



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE SANTA CRUZ – UESC**  
**PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

**TRITERPENOS ISOLADOS DE GALHOS DE *Pouteria macahensis***  
**T. D. Penn COM ÊNFASE A AÇÃO ANTIBACTERIANA FRENTE À**  
***Proteus mirabilis***

**GABRIEL DA SILVA AMARAL**

Ilhéus

2017

**GABRIEL DA SILVA AMARAL**

**TRITERPENOS ISOLADOS DE GALHOS DE *Pouteria macahensis* T. D. Penn COM ÊNFASE A AÇÃO ANTIBACTERIANA FRENTE À *Proteus mirabilis***

Dissertação apresentada à Universidade Estadual de Santa Cruz, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Química.

Linha de pesquisa: Química dos Produtos Naturais

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Rosilene Aparecida de Oliveira

Co-Orientador: Prof. Dr. Fernando Faustino de Oliveira

Ilhéus

2017

A485 Amaral, Gabriel da Silva.  
Triterpenos isolados de galhos de *Pouteria macahensis* T.D.  
Penn com ênfase a ação antibacteriana frente à *Proteus mirabilis* /  
Gabriel da Silva Amaral. – Ilhéus : UESC, 2017.  
xvi, 128f.  
Orientadora : Rosilene Aparecida de Oliveira.  
Co-orientador : Fernando Faustino de Oliveira.  
Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual de Santa  
Cruz. Programa de Pós-graduação em Química.  
Inclui referências.

Biomassa florestal – Bahia, Sul. 2. Mata atlântica. 3. Farma-  
cologia – Produtos naturais. 4. Química orgânica. I. Oliveira, Ro-  
silene Aparecida de. II. Oliveira, Fernando Faustino de. III. Título.

CDD – 553.098142

GABRIEL DA SILVA AMARAL

TRITERPENOS ISOLADOS DE GALHOS DE *Pouteria macahensis* T. D. PENN  
COM ÊNFASE A AÇÃO ANTIBACTERIANA FRENTE A *Proteus mirabilis*

Ilhéus-BA, 25 janeiro de 2017

COMISSÃO EXAMINADORA:



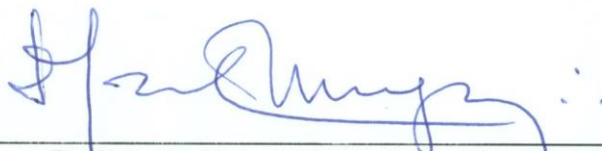
---

Prof(a). Dra. Rosilene Aparecida de Oliveira  
Doutora em Química - UFMG  
Universidade Estadual de Santa Cruz  
Orientador(a)



---

Prof(a). Dra. Carla Fernanda Fávaro (UESC)  
Doutora em Química - UFP  
Universidade Estadual de Santa Cruz - UESC



---

Prof(a). Dr. Djalma Menezes de Oliveira (UESB)  
Doutor em Química - UFMG  
Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia

*À Deus, pois ele tem me dado força e sabedoria para lutar contra as dificuldades da vida, aos meus pais Miravaldo e Carmem por serem mais que amigos nos momentos difíceis. E meus irmãos e amigos por todo carinho e companheirismo para que hoje estivesse vencendo mais esta etapa da minha vida.*

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus por ter me permitido forças para terminar este trabalho, e assim ter a oportunidade de vencer mais essa etapa da vida.

Aos meus pais Mirivaldo e Carmem, por todos os ensinamentos, educação, por sempre terem me dado suporte para que chegasse com êxito nessa fase da vida e pela compreensão nos momentos de dificuldade.

Aos meus irmãos Tiago, Elton, e Tatiana pelo incentivo e motivação e que sempre torceram pelo meu sucesso.

Aos meus avós Maria Rosa e Joaquim Amaral (*in memoriam*) e Maria de Lourdes (*in memoriam*) e João Augusto (*in memoriam*).

Aos amigos Talita Mendes, Jéssica Santana, Romário Rocha, Sidnei Silva e Tádía Campos pelos inúmeros conselhos e ajudas, sendo muitas vezes a minha segunda família.

Aos meus amigos e colegas da graduação e pós-graduação por compartilharem comigo desde os primeiros momentos nessa jornada. Em especial a Bruna Bernardes pela ajuda prestada nos momentos de sufoco e por estar sempre ao meu lado quando mais precisei me fazendo rir ou incentivando a continuar mesmo que fosse com um simples olhar ou abraço. Você me ajudou e muito para que hoje eu esteja vencendo essa etapa que é o mestrado.

Aos amigos conquistados no movimento EJC (Encontro de Jovens com Cristo) Jardim Primavera por todas as orações e companheirismo.

Aos companheiros do LPPNS Manoel, Hemerson, Luhyris, Rândilla, Thiago, Iago e Rafaela pela oportunidade única de ter convivido e ter dividido e também aprendido tantos conhecimentos no campo da pesquisa e da vida.

À Ivana Silva Lula pela aquisição dos espectros de Ressonância Magnética Nuclear, na Universidade Federal de Minas Gerais, e ao Grupo de Pesquisa Bioma pela aquisição dos espectros no Infravermelho, na UESC.

A Profa Aline Oliveira Conceição pelo apoio na realização dos testes microbianos.

À minha orientadora Rosilene Aparecida de Oliveira, pessoa iluminada que Deus colocou em meu caminho. E ao meu coorientador Fernando Faustino de Oliveira que contribui e muito para a realização desse trabalho, sempre auxiliando e contribuindo com muita excelência, paciência e sabedoria. Obrigado pela orientação, compreensão, compromisso, competência com a qual me tratou e balizou esse trabalho.

Agradeço também a banca examinadora pela gentileza em aceitar o convite para poder me avaliar.

A Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Bahia FABESB pela bolsa concedida.

A todos os professores do Programa de Pós-Graduação em Química da UESC e aos demais, que convivi desde os anos iniciais na escola até a graduação, por todos os ensinamentos que serão levados pela minha vida e por terem contribuído para a formação.

*A menos que modifiquemos à nossa maneira de pensar, não seremos capazes de resolver os problemas causados pela forma como nos acostumamos a ver o mundo.*

*Albert Einstein*



## RESUMO

No restante da Mata Atlântica na Região Sul da Bahia existem várias espécies vegetais endêmicas, desconhecidas do ponto de vista da Química de Produtos Naturais. Os metabólitos secundários presentes nessas espécies podem apresentar potencial farmacológico que auxiliam no combate a infecções bacterianas. Este trabalho apresenta resultados de isolamento de substâncias do extrato acetônico dos galhos de *Pouteria macahensis* T. D. Penn, espécie endêmica do bioma da Mata Atlântica, coletado em 2014. Os extratos brutos (acetônico, hexânico e etanólico) foram avaliados frente a bactérias Gram positivo e negativo, por biocromatografia. O extrato acetônico apresentou melhor ação frente a bactéria *Proteus mirabilis*. Foi cromatografado 60g do extrato acetônico em coluna de sílica gel (1.500 g) usando solventes orgânicos em série crescente de polaridade hexano e etanol, puro e em misturas, sendo obtidos 14 grupos. Após uso de técnicas de recristalização e cromatografia em coluna e preparativa, foram isolados e identificados mistura de friedelina e 3 $\beta$ -hidroxifriedelano (Grupo PM-A. 03 e PM-A. 04), 3 $\beta$ -hidroxifriedelano (PM-A. 04), mistura de linoato, araquidato e linolenato de eritrodilila (grupo PM-A. 04) e outro eritrodilol esterificado com ácido graxo de cadeia longa, não elucidado (grupo PM-A-6); além de outros derivados de ácidos graxos de cadeia longa não identificados. Os ésteres graxos de eritrodilol foram transesterificados levando ao isolamento do eritrodilol. As determinações estruturais foram realizadas a partir dos experimentos de IV, RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ , DEPT – 135, HSQC, HMBC e comparação com dados da literatura. A mistura dos ésteres de eritrodilol está sendo relatadas pela primeira vez no gênero. Foi determinado a concentração mínima inibitória (CMI) das substâncias frente a bactéria *P. mirabilis*, usando a técnica de microdiluição em caldo. As CMI para *P. mirabilis* foi maior ou igual a 500  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , para as substâncias friedelina e eritrodilol, sendo esse de ação mais forte; e maior que 600  $\mu\text{g mL}^{-1}$  para 3 $\beta$ -hidroxifriedelinol e ésteres de eritrodilol. Dessas substâncias, somente existe relatos de teste para a friedelina. O presente estudo é de grande importância, uma vez que contribui com informações sobre a composição química dos metabólitos secundários para uma espécie endêmica que apresenta atividade frente *P. mirabilis*, bactéria causadora de infecções urinárias.

**Palavras-chaves:** Sapotaceae, espécie endêmica, identificação estrutural.

## ABSTRACT

In the rest of the Atlantic Forest in the Southern Region of Bahia there are several endemic plant species, unknown from the point of view of Natural Product Chemistry. Secondary metabolites, present in these species, may present biological potential helping to combat bacterial infections. This work presents results of isolation of substances from the acetone extract of the branches of *Pouteria macahensis* T. D. Penn, endemic species of Itacaré, Bahia, collected in 2014. The crude extracts (acetone, hexane and ethanolic) were evaluated in the set of bacteriasgram positive and negative, by bioacromatography. The acetone extract presented better action in relation to the bacteria *Proteus mirabilis*. Chromatographed 60g of the acetonic extract on a silica gel column using organic solvents in increasing series of hexane and ethanol polarity, pure and in mixtures, 14 groups were obtained. After using recrystallization and column chromatography and preparative techniques, a mixture of friedelin and 3 $\beta$ -hydroxyfriedelane (Group PM-A 03 and PM-A 04), 3 $\beta$ -hydroxyfriedelane (PM-A 04) were isolated and identified. Mixture of erythrodiol linoate, arachidate and linolenoate (group PM-A 04) and erythrodiol transesterified with long chain fatty acid, not yet elucidated (group PM-A-6); As well as long chain fatty acid derivatives (unidentified). The erythrodiol esters were transesterified leading to erythrodiol isolation. Structural determinations were performed from the experiments, IV, RMN of  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$ , DEPT – 135, HSQC, HMBC and comparison with literature data. Mixtures of erythrodiol esters are being reported for the first time in the genus. The minimum inhibitory concentration (MIC) of the substances against the *P. mirabilis* bacterium was determined using the broth microdilution technique. The MIC for *P. mirabilis* was greater than or equal to 500  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , for the substances friedelin and erythrodiol, which is stronger; And greater than 600  $\mu\text{g mL}^{-1}$  for  $\beta$ -friedelinol and erythrodiol esters. Of these substances, only friedelin was tested in comparison with this microorganism. The present study has great importance, since it contributes with point information about the chemical composition of the secondary metabolites to an endemic species that shows activity in relation to *P. mirabilis*, a bacterium that causes urinary infections.

**Keywords:** Sapotaceae, endemic species, structural identification.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Mapa dos Remanescentes Florestais da Mata Atlântica no Brasil 2013-2014 .....	20
Figura 2 – Distribuição da família Sapotaceae no mundo .....	22
Figura 3 – Distribuição da família Sapotaceae na América do Sul .....	23
Figura 4 – Distribuição do gênero <i>Pouteria</i> na América do Sul .....	24
Figura 5 – Distribuição da espécie <i>Pouteria macahensis</i> na América do Sul .....	25
Figura 6 – Estrutura dos principais metabolitos isolados no gênero .....	38
Figura 7 – Esquema resumido da biossíntese dos terpenos .....	39
Figura 8 – Rota biossintética de alguns esqueletos de triterpenos pentacíclicos .....	41
Figura 9 – Fluxograma de preparação dos extratos dos galhos de <i>P. macahensis</i> .....	48
Figura 10 – Esquema geral do fracionamento em coluna cromatográfica do extrato acetônico de <i>P. macahensis</i> (PM-A) .....	50
Figura 11 – Esquema da purificação das substâncias presentes no grupo PM-A.03 .....	51
Figura 12 – Esquema geral da partição líquido-líquido do grupo PM-A.04 .....	52
Figura 13 – Purificação das substâncias presentes no material PM-A.04.H .....	52
Figura 14 – Grupos obtidos na coluna cromatográfica do material PM-A.4.1 .....	53
Figura 15 – Esquema de purificação das substâncias presentes no material PM-A.4.1.G5 .....	54
Figura 16 – Extratos obtidos através da maceração dos galhos de <i>P. macahensis</i> .....	57
Figura 17 – Espectro na região do infravermelho (KBr) do extrato acetônico (PM-A) .....	58
Figura 18 – Espectro na região do infravermelho (KBr) do extrato hexânico (PM-H) .....	59
Figura 19 – Espectro na região do infravermelho (KBr) do extrato etanólico (PM-E) .....	59
Figura 20 – Substâncias isoladas e identificadas do fracionamento do extrato bruto acetônico (PM-A) .....	61
Figura 21 – Espectro no infravermelho (KBr) dos derivados de ácidos graxos (substância 1) .....	63
Figura 22 – Estruturas da friedelina (A) e 3 $\beta$ -hidroxifriedelano (B) .....	65
Figura 23 – Núcleo do esqueleto friedelano .....	65
Figura 24 – Espectro no infravermelho (KBr) da mistura friedelina/3 $\beta$ -hidroxifriedelano (substância 2) .....	67
Figura 25 – Espectro de RMN $^1\text{H}$ ( $\text{CDCl}_3$ + piridina- $d_5$ , 400 MHz) da mistura friedelina/3 $\beta$ -hidroxifriedelano (substância 2) .....	68
Figura 26 – Ampliação da região $\delta$ 4,0 – 2,1 do espectro de RMN $^1\text{H}$ ( $\text{CDCl}_3$ + piridina- $d_5$ , 400 MHz) da mistura friedelina/3 $\beta$ -hidroxifriedelano (substância 2) .....	69
Figura 27 – Ampliação da região $\delta$ 0,7 – 2,1 do espectro de RMN $^1\text{H}$ ( $\text{CDCl}_3$ + piridina- $d_5$ , 400 MHz) da mistura friedelina/3 $\beta$ -hidroxifriedelano (substância 2) .....	70
Figura 28 – Espectro de RMN $^{13}\text{C}$ ( $\text{CDCl}_3$ + piridina- $d_5$ , 100 MHz) da mistura friedelina/3 $\beta$ -hidroxifriedelano (substância 2) .....	71
Figura 29 – Ampliação da região $\delta$ 34,9 – 73,0 do espectro de RMN $^{13}\text{C}$ ( $\text{CDCl}_3$ + piridina- $d_5$ , 100 MHz) da mistura friedelina/3 $\beta$ -hidroxifriedelano (substância 2) .....	72
Figura 30 – Ampliação da região $\delta$ 35,2 – 0,0 do espectro de RMN $^{13}\text{C}$ ( $\text{CDCl}_3$ + piridina- $d_5$ , 100 MHz) da mistura friedelina/3 $\beta$ -hidroxifriedelano (substância 2) .....	73

Figura 31 – Espectro de RMN DEPT-135 (CDCl <sub>3</sub> + piridina-d <sub>5</sub> , 100 MHz) da mistura friedelina/3β-hidroxifriedelano (substância 2) .....	74
Figura 32 – Estrutura do 3β-hidroxifriedelano .....	76
Figura 33 – Correlações observadas a partir do experimento HMBC para o 3β-hidroxifriedelano (substância 4) .....	77
Figura 34 – Espectro no infravermelho (KBr) do 3β-hidroxifriedelano (substância 4) .....	78
Figura 35 – Espectro de RMN <sup>1</sup> H (CDCl <sub>3</sub> + piridina-d <sub>5</sub> , 400 MHz) do 3β-hidroxifriedelano (substância 4) .....	79
Figura 36 – Ampliação da região δ 0,2 – 4,0 do espectro de RMN <sup>1</sup> H (CDCl <sub>3</sub> + piridina-d <sub>5</sub> , 400 MHz) do 3β-hidroxifriedelano (substância 4) .....	80
Figura 37 – Espectro de RMN <sup>13</sup> C (CDCl <sub>3</sub> + piridina-d <sub>5</sub> , 100 MHz) do 3β-hidroxifriedelano (substância 4) .....	81
Figura 38 – Ampliação da região δ 28,0 – 75,0 do espectro de RMN <sup>13</sup> C (CDCl <sub>3</sub> + piridina-d <sub>5</sub> , 100 MHz) do 3β-hidroxifriedelano (substância 4) .....	82
Figura 39 – Ampliação da região δ 0,0 – 29,0 do espectro de RMN <sup>13</sup> C (CDCl <sub>3</sub> + piridina-d <sub>5</sub> , 100 MHz) do 3β-hidroxifriedelano (substância 4) .....	83
Figura 40 – Espectro de RMN DEPT-135 (CDCl <sub>3</sub> + piridina-d <sub>5</sub> , 100 MHz) do 3β-hidroxifriedelano (substância 4) .....	84
Figura 41 – Principais correlações de H-C observadas no experimento de HSQC (CDCl <sub>3</sub> + piridina-d <sub>5</sub> , 400 MHz) do 3β-hidroxifriedelano (substância 4) .....	85
Figura 42 – Principais correlações de H-C observadas no experimento de HMBC (CDCl <sub>3</sub> + piridina-d <sub>5</sub> , 400 MHz) do 3β-hidroxifriedelano (substância 4) .....	86
Figura 43 - Correlações observadas a partir do experimento HMBC para o eritrodiolesterificado (substância 7) .....	89
Figura 44 – Estrutura do eritrodiolesterificado sem (C) e com grupo éster (D) .....	89
Figura 45 – Reação de transesterificação .....	90
Figura 46 - Correlações observadas a partir do experimento HMBC para o eritrodiolesterificado (substância 7) .....	91
Figura 47 – Espectro no infravermelho (KBr) do linoato, araquidato e linolenoato de eritrodiolesterificado (substância 6) .....	92
Figura 48 – Espectro de RMN <sup>1</sup> H (CDCl <sub>3</sub> , 400 MHz) do linoato, araquidato e linolenoato de eritrodiolesterificado (substância 6) .....	93
Figura 49 – Ampliação da região δ 2,2 – 5,5 do espectro de RMN <sup>1</sup> H (CDCl <sub>3</sub> , 400 MHz) do linoato, araquidato e linolenoato de eritrodiolesterificado (substância 6) .....	94
Figura 50 – Ampliação da região δ 0,7 – 2,1 do espectro de RMN <sup>1</sup> H (CDCl <sub>3</sub> , 400 MHz) do linoato, araquidato e linolenoato de eritrodiolesterificado (substância 6) .....	95
Figura 51 – Espectro de RMN <sup>13</sup> C (CDCl <sub>3</sub> , 100 MHz) do linoato, araquidato e linolenoato de eritrodiolesterificado (substância 6) .....	96
Figura 52 – Ampliação da região δ 70,0 – 175,0 do espectro de RMN <sup>13</sup> C (CDCl <sub>3</sub> , 100 MHz) do linoato, araquidato e linolenoato de eritrodiolesterificado (substância 6) .....	97
Figura 53 – Ampliação da região δ 13,0 – 56,0 do espectro de RMN <sup>13</sup> C (CDCl <sub>3</sub> , 100 MHz) do linoato, araquidato e linolenoato de eritrodiolesterificado (substância 6) .....	98

Figura 54 – Espectro de RMN DEPT-135 (100 MHz) do linoato, araquidato e linolenoato de eritrodiol (substância 6) .....	99
Figura 55 – Principais correlações de H-C observadas no experimento de HSQC (CDCl <sub>3</sub> , 400 MHz) do linoato, araquidato e linolenoato de eritrodiol (substância 6) .....	100
Figura 56 – Expansão (A) da correlação de H-C observadas no experimento de HSQC (CDCl <sub>3</sub> , 400 MHz) do linoato, araquidato e linolenoato de eritrodiol (substância 6) .....	101
Figura 57 – Expansão (B) da correlação de H-C observadas no experimento de HSQC (CDCl <sub>3</sub> , 400 MHz) do linoato, araquidato e linolenoato de eritrodiol (substância 6) .....	102
Figura 58 – Principais correlações de H-C observadas no experimento de HMBC (CDCl <sub>3</sub> , 400 MHz) do linoato, araquidato e linolenoato de eritrodiol (substância 6) .....	103
Figura 59 – Espectro de RMN <sup>1</sup> H (CDCl <sub>3</sub> , 400 MHz) do eritrodiol transesterificado (substância 7) .....	104
Figura 60 – Espectro de RMN <sup>13</sup> C (CDCl <sub>3</sub> , 100 MHz) do eritrodiol transesterificado (substância 7) .....	105
Figura 61 – Principais correlações de H-C observadas no experimento de HSQC (CDCl <sub>3</sub> , 400 MHz) do eritrodiol transesterificado (substância 7) .....	106
Figura 62 - Expansão (A) da correlação de H-C observadas no experimento de HSQC (CDCl <sub>3</sub> , 400 MHz) do eritrodiol transesterificado (substância 7) .....	107
Figura 63 - Expansão (A) da correlação de H-C observadas no experimento de HSQC (CDCl <sub>3</sub> , 400 MHz) do eritrodiol transesterificado (substância 7) .....	108
Figura 64 – Principais correlações de H-C observadas no experimento de HMBC (CDCl <sub>3</sub> , 400 MHz) do eritrodiol transesterificado (substância 7) .....	109
Figura 65 – Espectros de RMN de <sup>1</sup> H (400 MHz): A - mistura de linoato, araquidato e linolenoato de eritrodiol (substância 6) (CDCl <sub>3</sub> ). B - Eritrodiol esterificado com ácido graxo de cadeia longa (Substância 8) (CDCl <sub>3</sub> + piridina d <sub>5</sub> ) .....	112
Figura 66 – Espectros de RMN de <sup>13</sup> C (100 MHz): A - mistura de linoato, araquidato e linolenoato de eritrodiol (substância 6) (CDCl <sub>3</sub> ). B - Eritrodiol esterificado com ácido graxo de cadeia longa (Substância 8) (CDCl <sub>3</sub> + piridina d <sub>5</sub> ) .....	113
Figura 67 – Espectros de RMN de DEPT – 135 (100 MHz): A - mistura de linoato, araquidato e linolenoato de eritrodiol (substância 6) (CDCl <sub>3</sub> ). B - Eritrodiol esterificado com ácido graxo de cadeia longa (Substância 8) (CDCl <sub>3</sub> + piridina d <sub>5</sub> ) .....	114
Figura 69 – Estrutura I: friedelina; II: 3β-hidroxifriedelano; III e IV: eritrodiol com ácido graxo de cadeia longa; V: eritrodiol .....	116
Figura 70 – Estrutura C: núcleo friedelano; Estrutura C: núcleo oleanano .....	117
Figura 71 – Atividade biológica das substâncias isoladas frente à bactéria <i>P. mirabilis</i> .....	118
Figura 72 – Plaqueamento com as substâncias isoladas .....	118

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Relação dos metabólitos secundários isolados de plantas do gênero <i>Pouteria</i> . ....	27
Tabela 2 – Frações obtidas e eluentes usados na coluna cromatográfica do extrato PM-A.....	50
Tabela 3 – Grupos obtidos após a análise por CCD, da coluna cromatográfica do extrato PM-A .....	50
Tabela 4 – Frações obtidas e eluentes usados na coluna cromatográfica do grupo PM-A.03..	51
Tabela 5 – Grupos obtidos após a análise por CCD, provenientes da coluna cromatográfica do grupo PM-A.03 .....	51
Tabela 6 – Frações obtidas e eluentes usados na coluna cromatográfica do sólido PM-A.4.1	53
Tabela 7 – Grupos obtidos após a análise por CCD, provenientes da coluna cromatográfica do material PM-A.4.1 .....	53
Tabela 8 – Atividade antibacteriana dos extratos obtidos de <i>P. macahensis</i> frente às cepas de bactérias testadas .....	60
Tabela 9 – Comparação dos dados de RMN de <sup>13</sup> C e DEPT- 135 da substância 2 com os dados da literatura para friedelina/3β-hidroxifriedelano .....	66
Tabela 10 – Comparação dos dados de RMN de <sup>13</sup> C da substância 4 com os dados da literatura para 3β-hidroxifriedelano.....	76
Tabela 11 - Comparação dos dados de RMN de <sup>13</sup> C da substância 6 com os dados da literatura para eritrodíol esterificado.....	88
Tabela 12 – Comparação dos tempos de retenção obtidos para a substância 6 após a reação de transesterificação .....	90
Tabela 13 – Resultados da concentração mínima inibitória dos testes das substâncias isoladas de <i>P. macahensis</i> frente a bactéria <i>P. mirabilis</i> .....	119

## LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

AcOET	Acetato de etila
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
BHI	<i>Brain heart infusion</i>
CBM	Concentração bactericida mínima
CCD	Cromatografia em camada delgada
CCDP	Cromatografia em camada delgada preparativa
CDCl <sub>3</sub>	Clorofórmio deuterado
CG-DIC	Cromatografia gasosa acoplada ao detector de ionização de chama
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	Diclorometano
CMI	Concentração mínima inibitória
d	Dupleto
DMPA	3,3'-dimetilalilpirofosfato
EtOH	Etanol
FAME	<i>Fatty acid methyl ester</i>
Hex	Hexano
Hz	Hertz
IPCC	Painel Intergovernamental de Mudanças Climáticas
IPP	3-isopentenilpirofosfato
ITU	Infecção no trato urinário
IV	Infravermelho
<i>J</i>	Constante de acoplamento
KBr	Brometo de potássio
LEOAE	Lista Oficial de Espécies Ameaçadas de Extinção
MeOH	Metanol
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato
OMS	Organização Mundial da Saúde
P.F	Ponto de fusão
PMA	<i>Pouteria macahensis</i> acetônico (extrato)
PME	<i>Pouteria macahensis</i> etanólico (extrato)
PMH	<i>Pouteria macahensis</i> hexânico (extrato)
Ppm	Partes por milhão
RAM	Resistencia antimicrobiana
Rf	Fator de retenção
RMN	Ressonância magnética nuclear
s	Simpleto
t	Tripleto
TMS	Trimetilsufóxido
TTC	2,3,5-trifeniltetrazólio
UESC	Universidade Estadual de Santa Cruz
UFMG	Universidade Federal de Minas Gerais

## SUMÁRIO

RESUMO .....	ix
ABSTRACT .....	x
LISTA DE FIGURAS .....	xi
LISTA DE TABELAS .....	xiv
LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS .....	xv
<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>18</b>
<b>2. REVISÃO DA LITERATURA .....</b>	<b>20</b>
2.1. Bioma da Mata Atlântica .....	20
2.2. Família Sapotaceae .....	22
2.3. Gênero <i>Pouteria</i> .....	23
2.4. Metabólitos secundários isolados do gênero <i>Pouteria</i> .....	25
2.5. Triterpenos Pentacíclicos .....	38
2.6. Atividade antimicrobiana .....	42
<b>3. OBJETIVO .....</b>	<b>45</b>
3.1. Geral.....	45
3.2. Específicos .....	45
<b>4. METODOLOGIA .....</b>	<b>46</b>
4.1. Especificações de reagentes, materiais e equipamentos utilizados.....	46
4.2. Coleta e identificação do material vegetal .....	48
4.3. Preparação dos extratos.....	48
4.3.1. <i>Biocromatografia dos extratos de P. macahensis</i> .....	49
4.4. Isolamento de substâncias do extrato acetônico .....	49
4.4.1. <i>Estudo dos grupos obtidos do extrato acetônico</i> .....	50
4.4.2. <i>Atividade antibacteriana das substâncias isoladas</i> .....	56
<b>5. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>57</b>
5.1. Material vegetal e propriedade dos extratos .....	57
5.2. Avaliação da atividade antimicrobiana por Biocromatografia dos extratos .....	60
5.3. Identificação das substâncias isoladas no fracionamento do extrato acetônico .....	61



5.4. Atividade antimicrobiana das substâncias isoladas frente a <i>P. mirabilis</i> .....	115
<b>6. CONCLUSÕES .....</b>	<b>121</b>
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>123</b>

## 1. INTRODUÇÃO

Os produtos naturais desde os tempos antigos são utilizados pelo homem de várias formas no intuito de melhorar sua qualidade de vida, merecendo destaque o benefício a saúde humana (CHING *et al.*, 2006; HENDRICH, 2006). Dentre as diversas áreas da ciência, a Química de Produtos Naturais tem como uma das finalidades isolar, identificar e registrar os constituintes químicos resultantes do metabolismo secundário das espécies vegetais. Neste contexto a Química de Produtos Naturais surge como fornecedora de modelos estruturais para o desenvolvimento e criação de remédios e medicamentos, bem como disponibilizando matéria prima para aplicação na medicina popular, que é bastante difundida em todo o mundo.

As espécies vegetais são grandes produtoras de metabólitos secundários, formados por diferentes caminhos biossintéticos, produzindo moléculas com uma ampla diversidade de esqueletos e grupamentos funcionais, como, por exemplo, ácidos graxos e seus ésteres, hidrocarbonetos, álcoois, aldeídos e cetonas, compostos acetilênicos, compostos aromáticos, entre outros (ALVES, 2009). Essa variedade na constituição química pode ser dividida em três grandes grupos de metabólitos: os compostos fenólicos; terpenos e esteroides e os alcaloides.

A variabilidade na produção dos metabólitos secundários das espécies vegetais é influenciada principalmente pelos fatores extrínsecos (fatores abióticos); luminosidade, disponibilidade de nutrientes, estação do ano, período do dia, ciclo e parte da planta, e/ou fatores genéticos, além de fatores bióticos (SIMÕES *et al.*, 2010).

Os metabólitos secundários desempenham diferentes funções ecofisiológicas, contribuindo para a adaptação e sobrevivência das espécies. Além disso, os metabólitos secundários produzidos pelas espécies vegetais apresentam diversas propriedades farmacológicas que podem contribuir de forma relevante para a melhoria da qualidade de vida do ser humano.

Desse modo, diante da ampla diversidade de metabólitos secundários e suas variadas utilidades no reino vegetal, é imprescindível que sejam ampliados os estudos visando o isolamento, caracterização química e avaliação do potencial biológico desses compostos. A indústria farmacêutica se destaca nesse sentido. Inúmeras pesquisas têm sido realizadas a fim de descobrir novas substâncias que possuam atividade biológica, e que possam ser utilizadas para a melhoria da saúde dos seres humanos.

Muitas doenças são causadas por bactérias, e com o advento da síntese de novos antibióticos foi possível controlar o contágio por doenças infecciosas. Entretanto, devido ao uso indiscriminado de antibacterianos, muitos microrganismos têm se tornado resistentes a esses fármacos, tornando-se um grave problema de saúde pública mundial. Isso implica diretamente no insucesso de tratamentos já estabelecidos e na ineficácia de um grande número de antibióticos disponíveis para o combate de doenças infecciosas (MOREIRA, 2004; OLIVEIRA *et al.*, 2008; BANGHEZAL *et al.*, 2007).

Inúmeras pesquisas realizadas pela comunidade científica, a fim de descobrir novos antibióticos, tem apresentado resultados pouco eficazes (WANG *et al.*, 2006). Assim, se faz necessário a busca de novas alternativas para o combate às bactérias multirresistentes (HAIDA *et al.*, 2007).

Nesse contexto, o isolamento de metabólitos secundários de espécies vegetais, de ocorrência no bioma da Mata Atlântica, área de inserção da UESC, surge como uma importante fonte de substâncias orgânicas bioativas.

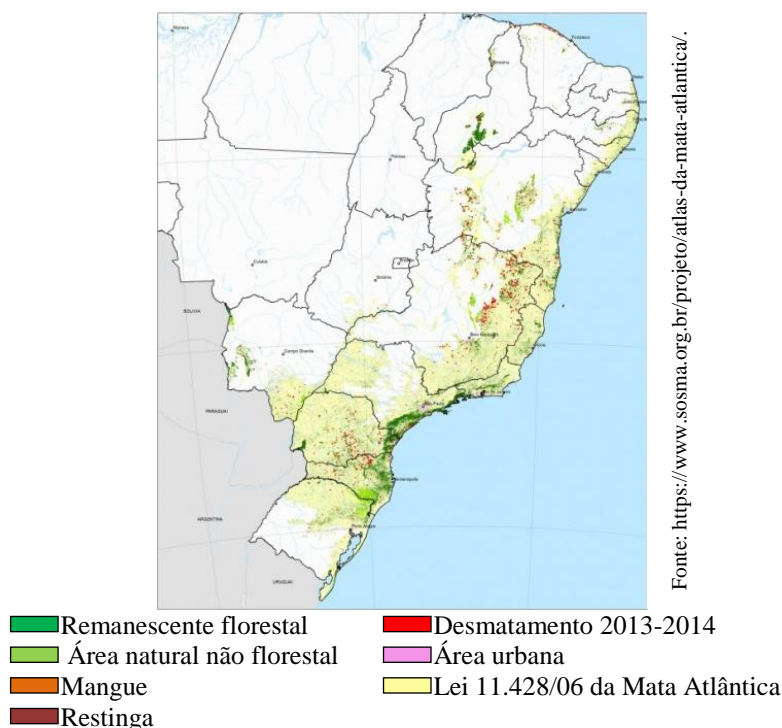
O objetivo desse trabalho consiste no estudo químico do extrato acetônico da espécie vegetal *Pouteria macahensis*, buscando o isolamento, caracterização estrutural e avaliação do potencial antibacteriano dos compostos. Ressaltamos que trata-se de um gênero endêmico da região de Mata Atlântica, e a espécie é totalmente desconhecida do ponto de vista químico e biológico.

## 2. REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1. Bioma da Mata Atlântica

Cada bioma brasileiro, independente de sua extensão, apresenta características específicas, representando uma importante fonte de conhecimento nas diferentes áreas das Ciências. Um bioma bastante rico em biodiversidade é a Mata Atlântica, cabendo ressaltar a sua vasta localização no território brasileiro, situada sobre uma extensa cadeia de montanhas, percorrendo a costa brasileira; onde a interação entre as diferentes áreas possibilita condições particulares de fauna e flora (BIOMA DA MATA ATLÂNTICA, 2016).

Atualmente a Mata Atlântica está distribuída por todo o litoral brasileiro, do Rio Grande do Norte ao Rio Grande do Sul, com amplas extensões para o interior, apesar de ter sido reduzida a cerca de 8% do seu território original (Figura 1). Ainda assim, ela apresenta mais de 60% de todas as espécies terrestres do planeta, além de estar entre os cinco *hotspots*<sup>1</sup> mais importantes do mundo, possuindo um dos mais ricos conjuntos de ecossistemas em termos de diversidade biológica do mundo (SÃO PAULO, 2008).



**Figura 1** – Mapa dos Remanescentes Florestais da Mata Atlântica no Brasil 2013-2014

<sup>1</sup> *Hotspot* é toda área prioritária para conservação, isto é, de rica biodiversidade e ameaçada no mais alto grau.

A flora da Mata Atlântica destaca-se essencialmente por sua biodiversidade e exuberância, sendo uma das mais valiosas do mundo. Alguns estudiosos sugerem que a especificidade da vegetação na Mata Atlântica seja consequente da vasta heterogeneidade de ambientes localizados numa grande abrangência de variações longitudinais, altitudinais, latitudinais e climáticas, ocasionado num cenário bastante complexo (SCUDELLER, 2002).

O solo da Mata Atlântica é caracterizado de pH ácido, sempre úmido e excessivamente pobre, é bastante raso, recebendo quase nenhuma luz, por motivo das árvores mais altas que absorvem os raios solares. A elevada umidade juntamente com elevada quantidade de matéria orgânica fazem com que o solo seja propício a ação de micro-organismos decompositores, tais como, bactéria e fungos, responsáveis por digerir os sais minerais e nutrientes provenientes pelas espécies vegetais (MATA ATLÂNTICA, 2016).

Os remanescentes de Mata Atlântica no Nordeste brasileiro correspondem a cerca de 6% do conjunto brasileiro da vegetação, sendo fortemente influenciado pela Floresta Amazônica e a Mata Atlântica do Sul e Sudeste (ARAÚLO, 2012). Apesar do desmatamento exacerbado, no intuito de liberar espaços para a criação de pastos e plantações de monoculturas, essa região apresenta um dos melhores níveis de conservação e preservação.

Estudos realizados pelo Painel Intergovernamental de Mudanças Climáticas (IPCC) indicam que se a temperatura nos locais remanescente de Mata Atlântica elevar em até dois graus Celsius, estima-se uma redução de até 30 % das espécies vegetais até 2100 e, caso o aumento seja de quatro graus Celsius, a diminuição poderá atingir a marca de 65 %.

Restringindo-se apenas a flora da Mata Atlântica, é notória a presença do forte endemismo. Estima-se que 8 mil espécies vegetais sejam endêmicas da Mata Atlântica, sendo cerca de 55 % das espécies arbóreas, e 40 % de não-arbóreas, 70 % das bromélias e 64 % das palmeiras (BIOMA DA MATA ATLÂNTICA, 2016).

A Mata Atlântica detém o recorde de plantas lenhosas (angiospermas) por hectare (450 espécies no Sul da Bahia) e cerca de 20 mil espécies vegetais, assim como recordes no número de espécies e endemismo em diversos grupos de plantas. Nos locais em que ainda se encontra a Mata Atlântica é possível observar uma vegetação exuberante, com marcante higrofitismo<sup>2</sup>. Dentre as espécies mais presentes destacam-se algumas briófitas, cipós e orquídeas (BIOMA DA MATA ATLÂNTICA, 2016).

Estudos realizados em 1998 mostram que a biodiversidade da floresta no trecho entre os municípios de Ilhéus e Itacaré, apresenta números expressivos. Há registros de 2.530

---

<sup>2</sup> Adaptação que algumas plantas apresentam para viver total ou parcialmente submersas em água ou em terrenos muito saturados de umidade.

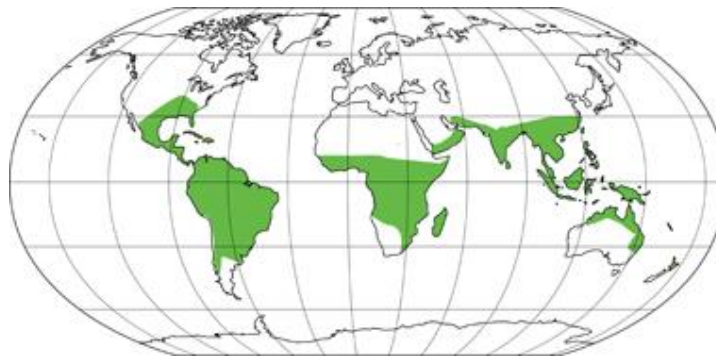
indivíduos arbóreos e arborescentes, pertencentes a 456 espécies relativa a 65 famílias por hectare, sendo este o maior índice até agora conhecido (ARAUJO *et al.*, 1998).

Coletas realizadas ao longo da faixa de ocorrência desse bioma apontam um alto índice de espécies endêmicas do sul da Bahia e norte do Espírito Santo, cerca de 28%. A atual Lista Oficial de Espécies Ameaçadas de Extinção (LOEAE) contém 472 espécies da flora brasileira, destas, 276 ocorrem na Mata Atlântica (THOMAS *et al.*, 1998). Nessa região, diversas angiospermas foram identificadas em uma lista preliminar de espécies endêmicas do sul da Bahia e Norte do Espírito Santo (THOMAS *et al.*, 2003).

O bioma da Mata Atlântica é o segundo maior centro de diversidade para as famílias Sapotaceae no Neotrópicos<sup>3</sup>, perdendo para a Floresta Amazônica. Os indivíduos dessa família por possuir madeira e látex de ótima qualidade são frequentemente vítimas da indústria madeireira, ocasionando na diminuição da densidade populacional nesse bioma.

## 2.2. Família Sapotaceae

A família Sapotaceae está inserida na ordem Ericales. Esta família é composta por cerca de 1.250 espécies dispostas em 53 gêneros. Sua distribuição ocorre principalmente nas regiões pantropicais, nas áreas das Américas, Ásia, na região do Pacífico e África, Figura 2 (PENNINGTON, 1991). Na região dos Neotrópicos estão presentes cerca de 450 espécies difundidas em 11 gêneros, *Chrysophyllum*, *Diploon*, *Ecclinusa*, *Elaeoluma*, *Manilkara*, *Micropholis*, *Mimusops*, *Pouteria*, *Pradosia*, *Sarcaulus* e *Sideroxylon*. Os gêneros *Pouteria* e *Chrysophyllum* são os mais expressivos, com cerca de 330 e 80 espécies respectivamente (PENNINGTON, 1991, 2004).



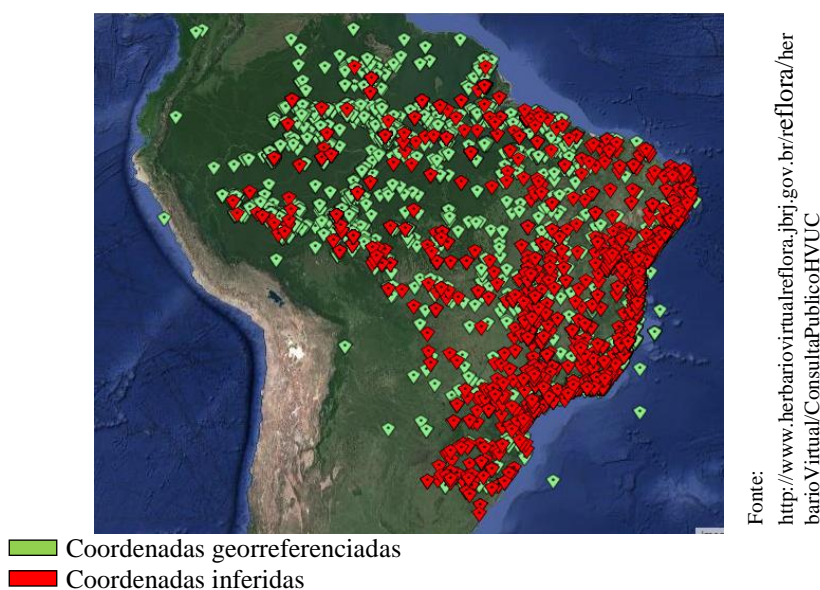
**Figura 2** – Distribuição da família Sapotaceae no mundo

Fonte:  
[http://www.thecompositae.net/www\\_ic\\_h/webcurso\\_spv/familias\\_pv/sapotaceae.htm](http://www.thecompositae.net/www_ic_h/webcurso_spv/familias_pv/sapotaceae.htm)

<sup>3</sup> É a região biogeográfica que compreende a América Central, incluindo a parte sul do México e da península da Baja Califórnia, o sul da Florida, todas as ilhas do Caribe e a América do Sul.

Os indivíduos pertencentes a essa família são arbóreos ou arbustivos, alguns se destacam por seu valor econômico, por exemplo, devido aos frutos comestíveis, tais como o caimito, (*Chrysophyllum* spp.); abricó-da-praia, (*Mimusops* spp.); abiu, (*Pouteria* spp.); a presença de látex de alta qualidade (utilizado para a confecção de coma comercial) ou por oferecer madeira de ótima qualidade, tais como a maçaranduba, *Manilkara* spp. Na medicina popular existem relatos para o combate a infecções dos tratos digestivo e respiratório, como antitérmico, anti-inflamatório e antidisentérica. (METCALFE; CHALK 1972, PENNINGTON, 1990, 2004, RIBEIRO *et al.* 1999, SOUZA; LORENZI, 2005)

Essa família ocorre principalmente em florestas úmidas, em geral em altitudes inferiores a 1.000 metros. No Brasil, há 11 gêneros (*Chromolucuma*; *Chrysophyllum*; *Ecclinusa*; *Elaeoluma*; *Manilkara*; *Micropholis*; *Planchonella*; *Pouteria*; *Pradosia*; *Sideroxylon* e *Xantolis*) e aproximadamente 200 espécies (Figura 3), destas, cerca de 70 encontram-se na Região Nordeste.



**Figura 3** – Distribuição da família Sapotaceae na América do Sul

### 2.3. Gênero *Pouteria*

Na América do Sul, comparado a regiões pan-tropicais, é possível encontrar a maior parte das espécies do gênero *Pouteria*, devido suas florestas úmidas e de baixa altitude. No Brasil há 120 espécies do gênero *Pouteria* (MONTEIRO *et al.* 2007). Sua distribuição predomina na região amazônica, e principalmente na faixa costeira, ocorrendo frequentemente em São Paulo, Rio de Janeiro, Espírito Santo e Bahia (Figura 4).



**Figura 4** – Distribuição do gênero *Pouteria* na América do Sul

Os indivíduos desta família são árvores ou arbustos, latescentes (látex alvo), monóicos ou dióicos. Suas folhas são do tipo alterno-espiraladas e simples ou alterno-dísticas ou alterno-espiraladas e simples. As flores são actinomorfas e gamopétalas, unissexuadas ou bissexuadas, agrupadas em fascículos axilares, ramifloros ou caulifloros. O gineceu é sincárpico, com ovário súpero, enquanto que os estames são adnatos e opostos aos lobos da corola (PENNINGTON, 2004).

Dentre as espécies de *Pouteria*, há relatos do uso na medicina popular, para tratamento de diarreia, vômitos, inflamação, febre, úlceras, erupções na pele, náuseas, dores nas costas, diabetes e para estimular a lactação (SOUZA *et al.*, 2012). Entretanto, do ponto de vista fitoquímico, há pouco estudos com espécies desse gênero, inclusive trabalhos que apresentem testes biológicos com metabólitos secundários isolados.

No Domínio da Mata Atlântica há registros de 34 espécies de *Pouteria*, sendo que 19 correm o risco de extinção e 18 são endêmicas: *P. andarahiensis* T. D. Penn., *P. atlântica* Alves-Araújo & M. Alves, *P. bapeba* T. D. Penn., *P. beaurepairei* (Glaz. & Raunk.) Baehni, *P. butyrocarpa* (Kuhl.) T. D. Penn., *P. ciliata* Alves-Araújo & M. Alves, *P. coelomatica* Rizzini, *P. confusa* Alves-Araújo & M. Alves, *P. franciscana* Baehni, *P. grandiflora* (A.DC.) Baehni, *P. macahensis* T. D. Penn., *P. microstrigosa* T. D. Penn., *P. nordestinensis* Alves-Araújo & M. Alves, *P. oxypetala* T. D. Penn., *P. pachycalyx* T. D. Penn., *P. stenophylla* Baehni, *P. subsessilifolia* Cronquist, *P. trifida* Alves-Araújo & M. Alves e *P. velutinicarpa* Alves-Araújo & M. Alves (ARAÚJO, 2012).



Dentre as espécies endêmicas destacamos a ocorrência da *P. macahensis* (Figura 5), objeto de estudo desse trabalho, a qual é totalmente desconhecida do ponto de vista fitoquímico, bem como da atividade biológica de seus metabólitos secundários.



■ Coordenadas georreferenciadas  
■ Coordenadas inferidas

Figura 5 – Distribuição da espécie *Pouteria macahensis* na América do Sul

Fonte:  
<http://www.herbariovirtualreflora.jbrj.gov.br/reflora/herbarioVirtual/ConsultaPublicoHVUC>

#### 2.4. Metabólitos secundários isolados do gênero *Pouteria*

Os metabólitos secundários e suas classes são originados a partir das rotas biossintéticas. Os compostos produzidos podem ser armazenados em todas as partes da espécie. Muitos trabalhos de isolamento de constituintes químicos são realizados a partir de folhas. Em contra partida, nas folhas a presença da clorofila pode implicar em dificuldade na purificação das substâncias. Vários metabólitos secundários também são armazenados nos galhos.

As espécies vegetais sintetizam três grandes famílias de metabólitos secundários, via diferentes rotas biossintéticas: os compostos fenólicos; terpenos e esteroides e os alcaloides. O ácido chiquímico é precursor dos compostos fenólicos e alcaloides, o ácido malônico dos compostos fenólicos e o ácido mevalônico dos terpenos. Cada classe possui suas propriedades específicas (TAIZ; ZEIGER, 2004).

As classes dos metabólitos secundários desempenham distintas funções na espécie vegetal. A finalidade dos compostos fenólicos tem relação com a síntese das ligninas, presente na maioria das plantas superiores, e por possuírem coloração, sabor e odor agradáveis,

chamam atenção dos homens, assim como de animais, que buscam a polinização. Para as plantas, essa classe de compostos é essencial, pois as protege dos raios ultravioleta, insetos, bactérias, vírus e fungos (CROTEAU *et al.*, 2000). Há relatos que algumas espécies vegetais produzem essa classe de compostos a fim de inibir o crescimento de outras espécies competidoras, ou seja, ação alelopática.

A classe dos compostos fenólicos por possuir grande diversidade química apresenta uma ampla diversidade de funções nos vegetais. Os flavonoides (flavonas e flavonóis) atuam na proteção das células vegetais contra a radiação UV-B. Os isoflavonóides (isoflavonas) apresentam eficaz atividade inseticida ou antiestrogênica<sup>4</sup>, ou podem atuar no combate a propagação de fungos e bactérias nos vegetais. Os taninos são característicos por possibilitarem maior resistência ao calor, a água e a microrganismos, uma vez que se ligam a moléculas de colágenos presente na pele dos animais. Nas plantas os taninos atuam como repelentes alimentares, geralmente quando os frutos estão na fase de maturação eles possuem altos teores de taninos (TAIZ; ZEIGER, 2004).

A classe dos alcaloides é nociva ao ser humano, por exemplo, os venenosconiína, e estricnina. Entretanto, em baixas concentrações podem ser utilizados como medicamentos. A morfina é um alcaloide utilizado como fármaco. Outros alcaloides são usados diariamente em todo o mundo, nicotina, cafeína e cocaína. Os alcaloides atuam no sistema nervoso humano, particularmente no nos transmissores químicos, outros atingem a síntese proteica, o transporte de membrana ou a atividade de várias enzimas. Nas plantas os alcaloides atuam como proteção principalmente contra herbívoros (TAIZ; ZEIGER, 2004).

