

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E NATERAIS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
CURSO DE POS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA E BIOTECNOLOGIA

ESTUDO FITOQUÍMICO BIOMONITORADO DA ENTRECASCA DE
***MAYTENUS RIGIDA* MART. (CELASTRACEAE)**

TESE DE DOUTORADO

MACEIÓ, MAIO DE 2006

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.



UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E NATERAIS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
CURSO DE POS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA E BIOTECNOLOGIA

ESTUDO FITOQUÍMICO BIOMONITORADO DA ENTRECASCA DE
***MAYTENUS RIGIDA* MART. (CELASTRACEAE)**

Tese de Doutorado apresentada por
Charles dos Santos Estevam programa
de Pós-Graduação em Química e
Biotecnologia da Universidade Federal
de Alagoas.

Orientador: Prof. Dr. Antônio Euzébio Goulart Sant'Ana

MACEIÓ, MAIO DE 2006

“De tudo ficaram três coisas:
a certeza de que estava sempre começando,
a certeza de que era preciso continuar e
a certeza de que seria interrompido antes de terminar.
fazer da interrupção um caminho novo,
da queda um passo da dança,
do medo uma escada,
do sonho uma ponte,
da procura um encontro”

Fernando Sabino

Ao Deus, por ter-me dado forças nas horas mais difíceis, ajudando-me a não desistir;

Aos meus pais Ana dos Santos Estevam e José Estevam por trabalharem sacrificando seus sonhos em favor dos meus. Por tudo, sou infinitamente grato.

Aos meus queridos irmãos, Adriana, Cícero e Eliana, por estarem presentes em todos os momentos.

A minha querida Rosangela de Moraes, com todo amor e carinho.

Ao Prof^o. Doutor Antônio Euzébio Goulart Sant'Ana,
Grande mestre e amigo, que nos seus
incondicionais ensinamentos me ensinou o real
sentido das palavras dedicação e trabalho...

AGRADECIMENTOS

* Ao prof. Dr. Humberto Reis Matos pelos ensinamentos e amizade ao longo do trabalho;

* Ao prof. Dr. Dennis Imbroisi, pela amizade e valiosa contribuição durante minha formação profissional;

* À Prof^a. Dr^a Lúcia Maria Conserva pela inigualável contribuição no início da minha formação profissional;

* À Prof^a. Dr^a Lúcia Maria Rebouças pela inigualável contribuição como professora de Pós-graduação.;

À prof^a. Dr^a. Margarida Humberto, pela valiosa contribuição como professora de Pós-graduação.

* À Prof^a. Dr^a. Rosilene Morette Marçal da Universidade Federal de Sergipe pela obtenção dos testes farmacológicos;

* Ao prof. Dr. Cossimo Pizza da Università de Salerno na Itália , por ter me recebido no Laboratório de Química de Produtos Naturais, onde e executei experimentos e pela obtenção dos espectros de Ressonância Magnética Nuclear

* À prof^a Dr^a. Marília Goulart, pela valiosa contribuição como professora de Pós-graduação;

* Ao prof. Dr. Carlos Simone, pela obtenção do raio X das amostras;

* Ao prof. Dr. Zenaldo Porfírio, pelos experimentos microbiológicos;

* A todos os professores do Departamento de Química, pela valiosa contribuição na minha formação acadêmica;

* Ao amigo Amaro Cavalcante pela amizade sincera e pelo apoio nos momentos de dificuldade;

* A Minha amiga Marcli Liborio pela admiração, amizade, companherismo e dedicação;

* Aos amigos e companheiros do Laboratório de Produtos Naturais (Depto. de Química - UFAL): Andre, Josiane, Dulce, Emília, Nadja, Valdiléia, Jussara, Jonathan, Mércia, Henrique Goulart, João Donato, Carlos, Silvio, Samila, Samia, Rosevaldo pela amizade, incentivo, companheirismo e carinho;

* Ao amigo Daniel, pela amizade e carinho;

* À Milena, Karol, Ana Lucila e Brancilene pela amizade e carinho

* À Cenira Monteiro de Carvalho pelo companherismo e amizade demonstrados ao longo dessa caminhada;

* Aos funcionários do Departamento de Química, Aldy e Margarida, pelo apoio e contribuição durante todo o trabalho;

* Aos funcionários da Secretária da Pós-Graduação do Departamento de Química;

* Ao Departamento de Fisiologia da Universidade Federal de Sergipe, pelo incentivo e apoio profissional;

* Ao amigo Aldy dos Santos, pelo companheirismo e colaboração na elaboração deste trabalho;

* Ao Marcos Sá, pela amizade e obtenção dos espectros de Infravermelho;

* A todos os colegas do Curso de Pós-graduação em Química e Biotecnologia do Departamento de Química – UFAL;

* À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa de estudo outorgada;

* À Fundação de Apoio à Pesquisa do Estado de Alagoas (FAPEAL) pelo financiamento da pesquisa;

* Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo financiamento da pesquisa;

INDICE

Agradecimentos	iv
Lista de figuras	ix
Lista de tabelas	x
Lista de quadros	xi
Lista de gráficos	xi
Lista de Abreviações, Siglas e Símbolos	xiii
Resumo	xiv
Abstract	xv
1 – Introdução	2
1.1 - Justificativa	5
1.2 – Objetivo	7
1.3 - Família Celastraceae	8
1.4 - Espécie <i>Maytenus rígida</i> Mart.	18
1.5 -Considerações Sobre a Malária	19
1.6 - Considerações Sobre o teste antinociceptivo	23
1.7 – Considerações sobre o teste antiulcerogenico	25
1.8 – Considerações sobre o teste antimicrobiano	26
1.9 – Considerações sobre atividade antioxidante	27
2 – Experimental	30
2.1 - Reagentes, solventes e equipamentos	30
2.2 - Coleta e identificação do material vegetal	32
2.3 - Preparação dos Extratos	32
2.4 - Extração ácido/base	36
2.5 - Prospecção fitoquímica	36
2.6 - Determinação de compostos polifenólicos	41
2.7 - Atividade antioxidante	42
2.8 - Estudo eletroquímico	44
2.9 – Desenho experimental do teste esquizonticida	45
2.10 – Teste antinociceptivo e antiinflamatório	47
2.11 – Atividade antiulcerogênica	49
2.12 – Desenho experimental da atividade antimicrobiana	50
2.13 – Separação e purificação dos constituintes químicos	50
2.14 – Dados físicos e espectrométrica das substâncias isoladas	65
2.15 - Estudo cristalográfico	69
3. Resultados e discussão	71

3.1 – Prospecção fitoquímica	71
3.2 - Ensaio biológicos	72
3.2.1 - Resultados dos Testes Anti-maláricos	72
3.2.2 - Resultados dos testes antiinflamatório e analgésicos	76
3.2.3 - Resultado do teste antiulcerogênico com os extratos e substâncias isoladas da entrecasca de <i>M. rigida</i>	86
3.2.4 - Resultado da atividade antimicrobiana	88
3.3 - Cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas das frações reunidas do grupo I do extrato em hexano	92
3.4 - Resultados do estudo químico da entrecasca de <i>M. rigida</i>	93
3.5 - Determinação quantitativa dos teores de compostos polifenólicos e determinação da atividade antioxidante dos extratos da entrecasca de <i>M.rigida</i>	147
3.6 - Resultados dos testes oxido-redutivo em meio aprótico das substâncias isoladas dos extratos da entrecasca de <i>M.rigida</i>	151
4 – Conclusões	163
5 - Espectros das substâncias isoladas	166
6 - Referências Bibliográficas	189

LISTA DE FIGURAS

1	Ciclo biológico do <i>Plasmodium falciparum</i>	23
2	Esquema geral de partição fase-reversa com o extrato alcoólico da entrecasca de <i>Maytenus rígida</i> .	33
3	Esquema Geral do Procedimento Experimental Efetuado com a Entrecasca de <i>Maytenus rígida</i> .	34
4	Esquema Geral do Procedimento Experimental Efetuado com as Folhas de <i>Maytenus rígida</i>	35
5	Esquema Geral do Procedimento Experimental Efetuado Para a Prospecção Fitoquímica dos Extrato da entrecasca de <i>Maytenus rígida</i> .	40
6	Esquema Geral do Procedimento Experimental Efetuado Para a Prospecção Fitoquímica dos Extrato das Folhas de <i>Maytenus rígida</i> .	40
7	Variação de coloração em transições de meio ácido e básico	171
8	Interpretação mecanística do padrão de fragmentação nos esteres metílicos de ácidos carboxílicos	92
9	Cromatograma dos ésteres metílicos obtido da fração reunida do grupo I do extrato em hexano	92
10	Espectro de massas do éster metílico do ácido dodecanóico	157
11	Espectro de massas do éster metílico do ácido tetradecanóico	157
12	Espectro de massas do éster metílico do ácido pentadecanóico	157
13	Espectro de massas do éster metílico do ácido hexadecanóico	158
14	Espectro de massas do éster metílico do ácido heptadecanóico	158
15	Espectro de massas do éster metílico do ácido octadecanóico	158
16	Espectro de massas do éster metílico do ácido 6-octadecanóico	159
17	Espectro na região IV (KBr) da substância MRCA2	159
18	Espectro de RMN ¹ H (300 HMz, CDCl ₃) da substância MRCA2	160
19	Espectro de RMN ¹³ C (75 HMz, CDCl ₃) da substância MRCA2	161
20	Esquema geral de fragmentação dos principais picos de MRCA2	98
21	Espectro na região IV (KBr) da substância MRCH7	162
22	Espectro de RMN ¹ H (200 HMz, CDCl ₃) da substância MRCH7	162
23	Espectro de RMN ¹³ C-DEPT (50 HMz, CDCl ₃) da substância MRCH7	163
24	Espectro na região IV (KBr) da substância MRCH4	163
25	Espectro de RMN ¹ H (200 HMz, CDCl ₃) da substância MRCH4	164
26	Espectro de RMN ¹³ C-DEPT (50 HMz, CDCl ₃) da substância MRCH4	165
27	Espectro de massas da substância MRCH4	166

28	Espectro na região IV (KBr) da substância MRCH5	166
29	Espectro de RMN ¹ H (300 HMz, CDCl ₃) da substância MRCH5	166
30	Espectro de RMN ¹³ C (75 HMz, CDCl ₃) da substância MRCH5	167
31	Espectro na região IV (KBr) da substância MRCCP1/MRCCP2	168
32	Espectro na região IV (KBr) da substância MRCA3	168
33	Espectro de RMN ¹ H (300 HMz, CDCl ₃) da substância MRCA3	168
34	Espectro na região IV (KBr) da substância MRCH6	169
35	Espectro de RMN ¹ H (300 HMz, CDCl ₃) da substância MRCH6	169
36	Espectro de RMN ¹³ C (75 HMz, CDCl ₃) da substância MRCH6	170
37	Espectro na região IV (KBr) da substância MRCH1	170
38	Espectro de RMN ¹ H (300 HMz, CDCl ₃) da substância MRCH1	171
39	Espectro de RMN ¹³ C -DEPT (75 HMz, CDCl ₃) da substância MRCH1	171
40	Espectro na região IV (KBr) da substância MRCH9/UFAL1	172
41	Espectro de RMN ¹ H (300 HMz, CDCl ₃) da substância MRCH9/UFAL1	172
42	Espectro de RMN ¹³ C (75 HMz, CDCl ₃) da substância MRCH9/UFAL1	173
43	Espectro na região IV (KBr) da substância MRCC5/MRCC6	174
44	Espectro de RMN ¹ H (300 HMz, CDCl ₃) da substância MRCC5/MRCC6	174
45	Espectro na região IV (KBr) da substância MRCHA1	175
46	Espectro de RMN ¹ H (300 HMz, CDCl ₃) da substância MRCHA1	175
47	Espectro de RMN ¹³ C- DEPT (75 HMz, CDCl ₃) da substância MRCHA1	176
48	Espectro de RMN ¹ H (300 HMz, CDCl ₃) da substância MRCA4	177
49	Espectro de RMN ¹³ C- DEPT (75 HMz, CDCl ₃) da substância MRCA4	177
50	Mecanismo de reação de um orto-difenol (a) e para-difenol (b)	149
51	Mecanismo de oxidação da catequina	152

LISTA DE TABELAS

1	Prospecção fitoquímica dos extratos das folhas e entrecasca de <i>M. rigida</i> .	72
2	Porcentagem de redução de parasitemia em grupos de camundongos tratados oralmente por quatro dias consecutivos, em relação ao grupo controle não tratado.	75
3	Atividade antimalárica de extratos da entrecasca de <i>M. rigida</i> em diferentes concentrações, testadas contra o <i>P. falciparum</i> (BHz 26/86) <i>in vitro</i> .	76
4	Efeito da 4' metilepigalocatequina no teste da placa quente (tail flick).	85
5	Atividade antibacteriana dos extratos alcoólico das folhas e entrecasca de <i>M. rigida</i> .	90
6	Atividade antibacteriana do extrato alcoólico da entrecasca de <i>M. rigida</i> .	90
7	Atividade antibacteriana dos extratos da entrecasca de <i>M. rigida</i>	91
8	Composição Química das Frações Reunidas do Grupo I da Fração em Hexano.	93
9	RMN da substância MRCA2 em $CDCl_3$, deslocamento em δ .	96
10	RMN da substância MRCA2 em $CDCl_3$, $CDCl_3$, e do modelo da literatura deslocamento em δ .	97
11	Dados cristalográficos e refinamento de estrutura para MRCA2/MRCC8	100
12	Coordenadas atômica ($\times 10^4$) e parâmetros isotrópico equivalentes ($\text{Å}^2 \times 10^3$) para MRCA2/MRCC8	101
13	Comprimento de ligação [Å] e ângulo de ligação [°] para MRCA2/MRCC8.	102
14	RMN da substância MRCH7 e do Modelo da Literatura (De Oliveira, 2003) em $CDCl_3$, deslocamento em δ .	106
15	RMN da substância MRCH4 e do Modelo da Literatura modelo do lupeol (Mahato & Kundu, 1994) em $CDCl_3$, deslocamento em δ .	108
16	RMN da substância MRCH5 e do modelo da literatura modelo do estigmasterol (MACARI e col., 1990) em $CDCl_3$, deslocamento em δ .	110
17	Dados cristalográficos e refinamento de estrutura para MRCA1	112
18	Coordenadas atômica ($\times 10^4$) e parâmetros isotrópico equivalentes ($\text{Å}^2 \times 10^3$) para MRCA1	113
19	Comprimento de ligação [Å] e ângulo de ligação [°] para MRCA1	115
20	Parâmetros de deslocamento anisotrópico ($\text{Å}^2 \times 10^3$) para MRCA1. Fator esponencial da amostra anisotrópica tem a forma: $-2(h^2 a^{*2} \cdot U_{11} + 2 hka^*b^*U_{12})$.	122
21	Coordenadas de hidrogênio e parametros isotrópicos equivalentes para MRCA1	123

22	Dados cristalográficos e refinamento de estrutura para MRCCP1/MRCCP2	125
23	Coordenadas atômica ($\times 10^4$) e parâmetros isotrópico equivalentes ($\text{Å}^2 \times 10^3$) para MRCCP1/MRCCP2	126
24	Comprimento de ligação [Å] e ângulo de ligação [°] para MRCCP1/MRCCP2	127
25	RMN da substância ácido gálico modelo da literatura (Almeida e col., 2005 em , deslocamento em δ .	132
26	RMN da substância MRCH6 e do modelo da literatura modelo do lupeol (Mahato & Kundu, 1994) em CDCl_3 , deslocamento em δ	134
27	Dados de RMN ^{13}C da substância MRCC5, modelos 1, 2, 3 e 4 (20,1 MHz, CDCl_3 , δ) e 3 e 4 (25,1 MHz, CDCl_3 , δ) (ANDRADE, 1997)	135
28	RMN da substância MRCH1 em CDCl_3 , deslocamento em δ . e do modelo da literatura (lupeol (Mahato & Kundu, 1994) em CDCl_3	138
29	RMN da substância MRCH9/UFAL1 em CDCl_3 , deslocamento em δ . e do modelo da literatura (lupeol (Mahato & Kundu, 1994) em CDCl_3 ,	140
30	RMN da substância MRCC5/MRCC6 em CDCl_3 , deslocamento em δ . e do modelo da literatura (lupeol (Mahato & Kundu, 1994) em CDCl_3	142
31	Dados de RMN da substância MRCHA1 em CD_3OD	144
32	Dados de RMN da substância em MRCA3 em MeOD e do modelo da literatura (AGRAWAL, 1989) em CDCl_3	146
33	Análise qualitativa para detecção de compostos fenólicos e teste antioxidante	150
34	Estruturas que foram submetidas a avaliação do potencial de oxidação	152

LISTA DE QUADROS

1	Fracionamento Cromatográfico da Fase Hexânica da Entrecasca de <i>M. rigida</i> .	51
2	Fracionamento Cromatográfico da Fase Clorofórmica da Entrecasca de <i>Maytenus rigida</i> .	54
3	Filtração da fase em acetato de etila da Entrecasca de <i>Maytenus rigida</i>	57
4	Filtração da fase hidroalcoólica da Entrecasca de <i>Maytenus rigida</i>	59
5	Procedimento de separação dos constituintes da fase aquosa liofilizada da Entrecasca de <i>Maytenus rigida</i> .	61
6	Procedimento de separação dos constituintes da fase em acetato de etilanda partição em fase reversa	62
7	Procedimento de separação dos constituintes da fase clorofórmica da partição em fase reversa	64
8	Sobrevida de camundongos infectados com <i>P. berghei</i> e tratados com extratos obtidos da espécie <i>M. rigida</i> durante vinte e dois dias. A cloroquina foi utilizada em paralelo como antimalárico de referência	75

LISTA DE GRÁFICOS

- 1 Teste in vivo modelo de inflamação, edema de pata induzido por carragenina nas doses de 100, 200 e 400 mg/kg 77
- 2 Teste in vivo modelo de inflamação, edema de pata induzido por carragenina nas doses de 100, 200 e 400 mg/kg. 77
- 3 Teste in vivo modelo de antinocicepção, teste de retirada da cauda com o extrato alcoólico na dose de 100 mg/kg 78
- 4 Teste in vivo modelo de antinocicepção, teste de retirada da cauda com extrato alcoólico 79
- 5 Teste in vivo modelo de antinocicepção, teste de retirada da cauda nas doses de 100, 200 e 400 mg/kg com o extrato hexânico. 80
- 6 Teste in vivo modelo de antinocicepção, teste de retirada de cauda nas doses de 100, 200 e 400 mg/kg com o extrato clorofórmico de *M. rigida*. 80
- 7 Teste in vivo modelo de antinocicepção, teste de retirada da cauda nas doses de 100, 200 e 400 mg/kg com o extrato acetato de etila de *M. rigida*. 81
- 8 Teste in vivo modelo de antinocicepção, teste de retirada de cauda com o extrato hidroalcoólico nas doses de 100, 200 e 400 mg/kg. 81
- 9 Teste in vivo modelo de antinocicepção, teste de retirada de cauda com o extrato hidroalcoólico nas doses de 100, 200 e 400 mg/kg. 82
- 10 Efeito do extrato alcoólico (EE), clorofórmico (CF), acetate de etila (EAF), hidrometanol (HMF) de *Maytenus rigida* no teste da placa quente (the tail) 82
- 11 Teste *in vivo* modelo de contorções abdominais induzidas por ácido acético dose 100 mg/kg com MRCA2. 84
- 12 Teste in vivo modelo de analgesia central (placa quente) na dose 100 mg/kg com a substância MRCA2. 84
- 13 Teste in vivo modelo de analgesia central (placa quente) na dose 100 mg/kg com a substância MRCA2. 85
- 14 Efeito dos extratos aquoso (100 mg/kg) e etanólico (100 mg/kg) da entrecasca *Maytenus rigida* sobre as úlceras induzidas por indometacina em ratos (n = 7). 87
- 15 Efeito das fases hexânica, clorofórmica e hidroalcoólica (100 mg/kg; p.o.) da entrecasca da *Maytenus rigida* sobre as úlceras induzidas por indometacina em ratos (n = 7). 87
- 16 Efeito da UFAL1 (100 mg/kg; p.o.) isolada da entrecasca da *M. rigida* sobre as úlceras induzidas por indometacina em ratos (n = 7). 88

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

δ	Deslocamento químico
AcOEt	Acetato de etila
C	Carbono
CHCl ₃	Clorofórmio
CDCl ₃	Clorofórmio deuterado
(CD ₃) ₂ CO	Acetona deuterada
CCDA	Cromatografia em camada delgada analítica
°C	Graus centígrados
CG-EM	Cromatografia acoplada a espectrometria de massas
CIP	Ciprofloxacina
CC	Cromatografia em coluna
CCDC	Cromatografia em camada delgada comparativa
COSY	Correlation Spectroscopy
<i>d</i>	Dupleto
<i>dd</i>	Duplo dupleto
DEPT	Distortionless Enhancement by Polarization Transfer
DMSO	Dimetilsulfóxido
EM	Espectrometria de massas
eV	Elétrons volts
EtOH	Etanol
g	Gramas
HMBC	Heteronuclear Multiple Bond Correlation
HMQC	Heteronuclear Multiple Quantun Coherence
Hz	Hertz
IV	Infravermelho
<i>J</i>	Constante de acoplamento
<i>Lit</i>	Literatura
MeOH	Metanol
MeOD	Metanol deuterado
<i>m</i>	Multiplete
M	Pico do Íon molecular
mg	Miligramas
MHz	Megahertz
mL	Mililitros
min	Minutos
<i>m/z</i>	Relação massa/carga
OMS	Organização Mundial de Saúde
nm	Nanômetro
p.	Página
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
RMN ¹³ C	Ressonância Magnética Nuclear de Carbono treze
RMN ¹ H	Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio
μL	Microlitros
<i>s</i>	Simpleto
<i>t</i>	Triplete
THF	Tetrahidrofurano
TMS	Tetrametilsilano

RESUMO

A planta escolhida para o trabalho pertence à família Celastraceae que compreende cerca de 85 gêneros contendo 800 a 900 espécies, com ampla distribuição nas regiões tropicais e subtropicais de todo o mundo. Nesta família destaca-se o gênero *Maytenus* que apresenta uma grande variedade de metabólitos bioativos. A espécie *Maytenus rigida* Mart, foi coletada no estado de Alagoas, no povoado Capim Grosso-AL. O trabalho teve como o objetivo realizar o estudo fitoquímico biomonitorado de *Maytenus rigida* Mart.

No teste de atividade antimalárica *in vivo* foi observado que os extratos alcoólico das folhas, extrato alcoólico da entrecasca e fase acetato de etila foram considerados ativos. Nos testes *in vitro* todos os extratos testados nas doses de 16,6 e 50 µg/mL foram considerados ativos.

No teste de inflamação, o extrato alcoólico, apresentou reduções significativas do edema de pata induzido pela carragenina, nas doses de 200 e 400mg/kg. No modelo de antinocicepção, o extrato alcoólico teve aumento significativo no tempo de latência em relação ao grupo controle, de 39,0% de aumento; $p < 0,005$, na dose de 100mg/kg. Já na dose 200mg/Kg ocorreu uma redução de 26,5% de aumento; $p < 0,05$. As frações obtidas da partição do extrato alcoólico da entrecasca foram testadas na dose de 400mg/Kg aumentando o tempo de latência significativamente de 41,4% para a fração hexânica, 37,1 % para clorofórmica, 37,2% para acetato de etila e 78% e 27,9% para a fração hidroalcoólica. A substância 4'-metil-epigalocatequina isolada da fase acetato de etila produziu uma significativa inibição no número de contorções abdominais (69 % de inibição, 100 mg/Kg, v.o) em comparação com a Dipirona (65 % de inibição, 33 mg/Kg, i.p).

No teste da atividade antiulcerogênica foi observado que o extrato etanólico da entrecasca na dose de 100 mg/kg estimulou atividade protetora da mucosa gástrica. O extrato aquoso da entrecasca foi testado na dose 100 mg/kg reduzindo de forma significativa ($p < 0,001$) as úlceras induzidas por indometacina. As fases hexânica, clorofórmica e hidroalcoólica do extrato etanólico da entrecasca, foram administradas por via oral na dose de 100 mg/kg. Essas frações reduziram de forma significativa, as úlceras induzidas por indometacina.

Nos testes da atividade antimicrobiana foi observada atividade antimicrobiana nos extratos aquoso, clorofórmico, acetato de etila e hidroalcoólico. Foi detectados compostos polifenólicos e atividade antioxidante nos extratos em clorofórmico, acetato de etila e hidroalcoólico, foi avaliado também a atividade o comportamento oxido-redutivo em meio aprótico com as substâncias isoladas 4'-metil-epigalocatequina, epicatequina e narigenina. A análise quantitativa da composição química da fração em hexano, através da cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas permitiu detectar a presença de sete compostos (dodecanoato de metila, tetradecanoato de metila, pentadecanoato de metila, hexadecanoato de metila, heptadecanoato de metila, octadecanoato de metila, 6-octadecanoato de metila). O estudo químico guiado pelos bioensaios forneceu as seguintes compostos 4'-metil-epigalocatequina, epicatequina, ácido 3,4,5-triidroxibenzóico, 3-metoxi-5, 7, 3', 4' – tetraidroxiflavona, β -sitosterol, estigmasterol, lupeol, friedo-oleanano 3-ona, 3- β -hidroxi-Friedelina, 3 β -28-Dihidroxi-lup-20(29)-eno, 3 β -hidroxi-lup-20-em,30 diol e duas estruturas que foram caracterizadas por raio X.

ABSTRACT

The chosen plant belongs to the family Celastraceae which comprehends about 85 genders and from 800 to 900 species with wide distribution in the tropical and subtropical regions of the world. In this family the gender *Maytenus* highlights due to a great variety of bioactive metabolites. From this gender, the specie *Maytenus rigida* Mart was collected in the village of Capim-Grosso, State of Alagoas. The main objective of this work was to accomplish a biomonitored phytochemical study of this specie.

The *in vitro* antimalarial test showed that all tested extracts at 16,6 and 50 μ g/mL were actives against *Plasmodium*. When the test was realized *in vivo*, the alcoholic extracts of the leaves and of the entrecasca, as well the etyl acetate extracts of *Maytenus rigida* Mart were active against *Plasmodium*.

In the antiinflammatory test, the alcoholic extract caused a significant reduction of the paw edema due to carrageenan, at 200 and 400 mg/kg. In the antinociception model, the alcoholic extract caused a significant increase in the latency time in relation to the control group: an increase of 39,0% ($p < 0,005$), at 100 mg/kg. At 200 mg/Kg occurred a significant reduction of 26,5% of the increase ($p < 0,05$). The fractions obtained by the partition of the alcoholic extract of entrecasca were tested at 400 mg/Kg and they increased the latency time significantly in 41,4% to the hexanic fraction, 37,1 % to the chloroformic fraction, 37,2% to the etyl acetate and 78% and 27,9% to the hydroalcoholic fraction. The substance MRCA2 isolated of the etyl acetate fraction produced a significant inhibition in the number of abdominal contortions (69% of inhibition, 100 mg/Kg, v.o) when compared with dipyrone (65% of inhibition, 33 mg/Kg, i.p).

In the antiulcerogenic test, the best ethanolic extract at 100 mg/kg stimulated the protective activity of the gastric mucous. The best aqueous extract was tested at 100 mg/kg and it reduced significantly ($p < 0,001$) the ulcers induced by indometacin. Hexanic, chloroformic and hydroalcoholic fractions of the best ethanolic extract were orally at 100 mg/kg. These fractions reduced significantly the ulcers induced by indometacin.

The aqueous, chloroformic and hydroalcoholic extracts showed antimicrobial activity. Phenolic compounds were detected and antioxidant activity was observed in the chloroformic, etyl acetate and hydroalcoholic extracts. It was also evaluated the redox behavior in aprotic medium with the isolated substances 4'-methyl-epigallocatechin, epicatechin and naringenin. The quantitative analysis of the chemical composition of the hexanic fraction, by gas chromatography - mass spectrometry, allowed detecting the presence of seven compounds (ethyl dodecanoate, methyl dodecanoate, methyl tetradecanoate, methyl pentadecanoate, methyl hexadecanoate, methyl heptadecanoate, methyl octadecanoate, methyl 6-octadecanoate). The chemical study guided by the bioassays gave the following compounds: 4'-methyl-epigallocatechin, epicatechin, 3,4,5-trihydroxybenzoic acid, 3-methoxy-5,7,3',4'-tetrahydroxyflavone, β -sitosterol, stigmasterol, lupeol, friedoleanan-3-ona, 3- β -hydroxy-friedelin, 3-28-dihydroxy-lup-20(29)-ene, 3-hydroxy-lup-20-en-30-diol and two structures that were characterized by X ray.

CAPÍTULO I

INTRODUÇÃO

1- Introdução

As plantas constituem a essência da vida principalmente pela sua posição singular como produtores primários em todas as cadeias alimentares e, em segundo lugar, como a única fonte de energia renovável disponível para os animais (MANTELL e cols., 1994). A cura através das plantas é tão antiga quanto a história da humanidade. Desde os tempos da alquimia, a medicina empírica, à base de ervas, sempre exerceu grande fascínio sobre a humanidade e o faz ainda hoje (MANTELL e cols., 1994).

Vale ressaltar que seu uso na terapêutica não teve origem apenas na experiência casual ou em grande conjunto de experiências conscientes, mas principalmente em aplicações com pretensões mágicas, que tinham por objetivo aumentar a ação dos feitiços e encantamentos. Portanto, ao longo dos séculos, inúmeras plantas com poder de cura se tornaram conhecidas e as informações transmitidas por diferentes civilizações, de geração à geração, até a era moderna (GUILLEN e cols., 1987). Desse modo, originou-se e difundiu-se a medicina popular.

Até o século XIX os recursos terapêuticos eram predominantemente constituídos por plantas e extratos vegetais. Com o avanço dos instrumentos científicos e tecnológicos se estabeleceu a tendência de utilização das substâncias ativas presentes nas plantas, cujas descobertas propiciaram uma revolução científica e tecnológica, enriquecendo rapidamente o arsenal terapêutico (ESTEVAM., 2001).

É importante lembrar a contribuição das plantas, ainda hoje, como fornecedoras de matérias-primas farmacêuticas. Apesar do desenvolvimento nas áreas de síntese orgânica, microbiologia industrial, biologia molecular, entre outras, parte dos fármacos permanece sendo obtido de matérias-primas vegetais.

Com o objetivo de confirmar o potencial curativo, bem como de buscar novos quimioterápicos, inúmeras plantas, com ou sem relato etnofarmacológico, pertencentes a diferentes famílias, vêm sendo estudadas (CRUZ., 1979; AHUMADA., 1975). As plantas constituem uma fonte inesgotável de princípios ativos, além de servirem de modelos para síntese de um grande número de fármacos, fornecendo a cada dia respostas para inúmeras doenças (BRAZ-FILHO., 1994; WALL e cols., 1996).

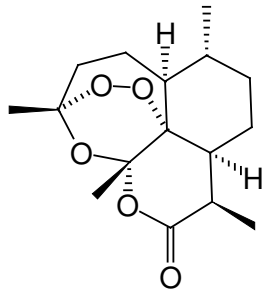
Como exemplo, podemos citar a artemisinina (**1**) obtida de *Artemisia annua* (Asteraceae), cafeína (**2**) das espécies *Camellia sinensis* (Theaceae), *Coffea spp*

(Rubiaceae), *Ilex paraguayensis* (Aquifoliaceae), *Paullinia cupana* (Sapindaceae) e *Cola acuminata* (Sterculiaceae) (SCHENKEL e cols., 2000; SIMÕES e cols., 1999 e HARBORNE e cols., 1993). Em outras situações, estão envolvidos fármacos que não são de origem natural, mas suas obtenções são facilitadas por semi-síntese a partir de precursores naturais. Como exemplo, pode-se citar os anticoncepcionais preparados a partir de matérias-primas vegetais como os esteróides diosgenina (3) e solasodina (4), obtidos de espécies de *Dioscorea* (Dioscoreaceae) e *Solanum* (Solanaceae) respectivamente, ou ainda, de fitoesteróides como o estigmasterol (5) (HARBORNE e cols., 1993; SIMÕES e cols., 1999; SCHENKEL e cols., 2000).

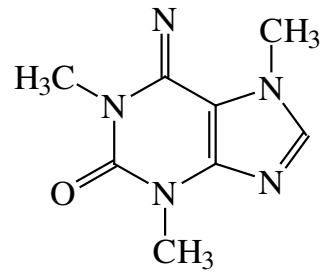
Por essa e outras razões, as plantas passaram a ser cogitadas por profissionais da área de saúde, bem como por órgãos governamentais, como um dos recursos terapêuticos possíveis de utilização no atendimento de algumas das necessidades dos serviços de saúde (SIMÕES e cols., 1989). Assim vários governos municipais têm estruturado programas de uso de fitoterápicos (MORESCO e OLIVEIRA., 1995). Este recurso é útil nos atendimentos às comunidades onde a existência médico-farmacêutica é deficiente, como é o caso do Nordeste brasileiro (MATOS, 1994).

O potencial das plantas superiores como fonte de novas drogas é ainda inexplorada, este fato é evidenciado pelo número de espécies de plantas existentes e pelo fato de apenas uma pequena percentagem ter sido investigada do ponto de vista químico e, menor número ainda do ponto de vista biológico e/ou farmacológico.

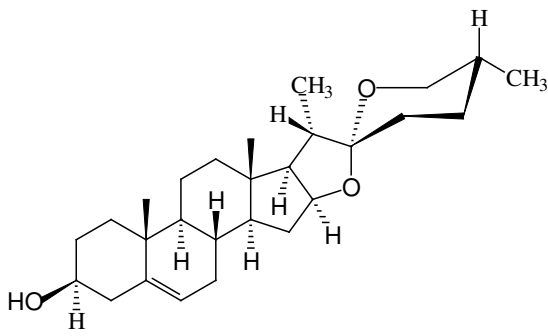
Recentemente, novas abordagens envolvendo técnicas de monitoramento químico através da busca racional de novas drogas como: fracionamento guiado por bioensaios específicos, bioensaios automatizados, técnicas Hifenadas (HPLC-EM), desreplicação e sistemas de "screening" de alta escala", estas técnicas são utilizadas para sendo utilizados para identificar novas substâncias bioativas de forma rápida e eficiente aproveitando o potencial existente nas plantas (HOSTETTMENN e cols., 1997; BOHLIN e cols., 1998; CONSTANT e cols., 1997; MONTANARI e cols., 2001; YUNES., 1998).



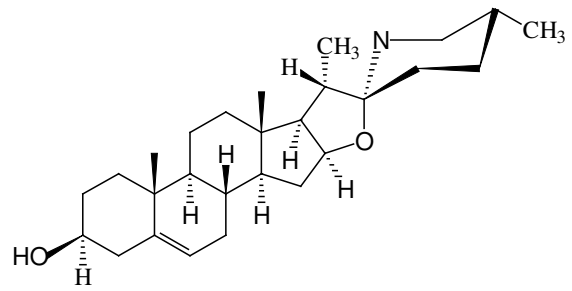
1



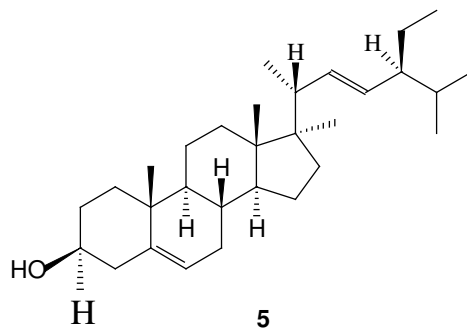
2



3



4



5

1.1– Justificativa

O semi-árido do nordeste brasileiro, com aproximadamente 1,0 milhão de km², é um repositório de genomas adaptados a profundas mudanças climáticas. O bioma caatinga é um mosaico de árvores e arbustos decíduos e xerófilos, espinhosos misturados com um grande número de cactus suculentos e bromélias.

Já foram descritas mais de 596 espécies arbustivas e arbóreas, 1.788 espécies herbáceas, sendo pelo menos 180 espécies endêmicas. Destacam-se as famílias botânicas: Caesalpinaceae, Mimosaceae, Euphorbiaceae, Fabaceae, Celastraceae e Cactaceae (JOLY, 1993).

O estado de Alagoas, onde domina o clima marcado por secas periódicas e precipitação que varia entre 300-800 mm/ano, é caracterizado pela diversidade de formações vegetais. Nesta região, existe um predomínio de caatingas, associadas a carrascos e mata de altitude (matas de brejo), além de áreas de cerrado e de campo rupestre, mata atlântica e vegetação costeira, entre outras. Este cenário ocupa 18 % do território nacional (1.561.177,8 km²), onde vivem 44 milhões de habitantes, dos quais até 1995, 17,5 milhões habitam a área rural (OLIVEIRA, 1995).

Apesar da grande influência dos meios de comunicação e do número crescente de farmácias e drogarias em todo país, o uso de plantas com fins terapêuticos ainda é bastante comum, tanto no meio rural como urbano, nas populações de baixo poder aquisitivo, onde a tradição cultural e os problemas sócio-econômicos dificultam o acesso à medicina convencional. Infelizmente, muitas das informações e práticas a respeito dos usos das plantas, principalmente daquelas consideradas medicinais, estão se perdendo ao longo do tempo, quer seja pela ausência de estudos etnobotânicos, quer seja pelo uso inadequado da flora nativa, sem um programa de manejo racional e sustentável, o que tem ameaçado e colocado em risco de extinção inúmeras espécies, muitas das quais são ainda desconhecidas para a Ciência (AGRA, 1996).

Apesar de sua diversidade e de seu potencial sócio-econômico, o uso dos recursos vegetais tem ficado aquém do seu potencial. Alguns dos fatores que restringem o uso racional da flora nordestina são, entre outros, o manejo insuficiente das reservas, as condições climáticas, a prática desaconselhável do uso da terra, o desenvolvimento agropecuário que exerce forte pressão sobre a biodiversidade, com redução substancial

de vegetação nativa, a crescente degradação dos recursos naturais e o desmatamento desenfreado que põem em risco a esperança da descoberta de novas drogas com atividade farmacológica e/ou biológica.

Assim, há necessidade de uma corrida contra o tempo empregando o conhecimento adquirido empiricamente pelas populações “Estudo Etnofarmacológico” em prol da investigação e do conhecimento científico (ELISABETSKY e SHANLEY., 1994; VIEIRA.,1999; PINTO e MADURO.,2003).

Esta abordagem reduz o tempo de pesquisa e também os custos por ser uma investigação baseada em informações prévias, ainda que de certa forma leiga. Investir em pesquisa etnofarmacológica é extremamente importante para os países onde a população possui um baixo poder aquisitivo e já está culturalmente adaptada ao uso de plantas para remediar seus males.

Em verdade, ganha-se tempo selecionando-se previamente as plantas com indicação terapêutica popular para só então optar pelo modelo experimental que deverá ser usado para a avaliação e comprovação científicas (ELYZABETSK.,1987). Neste contexto, a geração, a divulgação e a aplicação dos conhecimentos sobre a flora da região, a partir de bioensaios e estudos que envolvam conhecimento sobre a composição química, contribuirá para ampliar o conhecimento sobre o uso racional e sustentável da flora regional, bem como para beneficiar a população carente das áreas rural e urbana.

Apesar da flora nordestina gozar de grande prestígio na medicina popular, até agora não foi suficientemente estudada. Assim, o presente trabalho teve o objetivo de determinar os princípios ativos na espécie vegetal, como forma de contribuir para o conhecimento desta planta bastante utilizada na medicina tradicional. Outro aspecto importante em se conhecer o potencial da flora regional, está no alto índice de desaparecimento das espécies nativas em decorrência do crescente desmatamento para aproveitamento agrícola.

A planta escolhida para o trabalho foi à espécie *Maytenus rigida* Mart. (CELASTRACEAE) que foi coletada no estado de Alagoas. O interesse em estudar essa planta é fundamentada nas razões acima descritas, e especialmente porque a família Celastraceae tem uma larga história na medicina popular. O estudo de outras

espécies do gênero evidenciaram que há uma grande variedade de substâncias química e farmacologicamente ativas desta família (GONZALEZ e cols., 1996).

Desta forma o presente trabalho teve o objetivo de contribuir para o conhecimento fitoquímico da espécie *Maytenus rigida* Mart, através do estudo químico e biológico dos extratos da entrecasca. O presente trabalho apresenta uma visão interdisciplinar envolvendo especialidades em áreas distintas como a farmacologia, a botânica e química. A presente proposta contou com a colaboração de profissionais que atuam em diferentes áreas de pesquisa como: farmacêutico, químicos, fitoquímicos, e botânico, a fim de atingir os objetivos propostos.

1.2 - Objetivos

• Geral

O objetivo deste trabalho é contribuir para o conhecimento da composição química e da atividade biológica dos extratos da espécie *Maytenus rigida* Mart. Para tal foram realizados o isolamento e a caracterização química de seus constituintes e avaliação da atividade biológica através da atividade analgésica *in vivo*, da atividade antiinflamatória, a atividade antiulcerogênica *in vivo*, do potencial antimalárico *in vivo e in vitro*, ação antimicrobiana *in vitro*, antioxidante *in vitro* e detecção de compostos fenólicos dos extratos da entrecasca e/ou das substâncias isoladas de *Maytenus rigida* Mart. (*Celastraceae*). Além disso, o projeto visa também promover a Formação de Recursos Humanos especializados, com visão interdisciplinar, em Produtos Naturais e Ensaios Biológicos, através da geração de conhecimento, com vistas ao desenvolvimento de fitofármacos e buscando o desenvolvimento dos recursos naturais da região.

• Específico

- a) Coleta, identificação e estudo botânico do material vegetal;
- b) Preparação dos extratos;
- c) Partição e separação inicial dos extratos ativos;
- d) Prospecção fitoquímica;

- e) Separação e purificação dos constituintes químicos dos extratos em hexano, clorofórmio, acetato de etila, hidroalcoólica e aquoso liofilizado;
- f) Avaliar *in vivo* e *in vitro* a atividade antimalárica, estudar *in vivo* as atividades analgésica, antiinflamatória e antiulcerogênica, *in vitro* as atividades antimicrobiana, e a atividade antioxidante;
- g) Identificação e determinação estrutural das substâncias isoladas;

1.3 - Família Celastraceae

A família Celastraceae compreende cerca de 85 gêneros, contendo 800 a 900 espécies, com ampla distribuição nas regiões tropicais e subtropicais de todo o mundo (BARROSO, 1991 e JOLY., 1993). São plantas lenhosas, arbustivas ou arbóreas com folhas inteiras, quimicamente são caracterizadas pela presença de compostos com esqueletos terpenoídicos com grupos fenoldienônico e que apresentam propriedades quelantes. Os compostos químicos mais conhecidos são os triterpenos pentacíclicos das séries friedelano, oleanano e lupano que possuem comprovada ação antiinflamatória (MARINI-BETOLO., 1974).

Nesta família destaca-se o gênero *Maytenus* que possui espécies arbustivas ou arbóreas nas matas e campos (BARROSO., 1991 e JOLY., 1993), apresentam uma grande variedade de metabólitos bioativos e são largamente usado pelos povos da América do Sul. Neste gênero muitos compostos químicos têm sido isolados tais como:

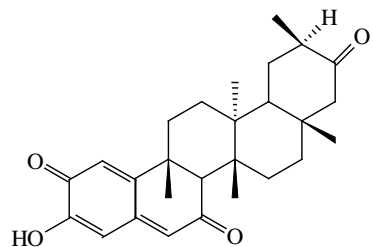
Triterpenóides: São várias as descrições de compostos triterpenicos isolados neste gênero, tais como triterpenos-quinônicos (6) e triterpenos diméricos (7) com atividade citotóxica. Além do 28-hidroxi-friedelan-1,3-diona (8), isolado de *Maytenus macrocarpa*, que atua na inibição da enzima aldose-redutase. já a atividade antiplasmodial e atividade antiulcerogênica foi observada no triterpeno pentacíclico 3 β -friedelanol (9). Vale ressaltar que compostos desta classe foram isolados das espécies tais como: Triterpenos quinônicos (7), (10), (11) e (12) de *M. amazônica*; *Maytenus sp* (GONZÁLEZ e cols., 1999; QUEIROGA e cols., 2000; FILHO e cols., 2002; CHÁVEZ e

cols., 1998; CHÁVEZ e cols., 2000; ALVARENGA e cols, 1999; CHÁVEZ e cols., 1999; AVILLA e cols., 2000; KHALED e col., 2001).

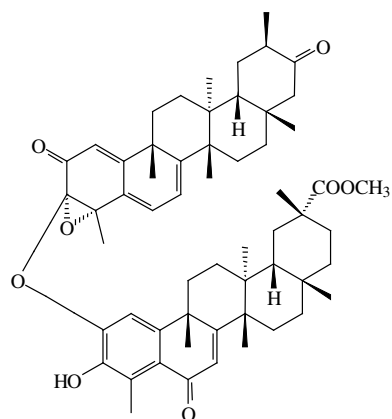
Dados da literatura relatam a ocorrência de triterpenos da série lupano com atividade antimicrobiana e citotóxica em *M.cuzcoina* e *M. chiapensis* (Nunez e col, 2005) são eles: 6 α -hidroxi-3-oxo-lupano-20(30)-eno (**13**), 11 α -hidroxi-epi-betulin (**14**), ridigenol 28- aldeído (**15**), 6 β -hidroxibetulin (**16**), 28 β ,6 β -diidroxilupano-20(29)eno (**17**), 24 -hidroxibetulin (**18**) e 28-hidroxiglochidona (**19**). Também existem relatos de nortriterpenos quinometídios com atividade inseticida em espécies de *Maytenus* como: 20 α -hidroxitigenona (**20**), tigenona (**21**) e pristimerina (**22**) (AVILLA e cols., 2000).

Estudos relatam a ocorrência de compostos fenólicos do tipo nor-triterpeno em *M. canariensis* (GONZAÁLES e cols., 1996) são eles: 6-oxo-tigenol (**23**), 3-O-metil-6-oxo-tigenol (**24**), 2-O-metil-6-oxo-tigenol (**25**), O-dimetil-6-oxo-tigenol (**26**), 6-oxo-tingenol (**27**) e 2,3-O-dimetil -6-oxo-iguasterol (**28**). Além de triterpenos em *M. ilicifolia* (OHSAKI e cols., 2004) maitefolin A, B e C (**29**, **30** e **31**), 3-cafeato (**32**). Nortriterpeno quinonico (ALVARENGA e cols., 1999) 15 α -hidroxi-21-cetopristimerin (**33**). Triterpenos de *M. arbustifolia* (ORABI e cols., 2001) 3 α -hidroxi-2-oxofriedelano-20 α -ácido carboxílico (**34**).

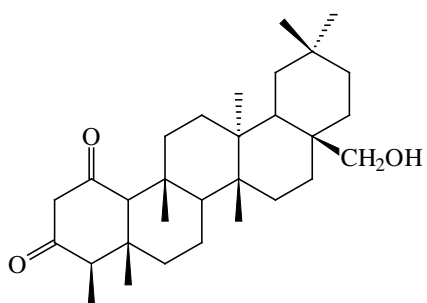
Triterpenos do tipo fiedo-nor-oleanano foram isolados em *M. ilicifolia* (FILHO e col., 2002) 20 α -hidroxi-maitenin (**35**), 20 β -hidroxi-maitenin (**36**), maitenin (**37**), celastrol (**38**) e pristimerina (**39**). Trabalhos relatam a análise quantitativa por HPLC de Triterpenos friedelina 3 β -ol (**40**) e friedelina (**41**) em *M. aquilifolium* (NOSSACK e cols., 2000). Nor-triterpenos macrocarpa A, B, C e D (**42**), (**43**), (**44**) e (**45**) em *M. macrocarpa* (CHÁVEZ e cols., 2000). Também foram isolados triterpenos do tipo quinona metídio em *M. amazônica* (CHÁVEZ e col.,1999) 23-oxo-isotigenona (**46**) e (8S)-7,8-diidro-6-oxo-tigenol (**47**). Triterpenos diméricos *M. chuchuhuasca* (SHIROTA e cols., 2004) Xuxuasim A (**48**) e Xuxuasim B (**49**). Triterpenos triméricos em *M. scutioides* (GONZÁLEZ e cols., 1999)Triscutin A (**50**) e Triscutin B (**51**).



