

Vânia Aparecida de Freitas Formenton Macedo dos Santos

**Aspectos metabolômico, biológico e
proteômico de *Maytenus ilicifolia* e *Salacia
campestris* (Celastraceae).**

Tese apresentada ao Instituto de Química,
Universidade Paulista como parte dos requisitos
para a obtenção do título de Doutor em Química

Orientadora: Prof^a Dr^a Maysa Furlan

Araraquara
2010

FICHA CATALOGRÁFICA

S237a Santos, Vânia Aparecida de Freitas Formenton Macedo dos
Aspectos metabolômico, biológico e proteômico de
Maytenus ilicifolia e *Salacia campestris* (Celastraceae) /
Vânia Aparecida de Freitas Formenton Macedo dos Santos. –
Araraquara : [s.n], 2010
263 f. : il.

Tese (doutorado) – Universidade Estadual Paulista, Instituto
de Química
Orientador: Maysa Furlan

1. Química organica. 2. Oxidorredutase do tipo P450.
3. Triterpenos quinonametídeos. 4. Alcalóides piridínicos
sesquiterpênicos fluxo. I. Título.

VÂNIA APARECIDA DE FREITAS FORMENTON MACEDO
DOS SANTOS

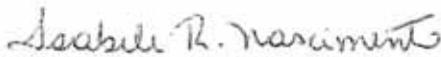
Tese apresentada ao Instituto de
Química, Universidade Estadual
Paulista, como parte dos requisitos para
obtenção do título de Doutor em
Química.

Araraquara, 23 de agosto de 2010.

BANCA EXAMINADORA



Prof^a Dr^a Maysa Furlan (Orientadora)
Instituto de Química – UNESP, Araraquara



Prof^a Dr^a Isabele Rodrigues Nascimento
Instituto de Química – UNESP, Araraquara



Prof. Dr. Otávio Henrique Thiemann
Instituto de Física – USP, São Carlos



Prof^a Dr^a Ana Maria Soares Pereira
Universidade de Ribeirão Preto – UNAERP, Ribeirão Preto



Prof. Dr. Luciano Morais Lião
Instituto de Química - UFG, Goiânia

DADOS CURRICULARES

1. Dados pessoais

Nome: Vânia Aparecida de Freitas Formenton Macedo dos Santos

Data de nascimento: 07 de outubro de 1968

Nacionalidade: Brasileira

Naturalidade: São Carlos, SP

Estado civil: casada

Profissão: Química

Endereço residencial: Rua Herculano Gomes, 468. Nova Estância Suíça – São Carlos, SP

Endereço profissional: Rua Prof. Francisco Degni, s/n – Araraquara, SP

Telefone residencial: (016) 34134323

e-mail: vaniaapf@iq.unesp.br

2. Formação Acadêmica

2.1. Graduação

Curso: Licenciatura em Ciências Exatas – Habilitação em Química

Instituição: Universidade de São Paulo - Instituto de Física, Instituto de Química, Instituto de Ciências Matemáticas de São Carlos – SP

Conclusão: 2001

2.2. Iniciação Científica

Instituição: Instituto de Química - Universidade Federal de São Carlos, São Carlos – São Paulo

Área de Concentração: Química Orgânica

Modalidade: Produtos Naturais

Projeto: Busca de compostos de partida para novas drogas antichagásicas e antileishmanioses, através do estudo fitoquímico de *Dictyoloma vandellianum* (Rutaceae) e ensaios bioquímicos com flavonóides isolados de *Lonchocarpus* e *Deguelia* (Leguminosae).

Orientação: Profa: Dra. Maria Fátima das Graças Fernandes da Silva

Conclusão: 2002

2.3. Pós-Graduação

2.3.1. Mestrado

Instituição: Instituto de Química - Universidade Estadual Paulista “Júlio Mesquita”, Araraquara - SP

Área de Concentração: Química Orgânica

Modalidade: Produtos Naturais

Projeto: Avaliação da capacidade antioxidante e possíveis associações sinérgicas de quinonametídeos e substâncias fenólicas em *Maytenus ilicifolia* (Celastraceae)

Orientação: Profa: Dra. Maysa Furlan

Co-orientador : Prof. Dr. Ian Castro-Gamboa

Conclusão: 2006

2.3.2. Doutorado

Instituição: Instituto de Química - Universidade Estadual Paulista “Júlio Mesquita”, Araraquara - SP

Área de Concentração: Química Orgânica

Modalidade: Produtos Naturais

Projeto: Aspectos metabolômico, biológico e proteômico de *Maytenus ilicifolia* e *Salacia campestris* (Celastraceae).

Orientação: Profa: Dra. Maysa Furlan

Conclusão: 2010

3. Atividades acadêmicas relevantes

3.1. Estágio de Docência em Química Orgânica Experimental II, realizado no 1º semestre de 2007, supervisionado pela Prof^a. Dr^a. Márcia Nasser Lopes; carga horária de 120 horas/ano, oferecida aos alunos do 4º ano de Química – Bacharel e Química Tecnológica. Instituto de Química (UNESP) – Araraquara.

3.2. Estágio de Docência em Química Orgânica I, realizado no 2º semestre de 2007, supervisionado pela Prof^a. Dr^a. Isabele Rodrigues Nascimento; carga horária de 60 horas/semestre, oferecida aos alunos do 1º ano de Farmácia-Bioquímica. Faculdade de Ciências Farmacêuticas (UNESP) – Araraquara.

3.3. Participação como membro da comissão organizadora do VI Simpósio e VI Reunião de Avaliação do Programa Biota/Fapesp, realizado no período de 8 – 12 de julho de 2008 em Araraquara, São Paulo

3.4. Participação como membro da comissão organizadora do III Workshop do NuBBE - Conservação e Uso Sustentável da Diversidade de Plantas do Cerrado e Mata Atlântica: Diversidade Química e Prospecção de Bioprodutos, realizados nos dias 7 e 8 de julho de 2008 em Araraquara, São Paulo

4. Prêmios

1. Prêmio IQSC de Desempenho Acadêmico – melhor desempenho acadêmico durante o ano letivo de 2000.

2. Apresentação oral no XX Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil e X Congresso Internacional de Etnofarmacologia “Potencial anti-chagásico de alcalóides piridino-sesquiterpênicos de *Maytenus ilicifolia*”, 2008.

5. Trabalhos publicados e/ou submetidos a periódicos indexados

1- VELLOSA, J. C. R.; SANTOS, V. A. F. F. M.; KHALI, N. M. L.; GUTIERRES, V. O.; FURLAN, M.; BRUNETI, I. L.; OLIVEIRA, O. M. M. F. *Salacia campestris* root bark extract: peroxidase inhibition, antioxidant and antiradical profile. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 45, n.1, 2009.

2- VELLOSA, J.C. R.; SANTOS, V. A. F. F. M.; KHALI, O. A. K. L.; KHALI, N. M. L.; BARBOSA, V. F.; HAKIME-SILVA, R. A.; FURLAN, M.; BRUNETTI, I. L.; OLIVEIRA, O. M. M. F. *Maytenus ilicifolia* as source of antioxidants and anti-radicals agents and its action on neutrophils peroxidase (myeloperoxidase). **African Journal of Biochemistry Research**, v. 2, n. 12, p. 232-239, 2008.

3- COSTA, P. M.; SANTOS, V. A. F. F. M.; FERREIRA, P. M. P.; CORSINO, J.; MORAES, M. O.; COSTA-LOTUFO, L. V.; MONTENEGRO, R. C.; BOLZANI, V. S.; FURLAN, M.; PESSOA, C. Antiproliferative activity of pristimerin isolated of *Maytenus ilicifolia* (Celastraceae) in human HL-60 cells. **Toxicology in Vitro**, v. 22, p. 854-863, 2008.

4- SANTOS, D. P.; SANTOS, V. A. F. F. M.; BERGAMINI, M. F.; FURLAN, M.; ZANONI, M. V. B. Preconcentration of rutin at a poly glutamic acid modified electrode and its determination by square wave voltammetry. **Analytical Letters**, v. 40, p. 3430-3442, 2007.

5- VELLOSA, J. C. R.; BARBOSA, V. F.; SANTOS, V. A. F. F. M.; KHALIL, N. M.; FURLAN, M.; BRUNETTI, I. L.; OLIVEIRA, O. M. M. Profile of *Maytenus aquifolium* action over free radicals and reactive oxygen species. Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 43, p. 447-453, 2007.

6- VELLOSA, J. C. R.; FORMENTON, V. A. F.; XIMENES, V. F.; FONSECA, L. M.; FURLAN, M.; BRUNETI, I. L.; OLIVEIRA, O. M. M. F. Antioxidant activity of *Maytenus ilicifolia* root bark. **Fitoterapia**, v. 77, p. 243-245, 2006.

7- SANTOS, V. A. F. F. M.; SANTOS, D. P.; CASTRO-GAMBOA, I.; ZANONI, M. V. B.; FURLAN, M. Evaluation of capacity and antioxidant synergic associations of possible quinonamethide triterpenes and phenolic substances from *Maytenus ilicifolia* (Celastraceae). **Molecules** (aceito).

8- NOGUEIRA, L. G.; DIGNANI, D. F.; ARÚJO, M. G. F.; GUTIERRES, V. O.; HAKIME-SILVA, R. A.; SANTOS, V. A. F. F.M.; FURLAN, M.; BAUAB, T. M. Evaluation of the antibacterial and antioxidant potential of *Maytenus ilicifolia* (Celastraceae) extracts. **Evidence Based Complementary and Alternative Medicine** (aceito).

6. Participação em eventos científicos

(A) 2nd Brazilian Conference on Natural Products (2nd BCNP) and XXVIII Annual Meeting on Micromolecular Evolution, Systematics and Ecology (XXVIII RESEM)

Sesquiterpene pyridine alkaloids from *Maytenus ilicifolia*, realizado em 09-12 de novembro de 2009 em São Pedro – SP. Apresentação de painel

Antifungal and antitumoral activities of *Salacia campestris* (Hippocrateaceae), realizado em 09-12 de novembro de 2009 em São Pedro. Apresentação de painel

(B) IV Workshop do NuBBE - Potencial anti-chagásico de alcalóides piridino-sesquiterpênicos de *Maytenus ilicifolia*, realizado em 13-14 de dezembro de 2009 em Araraquara – SP.

(C) VII Simpósio Brasileiro de Farmacognosia

Avaliação do potencial antibacteriano de extratos de *Maytenus ilicifolia* (Celastraceae), realizado na Universidade Estadual de Maringá – Departamento de Farmácia e Farmacologia, CESUMAR, em 04-07 de maio de 2009 em Maringá– PR-SP. Apresentação de painel

Potencial anti-chagásico de alcalóides piridino-sesquiterpênicos de *Maytenus ilicifolia*. XX Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil e X Congresso Internacional de Etnofarmacologia, realizado no Centro de Convenções Frei Caneca, de 16-19 de setembro de 2008 em São Paulo – Apresentação oral

Potencial anti-chagásico de alcalóides piridino-sesquiterpênicos de *Maytenus ilicifolia*. XX Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil e X Congresso Internacional

de Etnofarmacologia, realizado no Centro de Convenções Frei Caneca, de 16-19 de setembro de 2008 em São Paulo – Apresentação de painel

Avaliação da atividade mutagênica de pipartina, uma amida isolada de *Piper tuberculatum* (Piperaceae). XX Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil e X Congresso Internacional de Etnofarmacologia, realizado no Centro de Convenções Frei Caneca, de 16-19 de setembro de 2008 em São Paulo – Apresentação de painel

Produtos Naturais e doenças do trato gastrointestinal. XX Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil e X Congresso Internacional de Etnofarmacologia, realizado no Centro de Convenções Frei Caneca, de 16-19 de setembro de 2008 em São Paulo – participação em mini-curso.

Participação no XX Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil e X Congresso Internacional de Etnofarmacologia, realizado no Centro de Convenções Frei Caneca, de 16-19 de setembro de 2008 em São Paulo.

Participação no III Workshop do NuBBE – Conservação e Uso Sustentável da Diversidade de Plantas do Cerrado e Mata Atlântica: Diversidade Química e Prospecção de Bioprodutos, realizados nos dias 7 e 8 de julho de 2008 em Araraquara, São Paulo

Participação no VI Simpósio e VI Reunião de Avaliação do Programa Biota/Fapesp, realizado no período de 8 – 12 de julho de 2008 em Araraquara, São Paulo

Potencial anti-chagásico de alcalóides piridino-sesquiterpênicos de *Maytenus illicifolia*. VI Simpósio e VI Reunião de Avaliação do Programa Biota/Fapesp, realizado no período de 8 a 12 de julho de 2008 em Araraquara, São Paulo – Apresentação de resumo

Biota Funcional: proteoma/metaboloma ferramentas de avaliação macro e micromolecular para entendimento da biodiversidade. VI Simpósio e VI Reunião de Avaliação do Programa Biota/Fapesp, realizado no período de 8 – 12 de julho de 2008 em Araraquara, São Paulo, com carga horária de 8 horas

Busca de substâncias antioxidantes em *Pterogyne nitens* (Leguminosae) empregando cromatografia líquida de alta eficiência com detecção eletroquímica, realizado no II Simpósio de Cromatografia (SIMCRO), em São Pedro, São Paulo, no dia 20 de outubro de 2006 – Apresentação de painel

Participação no Workshop Pós-Graduação em Química da SBQ – Regional Interior Paulista Waldemar Saffioti “Estratégias para maior entrosamento e fortalecimento dos Cursos de Pós-Graduação em Química do Interior Paulista, realizado no Instituto de Química de Araraquara – UNESP, no dia 06 de outubro de 2006

Participação do I Workshop Pós-Graduação em Química: Formação de Recursos Humanos e Transferência de Tecnologia, realizado no Instituto de Química de Araraquara – UNESP, no dia 05 de outubro de 2006

Avaliação voltamétrica da capacidade antioxidante de triterpenos quinonametídeos e substâncias fenólicas de *Maytenus ilicifolia*, apresentado no XVII Congresso de la Sociedad Iberoamericana de Electroquímica - SIBAE, em La Plata, Argentina, nos dias 03 a 07 de abril de 2006 – Apresentação oral

7. Formação complementar

1. Radioproteção – uso, preparação e manuseio de fontes radioativas, realizado na Universidade de São Paulo – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto em 02/13 de maio de 2009 em Ribeirão Preto – SP.
2. Ge Healthcare Life Sciences – Estratégias de Purificação de Proteínas no Instituto de Física de São Carlos – USP em 29 de maio de 2009 em São Carlos – SP.
3. Medicinal Plants - Prof. Dr. Leslie Gunatilaka - Arizona
Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho – UNESP
Araraquara, 14 a 18 de Julho de 2008.
4. Operação e manutenção básica do Sistema HPLC, série 20^a Prominence e software LC Solution – marca Shimadzu. Scientific Instruments CO. SINC do Brasil; carga horária: 14 horas. Araraquara, 05 de junho de 2008

8. Cooperação em Projetos

8.1. Supervisão científica junto ao Instituto de Química (UNESP – Araraquara) e co-orientação junto a Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara – Farmácia Bioquímica

1. Determinação simultânea de triterpenos quinonametídeos e alcalóides piridínicos sesquiterpênicos em *Maytenus ilicifolia* por CLAE-DAD

Aluna: Raul Sgarbosa Zambon
Instituição: Instituto de Química - UNESP – Araraquara
Modalidade: Trabalho de Conclusão de Curso (TCC)
Órgão de Fomento: PIBIC/CNPQ

8.2. Supervisão científica junto ao Instituto de Química (UNESP – Araraquara)

2. Fracionamento biomonitorado por ensaios antifúngicos de *Salacia campestris*

Aluna: Milena Salmen Vidal
Instituição: Instituto de Química - UNESP – Araraquara
Modalidade: Iniciação Científica
Órgão de Fomento: PIBIC/CNPQ

Aos meus filhos: Rafael e Gabriel
Vocês são o que de melhor me aconteceu
São companheiros todos os dias, o dia todo
É lição ensinada e aprendida
É prática de vida
É a força que me empurra sempre em frente
Por isso e por acreditarem em mim
Dedico esta tese especialmente a vocês

Agradecimentos especiais

Aos meus pais Maria Dolores e Joaquim
Vocês são o motivo da minha existência
Amo vocês

Ao meu esposo Macedo
Obrigada pela convivência, companheirismo e sobre tudo
Pela liberdade de escolha e incentivo
A que me são depositados

À minha irmã Adriana e aos meus irmãos Lincon, Kairo e Maykon
por acreditarem em mim
Amo vocês

Ao Prof. Dr. Edson Rodrigues (Físico-Químico) da Universidade
de São Paulo - São Carlos, pelo incentivo

Agradecimentos especiais

À minha querida orientadora Profa. Dra. Maysa Furlan
Serei eternamente grata pelos ensinamentos de química e de
vida. Sua dedicação e entusiasmo sempre me incentivaram,
tornando possível a realização deste trabalho

Agradecimentos

Ao Instituto de Química - UNESP e ao NuBBE (Núcleo de
Bioensaios, Biossíntese e Ecofisiologia de Produtos Naturais),
pela oportunidade de desenvolver este trabalho.

Aos professores doutores do Instituto de Química - Araraquara
Prof. Dr. Alberto José Cavalheiro
Prof. Dr. Wagner Vilegas

Profa. Dra. Isabele Rodrigues Nascimento
Profa. Dra. Márcia Nasser Lopes
Profa. Dra. Ângela Regina Araújo
Profa. Dra. Lúcia Maria Xavier Lopes
Profa. Dra. Dulce Helena Siqueira Silva
Profa. Dra. Lourdes Campaner dos Santos

Agradecimentos

As professoras doutoras da Faculdade de Ciências Farmacêuticas
- UNESP - Araraquara

Profa. Dra. Regina Maria Barretto Cicarelli - Laboratório de
Imunologia

Profa. Dra. Maria José Soares Mendes Giannini - Laboratório de
Micologia

Profa. Dra. Ana Marisa Fusco Almeida - Laboratório de Micologia
(F)

Profa. Dra. Márcia Aparecida Silva Graminha - Laboratório de
Imunologia

A professora doutora - UNAERP - Ribeirão Preto

Profa. Dra. Ana Maria Soares Pereira - Laboratório de
Biotecnologia Vegetal

A professora doutora - Faculdade de Ciências Farmacêuticas- USP
- Ribeirão Preto

Profa. Dra. Simone de Pádua Teixeira - Laboratório de
Fisiologia Vegetal

Ao Prof. Dr. Massuo Jorge Kato - USP - São Paulo

Agradecimentos aos Amigos

Química Orgânica, Química Analítica, Físico-Química e
Bioquímica

A mais bela de todas as coisas....

O dia mais belo - Hoje
A coisa mais fácil - Errar
O maior erro - A inveja
O maior obstáculo - O medo
A distração mais proveitosa - O trabalho
A raiz de todos os males - O egoísmo
Os melhores professores - As crianças
A pior derrota - O desânimo
O melhor remédio - O otimismo
O pior defeito - O mau humor
A verdadeira alegria - Ser útil aos outros
O presente mais belo - O perdão
A sensação mais agradável - A paz interior
A rota mais acertada - O caminho do meio
As pessoas mais necessárias - Os pais
O mais imprescindível - O lar
A força mais potente do mundo - A fé
A mais bela de todas as coisas - O AMOR

Aos meus melhores amigos

Dra. Viviane Cândida da Silva
Dra. Andréa Nastri de Luca
Dr. Luis Octávio Regasini
MS. Claudio Rodrigo Nogueira

As minhas amigas da Biossíntese

Lidiane Gaspareto
Andréia Morandim

Aos inesquecíveis amigos

Luciana Polese
Adriana Lopes
Sara
Amanda Danuelo

Nivaldo Boralle
Alberto Camilo Alécio
Marquinho
Marcos Pivatto

Gabriela	João Marcos
Grenda	Marcos Marçal
Débora	Magela
Néia	Joaquim Corsino
Aline	Fernando Cotinguiba
Hosana	Fernando Passareli
Luciana Ávila	Renatinho
Raquel	Jorge
Sheila	João Medeiros

Aos meus queridos alunos científicos

Raul Sgarbosa Zambon
Milena Salmen Vidal

As amigas da Seção de Pós-Graduação e da secretaria da diretoria

Patrícia Freitas
Sandra Pavanelli
Célia Maria Chicareli Vieira Coelho
Wennia Limonti de Souza dos Santos
Shirley Ana Maria Costa
Cíntia Maria Gonçalves Grillo

As funcionárias da Biblioteca pela amizade e auxílio

Valéria Ap. Moreira Novelli
Cristina Aurora Boneli Giolo

Aos meus amigos da Vigilância pela proteção e amizade

Valter Costa Curta	Ricardo Luis de Souza
José Roberto Raphael	Jair Carlos Roque
Valdecir Galatte	José de Lima Theodoro
Carlos Alberto Nunes da Silva	Cleber Eduardo Vargas
Joaquim José de Carvalho	Anderson Roberto Serrano

Epígrafe

No princípio criou DEUS os céus e a terra
(Gênesis 1)

E disse: Produza a terra relva, ervas que dêem semente, e árvores frutíferas que dêem fruto segundo a sua espécie, cuja semente esteja nele, sobre a terra. E assim se fez (Gênesis 11)

" ⁴Da terra, o Senhor criou os remédios, e o homem de bom senso não os despreza....

⁶ O Senhor deu aos homens a ciência para que pudessem glorificá-lo por causa das maravilhas dele.

⁷ Com elas, o médico cura e elimina a dor, e o farmacêutico prepara as fórmulas. ⁸ Dessa

maneira, as obras de Deus não têm fim, e dele vem o bem-estar para a terra." (Eclesiásticos 38, 4- 8)

Aspectos metabolômico, biológico e proteômico de *Maytenus ilicifolia* e *Salacia campestris* (Celastraceae).

Resumo

Este projeto teve como principal objetivo o estudo de aspectos químicos, biológicos e biossintéticos dos metabólitos secundários de duas espécies de Celastraceae, *Maytenus ilicifolia* e *Salacia campestris*. O estudo fitoquímico das cascas das raízes das duas espécies selecionadas resultou no isolamento de oito substâncias pertencentes a três diferentes classes de metabólitos secundários, incluindo os triterpenos quinonametídeos, maitenina e pristimerina; os alcalóides piridínicos sesquiterpênicos, aquifoliunina E1, maiteina, wilforina, sendo dois inéditos, maiteinol e campestrina; além de uma catequina, ourateacatequina. Os extratos, frações e substâncias puras foram avaliados quanto a atividade antifúngica, frente aos patógenos humanos *Candida albicans*, *C. kruseii*, *C. parapsilosis* e *Cryptococcus neoformans*; tripanocida, frente a cepa Y da forma epimastigota do *Trypanosoma cruzi*; leishmanicida, frente a formas promastigotas de *L. amazonensis* e *L. chagasi* e antitumoral avaliado por testes de viabilidade metabólica usando três tipos de células tumorais, incluindo B16 (melanoma), HeLA (colo uterino) e U343 (astrocitoma cerebral). Em todas as matrizes biológicas avaliadas, os triterpenos quinonametídeos, maitenina e pristimerina, se mostraram os mais potentes, evidenciando atividade biológica superior aos controles positivos utilizados. Além dos triterpenos quinonametídicos, os alcalóides piridínicos sesquiterpênicos, aquifoliunina E1 e maiteinol se mostraram ativos nos testes leishmanicida e tripanocida, respectivamente, mas menos potentes que os triterpenos quinonametídeos. Experimentos para avaliar a biossíntese das etapas de oxidação que ocorrem no anel E dos triperpenos quinonametídeos foram baseados em protocolos para a extração da enzima oxidoreductase do tipo citocromo P450, supostamente envolvida nas referidas etapas de oxidação. Estudos de incorporação do primeiro precursor biossintético, a pristimerina, em extratos enzimáticos obtidos das cascas das raízes de *M. ilicifolia* e *S. campestris* não evidenciaram a formação do(s) produto(s) mais oxidado(s). A análise do perfil proteômico foi feita por eletroforese mono- e bidimensional que mostrou a presença de enzimas com a mesma massa molecular das enzimas oxidoreductases do tipo citocromo P450. Estudos histoquímicos foram realizados corroborando a presença dos triterpenos quinonametídeos nas raízes de *M. ilicifolia*.

Aspects metabolomic, proteomic and biological *Maytenus ilicifolia* and *Salacia campestris* (Celastraceae).

Abstract

The project was addressed to investigate chemical, biological and biosynthetic aspects of major secondary metabolites from two Celastraceae species, *Maytenus ilicifolia* (espinheira-Santa) and *Salacia campestris*. The phytochemical study of the bark roots resulted in the isolation of eight compounds belonging to three different classes of natural products including the quinonemethides triterpenes, maytenin and pristimerin; the alkaloids pyridine sesquiterpenes, aquifoliunine E1, mayteine, wilforine, including two novel, mayteinol and campestrine; in addition to one catechin, ourateacatechin. The localization of quinonemethides triterpenes in roots of *M. ilicifolia* was achieved by histochemical analysis based on complexation reactions using some specific reagents to identify groups or organic functions in the interested molecule. The crude extracts, fractions and pure compounds had their antifungal properties assayed against the human pathogens *Candida albicans*, *C. kruseii*, *C. parapsilosis* and *Cryptococcus neoformans*. Additionally, their anti-parasite activity were assessed against *Trypanosoma cruzi* (epimastigote form of Y strain), *L. amazonensis* and *L. chagasi* (promastigote forms) while the antitumoral activity was based on metabolic viability metabolic using two kinds of tumor cells, B16 (melanoma), HeLA (uterus) e U343 (cerebral astrocytoma). The quinonemethides triterpenes, maytenin and pristimerin displayed considerable potential since were more active than controls. The alkaloids pyridine sesquiterpenes, aquifoliunine E1 and mayteinol revealed to have some potential as leishmanicidal and trypanocide, respectively, but not comparable to quinonemethides triterpenes. As the biosynthesis of quinonemethides triterpenes is concerned, the oxidation step at ring E was investigated considering the participation of cytochrome P450 oxidoreductase besides enzymatic assays using pristimerin as a substrate and crude enzymatic extracts from bark roots of *M. ilicifolia* and *S. campestris*. The presence of cytochrome P450 oxidoreductase was further indicated by SDS-1D and -2D analysis followed by proteomic analysis.

Lista de Esquemas

Esquema 1- Partição líquido-líquido do extrato etanólico das cascas das raízes da planta adulta de <i>Maytenus ilicifolia</i>	49
Esquema 2- Fracionamento do extrato DCM e isolamento dos metabólitos secundários cascas das raízes de <i>Maytenus ilicifolia</i>	50
Esquema 3- Isolamento e purificação dos triterpenos quinonametídeos da planta jovem de <i>Maytenus ilicifolia</i>	53
Esquema 4- Fracionamento cromatográfico do extrato etanólico das cascas das raízes de <i>Salacia campestris</i>	54
Esquema 5- Conversão do 2,3-epoxiesqualeno à 3 β -friedelanol e friedelina e seu envolvimento como precursor biossintético dos triterpenos quinonametídeos em <i>Maytenus aquifolium</i> e <i>Salacia campestris</i>	202
Esquema 6- Protocolo 1 de extração enzimática das oxidoredutases do tipo P450 de <i>M. ilicifolia</i>	208
Esquema 7- Protocolo 2 de extração enzimática das oxidoredutases do tipo P450 de <i>M. ilicifolia</i>	210
Esquema 8- Protocolo 3 de extração enzimática das oxidoredutases do tipo P450 em <i>Salacia campestris</i>	211
Esquema 9- Protocolo 4 de extração enzimática das oxidoredutases do tipo P450 de <i>M. ilicifolia</i> e de <i>Salacia campestris</i>	213

Lista de Figuras

Figura 1 – Foto da espécie <i>Maytenus ilicifolia</i> (arquivo próprio)	33
Figura 2 – Foto da espécie <i>Salacia campestris</i> (arquivo próprio).	35

Figura 3 – Esqueleto 24-nor-D:A-friedo-oleanano presente em Celastraceae	36
Figura 4 – Estrutura química clássica do sesquiterpeno do tipo diidro-β-agarofurano	39
Figura 5 – Estrutura química clássica do alcalóide piridínico sesquiterpênico	39
Figura 6 – Estruturas dos ácidos piridínicos dicarboxílicos que esterificam o núcleo do esqueleto sesquiterpênico	40
Figura 7 – Espectro de RMN ¹ H da substância 1 (500 MHz, CDCl ₃)	65
Figura 8 – Expansão da região 1,0–2,3 δ do espectro de RMN ¹ H da substância 1 (500 MHz, CDCl ₃).	66
Figura 9 – Expansão da região 2,6–4,8 δ do espectro de RMN ¹ H da substância 1 (500 MHz, CDCl ₃).	67
Figura 10 – Expansão da região 5,2–6,7 δ do espectro de RMN ¹ H da substância 1 (500 MHz, CDCl ₃)	68
Figura 11 – Expansão da região 7,0–8,6 δ do espectro de RMN ¹ H da substância 1 (500 MHz, CDCl ₃)	69
Figura 12 – Espectro de RMN ¹³ C da substância 1 (500 MHz, CDCl ₃)	70
Figura 13 – Expansão da região 10,0–37,0 δ do espectro de RMN ¹³ C da substância 1 (500 MHz, CDCl ₃).	71
Figura 14 – Expansão da região 45,0–95,0 δ do espectro de RMN ¹³ C da substância 1 (500 MHz, CDCl ₃).	72
Figura 15 – Expansão da região 120,0–175,0 δ do espectro de RMN ¹³ C da substância 1 (500 MHz, CDCl ₃)	73
Figura 16 – Espectro de DEPT 135° da substância 1 (500 MHz, CDCl ₃)	74
Figura 17 – Espectro de gHMQC da substância 1 (500 MHz, CDCl ₃)	75
Figura 18 – Expansão do espectro gHMQC da região 8,0–28,0 δ para ¹³ C da substância 1 (500 MHz, CDCl ₃).	75
Figura 19 – Expansão do espectro gHMQC da região 58,0–80,0 δ para ¹³ C da substância 1 (500 MHz, CDCl ₃)	76
Figura 20 – Expansão do espectro gHMQC da região 120,0–155,0 δ para ¹³ C da substância 1 (500 MHz, CDCl ₃)	76
Figura 21 – Espectro de gHMBC da substância 1 (500 MHz, CDCl ₃)	77
Figura 22 – Expansão do espectro gHMBC da região 165,0–172,0 δ para ¹³ C da substância 1 (500 MHz, CDCl ₃)	77
Figura 23 – Expansão do espectro gHMBC da região 34,0–54,0 δ para ¹³ C da substância 1 (500 MHz, CDCl ₃)	78
Figura 24 – Expansão do espectro gHMBC da região 65,0–100 δ para ¹ H da substância 1 (500 MHz, CDCl ₃)	78
Figura 25 – Expansão do espectro gHMBC da região 70,0–100,0 δ para ¹³ C da substância 1 (500 MHz, CDCl ₃)	79
Figura 26 – Expansão do espectro gHMBC da região 121,0–138,0 δ para ¹³ C da substância 1 (500 MHz, CDCl ₃)	79
Figura 27 – Expansão do espectro gHMBC da região 148,0–174,0 δ para ¹³ C da substância 1 (500 MHz, CDCl ₃)	80
Figura 28 – Expansão do espectro gHMBC da região 150,0–176,0 δ para ¹³ C da substância 1 (500 MHz, CDCl ₃)	80
Figura 29 – Expansão do espectro gHMBC da região 161,0–180,0 δ para ¹³ C da substância 1 (500 MHz, CDCl ₃)	81
Figura 30 – Espectro de gCOSY da substância 1 (500 MHz, CDCl ₃).	81

Figura 31 – Espectro no IV da substância 1, em pastilha de KBr	82
Figura 32 – Espectro de massas da substância 1	82
Figura 33 – Espectro de RMN ¹ H da substância 2 (500 MHz, CDCl ₃)	87
.....	
Figura 34 – Espectro de RMN ¹ H da substância 2 (500 MHz, CDCl ₃)	88
.....	
Figura 35 – Expansão da região 2,5–4,8 δ do espectro de RMN ¹ H da substância 2 (500 MHz, CDCl ₃)	89
Figura 36 – Expansão da região 5,0–6,0 δ do espectro de RMN ¹ H da substância 2 (500 MHz, CDCl ₃)	90
Figura 37 – Expansão da região 6,0–8,6 δ do espectro de RMN ¹ H da substância 2 (500 MHz, CDCl ₃)	91
Figura 38 – Expansão e espectro de RMN ¹³ C da substância 2 (500 MHz, CDCl ₃)	92
Figura 39 – Expansão da região 125–175 δ do espectro de RMN ¹³ C da substância 2 (500 MHz, CDCl ₃)	93
Figura 40 – Espectro de DEPT 135° da substância 2 (500 MHz, CDCl ₃).	94
Figura 41 – Espectro de gHMQC da substância 2 (500 MHz, CDCl ₃)	94
....	
Figura 42 – Expansão do espectro gHMBC da região 8,0–26,0 δ para ¹³ C da substância 2 (500 MHz, CDCl ₃)	95
Figura 43 – Expansão do espectro gHMBC da região 120,-160,0 δ para ¹³ C da substância 2 (500 MHz, CDCl ₃)	95
Figura 44 – Espectro de gHMBC da substância 2 (500 MHz, CDCl ₃)	95
Figura 45 – Expansão do espectro gHMBC da região 34,0-54,0 δ para ¹³ C da substância 2 (500 MHz, CDCl ₃)	96
Figura 46 – Expansão do espectro gHMBC da região 70,0-95,0 δ para ¹³ C da substância 2 (500 MHz, CDCl ₃)	96
Figura 47 – Expansão do espectro gHMBC da região 76,0-100 δ para ¹³ C da substância 2 (500 MHz, CDCl ₃)	97
Figura 48 – Expansão do espectro gHMBC da região 162,0-178 δ para ¹³ C da substância 2 (500 MHz, CDCl ₃)	97
Figura 49 – Expansão do espectro gHMBC da região 162,0-178 δ para ¹³ C da substância 2 (500 MHz, CDCl ₃)	98
Figura 50 – Expansão do espectro gHMBC da região 120,0-140,0 δ para ¹³ C da substância 2 (500 MHz, CDCl ₃)	99
Figura 51 – Expansão do espectro gHMBC da região 142,0-174,0 δ para ¹³ C da substância 2 (500 MHz, CDCl ₃)	99
Figura 52 – Expansão do espectro gHMBC da região 6,0-28,0 δ para ¹³ C da substância 2 (500 MHz, CDCl ₃)	100
Figura 53 – Espectro gCOSY da substância 2 (500 MHz, CDCl ₃)	100
Figura 54 – Espectro no IV da substância 2, em pastilha de KBr.	101
Figura 55 – Espectro de massas da substância 2	101
Figura 56 – Expansão da região 1,0-2,3 δ do espectro de RMN ¹ H da substância 3 (500 MHz, CDCl ₃)	106

MHz, CDCl ₃).	
Figura 57 – Expansão da região 2,5–4,0 δ do espectro de RMN ¹ H da substância 3 (500 MHz, CDCl ₃).	107
Figura 58 – Expansão da região 4,5–6,2 δ do espectro de RMN ¹ H da substância 3 (500 MHz, CDCl ₃).	108
Figura 59 – Expansão da região 6,5–8,7 δ do espectro de RMN ¹ H da substância 3 (500 MHz, CDCl ₃).	109
Figura 60 – Espectro de RMN ¹³ C da substância 3 (500 MHz, CDCl ₃)	110
Figura 61 – Expansões do espectro de RMN ¹³ C da substância 3 (500 MHz, CDCl ₃)	111
Figura 62 – Espectro de DEPT 135 da substância 3 (500 MHz, CDCl ₃)	112
Figura 63 – Espectro de gHMQC da substância 3 (500 MHz, CDCl ₃)	113
Figura 64 – Expansão do espectro gHMQC da região 8,0-26,0 δ para ¹³ C da substância 3 (500 MHz, CDCl ₃).	113
Figura 65 – Expansão do espectro gHMQC da região 120,0-160,0 δ para ¹³ C da substância 3 (500 MHz, CDCl ₃)	114
Figura 66 – Espectro gHMBC da substância 3 (500 MHz, CDCl ₃)	114
Figura 67 – Expansão do espectro gHMBC da região 6,0-26,0 δ para ¹³ C da substância 3 (500 MHz, CDCl ₃)	115
Figura 68 – Expansão do espectro gHMBC da região 30,0-54,0 δ para ¹³ C da substância 3 (500 MHz, CDCl ₃)	115
Figura 69 – Expansão do espectro gHMBC da região 162,0-180,0 δ para ¹³ C da substância 3 (500 MHz, CDCl ₃)	116
Figura 70 – Expansão do espectro gHMBC da região 160,0-178,0 δ para ¹³ C da substância 3 (500 MHz, CDCl ₃).	116
Figura 71 – Expansão do espectro gHMBC da região 122,0-140,0 δ para ¹³ C da substância 3 (500 MHz, CDCl ₃).	117
Figura 72 – Expansão do espectro gHMBC da região 161,0-172,0 δ para ¹³ C da substância 3 (500 MHz, CDCl ₃).	117
Figura 73 – Expansão da região 4,0–7,0 δ do espectro de RMN ¹ H da substância 3 com D ₂ O (500 MHz, CDCl ₃)....	118
Figura 74 – Expansão da região 4,0–7,0 δ do espectro de RMN ¹ H da substância 3 com D ₂ O após alguns minutos (500 MHz, CDCl ₃).	119
Figura 75 – Experimento de TOCSY da substância 3 na região de 4,0-5,7 (500 MHz, CDCl ₃).	120
Figura 76 Experimento de TOCSY da substância 3 na região de 2,0-7,0 (500 MHz, CDCl ₃)....	120
Figura 77 – Espectro no IV da substância 3, em pastilha de KBr	121
Figura 78 – Espectro de massas para a substância 3	121
Figura 79 – Expansão da região 1,0–2,4 δ do espectro de RMN ¹ H da substância 4 (500 MHz, CDCl ₃)	126
Figura 80 – Expansão da região 2,0–3,6 δ do espectro de RMN ¹ H da substância 4 (500 MHz, CDCl ₃)	127
Figura 81 – Expansão da região 6,0–9,0 δ do espectro de RMN ¹ H da substância 4 (500 MHz, CDCl ₃)	128

MHz, CDCl ₃)	
Figura 82 – Expansão da região 20–220 δ do espectro de RMN ¹³ C da substância 4 (500 MHz, CDCl ₃)..	129
Figura 83 – Expansão da região 20–75 δ do espectro de DEPT 135° da substância 4 (500 MHz, CDCl ₃)	130
Figura 84 – Espectro gHMQC da substância 4 (500 MHz, CDCl ₃).	130
Figura 85 – Expansão na região entre 16-30 δ do espectro gHMQC da substância 4 (500 MHz, CDCl ₃)...	131
Figura 86 – Expansão na região entre 31-40 δ do espectro gHMQC da substância 4 (500 MHz, CDCl ₃)	131
Figura 87 – Expansão na região entre 32-35,0 δ do espectro gHMQC da substância 4 (500 MHz, CDCl ₃)..	132
Figura 88 – Espectro gHMBC da substância 4 (500 MHz, CDCl ₃)	132
..	
Figura 89 – Expansão na região entre 28-54 δ do espectro gHMBC da substância 4 (500 MHz, CDCl ₃)	133
Figura 90 – Expansão na região entre 60-95 δ do espectro gHMBC da substância 4 (500 MHz, CDCl ₃)	133
Figura 91 – Expansão na região entre 166-172 δ do espectro gHMBC da substância 4 (500 MHz, CDCl ₃)	134
Figura 92 – Expansão na região entre 163-180 δ do espectro gHMBC da substância 4 (500 MHz, CDCl ₃)..	134
Figura 93 – Expansão na região entre 18-40 δ do espectro gHMBC da substância 4 (500 MHz, CDCl ₃)	135
Figura 94 – Expansão na região entre 162-178 δ do espectro gHMBC da substância 4 (500 MHz, CDCl ₃)	135
Figura 95 – Espectro Jresolv da substância 4 (500 MHz, CDCl ₃).	136
Figura 96 – Expansão na região entre 2-3 δ do espectro Jresolv da substância 4 (500 MHz, CDCl ₃)	136
Figura 97 – Expansão na região entre 3,50-3,70 δ do espectro Jresolv da substância 4 (500 MHz, CDCl ₃).	137
Figura 98 – Espectro de massas da substância 4	137
Figura 99 – Espectro de RMN ¹ H da substância 6 (500 MHz, CDCl ₃).	142
.	
Figura 100 – Expansão da região 1,0-2,2 δ do espectro de RMN ¹ H da substância 6 (500 MHz, CDCl ₃)	143
Figura 101 – Expansão da região 2,0–4,0 δ do espectro de RMN ¹ H da substância 6 (500 MHz, CDCl ₃)	144
Figura 102 – Expansão da região 4,0-5,8 δ do espectro de RMN ¹ H da substância 6 (500 MHz, CDCl ₃)	145
Figura 103 – Expansão da região 6,0–9,0 δ do espectro de RMN ¹ H da substância 6 (500 MHz, CDCl ₃)	146
Figura 104 – Espectro de RMN ¹³ C da substância 6 (500 MHz, CDCl ₃)	147
Figura 105 – Expansão da região 18,0 –76,0 δ do espectro de RMN ¹³ C da substância 6 (500 MHz, CDCl ₃)	148
Figura 106 – Espectro gHMQC da substância 6 (500 MHz, CDCl ₃)	149
Figura 107 – Expansão na região entre 15-27 δ do espectro gHMQC da substância 6 (500 MHz, CDCl ₃)	149
Figura 108 – Espectro gHMBC da substância 6 (500 MHz, CDCl ₃)	150

Figura 109 – Expansão na região entre 30-56 δ do espectro gHMBC da substância 6 (500 MHz, CDCl ₃).	150
Figura 110 – Expansão na região entre 70-100 δ do espectro gHMBC da substância 6 (500 MHz, CDCl ₃).	151
Figura 111 – Expansão na região entre 161-178 δ do espectro gHMBC da substância 6 (500 MHz, CDCl ₃).	151
Figura 112 – Expansão na região entre 4,80-5,90 δ do espectro gHMBC da substância 6 (500 MHz, CDCl ₃).	152
Figura 113 – Espectro de gCOSY da substância 6	152
Figura 114 – Espectro de RMN ¹ H e expansões da substância 7 (500 MHz, CDCl ₃)	156
Figura 115 – Espectro de RMN ¹³ C e expansões da substância 7 (300 MHz, CDCl ₃)	157
Figura 116 – Espectro de RMN DEPT135° e expansões da substância 7 (300 MHz, CDCl ₃)	158
Figura 117 – Espectro de gHMQC da substância 7 (500 MHz, CDCl ₃)	159
Figura 118 – Espectro de gHMBC da substância 7 (500 MHz, CDCl ₃)	159
Figura 119 – Espectro de massas da substância 7	160
Figura 120 – Espectro de RMN ¹ H e expansões da substância 8 (500 MHz, CDCl ₃)	163
Figura 121 – Espectro de RMN ¹³ C da substância 8 (300 MHz, CDCl ₃)	164
Figura 122 – Espectro de RMN DEPT135° e expansões da substância 8 (300 MHz, CDCl ₃).	165
Figura 123 – Espectro de gHMQC da substância 8 (500 MHz, CDCl ₃)	166
Figura 124 – Espectro de gHMBC da substância 8 (500 MHz, CDCl ₃)	166
Figura 125 – Espectro de massas da substância 8	167
Figura 126 – Espectro de RMN ¹ H da substância 5 (500 MHz, CDCl ₃)	169
Figura 127 – Expansão da região 6,5–8,7 δ do espectro de RMN ¹ H da substância 5 (500 MHz, CDCl ₃)	169
Figura 128 – Espectro de RMN ¹³ C da substância 5 (300 MHz, CDCl ₃)	170
Figura 129 – Espectro de gHMQC da substância 5	170
Figura 130 – Espectro de gHMBC da substância 5	171
Figura 131 – Espectro de gCOSY da substância 5	171
Figura 132 – Espectro de massas da substância 5	172
Figura 133 – Valores de Concentração Inibitória Mínima, (μ M) das substâncias isoladas.	177
Figura 134 - Fotomicrografias de cortes transversais da raiz de <i>M. ilicifolia</i> . A- Raiz,	193

mostrando grãos de amido (em preto) no xilema secundário (Xi), floema secundário (FI), córtex (Co) e periderme (Pe), estrutura secundária. B- destaque (em preto) de grãos de amido no xilema secundário. Escalas: A= 100µm e B=50µm	
Figura 135 – Fotomicrografias de cortes transversais da raiz de <i>M. ilicifolia</i> . A- Raiz, mostrando terpenos (em amarelo-alaranjado ou vermelho) no súber (Su), B e C- coloração e aparência, D e E- mostrando terpenos no floema secundário (FI) e córtex (Co). Escalas: A, B= 50µm e C, D e E=100µm	194
Figura 136 – Fotomicrografias de cortes transversais da raiz de <i>M. ilicifolia</i> . A e B- Raiz, mostrando alcalóides (castanho escuro) no súber (Su), córtex (Co) e no xilema secundário (Xi). Escalas: A e B= 100µm	195
Figura 137 – Fotomicrografias de cortes transversais da raiz de <i>M. ilicifolia</i> . A e B- Raiz, mostrando compostos fenólicos (negro azulada) córtex (Co). Escala: 100µm..	195
Figura 138 – Caracterização histoquímica por cortes transversais por epifluorescência da raiz de <i>M. ilicifolia</i> . A – triterpenos localizados no súber e B- compostos fenólicos no córtex. Escala: 100µm	196
Figura 139 – Formação de IPP via MVA, MEP e TCA, átomos de carbono marcados na molécula de IPP após incorporação de glicose-1-[¹³ C]...	200
Figura 140 – Proposta biossintética das etapas de oxidação no anel E dos triterpenos quinonametídeos	203
Figura 141 – Isoformas da enzima P450	204
Figura 142 – Cromatograma do precursor (pristimerina) e do produto esperado (maitenina).	225
Figura 143 – Cromatograma do ensaio enzimático: (A) branco do extrato enzimático, (B) branco dos reagentes (C) e (D) reação enzimática	226
Figura 144 – Cromatograma do ensaio enzimático: (A) branco do extrato enzimático, (B) branco dos reagentes, (C) e (D) reação enzimática para MS4 e (A) branco do extrato enzimático, (B) branco dos reagentes, (C) reação enzimática, (D) maitenina (padrão) e (E) pristimerina (precursor)	226
Figura 145 – Curva de calibração construída com valores de concentração de albumina bovina X absorvância	227
Figura 146 – SDS-PAGE dos extratos protéicos obtidos aplicando os protocolos 2 e 3 das raízes de <i>M. ilicifolia</i>	228
Figura 147 – 2D SDS-PAGE do (MS5) das raízes de <i>Maytenus ilicifolia</i> .	229
Figura 148 – Cromatograma do sobrenadante (SN1) por CLAE-UV-DAD, branco dos reagentes (A) branco da enzima (B) reação da pristimerina (C).	230
Figura 149 – Cromatograma do sobrenadante (SN2) por CLAE-UV-DAD, branco dos reagentes (A) branco da enzima (B) reação da pristimerina (C).	231
Figura 150 – Curva de calibração construída com valores de concentração de albumina bovina X absorvância	232
Figura 151 – Eletroforese das frações sobrenadantes SN1 e SN2 obtidos no experimento de extração enzimática das cascas das raízes de <i>Salacia Campestris</i>	233
Figura 152 – Cromatograma do precursor (pristimerina) e do produto esperado (maitenina)	235
Figura 153 – Cromatograma do ensaio enzimático utilizando a <i>M. ilicifolia</i> - branco do extrato enzimático após 1 h de incubação	235

Figura 154 – Cromatograma do ensaio enzimático utilizando <i>M. ilicifolia</i> : branco dos reagentes após 1 h de incubação	236
Figura 155 – Cromatograma do ensaio enzimático utilizando <i>M. ilicifolia</i> : reação enzimática após 1h de incubação	236
Figura 156 – Cromatograma do ensaio enzimático utilizando <i>S. campestris</i> : branco do extrato enzimático após 1 h de incubação	237
Figura 157 – Cromatograma do ensaio enzimático utilizando <i>S. campestris</i> : branco dos reagentes após 1 h de incubação	237
Figura 158 – Cromatograma do ensaio enzimático utilizando <i>S. campestris</i> : reação enzimática após 1 h de incubação	238
Figura 159 – Cromatograma do ensaio enzimático utilizando <i>M. ilicifolia</i> : branco do extrato enzimático após 2 h de incubação	238
Figura 160 – Cromatograma do ensaio enzimático utilizando <i>M. ilicifolia</i> : branco dos reagentes após 2 h de incubação.	239
Figura 161 – Cromatograma do ensaio enzimático utilizando <i>M. ilicifolia</i> : reação enzimática após 2 h de incubação...	239
Figura 162 – Cromatograma do ensaio enzimático utilizando <i>S. campestris</i> : branco do extrato enzimático após 2 h de incubação.	240
Figura 163 – Cromatograma do ensaio enzimático utilizando <i>S. campestris</i> : branco dos reagentes após 2 h de incubação.	240
Figura 164 – Cromatograma do ensaio enzimático: utilizando <i>S. campestris</i> : reação enzimática após 2 h de incubação	241
Figura 165 – Curva de calibração construída com valores de concentração de albumina bovina X absorvância	241
Figura 166 – Eletroforese das frações obtidas durante o experimento enzimático (gel revelado com azul de coomassie)..	243
Figura 167 – Eletroforese das frações obtidas durante o experimento enzimático de <i>Mayt</i>	244
Figura 168 – Eletroforese das frações obtidas durante o experimento enzimático de <i>Salacia campestris</i> (gel revelado com nitrato de prata). <i>enus ilicifolia</i> (gel revelado com nitrato de prata)	245

Lista de Tabelas

Tabela 3- Dados de RMN de ^1H e RMN-2D (CDCl_3 , 500 MHz) da substância 1	63
Tabela 1- Triterpenos quinonametídeos e atividade biológica	37
Tabela 2- Alcalóides piridínicos e sequiterpenóides	41
Tabela 4- Dados de RMN de ^1H e RMN-2D (CDCl_3 , 500 MHz) da substância 2	85
Tabela 5- Dados de RMN de ^1H e RMN-2D (CDCl_3 , 500 MHz) da substância 3	104

Tabela 6- Dados de RMN de ^1H e RMN-2D (CDCl_3 , 500 MHz) da substância 4	124
Tabela 7- Dados de RMN de ^1H e RMN-2D (CDCl_3 , 500 MHz) da substância 6	140
Tabela 8- Dados de RMN de ^1H e RMN-2D (CDCl_3 , 500 MHz) da substância 7	155
Tabela 9- Dados de RMN de ^1H e RMN-2D (CDCl_3 , 500 MHz) da substância 8	162
Tabela 10 - Dados de RMN de ^1H e RMN-2D (CDCl_3 , 500 MHz) da substância 5	168
Tabela 11 - Valores de IC_{50} de extrato e frações obtidas de <i>M. ilicifolia</i>	176
Tabela 12 - Valores de Concentração Inibitória Mínima de extratos e frações obtidas de <i>M. ilicifolia</i> e <i>S. campestris</i>	181
Tabela 13 - Valores de Concentração Inibitória Mínima das substâncias isoladas de <i>M. ilicifolia</i> e <i>S. campestris</i>	182
Tabela 14 - Valores de IC_{50} de extratos e frações obtidas de <i>M. ilicifolia</i> e <i>S. campestris</i>	185
Tabela 15 - Atividade leishmanicida das substâncias isoladas [valores de IC_{50} expresso em ($\mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$)	186
Tabela 16 - Porcentagem de inibição de crescimento de células tumorais. IC_{50} ($\mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$)	188
Tabela 17 - Ensaio enzimático utilizando os protocolos 1- 3	214
Tabela 18 - Ensaio enzimático utilizando o protocolo 4	215
Tabela 19 - Padrão protéico utilizado no experimento de eletroforese	218
Tabela 20 - Protocolo de focalização isoelétrica	222
Tabela 21 - Concentração protéica utilizando protocolo 4	242

Lista de Abreviaturas e Símbolos

2D-PAGE – gel de poliacrilamida bi-dimensional
 $[\alpha]_D$ – rotação óptica
ACN - acetonitrila
AcOEt - acetato de etila
APG - *Angiosperm Phylogeny Group*
ax. - axial
CC - cromatografia em coluna
CCD - cromatografia em camada delgada
CCDC - cromatografia em camada delgada comparativa
CCDP - cromatografia em camada delgada preparativa
 CDCl_3 - clorofórmio deuterado
CHAPSO – 3-[(3-colamidopropil)dimetilamônio]-2-hidroxiopropanossulfato
CIM – concentração inibitória mínima
CLAE - cromatografia líquida de alta eficiência

COSY ^1H - ^1H - correlação bidimensional hidrogênio-hidrogênio
COSY ^1H - ^{13}C - correlação bidimensional hidrogênio-carbono
CYP - citocromo
 δ - deslocamento químico
d - dubleto
dd - duplo dubleto
ddd – duplo duplo dubleto
DCM - diclorometano
DEPT - “distortionless enhancement by polarization transfer”
DMAPP – difosfato de dimetilalila
DMSO - dimetilsulfóxido
DTT - 1,4-ditiotreitol
EDTA - ácido etilenodiamino tetracético (dissódico)
EM - espectrometria de massas
EtOH - etanol
eq. - equatorial
gHMBC - Gradiente Heteronuclear Multiple Bond Correlation
gHMQC - Gradiente Heteronuclear Multiple Quantum Correlation
gCOSY – Gradiente Correlated Spectroscopy
HCl – ácido clorídrico
HOAc – ácido acético
Hex - hexano
Hz – hertz
IC₅₀ – 50% da concentração inibitória
IEF – focalização isoelétrica
IPG – *Immobilized pH Gradient*
IPP - pirofosfato de isopentenila
IV - infravermelho
J - constante de acoplamento
 λ - comprimento de onda
KPi – tampão fosfato
LIT - *liver infusion tryptose*
Loading buffer – tampão de corrida
m - multiplete
MALDI – *Matrix assisted liquid desorption ionization*
MgCl₂ – cloreto de magnésio
MeOH – metanol
MEP – metileritritol 4- fosfato
MTT – 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio
MVA – ácido mevalônico
m/z - relação massa-carga
NaCl – cloreto de sódio
NADH – flavina mononucleotídeo
NADPH – fosfato de nicotinamida adenine dinucleotídeo reduzido
NOESY - Nuclear overhauser effect spectroscopy
p. - página
P. A. - para análise
PAGE – gel de poliacrilamida uni-dimensional
PMSF - fluoreto de fenilmetilsulfonil
PVPP - polivinilpolipirrolidona

RMN - ressonância magnética nuclear
RMN de ¹³C - ressonância magnética nuclear de carbono treze
RMN de ¹H - ressonância magnética nuclear de hidrogênio
rpm - rotações por minuto
SDS - dodecil sulfato de sódio
s - singleto
t – tripleto
TCA – ácido tricarbóxico
TEMED – N, N, N', N'-tetrametiletilenodimina
TMS - tetrametilsilano
TRIS – triidroxiaminometano
ToF – *Time of flight*
TOCSY – Total Correlation Spectroscopy
Triton X-100 – polioxietileno (9-10) p-tercetil fenol
Triton X-114 – éter(1,1,3,3 tetrametilbutil) fenil-(7-8)-polioxietilênico
UV - ultravioleta

Sumário

1. Estudo Fitoquímico de <i>Maytenus ilicifolia</i> e <i>Salacia campestris</i> (Celastraceae).....	31
1.1 Introdução.....	31
1.1.1 Considerações Gerais.....	31
1.1.2 A família Celastraceae e Hippocrateaceae.....	31
1.1.3 Aspectos gerais do gênero e da espécie <i>Maytenus ilicifolia</i>	33
1.1.4 Aspectos gerais do gênero e da espécie <i>Salacia campestris</i>	34
1.1.5 Triterpenos quinonametídeos.....	35
1.1.6 Alcalóides Piridínicos Sesquiterpênicos.....	38
2. Objetivo Geral.....	44
3. Materiais e Métodos.....	45
3.1. Material Vegetal.....	45
3.2. Reagentes e Solventes utilizados.....	45

3.3. Cromatografia em camada delgada comparativa (CCDC).....	45
3.4. Tratamento das amostras para análise por CLAE.....	46
3.5. Equipamentos e colunas utilizados na análise das amostras por CLAE.....	47
3.6. Métodos espectrométricos.....	47
3.7. Atividade óptica.....	48
3.8. Preparo do extrato vegetal e isolamento dos metabólitos das cascas das raízes da planta adulta de <i>Maytenus ilicifolia</i>	48
3.9. Fracionamento cromatográfico da fração DCM das cascas das raízes de <i>Maytenus ilicifolia</i>	49
3.10. Preparo do extrato vegetal e isolamento dos triterpenos quinonametídeos das raízes da planta jovem de <i>Maytenus ilicifolia</i>	52
3.11. Preparo do extrato vegetal e isolamento dos metabólitos das cascas das raízes de <i>Salacia campestris</i>	54
4. Substâncias isoladas	56
5. Determinação e identificação estrutural das substâncias isoladas de <i>Maytenus ilicifolia</i> e <i>Salacia campestris</i>	59
5.1. Considerações gerais.....	59
5.2. Determinação estrutural da substância 1.....	60
5.3. Determinação estrutural da substância 2	83
5.4. Determinação estrutural da substância 3.....	102
5.5. Determinação estrutural da substância 4.....	122
5.6. Determinação estrutural da substância 6.....	138
5.7. Identificação estrutural dos triterpenos quinonametídeos.....	153
5.7.1. Identificação estrutural da substância 7.....	153
5.7.2. Identificação estrutural da substância 8.....	160
5.8. Identificação estrutural da substância 5.....	167
6.10. Teste antileishmania.....	184
6.11. Resultados e Discussão.....	185
6.12. Atividade Antitumoral	186
6. Estudo Biológico	188
6.12.1.2.1.1. Linhagens tumorais.....	183
6.2. Atividade tripanocida.....	183
6.3. Ensaio de citotoxicidade.....	187
6.3.1. Materiais e Métodos.....	187
6.3.2. Resultados e Discussão.....	188
6.3.3. Microorganismos e condição de cultivo	194
7. Estudo Histoquímico	194
7.1. Teste tripanocida.....	194
7.2. Introdução e Discussão.....	196
6.6. Atividade Antifúngica	198
6.6.1. Objetivo.....	198
6.6.2. Introdução.....	198
6.6.3. Materiais e Métodos.....	199
6.6.4. Resultados e Discussão.....	199
6.6.5. Microorganismos e condições de cultivo.....	199
6.6.6. Reagentes e solventes utilizados.....	199
6.6.7. Equipamentos utilizados.....	199
6.6.8. Resultados e Discussão.....	199
6.4. Atividade Leishmanicida	199
6.4.1. Introdução.....	199
6.4.2. Resultados e Discussão.....	199
6.4.3. Conclusões.....	199
6.4.4. Materiais e Métodos.....	199
8. Estudo Biossintético	199
8.1.1. Microorganismos e condições de cultivo.....	199

8.1 Introdução.....	198
8.1.1 Biossíntese de isoprenóides – vias metabólicas envolvidas na formação dos isoprenóides.....	198
8.1.2 Triterpenos quinonametídeos.....	201
8.1.3 Enzimas do tipo citocromo P450.....	203
8.2 Objetivos.....	205
8.3 Materiais e Métodos.....	205
8.3.1 Material vegetal.....	205
8.3.2 Reagentes e solventes utilizados.....	205
8.3.3 Equipamentos utilizados nos ensaios de biossíntese.....	206
8.3.4 Cromatógrafos e condições cromatográficas utilizadas nas análises.....	207
8.3.5. Protocolos de extração enzimática.....	208
8.3.6 Protocolos de reação enzimática.....	214
8.3.7 Dosagem protéica dos extratos e frações enzimáticas.....	215
8.3.8 Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE).....	216
8.3.9 Soluções e reagentes químicos.....	217
8.3.10 Preparo das amostras e dos padrões.....	218
8.3.11 Preparo, desenvolvimento e revelação do gel.....	218
9 Eletroforese 2D-PAGE.....	219
9.1 Soluções.....	219
9.2 Clean-up das amostras.....	221
9.3 Hidratação das tiras de IPG.....	221
9.4 Primeira dimensão: focalização isoeletrica.....	222
9.5 Segunda dimensão: SDS-PAGE.....	222
9.5.1 Preparo do gel de poliacrilamida 12,5%.....	222
9.5.2 Equilíbrio das tiras.....	223
9.5.3 Aplicação das tiras e desenvolvimento da SDS-PAGE.....	223
9.5.4 Revelação do gel.....	224
10 Resultados e Discussão.....	225
10.1 Avaliação da atividade enzimática da oxidoredutase do tipo P450 nas raízes de <i>Maytenus ilicifolia</i> – Protocolos 1-2.....	225
10.2 Análise das bandas eletroforéticas no gel SDS-PAGE.....	228
10.3 Análise do SDS-PAGE-2D.....	229
10.4 Avaliação da atividade enzimática da oxidoredutase do tipo P450 nas cascas das raízes de <i>Salacia campestris</i> – Protocolo 3.....	230
10.5 Análise das bandas eletroforéticas no gel SDS-PAGE.....	232
10.6 Avaliação da atividade enzimática da oxidoredutase do tipo P450 nas raízes de <i>Maytenus ilicifolia</i> e <i>Salacia campestris</i>	234
10.7 Análise das bandas eletroforéticas no gel SDS-PAGE.....	242
11 Conclusões.....	246
12 Referências.....	248

1- ESTUDO FITOQUÍMICO de *Maytenus ilicifolia* e *Salacia campestris*

1.1 Introdução

1.1.1 Considerações Gerais

Muitos metabólitos secundários foram isolados e caracterizados a partir de uma variedade de fontes naturais, tais como bactérias, fungos e plantas. Eles são de grande interesse e importância, porque, muitas vezes, exibem um amplo espectro de atividades biológicas. Suas notáveis propriedades podem ser atribuídas à sua complexidade estrutural e diversidade (Watanabe, 2008).

Devido à grande importância dos metabólitos secundários, a fitoquímica clássica passou a ter um enfoque não apenas no isolamento e determinação estrutural das substâncias presentes em uma determinada espécie, mas também em estudos relacionados à descoberta de atividades biológicas, estudos morfoanatômicos e histoquímicos, elucidações de rotas biossintéticas, entre outros. Neste contexto, a busca por novas substâncias e suas respectivas propriedades não é mais focada apenas nos estudos das plantas, estendendo-se assim aos microorganismos, organismos marinhos e até mesmo a interações simbióticas entre diferentes organismos (Matos, 1997; Furr e Mahlberg, 1981).

A química de produtos naturais na atual era genômica, caracterizada pelo enfoque macromolecular, continua sendo uma ferramenta fundamental para o entendimento dos mecanismos metabólicos de cada parte da célula e das funções desses metabólitos em uma determinada unidade celular, atuando assim como uma ciência de fronteira do conhecimento (Pinto et al.; 2002).

1.1.2 A família Celastraceae e Hippocrateaceae

A família Celastraceae compreende aproximadamente 98 gêneros e 1264 espécies (Simmons et al.; 2001). Esta é comum em regiões tropicais e

subtropicais incluindo norte da África, sul da América e leste da Ásia, particularmente na China (Spivery et al.; 2002).

Nos últimos 30 anos, uma ampla variedade de metabólitos secundários biologicamente ativos tem sido identificada em membros desta família. Esta família tem como metabólitos secundários muitos terpenóides, incluindo os triterpenos do tipo friedelano; os triterpenos quinonametídeos (Corsino et al.; 1998c; Chávez et al.; 1999.; Alvarenga et al.; 1999; Nossack et al.; 2004; Cloren et al.; 2005), os triterpenos eno-quinonametídeos (Jeller et al.; 2004; Carvalho et al.; 2005) e tipo fenólicos (González et al.; 1996; Furbacher and Gunatilaka, 2001; lupano (Ohsaki et al.; 2004; Silva et al.; 2005; Oliveira et al.; 2006; Pimenta et al.; 2006; oleanano (Muhammad et al.; 2000; Buffa Filho et al.; 2002), diversos triterpenos diméricos (Shirota et al.; 1997; Shirota et al.; 2004), além de diterpenos com esqueleto do tipo kaurano e abietano (Tanaka et al.; 2004) e sesquiterpenos (Descoins et al.; 2002; Xia et al.; 2002; Chang et al.; 2003).

No Brasil, esta família está representada por quatro gêneros: *Maytenus* Juss, *Austroplenckia* Lund, *Gouppia* Reissek e *Fraunhoferia* Mart. (Carvalho-Okano, 1992).

Reconhecida anteriormente como táxon distinto, à família Hippocrateaceae atualmente é reconhecida por todos os sistemas de classificação de Angiospermas propostos nos últimos anos (Takhtajan, 1997; Judd et al.; 1999; APG 2003), sendo considerada parafilética e incluída em Celastraceae como duas subfamílias: Hippocrateoideae, com 19 gêneros e 100 espécies, e Salacioideae, com seis gêneros e 260 espécies (Simmons, 2004, Lombardi, 2010), com distribuição mundial em áreas tropicais e subtropicais.

A inclusão de Celastraceae e Hippocrateaceae em uma mesma família é justificada pela ocorrência de marcadores quimiotaxonômicos, como os alcalóides piridínicos sesquiterpênicos (Rodrigues-Fo et al.; 2001; Lião et al.; 2001; Corsino et al.; 1998a) e os triterpenos quinonametídeos (Lião, 1997; Corsino et al.; 2000; Jeller et al., 2004; Carvalho et al., 2005).

1.1.3 Aspectos gerais do gênero e da espécie *Maytenus ilicifolia*

O gênero *Maytenus* é constituído por cerca de 200 espécies distribuídas nos trópicos. A flora brasileira possui 76 espécies desse gênero, sendo 15 referidas para a Amazônia. A ocorrência é ampla, desde a Amazônia até o sul do país (Carvalho-Okano e Leitão-Filho, 2004).

Plantas do gênero *Maytenus* são extensivamente investigadas visando à obtenção de compostos bioativos, pois são amplamente usadas na medicina popular e tiveram algumas ações investigadas, incluindo inseticida (Núñez et al.; 2004b), citotóxica (Ohsaki et al.; 2004; Nakao et al.; 2004), antitumoral (González et al.; 2000; Costa et al.; 2008), antioxidante (Corsino et al.; 2003), antiplasmódica (Tahir et al.; 1999), antiulcerogênica (Gonzalez et al.; 2001; DI STASI et al.; 2001; Duarte e Debur, 2005; Bersani-Amado et al.; 2000), antiinflamatória (Jorge et al.; 2004) e antimicrobiana (Moujir et al.; 1990; Rodríguez et al.; 2005). Exibem diversos tipos de metabólitos secundários, incluindo flavonóides (Corsino et al.; 2003; Vilegas et al., 1999, 2001), triterpenos quinonametídeos (Buffa Filho et al., 2000, 2002, 2004; Corsino et al., 1998c), dímeros de triterpenos (Itokawa et al.; 1990; González et al.; 2000; Shirota et al.; 2004a), triterpenóides tetracíclicos (Núñez et al.; 2004a), alcalóides piridínicos sesquiterpênicos (Corsino et al., 1998a, 1998b; Shirota et al.; 2004b), glicosídeos fenólicos (Vilegas et al.; 1999 e 2001), e maitansinóides (Pullen et al.; 2003), com interessante espectro de atividades biológicas.



Figura 1 - Fotos da espécie *Maytenus ilicifolia*, folha e raiz (arquivo próprio).

As espécies *Maytenus aquifolium* Martius e *Maytenus ilicifolia* Martius (Figura 1, p. 33) são popularmente conhecidas como “espinheira-santa” (Leite et al.; 2001). A espécie *M. ilicifolia* ocorre no sub-bosque das florestas de Araucária ou às margens de rios, é encontrada predominantemente na região sul do Brasil e a ocorrência nos estados de São Paulo e Mato Grosso do Sul é pouco abundante. Quanto a *M. aquifolium* encontra-se na região sudeste nos estados de Minas Gerais, Rio de Janeiro, São Paulo e em toda a região sul do Brasil (França e Pereira, 1997).

Dentre as espécies do gênero, *M. ilicifolia* é a mais conhecida e explorada economicamente, devido a sua aplicabilidade na medicina popular e na indústria de Fitoterápicos, principalmente pela potente ação antiulcerogênica, tendo sua ação comprovada no tratamento de úlceras gástricas. Em 1988, foi incluído como fitoterápico no programa de fitoterapia coordenado pela Central de Medicamentos (Di Stasi, 2004). Atualmente, muitas indústrias farmacêuticas produzem e comercializam fitofarmacos contendo essas espécies (Soares et al.; 2004).

Semelhanças morfológicas das folhas das espécies de *Zolernia ilicifolia* (Fabaceae) e *Soracea bomplandii* (Moraceae) com as espécies *M. aquifolium* e *M. ilicifolia* tem sido motivo de adulteração. Estudos fitoquímicos realizados com a *Zolernia ilicifolia* demonstraram que esta produz glicosídeos cianogênicos, o que é um fator preocupante já que a *M. ilicifolia* é considerada um fitoterápico (Coelho et al.; 2003).

1.1.4 Aspectos gerais do gênero e da espécie *Salacia campestris*

No Brasil, ocorrem 12 gêneros (Smith, 1940) e cerca de 70 espécies (Barroso et al.; 1984). Na região sudeste do Brasil ocorre 10 gêneros e 33 espécies: *Anthodon* Ruiz & Pav. (uma sp.), *Cheiloclinium* Miers (três sp.), *Cuervea* Miers (uma sp.), *Elachyptera* A.C. Sm. (duas sp.), *Hippocratea* L. (uma sp.), *Peritassa* Miers (sete sp.), *Pristimera* Miers (duas sp.), *Salacia* L. (seis sp.), *Semialarium* N. Hallé (uma sp.) e *Tontelea* Aubl. (nove sp.).

Dos gêneros brasileiros, a *Salacia* é o mais abundante, totalizando mais de 20 espécies.

A espécie *Salacia campestris* Walp. (sin. *Peritassa campestris*) é popularmente conhecida como “bacupari do campo” (Figura 2, p. 35). Outros nomes populares atribuídos a essa espécie são: laranjinha do campo, capicuru, japicuru e saputá.



Figura 2 - Fotos da espécie *Salacia campestris*, folhas, fruto, flores e raiz (arquivo próprio).

Um grande número de espécies do gênero *Salacia* é utilizado na medicina tradicional. Por exemplo, *S. oblonga*, *S. reticulata* e a *S. beddomei* são utilizadas na medicina popular no tratamento de diabetes (Li et al.; 2004, 2008; Williams et al.; 2007). Além desta atividade, o extrato *S. reticulata* é consumido como suplemento alimentar na prevenção da obesidade (Yoshikawa et al.; 2002) e a *S. beddomei* como bactericida (Deepa et al.; 2004).

Do ponto de vista químico, observa-se os metabólitos secundários de ocorrência restrita às mesmas, destacando-se os alcalóides piridínicos sesquiterpênicos (Rodrigues-Fo et al.; 2001), triterpenos quinonametídeos (Lião, 1997; Jeller et al., 2004; Carvalho et al., 2005).

1.1.5 Triterpenos quinonametídeos

Os triterpenos quinonametídeos, também denominados de celastrolóides, se constituem em uma classe de substâncias naturais restrita à família Celastraceae, apresentando esqueleto carbônico do tipo D:A- friedo-*nor*-oleanano oxigenados e insaturados, formando um grupo relativamente pequeno de produtos naturais.

Em geral os celastrolóides incorporam o núcleo 24-*nor*-D:A-friedo-oleanano (Figura 3, p. 35) e contém invariavelmente funções oxigenadas em C-2 e C-3. Outros pontos comuns de oxidações do sistema quinonametídeo são C-6 e C-7, originando as classes 6-oxofenólico-*nor*-triterpenóide e 7-oxo-quinonametídeo. Triterpenos quinonametídeos com insaturações adicionais em C-14 (15) contendo um rearranjo de grupo metílico também são conhecidos e classificados como 14 (15)-enoquinonametídeos. A posição mais comumente oxidada fora do sistema quinonametídeo é C-29. Este grupo metílico geralmente é encontrado oxidado a CO₂H (ou CO₂Me) em que a subsequente descarboxilação fornece a série análoga 29-*nor*. Outras posições conhecidas de oxidações do esqueleto carbônico são C-15, C-21, C-22, C-23 e C-28.

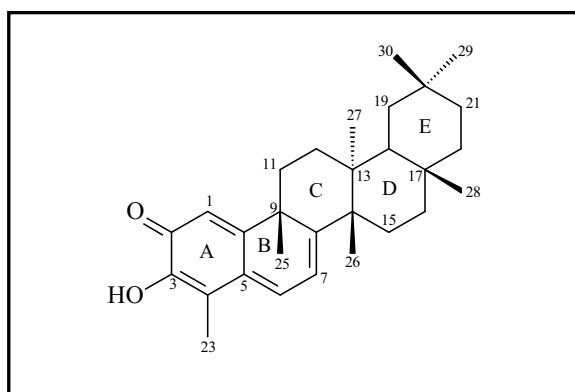
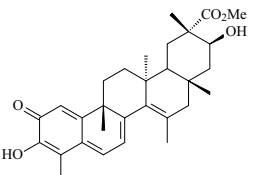
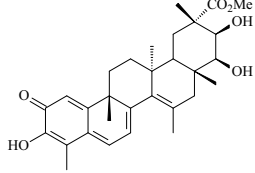
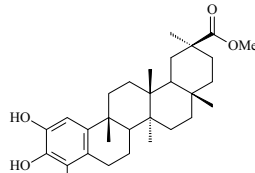
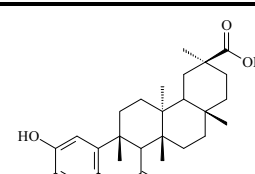
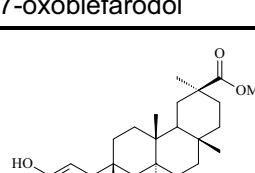
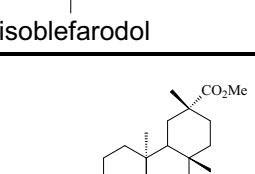


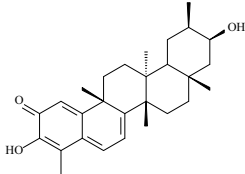
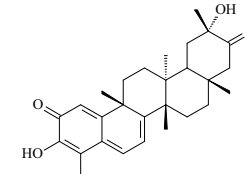
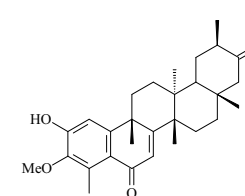
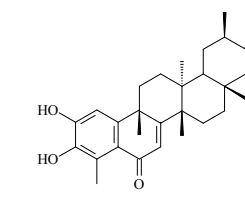
Figura 3 - Esqueleto 24-*nor*-D:A-friedo-oleanano presente em Celastraceae.

Pesquisas desenvolvidas pelo nosso grupo demonstraram que os triterpenos quinonametídeos são substâncias que apresentam como precursores biossintéticos os triterpenos friedelanos, os quais são biossintetizados nas folhas e posteriormente translocados para as raízes, onde são convertidos aos triterpenos quinonametídeos (Corsino et al.; 2000).

Devido ao amplo espectro de atividades biológicas demonstrada por estes metabólitos, inúmeros pesquisadores intensificaram os estudos químicos de diferentes espécies de Celastraceae. Na tabela 1, p. 37 são mostrados alguns exemplos de triterpenos quinonametídeos e o potencial biológico dessa classe de metabólito secundário.

Tabela 1. Triterpenos quinonametídeos e atividade biológica

Estutura	Espécie	Atividade	Referência
 netzaualcoiol	<i>M. horrida</i>	-----	González et al.; 1988
	<i>M. horrida</i>	antibiótica	Moujir et al.; 1990
	<i>C. cognatum</i>	antioxidante	Jeller et al. ; 2004
 natzauacoiondiol	<i>M. horrida</i>	-----	González et al.; 1988
	<i>M. horrida</i>	antibiótica	Moujir et al.; 1990
	<i>C. cognatum</i>	antioxidante	Jeller et al. ; 2004
 6-desoxoblefarodol	<i>M. blepharodes</i>	citotóxica e antimicrobiana	Rodríguez et al.; 2005
 7-oxoblefarodol	<i>M. blepharodes</i>	citotóxica e antimicrobiana	Rodríguez et al.; 2005
 isoblefarodol	<i>M. blepharodes</i>	citotóxica e antimicrobiana	Rodríguez et al.; 2005
 dispermoquinona	<i>M. dispermus</i>	-----	Martin, 1973

 tingenol	<i>C. cognatum</i>	tripanocida	Lião et al.; 2008
 6-oxo-tingenol	<i>M. caraniensis</i>	antibiótica	Gonzalez et al.; 1996
 3-O-metil-6-oxo-tingenol	<i>M. caraniensis</i>	antibiótica	Gonzalez et al.; 1996
 22β-hidroxi-6-oxo-tingenol	<i>M. caraniensis</i>	antibiótica	Gonzalez et al.; 1996

1.1.6 Alcalóides Piridínicos Sesquiterpênicos

Faz parte dos metabólitos secundários característicos da família Celastraceae um amplo grupo de sesquiterpenóides, incomuns, altamente oxigenados, baseados no esqueleto 5,11-epoxi-5β, 10α-eudesmano-4-(14)-eno conhecido como diidro-β-agarofurano (Figura 4, p. 39). Eles são conhecidos como marcadores quimiotaxonômicos ou indicadores desta família (Bruning and Wagner, 1978; Lião, 2003). Além disso, eles apresentam diversidade

química e complexa estereoquímica (Bruning and Wagner, 1978; Corsino et al.; 1998a e 1998b; Rodrigues-Fo et al.; 2001) e possuem um amplo espectro de atividades biológicas.

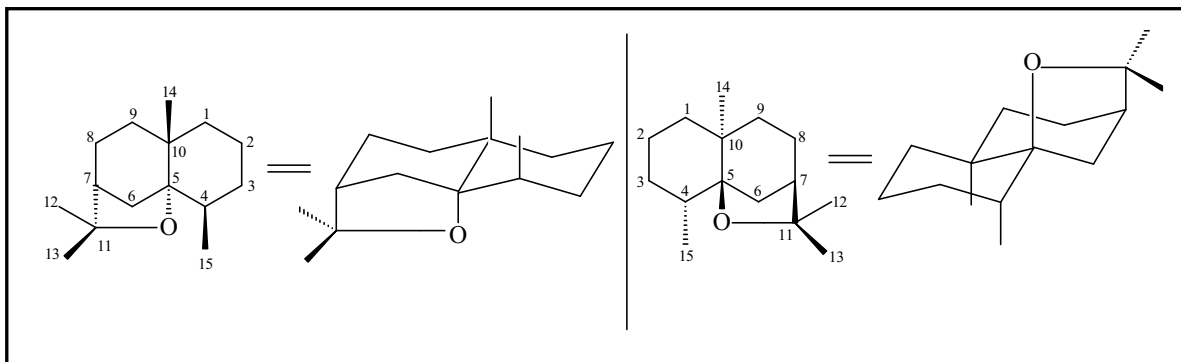


Figura 4 - Estrutura química clássica do sesquiterpeno do tipo diidro- β -agarofurano.

Dentre os metabólitos secundários com uma porção sesquiterpênica do tipo diidro- β -agarofurano reportados na literatura, destacam-se os alcalóides piridínicos sesquiterpênicos (Figura 5, p. 39). Eles têm sido isolados de plantas pertencentes à família Celastraceae (Corsino et al.; 1998; Duan et al.; 1997, 1998, 1999; Piacente et al.; 1999; Jinbo et al.; 2002; Descoins et al.; 2002; Kuo et al.; 2003; Núñez et al.; 2004; Nakagawa et al.; 2004; Horiuch et al.; 2006; Whitson et al.; 2006) e foram também isolados de três espécies de Hippocrateaceae; *Hippocratea excelsa* (Furukawa et al.; 2002), *Peritassa campestris* (Lião et al.; 2001) e *Peritassa compta* (Klass and Tinto.; 1993). Estes aspectos químicos reforçam a classificação botânica recente no qual as duas famílias, Celastraceae e Hippocrateaceae, aparecem como subfamílias da chamada família Celastraceae (Bruning and Wagner, 1978).

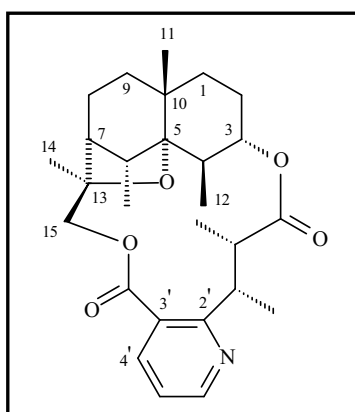


Figura 5 - Estrutura química clássica do alcalóide piridínico sesquiterpênico.

Estruturalmente, os alcalóides piridínicos sesquiterpênicos são caracterizados por uma porção sesquiterpênica do tipo diidro- β -agarofurano, constituída pelos anéis A e B na forma biciclo *trans*-decalino dimetilada axialmente e unidos 1,3-diaxialmente por ponte $(\text{CH}_3)_2\text{C-CO}$ constituindo o anel C-tetraidrofuranil e uma unidade alcaloídica como apresentada na Figura 6, p. 34. A unidade alcaloídica é formada por vários ácidos piridínicos dicarboxílicos (Figura 6, p. 40) que esterificam os grupos hidroxila do esqueleto sesquiterpênico, os quais são substituídos nas posições 2,3 ou 3,4 do anel piridínico, formando um macrociclo entre o C-3 e C-13 (Lião, 2003).

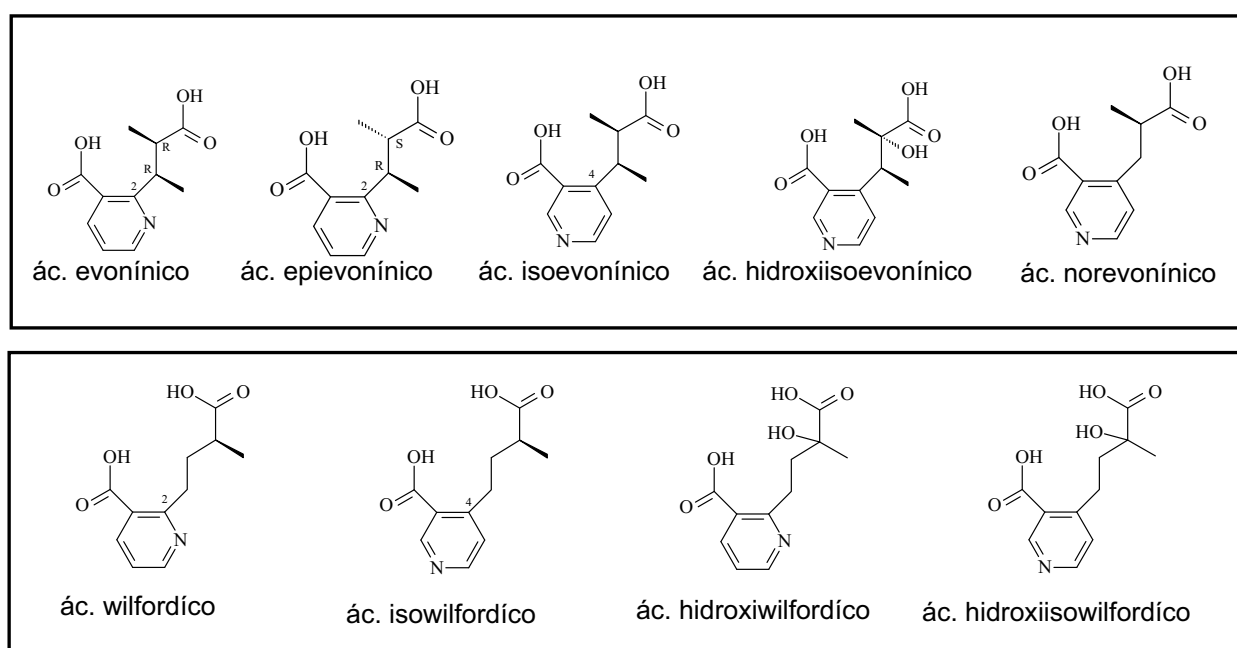


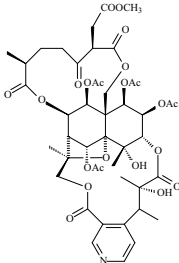
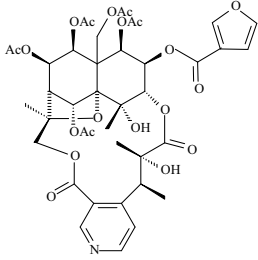
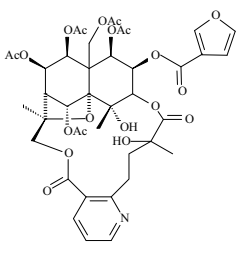
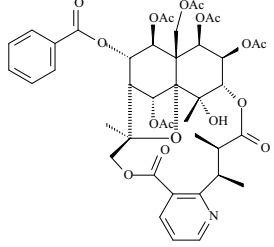
Figura 6 - Estruturas dos ácidos piridínicos dicarboxílicos que esterificam o núcleo do esqueleto sesquiterpênico.

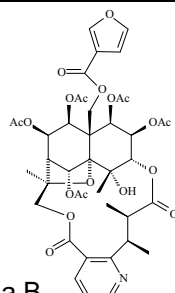
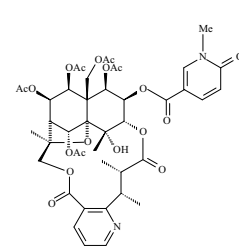
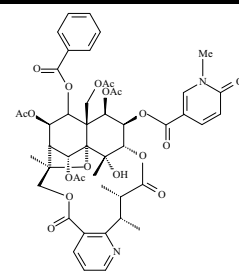
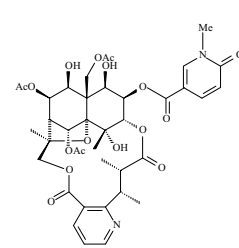
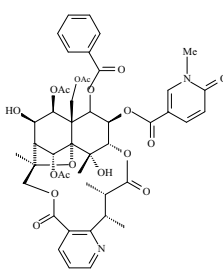
Desde 1990, uma quantidade significativa de trabalhos foram divulgados constando dados sobre a química e biologia destes sesquiterpenóides, do tipo diidro- β -agarofurano, em Celastraceae. Entre janeiro de 1990 e junho de 2006, 462 novos sesquiterpenóides diidro- β -agarofurano foram reportados, sendo que 440 tipos estruturais foram isolados de 64 espécies de Celastraceae, 21 tipos de 3 espécies de Hippocrateaceae e 1 tipo de uma espécie de Lamiaceae (Gao et al.; 2007).

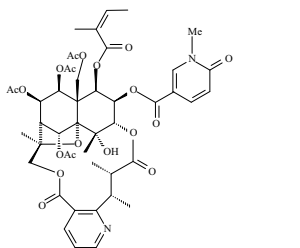
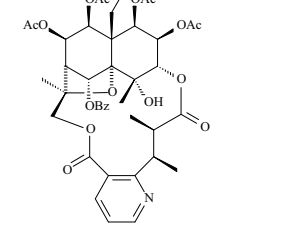
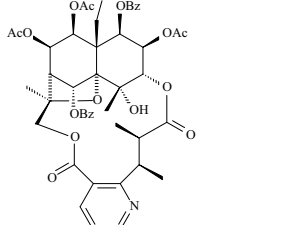
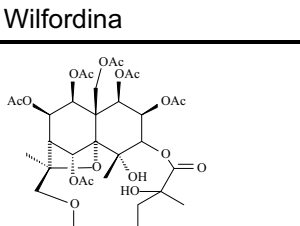
Dos 462 novos sesquiterpenóides diidro- β -agarofurano, 130 pertencem à classe de alcalóides piridínicos sesquiterpênicos do tipo macrolídeo.

A tabela 2, p. 41 lista alguns alcalóides piridínicos sesquiterpênicos com diferentes núcleos estruturais e atividades biológicas.

Tabela 2. Alcalóides piridínicos sesquiterpênicos

Estutura	Espécie	Atividade e Referência
 <p>Tryptonina B</p>	<i>Trypterygium hypoglaucum</i>	anti HIV Duan et al. ; 1999, 2000 Lião, 2003
 <p>Hipoglaunina B</p>	<i>Trypterygium hypoglaucum</i>	potente anti HIV Duan et al. ; 1999, 2000 Lião, 2003
 <p>Wilfortrina</p>	<i>Trypterygium hypoglaucum</i>	anti HIV Duan et al. ; 1999, 2000 Lião, 2003
 <p>Aquifoliunina E-I</p>	<i>Maytenus aquifolium</i>	citotoxicidade moderada Corsino et al. ; 1998

 <p>Hiponina B</p>	<p><i>Trypterygium hypoglaucum</i></p>	<p>Duan et al.; 1999, 2000 Lião, 2003</p>
 <p>Emarginatina A</p>	<p><i>Maytenus emarginata</i></p>	<p>citotóxica Kuo et al. ; 1990, 1994 Lião, 2003</p>
 <p>Emarginatina B</p>	<p><i>Maytenus emarginata</i></p>	<p>citotóxica Kuo et al. ; 1990 Lião, 2003</p>
 <p>Emarginatina E</p>	<p><i>Maytenus emarginata</i></p>	<p>citotóxica Kuo et al. ; 1994 Lião, 2003</p>
 <p>Emarginatina F</p>	<p><i>Maytenus emarginata</i></p>	<p>citotóxica Kuo et al. ; 1994 Lião, 2003</p>

	<p><i>Maytenus emarginata</i></p>	<p>citotóxica Kuo et al. ; 1994 Lião, 2003</p>
<p>Emarginatina G</p>	<p><i>Trypterygium hypoglaucum</i></p>	<p>imunossupressiva Duan et al. ; 2001 Lião, 2003</p>
	<p><i>Trypterygium hypoglaucum</i></p>	<p>imunossupressiva Duan et al. ; 2001 Lião, 2003</p>
<p>Cangorinina E-I</p>	<p><i>Maytenus chiapensis</i></p>	<p>antialimentar forte Núñez et al. ; 2004</p>
	<p><i>Maytenus chiapensis</i></p>	<p>antialimentar forte Núñez et al. ; 2004</p>
<p>Ebenifolina E-II</p>		<p>Alatusinina</p>

2 Objetivo Geral

Em função da recente tendência mundial voltada para a pesquisa em biossíntese de Produtos Naturais, que nos últimos quinze anos permitiu a elucidação de vias biossintéticas de metabólitos secundários, o presente trabalho de pesquisa teve como objetivo geral inserir uma abordagem moderna e de fronteira nesta área e fornecer subsídios preliminares para futuros estudos com enfoque em uma nova abordagem, denominada engenharia metabólica, que permitirá dar continuidade aos estudos biossintéticos. Aliado a isso, os objetivos específicos apontaram para a relevância multidisciplinar de reunir as experiências em estudos de biossíntese, através de incorporação de precursores utilizando extratos enzimáticos (*in vitro*) e/ou plântulas das espécies de interesse (*in vivo*), determinação da atividade e análise enzimática e análise proteômica, alicerçados em estudos químicos previamente desenvolvidos por importantes pesquisadores da área em nível mundial e em estudos biológicos que apontam às substâncias que se configuram em marcadores quimiosistemáticos de espécies de Celastraceae como promissores bioativos.

3. MATERIAIS e MÉTODOS

3.1 Material vegetal

As plantas da espécie *Maytenus ilicifolia* foram previamente coletadas na fazenda experimental da UNAERP (Universidade de Ribeirão Preto), Campus de Ribeirão Preto. Após coleta as plantas jovens utilizadas no estudo biossintético e isolamento dos triterpenos quinonametídeos foram mantidas em casa de vegetação no Instituto de Química de Araraquara. A identificação botânica foi realizada pela Profa. Dra. Rita Maria de Carvalho do Instituto de Biociências da Universidade Estadual de Campinas. Os exemplares estão depositados no herbário da UNICAMP (HPM-BR 0059).

As raízes de *Salacia campestris* utilizadas no estudo fitoquímico e biossintético foram coletadas na Universidade Federal de São Carlos (UFSCar) e sua identificação foi feita pelo Prof. Dr. Edson Rodrigues Filho. Sua exsicata está depositada no herbário do Departamento de Botânica da Universidade Federal de São Carlos, UFSCar.

3.2 Reagentes e solventes utilizados

Os solventes utilizados nos processos de extração foram das marcas Mallinckrodt e Merck P. A. Para as separações via CLAE utilizou-se (metanol) de grau CLAE e marca J. T. Baker[®]. A água ultra pura empregada foi obtida via osmose reversa em aparelho Millipore.

3.3 Cromatografia em camada delgada comparativa (CCDC)

Esta técnica foi empregada na análise comparativa da partição DCM e das frações obtidas no decorrer do fracionamento cromatográfico do extrato das cascas das raízes da planta adulta de *Maytenus ilicifolia*.

As cromatoplasmas foram preparadas aplicando-se uma suspensão de sílica gel 60 PF₂₅₄, com indicador de fluorescência em água destilada, na proporção de 1:2 (m:v) sobre placas de vidro, obtendo-se 25 mm de espessura de adsorvente através da utilização de espalhador Quickfitt®. Após a preparação das cromatoplasmas, estas foram ativadas em estufa por 30 minutos.

Revelação das cromatoplasmas: cada cromatoplasma foi revelada por meio de um ou mais dos métodos físicos e químicos descritos abaixo:

(A) Inspeção em luz ultravioleta: as cromatoplasmas foram expostas a luz ultravioleta, nos comprimentos de onda de 254 e 366 nm.

(B) Solução de anisaldeído: aproximadamente 5,0 mL de solução de anisaldeído (0,5 mL de anisaldeído + 10,0 mL de ácido sulfúrico concentrado + 85,0 mL de MeOH) foi preparada com a adição dos reagentes em banho de gelo. Tal solução foi acondicionada em vidro âmbar e armazenada à 8 °C.

Para a revelação de cromatoplasmas, borrifaram-se pequenas alíquotas e então, estas foram colocadas em estufas à 120 °C.

(C) Revelador de Dragendorff (revelação de substâncias nitrogenadas gerais)

Solução A: foi preparada por simples solubilização do sal em meio aquoso ácido (0,85 g de subnitrito de bismuto + 10,0 mL de HOAc + 40,0 mL de água destilada);

Solução B: 8,0 g de iodeto de bismuto dissolvido em 20,0 mL de água.

Para a preparação do revelador de Dragendorff, tomou-se do estoque, 5,0 mL da solução A e misturou-se à 20,0 mL da solução B.

3.4 Tratamento das amostras para análises por CLAE

Pesou-se 10 mg de amostra de interesse e dissolveu-se em 1 mL de MeOH:H₂O (95:5). Foi utilizada uma coluna de aproximadamente 1,0 cm de diâmetro, contendo aproximadamente 3 cm de fase estacionária (LiChroprep RP-18, 25-40 µm, Merck). A coluna foi equilibrada com MeOH:H₂O (95:5) e logo em seguida a amostra foi aplicada, sendo então eluída com os seguintes sistemas de solventes: 4,0 mL de MeOH:H₂O (95:5), 5,0 mL de MeOH e 5,0 mL de DCM, tendo-se desta forma 3 frações. A uma alíquota de 0,5 mL da

fração MeOH:H₂O (95:5) adicionou-se 1,0 mL de MeOH:H₂O (9:1). Essa solução foi filtrada em membrana de 0,45µm e em seguida analisada via CLAE.

3.5 Equipamentos e colunas utilizados na análise das amostras por CLAE

(A) Cromatógrafo analítico: cromatógrafo sistema quaternário VarianPro Star, modelo 240, detector UV-Vis com arranjo de diodos (DAD), modelo 330, auto injetor Varian Pro Star, modelo 410; coluna Phenomenex[®] Gemini C₁₈ 5µm (250 x 4,6 mm); λ = 200- 600nm.

(B) Cromatógrafo preparativo: cromatógrafo sistema ternário Varian Star Dynamax, modelo 320, detector UV-Vis; coluna Phenomenex[®] C₁₈ 10µm (250 x 21,2 mm) e λ = 254nm.

3.6 Métodos espectrométricos

(A) Para a identificação e elucidação estrutural das substâncias isoladas, foram empregadas as técnicas de ressonância magnética nuclear uni e bidimensionais. Os espectros de RMN foram realizados em espectrômetro Varian INOVA 500[®], operando a 500 MHz na frequência do hidrogênio e em 125 MHz na frequência do carbono. O padrão interno utilizado como referência foi tetrametilsilano (TMS) e os solventes deuterados CDCl₃ e CD₃OD das marcas Aldrich e Merck.

(B) Os espectros vibracionais na região do infravermelho foram obtidos no espectrofotômetro Perkin-Elmer FT-IR Spectrum 2000, no intervalo de 4.000 - 200 cm⁻¹, utilizando-se pastilha de KBr seco (Merck P. A), na proporção de 1 parte de amostra: 10 partes de KBr.