De acordo com Cordell (1981) a classe dos alcaloides é considerada como compostos farmacologicamente ativos. Todavia, essa classe de compostos não está presente em todas as espécies do reino vegetal, ocorrendo em alguns gêneros. Devido a essa distribuição restrita, os alcaloides formam a base da ecologia química e quimiotaxonomia (HARBORNE, 1988). A função dos alcaloides nas espécies vegetais ainda é pouco conhecida, porém, segundo Croteau *et al.*, (2000), é sabido que estas substâncias estão relacionadas com atividades eco-químicas. Nas plantas, essa classe de compostos exerce a função de defesa, uma vez que, estudos apontam diversos efeitos fisiológicos que essas substâncias atuam sobre os animais invasores, apresentando toxicidade aos insetos e agindo como repelente para os herbívoros, assim como, as atividades antimicrobianas.

---

<sup>4</sup> É uma substância que bloqueia a produção ou utilização de estrógenos, ou inibe seus efeitos. Estrogênios são a família de hormônios que promovem o desenvolvimento e manutenção das características sexuais femininas

É sabido que os metabólitos secundários diferem dos metabólitos primários (açúcares, aminoácidos, lipídeos e nucleotídeos) por possuírem distribuição somente no reino vegetal, ou seja, metabólitos secundários estão presentes em uma espécie vegetal ou a determinado grupo de espécies correlacionadas. Essas substâncias possuem funções ecológicas notáveis nos vegetais, uma vez que, elas podem defender as espécies contra infecção por micro-organismo ou herbívoros, assim como, podem atuar como atrativos para animais polinizadores e dispersores de sementes (TAIZ; ZEIGER, 2004). Devido aos diversos tipos de esqueletos e funções presentes nas diferentes substâncias, permitindo assim que essas substâncias possam interagir com outras e formarem complexos que sejam nocivos a insetos ou humanos.

Dentre as classes de metabólitos secundários, os terpenos é a maior delas. Esses compostos são tóxicos para muitos mamíferos herbívoros e insetos. No grupo dos triterpenos (C<sub>30</sub>) os cardenólídeos e as saponinas são nocivos aos herbívoros vertebrados. Nos humanos os cardenólídeos são responsáveis por atingirem drasticamente a musculatura do coração, ao ser utilizado em doses controladas podem diminuir ou aumentar a frequência cardíaca. As saponinas podem influenciar no sistema digestivo ou perturbar membranas uma vez inserida na corrente sanguínea (TAIZ; ZEIGER, 2004).

Assim, a seguir é apresentado um levantamento das substâncias isoladas do gênero *Pouteria* relacionando-as com suas atividades biológicas (Tabela 1, Figura 6).

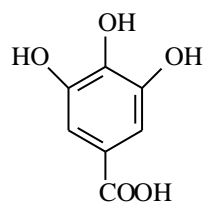
**Tabela 1** – Relação dos metabólitos secundários isolados de plantas do gênero *Pouteria*.

Espécie	Parte da planta	Local	Metabólitos secundários isolados			Atividade	Referências
			Classe	Substância	Estrutura		
<i>P. Sapota</i>	Frutas	Florida, Estados Unidos	FE	Ácido gálico	1	SR	Rodríguez <i>et al.</i> , (2011)
				Galocatequina	2		
				Catequina	3		
				Epicatequina	4		
				Diidromiricetina	5		
				Miricitrina	6		
				Catequina-3- <i>O</i> -galate	7		
<i>P. Sapota</i>	Frutas	Panamá	CA	(3 <i>S</i> ,5 <i>R</i> ,6 <i>S</i> )-β-Criptoxantin-5,6-epóxido	8	SR	Turcsi <i>et al.</i> , (2015)
				β-Criptoxantin	9		
				(3 <i>S</i> ,5 <i>S</i> ,6 <i>R</i> )-β-Criptoxantin-5,6-epóxido	10		
				(3 <i>R</i> ,5' <i>R</i> ,6' <i>S</i> )-β-Criptoxantin-5',6'-epóxido	11		
				(3 <i>S</i> ,5 <i>R</i> ,6 <i>S</i> , 5' <i>R</i> ,6' <i>S</i> )-β-Criptoxantin-5,6,5',6'-diepóxido	12		
(3 <i>S</i> ,5 <i>S</i> ,6 <i>R</i> , 5' <i>R</i> ,6' <i>S</i> )-β-Criptoxantin-5,6,5',6'-diepóxido	13						
<i>P. sapota</i>	Frutas	Panamá	CA	(3 <i>R</i> ,5' <i>S</i> ,6' <i>R</i> )-β-	14	SR	Turcsi <i>et al.</i> ,

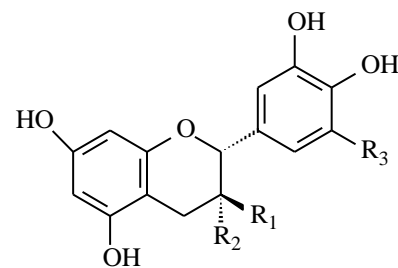
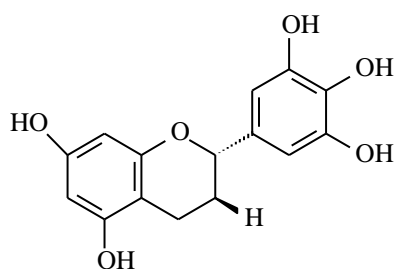
Espécie	Parte da planta	Local	Metabólitos secundários isolados			Atividade	Referências
			Classe	Substância	Estrutura		
				Criptoxantin-5',6'-epóxido			(2015)
				Criptoxantina	15		
				3'-Criptoxantina	16		
<i>P. sapota</i>	Frutas	Panamá	CA	Sapotexantina ( $\beta,\kappa$ -caroteno-6'-one)	17	SR	Murillo <i>et al.</i> , (2011)
<i>P. sapota</i>	Frutos	Panamá	CA	Capsantina	18	SR	Fekete <i>et al.</i> , (2013)
				Capsorubina	19		
				Criptocapsina	20		
				Sapotexantina	21		
				(5 <i>R</i> ,6 <i>S</i> )-Criptocapsin-5,6-epóxido	22		
				3'-Deoxicapsantin-5,6-epóxido	23		
				(5 <i>S</i> ,6 <i>R</i> )-Criptocapsin-5,6-epóxido	24		
				(3 <i>S</i> ,5 <i>R</i> ,6 <i>S</i> , 5' <i>R</i> ,6' <i>S</i> )- $\beta$ -Criptoxantin-5,6,5',6'-diepóxido	12		
				(3 <i>R</i> ,5' <i>R</i> ,6' <i>S</i> )- $\beta$ -Criptoxantin-5',6'-epóxido	11		
				(3 <i>S</i> ,5 <i>R</i> ,6 <i>S</i> )-Capsantin -5,6-epóxido	25		
				(5 <i>R</i> ,8 <i>S</i> )-Criptocapsin-5,8-epóxido	26		
				(5 <i>R</i> ,8 <i>R</i> )-Criptocapsin-5,8-epóxido	27		
(5 <i>S</i> ,8 <i>R</i> )-Criptocapsin-5,8-epóxido	28						
(5 <i>S</i> ,8 <i>S</i> )-Criptocapsin-5,8-epóxido	29						
<i>P. sapota</i>	Frutos	Panamá	CA	Capsorubina	19	SR	Murillo <i>et al.</i> , (2012)
				3'-Deoxicapsorubina	30		
				3,3'-Dideoxicapsorubina	31		
<i>P. viridis</i>	Frutos	Florida, Estados Unidos	FE	Ácido gálico	1	SR	Ma <i>et al.</i> , (2004)
				Galocatequina	2		
				Catequina	3		
				Epicatequina	4		
				3- <i>O</i> -Galato-catequina	7		
<i>P. torta</i>	Folhas	Brasília, Brasil	TR	Acetato de lupeolila	32	SR	Perfeito <i>et al.</i> , (2005)
		São Paulo, Brasil	FE	Miricitrina (Miricetin-3- <i>O</i> - $\alpha$ -L-raminopiranosídeo)	6	Mutações no DNA	Costa <i>et al.</i> , (2014)
				Miricitina	33		
				Miricetin-3- <i>O</i> - $\beta$ -D-galactopiranosídeo	34		
				Miricetin-3- <i>O</i> - $\alpha$ -L-arabinopiranosídeo	35		
<i>P. torta</i>	Galhos	Brasil	TR	3 $\alpha$ - <i>O</i> -acetato de $\alpha$ -amirina	36	SR	Che <i>et al.</i> , (1980)
				3 $\beta$ - <i>O</i> -acetato de $\beta$ -amirina	37		
				Ácido betulínico	38		
				Ácido ursólico	39		
<i>P. obovata</i>	Frutos	Lima, Peru	FE	Ácido gálico	1	SR	Dini, Irene (2011)
			FL	2 <i>R</i> ,3 <i>R</i> -4'- <i>O</i> -metil diidrocaempferol 7- <i>O</i> -[3''- <i>O</i> -acetil]- $\beta$ -D-	40		

Espécie	Parte da planta	Local	Metabólitos secundários isolados			Atividade	Referências
			Classe	Substância	Estrutura		
<i>P. obovata</i>	Frutos	Lima, Peru	FL	glucopiranosídeo		SR	Dini; Irene (2011)
				2 <i>R</i> ,3 <i>R</i> -4' <i>O</i> -metil diidrocaempferol 7- <i>O</i> -β- <i>D</i> -β- <i>L</i> -xilopiranosil-(1'''→6''')-[3''- <i>O</i> -acetil]-β- <i>D</i> -glucopiranosídeo	41		
				2 <i>R</i> ,3 <i>R</i> -4' <i>O</i> -metil diidrocaempferol 3- <i>O</i> -β- <i>D</i> -β- <i>L</i> -xilopiranosil-(1'''→6''')-[3''- <i>O</i> -acetil]-β- <i>D</i> -glucopiranosídeo	42		
<i>P. campechiana</i>	Folhas	Florida, Estados Unidos	ES	Ampelopsina	43	SR	Hernandez <i>et al.</i> , (2008)
				Balanocarpol	44		
				E-viniferin diol	45		
				Ampelopsina A	46		
				Hopeafenol	47		
				Vaticafenol	48		
			FL	Taxifolina 3- <i>O</i> -α-arabinofuranosídeo	49		
				Trans-taxifolina 3- <i>O</i> -α-arabinopiranosídeo	50		
				Quercetina 3- <i>O</i> -α-ramanopiranosídeo	51		
				Miricetina 3- <i>O</i> -α-ramanopiranosídeo	52		
				Taxifolina 3- <i>O</i> -α-ramanopiranosídeo	53		
				Quercetina 3- <i>O</i> -β-ramanopiranosídeo	54		
<i>P. campechiana</i>	Frutos	Florida, Estados Unidos	FE	Ácido gálico	1	SR	Ma <i>et al.</i> , (2004)
<i>P. venosa</i>	Casca do caule e caule	Alagoas, Brasil	ET	Espinasterol	55	SR	Montenegro <i>et al.</i> , (2006)
				Ácido ursólico	39		
			TR	Taraxerol	56		
				Ácido 19α,23-diidroxiursólico	57		
				Ácido miriântico	58		
<i>P. caimito</i>	Casca do caule	Venezuela	TR	β-Sitosterol	59	SR	Ardon; Nakano (1962)
				Taraxerol	60		
	Frutos	Venezuela	TR	Dammarendiol	61	SR	Pellicciari <i>et al.</i> , (1962)
				Lupeol	62		
				α-amirina	63		

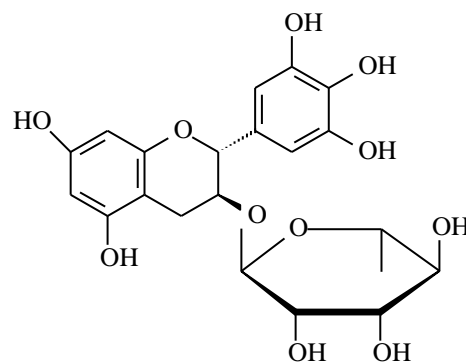
Flavonoides – **FL**; Compostos fenólicos – **FE**; Triterpenos – **TR**; Estilbenos – **ES**; Carotenoides – **CA**; Esteroides – **ET**; Sem a realização de testes biológicos para esses compostos isolados nesse gênero – **SR**.



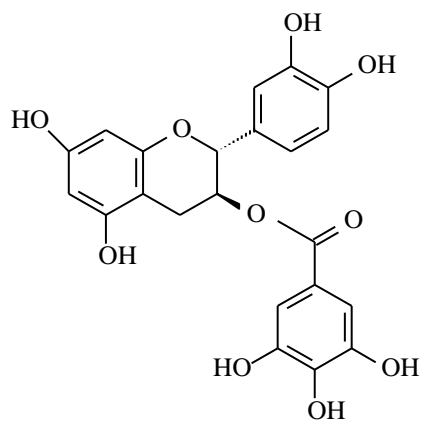
1

2 - ( $R_1 = \text{OH}$ ,  $R_2 = \text{H}$ ,  $R_3 = \text{OH}$ )3 - ( $R_1 = \text{OH}$ ,  $R_2 = \text{H}$ ,  $R_3 = \text{H}$ )4 - ( $R_1 = \text{H}$ ,  $R_2 = \text{OH}$ ,  $R_3 = \text{H}$ )

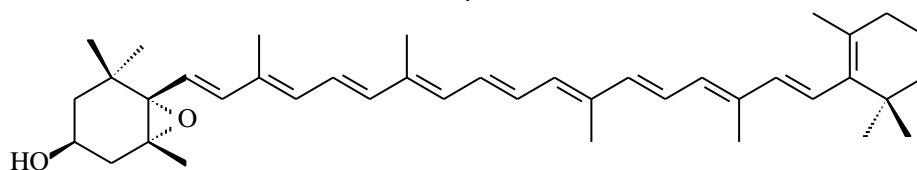
5



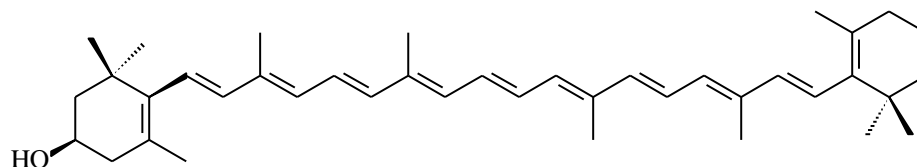
6



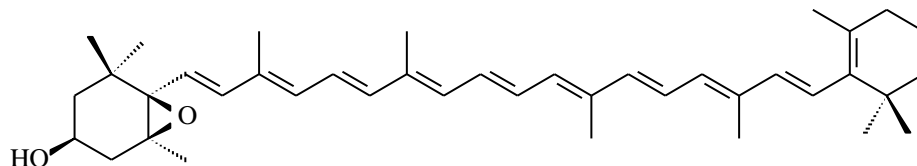
7



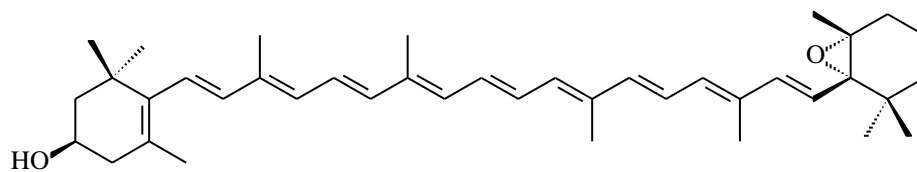
8



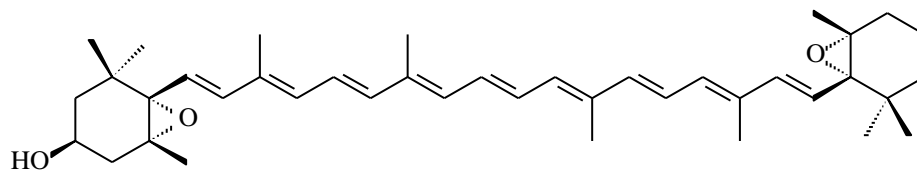
9



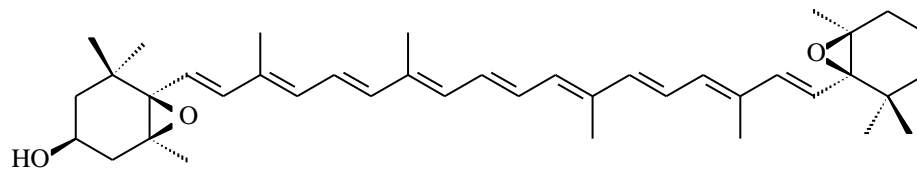
10



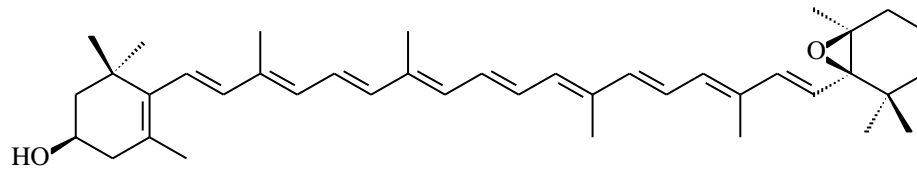
11



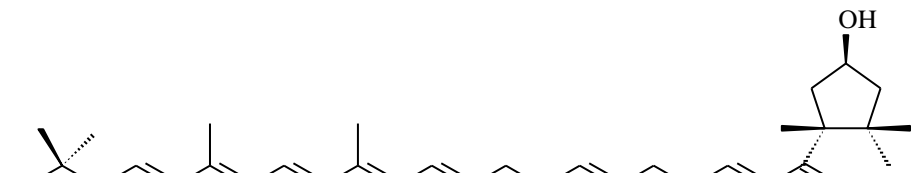
12



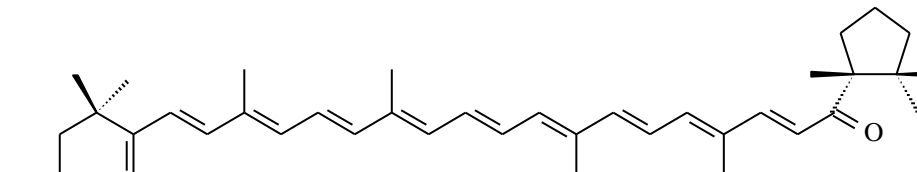
13



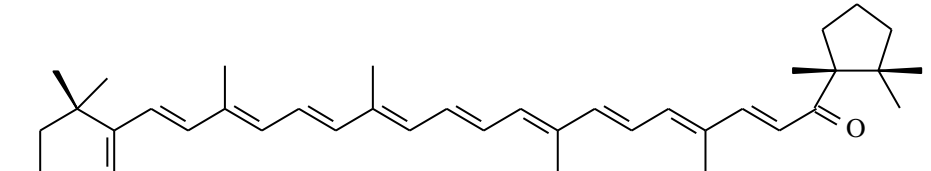
14



15

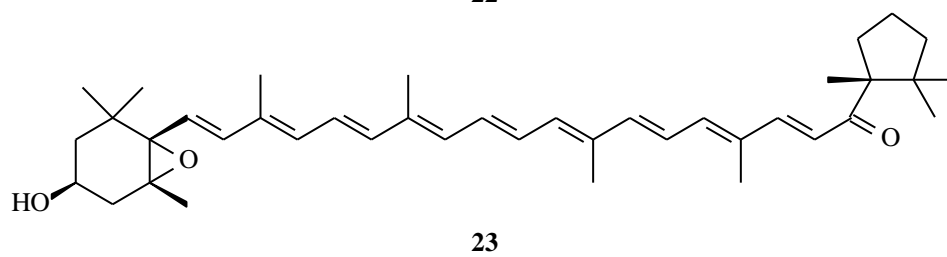
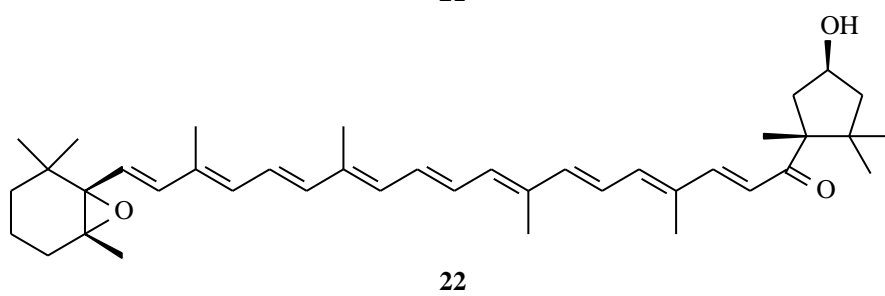
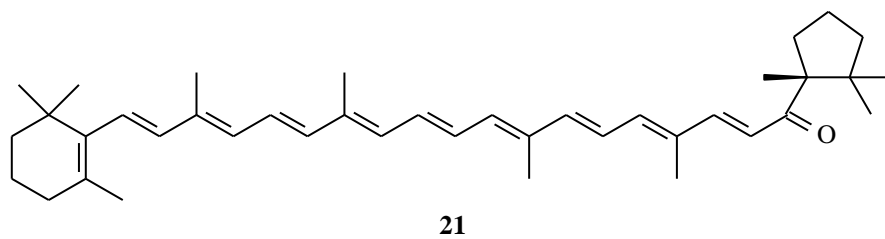
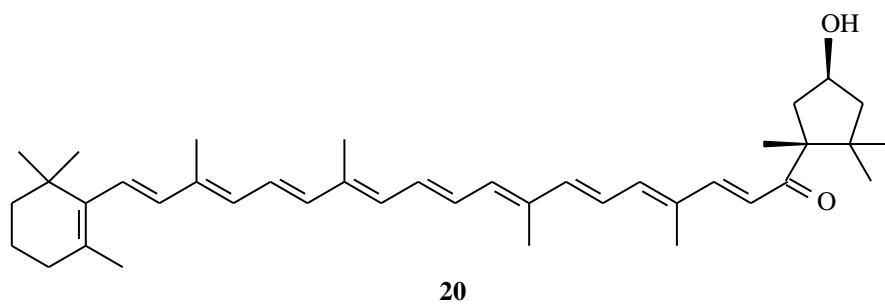
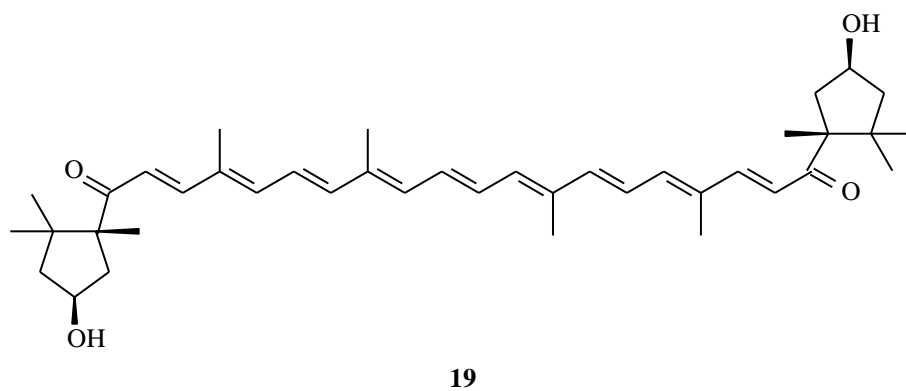
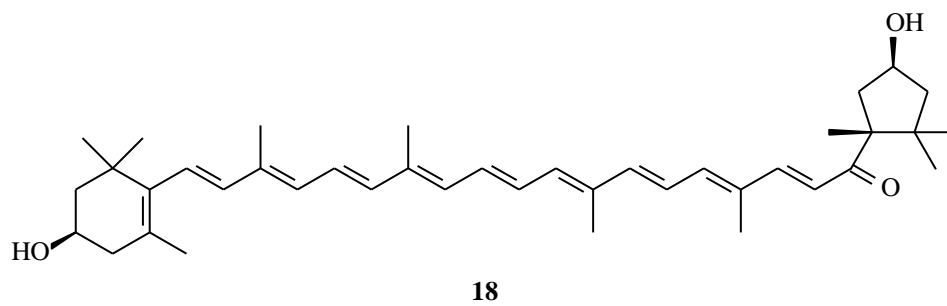


16

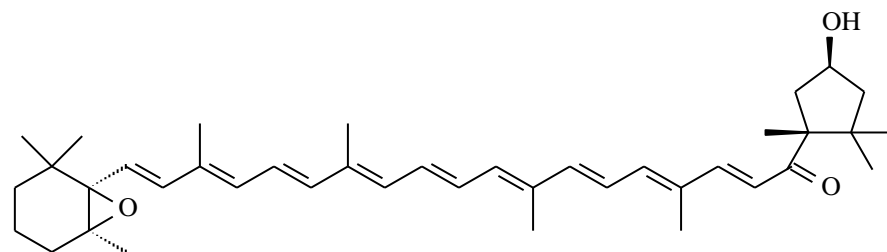


17

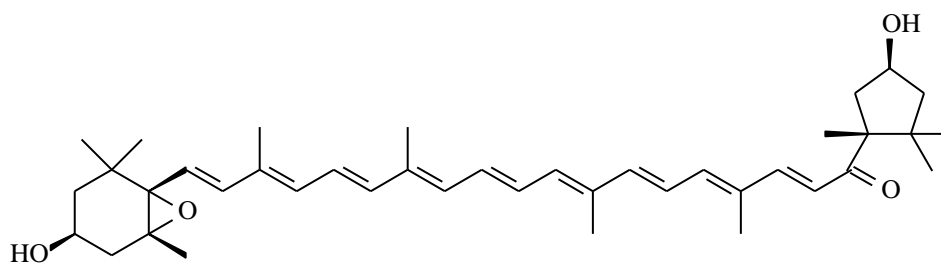




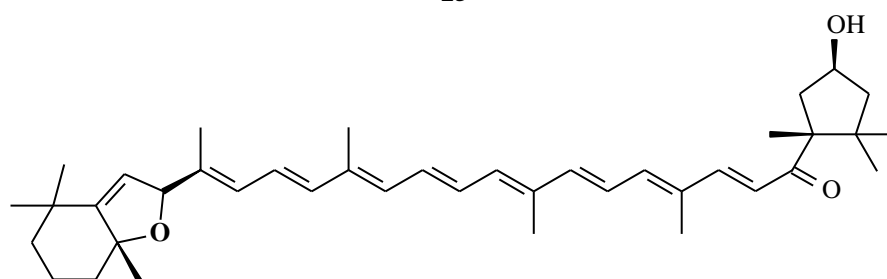




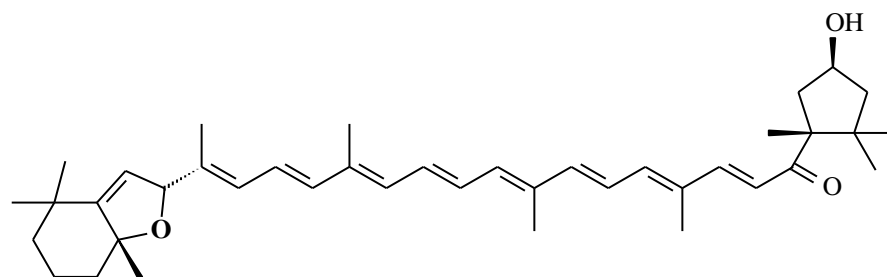
24



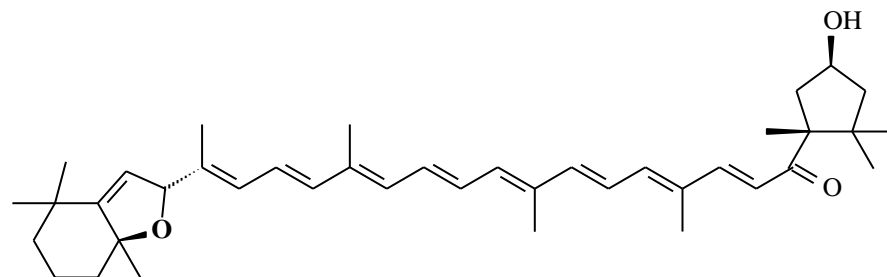
25



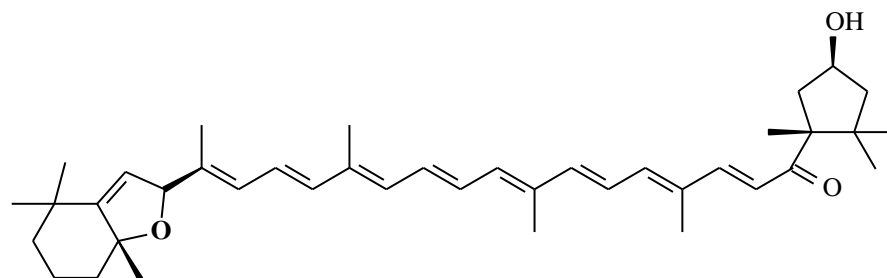
26



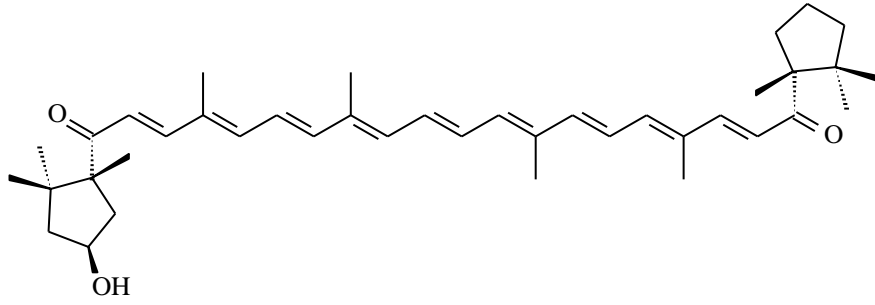
27



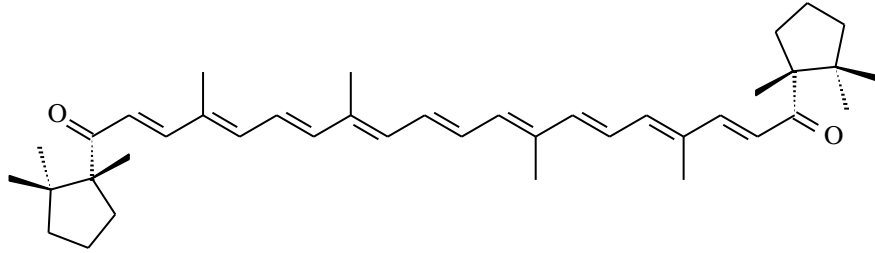
28



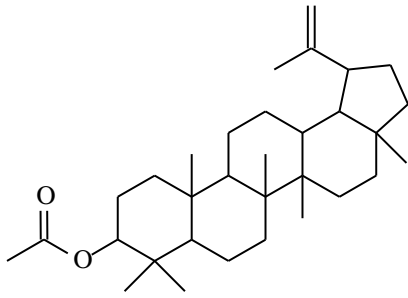
29



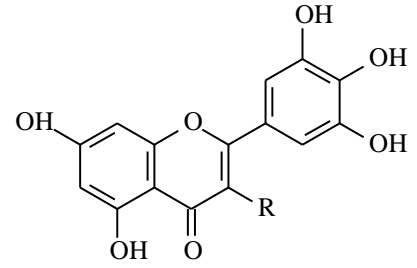
30



31



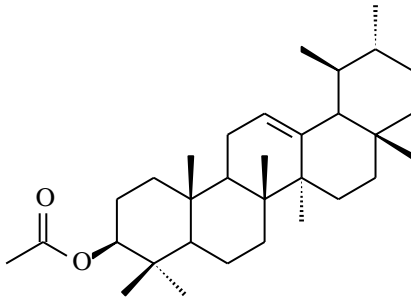
32



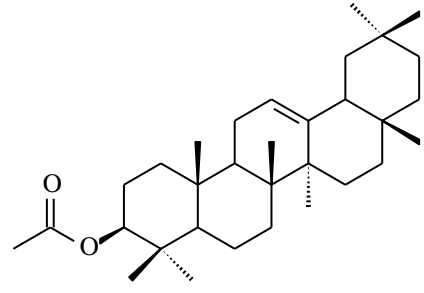
33 - (R = OH)

34 - (R = O-gal)

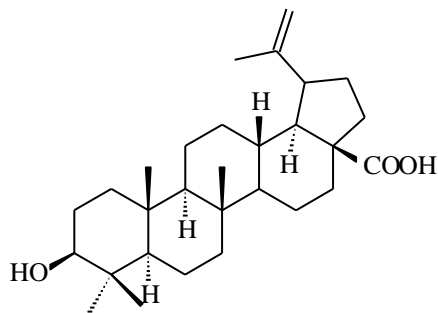
35 - (R = O-ara)



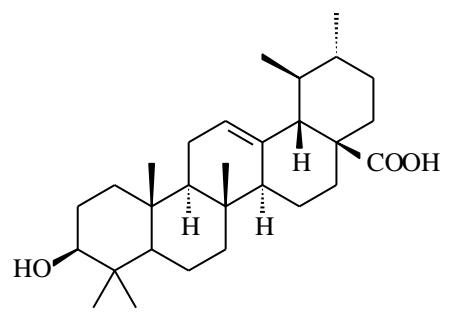
36



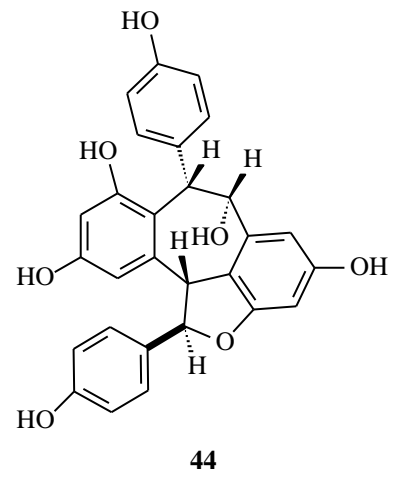
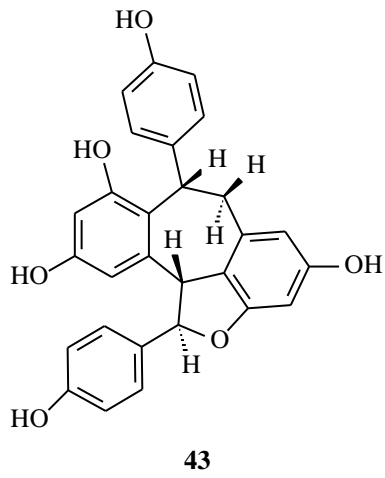
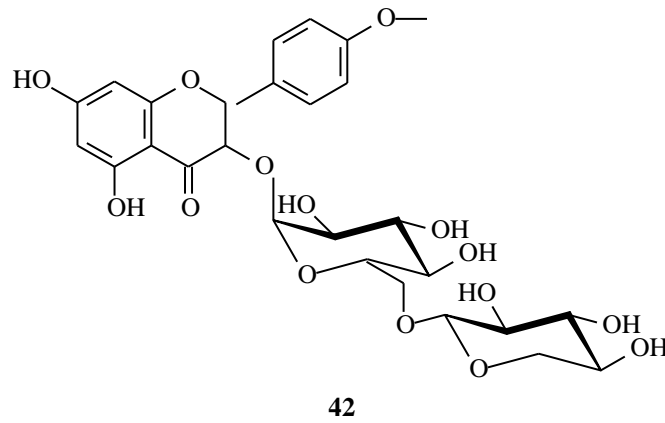
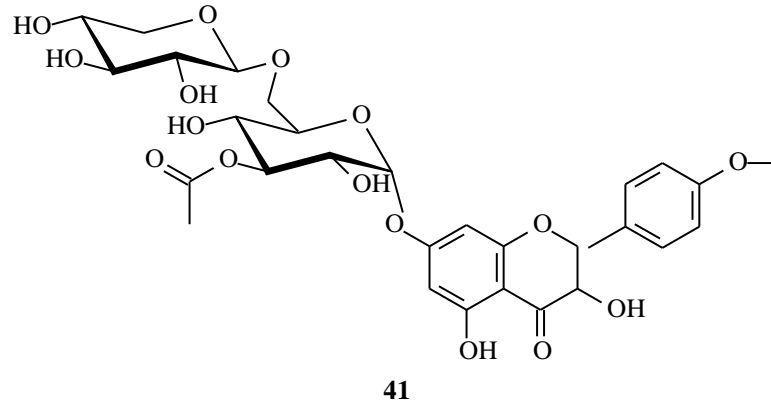
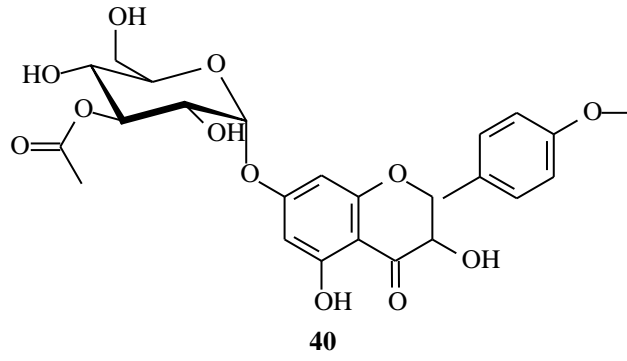
37

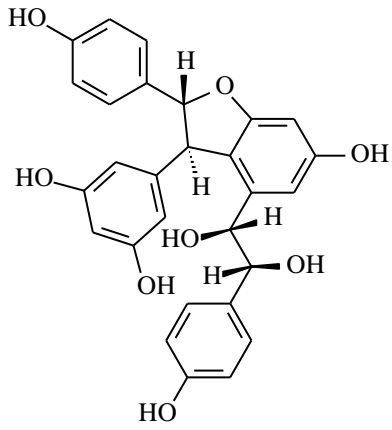


38

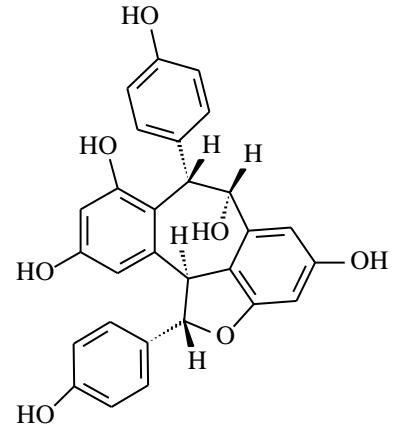


39

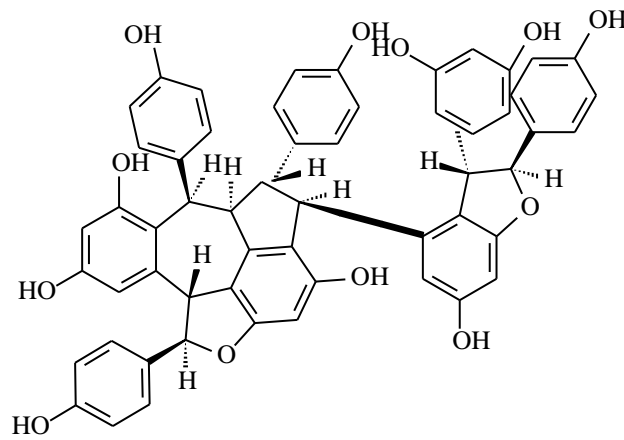




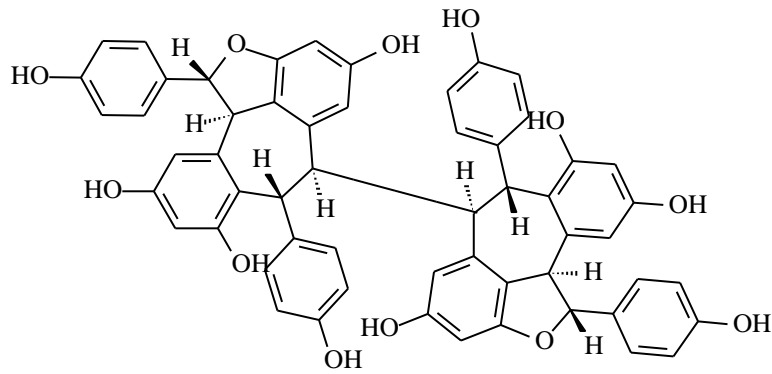
45



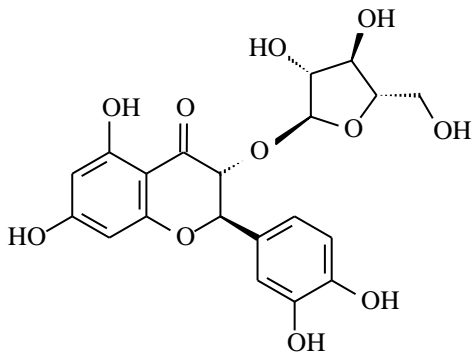
46



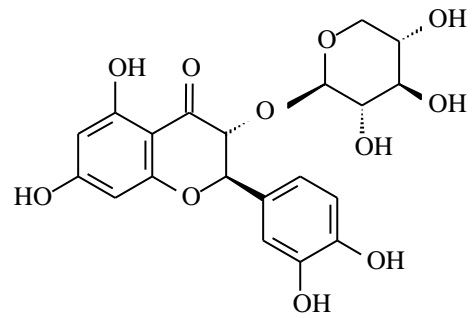
47



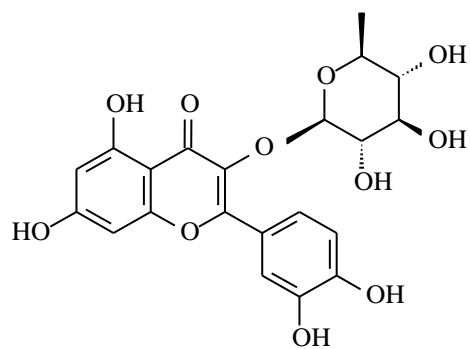
48



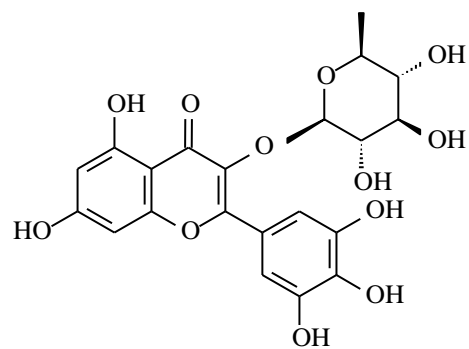
49



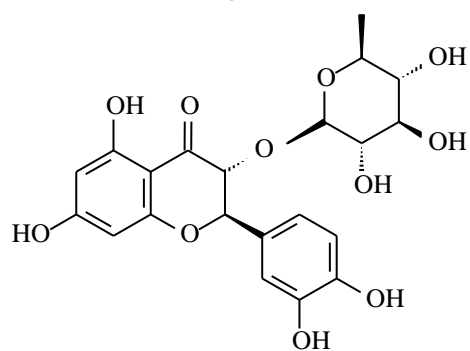
50



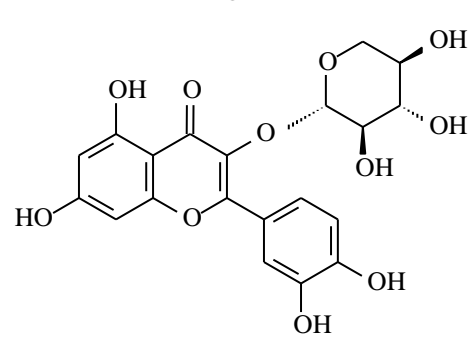
51



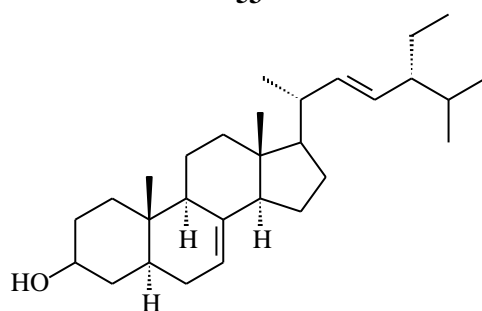
52



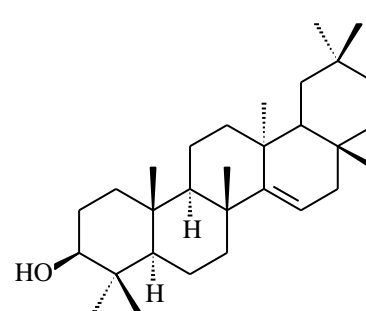
53



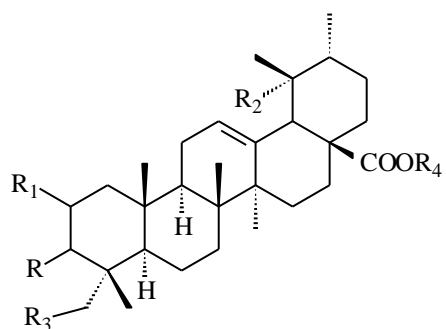
54



55

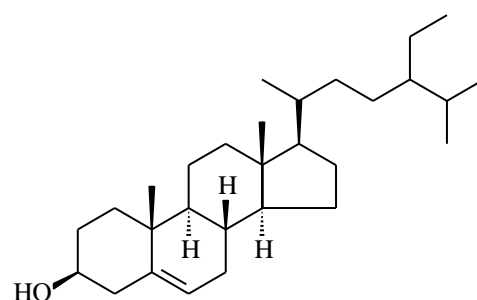


56

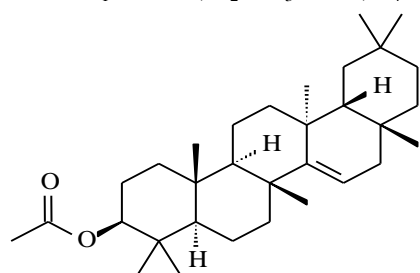


57 - R =  $\beta$ -OH, R<sub>1</sub> = R<sub>4</sub> = H, R<sub>2</sub> = R<sub>3</sub> = OH

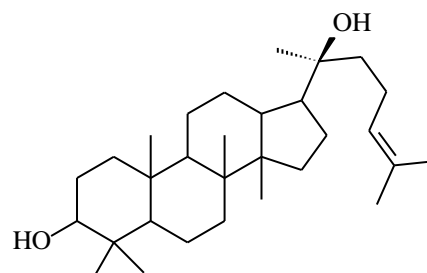
58 - R = R<sub>1</sub> =  $\alpha$ -OH, R<sub>2</sub> = R<sub>3</sub> = OH, R<sub>4</sub> = H



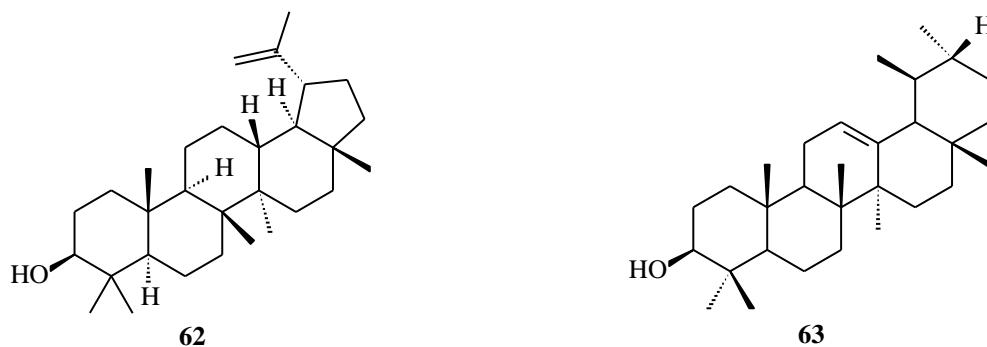
59



60



61



**Figura 6** – Estruturas dos principais metabólitos isolados no gênero

Assim sendo, dentre os vários estudos relatadas na (Tabela 1, páginas 26 a 28), o trabalho de Costa *et al* (2014) foi o único que relata a realização de testes com as substâncias isoladas das folhas de *P. torta*, compostos 6, 33, 34 e 35, que produziram mutações no DNA de células de ratos, as mutações foram do tipo *frameshift*<sup>5</sup> *in vitro* (ensaio de Ames), assim como a perda de cromossomas inteiros *in vivo* (ensaio micronúcleo).

É importante ressaltar que não há relatos para essas substâncias nesses estudos realizados.