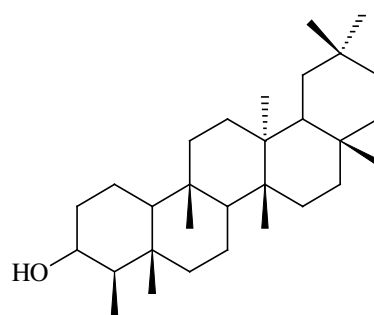
6



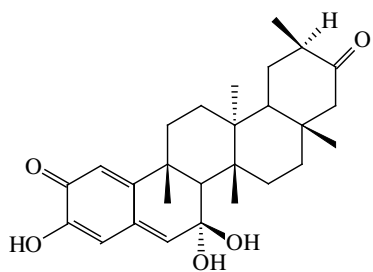
7



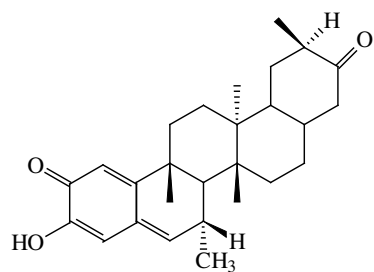
8



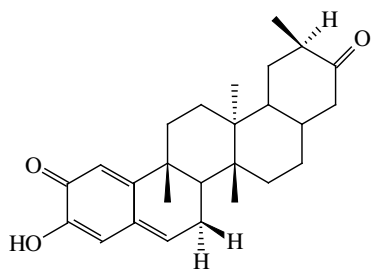
9



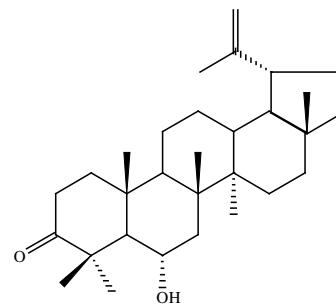
10



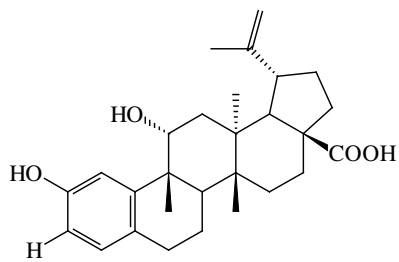
11



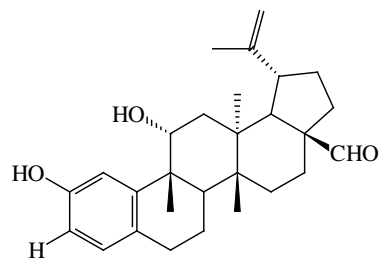
12



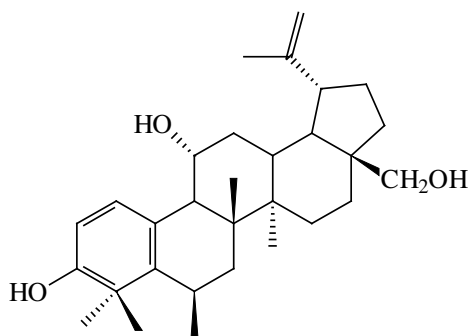
13



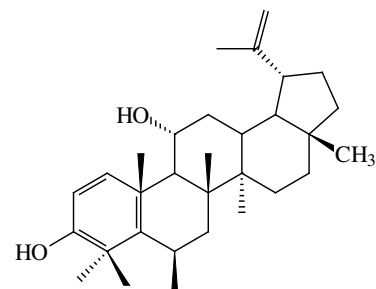
14



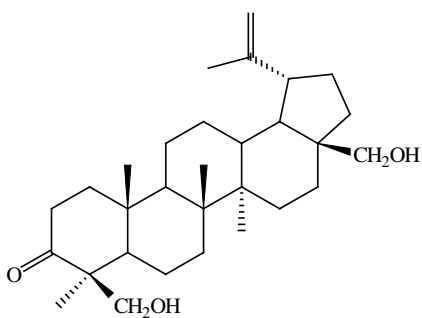
15



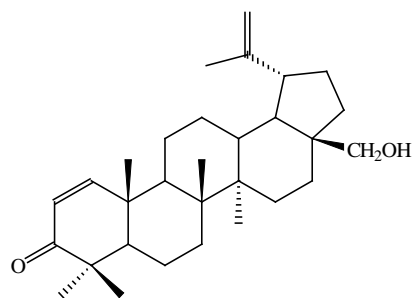
16



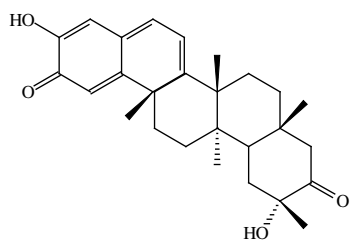
17



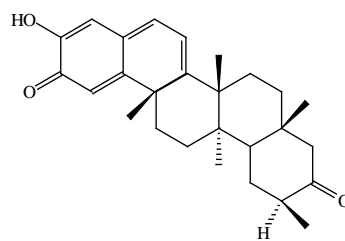
18



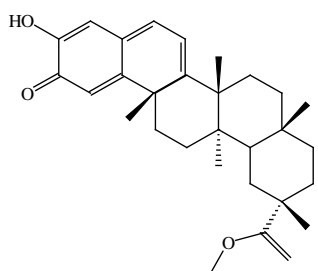
19



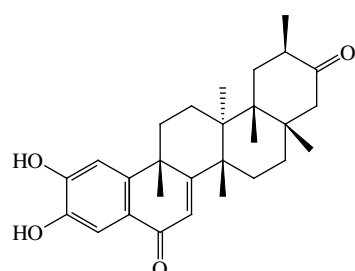
20



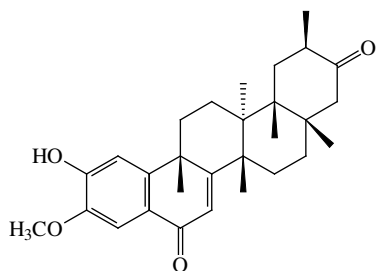
21



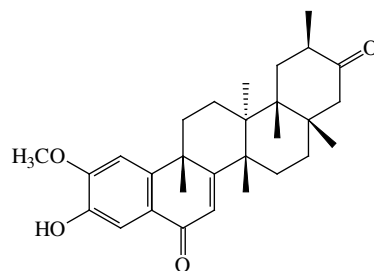
22



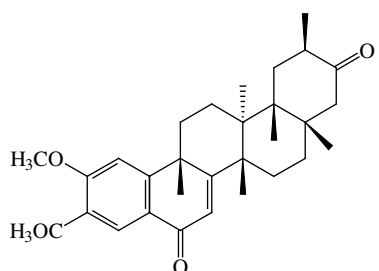
23



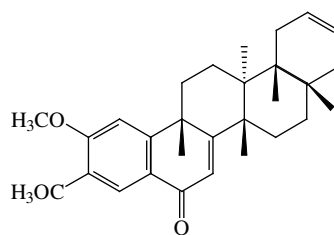
24



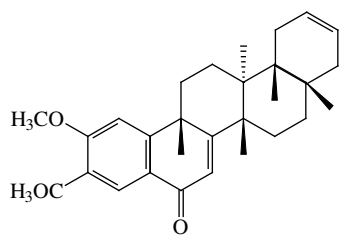
25



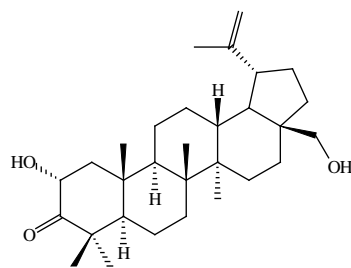
26



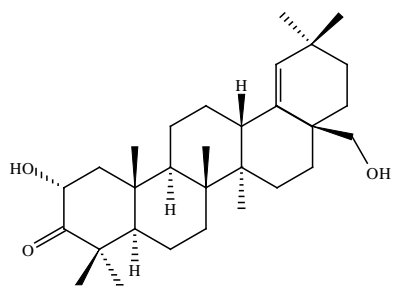
27



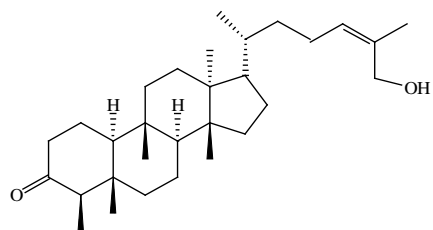
28



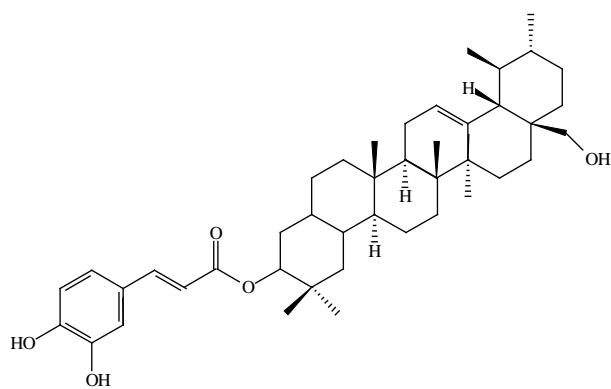
29



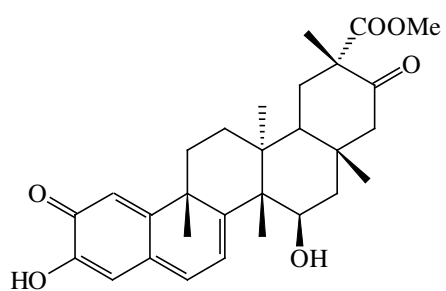
30



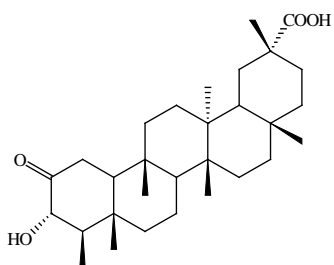
31



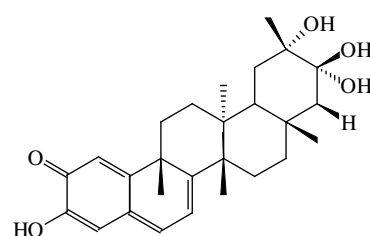
32



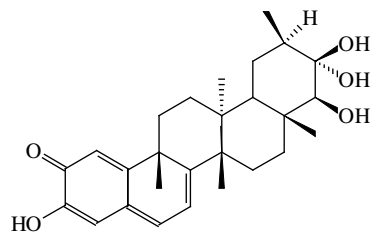
33



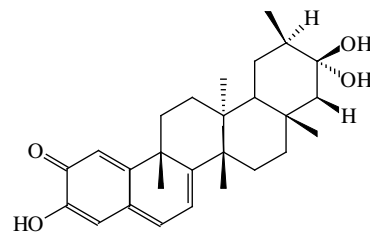
34



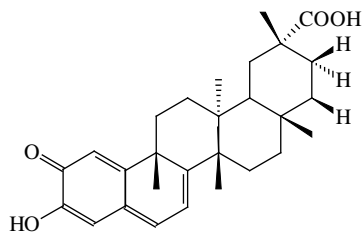
35



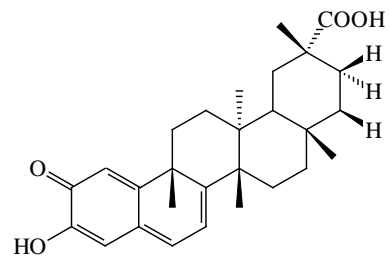
36



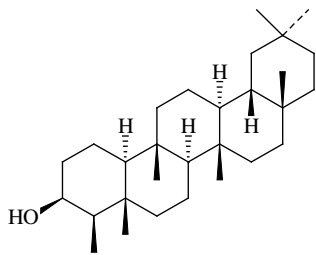
37



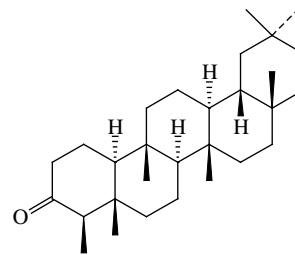
38



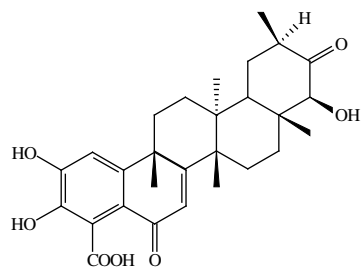
39



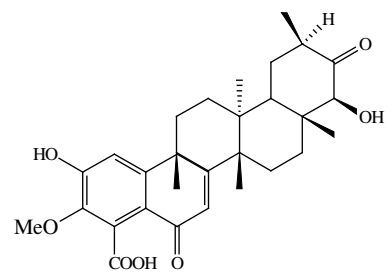
40



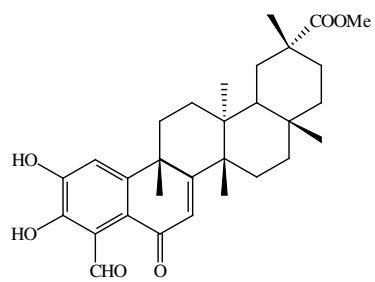
41



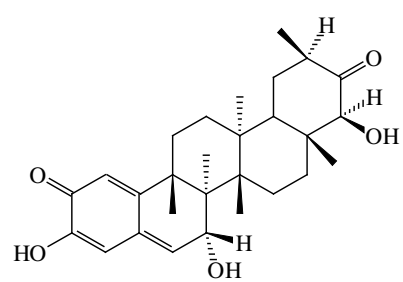
42



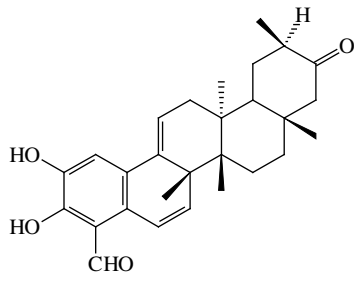
43



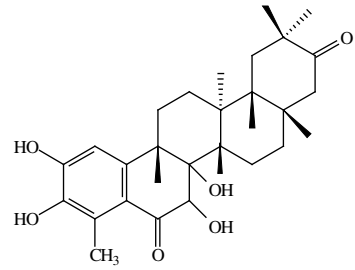
44



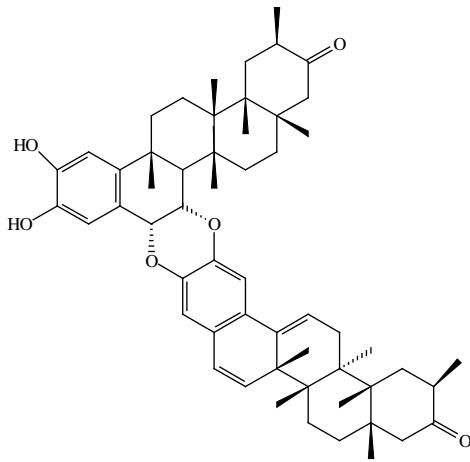
45



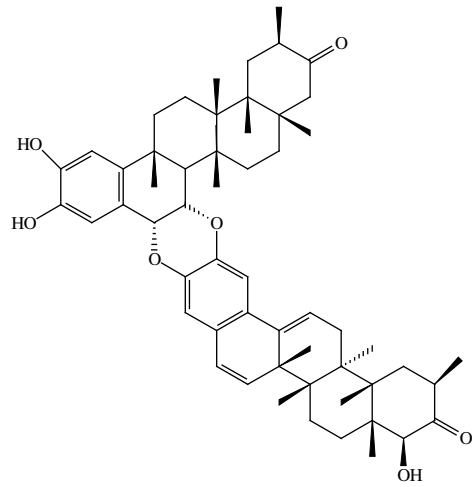
46



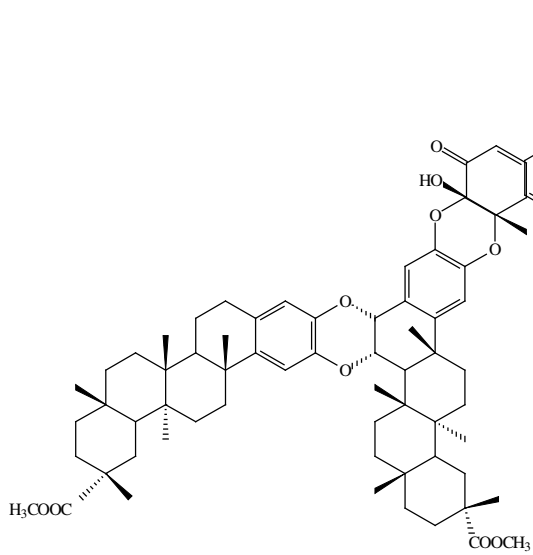
47



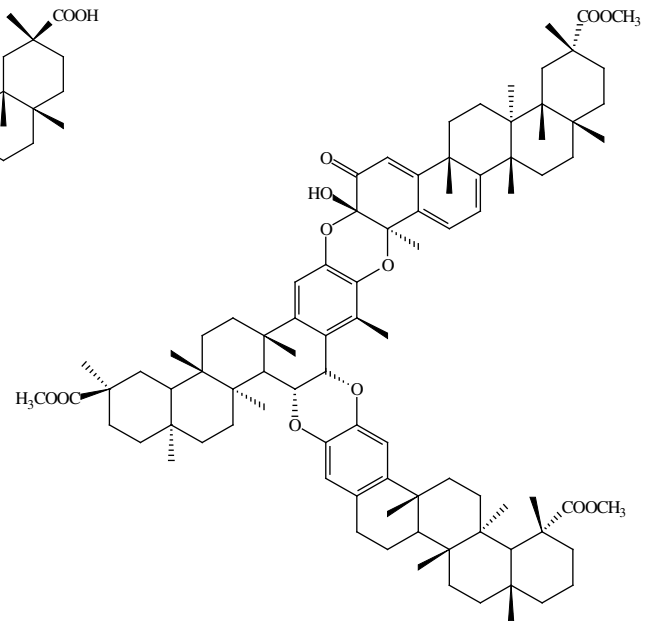
48



49

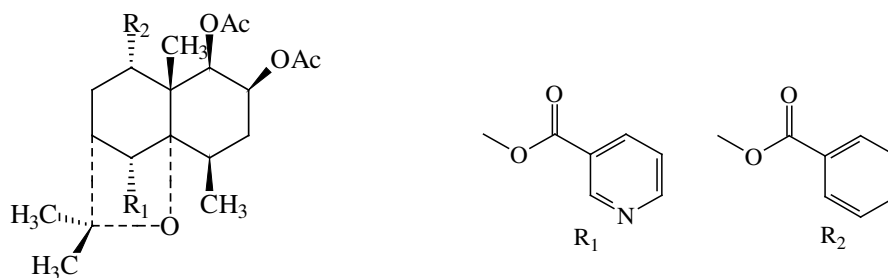


50



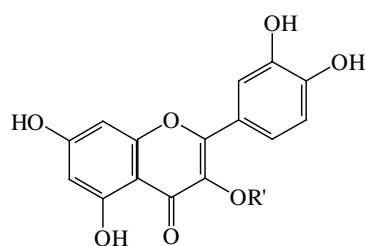
51

Alcalóides : Estudos relatam a ocorrência de alcalóides do tipo diidroagarofurano (**52**) em *M. heterophylla* (ORABI e cols., 2001).



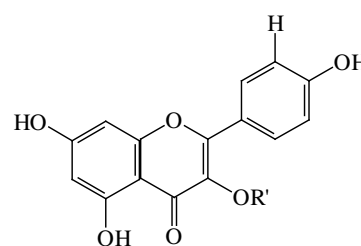
52

Flavonóides: Dados da literatura relatam a ocorrência de flavonóides quercetina (**53**), campeferol (**54**) e (**55**) nas folhas de *M. aquifolium* (VILEGAS e cols.,1999). Também relatam a análise quantitativa de flavonóides glicosilados por HPLC em *M. ilicifolia* e *M. aquifolium* (LEITE e cols., 2001).



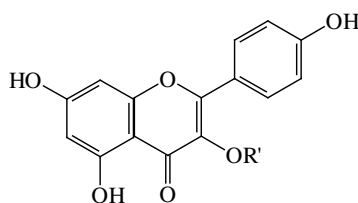
R'=Gli, Ram, Gli, Ram

53



R'=Gli, Ram, Gli, Ram

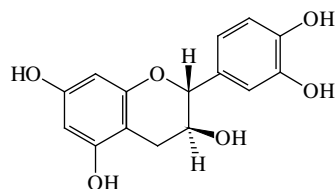
54



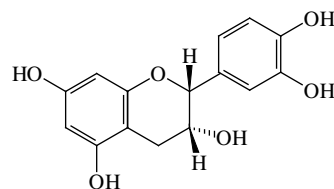
R'=Gli, Ram, Gli, Ram

55

Catequinas: Foi realizada validação do métodos de quantificação de (+) catequina e (-) epicatequina (**56** e **57**) do extrato aquoso das folhas de *M. ilicifolia* através deo método de HPLC (SOARES e cols., 2004).

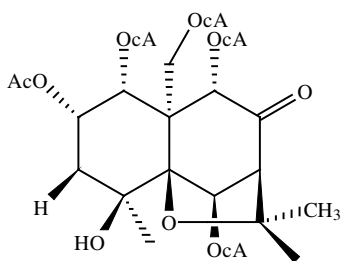


56

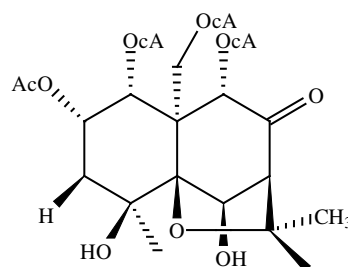


57

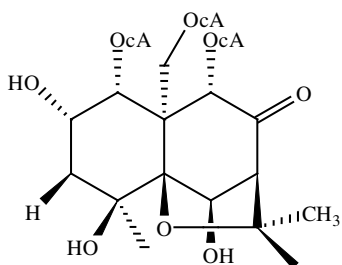
Sesquiterpenos: Foram isolados vários sesquiterpenos, sendo citados como exemplos os sesquiterpenos com atividade anti *Leishmania* tropical em *M. macrocarpa* (PÉREZ-VICTORIA e cols., 1999); *M. magellanica* e *M. chubutensis* (KENNEDY e cols., 2001); *M. cuzcoina* (CORTÉS-SELMA e cols., 2004). Dados da literatura relatam a ocorrência de dihidro- β -agarofurano sesquiterpenos (**58**, **59**, **60** e **61**) nas folhas de *M. chiapensis* (NÚNEZ e cols, 2003). Em *M.putterlickoides* (SCHANEBERG e cols., 2001) foram isolados diidroagarofurano sesquiterpenos alcaloidais. Já em *M. chiapensis* foi isolado alcalóides sesquiterpênicos piridínicos com atividade inseticida (NÚNEZ e cols., 2004).



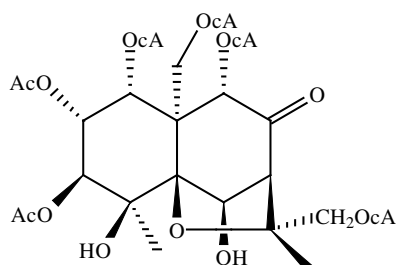
58



59

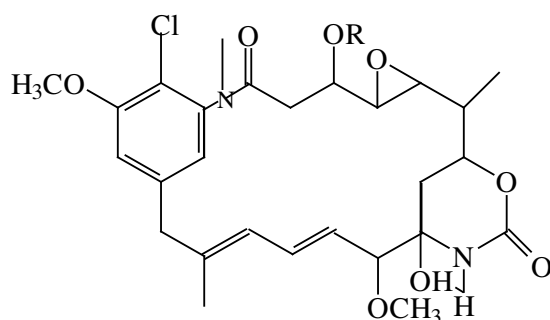


60



61

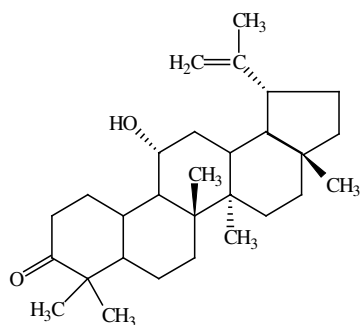
Macrolídeos : Estudos relatam a detecção de compostos macrolídeos do tipo Maitasinóides (**62**) que possui atividade citotóxica no gênero *Maytenus* (PULLEN e cols., 2003).



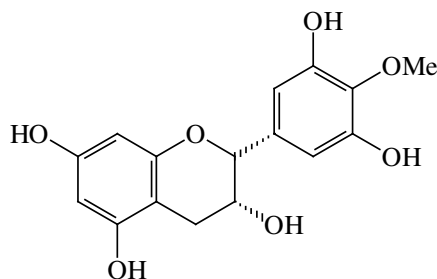
62

1.4 - Espécie *Maytenus rigida* Mart.

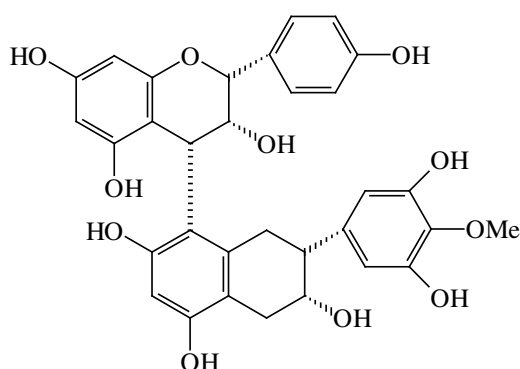
A espécie *Maytenus rigida* Mart, conhecida como Bom-homem, Bom-nome, Cabelo-de-negro, Casca-grossa e Pau-de-colher, é uma árvore de pequeno porte, com folhas curtamente pecioladas, inteiras, coreáceas, pequenas de cor branca, sua posição sistemática segundo Cronquist esta descrita no. Sua madeira é usada em pequenas carpintarias na produção de colher de pau na região Sul, Sudeste e Nordeste (BRAGA, 1960). A entrecasca do caule faz parte da composição do vinho de jurema utilizado nos cultos afro-indígenas. Quanto às propriedades terapêuticas, é empregada nos casos de dores em geral, infecções e inflamações. (MOTA e ALBUQUERQUE, 2002). Dados da literatura relatam a ocorrência do triterpeno da serie lupano, o 6 α -hidroxi-3-oxo-lupano-20(30)-eno (**63**), friedelano, n-alcanos e alcalóides (MARTA e cols., 1979; OLIVEIRA e col., 1999; OLIVEIRA e cols., 2000 e OLIVEIRA e cols., 2003). Estudos relatam também a influência do teor e composição química das ceras epicuticulares (OLIVEIRA e cols., 2000 & OLIVEIRA e cols., 2003). Dados da literatura relatam a ocorrência de alcalóides com atividade inseticida (DELLE MONACHE e cols., 1984), e (-)-4'-O-metil-epigallocatequina (**65**) e proantocianidinas (**65**) (DELLE MONACHE e cols., 1976).



63



64



65

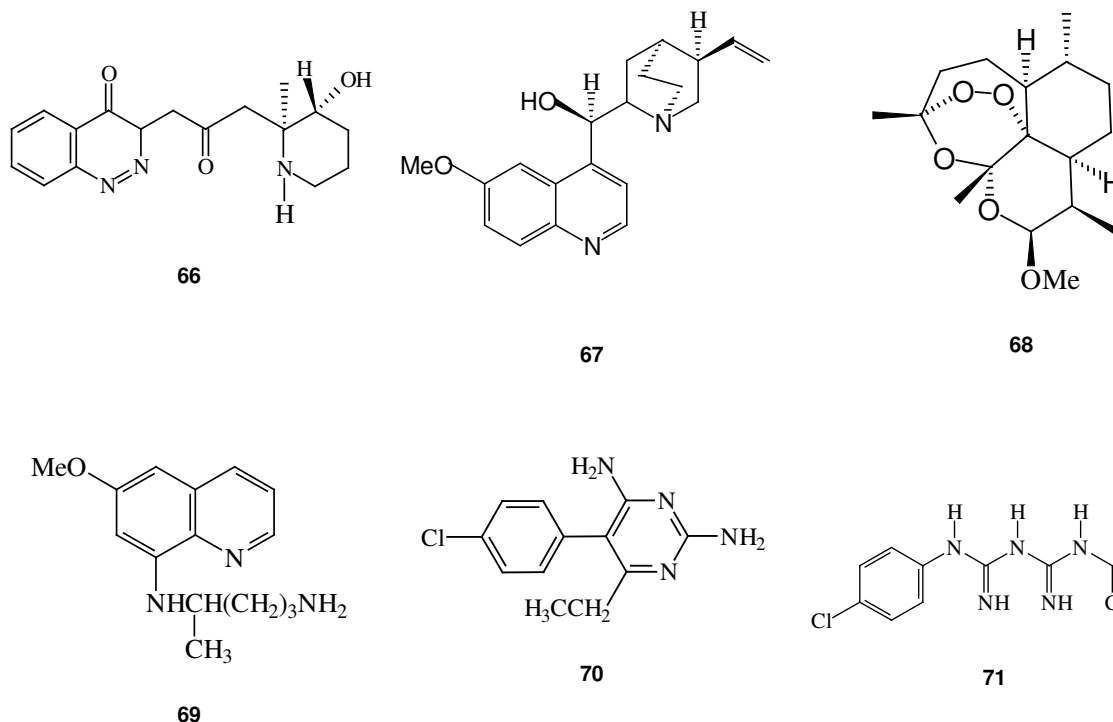
1.5 - Considerações Sobre a Malária

A malária, conhecida popularmente como “maleita”, “paludismo”, “sezão” ou “tremedeira” (FERREIRA,1982), é, atualmente, considerada uma das doenças parasitárias tropicais mais disseminadas no mundo. Segundo dados da Organização Mundial de Saúde (OMS), cerca de dois bilhões de pessoas vivem em áreas endêmicas, o que corresponde a cerca de 48 % da população mundial. Confinada nas regiões tropicais do globo terrestre, especialmente Ásia, África e América Latina, atualmente ocorre cerca de 1,5 a 2,0 milhões de obtos/ano, deste total 90% das mortes são registradas na África, atingindo principalmente pessoas que vivem em localidades onde o acesso a serviços de saúde é restrito ou quase inexistente (SVS, 2004; TILLYARD, 2004).

No Brasil, em meados dos anos 60 e 70, a malária estava confinada à Região Amazônica, onde foram registrados cerca de 30 mil casos/ano. Com o início da colonização desta região, e a migração desordenada da população da zona rural, houve um aumento do número de casos, sendo registrados nas décadas de 80 e 90 cerca de 600 mil casos/ano (FERREIRA, 1982). Em 2003, observa-se uma redução de 13,7% no número de casos de malária (208.718), comparando-se ao mesmo período do ano de 2002 (241.806). Neste período seis estados apresentaram redução do número de casos: Maranhão, Pará, Amapá, Roraima, Acre e Mato Grosso. Houve um desempenho negativo em três estados, os quais registraram aumento na incidência da doença: Amazonas, Tocantins e Rondônia, devido aos freqüentes desmatamentos realizados nestas regiões (UCHÔA, 2004).

Inúmeros programas de erradicação foram efetuados com o objetivo de controlar a doença. Geralmente a metodologia, utilizada como principal instrumento, baseava-se no uso de inseticidas de ação residual (DDT), bem como complementação com quimioterapia e aplicação de larvicidas. No entanto, o aparecimento de cepas resistentes, em especial do *P. falciparum*, aos fármacos disponíveis, tem sido um dos grandes obstáculos à quimioterapia da malária (FERREIRA, 1982). Isso provocou mudanças no combate à doença, que inclui a busca de novas drogas, utilizando-se como substrato principal as plantas (FERREIRA, 1982). A busca por quimioterápicos contra o parasito tem levado inúmeros grupos de pesquisa a buscar nas plantas novas drogas, que atuem inibindo ou controlando um ou mais estágios da doença ou que possam complementar a ação das drogas existentes. Como consequência dessas pesquisas, chegou-se à febrifugina (66), isolada de *Dichroa febrifuga*, a quinina (67) isolada de *Chinchona officinalles*, utilizada nos casos de resistência à cloroquina. A artemisinina, isolada de *Artemisia annua* é ativa nas formas mais graves da malária; ou ainda, drogas de origem sintética como o derivado artemeter (68), que atuam em algumas cepas de parasitas causadores de malária, resistentes aos derivados quinolínicos. (OLIVEIRA, 1995; REY, 1991 e SILVA, 2002). Alguns esquizonticidas sangüíneos, como a quinina e a cloroquina, inibem o desenvolvimento dos esquizontes; esquizonticidas teciduais, como a primaquina (69), que matam os esquizontes da fase exoeritrocitária; gametocitocidas, como a primaquina (69), pirimetamina (70) e

proguanila (**71**) impedem a formação dos oocistos e dos esporozoítas (PETERS, 1980; REY, 1991).



Entretanto, a alta taxa de resistência dos parasitas às drogas e outros fatores limitantes, mostrou a necessidade de pesquisas de novos agentes antimaláricos alternativos e complementar àqueles existentes.

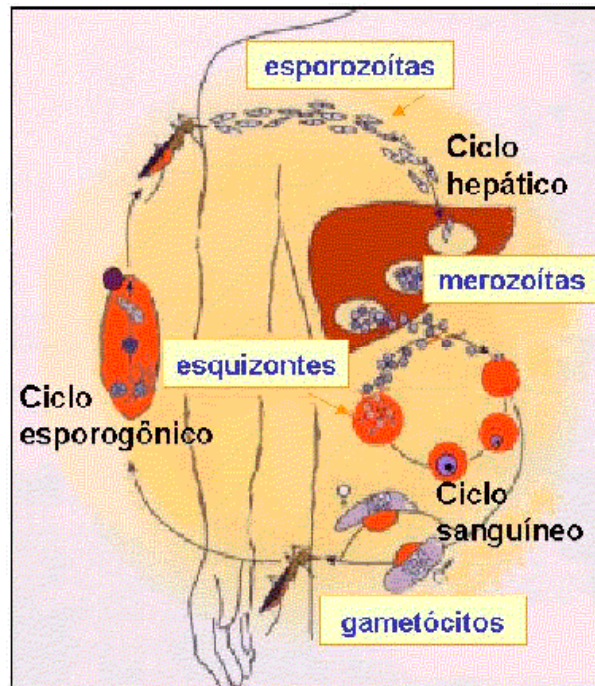
1.5.1 - Considerações Gerais Sobre os Agentes Transmissores

A malária humana é uma doença causada pela infecção de uma ou mais espécies de *Plasmodium*: *P. ovale*, *P. malariae*, *P. falciparum*, *P. vivax*, transmitida ao homem através da picada da fêmea de mosquitos do gênero *Anopheles* (FERREIRA., 1982; REY., 1991). Todos os transmissores de malária dos mamíferos são da ordem *Díptera*, da família *Culicidae* e do gênero *Anopheles*. Compreendem cerca de 400 espécies, das quais 100 são capazes de transmitir a doença. No Brasil, cinco espécies, são predominantes: *A. darlingi*, *A. aquasalis*, *A. albitarsis domesticus*, *A. cruzi* e *A. bellator*. Destas, a *A. darlingi* é a mais perigosa, sendo encontrada em reservatórios de água doce, terrenos altos e regiões subdesenvolvidas (REY, 1991; FERREIRA, 1982). O ciclo biológico do parasito tem início no homem onde ocorre a reprodução assexuada e se

completa nos invertebrados (mosquito) onde a reprodução sexuada se desenvolve (REY, 1991), (**Figura. 1, p. 23**). Os esporozoítos, formas infectantes do parasito, são inoculados no homem sadio através da saliva da fêmea *anofelina* infectante. Esses mosquitos, ao se alimentarem de indivíduos infectados, ingerem as formas sexuadas do parasito gametócitos que se reproduzem no interior do hospedeiro invertebrado, durante 8 a 35 dias, eliminando os esporozoítos, durante a picada. O período de incubação dura em média, de 7 a 14 dias para o *P. vivax* e de 30 para o *P. malariae*.

O ciclo assexuado do *Plasmodium falciparum* (**Figura 1, pág 23**) inicia-se quando a fêmea do mosquito *Anopheles* inocula, através da picada, saliva que contém os esporozoítos que são as formas infectantes do *Plasmodium*. Em seguida, essas formas infectantes entram na corrente sangüínea e deslocam-se até o fígado onde invadem suas células, dando inicio a fase conhecida como Tissular, onde amadurecem ate esquizontes teciduais. Esses parasitos são liberados para a corrente sangüínea, sob a forma de merozoitos e provocam uma infecção sintomática enquanto invadem e destroem hemácias. Entretanto, alguns parasitos permanecem em forma latente no fígado como *hipnozoitos*, esses são os parasitos que causam as recaídas da malária (nas infestações por *P. vivax* ou *P. ovale*). Uma vez na corrente sangüínea, os merozoitos, invadem as hemácias e amadurecem nos estágios assexuados (trofozoítos e esquizontes), os esquizontes destroem suas hemácias hospedeiras enquanto amadurecem, e liberam a geração seguinte de merozoítos que invadem hemácias não infectadas previamente. Dentro das hemácias alguns parasitos diferenciam-se em formas sexuadas (gametócitos). Esses, quando ingeridos por uma fêmea do mosquito *Anopheles*, amadurecem em gametas masculinos e femininos, que produzem zigotos. O mesmo invade o intestino do mosquito e desenvolve-se em um oocisto que amadurece, produzindo esporozoítos, estes migram para a glândula salivar do mosquito repetindo o ciclo (BRUCE-CHWATT, 1980; FERREIRA, 1982; REY, 1991; BENNET e PLUM, 1996).

Figura 1. Ciclo biológico do *Plasmodium falciparum*



1.6 - Considerações Sobre o Teste Antinociceptivo

Do ponto de vista evolutivo, a dor é um sinal de alerta do qual o sistema nervoso lança mão para sinalizar um processo de agressão ao organismo. Este alerta deflagra um conjunto de reações de adaptação de ordem psicológica, autônoma e motora, que visam afastar o organismo da fonte de agressão e preservar sua integridade. Esta reação se caracteriza na esfera emocional pela reação de fuga ou agressão (OLIVEIRA, 1979). Os processos inflamatórios, associadas ou não a dor e a febre, têm preocupado a humanidade há muitos séculos (SILVA, 1998). A utilização de infusões de plantas, notadamente de *Salix alba vulgares* (casca do salgueiro), como antipirético remonta ao século XVIII. Vale ressaltar que o controle da dor é uma das indicações mais importantes a que se determinam os medicamentos (SILVA, 1998).

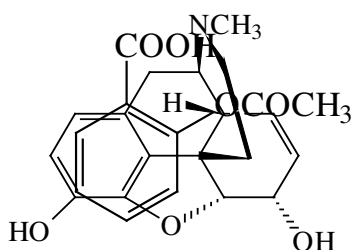
Embora seja um processo fisiológico importante ao indivíduo, pois o previne da ocorrência de patologias e/ou alterações que podem colocar em perigo sua sobrevivência, a “dor” constitui um dos seus primeiros flagelos. A dor pode ser

classificada de várias maneiras, e os agentes indutores do processo são também variados. Seu processo fisiológico, se desencadeia quando há danos teciduais decorrentes de um estímulo externo. Pode ser induzida por um estímulo mecânico, térmico, químico ou elétrico (LE BARRS e cols., 2001). Além disso, há dores cuja gênese é totalmente desconhecida, incluindo a dor psicogênica e neuropática, onde não se detecta especificamente um dano tecidual (BRESOLIN e FILHO 2003).

Os agentes analgésicos são classificados em quatro categorias principais: fármacos semelhantes à ação opióides da morfina (**72**) agentes anti-inflamatórios não esteróides semelhte à aspirina (**73**), anestésicos locais, os não opióides de ação central como exemplo a amitriptilina (**74**) (antidepressivo) e fármacos utilizados em afecções dolorosas específicas como carbamazepina (**75**) e ergotamina (**76**) (SILVA, 1998).

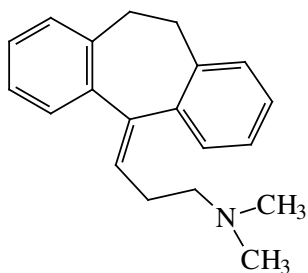
A obtenção de substâncias utilizadas para sana-la continua sendo um dos principais objetivos e alvos de pesquisa (BRESOLIN e FILHO 2003). Novas substâncias com propriedades anestésicas e/ou analgésicas com efeitos adversos menos graves que os atuais fármacos constitui fonte de pesquisa intensa (BRESOLIN e FILHO 2003).

Atualmente são poucos os estudos *in vivo* com extratos derivados de plantas no Brasil, considerando a enorme biodiversidade oferecida pela nossa flora (KELLOFF e cols., 2000). Desta forma a busca de novos quimioterápicos de origem natural na flora do estado de Alagoas bem como do nordeste brasileiro é importante tendo em vista a diversidade genética existente (MATOS, 1994).

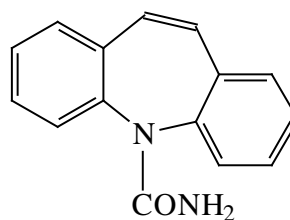


72

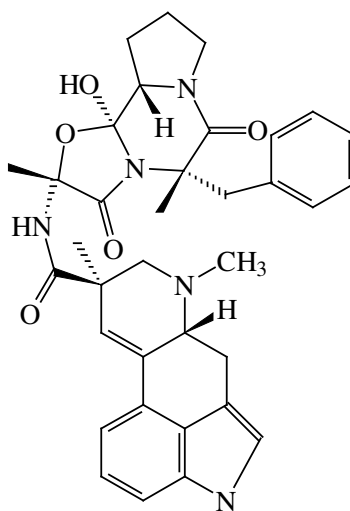
73



74



75



76

1.7 - Considerações Sobre o Teste Antiulcerogênico

Úlcera é o nome que se dá a uma lesão erosiva da mucosa gástrica ou intestinal (duodeno). Frequentemente, ambos os tipos são agrupados com o termo úlcera péptica. O tratamento para ambos é essencialmente o mesmo, os cuidados nutricionais são abordados em conjunto. Úlceras duodenais são mais comuns que as gástricas, sendo que os dois tipos ocorrem mais frequentemente em pessoas que são normalmente tensas e vivem em situações de stress. Desta forma muitos trabalhos têm sido propostos na tentativa de elucidar a etiologia das úlceras (HIRSCHOWITS e cols.,1995).

Muitas espécies de *Maytenus* são popularmente utilizadas na medicina tradicional brasileira, devido a sua atividade antiinflamatória e antiulcerogênica (AMADO, 2000; GONZALEZ, 2001; JORGE, 2004). Porém, o uso tradicional e a

comercialização desse gênero têm precedido à avaliação farmacológica e toxicológica em estudos pré-clínicos (SOUZA-FORMIGONI e cols., 1991; GONZALEZ e cols., 2001).

Trabalhos com infusão das folhas de *M. illicifolia*, comprovaram a ação protetora da mucosa gástrica (SOUZA-FORMIGONI, 1991). A presença de terpenos, flavonóides e taninos condensados justificam a atividade antiinflamatória e antiulcerogênica das espécies de *Maytenus* (GONZALEZ e cols., 1982; LEITE e cols., 2001; SHIROTA e cols., 1994).

1.8 - Considerações Sobre o Teste Antimicrobiano

O homem e os micróbios partilham uma vida comum e desde a pré-história os microorganismos provocam doenças no homem. Entretanto as causas destas doenças começaram a ser descobertas, a partir de 1878, graças aos trabalhos de Louis Pasteur e Robert Koch (BERSOLIN e FILHO 2003). O uso da terapia antimicrobiana é muito antiga com a utilização do uso da terra e plantas para o tratamento de várias lesões da pele. Vale ressaltar que no início do século XX, surgiram os primeiros quimioterápicos de ação sistêmica (BERSOLIN e FILHO 2003). Antes do desenvolvimento das sulfonamidas, foram introduzidos, na terapia diversos compostos desinfetantes e anti-sépticos formulados com arsênio, antimônio, bismuto e corantes. Devido a sua toxicidade, eles foram usados de forma tópica (BERSOLIN e FILHO 2003).

Substâncias antimicrobianas de origem nos vegetais superiores, não é um fato recente, a busca dessas substâncias teve grande impulso na década de 1930 (TAVARES, 1996) e gora um crescente interesse nessas substâncias. As plantas são possuidoras de várias vias metabólicas que dão origem a compostos, incluindo alcalóides, flavonóides, isoflavonóides, taninos, cumarinas, glicosídeos, terpenos, poliacetilenos além de óleos , é cujas funções, até pouco tempo eram desconhecidas. Os compostos isolados de plantas são substâncias com estruturas químicas bem diferenciadas dos antimicrobianos obtidos a partir de bactérias, leveduras e fungos. Tais produtos podem atuar no metabolismo intermediário ativando enzimas no nível nuclear ou ribossomal, provocando alterações nas membranas ou interferindo no metabolismo.

Portanto, a pesquisa para a obtenção de substâncias de origem vegetal com propriedades antimicrobianas com efeito adversos menos graves que os atuais fármacos constituem uma fonte de pesquisa intensa (BRESOLIN e FILHO 2003).

1.9 – Considerações Sobre Atividade Antioxidante

O reino vegetal constitui uma importante fonte de produtos naturais que diferem amplamente em suas propriedades biológicas e estruturas químicas e que possuem efeito antioxidante. Os antioxidantes têm sido associados com redução do risco de doenças crônicas tais como: doença vascular, câncer, diabetes, doença de Alzheimer e de Parkinson. (ARGOLO e cols., 2004; GUENDEZ, e cols., 2005; LIN e CHANG., 2005; LODYATO e cols., 2004; ZHANG; HAMAUZU, 2004).

Radicais livres são espécies químicas que possuem um ou mais elétrons desemparelhados na camada mais externa, o que os tornam extremamente instáveis e reativos em particular com moléculas essenciais nas membranas e ácidos nucleicos (WOJTASZEK e cols., 2003). Como principal fonte de radicais livres temos o metabolismo de oxigênio onde a oxidação é o processo mais importante que leva à decomposição de uma matéria-prima com posterior perda de sua função. Segundo BLAND (1998), a luz, o ar e o calor, os contaminantes do meio, os catalisadores, os metais pesados e o pH são os iniciantes deste tipo de reação.

Portanto oxigênio dá origem a diversas espécies reativas, estas são ânion superóxido ($\bullet\text{O}_2^-$), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o radical hidroxila ($\bullet\text{OH}$), os quais causam instabilidade química podendo acarretar danos à saúde. Desta forma os antioxidantes são substâncias que preservam os processos oxidativos; são capazes de inibir a deterioração oxidativa.

As plantas podem conter grande variedade de moléculas seqüestradoras de radicais livres, como compostos fenólicos das seguintes classes: flavonóides, quinonas, cumarinas, ligninas, taninos. Pesquisas relatam que muitos desses compostos possuem atividade antioxidantes, antimutagênicas, antimicrobianas, antidiabéticas e antiinflamatórias (REDDY e cols., 2003; CAI e cols., 2004; SABU e cols, 2002;

SÁNCHEZ-MORENO e cols, 1998; SOLER-RIVAS e cols, 2000; SULTANOVA e cols, 2001).

Os flavonóides possuem alta reatividade que se expressa na sua afinidade com polímeros biológicos e sua capacidade de seqüestrar radicais livres. Estudos relatam, também, a influência de produtos naturais como antioxidantes e agentes antiinflamatórios (ARGOLO e cols., 2004; GUENDEZ e cols., 2005; VILEGAS e cols., 1999; SOARES e cols., 2004).

