



UNIVERSIDADE DA BEIRA INTERIOR
Ciências

**Estudo fitoquímico e avaliação das atividades
antioxidantes dos extratos das folhas de *Maytenus
senegalensis***

Elias Kakapa Chamonengue Watengãla

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em
Química Medicinal
(2.º ciclo de estudos)

Orientador: Prof. Doutor Jesús M. López Rodilla

Covilhã, junho de 2018

Agradecimento

Em primeiro lugar agradeço a Deus por me permitir obter mais uma oportunidade científica na vida e pela capacidade proporcionada a minha Esposa Madalena de Jesus Fernando e aos meus filhos por suportarem a minha ausência durante a longa caminhada de formação.

Ao orientador desta dissertação o Prof. Doutor Jesús M. López Rodilla, pela sua disponibilidade, paciência e incentivo durante a realização dos trabalhos laboratoriais e á todos os docentes do Curso de Química Medicinal pela experiência proporcionada durante os dois anos de formação, em especial a professora Maria Ismael pois esteve sempre disponível para dar algumas opiniões e esclarecer possíveis inquietações durante os trabalhos laboratoriais.

A todos os amigos e colegas do curso de Química Medicinal que de uma forma directa ou indirecta, contribuíram, ou auxiliaram na elaboração do presente estudo, pela paciência, atenção e força que prestaram em momentos difíceis.

O meu reconhecimento e agradecimento aos meus colegas de laboratório por todo apoio prestado, paciência e troca de ideias. De forma especial aos que me acompanharam nas horas mais difíceis, podendo mesmo destacar: Nelo, Samba, Paulo, Selua e Mariana, onde o desespero imperava perante as colunas demoráveis. Sem esquecer a Maria pela ajuda tremenda na correção da linguagem textual desta dissertação.

Desejo igualmente agradecer aos meus amigos pelos momentos de descontração nas quadras desportivas.

Por último venho agradecer á Direção da Escola Superior Pedagógica por apostar nas minhas competências e projetar-me no processo de Formação de Quadros da Província sob direção do INAGBE-Angola.

Resumo

As plantas medicinais africanas são o medicamento tradicional mais comum em prática em todo o continente africano. Em muitas partes de África, as plantas medicinais são o recurso de saúde mais acessível e disponível para a comunidade. Um exemplo típico é a utilidade das folhas de *Maytenus Senegalensis* em Angola para a cura de doenças gastrointestinais, como diarreia e cólera, de dores de dentes e de casos de malária associados a dores gastrointestinais. Estes pressupostos proporcionaram o estudo fitoquímico e a análise biológica dos extratos de hexano das folhas de *M. senegalensis*. Para tal, as folhas colhidas no município da Humpata foram submetidas a processos de extração em *n*-hexano, acetona e etanol, e os extratos obtidos foram purificados por processos cromatográficos, obtendo diversas frações de acordo com o poder de eluição. Estas frações foram analisadas por técnicas espectroscópicas como a espectroscopia de infravermelho, de RMN de ^1H e de ^{13}C , cuja análise dos resultados permitiu identificar alguns compostos. Os extratos de acetona e etanol foram submetidos a avaliação biológica por determinação da atividade antioxidante pelo método do DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazilo). Depois das análises dos resultados espectroscópicos foi possível identificar cinco compostos do extrato de *n*-hexano, nomeadamente, a Friedelin, a β -Amirina, o β -Sitosterol, o ácido α -eleostearílico e o 3-Epi-gloquidiol. Estes resultados foram confirmados com o auxílio de diversas fontes de literatura, uma vez que os dados obtidos neste trabalho foram comparados com os referenciados na bibliografia, confirmando que os compostos em causa já tinha sido identificados na mesma espécie ou em espécies diferentes. Os resultados da avaliação da atividade biológica indicaram uma capacidade antioxidante forte para os extratos de acetona e etanol em comparação com os padrões Trolox e Rutina, e um carácter fraco em relação ao padrão do ácido gálico. Dos extratos analisados o de etanol apresentou maior atividade antioxidante. Tendo em conta os resultados obtidos podemos sugerir a utilização destes extratos como agentes que proporcionam um aumento da capacidade antioxidante frente a certas doenças como o cancro, doenças cardíacas e acidentes vasculares cerebrais no Homem.

Palavras-chaves: Plantas medicinais, Medicina tradicional Africana, *Maytenus senegalensis*, Fitoquímica, Atividade antioxidante e DPPH.

Abstract

African's medicinal plants are the most common traditional medicine in practice across the African continent. In many parts of Africa, medicinal plants are the most accessible health resource available to the community. A typical example is the use of *Maytenus Senegalensis* leaves in Angola for treating gastrointestinal diseases, such as diarrhea and cholera, toothache and malaria associated with gastrointestinal pain. These assumptions are the base for the phytochemical study and biological analysis of the *n*-hexane extracts of the leaves of *M. senegalensis*. For this, the leaves harvested in Humpata were subjected to extraction processes in *n*-hexane, acetone and ethanol, and the extracts obtained were purified by chromatographic processes, in which were obtained several fractions according to the elution power. These fractions were analyzed by spectroscopic techniques such as infrared, ¹H and ¹³C NMR spectroscopy, whose analysis of the results allowed to identify some compounds. The acetone and ethanol extracts were submitted to biological evaluation by determination of the antioxidant activity by the DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) method. After the spectroscopic analysis, it was possible to identify five compounds of the *n*-hexane extract, which are, Friedelin, β-Amyrin, β-Sitosterol, α-eleostearic acid and 3-Epi-glochidiol. These results were confirmed by several sources of literature, once the data obtained in this research were compared with those referenced in the literature, confirming that the compounds in question had already been identified in the same species or in different species. The results of the evaluation of the biological activity indicated a strong antioxidant capacity for the extracts of acetone and ethanol in comparison with the standards Trolox and Rutine, and a weak character against the standard gallic acid. Of the extracts analyzed, the ethanol showed higher antioxidant activity. Taking into account the results obtained we can suggest the use of these extracts as agents that provide an increase in antioxidant capacity against certain diseases such as cancer, heart disease and stroke in the human species.

Key words: Medicinal plants, Traditional African medicine, *Maytenus senegalensis*, Phytochemistry, Antioxidant activity and DPPH.

ÍNDICE

Agradecimento	II
Resumo.....	III
Abstract.....	IV
Lista de figuras	VII
Lista de tabelas	IX
Lista de gráficos	XI
Lista de acrónimos, abreviatura e símbolos.....	XII
Introdução.....	1
Capítulo 1. Revisão da literatura.....	3
1.1. Plantas medicinais	3
1.1. A medicina tradicional Africana	4
1.2. Caracterização das plantas da família <i>Celastráceae</i>	6
1.2.1. Descrição etnobotânica da espécie <i>Maytenus senegalensis</i>	6
1.2.2. Uso tradicional de <i>Maytenus Senegalensis</i>	7
1.3.Composição dos metabolitos secundários dos extratos de plantas do género <i>Maytenus</i>	9
1.3.1. Flavonoides.....	10
1.3.2. Terpenoides	10
1.3.3. Alcaloides.....	10
1.3.4. Taninos Condensados	11
1.4. Compostos químicos isolados dos extratos de <i>Maytenus senegalensis</i>	11
1.5. O uso de produtos naturais para avaliação biológica	17
1.6. Estudo Farmacológicos dos extratos da espécie <i>Maytenus senegalensis</i>	18
1.7. Atividades Antioxidantes	19
1.7.1. Radicais livres	19
1.7.2. Antioxidantes	20
1.7.3. Determinação da atividade antioxidante pelo método do DPPH	23
1.7.4. Importância dos antioxidantes para o corpo humano	24

Capítulo 2. Descrição experimental	25
2.1. Recolha da planta	25
2.2. Materiais e reagentes.....	25
2.2.1. Equipamentos	25
2.2.2. Reagentes e Solventes	26
2.3. Preparação dos extratos das folhas de <i>M. senegalensis</i>	26
2.3.1. Purificação dos extratos por cromatografia de coluna <i>flash</i> e por CCF	27
2.3.1.1. Cromatografia de coluna <i>flash</i> da fração Ms ₁ -Hex.....	28
2.3.1.2. Cromatografia de coluna <i>flash</i> da fração Ms ₂ -Hex.....	30
2.3.1.3. Cromatografia de coluna da fracção nº7 de C ₁ Ms ₁ -Hex.....	31
2.4. Determinação das estruturas dos compostos isolados	32
2.4.1. Caracterização dos compostos isolados nos extratos de <i>n</i> -hexano	32
2.5. Atividade antioxidante dos extratos de acetona e etanol	34
2.5.1.1. Determinação da absorvência das amostras.....	35
Capítulo 3. Resultados e discussões	36
3.1. Caracterização fitoquímica dos extratos de hexano das folhas de <i>M. senegalensis</i>	36
3.1.1. Compostos isolados no extrato de Ms ₁	36
3.1.1.1. Friedelin	36
3.1.1.2. β-Amirina	38
3.1.1.3. β-Sitosterol	41
3.1.2. Compostos isolados no extrato de Ms ₂	43
3.1.2.1. β-Amirina	43
3.1.2.2. Ácido α-eleostearíco	44
3.1.2.3. 3-epi-Gloquidiol.....	46
3.2.1.1. Extratos de acetona	49
Capítulo 4. Conclusões e perspetivas futuras	54
Referências bibliográficas	55
Anexos	62

Lista de figuras

Figura 1.1: Planta de espécie <i>Maytenus Senegalensis</i>	7
Figura 1.2: Estruturas de alguns compostos isolados das folhas de <i>M. senegalensis</i>	13
Figura 1.3: Estruturas de alguns compostos isolados na casca do caule de <i>M. senegalensis</i>	15
Figura 1.4: Estruturas de alguns compostos isolados na casca da raiz de <i>M. Senegalensis</i>	15
Figura 1.5: Estruturas de alguns compostos isolados na raiz de <i>M. senegalensis</i>	16
Figura 1.6: Reação do DPPH com um substrato, representando alteração da cor da solução.....	23
Figura 1.6.1. Amostra submetida a reação com o DPPH, mudança da coloração	23
Figura 2.1: Imagem do sistema de extração com Sohlet das folhas de MS ₁ em <i>n</i> -hexano a quente	27
Figura 2.2: Preparação do Diazometano a partir de N-metil-N-nitroso-p toluenos sulfonamida ...	31
Figura 2.3: Imagem dos produtos isolados dos extratos de <i>n</i> -hexano para Ms ₁	33
Figura 2.4: As imagens dos produtos isolados dos estratos de <i>n</i> -hexano de Ms ₂	33
Figura 3.1: Fórmula Estrutural da Friedelin	38
Figura 3.1A: Espectro de Infravermelho do composto identificado como: Friedelin.....	65
Figura 3.1B: Espectro de RMN de ¹ H, para amostra C-Ms ₁ -4 (Friedelin)	65
Figura 3.1C: Espectro de RMN de ¹³ C associado ao DEPT 90° e 135° para amostra C1-Ms ₁ -4	66
Figura 3.2: Fórmula Estrutural da β-Amirina	40
Figura 3.2A: Espectro de Infravermelho para o composto identificado como: β-amirina.....	68
Figura 3.2B: Espectro de RMN de ¹ H para amostra C ₁ -Ms ₁ -5 (β-amirina).....	68
Figura 3.2C: Espectro de RMN de ¹³ C associado ao DEPT 90° e 135° para amostra C ₁ -Ms ₁ -5 (β-amirina).....	69
Figura 3.3: Fórmula estrutural do β-Sitosterol	43
Figuras 3.3A: Espectro de RMN de ¹ H para amostra C ₁ -Ms ₁ -7 (β-Sitosterol)	70
Figura 3.3B: Espectro de RMN de ¹³ C associado ao DEPT 90° e 135° para amostra C ₁ -Ms ₁ -7 (β-Sitosterol).....	71
Figura 3.4: Fórmula estrutural do ácido α-eleostearíco	45

Figura 3.4A: Espectro de Infravermelho para amostra de C ₂ -Ms ₂ -8 (ácido α-eleostearíco)	72
Figura 3.4B: Espectro de RMN de ¹ H para amostra C ₂ -Ms ₂ -8 (ácido α-eleostearíco)	72
Figuras 3.4C: Espectro de RMN de ¹³ C associado ao DEPT 90° e 135° para amostra C ₂ -Ms ₂ -8.....	73
Figura 3.5: Estrutura do 3-epi-gloquidiol	48
Figura 3.5A: Espectro de Infravermelho para amostra de C ₂ -Ms ₂ -15 (3-Epi-gloquidiol)	75
Figura 3.5B: Espectro de RMN de ¹ H para amostra C ₂ -Ms ₂ -15 (3-Epi-gloquidiol)	75
Figura 3.5C: Espectro de RMN de ¹³ C associado ao DEPT 90° e 135° para amostra C ₂ -Ms ₂ -15	76

Lista de tabelas

Tabela 1.1: Utilidades de <i>M. senegalensis</i> na medicina tradicional de alguns países africanos ...	8
Tabela 1.2: Descrição de alguns compostos isolados de diferentes partes da planta de espécie <i>M. senegalensis</i>	11
Tabela 1.3: Atividades biológicas de diferentes extratos de <i>M. senegalensis</i>	18
Tabela 2.1: Reagentes e solventes utilizados no processo de extração, purificação e identificação dos compostos.....	26
Tabela 2.2: Descrição de massa de partidas e massa obtidas em diferentes extratos	26
Tabela 2.3: Descrição das frações cromatográficas dos extratos de <i>n</i> -hexano obtidos das folhas de <i>Ms</i> ₁ parte solúvel em metanol, com peso suficiente para RMN	29
Tabela 2.3A: Descrição das frações cromatográficas dos extratos de hexano obtidos das folhas de <i>Ms</i> ₁ parte solúvel em metanol	
Tabela 2.4: Descrição das frações cromatográficas dos extratos de <i>n</i> -hexano obtidos das folhas de <i>Ms</i> ₂ parte solúvel em metanol, com peso suficiente para RMN	30
Tabela 2.4A: Descrição das frações cromatográficas dos extratos de hexano obtidos das folhas de <i>Ms</i> ₁ parte solúvel em metanol	
Tabela 2.5: Descrição cromatográfica da fracção nº 7 da <i>C</i> ₁ <i>Ms</i> ₁ com peso suficiente para RMN ...	31
Tabela 2.5A. Cromatografia de Coluna da Fracção nº7 de <i>C</i> ₁ <i>Ms</i> ₁ -Hex	
Tabela 2.6: Caracterização dos compostos isolados nos extratos de <i>n</i> -hexano	32
Tabela 2.7: Classificação de uma amostra quanto à atividade antioxidante	35
Tabela 3.1: Dados espectroscópicos de RMN de ¹ H e ¹³ C do composto <i>Ms</i> ₁ -4	37
Tabela 3.2: Dados espectroscópicos de RMN de ¹ H e ¹³ C do composto <i>Ms</i> ₁ -5	39
Tabela 3.3: Dados espectroscópicos de RMN de ¹ H ¹³ C do composto <i>Ms</i> ₁ -7	42
Tabela 3.4: Dados espectroscópicos de RMN de ¹ H e ¹³ C do composto <i>Ms</i> ₂ -8	44
Tabela 3.5: Dados espectroscópicos de RMN de ¹ H e ¹³ C do composto <i>Ms</i> ₂ -15	47
Tabela 3.6: Representação dos parâmetros de IC ₅₀ e IAA dos diferentes ensaios de extrato de acetona para a [DPPH] de 0,0800 mM	49

Tabela 3.7: Representação dos parâmetros de IC ₅₀ e IAA dos diferentes ensaios de extrato de acetona para a [DPPH] de 0,1242 mM	50
Tabela 3.8: Representação dos parâmetros de IC ₅₀ e IAA dos diferentes ensaios de extrato de acetona para a [DPPH] de 0,2000 mM	50
Tabela 3.9: Representação dos parâmetros de IC ₅₀ e IAA dos diferentes ensaios de extrato de etanol para a [DPPH] de 0,0800 mM	51
Tabela 3.10: Representação dos parâmetros de IC ₅₀ e IAA dos diferentes ensaios de extrato de etanol para a [DPPH] de 0,1242 mM	52
Tabela 3.11: Representação dos parâmetros de IC ₅₀ e IAA dos diferentes ensaios de extrato de etanol para a [DPPH] de 0,2000 mM	52
Tabela 3.12: Tabela de parâmetros para o nível de atividade antioxidante dos extratos em relação aos padrões	52

Lista de gráficos

Gráfico 1.1: Frequência dos métodos usados <i>in vivo</i> para atividades antioxidante	21
Gráfico 1.2: Frequência dos métodos usados <i>in vitro</i> para atividades antioxidantes	22
Gráfico 1.3: Frequência dos solventes mais utilizados para avaliar atividades antioxidantes.....	22
Gráfico 3.1: Representação da % I em função da concentração de extrato de acetona [Ext. Acet] para a [DPPH] de 0,0800 mM	49
Gráfico 3.2: Representação da % I em função da [Ext. Acet], para á [DPPH] de 0,0800 mM	50
Gráfico 3.3: Representação da % I em função da [Ext. Acet], para á [DPPH] de 0,1242 mM	50
Gráfico 3.4: Representação da % I em função da [Ext. Acet] para a [DPPH] de 0,2000 mM	51
Gráfico 3.5: Representação da % I em função da concentração de extrato de etanol [Ext. EtOH] para a [DPPH] de 0,0800 mM	51
Gráfico 3.6: Representação da % I em função da [Ext. EtOH] para á [DPPH] de 0,1242 mM	52
Gráfico 3.7: Representação da % I em função da [Ext. EtOH] para á [DPPH] de 0,2000 mM	52
Gráfico 3.8: Comparação dos resultados da capacidade antioxidante dos extratos de acetona e etanol em relação os padrões utilizados.....	53

Lista de acrónimos, abreviatura e símbolos

α	Alfa
AcOEt	Acetato de etilo
AAI	Índice de atividade antioxidante
Abs ₀	Absorvência de controlo
Abs ₁	Absorvência da amostra
β	Beta
CAT	Catálase
CCF	Cromatografia de camada fina
d	Dupleto
dd	Dublo dupleto
DEPT	Distortionless Enhancement by Polarization Transfer
DMSO	Dimetilsulfóxido
DPPH	1,1-difenil-1-2-picrilhadrazilo
DPPH-H	2,2-difenil-1-picrilhadrazina
DPPH ⁻	Anião 2,2-difenil-1-picrilhadrazilo
DPPH [·]	Radical 2,2-difenil-1-picrilhadrazilo
Ext	Extrato
FTC	Tiocianato Férrico
FRAP	Poder redutor-antioxidante férrico
<i>t</i>	Tripleto
<i>m</i>	Multiplete
<i>Me</i>	Metil
MeOH	Metanol
IV	Infravermelho

Hex	Hexano
HMBC	Heteronuclear Multiple Bond Correlation
HSQS	Heteronuclear Single Quantum Correlation
NOE	Nuclear Overhouser Effect
NOESY	Nuclear Overhouser Effect Spectroscopy
IC ₅₀	Metade da concentração máxima de inibição
I %	Porcentagem de Inibição
GSHPx	Estimativa de glutathione Peroxidase
GSH	Estimativa de glutathione reduzida
GST	Glutathione-S-Transferase
SOD	Superóxido Dismutase
GGT	C-glutamyl- Transpeptidase
GR	Glutathione Redutase
ORAC	Capacidade de absorção de Radicais de Oxigênio
LOP	Peróxido Lipídico
RP	Redução de Potência
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
RMN de ¹³ C	Ressonância Magnética Nuclear de carbono 13
RMN de ¹ H	Ressonância Magnética Nuclear de próton
ROS	Reactive Oxygen Species (Espécies reativa de Oxigênio)
S	Singleto
TBA	Ácido Tiobarbiturico
TEAC	Capacidade Antioxidante Equivalente a Trolox
%	Porcentagem

Introdução

A origem do conhecimento que o homem tem sobre as plantas confunde-se com a sua própria história. Esse conhecimento certamente surgiu à medida que tentava minimizar as suas necessidades básicas, através das tentativas e observações de um conjunto de fatores que constituem o empirismo. Essas pessoas dependiam, fundamentalmente, do meio ambiente para sobreviver e foram utilizadas principalmente as plantas medicinais para curar os males que lhes acometia, e novas terapias foram surgindo ao longo da evolução.

Desde tempos muito antigos, o homem utilizou plantas para tratar algumas doenças infecciosas, e as investigações científicas do material vegetal demonstraram claramente a eficácia terapêutica das mesmas ao longo do tempo. Hoje, muitos países usam plantas para tratar diferentes patologias, como doenças infecciosas, dos sistemas respiratório, gastrointestinal, urinário e biliar, entre outros (Ríos & Reccio, M.C, 2005).

As plantas medicinais formam o pilar da medicina tradicional e têm o maior interesse nos estudos farmacológicos que, nos últimos anos, se tem realizado devido as variadas epidemias que vão surgindo. As plantas medicinais são consideradas como fontes primárias de metabolitos e de potenciais novos compostos com valor terapêutico para a descoberta e desenvolvimento de compostos *lead* para produção de fármacos. Além disso, existe também um mercado muito grande de partes de plantas medicinais minimamente processadas, especialmente na Europa e na América, que geralmente são dispensadas como medicamentos de venda livre. Nos países em desenvolvimento, estima-se que cerca de 80% da população depende da medicina tradicional para os seus cuidados primários de saúde.

A pesquisa fitoquímica com base na informação etnofarmacológico geralmente é considerada como uma abordagem efetiva na descoberta de novas propriedades medicinais de plantas (Duraipandiyar, Ignacimuthu, & Ayyanar, 2006). Sendo o *Maytenus senegalensis* uma planta muito usada pela população nativa do Sul de Angola para a cura da malária entre outros usos. Este facto suscitou um interesse no estudo desta espécie para identificar os princípios ativos existentes nas folhas da planta.

Objetivos

O objetivo geral desta pesquisa assenta em extrair, isolar e identificar os principais compostos químicos presentes nas folhas de *Maytenus senegalensis* e determinar as atividades antioxidante dos extratos de acetona e etanol.

Os objetivos específicos são:

- ✓ Identificar e recolher as folhas de *Maytenus senegalensis* para o estudo;
- ✓ Preparar e realizar os métodos de extração a quente em *n*-hexano (Soxhlet) e a frio com acetona e etanol;
- ✓ Separar e purificar os diferentes extratos obtidos através de técnicas de cromatografia de coluna;
- ✓ Analisar a composição das diferentes frações por cromatografia de camada fina;
- ✓ Analisar as diferentes frações obtidas por ressonância magnética nuclear (RMN), infravermelho (IV) e espectrometria de massa (MS) para identificar estruturas químicas dos compostos isolados;
- ✓ Justificar os seus efeitos medicinais pela análise comparativa dos seus compostos químicos.
- ✓ Determinar as atividades antioxidante dos extratos de acetona e etanol.

Capítulo 1. Revisão da literatura

1.1. Plantas medicinais

As plantas têm sido fontes importantes de substâncias biologicamente ativas. A maioria dos fármacos (drogas) atualmente disponíveis para uso clínico são produtos naturais ou análogos sintéticos destes. Alguns dos produtos naturais estudados têm mostrado ser uma fonte abundante de moléculas bioativas, uma vez que, a diversidade estrutural é fundamental na pesquisa para atingir diferentes alvos biológicos. Assim, observa-se a importância do estudo de produtos naturais, considerando que, durante os milhões de anos da evolução biológica a seleção natural realizou um processo de química combinatória inigualável (Yunes, Pedrosa, & Cechinel, 2001).

Apesar das muitas novas drogas no mercado, hoje as plantas medicinais ainda constituem o pilar fundamental para a cura de variadíssimas doenças em todo o mundo. Muitas das plantas são valiosas porque fornecem as matérias-primas com o qual produzimos novos medicamentos (Barreiro & Bolzani, 2009). O uso de plantas medicinais pela população é uma prática muito antiga devido à grande variedade de propriedades terapêuticas que essas fontes apresentam. A Organização Mundial de Saúde (OMS) afirma que cerca de 80% da população de países em desenvolvimento dependem essencialmente do uso de plantas para os cuidados de saúde (Souza-Moreira, Salgado, & Pietro, 2010) e mais de 100 países têm regulamento para o uso de medicamentos à base de plantas (Savoia, 2012). No entanto, muitas plantas utilizadas frequentemente por comunidades locais, ainda não foram estudadas e seus princípios ativos não foram identificados. Dessa forma, muitas delas não foram validadas ainda cientificamente para serem utilizadas pela indústria farmacêutica (Barreiro & Bolzani, 2009).

O valor medicinal das plantas reside no facto de possuírem algumas substâncias químicas que produzem uma ação fisiológica e curativa no corpo humano, destacando os alcaloides, flavonoides, taninos e compostos fenólicos como os mais importantes nas plantas (Duraipandiyan, Ignacimuthu, & Ayyanar, 2006).

As diferentes partes e componentes da planta (raízes, folhas, cascas de haste, flores ou suas combinações, óleos essenciais) têm sido empregados no tratamento de patologias infecciosas dos sistemas respiratório, urinário, gastrointestinal e biliar, bem como na pele. Elas têm contribuído fortemente para o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas por meio dos seus metabólitos secundários, conhecidos por atuar de forma direta ou indireta no organismo, podendo inibir ou ativar importantes alvos moleculares e celulares (Firmo, Wellyson, Menezes, Passos, & et al., 2011).

1.1.A medicina tradicional Africana

A medicina tradicional africana é uma das mais antigas, e talvez a mais variada de todos os sistemas terapêuticos. África é considerada o berço da humanidade com uma rica diversidade biológica e cultural marcada pelas diferenças regionais nas práticas de cura. Ela não é mais do que a soma total de conhecimento, habilidades e práticas baseadas nas teorias, crenças e experiências dos povos nativos de diferentes culturas, que são usadas para manter a saúde, bem como para prevenir, diagnosticar, melhorar ou curar doenças físicas e mentais. (Gurib-Fakim, 2006)

A medicina tradicional africana nas suas formas variadas defende a importância integral das plantas medicinais em diferentes vertentes envolvendo o corpo e a mente. O curador tradicional normalmente diagnostica e trata a base psicológica de uma doença antes de prescrever medicamentos, particularmente plantas medicinais para tratar os sintomas (Gurib-Fakim, 2006).

O interesse sustentado na medicina tradicional no sistema de Saúde Africano pode ser justificado por duas razões principais:

- ✓ O acesso inadequado a medicamentos alopáticos e formas ocidentais de tratamentos, pelo que a maioria das pessoas em África não pode pagar o acesso a cuidados médicos modernos, quer porque é muito caro ou porque não há prestadores de serviços médicos (Gurib-Fakim, 2006).
- ✓ A falta de tratamento médico moderno eficaz para algumas doenças, como a malária e o vírus da imunodeficiência humana (VIH), que embora global na distribuição, afetam desproporcionalmente a população africana mais do que as restantes (Gurib-Fakim, 2006).

O uso extensivo da medicina tradicional em África, composto principalmente de plantas medicinais, está vinculado a razões culturais e econômicas, sendo esta a razão pela qual a OMS incentiva aos Estados membros africanos a promoverem e integrar as práticas médicas tradicionais no seu sistema de saúde (Mahomoodally, 2013).

As plantas medicinais africanas constituem o medicamento tradicional mais comum, em prática, em todo o continente africano. Em muitas partes de África, as plantas medicinais são os recursos de saúde mais acessíveis que estão disponíveis para a comunidade, além disso, eles são mais frequentemente a opção preferida pelos pacientes. Para a maioria dessas pessoas, os curandeiros tradicionais oferecem informações, aconselhamento e tratamento aos pacientes e às suas famílias de forma pessoal, além de terem uma compreensão do ambiente no qual está inserido o paciente (Gurib-Fakim & Mahomoodally, 2013).

A África tem uma rica tradição no que refere ao uso de plantas, uma variedade imensa de climas, culturas e espécies bem como recursos humanos e naturais para se tornar um produtor ainda maior

de produtos naturais de origem vegetal. Os potenciais farmacêuticos das plantas medicinais africanas são imensos. Para melhorar a situação das plantas medicinais em África existe uma diversidade de opções, sendo elas, a necessidade de uma ação urgente para as pesquisas que se concentrem na geração de informações de base em plantas medicinais e aromáticas; e a promoção do processamento de medicamentos à base de plantas de valor agregado de materiais locais para indústrias locais, com formas de dosagem simples sendo padronizadas e embaladas a baixo custo usando a tecnologia apropriada (Rukangira, 1998).

Os governos devem estabelecer o apoio institucional e financeiro necessário para promover o papel potencial da indústria de ervas no desenvolvimento socio-econômico, portanto, deve ser dada prioridade ao desenvolvimento da fitoterapia através das seguintes medidas: inventário e documentação das diversas plantas medicinais e ervas, que são usados para tratar doenças comuns em cada país; criação de uma rede de laboratórios e plantas piloto com instalações adequadas para a avaliação da eficácia das ervas medicinais; e o estabelecimento de normas de dosagem e produção dos extratos de ervas mais eficazes em qualquer formulação farmacêutica. A conservação e a produção de plantas medicinais, principalmente em jardins comunitários, devem ser priorizadas, juntamente com outras opções de conservação e incentivos de mercado para a preservação de plantas medicinais essenciais (Rukangira, 1998).

Pode-se afirmar que África é abençoada com enormes recursos de biodiversidade e estima-se que contenha entre 40 a 45 mil espécies de plantas potencialmente bioativas das quais 5 mil são usadas medicinalmente. Isso não é surpreendente, uma vez que a África está localizada dentro do clima tropical e subtropical e é um fato conhecido que as plantas acumulam metabolitos secundários importantes através da evolução como um meio natural de sobrevivência num ambiente hostil. Por causa das suas condições tropicais, a África tem uma participação injusta de raios ultravioleta fortes da luz solar tropical e numerosos micróbios patogênicos, incluindo várias espécies de bactérias, fungos e vírus, sugerindo que as plantas africanas poderiam acumular mais substâncias quimiopreventivas do que as plantas do hemisfério norte (Manach, Scalbert, Morand, Rémésy, & Jimenez, 2004).

