

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS FÍSICAS E MATEMÁTICAS
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

**ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DE TRITERPENOS
FRIEDELANOS DE *Maytenus robusta* Reiss.**

Renata Krogh

Dissertação submetida à Universidade Federal de Santa Catarina para a
obtenção do grau de “Mestre em Química”

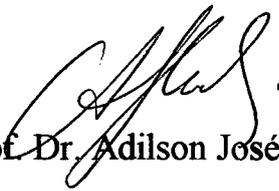
Florianópolis, dezembro de 1996

**ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DE TRITERPENOS
FRIEDELANOS DE *Maytenus robusta* Reiss.**

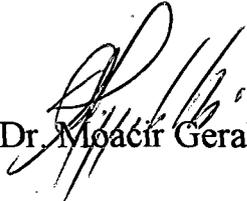
Renata Krogh

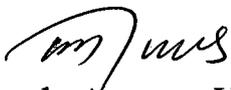
Esta dissertação foi julgada e aprovada em sua forma final pelo
Orientador e membros da Banca Examinadora

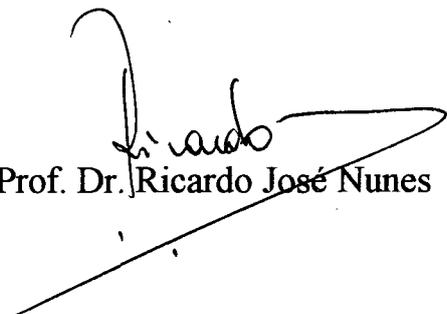

Prof. Dr. Moacir Geraldo Pizzolatti


Prof. Dr. Adilson José Curtius

Banca Examinadora:


Prof. Dr. Moacir Geraldo Pizzolatti


Prof. Dr. Rosendo Augusto Yunes


Prof. Dr. Ricardo José Nunes

Florianópolis, 09 de dezembro de 1996

Universidade Federal de Santa Catarina - UFSC

Aos meus pais,
Hans e Regina
pelo amor e dedicação
em todos os momentos da minha vida

“Ainda que eu falasse a língua dos Homens e dos Anjos.....sem amor eu nada seria”

(Camões)

Por isso agradeço muito
ao meu namorado
Adriano Andricopulo

“Devemos hoje ter em mente que reconhecer as plantas como nossos grandes ajudantes poderá abrir-nos as portas para a compreensão de inúmeros mistérios ligados à vida em harmonia”

Trigueirinho

1991

AGRADECIMENTOS

Ao professor Moacir Geraldo Pizzolatti, pela orientação, apoio e incentivo.

Às minhas irmãs, Karin e Erika, por serem acima de tudo minhas melhores amigas

Aos colegas de labor (atório): Jacir, Tânia, Guedes, Marize, Obdúlio e Niero pelos bons momentos e por tornarem muitas vezes este caminho mais fácil.

Aos professores Ricardo José Nunes e Inês Maria Brighente, pelo auxílio na parte formal da dissertação.

Ao professor Rosendo Augusto Yunes, pelo suporte e constante incentivo científico.

Aos professores do departamento de Química, que colaboraram para o meu crescimento profissional.

Aos demais professores e amigos que contribuíram para a realização deste trabalho.

À CAPES e ao CNPq, pelo suporte financeiro.

À Deus.

ÍNDICE

LISTA DE FIGURAS.....	iv
LISTA DE TABELAS.....	viii
LISTA DE ABREVIATURAS.....	ix
RESUMO.....	x
ABSTRACT.....	xii
CAPÍTULO 1 - INTRODUÇÃO.....	01
1.1 - Considerações Gerais sobre a Família e o Gênero <i>Maytenus</i>	04
1.2 - Considerações Gerais sobre a Espécie <i>Maytenus robusta</i>	05
1.2.1 - Descrição Botânica.....	06
1.2.2 - Posição Sistemática de <i>Maytenus robusta</i> Reiss.....	09
1.3 - Considerações sobre a Biossíntese de Terpenos.....	09
1.3.1 - Biossíntese de Metabólitos Secundários de Origem vegetal.....	11
1.3.2 - Rota Biossintética de Triterpenóides Friedelanos.....	14
1.4 - Revisão sobre o Estudo Químico da Família Celastraceae.....	17
1.4.1 - Ocorrência de Triterpenos.....	17
1.4.2 - Ocorrência de Alcalóides.....	20
1.4.3 - Ocorrência de Flavonóides.....	22

CAPÍTULO 2 - OBJETIVOS.....	24
CAPÍTULO 3 - PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL.....	25
3.1 - Introdução.....	25
3.2 - Materiais e Métodos.....	25
3.3 - Coleta e Identificação da Espécie Vegetal.....	28
3.4 - Análise Fitoquímica Preliminar.....	28
3.5 - Preparo dos Extratos Vegetais.....	28
3.6 - Obtenção dos Constituintes químicos.....	29
3.6.1 - Fracionamento do Extrato Bruto Etanólico.....	29
3.6.1.1 - Isolamento de F - 23 (3-oxo friedelano) (friedelina).....	30
3.6.1.2 - Isolamento de CM 8 (3,15-dioxo friedelano), CM-63 (3-oxo-29-hidroxi friedelano) e CM-4 (Stigmasterol).....	31
3.6.1.3 - Isolamento de FF - 5 (3 β -hidroxi friedelano) (friedelinol).....	32
3.6.2 - Pesquisa de Alcalóides.....	33
CAPÍTULO 4 - RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	35
4.1 - Ensaio Preliminares e Investigação Química do Extrato Alcoólico.....	35
4.2 - Análise da Fração Oleosa (MR 1 -10).....	36
4.2.1 - Identificação da Série Homóloga de Ésteres 2,8- dimetil metílicos.....	38
4.2.2 - Identificação de Stigma-3,5-dien-7-ona.....	44

4.3 - Isolamento e Identificação dos Triterpenos.....	46
4.3.1 - 3-oxo friedelano (friedelina) Fração - (F-23).....	47
4.3.2 - 3 β -hidroxi friedelano (friedelinol) Fração - (FF-5).....	56
4.3.3 - 3,15-dioxo friedelano Fração - (CM-8).....	64
4.3.4 - 3-oxo-29-hidroxi friedelano Fração - (CM-63).....	73
4.4 - Identificação de Stigma-5,22-dien-3 β -ol (Stigmasteról).....	80
4.5 - Identificação da Quercetina Fração (MR-46).....	85
4.6 - Pesquisa de Alcalóides.....	93
CAPÍTULO 5 - CONCLUSÕES.....	97
BIBLIOGRAFIA.....	99

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. Descrição botânica do ramo florífero de <i>Maytenus robusta</i>	08
FIGURA 2 - Cromatograma da fração oleosa MR-(1-10) obtida em coluna capilar de sílica fundida, OV - 1, 80 a 290 °C, 10 °C/min.....	37
FIGURA 3 - Proposta estrutural para a série homóloga de ésteres 2,8-dimetil- metílicos representando a fragmentação do íon base m/z 88 segundo Mc Lafferty, e os demais fragmentos indicados.....	39
FIGURA 4 - Espectros de Massas (1a a 1n) com impacto eletrônico de 70 eV representando uma série homóloga de ésteres 2,8-dimetil- metílicos.....	40
FIGURA 5 - Espectro de Massas com impacto eletrônico de 70 eV de stigmasta-3,5-dien-7-ona.....	45
FIGURA 6 - Fluxograma mostrando a obtenção dos compostos puros a partir do Extrato Bruto Hidroalcoólico de <i>Maytenus robusta</i> Reiss.....	46
FIGURA 7 - Cromatograma de 3-oxo friedelano (friedelina) F-23.....	47
FIGURA 8 - Espectro de Ultravioleta de F-23 (3-oxo friedelano) em clorofórmio.....	51
FIGURA 9 - Espectro de Infravermelho de F - 23 (3-oxo-friedelano) em pastilha comprimida de KBr.....	51
FIGURA 10 - Espectro de Massas com impacto eletrônico de 70eV de F-23 (3-oxo friedelano).....	52
FIGURA 11 - Proposta de fragmentação dos principais íons do Espectro de Massas do composto F-23 (3-oxo friedelano).....	48
FIGURA 12 - Espectro de RMN ¹ H (200 MHz, CDCl ₃) de F-23 (3-oxo friedelano).....	52
FIGURA 13 - Espectro de RMN ¹³ C (50 MHz, CDCl ₃) de F-23 (3-oxo friedelano).....	53

FIGURA 14 - Espectro de RMN ^{13}C ampliado na região 5 a 60 ppm (50 MHz, CDCl_3) de F-23 (3-oxo friedelano).....	54
FIGURA 15 - Espectro DEPT (50 MHz, CDCl_3) de F-23 (3-oxo friedelano).....	55
FIGURA 16 - Espectro de Infravermelho de FF-5 (3 β -hidroxi-friedelano) em pastilha comprimida de KBr.....	59
FIGURA 17 - Espectro de Massas com impacto eletrônico de 70eV de FF-5 (3 β -hidroxi-friedelano).....	60
FIGURA 18 - Espectro de RMN ^1H (200MHz, CDCl_3) de FF-5 (3 β -hidroxi- friedelano).....	60
FIGURA 19 - Espectro de RMN ^{13}C (50 MHz, CDCl_3) de FF-5 (3 β -hidroxi-friedelano).....	61
FIGURA 20 - Espectro de RMN ^{13}C ampliado na região de 10 a 70 ppm (50 MHz, CDCl_3) de FF-5 (3 β -hidroxi-friedelano).....	62
FIGURA 21 - Espectro de DEPT de FF-5 (3 β -hidroxi friedelano).....	63
FIGURA 22 - Espectro de Ultravioleta de CM-8 (3,15 dioxo friedelano) em metanol.....	67
FIGURA 23 - Espectro de Infravermelho de CM-8 (3,15-dioxo friedelano em pastilha comprimida de KBr.....	67
FIGURA 24 - Espectro de Massas com impacto eletrônico de 70eV de CM-8 (3,15-dioxo friedelano).....	68
FIGURA 25 - Espectro de RMN ^1H (200MHz, CDCl_3) de CM-8 (3,15-dioxo friedelano).....	68
FIGURA 26 - Espectro de RMN ^{13}C (50MHz, CDCl_3) de CM-8 (3,15-dioxo friedelano).....	69
FIGURA 27 - Espectro de RMN ^{13}C ampliado na região de 5 a 60ppm (50 MHz, CDCl_3) de CM-8 (3,15-dioxo-friedelano).....	70
FIGURA 28 - Espectro de DEPT de CM-8 (3,15-dioxo friedelano).....	71

FIGURA 29 - Espectro de HETCOR de CM-8 (3,15-dioxo friedelano).	72
FIGURA 30 - Espectro de Infravermelho de CM-63 (3-oxo,29-hidroxi friedelano) em pastilha comprimida de KBr.....	76
FIGURA 31 - Espectro de Massas com impacto eletrônico de 70eV de CM-63 (3-oxo,29-hidroxi friedelano).....	77
FIGURA 32 - Espectro de RMN ^1H (200 MHz, CDCl_3) de CM-63 (3-oxo-29-hidroxi friedelano).....	78
FIGURA 33 - Espectro de RMN ^{13}C (50 MHz, CDCl_3) de CM-63 (3-oxo,29-hidroxi friedelano).....	79
FIGURA 34 - Espectro de Infravermelho de CM-4 (stigmasterol) em pastilha comprimida de KBr.....	82
FIGURA 35 - Espectro de Massas com impacto eletrônico de 70eV de CM-4 (estigmasterol).....	83
FIGURA 36 - Espectro de RMN ^1H (200 MHz, CDCl_3) de CM-4 (estigmasterol).....	83
FIGURA 37 - Espectro de RMN ^{13}C (50 MHz, CDCl_3) de CM-4 (estigmasterol).....	84
FIGURA 38 - Espectro de Ultravioleta de MR-46 (quercetina) em metanol.....	88
FIGURA 39 - Espectro de Infravermelho de MR-46 (quercetina) em pastilha comprimida de KBr.....	88
FIGURA 40 - Espectro de Massas com impacto eletrônico de 70eV de MR-46 (quercetina).....	89
FIGURA 41 - Espectro de RMN ^1H (200 MHz, CDCl_3) de MR-46 (quercetina).....	90
FIGURA 42 - Espectro de RMN ^{13}C (50 MHz, CDCl_3) de MR-46 (quercetina).....	91
FIGURA 43 - Espectro HETCOR de MR-46 (quercetina).....	92

FIGURA 44 - Fluxograma demonstrativo do processo de extração da fração alcaloídica de <i>Maytenus robusta</i>	94
FIGURA 45 - Espectro de Ultravioleta da fração alcaloídica em metanol.....	95
FIGURA 46 - Cromatograma (CLAE) da fração alcaloídica: I) monitorado a 230nm, II) monitorado a 280 nm.....	96

LISTA DE TABELAS

TABELA I - Sistema de Eluição utilizado no fracionamento do extrato bruto etanólico.....	29
TABELA II - Sistema de eluição utilizado na purificação das frações MR-20 a MR-23 do extrato bruto etanólico.....	31
TABELA III - Sistema de Eluição utilizado na purificação das frações MR-42 a MR-45.....	32
TABELA IV - Sistema de eluição utilizado na purificação das frações F-189 a F-235.....	33
TABELA V - Resultados dos Ensaio Preliminares de <i>Maytenus robusta</i>	35
TABELA VI - Resultado da Investigação Química Preliminar de <i>Maytenus robusta</i>	36
TABELA VII - Atribuição dos dados de RMN ¹³ C para (F - 23) 3-oxo friedelano, comparando com os dados da literatura para friedelina. ⁴⁷	50
TABELA VIII - Atribuição dos dados de RMN ¹³ C para FF-5 (3,β hidroxi friedelano) e comparação com os dados da literatura. ⁷	58
TABELA IX - Atribuição dos dados de RMN ¹³ C para CM - 8 (3,15 dioxi friedelano) e comparação com os dados da literatura. ⁹	66
TABELA X - Atribuições dos dados de RMN ¹³ C para CM - 63 (3-oxo-29- hidroxi friedelano) e comparação com os dados da literatura. ³⁰	75
TABELA XI - Atribuições dos dados de RMN ¹³ C para MR - 46 (<i>Quercetina</i>) e comparação com os dados da literatura. ⁴⁶	87

LISTA DE ABREVIATURAS

Pf	Ponto de Fusão
IV	Infravermelho
UV	Ultravioleta
EM	Epectro de Massas
RMN ¹ H	Ressonância Magnética Nuclear de Próton
RMN ¹³ C	Ressonância Magnética Nuclear de Carbono
DEPT	Acoplamento Distorcido por Transferência de Polarização
CGAR	Cromatografia Gasosa de Alta Resolução
CGMS	Cromatografia Gasosa acoplada ao Espectro de Massas
CCD	Cromatografia em Camada Delgada
HPTLC	Cromatografia em Camada Delgada de Alta Resolução
CLAE	Cromatografia líquida de Alta Resolução (HPLC)
Rf	Mobilidade relativa do composto em relação ao solvente
Co-A	Coenzima-A
nm	nanômetro
cm ⁻¹	unidade de número de onda
δ	absortividade molar
ppm	parte por milhão da frequência aplicada
λ _{max}	comprimento de onda máximo
ν _{max}	frequência máxima
CDCl ₃	clorofórmio deuterado
AcOEt	acetato de etila
MeOH	metanol
Hex	hexano
Ome	metoxila

RESUMO

Maytenus robusta Reiss (Celastraceae) é uma planta característica da floresta ombrófila densa (Floresta Atlântica), apresentando maior densidade nas atuais áreas em formações secundárias. Por ser do mesmo gênero da espinheira-santa (*Maytenus ilicifolia* Reiss), uma planta consagrada no tratamento das afecções gástricas, optou-se em avaliar sua composição química.

O fracionamento do extrato bruto hidroalcoólico de *Maytenus robusta* Reiss proporcionou a obtenção de várias frações as quais foram analisadas por cromatografia gasosa de alta resolução e métodos espectroscópicos.

A fração MR 1-10, apresentou alto conteúdo em óleo, e foi submetida a análise por CGAR-EM, resultando na identificação de uma série homóloga de ésteres metílicos ramificados no carbono- α , e de um esterol.

A fração MR 20-23 mostrou alto rendimento de um sólido branco cuja análise por cromatografia gasosa indicou a presença de uma série de triterpenos sendo seis deles majoritários. Esta fração foi submetida a sucessivas purificações por cromatografia em coluna levando ao isolamento e identificação de quatro triterpenos friedelanos: 3-oxo friedelano (friedelina), 3,15-dioxo friedelano, 3-oxo-29-hidroxi friedelano e 3 β -hidroxi friedelano (friedelinol). Um flavonóide também foi isolado, a quercetina.

Estas estruturas foram determinadas através da análise dos dados espectrais de IV, UV, RMN ^1H , RMN ^{13}C , DEPT, técnicas

bidimensionais e Massas. O extrato bruto hidroalcoólico foi também submetido a metodologia clássica de extração de alcalóides.

A análise preliminar da fração alcaloídica, utilizando CCD com reveladores específicos e CGAR-EM revelou a presença de três alcalóides do tipo ansamacrolídeos.

ABSTRACT

Maytenus robusta Reiss (celastraceae) is a typical specie of dense “ombrofila” forest (Atlantic Forest); appering in higher density in the areas in secondary formation. This plant belongs to the some class of “espinheira-santa” (*Maytenus ilicifolia* Reiss), wich is largely used in the treatment of gastric affections.

From the crude hidroalcoholic extract of *Maytenus robusta* Reiss, it was obtained various fractions wich were analysed by high performance gas chromatography and spectrorcopic methodology.

The MR 1-10 fraction, showed a high oil percentage and was submitted to GC-MS analysis and resulted in a homologas series of branched methyl ester in carbon- α and a sterol.

The MR 20-23 fraction, showed high yield in a white solid wich by GC analysis was identified as a triterpene series with six as a majority. This fraction, was then submitted to various purifications by column chromatogaphy where four triterpenes were isolated and identified as: 3-oxo friedelano; 3,15-dioxo friedelano; 3-oxo-29-hidroxi friedelano; 3 β -hidroxi friedelano. The “quercetina” flavonoid was also isolated.

The structures were confirmed by analysis of IR, UV, ^1H nmr, ^{13}C nmr, DEPT and mass spectra.

The crude hidroalcoholic extract was also analysed by classical alkaloid extration methodology. The previous analyse of this fraction, by TLC and GC-MS showed the presence of three alkaloids from “ansamacrolides” type.

CAPÍTULO 1

INTRODUÇÃO

A vida do homem está intimamente ligada a seu ambiente, em particular aos vegetais, os quais lhe proporcionam alimento, vestimenta, materiais de construção, efeito estético, visual ou olfatório, saúde ou morte. Os vegetais, em diversas formas tem sido fator decisivo nos fenômenos sociais e econômicos determinantes da evolução da humanidade. O conhecimento e utilização total do mundo vegetal é uma meta cheia de recompensas intelectuais, materiais e econômicas.

A identificação de algumas plantas úteis e outras daninhas, começou com a exploração e cultivo das primeiras, surgindo assim a Agricultura. A observação de semelhanças e diferenças entre os vegetais e entre estes e outras formas de vida terrestre, originou uma grande área de estudo dentro da biologia, a Botânica, baseada na comparação da forma e das partes dos vegetais.¹

A história da Química abunda em intentos de separar substâncias puras dos vegetais. Entre eles destacamos o isolamento da sacarose por Margraff em 1747, e a obtenção por Scheele, entre 1769 e 1786, dos ácidos láctico, cítrico, oxálico, málico, gálico e tartárico. Em 1806, Serturmer marcou uma etapa importante na ciência, com a obtenção do primeiro alcalóide: a morfina. Anos depois, Pelletier e Caventou separaram de outras plantas medicinais a quinina, estriquinina e outros alcalóides. Liebig e Woehler em 1832, separaram da goma de benjuí o ácido benzóico e o benzaldeído. Das flores da dedaleira se isolou, em 1828, a digitalina. Abreviando uma larga história, a teoria estrutural da Química Orgânica

proposta em 1858, permitiu visualizar como estavam dispostos os átomos na molécula e inspirou a busca da estrutura e síntese dos produtos vegetais e assim, em 1868, Liebermann e Graebe determinaram a estrutura da alizarina e em 1873 realizaram sua síntese total.

Em 1923, Willstaetter sintetizou a cocaína, anteriormente isolada por Niemann em 1860. A partir de 1917, Robinson passou a estudar a biossíntese de alcalóides, pigmentos vegetais e outros produtos das plantas, enquanto que outros pesquisadores trataram de encontrar a relação entre as substâncias isoladas dos vegetais e sua classificação taxonômica, suas condições de cultivo e outros fatores externos. Se sabe que muitos dos quinze mil compostos isolados de plantas até 1977, são produtos de degradação que ocorrem durante o isolamento (muitos autores chamam de artefatos de isolamento) o que tem sido atribuído a ações de enzimas, agentes químicos externos e/ou condições de manuseio. Se tem consciência da imperfeição dos métodos atuais para o estudo dos componentes químicos das plantas; assim será evidente o interesse que desperta o estudo químico e farmacológico dos vegetais em químicos, botânicos, bioquímicos, médicos e outros cientistas.²

Desde o início da cultura humana, as plantas têm sido utilizadas pelo homem com vários objetivos para sua sobrevivência, mas seu uso medicinal foi de todo modo mistificado legando poderes a bruxos, feiticeiros, etc.

O uso popular folclórico das plantas constitui, em geral, a referência mais indicada para a descoberta de novos princípios ativos. Partindo-se diretamente das plantas de uso popular ou através da síntese de moléculas análogas às produzidas por essas plantas, foram obtidos compostos de atividades farmacológicas bem estabelecidas tais como, a digoxina, reserpina, tubocurarina e efedrina. De fato, 74% dos produtos

biologicamente ativos, derivados de plantas foram obtidos com pesquisas que visavam comprovar a autenticidade das informações populares de tal forma que ao longo dos tempos, a farmacologia tem incorporado ao arsenal terapêutico drogas de origem vegetal que, inicialmente foram utilizadas na medicina popular como remédios ou mesmo reputadas como tóxicas.³

Na antiguidade, quando a tecnologia estava voltada principalmente à produção do essencial, o homem tinha um comportamento mais cuidadoso em relação às plantas; neste fim de ^{século} ciclo, porém, a civilização inclinou-se totalmente para o consumo, e o respeito pela natureza foi desaparecendo. Isso não impede, contudo, que procuremos um correto relacionamento com o reino vegetal, preparando-nos assim, para os ciclos futuros, nos quais esse reino apresentará novos exemplares, ainda mais coerentes com o desenvolvimento superior do homem.

A utilização de plantas na medicina alternativa jamais perdeu seu interesse haja visto que não menos de 24% das prescrições médicas utilizam-se de princípios derivados de plantas e que 2.5% utilizam o extrato bruto delas.⁴

Um grande número de espécies das mais variadas famílias encontradas na flora mundial ainda é alvo de estudos no sentido de desvendar suas propriedades sejam elas química, botânica ou farmacológicas.

Muitas espécies da família Celastraceae, por exemplo, são conhecidas popularmente devido seu emprego no tratamento de distúrbios gástricos e tumores.⁵

Dentre as mais estudadas destacamos algumas espécies do gênero *Maytenus*, *Maytenus ilicifolia*, *Maytenus rothiana*, *Maytenus canariensis*, *Maytenus loeseneri*, *Maytenus serrata*, *Maytenus buchananii*, *Maytenus ovatus*, *Maytenus horrida*, *Maytenus boaria*, *Maytenus*

dispermus, *Maytenus disticha*, *Maytenus senegalsis*, *Maytenus buxifolia*. No presente trabalho daremos início ao estudo químico e farmacológico da espécie vegetal *Maytenus robusta*, uma planta de ocorrência comum na região do Vale do Rio Itajaí, no sentido de avaliar sua potencialidade.

1.1 - Considerações Gerais sobre a Família e o Gênero *Maytenus*

Com o intuito de realizar estudos químicos e farmacológicos da espécie *Maytenus robusta* Reiss, iniciamos uma ampla pesquisa bibliográfica sobre a família Celastraceae principalmente do gênero *Maytenus*.

A família Celastraceae compreende cerca de 60 gêneros de ampla distribuição nas regiões tropicais e subtropicais de todo o mundo. Exemplo frequente entre nós é o gênero *Maytenus*, com várias espécies arbustivas ou arbóreas nas matas e campos. Martius em suas excursões pelo Brasil dividiu a família Celastraceae em tribos atendendo aos tipos brasileiros.⁶

primeiro: tribo das Evonimeas

gênero *Maytenus*

segundo: tribo dos Eleodendros

gêneros *Plenckia*, *Eleodendra* e *Fraunhoferia*.

No Manual de Plantas Naturais Fanerogâmicas de Alberto Loefgren⁵ seguindo Engler-Frantl, foram suprimidas as tribos e assinalados os seguintes gêneros: *Maytenus*, *Plenckia*, *Faunhoferia*, *Cassine* e *Goupla*.

Dos gêneros da família das Celastraceas, *Maytenus* e *Plenckia* parecem ser os de distribuição mais tropical, enquanto que as 370 espécies são encontradas em todas as zonas; os gêneros *Plenckia* e *Fraunhoferia* são endêmicos do Brasil.

Análises químicas realizadas em espécies do gênero *Maytenus* mostram a presença de metabólitos secundários característicos para várias espécies, como triterpenos,^{7, 8, 9, 10} alcalóides,^{11, 12, 13} diterpenos,¹⁴ flavonóides^{15, 47} e sesquiterpenos.^{16, 17, 18}

Várias espécies do gênero *Maytenus* foram investigadas quanto sua composição micromolecular, sendo muito frequente a presença de triterpenos do tipo friedelano e de alcalóides, como mostram os dados da literatura das espécies de *Maytenus*.^{19, 20}

1.2 - Considerações Gerais sobre a Espécie *Maytenus robusta*



Maytenus robusta Reiss é uma planta característica da Floresta Ombrófila Densa (Floresta Atlântica), apresentando maior densidade nas atuais áreas em formações secundárias.

Por ser do mesmo gênero da Espinheira Santa (*Maytenus ilicifolia* Reiss) optou-se em avaliar sua composição química e perfil farmacológico.

Maytenus robusta Reiss, conhecida popularmente pelos nomes de “Cancerosa”, “Cancrosa”, “Espinho de Deus”, “Coromilho do Campo”, “Pau José (Paraná)”, “Sombra de Toiro (São Paulo)”, é uma espécie originária da América do Sul, encontrada em lugares de pouca insolação e brejos úmidos. Árvore de pequeno porte que floresce nos meses de setembro e outubro; suas folhas são usadas para falsificar a erva-mate.²¹

A espécie é utilizada na medicina popular, internamente, para tratamento dos males gástricos e intestinais, sob forma de infuso (abafado) ou decocto, obtido pela adição de água sobre uma certa quantidade de folhas moídas.^{22, 23} Externamente são usados o extrato aquoso ou mesmo a planta pulverizada sobre feridas e lesões cutâneas em geral. Não há registros de que seu uso prolongado traga inconvenientes, sendo somente contra-indicado para mulheres que amamentam, pois tem a propriedade de reduzir a secreção láctea.²³

A literatura registra ainda ação antitumoral que é atribuída a uma a presença de triterpenos e/ou alcalóides no gênero.^{7, 8, 9, 10, 11, 12, 13}

1.2.1 - Descrição Botânica ⁶

Totalmente glabra; ramusculos anuais, angularmente estriados; folhas esparsas, com pecíolos muito curtos; rigidíssimas e coriáceas; elíticas e subuladas, pontuadas, com os bordos desenvolvidos, bem sinuosos e com poucos dentes.

Nervuras de ambos os lados, sendo as laterais tênues, 8 a 10; fascículos de muitas flores; sépalas obtusas; pétalas três vezes mais longas que as sépalas; disco sub-carnoso, quinquecrenado.

Arbusto: um tanto baixo, á maneira da *Ilex aquifolium*; ramos grossos, fortes, eretos ou extendidos, cinzentos.

Folhas: espessas, disseminadas, com intervalos de 3 ou 8 linhas.

Pecíolo: comprimento de meia a uma linha, grosso, sulcado.

Limbo: comprimento de 9 linhas, até uma e meia polegada; largamente ou estreitamente elítico, truncado na base, agudo ou obtuso, leve quando seco, um pouco escuro na parte superior.

De ambos os lados 3 a 4 dentes, muitas vezes 1 a 2, ou faltam completamente; subulados, aguçados, com espinhos de uma e meia linha de comprimento.

A retícula das nervuras é visível de ambos os lados, ampla, nas mais novas obsoleta.

Estipulas: mais curtas que o pecíolo, ovais, agudas ou quase agudas; enfim, pouco acentuadas.

Pedunculos: uma linha de comprimento, um pouco mais curtas que a flor; a flor desabrochada recentemente tem duas e meia linhas de largura.

Cálice: com sépalas largamente ovais, um pouco obtusas, subciliadas.

Corolas: as pétalas são quase três vezes mais longas que as sépalas, ovalmente suboblôngas, membranosas.

Estames: duas vezes mais curtos que as pétalas.

Filetes: filiformes, no ápice curvados

Anteras: mais que duas vezes mais curta que os filetes e cordiformes.

Disco: interiormente um pouco côncavo.

Ovário: um tanto globoso.

Estilete: curto, subdividido.

Estigmas: dois a três dentes.

Pedunculo do fruto: cerca de uma a uma e meia linhas de comprimento.

Cápsulas: totalmente apoiadas no cálice; quatro a cinco linhas de comprimento; na frente ovais, achatadas, no estilete apiculadas, com 2 a 3 valvas, bem abertas, a princípio conchiformes, em seguida naviculares; interiormente uninervas, muito resistentes.

Sementes: uma a duas, achatadas, sublenticulares. escuras; quando secas cobertas de um tênue brilho.

Testa: tênue, quebradiço.

Embrião: com cotilédones iguais, aderentes, oleosos.

O comprimento da linha corresponde a 0.00256m.

Martius não se refere ao sexo das flores que examinou e ultimamente observou-se tratarem-se de “flores hermafroditas”, se bem que Loefgren diz que as flores do gênero *Maytenus* são em regra unissexuais. A espécie pode ser observada na figura 1.



- 1-Aspecto geral do ramo florífero
- 2-Porção da inflorescência
- 3-Flor em vista frontal
- 4-Estame
- 5-Ramo com frutos
- 6-Fruto aberto
- 7-Fruto fechado
- 8-Diagrama frontal

FIGURA 1. Descrição botânica do ramo florífero de *Maytenus robusta*.

1.2.2 - Posição Sistemática de *Maytenus robusta* Reiss²⁴

Classe: Dicotyledoneae

Família: Celastraceae

Gênero: *Maytenus*

Espécie: *Maytenus robusta*

1.3 - Considerações sobre a Biossíntese de Terpenos

Os isoprenóides são compostos frequentemente encontrados nos óleos essenciais, que Ruzicka²⁵ supôs que derivassem da polimerização do isopreno (2-metilbutadieno-1,3) pela união “cabeça-cauda” de duas moléculas de isopreno formando uma série de compostos com 10 unidades de carbono chamados de monoterpenos. A união cabeça-cauda de três, quatro, seis moléculas de isopreno originam respectivamente sesquiterpenos, diterpenos e triterpenos.

Na biossíntese dos chamados isoprenóides, o ácido mevalônico (ácido 3,5-dihidróxi-3-metilpentanóico), se converte no reativo pirofosfato de isopentenilo ou seu isômero. Durante esta reação, se forma o pirofosfato de geranilo cuja ciclização dá origem aos vários esqueletos de monoterpenos. A união de pirofosfato de geranilo com outro pirofosfato de isopentenilo forma o pirofosfato de farnesilo (precursor dos sesquiterpenos). A união de pirofosfato de farnesilo com seu isômero alílico origina os **triterpenos**. A união similar do pirofosfato de farnesilo com outra de pirofosfato de isopentenilo origina os diterpenos. As moléculas anteriores

podem ciclizar e oxidar originando diversos tipos de compostos policíclicos, como os triterpenóides, tetracíclicos e pentacíclicos.²⁶

Uma enorme variedade de substâncias de plantas são incluídas no mundo dos terpenóides, um termo que é usado para indicar que tais substâncias tem uma origem biossintética comum. O esqueleto carbonado dos terpenóides é constituído pela união de duas ou mais moléculas de isopreno, que é a unidade básica de formação dos mesmos. Assim, os terpenóides são classificados de acordo com o número de unidades de isopreno que os compõe: duas unidades (C₁₀)-monoterpeno, três unidades (C₁₅)-sesquiterpeno, quatro unidades (C₂₀)-diterpeno, seis unidades (C₃₀)-triterpeno, etc.

Embora os terpenóides sejam derivados biossinteticamente da molécula do isopreno este foi recentemente detectado como um produto natural nas folhas de Hamamelis,²⁷ esta substância não é o precursor *in vivo*.

O composto atualmente envolvido é o isopentenil-pirofosfato, CH₂=C(CH₃)CH₂CH₂OPP, que é formado a partir da Acetil CoA via ácido mevalônico, CH₂OH-CH₂C(OH,CH₃)CH₂CO₂H. Na biossíntese, dois isopentenil-pirofosfato são ligados para dar geranil-pirofosfato (C₁₀), o intermediário na formação de monoterpenos; geranil-pirofosfato e isopentenil-pirofosfato são, por vez, ligados para dar farnesil-pirofosfato (C₁₅), o intermediário na síntese dos sesquiterpenos. Triterpenóides são formados a partir de duas unidades de farnesil.

A era clássica dos triterpenóides pode-se dizer que iniciou em 1949 com a elucidação da estrutura do ácido oleanóico por Bischof.²⁷

Com o advento dos métodos analíticos mais poderosos e seu subsequente desenvolvimento ao longo dos anos, a elucidação estrutural de produtos naturais tornou-se um procedimento de rotina. Como

consequência, um grande número de novos triterpenóides incluindo uns muito complexos foram isolados e suas estruturas estabelecidas.

A literatura observada revelou que as investigações não se limitam ao isolamento e elucidação estrutural, mas também incluem estudos quimiotaxonômicos na distribuição de vários triterpenóides em plantas.

Triterpenóides ocorrem na natureza tanto no estado livre (aglicona) ou ligado a uma ou mais moléculas de açúcar (glicosídeo) como as saponinas. Os triterpenos livres são geralmente isolados no estado puro por extração por solvente e cromatografia em coluna do extrato em alumina ou sílica gel. Hidrólises ácida ou enzimática das saponinas são aplicadas antes da purificação por cromatografia dos triterpenos. Entretanto, hidrólise ácida das saponinas muitas vezes levam a artefatos. Hidrólise enzimática das saponinas não é sempre inteiramente bem sucedida.²⁸

Várias técnicas cromatográficas tem sido largamente usadas para o isolamento e identificação dos triterpenóides. O desenvolvimento dessas técnicas tem tornado o trabalho de isolamento e identificação muito mais fácil.

A grande potencialidade da biossíntese das plantas é muito bem ilustrada no grupo de metabólitos secundários conhecidos como “terpenóides” e é um dos grupos de compostos mais amplamente distribuído na natureza junto com os alcalóides e os compostos fenólicos.

1.3.1 - Biossíntese de Metabólitos Secundários de Origem Vegetal²⁶

Os dados que se dispõem permitem supor que as formas mais primitivas de material com as chamadas características vitais, foram unicelulares e marinhas. Seus componentes químicos deviam ser: minerais, proteínas, carboidratos e ácidos nucleicos.

Ao longo de milhões de anos foram evoluindo, aumentando e modificando suas substâncias originais; se agrupando e especializando, primeiro, em colônias de seres unicelulares e, depois, em conjuntos pluricelulares. A especialização conduziu aos tecidos e estes aos órgãos, direcionados todos eles a realização harmônica e cada vez mais eficiente dos chamados processos vitais.

