipado com o software WinLab32. As condições de utilização do equipamento estão listadas na Tabela 3.

 Tabela 3. Condições de operação do espectrômetro de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado

Parâmetros	Condição
Potência de RF	1300 W
Vista	axial
Gerador de RF	40,00 MHZ
Nebulizador	Fluxo cruzado (Cross Flow)
Câmara de nebulização	Duplo passo (Tipo Scott)
Detector	Estado Sólido (CCD)
Vazão de argônio do plasma	12,00 L /min
Vazão de nubilização	0,80 L /min
Vazão de argônio do auxiliar	0,70 L /min
Vazão de amostragem	1,50 mL /min

Argônio com pureza de 99,996% foi utilizado para a geração do plasma, como gás de nebulização e auxiliar. Ar comprimido foi utilizado como gás de corte do plasma e o nitrogênio de grau analítico 99,999% foi usado como gás de purga do sistema ótico do espectrômetro.

Linha do	Comprimento de	Linha do	Comprimento de
elemento	onda (nm)	elemento	onda (nm)
Ca II	317,933	Na I	589,592
Co II	228,616	Mg I	285,213
Cu II	324,752	Mn II	257,610
Fe II	238,204	Zn I	213,857
ΚI	766,49		

Tabela 4. Elementos estudados e suas respectivas linhas analíticas.

5.5.2 Preparo de soluções

Todos os reagentes utilizados nos experimentos foram de grau analítico. Para a preparação das amostras e soluções foi utilizada água ultra pura (Milli-Q®), proveniente de um purificador ELGA (Modelo Classic UF MK2 - resistividade de 18,2 $M\Omega$.Cm⁻¹) após prévia destilação e deionização. Como a determinação de elementos presentes na amostra em baixas concentrações exige que o material utilizado para estocar as amostras e soluções seja livre de contaminantes, toda a vidraria e frascos utilizados no decorrer desse estudo foram previamente descontaminados em solução de HNO₃ 5% (v/v) por 72 horas. Após a imersão em solução ácida, todos os materiais foram lavados com água deionizada.

5.5.3 Preparo das amostras

Inicialmente as folhas coletadas foram secas em temperatura ambiente e moídas em liquidificador industrial (Skywsem, modelo LSB - 15). A raiz de *Maytenus rigida* também foi coletada e seca em temperatura ambiente, descascada e moída. Aproximadamente 0,1000 g das folhas e da raiz foram pesadas para posterior digestão em frascos fechados. As amostras foram misturadas em 2,0 mL de solução de ácido nítrico (4,0 mol/L) e 0,5 mL de peróxido de hidrogênio. A mistura foi colocada em bombas de digestão e levada à estufa, onde foi mantida por 4 horas a uma temperatura em torno de 160°C. Após resfriamento do sistema em questão as soluções finais foram conservadas em geladeira até o momento da análise No momento de leitura no ICP OES as soluções foram transferidas para balões de 10 mL e avolumadas com água ultrapura.

5.5.4 Análise das amostras

Parâmetros químicos	Equação	R ²
Na	y = 1E+06x - 394029	0,9937
Ca	y = 228982x + 21982	0,9995
Mg	y = 540475x - 79976	0,9995
K	y = 323467x - 172407	0,9941
Fe	y = 295229x - 20539	0,9998
Mn	y = 2E+06x - 436317	0,9991
Со	y = 189820x - 23000	0,9996
Zn	y = 273377x - 4451,5	0,9998
Cu	y = 842282x - 109789	0,9994

Tabela 5. Micro e macroelementos determinados por ICP OES e os parâmetros da curva analítica.

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 Prospecção por DLLME/CG-EM de Extratos de Folhas de Maytenus

6.1.1 Extrato alcoólico das folhas de Maytenus acanthophylla (EMA)



Figura 10. TIC de EMA obtido por DLLME/CG-EM, utilizando metanol como solvente dispersor.

A análise do cromatograma de íons totais (TIC) de uma alíquota do extrato EMA, obtido mediante a aplicação das técnicas DLLME/CG-EM (Figura 10), tendo como solventes dispersor o metanol e extrator o DCM, permitiu identificar treze componentes químicos (71,3 %): 4, 6 dimetildodecano (1), *2,4-di-terc*-butil-fenol (2), ácido hexadecanóico (3), hexadecanoato de etila (4), fitol (5), ácido octadecanóico (6), esqualeno (7), *3* β -sitosterol (8), β -amirina (9), lupeol (10), *3* β -friedelinol (11), *3* α -friedelinol (12) e friedelina (13), sendo os compostos 2, 3, 4 e 6 inéditos para espécie *Maytenus acanthophylla* (Tabela 6, p.38), enquanto que os demais (1, 5, 7, 8, 9, 10, 11, 12 e 13) foram anteriormente identificados e isolados nessa mesma planta [7, 9].

Pico	t _R	IC(cal)	IC(lit)	Nome	Área Total (%)
1	$6,295 \pm 0,000$	1272 ± 0,000	1259	4,6-dimetildodecano (1)	0,725 ± 0,346
2	9,009 ± 0,001	1507 ± 0,054	1512	2,4-di-terc -butil-fenol (2)	1,470 ± 0,297
3	17,102 ± 0,010	1954 ± 0,430	1951	ácido hexadecanóico (3)	1,260 ± 0,156
4	17,968 ± 0,004	1992 ± 0,154	1990	hexadecanoato de etila (4)	$0,445 \pm 0,049$
5	21,146 ± 0,002	2111 ± 0,140	2114	fitol (5)	0,310 ± 0,057
6	21,883 ± 0,001	2159 ± 0,093	2157	ácido octadecanóico (6)	$0,500 \pm 0,156$
7	31,263 ± 0,000	*	_	esqualeno (7)	$0,680 \pm 0,057$
8	42,043 ± 0,004	*	_	3β-sitosterol (8)	$0,620 \pm 0,255$
9	43,157 ± 0,004	*	_	β-amirina (9)	0,473 ± 0,351
10	44,757 ± 0,006	*	_	lupeol (10)	5,615 ± 1,676
11	49,188 ± 0,052	*	_	3β-friedelinol (11)	44,535 ± 0,332
12	49,969 ± 0,024	*	_	3α -friedelinol (12)	9,350 ± 0,226
13	50,232 ± 0,033	*		friedelina (13)	5,340 ± 0,113
				Total	71,323 ± 0,313

 Tabela 6. Constituintes de EMA identificados por DLLME/CG-EM, tendo MeOH como solvente dispersor.

Nota: t_R : tempo de retenção; Área total: área total normalizada; IC(cal) e IC(lit): Índices cromatográficos calculados e da literatura [27].



Figura 11. TIC de EMA obtido por DLLME/CG-EM, utilizando acetona como solvente dispersor.

A Figura 11 mostra o TIC/DLLME/CG-EM de EMA, tendo como solvente dispersor o acetona, permitiu identificar os mesmos treze componentes químicos (39,5 %) que foram identificados quando se utilizou o metanol como solvente dispersor. Entretanto, foi observado que, os extrativos obtidos com acetona apresentaram valores inferiores aquelas obtidas com metanol, entretanto a acetona apresentou um maior rendimento extrativo para os compostos **1**, **3**, **5-8** e **9**. A tabela 7, p.39 resume os dados da DLLME/CG-EM de EMA feita com acetona como solvente dispersor.

Pico	t _R	IC(cal)	IC(lit)	Nome	Área total (%)
1	$6,296 \pm 0,006$	1272 ± 0,522	1259	4,6-dimetildodecano (1)	0,370 ± 0,191
2	9,010 ± 0,006	1507 ± 0,464	1512	2,4-di-terc-butil-fenol (2)	0,860 ± 0,366
3	17,108 ± 0,016	1954 ± 0,682	1951	ácido hexadecanóico (3)	1,380 ± 0,585
4	17,965 ± 0,004	1992 ± 0,153	1990	hexadecanoato de etila (4)	0,310 ± 0,195
5	21,150 ± 0,010	2111 ± 0,636	2114	fitol (5)	0,353 ± 0,282
6	21,889 ± 0,010	2160 ± 0,659	2157	ácido octadecanóico (6)	0,650 ± 0,295
7	31,267 ± 0,016	*	_	esqualeno (7)	0,917 ± 0,307
8	$42,053 \pm 0,043$	*	_	3β-sitosterol (8)	0,753 ± 0,320
9	43,156 ± 0,046	*	_	β-amirina (9)	0,483 ± 0,397
10	44,765 ± 0,042	*	_	lupeol (10)	3,883 ± 2,910
11	49,161 ± 0,036	*	_	3β-friedelinol (11)	22,193 ± 14,051
12	49,953 ± 0,048	*	_	3α -friedelinol (12)	4,647 ± 3,403
13	50,235 ± 0,029	*		friedelina (13)	2,770 ± 1,969
				Total	39,569 ± 1,944

 Tabela 7. Constituintes de EMA identificados por DLLME/CG-EM, tendo acetona como solvente dispersor.

Nota: t_R: tempo de retenção; Área total: área total normalizada; IC (cal) e IC(lit): Índices cromatográficos calculados e os obtidos na literatura [27], respectivamente.

O constituinte químico inédito 2,4-di-terc-butil-fenol (2) é utilizado largamente como antioxidante, sendo comercializado com o nome Prodox 146, e bastante utilizado nas indústrias farmacêuticas e alimentícias para proteção dos fármacos e cosméticos contra os processos oxidativos [28].

As identificações dos constituintes mostrados nas Tabelas 6 e 7 foram confirmadas em amostras de EMA submetidas a técnica DLLME/BSTFA/CG-EM (extração por DLLME, em seguida derivatização por reação com N,*O*-bis-(*trimetilsilil*)trifluroacetamida - BSTFA e analisadas por CG-EM).