(C) Os espectros de massas de baixa e alta resolução foram obtidos em espectrômetro Modelo ultrOTOF_Q – ESI-TOF Mass Spectrometer (Bruker).

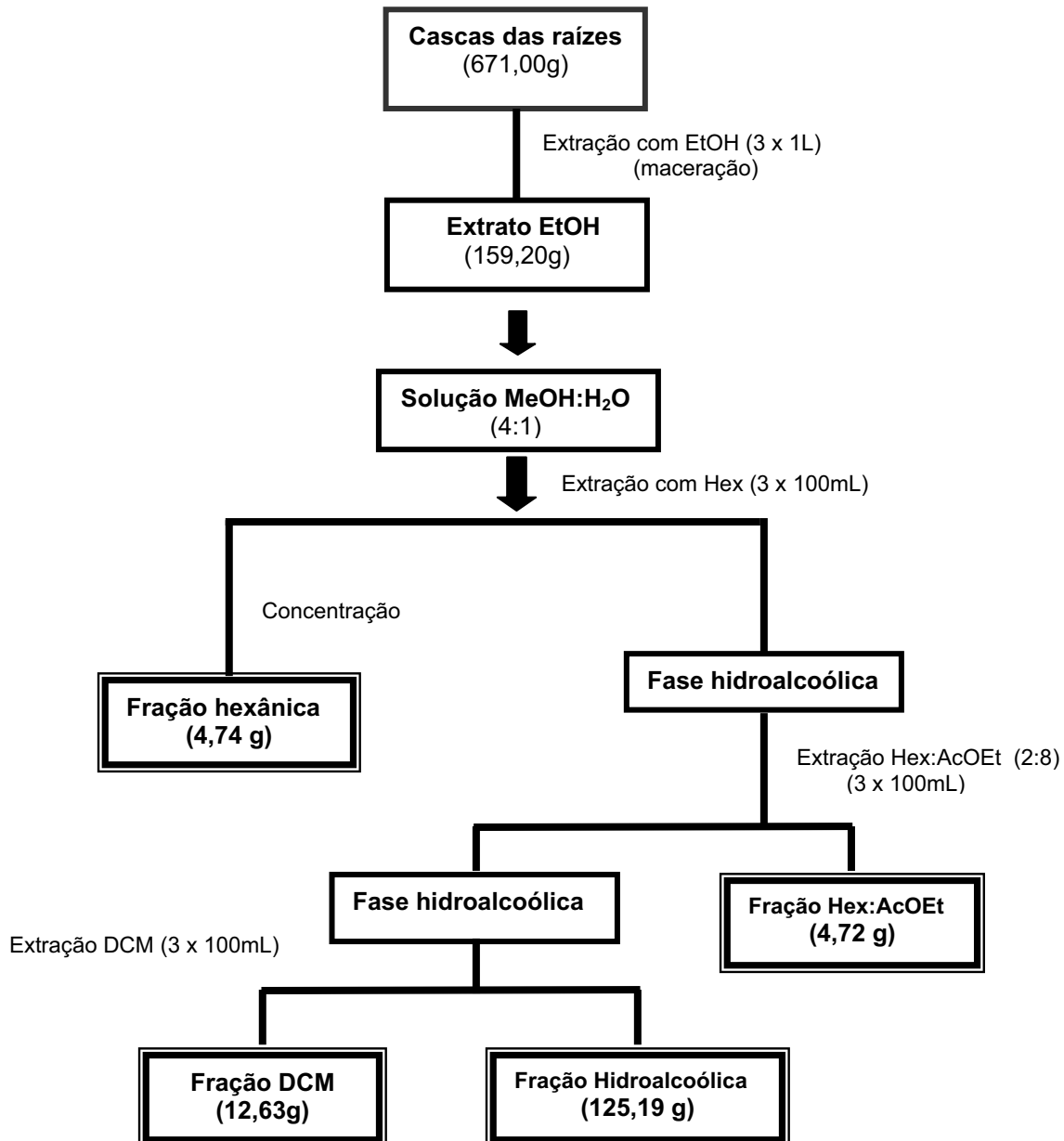
3.7 Atividade óptica

Os valores de rotação óptica ($[\alpha]_D$) foram obtidos em polarímetro Digital Jasco P-1020, lâmpada de sódio e $\lambda = 589$ nm.

3.8 Preparo do extrato vegetal e isolamento dos metabólitos das cascas das raízes da planta adulta de *Maytenus ilicifolia*

O estudo fitoquímico das cascas das raízes da planta adulta (15 anos) de *Maytenus ilicifolia* foi realizado tendo como objetivo principal o isolamento dos triterpenos quinonametídeos, os quais seriam utilizados como padrões cromatográficos e ou como substratos em experimentos de biossíntese desta classe de substância.

As cascas das raízes das plantas adultas de *Maytenus ilicifolia* foram secas em estufa a 30°C e trituradas em moinho de facas. Foram obtidos 671,00 g de material vegetal seco. O material obtido foi submetido à extração por maceração com EtOH, sendo repetido por três vezes. Posteriormente, o extrato EtOH foi filtrado e evaporado, sendo submetido a partição líquido-líquido conforme esquema 1, p. 49.

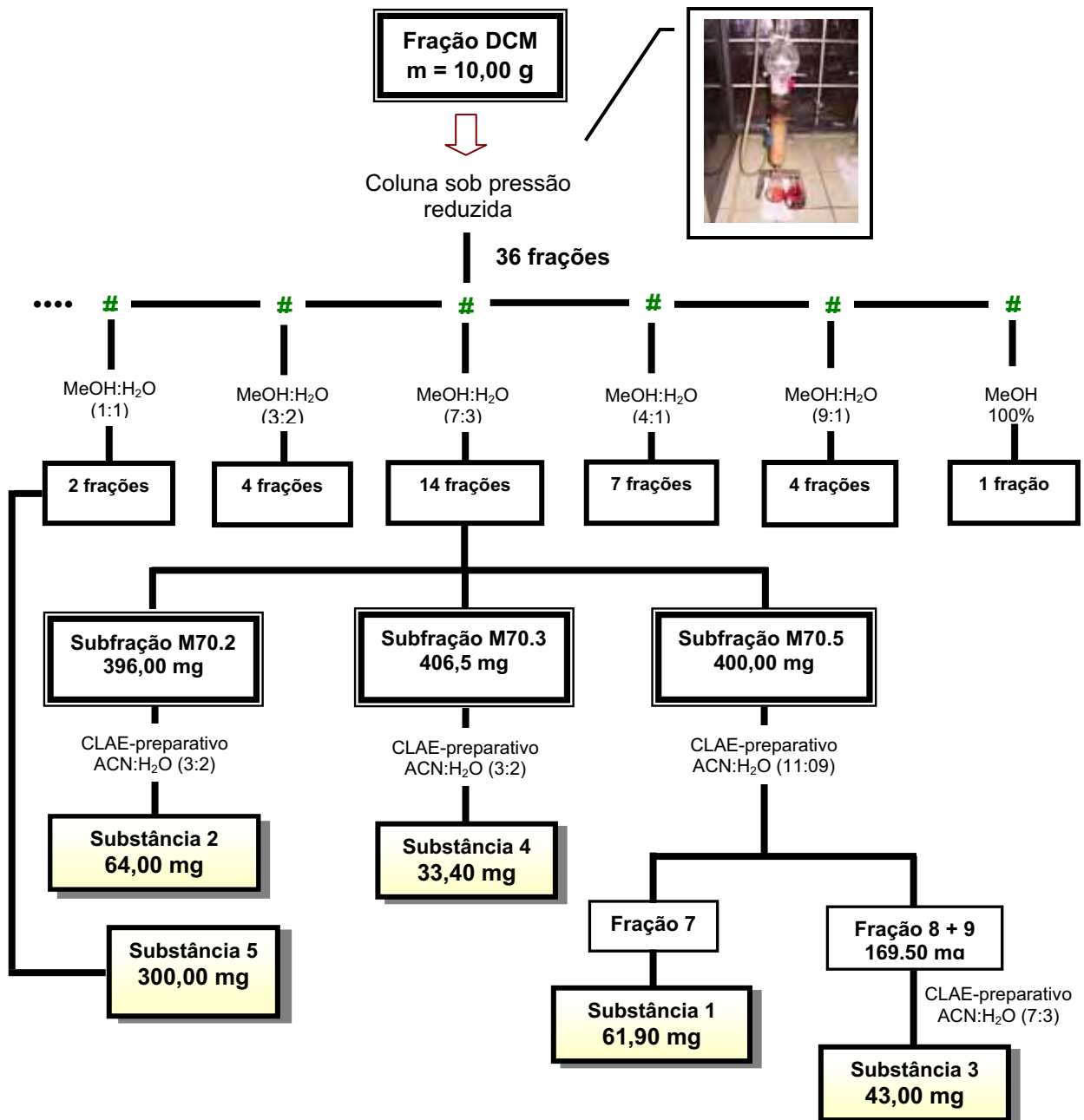


Esquema 1 - Partição líquido-líquido do extrato etanólico das cascas das raízes da planta adulta de *Maytenus ilicifolia*.

3.9 Fracionamento cromatográfico da fração DCM das cascas das raízes de *Maytenus ilicifolia*

Dos 12,63g da fração DCM provenientes do extrato etanólico, 10,00g foram submetidos a um fracionamento em CC sob pressão reduzida. Foi utilizada uma coluna de 20 x 4,5 cm de diâmetro, empregando como

adsorvente sílica C₁₈ com pastilha de carvão (2 cm), e como fase móvel água e MeOH, resultando um total de 36 frações de 200 mL cada.



Esquema 2 - Fracionamento do extrato DCM e isolamento dos metabólitos secundários das cascas das raízes de *Maytenus ilicifolia*.

Todas as frações coletadas foram secas em evaporador rotativo e após tratamento estas foram analisadas por CLAE-DAD. A análise no UV não evidenciou bandas características dos triterpenos quinonametídeos corroboradas pelo máximo de absorção em 420 nm. Posteriormente, estas

foram submetidas á análise através de CCDC utilizando diferentes sistemas de solventes e como reveladores, o anisaldeído e o reagente Dragendorff.

Das 14 frações coletadas (M70.1 – M70.14) quando eluídas com 70% de MeOH, as subfrações (M70.2 – M70.5) apresentaram afinidade pelo reagente Dragendorff, quando analisadas através de CCDC empregando como sistema de solventes Hex:AcOEt, na proporção de 1:4. Esta análise preliminar permitiu inferir a presença de substâncias nitrogenadas. No entanto, não foi verificada diferença significativa no Rf em CCDC dessas subfrações. Sendo assim, essas subfrações foram novamente analisadas por CLAE-DAD no modo gradiente e posteriormente no modo isocrático. Essa análise teve como objetivo estabelecer condições isocráticas com o intuito de fracioná-las e purificá-las em escala preparativa.

A subfração M70.2 foi submetida a CLAE-UV preparativa (condições: coluna Phenomenex[®] C₁₈ 10µm (250 x 21,2 mm); eluente ACN:H₂O (3:2); fluxo de 15 mL min⁻¹; tempo de análise de 30 min e $\lambda = 254\text{nm}$). Foram coletadas 3 frações, as quais foram analisadas por CLAE-DAD, sendo que a fração 2 apresentou-se pura, esta foi denominada de substância **2**.

A subfração M70.3 foi submetida a CLAE-UV preparativa (condições: coluna Phenomenex[®] C₁₈ 10µm (250 x 21,2 mm); eluente ACN:H₂O (3:2); fluxo de 12 mL min⁻¹; tempo de análise de 55 min e $\lambda = 254\text{nm}$). Foram coletadas 7 frações. Posteriormente essas foram analisadas por CLAE-DAD, sendo que a fração 3 apresentou-se pura, fornecendo a substância **4**.

A subfração M70.5 foi submetida a CLAE-UV preparativa (condições: coluna Phenomenex[®] C₁₈ 10µm (250 x 21,2 mm); eluente ACN:H₂O (11:09); fluxo de 16 mL min⁻¹; tempo de análise de 60 min e $\lambda = 254\text{nm}$) e resultou na coleta de 9 picos. Esses foram submetidos á análise por CLAE-DAD e a substância referente ao pico 7 apresentou-se pura e esta foi denominada de substância **1**. No entanto, as frações referentes aos picos 8 e 9 mostraram-se idênticas, porém não apresentaram grau de pureza. Objetivando-se o isolamento do metabólito majoritário com elevado grau de pureza, as frações foram reunidas e purificadas via escala preparativa (condições: coluna Phenomenex[®] C₁₈ 10µm (250 x 21,2 mm); eluente ACN:H₂O (7:3); fluxo de 12

mL min⁻¹; tempo de análise de 30 min e $\lambda = 254\text{nm}$) levando ao isolamento da substância **3**.

As subfrações (M50.1 e M50.2) provenientes da eluição com 50% de MeOH também foram submetidas a CLAE-UV preparativa (condições: coluna Phenomenex[®] C₁₈ 10 μm (250 x 21,2 mm); eluente MeOH:H₂O (1:3); fluxo de 10 mL min⁻¹; tempo de análise de 40 min e $\lambda = 254\text{nm}$) resultando em 8 frações, das quais a fração 8 forneceu a substância **5**, o isolamento das substâncias encontram-se no esquema 2, p. 50.

3.10 Isolamento e purificação dos triterpenos quinonametídeos da planta jovem de *Maytenus ilicifolia*

O estudo fitoquímico das cascas das raízes da planta adulta de *M. ilicifolia* foi realizado tendo como objetivo o isolamento dos triterpenos quinonametídeos, os quais seriam utilizados em experimentos de biossíntese. No entanto, a análise cromatográfica do extrato etanólico e das frações de partição não evidenciou a presença dos triterpenos quinonametídeos, mas outra classe de metabólito secundário, os alcalóides piridínicos sesquiterpênicos. Estes foram encontrados como metabólitos secundários majoritários em plantas adultas.

Posteriormente, a análise por CLAE-DAD do extrato das raízes da planta jovem (3 anos) mostrou o acúmulo dos triterpenos quinonametídeos como metabólito majoritário, sendo estas selecionadas para o isolamento desta classe de substância.

As raízes foram congeladas em N₂ líquido, trituradas utilizando gral e pistilo, e como solvente extrator foi utilizado o DCM. Posteriormente, o extrato DCM foi filtrado e evaporado obtendo-se 4,90 g de extrato, o fracionamento encontra-se descrito no esquema 3, p. 53.

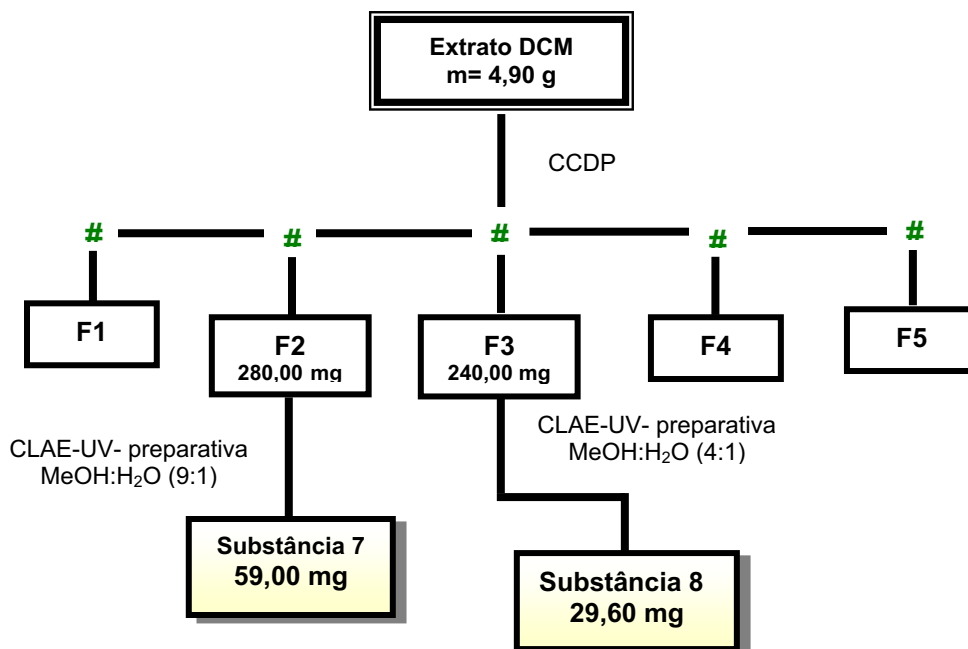
Alíquotas do extrato foram fracionadas por CCDP empregando como sistema de solventes Hex:AcOEt na proporção de 7:3. Estas placas foram eluídas três vezes. As 5 frações coletadas foram submetidas à extração em

ultrassom utilizando o MeOH:AcOEt na proporção de 19:01, filtradas à vácuo e concentradas.

Após análise e determinação da condição cromatográfica no modo isocrático por CLAE-DAD das frações coletadas, duas (F2 e F3) foram selecionadas para serem submetidas à purificação.

A fração F2 (280,0 mg) foi submetida à purificação por CLAE-UV preparativa (condição: coluna Phenomenex® C₁₈, 10µm (250x21,2 mm); eluente: MeOH: H₂O (9:1); fluxo 10 mL. min⁻¹, tempo de análise: 40 min e λ = 254 nm). A purificação resultou na coleta de 6 frações das quais a fração F2.5 (59,0 mg), após análise por CLAE-DAD apresentou-se pura. Esta foi denominada de substância 7.

A fração F3 (240,0 mg) também foi submetida à análise por CLAE-UV preparativa (Condição: coluna Phenomenex® C₁₈, 10µm (250x21,2 mm); eluente: MeOH: H₂O (4:1); fluxo 12 mL. min⁻¹, tempo de análise: 30 min e λ = 254 nm) e foram coletadas 5 frações. Foi observado por CLAE-DAD que a fração coletada F3.5 apresentava algumas impurezas, sendo assim, esta foi submetida a repurificação obtendo-se a substância 8.



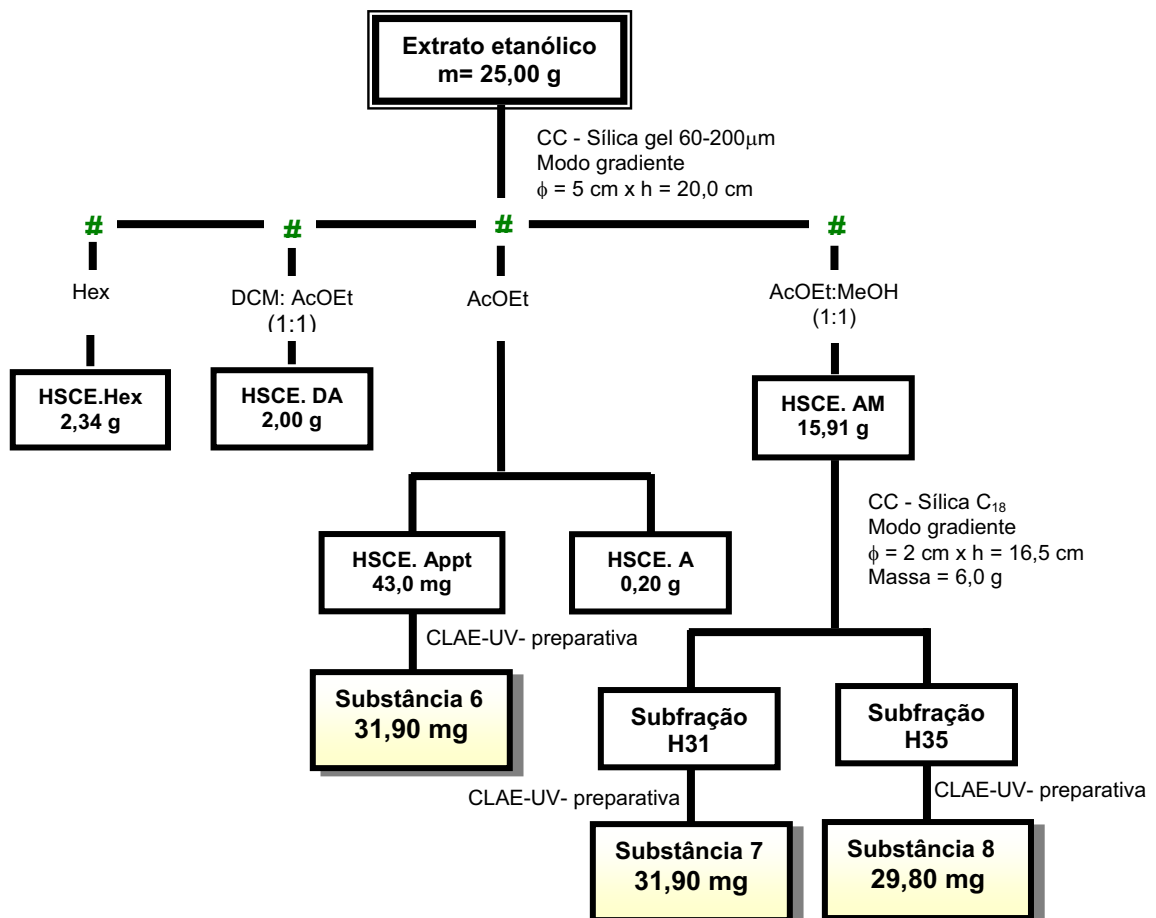
Esquema 3 - Isolamento e purificação dos triterpenos quinonametídeos da planta jovem de *Maytenus ilicifolia*.

3.11 Preparo do extrato vegetal e isolamento dos metabólitos das cascas das raízes de *Salacia campestris*

O estudo fitoquímico das cascas das raízes de *Salacia campestris* foi realizado tendo como objetivo o isolamento de outros triterpenos quinonametídeos e em quantidades apreciáveis.

As cascas das raízes de *Salacia campestris* foram secas em estufa a 30°C e trituradas em liquidificador. Foram obtidos 671,00 g de material vegetal seco e moído. O material obtido foi submetido à extração por maceração com EtOH, sendo repetido por três vezes. Posteriormente, o extrato etanólico foi filtrado e evaporado, obtendo-se 52,30 g de extrato etanólico.

Dos 52,30g provenientes do extrato etanólico, 25,00g foram submetidos a fracionamento em CC a vácuo. Foi utilizada uma coluna de 20 x 5 cm de diâmetro, empregando como adsorvente sílica gel e os solventes Hex, DCM:AcOEt, AcOEt, AcOEt:MeOH e MeOH em ordem crescente de polaridade, resultando um total de 4 frações e 1 precipitado (Esquema 4, p. 54).



Esquema 4 - Fracionamento cromatográfico do extrato etanólico das cascas das raízes de *Salacia campestris*.

Seis gramas da fração **HSCE.AM** foram submetidas a CC de sílica C₁₈ em modo gradiente utilizando como sistema de solventes MeOH: H₂O da qual foram coletadas 36 subfrações (H1 à H36). Estas subfrações foram analisadas por CLAE-DAD no modo gradiente (5 a 100% de MeOH; condição: coluna Phenomenex[®] C₁₈, 5µm (250x4,6 mm); fluxo 1 mL. min⁻¹, tempo de análise: 60 min e $\lambda = 254$ nm) e reunidas após análise do tempo de retenção e das bandas de absorção no UV. Esta análise permitiu observar bandas no UV correspondente aos triterpenos quinonametídeos corroboradas pelo máximo de absorção em 420 nm. Foram selecionadas as subfrações H-31 e H-35. Em seguida, foram estabelecidas as condições cromatográficas no modo isocrático, visando purificação destas por CLAE-UV preparativa.

A subfração H-31 foi submetida à CLAE-UV preparativa (condição: coluna Phenomenex[®] C₁₈, 10µm (250x21,2 mm); eluente: MeOH: H₂O (77:23); fluxo 8 mL. min⁻¹, tempo de análise: 40 min e $\lambda = 254$ nm). Foram coletadas 5 frações as quais, após análise por CLAE-DAD em modo isocrático levou ao isolamento da substância **8**.

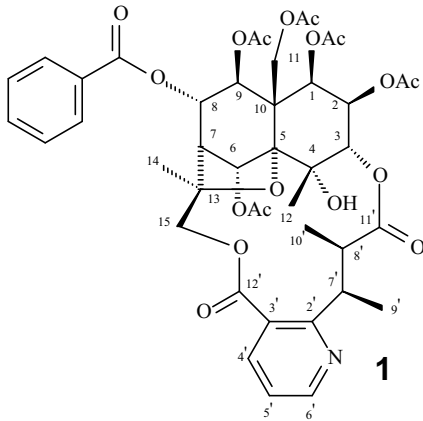
A purificação da subfração H-35 por CLAE-UV preparativa (condição: coluna Phenomenex[®] C₁₈, 10µm (250x21,2 mm); eluente: MeOH: H₂O (7:3); fluxo 8 mL. min⁻¹, tempo de análise: 45 min e $\lambda = 254$ nm) levou ao isolamento da substância **7**.

O precipitado **HSCE.Appt** coletado durante a eluição do extrato etanólico com acetato de etila foi analisado por CLAE-DAD em várias condições cromatográficas com o objetivo de se analisar a pureza e a classe a qual pertencia. A análise permitiu observar bandas de absorção no UV correspondente à classe dos alcalóides piridínicos sesquiterpênicos, a qual apresenta banda de absorção em 231 nm. Também foi observado um pico co-eluindo juntamente com o pico majoritário.

A purificação foi realizada por CLAE-UV preparativa (condição: coluna Phenomenex[®] C₁₈, 10µm (250x21,2 mm); eluente: MeOH: H₂O (7:3); fluxo 12 mL. min⁻¹, tempo de análise: 30 min e $\lambda = 254$ nm) fornecendo a substância **6**.

4. SUBSTÂNCIAS ISOLADAS

- Alcalóides Piridínicos Sesquiterpênicos



Aquifoliunina E-I

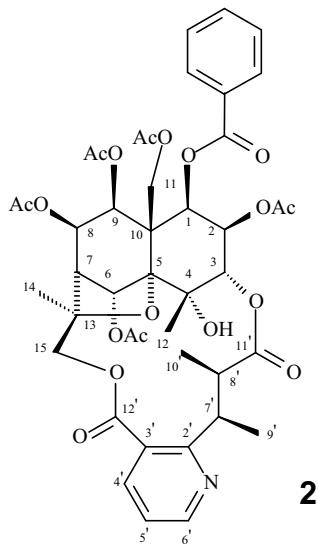
procedência: raiz da planta adulta de

M. ilicifolia

massa: 61,80 mg

isolamento: p. 51

identificação: p. 60



Maiteina

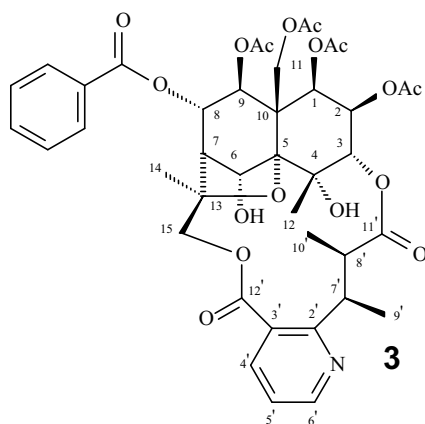
procedência: raiz da planta adulta de

M. ilicifolia

massa: 64,00 mg

isolamento: p. 51

identificação: p. 83



Maitenol

procedência: raiz da planta adulta de

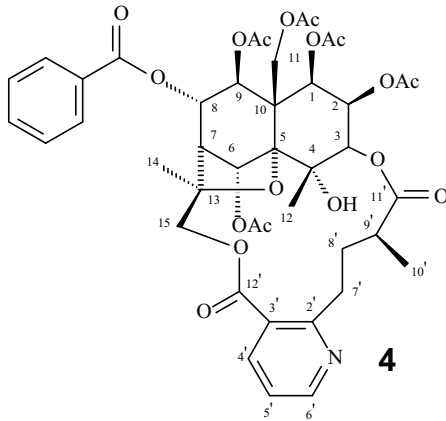
M. ilicifolia

massa: 43,00 mg

isolamento: p. 52

identificação: p. 102

• Alcalóides Piridínicos Sesquiterpênicos



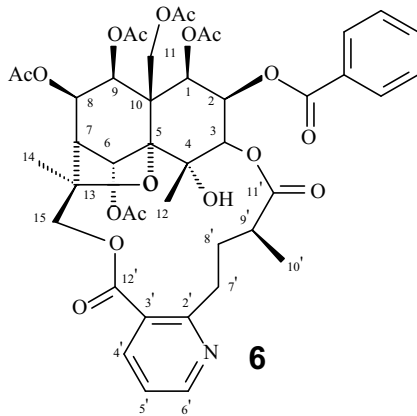
Campestrina

procedência: raiz da planta adulta de *M. ilicifolia*

massa: 33,40 mg

isolamento: p. 51

identificação: p. 122



Wilforina

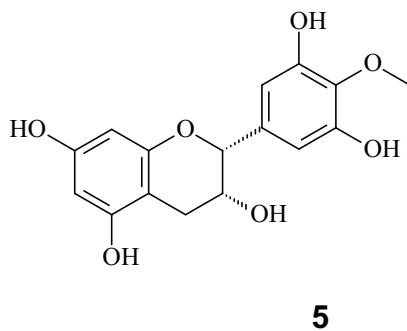
Procedência: raiz de *S. campestris*

massa: 31,90 mg

isolamento: p. 55

identificação: p. 138

• catequina



ouratecatequina

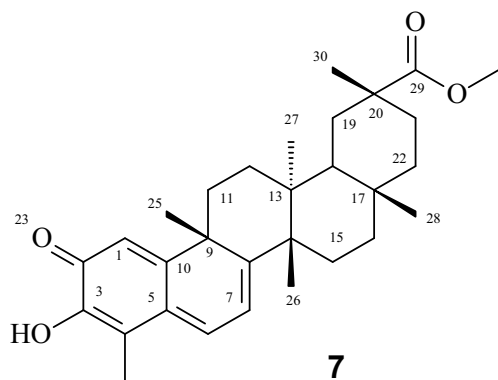
procedência: raiz da planta adulta de *M. ilicifolia*

massa: 300 mg

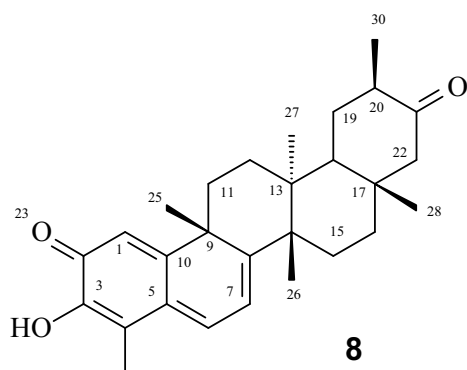
isolamento: p. 52

identificação: p. 167

- Triterpenos quinonametídeos

**Pristimerina**

procedência: raiz da planta jovem de
M. ilicifolia e *S. campestris*
massa: 59,00 mg
isolamento: p. 53
identificação: p. 153

**Maitenina**

procedência: raiz da planta jovem de
M. ilicifolia e *S. campestris*
massa: 29,60 mg
isolamento: p. 53
identificação: p. 160

5- Determinação e identificação estrutural das substâncias isoladas de *Maytenus ilicifolia* e *Salacia campestris*

5.1 Considerações gerais

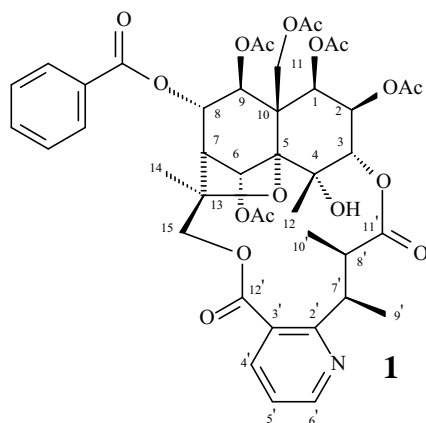
O estudo fitoquímico realizado com a planta adulta de *Maytenus ilicifolia* e *Salacia campestris* culminou no isolamento de cinco substâncias, caracterizadas como alcalóides piridínicos sesquiterpênicos apresentados na p. 49-51. Estas substâncias são formadas por um anel macrocíclico e são comumente encontradas em espécies de Celastraceae (Corsino et al.; 1998a, 1998b; Duan et al.; 1999; Lião et al.; 2001). Estes alcalóides apresentam duas classes principais, onde a unidade alcaloídica pode ser formada a partir tanto da esterificação dos ácidos evonínico ou wilfordíco. Neste trabalho foram isolados os alcalóides piridínicos sesquiterpênicos esterificado tanto pelo ácido evonínico, quanto pelo ácido wilfordínico. Estes alcalóides estão ligados a um sesquiterpeno diidro- β -agarofurano, formando o macrociclo.

A maioria dos alcalóides piridínicos sesquiterpênicos apresentam padrão de substituição da porção sesquiterpênica nas posições $1\beta_{eq}$, $2\beta_{ax}$, $11\beta_{ax}$, $8\beta_{ax}$, $9\beta_{eq}$ e contém um grupo hidroxílico em C-4 (Corsino, 2000). O espectro de RMN de ^1H desta classe de substância é caracterizado por um grande número de sinais, que abrange uma larga faixa do espectro com deslocamento químico de δ 1,0 a 9,0, demonstrando a grande funcionalização destas moléculas (Lião, 1997).

Para facilitar a discussão sobre a determinação estrutural das substâncias isoladas neste trabalho, estas foram separadas por classe de metabólitos secundários, independente da espécie.

As substâncias foram identificadas e elucidadas por meio de técnicas espectrométricas, incluindo RMN de ^1H , RMN de ^{13}C , DEPT, gHMBC, gHMQC, gCOSY, IV e EM.

5.2 Determinação estrutural da substância 1



A substância **1** apresenta fórmula molecular $C_{43}H_{49}NO_{18}$, definida pelo espectro de massas (Figura 32, p. 82), o qual apresentou pico do íon molecular em m/z 868,3010 $[M+1]^+$. O espectro de absorção no IV (Figura 31, p. 82) apresentou uma banda de absorção em 1758 cm^{-1} referente ao estiramento da ligação C=O, enquanto a banda de absorção em 1225 cm^{-1} caracteriza estiramentos referentes às ligações C-O de éster. As bandas de absorção em 2990 cm^{-1} e em 3000 cm^{-1} caracterizam estiramentos referentes às ligações C-H alifáticas e aromáticas, respectivamente. A banda de absorção larga em 3493 cm^{-1} refere-se ao estiramento da ligação O-H.

Os hidrogênios metínicos do sistema decalínico H-3, H-2 e H-1 mostraram sinais em $4,68\ \delta$ (d; $J = 3,0\text{ Hz}$); $5,21\ \delta$ (dd; $J = 3,5$ e $3,0\text{ Hz}$); $5,59\ \delta$ (d; $J = 3,5\text{ Hz}$), respectivamente, enquanto os sinais em $2,61\ \delta$ (d; $J = 3,5\text{ Hz}$); $5,62\ \delta$ (dd; $J = 9,5$ e $3,5\text{ Hz}$); $5,84\ \delta$ (d; $J = 9,5\text{ Hz}$) foram atribuídos aos H-7, H-8 e H-9, respectivamente (Tabela 3, p. 63).

A análise do espectro de RMN de ^{13}C (Figura 15, p. 73), permitiu atribuir os sinais relativos aos carbonos carbonílicos dos grupos acetoxílicos em $169,30$; $168,81$; $169,90$; $170,03$ e $170,23\ \delta$. Estes sinais mostraram correlação, no espectro de gHMBC (Figura 29, p. 81), com os singletos em $1,77$; $2,09$; $2,15$; $1,83$ e $2,28\ \delta$, respectivamente, sendo que a posição destes grupos acetoxílicos, no sistema decalínico, foi também definida a partir da análise do espectro de gHMBC (Figura 28, p. 80) á partir da correlação com os sinais em $5,59\ \delta$ (H-1 α , d; $J = 3,5\text{ Hz}$); $5,21\ \delta$ (H-2 α , dd; $J = 3,5$ e $3,0\text{ Hz}$); $6,67\ \delta$ (H-6 β , s); $5,84\ \delta$ (H-9 α , d; $J = 10,0\text{ Hz}$) e $4,58$ e $4,79\ \delta$ (H-11a, b, d; $J = 13,5\text{ Hz}$). No

espectro de gHMQC (Figura 18, p. 75) foram observadas as correlações diretas entre os sinais dos carbonos e hidrogênios dos referidos grupos metílicos dos grupos acetoxílicos localizadas em C-1 (δ_H 1,77; δ_C 19,85); C-2 (δ_H 2,09; δ_C 20,95); C-6 (δ_H 2,15; δ_C 21,45); C-9 (δ_H 1,83; δ_C 21,21) e C-11 (δ_H 2,28; δ_C 20,74). Essas correlações e as demais observadas no espectro de gHMQC estão relacionadas na tabela 3, p. 63.

Os sinais em 129,94, 128,99 e 133,96 δ foram atribuídos aos carbonos do anel aromático do grupo benzoato, enquanto o sinal em 165,74 δ foi atribuído ao grupo carbonílico deste, devido observação de sua correlação com o hidrogênio *o*-fenílico em 7,87 δ , no espectro de gHMBC (Figura 26, p. 79). Baseado nas correlações observadas no espectro de gHMBC dos sinais dos grupos acetoxílicos com os hidrogênios do sistema decalínico, assim como a magnitude da constante de acoplamento do H-8 (5,62 δ , dd; $J = 9,5$ e $3,5$ Hz) caracterizando o H-8 β , foi possível definir a posição do grupo benzoato em C-8.
 α

Os grupos metílicos C-12, C-14, C-9' e C-10' apresentaram no espectro de RMN ^{13}C (Tabela 3, p. 63), sinais em 22,86; 19,85; 12,26 e 10,03 δ . Os sinais em 70,85; 94,73; 51,61; 85,91; 165,66; 125,26; 174,23; 168,64 δ foram atribuídos aos carbonos quaternários C-4, C-5, C-10, C-13, C-2', C-3', C-11' e C-12'. Sinais em 72,66; 68,81; 75,48; 49,61; 74,75 e 74,06 δ foram atribuídos aos carbonos C-1, C-2, C-3, C-7, C-8 e C-9, respectivamente (Figuras 12-15, p. 70-73).

No espectro de gHMBC (Figura 23, p. 78) foram observadas as correlações entre os hidrogênios metílicos H-9' (1,34 δ) e H-10' (1,15 δ), com os carbonos C-7' (36,70 δ) e C-8' (45,09 δ), confirmando a presença do dimetilpropanoato. As configurações absolutas destes dois grupos metílicos foram estabelecidas previamente como sendo 2S, 3S por análise de raio X (Sasaki et al.; 1972).

Os hidrogênios metílicos H-12 (1,53 δ) mostraram correlação com os C-5 (94,73 δ), C-3 (75,48 δ), C-4 (70,85 δ) enquanto H-14 (1,76 δ) mostrou correlação com os C-7 (49,61 δ) e C-15 (70,11 δ) definindo assim a posição destes grupos metílicos na molécula.

A análise do espectro de RMN de ^1H (Tabela 3, p. 63, Figura 11, p. 69) da substância **1**, permitiu identificar a unidade alcaloídica devido á presença de três duplos dubletos em 7,96 δ ($J= 8,0$ e $2,0$ Hz; H-4'), 7,17 δ ($J= 8,0$ e $5,0$ Hz; H-5'), 8,62 δ ($J= 5,0$ e $2,0$ Hz; H-6') e caracterizando o anel piridínico 2,3-dissubstituído.

Todas as correlações de gHMBC observadas estão listadas na tabela 3, p. 56.

O espectro de DEPT 135° (Figura 16, p. 74) permitiu a identificação dos carbonos metínicos, metilênicos e metílicos.

O dado obtido de rotação óptica específica foi de $[\alpha]_D^{23,2} = -5$ (CHCl_3 , c 0,2 g/100 mL).

A configuração relativa dos grupos acetatos e benzoato foram deduzidas com base nas magnitudes das constantes de acoplamento observadas no espectro de RMN de ^1H , sendo comparadas com dados observados na literatura, corroborando a proposta estrutural deste alcalóide piridínico sesquiterpênico como a aquifoliunina E-1 (Corsino et al.; 1998a).

Tabela 3. Dados de RMN de ^1H e RMN-2D (CDCl_3 , 500 MHz) da substância 1.

H	δ (ppm), Mult. J (Hz)	δ ^{13}C (ppm)	gHMBC	gCOSY
1	5,59 d (3,5)	72,66 (CH)	51,61(C-10); 61,00(C-11); 74,06(C-9); 169,30(Ac-1)	N.O.
2	5,21 dd (3,5 e 3,0)	68,81 (CH)	N.O.	5,59(H-1)
3	4,68 d (3,0)	75,48 (CH)	72,66(C-1); 94,73 (C-5)	5,21(H-2)
4	-----	70,85 q	-----	-----
4-OH	4,46 d (1,0)	-----	24,05(C-12); 70,85(C-4)	N.O.
5	-----	94,73 q	-----	-----
6	6,67 s	74,92 (CH)	74,75(C-8); 74,92(C-6); 85,91(C-13); 94,73(C-5); 169,90(Ac-6)	N.O.
7	2,61 d (3,5)	49,61 (CH)	74,92(C-6); 94,73(C-5)	N.O.
8	5,62 dd (10,0 e 3,5)	74,75 (CH)	N.O.	N.O.
9	5,84 d (10,0)	74,06(CH)	51,61(C-10); 61,00(C-11); 72,66(C-1); 74,92(C-6); 170,23(C-9)	N.O.
10	-----	51,61 q	-----	-----
11a	4,58 d (13,0)	61,00 (CH_2)	51,61(C-10); 94,73(C-5)	N.O.
11b	4,79 d (13,0)	61,00 (CH_2)	74,06(C-9); 94,73(C-5)	N.O.
12	1,53 d (1,0)	24,05 (CH_3)	70,85(C-4); 75,48(C-3); 94,73(C-5)	N.O.
13	-----	85,91 q	-----	-----
14	1,76 s	19,85 (CH_3)	49,61(C-7); 70,11(C-15); 85,91(C-13)	N.O.
15a	3,59 d (12,0)	69,97 (CH_2)	168,64(C-12')	
15b	5,91 d (12,0)	69,97 (CH_2)	19,85(C-14); 85,91(C-13); 168,64(C-12')	3,59(H-15a)
2'	-----	165,66 q	-----	-----
3'	-----	125,26 q	-----	-----
4'	7,96 dd (8,0 e 2,0)	137,92 (CH)	151,77(C-6'); 165,66(C-2')	N.O.
5'	7,17 dd (8,0 e 5,0)	121,28 (CH)	125,26(C-3')	7,96(H-4'); 8,62(H-6')
6'	8,62 dd (5,0 e 2,0)	151,77 (CH)	N.O.	-----
7'	4,60 q (7,0)	36,70 (CH)	36,70(C-7'); 45,09 (C-8'); 174,23(C-11')	N.O.
8'	2,54 q (7,0)	45,09 (CH)	174,23 (C-11')	N.O.
9'	1,34 d (7,0)	12,26 (CH_3)	36,47(C-7'); 45,09 (C-8'); 165,66(C-2')	4,61(H-7')

10'	1,15 d (7,0)	10,03 (CH ₃)	36,70(C-7'); 45,09(C-8'); 174,23(C-11')	2,54(H-8')
11'	-----	174,23 q	-----	-----
12'	-----	168,64 q	-----	-----
1- <u>CH₃CO</u>	1,77 s	19,85	169,30(Ac-1)	N.O.
1- <u>CH₃CO</u>	-----	169,30	-----	-----
2- <u>CH₃CO</u>	2,09 s	20,95	168,81(Ac-2)	N.O.
2- <u>CH₃CO</u>	-----	168,81	-----	-----
6- <u>CH₃CO</u>	2,15 s	21,45	169,90(Ac-6)	N.O.
6- <u>CH₃CO</u>	-----	169,90	-----	-----
9- <u>CH₃CO</u>	1,83 s	21,21	170,23(Ac-9)	N.O.
9- <u>CH₃CO</u>	-----	170,03	-----	-----
11- <u>CH₃CO</u>	2,28	20,74	170,03(Ac-11)	N.O.
11- <u>CH₃CO</u>	-----	170,23	-----	-----
<u>CO</u> Ph	-----	165,74	-----	-----
<i>ipso</i>	-----	129,21	-----	-----
<i>orto</i>	7,87 dd (1,0 e 8,0)	129,94 (CH)	129,94(C-2''); 133,96 (C-4''); 165,74 (OBz)	N.O.
<i>meta</i>	7,37 t like (8,0)	128,99 (CH)	128,99(C-3'')	7,87(H _m)
<i>para</i>	7,52 t like (8,0)	133,96 (CH)	129,94(C-2'')	7,87(H _o)

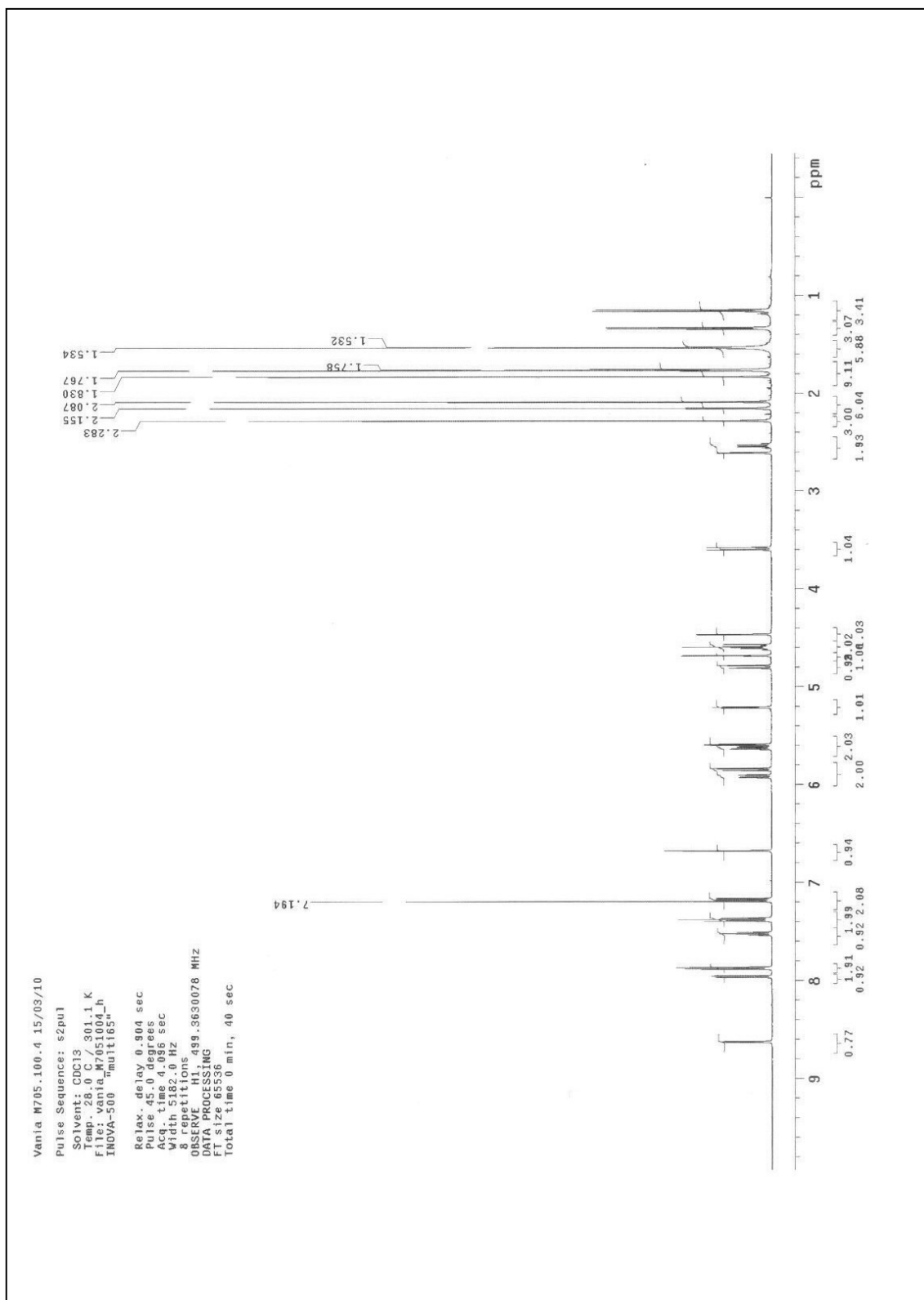


Figura 7 – Espectro de RMN de ^1H da substância 1 (500 MHz, CDCl_3).

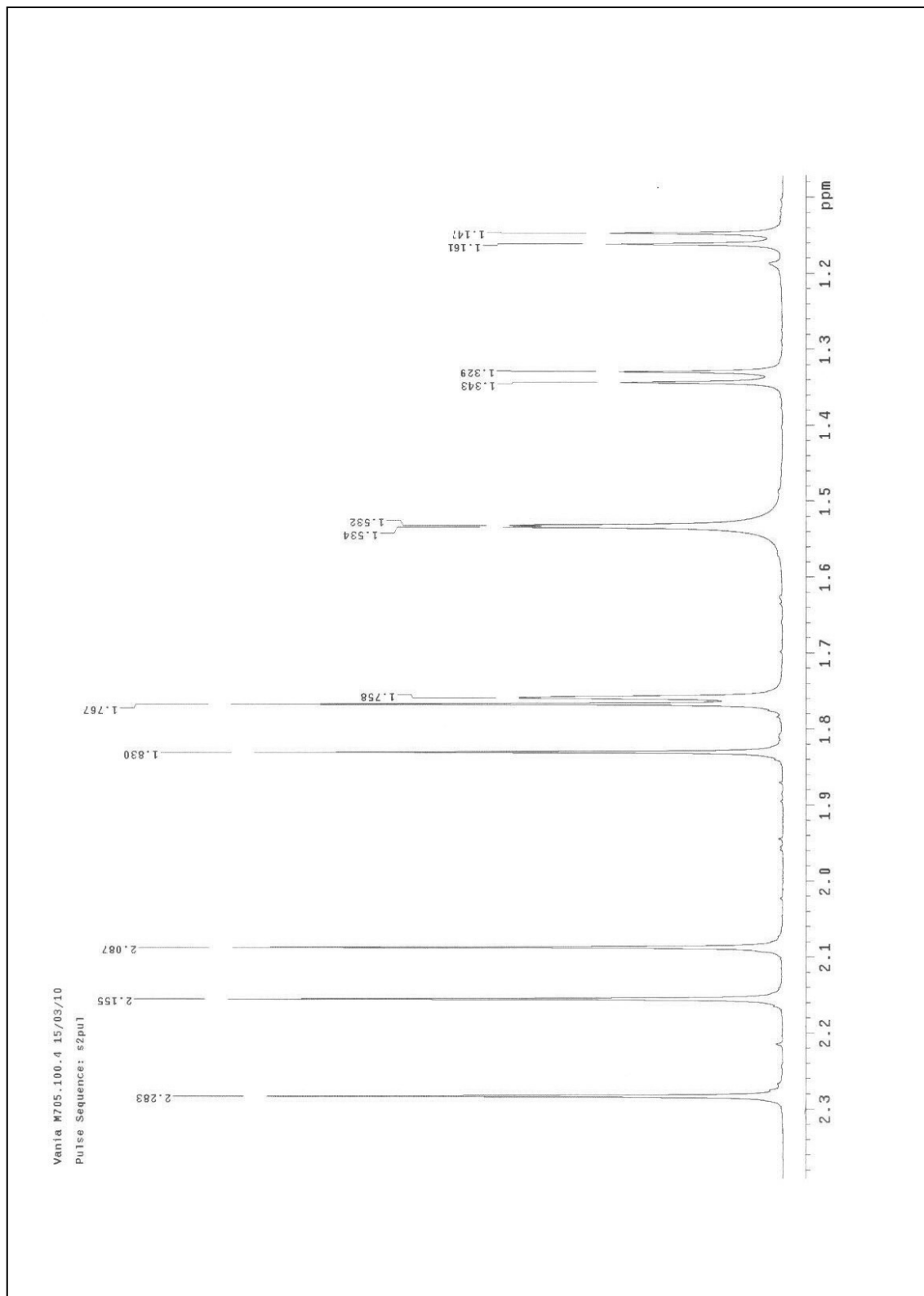


Figura 8 – Expansão da região 1,0–2,3 δ do espectro de RMN de ^1H da substância 1 (500 MHz, CDCl_3).

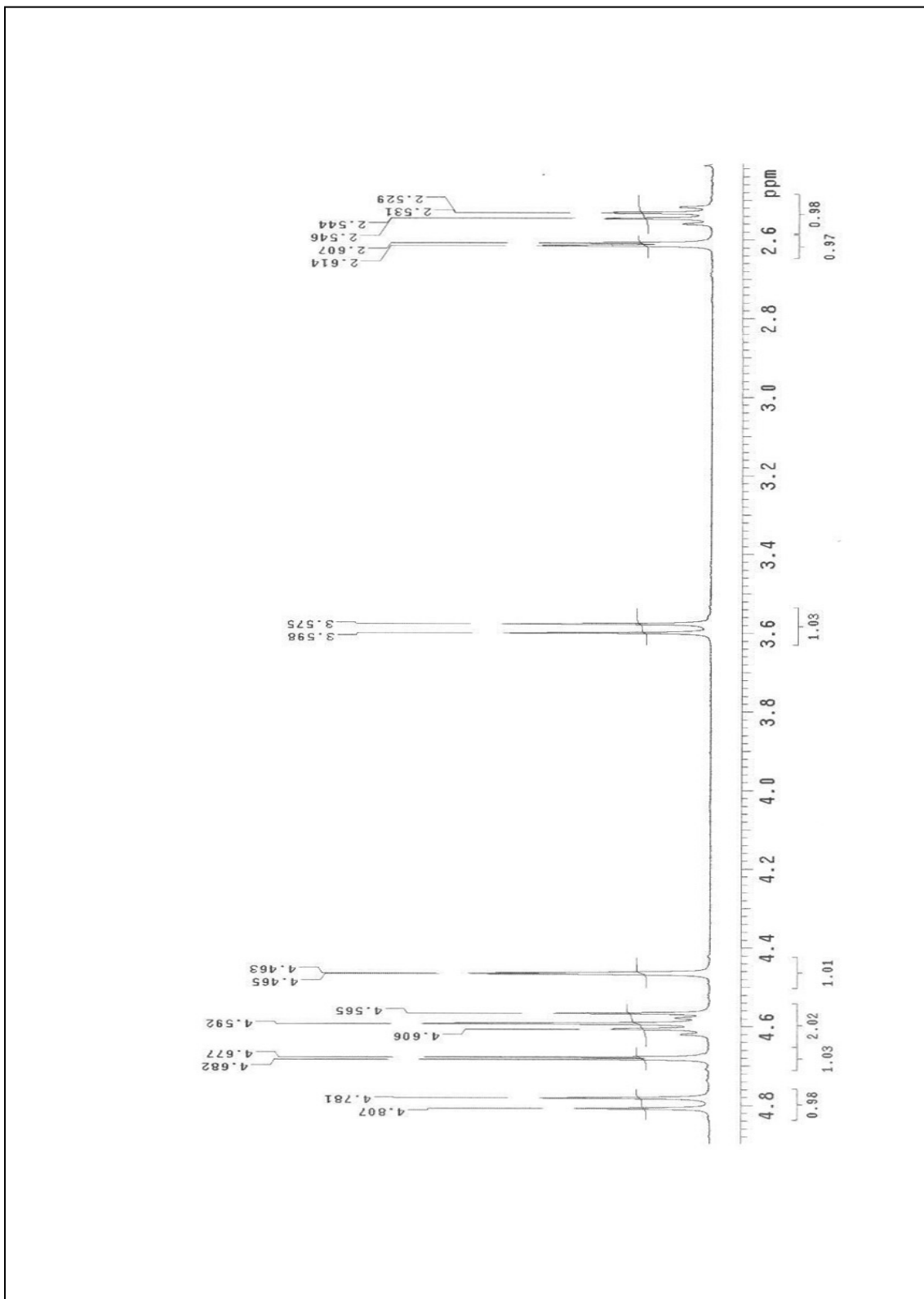


Figura 9 – Expansão da região 2,6–4,8 δ do espectro de RMN de ¹H da substância 1 (500 MHz, CDCl₃).

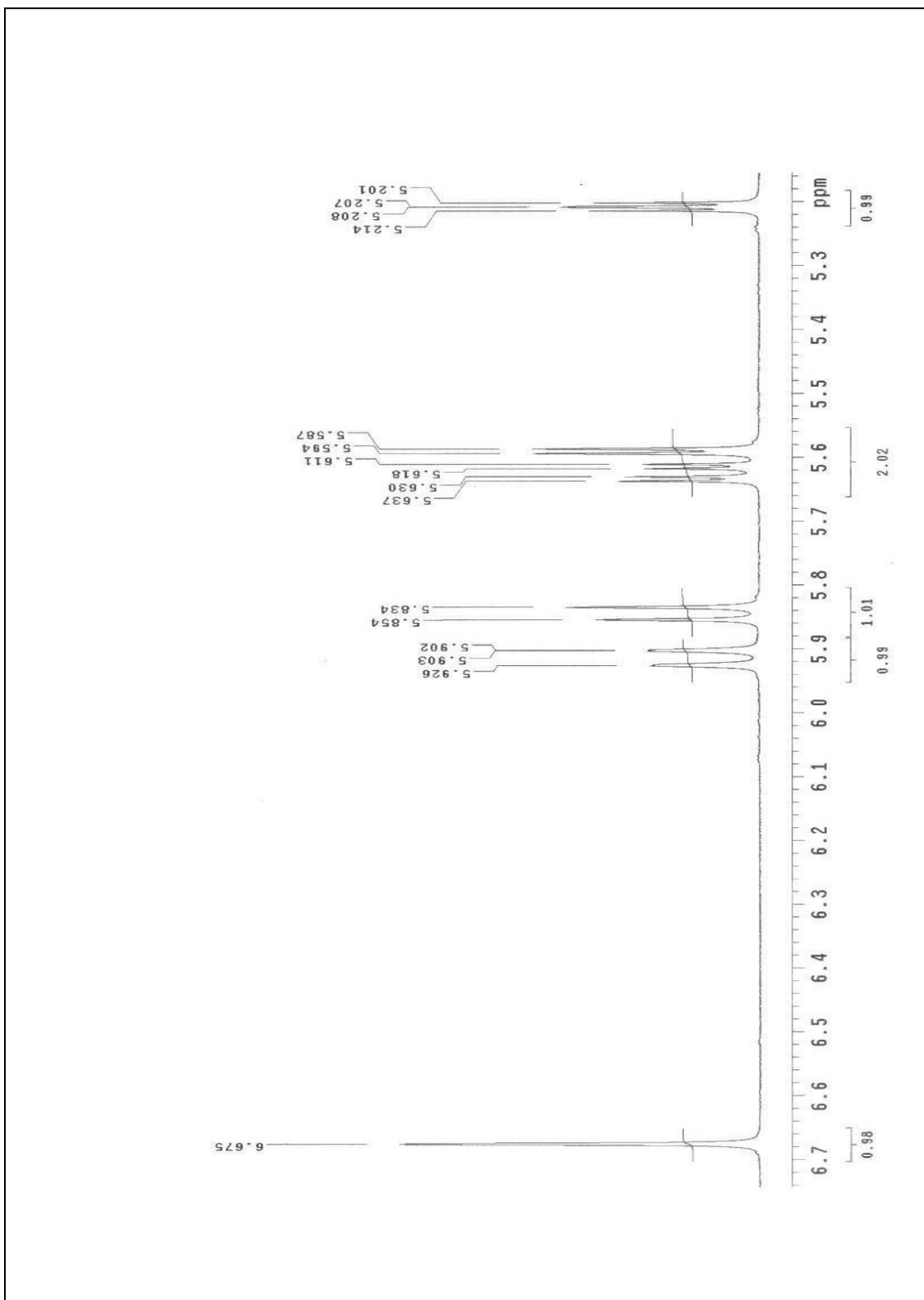


Figura 10 – Expansão da região 5,2–6,7 δ do espectro de RMN de ^1H da substância 1 (500 MHz, CDCl_3).

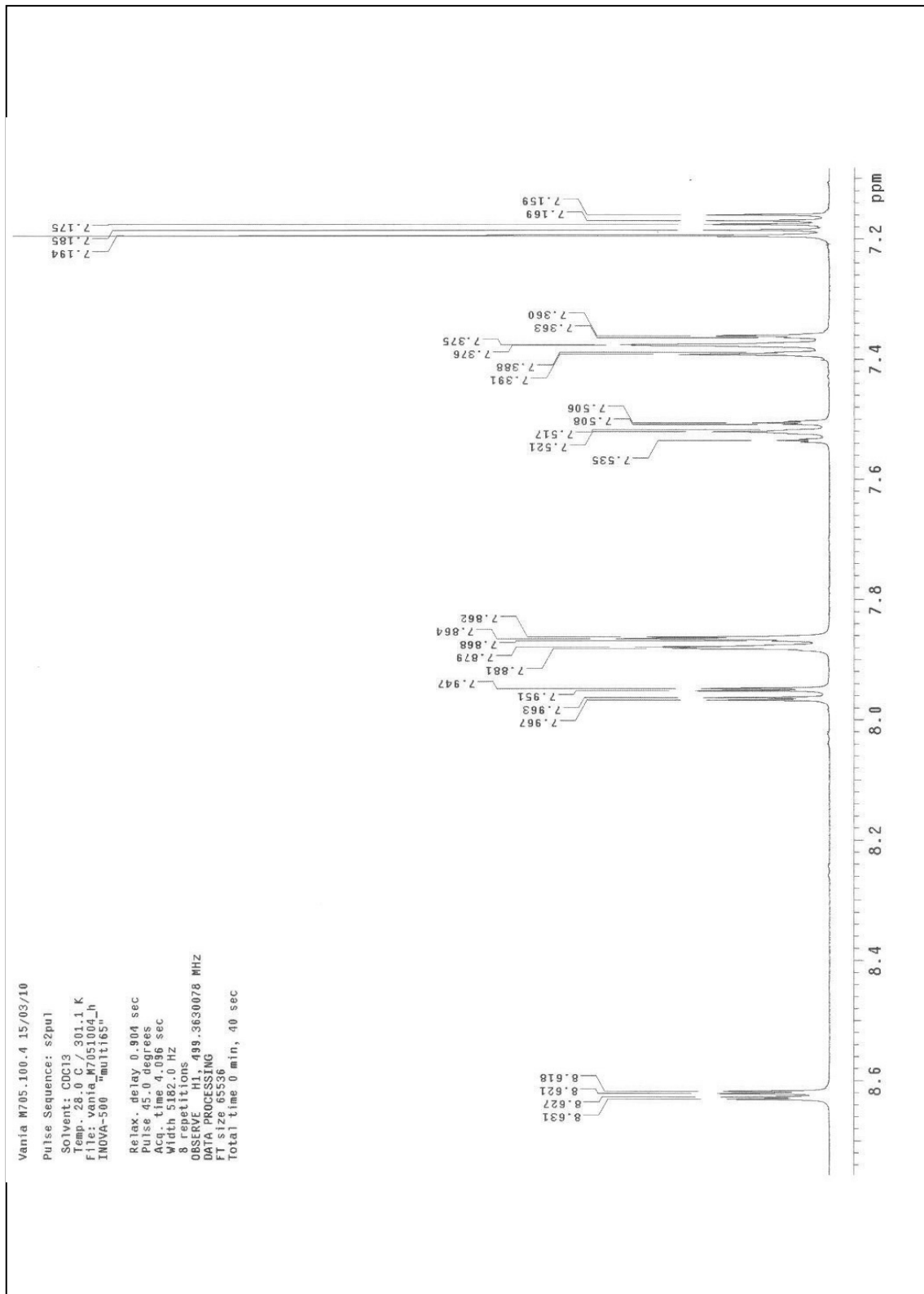


Figura 11– Expansão da região 7,0–8,6 δ do espectro de RMN de ^1H da substância 1 (500 MHz, CDCl_3).

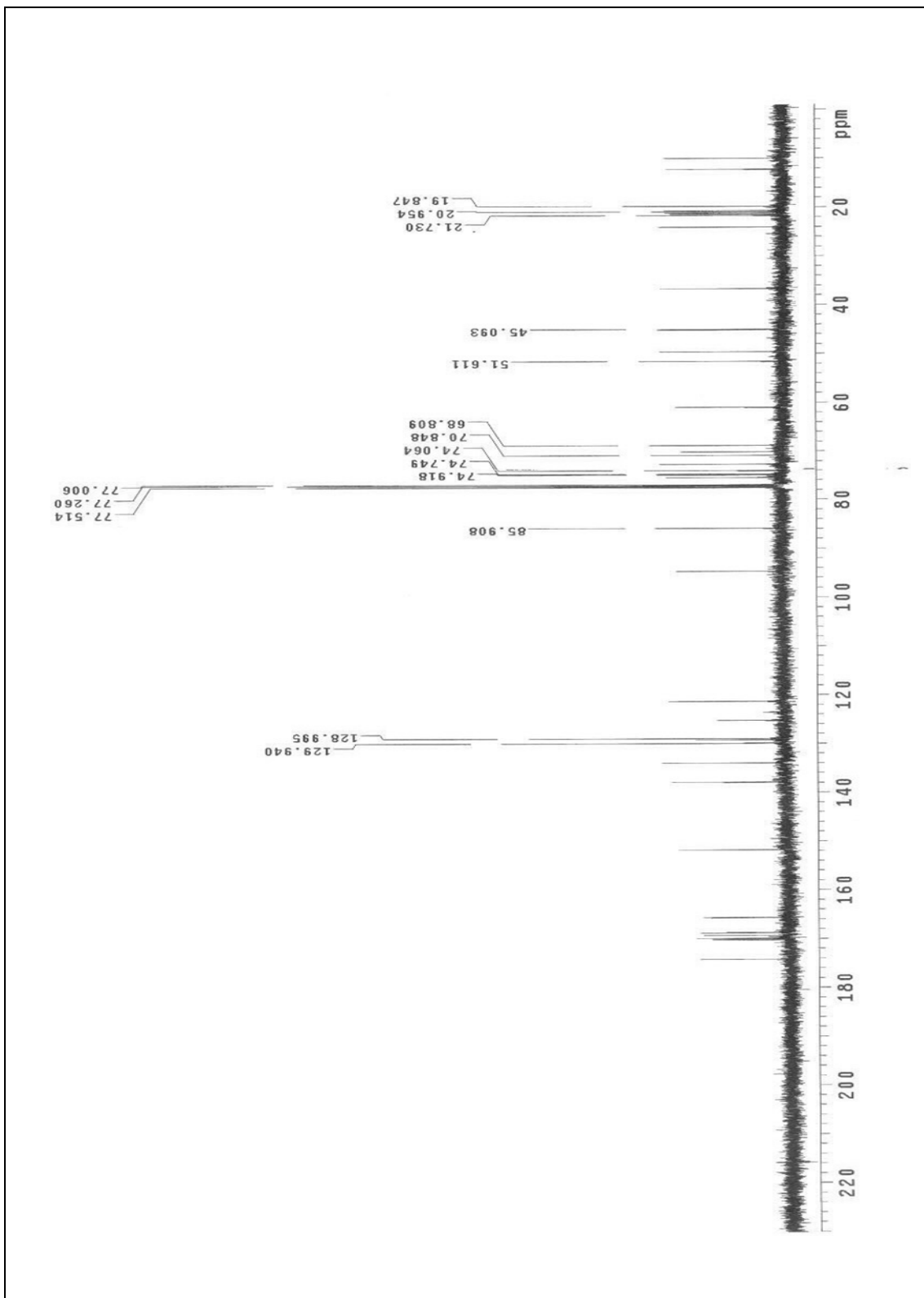


Figura 12 - Espectro de RMN de ^{13}C da substância 1 (500 MHz, CDCl_3).

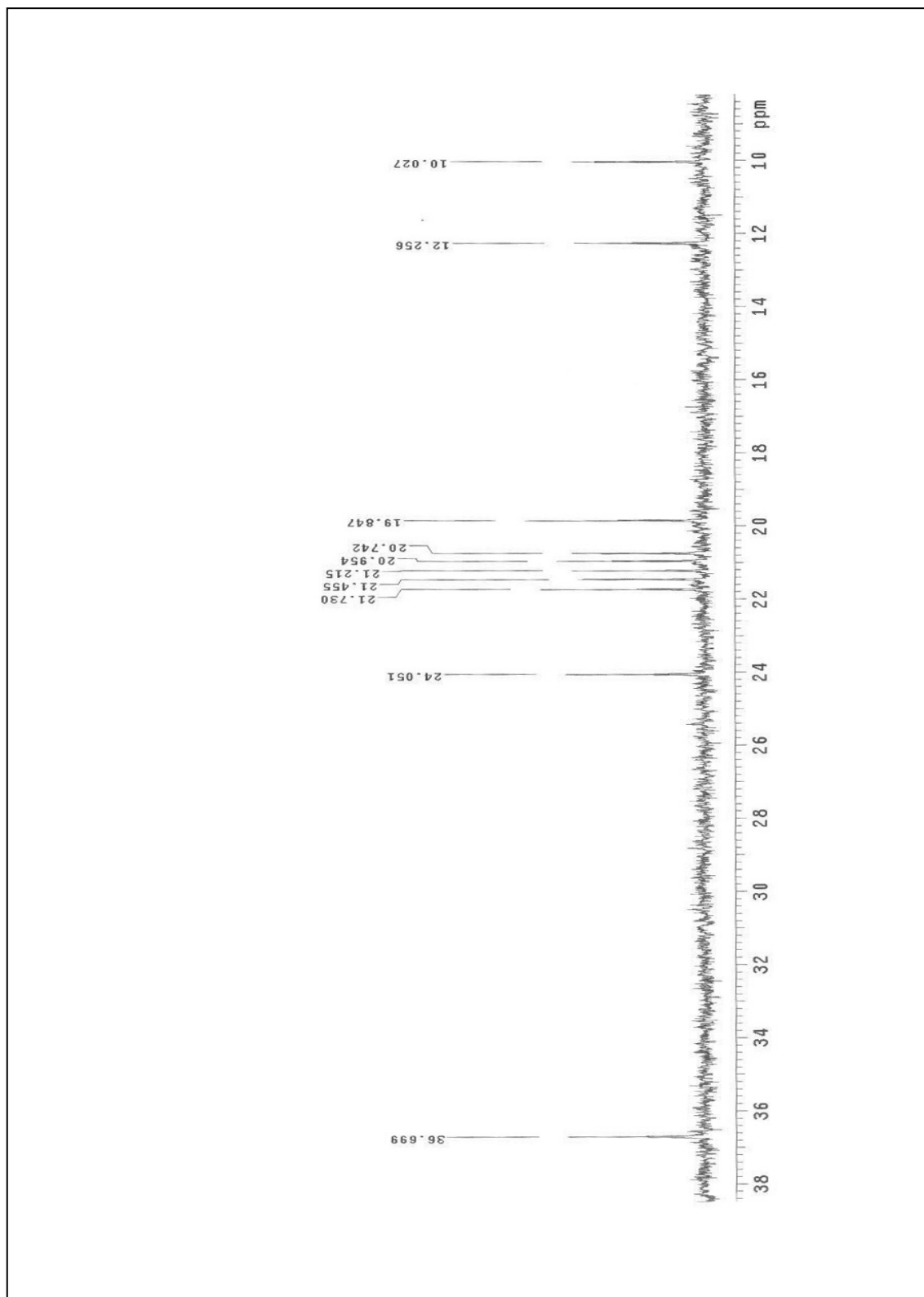


Figura 13 – Expansão da região 10,0–37,0 δ do espectro de RMN de ^{13}C da substância 1 (500 MHz, CDCl_3).

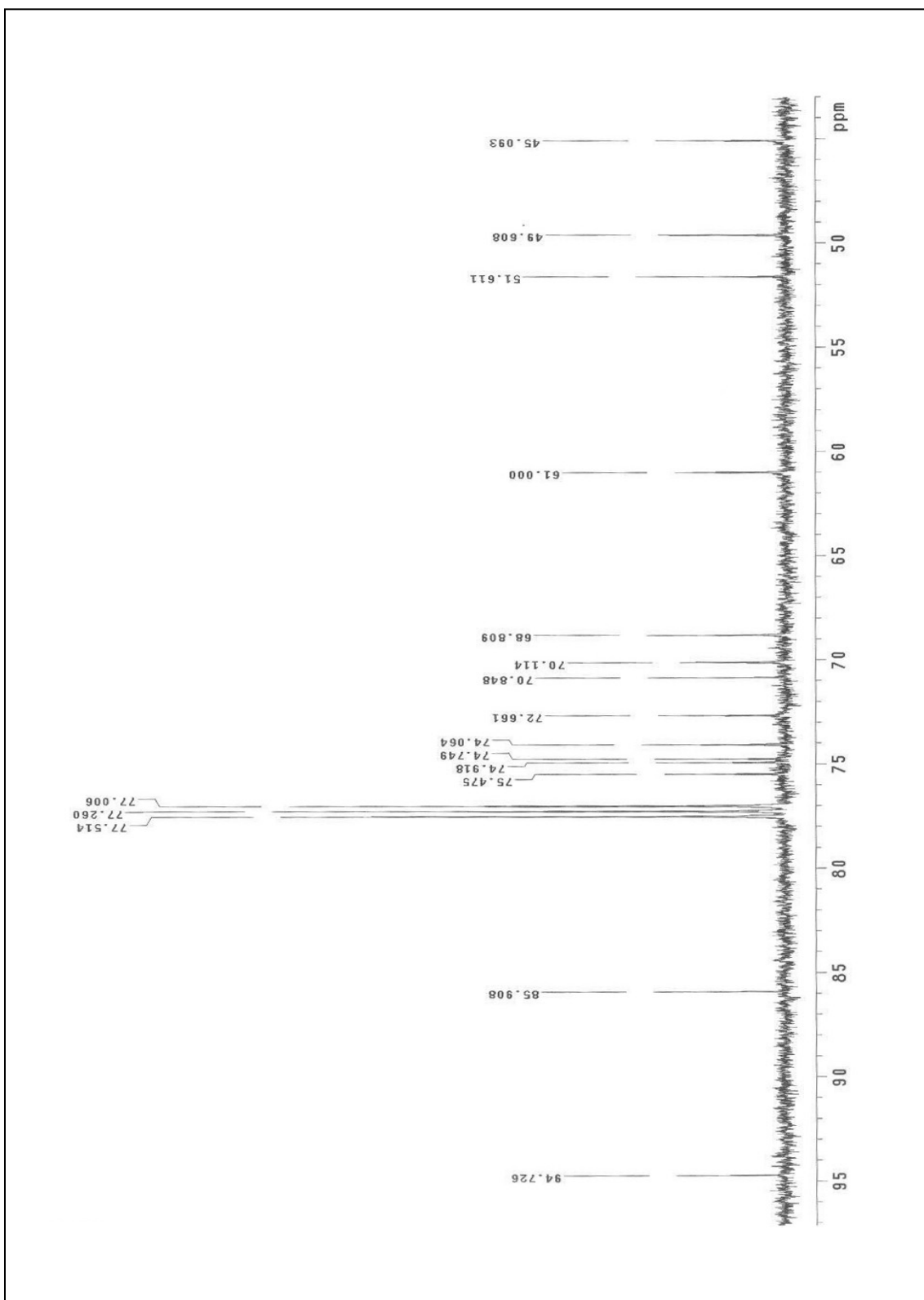


Figura 14 – Expansão da região 45,0–95,0 δ do espectro de RMN de ^{13}C da substância 1 (500 MHz, CDCl_3).

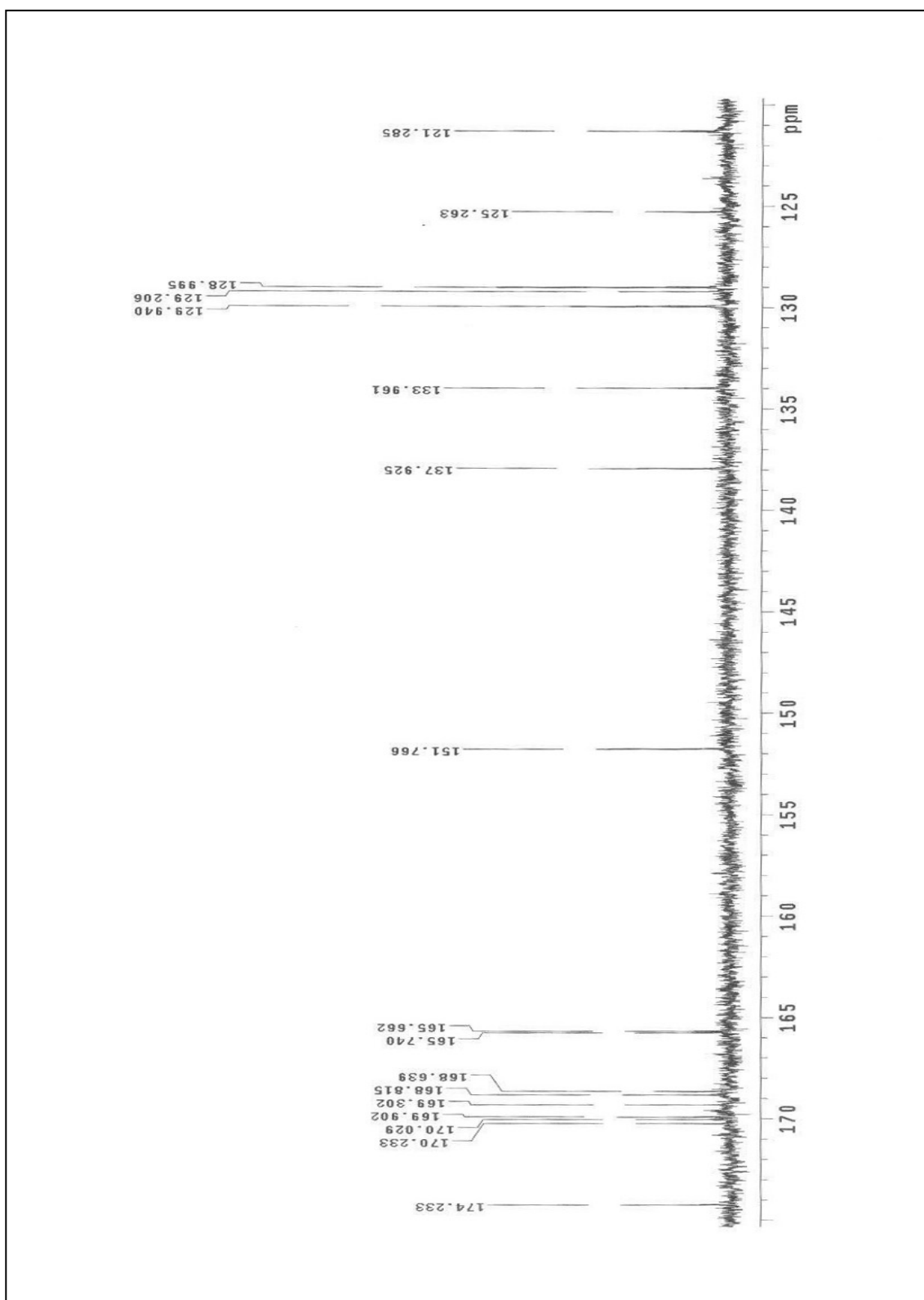


Figura 15 – Expansão da região 120,0–175,0 δ do espectro de RMN de ^{13}C da substância 1 (500 MHz, CDCl_3).

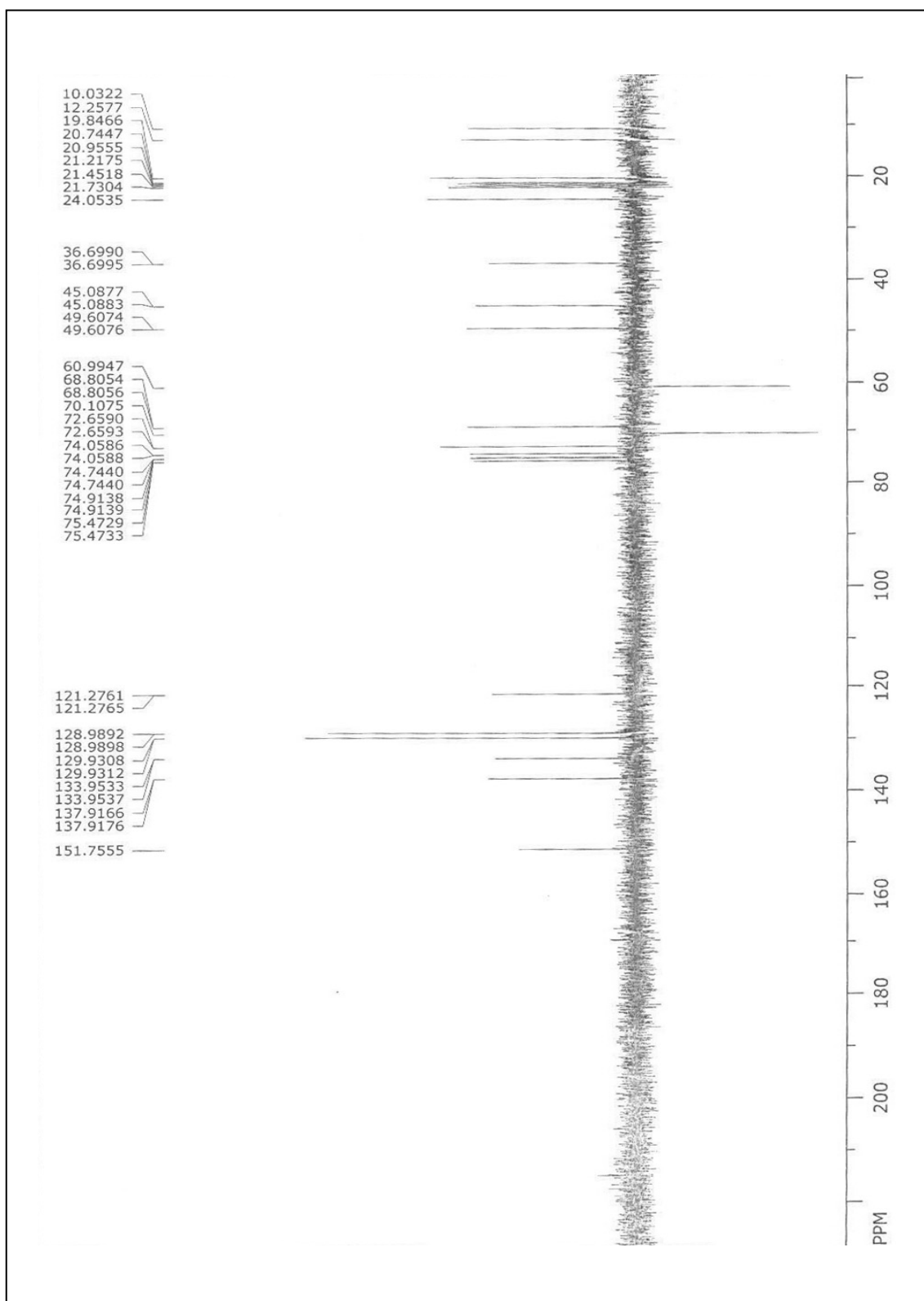


Figura 16 – Espectro de DEPT 135° da substância 1 (500 MHz, CDCl₃).

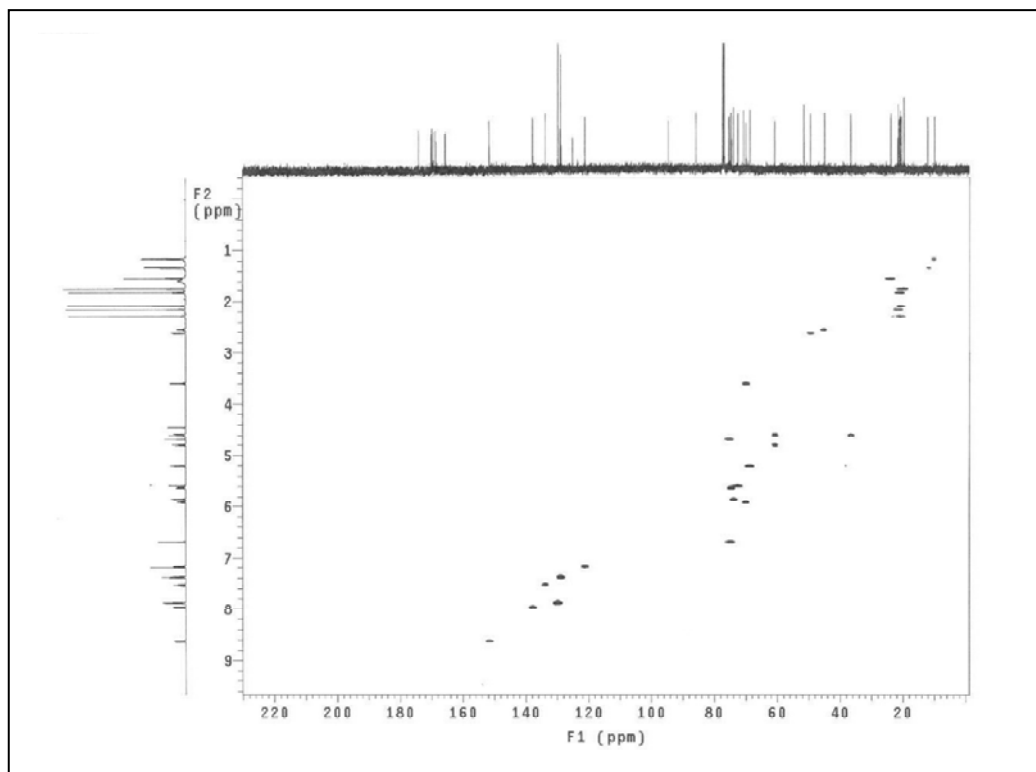


Figura 17 – Espectro de gHMQC da substância 1 (500 MHz, CDCl_3).

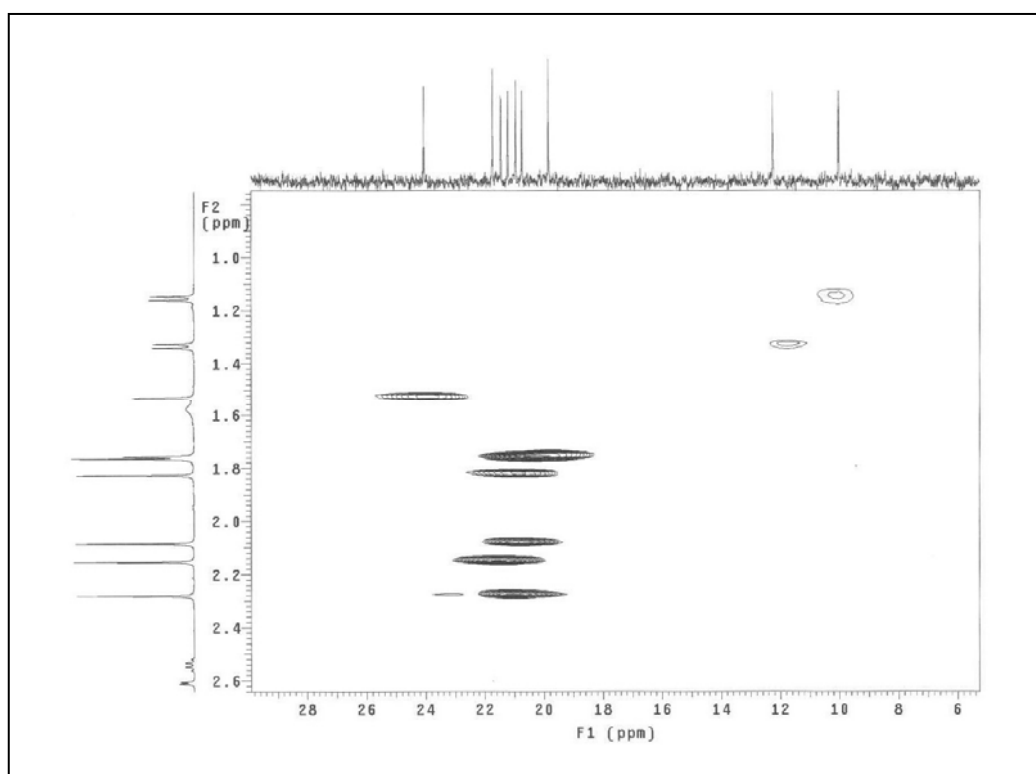


Figura 18 – Expansão do espectro gHMQC da região 8,0–28,0 δ para ^{13}C da substância 1 (500 MHz, CDCl_3).

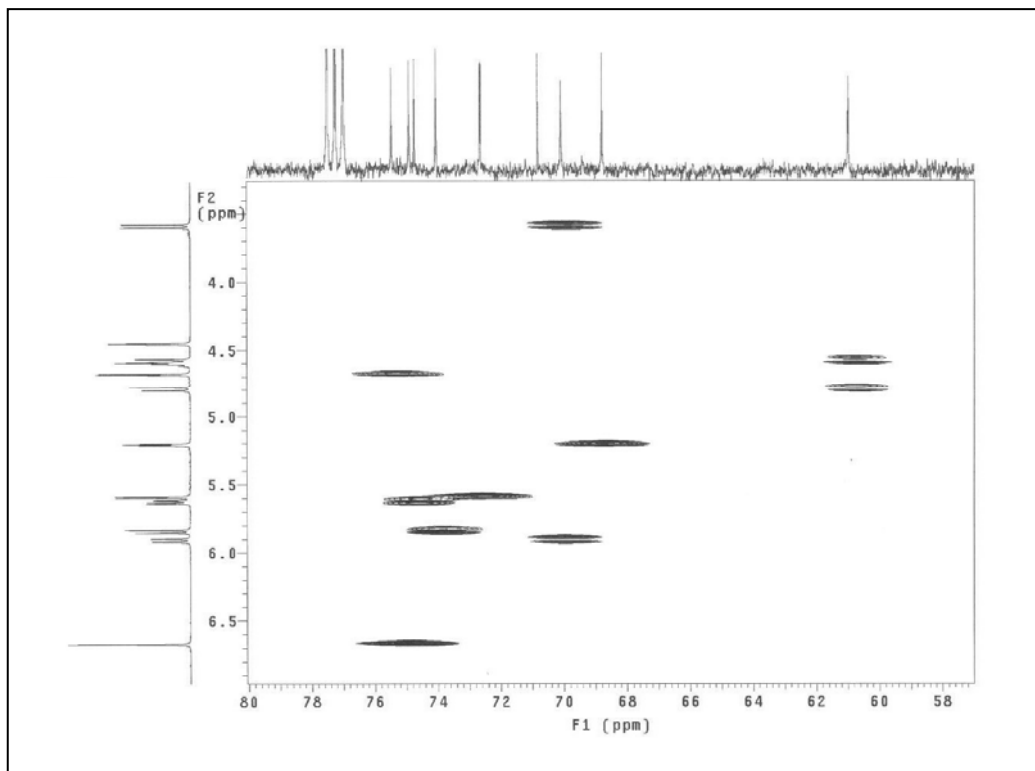


Figura 19 – Expansão do espectro gHMBC da região 58,0–80,0 δ para ^{13}C da substância 1 (500 MHz, CDCl_3).

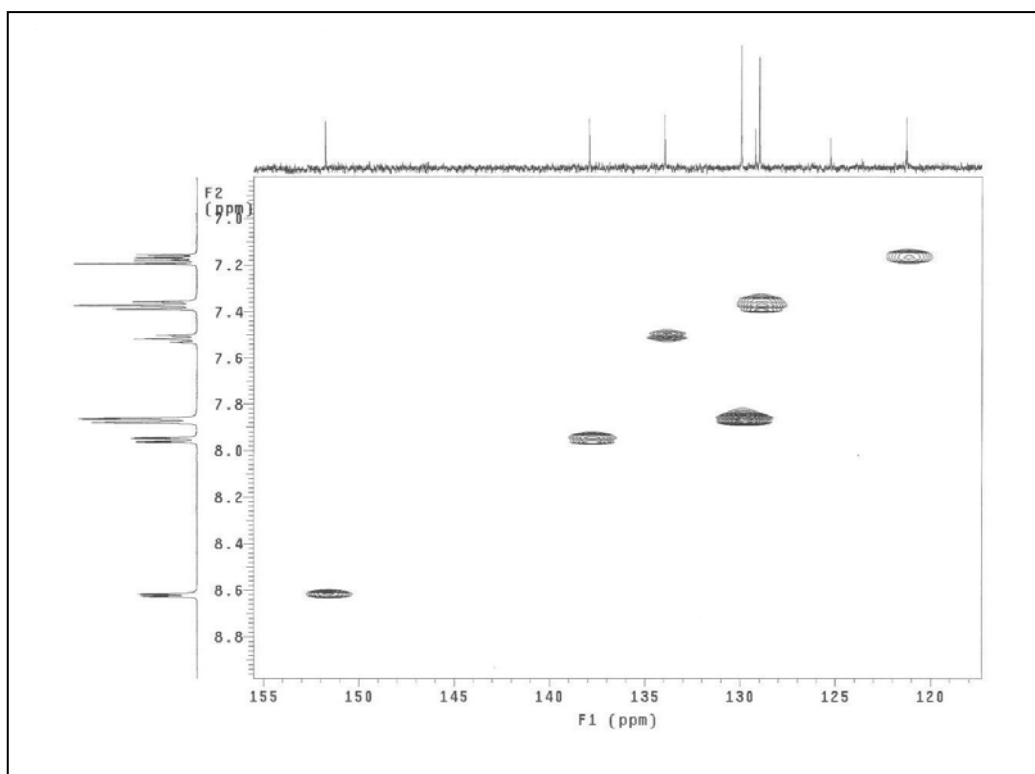


Figura 20 – Expansão do espectro gHMBC da região 120,0–155,0 δ para ^{13}C da substância 1 (500 MHz, CDCl_3).

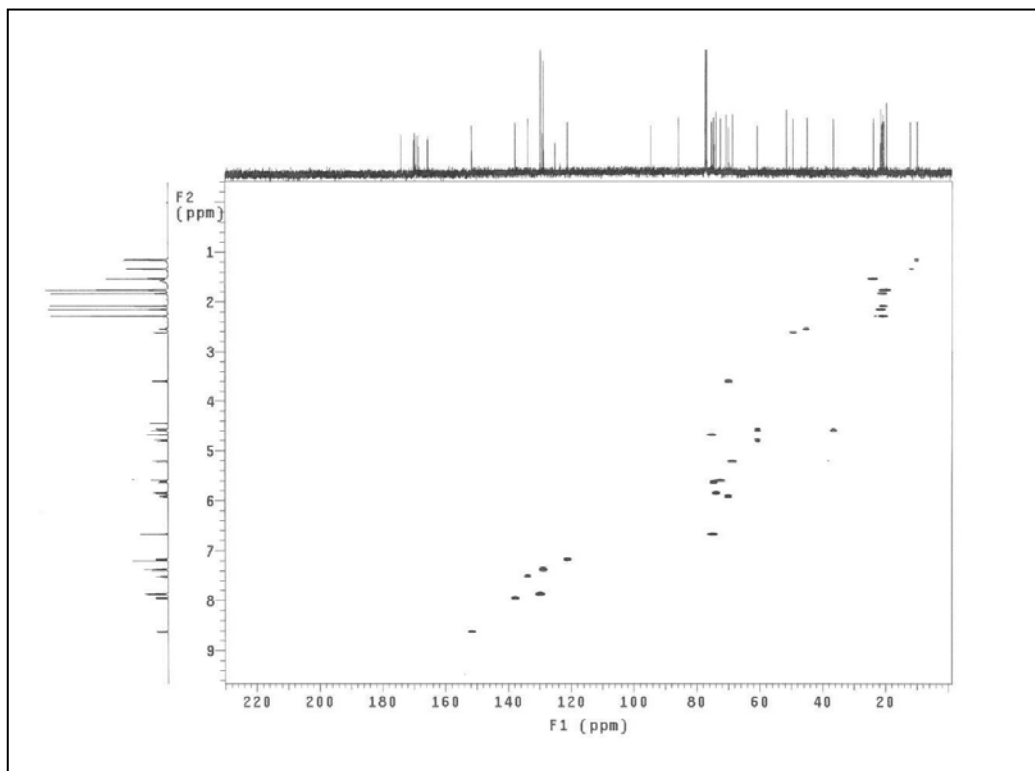


Figura 21 – Espectro de gHMBC da substância 1 (500 MHz, CDCl_3).