Portanto, o conhecimento etnofarmacológico e botânico sobre os usos de plantas medicinais em África é passado oralmente dos mais velhos aos mais novos. A medicina tradicional é reconhecida como parte dos programas de atenção primária à saúde em muitos países africanos e a tem sido alvo de preocupação em prol da necessidade de avaliar cientificamente os extratos brutos das plantas pelas suas propriedades medicinais e farmacodinâmicas, utilidade clínica e potencial toxicológico (Silva & Serrano, 2011).

1.2. Caracterização das plantas da família *Celastráceae*

A família *Celastráceae* é formada por 106 géneros e 1300 espécies que são amplamente distribuídas em regiões tropicais e subtropicais do mundo, incluindo o norte de África, a América do Sul e a Ásia Oriental, principalmente a China (Nunez, et al., 2016). As plantas desta família são normalmente árvores pequenas ou caducas, arbustos, cipós, trepadeiras (por exemplo Salácia), ou menos frequentemente herbáceas anuais e perenes. Geralmente, tem 4 a 5 flores bissexuais ou unissexuais, pequenas, ocorrendo na mesma planta ou em plantas diferentes (Simmons, et al., 2001).

Esta família é formada por vários géneros, sendo os principais: *Maytenus*, formado por 225 espécies; *Euonymus* formado por 200 espécies; *Cassine* formado por 40 espécies; e *Celastrus* formado por 30 espécies (Heywood, 1993). A estas espécies são atribuídos vários usos na medicina popular visto que seus extratos são utilizados para o tratamento de complicações no estômago, febre, artrite reumatoide e cancro (Spivey, Weston, & Woodhead, 2002). Todavia, o principal interesse económico desta família recai sobre algumas espécies do género *Maytenus*, utilizadas popularmente contra infeções gástricas, como úlceras e gastrites (Santos, 2008).

1.2.1. Descrição etnobotânica da espécie *Maytenus senegalensis*

O nome de *Maytenus* é derivado da palavra "*Maytén*", um nome usado pela primeira vez pelo povo "*mapuche*" para a expressão homens da terra do Chile (Maragnon, 1994). *Maytenus senegalensis* (Lam.) Exell é uma espécie da Família *Celastraceae*, que tem como sinónimos *Gymnosporia senegalensis* (Lam.) Loes., *Celastrus senegalensis* (Lam.), *Catha senegalensis* (Lam.) *Gymnosporia montana* (Mueller & Ernst Mechler, 2005).

A *M. senegalensis* (Lam.) Exell é um arbusto ou árvore pequena, das regiões tropicais e subtropicais, geralmente elíptica, que possui uma altura que varia entre 5 a 8 m e tem um diâmetro de tronco de 20 cm com margem regular e finamente dentado. O pecíolo é avermelhado com 6 a 15 mm de comprimento. As flores são brancas e esverdeadas, com cerca de 5 mm de diâmetro, 5 pétalas, 5 sépalas e 5 estames (Canelo, 2013). As suas folhas são grossas e coriáceas, com formas muito variáveis. A casca é escamosa com tons de cinzento e vermelho. Os seus ramos são avermelhados ou esverdeados e terminam em forma de espinhos axilares ou terminais de 2 a 5 cm de comprimento, muitas vezes com folhas e frutos perto da ponta do ramo. É uma árvore perene abundante que tem uma distribuição muito ampla em África, na Arábia, no Afeganistão e na Índia. O género *M. senegalensis* é conhecido, como um amargo-doce devido ao sabor do seu fruto (Gonzalez, Bazzocchi, Moujir, & Jimenez, 2000).



Figura 1.1: Planta *Maytenus Senegalensis*, fotografada por Elias Watengãla, 17 de agosto de 2017, Humpata-Huíla-Angola.

1.2.2. Uso tradicional de *Maytenus senegalensis*

A espécie *Maytenus senegalensis* é amplamente usada em diferentes países para a cura de diversas doenças e todas as partes da planta têm um papel fundamental na medicina tradicional, principalmente na Ásia e em África.

As folhas são recomendadas para doenças oculares, dores dos dentes, estomatites, gengivites e como antitransmissor e antitérmico gástrico (Neuwinger, 2000). Na Índia, as folhas são usadas para dores de dentes e infeções intestinais por vermes (Joshi, Singh, & Singh, 1981).

As raízes e cascas são tradicionalmente usadas na medicina popular de algumas regiões africanas para o tratamento de diversas doenças, incluindo dores no peito, reumatismo, mordidas de cobra, diarreia, infeção ocular, dispepsia e feridas (Okine, *et al.*, 2005) , (Sosa, *et al.*, 2007). Os curandeiros tradicionais africanos usam ainda a casca da raiz e do caule para tratar uma série de doenças como malária, dismenorreia, doenças crônicas, (Makgatho, Nxumalo , & Raphoko, 2018) dores de dentes, esfoliação de feridas, gonorreia, queixas gastrointestinais e disenteria (Nadkarne, 1944).

No Sudão, os curandeiros utilizam amplamente os extratos aquoso da casca do caule para tratar tumores, disenteria e picadas de cobras. (Husseini G. , Nakamura, Meselhy, & Hattori, 1999).

Na África Oriental, as raízes são frequentemente tomadas para hemoptise (tosse com sangue), diarreia, e picadas de cobra, e na África do Sul as raízes são cortadas, fervidas e tomadas para a cura da tosse (Mueller & Ernst Mechler, 2005).

Na região do Chivinguiro (Angola), as folhas de *Maytenus Senegalensis* são muito utilizadas em doenças gastrointestinais como, diarreia e cólera, dores de dentes e em alguns casos de malária associados a dores gastrointestinais.

Na tabela 1.1 são descritas as utilidades mais comuns de *M. senegalensis* na medicina tradicional em diferentes países Africanos (Mueller & Ernst Mechler, 2005).

Tabela 1.1: Utilidades de *Maytenus senegalensis* na medicina tradicional de alguns países africanos, adaptado do livro (Mueller & Ernst Mechler, 2005).

Parte da Planta	Doenças	Modo de preparação	País	Referência
Folhas	Diarreia	-Pisar filtrar e beber -Espremer as folhas e beber o sumo.	Benin	Adjanohoun <i>et al</i> 1989
	Mordida de cobra	-Decotar (as folhas e galhos) e beber o sumo.	Tanzânia	Haerdi F.,1964
	Infecções em volta da boca	-Decotar as folhas e bochechas o líquido	Benin	Kerharo J.B.,1949
	Febre	-Decotar aquecer e inalar o vapor	Costa de Marfim	Neuwenger H.D.,1994
		As folhas são moídas e a farinha é adicionada a água do banho.	Tanzânia	
Raízes	Diarreia	- Decotar as raízes ferver e tomar o chá	Burundi	Baersts M. L.,1989
	Tosse incluindo hemoptise	- Decotar as raízes ferver e tomar o chá	Quênia	Kokwaro J.O., 1976
		- Decotar e beber o sumo	Africa do Sul	Arnold H.J., 1984
	- Decotar e beber o sumo	Zimbabwe		Neuwer H.D.,1994
	- O pó a raiz é comido em mingau	Namíbia	Chhabra, Mahummah, 1989	
- Macerar as raízes em água morna e beber				

Mordidas de Cobras	- Decotar as raízes e beber	Tanzania	
	- Pisar as raízes mistura com óleo e aplicar no peito.	Zimbabwe	Gilges W., 1955
	- Ferver e beber como Chá	Zâmbia Gâmbia	Neuwenger H. D.,1994
Febre	- Assar, moer, mistura com saliva e aplicar na picada.	Senegal	Kerharo J. Adam,1971
	- Beber os extratos da raiz		
	- Ferver as raízes e lavar totalmente o corpo com o chá	Zimbabwe	Neuwenger H. D.,1994

1.3. Composição dos metabolitos secundários dos extratos de plantas do género *Maytenus*

As plantas são capazes de sintetizar um grande número de compostos orgânicos com uma grande variedade de estruturas, dos quais, a maior parte não influencia diretamente o crescimento e desenvolvimento da mesma, independentemente dos diferentes géneros dentro de cada espécie. Esses compostos são denominados de metabolitos secundários (Irchhaiya, et al., 2015).

Os metabolitos secundários são substâncias de biossíntese derivadas de metabolitos primários ou dos seus precursores, produzidas pelas plantas como substâncias químicas de defesa cuja ausência não causa efeitos nefasto às plantas (Irchhaiya, et al., 2015). Nestes estão incluídos compostos como os alcaloides, terpenos, flavonoides, ligninas, esteroides vegetais, curcuminas, saponinas, fenólicos e glucosídeos (Hahn, 1998).

Os metabolitos secundários são divididos em três grupos de compostos: os terpenos (constituídos por compostos voláteis como os glucosídeos, carotenoides e esteróis), os compostos fenólicos (constituídos pelos ácidos fenólicos, cumarinas, ligninas, estilbenos, flavonoides, taninos e ligninas) bem como os compostos com nitrogénio na sua estrutura, nomeadamente alcaloides e glucosinolatos (Irchhaiya, et al., 2015).

Estudos fitoquímicos de plantas do género *Maytenus* pesquisados em diversas fontes da literatura por Niero *et al*, 2011, relataram a presença de muitas classes de metabolitos secundários, incluindo flavonoides, triterpenos pentacíclicos, particularmente das séries de friedelano, oleanano, lupano e ursano, sesquiterpenos, alcalóides, e taninos condensados (Niero, Andrade, & Filho, 2011).

1.3.1. Flavonoides

Os flavonoides são compostos polifenólicos que apresentam quinze átomos de carbonos, com dois anéis aromáticos conectados por uma ponte de três carbonos (Irchhaiya, et al., 2015). Compreendem um grande grupo de compostos polifenólicos que são caracterizados por uma estrutura de benzo- γ -pirona, que é omnipresente em vegetais e frutas. A Quercetina e o kaempferol são flavonoides comuns presentes em quase 70% das plantas. Outros grupos de flavonoides incluem flavonas, di-hidroflavonas, flavanonas, flavonóis, antocianinas, proantocianidinas, calchonas, catequinas e leucoantocianidinas (Sarker & Nahar, 2007).

1.3.2. Terpenoides

Os terpenoides são compostos derivados de uma combinação de duas ou mais unidades de isopreno. O isopreno é uma unidade de cinco carbonos, quimicamente conhecida como 2-metil-1,3-butadieno (Sarker & Nahar, 2007). Para (Mahmoud *et al.* 2002) citado por Carla *et al.*, 2012., os terpenoides compreendem a maior e mais diversa classe de metabolitos secundários das plantas, cuja estrutura da molécula pode ser linear, cíclica ou policíclicas. São classificados pelo número de isopreno, nomeadamente: Monoterpenos (C₁₀), diterpenos (C₂₀), triterpenos (C₃₀), tetraterpenos (C₄₀) e politerpenos (Agostini-Costa, Vieira, Bizzo, Silveira, & Gimenes, 2012).

Os triterpenos (C₃₀) são formados por seis unidades de isopreno e são biossinteticamente derivados do esqualeno. São frequentemente sólidos incolores de alta fusão e são amplamente distribuídos entre resinas de plantas, cortiça e cutina. Existem vários grupos importantes de triterpenos, incluindo triterpenos comuns, esteroides, saponinas, esterolinas e glicosídeos cardíacos (Brietmann, et al., 2006).

1.3.3. Alcaloides

Os alcaloides são definidos como compostos básicos sintetizados por organismos vivos contendo um ou mais átomos de nitrogénio heterocíclico, derivados de aminoácidos, com algumas exceções, e farmacologicamente ativos (Brietmann, et al., 2006). O nome dos alcaloides deriva do “alcalino” e foi usado para descrever qualquer base contendo nitrogénio (Saxena, Saxena, Nema, Singh, & Gupta, 2013). A maioria dos alcaloides são sólidos cristalinos e têm sabor amargo (Sarker & Nahar, 2007). Os alcaloides constituem um grupo muito grande de metabolitos secundários, com mais de 12000 substâncias isoladas. Uma enorme variedade de fórmulas estruturais, provenientes de diferentes vias de biossíntese e apresentando atividades farmacológicas muito diversas, são características do grupo (Brietmann, et al., 2006).

1.3.4. Taninos Condensados

Pode-se dizer que os taninos são um grupo heterogêneo de compostos polifenólicos de alto peso molecular com capacidade de formar complexos reversíveis e irreversíveis com principalmente proteínas, polissacarídeos (celulose, hemicelulose, pectina, etc.), alcaloides, ácidos nucleicos e minerais, entre outros (Saxena, Saxena, Nema, Singh, & Gupta, 2013).

1.4. Compostos químicos isolados dos extratos de *Maytenus senegalensis*

Mueller e Mc.Allan, 1992, (Mueller & Mc. Allan, 1992) descreveram que as folhas de *Maytenus senegalensis* contêm alcaloides (efedrina, norefedrina), alcanos e alcanóis (hexacosano, hexacosanol, triacontanol), monoterpenos (terpineol, geraniol, linalol), triterpenos e esteróis (betulina, β -amirina, β -sitosterol), compostos fenólicos (ácido vanílico, ácido ferúlico), antocianos, leucoantocianos, glucósidos de flavonas como o kaempferol e a quercetina, bem como os taninos condensados (Oliver, 1960; Hansel, Keller, & Rimpler, 1993).

Foram identificados na casca as seguintes substâncias: triterpenos e esteróis (β -amirina, β -sitosterol, ácidos 3-*o*-acetiloleanoico e tingenona, iguesterina, pristimerina e ácido maitenóico. Enquanto que na raiz identificou-se triterpenos, esteróis, carboidratos, alcaloides e flavonóis (Mueller & Mc. Allan, 1992).

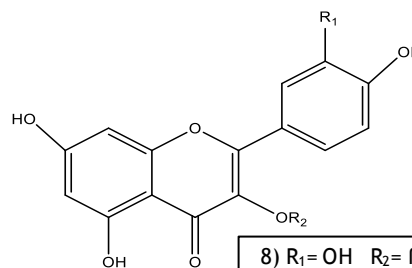
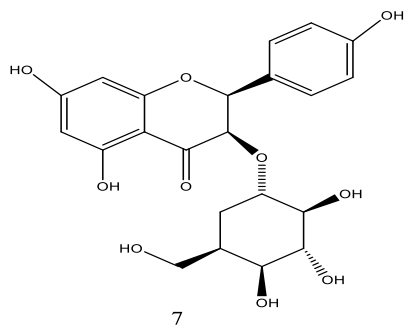
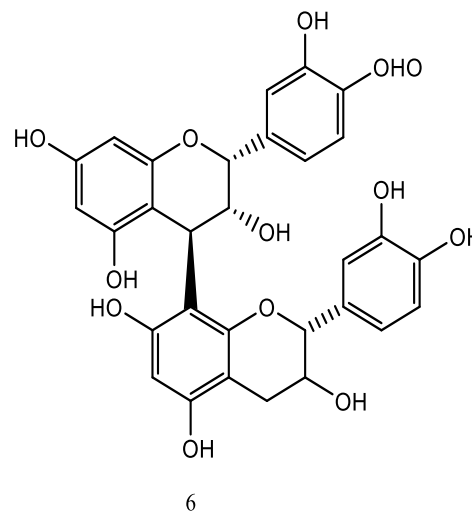
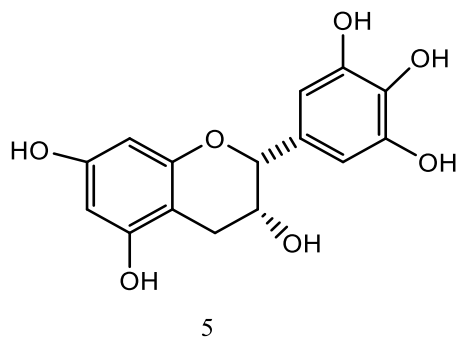
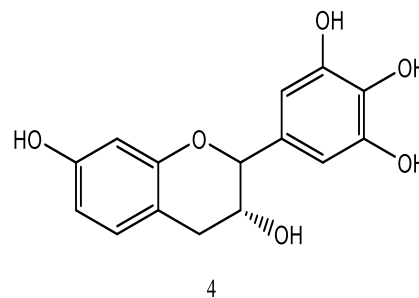
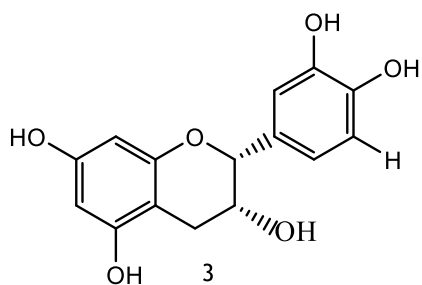
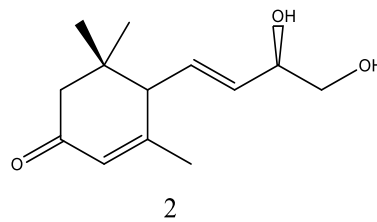
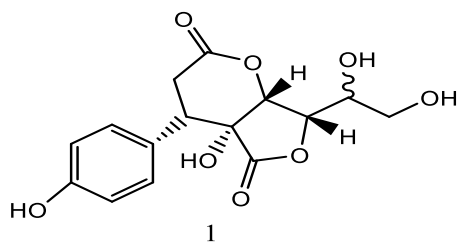
Na tabela 1.2 são apresentados de forma detalhada alguns dos compostos isolados de *Maytenus* nas diferentes partes da planta, sem deixar de destacar os solventes utilizados durante a extração.

Tabela 1.2: Descrição de alguns compostos isolados de diferentes partes da planta de espécie *Maytenus senegalensis*

Especie	Parte estudada	Solvente utilizado	Compostos isolados	Referencias
<i>Maytenus senegalensis</i>	Folhas	Metanol	Maisedilactona (1) 9,10,dihidroxi-4,7-magestigmadien-3-ona (2) (-) Epicatequina (3) (+) Gallocatequina (4) (-) Epigallocatequina (5) Procianidina B-2 (6)	(Okoye, et al., 2014)
			2,3-Dihidrokaempferol-3-O- β -D-glucopiranoside (7)	

<i>Maytenus senegalensis</i>		Quercetin 3-O-β-D-glucopiranoside (8)		
		Kaempferol 3-O-β-D-Xilopiranoside (9)		
		Quercetin 3-O-β-D-Xilopiranoside (10)		
		3,5- Dimetilgalate (11)	(Okoye F. B., et al., 2015)	
		Mayselignoside (12)		
		Benzoil R- (+) ácido málico (13)		
		Lioniresinol (14)		
		(-) - Isolariceresinol (15)		
		Álcool + (-) Dihidrodecaniferil (16)		
		β-Amirina (17)		
	Casca do caule	Metanol	-(-4) Metilepigalocatequina-5-O-β (1). +(-4) Metilgalocatequina -3-O-β-glucopiranoside (2)	(Lindsey, Budesinsky, Kohout, & Van Staden, 2006)
	Casca da raiz	Metanol	Acido-3-oxo-friedelan-20-α-oico (1)	(Lindsey, Budesinsky, Kohout, & Van Staden, 2006)
		Clorofórmio	Pristimerina (2)	(Khalid, Friedrichsen, Christensen, Tahir, & Satté, 2007)
	Raiz	Cloroformio e N-hexano	Acido maitenólico (1) β-Amirina (2) β-Sitosterol (3) Lupenona (4)	(Sosa, et al., 2007)

Figura 1.2: Fórmulas estruturais de alguns compostos isolados das folhas de *Maytenus senegalensis*



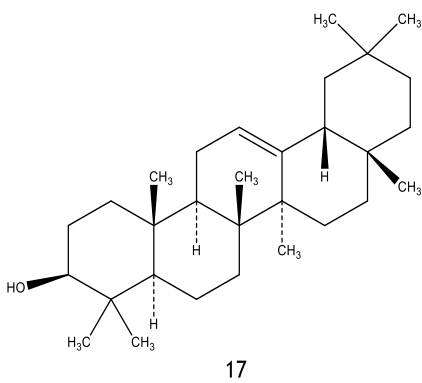
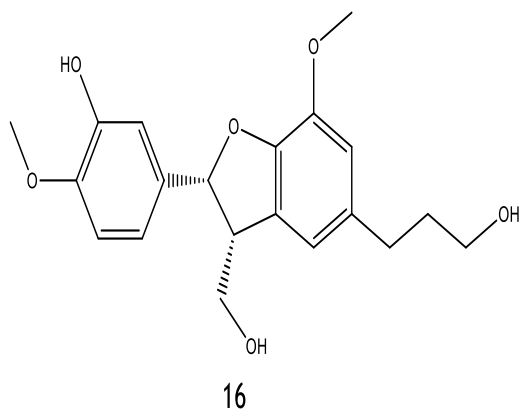
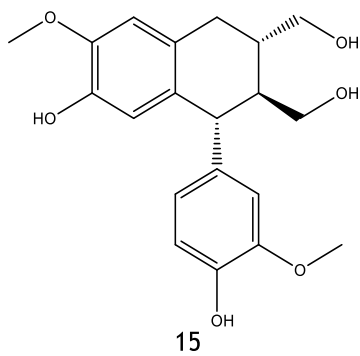
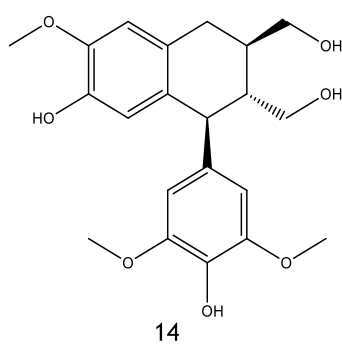
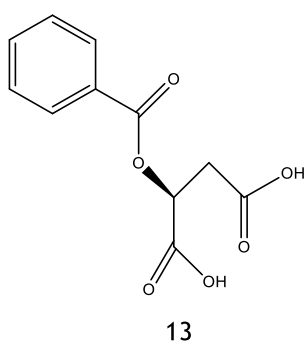
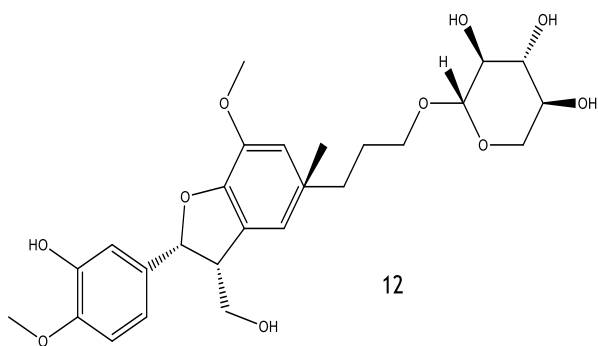
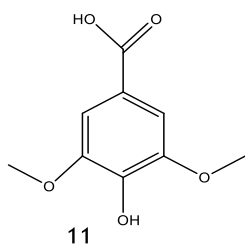


Figura1.3: Fórmulas estruturais de alguns compostos isolados na casca do caule de *M. senegalensis*

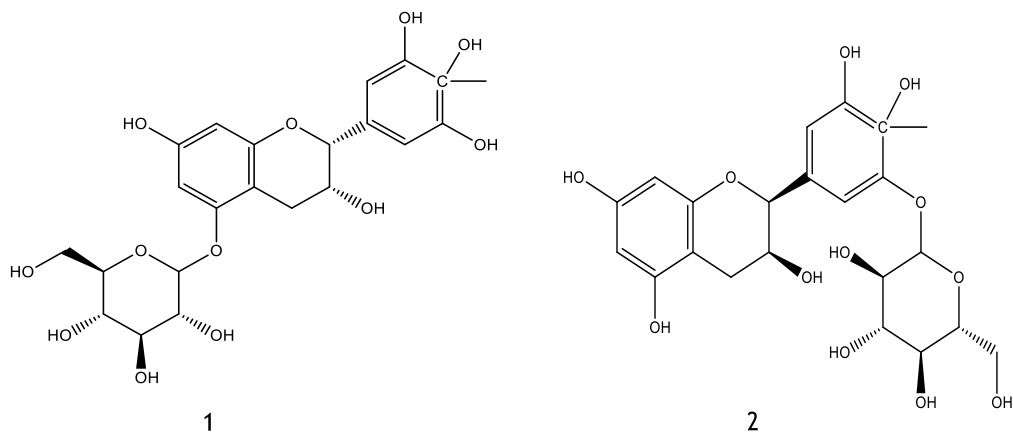


Figura 1.4: Fórmulas Estruturais dos compostos isolados na casca da raiz de *Maytenus Senegalensis*

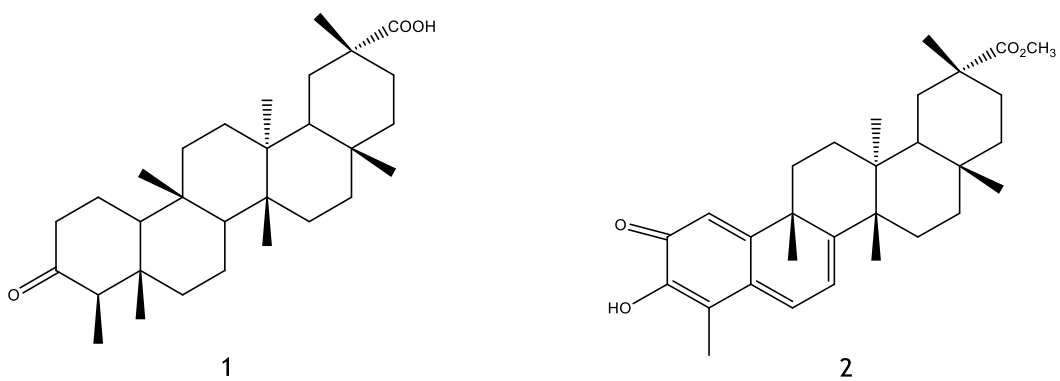
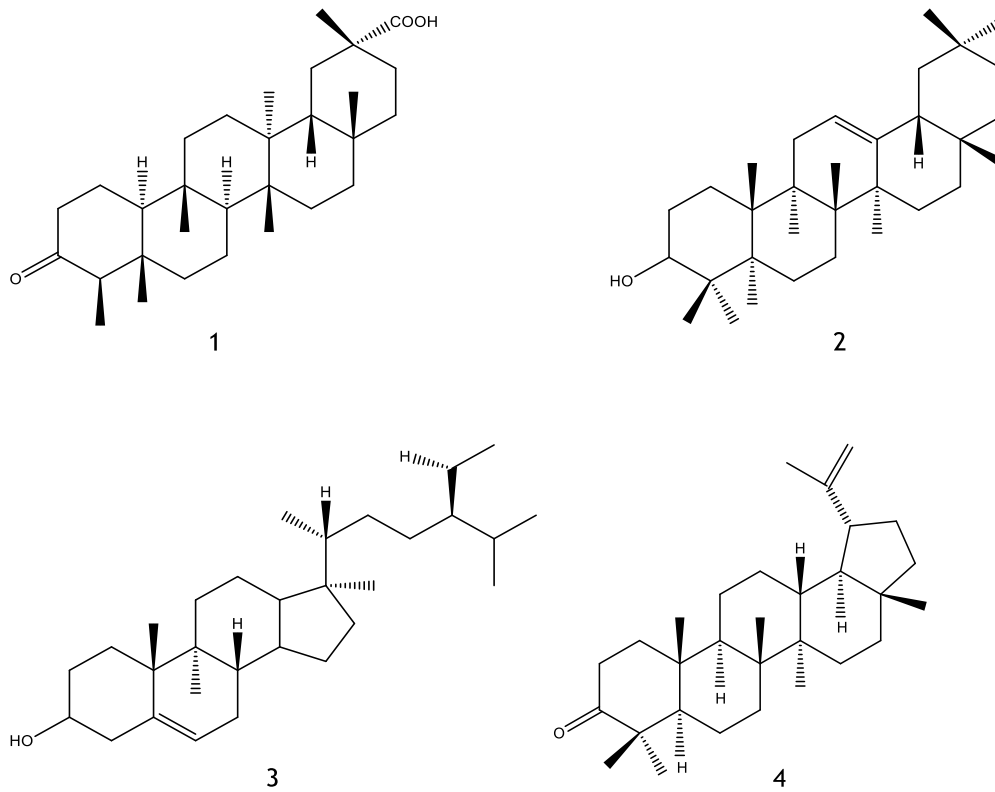


Figura 1.5: Fórmulas estruturais de alguns compostos isolados na raiz de *M. senegalensis*



1.5. O uso de produtos naturais para avaliação biológica

A procura por novos compostos biologicamente ativos para o uso medicinal e agrícola, são razões relevante para a pesquisa fitoquímica e o desenvolvimento de compostos leads (Cseke, *et al.* 2006). Os ensaios biológicos permitem determinar a atividade de compostos naturais e sintéticos, como tal, podem ser realizados no sentido de identificar quais os compostos sintéticos relevantes ou no caso de extratos de plantas, quais os promissores. Estes ensaios devem ser rápidos, simples de realizar, fornecer dados quantificáveis e de fácil análise, ser automatizados e económicos (Fernandes 2013).

No caso de produtos naturais os ensaios biológicos podem ser realizados em paralelo com o fracionamento dos extratos, e as frações individuais por sua vez podem ser submetidas a espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN) ou espectrometria de massa (MS) de modo a identificar-se as estruturas dos compostos presentes nas frações.

Existe uma variedade de atividades biológicas que podem ser testadas com produtos naturais, tais como:

- ✓ As atividades relacionadas com doenças causadas por microrganismos, como a atividade antibacteriana, antifúngica, antiparasitária e antiviral (Cseke, *et al.* 2006, Eldeen, Elgorashi e Staden 2005).
- ✓ As atividades relacionadas com a área neurológica como, por exemplo, a atividade relacionada com a doença de Alzheimer, de Parkinson e atividade analgésica (Stafforda, *et al.* 2008).
- ✓ As atividades antitumoral, antioxidante (Aremu, *et al.* 2011), antidiabética, antiosteoporose (Gurib-Fakim 2006), antiinflamatória (Eldeen, Elgorashi e Staden 2005) e outras.