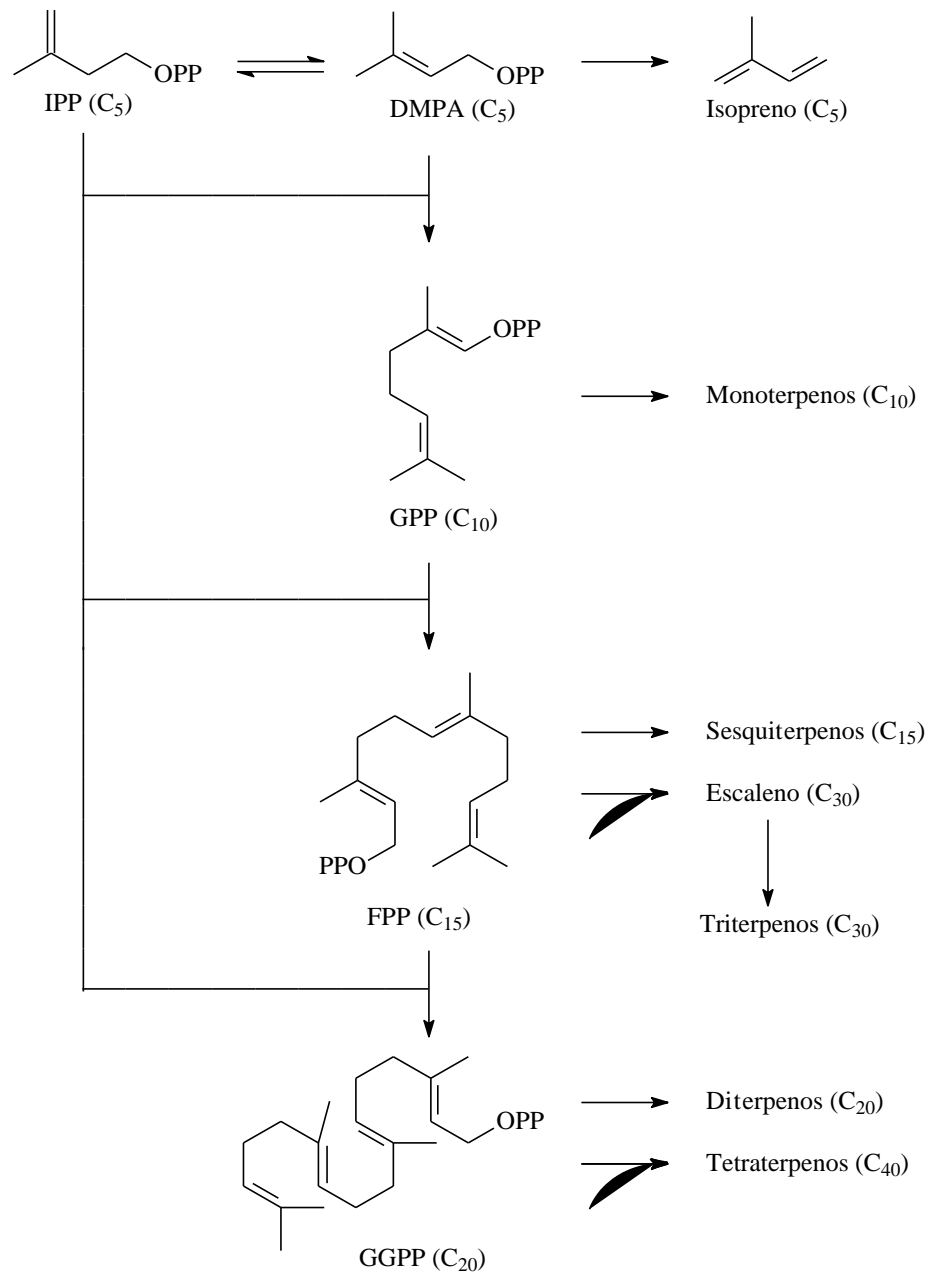
Em contrapartida, muitos artigos demonstram que extratos apresentam variadas atividades. Montenegro *et al.*, (2006) relata que os extratos de folhas (CHCl<sub>3</sub>), casca do caule (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) e caule (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>+AcOEt 1:1) da espécie *P. venosa*, apresentaram resultados positivos nos ensaios larvicidas e/ou antiradicalar. Dutok *et al.*, (2015) afirma que o extrato hidroalcoólico de *P. mammosa* é ligeiramente irritante frente a toxicidade em testes realizados com ratos. Asservatham *et al.*, (2013) relata que o extrato dos frutos de *P. campechiana* apresenta efeito hepatoprotetor significativo contra hepatotoxicidade<sup>6</sup>.

## 2.5. Triterpenos Pentacíclicos

Os terpenóides, consiste de uma ampla família de metabólitos secundários, que são formados por um esqueleto carbônico composto de diversas unidades de isopreno (2-metilbutadieno), (Figura 7) (LOBO; LOURENÇO, 2007).

<sup>5</sup> Mutações genéticas por inserção e deslocação de nucleotídeos.

<sup>6</sup> Também conhecido como toxidade hepática, é um dano no fígado causado por substâncias químicas chamadas hepatotoxinas.



**Figura 7** – Esquema resumido da biossíntese dos terpenos  
 Fonte: Roberts, 2007

Todavia, o isopreno (isoprenóides) não participa do processo de biossíntese desses compostos, estes são originados a partir de duas unidades de C<sub>5</sub>, o 3,3'-dimetilalilpirofosfato (DMPA) e 3-isopentenilpirofosfato (IPP), Figura 6. Os terpenos podem ser formados a partir de duas rotas biossintéticas distintas, a clássica via do mevalonato e a rota do metileritritol fosfato.

A rota do ácido mevalónico como intermediário, foi descoberta na década de 1950 e acreditava-se que era a única fonte de IPP e DMAPP. Essa rota acontece no citoplasma e é ativa nos fungos, bactérias, animais e plantas, produzindo desta forma os precursores dos

sesquiterpenos e triterpenos. A outra rota é via do metileritritol fosfato, é mais atual e atribuem a essa a maneira mais ocorrente na natureza frente à via do mevalonato. Essa rota acontece nos plastídios e na maioria das vezes produz os precursores dos monoterpenos, diterpenos e tetraterpenos (ROBERTS, 2007).

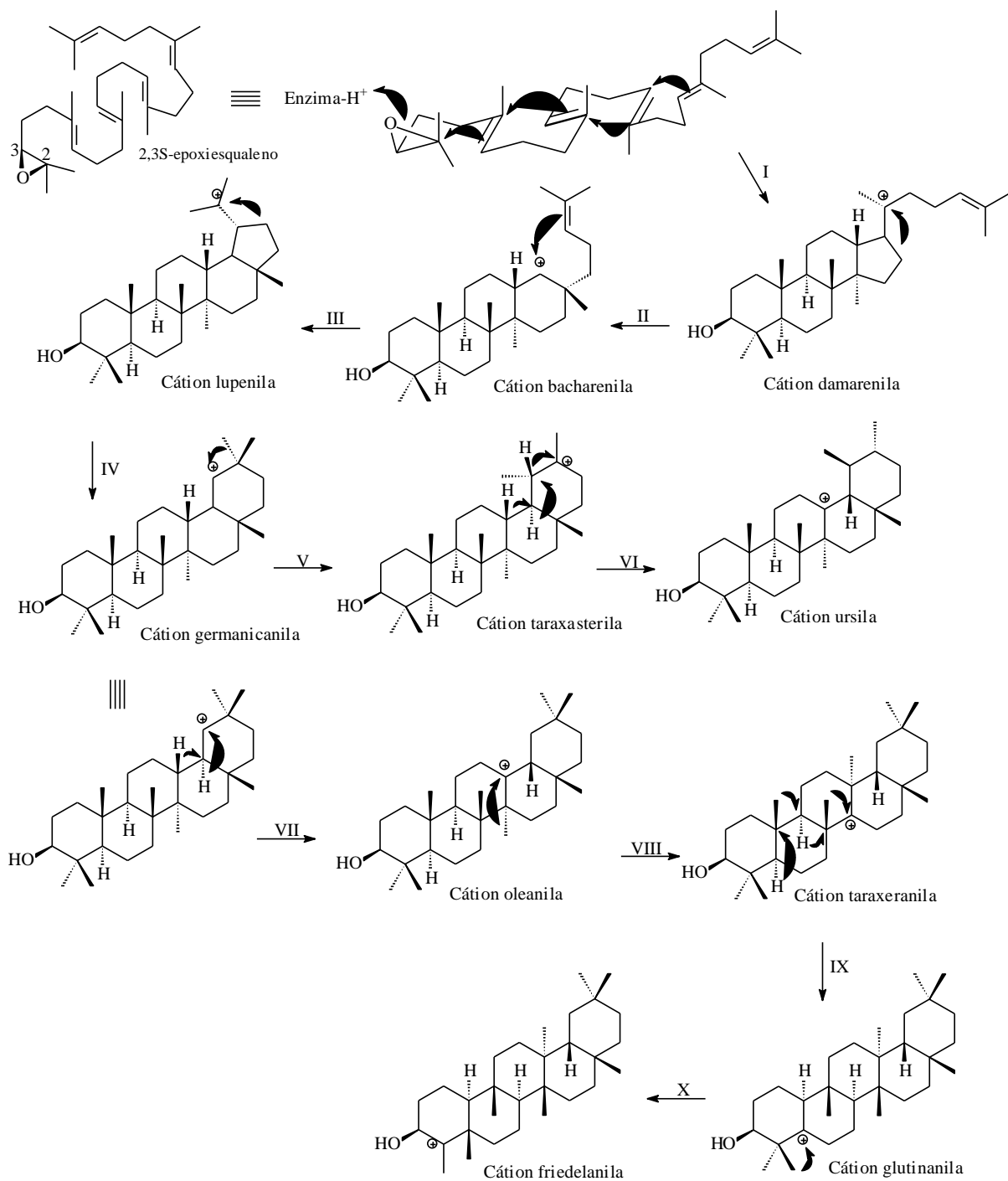
A condensação “cabeça-cauda” das unidades de DMAP e IPP, catalisada pela enzima prenil-transferase origina a cadeia precursora dos monoterpenos ( $C_{10}$ ), a geranilpirofosfato (GPP). Através da condensação dessa cadeia de 10 átomos de carbono com outras unidades de IPP forma conseqüentemente as cadeias precursoras dos sesquiterpenos ( $C_{15}$ ), diterpenos ( $C_{20}$ ) e sesterterpenos ( $C_{25}$ ); a farnesilpirofosfato (FPP), geranilgeranilpirofosfato (GGPF) e geranilfarnesilpirofosfato (GFPP), respectivamente. Para a formação das cadeias com 30 e 40 átomos de carbono, precursoras dos triterpenos e tetraterpenos (carotenóides), é necessário que haja a condensação de duas unidades de farnesilpirofosfato e de duas unidades de geranilgeranil pirofosfato, respectivamente (Figura 7).

Entre a classe dos terpenos, os triterpenos um grupo com maior número de estruturas diferentes, sendo mais de 100 esqueletos relatados como produtos naturais (DOMINGO *et al.*, 2009). Em alguns poucos casos ocorrem esses compostos apresentam-se como cadeias abertas, monocíclicos, bicíclicos, tricíclicos e hexacíclicos, entretanto a grande maioria é encontrada, no formato de tetracíclicos 6-6-6-5 e pentacíclicos 6-6-6-6-5 e 6-6-6-6-6 (XU *et al.*, 2004).

A fonte dessa variedade de estruturas esta atrelada ao mecanismo no processo de biossíntese (DOMINGO *et al.*, 2009). Estudos realizados por Ruzicka e colaboradores, na década de 1950, indicam que os triterpenos hidroxilados ( $C_{30}H_{50}O$ ) foram produzidos na mesma rota biossintática e posição do carbono C-3, sugerindo assim um mecanismo para explicar a elaboração do esqueleto triterpênico (XU *et al.*, 2004).

A partir do intermediário 2,3-epoxiesqualeno acontece a ciclização do esqualeno, oriundo da oxidação enzimática que precisa de uma flavoproteína e nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH), podendo apresentar-se com distintas conformações, tais como, e cadeira-barco-cadeira-barco e cadeira-cadeira-cadeira-barco (LOBO; LOURENÇO, 2007). As enzimas triterpenos sintases promove adições eletrofílicas nas duplas ligações causando as ciclizações, quebra do epóxido e criação de carbocátion, Figura 7 (XU *et al.*, 2004; LOBO; LOURENÇO, 2007; DOMINGO *et al.*, 2009). Estima-se que o 2,3-epoxiesqualeno seja o possível precursor da maioria dos triterpenoides  $3\beta$ -hidroxilados (XU *et al.*, 2004).





**Figura 8** – Rota biossintética de alguns esqueletos de triterpenos pentacíclicos  
 Fonte: NÚÑEZ; RIVAS, 2004

Nesse processo, depois de acontecer as primeiras ciclizações o esqueleto do tipo 6-6-6-5, é constituído com um carbocátion terciário, denominado de cátion damarenila (Etapa 1, Figura 8). Na etapa II ocorre a expansão do anel de 5 para um 6 átomos de carbono, formando o cátion bacharenila. Na etapa III acontece então outra ciclização criando um carbocátion terciário e a formação do cátion lupenila. Na etapa IV é formado um carbocátion secundário, o anel é expandido e o cátion germanicalina é produzido. Após a formação desse cátion, passa

a existir duas alternativas de vias biossintéticas e rearranjos do tipo Wagner-Meerwein acontecendo nas próximas etapas. Na etapa V, que é a primeira possibilidade ocorre a transferência 1,2 de metila produzindo o cátion taraxasterila. Na etapa VI a mudança em cadeia 1,2 de hidreto origina o cátion ursila. Na etapa VII, que é a segunda via, a transferência em cadeia 1,2 hidreto produz o cátion oleanila. Na etapa VIII o íon 1,2 metila produz o cátion taraxarenila. Na etapa IX a mudança em cadeia 1,2 de metila resulta no cátion glutinanila. Na última etapa, X, a migração 1,2 metila ocasiona no cátion friedelanila, (Figura 8) (NÚÑEZ; RIVAS, 2004).

## 2.6. Atividade antimicrobiana

Alguns estudos realizados relatam um aumento de resistência das bactérias aos antibióticos. Alguns antibióticos utilizados anteriormente no combate e prevenção de doenças infecciosas, já não são mais eficazes. Consequentemente pessoas têm sido vítimas de várias infecções, como por exemplo, a infecção hospitalar, que podem levar a óbito os enfermos.

A Organização Mundial da Saúde incorporou o aumento da resistência antimicrobiana (RAM) como ameaça à saúde pública mundial, pois prolonga a permanência de doenças e eleva os custos relacionados aos cuidados de saúde, uma vez que o tempo de internamento passa a ser maior com a necessidade de cuidados mais intensivos (OMS, 2016).

De acordo com estimativas realizadas na Europa em 2012, pressupõem que mais de 25.000 pessoas morrem por ano, devido a infecções causadas por bactérias que apresentam resistência. Além disso, os custos com cuidados referentes à saúde atingem a marca de 1,5 bilhão de euros anualmente (Resistência antibacteriana, 2012). Outro fator preocupante quanto a RAM é que haja a prescrição de novos medicamentos pode causar efeitos colaterais, uma vez que não se sabe os danos que eles possam causar ao organismo humano com o uso prolongado.

As bactérias *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* e *Proteus*, são as que apresentam maiores níveis de resistência aos antibióticos. Estudos mostram que nos casos de tratamento com antibióticos para essas bactérias houve resistência de 46,9% a sulfametoxazoltrimetoprima, 46,7% a cefalotina, 27,6% ao ácido nalidíxico e 22,3% a nitrofurantoína.

A bactéria *Acinetobacter baumannii*, do gênero *Acinetobacter* spp, possui alta capacidade de adaptação, além de variabilidade metabólica e nutricional elevada, e são

frequentemente encontras em equipamentos no ambiente hospitalar. *A. baumannii* é a causadora de algumas infecções: meningites, septicemias, pneumonias e infecções; sendo principalmente os pacientes imunocomprometidos os mais atingidos. Essa espécie é considerada um patógeno oportunista de ampla importância nas infecções nosocomiais<sup>7</sup> (MARTINS; BARTH, 2013).

A bactéria *Proteus mirabilis*, do gênero *Proteus* e família *Enterobacteriaceae*, é outro organismo considerado patógeno oportunista, classificado como gram-negativa. Em geral, esse microrganismo é encontrado no solo, em água poluída e na flora intestinal de seres humanos e animais. No homem, a bactéria *P. mirabilis* causa infecção no trato urinário em especial em indivíduos que já possuem problemas no sistema renal (MOTTA *et al.*, 2012).

Além disso, a *P. mirabilis* causa também doenças como pielonefrite<sup>8</sup> e urolitíase (pedras nos rins e na urina). Estima-se que aproximadamente 45% das infecções urinárias decorrente do uso de cateteres nos Estados Unidos são ocasionados pela *P. mirabilis* (Estudo sobre *Proteus mirabilis*, 2016).

Outras patologias também estão associadas a essa bactéria, como por exemplo, infecções em recém-nascidos, que podem evoluir para meningite e meningoencefalite<sup>9</sup>, e em alguns caso pode levar óbito. Há estudos também que apontam a ocorrência de infecções da artrite reumatóide.

Entretanto, as doenças mais comuns ocasionados pela *P. mirabilis* são as infecções no trato urinário. Essas infecções geralmente começam através de uma inflamação na ureta. Quando a infecção ocorre na bexiga é chamada de cistite, enquanto que a infecção nos ureteres<sup>10</sup> é chamada de uretrites. O risco maior para o paciente deve-se ao fato que a infecção pode aloca nos ureteres atingindo os rins, ocasionando em pielonefrite.

Em 2010 estimou-se que no mundo exista mais de 150 milhões de casos de infecção no trato urinário anualmente. Calcula-se que dos pacientes com infecção no trato urinário cerca de 90% manifestam cistite e o restante desenvolvem pielonefrite. A infecção se apresenta de modo recorrente em cerca de 25% dos casos.

Portanto, a comunidade científica tem interesse na descoberta de substâncias que apresentem ou intensifique o combate frente a essa bactéria.

---

<sup>7</sup> É a infecção contraída no hospital, provocada pela flora endógena (infecções iatrogênicas) ou pela flora exógena, proveniente do meio ambiente, pessoal e material inerte

<sup>8</sup> É uma infecção do trato urinário, que atinge a “piel” (pelve) do rim.

<sup>9</sup> Inflamação que atinge o encéfalo e as meninges.

<sup>10</sup> São tubos que faz parte das vias urinárias e que liga a pelve do rim à bexiga. A sua função é propelir a urina do rim até a bexiga.

Dentro do imenso universo de metabólitos secundários, produzido pelas espécies vegetais, têm-se os triterpenos. Vários efeitos biológicos reais e potenciais têm sido avaliados para essa classe de substâncias, tais como atividade anti-inflamatória, analgésica, antimicótica, antiviral, antiplasmodial, antiulcerogênica, anticariogênica, imunomoduladora, protetora vascular, antiobesidade, anticarcinogênica e efeito tônico (SILVA *et al.*, 2008).

Diante do exposto, é necessário que se busque novos compostos que possam ser utilizados de forma mais eficiente no combate de doenças infecciosas causadas por bactérias. Nesse sentido, o bioma da Mata Atlântica surge como uma reserva natural de espécies vegetais, muitas desconhecidas do ponto de vista químico, que podem conter diversas substâncias que auxiliem no combate de infecções.

### 3. OBJETIVO

#### 3.1. Geral

Isolar e identificar compostos orgânicos com potencial atividade bactericida dos galhos da espécie *Pouteria macahensis* T. D. Penn, endêmica da Bahia.

#### 3.2. Específicos

- Obter extratos orgânicos dos galhos da espécie *P. macahensis* através da maceração por extração exaustiva usando solventes de diferentes polaridades e avaliar sua atividade frente às bactérias *Acinetobacter baumannii*, *Proteus mirabilis*, *Escherichia coli* e *Staphylococcus epidermes*.
- Cromatografar o extrato selecionado, visando o isolamento e identificação de compostos orgânicos bioativos;
- Identificar os compostos isolados usando técnicas espectroscópicas na região no Infravermelho (IV), Ressonância Magnética Nuclear Uni e Bidimensional;
- Testar os compostos isolados frente à bactéria *Proteus mirabilis*.

## 4. METODOLOGIA

### 4.1. Especificações de reagentes, materiais e equipamentos utilizados

Nas técnicas cromatográficas foram utilizados, na cromatografia em camada delgada (CCD) placas de vidro recobertas com sílica gel Vetec<sup>®</sup> 60-G, espessura de 0,25 mm, na camada delgada preparativa (CCDP) placa de vidro recoberta com o mesmo tipo de sílica usando a espessura de 0,50 mm, todas ativada a 100 °C. Na cromatografia em coluna aberta foi utilizada sílica gel Merck<sup>®</sup> 60 (0,063 – 200 mm).

As cromatoplasmas foram reveladas com vapores de iodo, vanilina em meio ácido conforme de o procedimento descrito por PICMAN *et al.* (1980). O revelador vanilina foi preparado a partir de 3 g de vanilina, 135 mL de etanol, 135 mL de água e 30 mL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentrado (MERK, 1972).

Os espectros de absorção na região do Infravermelho (IV) foram obtidos na região de 4.000 – 400 cm<sup>-1</sup> no equipamento PerPMn Elmer<sup>®</sup> 400, na Universidade Estadual de Santa Cruz (UESC), com a colaboração do Grupo Bioma. As amostras foram homogeneizadas em pastilhas de brometo de potássio (KBr) sem humidade.

Os espectros de Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio e Carbono, Uni e Bidimensional (HSQC, HMBC) assim como os experimentos de DEPT 135 foram obtidos no espectrômetro Avance<sup>®</sup> AC400 (BRUKER) na Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG). O mesmo foi operado com frequência 400 MHz para os experimentos de <sup>1</sup>H e 100 MHz para <sup>13</sup>C. Os deslocamentos químicos foram expressos em valores de  $\delta$  (ppm), para referência interna foi usado o tetrametilsilano (TMS,  $\delta = 0,00$ ). Para solubilizar as amostras foram utilizados os solventes deuterados clorofórmio ( $\delta$ H 7,27 e  $\delta$ C 77,00) e piridina ( $\delta$ H 7,22; 7,68 e 8,62 e  $\delta$ C 123,87; 135,91 e 150,35).

Os espectros das substâncias no IV e RMN foram interpretados com auxílio das tabelas descritas por Pavia (2008).

Para a determinação da composição química dos triterpenos esterificados foi utilizada a metodologia de Mendes *et al.*, (1999). 6 mL de solução de NaOMe/MeOH (0,5 mol) foram adicionados a 10 mg de substâncias esterificada. Essa solução permaneceu a temperatura de 80°C por 2 horas. Após resfriamento, 10 mL de água foram adicionados ao sistema reacional, e em seguida foi realizada a extração com 3 mL de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, por duas vezes. As fases

orgânicas foram combinadas e analisadas por CG-DIC. A fase aquosa foi neutralizada com solução de HCl 10%, e em seguida extraída com 5 mL de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, por duas vezes. As fases foram combinadas, secas em sulfato de sódio anidro e concentrado levando ao isolamento do núcleo triterpênico.

Para a análise da fase transesterificada foi utilizada a cromatografia gasosa acoplada ao detector de ionização de chama (CG-DIC) com auxílio do cromatógrafo a gás Varian Saturn 3800, dotado de uma coluna capilar em sílica fundida Carbowax (30 m X 0,25 mm) sendo a fase estacionária Polietilenoglicol (0,25 µm de espessura de filme), utilizamos hélio 5.0 como gás arraste e fluxo de 1,0 mL.min<sup>-1</sup> (10 psi). A temperatura do injetor foi de 220 °C e do detector 240 °C. Foi injetado 1,0 µL de solução da amostra em hexano no modo *split* (1:10). A temperatura inicial da coluna foi de 60 °C, elevada de 5 °C.min<sup>-1</sup> até atingir 200 °C, manteve-se essa temperatura por 5 minutos.

Para a identificação foi utilizada uma mistura de ácidos graxos metilados, Fatty Acid Methyl Ester (FAME) contendo de 8 a 22 carbonos certificada (Supelco – USA; catalogo 47801- Lot: LC00126). Ao comparar os tempos de retenção da amostra com tempos de retenção dos padrões obteve-se a composição química dos ésteres metílicos dos ácidos graxos. Para a quantificação dos ésteres, utilizou-se a integração eletrônica dos picos detectados por DIC através da normatização, corrigido pelo fator resposta conforme a metodologia sugerida pelo Instituto Adolfo Lutz (2008).

Foi realizado o teste Lieberman-Burchard para diferenciar a esteroides e triterpenoides baseado na metodologia descrita por Matos (2009), com adaptações. Adicionou ao material 1 mL de clorofórmio e em seguida 1 mL de anidrido acético. A mistura foi agitada suavemente e adicionadas 3 gotas de ácido sulfúrico concentrado. O material foi novamente agitado e observado o aparecimento de cores. A coloração azul evanescente seguida de verde permanente indica a presença de esteroides livres, e a formação da cor parda até vermelha/roxo indica triterpenoides pentacíclicos livres.

Os pontos de fusão foram determinados usando o Ponto de Fusão Capilar Fisatom<sup>®</sup> 430 D.

Para a realização dos procedimentos foram utilizados solvente orgânicos das marcas Dinâmica<sup>®</sup>, Neon<sup>®</sup>, Química Moderna<sup>®</sup>, Synth<sup>®</sup> e Vetec<sup>®</sup>, todos com grau PA.

#### 4.2. Coleta e identificação do material vegetal

A espécie *Pouteria macahensis* T. D. Penn foi coletada no mês de setembro de 2014, as margens do rio de Contas, município de Itacaré – BA (coordenadas 4°15'53.0"S 38°59'59.6"W). O indivíduo é uma árvore alta, com aproximadamente 10 metros de altura e encontrado em terreno arenoso.

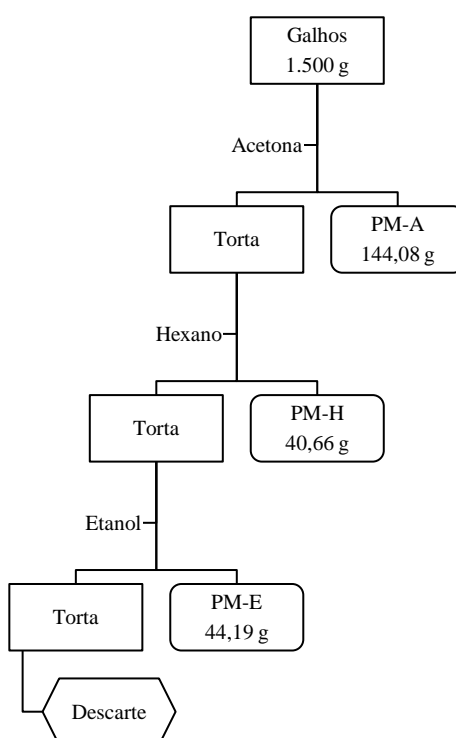
A identificação botânica foi realizada por Luis Alberto Matos e José Lima da Paixão, no herbário da UESC, sendo a exsicata depositada como número 21.426.

Os galhos foram separados e secos a sombra, em temperatura ambiente. Posteriormente, foram triturados em moinho de facas (Marconi®) fornecendo 1.688 g.

#### 4.3. Preparação dos extratos

Os galhos de *P. macahensis* (1.500 g) triturados, foram submetidos a extração exaustiva e sucessiva a frio, com acetona, hexano e etanol.

A mistura foi filtrada, concentrada sob pressão reduzida, e o material foi resubmetido à extração por 7 dias. Esse processo foi repetido por 4 vezes, sendo obtidos os extratos: acetônico 144,08 g (PM-A), hexânico 40,66 g (PM-H) e etanólico 44,19 g (PM-E), conforme a (Figura 9).



**Figura 9** – Fluxograma de preparação dos extratos dos galhos de *P. macahensis*



#### 4.3.1. Biocromatografia dos extratos de *P. macahensis*

Uma suspensão do micro-organismo foi preparada em 3 mL do meio infusão de cérebro e coração Brain Heart Infusion (BHI) a ponto de turvação 1 na escala MacFarland a partir de estoque de bactérias. Em um tubo de 50 mL foram adicionados 20 mL de ágar nutriente a uma temperatura de 45°C, 3 mL de suspensão bacteriana e 150 µL do corante cloreto de 2,3,5-trifeniltetrazólio (TTC).

Cerca de 1000 µL da mistura foram distribuídos sobre uma placa cromatográfica de sílica gel, contendo spots dos extratos brutos (acetônico, hexânico e etanólico). A cromatoplaça permaneceu em repouso por 24 horas, sob temperatura constante de 37 °C em estufa de esterilização e em seguida foi medido o halo de inibição. Esse procedimento foi realizado em triplicata. Foi utilizado como controle positivo antibiótico cloranfenicol.

Nesse teste foram utilizadas as bactérias *A. baumannii*, *P. mirabilis*, *Escherichia coli* e *Staphylococcus epidermes*.

Esses testes foram realizados sob a orientação da Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Aline Conceição, coordenadora do laboratório de micologia da UESC.

#### 4.4. Isolamento de substâncias do extrato acetônico

O extrato acetônico foi cromatografado em coluna de sílica gel. Nesta, empregou-se 60 gramas do extrato acetônico e 1.300 gramas de sílica gel; a coluna foi empacotada utilizando hexano e eluída com o mesmo e com misturas de polaridades crescentes de hexano e etanol (Tabela 2). O volume morto da coluna cromatográfica correspondeu a 1,5 L.

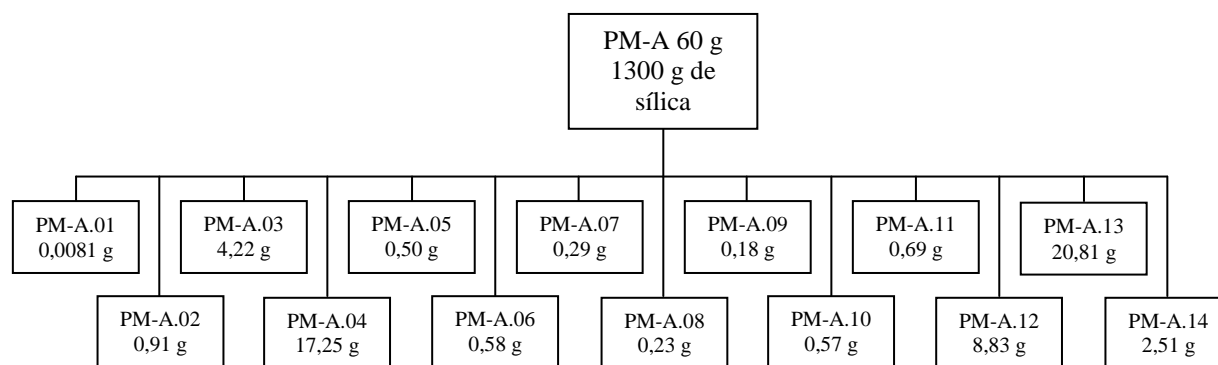
A coluna originou 39 frações (Tabela 2). As frações foram agrupadas utilizando a técnica de cromatografia em camada delgada (CCD), sendo as placas reveladas com vapores de iodo. As frações com RF próximos foram agrupadas, resultando em 14 grupos (Tabela 3 e Figura 10).

**Tabela 2** – Frações obtidas e eluentes usados na coluna cromatográfica do extrato PM-A

Eluente	(%)	Frações
Hex	100	1 – 6
Hex/Eta	95/05	7 – 14
Hex/Eta	90/10	15 – 19
Hex/Eta	80/20	20 – 22
Hex/Eta	70/30	23 – 26
Hex/Eta	50/50	27 – 31
Hex/Eta	70/30	32 – 35
Eta	100	36 – 39

**Tabela 3** – Grupos obtidos após a análise por CCD, da coluna cromatográfica do extrato PM-A

Frações	Grupos
1 – 3	PM-A.01
4 – 9	PM-A.02
10	PM-A.03
11 – 13	PM-A.04
14 – 16	PM-A.05
17 – 21	PM-A.06
22 – 23	PM-A.07
24 – 25	PM-A.08
26	PM-A.09
27 – 28	PM-A.10
29 – 30	PM-A.11
31 – 34	PM-A.12
35 – 38	PM-A.13
39	PM-A.14

**Figura 10** – Esquema geral do fracionamento em coluna cromatográfica do extrato acetônico de *P. macahensis* (PM-A)

#### 4.4.1. Estudo dos grupos obtidos do extrato acetônico

##### **Grupo PM-A.02:**

O grupo apresentou-se como um sólido branco, em meio a um óleo e com textura pastosa. Foi adicionado acetona a frio, a fim de lavar o material, porém houve a formação de uma pasta (resina). Ao aquecer, na tentativa de solubilizar, verificou-se a presença de óleo e material pastoso, essa substância apresentou faixa de fusão entre 64,8 a 68,1 °C e foi denominada substância 1.

##### **Grupo PM-A.03:**

Esse grupo apresentou um sólido branco em meio a um óleo amarelo e foi trabalhado de duas maneiras (Figura 10, página 49). Cerca de 1,22 g desse material foi separado e lavado sucessivas vezes com acetona. Obteve-se um sólido branco amorfo (0,0104 g), com faixa de fusão entre 260 – 263 °C, denominado substância 2.

Cerca de 3,00 g desse grupo foi submetido a coluna cromatográfica, utilizando 60 g de sílica gel. O solvente para empacotamento foi o hexano e a eluição ocorreu com o mesmo e com misturas com polaridades crescentes de hexano e diclorometano, o volume morto foi de 60 mL. Foram obtidas 59 frações (Tabela 4), que foram reunidas em 4 grupos (Figura 10).

Nas frações 1 a 22 e 27 a 31 não foram observados a presença de nenhum material. Somente após a fração 23 foi observado a presença de sólido. Então, as frações foram reunidas em 4 grupos, após a análise por CCD (Tabela 5).

**Tabela 4** – Frações obtidas e eluentes usados na coluna cromatográfica do grupo PM-A.03

Eluente	(%)	Frações
Hex	100	1 – 4
Hex/DCM	95/05	5 – 6
Hex/DCM	90/10	7 – 11
Hex/DCM	85/15	12 – 34
Hex/DCM	75/25	35 – 48
Hex/DCM	50/50	49 – 50
DCM	100	51 – 59

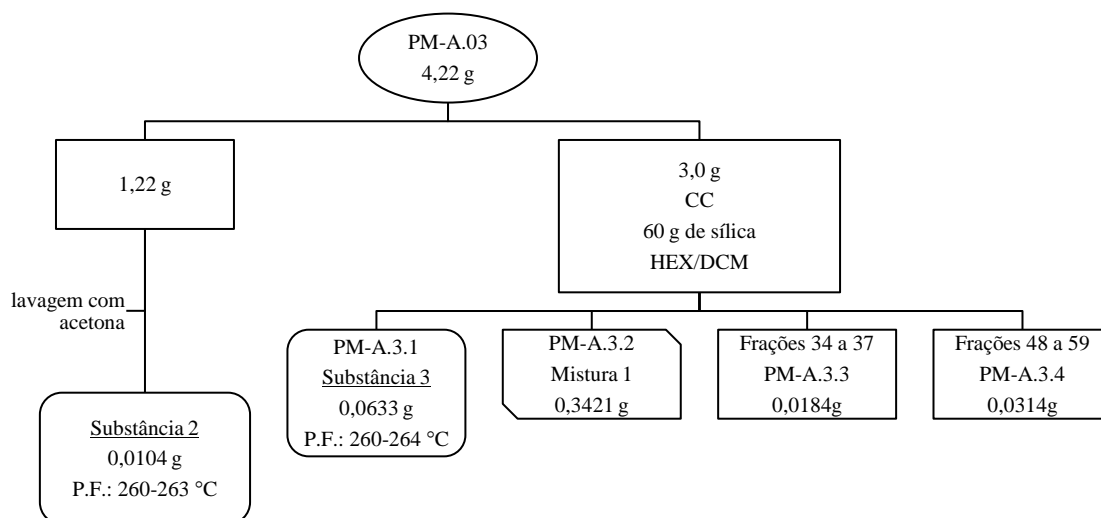
**Tabela 5** – Grupos obtidos após a análise por CCD, provenientes da coluna cromatográfica do grupo PM-A.03

Frações	Grupos
23 – 26 e 32	PM-A.3.1
33	PM-A.3.2
34 – 37	PM-A.3.3
48 – 59	PM-A.3.4

Do fracionamento do grupo PM-A.03, obteve-se o sólido branco (0,0633 g), denominado substância 3, com ponto de fusão 260 – 264 °C. Através de valores de RF obtidos por CCD, foi evidenciado que se trata de material adicional da substância 2.

Foi obtido também um sólido branco, (subgrupo PM-A.3.2) 0,3421 g que após análise por CCD mostrou-se como material rico na substância 2.

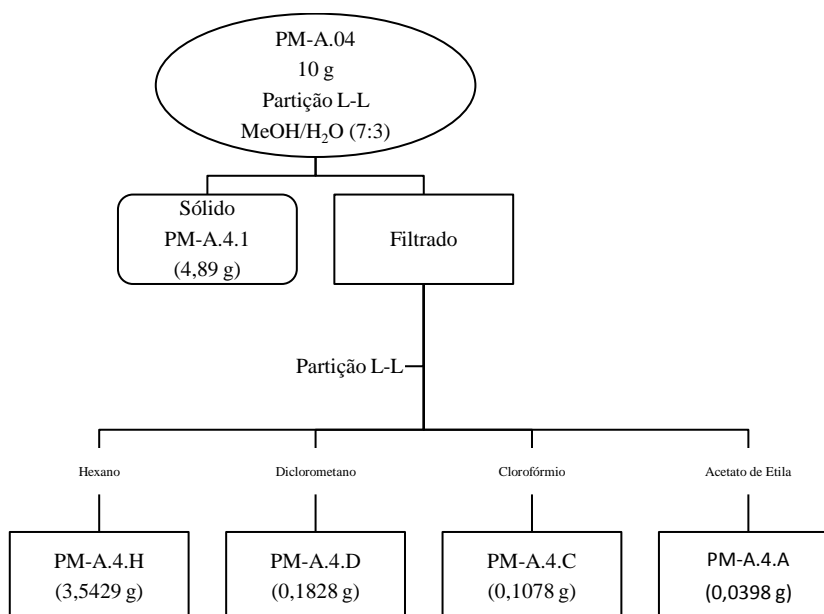
Os subgrupos PM-A.3.3 e PM-A.3.4 não foram trabalhados devido à pouca massa (Figura 11).



**Figura 11** – Esquema da purificação das substâncias presentes no grupo PM-A.03

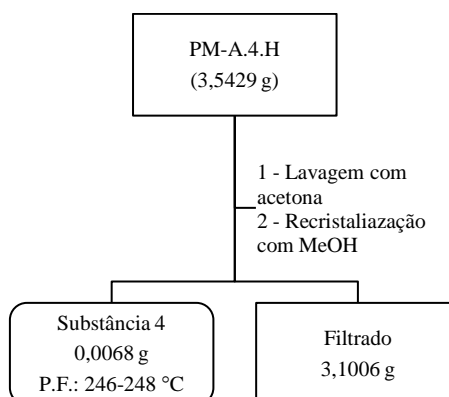
### Grupo PM-A.04:

Esse grupo apresentou um sólido em meio a um óleo de coloração verde escuro. Cerca de 10 g deste foi submetido à partição com 100 mL metanol/água (7:3). Houve a separação de um sólido de coloração verde, chamado de PM-A.4.1 (4,89 g). O material solúvel foi submetido à partição com os solventes hexano, diclorometano, clorofórmio e acetato de etila, fornecendo os seguintes grupos PM-A.4.H (3,5429 g), PM-A.4.D (0,1828 g), PM-A.4.C (0,1078 g) e PM-A.4.A (0,0398 g), (Figura 12).



**Figura 12** – Esquema geral da partição líquido-líquido do grupo PM-A.04

Dos grupos obtidos na partição, apenas o hexânico foi trabalhado devido a maior massa. Este foi lavado sucessivas vezes com acetona, sendo obtido um sólido branco amorfo, que foi recristalizado em metanol e chamado de substância 4 (0,0068 g); que apresentou faixa de fusão de 246 a 248 °C (Figura 13).



**Figura 13** – Purificação das substâncias presentes no material PM-A.04.H

O sólido PM-A.4.1 (4,89 g), (Figura 12, página 51), foi cromatografado em coluna de filtração rápida com sílica gel. Foram utilizados os solventes: hexano, diclorometano, clorofórmio e acetato de etila, nessa respectiva ordem, o volume morto da coluna foi de 50 mL. Foram obtidas 32 frações (Tabela 6).

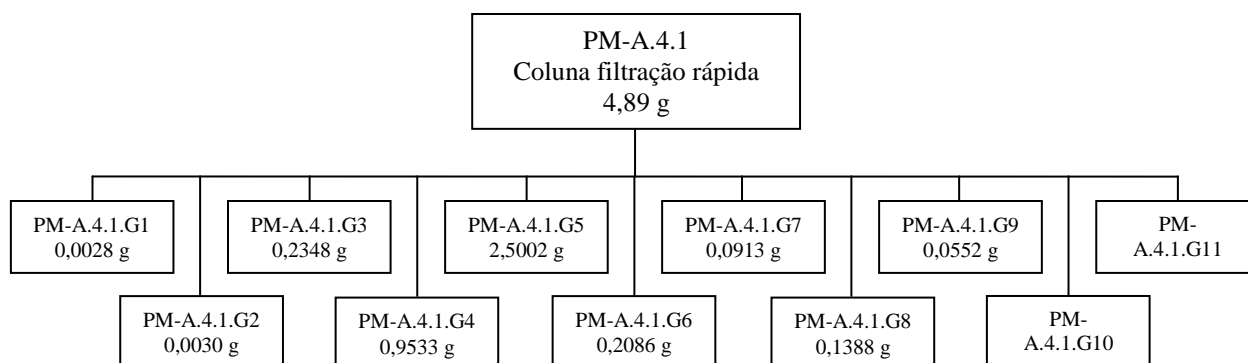
**Tabela 6** – Frações obtidas e eluentes usados na coluna cromatográfica do sólido PM-A.4.1

Eluente	(%)	Frações
Hex	100	1 – 10
DCM	100	11 – 19
CHCl <sub>3</sub>	100	20 – 30
Ac. Etila	100	31 – 32

**Tabela 7** – Grupos obtidos após a análise por CCD, provenientes da coluna cromatográfica do material PM-A.4.1

Frações	Grupos
1 – 2	PM-A.4.1.G1
3	PM-A.4.1.G2
4 – 5	PM-A.4.1.G3
6 – 10	PM-A.4.1.G4
11 – 12	PM-A.4.1.G5
13	PM-A.4.1.G6
14	PM-A.4.1.G7
15 – 17	PM-A.4.1.G8
18 – 23	PM-A.4.1.G9
24 – 28	PM-A.4.1.G10
29 – 32	PM-A.4.1.G11

As frações foram avaliadas por através de CCD, sendo reunidas em 11 grupos chamados de PM-A.4.1.G1 a PM-A.4.1.G11 (Tabela 7 e Figura 14).



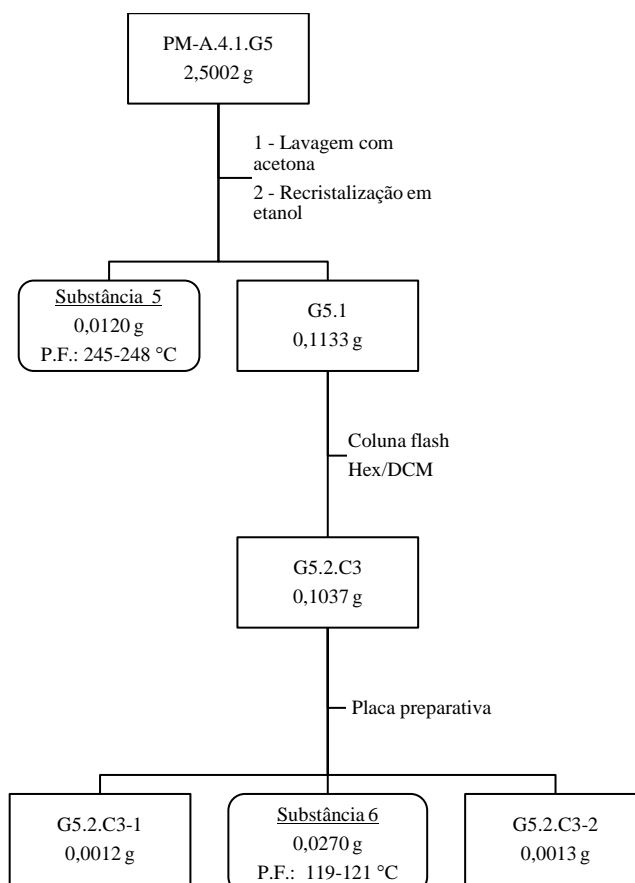
**Figura 14** – Grupos obtidos na coluna cromatográfica do material PM-A.4.1

Dos grupos obtidos na coluna cromatográfica do material PM-A.4.1, o grupo PM-A.4.1.G5 apresentou um sólido branco em meio a um óleo (Figura 15). Este material foi lavado sucessivas vezes com acetona, obtendo-se a substância 5 (0,0120 g) de faixa de fusão de 245 - 248°C. A comparação com o RF, CCD, com as demais substâncias isoladas conclui-se que este material é adicional da substância 4.

O material G5.1 (0,1133 g), foi cromatografado em coluna flash utilizando os solventes hexano e diclorometano, puros e com misturas de polaridades crescentes. Foram

obtidas 15 frações e reunidas em 3 grupos G5.2.C1 (0,0017 g), G5.2.C2 (0,0012 g) e G5.2.C3 (0,0729 g), (Figura 15).

Do grupo G5.2.C3 após a realização de várias placas preparativas foram obtidos 3 materiais. Um deles foi um sólido branco amorfo denominado substância 6 e apresentou faixa de fusão entre 119 - 121°C (Figura 15).



**Figura 15** – Esquema de purificação das substâncias presentes no material PM-A.4.1.G5

### **Grupo PM-A.06:**

Nesse grupo (Figura 10, pág. 49) foi observado a presença de um sólido em meio a um material de coloração verde intenso. Este foi lavado sucessivas vezes com acetona e obteve-se um sólido branco (0,0416 g) com faixa de fusão entre 124 a 125°C. O mesmo foi submetido ao processo de recristalização com metanol, obtendo-se um sólido cristalino designado substância 8.

### **Grupo PM-A.08:**

Esse grupo apresentou-se como uma resina de coloração marrom intensa. Neste foram adicionados acetona no intuito de se obter um sólido, porém este método não foi eficaz.

Novas tentativas foram realizadas com clorofórmio, acetato de etila e metanol, porém não foi possível obter nenhuma substância desse grupo.

#### **Grupo PM-A.12:**

O grupo PM-A.12 (Figura 10, pág. 49) apresentou-se como um material resinoso de coloração marrom intensa. Devido ao seu alto grau de polaridade foi submetido ao processo de partição líquido-líquido. Cerca de 5,80 g do material foi solubilizado numa mistura de metanol/água (8:2), posteriormente foram realizadas três extrações com diclorometano. Obteve-se um material sólido com coloração verde escuro (0,3394 g). Ao ser lavado com acetona, obteve-se um sólido branco. Este por sua vez, ao ser analisado no espectro visível na região do infravermelho e determinação do ponto de fusão, pode-se concluir que era um derivado de ácido graxo.

#### **Grupo PM-A.13:**

Este grupo (Figura 10, pág. 49) apresentou-se como uma resina de coloração marrom intensa. Parte desse material (7,90 g) foi submetida a uma partição líquido-líquido com 80 mL metanol/água (5:3) e realizadas extrações com clorofórmio e acetato de etila. O material obtido na extração clorofórmica apresentou pouca massa e o material obtido com acetato originou um sólido de cor marrom. Apesar das tentativas, não foi possível isolar nenhuma substância desse grupo; devido à alta complexidade do material e pouca massa.

#### **Grupo PM-A.14:**

Este grupo (Figura 10, pág. 49) apresentou-se como uma resina de coloração marrom intensa. Este grupo e parte do grupo PM-A.13 foram reunidos e cromatografados em coluna aberta com sílica gel. Foram obtidos 3 grupos. Devido a pouca massa dos grupos e alta complexidade, não foi possível obter nenhuma substância desse grupo.

#### **Demais grupos:**

Os grupos PM-A.01, PM-A.05, PM-A.07, PM-A.09, PM-A.10 e PM-A.11 (Figura 9, pág. 48) não foram trabalhados devido a pouca massa de material obtida e alta complexidade observada através da CCD.

#### 4.4.2. Atividade antibacteriana das substâncias isoladas

As substâncias isoladas (substância 2, 4 e 6) foram submetidas à atividade antibacteriana utilizando a técnica de microdiluição em caldo. O método usado está descrito conforme a CLSI (M100-S22, 2012) com modificações. 90  $\mu\text{L}$  das soluções a 600, 300, 150 e 75  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , das substâncias isoladas foram distribuídas em placas de 96 orifícios estéreis, de poliestireno, de fundo chato adicionando-se posteriormente 10  $\mu\text{L}$  da suspensão de *P. mirabilis* turvada a 0,5 na escala McFarland, totalizando um volume de 100  $\mu\text{L}$  em cada orifício. As placas foram incubadas em ambiente umidificado por 24 h à 37 °C, após o qual 20  $\mu\text{L}$  do corante resazurina na concentração final de 0,01% foram adicionados a cada orifício. A presença ou ausência de crescimento bacteriano foi determinada pela formação de coloração rosa ou azul, respectivamente. Todos os testes foram realizados em triplicata e repetidos três vezes. Como controles, foram utilizados cloranfenicol a 50  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , micro-organismos testes, caldo BHI, soluções testes sem a bactéria e caldo somente com a bactéria.

Após a determinação da concentração inibitória mínima (CIM), fez-se o plaqueamento das substâncias dos poços para a determinação da concentração bactericida mínima (CBM). Para isso, 10  $\mu\text{L}$  das amostras referentes a cada concentração dos tratamentos foram transferidas para placas de Petri contendo Ágar Nutriente.

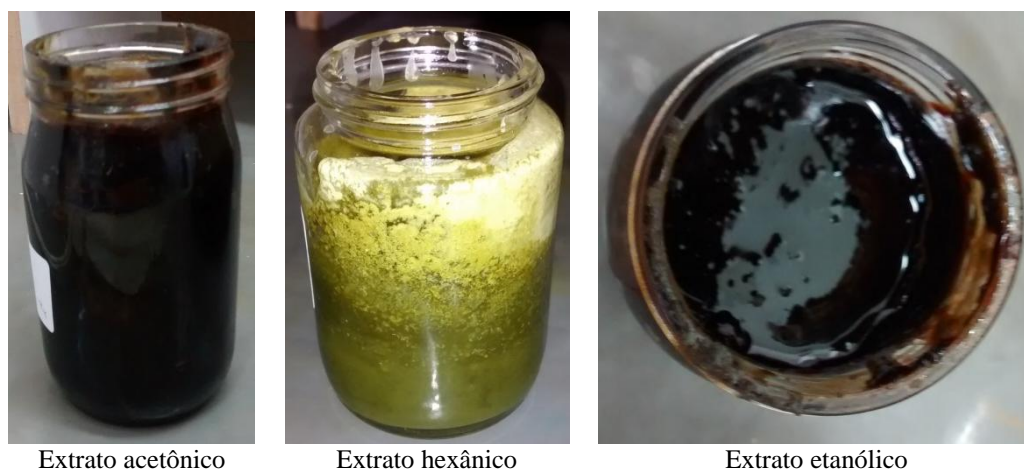
Esses testes foram realizados sob a orientação da Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Aline Conceição, coordenadora do laboratório de micologia da UESC.



## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1. Material vegetal e propriedade dos extratos

O material vegetal, após secagem em temperatura ambiente e triturado, gerou aproximadamente 1.750 g. Porém, apenas 1.500 g foram utilizados, originando três extratos brutos: acetônico 144,08 g (PM-A), hexânico 40,66 g (PM-H) e etanólico 44,19 g (PM-E), conforme a (Figura 16).



**Figura 16** – Extratos obtidos através da maceração dos galhos de *P. macahensis*

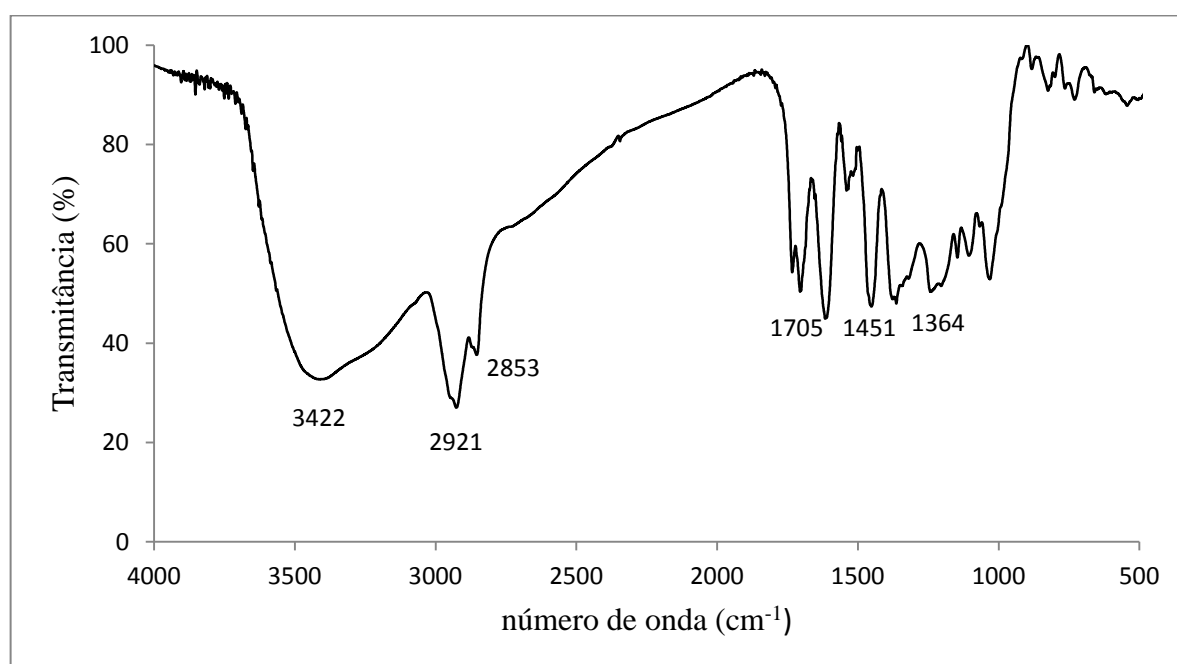
A escolha da ordem dos solventes para a extração do material vegetal foi devido à presença de látex na espécie vegetal. A primeira extração foi realizada com acetona, a fim de retirar grande parte dos compostos lipossolúveis (graxa e ou látex). Posteriormente, a extração foi feita com hexano, com o intuito de separar os compostos poliisoprênicos, ou seja, metabólitos com caráter apolar e, por fim, foi realizada a extração com o etanol, a fim de isolar compostos com caráter mais polar (MATOS, 2009).

O primeiro extrato obtido, acetônico (PM-A), (Figura 16) apresentou maior quantidade frente os outros, apresentou coloração marrom intensa e material com aspecto de graxa. No espectro no IV desse extrato, foi observada uma banda intensa na região entre 3600 e 3400  $\text{cm}^{-1}$ , atribuída ao estiramento de ligações O-H de grupos hidroxila; bandas agudas na região entre 2962 e 2853  $\text{cm}^{-1}$ , associadas a deformações de C-H de grupos  $\text{CH}_2$  e  $\text{CH}_3$ , respectivamente; bandas na faixa de 1725 a 1700  $\text{cm}^{-1}$ , associadas ao estiramento de ligações

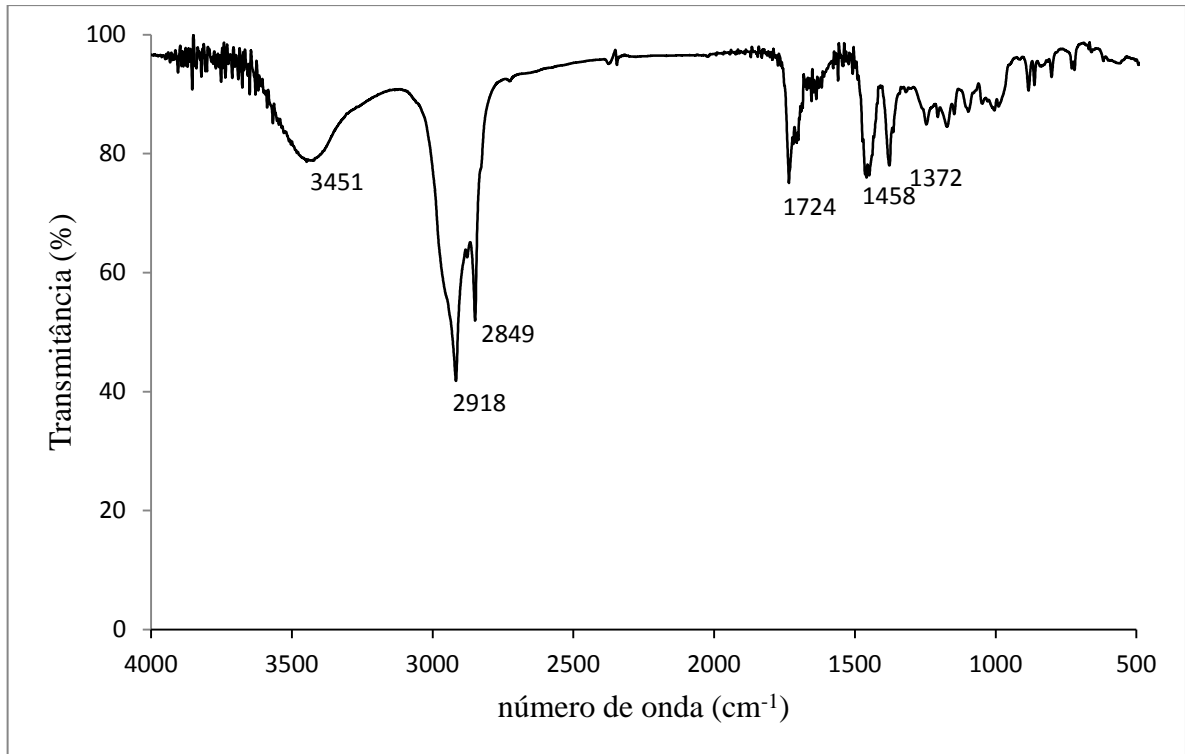
C=O de carbonilas de compostos alifáticos saturados e bandas na região entre 1485 a 1445 e 1370 a 1365  $\text{cm}^{-1}$ , relacionadas à deformação da ligação C-H, (Figura 17).

O extrato hexânico (PM-H), obtido após a extração com acetona, apresentou um material sólido, de coloração amarela esverdeada (Figura 16, página 56). No espectro na região do infravermelho desse extrato, foi observada uma banda fraca na região entre 3600 e 3400  $\text{cm}^{-1}$ , atribuída ao estiramento de ligações O-H de grupos hidroxila; bandas agudas e fracas na região entre 2962 e 2853  $\text{cm}^{-1}$ , associadas a deformações de C-H de grupos  $\text{CH}_2$  e  $\text{CH}_3$ , respectivamente; foram observadas bandas na faixa de 1725 a 1700  $\text{cm}^{-1}$ , associadas ao estiramento de ligações C=O de carbonilas de compostos alifáticos saturados e bandas na região entre 1485 a 1445 e 1370 a 1365  $\text{cm}^{-1}$ , relacionadas à deformação da ligação C-H (Figura 18, página 58).

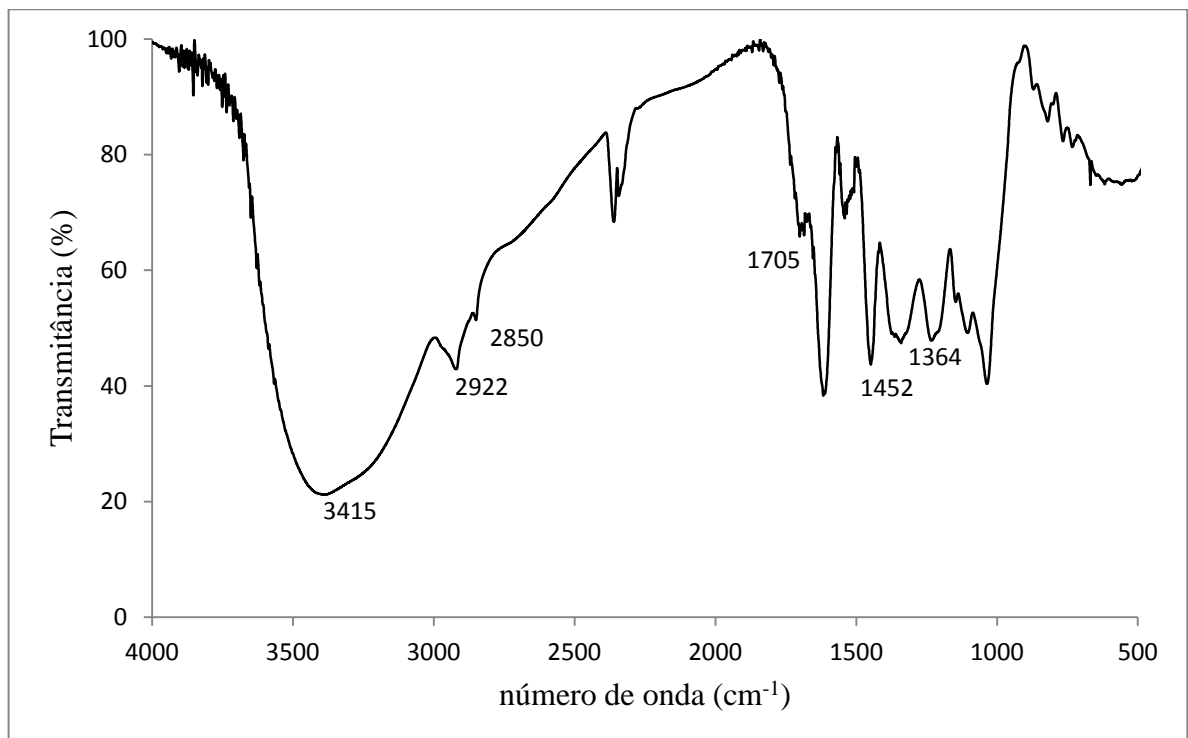
O último extrato obtido foi o etanólico (PM-E). Este material apresentou coloração marrom intensa e aspecto de resina, bastante viscoso (Figura 16, página 56). No espectro na região do infravermelho desse extrato, foi observada uma banda forte na região entre 3600 e 3400  $\text{cm}^{-1}$ , atribuída ao estiramento de ligações O-H de grupos hidroxila; bandas agudas e fracas na região entre 2962 e 2853  $\text{cm}^{-1}$ , associadas a deformações de C-H de grupos  $\text{CH}_2$  e  $\text{CH}_3$ , respectivamente; foram observadas bandas na faixa de 1725 a 1700  $\text{cm}^{-1}$ , associadas ao estiramento de ligações C=O de carbonilas de compostos alifáticos saturados e bandas na região entre 1485 a 1445 e 1370 a 1365  $\text{cm}^{-1}$ , relacionadas à deformação da ligação C-H (Figura 19, página 58).



**Figura 17** – Espectro na região do infravermelho (KBr) do extrato acetônico (PM-A)



**Figura 18** – Espectro na região do infravermelho (KBr) do extrato hexânico (PM-H)



**Figura 19** – Espectro na região do infravermelho (KBr) do extrato etanólico (PM-E)

Dando continuidade ao nosso estudo, em seguida, os extratos foram submetidos a testes microbianos, a fim de isolar compostos bioativos.

## 5.2. Avaliação da atividade antimicrobiana por Biocromatografia dos extratos

Os extratos foram submetidos, em triplicata, ao teste de atividade antimicrobiana com as bactérias: *A. baumannii*, *P. mirabilis*, *E. coli* e *S. epidermes*. Entretanto, somente foi observado halo de inibição com as bactérias *A. baumannii* e *P. mirabilis* (Tabela 8 página 58). Frente à bactéria *A. baumannii* apenas o extrato acetônico apresentou halo, enquanto que na bactéria *P. mirabilis* tanto o extrato acetônico como o hexânico apresentaram resultado positivo.

**Tabela 8** – Atividade antibacteriana dos extratos obtidos de *P. macahensis* frente às cepas de bactérias testadas

Extrato	Bactéria					
	<i>Acinetobacter baumannii</i>			<i>Proteus mirabilis</i>		
	halo 1 (mm)	halo 2 (mm)	halo 3 (mm)	halo 1 (mm)	halo 2 (mm)	halo 3 (mm)
Acetônico	2	2	1	7	7	7
Hexânico	Ø	Ø	Ø	6	6	6
Etanólico	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø

Ø: Não houve aparecimento de halo inibitório

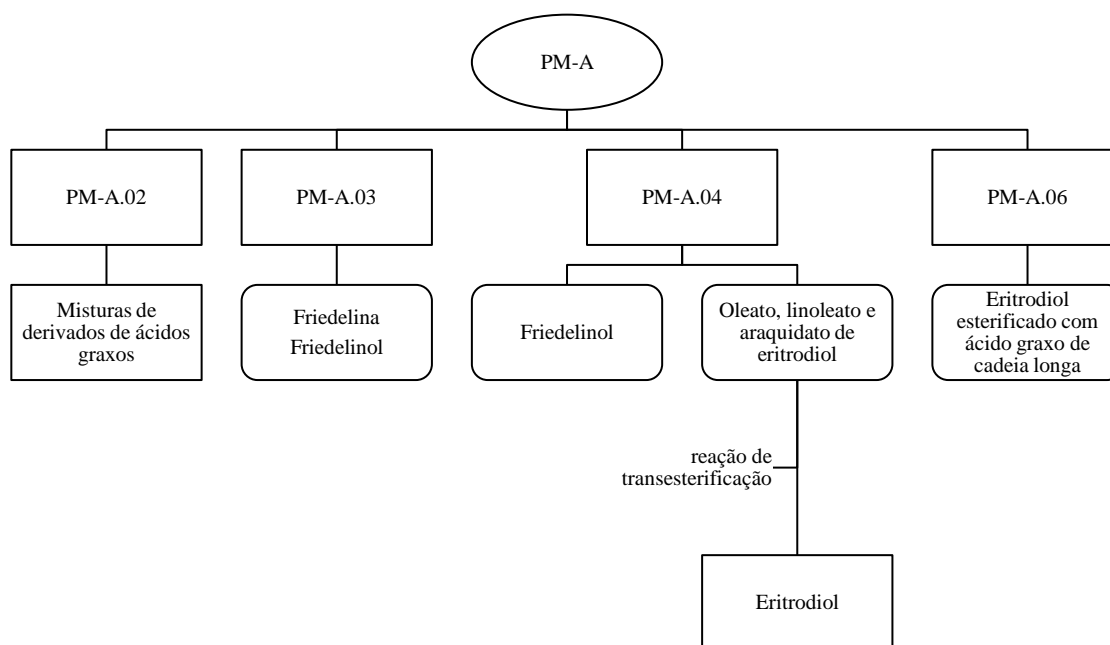
As bactérias utilizadas nesse teste são causadoras de algumas doenças. A bactéria *A. baumannii* é responsável por ocasionar infecções, meningites, septicemias, pneumonias e infecções; principalmente em pacientes que estão com o sistema imunológico debilitado. Já a bactéria *P. mirabilis* ocasiona a infecção no trato urinário, com ênfase maior nos indivíduos que já possuem problemas no sistema renal. Ambas são consideradas patógenos oportunista com grande relevância nas infecções hospitalares.

Diante dos resultados obtidos frente ao teste de biocromatografia, aliado ao perigo que essas bactérias apresentam à saúde humana, optou-se por trabalhar, inicialmente, com o extrato mais proeminente, o extrato acetônico, na tentativa de isolar metabólitos secundários que apresentem atividade biológica mais acentuada. Alguns estudos com extratos de espécies do gênero *Pouteria* sugerem a ação antimicrobiana, nos incentivando a continuar a pesquisa.

Nesse sentido, as substâncias isoladas e identificadas também serão submetidas ao teste antimicrobiano com a bactéria *P. mirabilis*, responsável por ser uma das causadoras de infecções no trato urinário (ITU), doença na qual possui elevado nível de reincidência, proveniente da RAM.

### 5.3. Identificação das substâncias isoladas no fracionamento do extrato acetônico

Do extrato acetônico (PM-A) foram isoladas e identificadas 5 substâncias diferentes, entre misturas e substâncias puras (Figura 20), além de um triterpeno obtido a partir da transesterificação dos compostos isolados.

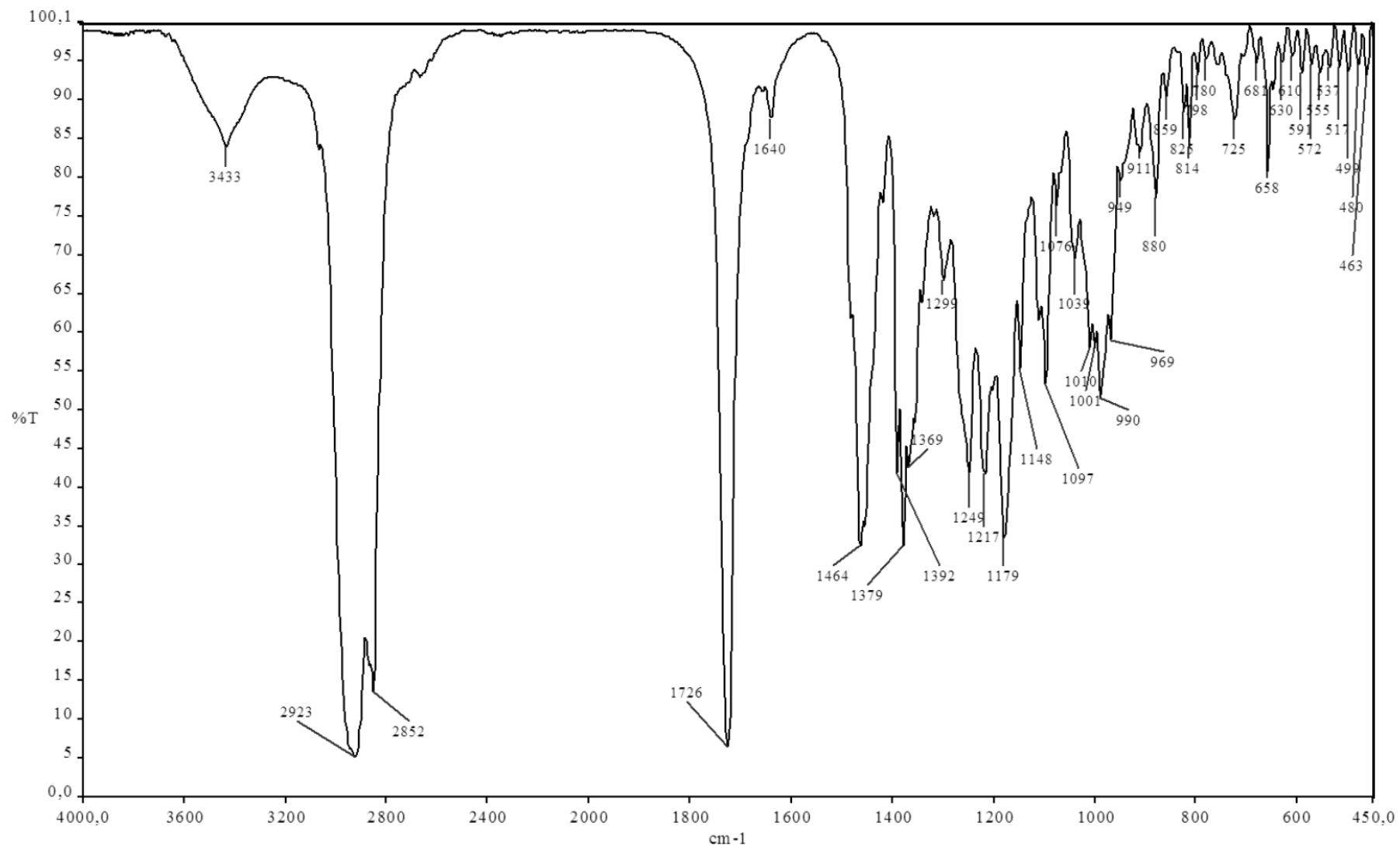


**Figura 20** – Substâncias isoladas e identificadas do fracionamento do extrato bruto acetônico (PM-A)

- **PM-A.02:** Mistura de ésteres derivados de ácidos graxos

A substância 1 apresentou no espectro na região do (IV) banda de absorção fraca em  $3433\text{ cm}^{-1}$  atribuída ao estiramento de ligações O-H dos grupos hidroxila. As bandas de absorção forte em  $2923$  e  $2852\text{ cm}^{-1}$  foram atribuídas ao estiramento das ligações C-H de grupos  $\text{CH}_2$  e  $\text{CH}_3$ , respectivamente. Em  $1179\text{ cm}^{-1}$  foi observada uma banda de absorção média do tipo deformação de ligação C-O. As bandas de absorção média em  $1464$  e  $1369\text{ cm}^{-1}$  foram relacionadas à deformação da ligação C-H. Foi observada também uma banda de absorção forte em  $1726\text{ cm}^{-1}$  foi associada à vibração de estiramento de carboxila de éster alifático, (Figura 21, página 62).

Os dados do espectro no IV da substância 1 associados a faixa de fusão entre 64,8 a 68,1°C, sugerem que essa substância seja uma mistura, sendo composta de derivados de ácidos graxos de cadeia longa.



**Figura 21** – Espectro no infravermelho (KBr) dos derivados de ácidos graxos (substância 1)

- **PM-A.03:** Friedelina e 3 $\beta$ -hidroxifriedelano (substância 2 e substância 3)

A substância 2 apresentou-se como um sólido branco, amorfo, solúvel em clorofórmio e faixa de fusão entre 260 a 263 °C. O teste de Liberman-Buchard para essa substância forneceu resultado positivo para triterpenos pentacíclicos. Sua determinação estrutural foi realizada a partir dos experimentos de IV, RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ , DEPT – 135, HSQC e HMBC e comparação com dados da literatura.

O espectro no infravermelho dessa substância apresentou banda de absorção média em  $3472\text{ cm}^{-1}$ , sendo associada a vibrações de estiramento do grupo O-H de álcool. As bandas de absorção forte em  $2925$  e  $2854\text{ cm}^{-1}$ , foram atribuídas a deformações de C-H de grupos  $\text{CH}_2$  e  $\text{CH}_3$ , respectivamente. A banda de absorção forte em  $1705\text{ cm}^{-1}$  foi associada à vibração de estiramento do grupo carbonila (C=O) de cetona. As bandas de absorção média em  $1465$  e  $1363\text{ cm}^{-1}$  foram relacionados à deformação da ligação C-H de grupos  $\text{CH}_2$  e  $\text{CH}_3$  (Figura 24, página 66). Esse espectro apresentou-se como um padrão característico de triterpenos oxigenados.

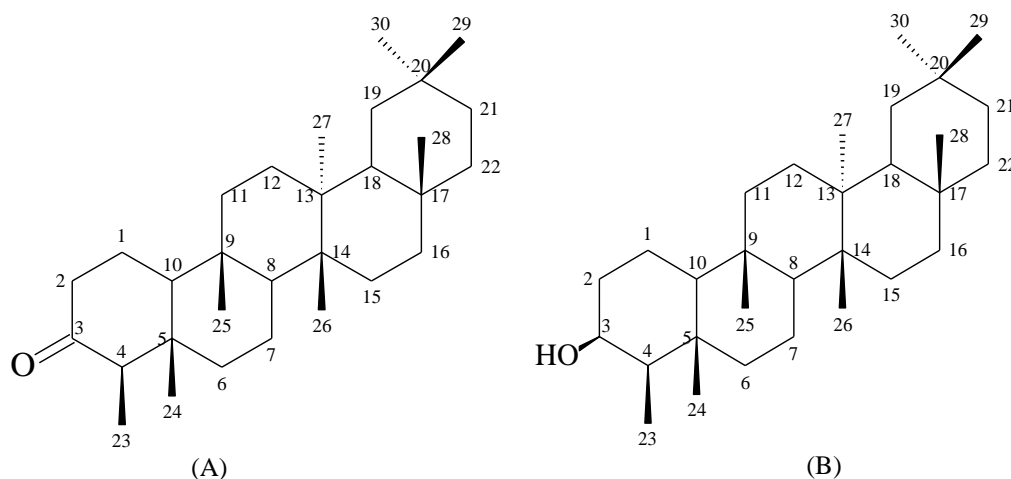
O espectro de RMN de  $^1\text{H}$  dessa substância (Figuras 25 a 27, páginas 67 a 69) apresentou sinais típicos de triterpenos com sete grupos de carbonos não hidrogenados na região entre  $\delta$  1,13 ppm a 0,79 ppm, e sinais característicos de deslocamentos químicos de hidrogênios alifáticos dos grupos metínicos e metilênicos, entre  $\delta$  1,90 ppm a 2,47 ppm. Foi observado também um sinal largo em  $\delta$  3,82 ppm característico de um hidrogênio carbinólico (C-3). A presença de um sinal largo em  $\delta$  0,79 ppm é característico de esqueleto friedelano para o grupo metila do carbono C-23.

O espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  apresentou 49 sinais de carbono. A presença do sinal característico de carbono de carbonila em  $\delta$  212,85 ppm, associado a absorção forte no espectro no IV em  $1705\text{ cm}^{-1}$ , característico de estiramento do grupo carbonila (C=O) de alifáticos saturados sugere a presença de carbonila (Figuras 28 a 30, páginas 70 a 72) no triterpeno. Também foi observado um sinal em  $\delta$  72,14 ppm, característico de carbono carbinólico, que juntamente com a região de absorção em  $3472\text{ cm}^{-1}$  no espectro de IV indica a presença do grupo hidroxila. O espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  DEPT-135 apresentou 19 sinais característicos de carbono metílicos e metínicos e 17 sinais de carbonos metilênicos (Figura 31, página 73).

Portanto, esses dados aliados a faixa de fusão sugerem que a substância 2 seja uma mistura de triterpenos, contendo os grupos oxo e a hidroxila.



Esses dados, comparados com a literatura, somados a comparação por CCD com amostra autêntica de friedelina e 3 $\beta$ -hidroxifriedelano, revelada com vapores de vanilina ácida, sugerem que a substância 2 seja a mistura desses dois triterpenos pentacíclicos, Figura 22.

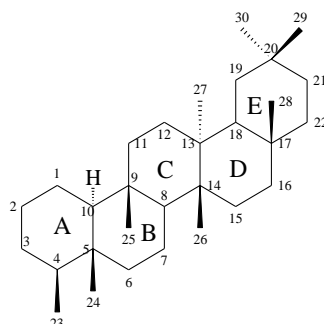


**Figura 22** – Estruturas da friedelina (A) e 3 $\beta$ -hidroxifriedelano (B)

Os dados da análise dos espectros de RMN de  $^{13}\text{C}$  e DEPT-135 e comparação com dados da literatura estão apresentados na Tabela 9.

Ao comparar o número de carbonos das estruturas desses compostos com os sinais obtidos no espectro de  $^{13}\text{C}$ , nota-se que há mais de 30 sinais de carbono, reforçando a proposta dessa substância ser uma mistura de dois triterpenos; isso ocorre devido à diferença de deslocamentos atribuídas aos diferentes grupos ligados ao carbono C-3.

A estrutura da friedelina possui um grupo carbonila no carbono C-3, (Figura 22 – A) enquanto que o 3- $\beta$ -hidroxifriedelano possui um grupo hidroxila (Figura 22 – B). Os diferentes grupos afetam os deslocamentos químicos nos carbonos C-1, C-2, C-4, C-5, presentes no anel A (Figura 23). No carbono C-23 sofre maior efeito de desblindagem na molécula, devido a presença da carbonila (PAVIA, 2008).



**Figura 23** – Núcleo do esqueleto friedelano

**Tabela 9** – Comparação dos dados de RMN de  $^{13}\text{C}$  e DEPT- 135 da substância 2 com os dados da literatura para friedelina/3 $\beta$ -hidroxifriedelano

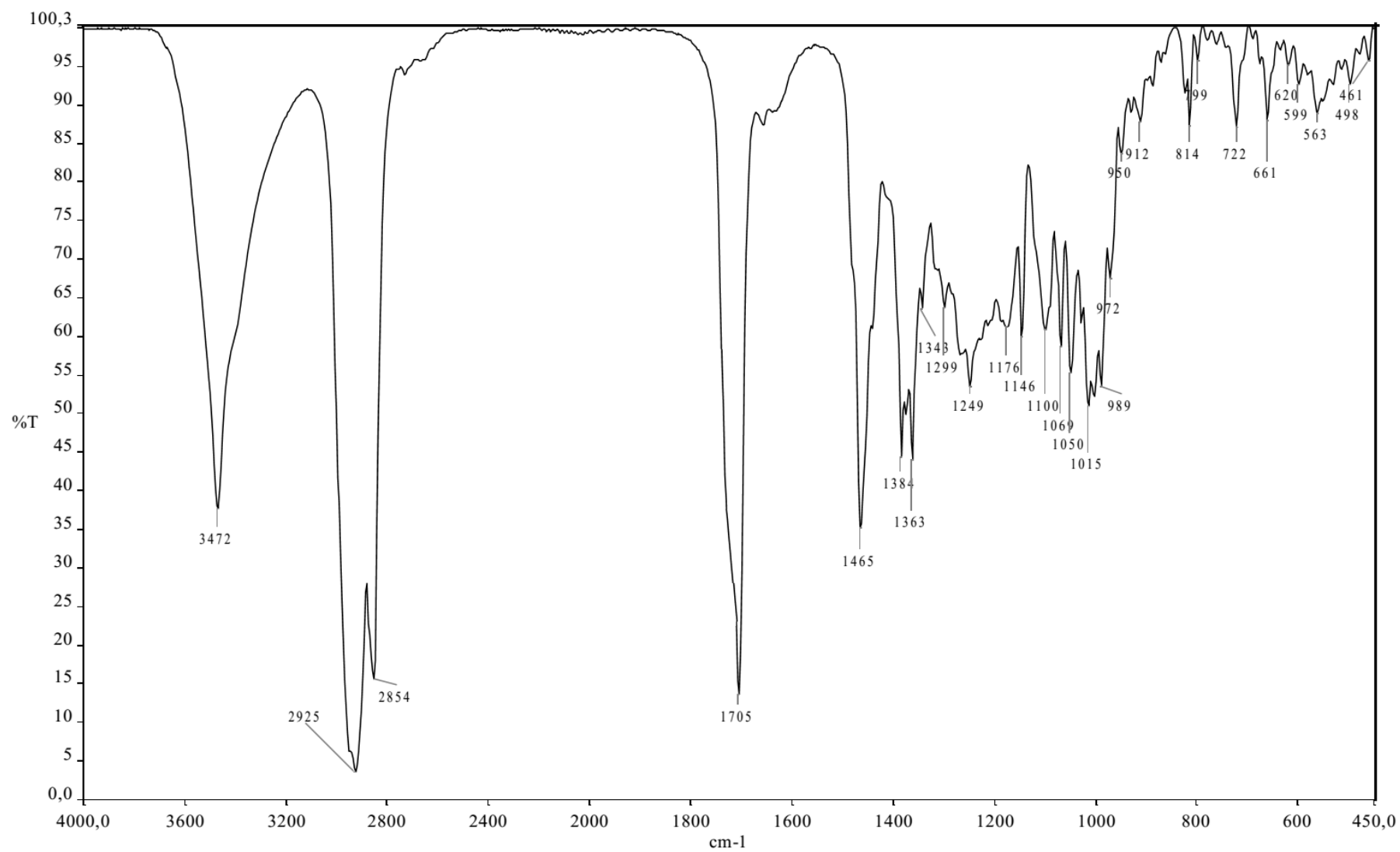
Posição	$^{13}\text{C}/$ DEPT	Friedelina		3- $\beta$ -hidroxifriedelano			
		$\delta\text{C}$ (ppm)*	Lit* $^{13}\text{C}/(\text{ppm})$	$^{13}\text{C}/$ DEPT	$\delta\text{C}$ (ppm)	Lit* $^{13}\text{C}/(\text{ppm})$ $\beta$	Lit* $^{13}\text{C}/(\text{ppm})$ $\alpha$
01	CH <sub>2</sub>	22,17	22,28	CH <sub>2</sub>	15,85	16,16	19,76
02	CH <sub>2</sub>	41,40	41,53	CH <sub>2</sub>	36,02	36,14	36,14
03	C	212,85	213,17	CH	72,14	71,59	71,59
04	CH	58,10	58,24	CH	49,30	49,62	49,62
05	C	42,78	42,14	C	37,85	38,09	38,09
06	CH <sub>2</sub>	41,19	41,30	CH <sub>2</sub>	41,76	41,99	41,99
07	CH <sub>2</sub>	17,50	18,24	CH <sub>2</sub>	17,51	17,69	17,69
08	CH	53,14	53,12	CH	53,14	53,27	53,27
09	C	37,05	37,45	C	37,05	37,18	37,18
10	CH	59,37	59,50	CH	61,42	61,65	64,65
11	CH <sub>2</sub>	35,38	35,64	CH <sub>2</sub>	35,39	35,66	35,66
12	CH <sub>2</sub>	30,56	30,50	CH <sub>2</sub>	30,56	30,69	30,69
13	C	39,60	39,71	C	38,29	38,38	38,38
14	C	38,29	38,31	C	39,60	39,69	39,69
15	CH <sub>2</sub>	32,76	32,78	CH <sub>2</sub>	32,26	32,34	32,34
16	CH <sub>2</sub>	35,02	36,01	CH <sub>2</sub>	35,51	35,90	35,90
17	C	29,93	29,99	C	29,93	30,02	30,02
18	CH	41,76	42,81	CH	42,79	42,88	42,88
19	CH <sub>2</sub>	35,26	35,35	CH <sub>2</sub>	35,26	35,36	35,36
20	C	28,07	28,18	C	28,06	28,17	28,17
21	CH <sub>2</sub>	32,25	32,44	CH <sub>2</sub>	32,77	32,88	32,88
22	CH <sub>2</sub>	39,18	39,24	CH <sub>2</sub>	39,18	39,28	39,28
23	CH <sub>3</sub>	06,70	06,81	CH <sub>3</sub>	11,66	12,09	12,09
24	CH <sub>3</sub>	14,53	14,65	CH <sub>3</sub>	16,33	16,59	16,59
25	CH <sub>3</sub>	17,82	17,94	CH <sub>3</sub>	18,17	18,35	18,35
26	CH <sub>3</sub>	20,01	20,25	CH <sub>3</sub>	20,00	20,13	20,13
27	CH <sub>3</sub>	18,53	18,65	CH <sub>3</sub>	18,53	18,69	18,69
28	CH <sub>3</sub>	32,00	32,09	CH <sub>3</sub>	32,00	32,12	32,12
29	CH <sub>3</sub>	31,69	31,77	CH <sub>3</sub>	34,90	35,02	35,02
30	CH <sub>3</sub>	34,91	35,01	CH <sub>3</sub>	31,71	31,85	31,85

Valores obtidos para experimentos realizados com  $\text{CDCl}_3$ . \* Salazar *et al.*, (2000).

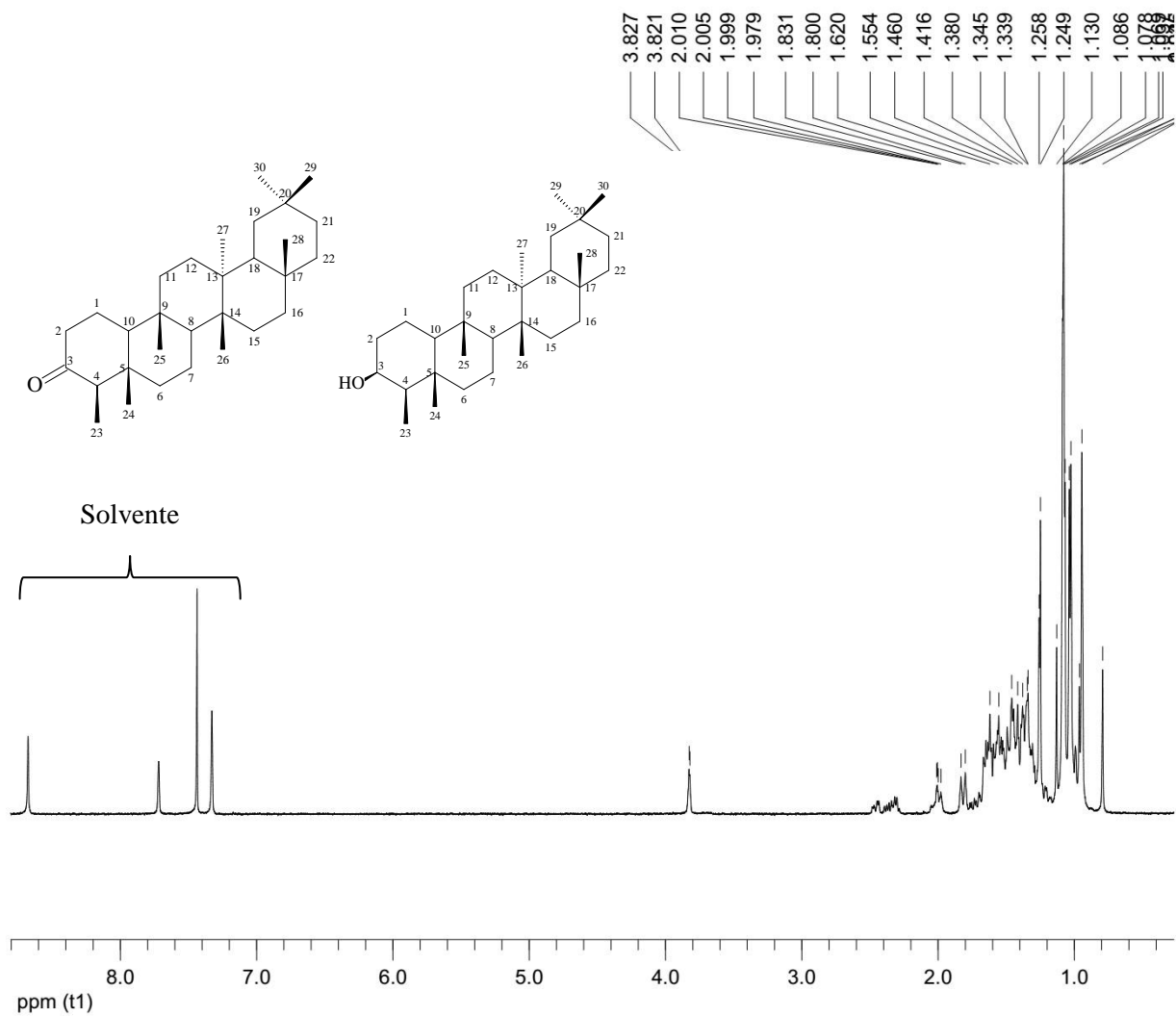
No caso do 3 $\beta$ -hidroxifriedelano, a hidroxila pode assumir a conformação na posição  $\alpha$  ou  $\beta$ . Ao comparar o  $\delta\text{C}$  15,85 do C-1 com deslocamentos para este carbono na literatura  $\delta\text{C}$  16,16 e 19,76 para  $\beta$  e  $\alpha$ , respectivamente, pode-se concluir que o grupo hidroxila no carbono C-3, na substância 2, está na posição  $\beta$ ; conforme dados apresentados na Tabela 9.

A substância 3-oxo-friedelina já foi isolada das folhas *P. ramiflora* (RODRIGUES, *et al.*, 2015), e o 3 $\beta$ -hidroxifriedelano das folhas *P. torta* (LOPES, *et al.*, 2005).

A substância 3 apresentou faixa de fusão entre 260 a 264 °C. A análise do espectro no IV dessa substância e a comparação por CCD com amostra autêntica da mistura de friedelina /3- $\beta$ -hidroxifriedelano permitiu concluir que a substância 3 é quantidade adicional da substância 2.



**Figura 24** – Espectro no infravermelho (KBr) da mistura friedelina/3β-hidroxifriedelano (substância 2)

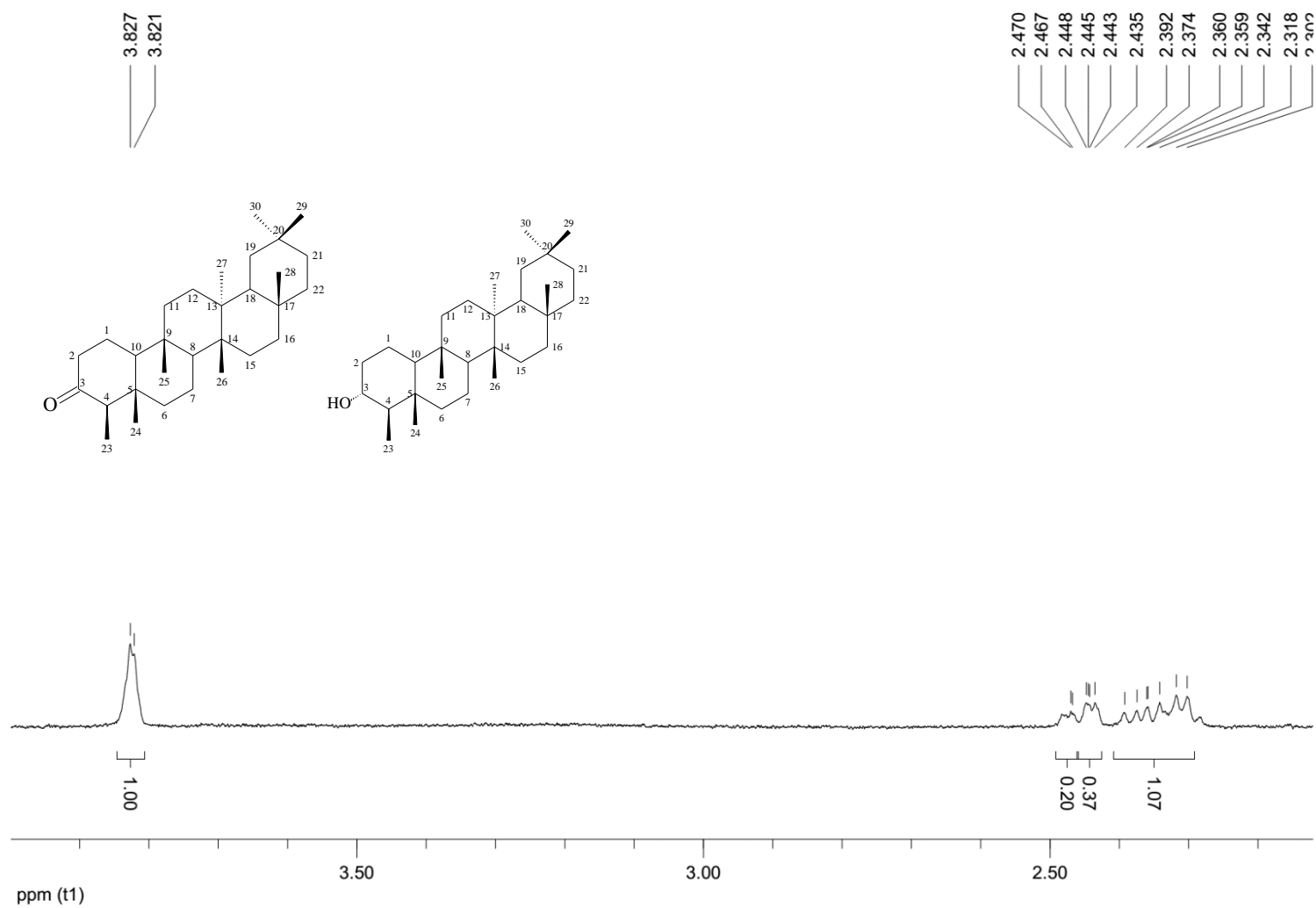


**Date:**  
4 Jan 2017  
**Document's Title:**  
1r

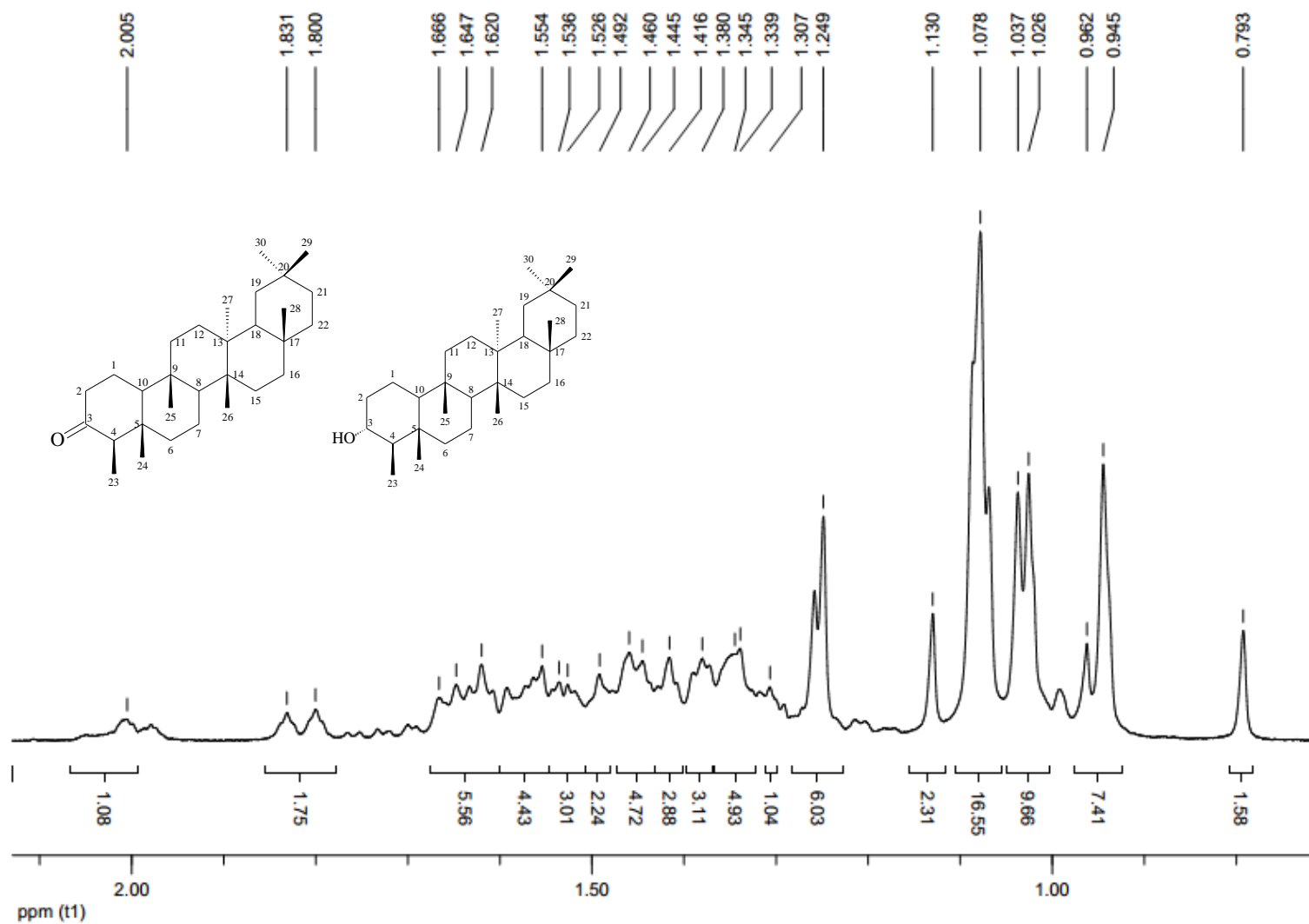
**Spectrum Title:**  
Substância 2

**Frequency (MHz):**  
(f1) 400.180  
**Original Points Count:**  
(f1) 65536  
**Actual Points Count:**  
(f1) 65536  
**Acquisition Time (sec):**  
(f1) 8.1789  
**Spectral Width (ppm):**  
(f1) 20.023  
**Pulse Program:**  
Unknown