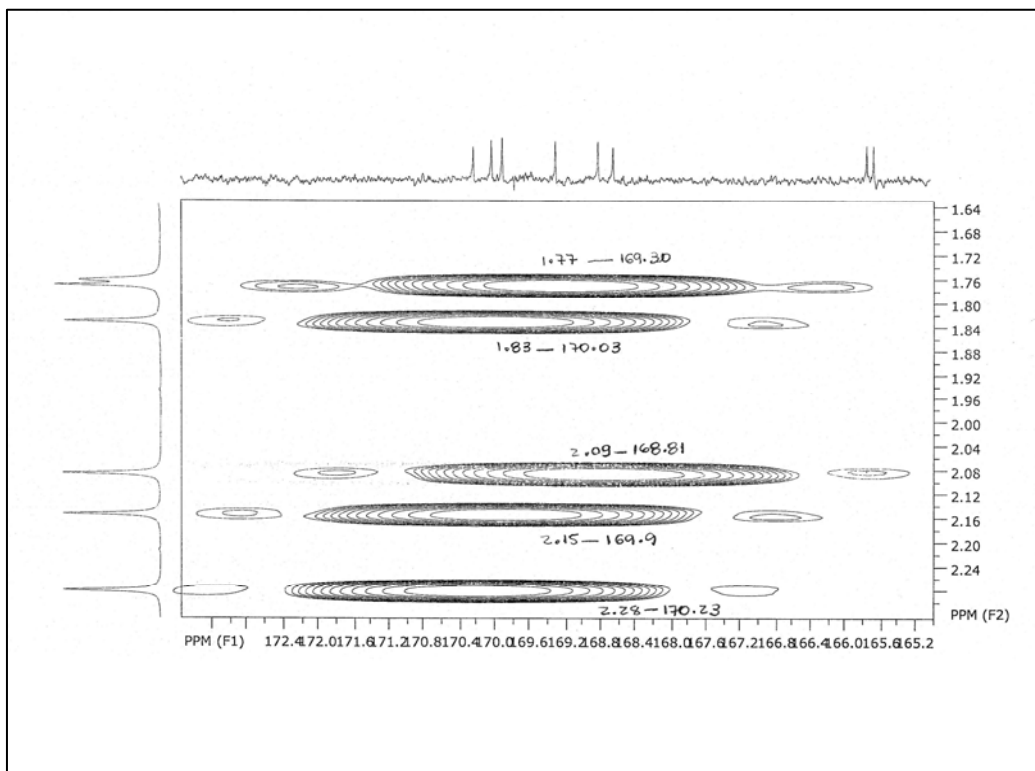


Figura 22 - Expansão do espectro gHMBC da região 165,0–172,0 δ para ^{13}C da substância 1 (500 MHz, CDCl_3).

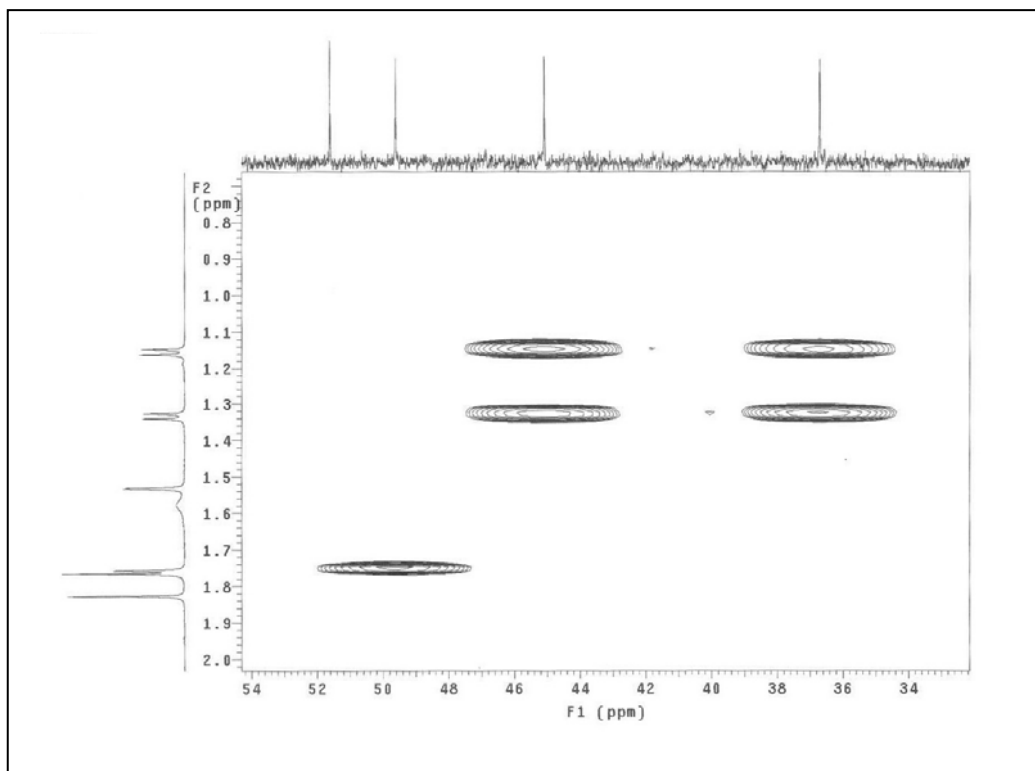


Figura 23 – Expansão do espectro gHMBC da região 34,0–54,0 δ para ^{13}C da substância 1 (500 MHz, CDCl_3).

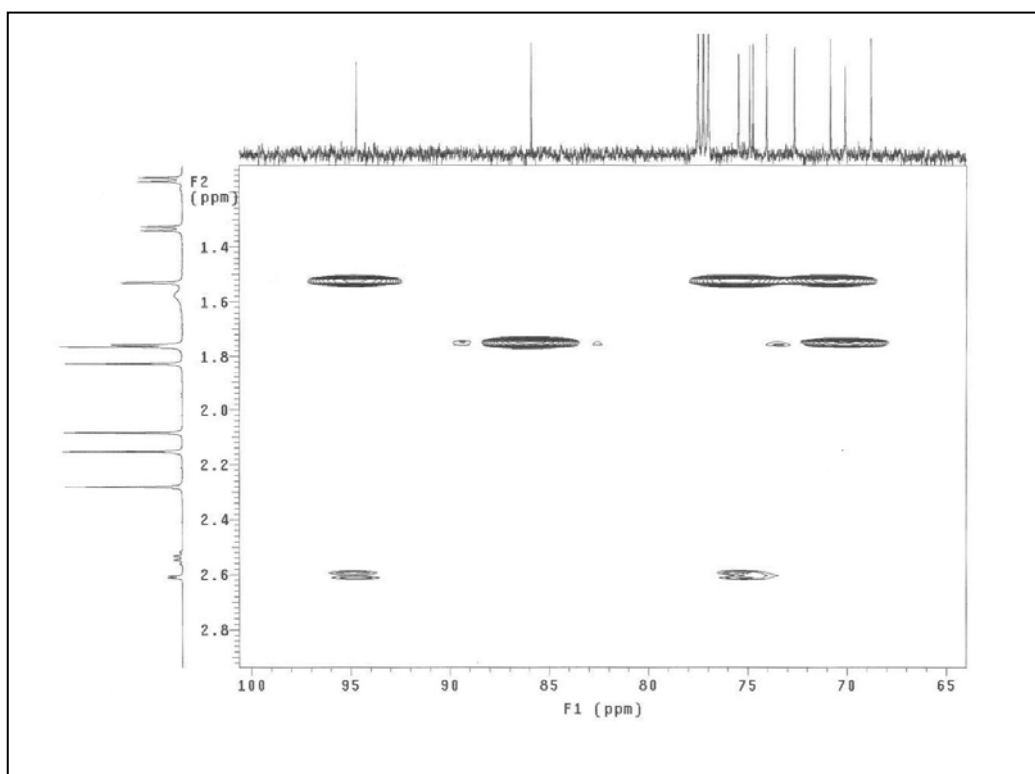


Figura 24 – Expansão do espectro gHMBC da região 65,0–100 δ para ^1H da substância 1 (500 MHz, CDCl_3).

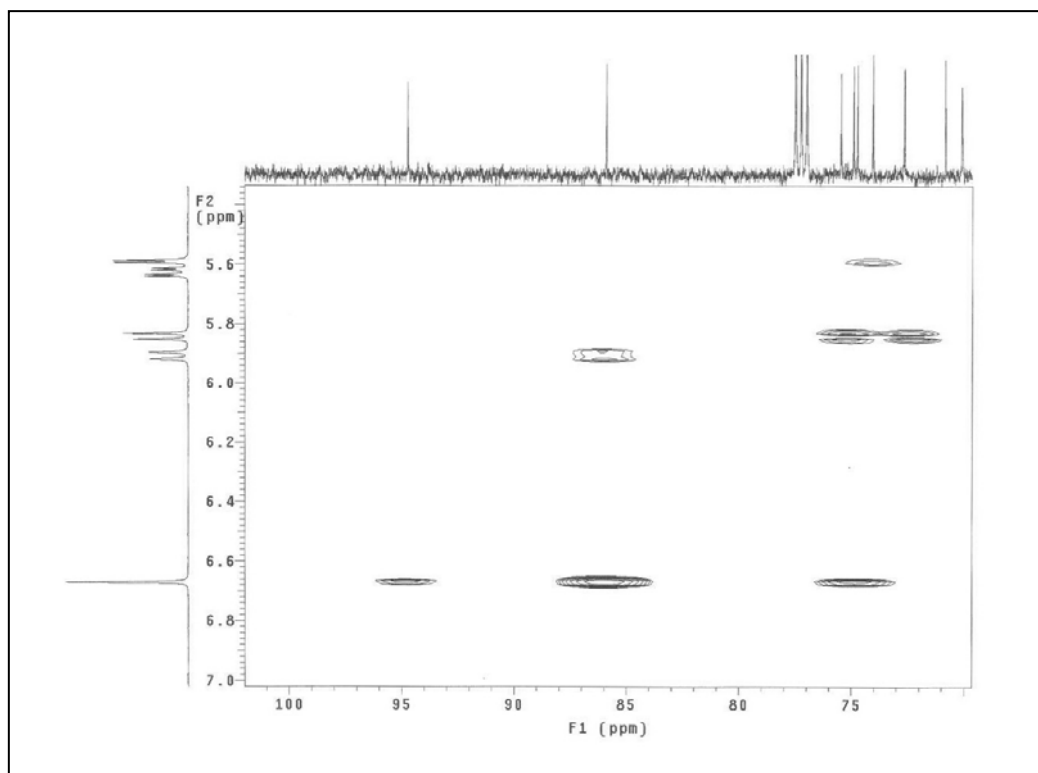


Figura 25 – Expansão do espectro gHMBC da região 70,0–100,0 δ para ^{13}C da substância 1 (500 MHz, CDCl_3).

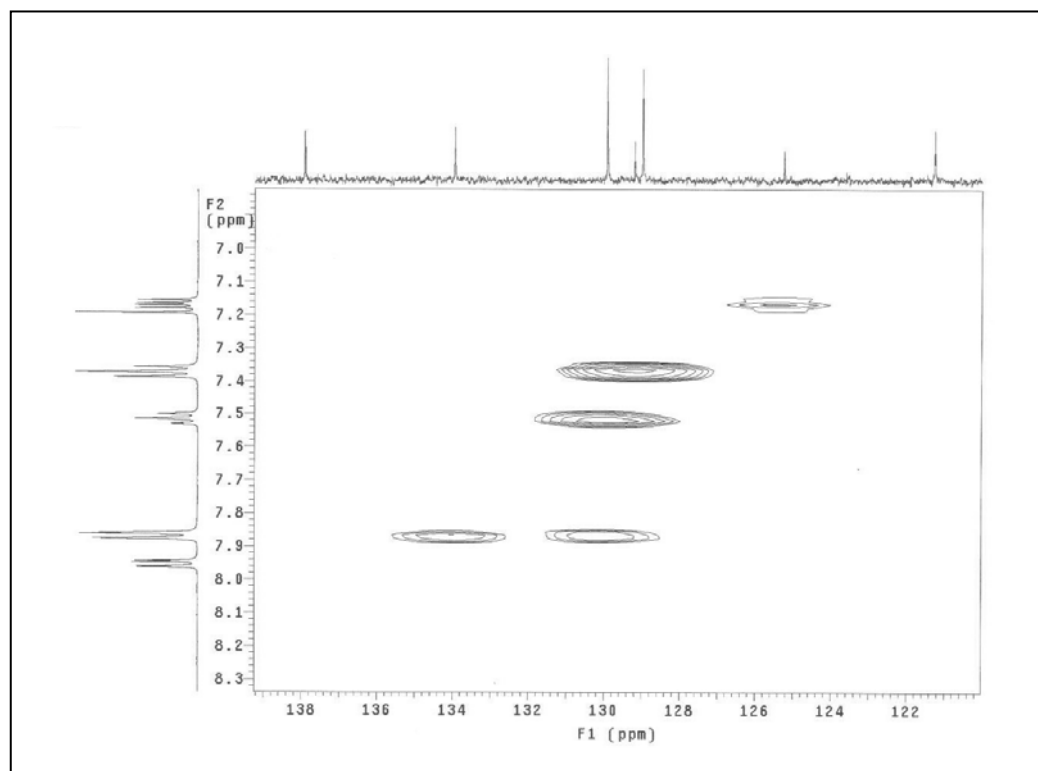


Figura 26 – Expansão do espectro gHMBC da região 121,0–138,0 δ para ^{13}C da substância 1 (500 MHz, CDCl_3).

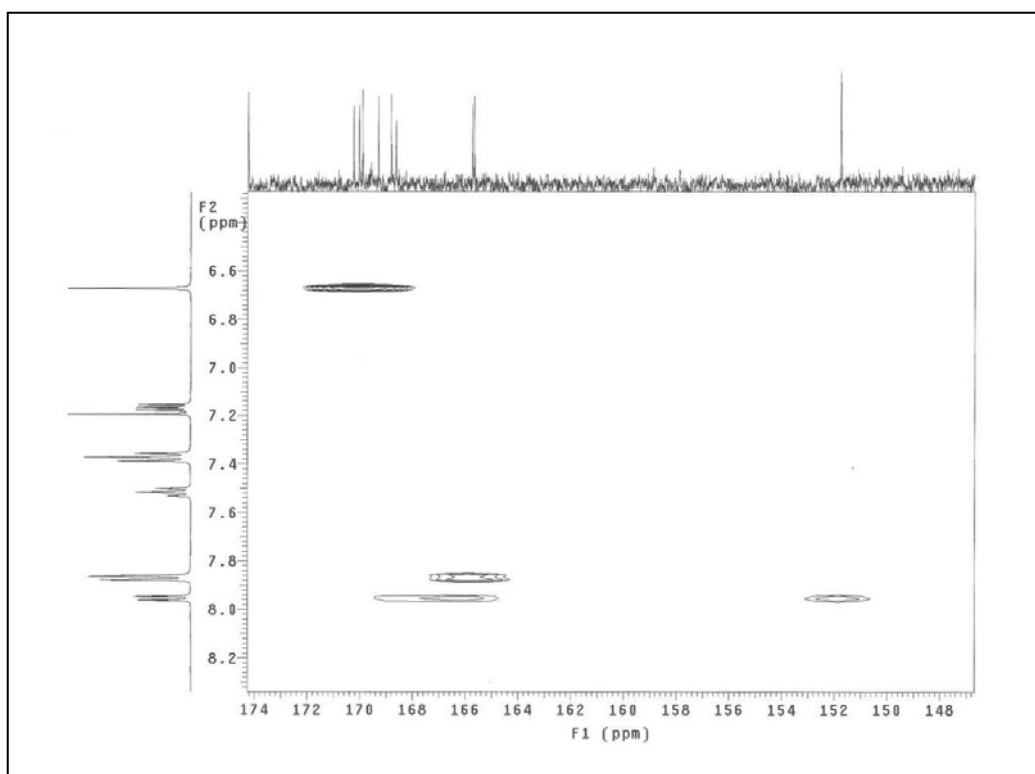


Figura 27 – Expansão do espectro gHMBC da região 148,0–174,0 δ para ^{13}C da substância 1 (500 MHz, CDCl_3).

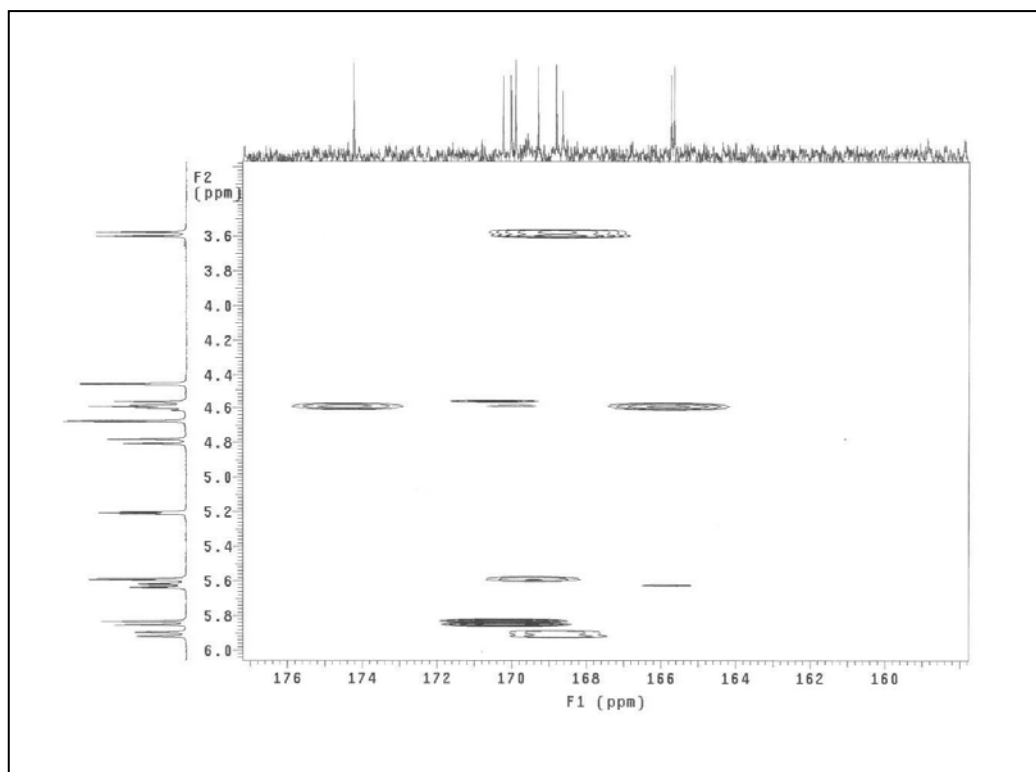


Figura 28 – Expansão do espectro gHMBC da região 150,0–176,0 δ para ^{13}C da substância 1 (500 MHz, CDCl_3).

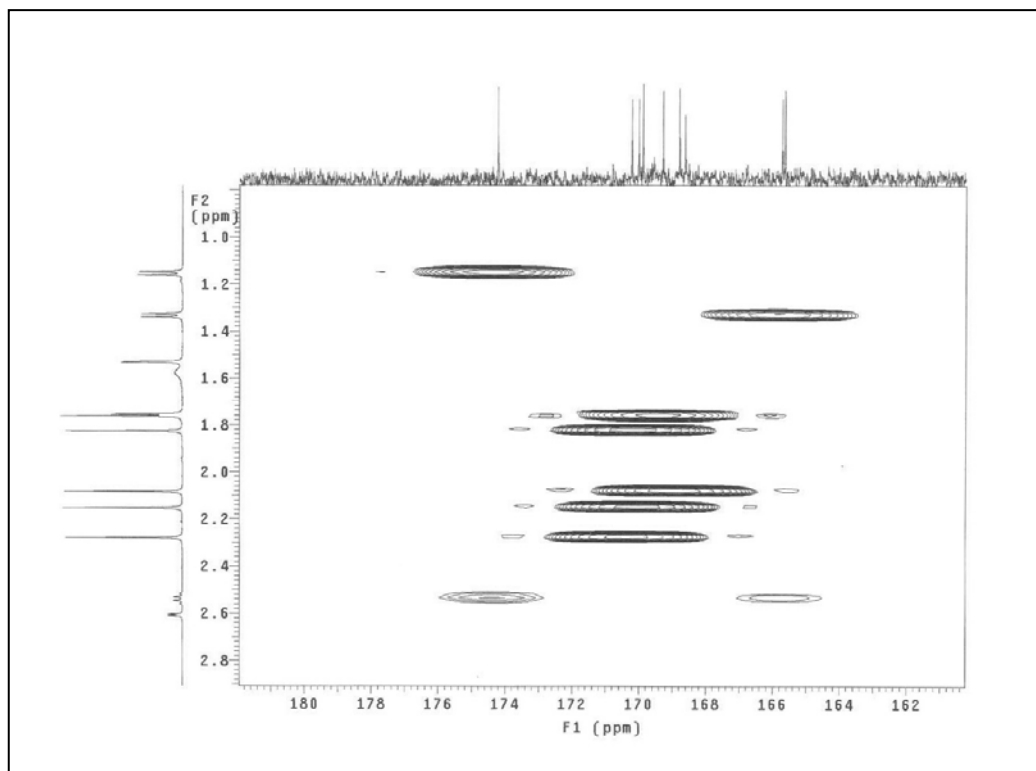


Figura 29 – Expansão do espectro gHMBC da região 161,0–180,0 δ para ^{13}C da substância 1 (500 MHz, CDCl_3).

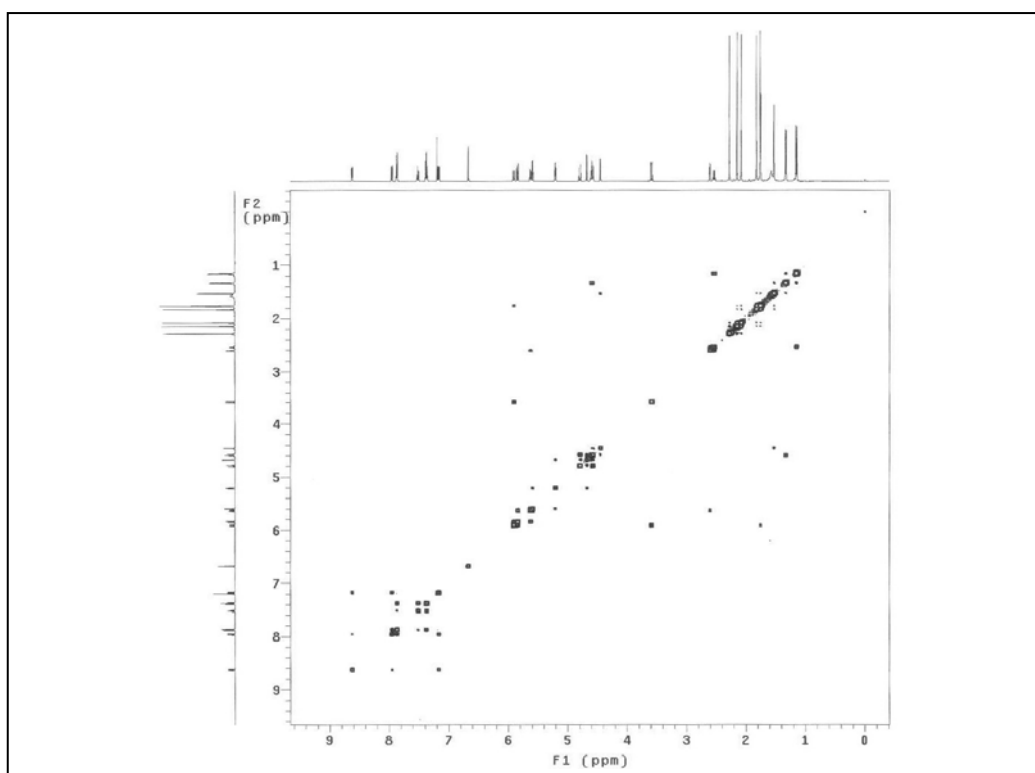


Figura 30 – Espectro de gCOSY da substância 1 (500 MHz, CDCl_3).

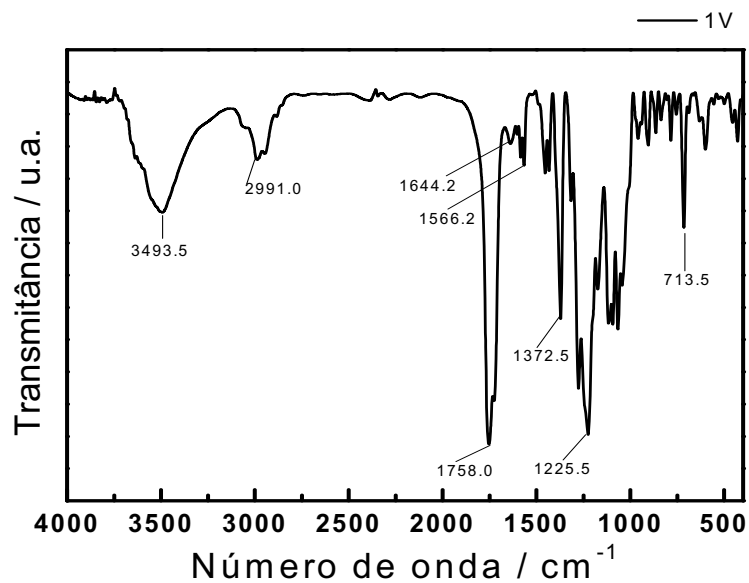


Figura 31 - Espectro no IV da substância 1, em pastilha de KBr.

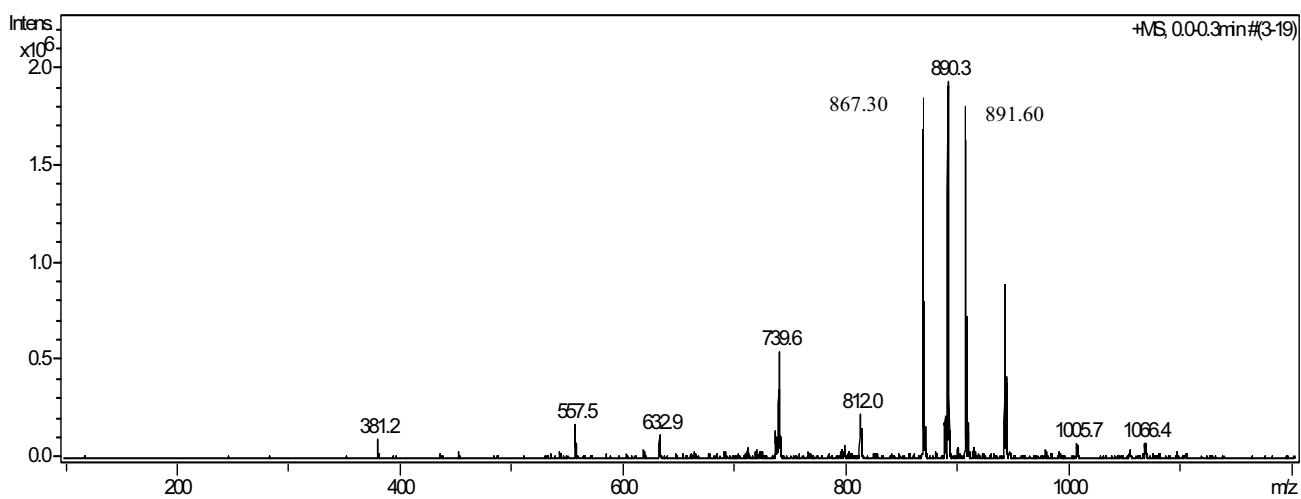
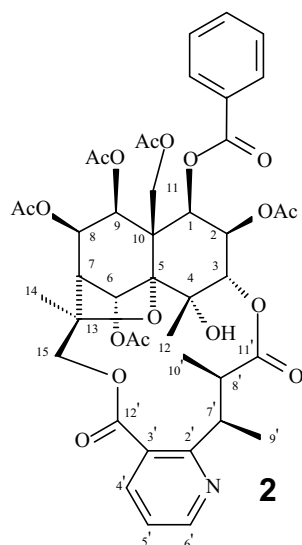


Figura 32 – Espectro de massas da substância 1.

5.3 Determinação estrutural da substância 2



O espectro de RMN de ^1H (Figuras 33-37, p. 87-91) obtido para a substância 2, apresenta sinais com padrões de multiplicidades e acoplamentos similares aos da substância 1.

A análise do espectro de RMN de ^1H (Tabela 4, p. 85, Figura 37, p. 91) da substância 2, permitiu identificar o grupo benzoato pelo duplo dubleto em 7,74 δ ($J= 7,0$ e 1,5 Hz, H-o) e dois tripletos em 7,32 δ ($J= 7,75$ Hz, H-m) e 7,46 δ ($J= 7,5$ Hz, H-p). A unidade alcaloídica foi identificada principalmente, devido à presença de três duplos dubletos em 8,05 δ ($J= 1,5$ e 7,75 Hz; H-4'), 7,24 δ ($J= 5,0$ e 7,5 Hz; H 5') e 8,67 δ ($J= 4,5$ e 1,5 Hz; H-6'), caracterizando o anel piridínico 2,3-dissubstituído.

A região do espectro de RMN de ^1H compreendida entre 6,0 e 1,0 δ é caracterizada por sinais com multiplicidades similares aos da substância 1, entretanto com variações nos deslocamentos químicos. Observam-se sinais em 5,28 δ (H-2, dd; $J= 4,0$ e 2,5 Hz); 4,73 δ (H-3, d; $J= 2,0$ Hz); 5,34 δ (H-9, d; $J= 5,75$ Hz); 5,45 δ (H-8, dd; $J= 6,0$ e 4,0 Hz); 2,29 δ (H-7, d; $J= 4,0$ Hz); 5,27 δ (H-11a, d; $J= 13,5$ Hz); 4,59 δ (H-11b, d; $J= 13,5$ Hz); 1,51 δ (H-12, d; $J= 1,0$ Hz); 5,89 δ (H-15a, d; $J= 11,5$ Hz); 3,65 δ (H-15b, d; $J= 11,5$ Hz) e um singleto em 6,98 δ , atribuído ao H-6, caracterizando a unidade sesquiterpênica.

A análise do espectro de RMN de ^{13}C (Figura 39, p. 93), permitiu atribuir os sinais relativos aos carbonos carbonílicos dos grupos acetoxílicos em 168,40; 168,84; 169,82; 169,90 e 170,31 δ . Estes sinais mostraram correlação, no

espectro de gHMBC (Figura 49, p. 98), com os singletos em 2,09; 1,33; 2,14; 2,05 e 2,27 δ , respectivamente, sendo que a posição destes grupos acetoxílicos, no sistema decalínico, foi também definida a partir da análise do espectro de gHMBC (Figura 48, p. 98) à partir da correlação com os sinais em 5,28 δ (H-2 α , dd; J = 4,0 e 2,5 Hz); 5,34 δ (H-9 α , d; J = 5,75 Hz); 6,98 δ (H-6 β , s); 5,45 δ (H-8 α , dd; J = 6,0 e 4,0 Hz) e 4,59 e 5,27 δ (H-11a, b, d; J = 13,5 Hz). No espectro de gHMQC (Figura 42, p. 95) foram observadas as correlações diretas entre os sinais dos carbonos e hidrogênios das referidas metilas dos grupos acetoxílicos localizadas em C-2 (δ_H 2,09; δ_C 20,91); C-6 (δ_H 2,14; δ_C 21,58); C-8 (δ_H 2,05; δ_C 20,83); C-9 (δ_H 1,33; δ_C 19,82) e C-11 (δ_H 2,27; δ_C 21,31). Essas correlações e as demais observadas no espectro de gHMQC estão relacionadas na tabela 4, p. 85.

O alcalóide **1** difere de **2** na localização do grupo benzoato, sendo que em **1** encontra-se na posição 8, enquanto que na substância **2** encontra-se ligado na posição 1. Este fato pode ser confirmado pelo mapa de contorno de gHMBC (Figura 48, p. 98) que exibiu a correlação entre o sinal em 5,81 δ_H e o sinal em 164,50 δ_C (C-1), corroborando a estrutura proposta deste alcalóide piridínico sesquiterpênico, denominado de maiteina (Hideji et al.; 1993). Essa carbonila também apresenta correlação com o hidrogênio orto, confirmando que esta carbonila é do grupo benzoato.

Os demais sinais foram atribuídos com base nos dados de RMN de 1H , RMN de ^{13}C , gHMQC, gHMBC, DEPT, IV, EM obtidos para **2**, além da comparação com dados da literatura.

O dado obtido de rotação óptica específica foi de $[\alpha]_D^{23,1} = -21.07$ (CHCl₃, c 0,2 g/100 mL).

Tabela 4. Dados de RMN de ^1H e RMN-2D (CDCl_3 , 500 MHz) da substância 2.

H	δ (ppm), Mult. J (Hz)	δ ^{13}C (ppm)	gHMBC	gCOSY
1	5,81 d (4,0)	73,45 (CH)	164,50 (OBz)	N.O.
2	5,28 dd (2,0 e 4,0)	69,15 (CH)	N.O.	N.O.
3	4,73 d (2,0)	75,65 (CH)	94,07(C-5); 173,92 (C-11')	N.O.
4	-----	70,55 q	-----	-----
4-OH	4,42 d (1.0)	-----	22,86(C-12)	N.O.
5	-----	94,07 q	-----	-----
6	6,98 s	73,80 (CH)	84,34(C-13); 94,07(C-5); 169,82(Ac-6)	N.O.
7	2,29 d (4,0)	50,42 (CH)	94,07(C-5)	N.O.
8	5,45 dd (4,0 e 6,0)	69,15 (CH)	169,90(Ac-8)	N.O.
9	5,34 d (6,0)	71,34 (CH)	73,45(C-1); 168,84 (Ac-9)	N.O.
10	-----	52,52 q	-----	-----
11a	4,59 d (13,5)	60,00 (CH_2)	94,07(C-5)	5,27(H-11b)
11b	5,27 d (13,5)	60,00 (CH_2)	170,31(Ac-11)	5,81(H-1)
12	1,51 d (1,0)	22,86 (CH_3)	94,07(C-5); 75,65(C-3); 70,55(C-4)	N.O.
13	-----	84,34 q	-----	-----
14	1,65 s	18,39 (CH_3)	50,42(C-7); 84,34(C-13); 69,97(C-15)	N.O.
15a	3,65 d (11,5)	69,97 (CH)	168,39(C-12')	5,89(H-15b)
15b	5,89 d (11,5)	69,97 (CH)	18,39(C-14); 168,39 (C-12')	N.O.
2'	-----	165,22 q	-----	-----
3'	-----	125,12 q	-----	-----
4'	8,05 dd (1,5 e 7,50)	137,88 (CH)	151,36(C-6'); 165,22 (C-2'); 168,39(C-12')	N.O.
5'	7,24 dd (5,0 e 7,50)	121,14 (CH)	125,12(C-3')	8,67(H-6') 8,05(H-4')
6'	8,67 dd (1,5 e 5,0)	151,36 (CH)	137,88(C-4')	-----
7'	4,61 q (7,0)	36,47 (CH)	9,77(C-10'); 11,88 (C-9'); 165,22(C-2'); 173,92(C-11')	N.O.
8'	2,54 q (7,0)	44,90 (CH)	165,22(C-2'); 173,92 (C-11')	N.O.
9'	1,36 d (7,0)	11,80 (CH_3)	36,47(C-7'); 44,90 (C-8'); 165,22(C-2')	4,61(H-7')
10'	1,16 d (7,0)	9,77 (CH_3)	36,47(C-7'); 44,90 (C-8'); 173,92(C-11')	2,54(H-8')

11'	-----	173,92 q	-----	-----
12'	-----	168,39 q	-----	-----
2-CH ₃ CO	2,09 s	20,91	168,40(Ac-2)	N.O.
2-CH ₃ CO	-----	168,40	-----	-----
6-CH ₃ CO	2,14 s	21,58	169,82(Ac-6)	N.O.
6-CH ₃ CO	-----	169,82	-----	-----
8-CH ₃ CO	2,05 s	20,83	169,90(Ac-8)	N.O.
8-CH ₃ CO	-----	169,90	-----	-----
9-CH ₃ CO	1,33 s	19,82	168,84(Ac-9)	N.O.
9-CH ₃ CO	-----	168,84	-----	-----
11- CH ₃ CO	2,27	21,31	170,30(Ac-11)	N.O.
11- CH ₃ CO	-----	170,31	-----	-----
COPh	-----	164,50	-----	-----
ipso	-----	129,10	-----	-----
orto	7,74 dd (1,5 e 7,5)	129,45 (CH)	133,43(C-4''); 164,50 (OBz); 129,11 (C-1'')	N.O.
meta	7,32 t like (7,5)	128,47 (CH)	129,11(C-1'')	7,74(Ho); 7,46(Hp)
para	7,46 t like (7,5)	133,43 (CH)	129,11(C-1'')	-----

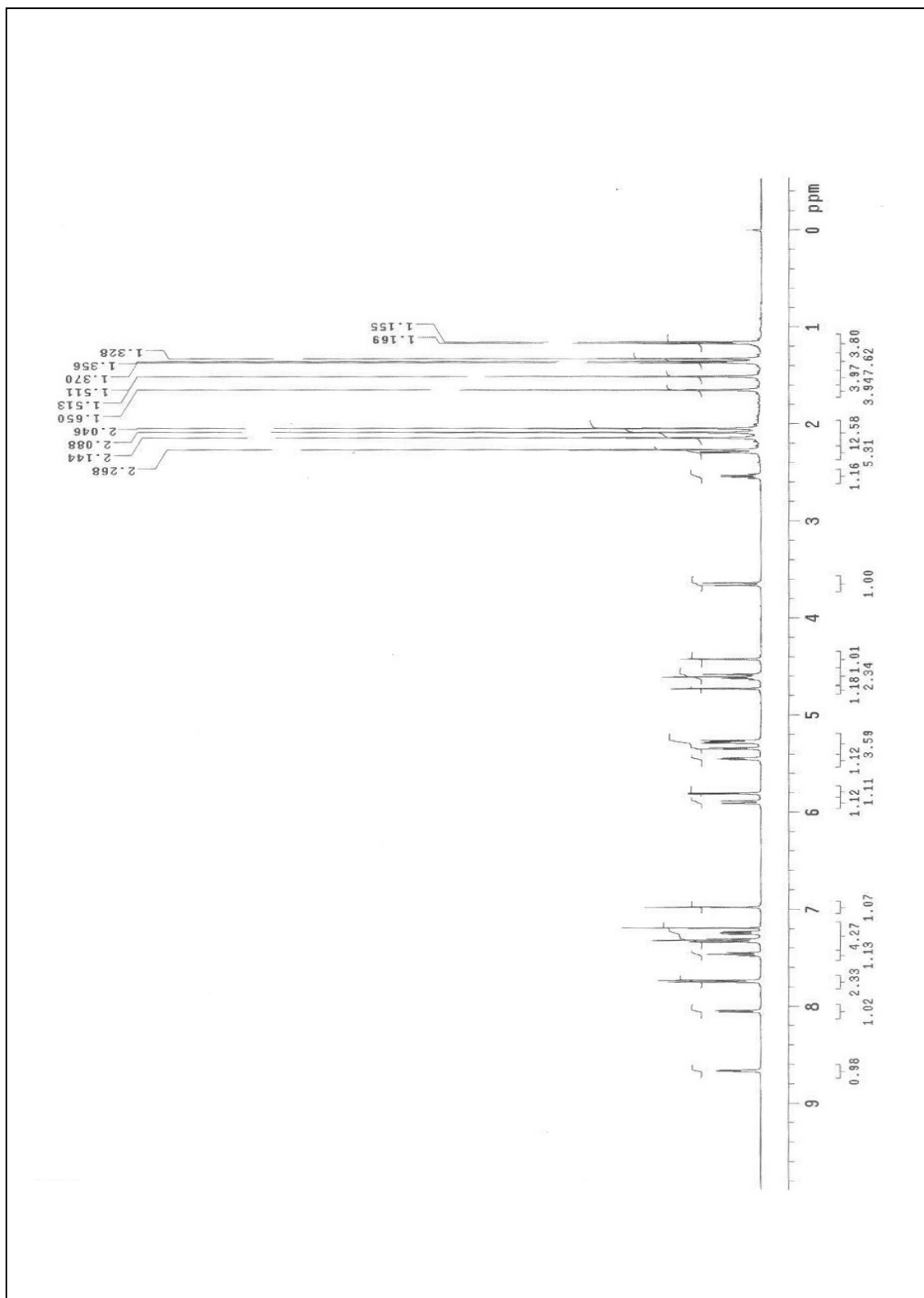


Figura 33 – Espectro de RMN de ^1H da substância 2 (500 MHz, CDCl_3).

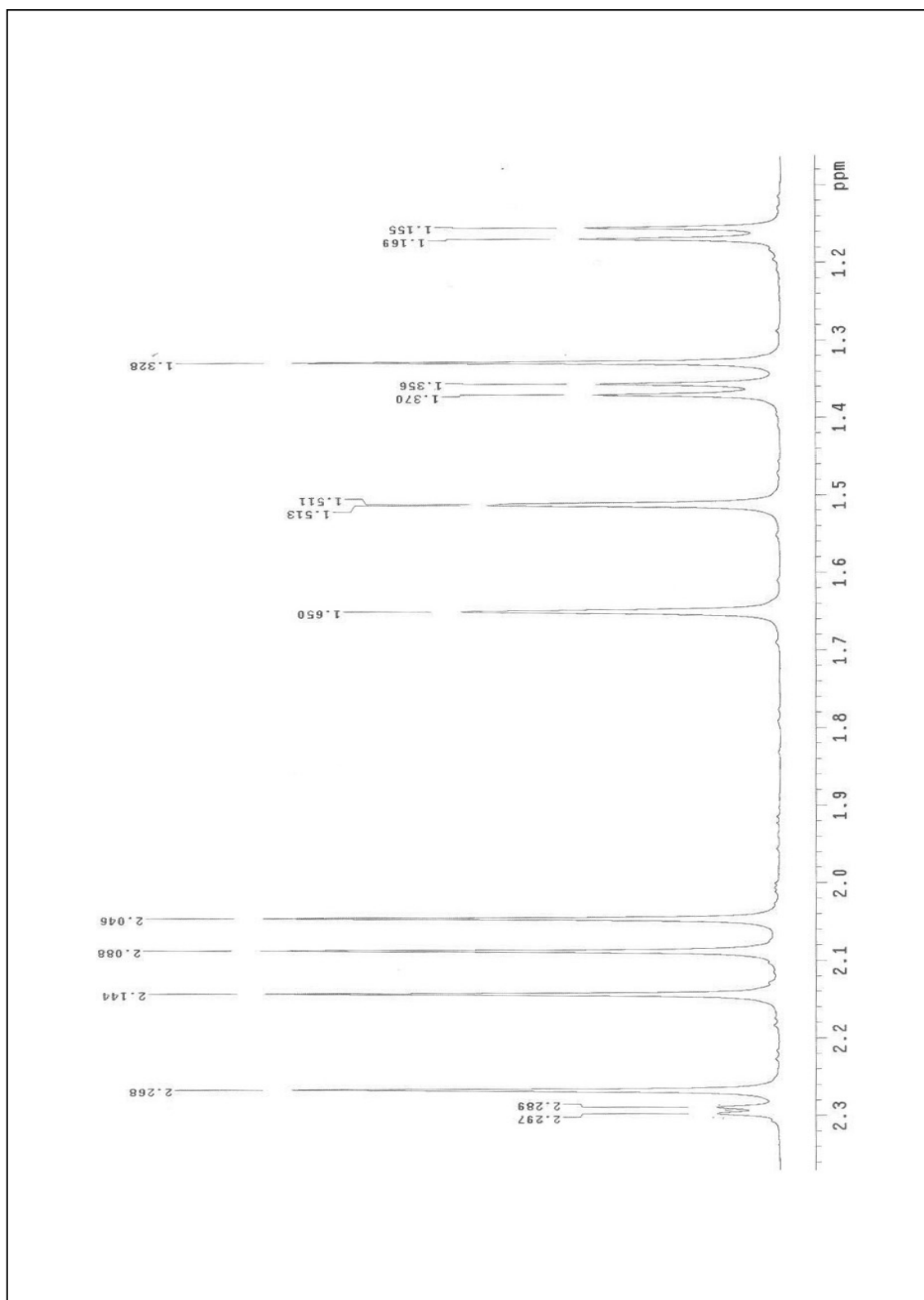


Figura 34 – Espectro de RMN de ¹H da substância 2 (500 MHz, CDCl₃).

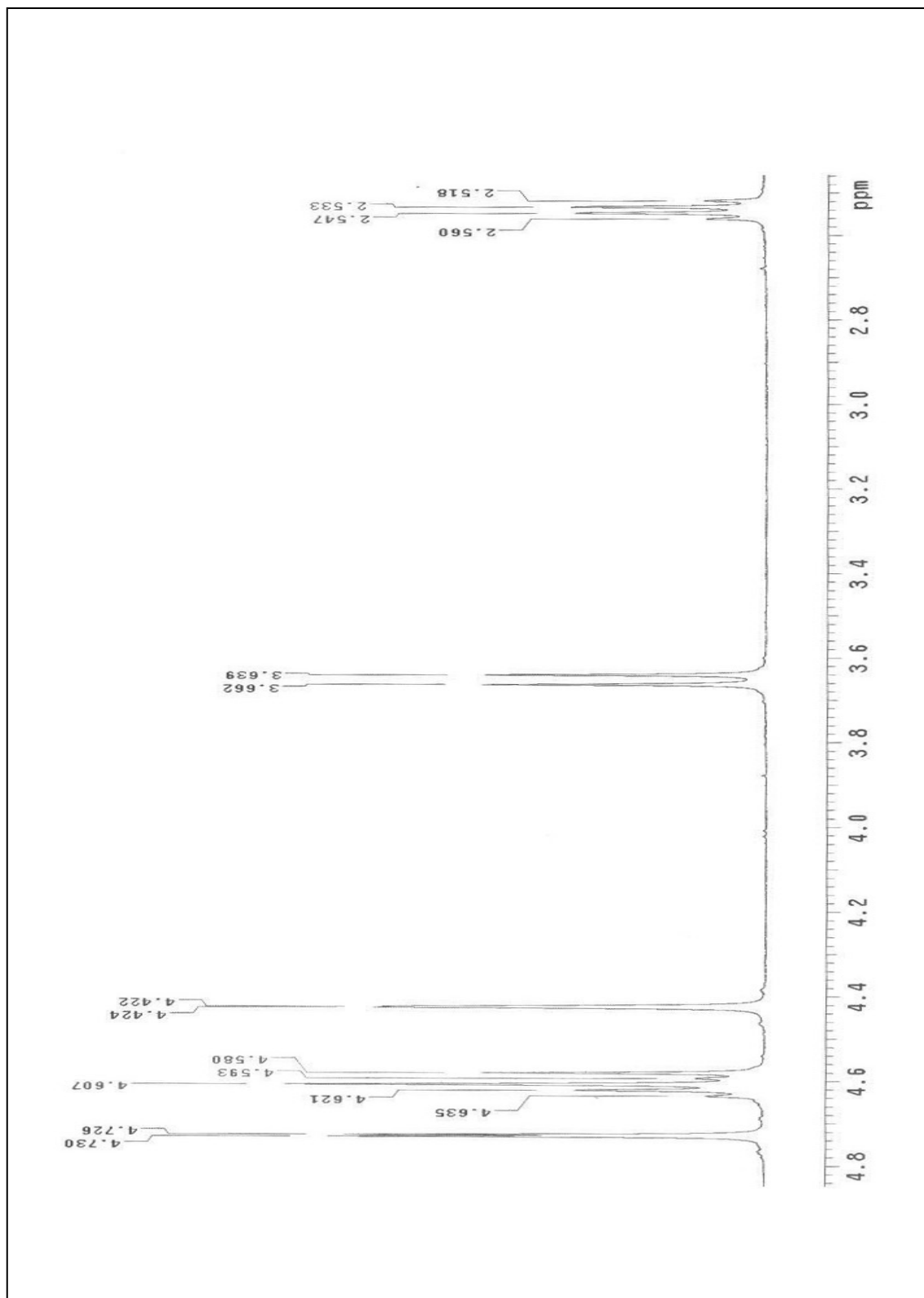


Figura 35 - Expansão da região 2,5–4,8 δ do espectro de RMN de ^1H da substância 2 (500 MHz, CDCl_3).

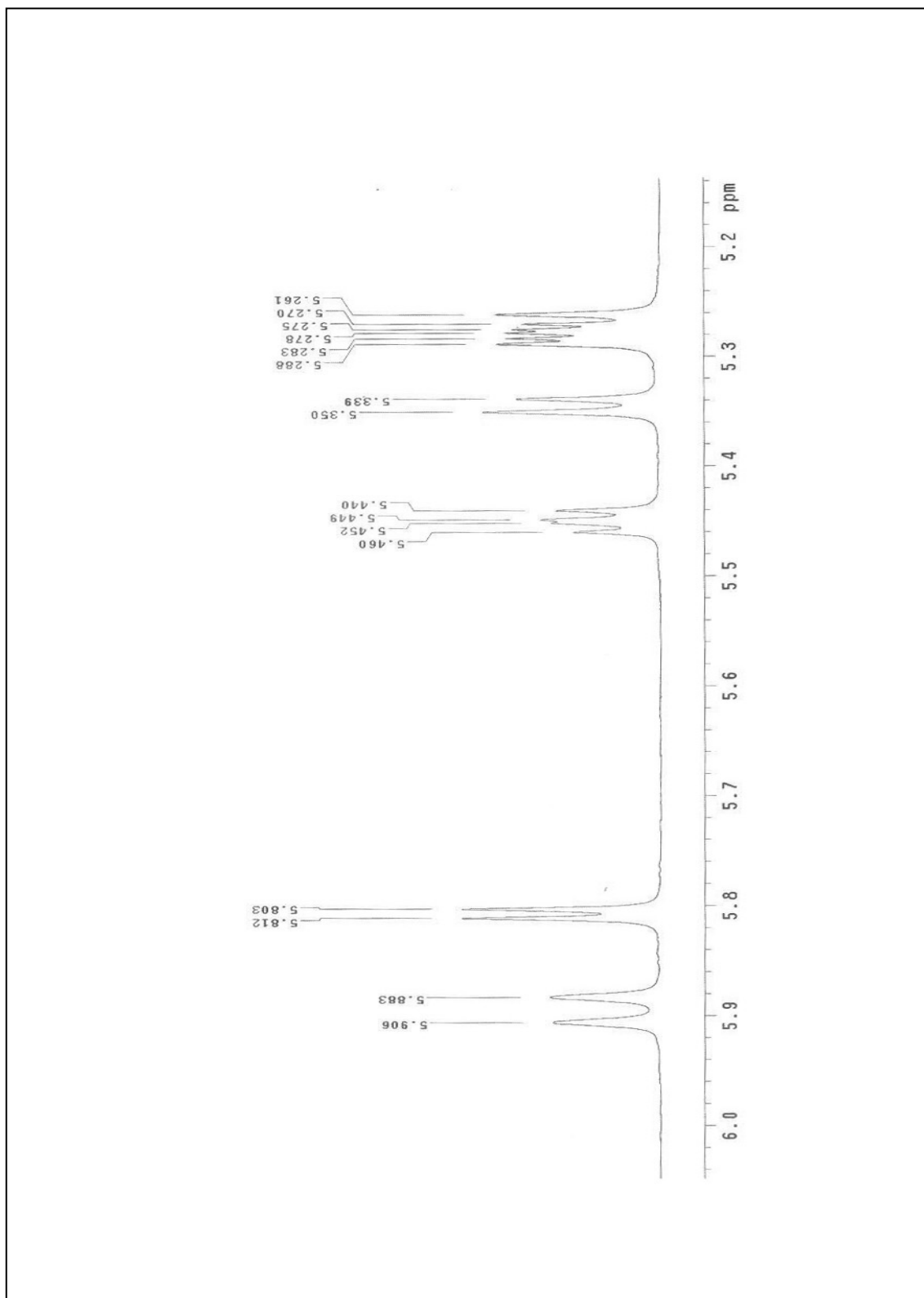


Figura 36 – Expansão da região 5,0–6,0 δ do espectro de RMN de ¹H da substância 2 (500 MHz, CDCl₃).

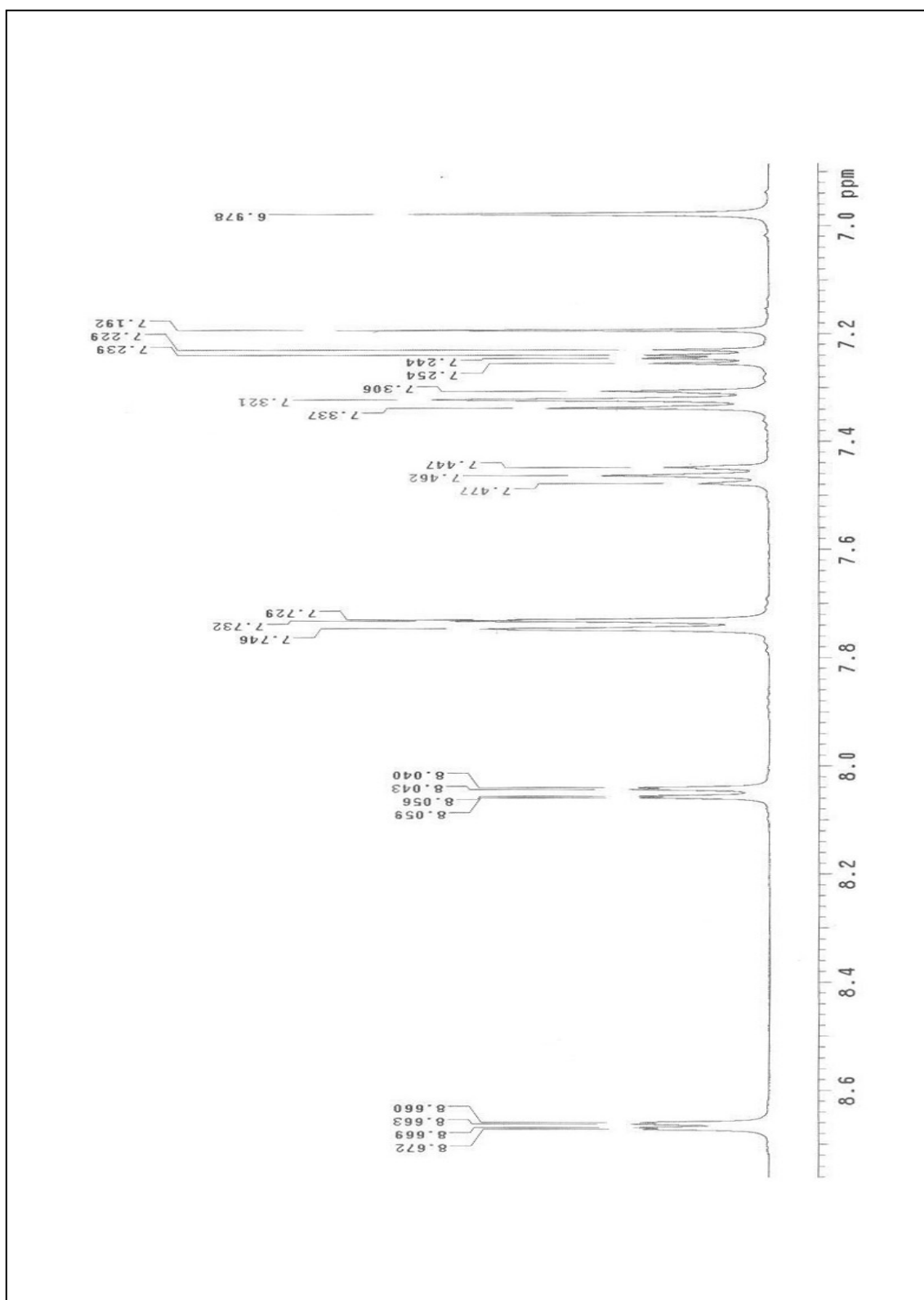


Figura 37 – Expansão da região 6,0–8,6 δ do espectro de RMN de ^1H da substância 2 (500 MHz, CDCl_3).

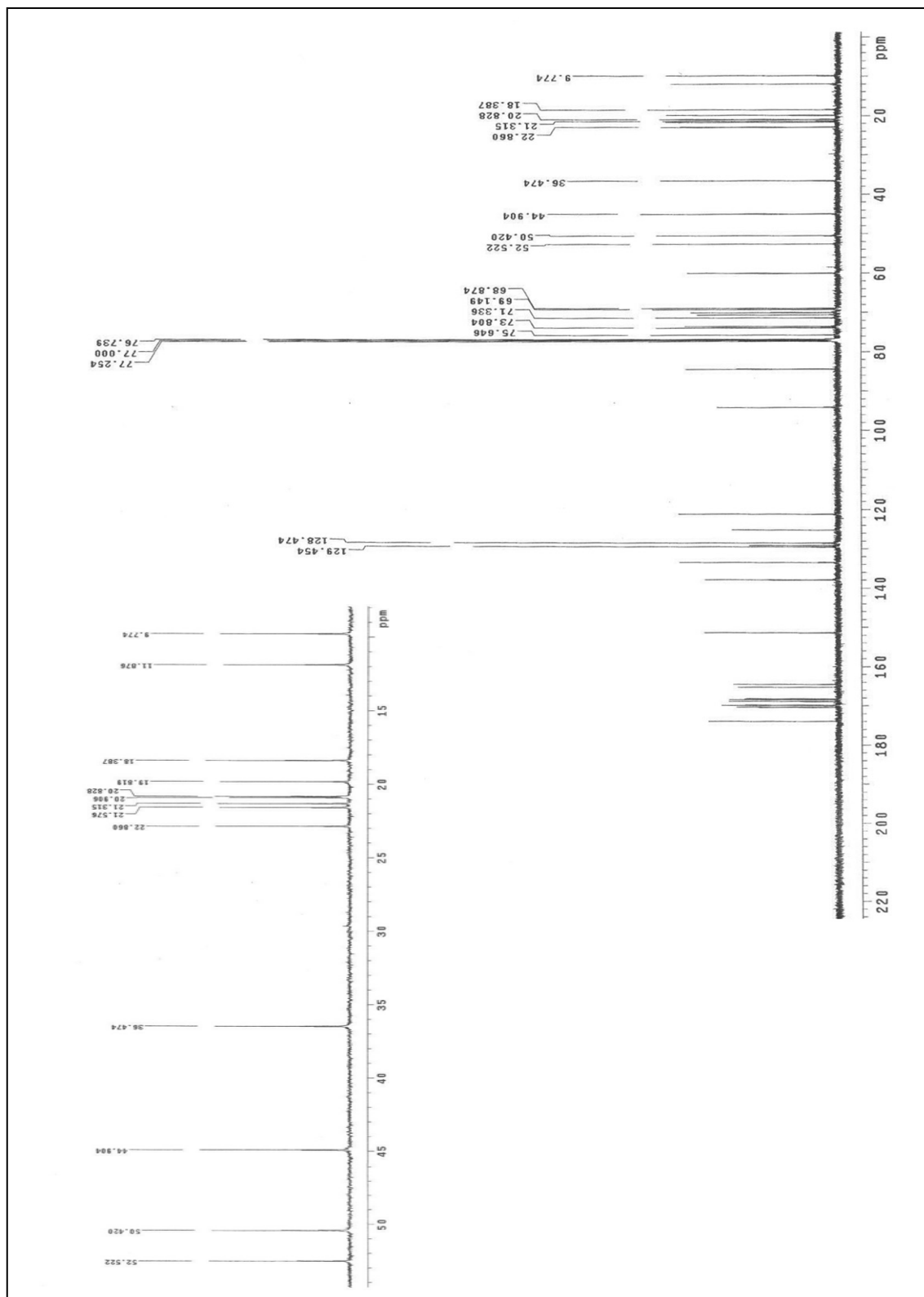


Figura 38 – Expansão e espectro de RMN de ^{13}C da substância 2 (500 MHz, CDCl_3).

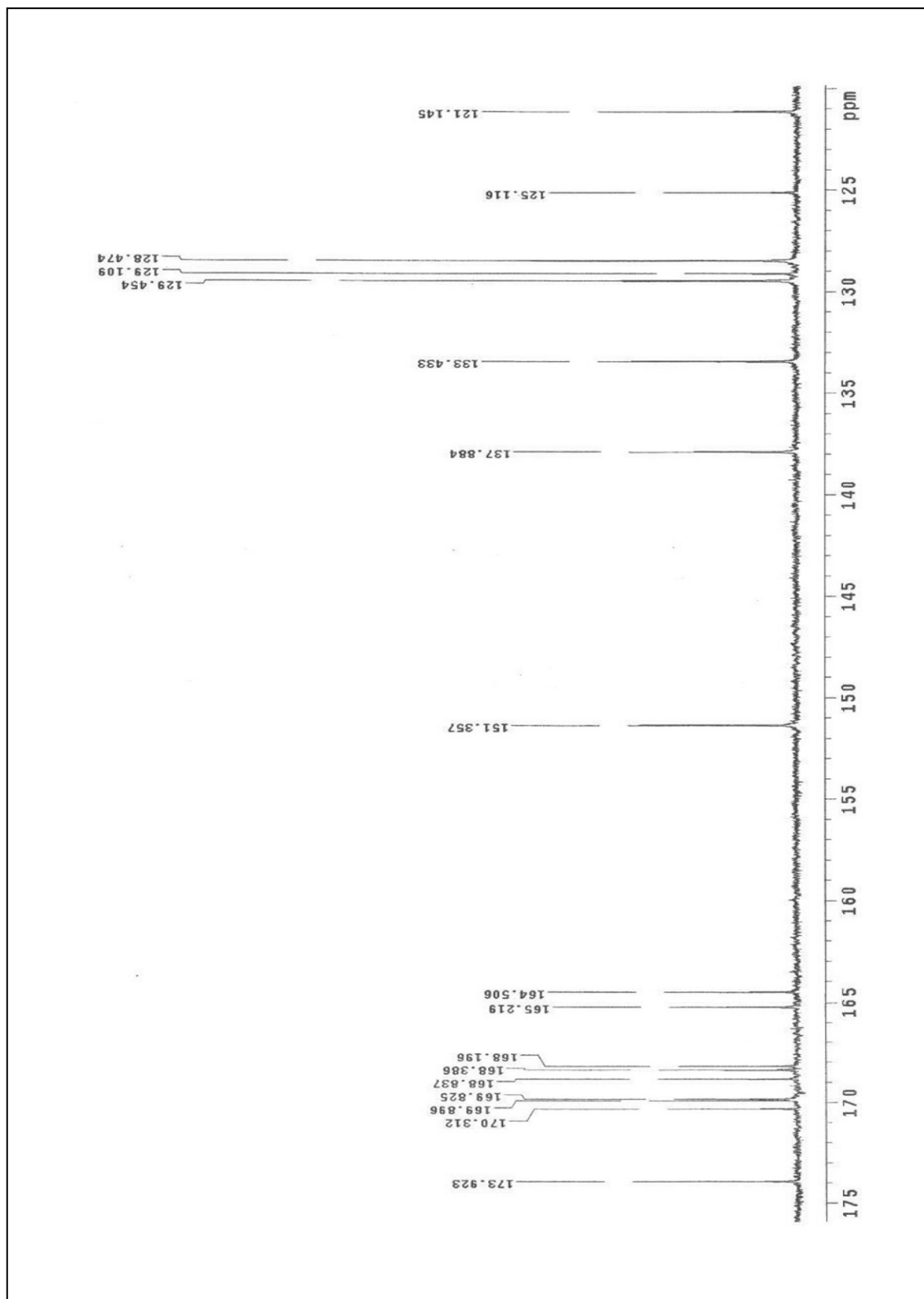


Figura 39 – Expansão da região 125–175 δ do espectro de RMN de ^{13}C da substância 2 (500 MHz, CDCl_3).

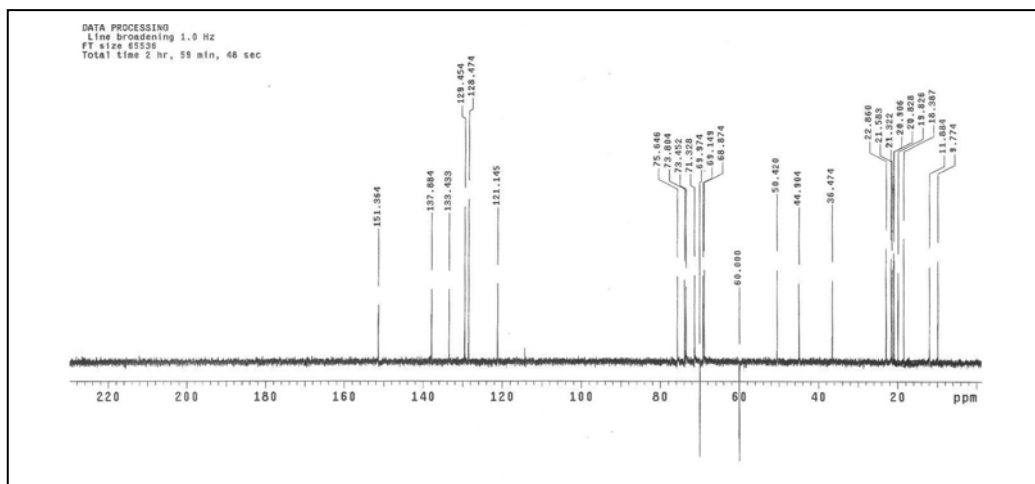


Figura 40 – Espectro de DEPT 135° da substância 2 (500 MHz, CDCl₃).

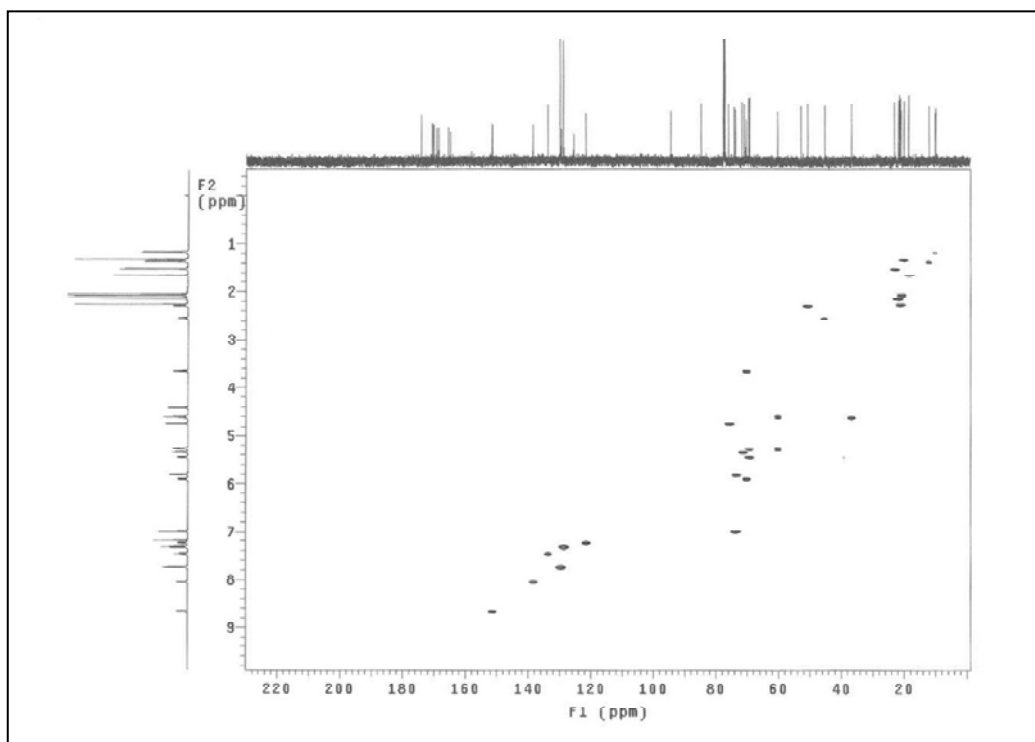


Figura 41 – Espectro de gHMBC da substância 2 (500 MHz, CDCl₃).

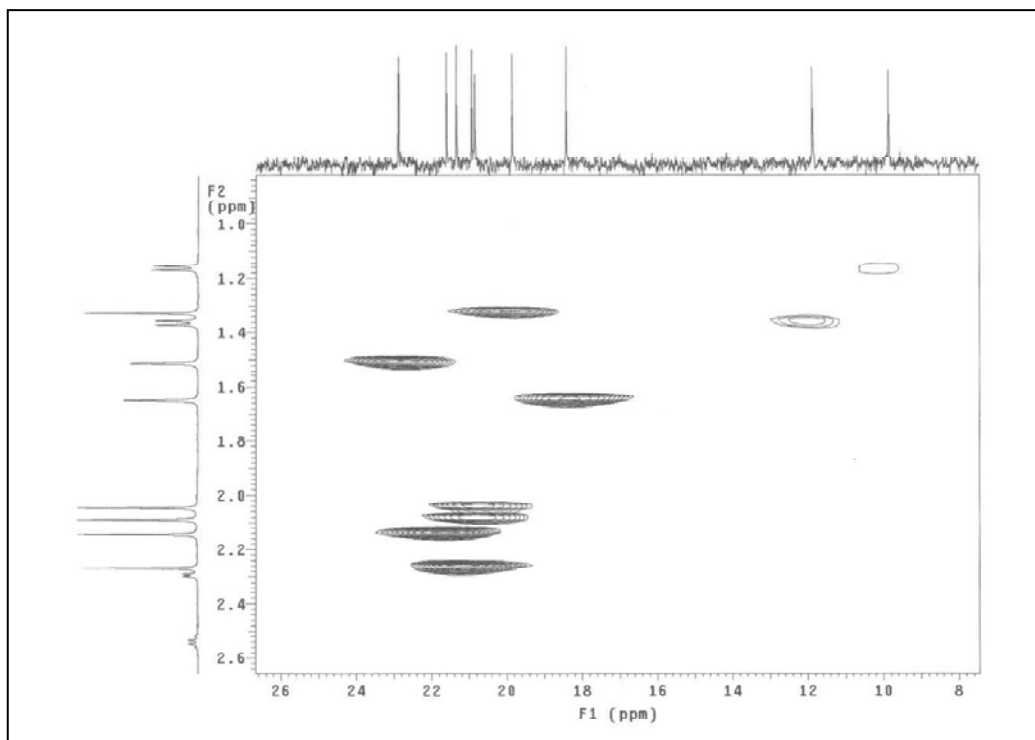


Figura 42 - Expansão do espectro gHMQC da região 8,0–26,0 δ para ^{13}C da substância 2 (500 MHz, CDCl_3).

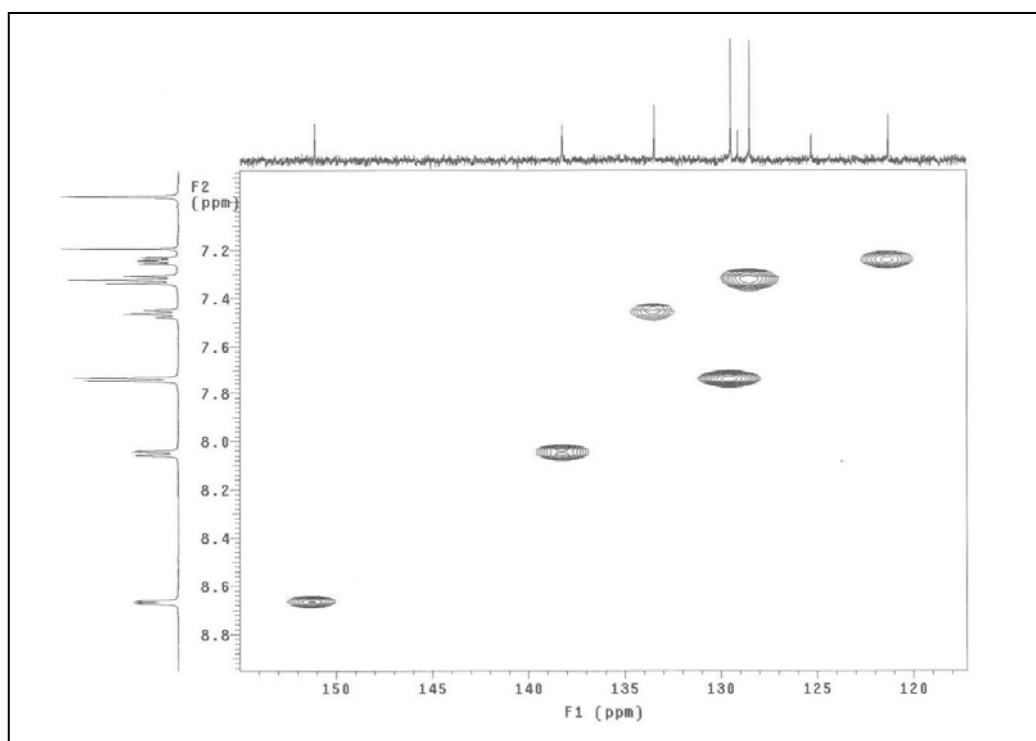


Figura 43 – Expansão do espectro gHMQC da região 120,-160,0 δ para ^{13}C da substância 2 (500 MHz, CDCl_3).

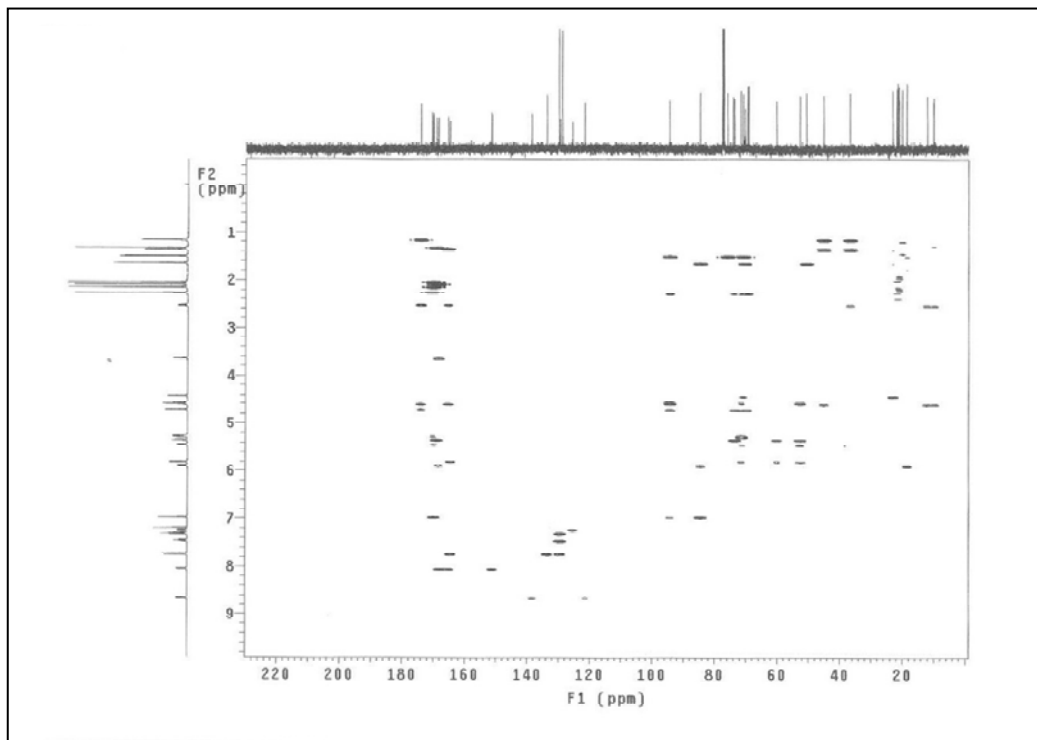


Figura 44 - Espectro de gHMBC da substância 2 (500 MHz, CDCl_3).

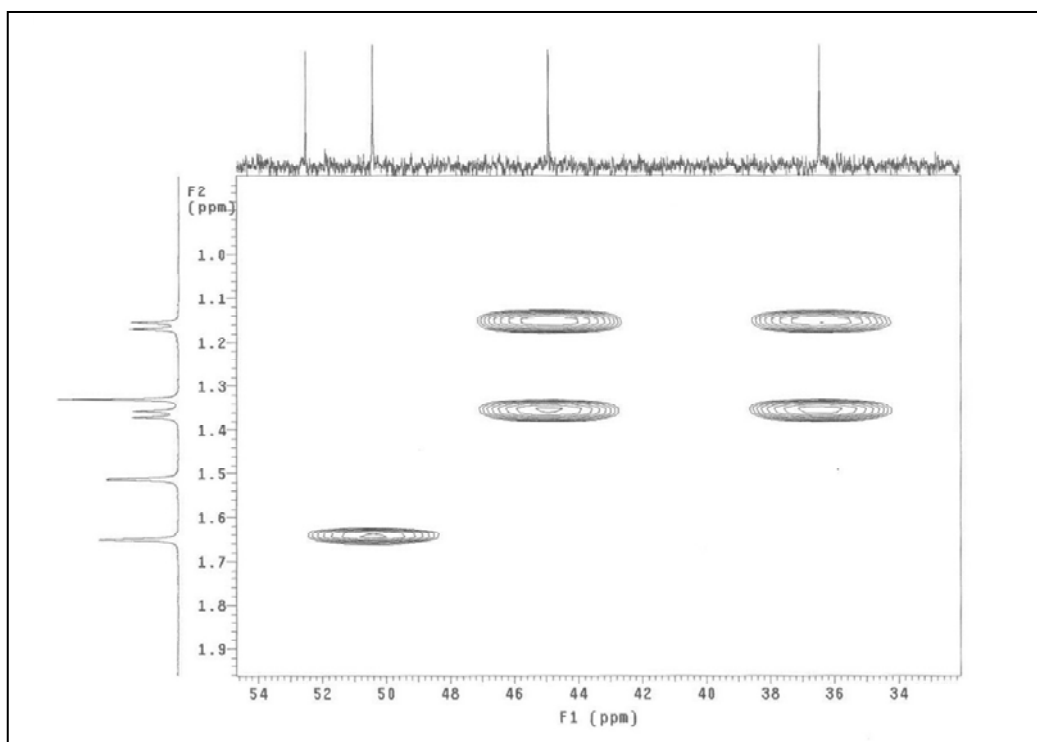


Figura 45 – Expansão do espectro gHMBC da região 34,0-54,0 δ para ^{13}C da substância 2 (500 MHz, CDCl_3).

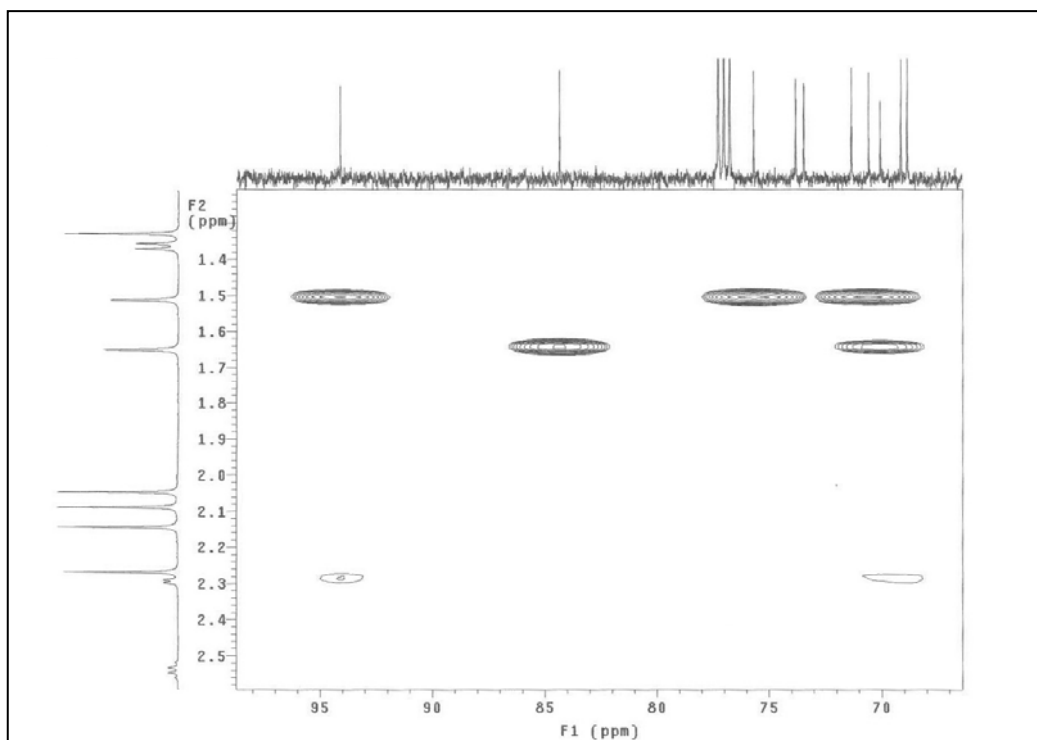


Figura 46 – Expansão do espectro gHMBC da região 70,0-95,0 δ para ^{13}C da substância 2 (500 MHz, CDCl_3).

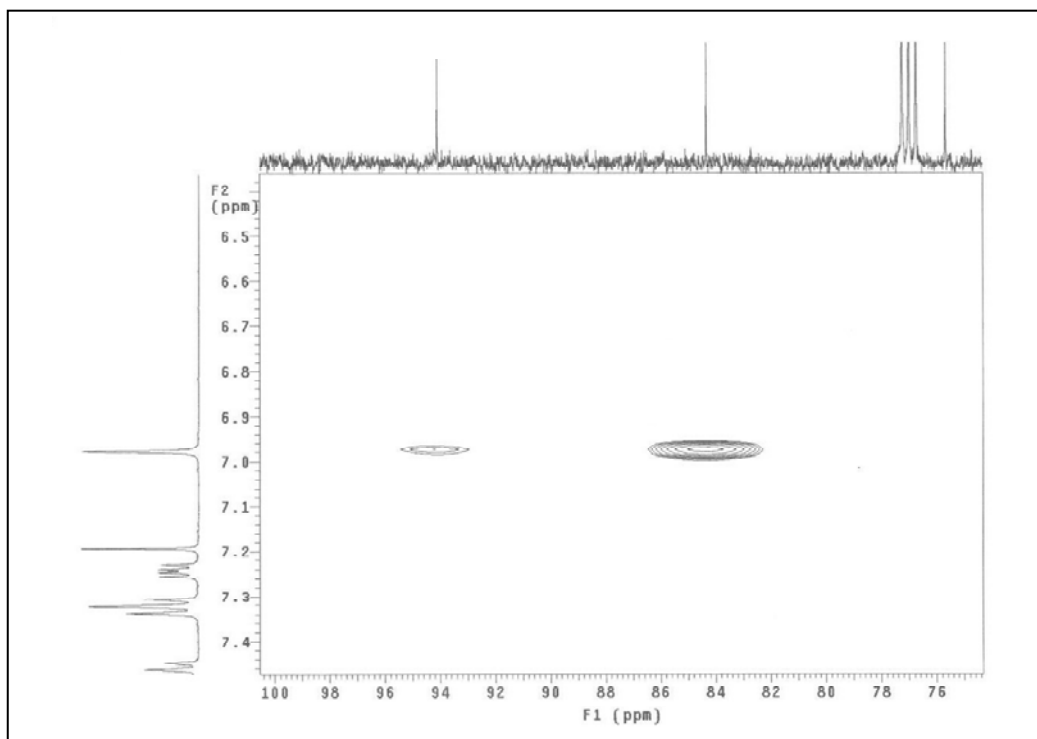


Figura 47 – Expansão do espectro gHMBC da região 76,0-100 δ para ^{13}C da substância 2 (500 MHz, CDCl_3).

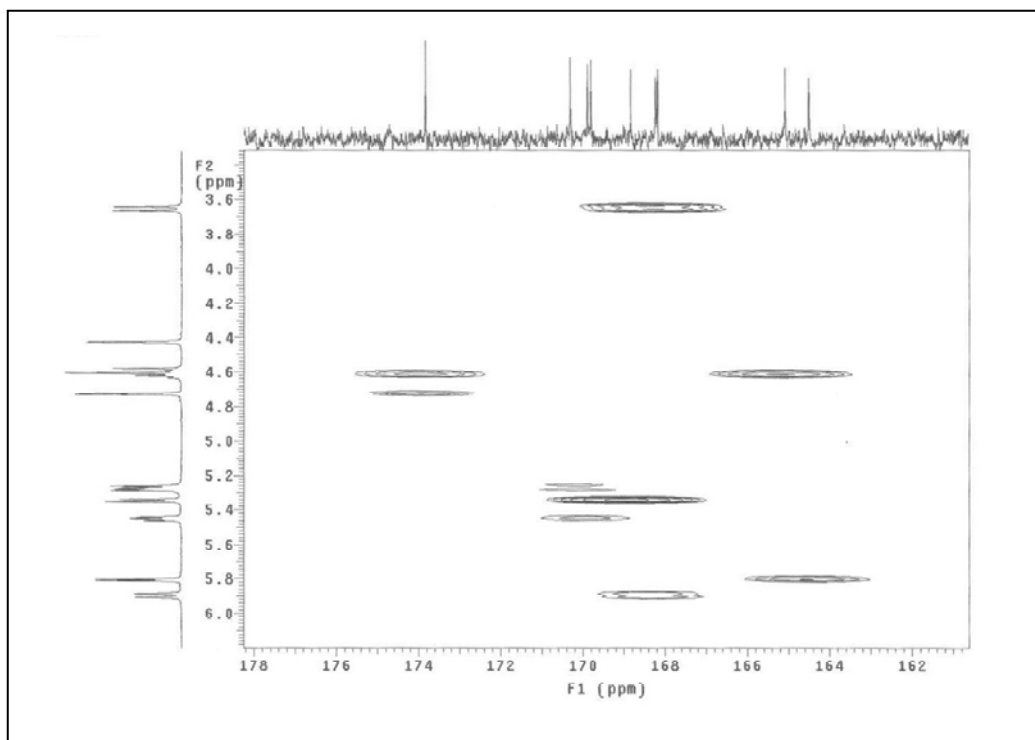


Figura 48 – Expansão do espectro gHMBC da região 162,0-178,0 δ para ^{13}C da substância 2 (500 MHz, CDCl_3).

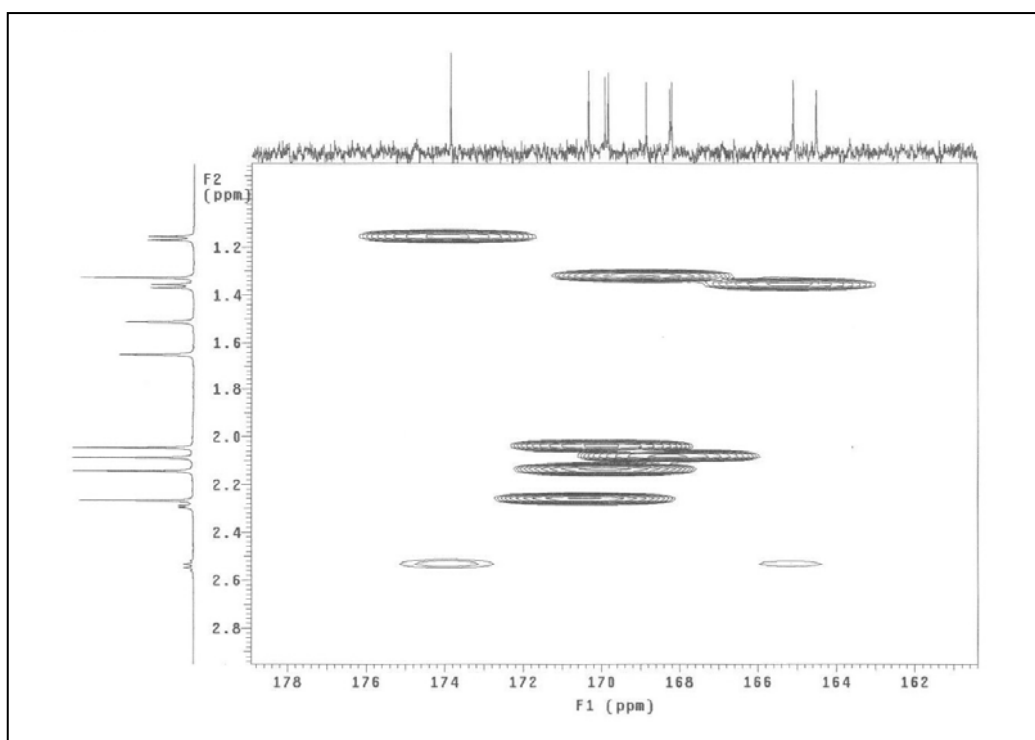


Figura 49 – Expansão do espectro gHMBC da região 162,0-178 δ para ^{13}C da substância 2 (500 MHz, CDCl_3).

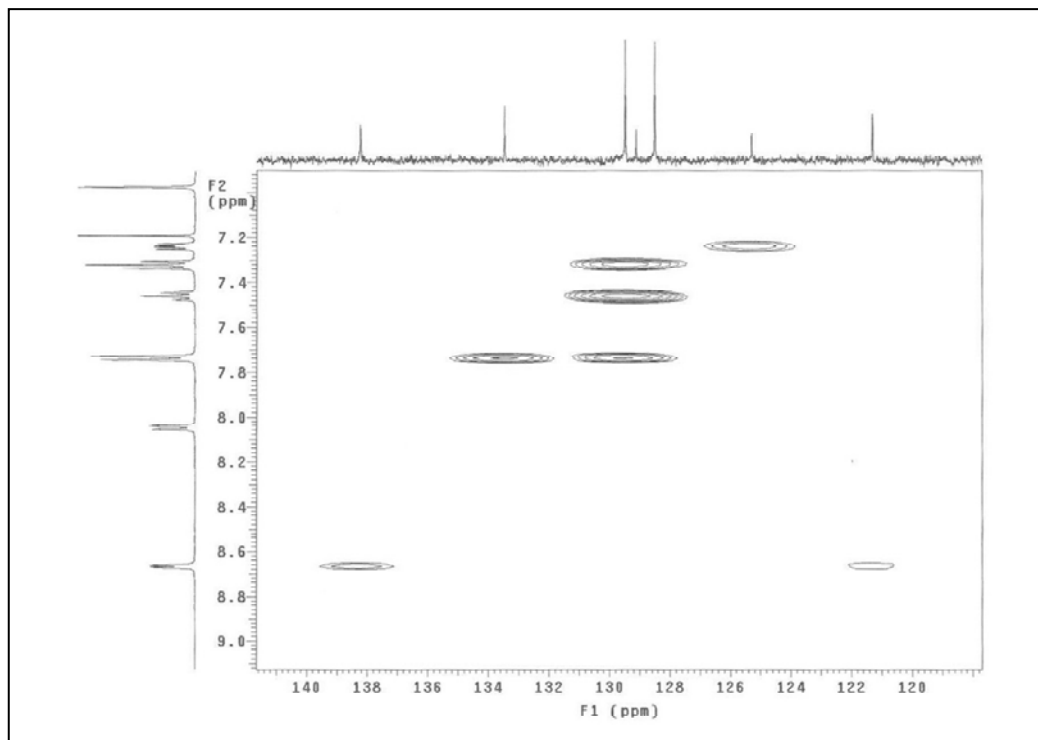


Figura 50 – Expansão do espectro gHMBC da região 120,0-140,0 δ para ^{13}C da substância 2 (500 MHz, CDCl_3).

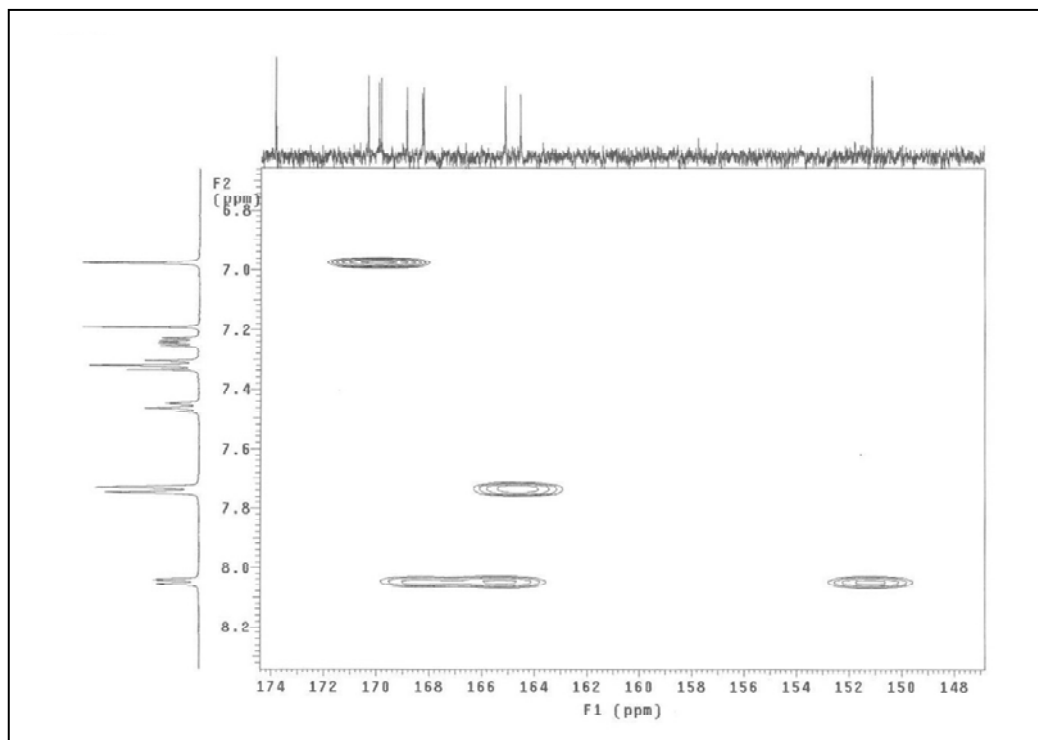


Figura 51 – Expansão do espectro gHMBC da região 142,0-174,0 δ para ^{13}C da substância 2 (500 MHz, CDCl_3).

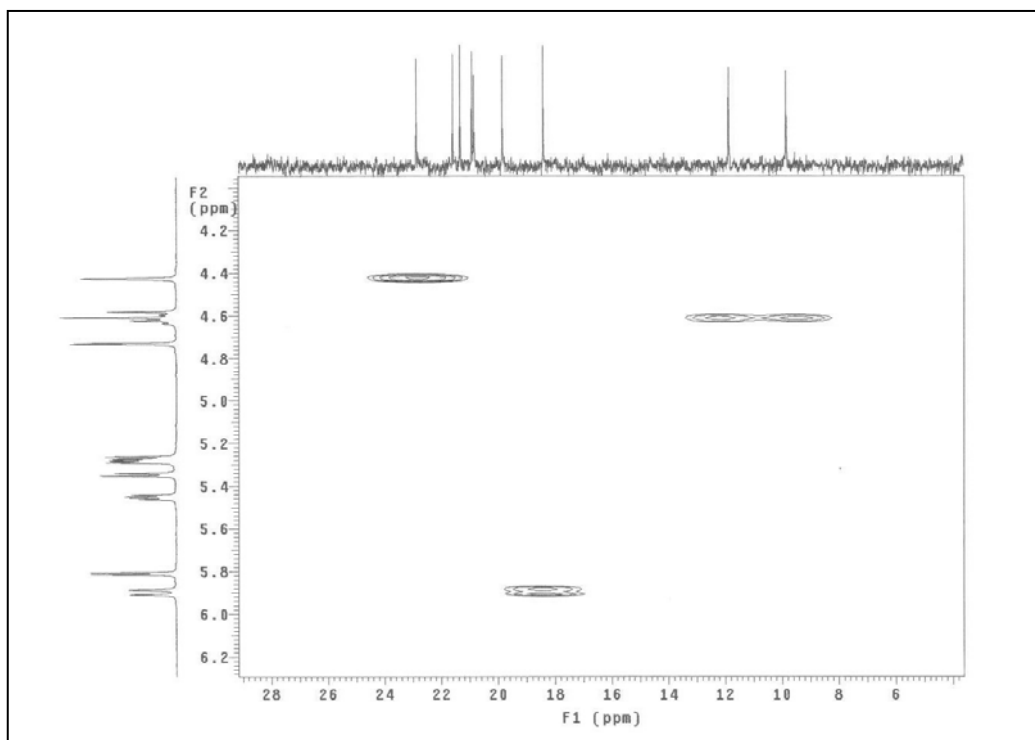


Figura 52 – Expansão do espectro gHMBC da região 6,0-28,0 δ para ^{13}C da substância 2 (500 MHz, CDCl_3).

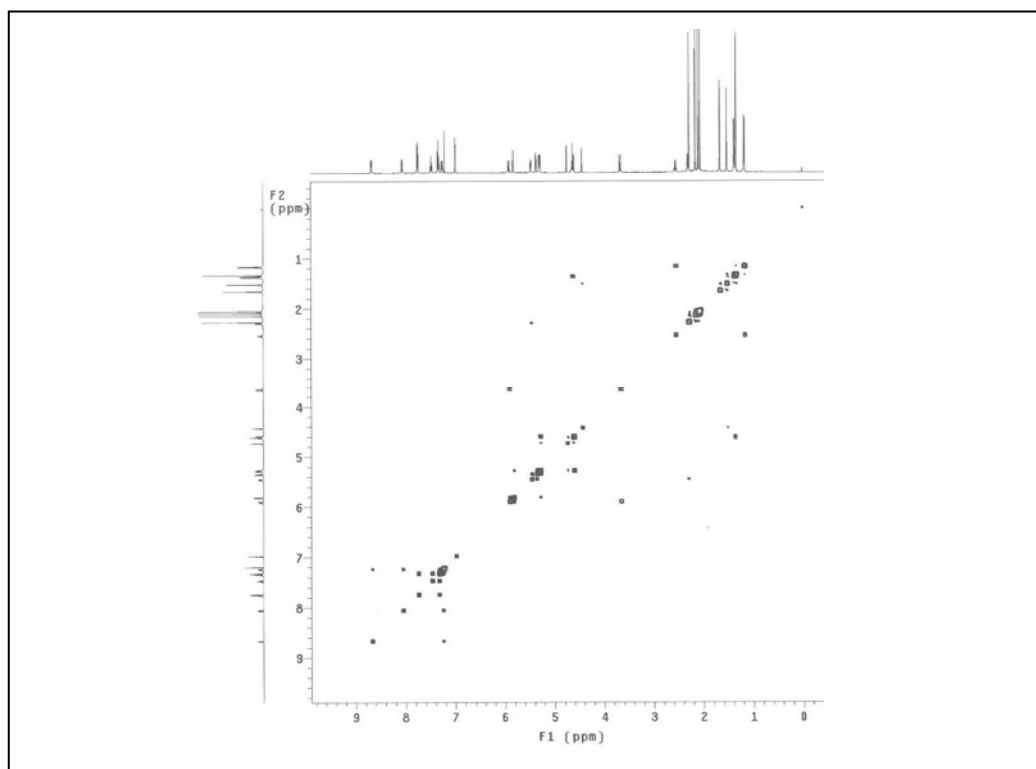


Figura 53 – Espectro gCOSY da substância 2 (500 MHz, CDCl_3).