CATÍTULO II

EXPERIMENTAL

2 - Experimental

2.1 - Reagente, Solventes e Equipamentos

- Na preparação do extrato etanólico utilizou-se um recipiente de aço inoxidável do tipo percolador;
- Nas separações cromatográficas em coluna, utilizou-se como adsorvente sílica gel 60 G(70-230 mesh ASTM) da Merck (Alemanha). O comprimento e o diâmetro das colunas utilizadas variam conforme as quantidades das amostras e de sílica gel a serem utilizadas. Nas permeações em gel, utilizou-se Sephadex LDH-20 da Pharmacia (Suécia);
- Nas análises comparativas através de cromatografia em camada delgada (CDC), utilizou-se gel de sílica 60 PF254 da Merck (Alemanha). A suspensão de sílica, obtida em água destilada, foi distribuída sobre placas de vidro através de um espalhador mecânico;
- A revelação das substâncias nas cromatoplasmas foi realizada através da exposição dessas a irradiação com luz no UV, em comprimentos de onda 254 e 366 nm, e os reveladores anisaldeído, sulfato cérico, solução de ácido fosfomolibidico e vapores de iodo;
- Os solventes utilizados foram destilados no próprio laboratório para as partições e filtrações. Porém, nas colunas cromatográficas e cristalizações foram utilizados solventes analiticamente puros;
- A concentração das soluções contendo grande volume foi efetuada em evaporador rotativo sob pressão reduzida, tipo Büchler; em quanto que as soluções contendo pequeno volume foram concentradas á temperatura ambiente em capela de exaustão;

- O critério de pureza adotado para as substâncias isoladas foi a obtenção de uma só mancha na placa cromatográfica, utilizando-se diferentes sistemas de eluentes e ponto de fusão;
- Os espectros no infravermelho foram registrados em espectrofotômetros Perkin-Elmer. Modelo FT 1600 (Parkém Elmer, Palo Alto-USA). A frequência de absorção foi medida em unidade de número de onda (cm^{-1});
- Os espectros de RMN foram registrados em espectrômetros das marcas Varian Mercury- 200 MHz e carbono-treze a 50 MHz, respectivamente. O referencial interno utilizado foi o TMS e/ou os sinais dos carbonos pertencentes às moléculas residuais não deuteradas dos solventes deuterados utilizados e os deslocamentos químicos foram expressos em escala de δ (delta).
- Os espectros de massas (EM), foram obtidos através de ionização por impacto de elétrons a 70 Ev.
- Solução de anisaldeído, foi preparada através da mistura de 3mL de anisaldeído com 150mL de ácido acético glacial, com uma solução de 6 mL de H_2SO_4 em 141 mL de água destilada.
- Solução de sulfato cérico, dissolveu-se 2,1 g de $\text{Ce}(\text{SO}_4)_2$ em 21 mL de H_2SO_4 com 50 mL de água destilada. Em seguida adiciona-se à solução de água destilada. Completando o volume da solução para 300 mL.
- Reagente de Dragendorff, foi preparado através da dissolução de 5g de subnitrito de bismuto em 50 mL de água, seguido da adição de 12mL de água e da adição de 12 ml de HCl. Em seguida, adicionou-se lentamente e sob agitação, 25g de iodeto de potássio. Após a dissolução, o volume foi completado com água destilada até obtenção de 100 mL de solução (Matos, 1997). Por sua vez o reagente de Dragendorff foi preparado em um balão de 100 mL pela adição de 25mL da solução do reagente de

Dragendorff com 18 mL de ácido acético glacial e completou-se o volume para 100 mL de água destilada (Matos, 1997).

2.2 - Coleta e Identificação do Material Vegetal

As folhas e entrecasca da planta *Maytenus rigida* Mart. (CELASTRACEAE), foram coletadas fora do período da floração, no povoado Capim Grosso – AL, próximo ao município de Canindé do São Francisco, no estado de Alagoas. Um espécime foi registrado no herbário da Universidade Federal de Sergipe, com o número 00767. As amostras foram colocadas em estufa (modelo MA-037) a 37° C, com renovação e circulação de ar por 48h até completa desidratação. A identificação botânica foi realizado pelo botânico. Dr. Carlos Dias, do Departamento de Biologia da Universidade Federal de Sergipe.

2.3 - Preparação dos Extratos

2.3.1 - Preparação do Extrato Alcoólico

O pó das folhas (460g) e entrecascas (4.546g) de *Maytenus rigida* Mart, foram submetidos, individualmente, à extração com etanol 90% em percolador de aço inoxidável durante cinco dias. Após concentração do solvente em evaporador rotativo sob pressão reduzida, obteve-se o extrato etanólico bruto das folhas (90,2g) e entrecasca (2461,9g). Os extratos etanólicos da entrecasca e das folhas foram individualmente suspensos em uma solução MeOH/H₂O (2:3) e extraídos exaustiva e sucessivamente com *n*-C₆H₁₄, CHCl₃ e AcOEt. Os extratos alcoólicos e suas fases obtidas, após a partição, foram secas e submetidas a ensaios preliminares para avaliar à atividade analgésica *in vivo*, antimalárica *in vivo* e *in vitro* e antimicrobiano *in vitro* (Figura 2 e 4 , p 31 e 32).

2.3.2 - Preparação do Extrato Aquoso

O pó das folhas (400g) e entrecascas (450g) foram submetidos, individualmente, à extração por decocção. Para cada 500g do material vegetal utilizou-se 1000 mL de

água destilada. Após filtração a vácuo o material foi liofilizado obtendo-se os extratos liofilizados das folhas e entrecasca. Estes foram submetidos a ensaios preliminares para avaliar a atividade analgésica *in vivo*, antimalárica *in vivo* e *in vitro* e antimicrobiano *in vitro* (Figura 3 e 4 , p 34 e 35).

2.3.3 - Partição em Fase Reversa

Pesou-se 1,9Kg do extrato alcoólico da entrecasca e incorporou-se em carvão ativo até que todo o extrato tomasse forma de pó. Após secagem completa (48 h) o material foi colocado em um funil de Buchner forrado com papel de filtro, uma camada de sílica (3 cm). Cobriu-se o material com outro papel de filtro. Logo em seguida este o material foi submetido a extração por partição em fase reversa em carvão ativo segundo gradiente decrescente de polaridade H₂O, EtOH:H₂O (1:1), EtOH, AcOEt e CHCl₃. Após a evaporação, a baixa pressão em aparelho rotatório, obteve-se 5 frações: Aquosa (620g), hidroalcoólica 1:1(545g), alcoólica (479g), acetato de etila (122g) e clorofórmio (82g) (Figura 2 , p33).

Figura 2. Esquema geral de partição fase-reversa com o extrato alcoólico da entrecasca de *Maytenus rigida*.

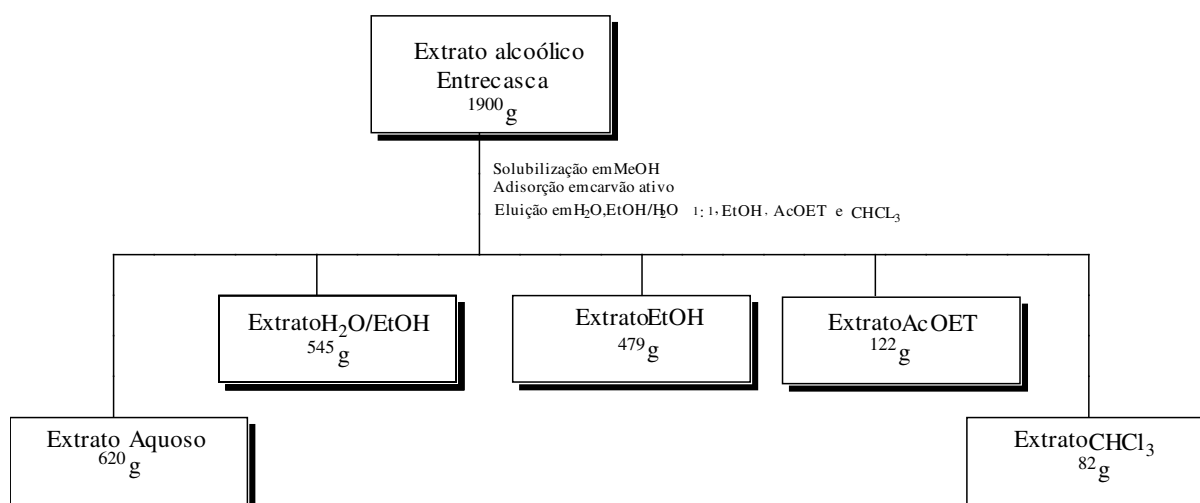


Figura 3. Esquema geral do procedimento experimental efetuado com a entrecasca de *Maytenus rigida*.

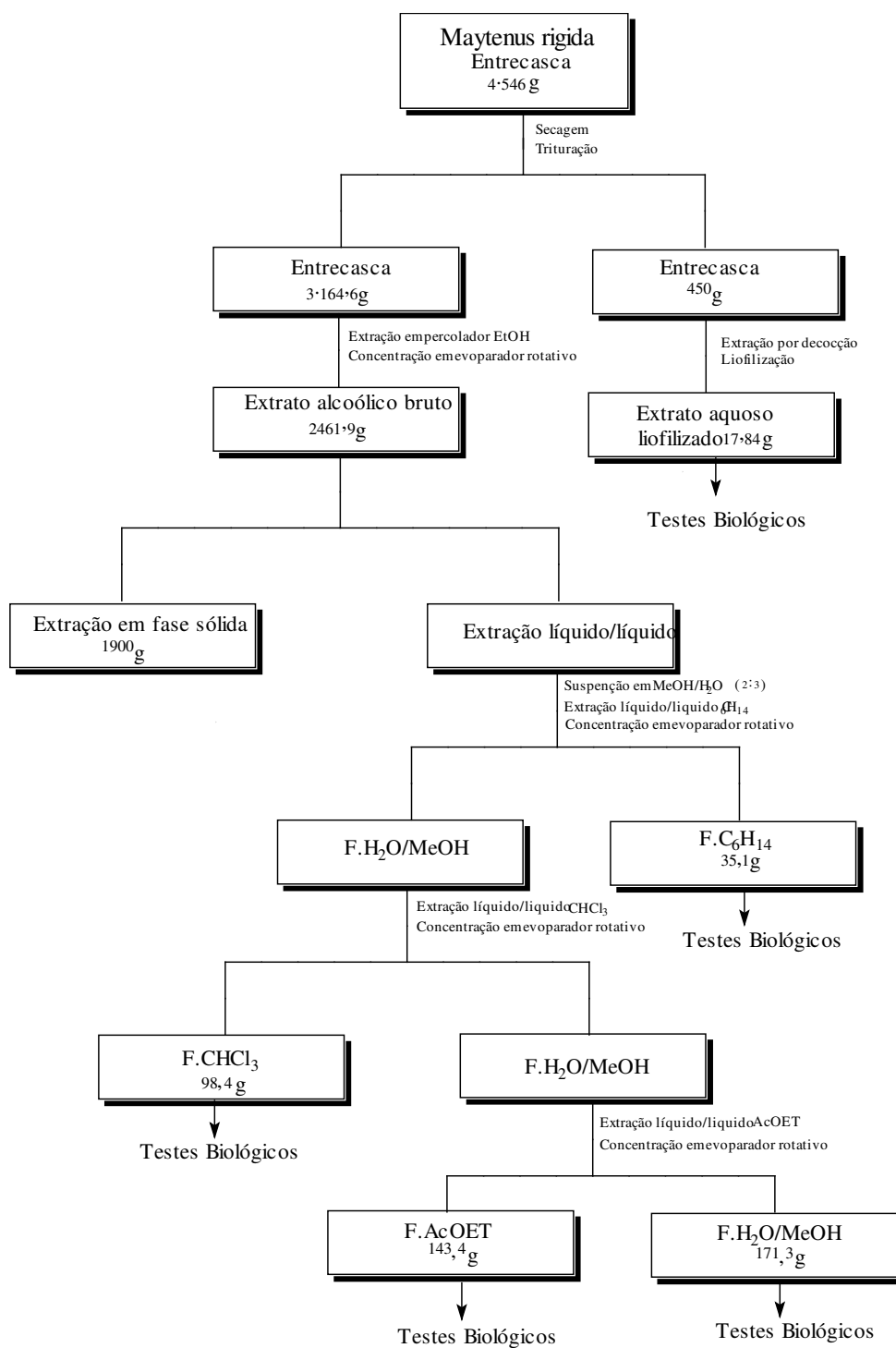
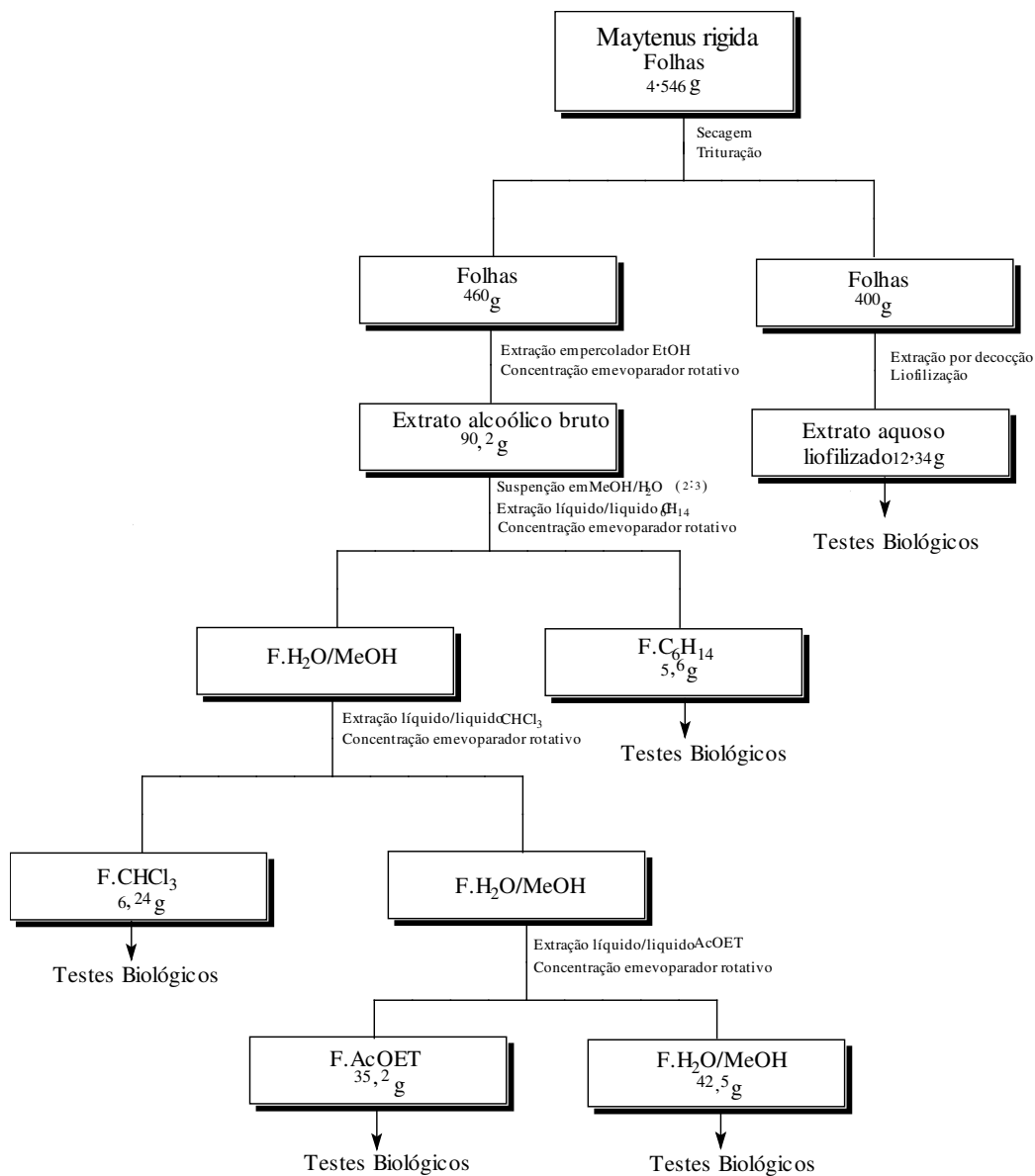


Figura 4. Esquema geral do procedimento experimental efetuado com as folhas de *Maytenus rigida*.



2.4 – Extração Àcido/Base

A fração {37-69}(1,65g) fase hexânica da entrecasca , foi dissolvida em 1mL de etanol e adicionou 5mL da solução aquosa a 5% de NaOH até pH 8 e deixada sob agitação à temperatura de 28°C por duas horas. A solução foi concentrada até a metade do volume em rotavapor e adicionada 30 mL de água. Em seguida, foi extraído com hexano (3x 25 mL) obtendo-se 975mg de compostos de caráter neutro. A fração aquosa básica foi acidificada com HCl 0,5 M até pH 1 e novamente extraída com hexano (3x 25 mL), obtendo-se 25mg de compostos de caráter ácido. A fase hexânica ácida após metilação e a fase neutra foram submetidas à análise qualitativa da composição química através de Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massas (CG/EM). Esta análise foi efetuada no Departamento de Química da Universidade Federal de Alagoas. As análises de CG/EM foram efetuadas em um equipamento Schimatzn Mat INCOS-XL, utilizando uma coluna capilar de sílica fundida DB-5 (300m x 0,25mm x 0,25 um); temperatura inicial/final de 60/250°C, com taxa de aumento de 3°C/minuto; injeção splitless(1uL, a 1:1000 em solução de hexano); fluxo de gás Hélio em velocidade linear de 32 cm/s (a 100°C) e temperatura do injetor de 220°C. Os espectros de massas (EM) foram obtidos por impacto eletrônico a 70eV, Temperatura da fonte de íon de 180°C e faixa de scan de 25-700u. As substâncias foram identificadas pela comparação entre o índice de retenção (IR) observado com os dos respectivos compostos armazenados em sistema de dados ou por comparação dos espectros de massas com aqueles de bibliotecas descritas na literatura (Adams, 1989; 1995; Jennings & Shibamoto, 1980). Os IRs foram calculados usando uma série homóloga de n-alcanos em coluna DB-5.

2.5 - Prospecção Fitoquímica

Os extratos da planta utilizada neste trabalho foram submetidos à prospecção fitoquímica, seguindo-se a descrição (MATOS, 1997) (**Figura 5 e 6 , p 40**). Os métodos utilizados nesta abordagem são apenas qualitativos, e a presença de um constituinte pode mascarar a cor indicativa do outro. Esta metodologia teve como objetivo detectar a ocorrência de diversos constituintes químicos presentes nos extratos das folhas e

entrecasca de *Maytenus rigida*, para os testes sete porções de 3-4mL de cada extrato dissolvidos em etanol, foram colocados em tubos de ensaio numerados de 1 a 7.

2.5.1 - Teste para Fenóis e Taninos

Nos tubos de ensaio de número 1, foram adicionadas três gotas de solução alcoólica de FeCl_3 1molL^{-1} . Agitou-se bem e observou-se qualquer variação de cor e/ou formação de precipitado escuro abundante. O resultado foi comparado com um teste em branco, usando-se água e FeCl_3 .

A coloração variando entre azul e vermelho é indicativo de fenóis. A formação de um precipitado azul escuro indica a presença de taninos pirogálicos (taninos hidrolisáveis) e de cor verde a presença de taninos flobabênicos (taninos condensados ou catêquicos).

A solução de cloreto férrico (FeCl_3) foi preparada adicionando-se 9g deste reagente em 50mL de água destilada contendo 2mL de ácido clorídrico 3molL^{-1} . Em seguida completou-se o volume para 100mL com etanol em um balão volumétrico. A solução de HCl 3molL^{-1} foi obtida através da adição de 33,3 mL do ácido concentrado em água destilada suficiente para 100mL de solução, em um balão volumétrico.

2.5.2 - Teste para Antocianinas, Antocianidinas e Flavonóides

Tomou-se os tubos numerados de 2 a 4. O tubo de número 2 foi acidulado a pH 3 com HCl 3molL^{-1} e os tubos 3 e 4 foram alcalinizados respectivamente a pH 8,5 e 11 com NaOH 1molL^{-1} . A observação de qualquer mudança da coloração da solução foi interpretada como mostrado a seguir:

Constituintes	COR		
	Acido pH=3	Alcalino pH=8,5	Alcalino pH=11
antocianinas e antocianidinas	Vermelha	Lilás	Azul-púrpura
flavonas, flavonóis e xantonas	-	-	Amarela
chalconas e auronas	Vermelha	-	Vermelho Púrpuro
Flavanonóis	-	-	Vermelho Laranja

Para se obter a solução de NaOH 1molL^{-1} dissolveu-se 4g deste reagente em água destilada para 100mL de solução em balão volumétrico.

2.5.3 - Teste para Leucoantocianidinas, Catequinas e Flavononas

Acidulou-se o tubo 5 por adição de HCl 3molL^{-1} até pH 1-3 e alcalinizou-se o tubo 6 com NaOH 1molL^{-1} até pH 11. Os tubos foram aquecidos cuidadosamente. Foi observada modificação na coloração, por comparação com os tubos correspondentes usados no teste anterior. A interpretação dos resultados foi feita como mostrado a seguir:

Constituintes	COR	
	Meio Ácido	Meio Alcalino
Leucoantocianidinas	Vermelha	-
catequinas (Taninos catéquicos)	Pardo-amarelada	-
Flavononas	-	Vermelho Laranja

2.5.4 - Teste para Flavonóis, Flavanonas, Flavanonóis e Xantonas

Nos tubos de número 7, foram adicionados alguns miligramas de magnésio granulado e 0,5 mL de HCl concentrado. O término da reação foi indicado pelo fim da efervescência. Observou-se por comparação a mudança na cor da mistura da reação nos tubos 5 e 7. O aparecimento ou intensificação da cor vermelha foi indicativo da presença de flavonóis, flavanonas, flavanonóis e/ou xantonas, livres ou seus heterosídeos.

2.5.5 - Teste para Esteróides e Triterpenóides Liebermann-Buchard

Adicionou-se 10mL de uma solução etanólica de cada extrato em béqueres e deixou-se secar em banho-maria. Extrauiu-se o resíduo seco de cada becker três vezes com porções de 1-2mL de CHCl_3 . Separou-se os extratos em tubos diferentes e colocou-se algumas gotas de CHCl_3 . Filtrou-se a solução clorofórmica em um pequeno funil fechado com uma bolinha de algodão, coberta com miligramas de Na_2SO_4 anidro,

para um tubo de ensaio bem seco. Adicionou-se 1 mL de anidrido acético e agitou-se suavemente. Adicionou-se cuidadosamente três gotas de H₂SO₄ concentrado. Agitou-se suavemente e observou-se o rápido desenvolvimento de cores. A coloração azul seguida da verde permanente é um indicativo da presença de esteróides livres. Coloração parda até vermelha indica triterpenóides pentacíclicos livres.

2.5.6 - Teste para Saponinas

Tomou-se os resíduos insolúveis em clorofórmio, separados no teste anterior, solubilizou-se em água destilada e filtrou-se a solução para um tubo de ensaio. Agitou-se fortemente o tubo com a solução, por dois a três minutos e observou-se a formação da espuma.

Uma espuma persistente e abundante (colarinho) indica a presença de saponinas.

2.5.7 - Teste para Alcalóides

Os extratos foram separados em tubos diferentes, solubilizados com metanol e submetidos à cromatografia em camada delgada. Após eluição, o cromatograma foi revelado com reagente de Dragendorff. O surgimento de manchas de cor alaranjada sugere a presença de alcalóides.

2.5.8 - Teste para Antraquinonas, Antronas e Cumarinas

Foram marcados os pontos com os extratos-teste em placas cromatográficas que foram eluídas em clorofórmio. As placas foram borrifadas com uma solução de hidróxido de potássio a 10% e observou-se a presença das cores indicativas em luz UV 365nm. A cor vermelha indica antraquinona, a amarela indica antrona e a azul indica coumarina.

Figura 5. Esquema geral do procedimento experimental efetuado para a prospecção fitoquímica dos extrato da entrecasca de *Maytenus rigida*.

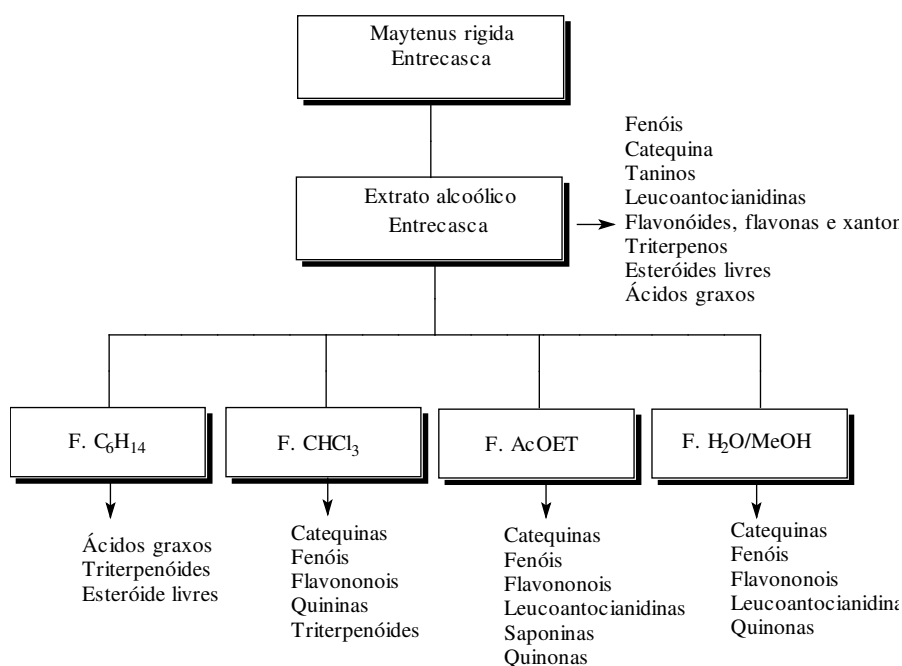
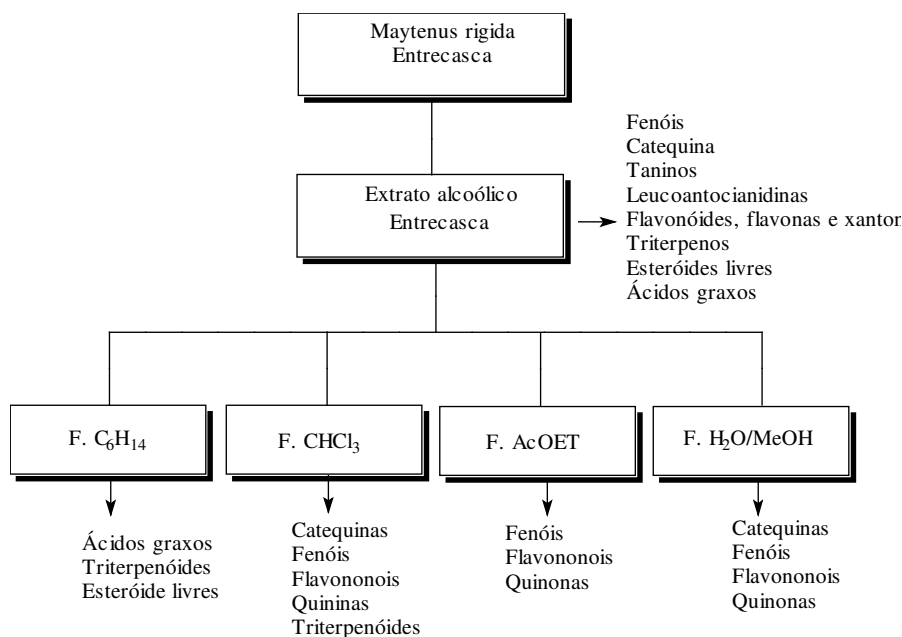


Figura 6. Esquema geral do procedimento experimental efetuado para a prospecção fitoquímica dos extrato das folhas de *Maytenus rigida*.

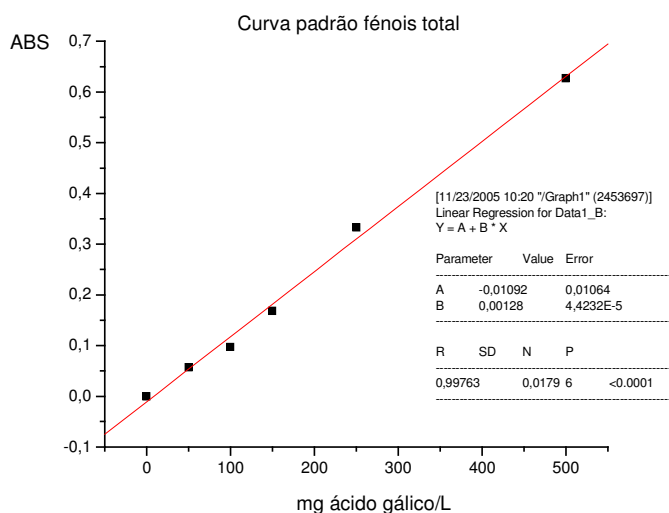


2.6 - Determinação de Compostos Polifenólicos pelo Método de Folin-Dennis

2.6.1 - Solução Estoque de Ácido Gálico: em um balão volumétrico de 100 mL dissolver 0,500g do ácido gálico seco em etanol frio e diluir com água até a marca de aferição do balão, tampar e estocar em refrigerador por duas semanas.

2.6.2 - Solução de Carbonato de Sódio: Dissolver 200 g de carbonato de sódio anidro em 800 mL de água e aquecer a até a ebulição. Depois da ebulição, adicionar alguns cristais de carbonato, filtrar e avolumar até 1000 mL.

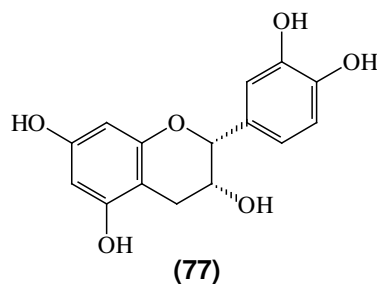
2.6.3 - Curva Padrão: Para preparar a curva padrão, adicionar 0 1, 2, 3, 5, e 10 mL da solução estoque do ácido gálico em um balão volumétrico de 100 mL e diluir com água. Estas soluções contêm 0, 50, 100, 150, 250 e 500 mg/L de ácido gálico. De cada solução para calibração adicionar amostras, ou branco, 20 µL em um cubeta, 1,58 mL de água e 100 µL do reagente Folin-Ciocalteu (Sigma) e agitar. Leve a solução até 20° C por duas horas e determine a absorbância da solução a 765 nm contra um branco, água, e plote um gráfico de absorbância x concentração.



2.7 - Atividade Antioxidante

2.7.1 - Ensaio Qualitativo da Atividade Antioxidante

Este teste foi baseado no método descrito por (Soler-Rivas, 2000). Inicialmente, as soluções estoques contendo 5 mg/ml de extrato etanólico, e as frações em hexano, em clorofórmio, em acetato de etila e hidroalcoólico foram preparados em metanol. A capacidade de captura de radical para DPPH foi testada usando placas de cromatografia de camada delgada (CCD) (Merck), gel de sílica 60 F₂₅₄ 20X10 cm alumina, com aplicação 2,0 µl da solução de cada extrato. As soluções estoques foram diluídas para evitar a coloração de fundo das amostras que possam mascarar a reação com o DPPH. Metanol puro foi utilizado como controle negativo e como controle positivo foi utilizado epicatequina (77), todos solubilizados em metanol (1,0 mg/ml). Foram aplicados 2,0 µl de cada extrato em triplicata e, depois de evaporados por um período de 2 a 3 min, as placas de cromatografia em camada delgada foram imersas em uma solução de DPPH a 0,4 mM, durante um período de 10 segundos. Após secagem à temperatura ambiente, observou-se o aparecimento de cor amarela para aqueles extratos que apresentaram atividade antioxidante.



2.7.2 - Ensaio Quantitativo da Atividade Antioxidante

Análise espectrofotométrica foi utilizada para determinar a concentração percentagem de inibição (PI) das amostras, que é um parâmetro utilizado para determinar a capacidade de captura do radical de amostras puras e extratos. O (PI) é a porcentagem de radical DPPH total (90nM) que reage com o antioxidante no estágio estacionário (20min).

Este ensaio quantitativo foi realizado usando um aparelho espectrofotômetro UV-VIS da Perkin-Elmer, modelo FT-IR-1600, lambda 2 de acordo com a metodologia de (Soler-Rivas, e cols 2000 e Moure e cols 2001).

Uma alíquota de 30,0 µl de cada solução teste foi misturada separadamente com solução metanólica do radical DPPH (90,0 µM) para um volume final de 1,5 mL. Um volume igual de metanol foi adicionado à cubeta controle.

O desaparecimento do radical DPPH foi monitorado pelo decréscimo na absorvância em 515 nm, que foi registrado nos tempos 0, 1, 2, 3, 4, e 5 min e posteriormente a cada 5 min até 30 min; durante este período, o radical esteve estável. A concentração do radical DPPH na mistura reacional foi calculada pela curva de calibração de acordo com a seguinte equação de regressão linear ($r= 0,999$); $A_{515nm} = 0,00518 + 0,00923[DPPH]$, onde a concentração de DPPH ([DPPH]) é expressa em mg/mL. A porcentagem de DPPH remanescente (%DPPH_{REM}) foi calculada de acordo com Brand-Williams *et al* (1995), como: $\%DPPH_{REM} = [DPPH]_t / [DPPH]_{t_0} \times 100$, onde: $[DPPH]_t$ é a absorvância que foi determinada durante o tempo de 1 a 30 min e $[DPPH]_{t_0}$ é a absorvância do controle no tempo zero, ou seja, sem antioxidante.

2.7.3- Ensaio Quantitativo

A avaliação quantitativa da atividade antioxidante dos extratos, foi realizado segundo a metodologia descrita por (ARGOLO e cols., 2004). Esta metodologia relata a determinação de parâmetros da atividade antioxidante, entre os quais a IP, que representa a concentração da amostra necessária para inibir a concentração do radical em 50%. De acordo com esta metodologia, a substância ou extrato cuja atividade antioxidante deseja-se avaliar, reage com o radical estável 2,2-difenil-1-picrilidrazina (DPPH) em solução metanólica. O consumo do radical foi monitorado pelo decréscimo da absorvância do radical DPPH em espectrofotômetro UV-VIS.

2.7.4 – Preparação da Curva Padrão para o DPPH

2.7.4.1 – Preparo da Solução Estoque e Diluição do DPPH

Foram preparados 25 mL de solução estoque de DPPH, na concentração de 40mg/mL mediante a solubilização do radical em metanol (grau PA). As diluições necessárias para a construção da curva de calibração do DPPH (20, 15, 10, 5, 2, 1 mg/mL) estas foram preparadas a partir da solução estoque.

2.7.4.2 – Construção da Curva de Calibração para o DPPH

A curva de calibração para o DPPH foi construída a partir de valores da absorbância UV (515nm), obtidas em cubetas de poliestireno e tendo como branco o metanol (grau PA). Para tanto, 1mL de cada solução nas concentrações de (20, 15, 10, 5, 2, 1 mg/mL) foram preparadas, as medidas de absorbância foram efetuadas em triplicata e em intervalos de um minuto entre cada leitura.

2.7.4.3 – Preparo das Amostras e do Padrão

As soluções foram preparadas na concentração de (400 ug/mL) e a partir de desta foram feitas diluições para cada extrato e frações de (20, 15, 10, 5, 2, 1 mg/mL) estas foram protegidas da luz e mantidas em refrigeração.

2.8 – Estudo Eletroquímico

A avaliação eletroquímica das substâncias isoladas dos extratos da entrecasca de *Maytenus rigida* Mart. Foi efetuado no laboratório de eletroquímica do Departamento de Química da Universidade Federal de Alagoas, em colaboração Dr^a. Marília Goulart Sant'Ana.

2.8.1 – Reagentes e Solventes

DMSO é um solvente polar que é largamente utilizado para compostos orgânicos, em eletroquímica é um dos solventes de escolha em se tratando de análises em meio

aprótico devido ao amplo domínio eletroquímico em que pode ser utilizado. O Dimetilsufóxido pode decompor-se na destilação sob pressão atmosférica, por esse motivo o caminho mais conveniente para a sua purificação é a secagem sob CaH_2 (hidreto de cálcio) anidro e destilação à pressão reduzida.

O Perclorato de tetrabutilamônio (TBAP), utilizado como eletrólito suporte nos estudos em meio aprótico, foi sintetizado e sua secagem procedida sob pressão reduzida.

2.8.2 - Voltametria Cíclica

Os estudos de voltametria cíclica foram realizados utilizando-se um sistema de três eletrodos – eletrodo de trabalho, auxiliar e de referência: carbono vítreo (BAS, área 7.065 mm^2), platina e $\text{Ag}/\text{AgCl}/\text{Cl}^-$ ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$) em um tubo com capilar de Luggin com vycor na extremidade, respectivamente. Nitrogênio foi utilizado em todas as análises (borbulhado na solução nos intervalos entre cada medida) para garantir a retirada de oxigênio dissolvido no meio. Em meio aprótico, utilizou-se, como eletrólito de suporte, DMSO e TBAP ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$). Os equipamentos utilizados foram o Potenciostato/Galvanostato mod. Autolab PGSTAT 20, interfaceado a microcomputador PCxt. e o pHmetro MARCONI, modelo MAPA200, série 0113992.

2.9 - Desenho Experimental do Teste Esquizotóxica Sanguínea

2.9.1 - Os Animais

Foram utilizados camundongos suíços, fêmeas pesando $20 \pm 2 \text{ g}$, provenientes do biotério central do Centro de Pesquisa Rener Rachou, FIOCRUZ/MG. Inicialmente foram inoculados e divididos de forma aleatória em grupos de cinco camundongos por gaiola. Foram incluídos grupos controles tratados com cloroquina 12 mg/Kg .

2.9.2– *Plasmodium berghei*

A cepa NK 65 do *P. berghei* foi originalmente recebida da Universidade de Nova Iorque (EUA) e mantida em camundongos suíços por passagem sanguínea semanal de animal para animal.

2.9.3 - Inoculação dos Camundongos

A coleta de sangue do camundongo doador foi realizada através de um pequeno corte na cauda. Para cada 3 gotas de sangue foi adicionado 2mL de PBS. Após a análise da parasitemia, o camundongo doador foi sangrado pelo plexo orbital com uma pipeta de Pasteur e o sangue foi recebido em tubo contendo 300mL de citrato de sódio 3,8%; 10uL deste sangue foi diluído em PBS para contagem das hemácias parasitadas em câmara de Neubauer. Desta forma o inóculo foi padronizado. Para a inoculação foi utilizado uma dose de 0,2 mL da solução (sangue/PBS).

Após o término da inoculação, uma fração do (sangue/PBS) foi submetida a contagem em câmara de Neubauer. Determinando desta forma que os camundongos foram infectados com 1×10^4 ou 1×10^5 hemácias parasitadas com *P. berghei*, via intraperitoneal..

2.9.4 – Avaliação da Atividade Antimalárica *in vivo*

Os extrato alcoólico das folhas, da entrecasca e suas frações e os extratos aquosos liofilizados das folhas e entrecasca foram submetidos a pesagem 0,06g e em seguida diluídos em água e álcool etílico a 70% na proporção de 50 uL :1150 uL respectivamente completando um volume final de 1,2 mL.

Para o teste *in vivo* os camundongos infectados com o *Plasmodium berghei* receberam diariamente suspensão dos referidos extratos oralmente na dose de 500mg/Kg durante quatro dias consecutivos e a parasitemia foi avaliada nos 5º e 7º dias. A mortalidade cumulativa foi determinada em relação aos grupos controles não tratados. Foram considerados ativos (A); quando a inibição foi de acima de 30%.

2.9.5– Avaliação da Atividade Antimalárica *in vitro*

Os extrato alcoólico das folhas, da entrecasca e suas frações e os extratos aquosos liofilizados das folhas e entrecasca foram testados contra o *P. falciparum* nas concentrações de 50 a 0,2 µg/mL. Neste teste, hemácias parasitadas com 1-2% de parasitemia e predomínio de formas jovens são ressuspendidas em meio completo (MPRI) e distribuídas em microplacas (96 poços) de poliestireno de fundo chato (Falcon®, EUA). Após 24 e 48 horas de incubação dos parasitos a 37° C em atmosfera de CO₂, o meio de cultura com ou sem extratos foi substituído em cada poço. Com 72 horas foram confeccionados esfregaços de todas as amostras as quais, após coloração com Giemsa, foram codificados e examinados ao microscópio ótico (1000 vezes). A atividade desses extratos foi expressa pela percentagem de redução da parasitemia em relação aos controles. Os experimentos foram realizados em duplicatas, como critério de atividade *in vitro*. Estabeleceu-se que os extratos que inibiram de 80 a 100% do crescimento foram considerados ativos (A); parcialmente ativos (PA) quando a inibição foi de 50 a 79% e inativas (I) quando a inibição foi menor que 50%, na concentração mais alta dos extratos testados.

2.10 – Testes Antinociceptivo e Antiinflamatório

2.10.1 - Os Animais

Nos testes antinociceptivo foram usados ratos Wistar (130 a 190g) de ambos os sexos. Os animais foram fornecidos pelo Biotério Central da Universidade Federal de Sergipe. Estes foram divididos em grupos de nove animais por gaiolas, e mantidos em caixas plásticas a temperatura ambiente (25±4°C) e providos de água e ração Purina à vontade. 24h antes do experimento os animais foram colocados em jejum, providos apenas de água.

2.10.2 - Vias de Administração

A administração utilizada por via oral (v.o)

2.10.3 - Teste de Retirada de Cauda

Os ratos foram divididos em grupos de 9 animais cada e após a realização de uma medida basal correspondente ao registro do primeiro tempo de latência , os animais com um tempo de latência fora do intervalo de 2 a 4s foram excluídos. Os animais selecionados tiveram suas respectivas caudas marcadas no segmento correspondente a segunda polegada a partir da extremidade distal . Este segmento foi colocado sobre a janela de infravermelho do Tail Flick 7360, e submetida a uma intensidade luminosa, sendo admitido um tempo máximo de corte de 10s e um tempo mínimo de latência de 2s. O tempo de latência foi mensurado imediatamente após a administração (tempo zero) dos extratos nas doses de 100 , 200 , 400mg/kg por via oral , nos intervalos de 30, 60, 90 e 120min . O mesmo protocolo foi seguido com o grupo controle , sendo que este recebeu apenas o veículo . O antagonista opióide naloxona (5mg/kg,i.p.) foi, posteriormente,utilizado em outros grupos (n=9) para verificar uma possível interação dos extratos e o sistema opióide.

2.10.4 - Atividade Antiinflamatória

A atividade antiinflamatória foi avaliada através do teste de edema de pata induzido por carragenina, os ratos foram divididos em grupos (n=8) e receberam injeção subcutânea de 0,1 mL de carragenina a 1% na região subplantar da pata direita para indução do edema. Uma hora antes da injeção, os animais foram pré-tratados com o extrato alcoólico da entrecasca, nas doses de 100, 200 e 400 mg/Kg, por via oral (v.o) e indometacina a 10mg/Kg. O volume da pata foi registrado após a administração de carragenina (tempo zero) em intervalos de 1, 2, 3 e 4 horas pelo método de deslocamento de água medido em pletismômetro (modelo 7150, Ugo Basile).

2.11 - Atividade Antiulcerogênica

2.11.1 - Animais

Foram utilizados ratos Wistar machos (140-190 g). Os animais foram mantidos em caixas plásticas com comida e água *ad libitum*, tendo sido submetidos à privação de ração durante as doze horas que precederam os experimentos.

2.11.2 - Efeito Antiulcerogênico.

Sessenta minutos antes da administração do agente ulcerogênico (indometacina, 100 mg/kg, p.o.), os animais (n = 7) foram tratados por via oral com a dose de 100 mg/kg dos extratos (aquoso e etanólico), das partições (hexânica, clorofórmica e hidroalcoólica) ou da substância isolada (UFAL 1). Seis horas após a administração da indometacina, cada animal foi sacrificado por deslocamento da coluna cervical, exsangüinado por ruptura da artéria carótida e o estômago foi retirado, aberto e imerso em formol a 10%. As úlceras formadas foram medidas em mm.

2.12 - Desenho Experimental da Atividade Antimicrobiana

Foi utilizado o método de Kirby-Bauer modificado (difusão ágar), foram produzidos pequenos poços no meio de cultura com capacidade de 50µL. Foram colocadas ponteiras estéreis sobre uma fina camada de, agar-ágar em placa de Petri. Em seguida, o microorganismo foi ressuspenso em meio agar Mueller-Hinton, a 45°C. O tubo de ensaio foi então vertido na placa de petri, que possuía ponteiras na posição vertical dispostas em sua superfície. Após 10 minutos as ponteiras foram retiradas e em cada poço foram colocados 40 µL de extratos teste e o poço central foi usado como controle (água –metanol 33%). As placas foram mantidas em estufa bacteriológica aquecida a 37°C, por 24 horas, a determinação da atividade antimicrobiana foi medida de acordo com o halo de inibição de crescimento em volta do poço. Estas foram medidas com halômetro. São consideradas ativas os extratos que apresentaram halos de inibição superior a 10mm.

2.12.1 - Amostra Bacteriana

As linhagens bacterianas usadas nos experimentos foram cedidas pelo Laboratório de Patologia Clínica da Santa Casa de Misericórdia de Maceió. São elas: *Staphylococcus aureus* (BAC -94), *Staphylococcus aureus* (BAC -97), *Staphylococcus aureus* (BAC -115), *Escherichia coli* (BAC -148), *Pseudomonas aeruginosa* (BAC -104), *Pseudomonas aeruginosa* (BAC -135), *Salmonella Typhi* (BAC -155), *Cândida albicans* (BAC -01), *Cândida krusei* (BAC -09), *Cândida tropicalis* (BAC -15) e *Escherichia coli* (BAC -148).

2.12.2 - Preparo das Amostras

Pesou-se 200mg de dada extrato e solubilizou em 1mL de H₂O/MeOH 33%

2.12.3 - Preparo dos Meios e Esterilização

Os meios de cultura BHI, ágar Mueller-Hinton, caldo nutriente e bacto-ágar foram preparados de acordo com o fabricante. As massas foram 37g, 38g, 10g e 10g por 1000 mL, respectivamente. Os meios foram esterilizados em autoclave a 121°C, durante 15 minutos.

2.13 - Separação e Purificação dos Constituintes Químicos

As frações ativas e parcialmente ativas após a realização dos testes da atividade anti-malária *in vivo* e *in vitro*, da atividade analgésica *in vivo*, da atividade antiulcerogênica *in vivo* e antimicrobiana *in vitro* foram submetidas a métodos de separação fitoquímica convencional (cromatografia em coluna de sílica gel, filtração em sílica gel, sephadex LH-20, cristalizações, cromatografia em camada delgada preparativa, cromatografia circular). As separações cromatográficas em coluna foram realizadas utilizando-se, como suporte, gel de sílica G 60 (70-230 mesh, MERCK). As análises efetuadas em cromatografia de camada delgada (CCD) foram realizadas com a utilização de gel de sílica PF₂₅₄ da MERCK. As cromatoplasmas foram preparadas por distribuição de uma suspensão de sílica em água destilada, sobre as placas de vidro,

com o auxílio de espalhador mecânico com espessura de 0,25 mm, secas ao ar livre e ativadas em estufa a 100 °C por uma hora.

2.13.1 - Separação dos Constituintes Químicos da Fase Hexânica da Entrecasca.

Uma parte do resíduo da fase em hexano (14,1g) foi submetido a fracionamento cromatográfico em coluna de sílica gel, utilizando como fase móvel hexano (C₆H₁₄), acetato de etila (AcOEt) e misturas destes solventes. Coletou-se um total de 234 frações com um volume médio de (5mL) cada. Essas frações, após análise comparativa através de cromatografia em camada delgada (CDC) e revelação com anisaldeído, sulfato cérico e/ou vapores de iodo, utilizando-se diferentes sistemas de eluentes, foram reunidas em sete grupos (**Quadro1, p51.**).

Quadro 1. Fracionamento cromatográfico da fase hexânica da entrecasca de *M. rigida*.