Os organismos, ao se evoluírem, se dividiram em duas classes: animais e vegetais. Ambos conservaram comuns suas principais macromoléculas e as unidades que as formam, proteínas e aminoácidos, polissacarídeos e açúcares, lipídeos e ácidos graxos, ácidos nucleicos e bases púricas, bases pirimídicas, pentoses e ácido fosfórico, enzimas e coenzimas. Tanto em animais como em vegetais, a energia para os fenômenos vitais provém de uma cadeia de oxidações e reduções, nas quais se produzem substâncias (metabólitos) úteis para o crescimento ou reprodução do organismo e substâncias tóxicas que geralmente são excretadas. Também é análogo o sistema de preservação das características do organismo, chamado informação genética. Mas a diferenciação e especialização se encaixam com os mecanismos empregados pelo organismo em suas transformações de matéria e energia (metabolismo), que experimenta algumas modificações, particularmente no que se refere a substâncias metabolizáveis, seja de organismos autotróficos ou heterotróficos e elaboração de metabólitos secundários.

No aspecto externo, as tendências evolutivas se manifestam por diferenças morfológicas e fisiológicas, notáveis em organismos muito distantes e sutis nos muito próximos; isto permite utilizar a informação adquirida por muitos bioquímicos para explicar, em termos de considerações biogenéticas, a presença de um mesmo metabólito secundário em plantas

pertencentes a taxons diferentes (espécies, gêneros, tribos, etc.), ou de metabólitos similares na mesma planta.

Também é importante que ao propor a estrutura ou a estereoquímica de um metabólito secundário, se discuta sua veracidade com base na sua biossíntese, pois se não há um mecanismo biossintético razoável é provável que a estrutura seja incorreta. As considerações biogenéticas tem servido para planejar sínteses das substâncias e para o desenho de novas moléculas que interferem com determinado processo metabólico.

A observação cuidadosa das estruturas de numerosos produtos naturais permite emitir hipóteses razoáveis sobre suas possíveis biossínteses. Além do interesse que tem para o bioquímico, para o químico orgânico significa uma base firme para:

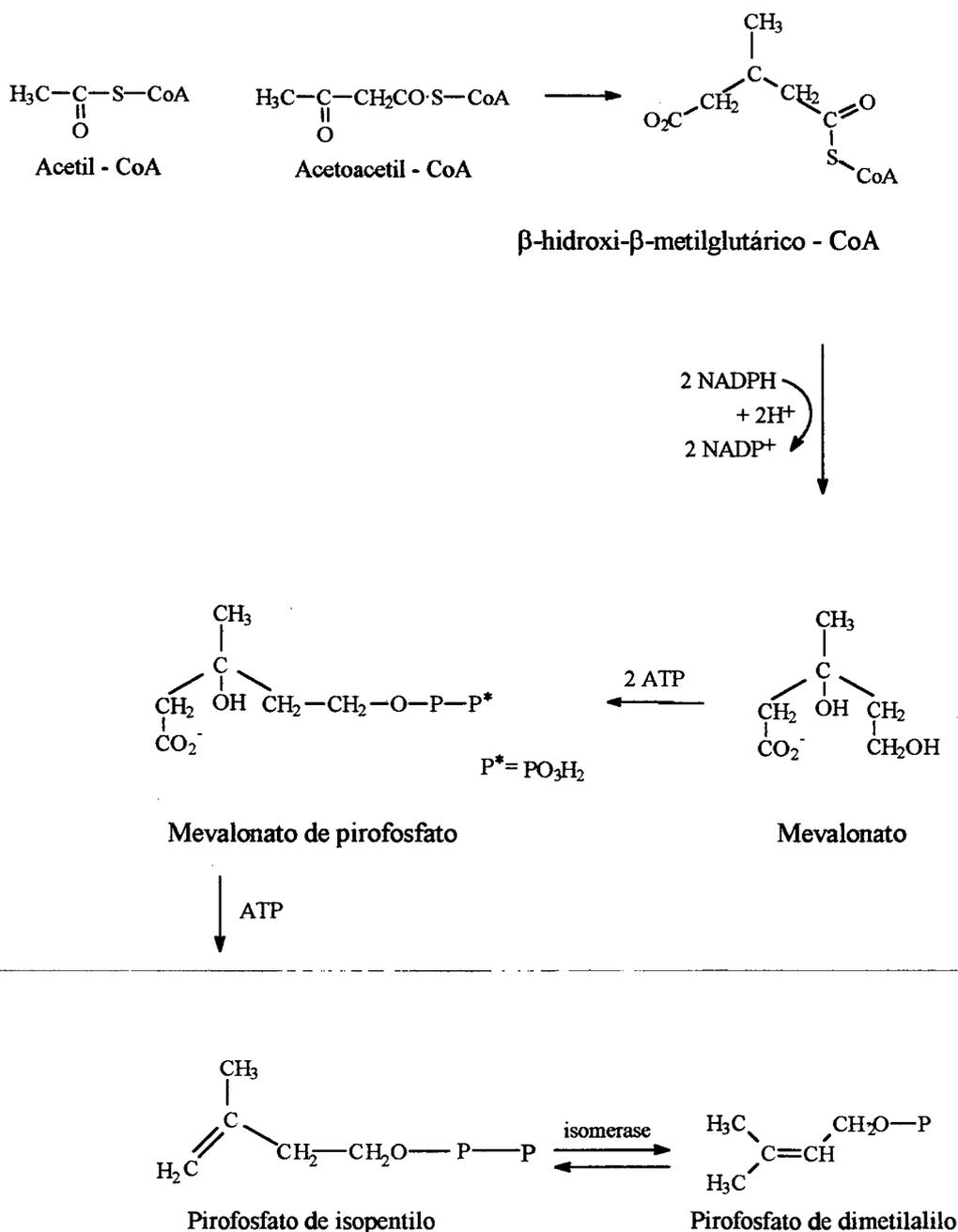
- a) Escolher com mais segurança entre várias estruturas possíveis para uma substância, a mais provável;
- b) A estereoquímica mais provável;
- c) Um caminho mais simples para sintetizar um composto natural;
- d) Uma hipótese que se permita escolher entre vegetais do mesmo gênero, para buscar compostos parecidos ou iguais, como consequência da grande coincidência de seus padrões genéticos.

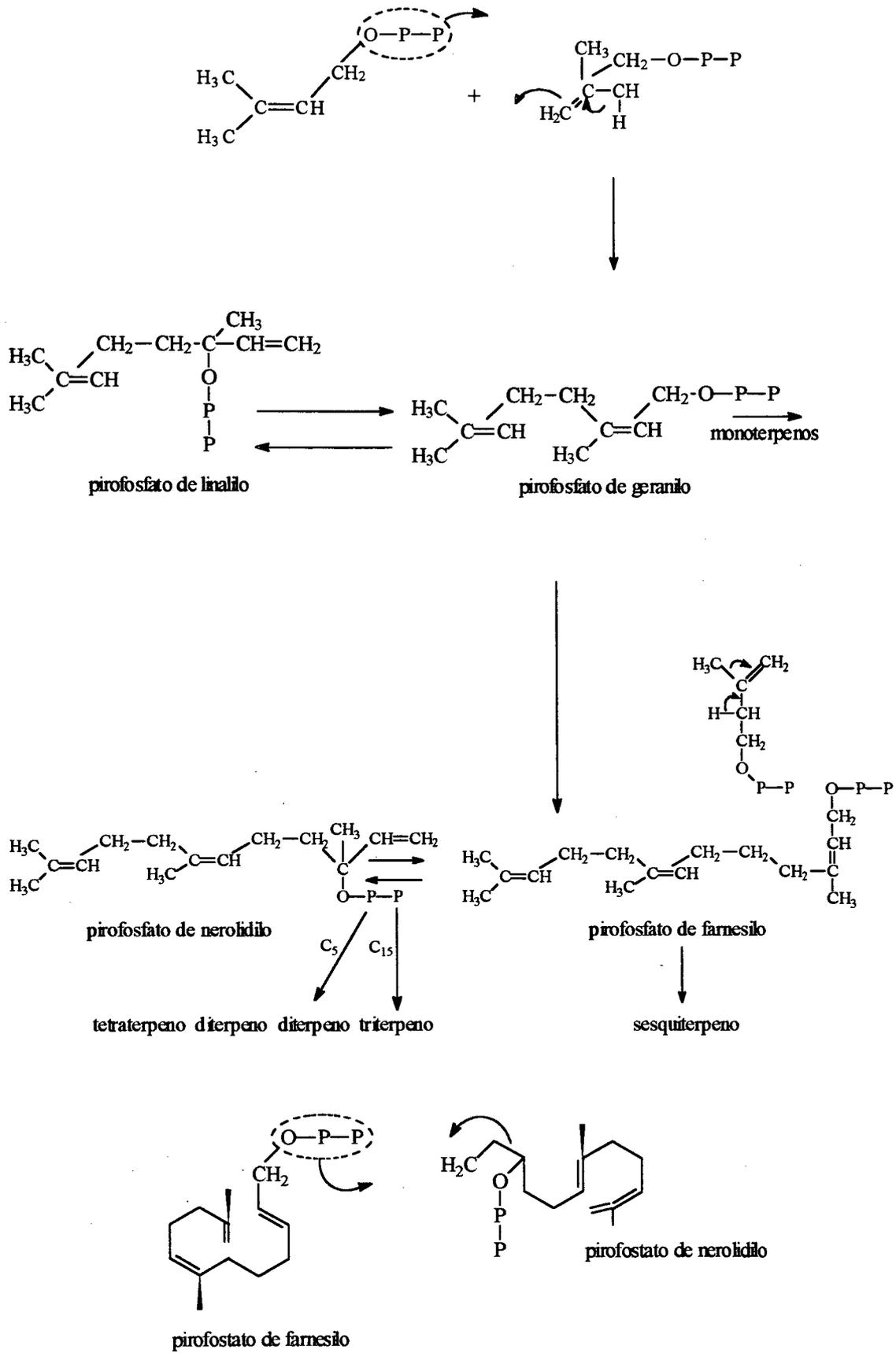
Os metabólitos secundários compreendem uma grande porcentagem dos princípios ativos das plantas, sendo denominados de metabólitos específicos, tendo como exemplos alcalóides, flavonóides, esteróides, triterpenóides, etc... Estes compostos são considerados como indispensáveis nas espécies que os produzem, sendo que ainda são desconhecidas suas diversas funções nas espécies vegetais. Outra

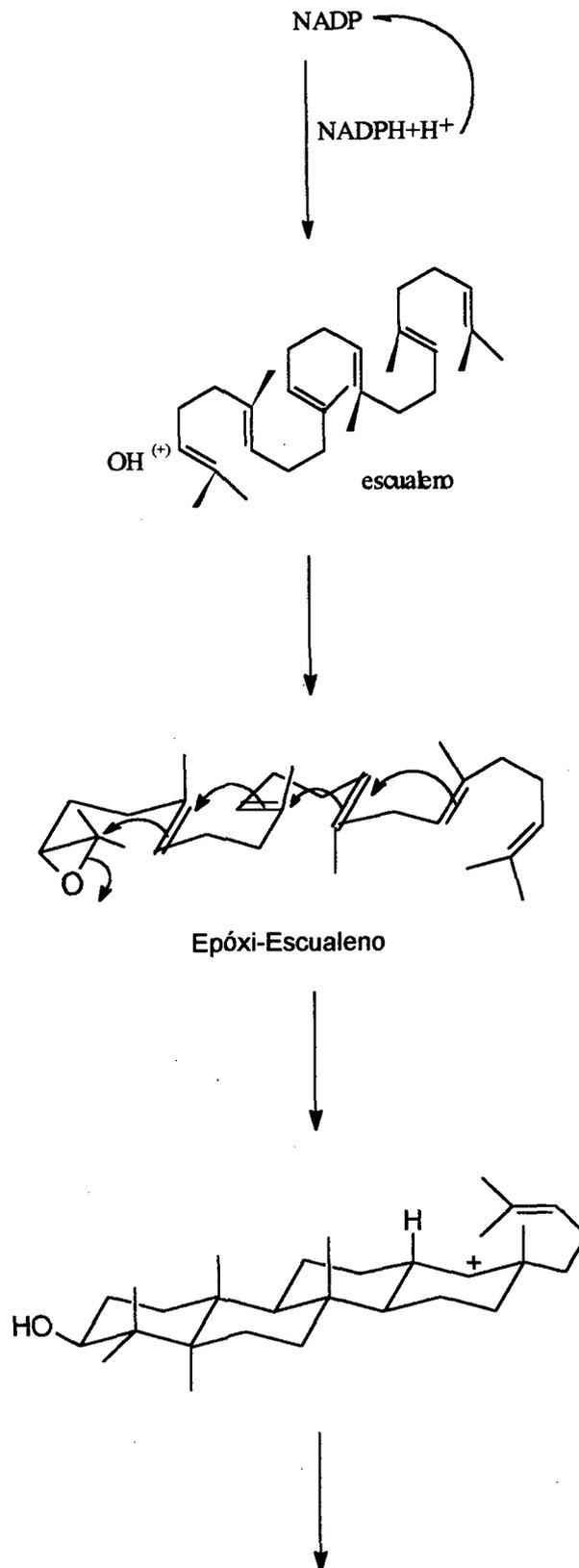
característica dos metabólitos secundários é sua importância na quimiotaxonomia de Famílias e Gêneros das espécies vegetais.

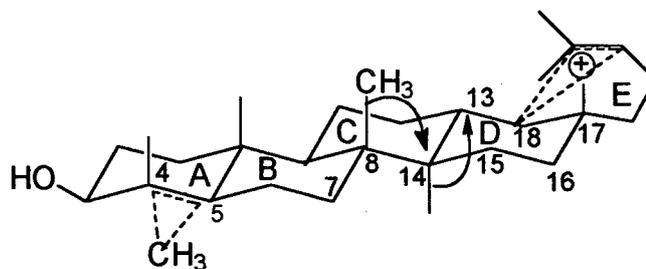
Como estão sendo levados em conta os objetivos da fitoquímica, a discussão se limitará a biossíntese dos compostos secundários.

1.3.2 - Rota Biossintética de Triterpenóides Friedelanos²⁹



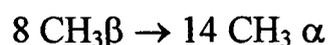






O íon carbonium intermediário formado na ciclização inicial do epóxi-escualeno reage com a dupla terminal da cadeia lateral dando a possibilidade de uma série de migrações de grupos metila e H resultando numa larga classe de compostos pentacíclicos.

O esqueleto friedelano é formado pelas seguintes migrações durante a formação do anel "E":



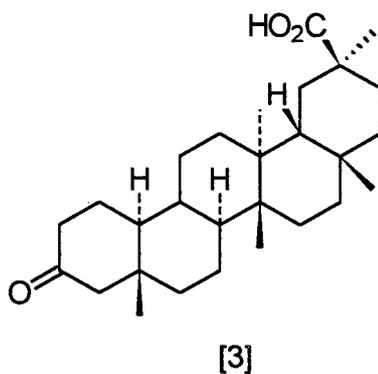
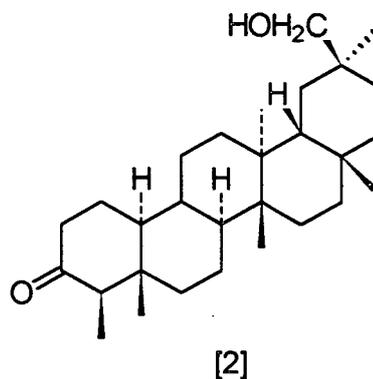
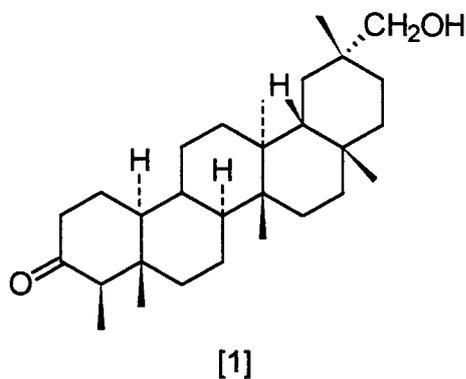
1.4 - Revisão sobre o Estudo Químico da Família Celastraceae

A família Celastraceae e principalmente o gênero *Maytenus* é caracterizado quimiotaxonômicamente pela ocorrência de triterpenos (principalmente do tipo friedelano) e alcalóides ansamacrolídeos, spermidínicos e nicotinoil sesquiterpeno.^{7, 8, 9, 10, 11, 12, 13}

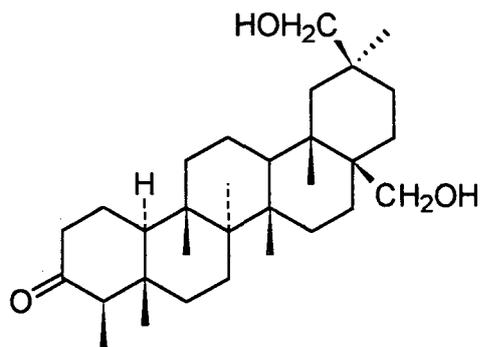
1.4.1 - Ocorrência de Triterpenos

Na espécie *Catha cassinoides*,³⁰ foram isolados e identificados três triterpenos denominados 30-hidroxifriedelano-3-ona [1], 29-

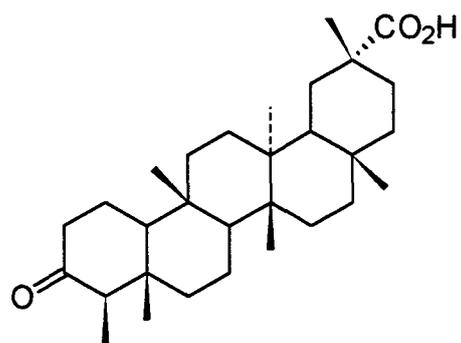
hidroxifriedelano-3-ona [2] e ácido 3-oxo-friedelano-29-oico [3]. Estes três triterpenos são descritos com propriedades antibacterial e antitumoral.



Das folhas e flores de *Gimnosporia emarginata*,³¹ foram isolados e identificados por raio-x, o Maytenfoliol [4] (17 β ,20 β -dihidroximetil-3-oxo friedelano), um triterpeno com atividade antileucêmica e o ácido 3-oxo-friedelano-29 α -oico ou ácido maytenônico (pulpônico) [5] com atividade antitumoral, antibacteriana e antimicótica. O ácido maytenônico foi isolado anteriormente das raízes de *Plenckia pulponea* (Hippocrateaceae).³²

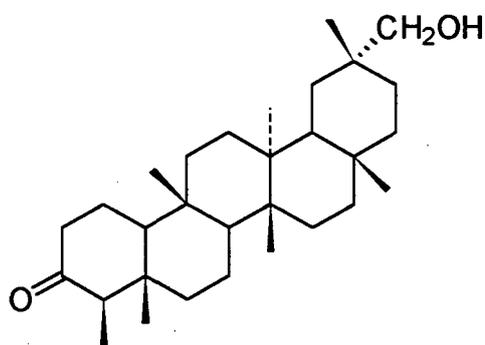


[4]



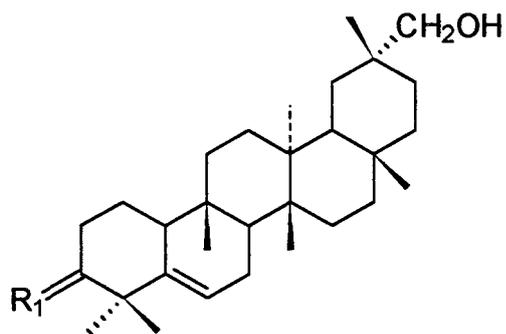
[5]

Das raízes de *Mortonia diffusa*³³ foram isolados os triterpenos ácido friedelano-3-ona-29-oico [5] e friedelan-3-ona-29-ol [6]



[6]

Das raízes de *Eleodendron balaë*³⁴ foi isolado o D:B-friedooleanano [7].

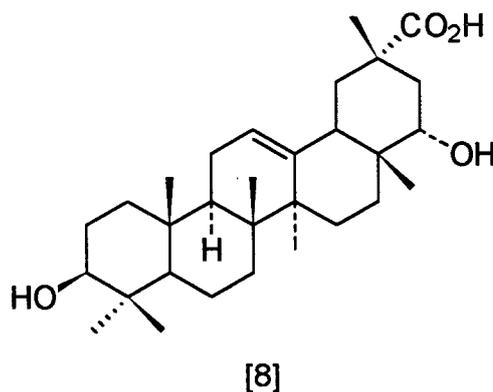


[7]

$$R_1 = \beta \text{ OH}, \alpha \text{ H}$$

O gênero *Maytenus* também é caracterizado quimiotaxonômicamente pela presença de triterpenos, principalmente com esqueleto friedelano, alcalóides e flavonóides.

Com relação a *Maytenus diversifolia*³⁵ foram isolados dois triterpenos com esqueleto friedelano denominado Maytenfoliol [4] e seu ácido derivado, ácido maytenfólico [8], ambos com atividade antitumoral quando testados *in vivo* (em P-388 leucemia linfótica em ratos BDF₁) e *in vitro* (em cultura de célula KB).



De *Maytenus ilicifolia*⁹ foram isolados triterpenos do tipo friedelano, ácido D:A-friedooleano-24-al-3-en-3-ol-2-on-29-oico e D:A-friedooleano-1-en-29-ol-3-ona; denominados cangoronino e ilicifolino respectivamente. Estes triterpenos apresentaram significativa atividade citotóxica quando testados em células P388.

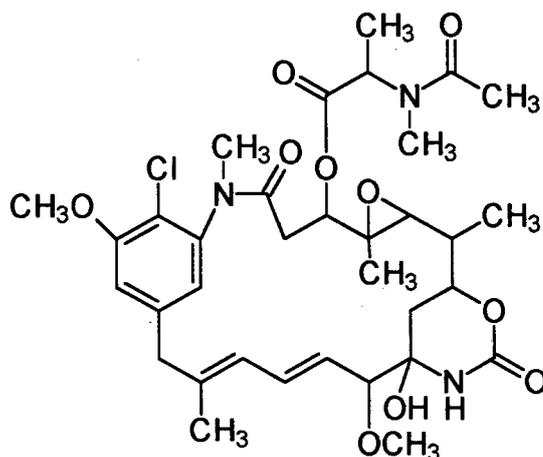
1.4.2 - Ocorrência de Alcalóides

Os alcalóides constituem um grupo quimicamente heterogêneo de bases vegetais nitrogenadas, com ação fisiológica mais ou menos intensa sobre os animais. Com raras exceções, como a efedrina e a mescalina, os alcalóides se caracterizam por apresentar um ou mais nitrogênio

heterocíclico. Há alguns alcalóides com nitrogênio amídico que não apresentam características básicas, como a colchicina. As bases púricas e pirimídicas estão excluídas do grupo dos alcalóides por não terem ação fisiológica notável e por suas relações bioquímicas com os ácidos nucleicos.²⁸

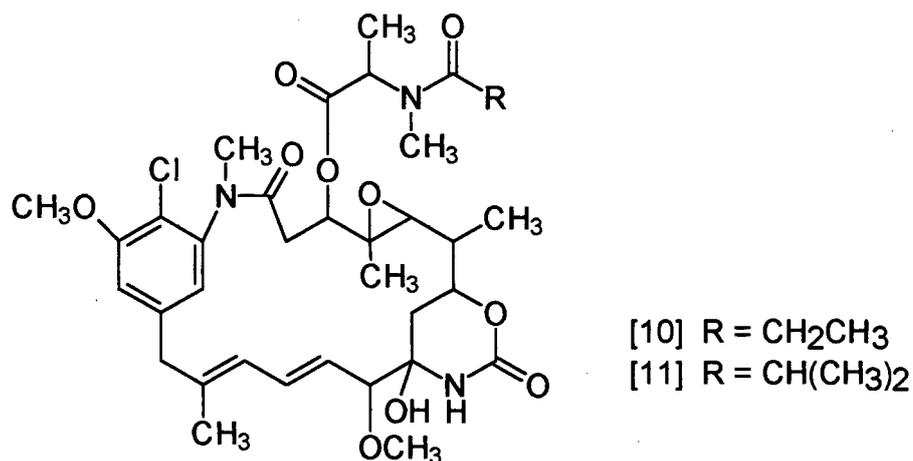
Algumas espécies do gênero *Maytenus* são muito ricas em alcalóides os quais contribuem em grande parte para a atividade biológica observada.

Um alcalóide com potente atividade antileucêmica, o Maytansine³⁷ [9] foi primeiramente isolado da espécie *Maytenus buchananii*(loes.) e apresentou significante atividade inibitória contra o carcinoma de pulmão e melanocarcinoma.³⁸



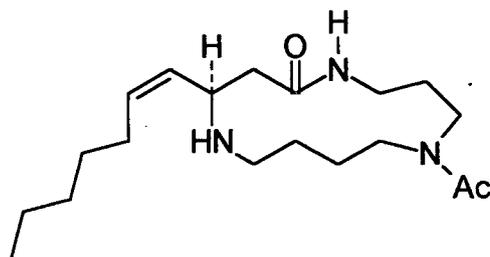
[9]

Da mesma espécie, foram isolados também, outros dois alcalóides com grande atividade antilêucêmica contra P-388 leucemia linfótica,³⁷ o Maytanprine [10] e o Maytanbutine [11].



Mais tarde estes mesmos alcalóides foram isolados também de outras espécies de *Maytenus*. *Maytenus rothiana*,¹¹ *Maytenus buxifolia*,³⁸ *Maytenus ovatus*,³⁹ *Maytenus serrata*,¹² evidenciando assim a classificação quimiotaxonômica do gênero *Maytenus* com relação aos alcalóides

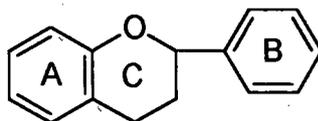
Da espécie *Maytenus loeseneri*⁴⁰ foi isolado o Loesenerine [12], um alcalóide espermidínico macrocíclico.



[12]

1.4.3 - Ocorrência de flavonóides

Os pigmentos flavonóides, um dos grupos mais numerosos e amplamente distribuídos de constituintes naturais, conhecidos também como antotaxinas se distribuem em dez classes, todos contendo quinze átomos de carbono em seu núcleo básico [13].⁴¹



[13]

Os carbonos estão arranjados em um sistema $C_6-C_3-C_6$, no qual dois anéis aromáticos chamados A e B estão unidos por uma unidade de três carbonos, que podem formar um terceiro anel, que no caso de existir é chamado anel C.

Como características gerais deste tipo de composto, devemos enfatizar sua solubilidade em água e em etanol, seu caráter fenólico e sua intensa absorção na região ultravioleta e visível do espectro devido a presença de sistemas aromáticos e conjugados.

As citações sobre a ocorrência de flavonóides em espécies de *Maytenus* são raras, porém Lenka Mandich⁴² trabalhando com *Maytenus boaria* e *Maytenus ilicifolia* citou a ocorrência de Quercetina e Kaempferol nas duas espécies.

CAPÍTULO 2

OBJETIVOS

Considerando a posição quimiotaxonômica do gênero *Maytenus*, a ocorrência de triterpenos friedelanos e alcalóides ansamacrolides, spermidinicos e nocotinoil sesquiterpenos, e a sua importância medicinal no tratamento da úlcera gástrica, ação antitumoral de seus alcalóides, iniciamos a investigação fitoquímica da espécie *Maytenus robusta* com o objetivo de:

- A) Determinar o teor de triterpenos e alcalóides.
- B) Isolar através de métodos cromatográficos e identificar por métodos espectrométricos de UV, IV, Massas, RMN ^1H , RMN ^{13}C , etc, os triterpenos presentes na espécie.
- C) Pesquisar a ocorrência de alcalóides.
- D) Posicionar a espécie como uma fonte alternativa de *Maytenus ilicifolia* (em franca extinção) devido sua grande ocorrência no sul do Brasil.

CAPÍTULO 3

PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

3.1 - Introdução

Os procedimentos experimentais adotados nesse trabalho foram baseados em técnicas tradicionais de separação de produtos naturais tais como extração, técnicas cromatográficas e recristalização.

No que concerne a identificação das substâncias isoladas, foram utilizados os métodos físico-químicos de análise a saber: Pf, EM, UV, IV, RMN ¹H e RMN ¹³C e outras técnicas de ressonância necessárias para a determinação estrutural. As técnicas empregadas visaram basicamente permitir o estabelecimento de uma metodologia capaz de caracterizar os compostos quanto ao seu isolamento por cromatografia, bem como sua identificação por métodos espectrométricos e cromatográficos

3.2 - Materiais e Métodos

As separações por cromatografia em coluna foram monitoradas por cromatografia em camada delgada (TLC) empregando-se placas de vidro de 2.5cm por 7.5cm, revestidas com sílica gel GF₂₅₄ (Merck). Os compostos foram aplicados em pontos equidistantes de 0.5cm e a 1.0cm da extremidade inferior da placa cromatográfica e eluidas com Hexano/Acetato de Etila (80:20). Para análise dos compostos mais purificados utilizou-se placas cromatográficas de alta resolução (HPTLC) de sílica gel PF₂₅₄ em

folhas de alumínio (Merck) como fase estacionária, e como fase móvel utilizou-se Hexano/Acetato de Etila (1:1).

Outro método para revelação dos compostos empregou reagentes com o auxílio de um pulverizador manual ou spray, numa distância de 15 a 20cm, onde as placas são posteriormente aquecidas em estufa à 120°C. Os reagentes utilizados foram anisaldeído-ácido sulfúrico⁴³ e sulfato cérico.

No fracionamento dos extratos foram utilizadas colunas cromatográficas recheadas com sílica gel 60 de granulação 70-230 mesh (0.063-0.2mm) e eluidas no modo gradiente usando uma mistura de solventes composta por Hexano: Acetato de Etila: Metanol. Purificações posteriores foram alcançadas usando a técnica de cromatografia relâmpago (Flash),⁴⁵ a qual utiliza sílica gel de granulometria 40-60µm e eluição no modo isocrástico sob pressão e fluxo constante de 5ml/min.

Os compostos separados nas placas cromatográficas foram visualizados sob radiação UV usando Minerlight 254 e 365nm.

Os solventes utilizados para as acetilações dos compostos (Anidrido Acético, Ácido Acético, e Piridina) foram todos P.A.. As colunas cromatográficas de purificação foram eluidas também com solventes P.A.

As análises de cromatografia gasosa foram realizadas em aparelho de Cromatografia Gasosa de Alta Resolução SHIMADZU-CG 14A com detector de ionização de chama e registrador Chromatopac SHIMADZU-C-R6A. As separações foram em coluna capilar de sílica fundida, OV-1, utilizando H₂ como gás de arraste a uma velocidade de 40 cm/s e nas condições cromatográficas indicadas em cada experimento.

As análises por cromatografia líquida de alta eficiência foram realizadas em cromatógrafo líquido BECKMAN SISTEM GOLD

constituído de um módulo INTERFACE 406, duas bombas modelo 100B e detetor de UV modelo 166.

Para as separações foi utilizada uma coluna semi-preparativa de fase reversa C-18 ultrasphere 005 5 μ , 10mm a.i x 250mm.

A eluição foi no modo gradiente iniciando com 30% metanol/70% água até 100% metanol durante 30 minutos, a um fluxo de 1ml/min. O cromatograma foi obtido no sistema CHROMATOPAC da Microquímica com a amostra monitorada a 235nm e a 280nm pelo detetor de UV.

Os espectros de absorção na região de infravermelho foram obtidos em espectrofotômetro FT Perkin Elmer 16PC, com as substâncias incorporadas em pastilhas comprimidas de Brometo de Potássio (KBr) anidro. As absorções foram registradas em escala de centímetro recíproco (cm^{-1}).

Os espectros de Massa foram obtidos no espectrômetro de Massa SHIMADZU-CGMS-QP-2000A, sob impacto de feixe eletrônico a 70eV por inserção direta, prob e/ou acoplado ao Cromatógrafo Gasoso de Alta Resolução SHIMADZU-CG 14A.

Foram obtidos espectros de RMN ^1H , RMN ^{13}C e DEPT-135, COSY e HETCOR em Espectrômetro de Ressonância Magnética Nuclear BRUCKER AC-200F; espectros de RMN ^1H , RMN ^{13}C , APT, foram elaborados em Espectrômetro de Ressonância Magnética Nuclear VARIAN GEMNI VXR-300F. Os deslocamentos químicos foram expressos em valores adimensionais δ (ppm) em relação a um padrão interno de tetrametilsilano (TMS). O solvente utilizado foi Clorofórmio deuterado.

As constantes de acoplamento (J) foram expressas em Hertz (Hz). As multiplicidades dos sinais são indicadas como segue: s = singlete; d = dublete; t = triplete; e m = multiplete. As determinações dos pontos de

fusão das substâncias puras foram realizadas com Aparelho de Ponto de Fusão APF-301 da marca Microquímica, e não sofreram correções.

Os espectros de absorção na região do ultravioleta foram obtidos em espectrofotômetro UV-VIS HITACHI U-2000, utilizando-se metanol como solvente. Os comprimentos de onda foram registrados em escala de nanômetro (nm).

3.3 - Coleta e Identificação da Espécie Vegetal

A espécie vegetal *Maytenus robusta* Reiss foi coletada no Morro do Baú, Vale do Itajaí em Santa Catarina e identificada pelo Dr. Ademir Reis.

3.4 - Análise Fitoquímica Preliminar

Foram realizadas análises fitoquímicas de *Maytenus robusta* Reiss com o intuito de determinar preliminarmente grupos químicos específicos, ou algum indício dos mesmos na espécie. Essas análises seguiram uma marcha sistemática de Análises em Fitoquímica

3.5 - Preparo dos Extratos Vegetais

O Material vegetal, folhas e galhos finos, após secagem á temperatura ambiente por uma semana, foi cortado em pequenas peças. O farelo resultante foi extraído por maceração em etanol durante uma semana e então percolado com repetidas reposições de solvente. O extrato foi concentrado em evaporador rotatório sob pressão reduzida e temperatura controlada até a completa remoção do solvente. Este procedimento resultou

na obtenção de uma densa pasta de coloração verde escuro pesando 450g , correspondendo a 11.25% do peso do vegetal. Esse extrato recebeu a denominação de Extrato Bruto Etanólico.

3.6 - Obtenção dos Constituintes químicos

3.6.1 - Fracionamento do Extrato Bruto Etanólico

O Extrato Bruto Etanólico (450g) foi redissolvido em clorofórmio, adicionando 250g de sílica e com constante agitação mecânica evaporou-se o solvente obtendo-se uma farofa “pastilha” com o extrato adsorvendo a sílica. O extrato bruto assim preparado foi submetido a um fracionamento através de cromatografia em coluna tendo as dimensões de 80cm de altura por 7cm de diâmetro e foi recheada com sílica gel 70-230 mesh. A eluição foi feita no modo gradiente com Hexano 100% e a polaridade aumentada gradativamente com Acetato de Etila e Metanol conforme mostra a Tabela I.

TABELA I- Sistema de Eluição utilizado no fracionamento do extrato bruto etanólico.

Eluente	%	Frações eluidas	Frações estudadas
Hexano	100	1 - 18	MR-1 a MR-10
Hexano/Ac.Etila	90/10	19 - 30	MR-20 a MR-23
Hexano/Ac.Etila	70/30	31 - 46	MR-42 a MR-46
Acetato de Etila	100	47 - 63	-
Metanol	100	64 - 66	MR-64 a MR-66

Durante o procedimento de eluição, coletou-se 66 frações de 250ml as quais foram individualmente concentradas em evaporador rotatório sob pressão reduzida, monitoradas por CCD e reunidas conforme o perfil apresentado. Com este procedimento obteve-se uma fração oleosa mais apolar resultado da reunião das frações MR-1 a MR-10. Esta fração oleosa foi submetida a cromatografia gasosa de alta resolução acoplada ao espectrômetro de massa (CGAR-MS) e foram identificados na mistura, um esterol, stigmasta-3,5-dien-7-ona, uma série homóloga de ésteres metílicos entre outros.

As frações MR-20 a MR-23 apresentaram-se como uma grande quantidade de um sólido branco e foram reunidas para posterior separação.

A fração MR-46 apresentou-se como um sólido amarelo que após recristalização em etanol e análises espectroscópicas (RMN ^{13}C , RMN ^1H , IV, UV, Massas e HETCOR), foi identificada como o flavonóide Quercetina.

3.6.1.1 - Isolamento de F-23 (3-oxo friedelano) - (friedelina)

As frações MR-20 a MR-23 foram reunidas (6.42g) e recromatografadas através de cromatografia em coluna recheada com sílica gel (40-60 mesh) como fase estacionária. A eluição foi feita no modo gradiente sob pressão de 2atm e vazão de 5ml/min utilizando-se um compressor de nebulização tipo doméstico.⁴⁵ A fase móvel foi iniciada com Hexano e posteriormente aumentou-se a polaridade do sistema com Hexano/Acetato de Etila em proporções de ordem crescente (Tabela II).