Das atividades biológicas utilizadas para testar os produtos naturais descritas acima destaca-se somente a atividade antioxidante por ser objeto de estudo desta pesquisa, sendo concretamente, executada pela análise dos extratos de acetona e etanol das folhas de *Maytenus senegalensis*.

1.6. Estudo Farmacológicos dos extratos da espécie *Maytenus senegalensis*

Os estudos farmacológicos efetuados em diferentes espécies de *Maytenus* mostraram a presença de compostos fenólicos como flavonoides, glucosídeos, terpenos, esteroides e alcaloides como responsáveis por diferentes atividades biológicas (Niero *et al*, 2011). Na tabela 1.3, apresentam-se diversas atividades biológicas de diferentes extratos de *M. senegalensis* existente em diversas literaturas, para todas partes da planta, desde a folha, casca do caule e raiz.

Tabela 1.3: Atividades biológicas de diferentes extratos de *M. senegalensis*, adaptado (Niero *et al*, 2011).

Atividade Biológica	Parte da planta	Solvente ou composto	Referência
Anti-inflamatória	Folhas	Diclorometano	(Makgatho, Nxumalo, & Raphoko, 2018)
	Raiz	Clorofórmio	
Antimicrobial	Casca e raiz	Metanol	(Matu & van Staden, 2003)
	Folhas	Metanol (ácido maytenóico).	(Hussein, Nakamura,, Meselhy,, & Hattori , 1999)
	Folhas	Diclorometano	(Makgatho, Nxumalo, & Raphoko, 2018)
Antibacterial	Folhas	Metanol	(Martin, 1973)
	Raízes	Etanol	(Jain, Light,, & Van Staden, 2008)
	Casca da raiz	Ácido-3-oxo-friedelan-20 α -óico.	(Lindsey, Budesinsky, Kohout, & Van Staden, 2006)
	Raiz e casca do caule	Metanol	(Matu & van Staden, 2003)
Antiplasmodial	Folhas e casca do caule	Terpenoides e compostos fenólicos	(Tahir, Satti, & Khalid, 1999)
	Casca da raiz	Pristimerina, triterpenos pentacíclico	(Gessler, Chollet, & Nkunia, 1995)
Antiviral	Casca do caule	Extratos aquoso e metanol	Hussein, Nakamura,, Meselhy,, & Hattori , 1999)
Antileishmanial	Folhas e caule	Pristerina (cloroformio)	(Khalid, Friedrichsen, Christensen, Tahir, & Satté, 2007)
Antioxidante	Folhas	Acetona	(Jaiwal, Shaikh, Kulkarni, & Tak, 2015)
	Sementes	Metanol	

Segundo Jaiwal *et al* 2015, o extrato de *M. senegalensis* pode ser uma potencial fonte de antioxidantes naturais que pode ter grande importância como agente terapêutico na prevenção de doenças degenerativas associadas ao envelhecimento e idade, relacionada ao stress oxidativo.

1.7. Atividades Antioxidantes

1.7.1. Radicais livres

Para Penna *et al.*, 2009, citado por (Fernando, 2013), um radical livre é um íão, átomo ou molécula capaz de existência independente e que apresenta na sua estrutura química um ou mais eletrões desemparelhados numa orbital atômica ou molecular. A sua química é muito diferente da química de eletrões emparelhados e de espécies deficiente em eletrões, como carbocatiões e carbenos. Um radical comporta-se como um eletrófilo, uma vez que requer apenas um único eletrão para completar o seu octeto (Sarker & Nahar, 2007). Os radicais podem ser formados por perda de um eletrão ou por quebra de uma ligação formada por partilha de eletrões, em que um eletrão do par de ligação permanece em cada átomo. Este processo é conhecido como quebra homolítica da ligação covalente e a energia necessária para dissociar ligações covalentes pode ser disponibilizada pelo calor, radiação ultravioleta ou radiação ionizante (Halliwell & Gutteridge, 2015).

Uma das famílias de radicais livres mais reativos são as espécies reativas de oxigénio (ROS), que podem atuar como oxidantes ou redutores, dependendo da natureza da espécie alvo. O termo ROS inclui não só os radicais de oxigénio, mas também alguns derivados de oxigénio não radicalares que podem originar radicais tais como, o peróxido de hidrogénio (H_2O_2), ácido hipocloroso (HOCl) e o ozono (O_3). Também foram identificadas espécies reativas de nitrogénio, cloro, bromo e enxofre (Gomes, Fernandes, & Lima, 2005).

Os ROS podem causar um grande número de desordens celulares ao reagir com lípidos, proteínas, carboidratos e ácidos nucleicos. Estas espécies estão envolvidas tanto no processo de envelhecimento, como também em muitas complicações biológicas, incluindo inflamação crónica, problemas respiratórios, doenças neurodegenerativas, *Diabetes mellitus*, aterosclerose, doenças auto-imunes das glândulas endócrinas, carcinogénese e mutagénese (Gyamfi, Yonamine, & Aniya, 1999).

Um desequilíbrio entre a formação e remoção de radicais livres pode levar a uma condição patológica chamada stress oxidativo. O stress oxidativo é causado por dietas antioxidantes deficientes ou pelo aumento da produção de espécies reativas de oxigénio por toxinas ambientais, como as causadas pelo tabagismo ou pela ativação inadequada de fagócitos, como a doença inflamatória crónica. (Halliwell, 1997).

Quando um radical livre reage com um composto não radicalar forma-se um novo radical e nesta situação podem ocorrer reações em cadeia que podem ter efeitos nefastos sobre biomoléculas ou estruturas como, por exemplo, as membranas celulares (Laguerre, Lecomte, & Villeneuve, 2007). No entanto, o corpo humano emprega moléculas conhecidas como antioxidantes para neutralizar esses radicais livres (Susinjan, 2015), que podem ser de origem exógena ou endógena funcionando de forma interativa e sinérgica, como:

- ✓ Antioxidantes derivados de nutrientes, como o ácido ascórbico (vitamina C), tocoferóis e tocotrienóis (vitamina E), carotenoides e outros compostos de baixo peso molecular, como a glutathione e o ácido lipóico;
- ✓ Antioxidantes enzimáticos como a superóxido dismutase, glutathione peroxidase e glutathione redutase, que catalisam reações de quebra de radicais livres;
- ✓ Proteínas de ligação a metais, como ferritina, lactoferrina, albumina e ceruloplasmina, que retiram o ferro livre e íons cobre que são capazes de catalisar reações oxidativas;
- ✓ Numerosos outros fitonutrientes antioxidantes presentes em uma ampla variedade de alimentos vegetais (Kumar, 2014).

1.7.2. Antioxidantes

A oxidação é uma reação química que ocorre com transferência de elétrons de uma substância para um agente oxidante. Essas reações podem produzir radicais livres, que por sua vez, podem iniciar reações em cadeia que danificam as células. Os antioxidantes terminam essas reações em cadeia removendo intermediários de radicais livres e inibindo outras reações de oxidação (Mishara & Bishet, 2011). Assim pode-se dizer que um antioxidante é um composto capaz de retardar a oxidação de um material oxidável, mesmo quando usado em quantidade muito menores que 1%, (geralmente 1-1000 mg / L) em comparação com a quantidade de material que eles têm para proteger (Amorali, Foli, & Valgimigli, 2013). Os antioxidantes bloqueiam a formação de radicais livres de diferentes maneiras e estabelecem importantes funções de controle em algumas doenças de stress oxidativo. (Allison, Cacabelos, Lombardi, Álvarez, & Vigo, 2001).

Em sistemas biológicos, o antioxidante é qualquer substância que, se apresente em baixa concentração quando comparada com a de um substrato oxidável, que pode atrasar significativamente ou prevenir a oxidação desse substrato (Halliwell, 1990).

Concentrando-se em processos de relevância em sistemas biológicos ou em ciência alimentar, os materiais a serem protegidos são mais comumente lípidos, proteínas, carboidratos e, em menor medida, outras moléculas orgânicas que compõem tecidos animais ou vegetais. A sua oxidação ocorre por uma reação em cadeia radical mediada por radicais de peróxido (ROO·) (Valgimigli & Pratt, 2012).

É prática comum nos estudos de compostos naturais identificarem antioxidantes como "moléculas capazes de reagir com radicais" ou proporcionadas de potência redutora para neutralizar o stress oxidativo causado por radicais (Amorali, Foli, & Valgimigli, 2013).

As plantas medicinais são uma das principais fontes de antioxidantes, que incluem carotenoides, vitaminas, fenóis, flavonoides, glutathiona dietética e metabolitos endógenos. Os antioxidantes derivados de plantas demonstraram funcionar como eliminadores de oxigénio singleto e triplo, eliminadores de radicais livres, decompositores de peróxido, inibidores de enzimas e sinergistas (Gawandi, *et al.*, 2001)

Os antioxidantes naturais aumentam a capacidade dos antioxidantes do plasma e reduzem o risco de certas doenças como cancro, doenças cardíacas e acidentes vasculares cerebrais. Os metabolitos secundários como os fenólicos e flavonoides de plantas são potentes eliminadores de radicais livres. Eles são encontrados em todas as partes de plantas como folhas, frutas, sementes, raízes e cascas. Na natureza, existe uma grande variedade de antioxidantes naturais que são diferentes na composição, propriedades físicas e químicas, mecanismo e local de ação (Kumar, 2014).

Vários métodos são usados para investigar a propriedades antioxidante das amostras, sejam elas, de dietas, extratos de plantas, antioxidantes comerciais, entre outros (Alam, Bristi, & Rafiquzzamam, 2012).

São conhecidos diversos métodos para avaliar a atividade antioxidante, tanto *in vitro* como *in vivo*. Alam *et al*, 2012, apresentam um resumo de conjuntos de diferentes métodos para avaliar a atividades antioxidantes *in vitro* e *in vivo*, bem como os solventes mais utilizados (Alam, Bristi, & Rafiquzzamam, 2012). Conforme os gráficos:

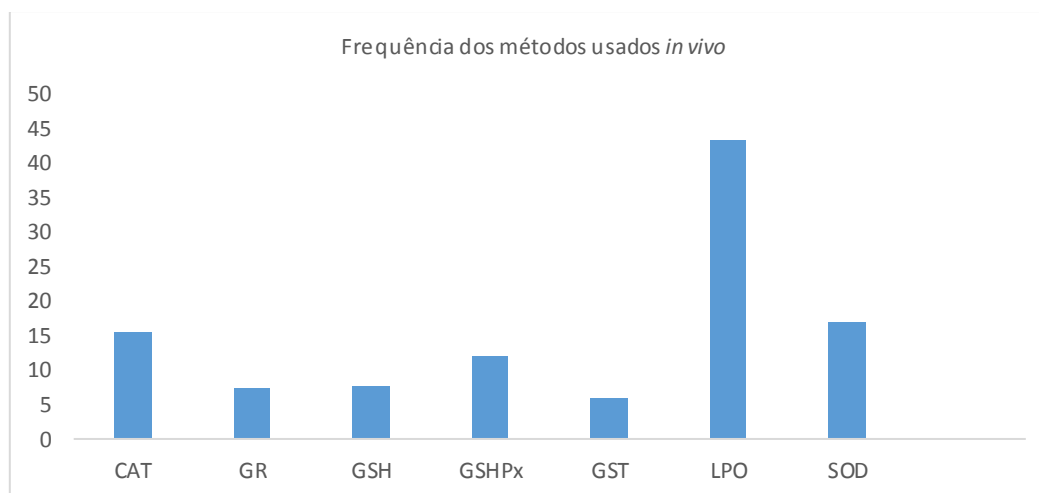


Gráfico 1.1: Frequência dos métodos usados *in vivo* para avaliar atividades antioxidantes (Adaptado de Alan *et al*, 2012).

Do gráfico 1.1 pode realçar-se que os métodos *in vivo* mais usados para atividade antioxidante são o ensaio de peroxidação lipídica (LPO), o método de superóxido dismutase (SOD), a catalase e a estimativa de glutatona reduzida (GSHPx).

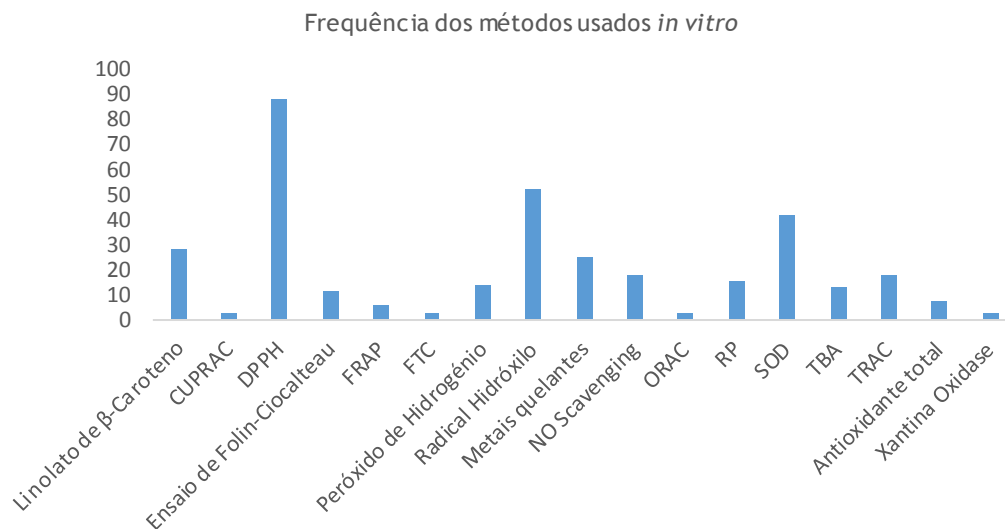


Gráfico 1.2: Frequência dos métodos usados *in vitro* para atividades antioxidantes (Adaptado de Alan *et al* 2012).

Do gráfico 1.2 pode-se realçar que os métodos *in vitro* mais usados para atividade antioxidante são o 1,1-difenil-2-picrilidrazilo (DPPH), eliminação de radicais livres, o método de Superóxido dismutase e linoleato de β-caroteno.

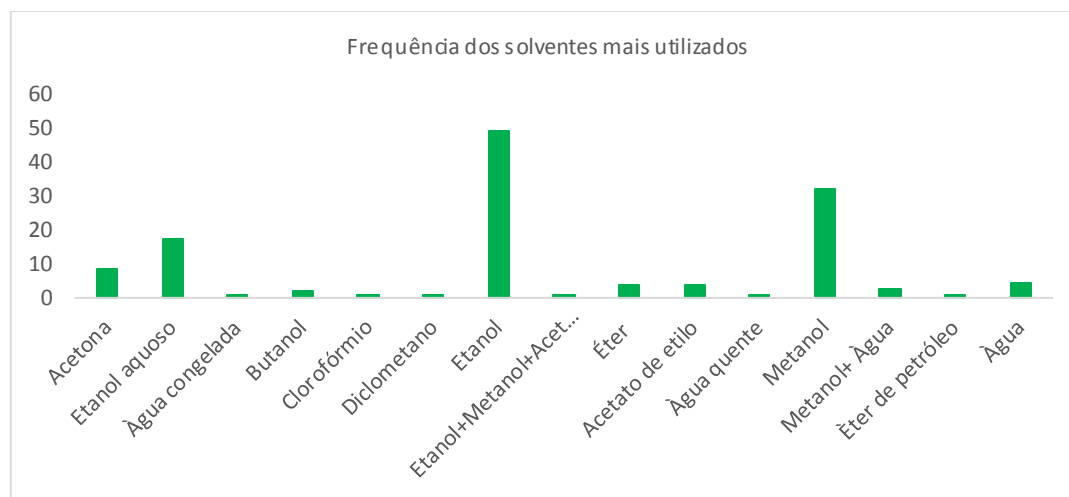


Gráfico 1.3: Frequência dos solventes mais utilizados para avaliar atividades antioxidantes (adaptado de Alan *et al* 2012).

Do gráfico 1.3, pode-se realçar que os solventes mais utilizados para avaliar a atividade antioxidante são o etanol, a água, o metanol e o etanol aquoso.

1.7.3. Determinação da atividade antioxidante pelo método do DPPH

É importante selecionar e empregar um método estável e rápido para ensaiar a atividade antioxidante, pois a determinação de muitas amostras é demorada. Vários métodos foram desenvolvidos para avaliar a capacidade de eliminação de radicais livres e a atividade antioxidante total de extratos de plantas. O método mais comum e confiável envolve a determinação do desaparecimento de radicais livres usando um espectrofotômetro (Abdel-Hameed, 2008).

A molécula de 1,1-difenil-2-picrilidrazilo ou α,α -difenil- β -picrilidrazilo (DPPH) é caracterizada como um radical livre estável em virtude da deslocalização do elétron sobressalente sobre a molécula como um todo, de modo a que a molécula não dimerize, como aconteceria com a maioria dos outros radicais livres. A deslocalização do elétron também dá origem à cor violeta profunda, caracterizada por uma banda de absorção no Ultravioleta-Visível (UV-Visível), em solução de etanol centrada a um comprimento de onda de 517 nm (Alam, Bristi, & Rafiquzzamam, 2012).

Quando uma solução de DPPH é misturada com a de um substrato (AH) que pode doar um átomo de hidrogénio, isso dá origem à forma reduzida com a perda da cor violeta (Alam, Bristi, & Rafiquzzamam, 2012). A equação da reação é representada abaixo.

Figura 1.6: Reação do DPPH com um substrato, representando alteração da cor da solução.

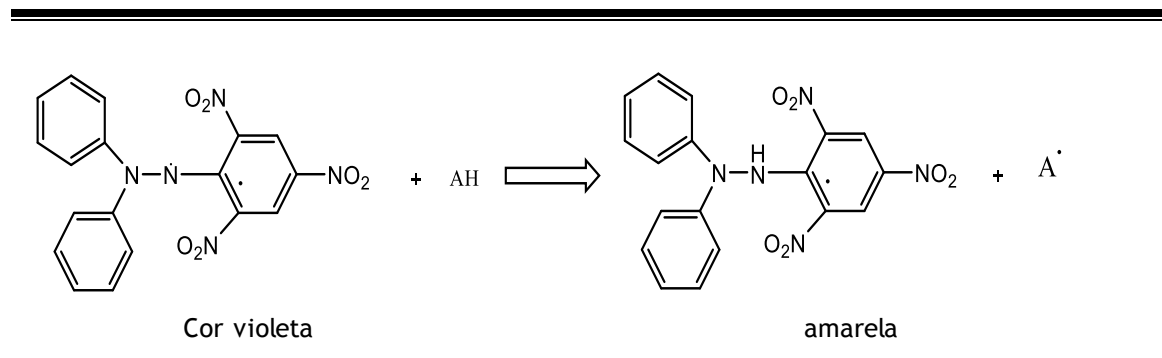
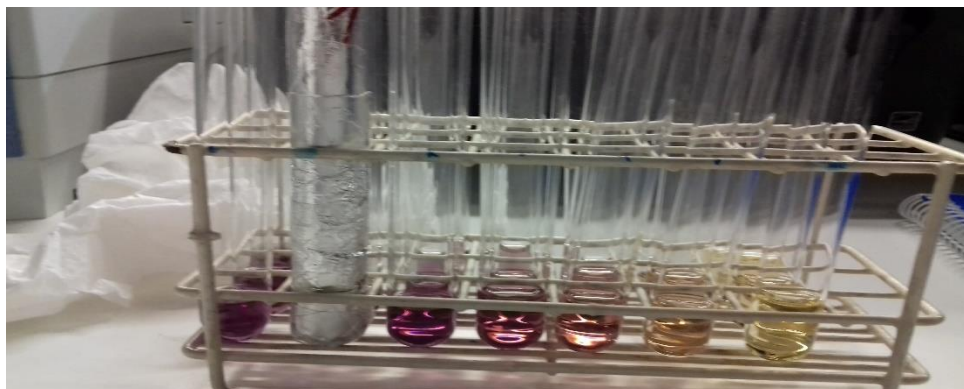


Figura 1.6.1. Amostra submetida a reação com o DPPH, mudança da coloração (tirada por Selúa,2018).



À medida que o eletrão desemparelhado do DPPH fica emparelhado na presença de um eliminador de radicais livres, a absorção desaparece e observa-se a mudança da coloração da solução original de violeta intensa para amarela, proporcional à concentração da substância com potencial antioxidante presente, em conformidade com a lei de Lambert e Beer, podendo ser medida espectrometricamente a $\lambda = 517 \text{ nm}$ (Blois, 1958), citado por (Andrade, *et al.*, 2007). Esta descoloração resultante é estequiométrica em relação ao número de eletrões retomados (Cotelle, *et al.*, 1995). Pode-se considerar como uma medida da capacidade redutora que por exemplo em alguns extratos podem ser observados nos flavonoides e permite avaliar a sua atividade antioxidante.

O ensaio de DPPH é um método potencial para avaliar a capacidade de eliminação de radicais livres de uma molécula antioxidante, considerado como um dos métodos colorimétricos padrão e fácil, para a avaliação de propriedades antioxidantes de compostos puros (Mishra, Ojha, & Chaudhury, 2012).

É importante frisar que o número de grupos hidroxilo fenólicos não é sempre o único fator que determina a atividade antioxidante de um composto. Vários estudos sugerem que a atividade e estrutura-antioxidante para os compostos de flavonoides e ácidos fenólicos depende da posição dos grupos hidroxilo fenólicos, presença de outros grupos funcionais em toda a molécula, tais como ligações duplas e sua conjugação com grupos hidroxilo e grupos cetónicos (Silva, *et al.*, 2002).

O método do DPPH foi introduzido por Marsden Blois (1958), no estudo realizado na Universidade de Stanford e foi usada a cisteína como modelo de antioxidante. Blois apresentou o mecanismo onde o radical DPPH foi representado por $Z\cdot$ e a molécula de cisteína por RSH (Sagar & Singh, 2011), conforme a equação abaixo:



1.7.4. Importância dos antioxidantes para o corpo humano

Os antioxidantes desempenham um papel muito importante no sistema de defesa do corpo contra as ROS, que são os subprodutos prejudiciais gerados durante a respiração aeróbica celular normal. O aumento da ingestão de antioxidantes na dieta pode ajudar a manter um estado antioxidante adequado e, proporcionar a função fisiológica normal de um sistema vivo. Para proteger as células e os sistemas de órgãos do corpo contra espécies reativas de oxigénio, os seres humanos desenvolveram um sistema altamente sofisticado e complexo de proteção antioxidante (Kumar, 2014).

Capítulo 2. Descrição experimental

2.1. Recolha da planta

As folhas de *Maytenus senegalensis* foram recolhidas na comuna do Chivinguiro, município da Humpata, província da Huila-Angola no dia 26 de agosto de 2017 (Ms₁) e no dia 4 de setembro de 2017 (Ms₂) com o auxílio do Professor Francisco Mayato, Herbanário do Instituto Superior de Ciências da Educação do Lubango-ISCED. Após a recolha as folhas foram secas à sombra e à temperatura ambiente, numa das salas do Herbário desta Instituição de Ensino.

2.2. Materiais e reagentes

2.2.1. Equipamentos

Na realização do trabalho experimental para além dos materiais básicos de laboratório foram utilizados os seguintes equipamentos:

- ✓ **Destilador de Solvente:** utilizado para destilar o hexano comercial em hexano puro, para ser utilizado como solvente na cromatografia de coluna e não só.
- ✓ **Espetros de Infravermelho (IV):** cuja as leituras foram realizadas num espectrofotómetro Thermo Scientific, modelo Nicolet IS 10. As amostras foram colocadas sobre o diamante, previamente limpo com isopropanol. O espetro foi realizado utilizando o software OMNIC.
- ✓ **Espetros de ressonância magnética nuclear de protão (¹H-RMN) e carbono (¹³C-RMN):** realizaram-se num espectrofotómetro Bruker Avant 400, a 400MHZ e 100MHZ, respectivamente. Os desvios químicos (δ) são expressos em partes por milhão (ppm) e as constantes de acoplamento (J) em Hertz. O solvente usado foi o clorofórmio deuterado (CDCl₃), sendo que o pico residual do solvente deuterado para ¹H é a 7,26 ppm e para o ¹³C é a 77,2 ppm.
- ✓ **Massa de alta resolução:** Espectrómetro de tempo-quadruplo de voo da Applied Biosystems QSTAR XL. A técnica de ionização é por eletrospray. As amostras introduzidas são dissolvidas em metanol, utilizando uma voltagem de ionização de 4500 volts.

2.2.2. Reagentes e Solventes

Na tabela 2.1 são apresentados os reagentes e solventes utilizados durante o processo de extração, purificação e identificação dos compostos isolados dos extratos de hexano, acetona e etanol bem como na análise das atividades antioxidantes dos extratos brutos das folhas de *Maytenus senegalensis* em diferentes solventes.

Tabela 2.1: Reagentes e solventes utilizados no processo de extração, purificação e identificação dos compostos.

Solventes ou Reagentes	Pureza %	Fornecedor
Hexano (Hex)	99,9	Valente e ribeira Lda
Acetona	99,7	Absolve
Etanol (EtOH)	99,98	Fisher Chemical
Diclorometano	99,9	Fluka-Riedel Haen
Metanol (MeOH)	100	José Manuel dos Santos LDA
Acetato de etilo (AcOEt)	99,97	Fisher Chemical
Clorofórmio deuterado	99,0	Carlo Erba
2,2-difenil-1-picrilhidrazina	-----	Sigma Aldrich
Permanganato de potássio	-----	-----

2.3. Preparação dos extratos das folhas de *M. senegalensis*

Nesta pesquisa foram utilizadas como matéria de partida 383 g e 863 g de folhas de *M. senegalensis*, da primeira e segunda recolha respectivamente, conforme detalhada na tabela 2.

Tabela 2.2: descrição de massa de partidas e massa obtidas em diferentes extratos.

	MS ₁	MS ₂
Massa de Partida	383g	863g
Massa de Extrato em <i>n</i> -hexano	9,110g	21,354g
Massa de Extrato em Acetona	9,701	21,239g
Massa de Extrato em Etanol	37,050g	49,602g + 47,510g
Massa total de extratos	55,861 (14,585 %)	139,705 (16,188 %)

A extração dos metabolitos secundários ativos das folhas de *M. senegalensis* foi realizada sequencialmente em diferentes solventes, polares e não polares, como o *n*-hexano, acetona, etanol, metanol, acetato de etilo e clorofórmio, tanto a quente (extrato de *n*-hexano) como a frio (extratos de acetona e etanol) em diferentes tempos e temperaturas, conforme as extrações efetuadas por Jaiwal *et al*, 2015. Os sobrenadantes foram recolhidos e os solventes de cada extrato removidos utilizando o evaporador rotativo a vácuo de acordo as propriedades de cada solvente como a temperatura e pressão equivalente. Os resíduos obtidos foram coletados em balões de 100 ml e conservados na *hotte*, para a evaporação efetiva dos solventes.



Figura 2.1: Imagem do sistema de extração com Soxhlet das folhas de MS, em *n*-hexano a quente

2.3.1. Purificação dos extratos por cromatografia de coluna *flash* e por CCF

A cromatografia é um dos meios mais úteis para separar misturas de compostos, como uma técnica para purificar os componentes e identificá-los. Na cromatografia, a mistura é separada pela distribuição diferencial dos componentes entre uma fase estacionária e uma fase móvel (Cseke, *et al.* 2006). Os métodos primários de cromatografia em isolamento e análise de produtos naturais utilizados para purificação dos extratos das folhas de *M. senegalensis* foram a cromatografia em coluna *flash* (CCf) e a cromatografia de camada fina (CCF).

A cromatografia em coluna é um método de purificação mais frequentemente usada para a separação de componentes em escala preparativa a partir de um extrato bruto da planta.

Para a separação dos extratos brutos foram preparadas cromatografias de coluna, com uma quantidade de sílica calculada a partir de uma fórmula. O extrato bruto a ser separado foi adicionado ao topo da coluna, com um pouco de *n*-hexano e em seguida adiciona-se mais um pouco de sílica. Os solventes adequados ou mistura de solventes, como o hexano, acetato de etilo e metanol são adicionados por proporção, aumentando a polaridade, começando com *n*-

hexano/acetato de etilo em 98/2, 95/5, 90/10, 80/20, 70/30, 60/40, 50/50 e 100% acetato de etilo que flui através da coluna, eluindo os vários componentes puros ou misturas que são recolhidos para balões de 100ml cujo solvente é evaporado até à secura.

Após a separação dos compostos em cromatografia de coluna *flash*, para cada extrato bruto foi realizada uma CCF (folha de alumínio revestida com sílica), utilizando o diclorometano como solvente pela sua capacidade de dissolver facilmente os extratos. A composição da fase móvel utilizada foi escolhida de acordo com a polaridade do qual os compostos, avaliada pelo solvente d qual eluíram na cromatografia em coluna *flash*. Os solventes utilizados foram o *n*-hexano e o acetato de etilo, em diferentes gradientes, para verificar se era um composto puro ou uma mistura.

Algumas gotas da solução da amostra a ser analisada são aplicados sobre a placa como um pequeno ponto isolado perto de uma extremidade da mesma usando um tubo microcapilar conforme descrito por Cseke, *et al.* 2006 (Cseke, *et al.* 2006). A polaridade inicial foi de 9/1 aumentando as proporções até atingir 10 ml de acetato de etilo, objetivando o aumento da polaridade. As amostras foram aplicadas em CCF com o capilar.

Em seguida a placa de CCF foi observada sob luz UV para visualização dos compostos resolvidos e posteriormente foi revelada através da pulverização com uma solução aquosa de permanganato de potássio a 4%, seguida de aquecimento a 98 °C durante alguns minutos. Finalmente juntou-se as diferentes frações com nível de eluição idênticas.