6.1.2 Prospecção fitoquímica de EMT (extrato etanólico das folhas de Maytenus truncata) feita por DLLME



Figura 12. TIC de EMT obtido por DLLME/CG-EM, utilizando metanol como solvente dispersor.

A análise do TIC, obtido por DLLME/CG-EM em uma alíquota do extrato EMT (Figura 12), tendo como solvente dispersor o metanol, permitiu identificar quatorze componentes químicos (39,6 %, Tabela 8, p.40):

Pico	t _R	IC(cal)	IC(Lit)	Nome	Área total (%)
1	$6,300 \pm 0,004$	1272 ± 0,309	1259	4,6-dimetildodecane (1)	1,147 ± 0,081
2	$7,849 \pm 0,004$	1404 ± 0,301	1403	dodecanal (14)	1,050 ± 0,156
3	9,014 ± 0,003	1507 ± 0,233	1512	2,4-di-terc-butil-fenol (2)	2,570 ± 0,052
4	17,116 ± 0,010	1955 ± 0,446	1963	ácido hexadecanóico (3)	3,117 ± 1,674
5	17,984 ± 0,009	1993 ± 0,379	1990	hexadecanoato de etila (4)	1,857 ± 0,396
6	21,150 ± 0,008	2111 ± 0,537	2114	fitol (5)	$0,420 \pm 0,144$
7	21,554 ± 0,008	2137 ± 0,553	2143	ácido linolênico (15)	3,700 ± 2,331
8	$22,024 \pm 0,006$	*	_	linoleato de etila (16)	2,010 ± 0,383
9	31,276 ± 0,007	*	_	esqualeno (7)	5,213 ± 1,521
10	36,911 ± 0,003	*	_	a-tocoferol (17)	1,910 ± 1,061
11	42,078 ± 0,010	*	_	β-sitosterol (8)	2,433 ± 0,919
12	49,135 ± 0,002	*	_	3β-friedelinol (11)	4,543 ± 0,595
13	49,988 ± 0,023	*	_	3α-friedelinol (12)	6,580 ± 2,452
14	50,254 ± 0,030	*		friedelina (13)	3,073 ± 1,135
				Total	39,623 ± 0,921

 Tabela 8. Constituintes de EMT identificados por DLLME/CG-EM, tendo MeOH como solvente dispersor.

Nota: t_R: tempo de retenção; Área total: área total normalizada; IC (cal) e IC(lit): Índices cromatográficos calculados e os obtidos na literatura [27], respectivamente.

o composto 4,6-dimetildodecano (1), 2,4-di-terc-butil-fenol (2), ácido hexadecanóico (3), hexadecanoato de etila (4), fitol (5), esqualeno (7), 3β -sitosterol (8), 3β friedelinol (11), 3α -friedelinol (12), friedelina (13), dodecanal (14) ácido linolênico (15), linoleato de etila (16) e α -Tocoferol (17), sendo os compostos 2, 3, 14 e 15 inéditos para espécie *M. truncata*, enquanto que os demais (1, 4, 5, 7, 8, 11, 12, 13, 16 e 17) foram isolados ou identificados anteriormente e na espécie *M. Truncata* [9, 20].



Figura 13. TIC de EMT obtido por DLLME/CG-EM, utilizando acetona como solvente dispersor.

A tabela 9, p.42 mostra que os resultados DLLME/CG-EM obtidos com acetona como solvente dispersor, a análise desses dados permitiu identificar quatorze componentes de EMT, de modo similar ao método utilizando metanol como dispersor. Quantitativamente a eficiência da DLLME/acetona foi maior para os compostos **4-8** e **15-17**.

Pico	t _R	IC(cal)	IC(Lit)	Nome	Área total (%)
1	6,298 ± 0,003	1272 ± 0,151	1259	4,6-dimetildodecane (1)	0,570 ± 0,299
2	$7,848 \pm 0,004$	1404 ± 0,297	1403	dodecanal (14)	0,630 ± 0,213
3	9,013 ± 0,003	1507 ± 0,677	1512	2,4-di-terc-butil-fenol (2)	1,387 ± 0,289
4	17,130 ± 0,022	1955 ± 0,926	1963	ácido hexadecanóico (3)	4,573 ± 1,190
5	17,983 ± 0,011	1992 ± 0,468	1990	hexadecanoato de etila (4)	2,173 ± 0,143
6	21,151 ± 0,005	2110 ± 0,423	2114	fitol (5)	$0,607 \pm 0,208$
7	21,568 ± 0,017	2138 ± 0,890	2143	ácido linolênico (15)	5,837±2,109
8	$22,024 \pm 0,006$	*	_	linoleato de etila (16)	$2,590 \pm 0,409$
9	31,276 ± 0,010	*	_	esqualeno (7)	12,953 ± 2,605
10	36,910 ± 0,015	*	_	α-tocoferol (17)	4,327 ± 2,649
11	42,072 ± 0,023	*	_	β-sitosterol (8)	3,333 ± 0,523
12	49,123 ± 0,028	*	_	3β-friedelinol (11)	$4,080 \pm 0,358$
13	49,970 ± 0,037	*	_	3α-friedelinol (12)	6,387 ± 0,705
14	50,248 ± 0,009	*	_	friedelina (13)	3,143 ± 0,317
				Total	52,59 ± 0,858

 Tabela 9. Constituintes de EMT identificados por DLLME/CG-EM, tendo acetona como solvente dispersor.

Nota: t_R: tempo de retenção; Área total: área total normalizada; IC(cal) e IC(lit): Índices cromatográficos calculados e da literatura [27], respectivamente.

As identificações dos constituintes mostrados nas Tabelas 8 e 9 foram confirmadas em amostras de EMT submetidas a técnica DLLME/BSTFA/CG-EM.

6.1.3 Prospecção fitoquímica de EMR (extrato metanólico das folhas de Maytenus rigida) feita por DLLME



Figura 14. TIC de EMR obtido por DLLME/CG-EM, utilizando metanol como solvente dispersor.

A análise do TIC de EMR, obtido mediante a aplicação das técnicas DLL-ME/CG-EM de EMR (Figura 14, p.42), tendo como solvente dispersor o metanol, permitiu identificar dezoito componentes químicos (52,5 %, Tabela 10, p.43):

Pico	t _R	IC(cal)	IC(lit)	Nome	Área total (%)
1	6,297 ± 0,007	1262 ± 0,472	1259	4,6-dimetildodecano (1)	0,940 ± 0,570
2	9,012 ± 0,007	1506 ± 0,464	1512	2,4-di-terc-butil-fenol (2)	1,657 ± 0,612
3	16,385 ± 0,017	1921 ± 0,652	1921	hexadecanoato de metila (18)	8,617 ± 3,918
4	17,106 ± 0,008	1951 ± 0,140	1951	ácido hexadecanóico (3)	2,143 ± 1,114
5	17,974 ± 0,014	1986 ± 0,465	1990	hexadecanoato de etila (4)	0,830 ± 0,428
6	20,822 ± 0,093	2088 ± 3,067	2094	octadecan-9,12-dienoato de metila (19)	1,517 ± 0,396
7	21,147 ± 0,010	2109 ± 0,612	2111	fitol (5)	1,693 ± 0,721
8	21,388 ± 0,014	2124 ± 0,748	2126	octadecanoato de metila (20)	1,103 ± 0,474
9	31,263 ± 0,001	*	_	esqualeno (7)	6,090 ± 2,121
10	36,883 ± 0,012	*	_	α-tocoferol (17)	1,135 ± 0,544
11	42,048 ± 0,004	*	_	3β-sitosterol (8)	1,680 ± 0,693
12	43,151 ± 0,006	*	_	β-amirina (9)	0,355 ± 0,163
13	43,378 ± 0,005	*	_	3α-amirina (21)	$0,460 \pm 0,000$
14	43,937 ± 0,007	*	_	acetato de lupeol (22)	2,070 ± 0,396
15	44,755 ± 0,006	*	_	lupeol (10)	3,480 ± 1,301
16	49,111 ± 0,028	*	_	3β-friedelinol (11)	15,360 ± 3,140
17	49,992 ± 0,004	*	_	3α -friedelinol (12)	0,410 ± 0,226
18	50,212 ± 0,012	*	_	friedelina (13)	2,560 ± 1,160
				Total	52,45 ± 0,962

Tabela 10. Constituintes de EMR identificados por DLLME/CG-EM, tendo MeOH como solvente dispersor

Nota: t_R: tempo de retenção; Área total: área total normalizada; IC(cal) e IC(lit): Índices cromatográfico calculados e da literatura [27], respectivamente.

4,6-dimetildodecano (1), 2,4-di-terc-butil-fenol (2), ácido hexadecanóico (3), hexadecanoato de etila (4), fitol (5), esqualeno (7), 3β-sitosterol (8), β-amirina (9), lupeol (10), 3β-friedelinol (11), 3α-friedelinol (12), friedelina (13), α-Tocoferol (17), hexadecanoato de metila (18), octadecan-9,12-dienoato de metila (19), octadecanoato de metila (20), 3α-amirina (21) e acetato de lupeol (22), sendo os compostos 1, 2, 3 e 4, inéditos para espécie *Maytenus rigida*, enquanto que os demais (5, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 17, 18, 19, 20, 21 e 22), já foram identificados e isolados na espécie *Maytenus rigida* [9].



Figura 15. TIC de EMR obtido por DLLME/CG-EM, utilizando acetona como solvente dispersor.

Os extrativos obtidos com EMR-acetona por DLLME/CG-EM (Figura 15 e Tabela 11) apresentaram um valor de área média total dos picos 17,2 % inferior àquelas obtidas com metanol (Tabela 10, p.43).