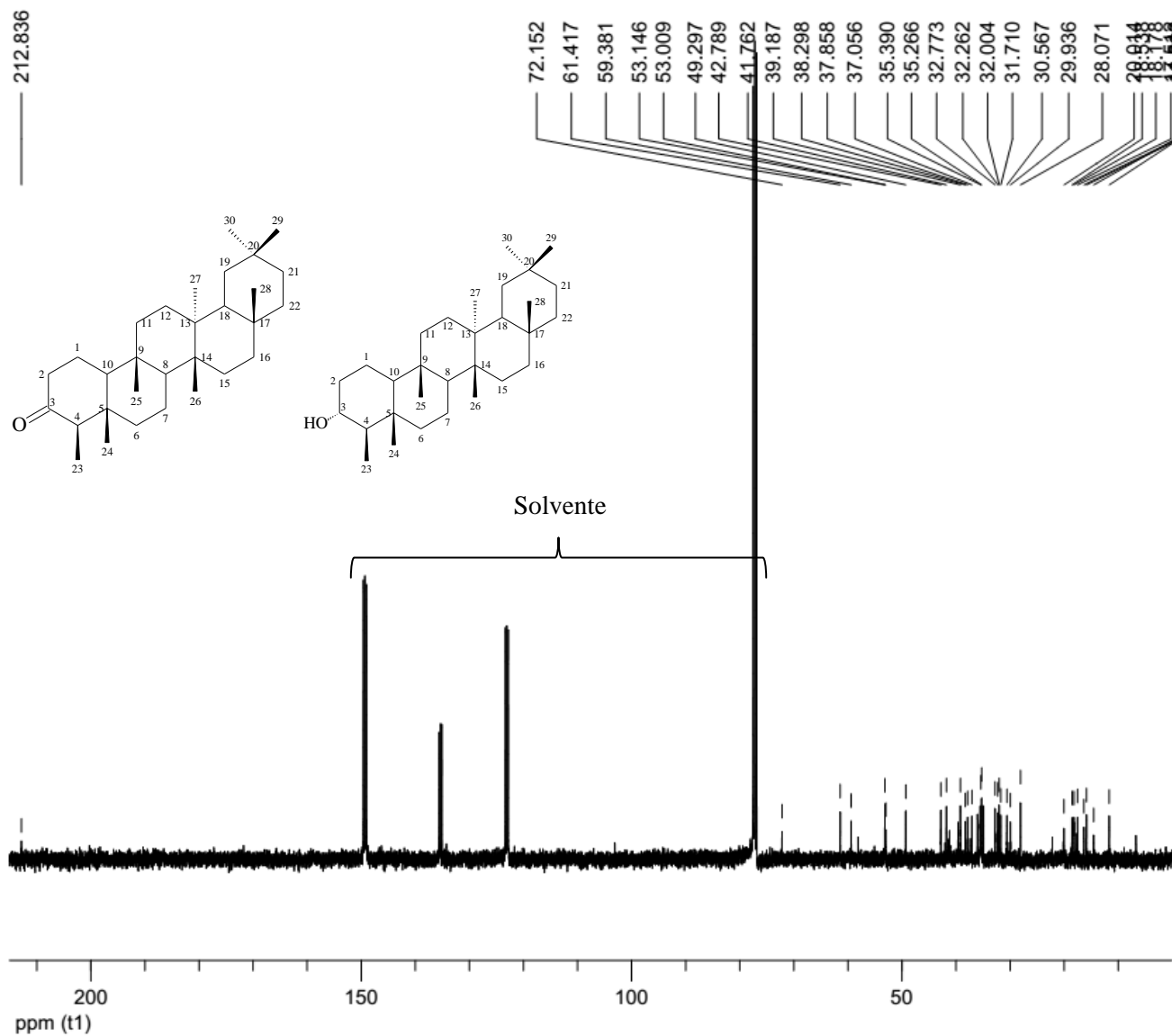
**Figura 25** – Espectro de RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$  + piridina- $d_5$ , 400 MHz) da mistura friedelina/ $3\beta$ -hidroxifriedelano (substância 2)



**Figura 26** – Ampliação da região  $\delta$  4,0 – 2,1 do espectro de RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$  + piridina- $d_5$ , 400 MHz) da mistura friedelina/3 $\beta$ -hidroxifriedelano (substância 2)



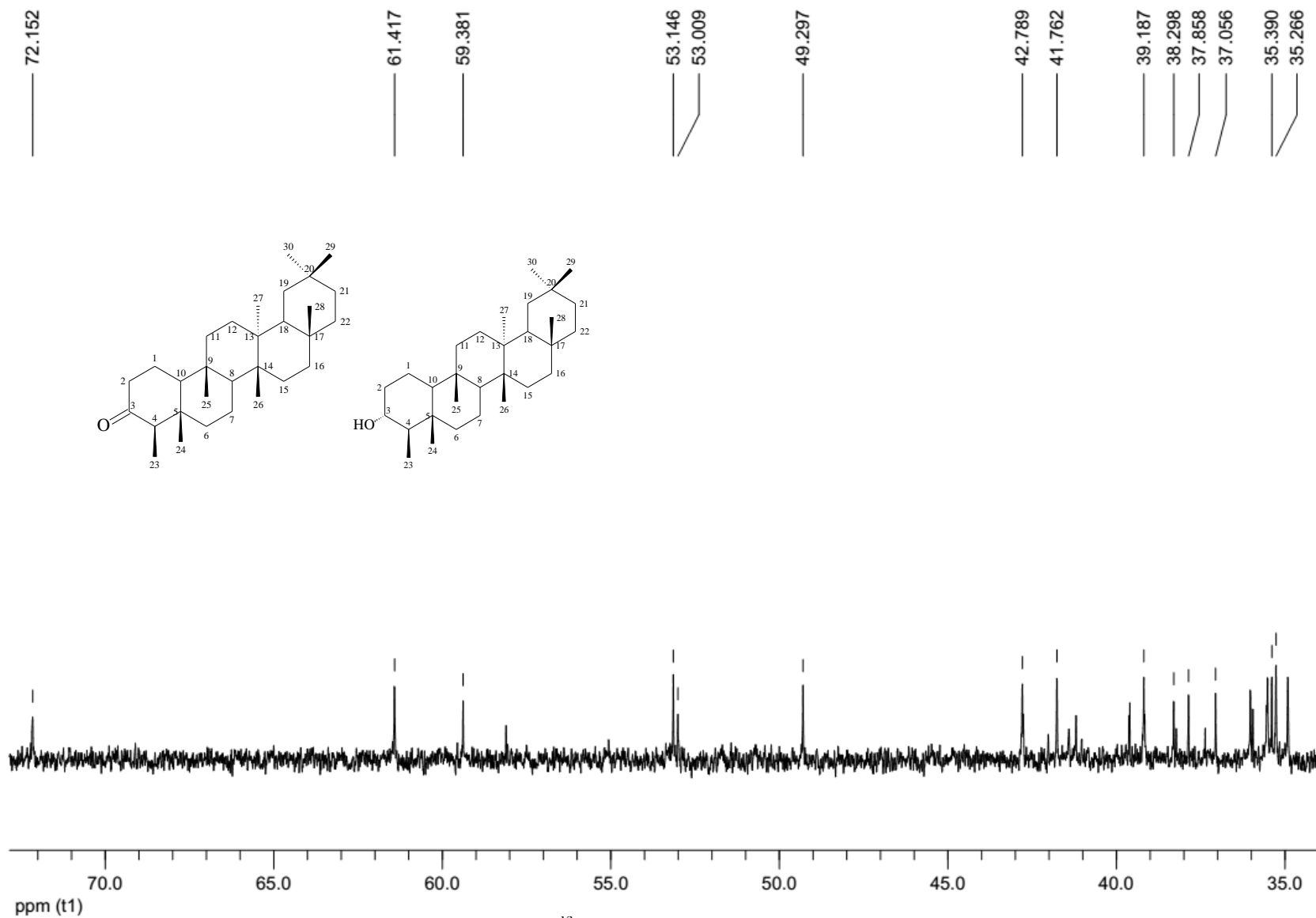
**Figura 27** – Ampliação da região  $\delta$  0,7 – 2,1 do espectro de RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$  + piridina- $d_5$ , 400 MHz) da mistura friedelina/ $3\beta$ -hidroxifriedelano (substância 2)



**Date:**  
7 Jun 2016  
**Document's Title:**  
1r

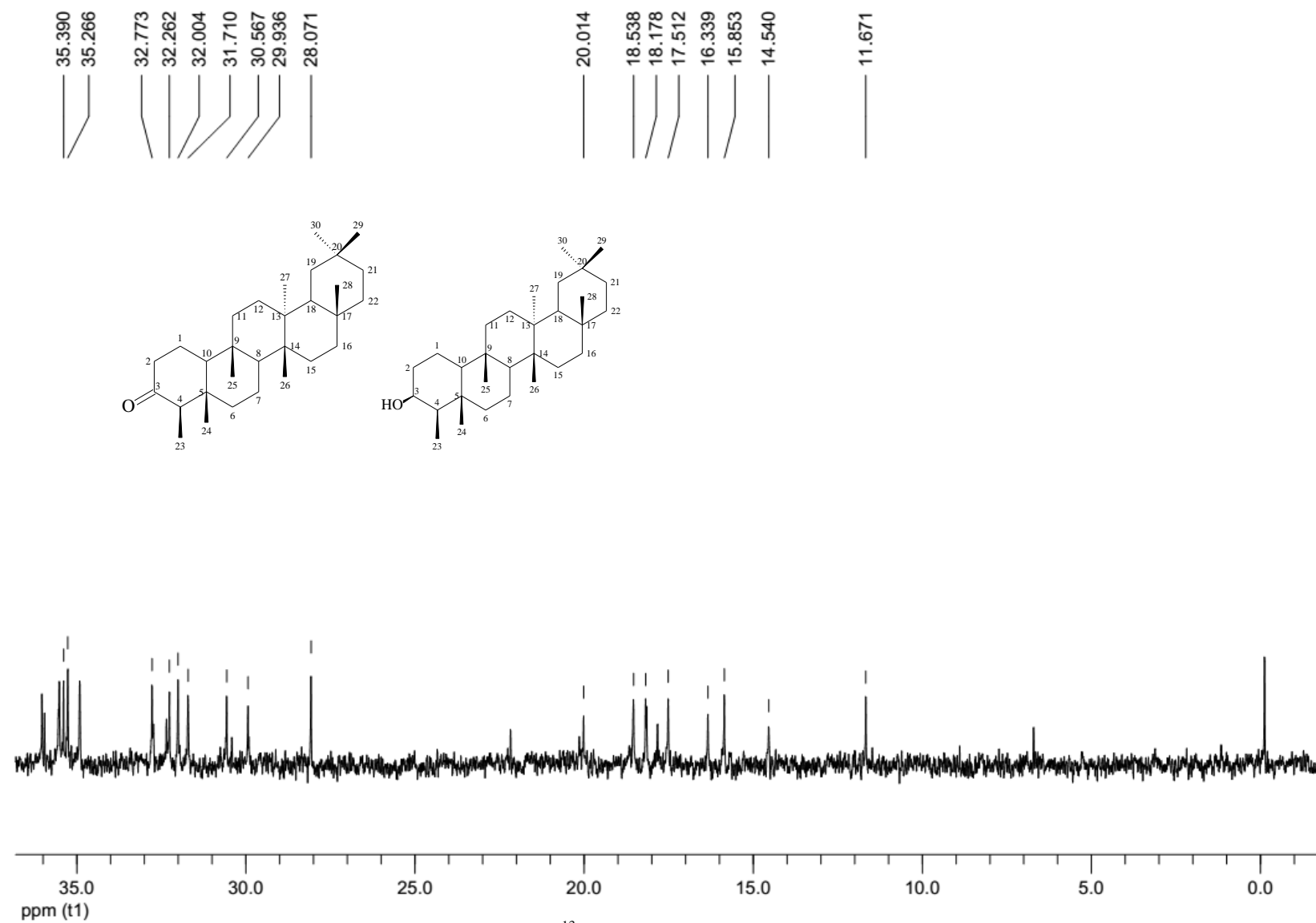
**Spectrum Title:**  
Substância 2  
**Frequency (MHz):**  
(f1) 100.625  
**Original Points Count:**  
(f1) 32768  
**Actual Points Count:**  
(f1) 32768  
**Acquisition Time (sec):**  
(f1) 1.3631  
**Spectral Width (ppm):**  
(f1) 238.891  
**Pulse Program:**  
Unknown

**Figura 28** – Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$  + piridina- $d_5$ , 100 MHz) da mistura friedelina/ $3\beta$ -hidroxifriedelano (substância 2)



**Figura 29** – Ampliação da região  $\delta$  34,9 – 73,0 do espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$  + piridina- $d_5$ , 100 MHz) da mistura friedelina/3 $\beta$ -hidroxifriedelano (substância 2)





**Figura 30** – Ampliação da região  $\delta$  35,2 – 0,0 do espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$  + piridina- $d_5$ , 100 MHz) da mistura friedelina/ $3\beta$ -hidroxifriedelano (substância 2)

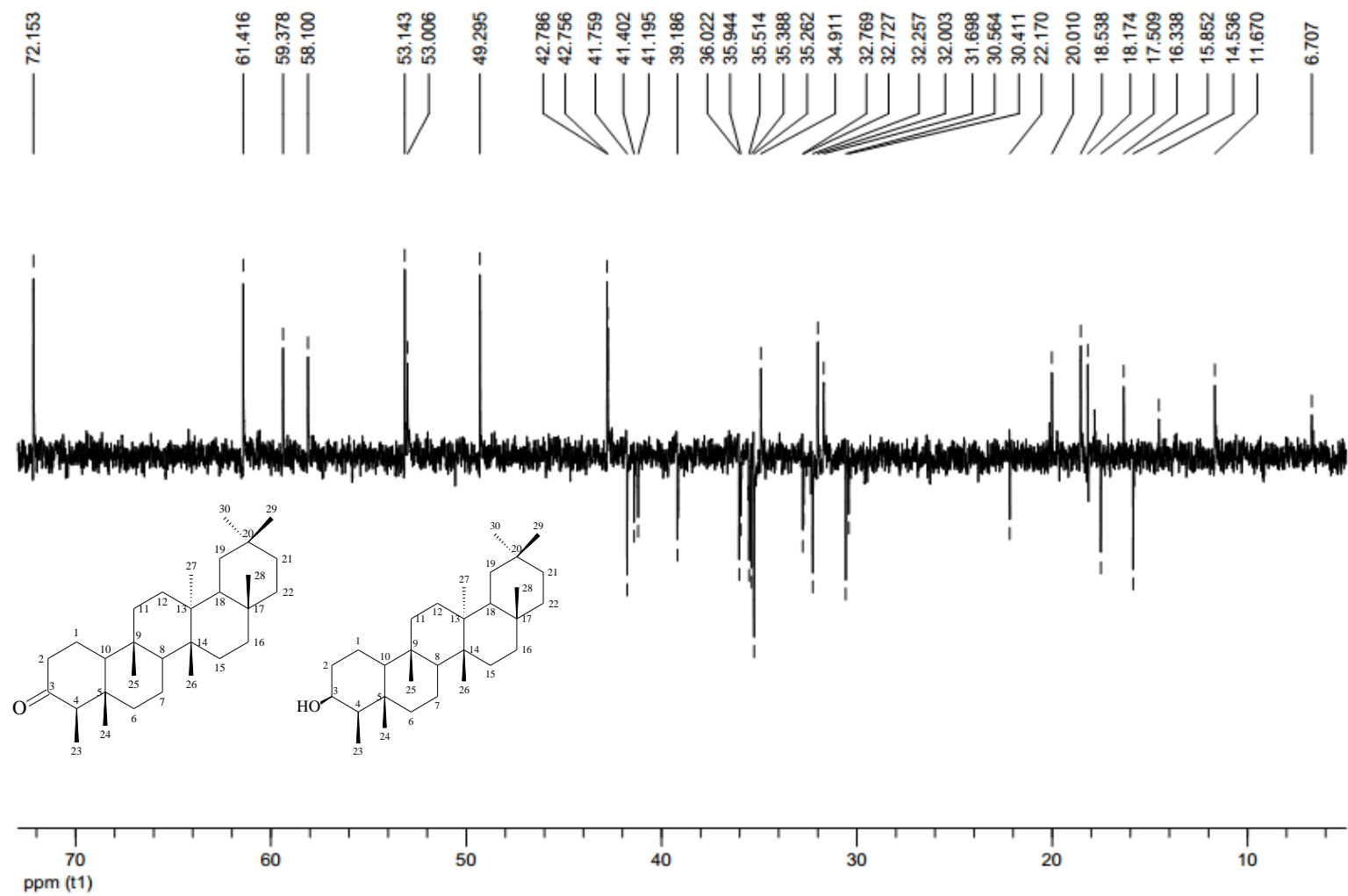


Figura 31 – Espectro de RMN DEPT-135 ( $\text{CDCl}_3$  + piridina- $d_5$ , 100 MHz) da mistura friedelina/3β-hidroxyfriedelano (substância 2)

- **PM-A.04:** 3 $\beta$ -hidroxifriedelano (substância 4)

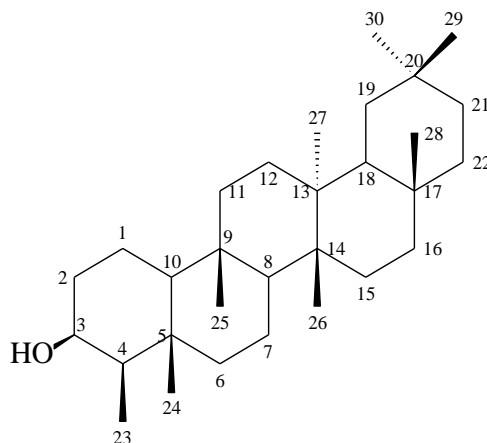
A substância 4 apresentou-se como um sólido branco, amorfo, solúvel em clorofórmio e faixa de fusão entre 246 a 248 °C. O teste de Liberman-Buchard realizado para essa substância apresentou resultado positivo para triterpenos pentacíclicos. Sua determinação estrutural foi realizada a partir dos experimentos de IV, RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ , DEPT – 135, HSQC, HMBC e em comparação com dados da literatura, (Tabela 10, página 75).

O espectro no infravermelho dessa substância apresentou uma banda de absorção média em  $3470\text{ cm}^{-1}$ , associada a vibrações de estiramento do grupo O-H de álcoois em compostos alifáticos saturados, sugerindo a presença de um triterpeno oxigenado. Foram observados, as bandas de absorção forte e média em  $2923$  e  $2852\text{ cm}^{-1}$ , atribuídas a deformações de C-H de grupos  $\text{CH}_2$  e  $\text{CH}_3$ , respectivamente e absorção média em  $1450$  e  $1385\text{ cm}^{-1}$  relacionados à deformação da ligação C-H (Figura 34, página 77).

O espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da substância 4 apresentou sinais característicos de triterpenos, com 7 metilas quaternárias e uma metila no carbono C-4, entre  $\delta$  1,05 ppm a 0,72 ppm, além de diversos sinais na região entre  $\delta$  1,91 ppm a 1,17 ppm característicos de deslocamentos químicos de hidrogênios alifáticos dos grupos metilênicos e metínicos. Foi observado também um sinal largo em  $\delta$  3,73 ppm característico de um hidrogênio carbinólico (Carbono C-3). O sinal largo em  $\delta$  0,72 ppm é característico do esqueleto friedelano com o grupo metila do carbono C-23, (Figuras 35 e 36, páginas 78 e 79).

O espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  apresentou 30 sinais de carbono (Figuras 37 a 39, páginas 80 a 82) e o DEPT-135 dessa substância apresentou 8 sinais característicos de carbono metílicos, 5 sinais correspondentes a carbono metínicos, 11 sinais de carbonos metilênicos e portanto, essa substância apresenta 6 carbonos não hidrogenados (Figura 40, página 83). A presença do sinal em  $\delta$  72,55 ppm, característico de carbono carbinólico, é reforçado pela presença da absorção no espectro no IV em  $3470\text{ cm}^{-1}$ , referente ao grupo hidroxila.

Os dados apresentados acima, aliado a faixa de fusão e comparação com amostras autênticas de fridelinol por CCD, revelada com vapores de vanilina, sugerem que a substância 4 seja o triterpeno pentacíclico 3 $\beta$ -hidroxifriedelano, (Figura 32).



**Figura 32** – Estrutura do 3β-hidroxifriedelano

O experimento de HSQC foi utilizado a fim de correlacionar H-C (Figura 41 página 84). Os dados da análise do espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$ , do experimento de HSQC e os dados literatura estão apresentados na Tabela 10.

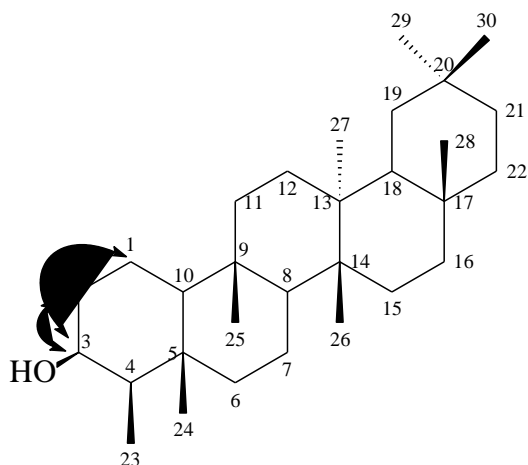
Ao comparar o sinal obtido para o carbono C-1,  $\delta$  15,83 ppm, da substância 4 com os deslocamentos obtidos na literatura de  $\delta$  16,16 e  $\delta$  19,76 ppm para o grupo hidroxila em  $\beta$  e  $\alpha$  no triterpeno hidroxifriedelano (Tabela 9 página 65), pode-se concluir que a hidroxila na substância 4 encontra-se na posição  $\beta$ .

**Tabela 10** – Comparação dos dados de RMN de  $^{13}\text{C}$  da substância 4 com os dados da literatura para 3β-hidroxifriedelano

Posição	$^{13}\text{C}/$ DEPT	$\delta\text{C}^{**}$ (ppm)	Lit* $^{13}\text{C}$ (ppm)	HSQC (C → H)	Posição	$^{13}\text{C}/$ DEPT	$\delta\text{C}^{**}$ (ppm)	Lit* $^{13}\text{C}$ (ppm)	HSQC (C → H)
1	CH <sub>2</sub>	15,83	16,16		16	CH <sub>2</sub>	35,60	35,9	
2	CH <sub>2</sub>	36,12	36,14		17	C	29,71	30,02	
3	CH	72,56	71,59	3,72 (s)	18	CH	42,88	42,88	
4	CH	53,24	53,27	1,26	19	CH <sub>2</sub>	35,03	35,36	
5	C	37,91	38,09		20	C	28,19	28,17	
6	CH <sub>2</sub>	41,81	41,99		21	CH <sub>2</sub>	32,37	32,88	
7	CH <sub>2</sub>	16,43	16,58		22	CH <sub>2</sub>	39,30	39,28	
8	CH	49,29	49,62	1,24 (m)	23	CH <sub>3</sub>	11,70	12,09	0,95 (s)
9	C	37,15	37,18		24	CH <sub>3</sub>	15,88	16,16	0,96 (s)
10	CH	61,45	61,65		25	CH <sub>3</sub>	17,60	17,69	1,06 (s)
11	CH <sub>2</sub>	35,37	35,66	1,88 (d)	26	CH <sub>3</sub>	20,13	20,13	
12	CH <sub>2</sub>	30,05	30,69		27	CH <sub>3</sub>	18,27	18,35	
13	C	38,41	38,38		28	CH <sub>3</sub>	31,81	32,12	
14	C	39,71	39,69		29	CH <sub>3</sub>	32,86	35,02	
15	CH <sub>2</sub>	32,11	32,34		30	CH <sub>3</sub>	30,67	31,85	

\*Valores obtidos para experimentos realizados com  $\text{CDCl}_3$ ; \*\*Valores obtidos para experimentos realizados com  $\text{CDCl}_3$  e piridina  $d_5$ ; (SALAZAR *et al.*, 2000).

Através do mapa de contorno do experimento HMBC (Figura 42 página 85), foi confirmado a posição do grupo hidroxila em C-3 através da correlação  $\delta$ 3,73 (1H, s largo,  $J=2,4$ ) e  $\delta$  15,83 (C-1) e 36,12 (C-2), conforme ilustrado na (Figura 33).

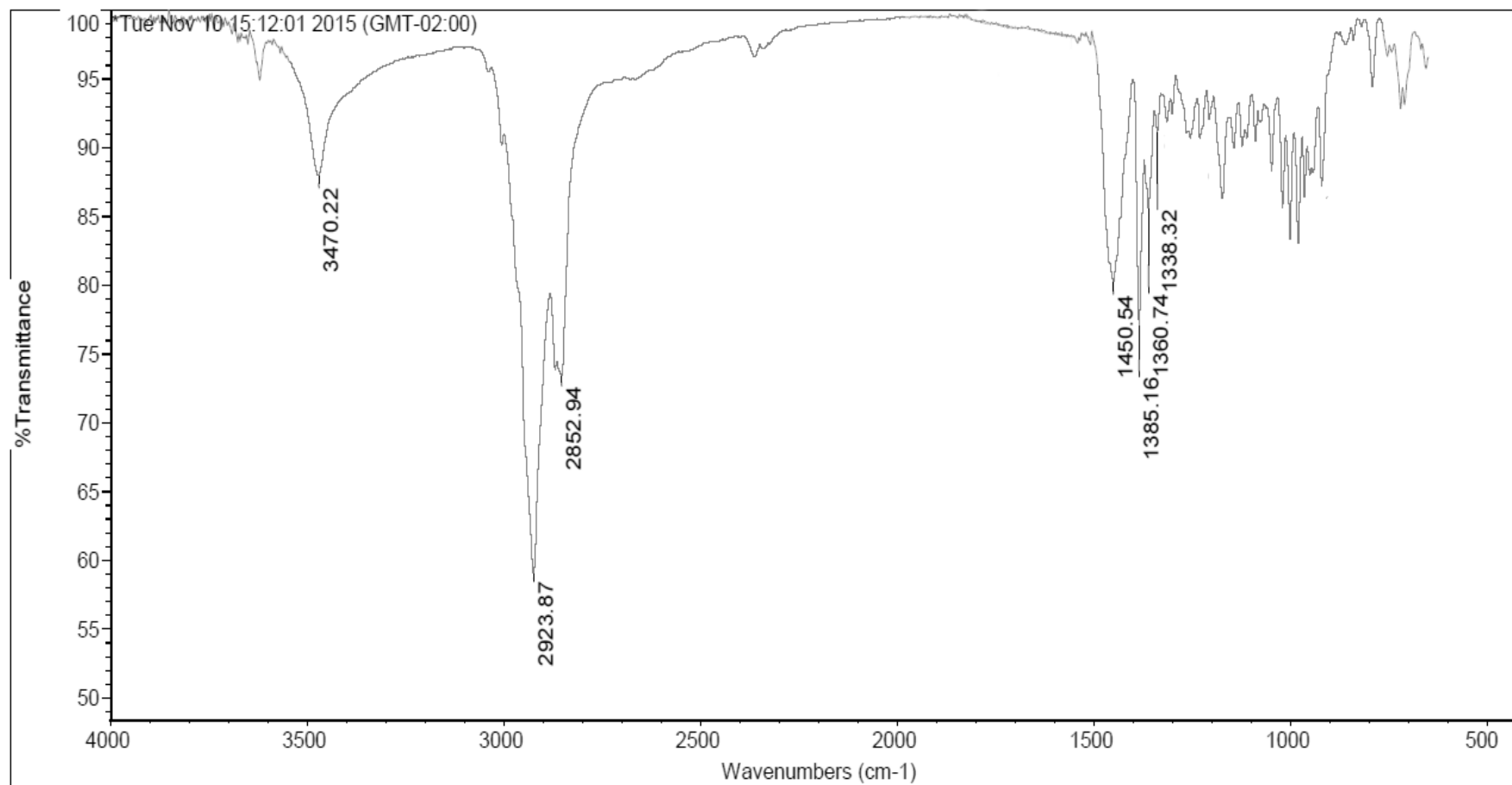


**Figura 33** – Correlações observadas a partir do experimento HMBC para o 3 $\beta$ -hidroxifriedelano (substância 4)

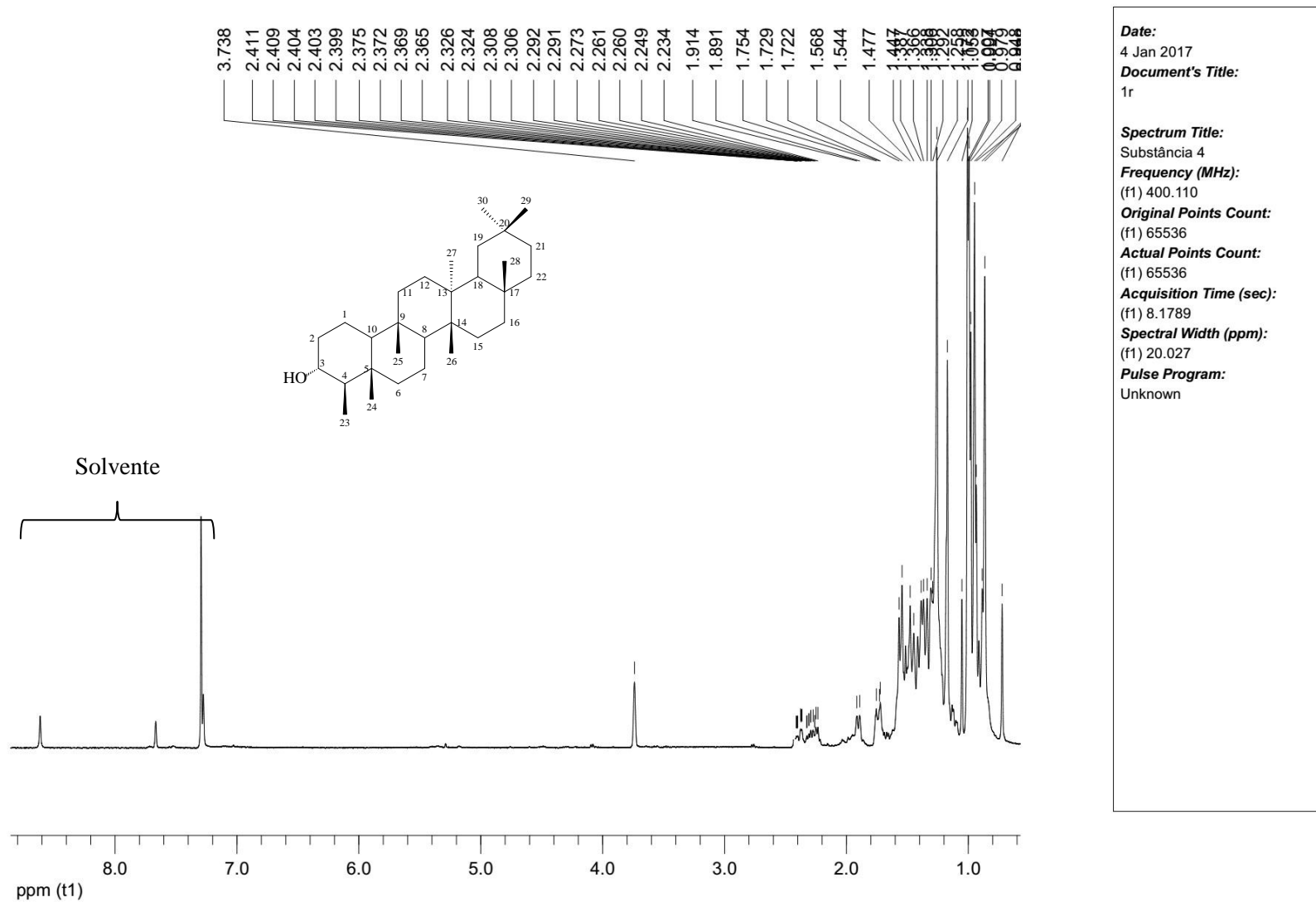
Diante das informações obtidas até o momento, dos espectros no IV e RMN, assim como comparação da substância 4 com amostra autêntica utilizando a técnica de CCD, pode-se sugerir que essa substância seja 3 $\beta$ -hidroxifriedelano, (Figura 32).

- **PM-A.04:** Substância 5

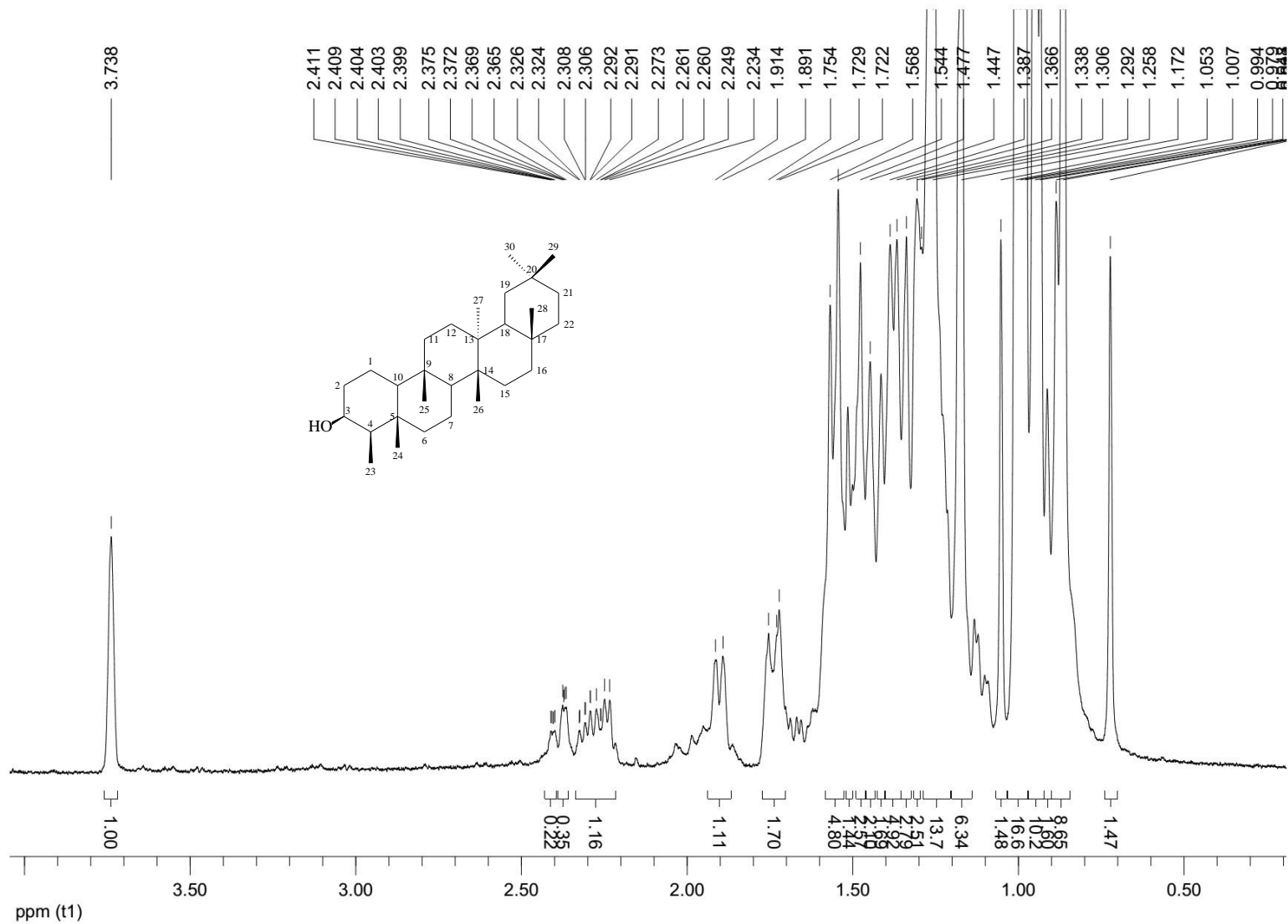
A substância 5 apresentou faixa de fusão entre 245 a 248 °C. Ao analisar o seu espectro no IV e ao compara-la por CCD, com amostra autêntica, concluiu-se que a substância 5 seja quantidade adicional da substância 4, ou seja, 3 $\beta$ -hidroxifriedelano.



**Figura 34** – Espectro no infravermelho (KBr) do 3β-hidroxifriedelano (substância 4)

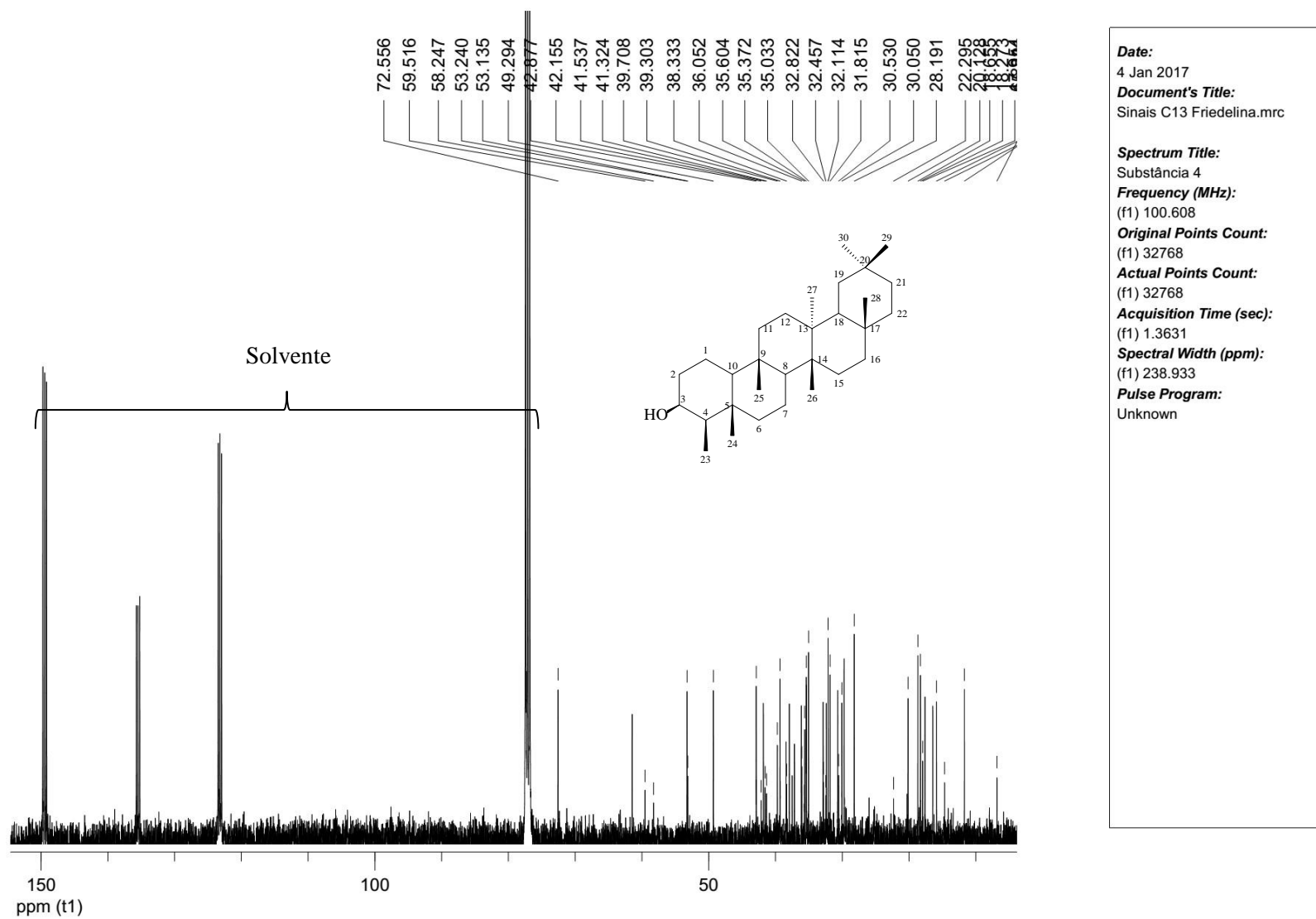


**Figura 35** – Espectro de RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$  + piridina- $d_5$ , 400 MHz) do 3 $\beta$ -hidroxifriedelano (substância 4)

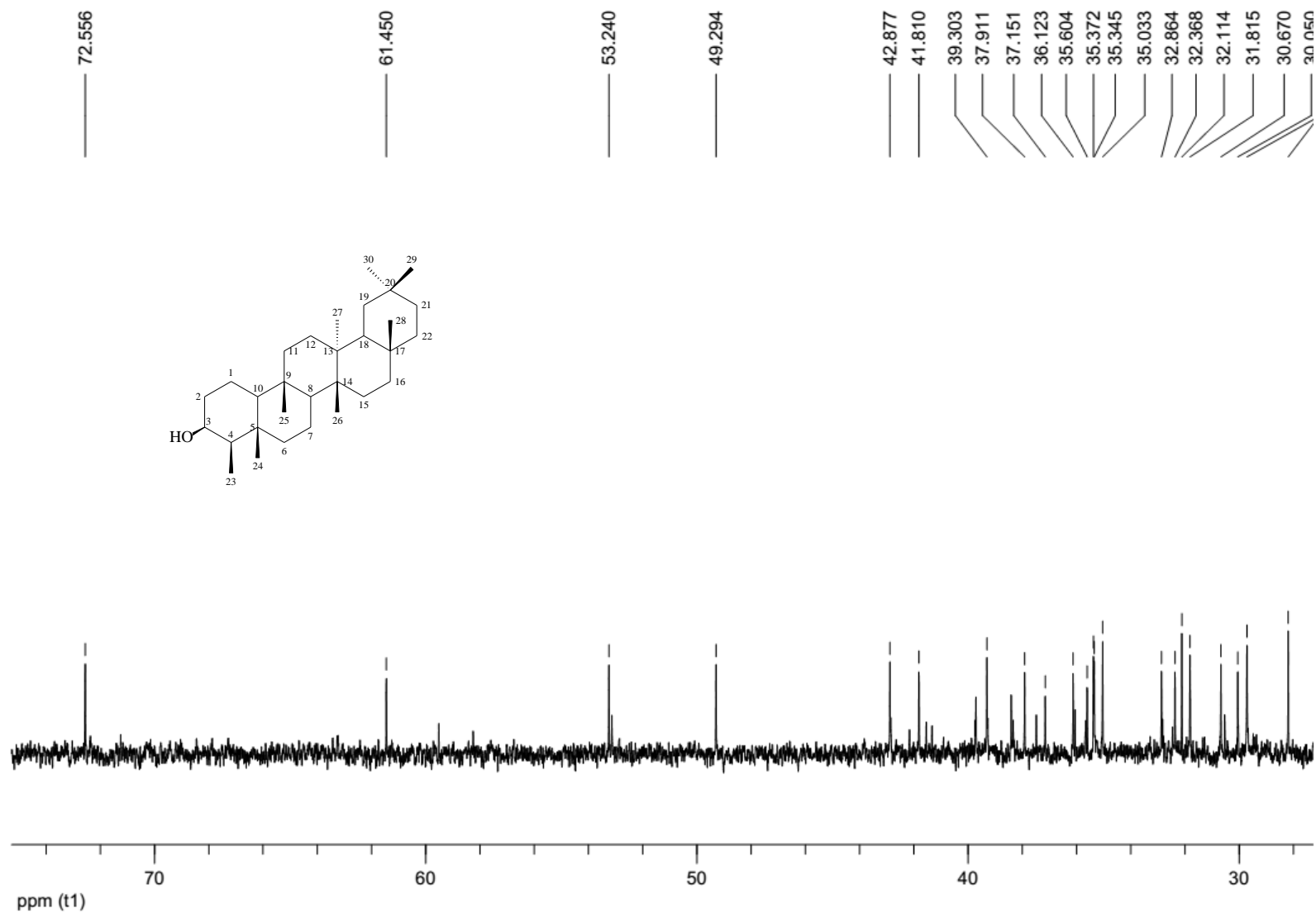


**Figura 36** – Ampliação da região  $\delta$  0,2 – 4,0 do espectro de RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$  + piridina- $\text{d}_5$ , 400 MHz) do 3 $\beta$ -hidroxifriedelano (substância 4)

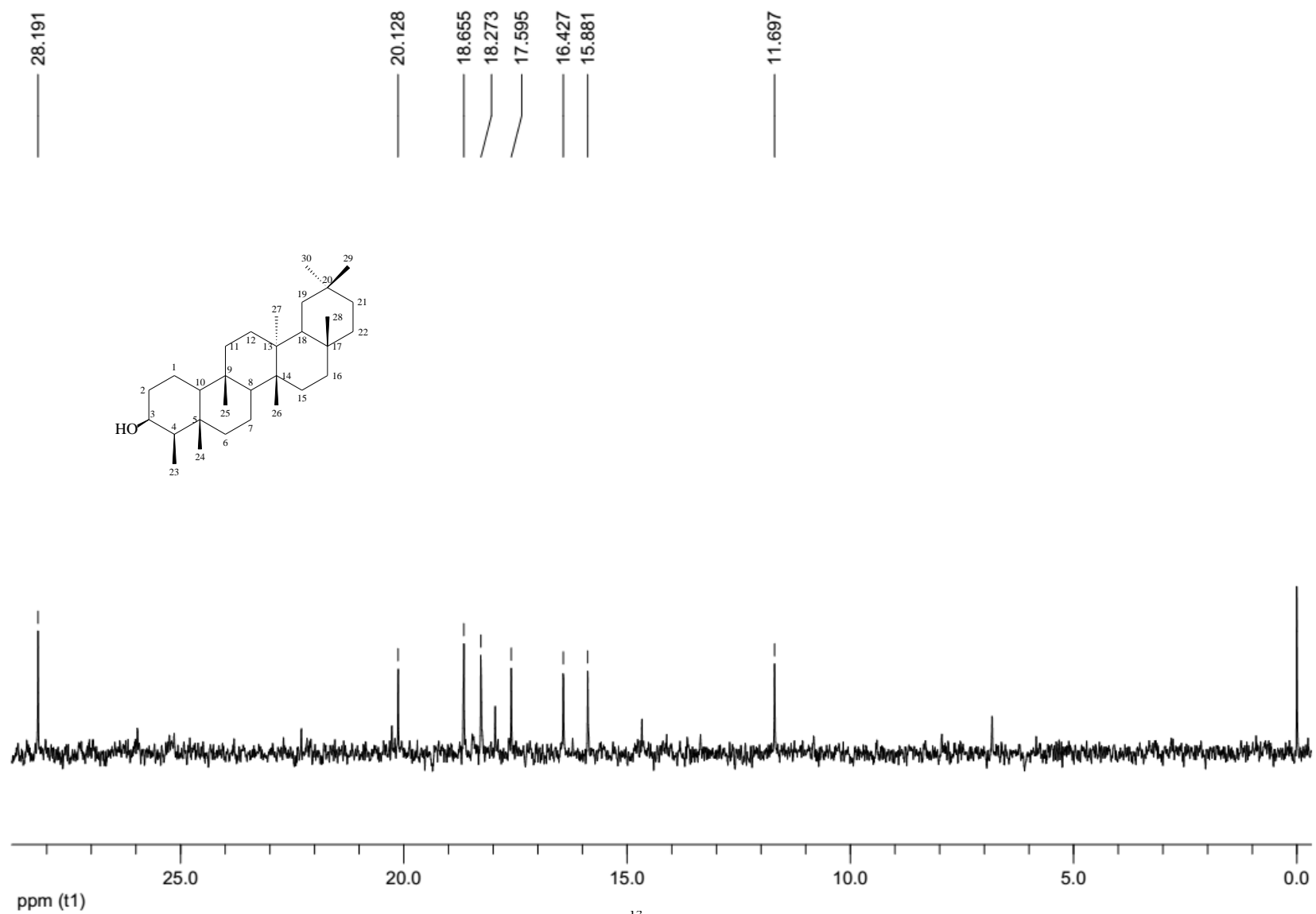




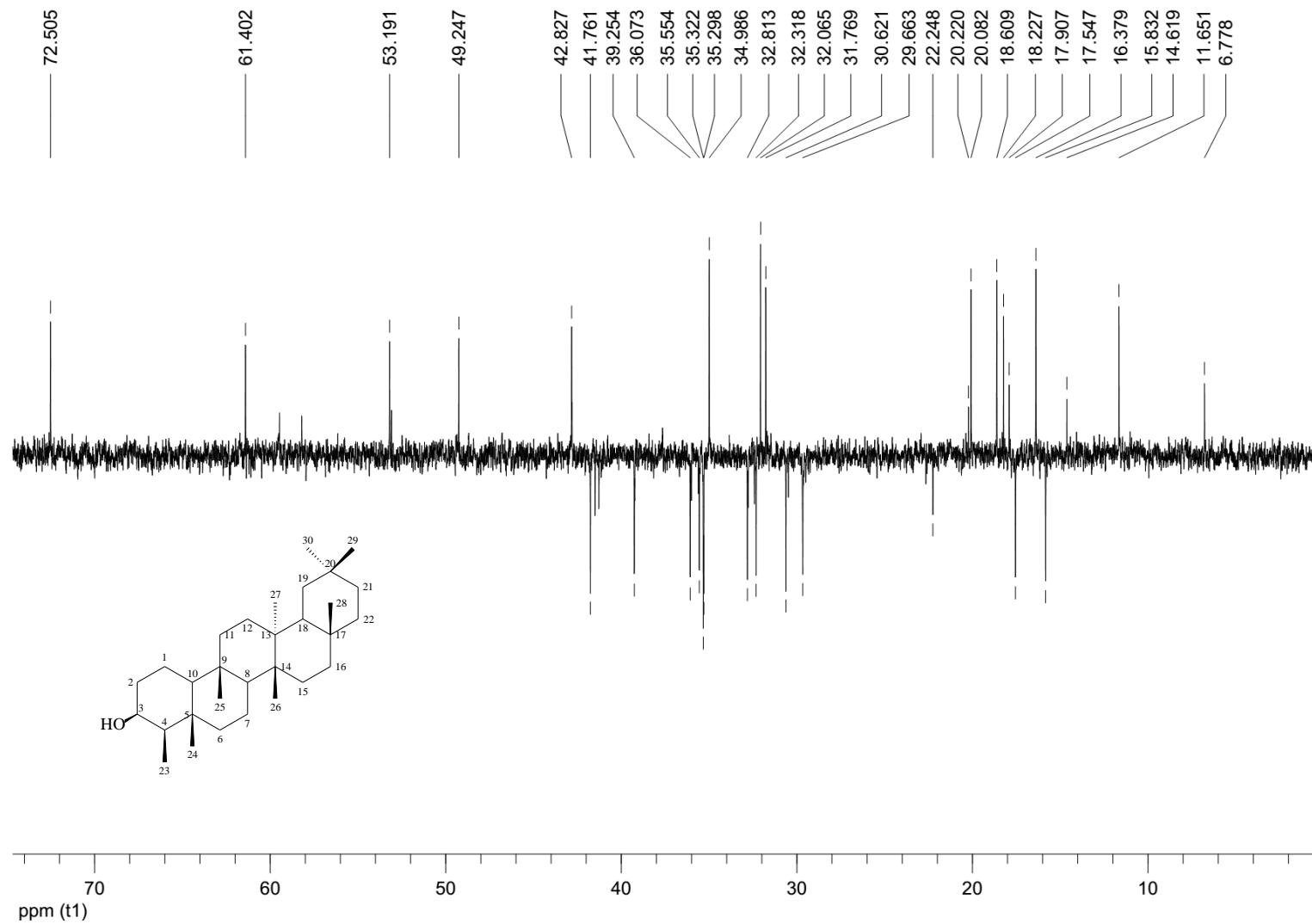
**Figura 37** – Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$  + piridina- $d_5$ , 100 MHz) do 3 $\beta$ -hidroxifriedelano (substância 4)