2.3.1.1. Cromatografia de coluna *flash* da fração Ms₁-Hex

Na fração do extrato de *n*-hexano a quente (3,857g), foram colocados 3,000 g numa coluna de sílica gel e eluídos, primeiro com hexano, de seguida com misturas de hexano (Hex) /acetato de etilo (AcOEt) e finalmente com acetato de etilo /metanol conforme o aumento da polaridade (tabela 2.3A, em Anexo). As frações com peso suficiente foram analisadas por técnicas espectroscópicas de RMN conforme apresentado na tabela 2.3.

Tabela 2.3: Descrição das frações cromatográficas dos extratos de hexano obtidos das folhas de *Msi* parte solúvel em metanol, com peso suficiente para RMN.

Nº	Frações com Produtos	Peso dos Produto (g)	Peso dos Produto (mg)	%	Polaridade Hex/AcOEt
1	1	0,017	17	0,566	9:1
2	26- 28	0,164	164	5,465	//
4	30-37	0,074	74	2.456	//
5	38	0,453	453	15.095	//
6	39	0,837	837	27,89	//
7	40	0,207	207	6,897	8:2
8	41	0,107	107	3.565	//
9	42-45	0,139	139	4,63	//
10	46	0,020	20	0,666	//
11	47	0,015	15	0,50	//
12	48-53	0,145	145	4,83	7:3
15	56-59	0,011	11	0,366	//
18	62-64	0,038	38	1,266	//
20	71-74	0,062	62	2,06	//
22	76-80	0,062	62	2.06	//
24	85-86	0,0283	28,3	0,94	//
25	87-88	0,0118	11,8	0,39	//
26	89-90	0,095	95	3,166	//
27	91-101	0,248	248	8,264	5:5
28	102	0,224	224	7,464	//
29	103-104	0,021	21	0,70	//
30	105	0,015	15	0,50	//
31	106-107	0,0100	10	0,333	//
33	109-112	0,012	12	0,40	//
Total		3,0161	3016,1		

2.3.1.2. Cromatografia de coluna *flash* da fração Ms₂-Hex

Na fração do extrato de *n*-hexano a quente (11,516g), foram colocados 4,000 g numa coluna de sílica gel e eluídos, primeiro com hexano, de seguida com misturas de hexano (Hex) /acetato de etilo (AcOEt) e finalmente com acetato de etilo /metanol conforme o aumento da polaridade, obtendo os resultados de acordo com a tabela 2.4A, em anexo. Em seguida as frações com peso suficiente foram analisadas por técnicas espectroscópicas de RMN conforme a tabela 2.4.

Tabela 2.4: Descrição das frações cromatográficas dos extratos de hexano obtidos das folhas de *Ms₂* parte solúvel em metanol, com peso suficiente para RMN.

Nº	Frações com Produtos	Peso dos Produtos (g)	Peso dos produtos (mg)	%	Polaridade Hex/AcOET
1	1-2	0,0216	21,6	0,553	9:1
2	40	0,033	3,3	0,084	8:2
3	41	0,2526	252,6	6,469	//
4	42	0,3272	327,2	8,379	//
5	43	1,4697	1.469,7	37,64	//
6	44	0,5524	552,4	14,146	//
7	45	0,2443	244,3	6,256	7:3
8	46-47	0,1734	173,4	4,44	//
9	48	0,0404	40,4	1,035	//
10	49-51	0,0707	70,7	1,810	//
11	52-56	0,0714	71,4	1,828	//
12	57-65	0,022	22	0,563	6:4
13	66-71	0,0296	29,6	0,758	//
14	72-75	0,0218	21,8	0,558	//
15	76-81	0,044	44	1,127	//
16	82-83	0,019	19	0,486	//
17	84-88	0,034	34	0,87	5:5
18	89	0,0163	16,3	0,417	//
19	90-92	0,0563	56,3	1,434	//
21	97-99	0,0197	19,7	0,50	//
25	108	0,03	30	0,768	//
26	109-111	0,037	37	0,947	//

27	112-114	0,0107	10,7	0,274	100%
30	119	0.0489	48,9	1.15	//
37	133-135	0,2208	220,8	5,65	//
Total		3,8371	3837,1	95,93	

2.3.1.3. Cromatografia de coluna da fracção nº7 de C₁Ms₁-Hex

Na cromatografia efetuada do extrato de *n*-hexano a quente (MS₁), obteve-se uma mistura na fracção nº7 (200,7 g) que foi esterificada com diazometano, e posteriormente submetida a cromatografia em coluna, tendo sido obtidos os seguintes resultados conforme a tabela 2.5A, em anexo. Em seguida as frações com peso suficiente foram submetidas a técnicas espectroscópicas de RMN, conforme a tabela 2.5.

Tabela 2.5: descrição cromatográfica da fracção nº 7 da C₁Ms₁

Nº	Frações com Produtos	Peso dos Produtos (grama)	Peso dos produtos (mg)	%	Polaridade Hex/AcOEt
8	24	0,057	57	28,43	6:4
9	30	0,0085	8,5	4,239	6:4
10	31	0,0349	34,9	17.406	5:5
11	32	0.0454	45,4	22,64	AcOEt
13	34	0,0068	6,8	3.391	AcOEt
19	40	0,0046	4,6	2,294	AcOEt
	Total	1,572	157,2	78,4	

Preparação do Diazometano

O Diazometano foi preparado em solução de éter, em meio alcalino, utilizando como composto de partida uma nitrosamida, nomeadamente o *N*-metil-*N*-nitroso-*p*-toluenossulfonamida (Diazald) na presença de um álcool, conforme a figura 2.2. O mesmo deve ser preparado numa quantidade de uso imediato e caso não seja totalmente utilizado deve ser conservado sob refrigeração (W.Christie, 1993).

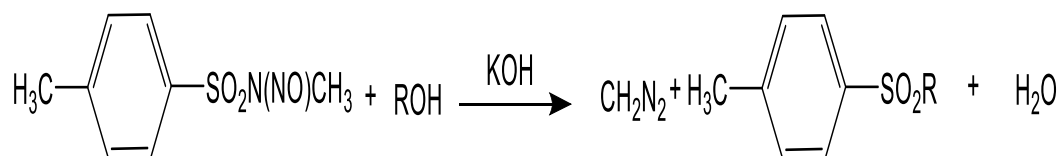


Figura 2.2: Preparação do Diazometano a partir de *N*-metil-*N*-nitroso-*p*-toluenossulfonamida.

2.4. Determinação das estruturas dos compostos isolados

Para determinar as estruturas dos compostos presentes nas diferentes frações obtidas por processos cromatográficos foram usadas técnicas espectroscópicas, tais como, a ressonância magnética nuclear (RMN), o infravermelho (IV) e a espectroscopia de massa. Sabe-se que as técnicas espectroscópicas consistem na passagem de radiação eletromagnética através de uma molécula orgânica que absorve parte da radiação e posteriormente é medida a quantidade de absorção desta radiação que produz um determinado espectro específico para certo tipo de ligações numa molécula (Altemimi, Lakhssassi, Baharlouei, Watson, & Lightfoot, 2017). A leitura deste espectro permite identificar a estrutura da molécula orgânica.

A **espectroscopia UV-visível** permitiu-nos analisar qualitativamente a estrutura da molécula orgânica, bem como identificar certas classes de compostos em misturas puras e biológicas, o que a torna muito útil para compostos naturais.

Pela absorção no infravermelho identificou-se diferentes tipos de ligações por frequências vibracionais, principalmente as ligações, C - C, C = C, C ≡ C, C - O, C = O, O - H e N - H, que são características de moléculas orgânicas, podendo ser identificadas pela deteção das bandas características de absorção de frequência no IV.

A **espectroscopia de RMN** está relacionada com as diferenças entre os vários núcleos magnéticos, principalmente o núcleo do átomo de hidrogénio (^1H) e o de carbono (isótopo ^{13}C), que nos permite uma imagem clara das posições desses átomos na molécula e da sua vizinhança.

Com auxílio da **espectroscopia de Massa** foi possível determinar com alta precisão a fórmula molecular do composto e saber o local onde a molécula foi fragmentada. Esta técnica está relacionada ao bombardeamento de moléculas orgânicas com eletrões ou laser transformando-os em iões carregados e pode ser apresentado em gráficos de abundância relativa de um ião fragmentado, relacionando a proporção de massa com a carga desses iões.

2.4.1. Caracterização dos compostos isolados nos extratos de *n*-hexano

Dos processos cromatográficos realizados nos extratos de hexano de Ms₁ e Ms₂ foi possível, através das técnicas espectroscópicas, identificar 6 compostos puros. Na tabela 2.6 são apresentados, detalhadamente, a fração ou frações onde foi identificado, a proporção de eluição, a numeração da análise de RMN, o peso (mg), o nome do composto e a família a que pertence, respetivamente.

Tabela 2.6: Caraterização dos compostos isolados nos extratos de *n*-hexano.

Nº	Tipo de Recolha	Fração /Frações	Polaridade Hex/AcOET	Nº/RMN	Peso (mg)	Nome dos compostos	Família de compostos
1	MS1	30-37	9:1	4	75	Friedelin	Terpenos
2	MS1	39	9:1	5	837	β-Amirina	Terpenos
3	MS1	40	8:2	7	207	β-Sitosterol	Esteroides
4	MS2	44	8:2	6	552,4	β-Amirina	Terpenos
5	MS2	46-47	7:3	8	173,4	Acido α-eleostearico	Acido
6	MS2	76-81	6:4	15	44	3-epi-Gloquidiol	Lupano

Nas imagens abaixo estão representados os compostos isolados dos extratos de hexano da espécie de *Maytenus senegalensis*.

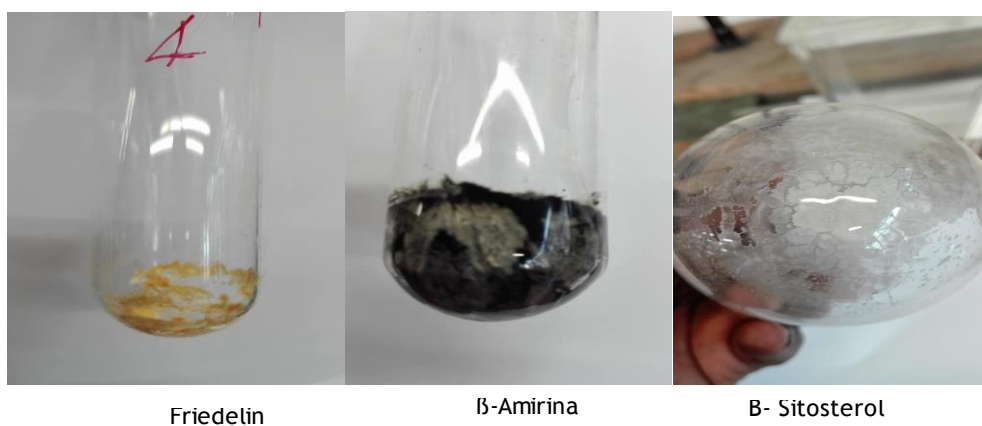


Figura 2.3: Imagem dos produtos isolados dos extratos de *n*-hexano para Ms₁.

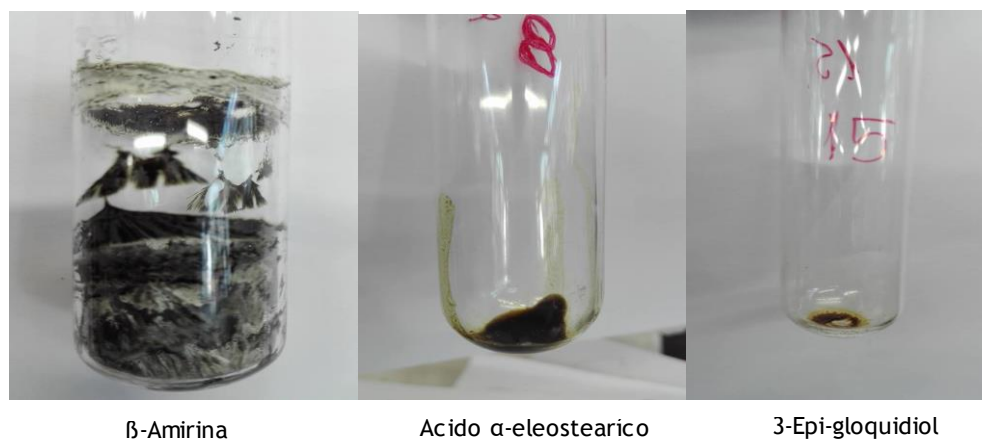


Figura 2.4: As imagens dos produtos isolados dos extratos de hexano de Ms₂ (fotografado por Elias Watengãla, maio de 2018).

2.5. Atividade antioxidante dos extratos de acetona e etanol

Para a avaliação da atividade antioxidante efetuada nos extratos de acetona e etanol das folhas *M. senegalensis* utilizou-se um dos métodos *in vitro* mais descrito, em diferentes bibliografias, para detectar a presença de compostos antioxidantes. Este é um método baseado na eliminação do radical livre estável 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH•) em solução metanólica.

Para o estudo foram pesados 0,062g de cada extrato bruto de acetona e de etanol dissolvido em metanol num balão de 25ml e foram também pesados 0,0197 g de DPPH diluído num balão de 250 ml como solução padrão. Da solução padrão de DPPH foram retirados 62,1 ml e 40 ml para preparar as outras duas soluções que foram diluídas em balões de 100ml.

Os testes foram realizados em triplicado e foram testadas as três soluções de DPPH com as concentrações de 0,2000mM, 0,1242mM e 0.0800mM conforme descrito por Scherer & Godoy,2009 (Rodrigo Scherer & Godoy , 2009).

Para as restantes amostras o procedimento é o seguinte:

- Num tubo de ensaio protegido da luz, colocou-se 0,1 mL de amostra e adicionou-se 3,9 mL de solução de DPPH, que foi agitado no vórtex;
- O controlo do ensaio foi constituído por 0,1 mL de metanol e 3,9 mL de solução de DPPH, colocado no vórtex para homogeneizar;
- Deixou-se reagir durante 90 minutos no escuro e à temperatura ambiente;
- A leitura das absorvências foi realizada a 517 nm contra um branco constituído apenas por metanol.

Para controlo positivo utilizam-se compostos antioxidantes como padrão, como por exemplo, a rutina, o trolox e o ácido gálico com as seguintes concentrações:

- Concentrações das soluções de rutina: 50, 100, 200, 300, 400 e 500 mg/mL.
- Concentrações das soluções de trolox: 5, 10, 25, 50, 75 e 100 mg/mL.
- Concentrações das soluções de ácido gálico: 10, 25, 50, 75, 100 e 150 mg/mL.
- O procedimento experimental é igual para os padrões e para as amostras.

2.5.1.1. Determinação da absorvência das amostras

A absorvência das células com as amostras, o branco e a solução de DPPH foi medida a 517nm, num intervalo de 15 minutos, aproximadamente. Posteriormente os resultados foram comparados com o padrão trolox de concentração igual a das amostras, bem como com as concentrações que fornecem 50% de inibição. Após a determinação das absorvências calculou-se a percentagem de inibição (% I) com base na fórmula seguinte:

$$\% I = \frac{Abs_0 - Abs_1}{Abs_0} \times 100$$

Onde Abs_0 é a absorvência do controlo aos 90 minutos e Abs_1 é a absorvência da amostra aos 90 minutos.

A concentração que fornece 50% de inibição (IC_{50}) é calculada a partir da linearidade obtida na representação gráfica da % I em função da concentração de amostra na célula do espectrofotómetro. Pela reta de calibração obtém-se a concentração de DPPH no controlo aos 90 minutos e a partir desta e do IC_{50} é calculado o AAI (Índice de atividade antioxidante) conforme descrito por Scherer & Godoy, (Scherer & Godoy, 2009), com a seguinte fórmula:

$$AAI = \frac{[DPPH \text{ no controlo aos 90 minutos}] (\mu\text{g/mL})}{IC_{50} (\mu\text{g/mL})}$$

O valor de AAI obtido permite classificar a atividade antioxidante do extrato de acordo com as categorias da tabela abaixo.

Tabela 2.7: Classificação de uma amostra quanto à sua atividade antioxidante.

Atividade Antioxidante	AAI
Pobre	$AAI < 0,5$
Moderada	$0,5 < AAI < 1,0$
Forte	$1,0 < AAI < 2,0$
Muito Forte	$AAI > 2,0$

Capítulo 3. Resultados e discussões

Neste capítulo são apresentados os resultados da caracterização fitoquímica dos compostos isolados dos extratos de hexano obtidos nas folhas de *Maytenus senegalensis* e da atividade antioxidante realizado nos extratos brutos de acetona e etanol, culminando com uma breve discussão destes resultados.

3.1. Caracterização fitoquímica dos extratos de hexano das folhas de *M. senegalensis*.

3.1.1. Compostos isolados no extrato de Ms₁

3.1.1.1. Friedelin

Na fração 4 da cromatografia do extrato de *n*-hexano foi isolado e purificado um composto sólido amarelado cujo espectro de RMN de ¹³C, indicou a presença de um composto com um total de 30 átomos de carbono. Foi possível com o auxílio do espectro de DEPT 90° e 135° identificar a presença de 8 grupos metilo, 11 grupos metileno, 4 grupos metino e um total de sete carbonos quaternários nos quais estão ligados os grupos metilo. O espectro de carbono-13 mostrou ainda um sinal a 213,3 ppm que pode ser atribuído a um carbono do grupo carbonilo de cetona e outros sinais característicos de carbonos saturados.

No infravermelho foi possível observar uma banda pouca intensa a 3483,61 cm⁻¹ característico da ligação carbono oxigênio, seguida por uma banda alongada desde 2925,85 cm⁻¹ a 2860,04 cm⁻¹, característica da absorção de alongamento da ligação dos grupos metileno e metilo, sem esquecer de destacar uma banda intensa de absorção de um grupo cetona (C=O) a aproximadamente 1715,19 cm⁻¹.

No espectro de RMN de ¹H (400 MHz; CDCl₃; ppm) foi possível observar vários sinais sobrepostos na região característica de átomos de hidrogênio alifáticos, como os dupletos a 2,36 - 1,22 (sinais sobrepostos) e os singletos a 1,18 (s, CH₃); 1,08 (s, CH₃); 1,03 (s, CH₃); 0,98 (s, CH₃); 0,94 (s, CH₃); 0,89 (s, CH₃); 0,88 (s, CH₃); e 0,76 (s, CH₃). Os valores obtidos foram cruzados com os dados da literatura (Viviane Gomes da Costa Abreu, Corrêa, Lagos, Silva, & Alcântara, 2013). Sendo idênticos ao RMN de ¹H dado para a Friedelin.

Tabela 3.1: Dados espectroscópicos de RMN de ^1H e ^{13}C do composto Ms₁-4 (Friedelin)

Nº de Carbonos	Tipo de carbonos	RMN de ^{13}C (CDCl ₃), δ	RMN de ^1H (CDCl ₃) δ
1	CH ₂	22,3	2,33 (dd, J= 2.5, 7.0,13.0) / 2,31 (dd, 5.0, 13.0)
2	CH ₂	41,5	2,63 (dd, 7.0, 13.0) / 2,41 (dd, J=2.5, 5.0)
3	C	213,3	-----
4	CH	58,2	2,40 (q)
5	C	42,2	-----
6	CH ₂	41,3	2,29/ 1.76 (dt, J=2.5, 5.0))
7	CH ₂	18,2	1,51(m)/1,04(m)
8	CH	53,1	1,28 (m)
9	C	37,4	-----
10	CH	59,5	2,14 (dd, J= 2.5, 12.5)
11	CH ₂	35,6	1,42 (m)
12	CH ₂	30,5	1,42 (m) / 1,42(m)
13	C	39,7	-----
14	C	38,3	-----
15	CH ₂	32,4	1,51 (m)
16	CH ₂	36,0	2,27 (m) / 1,58 (m)
17	C	30,0	-----
18	CH	42,8	2,19 (d, J=5,0)
19	CH ₂	35,3	1,21 (m) / 1,42 (m)
20	C	28,2	-----
21	CH ₂	32,8	1,57 (m) /0,92 (m)
22	CH ₂	39,3	1,58 (m)/1,51 (m)
23	CH ₃	6,8	0,90 (d, J=6,8)
24	CH ₃	14,7	0,76 (s)
25	CH ₃	18,0	0,89 (s)
26	CH ₃	20,3	1,03 (s)
27	CH ₃	18,7	1,04 (s)
28	CH ₃	32,1	1,08 (s)
29	CH ₃	35,0	0,98 (s)
30	CH ₃	31,8	0,92 (s)

Analisado os dados obtidos por infravermelho, RMN ^1H e ^{13}C (tabela 3.1) e dados de correlação bidimensional e comparadas com os dados presente na literatura (Oliveira *et al*,2012; Abreu *et al*,2013) foi possível confirmar que o composto isolado corresponde a Friedelin com fórmula estrutural apresentada na figura 7.

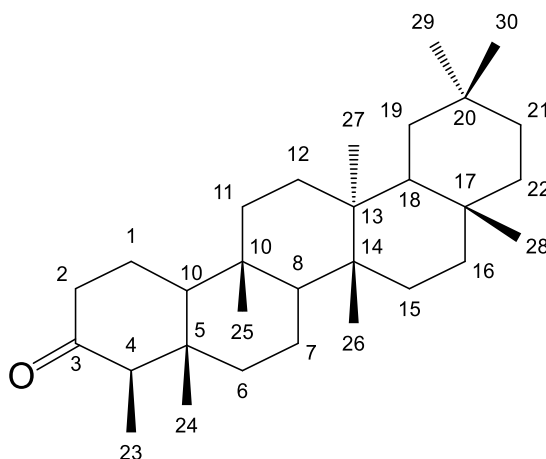


Figura 3.1: Fórmula estrutural da Friedelin

A Friedelin é um triterpeno já isolado em diversas espécies de plantas, como na casca e folhas da *Eschweilera longipes* Miers (Carvalho *et al*,1998), na casca do caule de *Sacoglotties uchi* (Abreu *et al*,2013),bem como em diferentes espécies de *Maytenus*, de destacar a sua identificação nas folhas de *Maytenus robusta* (Sousa *et al*.2012).

3.1.1.2. β -Amirina

Na fração C₁-Ms₁-5 foi possível obter um sólido esverdeado cujo espectro de infravermelho apresentou bandas de absorção características do alongamento do grupo OH a 3281,23 cm^{-1} , a alongamentos de CH, a aproximadamente 2924,58 cm^{-1} e 2853,83 cm^{-1} , a um alongamento correspondente à ligação C-O a 1096,81 cm^{-1} , e à deformação dos grupos metileno a 1455,28 cm^{-1} e 1379,28 cm^{-1} , e a uma banda de deformação a 1660,10 cm^{-1} correspondente à ligação C=C, do ciclohexano.

O espectro de RMN de ^{13}C apresentou trinta (30) sinais de carbono principais reconhecíveis, nomeadamente: oito grupos metilo que correspondem aos C-22 até C-30, um carbono secundário portador do grupo hidroxilo a um δ 79,0 ppm (C-3), mostrou também sinais reconhecíveis em δ 122 ppm e 145,2 ppm correspondentes à ligação dupla localizada nos C-12 e C-13, além disso, foram observados dez grupos metileno, cinco grupos metino e sete átomos de carbonos quaternários (Ogwuche C. E, Amupitan, Ndukwel, & Ayo, 2014).

No espectro de RMN ^1H foram observados sinais a δ 5,35 ppm e 5,17 ppm, atribuídos ao átomo de hidrogénio do grupo metino da dupla ligação do ciclohexano e a um metileno próximo da dupla ligação, sendo os dois tripletos. Foi também identificado um sinal a δ 3,23 ppm correspondente ao átomo de hidrogénio geminal sobre o átomo de carbono do grupo hidroxilo. Este espectro apresentou ainda oitos sinais de grupos metilo singletos a δ 1,24 ppm; 1,12 ppm; 0,98 ppm; 0,95 ppm; 0,92 ppm; 0,87 ppm; 0,82 ppm e 0,77 ppm que correspondem aos protões H-27, H-28, H-26, H-24, H-29, H-30, H-23 e H-25, respetivamente, (Vázquez, Palazon, & Ocaña, 2012).

Tabela 3.2: Dados espectroscópicos de RMN de ^{13}C e ^1H do composto Ms₁-5

Nº de Carbonos	Tipos de carbono	RMN de ^{13}C (CDCl ₃), δ	RMN de ^1H (CDCl ₃) δ
1	CH ₂	38,7	2,04 (d, J=11.5 Hz), e 2,29 (m)
2	CH ₂	27,2	1,61 (m)
3	CH	79,0	3,23(dd, J=4.4, 10.8 Hz)
4	C	38,6	-----
5	CH	55,2	2,32 (m)
6	CH ₂	18,4	1,59 (q)
7	CH ₂	32,5	1,67 (d)
8	C	39,8	----
9	CH	47,6	2,31 (t)
10	C	36,9	----
11	CH ₂	23,5	5,34(m)
12	CH	121,5	5,17(t, J=3.2)
13	C	145,2	----
14	C	41,7	----
15	CH ₂	26,9	2,32 (td, J= 4.0)
16	CH ₂	26,2	2,03 (dt, J= 4.3)
17	C	32,6	----
18	CH	47,2	5,11(t)
19	CH ₂	46,8	1,84 (dd)
20	C	31,1	----
21	CH ₂	32,6	1,61 (m)
22	CH ₂	37,1	
23	CH ₃	28,1	0,82 (s)
24	CH ₃	15,6	0,95 (s)

25	CH ₃	15,5	0,77 (s)
26	CH ₃	16,8	0,98 (s)
27	CH ₃	26,0	1,24 (s)
28	CH ₃	28,4	1,12 (s)
29	CH ₃	33,3	0,92 (s)
30	CH ₃	23,7	0,87 (s)

Dos dados obtidos por infravermelho, RMN ¹H e ¹³C (tabela 12), associados aos DEPT 90 e 135, bem como um conjunto de informação das diversas fontes da literatura (Okoye *et al*, 2014; Ogweiche *et al*, 2014; Hossain and Ismail, 2010; S. Negi *et al*, 2013) foi possível confirmar que o composto identificado é um triterpeno denominado 3β-Hidroxi-olean-12-en-3-ol, mais conhecido por β-amirina, cuja fórmula estrutural é apresentada na figura 3.2.

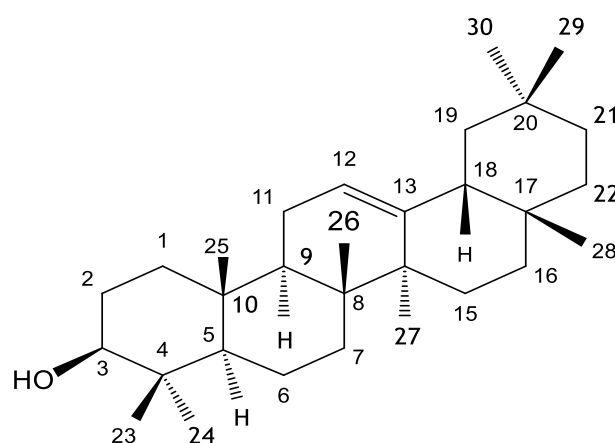


Figura 3.2: Fórmula Estrutural da β-Amirina

Este composto é um dos triterpenos frequentemente mais isolados em espécies do género *Maytenus*, destacando-se a sua identificação em *Maytenus senegalensis* tanto nas folhas (Okoye *et al* 2015) como na raiz (Sosa *et al*, 2007). Foi também isolado em diferentes espécies de planta como nos extratos de metanol extraído a quente em Soxhlet das folhas de *Orthasiphom Stamineus* (Hossain & Ismail, 2010) e nas folhas de *Echinops cornigerus* (Negi, *et al.*, 2013), entre outros.

Em Angola não existem informações publicadas de estudo de *Maytenus senegalensis* que indicaram o isolamento deste composto nas folhas.

3.1.1.3. β -Sitosterol

Da fração 31-32 de C₁-Ms₁-7, foi possível isolar um sólido cristalino branco, cuja análise espectroscópica de Infravermelho permitiu observar a existências de bandas de absorção a 3331,36 cm⁻¹ característica do alongamento O-H, a 2940,7 cm⁻¹ e 2867 cm⁻¹ devido a alongamento alifático, um sinal a 1016,52 cm⁻¹ característico de (C-O), a 1667 cm⁻¹ aparece um sinal característico do alongamento da dupla ligação. Outras frequências de absorção aparecem a 3838,47 cm⁻¹ devido à combinação de absorção, a 2353,23 cm⁻¹ devido ao harmônico da absorção e a 1269,2 cm⁻¹ que é uma frequência de curvatura para a parte cíclica (CH₂)_n. A frequência de absorção a 783,13 cm⁻¹ é característica dos cicloalcanos. A vibração fora do plano C-H da parte insaturada foi observada a 609,53 cm⁻¹ e essas frequências de absorção são semelhantes às frequências de absorção observadas para o β -sitosterol conforme os dados publicados por (Arjun *et al*, 2010).

O espectro de RMN de ¹³C, associado aos de DEPT 90° e 135° possibilitou a identificação de vinte e nove sinais dos átomos de carbono, dos quais seis corresponde a grupos metilo, onze a grupos metileno, nove a grupos metino (um olefínico e outro ligado ao grupo hidroxilo) e três carbonos quaternários (um dos quais olefínico) com desvios químicos a δ 140,8 ppm; 42,3 ppm e 36,5 ppm atribuídos aos C-5, C-13 e C-10 e ainda um metino olefínico a δ 121,7 ppm (C-6). A um desvio químico de δ 71,81 ppm encontra-se um sinal de um metino bastante desblindado devido à presença de um grupo hidroxilo sobre este carbono (C-3).

Pelo espectro de correlação direta C-H (HSQC) verifica-se a correlação entre o sinal de próton a 3,51 ppm e o sinal de ¹³C em relação ao C-3 (δ 71,8 ppm) e entre 5,35 ppm e o sinal do C-6 a um δ 121,7 ppm (Canelo, 2013).

