

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA  
CENTRO DE CIÊNCIAS NATURAIS E EXATAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

Daniela Copetti

**ESTUDO DA CASCA DA RAIZ DA ESPÉCIE *Maytenus ilicifolia* Mart. ex Reissek,  
MODIFICAÇÕES ESTRUTURAIS DO COMPOSTO  $\beta$ -SITOSTEROL E ANÁLISES  
DAS ATIVIDADES ANTIMICROBIANAS**

Santa Maria, RS  
2016

**Daniela Copetti**

**ESTUDO DA CASCA DA RAIZ DA ESPÉCIE *Maytenus ilicifolia* Mart. ex Reissek,  
MODIFICAÇÕES ESTRUTURAIS DO COMPOSTO  $\beta$ -SITOSTEROL E ANÁLISES  
DAS ATIVIDADES ANTIMICROBIANAS**

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós Graduação em Química da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Química.**

Orientador: Prof. Dr. Ademir Farias Morel

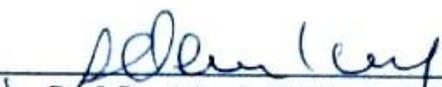
Santa Maria, RS  
2016

**Daniela Copetti**

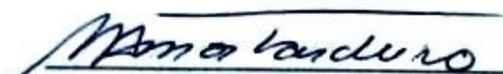
**ESTUDO DA CASCA DA RAIZ DA ESPÉCIE *Maytenus ilicifolia* Mart. ex Reissek, MODIFICAÇÕES ESTRUTURAIS DO COMPOSTO  $\beta$ -SITOSTEROL E ANÁLISES DAS ATIVIDADES ANTIMICROBIANA.**

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós Graduação em Química da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Química**.

**Aprovada em 05 de agosto de 2016.**

  
\_\_\_\_\_  
**Prof. Dr. Ademir F. Morel. (UFSM)**  
(Presidente/Orientador)

  
\_\_\_\_\_  
**Prof. Dr. Eduardo Miranda Ethur (UNIVATES)**

  
\_\_\_\_\_  
**Prof. Dr. Marco Aurélio Mostardeiro. (UFSM)**

Santa Maria, RS  
2016.

Aos meus pais Arnildo e Leonice pelo  
incentivo, carinho, amor incondicional e  
apoio durante toda minha vida.  
Com muito carinho.

## AGRADECIMENTOS

A Deus por me dar forças para que eu não desistisse de meus objetivos.

A meus pais e minha irmã Camila por todo apoio, amor e incentivo nesta longa jornada .

Ao meu namorado por toda paciência, amor e carinho dedicado.

A meus Avós que mesmo de longe sempre incentivaram e me apoiaram.

Ao Prof. Dr. Ademir Farias Morel, pela orientação, paciência e confiança.

A Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Ionara Irion Dalcol pela coorientação e sugestões no exame de qualificação.

Aos professores, Dr. Marco Aurélio Mostardeiro e Dr. Eduardo Miranda Ethur pelo auxílio e contribuições para melhoria deste trabalho.

Ao Adriano e Adriana pelas análises de Ressonância Magnética Nuclear.

Ao Dr. Ubiratan Flores da Silva pelas análises de cromatografia e ajuda no decorrer deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Robert Alan Burrow pelas análises de difração de Raio-X.

Aos colegas e amigos Adriana, Adriano, Alessandra, Denise, Eveline, Frederico, Gabriele, Inaiá, Janaina, Janice, Liziane, Lucimara, Sabrina, Tanize pela convivência diária.

A Natiele pela amizade e ajuda durante seu trabalho de Iniciação Científica.

Ao colega Adriano pela incansável tentativa de cristalização e sugestões no decorrer deste trabalho.

Aos funcionários do Departamento de Química, Ademir e Valéria pela disposição em ajudar alunos da Pós-Graduação em Química.

A CAPES pelo auxílio financeiro.

A todos que de alguma maneira colaboraram para a realização deste trabalho, o meu Muito Obrigada.

“O voo não pode ser ensinado.

Só pode ser encorajado.”

Rubem Alves.

## RESUMO

### **ESTUDO DA CASCA DA RAIZ DA ESPÉCIE *Maytenus ilicifolia* Mart. ex Reissek, MODIFICAÇÕES ESTRUTURAIS DO COMPOSTO $\beta$ -SITOSTEROL E ANÁLISES DAS ATIVIDADES ANTIMICROBIANAS**

AUTORA: Daniela Copetti  
ORIENTADOR: Prof. Dr. Ademir Farias Morel

O presente trabalho de dissertação descreve o estudo fitoquímico da espécie *Maytenus ilicifolia* Mart. ex Reissek, pertencente a família Celastreaceae. Além disso, foram realizadas reações de modificações estruturais no composto  $\beta$ -sitosterol, a fim de se realizar um estudo da relação estrutura/atividade frente a cepas de micro-organismos.

Através das cascas da raiz coletas no município de Santana do Livramento – RS foi obtido o extrato bruto metanólico o qual originou diferentes subfrações de acordo com a polaridade, a partir disto foi possível isolar 4 metabólitos secundários.

Complementarmente foram realizadas reações utilizando anidrido acético, anidrido Succínico e Anidrido Ftálico para obtenção de diferentes derivados do metabólito isolado  $\beta$ -sitosterol.

Findando com análise da atividade antimicrobiana dos extratos, frações, substâncias isoladas e derivados do  $\beta$ -sitosterol, realizadas através do método da microdiluição em placas, frente a cinco bactérias Gram-positivas, seis Gram-negativas e sete fungos.

Observou-se nesta análise que os extratos, frações e metabólitos isolados testados apresentaram bons resultados principalmente contra as bactérias *Enterococcus* e *Shigella sonnei*, e frente os fungos *Candida krusei* e *Cryptococcus neoformans*. No estudo da relação estrutura/atividade observou-se que adição de duas carbolinas ao  $\beta$ -sitosterol contribuiu para atividade antimicrobiana.

**Palavras Chaves:** *Maytenus ilicifolia*, Celastreaceae,  $\beta$ -sitosterol, atividade antimicrobiana.

**STUDY ROOT BARK OF SPECIES *Maytenus ilicifolia* Mart. ex Reissek,  
STRUCTURAL MODIFICATION OF COMPOUND  $\beta$ -SITOSTEROL AND  
ANALYSIS OF ANTIMICROBIAL ACTIVITIES**

**AUTHOR: Daniela Copetti**

**ADVISOR: Prof. Dr. Ademir Farias Morel**

This dissertation describes the phytochemical study of *Maytenus ilicifolia* Mart species. ex Reissek belonging to Celastraceae family. Further, structural modification reactions were performed in  $\beta$ -sitosterol compound, in order to carry out a study of structure / activity against strains of micro-organisms.

Through the root bark collected in the municipality of Santana do Livramento - RS was obtained crude extract methanol which gave different subfractions according to the polarity, as it was possible to isolate 4 secondary metabolites.

In addition reactions were carried out using acetic anhydride, succinic anhydride and phthalic anhydride to obtain various derivatives of the metabolite isolated  $\beta$ -sitosterol.

Ending with analysis of the antimicrobial activity of extracts, fractions and isolated compounds derived from  $\beta$ -sitosterol, carried out by microdilution method plates, opposite to five Gram-positive bacteria, six gram-negative and seven fungi.

It was observed in this analysis that the extracts, fractions and isolated metabolites tested showed good results mainly against bacteria *Enterococcus* and *Shigella sonnei*, and front the fungus *Candida krusei* and *Cryptococcus neoforman*. In the study of structure / activity it has been observed that the addition of two carbolines  $\beta$ -sitosterol contribute to antimicrobial activity.

**Key Words: *Maytenus ilicifolia*, Celastraceae,  $\beta$ -sitosterol, antimicrobial activity.**

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Imagem casca da raiz e folhas de <i>Maytenus ilicifolia</i> .....	5
Figura 2 – Alguns dos principais metabólitos isolados da família Celastraceae.....	6
Figura 3 – Compostos já isolados da espécie <i>Maytenus ilicifolia</i> .....	7
Figura 4 – Estrutura numerada do $\beta$ -sitosterol (M01).....	27
Figura 5 - Espectro de RMN de $^1\text{H}$ do $\beta$ -sitosterol, em $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz.....	28
Figura 6 - Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ do $\beta$ -sitosterol em $\text{CDCl}_3$ , 100,13 MHz.....	29
Figura 7 - Estrutura numerada do alcaloide Cangorinina E-1.....	30
Figura 8 - Espectro bidimensional HSQC do alcaloide M02.....	31
Figura 9 - Espectro HMBC do alcaloide M02.....	32
Figura 10 – Expansão espectro COSY, para identificação acoplamentos dos H-3 e H-6 do alcaloide M02.....	33
Figura 11 – Expansão do espectro de RMN de $^1\text{H}$ , em $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz.....	34
Figura 12 – Expansão do espectro HMBC, ênfase nas carbonilas do alcaloide M02.....	35
Figura 13 – Expansão do espectro HMBC, ênfase na região OAc do alcaloide M02.....	36
Figura 14 – Espectro de RMN de $^1\text{H}$ expandido nas metilas, em $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz.....	37
Figura 15 - Espectro de RMN de $^1\text{H}$ expandido nos aromáticos, em $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz.....	37
Figura 16 - Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ expandido, em $\text{CDCl}_3$ , 100 MHz.....	38
Figura 17 - Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ expandido, em $\text{CDCl}_3$ , 100 MHz.....	38
Figura 18 - Estrutura numerada do alcaloide Aquafoliunina E-1.....	41
Figura 19 - Espectro bidimensional de HSQC do alcaloide M03.....	41
Figura 20 - Espectro bidimensional HMBC expandido do alcaloide M03.....	42
Figura 21 - Espectro bidimensional HMBC expandido na região das OAc.....	43
Figura 22 - Espectro de RMN de $^1\text{H}$ expandido na região das metilas.....	44
Figura 23 - Espectro de RMN de $^1\text{H}$ do alcaloide M03, em $\text{CDCl}_3$ a 400 MHz.....	44
Figura 24 - Espectro de RMN do $^{13}\text{C}$ do alcaloide M03 em $\text{CDCl}_3$ , 100 MHz.....	45
Figura 25 - Espectro de RMN do $^{13}\text{C}$ expandido do alcaloide em $\text{CDCl}_3$ , 100 MHz.....	45
Figura 26 - Estrutura do $\beta$ -sitosterol Glicolisado numerada (M04).....	48
Figura 27 - Espectro de RMN de $^1\text{H}$ do M04, em $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ , a 400 MHz.....	49
Figura 28 - Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ do M04, em $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ , A 100MHz.....	49
Figura 29 - Estrutura numerada do acetato de $\beta$ -sitosterol (M01-1).....	51

Figura 30 – Espectro de RMN de $^1\text{H}$ do M01-1, em $\text{CD}_3\text{OD}$ , a 400 MHz.....	52
Figura 31 – Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ do M01-1, em $\text{CD}_3\text{OD}$ , a 100 MHz.....	52
Figura 32 - Representação obtida por difração de raio-X de M01-1.....	53
Figura 33 - Estrutura numerada de Succinato de $\beta$ -sitosterol (M01-2).....	54
Figura 34 - Espectro de RMN de $^1\text{H}$ do M01-2, em $\text{CD}_3\text{OD}$ , 400 MHz.....	55
Figura 35 - Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ do M01-2, em $\text{CD}_3\text{OD}$ , a 100 MHz.....	55
Figura 36 - Estrutura numerada do Ftalato de $\beta$ -sitosterol (M01-3).....	56
Figura 37 - Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ de M01-3, em $\text{CD}_3\text{OD}$ , a 100 MHz.....	57
Figura 38 - Espectro de RMN de $^1\text{H}$ de M01-3, em $\text{CD}_3\text{OD}$ , a 400 MHz.....	57
Figura 39 – Estrutura com composto (R/S) 4-hidroxi-4- <i>p</i> -tolilbutanoato de $\beta$ -sitosterol.....	59
Figura 40 - Espectro $^1\text{H}$ do composto (R/S) 4-hidroxi-4- <i>p</i> -tolilbutanoato de $\beta$ -sitosterol.....	59
Figura 41 - Espectro de $^{13}\text{C}$ do composto o (R/S) 4-hidroxi-4- <i>p</i> -tolilbutanoato de $\beta$ -sitosterol.....	60

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Micro-organismos indicadores utilizados na atividade antimicrobiana.....	20
Tabela 2 - Rendimento das frações em relação à casca e ao extrato bruto.....	22
Tabela 3 - Separação em coluna cromatográfica (CC) da fração hexânica.....	23
Tabela 4 - Separação em coluna cromatográfica (CC) da fração diclorometano funil.....	24
Tabela 5 - Separação em CC da subfração V.....	24
Tabela 6 - Separação em coluna cromatográfica da fração Diclorometano coluna.....	25
Tabela 7 - Separação em CC da subfração IV.....	25
Tabela 8 - Separação em coluna de filtração da fração Acetato de etila.....	26
Tabela 9 - Dados de RMN de $^1\text{H}$ e $^{13}\text{C}$ de M02. ( $\text{CDCl}_3$ , $^1\text{H}$ a 400 MHz, $^{13}\text{C}$ A 100 MHz).....	39
Tabela 10: Dados de RMN de $^1\text{H}$ e $^{13}\text{C}$ de M03. ( $\text{CDCl}_3$ , $^1\text{H}$ a 400 MHz, $^{13}\text{C}$ A 100 MHz).....	46
Tabela 11 - CIM 50 e CLM frente a cepas de fungos, em $\mu\text{g/mL}$ .....	63
Tabela 12 - CIM 20 frente a cepas de fungos, em $\mu\text{g/mL}$ .....	64
Tabela 13 - CIM 50 e CLM frente a cepas de bactérias, em $\mu\text{g/mL}$ .....	66
Tabela 14 - CIM 20 frente a cepas de bactérias, em $\mu\text{g/mL}$ .....	67

## LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1 – Fracionamento do extrato bruto, no funil de Extração, de <i>Maytenus ilicifolia</i> ...	13
Esquema 2 - Reação de Esterificação do $\beta$ -sitosterol com anidrido acético.....	51
Esquema 3 - Reação de Esterificação do $\beta$ -sitosterol com anidrido Succinico.....	54
Esquema 4 - Reação de Esterificação do $\beta$ -sitosterol com anidrido ftálico.....	56
Esquema 5 - Reação de redução da carbonila com $\text{NaBH}_4$ .....	58
Esquema 6 – Reação de Esterificação do $\beta$ -sitosterol.....	58

## LISTA DE SIGLAS, ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

$\delta$	Deslocamento Químicos
Ac <sub>2</sub> O	Anidrido Acético
ATCC	American Type Culture Collection (Coleção de tipos de cultura da América)
CC	Cromatografia em Coluna
CCD	Cromatografia em Camada Delgada
CCDP	Cromatografia em Camada Delgada Preparativa
°C	Graus Celsius
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CLM	Concentração Letal Mínima
d	duplete
dd	duplo duplete
DEPT	Distorsionless Enhancement by Polarization Transfer
DMAP	4-dimetilaminopiridina
E.B.M	Extrato Bruto Metanólico
Et <sub>3</sub> N	Trietilamina
FDA	Food and Drug Administration
F.H	Fração Hexânica
F.D	Fração Diclometano
F.A	Fração Acetato de Etila
F.M	Fração Metanólica
F.B	Fração Butanólica
h	hora
HSQC	Heteronuclear Single-Quantum Correlation
HMBC	Heteronuclear Multiple-Bond Correlation

Hz	Hertz
IC <sub>50</sub>	Concentração Inibitória de 50%
IC <sub>20</sub>	Concentração Inibitória de 20%
<i>J</i>	Constante de acoplamento
m	multipleto
μg	Micrograma
mg	Miligramas
NCCLS	National Committee for Clinical Laboratory Standards
NT	Não Testada
NPPN	Núcleo de Pesquisa de Produtos Naturais
OAc	Acetoxi
OBz	Carboxibenzeno
P.F	Ponto de Fusão
ppm	Partes por milhão
pág	Página
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
s	Simpleto
SNC	Sistema Nervoso Central
t	Tripleto
THF	Tetrahidrofurano
TMS	Tetrametilsilano
TSA	Trypticase Soy Agar (Agar Triptico de Soja)
UFSM	Universidade Federal de Santa Maria

## Sumário

<b>1. INTRODUÇÃO</b>	<b>1</b>
<b>2. OBJETIVOS</b>	<b>3</b>
2.1. OBJETIVO GERAL	3
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	3
<b>3. REVISÃO LITERATURA</b>	<b>4</b>
3.1. FAMÍLIA CELASTREACEAE	4
3.2. O GÊNERO MAYTENUS	4
3.3. A ESPÉCIE <i>Maytenus ilicifolia</i>	5
3.4. ESTUDO FITOQUÍMICO	6
3.5. ATIVIDADES BIOLÓGICAS	8
<b>4. MATERIAIS E MÉTODOS</b>	<b>10</b>
4.1. INSTRUMENTAÇÃO	10
<b>4.1.1 Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN)</b>	10
<b>4.1.2 Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)</b>	10
<b>4.1.3 Cromatografia gasosa (CG)</b>	10
<b>4.1.4 Espectrofotômetro</b>	10
<b>4.1.5 Aparelho de ponto de fusão</b>	11
<b>4.1.6 Espectrômetro de Difração de Raio X</b>	11
4.2. MATERIAIS E MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS	11
<b>4.2.1 Solventes Utilizados</b>	11
<b>4.2.2 Cromatografias</b>	11
4.3. COLETA E IDENTIFICAÇÃO DO MATERIAL VEGETAL	12
4.4. PREPARAÇÃO DO MATERIAL VEGETAL	12
4.5. DADOS DOS COMPOSTOS ISOLADOS	14
<b>4.5.1 Fração Hexânica</b>	14
<b>4.5.2 Fração Diclorometano</b>	14
<b>4.5.3 Fração Acetato de Etila</b>	16
4.6. REAÇÕES DE DERIVATIZAÇÕES	16
<b>4.6.1 Acetato de <math>\beta</math>-Sitosterol</b>	16
<b>4.6.2 Succinato de <math>\beta</math>-Sitosterol</b>	16
<b>4.6.3 Ftalato de <math>\beta</math>-Sitosterol</b>	17

<b>4.6.4 (R/S) 4-hidroxi-4-<i>p</i>-tolilbutanoato de <math>\beta</math>-sitosterol</b>	<b>17</b>
4.7. DADOS DOS COMPOSTOS DAS REAÇÕES DE DERIVATIZAÇÃO	18
<b>4.7.1 Acetato de <math>\beta</math>-sitosterol</b>	<b>18</b>
<b>4.7.2 Succinato de <math>\beta</math>-sitosterol</b>	<b>18</b>
<b>4.7.3 Ftalato de <math>\beta</math>-sitosterol</b>	<b>19</b>
<b>4.7.4 (R/S) 4-hidroxi-4-<i>p</i>-tolilbutanoato de <math>\beta</math>-sitosterol</b>	<b>19</b>
4.8. ATIVIDADE ANTIMICROBIANA <i>in vitro</i>	20
<b>4.8.1 Método para a determinação da CIM</b>	<b>21</b>
<b>4.8.2 Método da Concentração Letal Mínima (CLM)</b>	<b>21</b>
<b>5. APRESENTAÇÃO E DISCUSSÃO DOS RESULTADOS</b>	<b>22</b>
5.1. RENDIMENTOS DOS EXTRATOS E FRAÇÕES	22
5.2. METABOLITOS ISOLADOS DA FRAÇÃO DICLOMETANO	23
5.3. METABOLITOS ISOLADOS DA FRAÇÃO ACETATO DE ETILA	26
5.4. ESTUDO FITOQUIMICO DO METABOLITO ISOLADO DA FRAÇÃO HEXÂNICA	27
<b>5.4.1 <math>\beta</math>-sitosterol (M01)</b>	<b>27</b>
5.5. ESTUDO DOS METABOLITOS ISOLADOS NA FRAÇÃO DICLOROMETANO	30
<b>5.5.1 Cangorinina E-1 (M02)</b>	<b>30</b>
<b>5.5.2 Aquafoliunina E-1 (M03)</b>	<b>40</b>
5.6. METABOLITO ISOLADO FRAÇÃO ACETATO DE ETILA	48
<b>5.6.1 <math>\beta</math>-sitosterol Glicosilado (M04)</b>	<b>48</b>
5.7. REAÇÕES DE DERIVATIZAÇÃO	50
<b>5.7.1 Acetato <math>\beta</math>-sitosterol</b>	<b>50</b>
<b>5.7.2 Succinato de <math>\beta</math>-sitosterol</b>	<b>53</b>
<b>5.7.3 Ftalato de <math>\beta</math>-sitosterol</b>	<b>56</b>
<b>5.7.4 (R/S) 4-hidroxi-4-<i>p</i>-tolilbutanoato de <math>\beta</math>-sitosterol</b>	<b>58</b>
5.8. ATIVIDADE ANTIMICROBIANA	60
<b>6. CONSIDERAÇÕES FINAIS</b>	<b>69</b>
<b>7. REFERÊNCIAS</b>	<b>70</b>
ANEXO I	81

## 1. INTRODUÇÃO

A utilização dos produtos naturais para os mais variados fins tais como fitoterápicos, fonte de alimentos, utilidades domésticas, entre outras, é comum a milhares de anos, tanto que não há registros do seu início. Além disso, acredita-se que o alívio e cura de suas doenças foi o primeiro propósito para o uso de produtos naturais na medicina (VIEGAS, 2006).

Assim, o Brasil surge como um país promissor no avanço e na descoberta de novos fármacos de origem vegetal, isso se deve ao fato de possuir a maior biodiversidade do planeta, segundo dados do Ministério do meio Ambiente (MMA, 2016). Essa imensa biodiversidade, ainda pouco estudada, desperta interesse mundial para estudo e a descoberta de novos fitoterápicos e fitomedicamentos (BARREIRO, 2009).

A etnofarmacologia, ou seja, o conhecimento popular das plantas nos fornece dados importantes para novos estudos com plantas medicinais, pois estimula a investigação dos constituintes químicos biologicamente ativos distribuídos por suas raízes, caule, cascas e folhas, esse fator contribui para a medicina moderna na busca de novos tratamentos de doenças infecciosas, causadas tanto por vírus quanto por micro-organismos patogênicos ao homem.

Dentro do vasto leque de plantas medicinais encontra-se a espécie *Maytenus ilicifolia*, popularmente conhecida como Espinheira-santa, a qual pertence à família Celastraceae, seu uso popular já desencadeou várias pesquisas para comprovação de seus benefícios, por isso já está comprovada cientificamente, sua eficácia no combate a problemas gastrintestinais como a gastrite, úlcera e gases. Geralmente utilizada na forma de infusão ou cápsulas.

O fitosterol bastante conhecido nos produtos naturais é  $\beta$ -sitosterol, esse é amplamente utilizado, existente em vários tipos de óleos vegetais, frutas e outras sementes de plantas, tem atividades farmacológicas abrangentes, como a redução do colesterol sérico, anti-inflamatório, antipirético, antioxidante, anti-tumoral e anti-câncer, e também tem o uso extensivo em alimentos, produtos de saúde e cosméticos. Nos últimos anos, uma grande quantidade de trabalho sobre a modificação da estrutura e atividades biológicas de  $\beta$ -sitosterol tem sido feito de forma intensiva. Uma série de derivados do  $\beta$ -sitosterol já foram sintetizados, atualmente as pesquisas analisam e comprovam o progresso nas modificações estruturais de  $\beta$ -sitosterol frente a diversas cepas de micro-organismos oportunista.

Neste contexto, o Núcleo de Pesquisa de Produtos Naturais (NPPN) da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM) estuda a composição química e as atividades biológicas dos

metabólitos secundários, de espécies de plantas nativas do Rio Grande do Sul - Brasil, utilizadas na medicina popular. Além da busca de compostos com atividade significativa, também é realizado pesquisas na área da semi-síntese, no qual se avalia a relação estrutura/atividade dos compostos modificados estruturalmente. Dentre as famílias estudadas pelo grupo encontra-se a Celastraceae, que já é estudada há anos e possui vasto leque de compostos biologicamente ativo, ainda desperta o interesse de pesquisadores para novas drogas e novos modos de ação para torna-los mais eficientes. (SILVA, 2014).

## 2. OBJETIVOS

### 2.1. Objetivo geral

Este trabalho consiste em realizar o estudo químico e biológico das cascas da raiz da espécie *Maytenus ilicifolia*, pertencente a família Celasteraceae, nativa do Rio Grande do Sul – Brasil.

### 2.2. Objetivos específicos

Com a investigação fitoquímica da espécie *Maytenus ilicifolia* pretende-se:

- Realizar a extração dos metabolitos presente nas cascas da raiz da espécie *Maytenus ilicifolia*.
- Fracionamento neutro do extrato metanólico;
- Isolar e identificar os metabólitos secundários presentes na casca da raiz, fazendo uso de diferentes técnicas espectroscópicas uni e bidimensionais.
- Efetuar mudanças de grupamento funcional no metabólito  $\beta$ -sitosterol através de reações químicas, para análise e comparação dos resultados com teste antimicrobiano,
- Realizar ensaios biológicos para a determinação das atividades antimicrobiana do extrato bruto, das frações, das substâncias isoladas e dos derivados.

### 3. REVISÃO LITERATURA

#### 3.1. Família Celastraceae

A família Celastraceae, também conhecida como grupo vinha ou família agridoce, reúne aproximadamente 1.264 espécies em 98 gêneros. Esses têm grande ocorrência em climas tropicais e subtropicais, embora existam alguns representantes em climas temperados. (Silva, 2014).

De modo geral, as espécies da família Celastraceae se caracterizam por ter porte de árvores ou arbustos, raramente trepadeiras. Possuem folhas simples, opostas e dentadas, suas flores são pequenas (tetrâmeras ou pentâmeras), não vistosas, verdes claras ou brancas; frutos encapsulados e, sementes com arilo branco ou laranja. (Oliveira, 2012)

As primeiras pesquisas químicas sobre Celastraceae tiveram início no fim do século passado, com o isolamento de um glicosídeo cardiotônico da raiz de *Evonymus atropurpurea*, e posteriormente, em 1912, verificou-se a presença de dulcitol nessas plantas (Furlan, 1985).

No Brasil a família Celastraceae é representada por três principais gêneros: *Maytenus* Juss., *Austroplenckia* Lund. e *Franhoferia* Mart. Essa família tem grande destaque nas pesquisas devido a diversidade de metabólitos secundários e diferentes potenciais farmacológico (Carvalho, 1992).

#### 3.2. O gênero Maytenus

O gênero *Maytenus* é um dos maiores da família Celastraceae, possuindo, aproximadamente 225 espécies tropicais, das quais 77 são nativas do Brasil. (Silva, 2014). As espécies *Maytenus ilicifolia* (nativa do Brasil e conhecida como espinheira-santa) e *Maytenus aquifolium* (nativa do Brasil, também conhecida como espinheira-santa) são amplamente utilizadas na medicina popular brasileira. São ingeridas, na forma de infusão aquosa, para o tratamento de úlcera e outras afecções gastrointestinais. Em várias regiões do Brasil são encontrados locais onde esta planta é comercializada na forma verde, seca, em pó ou em cápsulas (Spivey, 2002).

Niero e colaboradores (2011) descreveram o uso dos constituintes isolados e as propriedades farmacológicas de várias espécies do gênero *Maytenus*, principalmente das encontradas no Brasil. Estas espécies surgem como fontes promissoras de substâncias de

interesse medicinal. Entre os diversos metabólitos secundários encontrados nas espécies do gênero *Maytenus*, destacam-se os triterpenos pentacíclicos.

Dentre outros metabólitos bioativos que já foram isolados de espécies do gênero *Maytenus*, destacam-se: maitensinoides com atividade inseticida, (Madrigal, 1985) poliésteres sesquiterpênicos com atividade antitumoral (Shirota, 1994<sup>a</sup>) dímeros triterpênicos com atividade antimicrobiana (González, 1996), triterpenos lupânicos com potente atividade anti-inflamatória (Reyes, 2006), sesquiterpenos com esqueleto básico de di-hidro- $\beta$ -agrofurano com atividade inibitória à resistência do parasita *Leishmania* à algumas drogas (Delgado, 2008).

### 3.3. A espécie *Maytenus ilicifolia*

A espécie *Maytenus ilicifolia* Mart. ex Reissek é conhecida popularmente como "espinheira-santa", "cancerosa", "cancorosa-de-sete-espinhos" e "maiteno", dentre outros nomes em alusão às suas folhas que possuem bordas espinhosas e propriedades medicinais, conforme figura 1. (Lorenzi, 2002).

Segundo Magalhães (2004), a *M. ilicifolia* é encontrada, predominantemente na região Sul do Brasil, no interior de matas nativas e em matas ciliares. Tem preferência por solos argilosos, porém bem drenados e com alto teor de matéria orgânica. Apresenta predileção por climas temperado e subtropical. A Espinheira Santa é uma espécie perene, de porte arbóreo-arbustivo, raramente ultrapassa 3 m. Um forte marcador taxonômico que difere a *M. ilicifolia* de outras espécies, principalmente de *M. aquifolia*, é a característica dos ramos apresentarem estrias longitudinais.

Figura 1: Imagem das folhas e casca da raiz de *Maytenus ilicifolia*

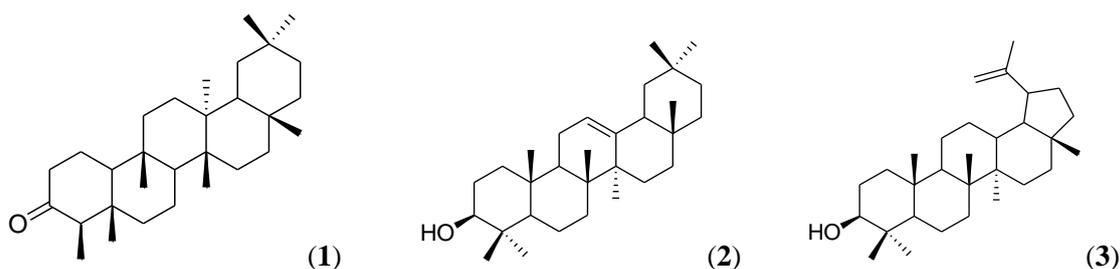


Fonte: Safari Garden, Paisagismo.

### 3.4. Estudo Fitoquímico

A via metabólica priorizada pelos membros da família Celastraceae, é a via dos terpenos. A composição química caracteriza-se, principalmente, pela presença de esteroides e de triterpenos pentacíclicos, tais como, friedelina,  $\beta$ -friedelinol,  $\alpha$ -amirina,  $\beta$ -amirina e lupeol (figura 2) (Valladão, 2005).