Grupos	Frações Reunidas	Condições de eluição	Massa	Substâncias Isoladas(g)
I	1 –105	C ₆ H ₁₄	1,00g	MRCH1 (30mg) MRCH2 (12mg) MRCH3 (18mg)
II	106-125	C ₆ H ₁₄ /AcOEt 1%	5,15g	MRCH4 (20mg) MRCH5 (21mg) MRCH6 (600mg) MRCH7 (20mg)
III	126-147	C ₆ H ₁₄ /AcOEt 2,5%	3,25g	MRCH8 (15mg) MRCH9 (13mg)
IV	148-170	C ₆ H ₁₄ /AcOEt 5%	1,10g	MRCH10 (26mg)
V	171-220	C ₆ H ₁₄ /AcOEt 10%	2,05g	
VI	221-228	C ₆ H ₁₄ /AcOEt 1:1	0,04g	
VII	229-234	AcOEt 100%	1,40g	

Grupo I

A fração {F-(1-105)} (1,00g) (**Quadro 1**), foi submetida a cromatografia em coluna de sílica gel. Nesta separação foram utilizado 3g de sílica, os eluentes foram C_6H_{14} , $C_6H_{14}/CHCl_3$ 1:1 e $CHCl_3$. Este procedimento experimental resultou na obtenção de três compostos: um sólido amorfo branca **MRCH1** (30mg), um material parafínico **MRCH2** (12mg) e um material parafínico **MRCH3** (18mg).

Grupo II

A fração {F-(106-125)} (5,15g) (**Quadro 1**), foi submetida a uma coluna cromatográfica, utilizando-se 110g de gel de sílica. este procedimento resultou em três frações (C_6H_{14} , $C_6H_{14}/CHCl_3$ 1:1 e $CHCl_3$). Estas foram submetidas individualmente a sucessivas recristalizações com EtOH seguindo-se de centrifugação (durante 30 minutos a 7000 rpm). Resultando na formação de um precipitado amorfo branca, codificado **MRCH4** (20mg), de um material sólido codificado como **MRCH5** (21mg) a partir da fração hexânica (C_6H_{14}). A fração $C_6H_{14}/CHCl_3$ 1:1 (4,98g) foi submetida a sucessivas recristalizações em MeOH e centrifugação (durante 30 minutos a 7000 rpm). Este procedimento resultou em duas amostras sendo um precipitado (2,30g) e um sobrenadante. O material sobrenadante (2,68g) foi submetido a fracionamento cromatográfico em coluna de gel de sílica nesta separação foram utilizados 40g de gel de sílica, utilizando como fase móvel hexano (C_6H_{14}) e clorofórmio ($CHCl_3$) e mistura destes. Foi obtido um precipitado constituído de uma mistura de dois compostos, quando analisados por CCD. Este material foi submetido a uma coluna filtrante resultando em dois sólidos um codificado como **MRCH6** (600 mg) e o segundo sólido cristalino foi codificado como **MRCH7** (20mg).

Grupo III

A fração {F-(126-147)} (3,25g) (**Quadro 1**), foi submetida a fracionamento cromatográfico em coluna de gel de sílica. Nesta separação foi utilizado 60g de gel de sílica. Como fase móvel foi utilizado hexano (C_6H_{14}), clorofórmio ($CHCl_3$) e mistura destes. Coletou-se um total de 89 frações, que foram combinados em doze grupos. O quarto grupo {F-(31-44)} (1,00g) após colunas cromatográficas filtrantes com gel de

sílica, resultou em um sólido de cor laranja codificado com **MRCH8** (15mg) e um sólido amorfo codificado como **MRCH9/UFAL 1** (13mg).

Grupo IV e V

A fração {F-(148-220)}(3,15g) (**Quadro 1**), foi submetido a uma coluna com gel de sílica. Nesta separação foi utilizado 60g de gel de sílica, resultando em um sólido cristalino que e após sucessivas recristalizações em EtOH e centrifugação (durante 30 minutos a 7000 rpm), foi codificado codificado como **MRCH10** (26mg).

Grupo VI e VII

A fração {F-(221-234)} (1,44g) (**Quadro 1**), não foi trabalhada visto que a análise comparativa, em diferentes sistemas de eluentes, através de cromatografia em camada delgada (CDC), revelou que este material era constituído de uma mistura complexa de compostos isolados nos grupos anteriores.

2.13.2 - Separação dos Constituintes Químicos da Fase Clorofórmica da Entrecasca.

Parte do resíduo da fase clorofórmica (73,87g) foi submetido à coluna filtrante em gel de sílica na proporção extrato/sílica (1:3). Coletou-se um total de sete frações com um volume médio de 1000 mL para cada fração. Obtendo-se os filtrados $C_6H_{14}/CHCl_3$ 1:1 (3,33g), $CHCl_3$ (3,40g), $CHCl_3/MeOH$ 5% (2,00g), $CHCl_3/MeOH$ 10% (12,18g), $CHCl_3/MeOH$ 20% (16,28g), $CHCl_3/MeOH$ 30% (20,56g) e $CHCl_3/MeOH$ 1: 1 (16,0g) (**Quadro 2, p 54**). Essas frações, foram submetidas à análise comparativa através de cromatografia em camada delgada (CDC) e reveladas com anisaldeído, sulfato cérico e/ou vapores de iodo.

Quadro 2. Fracionamento cromatográfico da fase clorofórmica da entrecasca de *Maytenus rígida*.

Grupos	Condições de eluição	Massa	Substâncias Isoladas(g)
I	C ₆ H ₁₄ /CHCl ₃ 1:1	3,330g	MRCC1/MRCC2/MRCC4/MRCC5
II	CHCl ₃	3,400g	MRCC3/MRCC6
III	CHCl ₃ /MeOH 5%	2,120g	MRCC7
IV	CHCl ₃ /MeOH 10%	12,18g	MRCC8
V	CHCl ₃ /MeOH 20%	16,28g	
VI	CHCl ₃ /MeOH 30%	20,56g	
VII	CHCl ₃ /MeOH 1:1	15,95g	

Grupo I

O material proveniente deste grupo (3,33g) (**Quadro 2**), foi submetido a colunas cromatográficas e sucessivas recristalizações em MeOH e centrifugação (durante 30 minutos a 7000 rpm). Este procedimento levou ao isolamento de um precipitado amorfo codificado como **MRCC1** (20mg) e um sobrenadante que foi submetido a sucessivas recristalizações em MeOH e centrifugação (durante 30 minutos a 7000 rpm), resultando na obtenção de um sólido amorfo que foi codificado como **MRCC2** (22mg) e um segundo sobrenadante (2,95g). Este resíduo foi submetido a fracionamento cromatográfico em coluna de gel de sílica (59g), utilizando-se como sistema de eluentes: (C₆H₁₄, C₆H₁₄/CHCl₃ 1:1, CHCl₃, CHCl₃/MeOH 2,5%, CHCl₃/MeOH 5%, CHCl₃/MeOH 10% e MeOH). Coletou-se um total de 101 frações, com um volume médio de 5mL cada. Essas frações, após análise comparativa através de cromatografia em camada delgada de sílica, utilizando-se diferentes sistemas de eluentes, foram reunidas em VII grupos. O grupo II foi submetido a sucessivas recristalizações em MeOH e centrifugação (durante 30 minutos a 7000 rpm) fornecendo um precipitado amorfo codificado **MRCC4** (23mg). O grupo III foi submetido ao mesmo procedimento resultando na obtenção de um sólido branco codificado como **MRCC5** (18mg).

Grupo II

O material proveniente deste grupo (3,40g) (**Quadro 2**), foi submetido a sucessivas recristalizações em MeOH e centrifugação (durante 30 minutos a 7000 rpm). Este procedimento resultou em um sólido amorfo codificado como **MRCC3** (25mg). O sobrenadante (3,38g), que foi submetido a fracionamento cromatográfico em coluna de gel de sílica com KOH (sílica/KOH 67,6g), utilizando como fase móvel hexano (C_6H_{14}) com adição de clorofórmio ($CHCl_3$) e mistura destes. Coletou-se um total de 157 frações com um volume médio de (5mL) cada. Essas frações, após análise comparativa através de cromatografia em camada delgada de sílica, utilizando-se diferentes sistemas de eluentes, foram reunidas em seis grupos. O material proveniente do segundo grupo {(fração 41-77)} (0,50g), após inúmeras tentativas de purificação em Sephadex LH-20, centrifugações e sucessivas recristalizações em MeOH resultou em um sólido amorfo codificado **MRCC6** (15mg). As frações dos grupos anteriores e posteriores (2,40g), após análise comparativa através de CCD e revelação com vapores de iodo, sulfato cérico ou anisaldeído foram arquivadas. São frações complexas e constituída de materiais previamente isolados.

Grupo III

O material proveniente deste grupo (2,12g) (**Quadro 2**), foi submetido a fracionamento cromatográfico em coluna de gel de sílica (42,4g de sílica), utilizando como fase móvel hexano (C_6H_{14}), clorofórmio ($CHCl_3$), metanol e mistura destes (C_6H_{14} , $C_6H_{14}/CHCl_3$ 1:1, $CHCl_3$, $CHCl_3/MeOH$ 1%, $CHCl_3/MeOH$ 2,5%, $CHCl_3/MeOH$ 5%, $CHCl_3/MeOH$ 10%, $CHCl_3/MeOH$ 1:1 e MeOH). Coletou-se um total de 212 frações com um volume médio de 5 mL, que foram reunidas em nove grupos. O primeiro grupo {(fração 1-8)} (50mg), após sucessivas recristalizações em MeOH e centrifugação (durante 30 minutos a 7000 rpm), forneceu um sólido amorfo codificado como **MRCC7** (12mg). As frações do grupo dois ao grupo nove (2,01g) foram arquivadas.

Grupo IV

O material proveniente deste grupo (12,18g) (**Quadro 2**), foi submetido à filtração em gel de sílica na proporção extrato/sílica (1:1), utilizando hexano (C_6H_{14}), clorofórmio

(CHCl₃) e acetato de etila (AcOEt) e misturas destes solventes. Obteve-se sete frações C₆H₁₄ (0,25g), CHCl₃(0,5g) e AcOEt (1,8g), AcOEt/MeOH 10% (1,12g), AcOEt/MeOH 20% (2,25g), AcOEt/MeOH 1:1 (3,0g) e MeOH (3,2g). Essas frações, após análise comparativa, em cromatografia em camada delgada de sílica, foram submetidas a purificação. O material proveniente da fração AcOEt/MeOH 20% (2,25g), foi submetido a fracionamento cromatográfico em coluna de gel sílica (45g de sílica), utilizando-se como fase móvel clorofórmio (CHCl₃), acetato de etila (AcOEt) e mistura destes. Coletou-se um total de 90 frações com um volume médio de 5 mL. Após análise cromatográfica por CCD foram agrupadas. O grupo da fração (36 a 69) com (2,2g) foi submetida a uma coluna filtrante na proporção extrato/sílica 1:3, fornecendo as frações clorofórmio (0,5g) e acetato de etila (1,7g). A fração acetato de etila foi submetida a uma cromatografia por exclusão (Sephadex LH-20), fornecendo 35 frações, que foram agrupadas em quatro frações sendo que a fração três (18 a 33) forneceu um material que por precipitação formou um sólido cristalino em forma de agulha codificado como **(MRCC8)**.

Grupo V, VI e VII

Esses grupos (**Quadro 2**), após análise comparativa através de cromatografia em camada delgada (CDC) e revelação com anisaldeído, sulfato cérico e vapores de iodo, foram descartadas. São frações muito complexas e cuja constituição continha material já isolado.

2.13.3 - Separação dos Constituintes Químicos da Fase Acetato de Etila da Entrecasca.

Parte do resíduo da fase em acetato de etila (133,13g) foi submetido a filtração por fase reversa usando-se carvão ativo, utilizando-se como eluente: H₂O, H₂O/EtOH 1:1, EtOH, EtOH/AcOEt 1:1, AcOEt e CHCl₃. Coletou-se um total de seis frações com um volume médio de 1000mL, cujos solventes foram evaporados em rotaevaporadores como mostrado (**Quadro 3, p57**).

Quadro 3. Filtração da fase em acetato de etila da entrecasca de *Maytenus rigida*.

Grupos	Condições de eluição	Massa (g)	Substâncias Isoladas
I	H ₂ O	2,55	
II	H ₂ O/EtOH 1:1	6,80	
III	EtOH	105,28	
IV	EtOH/AcOEt 1:1	14,50	MRCA3 (8mg)
V	AcOEt	2,80	MRCA2 (150 mg)
VI	CHCl ₃	1,20	MRCA1 (5mg) MRCA4 (20mg)

Grupo I, II e III

O material proveniente destes grupos (**Quadro 3**), após análise comparativa através de cromatografia em camada delgada (CDC), mostrou-se constituída de uma mistura complexa de compostos polares de difícil separação pelos métodos convencionais.

Grupo IV

O material proveniente deste grupo (14,50g) (**Quadro 3**), foi submetido a uma coluna filtrante em sílica desativada na proporção extrato/sílica (1:3), Coletou-se um total de sete frações com um volume médio de 1000 mL. CHCl₃ 100% (0,60g), AcOEt 100% (1,00g), AcOEt/MeOH 10% (1,2g), AcOEt /MeOH 20% (2,15g), AcOEt /MeOH 30% (1,8g), AcOEt/MeOH 1:1 (2,6g) e MeOH (5,10g). O material proveniente do grupo acetato de etila (1,00g) foi submetido cromatografia por exclusão (sephadex LDH-20), coletando um total de 50 frações. Obtivemos destas frações um material cristalino de cor branca que foi codificado como **MRCA3** (20mg).

Grupo V

O material deste grupo (2,80g) (**Quadro 3**), foi submetido a uma coluna filtrante em sílica desativada, na proporção extrato/sílica (1:3). Coletou-se um total de cinco frações com um volume médio de 500 mL que foram rotaevaporadas. Obtendo-se as seguintes frações CHCl₃/MeOH 5% (230mg), CHCl₃/MeOH 10% (510mg), CHCl₃/MeOH 20% (225mg), AcOEt (130mg) e MeOH (1685mg). Essas frações após análise comparativa através de cromatografia em camada delgada de sílica (CDC) e reveladas com sulfato cérico, foram então trabalhadas.

A fração CHCl₃/MeOH 10% (510mg), foi submetida a uma coluna de sílica desativada. Este procedimento resultou em quatro frações: CHCl₃/MeOH 5% (50mg), CHCl₃/MeOH 10% (360mg), CHCl₃/MeOH 20% (23mg) e CHCl₃/MeOH 1:1 (70mg). Após análise em cromatografia em camada delgada (CDC), a fração CHCl₃/MeOH 10% (360mg) foi submetida a uma cromatografia por exclusão molecular (Sephadex LDH-20), coletando-se um total de dez frações, Após análise comparativa através de cromatografia em camada delgada (CDC), estas foram agrupadas em duas frações, este procedimento resultou na obtenção de um material cristalino de cor rosa, este foi codificado como **MRCA2** (16mg) e uma mistura complexa contendo este sólido e outros compostos, que devido a pequena quantidade não foi trabalhada. O material foi arquivado.

Grupo VI

O material deste grupo (1,2g) (**Quadro 3**), foi submetido a uma cromatografia em sílica desativada, obtendo-se as frações em CHCl₃ (12mg), CHCl₃/MeOH 5% (59mg), CHCl₃/MeOH 10% (67mg), CHCl₃/MeOH 20% (155mg), CHCl₃/MeOH 1:1 (175mg) e MeOH (730mg), sendo que a fração CHCl₃/MeOH 10% (67mg) foi submetida a uma coluna cromatográfica em sílica desativada o que resultou na obtenção de um sólido cristalino que foi codificado como **MRCA1** (15mg) e um sólido amarelo que foi codificado como **MRCA4** (20mg) .

2.13.4 - Separação dos Constituintes Químicos da Fase Hidroalcoólica da Entrecasca.

Parte do resíduo hidroalcoólico (38,3g) foi submetido a uma coluna cromatografia em gel de sílica desativada, obtendo-se as frações: CHCl₃ (0,10g), CHCl₃/MeOH 5% (0,50g), CHCl₃/MeOH 10% (4,60g), CHCl₃/MeOH 20% (6,10g), AcOEt (12,0g) e MeOH (14,4g). Essas frações após análise comparativa através de cromatografia em camada delgada (CDC) foram submetidas a processo de isolamento e purificação (**Quadro 4, p59**).

Quadro 4. Filtração da fase hidroalcoólica da entrecasca de *Maytenus rigida*.

Grupos	Condições de eluição	Massa	Substâncias Isoladas(g)
I	CHCl ₃	0,10g	
II	CHCl ₃ /MeOH 5%	0,50g	
III	CHCl ₃ /MeOH 10%	4,60g	MRCHA1 (120mg)
IV	CHCl ₃ /MeOH 20%	6,10g	
V	AcOEt	12,0g	
VI	MeOH	14,4g	

Grupo I e II

O material proveniente destes grupos (**Quadro 4**), após análise comparativa através de cromatografia em camada delgada (CDC), mostrou-se constituída de uma mistura complexa de compostos polares de difícil separação.

Grupo III

O material deste grupo (4,6g) (**Quadro 4**), foi submetido a uma cromatografia por exclusão (sephadex LDH-20), coletando-se um total de 60 frações, com um volume médio de 3 mL. Essas frações, após análise comparativa através de cromatografia em camada delgada de sílica, utilizando-se como eluente AcOEt/MeOH 10%, foram

reunidas em IV grupos, sendo que no grupo II da fração 22 a 30 formou um sólido marrom que foi codificado **MRCHA1** (120mg).

Grupo IV e V

Os materiais das frações reunidas destes grupos (**Quadro 4**), após análise comparativa através de cromatografia em camada delgada de sílica com sistemas de eluentes diferentes mostraram-se constituídos de uma mistura dos componentes presentes no grupo anterior e por isto foi arquivada.

Grupo VI

Este grupo (**Quadro 4**) mostrou-se constituída de uma mistura complexa de compostos polares de difícil separação pelos métodos convencionais e por isto foi arquivada.

2.13.5 - Separação dos Constituintes Químicos da Fase Aquosa Liofilizada.

Parte do extrato aquoso liofilizado da entrecasca (15,84g), foi submetido a solubilização em metanol. Este procedimento levou a formação de um precipitado (2,82g) e um sobrenadante (13,02g), o material sobrenadante após concentração em rotaevaporador foi submetido a solubilização em metanol/acetona 1:1, obtendo um material precipitado (3,7g) e um sobrenadante (9,32). Em Cada fase verificou-se a possibilidade de isolamento e purificação de compostos através de cromatografia em camada delgada (CDC), (**Quadro 5, p 61**).

Quadro 5. Procedimento de separação dos constituintes da fase aquosa liofilizada da entrecasca de *Maytenus rigida*.

Grupos	Condições de eluição	Massa	Substâncias Isoladas(mg)
I	Precipitado	2,820g	
II	Sobrenadante	13,02g	MRCAQ1 (40mg) MRCAQ2 (150mg) MRCAQ3 (60mg) MRCAQ4 (200mg)

Gropo I

O material proveniente deste grupo (**Quadro 5**), após análise comparativa através de cromatografia em camada delgada (CDC), mostrou-se constituída de uma mistura complexa de compostos polares de difícil separação pelos métodos convencionais e foi arquivada.

Gropo II

O material deste grupo (11,31) (**Quadro 5**), foi submetido a uma coluna cromatográfica com sílica desativada (226,2g de sílica), utilizando-se a seguinte seqüência de solventes CHCl₃, AcOEt, AcOEt/MeOH 10%, AcOEt/MeOH 20%, AcOEt/MeOH 30% , AcOEt/MeOH 40% e MeOH. coletando-se um total de 103 frações, Essas após análise através de cromatografia em camada delgada (CDC), foram reunidas em vinte grupos, a fração {F-(37-68)} (0,5g) do grupo quatro, após sucessivas recristalizações em MeOH e submetida a uma cromatografia por exclusão molecular (Sephadex LDH-20) forneceu um sólido de cor marrom codificado como **MRCAQ1**(40mg). A fração {F-(94)}(0,58g) foi submetida a uma coluna cromatográfica

com sílica desativada na proporção extrato/sílica (1:3), fornecendo três sólidos de cor marrom codificados como **MRCAQ2** (150mg), **MRCA3** (60mg) e **MRCA4** (200mg).

2.13.6 - Separação dos Constituintes Químicos do Extrato Acetato de Etila da Partição em Fase Reversa

Parte do resíduo da fase acetato de etila (110g) foi submetido a coluna filtrante em gel de sílica na proporção extrato/sílica (1:3), Coletou-se um total de cinco frações com um volume médio de 1000 mL para cada fração. Obtendo-se os filtrados CHCl_3 (10,55g), AcOEt (22,6g), AcOEt/MeOH 10% (32,8g), AcOEt /MeOH 20% (12,18g), AcOEt /MeOH 1.1(38g) (**Quadro 6, p62**). Essas frações, foram submetidas a análise comparativa através de cromatografia em camada delgada (CDC) e reveladas com anisaldeído, sulfato cérico e/ou vapores de iodo.

Quadro 6. Procedimento de separação dos constituintes da fase em acetato de etila da partição em fase reversa.

Grupos	Condições de eluição	Massa	Substâncias Isoladas(g)
I	CHCl_3	10,55g	
II	AcOEt	22,6g	
III	AcOEt/MeOH 10%	32,8g	MRCCP1 (80mg)
IV	AcOEt/MeOH 20%	12,1g	
V	AcOEt/MeOH 1:1	38,0g	

Gropo III

A fração F- AcOEt/MeOH 10% (32,8g) (**Quadro 6**), esta fração foi submetida a sucessivas recristalizações em MeOH e centrifugação (durante 30 minutos a 7000 rpm)

forneceu um material que por precipitação formou um sólido cristalino em forma de agulha codificado como **(MRCCP1)** (80mg).

Gropo I, II, IV e V

Os materiais das frações destes grupos (**Quadro 6**), após análise comparativa através de cromatografia em camada delgada em sílica com sistemas de eluentes diferentes, mostraram-se constituídos misturas complexa, sendo então arquivadas para serem utilizadas posteriormente.

2.13.7 - Separação dos Constituintes Químicos do Extrato Clorofórmico da Partição em Fase Reversa

Parte do resíduo do extrato clorofórmico (75g) foi submetida a uma coluna cromatográfica em coluna de sílica gel. Nesta separação foi utilizado 150g de sílica, utilizando como fase móvel clorofórmio (CHCl_3), acetato de etila (AcOEt) e misturas destes solventes. Coletou-se um total de 112 frações com um volume médio de (5mL) cada. Essas frações, após análise comparativa através de cromatografia em camada delgada (CDC) e revelação com anisaldeído, sulfato cérico e/ou vapores de iodo, utilizando-se diferentes sistemas de eluentes, foram reunidas em cinco grupos (**Quadro 7, p64**).

Gropo II

A fração {F-(26-46)} (5,15g) (**Quadro 7**), foi submetida a uma coluna cromatográfica em coluna de sílica gel. Nesta separação foi utilizado 103g de sílica, os solventes foram CHCl_3 , $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ 5%, $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ 10%, $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ 20%, $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ 30%, $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ 1: 1 e MeOH. Este procedimento experimental resultou na obtenção de 100 frações com um volume médio de 5mL. A fração {F-(29-46)} (2g) foi submetida a sucessivas recristalizações em MeOH e centrifugação (durante 30 minutos a 7000 rpm) forneceu um material que por precipitação formou um sólido cristalino em forma de agulha codificado como **(MRCCP2)** (50mg) semelhante a substância codificada MRCCP1 isolada da fase acetato de etila. Esta fração foi submetida a sucessivas recristalizações em MeOH e centrifugação (durante 30 minutos

a 7000 rpm) forneceu um material que por precipitação formou um sólido cristalino em forma de agulha codificado como **(MRCCP1)** (80mg).

Grupo I, III, IV e V

Os materiais das frações destes grupos (**Quadro 7**), após análise comparativa através de cromatografia em camada delgada em sílica com sistemas de eluentes diferentes, mostraram-se constituídos misturas complexa, sendo então arquivadas para serem utilizadas posteriormente.

Quadro 7. Procedimento de separação dos constituintes da fase clorofórmica da partição em fase reversa.

Grupos	Frações Reunidas	Condições de eluição	Massa	Substâncias Isoladas(g)
I	1 -25	CHCl ₃	12,4g	
II	26 - 46	CHCl ₃ /AcOEt 10%	5,15g	MRCCP2 (55mg)
III	47 - 60	CHCl ₃ AcOEt 20%	35,9g	
IV	61 - 89	CHCl ₃ AcOEt 20%	7,02g	
V	90 - 112	AcOEt	5,2g	

2.14 - Dados Físicos e Espectrométricos das Substâncias Isoladas

2.14.1 – Substâncias Isoladas da Fração em Hexano

2.14.1.1– MRCH1

Apresenta-se como sólido cristalino, branco. pf. 271,1°C – 271,2°C. IV ν_{\max} (KBr; cm^{-1}): 3477, 2934, 2867, 1706, 1453, 1385, 1175 e 1020. **RMN ^1H** (600-MHz, CDCl_3 , δ , J em Hz): Tabela 7, pag. 150, **RMN 13** (150 MHz, CDCl_3 , δ): **Tabela 18, pag.105.**

2.14.1.2 – MRCH2

Apresenta-se como material parafínico pf. 51,3-51,6 °C. IV ν_{\max} (KBr; cm^{-1}): 2924, 2853, 1733, 1462, 1379, 1250, 1175, 1108, 984 e 722.

2.14.1.3 – MRCH3

Apresenta-se como material parafínico pf. 48,7-48,9 °C. IV ν_{\max} (KBr; cm^{-1}): 3425, 2923, 1716 e 1458.

2.14.1.4 - MRCH4

3 β -hidroxi-lup-20(29)-eno, sólido amorfo de cor branca, ponto de fusão 176-178°C (MeOH), **RMN ^1H** (200-MHz, CDCl_3 , δ , J em Hz): Tabela 7, pag. 60, **RMN 13** (50 MHz, CDCl_3 , δ): **Tabela 13, pag. 94.**

2.14.1.5 – MRCH5

Material sólido amorfo branco. pf. 176,8-177,2°C. **RMN ^1H** (600-MHz, CDCl_3 , δ , J em Hz): Tabela 7, pag. 150, **RMN 13** (150 MHz, CDCl_3 , δ): **Tabela 14, pag. 96.**

2.14.1.6 – MRCH6

Sólido amorfo branco pf. 257,6-257,9°C. IV ν_{\max} (KBr; cm^{-1}): 2928, 2867, 1715, 1459, 1458, 1388 e 921. **RMN ^1H** (600-MHz, CDCl_3 , δ , J em Hz): Tabela 16, pag. 101, **RMN 13** (150 MHz, CDCl_3 , δ): **Tabela 16, pag. 101.**

2.14.1.7- MRCH7

3 β -estigmast-5-en-3-ol, Cristais na forma de escama, de cor branco. pf. 134,2°C – 135,6 °C (MeOH), **RMN ^1H** (400-MHz, CDCl_3 , δ , J em Hz): Tabela 6, pag. 59., **RMN 13** (100 MHz, CDCl_3 , δ): **Tabela 12, pag. 92.**

2.14.1.8- MRCH8

Sólido amorfo de cor laranja pf. 206,4-206,6°C. IV ν_{\max} (KBr; cm^{-1}): 3476, 2927, 1627, 1476, 1384, 1272, 1226, 1161 e 758.

2.14.1.9– MRCH9

Sólido cristalino, ponto de fusão 134,2°C – 135,6 °C (MeOH), **RMN ^1H** (200-MHz, CDCl_3 , δ , J em Hz): Tabela 14, pag. 96, **RMN 13** (50 MHz, CDCl_3 , δ): **Tabela 7, pag. 61.**

2.14.1.10- MRCH10

Sólido amorfo de cor branca pf. 257,6-257,9°C. IV ν_{\max} (KBr; cm^{-1}): 2928, 2867, 1713, 1459, 1387, 1189, 1074 e 921.

2.14.2 – Moléculas Isoladas da Fração em Clorofórmio

2.14.2.1– MRCC1/ MRCC2/MRCC3/MRCC4/MRCC5/MRCC6/MRCC7

Sólido amorfo branca pf. 231,2-231,8°C. IV ν_{\max} (KBr; cm^{-1}): 3320, 2936, 1651, 1450, 1383, 1187, 1047, 911 e 653.

2.14.2.2 – MRCC8/MRCA2

4'-metilepialatocatequina , Sólido cristalino em forma de agulha de cor marrom claro. pf. 149,5-149,8 °C. IV ν_{\max} (KBr; cm^{-1}): 3359, 2361, 1625, 1514, 1464, 1376, 1322, 1279, 1195, 1145, 1091, 1063, 1011, 986, 877, 820, 756, 715, 664 e 526. difração de raios X (KappaCCD da Enraf-Nonius com detector de área). (MeOH), **RMN ^1H** (200 MHz, CDCl_3 , δ , J em Hz): **Tabela 9, pag. 88**, **RMN ^{13}C** (50 MHz, CDCl_3 , δ): **Tabela 9, pag. 88**.

2.14.3 – Moléculas Isoladas da Fração em Acetato de Etila

2.14.3.1 – MRCA1

Material cristalino de cor rosa pf. 146,2-146,7°C. IV ν_{\max} (KBr; cm^{-1}): 3202, 1625, 1513, 1464, 1374, 1278, 1196, 1145, 1091, 985 e 821. difração de raios X (KappaCCD da Enraf-Nonius com detector de área)

2.14.3.2 – MRCA3

Material cristalino de branca IV ν_{\max} (KBr; cm^{-1}): 3477, 3151, 1700, 1623, 1548, 1455, 1273, 1044 e 867. **RMN ^1H** (300 MHz, CDCl_3 , δ , J em Hz): Tabela 9, pag. 88, **RMN 13** : Tabela 15, pag. 99.

2.14.3.3 – MRCA4

Material cristalino em forma de agulhas de cor marrom pf. 149,1-149,8°C. IV ν_{\max} (KBr; cm^{-1}): 3195, 1624, 1513, 1464, 1375, 1278, 1195, 1145, 1091, 985, 821 e 665.

2.14.4 – Moléculas Isoladas da Fração Hidroalcoólica

2.14.4.1 – MRCHA1

Sólido amorfo de cor marrom pf. 146,1-146,3 °C. IV ν_{\max} (KBr; cm^{-1}): 3502, 3455, 3134, 2360, 1621, 1520, 1467, 1439, 1387, 1258, 1223, 1182, 1142, 1093 e 1044. **RMN ^1H** (600-MHz, CDCl_3 , δ , J em Hz): Tabela 21, pag. 113, **RMN ^{13}C** (150 MHz, CDCl_3 , δ): Tabela 21, pag. 113.

2.14.5 – Moléculas Isoladas do Extrato Aquoso

2.14.5.1 – MRCAQ1

Sólido amorfo de cor marrom pf. 229,4-229,5 °C. IV ν_{\max} (KBr; cm^{-1}): 3317, 1611, 1515, 1449, 1367, 1263, 1145, 1098, 1059, 987, 824, 790, 718.

2.14.5.2 - MRCAQ3

Sólido amorfo de cor marrom pf. 178,2-178,9 °C. O IV ν_{\max} (KBr; cm^{-1}): 3340, 1623, 1514, 1463, 1372, 1279, 1196, 1145, 1092, 1062, 1012, 987, 820, 717 e 663.

2.14.6 – Moléculas Isoladas do Extrato Clorofórmico e Acetato de Etila da Partição em Fase Reversa

2.14.6.1 – MRCCP1/MRCCP2

Sólido cristalino, difração de raios X (KappaCCD da Enraf-Nonius com detector de área). IV ν_{\max} (KBr; cm^{-1}): 3318, 2943, 2931, 2869, 1711, 1654, 1466, 1451, 1386, 1378, 1237, 1186, 1146, 1106, 1043, 1032, 1013, 985, 942, 912, 858, 746 e 650

2.15 - Estudo Cristalográfico

Um monocristal de dimensões 0,083 x 0,212 x 0,174 (mm) foi selecionado com auxílio de um microscópio de polarização e colado numa fibra de vidro e montada no eixo de uma cabeça goniométrica. Em seguida foi levado ao difratômetro automático para a coleta de dados por difração de raios X. No Laboratório de Cristalografia e Modelagem Molecular (LaboCriMM) do Departamento de Química da Universidade Federal de Alagoas (UFAL), que dispõe de um KappaCCD da Enraf-Nonius com detector de área.

A cabeça goniométrica com o monocristal foi colocada no difratômetro, com o eixo principal desta coincidindo com o eixo Φ , e ajustada para que o cristal girasse sobre si mesmo, mas sem a necessidade de orientação específica. Foram coletadas 2560 reflexões de 11 imagens do espaço recíproco que foram utilizadas para determinar a cela unitária reduzida, levando-se conseqüentemente à identificação do sistema cristalino.

As estruturas foram resolvidas pelos Métodos Diretos utilizando o programa SHELXS-97 [Sheldrick,1998]. O pacote de programas utilizado foi o WinGX [Farrugia,1999]. O refinamento do modelo inicial foi feito pelo método de mínimos quadrados com matriz completa e cálculos de Fourier diferença utilizando o sistema de programas SHELXL97 [Sheldrick, 1998] instalado. O processo de refinamento foi sempre acompanhado de verificação da geometria e confiabilidade química do modelo, através de cálculos de distâncias e ângulos interatômicos. O índice de verificação da adequação do sistema de pesos utilizado no refinamento foi o "godness of fit" (GOF).

CAPÍTULO III
RESULTADOS E DISCUSSÃO

3 - Resultados e Discussão

3.1 - Prospecção Fitoquímica

A prospecção fitoquímica teve como objetivo conhecer os constituintes e/ou avaliar sua presença nos extratos de plantas. Esta metodologia é importante quando não se dispõe de estudos químicos sobre a espécie de interesse. A análise fitoquímica preliminar indica os grupos de metabólitos secundários relevantes. Caso o interesse esteja restrito a uma classe específica de constituintes ou substâncias responsáveis por certa atividade biológica, a investigação será direcionada para o isolamento e elucidação estrutural das substâncias desejadas. O estudo fitoquímico do extrato alcoólico e das frações, obtidas por partição líquido-líquido do extrato alcoólico da entrecasca e folhas de *Maytenus rígida*, apresentou os seguintes grupos químicos: triterpenóides, esteróides, saponinas, quinonas, taninos, fenóis, catequinas, leucoantocianidinas, flavonóides, flavonóis, flavonas e xantonas (**Figura 5 e 6, p 40; Tabela 1, p 72**).

A mudança de coloração em equilíbrio ácido-base (**Figura 7, p 71.**), indicou a presença de esqueletos flavônicos, tais como: flavonona e/ou antocianinas e antocianidininas.

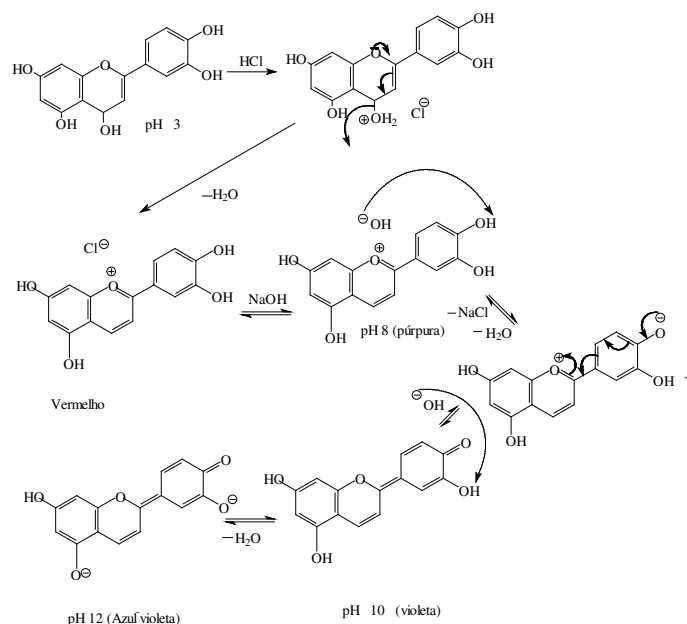


Figura 7. Variação de coloração em transições em meio ácido e básico

Tabela 1 - Prospecção fitoquímica dos extratos das folhas e entrecasca de *M. rigida*.

Constituintes químicos	Extratos											
	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	VX	X	XI	XII
Alcalóides	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Antocianidinas	-	-	-	+	+	-	+	+	-	-	-	+
Antocianinas	-	-	-	+	+	-	+	+	-	-	-	+
Ácidos fixos	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Auronas	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
Catequinas	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+
Chalconas	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
Esteróides	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+
Flavonois	-	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+
Flavononois	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+
Flavonóides	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+
Fenóis	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Heterosídeos cianogênicos	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
Leucoantocianidinas	-	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+
Quinonas	+	+	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+
Resinas	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Saponinas	+	+	-	+	-	+	+	+	-	+	+	+
Taninos	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
Triterpenos	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Xantonas	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-

* Folhas alcoólico (I); Aquoso liofilizado (II); Fase hexânica (III); Fase clorofórmico (IV); Fase acetato de etila (V) e Fase hidroalcoólico (VI).
Entrecasca alcoólico (VII); Aquoso liofilizado (VIII); Fase hexânica (VX); Fase clorofórmico (X); Fase acetato de etila (XI) e Fase hidroalcoólico (XII).

3.2 - Ensaio Biológicos

3.2.1 – Resultados dos Testes Anti-maláricos

Buscando novos antimaláricos com ação esquizotóxica sangüínea, de baixo custo, alta eficácia e baixa toxicidade, pesquisamos a ação do extrato alcoólico, aquoso liofilizados e frações obtidas por partição dos extratos das folhas e entrecasca de *Maytenus rigida* usada popularmente para tratar dores em geral, infecções e inflamações.

Os ensaios *in vivo* realizados revelaram redução significativa da parasitemia induzida pelo *P. berghei*. A redução observada foi de 80%, 43% e 33% (extrato alcoólico das folhas, extrato alcoólico da entrecasca e fase acetato de etila) respectivamente. Como critério de avaliação da atividade *in vivo*, estabeleceu-se que os extratos e/ou as frações que inibissem acima de 30% seriam consideradas ativas (**A**); 30% parcialmente ativas (**PA**) e abaixo de 30% são consideradas inativas (**I**). Portanto, os extratos alcoólico das folhas, alcoólico da entrecasca e acetato de etila foram considerados ativos, na dose testada de 500 mg/Kg (**Tabela 2, p 75**). Em relação à mortalidade, observou-se que não houve significância estatística entre as médias de parasitemia dos animais tratados e controle (**Quadro 8, p 75**). Vale ressaltar que a cloroquina apresenta uma mortalidade mais precoce. Normalmente a dose de cloroquina utilizada protege bem o animal e a mortalidade ocorre bem mais tarde e não no 5º dia de infecção (**Tabela 2, p 75**). A inibição *in vitro* do crescimento do *Plasmodium falciparum* BHz 26/86, após 72h de incubação foi avaliada utilizando oito amostras sendo seis provenientes da entrecasca de *Maytenus rigida* (aquoso liofilizado, alcoólico, hexânica, clorofórmica, acetato de etila e hidro alcoólico) e duas das folhas (aquoso das folhas e alcoólico das folhas) estas amostras foram testadas em diferentes concentrações (50; 16,6; 5,5; 1,8; 0,6; 0,2 e 0,06 µg/mL). Como critério de avaliação da atividade *in vitro*, estabeleceu-se que os extratos e/ou frações que inibissem 80 a 100% o crescimento dos parasitas seriam consideradas ativas (**A**); parcialmente ativas (**PA**) quando a inibição fosse de 50 a 79%; e inativas (**I**) quando a inibição fosse menor que 50%, na concentração mais alta da droga testada.

As amostras testadas da entrecasca de *Maytenus rigida* mostraram os seguintes resultados: o extrato aquoso das folhas foi considerado inativo para as doses 0,06; 0,2 e 0,6 µg/mL e parcialmente ativo nas doses de 1,8; 5,5; 16,6 e 50 µg/mL. O extrato aquoso da entrecasca foi considerado inativo em 0,06 e 0,2 µg/mL e parcialmente ativos nas doses de 0,6; 1,8; 5,5; 16,6 e 50 µg/mL. O extrato alcoólico das folhas foi considerado parcialmente ativo para as dose 0,06; 0,2; 0,6; 1,8 e 5,5 µg/mL e ativo nas doses de 16,6 e 50 µg/mL. O extrato alcoólico da entrecasca foi inativo nas doses de 0,06; 0,2; 0,6 e 1,8 µg/mL, parcialmente ativo em 5,5 e 16,6 µg/mL e considerado ativo na dose de 50 µg/mL. Os extratos provenientes da partição do extrato alcoólico da

entrecasca: os extratos em hexano, clorofórmio, acetato de etila e hidroalcoólico foram consideradas inativos nas doses de 0,06, 0,2 e 0,6 µg/mL, sendo que o extrato obtido em hexano, na dose de 0,6 µg/mL, foi considerado parcialmente ativo. Estes mesmos extratos foram considerados parcialmente ativos para as doses de 1,8 e 5,5 µg/mL e ativos em 16,6 e 50 µg/mL. Estes resultados permite-nos concluir que todos os extratos testados nas doses de 16,6 e 50 µg/mL foram consideradas ativas (**Tabela 3, p76**).

Dados da literatura para extratos de plantas relatam os seguintes resultados de redução de parasitemia: *Casaria elliptica* com 99% e 96% da na dose de 50µg/mL e 25µg/mL, *Ammannia multiflora* redução de 90% e 64% na dose de 50µg/mL e 25µg/mL, *Cocculus pendulus* redução de 94% e 87% nas doses de 50µg/mL e 25 µg/mL, *Ailantuths excelsa* redução de 98% e 97% nas doses de 50µg/mL e 25µg/mL (Simonsen et al.,2001). Comparando estes resultados com os obtidos de *Maytenus rigida*, na dose de 50µg/mL, podemos considerar os extratos em hexano, clorofórmio, acetato de etila e hidroalcoólico como tendo resultados de redução de parasitemia igual e/ou superior à literatura. Nos resultados *in vivo* o extrato alcoólico das folhas, extrato alcoólico da entrecasca e fase acetato de etila reduziu a parasitemia 80%, 43% e 33% repectivamente na dose de 500mg/Kg, dados da literatura relatam uma redução na dose de 500 mg/Kg de 42,5%, 39,1% para as espécies *Cassia semicordata* (Caesalpinaceae) e *Salzmannia nitida* (Rutaceae) respectivamente sendo estas consideradas ativas (DEHARO e cols., 2001). Comparando estes resultados com os obtidos dos extratos da entrecasca de *Maytenus rigida*, nos testes *in vitro* e *in vivo* podemos considerar esta espécie promissora para estudo da atividade antimalárica.

Tabela 2 - Porcentagem de redução de parasitemia em camundongos infectados com *P. berghei*, em relação ao grupo controle não tratado.

Grupos	Redução de parasitemia	
	5ºdia	7ºdia
I	0	0
II	0	0
III	80	85
IV	24	43
V	10	0
VI	0	0
VII	30	33
VIII	20	0
VX	100	100

Grupo I – Liofilizado Folhas, Grupo II – Liofilizado Entrecasca, Grupo III – Extrato Alcoólico das Folhas, Grupo IV – Extrato Alcoólico da Entrecasca, Grupo V – Fase Hexanica, Grupo VI – Fase Clorofórmica, Grupo VII – Fase Acetato de Etila, Grupo VIII – Fase Hidroalcoólica, Grupo VX - Cloroquina

Quadro 8 - Sobrevida de camundongos infectados com *p. berghei* e tratados com extratos obtidos da espécie *M. rigida* durante vinte e dois dias. a cloroquina foi utilizada em paralelo como antimalárico.

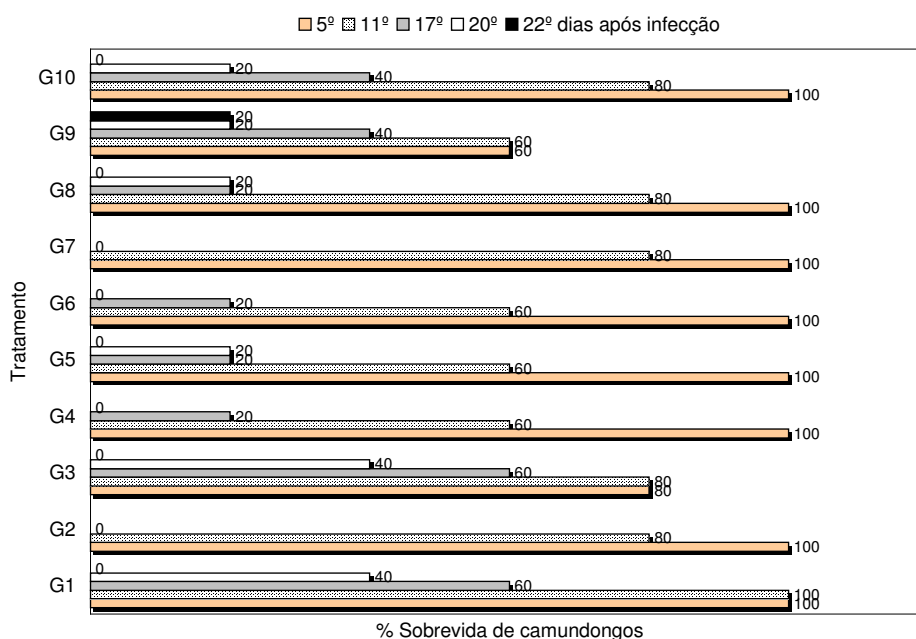


Tabela 3 - Atividade antimalárica de extratos da entrecasca de *M. rigida* em diferentes concentrações, testadas contra o *P. falciparum* (bhz 26/86) *in vitro*.

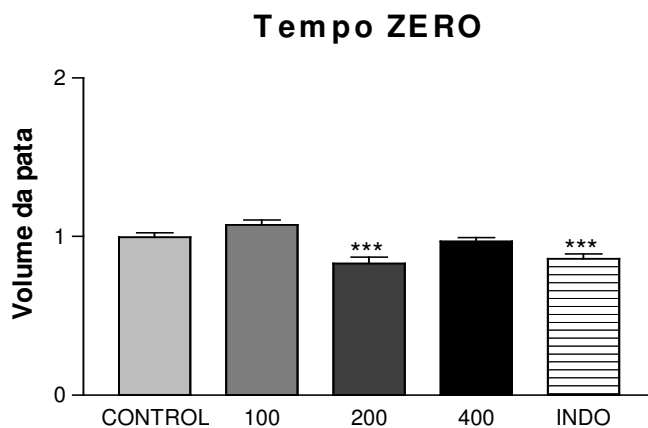
Extratos	% Inibição de parasitemia/dose ($\mu\text{g/mL}$)						
	0,06	0,2	0,6	1,8	5,5	16,6	50
Ext. aquoso das folhas	00	08	24	64	64	68	76
Ext. aquoso da entrecasca	18	48	52	56	58	72	82
Ext. alcoólico das folhas	52	66	68	68	69	79	82
Ext. alcoólico da entrecasca	26	49	48	49	52	69	88
Ext. hexânico	16	30	56	64	66	84	100
Ext. clorofórmico	06	30	48	58	76	86	90
Ext. acetato de etila	00	26	44	58	72	88	98
Ext. hidroalcoólico	12	22	24	32	54	58	88

3.2.2 – Resultados dos Testes Antiedematogênico e Analgésicos

3.2.2.1 – Teste Antiedematogênico Com o Extrato Alcoólico da Entrecasca de *Maytenus rigida*.