Coletou-se 369 frações de 10ml, as quais foram monitoradas por CCD e reunidas por semelhança de Rfs. A mistura das frações obtidas corresponde a vários compostos, sendo que somente a fração F-23

apresentou composto puro de coloração branca, sendo identificado respectivamente como 3-oxo friedelano (friedelina).

TABELA II - Sistema de eluição utilizado na purificação das frações MR-20 a MR-23 do extrato bruto etanólico

Eluente	%	Frações eluidas	Frações estudadas
Hexano	100	1 - 20	-
Hexano/Ac.Etila	90/10	21 - 172	F-23
Hexano/Ac.Etila	80/20	173 - 226	F-185
Hexano/Ac.Etila	70/30	227 - 326	F-189-F-235
Hexano/Ac.Etila	60/40	327 - 368	-
Acetato de Etila	100	369	-

3.6.1.2 - Isolamento de CM-8 (3,15-dioxo friedelano), CM-63 (3-oxo-29-hidroxi friedelano) e CM-4 (stigmasterol)

As frações MR-42 a MR-45 foram reunidas e recromatografadas em coluna de dimensões de 40cm de altura por 2cm de diâmetro recheada com sílica-gel 70-230 mesh. A fase móvel foi iniciada com Hexano e posteriormente incrementada, Acetato de Etila e Metanol em proporções de ordem crescente de polaridade (Tabela III). Coletou-se 285 frações de 10ml, as quais foram monitoradas por CCD e reunidas por semelhança de Rfs. A fração CM-63 apresentava-se como uma mistura de três compostos dos quais pode-se identificar o 3-oxo, 29 hidroxi friedelano e a fração CM-8 contendo um único composto identificado como 3,15-dioxo-friedelano. O composto CM-63 foi acetilado pesando-se 5mg do mesmo sendo adicionado a uma solução de 0.5ml de Anidrido Acético, 0.5ml de

Ácido Acético em Piridina, com agitação magnética por 12 horas em temperatura ambiente⁴⁴. A acetilação foi monitorada por HPTLC e confirmada por RMN ¹H.

A fração CM-4 após a recristalização em acetona resultou num único composto identificado como stigmasterol.

TABELA III - Sistema de Eluição utilizado na purificação das frações MR-42 a MR-45

Eluente	%	Frações eluidas	Frações estudadas
Hexano	100	-	-
Hexano/Ac.Etila	95/5	1 - 2	CM-4 e CM-8
Hexano/Ac.Etila	90/10	3 - 70	CM-63
Hexano/Ac.Etila	85/15	71 - 133	-
Hexano/Ac.Etila	83/17	134 - 154	-
Hexano/Ac.Etila	80/20	155 - 197	-
Hexano/Ac.Etila	75/25	198 - 264	-
Hexano/Ac. Etila	70/30	265 - 283	-
Acetato de Etila	100	284	-
Metanol	100	285	-

3.6.1.3 - Isolamento de FF-5 (3 β -hidroxi friedelano) (friedelinol)

As frações F-189 a F-235 foram reunidas e recromatografadas em coluna de dimensões de 40cm de altura por 2cm de diâmetro e como fase estacionária foi utilizada sílica-gel 70-230 mesh. A fase móvel utilizada para a eluição da coluna foi Hexano/Acetato de Etila em proporções de ordem crescente de polaridade (Tabela IV). Coletou-se 30 frações de 20ml,

as quais foram monitoradas por CCD e reunidas por semelhança de Rfs. A fração FF-5 apresentou-se contendo um único composto identificado como 3- β -hidroxi-friedelano (friedelinol).

TABELA IV - Sistema de eluição utilizado na purificação das frações F-189 a F-235

Eluente	%	Frações eluidas	Frações estudadas
Hexano	100	-	-
Hexano/Ac.Etila	95/5	1 - 12	FF-5
Hexano/Ac.Etila	90/10	13 - 18	-
Hexano/Ac.Etila	85/15	19 - 22	-
Hexano/Ac.Etila	80/20	23 - 28	-
Hexano/Ac.Etila	75/25	29 - 30	-

O composto FF-5 foi acetilado pesando-se 5mg do mesmo sendo adicionado a uma solução de 0.5 ml de Anidrido Acético, 0.5ml de Ácido Acético em Piridina, com agitação magnética por 12 horas em temperatura ambiente.⁴⁴ A acetilação foi confirmada por HPTLC.

3.6.2 - Pesquisa de Alcalóides

A obtenção e identificação de alcalóides presentes no extrato bruto hidroalcoólico, foi obtido através de extração ácido-base e por HPLC.

Após a extração da fração alcaloídica procedeu-se análises cromatográficas por CCD usando Clorofórmio/Metanol (90/10) como fase móvel e reveladas com Reativo de Dragendorff⁴³ (específico para alcalóides). Também foram realizadas análises por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) usando uma coluna analítica de fase reversa ODS

e detecção por Ultravioleta fixo a 230nm e a 280nm. A eluição foi feita no modo gradiente partindo-se de 30% Metanol-70% água a 100% Metanol durante trinta minutos.

CAPÍTULO 4

RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1- Ensaio Preliminares e Investigação Química do Extrato Alcoólico

Os resultados obtidos nos ensaios preliminares são apresentados na Tabela V.

TABELA V - Resultados dos Ensaio Preliminares de Maytenus robusta.

Pesquisa realizada	Resultado
Extrato hidroalcoólico	
cor	verde-escuro
sabor	adstringente
odor	chá-mate
pH	± 6

A Tabela VI apresenta os resultados obtidos na investigação química do extrato alcoólico.

TABELA VI - Resultado da Investigação Química Preliminar de *Maytenus robusta*

Extrato hidroalcoólico	
Testes	
Ácidos orgânicos	+
Alcalóides	+
Esteróides e/ou triterpenos	+
Cumarinas	-
Flavonóides	+

- = resultado negativo

+ = resultado positivo

4.2 - Análise da Fração Oleosa - (MR 1-10)

As frações MR-1 a MR-10, eluídas com hexano do fracionamento do Extrato Bruto Hidroalcoólico, foram reunidas segundo o perfil mostrado pela análise por CCD constituindo uma fração que denominamos de Fração Oleosa.

Esta Fração Oleosa foi submetida a análise por Cromatografia Gasosa de Alta Resolução acoplada a Espectrometria de Massas. O cromatograma apresentado na Figura 2, mostra uma composição bastante complexa onde se pode distinguir classes distintas de substâncias orgânicas. Pode-se identificar uma série de compostos mais voláteis, na região de 12min. a 18 min., representada por séries homólogas de hidrocarbonetos, ácidos e esteres carboxílicos de baixo peso molecular. No item. 4.2.1 exemplificamos estas identificações com uma série homóloga de ésteres 2,8-dimetil metílicos.

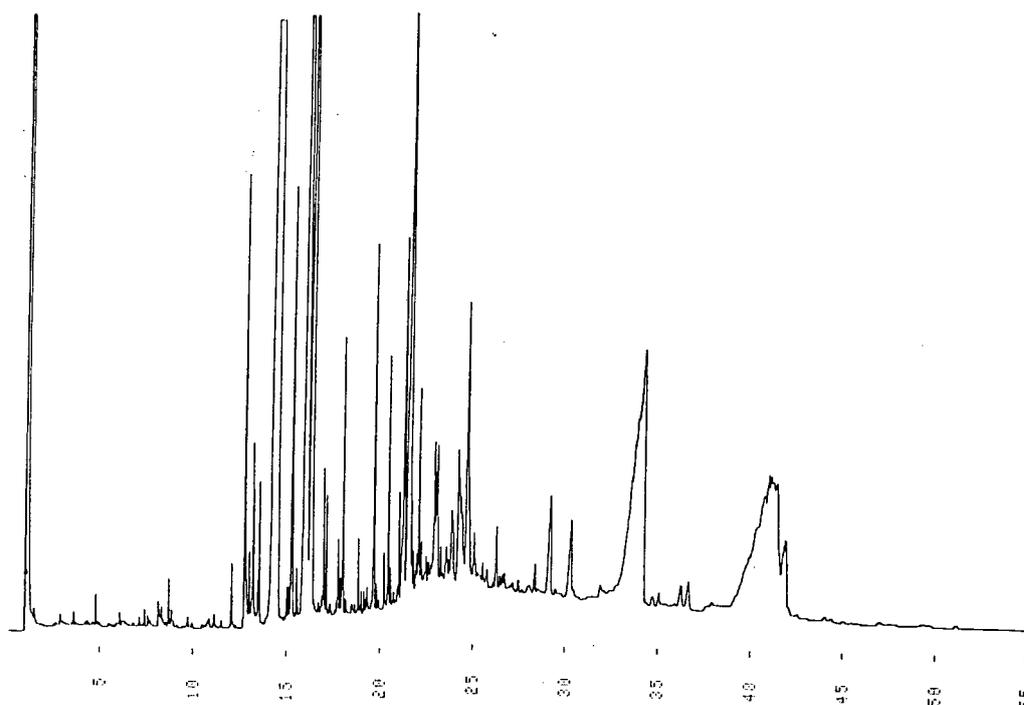


FIGURA 2 - Cromatograma da fração oleosa MR - (1-10) obtida em coluna capilar de sílica fundida, OV - 1, 80 a 290 °C, 10 °C/min

Um segundo grupo de compostos de volatilidade média pode ser observado na região de 18 min a 25 min. Além dos membros mais altos das séries homólogas, esta é a região onde normalmente eluem os diterpenos e alguns sesquiterpenos. Apesar de não se ter efetivamente identificado diterpenos nesta planta pela carência destes padrões, alguns argumentos sugerem sua presença: Primeiro a análise por CCD da fração MR 1-10 mostrou compostos revelados por reagentes para diterpenos. Segundo, por ser uma espécie onde a ocorrência de triterpenos é abundante, é razoável pensar que em

algum momento sua função biossintética leve a formação de diterpenos. Estas hipóteses ficam reforçadas quando encontramos vários espectros de massas sugerindo estruturas diterpênicas.

Um terceiro grupo de compostos está muito bem evidenciado na região do cromatograma compreendida entre 28 min a 45 min. Esta é a faixa comum de eluição, entre outros compostos, dos esteróis e triterpenos. De fato, os espectros de massas dos compostos eluídos nesta região do cromatograma são, na sua maioria, característicos de esteróis e triterpenos. Apesar de os triterpenos terem sido isolados em frações posteriores, a sua presença na fração oleosa é explicada devido sua grande abundância no extrato cromatografado.

4.2.1 - Identificação da Série Homóloga de Ésteres 2,8-dimetil metílicos [17]

A série homóloga de ésteres 2,8-dimetil metílicos de C-15 a C-27, foi identificada através da análise conjunta de seus respectivos Espectros de Massas. Os Espectros de Massas (1a a 1n) (Figura 4) apresentaram os íons molecular M^+ a m/z na sequência 256 uma, $(256 + n \cdot 14)$ u.m.a . . . 424 u.m.a, onde $n = 1, 2, 3, \dots, 11$.

Observou-se nestes espectros um padrão de fragmentação comum com fragmentos a m/z (% rel.) $[M^+ - 29]$ (10), $[M^+ - 43]$ (40), 185 (variável), 157 (60), 143 (22), 101 (50), 88 (100), 70 (20), 55 (40) e 43 (65).

Os fragmentos $[M^+ - 29]$ (10) e $[M^+ - 43]$ (40) representam respectivamente os íons etil e n-propil devido a fragmentação da extremidade da cadeia hidrocarbonada linear.

Os fragmento m/z 157 (60) e 185 ao nível da ramificação no meio da cadeia carbonada da molécula sugerem uma ramificação com grupo metil no carbono C-8.

O fragmento m/z 88 (100) resultante do rearranjo Mc Lafferty do íon molecular envolvendo a carbonila do éster, como mostra a Figura 3, estabelece uma ramificação no carbono C-2 com um radical metil bem como ser uma série homóloga de ésteres metílicos. Deste modo a presente série homóloga foi identificada como sendo de ésteres 2,8-dimetil metílicos.

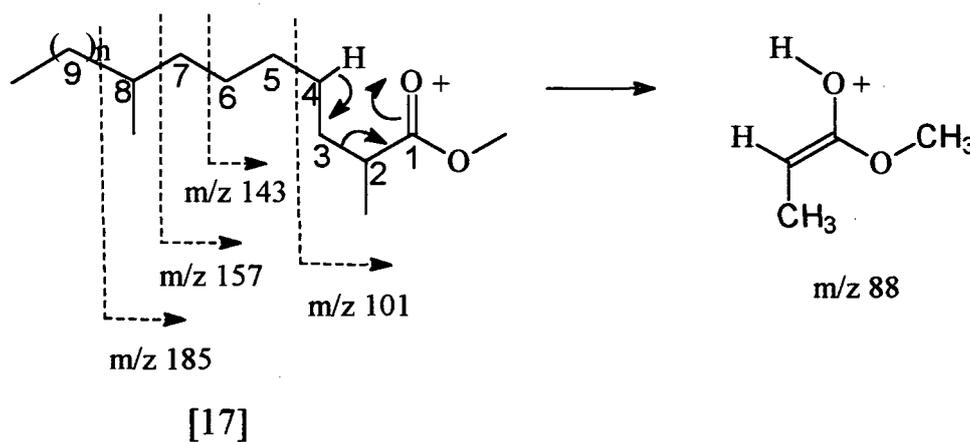
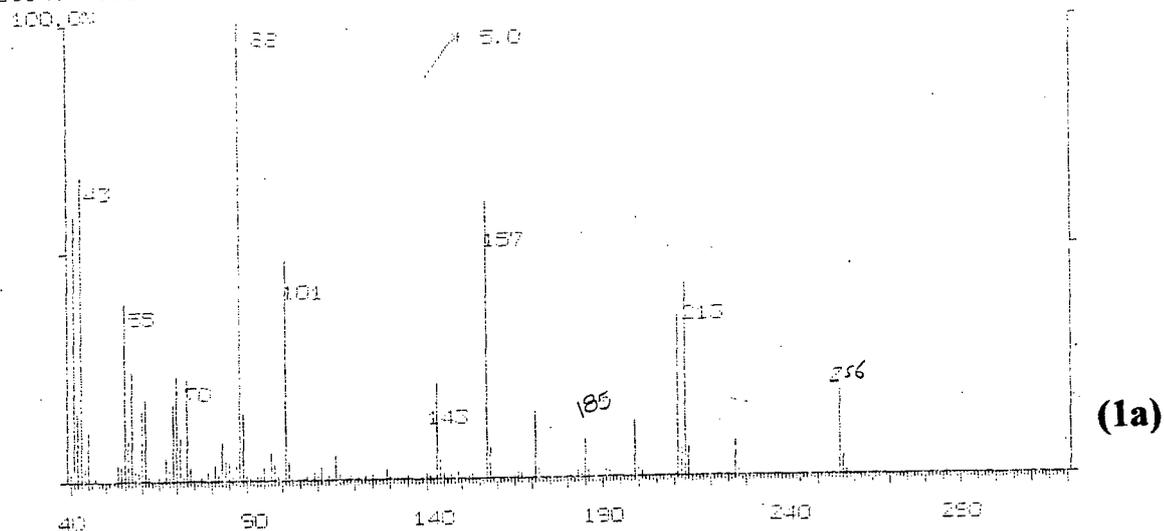
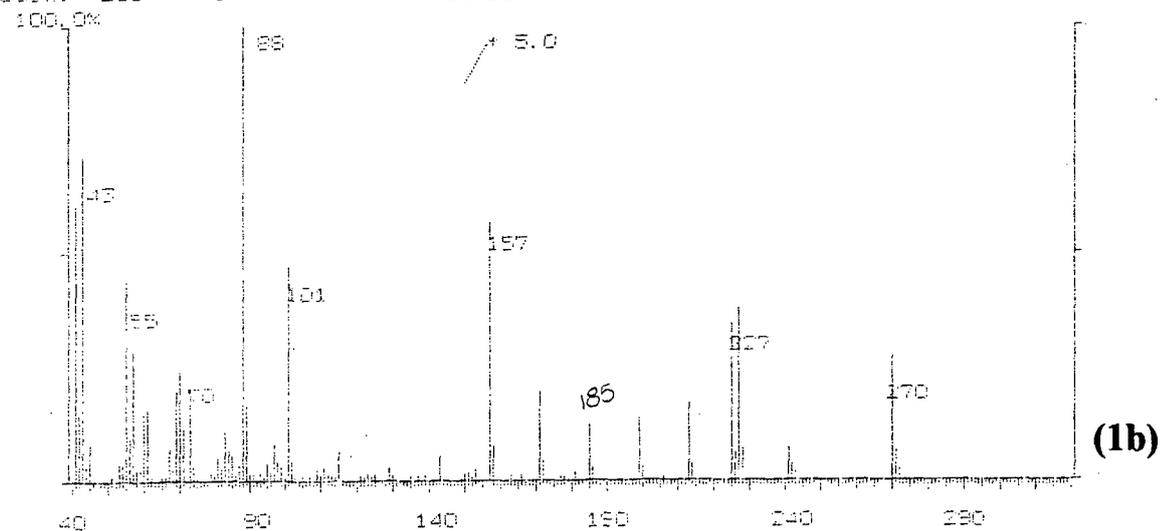


FIGURA 3 - Proposta estrutural para a série homóloga de ésteres 2,8-dimetil-metílicos representando a fragmentação do íon base m/z 88 segundo Mc Lafferty, e os demais fragmentos indicados.

Scan: 238 (0- 0) R.T.: 15.23min Base Peak: 88.0 Int: 33170(=100%)



Scan: 268 (0- 0) R.T.: 15.93min Base Peak: 88.0 Int: 16890(=100%)



Scan: 308 (0- 0) R.T.: 18.20min Base Peak: 88.0 Int: 20390(=100%)

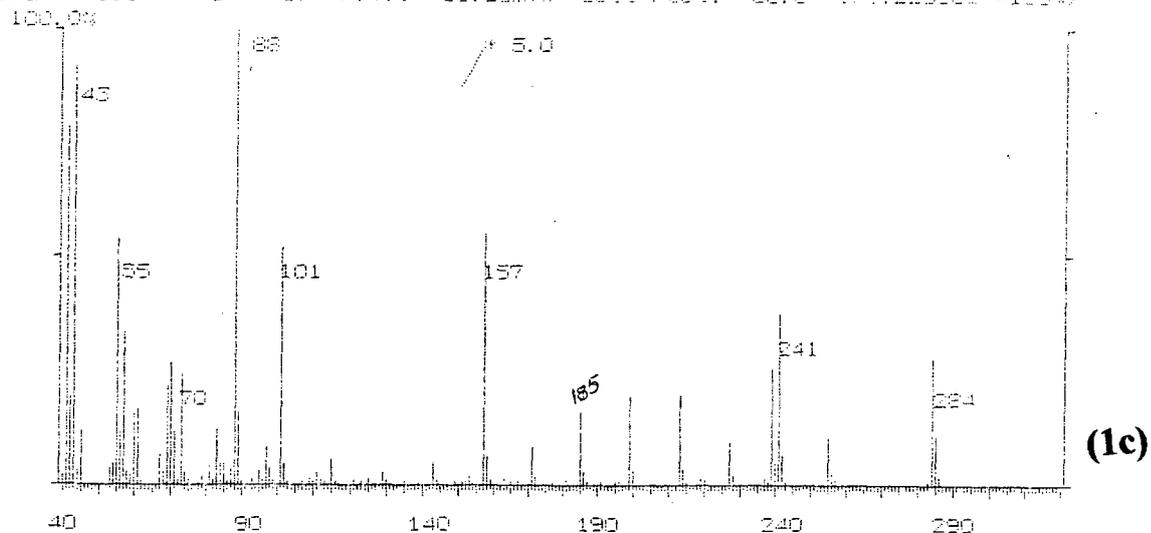
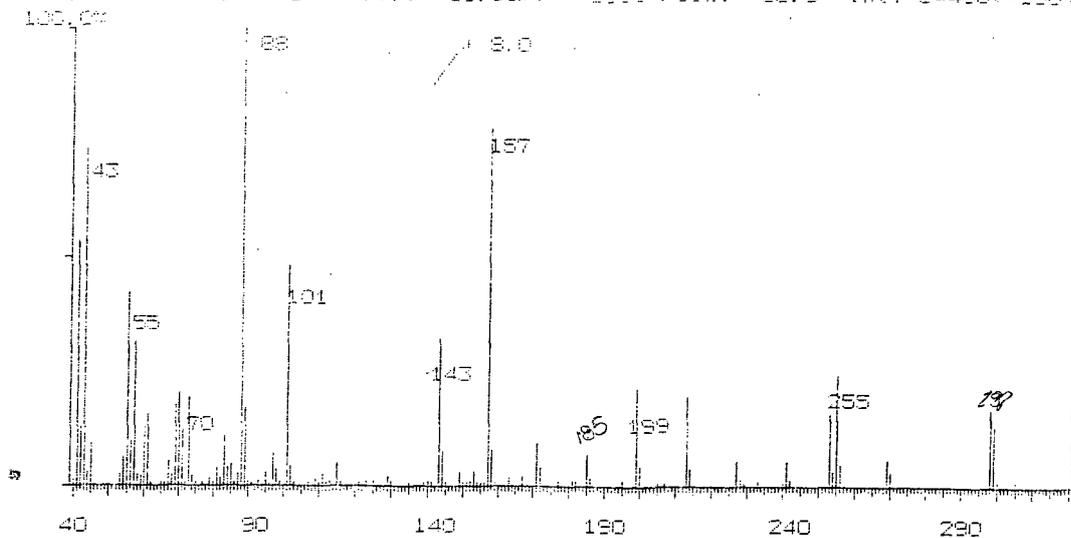
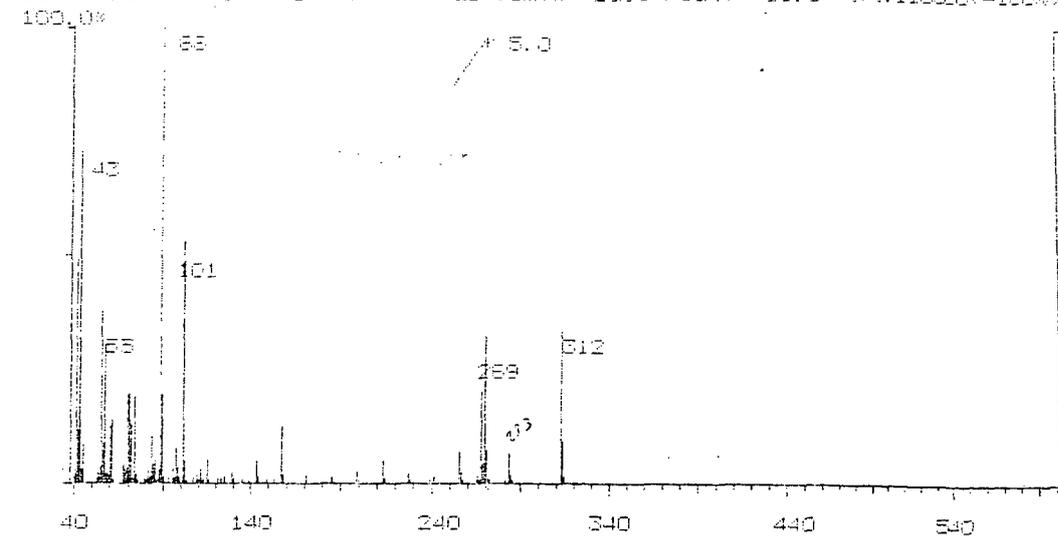


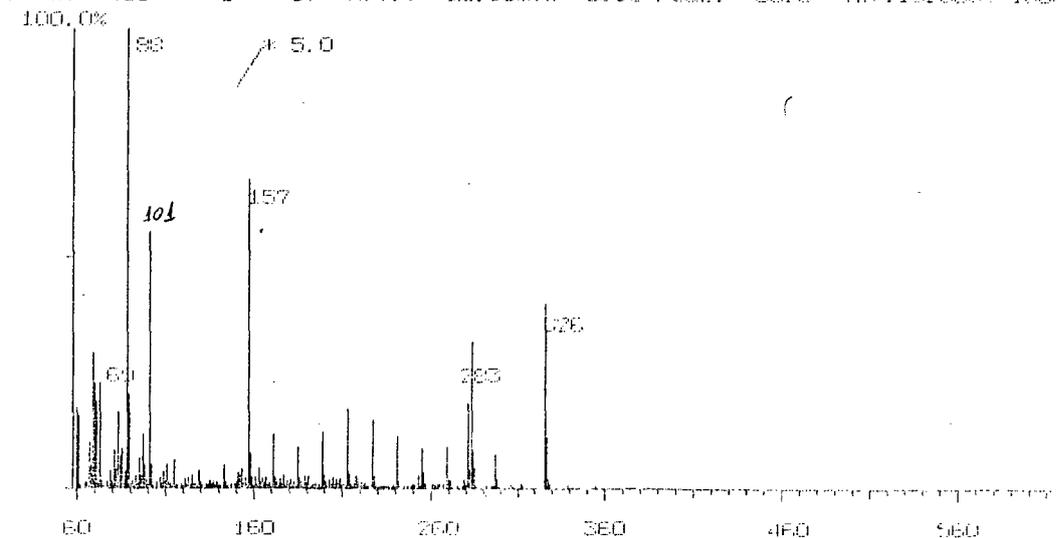
FIGURA 4 - Espectros de Massas (1a a 1n) com impacto eletrônico de 70 eV representando uma série homóloga de ésteres 2,8-dimetil-metílicos.



(1d)



(1e)



(1f)

FIGURA 4

Continuação...

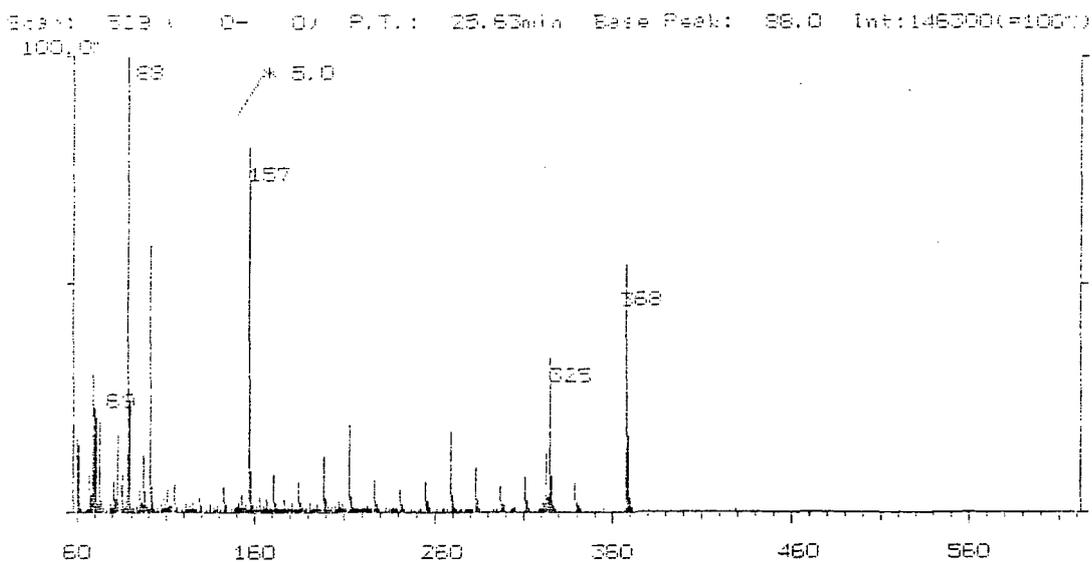
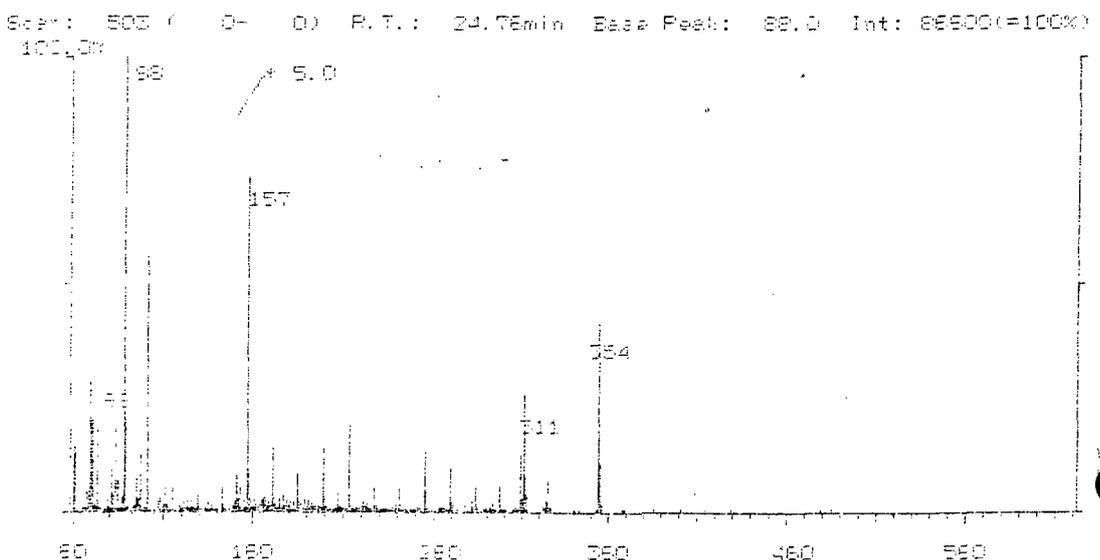
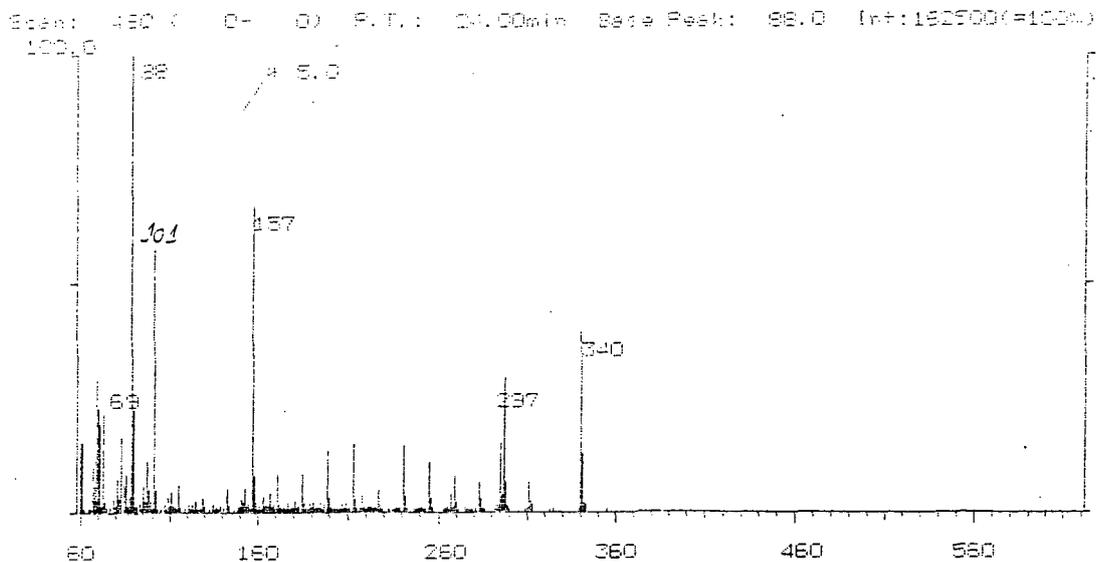


FIGURA 4

Continuação...

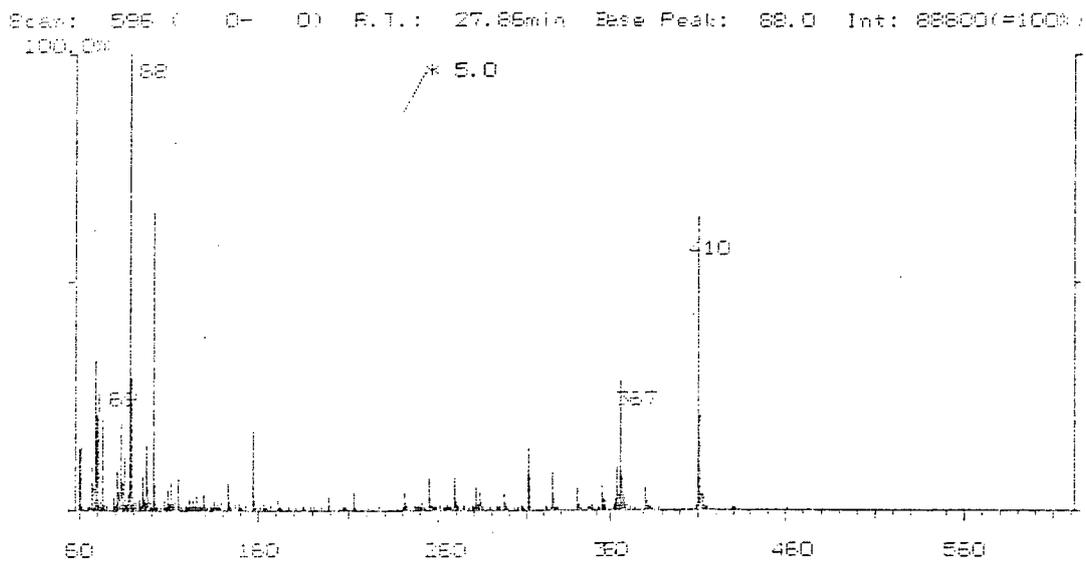
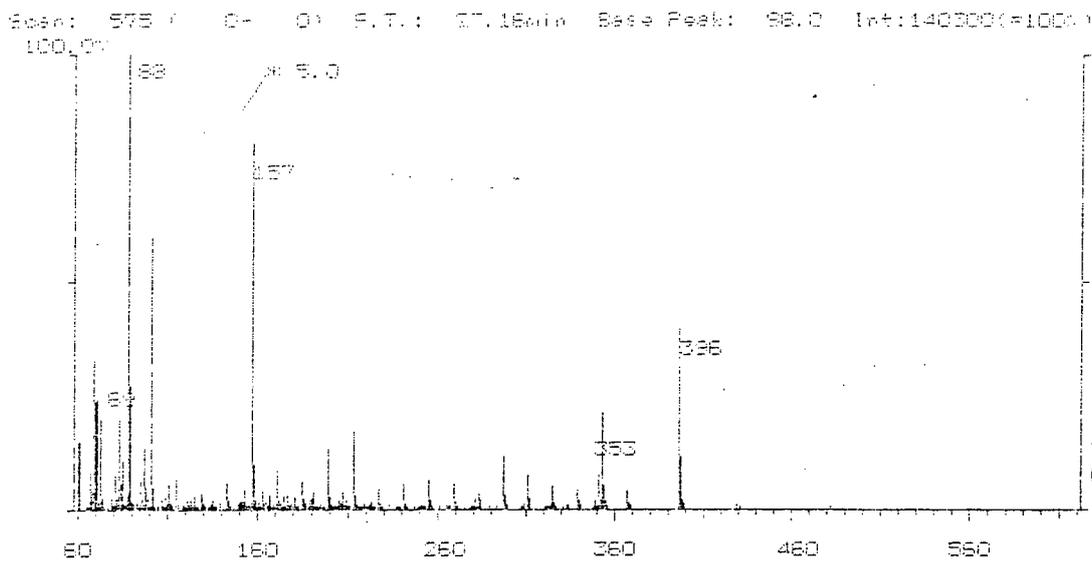
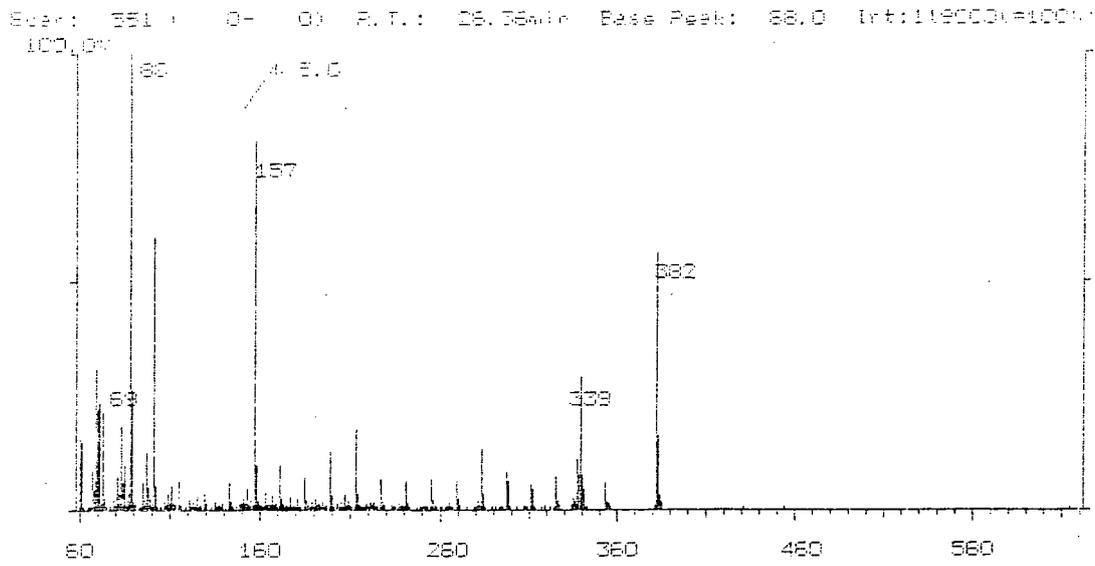


FIGURA 4

Continuação...