 Tabela 11. Constituintes de EMR identificados por DLLME/CG-EM, tendo acetona como solvente dispersor.

Pico	t _R	IC(cal)	IC(lit)	Nome	Área total (%)
1	6,299 ± 0,005	1262 ± 0,335	1259	4,6-dimetildodecano (1)	0,627 ± 0,150
2	9,013 ± 0,004	1506 ± 0,279	1512	2,4-di-terc-butil-fenol (2)	1,587 ± 0,549
3	16,387 ± 0,011	1921 ± 0,425	1921	hexadecanoato de metila (18)	5,837 ± 4,621
4	17,110 ± 0,013	1951 ± 0,520	1951	ácido hexadecanóico (3)	2,470 ± 0,988
5	17,984 ± 0,013	1986 ± 0,542	1990	hexadecanoato de etila (4)	0,463 ± 0,396
6	20,777 ± 0,015	2087 ± 0,483	2094	octadecan-9, 12-dienoato de metila (19)	0,607 ± 0,577
7	21,151 ± 0,009	2110 ± 0,531	2111	fitol (5)	0,917 ± 0,904
8	21,389 ± 0,007	2124 ± 0,425	2126	octadecanoato de metila (20)	0,597 ± 0,503
9	31,272 ± 0,008	*	_	esqualeno (7)	5,695 ± 2,991
10	36,906 ± 0,019	*	_	a-tocoferol (17)	1,200 ± 0,877
11	42,071 ± 0,028	*	_	3β-sitosterol (8)	0,985 ± 0,969
12	43,174 ± 0,025	*	_	β-amirina (9)	0,230 ± 0,184
13	43,423 ± 0,011	*	_	3α-amirina (21)	0,180 ± 0,000
14	43,960 ± 0,007	*	_	acetato de lupeol (22)	0,970 ± 0,970
15	44,752 ± 0,016	*	_	lupeol (10)	2,115 ± 2,128
16	49,121 ± 0,013	*	_	3β -friedelinol (11)	8,955 ± 3,118
17	50,014 ± 0,039	*	_	3α -friedelinol (12)	0,339 ± 0,210
18	50,248 ± 0,034	*	_	friedelina (13)	1,180 ± 0,240
				Total	35,252 ± 1,088

Nota: t_R: tempo de retenção; Área total: área total normalizada; IC(cal) e IC(lit): Índices cromatográficos calculados e da literatura [27], respectivamente.

As identificações dos constituintes mostrados nas Tabelas 10 e 11 foram confirmadas em amostras de EMR submetidas a técnica DLLME/BSTFA/CG-EM.

6.1.4 Prospecção fitoquímica de EMRR (extrato etanólico das raízes M. rigida) feita por DLLME



Figura 16. TIC de EMRR obtido por DLLME/CG-EM, utilizando Metanol como solvente dispersor.

A análise dos TIC's de EMRR-MeOH e EMRR-Acet, obtidos por DLLME/CG-EM, tendo como solvente dispersor o metanol e acetona, respectivamente. (Figura 16 e 17), permitiram identificar sete componentes químicos (Tabelas 12 e 13, p.46): 4, 6 dimetildodecano (1), 2,4-di-terc-butil-fenol (2), ácido hexadecanóico (3), hexadecanoato de etila (4), ácido octadecanóico (6), esqualeno (7), friedelina (13), sendo os compostos 1, 2, 3, 4 e 6 inéditos para espécie *M. rigida*, enquanto que os demais (7 e 13), já foram identificados e isolados na espécie *M. rigida* [9]. De modo geral, os extrativos identificados EMRR/DLLME/MeOH rendimentos para е EMRR/DLLME/acetona foram baixos (6,0% e 3,9%, respectivamente) e o quantitativo de material extraído que foi identificado com EMRR/DLLME/acetona (Tabela 13, p.46) foi menor 2,1% do que com EMRR/DLLME/MeOH (Tabela 12, p.46).

Pico	t _R	IC(cal)	IC(lit)	Nome	Área total (%)
1	6,294 ± 0,005	1262 ± 0,393	1259	4,6-dimetildodecano (1)	1,017 ± 0,339
2	9,008 ± 0,006	1506 ± 0,408	1512	2,4-di-terc-butil-fenol (2)	$2,600 \pm 0,330$
3	17,086 ± 0,010	1950 ± 0,398	1951	ácido hexadecanóico (3)	0,947 ± 0,122
4	17,975 ± 0,016	1985 ± 0,663	1990	hexadecanoato de etila (4)	0,280 ± 0,095
5	21,879 ± 0,008	2153 ± 0,445	2157	ácido octadecanóico (6)	0,367 ± 0,137
6	31,267 ± 0,025	*	_	esqualeno (7)	0,391 ± 0,118
7	50,218 ± 0,025	*	_	friedelina (13)	0,403 ± 0,112
				Total	6.004 ± 0.179

 Tabela 12. Constituintes de EMRR identificados por DLLME/CG-EM, tendo MeOH como solvente dispersor.

Nota: t_R: tempo de retenção; Área total: área total normalizada; IC(cal) e IC(lit): Índices cromatográficos calculados e da literatura [27], respectivamente.



Figura 17. TIC de EMRR obtido por DLLME/CG-EM, utilizando acetona como solvente dispersor.

As identificações desses constituintes químicos de EMRR foram confirmadas pela reação de derivatização utilizando o reagente BSTFA e analisado por CG-EM.

 Tabela 13. Constituintes de EMRR identificados por DLLME/CG-EM, tendo acetona como solvente dispersor.

Pico	t _R	IC(cal)	IC(lit)	Nome	Área total (%)
1	$6,295 \pm 0,008$	1262 ± 0,563	1259	4,6-dimetildodecano (1)	0,410 ± 0,135
2	$9,009 \pm 0,008$	1506 ± 0,562	1512	2,4-di-terc-butil-fenol (2)	1,023 ± 0,476
3	17,091 ± 0,025	1950 ± 0,995	1951	ácido hexadecanóico (3)	$0,800 \pm 0,090$
4	17,970 ± 0,017	1985 ± 0,658	1990	hexadecanoato de etila (4)	0,163 ± 0,051
5	21,884 ± 0,015	2153 ± 0,859	2157	ácido octadecanóico (6)	0,443 ± 0,186
6	31,267 ± 0,021	*	_	esqualeno (7)	0,593± 0,137
7	50,212 ± 0,062	*	_	friedelina (13)	0,478 ± 0,031
				Total	3,911 ± 0,158

Nota: t_R: tempo de retenção; Área total: área total normalizada; IC(cal) e IC(lit): Índices cromatográficos calculados e da literatura [27], respectivamente.

6.2 Estudo fitoquímico do extrato metanólico Maytenus rigida

Nesse trabalho utilizou-se um banco de dados de espectros de RMN de ¹³C de TTPC³s (MATCH-5) [7]. As elucidações estruturais foram feitas mediante comparação com os dados da literatura e um banco de dados de deslocamento químico de ¹³C.

6.2.1 Mistura de friedelina (13) e 3β-friedelinol (11)



A comparação por CCD (Figura 18, p.47) com amostras autênticas permitiram identificar F1 (cristais de coloração branca) como sendo uma mistura de friedelina e 3β -friedelinol, dois TTPC pertencentes à classe dos friedelanos, comuns em Celas-traceae [9].



Figura 18. Fotografia da cromatoplaca CCD em sílicagel 60G, eluente: CHCl₃:Hexano (9:1), revelador: solução hidroalcoólica ácida (H₃PO₄ 1,5 %) de vanilina (1,5%) seguida de aquecimento em estufa a 100°C. 1: padrão da mistura friedelina e 3β -friedelinol, 2: composto 7, 3: mistura de 11 e 13, 4: fração em acetona.

O espectro na região do IV (Figura19, p.49) da mistura **11** e **13** apresentou banda centrada em 3471 cm-1 característica de estiramento de ligação OH (hidroxila de álcool), e em 2921,1 cm⁻¹, característica de estiramento assimétrico da ligação

CH de grupos CH₂ alifáticos; em 2869,6 cm⁻¹, característica de estiramento simétrico da ligação CH de grupos CH₂ e CH₃ alifáticos; apresentou também bandas em 1450,0 e 1384,7 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.

O espectro de RMN de ¹H (Figura 21, p.51) apresenta um multipleto entre δ 3,75 a δ 3,72 (**11**) característico de hidrogênio carbinólico. Na região entre δ 0,73 e δ 1,22 são encontrados vários sinais correspondentes a metilas e sinais entre δ 1,22 e 2,40, correspondentes aos hidrogênios metilênicos e metínicos. Apresentou ainda um quarteto centrado em δ 2,25 referente ao H-4 (**13**). Não são observados sinais referentes a átomos de hidrogênio vinílico. A partir desses dados, pode-se inferir que se tratava de uma estrutura triterpênica do tipo friedelânica.

No espectro de RMN de ¹³C (figura 22 e 23, p.52), os sinais em δ 212,99 e δ 72,17, foram atribuídos aos carbonos oxigenados (C-3) da friedelina e do 3β -friedelinol, respectivamente. Através dos dados já descritos na literatura [7, 20] (Tabela 14, p.50) por comparação permitiu propor 3β -friedelinol (11) e friedelina (13) como os constituintes dessa mistura.



Número de onda (cm⁻¹)

Figura 19. Espectro de absorção de 11 e 13 na região do IV.



Tabela 14. Comparação entre os valores de δ de ¹³C de **11** e **13** (CDCl₃, 125 MHz) e os respectivos valores publicados para a mistura *3β*-friedelinol e friedelina (CDCl₃, 100 MHz) [7].

Figura 20. (a) gráfico de dispersão entres os valores de δ de¹³C de **11** e *3* β -friedelinol [7]. (b) de **13** e friedelina [7].