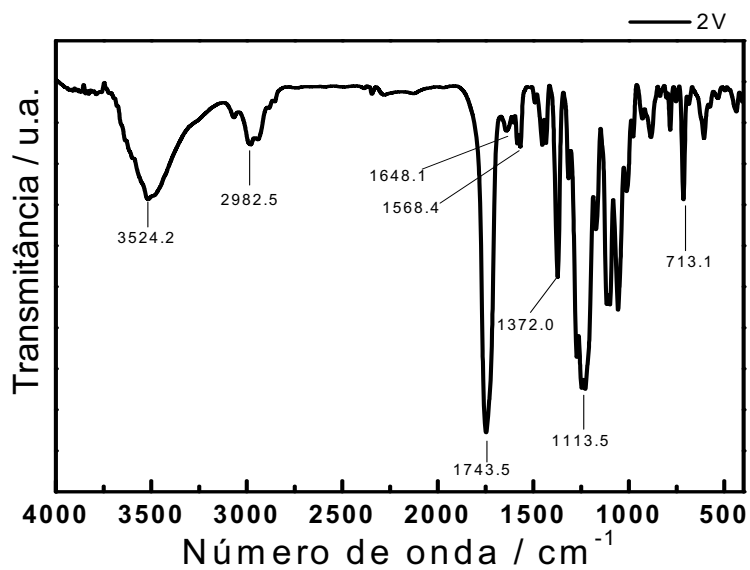


Figura 54 – Espectro no IV da substância 2, em pastilha de KBr.

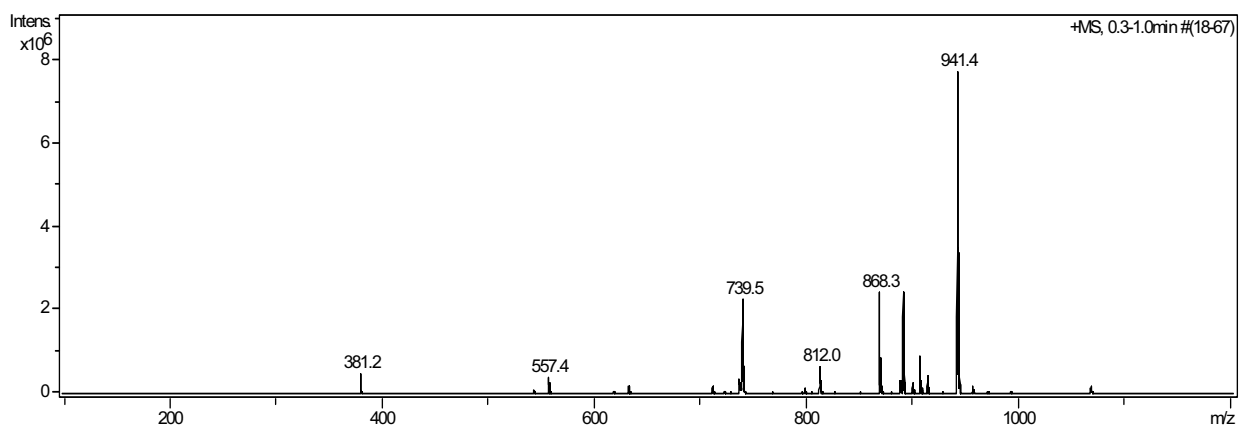
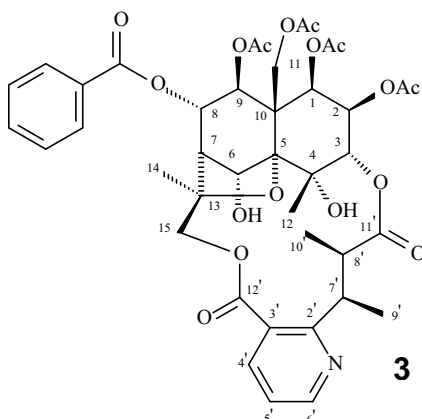


Figura 55 – Espectro de massas da substância 2.

5.4 Determinação estrutural da substância 3



A substância **3** apresenta fórmula molecular $C_{41}H_{47}NO_{17}$, definida pelo espectro de massas de alta resolução (Figura 78, p. 121), o qual apresentou pico do íon molecular em m/z 826,2905 $[M+1]^+$.

O espectro de RMN de 1H (Tabela 5, p. 1, Figura 59, p. 109) registrado para este alcalóide, apresenta na região desblindada, sinais característicos de hidrogênios do anel piridínico 2,3-substituído, representado por três duplos dubletos em 8,11 δ ($J= 8,0$ e $2,0$ Hz; H-4'), 7,26 δ ($J= 8,0$ e $5,0$ Hz; H-5') e 8,71 δ ($J= 5,0$ e $2,0$ Hz; H-6') caracterizando o anel piridínico 2,3-dissubstituído. Estas atribuições foram confirmadas pelos sinais observados no espectro de RMN de ^{13}C e gHMBC em 138,1; 121,1; 151,6 δ atribuídos aos C-4', C-5' e C-6', respectivamente.

O esqueleto carbônico do tipo evoninato observado na substância **3** foi proposto com base nos dois quadrupletos em 2,58 δ (1H) e 4,81 δ (1H), atribuídos aos H-7' e H-8' b, respectivamente, e dois dubletos na região de 1,19 δ (3H) e 1,42 δ (3H), atribuídos a H-9' e H-10' (Figura 56, p. 106).

O grupo benzoato foi identificado através de um duplo dubleto em 7,95 δ ($J= 8,0$ e $1,0$ Hz, H-o) e dois tripletos em 7,45 δ ($J= 7,75$ Hz, H-m) e 7,59 ($J= 7,75$ Hz, H-p). O mapa de contorno de gHMBC (Figura 72, p. 117) exibiu a correlação entre o sinal em 5,67 δ_H (dd, $J= 10,0$ e $3,5$ Hz) e o sinal em δ_C 165,47(C-8). Este dado permitiu atribuir o grupo benzoato como substituinte na posição 8. A magnitude das constantes de acoplamento corroboraram a atribuição do grupo benzoíla na configuração α .

Na região do espectro de RMN de ^1H entre 2,30 e 1,80 δ são observados seis singletos, integrando para três hidrogênios cada, referentes a grupos metílicos, dos quais quatro são característicos de grupos acetatos, mostrando sinais em 2,29; 2,17; 1,86; 1,84 δ e dois relativos aos H-12 e H-14 em 1,89 e 1,85 δ , respectivamente. A análise do espectro de gHMBC (Figura 70, p. 116) permitiu estabelecer que os grupos acetoxílicos 169,10 δc ; 169,79 δc e 169, 89 δc no sistema decalínico, mostraram correlação com os sinais em 5,66 δ (H-2 α , d; $J = 3,5$ Hz); 5,91 δ (H-9 α , d; $J = 9,5$ Hz) e 4,80 δ (H-11a, d; $J = 13,5$ Hz).

O espectro TOCSY (Figura 75-76, p. 120) mostrou dois sistemas de *spins*, um constituído por sinais em 5,66 δ (H-1), 5,32 δ (H-2), 4,75 δ (H-3) e outro 5,91 δ (H-9), 5,67 δ (H-8), 2,77 δ (H-7) que corresponde aos anéis do sistema decalínico.

A ausência de um grupo acetoxílico permitiu inferir a presença de uma hidroxila. Algumas peculiaridades são observadas para os alcalóides piridínicos sesquiterpênicos com relação aos substituintes ligados aos carbonos 4 e 6. Na análise de RMN de ^1H foi possível observar que o grupo hidroxílico em C-4 aparece como um dubleto em 5,70 δ (1,5 Hz), hidrogênio este que se apresenta desblindado em cerca de 1,28 δ , quando comparado com aqueles já discutidos. Também pode ser observada a desproteção para a metila C-12, observada como um dubleto em 1,89 δ (1,0 Hz). O sinal referente ao hidrogênio em 6 é registrado nos alcalóides anteriores como um singleto próximo a 7,0 δ , neste caso como um singleto em 5,32 δ .

A existência de um grupo hidroxílico a mais na molécula foi comprovada pela análise de RMN de ^1H em presença de D_2O (Figura 73-74, p. 118-119), a qual foi observada a diminuição dos sinais 5,70 δ (4-OH) e 6,14 δ (6-OH).

O dado obtido de rotação óptica específica foi de $[\alpha]_D^{23,6} = +10.57$ (CHCl_3 , c 0.2 g/100 mL).

Os demais sinais foram atribuídos com base nos dados de RMN de ^1H , RMN de ^{13}C , gHMQC, gHMBC, DEPT, IV, EM obtidos para **3**, além da comparação com dados da literatura (Hideji et al.; 1993).

Tabela 5. Dados de RMN de ^1H e RMN-2D (CDCl_3 , 500 MHz) da substância 3

H	δ (ppm), Mult. J (Hz)	δ ^{13}C (ppm)	gHMBC
1	5,66 d (3,0)	72,20 (CH)	50,91 (C-10); 60,50 (C-11); 73,96 (C-9); 169,10 (Ac-1)
2	5,32 t (3,0)	68,20 (CH)	72,4 (C-4); 74,6 (C-3); 93,25 (C-5)
3	4,75 d (3,0)	74,60 (CH)	50,91 (C-10); 68,2 (C-2); 72,2 (C-1); 93,25 (C-5); 173,7 (C-11')
4	-----	72,40 q	-----
4-OH	5,70 d (1,5)	-----	23,81 (C-12); 72,47 (C-4)
5	-----	93,25 q	-----
6	5,32 sl	76,70 q	73,96 (C-9); 93,25 (C-5)
6-OH	6,14 sl (2,0)	-----	-----
7	2,77 d (3,0)	51,2 (CH)	73,96 (C-9); 93,25 (C-5)
8	5,67 dd (10,0 e 3,0)	74,10 (CH)	72,40 (C-4); 165,47 (OBz); 169,10 (C-Ac-1)
9	5,91 d (10,0)	73,90 (CH)	50,91 (C-10); 60,5 (C-11); 72,21 (C-1); 169,79 (AC-9)
10	-----	50,91 q	-----
11a	4,68 d (13,0)	60,50 (CH_2)	72,2 (C-1); 73,96 (C-9); 93,25 (C-5)
11b	4,80 d (13,0)	60,50 (CH_2)	50,91 (C-10); 72,2 (C-1); 93,25 (C-5); 169,79 (C-9); 165,47 (OBz)
12	1,89 d (1,0)	23,80 (CH_3)	72,2 (C-1); 74,6 (C-3); 93,2 (C-5)
13	-----	85,90 q	-----
14	1,85 s	20,40 (CH_3)	51,2 (C-7); 70,7 (C-15)
15a	3,66 d (12,0)	70,70 (CH_2)	168,77 (C-12')
15b	6,10 d (12,0)	70,70 (CH_2)	20,4 (C-14); 85,96 (C-13); 168,77 (C-12')
2'	-----	165,70 q	-----
3'	-----	124,40 q	-----
4'	8,11 dd (8,0 e 2,0)	138,10 (CH)	151,67 (C-6'); 165,70 (C-2'); 168,77 (C-12')

5'	7,26 dd (8,0 e 5,0)	121,10 (CH)	124,45 (C-3')
6'	8,71 dd (5,0 e 8,0)	151,60 (CH)	N.O.
7'	4,81 q (7,0)	36,00 (CH)	173,7 (C-11')
8'	2,58 q (7,0)	45,20 (CH)	9,57 (C- 10'); 11,4 (C- 9'); 165, 7 (C- 2'); 174,71 (C-11')
9'	1,42 d (7,0)	11,40 (CH ₃)	36,0 (C-7'); 45,2 (C-8'); 165,7 (C-2')
10'	1,19 d (7,0)	9,57 (CH ₃)	36,0 (C-7'); 45,2 (C-8'); 173,7 (C-11')
11'	-----	173,70 q	-----
12'	-----	168,70 q	-----
1-CH ₃ CO	1,86 s	20,40	N.O
1-CH ₃ CO	-----	169,10	-----
2-CH ₃ CO	1,84 s	20,95	50,9 (C-10)
2-CH ₃ CO	-----	168,41	-----
9-CH ₃ CO	2,17 s	20,50	21,36 (Ac- 11); 169,10 (AC-1)
9-CH ₃ CO	-----	169,79	-----
11- CH ₃ CO	2,29	21,30	20,9 (C- 9); 169,7(Ac-9)
11- CH ₃ CO	-----	169,89	-----
COPh	-----	165,47	-----
<i>ipso</i>	-----	129,10	-----
<i>orto</i>	7,95 dd (7,5 e 1,0)	129,60 (CH)	129,66 (C-2''); 133,57 (C-4''); 165,47 (OBz)
<i>meta</i>	7,45 t like (7,5)	128,60 (CH)	129,16 (C-3'')
<i>para</i>	7,59 t like (7,5)	133,50 (CH)	129,66 (C-2'')

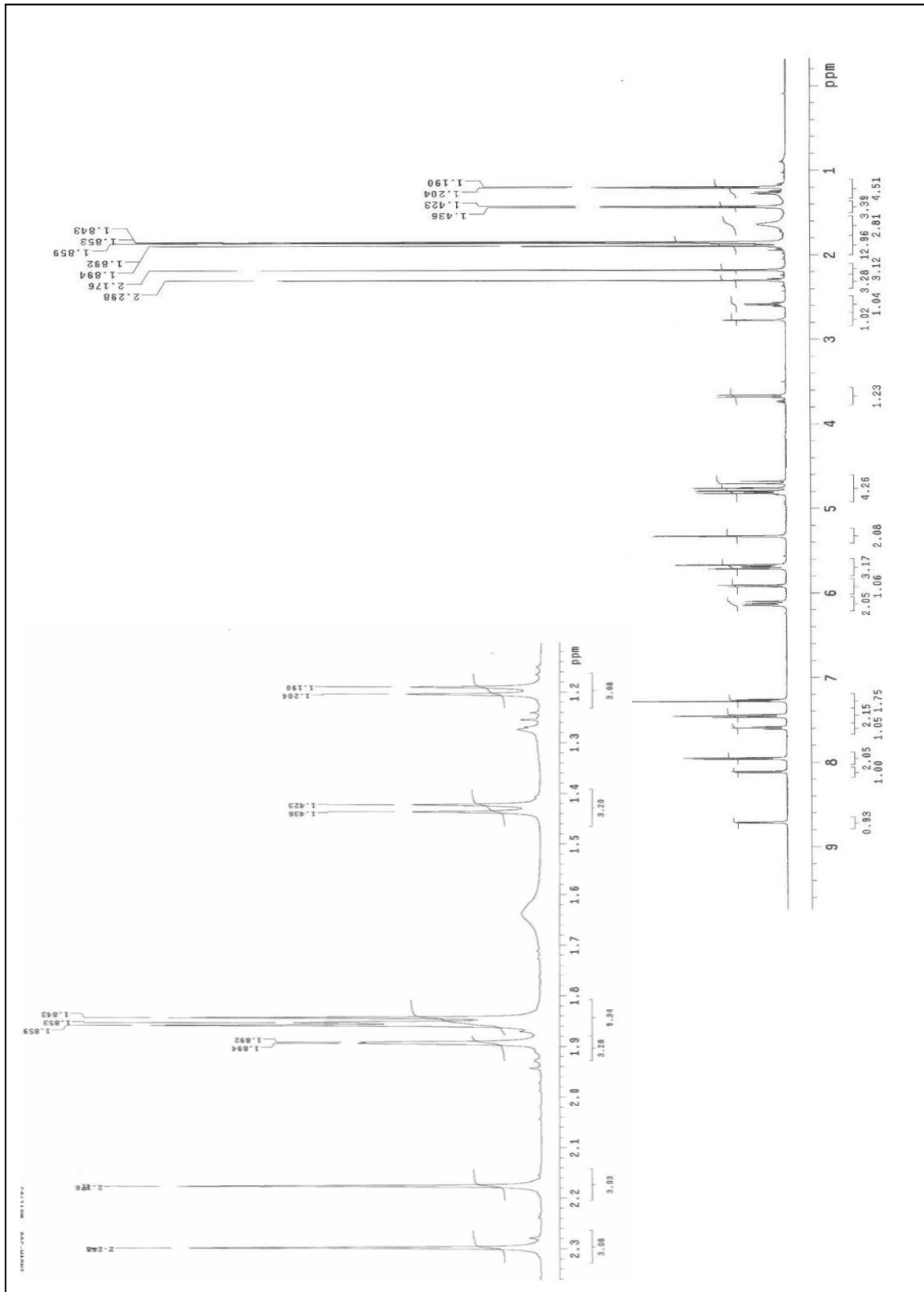


Figura 56 – Expansão da região 1,0-2,3 δ do espectro de RMN de ^1H da substância 3 (500 MHz, CDCl_3).

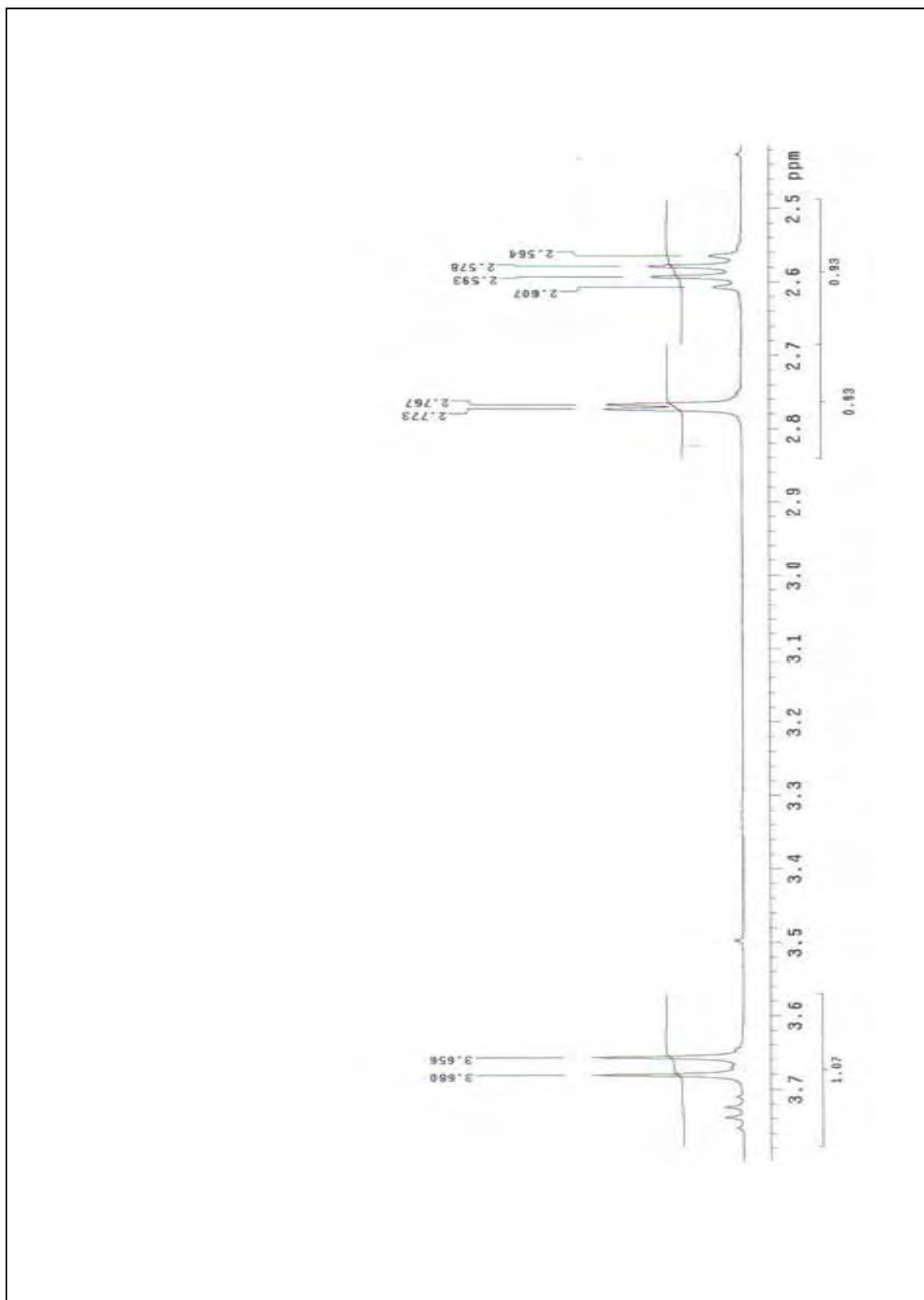


Figura 57– Expansão da região 2,5–4,0 δ do espectro de RMN de ^1H da substância 3 (500 MHz, CDCl_3).

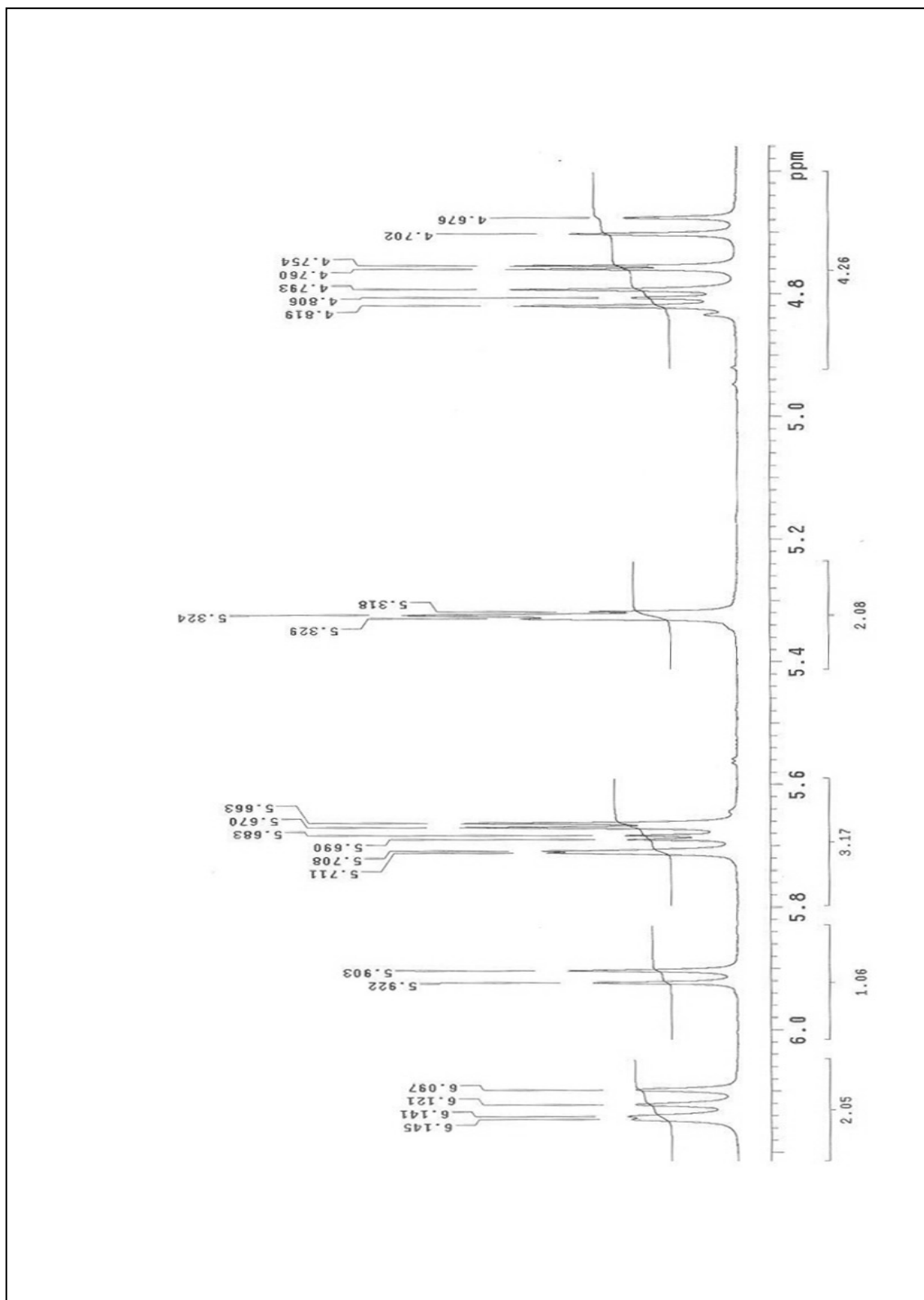


Figura 58 – Expansão da região 4,5–6,2 δ do espectro de RMN de ^1H da substância 3 (500 MHz, CDCl_3).

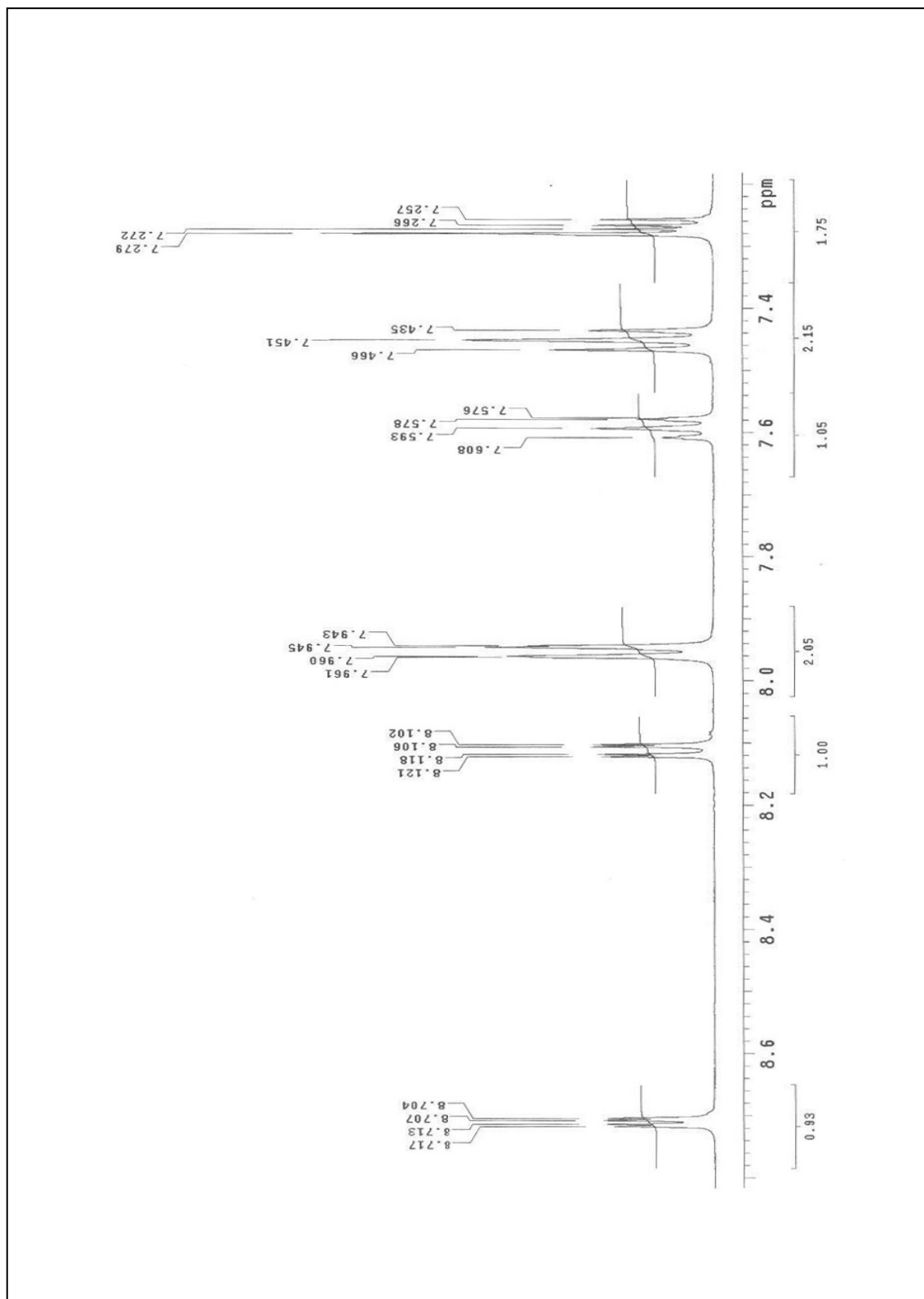


Figura 59 – Expansão da região 6,5–8,7 δ do espectro de RMN de ^1H da substância 3 (500 MHz, CDCl_3).

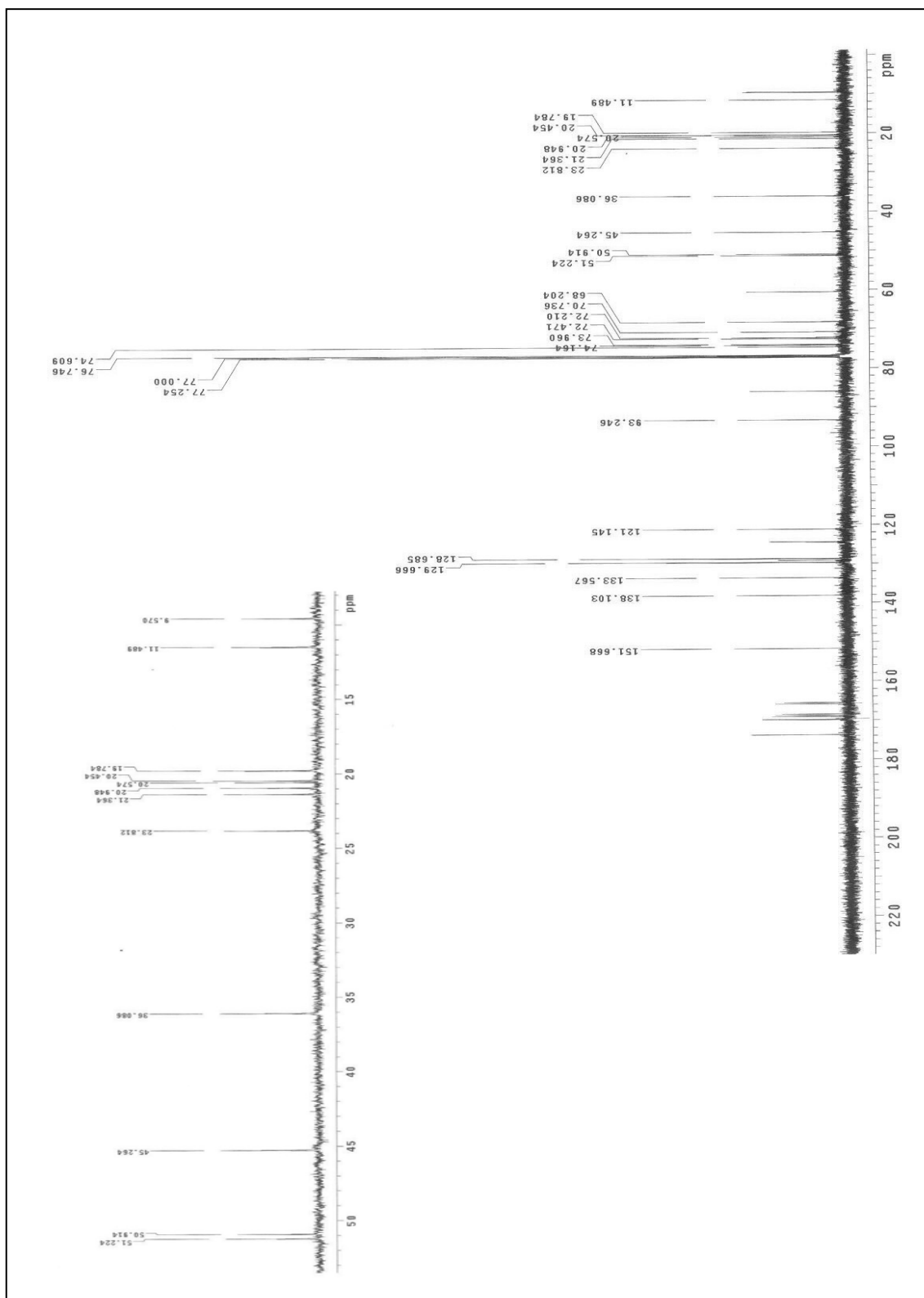


Figura 60 – Espectro de RMN de ^{13}C da substância 3 (500 MHz, CDCl_3).

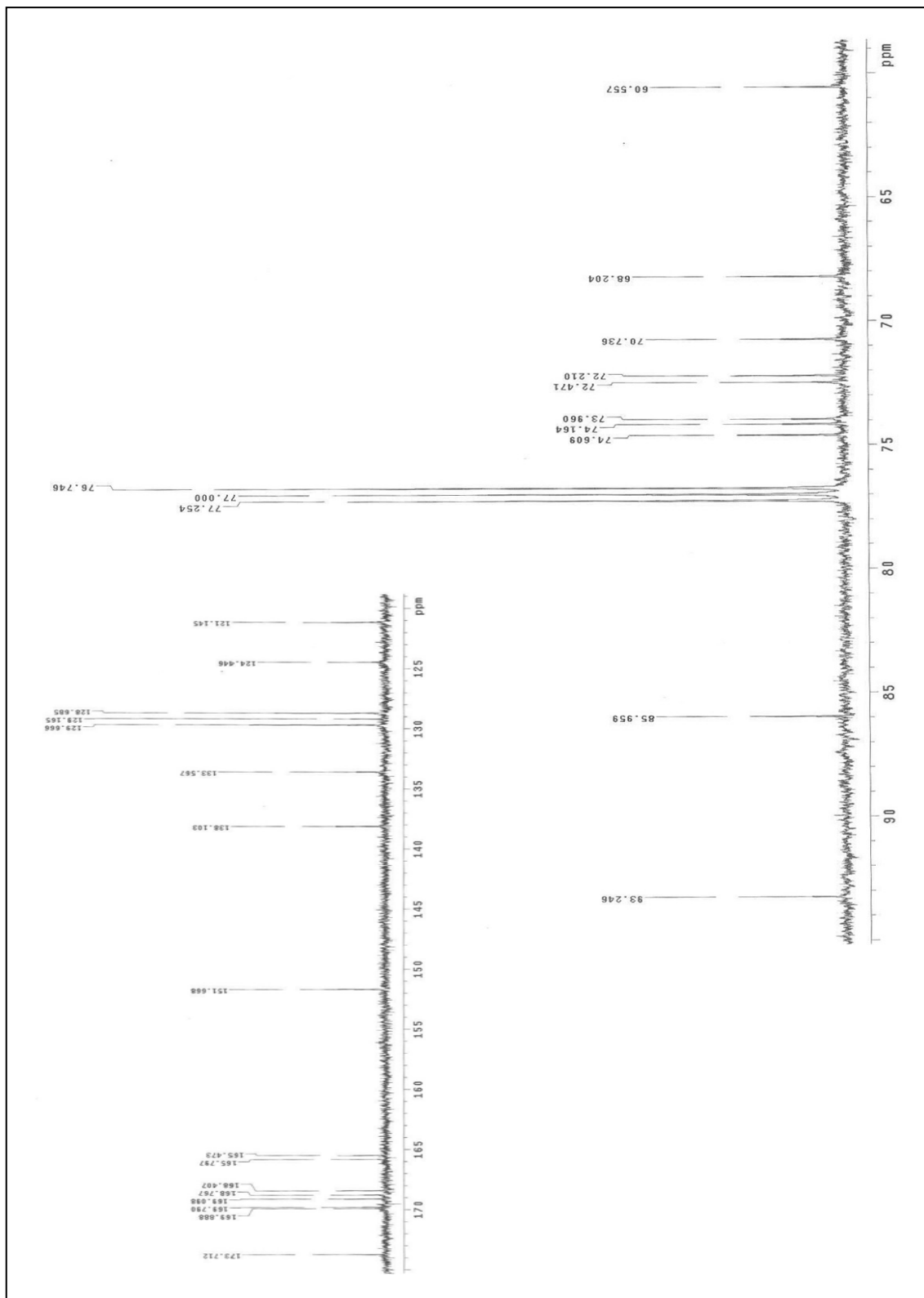


Figura 61 – Expansões do espectro de RMN de ^{13}C da substância 3 (500 MHz, CDCl_3).

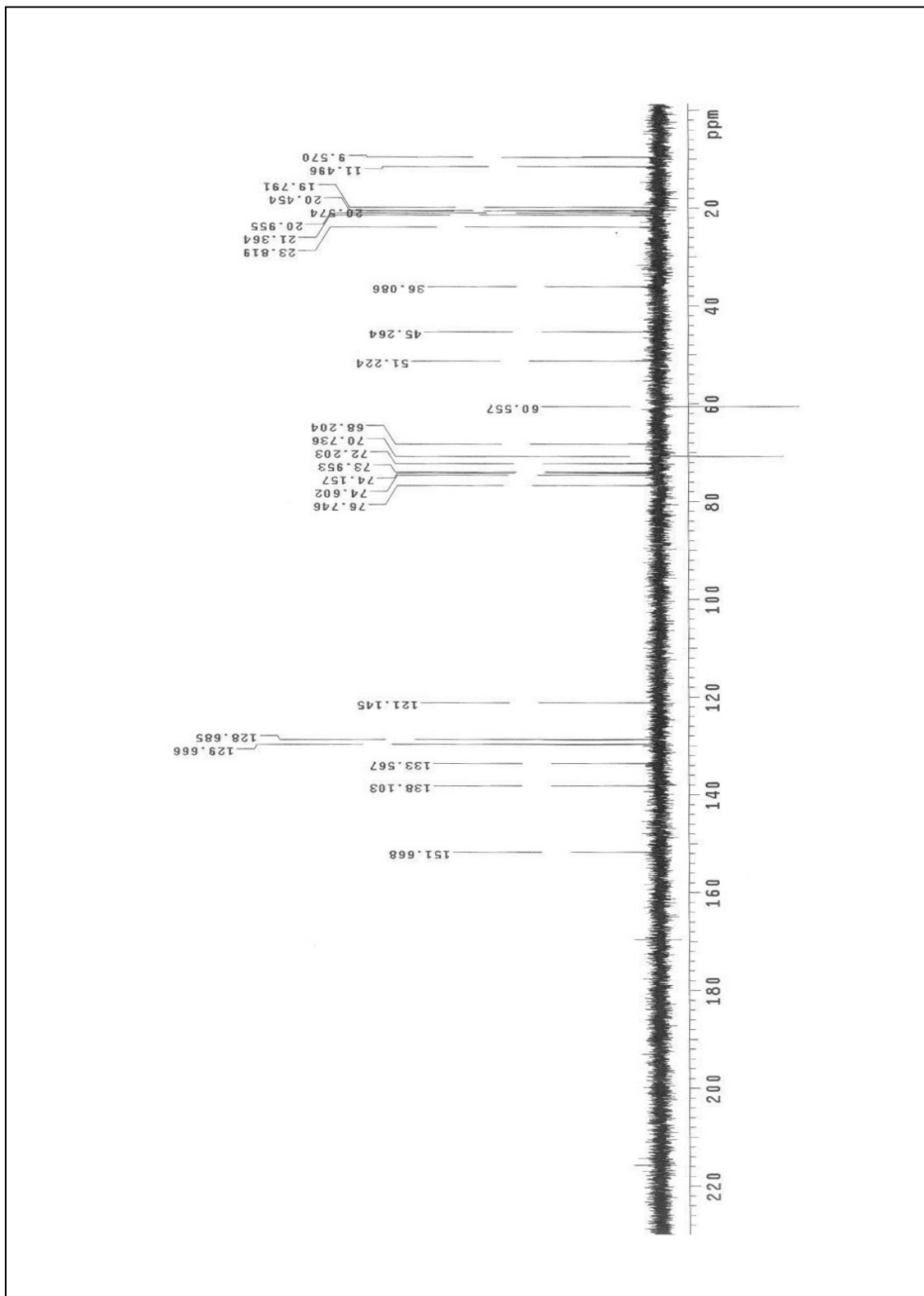


Figura 62 – Espectro de DEPT 135 da substância 3 (500 MHz, $CDCl_3$).

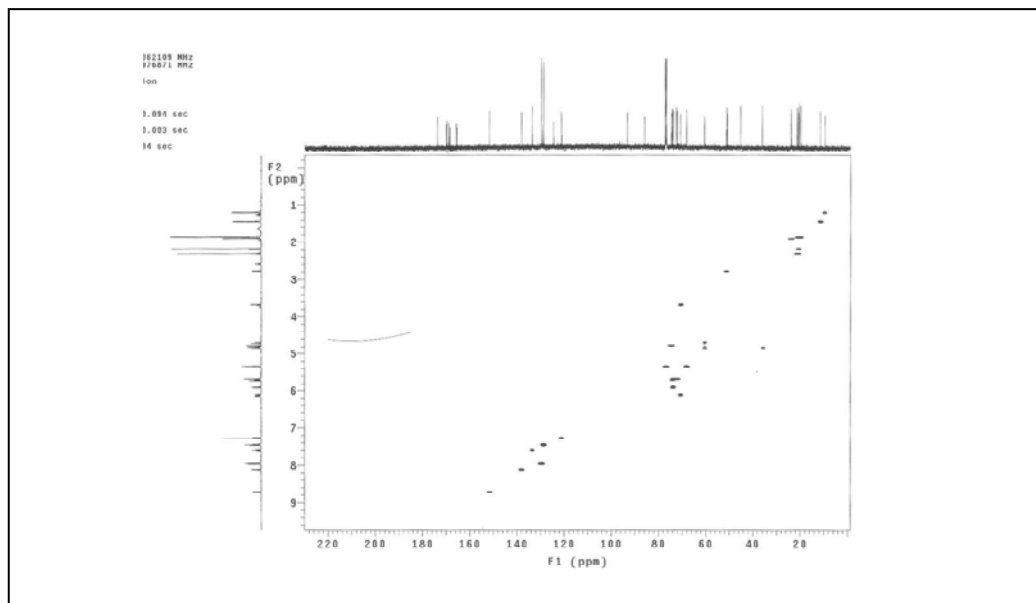


Figura 63 – Espectro de gHMBC da substância 3 (500 MHz, CDCl₃).

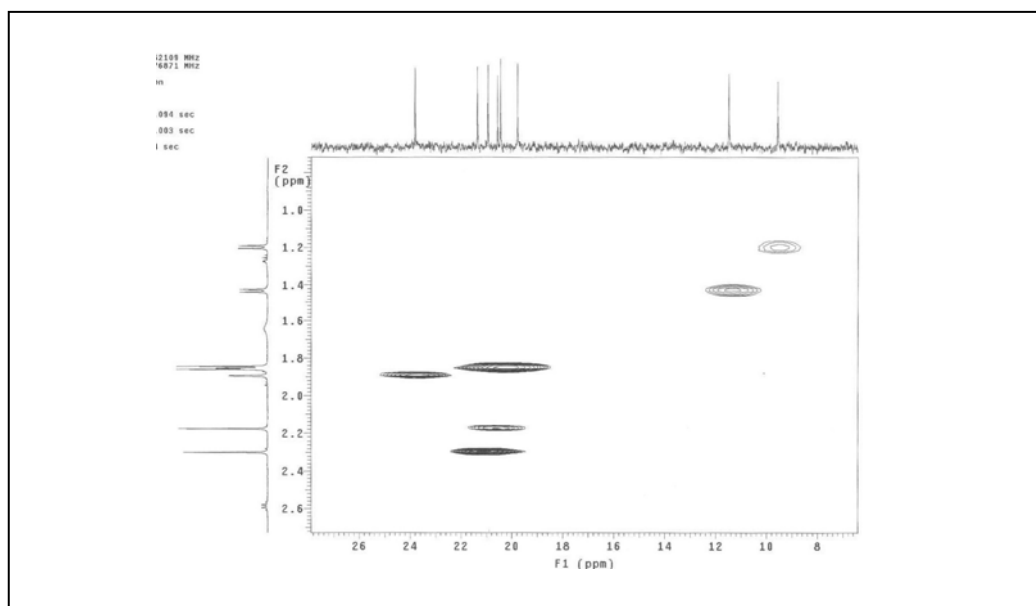


Figura 64 – Expansão do espectro gHMBC da região 8,0-26,0 δ para ¹³C da substância 3 (500 MHz, CDCl₃).

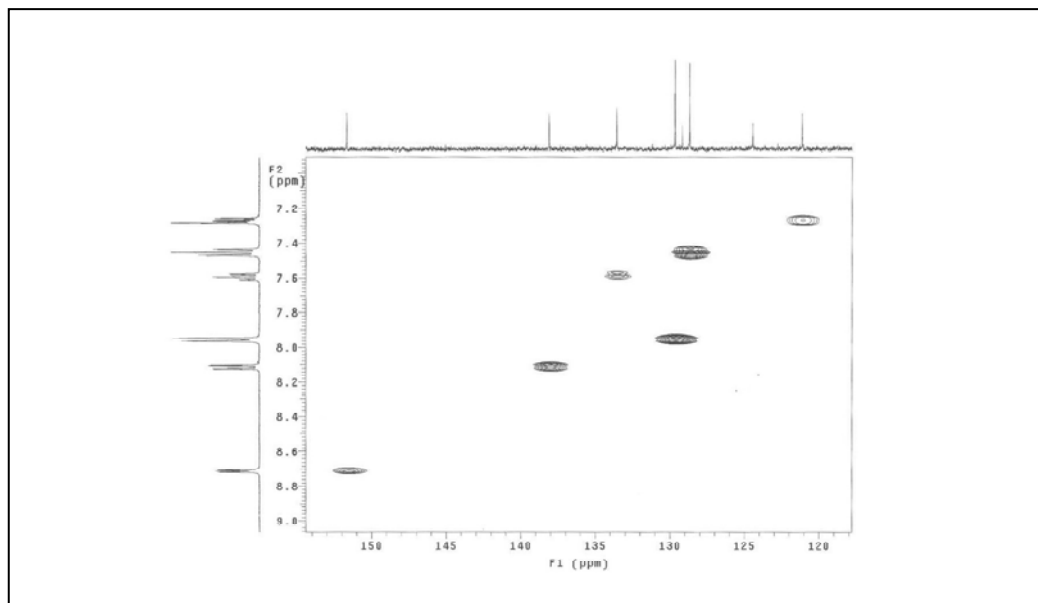


Figura 65 – Expansão do espectro gHMBC da região 120,0-160,0 δ para ^{13}C da substância 3 (500 MHz, CDCl_3).

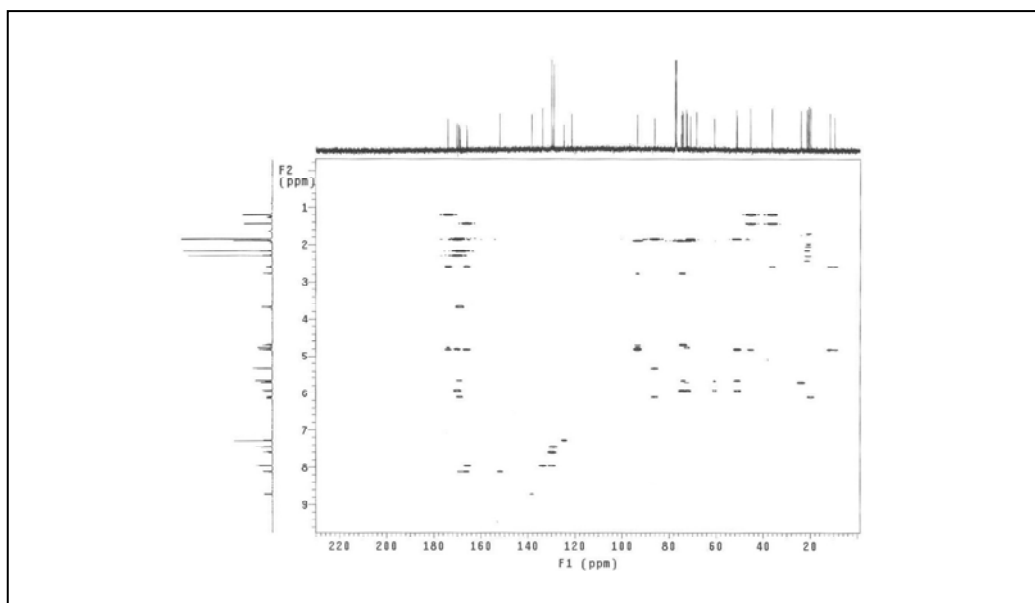


Figura 66 – Espectro gHMBC da substância 3 (500 MHz, CDCl_3).

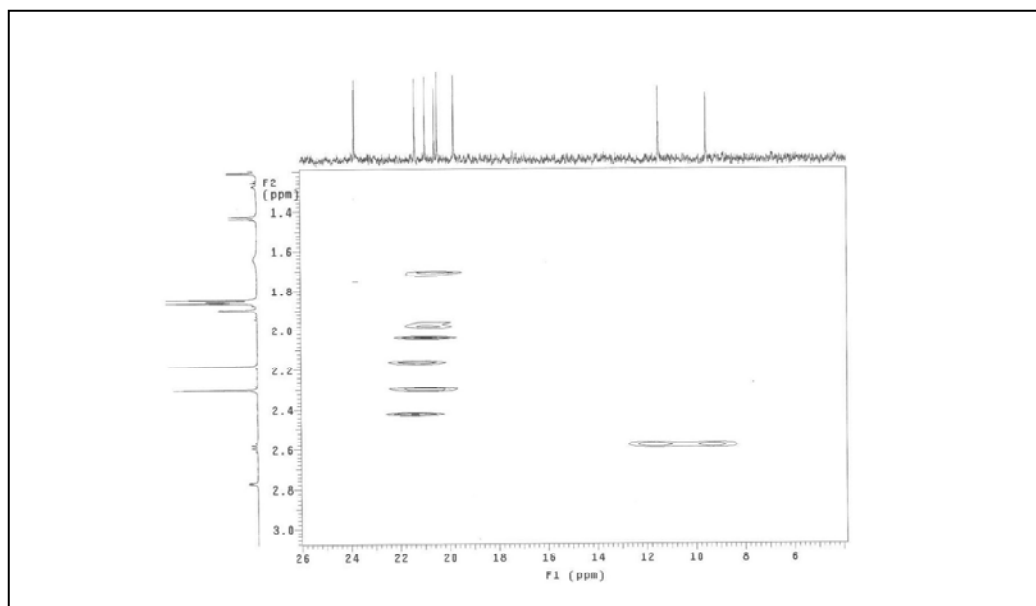


Figura 67 – Expansão do espectro gHMBC da região 6,0-26,0 δ para ^{13}C da substância 3 (500 MHz, CDCl_3).

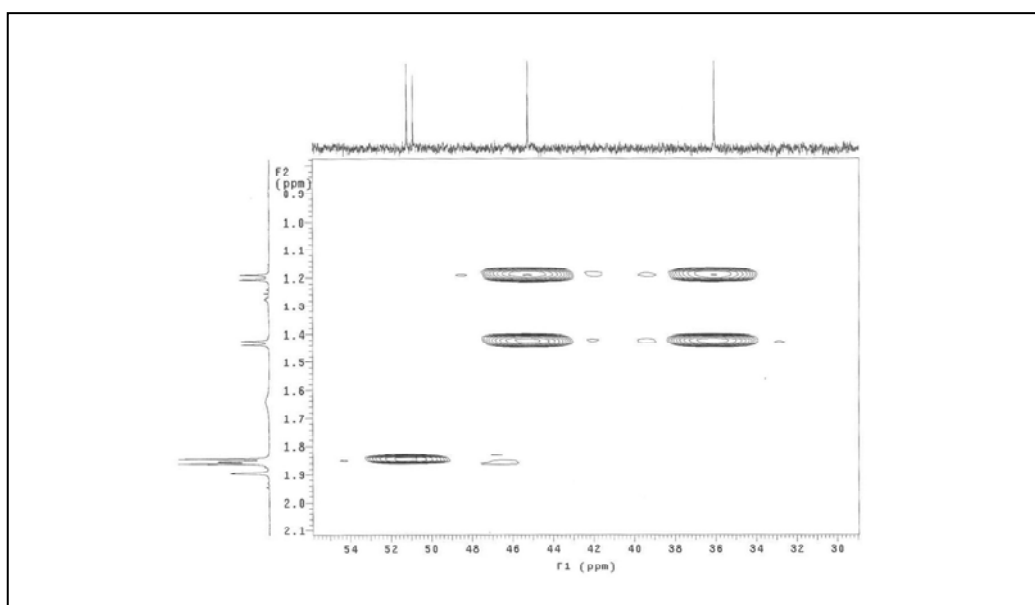


Figura 68 Expansão do espectro gHMBC da região 30,0-54,0 δ para ^{13}C da substância 3 (500 MHz, CDCl_3).

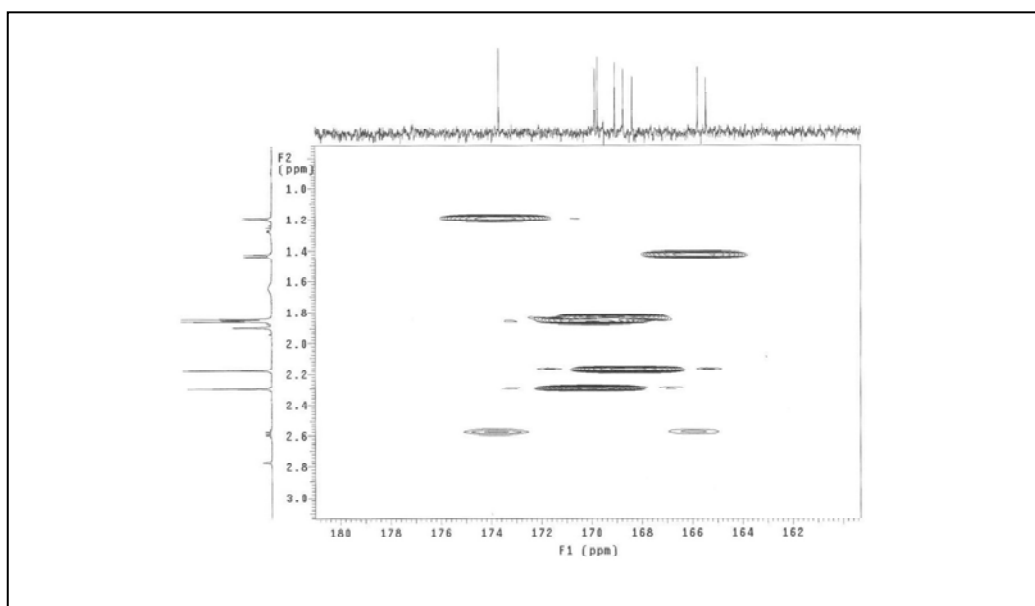


Figura 69 – Expansão do espectro gHMBC da região 162,0-180,0 δ para ^{13}C da substância 3 (500 MHz, CDCl_3).

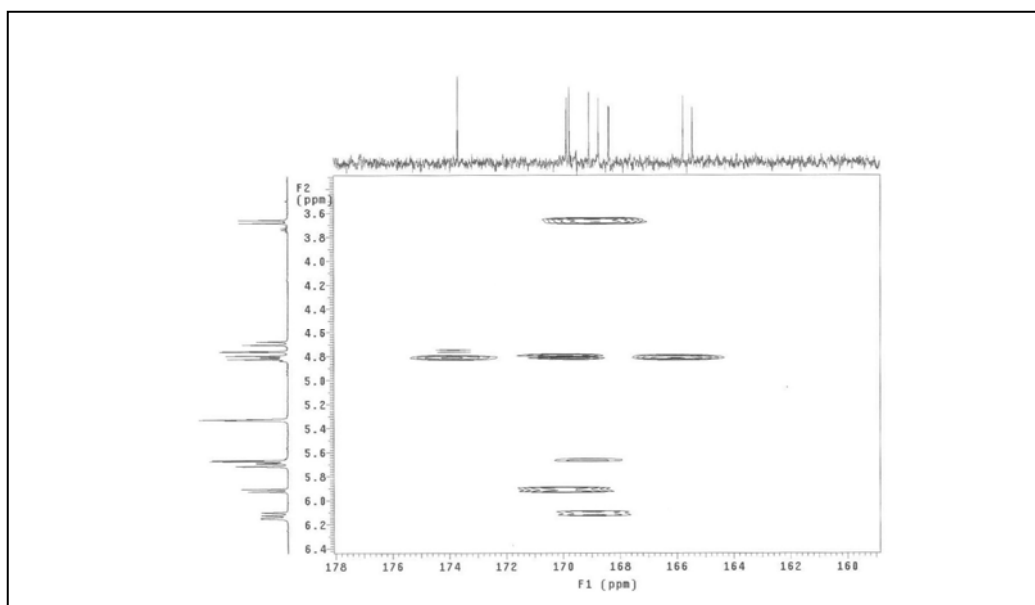


Figura 70 – Expansão do espectro gHMBC da região 160,0-178,0 δ para ^{13}C da substância 3 (500 MHz, CDCl_3).

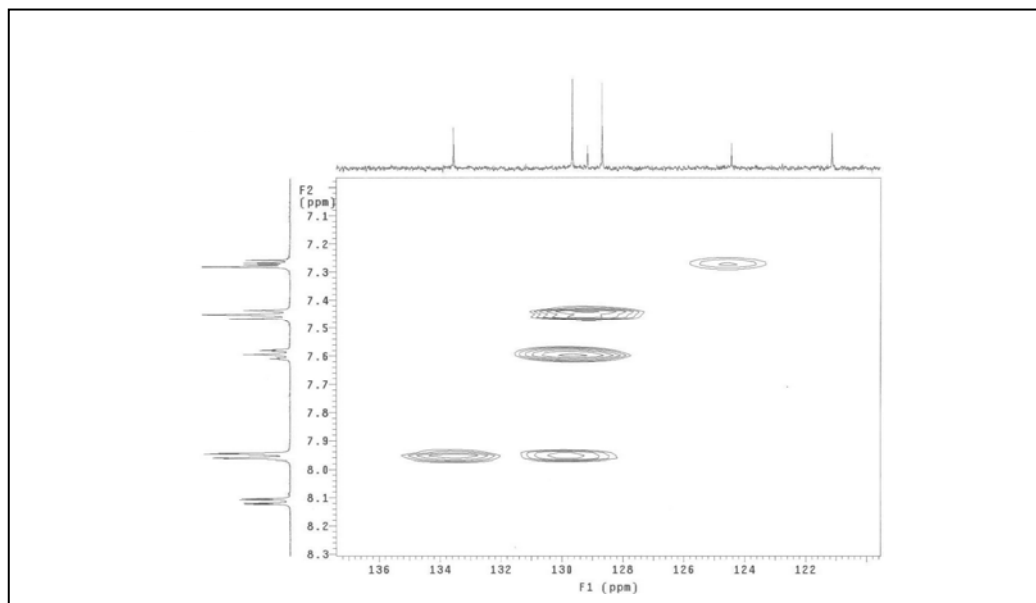


Figura 71 – Expansão do espectro gHMBC da região 122,0-140,0 δ para ^{13}C da substância 3 (500 MHz, CDCl_3).

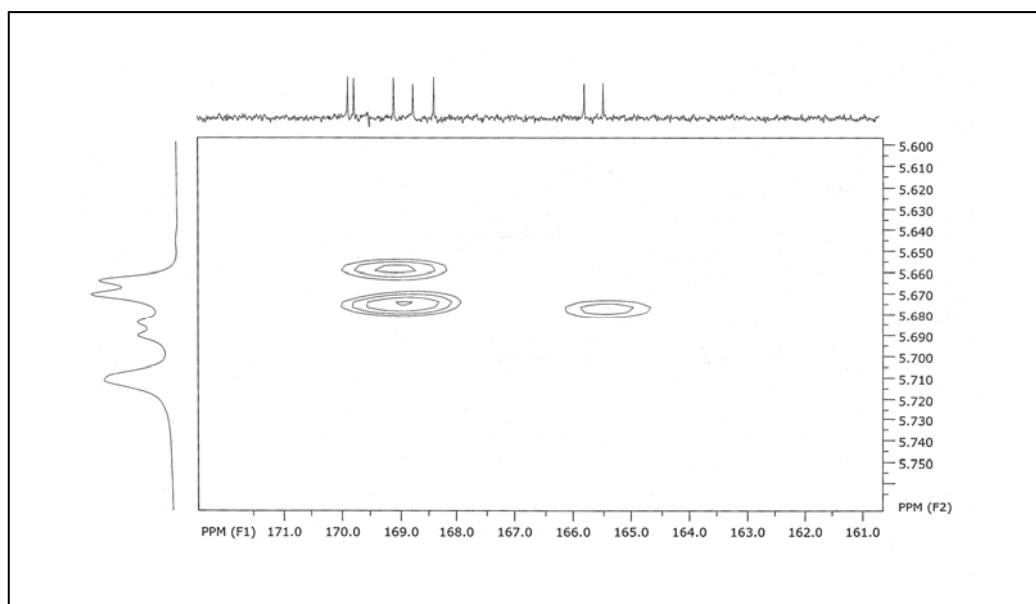


Figura 72 – Expansão do espectro gHMBC da região 161,0-172,0 δ para ^{13}C da substância 3 (500 MHz, CDCl_3).

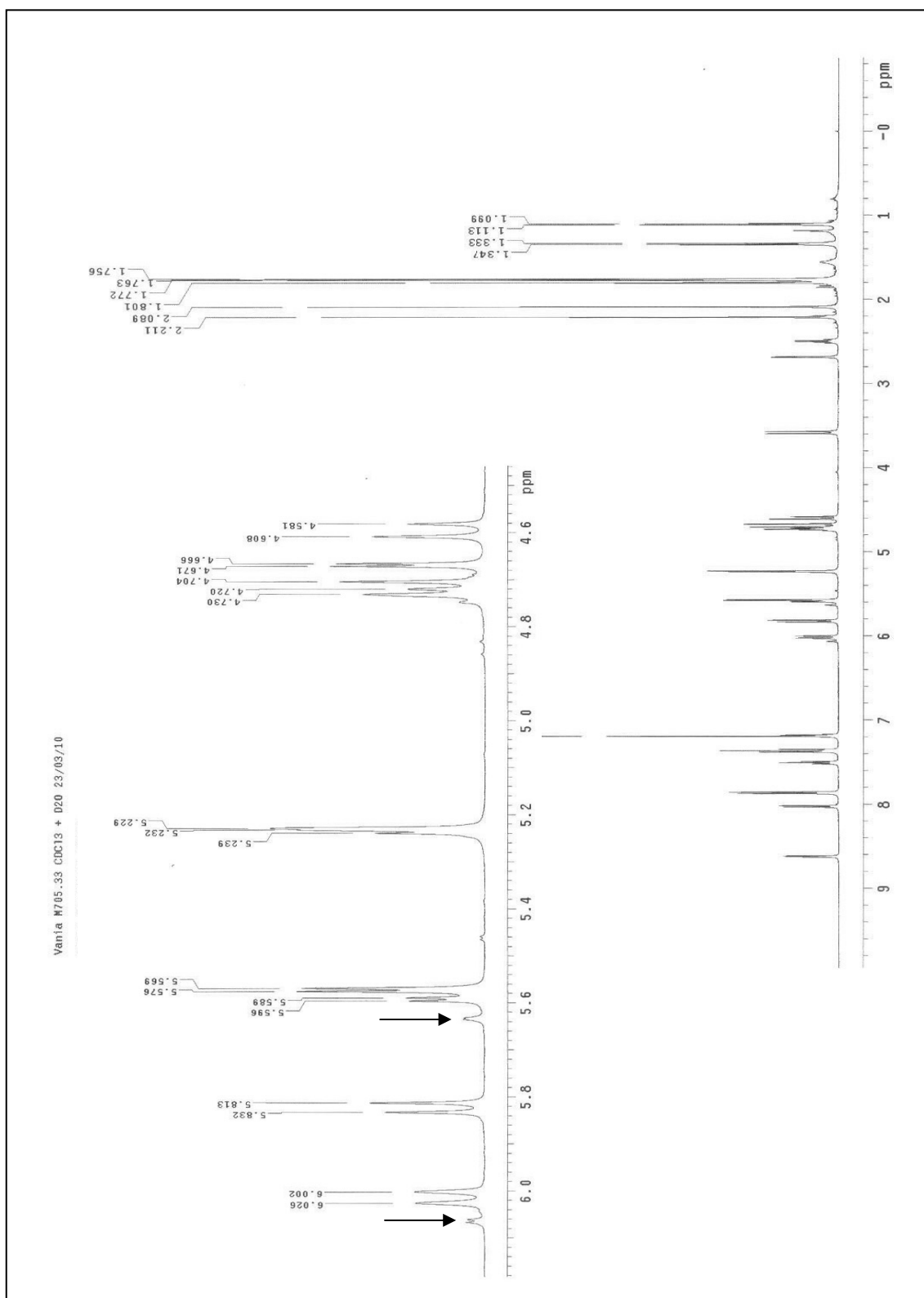


Figura 73 – Expansão da região 4,0–7,0 δ do espectro de RMN de ^1H da substância 3 com D_2O (500 MHz, CDCl_3).

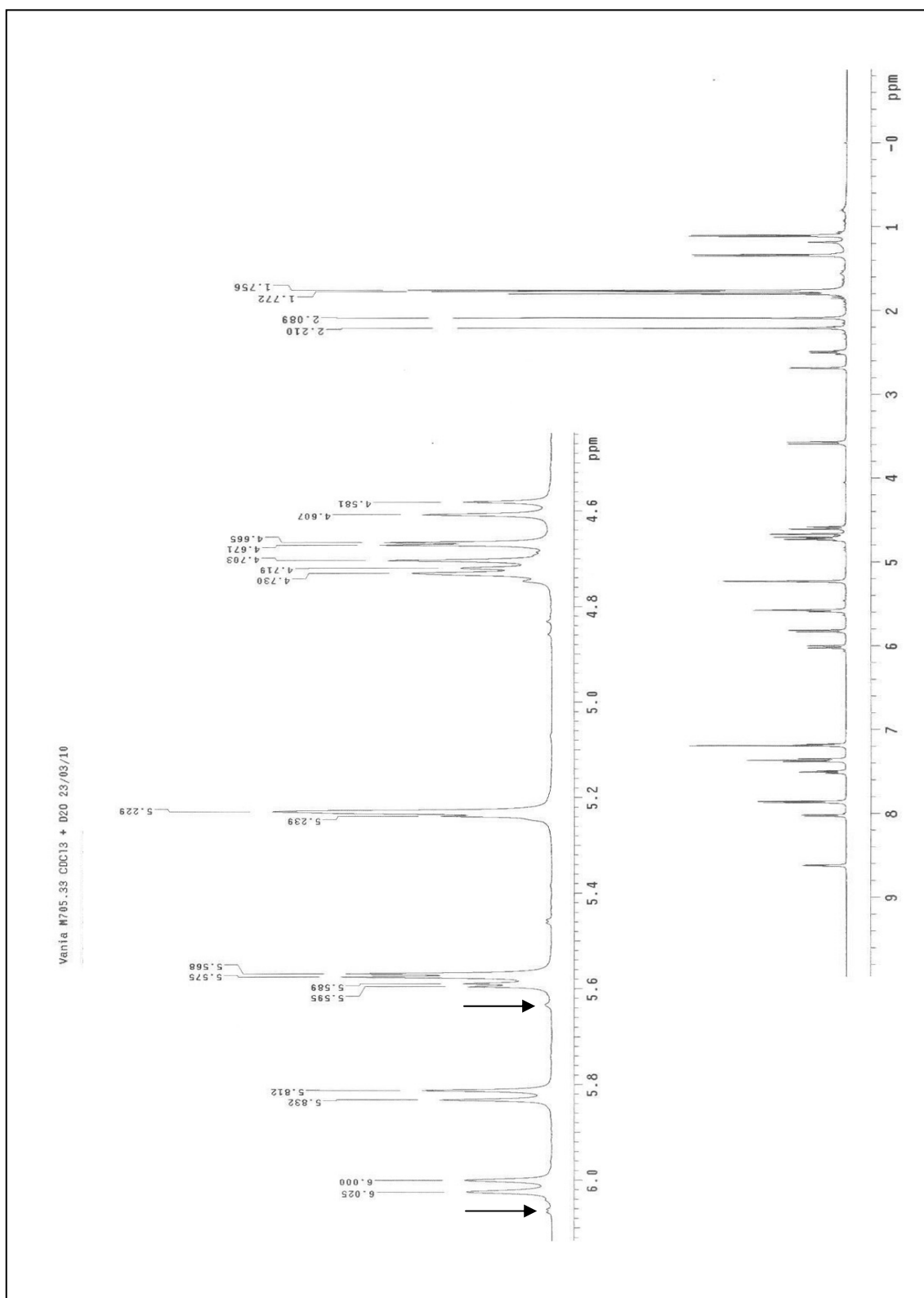


Figura 74 – Expansão da região 4,0–7,0 δ do espectro de RMN de ^1H da substância 3 com D_2O após alguns minutos (500 MHz, CDCl_3).

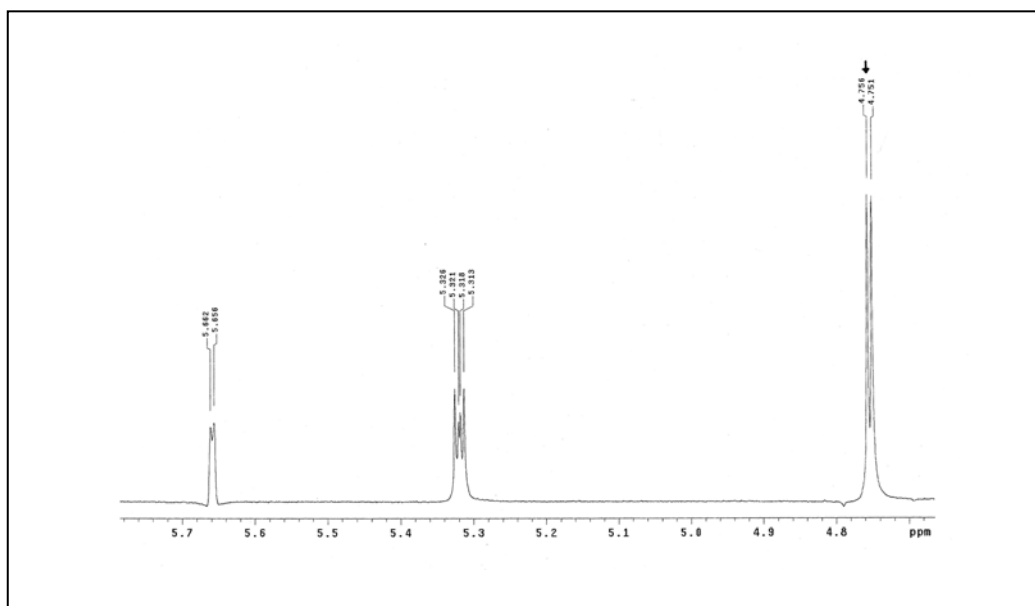


Figura 75 – Experimento de TOCSY da substância 3 na região de 4,0-5,7 (500 MHz, $CDCl_3$).

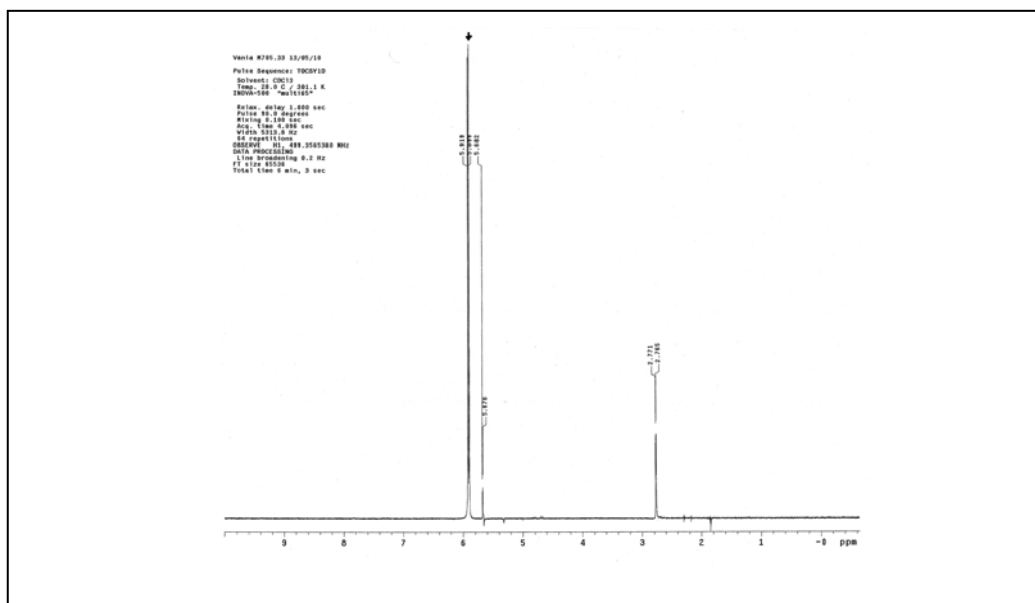


Figura 76 – Experimento de TOCSY da substância 3 na região de 2,0-7,0 (500 MHz, $CDCl_3$).

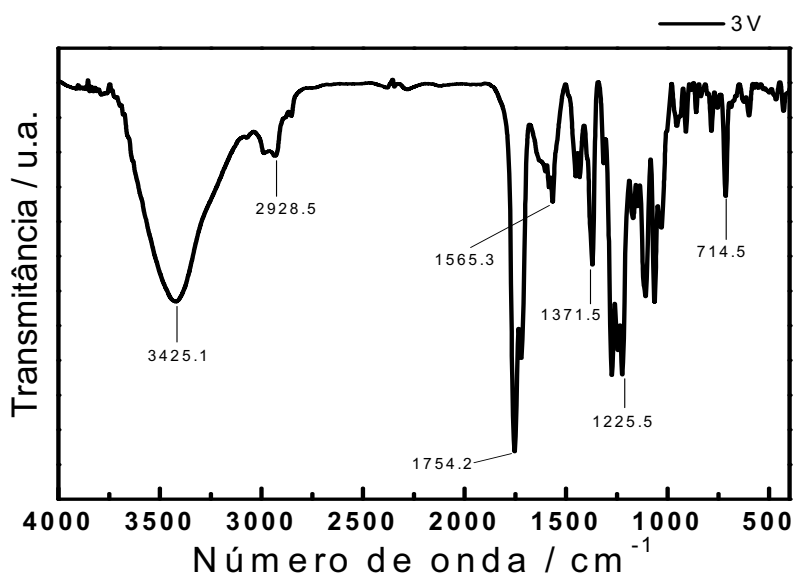


Figura 77 – Espectro no IV da substância 3, em pastilha de KBr.

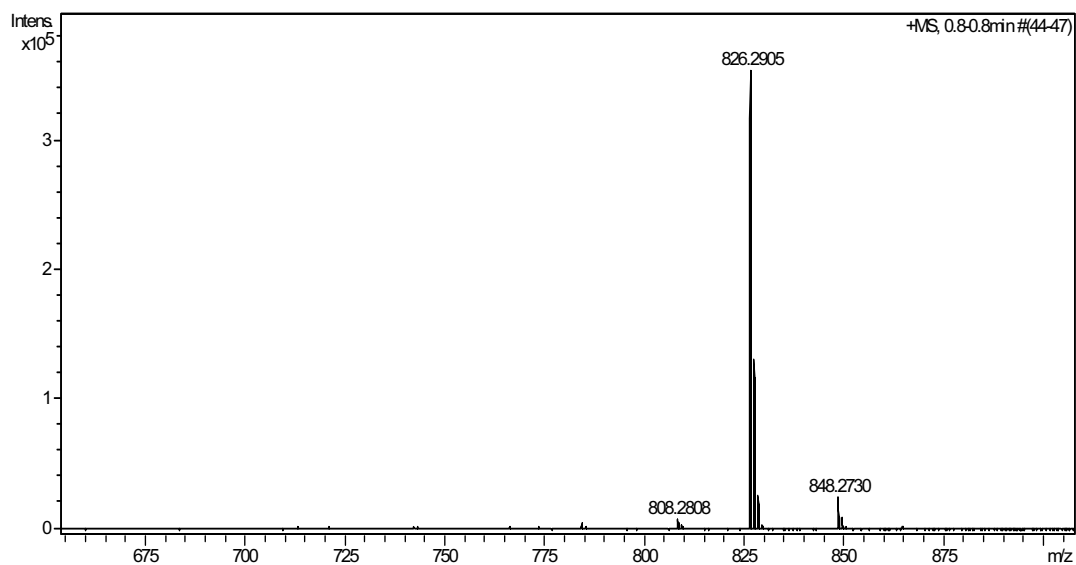
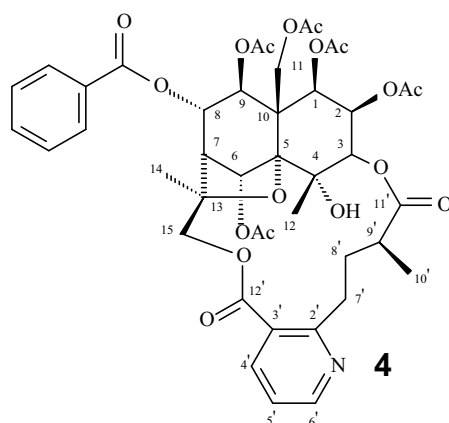


Figura 78 – Espectro de massas para a substância 3.

5.5 Determinação estrutural da substância 4



A substância **4** apresenta fórmula molecular $C_{43}H_{49}NO_{18}$, definida pelo espectro de massas de alta resolução (Figura 98, p. 137), o qual apresentou pico do íon molecular em m/z 868,3020 $[M+1]^+$.

A análise do espectro de RMN de 1H (Tabela 6, p. 124, Figura 81, p. 128) da substância **4**, permitiu identificar a unidade alcaloídica devido à presença de três duplos dubletos em 8,19 δ ($J= 8,0$ e 2,0 Hz; H-4'), 7,18 δ ($J= 8,0$ e 5,0 Hz; H-5') e 8,66 δ ($J= 5,0$ e 2,0 Hz; H-6'), caracterizando o anel piridínico 2,3-dissubstituído.

Na região do espectro de RMN de 1H entre 2,28 e 1,15 δ são observados seis singletos, integrando para três hidrogênios cada, referentes a grupos metílicos, dos quais cinco são característicos de grupos acetatos, mostrando sinais em 2,28; 2,11; 2,07; 1,82; 1,79 δ e um relativo à H-12 em 1,51 δ , respectivamente. Foi observado ainda dois dubletos em 1,15 δ (3H, $J= 7,0$ Hz) e 1,51 δ (3H, $J= 1,0$ Hz), referentes ao grupo metílico H-10' e H-12.

A unidade sesquiterpênica pode ser visualizada através de sinais em 5,64 δ (1H; $J= 3,5$ Hz; H-1); 5,12 δ (1H; $J= 3,0$ Hz; H-2); 4,87 δ (1H; $J= 3$ Hz; H-3); 2,60 δ (1H; $J= 3,5$ Hz; H-7); 5,70 δ (1H; $J= 10$ e 3,5 Hz; H-8); 5,83 δ (1H; $J= 10,0$ Hz; H-9); 4,62 δ (1H; $J= 13,0$ Hz; H-11a), 4,73 δ (1H; $J= 13,0$ Hz; H-11b), 3,72 δ (1H; $J= 12$ Hz; H-15b); 5,63 δ (1H; $J= 11,5$ Hz; H-15a); 1,51 δ (3H; $J= 1,0$ Hz; CH_3 -12), 6,63 δ (1H; H-6) e 1,73 δ (3H; H-14).

O grupo benzoato foi identificado através de um duplo dubleto em 7,86 δ (1H; $J= 8,0$; 1,0 Hz, H-o) e dois tripletos em 7,51 δ ($J= 8,0$ Hz, H-p) e 7,36 ($J= 8,0$ Hz, H-m). A análise do mapa de contorno de gHMBC (Figura 94, p. 135)

exibiu a correlação entre o sinal em $5,67 \delta_H$ e o sinal em δ_C 165,45 (C-8), permitindo atribuir o grupo benzoato na posição 8.

A substância **4** difere de **1** pelo esqueleto carbônico do tipo wilfordínico, o qual foi proposto com base em dois duplos duplos dubletos centrados em $3,79 \delta$ (14,0; 9,0 e 5,5 Hz; H-7'a) e $2,95 \delta$ (13,0; 8,0 e 5,5 Hz; H-7'b); um multiplete na região de $2,40 \delta$, atribuídos a H-8' e H-9', além de um dubleto em $1,15 \delta$ (7,0 Hz; H-10'), caracterizando a presença do grupo wilfordato (Figura 80, p. 127). As constantes de acoplamento foram calculadas por meio do experimento HOM_2d_1 (Figura 95-97, p. 136-137).

A presença do esqueleto carbônico do tipo wilfordínico foi confirmada com base nos sinais do experimento de DEPT 135° , devido à presença de dois carbonos metilênicos em $33,12$ e $33,46 \delta$, característicos de C-7' e C-8', respectivamente (Figura 83, p. 130).

A configuração relativa dos grupos acetatos foi deduzida com base nas magnitudes das constantes de acoplamento observadas no espectro de RMN de 1H . As constantes de acoplamento podem ser visualizadas na tabela 6, p. 124.

O dado obtido de rotação óptica específica foi de $[\alpha]_D^{23,6} = -1.07$ ($CHCl_3$, c 0,2 g/100 mL).

Tabela 6. Dados de RMN de ^1H e RMN-2D (CDCl_3 , 500 MHz) da substância 4

H	δ (ppm), Mult. <i>J</i> (Hz)	δ ^{13}C (ppm)	gHMBC	gCOSY
1	5,64 d (3,5)	72,58 (CH)	51,42(C-10); 60,62(C-11)	N.O.
2	5,12 t (3,0)	69,01 (CH)	N.O.	N.O.
3	4,87 d (3,0)	75,43 (CH)	23,30(C-12); 94,02 (C-5);72,58 (C-1)	N.O.
4	-----	69,77 q	-----	-----
4-OH	4,77 d (0,5)	-----	23,30(C-12); 174,99(C-11')	N.O.
5	-----	94,02 q	-----	-----
6	6,63 s	74,53 q	51,42(C-10); 74,53(C-6); 85,81(C-13); 94,02(C-5); 169,69(AC-6)	N.O.
7	2,60 d (3,5)	49,97 (CH)	74,24(C-8); 94,02(C-5)	N.O.
8	5,70 dd (3,5 e 10,0)	74,24 (CH)	N.O.	N.O.
9	5,83 d (10,0)	74,15 (CH)	51,61(C-10); 61,00(C-11); 72,66(C-1); 74,92(C-6); 170,23(C-9)	N.O.
10	-----	51,42 q	-----	-----
11a	4,62 d (13,0)	60,62 (CH_2)	51,42(C-10); 94,02(C-5); 170,03(AC-11)	5,27(H- 11b)
11b	4,73 d (13,0)	60,62 (CH_2)	74,15(C-9); 94,02(C-5)	5,81(H-1)
12	1,51 d (1,0)	23,30 (CH_3)	69,77(C-4); 75,43(C-3); 94,02(C-5)	N.O.
13	-----	85,81 q	-----	-----
14	1,73 s	19,15 (CH_3)	49,97(C-7); 70,20(C-15); 85,81(C-13)	N.O.
15a	3,72 d (12,0)	70,20 (CH_2)	166,91(C-12')	5,89(H-15b)
15b	5,63 d (12,0)	70,20 (CH_2)	85,81(C-13); 166,91 (C-12')	N.O.
2'	-----	163,70 q	-----	-----
3'	-----	124,55 q	-----	-----
4'	8,19 dd (2,0 e 8,0)	138,73 (CH)	152,91(C-6'); 163,70(C-2');166,91 (C-12')	N.O.

5'	7,18 dd (5,0 e 8,0)	121,10 (CH)	124,55(C-3')	8,67(H-6')	
6'	8,66 dd (2,0 e 5,0)	152,91 (CH)	N.O.	-----	
7'a	3,79 ddd (14,0; 9,0; 5,5)	33,12 (CH ₂)	33,12	N.O.	N.O.
7'b	2,95 ddd (13,0; 8,0; 5,5)	33,12 (CH ₂)	33,12	38,63(C-9'); 33,46(C-8')	N.O.
8'	2,58 q (7,5)	33,46 (CH ₂)	45,20	N.O.	N.O.
9'	2,40 m	38,6 (CH ₃)	38,6	N.O.	4,61(H-7')
10'	1,15 d (7,0)	18,34 (CH ₃)	18,34	33,12 (C-7'); 38,63(C-9'); 174,99 (C-11')	2,54(H-8')
11'	-----	174,99 q	174,99	-----	-----
12'	-----	166,91 q	166,91	-----	-----
1-CH ₃ CO	1,79 s	20,54	20,54	169,23(Ac-1)	N.O.
1-CH ₃ CO	-----	169,23	169,23	-----	-----
2-CH ₃ CO	2,07 s	20,98	20,98	168,65(Ac-2)	N.O.
2-CH ₃ CO	-----	168,65	168,65	-----	-----
6-CH ₃ CO	2,11 s	21,45	21,45	169,69(Ac-6)	N.O.
6-CH ₃ CO	-----	169,69	169,69	-----	-----
9-CH ₃ CO	1,82	20,74	20,74	169,86(Ac-9)	
9-CH ₃ CO	-----	169,86	169,86	-----	-----
11-CH ₃ CO	2,28	21,23	21,23	170,03(Ac-11)	N.O.
11-CH ₃ CO	-----	170,03	170,03	-----	-----
COPh	-----	165,45	165,45	-----	-----
ipso	-----	128,94	128,94	-----	-----
orto	7,86 dd (1,0 e 8,0)	129,67 (CH)	129,67	133,69(C-4''); 165,45 (OBz)	N.O.
meta	7,36 t like (8,0)	128,73 (CH)	128,73	128,73(C-3'')	7,74(Ho); 7,46(Hp)
para	7,51 t like (8,0)	133,69 (CH)	133,69	129,67 (C-2'')	-----

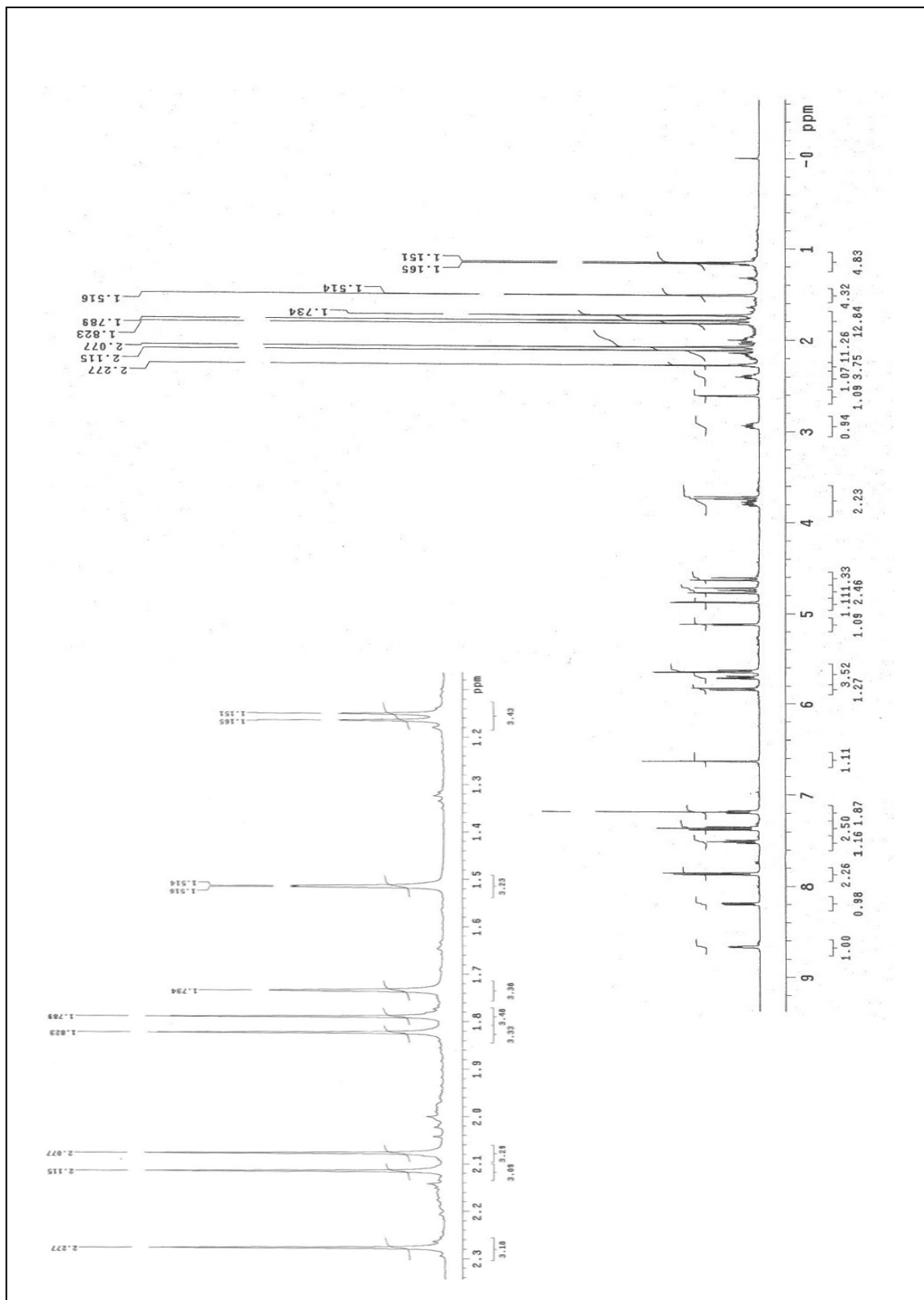


Figura 79 – Expansão da região 1,0–2,4 δ do espectro de RMN de ¹H da substância 4 (500 MHz, CDCl₃).

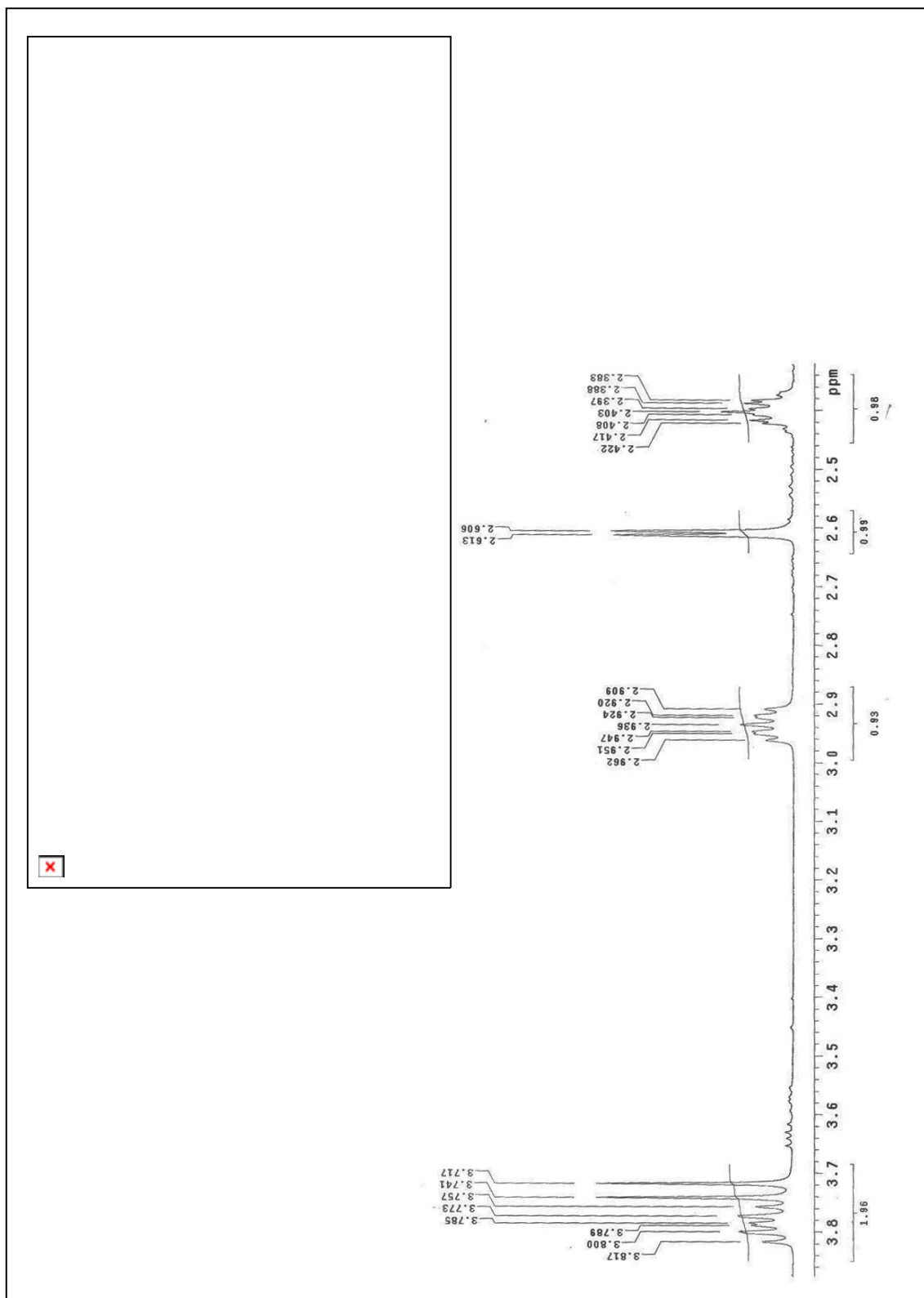


Figura 80 – Expansão da região 2,0–3,6 δ do espectro de RMN de ^1H da substância 4 (500 MHz, CDCl_3).

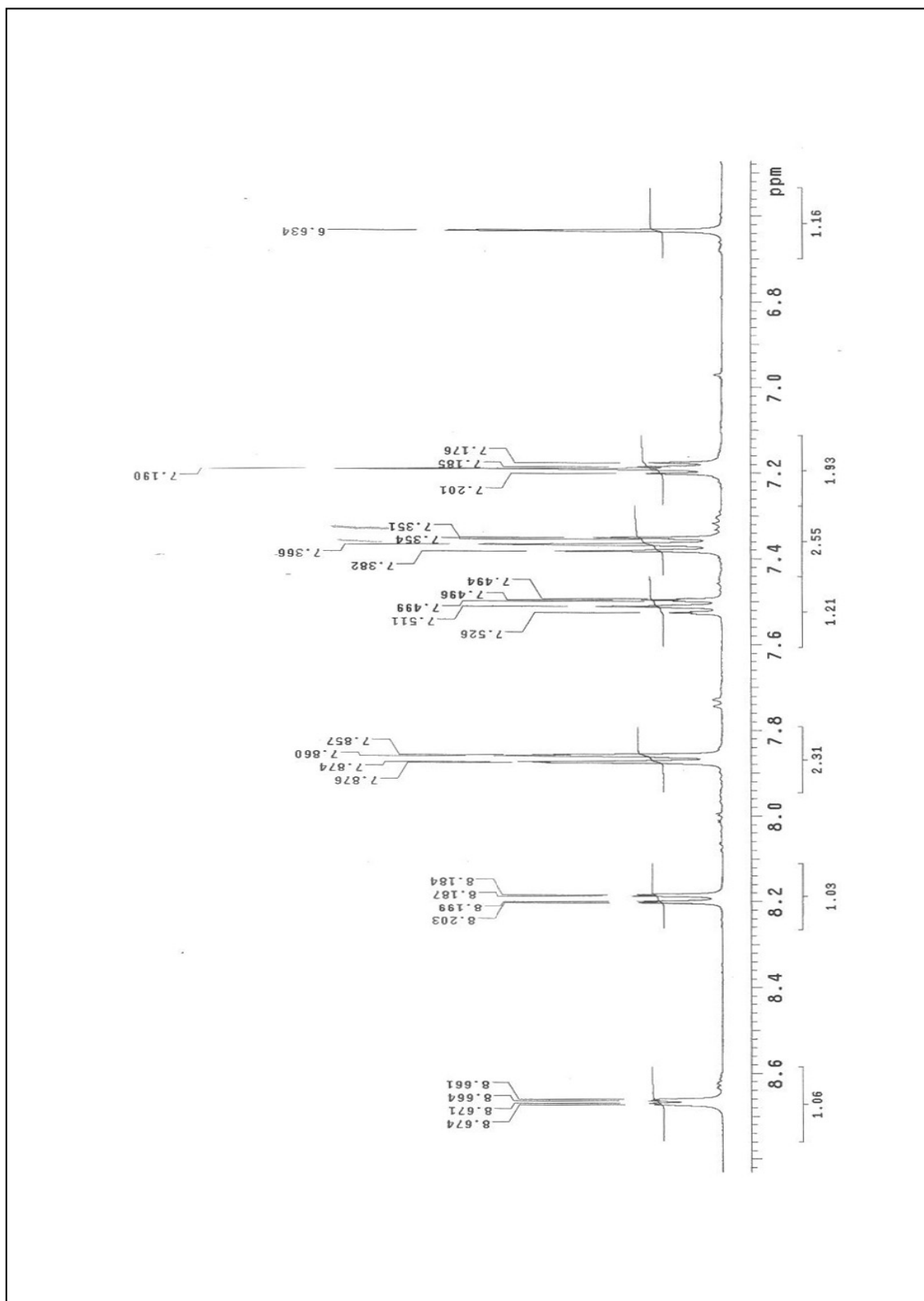


Figura 81 – Expansão da região 6,0–9,0 δ do espectro de RMN de ^1H da substância 4 (500 MHz, CDCl_3).