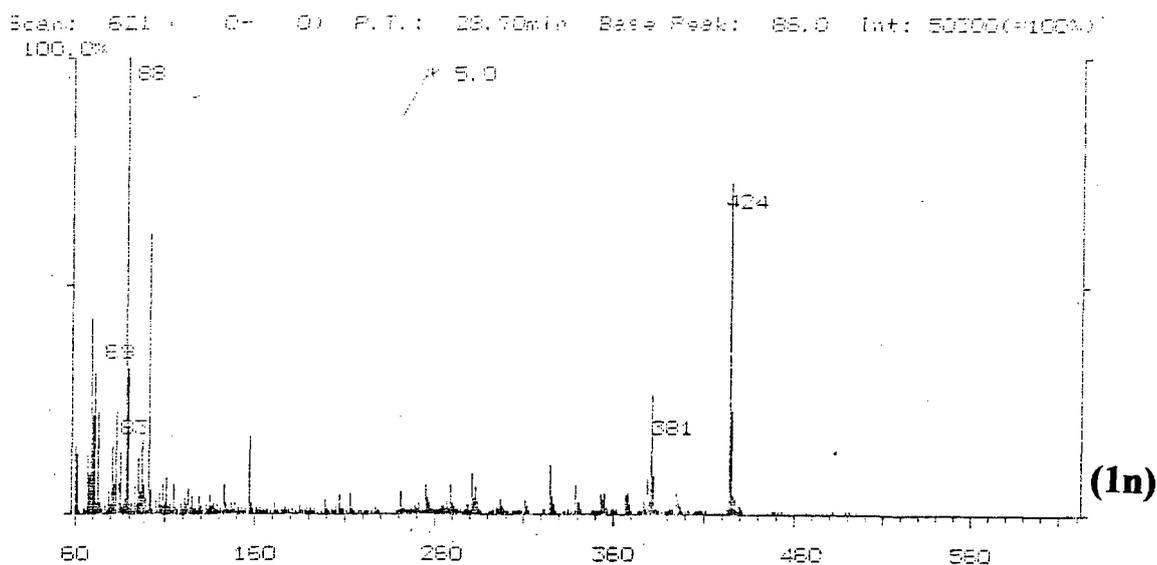


FIGURA 4

Continuação.

4.2.2 - Identificação de Stigma-3,5-dien-7-ona [18]

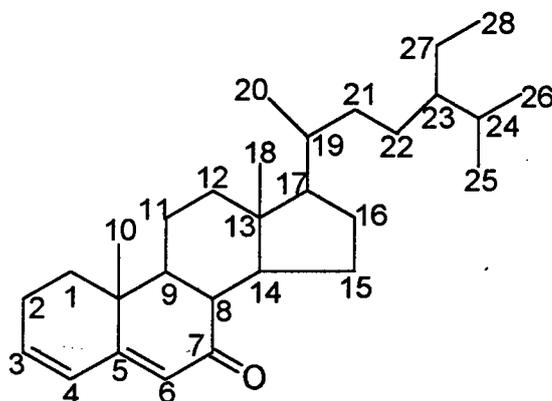
A identificação de stigma-3,5-dien-7-ona foi feita pela análise de seu espectro de massas e por comparação com dados de massas da literatura.⁴¹

O Espectro de Massas (Figura 5) apresentou o íon molecular M^+ a m/z (% rel.) 410 (40), indicando a fórmula molecular $C_{22}H_{46}O$, e os fragmentos 395 (M-15) (8), 269 (15), 187 (25), 174 (85), 161 (30) e 43 (100),

O fragmento m/z 43 (100) define o grupo isopropil terminal na cadeia lateral.

A perda da cadeia lateral ligada ao anel “D” dá origem ao fragmento m/z 269 (M-141).

O fragmento m/z 174 resultante da quebra da molécula no anel “C”, juntamente com os íons a m/z 187 (174-14) e 181 (174+14) permitem inferir as insaturações nos anéis “A” e “B” e a presença do grupo carbonila em C-7.



Stigmasta - 3,5 - dien -7 - ona [18]

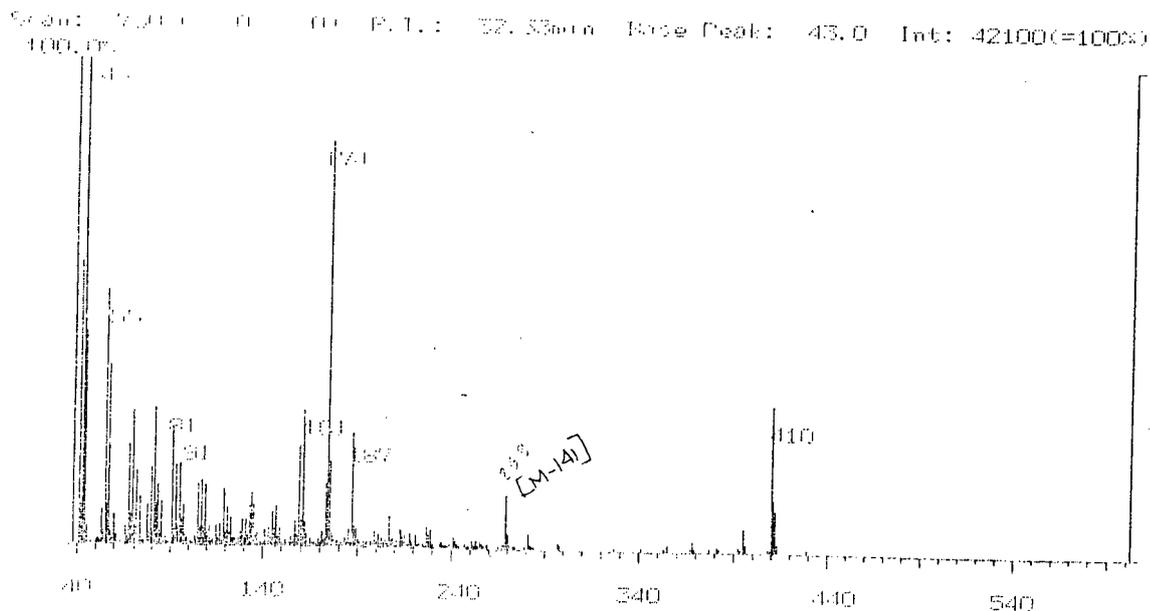


FIGURA 5 - Espectro de Massas com impacto eletrônico de 70 eV de stigmasta-3,5-dien-7-ona.

4.3 - Isolamento e Identificação dos Triterpenos

Os triterpenos foram isolados a partir do fracionamento em coluna de sílica gel do Extrato Bruto Hidroalcoólico e por sucessivas recromatografias das frações MR-20-23 e MR-42-45. O fluxograma apresentado na Figura 6 mostra de maneira esquemática como foram isolados os triterpenos.

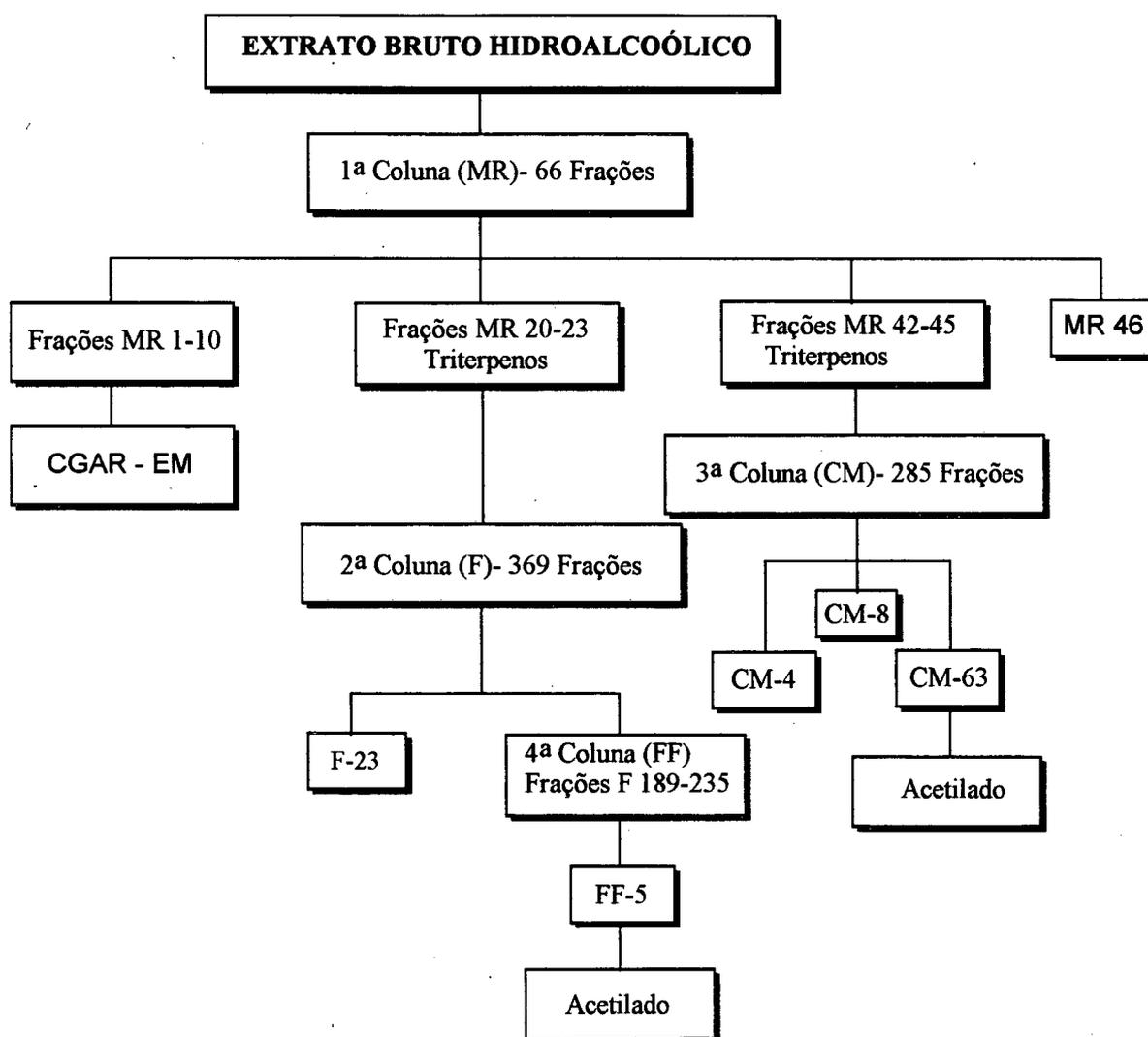


FIGURA 6 - Fluxograma mostrando a obtenção dos compostos puros a partir do Extrato Bruto Hidroalcoólico de *Maytenus robusta* Reiss.

4.3.1 - 3-oxo friedelano (friedelina) - Fração F - 23 [19]

O material sólido branco obtido da fração F-23, do refractionamento da fração MR 20-23, foi purificado por sucessivas recristalizações em acetona obtendo-se cristais brancos de ponto de fusão 263 °C.

A análise por Cromatografia Gasosa de Alta Resolução (CGAR) mostra a presença de um único composto com tempo de retenção 32.6min. (Figura 7).

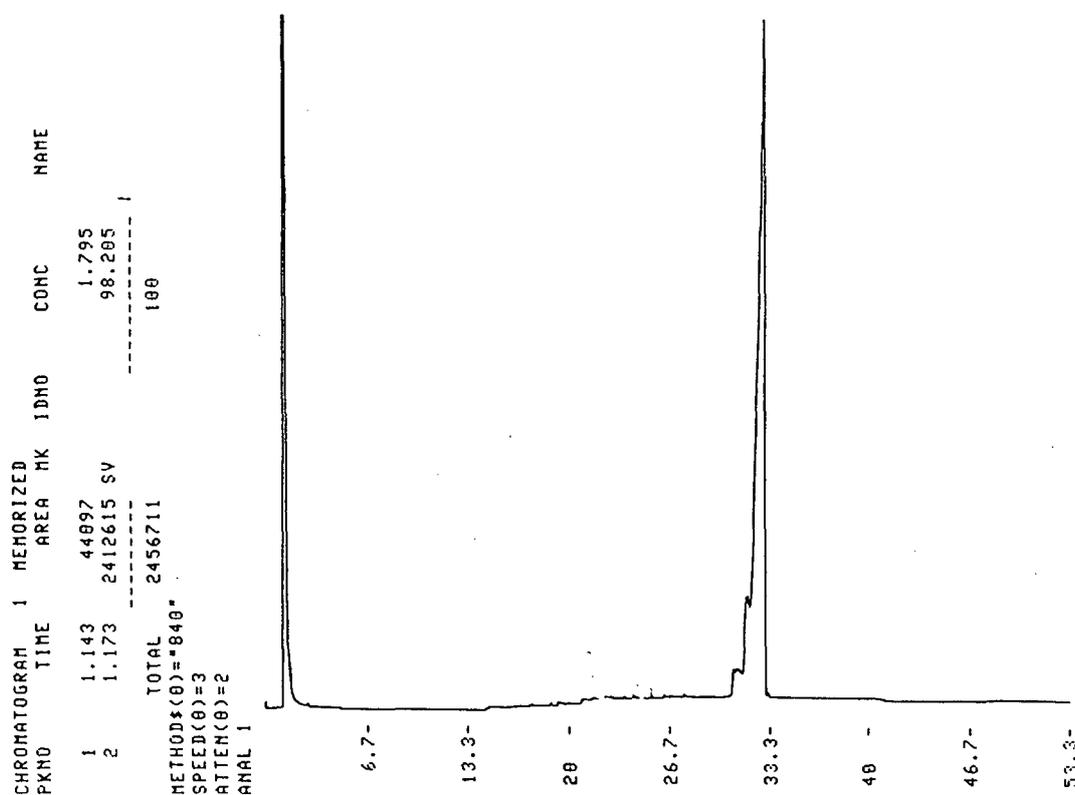


FIGURA 7 - Cromatograma de 3-oxo friedelano (friedelina) F-23.

O Espectro de Ultravioleta (Figura 8) mostrou uma fraca absorção em 275nm sugerindo a presença do cromóforo carbonila.

O Espectro de Infravermelho (Figura 9) mostrou intensas absorções em 2926 e 2866 cm^{-1} para estiramentos C-H e em 1714 cm^{-1} para grupo carbonila. O padrão de absorção no infravermelho tem um perfil característico de triterpeno.

O Espectro de Massas (Figura 10) mostrou o pico molecular M^+ a m/z (% rel.) 426 (65) e a presença de fragmentos a m/z 411 (35) para perda de um grupo metila, 341 [M-85] (20), 302 [M-124] (45), 287 [M-139] (20) e 273 [M-153] (100).

A Figura 11 apresenta um caminho geral de fragmentação para os friedelanos. A intensidade dos fragmentos depende do grau e posição de oxigenação na molécula. No caso da friedelina destaca-se os principais fragmentos diagnósticos: “a” ou “f” = M-85 a m/z 341 e “d” = M-129 a m/z 302. O fragmento “b” = M-153 a m/z 273 (100) é o principal íon diagnóstico para os friedelanos não substituídos ao nível do anel “D”.⁴⁹

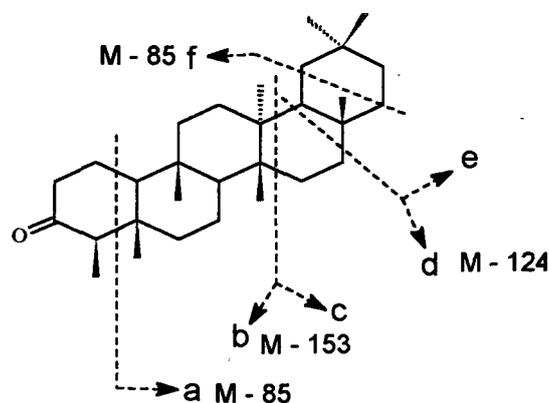
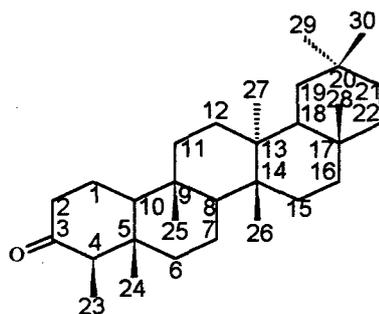


FIGURA 11 - Proposta de fragmentação dos principais íons do Espectro de Massas do composto F-23 (3-oxo friedelano).

O Espectro de RMN ^1H (Figura 12) apresenta um perfil de absorções característico de triterpenos. Observa-se sinais referentes a sete metilas quaternárias e uma metila dublete provavelmente no carbono C-4. O grupo de sinais na região de 2,3 ppm com integração para três prótons e com constantes de acoplamento geminal e vicinal (e-a, e-e) sugerem o grupo carbonila situado no carbono C-3.

O Espectro de RMN ^{13}C (Figuras 13-14) apresentou trinta sinais que com o auxílio do Espectro DEPT (Figura 15) podem ser assim atribuídos: oito metilas, 11 metilenos, 4 metinos, 6 carbonos quaternários e uma carbonila. A Tabela VII mostra os valores dos deslocamentos químicos do espectro de RMN ^{13}C de F-23 (3-oxo friedelano) com as devidas atribuições e compara com os valores da literatura para a friedelina.⁴⁷ Isto permitiu a identificação do composto F-23 como sendo 3-oxo friedelano.



3-oxo friedelano (friedelina)[19]

TABELA VII - Atribuição dos dados de RMN ^{13}C para (F - 23) 3-oxo friedelano, comparando com os dados da literatura para friedelina.⁴⁷

^{13}C	3-oxo-friedelano ⁴⁷	3-oxo-friedelano (friedelina)(f-23)	
	^{13}C	^{13}C	DEPT
1	22.3	22.2	CH ₂
2	41.5	41.44	CH ₂
3	213.2	213.19	C=O
4	58.2	58.13	CH
5	42.1	42.05	C
6	41.3	41.20	CH ₂
7	18.2	18.14	CH ₂
8	53.1	53.00	CH
9	37.4	37.35	C
10	59.4	59.38	CH
11	35.6	35.53	CH ₂
12	30.5	30.41	CH ₂
13	39.7	39.60	C
14	38.3	38.20	C
15	32.4	32.33	CH ₂
16	36.0	35.92	CH ₂
17	30.0	29.90	C
18	42.8	42.70	CH
19	35.3	35.25	CH ₂
20	28.1	28.08	C
21	32.7	32.68	CH ₂
22	39.2	39.16	CH ₂
23	6.8	6.73	CH ₃
24	14.6	14.56	CH ₃
25	17.9	17.85	CH ₃
26	20.2	20.16	CH ₃
27	18.6	18.57	CH ₃
28	32.1	32.00	CH ₃
29	35.0	34.95	CH ₃
30	31.8	31.69	CH ₃

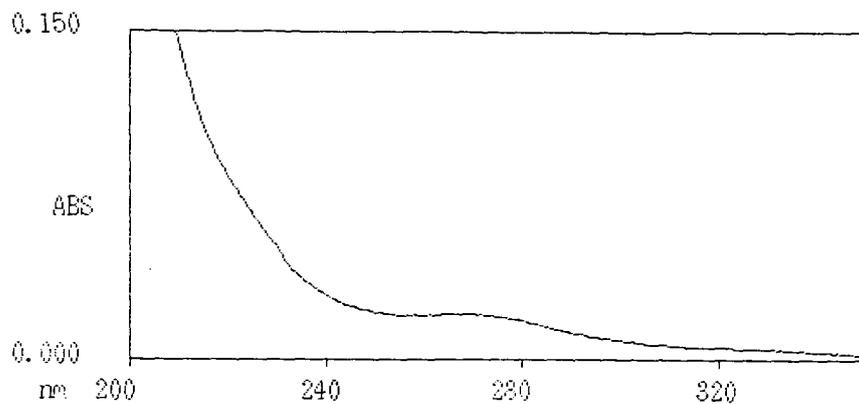


FIGURA 8 - Espectro de Ultravioleta de F-23 (3-oxo friedelano) em clorofórmio.

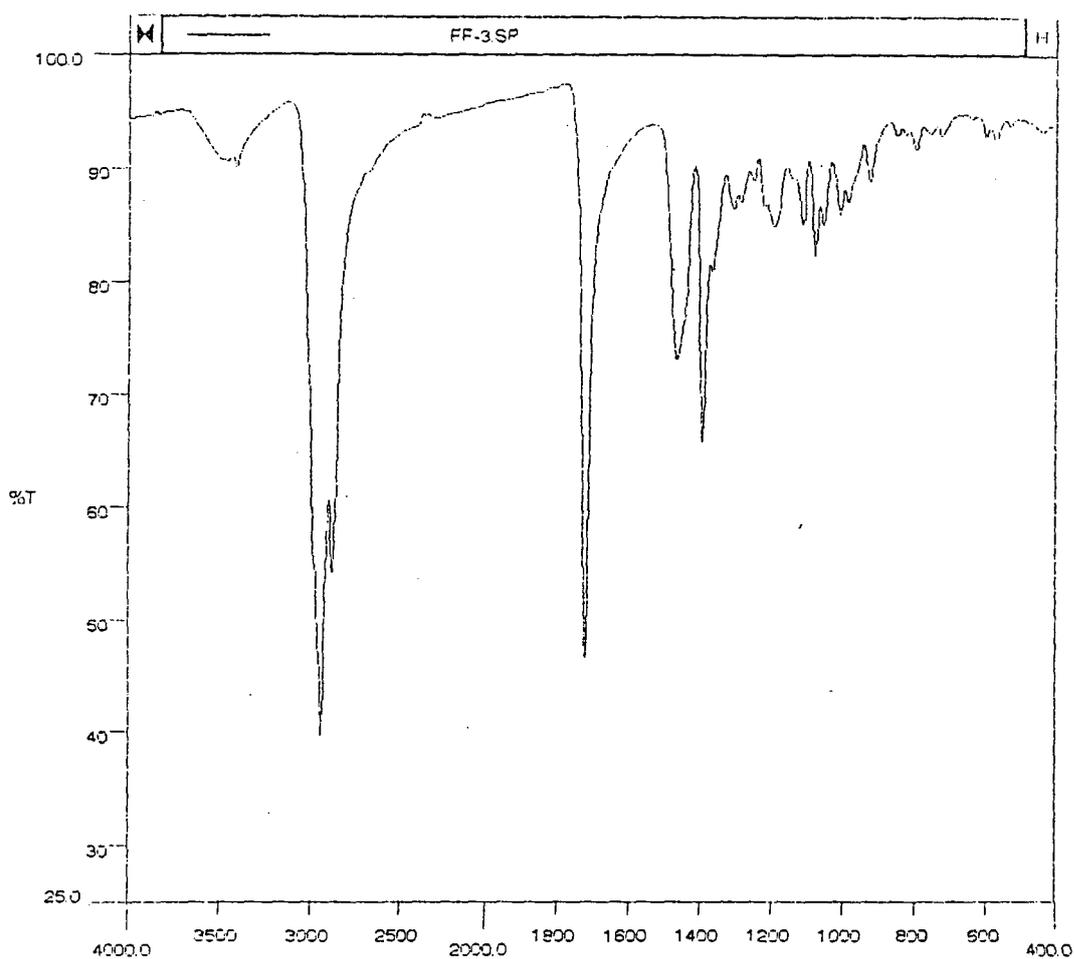


FIGURA 9 - Espectro de Infravermelho de F - 23 (3-oxo-friedelano) em pastilha comprimida de KBr.

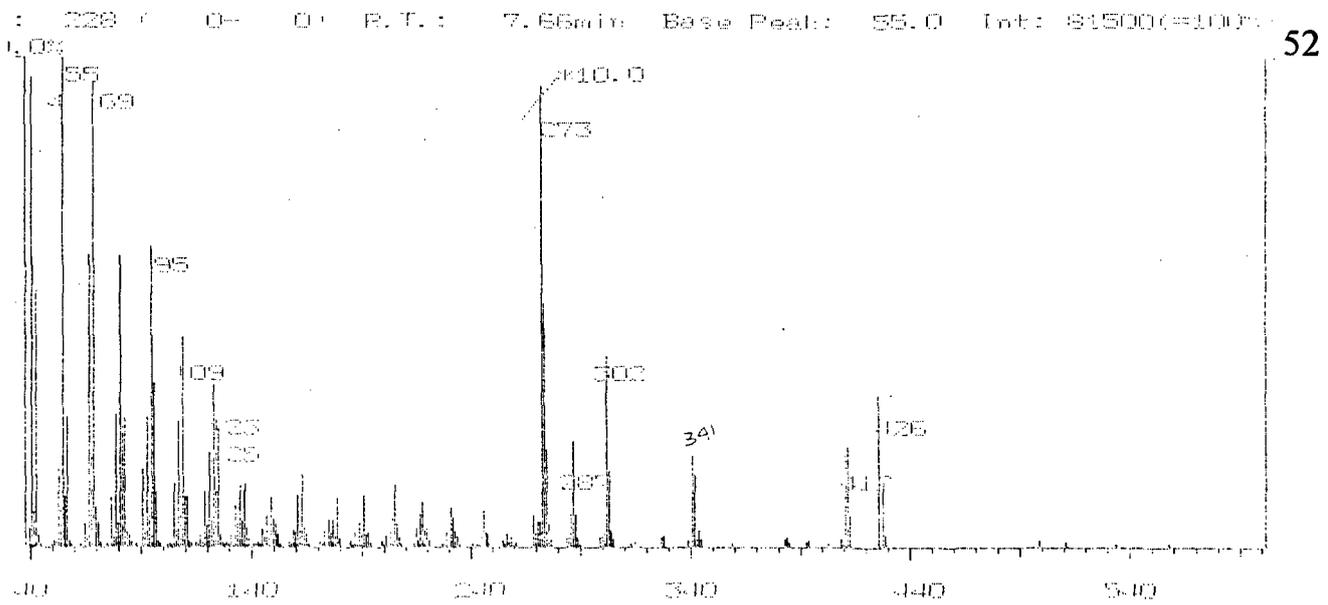


FIGURA 10 - Espectro de Massas com impacto eletrônico de 70eV de F-23 (3-oxo friedelano).

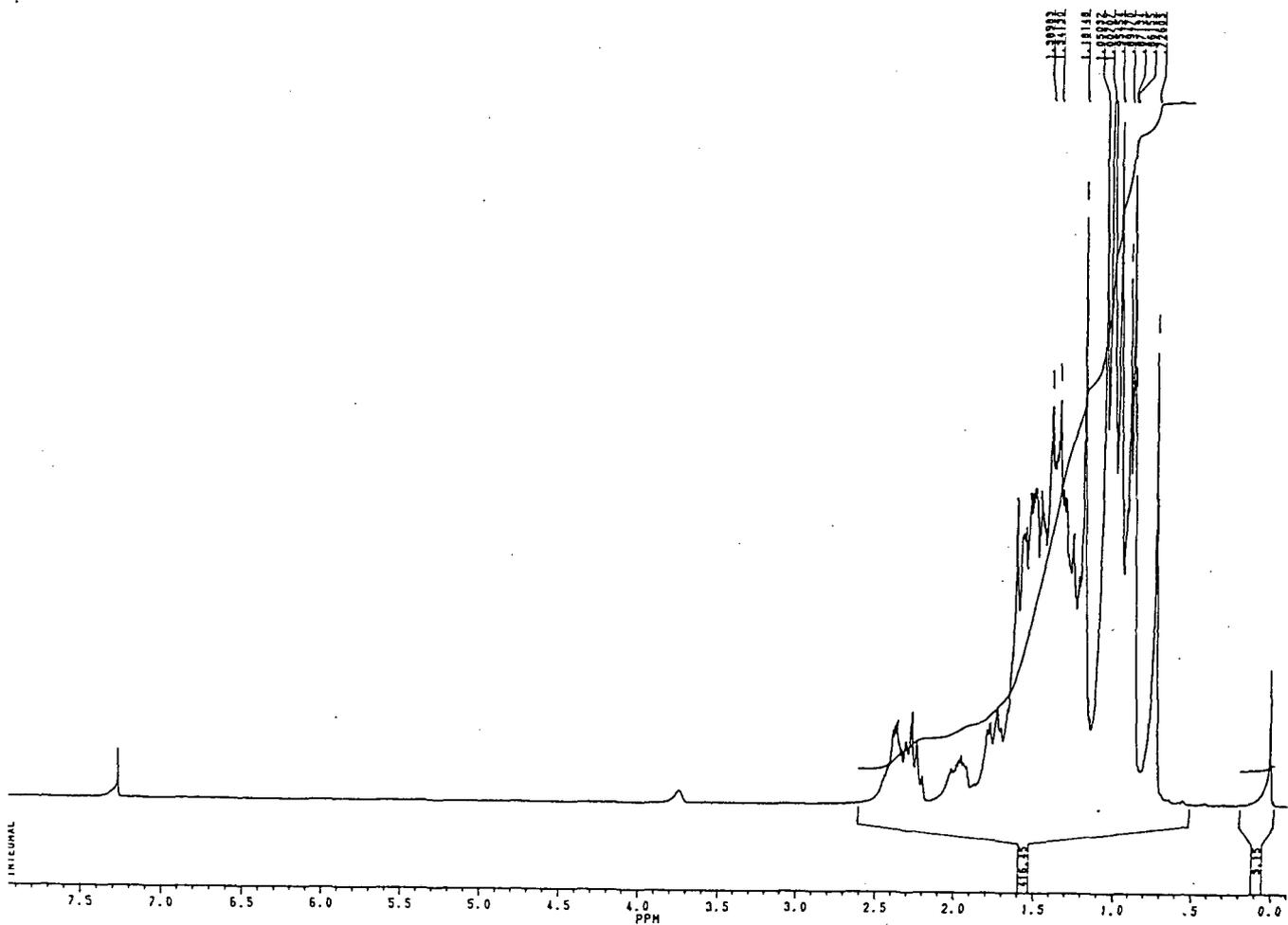


FIGURA 12 - Espectro de RMN ^1H (200 MHz, CDCl_3) de F-23 (3-oxo friedelano).

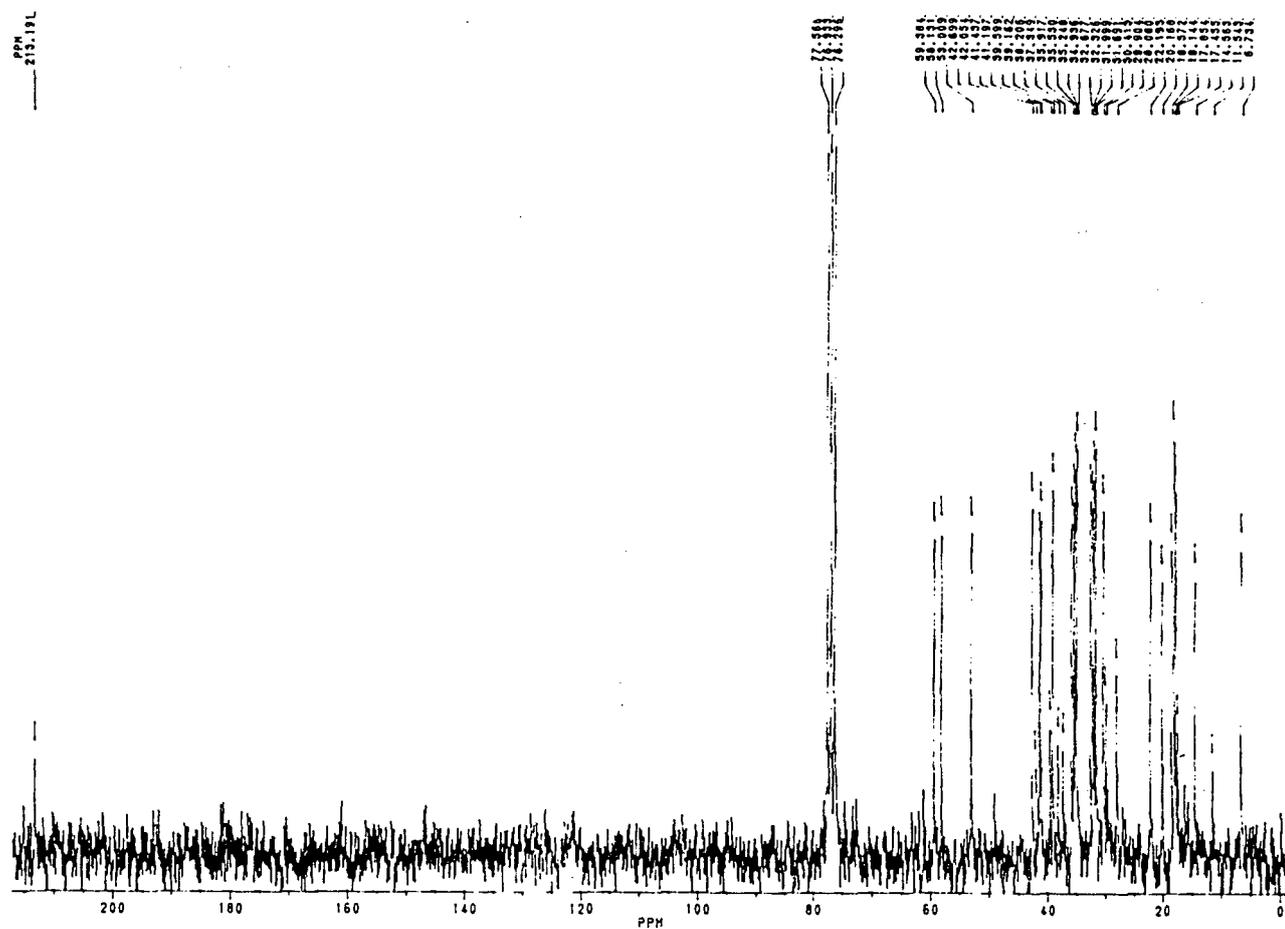


FIGURA 13 - Espectro de RMN ^{13}C (50 MHz, CDCl_3) de F-23 (3-oxo friedelano).