13

200,00



Figura 21. Espectro de RMN de ¹H de 11 e 13 (CDCl₃, 500 MHz).





Uma alíquota da mistura **11** e **13** foi analisada por CG-EM e os espectros de massas obtidos a partir do cromatograma de íons totais (TIC).



Figura 24. Cromatograma de íons totais (TIC). Nota: obtido por CG-EM de **11** e **13**. Condições: Coluna SPB-tm5, capilar, 30 m x 0,25 mm de diâmetro interno, filme de 0,25 µm dimetilpolisiloxano (95%), e fenila (5%) SHIMADZU. Temperaturas: coluna: Inicial a 190 °C, final até 290 °C por 5 min, a uma taxa de 5 °C/min. Detector e injetor operaram a 280 °C.



Figura 25. EM associado ao pico em t_R = 32,70 min do TIC do 3β -Friedelinol (11).

Dados: MM: 428g/mol Formula: C₃₀H₅₂O



Figura 26. EM associado ao pico em t_R = 33,30 min do TIC de Friedelina (13).

Dados: MM: 426g/mol Formula: C₃₀H₅₀O



O Sobrenadante da fração hexânica (F1/C-1) que consistiu em um óleo amarelado e viscoso, solúvel em clorofórmio, que, após análise por CG-EM foi identificado como sendo o triterpeno acíclico esqualeno (**7**).

Esse triterpeno acíclico é um antioxidante natural encontrado em faixas amplas de óleos vegetais, como por exemplo: na semente de linhaça, semente de uva, óleo de soja e azeite de oliva [29].

O cromatograma de íons totais (TIC, Figura 27, p.54), adquirido por CG-EM de 7, apresentou o pico em $t_R = 35,82$ min. O EM desse pico (Figura 28, p.55) apresentou a seguinte fragmentação m/z 69,07 (100%), m/z 81,07 (63,70%), 121,10 (12,26%), 137,13 (9,90%), 273,26 (0,33%); 341,32 (0,71%) e 410,35 (traços). A consulta ao banco de dados da biblioteca da NIST11, residente no cromatógrafo, identificou o espectro de massas de 7 como sendo equivalente ao do esqualeno com similaridade de 96%. Os valores destes íons coincidiram com a literatura referente ao esqualeno [6]. Na Figura 29, p.55 consta a proposta de fragmentação do esqualeno para os principais íons da espectrometria de massas por impacto eletrônico (EM-IE) obtida de 7.



Figura 27. Cromatograma de íons totais (TIC) obtido por CG-EM de **7**. Nota: Condições: Coluna SPBtm5, capilar, 30 m x 0,25 mm de diâmetro interno, filme de 0,25 µm dimetilpolisiloxano (95%), e fenila (5%) SHIMADZU. Temperaturas: coluna: Inicial a 100 °C, final até 285 °C por 1 min, a uma taxa de 5 °C/min. Detector e injetor operaram a 290 °C.



Figura 28. EM associado ao pico em t_R = 35,82 min do TIC de 7.



Figura 29. Proposta de fragmentação do esqualeno com base no EM de 7 (Figura 28).



O composto **11** foi obtido do Fracionamento em coluna (C-3) da amostra G4/C-2, correspondente as frações F10 a F15 que foram coletadas como um sólido branco cristalino. A comparação do sólido **11** com uma amostra autêntica através de CCD confirmou a identidade desse sólido como sendo 3β -friedelinol (**11**).

O espectro de RMN de ¹H (Figura 31, p.58) mostrou um multipleto entre δ 3,76 a δ 3,71, que foi atribuído ao hidrogênio carbinólico (H-3). Na região de valores de deslocamentos químicos dos hidrogênios alifáticos foram observados sete simpletos atribuídos aos hidrogênios de grupos metila em δ 0,87 (H-25), 0,96 (H-29), 0,98 (H-24), 1,00 (H-26), 1,01 (H-30), 1,03 (H-27) e 1,21 (H-28) e um dupleto, observado por comparação com a literatura em δ 0,93 (H-23) [7, 20].

No espectro de RMN de ¹³C (Figura 32, p.59) foram observados seis sinais de carbonos quaternários, cinco metínicos, onze metilênicos e oito metílicos, característicos de triterpeno pentacíclico da série friedelano. O espectro apresentou também sinal em δ 72,77; referente a carbono ligado a hidroxila (C-3) Através dos dados já descritos na literatura [7, 20] (Tabela 15, p.57) por comparação permitiu identificar esse composto 3β -friedelinol (**11**). A comparação entre os valores de δ de ¹³C de **11** com os da literatura mostrou uma excelente correlação linear (R² = 1,00; Figura 30, p.57).

		δ ¹³ C	29 30
Carbono	11	3β -friedelino	27 19 20 21
1	15,79	15,81	
2	36,08	36,10	1 + 1 + 1 + 1 + 1 + 1 + 1 + 1 + 1 + 1 +
3	72,76	72,77	$\begin{bmatrix} 10 & 8 & 15 \\ 5 & 5 \end{bmatrix}$ H $_{26}$ H $_{26}$
4	49,17	49,20	HO $3 \frac{4}{24} \frac{6}{6} 7$
5	37,83	37,85	23
6	41,73	41,75	
7	17,55	17,56	
8	53,20	53,22	
9	37,10	37,12	
10	61,35	61,38	
11	35,34	35,36	80,00
12	30,64	30,65	F ^{70,00}
13	39,67	39,70	₽ 60,00 - y = 1,0002x + 0,0108
14	38,37	38,39	.≡ 9 50,00 − R ² = 1
15	32,34	32,35	[⊕] ₇ 40,00 −
16	35,56	35,58	o 30,00 -
17	30,02	30,04	မှ 20,00 -
18	42,82	42,85	10,00 -
19	35,19	35,21	0,00
20	28,18	28,19	0,00 10,00 20,00 30,00 40,00 50,00 60,00 70,00 80,00
21	32,82	32,84	ð ¹3C de 11
22	39,28	39,30	
23	11,61	11,62	
24	16,39	16,40	
25	18,24	18,26	
26	20,11	20,13	
27	18,64	18,65	
28	32,09	32,10	
29	35,02	35,03	
30	31,79	31,80	

Tabela 15. Comparação entre os valores de δ de ¹³C de **11** (CDCl₃, 125 MHz) e os respectivos valores publicados para o 3β -friedelinol (CDCl₃, 100 MHz) [7].

Figura 30. Gráfico de dispersão entre os valores de δ de ¹³C de **11** e os respectivos valores publicados para o *3* β -friedelinol [7, 20].



Figura 31. Espectro de RMN de ¹H de 11 (CDCl₃, 500 MHz).



6.2.4 Mistura β-amirina, 3β-hidroxi-olean-12-eno (**9**) e 3β-Lup-20(29)-en-3-ol (lupeol (**10**))



A mistura de **10** e **9** consistiu em um sólido de coloração branca, que foi obtido do fracionamento em coluna (C-3) da amostra G4/C-2, correspondente as frações F17 a F25.

O espectro de RMN de ¹H (Figura 34, p.62) registrou dois sinais multipletos sobrepostos em δ 3,20, atribuídos aos hidrogênios carbinólicos H-3 de **9** e **10**. Foi também observado um dupleto triplo em δ 2,39 atribuído ao hidrogênio metínico H-19 de **10**. Apresentou também um sinal em δ 4,57 que foi atribuído ao hidrogênio H-29a de **10**, em posição cis em relação aos hidrogênios do grupo metila H-30 e um multpleto em δ 4,70 (multipleto) atribuído a H-29b de **10**. Também foi possível verifi-

car um sinal de hidrogênio olefínico em δ 5,14 (tripleto largo) que foi atribuído ao hidrogênio H-12 de **9**.

Os espectros de RMN de ¹³C (Figura 35, p.62) apresentaram dois sinais de carbonos não hidrogenados de ligação dupla em δ 159,96 C-20 de **10**, em δ 109,50 C-29 de **10** e dois sinal de carbono carbinólico em δ 79,07 e 79,01 (C-3) de **9** e **10** respectivamente. Verificou-se também os sinais de carbonos de grupos CH olefínicos em δ 121,72 (CH) e δ 145,19 (C), totalizando sessenta sinais de carbono, sugerindo se tratar de uma mistura de dois TTPC's das séries oleanano e lupano. Os dados discutidos acima e a comparação entre os valores de δ de ¹³C de **9** e **10** com os valores da literatura (Tabela 16, p.61), mostrou uma excelente correlação linear (R²= 1,00; Figura 33, p.61) e confirmou a identificação como sendo a mistura de lupeol e β -amirina.