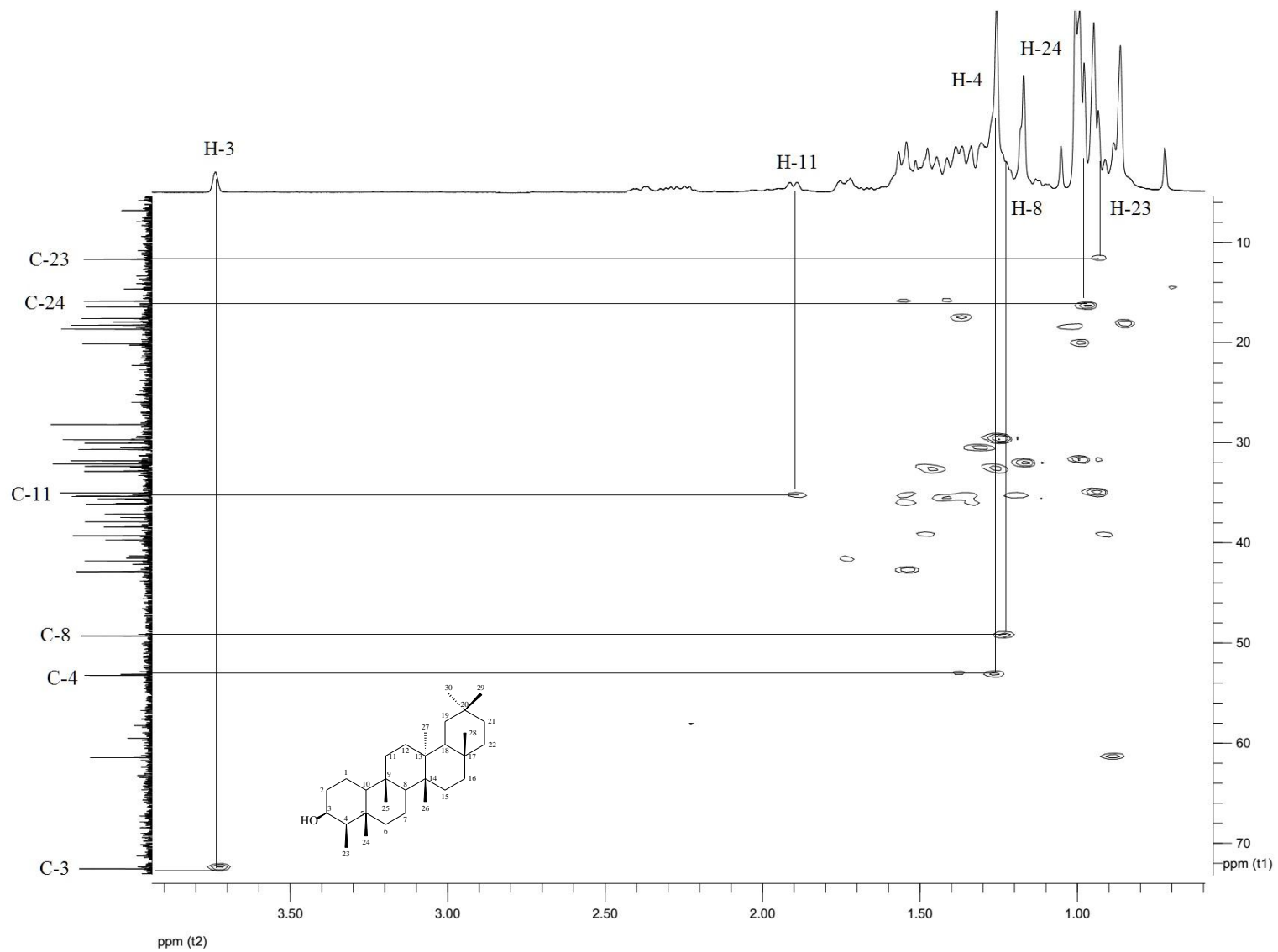
**Figura 38** – Ampliação da região  $\delta$  28,0 – 75,0 do espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$  + piridina- $d_5$ , 100 MHz) do 3 $\beta$ -hidroxifriedelano (substância 4)



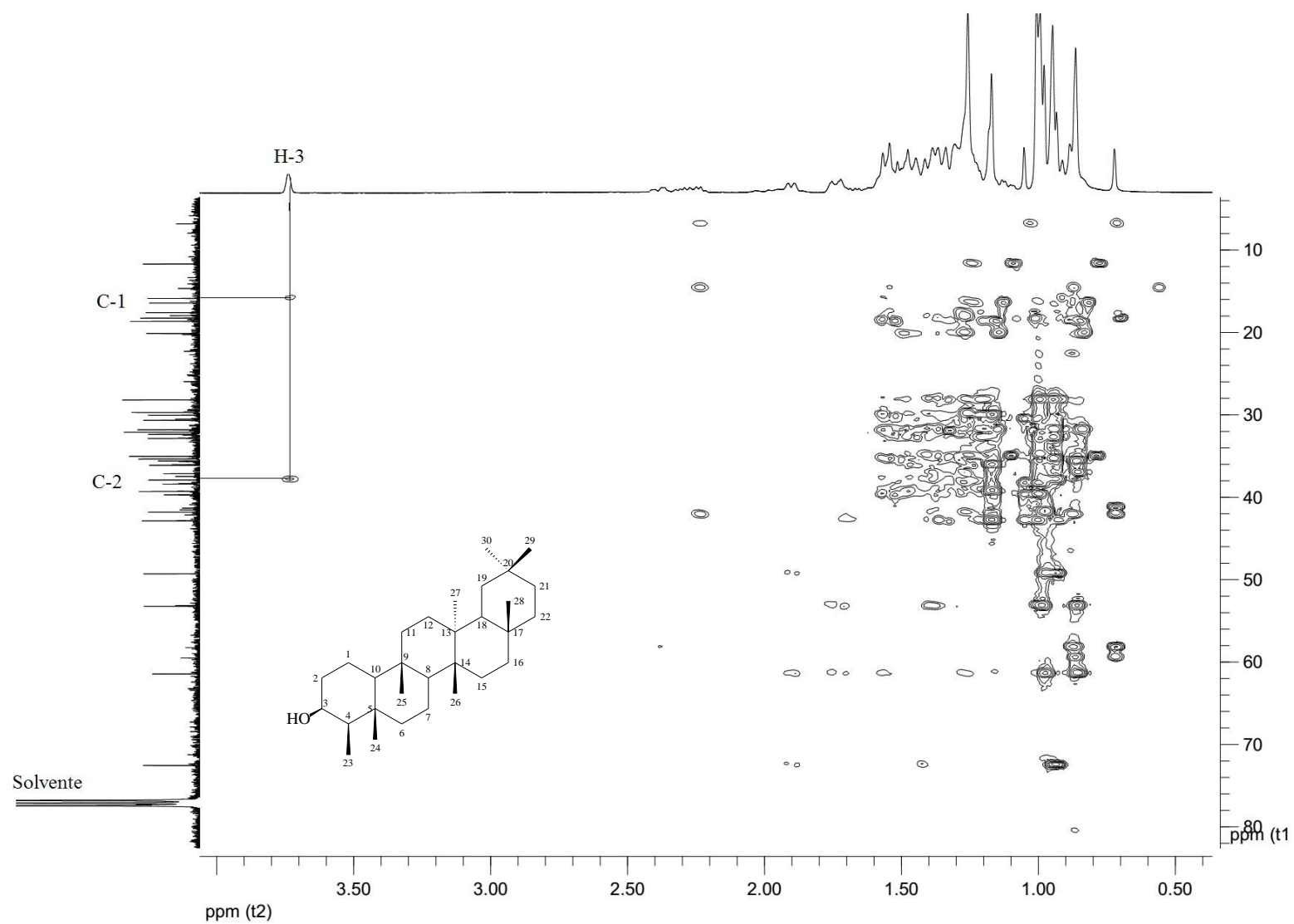
**Figura 39** – Ampliação da região  $\delta$  0,0 – 29,0 do espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$  + piridina- $d_5$ , 100 MHz) do 3 $\beta$ -hidroxifriedelano (substância 4)



**Figura 40** – Espectro de RMN DEPT-135 ( $\text{CDCl}_3$  + piridina- $d_5$ , 100 MHz) do 3β-hidroxfriedelano (substância 4)



**Figura 41** – Principais correlações de H-C observadas no experimento de HSQC ( $\text{CDCl}_3$  + piridina- $d_5$ , 400 MHz) do 3 $\beta$ -hidroxifriedelano (substância 4)



**Figura 42** – Principais correlações de H-C observadas no experimento de HMBC (CDCl<sub>3</sub> + piridina-d<sub>5</sub>, 400 MHz) do 3β-hidroxifriedelano (substância 4)

- **PM-A.04:** Mistura de linoato, araquidato e linolenoato de eritrodilila (substância 6)

A substância 6 apresentou-se como um sólido branco, amorfo, solúvel em clorofórmio e faixa de fusão entre 119 a 121 °C. O teste de Liberman-Buchard forneceu resultado positivo para triterpenos pentacíclicos. Sua determinação estrutural foi realizada a partir dos experimentos de IV, RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ , DEPT – 135, HSQC e HMBC e comparação com dados da literatura, Tabela 11.

O espectro no infravermelho dessa substância apresentou banda de absorção forte em  $3472\text{ cm}^{-1}$ , sendo associada a vibrações de estiramento do grupo O-H. As bandas de absorção forte em  $2925$  e  $2855\text{ cm}^{-1}$ , foram atribuídas a deformações de C-H de grupos  $\text{CH}_2$  e  $\text{CH}_3$ , respectivamente. A banda de absorção média em  $1732\text{ cm}^{-1}$  foi associada à vibração de estiramento do grupo carbonila (C=O) de alifáticos saturados. As bandas de absorção média em  $1465$  e  $1363\text{ cm}^{-1}$  foram relacionados à deformação da ligação C-H (Figura 47, página 91). Esses dados sugerem a presença de um esqueleto triterpênico na substância 6.

O espectro de RMN de  $^1\text{H}$  dessa substância apresentou sinais na região entre  $\delta$  0,86 ppm e  $\delta$  1,27 ppm característicos de grupos metílicos em estruturas de triterpenos. Desses sinais, o simpleto intenso em  $\delta$  1,25 ppm é característico de hidrogênio alifáticos de cadeia longa característicos de ácidos graxos. Essa proposta é reforçada pela presença de um tripleto em  $\delta$  2,28 (2H,  $J=7,4$  Hz) correspondente a hidrogênios metilênico vizinho a um grupo éster. Já o tripleto em  $\delta$  4,5 ppm (1H,  $J=8,3$  Hz) corresponde a apenas um hidrogênio, é característico de hidrogênios oximetilênicos de triterpenos pentacíclicos. Foi observada também a presença de dois dupletos definidos em  $\delta$  3,54 ppm (1H, d,  $J=10,9$  Hz) e  $\delta$  3,21 ppm (1H, d,  $J=10,9$  Hz) referentes a 2 hidrogênios acoplados. Foi observado ainda um sinal largo em  $\delta$  5,19 ppm (1H), característico de um hidrogênio olefínico, e na região em  $\delta$  5,30 ppm, outro sinal, provavelmente de outro grupo olefínico, (Figuras 48 a 50, páginas 92 a 94).

O espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (Figuras 51 a 53, páginas 95 a 97) dessa substância apresentou 45 sinais de carbono sendo, com base no experimento do DEPT-135 (Figura 54, página 98), 8 sinais são referentes a carbonos metílicos, 20 metilênicos e 5 metínicos. Portanto, a substância apresenta 8 sinais de carbono não hidrogenado. A presença de um sinal do carbono metilínico em  $\delta$  122,31 ppm e de um carbono não hidrogenado em  $\delta$  144,23 ppm sugerem a presença de um triterpenos com esqueleto olean-12-eno. O triterpeno pentacíclico do tipo oleanano possui dois grupos metilas ligado ao carbono C-20 (NUNES, 2013).

**Tabela 11** - Comparação dos dados de RMN de  $^{13}\text{C}$  da substância 6 com os dados da literatura para eritrodíol esterificado

Posição	$^{13}\text{C}/$ DEPT	$\delta\text{C}^*$ (ppm)	Lit** $^{13}\text{C}/$ (ppm)	HSQC (C $\rightarrow$ H)	Posição	$^{13}\text{C}/$ DEPT	$\delta\text{C}^*$ (ppm)	Lit** $^{13}\text{C}/$ (ppm)	HSQC (C $\rightarrow$ H)
1	CH <sub>2</sub>	38,29	38,2		22	CH <sub>2</sub>	31,04	31,0	
2	CH <sub>2</sub>	23,60	23,5		23	CH <sub>3</sub>	15,56	28,0	
3	CH	80,55	80,5	4,50 (d, $J=8,3$ Hz)	24	CH <sub>3</sub>	15,56	15,6	
4	C	37,77	37,7		25	CH <sub>3</sub>	15,56	15,7	
5	CH	55,28	55,2	0,83	26	CH <sub>3</sub>	16,75	16,8	
6	CH <sub>2</sub>	18,25	18,2		27	CH <sub>3</sub>	25,90	25,9	
7	CH <sub>2</sub>	32,54	32,5		28	CH <sub>2</sub>	69,71	69,8	3,55/3,21 (d,d) ( $J=10,9$ Hz)
8	C	39,83	39,8		29	CH <sub>3</sub>	33,17	34,1	
9	CH	47,52	47,5		30	CH <sub>3</sub>	23,58	23,6	
10	C	36,84	36,8		1'	C	173,67	173,7	
11	CH <sub>2</sub>	23,54	23,6		2'	CH <sub>2</sub>	34,90	34,9	2,30 (t) ( $J=7,4$ Hz)
12	CH	122,31	122,3	5,19 (t)	3'	CH <sub>2</sub>	25,18	25,2	
13	C	144,23	144,2		4'-7'	CH <sub>2</sub>		29,7	
14	C	41,75	41,7		8'	CH <sub>2</sub>		29,7	
15	CH <sub>2</sub>	25,56	25,5		9'	CH <sub>2</sub>		29,7	
16	CH <sub>2</sub>	22,04	22,0		10'	CH <sub>2</sub>		31,9	
17	C	36,96	36,9		11'	CH <sub>2</sub>		22,7	
18	CH	42,36	42,3		12'	CH <sub>2</sub>		14,1	
19	CH <sub>2</sub>	46,44	46,6		13'-19'*	CH <sub>2</sub>			
20	C	31,04	31,0		20'*	CH <sub>3</sub>			
21	CH <sub>2</sub>	34,10	34,1						

Valores obtidos para experimentos realizados com  $\text{CDCl}_3$ . Valores referentes a experimentos utilizando  $\text{CDCl}_3$  (WANG *et al.*, 2009).

Foi observado um sinal em  $\delta$  69,71 ppm referente a um carbono carbinólico, que acrescido das informações do experimento HSQC (Figuras 55 a 57, páginas 99 a 101) está correlacionado com os sinais de hidrogênio em  $\delta$  3,54 ppm e  $\delta$  3,21 ppm. Essas informações, comparado com dados da literatura (WANG *et al.*, 2006) permitem sugerir que o núcleo do triterpeno seja o eritrodíol (Figura 44 – C, página 88).

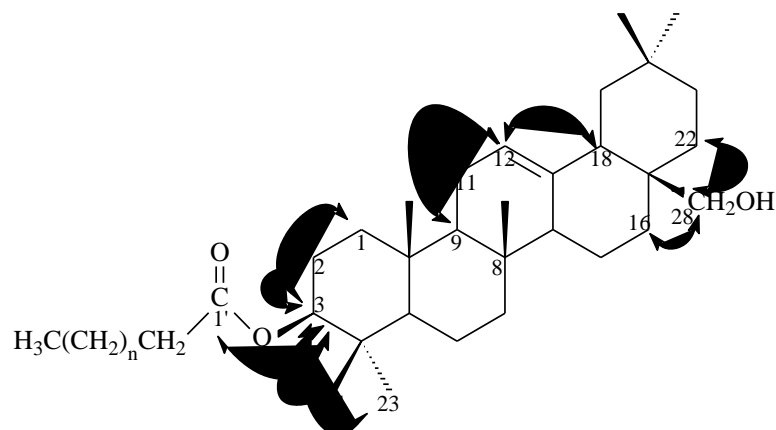
A substância 6 apresenta um sinal a  $\delta$  173,67 característico de carbonila de éster. Essa informação aliado aos sinais característicos de grupos alquilas de cadeia longa sugerem presença de um éster de cadeia longa no núcleo eritrodíol, provavelmente na posição C-3.

Com base nesses dados sugerimos que a substância 6 seja um éster de ácido graxo de cadeia longa do eritrodíol (Figura 44 – D, página 88).

O mapa de contorno do experimento HMBC (Figura 58, página 102) possibilitou a identificação da ligação dupla dos carbonos C-12 e C-13, comprovando através da correlação do sinal em  $\delta$  5,19 ppm (1H, t, H-12) e  $\delta$  47,52 ppm (C-9), 23,54 ppm (C-11), 42,36 ppm (C-18). Também foi possível confirmar o grupo oximetilênico C-28 através da correlação entre  $\delta$  3,53 ppm, 3,21 ppm (1H, d, H-28) e  $\delta$  22,03 ppm (C-16) e 31,04 ppm (C-22), correlação em  $\delta$  4,51 ppm (1H, d,  $J=8,4$ ) e  $\delta$  38,28 ppm (C-1), 23,60 ppm (C-2), 28,05 ppm (C-23), 15,56 ppm

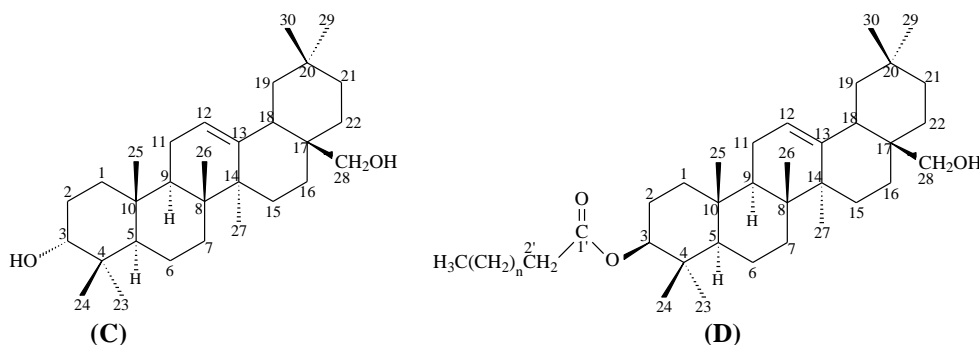


(C-24) e 173,67 ppm (C-1'), sendo que esses valores de deslocamentos químicos são compatíveis com os relatados por (WANG *et al.*, 2006). Dessa maneira, essas informações sugerem que a substância 6 seja o eritrodíol esterificado com ácido graxo de cadeia longa (Figura 43).



**Figura 43** - Correlações observadas a partir do experimento HMBC para o eritrodíol esterificado (substância 7)

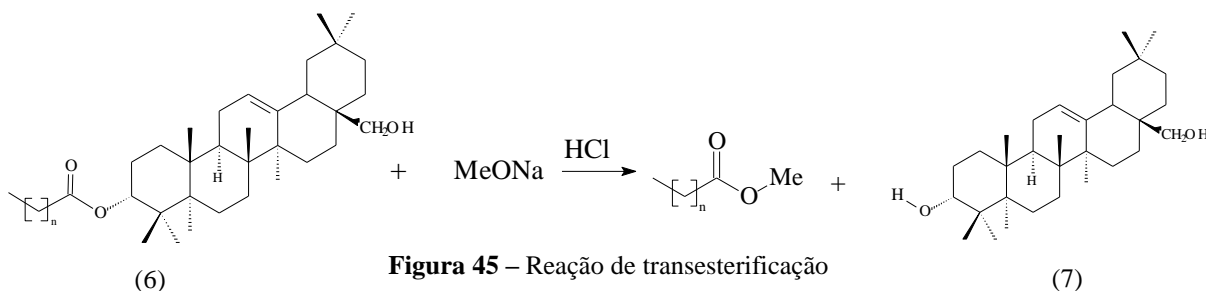
No RMN de ácidos graxos é observada a sobreposição de sinais, tanto na RMN de  $^1\text{H}$  como  $^{13}\text{C}$ . Uma técnica utilizada para identificar ácidos graxos é cromatografia gasosa com detector FID, através da reação de transesterificação de ácidos graxos (Instituto Adolfo Lutz). Então para identificar a cadeia lateral do éster (ácido graxo) foi realizado uma reação e transesterificação do éster do eritrodíol, substância 6.



**Figura 44** – Estrutura do eritrodíol sem (C) e com grupo éster (D)

Assim, adotamos o procedimento de Mendes *et al.*, (1998), com modificações, para determinar a composição do éster na substância 6, conforme apresentado na Figura 44- D.

Após a reação, a fração contendo o ácido graxo metilado foi submetido a análise CG-FID e comparado os tempos de retenção com padrões de ésteres metílicos de ácidos graxos certificados ( $\text{C}_8 - \text{C}_{22}$ ), conforme Tabela 12.



**Figura 45** – Reação de transesterificação

A análise CG sugere a presença dos derivados de ácidos graxos o linoato, araquidato e linolenoato de metila. A presença de derivados de ácidos graxos contendo ácidos graxos insaturados é reforçada pela presença do sinal na RMN de <sup>1</sup>H a δ 5,19 ppm.

**Tabela 12** – Comparação dos tempos de retenção obtidos para a substância 6 após a reação de transesterificação

Ácidos graxos metilados*	Fórmula	TR (min) padrão	Tr (min) Fração apolar da substância 6	Área (%)**
Elaidato de metila	(C18:1n9t)	25,606	—	—
Oleato de metila	(C18:1n9c)	25,941	—	—
Linoato de metila	(C18:2n6c)	26,651	26,776	9,9
Araquidato de metila	(C20:0)	27,655	27,616	14,7
Eicosanoato de metila	(C20:1)	28,857	—	—
Linolenoato de metila	(C18:3n3)	29,186	29,313	14,5
Behenato de metila	(C22:0)	33,721	—	—
Erucicato de metila	(C22:1n9)	34,323	—	—

\* Foram relatados apenas os tempos de retenção dos padrões próximos aos detectados na substância 6.

\*\* Baseado na normatização das áreas.

Coluna capilar de sílica fundida Carbowax (30m X 0,25mm), temperatura inicial a 60 °C, acrescida de 5 °C.min<sup>-1</sup> até 200 °C, sendo mantida nessa temperatura por 5 minutos. Uma mistura de ácidos graxos (FAME) variando de 8 a 22 carbono certificada (Supelco – USA; catalogo 47801- Lot: LC00126).

Com base nesses dados sugerimos que a substância 6 seja uma mistura de linoato, araquidato e linolenoato de eritrodilol. Essa é a primeira vez que essas substâncias é relatada no gênero.

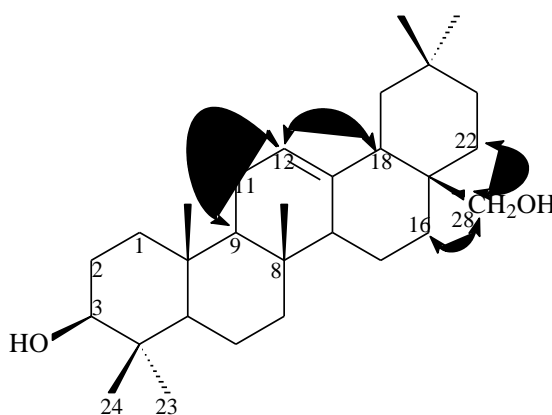
A substância 6, após ser transesterificada, forneceu um sólido branco de P.F: 124 °C denominado substância 7. No espectro de <sup>1</sup>H foi observado diferenças quando comparado com o experimento de RMN de <sup>1</sup>H para o triterpeno esterificado (substância 6). O tripleto em δ 4,5 ppm (1H, J=8,3 Hz) correspondente a um hidrogênio, característico de hidrogênios oximetilênicos de triterpenos pentacíclicos, sofre deslocamento para δ 3,21 ppm, se sobrepondo ao duplete (H-28) e a ausência do tripleto em δ 2,28 ppm (2H, J=7,4 Hz), característico de hidrogênios metilênico vizinho a um grupo éster, sugerem que o grupo éster foi substituído por um grupo hidroxila (Figura 59, página 103).

O espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  da substância 7 apresentou 30 sinais de carbono (Figura 60, página 110); desses, baseados no experimento do DEPT-135, 10 sinais são referentes a carbonos metílicos, 7 metilênicos e 5 metínicos. Portanto, a substância apresenta 8 sinais de carbono não hidrogenado. A presença do sinal em  $\delta$  69,71 ppm referente a um carbono carbinólico confirma a substituição do grupo éster pelo grupo hidroxila.

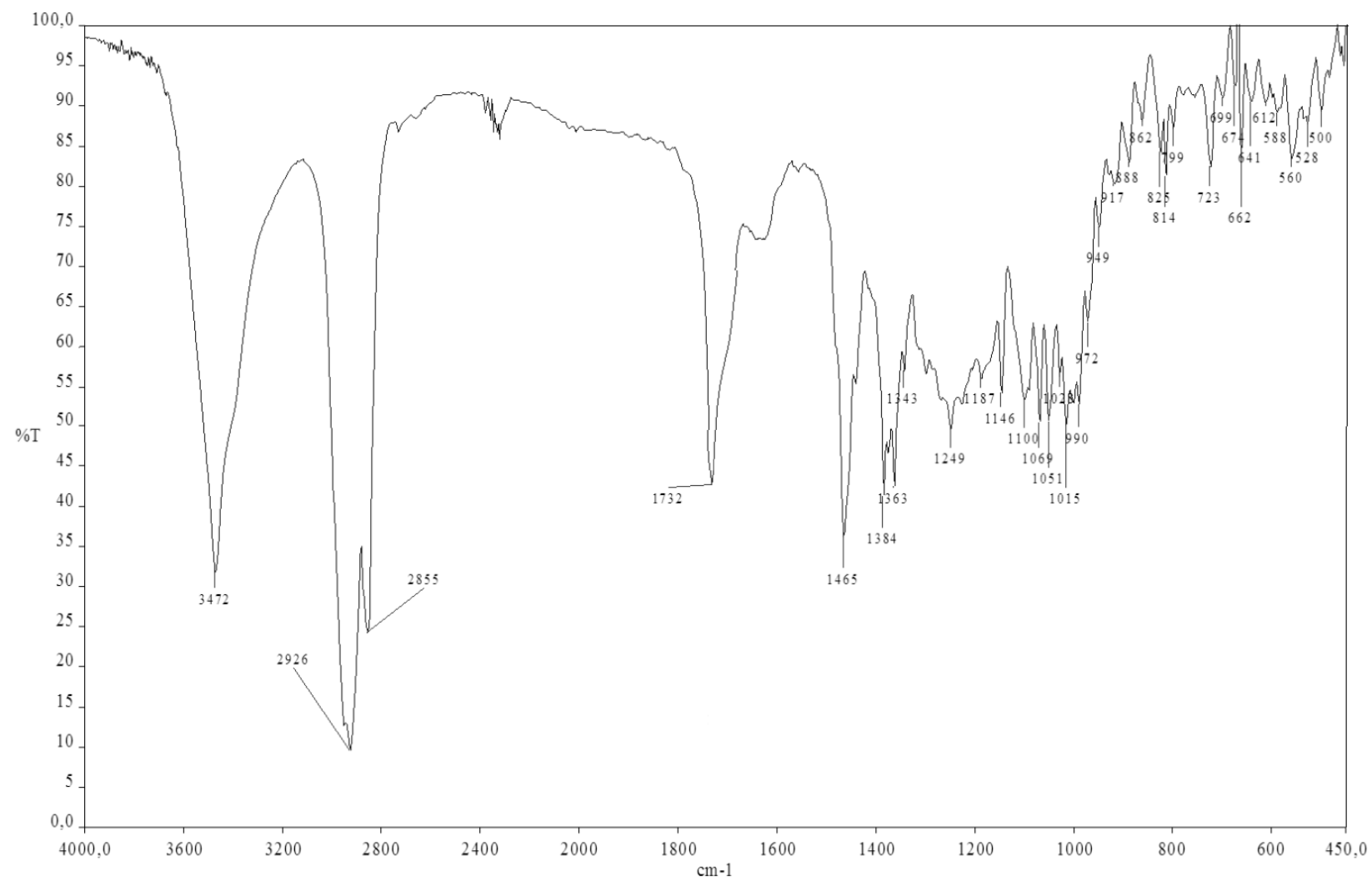
Essa proposta é reforçada pela ausência do sinal em  $\delta$  173,67 ppm característico de carbonila de éster.

Através do experimento HSQC (Figura 55 a 57, páginas 99 a 101) o sinal em  $\delta$  69,71 ppm referente ao C-3 carbono carbinólico, está correlacionado com o duplete em  $\delta$  3,21 ppm (H-28).

O mapa de contorno do experimento HMBC do eritrodíol transesterificado (Figura 58, página 102) possibilitou confirmar a sobre posição do grupo oximetilênico C-28 através da correlação entre  $\delta$  3,53 ppm, 3,21 ppm (1H, d, H-28) e  $\delta$  22,03 ppm (C-16) e 31,04 ppm (C-22), correlação em  $\delta$  3,21 ppm (1H, d,  $J=8,4$ ), (Figura 46), sendo que esses valores de deslocamentos químicos são compatíveis com os relatados por (WANG *et al.*, 2006). Dessa maneira, essas informações confirmam que a substância 7 seja o eritrodíol esterificado com ácido graxo de cadeia longa.



**Figura 46** - Correlações observadas a partir do experimento HMBC para o eritrodíol transesterificado (substância 7)



**Figura 47** – Espectro no infravermelho (KBr) do linoato, araquidato e linolenato de eritrodiol (substância 6)

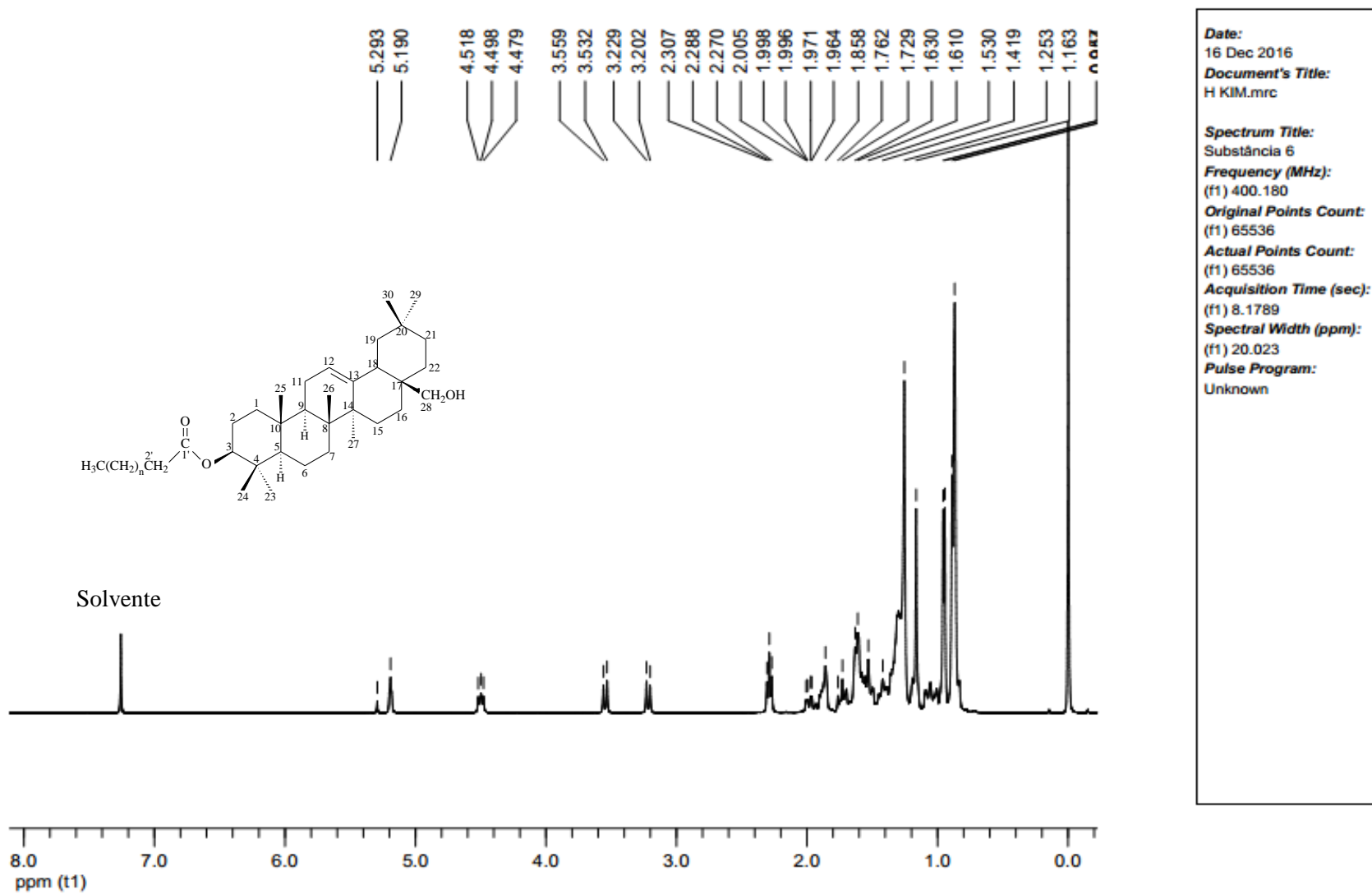
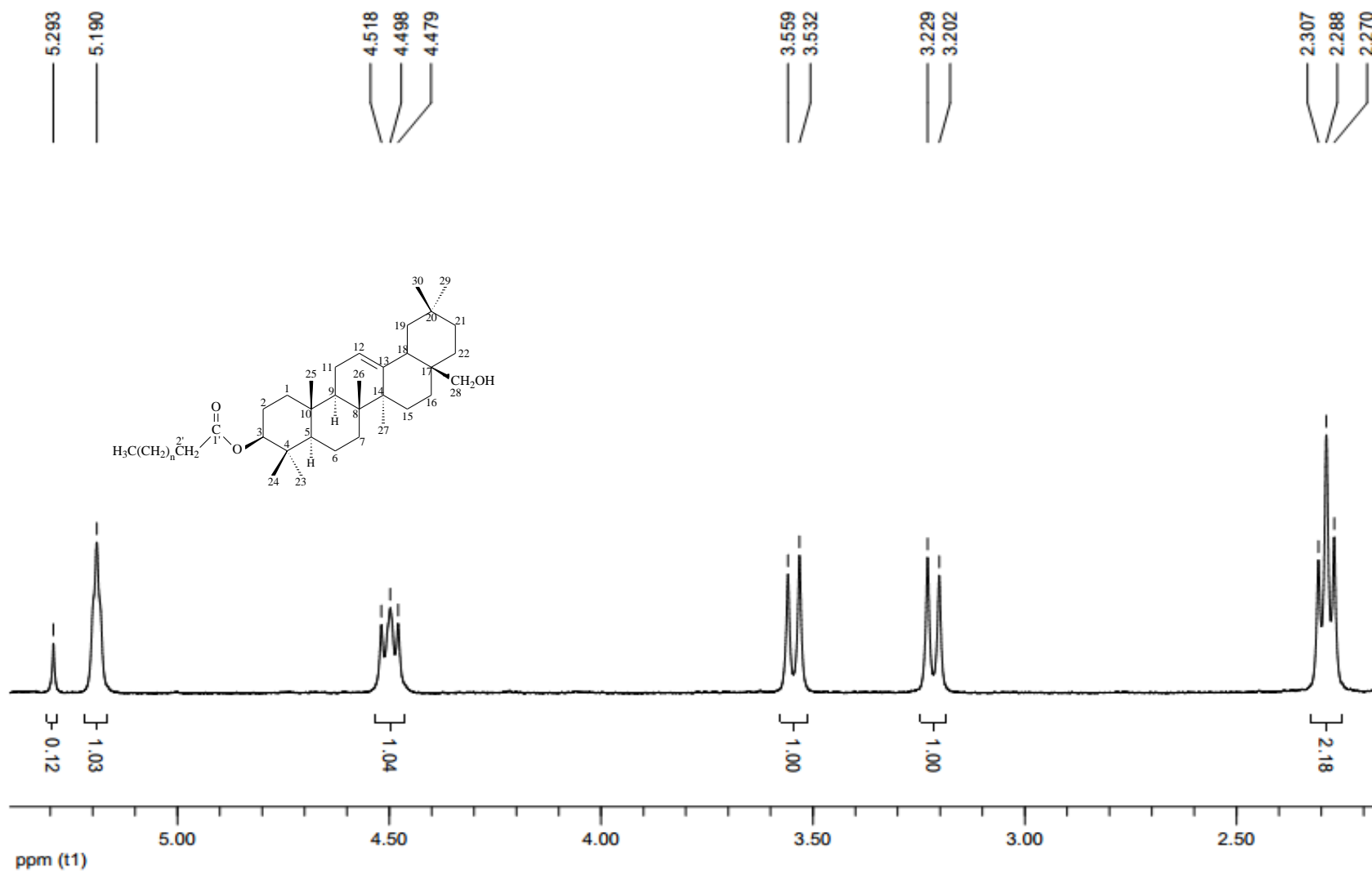
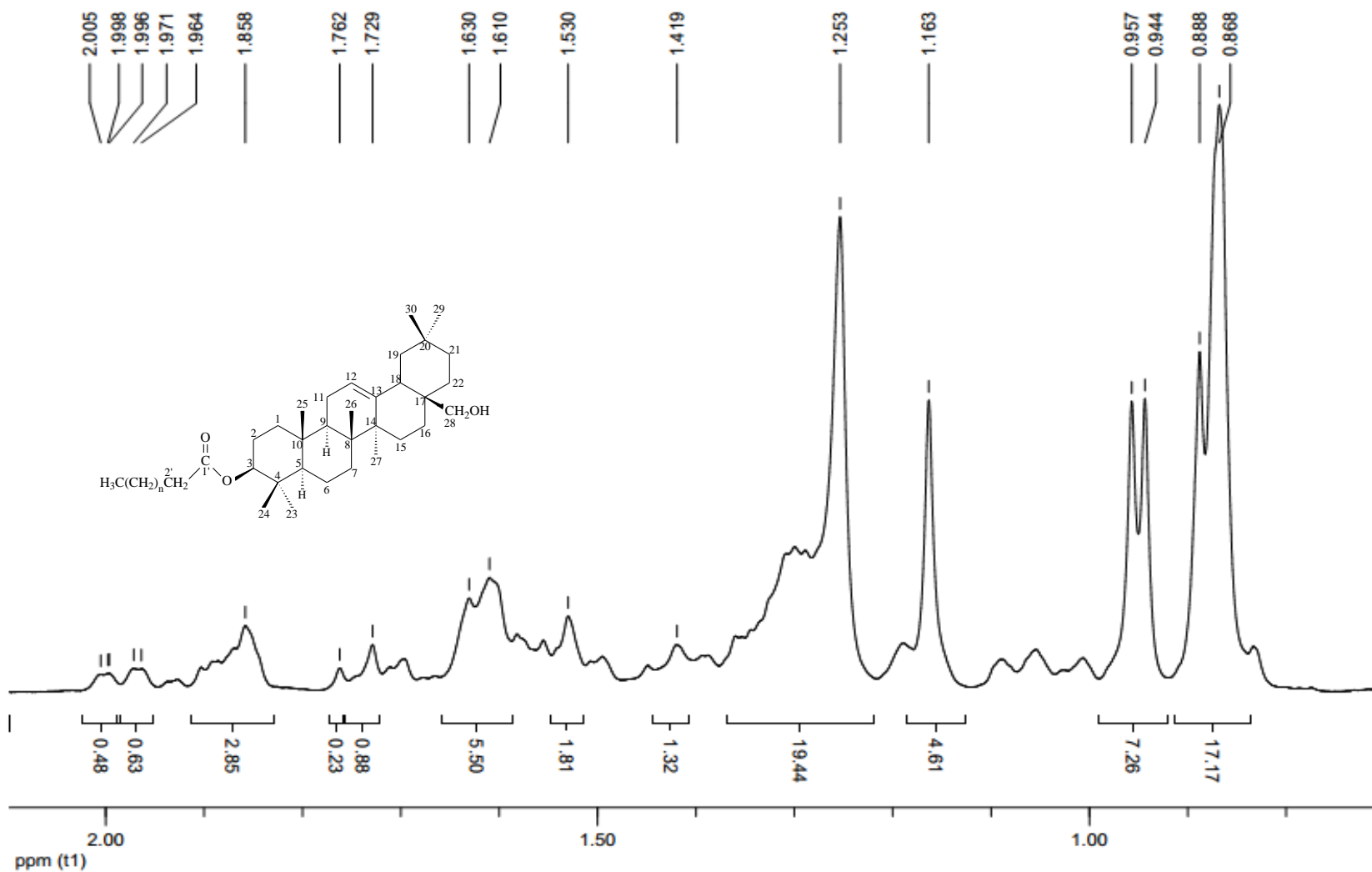


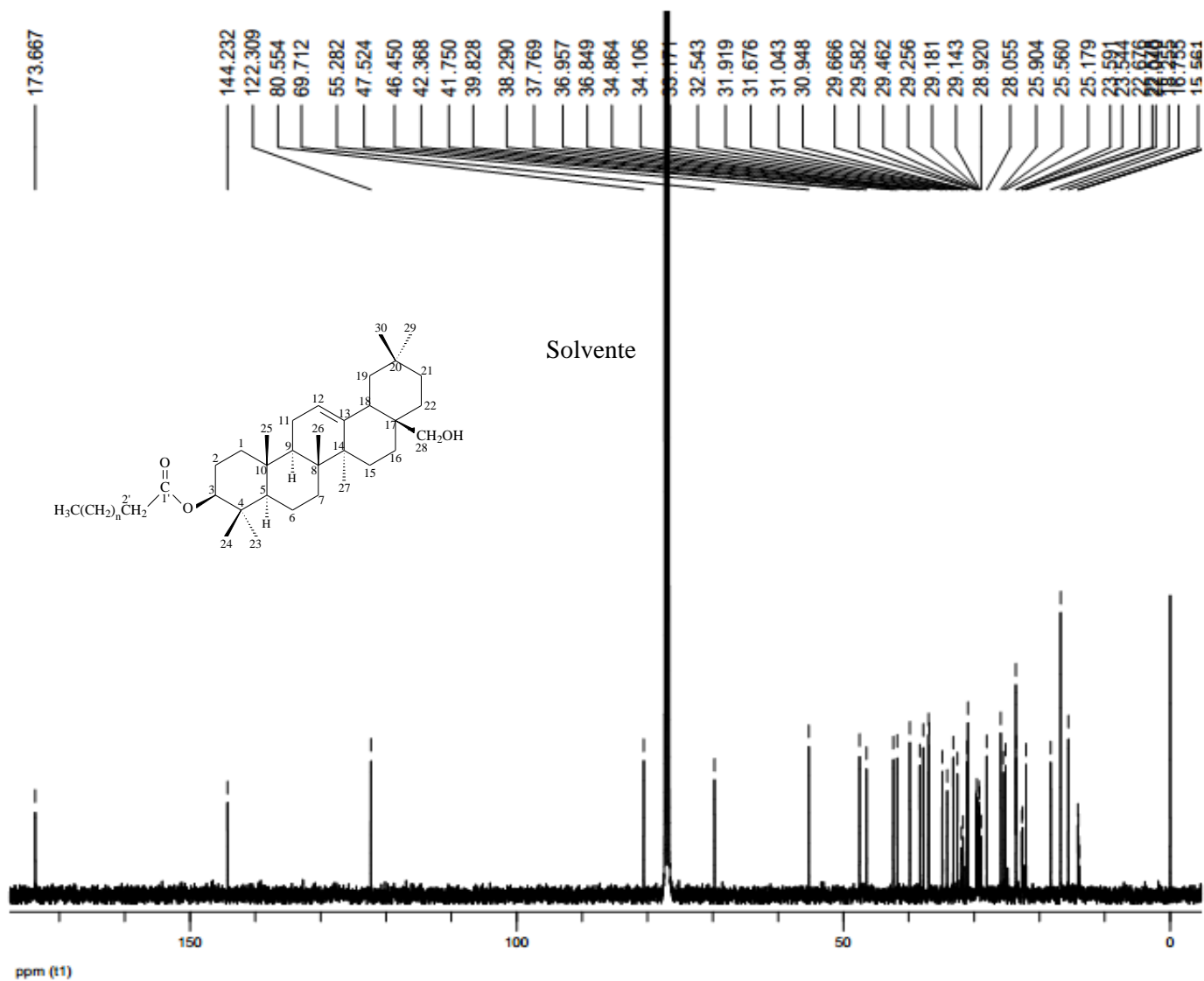
Figura 48 – Espectro de RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz) do linoato, araquidato e linolenato de eritrodio (substância 6)



**Figura 49** – Ampliação da região  $\delta$  2,2 – 5,5 do espectro de RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz) do linoato, araquidato e linolenoato de eritrodiol (substância 6)



**Figura 50** – Ampliação da região  $\delta$  0,7 – 2,1 do espectro de RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz) do linoato, araquidato e linolenato de eritrodil (substância 6)



Date:  
16 Dec 2016  
Document's Title:  
C KIM.mrc

Spectrum Title:  
Substância 6  
Frequency (MHz):  
(f1) 100.625  
Original Points Count:  
(f1) 32768  
Actual Points Count:  
(f1) 32768  
Acquisition Time (sec):  
(f1) 1.3631  
Spectral Width (ppm):  
(f1) 238.891  
Pulse Program:  
Unknown

Figura 51 – Espectro de RMN <sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>, 100 MHz) do linoato, araquidato e linolenoato de eritrodiol (substância 6)