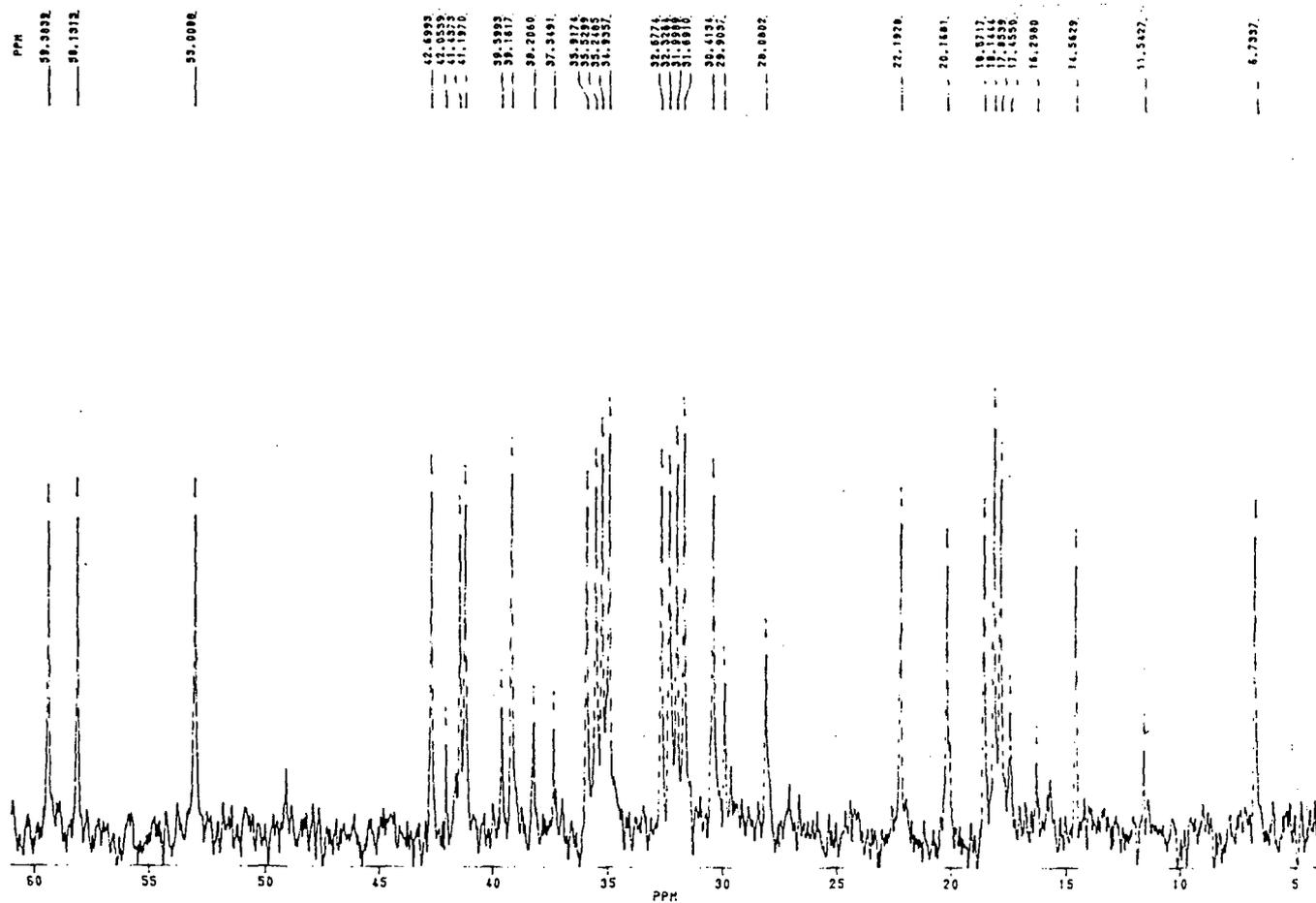


FIGURA 14 - Espectro de RMN ^{13}C ampliado na região 5 a 60 ppm (50 MHz, CDCl_3) de F-23 (3-oxo friedelano).

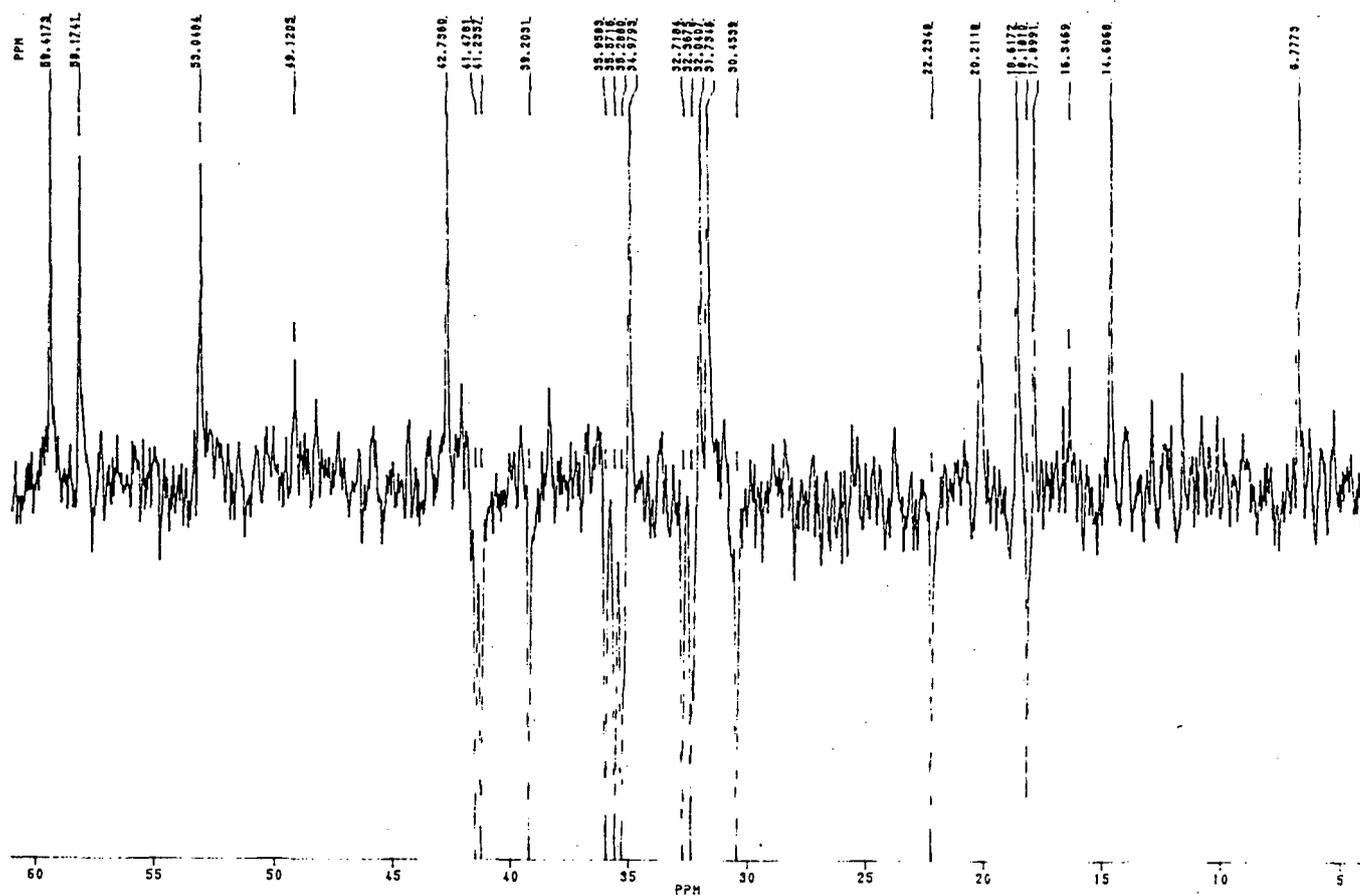


FIGURA 15 - Espectro DEPT (50 MHz, CDCl₃) de F-23 (3-oxo friedelano).

4.3.2 - 3 β -hidroxi friedelano (friedelinol) - Fração FF - 5 [20]

O material sólido obtido nas frações F 189-235 do refractionamento das frações MR 20-23 foi recromatografado em coluna de sílica gel. A fração FF-5 apresentou grande quantidade de um sólido branco que foi purificado por recristalização em acetona resultando num composto puro com ponto de fusão 279 °C.

O Espectro de Infravermelho (Figura 16) mostrou um padrão de absorção característico de triterpenos com intensa absorção em 2932 e 2868 cm^{-1} devido a estiramentos C-H e intensa e fina absorção em 3474 cm^{-1} indicando a presença de um grupo hidroxila livre.

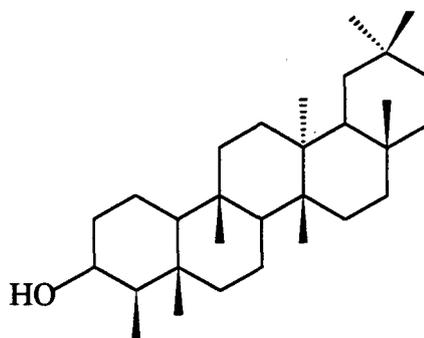
O Espectro de Massas (Figura 17) mostrou o pico molecular M^+ a m/z (% rel.) 428 (20) e fragmentos a m/z 413 [M-15] (45) e 395 [M-15-18] (20), indicando a perda sucessiva de um radical metila e água, o que caracteriza o grupo hidroxila secundário.

O Espectro de Massas mostra ainda os fragmentos a m/z 341 M-87 (15), 302 (20), 273 (10) e 232 (20).

O Espectro de RMN ^1H (Figura 18) apresentou um pico de absorção típica de triterpenos mostrando sinais para sete metilas quaternárias e um metila dublete provavelmente no carbono C-4. Um sinal largo em 3.75 ppm com integração para um próton foi atribuído ao hidrogênio ligado no carbono C-3.

O Espectro de RMN ^{13}C (Figura 19-20) apresentou trinta sinais que juntamente com DEPT (Figura 21) notamos a presença de: oito metilas, 11 metilenos, cinco metinos e seis carbonos quaternários. O sinal em 72.72 ppm para um CH, adicionado a absorção em 3477 cm^{-1} na região do infravermelho e

a perda de água no espectro de massas, confirma a presença de um grupo OH secundário. A Tabela VIII mostra as atribuições dos dados de RMN ^{13}C /DEPT obtidos para o composto FF-5 identificado como sendo 3 β -hidroxi friedelano e compara com os dados da literatura para friedelinol.⁷



3, β -hidroxi friedelano (friedelinol) [20]

TABELA VIII - Atribuição dos dados de RMN ^{13}C para FF-5 (3, β hidroxifriedelano) e comparação com os dados da literatura.⁷

C	3β-OH-27-COOH⁷	3,β-hidroxifriedelano (FF-5)	
	RMN ^{13}C	RMN ^{13}C	DEPT
1	17.80	17.50	CH ₂
2	35.00	35.13	CH ₂
3	72.70	72.72	CH
4	49.00	49.12	CH
5	37.30	37.06	C
6	41.40	41.67	CH ₂
7	15.80	15.75	CH ₂
8	53.20	53.15	CH
9	37.90	37.79	C
10	61.20	61.30	CH
11	37.90	35.50	CH ₂
12	27.80	30.60	CH ₂
13	54.80	39.62	C
14	39.30	38.32	C
15	32.80	32.76	CH ₂
16	35.60	36.04	CH ₂
17	36.70	29.97	C
18	43.30	42.78	CH
19	35.70	35.29	CH ₂
20	28.50	28.13	C
21	32.50	32.29	CH ₂
22	38.20	39.24	CH ₂
23	11.60	11.58	CH ₃
24	16.40	16.35	CH ₃
25	18.80	18.61	CH ₃
26	22.50	20.08	CH ₃
27	17.90	18.20	CH ₃
28	31.10	31.75	CH ₃
29	30.60	32.05	CH ₃
30	35.30	35.00	CH ₃

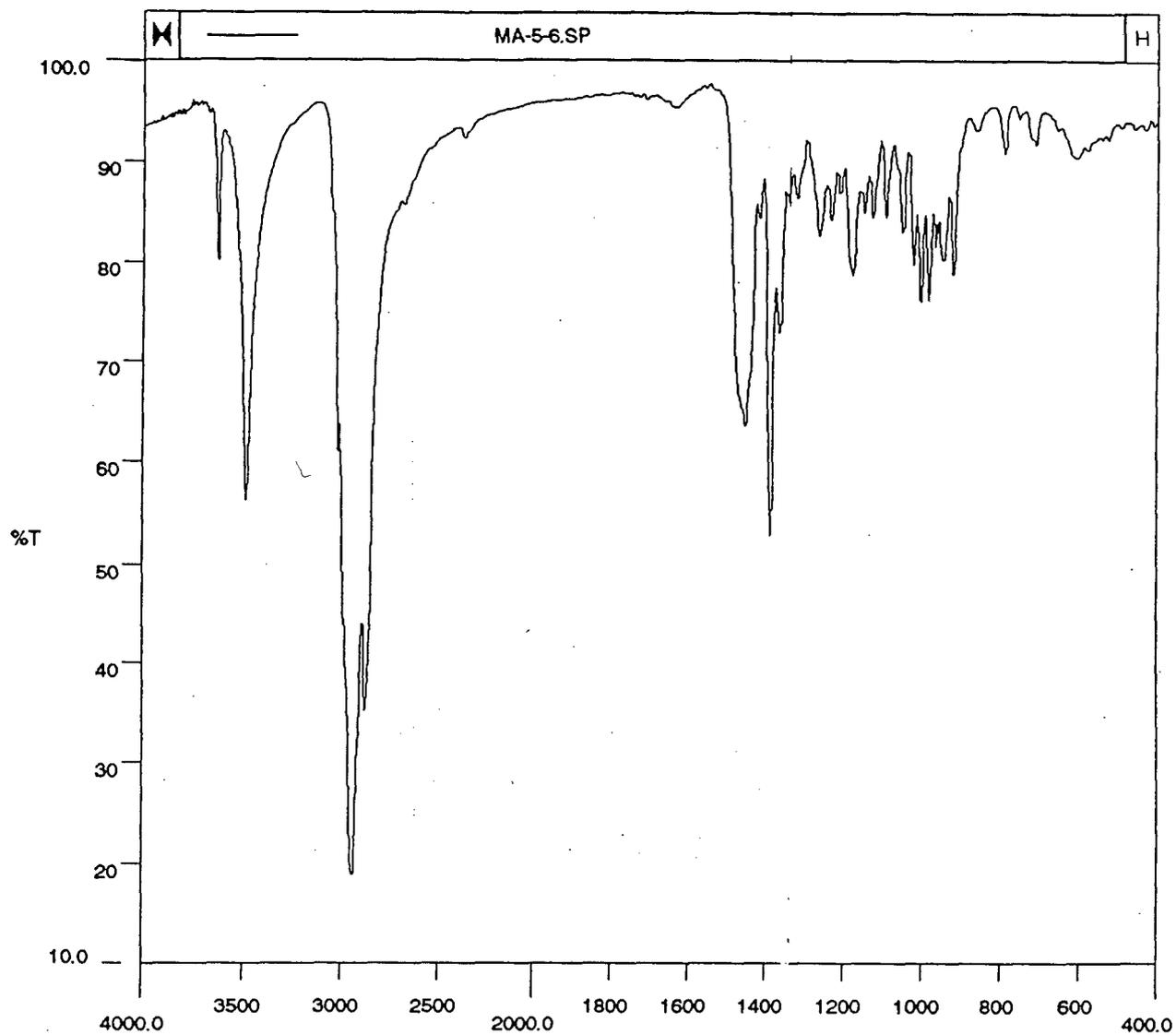


FIGURA 16- Espectro de Infravermelho de FF-5 (3β -hidroxi-friedelano) em pastilha comprimida de KBr.

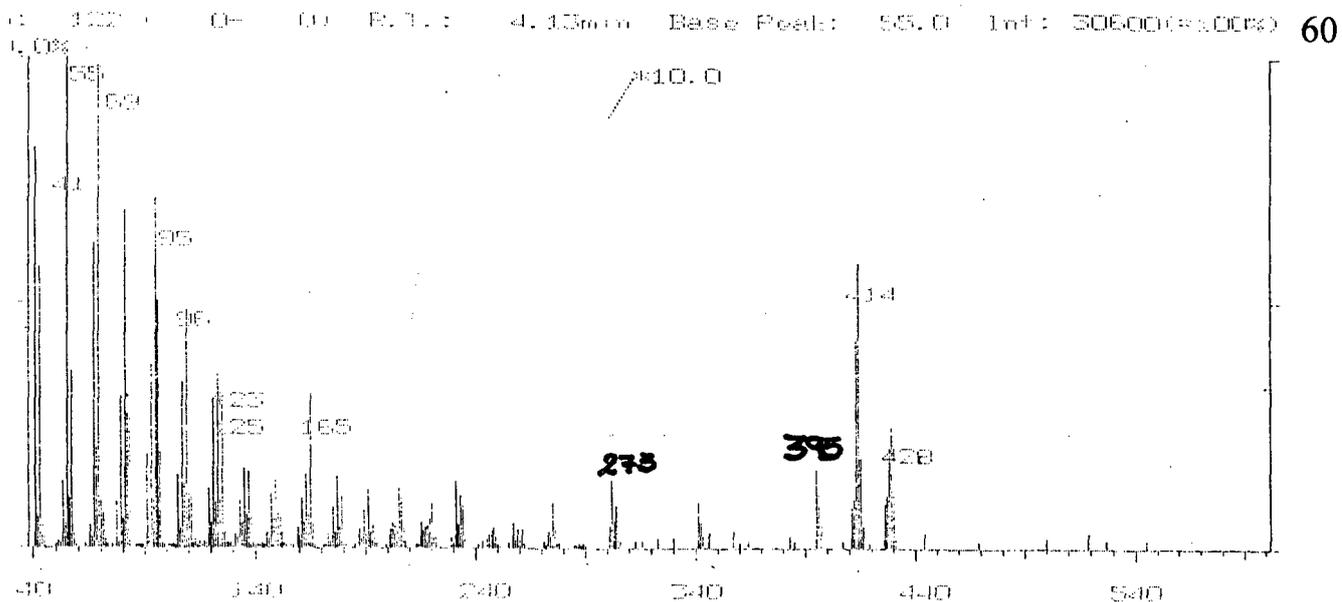


FIGURA 17 - Espectro de Massas com impacto eletrônico de 70eV de FF-5 (3 β -hidroxi-friedelano).

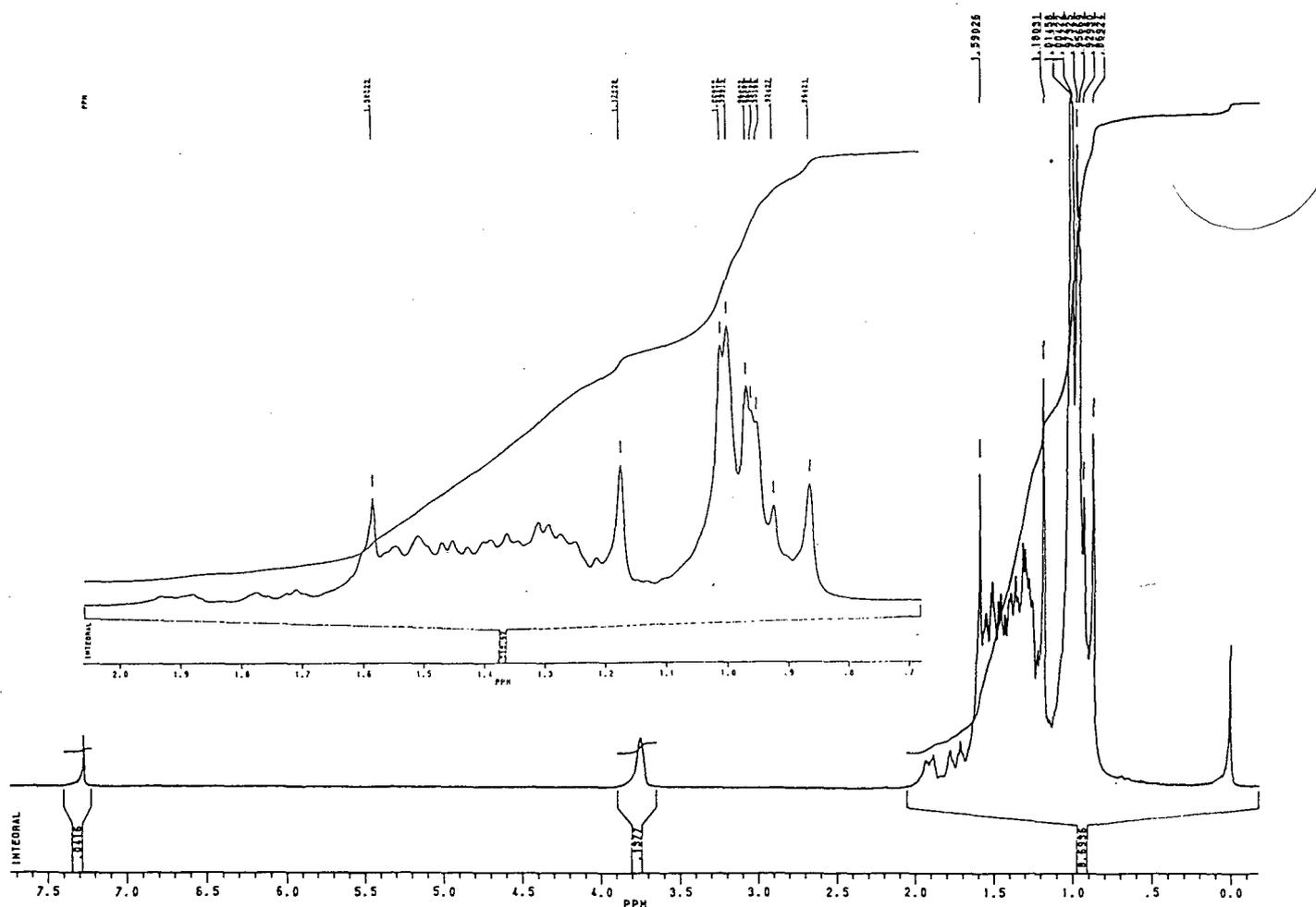


FIGURA 18 - Espectro de RMN ^1H (200MHz, CDCl_3) de FF-5 (3 β -hidroxi-friedelano).

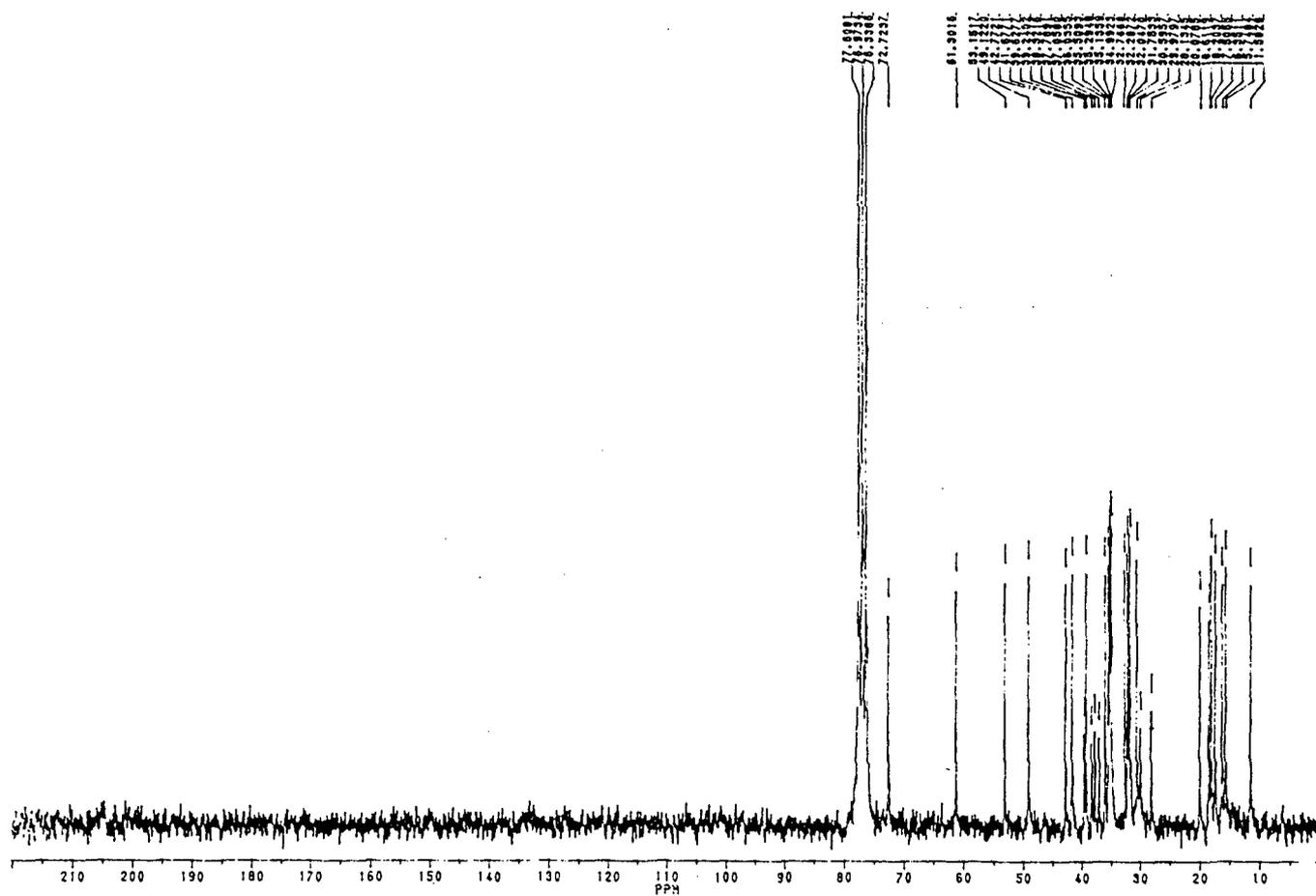


FIGURA 19 - Espectro de RMN ^{13}C (50 MHz, CDCl_3) de FF-5 (3 β -hidroxi-friedelano).

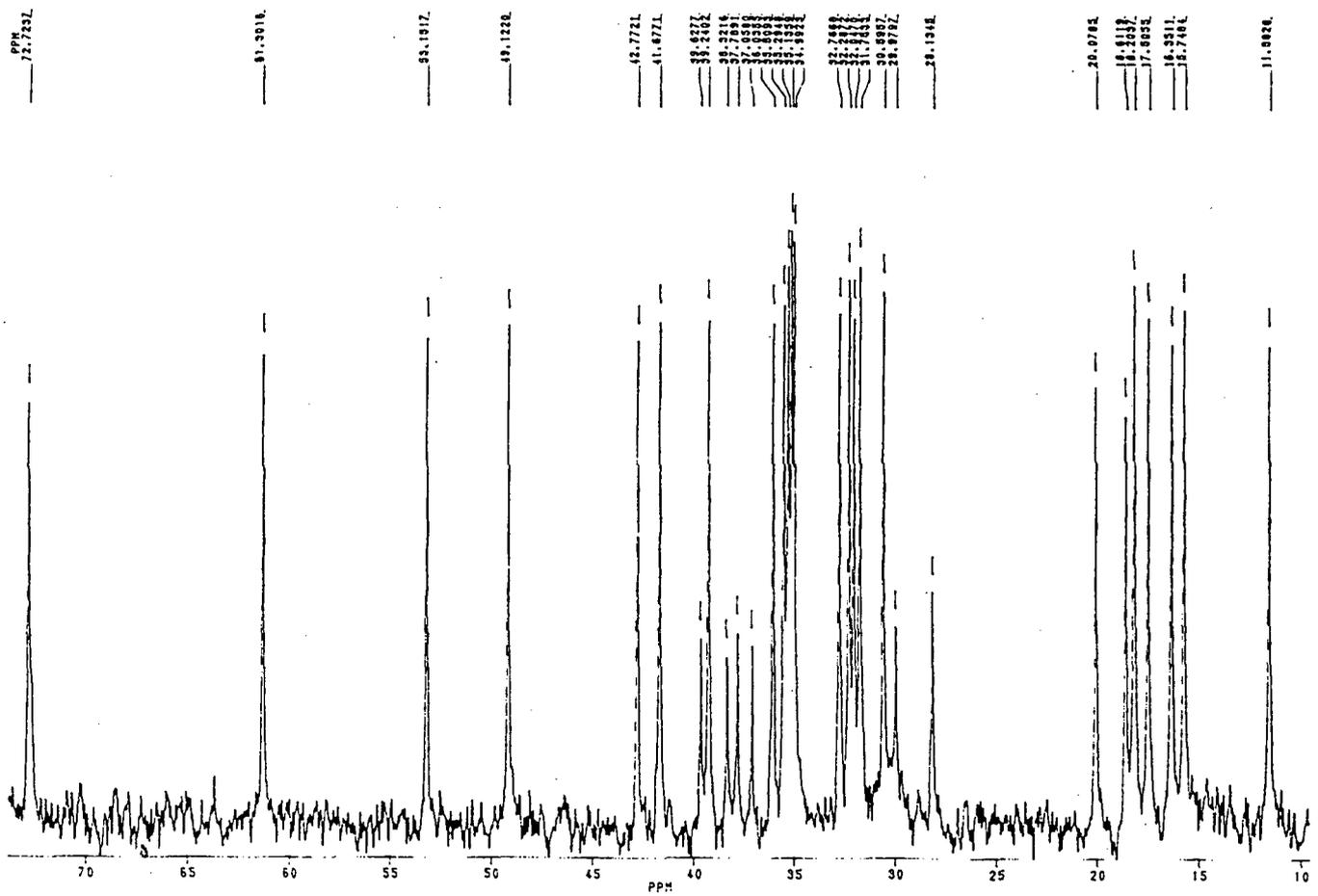


FIGURA 20 - Espectro de RMN ^{13}C ampliado na região de 10 a 70 ppm (50 MHz, CDCl_3) de FF-5 (3 β -hidroxi-friedelano).

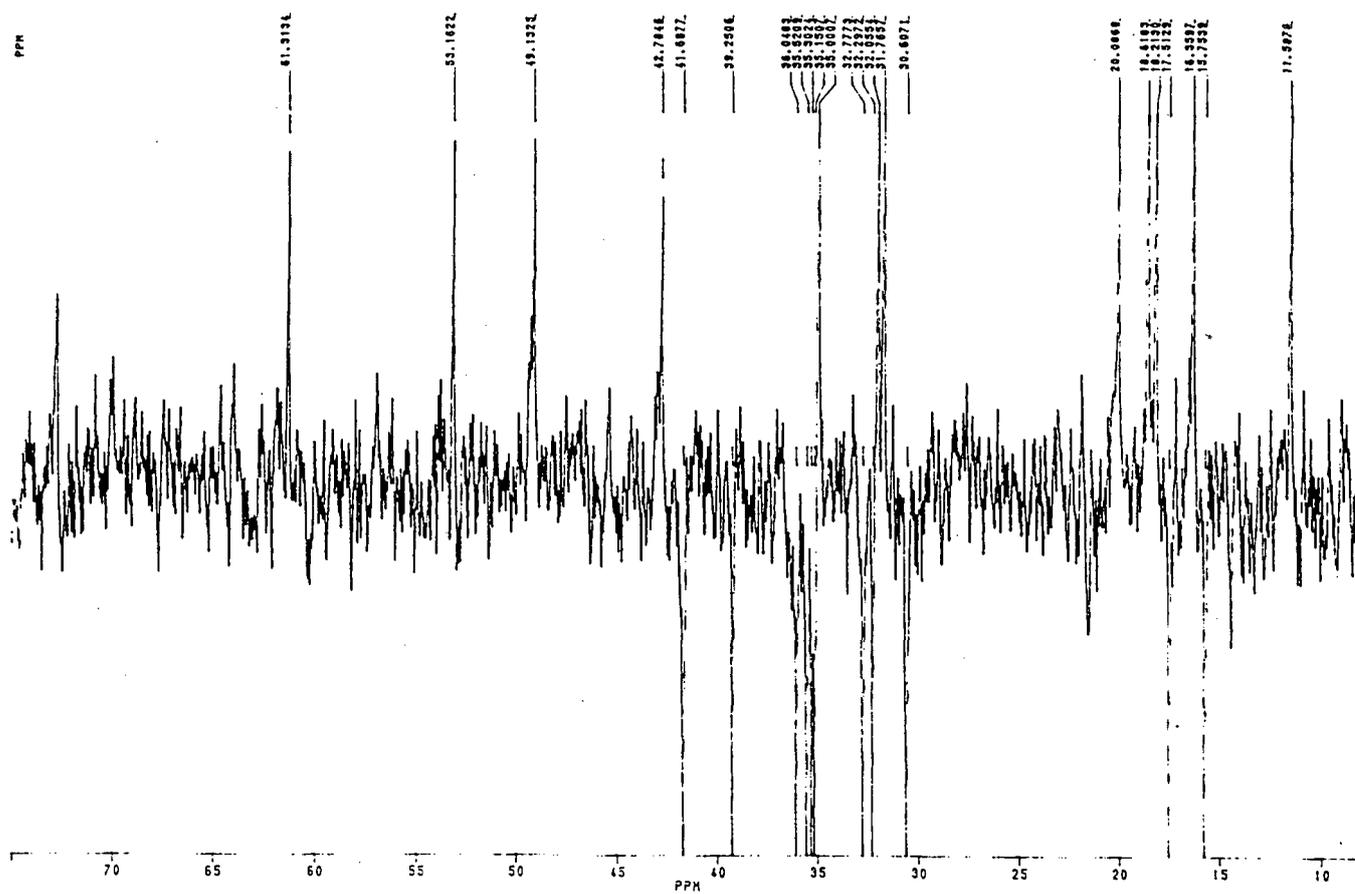


FIGURA 21 - Espectro de DEPT de FF-5 (3 β -hidroxi friedelano).

4.3.3 - 3,15 dioxo friedelano - Fração (CM-8) [21]

O material sólido obtido na fração CM-8 resultante do refractionamento da fração MR 42-45 foi recristalizado em acetona até obtenção de ponto de fusão constante de 283 °C

O Espectro de Ultravioleta (Figura 22) mostrou uma absorção máxima de baixa intensidade a 283nm típica do cromóforo carbonila exocíclico.

O Espectro de Infravermelho (Figura 23) apresenta um padrão de absorção típico de triterpenos destacando uma intensa e longa banda de absorção em 1714 cm^{-1} atribuída aos grupos carbonila.

Comparando a feição e intensidade relativa da absorção da carbonila com a absorção do estiramento CH em 2934-2868 cm^{-1} , inferimos a presença de duas carbonilas.

O Espectro de Massas (Figura 24) mostrou o pico molecular M^+ a m/z (% rel.) 440 (35) e com fragmentos de m/z 425 (55) para perda de metila, 408 [M-32] (25). A ausência do fragmento “b” (quebra ao nível do anel “D” a maior abundância do fragmento “f” a m/z 355 [M-85] (50) (fragmento típico de quebra no anel “E”) permitiu localizar uma segunda carbonila no anel “D” em C-15.⁴⁹

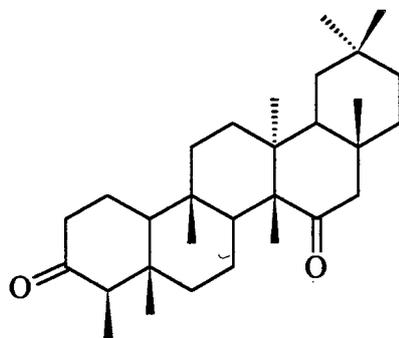
O Espectro de RMN¹H (Figura 25) com um padrão de absorções típico de triterpenos apresentou sinais para sete metilas quaternárias, e uma metila dublete. O multiplete na região de 2.3 ppm com integração para três hidrogênios está de acordo com a estrutura de um friedelano 3-oxo, e pode então ser atribuído a dois hidrogênios ligados ao carbono C-2 e a um hidrogênio ligado ao carbono C-4. O duplo dublete com integração para um

próton cada, centrados em 2.18 ppm e 2.51 ppm com constante de acoplamento geminal, são atribuídos aos prótons ligados ao carbono C-16, localizando a segunda carbonila no carbono C-15. Segundo os dados espectrais de RMN ^1H poderíamos propor teoricamente outras cinco estruturas localizando a segunda carbonila nos carbonos C-16, C-21, C-22, C-11 e C-12, mas a localização da carbonila em C-15 foi feita com base em dois importantes aspectos, o fragmento m/z 355 (50) do espectro de massas e o valor dos deslocamentos químicos no espectro de RMN ^{13}C .

O Espectro de RMN ^{13}C (Figuras 26-27) mostrou absorção para vinte e oito carbonos alifáticos não oxigenados e dois sinais em 213.77 e 214.84ppm que pelos seus deslocamentos químicos indicam oxidação nos carbonos C-3 e C-15, confirmando assim a presença das duas carbonilas na molécula.

A análise do espectro de RMN ^{13}C , DEPT (Figura 28) e HETCOR (Figura 29) mostraram a presença de oito metilas, dez metilenos, quatro metinos e seis carbonos quaternários e os dois carbonílicos em C-3 e C-15.