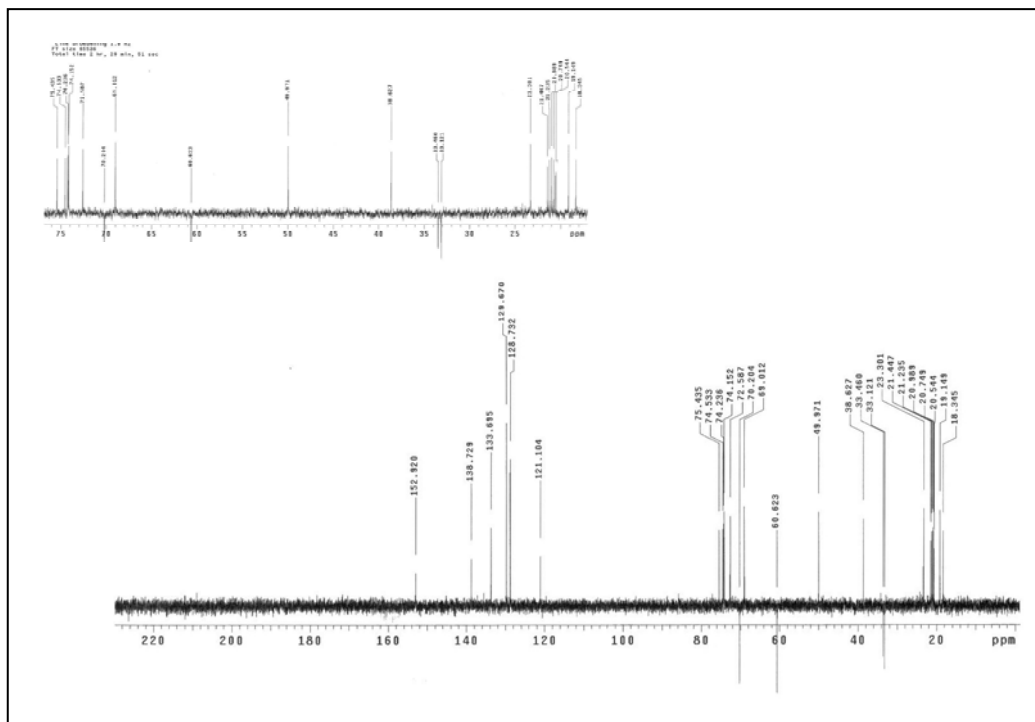


Figura 83 – Expansão da região 20–75 δ do espectro de DEPT 135° da substância 4 (500 MHz, CDCl_3).

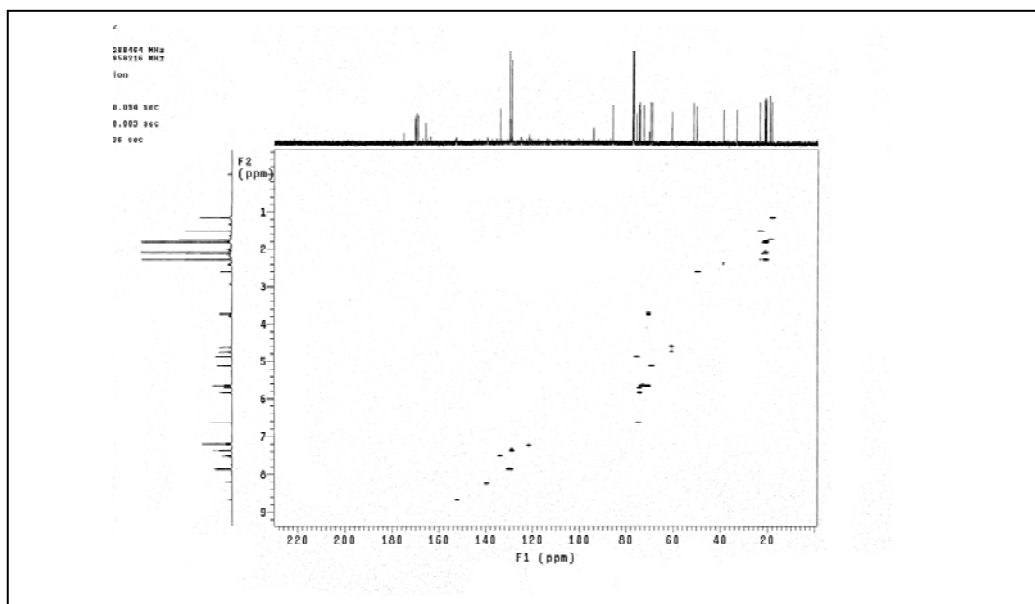


Figura 84 – Espectro gHMBC da substância 4 (500 MHz, CDCl_3).

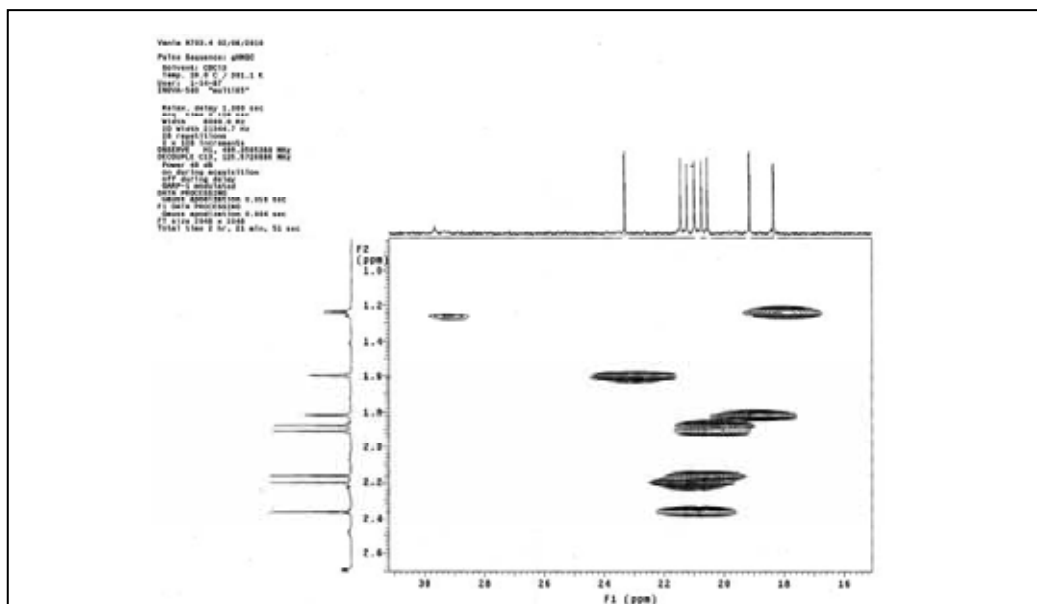


Figura 85 – Expansão na região entre 16-30 δ do espectro gHMQC da substância 4 (500 MHz, CDCl_3).

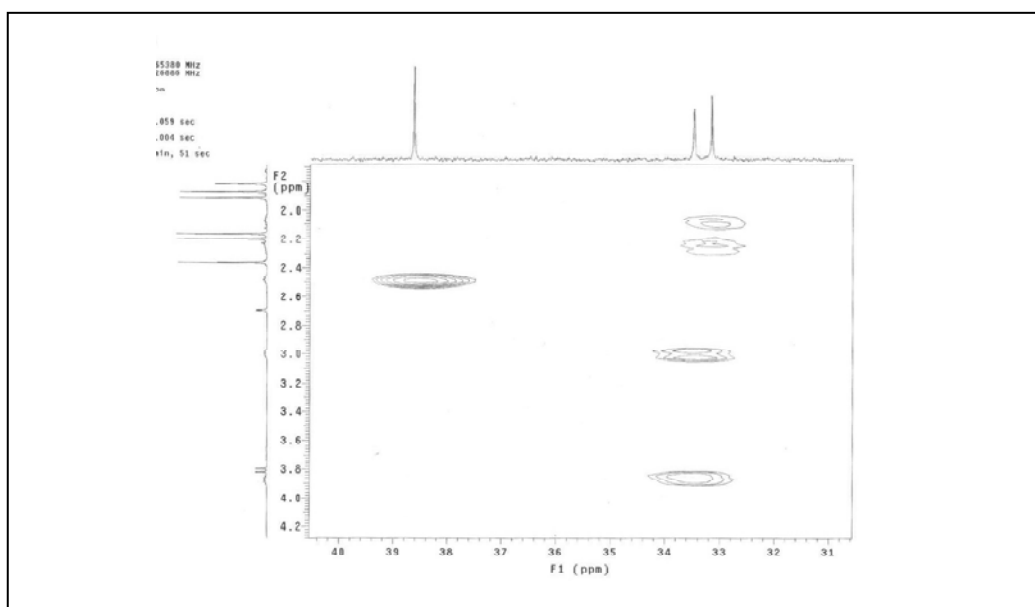


Figura 86 – Expansão na região entre 31-40 δ do espectro gHMQC da substância 4 (500 MHz, CDCl_3).

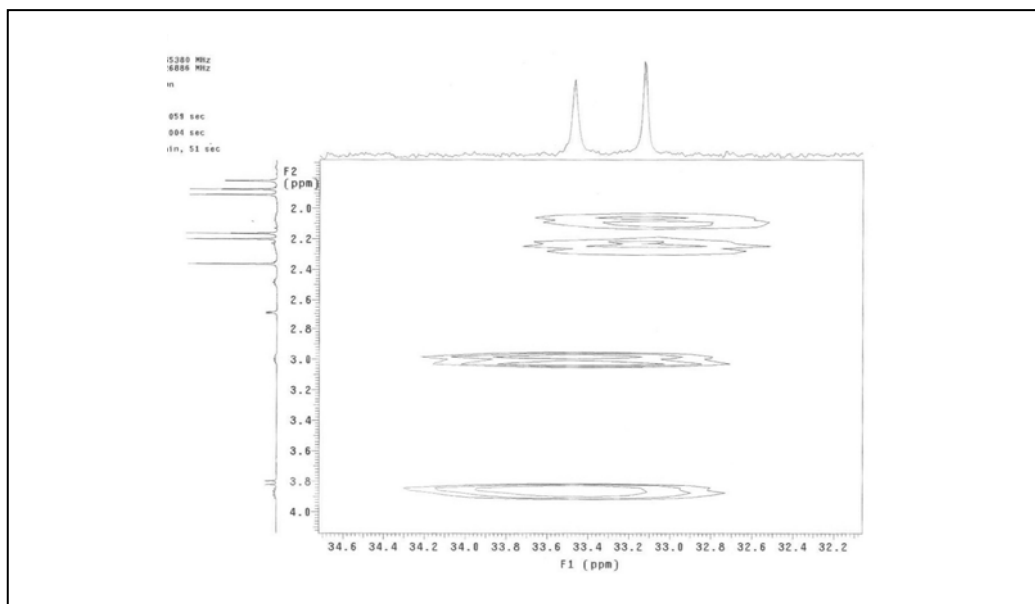


Figura 87 – Expansão na região entre 32-35,0 δ do espectro gHMBC da substância 4 (500 MHz, CDCl_3).

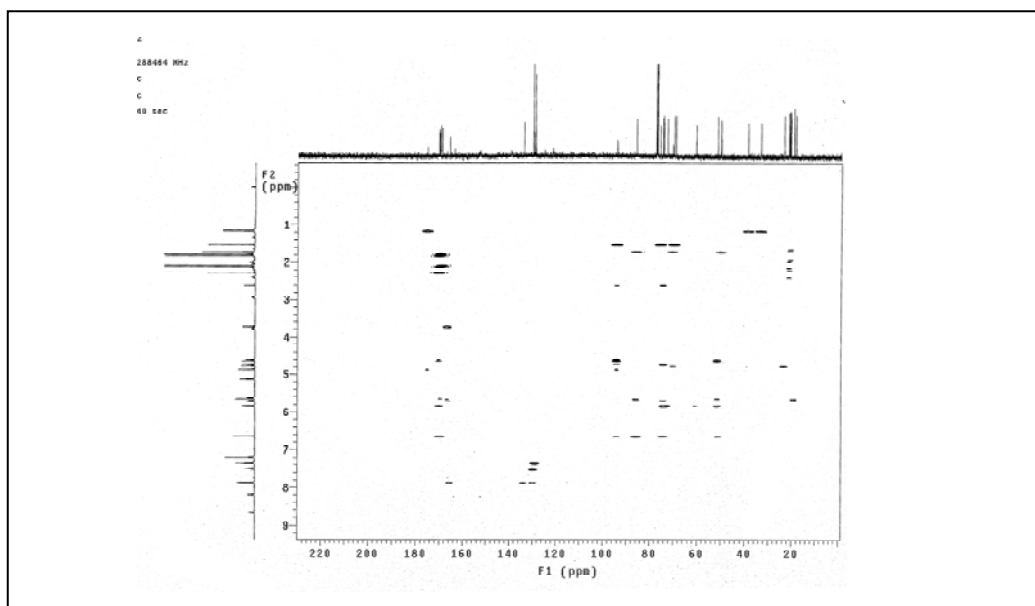


Figura 88 – Espectro gHMBC da substância 4 (500 MHz, CDCl_3).

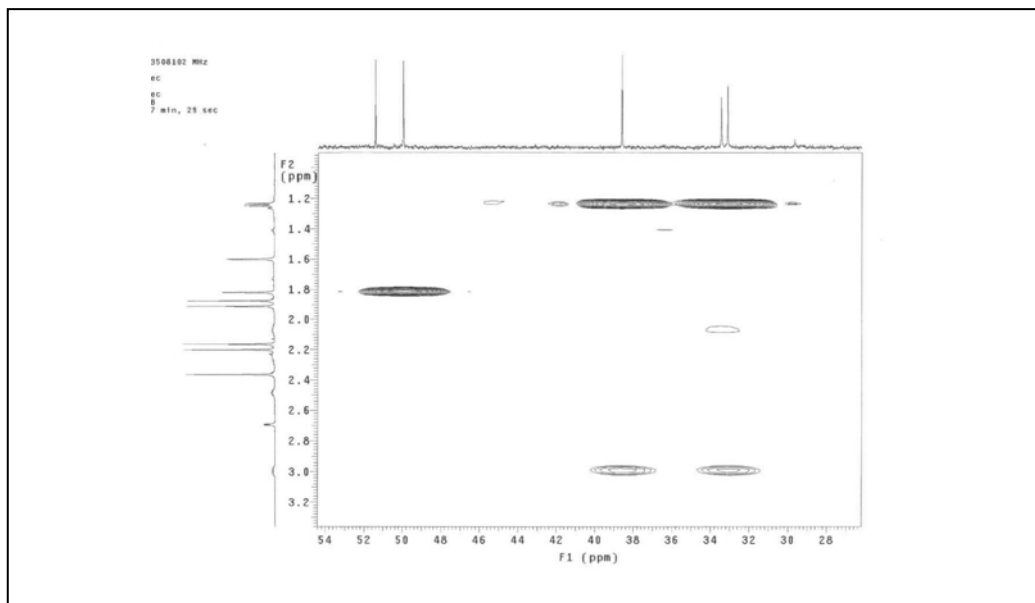


Figura 89 – Expansão na região entre 28-54 δ do espectro gHMBC da substância 4 (500 MHz, CDCl_3).

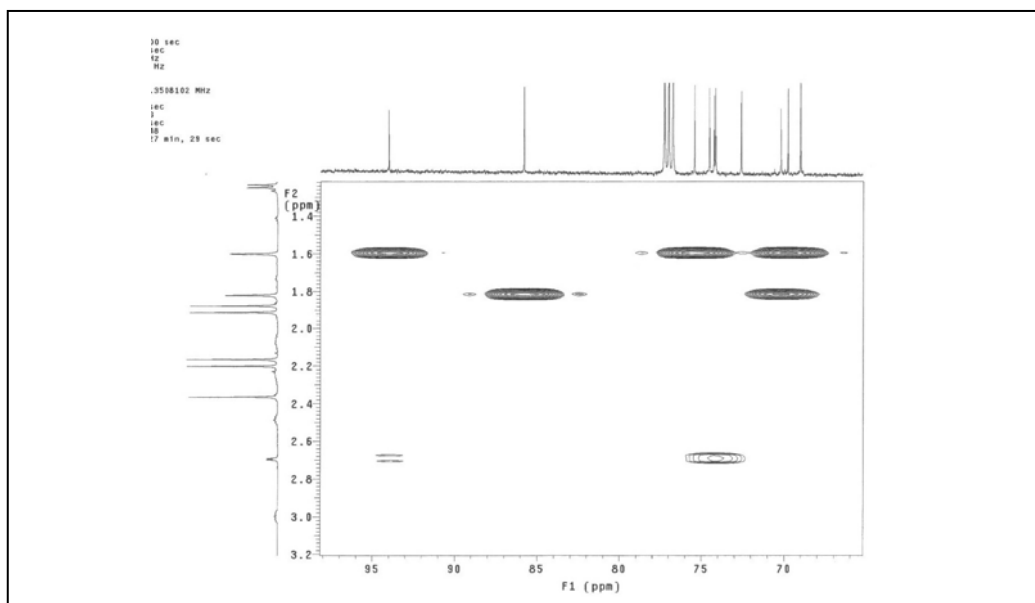


Figura 90 – Expansão na região entre 60-95 δ do espectro gHMBC da substância 4 (500 MHz, CDCl_3).

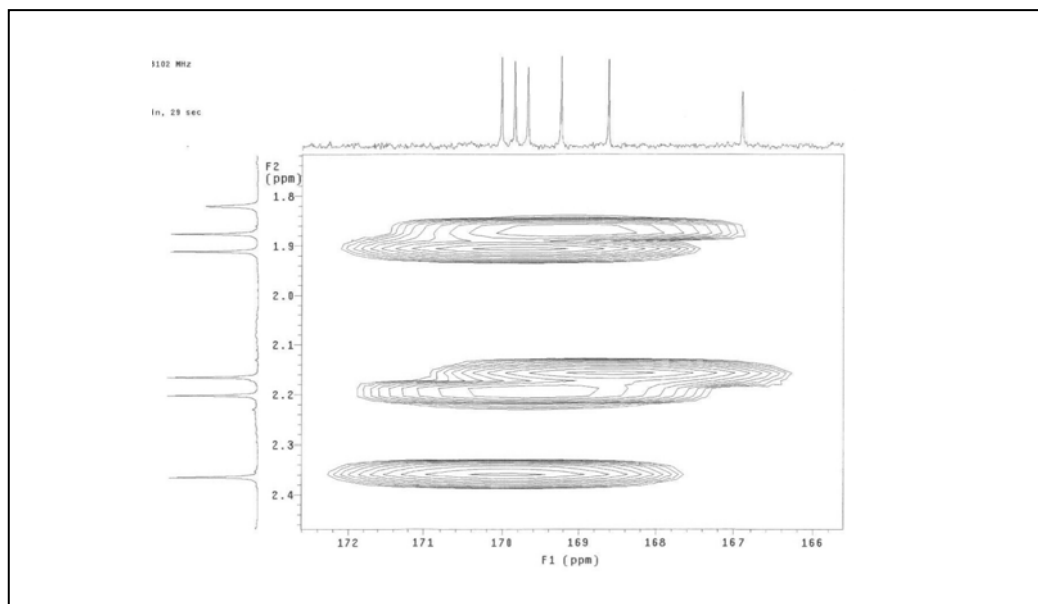


Figura 91 – Expansão na região entre 166-172 δ do espectro gHMBC da substância 4 (500 MHz, CDCl_3).

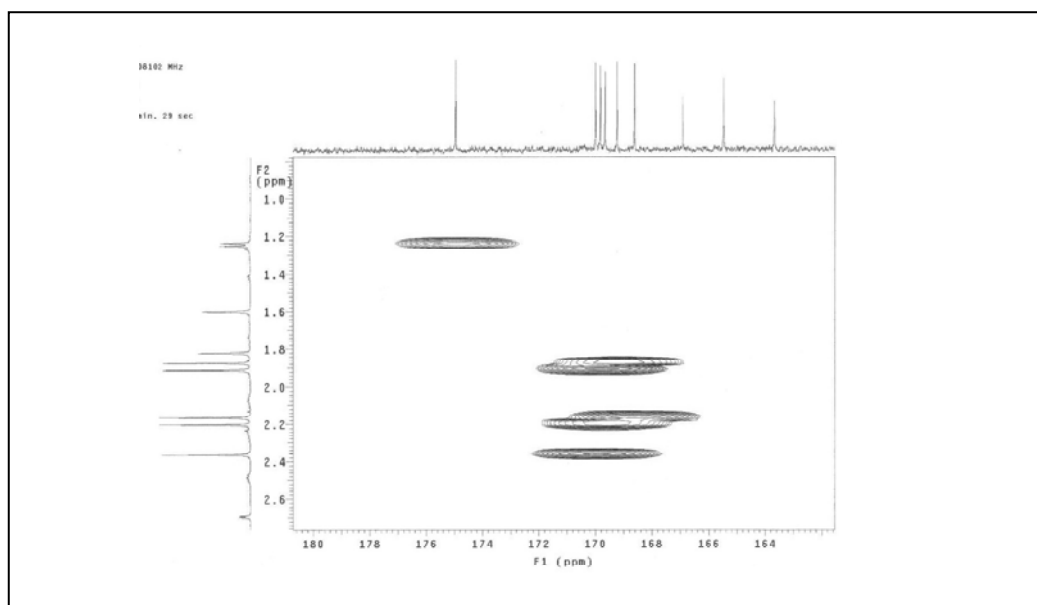


Figura 92 – Expansão na região entre 163-180 δ do espectro gHMBC da substância 4 (500 MHz, CDCl_3).

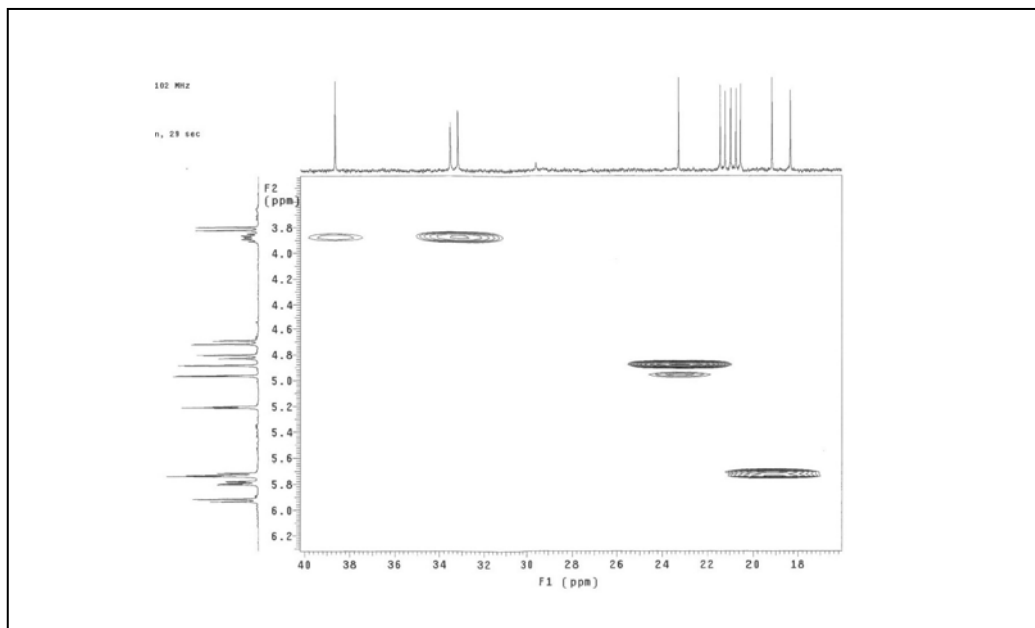


Figura 93 – Expansão na região entre 18-40 δ do espectro gHMBC da substância 4 (500 MHz, CDCl_3).

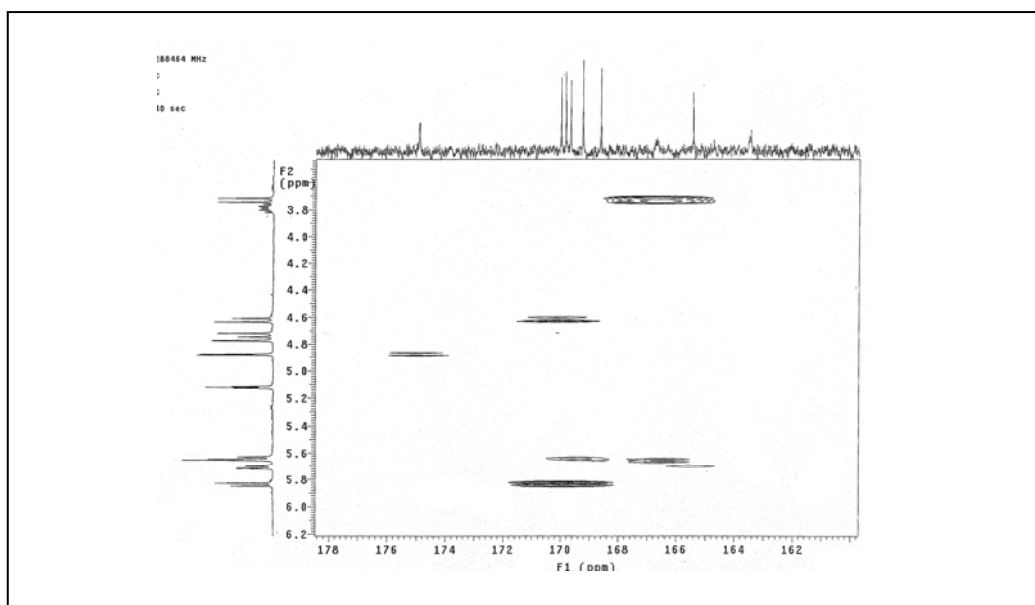


Figura 94– Expansão na região entre 162-178 δ do espectro gHMBC da substância 4 (500 MHz, CDCl_3).

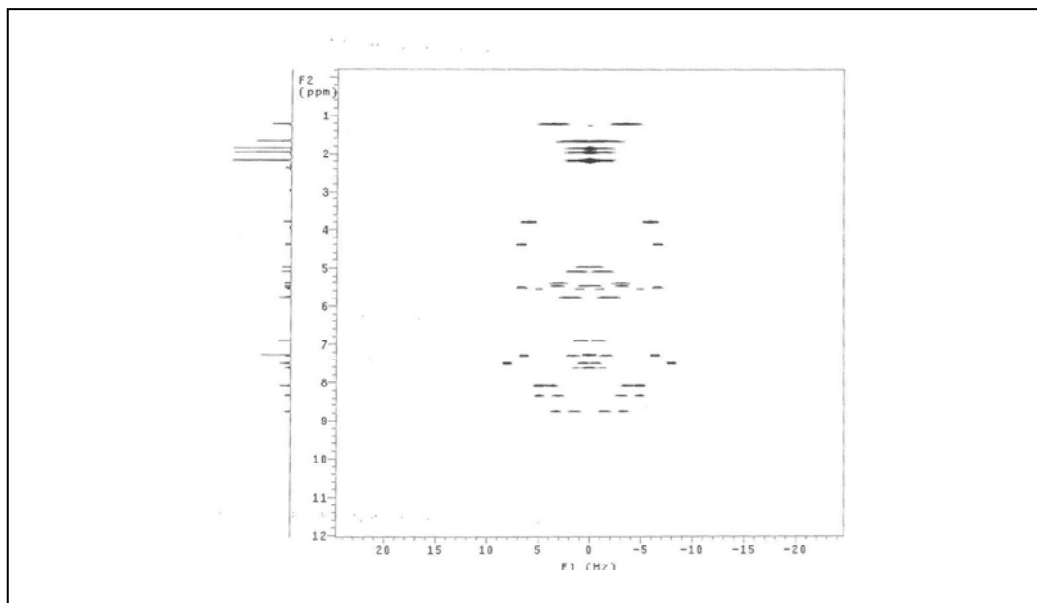


Figura 95 – Espectro HOM₂d₁ da substância 4 (500 MHz, CDCl₃).

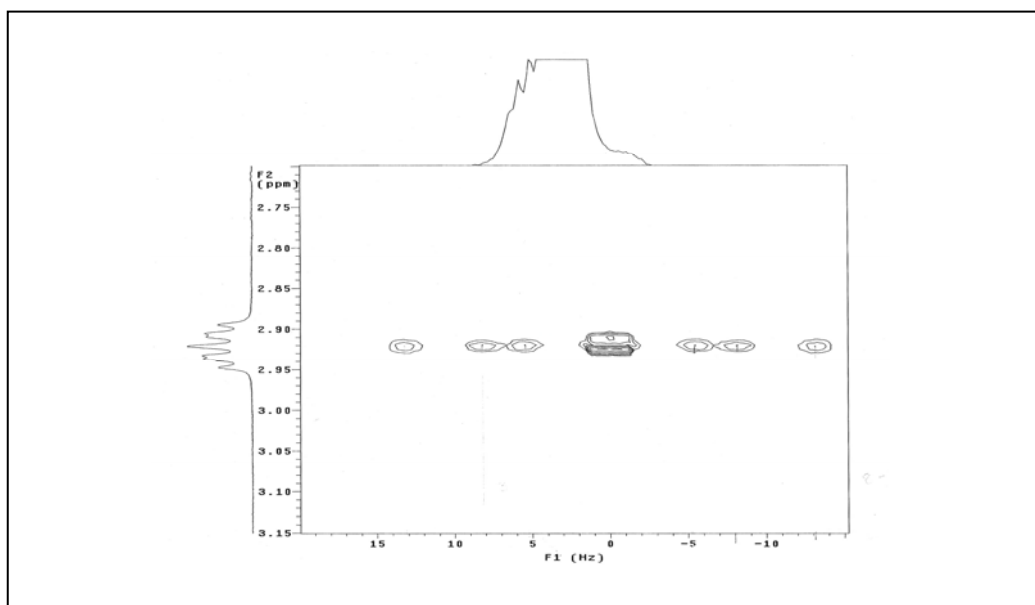


Figura 96 – Expansão na região entre 2-3 δ do espectro HOM₂d₁ da substância 4 (500 MHz, CDCl₃).

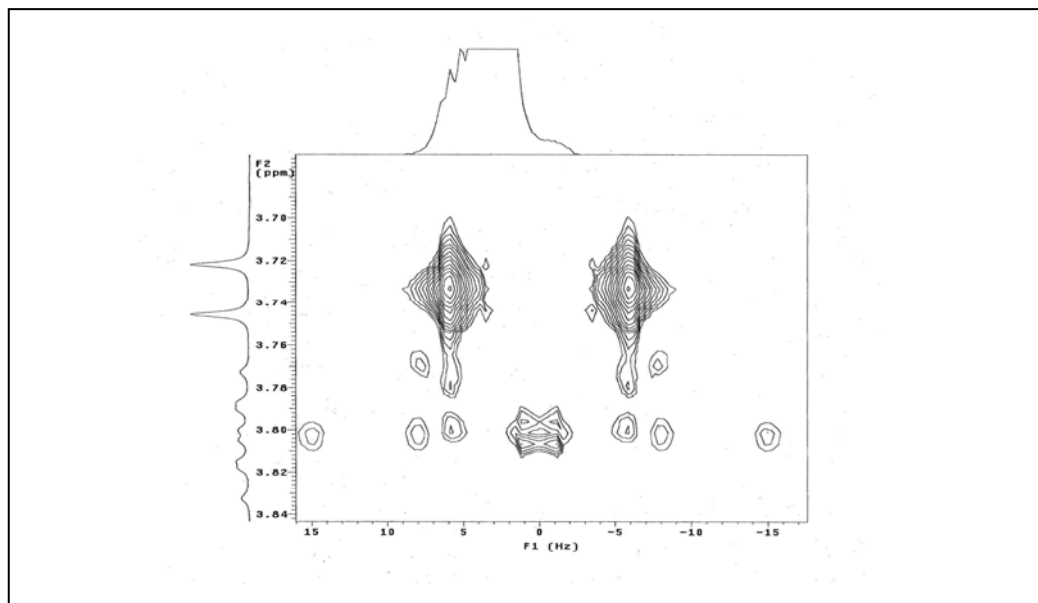


Figura 97 – Expansão na região entre 3,50-3,70 δ do espectro HOM_2d_1 da substância 4 (500 MHz, CDCl_3).

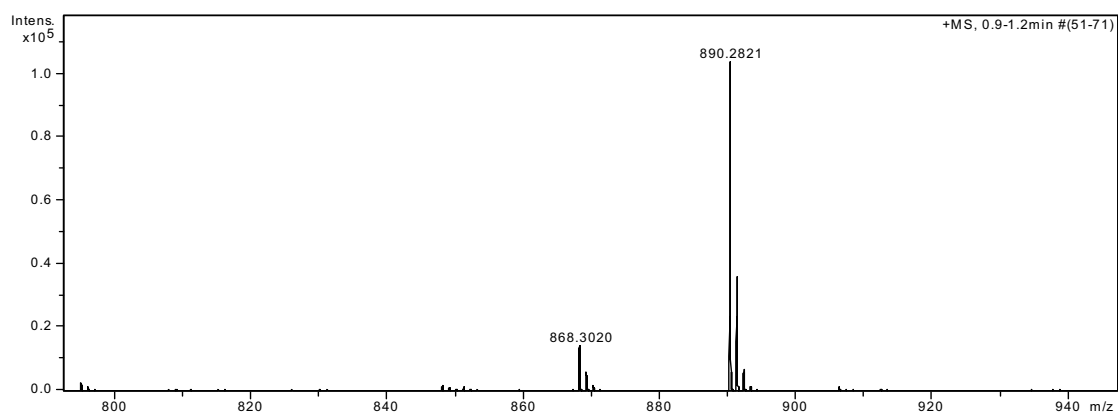
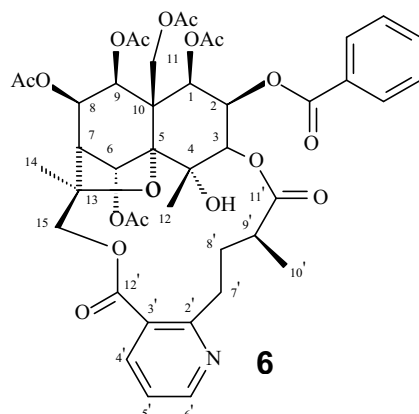


Figura 98 – Espectro de massas da substância 4

5.6 Determinação estrutural da substância 6



A substância **6** apresenta fórmula molecular $C_{43}H_{49}NO_{18}$, definida pelo espectro de massas de alta resolução, o qual apresentou pico do íon molecular em m/z 868,3010 $[M+1]^+$.

A análise do espectro de RMN de 1H (Tabela 7, p. 140, Figura 103, p. 146) da substância **6**, permitiu identificar a unidade alcaloídica devido à presença de três duplos dubletos em $8,68 \delta$ ($J= 5,0$ e $2,0$ Hz; H-6'), $8,33 \delta$ ($J= 8,0$ e $2,0$ Hz; H-4') e $7,21 \delta$ ($J= 8,0$ e $5,0$ Hz; H-5'), caracterizando o anel piridínico 2,3-dissubstituído.

A unidade sesquiterpênica pode ser visualizada através de sinais em $5,69 \delta$ (1H; d; $J= 4,0$ Hz; H-1); $5,40 \delta$ (1H; dd, $J= 4,0$ e $3,0$ Hz; H-2); $5,01 \delta$ (1H; d, $J= 3$ Hz; H-3); $2,30 \delta$ (1H; d, $J= 4,0$ Hz; H-7); $5,48 \delta$ (1H; dd, $J= 6,0$ e $4,0$ Hz; H-8); $5,33 \delta$ (1H; d, $J= 6,0$ Hz; H-9); $4,33 \delta$ (1H; d, $J= 13,0$ Hz; H-11a), $5,44 \delta$ (1H; d, $J= 13,0$ Hz; H-11b), $3,73 \delta$ (1H; d, $J= 12$ Hz; H-15b); $5,68 \delta$ (1H; d, $J= 12,0$ Hz; H-15a); $1,60 \delta$ (3H; d, $J= 1,5$ Hz; CH_3 -12), $6,83 \delta$ (1H; H-6) e $1,61 \delta$ (3H; H-14).

O esqueleto carbônico do tipo wilfordínico observado na substância **6** foi proposto com base nos três multipletos em $1,92 \delta$, $2,24 \delta$ e $2,35 \delta$, atribuídos aos H-8'a, H-8b' e H-9', respectivamente, dois duplos duplos dubletos em $3,90 \delta$ e $2,88 \delta$, atribuídos a H-7a' e H-7b', além de um dubleto em $1,15 \delta$ (3H), atribuídos ao H-10'.

A presença do esqueleto carbônico do tipo wilfordínico foi confirmada pela presença de dois carbonos metilênicos em 33,23 e 33,36 δ , (experimento de DEPT 135°), característicos de C-7' e C-8', respectivamente.

Na região do espectro de RMN de ^1H entre 2,12 e 1,61 δ são observados seis singletos, integrando para três hidrogênios cada, referentes a grupos metilas, dos quais cinco são característicos de grupos acetatos, mostrando sinais em 2,12; 2,11; 2,10; 1,87; 1,78 e um relativo à H-14 em 1,61 δ . Foi observado ainda dois dubletos, em 1,15 δ (3H, $J= 7,5$ Hz) e 1,60 δ (3H, $J= 1,5$ Hz) atribuídos aos grupos metílicos H-10' e H-12, respectivamente. Os grupos acetatos foram atribuídos por experimento gHMBC, podendo as posições dos acetatos estarem trocadas.

O grupo benzoato foi identificado através de um duplo dubleto em 8,00 δ (2H; $J= 8,0$ e 1,5 Hz, H-o) e dois tripletos em 7,54 δ (1H; $J= 8,0$ Hz, H-p) e 7,43 δ (1H; $J= 8,0$ Hz, H-m).

A configuração relativa dos grupos acetatos e benzoato foram deduzidas com base nas magnitudes das constantes de acoplamento observadas no espectro de RMN de ^1H , sendo comparadas com dados observados na literatura, corroborando a proposta estrutural deste alcalóide piridínico sesquiterpênico como a wilforina (Lião, 1997). Os espectros podem ser visualizados nas figuras 99, p. 145.

O dado obtido de rotação óptica específica foi de $[\alpha]_{\text{D}}^{22,5} = +29$ (MeOH, c 0,2 g/100 mL).

Tabela 7. Dados de RMN de ^1H e RMN-2D (CDCl_3 , 500 MHz) da substância 6

H	δ (ppm), Mult. J (Hz)	δ ^{13}C (ppm)	gHMBC	gCOSY
1	5,69 d (4,0)	73,47 (CH)	52,07(C-10); 70,94(C-9)	N.O.
2	5,40 dd (4,0 e 3,0)	69,79 (CH)	N.O	N.O
3	5,01 d (3,0)	75,93 (CH)	69,79(C-2); 73,47 (C-1); 73,69;(C-6); 93,72 (C-5)	5,40(H-12)
4	-----	69,74 q	-----	-----
4-OH	4,91 d (1,5)	-----	23,10(C-12); 69,79(C-2)	1,6(H-9')
5	-----	93,72 q	-----	-----
6	6,83 s	73,69 (CH)	84,45(C-13); 93,72(C-5)	N.O.
7	2,30 d (4,0)	51,15 (CH)	70,94(C-9); 73,69(C-6); 93,72(C-5)	N.O.
8	5,48 dd (6,0 e 4,0)	69,03 (CH)	N.O.	2,30(H-7)
9	5,33 d (6,0)	70,94(CH)	52,07(C-10); 60,58(C-11); 73,47(C-1); 73,69(C-6)	N.O.
10	-----	52,07 q	-----	-----
11a	4,33 d (13,0)	60,58 (CH_2)	52,07(C-10); 70,94(C-9); 93,72(C-5)	5,44(H-11)
11b	5,44 d (13,0)	60,58 (CH_2)	60,58(C-11)	N.O.
12	1,60 d (1,5)	23,10 (CH_3)	69,79(C-2); 75,93(C-3); 93,72(C-5)	N.O.
13	-----	84,45 q	-----	-----
14	1,61 s	17,99 (CH_3)	51,15(C-7); 85,45(C-13)	N.O.
15a	3,73 d (12,0)	70,94 (CH_2)	166,84(C-12')	5,68(H-15)
15b	5,68 d (12,0)	70,94 (CH_2)	17,99(C-14); 84,45(C-13); 164,97(OBz)	5,68(H-14)
2'	-----	164,11 q	-----	-----
3'	-----	125,35 q	-----	-----
4'	8,25 dd (8,0 e 2,0)	138,67 (CH)	153,18(C-6'); 164,11(C-2')	N.O.
5'	7,21 dd (8,0 e 5,0)	121,12 (CH)	N.O.	N.O
6'	8,68 dd (5,0 e 2,0)	153,18 (CH)	N.O.	-----
7'a	3,90 ddd (13,5; 9,0 e 6,0)	33,23 (CH_2)	166,84(C-12')	N.O.
7'b	2,88 ddd (13,5; 6,0 e 5,2)	33,23 (CH_2)	164,11(C-2')	2,88(H-7a')

8'a	1,92 m	33,36 (CH ₂)	174,23 (C-11')	2,24(H-8b')
8'b	2,24 m	33,36 (CH ₂)	174,23 (C-11')	N.O.
9'	2,35 m	38,44 (CH)	69,74(C-4); 73,69 (C-6); 93,72(C-5)	4,61(H-7')
10'	1,15 d (7,5)	18,72 (CH ₃)	33,36(C-8'); 38,44(C-9'); 175,10 (C-11')	2,35(H-9')
11'	-----	175,10 q	-----	-----
12'	-----	166,84 q	-----	-----
1-CH ₃ CO	1,77 s	19,85	169,30(Ac-1)	N.O.
1-CH ₃ CO	-----	169,30	-----	-----
2-CH ₃ CO	2,09 s	20,95	168,81(Ac-2)	N.O.
2-CH ₃ CO	-----	168,81	-----	-----
6-CH ₃ CO	2,15 s	21,45	169,90(Ac-6)	N.O.
6-CH ₃ CO	-----	169,90	-----	-----
9-CH ₃ CO	1,83 s	21,21	170,03(Ac-8)	N.O.
9-CH ₃ CO	-----	170,03	-----	-----
11-CH ₃ CO	2,28	20,74	170,23(Ac-9)	N.O.
11-CH ₃ CO	-----	170,23	-----	-----
COPh	-----	164,97	-----	-----
<i>ipso</i>	-----	128,84	-----	-----
<i>orto</i>	8,00 dd (8,0 e 1,5)	129,88 (CH)	129,88(C-2''); 133,71 (C-4''); 164,97 (OBz)	N.O.
<i>meta</i>	7,43t like (8,0)	128,73 (CH)	129,88(C-2'')	8,0(Ho)
<i>para</i>	7,54 t like (8,0)	133,71 (CH)	129,88(C-2'')	8,0 (Ho)

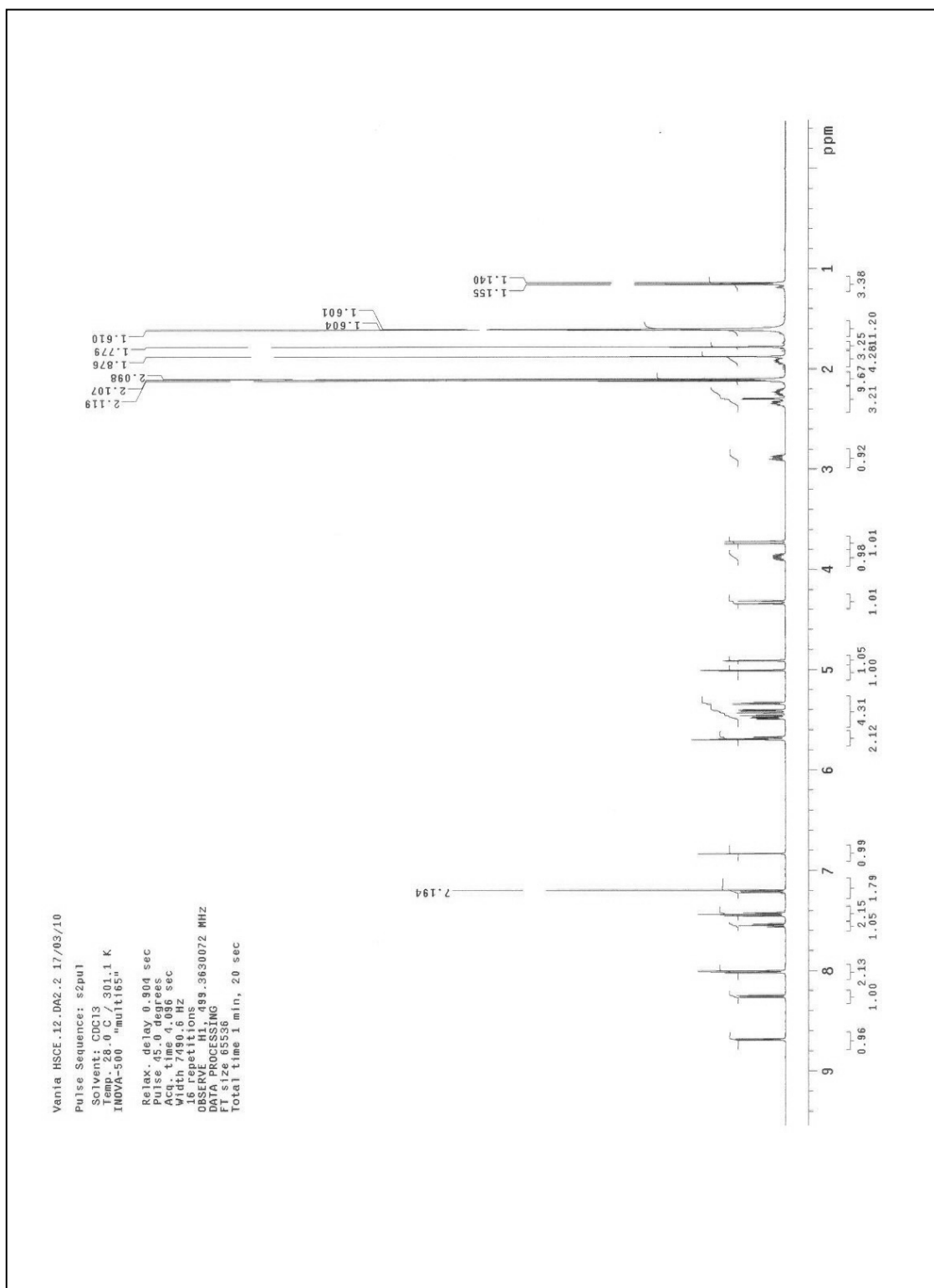


Figura 99 – Espectro de RMN de ¹H da substância 6 (500 MHz, CDCl₃).

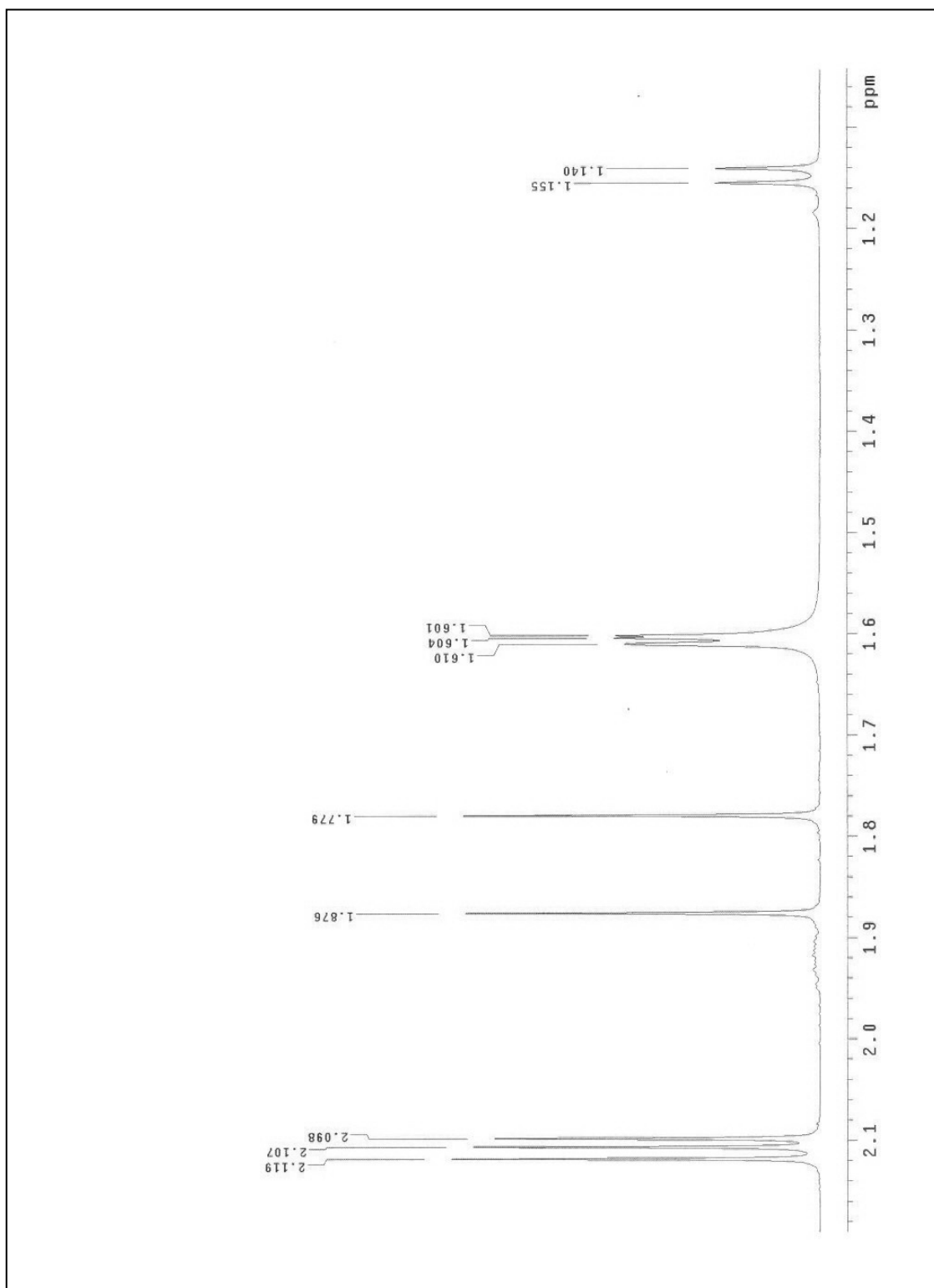


Figura 100 – Expansão da região 1,0-2,2 δ do espectro de RMN de ^1H da substância 6 (500 MHz, CDCl_3).

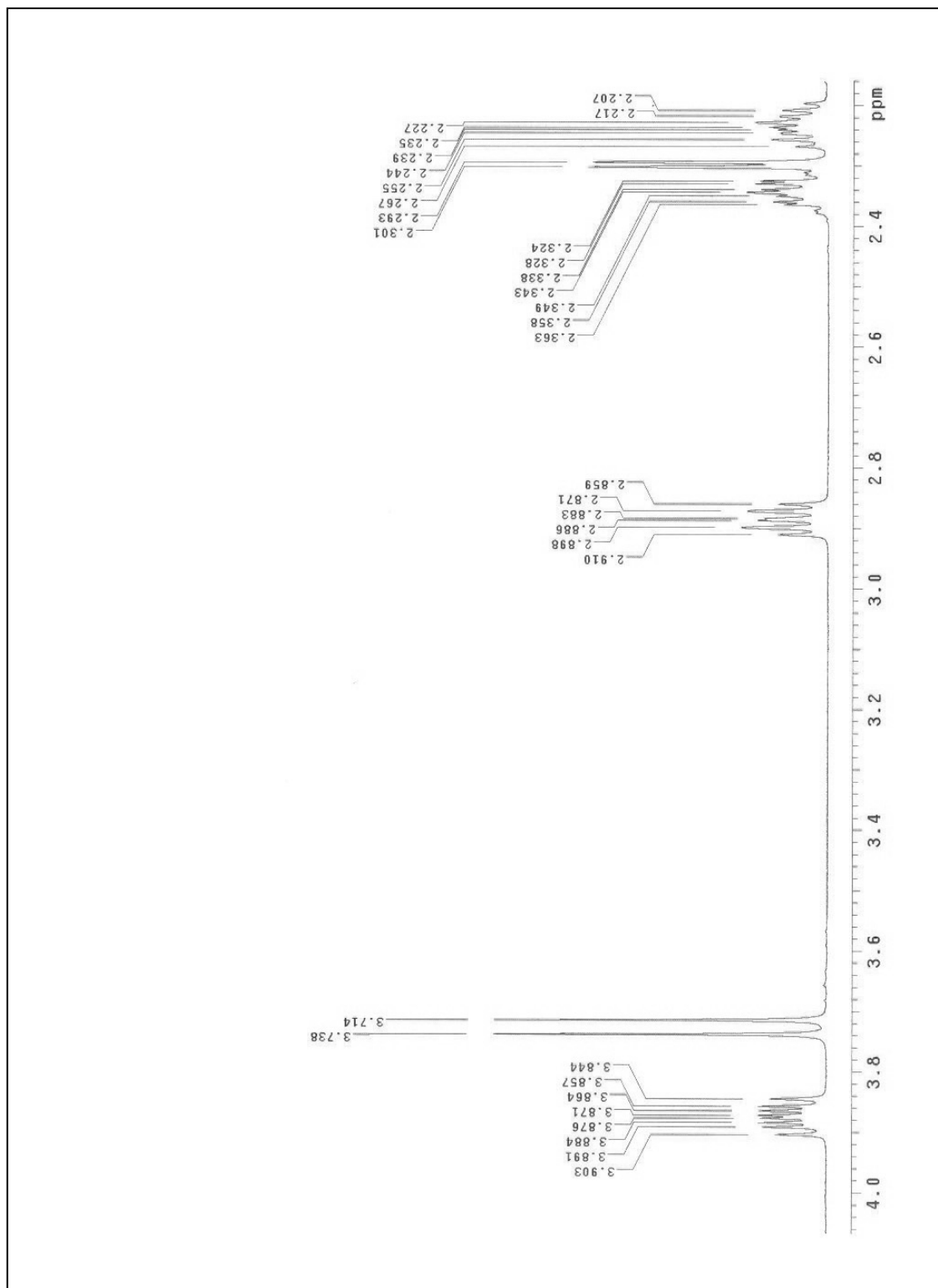


Figura 101 – Expansão da região 2,0–4,0 δ do espectro de RMN de ^1H da substância 6 (500 MHz, CDCl_3).

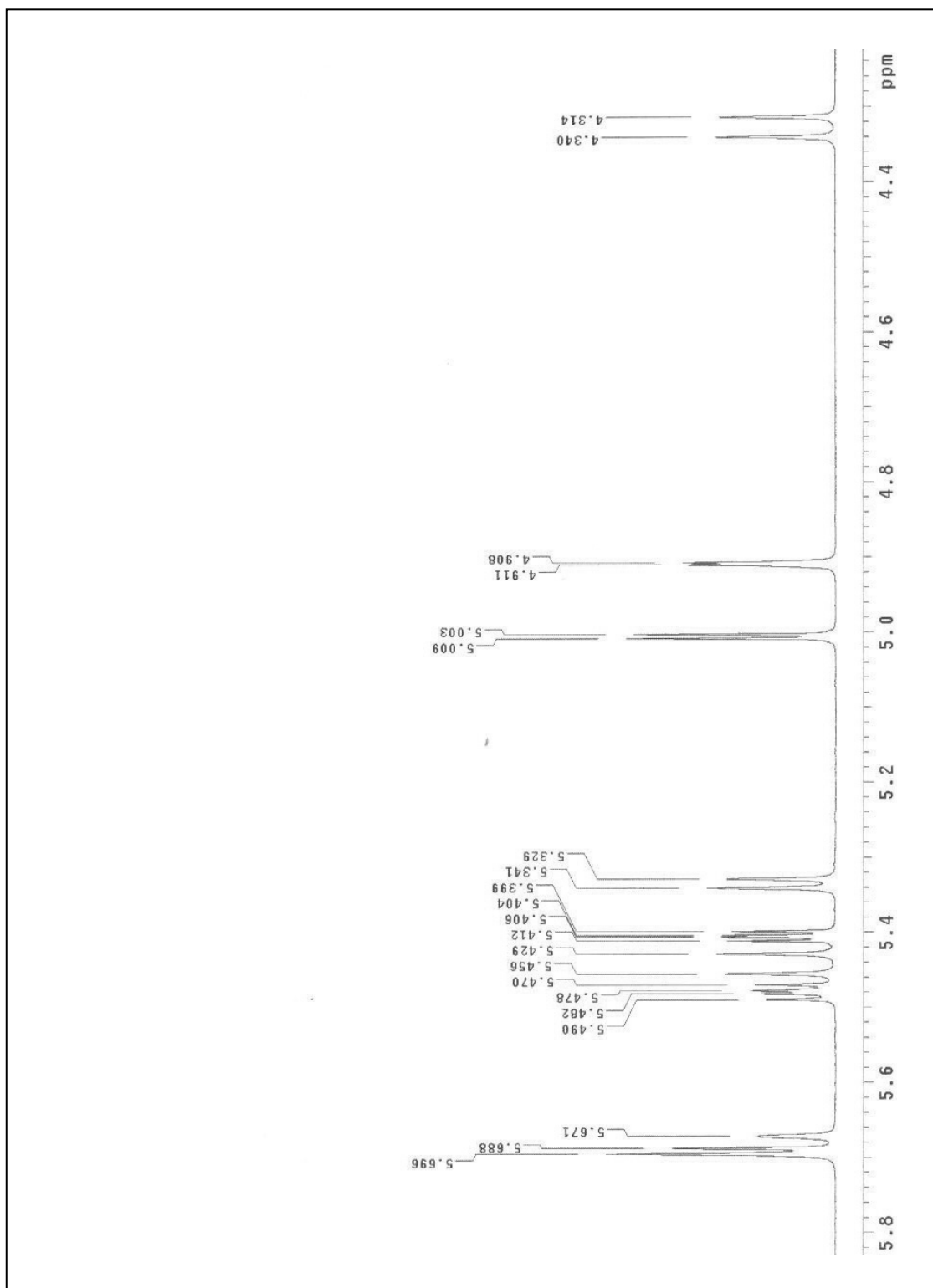


Figura 102 – Expansão da região 4,0-5,8 δ do espectro de RMN de ^1H da substância 6 (500 MHz, CDCl_3).

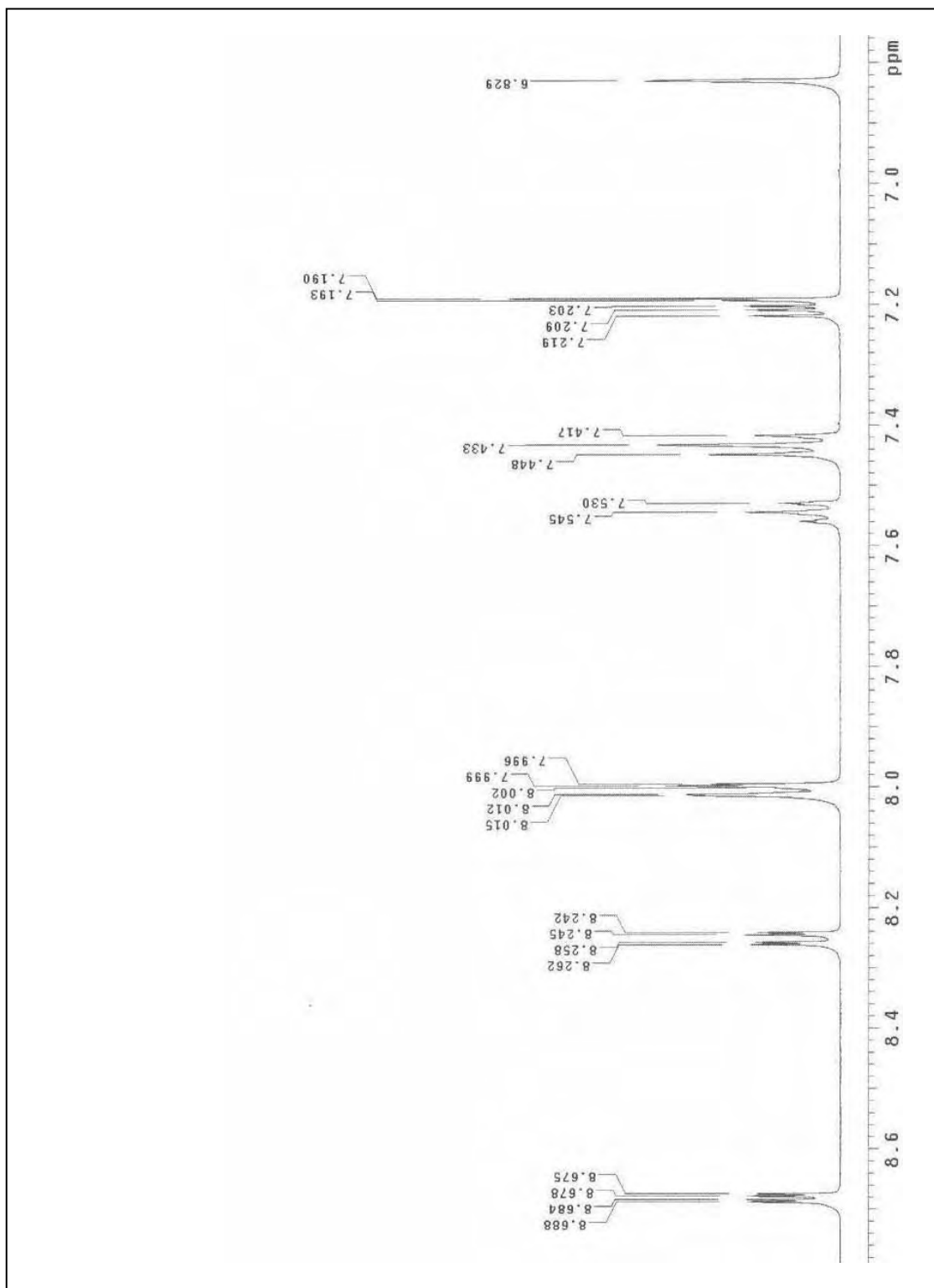


Figura 103 – Expansão da região 6,0–9,0 δ do espectro de RMN de ^1H da substância 6 (500 MHz, CDCl_3).

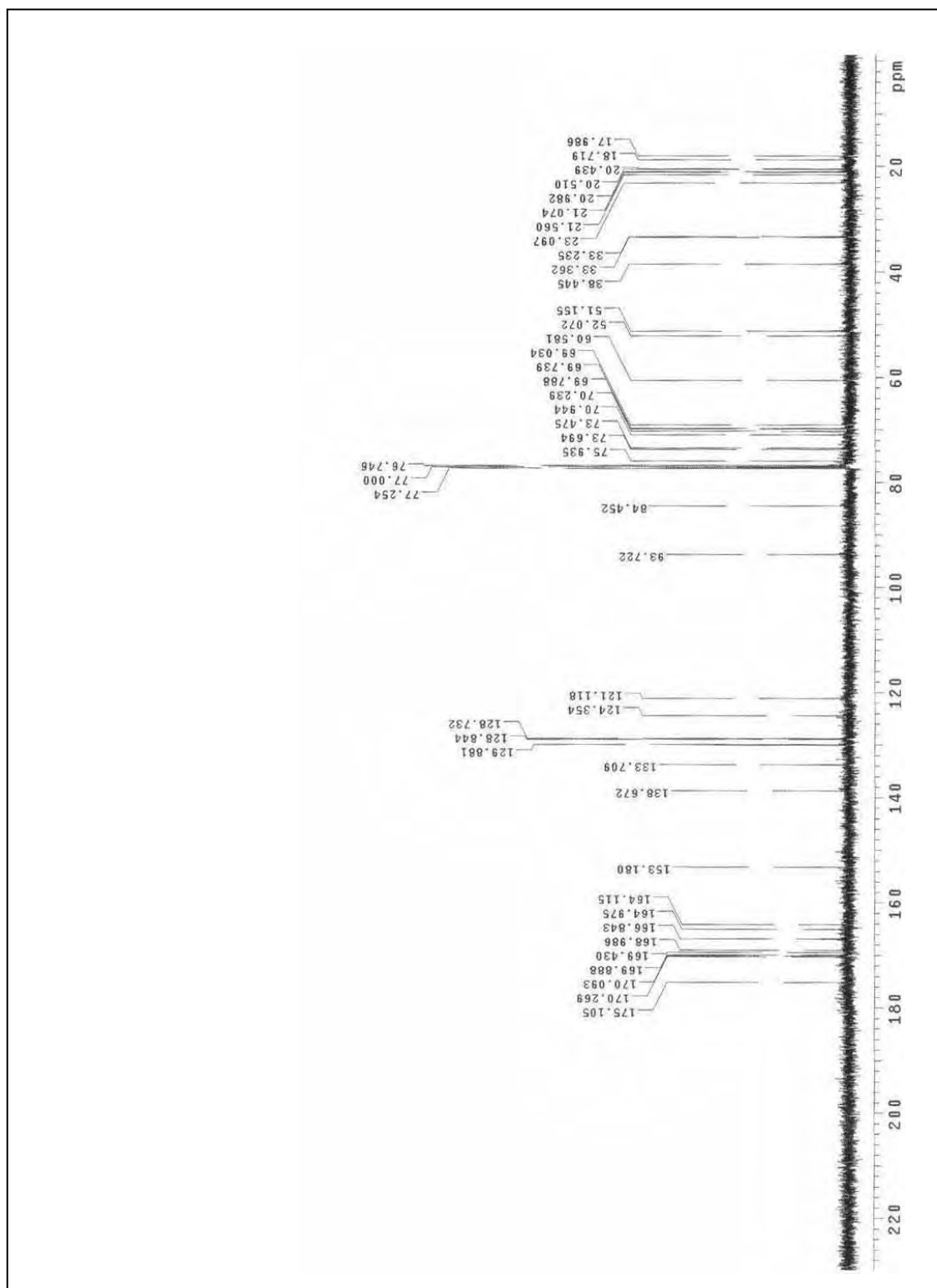


Figura 104– Espectro de RMN de ^{13}C da substância 6 (500 MHz, CDCl_3).

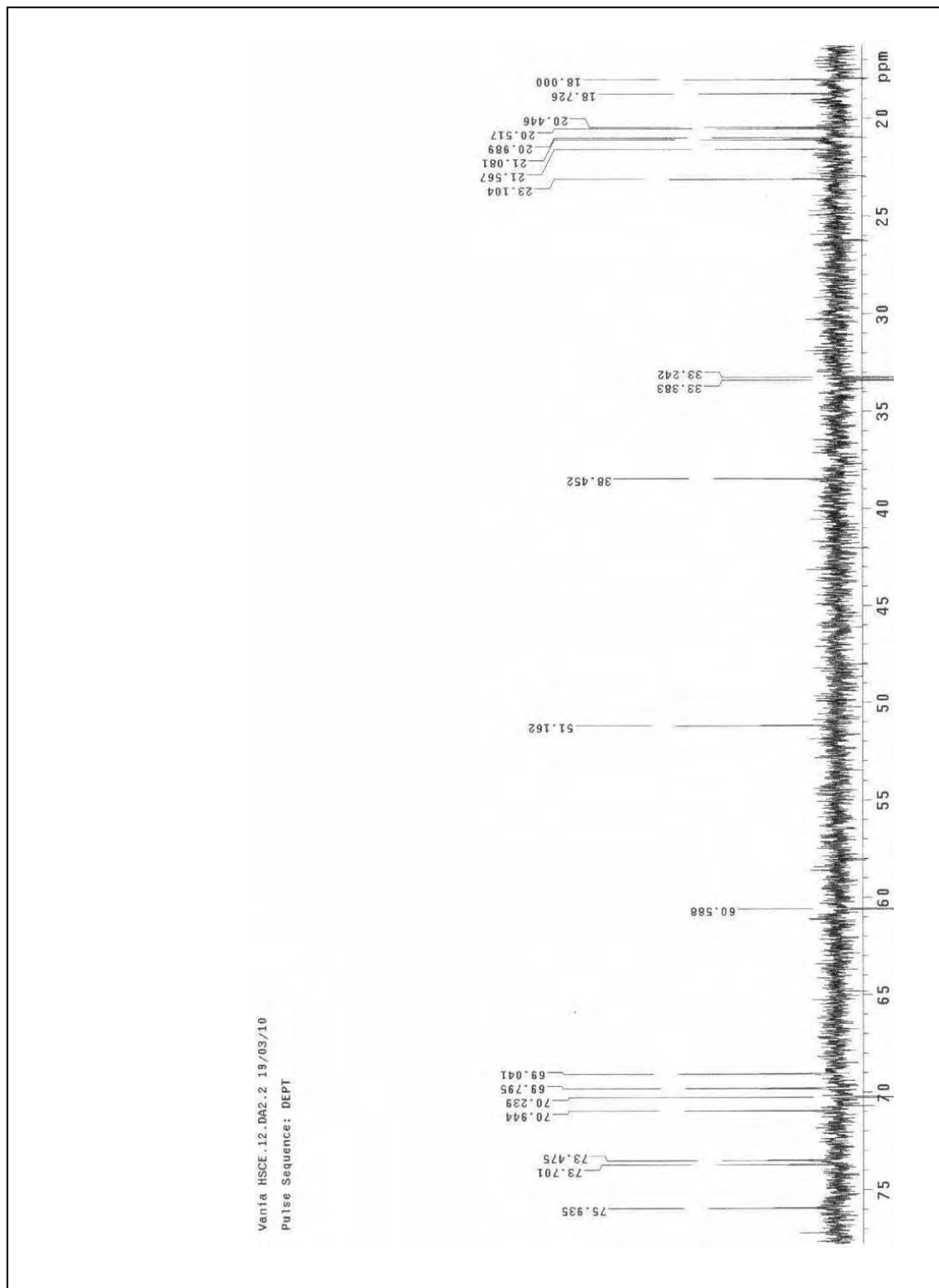


Figura 105 – Expansão da região 18,0 –76,0 δ do espectro de RMN de ^{13}C da substância 6 (500 MHz, CDCl_3).

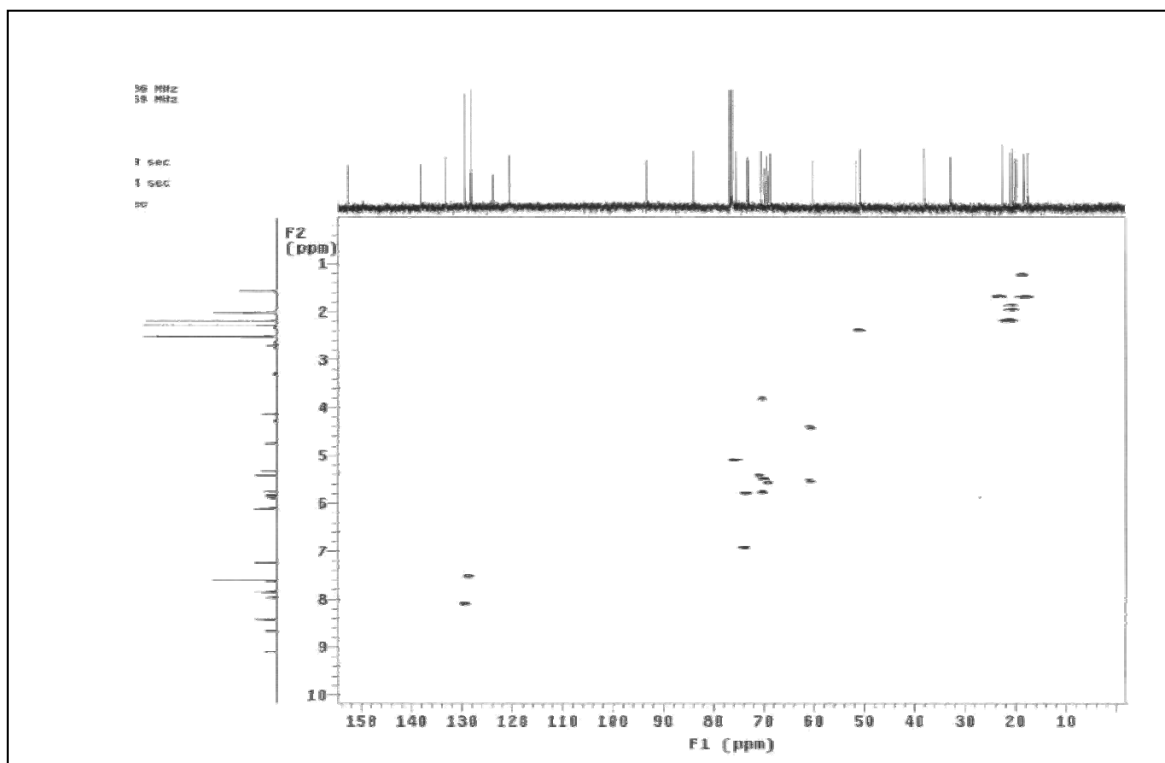


Figura 106 – Espectro gHMBC da substância 6 (500 MHz, CDCl_3).

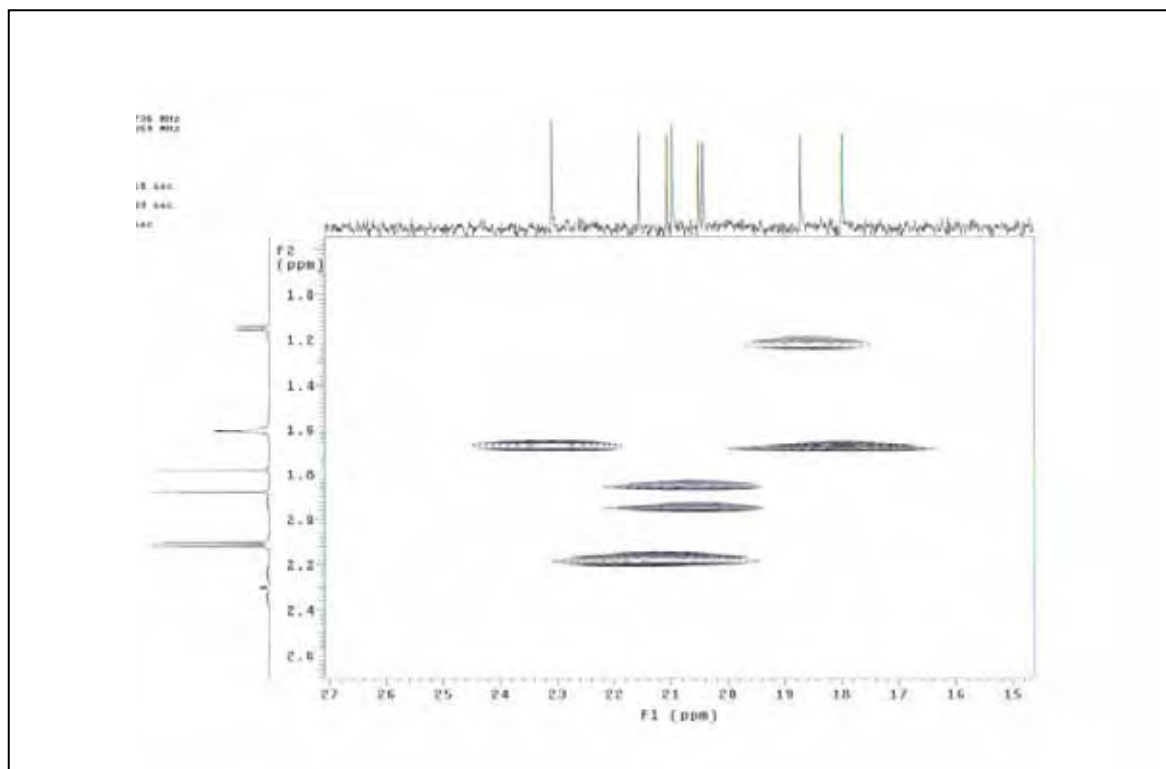


Figura 107 – Expansão na região entre 15-27 δ do espectro gHMBC da substância 6 (500 MHz, CDCl_3).

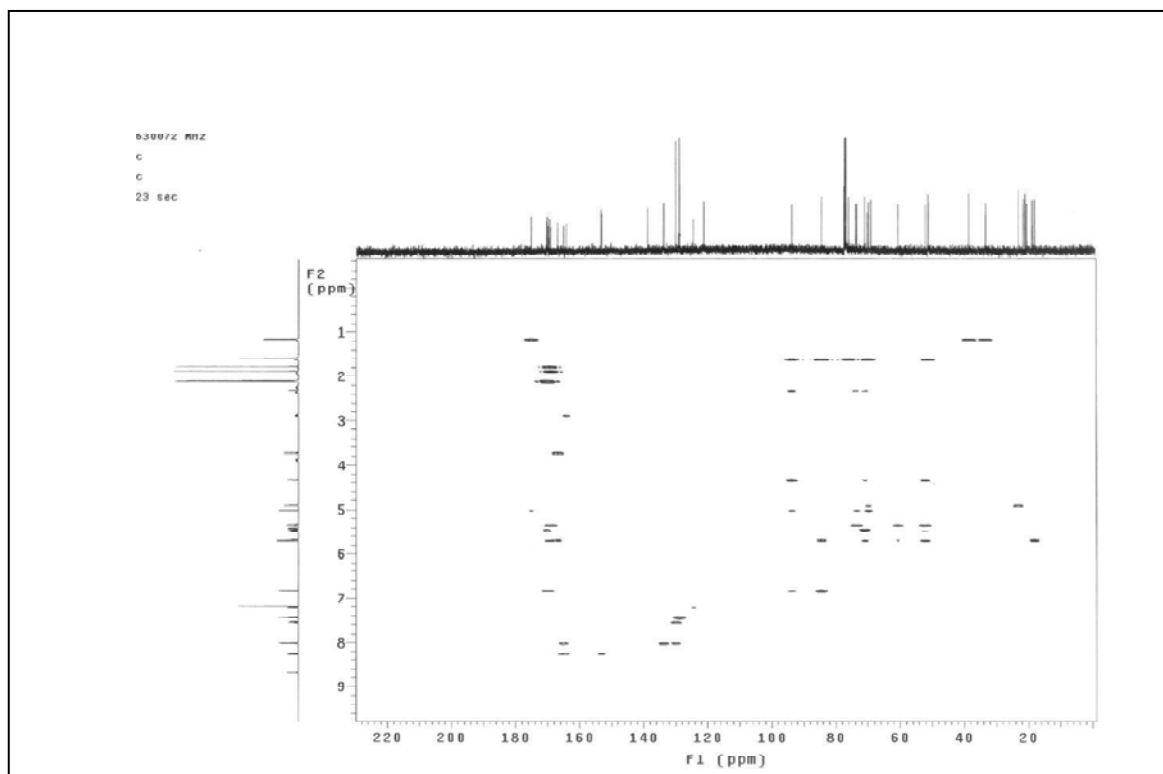


Figura 108 – Espectro gHMBC da substância 6 (500 MHz, CDCl₃).

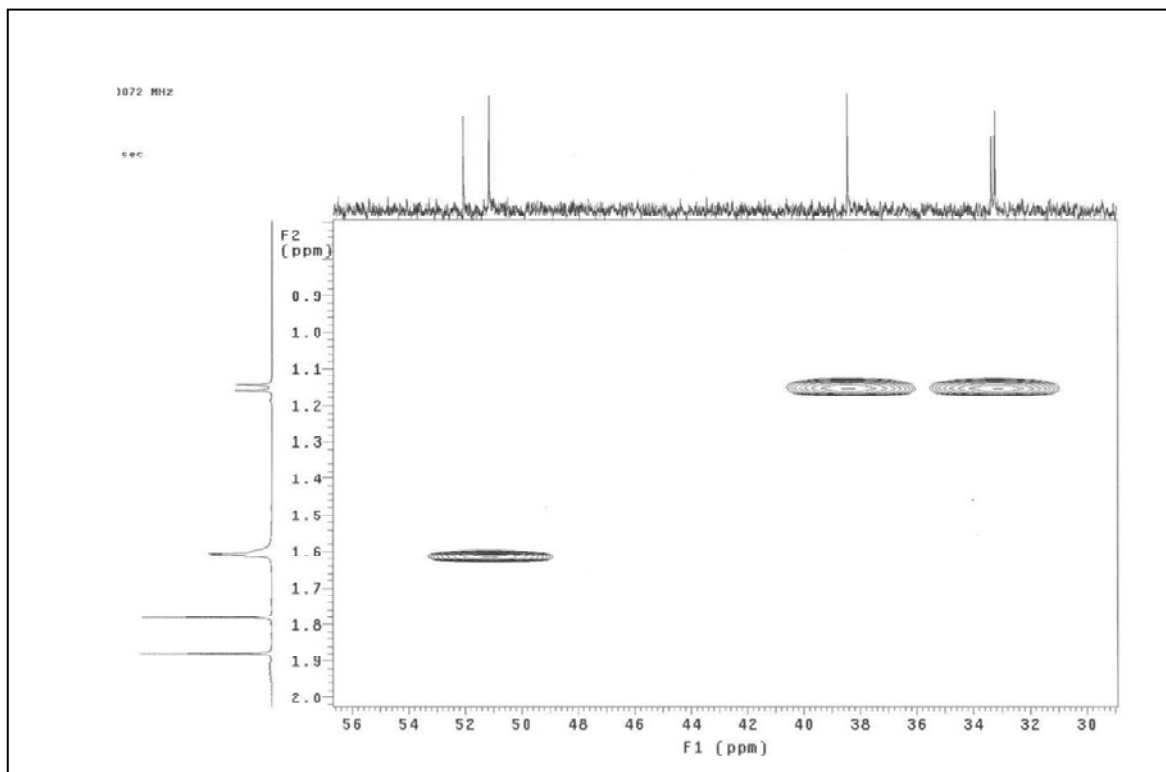


Figura 109 – Expansão na região entre 30-56 δ do espectro gHMBC da substância 6 (500 MHz, CDCl₃).

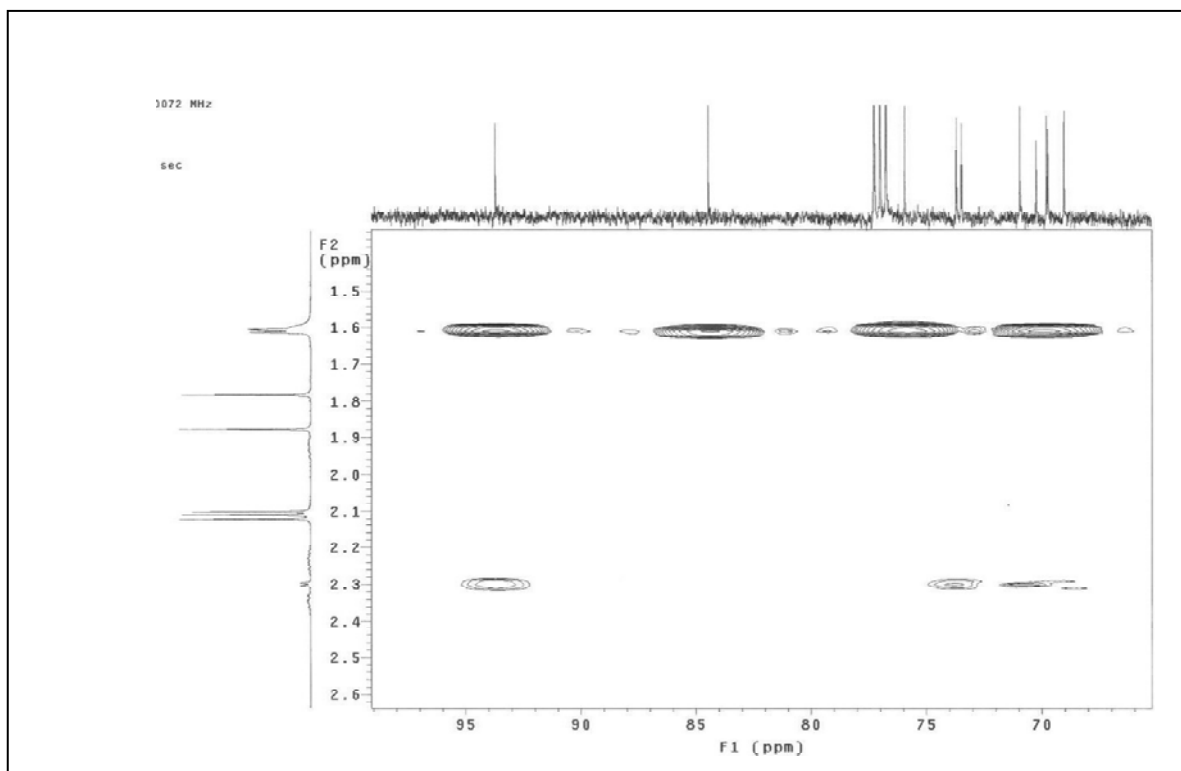


Figura 110 – Expansão na região entre 70-100 δ do espectro gHMBC da substância 6 (500 MHz, CDCl_3).

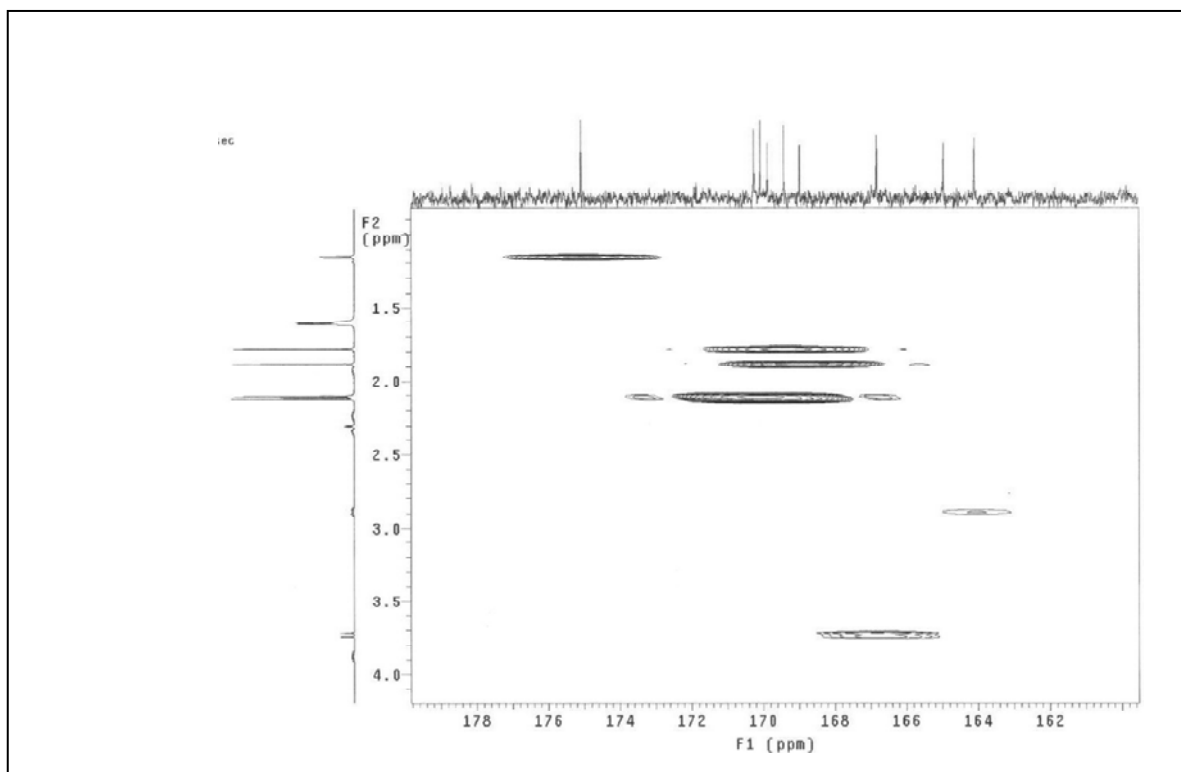


Figura 111 – Expansão na região entre 161-178 δ do espectro gHMBC da substância 6 (500 MHz, CDCl_3).

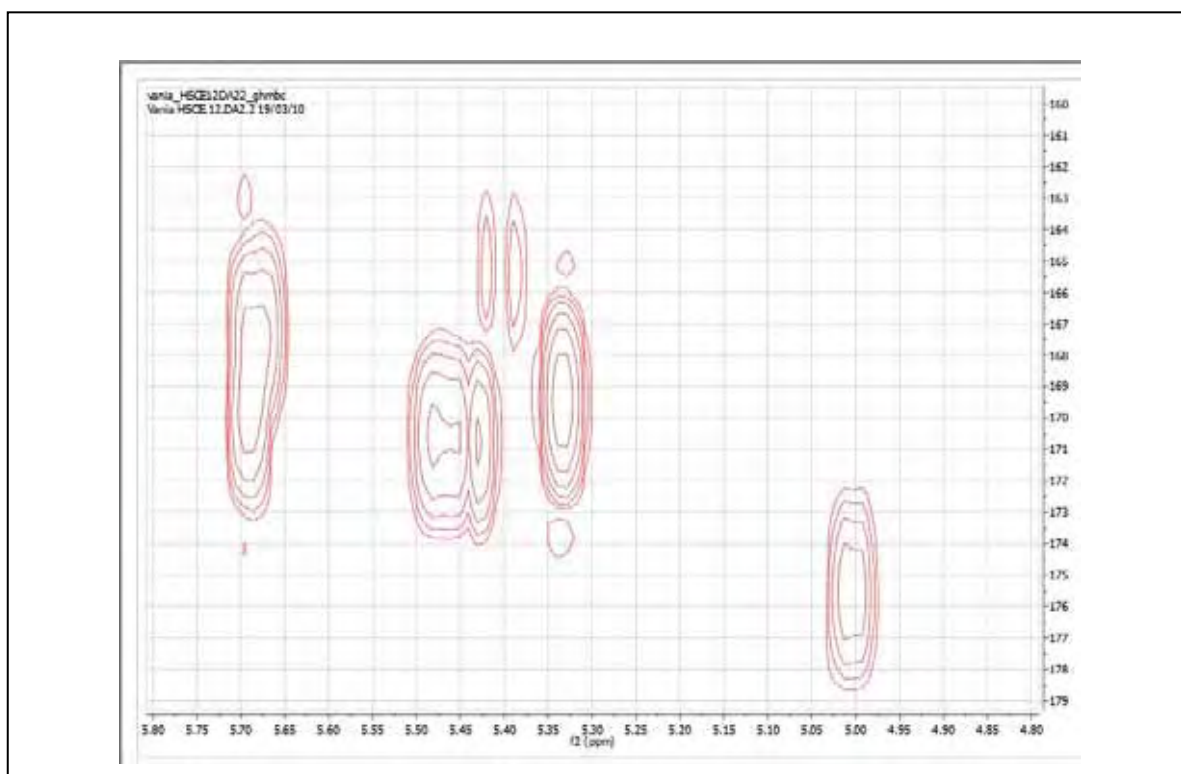


Figura 112 – Expansão na região entre 4,80-5,90 δ do espectro gHMBC da substância 6 (500 MHz, CDCl_3).

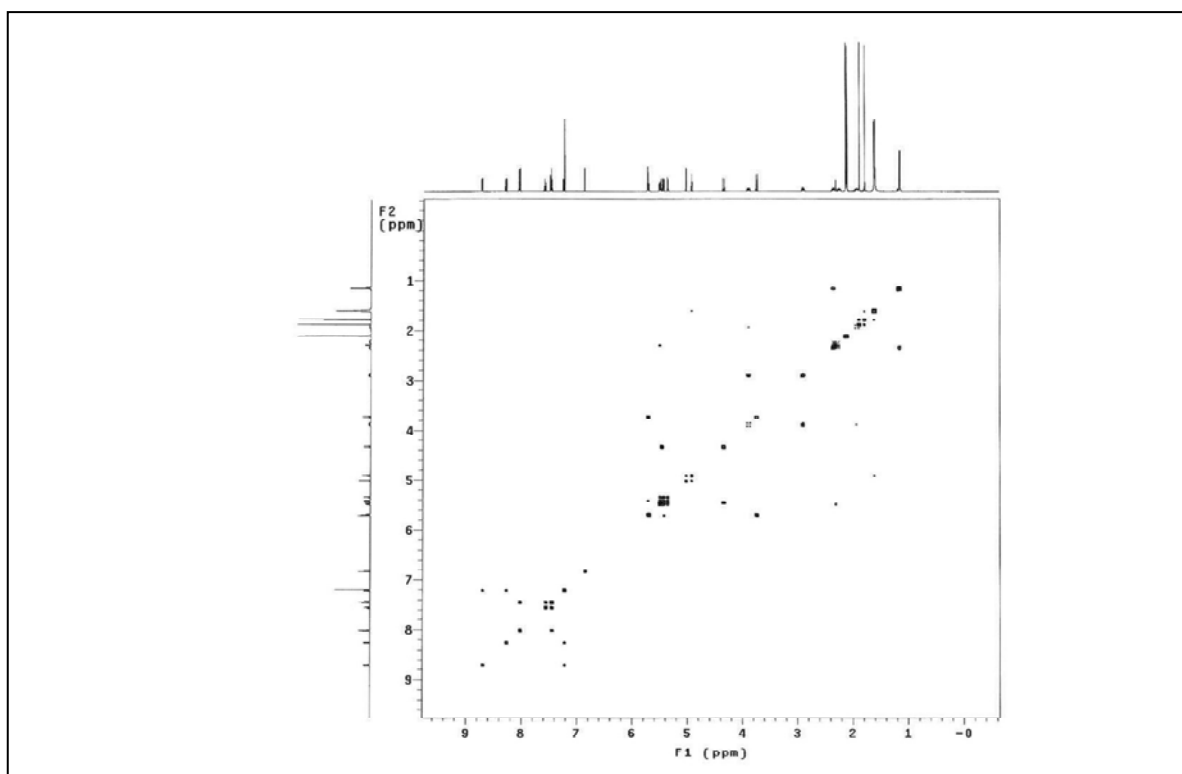
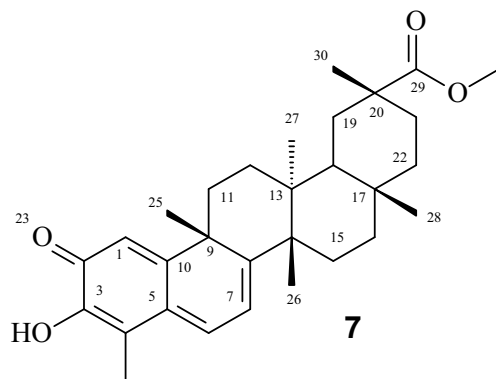


Figura 113 – Espectro de gCOSY da substância 6.

5.7 Identificação estrutural dos triterpenos quinonametídeos

5.7.1 Identificação estrutural da substância 7



No espectro de RMN de ^1H (Tabela 8, p. 155) foram observados dois dubletos em 6,27 δ (1H, $J = 7,0$ Hz), 6,46 δ (1H, $J = 1,0$ Hz) e um duplo dubleto em 6,94 δ (1H, $J = 7,0$ e 1,0 Hz). Estes sinais foram atribuídos aos H-7, H-1 e H-6, respectivamente, os quais são sinais típicos do sistema quinonametídeo que caracteriza esta classe de substâncias.

Na região em torno de 2,14 δ foi observado um sinal, integrando para 3H, característico de grupo metílico sob ligação dupla, o qual foi atribuído a H-23.

A análise do espectro de RMN de ^1H (Figura 114, p. 156) da substância 7, permitiu identificar em 3,48 δ (3H) um singlete correspondente a hidrogênios de grupo metoxílico de éster, o qual foi comprovado pela correlação deste com o sinal de carbono carbonílico em 178,72 (C-29) no experimento de gHMBC (Figura 118, p. 152). No espectro de RMN de ^1H foi observado cinco singletos atribuídos a grupos metílicos em 1,38; 1,19; 1,11; 1,03 e 0,46 δ , integrando para 3H cada, atribuídos a H-25, H-26, H-30, H-28 e H-27, respectivamente.

O espectro de RMN de ^{13}C (Figura 115, p. 157) de 7 apresentou 30 sinais, sendo que em 178,72 δ foi observado um sinal característico de carbono carboxílico de éster, atribuído a C-29. Na região de 45,0 δ a 10,0 δ foram observados sinais típicos de carbonos metílicos, metilênicos, metínicos e quaternários, os quais foram devidamente caracterizados e comparados com dados descritos na literatura (Jeller et al.; 2004; Carvalho et al.; 2005) e se encontram descritos na tabela 8, p. 155.