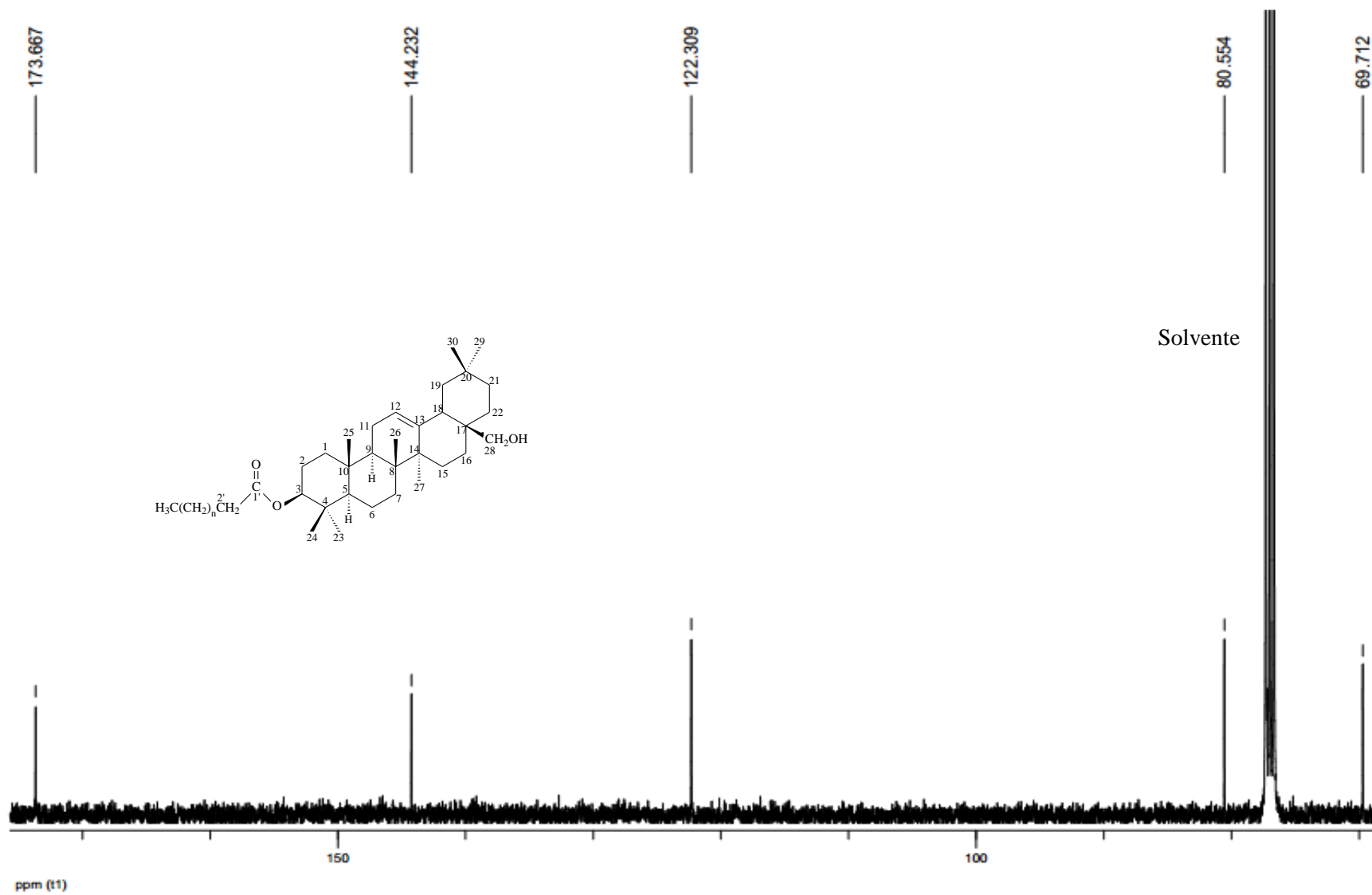
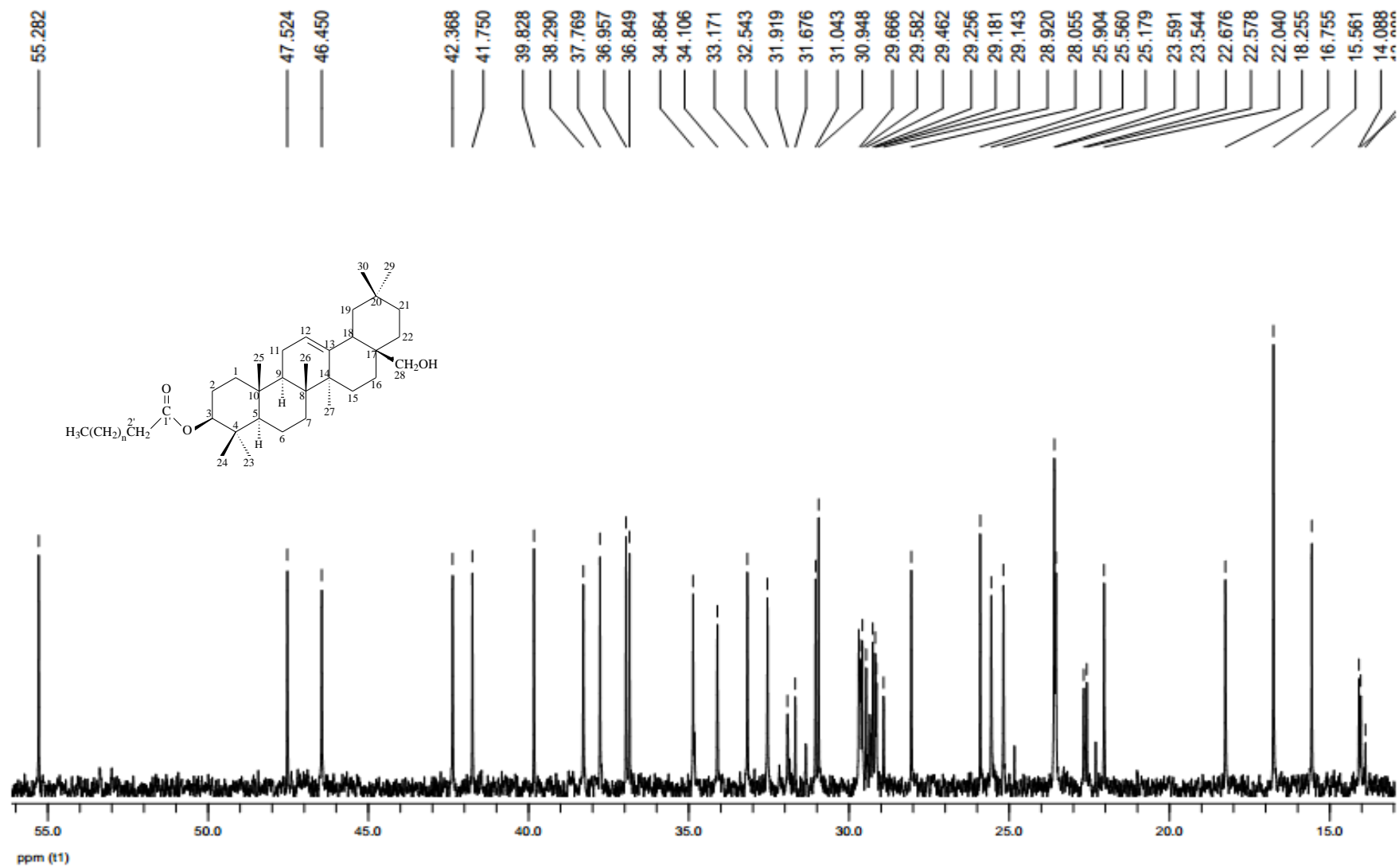
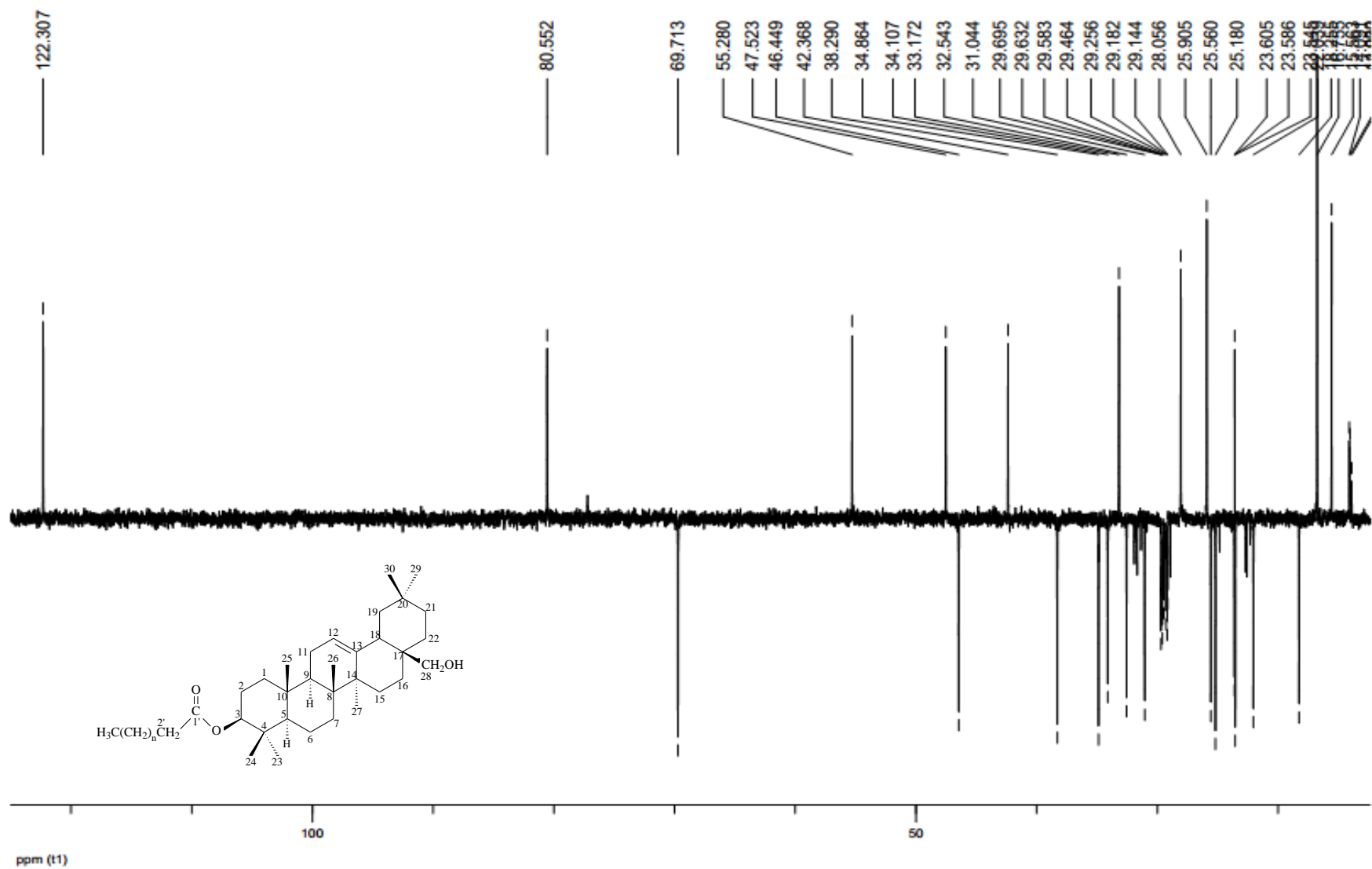
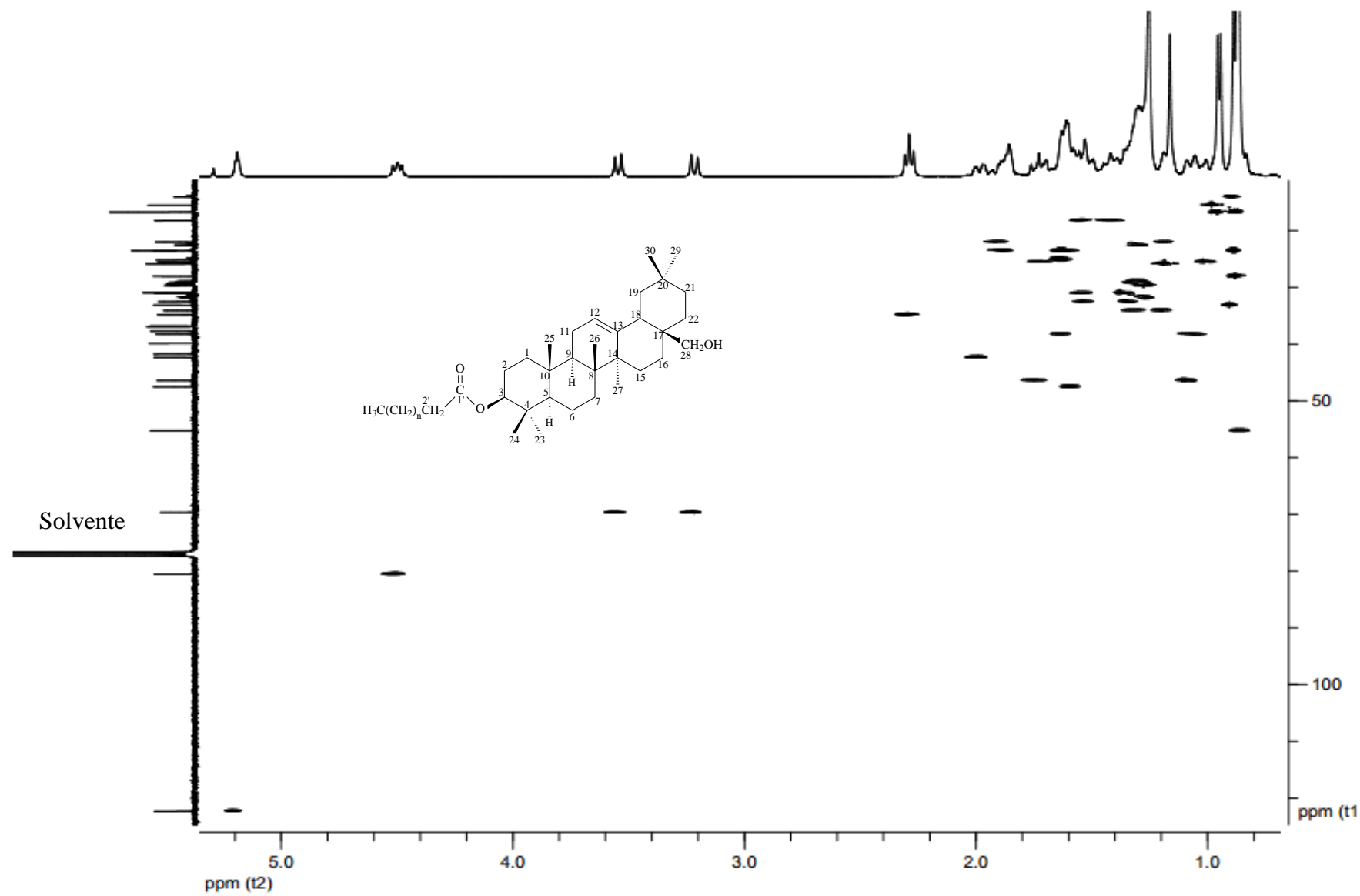


Figura 52 – Ampliação da região  $\delta$  70,0 – 175,0 do espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 100 MHz) do linoato, araquidato e linolenato de eritrodio (substância 6)

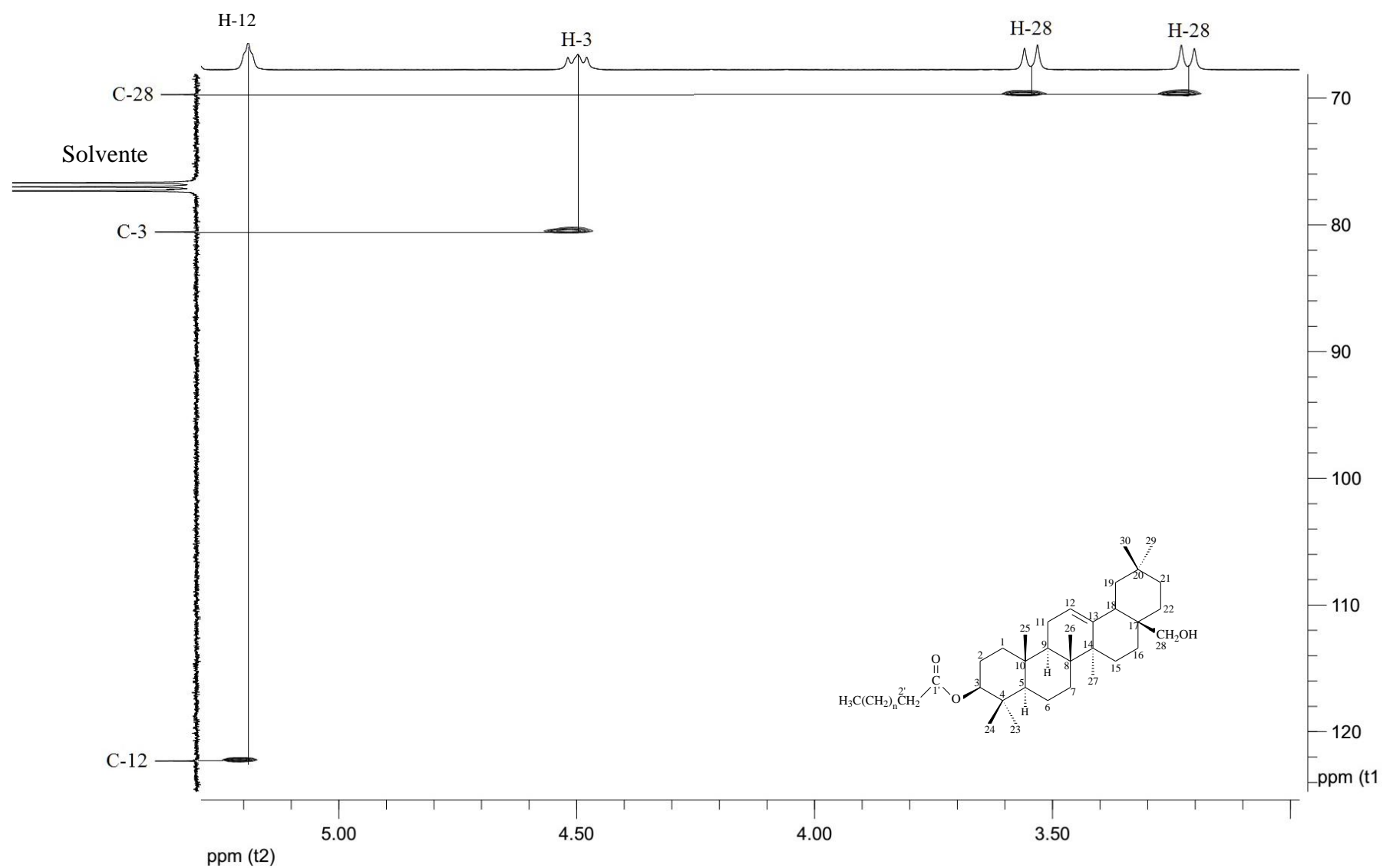


**Figura 53** – Ampliação da região  $\delta$  13,0 – 56,0 do espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 100 MHz) do linoato, araquidato e linolenato de eritrodiol (substância 6)

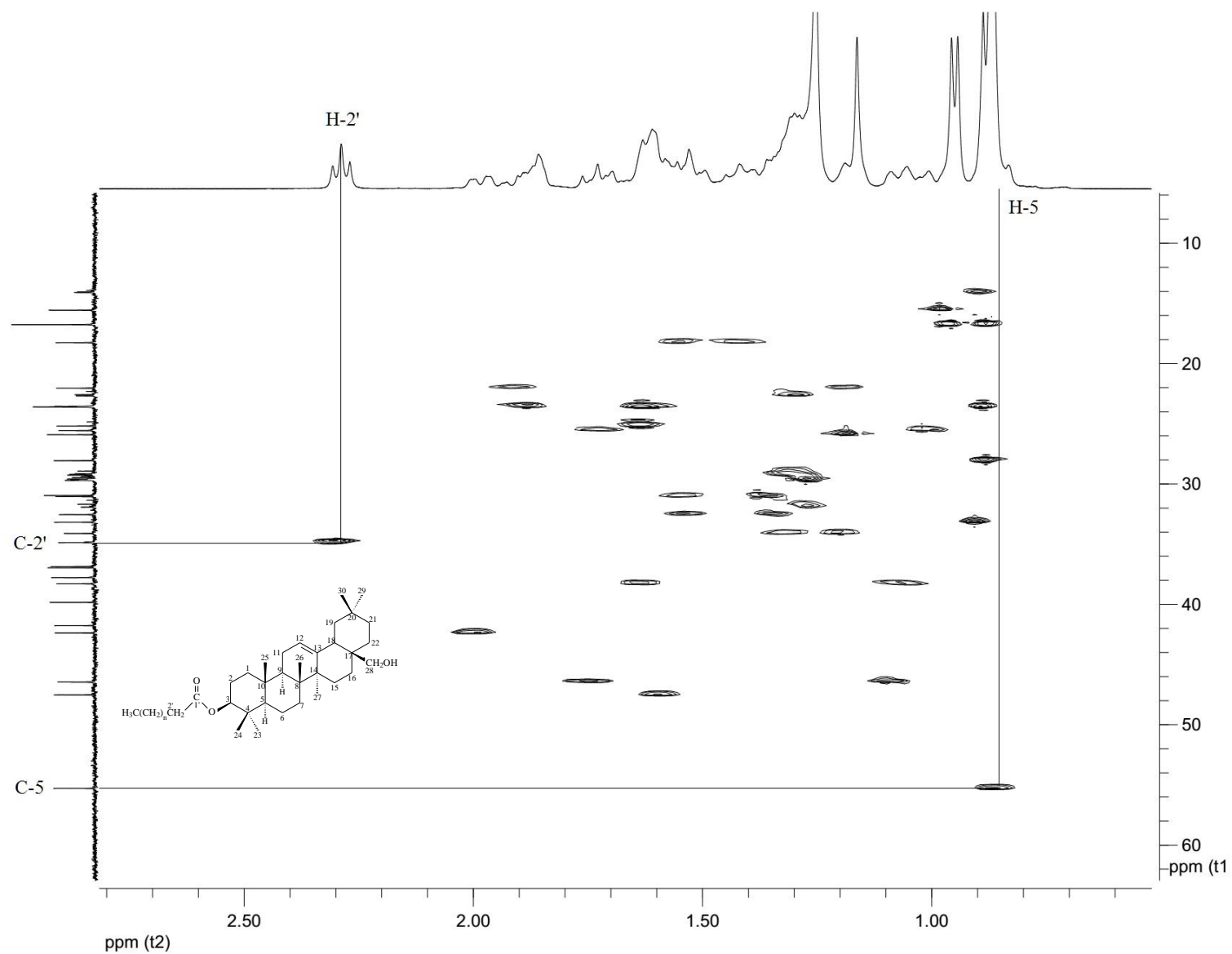




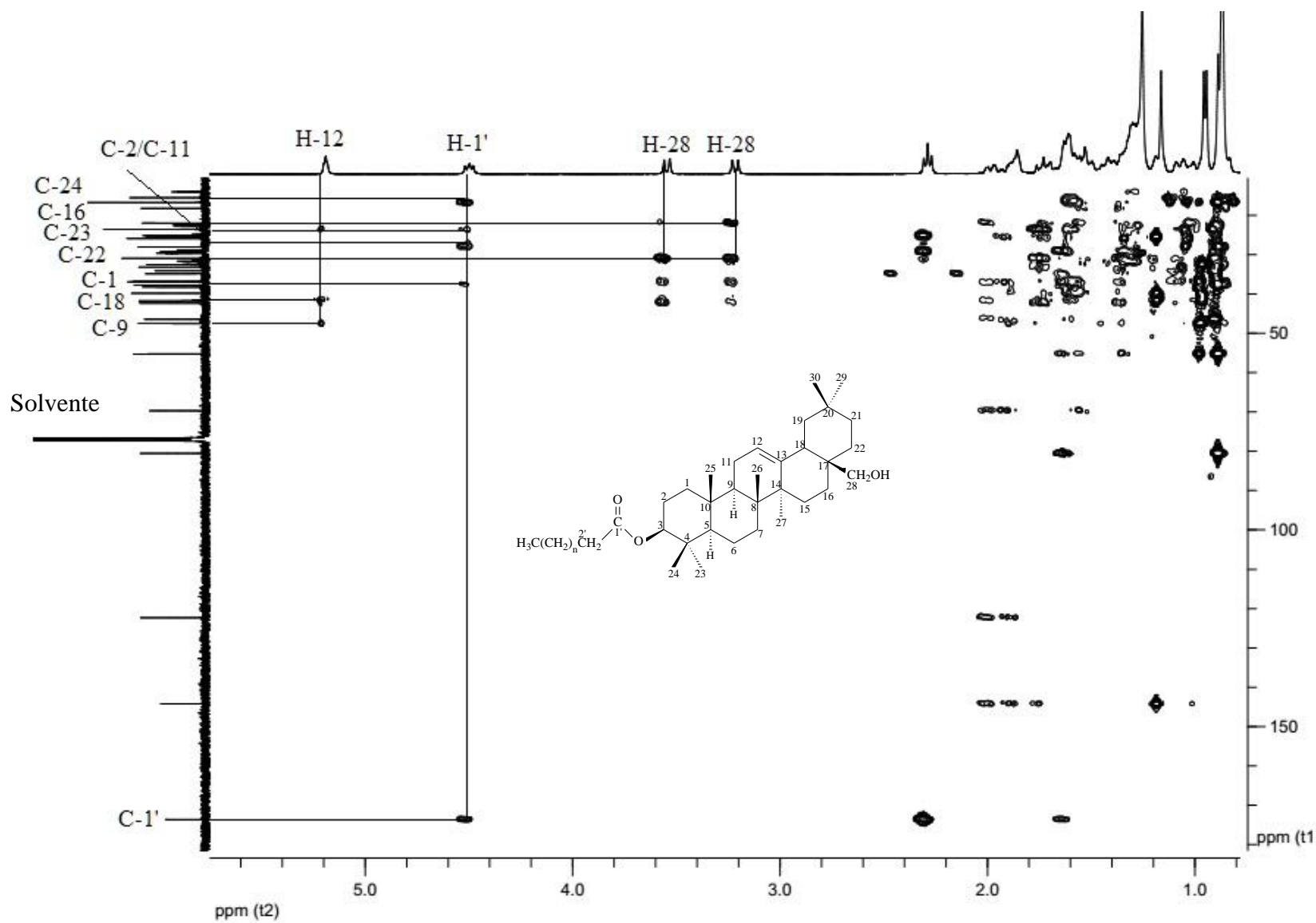
**Figura 55** – Principais correlações de H-C observadas no experimento de HSQC (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz) do linoato, araquidato e linolenoato de eritrodil (substância 6)



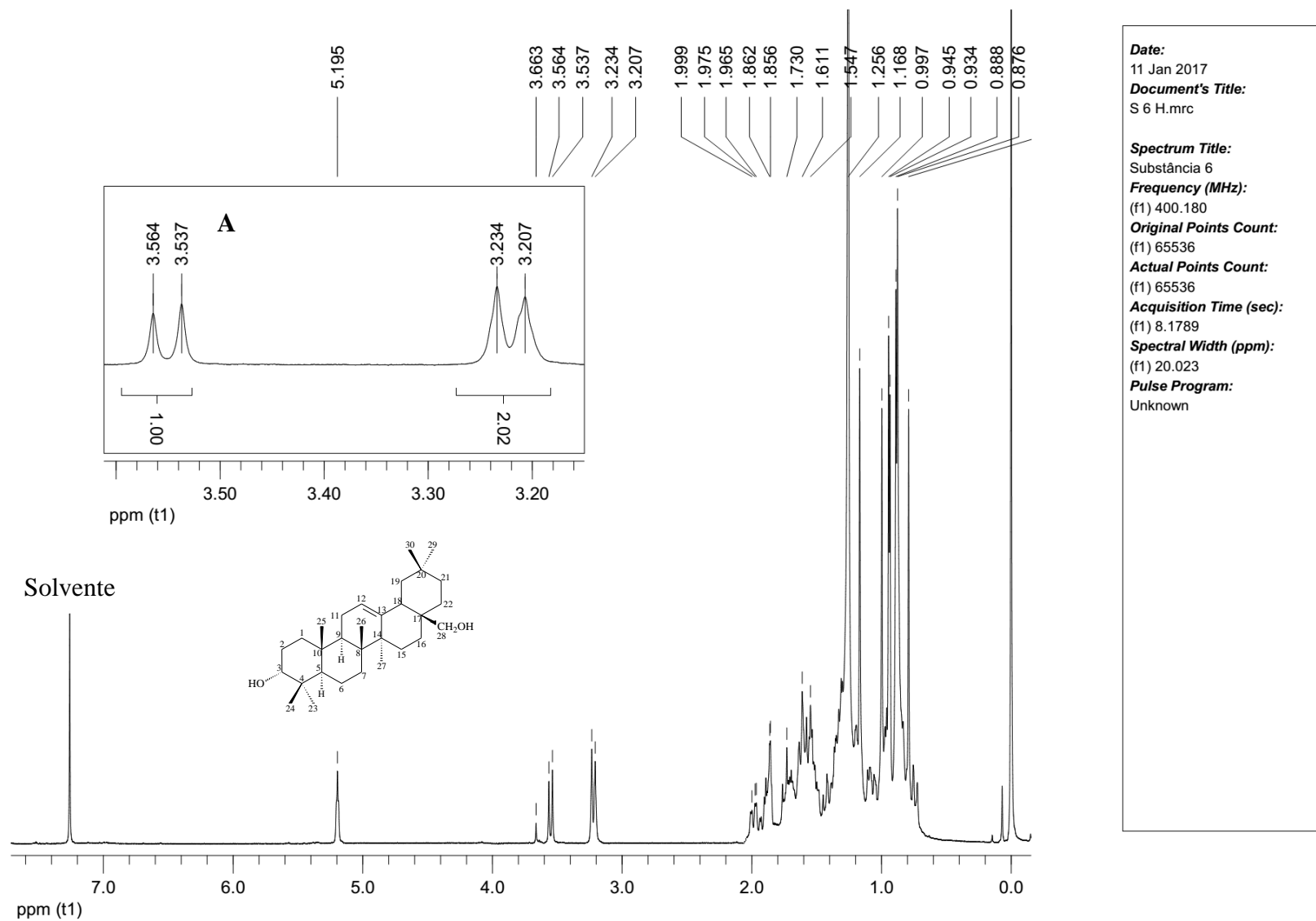
**Figura 56** – Expansão (A) da correlação de H-C observadas no experimento de HSQC (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz) do linoato, araquidato e linolenato de eritrodíol (substância 6)



**Figura 57** – Expansão (B) da correlação de H-C observadas no experimento de HSQC ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz) do linoato, araquidato e linolenato de eritrodio (substância 6)



**Figura 58** – Principais correlações de H-C observadas no experimento de HMBC ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz) do linoato, araquidato e linolenato de eritrodol (substância 6)



**Figura 59** – Espectro de RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz) do eritrodioil transesterificado (substância 7)



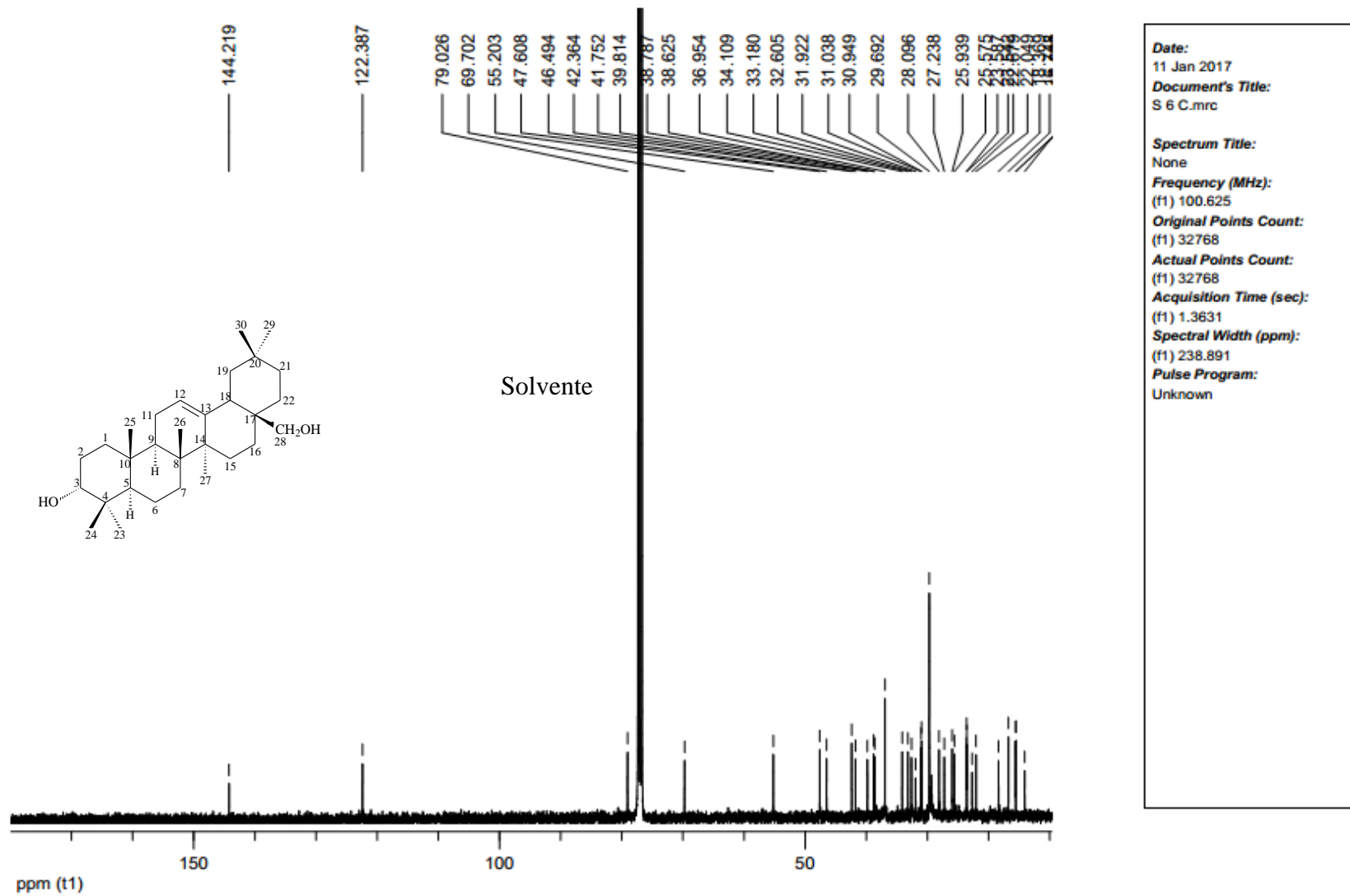
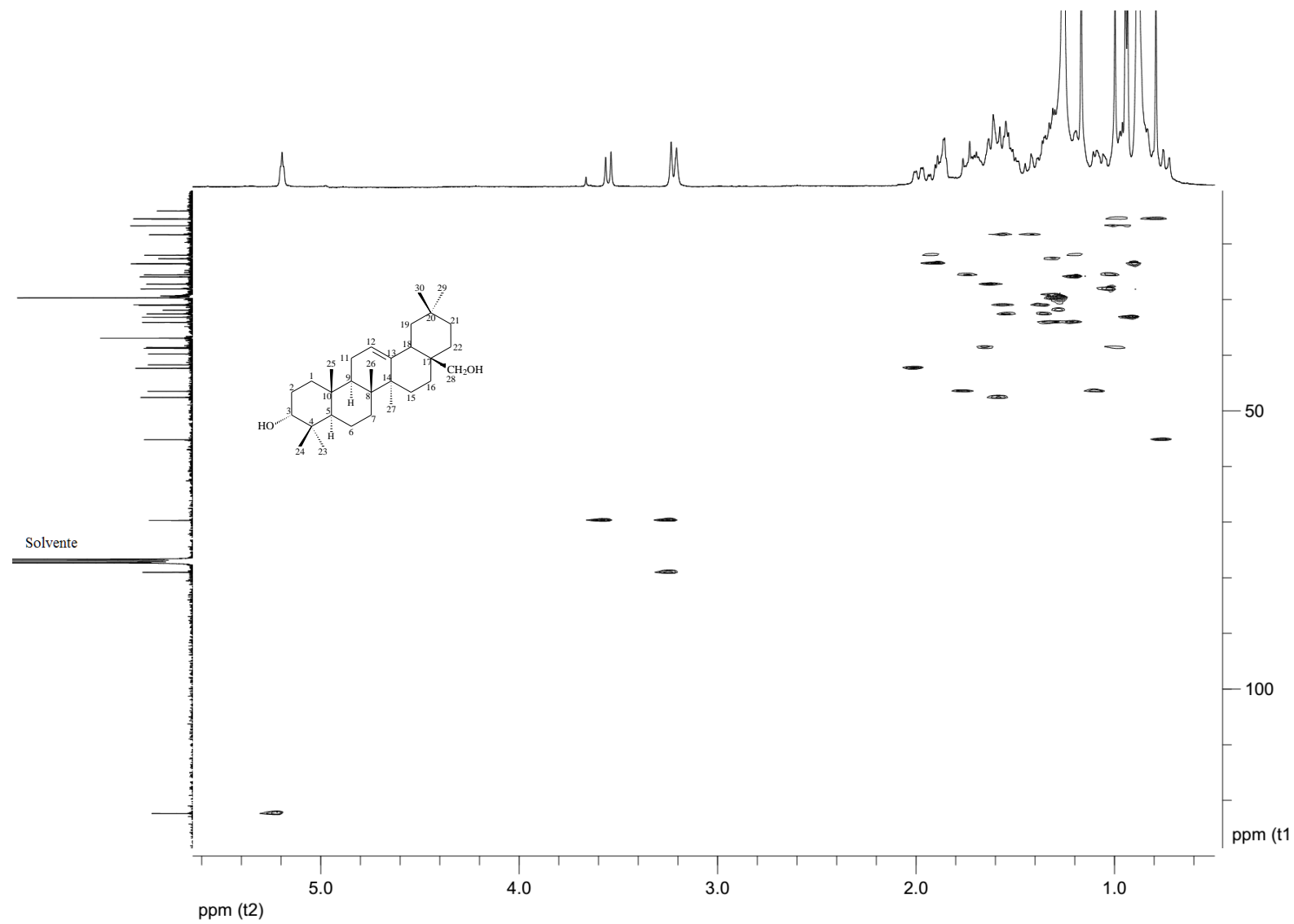
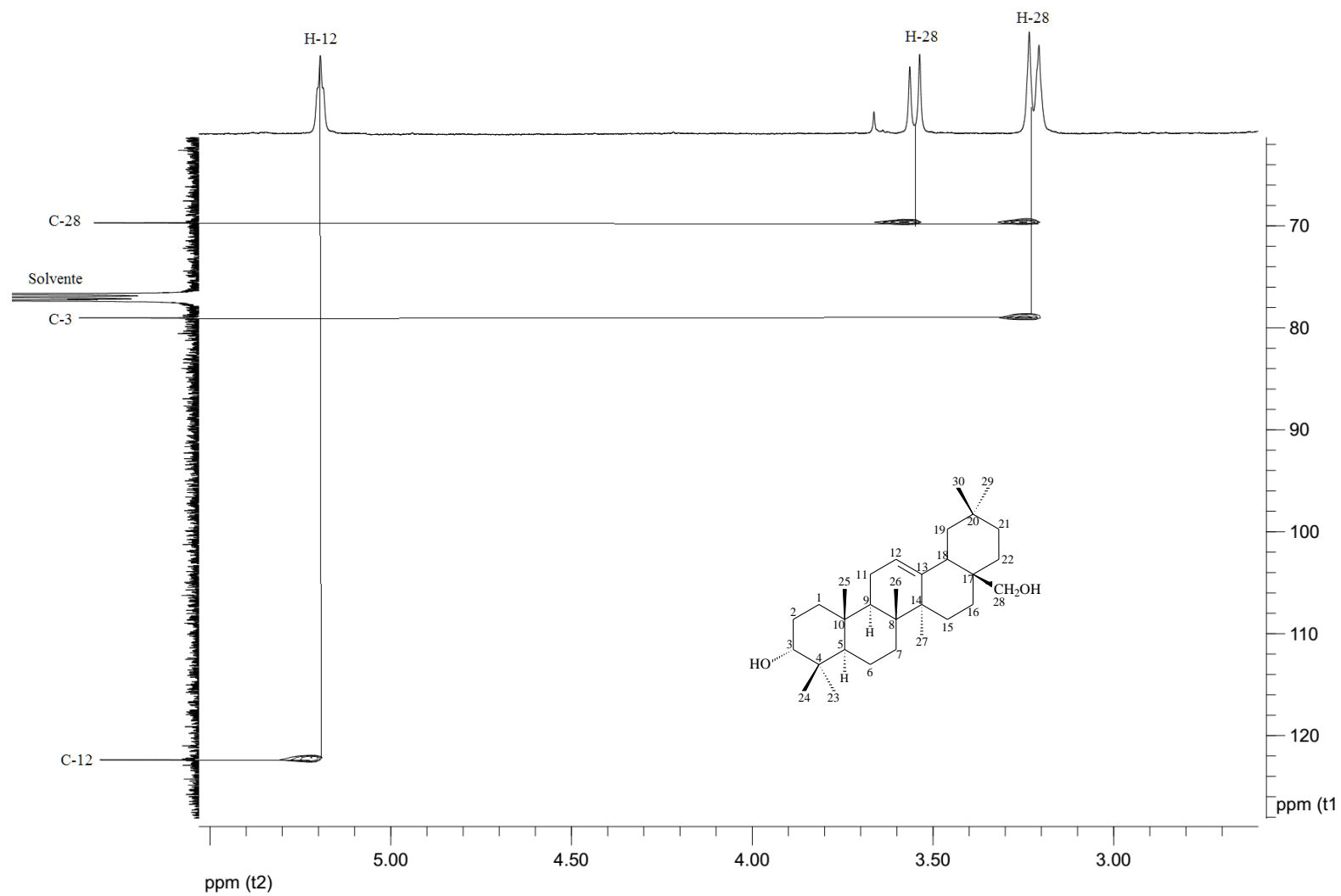


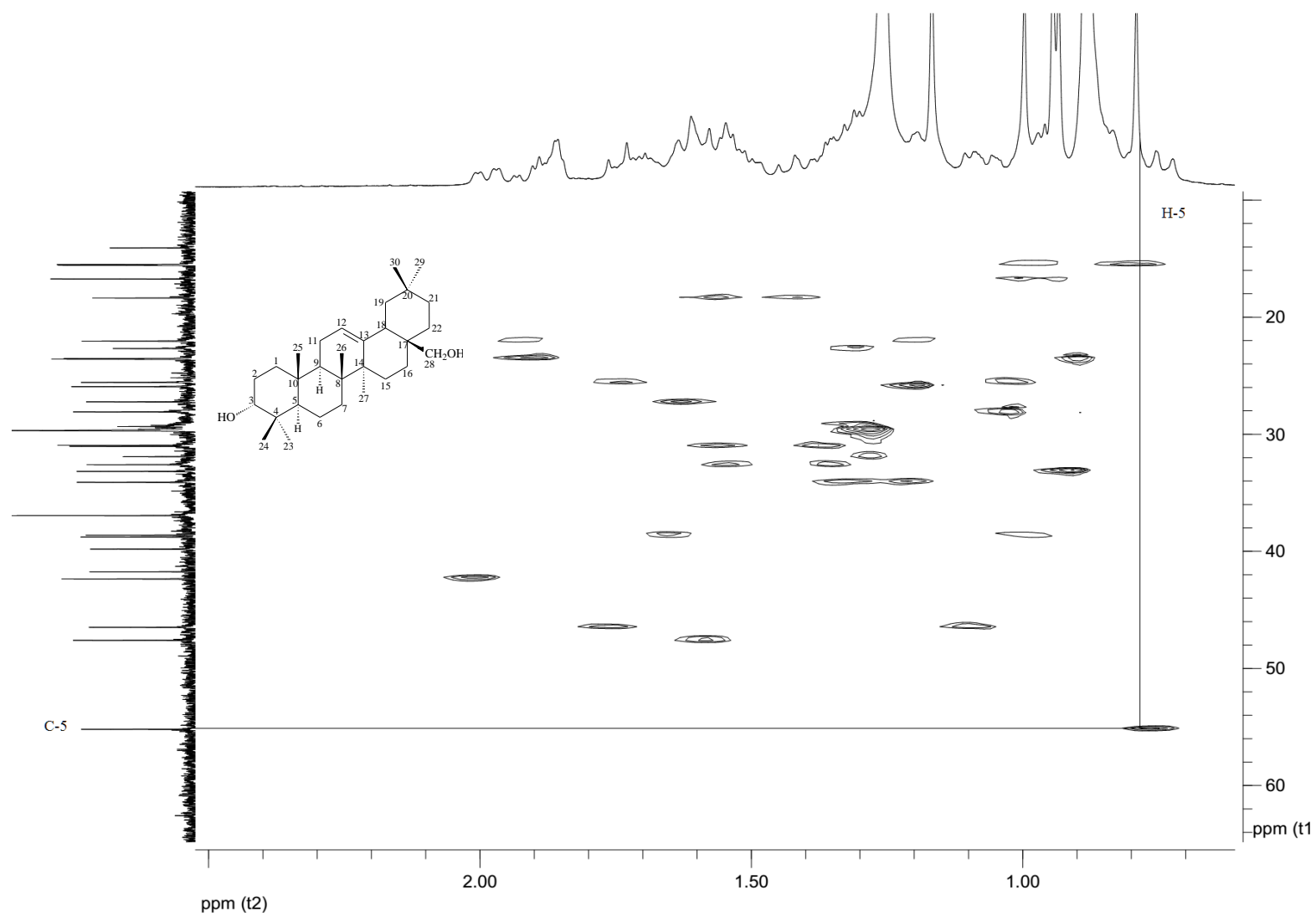
Figura 60 – Espectro de RMN <sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>, 100 MHz) do eritrodiool transesterificado (substância 7)



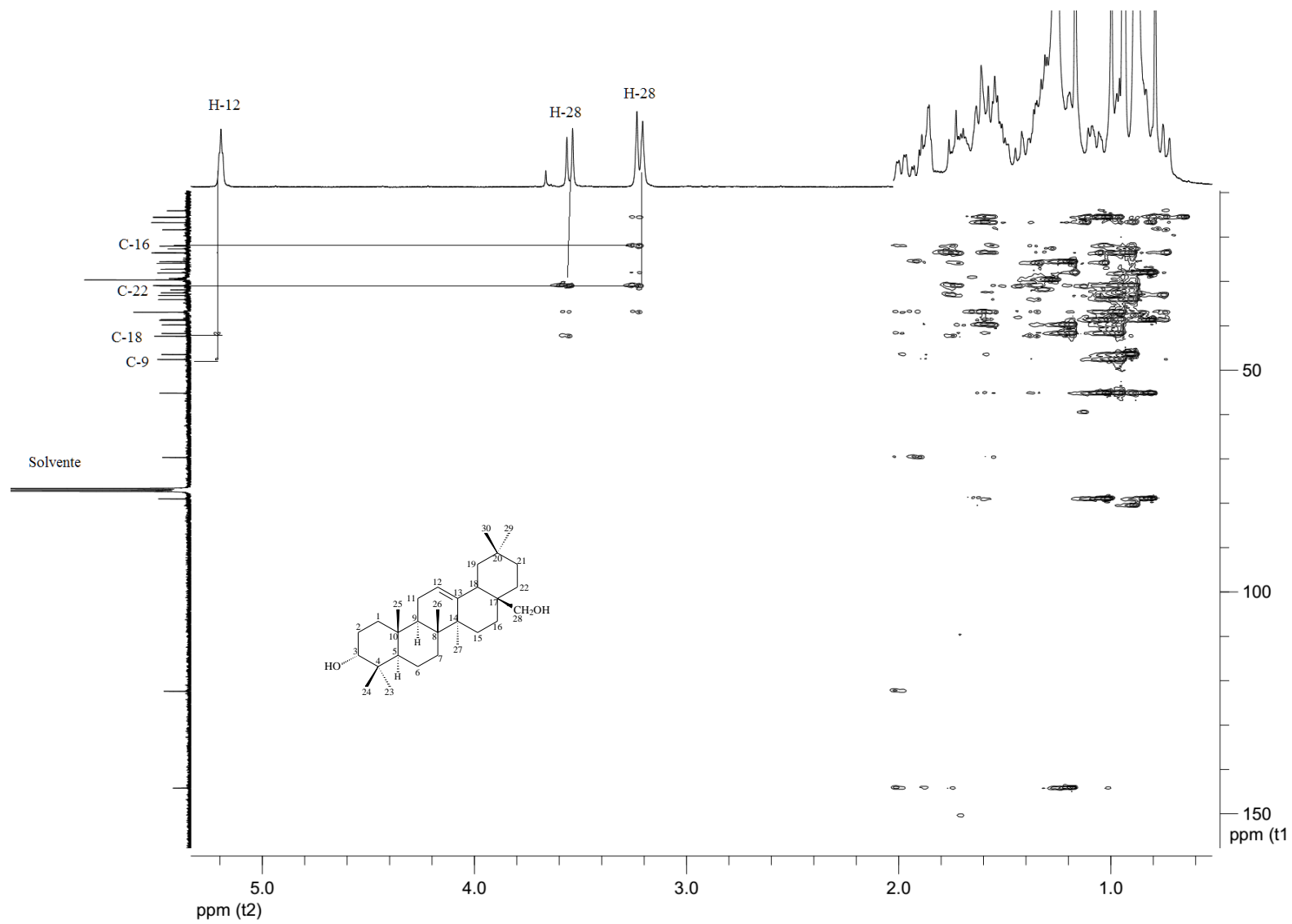
**Figura 61** – Principais correlações de H-C observadas no experimento de HSQC ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz) do eritrodil transesterificado (substância 7)



**Figura 62** - Expansão (A) da correlação de H-C observadas no experimento de HSQC ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz) do eritrodil transesterificado (substância 7)



**Figura 63** - Expansão (A) da correlação de H-C observadas no experimento de HSQC ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz) do eritrodil transesterificado (substância 7)



**Figura 64** – Principais correlações de H-C observadas no experimento de HMBC (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz) do eritrodíol transesterificado (substância 7)

**PM-A.06:** Eritrodiol esterificado com ácido graxo de cadeia longa (Substância 8)

A substância 8 apresentou-se como um sólido branco amorfo, solúvel em clorofórmio e com faixa de fusão entre 124 a 125 °C. O teste de Liberman-Buchard realizado para essa substância apresentou resultado positivo para triterpenos pentacíclicos.

Os espectros de RMN ( $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ . DEPT, HSQC e HMBC) dessa substância apresentaram sinais próximos aos deslocamentos de linoato, araquidato e linolenoato de eritrodiol (substância 6).

O espectro de RMN de  $^1\text{H}$  dessa substância apresentou sinais na região entre  $\delta$  0,86 e  $\delta$  1,27 ppm característicos de grupos metílicos em estruturas de triterpenos. O simpleto intenso em  $\delta$  1,25 ppm é característico de hidrogênio alifáticos de cadeia longa característicos de ácidos graxos. Logo, a presença de um tripleto em  $\delta$  2,28 ppm (2H,  $J=7,4$  Hz) reforçada a proposta. O tripleto em  $\delta$  4,5 ppm (1H,  $J=8,3$  Hz) corresponde a apenas um hidrogênio, é característico de hidrogênios oximetilênicos de triterpenos pentacíclicos. Assim como a presença de dois dupletos definidos em  $\delta$  3,54 ppm (1H, d,  $J=10,9$  Hz) e  $\delta$  3,21 ppm (1H, d,  $J=10,9$  Hz) referentes a 2 hidrogênios acoplados. Foi observado ainda um sinal largo em  $\delta$  5,19 ppm (1H), característico de um hidrogênio olefínico, e na região em  $\delta$  5,30 ppm, outro sinal, provavelmente de outro grupo olefínico, (Figura 65, página 111).