A tabela IX mostra os assinalamento para 3,15-dioxofriedelano comparando com os dados da literatura.⁹



3,15-dioxo friedelano [21]

TABELA IX - Atribuição dos dados de RMN ^{13}C para CM - 8 (3,15 dioxo friedelano) e comparação com os dados da literatura.⁹

C	3,15- dioxo friedelano ⁹	3,15-dioxo-friedelano (CM-8)	
	^{13}C	^{13}C	DEPT
1	22.3	22.91	CH ₂
2	41.4	42.07	CH ₂
3	213.1	213.77	C=O
4	58.2	58.86	CH
5	42.0	42.71	C
6	40.5	41.11	CH ₂
7	21.3	21.92	CH ₂
8	45.3	45.93	CH
9	37.2	37.86	C
10	59.3	59.91	CH
11	34.3	35.03	CH ₂
12	29.4	30.06	CH ₂
13	42.4	43.02	C
14	54.2	54.85	C
15	214.1	214.84	C=O
16	54.0	54.65	CH ₂
17	33.5	34.14	C
18	44.0	44.64	CH
19	34.9	35.57	CH ₂
20	27.9	28.55	C
21	33.8	34.42	CH ₂
22	38.6	39.28	CH ₂
23	6.8	7.49	CH ₃
24	15.0	15.63	CH ₃
25	17.4	18.01	CH ₃
26	14.7	15.35	CH ₃
27	18.9	19.60	CH ₃
28	32.2	32.82	CH ₃
29	33.3	33.96	CH ₃
30	33.4	34.01	CH ₃

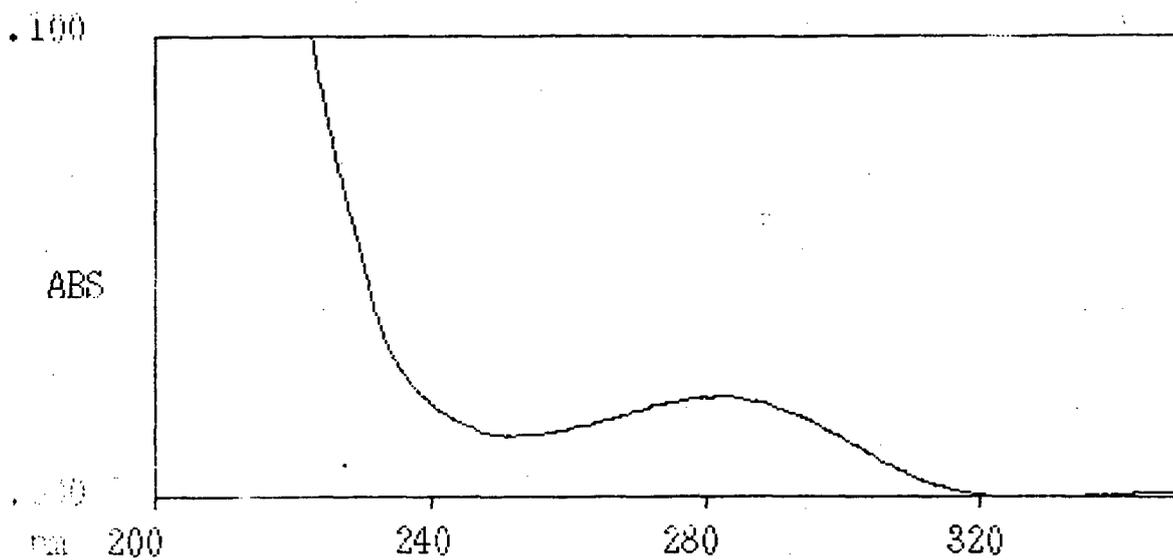


FIGURA 22 - Espectro de Ultravioleta de CM-8 (3,15 dioxo friedelano) em metanol.

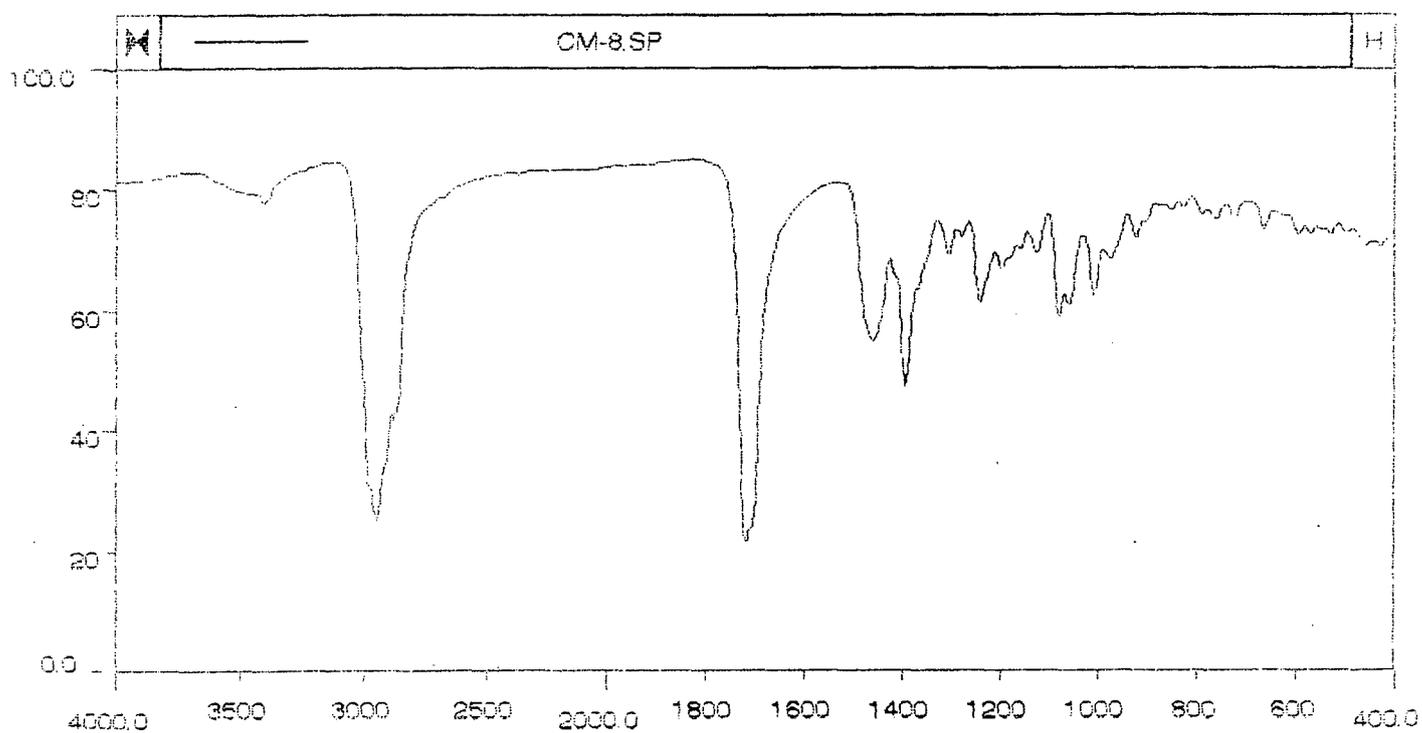


FIGURA 23 - Espectro de Infravermelho de CM-8 (3,15-dioxo friedelano em pastilha comprimida de KBr.

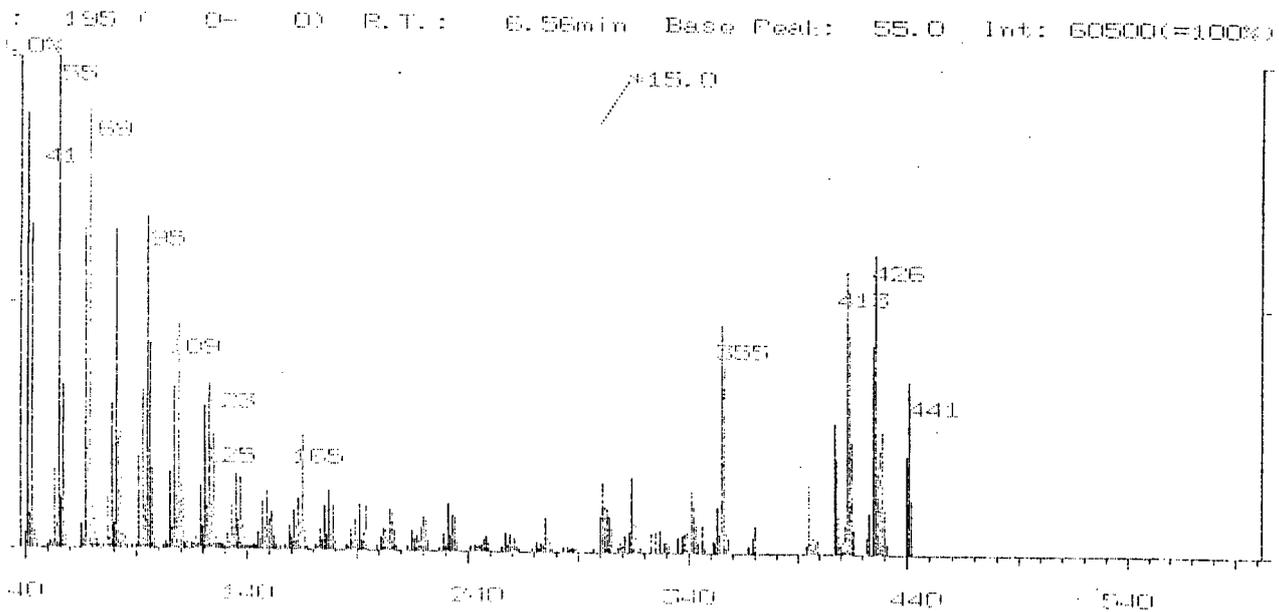


FIGURA 24 - Espectro de Massas com impacto eletrônico de 70eV de CM-8 (3,15-dioxo friedelano).

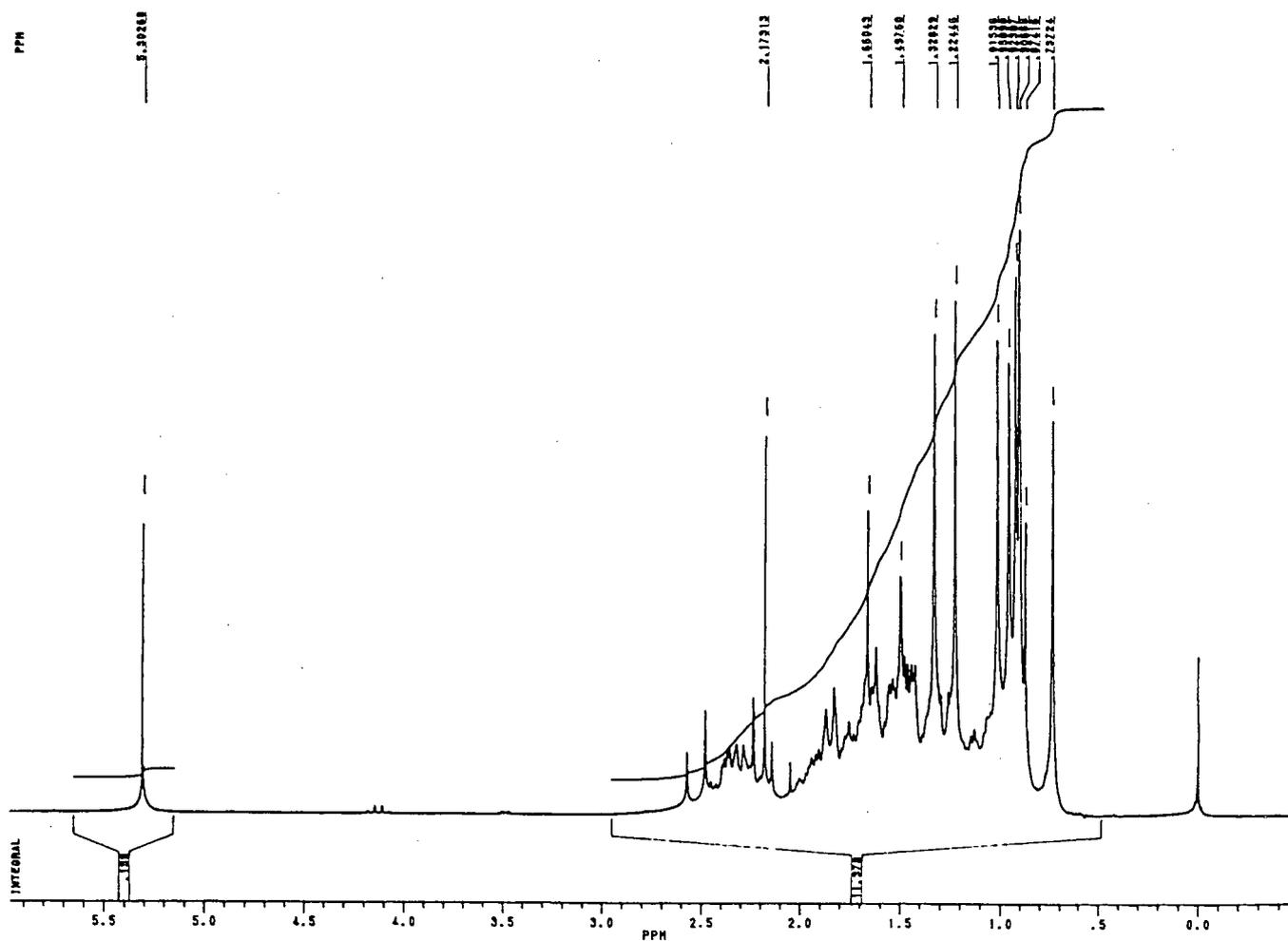


FIGURA 25 - Espectro de RMN ^1H (200MHz, CDCl_3) de CM-8 (3,15-dioxo friedelano).

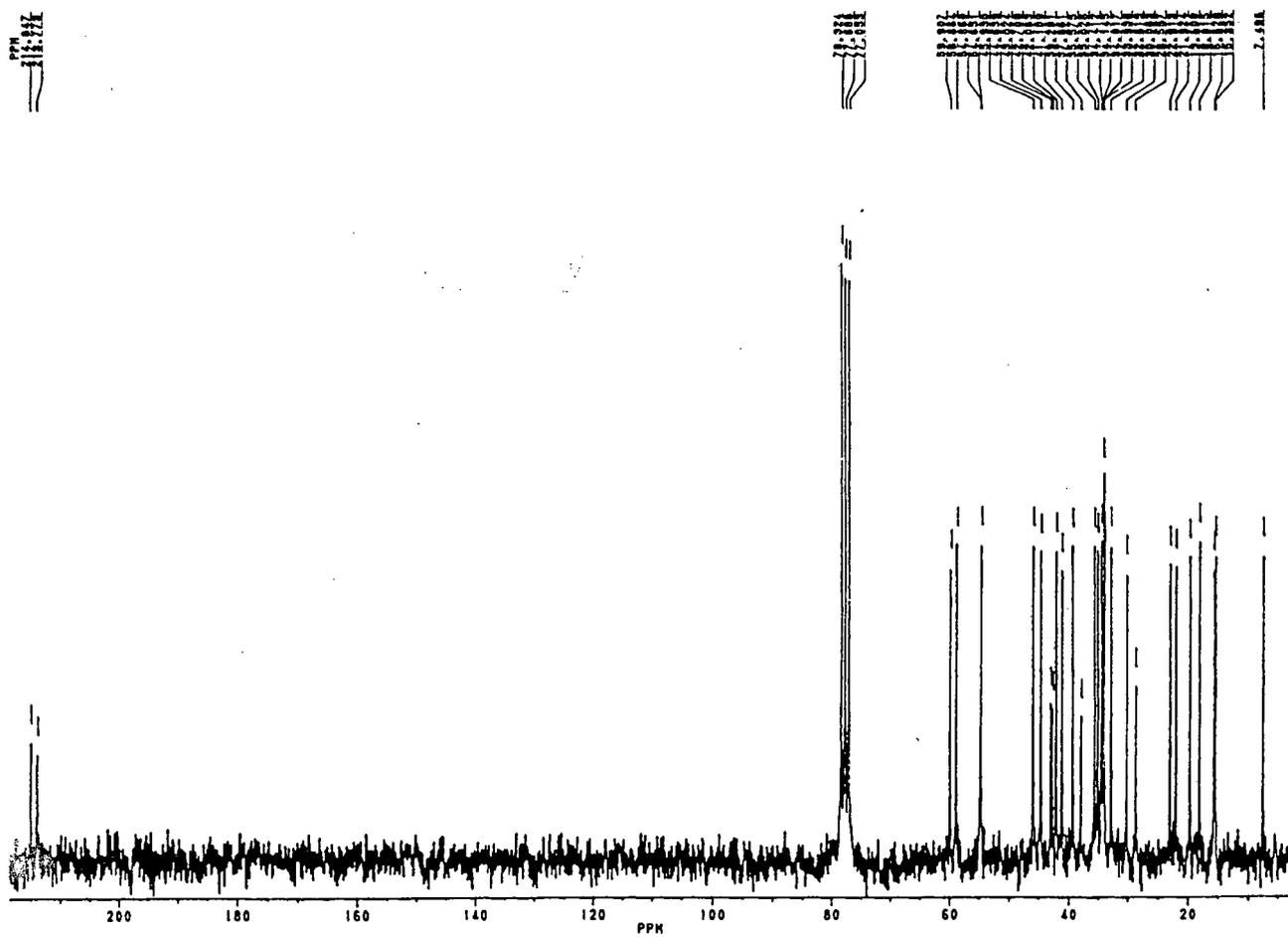


FIGURA 26 - Espectro de RMN ^{13}C (50MHz, CDCl_3) de CM-8 (3,15-dioxo friedelano).

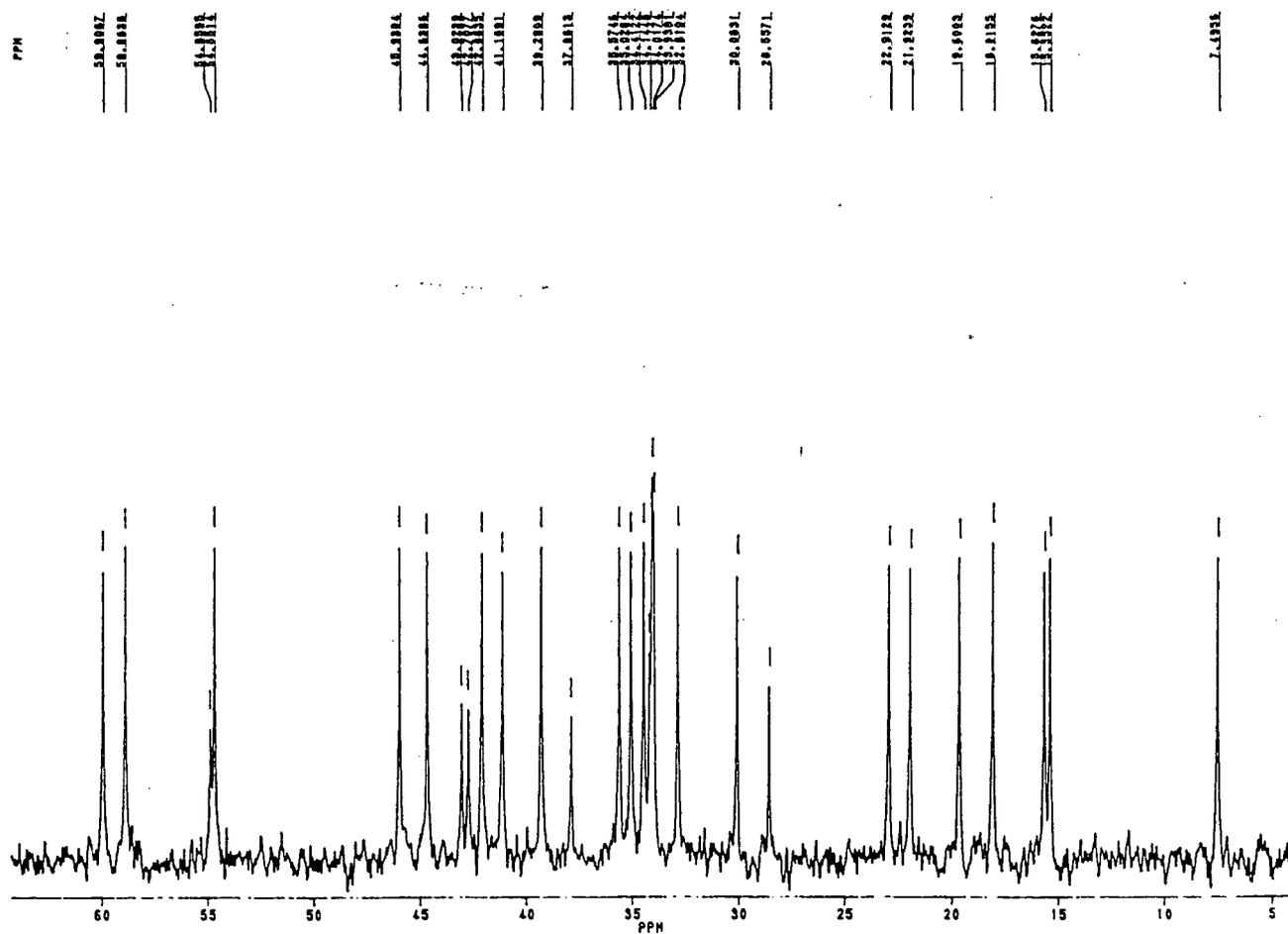


FIGURA 27 - Espectro de RMN ^{13}C ampliado na região de 5 a 60ppm (50 MHz, CDCl_3) de CM-8 (3,15-dioxo-friedelano).

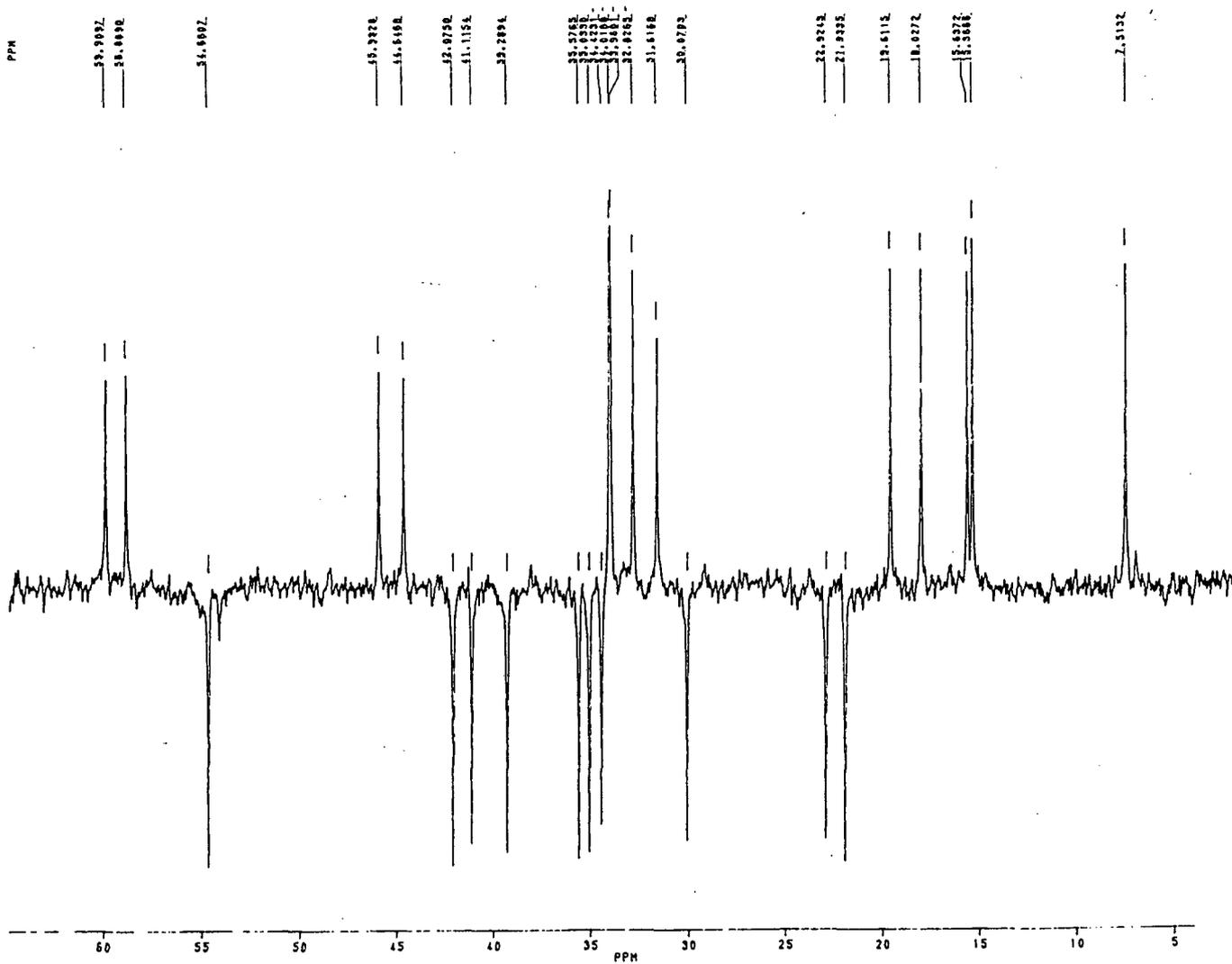


FIGURA 28 - Espectro de DEPT de CM-8 (3,15-dioxo friedelano).

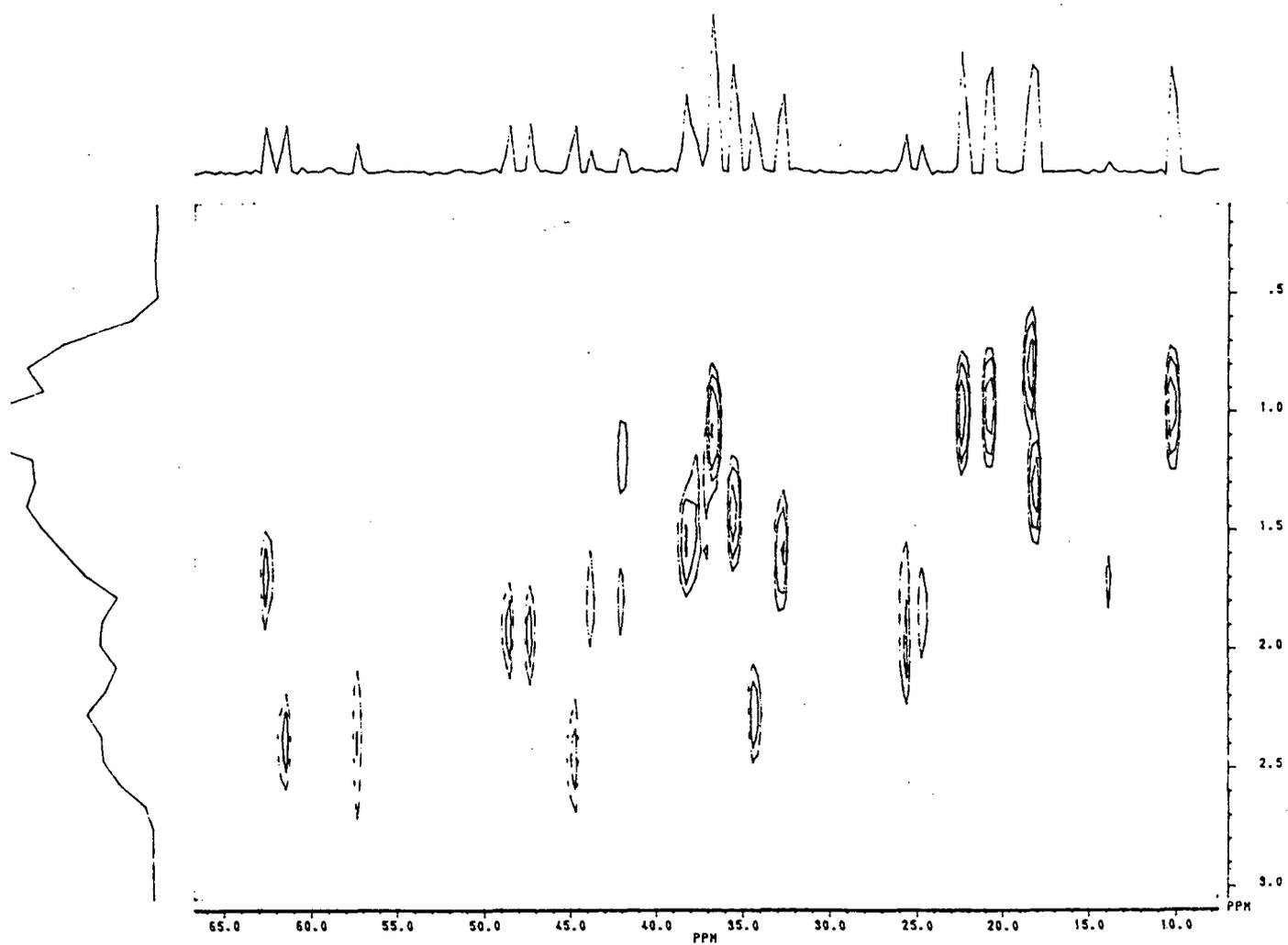


FIGURA 29 - Espectro de HETCOR de CM-8 (3,15-dioxo friedelano)

4.3.4 - 3-oxo-29-hidroxi friedelano - Fração (CM-63) [22]

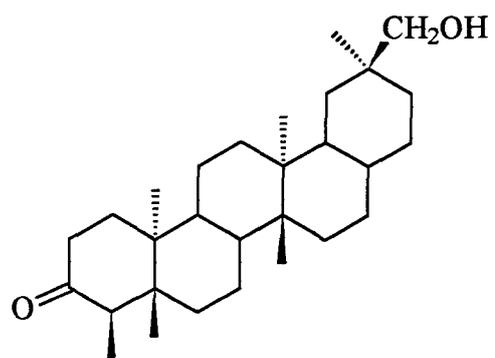
A fração CM-63, resultante do refractionamento em coluna de sílica gel da fração MR 42-45, após sucessivas recristalizações com acetona resultou na obtenção de cristais com ponto de fusão 279-290 °C. Outras tentativas de purificação não tiveram sucesso, porém a análise por CGAR mostrou a presença de um composto majoritário contaminado com pequenas quantidades de outros triterpenos

O Espectro de Infravermelho (Figura 30) com um padrão característico de triterpenos, apresentou absorções em 1715 cm^{-1} para grupamento carbonila e 3390 cm^{-1} para grupo hidroxila.

O Espectro de Massas obtido pela técnica CGAR-EM (Figura 31) mostrou o pico molecular M^+ a m/z 442 e os fragmentos M-15 a m/z 427 para a perda de uma metila, M-18 a m/z 424 para perda de uma molécula de água e o fragmento “b” a m/z 302 u.m.a, caraterístico da fragmentação de friedelanos no anel “D”.⁴⁹

O Espectro de RMN ^1H (Figura 32) apresentou entre outros sinais seis metilas quaternárias, uma metila dublete, um multiplete na região de 2,4 ppm para hidrogênios α -carbonila e um sistema de spin do tipo AB referente a um CH_2 carbinólico.

O Espectro de RMN ^{13}C (Figura 33), embora em mistura, pode-se confirmar grupo carbonila em C-3 e a oxidação da metila C-29 como um álcool primário. A Tabela X mostra o assinalamento dos dados de carbono comparando com os dados da literatura.³⁰



3-oxo,29-hidroxi friedelano [22]

TABELA X - Atribuições dos dados de RMN ^{13}C para CM - 63 (3-oxo-29-hidroxi friedelano) e comparação com os dados da literatura.³⁰

C	3-oxo-29-OH friedelano ³⁰	3-oxo,29-hidroxi-friedelano (CM-63)	
	^{13}C	^{13}C	DEPT
-			
1	22.3	22.27	CH ₂
2	41.6	41.52	CH ₂
3	212.2	213.97	-
4	58.3	58.20	CH
5	42.2	42.83	C
6	41.4	41.41	CH
7	18.3	18.22	CH ₂
8	53.5	53.37	CH
9	37.5	37.49	C
10	59.6	59.42	CH
11	35.7	35.61	CH ₂
12	29.8	29.73	CH ₂
13	40.0	40.01	C
14	38.3	38.30	C
15	32.8	32.70	CH ₂
16	36.0	35.84	CH ₂
17	29.8	28.56	C
18	42.0	41.82	CH
19	30.6	30.57	CH ₂
20	33.2	33.12	-
21	27.9	27.76	CH ₂
22	39.6	39.49	CH ₂
23	6.80	6.84	CH ₃
24	14.7	14.66	CH ₃
25	17.9	17.87	CH ₃
26	18.40	18.40	CH ₃
27	20.80	20.77	CH ₃
28	32.1	32.08	CH ₃
29	25.9	25.80	CH ₃
30	74.8	74.76	CH ₂

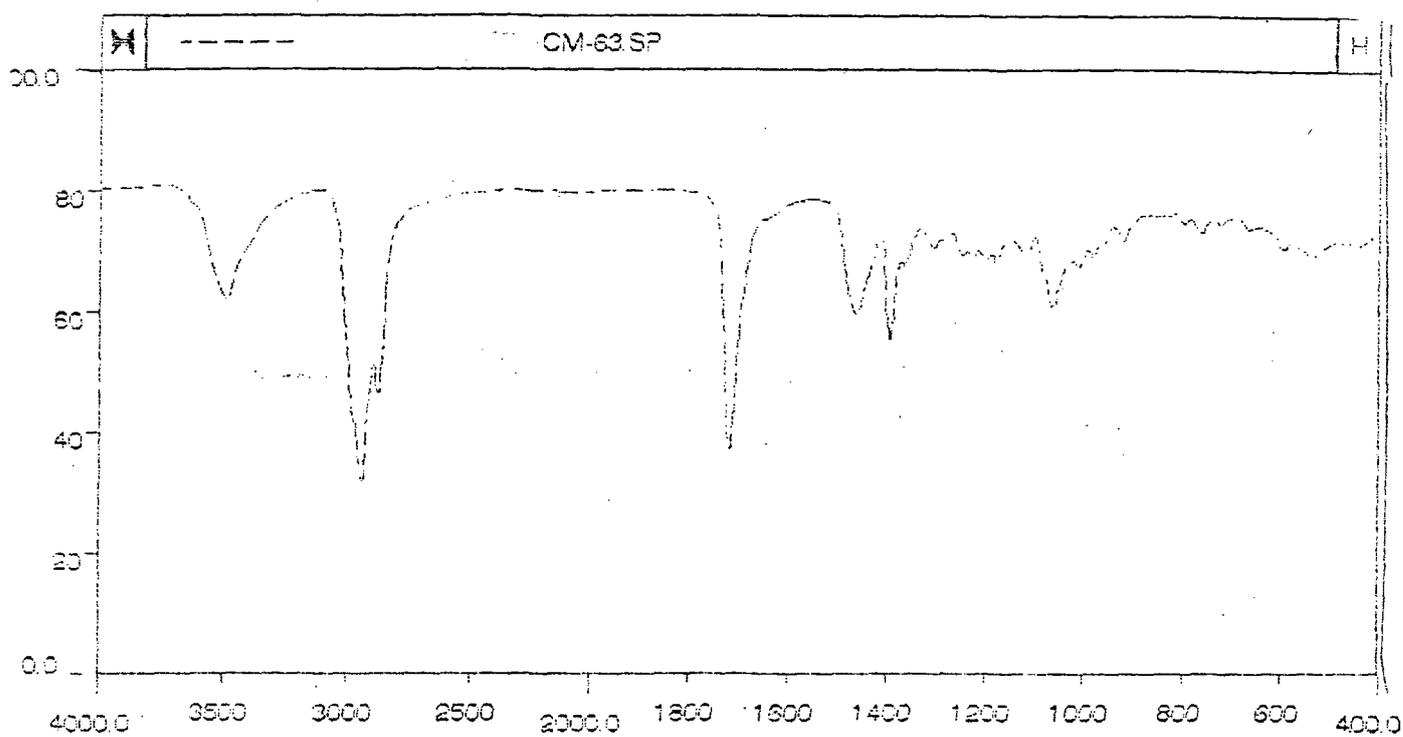


FIGURA 30 - Espectro de Infravermelho de CM-63 (3-oxo,29-hidroxi friedelano) em pastilha comprimida de KBr.