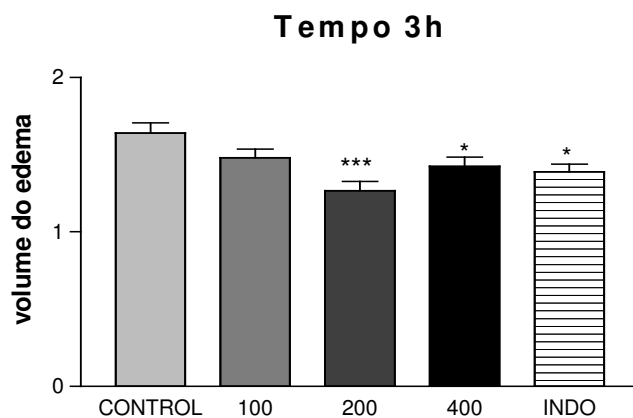
No modelo de inflamação testado, o modelo da carragenina, nas doses de 200 e 400mg/kg, foram detectadas reduções significativas do edema de pata induzido pela carragenina em relação ao grupo controle. Para a dose de 200mg/Kg, foi observada reduções de 16,2% do edema de pata imediatamente após a administração do extrato alcoólico. Para a dose de 400mg/kg após três horas de administração, ocorreu uma redução do edema de pata de 22,7% em relação ao controle (**Gráfico 1 e 2, p77**).

Gráfico 1 – Teste *in vivo* modelo de inflamação (Antiedematogênico), edema de pata induzido por carragenina nas doses de 100, 200 e 400 mg/kg.



*** $p < 0,001$

Gráfico 2 – Teste *in vivo* modelo de inflamação (Antiedematogênico), edema de pata induzido por carragenina nas doses de 100, 200 e 400 mg/kg.

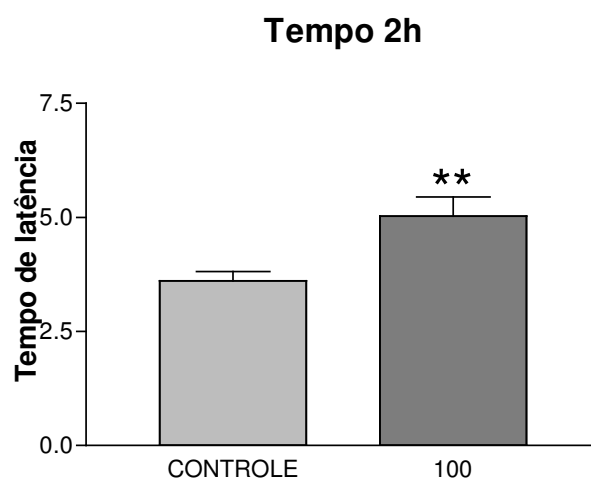


* $p < 0,05$; *** $p < 0,001$

3.2.2.2 – Teste Analgésico Com o Extrato Alcoólico da Entrecasca de *Maytenus rigida*.

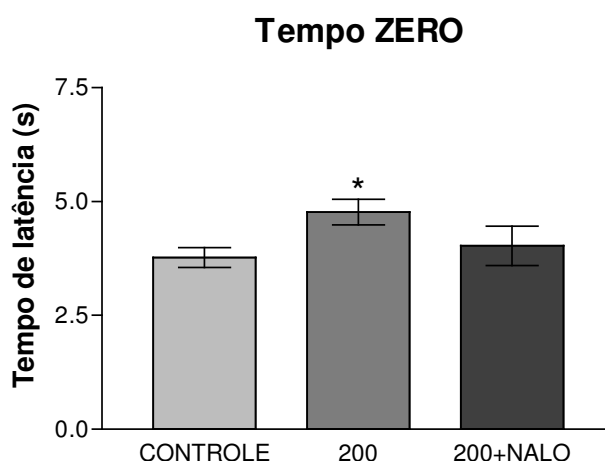
No modelo de antinocicepção, foram observados aumentos significativos no tempo de latência em relação ao grupo controle, de 39,0% de aumento; $p < 0,005$, na dose de 100mg/kg duas horas após a administração do extrato alcoólico. Já na dose 200mg/Kg ocorreu uma redução de 26,5% de aumento; $p < 0,05$, imediatamente após a administração do extrato (**Gráfico 3, 4 e 10 , p78, 79 e 82**).

Gráfico 3 – Teste in vivo modelo de antinocicepção, teste de retirada da cauda com o extrato alcoólico na dose de 100 mg/kg.



** $p < 0,005$

Gráfico 4 – Teste in vivo modelo de antinociceção, teste de retirada da cauda com extrato alcoólico.



*p<0,05

Estes resultados permiti-nos concluir que o Extrato Alcoólico da entrecasca de *Maytenus rigida* Mart., nos modelos de edema de pata e nocicepção, apresentam um efeito antiinflamatório e analgésico central, envolve sistema opióide. Constatado este efeito antiinflamatório e analgésico, realizou-se o biomonitoramento da atividade analgésico das fases particionadas em hexano, clorofórmio, acetato de etila e hidroalcoólico liofilizado.

3.2.2.3 – Teste Analgésico Com os Extratos da Entrecasca de *Maytenus rigida*.

A fração hexanica, na dose de 400mg/kg no tempo zero, aumentou o tempo de latência significativamente, sendo a porcentagem de aumento de 41,4% (**Gráfico 5 e 10 p80 e 82**), A fração clorofórmica na dose de 400mg/kg no tempo 60min, aumentou o tempo de latência significativamente, sendo a porcentagem de aumento de 37,2% (**Gráfico 6 e 10, p80 e 82**). A fração acetato de etila na dose de 400mg/Kg, 30 minutos após a administração desta fração, foi observado aumento de 37,1% (p<0,05) do tempo de latência em relação ao grupo controle (**Grafico 7 e 10, p81 e 82**) e a fração

hidroalcoólica na dose de 400mg/kg foram observados aumentos significativos do tempo de latência durante 60 e 90 minutos após a administração do extrato 78,4% e $p < 0,001$ e 27,9% e $p < 0,05$, respectivamente (**Gráfico 8, 9 e 10, p81 e 82**). O resultado do modelo de nocicepção no teste de retirada da cauda (Tail Flick), possibilitou a avaliação do efeito antinociceptivo central via sistema opióide, com as Frações Hexânica, Clorofórmica, Acetato de Etila e Hidroalcoólica liofilizada da entrecasca de *M. rigida* Mart. os resultados obtidos validam o uso popular.

Gráfico 5 – Teste in vivo modelo de antinocicepção, teste de retirada da cauda nas doses de 100, 200 e 400 mg/kg com o extrato hexânico.

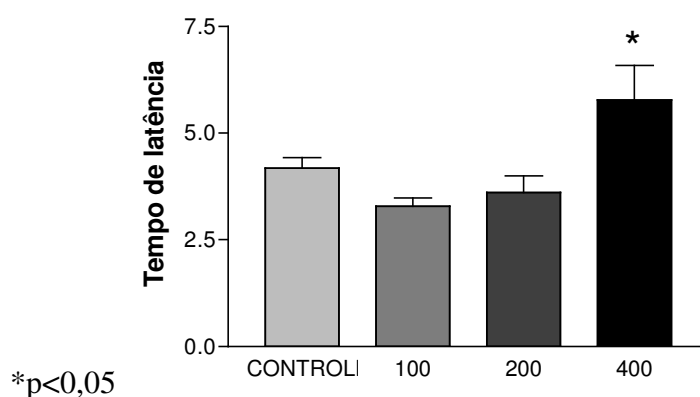


Gráfico 6– Teste in vivo modelo de antinocicepção, teste de retirada de cauda nas doses de 100, 200 e 400 mg/kg com o extrato clorofórmico de *M. rigida*.

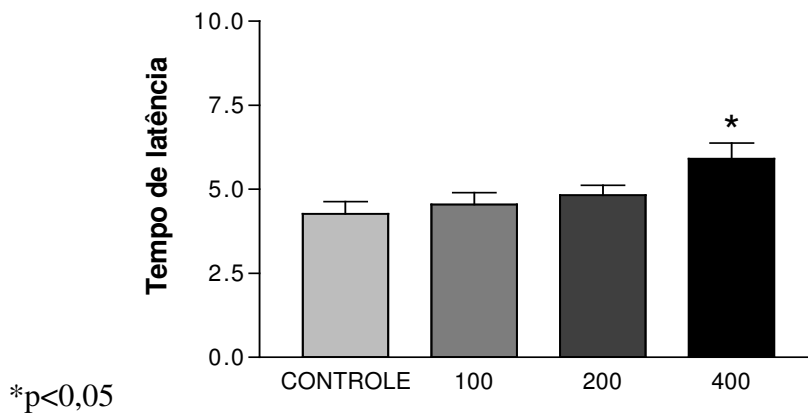


Gráfico 7 – Teste in vivo modelo de antinocicepção, teste de retirada da cauda nas doses de 100, 200 e 400 mg/kg com o extrato acetato de etila de *M. rigida*.

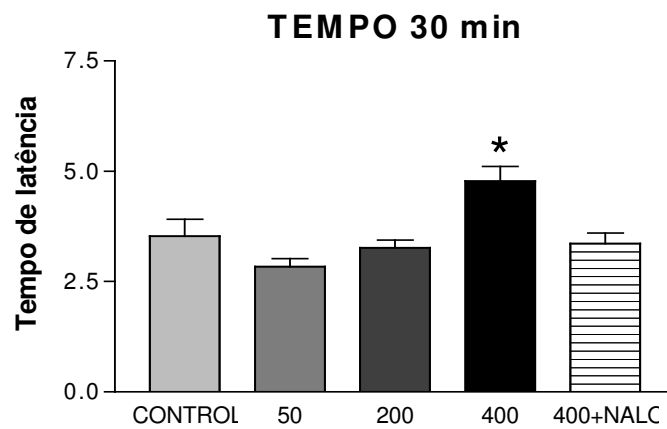


Gráfico 8 – Teste in vivo modelo de antinocicepção, teste de retirada de cauda com o extrato hidroalcoólico nas doses de 100, 200 e 400 mg/kg.

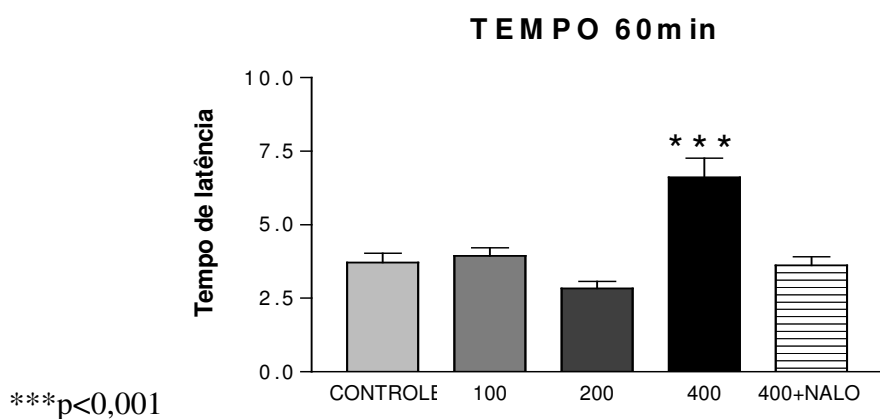


Gráfico 9 – Teste in vivo modelo de antinocicepção, teste de retirada de cauda com o extrato hidroalcoólico nas doses de 100, 200 e 400 mg/kg.

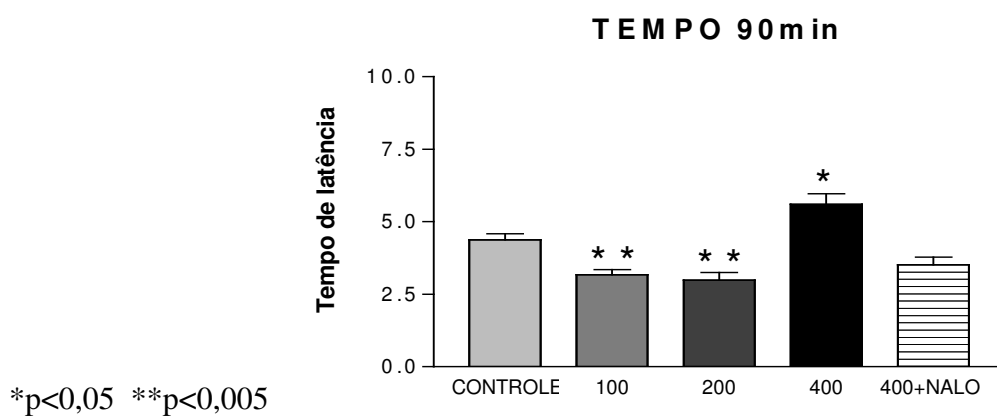
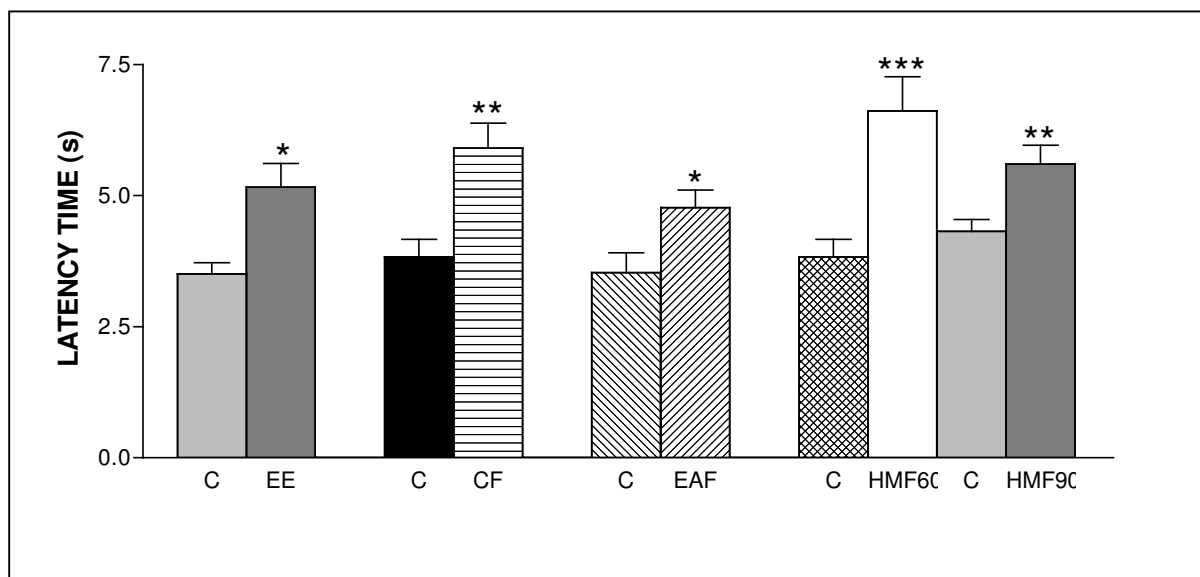


Gráfico 10 - Efeito do extrato alcoólico (EE), clorofórmico (CF), acetate de etila (EAF), hidroalcoólico (HMF) de *Maytenus rigida* no teste da placa quente (the tail).



volume da pata \pm S.E.M (n=09); *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001 comparada com o grupo controle(C). EE: 100 mg/kg, 120 min.; CF: 400 mg/kg, 60 min.; EAF: 400 mg/kg; 30 min.; HMF60: 400 mg/kg; 60 min.; HMF90: 400mg/kg, 90 min.

3.2.2.4 - Teste Analgésico Antiinflamatória Com a Substância 4' – Metilepialatocatequina Codificada Como MRCA2 Isolada do Extrato em Acetato de Etila.

Neste trabalho, investigamos uma possível atividade antinociceptiva e antiinflamatória da substância 4' – metilepialatocatequina codificada como **MRCA2**, isolada do extrato em acetato de etila da entrecasca de *Maytenus rigida* (Celastraceae). Foram utilizados modelos clássicos de nocicepção aguda (ensaio de contorções induzidas por ácido acético, nocicepção induzida por formalina) e dor induzida por estímulo térmico (hot plate) em camundongos Swiss (25-30g). A substância **MRCA2** produziu uma significativa inibição no número de contorções abdominais (69 % de inibição, 100 mg/Kg, v.o), bem como o padrão de referência, Dipirona (65 % de inibição, 33 mg/Kg, i.p) (**Gráfico 11, p84**). A **MRCA2** inibiu de forma significativa o efeito

analgésico no ensaio de “hot plate” aumentado o tempo de latência (5s), bem como as duas fases do ensaio de formalina (50%- 1ª fase e 30 %-2ª fase, 100 mg/Kg, v.o) (Gráfico 12 e 13, p84 e 85). No teste da placa quente (tail flick) a 4' metilepigalocatequina (Tabela 4, p85) mostrou atividade antinociceptiva. Nossos resultados permitem-nos inferir que a MRCA2 possui uma atividade antinociceptiva (central e periférica).

Gráfico 11 – Teste *in vivo* modelo de contorções abdominais induzidas por ácido acético dose 100 mg/kg com MRCA2.

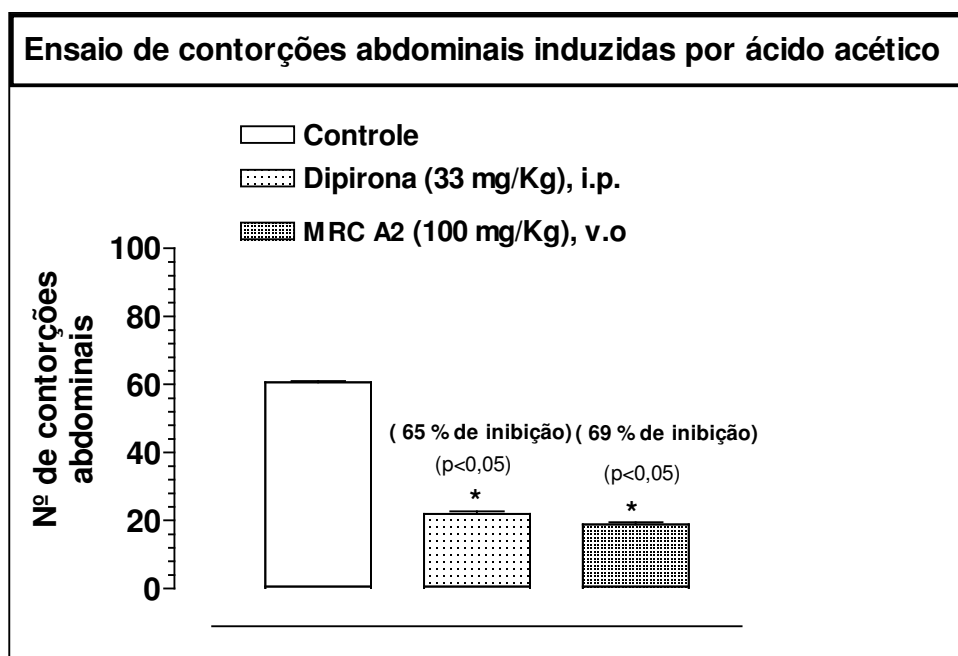


Gráfico 12 – Teste *in vivo* modelo de analgesia central na dose 100 mg/kg com a substância MRCA2.

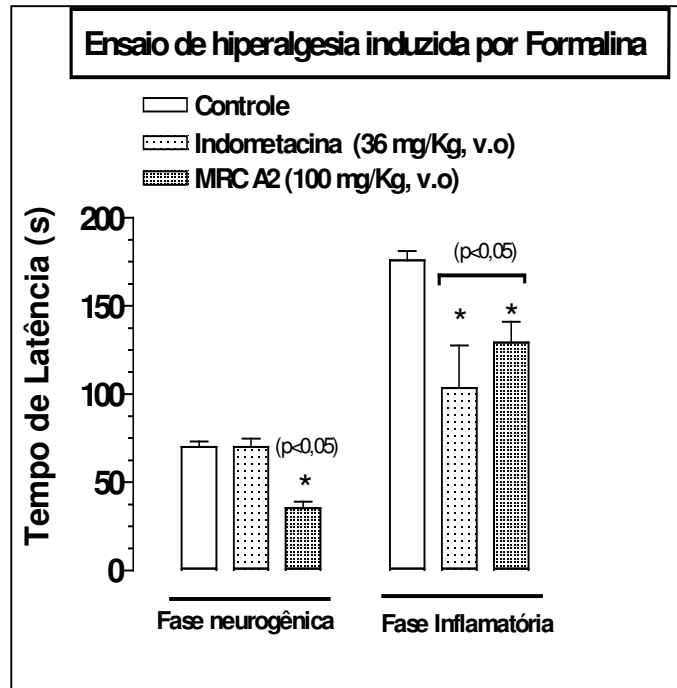


Gráfico 13 – Teste *in vivo* modelo de analgesia central (placa quente) na dose 100 mg/kg com a substância MRCA2.

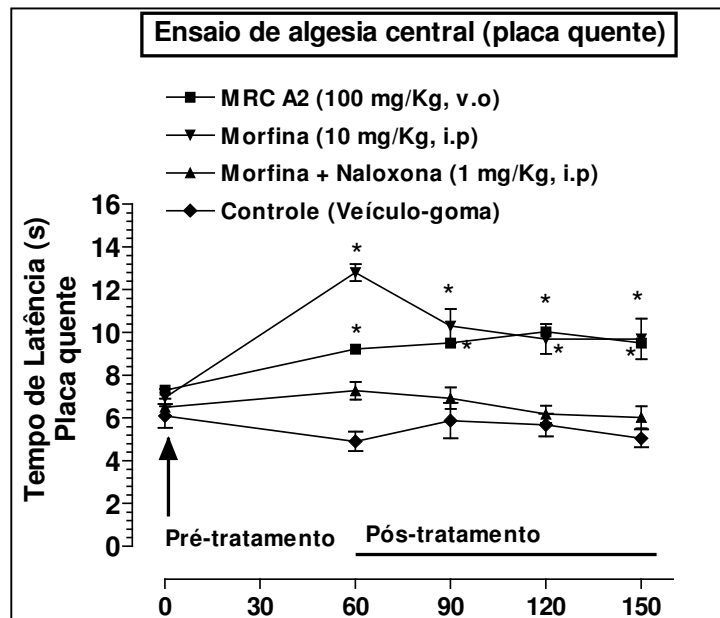


Tabela 4 - Efeito da 4' metilepigalocatequina no teste da placa quente (tail flick).

Tratamento	Dose mg/Kg	Tempo de latência (s)				
		M±SEM				
		zero	+30	+60	+90	+120
Controle	-	3.68±0.57	2.48±0.31	1.70±0.10	2.32±0.31	2.32±0.22
Morfina	10	2.85±0.10*	5.30±0.94*	4.65±0.85***	5.74±1.12**	4.15±0.73**
CA	75	2.13±0.14	2.67±0.32	2.45±0.17*	2.03±0.25	2.35±0.29
CA + naloxona	75 + 3	5.45±0.84	2.63±0.24	1.65±0.34	2.40±0.12	2.78±0.08

Volume da pata ±S.E.M. (n=09); *p<0.05; p<0.01; p<0.001 comparada com o grupo controle.

3.2.3 - Resultado do Teste Antiulcerogênico Com os Extratos da Entrecasca de *Maytenus rigida*.

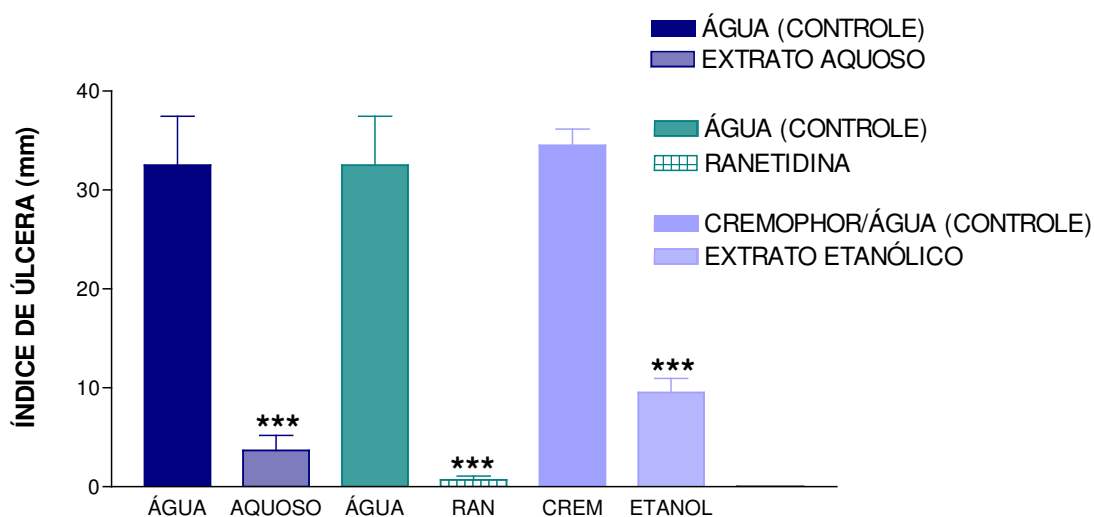
Os extratos, partições e substâncias isoladas da entrecasca da *Maytenus rigida* foram avaliados em um modelo de úlcera em ratos. O extrato etanólico da entrecasca da *Maytenus rigida* promoveu atividade protetora da mucosa gástrica, induzida pelo extrato alcoólico que foi administrado por via oral, (p<0,001; 100 mg/kg; **Gráfico 14, p 87**). Trabalhos relatam a ação protetora da infusão de *M. illicifolia* contra o desenvolvimento de úlceras (SOUZA-FORMIGONI, 2001). A presença de terpenos, flavonóides e taninos condensados justificam a atividade antiinflamatória e antiulcerogênica das espécies (GONZALEZ e cols., 1982; LEITE e cols., 2001; ITOKAWA e cols., 1991; SHIROTA e cols., 1994).

O extrato aquoso da entrecasca foi testado na dose (100 mg/kg; p.o.) reduzindo de forma significativa (p<0,001) as úlceras induzidas por indometacina (100 mg/kg; p.o.) em ratos. A droga padrão, ranetidina (100 mg/kg; p.o.; p<0,001), também apresentou eficácia neste teste. Todos estes resultados encontram-se no (**Gráfico 14, p87**)

Com o objetivo de realizar o isolamento de substâncias com atividade antiúlcera, foram preparadas e testadas as fases hexânica, clorofórmica e hidroalcoólica do extrato

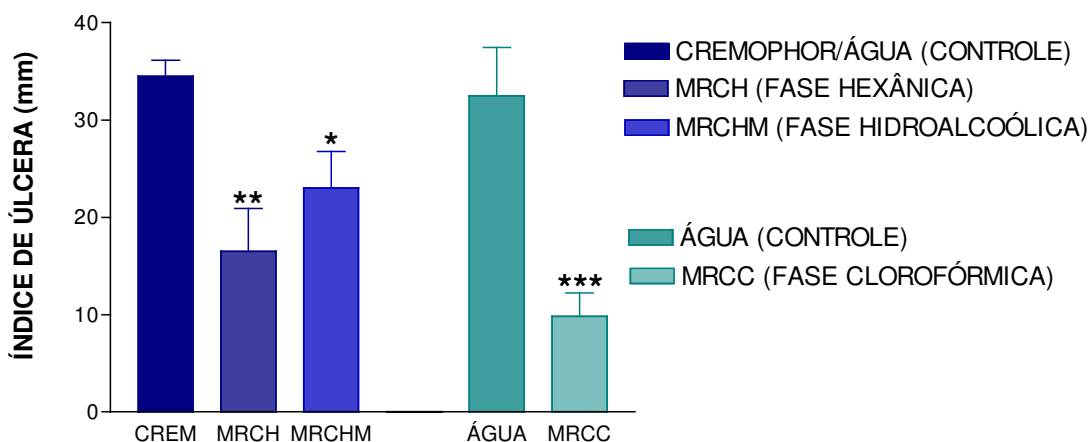
etanólico da entrecasca. Todas as fases testadas, foram administradas por via oral na dose de 100 mg/kg. Estas frações reduziram de forma significativa ($p < 0,5$ hidroalcoólica; $p < 0,01$ hexânica; clorofórmica $p < 0,001$) as úlceras induzidas por indometacina (100 mg/kg; p.o.) em ratos (**Gráfico15, p 87**).

Gráfico 14 - Efeito dos extratos aquoso (100 mg/kg) e etanólico (100 mg/kg) da entrecasca da *Maytenus rigida* sobre as úlceras induzidas por indometacina em ratos (n = 7).



*** $p < 0,001$ (vs controle; test t de Student). Cremophor/água foi o grupo controle para o extrato etanólico; água foi o controle para o extrato aquoso. A droga padrão ranetidina foi administrada na dose de 100 mg/kg.

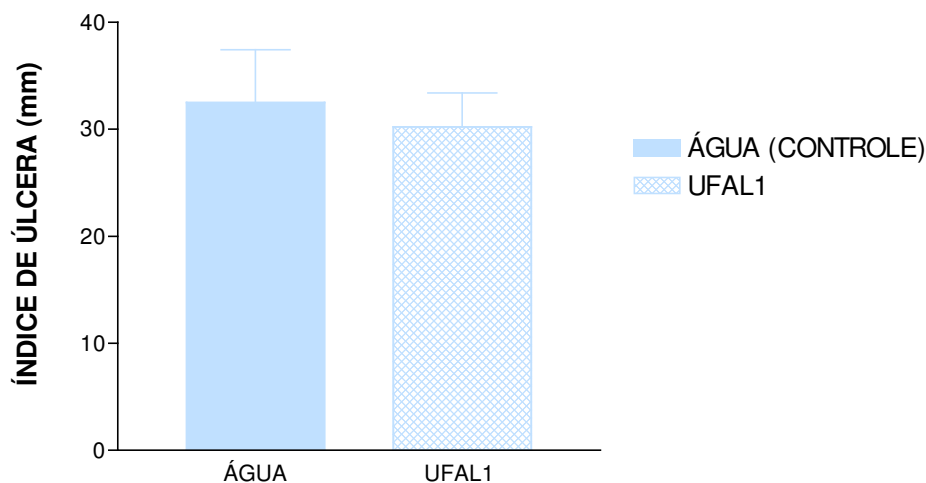
Gráfico 15 - Efeito das fases hexânica, clorofórmica e hidroalcoólica (100 mg/kg; p.o.) da entrecasca da *Maytenus rigida* sobre as úlceras induzidas por indometacina em ratos (n = 7).



* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ (vs controle; ANOVA, *pos hoc* de Bonferroni ou test t de Student). Cremophor/água foi o grupo controle para as fases hexânica e hidroalcoólica; água foi o controle para a fase clorofórmica.

A substância **MRCH9/UFAL 1**, um terpeno isolado da fase hexânica do extrato etanólico da entrecasca da *Maytenus rigida*, parece não ser responsável pelo efeito antiulcerogênico observado por não apresentar eficácia em reduzir as úlceras ($p > 0,05$; **Gráfico 16, p88**) induzidas por indometacina (100 mg/kg; p.o.).

Gráfico 16 - Efeito da MRCH9/UFAL1 (100 mg/kg; p.o.) isolada da entrecasca da *M. rigida* sobre as úlceras induzidas por indometacina em ratos (n = 7).



3.2.4 – Resultados da Atividade Antimicrobiana

Compostos com atividade antimicrobiana com efeitos adversos menos graves que os atuais fármacos são ativamente procurados, principalmente aqueles compostos com um espectro de atividade complementar aos quimioterápicos já existentes. O método para análise antimicrobiana utilizado foi o da difusão. Neste método os extratos em pesquisa são colocados num reservatório (disco de papel, cavidade no meio de cultura ou cilindro sobre a superfície), em contato com o meio de cultura sólido, inoculado com o microorganismo. Após o tempo de incubação, mede-se o diâmetro ou halo de inibição, a informação obtida é qualitativa, útil para estabelecer a sensibilidade do microorganismo.

Estabeleceu-se que os extratos considerados ativos são aqueles que formaram zonas de inibição $\geq 10\text{mm}$. Deste modo, o extrato alcoólico bruto das folhas não apresentou atividade, por outro lado, o extrato alcoólico bruto da entrecasca apresentou atividade frente às bactérias *Staphylococcus aureus* (97) e *Escherichia coli* (148) (**Tabela 5, p90**). O extrato hexânico (C_6H_{14}) proveniente da partição líquido-líquido do extrato alcoólico da entrecasca não apresentou atividade antibiótica com nenhum dos microorganismos testados. Já os extratos em clorofórmico (CHCl_3), acetato de etila (AcOEt), Hidroalcoólico ($\text{H}_2\text{O}/\text{MeOH}$) e aquoso liofilizado foram ativos contra as cepas *S. aureus* (94), *S. aureus* (97), *S. aureus* (115) bacterianas, *Escherichia coli* (148), *Pseudomonas aeruginosa* (104), *Pseudomonas aeruginosa* (135), *Salmonella Typhi* (155), (**Tabela 6 e 7, p90 e 91**). Dados da literatura com extratos de plantas relatam os resultados da atividade com diferentes cepas de *Pseudomonas aeruginosa* do extrato alcoólico de *Borreria verticillata*, que apresentam zonas de inibição de 18mm, 16mm, 14mm e 10mm (PEDRO, 2002). Estes resultados estão em conformidade com os observados para os extratos de *Maytenus rigida* que apresentou atividade antibacteriana com *Pseudomonas aeruginosa*, com zonas de inibição: (16mm e 25 mm para o extrato aquoso, 14mm e 21mm para o extrato em clorofórmio, 16mm e 21mm para o extrato acetato de etila e 13mm e 22mm para o extrato hidroalcoólico). Estes resultados mostram um potencial efeito antimicrobiano de *Maytenus rigida*.

Tabela 5 - Atividade antibacteriana dos extratos alcoólico das folhas e entrecasca de *M. rigida*.

Extratos	Bactéria	Zona de inibição (mm)
Ext. alcoólico das folhas	<i>Cândida allicans</i> (01)	-
	<i>Cândida kruse</i> (09)	-
	<i>Cândida tropicalis</i> (15)	-
	<i>Staphylococcus aureus</i> (97)	-
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (135)	-
	<i>Escherichia coli</i> (148)	-
Ext. alcoólico da entrecasca	<i>Cândida allicans</i> (01)	-
	<i>Cândida kruse</i> (09)	-
	<i>Cândida tropicalis</i> (15)	-
	<i>Staphylococcus aureus</i> (97)	12
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (135)	-
	<i>Escherichia coli</i> (148)	14

* são considerados ativos os extratos que formaram zonas de inibição ≥ 10 mm

Tabela 6 - Atividade antibacteriana do extrato alcoólico da entrecasca de *M. rigida*.

Extrato	Bactéria	Zona de inibição (mm)
Ext. aquoso	<i>S. aureus</i> (94)	15
	<i>S. aureus</i> (97)	16
	<i>S. aureus</i> (115)	16
Ext. C ₆ H ₁₄	<i>S. aureus</i> (94)	-
	<i>S. aureus</i> (97)	-
	<i>S. aureus</i> (115)	-
Ext. CHCl ₃	<i>S. aureus</i> (94)	11
	<i>S. aureus</i> (97)	11
	<i>S. aureus</i> (115)	11
Ext. AcOEt	<i>S. aureus</i> (94)	15
	<i>S. aureus</i> (97)	16
	<i>S. aureus</i> (115)	16
Ext. H ₂ O/MeOH	<i>S. aureus</i> (94)	12
	<i>S. aureus</i> (97)	13
	<i>S. aureus</i> (115)	13

* são considerados ativos os extratos que formaram zonas de inibição ≥ 10 mm

Tabela 7- Atividade antibacteriana dos extratos da entrecasca de *M. rigida*.

Extrato	Bactéria	Zona de inibição (mm)
Ext. aquoso	<i>S. aureus</i> (94)	15
	<i>S. aureus</i> (97)	16
	<i>S. aureus</i> (115)	16
	<i>Escherichia coli</i> (148)	16
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (104)	16
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (135)	25
	<i>Salmonela typhi</i> (155)	-
Ext. hexânico	<i>S. aureus</i> (94)	-
	<i>S. aureus</i> (97)	-
	<i>S. aureus</i> (115)	-
	<i>Escherichia coli</i> (148)	-
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (135)	-
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (104)	-
	<i>Salmonela typhi</i> (155)	-
Ext. CHCl ₃	<i>S. aureus</i> (94)	11
	<i>S. aureus</i> (97)	11
	<i>S. aureus</i> (115)	11
	<i>Escherichia coli</i> (148)	13
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (104)	14
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (135)	21
	<i>Salmonela typhi</i> (155)	-
Ext. AcOEt	<i>S. aureus</i> (94)	15
	<i>S. aureus</i> (97)	16
	<i>S. aureus</i> (115)	16
	<i>Escherichia coli</i> (148)	14
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (135)	16
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (104)	21
	<i>Salmonela typhi</i> (155)	-
Ext. H ₂ O/MeOH	<i>S. aureus</i> (94)	12
	<i>S. aureus</i> (97)	13
	<i>S. aureus</i> (115)	13
	<i>Escherichia coli</i> (148)	14
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (104)	13
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (135)	22
	<i>Salmonela typhi</i> (155)	-

• são considerados ativos os extratos que formaram zonas de inibição ≥ 10 mm

3.3 – Cromatografia Gasosa Acoplada à Espectrometria de Massas das Frações Reunidas do Grupo I do Extrato em Hexano.

A análise quantitativa da composição química da fração reunida do grupo I {37-69}(1,65g) do extrato em hexano, permitiu detectar a presença de um total de sete componentes como consta na (Tabela 8, p93). Os componentes foram determinados como ésteres metílicos (Figura 9 p92, Figuras 10 a 16, p157-159). Trabalhos anteriores sobre a composição química de espécies do gênero *Maytenus* reletam a detecção de misturas de n-alcenos e ceras epicuticulares sem determina-los (OLIVEIRA e cols, 1999; 2000 e 2003). Assim, as substâncias identificadas no presente trabalho, estão sendo descritas pela primeira vez neste gênero. Os espectros de massas destes ésteres revelaram picos de fragmentação característicos da classe (Figura 8, p92). dentre os quais, o pico base em m/z 74 (100), proveniente do rearranjo do tipo MacLafferty.

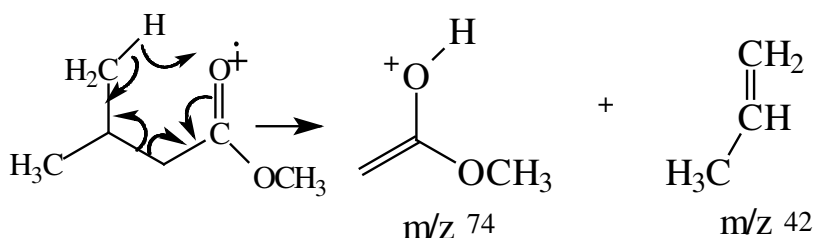


Figura 8 - Interpretação mecanística do padrão de fragmentação nos ésteres metílicos de ácidos carboxílicos.

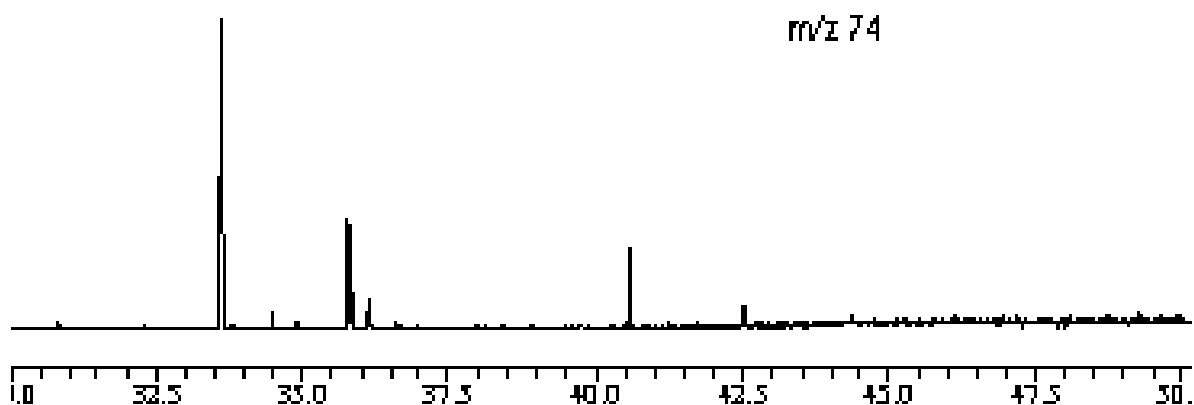


Figura 9 – Cromatograma constituído de ésteres metílicos obtido da fração reunida do grupo I do extrato em hexano.

Tabela 8 - Composição química das frações reunidas do grupo I da fração em hexano.

<i>Substâncias Identificadas</i>	<i>Tempo de Retenção</i>	<i>Quantidade (%)</i>
Ésteres metílicos		
Dodecanoato de metila	33,602	37,20
Tetradecanoato de metila	35,787	14,04
Pentadecanoato de metila	35,856	4,79
Hexadecanoato de metila	36,126	3,79
Heptadecanoato de metila	36,663	17,03
Octadecanoato de metila	41,100	6,45
6-Octadecanoato de metila	42,012	3,28

Identificação por comparação com banco de dados

3.4 - Resultados do Estudo Químico

O estudo fitoquímico biomonitorado dos extratos da entrecasca de *Maytenus rigida* resultou, até o momento, no isolamento de 15 substâncias que foram codificadas de MRCH, MRCC, MRCA, MRCAQ e MRCCP, dependendo do extrato que a originou. O extrato etanólico bruto da entrecasca de *Maytenus rigida* (CELASTRACEAE), foi submetido a um processo de partição líquido-líquido com solventes de polaridade crescentes, obtendo as fases em hexano, clorofórmio, acetato de etila e hidroalcoólica.

Estas foram submetidas individualmente a processos cromatográficos, para separação e purificação dos constituintes químicos. Dentre os compostos químicos isolados temos o sitosterol, estigmaterol, quatro triterpenos pentacíclicos da série lupano, dois triterpenos pentacíclicos da série friedelano, quatro esqueletos catequínicos, dois flavonóides e o ácido gálico. As análises destas substâncias foram realizadas em colaboração com Dr. Cossimo Piza da Università degli Studi di Salerno/Italia.

3.4.1 – Identificação das Substâncias Químicas

3.4.1.1 – Composto MRCA2

A substância codificada como MRCA-2 foi identificada através da análise conjunta dos dados obtidos dos espectros de UV, IV, EM, RMN de ^1H e ^{13}C uni e bidimensionais.

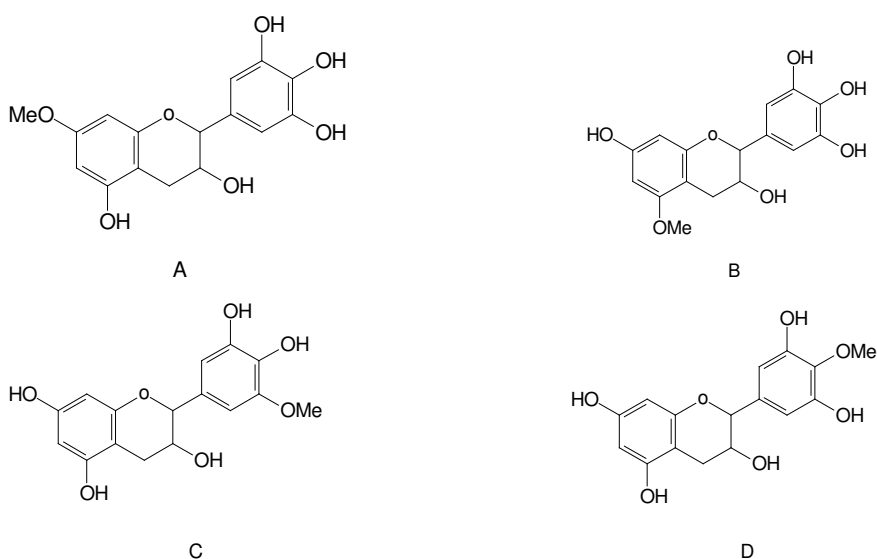
A molécula isolada da fração em acetato de etila, apresenta-se como um cristal na forma de escamas, de cor marrom, pf 148,2 – 148,9°C. O espectro no IV (**Figura 17, p 159**) apresentou banda de absorção a 3386 cm^{-1} que é atribuída ao estiramento de grupos hidroxílicos e absorções em 1145 e 1625 cm^{-1} referentes a presença de anel aromático. O espectro de massa indicou o peso molecular de 320, com fórmula molecular $\text{C}_{16}\text{H}_{16}\text{O}_7$ com número de deficiência de hidrogênio igual a 9.

O espectro de RMN ^1H (**Figura 18, p160**) mostra na região de baixa frequência sinais em δ 2,86 (*dd*, $J= 4,4$ e 16,6 Hz) e 2,71 (*dd*, $J= 3,0$ e 16,6 Hz), absorção em 3,78 (3H, *s*) característico de hidrogênios metoxílicos, sinais em δ 4,17 (1H, *m*) e 4,76 (1H, *s*) além de absorções de hidrogênios em anéis aromáticos em δ : 5,84 (1H, *d*, $J=2,2$, Hz); 5,87 (1H, *d*, $J=2,2$ Hz) e 6,52 (2H, *s*), dados esses que corroboram com o espectro no IV que mostrou a presença de anel aromático. (tab 9, pag 96).

O espectro de RMN ^{13}C –APT (**Figura 19, p161**) mostra 14 sinais correspondentes a 16 átomos de carbonos dos quais um é correspondente a carbono metilênico (ppm: 29,1); seis a carbonos metínicos (ppm: 67,3; 79,6; 95,8; 96,4 e 107,1 (2C); um a carbono metílico (ppm: 60,8) e oito a carbonos quaternários (ppm: 157,9; 157,6; 157,1; 151,3 (2C); 136,6; 136,0 e 100,0). (**Tabela 9, p 96**).

Na expansão do espectro de RMN ^1H , (**Figura 18, p160**), a presença do sinal de hidrogênio carbinólico em δ_{H} 4,76 (*s*) e das constantes de acoplamento dos hidrogênios metilênicos em δ_{H} 2,86 (*dd*, $J=4,4$ e 16,6 Hz) e 2,71 (*dd*, $J=3,0$ e 16,6 Hz) em relação ao H-3 (*m*) levou a sugerir a proposta estrutural de uma catequina. A presença do sinal em 29,1 ppm correspondente a carbono metilênico esta de acordo com os dados

observados para o C-4 de uma catequina. A presença de sinais em 79,5 ppm (CH) e 67,3 ppm (CH) podem ser atribuídos aos carbonos 2 e 3, de um anel C de uma catequina, o que nos levaram a postular a estrutura de um esqueleto do tipo flavan-3-ol. Estes dados juntamente com a observação dos sinais correspondentes aos hidrogênios aromáticos em δ 6,52 (s, 2H); δ 5,87 (d, $J= 2,2$ Hz) e δ 5,84 (d, $J= 2,2$ Hz) no espectro de RMN ^1H , permitem propor para a molécula de MRCA2 as estruturas A,B,C e D abaixo:



O valor do deslocamento químico para o carbono metoxílico observado no espectro de RMN ^{13}C descarta as hipóteses estruturais **A**, **B** e **C**, visto que a absorção em 60,7 ppm sugere que o grupo metoxila está ligado a carbono vizinho a carbonos quaternários. No espectro de massas observamos os picos correspondentes a $m/z = 139$ e $m/z = 167$ (**Figura 20, p98**), indicando que o grupo metoxila deve estar localizado no anel B. Diante desses fatos propomos que a substância em análise tem a estrutura **D**, ou seja, é a 4' – metilepialatocatequina, inédita na espécie, porém já isolado anteriormente em várias espécies de *Maytenus*. A atribuição dos carbonos hidrogenados foi feita utilizando a técnica 2D HMQC (**Tabela 9, p96**).

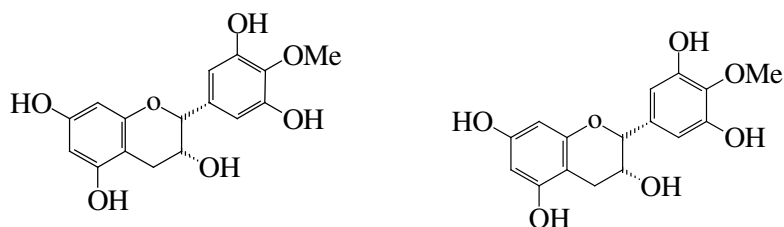
O espectro 2D HMBC, juntamente com dados da literatura (**Tabela 10, p97**) (HUSSEIN e cols., 1999) permitiram atribuir os carbonos não hidrogenados da substância em estudo.