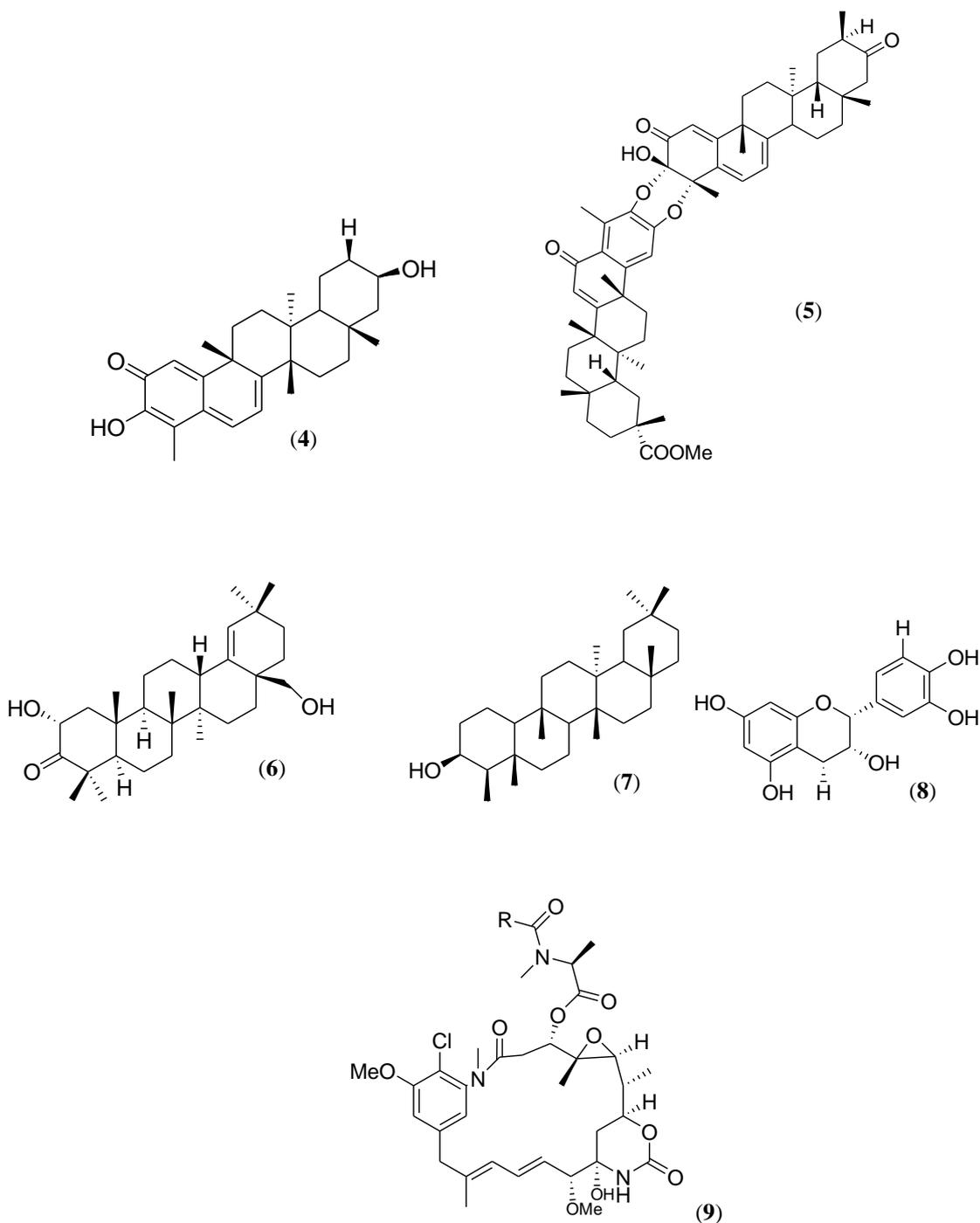
Figura 2: Alguns dos principais metabólitos isolados da família Celastraceae.



(1)- Friedelina, (2)-  $\beta$ -amirina e (3) Lupeol.

Na espécie *Maytenus ilicifolia*, pode-se citar vários grupos, dentre eles os terpenos (maitenina (4) (Regasini, 2010), tringenona, isotenginona II, congorosinas A e B (5) (Shirota, 1997), ácido maitenólico), os triterpenos (maitefolina A, maitefolina B (6) (Ohsaki, 2004), friedelanol (7) (Sousa, 2012) e friedelina), óleos essenciais (friedenelol), taninos, principalmente os gálicos (epicatequina (8) (Souza, 2008), epigalocatequina e galato de epigalocatequina), glicolípídeos (monogalactosildiácilglicerol, digalactosildiácilglicerol, trigalactosildiácilglicerol, tetragalactosildiácilglicerol e sulfoquinovosildiácilglicerol) e, por último, os alcaloides (maiteina, maitanprina e maitensina (9) (Itokawa, 2008), (Carlini, 1988; Mendes, 2006).

Figura 3: Compostos já isolados da espécie *Maytenus ilicifolia*.



Estudos comprovam que diferentes climas e práticas de cultivos podem resultar em alterações fitoquímicas severas na planta, como as relatadas por Radomski & Wisniewski (1998), que detectaram o aparecimento de grandes quantidades de taninos nas folhas da *M. ilicifolia* cultivada a pleno sol. Portanto, técnicas de plantio padronizadas e seguras são recomendadas, principalmente quando se trata de espécies com uso terapêutico, já que

alterações em seu ciclo de plantio podem resultar em alterações nas concentrações, ou até desaparecimento de constituintes, incluindo os que possuem ação terapêutica.

### 3.5. Atividades biológicas

O uso medicinal de *M. ilicifolia* é datado em torno da década de 20 quando se tem o primeiro registro escrito de sua utilização, fato que impulsionou a investigação por suas propriedades farmacológicas. (CUNHA, 2003).

Segundo o uso popular acredita-se que a *M. ilicifolia* é uma erva que possa combater várias doenças, dentre as quais pode se destacar gastrites, úlceras e dispepsias. Também possui ações tônicas, analgésicas, anti-sépticas, cicatrizantes, diuréticas e laxativas (CIPRIANI, 2004).

Os primeiros estudos de eficácia terapêutica da *M. ilicifolia* foram realizados por Aluizio França, professor da Faculdade de Medicina do Paraná, em 1922 que usou a *M. ilicifolia* em pacientes portadores de úlcera gástrica e relatou o sucesso do tratamento. (CARLINI, 1988), Atualmente há estudos que afirmam que a *M. ilicifolia* apresenta, também, atividades antineoplásica e antimicrobiana (QUEIROGA, 2000).

Cipriani et al. (2004) relatam, ainda a descoberta e caracterização de arabinogalactanas, polímeros essenciais encontrados nas paredes celulares de plantas superiores, que possuem atividade imunológica. Esse fato pode ajudar a explicar a melhora dos quadros de câncer mediante sua aplicação, já que a maioria, senão a totalidade das drogas antineoplásicas, apresenta grande efeito imunossupressor, principalmente quando associadas a procedimentos cirúrgicos e anti-inflamatórios esteroidais, como betametasona e dexametasona, prática comum nos protocolos antineoplásicos. No caso do tratamento de úlceras e gastrites, pode ser preparada tanto na forma de emplastos de suas folhas, cozimento, por infusão ou como na forma de chás e extratos (LORENZI, 2002).

### 3.6. $\beta$ -Sitosterol

O termo "fitoquímicos" (produtos químicos à base de plantas), são de ocorrência natural nos constituintes das plantas, estes compostos não são sintetizados em mamíferos, começou a ter destaque no meio científico em 1994 e rapidamente se tornou uma tendência e conseguiu despertar o interesse de pesquisadores e cientistas. Os fitoesteróis são um subgrupo dos esteróides, já são considerados uma importante classe de moléculas bioorgânicas (SAEIDNIA, 2014).

Os fitoesteróis são comuns em plantas e animais, bem como fungos, e tem estrutura semelhante ao do colesterol. Fitoesteróis desempenham papéis essenciais na fisiologia eucariótica dos organismos. Por exemplo, o colesterol é a parte principal da membrana celular em animais, afeta a fluidez da membrana celular e serve como mensageiro secundário em desenvolvimento sinalização (PRIETO, 2006). O benefício mais importante destes metabolitos naturais é a sua inscrição entre os componentes de promoção da saúde de alimentos naturais que as contém. O Autoridade Européia de Segurança Alimentar (AESAs) recomenda consumir cerca de 1,5 - 2,4 g / dia de fitoesteróis e / ou estanois em fim de reduce colesterol no sangue (SAEIDNIA, 2014).

Os fitoesteróis mais comum e conhecidos são  $\beta$ -sitosterol, campesterol e estigmasterol. Estes compostos têm uma longa história de consumo como alimento ou produtos farmacêuticos, e geralmente reconhecido como seguro, sem efeitos colaterais indesejáveis (PRIETO, 2006).

Estudos comprovam a eficiência do composto  $\beta$ -sitosterol em diversas áreas da farmacologia como: atividade anti-inflamatória (LOIZOU, 2010), hipocolesterolêmica (SUGANO, 2011), angiogênica (MOON, 1999), analgésica, anti-helmíntica, antimutagênica (VILLASENOR, 2002), imunomoduladora (BOUIC, 1996), antioxidante (BASKAR, 2012), antidiabética (GUPTA, 2011), antitumoral (inibição da proliferação celular e indução da apoptose) frente às linhagens do cancro da mama (MCF-7, MDA-MB-231) (CHAI, 2008), leucemia (U937) (PARK, 2007), próstata (LNCaP) e carcinoma do cólon (HT-29) (HOLTZ, 1998). Também demonstrou efeito sobre a hiperplasia prostática benigna e o mais interessante deste composto é que não apresenta nenhum potencial genotóxico nem citotóxico conforme estudo realizado por Paniagua em 2005, fato que incentiva a continuidade nas pesquisas sobre suas propriedades farmacológicas.

## 4. MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1. Instrumentação

#### 4.1.1 Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

Os espectros de ressonância magnética de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  uni e bidimensionais (COSY, HSQC, HMBC) foram realizados em espectrômetro Bruker avance, operando a 400,13 MHz para  $^1\text{H}$  e 100,62 MHz para  $^{13}\text{C}$ , do Departamento de Química, da Universidade Federal de Santa Maria.

Para preparação das amostras, utilizou-se 3,0 – 15 mg de amostra em 0,5 mL de solvente deuterado em tubos de 5 mm. O solvente utilizado para análise das amostras foram clorofórmio deuterado ( $\text{CDCl}_3$ ), metanol deuterado ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ) e piridina deuterada ( $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ ). Para calibração dos espectros de hidrogênio utilizou-se como referência interna o TMS ( $\delta$  0,00), e para os espectros de carbono  $\text{CDCl}_3$  ( $\delta$  77,00),  $\text{CD}_3\text{OD}$  ( $\delta$  49,05) e  $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$  ( $\delta$  135,30).

#### 4.1.2 Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

As análises em cromatografia líquida de alta eficiência foram realizadas empregando-se um cromatógrafo Agilent Technologies Modelo 1200, com detector DAD e coluna de fase reversa ZORBAX Eclipse Plus C18 (4,6 mm x 150 mm, 5 $\mu\text{m}$ ).

#### 4.1.3 Cromatografia gasosa (CG)

As análises de cromatografia gasosa foram realizadas em cromatógrafo Varian CP 3800, equipado com coluna DB5; a temperatura de operação do injetor foi de 220 °C, do detector de 300 °C e a da coluna foi de 50-280 °C com aumento de 4 °C/min; o gás de arraste utilizado foi hidrogênio ( $\text{H}_2$ ) e na chama, ar sintético.

#### 4.1.4 Espectrofotômetro

Para as leituras de microplacas utilizadas para avaliação dos resultados das atividades antimicrobianas, utilizou-se espectrofotômetro SpectraMax M2 e SoftMax Pro 5.4.1 (Molecular Devices Inc., USA), operando em 620 nm e 25 °C.

#### 4.1.5 Aparelho de ponto de fusão

Os pontos de fusão (PF) das substâncias foram determinados em aparelhos MQAPF-302 da Microquímica Equipamentos, disponível no departamento de Química da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM).

#### 4.1.6 Espectrômetro de Difração de Raio X

As medidas cristalográficas foram obtidas no aparelho Bruker X8 Kappa-Apex II CCD empregando radiações de Mo e Cu de propriedade do Departamento de Química da Universidade Federal de Santa Maria.

### **4.2. Materiais e métodos cromatográficos**

#### 4.2.1 Solventes Utilizados

Os solventes hexano, diclometano e clorofórmio, utilizados neste trabalho, possuem procedência Synth® e Vetec®, considerados P.A (Padrão analítico), sem necessidade de purificação, já para acetona, acetato de etila e metanol, foi necessária utilização de técnicas de destilação para sua purificação. Os solventes deuterados utilizados foram clorofórmio e piridina da marca Cambridge Isotope Laboratories, Inc. Nas reações de modificação estrutural, foram utilizados: anidrido acético, anidrido succinico, anidrido ftálico, trietilamina, Iodeto de metila. A polaridade das misturas dos solventes utilizados no trabalho são indicados no decorrer do texto.

#### 4.2.2 Cromatografias

As separações cromatográficas em coluna (CC) foram realizadas com diferentes diâmetros interno, utilizando sílica gel tipo 60 como fase estacionária, numa relação 1 g de amostra: 50 g de sílica. Para purificação dos compostos utilizou-se a cromatografia em camada delgada preparativa (CCDP), o qual é feita em placas de vidro (20 cm X 20 cm) recobertas com o adsorvente gel de sílica 60 GF<sub>254</sub>. A cromatografia em camada delgada (CCD) foi efetuada em cromatofolhas de alumínio, como suporte e sílica gel 60 F<sub>254</sub> como adsorvente. As cromatoplasmas foram reveladas através de lâmpada ultravioleta ( $\lambda = 254$  e 365 nm, Spectroline), reagente de Dragendorff para a revelação dos alcaloides e para demais metabólitos uma solução de álcool etílico e ácido sulfúrico (95:5 v/v) seguido de aquecimento.

### 4.3. Coleta e identificação do material vegetal

As cascas da raiz da espécie *Maytenus ilicifolia* M. ex Ressek, foram coletadas no município de Santana do Livramento (Latitude 30° 53' 27" sul e longitude 55° 31' 58" oeste) RS, Brasil, no mês de Novembro de 2014. A identificação do material botânico foi realizada pelo professor Dr. Renato Zacchia e uma exsicata foi depositada no Herbário do Departamento de Botânica da Universidade Federal de Santa Maria – UFSM, sob número de registro SMDB 15.012.

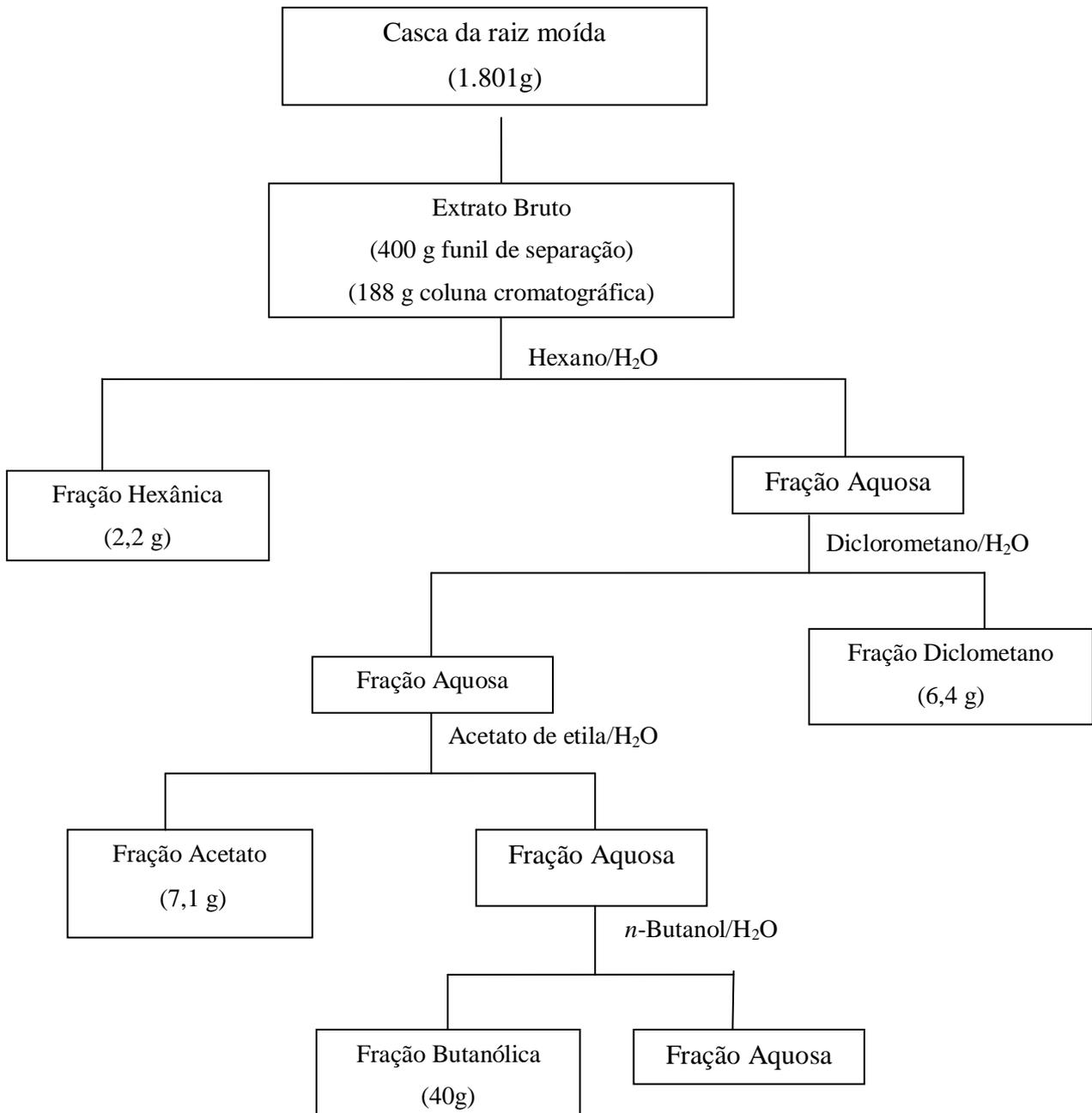
### 4.4. Preparação do material vegetal

O material vegetal coletado foi seco em estufa com ar circulante a uma temperatura de 50 °C e moído em moinho de facas, obtendo-se um total 1,8 kg do material vegetal seco, coletados em Santana do Livramento.

Realizou-se a extração deste material com metanol, através de um extrator soxhlet acoplado a um condensador e a um balão de 5 L, onde foram adicionados cerca de 3 L de metanol. Com o aquecimento o metanol é evaporado, ao entrar em contato com o condensador é resfriado passando pelo material vegetal depositado no soxhlet, em seguida retorna ao balão com os metabólitos extraídos. Após a exaustão da extração o solvente é evaporado a pressão reduzida, resultando num resíduo escuro e viscoso, denominado Extrato Bruto Metanólico (EBM).

O extrato bruto, 588 g, foi dividido em dois fracionamentos, o primeiro fracionamento (400 g) foi realizado em um funil de separação, o qual o material é solubilizado em água, líquido-líquido, com gradiente de polaridade dos solventes, *n*-hexano (F.H.), diclorometano (F.D.), acetato de etila (F.A.) e *n*-butanol (F.B.), obtendo assim as quatro frações, conforme esquema 1. Com o restante do EBM, (188 g), foi confeccionada uma pastilha com sílica gel e submetido a uma coluna cromatográfica (CC), o qual a fase móvel utilizada, até a exaustão, foi em gradiente de polaridade, iniciando com *n*-hexano, 0,2 g (F.H.), diclorometano, 4,6 g (F.D.), acetato de etila, 30,4 g (F.A.) e metanol, 130,0 g (F.M.), também resultando em 4 frações obtidas.

Esquema 1: Fracionamento do extrato bruto no funil de extração, de *Maytenus ilicifolia*, coletada em Santana do Livramento.

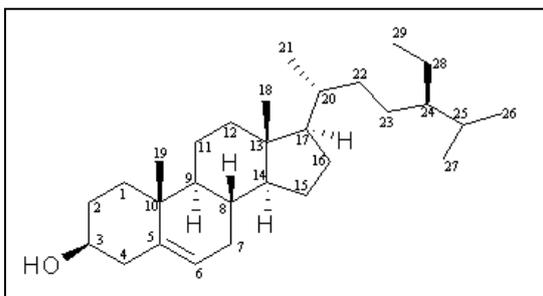


Foi realizado este fracionamento duplo apenas com intuito de acelerar o processo de obtenção das frações, porém também foi realizado o perfil cromatográfico por CLAE das frações obtidas, para verificação de pureza das frações.

## 4.5. Dados dos compostos isolados

### 4.5.1 Fração Hexânica

**$\beta$ -sitosterol (M01):** 250mg, sólido branco, PF. 125-128°C. (Lit: 137-138 °C). (YI, 2014).

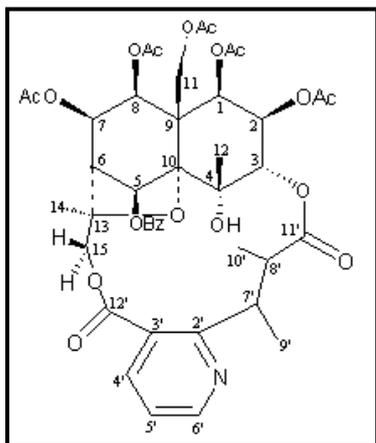


RMN  $^1\text{H}$  a 400,13 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$  (ppm): 0,67 (3H, s, H-18), 0,81 (3H, d,  $J=6,8$ , H-26), 0,84 (3H, d,  $J=6,8$ , H-27), 0,86 (3H, s, H-29), 0,92 (3H, d,  $J=6,4$ , H-21), 0,95 (H, m, H-24) 0,96 (H, m, H-9) 1,0 – 2,2 (m, demais hidrogênios), 3,52 (1H, m, H-3), 5,34 (1H, d, H-6). RMN de  $^{13}\text{C}$  a

100,62 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$  (ppm): 11,8 (C-18), 11,9 (C-29), 18,8 (C-21), 19,0 (C-27), 19,03 (C-19), 19,7 (C-26), 21,1 (C-11), 23,1 (C-28) 24,3 (C-15), 26,2 (C-23), 28,2 (C-16), 29,2 (C-25), 31,7 (C-2), 31,9 (C-7 e C-8), 34,0 (C-22), 36,1 (C-20), 36,5 (C-10), 37,3 (C-1), 39,8 (C-12), 42,3 (C-4 e C-13), 45,9 (C-24), 50,2 (C-9), 56,1 (C-17), 56,8 (C-14), 71,8 (C-3), 121,7 (C-6), 140,8 (C-5).  $\text{C}_{29}\text{H}_{50}\text{O}$ . m/z: 414.

### 4.5.2 Fração Diclorometano

**Cangorinina E-1 (M02):** 7 mg, sólido amorfo branco, PF. 104-107°C (Lit 105-107 °C), (SHIROTA, 1994a).

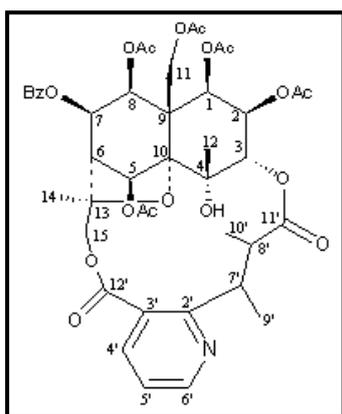


RMN  $^1\text{H}$  a 400,13 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$  (ppm): 1,22 (3H, d,  $J=7.2$ , H-10'), 1,40 (3H, d,  $J=7.2$ , H-9'), 1,40 (3H, s, H1-OAc), 1,58 (3H, s, H-12), 1,72 (3H, s, H-14), 2,12 (3H, s, H2-OAc), 2,16 (3H, s, H8-OAc), 2,21 (3H, s, H7-OAc), 2,34 (3H, s, H11-OAc), 2,38 (1H, d,  $J=4,0$ , H-6), 2,64 (1H, q,  $J=6,8$ , H-8'), 3,76 (1H, d,  $J=11,6$ , H-15a), 4,43 (OH), 4,66 (2H, d,  $J=13,6$  H-11a e q, H-7'), 4,80 (1H, d,  $J=2,4$ , H-3), 5,34 (1H, d,  $J=13,6$ , H-11b), 5,35 (1H, dd,  $J=2,8$  e 4,4, H-2), 5,41 (1H,

d,  $J=6,0$ , H-8), 5,52 (1H, dd,  $J=4,0$  e 5,8, H-7), 5,88 (1H, d,  $J=4,0$ , H-1), 5,97 (1H, d,  $J=11,6$ , H-15b), 7,04 (1H, s, H-5), 7,27 (1H, dd,  $J=4,8$  e 8,0, H-5'), 7,39 (2H, d,  $J=7,2$ , OBz (m)), 7,53 (1H, d,  $J=7,2$ , OBz (p)) 7,81 (2H, dd,  $J=8,4$ , OBz (o)), 8,08 (1H, dd,  $J=1,6$  e 7,6, H-4'), 8,70 (1H, dd,  $J=2,0$  e 4,8, H-6'); RMN de  $^{13}\text{C}$  a 100,62 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$  (ppm): 9,7 (C-10'), 11,9 (C-9'), 18,3 (C-14), 20,8 (C1- $\text{CH}_3$ ), 20,8 (C8- $\text{CH}_3$ ), 20,9 (C2- $\text{CH}_3$ ), 21,3 (C7- $\text{CH}_3$ ), 21,5 (C11- $\text{CH}_3$ ), 22,8 (C-12), 36,3 (C-7'), 44,9 (C-8'), 50,4 (C-6), 52,5 (C-9), 60,0 (C-

11), 68,8 (C-2), 69,1 (C-7), 69,9 (C-15), 70,5 (C-4), 71,3 (C-8), 73,4 (C-1), 73,8 (C-5), 75,6 (C-3), 84,3 (C-13), 94,0 (C-10), 121,0 (C-5'), 125,0 (C-3'), 128,4 (C-Obz(*m*)), 129,1 (C-Obz(*o*)), 129,4 C-Obz(*i*)), 133,4 (C-Obz(*p*)), 137,7 (C-4'), 151,4 (C-6'), 164,5 (5-OC=O), 165,3 (C-2'), 168,2 (C-12'), 168,5 (8-OC=O), 168,8 (1-OC=O), 169,8 (2-OC=O), 169,9 (7-OC=O), 170,3 (11-OC=O), 173,9 (C-11'). C<sub>43</sub>H<sub>49</sub>NO<sub>18</sub>, m/z 868.

**Aquafoliunina E-1 (M03)** 50 mg, sólido amorfo branco, PF. 100-105 °C. (Lit. 98-101 °C),

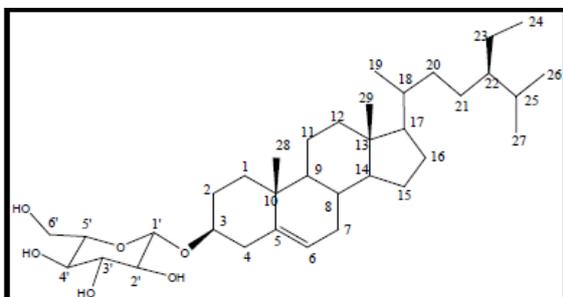


(CORSINO,1998).

RMN <sup>1</sup>H a 400,13 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ (ppm): 1,22 (3H, d, *J*=7,1, H-10'), 1,39 (3H, d, *J*=7,0, H-9'), 1,60 (3H, s, H-12), 1,82 (3H, s, H-14), 1,82 (3H, s, H1-OAc), 1,89 (3H, s, H5-OAc), 2,15 (3H, s, H2-OAc), 2,22 (3H, s, H8-OAc), 2,34 (3H, s, H11-OAc), 2,58 (1H, q, *J*=7,2, H-8'), 2,67 (1H, d, *J*=3,2, H-6), 3,64 (1H, d, *J*=11,4, H-15a), 4,48 (OH), 4,63 (2H, d, *J*=13,2 H-11a e m, H-7'), 4,74 (1H, d, *J*=2,5, H-3), 4,85 (1H, d, *J*=13,2, H-11b), 5,27 (1H, t, *J*=2,8, H-2), 5,69 (1H, dd, *J*=3,3 e 9,8, H-7), 5,66 (1H, d, *J*=3,5, H-1), 5,89 (1H, d, *J*=9,9, H-8), 5,94 (1H, d, *J*=11,4, H-15b), 6,73 (1H, s, H-5), 7,23 (1H, dd, *J*=4,8 e 7,7, H-5'), 7,43 (2H, t, OBz (*m*)), 7,56 (1H, t, OBz (*p*)) 7,93 (2H, d, *J*=7,2, OBz (*o*)), 8,02 (1H, dd, *J*=1,7 e 7,8, H-4'), 8,68 (1H, dd, *J*=1,6 e 4,7, H-6'); RMN de <sup>13</sup>C a 100,62 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ (ppm): 9,7 (C-10'), 12,0 (C-9'), 19,5 (C-14), 20,4 (C1-CH<sub>3</sub>), 20,6 (C5-CH<sub>3</sub>), 20,9 (C11-CH<sub>3</sub>), 21,1 (C2-CH<sub>3</sub>), 21,4 (C8-CH<sub>3</sub>), 23,7 (C-12), 36,5 (C-7'), 44,8 (C-8'), 49,4 (C-7), 51,4 (C-9), 60,7 (C-11), 68,6 (C-2), 69,8 (C-15), 70,6 (C-4), 72,4 (C-1), 73,8 (C-8), 74,5 (C-7), 74,7 (C-5), 75,2 (C-3), 85,6 (C-13), 94,4 (C-10), 120,9 (C-5'), 125,0 (C-3'), 128,7 (C-Obz(*m*)), 129,6 (C-Obz(*o*)), 130,6 C-Obz(*i*)), 133,6 (C-Obz(*p*)), 137,6 (C-4'), 151,4 (C-6'), 165,4 (C-2'), 165,3 (7-OC=OBz), 168,5 (2-OC=O), 168,3 (12'), 169,0 (1-OC=O), 169,6 (9-OC=O), 169,7 (5-OC=O), 169,9 (11-OC=O), 173,8 (C-11'). C<sub>43</sub>H<sub>49</sub>NO<sub>18</sub>, m/z 868.

#### 4.5.3 Fração Acetato de Etila

**$\beta$ -Sitosterol-glicosilado (M04):** 8mg; sólido branco PF. 165-168°C. (Lit. 168-169 °C) (KHATUN, 2012).



RMN de  $^1\text{H}$  a 400,13 MHz, em  $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ :  $\delta$  3,97 (1H, *m*, C-3), 5,37 (1H, *m*, C-6), 5,12 (1H, *m*, C-1'), 4,06 (C-2'), 4,25-4,30 (2H, *m*, C-3'-4'), 3,98 (1H, *m*, C-5'), 4,38-4,57 (2H, *dd*, C-6') 2,05-0,81 (*m*, demais hidrogênios). RMN de  $^{13}\text{C}$  a 100,62 MHz, em  $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ :  $\delta$  38,7 (C-1), 30,8 (C-2), 79,8 (C-3), 40,6 (C-4), 142,2 (C-5), 123,1 (C-6), 33,4 (C-7), 33,3 (C-8), 51,6 (C-9), 38,2 (C-10), 22,5 (C-11), 41,2 (C-12), 43,7 (C-13), 58,1 (C-14), 25,7 (C-15), 29,8 (C-16), 57,5 (C-17), 13,2 (C-18), 21,2 (C-19), 37,6 (C-20), 20,7 (C-21), 35,5 (C-22), 27,7 (C-23), 47,3 (C-24), 31,5 (C-25), 20,5 (C-26), 20,3 (C-27), 24,7 (C-28), 13,4 (C-29), 103,8 (C-1'), 76,5 (C-2'), 79,6 (C-3'), 73,0 (C-4'), 79,5 (C-5'), 64,1 (C-6').