O experimento de gHMQC (Figura 117, p. 159) permitiu observar a correlação do sinal em 3,48 δ_H com sinal em 51,3 δ_C corroborando a caracterização do grupo metoxílico de éster. Foram também observadas as correlações dos sinais dos grupos metílicos em 2,14 δ_H com 10,22 δ_C ; 1,38 δ_H com 38,25 δ_C ; 1,19 δ_H com 21,62 δ_C ; 1,11 δ_H com 32,66 δ_C ; 1,03 δ_H com 31,58 δ_C e 0,47 δ_H com 18,32 δ_C , atribuídos aos H-23, H-25, H-26, H-30, H-28, H-27, respectivamente.

A análise do experimento de gHMBC permitiu confirmar as atribuições propostas, e estas podem ser visualizadas na tabela 8, p. 155.

O espectro de massas de baixa resolução para a substância **7** (Figura 119, p. 160), apresentou pico do íon molecular em m/z 465,30 $[M+1]^+$ confirmando a fórmula molecular $C_{30}H_{40}O_4$.

Tabela 8. Dados de RMN de ^1H e RMN-2D (CDCl_3 , 500 MHz) da substância 7.

H	δ (ppm), Mult. J (Hz)	δ ^{13}C (ppm)	gHMQC	gHMBC
1	6,47 d (1,5)	119,56 (CH)	119,56	42,93 (C-9); 127,43 (C-5); 146,02 (C-3)
2	-----	178,34 (CH)	178,34	-----
3	-----	146,02 (CH)	146,02	-----
4	-----	117,10 q	117,10	-----
5	-----	127,43 q	127,43	-----
6	6,94 dd (1,5 e 7,0)	134,02 q	134,02	117,10 (C-4); 164,76 (C-10); 170,03 (C-8)
7	6,28 d (7,0)	118,12 (CH)	118,12	42,93 (C-9); 45,04 (C-14); 127,43 (C-5)
8	-----	170,03 q	170,03	-----
9	-----	42,93 (CH)	42,93	-----
10	-----	164,76 q	164,76	-----
11	-----	33,57 (CH_2)	33,57	-----
12	-----	29,66 (CH_2)	29,66	-----
13	-----	39,42 q	39,42	-----
14	-----	45,04 q	45,04	-----
15	-----	28,65 (CH_2)	28,65	-----
16	-----	36,39 (CH_2)	36,39	-----
17	-----	30,53 q	30,53	-----
18	-----	44,32 (CH)	44,32	-----
19	-----	30,90 (CH_2)	30,90	-----
20	-----	40,41 (CH)	40,41	-----
21	-----	29,88 (CH_2)	29,88	-----
22	-----	34,80 (CH_2)	34,80	-----
23	2,14 s	10,22 (CH_3)	10,22	117,10 (C-4); 127,43 (C-5); 146,02 (C-3)
25	1,38 s	38,25 (CH_3)	38,25	33,57 (C-11); 42,93(C-9); 164,76 (C-10); 170,03 (C-8)
26	1,19 s	21,62 (CH_3)	21,62	28,65 (C-15); 39,42(C-13); 45,04 (C-14); 170,03 (C-8)
27	0,47 s	18,32 (CH_3)	18,32	29,66 (C-12); 39,42 (C-13); 44,32(C-18)
28	1,03 s	31,58 (CH_3)	31,58	30,53 (C-17); 36,39(C-16); 44,32(C-18)
29	-----	-----	178,72	-----
30	1,11 s	32,36 (CH_3)	32,36	30,90 (C-19); 40,41(C-20); 178,72 (C-29)
CH_3O em 29	3,48 s	51,53 (CH_3)	51,53	178,72 (C-29)

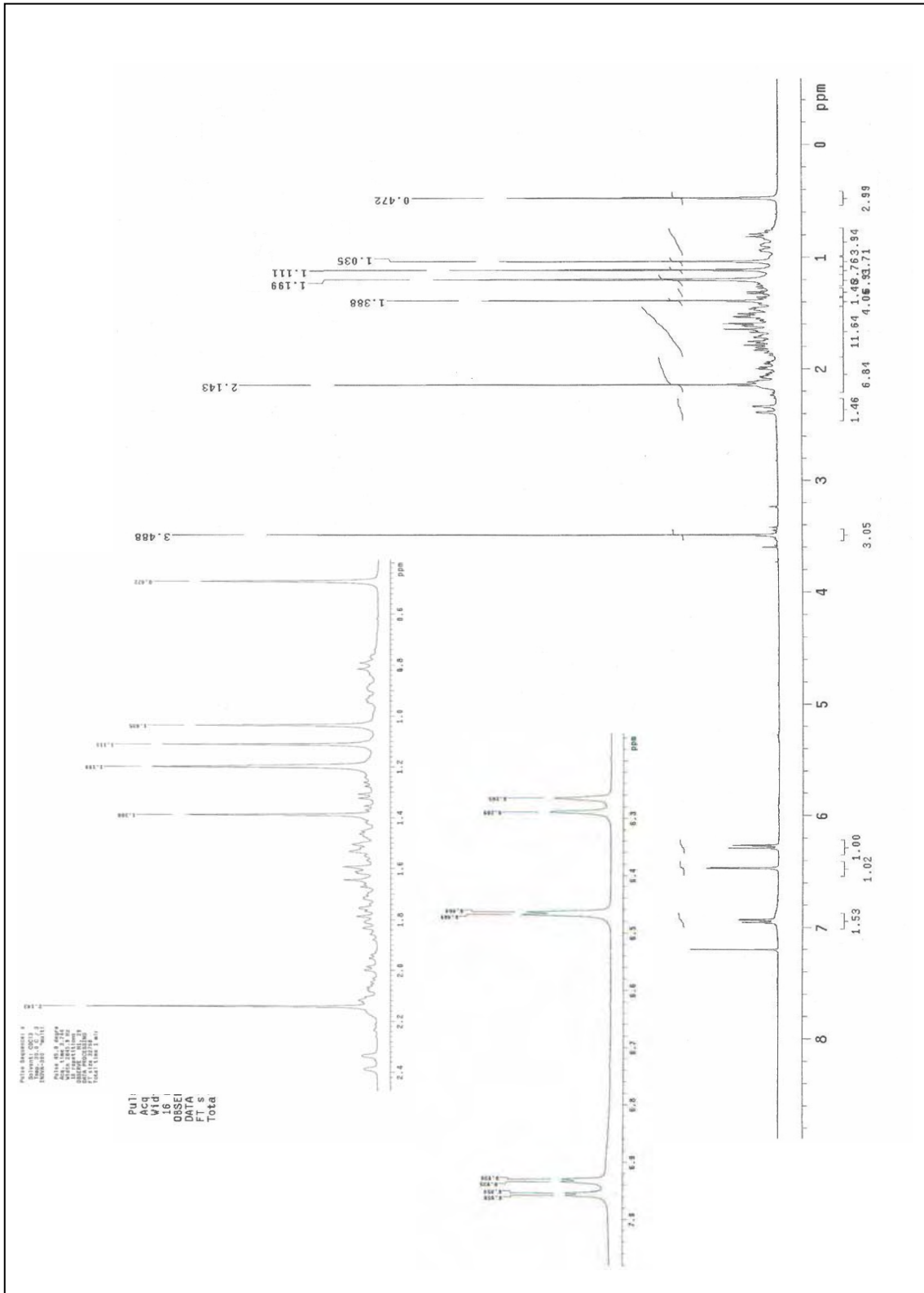


Figura 114 – Espectro de RMN de ^1H e expansões da substância 7 (500 MHz, CDCl_3).

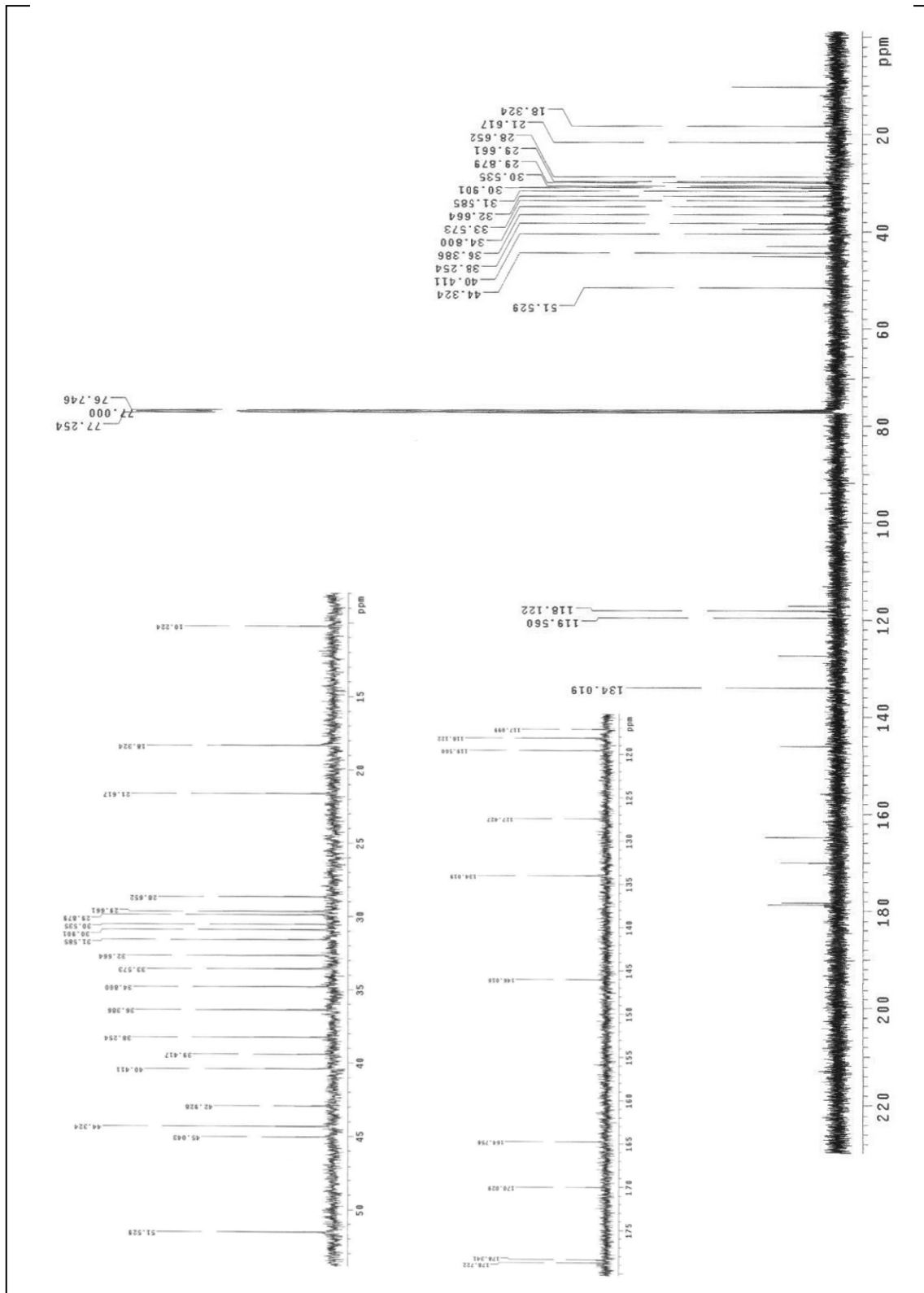


Figura 115 – Espectro de RMN de ¹³C e expansões da substância 7 (300 MHz, CDCl₃).

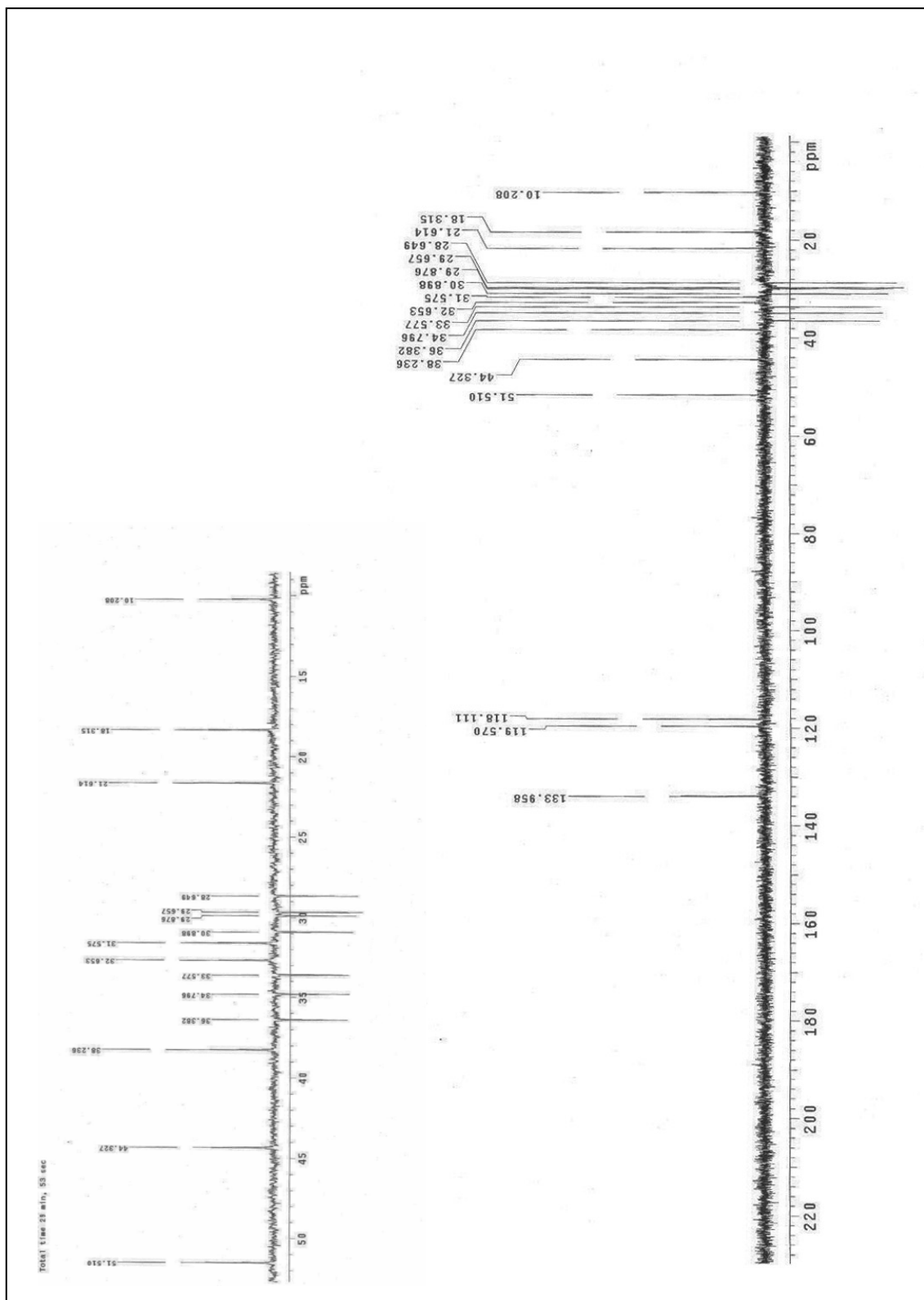


Figura 116 – Espectro de DEPT135° e expansões da substância 7 (300 MHz, CDCl₃).

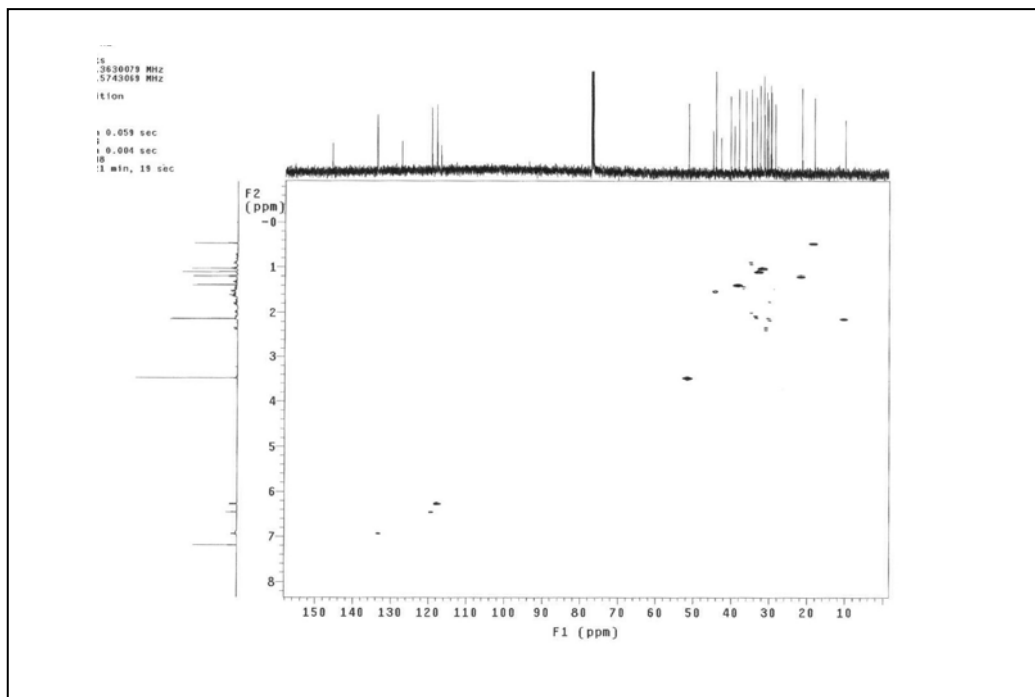


Figura 117 – Espectro de gHMBC da substância 7 (500 MHz, CDCl₃).

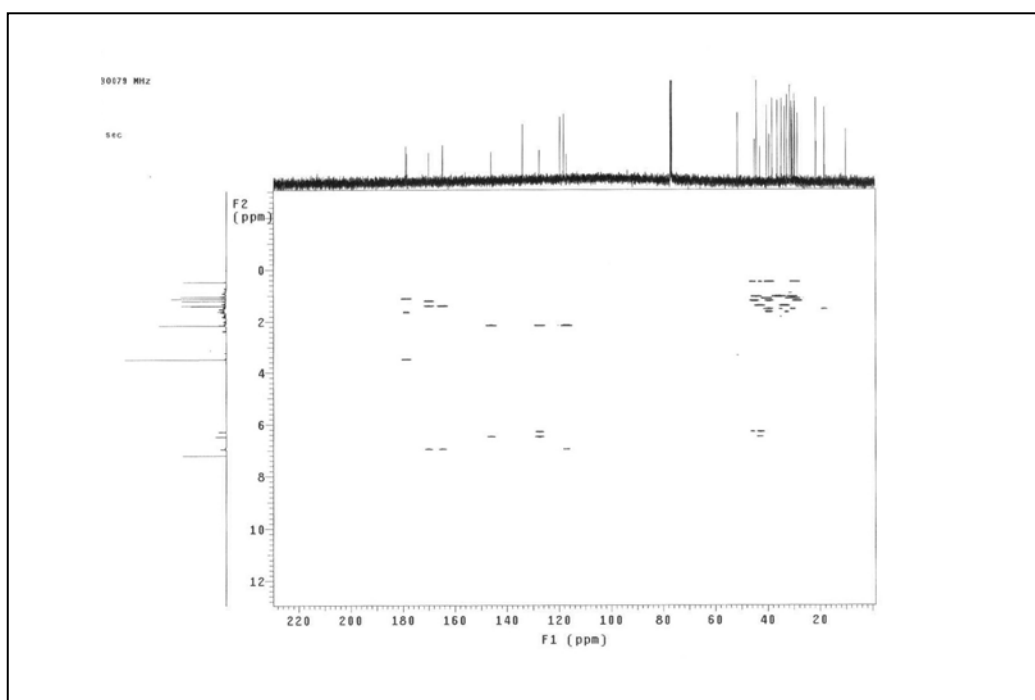


Figura 118 – Espectro de gHMBC da substância 7 (500 MHz, CDCl₃).

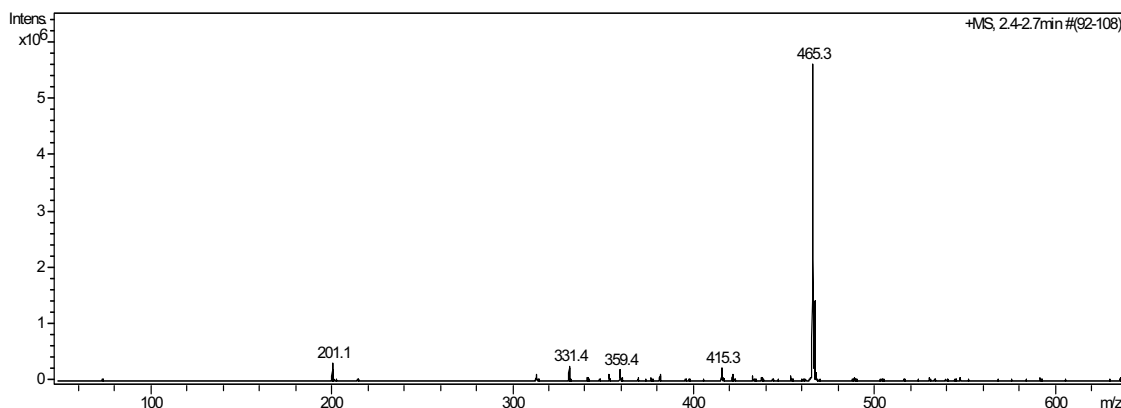
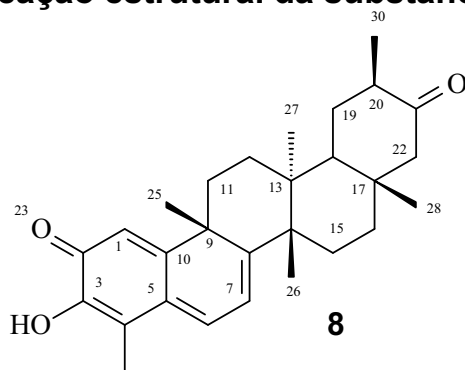


Figura 119 – Espectro de massas da substância 7 .

5.7.2 Identificação estrutural da substância 8



O sistema quinonamético foi caracterizado por dois dubletos em 6,27 δ (1H, $J=7,0$ Hz), 6,46 δ (1H, $J=1,0$ Hz) e um duplo dubleto em 6,94 δ (1H, $J=7,0$ e 1,0 Hz), atribuídos aos H-7, H-1 e H-6, respectivamente. O singleto em 2,14 δ (H-23), característico de grupo metílico sob ligação dupla, corroborou a presença do sistema quinonamético.

No espectro de RMN de ^1H da substância **8** (Tabela 9, p. 162) foi observado cinco sinais, integrando para 3H cada, atribuídos a grupos metílicos em 2,16; 1,44; 1,28; 0,92 e 0,94 δ , caracterizados como H-23, H-25, H-26, H-27 e H-28, respectivamente. Em 2,84 e 1,79 δ foi observado dois dubletos ($J = 15,0$ Hz, cada), integrando para 1H cada atribuído ao grupo metilênico H-22.

O espectro de RMN de ^{13}C (Figura 121, p. 164) apresentou 29 sinais, permitindo inferir a perda de um carbono em relação a **7**. O sinal em 213,54 δ típico de carbono carbonílico, foi atribuído a C-21. Foram observados na região 53,0 a 10,0 δ , sinais característicos de carbonos saturados. Estes sinais foram

atribuídos e comparados com a literatura (Jeller et al.; 2004; Carvalho et al.; 2005).

A análise do experimento de gHMQC (Tabela 9, p. 162) permitiu observar as correlações dos sinais: 2,16 δ_H com 10,24 δ_C ; 1,44 δ_H com 39,03 δ_C ; 1,28 δ_H com 21,54 δ_C ; 0,95 δ_H com 15,06 δ_C ; 0,94 δ_H com 32,54 δ_C e 0,92 δ_H com 19,70 δ_C , atribuídos aos H-23, H-25, H-26, H-30, H-28, H-27, respectivamente

O experimento de gHMBC (Figura 124, p. 166) apresentou como correlação mais significativa para a caracterização do anel E de **8**, a correlação entre o sinal de grupo metílico em 0,95 δ (H-30) com o sinal de carbono carbonílico em 213,54 δ , atribuído a C-21. As correlações observadas no experimento de gHMBC podem ser visualizadas na tabela 9, p. 162.

O espectro de massas de baixa resolução para a substância **8** (Figura 125, p. 167), apresentou pico do íon molecular em m/z 421,30 $[M+1]^+$ concordante com a fórmula molecular $C_{28}H_{36}O_3$, corroborando a perda de um carbono de esqueleto básico.

Tabela 9. Dados de RMN de ^1H e RMN-2D (CDCl_3 , 500 MHz) da substância 8.

H	δ (ppm), Mult. <i>J</i> (Hz)	δ ^{13}C (ppm)	gHMQC	gHMBC
1	6,48 d (1,5)	119, 77 (CH)	119, 77	42,70 (C-9); 127,74 (C-5); 146,08 (C-3)
2	-----	178, 40 q	178, 40	-----
3	-----	146, 08 q	146, 08	-----
4	-----	117,15 q	117,15	-----
5	-----	127,74 q	127,74	-----
6	6,97 dd (1,0 e 7,25)	133, 57 (CH)	133, 57	117,15 (C-4); 164,69 (C-10); 168,64 (C-8)
7	6,31 d (7,5)	118,12 (CH)	118,12	42,70 (C-9); 127,74 (C-5)
8	-----	168,64 q	168,64	-----
9	-----	42,70 q	42,70	-----
10	-----	164,69 q	164,69	-----
11	-----	33, 78 (CH_2)	33, 78	-----
12	-----	29,93 (CH_2)	29,93	-----
13	-----	40,62 q	40,62	-----
14	-----	44,64 q	44,64	-----
15	-----	28,50 (CH_2)	28,50	-----
16	-----	35,50 (CH_2)	35,50	-----
17	-----	38,17 q	38,17	-----
18	-----	43,53 (CH)	43,53	-----
19	-----	32,05 (CH_2)	32,05	-----
20	-----	40,62 q	40,62	-----
21	-----	213,54	213,54	-----
22a	1,79 d (15,0)	52,52 (CH_2)	52,52	43,53 (C-18); 213,54 (C-21)
22b	2,84 d (14,5)	52,52 (CH_2)	52,52	38,17 (C-17); 213,54 (C-21)
23	2, 16 s	10,24 (CH_3)	10,24	117,15 (C-4); 127,74 (C-5); 146,08 (C-3)
25	1,44 s	39,03 (CH_3)	39,03	33,78 (C-11); 42,70 (C-9); 168,64 (C-8); 164,69(C-10);
26	1,28 s	21,54 (CH_3)	21,54	28,50 (C-15); 40,62 (C-13); 44,64 (C-14); 168,64 (C-8)
27	0,92 d (6,5)	19,70 (CH_3)	19,70	-----
28	0,94 s	32,54 (CH_3)	32,54	213,54 (C-21)
29	-----	-----	-----	-----
30	0,95 s	15,06	15,06	52,52 (C-22); 213,54 (C-21)

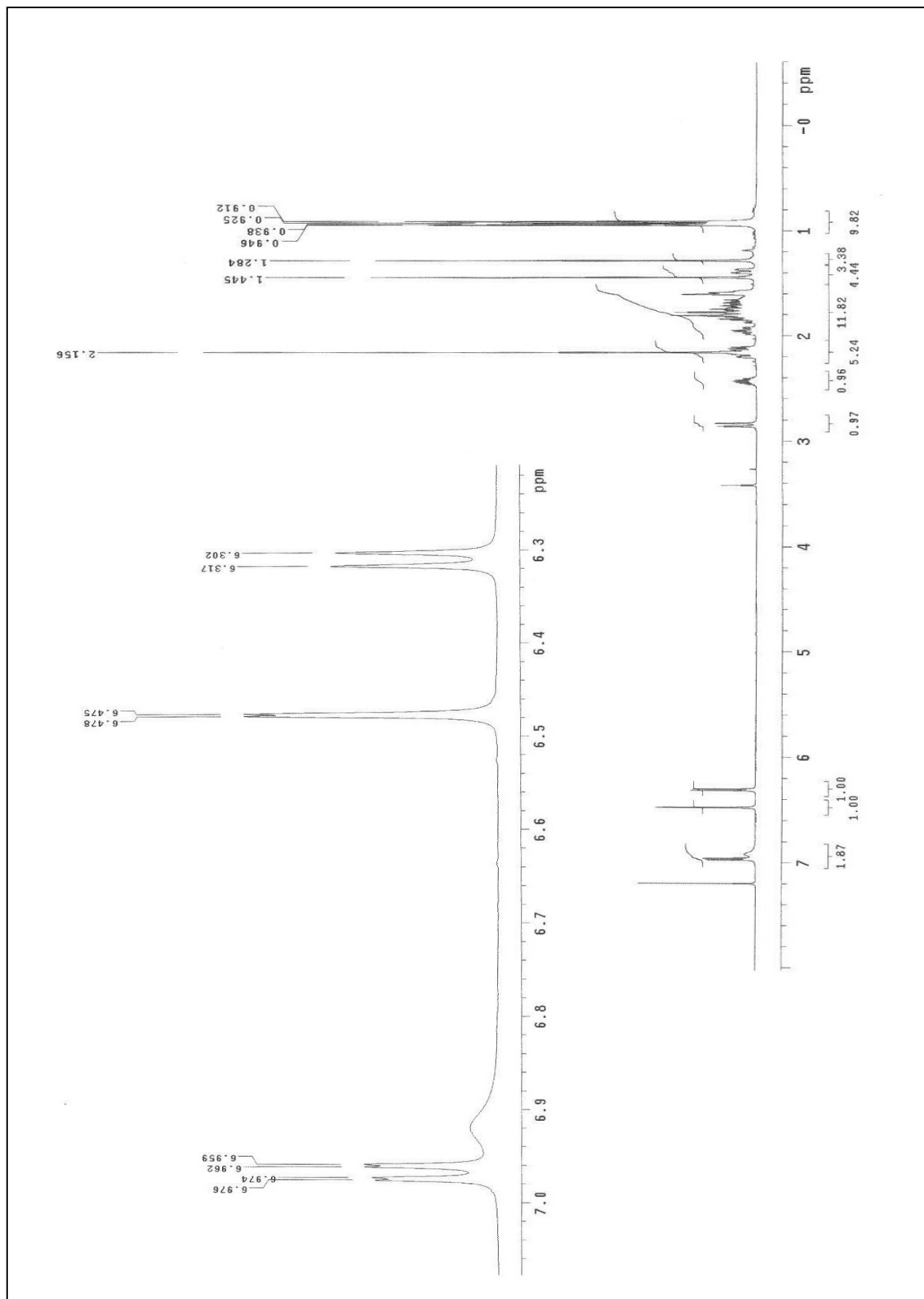


Figura 120– Espectro de RMN de ^1H e expansões da substância 8 (500 MHz, CDCl_3).

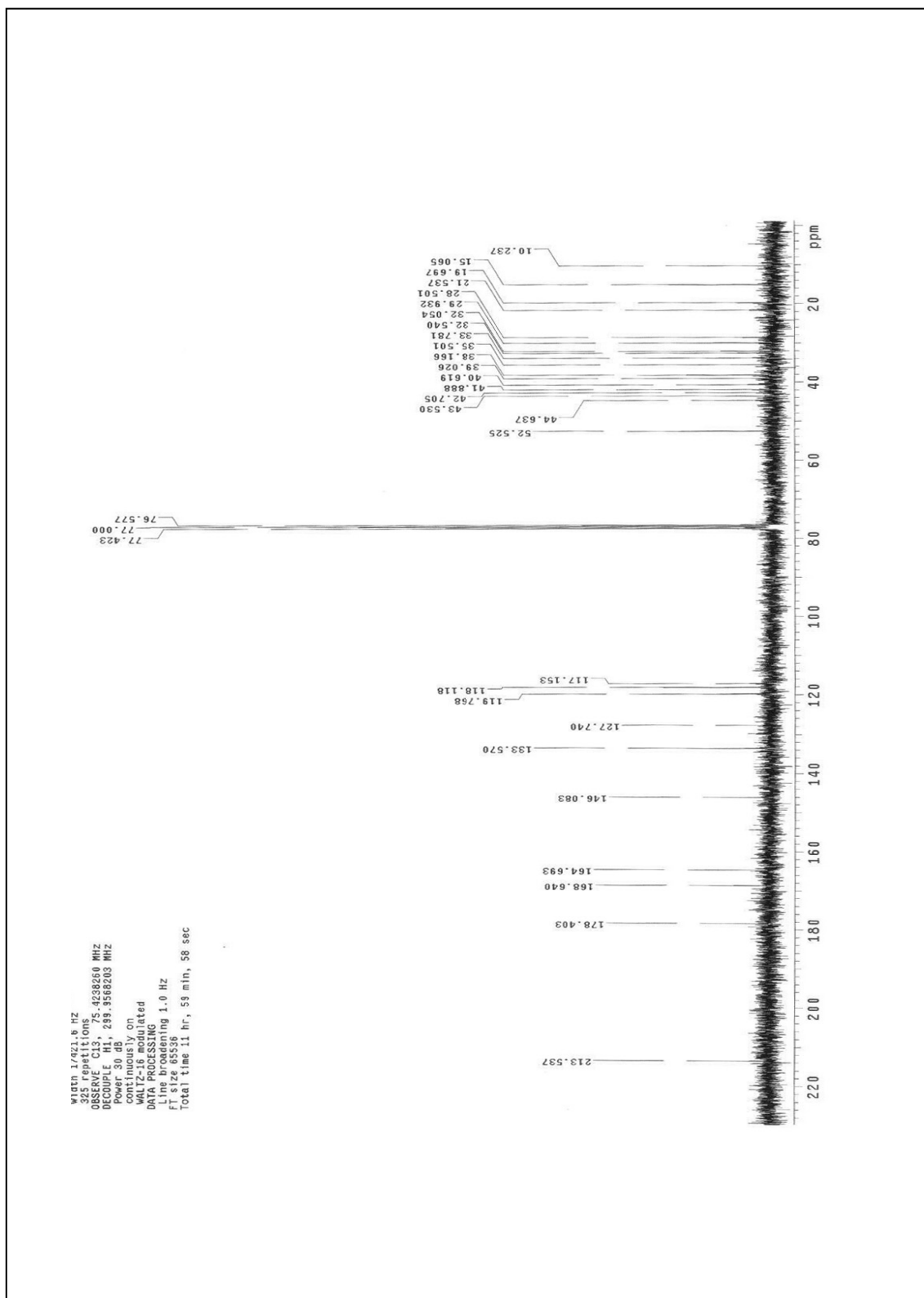


Figura 121 – Espectro de RMN de ^{13}C da substância 8 (300 MHz, CDCl_3).

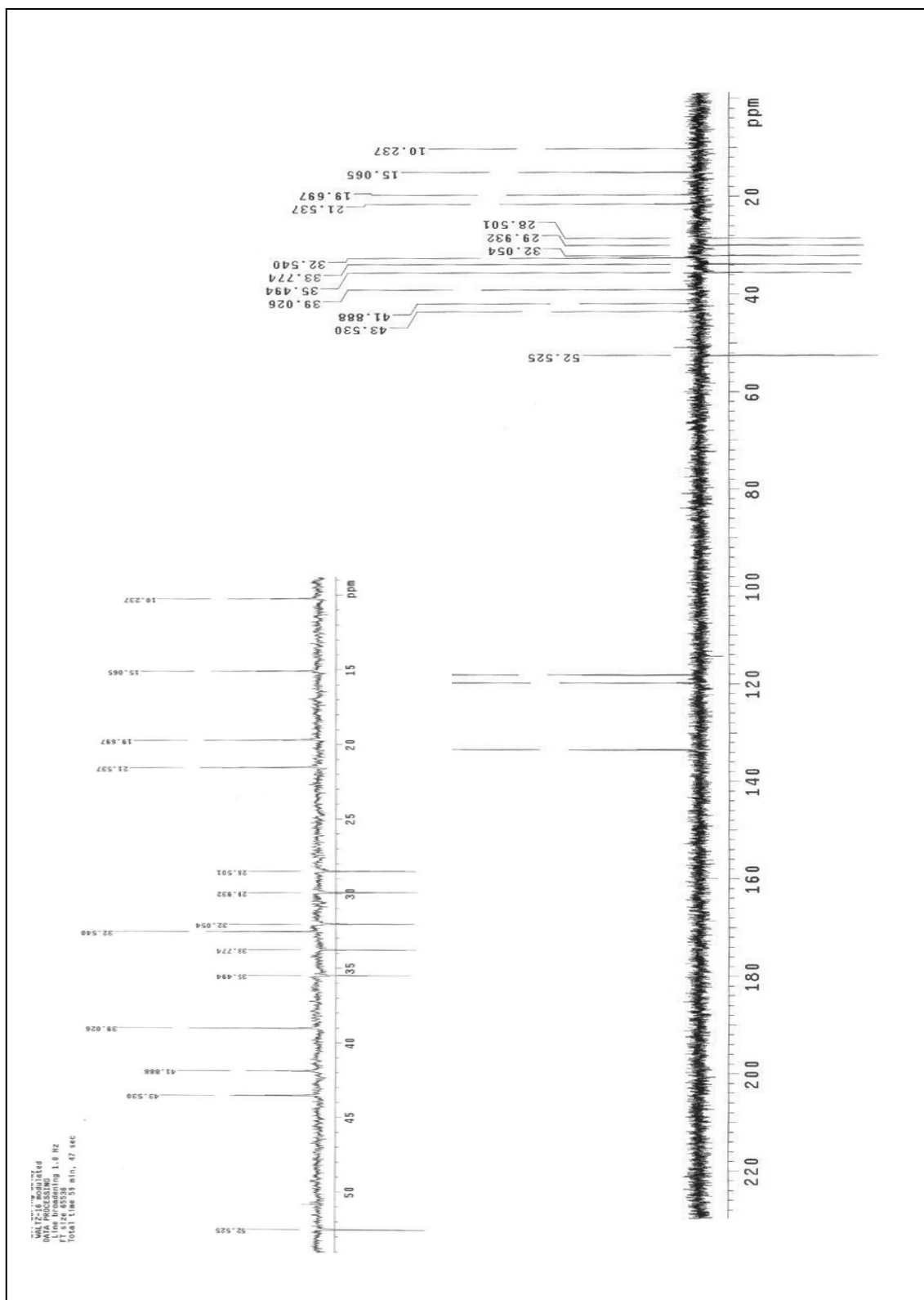


Figura 122 – Espectro de DEPT135° e expansões da substância 8 (300 MHz, CDCl₃).

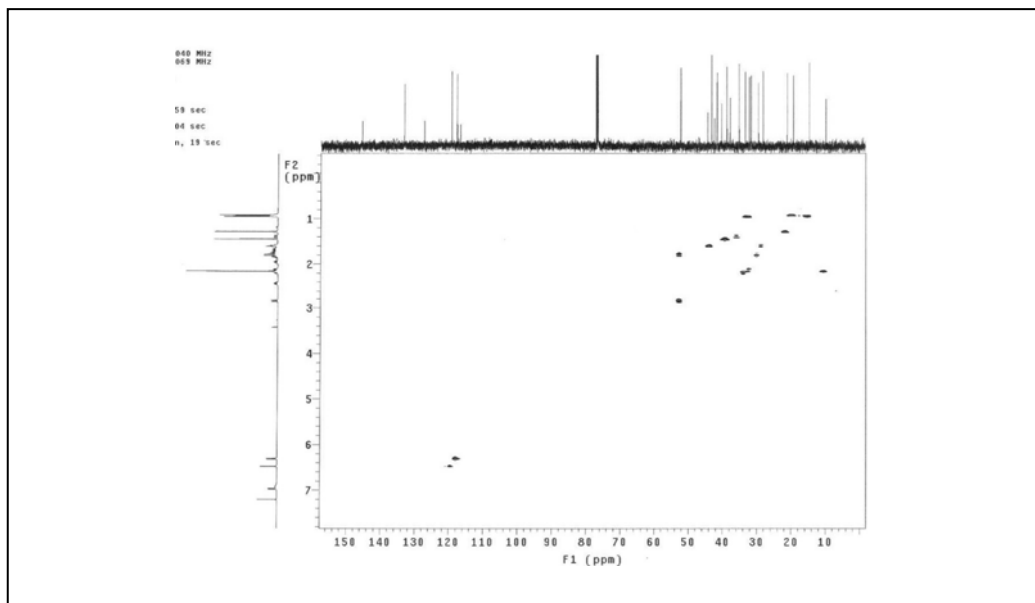


Figura 123 – Espectro de gHMBC da substância 8 (500 MHz, CDCl₃).

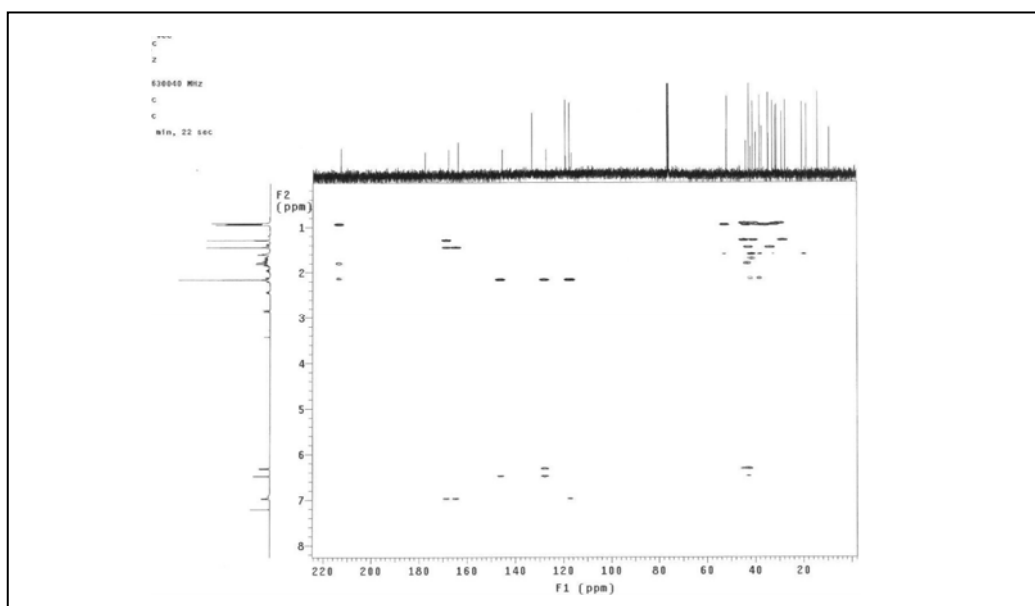


Figura 124– Espectro de gHMBC da substância 8 (500 MHz, CDCl₃).

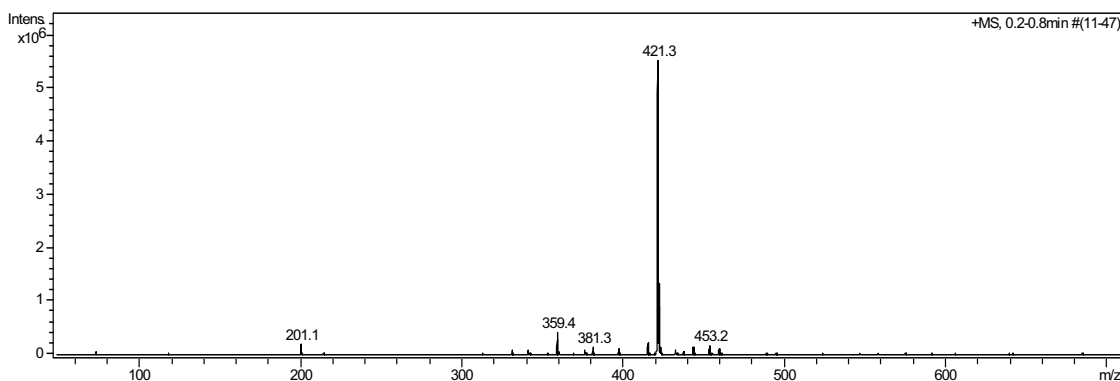
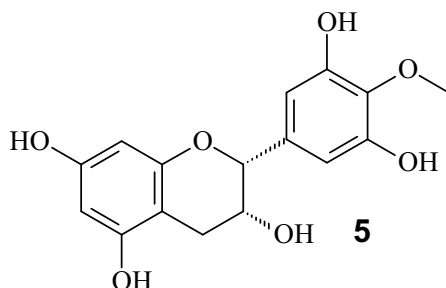


Figura 125– Espectro de massas da substância 8 .

5.8 Identificação estrutural da substância 5



A substância **5** foi elucidada por meio de comparação dos dados espectrométricos com os descritos na literatura (Agrawal et al.; 1989).

No espectro de RMN de ¹H (Tabela 10, p. 168) foram observados dois duplos dubletos em 2,87 δ (1H; *J*= 16,5 e 4,5 Hz) e 2,74 δ (1H, *J*= 16,5 e 2,0 Hz), atribuídos a H-4; um multipletto em 4,19 δ, integrando para 1H, atribuído ao hidrogênio carbinólico H-3. Em 4,78 δ foi observado um singleto, integrando para 1H, atribuído ao hidrogênio H-2, e em 5,95 δ e 5,93 δ foram observados dois dubletos atribuídos a H-6 e H-8, respectivamente. Um sinal em 6,54 δ (s), integrando para 2H, foi atribuído aos H-2' e H-6'. Um singleto em 3,80 δ, integrando para 3H, foi caracterizado como sinal dos hidrogênios de grupo metoxílico em C-4'. Através da análise do experimento de gHMBC (Figura 130, p. 171) pode-se observar a correlação deste em 3,80 δ com o sinal em 136,5 δ, corroborando o padrão de substituição proposto para C-4'.

A análise dos espectros de RMN de ¹³C (Figura 128, p. 170) mostrou a presença de 15 sinais, dos quais sete foram caracterizados como quaternários, cinco metínicos, um metílico e um metilênico. Este espectro mostrou a

presença de carbonos característicos dos anéis **A** e **B** de substâncias da classe dos flavonóides: em 96,4 δ (CH) e 95,9 δ (CH) atribuídos aos C-6 e C-8, respectivamente; 157,9; 157,6; 157,1 δ , atribuídos aos C-5, C-7 e C-9, respectivamente. Os sinais em 107,1; 151,3; 136,5 δ , atribuídos aos carbonos C-2', C-3', C-4', caracterizam o anel **B**.

A determinação da configuração relativa da hidroxila em C-3 foi definida pelas magnitudes das constantes de acoplamento de 4,5 Hz e 2,5 Hz, caracterizando acoplamentos *ax-eq* e *eq-eq* entre o H-4 e H-3, respectivamente.

Aliado a essas informações o espectro de massas apresentou pico do íon molecular em m/z 321.1 $[M+1]^+$, corroborando a fórmula molecular $C_{16}H_{16}O_7$.

Tabela 10. Dados de RMN de 1H e RMN-2D ($CDCl_3$, 500 MHz) da substância 5.

H	δ (ppm),Mult. J (Hz)	$\delta^{13}C$ (ppm)	gHMQC	gHMBC	gCOSY
02	4,78 (sl)	79,6	79,5	107,2 (C-6'); 136,1 (C-1');	
03	4,19 (m)	67,3	67,3	29,0 (C-4); 96,5 (C-6); 136,1 (C-1')	2,71 (H-4)
04 ^a	2,87 (dd; 16,5 e 4,5)	29,1	29,0	100,1 (C-10); 79,6 (C-2); 67,3 (C-3); 96,5 (C-6); 157,6 (C-5) ou 157,1 (C-9)	4,18(H-3)
04 ^b	2,74 (dd; 16,5 e 2,5)	29,0	29,0		
05		157,6			
06	5,95 (d; 2,0)	96,4	N.O	157,6 (C-5)	
07		157,9			
08	5,93 (d; 2,0)	95,9	N.O		
09		157,1			
10		100,1			
1'		136,1			
2'	6,54 (s)	107,2	107,2	151,3 (H-3'); 136,1 (H-1') ou 136,5 (H-1'); 107,2 (H-6'); 79,6(H-2)	4,77 (H-2)
3'		151,3			
4'		136,5			
5'		151,1			
6'	6,53 (s)	107,2	107,2	151,3 (H-3'); 136,1 ou 136,5 (H-1'); 107,2 (H-6'); 79,6 (H-2)	4,72 (H-2)
OCH ₃	3,80 (s)	60,7	60,7	136,5 (H-4')	

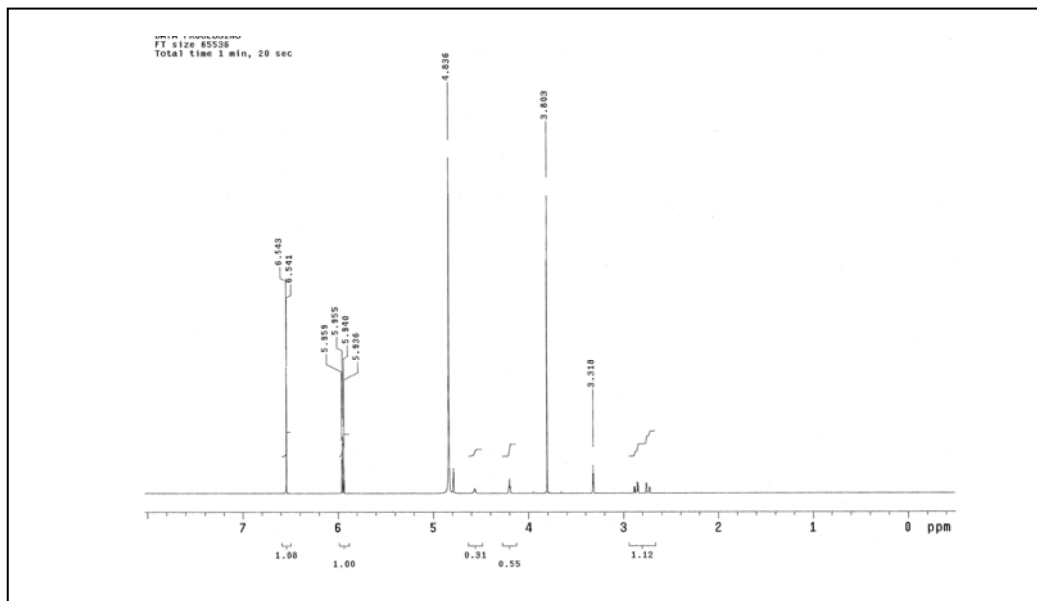


Figura 126 Espectro de RMN de ¹H da substância 5 (500 MHz, CDCl₃).

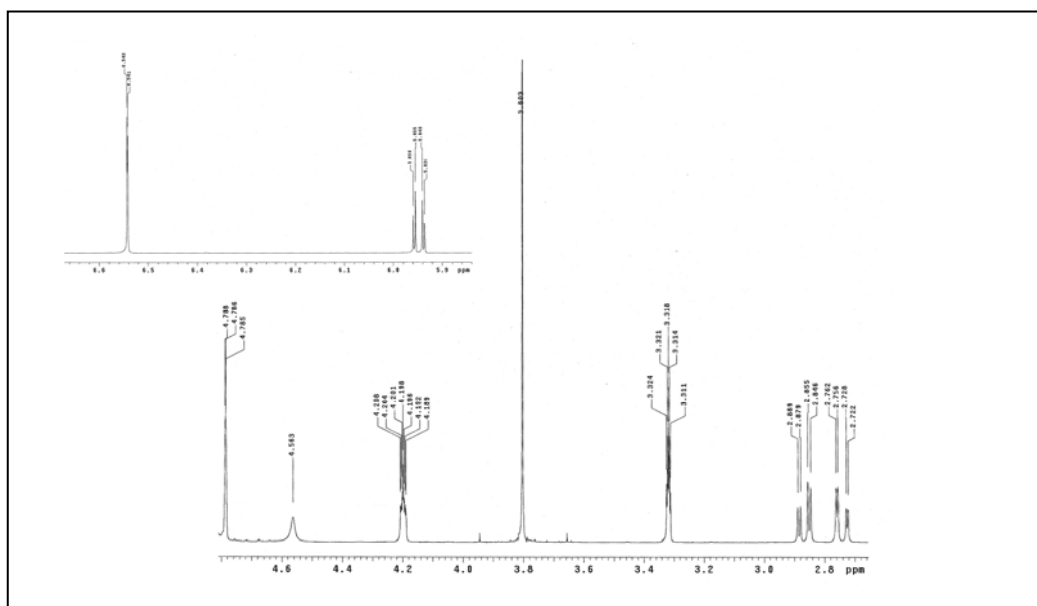


Figura 127 Expansão da região 6,5–8,7 δ do espectro de RMN de ¹H da substância 5 (500 MHz, CDCl₃).

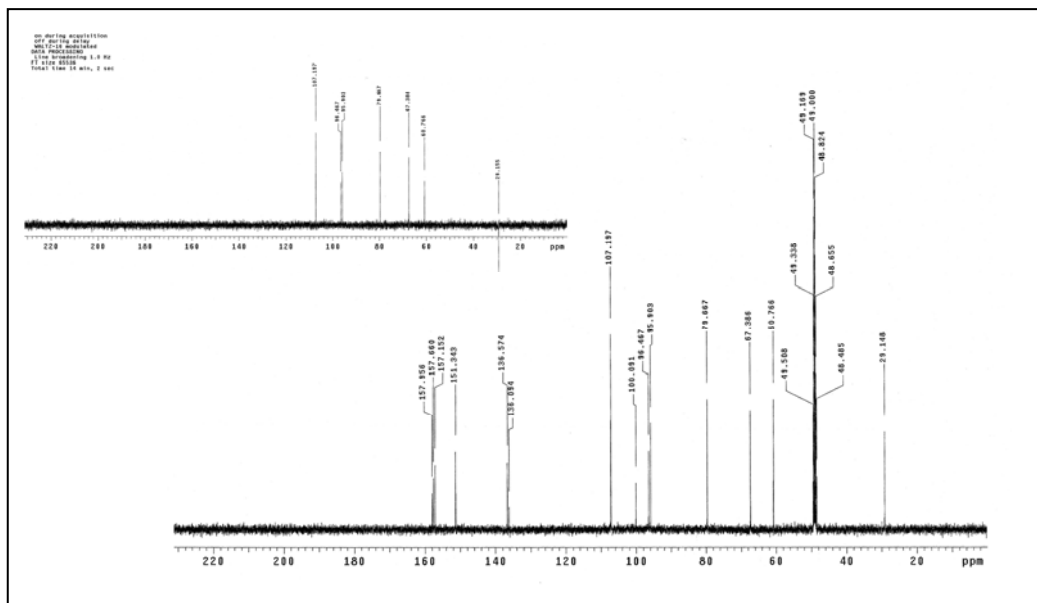


Figura 128 Espectro de RMN de ^{13}C da substância 5 (300 MHz, CDCl_3).

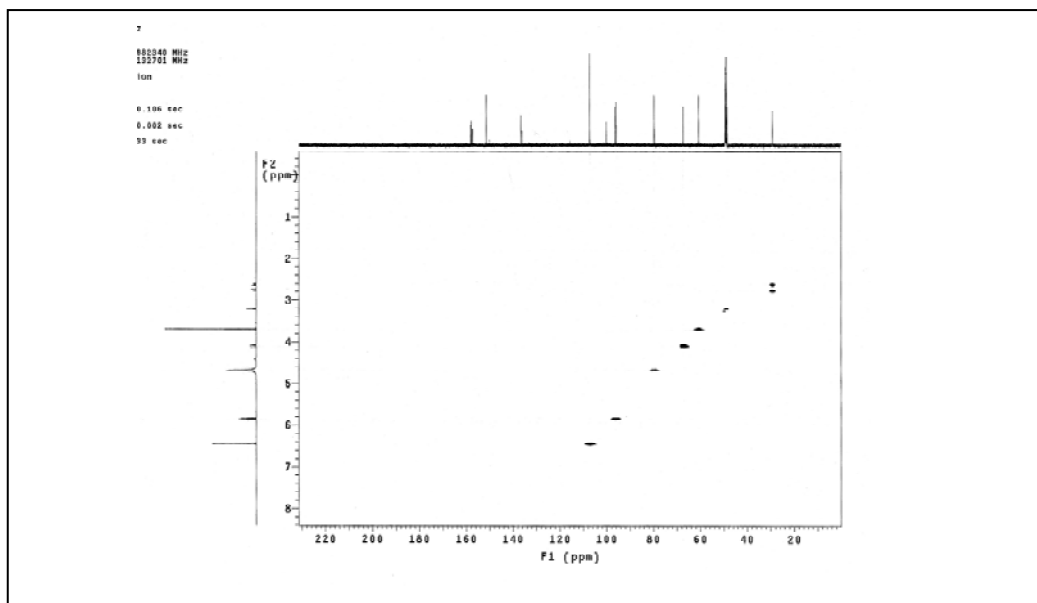


Figura 129 Espectro de gHMBC da substância 5

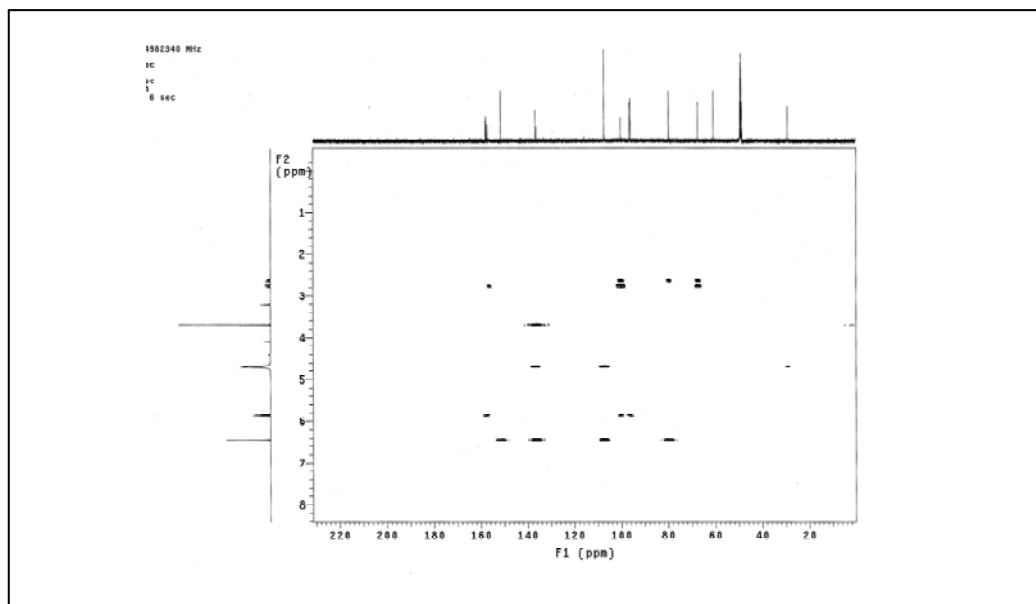


Figura 130 Espectro de gHMBC da substância 5

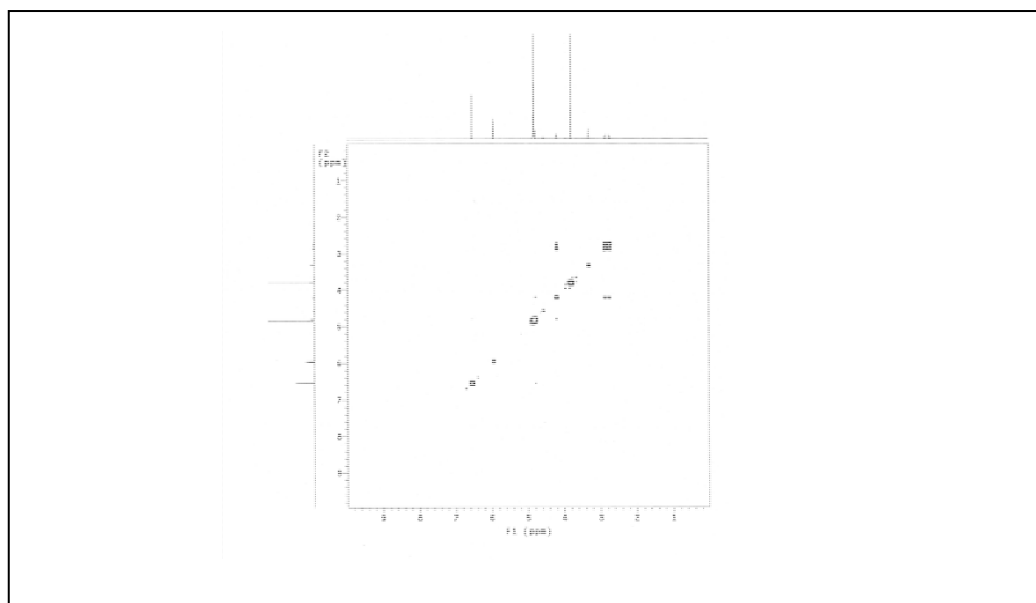


Figura 131 Espectro de gCOSY da substância 5

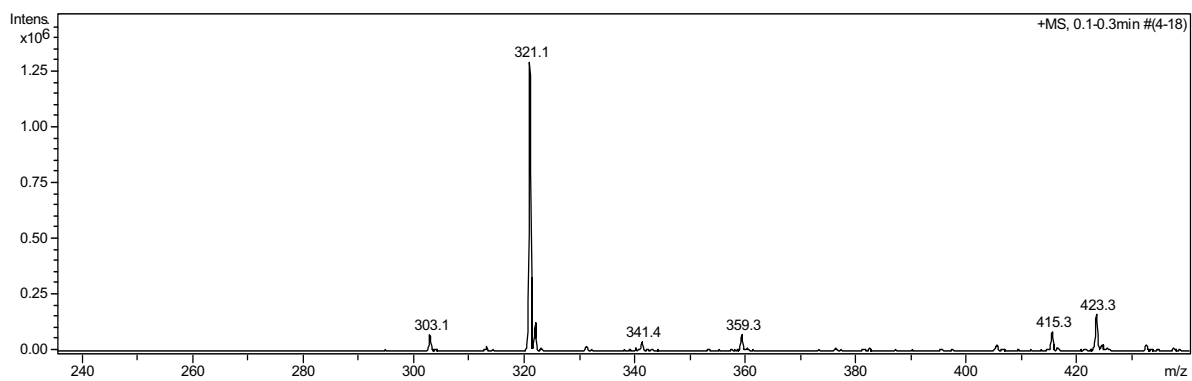


Figura 132 Espectro de massas da substância 5

6. Estudo Biológico

6.1 Introdução

Os metabólitos secundários derivados de plantas têm sido utilizados para tratar a doença humana desde o alvorecer da medicina. A investigação de produtos naturais como fonte de novas terapêuticas humanas atingiu o seu auge na indústria farmacêutica ocidental no período de 1970-1980, que resultou em uma paisagem farmacêutica fortemente influenciada por moléculas não-sintéticas (Newman e Gragg, 2007).

São inúmeras as doenças que afetam a humanidade. Dentre elas, as doenças negligenciadas têm como maior agravante o fato de não disporem de tratamentos eficazes ou adequados. Em sua maioria, são doenças tropicais infecciosas e parasitárias e geram um impacto devastador sobre a humanidade.

Nesse contexto, este estudo teve como objetivo avaliar a atividade biológica do extrato bruto, frações de partição e substâncias puras isoladas das raízes e cascas das raízes de *M. ilicifolia*, visando analisar seu potencial biológico, principalmente frente a enfermidades caracteristicamente negligenciadas.

6.2 Atividade Tripanocida

O protozoário *Trypanosoma cruzi* é o agente etiológico da doença de Chagas que afeta 20 milhões de pessoas na América Central e América do Sul e é responsável pela morte de mais de 45 mil pacientes por ano (Who, 1999). No Brasil, existem cerca de 4 milhões de pessoas infectadas (Vinhaes, 2000). A quimioterapia atual da doença de Chagas é baseada exclusivamente nos derivados de nitroimidazóis, a maioria deles desenvolvidos a mais de 30 anos. Benznidazol e nifurtimox são as drogas mais usadas para tratar a doença de Chagas e têm demonstrado baixa eficácia, especialmente na fase crônica da infecção, além de alta toxicidade (Sênior, 2007).

No entanto, no Brasil, o nifurtimox foi retirado do mercado devido a seus efeitos colaterais (Lana e Tafui, 2000, Rey, 2001). Entre os efeitos colaterais

dos dois medicamentos, pode-se observar: perda de peso (anorexia), náusea e vômito, excitação nervosa, insônia, convulsão, vertigens, dores de cabeça, depressão do sistema nervoso central e dermatites (Saúde-Guimarães e Faria, 2007). Dessa forma, o benznidazol se tornou, no Brasil, a única alternativa para o tratamento, apesar de muitas críticas devidas também a seus efeitos colaterais e a pouca efetividade na fase crônica da doença.

As plantas medicinais têm sido utilizadas como fonte de agentes terapêuticos em nível mundial e tem se configurado em alternativas para a busca de novos fármacos e ou inspiração para novos modelos de fármacos. Atualmente, é observado na literatura aumento exponencial das investigações sobre a atividade tripanocida utilizando uma grande variedade de extratos vegetais e/ou seus metabólitos isolados (Coura e Castro, 2002).

6.3 Materiais e Métodos

6.3.1. Microrganismos e condições de cultivo

O ensaio tripanocida foi desenvolvido no Laboratório de Imunologia, do Departamento de Ciências Biológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, UNESP - Araraquara, sob supervisão da Profa. Dra. Regina Maria Barretto Cicarelli.

Neste ensaio foi utilizada a forma epimastigota da cepa Y de *Trypanosoma cruzi* por ser uma forma não infectante e de fácil manutenção em cultura. Os parasitos são cultivados em meio LIT a 28°C.

6.4 Teste tripanocida

O teste colorimétrico utilizando MTT foi descrito por Muelas-Serrano et al.; 2000, com formas epimastigotas de *Trypanosoma cruzi* (cepa Y). Os testes foram realizados em triplicata em placas de poliestireno com 96 poços estéreis e com tampa, na câmara de fluxo laminar.

Para o teste foram colocados 3µL de cada substância (concentrações finais de 100, 50, 25, 10, 5, 2,5 e 1µg/mL, respectivamente), não ultrapassando o limite de 3% de DMSO, uma vez que porcentagens superiores mostram-se

tóxicas para o parasita. A seguir, foram adicionados 97µL de meio LIT contendo as formas epimastigotas de *Trypanosoma cruzi* na concentração desejada, nos poços para teste e 97µL de meio LIT nos poços controles. Foram realizados 2 controles, um na ausência do parasito, mas na presença da substância e outro na ausência da substância, mas contendo parasitas.

A placa foi incubada em câmara úmida a 28°C, por 72 horas. A seguir, adicionou-se 10 µL de uma solução MTT/PMS (2,5mg/mL de MTT e 0,22mg/mL de PMS) em todos os poços e a placa foi incubada ao abrigo da luz por 75 minutos a 28°C. Neste momento, ocorreu a redução do sal tetrazolium MTT 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2-5-defeniltetrazólio em um produto colorido, *formazan*, pela ação da enzima succinato desidrogenase das mitocôndrias (Dutta et al.; 2005).

Adicionou-se 100 µL de uma solução 10% SDS -0,01N, para dissolver os cristais de *formazan* e incubou-se a temperatura ambiente por 30 minutos ao abrigo da luz. A leitura da densidade ótica foi realizada em espectrofotômetro (Leitor de ELISA - BioRad) a 595nm e os resultados foram obtidos em absorbância. A porcentagem de citotoxicidade (%C) foi calculada segundo a equação abaixo (Muelas-Serrano et al, 2000),

$$\%C = [(Gc - Gp)/Gc] \times 100$$

$$Gc = Ac - Am$$

$$Gp = Ap - Apm$$

sendo que Gc representa o número de parasitos/mL nos poços controles e, Gp, o número de parasitas/mL detectados em diferentes concentrações da substância. Ac corresponde ao valor de absorbância nos poços de controle (na ausência da substância) com parasitos; Am representa o valor da absorbância nos testes e Apm, o valor da absorbância das diferentes concentrações da substância na ausência do parasito.

6.5 Resultados e Discussão

Inicialmente, foi avaliado o extrato etanólico das cascas das raízes da planta adulta de *M. ilicifolia* e suas frações obtidas após partição líquido-líquido. Posteriormente, também foram avaliados os triterpenos quinonametídeos, maitenina e pristimerina, isolados do extrato DCM das raízes de *M. ilicifolia*.

Dentre os resultados obtidos para o extrato etanólico e suas frações (Tabela 11, p. 176), destacou-se a atividade pronunciada da fração DCM ($IC_{50} = 69,6 \mu\text{g/mL}$), a qual foi selecionada para investigação química.

Tabela 11. Valores de IC_{50} de extrato e frações obtidas de *M. ilicifolia*.

Extrato e Frações	IC_{50} ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)
	Forma epimastigota
CMICR-EV	183,50
CMICR-EV-P.HEX	1104,90
CMICR-EV-DCM	69,60
CMICR-EV-P.H.A	110,3
benznidazol	31,20 (μM)

CMICR-EV (extrato etanólico de raízes de *M. ilicifolia*), CMICR-EV-P.HEX (fração de partição líquido-líquido com hexano), CMICR-EV-DCM (fração de partição líquido-líquido com diclorometano)CMICR-EV-P.H.A (fração de partição líquido-líquido com hexano-acetato).

O fracionamento cromatográfico da fração de partição DCM culminou no isolamento de 4 alcalóides piridínicos sesquiterpênicos, sendo três do tipo evoninato e um do tipo wilfordato, além de ourateacatequina. Esses, foram também avaliados por ensaio tripanocida. Na figura 133, p. 177 encontram-se os valores de IC_{50} apresentados pelas substâncias puras avaliadas.

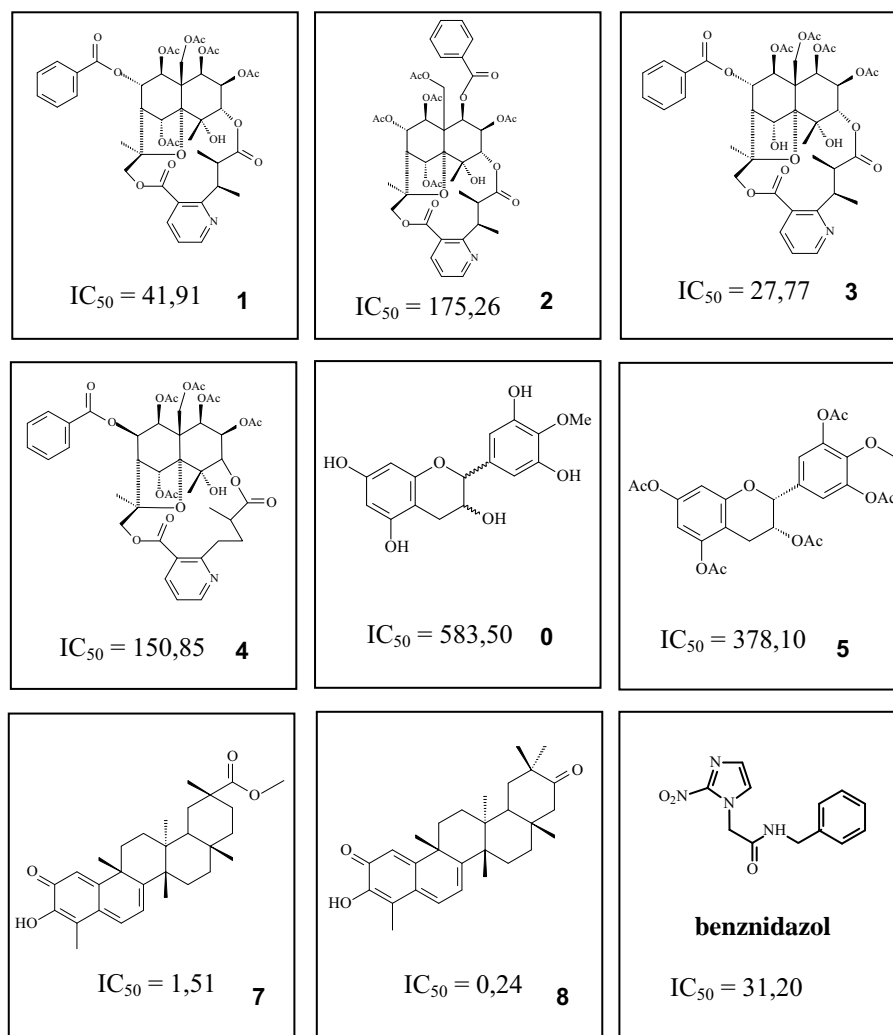


Figura 133 - Valores de IC_{50} (μM) das substâncias isoladas, preparada e padrão

O valor de IC_{50} para a ourateacatequina não evidenciou atividade frente ao ensaio tripanocida. Visando potencializar a atividade desta catequina foi realizada uma reação de acetilação. O peracetato de ourateacatequina apresentado na figura 133, p. 177, revelou ser mais ativo que a catequina, mas quando comparada ao controle positivo (benznidazol), foi considerado inativa.

A comparação do valor de IC_{50} do alcalóide **1**, do tipo evoninato, com o alcalóide **4**, do tipo wilfordato, permitiu inferir que **1** é cerca de três vezes mais ativo que **4**.

A troca de um grupo benzoíla da posição 8 de **1** para a posição 1 como no alcalóide **2**, nos derivados do tipo evoninato acarreta perda da atividade. Essa observação sugere a importância do grupo benzoíla na posição 8 para a atividade tripanocida.

O valor de IC₅₀ obtido para o alcalóide **3** com um grupo hidroxila livre na posição 6 revelou uma maior atividade tripanocida quando comparado ao alcalóide **1** que apresenta-se acetilado.

Os valores de IC₅₀ exibidos pelos triterpenos quinonametídeos, maitenina e pristimerina, foram de 0,24 µM e 1,51 µM, respectivamente, quando avaliados utilizando as formas epimastigotas. Os dados de bioatividade revelaram ação potente dos triterpenos quinonametídeos maitenina e pristimerina, quando comparados ao alcalóide piridínico sesquiterpênico mais ativo (27,77 µM). Os valores de IC₅₀ obtidos para essas duas classes de metabólitos secundários foram comparados com o padrão positivo (benznidazol - Roche[®]) o qual exibe valor de IC₅₀ de 31,20 µM, corroborando suas potentes atividades biológicas.

A potente atividade apresentada pelos triterpenos quinonametídeos pode estar relacionada à composição da membrana plasmática das formas epimastigotas. Essa composição apresenta maior percentagem dos esteróides em sua composição, principalmente ergosterol, que desempenha um papel importante no transporte das substâncias através da membrana plasmática do parasita (Silveira et al, 1979, Lião et al, 2008), transformando a forma epimastigota mais suscetíveis à ação de substância exógena.

Vale salientar, a importância e o potencial biológico dessas duas classes de metabólitos secundários de *M. ilicifolia* para doenças negligenciadas.

6.6 Atividade Antifúngica

6.6.1 Introdução

Nas últimas décadas tem sido observado um aumento acentuado de infecções fúngicas, as quais contribuem para uma elevada taxa de mortalidade em pacientes imunocomprometidos, como os pacientes HIV positivos, pacientes com câncer e transplantados, além daqueles submetidos a procedimentos invasivos como diálise e hemodiálise, a terapia com antibióticos de amplo espectro e com uso ininterrupto de corticóides (Moellering et al., 2007; Montagnac et al., 2006; Perea e Patterson, 2002; Rubin et al.; 1993).

Os freqüentes agentes causadores dessas infecções estão principalmente concentrados nas espécies de *Candida*, *Aspergillus*, *Cryptococcus*, *Mucor* e algumas outras incomuns espécies como *Fusarium*, *non-albicans Candida* que são resistentes a terapia convencional (Moellering et al., 2007; Montagnac et al., 2006).

O número de fármacos disponíveis para o tratamento de infecções fúngicas é limitado e conduz a inúmeros efeitos tóxicos.

Hoje as plantas medicinais representam uma importante fonte de substâncias fungitóxicas, as quais, quando comparadas com fungicidas de origem sintética, caracterizam uma proposta ecológica praticamente inofensiva ao meio ambiente (Stangarlin et al.; 1999; Alves et al.; 2000).

6.6.2 Materiais e Métodos

6.6.2.1 Microrganismos e condições de cultivo

Os ensaios antifúngicos foram desenvolvidos no Laboratório de Micologia Clínica, Departamento de Análises Clínicas, Faculdade de Ciências Farmacêuticas – UNESP- Araraquara, sob a supervisão da Profs. Dra. Maria José Soares Mendes Giannini e Dra. Ana Marisa Fusco Almeida.

Os fungos utilizados neste trabalho incluem *Candida albicans* (ATCC 90028), *C. krusei* (ATCC 6258), *C. parapsilosis* (ATCC 22019) e *Cryptococcus neoformans* (ATCC 90012) todos padrões ATCC (*The American Type Culture Collection*), pertencentes a micoteca do Laboratório de Micologia Clínica do Departamento de Análises Clínicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, UNESP, Araraquara, sendo cultivadas em ágar Sabouraud sem a adição de cloranfenicol, incubadas a 30°C, durante 24 horas as do gênero *Candida* e 48 horas a do gênero *Cryptococcus*.

6.7 Teste antifúngico

Os ensaios antifúngicos foram desenvolvidos segundo o método de microdiluição em caldo, segundo descrito no documento M27-A2 (2002) do CLSI (*Clinical and Laboratory Standards Institute*) com modificações. O meio

de cultura utilizado foi RPMI-1640 com L-glutamina sem bicarbonato de sódio e acrescido de 2% de glicose, tamponado com morfolinopropanosulfônico (MOPS) 0,165M. O pH foi ajustado para 7,2 e a esterilização realizada por filtração.

Os extratos, frações e substâncias puras foram diluídos assépticamente em 1mL de dimetilsulfóxido e solubilizados com o auxílio do vórtex e logo dissolvidas no meio de cultura RPMI. Foram realizados cálculos para determinar a quantidade de cada substância a ser adicionada, para que a concentração inicial na placa de microdiluição fosse 250µg/mL.

A suspensão de células fúngicas foi preparada em solução salina 0,85% com densidade óptica de 0,5 (McFarland) e então diluída na razão de 1:100 em meio RPMI tendo uma densidade fúngica equivalente à 1×10^5 unidades formadoras de colônia/mL. Esta suspensão foi inoculada sobre as microplacas com as substâncias, sendo este inóculo diluído até a concentração de 0,48 µg/mL. As microplacas foram incubadas sob agitação constante a uma temperatura de 30°C, durante 24 horas para o gênero *Candida* e 48 horas para *Cryptococcus neoformans*. Os controles positivos empregados nos ensaios de fungitoxicidade foram a anfotericina B e fluconazol. A concentração inibitória mínima (CIM) foi definida como a concentração capaz de inibir em 100% o crescimento fúngico, sendo este analisado por espectrofotometria.

6.8 Resultados e Discussão

Neste ensaio foram avaliados o extrato etanólico e as frações de partição das cascas das raízes de *M. ilicifolia* adulta, o extrato DCM de *Salacia campestris* e uma fração enriquecida de triterpenos quinonametídeos denominados de TQ.

Os dados de CIM (concentração inibitória mínima capaz de inibir em 100% o crescimento fúngico), apresentados na tabela 12, p.181 revelaram ação antifúngica para os extratos (CMICR-EV) e (SCD). Dentre as frações de partição (CMICR.EV.PHEX), (CMICR.EV.PHA) e (CMICR.EV.PHI) referente ao extrato etanólico da família Celastraceae (CMICR-EV) e a fração de partição (CMICR.EV.PHI) revelaram ação antifúngica frente ao fungo *Candida krusei*, quando comparada ao fluconazol.

Dentre os valores de CIM apresentados na tabela 12 p.181, aquele que revelou potente ação antifúngica frente ao fungo *Candida krusei* foi o extrato diclorometano de *Salacia campestris* (SCD), quando comparado ao controle positivo fluconazol.

Os dados preliminares contidos na tabela 12, p.181 indicaram uma atividade antifúngica promissora da mistura de triterpenos quinonametídeos (TQ). Essa apresentou valor de CIM de 0,97 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ e foi seletiva frente aos fungos *Candida parapsilosis* e *Cryptococcus neoformans*, respectivamente, quando comparada aos controles positivos fluconazol (8,00 e 4,00 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) e anfotericina B (1,00 e 2,00 $\mu\text{g.mL}^{-1}$).

Tabela 12. Concentração Inibitória Mínima de extratos e frações obtidas de *M. ilicifolia* e *S. campestris*.

Extrato e Frações	CIM ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)			
	Ca	Ck	Cp	Cn
CMICR-EV	250	31,25	250	31,25
CMICR-EV-P.HEX	>250	>250	>250	>250
CMICR-EV-P.H.A	>250	>250	>250	>250
CMICR-EV-P.HI	>250	31,25	250	62,50
SCD	250	7,81	250	7,81
TQ	31,25	15,60	0,97	0,97
fluconazol	2,00	64,00	8,00	4,00
anfotericina B	2,00	2,00	1,00	2,00

Ca (*Candida albicans*), **Ck** (*Candida krusei*), **Cp** (*Candida parapsilosis*) e **Cn** (*Cryptococcus neoformans*); CMICR-EV (extrato etanólico de raízes de *M. ilicifolia*), CMICR-EV-P.HEX (fração de partição líquido-líquido com hexano), CMICR-EV-P.H.A (fração de partição hexano-acetato), CMICR-EV-P.HI (fração de partição hidroalcoólica), SCD (extrato diclorometano de *S. campestris*) e TQ (fração enriquecida de maitenina e pristimerina).

Visando a obtenção do metabólito secundário responsável pela seletividade e potente atividade fungicida, foi realizado o isolamento das substâncias que compunham a mistura de triterpenos quinonametídeos, resultando no isolamento da maitenina (**8**) e da pristimerina (**7**). Além destes, também foram submetidos ao ensaio antifúngico os alcalóides piridínicos sesquiterpênicos (**1-4**) e as catequinas (**0** e **5**). Na tabela 13, p.182 encontram-se os valores de CIM, sendo que as substâncias que apresentaram valor maior ou igual a 250 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ foram consideradas inativas.

Tabela 13. Valores de Concentração Inibitória Mínima das substâncias isoladas de *M. ilicifolia* e *S. campestris*.

Substâncias	CIM ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)			
	Ca	Ck	Cp	Cn
0	> 250	> 250	> 250	> 250
1	> 250	> 250	> 250	> 250
2	> 250	> 250	> 250	> 250
3	> 250	> 250	> 250	> 250
4	> 250	> 250	> 250	125
5	> 250	250	> 250	250
7	15,6	3,9	15,6	1,95
8	31,25	1,95	0,97	0,48
fluconazol	2,00	64,00	8,00	4,00
anfotericina B	2,00	2,00	1,00	2,00

Ca (*Candida albicans*), **Ck** (*Candida krusei*), **Cp** (*Candida parapsilosis*) e **Cn** (*Cryptococcus neoformans*)

Os valores de CIM exibidos pelos triterpenos quinonametídeos, pristimerina (**7**) e maitenina (**8**), foram de 3,9; 15,6; 1,95 e 1,95; 0,97; 0,48 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ respectivamente, quando avaliados frente aos fungos *C. krusei*, *C. parapsilosis* e *Cryptococcus neoformans*, sendo comparados com a anfotericina B e melhor que o fluconazol.

Salienta-se para os valores de CIM em negrito na tabela 13, p.182, os quais apontam uma ação antifúngica comparável ou potente apresentada pela pristimerina (**7**) e maitenina (**8**) quando comparado aos dois fármacos antifúngicos utilizados como padrões positivos, corroborando a atividade biológica apresentada por essa classe de metabólito secundário.

6.9- Atividade Leishmanicida

6.9.1 Introdução

A leishmaniose é uma doença não contagiosa causada por parasitas (protozoário *Leishmania*). Esta doença pode se manifestar de duas formas: leishmaniose tegumentar e a leishmaniose visceral.

A leishmaniose tegumentar é caracterizada por lesões na pele, podendo também afetar nariz, boca e garganta (esta forma é conhecida como “ferida brava”). A visceral é uma doença sistêmica, pois afeta vários órgãos, sendo que os mais acometidos são o fígado, baço e medula óssea.

A Organização Mundial da Saúde (OMS) estima que 350 milhões de pessoas estejam expostas ao risco com registro aproximado de dois milhões de novos casos das diferentes formas clínicas ao ano (Brasil, 2007).

No Brasil, os antimoniais pentavalentes são as drogas de escolha para o tratamento da leishmaniose visceral em virtude de sua comprovada eficácia terapêutica (SANTOS et al., 2002). A anfotericina B é a única opção no tratamento de gestantes e está indicada como segunda opção para os pacientes que tenham contra-indicações ou tenham apresentado toxicidade ou refratariedade relacionadas ao uso dos antimoniais pentavalentes (Brasil, 2003; 2006).

Estudos químicos e imunofarmacológicos têm sido realizados com o intuito de encontrar novos compostos menos tóxicos, economicamente mais viáveis, de efeito específico e que reverta à resistência do parasita às drogas.

O efeito leishmanicida dos compostos isolados das espécies vegetais tem sido avaliado *in vitro* sobre formas promastigota e/ou amastigota de *Leishmania*. Dentre eles, os terpenóides de *Artemisia annua* (Yang et al., 1992), de *Guarea rhopalocarpa* (Camacho et al., 2000), além dos flavonóides de *Centrolobium sclerophyllum* (Araújo et al., 1998) e as neolignananas de *Virola surinamensis* têm se mostrado serem bons modelos leishmanicidas (Barata et al., 2000).

Além destes compostos, os alcalóides também têm sido muito estudados quanto ao seu potencial leishmanicida. Muitos destes alcalóides são

do tipo isoquinolínico, isolados de espécies vegetais nativas bolivianas comumente utilizadas pelos indígenas quimane. As espécies *Cardiopetalum calophyllum*, *Abuta rufescens* e *Abuta pahni* estão entre elas. Também foram isolados dois alcalóides quinolínicos di-substituídos da *Galipea longiflora* da família Rutaceae, que apresentaram efeito leishmanicida *in vivo* nas infecções causadas por duas espécies de *Leishmania*, a *amazonensis* e *venezuelensis* (Fournet et al., 1993).

6.9.2 Materiais e Métodos

6.9.2.1 Microrganismos e condições de cultivo

Os ensaios anti-leishmania foram desenvolvidos no Laboratório de Parasitologia, Departamento de Análises Clínicas, Faculdade de Ciências Farmacêuticas – UNESP- Araraquara, sob a supervisão da Profa. Dra. Márcia Aparecida Graminha.

Neste ensaio foi utilizada a forma promastigotas de *Leishmania amazonensis* e *Leishmania chagasis*. Os parasitos são cultivados em meio LIT a 28°C.

6.10 Teste anti-leishmania

Os ensaios de atividade antiparasitária foram realizados utilizando a técnica de MTT (sal de tetrazólio), de acordo com Muelas-Serrano (2000). Inicialmente, formas promastigotas de *L. amazonensis* e *L. chagasis* foram cultivadas em meio LIT. As formas promastigotas foram utilizadas na fase logarítmica de crescimento. Em uma placa de cultura de células de 96 poços foram adicionados 97µL por poço de promastigotas de *L. amazonensis* na fase exponencial de crescimento em meio LIT e 3µL das substâncias a serem testadas (concentração variando de 500 a 7,8 µg/mL) dissolvidas em DMSO (3% v/v) e incubadas por 3 dias á 28°C. Cada concentração foi realizada em triplicata, em 3 experimentos independentes. A viabilidade de promastigotas foi

determinada por meio da técnica colorimétrica de MTT (sal de tetrazólio) após 3 dias de incubação.

Para confirmação dos resultados obtidos pelo método MTT, também foi realizada a avaliação visual da porcentagem de viabilidade celular em câmara de Neubauer, expressando a porcentagem de parasitas viáveis em relação ao total de parasitas contatos.

Para análise dos dados foi elaborada uma curva dose-resposta (viabilidade de parasitas em cultura), com base no tratamento utilizando as diferentes concentrações das substâncias testadas com o controle negativo (somente parasitas em meio de cultura). Os dados foram submetidos à adequada análise de variância (ANOVA) e pelo pós-teste de Dunnet, assumindo $p < 0,01$. A curva dose-resposta foi obtida na forma de gráfico e a IC_{50} calculada por meio da equação da reta entre os pontos. Foram utilizadas as funções do Excel, Origin 6.0 Professional e Graph Pad Prism 5 (Graph-Pad Software Inc., San Diego, CA, USA).

6.11 Resultados e Discussão

Tabela 14. Valores de IC_{50} de extratos e frações obtidas de *M. ilicifolia* e *S. campestris*.

Extratos e frações	L. Visceral	
	<i>L. amazonensis</i>	<i>L. chagasi</i>
CMICR-EV	183,50	179,59
CMICR-EV-P.HEX	248,87	327,14
CMICR-EV-P.H.A	18,65	36,91
CMICR-EV-P.HI	398,00	334,25
SCD	5,18	5,77
TQ	< 1,60	< 0,195
pentamidina	4,00	4,00

Os valores de IC₅₀ ($\mu\text{g.mL}^{-1}$), contidos na tabela 14 (p.185), para a mistura de triterpenos revelou uma atividade preliminar promissora.

Em uma segunda etapa, foram testados os alcalóides (1) e (3), a catequina (5) e os triterpenos pristimerina (7) e maitenina (8). Os valores de IC₅₀ encontram-se na tabela15, p 186.

Tabela 15. Atividade leishmanicida das substâncias isoladas [valores de IC₅₀ expresso em $\mu\text{g.mL}^{-1}$].

Substâncias	L. Visceral	
	<i>L. amazonensis</i>	<i>L. chagasi</i>
1	>100	< 1,56
3	sem atividade	>100
5	304,68	sem atividade
7	< 1,56	< 1,56
8	< 1,56	< 1,56
pentamidina	4,00	4,00

De maneira semelhante ao comportamento apresentado frente aos ensaios tripanocida e antifúngico, os triterpenos quinonametídeos (7) e (8) revelaram potente atividade leishmanicida, frente a *L. amazonensis* e *L. chagasi*.

Um dado interessante, até então, não apresentado frente aos ensaios anteriores, foi o valor de IC₅₀ menor que $1,56 \mu\text{g.mL}^{-1}$ exibido pelo alcalóide 1.

6.12 Atividade Antitumoral

6.12.1 Introdução

O câncer é uma das doenças que mais causam temor na sociedade, por ter se tornado um estigma de mortalidade e dor. A definição científica de câncer refere-se ao termo neoplasia, especificamente aos tumores malignos,

como sendo uma doença caracterizada pelo crescimento descontrolado de células transformadas.

Existem quase 200 tipos que correspondem aos vários sistemas de células do corpo, os quais se diferenciam pela capacidade de invadir tecidos e órgãos, vizinhos ou distantes. Estatisticamente, em pesquisa realizada pela Organização Mundial da Saúde, o câncer é a terceira causa de óbitos no mundo com 12%, matando cerca de 6,0 milhões de pessoas por ano. Atualmente, é a segunda causa de mortes por doença no Brasil, estimando-se em 2002, 337.535 casos novos e 122.600 óbitos (Almeida et al, 2005).

Os produtos naturais, ciclo-celular específicos, é um tipo de agente antineoplásico importante e eficiente, e que se refere a muitos fármacos usados na terapia clínica do câncer e que originalmente não foram sintetizados. Dentre alguns produtos naturais citotóxicos, usados clinicamente no tratamento de neoplasias, têm-se os alcalóides da vinca (vimblastina e vincristina) e o taxol conhecido comercialmente como Paclitaxel® (Oliveira e Alves, 2002).

6.12.2 Materiais e Métodos

6.12.2.1 Linhagens tumorais

O ensaio de citotoxicidade foi desenvolvido no Departamento de Biotecnologia Vegetal da Universidade de Ribeirão Preto - UNAERP, sob supervisão da Profa. Dra. Ana Maria Soares Pereira.

As células tumorais utilizadas neste ensaio foram B16 (melanoma), HeLA (colo uterino) e U343 (astrocitoma cerebral).

6.13 Ensaio de citotoxicidade

A citotoxicidade foi avaliada por testes de viabilidade metabólica usando o Kit II[®] Cell Proliferation (MTT). As substâncias foram dissolvidas em DMSO 10% e testadas em várias diluições. Resumidamente, 100µL/mL do princípio ativo foram adicionadas a diluições contendo 100, 10 e 2 células de tumor cultivadas em microplacas de 96 poços e incubadas por 48 horas sob

atmosfera de 5% de circulação de CO₂. Após este período, os conteúdos dos poços foram cuidadosamente retirados e lavados com tampão fosfato (PBS), sob condições de fluxo laminar, para posterior processamento. A mistura de células cultivadas (100µL) e 51 µL de MTT (50 µL do reagente de rotulagem e 1 µL do reagente de acoplamento) foi cuidadosamente homogeneizada e, novamente, incubada em microplacas durante 24 horas a 37° C e 5% de circulação CO₂. A leitura foi realizada em espectrofotômetro (Leitor de ELISA) a 490nm e os resultados foram obtidos em absorbância.

6.14 Resultados e Discussão

Visando avaliar a citotoxicidade das substâncias isoladas de *M. ilicifolia*, os alcalóides piridínicos sesquiterpênicos, a catequina e os triterpenos quinonametídeos maitenina e pristimerina foram submetidas ao ensaio antitumoral.

Os valores de IC₅₀ obtidos para as substâncias isoladas foram comparados com o padrão positivo (actinomicina D) e são apresentados na tabela 16, p. 188.

Os valores de IC₅₀ revelaram que os alcalóides piridínicos sesquiterpênicos e a catequina, isolados de *M. ilicifolia*, foram inativos frente às três linhagens tumorais.

Tabela 16. Substâncias isoladas de *M. ilicifolia*. Porcentagem de inibição de crescimento de células tumorais - IC₅₀ (µg.mL⁻¹).

Substâncias	B16	HeLa	U343
1	> 100	> 100	> 100
2	> 100	> 100	100
3	> 100	> 100	> 100
4	> 100	> 100	> 100
5	> 100	100	100
8	> 100	> 100	2
Actinomicina D	2	2	10

Os dados de bioatividade demonstraram que a maitenina possui uma potente e seletiva atividade antitumoral cerebral (U343), apresentando valor de IC_{50} de 2 $\mu\text{L/mL}$, quando comparado com o controle positivo (actinomicina D, $IC_{50} = 10 \mu\text{L/mL}$).

Embora, a *Maytenus ilicifolia* seja uma planta medicinal amplamente estudada, esse estudo revela uma importante fonte de agentes bioativos, incluindo os triterpenos quinonametídeos.

7. Estudo Histoquímico

7.1 Introdução

Atualmente são descritas cerca de 80 espécies de *Maytenus* distribuídas no território brasileiro (Carvalho-Okano e Leitão Filho.; 2005).

As informações estruturais sobre espécies de *Maytneus* são baseadas nas descrições anatômicas elaboradas por Solereder (1908) e Metcalfe e Chalk (1957), nas interpretações ecológicas da anatomia da folha de 11 espécies da África do Sul, dentre elas *M. oleoides* (Hlwatika e Bhat.; 2002), na anatomia da folha de *M. ardisiaefolia* Reiss., *M. brasiliensis* Mart., *M. cestrifolia* Reiss., *M. communis* Reiss. e *M. obtusifolia* Mart. (Joffily e Vieira.; 2005). Associadas a essas informações as folhas, os caules e as raízes das espécies desse gênero são utilizadas na medicina tradicional e, conseqüentemente, investigadas com propósitos fitoquímicos e farmacológicos (Duarte e Debur.; 2005).

Apesar da diversidade e da importância farmacológica dos metabólitos secundários, são poucos os trabalhos anatômicos realizados com a raiz deste gênero (Prata e Mendonça.; 2009). Visto o potencial das espécies do gênero *Maytenus* para fins medicinais, a localização dos metabólitos secundários produzidos por suas espécies poderá contribuir para a otimização de trabalhos do ponto de vista químico, biológico e biossintético.

7.2 Histoquímica vegetal

Evidências da diversidade química nos diversos órgãos vegetais podem ser constatadas por ensaios histoquímicos, com a aplicação de diversas técnicas.

A técnica químico-histológica de identificação botânica de substâncias dos vegetais está baseada no uso de reagentes cito ou químicos-histológicos previamente estabelecidos. A análise histoquímica é baseada em reações químicas cromáticas ou de precipitação entre os reagentes específicos e os

constituintes celulares presentes na matriz selecionada (Costa e Proença da Cunha, 2000).

Os testes histoquímicos básicos revelam a natureza de tais substâncias no que concerne o caráter lipofílico e ou hidrofílico (Costa, 1996). São auxiliares na localização microquímica dos princípios farmacologicamente ativos e úteis na comprovação da autenticidade da droga (Costa e Proença da Cunha, 2000).

Esses métodos combinam várias técnicas de microscopia, fotomicroscópica apoiados em metodologia especial que valoriza a presença, bem como o sítio ativo, das substâncias químicas ou grupos de compostos do metabolismo secundário em plantas.

7.3 Objetivo

Este estudo teve como principal objetivo detectar por meio de testes histoquímicos, as células vegetais que acumulam os metabólitos secundários previamente isolados das raízes de *Maytenus ilicifolia*.