		δ ¹³ C			_
Carbono	9	β-amirina [7]	10	lupeol [7]	<u>1</u>
1	38,60	38,59	38,72	38,73	
2	26,95	26,93	27,42	27,43	
3	79,07	79,05	79,01	79,01	
4	38,77	38,78	38,86	38,87	
5	55,20	55,17	55,31	55,32	
6	18,38	18,38	18,32	18,33	
7	32,67	32,65	34,30	34,30	
8	39,67	39,79	40,85	40,85	
9	47,64	47,63	50,45	50,46	
10	36,96	36,94	37,18	37,19	
11	23,54	23,53	20,94	20,95	30 ²⁹ Ha
12	121,73	121,73	25,16	25,17	19 20 21 Hb
13	145,19	145,20	38,07	38,07	25 11 12 18 22 25^{11} 22 25^{11} 22
14	41,73	41,71	42,84	42,85	1 1 1 1 1 1 1 1 1 1
15	27,25	27,22	27,46	27,46	HO 3 4 5 6 7 7 HO 3 4 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1
16	26,17	26,16	35,59	35,60	²³ ²⁴ 9 ²³ ²⁴
17	32,50	32,49	43,01	43,01	Ū
18	47,24	47,23	48,32	48,33	
19	46,84	46,79	47,73	47,78	
20	31,08	31,08	150,96	150,96	
21	34,75	34,73	29,86	29,87	
22	37,15	37,14	40,01	40,02	
23	28,10	28,10	27,99	28,00	
24	16.62	16.60	15.36	15.37	
25	15.50	15.50	16.12	16.12	
26	16.82	16.81	15.99	15,99	
_=© 27	25,99	26.00	14,55	14.56	
28	28.40	28.39	18.00	18.01	
29	33.34	33.35	109.32	109.32	
30	23,69	23,69	19,31	19,32	
				•	_
160,00					160,00
140,00 -				•	140,00 -
E _{120.00}	v = 1.0001x - 0	01			∑ 120,00 - y = 1,0001x - 0,01
u 100.00	R ² = 1	/	/		$\frac{1}{9}$ 100,00 - R ² = 1
					80,00 ×
ප් ^{60,00}		/			€ 60.00 -
0		H. C.			40.00 -
÷ 40,00 - νο					20.00
20,00 -					20,00

 δ ^{13}C de $\bm{9}$

Tabela 16. Comparação entre os valores de δ de ¹³C de **9** e **10** (CDCl₃, 125 MHz) com os respectivos valores publicados para os compostos lupeol e β -amirina (CDCl₃, 100 MHz) [7].



61



Figura 34. Espectro de RMN de ¹H de 9 e 10 (CDCl₃, 500 MHz).



Figura 35. Espectro de RMN de ¹³C de 9 e 10 (CDCl₃, 125 MHz).

6.2.5 Ácido 3,4-seco-friedelan-3-óico (23)



O Constituinte **23** foi isolado na forma um sólido de coloração branca, que foi obtido do fracionamento de C-3 da amostra G4/C-2, correspondente as frações F36 a F34. A análise do espectro de RMN de ¹H (Figura 37, p.65) foi, então, conduzida com base nas seguintes observações: registro de um multipleto em δ 2,40 atribuído ao hidrogênio alfa-carbonílico e um simpleto centrado em δ 12,02 atribuído ao hidrogênio do grupo OH de ácido carboxílico.

Através do espectro de RMN de ¹³C (Figura 39, p.65) associado ao DEPT-135 (Figura 38, p.65), foi possível detectar sinais correspondentes a trinta carbonos, sendo sete não hidrogenados, três metínicos, doze metilênicos e oito metílicos, o que é compatível com a estrutura de um triterpeno pentacíclico do tipo *3,4*-seco-friedelano. O sinal em δ 179,20 atribuído ao carbono do função ácido carboxílico, e um sinal altamente protegido em δ 7,58 referente a C-23. Os Valores de deslocamento químico de carbono de **23** foram listados comparativamente com os valores relatados para o ácido *3,4*-seco-friedelan-*3*-óico na literatura [30] (Tabela 17, p.64). Além disso, análise de dispersão apresentou uma excelente correlação (R²= 1,00; Figura 36, p.64) confirmando a identificação de **23** como sendo o ácido *3,4*-seco-friedelan-*3*óico.



δ¹³C Literatura [30] Carbono 23 1 21,05 21,03 2 38,28 38,30 3 179,17 179,41 4 37,81 37,80 5 39,61 39,56 6 39,04 39,10 7 18,09 18,08 8 52,97 52,55 9 37,40 37,46 10 59,79 59,37 200,00 δ 13C do ácido3,4 seco-friedelan-3-11 35,29 35,28 180,00 12 30,00 29,97 y = 1,0009x - 0,071 160,00 R² = 1 38,90 13 38,92 140,00 14 39,28 39,26 120,00 óico [30] 100,00 15 32,27 32,24 80,00 16 36,04 36,03 60,00 17 30,20 30,18 40,00 18 42,82 42,79 20,00 19 35,14 35,16 0,00 20 28,15 28,14 0,00 50,00 100,00 150,00 200,00 21 32,83 32,81 δ ^{13}C de $\boldsymbol{23}$ 22 39,04 39,01 23 7,58 7,40 24 19,36 19,33 25 17,93 17,92 26 20,13 20,13 27 18,74 18,74 28 32,11 32,09 29 34,96 34,96 30 31,84 31,82

Tabela 17. Comparação entre os valores de δ de ¹³C de **23** (CDCl₃, 125 MHz) e os respectivos valores publicados para o ácido *3,4*-seco-friedelan-*3*-óico (CDCl₃, 100 MHz) [30].

Figura 36. Gráfico de dispersão entre os valores de δ de ¹³C de **23** e os respectivos valores publicados para o ácido *3,4*-seco-friedelan-*3*-óico [30].



Figura 37. Espectro de RMN de ¹H de 23 (CDCl₃, 500 MHz).



Expansão A



6.2.6 Mistura de 3β-sitosterol (8) e ácido 3,4-seco-friedelan-3-óico (23)



A mistura de **8** e **23** apresentou-se na forma um sólido de coloração branca, que foi obtido do fracionamento em C-3 da amostra G4/C-2, correspondente as frações F35 a F40 da coluna C-3 que foram agrupadas (G4).

O espectro de RMN de ¹H (Figura 41, p.68) apresentou um multipleto em δ 2,40 atribuído ao hidrogênio alfa-carbonílico H-2 (**23**), um sinal em δ 3,54 que foi atribuído a hidrogênio carbinólico H-3 e um sinal em δ 5,36 referente à hidrogênio olefiníco H-6 (**8**). Verificou-se também um simpleto centrado em δ 12,00 atribuído ao hidrogênio de ácido carboxílico. Todos esses dados evidenciados, mais a comparação feita com os relatos na literatura sugeriram trata-se de uma mistura de **8** e **23**.

No espectro de RMN de ¹³C (Figura 42, p.68) o sinal em δ 121,73 e em δ 140,73 confirmaram a presença de dupla ligação e o sinal em δ 71,85 foi atribuído ao carbono ligado hidroxila C-3 de **8**. Foi possível detectar um sinal em δ 179,17, referente ao carbono da função ácido carboxílico C-3 de **23**. Através da comparação dos valores de δ de ¹³C de **8** e **23**, com os valores encontrados para o *3* β -sitosterol e o ácido *3*,*4*-seco-friedelan-*3*-óico e na literatura [7, 30] (Tabela 18, Figura 40, p.67) foi possível atribuir como sendo uma mistura de *3* β -sitosterol e o ácido *3*,*4*-seco-friedelan-*3*-óico.
-	δ ¹³ C				
Carbono	8	Literatura [7]	23	Literatura [30]	
1	37,26	37,28	21,05	21,03	
2	31,64	31,70	38,30	38,28	
3	71,85	71,83	179,17	179,41	
4	42,32	42,34	37,81	37,80	
5	140,73	140,78	39,61	39,56	
6	121,73	121,73	39,04	39,10	
7	31,92	31,93	18,09	18,08	
8	31,92	31,93	52,97	52,55	
9	50,14	50,17	37,40	37,46	
10	36,51	36,53	59,79	59,37	
11	21,09	21,11	35,29	35,28	
12	39,78	39,80	30,00	29,97	
13	42,27	42,33	38,92	38,90	
14	56,78	56,80	39,28	39,26	
15	24,31	24,32	32,27	32,24	
16	28,25	28,26	36,04	36,03	
17	56,07	56,09	30,20	30,18	
18	11,86	11,87	42,82	42,79	
19	19,39	19,41	35,16	35,14	
20	36,15	36,16	28,15	28,14	
21	18,78	18,80	32,83	32,81	
22	33,96	33,98	39,04	39,01	
23	26,10	26,13	7,58	7,40	
24	45,86	45,88	19,36	19,33	
25	29,17	29,20	17,93	17,92	
26	19,81	19,82	20,13	20,13	
27	19,04	19,05	18,74	18,74	
28	23,08	23,10	32,11	32,09	
29	11,99	12,00	34,96	34,96	
30			31.8/	31.82	

Tabela 18. Comparação entre os valores de δ de ¹³C de **8** e **23** (CDCl₃, 125 MHz) com os respectivos valores publicados para os compostos *3* β -sitosterol e o ácido *3*,*4*-seco-friedelan-*3*-óico (CDCl*3*, 100 MHz) [7, 30].





Figura 40. Comparação gráfica da dispersão entre os valores de δ de ${}^{13}C$ de **8** (a) e **23**(b) e os respectivos valores da literatura para a mistura de *3* β -sitosterol e o ácido *3*,*4*-seco-friedelan-*3*-óico [7, 30].



Figura 41. Espectro de RMN de ¹H d 8 e 23 (CDCl₃, 500 MHz).



Figura 42. Espectro de RMN de ¹³C de 8 e 23 (CDCI₃, 125 MHz)

6.2.7 3β-sitosterol (8)



O Constituinte **8** consistiu um sólido de coloração branca, que foi obtido do fracionamento de C-3 da amostra G4/C-2, correspondente as frações F41 a F50 da coluna C-3 que foram agrupadas (G5).

O espectro de RMN de ¹H (Figura 44, p.71) apresenta um acúmulo de sinais relativos a átomos de hidrogênio metínicos, metilênicos e metílicos, na região de δ 0,68 a 2,32, o que evidenciou haver estrutura alifática na substância **8**. O multipleto em δ 5,36 foi atribuído a um hidrogênio olefínico H-6 e o sinal em δ 3,53 (tripleto triplo), referente a um hidrogênio oximetínico H-3 de **8**.