No espectro de RMN de ¹H foi observado um desvio químico de δ 3,52 ppm, um multiplete correspondente ao próton H-3, e a desvio δ 5,35 ppm um multiplete característico do próton olefínico do H-6. Além disso observou-se seis prótons metílicos nos desvios químicos de δ 1,26 ppm; δ 1,24 ppm; δ 1,03 ppm; δ 1,00 ppm e 0,92 ppm (3H, Singletos, CH₃) correspondente aos H-19, H-18, H-26, H-27 e H-21 respectivamente (Rajput & Rajput, 2012).

Tabela 3.3: Dados espectroscópicos de RMN de ^1H e ^{13}C do composto $\text{Ms}_1\text{-7}$

Nº de Carbono	Tipos de carbono	RMN de ^{13}C (CDCl ₃), δ	RMN de ^1H (CDCl ₃) δ
1	CH ₂	37,3	1,28 (s)
2	CH ₂	31,7	1,49 (s)
3	CH	71,8	3,52 (m, J=11.0, 5.3, 4.0 Hz)
4	CH ₂	42,3	2,27 (m)
5	C	140,7	----
6	CH	121,7	5,35 (m, J= 5.4, 2.0 Hz)
7	CH ₂	34,0	2,17 (m)
8	CH	31,9	7,35(m)
9	CH	50,1	1,15(m)
10	C	36,5	----
11	CH ₂	21,1	1,66(m)
12	CH ₂	39,8	1,67 (m)
13	C	42,3	----
14	CH	45,8	0,93 (m)
15	CH ₂	24,3	1,86 (m)
16	CH ₂	28,3	1,84(m)
17	CH	56,1	1,28(m)
18	CH ₃	12,0	1,25 (m)
19	CH ₃	19,8	1,26 (s)
20	CH	36,2	1,49 (s)
21	CH ₃	18,8	0,92 (s)
22	CH ₂	31,7	0,83 (s)
23	CH ₂	28,1	0,80 (s)
24	CH	45,8	0,82(s)
25	CH	29,2	0,82 (s)
26	CH ₃	19,8	1,03 (s)
27	CH ₃	19,4	1,00 (s)
28	CH ₂	23,1	0,67 (s)
29	CH ₃	11,9	0,91 (t)

Com base nos dados de infravermelho, de RMN ^1H e ^{13}C , associados aos DEPT 90 e 135, bem como um conjunto de informação da literatura (Canelo, 2013; Rajput & Rajput, 2012 e Pierre & Moses, 2015) foi possível confirmar que o composto identificado é o Stigmast-5-en-3 β -ol, mais conhecido por β -Sitosterol, cuja fórmula estrutural é apresentada na figura 3.3.

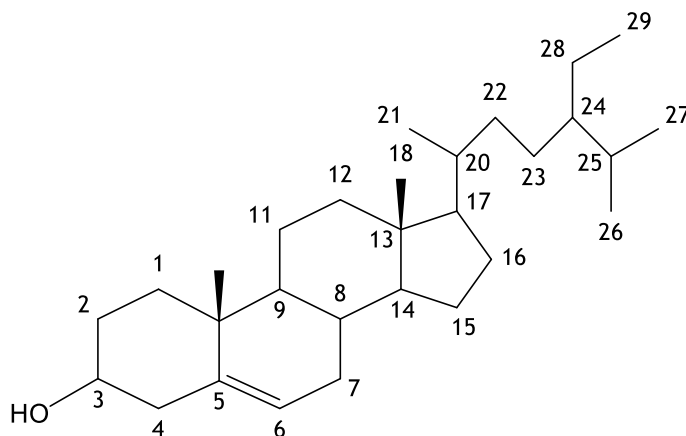


Figura 3.3: Fórmula estrutural da β -Sitosterol.

Este composto além de já ter sido isolado na espécie *Maytenus* foi identificado noutras espécies, como nas folhas de *Odontonema Stricteem* (Pierre & Moses, 2015), no extrato de clorofórmio das folhas de *Corchorus fasciculares* Lam (Rajput & Rajput, 2012), no extrato de acetato de etilo da casca da raiz de *Terminalia glaucescenes* (Bulama, Dangoggo, & Mathias, 2015) e ainda isolados nos extratos de *n*-hexano da raiz de *Piliostigma thonningii* e nos ramos *Maytenus senegalensis* (Canelo, 2013).

3.1.2. Compostos isolados no extrato de Ms₂

3.1.2.1. β -Amirina

Composto com características idênticas ao isolado em Ms₁₋₅, denominado de β -Amirina (Figura 3.2).

3.1.2.2. Ácido α -eleostearico

Na cromatografia da fração 8 de C₂-Ms₂ foi obtido um sólido, cuja análise espectroscópica de infravermelho mostrou uma banda de absorção com deformação axial de OH característico de um grupo carboxílico a aproximadamente 3266,81 cm⁻¹, uma banda de estiramento de deformação axial de C-H de metilo e metileno num intervalo de 2928,17 cm⁻¹ a 2855,04 cm⁻¹. Ainda de destacar a banda de absorção de deformação axial do grupo carbonilo C=O característico dos ácidos carboxílicos alifáticos saturados a 1638,8 cm⁻¹ e a banda referente a duplas ligações (cis e trans) a 995,15 cm⁻¹ (Sousa, 2013).

A análise dos dados de RMN de ¹³C, associado aos espectros DEPT 90° e 135°, permitiu confirmar a presença de um ácido carboxílico de cadeia linear com três duplas ligações e um total de dezoito sinais de carbono. Destes átomos, um corresponde ao grupo metilo terminal, dez grupos metileno (um sp²), seis grupos metino correspondentes a três ligações duplas e a um carbono quaternário (carbono do grupo carboxílico). Entre os sinais observados, destacam-se os sinais a δ 179.5 ppm (C-1) característico do grupo ácido carboxílico e a δ 14.3 ppm do grupo metilo terminal.

No espectro de RMN de ¹H podemos observar sinais de multipletos a 5,35 ppm; 5,34 ppm; 5,33 ppm e 5,32 ppm que podem ser característicos dos hidrogénios vinílicos presentes nas ligações duplas conjugadas cis, trans, trans em C-9, C-11 e C-13, respetivamente. Também se observa um tripleto a 2,78 ppm referente ao hidrogénio do CH₂- α -carbonilo, um multipletos a 2,04 ppm referente aos hidrogénios alílicos, um multipletos a 1,58 ppm referente ao hidrogénio β -carbonilo, bem como um tripleto a 0,85 ppm, correspondente ao CH₃ da cadeia terminal do ácido.

Tabela 3.4: Dados espectroscópicos de RMN de ^1H e ^{13}C do composto Ms₂-8

Nº de Carbono	Tipos de carbono	RMN de ^{13}C (CDCl ₃), δ	RMN de ^1H (CDCl ₃) δ
1	C	179,5	5,35(O-H)
2	CH ₂	34,1	2,78 (t, J=6,1 Hz)
3	CH ₂	24,7	2,04 (dd,
4	CH ₂	29,0	1,30(m)
5	CH ₂	29,1	1,29 (m)
6	CH ₂	29,6	1,29 (s)
7	CH ₂	29,2	1,23 (s)
8	CH ₂	34,1	1,58 (m)
9	CH	131,9	5,34 (m)
10	CH	128,3	5,34 (m)
11	CH	128,2	5,34 (m)
12	CH	127,7	5,34 (m)
13	CH	127,1	5,32 (m)
14	CH	130,2	5,33 (m)
15	CH ₂	29,7	1,23 (m)
16	CH ₂	29,6	1,29 (t)
17	CH ₂	20,5	2,31(t)
18	CH ₃	14,3	0,95 (t, J=7,5 Hz)

Com o auxílio dos dados dos espectros de infravermelho, RMN ^1H e ^{13}C , associados aos DEPT 90° e 135°, bem como um conjunto de informação da literatura (Sousa, 2013), foi possível confirmar que o composto identificado é o ácido cis,trans,trans-9,11,13-octadecatrienóico, usualmente conhecido por ácido α -eleostearíco, com a seguinte fórmula estrutural (Figura 3.4).

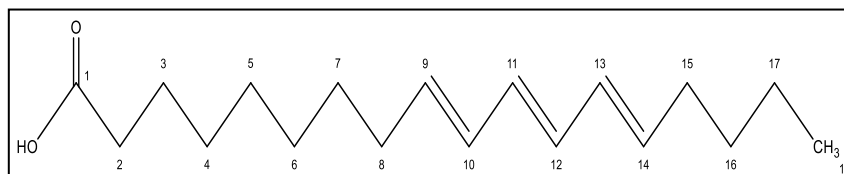


Figura 3.4: Fórmula estrutural do ácido α -eleostearíco

Não foram encontrados na literatura dados que relatem o isolamento deste ácido na espécie de *M. senegalensis*.

3.1.2.3. 3-epi-Gloquidiol

Na fração cromatográfica 76-81 de C₂-Ms₂ foi obtido um óleo incolor cujo espectro de IV revelou absorções características do grupo hidroxilo a 3364,03 cm⁻¹, da ligação C=C á aproximadamente 1640 cm⁻¹, vibrações simétricas e assimétricas dos grupos metilo entre 2927,30 cm⁻¹ e 2856,66 cm⁻¹ e deformações dos grupos metileno entre 1455,16 cm⁻¹ e 1039,47 cm⁻¹ (Canelo, 2013).

A análise dos dados de RMN de ¹³C, associado aos espectros DEPT 90° e 135°, permitiu confirmar um triterpeno pela presença de trinta sinais de carbono. Destes, sete correspondem a grupos metilo (um sobre ligação dupla), dez a grupos metileno (um sp²), sete a grupos metino (dois dos quais são geminais ligados a dois grupos hidroxilo) e seis a carbonos quaternários um dos quais é sp². Entre os sinais observados, destacam-se os sinais a δ 109,4 ppm (C-29) e a δ 150,8 ppm (C-20), que são característicos de uma ligação dupla presente em muitos dos triterpenos com esqueleto lupano (Souza *et al.*, 2001), bem como o sinal a δ 79,0 ppm (C-1) e a δ 75,8 ppm (C-3) que correspondem a carbonos ligados a grupos hidroxilos (carbonos oximetinico).

No espectro de RMN ¹H foram observados sinais a δ 4,66 ppm e 4,54 ppm, atribuídos a átomos de hidrogénio metilénicos de dupla ligação terminal do esqueleto, bem como sinais a δ 3,40 ppm e 3,24 ppm característicos de hidrogénios de carbono ligados a grupos hidroxilos. Além disso, foi possível observar um duplo tripleto a δ 2,33 ppm (*J* = 11,0; 5,5 Hz), correspondente ao protão H-19. Este espectro apresentou ainda sinais de grupos metilo singletos a δ 1,66 ppm; 1,02 ppm; 0,93 ppm; 0,93 ppm; 0,88 ppm; 0,77 ppm e 0,73 ppm que correspondem aos protões H-30, H-26, H-23, H-27, H-25; H-28 e H-24, respetivamente.

Tabela 3.5: Dados espectroscópicos de RMN de ^1H e ^{13}C do composto Ms₂-15

Nº de Carbono	Tipos de carbono	RMN de ^{13}C (CDCl ₃), δ	RMN de ^1H (CDCl ₃) δ
1	CH	79,0	3,40 (dd, J=11.3, 4.6 Hz)
2	CH ₂	37,6	1,59 (m)
3	CH	75,8	3.23 (dd, J=12.1, 4.3Hz)
4	C	38,9	----
5	CH	53,1	0,56 (dd, 11.3, 2.6 Hz)
6	CH ₂	18,0	1,58 (m)
7	CH ₂	34,1	1,36 (m)
8	C	42,9	-----
9	CH	51,5	1,49 (m)
10	C	43,5	-
11	CH ₂	23,8	1,35 (m)
12	CH ₂	25,1	1,24 (m)
13	CH	37,6	1,62 (m)
14	C	41,3	-
15	CH ₂	27,5	1,02 (m)/1,62(m)
16	CH ₂	35,6	1,47 (m)
17	C	42,9	-
18	CH	48,3	1,30 (m)
19	CH	48,0	2,33 (dt, 11.0, 5.5 Hz)
20	C	150,8	----
21	CH ₂	29,8	1,89 (m)
22	CH ₂	40,0	1,17 (m)/1,36 (m)
23	CH ₃	27,8	0,93 (s)
24	CH ₃	15,0	0,73 (s)
25	CH ₃	12,0	0,88 (s)
26	CH ₃	16,2	1,02 (s)
27	CH ₃	14,4	0,93 (s)
28	CH ₃	18,0	0,77 (s)
29	CH ₂	109,5	4,54 (dd, 2.5, 1.4 Hz), 4,66 (d, J= 2.4, 1.4 Hz)
30	CH ₃	19,2	1,66 (s)

Com auxílio dos dados de RMN ^1H e ^{13}C , associado aos DEPT 90° e 135° , às correlações de HMBC, bem como a um conjunto de informação da literatura (Canelo, 2013), foi possível confirmar que o composto identificado é o Lup-20(29)-en- $1\beta,3\beta$ -diol, sendo conhecido por 3-epi-gloquidiol cuja fórmula molecular é $\text{C}_{30}\text{H}_{58}\text{O}$ e a sua fórmula estrutural é:

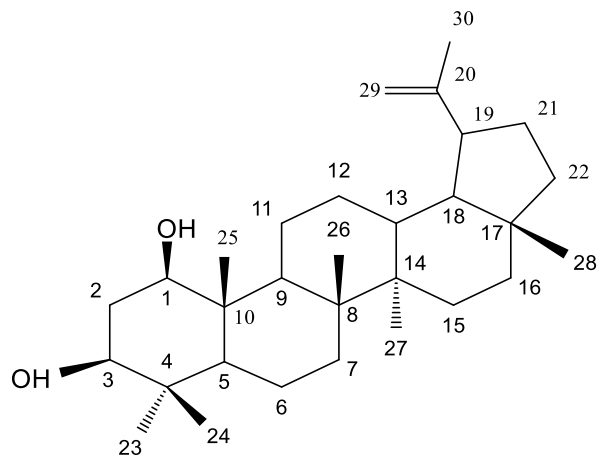


Figura 3.5: Estrutura do 3-Epi-gloquidiol.

Este composto já foi identificado no tronco da espécie *Maytenus senegalensis* (Canelo, 2013), contudo não foi encontrado nenhum relato bibliográfico de ter sido isolado nas folhas de *Maytenus senegalensis*.

3.2. Atividade biológica dos extratos brutos de acetona e etanol

Os produtos naturais tem sido uma grande alternativa de estudo a nível dos fitoquímicos e farmacêuticos para identificar compostos com capacidade antioxidante (antioxidantes naturais), pois esses compostos podem ser úteis para a cura de diversas doenças e não só, podendo ainda substituir os antioxidantes sintéticos presentes em alimentos e produtos farmacêuticos, conforme citado por (Lucas, 2017). Os extratos de acetona e etanol das folhas de *Maytenus senegalensis* foram submetidas a ensaios de atividade antioxidante pelo método de DPPH.

3.2.1. Atividade antioxidante DPPH

Para avaliar a atividade antioxidante deve-se ter em conta, além dos valores da absorvência, a percentagem de inibição (%) cuja representação gráfica em função da concentração das amostras nas células do espectrofotómetro é dada pela linearidade da qual se obtém a concentração que fornece 50% de inibição (IC₅₀) permitindo saber o índice de atividade antioxidante (IAA) conforme a tabela 10.

Como padrão foi usado o Trolox em concentração igual à das amostras. No gráfico abaixo apresentamos os resultados dos diferentes parâmetros da avaliação da atividade antioxidante dos extratos de acetona e etanol de *Maytenus senegalensis*.

3.2.1.1. Extratos de acetona

Abaixo estão representados os resultados das atividades antioxidante dos extratos de acetona na qual para cada concentração são efetuados três ensaios representados por Linear (1), (2) e (3), respetivamente.

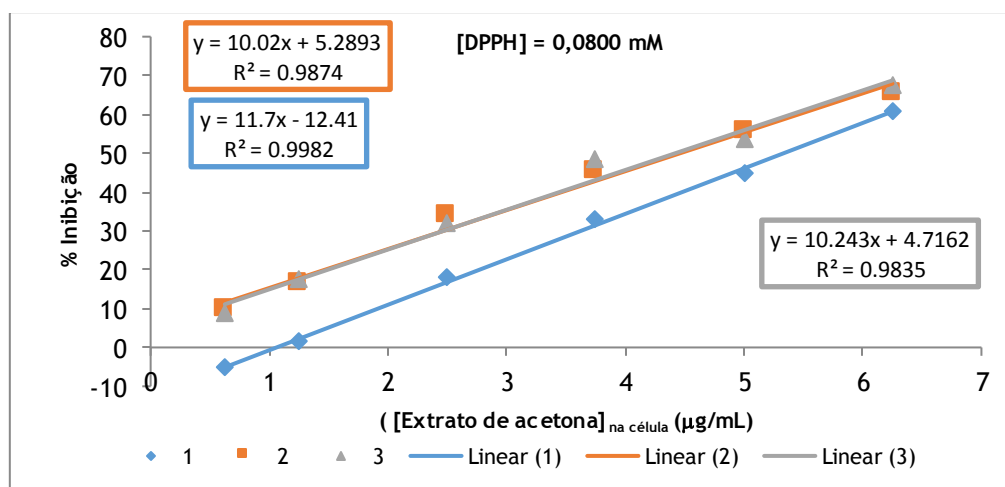


Gráfico 3.1: Representação da % I em função da [extrato de acetona] para a [DPPH] de 0,0800 mM.

Tabela 3.6: Representação dos parâmetros de IC₅₀ e IAA dos diferentes ensaios de extrato de acetona.

Parâmetros	Ensaio 1	Ensaio 2	Ensaio 3	Média ± Desvio padrão
IC ₅₀	5.33	4.46	4.42	4.74 ± 0.516
IAA	4.58	6.53	6.58	5,90 ± 114

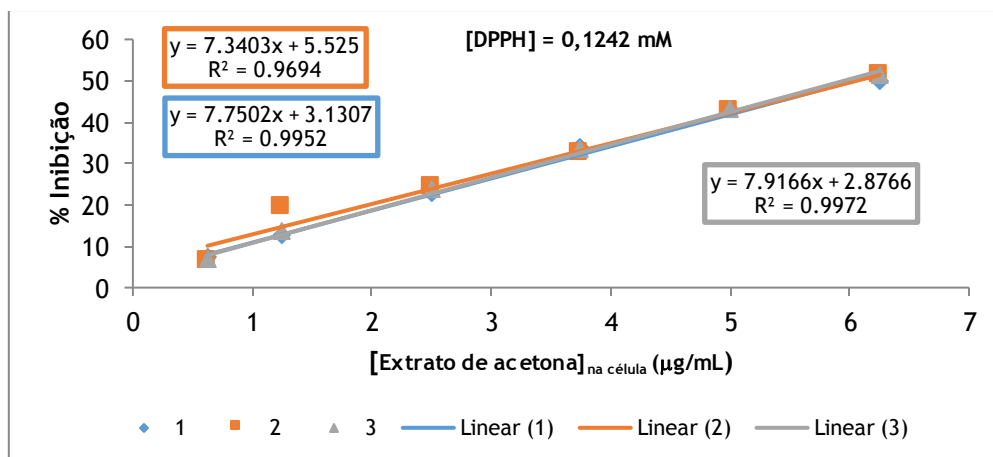


Gráfico 3.2: Representação da % I em função da [extrato de acetona], para a [DPPH] de 0,1242 mM.

Tabela 3.7: Representação dos parâmetros de IC₅₀ e IAA dos diferentes ensaios de extrato de acetona.

Parâmetros	Ensaio 1	Ensaio 2	Ensaio 3	Média ± Desvio padrão
IC ₅₀	6.04	6.06	5.95	6.02 ± 0.058
IAA	7.52	7.50	7.65	7.56 ± 0.086

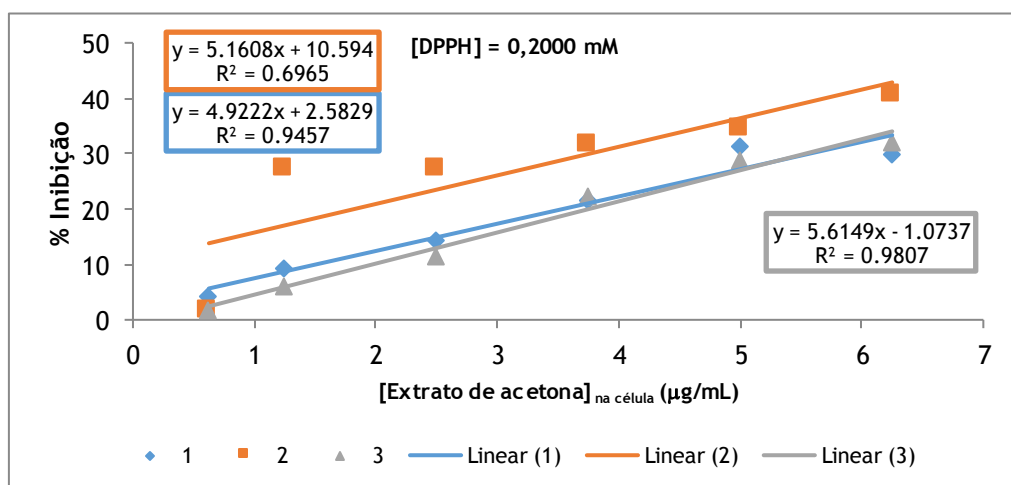


Gráfico 3.3: Representação gráfica de % I em função da [do extrato de acetona], para a [DPPH] de 0,2000 mM.

Tabela 3.8: Representação dos parâmetros de IC₅₀ e IAA dos diferentes ensaios de extrato de acetona.

Parâmetros	Ensaio 1	Ensaio 2	Ensaio 3	Média ± Desvio padrão
IC ₅₀	9.63	7.63	9.096	8.788 ± 1.033
IAA	7.63	9.42	7.79	8.285 ± 0.993

3.2.1.2. Extratos de etanol

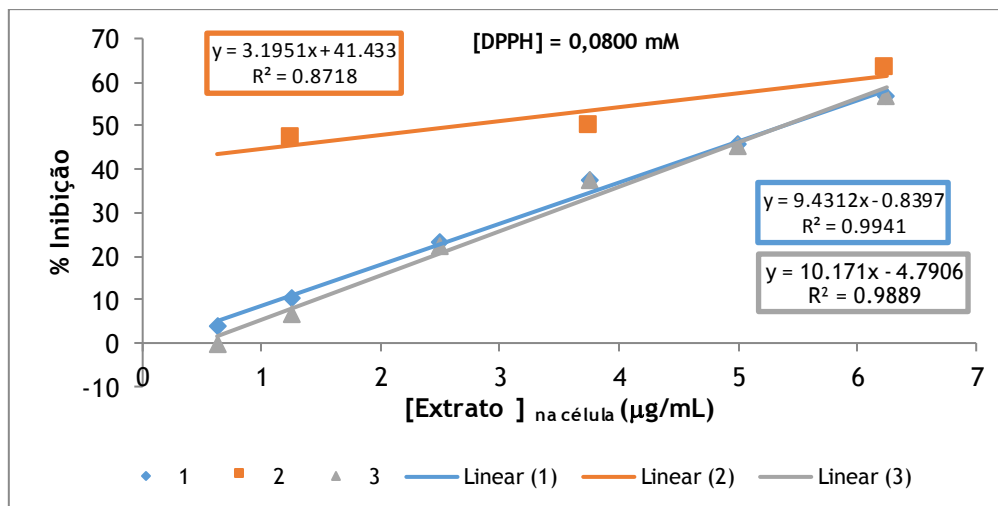


Gráfico 3.4: Representação da % I em função da [extrato de etanol] para a [DPPH] de 0,0800 mM.

Tabela 3.9: Representação dos parâmetros de IC₅₀ e IAA dos diferentes ensaios de extrato de etanol.

Parâmetros	Ensaio 1	Ensaio 2	Ensaio 3	Média ± Desvio padrão
IC ₅₀	5.39	2.68	5.39	4.49 ± 1.56
IAA	5.03	10.77	4.6	6.8 ± 3.44

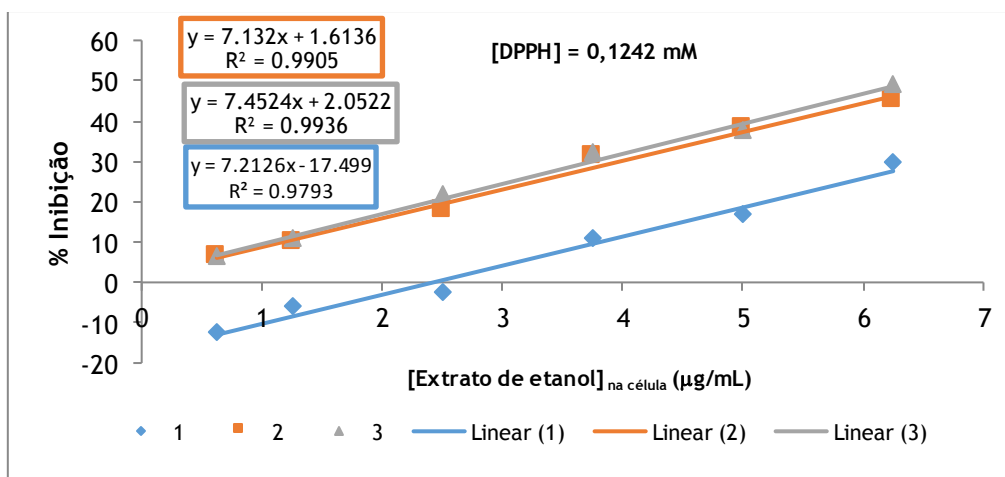


Gráfico 3.5: Representação da % I em função da [Extrato de etanol] para a [DPPH] de 0.1242 mM.

Tabela 3.10: Representação dos parâmetros de IC₅₀ e IAA dos diferentes ensaios de extrato de etanol.

Parâmetros	Ensaio 1	Ensaio 2	Ensaio 3	Média ± Desvio padrão
IC ₅₀	9.36	6.78	6.43	7.52 ± 1.6
IAA	3.54	6.46	6.96	5.65 ± 1.84

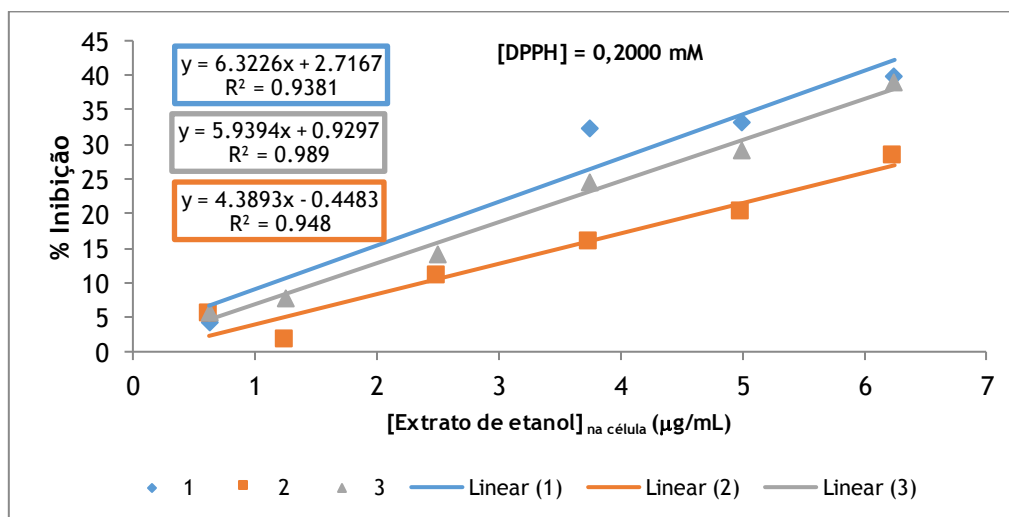


Gráfico 3.6: Representação da % I em função da [Extrato de etanol] para a [DPPH] de 0.2000 mM.

Tabela 3.11: Representação dos parâmetros de IC₅₀ e IAA dos diferentes ensaios de extrato de etanol.

Parâmetros	Ensaio 1	Ensaio 2	Ensaio 3	Média ± Desvio padrão
IC ₅₀	8.92	11.5	8.26	9.56 ± 1.707
IAA	8.20	5.64	8.89	7.58 ± 1.709

Na Tabela 3.12 é apresentado um resumo dos parâmetros IC₅₀ e AAI (média ± desvio padrão) e é atribuída a classificação da atividade antioxidante para os extratos de acetona, etanol e para os padrões rutina, trolox e ácido gálico.

Tabela 3.12: Tabela de parâmetros para o nível de atividade antioxidante dos extratos em relação aos padrões utilizados.

Amostras	IC ₅₀ µg/mL	AAI	Atividade antioxidante
Extrato de acetona	6,5 ± 1,5	7,25 ± 0,9	Muito Forte
Extrato de Etanol	7,19 ± 1,80	6,68 ± 0,68	Muito Forte
Trolox	7,83 ± 2,45	6,34 ± 0,23	Muito Forte
Acido Gálico	2,01 ± 0,57	23,89 ± 1,37	Muito Forte
Rutina	8,14 ± 2,14	6,04 ± 0,38	Muito Forte

Após a determinação dos parâmetros de avaliação da atividade antioxidante concluiu-se que para inibir 50% da atividade antioxidante é necessária uma concentração de 6,5 µg/mL de extrato de acetona e de 7,19 µg/mL de extrato de etanol, o que os caracteriza como extratos com atividade antioxidante muito forte. Os valores de AAI dos extratos são superiores aos obtidos para os padrões Trolox e Rutina, e inferiores ao do ácido gálico, embora todos os padrões apresentem AAI muito forte uma vez que possuem valores superiores a 2. Portanto os extratos têm maior capacidade antioxidante que os padrões Trolox e Rutina e menor em relação ao ácido gálico, sendo o extrato de etanol aquele com maior capacidade entre os extratos analisados, conforme está ilustrado no gráfico 3.7.