7.4 Materiais e métodos

7.4.1 Material vegetal

Os testes histoquímicos foram desenvolvidos no Laboratório de Fisiologia Vegetal, Departamento de Ciências Farmacêuticas – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, USP - Ribeirão Preto, sob a supervisão da Profa. Dra. Simone de Pádua Teixeira.

Para a realização dos testes histoquímicos, foram selecionadas raízes laterais frescas de indivíduos jovens (2 anos) de *Maytenus ilicifolia*.

7.4.2 Reagentes e Solventes Utilizados

Sudan III (Johansen, 1940), Reagente de Wagner (Furr e Mahlberg, 1881), Cloreto férrico (Johansen, 1940), reagente de Dragendorff (Svendsen e Verpoorte, 1983), além de água deionizada.

7.4.3 Equipamentos utilizados para análise das amostras

As observações e ilustrações foram obtidas a partir de uma câmara digital Leica DFC 320 acoplada a um microscópio Leica DM 5000.

7.4.4 Método

Cortes transversais foram feitos a mão livre e transferidos por meio de um pincel de ponta fina, para um vidro de relógio contendo água deionizada, para preservação do tecido. Posteriormente, estes foram selecionados, utilizando lupa, visando selecionar os cortes mais finos e com orientação correta. Após seleção dos cortes, parte destes, foi mantida sem coloração, com o intuito de atuar como branco, e a outra parte foi submetida à diferentes reagentes, visando à detecção das diferentes classes de metabólitos secundários previamente isolados das raízes de *Maytenus ilicifolia*. Para a realização dos testes histoquímicos foram utilizados os seguintes reagentes: Sudan III para substâncias lipofílicas, Dragendorff para alcalóides, Cloreto férrico para compostos fenólicos. Após seleção, os cortes foram transferidos para vidros de relógio adicionando-se sobre eles os diferentes reagentes. Em seguida, os cortes foram montados entre lâmina e lamínula e analisados em microscópio.

7.5 Resultados e Discussão

A análise das seções anatômicas evidenciou que as raízes se encontram em estrutura secundária, sendo possível visualizar os seguintes tecidos: xilema secundário, floema secundário, córtex e periderme.

Em quase todas as lâminas foi possível visualizar um enorme número de células contendo grãos de amido. As células parenquimáticas corticais e todas as células do xilema secundário (elemento de vaso, parenquimática e fibra) apresentaram muitos grãos de amido (Figura 134, p. 193).

O amido (homoglicano) é acumulado em plantas sendo a principal fonte de reserva nos tecidos parenquimatosos. A celulose é o composto orgânico

abundante na terra, parte constitutiva das paredes celulares da célula vegetal (Carvalho e Ribeiro.; 2006).

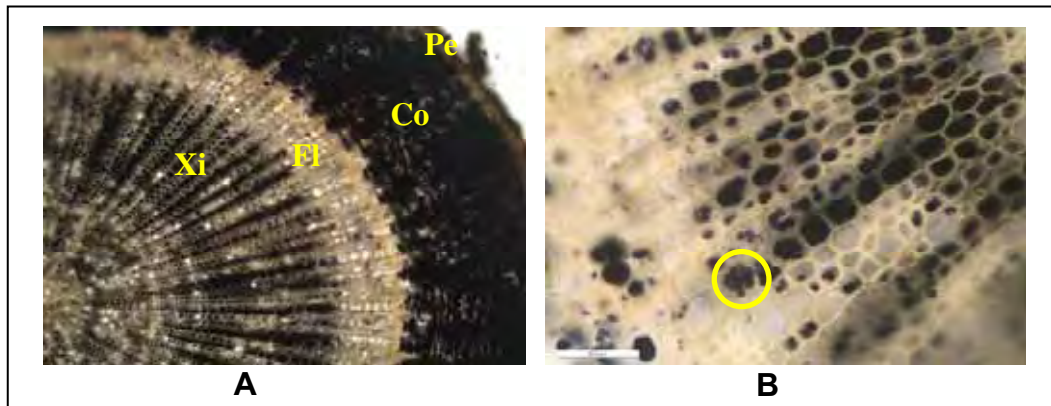


Figura 134 - Fotomicrografias de cortes transversais da raiz de *M. ilicifolia*. A- Raiz, mostrando grãos de amido (em preto) no xilema secundário (Xi), floema secundário (Fi), córtex (Co) e periderme (Pe), estrutura secundária. B- destaque (em preto) de grãos de amido no xilema secundário. Escalas: A= 100 μ m e B=50 μ m

Os terpenos (Figura 135, p. 194) foram evidenciados majoritariamente nas células do súber. Apresentaram coloração natural amarela e aparência lisa. Ocupam todo o citoplasma da célula. Ocorrem também em algumas células do córtex e do xilema secundário.

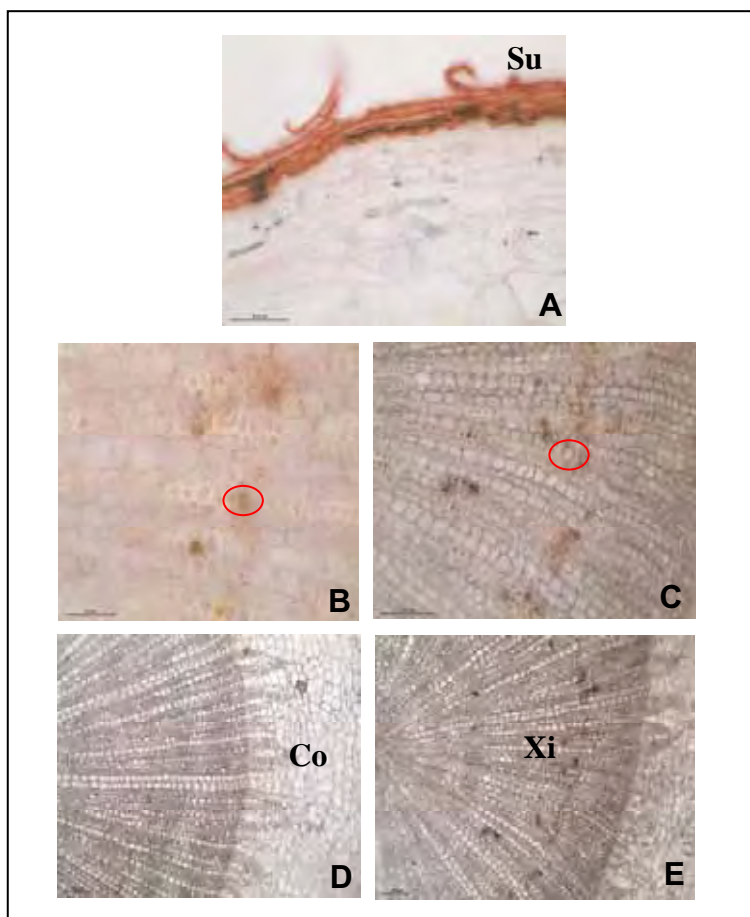


Figura 135 - Fotomicrografias de cortes transversais da raiz de *M. ilicifolia*. A- Raiz, mostrando terpenos (em amarelo-alaranjado ou vermelho) no súber (Su), sem uso de reagente, B e C- com uso de reagente, D e E- mostrando terpenos no córtex (Co) e no xilema secundário (Xi), sem uso de reagente. Escalas: A, B= 50 μ m e C, D e E=100 μ m

Os alcalóides foram observados nas células do córtex, do xilema secundário (fibras) e do súber (Figura 136, p. 195). Ocupam o citoplasma celular e possuem aparência granulosa.

Os alcalóides podem ser localizados sob a forma de sais orgânicos, nos tecidos externos de raízes e caules, nas epidermes, tricomas, no mesofilo das folhas, no tegumento das sementes e nos canais secretores. Esses compostos apresentam distribuição restrita nos vegetais e embora sua atuação não seja bem compreendida, sabe-se que os alcalóides constituem um grupo importante na defesa contra herbívoros por seu sabor amargo. Os alcalóides apresentam amplo espectro de atividades biológicas, como por exemplo, atividade antitumoral e anti-hipertensiva.

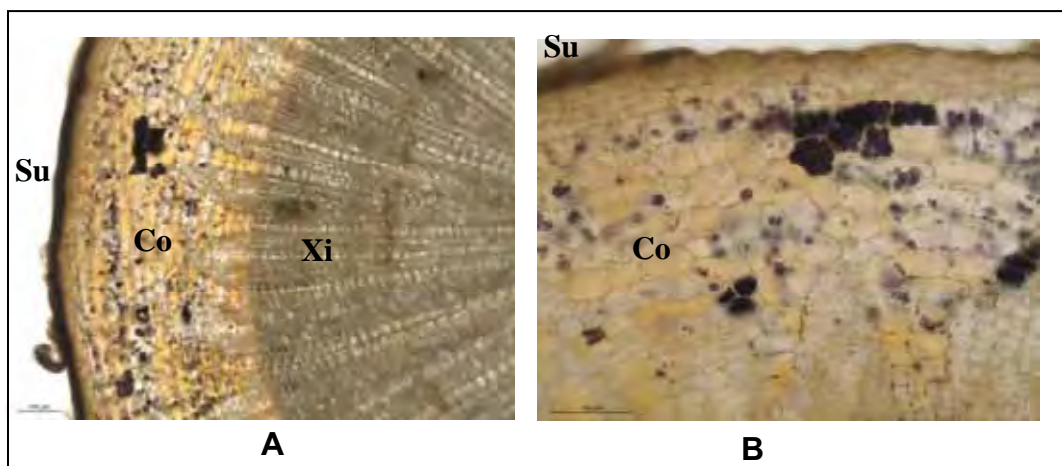


Figura 136 - Fotomicrografias de cortes transversais da raiz de *M. ilicifolia*. A e B- Raiz, mostrando alcalóides (castanho escuro) no súber (Su), córtex (Co) e no xilema secundário (Xi). Escalas: A e B= 100 μ m

Os compostos fenólicos (Figura 137, p. 195) foram observados no córtex, após coloração com cloreto férrico. Os testes para compostos fenólicos são, de um modo geral, poucos específicos, havendo compostos como os flavonóides que, na maioria das vezes, são detectáveis senão em microscopia de fluorescência em luz ultravioleta.

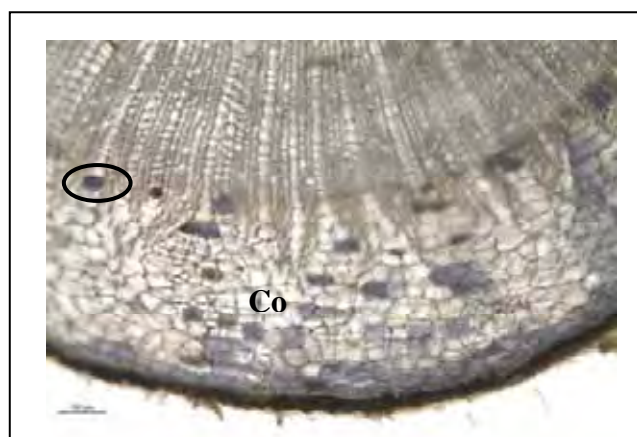


Figura 137 - Fotomicrografias de cortes transversais da raiz de *M. ilicifolia*. Raiz, mostrando compostos fenólicos (negro azulada) córtex (Co). Escala: 100 μ m

A fluorescência é um fenômeno óptico no qual a luz é absorvida por uma substância chamada fluoróforo e quase instantaneamente re-emitada com luz de comprimento de onda maior. Como resultado da absorção da luz, as

moléculas de fluoróforo tornam-se excitadas, quer dizer, absorvem a energia da luz e passa a um estado excitado no qual a energia de cada molécula é maior do que o seu estado fundamental.

A energia excedente é dissipada em calor, emitida em fluorescência, ou usada numa reação fotoquímica.

Esta técnica não é só utilizada quando se pretende detectar substâncias em concentrações mínimas, mas também se usa para observações depois de tratamentos químicos. Quando surgem mudanças nos processos de excitação e/ou emissão de energia devido à sua união ao substrato, também se podem obter informações a respeito da conformação das moléculas do substrato.

A autofluorescência é predominante nos tecidos vegetais. Nos tecidos animais, pode-se encontrá-la nas fibras do tecido conjuntivo (colágeno e elastina). No interior celular, a maior parte da autofluorescência é devida à presença do NADH unido a uma deidrogenase mitocondrial.

A detecção de células autofluorescentes foi monitorada por microscopia de epifluorescência, sendo selecionado comprimento de onda no vermelho.

A autofluorescência dos triterpenos foi observada no súber e os compostos fenólicos foram observados nas paredes de algumas células do córtex (imagem de fluorescência, Figura 138, p. 196).

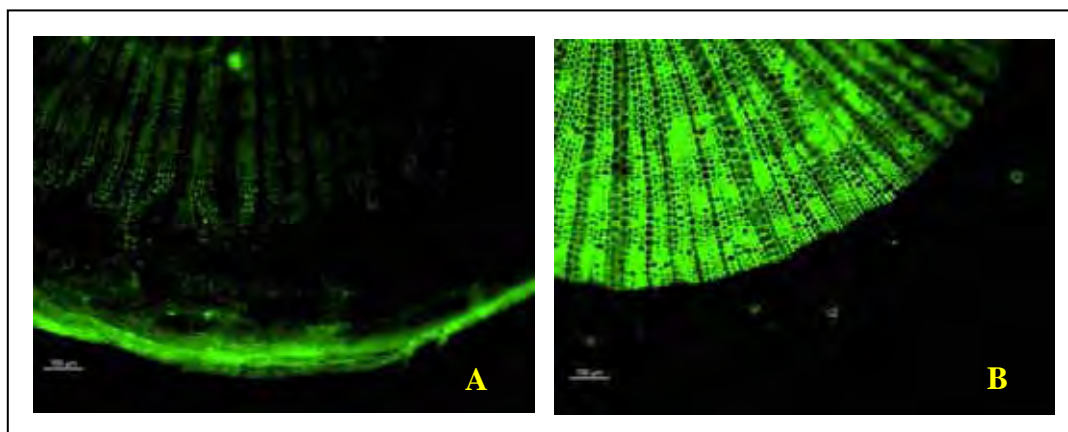


Figura 138 - Caracterização histoquímica por cortes transversais por epifluorescência da raiz de *M. ilicifolia*. A – triterpenos localizados no súber e B- compostos fenólicos no córtex. Escala: 100µm

Os testes histoquímicos indicaram que as raízes apresentaram células com compostos de natureza química diversificada onde estão incluídos os terpenos, os alcalóides e os compostos fenólicos. A ocorrência dos triterpenos quinonametídeos e dos alcalóides piridínicos sesquiterpênicos corroboram o caráter quimiotaxonômico da família em estudo. Estes metabólitos secundários são compostos restritos ao órgão em estudo, podendo-se inferir que o estudo histoquímico confirmou a presença das duas principais classes de metabólitos secundários comumente encontrados nesta espécie.

A presença de triterpenos, alcalóides e compostos fenólicos em *M. ilicifolia* não está associada às estruturas especializadas na produção e secreção de metabólitos secundários, mas sim a células não especializadas.

7.6 Conclusões

O estudo histoquímico permitiu a visualização e identificação de células autofluorescentes, o que forneceu subsídios para a identificação de diferentes classes de metabólitos secundários nos tecidos e nas células da espécie estudada. Esta análise é pioneira em espécies de Celastraceae e contribuiu sobremaneira aos estudos químicos e biossintéticos, uma vez que os metabólitos especiais presentes nas espécies estudadas apresentam-se compartimentalizados e são dependentes do ciclo de vida da planta. Estes estudos corroboraram a compartimentalização desses metabólitos, que, associado com a química, fornece indícios para os estudos biossintéticos, principalmente relacionados aos aspectos proteômicos. Portanto, a localização majoritária dos terpenos nas células do súber contribuiu para o planejamento e protocolos de extração enzimática, uma vez que evidenciou que esta classe de compostos está localizada nas células da parte externa das raízes. Tal evidencia possibilitou dar continuidade aos estudos proteômicos, uma vez que a parte interna das raízes (córtex) é de difícil acesso devido sua rigidez.

8- Estudo Biossintético

8.1 Introdução

A química de produtos naturais tem sido alvo de intensas investigações durante as últimas décadas, resultando no desenvolvimento de estudos biossintéticos e em maior compreensão envolvendo os mecanismos de ação das enzimas (Macedo, 2007).

Os estudos biossintéticos de produtos naturais tiveram início nos anos 60 e 70 (Kuokol et al.; 1961). Estes estudos são realizados por meio de experimentos *in vivo* e *in vitro*. O experimento *in vivo* consiste na incorporação de precursores marcados com isótopos estáveis e/ ou radioativos. Dentre as técnicas utilizadas na determinação de rotas biossintéticas de produtos naturais, a RMN de ^{13}C aliada à marcação isotópica apresenta-se como uma ferramenta poderosa na elucidação de rotas biossintéticas (Macedo, 2007; Furlan et al.; 2007).

O experimento *in vitro* consiste na incubação de precursores marcados ou não em extratos enzimáticos, sendo que a análise do produto se configura na prova definitiva de que o precursor atua como um intermediário na via biossintética em análise (Furlan et al.; 2007).

Após o estabelecimento do caminho biossintético, a etapa seguinte envolve o estudo das enzimas envolvidas na biossíntese proposta. Muitas vezes, esta etapa é limitante, pois muitas enzimas apresentam baixa atividade ou, ainda, são difíceis de serem extraídas da planta matriz. O estudo utilizando-se diferentes espécies de plantas que apresentam o mesmo metabolismo secundário pode ser mais fácil a partir de uma planta do que de outra (Corsino et al.; 2000).

8.1.1 Biossíntese de isoprenóides – Vias metabólicas envolvidas na formação dos isoprenóides

Os isoprenóides estão presentes em todos os organismos vivos, entretanto são considerados como metabólitos secundários por

desempenharem funções menos essenciais em todo o metabolismo da planta (Rohmer, 1999). Os primeiros experimentos de incorporação de compostos marcados com radioisótopos revelaram que a biossíntese dos isoprenóides tem como primeiro precursor a acetil-CoA levando a formação da unidade de pirifosfato de isopentenila (IPP) e, por ação de uma isomerase, o IPP é isomerizado a uma unidade de difosfato de dimetilalila (DMAPP). Esses se constituem nos precursores base de todas as séries de isoprenóides. Concomitantemente nesta via metabólica acontece uma condensação da HMG-CoA com outra unidade de acetil-CoA originando o ácido mevalônico. Este esquema biossintético, conhecido como via do mevalonato (MVA), foi aceito por muito tempo como único na biossíntese dos isoprenóides em todos os organismos vivos (Rohmer, 1999).

Nos últimos anos muitos pesquisadores vêm estudando a biossíntese do IPP em plantas realizando experimentos de comprovação de três vias metabólicas, incluindo a via do ácido mevalônico (MVA), a via do metileritritol 4-fosfato (MEP) e a via do ácido tricarbóxico (TCA). Dentre esses, pode-se citar Michael Rohmer, Rodney Croteau, Douglas J. McGarvey, entre outros (Rohmer, 1999; McGarvey; Gershenzon et al., 1993; Eisenreich et al., 1998; 2004; Hirai et al., 2000, Dudareva et al., 2005).

Atualmente estas três vias biossintéticas envolvidas na biossíntese do IPP foram comprovadas por experimentos de incorporação utilizando glicose marcada com ^{13}C , mais especificamente $[1-^{13}\text{C}]$ glicose. Estes experimentos permitiram mostrar que a unidade IPP proveniente da via do MVA se apresenta marcada nos carbonos C-2, C-4 e C-5; quando proveniente da via do MEP a marcação se dá nos carbonos C-1 e C-5 e quando se origina da via do TCA, o IPP encontra-se marcado nos carbonos C-1, C-3 e C-5, destacando-se a marcação no C-3 (Hirai et al., 2000).

A figura 139, p. 200 descreve a biossíntese do IPP desde o processo de glicólise, seguindo pelas vias do ácido mevalônico (MVA), da triose / piruvato (MEP) e do ácido tricarbóxico (TCA), assim como o padrão de marcação de ^{13}C do IPP, respectivo para cada via biossintética.

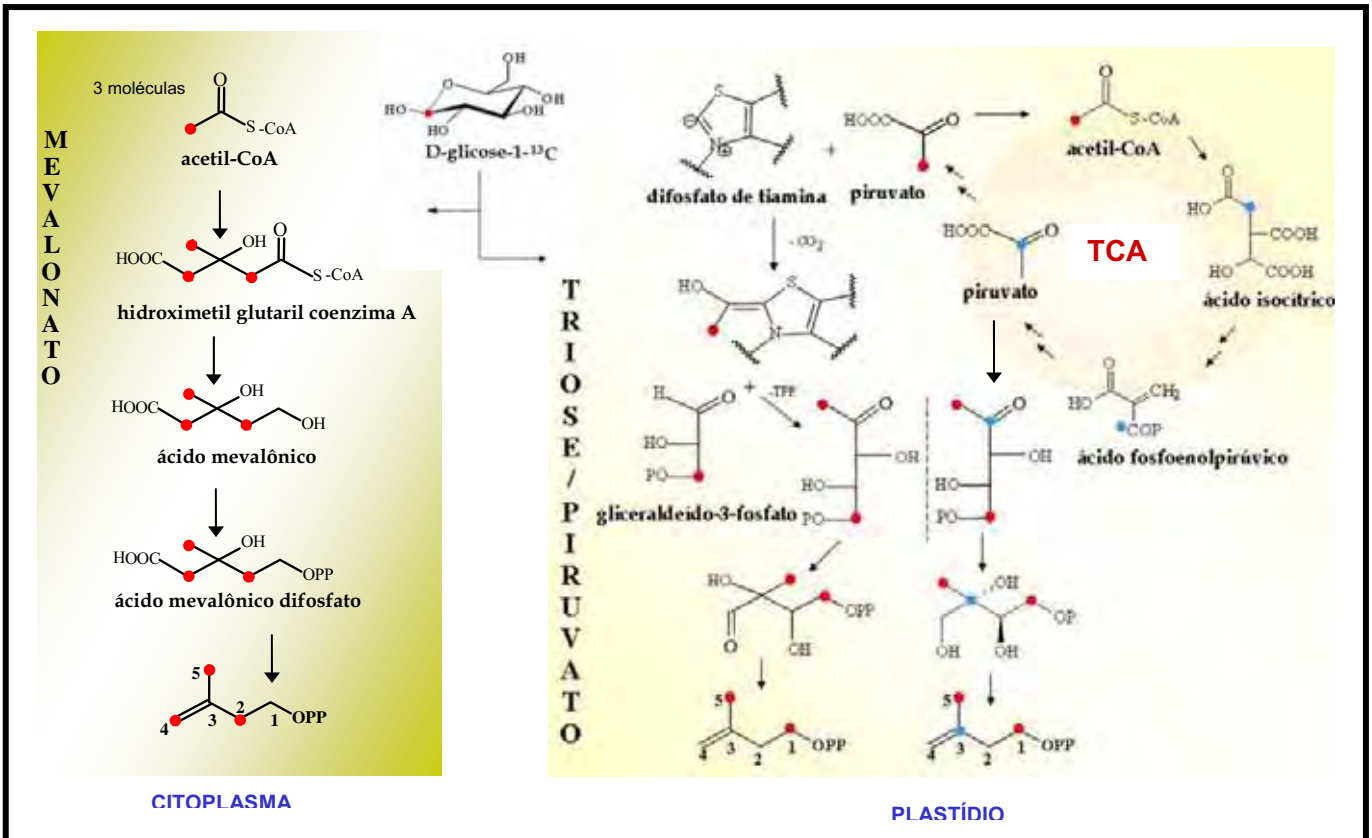


Figura 139- Formação de IPP via MVA, MEP e TCA, átomos de carbono marcados na molécula de IPP após incorporação de glicose-1-[¹³C]

Muitos trabalhos mostraram que a biossíntese do IPP é compartimentalizada em diferentes organelas celulares e que a via do MVA ocorre exclusivamente, no citoplasma, enquanto que as vias MEP e TCA localizam-se no plastídio, caracterizando um processo de compartimentalização celular.

A presença do ácido pirúvico nas vias do MEP e do TCA leva a concluir que essas duas vias podem estar ocorrendo simultaneamente, uma vez que, o ácido pirúvico é precursor comum nestas vias para a formação do IPP.

É importante ressaltar que muitas vezes um terpeno pode ser biossintetizado por duas vias metabólicas, através da migração do IPP para interstícios celulares, ou seja, entre o citoplasma e o plastídio (Bergamo et al., 2005; Lopes et al.; 2007, Leite et al.; 2007).

8.1.2 Triterpenos quinonametídeos

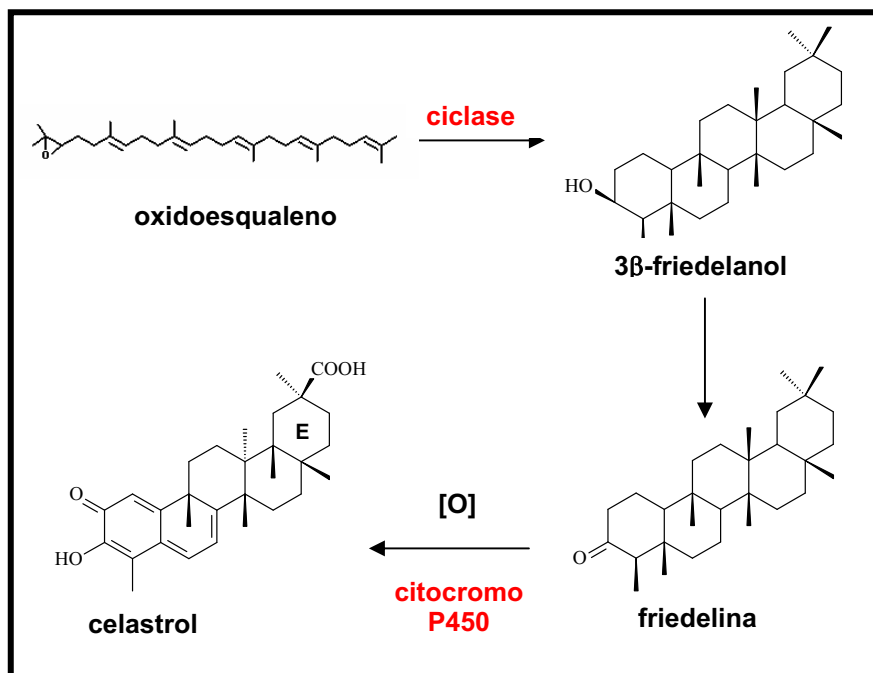
A elucidação da via metabólica dos triterpenos quinonametídeos tem despertado grande interesse, pois permite o entendimento dos mecanismos de biossíntese da classe de substâncias biologicamente ativas e os sistemas enzimáticos. A elucidação da biossíntese desses metabólitos foi explorada (Corsino et al., 2000) e se configura em uma etapa primordial para o desenvolvimento de futuras pesquisas envolvendo estudos proteômicos e genômicos desta classe de metabólito.

Pesquisas desenvolvidas por nosso grupo (Corsino et. al., 2000), demonstraram que os triterpenos friedelânicos são os precursores dos triterpenos quinonametídeos. Estes trabalhos indicaram também que há uma compartimentalização dos sítios reativos, uma vez que os friedelanos são biossintetizados nas folhas e posteriormente translocados para as raízes onde são transformados nos triterpenos quinonametídeos.

O esquema 5, p. 202 descreve a biossíntese dos triterpenos quinonametídeos, tendo como precursores o 3 β -friedelanol e a friedelina, triterpenos friedelânicos, comumente encontrados nas folhas de espécies de Celastraceae e Hippocrateaceae.

Estes experimentos foram realizados utilizando-se 2,3-epoxiesqualeno como substrato, em extratos enzimáticos das folhas e raízes de *Maytenus aquifolium* (Celastraceae) e *Salacia campestris* (Hippocrateaceae), determinando a atividade da enzima ciclase exclusivamente nas folhas de *M. aquifolium* e *S. campestris* (Esquema 5, p. 202) (Corsino et. al., 2000).

Experimentos utilizando-se mevalonolactona-5-³H como precursor foram realizados, através do contato direto do precursor marcado com as folhas de *Maytenus aquifolium*, a fim de comprovar o envolvimento dos derivados friedelânicos na biossíntese e compartimentalização dos triterpenos quinonametídeos (Corsino et. al., 2000). Posterior análise via cromatografia líquida de alta eficiência, acoplada a detector de partículas *beta* (β), permitiu comprovar que os quinonametídeos, também marcados, estavam presentes nos extratos obtidos das cascas das raízes das plântulas de *M. aquifolium*, utilizadas como matriz (Esquema 5, p. 202) (Corsino et. al., 2000).



Esquema 5 - Conversão do 2,3-epoxiesqualeno à 3β-friedelanol e friedelina e seu envolvimento como precursor biossintético dos triterpenos quinonametídeos em *Maytenus aquifolium* e *Salacia campestris* (Corsino et al., 2000).

O conjunto de todos estes resultados envolvendo a biossíntese dos triterpenos quinonametídeos trouxe um novo desafio. Tal desafio, está centrado no estudo das etapas de oxidação dos potenciais precursores envolvidos na formação dos diferentes triterpenos quinonametídeos. Foi proposto, então, que as etapas de oxidação, centrada no anel E, poderiam estar sendo mediadas por enzimas oxidorreductase do tipo citocromo P450 (Figura 140, p. 203).

A proposta de biossíntese dos quinonametídeos, descrita na Figura 140, p. 203), foi baseada em experimentos de incorporação da maitenina e da pristimerina.

Os resultados obtidos utilizando as matrizes vegetais indicaram que, na biossíntese dos triterpenos quinonametídeos, a pristimerina é o precursor exclusivo da maitenina, 20α-hidroximaitenina e de 22β-hidroximaitenina, sendo que etapas de hidrólise e descarboxilação ocorrem em etapas subseqüentes.

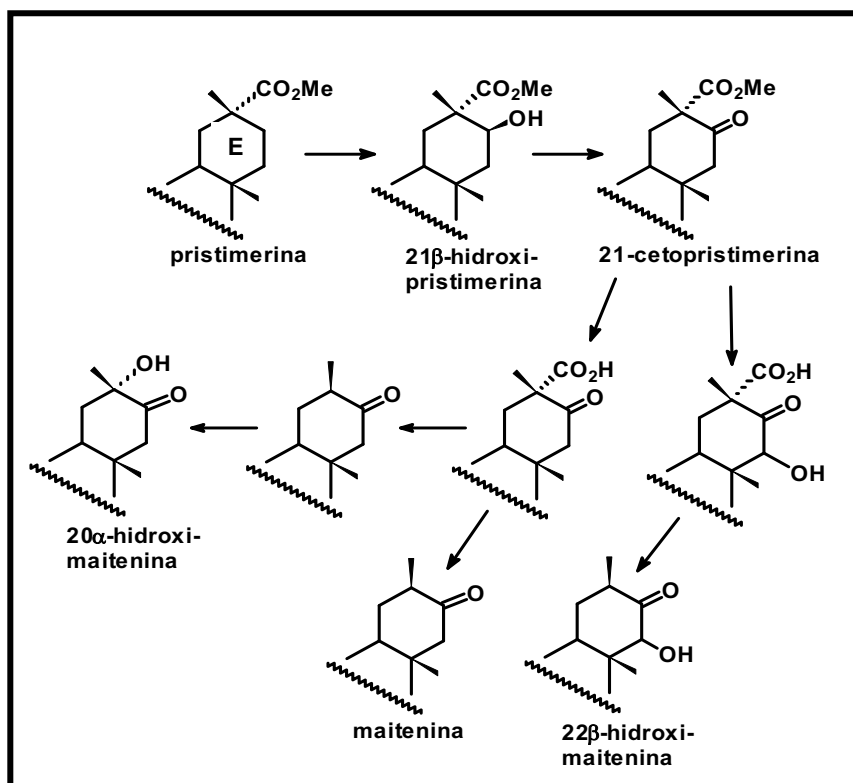


Figura 140- Proposta biossintética das etapas de oxidação no anel E dos triterpenos quinonametídeos.

Tendo como base todos os dados obtidos pelo nosso grupo de pesquisa, este trabalho teve como principal objetivo realizar experimentos utilizando a matriz vegetal *Maytenus ilicifolia* e *Salacia campestris* e analisar as enzimas oxidorrredutase do tipo citocromo P450, supostamente envolvidas nas etapas de oxidação dos triterpenos quinonametídeos.

8.1.3 Enzimas do tipo citocromo P450

O termo **citocromo P450** refere-se a uma família de heme proteínas, os quais estão presentes em muitos organismos e funcionam primariamente como mono-oxigenases. As enzimas do tipo citocromo P450 são encontradas em todos os tipos de vida, incluindo: i) bactérias, onde têm funções catabólicas e biossintéticas; ii) plantas, onde elas estão envolvidas na biossíntese de metabólitos primários e secundários; iii) animais, onde desempenham papel na biossíntese e desintoxicação (Delgoda e Westlake, 2004).

Essas enzimas são encontradas em todos os tipos de células de mamíferos, exceto nos glóbulos vermelhos e nas células musculares, que catalisam a oxidação de uma grande variedade de compostos estruturalmente diferentes. Substratos para este sistema enzimático incluem compostos sintetizados endogenamente, como esteróides e ácidos graxos e compostos exógenos como drogas, conservantes de alimentos ou subprodutos industriais que entram no organismo através de fontes alimentares, injeção, inalação do ar ou absorção através da pele (Urlacher, 2004; Delgoda e Westlake, 2004).

Em células eucarióticas, a enzima citocromo P450R (P450 redutase) é encontrada no retículo endoplasmático e está fortemente ligada à membrana microsomal (Kumar e Kuttan, 2006), sendo necessário solubilizar a membrana para purificar a enzima. Em eucariotos, a enzima P450 está envolvida no metabolismo de oxidação e redução de uma variedade de compostos inclusive xenobióticos usados na terapia de tumor (Lengler et al.; 2006).

A P450R é monomérica com peso molecular de aproximadamente 47-57 kDa, dependendo da fonte da qual foi extraída (Andersen e Moller, 1998).

Aproximadamente 150 isoformas de P450 têm sido identificadas, dependendo da reação sobre o qual é catalisada (Figura 141, p. 204). A importância destas enzimas reside nas suas habilidades em desintoxicar uma cadeia ampla de xenobióticos, compostos exógenos e endógenos, constituintes dietéticos e toxinas ambientais através da redução de 2 elétrons para oxigênio molecular para formar as espécies reativas de oxigênio e água (Kumar e Kuttan, 2006).

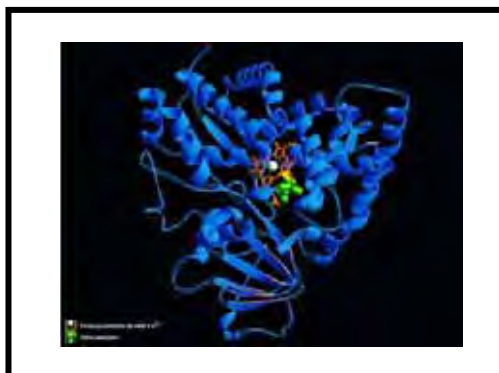


Figura 141 - Isoformas da enzima P450

A ação da P450 pode gerar potencialmente compostos carcinogênicos e tóxicos durante o metabolismo de xenobióticos (Kumar e Kuttan, 2006).

A P450 está envolvida em muitas interações biológicas, incluindo hidroxilações, epoxidação, dialquilação de oxigênio e nitrogênio, diaminação oxidativa e diidrogenação, entre outras (Aguiar e Gibbs, 2005).

Problemas associados ao isolamento das enzimas oxidorredutase do tipo P450 em extratos vegetais em geral, consiste em sua baixa abundância e pouca estabilidade, o que impede a caracterização deste importante grupo de enzima encontrada em plantas. Por se tratar de proteínas de membranas, para a sua solubilização é necessária a utilização de detergentes.

8.2 Objetivos

Os objetivos deste estudo foram:

- Avaliar a atividade enzimática da(s) oxidorredutase (s) do tipo P450 nos extratos enzimáticos de *Maytenus ilicifolia* e de *Salacia campestris*;
- Caracterizar a (s) enzima (s) oxidorredutase (s) do tipo P450 por eletroforese (SDS-PAGE-1D e 2D).

8.3 Materiais e Métodos

8.3.1 Material vegetal

Exemplares da *Salacia campestris* foram coletados na UFSCar. Após a coleta as raízes foram imediatamente colocadas em gelo para preservação do sistema enzimático. Estas foram mantidas á -80°C.

As plantas jovens (2 e 3 anos) de *Maytenus ilicifolia* foram coleta no Departamento de Biotecnologia da UNAERP. Essas plantas foram mantidas na casa de vegetação do Instituto de Química de Araraquara – UNESP.

8.3.2 Reagentes e Solventes Utilizados

Os solventes e reagentes utilizados nas reações enzimáticas foram das marcas Merck, Sigma-Aldrich, Amersham e Mallinckrodt de qualidade P. A. Nas separações por CLAE utilizou-se (MeOH ou ACN) de grau CLAE e marca J. T.

Baker[®]. A água ultra pura empregada foi obtida via osmose reversa em aparelho Millipore.

8.3.3 Equipamentos utilizados nos ensaios de biossíntese

- O moinho analítico utilizado na trituração é da marca IKA[®] - werke, modelo All.
- A centrífuga refrigerada utilizada durante o processo de extração enzimática é da marca SORVALL[®] RC PLUS. Foi utilizada também a ultracentrífuga Beckman Optima, modelo LE80K e a microcentrífuga Denver Instrument Force 7.
- O Freezer -80°C utilizado para o armazenamento dos extratos enzimáticos e reagentes da marca FORMA Scientific.
- Para a incubação da reação enzimática foi utilizado um banho climatizado da marca Marconi, Banho Dubnoff, modelo TE-053, operando a temperaturas controladas com agitação constante.
- Para a determinação de proteínas foi utilizado um espectrofotômetro UV-Vis Ultrospec 2100 Pro UV/Visible.
- As imagens dos géis foram obtidas em um Scanner Magic Scan 32 V-4,6 da marca Amersham Biosciences.
- A cuba utilizada na eletroforese SDS-PAGE foi uma Hoefer Mighty Small Dual Gel Caster; Mighty Small SE250/SE260 Mini Vertical Unity, Fonte Eletcrophoresis Power Supply EPS 301.
- A eletroforese 2D foi realizada utilizando o sistema o *Multiphor II* para a focalização das proteínas, sendo que as tiras de gradiente de pH imobilizados (IPG) foram comercialmente obtidas na forma desidratada e antes de serem utilizadas foram reidratadas na bandeja de reidratação (*DryStrip Reswelling Tray*). Na segunda dimensão foi utilizada uma cuba de eletroforese SE 600 Ruby system.

8.3.4 Cromatógrafos e condições cromatográficas utilizadas na análise

(A) Protocolos 1 e 2- cromatógrafo analítico com sistema quaternário VarianPro Star, modelo 240, detector UV-Vis com arranjo de diodos (DAD), modelo 330, auto injetor Varian Pro Star, modelo 410; coluna Phenomenex® Gemini C₁₈ 5µm (250 x 4,6 mm); eluente ACN : H₂O (HOAc aquoso 0,1%) em modo isocrático (85:15); fluxo de 1mL min⁻¹; tempo de análise de 30 min e $\lambda = 420\text{nm}$ e 254nm.

(B) Protocolo 3- cromatógrafo analítico com sistema ternário de bombas Shimadzu LC-10 AD, controladora CBM 10 A, detector UV-Vis com arranjo de diodos (DAD), modelo SPD- M 10 AVP, coluna Phenomenex® Gemini C₁₈ 5µm (250 x 4,6 mm); eluente ACN : H₂O (HOAc aquoso 0,1%) em modo isocrático (85:15); fluxo de 1mL min⁻¹; tempo de análise de 30 min e $\lambda = 420\text{nm}$ e 254nm

(C) Protocolo 4- cromatógrafo analítico com sistema quaternário Shimadzu LC-20 AT, controladora CBM 20 A, detector UV-Vis com arranjo de diodos (DAD), modelo SPD- M 20A, degaser DGU- 20A₃, auto sample SIL-20 A coluna Phenomenex® C₁₈ Luna 5µm (250 x 4,6 mm); eluente MeOH: H₂O em modo isocrático (85:15); fluxo de 1mL min⁻¹; tempo de análise de 40 min e $\lambda = 420\text{nm}$ e 254nm

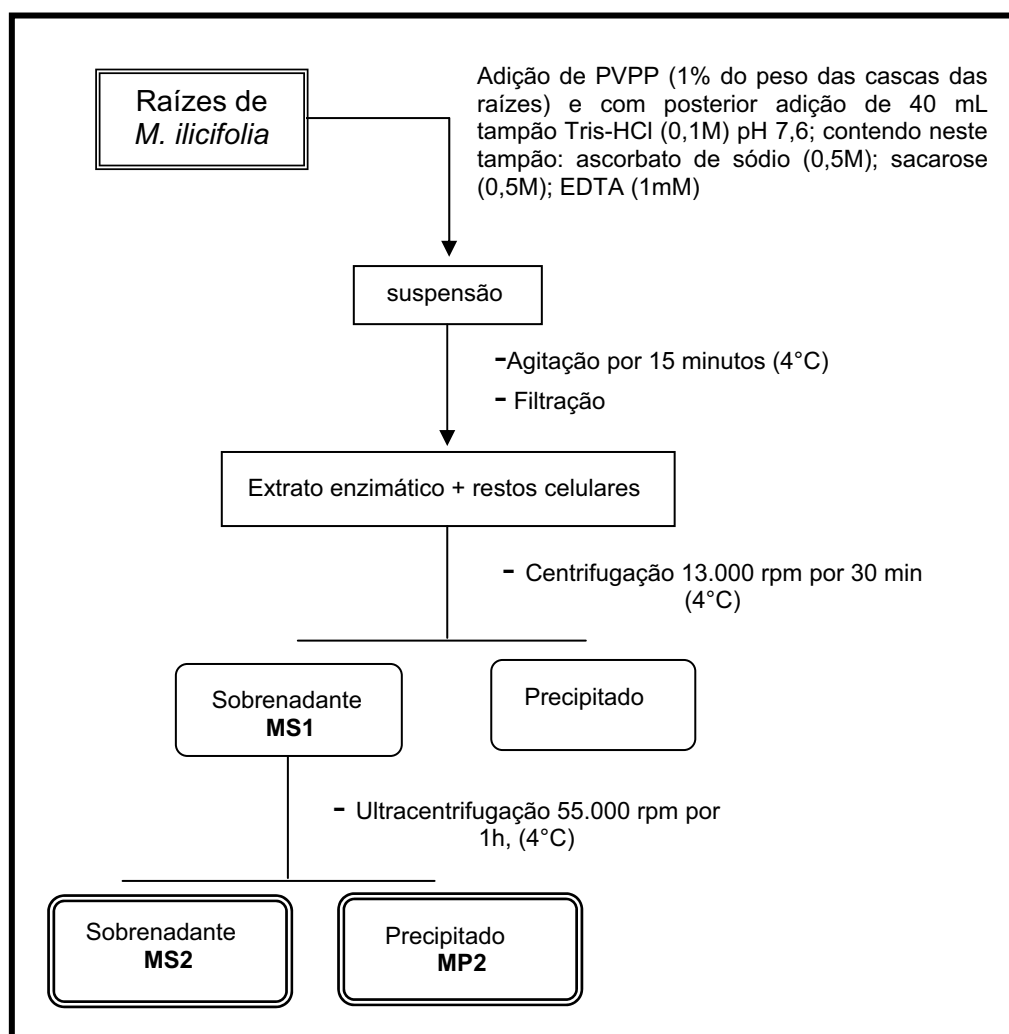
(D) Cromatógrafo preparativo com sistema ternário Varian Star Dynamax, modelo 320, detector UV-Vis; colunas: Phenomenex® Luna C₁₈ 10µm (250 x 21,2 mm) e $\lambda = 254\text{nm}$, eluente MeOH : H₂O em modo isocrático (4:1); fluxo de 10 mL min⁻¹; tempo de análise de 20 min e $\lambda = 254\text{nm}$ e Phenomenex® Luna C₁₈ 5µm (250 x 10,0 mm) e $\lambda = 254\text{nm}$, eluente MeOH : H₂O em modo isocrático (7:3); fluxo de 4 mL min⁻¹; tempo de análise de 20 min e $\lambda = 254\text{nm}$

(E) Coluna de exclusão molecular, para eliminação de substâncias interferentes de baixo peso molecular presentes nos extratos protéicos, foi utilizada uma coluna de exclusão e filtração molecular Sephadex G-25 da marca Amersham.

8.3.5 Protocolos de extração enzimática

Protocolo 1 - Raízes de *Maytenus ilicifolia*

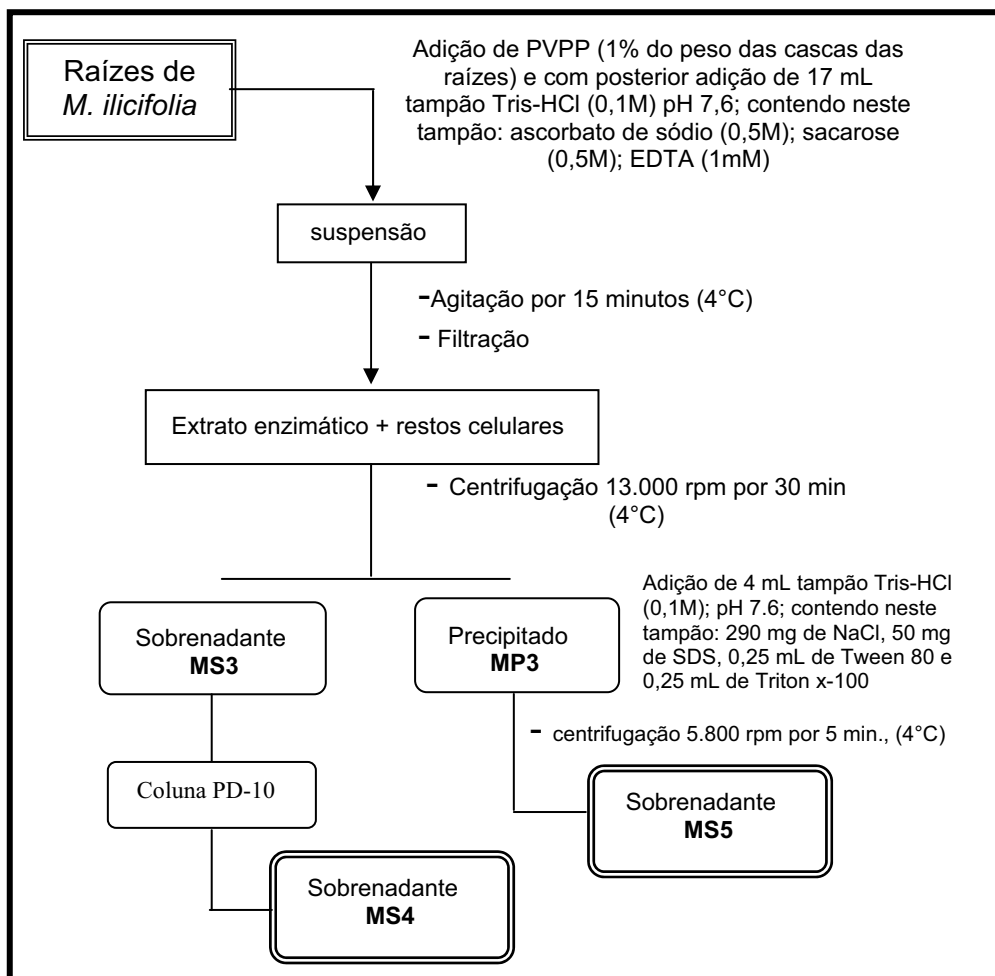
Foram pesados 12g de raízes de *M. ilicifolia* e essas foram trituradas em N₂ líquido, utilizando-se gral e pistilo. Posteriormente, foram adicionados 40 mL da solução tampão Tris-HCl 0,1M pH 7,6 contendo neste tampão: ascorbato de sódio 0,5M; sacarose 0,5M; EDTA 1mM e 0,1 g de PVPP. A suspensão obtida foi agitada suavemente por 15 min. em banho de gelo, filtrada em gaze, e posteriormente centrifugada a 13000 rpm, por 30 min., a 4°C. O sobrenadante (MS1) foi ultracentrifugado a 55.000 rpm, durante 1 hora, a 4°C, obtendo-se o sobrenadante (MS2) e o precipitado (MP2). Ambos foram utilizados como fonte de enzima. O protocolo está representado no esquema 6, p. 208.



Esquema 6: Protocolo 1 de extração enzimática das oxidoredutases do tipo P450 de *M. ilicifolia*

Protocolo 2 - Raízes de *Maytenus ilicifolia*

Foram pesados 11g de raízes de *M. ilicifolia*. Essas, foram trituradas em N₂ líquido, utilizando-se gral e pistilo. Posteriormente, foram adicionados 17 mL da solução tampão Tris-HCl 0,1M pH 7,6 contendo neste tampão: ascorbato de sódio 0,5M; sacarose 0,5M; EDTA 1mM e 0,1 g de PVPP. A suspensão obtida foi agitada suavemente por 15 min. em banho de gelo, filtrada em gaze, e posteriormente centrifugada a 13.000 rpm, por 30 min., a 4°C, obtendo o precipitado (MP3) e o sobrenadante (MS3). Após o processo da primeira centrifugação reservou-se o sobrenadante (MS3). 2,5 mL deste sobrenadante foram aplicados em coluna PD10 eluída com 3,5 mL do tampão Tris-HCl 0,1 M pH 7,6 contendo neste tampão 290 mg de NaCl, 50 mg de SDS, 0,25 mL de Tween 80 e 0,25 mL de Triton X-100. Esta solução foi agitada e posteriormente submetida á ultracentrifugação (55.000 rpm, durante 1 hora a 4°C). O sobrenadante (MS4) foi utilizado como fonte enzimática. O precipitado MP3 foi ressuspenso em 4mL de tampão Tris-HCl 0,1 M pH 7,6 contendo neste tampão 290 mg de NaCl, 50 mg de SDS, 0,25 mL de Tween 80 e 0,25 mL de Triton X-100 e submetido a uma segunda centrifugação a 5800 rpm, durante 5 min., a 4°C. O sobrenadante (MS5) foi usado como fonte de enzimas. O protocolo está representado no esquema 7, p. 210.



Esquema 7: Protocolo 2 de extração enzimática das oxidoredutases do tipo P450 de *M. ilicifolia*

Protocolo 3 – Cascas das raízes de *Salacia campestris*

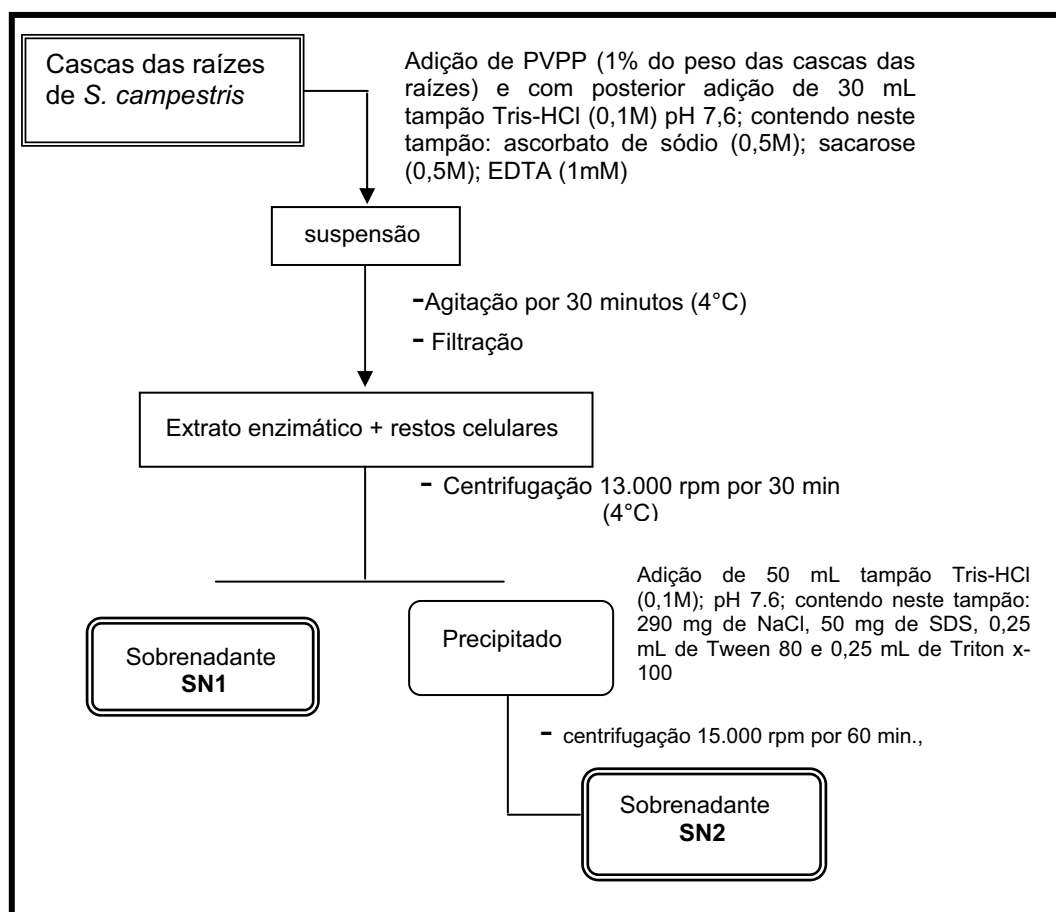
A extração da enzima ou complexo enzimático envolvido na biossíntese da oxidoredutase do tipo P450 foi realizada utilizando-se as cascas das raízes de *Salacia campestris*.

As raízes de *Salacia campestris* mantidas no refrigerador à -80°C foram retiradas deste e descascadas. Em seguida pesou-se 10g. Transferiu-se as cascas das raízes para um gral e N₂ líquido despejado sobre estas. Triturou-se com auxílio de um pistilo, seguido da adição de 15 mL da solução tampão Tris-HCl 0,1M pH 7,6, contendo neste tampão: ascorbato de sódio (0,5 M), EDTA e sacarose (0,5 M) e 0,1 g de PVPP (5% em relação à massa de material vegetal). O processo de trituração foi realizado por mais alguns minutos.

Essa mistura foi transferida para um béquer e agitada (agitador magnético e barra de agitação) em banho de gelo por 15 minutos. Filtrou-se a mistura em gaze e transferiu-se para um frasco apropriado para o processo de centrifugação. Centrifugou-se a 13.000 rpm (rotor 5), por 30 minutos, a 4°C.

Reservou-se o sobrenadante (SN1). Adicionou-se sobre o 1° precipitado 10 mL da solução tampão Tris-HCl 0,1M pH 7,6, contendo neste tampão: 290 mg de NaCl, 50 mg de SDS, 0,25 mL de Tween 80 e 0,25 mL de Triton x-100. Esta solução foi agitada por 4 minutos. Em frasco apropriado, centrifugou-se esta solução a 15.000 rpm por 1 hora a 4°C. Separou-se o sobrenadante (SN2) do 2° precipitado e este último foi guardado.

Em todo o procedimento experimental de extração deve-se manter a temperatura controlada entre 0 e 4°C.



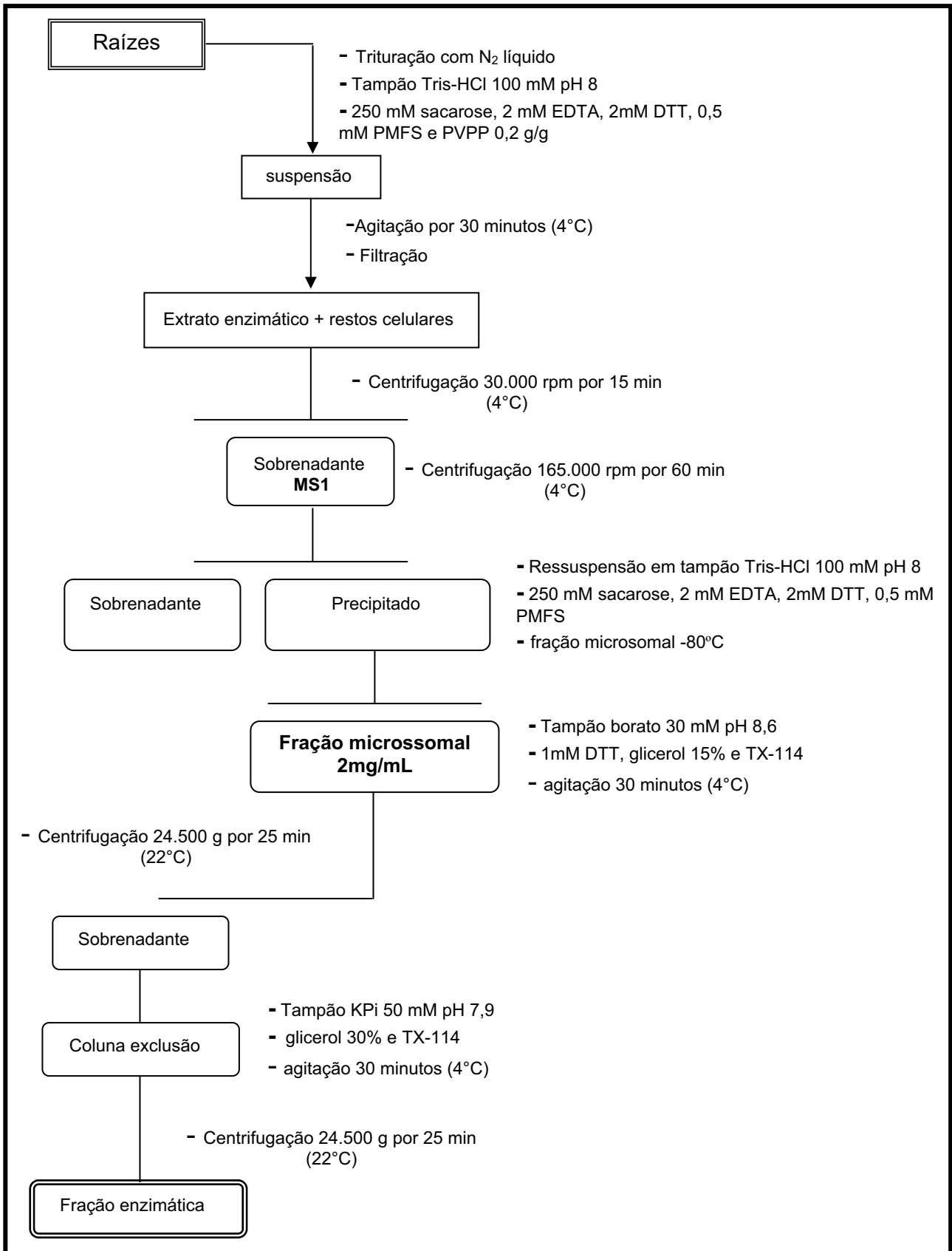
Esquema 8: Protocolo 3 de extração enzimática das oxidorreduções do tipo P450 em *Salacia campestris*

Protocolo 4 – Cascas das raízes de *Salacia campestris* e raízes de *Maytenus ilicifolia* (Andersen e Moller, 1998).

As raízes foram lavadas, sendo que as raízes de *S. campestris* foram posteriormente descascadas. Após trituração, foram adicionados sobre as raízes de *M. ilicifolia* (35,0 g) e de *S. campestris* (80,0 g) 100 e 200 mL, respectivamente de tampão Tris-HCl 100 mM pH 8, contendo neste tampão: 250 mM de sacarose, 2 mM de EDTA, 2 mM de DTT, 0,5 mM de PMSF e PVPP (0,2 g/g peso material). Depois de homogeneizados por 30 minutos em agitador magnético, os extratos obtidos foram filtrados em gaze. Os filtrados foram recolhidos em um tubo de centrifuga e as soluções sofreram uma primeira centrifugação a 4° C durante 15 minutos a 30.000 xg. O sobrenadante foi então submetido à centrifugação à 4° C durante 60 minutos a 165.000 xg. Os sobrenadantes foram reservados e os precipitados ressuspensos no mesmo tampão utilizado nas extrações. As frações microssomais foram armazenadas à -80°C e posteriormente utilizadas como fonte de enzimas.

Após dosagem protéica, as frações microssomais (2 mg/mL de proteína) foram submetidas a uma primeira fase de partição utilizando 20 mL de tampão borato (ácido bórico/KOH 30 mM pH 8,6) contendo neste tampão: 1 mM de DTT, glicerol 15% e TX-114 a uma concentração final de 1%. Essa etapa foi realizada sob agitação por 30 min. a 4 °C e a separação das fases foi obtida por centrifugação e variação de temperatura (24.500 xg, 25 min, 22 °C). Após centrifugação e separação das fases, foi coletada a fase superior. Essa fase de partição teve como objetivo remover os pigmentos presentes na solução.

A segunda fase de partição teve como principal objetivo concentrar as enzimas P450. Alíquota de 3,5 mL das frações enzimáticas foram eluídas em uma coluna de exclusão molecular G-25, equilibrada com tampão KPi 50 mM pH 7,9, contendo neste tampão: glicerol 30% e TX-114 a uma concentração final de 1%. A solução foi mantida e equilibrada a 4 °C, sendo posteriormente submetida à centrifugação e variação de temperatura, como anteriormente. Foi coletada a fase superior (esquema 9, p. 213).



Esquema 9: Protocolo 4 de extração enzimática das oxidoredutases do tipo P450 de *M. ilicifolia* e de *Salacia campestris*

8.3.6 Protocolos de reação enzimática

(A) Ensaio enzimático

Os ensaios enzimáticos foram realizados com a adição das seguintes soluções em eppendorf: uma solução do substrato (10 µL) solubilizados em DMSO (25 mM), NADPH (50 ou 30 µL de uma solução 25 mM, solubilizado na solução tampão, MgCl₂ (10 µL de uma solução 250 mM) e frações protéicas obtidas (110 µL) e 50 µL de uma solução 25 mM de NADPH (solubilizado no tampão extrator). O experimento foi iniciado pela adição de NADPH, e mantido por 24 hs a 32°C em banho de água sob agitação.

Foram realizados brancos para as fontes de enzima e um branco dos reagentes, sem a presença da enzima. Decorrido o tempo de incubação os produtos da reação foram extraídos com 230 µL de acetato de etila. Posteriormente, estes foram centrifugados a 9.000 rpm por 4 min, e 200 µL da fase orgânica foram coletados, evaporados e ressuspensos em 200 µL de MeOH para serem analisados por CLAE-DAD. A tabela 17, p. 214, descreve o experimento da reação enzimática, utilizando os seguintes componentes: extrato enzimático, tampão, substrato, cloreto de magnésio e NADPH.

Tabela 17- Ensaio enzimático utilizando os protocolos 1- 3

Código	Descrição	Tampão Tris	Precursor	NADPH	MgCl ₂	F. Enz.
1	branco enzima	120 µL	-	-	-	110 µL [▼]
2	branco enzima	120 µL	-	-	-	110 µL [▼]
3	reação pristimerina	50 µL	10 µL [*]	50 µL	10 µL	110 µL [▼]
4	reação pristimerina	50 µL	10 µL [*]	50 µL	10 µL	110 µL [▼]
5	branco reagentes	160 µL	10 µL [*]	50 µL	10 µL	-
6	branco reagentes	160 µL	10 µL [*]	50 µL	10 µL	-

* precursor: pristimerina; ▼ frações enzimáticas

(B) Ensaio enzimático**Tabela 18- Ensaio enzimático utilizando o protocolo 4**

Código	Descrição	Tampão Tris	Precursor	NADPH	MgCl ₂	F. Enz.
1	branco enzima	100 µL	-	-	-	110 µL [▼]
2	branco enzima	100 µL	-	-	-	110 µL [▼]
3	reação pristimerina	50 µL	10 µL [*]	30 µL	10 µL	110 µL [▼]
4	reação pristimerina	50 µL	10 µL [*]	30 µL	10 µL	110 µL [▼]
5	branco reagentes	160 µL	10 µL [*]	30 µL	10 µL	-
6	branco reagentes	160 µL	10 µL [*]	30 µL	10 µL	-

* precursor: pristimerina; [▼] frações enzimáticas

8.3.7 Dosagem protéica dos extratos e frações enzimáticas

A determinação da concentração de proteína total nas amostras foi realizada utilizando-se o método de Bradford modificado (STOSCHECK, 1990; BELL, 1988).

O reagente foi preparado utilizando 500 mL de HCl (0,6 M), no qual foi adicionado Coomassie Brilliant Blue G-250 suficiente para alcançar um valor de 1,3-1,5 unidades de absorvância, medidas a 465 nm (branco de H₂O).

Uma curva padrão foi realizada utilizando uma solução de albumina bovina (Sigma) a uma concentração de 1 mg/mL. Em cubetas de poliestireno foram adicionados volumes de 5 a 50 µL desta solução, completados a 50 µL quando necessário, e misturados com 1 mL de H₂O deionizada e 1 mL do reagente de Bradford. Após homogeneização por inversão e transcorridos 5 min. de incubação à temperatura ambiente, foi determinada a absorvância a 595 nm. O valor 0 de absorvância foi calibrado com a mistura do reagente e H₂O. Cada valor foi determinado em duplicata.

Os valores de concentração foram obtidos por interpolação na curva de calibração, ou aplicando a equação da regressão linear obtida e o programa Sigma Plot[®] 8,0.

8.3.8 Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)

8.3.9 Soluções e reagentes necessários

1. Tampão de Separação (pH 8,8)

TRIS	1,5 M
SDS	0,4% p/v

2. Tampão de Concentração (pH 6,8)

TRIS	0,5 M
SDS	0,4% p/v

3. Solução Acrilamida-Bisacrilamida

Acrilamida	30% p/v
Bisacrilamida	0,8% p/v

4. Bisacrilamida 2% p/v

5. Solução tampão de corrida (pH 8,3)

TRIS	3,025 g/L (0,025 M)
Glicina	14,4 g/L (0,192 M)
SDS	1 g/L

6. Loading buffer

TRIS	1,5 M (pH 6,8) 0,83 mL
Glicerol	4 mL
SDS	4 mL
EDTA	37,2 mg
Azul de Bromofenol	0,4 mg
H ₂ O deionizada	Completado com 10 mL

Esta solução foi armazenada a -20°C em alíquotas de 290 µL, sendo que antes do uso foram adicionados 13,5 µL de uma solução 0,5 M de DTT.

8.3.10 Preparo das amostras e dos padrões

Após a determinação da concentração protéica, as amostras foram submetidas à análise por eletroforese em gel de poliacrilamida. Primeiramente, as frações foram diluídas para uma concentração próxima a 1mg.mL⁻¹. As amostras foram preparadas misturando-se 20 µL destas com 10 µl de solução tampão de corrida (*loading buffer*) e aquecidas a 100°C, durante 5 min. Estas soluções foram então centrifugadas a 9.000 rpm por 30 segundos e aplicadas ao gel. Como padrão foi utilizado 5 µL de uma solução que continha as enzimas descritas na tabela 19 (p. 212). A esta solução foram adicionados 25 µL de H₂O deionizada e 10 µL de *loading buffer*. Os mesmos procedimentos de aquecimento e centrifugação descritos para as amostras foram realizados para a solução padrão. O volume de cada aplicação no gel foi de 10 µL para as amostras e de 7,5 µL para os padrões.

Tabela 19. Padrão protéico utilizado no experimento de eletroforese e suas respectivas massas moleculares (KDa).

Enzima	MM (KDa)
fosforilase	97,4
albumina sérica	66,2
ovalbumina	45,0
anidrase carbônica	31,0
inibidora de tripsina	21,5
α -lactalbumina	14,4

8.3.11 Preparo, desenvolvimento e revelação do gel

Foram utilizados dois tipos de géis, o gel de concentração e o gel de separação. Algumas modificações podem ser feitas no gel de separação visando uma melhor resolução das bandas eletroforéticas de interesse. Estão indicadas abaixo as proporções dos reagentes que foram necessárias para preparar o gel de separação 12%.

· Gel de separação

Reagente	Gel 12%
Tampão de separação	1,25 mL
Solução acril-bisacrilamida	2 mL
H ₂ O	1,72 mL
PSA (10% p/v)*	50 μ L
TEMED	7 μ L

* Preparou-se no momento da utilização.

· Gel de concentração

Reagente	Quantidade
Tampão de concentração	375 μ L
Solução acril-bisacrilamida	150 μ L

H ₂ O	770µL
Bisacrilamida 2%	100µL
PSA (10% p/v)*	15µL
TEMED	2,5µL

* Preparou-se no momento da utilização.

Cada gel foi montado no suporte e foi adicionado o volume necessário da solução tampão de corrida, sendo então aplicada uma intensidade de corrente de 20 mA até o *loading buffer* atingir o final do gel. Posteriormente, o gel foi retirado da cuba eletroforética e iniciou-se o processo de revelação.

9. Eletroforese 2D- PAGE

Foi escolhido para ser submetido a 2D SDS-PAGE a amostra com maior dosagem proteica e que apresentou bandas eletroforéticas melhor resolvidas. Neste caso foi escolhido o extrato (MS5).

9.1 Soluções

A. Tampão lise

	Concentração final	Quantidade
Uréia	8 M	19,2 g
Triton X-100	4% (m/v)	1,6 g
Pharmalyte 3-10	2% (v/v)	800 µL
DTT	40 mM	
Água deionizada		para 40 mL

B. Tampão de reidratação (alíquotas de 2,5 mL foram estocadas a -20°C)

	Concentração final	Quantidade
Uréia	8 M	12 g
Triton X-100	2% (m/v)	0,5 g
Azul de bromofenol (1%)	0,002% (m/v)	50 µL
Água deionizada		para 25 mL

C. Tampão de equilíbrio (alíquotas de 5 mL foram estocadas a -20°C)

	Concentração final	Quantidade
TRIS-HCl, pH 8,8 (solução E)	50 mM	10 mL
Uréia	6 M	72,07 g
Glicerol (87 v/v)	30% (v/v)	69 mL
SDS	2% (m/v)	4,0 g
Azul de bromofenol (1%)	0,002% (m/v)	400 µL
Água deionizada		para 200 mL

D. Solução estoque de acrilamida/bisacrilamida

	Concentração final	Quantidade
Acrilamida	30% (m/v)	60 g
Bisacrilamida	0,8% (m/v)	1,6 g
Água deionizada		para 200 mL

E. Tampão de resolução

	Concentração final	Quantidade
TRIS	1,5 M	181,7 g
Água deionizada		750 mL
HCl		Ajustar o pH para 8,8
Água deionizada		para 1 L

F. Tampão de corrida

	Concentração final	Quantidade
TRIS	25 mM	30,3 g
Glicina	192 mM	144 g
SDS	0,1%	10 g
Água deionizada		para 10 L

G. Solução de agarose

	Concentração final	Quantidade
Tampão de corrida		100 mL
Agarose	0,5%	0,5 g
Azul de bromofenol (1%)	0,002% (m/v)	200 µL

9.2 *Clean-up* das amostras

O *clean-up* da amostra foi realizado utilizando o kit 2-D *clean-up* da Amersham Biosciences. Este procedimento envolve a combinação de agentes precipitantes que eliminam da amostra a presença de interferentes, tais como sais e ácidos nucleicos, que dificultam o desenvolvimento e a resolução da metodologia.

Em tubo tipo *Eppendorf* de 1,5 mL, transferiu 1-100 μ L de uma solução contendo 1-100 μ g de proteína e 300 μ L da solução precipitante. A amostra foi mantida sob agitação em vortex e banho de gelo. Adicionou-se 300 μ L da solução co-precipitante e aguardou-se 15 min.

A mistura foi centrifugada por 10 min. a 5.000 xg. Após, descartou-se o sobrenadante e o precipitado foi centrifugado.

Em seguida, adicionou-se 40 μ L da solução co-precipitante sobre o precipitado e centrifugou-se a 5.000 xg por 5 min. Descartou-se o sobrenadante.

Adicionou-se 25 μ L de água deionizada ao precipitado e agitou-se em vortex até dispersar o precipitado (5-10 seg.).

Adicionou-se 1 mL de Tampão de Lavagem (resfriado a -20°C por pelo menos 1 hora, prévio ao uso) e 5 μ L de Aditivo de Lavagem. Agitou-se o tubo em vortex durante 20-30 seg. por cada 10 min. (tempo de 30 min.). Em seguida centrifugou-se a 10.000 xg por 10 min. Descartou-se o sobrenadante. Depois de seco o precipitado foi ressuspensionado em 250 μ L de uma solução de reidratação (12 g de uréia 8M, 0,5 g CHAPS 2% (m/v), 50 μ L de azul de bromofenol (1%), H₂O para 25 mL). Alíquotas de 2,5 mL foram estocadas a -80°C. Imediatamente antes do uso, 7 mg de DTT e 50 μ L de tampão IPG ou Pharmalyte (3-10 seg.) foram adicionados por cada alíquota.

9.3 Hidratação das tiras de IPG

Foram utilizadas tiras de IPG (*Immobilized pH Gradient*) de 13 cm (pH 3-10 e pH 4-7), as quais foram reidratadas na bandeja de *DryStrip Reswelling*

Tray com 250 μ L da solução de reidratação (12 g de uréia 8M, 0,5 g CHAPS 2% (m/v), 50 μ L de azul de bromofenol (1%), H₂O para 25 mL com adição de DTT e tampão IPG. O período de reidratação foi de 14-18hs à temperatura ambiente.

Após a reidratação, as tiras foram transferidas ao focalizador isoeletrico Ettan™ IPGphor II.

9.4 Primeira dimensão: focalização isoeletrica

A focalização isoeletrica foi realizada utilizando o equipamento Ettan™ IPGphor II.

As tiras foram colocadas no *Strip Holder* segundo o especificado pelo fabricante. A focalização foi realizada a 20°C sendo aplicados 50 μ A por tira. O gradiente utilizado está descrito na tabela 20, p. 222. Depois de focalizadas, as tiras foram armazenadas a -80°C até serem submetidas à segunda dimensão SDS-PAGE.

Tabela 20 – Protocolo de focalização isoeletrica

Etapa	Voltagem (V)	Volts-Hora	Tempo (hs)
1	500	500	1
2	1000	1000	1
3	8000*	16.000	Variável (4-6 hs)

* O tempo consumido para atingir esta voltagem dependerá da natureza da amostra

9.5 Segunda dimensão: SDS-PAGE

9.5.1 Preparo do gel de poliacrilamida 12,5% (100 mL)

Para aplicar tiras de IPG de 13 cm de comprimento, foram preparados géis em placas de 18x16 cm com espaçadores de 1,5 mm de espessura e 1 cm de largura.

Estes géis foram preparados pela adição de 41,7 mL de uma solução de acilamida/bisacrilamida (60 g de acrilamida 30% (m/v), 1,6 g de bisacrilamida 0,8% (m/v), H₂O para 200 mL; 25 mL de tampão de resolução (181,7 g de TRIS 1,5 M), 750 mL de H₂O, HCl para ajustar pH para 8,8 e H₂O para completar 1L;

1 mL de solução SDS 10% (5,0 g de SDS 10% (m/v) e H₂O para completar 50 mL); 31,8 mL de H₂O; 0,5 mL de persulfato de amônio 10% e 0,033 mL de TEMED.

Para favorecer a polimerização rápida, os primeiros quatro reagentes foram misturados e deareados em ultrassom. Após essa etapa, foram adicionados o persulfato de amônio e o TEMED. A solução foi mantida em agitação por uns minutos antes da aplicação

9.5.2 Equilíbrio das tiras

Antes de serem aplicadas ao gel as tiras foram submetidas a um tratamento com DTT e iodoacetamida no tampão de equilíbrio (10 mL de TRIS-HCl (50 mM) pH 8,8; 72,07 g de uréia 6M; 69 mL de glicerol (30% v/v); 4,0 g de SDS 2% v/v; 400 µL de azul de bromofenol 1% e H₂O para 200 mL) para reduzir as pontes de dissulfeto das proteínas e alquilar os grupos tiois, evitando assim processos de re-oxidação durante o experimento de eletroforese.

A tira foi colocada em um tubo tampado com 10 mL de tampão de equilíbrio contendo 100 mg de DTT e mantida sob agitação por 15 min. Essa solução foi descartada e trocada por 10 mL de tampão de equilíbrio contendo 250 mg de iodoacetamida, mantida por 15 min., sob agitação.

9.5.3 Aplicação das tiras e desenvolvimento da SDS-PAGE

Foram utilizados os padrões de peso molecular, 7,5 µL da solução estoque dos padrões foram aplicados em papel absorvente, o qual foi colocado à esquerda do gel, próximo ao extremo ácido da tira. Após isso, o gel foi selado com solução de agarose contendo 100 mL de tampão de corrida (TRIS 25 mM, glicina 192 mM, SDS 0,1% e H₂O para completar 10 L); 0,5 g de agarose 0,5% e 200 µL azul de bromofenol 0,002% m/v.

O gel foi colocado na cuba de eletroforese (SE 600 Ruby system) refrigerada em 10-12°C, previamente preenchida com 4 litros de tampão de corrida (TRIS 25 mM, glicina 192 mM, SDS 0,1% e H₂O para completar 10 L). Aplicou-se uma corrente de 45 mA por gel, com voltagem máxima em 600 V. A corrente foi interrompida quando o azul de bromofenol migrou até 0,5 cm da parte inferior do gel.

9.5.4 Revelação do gel

(A) **Corante Comassie** Brilliant Blue R-250 foi preparado pela adição de 540 mL de metanol, 135 mL de ácido acético glacial e 2,7 g de Coomassie Brilliant Blue R 250 para o volume de 1L de solução.

O gel foi colocado nessa solução e ficou sob agitação a temperatura ambiente por 1 hora. Decorrido o tempo necessário, a solução de coomassie foi retirada e o gel foi colocado em uma solução descorante contendo: 300 mL de metanol, 100 mL de ácido acético glacial (para 1L de solução). A solução descorante foi trocada sempre que estava azul, sendo que uma nova porção era adicionada até que o gel estivesse incolor e apenas as bandas de proteínas pudessem ser observadas. A solução descorante pode ser reaproveitada filtrando a mesma em carvão ativo.

(B) Nitrato de Prata

O gel foi colocado em uma solução de 10% de ácido tricloroacético, na qual permaneceu por 30 min., sob agitação. Esta solução foi então descartada e adicionou-se água destilada. O gel ficou sob agitação em água destilada por 30 minutos. A solução foi então descartada e adicionou-se uma solução de DTT (5 µg/ml), na qual o gel ficou sob agitação por mais 20 minutos. Posteriormente, esta solução foi descartada e adicionou-se uma solução 0,1% de nitrato de prata, a qual foi descartada após 20 minutos. Em seguida foi adicionada uma solução de carbonato de sódio 3%, que continha 0,085% de formaldeído, sendo que após 10-30 segundos esta solução foi descartada, adicionando-se outra vez a mesma solução. Após o aparecimento das bandas relativas às proteínas, a reação foi finalizada adicionando-se uma solução 2,3 M de ácido cítrico até não se observar mais o desprendimento de CO₂. Após 1 hora esta solução foi descartada, o gel foi lavado com água destilada por três vezes.

10. Resultados e Discussão

10.1 Avaliação da atividade enzimática da oxidoredutase do tipo P450 nas raízes de *Maytenus ilicifolia* – Protocolos 1 e 2

Com o intuito de averiguar o envolvimento da (s) enzima (s) em estudo, nas etapas de oxidação do anel E dos triterpenos quinonametídeos buscou-se realizar os experimentos biossintéticos utilizando a espécie *M. ilicifolia*. Esses estudos foram baseados em dois protocolos de extração enzimática (protocolo 1 e 2), os quais se encontram descritos na p. 208 -210.

No experimento utilizando o protocolo 1, foram analisados por CLAE-DAD, os produtos das reações (**MS2**) e (**MP2**) (p. 208) provenientes da ultracentrifugação do primeiro sobrenadante (**MS1**), além do precursor (pristimerina) e do produto esperado (maitenina).

Nos cromatogramas apresentados na figura 143, p. 226, são mostrados os picos referentes aos padrões pristimerina ($t_r = 17,6$ min) e maitenina ($t_r = 7,4$ min) utilizados no ensaio enzimático.

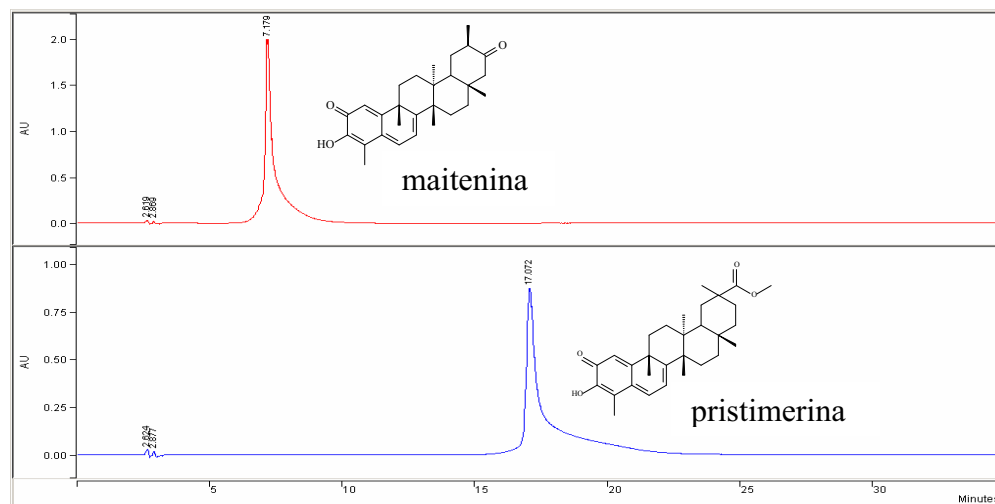


Figura 142- Cromatograma do precursor (pristimerina) e do produto esperado (maitenina).

Nos cromatogramas apresentados na figura 144, p. 225 são mostrados os experimentos das reações enzimáticas analisadas por CLAE-DAD, utilizando o protocolo 1. Neste experimento foi avaliado o branco do extrato enzimático, o branco dos reagentes e a reação enzimática utilizando o

sobrenadante (**MS2**) e o precipitado (**MP2**) como fonte enzimática. Era esperada o aparecimento de um pico em aproximadamente 7,4 min. referente ao triterpeno quinonametideo maitenina, mas este não foi observado.

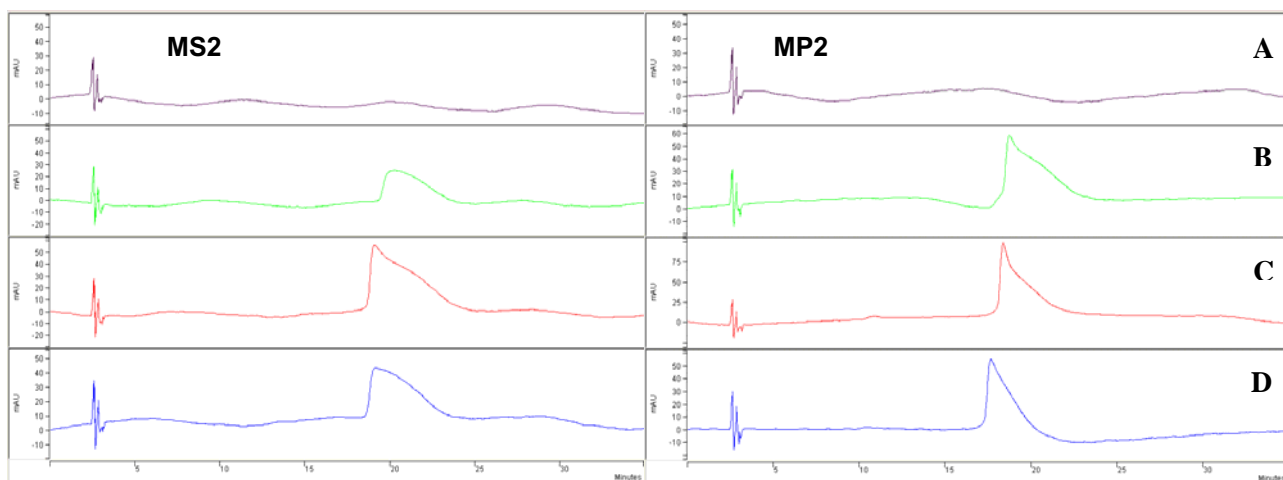


Figura 143- Cromatograma do ensaio enzimático: (A) branco do extrato enzimático, (B) branco dos reagentes (C) e (D) reação enzimática.

Na figura 145, p. 226 são apresentados os cromatogramas obtidos por CLAE-DAD dos experimentos das reações enzimáticas, utilizando o protocolo 2 e como fontes enzimáticas os sobrenadantes (MS4) e (MS5).

Nos cromatogramas apresentados na figura 145, p. 222 são mostrados os experimentos de reação enzimática utilizando o sobrenadante (MS4). Pode-se observar que não houve a formação do produto, cromatogramas (C) e (D). Para a reação utilizando o sobrenadante (MS5) (C) observa-se que houve a formação de um produto com $t_r = 10,24$ min., porém não o produto esperado com $t_r = 7,17$ min. Esse produto não foi caracterizado.

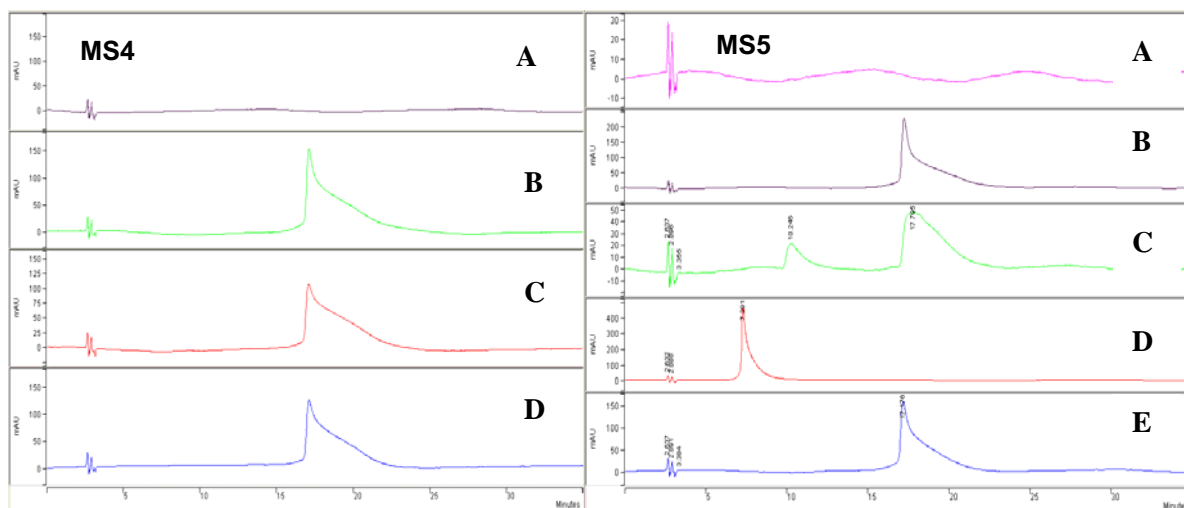
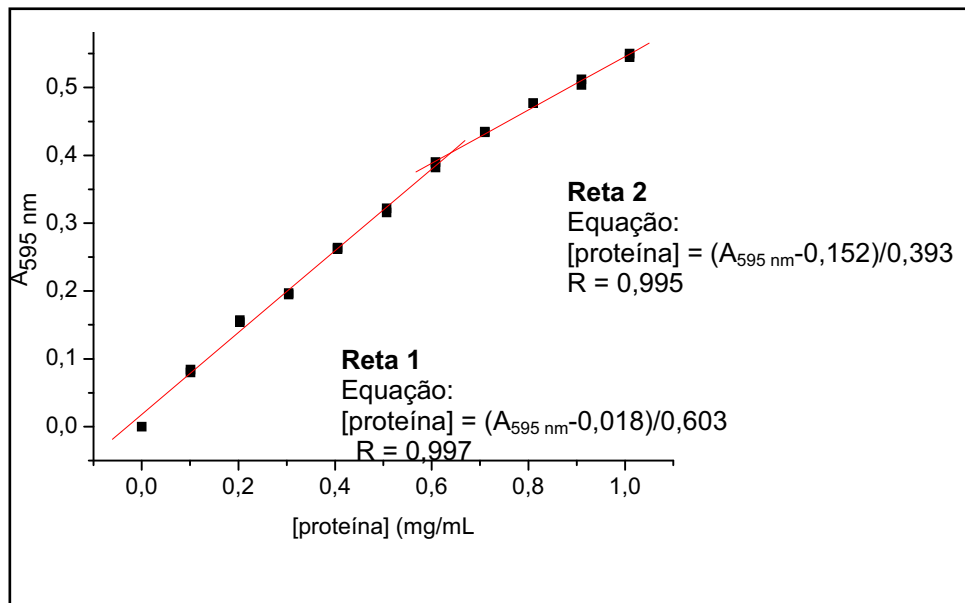


Figura 144- Cromatograma do ensaio enzimático: (A) branco do extrato enzimático, (B) branco dos reagentes, (C) e (D) reação enzimática para MS4 e (A) branco do extrato enzimático, (B) branco dos reagentes, (C) reação enzimática, (D) maitenina (padrão) e (E) pristimerina (precursor)

Apesar de não ter sido observado a conversão da pristimerina em maitenina, foi realizada a dosagem protéica com o intuito de saber qual a concentração de proteínas presentes nessas frações para posterior análise por eletroforese.

A dosagem protéica foi realizada utilizando o método de Bradford. A partir da equação da reta curva foi calculada a concentração de proteínas presentes nas frações enzimáticas.



$$[proteína] = ([proteína\ encontrada\ no\ gráfico] * 50 / \text{volume utilizado})$$

Figura 145- Curva de calibração construída com valores de concentração de albumina bovina X absorbância.

As concentrações de proteínas presentes nas amostras analisadas pelo método de Bradford foram: **MS2** (0,347 mg/mL), **MP2** (0,541 mg/mL), **MS4** (1,60 mg/mL) e **MS5** (0,009 mg/mL), o que caracteriza um baixo índice protéico, mas compatível com o órgão vegetal estudado.

10.2 Análise das bandas eletroforéticas no gel SDS-PAGE

Considerando a faixa de pesos moleculares (47-57 KDa) que apresentam as enzimas do tipo P450 (Andersen e Moller, 1998), e com o intuito de se avaliar os perfís protéicos correspondentes a espécie vegetal em estudo, foram realizadas análises utilizando eletroforeses monodimensionais SDS-PAGE para cada um dos extratos obtidos e estudados.

Foram analisadas as frações (MS2), (MP2), (MS4) e (MS5) das raízes de *M. ilicifolia*.

Na figura 146, p. 228 é apresentado o gel SDS-PAGE após revelação com nitrato de prata. Os códigos **1** e **2** indicam o comportamento da fração sobrenadante (MS2) e precipitado (MP2) sem utilização de PD-10, no qual não foi possível observar bandas eletroforéticas.

Os códigos **3** e **4** indicam o comportamento das frações (MS5) e (MS4). Foi possível observar em (MS5) 1 banda eletroforética intensa na região referente a proteínas entre 31 e 45 kDa, entre outras bandas (indicadas por setas), algumas delas com menor intensidade.

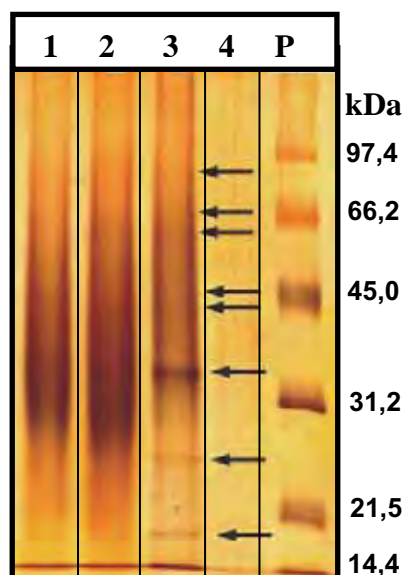


Figura 146- SDS-PAGE dos extratos protéicos obtidos aplicando os protocolos 2 e 3 das raízes de *M. ilicifolia*.

10.3 Análise do SDS-PAGE-2D

Foi realizado o experimento de 2D SDS-PAGE, para o sobrenadante (MS5) visando obter maiores informações sobre as proteínas de interesse, separadas e caracterizadas segundo seus MW e pI. Foram obtidos em geral, poucos *spots* protéicos, concentrados fundamentalmente na região dos 52 kDa e pI=6 e na região dos 32 kDa e pI= 4,6. Os *spots* foram detectados pelo software *Image Master 5.0* e caracterizados, sendo que na figura 147, p. 229 se encontra um detalhe dos parâmetros mais importantes.

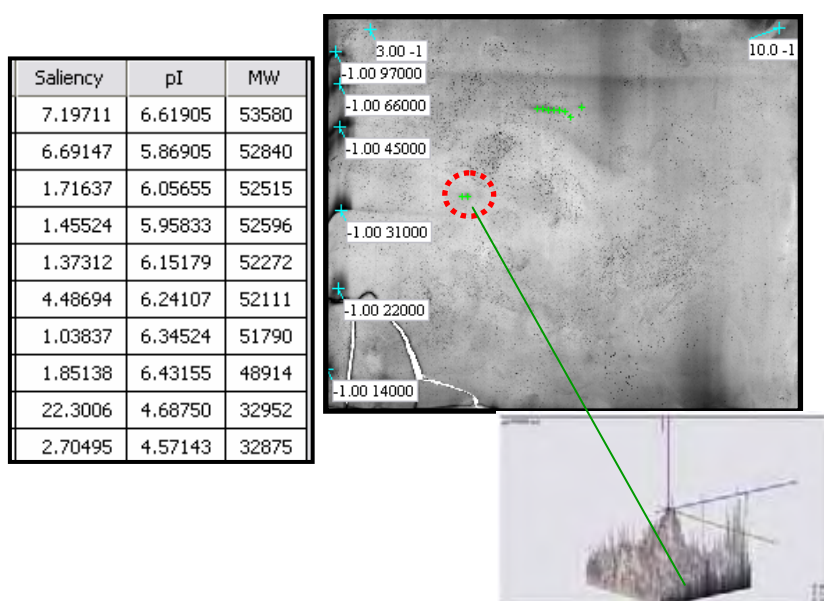


Figura 147- 2D SDS-PAGE do (MS5) das raízes de *Maytenus ilicifolia*. Separação entre pI 3 (IPG 3-10 Linear) e MW entre 31-45 kDa. Massa aplicada: 250 μ g de proteínas totais. Vista tridimensional do spot selecionado, junto à caracterização de cada um deles (Software *Image Master 5.0*, Amersham Biosciences).

A caracterização de cada *spot* implica a determinação do MW por EM. Do caso de ser maior que 50 kDa deve ser realizado por MALDI-ToF. Além disso, cada proteína deve ser digerida com tripsina gerando peptídeos que serão sequenciados para determinar a sequência completa. Esta informação permitirá pesquisar em bases de dados de proteínas (www.expasy.org entre outras), comparar com o já conhecido, aportando eventualmente novos dados da espécie.

10.4 Avaliação da atividade enzimática da oxidoredutase do tipo P450 nas cascas das raízes de *Salacia campestris* – Protocolo 3

Os sobrenadantes da primeira (SN1) e segunda (SN2) centrifugações dos ensaios enzimáticos realizados com as cascas das raízes de *S. campestris* (protocolo 3) foram analisados por CLAE-DAD e por eletroforese.

A figura 148, p. 230 mostra os cromatogramas referentes aos experimentos de reação enzimática. Utilizando o sobrenadante SN1 observa-se que não houve a conversão do precursor pristimerina ($t_r = 21,4$ min) no produto esperado, a maitenina ($t_r = 10,0$ min).

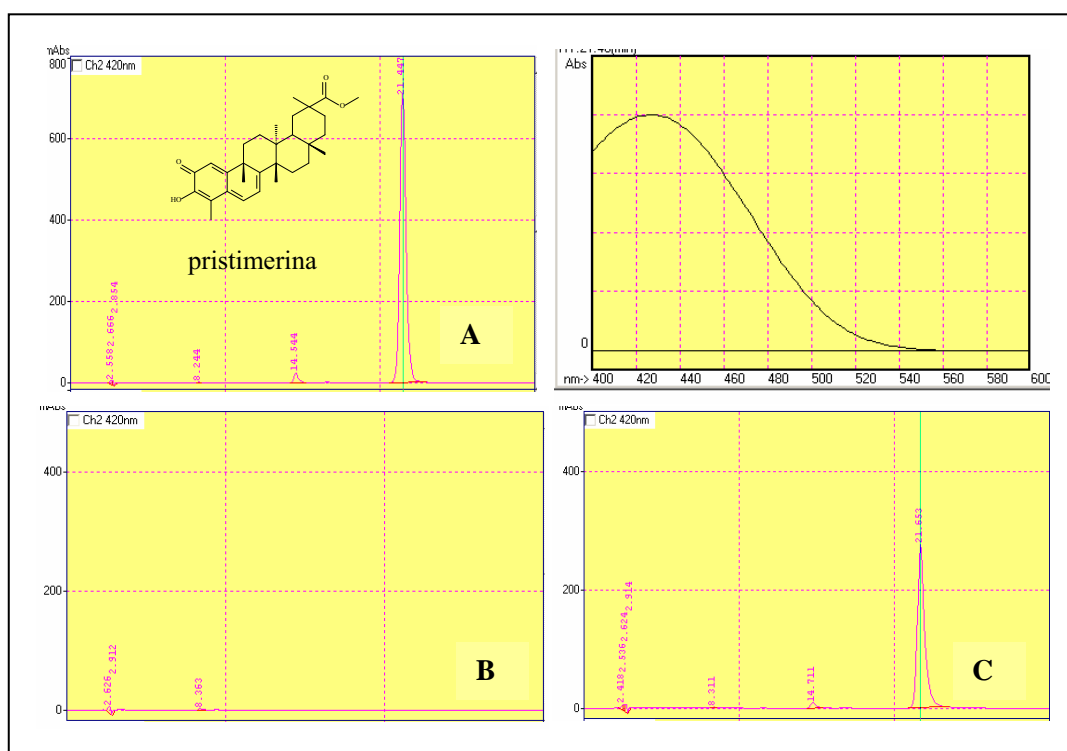


Figura 148- Cromatograma do sobrenadante (SN1) por CLAE-UV-DAD, branco dos reagentes (A) branco da enzima (B) reação da pristimerina (C)

Nos cromatogramas mostrados na figura 149, p. 231, utilizando o sobrenadante SN2 observa-se uma diminuição significativa do pico referente a pristimerina ($t_r = 21,4$ min), o qual foi consumido e talvez tenha formado outro produto.