### 4.6. Reações de derivatizações

#### 4.6.1 Acetato de $\beta$ -Sitosterol

Em um balão de fundo redondo provido de agitação magnética adicionou-se 20 mg (0,048 mmol) de  $\beta$ -sitosterol isolado da fração hexânica do extrato bruto, anidrido acético em excesso, 2-3 gotas de trietilamina e 20 mL de clorofórmio como solvente. A reação permaneceu sob agitação constante, 24 h em 25 °C. A reação foi monitorada por CCD após observar a formação do produto, foi evaporado o solvente em um rotaevaporador, o bruto reacional foi purificado em CC de sílica gel utilizando como solvente hexano/acetona 1 %. Obtendo composto Acetato de  $\beta$ -sitosterol (11 mg, 50%).

#### 4.6.2 Succinato de $\beta$ -Sitosterol

Em um balão de fundo redondo provido de condensador de refluxo e agitação magnética adicionou-se 30 mg (0,072 mmol) de  $\beta$ -sitosterol isolado da fração hexânica do extrato bruto, anidrido succínico, em excesso, 2-3 gotas de trietilamina e 20 mL de clorofórmio, como solvente. A reação foi monitorada por CCD e após um período de 48h sob refluxo, observou-se a formação do produto, em seguida foi evaporado o solvente em um

rotaevaporador. O bruto reacional foi purificado em CC de sílica gel utilizando como solvente hexano/acetona 25%. Obtendo composto Succinato de  $\beta$ -sitosterol (24,5 mg, 64,72%).

#### 4.6.3 Ftalato de $\beta$ -Sitosterol

Em um balão de fundo redondo provido de condensador de refluxo e agitação magnética adicionou-se 20 mg (0,048 mmol) de  $\beta$ -sitosterol isolado da fração hexânica do extrato bruto, anidrido ftálico, em excesso, 2-3 gotas de trietilamina e 20 mL de clorofórmio, como solvente. A reação foi monitorada por CCD e após um período de 72h sob refluxo, observou-se a formação do produto, em seguida foi evaporado o solvente em um rotaevaporador, o bruto reacional foi purificado em CCDP de sílica gel, visto que o produto era visível em luz UV, utilizando como solvente hexano/acetona 25%. Obteve-se o ftalato de  $\beta$ -sitosterol (9,5 mg, 35,22%).

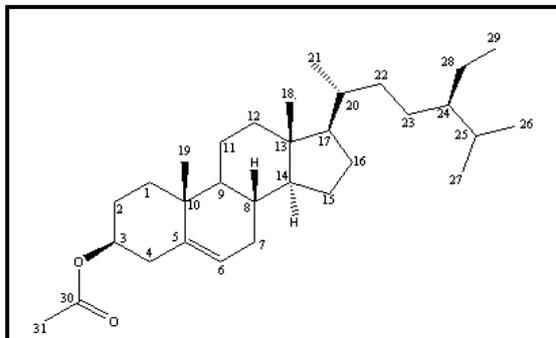
#### 4.6.4 (R/S) 4-hidroxi-4-*p*-tolilbutanoato de $\beta$ -sitosterol

Para esta reação foi utilizado um reagente disponível no laboratório, que foi sintetizado através de uma acilação de Friedel-Crafts entre tolueno e anidrido succínico, com cloreto de alumínio anidro. Para ocorrer a reação de substituição na carboxila, foi reduzida a carbonila cetônica com  $\text{NaBH}_4$  e Metanol sob agitação por 2 h. A reação de redução foi acompanhada por CCD, com a formação do produto extraiu uma vez com acetato de etila, para eliminação de algum material de partida, em seguida acidificou o meio com ácido clorídrico (HCl) 1N, para pH 5,0 e extraiu 3x com acetato de etila.

Em seguida, em um balão de fundo redondo, provido de agitação magnética, adicionou-se 40 mg (0,096 mmol) de  $\beta$ -sitosterol isolado da fração hexânica do extrato bruto, o produto da acilação de Friedel-Crafts reduzido, 20 mg dimetilaminopiridina (DMAP), 50 mg de dicitloexilcarbodiimida (DCCI) e solvente THF seco. A reação foi monitorada por CCD e após um período de 48 h, observou-se a formação do produto, em seguida foi filtrado o precipitado dicitloexiluréia (DCCU) e evaporado o solvente (THF) em um rotaevaporador, o bruto reacional foi purificado em CCDP de sílica gel, visto que o produto era visível em luz UV, utilizando como solvente hexano/acetona 50%. Obteve-se o (S/R) 4-hidroxi-4-*p*-tolilbutanoato de  $\beta$ -sitosterol (20 mg, 35,25%).

#### 4.7. Dados dos compostos das reações de derivatização

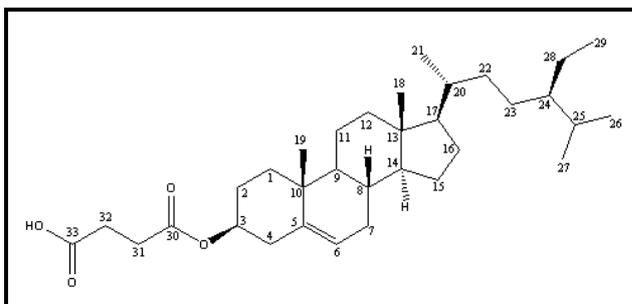
4.7.1 Acetato de  $\beta$ -sitosterol: (11 mg) composto cristalino incolor. (PF. lit. 118-119 °C) (McCARTHY, 2005).



RMN de  $^1\text{H}$  a 400,13 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$  (ppm): 0,67 (3H, S, H-18), 0,81 (3H, d,  $J=6,8$ , H-26), 0,84 (3H, d,  $J=6,8$ , H-27), 0,86 (3H, s, H-29), 0,92 (3H, d,  $J=6,4$ , H-21), 0,95 (H, m, H-24), 0,96 (H, m, H-9), 2,02 (3H, s, H-31), 1,0 – 2,2 (m, demais hidrogênios), 4,60 (1H, m, H-3), 5,36 (1H, d,  $J=4,8$ , H-6). RMN de  $^{13}\text{C}$  a 100,62

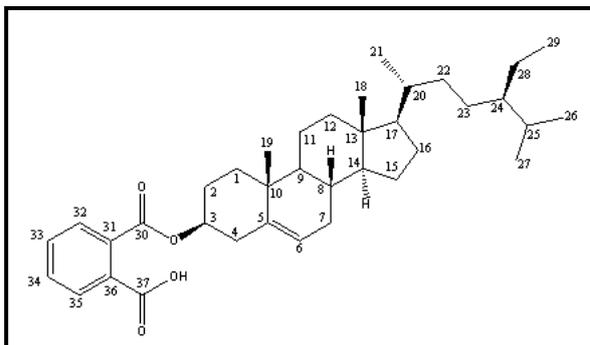
MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$  (ppm): 11,8 (C-18), 11,9 (C-29), 18,7 (C-21), 19,0 (C-27), 19,3 (C-19), 19,8 (C-26), 21,0 (C-11), 21,4 (C-31), 23,0 (C-28), 24,2 (C-15), 26,1 (C-23), 28,2 (C-16), 29,2 (C-25), 31,7 (C-2), 31,9 (C-7 e C-8), 34,0 (C-22), 36,1 (C-20), 36,6 (C-10), 37,0 (C-1), 38,1 (C-12), 39,7 (C-4), 42,3 (C-13), 45,8 (C-24), 50,0 (C-9), 56,0 (C-17), 56,7 (C-14), 74,0 (C-3), 122,6 (C-6), 139,6 (C-5), 170,5 (C-30).  $\text{C}_{30}\text{H}_{52}\text{O}_2$ . m/z: 456.

4.7.2 Succinato de  $\beta$ -sitosterol: (24,5 mg) composto cristalino branco, (PF. 150-151 °C) (KLUMPHU, 2014).



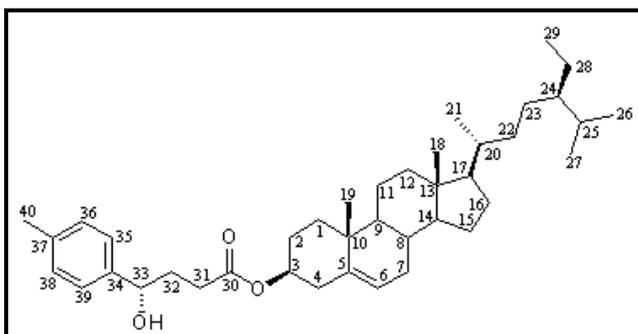
$^1\text{H}$  a 400,13 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$  (ppm): 0,78 (3H, S, H-18), 0,90 (3H, d,  $J=7,2$ , H-26), 0,93 (3H, d,  $J=7,6$ , H-27), 0,95 (3H, s, H-29), 1,00 (3H, d,  $J=6,8$ , H-21), 1,02 (H, m, H-24), 1,02 (H, m, H-9), 1,10 (3H, s, H-19), 1,11 – 2,2 (m, demais hidrogênios), 2,37

(2H, d,  $J=6,8$ , H-32), 2,62 (2H, m, H-31), 4,60 (1H, m, H-3), 5,44 (1H, d, H-6). RMN de  $^{13}\text{C}$  a 100,62 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$  (ppm): 12,3 (C-18), 12,4 (C-29), 19,3 (C-21), 19,4 (C-27), 19,7 (C-19), 20,2 (C-26), 22,1 (C-11), 24,2 (C-28 e C-15), 25,3 (C-23), 27,3 (C-16), 29,3 (C-25), 29,9 (C-31), 30,5 (C-32), 33,0 (C-2), 33,2 (C-7 e C-8), 35,1 (C-22), 37,4 (C-20), 37,8 (C-10), 38,2 (C-1), 39,1 (C-12), 41,1 (C-4), 43,5 (C-13), 47,3 (C-24), 51,6 (C-9), 57,5 (C-17), 58,1 (C-14), 75,7 (C-3), 123,6 (C-6), 141,1 (C-5), 173,7 (C-30), 176,0 (C-33).  $\text{C}_{33}\text{H}_{55}\text{O}_4$ . m/z: 515.

4.7.3 Ftalato de  $\beta$ -sitosterol: (9,5 mg) composto incolor. (BALONOVA, 1964).

RMN  $^1\text{H}$  a 400,13 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ,  $\delta$  (ppm): 0,86 (3H, S, H-18), 0,96 (3H, d,  $J=7,2$ , H-26), 1,00 (3H, d,  $J=7,2$ , H-27), 0,98 (3H, s, H-29), 1,10 (3H, d,  $J=6,4$ , H-21), 1,20 (3H, s, H-19), 1,0 – 2,2 (m, demais hidrogênios), 2,60 (1H, m, H-3), 5,56 (1H, d,  $J=4,8$ , H-6), 7,62 (2H, dd,  $J=1,6, 7,6$ , H-33-34) 7,80 (2H, dd,  $J=1,6,$

7,6, H-32, 35). RMN de  $^{13}\text{C}$  a 100,62 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ,  $\delta$  (ppm): 12,3 (C-18), 12,4 (C-29), 19,4 (C-21), 19,5 (C-27), 19,8 (C-19), 20,2 (C-26), 22,2 (C-11), 24,2 (C-28), 25,3 (C-15), 27,3 (C-23), 28,5 (C-16), 29,3 (C-25), 30,4 (C-2), 33,1 (C-7), 33,2 (C-8), 35,1 (C-22), 37,4 (C-20), 37,8 (C-10), 38,5 (C-1), 38,9 (C-12), 41,1 (C-4), 43,5 (C-13), 47,3 (C-24), 51,7 (C-9), 57,5 (C-17), 58,1 (C-14), 76,9 (C-3), 123,6 (C-6), 129,6 (C-32-36), 131,2 (C-33-35), 132,0 (C-34), 133,3 (C-31), 141,2 (C-5), 166,9 (C-37), 169,4 (C-30)  $\text{C}_{37}\text{H}_{54}\text{O}_4$ . m/z: 562.

4.7.4 (S/R) 4-hidroxi-4-*p*-tolilbutanoato de  $\beta$ -sitosterol. Composto cristalino branco.

RMN  $^1\text{H}$  a 400,13 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$  (ppm): 0,68 (3H, S, H-18), 0,82 (3H, d,  $J=6,8$ , H-26), 0,84 (3H, d,  $J=6,8$ , H-27), 1,01 (3H, s, H-29), 1,25 (3H, d,  $J=6,4$ , H-21), 1,0 – 2,2 (m, demais hidrogênios), 2,35 (3H, s, H-40), 2,63 (4H, m, H-31 e 32), 3,49 (1H, m, H-3), 4,05 (1H, dd,  $J=2,0$  e 2,8, H-33) 5,47 (1H, d, H-6), 7,20 (2H, H-35 e 39),

7,21 (2H, H-36 e 38). RMN de  $^{13}\text{C}$  a 100,62 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$  (ppm): 11,8 (C-18), 11,9 (C-29), 18,8 (C-21), 19,0 (C-27), 19,3 (C-19), 19,7 (C-26), 21,1 (C-11), 23,1 (C-28) 24,3 (C-15), 26,2 (C-23), 28,2 (C-16), 28,9 (C-40), 29,2 (C-25), 30,8 (C-1), 31,7 (C-2), 31,9 (C-7 e C-8), 34,0 (C-22), 36,1 (C-20), 36,5 (C-10), 37,3 (C-12), 39,8 (C-4 e C-13), 42,3 (C-31 e C-32), 45,9 (C-24), 50,2 (C-9), 56,1 (C-17), 56,8 (C-14), 71,8 (C-3), 81,2 (C-33), 121,6 (C-6), 125,3 (C-35 e C-39), 129,4 (C-36 e C-38), 136,4 (C-34), 138,3 (C-37), 140,8 (C-5), 140,8 (C-5), 176,7 (C-30).  $\text{C}_{40}\text{H}_{63}\text{O}_3$ . m/z: 591.

#### 4.8. Atividade antimicrobiana *in vitro*

A susceptibilidade antimicrobiana de uma substância é avaliada com base na determinação de sua concentração inibitória mínima que é a menor concentração de um composto testado capaz de inibir o crescimento de micro-organismos, sob condições de cultura adequadas e padronizadas. Este método trata-se de um ensaio quantitativo aplicado a avaliação do potencial dos extratos, frações e substâncias isoladas obtidas.

Para as análises foram utilizados cepas padrão da American Type Culture Collection (ATCC), composta de micro-organismos Gram-positivos, Gram-negativos e fungos, conforme a Tabela 1.

**Tabela 1.** Micro-organismos indicadores utilizados na atividade antimicrobiana

Micro-organismos (ATCC)		
Gram-negativos	Gram-positivos	Fungos
<i>Pseudomas aeruginosa</i> (27853)	<i>Bacilus cereus</i> (33019)	<i>Candida albicans</i> (44373)
<i>Burkholderia cepacia</i> (17759)	<i>Enterococcus</i> sp. (6589)	<i>Candida parapslosis</i> (22018)
<i>Morganella morgani</i> (25829)	<i>Staphylococcus aureus</i> (25923)	<i>Candida krusei</i> (6258)
<i>Escherichia coli</i> (25922)	<i>Enterobacter aerogenes</i> (13048)	<i>Candida tropicalis</i> (750)
<i>Shigella sonnei</i> (25931)	<i>Bacillus subtilis</i> (19659)	<i>Cryptococcus neoformans</i> (28952)
<i>Salmonella typhimurium</i> (14028)		<i>Cryptococcus gatti</i> (56990)
		<i>Sacharomyces cereviseae</i> (2601)

As substâncias utilizadas como padrões foram cloranfenicol para bactérias e fluconazol para fungos, preparados conforme as normas da Food and Drugs Administration (FDA).

Os meios de cultura utilizados foram o Caldo de caseína de soja (5 g de cloreto de sódio, 2,5 g de dextrose, 2,5 g de Fosfato dibásico, 17 g de peptona de caseína, 3 g de peptona de soja e 1 L de água destilada) para bactérias e o Caldo Sabouraud dextrosado (40 g de dextrose, 5 g de peptona de carne, 5 g de peptona de caseína e 1 L de água destilada) para os fungos.

#### 4.8.1 Método para a determinação da CIM

A determinação da CIM foi realizada pelo método de microdiluição em caldo, conforme descrito pela National Committee for Clinical Laboratories Standards (NCCLS). Este teste foi realizado em placas de cultura estéreis de 96 poços. Nesta técnica, cada poço foi inoculado com os micro-organismos na concentração de  $1 \times 10^6$  células viáveis e, posteriormente, as amostras a serem testadas foram adicionadas no primeiro poço seguindo-se a diluição em série das mesmas, de 500  $\mu\text{g/mL}$  até 1,56  $\mu\text{g/mL}$ . As placas foram incubadas por 24 horas a 35 °C para as bactérias e, por 48 horas a 25 °C para os fungos. Após a incubação, determinou-se o crescimento microbiano através da leitura da microplaca no espectrofotômetro SPECTRAMAX M2 utilizando o comprimento de onda de 620 nm.

Todos os testes foram realizados em triplicata e comparados com os padrões. Utilizou-se também um controle positivo e um negativo para cada substância testada, de forma a garantir a reprodutibilidade do ensaio.

#### 4.8.2 Método da Concentração Letal Mínima (CLM)

A concentração letal mínima (CLM) é a menor concentração da substância capaz de alcançar uma redução maior que 99% do número das unidades formadoras de colônia (UFC), segundo Hammer 1999.

Neste método, as culturas de micro-organismos que não apresentaram crescimento ou foram inibidas no método CIM, foram inoculadas novamente utilizando 10  $\mu\text{L}$  de cada uma das soluções presentes nos poços do teste anterior e 90  $\mu\text{L}$  de um novo meio de cultura líquido apropriado para cada classe de microorganismo.

## 5. APRESENTAÇÃO E DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

Este trabalho foi desenvolvido através do estudo fitoquímico da espécie *Maytenus ilicifolia* da família celastreaceae, com intuito do isolamento e identificação dos metabólitos secundários presentes.

Foi obtido o extrato bruto da planta, assim como as frações hexânica, diclorometano, acetato de etila, butanólica e metanólica. Foram isolados total de 4 compostos, um da fração hexânica, dois da fração diclorometano e um da fração Acetato de etila. Identificados como:  $\beta$ -Sitosterol, Cangorinina E-1, Aquafoliunina E-1 e  $\beta$ -Sitosterol-glicosilado.

Com o metabólito isolado  $\beta$ -sitosterol foram realizadas 4 modificações estruturais, acetato de  $\beta$ -sitosterol, Succinato de  $\beta$ -sitosterol, Ftalato de  $\beta$ -sitosterol e (S/R) 4-hidroxi-4-*p*-tolilbutanoato de  $\beta$ -sitosterol.

### 5.1. Rendimentos dos extratos e frações

Após a coleta, secagem e moagem das cascas da raiz da *Maytenus ilicifolia*, obteve-se o total de 1,8 kg. Os rendimentos de cada fração em relação à casca moída e ao extrato bruto, são apresentados na tabela 2:

Tabela 2: Rendimento das frações em relação à casca e ao extrato bruto.

Frações	Quantidade obtida (g)	Em relação à casca (%)	Em relação ao extrato bruto (%)
<b>FH coluna</b>	<b>0,2</b>	<b>0,01</b>	<b>0,03</b>
<b>FH funil</b>	<b>2,2</b>	<b>0,12</b>	<b>0,37</b>
<b>FD coluna</b>	<b>4,6</b>	<b>0,25</b>	<b>0,78</b>
<b>FD funil</b>	<b>6,4</b>	<b>0,35</b>	<b>1,08</b>
<b>FA coluna</b>	<b>31,4</b>	<b>1,74</b>	<b>5,34</b>
<b>FA funil</b>	<b>7,1</b>	<b>0,39</b>	<b>1,20</b>
<b>FM coluna</b>	<b>130,0</b>	<b>7,21</b>	<b>22,10</b>
<b>FB funil</b>	<b>40,0</b>	<b>2,22</b>	<b>6,80</b>

F.H.- Fração Hexânica, F.D.- Fração Diclorometano, F.A.- Fração Acetato, F.M.-Fração Metanólica, F.B.- Fração Butanólica.

### 5.1 Metabolitos isolados da Fração Hexânica

A fração Hexânica (2,2 g) foi cromatografada em coluna, utilizando-se sílica gel 60A (70-230 mesh) como fase estacionária, com proporção 1 g de amostra:50 g de sílica, e hexano/acetona como sistema eluente com gradiente de polaridade. Foram coletadas 80 frações de 100 mL e rotaevaporadas conforme a Tabela 3:

Tabela 3: Separação em coluna cromatográfica (CC) da fração Hexânica.

Subfrações	Frações	% Solventes	Substâncias	Peso
I	1-20	Hexano	Mistura	100 mg
II	21-35	Hexano/Acetona 10%	Mistura	55 mg
III	36-48	Hexano/Acetona 25%	M01 + mistura	60 mg
IV	49- 58	Hexano/Acetona 50%	Mistura	30 mg
V	59-80	Acetona	Mistura	100 mg

Em seguida as frações similares foram reunidas após serem comparadas por CCD. Nas frações 36-48 houve a formação de um precipitado branco, foi lavado com acetona, retirando o sobrenadante até limpeza total. Quando testado na CCD apresentou-se puro, então foi submetido a amostra de RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  a qual levou a identificação do composto como sendo o  $\beta$ -Sitosterol (M01).

O restante das frações não foi trabalhado, pois havia bastante óleo e dificuldade na purificação, então optou por trabalhar com as frações de diclorometano com intuito de isolar alcaloides devido a pouca bibliografia desses metabolitos.

### 5.2. Metabolitos isolados da Fração Diclorometano

A fração diclorometano obtida no funil de extração (4,6 g) foi cromatografada em coluna, utilizando-se sílica gel 60A (70-230 mesh) como fase estacionária, com proporção 1g de amostra:30 g de sílica, e como sistema eluente foi utilizado gradiente de polaridade dos solventes: hexano/diclorometano/acetona. Foi coletadas frações de 50 mL e rotaevaporadas, conforme tabela 4:

Tabela 4: Separação em coluna cromatográfica (CC) da fração diclorometano funil.

Subfrações	Frações	% Solventes	Substâncias	Peso
I	1 a 10	Hexano/dicloro 50%	Mistura	250 mg
II	11 a 46	Diclorometano	Mistura	1,2 g
III	47 a 75	Dicloro/acetona 10%	Mistura	350 mg
IV	76 a 98	Dicloro/acetona 25%	Mistura	178 mg
V	99 a 152	Dicloro/acetona 50%	Mistura+alcaloide	850 mg
VI	153 a 200	Acetona	Mistura	523 mg

Em seguida as frações foram agrupadas de acordo com suas similaridades, após a comparação em CCD.

Na Subfração V, pode-se perceber a ocorrência de alcaloides conforme o teste com reagente de dragendorff na CCD. Devido a pouca bibliografia com relação a esses metabólitos, decidiu-se trabalhar com esta fração, submetendo a uma nova CC, utilizando hexano/acetona num gradiente crescente de polaridade. Foram coletadas frações de 15 mL cada, em seguidas analisadas por CCD e as similares reunidas. De acordo com Tabela 5.

Tabela 5: Separação em CC da subfração V.

Frações	%solventes	Substância	Peso
1 a 20	Hexano/Acetona 5%	Mistura	100 mg
21 a 30	Hexano/Acetona 15%	Mistura	125 mg
31 a 45	Hexano/Acetona 25%	Mistura + M01	57 mg
46 a 50	Hexano/Acetona 30%	Mistura	240 mg
51 a 60	Hexano/Acetona 50%	Mistura	98 mg
61 a 80	Acetona	Mistura	180 mg

Nas frações 31 a 45 através da revelação de CCD com reativo de Dragendorff, pode-se observar um metabólito em maior quantidade, então foi realizado cromatografia de camada delgada preparativa (CCDP) para purificação de um alcaloide. O sistema de solvente utilizado para eluição da placa foi Hexano/Acetona 25%. Após confirmou-se a pureza através de CCD e CLAE para posteriormente ser submetida análise de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ . Através de comparação com dados da literatura confirmou-se ser a substância Cangorinina E-1 (SHIROTA, 1994b).

A fração diclorometano da coluna (4,6 g) também foi cromatografada em coluna, utilizando-se sílica gel como fase estacionária, com proporção 1g de amostra:30g de sílica, e como sistema eluente foi utilizado gradiente de polaridade dos solventes: hexano/acetona. Foi coletadas frações de 30 mL e rotaevaporadas. Conforme tabela 6. Em seguida foram agrupadas de acordo com suas similaridades, após a comparação em CCD.

Tabela 6: Separação em coluna cromatográfica da fração Diclorometano coluna.

Subfração	Frações	% Solventes	Substância	Peso
I	1 a 40	Hexano/acetona 1%	Misturas	1,0 g
II	41 a 72	Hexano/acetona 5%	M01+ mistura	1,5 g
III	73 a 105	Hexano/acetona 10%	Mistura	850 mg
IV	106 a 150	Hexano/acetona 25%	M03 + Mistura	3,0 g
V	151 a 200	Hexano/acetona 50%	Mistura	725 mg
VI	201 a 250	Acetona	Mistura	520 mg
VII	251 a 280	Metanol	Mistura	340 mg

Na subfração II, houve a formação de um sólido branco cristalino, o qual foi submetido a uma lavagem com o solvente hexano para a limpeza, quando testado na placa CCD, apresentou-se puro. Então foi enviado para análises de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ , confirmando ser o composto já isolado na fração hexânica  $\beta$ -sitosterol (M01).

Da subfração IV, observou-se por placa CDD e revelador dragendorff, a presença de alcaloide, então foi submetido a outra CC, com clorofórmio/acetona com gradiente de polaridade. Foi coletado frações de 20 mL, conforme tabela 7.

Tabela 7: Separação em CC da subfração IV.

Frações	% Solvente	Substância	Peso
1 a 20	Clorofórmio/acetona 1%	Mistura	200 mg
21 a 30	Clorofórmio/acetona 3%	M03 + mistura	120 mg
31 a 46	Clorofórmio/acetona 5%	Mistura	350 mg
47 a 60	Clorofórmio/acetona 10%	Mistura	150 mg
61 a 75	Clorofórmio/acetona 25%	Mistura	130 mg
76 a 125	Clorofórmio/acetona 50%	Mistura	100 mg

Nas frações 21 a 30 pode-se perceber a presença de alcaloide, para purificação deste metabólito foi realizado uma CCDP, o eluente utilizado foi hexano/acetona 25%. Após foi realizados análise de RMN de uni e bidimensionais para identificação do metabólito M03.

Através de comparação com dados da literatura confirmou-se ser a substância Aquafoliunina E-1 (CORSINO, 1998).

### 5.3. Metabólitos isolados da Fração Acetato de Etila

As frações Acetato de etila foram analisadas em CLAE e ao constatar que apresentavam perfis cromatográficos parecidos foram misturadas as frações no intuito de separar metabólitos em maior quantidade.

Como havia quantidade de extrato significativa, foi realizada uma coluna cromatográfica modo de filtração, a qual foi feita uma pastilha das frações acetato de etila com sílica gel, através de um funil de placa porosa, em vidro sinterizado, com auxílio de sucção, a pastilha ficou sob uma pequena quantidade de sílica (100 g) e o sistema eluente utilizou-se até a exaustão.

Para esta filtração, foram utilizados solventes em ordem crescente de polaridade e em diferentes proporções, do hexano ao metanol, foram coletadas frações de 200 mL. As frações que apresentaram similaridade através da análise em CCD foram reunidas, de acordo com a Tabela 8.

Tabela 8: Separação em coluna de filtração da fração Acetato de etila.

Subfração	Frações	% Solvente	Substância	Peso
I	1 a 25	Hexano/Acetato 50%	Mistura	500 mg
II	26 a 47	Acetato	Mistura	1,5 g
III	48 a 53	Acetato/Metanol 1%	Mistura + M04	450 mg
IV	54 a 75	Acetato/Metanol 10%	Mistura	2,5 g
V	76 a 87	Acetato/Metanol 25%	Mistura	3,7 g
VI	88 a 110	Acetato/Metanol 30%	Mistura	3,5 g
VII	111-125	Acetato/Metano 40%	Mistura	3,7 g
VIII	126-150	Acetato/Metanol 50%	Mistura	6,8 g
IX	151-230	Metanol	Mistura	10,5 g

A fração III, ao ser concentrada formou um precipitado branco, insolúvel, este precipitado foi lavado várias vezes com acetona, ao retirar o sobrenadante, obteve o precipitado puro, conforme acompanhamento por CCD. Pela dificuldade em solubilizar a amostra acreditou-se tratar de um composto glicolizado.

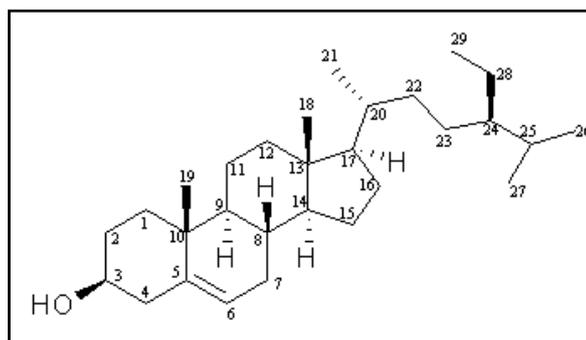
Depois de realizado as análise de RMN unidimensionais do composto M04 e comparação com dados da literatura confirmou-se ser o metabólito  $\beta$ -sitosterol glicolisado (KHATUN, 2012).