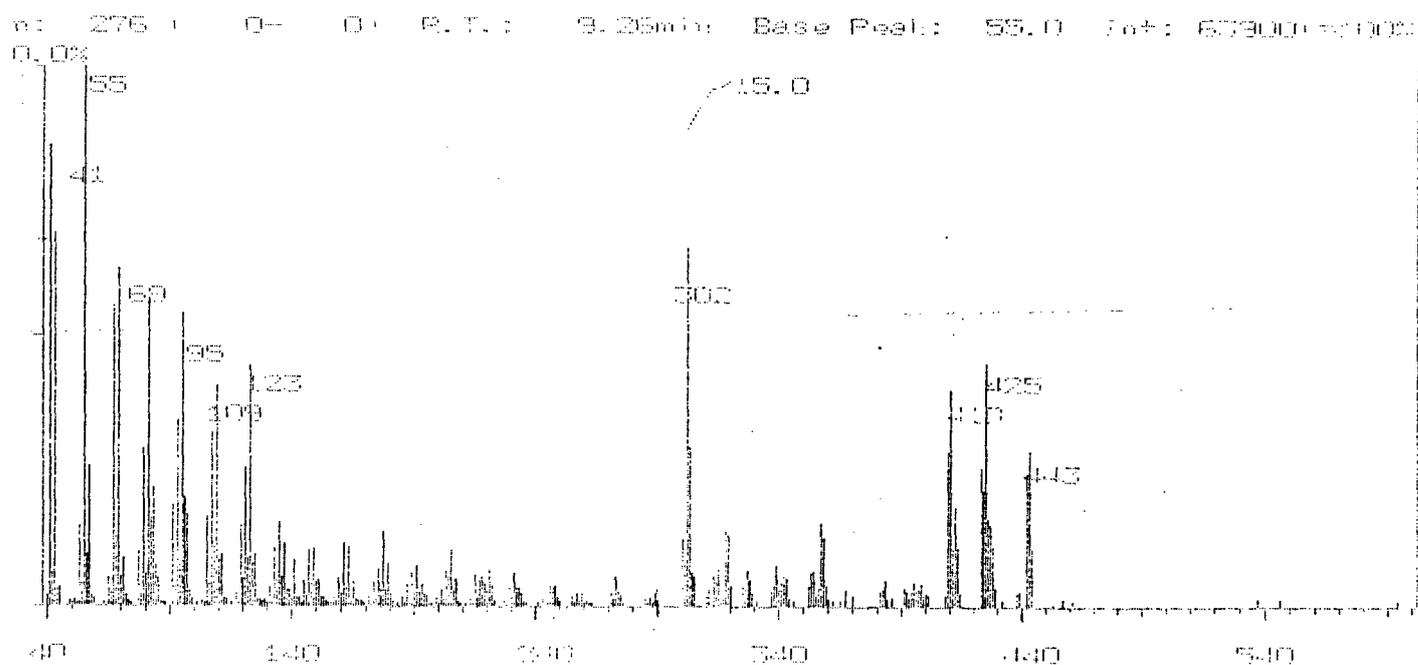


FIGURA 31 - Espectro de Massas com impacto eletrônico de 70eV de CM-63 (3-oxo,29-hidroxi friedelano).

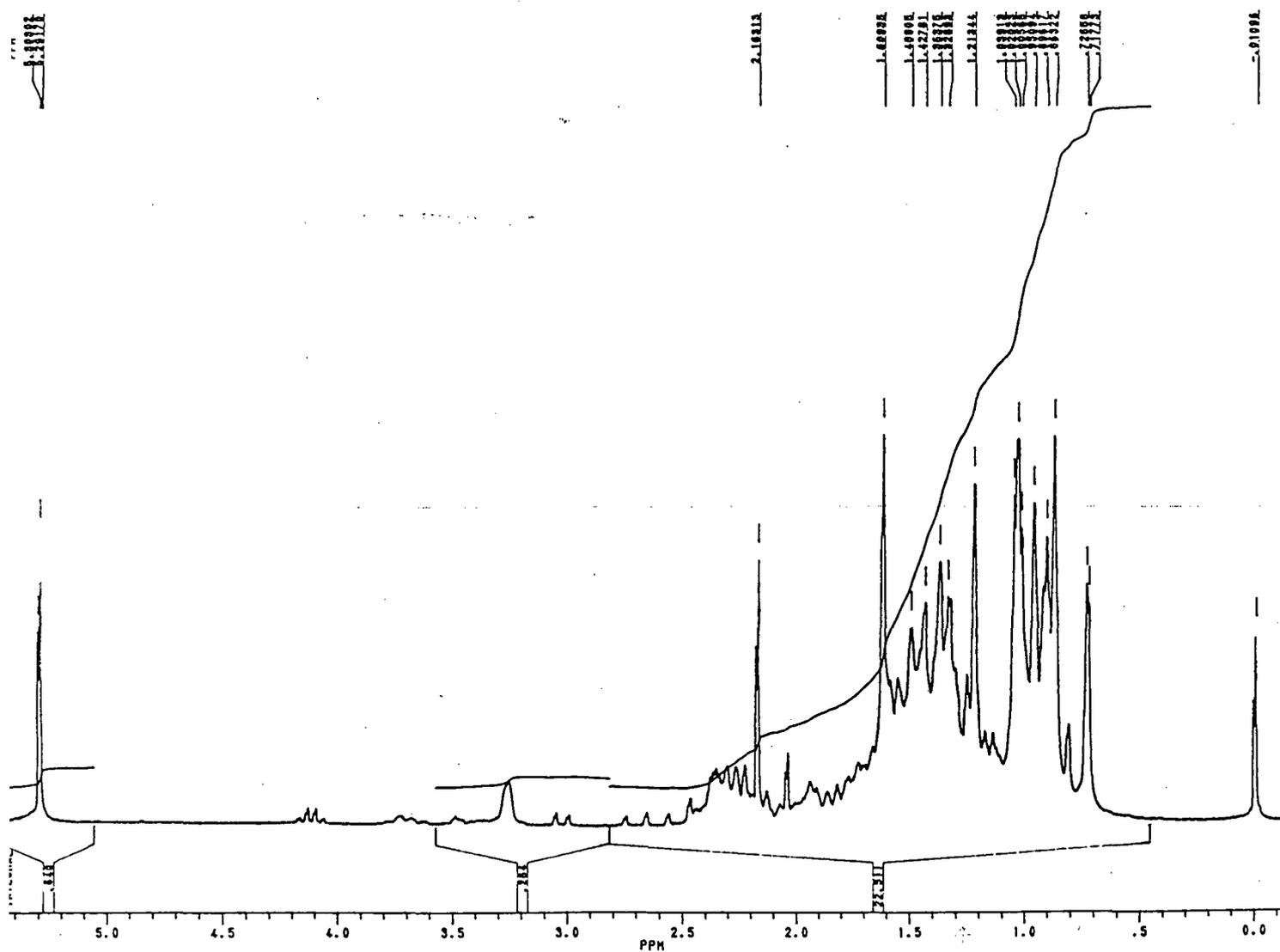


FIGURA 32 - Espectro de RMN ^1H (200 MHz, CDCl_3) de CM-63 (3-oxo,29-hidroxi friedelano).

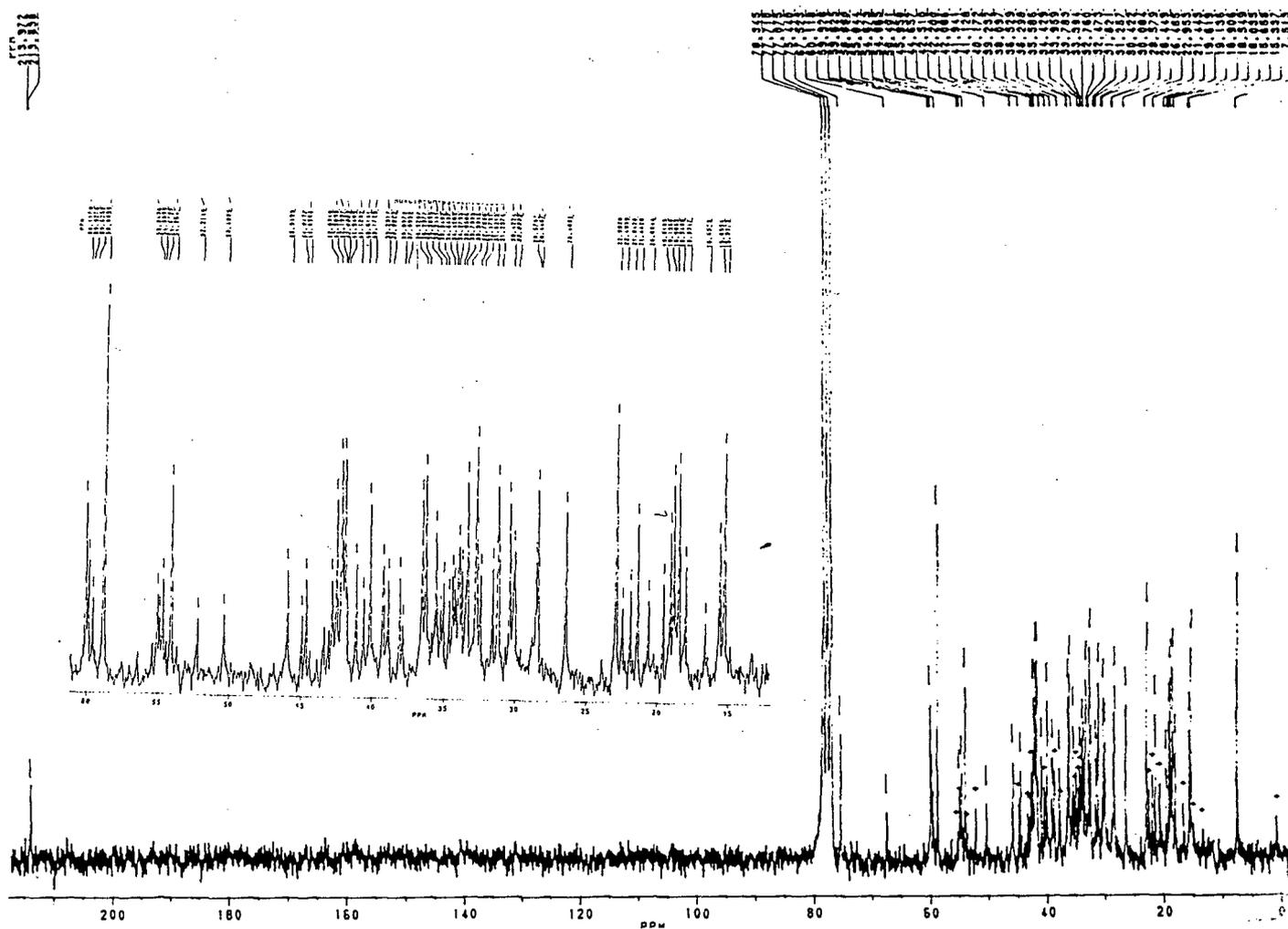


FIGURA 33 - Espectro de RMN ^{13}C (50 MHz, CDCl_3) de CM-63 (3-oxo,29-hidroxi friedelano).

4.4 - Identificação de Stigmasta-5,22-dien-3 β -ol (Stigmasterol) - Fração (CM-4) [23]

A recristalização em acetona da fração CM-4, do refractionamento da fração MR-42-45, resultou em cristais em forma de agulha com ponto de fusão 167 °C.

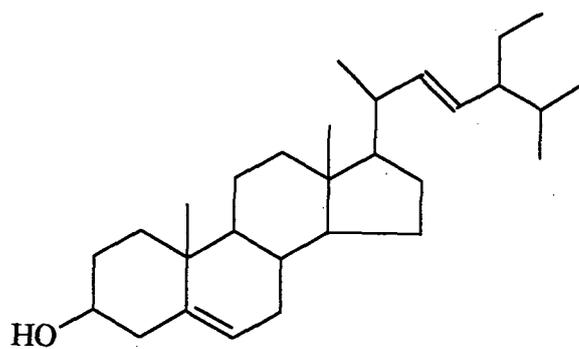
O Espectro de Infravermelho (Figura 34) mostra um padrão de absorção típica de esteróis, destacando a absorção do grupo OH em 3352 cm^{-1} e dos estiramentos CH em 1638, 1458 e 1376 cm^{-1} .

O Espectro de Massas (Figura 35), apresenta o pico molecular M^+ a m/z (% rel.) em 412 mostrando o mesmo padrão de fragmentação descrito na literatura para o composto.⁵¹

O Espectro de RMN ^1H (Figura 36) mostrou entre outras absorções um multiplete centrado em 3.5ppm atribuído ao próton do carbono C-3. O par de duplo dublete centrados em 4.95 e 5.15ppm e com constantes de acoplamento trans e vicinal caracterizou a dupla trans dissubstituída da cadeia lateral e o duplo dublete centrado em 5.85ppm foi atribuído ao próton ligado ao carbono C-6 da dupla trissubstituída endocíclica do anel "B".

O Espectro de RMN ^{13}C (Figura 37) mostrou absorções para quatro carbonos sp^2 sendo um quaternário e três CH, confirmando a presença da dupla endocíclicas trissubstituída e da dissubstituída situada na cadeia lateral.

O sinal em 72.47ppm para CH carbinólico evidencia a presença do grupo OH secundário na posição C-3 e os demais sinais confirmam a estrutura proposta, quando comparado com os dados da literatura.⁵⁰



Estigmasterol

[23]

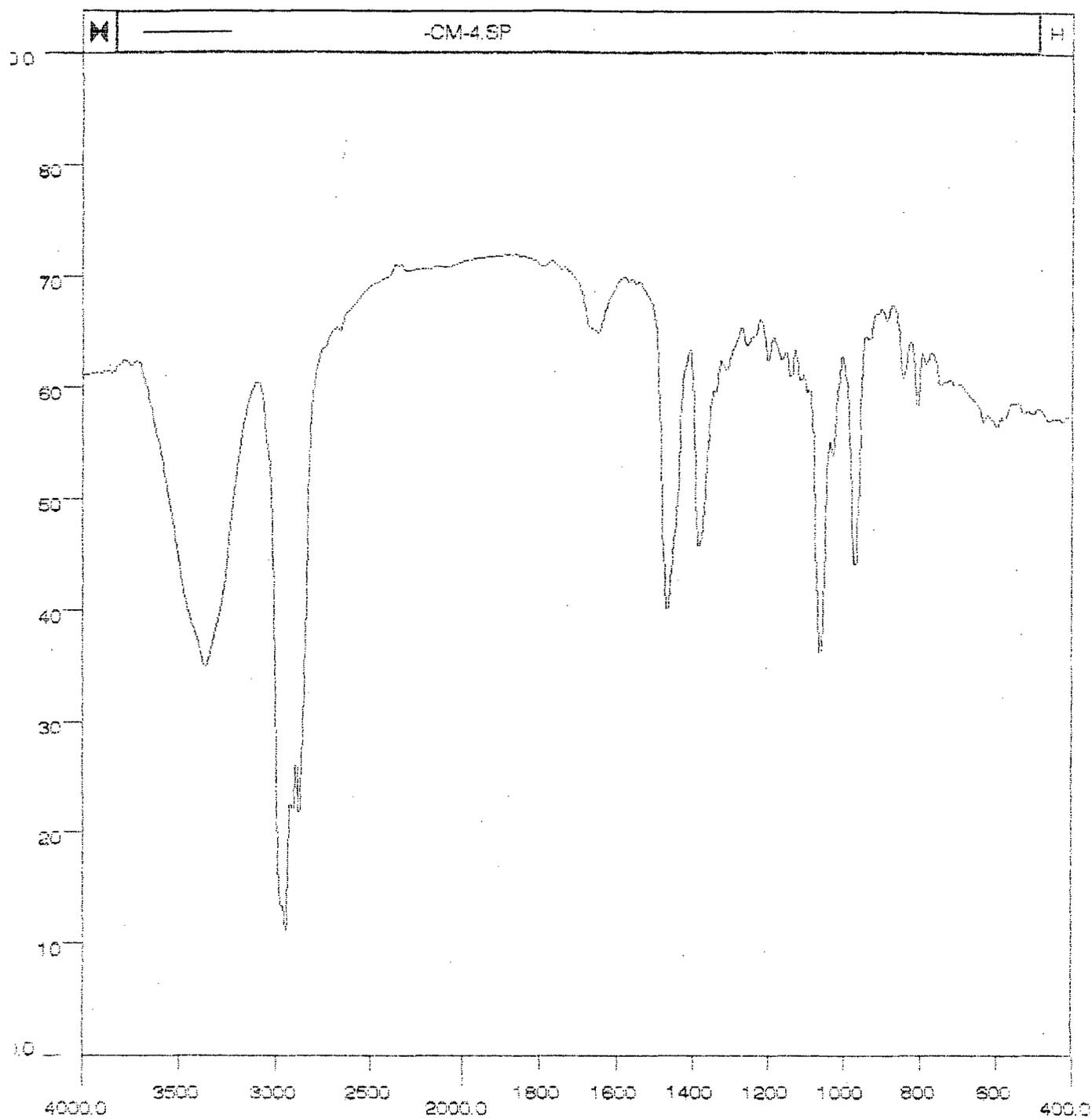


FIGURA 34 - Espectro de Infravermelho de CM-4 (stigmasterol) em pastilha comprimida de KBr.

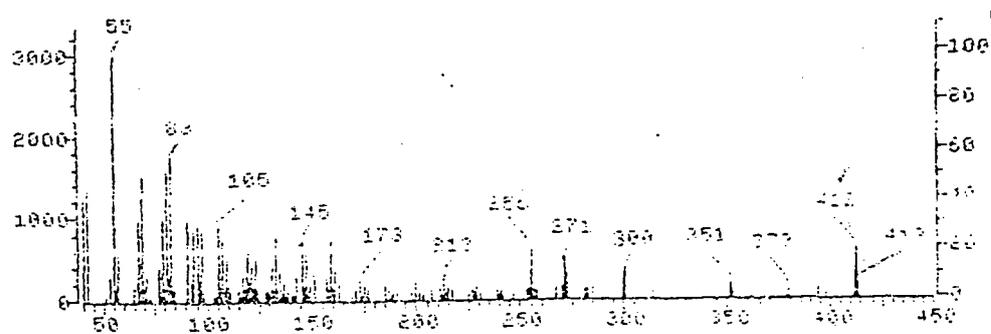


FIGURA 35 - Espectro de Massas com impacto eletrônico de 70eV de CM-4 (estigmasterol).

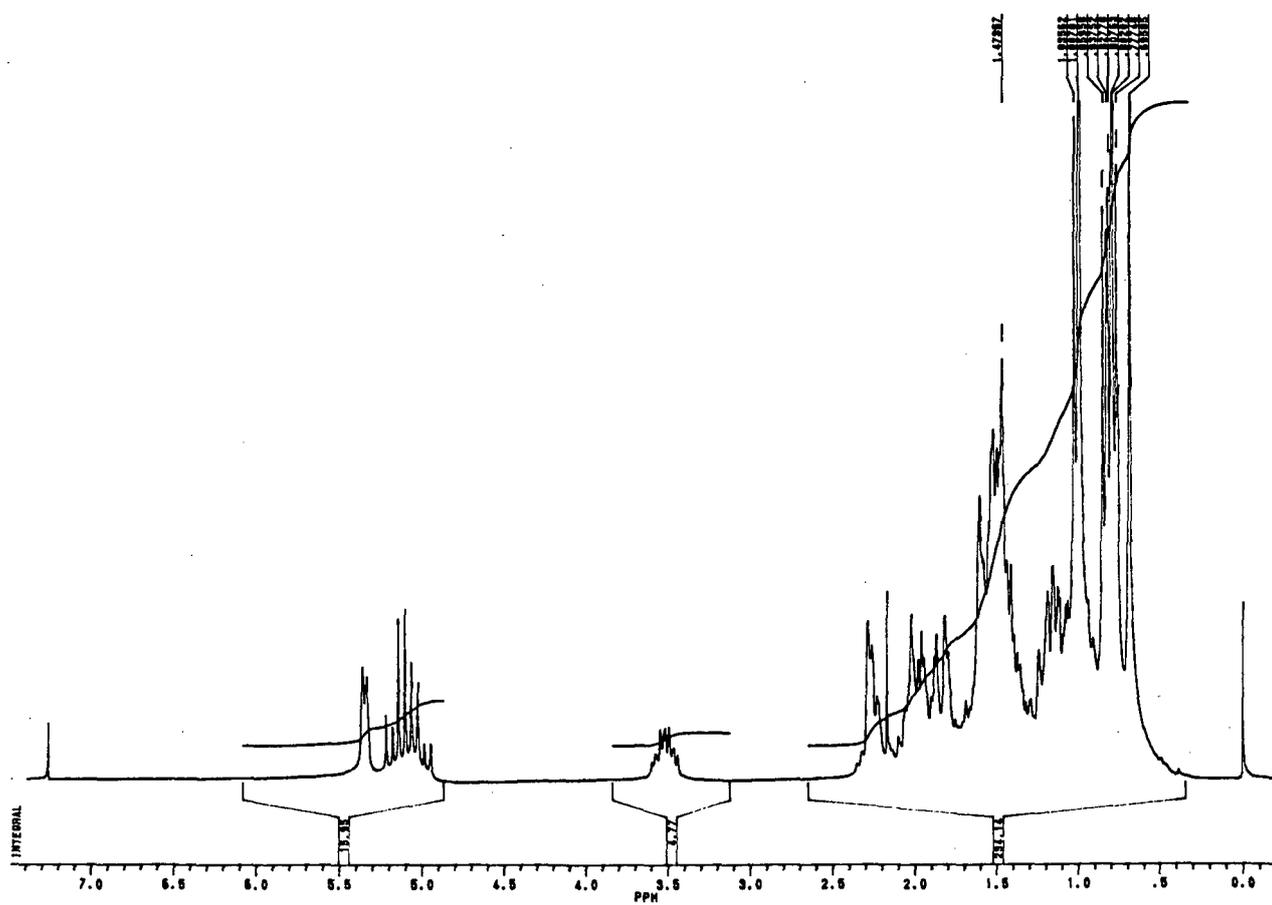


FIGURA 36 - Espectro de RMN ^1H (200 MHz, CDCl_3) de CM-4 (estigmasterol).

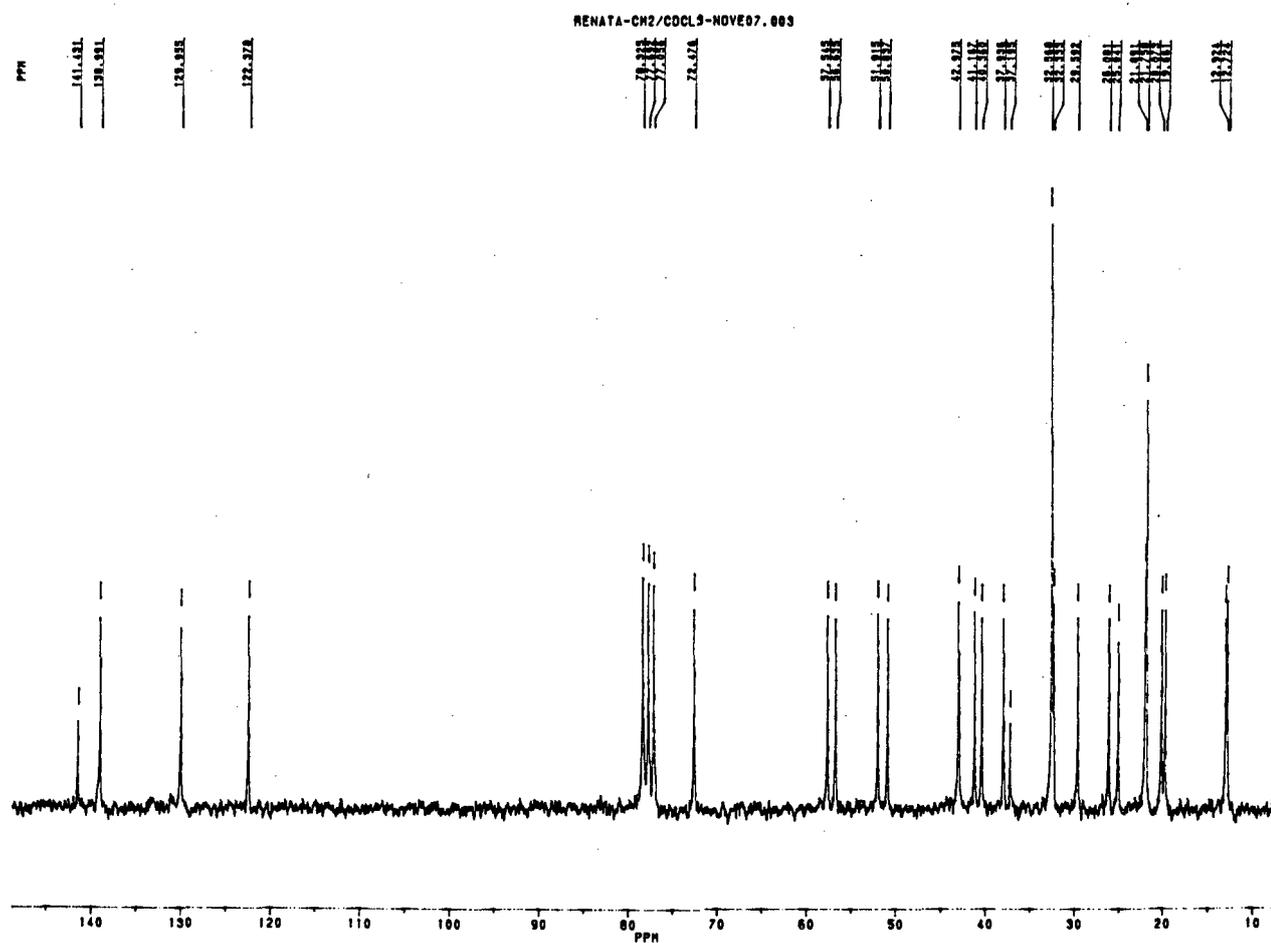


FIGURA 37 - Espectro de RMN ^{13}C (50 MHz, CDCl_3) de CM-4 (estigmasterol).

4.5 - Quercetina - Fração MR-46 [24]

A purificação por recristalização em metanol da fração MR-46 obtida do fracionamento do Extrato Bruto Hidroalcoólico resultou na obtenção de um sólido amarelo de ponto de fusão 290 °C.

O Espectro de absorção na região do ultravioleta (Figura 38) com o composto diluído em metanol, mostrou absorções máximas em 366.5, 298 e 253.5nm sugerindo um esqueleto molecular compatível com flavonóides.

O Espectro de Infravermelho (Figura 39) apresentou um padrão de absorção característico de flavonóides destacando uma intensa e larga absorção com máximas em 3408 e 3318 cm^{-1} para grupos OH fenólicos.

A absorção em 1664 cm^{-1} indica a presença de uma carbonila conjugada caracterizando esqueleto de um flavonol.

O Espectro de Massas (Figura 40), apresentou o pico molecular M^+ a m/z (%rel.) 302 (100) e pequenos fragmentos a m/z 271, 153, 136 e 69.

O Espectro de RMN ^1H (Figura 41) apresentou um par de dubletes centrados em 6.21ppm (1H, d, $J=1.8$ Hz) e 6.40ppm (1H, d, $J=1.87$ Hz) com constante de acoplamento meta.

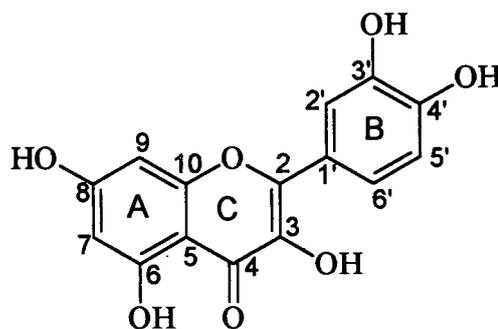
Estes dados juntamente com o sinal em 12.3ppm (1H, s) atribuído ao próton de uma hidroxila quelada em C-5 e a ausência de sinal na região de 7.9 a 8.2 ppm, onde deveria absorver um próton ligado ao carbono C-5 sob a influência do campo de desproteção anisotrópica da carbonila definem a substituição 5,7 dihidroxi do anel "A".

A substituição do anel "C" é inferida pelo sistema de spins representado pelas absorções em 6.90ppm (1H, d, $J=8.54\text{Hz}$) para um próton orto relacionado, 7.59ppm (1H, dd, $J=1.90$ e 8.54Hz) para um próton orto meta

relacionado e 7.74ppm (1H, d, J=1.96Hz) para um próton meta relacionado. Este padrão de spin permite duas possibilidades de substituição para o anel C : 2',4' dihidroxi ou 3',4' dihidroxi.

O Espectro de RMN ^{13}C (Figura 42) e COSY (Figura 43) foram decisivos no estabelecimento da substituição do anel "B". Como o padrão de substituição 5,7 dihidroxi do anel "A" requer dois carbonos CH mais protegidos (C-6 e C-8) por estarem entre carbonos não oxigenados, a eles foi atribuído os valores 98.1 e 93.2ppm respectivamente. Assim resta os carbonos hidroxilados 115.2, 114.8 e 120.4ppm que definem o padrão de substituição 3',4' dihidroxi para o anel "B". Como resultado da análise acima e da comparação dos dados de RMN ^{13}C com os dados da literatura,⁴⁶ tivemos a identificação de MR-46 como sendo o flavonóide quercetina.

A Tabela XI mostra os dados de RMN ^{13}C da quercetina comparados com dados da literatura.⁴⁶



Quercetina

[24]

TABELA XI - Atribuições dos dados de RMN ¹³C para MR - 46 (Quercetina) e comparação com os dados da literatura.

MR - 46 QUERCETINA			QUERCETINA ⁴⁶
C	RMN ¹³ C	DEPT	RMN ¹³ C
2	147.2	C	147.5
3	135.6	C	136.5
4	175.5	C=O	176.5
5	156.2	C	181.0
6	98.1	CH	99.5
7	163.7	C	166.0
8	93.2	CH	94.5
9	160.6	C	156.7
10	102.9	C	104.0
1'	122.1	C	123.0
2'	115.2	CH	116.0
3'	144.6	C	145.7
4'	146.1	C	148.1
5'	114.8	CH	116.5
6'	120.0	CH	121.0

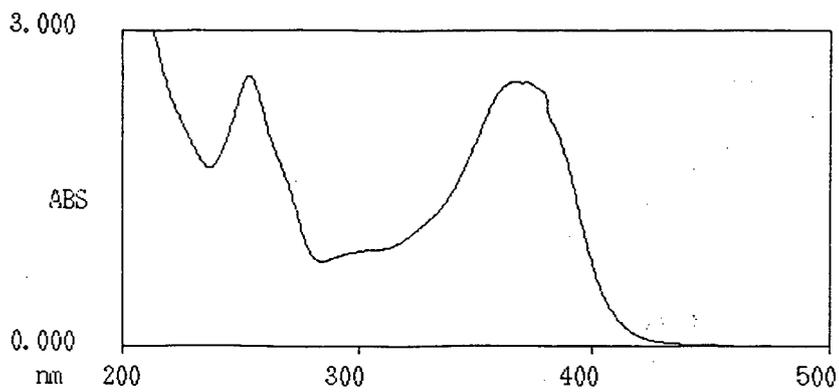


FIGURA 38 - Espectro de Ultravioleta de MR-46 (quercetina) em metanol.

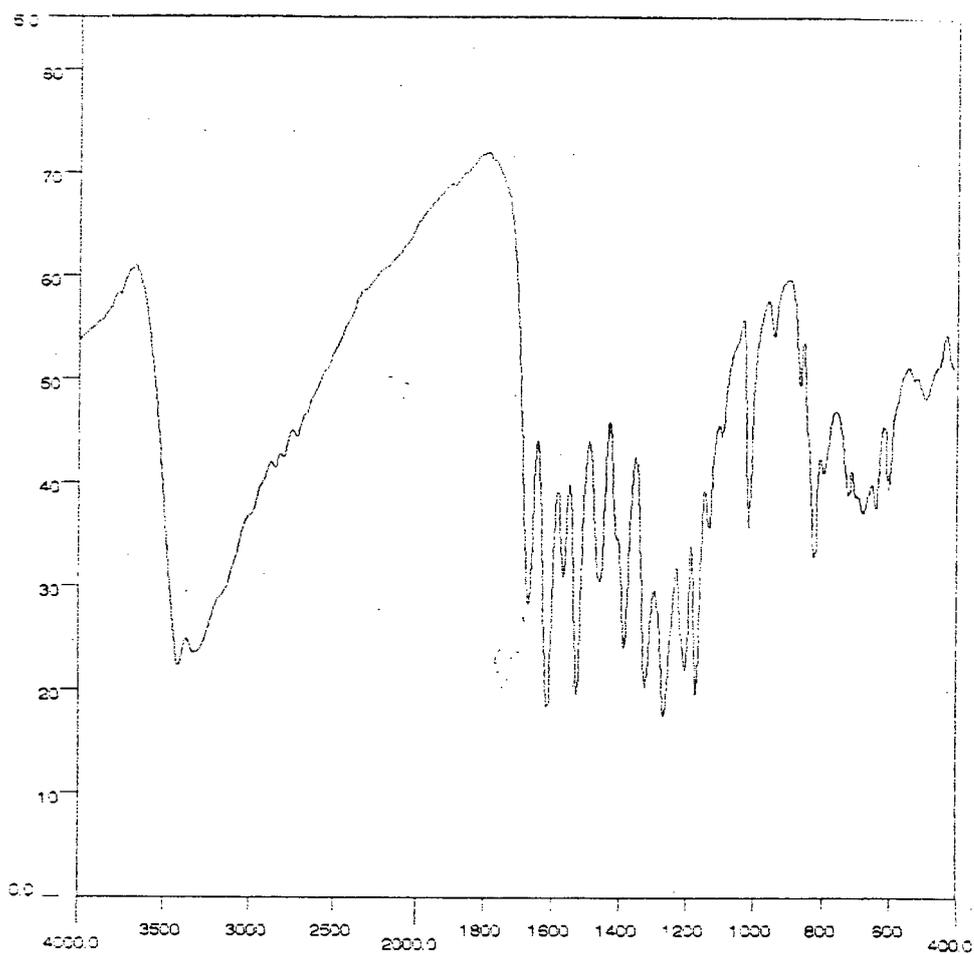


FIGURA 39 - Espectro de Infravermelho de MR-46 (quercetina) em pastilha comprimida de KBr.

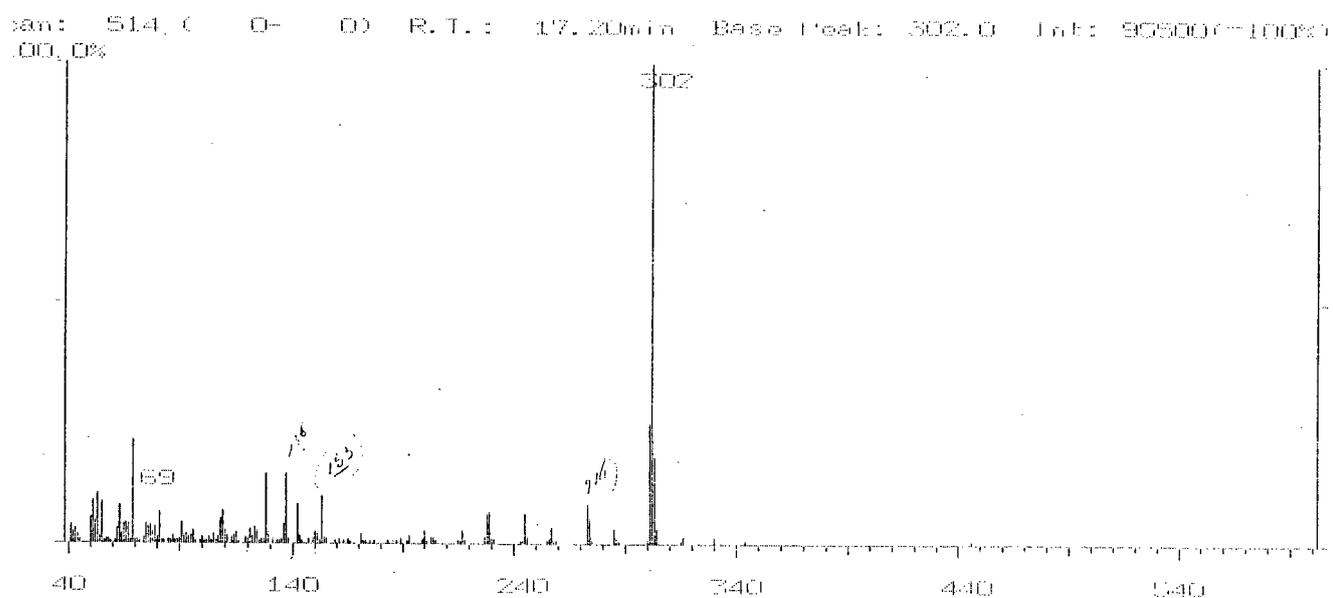


FIGURA 40 - Espectro de Massas com impacto eletrônico de 70eV de MR-46 (quercetina).