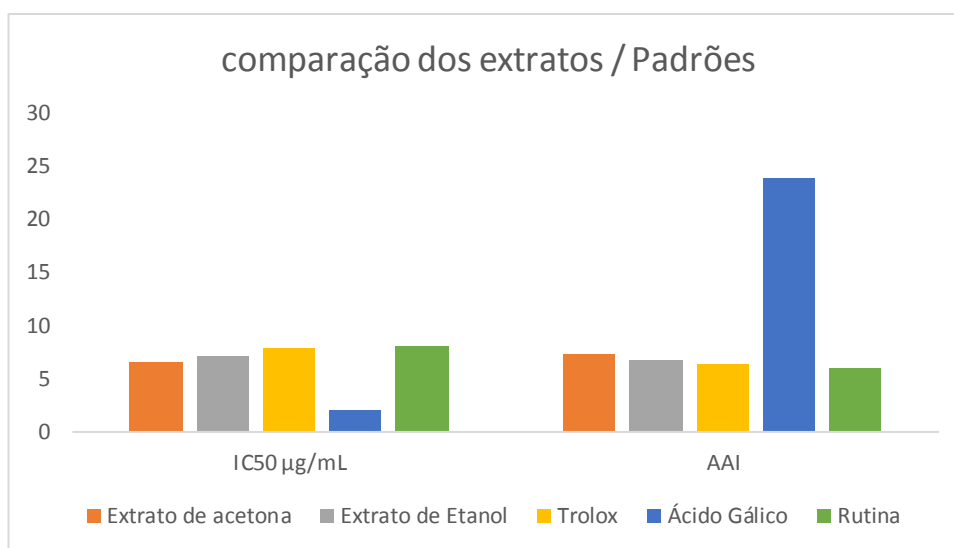


Gráfico 3.7: Comparação dos resultados da capacidade antioxidante dos extratos de acetona e etanol em relação os padrões utilizados.

Estudos realizados por Wichi, 1998, confirmam a exibição de atividade antioxidante em extratos polares das folhas de *M. senegalensis* (H.P. Wichi, 1998), assim como no trabalho de Jewell *et al*, 2015 foi determinada a atividade antioxidante pelo método de DPPH em extratos de metanol, acetato de etilo e acetona das folhas de *M. senegalensis* colhidas na aldeia de Dangargoon em Ahmednagar na Índia, cujos IC₅₀, foram de 21,6 µg/ml, 14,586 µg/ml e 35,41 µg/ml, respetivamente (Jaiwal1, Shaikh,, Kulkarni, & Tak, 2015).

A partir destes resultados é possível confirmar que os estudos realizados com a mesma parte da planta, recolhida em lugares diferentes, apresentam as mesmas conclusões, contudo os extratos de acetona da planta recolhidas na Índia possuem maior IC₅₀, o que quer dizer que possui menor capacidade antioxidante, em relação a MS recolhida em Angola.

Capítulo 4. Conclusões e perspectivas futuras

As plantas medicinais constituem uma base da medicina tradicional mundial, em geral, e em particular na medicina Africana. O uso de plantas para o tratamento de diversas doenças em Angola tem-se intensificando cada vez mais, devido à escassez de recursos financeiros das comunidades em geral. Pelo uso excessivo e sem conhecimentos científicos dos terapeutas, algumas plantas têm causado danos nas populações utentes. Portanto, a solução destes problemas pode ser diminuída com o conhecimento das plantas e o desenvolvimento das investigações científicas. Neste trabalho de investigação foi realizada a extração e identificação de compostos químicos do extrato de *n*-hexano das folhas de *Maytenus senegalensis*, uma importante planta na medicina tradicional, e a determinação das atividades antioxidantes pelo método de DPPH dos extratos de acetona e etanol. A atividade antioxidante do extrato de *n*-hexano não foi realizada, uma vez que o método não era adequado devido ao solvente utilizado para preparar as soluções.

Com a utilização de técnicas cromatográficas e espectroscópicas foi possível identificar um total de cinco compostos nas duas recolhas efetuadas, nomeadamente, a Friedelin, a β -Amirina e o β -Sitosterol, o ácido α -eleostearílico e o 3-epi-gloquidiol. Embora já tenham sido realizados vários estudos sobre esta planta, não foram encontrados dados publicados de estudos de identificação de compostos químicos e de atividades biológicas em extratos das folhas de *Maytenus senegalensis*, recolhida em Humpata, Angola.

No estudo da atividade antioxidante, os resultados indicaram uma capacidade antioxidante forte dos extratos de acetona e etanol em comparação com os padrões Trolox e Rutina e uma atividade fraca em relação ao padrão ácido gálico. Dos extratos analisados o extrato de etanol apresentou a maior capacidade antioxidante.

Achamos que seria pertinente para futuros estudos, isolar e identificar os compostos presentes nesses extratos para realizar os estudos dos compostos responsáveis pela forte atividade antioxidante que apresenta.

Pela importância medicinal desta planta no sul de Angola para a cura de diversas enfermidades, além do estudo da atividade antioxidante deveriam ser estudadas outras atividades biológicas. Desde já, é lançado o desafio para os futuros estudantes de Química Medicinal.

Referências bibliográficas

- Abdel-Hameed, E.-S. S. (2008). Total phenolic contents and free radical scavenging activity of certain Egyptian Ficus species leaf samples. *Food Chemistry*, 1271-1277.
- Agostini-Costa, T. d., Vieira, R. F., Bizzo, H. R., Silveira, D., & Gimenes, M. A. (2012). Secondary Metabolites. *Journal of Chromatography and its applications*, 131-164.
- Alam, M. N., Bristi, N. J., & Rafiquzzamam, M. (2012). Review on in vivo and in vitro methods avaluation of antioxidant activity. *Saudi Pharmaceutical Journal*, 143-152.
- Allison, A. C., Cacabelos, R., Lombardi, M. V., Álvarez, A. X., & Vigo, C. (2001). Celastrol, a potent antioxidant and anti-inflammatory drug, as a possibl tratment for Alzheimer disease. *Prog, Neuro-Psichop*, 1341-1357.
- Altemimi, A., Lakhssassi, N., Baharlouei , A., Watson , D. G., & Lightfoot , D. A. (2017). Phytochemicals: Extraction, Isolation, and Identification of Bioactive Compounds from Plant Extracts. *Journal of Plants*, 1-23.
- Amorali, R., Foli, M. C., & Valgimigli, L. (2013). Antioxidant Activity of Essential Oils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* , 16835-16847.
- Andrade, C. A., Costa, C. K., Bora, K., Miguel, M. D., Miguel, O. G., & Kerber1, V. A. (2007). Determinação do conteúdo fenólico e avaliação da atividade antioxidante de Acacia podalyriifolia A. Cunn. ex G. Don, Leguminosae-mimosoideae. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*, 231-235.
- Aremu, A. O., Amoo, O. S., Finnie, F. J., & Van Staden, J. (2011). Antioxidant activity acetylcholinesterase inhibition , iridoid content and mutagenic evaluation of leucosidea sericea. *Food Chemestry Toxicology*, 1122-1128.
- Barreiro, E., & Bolzani, V. (2009). Biodiversidade: Fonte potencial para a descoberta de fármacos. *Química Nova*, 679-688.
- Brietmann, H. L., Cseke, L. J., Kerakosyan, A., Kaufmann, P. B., Warber, S. L., & Duke, J. A. (2006). *Natural products from plants*. London New York: Tailor and Francis Group.
- Bulama, J. S., Dangoggo, S. M., & Mathias(, S. N. (2015). Isolation and Characterization of Beta-Sitosterol from ethyl acetate extract of root bark of Terminalia glaucescens. *International Journal of Scientific and Research Publications*, 1-3.
- Canelo, L. I. (2013). *Caracterização de Produtod Naturais de Plantas Mediciniais de Angola*. Covilhã: Tese para obtenção do Grau de Doutor em Química.
- Chhabra, S., & Uiso, F. (1991). Antibacterial activity of some Tanzanian plants used in Tradicional medicine. *Fitotherapia*, 499-503.
- Cotelle, N., Bernier, J.-L., Catteau, J.-P., Pommary, J., Nallet, J.-C., & Gaydou, E. M. (1995). Antioxidant Properties of Hidroxy-flavones. *Free Radical Biology and Medicine*, 33-43.
- Cseke, J. L., Kirakosyan, A., Kauman, B. P., Warber, L. S., Duke, A. J., & Brielmann, L. H. (2006). Natural Product from Plants. *CRC Press Taylor and Francis Group*.
- Cseke, L. J., Kirakosyan , A., Kaufman, P. B., Warber, S. L., Duke, J. A., & Brielmann, H. L. (2006). *Natural Product from Plants*. London New York: CRC Press Taylor and Francis Group.

- Duraipandiyan, V., Ignacimuthu, S., & Ayyanar, M. (2006). Antimicrobial Activity of Some Ethnomedical Plants uses by Paliyar tribe from TamiNadu,India. *BMC Complementary and Alternative medicine*, 635.
- El Tahir A, Satti G, M., & Khalid S, A. (1999). Aniplasmodial activity of selected sudanese medicinal plants wth emphasis on Maytenus Senegalensis(Lam.).Exell. *Journal of Ethnopharmacology*, 227-233.
- Eldeen, I. M., Elgorashi, E. E., & Staden, V. J. (2005). Antibacterial,anti-inflammatory,anticholisesterase and mutagenic efeccs of extracts obtained from some trees used in South African Tradicional medicine. *Journal of Ethnopharmacology*, 457-464.
- Fernandes, N. A. (2013). Avaliação da atividade biologica de compostos naturais de plantas de Angola e de compostos de síntese. *Tese de Doutoramento*, 1-172.
- Firmo. Wellyson, C. A., Menezes, V. d., Passos, C. E., & et all. (Outubro de 2011). Historical context ,Popular use and scientific conception on medicinal plants use. 18, pp. 90-95. Obtido em 03 de 10 de 2017
- G., H., Miyashiro, H., & Nakamura, N. (1999). Inhibitory effects of Sudanese Plant extracts on HIV-1 replication and HIV-1 Protease. *Phytother*, 31-60.
- Gawandi, B. V., Satav, J. G., Yakhmi, J. V., Banavalikar, M. M., Biyani, M. K., & Mittal, J. P. (2001). Characterizing the antioxidant activity of amla (phyllanthus emblica) extract,. *Curricular Sciencie*, 185-190.
- Gessler, M., Chollet, C., & Nkunia, J. M. (1995). Tanzanian medicinal plants used tradicionally for the treatment of malaria: in vivo antimalarial and invitro cytotoxic activities. *Journal Phytother*, 504-508.
- Gessler, M., Nkunya, M. H. H, & Mwasumbi L.B. (1994). Screening Tanzanian medicinal plans for antimalarial activity. *Acta Tropical*, 65-77.
- Gomes, A., Fernandes, M., & Lima, L. J. (2005). Fluorescence probes used for detection of reactive oxygen species. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, 45-80.
- Gonzalez, A., Bazzocchi, L. I., Moujir, L., & Jimenez, A. I. (2000). Ethnobotanical uses of Celastraceae bioactive metabolites. *Natural Products of Chemistry*, 649-738.
- Gurib-Fakim, A. (2006). Medicinal plants: Traditions of yesterday and drugs of tomorrow. *MOLECULAR ASPECTS OF MEDICINE*, 27, 1-93. Obtido em 7 de Março de 2018, de file:///C:/Users/pc/Downloads/Medicinalplantstraditionsofyesterdayanddrugsoftomorrow.pdf
- Gurib-Fakim, A., & Mahomoodally, M. F. (21 de January de 2013). African Flora as Potential Sources of Medicinal Plants: Towards the Chemotherapy of Major Parasitic and Other Infectious Diseases. *Jordan Journal of Biological Sciences*, 6, 77-84. Obtido de <http://jjbs.hu.edu.jo/files/v6n2/Paper%20Number%201m.pdf>
- Gyamfi, M. A., Yonamine, M., & Aniya, Y. (1999). Free-radical scavenging action of medicinal herbs from Ghana Thonningia sanguinea on experimentally-induced liver injuries. *General Pharmacology*, 661-667.

- H.P. Wichi. (1998). Enhanced tumor development by butylated hydroxyanisole (BHA) from the perspective of effect on forestomach and oesophageal squamous epithelium. *Journal of Food Chemistry Toxicol*, 717-723.
- Hahn, N. I. (1998). Is Phytoestrogens Nature's cure for What Ails Us? A look at the Research. *Journal of The American Dietetic Association*, 974-976.
- Hallewell, B., & Gutteridge, J. M. (2015). *Free Radicals in Biology and Medicine*. Great Clarendon Street, Oxford, Reino Unido: CPI, Croup(UK) Ltd.
- Halliwell, B. (1990). How to Characterize a biological antioxidant? *Free Radical Research*, 1-32.
- Halliwell, B. (1997). Antioxidant and human disease : A general Introduction. *Nutricional Rev.*, 544-549.
- Hansel, R., Keller, K., & Rimpler, H. (1993). Hagers Handbuch der Pharmazeutischer. *Journal of Springer*, 803-810.
- Heywood, V. (1993). *Flowering plants of the world*. New York: Oxford University Press.
- Hossain, M. A., & Ismail, Z. (2010). Isolation and characterization of triterpenes from the leaves of *Orthosiphon stamineus*. *Arabian Journal of Chemistry*, 295-298.
- Hussein, G., Nakamura, N., Meselhy, M., & Hattori, M. (1999). Phenolics from *Maytenus senegalensis*. *Phytochemistry*, 689-694.
- Irchhaiya, R., Kumar, A., yadav, A., Gupta, N., Kumar, S., Gupta, N., . . . Gurjar, H. (2015). Metabolites in Plants and its classification. *World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 287-305.
- Itokawa, N., Shirota, O., Ikuta, H., Morita, H., Takeya, K., & Jitaka, Y. (1991). Triterpenes from *Maytenus ilicifolia*. *Phytochemistry*, 3713-3716.
- J.David, P. (1 de 8 de 2001). Phytochemistry and medicinal plants. (B. Square, Ed.) *Phytochemistry*, pp. 237-243. Obtido em 26 de 9 de 2017
- Jain, N., Light, M. E., & Van Staden, J. (2008). Antibacterial activity of hairy-root cultures of *Maytenus senegalensis*. *South African Journal of Botany*, 163-166.
- Jaiwal, B. V., Shaikh, V. S., Kulkarni, A. A., & Tak, R. D. (2015). Assessment of Total Phenolics and Antioxidant Activity from Different Solvent Extracts of *Maytenus senegalensis* (Lam) Excell: Purification and Partial Characterization of Antioxidant. *International Journal of Current Research in Biosciences and Plant Biology*, 144-152.
- Joshi, K., Singh, P., & Singh, L. C. (1981). *Plant Medicinal*. 89-91.
- Jr.Viegas, C., Bolzani, V. d., & Barreiro, E. J. (2006). Os produtos naturais e a química medicinal moderna. *Química Nova*, 326.
- Khalid, S. A., Friedrichsen, G. M., Christensen, S. B., Tahir, E. A., & Satté, G. M. (2007). Isolation and Characteriation of pristemerin as the antiplasmodial and antileishmanial agent of *Maytenus senegalensis*(Lam) EXELL. 129-134.
- Kumar, S. (2014). The importance of antioxidant and their role in Pharmaceutical Science -A Review. *Asian Journal of Research in Chemistry and Pharmaceutical Sciences*, 27-44.

- Laguerre, M., Lecomte, J., & Villeneuve, P. (2007). Evaluation of ability of antioxidants to counteract lipid oxidation: Existing methods, new trends and challenges. *Progress in Lipid Research*, 244-282.
- Lindsey, K., Budesinsky, M., Kohout, L., & Van Staden, J. (2006). Antibacterial activity of maytenonic acid isolated from the root-bark of *Maytenus senegalensis*. *South African Journal of Botany*, 473-477.
- Lucas, M. F. (2017). *Caraterização fitoquímica e determinação da atividade biológica de extratos de cascas de Salix saluiifolia*. Dissertação, Universidade de Beira Interior, Química, Covilhã.
- Mahomoodally, M. F. (10 de October de 2013). Traditional Medicines in Africa: An Appraisal of Ten Potent African Medicinal Plants. (J. R. Tabuti, Ed.) *Hindawi Publishing Corporation*, 1-15. Obtido em 7 de Março de 2018, de file:///C:/Users/pc/Downloads/617459.pdf
- Makgatho, M. E., Nxumalo, W., & Raphoko, L. A. (2018). Anti-micobacterial -oxidature-proliferative and inflammatory activities of dichloromethane leaf extracts of *Gimnosporia senegalensis*(Lam) loes. *South African Journal of Botany*, 217-222.
- Manach, C., Scalbert, A., Morand, C., Rémésy, C., & Jimenez, L. (2004). Polyphenols: food sources and Bioavailability. *American Journal of Clinical Nutrition*, 727-747.
- Maragnon, R. A. (1994). Etimologia e pronuncia do nome botânico de plantas do município de Curitiba. pp.13.
- Martin, J. D. (1973). The structure of dispermoquinona A triterpenoid quinone methide from *Maytenus Dispermies*. *Journal Tethahidran*, 2997-3000.
- Matu, E. N., & van Staden, J. (2003). Antibacterial and anti-inflammatory activities of some plants used for medicinal purposes in Kenya. *Journal of Ethnopharmacology*, 35-41.
- Mishara, R., & Bishet, S. S. (2011). Antioxidants and their charecterization. *Journal Pharmacy Research*, 2744-2746.
- Mishra, K., Ojha, H., & Chaudhury, N. K. (2012). Estimation of antiradical properties of antioxidants using DPPH assay: A critical Review and results. *Food Chemistry*, 1036-1043.
- Mueller, H. I., & Mc. Allan, A. B. (1992). *Their biochemistry and nutricional properties* (Vol. 1). London (UK), London, England: JAI Press Ltd.
- Mueller, M. S., & Ernst Mechler. (2005). *Medicinal plants in Tropical countries*. New York: Complementary Medicine- Library of Congress cataloging.
- N, Z., Sharapin, N., & Zhang, J. (1998). Three glucosides from *Maytenus ilicifolia*. *Phytochemistry*, 265-268.
- Nadkarne, A. K. (1944). *India Materia medicavol. Popular Book dept*, 606.
- Negi, S., Singhal, D., Pant, H. V., Joshi, H. C., Dhoundiyal, R., & Gupta, A. K. (2013). Bio-Chemical investigation of *Echinops cornigerus*. *International Transactions in Applied Sciences*, 180-187.
- Neuwinger, H. (2000). African tradicional medicine: a dictionary of plant use and applications. Em H. Neuwinger, *African traditional medicine: a dictionary of plant use and applications*. (p. 589). Stuttgart: Medpharm Scientific.

- Niero, R., Andrade, d. S., & Filho, V. C. (2011). A Review of the Ethnopharmacology, Phytochemistry and Pharmacology of Plants of the Maytenus genus. *Current pharmaceutical design*, 0000-0000.
- Nunez, M., Jiménez,, A. I., Mendonza, R. C., Chaves-Sifontes, M., Martinez, L. M., Ichishi, E., . . . Bazzocchi,, L. I. (2016). Dihydro-agarofuran sesquiterpenes from celastraceae species as anti-tumor-promoting agents. *Medicinal chemistry*, 95-102.
- Ogwuche C. E, Amupitan , J. O., Ndukwel, I. G., & Ayo , R. G. (2014). Isolation and Biological Activity of the Triterpene B-Amyrin from the Aerial Plant Parts of *Maesobotrya Barteri* (Baill). *Medicinal chemistry*, 729-733.
- Okine, L., Nyarko, K. A., Osei-Kwabenam, N., Oppongm, V. I., Barnes, F., & Ofosuhenne, M. (2005). The antidiabetic activity of the herbal preparatio ADD-. *Journal of ethnopharmacol*, 31-38.
- Okoye, F. B., Agbo, M. O., Nworu, C. S., Nwodo, N. J., Esimone, C. O., Osadebe, P. O., & Proksch, P. (2015). Isolation and characterization of pristimerin as the antiplasmodial malic acid derivative from *Maytenus senegalensis* leaves. *Journal of Natural Product Research*,, 29, 109-115.
- Okoye, F. B., Agbo, M. O., Esimone, C. O., Nworu, C. O., Proksch, P., & Osadebe, P. O. (2015). New neolignan glycoside and an unusual benzoyl malic acid derivative from *Maytenus senegalensis* leaves. *Natural Products*, 109-115.
- Okoye, F. B., Agbo, M. O., Nworu,, C. S., Nwodo,, N. J., Esimone,, C. O., Osadebe, P. O., & Proksch, P. (2014). New neolignan glycoside and an unusual benzoyl malic acid derivative from *Maytenus senegalensis* leaves. *Natural Product Research*, 109-115.
- Okoye, F. B., Debbab, A., Wray, V., Esimone, C. O., Osadebe, P. O., & Proksch, P. (2014). A phenyldilactone, bisnorsesquiterpene, and cytotoxic phenolics from *Maytenus senegalensis* leaves. *Tetrahedron Letters*, 3756-3760.
- Oliver, B. E. (1960). Medicinal plants in Niegria. 71.
- Pierre, L. L., & Moses, M. N. (2015). Isolation and Characterisation of Stigmasterol and B -Sitosterol from *Odontonema Strictum* (Acanthaceae). *Journal of Innovations in Pharmaceuticals and Biological Sciences*, 88-95,.
- Rajput, A., & Rajput, T. A. (2012). Isolation of Stigmastero and B-Sitosterol from Chloroform Extract of leaves of *Corcharusfascicularis* Lam. *International Journal of Biology Chemistry*, 130-135.
- Ríos, J., & Reccio,M.C. (2005). Medicinal plants and antimicrobial activity. *Jornal Ethnopharmacol*, 80-84.
- Rodrigo Scherer, & Godoy , H. T. (2009). Antioxidant activity index (AAI) by the 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl method. *Food Chemistry*, 654-658.
- Rukangira, E. (1998). Medicinal Plants and Tradicional Medicine in Africa: Constraints and Challenges. *Conserve Africa Internacional*, 179-184. Obtido em 7 de Março de 2017, de <http://infohouse.p2ric.org/ref/40/39776.pdf>
- Sagar, K. B., & Singh, R. P. (2011). Genesis and development of DPPH method of antioxidant assay- Review. *Journal Food Scientists and Technologists*, 412-422.

- Sanogo, R. (2011). Medicinal plants traditionally used in Mali for Dysmenorrhea., (pp. 90-96). University of Bamako.
- Santos, L. (2008). *A família Celastraceae na Reserva Biológica Municipal da Serra do Japi*. Monografia de Conclusão da Graduação, Universidade Estadual de São Paulo, Botucatu.
- Sarker, S. D., & Nahar, L. (2007). *Chemistry for Pharmacy students General, Organic and natural product chemistry*. England: British Library Cataloguing la Publicate.
- Sarker, S. D., & Nahar, L. (2007). *Chemistry for pharmacy students, General ,Organic and Natural Chemistry*. Northern Ireland: John Wiley and Sons, Ltd.
- Savoia, D. (2012). Plant-derived antimicrobial compounds: alternatives to antibiotics. . *Future Microbiology*, 979-990.
- Saxena, M., Saxena, J., Nema, R., Singh, D., & Gupta, A. (2013). Phytochemistry of Medicinal Plants. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 168-182.
- Scherer, R., & Godoy, H. T. (2009). Antioxidant activity index (AAI) by the 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazilmethod. *Food Chemistry*, 654-658.
- Serrano, R., Gomes, E. T., & Silva, O. (2008). Identificação botânica de Maytenus Senegalensis folha como fármaco vegetal. *Plantas Medicinai s e Fitoterapeu ticas*.
- Silva, G. d., & Serrano, R. (2011). Maytenus heterophylla and maytenus senegalensis two tradicioanl herbal medicines. *Journal of Natural Sciencie s ,Biology and Medicine* , 59-65.
- Silva, M. M., Santos, M. R., Carço, G., Rocha, R., Justino, G., & Mira, L. (2002). Structure-antioxidant Activity Relationships of Flavonoids: A Re-examination. *Free Radical Research*, 1219-1227.
- Simmons, M., Clevinger,, C. C., Savolainen, V., Archer, R. H., Mathews, S., & Doyle, J. J. (2001). Phylogeny of Celastraceae inferred from phytochrome B gene sequece and morphology. *American Journal Botany*, 313-325.
- Sosa, S., Morelli, C. F., Tubaro, A., Cairoli, P., Speranza, G., & Manitto, P. (2007). Anti-inflammatory activity of Maytenus senegalensis root extracts and of maytenoic acid. *Phytochemical*, 109-114.
- Sousa, R. S. (2013). *Influência da incorporação de ácido α -eleostearico, purificado e isolado do óleo de tungue, na dinâmica molecular de lipossomos*. Rio Grande Brasil: Universidade Federal do Rio Grande.
- Souza-Moreira, T., Salgado, N. H., & Pietro, R. R. (2010). O Brasil no contexto de controle de qualidade de plantas medicinais. pp. 435-440.
- Spivey, A., Weston, M., & Woodhead, S. (2002). Celastraceae sesquiterpenoida: biolical activity and synthesis. *Sociedad chemistry*, 43-59.
- Stafforda, I. G., Pedersen, E. M., Staden, V. J., & Jager, K. A. (2008). Review on plants with CNS effects used in tradicional South African medicine against mental diseases. *Journal of Ethnopharmacology*, 513-537.
- Susinjan, B. (2015). Reactive Oxygen Species and Celular Defense System. *Free Radical in Human Heatth and Disease*, 17-30.

- Tahir, A. E., Satti, G. M., & Khalid, S. A. (1999). Antiplasmodial activity of selected Sudanese medicinal plants with emphasis on *Maytenus senegalensis* (Lam.) Exell. *Journal of Ethnopharmacology*, 227-233.
- Valgimigli, L., & Pratt, D. A. (2012). Antioxidants in chemistry and biology. *In Encyclopedia of Radicals in Chemistry, Biology and Materials*, 1623-1677.
- Viviane Gomes da Costa Abreu, Corrêa, G. M., Lagos, I. A., Silva, R. R., & Alcântara, A. F. (2013). Pentacyclic triterpenes and steroids from the stem bark of uchi (*Sacoglottis uchi*, Humiriaceae). *Acta Amazonica*, 525-528.
- W.Christie, W. (1993). Preparation of ester derivatives of fatty acids for Chromatographic analysis. *In Advances in Lipid Methodology*, 69-111.
- Yunes, R. A., Pedrosa, C. R., & Cechinel, V. F. (2001). Fármacos e Fitoterápias: a Necessidade do Desenvolvimento da industria de fitoterápias e fitofármacos no Brasil. *Química nova*, 147-152.

Anexos

São apresentados os dados das diferentes cromatografias efetuadas no estrato de *n*-hexano das folhas de *Maytenus senegalensis*.

Tabela 2.3A: Descrição das frações cromatográficas dos extratos de hexano obtidos das folhas de *Ms*₁ parte solúvel em metanol

Nº	Frações com Produtos	Peso dos Produto (mg)	Peso dos Produto (mg)	%	Polaridade Hex-AcOEt
1	1	0,017	17	0,566	9:1
2	26- 28	0,164	164	5,465	//
3	29	0,009	9	0,30	//
4	30-37	0,074	74	2,456	//
5	38	0,453	453	15,09	//
6	39	0,837	837	27,89	//
7	40	0,207	207	6,897	8:2
8	41	0,107	107	3,565	//
9	42-45	0,139	139	4,63	//
10	46	0,020	20	0,666	//
11	47	0,015	15	0,50	//
12	48-53	0,145	145	4,83	7:3
13	54	0,003	3	0,099	//
14	55	0,004	4	0,133	//
15	56-59	0,011	11	0,366	//
16	60	0,004	4	0,133	6:4
17	61	0,001	1	0,033	//
18	62-64	0,038	38	1,266	//
19	65-70	0,0066	6,6	0,220	//
20	71-74	0,062	62	2,06	//
21	75	0,0017	1,7	0,056	//
22	76-80	0,062	62	2,06	//
23	81-84	0,004	4	0,133	//
24	85-86	0,0283	28,3	0,94	//
25	87-88	0,0118	11,8	0,39	//
26	89-90	0,095	95	3,166	//
27	91-101	0,248	248	8,264	5:5
28	102	0,224	224	7,464	//
29	103-104	0,021	21	0,70	//
30	105	0,015	15	0,50	//
31	106-107	0,0100	10	0,333	//
32	108	0,0042	4,2	0,14	//
33	109-112	0,012	12	0,40	//
Total		3,001	3001	100	

Tabela 2.4A: Descrição das frações cromatográficas dos extratos de hexano obtidos das folhas de *M_s1* parte solúvel em metanol

Nº	Frações com Produtos	Peso dos Produtos (g)	Peso dos produtos (mg)	%	Polaridade Hex/AcOEt
1	1-2	0,0216	21,6	0,553	9:1
2	40	0,033	3,3	0,084	8:2
3	41	0,2526	252,6	6,469	//
4	42	0,3272	327,2	8,379	//
5	43	1,4697	1.469,7	37,64	//
6	44	0,5524	552,4	14,146	//
7	45	0,2443	244,3	6,256	7:3
8	46-47	0,1734	173,4	4,44	//
9	48	0,0404	40,4	1,035	//
10	49-51	0,0707	70,7	1,810	//
11	52-56	0,0714	71,4	1,828	//
12	57-65	0,022	22	0,563	6:4
13	66-71	0,0296	29,6	0,758	//
14	72-75	0,0218	21,8	0,558	//
15	76-81	0,044	44	1,127	//
16	82-83	0,019	19	0,486	//
17	84-88	0,034	34	0,87	5:5
18	89	0,0163	16,3	0,417	//
19	90-92	0,0563	56,3	1,434	//
20	94	0,0035	3,5	0,089	//
21	97-99	0,0197	19,7	0,50	//
22	100-103	0,0077	7,7	3	//
23	104	0,0034	3,4	0,087	//
24	105-107	0,007	7,0	0,179	//
25	108	0,03	30	0,768	//
26	109-111	0,037	37	0,947	//
27	112-114	0,0107	10,7	0,274	100%
28	115-116	0,0056	5,6	0,14	//
29	117-118	0,0059	5,9	0,15	//
30	119	0,0489	48,9	1,15	//
31	120	0,0062	6,2	0,159	//
32	121-123	0,004	4,0	0,102	//
33	124	0,004	4,0	0,102	//
34	125-128	0,0045	4,5	0,115	//
35	129-131	0,007	7,0	0,179	//
36	132	0,005	5,0	0,128	//
37	133-135	0,2208	220,8	5,65	//
38	136	0,0041	4,1	0,105	//
Total		0,003905	3.905	97,6	

Tabela 2.5A. Cromatografia de Coluna da Fracção nº7 de C₁MS₁-Hex

Nº	Frações com	Peso dos Produtos (g)	Peso dos produtos	%	Polaridade Hex/AcOET
1	1	0,003	3	1,496	7:3
2	2	0,003	3	1,496	//
3	3	0,0022	2,3	1.147	//
4	6	0,0008	0,8	0,399	//
5	8	0,002	2	0,997	//
6	12	0,0008	0,8	0,399	//
7	15	0,0006	0,6	0,299	6:4
8	24	0,057	57	28,43	//
9	30	0,0085	8,5	4,239	//
10	31	0,0349	34,9	17.41	5:5
11	32	0.0454	45,4	22,64	//
12	33	0,0045	4,5	2,244	//
13	34	0,0068	6,8	3.391	//
14	35	0,0043	4,3	2,145	10
15	36	0,0030	3	1,496	//
16	37	0,0043	4,3	2,145	//
17	38	0,0021	2,1	1,047	//
18	39	0,0032	3,2	1,596	//
19	40	0,0046	4,6	2,294	//
20	41	0,0015	1,5	0,748	//
21	42	0,002	2	0,997	//
22	45	0,001	1	0,498	//
23	46	0,001	1	0,498	//
24	47	0,001	1	0,498	//
25	56	0,003	3	0,498	//
	Total	0,2005	200,5	99,9	

A seguir estão apresentados os resultados da análise espectroscópicas efetuadas no extrato de n-hexano das quais foram identificados cinco compostos puros.