#### 5.4. Estudo fitoquímico do metabólito isolado da fração Hexânica

##### 5.4.1 $\beta$ -sitosterol (M01)

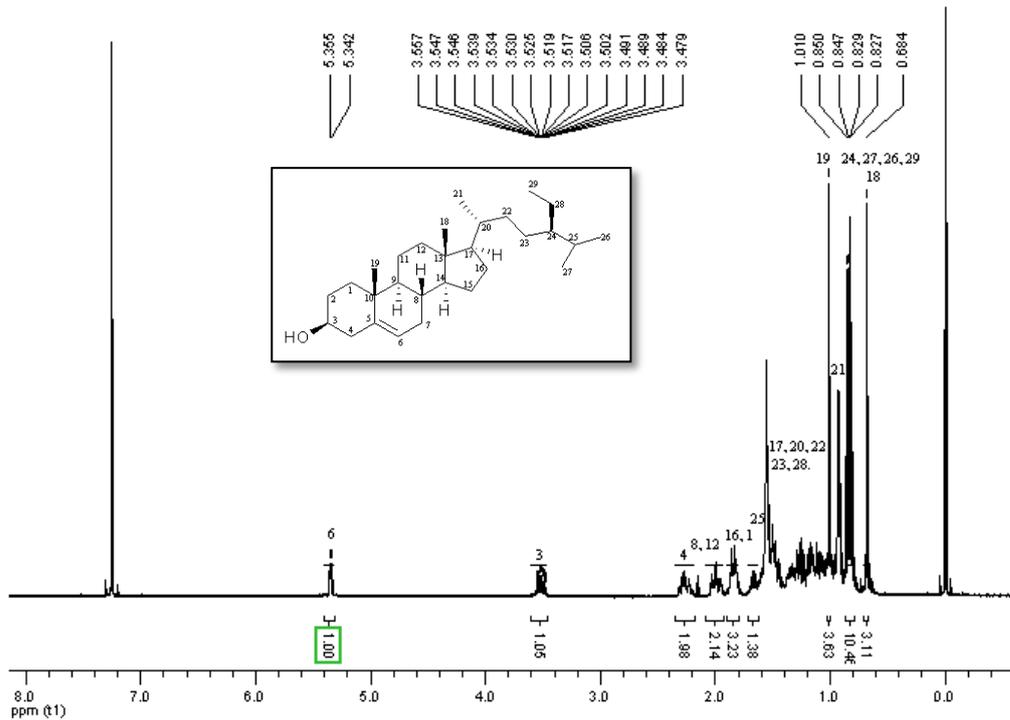
O esteroide isolado na forma de um sólido cristalino branco foi identificado como  $\beta$ -sitosterol (Figura 4), através de técnicas de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ , além de comparação com substância padrão e dados da literatura (YI, 2014).

Figura 4: Estrutura numerada do  $\beta$ -sitosterol (M01)



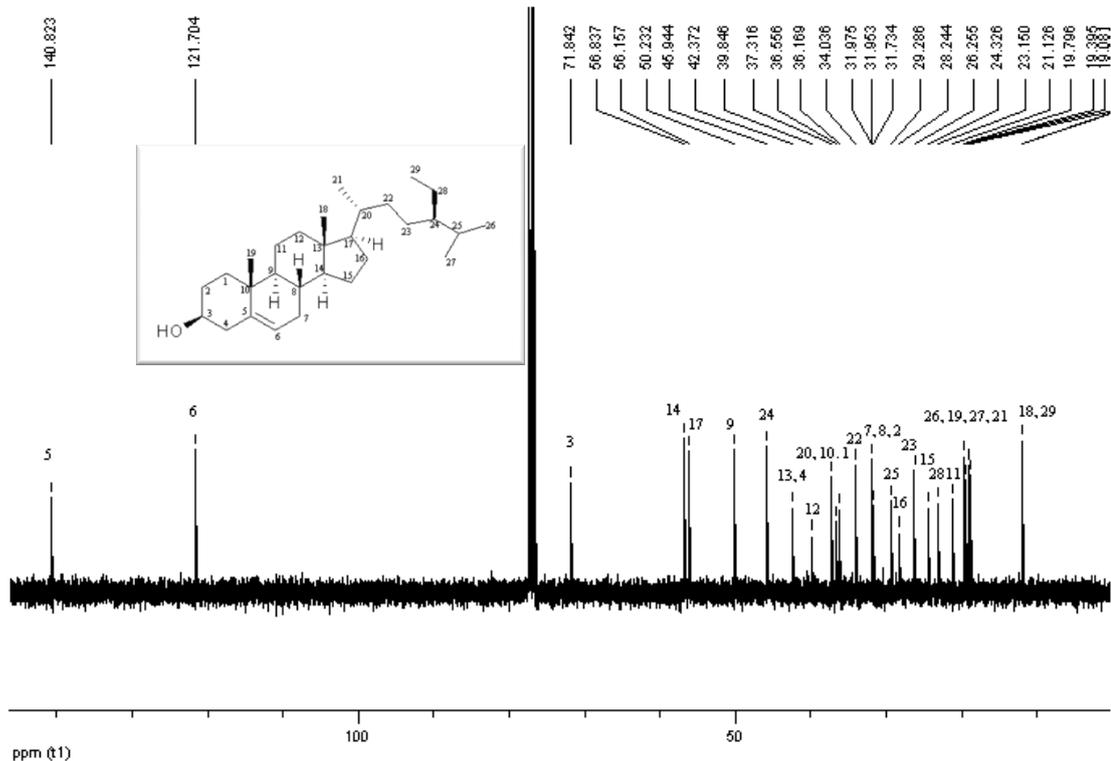
Através da análise de RMN de  $^1\text{H}$  (Figura 4), pode-se observar presença um duplete em  $\delta$  5,34 ppm (1H, d,  $J = 5,2$  Hz) característico de dupla ligação, sendo atribuído ao H-6. O multiplete com deslocamento 3,50 ppm é atribuído ao H-3 devido ao efeito do substituinte OH do C-3. As metila são facilmente identificadas nos simpletos  $\delta$  0,68 ppm (3H, s), 0,82 ppm (3H, s), 0,83 (3H, s), 0,85(3H, s), 0,93 (3H, s) e 1,01 (3H, s) atribuídos a H-18, H-26, H-27, H-29, H-21, H-19 respectivamente.

Figura 5: Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  do  $\beta$ -sitosterol, em  $\text{CDCl}_3$ , 400MHz.



O espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  para o  $\beta$ -sitosterol (Figura 5), mostrou dois sinais bem característicos de carbonos com insaturação, um hidrogenado outro não, na região  $\delta$  140,8 e 121,7 ppm referentes aos C-5 e C-6 respectivamente. O carbono oxigenado apresenta deslocamento químico 71,8 ppm atribuído ao C-3. Os carbonos metílicos, C-18, C-29, C-21, C-27, C-19 e C-26 são atribuídos aos sinais com deslocamentos de 11,8 ppm, 11,9 ppm, 18,8 ppm, 19,0 ppm, 19,3 ppm e 19,7 ppm, respectivamente. Os demais carbonos são identificados no espectro.

Figura 6: Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  do  $\beta$ -sitosterol em  $\text{CDCl}_3$ , 100,13MHz.



Todos os deslocamentos químicos de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  foram comparados com a literatura para comprovação do composto. (YI, 2014).

O metabolito  $\beta$ -sitosterol é um fitoesterol ativo em muitas plantas medicinais e comestíveis, podendo ser isolado de várias partes da planta, principalmente aéreas. Quanto ao seu potencial farmacológico, existem na literatura comprovações quanto aos efeitos antioxidante, cardioprotetor e com potencial inibitório do desenvolvimento de células cancerígenas, além dos variados potenciais de seus derivados (VIVANCOS, 2005).

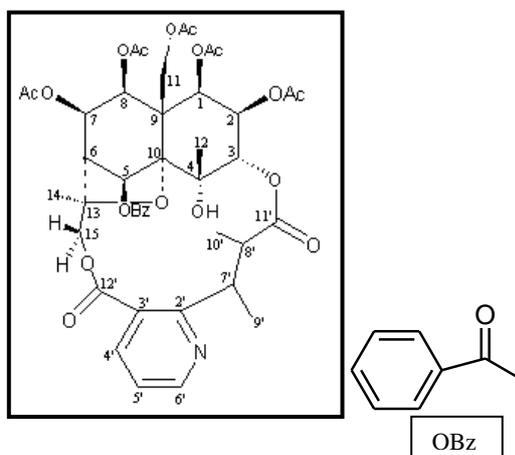
O composto  $\beta$ -sitosterol foi identificado nas espécies *Maytenus ilicifolia* e *Maytenus aquifolium*, apenas por análise cromatográfica, através do acoplamento entre cromatografia gasosa de alta resolução e espectrometria de massas (HRGC-MS), por serem constituintes químicos minoritários nas plantas analisadas não foram isolados (CORDEIRO, 1999).

## 5.5. Estudo dos metabolitos isolados na Fração Diclorometano

### 5.5.1 Cangorinina E-1 (M02)

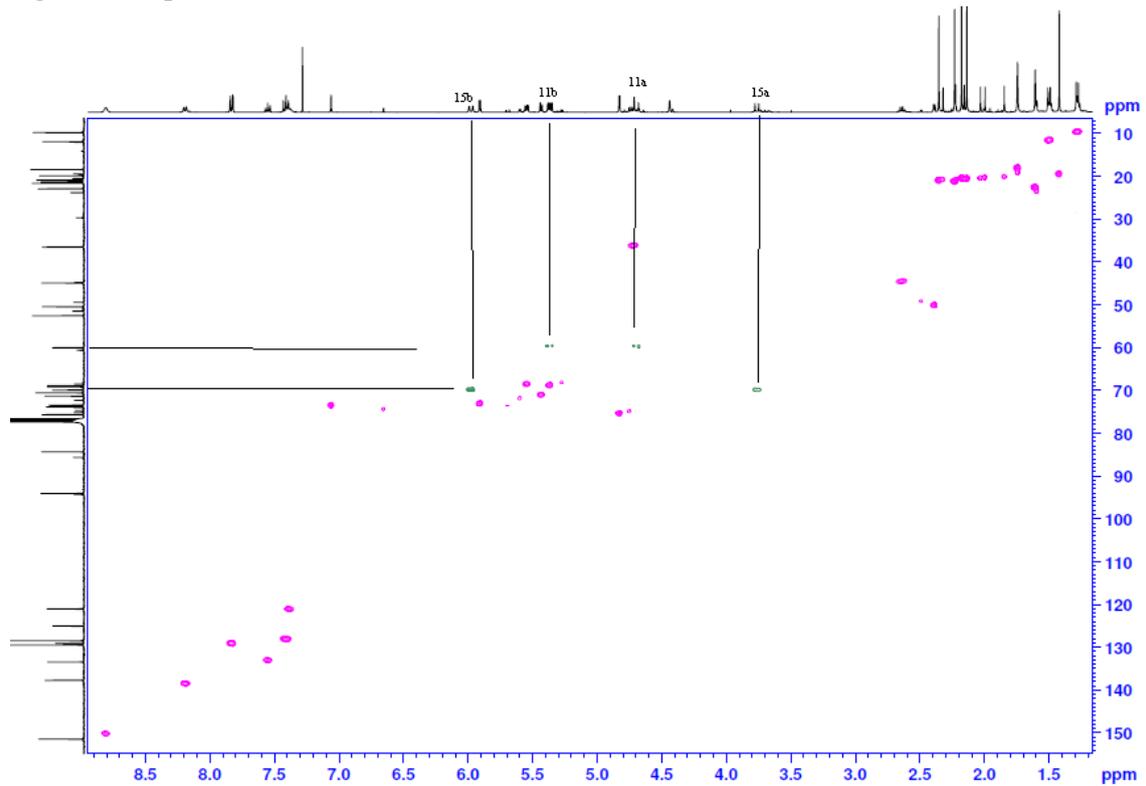
O Alcaloide M02 foi isolado na forma de um sólido branco amorfo, da fração diclorometano do extrato bruto das cascas da raiz da *Maytenus ilicifolia*. Foi identificado como Cangorinina E-1 (Figura 7), através de técnicas de RMN uni e bidimensionais comparando-os com dados da literatura (SHIROTA, 1994a).

Figura 7: Estrutura numerada do alcaloide Cangorinina E-1



De acordo com a literatura nos alcaloides dessa família é comum a presença do núcleo sesquiterpeno piridínico, por isso que a identificação dos alcaloides obtidos foi baseado por estas referências. Como no grupo não há padrões e frequência desses alcaloides foi realizada uma análise minuciosa para a identificação, como referência inicial foi identificado dois  $\text{CH}_2$  no espectro bidimensional HSQC os quais os H são diastereotópicos, como é observado na figura 8 abaixo:

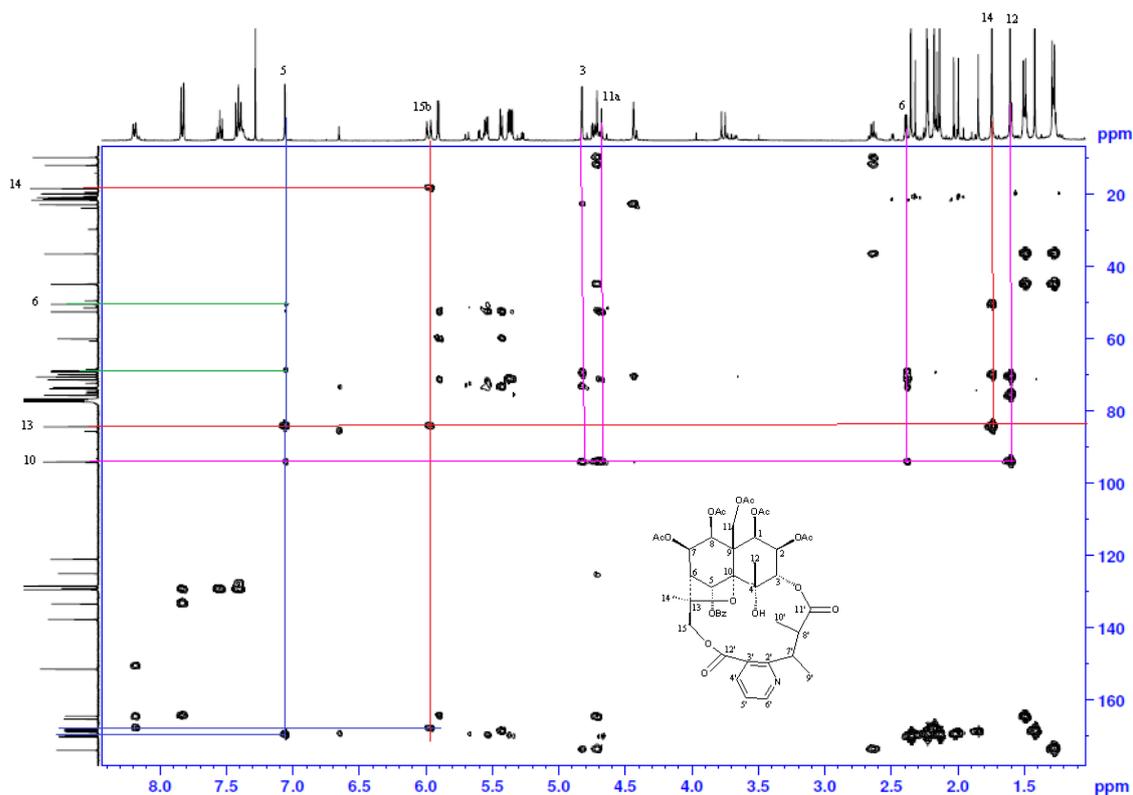
Figura 8: Espectro bidimensional HSQC do alcaloide M02.



Propõe-se que um seja  $\text{CH}_2$ -11 e outro  $\text{CH}_2$ -15, observa-se que há um H em campo baixo,  $\delta$  5,97 ppm, isso pode ser atribuído devido ao efeito de desblindagem do éster ligado a piridina, então por isso determinou-se como H-15b e seu par, como pode ser visto no espectro, H15a,  $\delta$ 3,76 ppm. Com isso identificou também os H-11a e H-11b.

Partindo dessas observações e complementando com os dados do espectro de HMBC pode-se determinar as carbonos vizinhos, como demonstrado na figura 9:

Figura 9: Espectro HMBC do alcaloide M02.



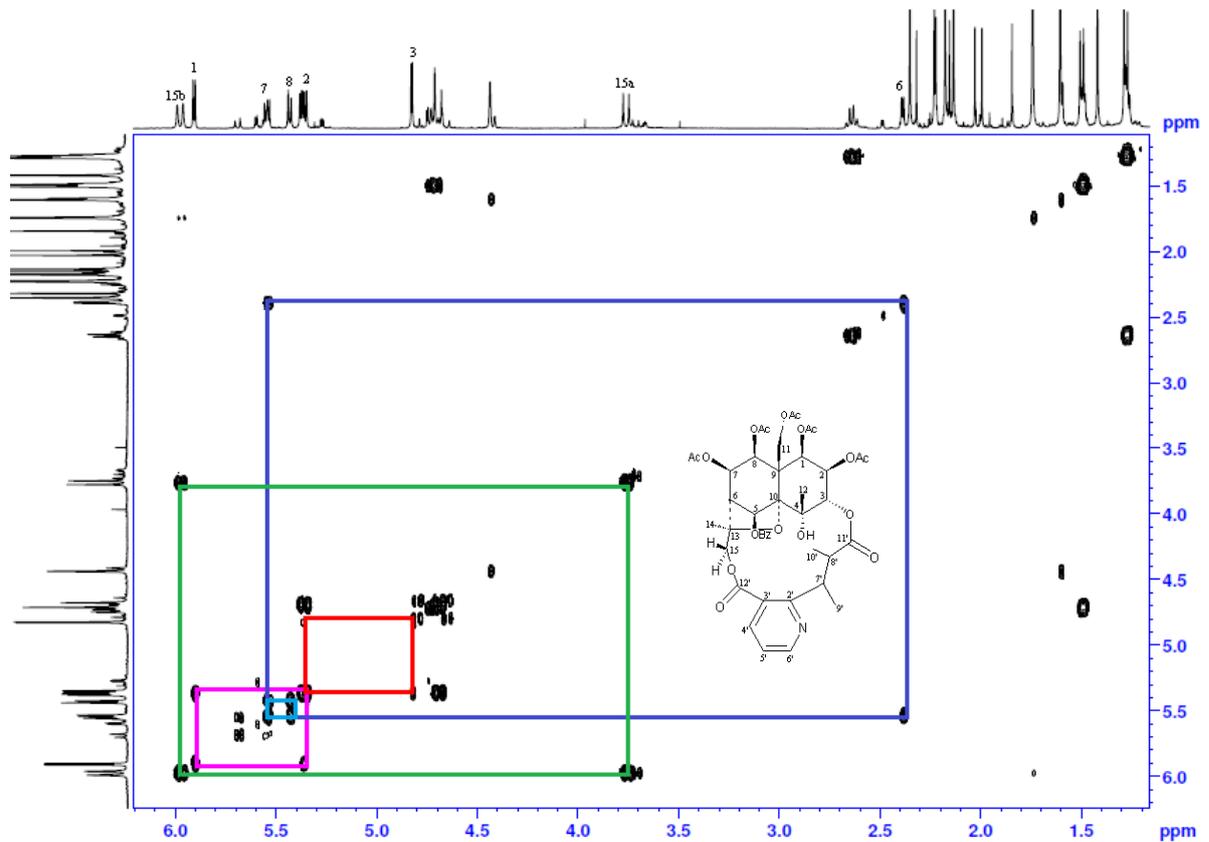
A partir do H-15b identificou-se a metila C-14, um carbono quaternário C-13 e a carbonila referente ao éster (C-12'). Assim por consequência já é possível verificar um os acoplamentos do carbono C-13, o H-5 em  $\delta$  7,04 ppm, e o CH<sub>3</sub> do C-14.

Com o H-5 identificado observa-se o acoplamento com o carbono quaternário C-10, C-6 e a carbonila OBz.

O H-3 também foi identificado através do acoplamento com o C-10, por estar ligado ao heteroátomo seu deslocamento é  $\delta$  4,80 ppm, já o H-6 por não estar ligado a nenhum heteroátomo, somente a carbonos, seu deslocamento fica em campo alto,  $\delta$  2,38 ppm, e a metila C-12 também foi identificada.

Para confirmação final do ciclo sesquiterpeno utiliza-se o espectro de COSY, para confirmação dos H vizinhos aos H-3 e H-6, conforme figura 10:

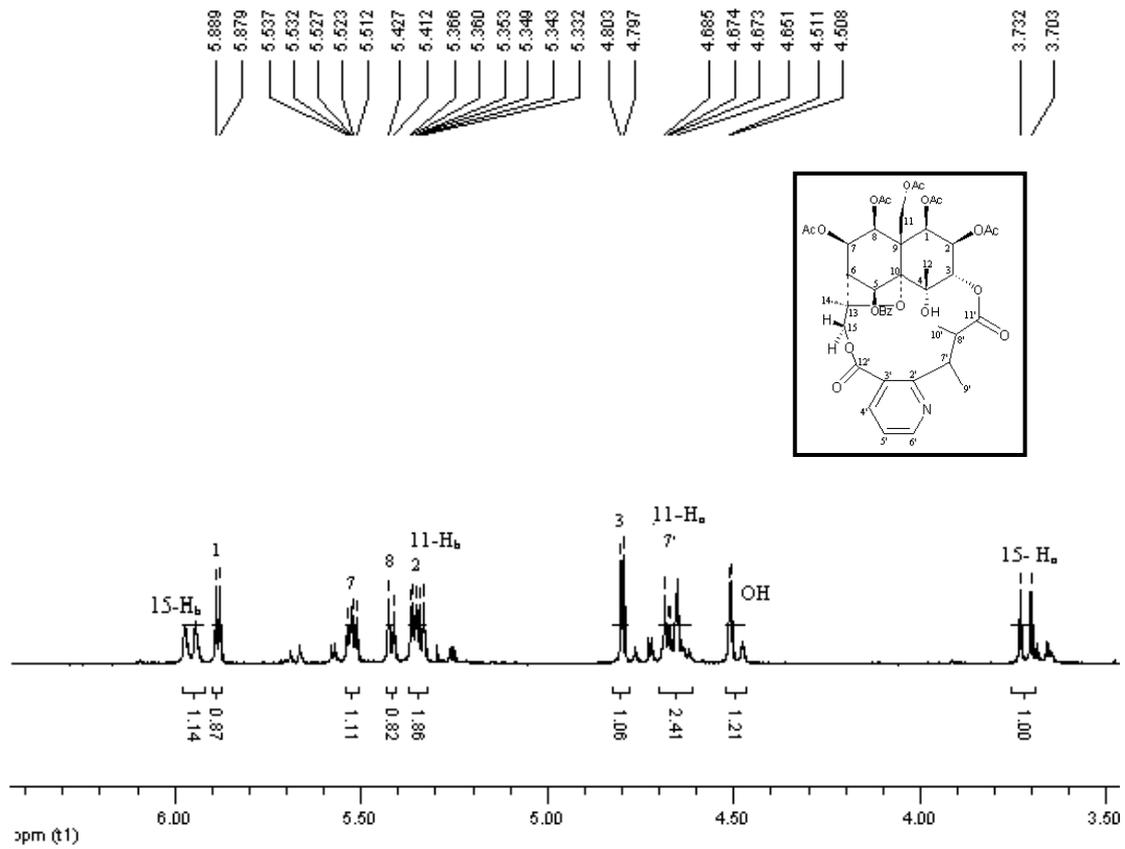
Figura 10: Expansão espectro COSY, para identificação acoplamentos dos H-3 e H-6.



Através do espectro de COSY é possível confirmar 4 sistemas de spins, o acoplamento entre H-1 com H-2 e este com H-3, assim como H-6 com H-7 e este com H-8, além destes há acoplamentos entre H-15a com H-15b e H-11a com H-11b.

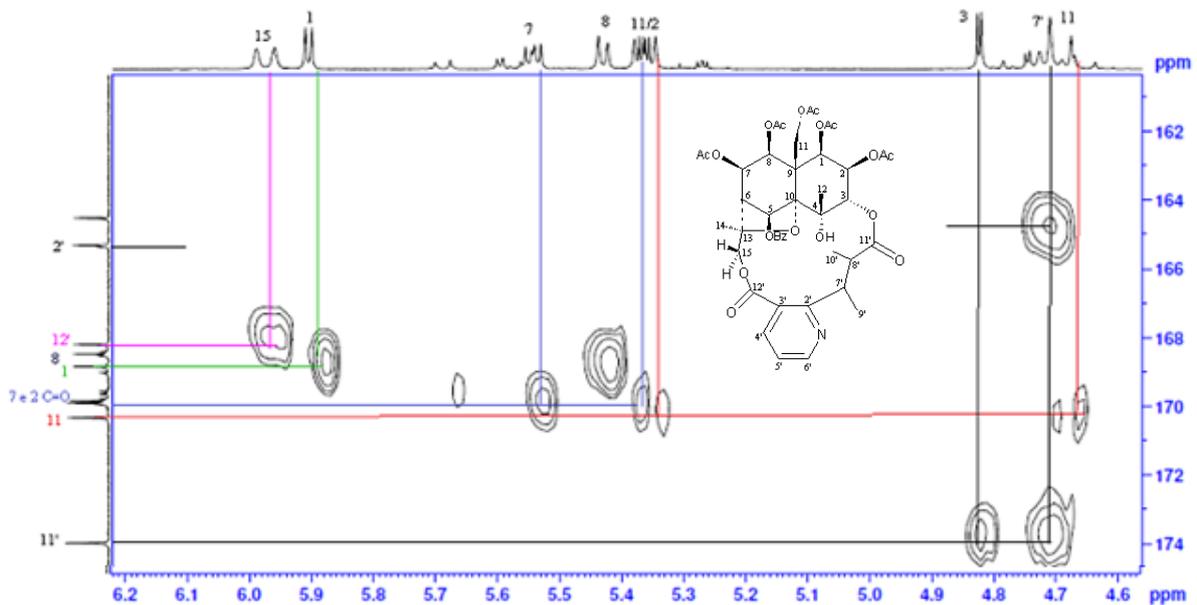
Após a confirmação do núcleo esperado e identificação dos principais hidrogênios, conforme expansão do espectro de  $^1\text{H}$  (figura 11), foi necessário correlacionar os substituintes e o complemento do macrociclo.

Figura 11: Expansão do espectro de RMN de  $^1\text{H}$ , em  $\text{CDCl}_3$ , a 400 MHz.



Pela literatura e os espectro observou-se a presença de carbonilas acreditando ser os substituintes ésteres acetil (OAc) Para foi necessária a expansão do espectro HMBC, para confirmação da posição de cada substituinte, conforme figura 12:

Figura 12: Expansão do espectro HMBC, ênfase nas carbonilas do alcaloide M02.



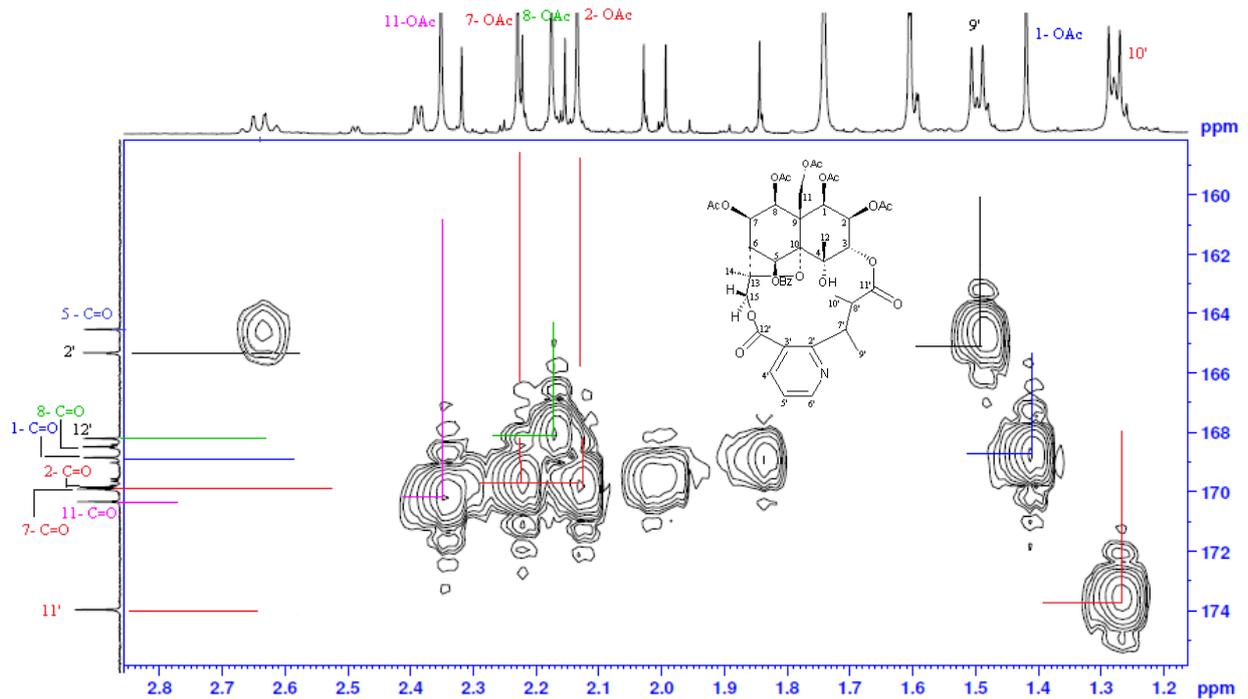
Com isso podemos observar que os carbonos C-1, 2, 7, 8 e 11 possuem o mesmo substituinte, um ester acetil, pode-se dizer que essas carbonilas sofrem efeito mesomérico das metilas a quais estão ligadas, por isso estão mais blindadas.

Nota-se também duas carbonilas características de ésteres (C-11' e C-12') pertencentes ao macrociclo deste alcaloide, uma sofre efeito de desblindagem por estar ligada ao anel piridinico (C-11'), outra está blindada por estar entre carbonos (C-12').

Outro sinal identificado é C-2', que é característico de ligação C-N, que pelo efeito indutivo do nitrogênio desblinda o carbono, levando seu deslocamento para 165,4 ppm.

A figura 13 mostra a expansão HMBC correlacionando às carbonilas já identificadas com suas metilas.

Figura 13: Expansão do espectro HMBC, com ênfase na região OAc do alcaloide M02.



Com isso foi possível a identificação no núcleo principal e dos grupos substituintes desse alcaloide, a carbonila 5-C=O por ter o substituinte carboxibenzeno é a carbonila mais blindada no espectro.

As Figura 14 e 15 apresentam o espectro de  $^1\text{H}$  com expansão na área das metilas e dos OAc e a expansão do anel aromático e piridinico respectivamente, com a identificação de cada pico.

Já nas figuras 16 e 17 os espectro de  $^{13}\text{C}$ , com expansão nos  $\text{CH}_3$  e  $\text{CH}_2$ , identificando ciclos do alcaloide e expansão na área do anel aromático, piridinico e das carbonilas todos com suas respectivas identificações.

Figura 14: Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  expandido nas metilas, em  $\text{CDCl}_3$ , 400MHz, do alcaloide M02.