Tabela 9 - RMN da substância MRCA2 em CDCl₃, deslocamento em δ .

	HMQC		HMBC		COSY
	¹ H	¹³ C	J^{α}	J^{β}	¹ H X ¹ H
1					
2	4,84 (1H,s)	79,5	136,5	107,1	H-3; H-2'; H-6'
3	4,22(1H, ddd; J=1,6; 3,2 e 4,4)	67,3			H-2; H-4
4ax	2,86 (1H, dd; J= 44 e 16,4Hz)				
4eq	2,73 (1H, dd; J= 3,2 e 16,4Hz)	29,1			
5		157,9			
5a		100,0			
6	5,93 (1H, d; J= 2,2Hz)	96,3		100,0 ;95,8	
7		157,6			
8	6,02 (1H, d; J= 2,2Hz)	95,8	157,5	100,0 ;96,3	
8a		157,1			
1'		135,5			
2'	6,59 (1H, s)	107,1	151,3	136,0; 107,1; 79,5	H-2
3'		151,3			
4'		136,6			
5'		151,3			
6'	6,59 (1H, s)	107,1	151,3	136,0; 107,1; 79,5	H-2
Ome	3,80 (3H, s)	60,7		136,0	

Dados de RMN ¹H 400-MHz, ¹³C obtido a 100 MHz, padrão interno TMS.

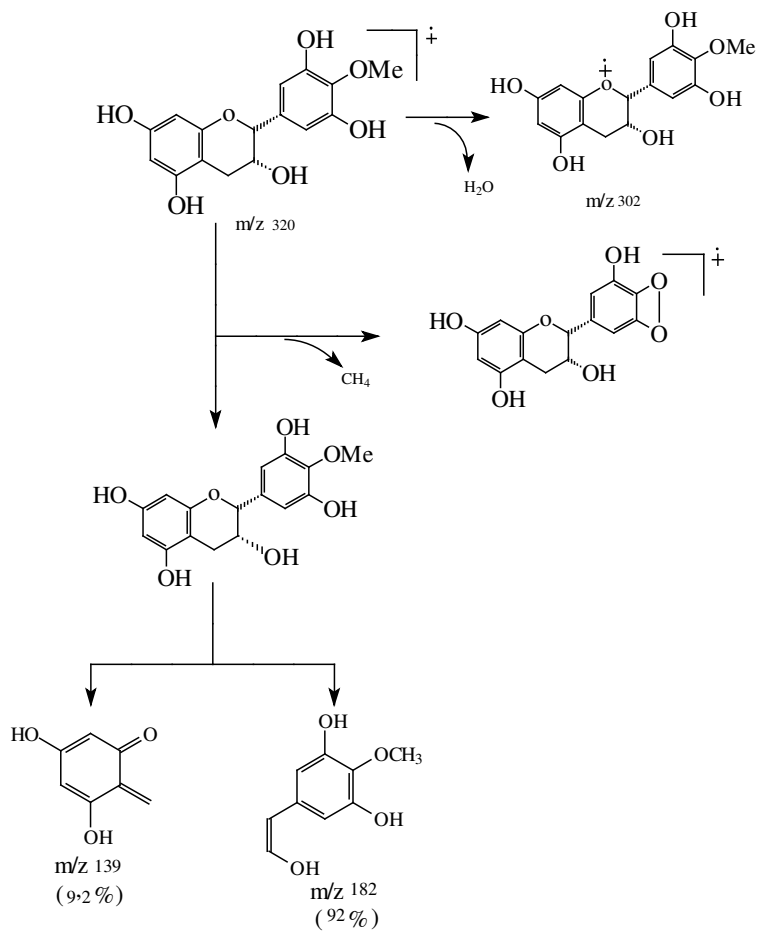
Tabela 10 - RMN da substância MRCA2 em CDCl_3 , e do modelo da literatura(HUSSEIN, 1999) deslocamento em δ .



Carbonos	MRCA2	Modelo
1		
2	79,5	79,6
3	67,3	67,3
4ax	29,1	29,1
4eq	29,1	29,1
5	157,9	157,9
5a	100,0	100,0
6	96,3	96,3
7	157,6	157,5
8	95,8	95,8
8 ^a	157,1	157,1
1'	135,5	135,9
2'	107,1	107,1
3'	151,3	151,3
4'	136,6	136,5
5'	151,3	151,3
6'	107,1	107,1
OMe	60,7	60,7

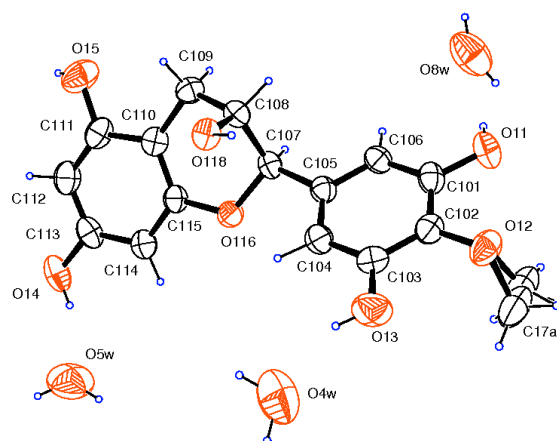
Dados de RMN ^1H 200-MHz, ^{13}C obtido a 50 MHz, padrão interno TMS.

Figura 20 – Esquema geral de fragmentação dos principais picos de MRCA2



A molécula **MRCA2/MRCC8** foi submetida à análise cristalográfica através da difração de raio X (**Tabela 11 a 13, p100-102**), utilizando o programa SHELXS-97 [Sheldrick,1998]. O pacote de programas utilizado foi o WinGX [Farrugia,1999]. O refinamento do modelo inicial foi feito pelo método de mínimos quadrados com matriz completa e cálculos de Fourier diferença utilizando o sistema de programas SHELXL97 [Sheldrick, 1998] instalado.

O processo de refinamento foi sempre acompanhado de verificação da geometria e confiabilidade química do modelo, através de cálculos de distâncias e ângulos interatômicos. O índice de verificação da adequação do sistema de pesos utilizado no refinamento foi o “godness of fit” (GOF). Este procedimento permitiu confirmar a proposta estrutural.



MRCA2/MRCC8

Tabela 11 – Dados cristalográficos e refinamento de estrutura para MRCA2/MRCC8

Formula empírica	C ₁₆ H ₁₆ O ₇
Peso molecular	319
Temperatura	293(2) K
Comprimento de onda	0.71073 Å
Dimensões da cela unitária	a = 19.0510(16) Å $\alpha = 90^\circ$ b = 19.0510(16) Å $\beta = 97.4130(10)^\circ$ c = 7.22290(3) Å $\gamma = 90^\circ$
Volume	2623.7(3) Å ³
Z, densidade calculada	4, 1.116 Mg/m ³
Coeficiente de absorção	0.064 mm ⁻¹
F (000)	984
Tamanho do cristal	0.11 x 0.10 x 0.08 mm
Índices limitantes	-23<=h<=23, -16<=k<=16, -8<=l<=16
Reflexões únicas coletadas	4612 / 4612 [R(int) = 0.0000]
Completância dos dados	99,6 %
Transmissão max e min	0.9765 e 0.9765
Método de refinamento	Matrix completa de mínimos quadrados n sobre F ²
Dados e parâmetros	4612 / 1 / 289
Avaliação do F ²	1.05
Índice R final[>2sigma(I)]	R1 = 0.1091, wR2 = 0.2402
Índice R (todos os dados)	R1 = 0.1891, wR2 = 0.3001
Coeficiente de extinção	-3(10)
Maior diferença entre os picos	0.547 e -0.359 e.Å ⁻³

Tabela 12 – Coordenadas atômicas ($\times 10^4$) e parâmetros isotrópicos equivalentes ($\text{Å}^2 \times 10^3$) para MRCA2/MRCC8

	X	Y	Z	U(eq)
C(39)	9479(3)	-567(3)	24(1)	1316(8)
C(38)	5685(4)	1148(4)	43(2)	8755(10)
C(36)	5678(4)	2047(4)	42(2)	5324(9)
C(37)	6618(4)	326(4)	38(2)	7387(9)
C(35)	5969(4)	815(4)	38(2)	6957(9)
C(7)	6506(4)	1118(4)	49(2)	3828(11)
C(8)	6895(4)	25(4)	43(2)	5510(10)
C(9)	6208(4)	1422(4)	37(2)	5619(9)
C(10)	5036(4)	1835(4)	48(2)	4119(10)
C(11)	5071(4)	3030(4)	46(2)	7373(10)
C(12)	5149(4)	1731(4)	45(2)	8452(10)
C(13)	7219(4)	731(4)	45(2)	8381(11)
C(14)	5474(4)	2323(4)	42(2)	7272(10)
C(15)	5647(5)	3338(4)	55(2)	4308(11)
C(16)	7178(4)	-1152(4)	49(2)	6996(11)
C(17)	7110(4)	605(4)	45(2)	4187(10)
C(18)	7464(4)	-536(4)	40(2)	5868(10)
C(19)	7861(4)	-874(4)	45(2)	4217(11)
C(20)	5357(4)	383(4)	54(2)	6123(12)
C(21)	5480(4)	3566(4)	51(2)	6279(11)
C(22)	8496(4)	-479(4)	41(2)	3528(10)
C(23)	6416(4)	-285(4)	50(2)	8695(12)
C(24)	4300(4)	2982(5)	63(2)	6716(14)
C(25)	6055(4)	2646(4)	51(2)	4311(11)
O(7)	8802(5)	79(5)	110(3)	4381(13)
C(40)	8801(5)	-773(5)	61(2)	1772(12)
C(28)	6957(4)	-876(4)	54(2)	8893(12)
C(29)	5046(5)	3273(5)	62(2)	9406(11)
C(30)	7810(4)	-1637(5)	58(2)	6978(12)
C(31)	8099(5)	-1610(5)	60(2)	5001(12)
C(32)	6559(5)	-1544(5)	68(3)	6008(14)

Tabela 13 – Comprimento de ligação [Å] e ângulo de ligação [°] para MRCA2/MRCC8.

C(34)-C(21)	1.443(9)
C(39)-C(40)	1.389(10)
C(38)-C(12)	1.524(10)
C(38)-C(35)	1.545(10)
C(36)-C(25)	1.533(10)
C(36)-C(14)	1.553(10)
C(36)-C(10)	1.556(10)
C(36)-C(9)	1.575(10)
C(37)-C(23)	1.548(10)
C(37)-C(13)	1.557(10)
C(37)-C(8)	1.565(10)
C(37)-C(35)	1.577(10)
C(35)-C(20)	1.549(10)
C(35)-C(9)	1.575(9)
C(7)-C(9)	1.529(10)
C(7)-C(17)	1.530(10)
C(8)-C(17)	1.518(10)
C(8)-C(18)	1.545(10)
C(11)-C(21)	1.508(10)
C(11)-C(29)	1.542(11)
C(11)-C(24)	1.546(11)
C(11)-C(14)	1.552(10)
C(12)-C(14)	1.543(10)
C(15)-C(21)	1.524(11)
C(15)-C(25)	1.530(11)
C(16)-C(30)	1.519(11)
C(16)-C(28)	1.528(12)
C(16)-C(18)	1.529(10)
C(16)-C(32)	1.567(11)
C(18)-C(19)	1.552(10)
C(19)-C(22)	1.509(10)
C(19)-C(31)	1.579(11)
C(22)-O(7)	1.361(11)
C(22)-C(40)	1.504(11)
C(23)-C(28)	1.532(10)
C(30)-C(31)	1.532(12)

Continuação da tabela 13

C(12)-C(38)-C(35)	114.4(6)
C(25)-C(36)-C(14)	107.4(6)
C(25)-C(36)-C(10)	107.1(6)
C(14)-C(36)-C(10)	113.4(6)
C(25)-C(36)-C(9)	109.1(6)
C(14)-C(36)-C(9)	107.1(5)
C(10)-C(36)-C(9)	112.5(6)
C(23)-C(37)-C(13)	105.8(6)
C(23)-C(37)-C(8)	109.7(6)
C(13)-C(37)-C(8)	109.4(6)
C(23)-C(37)-C(35)	111.7(6)
C(13)-C(37)-C(35)	112.0(6)
C(8)-C(37)-C(35)	108.0(5)
C(38)-C(35)-C(20)	106.3(6)
C(38)-C(35)-C(9)	108.4(6)
C(20)-C(35)-C(9)	111.6(6)
C(38)-C(35)-C(37)	110.6(5)
C(20)-C(35)-C(37)	110.6(6)
C(9)-C(35)-C(37)	109.2(5)
C(9)-C(7)-C(17)	112.2(6)
C(17)-C(8)-C(18)	114.9(6)
C(17)-C(8)-C(37)	111.7(6)
C(18)-C(8)-C(37)	110.2(6)
C(7)-C(9)-C(35)	110.4(6)
C(7)-C(9)-C(36)	114.2(5)
C(35)-C(9)-C(36)	117.0(6)
C(21)-C(11)-C(29)	108.2(7)
C(21)-C(11)-C(24)	111.7(7)
C(29)-C(11)-C(24)	106.3(7)
C(21)-C(11)-C(14)	107.9(6)
C(29)-C(11)-C(14)	108.7(6)
C(24)-C(11)-C(14)	113.9(7)
C(38)-C(12)-C(14)	110.2(6)
C(12)-C(14)-C(11)	114.2(6)
C(12)-C(14)-C(36)	110.8(6)
C(11)-C(14)-C(36)	117.4(6)
C(21)-C(15)-C(25)	110.5(6)
C(30)-C(16)-C(28)	115.8(7)
C(30)-C(16)-C(18)	100.3(6)
C(28)-C(16)-C(18)	108.2(6)
C(30)-C(16)-C(32)	107.6(7)
C(28)-C(16)-C(32)	111.5(7)
C(18)-C(16)-C(32)	113.0(7)
C(8)-C(17)-C(7)	111.7(6)
C(16)-C(18)-C(8)	111.7(6)
C(16)-C(18)-C(19)	105.4(6)

Continuação da tabela 13

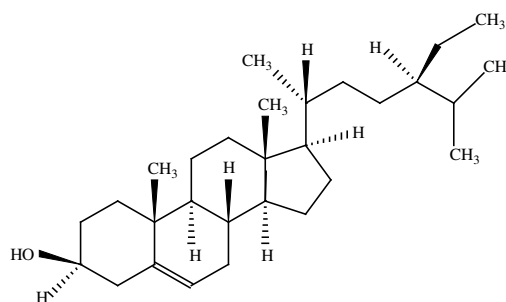
C(8)-C(18)-C(19)	120.0(6)
C(22)-C(19)-C(18)	116.0(6)
C(22)-C(19)-C(31)	109.3(6)
C(18)-C(19)-C(31)	103.4(6)
C(34)-C(21)-C(11)	112.7(6)
C(34)-C(21)-C(15)	108.0(6)
C(11)-C(21)-C(15)	113.9(7)
O(7)-C(22)-C(40)	120.5(7)
O(7)-C(22)-C(19)	125.7(7)
C(40)-C(22)-C(19)	113.8(6)
C(28)-C(23)-C(37)	116.3(6)
C(15)-C(25)-C(36)	113.8(6)
C(39)-C(40)-C(22)	117.0(7)
C(16)-C(28)-C(23)	110.7(6)
C(16)-C(30)-C(31)	105.8(7)
C(30)-C(31)-C(19)	105.2(7)

3.4.1.2 – Composto (MRCH7)

A molécula isolada da fração hexânica, apresenta-se como um cristal na forma de escamas, de cor branca. pf. 134,2°C – 135,6 °C. O espectro na região do IV (**Figura 21, p162**), obtido em solução de KBr, revelou a presença de bandas de estiramento para grupos hidroxila em 3426 cm⁻¹, sistema alifático 2937 cm⁻¹, ligação olefínica em 1663 cm⁻¹, banda de estiramento C-O foi observado a 1047 cm⁻¹, além de banda de deformação do esqueleto carbônico olefínico em 1462 e 1376 cm⁻¹.

O espectro de RMN¹H (**Figura 22, p162**) possui um simpleto largo em δ 5,38 e um multipeto a δ 3,55. Em campo alto δ 2,40-0,40, o espectro possui uma série de sinais de complexidade elevada. Observa-se dois sinais simples a δ 0,71 e δ 1,05 referentes a dois grupos metilas, dois sinais na forma de dupletos a δ 0,82 (J=7 Hz), um terceiro dupeto a δ 0,95 J=7,0 Hz referentes a três grupos metilas. Um triplete é observado a δ 0,87 com J=7 Hz (tab 12, p108). A análise conjunta dos dados obtidos dos espectros de RMN ¹³C e DEPT (**Figura 23, p163**) permitiram reconhecer um total de vinte e nove átomos de carbono, dentre os quais três são não hidrogenados (C)₃, nove são monoidrogenados (CH)₉, onze diidrogenados (CH₂)₁₁ e seis triidrogenados (CH₃)₆ (**Tabela 14, pag 106**).

Os sinais a δ 140,28 e δ 121,73 referem-se a uma ligação dupla trissubstituída o sinal a δ 71,83 refere-se a um grupo carbinólico metínico. A comparação com os dados da literatura (DE OLIVEIRA, 2003) (**Tabela 14, pag 106**), e comparação com amostra autêntica por CDC permitiu identificar a amostra como sendo o β -sitosterol (3 β -estigmast-5-em-3-ol), um esteróide muito comum entre as plantas superiores, tendo sido isolado de várias espécies de plantas. Este composto apresenta várias atividades biológicas, apresentando efeito hiperlipoproteinemia, inibindo a absorção do colesterol, pelo aumento do catabolismo das lipoproteínas de baixa densidade, além de atividade antitumoral e antinociceptiva (HESS, 1995).



MRCH7

Tabela 14 - RMN da substância MRCH7 e do modelo da literatura (De Oliveira, 2003) em CDCl₃, deslocamento em δ .

	MRCH7		β -Sitosterol	
	H ¹	C ¹³	H ¹	C ¹³
1		31,25		31,25
2		31,69		32,05
3	3,55 (m)	71,83	3,55 – 3,42 (m)	72,20
4		43,00		42,25
5		140,28		141,16
6	5,38 (m)	121,73	5,34 – 5,26 (m)	122,12
7		31,69		32,32
8		31,93		32,31
9		50,16		50,55
10		36,53		37,66
11	1,05 (s)	21,10	0,98 (s)	21,49
12		39,80		40,19
13		42,33		42,69
14		56,79		57,18
15		24,32		24,71
16		28,26		28,65
17		56,08		56,47
18	0,71 (s)	11,87	0,70 (s)	12,26
19	1,05 (s)	19,40	1,03 (s)	19,44
20		36,16		36,55
21	0,95 (d)	18,79		18,18
22		31,93	0,95 – 0,83 (m)	32,04
23		26,12		26,51
24		45,87		46,25
25		29,19		29,57
26	0,82 (d)	19,82	0,91 – 0,77 (s)	19,80
27	0,82 (d)	19,05		19,19
28		23,09		23,48
29	0,87 (t)	11,99		12,27

Dados de RMN ¹H 400-MHz, ¹³C obtido a 100 MHz, padrão interno TMS.

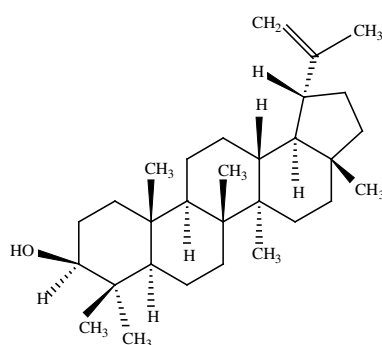
3.4.1.3 – Composto (MRCH4)

A molécula isolada da fração hexânica, apresenta-se como um sólido branco de ponto de fusão 176-178°C. Sua natureza triterpenoídica foi sugerida por apresentar coloração rósea a vermelhada frente ao reagente de Liebermann-Burchard. O espectro na região IV, obtido em solução de KBr (**Figura 24, p163**), revelou a presença de bandas de estiramento para grupos hidroxila (3375 e 1043 cm⁻¹), de ligação dupla do tipo metileno terminal (1639 e 880 cm⁻¹) e grupos alquila saturados (2943, 2870, 1454 e 1380 cm⁻¹).

Os dados obtidos do espectro de RMN ^1H , a 200 MHz, em CDCl_3 (**Figura 25, p164; Tabela 15, p108**) revelaram sinais cujos valores de deslocamento químicos, multiplicidade e constante de acoplamento estão condizentes com a presença de grupos metila terciários $\{\delta 0,74, 0,77, 0,81, 0,93, 0,95, 1,01(\text{s})\}$, de uma unidade isopropilidênica $\{\delta 1,66, 3\text{H} (\text{s}), \delta 4,66 (\text{d}, J=2,4 \text{ Hz})\}$ e $4,54 \{\text{d}, J=2,4 \text{ Hz}\}$ e hidrogênio metínico carbinólico $\{\delta 3,21, 1\text{H} (\text{m})\}$.

A análise conjunta dos dados obtidos dos espectros de RMN ^{13}C e DEPT a 135 MHz (**Figura 26, p165; Tabela 15, p108**) permitiram reconhecer um total de trinta átomos de carbono, dentre estes destacam-se as absorções a $\delta 150,94(\text{C})$ e $\delta 109,31 (\text{CH}_2)$ atribuídas a uma ligação dupla dissubstituída, confirmando a unidade isopropilidênica. Observa-se um sinal para carbono monoidrogenado carbinólico $\delta 78,99 (\text{CH})$, cujo valor de deslocamento químico sugere a presença de um grupo hidroxila em C-3 de triterpeno pentacíclico da série lupano.

Esta proposta estrutural foi reforçada pela comparação com os dados espectrais obtidos com os descritos na literatura (MAHATO e KUNDU 1994) (**Tabela 15, p108**). O espectro de massas (**Figura 27, p166**) mostrou pico correspondente ao íon molecular em $m/z 426 (38\%)$, compatível com a fórmula molecular ($\text{C}_{30}\text{H}_{56}\text{O}$). A substância MRCH4 foi assim identificada como sendo um triterpenóide pentacíclico da série lupano, denominado de 3β -hidroxi-lup-20(29)-ene, conhecido como lupeol.



MRCH4

Tabela 15. RMN da substância MRCH4 e do modelo da literatura modelo do lupeol (Mahato & Kundu, 1994) em CDCl₃, deslocamento em δ .

	MRCH4	MRCH4	Lupeol	Lupeol
	H ¹	C ¹³	H ¹	C ¹³
1		38,70 CH ₂		38,7
2		27,42 CH ₂		27,4
3	3,21-3,13 (m)	78,99 CH		78,9
4		38,83 C		38,8
5		55,29 CH		55,3
6		18,31CH ₂		18,3
7		34,28 CH ₂		34,2
8		40,82 C		40,8
9		50,43 CH		50,4
10		37,16 C		37,1
11		20,92 CH ₂		20,9
12		25,14 CH ₂		25,1
13		38,05 CH		38,0
14		42,80 C		42,8
15		27,42 CH ₂		27,4
16		35,58 CH ₂		35,5
17		42,98 C		43,0
18		48,30 CH		48,3
19	2,43-2,29 (m)	47,97 CH		47,9
20		150,94 C		150,9
21		29,84 CH ₂		29,8
22		39,99 CH ₂		40,0
23	0,74(s)	27,99 CH ₃		28,0
24	0,77 (s)	15,36 CH ₃		15,4
25	0,81(s)	16,10 CH ₃		16,1
26	0,93(s)	15,99 CH ₃		15,9
27	0,95(s)	14,54 CH ₃		14,5
28	1,01(s)	17,99 CH ₃		18,0
29	4,66 (d,J=2,4 Hz)	109,31 CH ₂		109,3
	4,55 (d,J=2,4 Hz)			
30	1,66(s)	19,30 CH ₃		19,3

Dados de RMN ¹H 200-MHz, ¹³C obtido a 50 MHz, padrão interno TMS.

3.4.1.4 – Composto (MRCH5)

A molécula isolada da fração hexânica, apresenta-se como um sólido branco de ponto de fusão 176-178°C. Sua natureza esteroideal foi sugerida por apresentar coloração roxa frente ao reagente de Liebermann-Burchard. O espectro na região IV, obtido em solução de KBr (**Figura 28, p166**), revelou a presença de bandas de estiramento para grupos hidroxila (3427cm⁻¹), sistema alifático 2937 cm⁻¹, de ligação olefinicas (1644 cm⁻¹).

O espectro de RMN¹H ((**Figura 29, p166 ;Tabela 16 , p110.**) revelou a presença de sinais simples e múltiplos correspondentes a grupos metílicos entre (δ 0,98 a 0,65), um multiplete referente a hidrogênio carbinólico (δ 3,55 – 3,42) , hidrogênio olefínico (δ 5,34-5,26), além de sinais para grupos metílicos condizentes com a presença de um núcleo esteroidal.

A análise conjunta dos dados obtidos dos espectros de RMN ¹³C e DEPT a 135 MHz (**Figura 30 p167. ;Tabela 16, p110**) permitiram reconhecer a natureza dos sinais de átomos de carbono, como sendo quaternários (C) , monoidrogenados(CH)₃ , diidrogenados (CH₂) e triidrogenados (CH₃). Dentre esses carbonos, ressaltam-se os valores de deslocamentos químicos referentes aos carbonos sp² C-5 (δ 140,75) e C-6 (δ 121,7), do carbono C-22 (δ 138,31) e C-23 (δ 129,26), vale ressaltar o deslocamento do carbono sp³ oxigenado C-3 (δ 71,79).

Esta proposta estrutural foi reforçada pela comparação com os dados espectrais obtidos com os descritos na literatura (MACARI e col., 1990). O espectro de massas mostrou pico correspondente ao íon molecular em m/z 412(38%), compatível com a substância MRCH5, que foi identificada como sendo do estigmasterol.

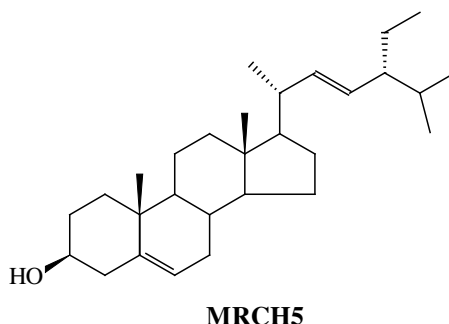


Tabela 16. RMN da substância MRCH5 e do modelo da literatura modelo do estigmasterol (MACARI e col., 1990) em CDCl₃, deslocamento em δ .

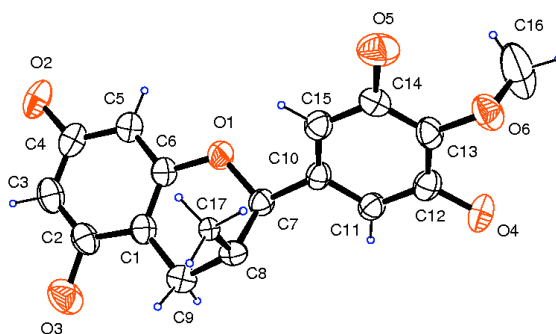
	MRCH5	MRCH5
	H ¹	C ¹³
1		37,25 CH ₂
2		31,65 CH ₂
3	3,55-3,42 (m)	71,79 CH
4		42,29 CH ₂
5		140,75 C
6	5,34-5,26 (m)	121,70 CH
7		31,65 CH ₂
8		31,89 CH ₂
9		50,12 CH
10		36,50 C
11		21,07 CH ₂
12		39,76 CH ₂
13		39,76 C
14		56,86 CH
15		24,29 CH ₂
16		29,00 CH ₂
17		55,95 CH
18	0,65 (s)	11,85 CH ₃
19	0,98 (s)	19,02 CH ₃
20		40,48 CH
21		21,20 CH ₃
22	5,19-5,0 (m)	138,31 CH
23	5,19-5,0 (m)	129,26 CH
24		51,23 CH
25		29,70 CH
26		21,00 CH ₃
27		19,39 CH ₃
28		25,39 CH ₂
29		12,24 CH ₃

Dados de RMN ¹H 200-MHz, ¹³C obtido a 50 MHz, padrão interno TMS.

3.4.1.5 – Composto (MRCA1)

A molécula isolada da fração em acetato de etila, apresenta-se como um cristal marrom em forma de agulhas, esta foi submetida à análise cristalográfica através da difração de raio X (**Tabela 17 a 21, p112-123**). Sua estrutura foi resolvida pelos Métodos Diretos utilizando o programa SHELXS-97 [Sheldrick,1998]. O pacote de programas utilizado foi o WinGX [Farrugia,1999]. O refinamento do modelo inicial foi feito pelo método de mínimos quadrados com matriz completa e cálculos de Fourier diferença utilizando o sistema de programas SHELXL97 [Sheldrick, 1998] instalado.

O processo de refinamento foi sempre acompanhado de verificação da geometria e confiabilidade química do modelo, através de cálculos de distâncias e ângulos interatômicos. O índice de verificação da adequação do sistema de pesos utilizado no refinamento foi o “goodness of fit” (GOF).



MRCA1

Tabela 17 – Dados cristalográficos e refinamento de estrutura para MRCA1

Formula empírica	C ₁₇ H ₁₈ O ₆
Peso molecular	318
Temperatura	293(2) K
Comprimento de onda	0.71073 Å
Dimensões da cela unitária	a = 8.7740(3) Å $\alpha = 90^\circ$ b = 19.9170(4) Å $\beta = 97.4130(10)^\circ$ c = 10.2570(4) Å $\gamma = 90^\circ$
Volume	1777.45(10) Å ³
Z, densidade calculada	4, 1.425 Mg/m ³
Coefficiente de absorção	0.120 mm ⁻¹
F (000)	796
Tamanho do cristal	0.20 x 0.20 x 0.20 mm
Índices limitantes	-11<=h<=11, -24<=k<=25, -13<=l<=13
Rreflexões únicas coletadas	7706 / 7706 [R(int) = 0.0000]
Completância dos dados	27.54 99.0 %
Transmissão max e min	0.9765 e 0.9765
Método de refinamento	Matrix completa de mínimos quadrados n sobre F ²
Dados e parâmetros	7706 / 0 / 470
Avaliação do F ²	1.05
Índice R final[I>2sigma(I)]	R1 = 0.0826, wR2 = 0.2182
Índice R (todos os dados)	R1 = 0.1049, wR2 = 0.2439
Coefficiente de extinção	0.2(14)
Maior diferença entre os picos	0.734 and -0.489 e.Å ⁻³

Tabela 18 – Coordenadas atômica ($\times 10^4$) e parâmetros isotrópico equivalentes ($\text{Å}^2 \times 10^3$) para MRCA1.

	X	Y	Z	U(eq)
C(29)	7565(4)	4114(5)	15449(3)	20(1)
C(15)	7933(4)	2662(5)	5255(3)	23(1)
O(5)	6648(4)	4000(5)	9103(4)	55(1)
O(9)	-209(4)	4549(5)	7481(4)	51(1)
(10)	239(5)	3291(5)	13844(6)	86(2)
O(111)	6137(5)	5158(5)	10410(4)	67(1)
O(113)	9226(6)	5152(6)	9876(6)	98(2)
O(112)	9473(8)	3420(6)	10376(8)	121(2)
C(16)	2976(7)	4236(5)	9764(6)	58(1)
C(36)	3760(14)	2102(6)	9787(7)	104(3)
O(3)	9462(5)	-380(5)	7640(5)	65(1)
O(22)	3749(10)	5894(5)	9020(7)	123(3)
O(46)	10243	7030	10888	209(3)
O(47)	10557	6284	9046	209(3)
O(1)	6822(4)	1692(5)	6992(3)	45(1)
O(6)	3546(4)	4368(5)	8537(3)	45(1)
O(13)	2161(4)	2644(5)	12306(4)	53(1)
O(78)	6542(4)	4956(5)	13235(3)	43(1)
O(101)	9501(4)	6965(5)	13390(5)	58(1)
O(2)	8270(5)	500(5)	3315(4)	58(1)
C(30)	5227(5)	3900(5)	13025(4)	35(1)
O(4)	1642(4)	3592(5)	6691(4)	58(1)
C(31)	3807(5)	3583(5)	13 024(4)	38(1)
O(14)	7189(5)	2675(5)	11163(4)	68(1)
O(15)	4392(5)	2071(5)	11093(4)	55(1)
C(9)	5247(5)	2686(5)	6786(4)	38(1)
C(25)	7147(5)	5498(5)	13964(4)	37(1)
C(4A)	7492(5)	1096(5)	5089(4)	39(1)
O(11)	7523(6)	6203(5)	17240(4)	67(1)
C(24)	7957(5)	5960(5)	13286(5)	42(1)
C(28)	5489(5)	4540(5)	13825(4)	36(1)
C(23)	8681(5)	6495(5)	13988(5)	45(1)
C(12)	4100(5)	3805(5)	7966(4)	37(1)
C(2)	5793(5)	2091(5)	6077(4)	38(1)
C(5)	8199(5)	520(5)	4636(5)	44(1)
(35)	6357(5)	3610(5)	12418(5)	41(1)
C(14)	3734(5)	2868(5)	6477(5)	40(1)
C(27)	6043(5)	4409(5)	15287(4)	36(1)

Continuação da Tabela 18

	X	Y	Z	U(eq)
C(3)	6582(5)	2277(5)	86(4)	39(1)
C(20)	6996(5)	5571(5)	15292(5)	39(1)
C(21)	7705(6)	6139(5)	15920(5)	46(1)
C(34)	6090(5)	2993(5)	11748(4)	42(1)
C(33)	4673(6)	2689(5)	11714(4)	42(1)
C(11)	5638(5)	3627(5)	8260(4)	40(1)
C(8)	8074(6)	648(5)	7302(5)	45(1)
C(32)	3531(5)	2979(5)	12352(5)	42(1)
C(8A)	7431(5)	1140(5)	6426(5)	41(1)
C(10)	6233(5)	3063(5)	7679(5)	41(1)
C(26)	6136(5)	5070(5)	16016(5)	41(1)
C(22)	8549(6)	6581(5)	15306(5)	50(1)
C(6)	8856(6)	28(5)	5481(6)	51(1)
C(4)	6883(6)	1643(5)	4139(4)	44(1)
C(13)	3151(5)	3424(5)	7068(4)	40(1)
C(7)	8791(6)	104(5)	6797(6)	49(1)

Tabela 19 – Comprimento de ligação [Å] e ângulo de ligação [°] para MRCA1.

C(29)-C(27)	1.449(5)
C(29)-H(37A)	0.9600
C(29)-H(37B)	0.9600
C(29)-H(37C)	0.9600
C(15)C(3)	1.421(6)
C(15)H(19A)	0.9600
C(15)H(19B)	0.9600
C(15)H(19C)	0.9600
O(5)C(11)	1.373(6)
O(5)H(21)	1.148(9)
O(112)H(22)	1.346(12)
C(16)O(6)	1.438(6)
C(16)H(17A)	0.9600
C(16)H(17B)	0.9600
C(16)H(17C)	0.9600
C(36)O(15)	1.384(8)
C(36)H(40 ^a)	0.9600
C(36)H(40B)	0.9600
C(36)H(40)	0.9600
O(3)C(7)	1.375(6)
O(3)H(28)	0.878(6)
O(1)C(8 ^a)	1.382(5)
O(1)C(2)	1.452(5)
O(6)C(12)	1.382(5)
O(13)C(32)	1.370(6)
O(13)H(87)	1.157(6)
O(78)C(25)	1.381(5)
O(78)C(28)	1.432(5)
O(101)C(23)	1.374(6)
O(2)H(5)	1.365(7)
O(2)H(27)	1.094(6)
C(30)C(35)	1.365(6)
C(30)C(31)	1.396(6)
C(30)C(28)	1.518(6)
O(4)C(13)	1.371(6)
O(4)H(23)	1.201(6)
C(31)C(32)	1.393(7)
C(31)H(33)	0.9300
O(14)C(34)	1.357(6)
O(15)C(33)	1.392(6)
C(9)C(14)	1.373(6)
C(9)C(10)	1.394(6)

Continuação da Tabela 19

C(9)C(2)	1.502(6)
C(25)C(20)	1.393(6)
C(25)C(24)	1.401(6)
C(4A)C(8A)	1.382(7)
C(4A)C(5)	1.411(6)
C(4A)C(4)	1.514(6)
O(11)C(21)	1.389(6)
O(11)H(20)	0.879(8)
C(24)C(23)	1.392(7)
C(24)H(26)	0.9300
C(28)C(27)	1.538(8)
C(23)C(22)	1.382(8)
C(12)C(13)	1.386(6)
C(12)C(11)	1.390(7)
C(2)C(3)	1.525(7)
C(2)H(89)	1.038(7)
C(5)C(6)	1.384(7)
C(35)C(34)	1.412(7)
C(35)H(29)	0.9300
C(14)C(13)	1.392(6)
C(14)H(16)	0.9300
C(27)C(26)	1.509(6)
C(3)C(4)	1.517(6)
C(3)H(79)	1.010(7)
C(20)C(21)	1.406(6)
C(20)C(26)	1.505(6)
C(21)C(22)	1.356(8)
C(34)C(33)	1.380(7)
C(33)C(32)	1.391(7)
C(11)C(10)	1.404(6)
C(8)C(7)	1.385(7)
C(8)C(8A)	1.398(6)
C(8)H(2)	0.9300
C(10)H(12)	0.9300
C(26)H(21A)	0.9700
C(26)H(21B)	0.9700
C(22)H(18)	0.9300
C(6)C(7)	1.367(8)
C(6)H(10)	0.9300
C(4)H(7A)	0.9700
C(4)H(7B)	0.9700

Continuação da Tabela 19

C(12)C(13)	1.386(6)
C(12)C(11)	1.390(7)
C(2)C(3)	1.525(7)
C(2)H(89)	1.038(7)
C(5)C(6)	1.384(7)
C(35)C(34)	1.412(7)
C(35)H(29)	0.9300
C(14)C(13)	1.392(6)
C(14)H(16)	0.9300
C(27)C(26)	1.509(6)
C(3)C(4)	1.517(6)
C(3)H(79)	1.010(7)
C(20)C(21)	1.406(6)
C(20)C(26)	1.505(6)
C(21)C(22)	1.356(8)
C(34)C(33)	1.380(7)
C(33)C(32)	1.391(7)
C(11)C(10)	1.404(6)
C(8)C(7)	1.385(7)
C(8)C(8A)	1.398(6)
C(8)H(2)	0.9300
C(10)H(12)	0.9300
C(26)H(21A)	0.9700
C(26)H(21B)	0.9700
C(22)H(18)	0.9300
C(6)C(7)	1.367(8)
C(6)H(10)	0.9300
C(4)H(7A)	0.9700
C(4)H(7B)	0.9700
C(12)C(13)	1.386(6)
C(12)C(11)	1.390(7)
C(2)C(3)	1.525(7)
C(2)H(89)	1.038(7)
C(5)C(6)	1.384(7)
C(35)C(34)	1.412(7)
C(35)H(29)	0.9300
C(14)C(13)	1.392(6)
C(14)H(16)	0.9300
C(27)C(26)	1.509(6)
C(3)C(4)	1.517(6)

Continuação da Tabela 19

C(12)C(13)	1.386(6)
C(12)C(11)	1.390(7)
C(2)C(3)	1.525(7)
C(2)H(89)	1.038(7)
C(5)C(6)	1.384(7)
C(35)C(34)	1.412(7)
C(35)H(29)	0.9300
C(14)C(13)	1.392(6)
C(14)H(16)	0.9300
C(27)C(26)	1.509(6)
C(3)C(4)	1.517(6)
C(3)H(79)	1.010(7)
C(20)C(21)	1.406(6)
C(20)C(26)	1.505(6)
C(21)C(22)	1.356(8)
C(34)C(33)	1.380(7)
C(33)C(32)	1.391(7)
C(11)C(10)	1.404(6)
C(8)C(7)	1.385(7)
C(8)C(8A)	1.398(6)
C(8)H(2)	0.9300
C(10)H(12)	0.9300
C(26)H(21A)	0.9700
C(26)H(21B)	0.9700
C(22)H(18)	0.9300
C(6)C(7)	1.367(8)
C(6)H(10)	0.9300
C(4)H(7A)	0.9700
C(4)H(7B)	0.9700
C(27)C(29)	H(37 ^a)109.5
C(27)C(29)	H(37B)109.5
H(37A)C(29)	H(37B)109.5
C(27)C(29)	H(37C)109.5
H(37A)C(29)	H(37C)109.5
H(37B)C(29)	H(37C)109.5
C(3)C(15)	H(19A)109.5
C(3)C(15)	H(19B)109.5
H(19A)C(15)	H(19B)109.5

Continuação da Tabela 19

C(3)C(15)	H(19C)109.5
H(19A)C(15)	H(19C)109.5
H(19B)C(15)	H(19C)109.5
C(11)O(5)	H(21) 113.9(4)
O(6)C(16)	H(17A)109.5
O(6)C(16)	H(17B)109.5
H(17A)C(16)	H(17B)109.5
O(6)C(16)	H(17C)109.5
H(17A)C(16)	H(17C)109.5
H(17B)C(16)	H(17C)109.5
O(15)C(36)	H(40A)109.5
O(15)C(36)	H(40B)109.5
H(40A)C(36)	H(40B)109.5
O(15)C(36)	H(40C)109.5
H(40A)C(36)	H(40C)109.5
H(40B)C(36)	H(40C)109.5
C(7)O(3)	H(28)106.1(7)
C(8A)O(1)	C(2)113.9(3)
C(12)O(6)	C(16)113.8(3)
C(32)O(13)	H(87)113.0(5)
C(25)O(78)	C(28)116.6(3)
C(5)O(2)	H(27)15.0(4)
C(35)C(30)	C(31)120.6(4)
C(35)C(30)	C(28)122.2(4)
C(31)C(30)	C(28)116.9(4)
C(13)O(4)	H(23)98.0(3)
C(32)C(31)	C(30)119.3(4)
C(32)C(31)	H(33)120.4
C(30)C(31)	H(33)120.4
C(36)O(15)	C(33)115.4(4)
C(14)C(9)	C(10)120.6(4)
C(14)C(9)	C(2)117.1(4)
C(10)C(9)	C(2)122.2(4)
O(78)C(25)	C(20)122.2(4)
O(78)C(25)	C(24)115.4(4)
C(20)C(25)	C(24)122.4(4)
C(8A)C(4A)	C(5)117.0(4)
C(8A)C(4A)	C(4)122.5(4)

Continuação da Tabela 19

C(5)C(4A)	C(4)120.5(4)
C(21)O(11)	H(20)133.4(6)
C(23)C(24)	C(25)118.1(4)
C(23)C(24)	H(26)120.9
C(25)C(24)	H(26)120.9
O(101)C(23)	C(22)117.9(4)
O(101)C(23)	C(24)121.4(5)
C(22)C(23)	C(24)120.7(5)
O(6)C(12)	C(13)120.8(4)
O(6)C(12)	C(11)120.0(4)
C(13)C(12)	C(11)119.2(4)
O(1)C(2)	C(9)109.3(3)
O(1)C(2)	C(3)110.0(3)
C(9)C(2)	C(3)113.7(4)
O(1)C(2)	H(89)107.5(5)
C(9)C(2)	H(89)111.1(5)
C(1)C(2)	H(89)105.0(4)
C(9)C(2)	C(6)122.2(4)
C(3)C(2)	C(4A)115.4(4)
O(2)C(5)	C(4A)122.3(5)
O(2)C(5)	C(34)120.3(4)
C(6)C(5)	H(29)119.8
C(34)C(35)	H(29)119.8
C(9)C(14)	C(13)120.6(4)
C(9)C(14)	H(16)119.7
C(13)C(14)	H(16)119.7
C(29)C(27)	C(26)107.9(3)
C(29)C(27)	C(28)110.5(3)
C(26)C(27)	C(28)109.0(4)
C(15)C(3)	C(4)112.9(4)
C(15)C(3)	C(2)111.5(3)
C(4)C(3)	C(2)109.2(4)
C(15)C(3)	H(79)104.6(5)
C(4)C(3)	H(79)111.7(5)
C(2)C(3)	H(79)106.7(4)
C(25)C(3)	C(21)116.1(4)
C(25)C(3)	C(26)122.0(4)
C(21)C(20)	C(26)121.9(4)

Continuação da Tabela 19

C(22)C(20)	O(11)122.1(4)
C(22)C(21)	C(20)123.0(5)
O(11)C(21)	C(20)114.9(5)
O(14)C(21)	C(33) 118.2(4)
O(14)C(34)	C(35)122.6(5)
C(33)C(34)	C(35) 119.2(4)
C(34)C(34)	C(32)120.5(4)
C(34)C(34)	O(15)120.4(4)
C(32)C(33)	O(15)119.1(4)
O(5)C(33)	C(12)121.9(4)
O(5)C(33)	C(10)117.0(4)
C(12)C(11)	C(10)121.0(4)
C(7)C(11)	C(8A)118.2(5)
C(7)C(11)	H(2) 120.9
C(8A)C(8)	H(2)120.9
O(13)C(8)	C(33)117.6(4)
O(13)C(8)	C(31)122.2(4)
C(33)C(32)	C(31)120.1(4)
O(1)C(32)	C(4A)122.3(4)
O(1)C(32)	C(8)115.7(4)
C(4A)C(A8)	C(8)121.9(4)
C(9)C(10)	C(11)118.4(4)
C(9)C(10)	H(12)120.8
C(11) C(10)	H(12)120.8
C(20)C(26)	C(27)109.4(4)
C(20)C(26)	H(21A)109.8
C(27)C(26)	H(21A)109.8
C(20)C(26)	H(21B)109.8
C(27)C(26)	H(21B)109.8
H(21A)C(26)	H(21B)108.2
C(21)C(22)	C(23)119.6(4)
C(21)C(22)	H(18)120.2
C(23)C(22)	H(18)120.2
C(7)C(6)	C(5)118.2(4)
C(7)C(6)	H(10)120.9
C(5)C(6)	H(10)120.9
C(4A)C(4)	C(3) 10.1(4)
C(4A)C(4)	H(7A)109.6
C(3)C(4)	H(7A)109.6
C(4A)C(4)	H(7B)109.6
C(3)C(4)	H(7B)109.6
H(7A)C(4)	H(7B)108.1
O(4)C(13)	C(12)122.0(4)

Tabela 20 – Parâmetros de deslocamento anisotrópico ($\text{Å}^2 \times 10^3$) para MRCA1. Fator esponencial da amostra anisotrópica tem a forma: $-2(h^2 a^{*2} U_{11} + 2 hka^* b^* U_{12})$.