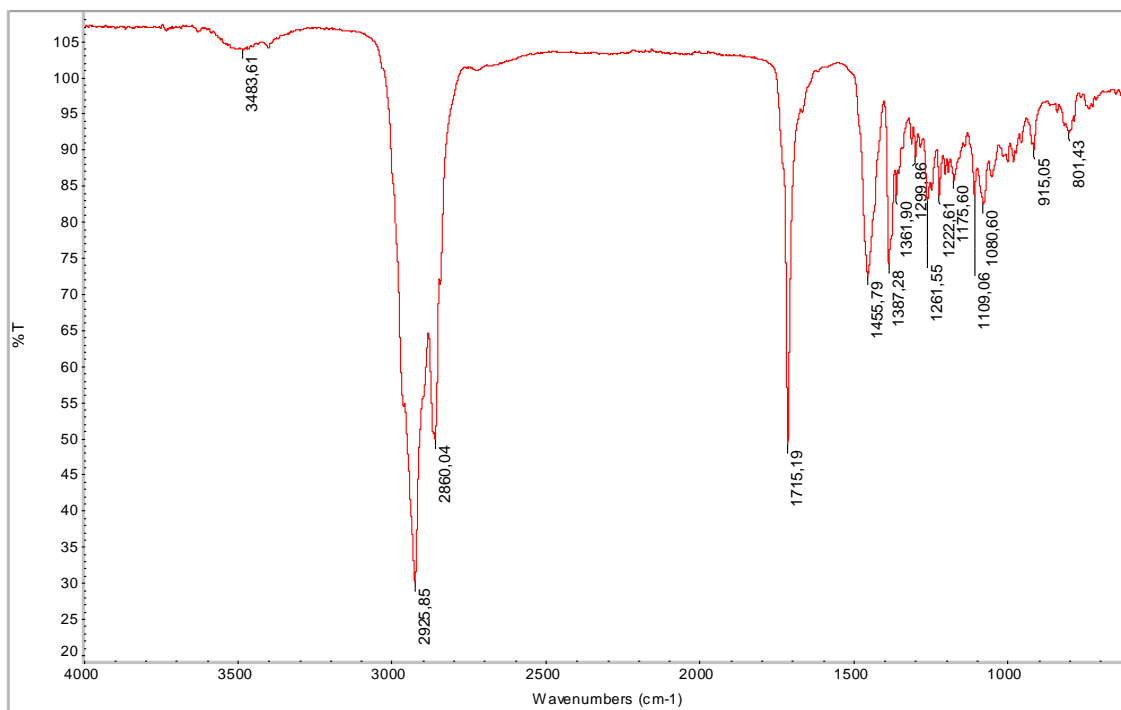
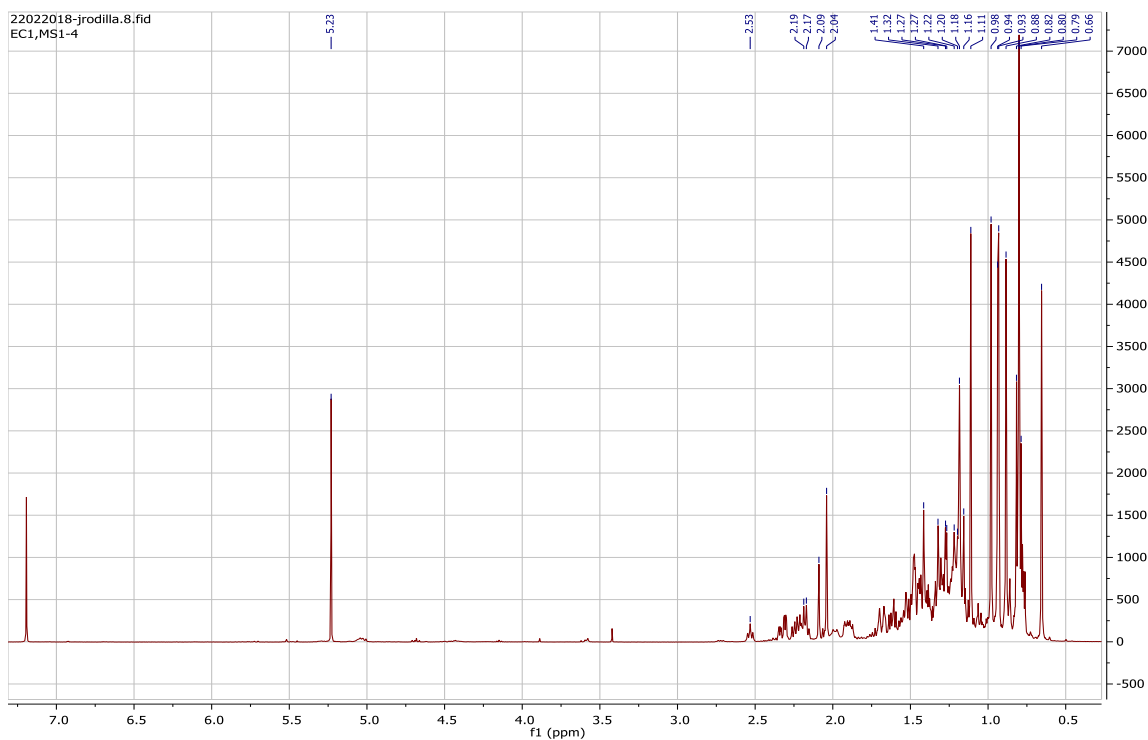
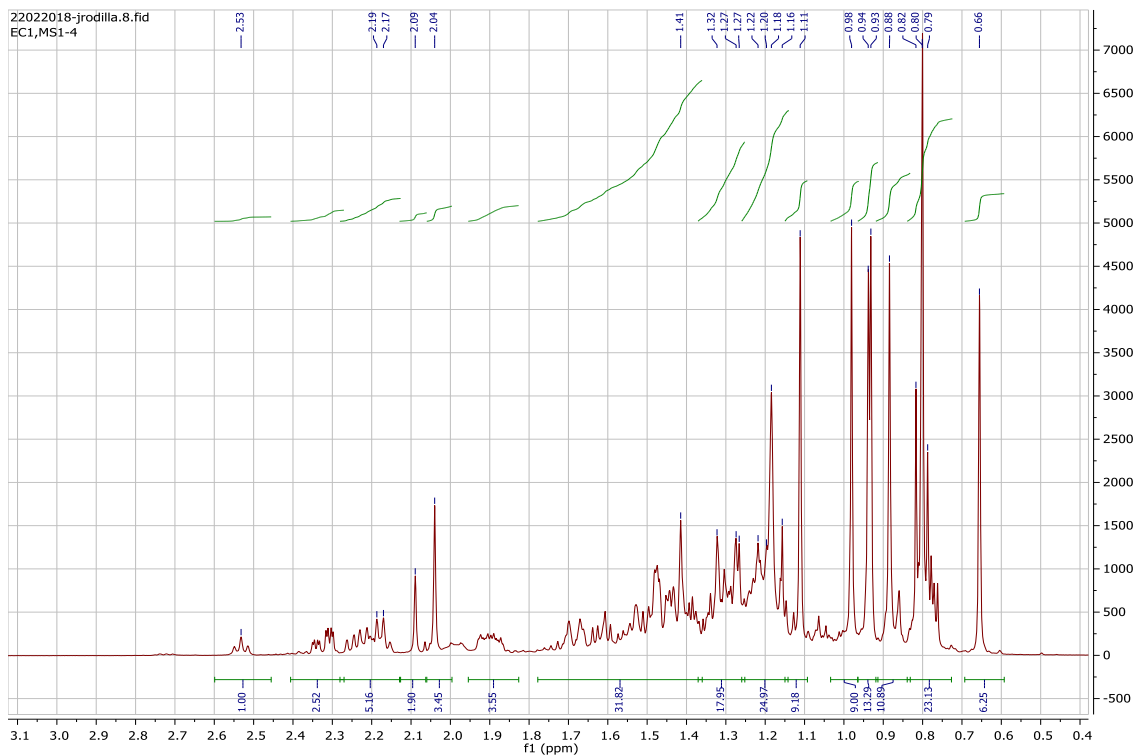


Figura 3.1A: Espectro de Infravermelho do composto identificado como: Friedelin



Figuras 3.1B: Espectro de RMN de ¹H, para amostra C-*Ms*₁-4 (Friedelin)



Ampliação

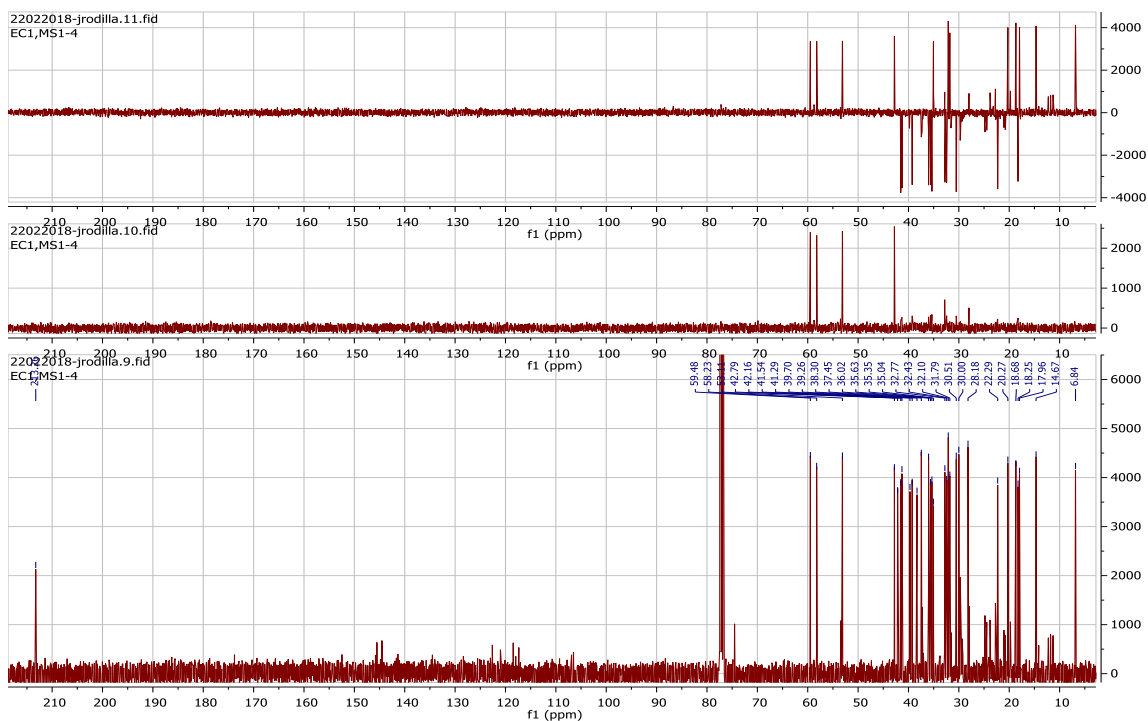
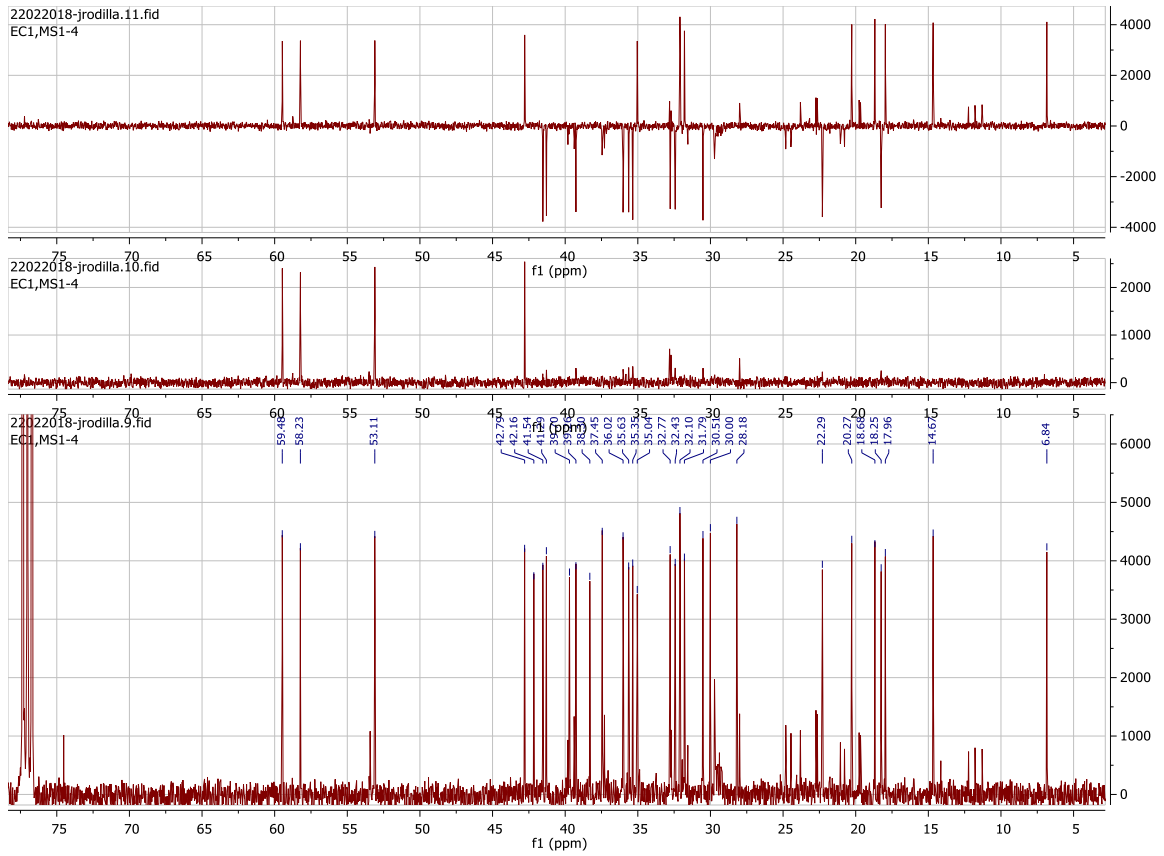


Figura 3.1C: Espectro de RMN de ^{13}C associado ao DEPT 90° e 135° para amostra $\text{C1-Ms}_1\text{-4}$



Ampliação:

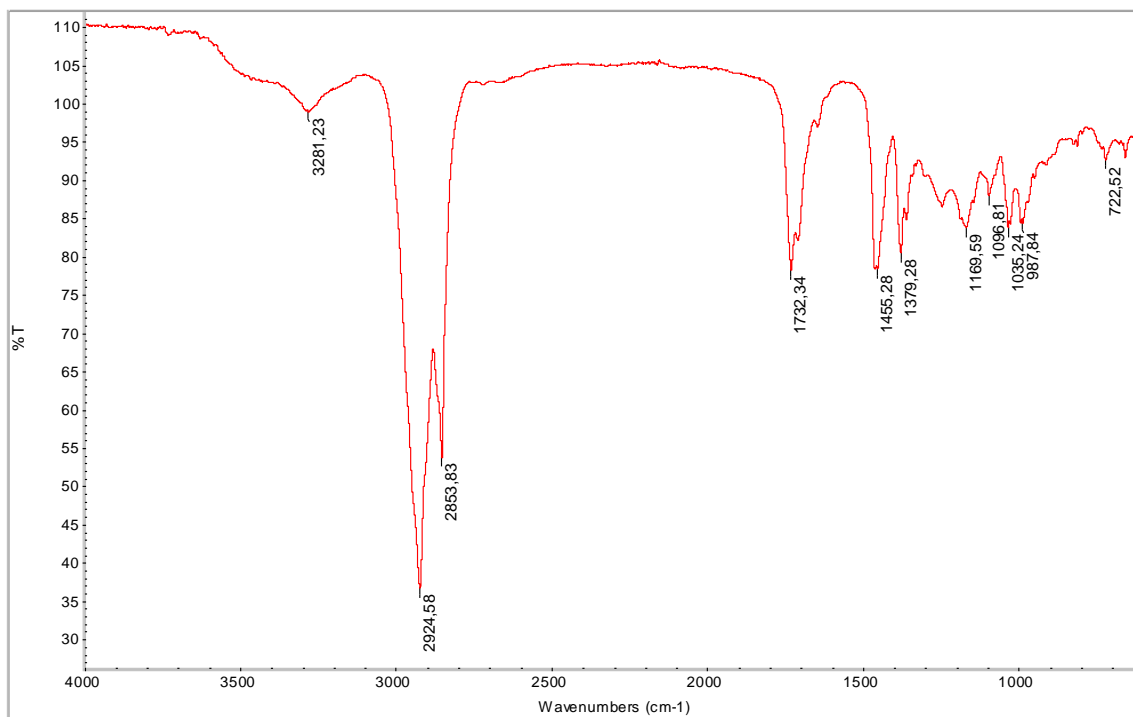


Figura 3.2A: Espectro de Infravermelho para o composto identificado como: β-amirina

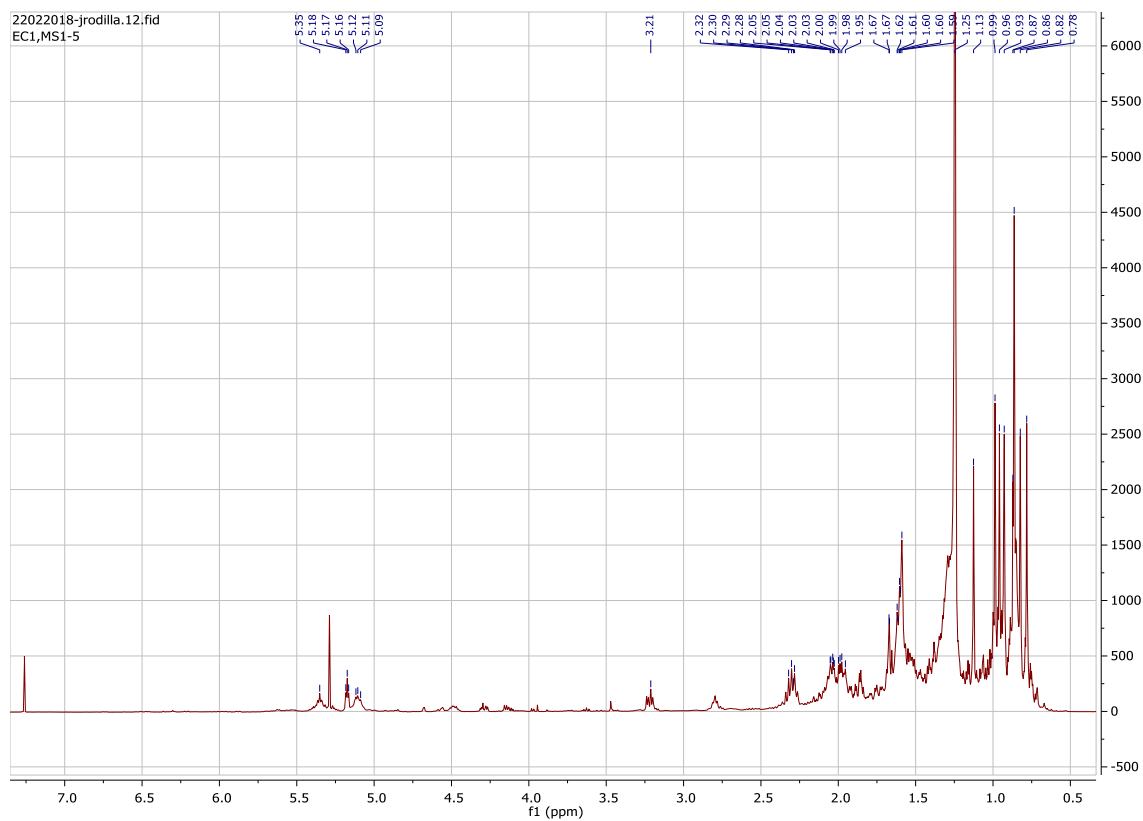


Figura 3.2B: Espectro de RMN de ¹H para amostra C1-MS₁-5 (β-amirina)

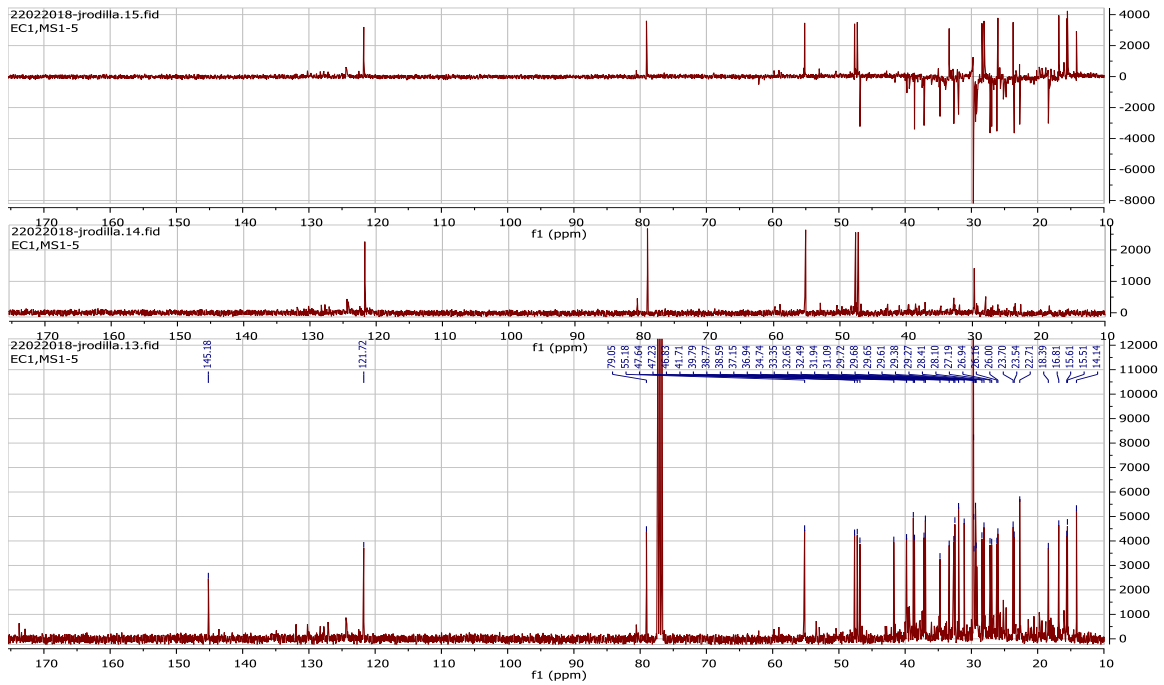
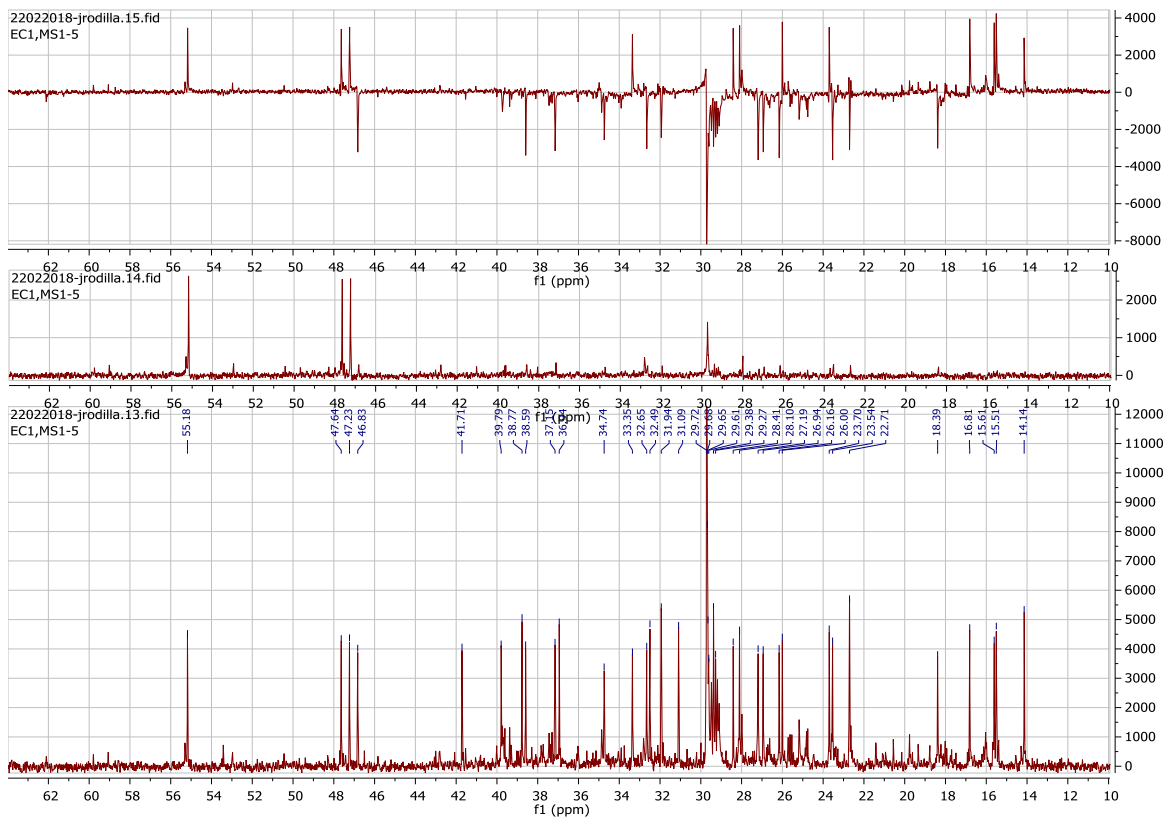
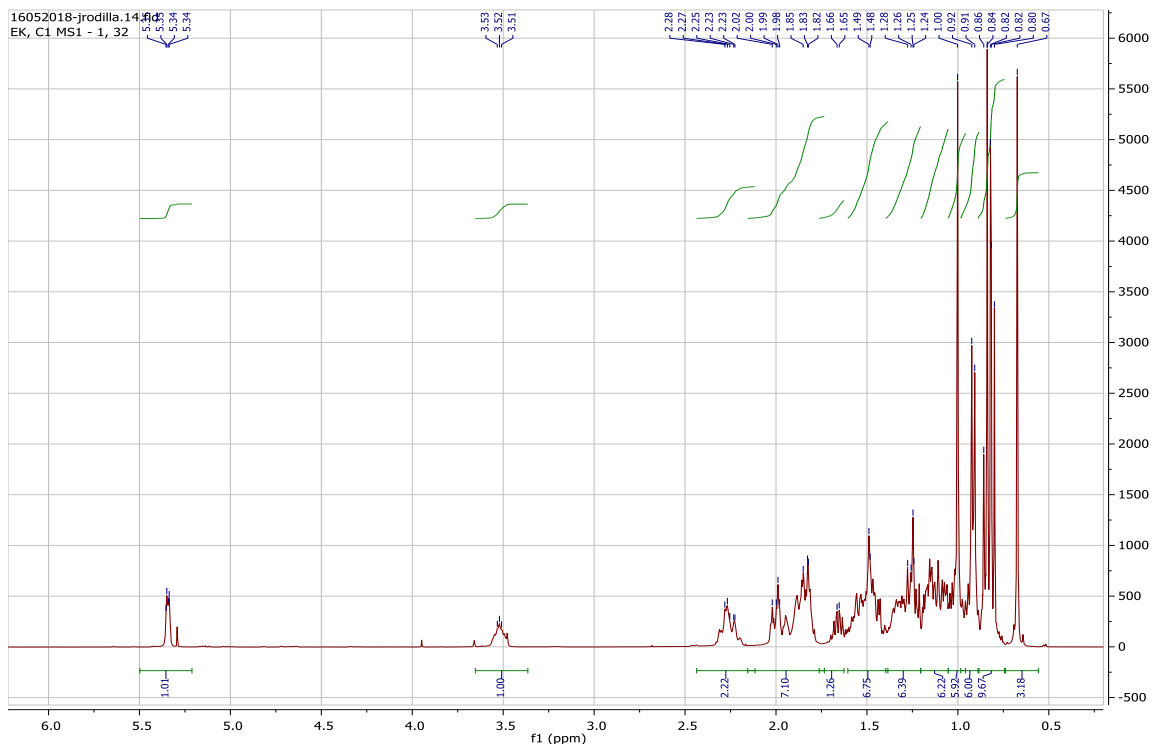