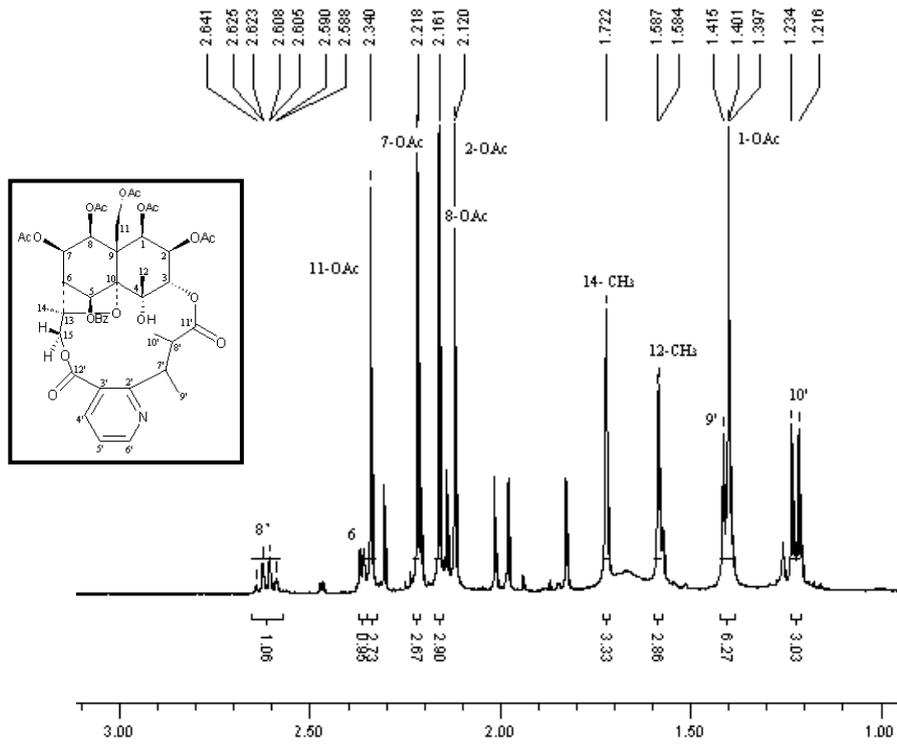


Figura 15: Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  expandido nos aromáticos, em  $\text{CDCl}_3$ , 400MHz do alcaloide M02.

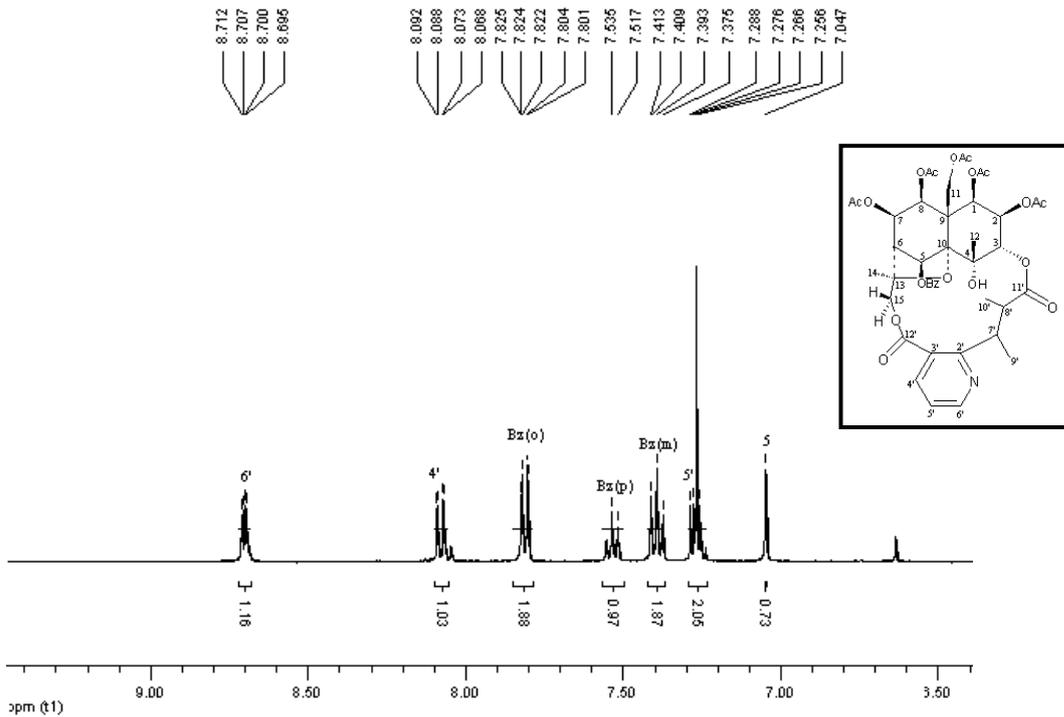


Figura 16: Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  expandido, em  $\text{CDCl}_3$ , 100MHz, do alcaloide M02.

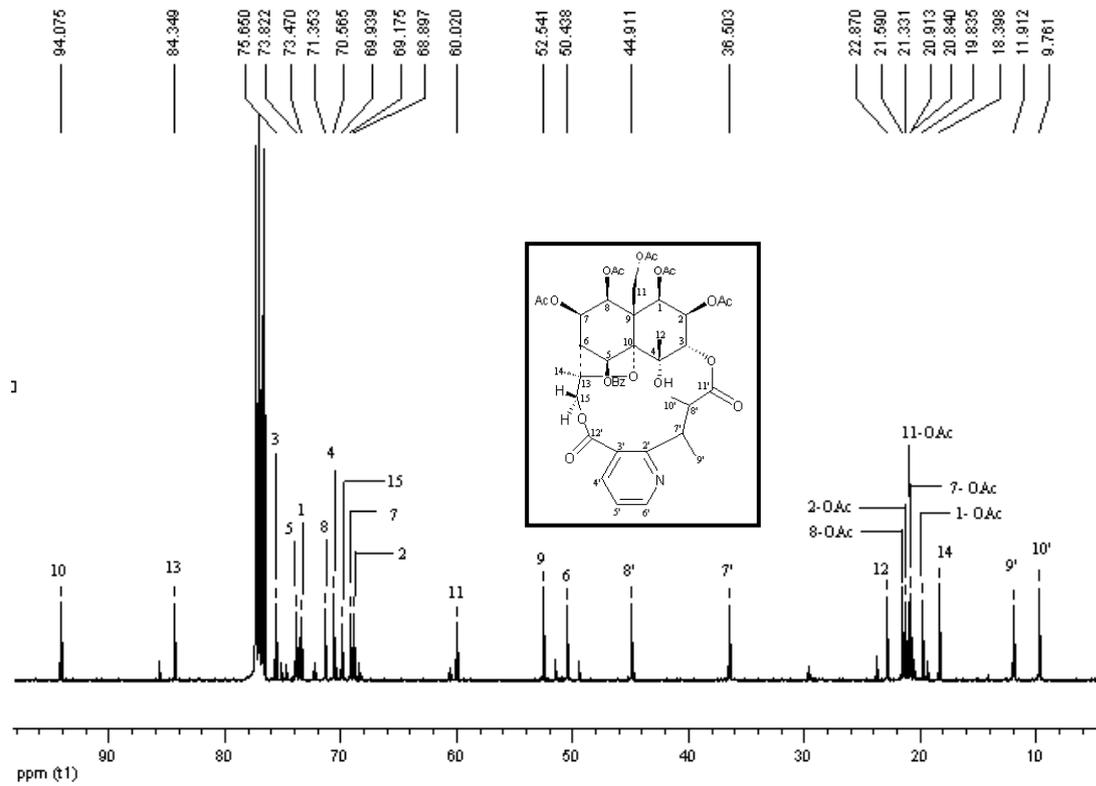
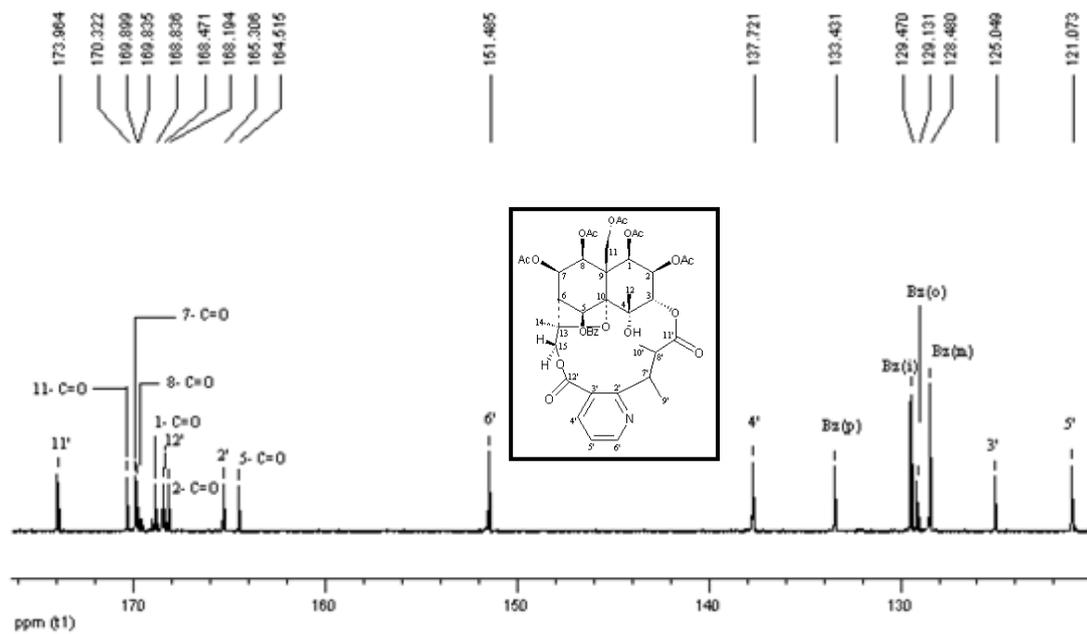


Figura 17: Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  expandido, em  $\text{CDCl}_3$ , 100MHz, do alcaloide M02.



Contudo pode-se comprovar que realmente se trata do alcaloide Cangorinina E-1, isolado por Shirota em 1994<sup>a</sup>, o qual é comparado os dados de RMN <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C na tabela abaixo:

Tabela 9: Dados de RMN de <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C de M02 (CDCl<sub>3</sub>, <sup>1</sup>H a 400 MHz, <sup>13</sup>C A 100 MHz).

Posição	δ <sub>H</sub> (ppm)	δ <sub>H</sub> * (ppm)	Posição	δ <sub>C</sub> (ppm)	δ <sub>C</sub> * (ppm)
1-H	5,88 (d, 4,0)	5,59 (d, 3,8)	1	73,4	73,3
2-H	5,35 (dd, 2,8, 4,4)	5,27 (dd, 2,6, 3,8)	2	68,8	68,7
3-H	4,80 (d, 2,4)	4,83 (d, 2,5)	3	75,6	75,8
4-OH	4,43	4,74	4	70,5	70,6
5-H	7,04 (s)	7,17 (s)	5	73,8	74,8
6-H	2,38 (d, 4,0)	2,51 (d, 3,9)	6	50,4	50,4
7-H	5,52 (dd, 4,0, 5,8)	5,54 (dd, 3,9, 5,8)	7	69,1	69,1
8-H	5,41 (d, 6,0)	5,39 (d, 5,8)	8	71,3	70,8
11-H <sub>a</sub>	4,66 (d, 13,6)	4,56 (d, 13,5)	9	52,5	52,3
11-H <sub>b</sub>	5,34 (d, 13,6)	5,17 (d, 13,5)	10	94,0	93,7
12-CH <sub>3</sub>	1,58 (s)	1,55 (s)	11	60,0	60,0
14- CH <sub>3</sub>	1,72 (s)	1,68 (s)	12	22,8	22,8
15- H <sub>a</sub>	3,76 (d, 11,6)	3,61 (d, 11,5)	13	84,3	84,1
15-H <sub>b</sub>	5,97 (d, 11,6)	6,01 (d, 11,5)	14	18,3	18,4
4'-H	8,08 (dd, 1,6, 7,6)	8,04 (dd, 1,5, 7,7)	15	69,9	69,9
5'-H	7,27 (dd, 4,8, 8,0)	7,25 (dd, 4,8, 7,7)	2'	165,3	165,2
6'-H	8,70 (dd, 2,0, 4,8)	8,69 (dd, 1,5, 4,8)	3'	125,0	125,1
7'-H	4,67 (q)	4,70 (q, 6,8)	4'	137,7	137,6
8'-H	2,64 (q, 6,8)	2,58 (q, 7,1)	5'	121,0	121,0
9'- CH <sub>3</sub>	1,40 (d,7,2)	1,43 (d, 6,8)	6'	151,5	151,4
10'- CH <sub>3</sub>	1,22 (d, 7,2)	1,19 (d, 7,1)	7'	36,3	36,3
1-OAc	1,72 (s)	1,84 (s)	8'	44,9	45,0
2-OAc	2,12 (s)	2,15 (s)	9'	11,9	11,8
7-OAc	2,21 (s)	2,22 (s)	10'	9,7	9,5
8-OAc	2,16 (s)	2,00 (s)	11'	174,0	173,9
11-OAc	2,34 (s)	2,33 (s)	12'	168,2	168,5

			1-OC=O	168,8	169,0
			CH <sub>3</sub>	19,8	20,4
			2-OC=O	169,8	168,5
			CH <sub>3</sub>	21,3	21,0
5-Obz	-	-	5-OC=O	164,5	165,7
OBz( <i>o</i> )	7,81 (d, 8,4)	8,31 (d, 7,6)	<i>ipso</i>	129,4	129,5
OBz( <i>m</i> )	7,39 (m)	7,49 (m)	<i>orto</i>	129,1	130,5
OBz( <i>p</i> )	7,53 (m)	7,58 (m)	<i>meta</i>	128,4	128,8
			<i>para</i>	133,4	133,5
			7-OC=O	169,9	170,1
			CH <sub>3</sub>	20,8	21,0
			8-OC=O	168,5	168,9
			CH <sub>3</sub>	21,6	20,4
			11-OC=O	170,3	170,1
			CH <sub>3</sub>	20,9	21,4

\*  $\delta_H$  e  $\delta_C$  (CDCl<sub>3</sub> a 400MHz), conforme Shirota.

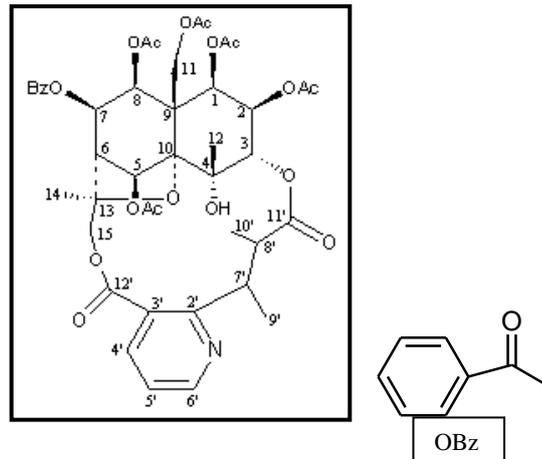
Cabe ressaltar que até o momento não foi possível à determinação da estereoquímica absoluta deste alcaloide, pois não ocorreu a cristalização, na literatura não há relatos de sua análise por raio-X, apenas foi determinado a configuração relativa pelo experimento NOESY.

Quanto ao efeito farmacológico destes alcaloides sesquiterpeno piperidínicos ainda há pouco estudo, porém referente ao alcaloide Cangorinina E-1 já observou-se efeitos inibitórios significativos sobre a produção de citocinas (DUAN, 2001).

### 5.5.2 Aquafoliunina E-1 (M03)

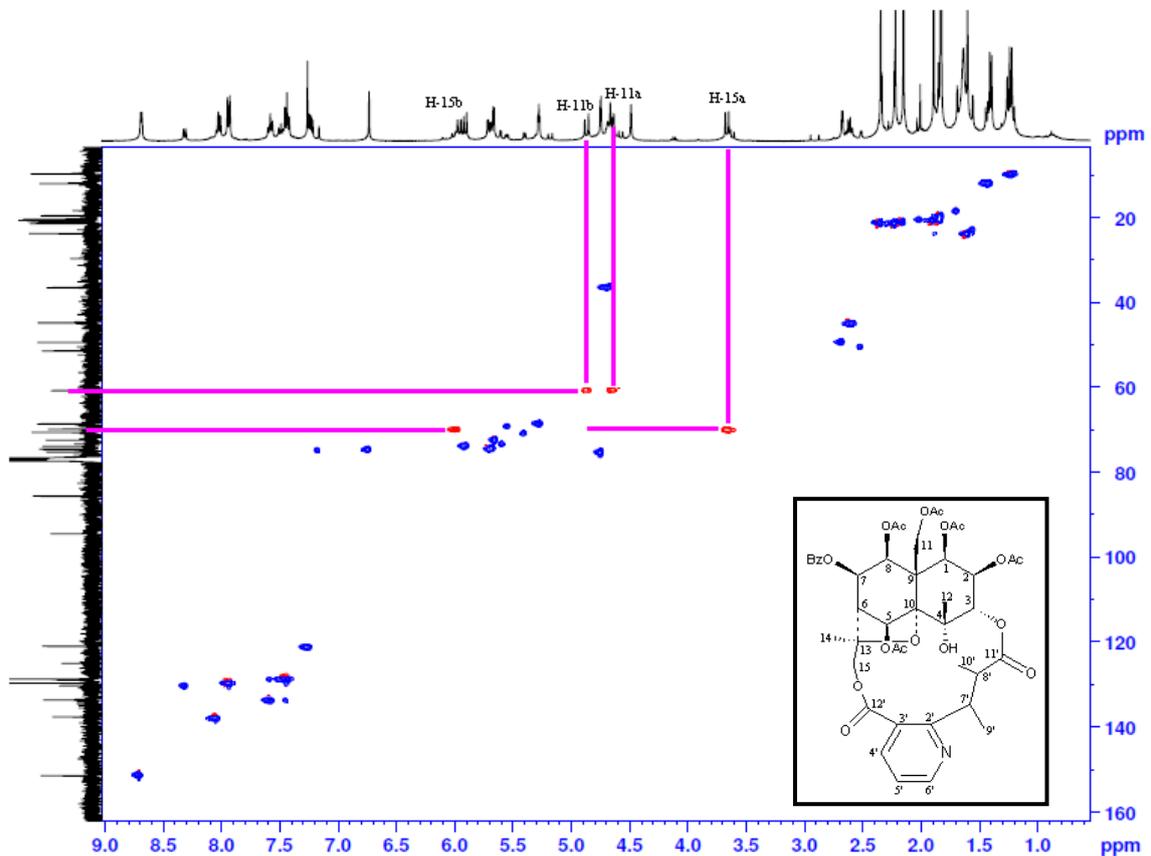
O Alcaloide M03 foi isolado na forma de um sólido branco amorfo, da fração diclorometano do extrato bruto das cascas da raiz da *Maytenus ilicifolia* coletado em Santana do Livramento. Foi identificado como Aquafoliunina E-1 (Figura 18) através de técnicas de RMN uni e bidimensionais comparando-os com dados da literatura (CORSINO, 1998).

Figura 18: Estrutura numerada do alcaloide Aquafoliunina E-1



Para este alcaloide também foi necessário uma análise minuciosa dos espectros bidimensionais por apresentarem grupamentos e núcleos muito parecidos. Uma das principais diferenças é a blindagem de um dos H-11, como evidenciado na figura 19.

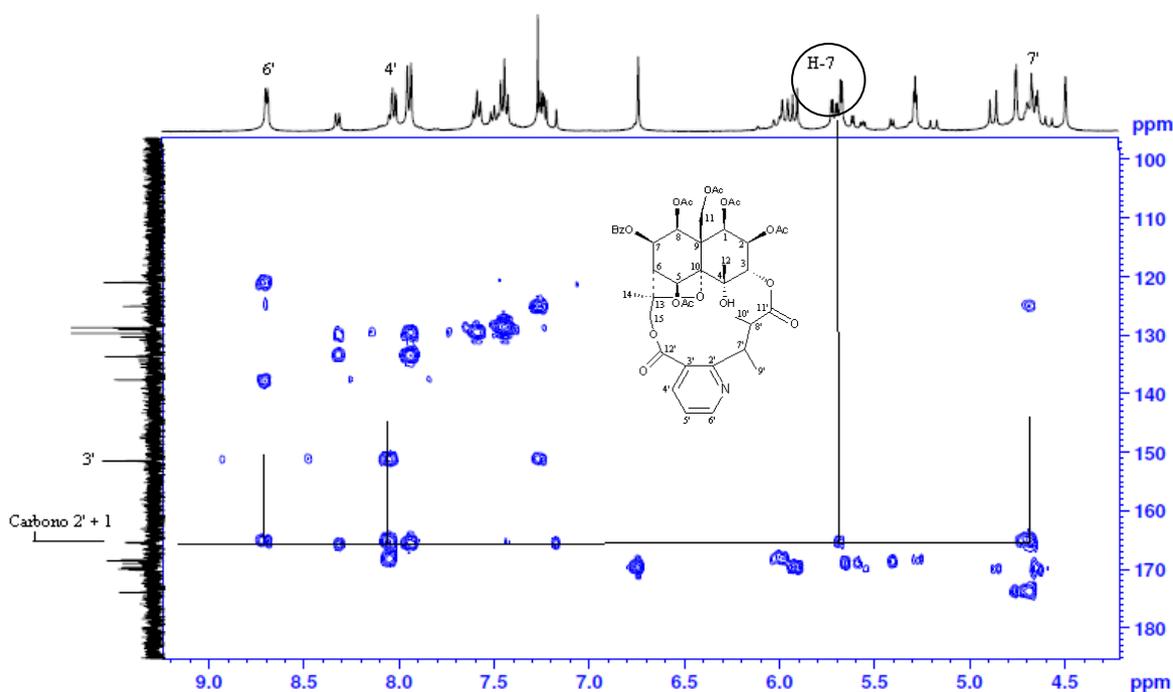
Figura 19: Espectro bidimensional de HSQC do alcaloide M03.



Com isso foi possível concluir que algum dos substituintes vizinhos ao C-11 não seria o grupamento éster acetil (OAc) como no alcaloide Cangorinina E-1. Como esse alcaloide também tem a presença dos sinais característicos do carboxibenzeno (OBz), considerou-se a possibilidade de ser esse o substituinte que alteraria o deslocamento químico desta região.

Após a comprovação de todos os sinais do núcleo principal também ser um sesquiterpenos piridinico, como o alcaloide (M02), observou-se que o C-7 e H-7 tiveram seus deslocamentos químicos alterados, então observou-se na expansão do espectro de HMBC (Figura 20) que a carbonila referente ao carbono ligado ao anel aromático acoplaria com H-7, assim confirmando o substituinte do C-7.

Figura 20: Espectro bidimensional HMBC expandido do alcaloide M03.

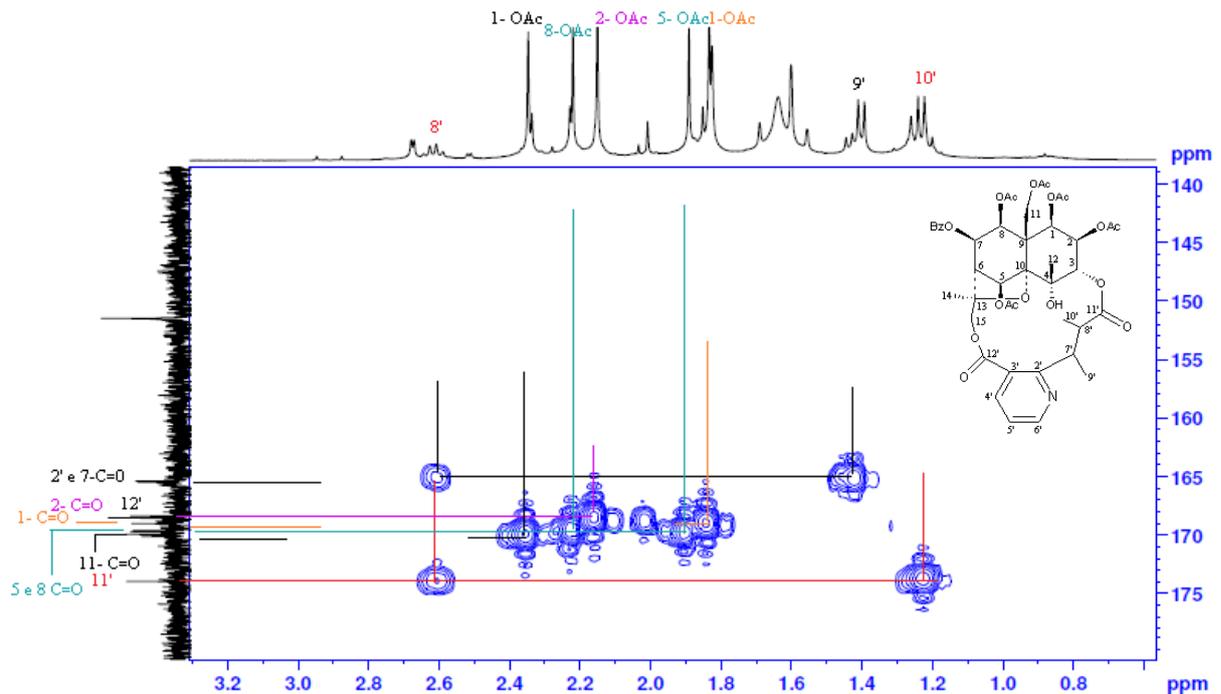


Na figura observa-se claramente o acoplamento do C-2' com H-6', H-4' e H-7' todos vizinhos ao anel piridinico e acoplamento da carbonila ligada ao anel aromático acoplando com o H-7.

Os hidrogênios do núcleo principal foram todos confirmados pelos espectros uni e bidimensionais, principalmente pelo espectro de COSY (Anexo 1), assim como no alcaloide M02.

Na figura 21 traz a expansão do espectro HMBC na região das metilas e OAc para confirmação dos substituintes e a ligação com as carbonilas do alcaloide.

Figura 21: Espectro bidimensional HMBC expandido na região das metilas do alcaloide M03.



Com isso foi possível a identificação no núcleo principal e os grupamentos substituintes desse alcaloide, bem como a comprovação de que o substituinte OBz está no C-7 e não no C-5 como no composto M02.

As figuras 22 e 23 apresentam a expansão do espectro de  $^1\text{H}$  na área das metilas e OAc, e também a expansão no anel aromático e piridínico respectivamente, com todos H identificados e numerados.

Por último as figuras 24 e 25 mostram a expansão dos espectros de  $^{13}\text{C}$  com a identificação dos  $\text{CH}_2$  e  $\text{CH}_3$  que compõem os ciclos da estrutura e a expansão na área do anel aromático, piridínico e das carbonilas.



Figura 24: Espectro de RMN do  $^{13}\text{C}$  do alcaloide M03 em  $\text{CDCl}_3$ , 100MHz.

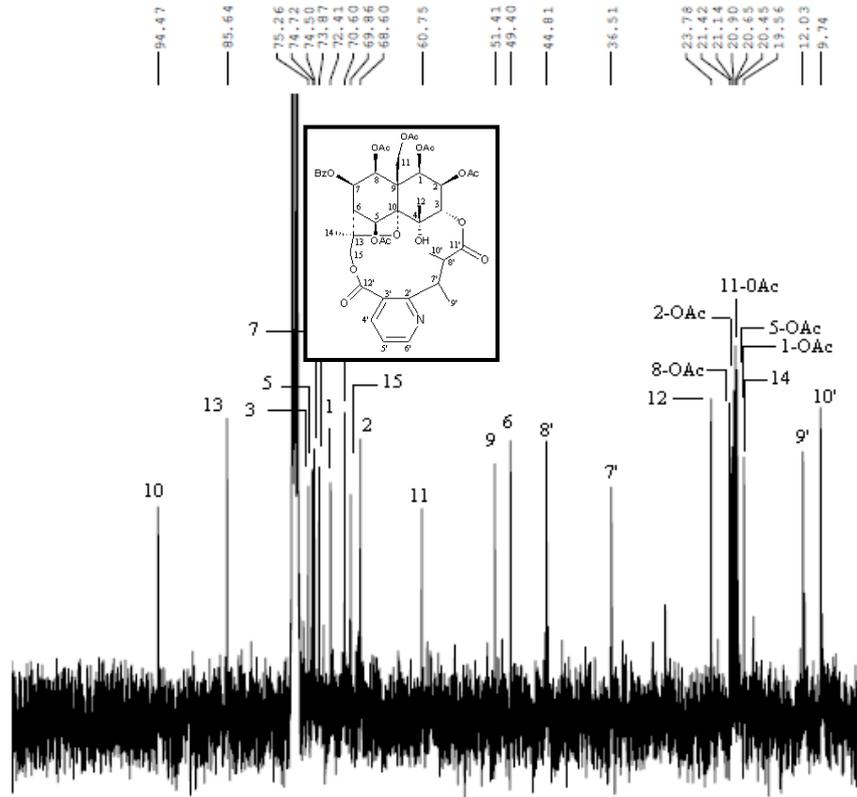
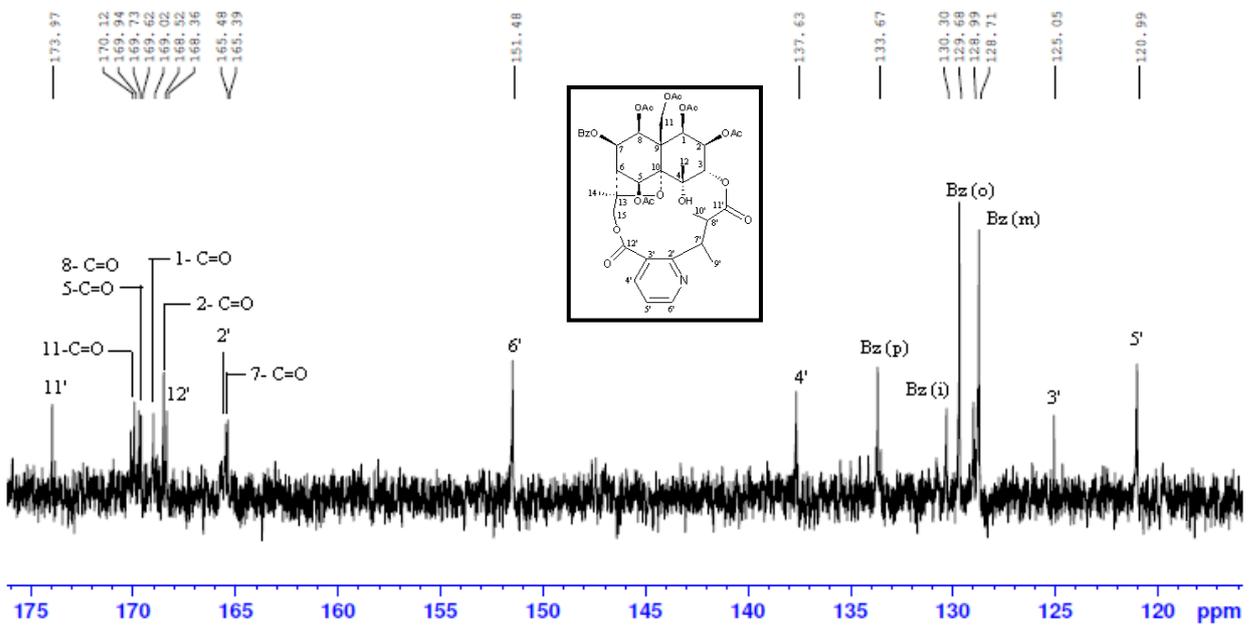


Figura 25: Espectro de RMN do  $^{13}\text{C}$  expandido do alcaloide M03 em  $\text{CDCl}_3$ , 100MHz.