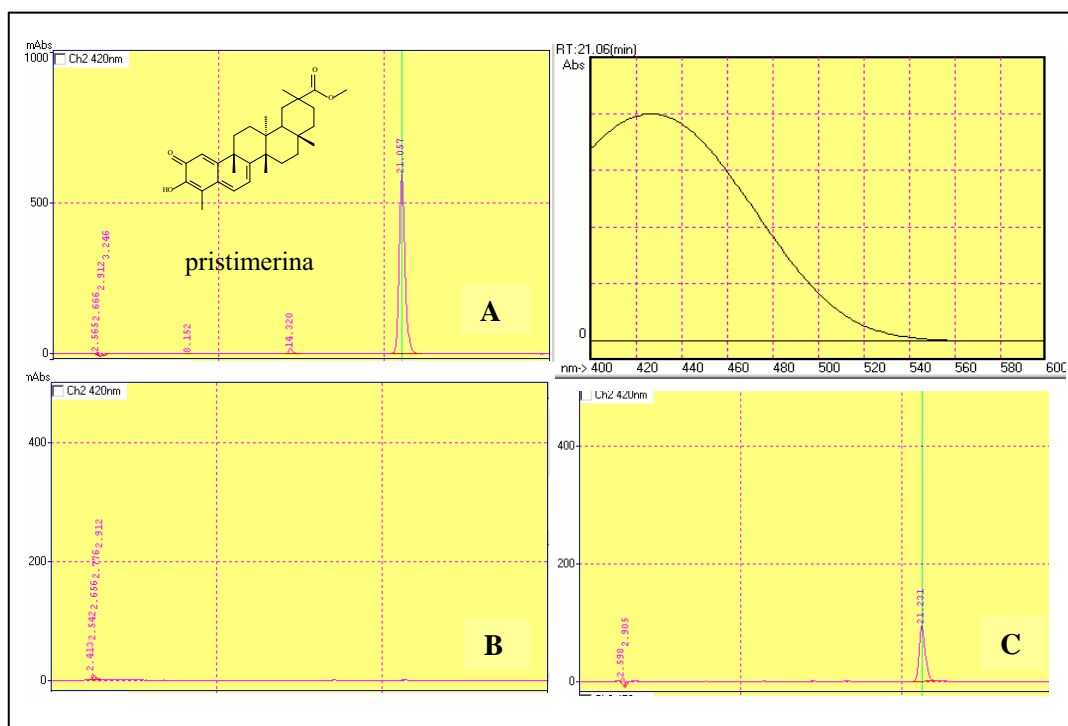
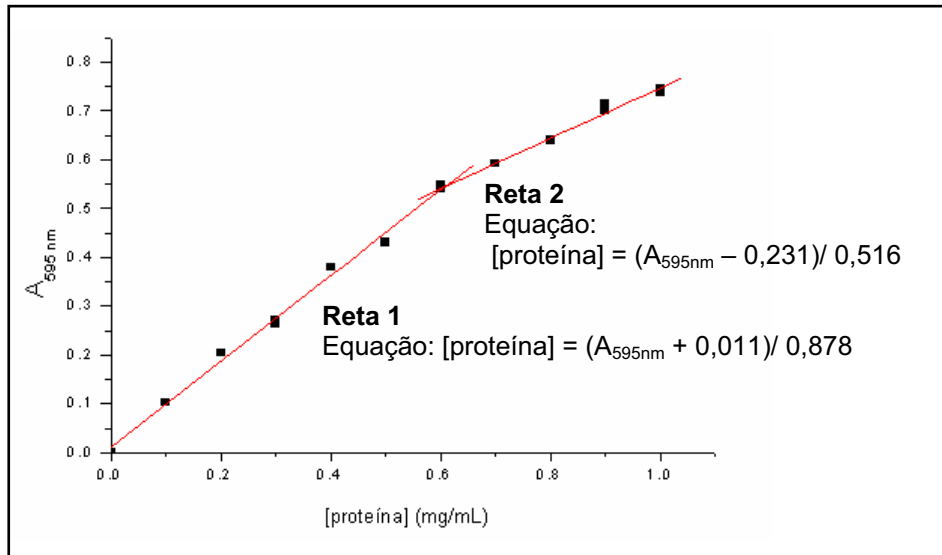


Figura 149- Cromatograma do sobrenadante (SN2) por CLAE-UV-DAD, branco dos reagentes (A) branco da enzima (B) reação da pristimerina (C)

Visando determinar a concentração de proteínas presentes nas frações (SN1) e (SN2) provenientes do extrato enzimático de *S. campestris*, foi realizada a dosagem protéica utilizando o método de Bradford.

Na Figura 150 (p. 232) são apresentadas as duas equações ajustadas com os pontos obtidos. Valores de absorbância até 0,4 foram ajustados com a equação 1, sendo que absorbâncias maiores devem ser ajustadas com a equação 2. A curva é construída toda vez que o reagente é preparado.



$$[\text{proteína}] = ([\text{proteína encontrada no gráfico}] * 50/\text{volume utilizado})$$

Figura 150- Curva de calibração construída com valores de concentração de albumina bovina X absorvância

As concentrações de proteínas presentes nas amostras foram de **SN1** (1,5 mg/mL) e **SN2** (0,471 mg/mL), o que caracteriza um bom índice protéico e compatível com o órgão vegetal estudado.

10.5 Análise das bandas eletroforéticas no gel SDS-PAGE

A investigação do possível envolvimento de enzimas do tipo P450 foi monitorada pela análise de eletroforese SDS-PAGE-1D.

A Figura 152, p. 233 mostra o gel SDS-PAGE após revelação com nitrato de prata. A letra **P** (padrão) mostrada nesta figura indica o comportamento da mistura de proteínas de massa molecular conhecida, servindo como referencial. Foi possível observar bandas esperadas referente às proteínas fosforilase (97,4 KDa), albumina sérica (66,2 KDa), ovalbumina (45,0 KDa), anidrase carbônica (31,2 KDa), inibidora de tripsina (21,5 kDa) e α -lactalbumina (14,4 kDa).

Foram analisadas as frações sobrenadantes SN1 e SN2 das cascas das raízes de *Salacia campestris* utilizando o protocolo 3.

Os códigos **1A** e **1B** indicam o comportamento das frações sobrenadantes SN1 e SN2 antes da dessalinização utilizando PD-10.

Os códigos **2A** e **2B** indicam o comportamento das frações sobrenadantes SN1 e SN2 após a dessalinização utilizando PD-10. Foi possível observar três bandas eletroforéticas intensas na região referente a proteínas entre 31,2 e 45,0 kDa. Foram também observadas bandas (indicadas pela seta amarela) na região de proteínas entre 45,0 kDa - 97,4 kDa, porém com menor intensidade.

As enzimas oxidoredutases do tipo citocromo possuem massa molecular entre 47-57 KDa (Andersen e Moller, 1998). Logo, é possível que estas bandas sejam referentes a estas enzimas, porém em baixa concentração.

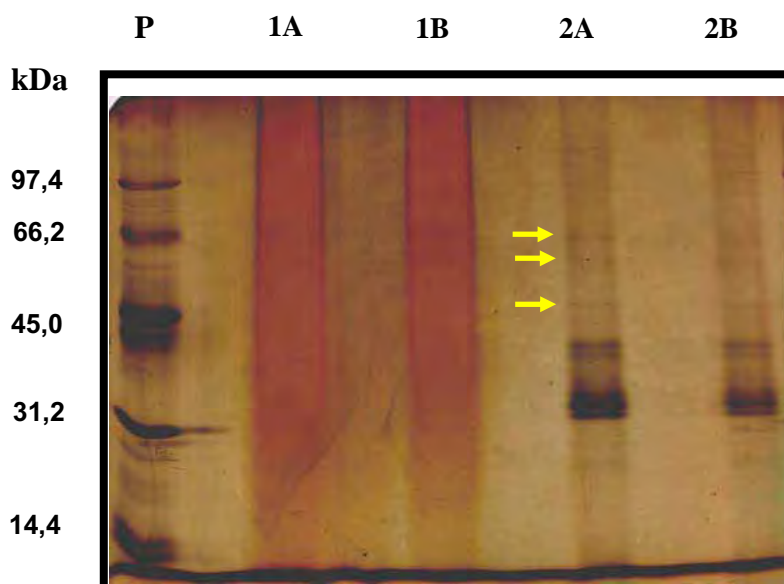


Figura 151- Eletroforese das frações sobrenadantes SN1 e SN2 obtidos no experimento de extração enzimática das cascas das raízes de *Salacia Campestris* - (**1A**) sobrenadante (não dessalinizado) SN1; (**1B**) sobrenadante (não dessalinizado) SN2; (**2A**) fração sobrenadante SN1; (**2B**) fração sobrenadante SN2.

10.6 Avaliação da atividade enzimática da oxidoredutase do tipo P450 nas raízes de *Maytenus ilicifolia* e *Salacia campestris*

– Protocolo 4

Tendo em vista que os triterpenos quinonametídeos mostram acúmulo nas raízes e que estas se configuram em um órgão vegetal rígido, buscou-se compreender melhor o processo de extração de microssomas destes tecidos. As enzimas citocromo P450 em tecidos lenhosos é de difícil extração, devido, principalmente a dois fatores: estes tecidos são normalmente fibrosos e densos, conseqüentemente, difíceis de serem homogenizados. Outro fator a ser considerado é que este normalmente contém baixo índice protéico, além destas serem proteínas de membrana. Além disso, os tecidos lenhosos são geralmente pigmentados e frequentemente acumulam consideráveis quantidades de óleo, resinas e compostos fenólicos podendo desativar as enzimas presentes nas frações microssomais, dificultando o processo de isolamento e análise, interferindo nas análises espectrofotométricas.

Baseado nessas propriedades buscou-se um novo protocolo. Esse protocolo é composto de duas fases de partição, sendo que a primeira fase de particionamento é realizada em tampão borato e serve para remover os pigmentos, a segunda fase de partição é realizada em tampão fosfato que tem por finalidade concentrar as enzimas do tipo P450 (Esquema 9, p. 213).

Os produtos obtidos após ensaio enzimático, descritos na tabela 17-18, p. 214-215, foram analisados por CLAE-DAD e comparados com os padrões pristimerina e maitenina (figura 153, p. 235). Foram analisados os produtos formados com 1 e 2 horas de incubação nos comprimentos de onda de 254 e 420 nm, além do branco do extrato enzimático e o branco dos reagentes.

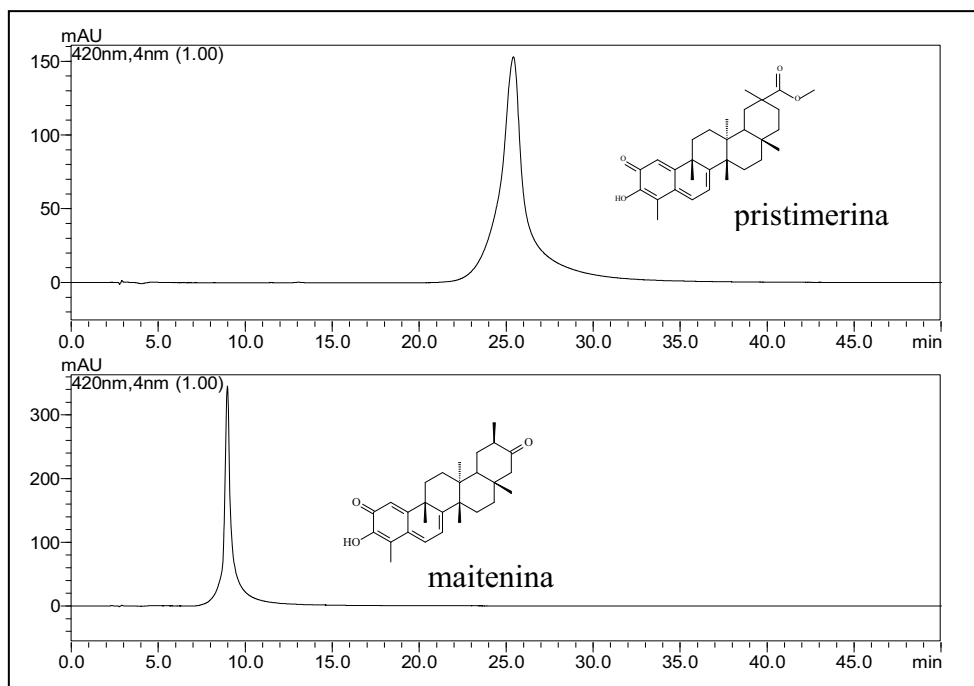


Figura 152- Cromatograma do precursor (pristimerina) e do produto esperado (maitenina).

Pela análise dos cromatogramas (figuras 153-164, p. 235-240) não foi possível constatar qualquer indício sobre a possível presença do citocromo P450, uma vez que, os picos referentes ao precursor e o possível produto formado não foram alterados e observados, respectivamente.

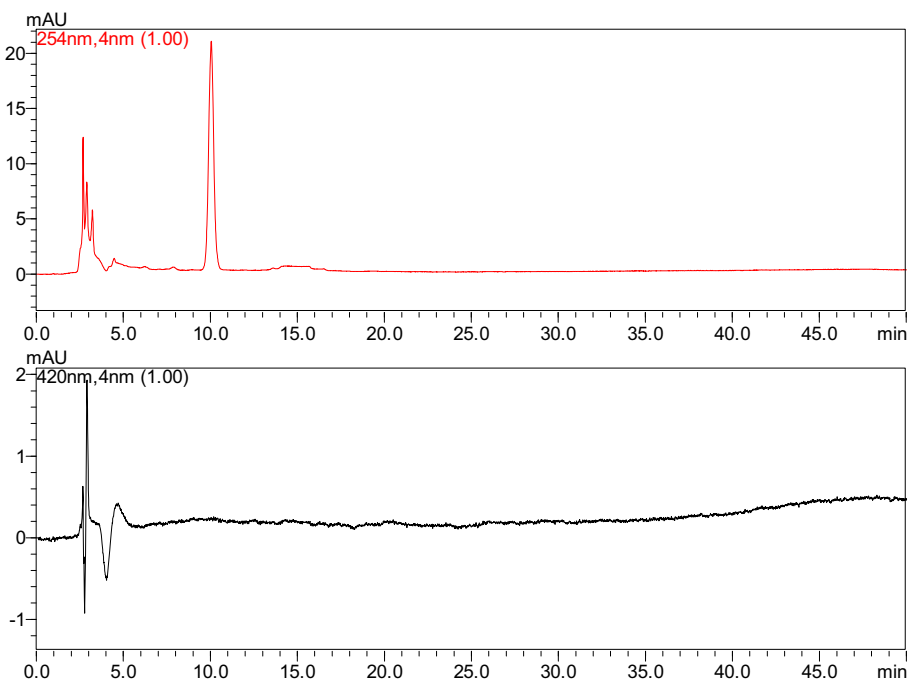


Figura 153- Cromatograma do ensaio enzimático utilizando a *M. ilicifolia* - branco do extrato enzimático após 1 h de incubação.

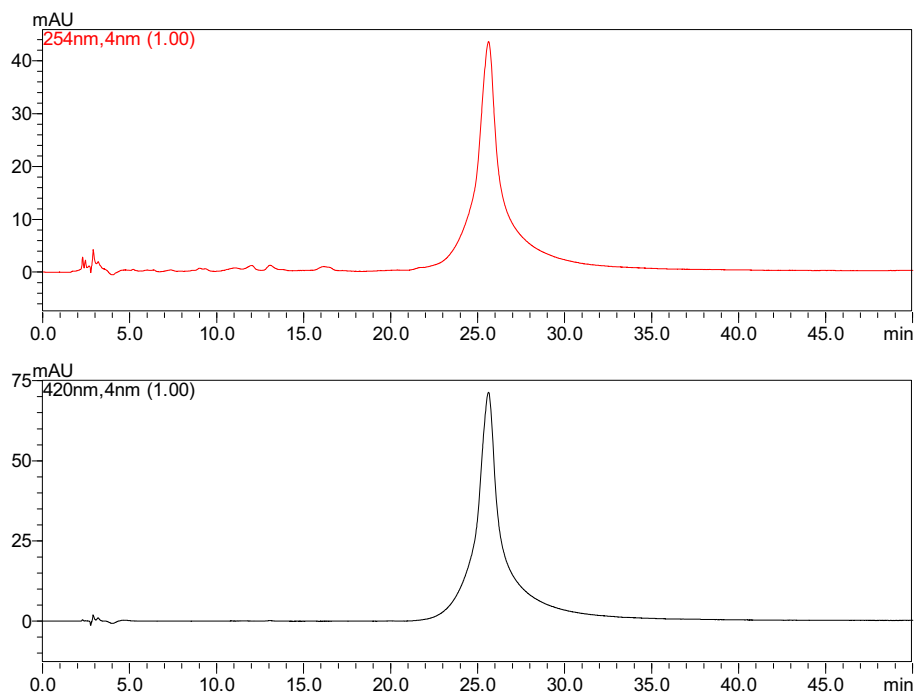


Figura 154- Cromatograma do ensaio enzimático utilizando *M. ilicifolia*: branco dos reagentes após 1 h de incubação.

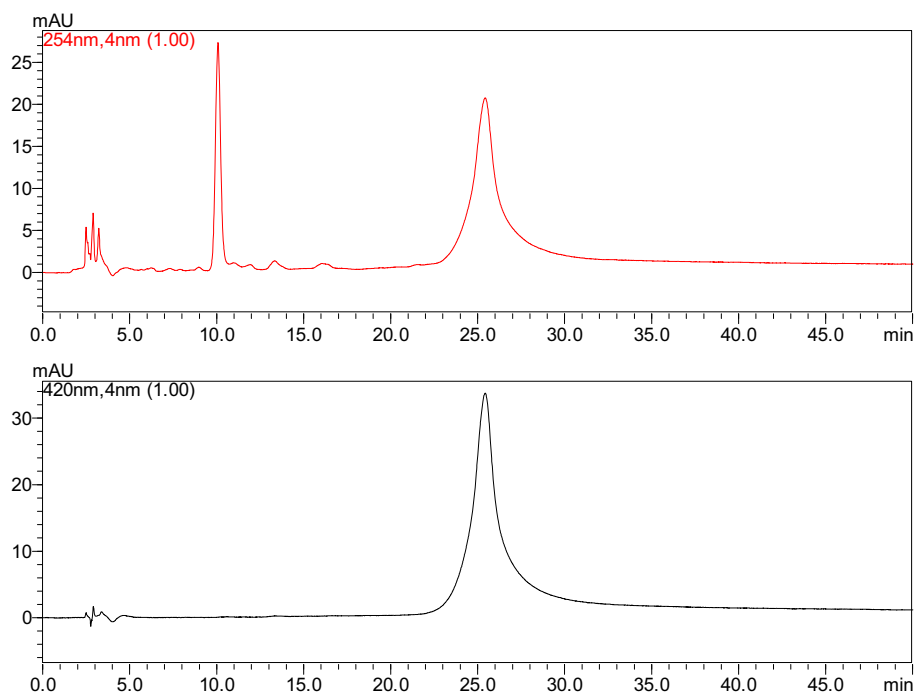


Figura 155- Cromatograma do ensaio enzimático utilizando *M. ilicifolia*: reação enzimática após 1h de incubação.

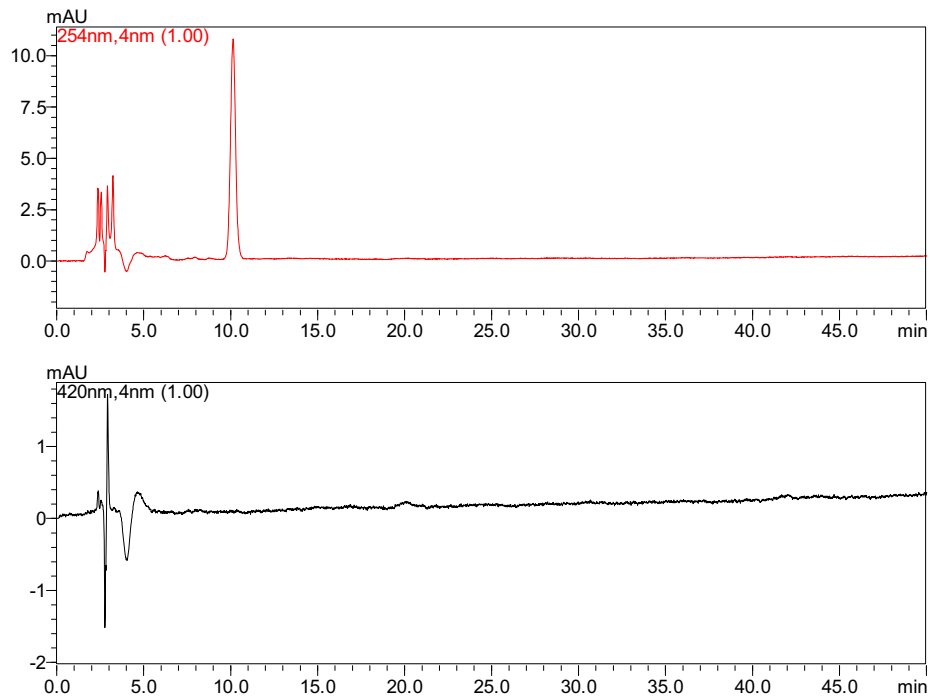


Figura 156- Cromatograma do ensaio enzimático utilizando *S. campestris*: branco do extrato enzimático após 1 h de incubação.

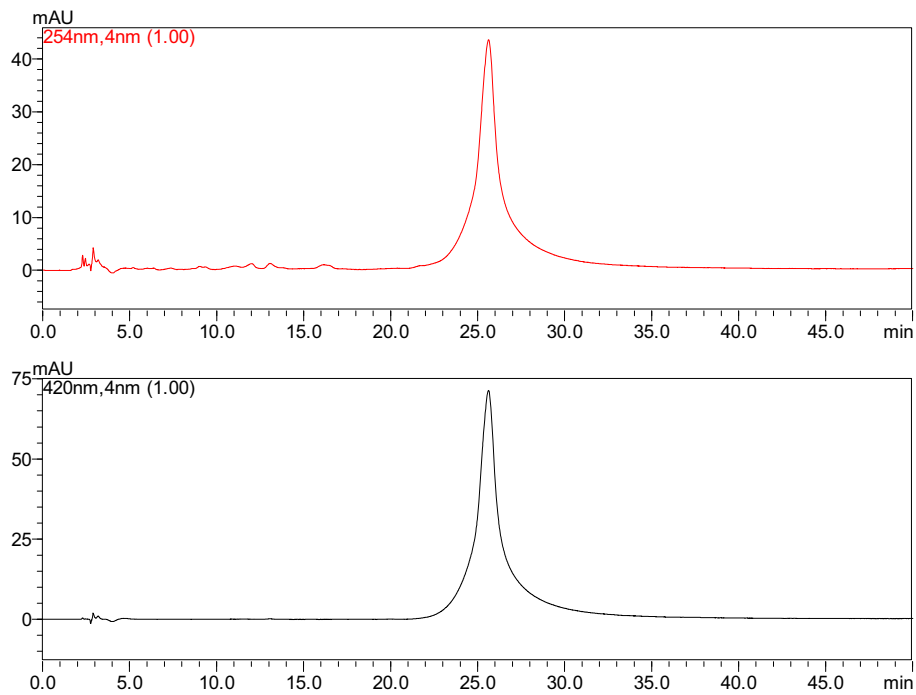


Figura 157- Cromatograma do ensaio enzimático utilizando *S. campestris*: branco dos reagentes após 1 h de incubação.

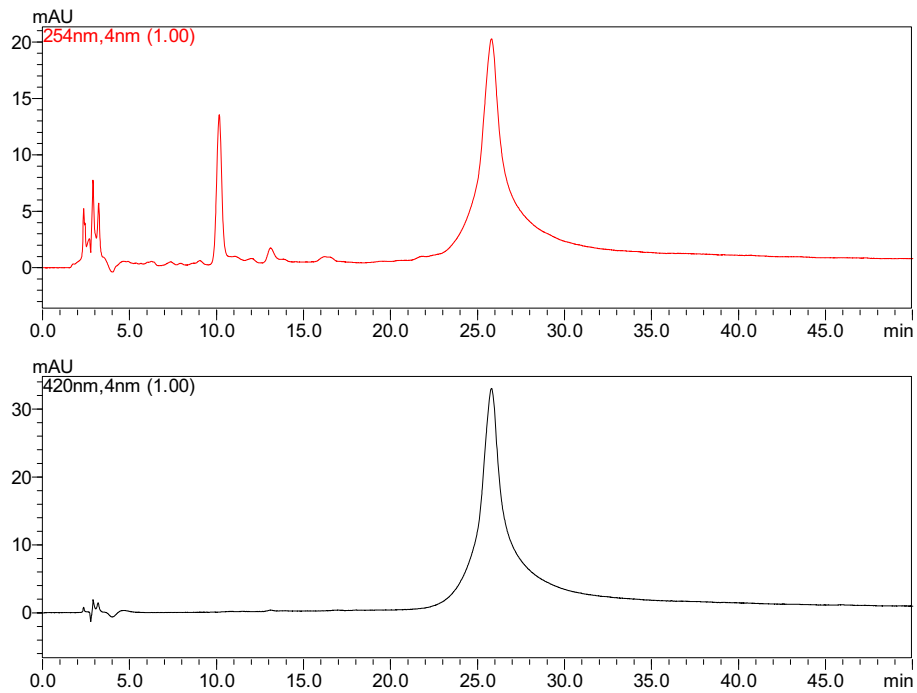


Figura 158- Cromatograma do ensaio enzimático utilizando *S. campestris*: reação enzimática após 1 h de incubação.

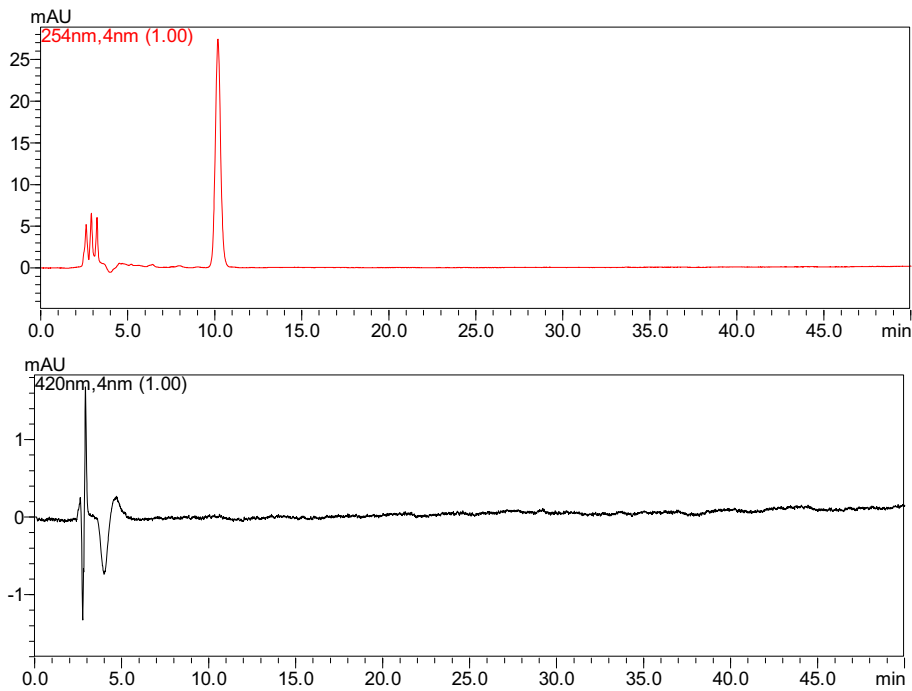


Figura 159- Cromatograma do ensaio enzimático utilizando *M. ilicifolia*: branco do extrato enzimático após 2 h de incubação.

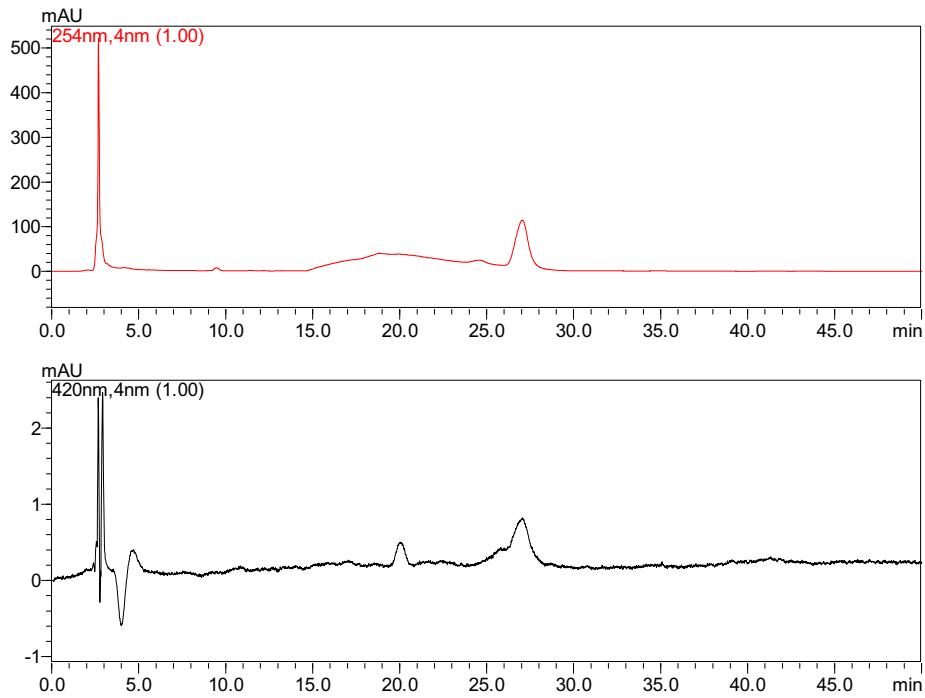


Figura 160- Cromatograma do ensaio enzimático utilizando *M. ilicifolia*: branco dos reagentes após 2 h de incubação.

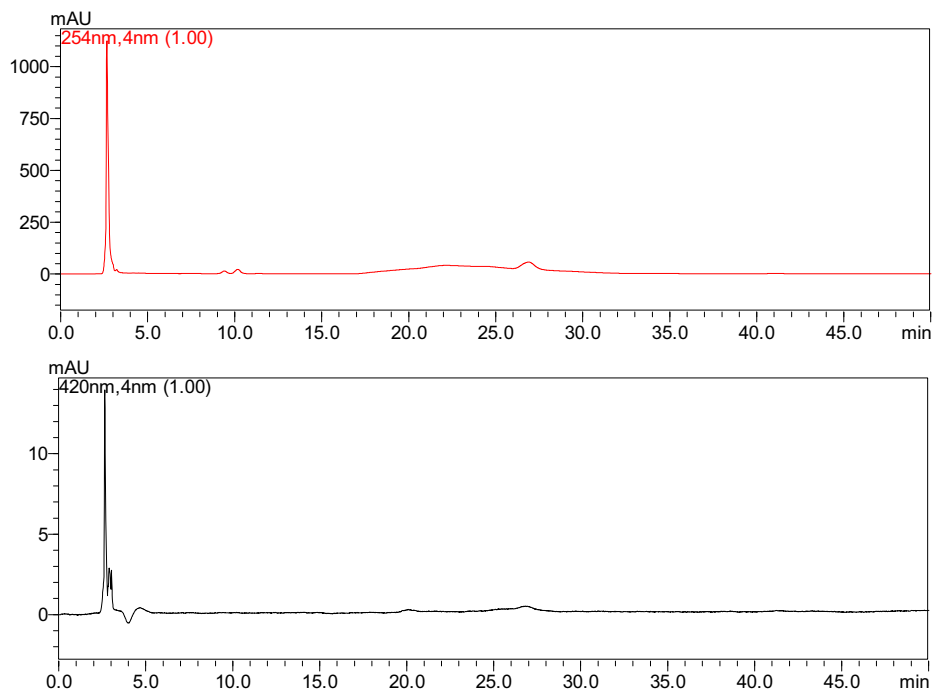


Figura 161- Cromatograma do ensaio enzimático utilizando *M. ilicifolia*: reação enzimática após 2 h de incubação.

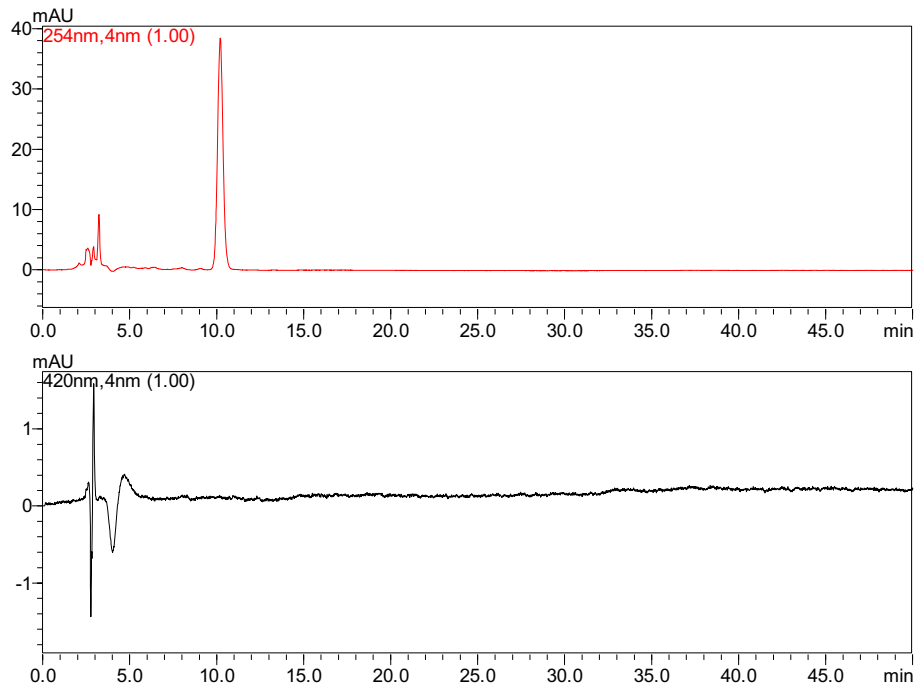


Figura 162- Cromatograma do ensaio enzimático utilizando *S. campestris*: branco do extrato enzimático após 2 h de incubação.

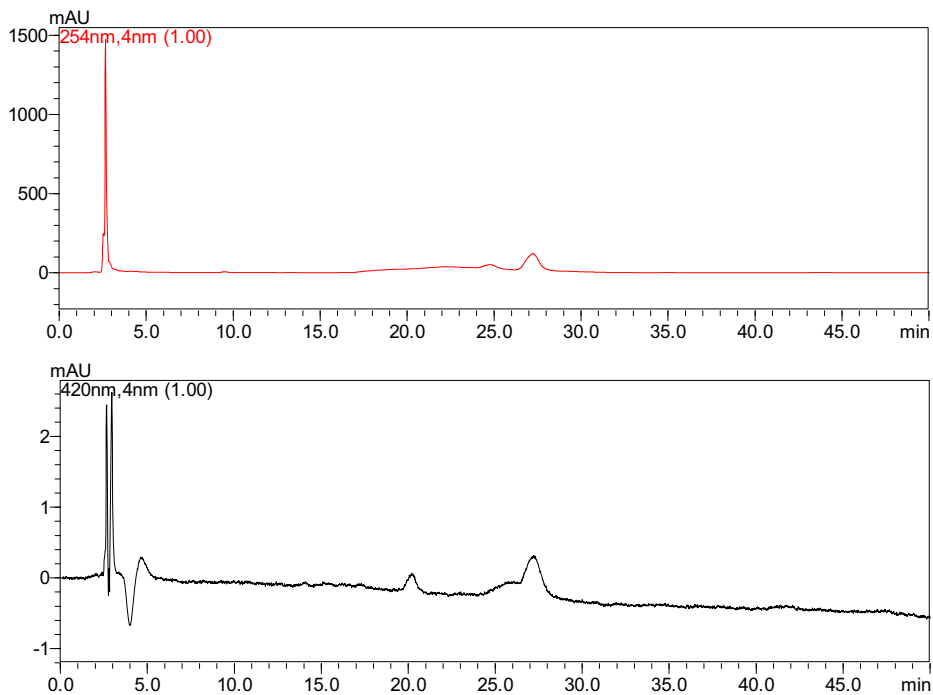


Figura 163- Cromatograma do ensaio enzimático utilizando *S. campestris*: branco dos reagentes após 2 h de incubação.

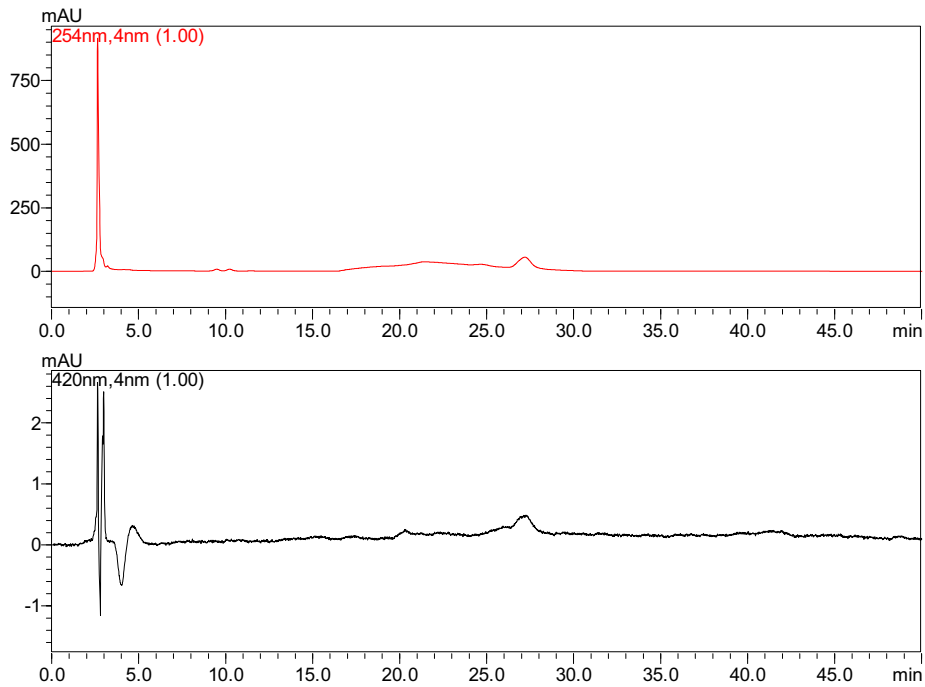
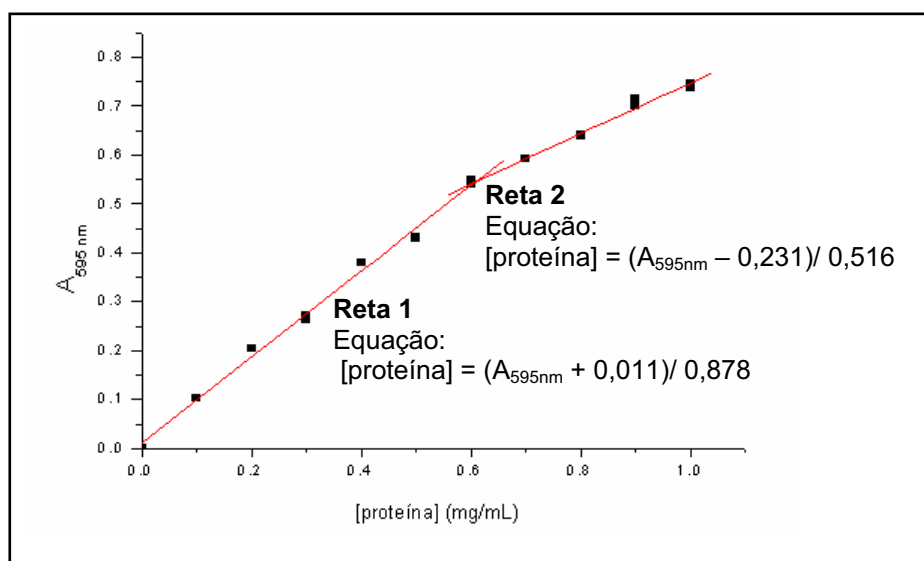


Figura 164- Cromatograma do ensaio enzimático: utilizando *S. campestris*: reação enzimática após 2 h de incubação.

Com o intuito de monitorar a concentração de proteínas durante todo o processo de extração enzimática, foi realizada a dosagem protéica na primeira e segunda fase de partição, além das frações obtidas durante a separação. A dosagem protéica foi realizada utilizando o método de Bradford e a concentração protéica calculada encontra-se na tabela 21, p. 242.



$$[\text{proteína}] = ([\text{proteína encontrada no gráfico}] * 50 / \text{volume utilizado})$$

Figura 165- Curva de calibração construída com valores de concentração de albumina bovina X absorvância.**Tabela 21.** Concentração protéica utilizando protocolo 4

Código	Fração	Conc. mg/mL
1	SB S1 -100PD10	1,89
2	SB S1 -PD10	1,83
3	MB S1 -100PD10	1,00
4	MB S1-PD10	0,071
5	SB S2 -100PD10	1,70
6	SB S2 -PD10	1,66
7	MB S2 -100PD10	1,12
8	MB S2 -PD10	0,15
9	SBFS -100PD10	0,04
10	MBFS -100PD10	1,30
11	SBFI -100PD10	1,70
12	MBFI -100PD10	0,63
13	SF -100PD10	0,06
14	MF -100PD10	0,011

SB S1 -100PD10 (*S.campestris* bruto sobrenadante 1 passado por PD-10), SB S1 -PD10 (*S.campestris* bruto sobrenadante 1 sem PD-10), MB S1 -100PD10 (*M. ilicifolia* bruto sobrenadante 1 passado por PD-10), MB S1-PD10 (*M. ilicifolia* bruto sobrenadante 1 sem PD-10), SB S2 -100PD10 (*S.campestris* bruto sobrenadante 2 passado por PD-10), SB S2 -PD10 (*S.campestris* bruto sobrenadante 2 passado por PD-10), MB S2 -100PD10 (*M. ilicifolia* bruto sobrenadante 2 passado por PD-10), MB S2 -PD10 (*M. ilicifolia* bruto sobrenadante 2 sem PD-10), SBFS -100PD10 (*S.campestris* borato fase superior sem PD-10), MBFS -100PD10 (*M. ilicifolia* borato fase superior sem PD-10), SBFI -100PD10 (*S.campestris* borato fase inferior sem PD-10), MBFI -100PD10 (*M. ilicifolia* borato fase inferior sem PD-10), SF -100PD10 (*S.campestris* fração enzimática -100PD10), MF -100PD10 (*M. ilicifolia* fração enzimática -100PD10).

10.7 Análise das bandas eletroforéticas no gel SDS-PAGE

Com o intuito de se avaliar os perfis protéicos das espécies estudadas, foram realizadas análises utilizando eletroforeses monodimensionais SDS-PAGE para cada uma das frações obtidas.

A figura 166, p. 243 mostra o gel SDS-PAGE após revelação com azul de coomassie. A letra **P** (padrão) mostrada indica o comportamento da mistura de proteínas de massa molecular conhecida, servindo como referencial. Foi possível observar bandas esperadas referente às proteínas fosforilase (97,4 KDa), albumina sérica (66,2 KDa), ovalbumina (45,0 KDa), anidrase carbônica (31,2 KDa), inibidora de tripsina (21,5 kDa) e α -lactalbumina (14,4 kDa).

Foi analisado o sobrenadante resultante da ultracentrifugação (microssomas extraídos com tampão Tris-HCl). A fase superior resultante da partição com tampão borato e com tampão fosfato para a *Maytenus ilicifolia* e *Salacia campestris*.

Os códigos apresentados nos géis indicam: **4M** (sobrenadante dessalinizado – fração microssomal da *M. ilicifolia*), **8M** (sobrenadante não dessalinizado – fração microssomal da *M. ilicifolia*), **12M** (fase superior não dessalinizado – tampão borato da *M. ilicifolia*) e **14M** (fase superior não dessalinizado – tampão fosfato da *M. ilicifolia*).

Os códigos apresentado no gel referente á *Salacia campestris* indicam: **2S** (sobrenadante não dessalinizado – fração microssomal), **6S** (sobrenadante dessalinizado – fração microssomal), **11S** (fase superior não dessalinizado – tampão borato) e **13S** (fase superior não dessalinizado – tampão fosfato) e **9S** (fase inferior não dessalinizada – tampão borato).

Na figura 166, p. 243 é mostrado o gel revelado com azul de coomassie, no qual é observado uma banda eletroforética azul indicando a presença de uma proteína de peso molecular entre 21,5 e 31,0 kDa. Este revelador se mostrou pouco sensível, visto que as bandas coraram muito pouco.

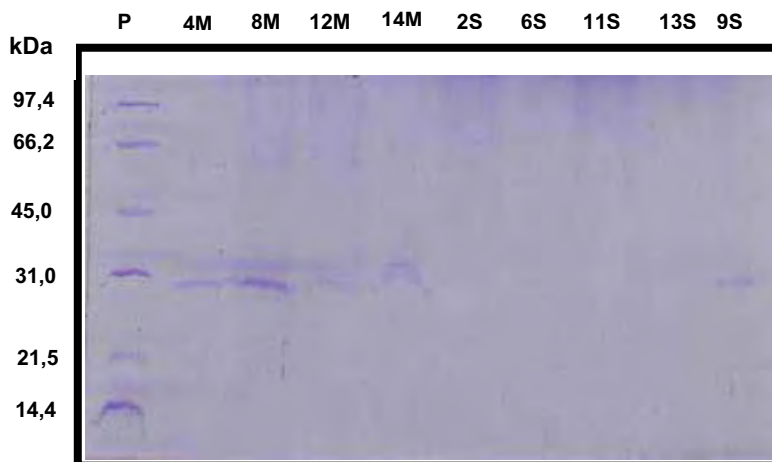


Figura 166- Eletroforese das frações obtidas durante o experimento enzimático (gel revelado com azul de coomassie).

Nas figuras 167-168, p. 244-245 são mostrados os géis de SDS-PAGE após revelação com nitrato de prata, sendo muito mais sensível que a coloração com azul de coomassie.

Foi possível observar, para todas as frações, de *Maytenus ilicifolia* uma banda eletroforética intensa na região referente às proteínas de 31,0 kDa. A fração microssomal (**4M**) apresentou três bandas de proteínas pouco intensas na faixa de 45,0 e 66,2 kDa, sendo que a mesma fração, porém não dessalinizada (**8M**), além destas apresentou duas bandas entre 31,0 e 45,0 kDa. Foi possível observar para a fração borato (**12M**) bandas um pouco mais intensas na faixa de 45,0 e 66,2 kDa, quando comparada a fração (**4M**). O código (**14M**) indica o comportamento da fração fosfato que tinha por objetivo concentrar as enzimas oxidoredutase do tipo P450. Segundo o protocolo utilizado (Andersen e Moller, 1998), as enzimas P450 apresentam uma banda entre 47-57 kDa, podendo assim, sugerir uma possível presença da enzima oxidoredutase do tipo P450.

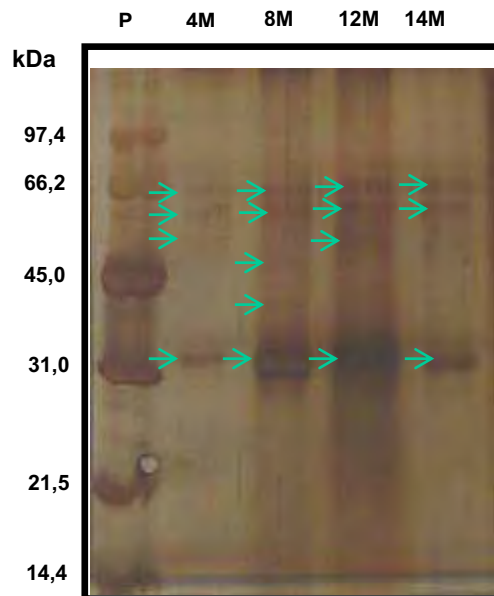


Figura 167- Eletroforese das frações obtidas durante o experimento enzimático de *Maytenus ilicifolia* (gel revelado com nitrato de prata).

No gel apresentado na figura 168, p. 245, observa-se que não foi possível visualizar bandas eletroforéticas na fração microssomal não dessalinizada (**2S**) e na fração (**11S**). No entanto, observa-se que a fração microssomal dessalinizada (**6S**), fração superior não dessalinizada (**13S**) e fração inferior não dessalinizada (**9S**) apresentaram bandas de proteínas entre 45,0 e 66,2 kDa.

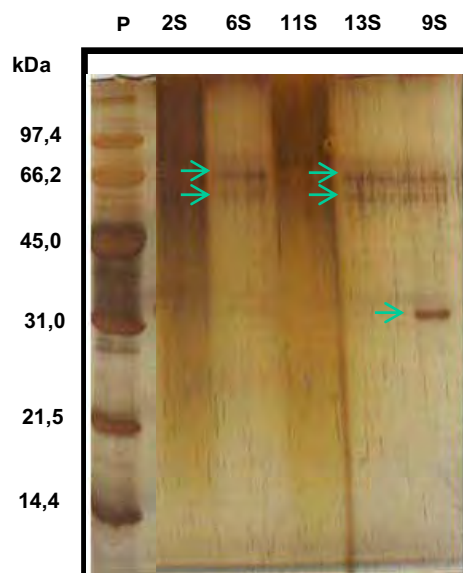


Figura 168- Eletroforese das frações obtidas durante o experimento enzimático de *Salacia campestris* (gel revelado com nitrato de prata).

Vale ressaltar, que apesar de não ter sido possível a visualização de bandas protéicas na fração (**11S** – fração superior), a fração (**9S** – fração inferior) apresentou uma banda intensa em 31,0 kDa e duas outras bandas menos intensa entre 45,0 e 66,2 kDa.

A fração (**13S**) apresentou duas bandas eletroforéticas entre 45,0 e 66,2 kDa enquanto a fração (**14M**) de *M. ilicifolia*, além destas, apresentou outra em 31,0 kDa. Essa análise sugere que a extração das enzimas do tipo P450 na *Salacia campestris* foi eficiente quando comparada a *Maytenus ilicifolia*.

10. Conclusões

Os estudos químicos, biológicos e biossintéticos realizados neste trabalho com as matrizes vegetais *Maytenus ilicifolia* e *Salacia campestris* (Celastraceae) trouxeram informações valiosas para futuros estudos com vista a complementação das investigações dos aspectos proteômicos e genômicos de importantes seqüências de metabólitos secundários que mostram acúmulo exclusivo em espécies da família Celastraceae.

Para tanto, a necessidade de obtenção dos padrões específicos para a avaliação das rotas biossintéticas selecionadas é condição *sine qua non* para os estudos das reações de oxidação uma vez que são utilizados como padrões cromatográficos de todos os possíveis produtos formados *in vitro*. Portanto, o estudo químico se configura em uma importante etapa, uma vez que muitas reações podem gerar produtos de estruturas isoméricas com igual peso molecular. Esses estudos também foram importantes, pois além de contribuir para alguns estudos biossintéticos dos triterpenos quinonametídeos, evidenciaram também que a biossíntese desses e dos alcalóides piridínicos sesquiterpênicos dependem do ciclo de vida da planta. Outrossim, tais estudos resultaram no isolamento de dois novos derivados dos alcalóides piridínicos sesquiterpênicos, denominados maitenol e campestrina. Um outro aspecto a ser considerado é que o estudo químico sucessivo possibilitou ampliar o espectro de testes biológicos utilizando os alcalóides piridínicos sesquiterpênicos e os triterpenos quinonametídeos, corroborando a importância biológica dos quinonametídeos e as possibilidades de explorar a potencialidade biológica dos alcalóides piridínicos sesquiterpênicos. Os triterpenos quinonametídeos se mostraram potentes antifúngicos frente aos patógenos humanos *Candida parapsilosis* e *Cryptococcus neoformans*. A potencialidade antifúngica mostrada frente a *C. neoformans* traz uma nova inserção ao uso dessa classe de substâncias como saneante, uma vez que a Cryptococose é uma enfermidade transmitida por fezes de pombos, e tem aumentado substancialmente sua incidência em pacientes imunodeprimidos. Da mesma forma, os triterpenos

quinonametídeos demonstraram potente atividade tripanocida, leishmanicida e antitumoral.

As determinações das atividades enzimáticas, com especificidade para o substrato pristimerina, foram conduzidos por experimentos visando a obtenção de extratos enzimáticos das cascas das raízes de *Maytenus ilicifolia* e *Salacia campestris*. A enzima selecionada para extração foi a oxidoreductase do tipo citocromo P450, que supostamente estaria envolvida nas etapas de oxidação que ocorrem no anel E, do sistema pentacíclico dos triterpenos quinonametídeos. Etapas de caracterização da(s) enzima(s) de interesse foram realizadas utilizando eletroforese mono- e bidimensional (SDS-PAGE). Para tanto, sucessivas centrifugações e/ou ultracentrifugações foram realizadas, uma vez que as oxidoreductases do tipo citocromo P450 são, em geral, enzimas de membrana. A quantidade de informações em nível molecular das enzimas que fazem a mediação da biossíntese dessa classe de produtos naturais mostrou que a enzima estava diluída. Tal dificuldade pode estar associada ao órgão vegetal que a enzima mostra acúmulo, as cascas das raízes, e também a necessidade de ampliar e otimizar os protocolos de extração utilizados. Devido a dificuldade de obtenção dos extratos enzimáticos enriquecidos com a enzima oxidoreductases do tipo citocromo P450, estudos histoquímicos foram realizados para confirmar se no córtex das raízes não poderiam estar sendo acumulados quantidades apreciáveis desta classe de metabólitos. Esses experimentos corroboraram a maior concentração de acúmulo destes metabólitos no córtex indicando ser as cascas das raízes melhores matrizes para os estudos biossintéticos.

Portanto, todos os estudos aqui enfocados trouxeram subsídios para futuras pesquisas visando a prospecção de genes nestas espécies de interessante importância biológica, de forma a utilizar tais informações para o incremento da produção dos triterpenos quinonametídeos, que ocorrem em baixa concentração na planta jovem, via técnicas de engenharia metabólica.

REFERÊNCIAS

- AGRAWAL, P. K.; BANSAL, M. C.; PORTER, L. J.; FOO, L. Y. Flavonoid. In: AGRAWAL, P. K. (Ed.). **Carbon-13 of flavonoids**. New York: Elsevier, 1989, 39, 433.
- AGUIAR, M.; GIBBS, B. F.; MASSE, R. Regulation of cytochrome P450 by posttranslational modification. **Drug Metabolism Reviews**, v. 37, n. 2, p. 379-404, 2005.
- ALMEIDA, V. L.; LEITÃO, A.; REINA, L. C. B.; MONTANARI, A.; DONNICI, C. L. Câncer e agentes antineoplásicos ciclo-celular específicos e ciclo-celular não específicos que interagem com o DNA: uma introdução. **Química Nova**, v. 28, n. 1, p. 118-129, 2005.
- ALVARENGA, N. L.; VELÁZQUEZ, C. A.; GÓMEZ, R.; CANELA, N. J.; BAZZOCCHI, I. L.; FERRO, E. A. A new antibiotic nortriterpene quinone methide from *Maytenus catingarum*. **Journal of Natural Products**, v. 62, p. 750-751, 1999.
- ALVES, T. M. A.; SILVA, A. F.; BRANDÃO, M.; GRANDI, T. S.; SMÂNIA, E. F.; SMÂNIA, J. R. A.; ZANI, C. L. Biological screening of Brazilian medicinal plants. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 95, p. 367-373, 2000.
- ANDERSEN, M. D.; MOLLER, B. L. Double triton x-114 phase partitioning for the purification of plant cytochromes P450 and removal of Green pigments. **Protein Expression and Purification**, v. 13, p. 366-372, 1998.
- ANGIOSPERM PHYLOGENY GROUP. Classification for the orders and families of flowering plants: APG II. **Botanicals Journal of the Linnean Society**, v. 141, p. 399-436, 2003.
- ARAÚJO, C. A. C.; ALEGRIO, L. V.; LEON, L. L. Antileishmanial activity of compounds extracted and characterized from *Centrolobium sclerophyllum*. **Phytochemistry**, v. 49, p. 751-754, 1998.
- BARATA, L. E. S.; SANTOS, L. S.; FERRI, P. H.; PHILLIPSON, J. D.; PAINE, A.; CROFT, S. L. Anti-leishmanicidal activity of neolignans from *Viola* species and synthetic analogues. **Phytochemistry**, v. 55, p. 589-595, 2000.

- BARROSO, G. M.; PEIXOTO, A. L.; ICHASSO, C. L. F.; COSTA, C. G.; GUIMARÃES E. F.; LIMA, H. C. **Sistemática das angiospermas do Brasil**. Viçosa: Ed. UFU, 1984.
- BERGAMO, D. C. B.; KATO, M. J.; BOLZANI, V. S.; FURLAN, M. Biosynthetic origins of the isoprene units of 4-nerolidycatechol in *Photomorphe umbellata*. **Journal of Brazilian Chemical Society**, v. 16, n. 6B, p. 1406-1409, 2005.
- BERSANI-AMADO, C. A.; MASSAO, L. B.; BAGGIO, S. R.; JOHANSON, L.; ALBIERO, A. L. M.; KIMURA, E. Antiulcer effectiveness of *Maytenus aquifolium* spray dried extract. **Phytotherapy Research**, v. 14, n. 7, p. 543-545, 2000.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral**. Brasília, 2003. 120 p.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Leishmaniose visceral grave: normas e condutas**. Brasília, 2006. 60 p.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana**. 2. ed. atual. Brasília, 2007.
- BRÜNING, R.; WAGNER, H. Übersicht über die celastraceen-inhaltsstoffe: chemie, chemotaxonomie, biosynthese und pharmakologie. **Phytochemistry**, v. 17, p. 1821-1858, 1978.
- BUFFA FILHO, W.; FURLAN, M.; PEREIRA, A. M. S.; FRANÇA, S. C. Indução de metabólitos bioativos em culturas de células de *Maytenus ilicifolia*. **Eclética Química**, v. 27, p. 403-416, 2000.
- BUFFA FILHO, W.; BOLZANI, V. S.; FURLAN, M.; PEREIRA, A. M. S.; PEREIRA, S. I. V.; FRANÇA, S. C. *In vitro* propagation of *Maytenus ilicifolia* (Celastraceae) as potential source for antitumoral and antioxidant quinomethide triterpenes production. A rapid quantitative method for their analysis by reverse-phase high-performance liquid chromatography. **Arkivoc**, part 4, p. 137-146, 2004.

BUFFA FILHO, W.; CORSINO, J.; BOLZANI, V. S.; FURLAN, M.; PEREIRA, A. M. S.; FRANÇA, S. C. Quantitative determination of cytotoxic friedo-nor-oleanane derivatives from five morphological types of *Maytenus ilicifolia* (Celastraceae) by reverse-phase high-performance liquid chromatography. **Phytochemical Analysis**, v. 13, p. 75-78, 2002.

CAMACHO, M. R.; PHILLIPSON, J. D.; CROFT, L. S.; KIRBY, G. C.; WARHURST, D. C.; SOLIS, P. N. Terpenoids from *Guarea rhopalocarpa*. **Phytochemistry**, v. 56, p. 203-210, 2000.

CARVALHO, P. R. F.; SILVA, D. H. S.; BOLZANI, V. S.; FURLAN, M. Antioxidant quinonemethide triterpenes from *Salacia campestris*. **Chemistry & Biodiversity**, v. 2, p. 367-372, 2005.

CARVALHO, S. F. G. **Utilização de baixas doses de Desoxicolato de Anfotericina B no tratamento da leishmaniose visceral em crianças e adolescentes**. 2000. 107 f. Dissertação (Mestrado em Pediatria) – Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2000.

CARVALHO-OKANO, R. M. **Estudos taxonômicos do gênero *Maytenus* Mol. emend. Mol (Celastraceae) do Brasil extra amazônico**. 1992. 253 f. Tese (Doutorado em Biologia) - Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1992.

CARVALHO-OKANO, R. M.; LEITÃO FILHO, H. F. O gênero *Maytenus* Mol. emend. Mol. (Celastraceae) no Brasil extra-amazônico. In: REIS, M. S.; SILVA, S. R. (Org.). **Conservação e uso sustentável de plantas medicinais e aromáticas: *Maytenus* spp., espinheira-santa**. Brasília: IBAMA, 2004. p.11-51.

CHANG, F-R.; HAYASHI, K-I.; CHEN, I-H.; LIAW, C-C.; BASTOW, K. F.; NAKANISHI, Y.; NOZAKI, H.; CRAGG, G. M.; WU, Y.-C.; LEE, K.-H. Antitumor agents. 228. Five new agarofurans, Reissantins A-F, and cytotoxic principles from *Reissantia buchananii*. **Journal of Natural Products**, v. 66, p. 1416-1420, 2003.

CHÁVEZ, H.; ESTÉVEZ-BRAUN, A.; RAVELO, A. G.; GONZÁLEZ, A. G. New phenolic and quinone-methide triterpenes from *Maytenus amazônica*. **Journal of Natural Products**, v. 62, p. 434-436, 1999.

CLOREN, C.; CALINGASAN, N. Y.; CHEN, J.; BEAL, M. F. Celastrol protects against MPTP- and 3-nitropropionic acid-induced neurotoxicity. **Journal of Neurochemistry**, v. 94, p. 995-1004, 2005.

COELHO, R. G.; DI STASI, L. C.; VILEGAS, W. Chemical constituents from the infusion of *Zollernia ilicifolia* Vog. and comparison with *Maytenus species*. **Journal of Biosciences**, v. 58, n. 2, p. 47-52, 2003.

CORSINO, J.; BOLZANI, V. S.; PEREIRA, A. M. S.; FRANÇA, S. C.; FURLAN, M. Bioactive sesquiterpene pyridine alkaloids from *Maytenus aquifolium*. **Phytochemistry**, v. 48, n. 1, p. 137-140, 1998a.

CORSINO, J.; BOLZANI, V. S.; PEREIRA, A. M. S.; FRANÇA, S. C.; FURLAN, M. Further sesquiterpene pyridine alkaloids from *Maytenus aquifolium*. **Phytochemistry**, v. 49, n. 7, p. 2181-2183, 1998b.

CORSINO, J.; ALÉCIO, A. L.; RIBEIRO, M. L.; PEREIRA, A. M. S.; DUARTE, I. B.; FRANÇA, S. C.; FURLAN, M. Quantitative determination of Maytenin and 22 β –hydroxymaytenin in callus of *Maytenus aquifolium* (Celastraceae) by reversed phase high performance liquid chromatography. **Phytochemical Analysis**, v. 9, p. 245-247, 1998c.

CORSINO, J.; SILVA, D. H. S.; ZANONI, M. V. B.; BOLZANI, V. S.; FRANÇA, S. C.; PEREIRA, A. M. S.; FURLAN, M. Antioxidant flavan-3-ols and flavonol glycosides from *Maytenus aquifolium*. **Phytotherapy Research**, v. 17, p. 913-916, 2003.

CORSINO, J.; CARVALHO, P. R. F.; KATO, M. J.; OLIVEIRA, O. M. F.; ARAÚJO, A. R.; BOLZANI, V. S.; PEREIRA, A. M. S.; FRANÇA, S. C.; FURLAN, M. Biosynthesis of friedelane and quinomethide triterpenoids is compartmentalized in *Maytenus aquifolium* and *Salacia campestris*. **Phytochemistry**, v. 55, n. 7, p. 741-748, 2000.

COSTA, P. M.; FERREIRA, P. M. P.; BOLZANI, V. S.; FURLAN, M.; SANTOS, V. A. F. F. M.; CORSINO, J.; MORAES, M. O.; COSTA-LOTUFO, L. V.; MONTENEGRO, R. C.; PESSOA, C. Antiproliferative activity of pristimerin isolated of *Maytenus ilicifolia* (Celastraceae) in human HL-60 cells. **Toxicology in Vitro**, v. 22, p. 854-863, 2008.

COURA, J. R.; CASTRO, S. L. A critical review on Chagas disease chemotherapy. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 97, p. 3-24, 2002. Suplemento 1.

- DEEPA, M. A.; BAI, V. N. Antibacterial activity of *Salacia beddomei*. **Fitoterapia: Short Report**, v. 75, p. 589-591, 2004.
- DELGODA, R.; WESTLAKE, A. C. G. Herbal interactions involving cytochrome P450 enzymes. **Toxicological Reviews**, v. 23, n. 4, p. 239-249, 2004.
- DESCOINS, C. J. R.; BAZZOCCHI, I. L.; RAVELO, A. G. New sesquiterpenes from *Euonymus europaeus* (Celastraceae). **Chemical & Pharmaceutical Bulletin**, v. 50, n. 2, p. 199-202, 2002.
- DI STASI, L. C. Aspectos químicos e farmacológicos da espinheira-santa: uma análise da utilidade dos dados. In: REIS, M. S.; SILVA, S. R. (Org). **Conservação e uso sustentável de plantas medicinais e aromáticas: *Maytenus spp.*; espinheira-santa**. Brasília: IBAMA, 2004. p. 204.
- DI STASI, L. C.; GONZALEZ, F. G.; PORTELA, T. Y.; STIPP, E. J. Antiulcerogenic and analgesic effects of *Maytenus aquifolium*, *Sorocea bomplandii* and *Zolernia ilicifolia*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 77, p. 41-47, 2001.
- DUAN, H.; TAKAISHI, Y. Structures of sesquiterpene polyol alkaloids from *Tripterygium hypoglaucum*. **Phytochemistry**, v. 49, n. 7, p. 2185-2189, 1998.
- DUAN, H.; TAKAISHI, Y. Sesquiterpene evoninate alkaloids from *Tripterygium hypoglaucum*. **Phytochemistry**, v. 52, p. 1735-1738, 1999.
- DUAN, H.; KAWAZOE, K.; TAKASAISHI, Y. Sesquiterpene alkaloids from *Tripterygium hypoglaucum*. **Phytochemistry**, v. 45, n. 3, p. 617-621, 1997.
- DUAN, H.; TAKAISHI, Y.; BANDO, M.; KIDO, M.; IMAKURA, Y.; LEE, K. Novel sesquiterpene esters with alkaloids and monoterpene and related compounds from *Tripterygium hypoglaucum*: a new class of potent anti-HIV agents. **Tetraedron Letters**, v. 40, p. 2969-2972, 1999.
- DUAN, H.; TAKAISHI, Y.; MOMOTA, H.; OHMOTO, Y.; TAKI, T.; JIA, Y.; LI, D. Immunosuppressive sesquiterpene alkaloids from *Tripterygium wilfordii*. **Journal of Natural Products**, v. 64, p. 582-587, 2001.

DUAN, H.; KAWAZOE, K.; TAKASAISHI, Y.; IMAKURA, Y.; JIA, Y.; LI, D.; COSENTINO, L. M.; LEE, K. Sesquiterpene alkaloids from *Tripterygium hypoglaucum* and *Tripterygium wilfordii*: a new class of potent anti-HIV agents. **Journal of Natural Products**, v. 63, p. 357-361, 2000.

DUARTE, M. R.; DEBUR, M. C. Stem and leaf morphoanatomy of *Maytenus ilicifolia*. **Fitoterapia**, v. 76, p. 41-49, 2005.

DUDAREVA, N.; ANDERSSON, S.; ORLOVA, I.; GATTO, N.; REICHEL, M.; RHODES, D.; BOLAND, W.; GERSHENZON, J. The nonmevalonate pathway supports both monoterpene and sesquiterpene formation in snapdragon flowers. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 2, n. 3, p. 933-938, 2005.

DUTTA, A.; BANDYOPADHYAY, S.; MANDAL, C.; CHATTERJEE, M. Development of a modified MTT assay for screening antimonial resistant field isolates of Indian visceral leishmaniasis. **Parasitology International**, v. 54, n. 2, p. 119-122, 2005.

EISENREICH, W.; BACHER, A.; ARIGONI, D.; ROHDICH, F. Biosynthesis of isoprenoids via the non-mevalonate pathway. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 61, n. 12, p. 1401-1426, 2004.

EISENREICH, W.; SCHWARZ, M.; CARTAYRADE, A.; ARIGONI, D.; ZENK, M. H.; BACHER, A. The deoxyxylulose phosphate pathway of terpenoid biosynthesis in plants and microorganisms. **Chemistry & Biology**, v. 5, n. 9, p. 221-233, 1998.

FOURNET, A.; MUNÓZ, A. A. R.; MUÑOZ, V.; HOCQUEMILLER, R.; CAVÉ, A.; BRUNETON, J. 2-Substituted quinoline alkaloids as potential antileishmanial drugs. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 37, p. 859-863, 1993.

FRANÇA, S. C.; PEREIRA, A. M. S. Espinheira santa: do estudo à viabilização de um fitoterápico brasileiro contra úlcera gástrica. **P.D: Plantas em Destaque**. p. 67-69, 1997.

FURLAN, M.; BERGAMO, D. C.; KATO, M. J. Biossíntese de produtos naturais: atualidades e perspectivas no desenvolvimento de novos fármacos. In: YUNES, R. A.; CECHINEL FILHO, V. **Química de produtos naturais, novos fármacos e a moderna farmacognosia**. Itajaí: Ed. UVI, 2007. p. 82.

FURR, M.; MAHLBERG, P. G. Histochemical analysis of laticifers and glandular trichomes in *Cannabis sativa*. **Journal of Natural Products**, v. 44, p. 153-159, 1981.

FURUKAWA, M.; MAKINO, M.; UCHIYAMA, T.; ISHIMI, K.; ICHINOHE, Y.; FUJIMOTO, Y. Sesquiterpene pyridine alkaloids from *Hippocratea excelsa*. **Phytochemistry**, v. 59, p. 767-777, 2002.

GAO, J-M.; WU, W-J.; ZHANG, J-W.; KONISHI, Y. The dihydro- β -agarofuran sesquiterpenoids. **Natural Product Reports**, v. 24, p. 1153-1189, 2007.

GERSHENZON, J.; CROTEAU, R. B. Terpenoids biosynthesis: the basic pathway and formation of monoterpenes, sesquiterpenes, and diterpenes. **Lipid Metabolism of Plants**. [S.l.; s.n.], 1993. p. 339-388.

GONZÁLEZ, A. G.; RODRÍGUEZ, F. M.; BAZZOCCHI, I. L.; RAVELO, A. G. New terpenoids from *Maytenus blepharodes*. **Journal of Natural Products**, v. 63, p. 48-51, 2000.

GONZÁLEZ, A. G.; ALVARENGA, N. L.; RAVELO, A. G.; BAZZOCCHI, I. L.; FERRO, E. A.; NAVARRO, A. G.; MOUJIR, L. M. Scutione, a new bioactive norquinonemethide triterpene from *Maytenus scutioides* (Celastraceae). **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 4, n. 6, p. 815-820, 1996a.

GONZÁLEZ, A. G.; ALVARENGA, N. L.; RAVELO, A. G.; JAMENEZ, I. A.; BAZZOCCHI, I. L.; CANELA, N. J.; MOUJIR, L. M. Antibiotic phenol nortriterpenes from *Maytenus canariensis*. **Phytochemistry**, v. 43, n. 1, p. 129-132, 1996b.

GONZÁLEZ, A. G.; RAVELO, A. G.; BAZZOCCHI, I. L.; JIMENES, J.; GONZÁLEZ, C. M.; LUIS, J. G.; FERRO, E. A.; GUTIERREZ, A.; MOUJIR, L.; DE LAS HERAS, F. G. Biological study of triterpenequinones from Celastraceae. **Farmaco**, v. 42, p. 501-505, 1988.

GONZÁLEZ, F. G.; PORTELLA, T. Y.; STIPP, E. J.; DI STASI, L. C. Antiulcerogenic and analgesic effects of three *Maytenus ilicifolia* ("espinheira-santa") adulterants: *Maytenus aquifolium*, *Soracea bomplandii* and *Zollernia ilicifolia*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 77, p. 41-47, 2001.

HEYWOOD, V. H. **Flowering plants of the world**. New York: Oxford University Press, 1996. p. 178-181.

HLWATIKA, C. N. M.; BHAT, R. B. An ecological interpretation of the difference in leaf anatomy and its plasticity in contrasting tree species in Orange Kloof, Table Mountain, South Africa. **Annals of Botany**, v. 89, p. 109-114, 2002.

HIRAI, N.; YOSHIDA, R.; TODOROKI, Y.; OHIGASHI, H. Biosynthesis of abscisic acid by the non-mevalonate pathway in plants, and by the mevalonate pathway in fungi. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v. 64, n. 7, p. 1448-1458, 2000.

HORIUCHI, M.; MURAKAMI, C.; FUKAMIYA, N.; YU, D.; CHEN, T-H.; BASTOW, D-Z.; TAKAISHI, Y.; IMAKURA, Y.; LEE, K-H. Tripfordines A-C, sesquiterpene pyridine alkaloids from *Tripterygium wilfordii*, and structure anti-HIV activity relationships of *Tripterygium* alkaloids. **Journal of Natural Products**, v. 69, p. 1271-1274, 2006.

ITOKAWA, H.; SHIROTA, O.; MORITA, H.; TAKEYA, K.; TOMIOKA, N.; ITAI, A. New triterpene dimers from *Maytenus ilicifolia*. **Tetrahedron Letters**, v. 31, p. 6881-6882, 1990.

ITOKAWA, H.; SHIROTA, O.; MORITA, H.; TAKEYA, K.; LITAKA, Y. Isolation, structural elucidation and conformational analysis of sesquiterpene pyridine alkaloids from *Maytenus ebenifolia* Reiss. X-ray molecular structure of ebenifoline W-I. **Journal of the Chemical Society**. Perkin Transactions 1: Organic and Bio-Organic Chemistry, v. 11, p. 1247-1254, 1993.

JELLER, A. H.; SILVA, D. H. S.; LIÃO, L. M.; BOLZANI, V. S.; FURLAN, M. Antioxidant phenolic and quinonemethide triterpenes from *Cheiloclinium cognatum*. **Phytochemistry**, v. 65, p. 1977-1982, 2004.

JINBO, Z.; MINGAN, W.; WENJUN, W.; ZHIQING, J.; ZHAONONG, H. Insecticidas sesquiterpene pyridine alkaloids from *Euonymus* species. **Phytochemistry**, v. 61, p. 699-704, 2002.

JOFFILY, A.; VIEIRA, R. C. Anatomia foliar de *Maytenus* Mol. emend Mol. (Celastraceae), ocorrente no Estado do Rio de Janeiro, Brasil. **Acta Botanica Brasilica**, v. 19, n. 3, p. 549-561, 2005.

JOHANSEN, D. A. **Plant microtechnique**. New York: McGraw- Hill, 1940.

JORGE, R. M.; LEITE, J. P. V.; OLIVEIRA, A. B.; TAGLIATI. Evaluation of antinociceptive, anti-inflammatory and antiulcerogenic activities of *Maytenus ilicifolia*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 94, p. 93-100, 2004.

JUDD, W. S.; CAMPBELL, C. S.; KELLOG, E. A.; STEVENS, P. F. **Plant systematics**: a phylogenetic approach. Sunderland: Sinauer Associates, 1999.

KLASS, J.; TINTO, W. F.; REYNOLDS, W. F.; McLEAN, S. Peritassinines A and B, new sesquiterpene alkaloids from *Peritassa compta*. **Journal of Natural Products**, v. 56, n. 6, p. 946-948, 1993.

KUMAR, K. B. H.; KUTTAN, R. Inhibition of drug metabolizing enzymes (cytochrome P450) *in vitro* as well as *in vivo* by *Phyllanthus amarus* Schum & Thonn. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 29, n. 7, p. 1310-1313, 2006.

KOUKOL, J.; CONN, E. E. The metabolism of aromatic compounds in higher plants IV. Purification and properties of the phenylalanine deaminase of *Hordeum vulgare*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 236, p. 2692-2698, 1961.

KUO, Y-H.; CHEN, C-H.; KING, M-L.; WU, T-S.; LEE, K-H. Sesquiterpene pyridine alkaloids from *Maytenus emarginata*: emarginatine-C and -D and cytotoxic emarginatine-E and emarginatinine. **Phytochemistry**, v. 35, n. 3, p. 803-807, 1994a.

KUO, Y-H.; KING, M-L.; CHEN, C-F.; CHEN, H-Y.; CHEN, C-H.; CHEN, K.; LEE, K.-H. Two new macrolide sesquiterpene pyridine alkaloids from *Maytenus emarginata*: emarginatine G and the cytotoxic emarginatine F. **Journal of Natural Products**, v. 57, n. 2, p. 263-269, 1994b.

KUO, Y-H.; HUANG, H-C.; CHIOU, W-F.; SHI, L-S.; WU, T-S.; WU, Y. C. A novel NO-production-inhibiting triterpene and cytotoxicity of known alkaloids from *Euonymus laxiflorus*. **Journal of Natural Products**, v. 66, p. 554-557, 2003.

KUO, Y-H.; CHEN, C-H.; YANG KUO, L-M.; KING, M-L.; WU, T-S.; HARUNA, M.; LEE, K.-H. Antitumor agents, 112. Emarginatine B, a novel potent cytotoxic sesquiterpene pyridine alkaloid from *Maytenus emarginata*. **Journal of Natural Products**, v. 53, n. 2, p. 422-448, 1990.

LANA, M.; TAFURI, W. L. *Trypanosoma cruzi* e doença de Chagas. In: NEVES, D. P. **Parasitologia humana**. 10. ed. São Paulo: Atheneu, 2000. p. 73-96.

LEITE, A. C.; LOPES, A. A.; KATO, M. J.; BOLZANI, V. S.; FURLAN, M. Biosynthetic origin of the isoprene units in chromenes of *Piper aduncum* (Piperaceae). **Journal of Brazilian Chemical Society**, v. 18, n. 8, p. 1500-1503, 2007.

LEITE, J. P.; RASTRELLI, L.; ROMUSSI, G.; OLIVEIRA, A. B.; VILEGAS, J. H. Y.; VILEGAS, W.; PIZZA, C. Isolation and HPLC quantitative analysis of flavonoid glycosides from Brazilian beverages (*Maytenus ilicifolia* and *Maytenus aquifolium*). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 49, p. 3796-3801, 2001.

LEGLER, J.; OMANN, M.; DÜVIER, D.; HOLZMÜLLER, H.; GREGOR, W.; SALMONS, B.; GÜNZBURG, W. H.; RENNER, M. Cytochrome P450 reductase dependent inhibition of cytochrome P450 2B1 activity: implications for gene directed enzyme prodrug therapy. **Biochemical Pharmacology**, v. 72, p. 893-901, 2006.

LI, Y.; HUANG, T. H-W.; YAMAHARA, J. *Salacia* root, a unique ayurvedic medicine, meets multiple targets in diabetes and obesity. **Life Sciences**, v. 82, p. 1045-1049, 2008.

LI, Y.; PENG, G.; LI, Q.; WEN, S.; HUANG, T. H-W.; ROUFOGALIS, B. D.; YAMAHARA, J. *Salacia oblonga* improves cardiac fibrosis and inhibits postprandial hyperglycemia in obese Zucker rats. **Life Sciences**, v. 75, p. 1735-1746, 2004.

LIÃO, L. M. **Alcalóides sesquiterpênicos piridínicos e triterpenos quinonametídeos degradados de *Salacia campestris* (Hippocrateaceae)**. 1997. 183 f. Tese (Doutorado em Química Orgânica) – Instituto de Química. Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 1997.

LIÃO, L. M. Sesquiterpene pyridine alkaloids. In: CORDEL, G.A. (Ed.). **The Alkaloids: chemistry and biology**. Amsterdam: Elsevier, 2003. v. 60, p. 1205-1207.

LIÃO, L. M.; SILVA, G. A.; MONTEIRO, M. R.; ALBUQUERQUE, S. Trypanocidal activity of quinonemethide triterpenoids from *Cheiloclinium cognatum* (Hippocrateaceae). **Zeitschrift fuer Naturforschung, C: Journal of Biosciences**, v. 63, n. 3/4, p. 207-210, 2008.

LIÃO, L. M.; VIEIRA, P. C.; RODRIGUES FILHO, E.; FERNANDES, J. B.; SILVA, M. F. G. F. Sesquiterpene pyridine alkaloids from *Peritassa campestris*. **Phytochemistry**, v. 58, p. 1205-1207, 2001.

LOMBARDI, J. A. Nomenclaturais notes on Salacioideae (Celastraceae). **Rodriguésia**, v. 61, n. 1, p. 123-125, 2010.

LOPES, A. A.; BALDOQUI, D. C.; LÓPEZ, S. N.; KATO, M. J.; BOLZANI, V. S.; FURLAN, M. Biosynthetic origins of the isoprene units of gaudichaudianic acid in *Piper gaudichaudianum* (Piperaceae). **Phytochemistry**, v. 68, p. 2053-2058, 2007.

MACEDO JUNIOR, F. C. Espectroscopia de ressonância magnética nuclear de ^{13}C no estudo de rotas biossintéticas de produtos naturais. **Química Nova**, v. 30, n. 1, p. 116-124, 2007.

McGARVEY, D. J.; CROTEAU, R. Terpenoid metabolism. **Plant Cell**, v. 7, n. 7, p. 1015-1026, 1995.

MARTIN, J. D. The structure of dispermoquinone. A triterpenoid quinine methide from *Maytenus dispermus*. **Tetrahedron**, v. 29, p. 2997-3000, 1973.

MATOS, F. J. A. Introdução. In: _____. **Introdução à fitoquímica experimental**. 2. ed. Fortaleza: Ed. UFC, 1997. p. 13.

METCALFE, C. R.; CHALK, L. **Anatomy of the dicotyledons: leaves, stems and wood in relation taxonomy with notes in economic uses**. Oxford: Clarendon Press, 1957. v. 2, p. 387-397.

MOELLERING, R. C.; GRAYBILL, J. R.; MCGOWAN, J. E.; COREY, L. Antimicrobial resistance prevention initiative an update: proceedings of an expert panel on resistance. **America Journal of Medicine**, v. 7, n. 120, p. 4-25 2007.

MONTAGNAC, R.; BOKOWY, C.; CIUPEA, A.; DELAGNE, J. M.; SCHILLINGER, F. Fungal sinusitis from endodontic origin. Some reflexions about an observation by an hemodialyzed patient. **Néphrologie & Thérapeutique**, v. 2, p. 87-92, 2006.

- MOUJIR, L.; GUTIÉRREZ-NAVARRO, A. M.; GONZÁLEZ, A. G.; RAVELO, A. G.; LUIS, J. G. The relationship between structure and antimicrobial activity in Quinones from the Celastraceae. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 18, n. 1, p. 25-28, 1990.
- MUELAS-SERRANO, S.; NOGAL-RUIZ, J. J.; GÓMEZ-BARRIO, A. Setting of a colorimetric method to determine the viability of *Trypanosoma cruzi* epimastigotas. **Parasitology Research**, v. 86, n.12, p. 999-1002, 2000.
- MURATALIEV., M. B.; FEYEREISEN, R.; WALKER, F. Electron transfer by diflavin reductases. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1698, p. 1-26, 2004.
- NAKAGAWA, H.; TAKAISHI, Y.; FUJIMOTO, Y.; DUQUE, C.; GARZON, C.; SATO, M.; OKAMOTO, M.; OSHIKAWA, T.; AHMED, S. U. Chemical constituents from the colombian medicinal plant *Maytenus laevis*. **Journal of Natural Products**, v. 67, p. 1919-1924, 2004.
- NAKAO, H.; SENOKUCHI, K.; UMEBAYASHI, C.; KANEMARU, K.; MASUDA, T.; OYAMA, Y.; YONEMORI. Cytotoxic activity of maytanprine isolated from *Maytenus diversifolia* in human leukemia K562 cells. **Biology Pharmacology Bulletin**, v. 28, n. 8, p. 1236-1240, 2004.
- NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS. **Método de referência para testes de diluição em caldo para determinação da sensibilidade de leveduras à terapia antifúngica**. 2. ed. Washington, 2002, v. 22, n. 15.
- NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural products as sources of new drugs over the last years. **Journal of Natural Products**, v. 70, n. 3, p. 461-477, 2007.
- NOSSACK, A. C.; CELEGHINI, R. M. S.; LANÇAS, F. M. YARIWAKE, J. H. HPLC-UV and LC-MS analysis of quinonemethides triterpenes in hydroalcoholic extracts of "espinheira santa" (*Maytenus aquifolium* Martius, Celastraceae) leaves. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 15, n. 4. p. 582-586, 2004.
- NÚÑEZ, M. J.; LÓPEZ, M. R.; JIMÉNEZ, I. A.; MOUJIR, L. M.; RAVELO, A. G.; BAZZOCCHI, I. L. First examples of tetracyclic triterpenoids with a *D:B*-friedobaccharane skeleton. A tentative biosynthetic route. **Tetrahedron Letters**, v. 45, p. 7367-7370, 2004a.

- NÚÑEZ, M. J.; GUADAÑO, A.; JIMÉNEZ, I. A.; RAVELO, A. G.; GONZÁLEZ-COLOMA, A.; BAZZOCCHI. Insecticidal sesquiterpene pyridine alkaloids from *Maytenus chiapensis*. **Journal of Natural Products**, v. 67, p. 14-18, 2004b.
- O'FARREL, P. H. High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. **Journal of Biological Chemistry**, v. 250, p. 4007, 1975.
- OHSAKI, A.; IMAI, Y.; NARUSE, M.; AYABE, S.; KOMIYAMA, K.; TAKASHIMA, J. Four new triterpenoids from *Maytenus ilicifolia*. **Journal of Natural Products**, v. 67, p. 469-471, 2004.
- OLIVEIRA, D. M.; SILVA, G. D. F.; DUARTE, L. P.; VIEIRA, S. A. F. Chemical constituents isolated from roots of *Maytenus acanthophylla* Reissek (Celastraceae). **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 34, 661-665, 2006.
- OLIVEIRA, R. B.; ALVES, R. J. Agentes antineoplásicos biorredutíveis: uma nova alternativa para o tratamento de tumores sólidos. **Química Nova**, v. 25, n. 6, p. 976-984, 2002.
- PEREA, S.; PATTERSON, T. F. Antifungal resistance in pathogenic fungi. **Clinical Infectious Diseases**, v. 35, p. 1073-1080, 2002.
- PIACENTE, S.; TOMMASI, N.; COSIMO, P. Laevisines A and B: two new sesquiterpene-pyridine alkaloids from *Maytenus laevis*. **Journal of Natural Products**, v. 62, n. 1, p. 161-163, 1999.
- PIMENTA, A. A. J.; SILVA, S. R. S.; SILVA, G. D. F.; BARBOSA, L. C. A.; ELLENA, J.; DORIGUETO, A. C. A pentacyclic triterpene from *Maytenus imbricata*: structure elucidation by X-ray crystallography. **Structure Chemical**, v. 17, p. 149-153, 2006.
- PINTO, A. C.; SILVA, D. H. S.; BOLZANI, V. S.; LOPES, N. P.; EPIFANIO, R. P. Current status, challenges and trends on natural products in Brazil. **Química Nova**, v. 25, n. 1, p. 45-61, 2002.
- PRATA, R. R.; MENDONÇA, M. S. Estudo anatômico do xilema secundário da raiz e do caule de *Maytenus guyanensis* Klotzsch ex Reissek (Celastraceae). **Acta Amazonica**, v. 39, n. 2, p. 261-266, 2009.

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

REY, L. **Parasitologia**: parasitos e doenças parasitárias do homem nas Américas e na África. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001.

RODRIGUES FILHO, E.; BARROS, F. A. P.; FERNANDES, J. B.; SILVA, M. F. G. F. Studies towards the detection and identification of sesquiterpene pyridine alkaloids in *Peritassa campestris* by mass spectrometry. **Phytochemical Analysis**, v. 12, p. 185-193, 2001.

RODRÍGUEZ, F. M.; LÓPEZ, M. R.; JIMÉNEZ, I. A.; MOUJIR, L.; RAVELO, A. G.; BAZZOCCHI, I. L. New phenolic triterpenes from *Maytenus blepharodes*. Semisynthesis of 6-deoxoblepharodol from pristimerin. **Tetrahedron**, v. 61, p. 2513-2519, 2005.

ROHMER, A. The discovery of a mevalonate-independent pathway for isoprenoid biosynthesis in bacteria, algae and higher plants. **Natural Product Reports**, v. 16, n. 5, p. 565-574, 1999.

RUBIN, R. H. Infectious disease complications of renal transplantation. **Kidney International**, v. 44, p. 221-236, 1993.

SANTOS, N. C.; CASTANHO, M. A. R. B. Liposomes: has the Magic bullet hit the target? **Química Nova**, v. 25, p. 1181, 2002.

SAÚDE-GUIMARÃES, D. A.; FARIA, A. R. Substâncias da natureza com atividade anti-*Trypanosoma cruzi*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.17, n. 3, p. 455-465, 2007.

SENIOR, K. Chagas disease: moving towards global elimination. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 7, n. 9, p. 572, 2007.

SHIROTA, O.; MORITA, H.; TAKEYA, K.; ITOKAWA, H. Five new triterpene dimmers from *Maytenus ilicifolia*. **Journal of Natural Products**, v. 60, p. 1100-1104, 1997.

- SHIROTA, O.; MORITA, H.; TAKEYA, K.; ITOKAWA, H.; IITAKA, Y. Cytotoxic aromatic triterpenes from *Maytenus ilicifolia* and *Maytenus chuchuhusca*. **Journal of Natural Products**, v. 57, n. 12, p. 1675-1681, 1994.
- SHIROTA, O.; SEKITA, S.; SATAKE, M.; MORITA, H.; TAKEYA, K.; ITOKAWA, H. Two cangorosin A type triterpene dimers from *Maytenus chuchuhusca*. **Chemical Pharmacological**, v. 52, n. 9, p. 1148-1150, 2004.
- SHIROTA, O.; SETSUKO, S.; MOTOYOSHI, S.; MORITA, H.; TAKEYA, K.; ITOKAWA, H. Two new sesquiterpene pyridine alkaloids from *Maytenus chuchuhusca*. **Heterocycles**, v. 63, n. 8, p. 1891-1896, 2004.
- SILVA, S. R. S.; SILVA, G. D. F.; BARBOSA, L. C. A.; DUARTE, L. P.; VIEIRA FILHO, S. A. Lupane pentacyclic triterpenes isolated from stems and branches of *Maytenus imbricata* (Celastraceae). **Helvetica Chimica Acta**, v. 88, p. 1102-1109, 2005.
- SILVEIRA J. F. da; ABRAHAMSOHN, P. A.; COLLI, W. Plasma membrane vesicles isolated from epimastigote forms of *Trypanosoma cruzi*. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 550, p. 222-232, 1979.
- SIMONS, M. P. Celastraceae. In: KUBITZKI, K. (Ed.). **The families and genera of vascular plants**. Berlin: Springer, 2004. v. 6, p. 29-64.
- SIMMONS, M. P.; SAVOLAINEN, V.; CLEVINGER, C. C.; ARCHER, R. H.; DAVIS, J. I. Phylogeny of the Celastraceae inferred from 26 S nuclear ribosomal DNA, phytochrome B, rbc1 atp B, and morphology. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 19, p. 353-366, 2001.
- SMITH, A. C. The American species of Hippocrateaceae. **Brittonia** 3, v. 3, n. 3, p. 341-356, 1940.
- SOARES, L. A. L.; OLIVEIRA, A. L.; ORTEGA, G. G.; PETROVICK, P. R. Development and validation of a LC-method for determination of catechin and epicatechin in aqueous extractives from leaves of *Maytenus ilicifolia*. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 36, p. 787-790, 2004.
- SOLEREDER, H. **Systematic anatomy of the dicotyledons II**. Oxford: Clarendon Press, 1908. p. 874-880.

- SPIVEY, A. C.; WESTON, M. S. Celastraceae sesquiterpenoids: biological activity and synthesis. **Chemical Society Reviews**, v. 31, p. 43, 2002.
- STANGARLIN, J. R.; SCHWAN-ESTRADA, K. R. F.; CRUZ, M. E. S.; NOZAKI, M. H. Plantas medicinais e controle alternativo de fitopatógenos. **Biotecnologia: Ciência & Desenvolvimento**, n. 11, p. 16-21, 1999.
- STOSCHECK, C. M. **Methods in Enzymology**: guide to protein purification. San Diego: Academic Press, 1990. p. 63
- TAKHTAJAN, A. **Diversity and classification of flowering plants**. New York: Columbia University Press, 1997.
- TANAKA, N.; OOBA, N.; DUAN, H.; TAKAISHI, Y.; NAKANISHI, Y.; BASTOW, K.; LEE, KUO-HSIUNG. Kaurane and abietane diterpenoids from *Tripterygium doianum* (Celastraceae). **Phytochemistry**, v. 65, p. 2071-2076, 2004.
- THAIR, A. E.; SATTI, G. M. H.; KHALID, S. A. Antiplasmodial activity of selected Sudanese medicinal plants with emphasis on *Maytenus senegalensis* (Lam.) exell. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 64, p. 227-233, 1999.
- URLACHER, V. B.; LUTZ-WAHL, S.; SCHMID, R. D. Microbial P450 enzymes in biotechnology. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 64, p. 317-325, 2004.
- VILEGAS, W.; SANOMIMIYA, M.; RASTRELLI, L.; PIZZA, C. Isolation and structure of two flavonoid glycosides from the infusion of *Maytenus aquifolium* leaves. Evaluation of the antiulcer activity of the infusion. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 47, p. 403, 1999.
- VILEGAS, W.; LEITE, J. P.; RASTRELLI, L.; ROMUSSI, G.; OLIVEIRA, A. B.; VILEGAS, J. H. Y.; PIZZA, C. Isolation and HPLC quantitative analysis of flavonoid glycosides from Brazilian beverages (*Maytenus ilicifolia* and *Maytenus aquifolium*). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 49, p. 3796-3801, 2001.
- VINHAES, M. C.; DIAS, J. C. P. Doença de Chagas no Brasil. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 16, p. 16-17, 2000.

- WATANABE, K. Exploring the biosynthesis of natural products and their inherent suitability for the rational design of desirable compounds through genetic engineering. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, v. 72, n. 10, p. 2491-2506, 2008.
- WHITSON, E. L.; MALA, S. M. V. D.; VELTRI, C. A.; BUGNI, T. S.; SILVA, E. D.; IRELAND, C. M. Oppositines A and B, sesquiterpene pyridine alkaloids from a Sri Lankan *Pleurostyliia opposita*. **Journal of Natural Products**, v. 69, p. 1833-1835, 2006.
- WILLIAMS, J. A.; CHOE, Y. S.; NOSS, M. J.; BAUMGARTNER, C. J.; MUSTAD, V. A. Extract of *Salacia oblonga* lowers acute glycemia in patients with type 2 diabetes. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 86, n.1, p. 124-130, 2007.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Tropical disease research: progress 1997-1998**. Geneva, 1999.
- XIA, W. J.; LI, D. R.; SHI, L.; TU, Y. Q. A novel approach for construction of the naturally occurring dihydroagarofuran sesquiterpene skeleton. **Tetrahedron Letters**, v. 43, n. 4, p. 627-630, 2002.
- YANG, D. M.; LIEW, F.Y. Effects of qinghaosu (artemisin) and its derivatives on experimental cutaneous leishmaniasis. **Parasitology**, v.106, p 7-11, 1992.
- YANG, H.; CHEN, D.; CUI, Q. C.; YUAN, X.; DOU, P. Celastrol, a triterpene extracted from Chinese "Thunder of God Vine", Is a potent proteasome inhibitor and suppresses human prostate cancer growth in nude mice. **Cancer Research**, v. 66, n. 9, p. 4758-4765, 2006.
- YOSHIKAWA, M.; SHIMODA, H.; NISHIDA, N.; TAKADA, M.; MATSUDA, H. *Salacia reticulata* and its polyphenolic constituents with lipase inhibitory and lipolytic activities have mild antiobesity effects in rats. **The Journal of Nutrition**, v. 132, p. 1819-1824, 2002.