	U11	U22	U33	U23	U13	U12
C(29)	21(2)	16(2)	23(2)	1(1)	1(1)	2(1)
O(5)	52(2)	57(2)	53(2)	-17(2)	-4(2)	0(2)
O(9)	45(2)	53(2)	57(2)	-4(2)	6(2)	1(2)
O(10)	59(3)	69(3)	136(5)	10(3)	37(3)	2(2)
O(111)	84(3)	60(2)	56(2)	-7(2)	5(2)	-9(2)
O(113)	79(3)	130(5)	83(3)	-36(3)	6(3)	-12(3)
O(112)	90(4)	136(6)	133(6)	12(5)	-1(4)	-21(4)
C(16)	67(3)	52(3)	57(3)	-8(2)	20(3)	3(2)
C(36)	178(10)	59(4)	62(4)	2(3)	-35(5)	-29(5)
O(3)	68(2)	43(2)	84(3)	23(2)	4(2)	14(2)
O(22)	163(6)	84(4)	105(4)	32(3)	-48(4)	-49(4)
O(1)	52(2)	41(2)	41(2)	3(1)	4(1)	12(1)
O(6)	55(2)	34(2)	47(2)	1(1)	12(1)	4(1)
(13)	44(2)	40(2)	74(2)	0(2)	4(2)	-14(1)
O(78)	51(2)	39(2)	40(2)	2(1)	5(1)	-10(1)
O(101)	43(2)	39(2)	93(3)	8(2)	6(2)	8(1)
O(101)	43(2)	39(2)	93(3)	8(2)	6(2)	-8(1)
C(30)	36(2)	32(2)	38(2)	4(2)	1(2)	-3(2)
O(4)	38(2)	56(2)	78(3)	-16(2)	-1(2)	8(2)
C(31)	37(2)	40(2)	37(2)	3(2)	5(2)	-3(2)
O(14)	66(2)	73(3)	69(3)	-7(2)	27(2)	13(2)
O(15)	80(3)	37(2)	45(2)	-4(1)	2(2)	-1(2)
C(9)	42(2)	32(2)	42(2)	2(2)	8(2)	3(2)
C(25)	38(2)	29(2)	42(2)	1(2)	1(2)	2(2)
C(4A)	37(2)	34(2)	45(2)	-6(2)	-2(2)	2(2)
O(11)	96(3)	47(2)	58(2)	-13(2)	11(2)	-2(2)
C(24)	41(2)	37(2)	45(2)	3(2)	1(2)	0(2)
C(28)	38(2)	31(2)	40(2)	1(2)	6(2)	-1(2)
C(12)	45(2)	33(2)	34(2)	3(2)	12(2)	1(2)
C(2)	39(2)	34(2)	38(2)	-3(2)	1(2)	5(2)
C(5)	37(2)	34(2)	59(3)	-11(2)	1(2)	-2(2)
C(35)	38(2)	44(2)	40(2)	2(2)	3(2)	-2(2)
C(14)	35(2)	36(2)	48(2)	-4(2)	1(2)	-2(2)
C(27)	34(2)	40(2)	35(2)	1(2)	8(2)	2(2)
C(3)	47(2)	34(2)	34(2)	-1(2)	1(2)	7(2)
C(20)	39(2)	30(2)	46(2)	-2(2)	2(2)	2(2)
C(21)	52(3)	36(2)	49(3)	-12(2)	2(2)	6(2)
C(34)	49(2)	40(2)	36(2)	0(2)	6(2)	7(2)
C(33)	55(3)	28(2)	42(2)	-1(2)	2(2)	-3(2)
C(11)	46(2)	38(2)	34(2)	-3(2)	2(2)	-2(2)
C(8)	46(2)	38(2)	52(3)	9(2)	4(2)	4(2)

Continuação da Tabela 20

	U11	U22	U33	U23	U13	U12
C(32)	45(2)	35(2)	47(2)	8(2)	4(2)	-3(2)
C(8A)	42(2)	28(2)	52(3)	0(2)	5(2)	0(2)
C(10)	35(2)	48(2)	42(2)	-8(2)	7(2)	7(2)
C(26)	43(2)	40(2)	39(2)	2(2)	7(2)	5(2)
C(22)	51(3)	37(2)	57(3)	-6(2)	-7(2)	4(2)
C(6)	43(2)	34(2)	74(4)	-8(2)	-1(2)	6(2)
C(4)	55(3)	37(2)	37(2)	-2(2)	-2(2)	9(2)
C(13)	38(2)	39(2)	41(2)	2(2)	5(2)	3(2)
C(7)	44(3)	35(2)	66(3)	7(2)	0(2)	0(2)

Tabela 21 – Coordenadas de hidrogênio e parâmetros isotrópicos equivalentes para MRCA1

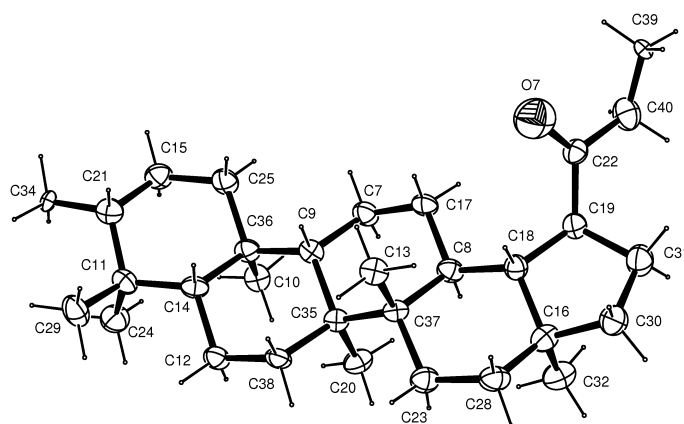
	X	Y	Z	U(eq)
H(37A)	7536	3692	14993	30
H(37B)	7899	4042	16367	30
H(37C)	8267	4412	15094	30
H(19A)	7678	3055	5722	34
H(19B)	8368	2792	4482	34
H(19C)	8665	2397	5812	34
H(17A)	2605	4645	10103	86
H(17B)	3790	4057	10383	86
H(17C)	2152	3916	9626	86
H(40A)	3605	1655	9445	156
H(40B)	4445	2340	9292	156
H(40C)	2791	2332	9717	156
H(21)	6167	4509	9380	180(3)
H(20)	7723	6527	17818	186(3)
H(23)	1419	3887	7669	186(3)
H(22)	9981	2783	10354	186(3)
H(24)	772	2551	13599	192(3)
H(27)	9179	181	3016	190(3)
H(28)	9473	-217	8436	180(3)
H(87)	1273	2924	12848	193(3)
H(79)	5864	2592	4333	181(3)
H(89)	4879	1785	5708	181(3)
H(33)	3054	3774	13467	46
H(26)	8009	5911	12391	50
H(29)	7307	3820	12445	46
H(16)	3094	2618	5867	48
H(2)	8021	684	8199	55
H(12)	7260	2942	7884	50
H(21A)	5109	5235	16081	49
H(21B)	6661	5007	16899	49
H(18)	9036	6939	15769	60
H(10)	9329	-345	5163	62
H(7A)	5937	1495	3626	53
H(7B)	7625	1737	3540	53

3.4.1.7 – Composto (MRCCP1/MRCCP2)

A molécula isolada da fração em clorofórmica e acetato de etila da extração em fase sólida, apresenta-se como um cristal em forma de agulha. pf. 334,1-234,9°C. Sua natureza triterpenoídica foi sugerida por apresentar coloração rósea a vermelhada frente ao reagente de Liebermann-Burchard.

Sua estrutura foi resolvida pelo método da difração de raio X (**Tabela 22 a 24, p125-130**), utilizando o programa SHELXS-97 [Sheldrick,1998]. O pacote de programas utilizado foi o WinGX [Farrugia,1999]. O refinamento do modelo inicial foi feito pelo método de mínimos quadrados com matriz completa e cálculos de Fourier diferença utilizando o sistema de programas SHELXL97 [Sheldrick, 1998] instalado.

O processo de refinamento foi sempre acompanhado de verificação da geometria e confiabilidade química do modelo, através de cálculos de distâncias e ângulos interatômicos. O índice de verificação da adequação do sistema de pesos utilizado no refinamento foi o “godness of fit” (GOF).



MRCCP1/MRCCP2

Tabela 22 – Dados cristalográficos e refinamento de estrutura para MRCCP1/MRCCP2

Formula empírica	C ₃₀ H ₅₁ O
Peso molecular	427
Temperatura	293(2) K
Comprimento de onda	0.71073 Å
Dimensões da cela unitária	a = 8.7682(3) Å $\alpha = 90^\circ$ b = 19.9258(4) Å $\beta = 97.5890(10)^\circ$ c = 10.2585(4) Å $\gamma = 90^\circ$
Volume	1776.60(10) Å ³
Z, densidade calculada	2,1.433 Mg/m ³
Coeficiente de absorção	0.121 mm ⁻¹
F (000)	812
Tamanho do cristal	0.20 x 0.20 x 0.20 mm
Índices limitantes	-10<=h<=10, -23<=k<=22, -12<=l<=12
Rflexões únicas coletadas	5728 / 5728 [R(int) = 0.002]
Completância dos dados	25.00 96.0 %
Transmissão max e min	0.9761 e 0.9761
Método de refinamento	Full matrix completa de mínimos quadrados n sobre F ²
Dados e parâmetros	5728 / 1 / 509
Avaliação do F ²	1.069
Índice R final[>2sigma(I)]	R1 = 0.0560, wR2 = 0.1293
Índice R (todos os dados)	R1 = 0.0688, wR2 = 0,1398
Coeficiente de extinção	0.033(5)

Tabela 23 – Coordenadas atômica ($\times 10^4$) e parâmetros isotrópico equivalentes ($\text{Å}^2 \times 10^3$) para MRCCP1/MRCCP2.

	X	Y	Z	U(eq)
O(11)	12839(3)	3329(1)	2701(3)	52(1)
O(12)	10604(4)	3898(1)	3907(3)	51(1)
O(13)	7813(4)	3298(2)	3825(4)	63(1)
O(14)	5526(3)	-999(1)	1597(4)	55(1)
O(15)	7497(5)	-229(2)	-2229(3)	65(1)
C(101)	11477(4)	2994(2)	2646(4)	40(1)
C(102)	10328(5)	3282(2)	3284(4)	39(1)
C(103)	8912(5)	2971(2)	3254(4)	42(1)
C(104)	8640(5)	2359(2)	2592(4)	40(1)
C(105)	9776(4)	2073(2)	1966(3)	35(1)
C(106)	11187(4)	2391(2)	1983(4)	37(1)
C(107)	9528(4)	1437(2)	1168(3)	35(1)
C(108)	8947(4)	1564(2)	-277(3)	35(1)
C(109)	8882(5)	901(2)	-1005(4)	39(1)
C(110)	8021(4)	398(2)	-285(4)	38(1)
C(111)	7290(5)	-162(2)	-931(4)	43(1)
C(112)	6451(5)	-612(2)	-301(4)	47(1)
C(113)	6345(4)	-525(2)	1011(4)	42(1)
C(114)	7046(4)	12(2)	1707(4)	39(1)
C(115)	7852(4)	470(2)	1039(4)	34(1)
O(116)	8471(3)	1010(1)	1773(3)	41(1)
C(17A)	10840(40)	3890(20)	5350(40)	68(6)
C(17B)	11380(30)	3837(18)	5170(40)	68(6)
O(118)	7440(3)	1854(1)	-442(3)	40(1)
O(21)	1654(3)	-3031(1)	4093(3)	52(1)
O(22)	-1449(3)	-3400(1)	3528(3)	42(1)
O(23)	-3354(3)	-2621(1)	1684(4)	57(1)
O(24)	3259(4)	473(2)	1677(3)	59(1)
O(25)	4479(4)	1345(2)	2669(4)	64(1)
C(201)	657(4)	-2653(2)	3256(3)	37(1)
C(202)	-899(4)	-2837(2)	2964(4)	35(1)
C(203)	-1849(4)	-2460(2)	2048(4)	39(1)
C(204)	-1262(4)	-1910(2)	1471(4)	38(1)
C(205)	250(4)	-1722(2)	1784(3)	35(1)
C(206)	1236(4)	-2100(2)	2675(4)	40(1)
C(207)	810(4)	-1124(2)	1076(4)	38(1)
C(208)	1581(4)	-1311(2)	-100(4)	37(1)
C(209)	1882(5)	-674(2)	-844(4)	43(1)
C(210)	2498(4)	-121(2)	105(4)	38(1)
C(211)	3204(5)	445(2)	-348(4)	43(1)
C(212)	3852(5)	938(2)	507(5)	48(1)
C(213)	3807(4)	857(2)	1834(5)	46(1)
C(214)	3081(5)	317(2)	2319(4)	44(1)
C(215)	2445(4)	-173(2)	1439(4)	37(1)

Continuação da Tabela 23

O(216)	1833(3)	-730(1)	1988(3)	43(1)
C(217)	-2014(6)	-3269(2)	4739(4)	53(1)
O(218)	2946(3)	-1697(1)	262(3)	43(1)
O(1W)	5198(3)	1415(2)	-2454(3)	50(1)
O(2W)	5777(5)	811(2)	-4865(5)	91(1)
O(3W)	4395(11)	-287(5)	-4042(9)	109(3)
O(4W)	5551(6)	2543(3)	4584(6)	108(2)
O(5W)	4780(12)	-1134(4)	3961(8)	106(3)
O(6W)	1165(4)	-4192(2)	5404(3)	66(1)
O(7W)	-1214(7)	-4926(2)	4016(5)	64(2)
O(8W)	14750(5)	2680(2)	1174(6)	87(1)
O(9W)	2190(50)	-657(17)	4780(20)	169(19)

Tabela 24 – Comprimento de ligação [Å] e ângulo de ligação [°] para MRCCP1/MRCCP2.

O(11)-C(101)	1.363(5)
O(12)-C(17B)	1.39(4)
O(12)-C(102)	1.389(5)
O(12)-C(17A)	1.46(4)
O(13)-C(103)	1.359(5)
O(14)-C(113)	1.371(5)
O(15)-C(111)	1.374(5)
C(101)-C(106)	1.388(5)
C(101)-C(102)	1.396(6)
C(102)-C(103)	1.385(6)
C(103)-C(104)	1.400(5)
C(104)-C(105)	1.378(5)
C(105)-C(106)	1.388(5)
C(105)-C(107)	1.509(5)
C(107)-O(116)	1.455(4)
C(107)-C(108)	1.524(5)
C(108)-O(118)	1.432(4)
C(108)-C(109)	1.514(5)
C(109)-C(110)	1.506(5)
C(110)-C(115)	1.393(5)
C(110)-C(111)	1.408(5)
C(111)-C(112)	1.374(6)
C(112)-C(113)	1.372(6)
C(113)-C(114)	1.385(5)
C(114)-C(115)	1.390(5)
C(115)-O(116)	1.382(4)
O(21)-C(201)	1.367(5)
O(22)-C(202)	1.378(4)
O(22)-C(217)	1.421(5)
O(23)-C(203)	1.361(5)
O(24)-C(211)	1.371(5)

Continuação da Tabela 24

O(25)-C(213)	1.375(5)
C(201)-C(206)	1.381(5)
C(201)-C(202)	1.406(5)
C(202)-C(203)	1.390(5)
C(203)-C(204)	1.379(5)
C(204)-C(205)	1.373(5)
C(204)-C(205)	1.373(5)
C(205)-C(206)	1.393(5)
C(205)-C(207)	1.511(5)
C(207)-O(216)	1.440(4)
C(207)-C(208)	1.506(5)
C(208)-O(218)	1.430(5)
C(208)-C(209)	1.522(5)
C(209)-C(210)	1.522(5)
C(210)-C(215)	1.380(6)
C(210)-C(211)	1.395(5)
C(211)-C(212)	1.387(6)
C(212)-C(213)	1.377(7)
C(213)-C(214)	1.376(6)
C(214)-C(215)	1.395(5)
C(102)-O(12)-C(17A)	1.384(4)
C(215)-O(216)	112.8(15)
C(17B)-O(12)-C(102)	21.7(17)
C(17B)-O(12)-C(17A)	116.6(17)
O(11)-C(101)-C(106)	123.2(4)
O(11)-C(101)-C(102)	117.5(3)
C(106)-C(101)-C(102)	119.3(3)
C(103)-C(102)-O(12)	120.5(3)
C(103)-C(102)-C(101)	120.4(3)
O(12)-C(102)-C(101)	119.1(3)
O(13)-C(103)-C(102)	117.3(3)
O(13)-C(103)-C(104)	122.9(4)
C(102)-C(103)-C(104)	119.7(3)
C(105)-C(104)-C(103)	119.9(3)
C(104)-C(105)-C(106)	120.2(3)
C(104)-C(105)-C(107)	122.6(3)
C(106)-C(105)-C(107)	117.0(3)
C(105)-C(106)-C(101)	120.4(3)
O(116)-C(107)-C(105)	108.3(3)
O(116)-C(107)-C(108)	111.2(3)
C(105)-C(107)-C(108)	113.2(3)

Continuação da Tabela 24

O(118)-C(108)-C(109)	108.7(3)
O(118)-C(108)-C(107)	111.6(3)
C(109)-C(108)-C(107)	108.7(3)
C(110)-C(109)-C(10)	109.1(3)
C(115)-C(110)-C(11)	116.2(3)
C(115)-C(110)-C(109)	122.3(3)
C(111)-C(110)-C(109)	121.5(3)
O(15)-C(111)-C(112)	122.7(3)
O(15)-C(111)-C(110)	115.0(4)
C(112)-C(111)-C(110)	122.2(4)
C(113)-C(112)-C(111)	119.4(3)
O(14)-C(113)-C(112)	116.8(3)
O(14)-C(113)-C(114)	121.9(4)
C(112)-C(113)-C(114)	121.3(4)
C(113)-C(114)-C(115)	118.3(4)
O(116)-C(115)-C(114)	115.5(3)
O(116)-C(115)-C(110)	121.8(3)
C(114)-C(115)-C(110)	122.6(3)
C(115)-O(116)-C(107)	116.6(3)
C(17B)-C(17A)-O(12)	71(8)
C(17A)-C(17B)-O(12)	87(9)
C(202)-O(22)-C(217)	113.6(3)
O(21)-C(201)-C(206)	118.0(3)
O(21)-C(201)-C(202)	120.9(3)
C(206)-C(201)-C(202)	121.2(3)
O(22)-C(202)-C(203)	120.8(3)
O(22)-C(202)-C(201)	120.4(3)
C(203)-C(202)-C(201)	118.8(3)
O(23)-C(203)-C(204)	118.2(3)
O(23)-C(203)-C(202)	122.1(3)
C(204)-C(203)-C(202)	119.7(3)
C(205)-C(204)-C(203)	121.3(3)
C(204)-C(205)-C(206)	120.2(3)
C(204)-C(205)-C(207)	117.8(3)
C(206)-C(205)-C(207)	121.9(3)
C(201)-C(206)-C(205)	118.9(3)
O(216)-C(207)-C(208)	110.3(3)
O(216)-C(207)-C(205)	109.4(3)
C(208)-C(207)-C(205)	113.6(3)
O(218)-C(208)-C(207)	111.9(3)
O(218)-C(208)-C(209)	112.6(3)
C(207)-C(208)-C(209)	108.8(3)
C(210)-C(209)-C(208)	110.7(3)
C(215)-C(210)-C(211)	117.8(3)

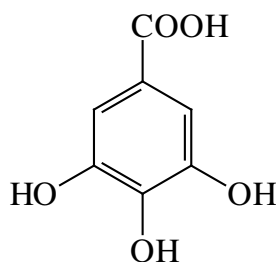
Continuação da Tabela 24

C(215)-C(210)-C(209)	121.6(3)
C(211)-C(210)-C(209)	120.5(4)
O(24)-C(211)-C(212)	122.3(3)
O(24)-C(211)-C(210)	116.0(3)
C(212)-C(211)-C(210)	121.6(4)
C(213)-C(212)-C(211)	118.7(3)
O(25)-C(213)-C(214)	120.6(4)
O(25)-C(213)-C(212)	117.8(4)
C(214)-C(213)-C(212)	121.6(3)
C(213)-C(214)-C(215)	118.5(4)
C(210)-C(215)-O(216)	122.0(3)
C(210)-C(215)-C(214)	121.7(3)
O(216)-C(215)-C(214)	116.2(3)
C(215)-O(216)-C(207)	114.5(3)

3.4.1.8 – Composto (MRCA3)

A substância MRCA3 foi isolada como um sólido branco cristalino de ponto de fusão. O espectro na região do infravermelho (**Figura 32, p168**), obtido em KBr, revelou a presença de bandas de estiramento de sistema aromático 1,3,4,5 tetrasubstituído (1623, 1548, 1455 e 867 cm^{-1}), grupo carboxila (1700 e 3151 cm^{-1}), grupos hidroxila de fenol (3477 cm^{-1}) e estiramento C-O de fenol (1273 e 1044 cm^{-1}). O espectro de RMN ^1H em CD_3OD a 300 MHz (**Figura 33, p168**) revelou a presença de apenas um sinal simples (δ 7,09), cujo valor de deslocamento químico está condizente com a existência de hidrogênio aromático (*Silverstein et al.*, 1994).

O espectro de RMN ^{13}C em CD_3OD . (**Tabela 25, p132.**) da substância revelou um total de cinco sinais. Sendo que quatro destes apresentaram valores de deslocamentos químicos compatíveis com carbonos aromáticos (δ 110,42; 122,05; 139,63 e 146,41) e o quinto sinal com deslocamento químico em δ 170,50 foi atribuído a carbono de grupo carboxila, como evidenciado no espectro no infravermelho. Com base nos dados discutidos para MRCA3, associados à análise comparativa com a descrita na literatura para o ácido 3,4,5-triidroxibenzoico, conhecido como ácido gálico (ALMEIDA e cols.,2005).

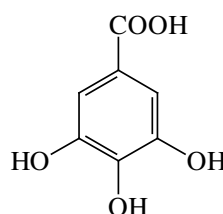


MRCA3

O ácido gálico tem reconhecida ação anti-carcinogênica, anti-tumoral, antioxidante, anti-inflamatória, hepatoprotetora, antifúngica e antimicrobiana (NEGI e col, 2005; PELEGRINE e col, 2005; AHN e col,2005; URREA-BULLA e col, 2004; PANIZZI e col, 2002). Além destas atividades, o ácido gálico tem sido usado como produto de partida, originando diversos derivados com importantes ações farmacológicas, tais como anti-carcinogênica, analgésica, antioxidante e antimalárico (NEGI e col, 2005; KROGH e col, 2000).

Tabela 25 - RMN 13 C da substância ácido gálico e modelo da literatura (Almeida e col., 2005).

Carbonos	MRCA3	Ácido gálico
1	122,05	120,70
2	110,42	109,70
3	146,4	145,10
4	139,63	138,30
5	146,41	145,10
6	110,42	109,10
7	170,50	169,10



3.4.1.9 – Composto (MRCH6)

A substância foi isolada como um sólido amorfo, de ponto de fusão 257,6-257,9°C. O espectro na região do infravermelho (**Figura 34, p169**), obtido em KBr, revelou a presença de bandas de absorção condizentes com a presença de grupo carbonílico de cetona em anel de seis membros (1715 cm^{-1}) e de grupos metílicos, metilênicos e metínicos (2925, 2868, 1458, 1388 cm^{-1}).

Os dados obtidos do espectro de RMN ^1H (**Figura 35, p169; Tabela 26, p134**) revelaram a presença de sinais simples, com integração relativa para três hidrogênios cada, atribuído a grupos metílicos, um sinal duplo (δ 0,86 d, $J=7,2$ Hz), com intensidade relativa para três hidrogênios, referente a um grupo metílico ligado a um carbono terciário, um quarteto (δ 2,22 q, $J=7,2$ Hz) integrado para um hidrogênio, além de um sinal múltiplo (δ 2,35-2,30 m).

A análise do espectro de RMN ^{13}C (**Figura 36, p170; Tabela 26, p134**) permitiu identificar um total de trinta átomos de carbonos, dos quais quatro monohidrogenados (CH), onze dihidrogenados (CH_2), oito trihidrogenados (CH_3) e sete não hidrogenados. Dentre os sinais de átomos de carbonos, ressaltam-se os deslocamentos químicos principalmente os atribuídos a um grupo carbonílico de cetona em anel de seis membros (δ 213,13 C-3), e aos C-2 (δ 41,50 CH_2), C-4 (δ 58,20 CH), C-5 (δ 42,11 C), C-23 (δ 6,80 CH_3) e C-24 (δ 14,63 CH_3), cujo os valores estão condizentes com a presença de um triterpeno pentacíclico da série friedelano (MAHATO e KUNDU, 1994). Com base nos dados discutidos associados à análise comparativa com a descrita na literatura (**Tabela 26, p134**) (ANDRADE, 1998; MAHATO e KUNDU, 1994), permitiram propor para MRCC5/MRCC6 a estrutura de um triterpeno pentacíclico da série friedelano, conhecido como Friedo-oleanano 3-ona.

O espectro de massas mostrou pico correspondente ao íon molecular em m/z 426 (22) e. Este dado, associado à interpretação mecanística dos principais picos presentes no espectro de massas (**Figura 29, p136**) permitiram confirmar a proposta estrutural. A comparação de dados de RMN ^{13}C descritos na literatura (ANDRADE, 1998; MAHATO e KUNDU, 1994), bem como a utilização de modelos com grupo carbonílico em diferentes posições do esqueleto (**Tabela 27, p135**) confirmam a proposta estrutural.

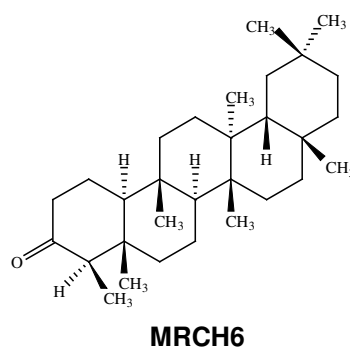


Tabela 26 - RMN da substância MRCH6 e do modelo da literatura modelo da friedelina (Mahato & Kundu, 1994) em CDCl₃, deslocamento em δ .

	MRCH6 H ¹	MRCH6 C ¹³	Modelo C ¹³
1		22,3 CH ₂	22,3 CH ₂
2	3,21-3,13 (m)	41,5 CH ₂	41,5 CH ₂
3		213,6 C	213,2 C
4	2,2 (q, J=7,2Hz)	58,2 CH	58,2 CH
5		42,1 C	42,1 C
6		41,3 CH ₂	41,3 CH ₂
7		18,2 CH ₂	18,2 CH ₂
8		53,1 CH	53,1 CH
9		37,4 C	37,4 C
10		59,4 CH	59,4 CH
11		35,6 CH ₂	35,6 CH ₂
12		31,1 CH ₂	30,5 CH ₂
13		39,7 C	39,7 C
14		38,4 C	38,3 C
15		32,4 CH ₂	32,4 CH ₂
16		36,0 CH ₂	36,0 CH ₂
17		30,0 C	30,0 C
18		42,8 CH	42,8 CH
19		35,2 CH ₂	35,3 CH ₂
20		28,0 C	28,1 C
21		32,7 CH ₂	32,7 CH ₂
22		39,2 CH ₂	39,2 CH ₂
23	0,88s (d, J=6,7Hz)	6,8 CH ₃	6,8 CH ₃
24	0,72s	14,6 CH ₃	14,6 CH ₃
25	0,88s	17,9 CH ₃	17,9 CH ₃
26	1,05s	18,6 CH ₃	20,2 CH ₃
27	1,00s	20,2 CH ₃	18,6 CH ₃
28	1,20s	32,1 CH ₃	32,1 CH ₃
29	0,98s	35,0 CH ₃	35,0 CH ₃
30	0,98s	31,8CH ₃	31,8 CH ₃

Dados de RMN ¹H 600 MHz, ¹³C obtido a 150 MHz, padrão interno TMS.

Tabela 27 - Dados de RMN 13C da substância MRCC5, modelos 1, 2, 3 e 4 (20,1 MHz, CDCl₃, δ) e 3 e 4 (25,1 MHz, CDCl₃, δ) (ANDRADE, 1997).

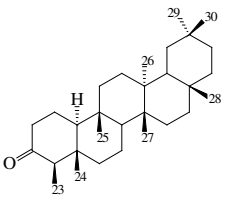
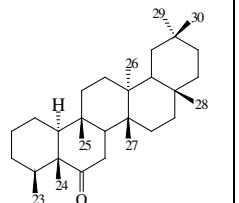
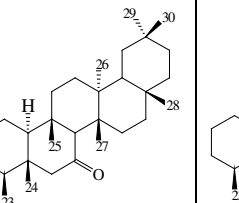
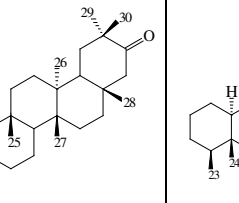
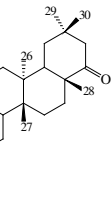
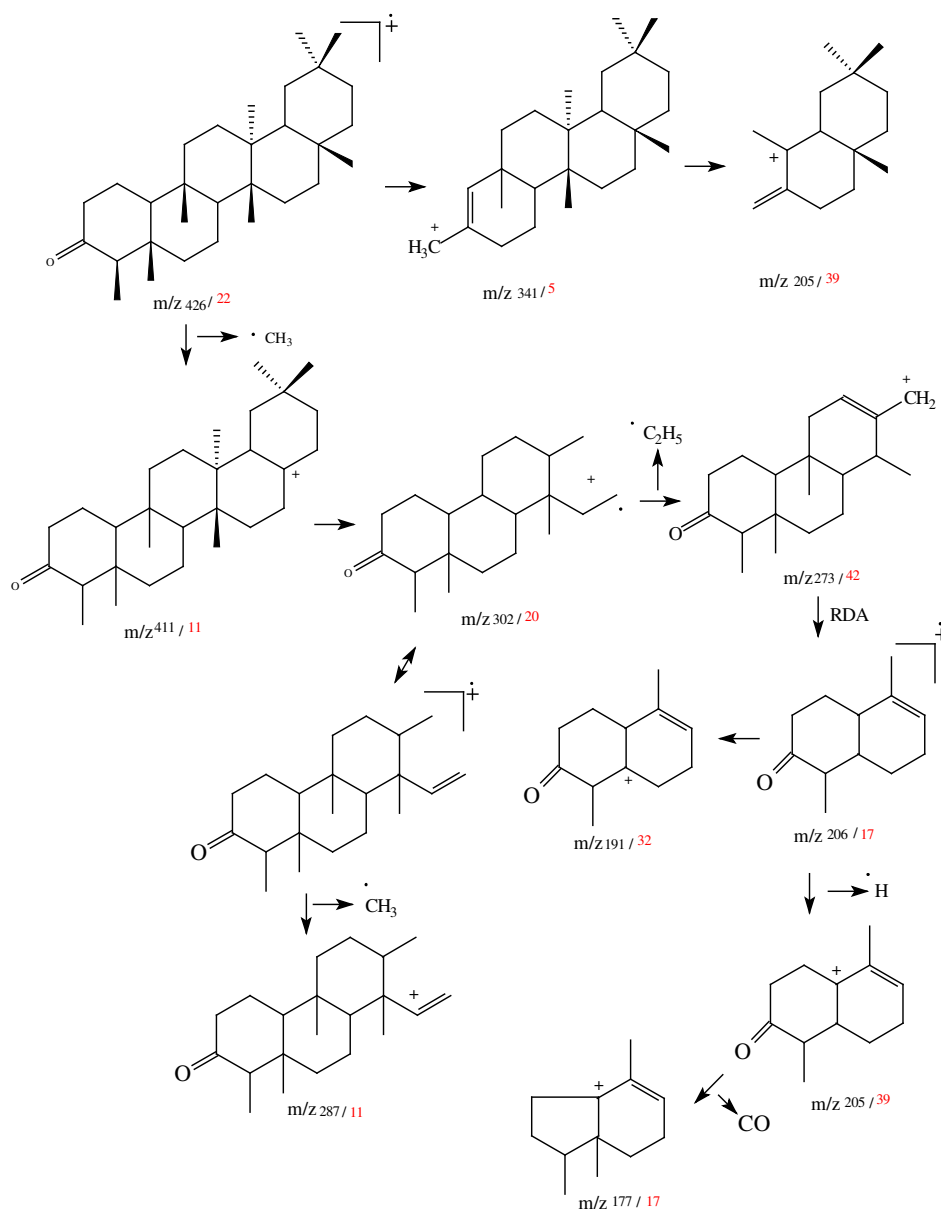
	 MRCC5	 1	 2	 3	 4
1	22,26 CH ₂	31,4	21,1	20,7	20,8
2	41,50 CH ₂	35,6	27,0	27,4	27,5
3	213,13 C	30,4	30,2	30,9	31,1
4	58,20 CH	37,6	46,3	46,0	46,3
5	42,11 C	53,1	44,1	37,6	37,6
6	41,28 CH ₂	217,0	58,0	41,4	41,5
7	18,22 CH ₂	32,7	212,4	18,2	18,2
8	53,08 CH	55,3	63,9	53,4	51,9
9	37,42 C	38,0	43,5	37,1	37,2
10	59,46 CH	62,1	60,6	60,7	61,0
11	35,61 CH ₂	36,4	35,7	35,4	35,6
12	32,40 CH ₂	31,7	32,0	32,7	30,2
13	38,28 C	39,1	39,4	38,2	38,7
14	39,67 C	40,2	37,6	39,8	39,6
15	30,48 CH ₂	31,8	30,7	30,8	30,4
16	35,99 CH ₂	35,4	36,2	37,0	27,2
17	29,97 C	30,0	30,2	33,2	45,1
18	42,78 CH	42,9	42,0	41,9	48,1
19	35,32 CH ₂	35,7	35,1	35,2	34,8
20	28,15 C	28,1	28,2	42,7	31,4
21	32,76 CH ₂	35,0	33,0	219,2	49,7
22	39,23 CH ₂	39,1	38,9	55,0	217,3
23	6,80 CH ₃	11,9	13,8	13,6	13,6
24	14,63 CH ₃	17,9	15,1	15,1	15,1
25	17,92 CH ₃	18,1	19,6	17,9	18,0
26	18,64 CH ₃	18,5	18,4	18,4	18,4
27	20,24 CH ₃	20,4	19,6	21,1	18,5
28	32,07 CH ₃	26,7	32,3	33,5	34,0
29	31,76 CH ₃	32,0	31,7	28,8	31,1
30	35,00CH ₃	20,1	34,7	25,0	35,1

Figura 29 - Esquema geral de fragmentação dos principais picos de MRCH6

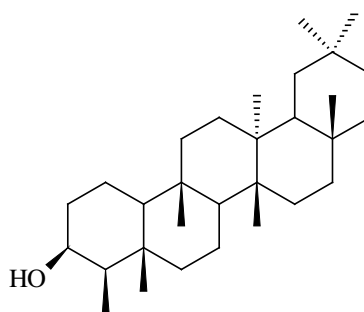


3.4.1.10 – Composto (MRCH1)

A substância MRCH1 foi isolada como um sólido amorfo, de ponto de fusão 271,1-271,6°C. O espectro na região do infravermelho (**Figura 37, p170**), obtido em KBr, revelou a presença de bandas de absorção condizentes com a presença de grupo hidroxila (3477cm⁻¹) e de grupos metílicos, metilênicos e metínicos (2934, 2867, 1453,1385cm⁻¹).

Os dados obtidos do espectro de RMN ^1H a 600 MHz em CDCl_3 (**Figura 38, p171; Tabela 28, p138**) revelaram a presença de sinais simples, com integração relativa para três hidrogênios cada, atribuído a grupos metílicos, além de revelar sinais correspondentes a um hidrogênio carbinólico (δ 3,73 m).

A análise do espectro de RMN ^{13}C (**Figura 39, p171;Tabela 28, p138**) permitiu identificar um total de trinta átomos de carbonos, dos quais quatro são monohidrogenados (CH), onze são dihidrogenados (CH_2), oito são trihidrogenados (CH_3) e sete são não hidrogenados. Dentre os sinais ressaltam-se aqueles de deslocamentos químicos atribuídos a carbono carbinólico secundário (δ 77,0 C-3) e aos C-2 (δ 35,0 CH_2), C-4 (δ 49,0 CH), C-5 (δ 36,8 C), C-23 (δ 11,6 CH_3) e C-24 (δ 16,4 CH_3), cujo os valores estão condizentes com a presença de um triterpeno pentacíclico (MAHATO e KUNDU, 1994). Com base nos dados discutidos associados à análise comparativa com a descrita na literatura (ANDRADE, 1998; MAHATO e KUNDU, 1994). Permitiram propor para MRCC5/MRCC6 a estrutura de um triterpeno pentacíclico da série friedelano, conhecido como 3- β -hidroxi-Friedelina. O espectro de massas mostrou pico correspondente ao íon molecular em m/z 428(1). Estes dados e a comparação dos dados de RMN ^{13}C com aqueles descritos na literatura (ANDRADE, 1998; MAHATO e KUNDU, 1994) permitiram confirmar a proposta estrutural.



MRCH1

Tabela 28 - RMN da substância MRCH1 em CDCl_3 , deslocamento em δ . e do modelo da literatura friedelanol (Mahato & Kundu, 1994) em CDCl_3 .

	MRCH1	MRCH1	Modelo
	H^1	C^{13}	C^{13}
1		17,8 CH_2	17,8 CH_2
2		35,0 CH_2	35,0 CH_2
3	3,37-3,38 (m)	77,0 C	72,0 C
4	2,3 (q)	49,0 CH	49,0 CH
5		36,8C	37,3C
6		41,4 CH_2	41,4 CH_2
7		15,8 CH_2	15,8 CH_2
8		53,2 CH	53,8 CH
9		37,9 C	37,9 C
10		61,2 CH	61,2 CH
11		37,9 CH_2	37,9 CH_2
12		27,8 CH_2	27,8 CH_2
13		54,8 C	54,8 C
14		39,3 C	39,3 C
15		32,4 CH_2	32,8 CH_2
16		35,6 CH_2	35,6 CH_2
17		36,7 C	36,7 C
18		43,3 CH	43,3 CH
19		35,7 CH_2	35,7 CH_2
20		28,5 C	28,5 C
21		32,5 CH_2	32,5 CH_2
22		39,2 CH_2	38,2 CH_2
23	0,97s	11,6 CH_3	11,6 CH_3
24	0,97s	16,4 CH_3	16,4 CH_3
25	0,86s	18,0 CH_3	18,8 CH_3
26	1,05s	20,5 CH_3	22,5 CH_3
27	1,00s	28,4 CH_3	28,4 CH_3
28	1,18s	31,1 CH_3	31,1 CH_3
29	0,95s	30,6 CH_3	30,6 CH_3
30	0,95s	35,3 CH_3	35,3 CH_3

Dados de RMN ^1H 600 MHz, ^{13}C obtido a 150 MHz, padrão interno TMS.

3.4.1.11 – Composto MRCH9/UFAL 1

A molécula isolada da fração hexânica, apresenta-se como um sólido branco de ponto de fusão 234,1-234,9°C. Sua natureza triterpenoídica foi sugerida por apresentar coloração rósea a vermelhada frente ao reagente de Liebermann-Burchard. O espectro na região IV, obtido em solução de KBr (**Figura 40, p172**), revelou a presença de bandas de estiramento para grupos hidroxila (3441 cm^{-1}), grupo carbonílico (1690 cm^{-1}) de ligação dupla (1642 cm^{-1}), além de bandas de estiramento e deformação de grupos alquílicos saturados ($2943, 2870, 1452$ e 1389 cm^{-1}).

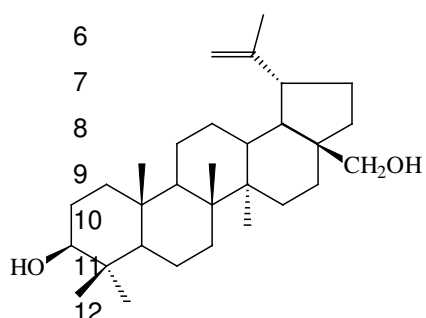
Os dados obtidos do espectro de RMN ^1H a 600 MHz em CDCl_3 (**Figura 41, p172. ;Tabela 29, p140**) revelaram sinais cujos valores de deslocamento químicos, multiplicidade e constante de acoplamento estão condizentes com a presença de um hidrogênio carbinólico $\{\delta 3,20 -2,40(\text{m})\}$, dois hidrogênios olefinicos $\{\delta 4,46$ e $4,47 (\text{d})\}$, além de sinais para seis grupos metílicos $\{\delta 0,63; 0,70; 0,82; 0,84; 0,85; 1,57 (\text{s})\}$.

A análise conjunta dos dados obtidos dos espectros de RMN ^{13}C e DEPT a 135 MHz (**Figura 42, p173.; Tabela 29, p140**) permitiram reconhecer um total de trinta sinais de átomos de carbono, destacando-se as absorções a $\delta 150,6(\text{C})$ e $\delta 109,6$ (CH_2) atribuídas a uma ligação dupla dissubstituída, a unidade isopropilidênica. Observa-se um sinal para carbono monoidrogenado carbinólico $\delta 78,99 (\text{CH})$, cujo valor de deslocamento químico sugere a presença de um grupo hidroxila em C-3 de triterpeno pentacíclico da série lupano.

Esta proposta estrutural foi reforçada pela comparação com os dados espectrais obtidos com os descritos na literatura (MAHATO e KUNDU1994) (**Tabela 29, p140**). O espectro de massas mostrou pico correspondente ao íon molecular em $m/z 442$, compatível com a fórmula molecular ($\text{C}_{30}\text{H}_{50}\text{O}_2$). A substância MRCH4 foi assim identificada como sendo um triterpenoide pentacíclico da série lupano, denominado de 3β -28-Dihidroxlupano-20(29)-eno, conhecido como betulina.

Tabela 29 - RMN da substância MRCH9/UFAL1 em CDCl₃, deslocamento em δ . e do modelo da literatura (lupeol (Mahato & Kundu, 1994) em CDCl₃,

	MRCH9/UFAL 1	MRCH9/UFAL 1	Modelo
	H ¹	C ¹³	C ¹³
1		38,8CH ₂	38,8 CH ₂
2		27,2CH ₂	27,2 CH ₂
3	3,2O(m)	78,9C	78,9 C
4		38,9 CH	38,9 CH
5		55,3C	55,3 C
6		18,4CH ₂	18,3 CH ₂
7		34,3CH ₂	34,3 CH ₂
8		40,9 CH	40,9 CH
9		50,4 C	50,4 C
10		37,2 CH	37,2 CH
11		20,9 CH ₂	20,9 CH ₂
12		25,3CH ₂	25,3 CH ₂
13	MRCH9/UFAL1	37,3C	37,3 C
14		42,7 C	42,7 C
15		27,1 CH ₂	27,0 CH ₂
16		39,2 CH ₂	29,2 CH ₂
17		47,8 C	47,8 C
18		48,8 CH	48,8 CH
19		47,9 CH ₂	47,8 CH ₂
20		150,6 CH ₂	150,5 CH ₂
21		29,8 C	29,8 C
22		34,0CH ₂	34,0 CH ₂
23	0,74(s)	28,0 CH ₂	28,0 CH ₂
24	0,77 (s)	15,4 CH ₃	15,4 CH ₃
25	0,81(s)	16,1 CH ₃	16,1 CH ₃
26	0,93(s)	16,0 CH ₃	16,0 CH ₃
27	0,95(s)	14,8 CH ₃	14,8 CH ₃
28	1,01(s)	60,2 CH ₃	60,2 CH ₃
29	4,60 (d)	109,6 CH ₂	109,6 CH ₂
	4,70 (d)		
30	1,66(s)	19,1CH ₃	19,1CH ₃



Dados de RMN ¹H 600 MHz, ¹³C obtido a 150 MHz, padrão interno TMS.

3.4.1.12 – Composto MRCC5/MRCC6

A molécula isolada da fração hexânica, apresenta-se como um sólido branco de ponto de fusão 238,1-238,7°C. Sua natureza triterpenoídica foi sugerida por apresentar coloração rósea a vermelhada frente ao reagente de Liebermann-Buchard. O espectro na região IV, obtido em solução de KBr (**Figura 43, p174**), revelou a presença de bandas de estiramento para grupos hidroxila (3317 e 1041 cm^{-1}), de ligação dupla (1651 cm^{-1}) e grupos alquila saturados (2937 , 1450 e 1380 cm^{-1}), de ligação dupla do tipo metileno terminal (1651 cm^{-1}) e grupos alquila saturados (2947 , 1450 e 1384 cm^{-1})

Os dados obtidos do espectro de RMN ^1H a 300 MHz em CDCl_3 (**Figura 44, p174**; **Tabela 30, p142**) revelaram sinais cujos valores de deslocamento químicos, multiplicidade e constante de acoplamento estão condizentes com a presença de grupos metila terciários $\{\delta\ 0,74, 0,77, 0,81, 0,93, 0,95, 1,01(\text{s})\}$, hidrogênio metínico carbinólico $\{\delta\ 3,21, 1\text{H}(\text{m})\}$.

A análise conjunta dos dados obtidos dos espectros de RMN ^{13}C e DEPT a 135 MHz (**Tabela 30, p142**) permitiram reconhecer um total de trinta sinais de átomos de carbono, dentre estes destacam-se as absorções a $\delta\ 154,7(\text{C})$ e $\delta\ 106,6(\text{CH}_2)$ atribuídas a uma ligação dupla dissubstituída. Observa-se um sinal para carbono monoidrogenado carbinólico $\delta\ 78,99(\text{CH})$, cujo valor de deslocamento químico sugere a presença de um grupo hidroxila em C-3 de triterpeno pentacíclico da série lupano. Esta proposta estrutural foi reforçada pela comparação com os dados espectrais obtidos com os descritos na literatura (MAHATO e KUNDU 1994) (**Tabela 30, p142**). O espectro de massas mostrou pico correspondente ao íon molecular em $m/z\ 448$, compatível com a fórmula molecular ($\text{C}_{30}\text{H}_{56}\text{O}_2$). A substância MRCH4 foi assim identificada como sendo um triterpenoide pentacíclico da série lupano. denominado de 3β -hidroxi-lup-20-em,30 diol.

Tabela 30 - RMN da substância MRCC5/MRCC6 em CDCl₃, deslocamento em δ . e do modelo da literatura (Mahato & Kundu, 1994) em CDCl₃.

	MRCC5/MRCC6	MRCC5/MRCC6	Modelo
	H ¹	C ¹³	C ¹³
1		39,6CH ₂	39,6 CH ₂
2		34,1CH ₂	34,1 CH ₂
3	3,2O (m, J=5,3 e 10,5 Hz)	78,9 C	78,9 C
4		47,3 CH	47,3 CH
5		54,9 C	54,9 C
6		19,7CH ₂	19,7CH ₂
7		33,6CH ₂	33,6CH ₂
8		40,8 CH	40,8 CH
9		49,7 C	49,7 C
10		36,9 CH	36,9 CH
11		21,6 CH ₂	21,6 CH ₂
12		26,7CH ₂	26,7CH ₂
13		38,1C	38,1C
14		42,9 C	42,9 C
15		27,4 CH ₂	27,4 CH ₂
16		35,4 CH ₂	35,4 CH ₂
17	MRCC5/MRCC6	43,0 C	43,0 C
18		48,8 CH	48,8 CH
19		43,8 CH ₂	43,8 CH ₂
20		154,7 C	154,7 C
21		31,1CH ₂	31,8 CH ₂
22		39,8 CH ₂	39,8 CH ₂
23	0,74(s)	27,5 CH ₃	26,7 CH ₃
24	0,76 (s)	21,0 CH ₃	21,0 CH ₃
25	0,81(s)	16,0 CH ₃	16,0 CH ₃
26	0,93(s)	15,8 CH ₃	15,8 CH ₃
27	0,95(s)	14,8 CH ₃	14,5 CH ₃
28	1,01(s)	17,7 CH ₃	17,7 CH ₃
29	4,90 (d, J=8,22 Hz)	106,6 CH ₂	106,6 CH ₂
30	1,66(s)	65,0 CH ₂	65,0 CH ₂

Dados de RMN ¹H 600 MHz, ¹³C obtido a 150 MHz, padrão interno TMS.

3.4.1.13 – Composto MRCHA1

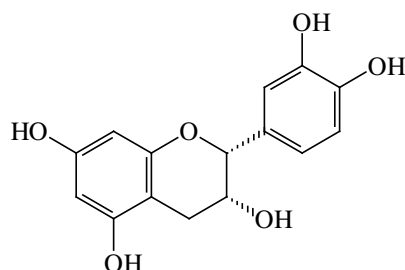
A molécula isolada da fração acetato de etila, apresenta-se como um sólido de coloração rósea de ponto de fusão 134,2 – 135,6 °C.

O espectro no IV (**Figura 45, p175**) apresentou banda de absorção a 3502 cm⁻¹ que é atribuída ao estiramento de grupos hidroxílicos e absorções em 1142 e 1621 cm⁻¹ referentes a presença de anel aromático.