Contudo pode-se comprovar que realmente se trata do alcaloide Aquafoliunina E-1, isolado por Corsino em 1998, o qual é comparado os dados de RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  na tabela abaixo:

Tabela 10: Dados de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  de M03. ( $\text{CDCl}_3$ ,  $^1\text{H}$  a 400 MHz,  $^{13}\text{C}$  A 100 MHz).

Posição	$\delta_{\text{H}}$ (ppm)	$\delta_{\text{H}}^*$ (ppm)	Posição	$\delta_{\text{C}}$ (ppm)	$\delta_{\text{C}}^*$ (ppm)
1-H	5,66 (d, $J=3,5$ )	5,63 (d, $J= 3,5$ )	1	72,4	72,4
2-H	5,27 (t, $J= 2,8$ )	5,25 (dd, $J=3,5, 2,5$ )	2	68,6	68,5
3-H	4,74 (d, $J=2,5$ )	4,73 (d, $J= 2,5$ )	3	75,2	75,2
4-OH	4,48	4,53	4	70,6	70,6
5-H	6,73 (s)	6,73 (s)	5	74,7	74,6
7-H	5,69 (dd, $J= 3,3, 9,8$ )	5,67 (dd, $J= 3,6, 9,9$ )	6	49,4	49,3
8-H	5,89 (d, $J= 9,8$ )	5,89 (d, $J= 9,9$ )	7	74,5	74,5
11-H <sub>a</sub>	4,63 (d, $J= 13,2$ )	4,62 (d, $J= 13,6$ )	8	73,8	73,7
11-H <sub>b</sub>	4,85 (d, $J= 13,2$ )	4,82 (d, $J= 13,6$ )	9	51,4	51,3
12-CH <sub>3</sub>	1,60 (s)	1,54 (d, $J= 1,2$ )	10	94,4	94,5
14- CH <sub>3</sub>	1,82 (s)	1,81 (s)	11	60,7	60,7
15- Ha	3,64 (d, $J= 11,4$ )	3,63 (d, $J= 11,6$ )	12	23,7	23,8
15-H <sub>b</sub>	5,94 (d, $J= 11,4$ )	5,96 (d, $J= 11,6$ )	13	85,6	85,7
4'-H	8,02 (dd, $J= 7,8 1,7$ )	8,03 (dd, $J= 8,0, 1,6$ )	14	19,5	19,6
5'-H	7,23 (dd, $J= 7,7, 4,8$ )	7,23 (dd, $J= 8,0, 4,8$ )	15	69,8	69,8
6'-H	8,68 (dd, $J= 4,7, 1,6$ )	8,68 (dd, $J= 4,6, 1,6$ )	2'	165,4	165,6
7'-H	4,66 (m)	4,65 (q, $J= 7,2$ )	3'	125,0	125,0
8'-H	2,58 (q)	2,58 (q, $J= 7,2$ )	4'	137,6	137,7
9'- CH <sub>3</sub>	1,39 (d, $J= 7,0$ )	1,39 (d, $J= 7,0$ )	5'	120,9	121,0
10'- CH <sub>3</sub>	1,22 (d, $J= 7,1$ )	1,20 (d, $J= 7,0$ )	6'	151,4	151,5
1-OAc	1,82 (s)	1,82 (s)	7'	36,5	36,4
2-OAc	2,15 (s)	2,14 (s)	8'	44,8	44,9
5- OAc	1,89 (s)	1,88 (s)	9'	12,0	12,0
8-OAc	2,22 (s)	2,20 (s)	10'	9,7	9,8
11-OAc	2,34(s)	2,33 (s)	11'	173,8	174,0
			12'	168,3	168,4

			1-OC=O CH <sub>3</sub>	169,0 20,4	169,1 20,5
7-OC=O <i>orto</i> <i>meta</i> <i>para</i>	7,93 (d, <i>J</i> = 7,24) 7,43 (t, <i>J</i> =7,2) 7,56 (t, <i>J</i> =7,6)	7,92 (dd, <i>J</i> = 1,2, 7,8) 7,43 (t, <i>J</i> = 7,4) 7,57 (t, <i>J</i> =7,3)	2-OC=O CH <sub>3</sub>	168,5 21,1	168,6 21,0
			7-OC=O <i>ipso</i> <i>orto</i> <i>meta</i> <i>para</i>	165,3 130,6 129,6 128,7 133,6	164,5 129,7 129,7 128,8 133,7
			5-OC=O CH <sub>3</sub>	169,7 20,6	169,8 20,7
			8-OC=O CH <sub>3</sub>	169,6 21,4	169,7 21,5
			11-OC=O CH <sub>3</sub>	169,9 20,9	170,0 21,2

\*  $\delta_H$  e  $\delta_C$  (CDCl<sub>3</sub> a 400MHz), conforme Corsino.

Este alcaloide apresentou potente atividade *in vitro* contra protozoários *Leishmania chagasi* e *Trypanosoma cruzi*, com valores de IC<sub>50</sub> de 1,4 e 41,9  $\mu$ M, respectivamente, bem como baixa citotoxicidade contra macrófagos peritoneais murinos (IC<sub>50</sub> de 1,8 mM) (SANTOS, 2012)

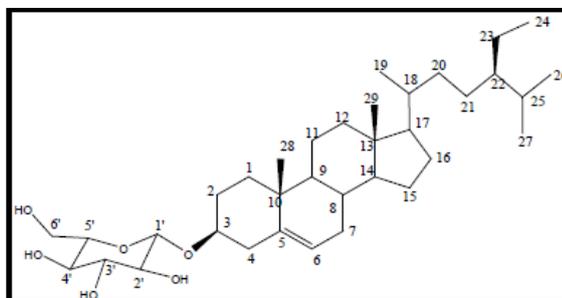
Contudo, apesar destes alcaloides já terem sido isolados há anos por outros grupos de pesquisas, ainda não obteve-se sua estereoquímica absoluta, apenas a estereoquímica relativa através de técnica de RMN bidimensionais, com este propósito foi testado reações de modificação estrutural com anidrido acético no intuito de ocorrer acetilação no grupamento OH, e a formação do sal com CH<sub>3</sub>I, no nitrogênio, na tentativa de obter o cristal destes alcaloides, porém não se obteve os resultados esperados.

## 5.6. Metabolito isolado Fração Acetato de etila

### 5.6.1 $\beta$ -sitosterol Glicosilado (M04)

O fitoesterol isolado na forma de um sólido branco, foi isolado a partir filtração em forma de coluna da fração Acetato de etila, foi identificado como  $\beta$ -sitosterol-glicosilado (Figura 26), através de técnicas de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  e comparação com dados da literatura (KHATUN, 2012). Devido a dificuldade de solubilizar este composto foi utilizado piridina deuterada como solvente.

Figura 26: Estrutura do  $\beta$ -sitosterol Glicosilado numerada (M04).



Nas Figuras 27 e 28 observa-se o espectro de RMN  $^1\text{H}$  e RMN  $^{13}\text{C}$  do  $\beta$ -sitosterol glicosilado respectivamente. Em relação aos espectros do  $\beta$ -sitosterol verifica-se aumento no número de hidrogênios na região de 3,5 ppm a 5,0 ppm referente aos H- 1', 2', 3', 4', e 5' e 6'. Já para os carbonos ocorre um aumento no número de sinais na região entre 64,1 e 79,6 ppm relativos aos carbonos da porção glicose, os quais possuem proximidade com grupamentos hidroxilas e por isso são observados nessa região do espectro. Outro sinal que pode ser atribuído é o sinal a 103,8 ppm referente ao carbono C-1', o qual esta conectado a dois oxigênios por isso seu deslocamento em campo baixo.

Figura 27: Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  do M04, em  $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ , a 400 MHz.

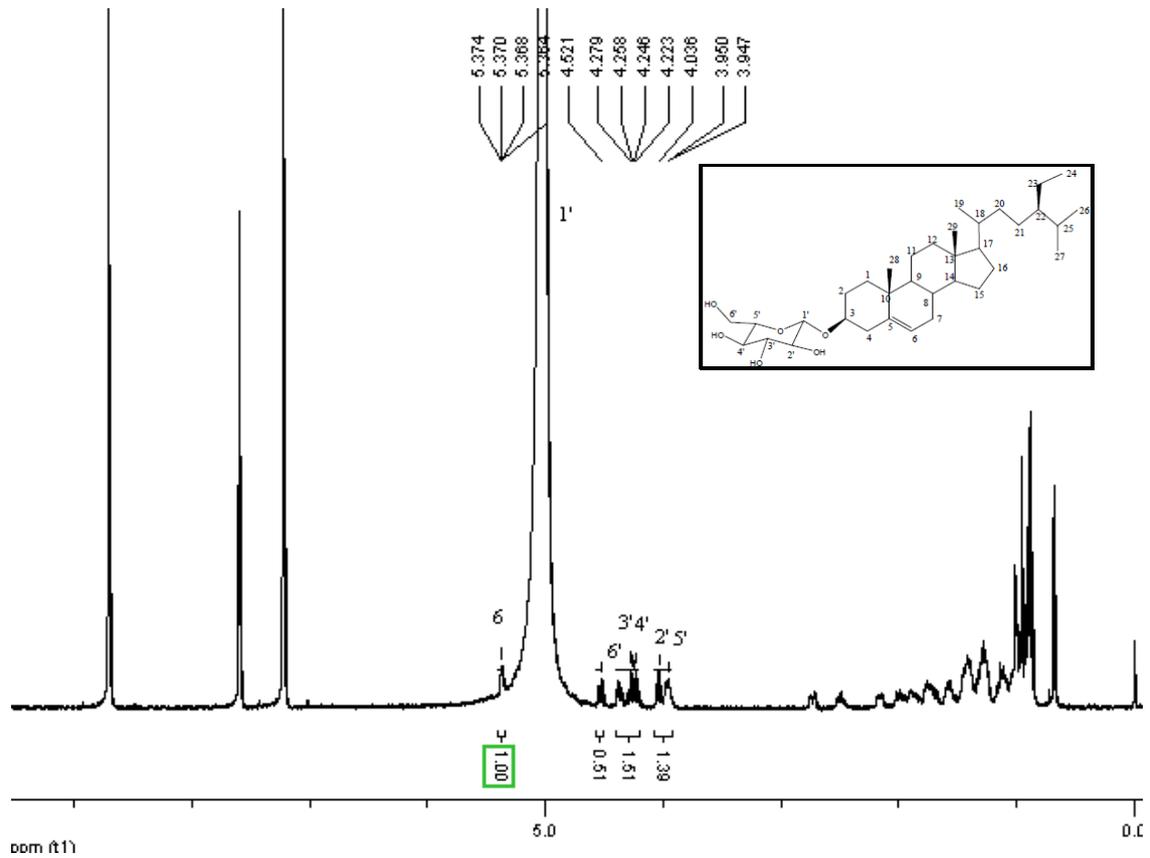
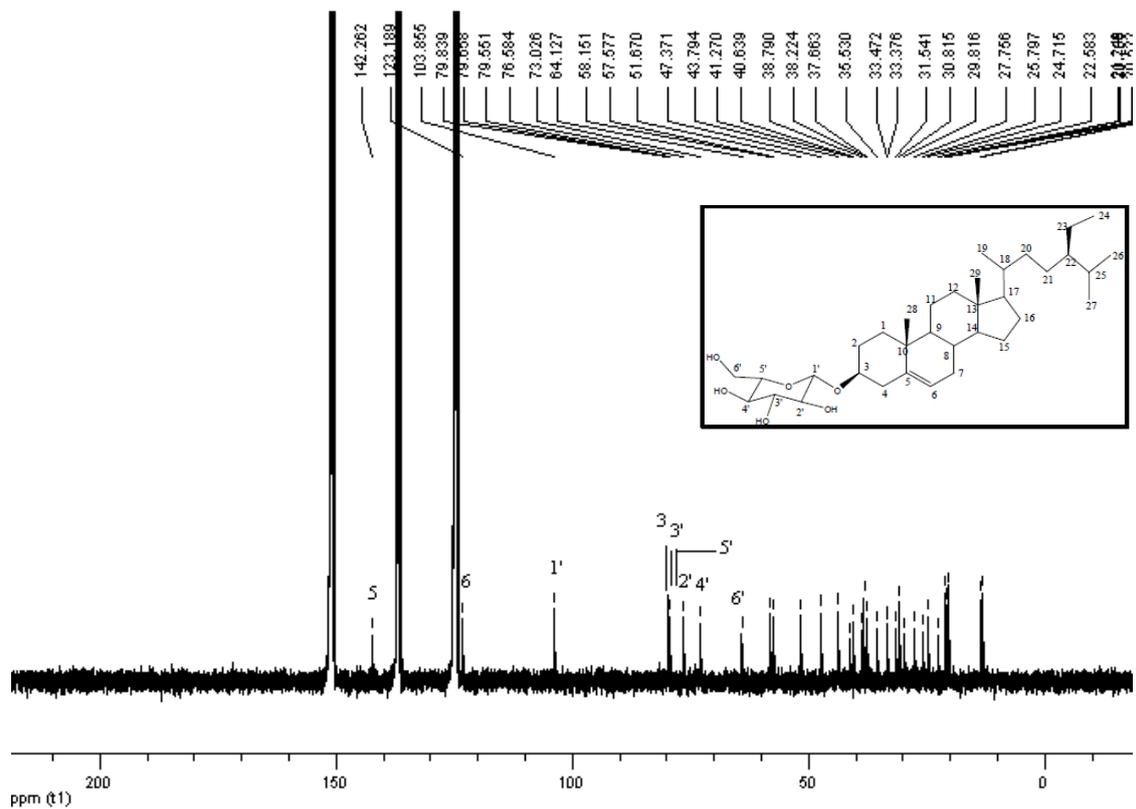


Figura 28: Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  do M04, em  $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ , A 100MHz.



Esta variação do composto  $\beta$ -sitosterol é frequentemente observada, pode ser encontrado na forma de derivados mais complexos, como ésteres de ácidos graxos, aromáticos ou glicosilados (PRIDHAM, 1967) isso confere ao  $\beta$ -sitosterol diversas outras atividades biológicas como: agente alelopático, feromônio de agregação, tem ação antiviral, anti-inflamatória, antibacteriano, atividade frente ao vírus da hepatite (ensaios *in vitro*) e ainda apresentando atividade citotóxica seletiva contra alguns tipos de células cancerígenas, além de atuarem na diminuição do colesterol total do plasma sanguíneo e no combate a arteriosclerose (enrijecimento das artérias) (ESPINDOLA, 2006; DROZDOVA, 2007).

Nozaki e colaboradores isolaram este esteroide glicosidado em 1986, na família celastraceae, na espécie *Maytenus diversifolia*, porém ainda não há registro na literatura de ter sido isolado na espécie *Maytenus ilicifolia* (NOZAKI, 1986).

## 5.7. Reações de Derivatização

Os esteróides constituem uma classe de compostos naturais com ampla distribuição na natureza, que apresentam em sua estrutura química um núcleo ciclopentanoperidrofenantreno. A diversidade das atividades biológicas desses metabólitos compreende o desenvolvimento e o controle do sistema reprodutor humano, como também indução da reprodução sexual em fungos aquáticos, além de funcionarem como cardiotônicos, precursores da vitamina D, anticoncepcionais orais, agentes anti-inflamatórios e agentes anabolizantes. Por possuírem esta diversidade os esteroides são bastante estudados, com intuito de melhorar sua eficácia na farmacologia são realizadas modificações em suas estruturas com intuito de otimizar os resultados já obtidos (FILHO, 2011).

Devido a quantidade considerável isolada do esteroide  $\beta$ -sitosterol foram realizadas reações de modificação estrutural, com intuito de realizar estudo de estrutura-atividade microbiológica dos derivados obtidos.

### 5.7.1 Acetato $\beta$ -sitosterol

Essa reação utilizou-se 20 mg do material de partida, anidrido acético em excesso, 2-3 gotas da base trietilamina e clorofórmio como solvente. Foi realizada sob agitação constante, 24 horas em temperatura ambiente, 25 °C, conforme Esquema 2. A reação foi monitorada por

CCD e após o período descrito, o produto M01-1 foi purificado em CC, com solvente hexano/acetona 1%. Observou-se rendimento de 50% (11 mg).

Esquema 2: Reação de Esterificação do  $\beta$ -sitosterol com anidrido acético.

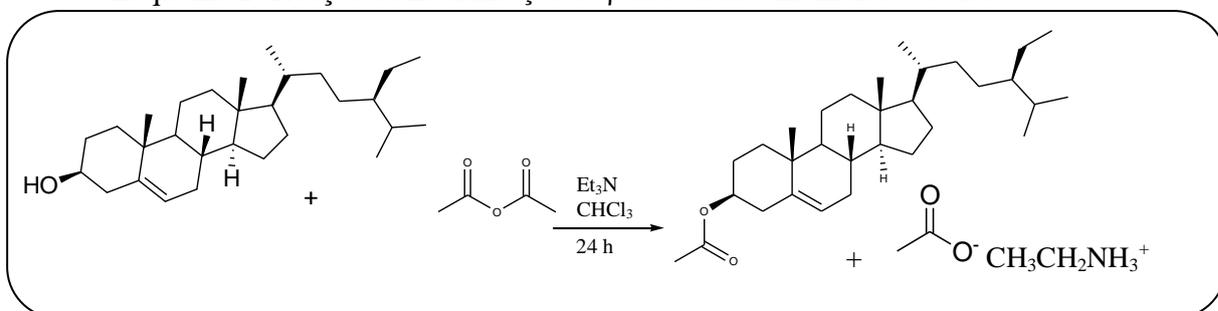
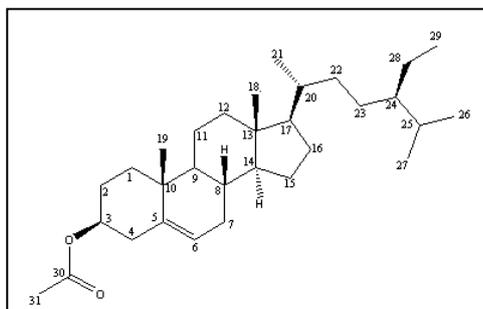


Figura 29: Estrutura numerada do acetato de  $\beta$ -sitosterol (M01-1).



A estrutura do derivado M01-1 (Figura 29) foi determinada através de espectroscopia de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  em  $\text{CDCl}_3$ , no qual foi possível identificar a formação do composto através do sinal na forma de um simpleto em 2,02 ppm referente a metila do grupo acetil, também pode-se observar que o H-3 teve efeito de blindagem, devido a presença da carbonila, alterando seu deslocamento para 4,60 ppm enquanto no material de partida era 3,50 ppm. No espectro de  $^{13}\text{C}$  acrescentou os sinal 170,5 ppm e 21,4 ppm, referente ao C-30 e C-31 respectivamente, bem característicos da carbonila e metila. Conforme figuras 30 e 31, com ênfase na diferenciação do composto obtido com material de partida:

Figura 30: Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  do M01-1, em  $\text{CD}_3\text{OD}$ , a 400MHz.

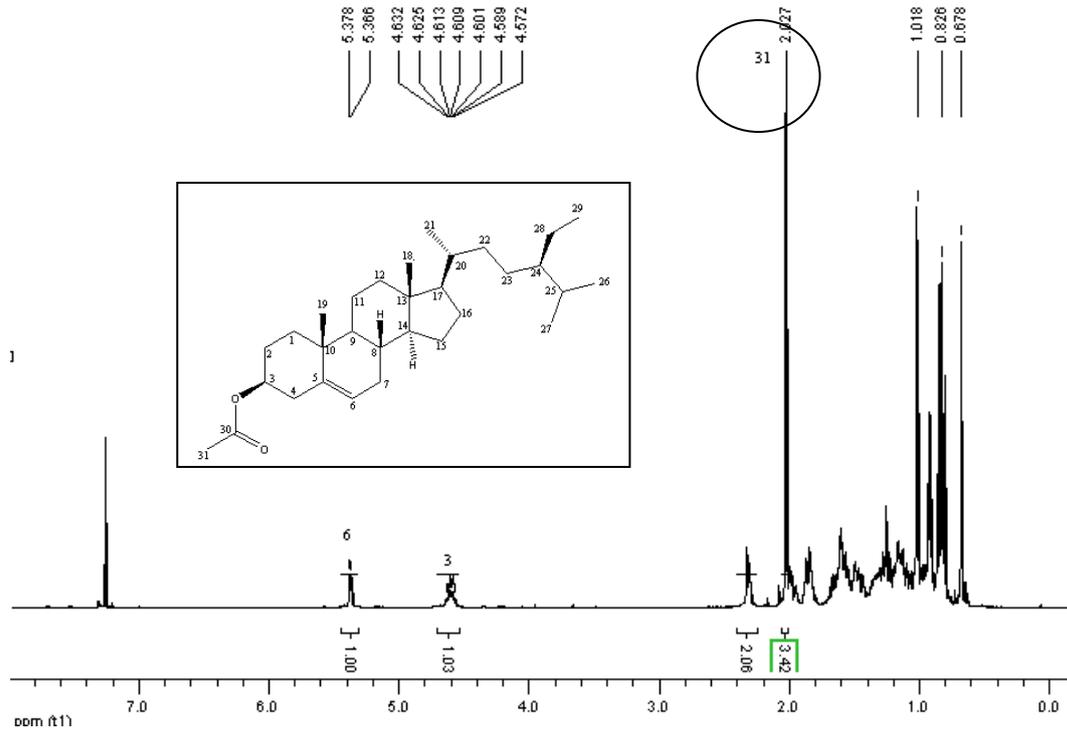
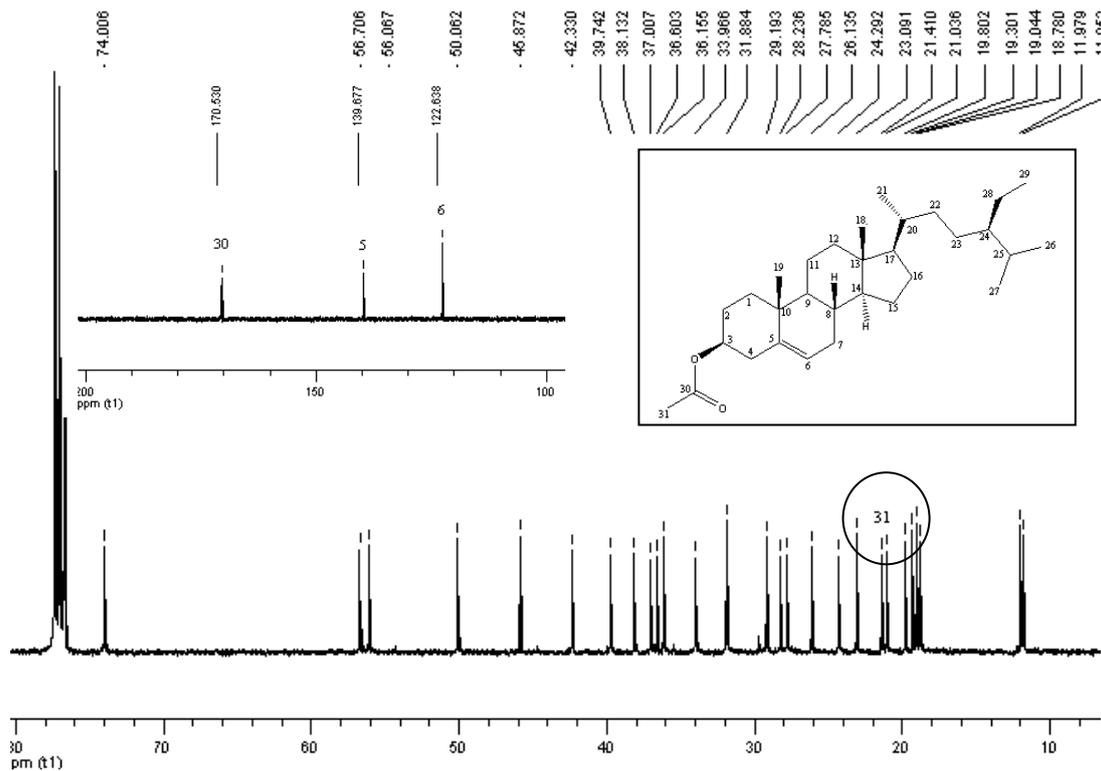


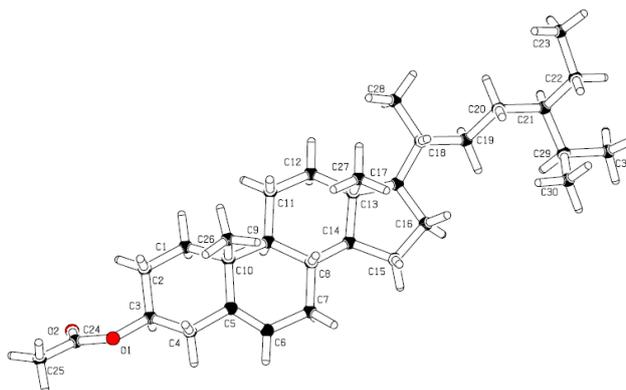
Figura 31: Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  do M01-1, em  $\text{CD}_3\text{OD}$ , a 100MHz.



Após purificação em CC, com solvente hexano, obteve-se um cristal incolor bem definido, o que permitiu sua identificação através do método de difração de raio-X.

A Figura 32 apresenta a estrutura obtida para este composto, com sua estereoquímica absoluta definida.

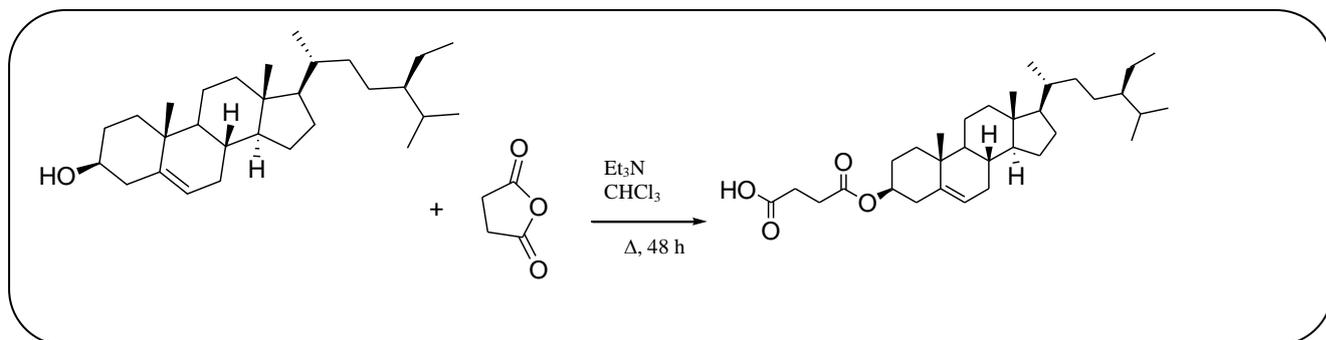
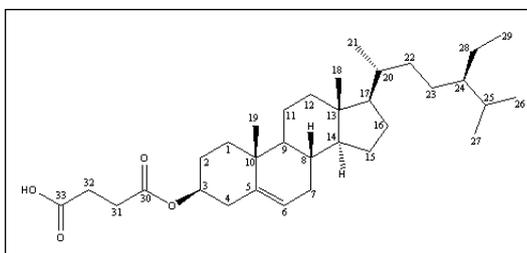
Figura 32: Representação obtida por difração de raio-X de M01-1.



Este cristal foi obtido em 1940 por Bernal, porém devido a época e aos recursos utilizados a medição cristalográfica foi bem limitada, com este cristal foi possível obter a estereoquímica absoluta desse composto, com total exatidão devido ao metal complexante ser Cobre (Cu), fato que não é relatado por Bernal. Comprovou-se que este composto tem a configuração: (S) C-3, (S) C-8, (S) C-9, (R) C-10, (S) C-14, (R) C-21.

### 5.7.2 Succinato de $\beta$ -sitosterol

Essa reação utilizou-se 30 mg do material de partida, anidrido succínico em excesso, 2-3gotas da base trietilamina e clorofórmio como solvente. Foi realizada sob refluxo e com agitação constante por 48 h. Conforme Esquema 3. A reação foi monitorada por CCD e após o período descrito o produto M01-2 foi purificado em CC, com solvente hexano/acetona 25%. Observou-se rendimento de 64,72% (24,5 mg).

Esquema 3: Reação de Esterificação do  $\beta$ -sitosterol com anidrido succínico.Figura 33: Estrutura numerada de Succinato de  $\beta$ -sitosterol (M01-2).

A estrutura do derivado M01-2 (figura 33) foi determinada através de espectroscopia de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  em  $\text{CD}_3\text{OD}$ , no qual foi possível identificar a formação do composto através dos sinais na forma simpleto e multipeto, 2,39 e 2,60 ppm referentes aos  $\text{CH}_2$  adicionados, também observa-se o efeito de blindagem sobre o H-3, devido a inserção da carbonila, alterando seu deslocamento para 4,60 ppm. No espectro de  $^{13}\text{C}$  salienta-se o acrescimento dos sinais em 176,0 e 173,7 ppm referente as carbonilas C-33 e C-30 respectivamente e dois sinais referentes aos  $\text{CH}_2$  relativos aos C-32 e C-31. Conforme figuras 34 e 35, com ênfase na diferenciação dos espectros em comparação ao padrão.

Figura 34: Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  do M01-2, em  $\text{CD}_3\text{OD}$ , 400MHz.