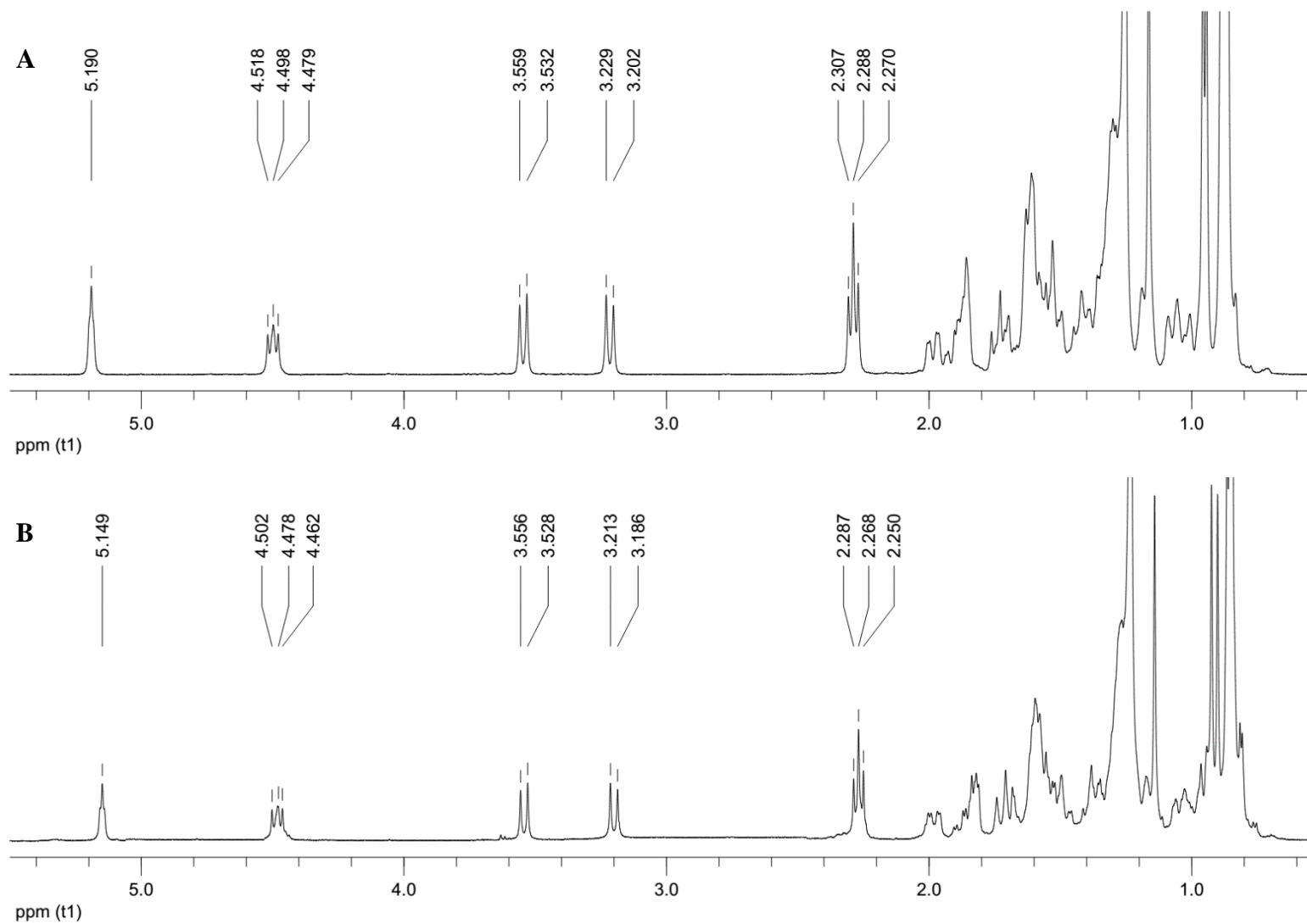
O espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (Figuras 66 e 67, páginas 112 e 113) dessa substância apresentou 45 sinais de carbono. A presença de um sinal do carbono metilínico em  $\delta$  122,31 ppm e de um carbono não hidrogenado em  $\delta$  144,23 ppm confirmando a presença de um triterpenos com esqueleto olean-12-eno.

Foi observado um sinal em  $\delta$  69,71 ppm referente a um carbono carbinólico, que acrescido das informações do experimento HSQC está correlacionado com os sinais de hidrogênio em  $\delta$  3,54 ppm e  $\delta$  3,21 ppm. Essas informações, comparados com dados da literatura (WANG *et al.*, 2006), permitem sugerir que o núcleo do triterpeno seja o eritrodiol (Figura 44 – C, página 88).

A substância 6 apresenta um sinal a  $\delta$  173,67 ppm no espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  característico de carbonila de éster. Essa informação aliados aos sinais característicos de grupos alquilas de cadeia longa confirmam a presença de um éster de cadeia longa no núcleo eritrodiol, na posição C-3.

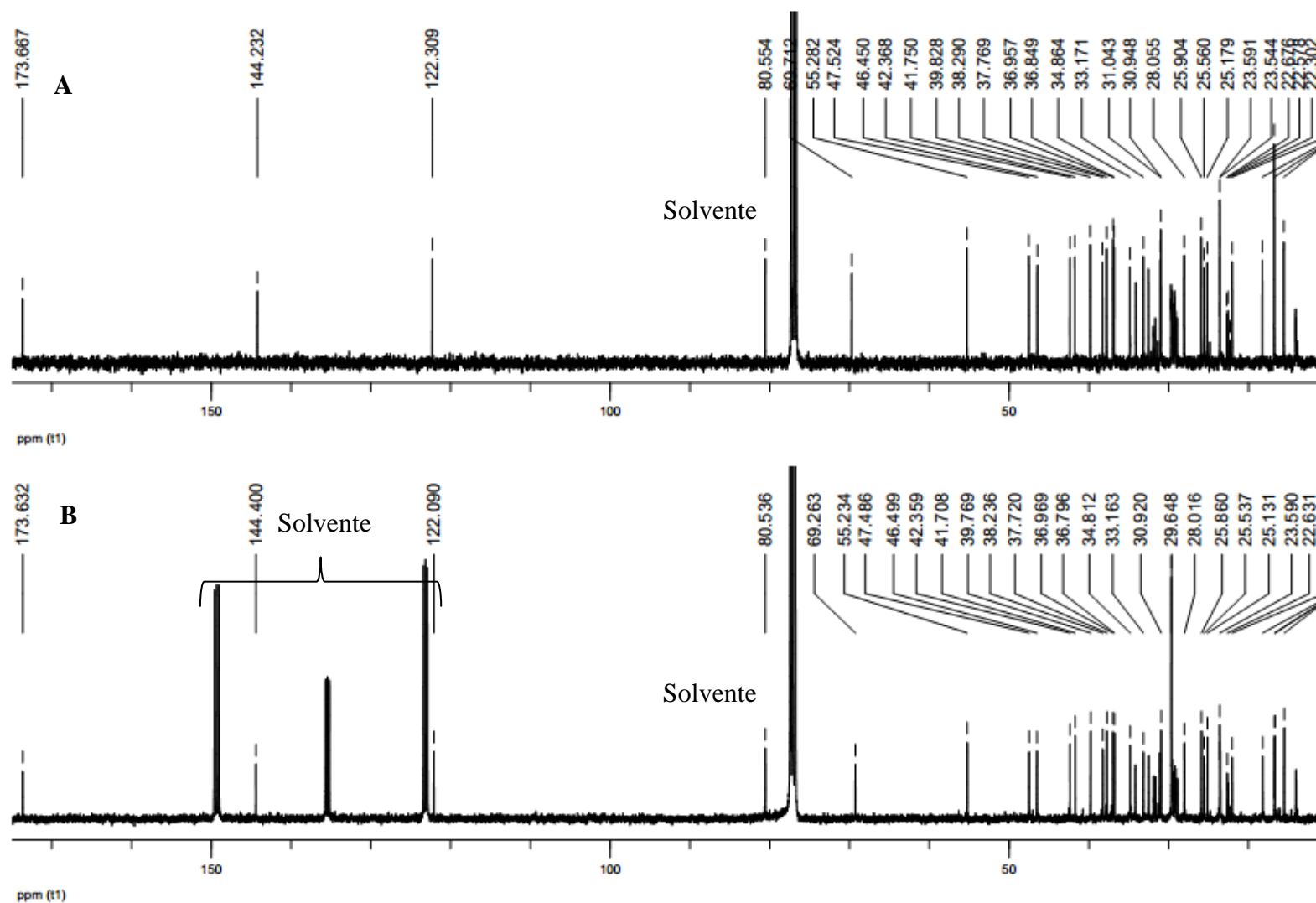
Com base nesses dados sugerimos que a substância 8 seja um éster de ácido graxo de cadeia longa do eritrodiol (Figura 44 – D, página 88).

A ausência do sinal em  $\delta$  5,29 ppm no espectro de RMN de  $^1\text{H}$  sugere que a cadeia longa não seja formada por ácidos graxos insaturados. A identificação da cadeia do ácido graxo deve ser feita, semelhante ao procedimento realizado para a substância 6, no entanto, isso não foi realizado devido à pouca quantidade isolada da substância 8. Não tivemos sucesso para obter quantidades adicionais dessa substância.

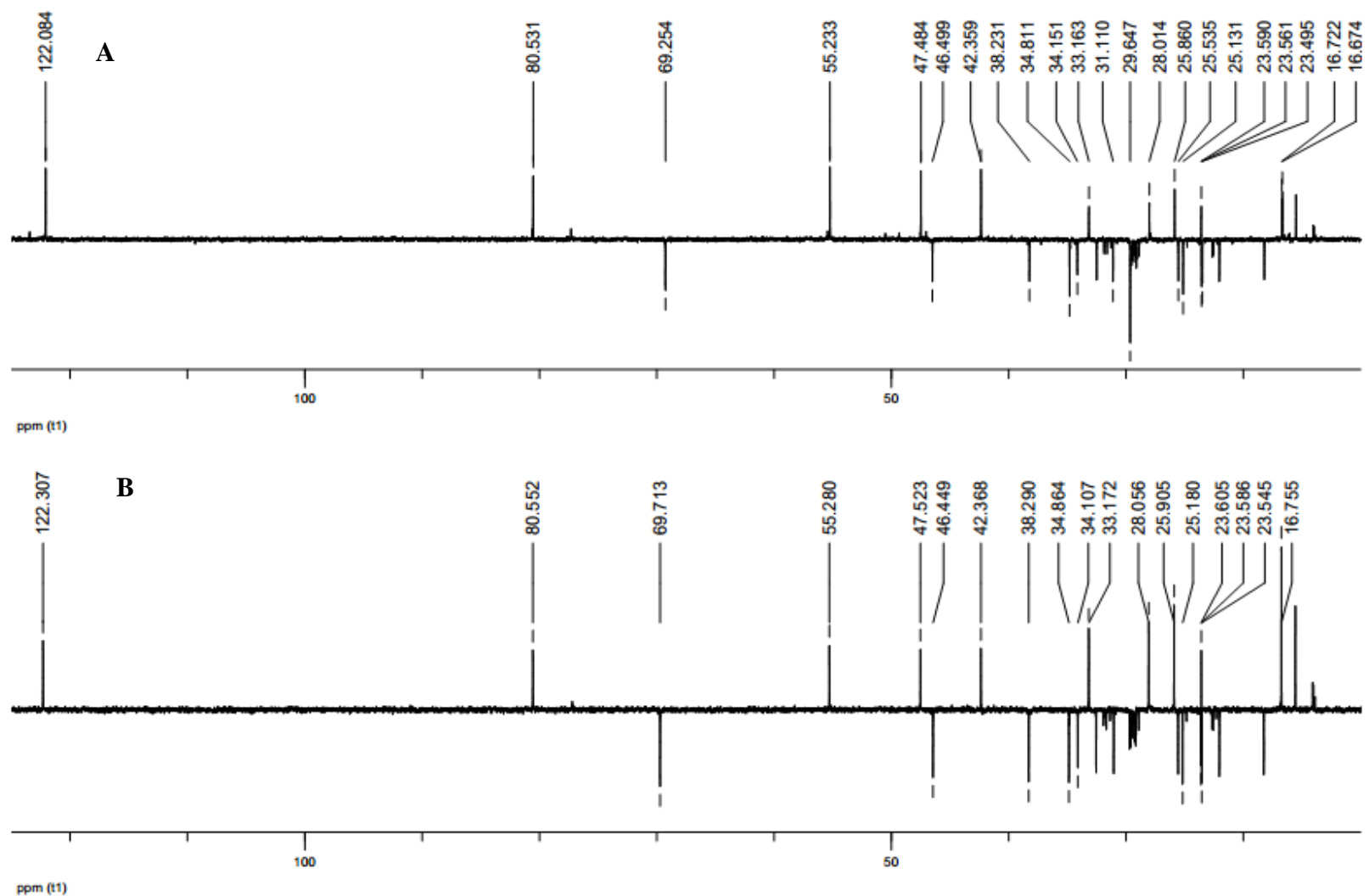


**Figura 65** – Espectros de RMN de  $^1\text{H}$  (400 MHz): **A** - mistura de linoato, araquidato e linolenato de eritrodol (substância 6) ( $\text{CDCl}_3$ ). **B** - Eritrodol esterificado com ácido graxo de cadeia longa (Substância 8) ( $\text{CDCl}_3$  + piridina  $\text{d}_5$ )





**Figura 66** – Espectros de RMN de  $^{13}\text{C}$  (100 MHz): **A** - mistura de linoato, araquidato e linolenato de eritrodio (substância 6) ( $\text{CDCl}_3$ ). **B** - Eritrodio esterificado com ácido graxo de cadeia longa (Substância 8) ( $\text{CDCl}_3 + \text{piridina } d_5$ )



**Figura 67** – Espectros de RMN de DEPT – 135 (100 MHz): **A** - mistura de linoato, araquidato e linolenato de eritrodil (substância 6) ( $\text{CDCl}_3$ ). **B** - Eritrodil esterificado com ácido graxo de cadeia longa (Substância 8) ( $\text{CDCl}_3 + \text{piridina } d_5$ )

#### 5.4. Atividade antimicrobiana das substâncias isoladas frente a *P. mirabilis*

O extrato acetônico apresentou maior potencial frente à bactéria *P. mirabilis*, responsável principalmente por infecção no trato urinário. Sabemos que a composição química dos extratos, no geral é bastante complexa e, portanto, nem sempre uma resposta positiva de inibição de extrato frente a um determinado micro-organismo significa que os compostos isolados apresentarão a mesma ação. Vale lembrar que outros fatores como antagonismo ou sinergismo podem atuar no extrato interferindo nos resultados. Um exemplo foi o estudo realizado com extrato de própolis. Vignoto *et al* (2014) avaliou 278 combinações de própolis com vários antimicrobianos comerciais, usando método de difusão em ágar, em 121 combinações foram observados aumento da zona de inibição de crescimento (sinergismo) em 60 destas diminuição da zona de inibição (antagonismo).

Os fármacos que apresentaram maior sinergismo com a própolis foram nitrofurantoína, ceftriaxona, tetraciclina, meropenem, cefaclor, ceftioxina, cloranfenicol, amicacina, sulfazotrim, rifampicina, neomicina, eritromicina, e ampicilina. As que apresentaram antagonismo foram tobramicina; neomicina, gentamicina e ampicilina; polimixina, meropenem, levofloxacino, imipenem, ertapenem, enrofloxacino, doxiciclina, ciprofloxacino, azitromicina, amoxicilina e amicacina.

Portanto, substância (s) presentes nos extratos podem separadamente não exibir atividade frente a um determinado micro-organismo. Ou separadamente, exibir uma atividade maior, quando comparada com o extrato bruto.

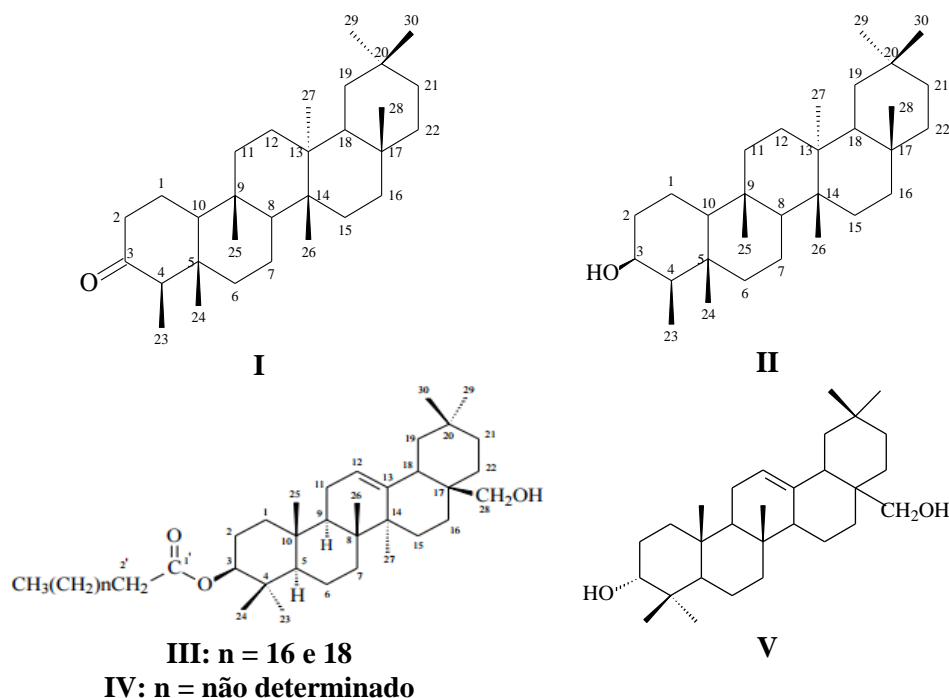
Extratos etanólicos e aquosos de varias plantas foram testados frente a *P. mirabilis*. Exemplos dessa atividade, pelo método de difusão de ágar, são o extrato etanólico das folhas *Aloe barbadensis* que apresentou MIC de 0,50 mg mL<sup>-1</sup> (PANDEY; MISHRA, 2010); o extrato aquoso de *Exoecaria agallocha* (Índia) apresentou halo de inibição de 16,7 mm (SAHOO *et al*, 2012). Pelo método de microdiluição, o extrato aquoso e etanólicos de pétalas de *Rosa rugosa* (Polônia) apresentaram MIC 1,25 mg mL<sup>-1</sup>.

Diferentes partes de uma espécie vegetal apresentam diferentes componentes, podendo levar a diferentes respostas frente aos micro-organismo. Noundou *et al*, (2010) pesquisou a ação de extratos de várias polaridades das folhas, raízes e caules de *Alchornea floribunda* (da África) usando o método de microdiluição, e observou que o extrato etanólico e em acetato de etila das raízes, acetato de etila dos galhos e acetato de etila e clorofórmio das folhas apresentaram as menores CMI 125 µg mL<sup>-1</sup>, portanto maior eficiência.

Trinta e quatro extratos obtidos de 13 espécies vegetais da África do Sul foram testados frente a *P. mirabilis*, sendo os mais ativos os extratos metanólicos e aquosos de *Carpobrotus edulis*, *Lippia javanica*, *Pelargonium viridiflorum*, *Ptaeroxylon obliquum*, *Syzygium cordatum*, *Terminalia pruinoides*, *T. sericea* e *Warburgia salutaris* juntamente com o extrato aquoso de *W. salutaris* que apresentaram MIC menor ou igual a  $2.000 \mu\text{g mL}^{-1}$ , usando o método de difusão em ágar (COCK; VAN VUUREN, 2014).

Segundo uma revisão de Novaes *et al.* (2013) várias espécies do Cerrado Brasileiro apresentam ação anti-bacteriana: *Hancornia speciosa*, *Arrabidaea harley*, *Austroplenckia populnea*, *Bowdichia virgilioides*, *Croton urucurana*, *Hyptis cretana*, *Virola surinamensis*, *Virola surinamensis*, dessas somente *C. urucurana* exibem ação frente a *P. mirabilis*, MIC  $1.000 \mu\text{g mL}^{-1}$  (SILVA JUNIOR *et al.*, 2009).

Neste estudo fitoquímico do extrato acetônico de galhos de *P. macahensis* foi isolado e caracterizado os compostos: mistura friedelina (I) e 3β-hidroxifriedelano (II); 3β-hidroxifriedelano (II); eritrodiol transesterificado com ácido graxo de cadeia longa (III e IV) e eritrodiol puro após reação de transesterificação (V), (Figura 69).



**Figura 68** – Estrutura I: friedelina; II: 3β-hidroxifriedelano; III e IV: eritrodiol com ácido graxo de cadeia longa; V: eritrodiol

Entre os triterpenos isolados, dois pertencem a classe dos friedelano (I) e (II) e os demais possuem em comum o eritrodiol que pertence a classe dos oleananos (III; IV e V). No

grupo dos friedelanos, nessas substâncias, existe diferença na posição C-3, a substância (I) contém o grupo carbonila e o outro a hidroxila (II) no carbono C-3. Dentre outras diferenças, os olenanos diferem dos friedelanos devido à presença de uma ligação dupla entre os carbonos C-12 e C-13, e nos compostos isolados existe a presença de grupo hidroxila no carbono metilênico C-28, substâncias (III e IV). Além dessas diferenças, na posição C-3 na substância (III e IV) existe um éster derivado de ácidos graxos de cadeia longa, logo essa substância apresenta um maior caráter lipofílico entre as substâncias isoladas. No eritrodíol, originado do éster (V), em C-3, existe a presença do grupo hidroxila, semelhante à substância (II).

Essas diferenças estruturais acrescidas das diferentes conformações dos núcleos friedelanos e olenanos, Figura 69, podem interagir de forma diferenciada sobre a *P. mirabilis* podendo levar a sua inibição ou destruição.

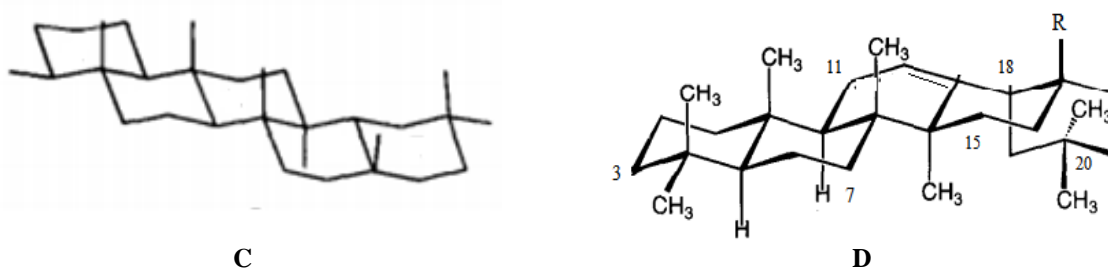


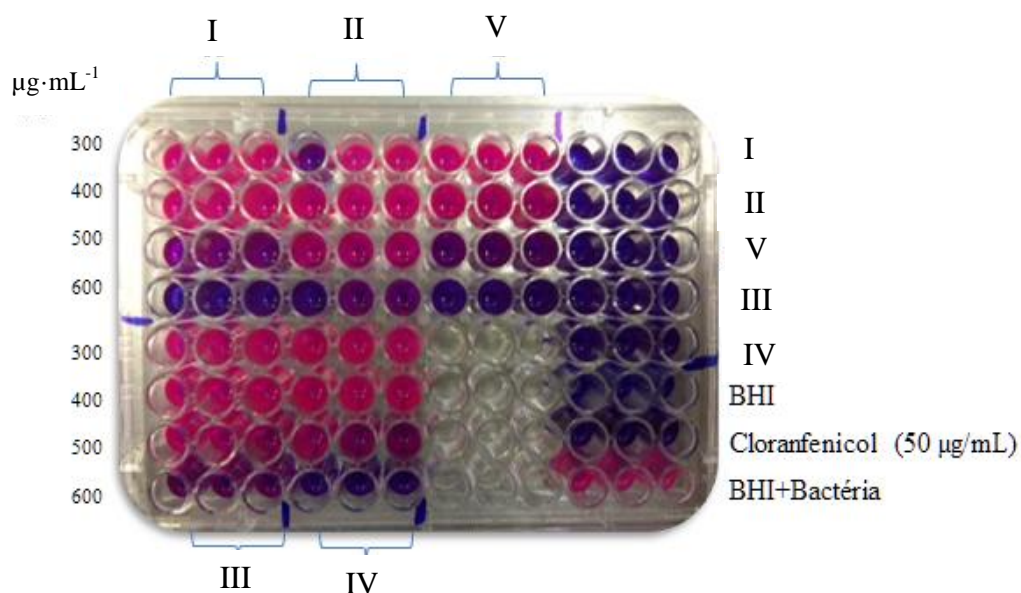
Figura 69 – Estrutura C: núcleo friedelano; Estrutura D: núcleo olenano

Dessa forma, a fim de avaliar a influência dessas diferenças conformacionais e estruturais, os compostos isolados puros (II), (III) e (IV) foram testados usando a técnica de microdiluição frente a *P. mirabilis*. Embora a friedelina tenha sido isolado como mistura, diante da disponibilidade dessa substância em nosso laboratório, realizamos o teste com ela pura a fim de avaliar se a presença da carbonila na posição C-3 no núcleo friedelano influenciaria na resposta na atividade microbiana.

Inicialmente testamos as substâncias nas concentrações de 600, 300, 150 e 75  $\mu\text{g mL}^{-1}$  e como controle positivo foi usado o cloranfenicol. Nessa técnica, após 24 horas, foi observado o surgimento da cor violeta, ou seja, inibição da bactéria, para todas as substâncias na concentração de 600  $\mu\text{g mL}^{-1}$ .

As várias concentrações das substâncias foram plaqueadas em placa de petri, a fim de verificar se ação das substâncias eram bactericida ou bacteriostática. Após 48 horas foi observado o crescimento da bactéria, permitindo classificá-las com ação bacteriostática, ou seja, não inibe totalmente a bactéria.

Então o experimento foi repetido, em concentrações mais próximas a  $600 \mu\text{g mL}^{-1}$ , afim de associar as diferenças estruturais e conformacionais a capacidade de inibição da bactéria, conforme resultado apresentado na Figura 71.

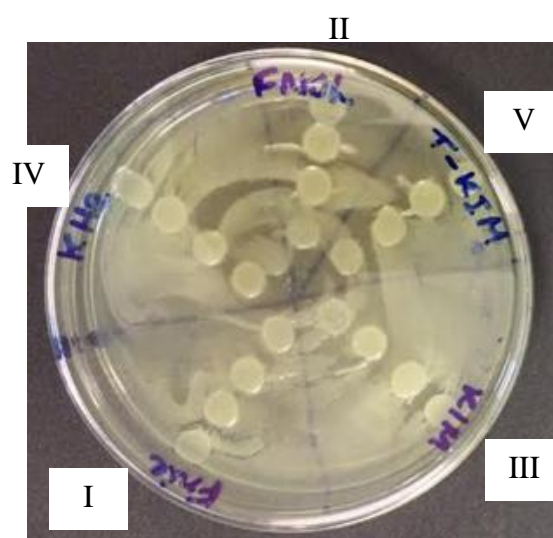


**I** – Fridelina; **II** – 3 $\beta$ -hidroxifriedelano; **III** – Oleato, araquidato e linoleato de eritrodiol; **IV** – Eritrodiol (ésteres não identificados); **V** – Eritrodiol

Coloração rosa indica a presença da bactéria, a coloração violeta indica que no meio não há a presença da bactéria ou seu crescimento foi inibido

**Figura 70** – Atividade biológica das substâncias isoladas frente à bactéria *P. mirabilis*

Realizado o plaqueamento, após 48 horas, Figura 72, foi novamente observado o comportamento bacteriostático das substâncias em todas as concentrações.



**I** – Fridelina; **II** – 3 $\beta$ -hidroxifriedelano; **III** – Oleato, araquidato e linoleato de eritrodiol; **IV** – Eritrodiol (ésteres não identificados); **V** – Eritrodiol

**Figura 71** – Plaqueamento com as substâncias isoladas

Na Tabela 13 expressamos esses resultados qualitativamente.

**Tabela 13** – Resultados da concentração mínima inibitória dos testes das substâncias isoladas de *P. macahensis* frente a bactéria *P. mirabilis*

Concentração $\mu\text{g mL}^{-1}$	Substâncias				
	Friedelina	3 $\beta$ - hidroxifriedelano	Oleato, araquidato e linoleato de eritrodiolila	Eritrodiol (ésteres não identificados)	Eritrodiol
300	-	-	-	-	-
400	-	-	-	-	-
500	+	-	+/-	-	+
600	+	+/-	+	+/-	+

Controle positivo: Cloranfenicol. Teste realizado em triplicata. +: positivo -: negativo +/-: inibe porém não totalmente. **I** – Friedelina; **II** – 3 $\beta$ -hidroxifriedelano; **III** – Oleato, araquidato e linoleato de eritrodiolila; **IV** – Eritrodiol (ésteres não identificados); **V** – Eritrodiol

Com base em nossos experimentos, o eritrodiol e friedelina foram os triterpenos com maior capacidade de bacteriostática frente a *P. mirabilis*. A presença do grupo éster na posição C-3 não aumenta a atividade do núcleo oleanano, ou seja, o aumento do caráter lipofílico não inibe a bactéria. No núcleo do friedelano a presença do grupo carbonila em C-3 aumentou a atividade. Tanto o núcleo friedelano como oleanano são capazes de inibir o crescimento da bactéria. Esses dados sugerem que a ação pode estar associada aos núcleos triterpênicos dos pentacíclicos, associados as suas conformações e polaridade e, não somente a presença de grupos na posição C-3.

Portanto CMI para *P. mirabilis* foi maior ou igual a 500  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , para friedelina e eritrodiol, sendo esse de ação mais forte; e maior que 600  $\mu\text{g mL}^{-1}$  para 3 $\beta$ -hidroxifriedelano e friedelina.

Poucos trabalhos relatam a atividade frente a *P. mirabilis* de substâncias isoladas de extratos. Extrato etanólico de *Lithrea molleoides* (da Argentina) exibe atividade frente a esse micro-organismo, CMI de 2000 a 8000  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . Em 2011, Carpinella *et al*, 2011, isolaram dessa espécie a substância (Z,Z)-5-(trideca-4',7'-dienyl)-resorcinol que apresentou CMI de 4000  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . Sugerindo assim que essa substância contribua para a resposta desse extrato (CARPINELLA *et al*, 2011).

Viswanathan *et al* (2012) relataram a atividade para essa bactéria tanto dos extratos metanólicos e clorofórmico das folhas de *Jatropha tanjorensis* (da Índia) bem como da friedelina, substância isolada do extrato, usando o método de difusão em ágar. Os extratos foram testados na concentração de 50, 25 e 12.5  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , com halos de inibição de 24, 22 e

19 mm para o extrato metanólico e 23, 22 e 10 mm para o clorofórmio. Já a friedelina foi testada nas concentrações de 10, 5 e 2.5  $\mu\text{g mL}^{-1}$  apresentou halo de inibição.

A friedelina em nossos testes também inibiu *P. mirabilis*, em uma maior concentração, lembrando que o nosso método utilizado foi diferente.

Para os demais compostos (II, III, IV e V), segundo a pesquisa bibliográfica, não há relatos de testes com essas substâncias puras frente a *P. mirabilis*.

Os resultados indicaram que os triterpenos isolados são substâncias bioativas frente a essa bactéria.



## 6. CONCLUSÕES

O objetivo central deste projeto de pesquisa foi o de estudar quimicamente e avaliar a atividade biológica das substâncias isoladas dos galhos de *Pouteria macahensis* (Sapotaceae), coletados em Itacaré, Bahia, Brasil.

O fracionamento do extrato acetônico resultou no isolamento e identificação de quatro triterpenos pentacíclicos (mistura friedelina e 3 $\beta$ -hidroxifriedelano, 3 $\beta$ -hidroxifriedelano e as misturas de linoato, araquidato e linolenato de eritrodiolila e eritrodiol esterificado com ácido graxo de cadeia longa (não elucidado), identificados com auxílio das análises de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ ; além de um ácido graxo de cadeia longa (não identificado).

Os triterpenos isolados linoato, araquidato e linolenato de eritrodiolila e eritrodiol esterificado com ácido graxo de cadeia longa, não elucidado, são inéditos para o gênero. A elucidação de suas estruturas foi possível através de RMN de  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ , HSQC, HMBC.

O isolamento de substâncias desconhecidas no gênero retoma a importância de pesquisar metabólitos secundários de pouterias, uma vez que proporciona o conhecimento de novos compostos com atividade biológica.

No gênero *Pouteria* é notório grande presença de triterpenos, sendo o isolamento de triterpenos do tipo friedelânicos e oleanânicos coerente com o perfil fitoquímico da espécie *P. macahensis*.

Os extratos obtidos foram testados através da biocromatografia e os extratos acetônico e hexânico apresentaram alguma resistência inibitória frente às bactérias *P. mirabilis* e *A. baumannii*.

O extrato acetônico (PM-A) apresentou atividade contra as bactérias Gram-negativa *A. baumannii*. e *P. mirabilis* (halo de inibição (média): 2 e 7 mm, respectivamente). O extrato hexânico (PM-H) apresentou atividade somente contra a bactéria Gram-negativa *P. mirabilis* (halo de inibição (média): 6 mm).

Todos os triterpenos isolados no extrato acetônico, incluindo o eritrodiol sem a presença de grupos ésteres foram submetidos ao teste biológico. Foi utilizada a técnica de microdiluição. Os testes foram realizados em triplicatas. Das concentrações testadas todas as substâncias apresentam atividade acima de 600  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ , após essa informação, as mesmas foram plaqueadas e verificou-se que ambas possuem caráter bacteriostático, ou seja, inibe o crescimento da bactéria.

Assim sendo, essas substâncias podem ser promissoras agente de combate a infecção do trato urinário, doença casada pela bactéria *P. mirabilis*. Para verificar se essas substâncias possuem caráter bactericida seria necessário testar em concentrações maiores.

Alguns testes biológicos não foram possíveis realizar com os triterpenos isolados, devido a pouca massa de material obtida.

Faz-se necessário continuar a pesquisa com galhos e raiz, e iniciar outras partes da espécie em estudo, trabalhando também com extratos bruto não explorado, a fim de obter metabólitos secundários com potencial atividade biológica ou até mesmo o isolamento em quantidade adicional dos que já foram isolados.

Nessa perspectiva, é importante que sejam realizadas pesquisas com espécies desconhecidas do ponto de vista fitoquímico, uma vez que é necessário o surgimento de novos fármacos que sejam capazes de combater bactérias causadoras de inúmeras doenças. Porém, o crescente desmatamento e má utilização dos recursos naturais tem ocasionado na extinção de muitas espécies, muitas delas endêmicas, gerando um grave problema, pois uma única espécie é capaz de contar dezenas de metabólitos secundários bioativos.

## REFERÊNCIAS

ALVES, H. M. A diversidade química das plantas como fonte de fitofármacos. Cadernos Temáticos de Quim. Nova na Escola. V 3, p.1-15, 2001.

ARAÚJO, A. A. Taxonomia e Filogenia de *Pouteria* Aubl. (Sapotaceae) na Mata Atlântica setentrional. 2012. Tese (Doutorado em Biologia Vegetal) – Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2012.

ARAÚJO, M.; ROCHA, R; ALGER, K.; MESQUITA, C. A. B.; A Mata Atlântica do Sul da Bahia. São Paulo, 1998.

Bioma da Mata Atlântica: banco de dados. Disponível em:<  
<http://www.ibflorestas.org.br/bioma-mata-atlantica.html>>. Acesso em: 14 mar. 2016.

CARPINELLA, M.C.; BELLIS, L.; JORAY, M. B.; SOSA, V.; ZUNINO, P.M.; PALACIOS S.M. Inhibition of development, swarming differentiation and virulence factors in *Proteus mirabilis* by an extract of *Lithrea molleoides* and its active principle (Z,Z)-5-(trideca-4',7'-dienyl)-resorcinol.. *Phytomedicine* 18, 994–997, 2011.

CHING, Y.W.; BALUNAS, M. J.; CHAI, H. B.; KINGHORN, A. D. Drug discovery from natural sources. *AAPS J*, v. 8, n° 2, p. 239-253, 2006.

COCK. E.; VAN VUUREN, S. F. Anti-*Proteus* activity of some South African medicinal plants: their potential for the prevention of rheumatoid arthritisI. *Inflammopharmacol*, 2014.

COSTA, D. L. M. G., RINALDO, D., VARANDA, E. A, DE SOUSA, J. F., NASSER, A. L. M., SILVA, A. C. Z., DOS SANTOS, L. C. Flavonoid detection in hydroethanolic extract of *Pouteria torta* (Sapotaceae) leaves by HPLC-DAD and the determination of its mutagenic activity. *Journal of Medicinal Food*, 17(10), 1103–12. 2014.

DINI, I. Flavonoid glycosides from *Pouteria obovata* (R. Br.) fruit flour. *Food Chemistry*, 124(3), 884–888. 2011.

DOMINGO, V.; ARTEAGA, J. F.; MORAL, J. F. Q.; BARRERO, A. F. Unusually cyclized triterpenes: occurrence, biosynthesis and chemical synthesis. *Natural Product Reports*, 26, 115-134, 2009.

DUTOK, C. M. S., BERENQUER-RIVAS, C. A., RODRÍGUEZ-LEBLANCH, E., PÉREZ-JACKSON, L., CHIL-NUÑEZ, I., ESCALONA-ARRANZ, J. C.; QUEIROZ, M. M. C. Acute toxicity and dermal and eye irritation of the aqueous and hydroalcoholic extracts of the seeds of “zapote” *Pouteria mammosa* (L.) Cronquist. *Scientific World Journal*, 2015.

FEKETE, G. G.; KURTN, M. E.; PAPP, T.; ILLYS T.; DRAHOS, T. Z.; LDELI, J. Cryptocapsinepoxyde-type carotenoids from red mamey, *Pouteria sapota*. *Journal of Natural Products*, 76(4), 607–614. 2013.

HAIDA, K.S.; PARZIANELLO, L.; WERNER, S.; GARCIA, D. R.; INÁCIO, CV. Avaliação in vitro da atividade antimicrobiana de oito espécies de plantas medicinais. *Arq Cienc Saude Unipar* 11: 185-192. 2007.

HENDRICH, A. B. Flavonoid-membrane interactions: possible consequences for biological effects of some polyphenolic compounds. *Acta. Pharmacol. Sin.*, v. 27, n. 1, p. 27-40, 2006.

HERNANDEZ, C. L. C., VILLASEÑOR, I. M., JOSEPH, E., TOLLIDAY, N., AVE, L., & MA, B. Isolation and Evaluation of Antimitotic Activity of Phenolic Compounds from *Pouteria campechiana* Baehni ., 137(June), 1–10. 2008.

IAL. INSTITUTO ADOLFO LUTZ. Métodos físico-químicos para análises de alimentos. 4. ed., São Paulo, 1020 p, 2008.

JATROPHA T. M. B. G. V.; JESU D. J. A., PERUMAL SATHISH KUMAR. Antimicrobial activity of bioactive compounds and leaf extracts in. *Fitoterapia* 83, 1153–1159. 2012.

KAUFMAN. P. B.; CSEKE L. J.; WARBER, S.; DUKE, J. A.; BRIELMANN, H. L. *Natural Products From Plants*. CRC Press: New York. 1999.

LOBO, A. M.; LOURENÇO, A. M. *Biossíntese de produtos naturais*. 1 edição, IST Press, Lisboa, 272 p, 2007.

MA, J., YANG, H., BASILE, M. J., & KENNELLY, E. J. Analysis of polyphenolic antioxidants from the fruits of three *Pouteria* species by selected ion monitoring liquid chromatography-mass spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(19), 5873–5878. 2004.

MARTINS, A. F.; BARTH, A. L. *Acinetobacter* multirresistente – um desafio para a saúde pública. *Scientia Medica* (Porto Alegre); volume 23, número 1, p. 56-62. 2013.

Mata Atlântica disponível em:

[http://www.ib.usp.br/ecosteios/textos\\_educ/mata/terra/terra.htm](http://www.ib.usp.br/ecosteios/textos_educ/mata/terra/terra.htm). Acesso em: 10 de ago 2016.

MATOS, F.J. Em *Introdução a Fitoquímica Experimental*; Matos, F.J. 3ª ed. UFC Editora: Fortaleza, 141p, 2009.

MERCK, E. Reactivos de coloración para cromatografía em capa fina y em papel. 1982.

METCALFE, C. R.; L. CHALK.. *Anatomy of the dicotyledons*. Vol. II. 2ª Ed. Oxford, Clarendon Press. 1972.

MICHALAK, A. Phenolic compounds and their antioxidant activity in plants growing under heavy metal stress. *Polish J. of Environ. Stud.* v. 15, n. 4, p. 523-530, 2006.

MONTENEGRO, L. H. M. Estudo químico e ensaios biológicos preliminares de *Pouteria venosa* (Mart.) Baehni e revisão dos terpenóides e das atividades biológicas de espécies de Sapotaceae. Maceió, 141p. Dissertação de Mestrado – Universidade Federal de Alagoas. 2005.

MOREIRA, L. B. Princípios para uso racional de antimicrobianos. *Rev AMRIGS* 48: 118-120. 2004.

MOTEIRO, M. H. D. A; NEVES, L. J.; ANDREATA, R. H. P. Taxonomia e Anatomia das Espécies de *Pouteria Aubl.* (Sapotaceae) do Estado do Rio de Janeiro, Brasil. *Pesquisas Botânicas* 58:7-118. 2007.

MOTTA, M. C.; SPINELLI, M. O.; GODOY, C. M. S. C.; CRUZ, R. J.; BORTOLATTO, J. Detecção de *Proteus mirabilis* nas fezes de camundongos SPF. *RESBCAL*, São Paulo, v.1 n.3, p. 246-250, jul./ago./set. 2012.

MURILLO, E., MCLEAN, R., BRITTON, G., AGÓCS, A., NAGY, V., & DELI, J. Sapotexanthin, an A-provitamin carotenoid from red mamey (*Pouteria sapota*). *Journal of Natural Products*, 74(2), 283–285. 2011.

MURILLO, E., MOSQUERA, Y., KURTÁN, T., GULYÁS-FEKETE, G., NAGY, V., & DELI, J. Isolation and characterization of novel capsorubin-like carotenoids from the red mamey (*Pouteria sapota*). *Helvetica Chimica Acta*, 95(6), 983–988. 2012.

NUNES, F. I. A. Caracterização estrutural de novos triterpenóides pentacíclicos. Dissertação (Mestrado em Química Farmacêutica Industrial) – Universidade de Coimbra, Coimbra, 2013.

NÚÑEZ RIVAS, M. J. Metabólitos secundarios bioactivos aislados de *Maytenus chiapensis* y *Crossopetalum uragoga* (Celastraceae). Tesis Doctoral. Departamento de Química Orgánica. Universidad de La Laguna. La laguna, Tenerife. 2004

OLIVEIRA AC, SILVA RS. Desafios de cuidar em saúde frente à resistência bacteriana: uma revisão. *Rev Elet Enferm 10*: 189-197. 2008.

Organização mundial da saúde disponível em: <https://www.dgs.pt/em-destaque/oms-publica-relatorio-global-sobre-as-resistencias-aos-antimicrobianos.aspx>. Acesso em 8 de jun 2016.

PANDEY, R.; MISHRA, A. Antibacterial Activities of Crude Extract of *Aloe barbadensis* to Clinically Isolated Bacterial Pathogens. *Appl Biochem Biotechnol*. 160:1356–1361. 2010.

PAULA NOVAES, JOSÉ M. G. MOLINILLO, ROSA M. VARELA, FRANCISCO A. MACI Ecological phytochemistry of Cerrado (Brazilian savanna) plants.. *Phytochem Rev* 12:839–855. 2013.

PAVIA, Donald et al. *Introduction to Spectroscopy*. 4 ed. Brooks Cole, 2008.

PEIXOTO, T. J.S.; SILVAI, C. H. T. P.; NASCIMENTO, J. E.; MONTEIRO, J. M.; ALBUQUERQUE, U. P.; AMORIM, E. L. C. Validação de metodologia espectrofotométrica para quantificação dos flavanóides de *Bauhinia cheilantha* (Bongard) Steudel. *RBCF, VOL 44*, p. 4, 2008.

PELLICCARI, R; ARDON, A.; BELLAVISTA, V. TRITERPENES FROM *POUTERZA CAIMITO*. *Planta Médica* (Vol. 22). 1962.

PENNINGTON, T. D. *Flora Neotropica Monograph 52. Sapotaceae*. The New York Botanical Gardens, New York. 1990.

PENNINGTON, T. D. 1991. *The genera of Sapotaceae*. The Royal Botanical Garden, Kew.

PENNINGTON, T. D. Sapotaceae (Sapodilla family). Pp. 342-344. *In: Flowering plants of the Neotropics*. N. Smith, S. A. Mori, A. Henderson, D. Wm. Stevenson and S. V. Heald (Eds.). New Jersey, The New York Botanical Garden. 2004.

PICMAN, A. K. et al. Visualization reagents for sesquiterpene lactones and polyacetylenes on thin-layer chromatograms. *Journal of chromatography*, v. 189, p. 187-198, 1980.

*Proteus mirabilis* disponível em: <http://www.ufrgs.br/laprottox/o-que-fazemos/linhas-de-pesquisa/ureases-como-fator-de-virulencia/proteus-mirabilis>. Acesso em 25 de mai 2016.

RENATA NOWAK, MARTA OLECH, ŁUKASZ PECIO, WIESŁAW OLESZEK, RENATA LOS, ANNA MALMC AND JOLANTA RZYMOWSKA Cytotoxic, antioxidant, antimicrobial properties and chemical composition of rose petals.. *J Sci Food Agric*; 94: 560–567. 2014.

Resistência antibacteriana disponível em [http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/75389/3/OMS\\_IER\\_PSP\\_2012.2\\_por.pdf](http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/75389/3/OMS_IER_PSP_2012.2_por.pdf). Acesso em 3 de mar 2016.

RIBEIRO, J. E. L. S., M. J. G. HOPKINS, A. VICENTINI, C. A. SOTHERS, M. A. S. COSTA, J. M. BRITO, M. A. D. SOUZA, L. H. P. MARTINS, L. G. LOHMANN, P. A. C. L. ASSUNÇÃO, E. C. PEREIRA, C. F. SILVA, M. R. MESQUITA AND L. C. Procópio. *Flora da Reserva Ducke: Guia de Identificação das plantas vasculares de uma floresta de terra-firme na Amazônia Central*. 1999.

RIBERIO, S. S.; et al., Evaluation of the Cytotoxic Activity of Some Brazilian Medicinal Plants. *Planta Med*; 78: 1601–1606. 2012.

ROBERTS, S. C. Production and engineering of terpenoids in plant cell culture. *Nature Chemical Biology*, 3, 387-395, 2007.

SAHOO, G.; MULLA, N. S S.; ANSARI, Z.; MOHANDASS, C. Antibacterial activity of mangrove leaf extracts against human pathogens. *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences*. 74.4 (JulyAugust): p348. 2012

SÃO PAULO (Estado). Secretaria do Estado do Meio Ambiente. Parque Estadual Carlos Botelho: plano de manejo. São Paulo: Secretaria do Estado do Meio Ambiente, 2008.

SCUDELLER, Veridiana Vizoni. Análise fitogeográfica da mata atlântica. 2002. 94 f. Tese (Doutorado em Biologia Vegetal) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2002.

SILVA JUNIOR IF, CECHINEL FILHO VC, ZACCHINO SA, LIMA JCS, MARTINS DTO. Antimicrobial screening of some medicinal plants from Mato Grosso Cerrado. *Rev Bras Farmacogn* 19:242–248. 2009.

SILVA, C. A. M., SIMEONI, L. A., SILVEIRA, D. Genus Pouteria : Chemistry and biological activity Revisão. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 19(2A), 501–509. 2009.

SILVA, C. A. M.; SIMEONI, L. A.; SILVEIRA, D. Genus Pouteria: Chemistry and biological activity. Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade de Brasília, Campus Universitário Darcy Ribeiro, Asa Norte, n70910-900 Brasília-DF, Brazil *Revista Brasileira*

SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. *Farmacognosia, da planta ao medicamento*. 5ª ed. UFRGS Editora: Florianópolis, 2010.

SIWE NOUNDOU , R.W.M. KRAUSE , S.F. VAN VUUREN , D. TANTOH NDINTEH , D.K. OLIVIE. Antibacterial activity of the roots, stems and leaves of *Alchornea floribunda* . X. *Journal of Ethnopharmacology* 151 (2014) 1023–1027.

SOUZA, P. M.; SALES, P. M.; SIMEONI, L. A.; SILVA, E. C.; SILVEIRA, D.; MAGALHÃES, O. Inhibitory activity of  $\alpha$ -amylase and  $\alpha$ -glucosidase by plant extracts from the Brazilian cerrado. *Planta. Med.*, v. 78, n. 4, p. 393-399, 2012.

SOUZA, V. C.; LORENZI, H. *Botânica sistemática: guia ilustrado para identificação das famílias de Angiospermas da flora brasileira*. 2ª ed. Nova Odessa, SP: Instituto Plantarum, 2005.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. *Fisiologia vegetal*. 3. ed. Porto Alegre: Artmed, 2004. 719p.

TORRES-RODRÍGUEZ, A., SALINAS-MORENO, Y., VALLE-GUADARRAMA, S., & ALIA-TEJACAL, I. (2011). Soluble phenols and antioxidant activity in mamey sapote (*Pouteria sapota*) fruits in postharvest. *Food Research International*, 44(7), 1956–1961.

TURCSI, E., MURILLO, E., KURTN, T., SZAPPANOS, DM, Illys, T. Z., Gulys-Fekete, G., Deli, J. Isolation of Cryptoxanthin-epoxides, Precursors of Cryptocapsin and 3-Deoxycapsanthin, from Red Mamey (*Pouteria sapota*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 63(26), 6059–6065. 2015.

VIGNOTO, VANESSA KELLY CAPOIA; NAKADOMARI, GIOVANA HASHIMOTO; BORDIN, JÉSSICA TAINÁ; WOSIACKI, SHEILA REZLER. - Avaliação do sinergismo e antagonismo do extrato de própolis com antibacterianos em isolados bacterianos de urina de animais. *Rev. Ciên. Vet. Saúde Públ.*, 2012.



WANG J, SOISSON SM, YOUNG K, SHOOP W, KODALI S, GALGOCI A, PAINTER R, PARTHASARATHY G, TANG YS, CUMMINGS R, HÁ S, DORSO K, MOTYL M, JAYASURIYA H, ONDEYKA J, HERATH K, ZHANG C, HERNANDEZ L, ALLOCCO J, BASILIO A, TORMO JR, GENILLOUD O, VICENTE F, PELAEZ F, COLWELL L, LEE SH, MICHAEL B, FELCETTO T, GILL C, SILVER LL, HERMES JD, BARTIZAL K, BARRETT J, SCHMATZ D, BECKER JW, CULLY D, SINGH SB. PLATENSIMYCIN IS a selective FabF inhibitor with potent antibiotic properties. *Nature* 441: 358-361. 2006.

XU, R.; FAZIO, G. C.; MATSUDA, S. P. T. On the origins of triterpenoid skeletal diversity. *Phytochemistry*, 65, 261-291, 2004.