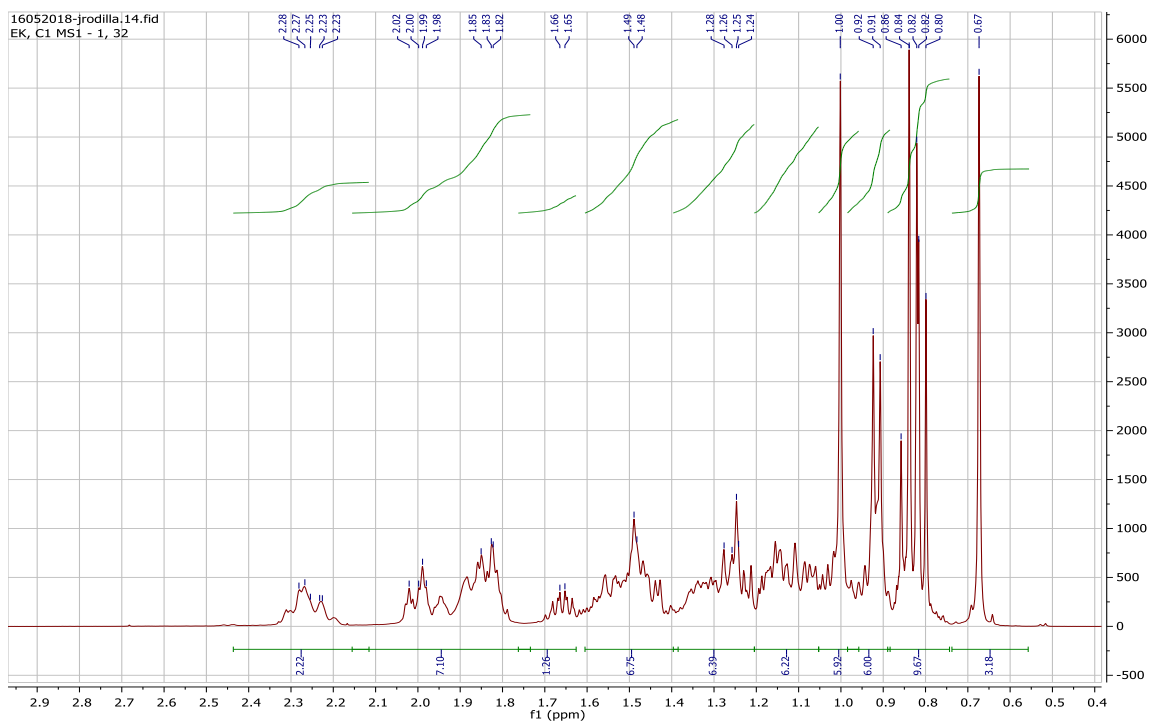
Figura 3.2C: Espectro de RMN de ^{13}C associado ao DEPT 90 e 135° para amostra C1-MS1-5 (β -amirina)



Ampliação:



Figuras 3.3A: Espectro de RMN de ^1H para amostra C1-MS₁-7 (β -Sitosterol)



Ampliação:

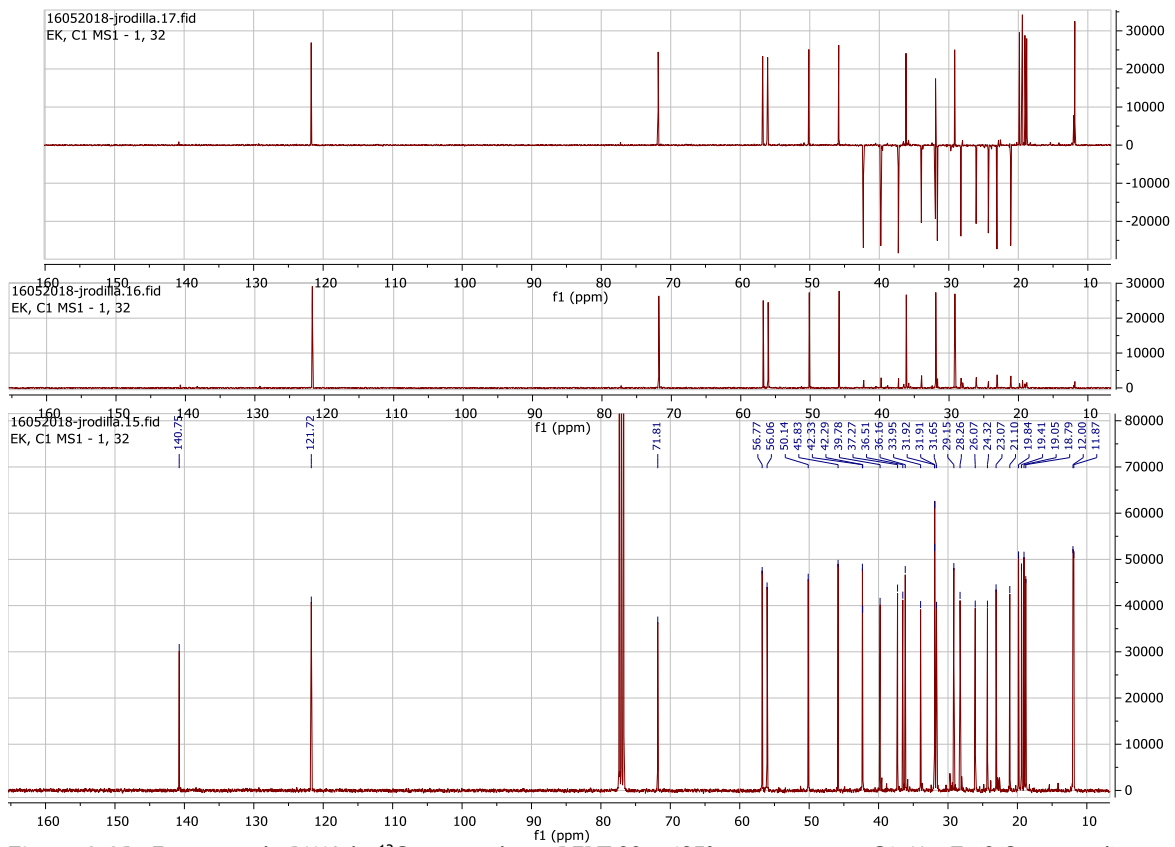


Figura 3.3B: Espectro de RMN de ^{13}C associado ao DEPT 90 e 135° para amostra C1- M_{s_1} -7 (β -Sitosterol)

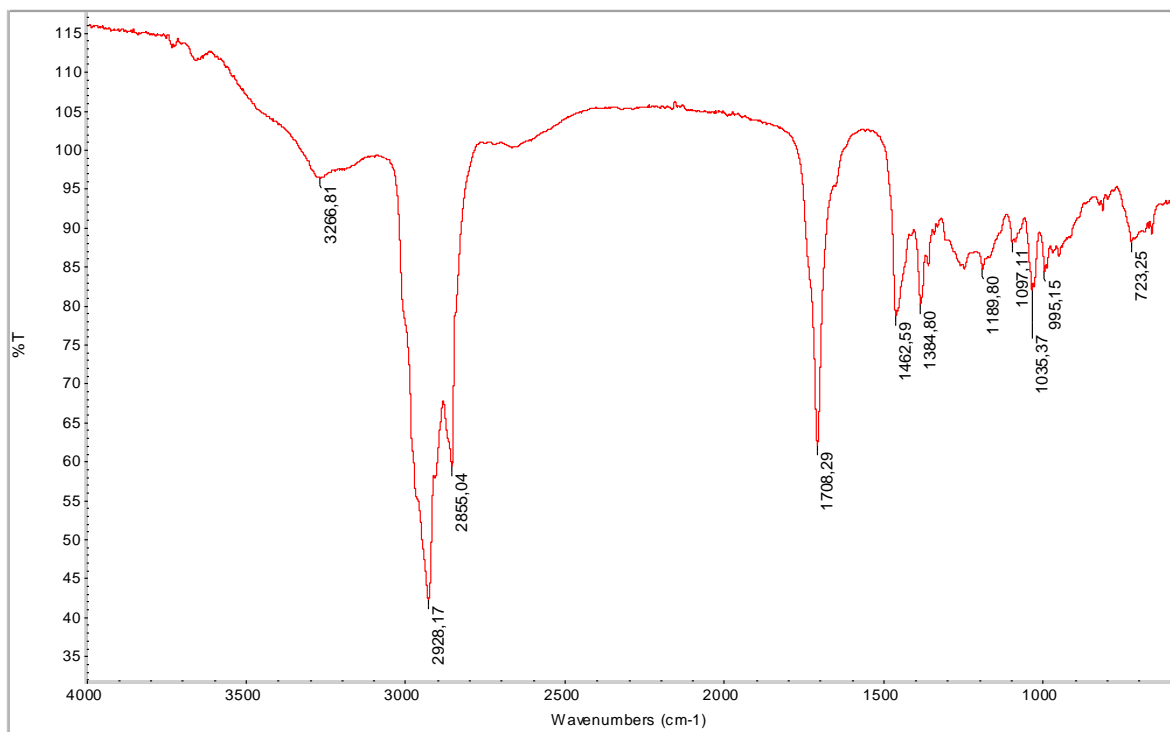


Figura 3.4A: Espectro de Infravermelho para amostra de C.Ms₂-8 (ácido α-oleostearico)

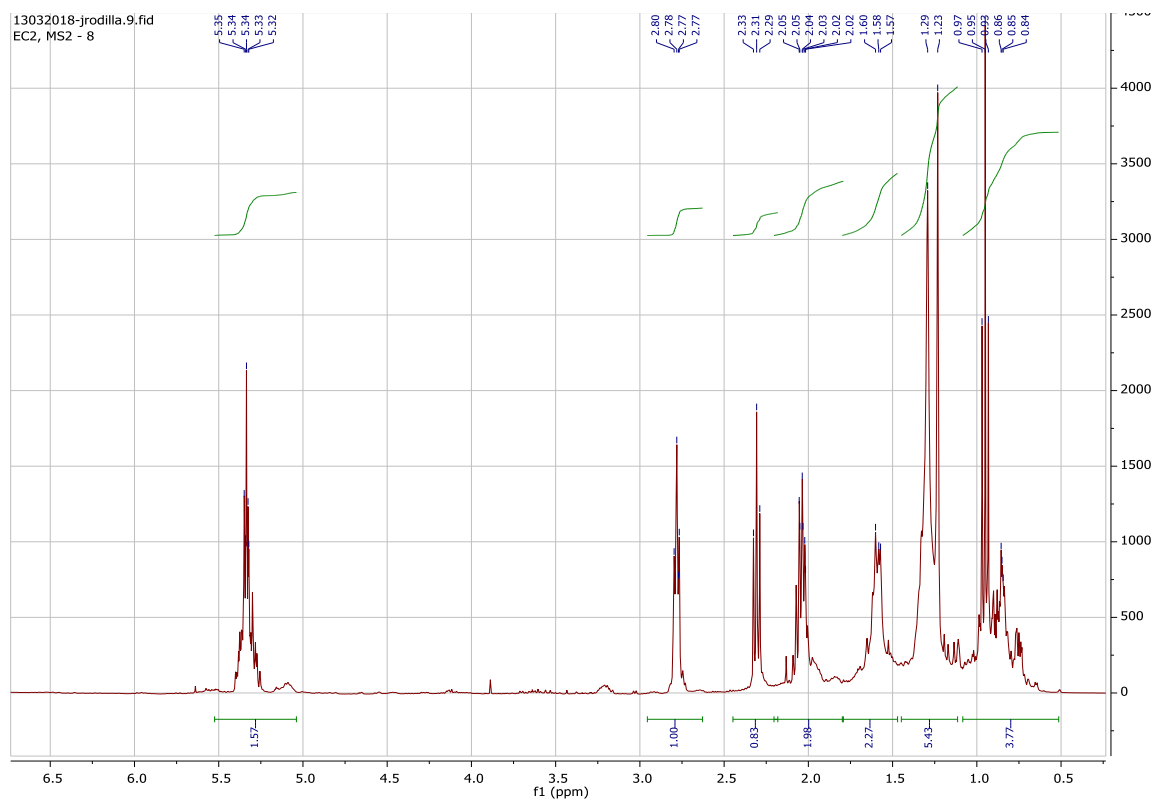
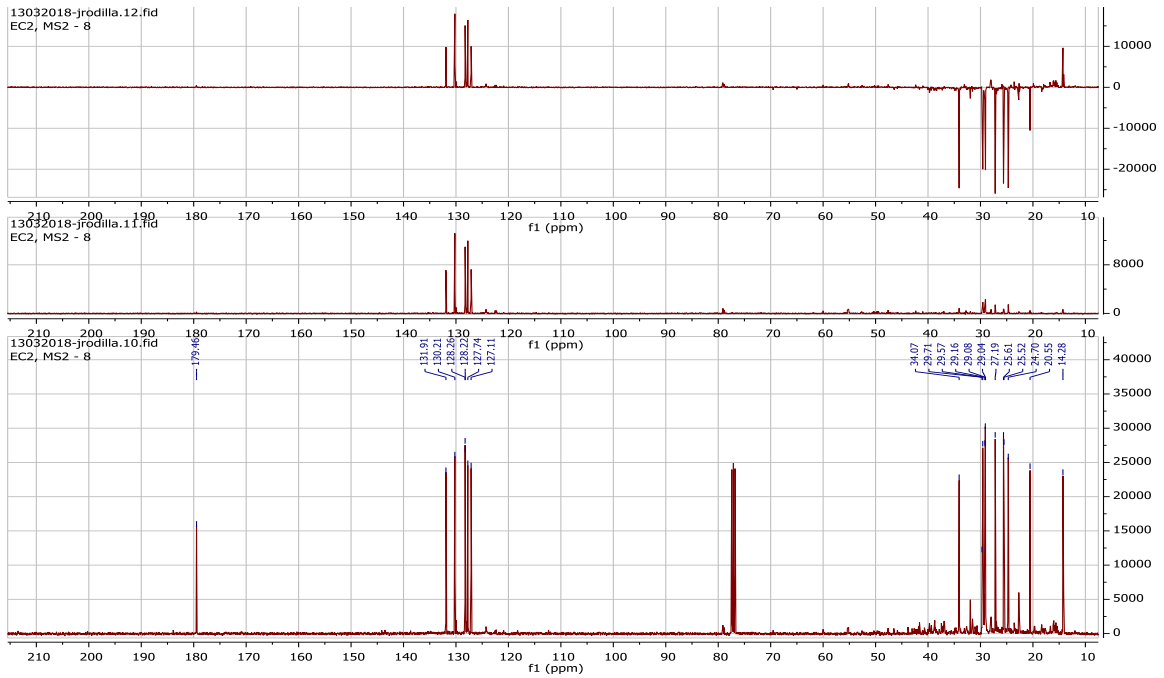
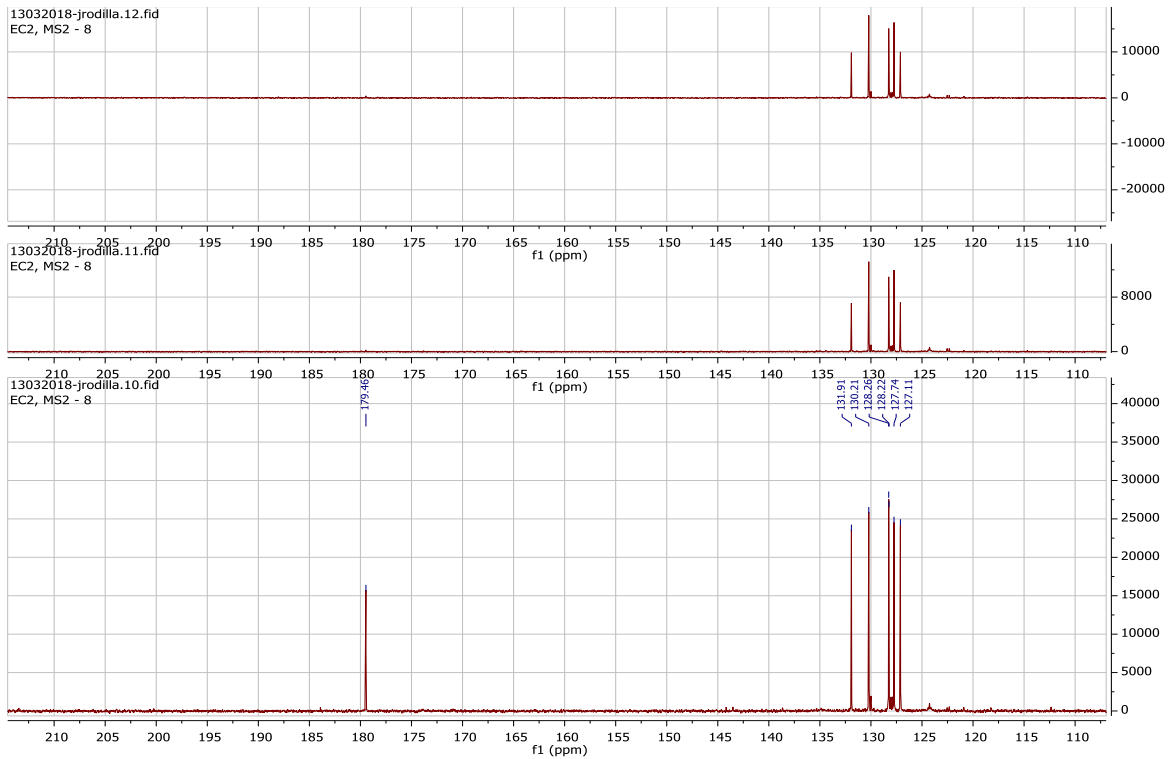


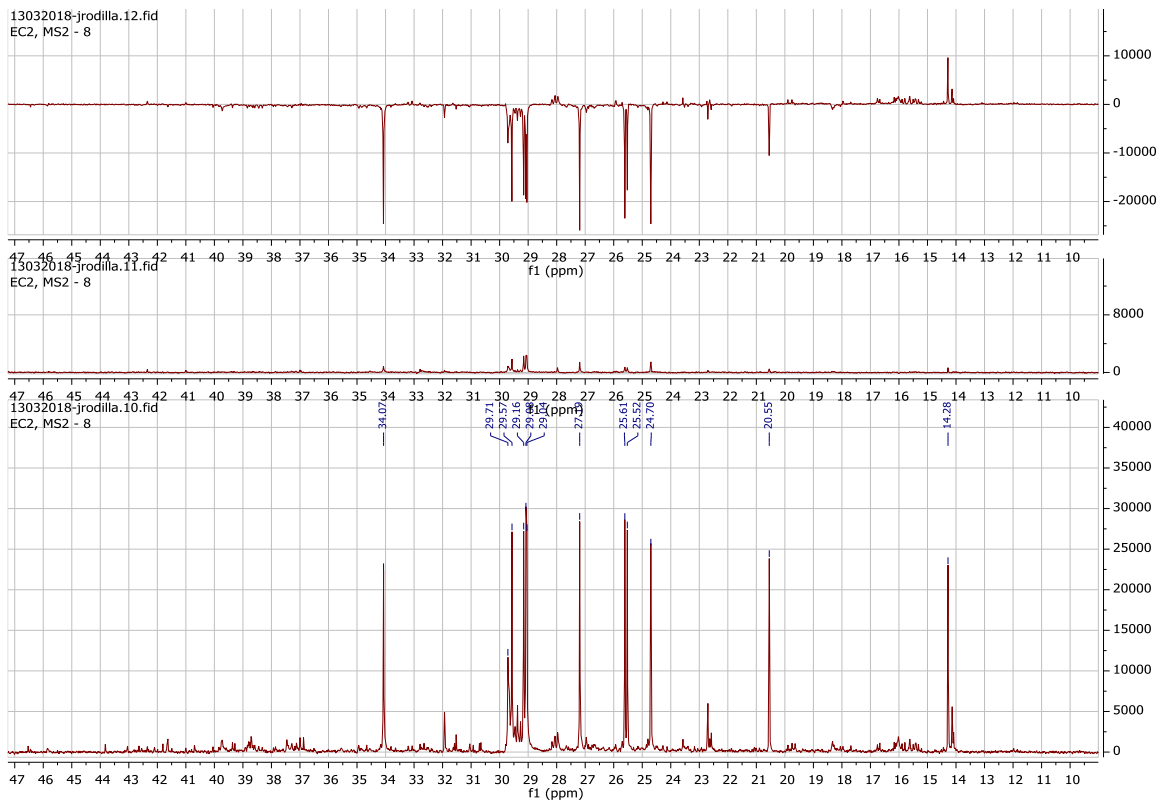
Figura 3.4B: Espectro de RMN de ¹H para amostra C.Ms₂-8



Figuras 3.4C: Espectro de RMN de ^{13}C associado ao DEPT 90° e 135° para amostra C.- Ms_2 -8



Espectro de RMN de ^{13}C associado ao DEPT 90° para amostra C. Ms_2 -8 (Ampliação):



Espetro de RMN de ^{13}C associado ao DEPT 90° e 135° para amostra C.Ms₂-8 (Ampliação):

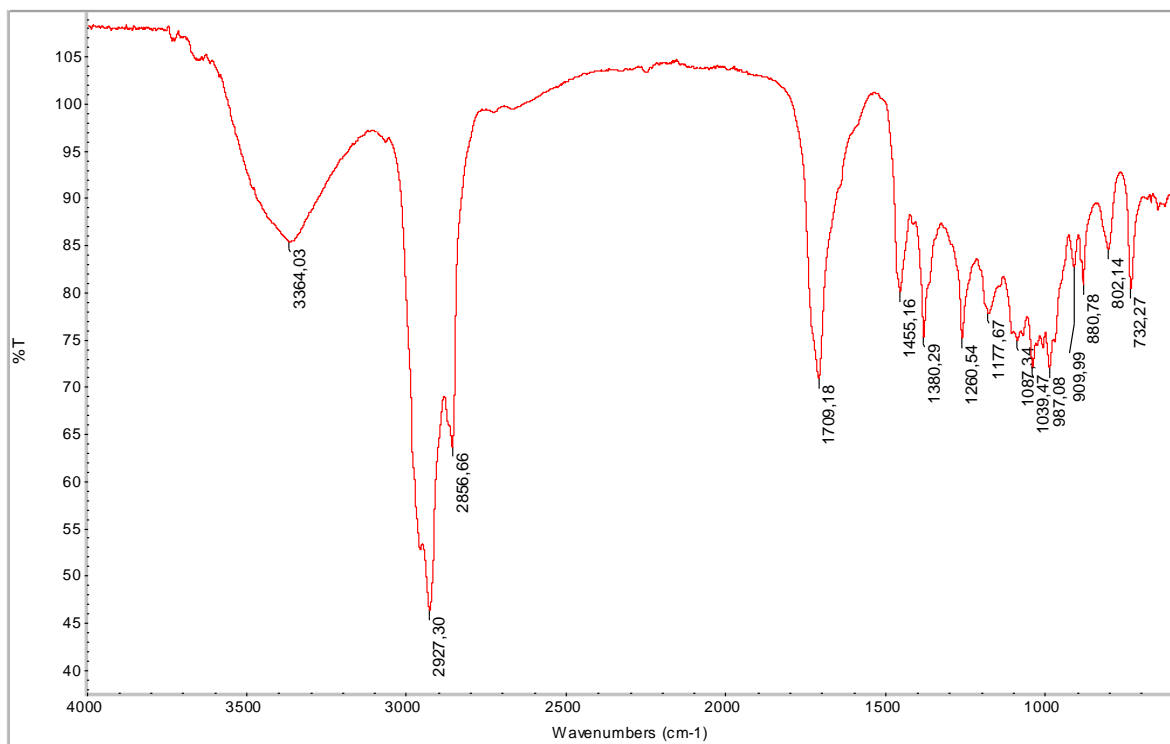


Figura 3.5A: Espectro de Infravermelho para amostra de C₂.MS₂-15 (3-Epi-gloquidiol)

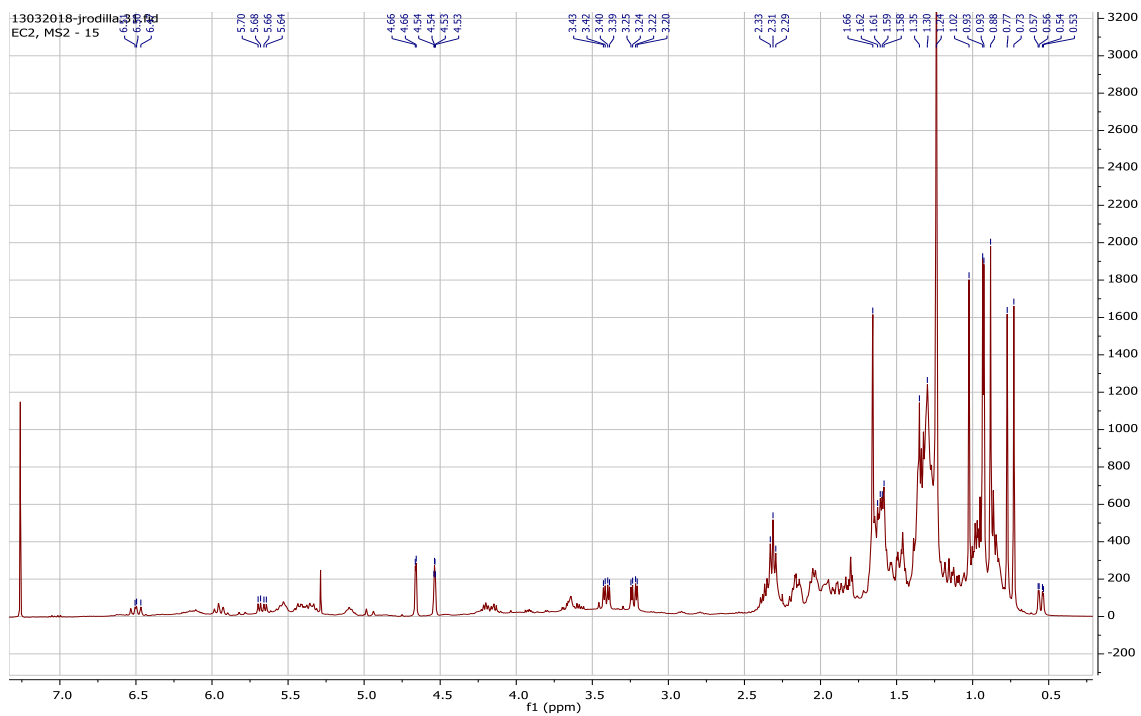


Figura 3.5B: Espectro de RMN de ¹H para amostra C₂.MS₂-15 (3-Epi-gloquidiol)

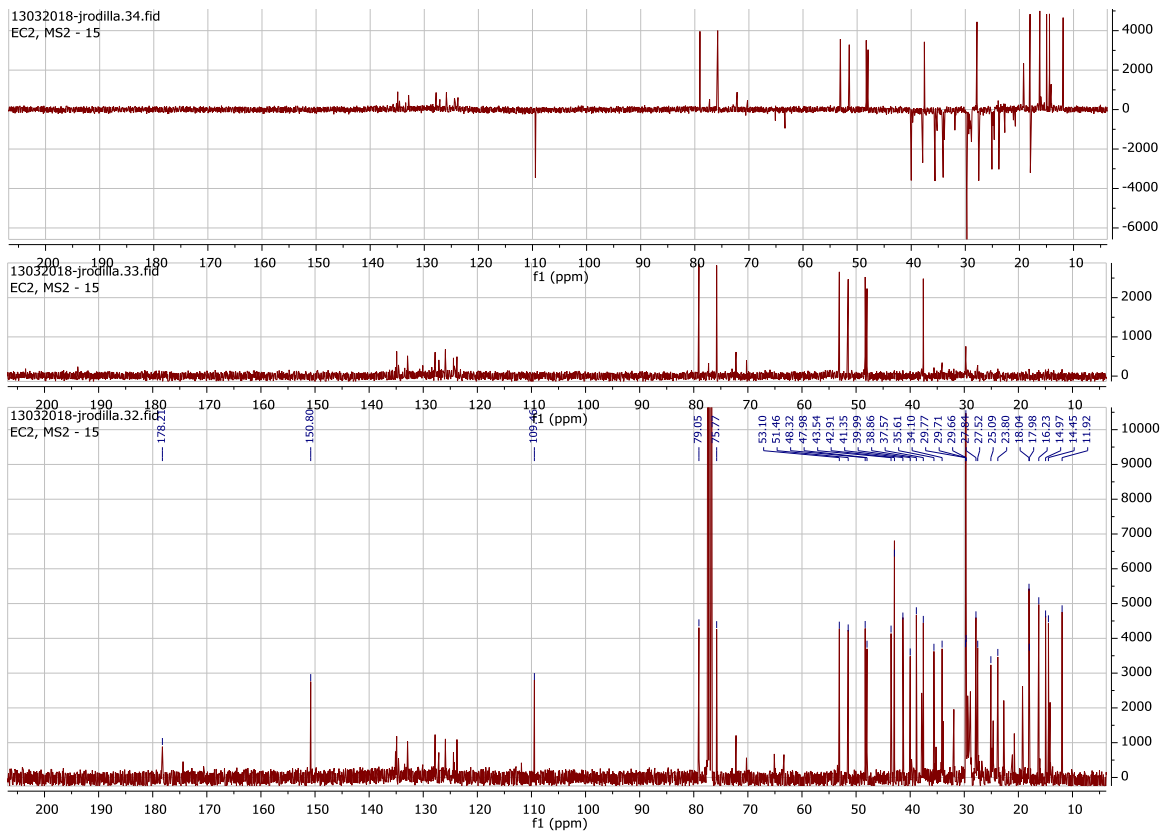


Figura 3.5C: Espectro de RMN de ^{13}C associado ao DEPT 90° e 135° para amostra $C.Ms_2-15$