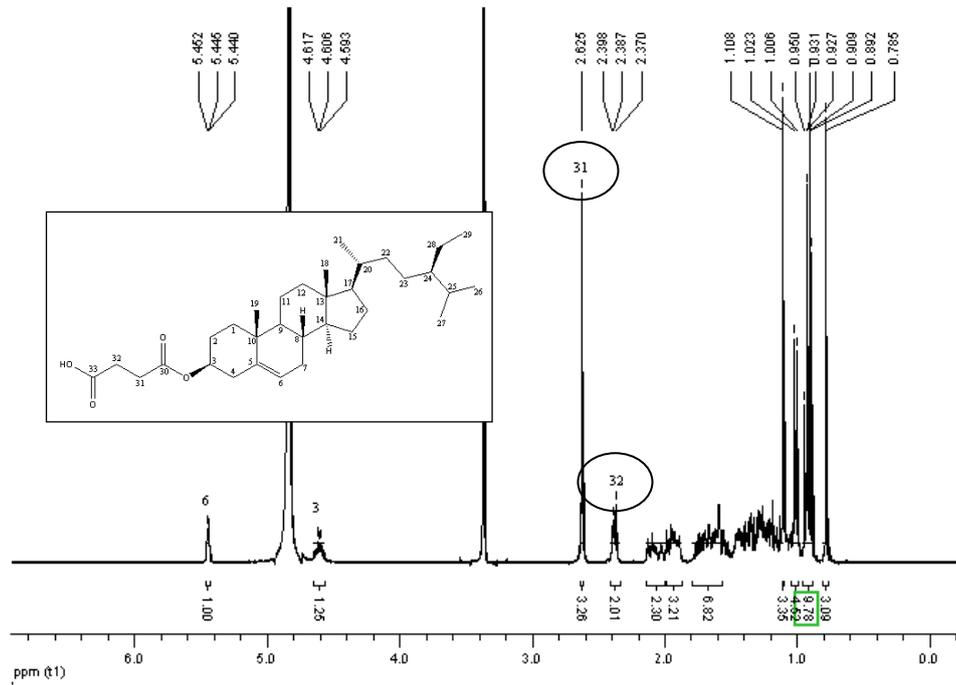
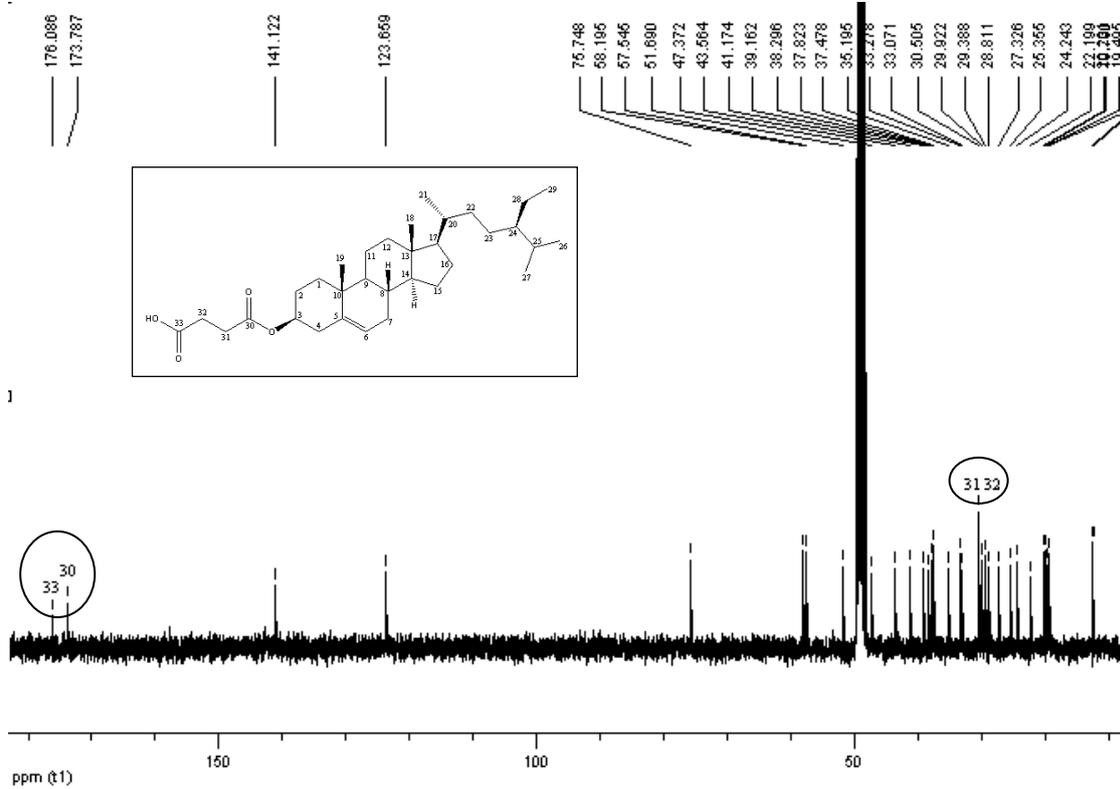


Figura 35: Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  do M01-2, em  $\text{CD}_3\text{OD}$ , a 100MHz.



### 5.7.3 Ftalato de $\beta$ -sitosterol (M01-3)

Essa reação utilizou-se 20 mg do material de partida, anidrido ftálico em excesso, 2-3 gotas da base trietilamina e clorofórmio como solvente. Foi realizada sob refluxo e com agitação constante por 72 horas. Conforme Esquema 4. A reação foi monitorada por CCD e após o período descrito observou-se a formação de um produto acreditando-se ser M01-3, foi purificado em CC, com solvente hexano/acetona 25%. Observou-se rendimento de 35,22% (9,5 mg).

Esquema 4: Reação de Esterificação do  $\beta$ -sitosterol com anidrido ftálico.

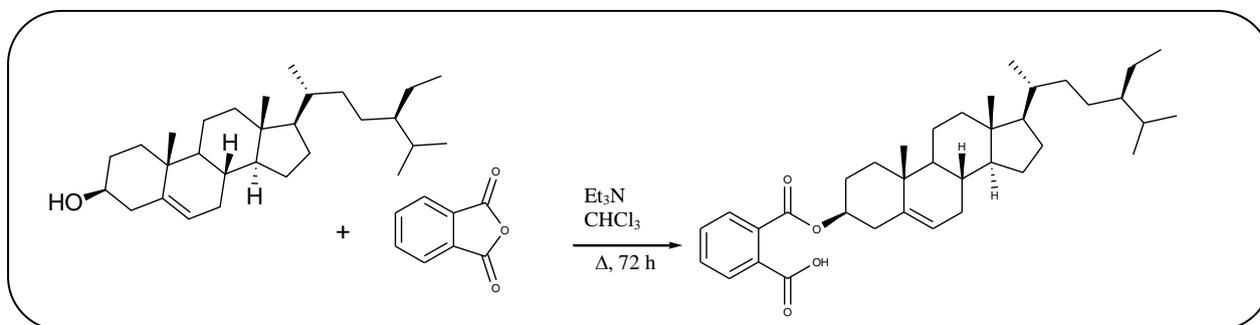
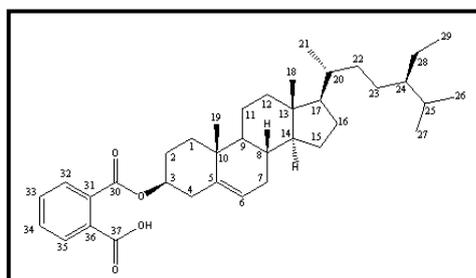


Figura 36: Estrutura numerada do Ftalato de  $\beta$ -sitosterol (M01-3).



A estrutura do derivado M01-3 (Figura 36) foi determinada através de espectroscopia de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  em  $\text{CD}_3\text{OD}$ , no qual foi possível identificar a formação do composto através dos sinais referentes ao anel aromático C-31-32-33-34-35-36, e das carbonilas C-30 e C-37, destacadas no na figura 37, espectro de RMN  $^{13}\text{C}$ .

No espectro de  $^1\text{H}$  também se confirma pela presença de 4H referentes ao anel aromático, destaca da figura 38.

Figura 37: Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  de M01-3, em  $\text{CD}_3\text{OD}$ , a 100MHz.

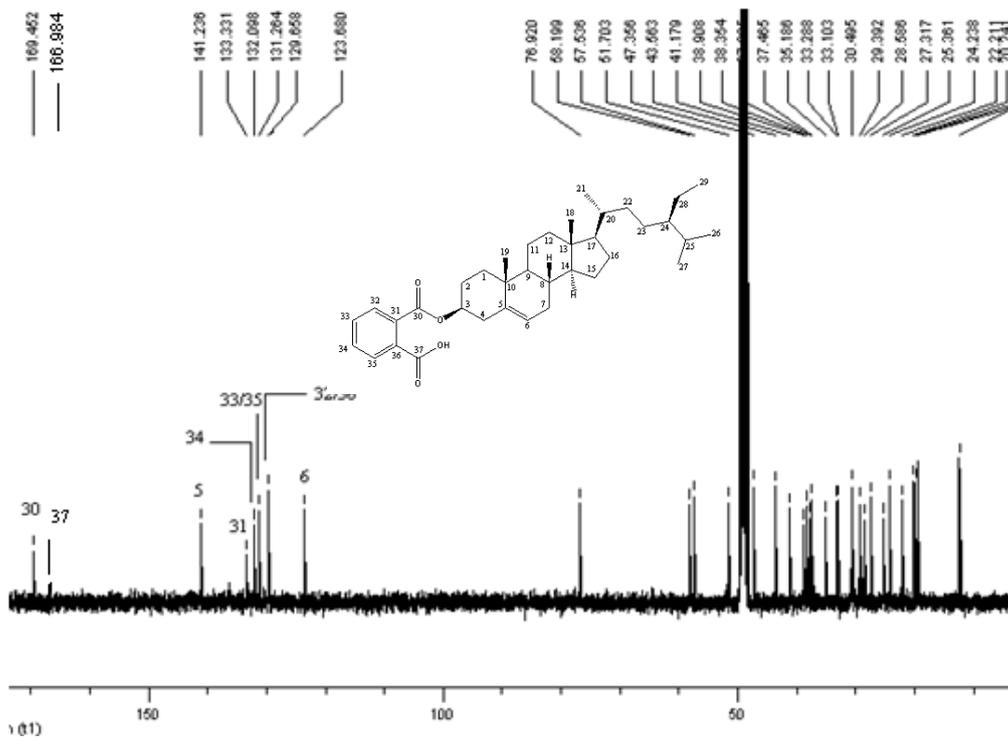
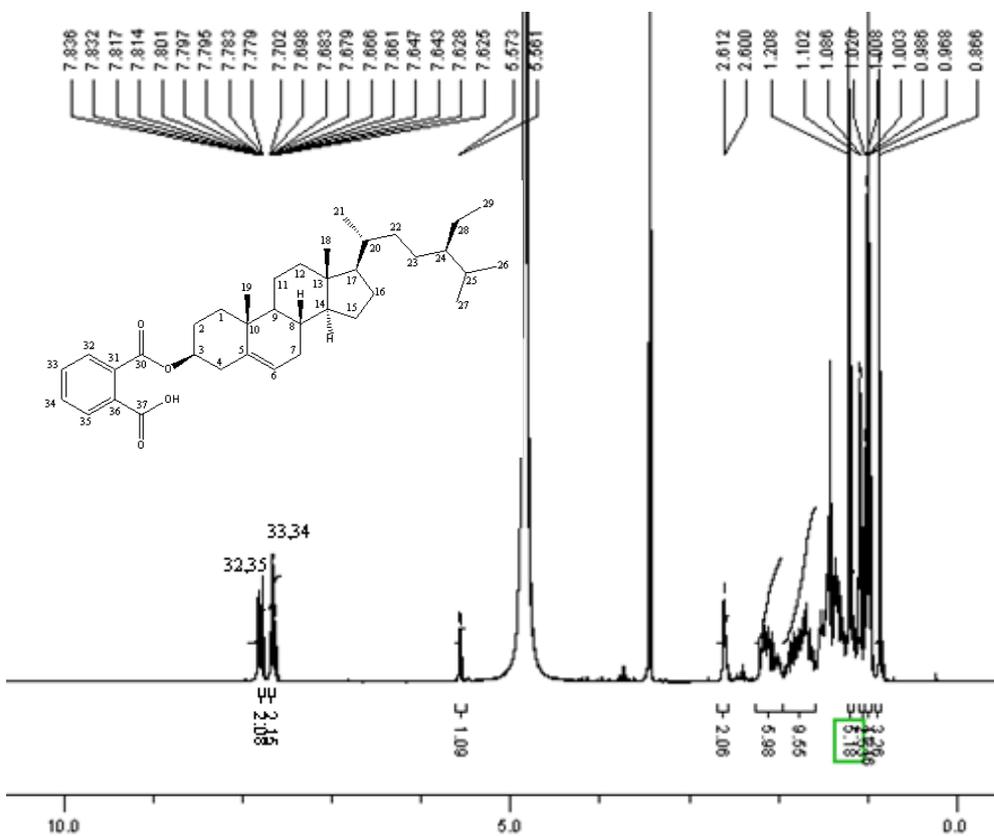


Figura 38: Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de M01-3, em  $\text{CD}_3\text{OD}$ , a 400MHz.

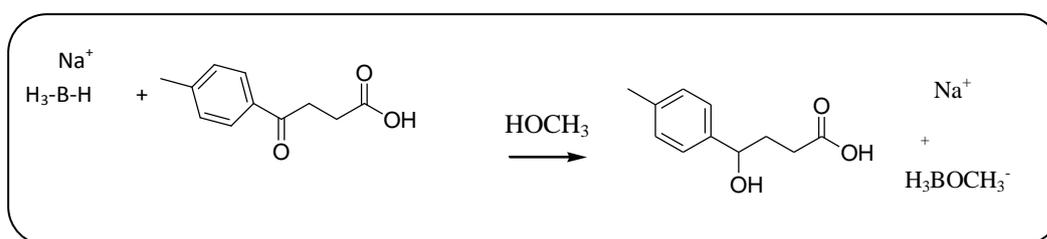


### 5.7.4 (S/R) 4-hidroxi-4-*p*-tolilbutanoato de $\beta$ -sitosterol (M01-4)

Para esta reação foi utilizado um reagente disponível no laboratório, que foi sintetizado através de uma acilação de Friedel-Crafts entre tolueno e anidrido succinico, com cloreto de alumínio anidro. Para ocorrer a reação de substituição na carboxila, foi reduzida a carbonila cetônica utilizando  $\text{NaBH}_4$  como agente redutor e Metanol como solvente, com intuito de obter os produtos com estereoquímica R e S, sob agitação por 2 h (Esquema 5). A reação de redução foi acompanhada por CCD, constatando a formação do produto, extraiu uma vez com acetato de etila, para eliminação de algum resquício do material de partida, em seguida acidificou o meio, com ácido clorídrico (HCl) 1 mol/L, para pH 5,0 e extraiu 3x com acetato de etila.

Em seguida, em um balão de fundo redondo, provido de agitação magnética, adicionou-se 40 mg (0,096 mmol) de  $\beta$ -sitosterol isolado da fração hexânica do extrato bruto, o produto da acilação de Friedel-Crafts reduzido, 20 mg dimetilaminopiridina (DMAP), 50 mg de dicicloexilcarbodiimida (DCCI) e solvente THF seco. A reação foi monitorada por CCD e após um período de 48 h, observou-se a formação do produto, em seguida foi filtrado o precipitado dicicloexiluréia (DCCU) e evaporado o solvente (THF) em um rotaevaporador, o bruto reacional foi purificado em CCDP de sílica gel, visto que o produto era visível em luz UV, utilizando como solvente hexano/Acetona 50%. Obteve-se o produto (S/R) 4-hidroxi-4-*p*-tolilbutanoato de  $\beta$ -sitosterol (figura 39) (20 mg, 35,22%). Conforme os esquemas 6 e 7:

Esquema 5: Reação de redução da carbonila com  $\text{NaBH}_4$ .



Esquema 6: Reação de Esterificação do  $\beta$ -sitosterol.

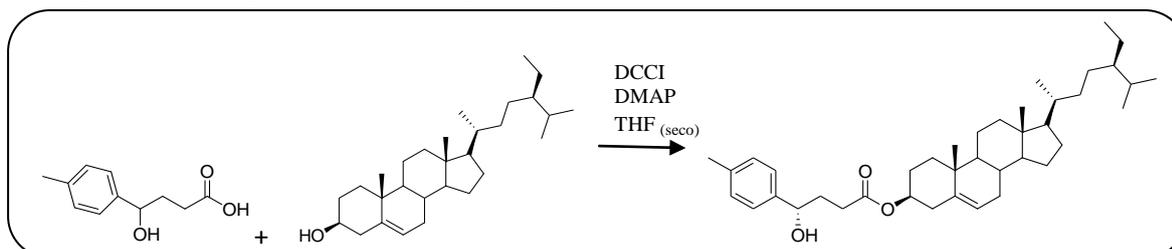
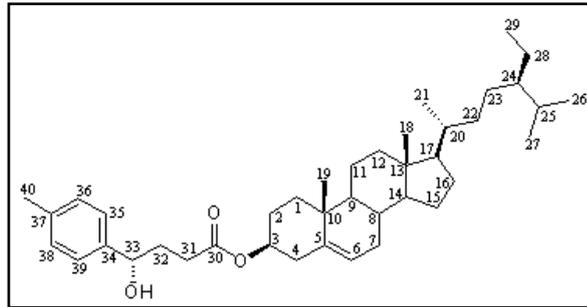


Figura 39: (S/R) 4-hidroxi-4-*p*-tolilbutanoato de  $\beta$ -sitosterol (M01-4)



A estrutura do derivado M01-4 (figura 39) foi determinada através de espectroscopia de RMN de  $^1\text{H}$  em  $\text{CDCl}_3$ , no qual foi possível identificar a formação do composto através dos sinais referentes ao anel aromático H-35-39 e H-36-38, com  $\delta$  7,20 ppm e  $\delta$  7,21 ppm. O H-33 por estar ligado um heteroátomo tem deslocamento muito característico 4,05 ppm. E os 4H referentes aos  $\text{CH}_2$  em 2,63 ppm.

No espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  é possível identificar o carbono ligado ao OH, com deslocamento em 81,2 ppm, característico de carbonos com substituintes que desblindem. Observa-se também os sinais referentes ao anel aromático com deslocamentos em 136,4 ppm (C-34), 125,3 ppm (C-35 e C-39), 129,4 ppm (C-36 e C-38) e 138,3 ppm (C-37) e sinal da carbonila C-30 em 176,7 ppm. Nas figuras 40 e 41 destaca-se os picos que comprovam a formação do produto.

Figura 40 : Espectro  $^1\text{H}$  do composto (S) 4-hidroxi-4-*p*-tolilbutanoato de  $\beta$ -sitosterol.

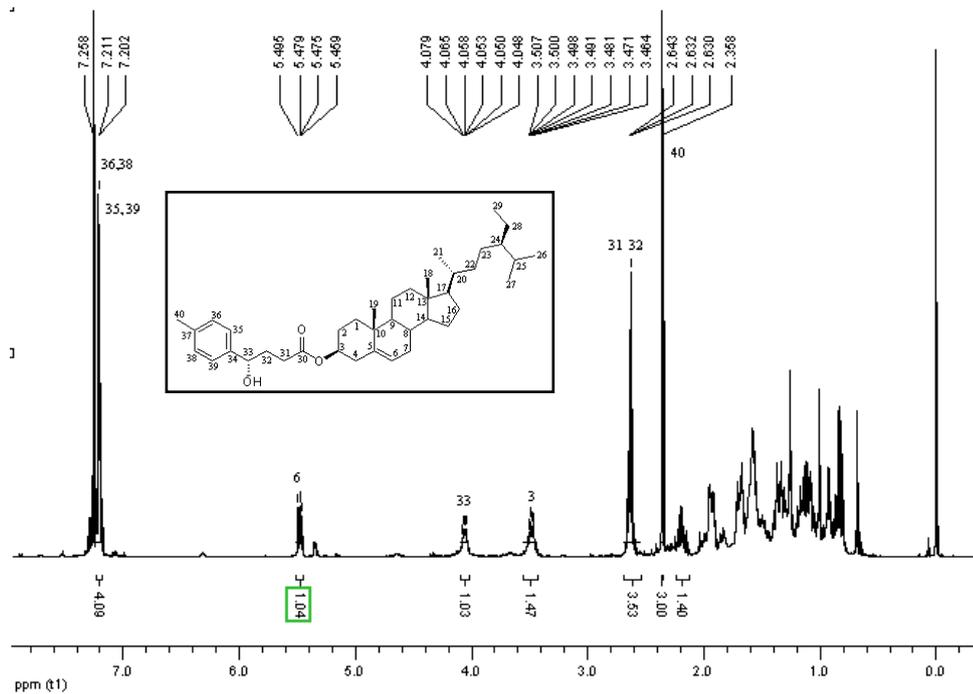
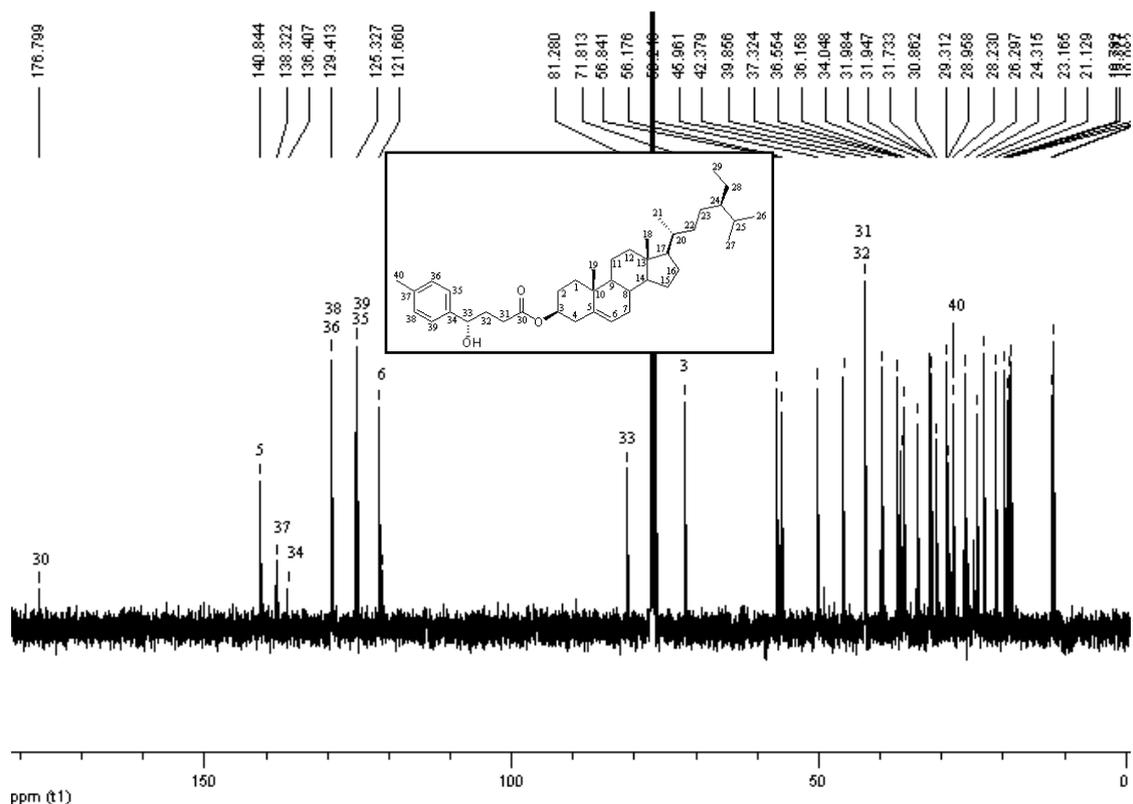


Figura 41: Espectro de  $^{13}\text{C}$  do composto o (S) 4-hidroxi-4-*p*-tolilbutanoato de  $\beta$ -sitosterol



Este derivado foi obtido na forma de cristal e foi encaminhado para medida de Raio-X para obtenção de sua estereoquímica absoluta e confirmação da configuração (S/R), visto que este derivado ainda não há relatos na literatura de sua síntese.

### 5.8. Atividade Antimicrobiana

No presente trabalho, foram avaliadas as atividades antibacteriana e antifúngica dos extratos e das amostras obtidas, foram testadas através do método de microdiluição em placas, como descrito na parte experimental, frente a 18 cepas, de micro-organismos oportunitas, sendo 11 bactérias (5 Gram-positivas e 6 Gram-negativa) e 7 Fungos.

De acordo com Tortora e colaboradores um patógeno oportunista geralmente é inofensivo em seu habitat natural, mas pode se tornar patogênico em indivíduos que se encontram debilitados ou traumatizados; hospedeiros que estejam em tratamento com antibióticos de amplo espectro; pacientes com sistema imune suprimido por drogas ou por distúrbios, entre outros. Outra característica que contribui para sua habilidade em causar doenças é o fato de eles estarem presentes, tanto dentro e fora dos organismos, ou no meio ambiente, em números relativamente altos (TORTORA, 2012).

Um exemplo bastante comum de bactéria oportunista é a *Echerichia coli*, abundante no intestino delgado e que pode torna-se fatal quando acessa o trato urinário e respiratório, ao causar graves infecções. Outra bactéria que também tem destaque e com bastante abundância na pele e fossas nasais dos seres humanos é a *Staphylococcus aureus*, que pode causar uma grande variedade de infecções, de espinhas e furúnculos a pneumonias e intoxicações alimentares, endocardites, síndrome do choque tóxico e septicemia, entre outros (SANTOS, 2007; TORTORA, 2012). As bactérias pertencentes ao gênero *Enterococcus* também são encontradas em áreas do corpo ricas em nutrientes, porém pobres em oxigênio, como por exemplo, o trato gastrointestinal, a vagina e a cavidade oral; nos últimos anos, tornaram-se a principal causa de infecções hospitalares, pois são consideradas responsáveis pela maiorias das infecções de feridas cirúrgicas, além de apresentarem alta resistência a maioria dos antibióticos disponíveis (TORTORA, 2012).

Destacam-se duas espécies do gênero *Enterobacter*, a *E. cloacae* e *E. aerogenes*, são amplamente distribuídas em humanos e animais, assim como na água, esgoto e no solo, também podem causar infecções do trato urinário e infecções hospitalares (TORTORA, 2012). Membros do gênero *Salmonella* são potencialmente patogênicos, comumente são encontrados no trato intestinal de muitos animais, especialmente de aves domésticas e gado; quando em condições sanitárias inadequadas, podem contaminar os alimentos e causar doenças gastrointestinais, como a salmonelose, a forma mais comum de infecção de origem alimentar. A doença mais grave causada por uma espécie de *Salmonella*, a *S. typhi*, é a febre tifóide.

Espécies do gênero *Shigella* são responsáveis pela disenteria bacilar ou shigelose, também conhecida como diarreia dos viajantes, sendo que há relatos que algumas linhagens são capazes de causar uma disenteria potencialmente fatal, fato que as difere das salmonelas, elas são encontradas no trato intestinal dos seres humanos e tornam-se patogênicas, anualmente, a mais de 165 milhões de pessoas pelo mundo (TORTORA, 2012; KOTLHOFF, 1999).

Amplamente distribuídos no solo e em fontes de água, espécies de *Pseudomonas* são capazes de crescer em qualquer ambiente úmido e com traços de matérias orgânicas, como filmes de sabão ou adesivos selantes, sendo resistentes a muitos antibióticos e desinfetantes. A espécie com maior destaque é a *Pseudomonas aeruginosa*, considerada um modelo de patógeno oportunista, a qual sob certas condições pode infectar o trato urinário e feridas e causar infecções sanguíneas (septicemia), abscessos e meningite; um grupo de risco frente a *P. aeruginosa* são os pacientes com queimaduras, visto que nesses casos o tratamento torna-se

bastante difícil e os casos fatais chegam a 40-50% (ESTAHBANATI, 2002; TORTORA, 2012). Outro gênero de bactérias encontrado no meio ambiente é o *Bacillus*; espécies desse gênero são comuns no solo e somente algumas são prejudiciais aos seres humanos, como a *B. cereus*, ocasionalmente identificada como a causa de intoxicações alimentares, principalmente em alimentos como o arroz (TORTORA, 2012).

Entre os fungos a *Candida albicans* é o exemplo mais comum de micro-organismo oportunista, é encontrada em pequena quantidade nas membranas mucosas do sistema geniturinário e da boca, porém é um fungo que se desenvolve abundantemente e causa sérias infecções quando ocorre um desequilíbrio entre a flora normal e os patógenos e conseqüentemente o pH é alterado. Outras espécies do gênero *Candida*, como a *C. tropicalis*, *C. kruzei* e *C. parapsilosis* também podem estar envolvidas nesse tipo de infecção, conhecida como candidíase. Fungos do gênero *Cryptococcus* são amplamente distribuídos em áreas contaminadas por fezes de pássaros, especialmente de pombos e causam uma doença chamada de criptococose; esta preocupante doença oportunista é a terceira entre as doenças que atacam o sistema nervoso central (SNC) e geralmente é diagnosticada como meningoencefalite de caráter insidioso. Esse fungo é transmitido via inalação de seus esporos e infecta principalmente indivíduos com sistema imunológico suprimido, como infectados pela síndrome da imunodeficiência adquirida (SIDA) (TORTORA, 2012; JUNIOR, 2006). Dentre os milhares micro-organismos oportunistas existentes em nosso meio, foram esses os disponíveis no laboratório para a realização deste trabalho,

Os resultados obtidos são expressos em função da concentração inibitória mínima (CIM) e concentração letal mínima (CLM). A CIM 50 é definida como a concentração inibitória mínima capaz de inibir em 50% o crescimento dos micro-organismos, a CIM 20 refere-se à capacidade de inibição de 20% do crescimento dos micro-organismos e a CLM a concentração mínima capaz de matar os micro-organismos. Os resultados obtidos nos testes são mostrados nas tabelas 11, 12, 13 e 14 e discutidos a seguir.