No espectro de RMN de ¹³C (Figura 45, p.71), os sinais em δ 122,1 e δ 141,6 são característicos de átomos de carbono olefínicos (C-6 e C-5, respectivamente) de **8**. Apresentou um sinal em δ 71,83 foi atribuído ao carbono carbinólico C-3. Os valores de deslocamento químico encontrados para carbono e hidrogênio de **8** estão de acordo com ao relatados na literatura para o composto β -sitosterol [7] e encontramse listados na Tabela 19, p.70, mostrou uma excelente correlação linear (R² =1,00; Figura 43, p.70), confirmando a identificação de **8** como sendo o β -sitosterol.

_		δ ¹³ C	
Carbono	8	Literatura [7]	
1	37,26	37,28	
2	31,64	31,70	
3	71,85	71,83	
4	42,32	42,34	
5	140,73	140,78	
6	121,73	121,73	
7	31,92	31,93	
8	31,92	31,93	
9	50,14	50,17	
10	36,51	36,53	
11	21,09	21,11	
12	39,78	39,80	
13	42,27	42,33	
14	56,78	56,80	
15	24,31	24,32	11
16	28,25	28,26	18 1
17	56,07	56,09	2 10
18	11,86	11,87	3 5
19	19,39	19,41	HO 4
20	36,15	36,16	
21	18,78	18,80	
22	33,96	33,98	
23	26,10	26,13	
24	45,86	45,88	
25	29,17	29,20	
26	19,81	19,82	
27	19,04	19,05	
28	23,08	23,10	
29	11,99	12,00	
		160,00 -	
		140,00	
		<u> </u> 120,00 -	y = 0,9999x - 0,0176
		- 100,00 s	K- = 1
		بية 20,00 – 20	
		ন্ট ভূ 60,00 –	*
		မ္မ်ာ 40,00 -	A R R R R R R R R R R R R R R R R R R R
		ю 20,00 -	
		0,00 -	
		0,0	JU 50,00 100,00

Tabela 19. Comparação entre os valores de δ de ¹³C de **8** (CDCl₃, 125 MHz) com os respectivos valores publicados para $\beta\beta$ -sitosterol (CDCl₃, 100MHz) [7]

Figura 43. Gráfico de dispersão entre os valores de δ de ¹³C de **8** e os respectivos valores publicados para o β -sitosterol [7].

 $\delta^{\, 13}C$ de ${\bm 8}$

26

29

23

16

15

8

12

Н

14

150,00

8 [±] H 28



Figura 44. Espectro de RMN de ¹H de 8 (CDCI₃, 500 MHz)



6.3 Ensaios biológicos

6.3.1 Avaliação antioxidante

Na análise qualitativa da atividade antioxidante realizada em CCD, foi possível observar a mudança de coloração do DPPH após contato com as amostras, passando de violeta para amarelo. Todos os extratos apresentaram coloração amarelada nos pontos de aplicação comparada à dos padrões. A mudança de cor nas placas indica o potencial antioxidante da amostra frente ao radical DPPH, mudando a coloração de violeta para amarelo nos pontos em que o DPPH é reduzido pelas substâncias responsáveis por essa atividade. Esse teste pode ser considerado como uma avaliação preliminar na busca de substâncias antioxidantes.

Os resultados da avaliação quantitativa do potencial antioxidante das amostras encontram-se descritos na Tabela 20, p.72. Os dados estão demonstrados na forma de percentual de inibição do radical DPPH frente às amostras e padrões avaliados nas três concentrações diferentes.

Tabela 20. Percentual médio de inibição do radical DPPH frente aos padrões quercetina e ácido gálico e aos extratos de *M. acanthophylla*, *M. truncata* e *M. rigida*.

Conc.	% de inibição						
(µg/mL)	Quercetina	Ác. Gálico	EMA	EMT	EMR	ΑΜΑ	AMT
100	94,3 ± 0,6	94,2 ±1,5	96,8 ± 0,3	86,8 ± 1,5	97,2 ±0,02	77,4 ± 1,6	78,3 ± 1,3
10	92,9 ± 1,1	91,5 ±1,1	53,1 ± 1,1	78,2 ± 0,02	76,1 ± 1,0	37,1 ±,04	41,5 ± 0,4
1	44,8 ±1,1	47,3 ±1,6	45,4 ± 1,4	43,8 ± 1,1	49,1 ± 2,0	31,1 ± 1,8	37,0 ± 0,8

Legenda: EMA: Extrato Etanólico *Maytenus acanthophylla*; EMT: Extrato Etanólico *Maytenus truncata*; EMR: Extrato metanólico *Maytenus rigida*; AMA: Extrato Aquoso *Maytenus acanthophylla*; AMT: Extrato Aquoso *Maytenus truncata*.

Os extratos aquosos AMA e AMT apresentaram percentual de inibição do radical DPPH menor que o percentual dos padrões e extratos etanólicos testados nas três concentrações. Em todas as concentrações testadas, 100, 10 e 1 µg/mL, o extrato AMT apresentou maior efetividade na captura dos radicais livres de DPPH, com 78,3 ± 1,3%, 41,4 ± 0,4% e 37,0 ± 0,8%, respectivamente, quando comprado ao extrato AMA que teve percentuais de 77,4 ± 1,6%, 37,1 ± 0,4 e 31,1 ± 1,8%, respectivamente.

É possível observar com os resultados obtidos que os extratos etanólicos e metanólico apresentaram um percentual de inibição do radical DPPH maior que os extratos aquosos nas três concentrações.

Na concentração de 100 μ g/mL, os extratos EMA e EMR inibiram 96,8 ± 0,3% e 97,2 ± 0,02%, respectivamente, do radical DPPH, apresentando percentuais de inibição maiores que os padrões: ácido gálico, com 94,1 ± 1,5% e quercetina, com 94,1 ± 0,6%. Quando comparados entre si, o extrato etanólico EMR apresentou maior percentual de inibição na concentração de 1 e 100 μ g/mL, com 49,1 ± 2,0% e 97,2

 \pm 0,02%, respectivamente. Já na concentração de 10 µg/mL o extrato EMT foi mais efetivo no sequestro dos radicais livres de DPPH, com percentual de 78,2 \pm 0,02%.

Na Figura 46, p.73 é possível observar os efeitos dos padrões e das amostras testadas em três concentrações diferentes frente à captura dos radicais DPPH.



Figura 46. Percentual de inibição de radicais livres de DPPH

Os dados referentes à captura dos radicais DPPH, aos pares, foram submetidos à análise estatística realizada pelo teste-t (Student), o resultado obtido mostrou que os extratos AMA e AMT não apresentaram diferenças significativas nas variâncias e médias entre si, dentro do limite de confiança estabelecido (95%). Ou seja, os extratos aquosos liofilizados das espécies *M. acanthophylla e M. truncata* têm grande probabilidade de apresentarem atividades antioxidantes semelhantes frente a radicais livres.

Os resultados encontrados para os percentuais de inibição de radicais livres DPPH dos extratos de *M. acanthophylla, M. truncata e M. rigida* indicaram que esses extratos possuem grande potenciais antioxidantes, principalmente os extratos metanólico e etanólicos. Essa capacidade de sequestro de radicais livres (DPPH) pode estar relacionada a presença de vários componentes com atividades antioxidantes comprovadas, como os compostos fenólicos, a exemplo de flavonoides [9].e 2,4-di*terc*-butil-fenol (2) [28], e de compostos com ligações duplas conjugadas como o esqualeno (7) [29].

As espécies do gênero *Maytenus* são conhecidas pela presença de diversos compostos fenólicos e flavonoides que apresentam atividade antioxidante [7, 9] reforçando os resultados encontrados neste trabalho. Além disso, à atividade antioxidante também está relacionado o poder anti-inflamatório ou de proteção do sistema gástrico em úlceras e gastrites relacionado a diversas espécies desse gênero, como *M.ilicifolia, M. aquifolium* e *M. acanthophylla, M. truncata e M. rigida*, muito utilizadas na medicina popular [31].

6.3.2 Avaliação do efeito gastroprotetor de AMA

O tratamento com o extrato aquoso liofilizado das folhas de *M. acanthophylla* (AMA) (100 – 100 mg/Kg) não diminuiu de forma significativa as lesões induzidas pela administração de solução de HCl/etanol na mucosa gástrica de camundongos (Figuras 47(a) e 47(b), p.75). Por outro lado, o tratamento prévio dos animais com carbenoxolona (250 mg/Kg) protegeu a mucosa gástrica dos efeitos lesivos da solução de HCl/etanol (Figuras 47(a) e 47(b), p.75).



Figura 47. (a) Imagens representativas das lesões induzidas na mucosa gástrica pela administração de HCl/etanol em animais. (b) índices de úlcera (I.U.) em mm² obtidos nos diferentes grupos experimentais. Nota: (a) Imagens representativas das lesões induzidas na mucosa gástrica pela administração de HCl/etanol em animais controles (CTR), tratados com carbenoxolona (CBX, 250 mg/Kg, v.o.) ou com extrato aquoso liofilizado das folhas de *M. acanthophylla* (100 – 1000 mg/Kg, v.o.). (b) índices de úlcera (I.U.) em mm² obtidos nos diferentes grupos experimentais. Os resultados representam a média ± EPM de 6-8 experimentos. *P<0,05 vs. controle (ANOVA seguida do teste de Dunnett).

6.3.3 Avaliação in vitro da atividade antiácida de AMA

A adição de alíquotas (0,1 mL) de AMA (44 mg/mL) aumentou o pH de uma solução 3,8 x 10⁻³ mol/L de HCl de forma concentração-dependente (Figura 48, p.76). Por outro lado, a adição de volumes idênticos de água destilada não alterou o pH inicial (2,42) da solução (Figura 48, p.76).



Aumento do pH de uma solução de HCI (10 mL) após a adição de alíquotas (0,1 mL) de solução de extrato aquoso liofilizado de *M. acanthopylla* (44 mg/mL). Note que a adição de igual volume de água destilada não alterou o pH da solução.