Os dados obtidos do espectro de RMN 1H (**Figura 46, p175; Tabela 31, p144**), mostrou a presença de quatro dupletos com deslocamentos químicos característicos de hidrogênios aromáticos δ 6,78 (J=8,2Hz), δ 7,00 (1,7Hz); δ 5,97 (2,25Hz) e δ 5,94 (2,25Hz) e um duplete a δ 4,83, três duplos dupletos: um característico de hidrogênio aromático em δ 6,82 (1,7Hz e 8,2Hz) e dois pertencentes a carbono metílico δ 2,88 (4,5Hz e 16,7Hz) e δ 2,76 (2,65Hz e 16,7Hz), um simpleto em δ 4,83 e um simpleto largo em δ 4,19 com deslocamentos químicos característicos de hidrogênios ligados a carbonos oxigenados. A multiplicidade dos sinais e os valores das constantes de acoplamento indicam que há um acoplamento meta entre os hidrogênios em δ 5,97 e δ 5,94, que o hidrogênio em δ 6,82 possui um acoplamento orto com o hidrogênio em δ 6,78 e um acoplamento meta com o hidrogênio em δ 7,00 e que há ainda um acoplamento geminal entre os hidrogênios em δ 2,88 e δ 2,76. (**Tabela 31, p144**)

A análise comparativa entre os espectros de RMN¹³C, DEPT 135° e DEPT 90° (**Figura 47, p176**), evidenciou a existência de 15 sinais relativos a 15 átomos de carbono: sendo sete carbonos quaternários, sete metínicos e um metílico, o que permite indicar para esse composto a fórmula molecular C₁₅H₁₂O₆, com um índice de deficiência de hidrogênio igual a 10 referente a dois anéis aromáticos, um anel não aromático e uma dupla ligação carbono-carbono.

A feição espectral, a observação dos dados de correlação, constantes de acoplamento e comparação com dados da literatura (SANG e cols., 2002; GIL e cols., 2003) permitem propor a estrutura da epicatequina para a substância MRCHA1.



MRCHA1

Tabela 31 - Dados de RMN da substância MRCHA1 em CD₃OD

MRCHA1		
	H ¹	C ¹³
2	4,83 d	79,98
3	4,19 sl	67,60
4	2,88 (dd, J=4,5 e 16,7 Hz) 2,76 (dd, J=2,7 e 16,7 Hz)	29,83
5a	-	100,21
5	-	158,11
6	5,97 (d, 2, 3 Hz)	96,52
7	-	157,77
8	5,94 (d, 2,3 Hz)	96,02
8a		157,49
1'	-	132,41
2'	7,00 (d, 1,7 Hz)	115,44
3'	-	145,88
4'	-	146,04
5'	6,78 (d, 8,2 Hz)	116,02
6'	6,82 (dd, 1,7 e 8,2 Hz)	119,54

Dados de RMN ¹H 300-MHz, ¹³C obtido a 75MHz, padrão interno TMS.

3.4.1.14 – Composto MRCA4

A molécula isolada da fração clorofórmica, apresenta-se como um sólido de coloração amarela. Os dados obtidos do espectro de RMN ^1H (**Figura 48, p177; Tabela 32, p146**), mostrou a presença de dois dupletos com deslocamentos químicos característicos de hidrogênios aromáticos δ 6,35 (1H, $J=2,0$ Hz) e δ 6,16 (1H, $J=2,0$ Hz), característico dos hidrogênios H-6 e H-8 de flavonas oxigenadas nas posições 5 e 7. Foram observados dois dupletos em δ 7,60 (1H, $J=2,2\text{Hz}$) e δ 6,88 (1H, $J=8,4$ Hz) e um duplo dubleto em δ 7,50 (1H, $J=2,2$ e $8,4$ Hz), sugerindo o anel B da flavona.

A análise dos espectros de RMN ^{13}C (**Figura 49, p177; Tabela 32, p146**), evidenciou a existência de 16 sinais relativos a 16 átomos de carbono: sendo dez para carbonos não hidrogenados e cinco metílicos, sete sinais referentes a carbonos não hidrogenados que sustentam grupos oxigenados, em δ 165,87, 163,04, 158,37, 157,96, 149,90, 146,42 e 139,48. além deste foi observado a presença de cinco sinais metílicos aromáticos, surgindo o esqueleto do tipo flavona pentasubstituída.

A feição espectral, e a observação dos dados de correlação, constantes de acoplamento e comparação com dados da literatura (AGRAWAL, 1989) permitem propor para a substância a estrutura como sendo a 3-metoxi-5, 7, 3', 4' – tetraidroxiflavona conhecida como 3-O-metilquercetina.

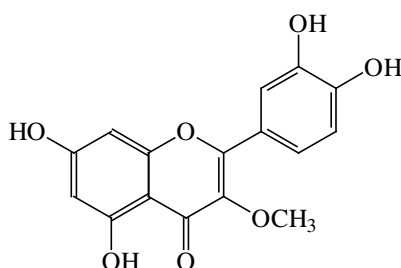


Tabela 32 - Dados de RMN da substância em MRCA4 em MeOD e do modelo da literatura (AGRAWAL, 1989) em CDCl₃.

MRCA3			
	H ¹	C ¹³	Modelo
2		157,96	157,8
3		139,50	139,2
4		179,98	179,4
5		163,04	163,2
7		165,87	164,7
9		158,37	162,3
10		105,84	105,8
1'		122,92	122,1
3'		146,42	145,2
4'		149,90	149,0
6	6,16 (d, J=2,0Hz)	99,75	99,3
8	6,35 (d, J=2,0 Hz)	94,71	94,3
2'	7,60 (d, J=2,2Hz)	116,40	115,7
5'	6,88 (d, J=8,4Hz)	116,46	116,2
6'	7,50 (dd, J= 2,2 e 8,4 Hz)	122,33	123,0
OCH ₃	3,76 (s)	60,49	59,7

Dados de RMN ¹H 300-MHz, ¹³C obtido a 75MHz, padrão interno TMS.

3.5 – Determinação Quantitativa dos Teores de Compostos Polifenólicos e Determinação da Atividade Antioxidante dos Extratos da Entrecasca de *Maytenus rigida* Mart.

Os métodos disponíveis para verificar atividade antioxidante em extratos e substâncias de plantas. Cita-se o da geração de radicais livres através do 1,1-difenil-2-picril-hidrazina (DPPH) e do ácido 2,2'-azinobis-3-etilbenzotiazolina sulfônico (ABTS), em solventes orgânicos polares (GORDON, 2001). No presente trabalho foi escolhido o método do DPPH.

3.5.1 – Atividade Antioxidante

Os processos oxidativos estão associados ao envelhecimento, mutação do material genético e da degradação do tecido vivo. Os compostos responsáveis por essa ação maléfica são conhecidos como radicais livres, e as substâncias que combatem esses radicais são os chamados antioxidantes.

Considerando que o uso de antioxidantes sintéticos não é muito recomendado uma vez que podem promover efeitos colaterais, observa-se uma tendência para o uso de antioxidantes naturais. Além dos alimentos já conhecidos que possuem antioxidantes, como frutas e verduras, a procura de espécies vegetais que possuam esta atividade vem se acentuando.

O modelo de captura do radical estável DPPH é um método amplamente usado para avaliar a atividade antioxidante de compostos naturais em um tempo relativamente curto quando comparado com outros métodos. O efeito do antioxidante sobre o radical DPPH capturado deve-se a sua habilidade de doar de hidrogênio. O DPPH é um radical livre estável que aceita um elétron ou um radical hidrogênio para tornar-se uma molécula diamagnética estável (GÜLÇİN e col, 2004; PIAO e col, 2004).

A capacidade de redução do radical DPPH foi determinada pelo ensaio qualitativo em CCDA nas concentrações de 5,0 mg/ml; 2,5 mg/ml; 1,25 mg/ml; 0,625 mg/ml e 0,3125 mg/ml que nos extratos mais polares apresentou reação positiva e por

ensaio quantitativo, o qual é determinado pelo decréscimo na sua absorvância em 515 nm induzida pelo antioxidante.

Este ensaio qualitativo revelou que os extratos mais polares: aquoso das folhas, aquoso da entrecasca, alcoólico da folhas e alcoólico da entrecasca apresentaram atividade antioxidante. Os extratos provenientes do processo de partição líquido-líquido reagem forte e rapidamente com o radical DPPH, quase da mesma maneira que o controle positivo. No entanto, a fração em hexano dá uma reação fraca, a qual progrediu muito lentamente quando comparada com o controle positivo (**Tabela 33, p150**)

A capacidade para seqüestrar radicais livres foi avaliada para os extratos em diferentes concentrações: 20, 15, 10, 5, 2 e 1 µg/mL em relação controle positivo (-) epicatequina. O estado estacionário foi alcançado no tempo de 30 minutos. Em contraste, a fração em hexano reage muito lentamente com o radical DPPH. Este tipo de comportamento está correlacionado com a natureza e concentração do antioxidante na amostra teste, como mostrado previamente por (Sánchez-Moreno e col, 1998; Choi e col, 2002).

A característica estrutural responsável pela atividade seqüestrante do radical livre é a presença dos grupos hidroxilas. A posição do grupo hidroxila doador de elétron na posição orto também diminui a entalpia de dissociação da ligação O-H e aumenta a velocidade de transferência do átomo de hidrogênio para o radical peroxila. A insaturação da cadeia lateral também maximiza a estabilização do radical fenólico (**Figura 50, p149**).

Então, a atividade antioxidante do extrato aquoso e alcoólico das folhas e entrecasca e os extratos provinientes da extração líquido-líquido do extrato alcoólico da entrecasca: clorofórmio, acetato de etila e hidroalcoólico, pode ser explicada pela presença de compostos polifenólicos presentes nesses extratos. Estes compostos polifenólicos foram quantificados pelo método analítico Folin-Dennis, através deste foi quantificado o conteúdo de compostos fenólicos solúveis nos extratos (**Tabela 33, p150**).

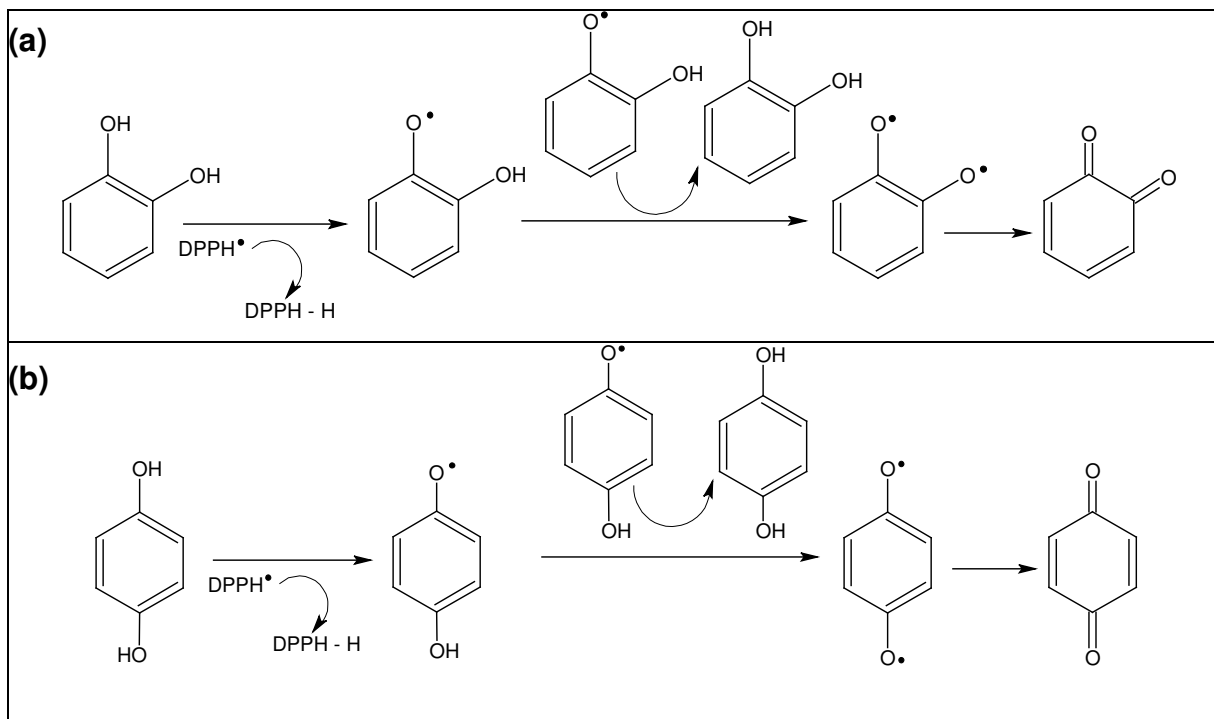


Figura 50 – Mecanismo de reação de um orto-difenol (a) e para-difenol (b)

Tabela 33 - Análise qualitativa para detecção de compostos fenólicos e teste antioxidante

Extratos	Compostos Fenólicos		Teste para DPPH	
		Concentração mg/L	Concentração µg/mL	IP (%)
Extrato alcoólico da entrecasca	50	30,4±0,0028	20	36,1
	250	50,3 ±0,0035	15	18,1
	500	90,9±0,0007	10	15,4
			5	6,8
Extrato aquoso da entrecasca	50	26,9±0,0035	20	33,9
	250	38,6±0,0007	15	25,7
	500	54,6±0,0014	10	23,2
			5	9,5
			2	3,2
			1	4,9
Extrato alcoólico das folhas	50	71,4±0,0049	20	3,9
	250	71,4±0,0021	15	3,1
	500	71,4±0,0021	10	3,0
			5	1,4
Extrato aquoso das folhas	50	27,30±0,0042	20	52
	250	31,1±0,0014	15	40
	500	65,9±0,0007	10	24
			5	14
			2	6,2
			1	5,8
Fase hexânica da entrecasca	50	10,5±0,0049	20	4,0
	250	22,1±0,0042	15	2,8
	500	48,8±0,0001	10	4,1
			5	7,1
			2	5,9
			1	1,7
Fase clorofórmica da entrecasca	50	55,4±0,0084	20	32,3
	250	122,2±0,0332	15	29,3
	500	251,1±0,0176	10	19,2
			5	18,0
			2	7,04
			1	1,66
Fase acetate de etila da entrecasca	50	56,2±0,0028	20	29,4
	250	79,6±0,0141	15	24,4
	500	78,8±0,0014	10	17,1
			5	5,4
			2	3,9
			1	2,6
Fase hidroalcoólico da entrecasca	50	27,3±0,0028	20	44,6
	250	66,3±0,0014	15	42,3
	500	78,5±0,0007	10	27,5
			5	15,0
			2	12,1
			1	9,6
Epicatequina			20	92,9
			15	92,8
			10	92,1
			5	75,6
			2	44,4
			1	17,2

3.6 - Resultados dos Testes Oxido-redutivo em Meio Aprótico

Foi realizado o estudo dos parâmetros eletroquímicos em função da velocidade de varredura para as substâncias MRCHA1, MRCA2 e Narigenina (**Tabela 34, p152**) em meio aprótico, utilizando a técnica de voltametria cíclica. Estas substâncias apresentaram efeito oxidoreduutivo em meio aprótico.

A voltametria cíclica é bastante utilizada para a avaliação da capacidade antioxidante de diversos polifenóis como também de seus derivados (HOTTA, 2001 e CHEVION, 2000). O potencial de oxidação (E_{pa}) medido pode ser relacionado à capacidade antioxidante das moléculas, uma vez que a habilidade do composto doar elétrons refletir a sua capacidade antioxidante (CHEVION, 2000).

Os métodos tradicionais para determinar e quantificar as catequinas incluem a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) podendo ser combinada com a quimioluminescência, ou com detecção em espectroscopia de massas como também detecções eletroquímicas (SONO, 2002), ultravioleta (MERKEN, 2000) e fluorimétricas (RODRIGUEZ, 2001). A eletroforese por capilar com detecção eletroquímica também foi desenvolvida para determinar catequinas. Há relatos do uso da voltametria cíclica para a avaliação da capacidade antioxidante.

A atividade antioxidante dos polifenóis significa primeiramente liberação de radical associado com sua oxidação simultânea (**Figura 51, p152**). Em uma reação de liberação, um átomo de hidrogênio é doado ao radical que se transforma em um composto neutro. Assim a oxidação de um composto reflete sua estabilidade de liberar o radical podendo este ser determinado através da medição do potencial de oxidação na voltametria cíclica .

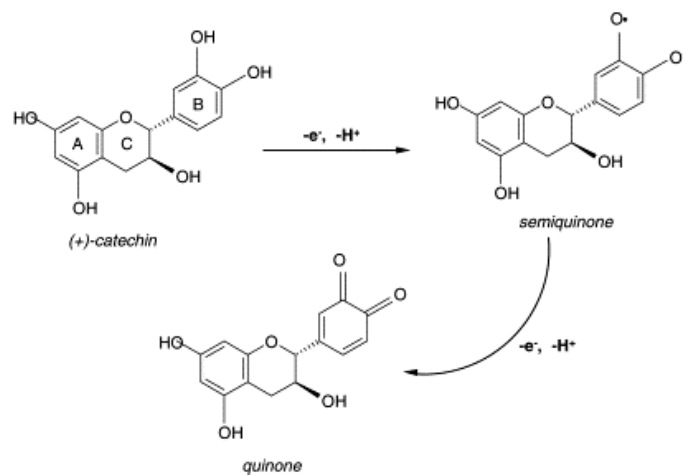


Figura 51- Mecanismo de oxidação da catequina (JANEIRO,2004).

Tabela 34- Estruturas das substâncias que foram submetidas à avaliação do potencial de oxidação

MRCHA1	MRCA2	NARIGENINA
	<p style="text-align: center;">D</p>	

CAPÍTULO IV

CONCLUSÃO

4 – Conclusão

O estudo fitoquímico de *Maytenus rigida* Mart. biomonitorado pelas atividades antinociceptiva, antiinflamatória, antiulcerogênica, antimalárica, antimicrobiana e antioxidante, conduziu ao isolamento de treze substâncias 4'-metil-epigallocatequina, epicatequina, ácido 3,4,5-triidroxibenzóico, 3-metoxi-5,7,3',4' – tetraidroxiflavona, β -sitosterol, estigmasterol, lupeol, friedo-oleanano 3-ona, 3- β -hidroxi-friedelina, 3 β -28-diidroxi-lup-20(29)-eno, 3 β -hidroxi-lup-20-en,30 diol, 1(3a,5a,5b,8,8,11a)-heptametlicosanoide-ciclopenta-crisen(il)propan-1ona e 3,4'dimetilcatequina.

A análise quantitativa da composição química da fração em hexano, através da cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas permitiu detectar a presença de sete ácidos carboxílicos na forma de esteres metílicos (dodecanoato de metila, tetradecanoato de metila, pentadecanoato de metila, hexadecanoato de metila, heptadecanoato de metila, octadecanoato de metila e 6-octadecanoato de metila)

No teste da atividade antimalárica *in vivo* foi observado que os extratos alcoólico das folhas, extrato alcoólico da entrecasca e a fase em acetato de etila foram considerados ativos. Nos testes *in vitro* todos os extratos testados nas doses de 16,6 e 50 $\mu\text{g/mL}$ foram consideradas ativos.

No teste de inflamação e antinocicepção o extrato alcoólico apresentou atividade antinociceptiva e antiinflamatória. Devido a esta atividade as frações obtidas por partição líquido-líquido, em hexano, clorofórmio, acetato de etila e hidroalcoólica foram submetidas aos testes da atividade antinociceptiva e antiinflamatória. Estes testes acompanharam todo o processo de isolamento por cromatografia e conduziram ao isolamento da substância ativa 4'-metilepicatequina presente nas frações clorofórmica, acetato de etila e hidroalcoólica

O extrato etanólico e aquoso da entrecasca, estimulou a atividade protetora da mucosa gástrica. As frações hexânica, clorofórmica e hidroalcoólica do extrato alcoólico da entrecasca reduziram as úlceras de forma significativa.

Os extrato aquoso e as frações em clorofórmio, em acetato de etila e hidroalcoólico apresentaram atividade antimicrobiana contra as cepas *Cândida albicans* (01), *Candida kruse* (09), *Candida tropicalis* (15), *Staphylococcus aureus* (97), *Pseudomonas aeruginosa* (135), *Escherichia coli* (148), *Staphylococcus aureus* (94), *Staphylococcus aureus* (115), *Escherichia coli* (148), *Pseudomonas aeruginosa* (104), *Pseudomonas aeruginosa* (135), *Salmonela typhi* (155).

Foi detequitados compostos polifenólicos e atividade antioxidante nos extratos em clorofórmico, acetato de etila e hidroalcoólico.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

5 - Referências Bibliográficas

AGRA, M. F. Plantas Medicinais dos Cariris Velhos, Paraíba: Um Projeto Interdisciplinar. *Anais do I Workshop Geral de Plantas do Nordeste*, Recife/PE, p.16-21, 1996.

AGRAWALL, P. K. Studies in organic chemistry. Carbon-13 NMR of flavonoids. Elsevier Science Publishers B. V., v. 39, Netherlands, 1989.

AHN, Y., LEE, H., OH, H., KIM, H., LEE, Y. Antifungal activity and mode of action of galla rhois-derived phenolics against phytopathogenic fungi. *Pesticide Biochemistry and Physiology*. v81, p.105-112. 2005.

AHUMADA, L. Z. Aristoloquiáceas, *Flora Ilustrada Catarinense*, Parte I, 10, 1975

ALMEIDA, S. C. X; LEMOS, T. L.G; SILVEIRA, E.R; PESSOA, O. D. L. Constituintes voláteis e não-voláteis de *Cachiospermum vitifolium* (Willdenow) Sprengel. *Quimica Nova*, v28, n1, p57-60, 2005.

ALVARENGA , N. L. ET AL. A New Antibiotic Nortriterpene Quinone Methide from *Maytenus cantingarum*. *Journal Nat. Prod*, v 62, p 750-751, 1999.

ARGOLO, A.C.C.; SANT'ANA, A.E.G.; PLETSCH, M.; COELHO, L.C.B.B. Antioxidant activity of leaf extracts from *Bauhinia monandra*. *Bioresource Technology*. v.95, n.2, p.229-233, 2004.

AVILLA, J. ET AL. Insecticidal Activity of *Maytenus species* (Celastraceae) Nortriterpene Quinone Methides Against Codling Moth, *Cydia pomonella* (L.) (Lepidoptera: Tortricidae). *Journal Agriculture Food Chemistry*, v. 48, p 88-92, 2000.

BARROSO, G.M. Sistemática de Angiospermas do Brasil. 1.ed. vol.2. Viçosa-MG, UFV : Imprensa Universitária, 1991.

BRAGA, R. Plantas do Nordeste Especialmente do Ceará: UFRN, 1960.

BRAZ-FILHO, R. Química de Produtos Naturais: Importância, Interdisciplinaridade, Dificuldades e Perspectivas. A Peregrinação de um Pacatubano. *Quim. Nova* v17, n5, p405-445, 1994.

BRESOLIN, T. M. B.; FILHO, V. C. Contribuição ao Desenvolvimento de Novos Fármacos e Medicamentos. In: Ciências Farmacêuticas, Itajaí/Santa Catarina: ed. Universidade do Vale do Itajaí, p239 , 2003.

BLAND, J.S. Oxidantes e antioxidants na clínica médica. v.1, p.10-25, 1998

BENNETT, J. L., PLUM, F. Tratado de Medicina Interna. 20° Ed. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 1996.

BERSANI-AMADO, C.A; MASSAO, L.B; BAGGIO, S.R; JOHANSON, L; ALBIERO, A. L.M; KIMURA, E. Antiulcer effectiveness of *Maytenus aquifolium* spray dried extract. *Phytotherapy Research*, v14, p.543-545, 2000.

BRUCE-CHWATT, L. J. (1980) Essential Malariology. Willian Heinemann Medical Books Ltd., London.

CAI, Y; LUO, Q; SUN, M;CORKE,H. Antioxidant activity and phenolic compounds of 112 tradicional. Chinese medicinal plants associated with anticancer. *Lefe Sci.* v74, p.2157-2184. 2004.

CHÁVEZ, H. ET AL. Macrocarpins A-D, New Cytotoxic Nor-Triterpenes from *Maytenus macrocarpa*. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, v 10, p. 759-762, 2000.

CHÁVEZ, H.; ESTÉVEZ-BRAUN, A.; RAVELO, A.G; GONZÁLEZ, A. G. Friedelane Triterpenoids from *Maytenus macrocarpa*. Journal Nat. Prod, v 61, p 82-85, 1998.

CHÁVEZ, H.; ESTÉVEZ-BRAUN, A.; RAVELO, A.G; GONZÁLEZ, A. G. New Phenolic and Quinone – Methide Triterpenes from *Maytenus amazonica*. Journal Nat.Prod, v 62, p 434-436, 1999.

CHEVION, C; ROBERTS, M, A; CHEVION, M. Free Radical Biol. Med. 6, p860, 2000.

CONSTANT, W.L; SLOWING,K; GRAHAM, J.G; PEZZUTO,J.M; CORDELL,G.A; BEECHER, W.W. A general method for the dereplication of flavonoid glycosides utilizing high performance liquid chromatography/mass spectrometric analysis. Phytochemical Analysis, v.8,p.176-180. 1997.

CORTES-SELVA, F; CAMPILLO, M; REYES, C. P.; JIMENEZ, I. A.; CASTANYS, S; BAZZOCCHI, I.L.; PARDO, L; GAMARRO, F; RAVELO, A. G. SAR Studies of Dihydro- α -agarofuran Sesquiterpenes as Inhibitors of the Multidrug-Resistance Phenotype in a *Leishmania tropica* Line Overexpressing a P-Glycoprotein-Like Transporter. Journal of Medicinal Chemistry, v47, n3, p576-587, 2004.

CRUZ, G. L. *Dicionário das Plantas Úteis do Brasil*. Editora Civilização Brasileira S.A., Rio de Janeiro, 1979.

DEHARO E., BOURDY, G., QUENEVO, C., MUNOZ, RUIZ, G. and SAUVAIN, M. A Search for Natural Bioactive Compounds in Bolivia Thorough a Multidisciplinary Approach Part V. Evaluation of the Antimalarial Activity of Plants Used by the Tacana Indians. Journal of Ethnopharmacology: v77, p91-98, 2001.

DE OLIVEIRA, P. M. Avaliação do Potencial Larvicida de Espécie Vegetais no Controle de *Aedes (Stegomyia) aegypti* L., 1762 (*Díptera*: Culicidae) e Isolamento Derivados Furanocumarínicos das Raízes de *Esenbeckia grandiflora* Mart (Rutaceae). Dissertação de Mestrado, Departamento de Química, Universidade Federal de Alagoa, Maceió-AL, 2003.

ESTEVAM, C. S. Isolamento e Caracterização de Constituintes Químicos de Raízes de *Esenbeckia grandiflora* (Rutaceae). Dissertação de Mestrado, DQ/UFAL, 2001.

ELIZABETSKY, E.; SHANLEY, P. Ethnopharmacology in the Brazilian Amazon. *Pharmacology and Therapeutics*, v64, n2, p201-214, 1994.

ELIZABETSKY, E. Pesquisas em Plantas Mediciniais. *Ciência e Cultura*, v39, p697-702, 1987

FERREIRA, E. I. Malária, Aspectos Gerais e Quimioterapia. Editora Ateneu São Paulo/SP, 1982.

FILHO, W. B.; CORSINO, J.; BOLZANI, S. V.; FURLAN, M.; FERREIRA, A. M. S.; FANÇA, S. C. Quantitative Determination of cytotoxic friedo-nor-oleanane derivatives from five morphologicalo types of *Maytenus ilicifolia* (Celastraceae) by reverse-phase high-performance liquid chromatography. *Phytochemical Analysis*, v 13, p75-78 , 2002.

DELLE MONACHE, F; POMPONI, M; MARINI-BETTOLO, G. B.; D'ALBUQUERQUE, I. L.; GONÇALVES, L.O. A methylated catechin and proanthocyanidins from the Celastraceae. *Phytochemistry*, v.15, n4, p573-4. 1976.

DELLE MONACHE, F.; BETTOLO, G. B. M; BERNAYS, E. A.. Isolation of insect antifeedant alkaloids from *Maytenus rigida* (Celastraceae). *Zeitschrift fuer Angewandte Entomologie*. v.9, n 4, p406-14. 1984.

GONZALEZ, F.G; PORTELA, T.Y; STIPP, E.J; DI STASI, L.C. Antiulcerogenic and analgesic effects of *Maytenus aquifolium*. Journal Ethnopharmacol, v.77, p. 41-47, 2001.

GONZÁLEZ, A.G; ALVARENGA, N.L; BAZZOCCHI, I.L; RAVELO, A.G; MOUJIR,L. Triterpene trimers from *Maytenus scutioides* : Cycloadtion compounds. Journal of Natural Products. V.62, p.1185-1187, 1999.

GONZÁLEZ, A. G.; ALVARENGA, N. L.; RAVELO, A. G.; JIMENEZ, I. A.; BAZZOCCHI, I. L.; CANELA, N. J.; MOUJIR, L. M. Antibiotic Phenol Nor-Triterpenes from *Maytenus canariensis*. Phytochemistry, v43,n1, 129-132, 1996.

GONZALEZ, A.G.; FRAGA, B. M.; GONZALEZ, P; MARTA, M; DELLE MONACHE, F; MARINI-BETTOLO, G.B.; DE MELLO, J. F.; GONCALVES, O. A revised structure for the triterpene rigidinol. Phytochemistry, v21, n2, p470-1. 1982.

GUENDEZ, R; KALLITHRAKA, S; MARKRIS, D.P; KEFALAS, P. Determination of low molecular weight polyphenolic constituents in grape *Vitis vinifera* seeds extracts: Correlation with antiradical activity. Food Chemistry. v.89,n1,p.1-9,2005.

GÜLÇİN, I.; SAT, I.G.; BEYDEMİR, S.; ELMASTAŞ, M.; KÜFREVİOĞLU, Ö. Comparison of antioxidant of clove (*Eugenia caryophyllata* Thunb) buds and lavender (*Lavandula stoechas* L.). Food Chemistry, v.87, n.3, p.393-400, 2004.

GUILLÉN, D. I., ALBARRACÍN A., ARQUIOLA, E., ERIEL, S., MONTIEL, L., PESET, J. L., Entralgo, P. L. História do Medicamento. Diagraphic Projetos Gráficos e Editoriais Ltda, Rio de Janeiro,1987.

HARBORNE, J. B., BAXTER, H. Phytochemistry Dictionary – A Handbook of Bioactive Compounds from Plants. Ed. Taylor and Francis, London, U. K, 1993.

HESS, S. C. Estudos Químicos, Biológicos e Farmacológicos com *Vochysia divergens* Pohl. (Vochysiaceae). Tese de Doutorado – Centro de Ciências Físicas e Matemáticas – Universidade Federal de Santa Catarina – Florianópolis, 1995.

HIRCHOWITZ, B.I; KEELING, D; LEWIN, M; OKABE, S; PARSONS, M;SEWING, K; WALLMARK, B; SACHS, G. Pharmacological aspects of acid secretion. Dis.Dis.Sci., v40, n2 (supplement), p.3S-23S.1995.

HOSTETTMENN; M. P. GUPTA E A. MARSTON. Chemistry, Biological and Pharmacological Properties of Medicin Plants from the Americas. Edited by, 1997.

HOTTA, H; SAKAMOTO, H; NAGANO, H; OSAKAI, T; TSUJINO, Y. Biochimica et Biophysica Acta v159, p1526, 2001.

HOTTA, H; NAGANO, S; UEDA, M; TSUJINO, Y; KOYAMA, J; OSAKAI, T. Biochim. Biophys. Acta v123, p1572, 2002.

HUSSEIN, G.; NAKAMURA, N.; MESELHY, M. R.; HATTORI, M. Phenolics from *Maytenus senegalensis*. Phytochemistry. v50 p689-694, 1999.

JANEIRO, P; OLIVEIRA BRETT, A. M. Analytica Chimica Acta v518, p109–115, 2004..

JOLY, A.B. Botânica: Introdução à Taxonomia Vegetal. 11.ed. São Paulo: Editora Nacional, 1993.

JOVANOVIC, S. V; STEENKEN, S; TOSIC, M; MARJANOVIC, B; SIMIC, M. G.J. Am. Chem. Soc. v116 ,p4846, 1994.

KELLOFF, G.J., CROWELL J.A., STEELE V.E., LUBET R.A., MALONE W.A., BOONE C.W., KOPELOVICH L., HAWK E.T., LIEBERMAN R., LAWRENCE J.A., ALI I., VINER J.L., SIGMAN C.C. Progress in Cancer Chemoprevention: Development of Diet-Derived Chemoprevention Agents *American Society for Nutrition Sciences*, 467S – 471S, 2000.

KENNEDY, M.L. ET AL. Chemosensitization of a Multidrug-Resistant *Leishmania tropica* Line by New Sesquiterpens from *Maytenus magellanica* and *Maytenus chubutensis*. *Journal Med. Chemistry*, v 44, p. 4668-4676, 2001.

KROGH, R., YUNES, R. A., ANDRICOPULO, A. D. Structure-activity relationships for the analgesic activity of gallic acid derivatives. *II Farmaco*. v5, p730-735. 2000.

ITOKAWA, H; SHIROTA, O; IKUTA, H; MORITA, H; TAKEYA, K; ITAKA, Y. Triterpenes from *Maytenus ilicifolia*. *Phytochemistry*, v.30, p.3713-3716, 1991.

LE BARRIS, D.; GOZARIU, M.; CADENN, S.W. *Pharmacol. Rew.* 53(4), p.597, 2001.

LEITE, J.P.V. ET AL. Isolation and HPLC Quantitative Analysis of Flavonoid Glycosides from Brazilian Beverages (*Maytenus ilicifolia* and *M. aquifolium*). *Journal Agric. Food Chemistry*, v.49, p.3796-3801, 2001.

LIN, C.H.; CHANG, C.Y. Textural change and antioxidante properties of broccoli under different cooking treatments. *Food chemistry*, v.90, n.(1-2), p.9-15, 2005.

LODYATO, V.I.; YURKOVA, I.L.; SOROKIN, V.L.; SHADYRO, O.I.; DOLGOPALET, V.I.; KISEL M.A. Novel (3,5-di-*ter*-butyl-2-hydroxy-phenylcarbomoyl)-alkanoic acid as potent antioxidants. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. v.14, n.16, p.4253-4256, 2004.

MAHATO, S. B.; KUNDU, A. P. (1994) ^{13}C RMN Spectra of Pentacyclic Triterpenoids – a Compilation and Some Salient Features, *Phytochemistry* 37(6), 1517-1575.

MATOS, F.J. A. *Introdução à Fitoquímica Experimental*: UFC, 1994.

MATOS, F.J. A. *Introdução à Fitoquímica Experimental*: UFC. 2ª ed, 1997.

MANTELL, S. H., MATTHEWS, J. A., MCKEE, R. A. *Princípios de Biotecnologia em Plantas*. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética, 1994.

MOCHIZUKI, M; YAMAZAKI, S; KANO, K; IKEDA, T. *Biochim. Biophys. Acta.* v35, p1569 , 2002.

MONTANARI, C. A & BALZANI, V. S. Planejamento Racional de Fármacos Baseado em Produtos Naturais. *Química nova*, vol 24, n1, p105-111, 2001.

MARINI-BETTOLO, G. B. Chemistry of The Active Principles of Celastraceae. *Farmacol. Ed. Sci.*, v.29, p.551-568, 1974.

MARTA, A.; DELLEMONACHE, F.; MARINIBETTOLO, G. B. Rigidinol, a New Triterpene With a Lupane Skeleton from *Maytenus rigida*. *Gazzeta Chimica Italiana* v.109, n.1-2, p.61-63, 1979.

MERKEN, H. M; BEECHER, G.R. *Journal Agriculture. Food Chem.* v3, p48 2000.

MORESCO, P. M.; DE OLIVEIRA, L. N. P. *Farmácias Caseiras: Plante Saúde*. Curitiba: Prefeitura Municipal de Curitiba, p.60,1995.

MOTA, C. N; ALBUQUERQUE, U. P. *As Muitas Fases da Jurema: De Espécie Botânica à Divindade Afro-indígena*, 2002.

NEGI, A. S., DAROKAR, M.P., CHATTOPADHYAY, S. K., GARG, A., BRATTACHARYA, A. K., SRIVASTAVA, V., KHANUJA, S. P. S. Synthesis of a novel plant growth promoter from gallic acid. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. v15, p 1243-1247, 2005.

NOSSACK, A.C; DE VASCONCELOS, E. C; VILEGAS, J. H. Y; LANCAS, F.M; ROQUE, N. F. Quantitative analysis of triterpenes friedelan-3- α -ol and friedelin in *Maytenus aquifolium* by high-resolution gas chromatography and high-temperature capillary gas chromatography. *Phytochemical Analysis*, v.11, n.4, p.243-246, 2000.

NÚÑEZ, M.J; CORTÉS-SELVA, F; BAZZOCCHI, I.L; JIMÉNEZ, I.A; GONZÁLEZ, A.G; RAVELO, A.G; GAVIN, J.A. Absolute configuration and complete assignment of ^{13}C NMR data for new sesquiterpenes from *Maytenus chiapensis*. *Journal of Natural Products*. v.66, p.572-574, 2003

NÚÑEZ, M.J; GUADAÑO, A; JIMÉNEZ, I.A; RAVELO, A.G; COLOMA-GONZÁLEZ; BAZZOCCHI, I.L. Insecticidal sesquiterpene pyridine alkaloids from *Maytenus chiapensis*. *Journal of Natural Products*. v.67, p.14-18. 2004.

OHSAKI, A; IMAI, Y; NARUSE, M; AYABE, S; KAMIYAMA, K ; TAKASHIMA. J. Four new triterpenoids from *Maytenus ilicifolia*. *Journal Natural Products*. v.62, p.469-471, 2004.

OLIVEIRA, A .F. M; MEIRELLES, S. T; SALATINO. A. Epicuticular Waxes From Caatinga and Cerrado Species and Their Efficiency Against Water Loss. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, v.75, n.4, p.431-439 DEC 2003.

OLIVEIRA, A. F. M; SALATINO, A. Major Constituents of The Foliar Epicuticular Waxes of Species From the Caatinga and Cerrado. *Zeitschrift fur Naturforschung C- A Journal of Biosciences*, v. 55 n. (9-10): 688-692 SEP-OCT 2000

OLIVEIRA, A. F. M; MEIRELLES. Friedelan-3b-ol, and Abundant Foliar Triterpene of *Maytenus rigida* Mart. (CELASTRACEAE). Bolletino Chimico Farmaceutico, v. 138, n.2, p.186, 1999.

OLIVEIRA, F. M. Isolamento e Caracterização de Constituintes Químicos de Raízes de *Esenbeckia grandiflora* (Rutaceae). Dissertação de Mestrado, DQ/UFAL, 1995.

OLIVEIRA, L.F. Dor Fisiopatologia, Revista Brasileira de Anestesiologia, v.28, n.3, p227-246, 1979.

ORABI, K.Y. ET AL. Dihydroagarofuran Alkaloid Ande Triterpenes from *Maytenus heterophylla* and *Maytenus arbutifolia*. Phytochemistry, v.58, p. 475-480, 2001.

PANIZZI, L., CAPONI, C., CATALANO, S., CIONI, P. L., MORELLI, I. *In vitro* antimicrobial acvity of extracts and isolated constituents of *Rubus ulmifolius*. Journal Ethnopharmacology. v79, p165-168. 2002.

PEDRO, A. de S. P. N; MARIA, V. S; NADJA, V. C. C; ZENALDO. P & LUIZ, C. C. Antibacterial activity of *Borreria verticillata* roots. Fitoterapia v.73, p.529-531, 2002.

PIAO, X.L.; PARK, I.H.; BEAK, S.H.; KIM, H.Y.; PARK, M.K.; PARK, J.H. Antioxidative activity of furanocoumarins isolated from *Angelicae dahuricae*. Journal of Ethnopharmacology, v.93, n.(2-3), p.243-246, 2004.

PULLEN, C.B; SCHMITZ, P; HOFFMANN, D; MEURER, K; BOETTCHER, T; BAMBERG, D; PEREIRA, A.M; FRANÇA, C. S; HAUSER,M; GEERTSEMA,H; WYK, A; MAHMUD, T; FLOSS,G.H; LEISTNER, E. Occurrence and non-detectability of maytansinoids in individual plants of the genera *Maytenus* and *Putterlickial*. Phytochemisrty, v.62, p.377-387, 2003.

PINTO, A. A. C.; MADURO, C. B. Produtos e Subprodutos da Medicina Popular Comercializada na Cidade de Boa Vista, Roraima. *Acta Amazônica*, v.33, n.2, p.281-289. 2003.

PELLEGRINA, C. D., PADOVANI, G., MAINENTE, F., ZOCCATELLI, G., BISSOLI, G., MOSCONI, S; VENERI, G., PERUFFO, A., ANDRIGHETTO, G., RIZZI, C., CHIGNOLA, R. Anti-tumour potential of a gallic acid-containing phenolic fraction from *Oenothera biensis*. *Câncer Letters*, p1-9. 2005.

PÉREZ-VICTORIA, J.M. ET AL. New Natural Sesquiterpenes as Modulators of Daunomycin Resistance in a Multidrug-Resistant *Leishmania tropica* Line. *Journal Med Chemistry*, v.42, p. 4388-4393, 1999.

PETER, W. Chemotherapy of malaria. In: *Malaria epidemiology, chemotherapy, morphology and metabolism*. Academic press Inc., New York. 1980.

QUEIROGA, C. L. ET AL. Evaluation of the Antiulcerogenic Activity of Friendelan- 3B-ol and Friedelin Isolated from *Maytenus ilicifolia* (Celastraceae). *Journal of Ethnopharmacology*, v.72, p.465-468, 2000.

REDDY, L; ODHAV, B; BHOOLA, K.D. Natural products for câncer prevention: a global perspective. *Pharmacol & therapeutics*, v.99, p.1-13, 2003.

REY, L. *Parasitologia*. Editora Guanabara Koogan S.A., 2^a Edição, Rio de Janeiro, 1991.

SABU, M.C; KUTTAM, R. Anti-diabetic activity of medical plants and its relationship with their antioxidant property. *J. Ethopharmacol*, v.81, p.115-160. 2002.

SANCHES-MORENO, C; LARRAURI, J.A; SAURA-CALIXTO, F. A procedure to measure the antiradical efficiency of polyphenols. J. Sci. Food Agric, v.76, p.270-276. 1988.

SCHANEBERG,B.T.; GREEN,D.K.; SNEDEN,A.T. Dihydroagarofuran Sesquiterpene Alkaloids from *Maytenus putterlickoides*. Journal Nat.Prod, v.64, p. 624-626, 2001.

SCHENKEL, E. P., GOSMANN, G., PETROVICK, P. R. Produtos de Origem Vegetal e o Desenvolvimento de Medicamentos. In: SIMÕES, C. M. O., SCHENKEL, E. P. P.2000.

SILVA, P. Farmacologia. 5. ed. Editora Guanabara Koogan, 1998.

SOARES, L.A.L; OLIVEIRA. A.L; ORTEGA, G.G; PETROVICK, P.R. Development and validation of a LC-method for determination of catechin and epecatechin in aqueous extractives from leaves of *Maytenus ilicifolia*. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis. v.36, p.787-790, 2004.

SOLER-RIVAS, C; SPIN, J.C; WICHERS, H.J. An easy and fast test to compare total free radical scavenger capacity of foodstuffs. Phytochemical Analysis. v.11, p.1-9,2000.

SOUZA-FORMIGONI, M.L.O; OLOVEIRA, M.G.M; MOMTEIRO, M.G; SILVEIRO FILHO N.G, BRAZ, S; CARLINI, E.A. Antiulcerogenic effects of tow *Maytenus* species in laboratory animals. Journal Ethnopharmacol, v.34, p.21-27, 2001.

SHIROTA, O.; MORITA, H.; TAKEYA, K.; ITOKAWA, H. Cytotoxic Aromatic Triterpenes from *Maytenus ilicifolia* and *Maytenus chuchuhuasca*. Journal of Natural Products, v.57, n.12, p.1675-1681.1994.

SHIROTA, O; SEKITA, S; SATAKE, M; MORITA, H; TAKEYA, K; ITOKAWA, H. Tow cangorosin A type triterpene dimmers from *Maytenus chunchuhuasca*. *Chemical Pharmaceutc Bull.* v.52, n. 9, p.1148-1150, 2004.

SIMÕES, C. M. O; SPITZER, V. Óleos Voláteis. In: FARMACOGNOSIA: DA PLANTA AO MEDICAMENTO. Porto Alegre/Florianópolis: ed. Universidade/UFRGS/ed. da UFSC, 1999, 387 p.

SIMÕES, C. M. O., MENTZ, L. A., SCHEENKEL, E. P., IRGANG, B. E., SSTEHMANN, J. R. Plantas da Medicina Popular no Rio Grande do Sul, 3 edição, ed da UFRGS. 1989.

SANO, M; TABATA, M; SUZUKI, M; DEGAWA, M; MIYASE, T; MAEDE-AMAMOTO, M. *Analytical* v126 ,p816, 2001.

SULTANOVA, N; MAKHMOOR, T; ABILOU, Z.A; PARQUEEN, Z; OMURKAMZINOVA, B; RAHMAN, A. Antioxidant and antimicrobial activities of *Tomarix ramosissima*. *Journal of Ethnopharmacology.* v.78,n.(2-3), p.201-205, 2001.

SVS Guia de Vigilância Epidemiológica. Disponível em: <http://dtr2001.saude.gov.br/svs/> (2004).

TILLYARD, A. Severe malaria and intensive care. *Current Anaesthesia & Critical Care.* v15, p185-197, 2004.

UCHÔA, V. T. Estudo Fitoquímico da *Cecropia pachypachya* Guiado pelo Bioensaio Antimalárico *in vivo* e Avaliação de algumas Atividades Biológicas dos Extratos e Frações das Espécies *Cecropia pachystachya* Trec. (Cecropiaceae) e *Ximenia americana* L. (Olacaceae). Dissertação de Mestrado, DQ/UFAL, 2004.

URREA-BULLA, A., SUAREZ, M. M., MORENO-MURILO, B. Biological activity of phenolic compounds from *Alchornea glandulosa*. *Fitoterapia.* v75, p.392-394. 2004.

VIEIRA, R. F. Conservation of Medicinal and Aromatic Plants in Brazil. In : J. Janick (ed). Perspectives on New Crops and New Uses. ASHS Press, Alexandria, V.A . p. 152-159, 1999.

VILEGAS, W.; SANOMMIYA, M.; RASTRELLI, L.; PIZZA, C. Isolation and Structure Elucidation of Two New Flavonoid Glycosides From the Infusion of *Maytenus aquifolium* leaves. Evaluation of The Antiulcer Activity of The Infusion. Journal Agric. Food Chemistry, v.47, p. 403-406, 1999.

WALL, M.E.; WANI, M.C. Camptothecin and Taxol: From Discovery to Clinic. J. Ethnopharmacol.,v.51, p. 239-254, 1996.

WOJTASZEK, M.E.; KRUCZYŃSKI, Z.; KASPRZAK, J. Investigation of the free scavenging activity of *Ginkgo biloba* L. leaves. Fitoterapia, v.74, n.(1-2), p.1-6, 2003.

YUNES, R.A; CECHINE, F.V. Estratégia para obtenção de compostos farmacologicamente ativos a partir de plantas medicinais. Conceito sobre modificação estrutural para otimização da atividade. Química Nova, v.21, n.1,p.99-105, 1998.

ZHANG, D.; HAMAUZU, Y. Phenolics, ascorbic acid, carotenoids and antioxidant activity of broccoli and their change during conventional and microwave cooking. Food Chemistry. V.88, n.4, p.503-509, 2004.

PIAO, X.L.; PARK, I.H.; BEAK, S.H.; KIM, H.Y.; PARK, M.K.; PARK, J.H. Antioxidative activity of furanocoumarins isolated from *Angelicae dahuricae*. Journal of Ethnopharmacology, v.93, n.(2-3), p.243-246, 2004.

GÜLÇİN, I.; SAT, I.G.; BEYDEMİR, S.; ELMASTAŞ, M.; KÜFREVİOĞLU, Ö. Comparison of antioxidant of clove (*Eugenia caryophyllata* Thunb) buds and lavender (*Lavandula stoechas* L.). Food Chemistry, v.87, n.3, p.393-400, 2004..

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)