Tabela 11: CIM 50 e CLM frente a cepas de fungos, em µg/ml

Amostras/Microorg*.	<i>Cp</i>	<i>Ck</i>	<i>Ct</i>	<i>Ca</i>	<i>Cg</i>	<i>Cn</i>	<i>Sc</i>
E. B. Funil	250/500	<b>62,5/500</b>	250/500	NT	250/>500	<b>250/&gt;500</b>	250/250
E. B. Coluna	250/250	<b>62,5/250</b>	250/500	NT	250/500	<b>125/&gt;500</b>	250/250
F. Dicloro Funil	250/250	<b>62,5/&gt;500</b>	250/>500	NT	250/>500	<b>125/&gt;500</b>	250/>500
F. Dicloro Coluna	250/250	<b>62,5/&gt;500</b>	250/>500	NT	250/>500	<b>250/&gt;500</b>	250/>500
F. Acetato Funil	250/250	<b>62,5/250</b>	250/500	NT	250/>500	<b>125/&gt;500</b>	250/500
F. Acetato Coluna	250/>500	<b>31,2/500</b>	250/500	NT	250/250	<b>250/&gt;500</b>	250/500
F. Butanolica Funil	250/500	<b>31,2/500</b>	250/500	NT	250/250	<b>125/&gt;500</b>	250/500
F. Hexânica Funil	250/>500	<b>31,2/500</b>	250/250	NT	250/250	<b>125/&gt;500</b>	125/250
Cangorinina E-1	100/>200	<b>12,5/200</b>	100/>200	100/200	<b>50/200</b>	<b>100/100</b>	100/>200
Aquafoliumina E-1	100/>200	<b>12,5/200</b>	100/>200	100/200	<b>50/200</b>	<b>100/100</b>	100/>200
β-sitosterol	100/>200	<b>50/200</b>	100/>200	100/>200	<b>100/&gt;200</b>	<b>100/200</b>	100/>200
β-sitosterol glicosilado	100/>200	<b>50/200</b>	100/>200	100/>200	<b>200/&gt;200</b>	<b>100/&gt;200</b>	100/>200
Acetato de β- sitosterol	100/>200	<b>50/200</b>	100/>200	100/200	<b>100/200</b>	<b>100/200</b>	100/>200
Succinato de β – sitosterol	100/>200	<b>25/200</b>	50/200	100/200	<b>25/200</b>	<b>100/200</b>	100/>200
Ftalato de β –sitosterol	100/>200	<b>50/200</b>	50/200	100/200	<b>50/200</b>	<b>100/200</b>	100/>200
Fluconazol	3,1/50	<b>3,1/100</b>	100/100	3,1/25	100/100	<b>12,2/50</b>	12,2/50

\**Ca-Candida albicans*, *Cp-Candida parapslosis*, *Ck-Candida krusei*;; *Ct-Candida tropicalis*;; *Cg-Cryptococcus gatti*; *Cn-Cryptococcus neoformans* *Sc-Sacharomyces cerivisiae*

Tabela 12: CIM 20 frente a cepas de fungos, em µg/mL

Amostras/Microorg*.	<i>Cp</i>	<i>Ck</i>	<i>Ct</i>	<i>Ca</i>	<i>Cg</i>	<i>Cn</i>	<i>Sc</i>
E. B. Funil	125	<b>15,6</b>	125	NT	125	62,5	125
E. B. Coluna	125	<b>31,2</b>	-	NT	125	-	62,5
F. Dicloro Funil	125	<b>7,8</b>	-	NT	125	125	62,5
F. Dicloro Coluna	-	<b>7,8</b>	-	NT	-	125	125
F. Acetato Funil	125	<b>15,6</b>	125	NT	125	125	-
F. Acetato Coluna	125	<b>7,8</b>	125	NT	125	125	125
F. Butanolica Funil	-	<b>15,6</b>	-	NT	125	-	62,5
F. Hexânica Funil	125	<b>7,8</b>	-	NT	-	62,5	62,5
Cangorinina E-1	50	<b>6,2</b>	50	50	-	50	50
Aquafoliunina E-1	50	<b>6,2</b>	50	25	-	50	50
β-sitosterol	-	<b>12,5</b>	50	50	-	25	50
β-sitosterol glicosilado	-	<b>12,5</b>	50	-	50	100	50
Acetato de β- sitosterol	-	<b>6,2</b>	50	25	-	25	50
Succinato de β – sitosterol	-	<b>6,2</b>	-	25	-	50	25
Ftalato de β –sitosterol	-	<b>12,5</b>	25	-	-	100	50
Fluconazol	1,5	<b>1,5</b>	1,5	1,5	12,5	3,1	6,2

\**Ca-Candida albicans*, *Cp-Candida parapslosis*, *Ck-Candida krusei*;; *Ct-Candida tropicalis*;; *Cg-Cryptococcus gatti*; *Cn-Cryptococcus neoformans* *Sc-Sacharomyces cerevisiae*

Os resultados observados nas Tabelas 11 e 12, referente a atividade antifúngica, demonstram um maior potencial de inibição das amostras frente as cepas de *Candida krusei* e *Cryptococcus neoformans*, tanto para extratos, frações de extração e metabólitos secundário. Para *Cryptococcus gatti* apenas os produtos obtiveram resultados satisfatórios, porem observa-se que nenhum apresentou resultados fungicidas, ou seja capacidade letal frente aos fungos.

Os produtos derivados de  $\beta$ -sitosterol não tiveram resultados muito superiores ao composto original, apenas succinato de  $\beta$ -sitosterol teve capacidade inibitória de crescimento relevante.

Na literatura encontra-se relatos antimicrobiano frente a cepas de fungos apenas para os compostos friedelina e o friedelan que já foram testados *in vitro* sobre os fungos *S. aureus*, *E. coli*, e também contra o *Aspergillus niger* (SINGH, 2001).

Tabela 13: CIM 50 e CLM frente a cepas de bactérias, em µg/mL

Amostra/Microorg.*	Gram-positivas					Gram-negativas					
	<i>Sa</i>	<i>Bc</i>	<i>Ea</i>	<i>E</i>	<i>Bs</i>	<i>St</i>	<i>Ec</i>	<i>Bc</i>	<i>Mm</i>	<i>Ss</i>	<i>Pa</i>
E. B. Funil	NT	NT	NT	<b>125/&gt;500</b>	250/>500	125/>500	250/>500	250/>500	NT	<b>62,5/&gt;500</b>	125/>500
E. B. Coluna	NT	NT	NT	<b>125/&gt;500</b>	250/>500	250/>500	125/>500	125/>500	NT	<b>125/&gt;500</b>	125/>500
F. Dicloro Funil	NT	NT	NT	<b>62,5/&gt;500</b>	250/>500	125/>500	125/>500	250/>500	NT	<b>62,5/&gt;500</b>	250/>500
F. Dicloro Coluna	NT	NT	NT	<b>125/&gt;500</b>	250/>500	250/>500	250/>500	250/>500	NT	<b>250/&gt;500</b>	250/>500
F. Acetato Funil	NT	NT	NT	<b>62,5/&gt;500</b>	250/>500	125/>500	125/>500	250/>500	NT	<b>62,5/&gt;500</b>	125/>500
F. Acetato Coluna	NT	NT	NT	<b>62,5/&gt;500</b>	250/>500	125/>500	125/>500	250/>500	NT	<b>62,5/&gt;500</b>	250/>500
F. Butanólica Funil	NT	NT	NT	<b>250/&gt;500</b>	250/>500	125/>500	62,5/>500	250/>500	NT	<b>62,5/&gt;500</b>	125/>500
F. Hexânica Funil	NT	NT	NT	<b>250/&gt;500</b>	250/>500	250/>500	125/>500	250/>500	NT	<b>125/&gt;500</b>	250/>500
Cangorinina E-1	50//>200	100/>200	100/>200	<b>50/&gt;200</b>	100/>200	50/>200	100/>200	100/200	50/>200	<b>50/&gt;200</b>	50/200
Aquafoliumina E-1	100//>200	100/>200	100/>200	<b>25/&gt;200</b>	100/>200	50/>200	100/>200	100/200	50/>200	<b>50/200</b>	50/200
β-sitosterol	100//>200	200/>200	100/>200	<b>100/&gt;200</b>	200/>200	100/>200	100/>200	200/>200	100/>200	<b>100/&gt;200</b>	100/200
β-sitosterol glicosilado	100//>200	100/>200	100/>200	<b>100/&gt;200</b>	200/>200	100/>200	100/>200	200/>200	100/>200	<b>200/&gt;200</b>	100/200
Acetato de β-sitosterol	100//>200	100/>200	100/>200	<b>50/&gt;200</b>	200/>200	100/>200	100/>200	200/>200	50/>200	<b>100/&gt;200</b>	100/200
Succinato de β-sitosterol	<b>50//&gt;200</b>	<b>50/&gt;200</b>	<b>50/&gt;200</b>	<b>50/&gt;200</b>	<b>100/&gt;200</b>	<b>100/&gt;200</b>	<b>100/&gt;200</b>	<b>200/&gt;200</b>	<b>50/&gt;200</b>	<b>50/200</b>	<b>50/200</b>
Ftalato de β-sitosterol	100//>200	100/>200	100/>200	<b>100/&gt;200</b>	200/>200	100/>200	100/>200	200/>200	50/>200	<b>100/200</b>	100/200
Cloranfenicol	25/12,5	1,5/12,5	1,5/6,2	<b>1,5/25</b>	1,5/6,2	1,5/25	3,1/15,6	6,2/12,5	NT	<b>6,2/12,5</b>	25/50

\*Gram-positivas: *Sa* – *Staphylococcus aureus*, *Bc* - *Bacillus cereus*, *Ea* - *Enterobacter aerogenes*, *E* – *Enterococcus*, *Bs*- *Bacillus subtilis*. Gram-negativas: *St*- *Salmonella typhimurium*, *Ec*- *Escherichia coli*, *Bc*- *Burkholderia cepacia*, *Mm*- *Morganella morganii*, *Ss*- *Shigella sonnei*, *Pa* – *Pseudomonas aeruginosa*

Tabela 14: CIM 20 frente a cepas de bactérias, em µg/mL

Amostra/Microorg.*	Gram-positivas					Gram-negativas					
	<i>Sa</i>	<i>Bc</i>	<i>Ea</i>	<i>E</i>	<i>Bs</i>	<i>St</i>	<i>Ec</i>	<i>Bc</i>	<i>Mm</i>	<i>Ss</i>	<i>Pa</i>
E. B. Funil	NT	NT	NT	125	-	15,6	-	125	NT	31,2	15,6
E. B. Coluna	NT	NT	NT	31,5	-	31,2	<b>15,6</b>	31,2	NT	62,5	15,6
F. Dicloro Funil	NT	NT	NT	15,6	-	15,6	<b>7,8</b>	31,2	NT	31,2	31,2
F. Dicloro Coluna	NT	NT	NT	15,6	62,5	31,2	<b>7,8</b>	31,2	NT	125	-
F. Acetato Funil	NT	NT	NT	15,6	-	15,6	<b>7,8</b>	31,2	NT	15,6	15,6
F. Acetato Coluna	NT	NT	NT	15,6	-	15,6	<b>7,8</b>	62,5	NT	15,6	31,2
F. Butanolica Funil	NT	NT	NT	31,2	-	31,2	<b>7,8</b>	125	NT	31,2	15,6
F. Hexânica Funil	NT	NT	NT	-	62,5	31,2	<b>15,6</b>	125	NT	62,5	125
Cangorinina E-1	-	25	50	25	-	-	<b>50</b>	-	-	50	25
Aquafoliunina E-1	25	-	50	3,1	-	6,2	<b>25</b>	25	12,2	25	25
β-sitosterol	50	-	50	3,1	-	25	<b>50</b>	100	25	50	25
β-sitosterol glicosilado	-	50	-	50	-	50	-	-	50	-	25
Acetato de β-sitosterol	25	-	25	3,1	-	25	<b>25</b>	50	12,2	25	25
Succinato de β-Sitosterol	-	25	12,5	25	-	-	<b>25</b>	-	25	50	50
Ftalato de β-sitosterol	-	50	-	50	-	50	-	-	50	-	50
Cloranfenicol	<1,5	<1,5	<1,5	<1,5	<1,5	<1,5	<b>1,5</b>	3,1	3,1	3,1	12,5

\*Gram-positivas: *Sa* – *Staphylococcus aureus*, *Bc* - *Bacillus cereus*, *Ea*- *Enterobacter aerogenes*, *E* – *Enterococcus*, *Bs*- *Bacillus subtilis*. Gram-negativas: *St*- *Salmonella typhimurium*, *Ec*- *Escherichia coli*, *Bc*- *Burkholderia cepacia*, *Mm*- *Morganella morganii*, *Ss*- *Shigella sonnei*, *Pa* – *Pseudomonas aeruginosa*.

De acordo com os dados da Tabela 12 e 13, pode-se observar que os melhores resultados de CIM 50 e CIM 20 obtidos frente às cepas de microorganismos Gram-positivos foi para o *Enterococcus*. Entre os micro-organismos Gram-negativos, os melhores resultados observados foi para a cepa *Shigella sonnei*, tanto para os extratos quanto para os metabolitos isolados. Os resultados indicam que compostos e extratos de *Maytenus ilicifolia* possuem potencial bacteriostáticos porem não apresentaram capacidade bactericida, ou seja, não foram letais às cepas testadas.

Cabe ressaltar que os derivados de  $\beta$ -sitosterol obtiveram potencial inibitório igual ou superior ao composto isolado, destaca-se o succinato de  $\beta$ -sitosterol que frente a algumas cepas e bactérias teve um bom potencial de inibição do crescimento até com metade da concentração que o composto original, acredita-se que deve-se ao fato das carbonilas adicionadas a substância auxiliarem na inibição.

Na literatura estudos pioneiros como o de Lima et al. (1969) já demonstravam que a maitenina exibe forte atividade antimicrobiana contra várias bactérias Gram-positivas. Tais efeitos foram corroborados com a demonstração que os extratos das folhas e raízes têm efeito antimicrobiano para vários patógenos, dentre eles *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus* sp. os taninos gálicos podem inibir o crescimento de bactérias. Taninos derivados da catequina possuem atividade *in vivo* e *in vitro* contra *H. pylori* (MABE, 1999).

Com isso, observa-se que as cepas de micro-organismos utilizadas são de diferentes classes e mecanismos de ação no individuo. Os extratos e metabolitos da espécie *Maytenus ilicifolia* obteve resultados satisfatórios para bactérias relacionas a sistema gastrointestinal.

## 6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Conforme os objetivos propostos para este trabalho de estudo fitoquímico da casca da raiz da espécie *Maytenus ilicifolia* e modificações estruturais do composto  $\beta$ -sitosterol bem como a avaliação das atividades biológicas pode-se concluir que:

Com o método de extração utilizado foi possível isolar 4 metabólitos secundários presente nesta parte da planta como Cangorinina E-1, Aquafoliunina E-1,  $\beta$ -sitosterol e  $\beta$ -sitosterol glicosilado.

Em relação as modificações estruturais do composto isolado  $\beta$ -sitosterol, foram obtidos quatro derivados Acetato de  $\beta$ -sitosterol, Succinato de  $\beta$ -sitosterol, Ftalato de  $\beta$ -sitosterol e (S/R) 4-hidroxi-4-*p*-tolilbutanoato de  $\beta$ -sitosterol, com isso obteve-se a confirmação da estereoquímica do composto acetato de  $\beta$ -sitosterol e aguardando os resultados do raio-X do diastereoisomero (S/R) 4-hidroxi-4-*p*-tolilbutanoato de  $\beta$ -sitosterol.

A respeito das análises antimicrobianas, os extratos, frações e metabólitos testados apresentaram bons resultados principalmente contra as bactérias *Enterococcus* e *Shigella sonnei*, para os fungos foram frente as cepas de *Candida krusei* e *Cryptococcus neoformans*. Cabe resaltar que os compostos e extratos de *Maytenus ilicifolia* possuem potenciais bacteriostáticos e antifúngico porem não apresentaram capacidade bactericida e fungicida, ou seja, não foram letais às cepas testadas.

Quanto ao estudo da relação estrutura/atividade dos compostos obtidos observa-se que inserção de carbonilas contribuiu para resultados iguais ou superiores ao composto inicial, tendo resultado satisfatório o derivado Succinico de  $\beta$ -sitosterol, porém ainda não foi possível realizar o teste de atividade com o composto (S/R) 4-hidroxi-4-*p*-tolilbutanoato de  $\beta$ -sitosterol.

## 7. REFERÊNCIAS

BALONOVA, E. M.; KHALETSKII, A. M.; PESIN, V. G. Esters of  $\beta$ -sitosterol **Zhurnal Obshchei khimii**, V. 34, p. 2157-2158, 1964.

BARREIRO, E. J., BOLZANI, V. S. Biodiversidade: fonte potencial para a descoberta de fármacos. **Química Nova**, V. 32 (3), p. 679-688, 2009.

BASKAR, A. A., AL NUMAIR, K. S., PAULRAJ, M. G., ALSAIF, M. A., AL MUAMAR, M., IGNACIMUTHU, S.,  $\beta$ -Sitosterol prevents lipid peroxidation and improves antioxidant status and histoarchitecture in rats with 1,2-dimethylhydrazine-induced colon cancer. **J. Med. Food**. V. 15, p. 335-43, 2012.

BERNAL, J. D., DOROTHY, F.R.S, FANKUCHEN, I., X-Ray Crystallography and the chemistry of the steroids. Part I. **The Royal Society Publishing**. V.239, p. 135-182, 1940.

BOUIC, P. J., ETSEBETH, S., LIEBENBERG, R. W., ALBRECHT, C. F., PEGEL, K., VAN JAARSVELD, P. P. beta-Sitosterol and beta-sitosterol glucoside stimulate human peripheral blood lymphocyte proliferation: implications for their use as an immunomodulatory vitamin combination. **Int J Immunopharmacol**. V. 18, p. 693-700, 1996.

CARLINI, E. A., FROCHTENGARTEN, M. L., **Toxicologia clínica** (Fase I) da espinheira-santa (*Maytenus ilicifolia*).Brasília-Distrito Federal, p. 67-73. 1988.

CARVALHO, O. R. M.; **Tese de Doutorado**, Universidade Estadual de Campinas, 1992.

CHAI, J. W., KUPPUSAMY, U. R., KANTHIMATHI, M. S., Beta-sitosterol induces apoptosis in MCF-7 cells. **Malays J Biochem Molecular Bio**. V.16, p. 28-30, 2008.

CIPRIANI, T. R., MELLINGER, C. G., GORIN, P. A. J., IACOMINI, M; An arabinogalactan isolated from the medicinal plant *Maytenus ilicifolia*. **J. Nat. Prod**. V.67, p.703-706, 2004.

CORDEIRO, P. J. M., VILEGAS, J. H.Y., LANÇAS, F.M., HRGC-MS Analysis of Terpenoids from *Maytenus ilicifolia* and *Maytenus aquifolium* (“Espinheira Santa”). **J. Braz. Chem. Soc.**, V. 10 (6), p.523-526, 1999.

CORSINO, J., BOLZANI, V. S., PEREIRA, A . M., FRANÇA, S. C., FURLAN, M. Bioactive Sesquiterpene pyridine Alkaloids from *Maytenus Aquifolium*. **Phytochemistry**. V. 48, p. 136-140, 1998.

CUNHA, S. C., OLIVEIRA, R. S. Ação farmacológica da espinheira-santa: usos precauções. **Monografia de especialização**. Universidade Federal de Lavras. 2003.

DELGADO, M. P.; HERRERA, N.; CHÁVEZ, H.; ESTÉVEZ, B. A.; RAVELO, A. G.; CORTES, F.; et al.,. New terpenoids from *Maytenus apurimacensis* as MDR reversal agents in the parasite *Leishmania*. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, V. 16, p. 1425. 2008.

DROZDOVA, F. V.; MEKHTIEVA, A. P. Cytotoxic Derivatives of (22R, 23R)-Dihydroxystigmastan. **Russian Journal of Bioorganic Chemistry**, V. 33, p. 326–333, 2007.

DUAN, H., TAKAISHI, Y., MOMOTA, H., et al., Immunosuppressive Sesquiterpene Alkaloids from *Tripterygium wilfordii*. **J. Nat. Products**. V. 64, p. 582-587. 2001.

ESPINDOLA, J. A. A. **Floresta e ambiente**. Potencial alelopático de ésteres derivados do ácido cinâmico. V. 13, p. 53-60, 2006.

ESTAHBANATI, H. K.; KASHANI, P. P.; GHANAATPISHEH, F. Frequency of *Pseudomonas aeruginosa* serotypes in burn wound infections and their resistance to antibiotics. **Burns**, Vol. 28, 340-348, 2002.

FILHO, S. G. B., Feofitinas e Esteróides de *Turnera subulata* Sm. (Turneraceae). **Dissertação de Mestrado**. João Pessoa, PB. 2011.

FOOD AND DRUGS ADMINISTRATION (FDA): Code of Federal Regulations, Cap. 21, 300, 1991.

FURLAN, M. Estudo químico de *Maytenus evonymoides* Reiss. São Paulo. **Dissertação - Mestrado**. 1985.

GONZÁLEZ, A. G.; ALVARENGA, N.; RAVELO, A.; BAZZOCCHI, I.; FERRO, E.; et al., A new bioactive norquinonemethide triterpene from *Maytenus scutioides* (Celastraceae). **Bioorganic & Medicinal Chemistry** V. 815. 1996.

GUPTA, A., SHARMA, A. K., DOBHAL, M. P., SHARMA, M. C., GUPTA, R. S., Antidiabetic and antioxidant potential of b-sitosterol in treptozotocin-induced experimental hyperglycemia. **J. Diabetes**. V. 3, p. 29-37, 2011.

HAMMER, K. A.; CARSON, C. F.; RILEY, T. V.; Antimicrobial Activity of Essential Oils and Other Plants Extracts. **Journal of applied of food Microbiology**, V. 86, p. 985-990, 1999.

HOLTZ, R. L., FINK, C. S., AWAD, A. B., Beta-sitosterol activates the sphingomyelin cycle and induces apoptosis in LNCaP human prostate cancer cells. **Nutr. Cancer**. V. 32, p. 8-12, 1998.

ITOKAWA, H., NATSCHKE, S. L. M., AKIYAMA, T., HSIUNG, K., LEE, K. H. Plant-derived natural product research aimed at new drug Discovery. **J. Nat Med**. V. 62, p. 263–280. 2008

JUNIOR, V. C. P. et al. Criptococose associada à AIDS. A importância do cultivo da urina no seu diagnóstico. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Vol. 39(2), p. 230-232, 2006.

KHATUN, M. Sterols and Sterol Glucoside from *Phyllanthus* Species. Dhaka University Journal of Science, V. 60, p. 5-10, 2012.

KLUMPHU, P.; LIPSHUTZ, B. H. “Nok”: A Phytosterol-Based Amphiphile Enabling Transition-Metal-Catalyzed Couplings in Water at Room Temperature. **The Journal of Organic Chemistry**. V. 79, p. 888-900. 2014.

KOTLHOFF, K. L. et al. Global burden of Shigella infections: implications for vaccine development and implementation of control strategies. **Bulletin of the World Health Organization**, Vol. 77 (8), p. 651-666, 1999.

LIMA, O. G., COELHO, J. S. B., WEIGERT, E., D'ALBUQUERQUE, I. L., SOUZA M. A. M. Substâncias antimicrobianas de plantas superiores. **Rev. Inst. Antibioticos** V. 9 p. 17-25. 1969.

LOIZOU, S., LEKAKIS, I., CHROUSOS, G.P., MOUTSATSOU, P. Beta-sitosterol exhibits anti-inflammatory activity in human aortic endothelial cells. **Mol Nutr Food Res.**; V. 54, p. 551-8, 2010.

LORENZI, H., MATOS, F. J. A. Plantas medicinais no Brasil -nativas e exóticas. São Paulo: **Instituto Plantarum**, p. 120-122, 2002.

MAGALHÃES, P. M. **Agrotecnologia para o cultivo da espinheira santa**. artigo completo. CPQBA-UNICAMP, 2004. [on line]. Disponível na Internet via URL: <http://www.cpqba.unicamp.br/plmed/artigos/agroespsant.htm>.

MABE, K., YAMADA, M., OGUNI, I. In vitro and in vivo activities of tea catechins against Helicobacter pylori. **Antimicrob. Agents Chemother** V. 43, p. 1788-1791. 1999.

MADRIGAL, R. V.; ZILKOWSKI, B. W.; SMITH, JR.; Structure – activity relationships among maytansinoids in their effect on the European Corn Borer. **Journal of Chemical Ecology**, V. 11, p. 501, 1985.

McCARTHY, F. O.; et al. Synthesis, isolation and characterisation of  $\beta$ -sitosterol and  $\beta$ -sitosterol oxide derivatives. **Org. Biomol. Chem.**, V.3, p. 3059–3065, 2005.

MENDES, B. G., MACHADO, M. J., FALKENBERG, M., Triagem de glicolipídios em plantas medicinais. **ReV. Bras. Farmacogn.** V. 16, p. 568-575. 2006.

MMA, **Ministério do Meio Ambiente**. Disponível em: <http://www.mma.gov.br/biodiversidade/biodiversidade-brasileira>. Acesso em 22 de Maio de 2016.

MOON, E. J., LEE, Y. M., LEE, O. H., LEE, M. J., LEE, S. K., CHUNG, M. H, et al. A novel angiogenic factor derived from Aloe vera gel: beta-sitosterol, a plant sterol. **Angiogenesis**. V. 3, p. 117-23, 1999.

NCCLS. **Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically**; Approved Standard—Sixth Edition. NCCLS document M7-A6 (ISBN 1-56238-486-4). NCCLS, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 USA, 2003.

NIERO, R.; ANDRADE, S. F.; FILHO, V. C. A review of the ethnopharmacology, phytochemistry and pharmacology of plants the Maytenus genus. **Current Pharmaceutical Design**. V. 17, p. 1851, 2011.

NOZAKI, H., SUZUKI, H., HIRAYAMA, T., KASAI, R., WU, R. Y., LEE, K.H.; Antitumour triterpenes of Maytenus diversifolia. **Phytochemistry**, V. 25, p. 479-485. 1986.

OHSAKI A., IMAI Y., NARUSE, M., AYABE, S., KOMIYAMA, K., TAKASHIMA, J., Four new triterpenoids from Maytenus ilicifolia. **J. Nat. Prod.** V. 67, p. 469-471. 2004.

OLIVEIRA, R. S.; CUNHA, S. C.; COLAÇO, W.; Revisão da Maytenus ilicifolia Mart. ex Reissek, Celastraceae. Contribuição ao estudo das propriedades farmacológicas. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. V. 19, p. 650-659. 2009.

PANIAGUA, P. R., MADRIGAL, B. E., REYES-CADENA, S., MOLINA, J. D., GALLAGA, J. P., et. al. Genotoxic and cytotoxic studies of beta-sitosterol and pteropodine in mouse. **J. Biomed. Biotechnol.** V. 2005, p. 242-7, 2005.

PARK, C., MOON, D. O., RHU, C. H., CHOI, B. T., LEE, W. H., KIM, G. Y., CHOI, Y. H.,  $\beta$ -sitosterol induces antiproliferation and apoptosis in human leukemic U937 cells through activation of caspase-3 and induction of Bax/Bcl-2 ratio. **Biol Pharm Bull**. V. 30, p. 1317-23, 2007.

PRIDHAM, J. B. Terpenoids in Plants. London, **Academic Press.**, 1967.

PRIETO, J. M., RECIO, M. C., GINER, R. M., Anti-inflammatory activity of (3-sitosterol in a model of oxazolone-induced contact-delayed-type hypersensitivity. **Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromaticas Mayo.**; V. 5, p. 57-62, 2006.

QUEIROGA C. L., SILVA G. F., DIAS P. C., POSSENTI A. Evaluation of the anti-ulcerogenic activity of friedelan-3-betaol and friedelin isolated from *Maytenus ilicifolia* M.(Celastraceae). **J. Ethnopharmacol.** V. 72, p. 465-468. 2000.

RADOMSKI, M. I., WISNIEWSKI, C. Teores de elementos químicos hidrossolúveis em folhas e ramos de *Maytenus ilicifolia* Mart. **15º Simpósio de Plantas Mediciniais do Brasil**, São Paulo. 1998.

REGASINI, L. O., MARTINEZ, I., NOGUEIRA, C. T., GALUPPO, M.K., et al., Antiprotozoal Activity of Quinonemethide Triterpenes from *Maytenus ilicifolia* (Celastraceae). **Molecules**, V. 15, p. 6956-6973. 2010.

REYES, C. P.; NÚÑEZ, M. J.; JIMÉNEZ, I. A.; BUSSEROLLES, J.; ALCARAZ, M. J.; BAZZOCCHI, I. L. Activity of lupane triterpenoids from *Maytenus* species as inhibitors of nitric oxide and prostaglandin E2. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**. V. 14, 1573. 2006,

SAEIDNIA, S., MANAYI, A., GOHARI, A. R., ABDOLLAHI, M., The Story of Beta-sitosterol- A Review. **European Journal of Medicinal Plants**. V. 4. p. 590-609, 2014.

SAFARI GARDEN, Plantas Exóticas. Disponível em: <http://www.safarigarden.com.br/muda-de-espinaheira-santa-maytenus-ilicifolia>. Acesso em: 29/07/2016.

SANTOS, V. F. F. M., REGASINI, L. O., NOGUEIRA, C. R., et al., Antiprotozoal Sesquiterpene pyridine Alkaloids from *Maytenus ilicifolia*. **Journal of Natural Products**. V. 75, p. 991-995, 2012.

SANTOS, A. L. et al. *Staphylococcus aureus*: visitando uma cepa de importância hospitalar. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, Vol. 43 (6), p. 413-423, 2007.

SHIROTA, O., MORITA, H., TAKEYA, K., ITOKAWA, H. Sesquiterpene pyridine alkaloids from *Maytenus ilicifolia*. **Heterocycles**, V. 38, 1994<sup>a</sup>.

SHIROTA, O.; MORITA, H.; TAKEYA, K.; ITOKAWA, H. Cytotoxic aromatic triterpenes from *Maytenus ilicifolia* and *Maytenus chuchuhuasca*. **Journal of Natural Products**, V. 57, p. 1675, 1994<sup>b</sup>.

SHIROTA, O., MORITA, H., TAKEYA, K., ITOKAWA, H., Revised Structures of Cangorosins, Triterpene Dimers from *Maytenus ilicifolia*. **J. Nat. Prod.**, V. 60, p. 111-115, 1997.

SILVA, F. C.; DUARTE, L. P.; VIEIRA FILHO, S. A.. Celastráceas: Fontes de Triterpenos Pentacíclicos com Potencial Atividade Biológica. **Revista virtual de Química**. V. 6, 2014.

SINGH, B., DUBEY, M. M., Estimation of triterpenoids from *Heliotropium maifolium* Kohen ex Retz *in vivo* and *in vitro* antimicrobial screening. **Phytother Res.** V. 15, p. 231-234. 2001.

SOUSA, G. F., DUARTE, L. P., ALCANTARA, A. F.C., SILVE, G. D. F. et. al., New Triterpenes from *Maytenus Robusta*: Strutural Elucidation Based on NMR Experimental Data and Theoretical Calculations. **Molecules**. V. 17, p. 13439-13456. 2012.

SOUZA, L. M., CIPRIANI, T. R., IACOMINI, M. GORIN, P. A. J., HPLC/ESI-MS and NMR analysis of flavonoids and tannins in bioactive extract from leaves of *Maytenus ilicifolia*. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**. V.47, p.59–67. 2008.

SPIVEY, A. C.; WESTON, M.; WOODHEAD, S., Celastraceae sesquiterpenoids: biological activity and synthesis. **Chemical Society Reviews**, V. 31, p. 43, 2002.

SUGANO, M., MORIOKA, H., IKEDA, I. A comparison of hypocholesterolemic activity of beta-sitosterol and beta-sitostanol in rats. **J. Nutr.** V. 107, p. 2011-9, 1977.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia**. 10<sup>a</sup> edição. Ed. Artmed, 2012.

VALLADÃO, F.N. Estudo quimiotaxonômico em folhas de espécies da classe Magnoliopsida e estudo fitoquímico em polpa de fruto de maytenus salicifolia Reissek. Departamento de Química, ICEX, Universidade Federal de Minas Gerais, **Dissertação-Mestrado**. 2005.

VIEGAS J., C; BOLZANI, V. S. Os produtos naturais e a química medicinal moderna. **Química Nova**, V. 29, p. 326-377, 2006.

VILLASENOR, I. M., ANGELADA, J., CANLAS, A. P., ECHEGOYEN, D., Bioactivity studies on beta-sitosterol and its glucoside. **Phytother Res.** V.16, p. 417-21, 2002.

VIVANCOS, M.; MORENO, J. J.  $\beta$ -Sitosterol modulates antioxidant enzyme response in RAW 264.7 macrophages. **Free Radical Biology & Medicine**, V. 39, p. 91-97, 2005.

YI, W. X., MAO, C. Z., CHUN, W., WEN, S., FENG, Z. G.; Extraction and Crystal Structure of  $\beta$ -Sitosterol. **Chinese J. Struct. Chem.** V. 33, p. 801-806. 2014.

# **ANEXO**

Anexo I: Espectro de COSY, do alcaloide Aquafoliunina E-1 (M02).