Analisados os resultados verifica-se que AMA pode ser utilizada como um antiácido, tal efeito evidencia um potencial biofarmacêutico para essa espécie.

6.4 Determinação de micro e macroelementos nas folhas do gênero *Maytenus* (celastraceae), tais como *M. rigida*, *M. truncata* e *M. acanthophylla* e nas raízes *M. rigida* por ICP OES.

Na quantificação dos micro e macroelementos (Ca, Co, Cu, Fe, K, Mg, Mn, Na e Zn) nas amostras MRF, MTF, MAF e MRR foi utilizada a técnica espectrometria de emissão óptica com plasma acoplado indutivamente (ICP OES), uma técnica muito bem estabelecida para a determinação de metais. Além disso, essa técnica tem como vantagens: determinação multi-elementar, rapidez, sensibilidade e ampla faixa linear de resposta.

Os resultados da quantificação dos micro e macroelementos em MRF, MRR, MAF, MTF detectados por ICP OES, estão mostrados na tabela 21, p.77 em valores médios e desvio padrão para três replicatas.

		Concentração(ug/g)		
Elemento	MRF	MRR	MAF	MTF
Ca	8394,6 ± 825,4	4069,8 ± 173,1	7970,3 ± 1557,1	4869,8 ± 710,5
Co	$13,6 \pm 0,7$	$15,0 \pm 0,1$	14,7 ± 1,8	$12,9 \pm 0,5$
Cu	$33,5 \pm 3,0$	$52,2 \pm 22,4$	$38,5 \pm 10,2$	51,3 ± 12,7
Fe	475,8 ± 48,52	5154,4 ± 213,2	491,4 ± 150,1	241,1 ± 62,7
K	2630,9 ± 221,1	1830,7 ± 69,7	3468,5 ± 622,5	1312,7 ± 230,6
Mg	1067,4 ± 113,8	483,0 ± 15,9	1267,1 ± 227,0	1707,6 ± 262,5
Mn	125,1 ± 8,0	$203,0 \pm 2,6$	144,0 ± 26,8	136,2 ± 10,7
Na	1058,6 ± 22,9	2308,9 ± 183,1	4024,5 ± 990,18	3054,0 ± 105,4
Zn	52,6 ± 2,2	$136,0 \pm 14,5$	66,0 ± 11,3	$63,5 \pm 22,8$

Tabela 21. Concentrações (µg/g) dos elementos estudados nas amostras de folhas de *M. rigida*, *M. truncata* e *M. acanthophylla* e na raiz *M. rigida* detectada por ICP OES.

São escassos relatos sobre o conteúdo mineral de partes de plantas na literatura. Os resultados apresentados na tabela 21 mostram que as concentrações dos macroelementos Ca, K, e Na, presentes nas amostras estão na mesma ordem de grandeza. MRF e MAF apresentam quantidades similares de Ca, K, Mg e Na, e MRR apresenta o menor conteúdo desses minerais, possivelmente isso se deve às diferenças químicas entre folhas e raízes. As concentrações dos microelementos Cu, Co e Mn entre as amostras também são comparáveis quanto a ordem de grandeza. Os resultados de micro e macroelementos são compatíveis com a literatura [32], entretanto Fe e Zn são mais abundantes em MRR (raízes).

7 CONCLUSÃO

Os resultados apresentados na presente dissertação contribuem significativamente para o estudo químico e farmacológico de *Maytenus acanthophylla, M. truncata* e *M. rigida* porque origina novos conhecimentos relativos a existência de novos constituintes químicos, bem como as relações entre as atividades biológicas e os potenciais antioxidantes encontrados.

Por outro lado, a pesquisa sistemática desenvolvida durante o mestrado permitiu, de forma abrangente, atingir a formação acadêmica e profissional do mestrando, porque envolveu conhecimentos teórico-práticos relacionados à execução/interpretação de dados e técnicas de análise química, espectrometria e ensaios farmacológicos, tais como, cromatográfica líquida a baixa e média pressão, DLLME, CG-EM, RMN de ¹H e ¹³C, ATR-FTIR, UV-Vis, ICP OES, testes de avaliação de potencial antioxidante *in vitro*, atividade antiácida *in vitro* e ação gastroprotetora *in vivo* utilizando compostos derivados de plantas.

Aplicando o método DLLME/CG-EM foi possível identificar 22 componentes que ocorrem concomitantemente ou isoladamente nos extratos de folhas das três espécies de *Maytenus*, sendo: 18 compostos no extrato metanólico de *M. rigida*; 14 no extrato etanólico de *M. truncata* e 13 no extrato etanólico de *M. acanthophylla*. Também foram identificados sete constituintes químicos no extrato etanólico da raiz de *M. rigida*. A identificação desses 22 compostos foi confirmada por DLLME/CG-EM seguida de derivatização por sililação utilizando BSTFA como fonte de trimetilsilício. Foi constatado pela pesquisa bibliográfica que nove destes compostos (1, 2, 3, 4, 15, 16, 17, 19 e 20) são inéditos nas espécies estudadas. Destes, destacamos o *2,4-di-terc*-butil-fenol (2), inédito no gênero *Maytenus*, como sendo um composto fenólico antioxidante empregado na indústria alimentícia e farmacêutica, também conhecido pelo nome comercial de Prodox-146.

O estudo fitoquímico feito a partir do fracionamento por cromatografia líquida do extrato metanólico de das folhas de *M. rigida* (EMR) e elucidação estrutural por técnicas espectrométricas foi possível isolar e identificar sete constituintes químicos: esqualeno (7), β -sitosterol (8), β -amirina (9), lupeol (10), β -friedelinol (11), friedelina (13) e ácido 3,4-seco-friedelan-3-óico (23). Ressaltamos que o TTPC 23 foi considerado inédito na espécie *M. rigida*.

O ensaio quantitativo de DPPH *in vitro* demonstrou que as espécies de *Maytenus* apresentaram um significativo potencial antioxidante e esta ação é atribuída a compostos identificados na prospecção fitoquímica e relatados na literatura, como excelentes sequestradores de radicais livres.

Em relação à atividade antiulcerogênica *in vivo* os resultados apresentaram efeito gastroprotetor insignificante, visto que o extrato é uma mistura complexa de compostos que podem mascarar esta ação. Entretanto, este ensaio é inédito para a espécie estudada e pode ser considerado como de relevante contribuição científica, proporcionando subsídios para melhores investigações sobre as espécies *Maytenus*.

A atividade antiácida *in vitro* do extrato em estudo revelou uma potencial ação neutralizante, podendo inferir que este resultado contribui para novos estudos desta natureza podendo gerar um fitoterápico e confirmar uso na medicina popular de *M. acanthophylla* no tratamento de úlceras e gastrites.

Portanto, todos os ensaios biológicos desenvolvidos reforçam uso farmacológico de *Maytenus* na medicina tradicional, bem como enfatizam a diversidade de constituintes químicos que são responsáveis por estas ações.

A determinação de micro e macroelementos nas folhas de *M. rigida, M. trun*cata e *M. acanthophylla* e nas raízes de *M. rigida* é inédito no gênero contribuindo com novos conhecimentos científicos.

8 PERSPECTIVAS

O presente estudo atendeu os objetivos traçados no início da dissertação e devido ao grande potencial das espécies *Maytenus acanthophylla*, *M. truncata e M. rigida* é necessário a continuidade de novos estudos químicos e farmacológicos que contribuirão no desenvolvimento de novos fármacos, marcadores e reagentes químicos.

A prospecção fitoquímica identificou apenas os constituintes dos extratos de EMA, EMR, EMT e EMRR, sendo importante isolar os compostos puros e elucidar as estruturas. Diante disso, melhores investigações sobre a atividade gastropotetora, antiácida e antioxidante poderão ser realizadas, bem como novos estudos farmacológicos poderão avaliar as várias atividades biológicas atribuídas ao gênero e que não há relatos de estudos com as espécies *Maytenus* estudadas.

Enfim, existe a necessidade de novos estudos físico-químicos e terapêuticos sobre os compostos isolados das espécies *Maytenus* encontradas na região de Jequié-Ba.

9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

[1] JUNIOR, V.F.V.; PINTO, A.C.; MACIEL, M.A.M. Plantas medicinais: cura segura?Rev. Quím. Nov., v.28, p.519-528, 2005.

[2] SOUZA, C.D.; FELFILI, J.M. Uso de plantas medicinais na região de Alto Paraíso de Goiás, GO, Brasil. **Acta bot. bras.**, p.135-142, 2006.

[3] ALMEIDA, M.Z. Plantas Medicinais. III ed. Salvador: Editora da UFBA, 2011.

[4] BOCHNER, R.; FISZON, J.T.; ASSIS, M.A.; AVELAR, K.E.S. Problemas associados ao uso de plantas medicinais comercializadas no Mercadão de Madureira, município do Rio de Janeiro, Brasil. **Rev. Bras. Pl. Med.**, v.14, p.537-547, 2012.

[5] ANTONIO, G.D.; TESSER, C.D.; MORETTI-PIRES, R.O. Contribuições das plantas medicinais para o cuidado e a promoção da saúde na atenção primária. Interf. Comun. Saúd. Educ., v.17, n.46, p.615-33, 2013.

[6] Lombardi, J. A., Three New Species of Celastraceae (Hippocrateoideae) from Southeastern Brazil, and a New Combination in Peritassa. **Nov.**, v.14, n.3, p.315-321, 2004.

[7] 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.

[8] SIMMONS, M.P.; SAVOLAINEN, V.; CLEVINGER, C.C.; ARCHER, R.H.; DAVIS, J. I. Phylogeny of the Celastraceae Inferred from 26S Nuclear Ribosomal DNA, Phytochrome B, rbcL, atpB, and Morphology. **Molec. Phylog. and Evol.,** v.19, p.353–366, 2001.