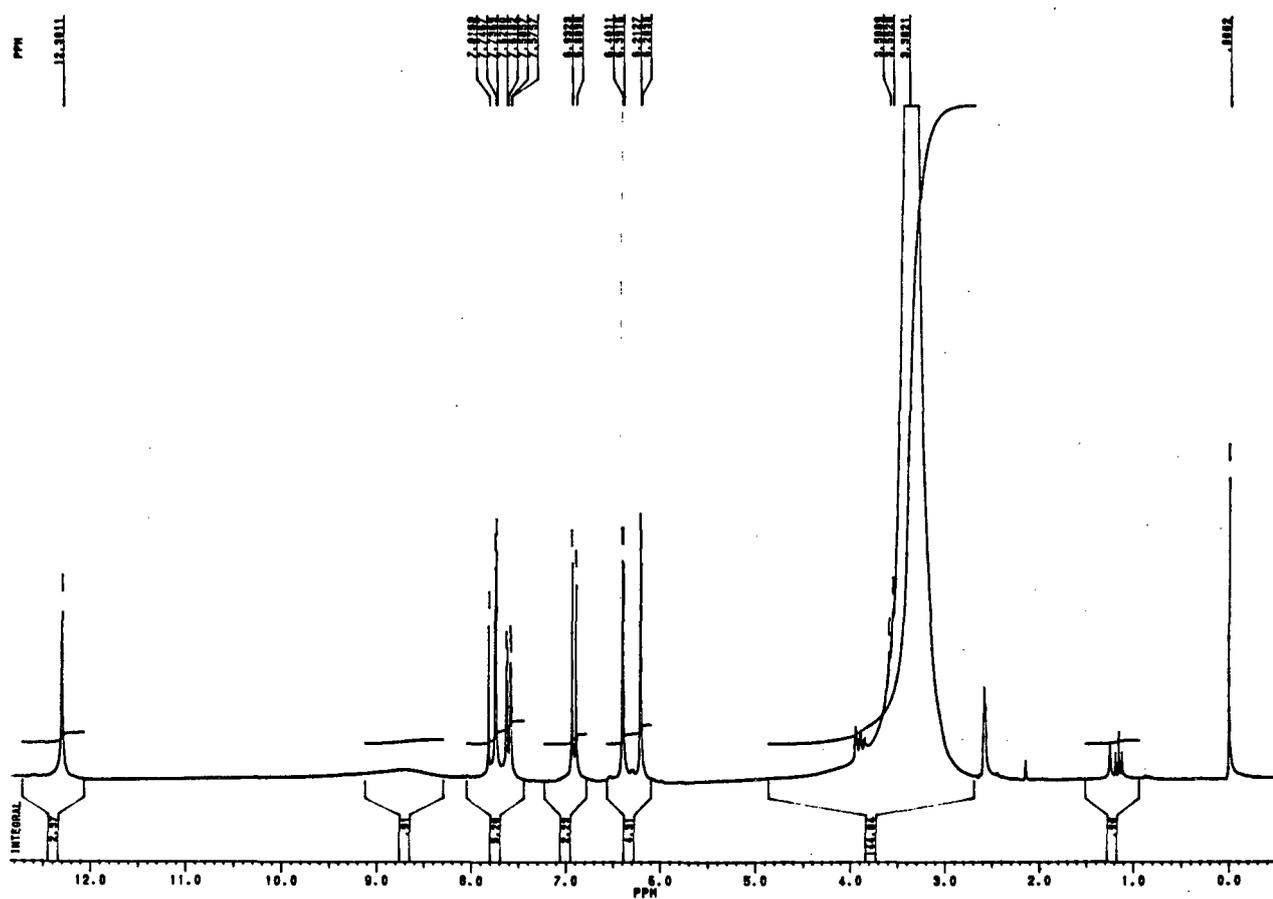


FIGURA 41 - Espectro de RMN ^1H (200 MHz, CDCl_3) de MR-46 (quercetina).

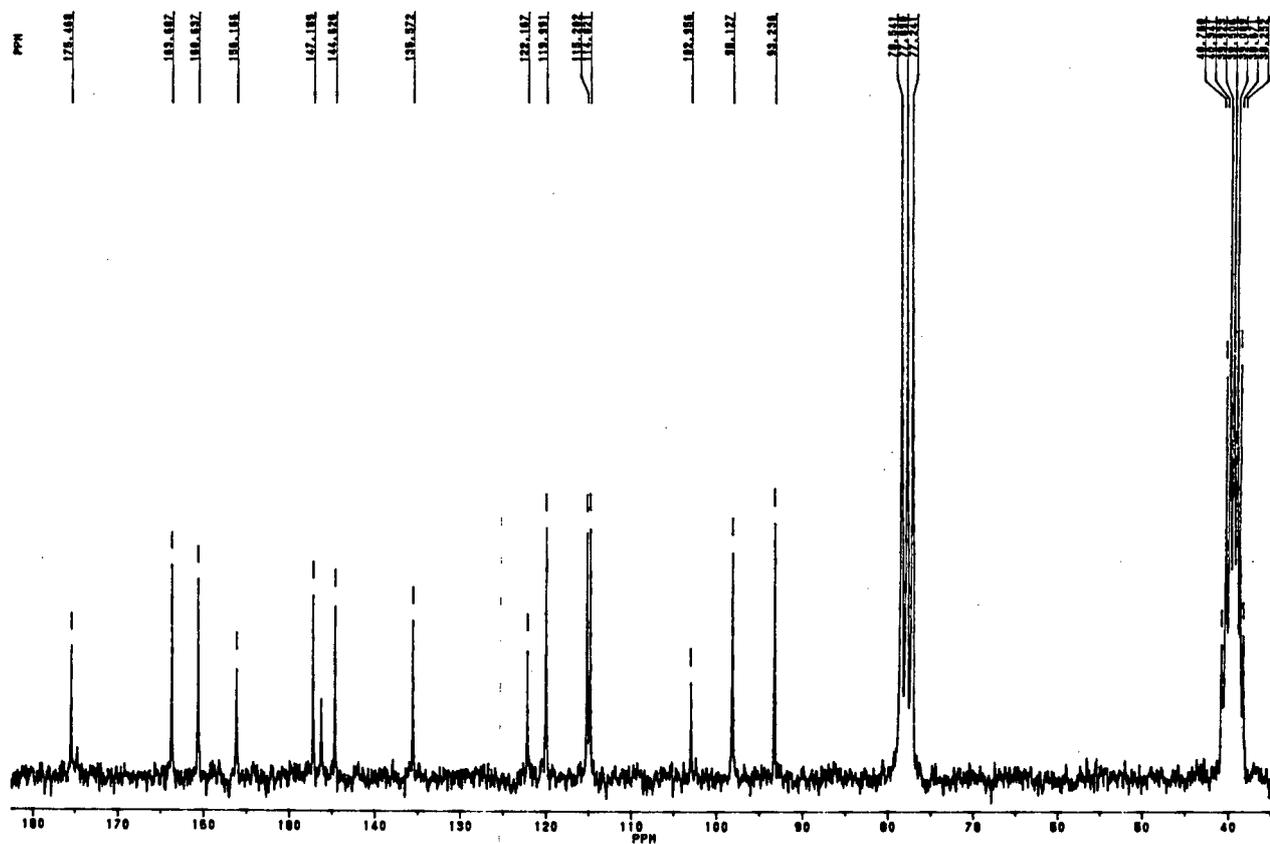


FIGURA 42 - Espectro de RMN ^{13}C (50 MHz, CDCl_3) de MR-46 (quercetina).

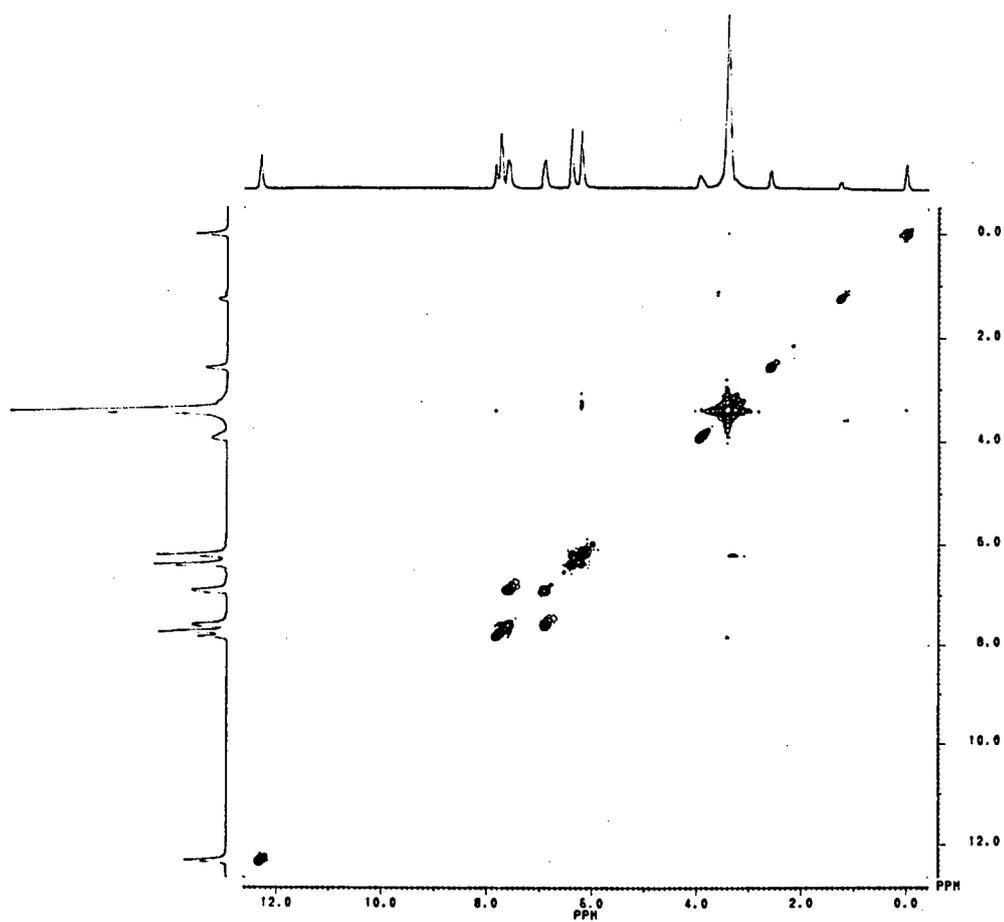


FIGURA 43 - Espectro COSY de MR-46 (quercetina).

4.6 - Pesquisa de Alcalóides

Devido a conhecida presença de maytansinoides, alcalóides ansa macrolídeos, com intensa atividade antitumor e citotóxica em diversas espécies do gênero *Maytenus* bem como a comum ocorrência de alcalóides spermidínicos macrocíclicos e alcalóides nicotinoil sequitepenos com atividade imunossupressora, procedemos uma pesquisa mais minuciosa de alcalóides no Extrato Bruto Hidroalcolico de *M. robusta* .

O extrato hidroalcolico obtido de 2700 g da planta moída (folha e galhos finos) foi concentrado até um terço de seu volume e submetido a um procedimento de extração de alcalóides seguindo o fluxograma apresentado na Figura 44. O Extrato Hidroalcolico devidamente concentrado foi deixado em repouso em câmara fria por 24 h objetivando a precipitação dos triterpenos que foram removidos por filtração. O filtrado aquoso resultante foi acidificado a pH 2 com Ácido Clorídrico e extraído com Clorofórmio. A fase aquosa ácida foi então alcalinizada a pH 10 com Hidróxido de Amônio e extraída com Acetato de Etila para obtenção da fração alcaloídica bruta (153mg) representando um rendimento de 0.0056 %.

Devido o baixo rendimento da fração alcaloídica com a planta coletada no mês de março e para verificar uma possível variação sazonal na biossíntese de alcalóides em *M. robusta*, procedeu-se uma nova coleta na época de floração, setembro, e o procedimento de extração de alcalóides foi repetido. O resultado foi o mesmo nos dois casos.

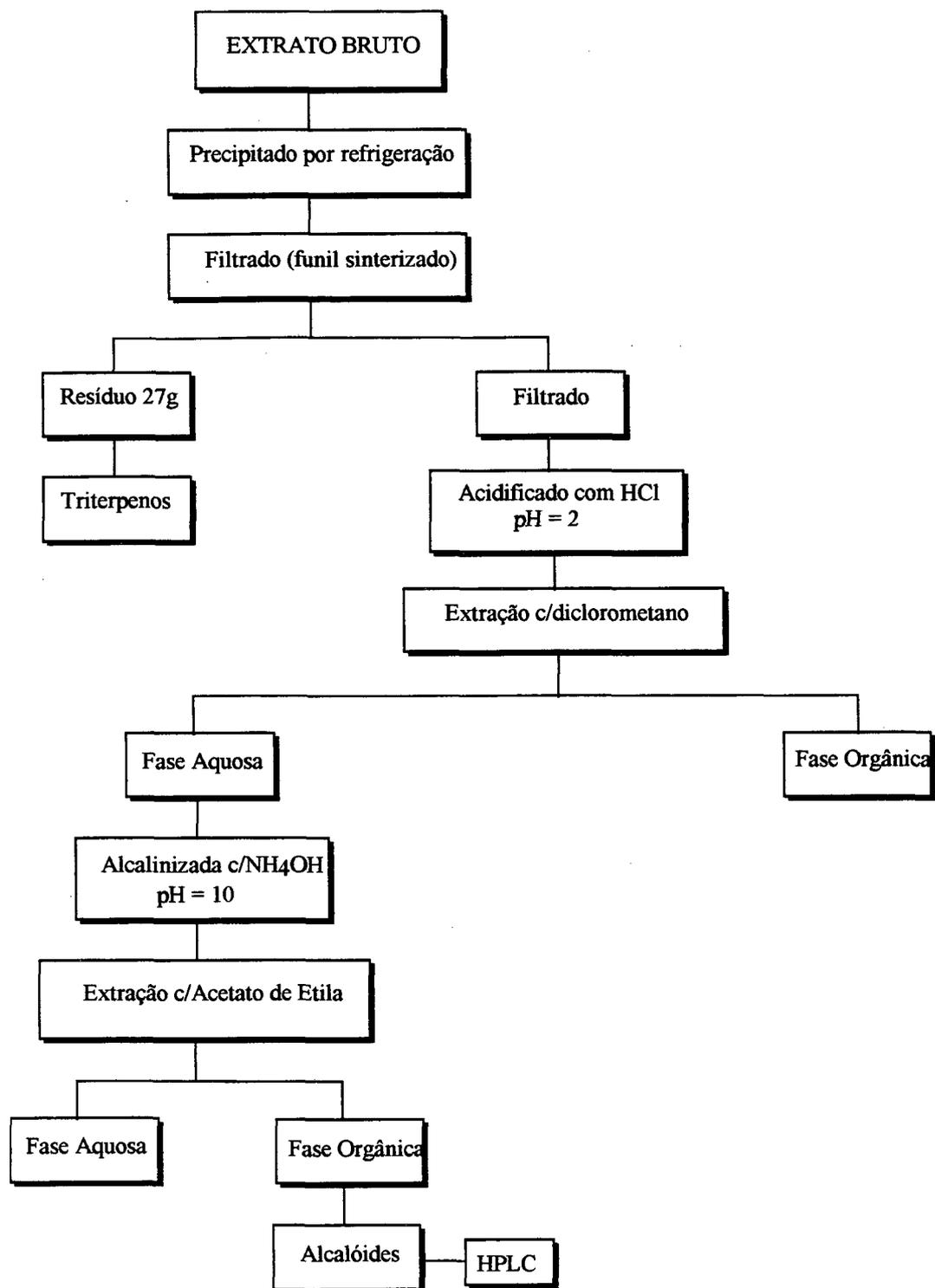


FIGURA 44 - Fluxograma demonstrativo do processo de extração da fração alcaloídica de *Maytenus robusta*.

A fração Alcaloídica foi analisada por por cromatografia em camada fina de sílica gel, eluída com clorofórmio/metanol (90:10) e visualizada através de reagentes específicos para alcalóides.⁴³ Esta análise revelou a presença de três manchas características atribuídas aos possíveis alcalóides.

A análise por espectroscopia de Ultravioleta (Figura 45) da fração alcaloídica mostrou-se muito semelhante ao do maytansine, mostrando as absorções características a 233, 243, 282 e 311nm, sugerindo a presença de alcalóides ansamacrolídeos.

A análise por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC), Figura 46, da fração alcaloídica com os cromatogramas monitorados a 280nm e a 233 nm destacaram a presença de três compostos majoritários “B” (25.95min.), “C” (27.2min.) e “D” (27.37min) cujos tempos de retenção são comparáveis aos da literatura para maytansinoides.^{48,11} Estes resultados adicionados ao teste positivo para alcalóides realizado no efluente da coluna naqueles tempos de retenção, é razoável sugerir a presença de três alcalóides ansamacrolídeos em *M. Robusta*.

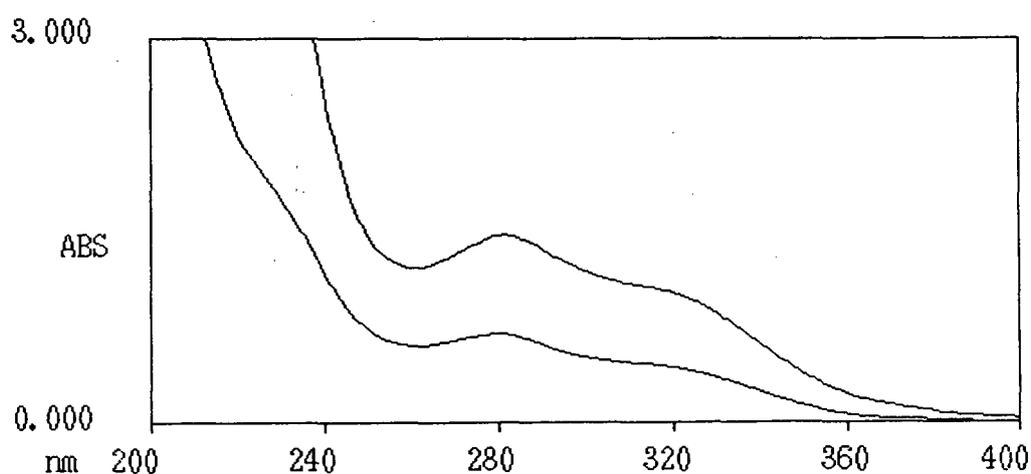


FIGURA 45 - Espectro de Ultravioleta da fração alcaloídica em metanol.

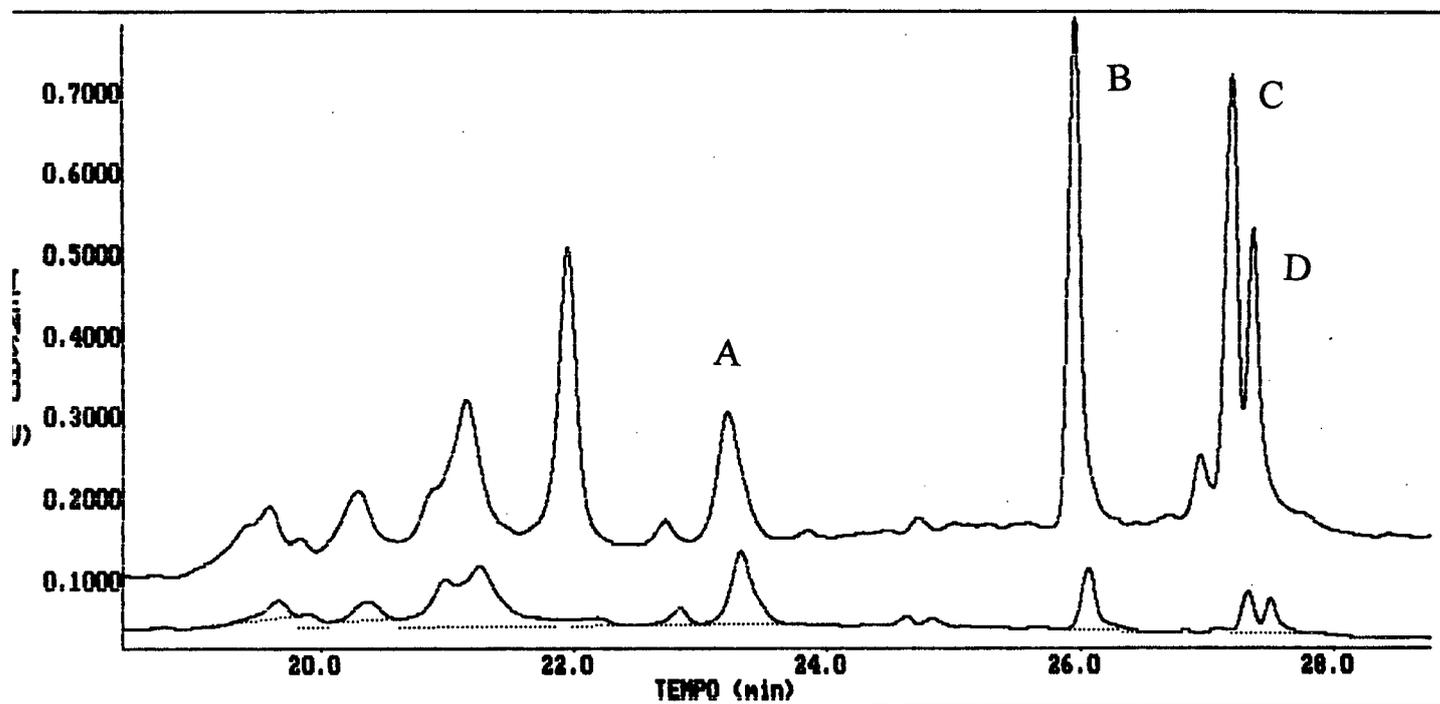
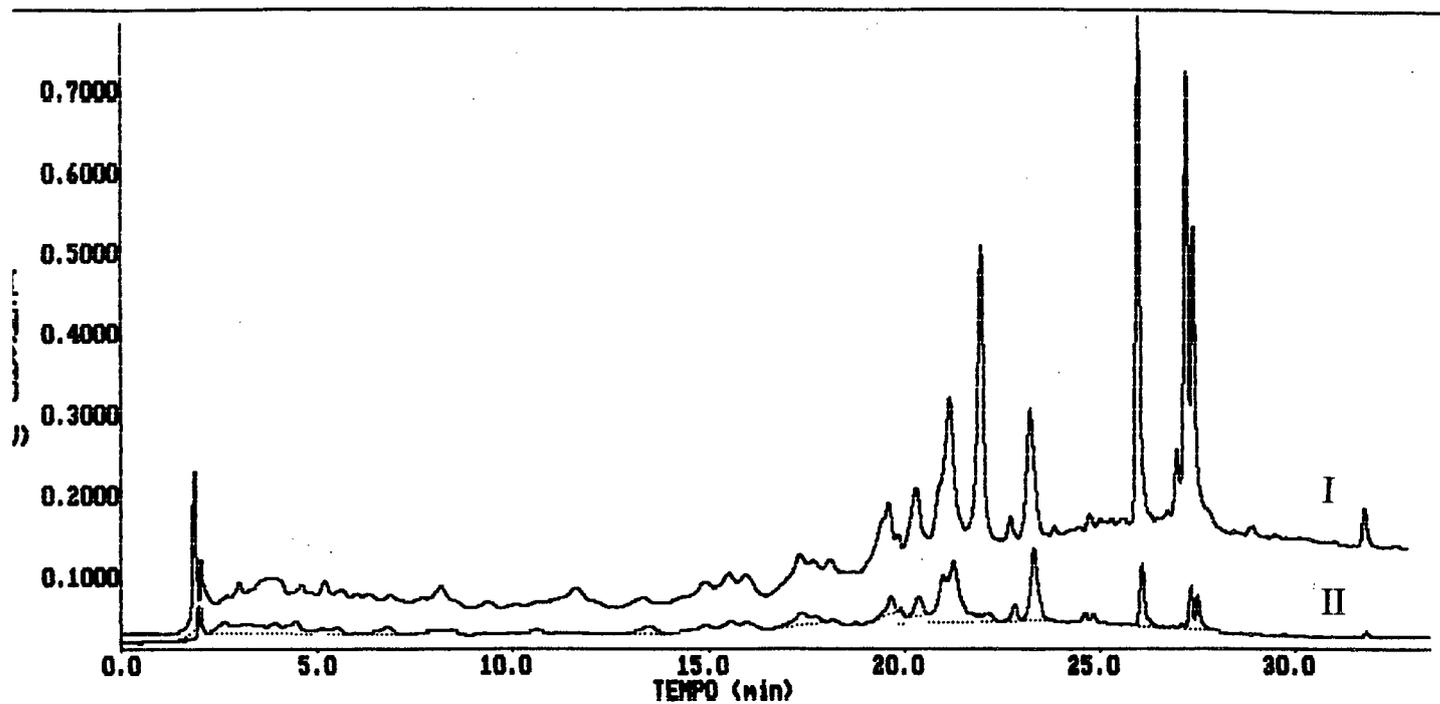


FIGURA 46 - Cromatograma (CLAE) da fração alcaloídica: I) monitorado a 230nm, II) monitorado a 280 nm.

CAPÍTULO 5

CONCLUSÕES

A investigação fitoquímica do Extrato Bruto Hidroalcolico de *Maytenus robusta* resultou no isolamento e identificação de uma série de metabólitos secundários.

Na fração oleosa detectou-se uma série de hidrocarbonetos ácidos e ésteres carboxílicos onde foi destacada a identificação de uma série homóloga de ésters 2,8-dimetil metílicos.

Isolamento e identificação de dois esteróis, Stigma-3,5-dien-7-ona e Stigmasta-5,22-dien-3 β -ol (stigmasterol).

Na Fração terpenoídica, representando aproximadamente 1% da planta seca. procedeu-se o isolamento e identificação, por meio dos dados espectroscópicos de UV, IV, RMN ^1H , RMN ^{13}C , de quatro triterpenos com esqueleto friedelano: 3-oxo friedelano (friedelina), 3 β -hidroxi friedelano (friedelinol), 3,15-dioxo friedelano e 3-oxo-29-hidroxi friedelano.

Devido a conhecida ação “anti-úlceras” dos triterpenos friedelanos no gênero *Maytenus*, a presença abundante destes friedelanos em *Maytenus robusta* coloca esta planta como potencial fonte na medicina alternativa para o tratamento de úlcera gástrica juntamente com *Maytenus ilicifolia* já consagrada para esta finalidade e em franca extinção.

Nas frações mais polares foi isolado e identificado um flavonol: a quercetina.

A fração alcaloídica apresentou um baixo rendimento de alcalóides e cuja análise conjunta por CCD com reveladores específicos, Ultravioleta e CLAE, sugeriam a presença de tres alcalóides do tipo ansamacrolíceos.

O resultado da análise fitoquímica de *Maytenus robusta*, reafirma sua posição quimiosistemática dentro do gênero botânico Maytenus.

BIBLIOGRAFIA

1. GROS, E. G.; POMPÍLIO, A. B.; SELDES, A. M.; et al. Introducción al estudio de los productos naturales. Facultad da ciencias exactas y naturales Universidad de Buenos Aires - Argentina; 1985, p 01
2. HERTWIG, V. Plantas Aromáticas e Medicinais. São Paulo: 2.ed Icone, 1991, p 335
3. CRUZ, G. L. Dicionário de Plantas Úteis do Brasil. 2.ed. Rio de Janeiro, Civilização Brasileira, 1982.
4. CAMPOS, J. M.; CARIBÉ, J. Plantas que ajudam o Homem. São Paulo: ed pensamento, 1991, p 07
5. LOEFGREN, A. Manual de Plantas Naturais Fanerogâmicas. Rio de Janeiro: Imprensa Nacional, 1927
6. ARAUJO, S. J.; LUCAS, V. Catálogo de Extratos Fluidos. Rio de Janeiro: Nova edição, 1930
7. ANTONIO, G. G.; ESTEBAN, A. F.; ANGEL, G. R. triterpenes from *Maytenus horrida*; Phytochemistry, V 26, p 2785, 1987
8. MARTIN, J. D. A triterpenoid quinone methide from *Maytenus dispermus*; Tetrahedron, V 29, p 2997-3000, 1973

9. ITOKAWA, H.; SHIROTA, O.; MORITA, K.; TAKEYA, K. Triterpenes from *Maytenus ilicifolia*; Phytochemistry, V 30, p 3713-3716, 1991
10. ITOKAWA, H.; SHIROTA, O.; MORITA, K.; TAKEIA, K.; IKUTA, H. New triterpene dimer from *Maytenus ilicifolia*; Phytochemistry, V 31, p 6881-6882, 1990
11. NETHLETON, D. E.; BALITZ, M. D.; BROWN, M.; et.al. Large Scale Isolation of Maytansinoids from the seeds of *Maytenus rothiana* using preparative LC; J. Nat. Prod., V 44, p 340-347, 1981
12. MORRIS, S.; SMITH, R. S. Maytoline, Maytine and Maytohdine, Novel Nicotinoyl Sesquiterpene Alkaloids from *Maytenus serrata*; J. Org. chem, V 42, p 115-117, 1977
13. KUPCHAN, S. M.; KOMODA, Y. A.; et. al. The Maytansinoids, Isolation, Strutural Elucidation and Chemical Interrelation of Novel Ansamacrolides; J. Org. Chem., V 42, p 2349-2357, 1977
14. MARTIN, J. D. New diterpenoids extractives of *Maytenus dispermus*; Tetrahedron, V 29, p 2553-2559, 1973
15. MANDICH, L.; MAGALIS, B.; SILVA, M.; BARROS, C. Phytochemical screening of medicinal plants studies of flavonoids; Rev. Latinoamer. Quim., V 15, p 80-82, 1984
16. BECERRA, J.; GAETE, L.; SILVA, M.; et.al. Sesquiterpenes from seeds of *Maytenus boaria*; Phytochemistry, V 26, p 3073-3074, 1987

17. MUÑOZ, O.; GONZALEZ, G. A.; et.al. Sesquiterpenes esters from *Maytenus disticha*; Phytochemistry, V 29, p 3225-3228, 1990
18. GONZALEZ, G. A.; JIMENEZ, I. A.; ANGEL, G. R.; et.al. β -agarofurane sesquiterpene ester from *Maytenus canariensis*; Phytochemistry, V 28, p 173-175, 1989
19. WEERATUNGA, G. AND KUMAR, V. Phytochemistry, V 24, p 2369, 1985
20. KUPCHAN, I.; UCHIDA, K.; et. al. Tumor Inhibitors; Chem. Commun., part 121, 1976
21. JOLY, A. B.; LEITÃO, H. F. Botânica e Economia; Editora da Universidade de São Paulo, 1979
22. SCHULTZ, A. R. Introdução ao estudo da Botânica sistemática. 2. ed. Porto Alegre, Globo, S.D., p 388-389
23. BALBACH, A. A flora nacional na medicina doméstica. 2. ed. São Paulo, A edificação no lar, 1980.
24. JOLY, A. B. Botânica. Introdução à taxonomia vegetal. São paulo: Ed. USP, 1978, p 444
25. RUZICKA, L. Proc. Chem. Soc., 341, 1959

26. BULLOCK, J. D.; *Biosintesis de Productos Naturales*, URMO, Bilbao, 1969
 27. HARBORNE, J. D. Phytochemical Methods-A guide to modern technics of plant analysis, London, p 182, 1973
 28. HENDRICKSON, J. B. The molecules of nature, Benjamin, N.Y., 1965
 29. GEISSMAN, T. A.; CROUT, D. H. G. Organic chemistry of secondary plant metabolism, p 325-327, 1969
 30. BITANCOR, C.; FREIRE, R. et. al. Three triterpenes and other terpenoids from *Catha cassinoides*; Phytochemistry, V 19, p 1989-1993, 1980
 31. ATCHUTA, P.; FROLOW, F. et. al. 3-oxo-friedelan-20 α -oic acid from *Gimnosporia emarginata*; Phytochemistry, V 23, p 2251-2255, 1984
 32. MONACHE, F. D.; MARINI, J. F.; LIMA, G. V. Gazz. Chim. Italia, 102, p 636, 1972
 33. MARTINEZ, M.; MIGUEL, M. C.; SANCHES, V. C. Terpenoids from *Mortonia diffusa*; J. Nat. Prod., V 51, p 793-796, 1988
 34. WEERATUNGA, G.; KUMAR, V. D:B-Friedoolean-5-ene-3 β ,29-diol, an angular methyl oxygenated D:B friedooleanene from *Elaeodendron balae*; Phytochemistry, V 24, p 2369-2372, 1980
-

35. NOZAKI, H. ; SUZUKI, H.; HIRAYAMA. et.al., Phytochemistry, V 25, p 479-485, 1986

36. GONZALEZ, G. A.; GONZELEZ, M. C.; RAVELO, G. A. 3-oxo-28,29-dihidroxyolean-12-ene from *Orthosphenia mexicana*; Phytochemistry, V 29,p 130, 1986

37. KUPCHAN, S. M.; KOMODA, Y.; GARETH, J. T. Maytanprine and Maytanbutine, New antileukaemic Ansamacrohdes from *Maytenus buchananii*; J. C. Soc. Chem. Comm., p 1065, 1972

38. HELMUT, R.; Mayfoline, a novel alkaloid from *Maytenus buxifolia*; Phytochemistry, V 19, p 162, 1980

39. KUPCHAN, S. M.; KOMODA, Y.; COURT, G. J. Maytansine, a novel Antileukaemic Ansamacrohde from *Maytenus ovatus*; J. Am. Chem. Soc., V 94:4, p 1354-1356, 1972

40. DIAZ, M.; PREISS, A.; RIPPERGER, H. Loesenerine, an alkaloid from *Maytenus loeseneri*; Phytochemistry, V 26, p 1847-1848, 1987

41. UGAZ, O. L. Investigacion fitoquimica. Métodos en el estudio de productos naturales. 2º ed., Peru: Fondo editorial, 1994, p 179

42. MARBY, T. J.; MARKHAM, K. R.; THOMAS, M. B. The Sistematic Identification of Flavonoids. Springer Verlag. New York, p 354

43. MERCK. Reactivos de coloración para cromatografía en capa fina y en papel; E. Merck, Darmstadt (R.F. de Alemania), p 27, 1958
44. THEILHEIMER, W. Synthetic methods of organic chemistry. 1952, V 6, p 79
45. STILL, C. W.; KANN, M.; MITRA, A. Rapid chromatographic technique for preparative separations with moderate resolution. J. Org. Chem, V 43, p 2923-2925, 1978
46. WAGNER, H.; CHARI, M. V; SONNENBICHLER, J. Tetrahedron Letters. p 1799, 1976
47. NOZAKI, H.; SUZUKI, T. H.; KASAI, R. Antitumor triterpenes of *Maytenus diversifolia*; Phytochemistry, V 25, p 479-485, 1986
48. AHMED, M. S.; FONG, H. H. S.; SOEJARTO, D. D. High-performance chromatographic separation of maytansinoids in *Maytenus ilicifolia*
49. BUDZIKIEWICZ, H.; WILSON, J. M.; DJERASSI, C. Mass Spectrometry in Structural and Stereochemical Problems of Pentacyclic Triterpenes. J. Am. Chem. Soc, V 81, p4587, 1959
50. BREITMAIER, E.; VOELTER, W. ¹³C NMR Spectroscopy. Verlag Chemie, New York, 1978
51. MAHATO, S. B.; GANGULY, A. N.; SAHU, N.P. Review. Steroid saponins. Phytochemistry, V 21, p 959-978, 1982