[9] 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.

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

[11] OLIVEIRA, D.M.; AGUILAR, M.I.; DÍAZ, B.K.; FILHO, S.A. V.; DUARTE, L.P.; SILVA, G.D.F.; HENNSEN, B.L. 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. **Molec.**, v.16, p.9939-9956, 2011.

[12] Carvalho-Okano, R. Estudos taxonômicos do gênero Maytenus Mol. emend.Mol. (Celastraceae) do Brasil Extra-Amazônico. Tese de Doutorado, UNICAMP, Campinas, 1992.

[13] MINC, C. Instrução normativa de setembro de 2008. Ministério Do Meio Ambiente. Disponível em: http://www.mma.gov.br. Acesso em: 20 Mar. 2015.

[14] SANTOS, V.L.; SOUZA, M.F.V.; BATISTA, L.M.; SILVA, B.A.; LIMA, M.S.; SOU-ZA, A.M.F.; BARBOSA, F.C.; CATÃO, R.M.R. Avaliação da atividade antimicrobiana de *Maytenus rigida* Mart. (Celastraceae). **Rev. Bras. Pl. Med.,** Botucatu, vol.13, n.1, p.68-72, 2011.

[15] DIAS, K.S.; MARQUES, M.S.; MENEZES, I.A.C.; SANTOS, T.C.; SILVA, A.B.L.; ESTEVAM, C.S.; SANT'ANA, A.E.G.; PIZZA, C.; ANTONIOLLI, A.R.; MARÇAL, R.M. Antinociceptive activity of *Maytenus rigida* stem bark. **Fitot.**, p.460-464, 2007.

[16] ESTEVAM, C.S.; CAVALCANTI, A.M.; CAMBUI, E.V.F.; NETO, V.A.; LEOPOL-DO, P.T.G.; FERNANDES, R.P.M.; ARAUJO, B.S.; PORFÍRIO, Z.; SANT'ANA, A.E.G. Perfil fitoquímico e ensaio microbiológico dos extratos da entrecasca de *Maytenus rigida* Mart. (Celastraceae). **Rev. Bras. Farmacogn.,** vol.19, n.1, p.299-303, 2009.

[17] SANTOS, V.L.; COSTA, V.B.M.; AGRA, M.F.; SILVA, B.A.; BATISTA, L.M. Pharmacological studies of ethanolic extracts of *Maytenus rigida* Mart (Celastraceae) in animal models. **Rev. Bras. Farmacogn.**, p.336-342, 2007.

[18] ROCHA, C.S. Estudo comparativo farmacognóstico e atividade biológica de Maytenus rigida Mart. e Maytenus ilicifolia Mart. ex. Reiss. (Celastraceae).
98f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas), Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2003.

[19] MARTUCCIELLO, S.; BALESTRIERI, M.L.; FELICE, F.; ESTEVAM, C.D.S.; SANT'ANA, A.E.G.; PIZZA, C.; PIACENTE, S. Effects of triterpene derivatives from *Maytenus rigida* on VEGF-induced Kaposi's sarcoma cell proliferation. **Chemico-Biological Interactions**, p.450–454, 2010

[20] SALAZAR, G. D. C. M. Maytenus truncata REISSEK: Estudo fotoquímico, analises 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.

[21] FONSECA, A.P.N.D.; SILVA G.D.F.; CARVALHO, J.J.; SALAZAR, G. D. C. M.; DUARTE, L.P. Estudo fitoquímicodo decocto das folhas de *Maytenus truncata* Reis-

sek e avaliação das atividades antinociceptiva, antiedematogênica e antiulcerogênicade extratos do decocto. **Quim. Nova**, vol.30, n.4, p.842-847, 2007.

[22] MARTINS, M.L.; PRIMEL, E.G.; CALDAS, S.S.; PRESTES, O.D.; ADAIME,

M.B.; ZANELLA, R. Microextração líquido-líquido dispersiva (DLLME) fundamentos e aplicações. **Sci. chomatogr.**, v.4, n.1, p.35-51, 2012.

[23] MENDES, S.S.; ANDRADE, J.A.A.; XAVIER, M.A.; JUNIOR, J.A.S.; PANTA-LEÃO, S.M; ESTEVAM, C.S.; GARCIA, C.A.B.; FERRARI, S.F. Genotoxicity test of *Maytenus rigida* and Aristolochia birostrisin the radicular meristem of the onion, Allium cepa. **Rev. Bras. Farmacog**., vol.22, n.1, p.76-81, 2012.

[24] MIZUI T, DOTEUCHI M. Effect of polyamines on acidified ethanol-induced gastric lesions in rats. **Jpn. J. Pharmacol.,** v.33 n.5, p.939-45, 1983.

[25] Disponível em < http://rsb.info.nih.gov/ > Acesso em 18 Mai. 2015.

[26] PRADO, L.C.; SILVA, D.B.; OLIVEIRA, S G.L.; HIRAKI, K.R.; CANABRAVA, H.A.; SILVA, B.LB. The gastroprotective effects of *Eugenia dysenterica* (Myrtaceae) leaf extract: the possible role of condensed tannins. **Biol Pharm Bull**., v.37, n.5, p.722-30, 2014.

[27] Linstrom, P. J.; Mallard, W. G. NIST Chemistry WebBook, NIST Standard Reference Database Number 69. Disponível em < http://webbook.nist.gov >. Acesso em 8 Junh 2015.

[28] Disponível em < http://chemindustry.ru/2,4-di-tert-Butylphenol.php > Acesso em20 Junh. 2015.

[29] Amarowicz, R. Squalene: A natural antioxidant?. Eur. J. Lipid Sci. Technol., p.411–412, 2009.

[30] ESTEVAM, C.S.; OLIVEIRA, F.M.; CONSERVA, L. M.; LIMA, L.F.C.O.; BAR-ROS, E.C.P.; BARROS, A.C.P.; Rocha, E.M.M.; Andrade, E.H.A. Constituintes químicos e avaliação preliminar in vivo da atividade antimalárica de *Ouratea nítida* Aubl (Ochnaceae). **Rev. Bras. Farmacogn. Braz. J. Pharmacogn.**, v.15, n.3, 2005.

[31] SILVA, J.L.; SILVA, R.P.; JORGE, R.M.; SILVA, G.D.F.; FILHO, S.A.V.; FON-SECA, A.P.N.D.; TAGLIATI, C.A. Avaliação da atividade antiulcerogênica da *Mayte-nus truncata* Reiss (Celastraceae). **Rev. Bras. Farmacogn.**, v.15, n.1, p. 30-35, 2005.

[32] KINUPP, V.F.; BARROS, I.B.I.Teores de proteína e minerais de espécies nativas, potenciais hortaliças e frutas. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, Campinas, v.28, n.4, p.846-857, 2008.

10 APÊNDICE A – TIC dos extratos sililados



Figura 1A. TIC de EMA obtido por DLLME/BSTFA/CG-EM, utilizando metanol como solvente dispersor.



Figura 2A. TIC de EMA obtido por DLLME/BSTFA/CG-EM, utilizando acetona como solvente dispersor



Figura 3A. TIC de EMT obtido por DLLME/BSTFA/CG-EM, utilizando metanol como solvente dispersor.



Figura 4A. TIC de EMT obtido por DLLME/BSTFA/CG-EM, utilizando acetona como solvente dispersor.



Figura 5A. TIC de EMR obtido por DLLME/BSTFA/CG-EM, utilizando metanol como solvente dispersor.



Figura 6A. TIC de EMR obtido por DLLME/BSTFA/CG-EM, utilizando acetona como solvente dispersor.



Figura 7A. TIC de EMRR obtido por DLLME/BSTFA/CG-EM, utilizando metanol como solvente dispersor.



Figura 8A. TIC de EMRR obtido por DLLME/BSTFA/CG-EM, utilizando acetona como solvente dispersor.

11 ANEXO A- Análise da comissão de ética na utilização de animais em ensaios

Universidade Federal de Uberlândia Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação Comissão de Ética na Utilização de Animais (CEUA) Rua Ceará, S/N - Bloco 2T, sala 113 - CEP 38405-315 Campus Umuarama - Uberlândia/MG - Ramal (VoIP) 3423; e-mail:ceua@propp.ufu.br; www.comissoes.propp.ufu.br ANÁLISE FINAL Nº 198/14 DA COMISSÃO DE ÉTICA NA UTILIZAÇÃO DE ANIMAIS PARA O PROTOCOLO REGISTRO CEUA/UFU 103/14 Projeto Pesquisa: "Avaliação do efeito gastroprotetor do extrato aquoso liofilizado e do chá das folhas de Maytenus acanthophylla Reissek" Pesquisador Responsável: Luiz Borges Bispo-da-Silva. O protocolo não apresenta problemas de ética nas condutas de pesquisa com animais nos limites da redação e da metodologia apresentadas. Ao final da pesquisa deverá encaminhar para a CEUA um relatório final. SITUAÇÃO: PROTOCOLO DE PESQUISA APROVADO. OBS: O CEUA/UFU LEMBRA QUE QUALQUER MUDANÇA NO PROTOCOLO DEVE SER INFORMADA IMEDIATAMENTE AO CEÚA PARA FINS DE ANÁLISE E APROVAÇÃO DA MESMA. Uberlândia, 09 de dezembro de 2014.

Prof. Dr. César Augusto Garcia Coordenador da CEUA/UFU

Local: Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, Campus Jequié Cidade: Jequié, Bahia Brasil Data: 21 de Setembro de 2015 Edição e impressão particular em Microsoft Office Word V. 2007. Total: 87 páginas