

Universidade Federal de Minas Gerais
Instituto de Ciências Exatas
Departamento de Química

Shirley Alejandra Torres Morales

Maytenus distichophylla*: Fitoquímica dos extratos hexânico e clorofórmico das raízes, atividade biológica e cálculos *in silico

Belo Horizonte
2017

UFMG/ICEx/DQ. 1202^a

D. 661^a

SHIRLEY ALEJANDRA TORRES MORALES

Maytenus distichophylla*: Fitoquímica dos extratos hexânico e clorofórmico das raízes, atividade biológica e cálculos *in silico

Dissertação apresentada ao Departamento de Química do Instituto de Ciências Exatas da Universidade Federal de Minas Gerais, como parte dos requisitos necessários para a obtenção do grau de Mestre em Química – Química Orgânica.

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

Belo Horizonte

2017

T693m Torres Morales, Shirley Alejandra
2017 Maytenus distichophylla [manuscrito]: fitoquímica
D dos extratos hexânico e clorofórmico das raízes,
atividade biológica e cálculos in silico / Shirley
Alejandra Torres Morales. 2017.
[ix],82 f.: il.

Orientadora: Lucienir Pains Duarte.
Coorientador: Sidney Augusto Vieira Filho.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de
Minas Gerais - Departamento de Química.
Inclui bibliografia.

1. Química orgânica - Teses 2. Maytenus - Teses 3.
Terpenios - Teses 4. Agentes antibacterianos - Teses
5. Agentes antineoplásicos - Teses 6. Produtos
naturais - Teses I. Duarte, Lucienir Pains,
Orientadora II. Vieira Filho, Sidney Augusto,
Coorientador III. Título.

CDU 043

"*Maytenus distichophylla*: Fitoquímica dos Extratos Hexânico e Clorofórmico das Raízes, Atividade Biológica e Cálculos *in silico*"

Shirley Alejandra Torres Morales

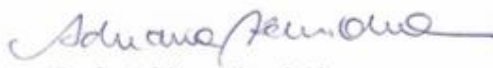
Dissertação aprovada pela banca examinadora constituída pelos Professores:



Profa. Lucienir Pains Duarte - Orientadora
UFMG



Prof. Sidney Augusto Vieira Filho - Coorientador
UFOP



Profa. Adriana Akemi Okuma
CEFET-MG



Profa. Henriete da Silva Vieira
UFMG

Belo Horizonte, 22 de fevereiro de 2017.

O trabalho descrito nesta dissertação foi realizado sob orientação da Professora Doutora Lucienir Pains Duarte e coorientação do Professor Doutor Sidney Augusto Vieira Filho.

Dedico este trabalho aos meus pais e à minha avó.

“Si nada nos salva de la muerte, al menos que el amor
nos salve de la vida”.

Pablo Neruda

AGRADECIMENTOS

A Deus, luz e guia do meu caminho.

À minha mãe, Elizabeth Morales, pelo amor e seu apoio incondicional.

A meu pai, Nery Torres, seu apoio e ajuda foram indispensáveis para mim.

À minha avó, Francisca Zepeda, que é minha fonte inesgotável de força.

À minha orientadora, professora Dra. Lucienir Duarte, por ter me acolhido na família do NEPLAM, pela sua orientação e ajuda com todo meu trabalho do mestrado, sua paciência, aprendi muito e agradeço a você com todo meu coração.

Ao meu coorientador, Bibo, suas palavras e as conversas sobre química e a vida que a gente teve, sempre me fez sentir acolhida e bem-vinda, agradeço muito sua amizade.

Aos meus novos e agora eternos amigos, Adriana García, Adriana Vargas (além de me ajudar com os espectros no IV apresentados neste trabalho), Fernanda Ferreira, Flávia Oliveira, Nahum Pineda, Carlos Amaya e Eduard Valenzuela, essa viagem foi um milhão de vezes mais fácil e divertida com vocês.

Aos meus colegas do NEPLAM: Grasi, Thiago, Mari, Isabel, Louise, Rafa e Josana, pela sua amizade.

Aos meus amigos e irmãos, Gerson Villatoro e Ángel Rodriguez, que ainda estando longe me deram sempre seu apoio, obrigada por tudo.

À minha mãe adotiva brasileira, Janua Coeli Ferreira Diaz, por abrir as portas de sua casa e me fazer sentir parte de sua família.

Ao meu brasileiro favorito, Victor Carvalhido, meu tutor de português, obrigada por me acolher em seu planeta.

À Dra. Ivana Lula, pela realização dos espectros de RMN.

À Dra. Adriana Akemi, pela realização das análises de CG-EM.

Ao Dr. Júlio López, pela realização dos cálculos da estimação da atividade biológica apresentados neste trabalho.

À Dra. Viviane Gouveia e sua equipe do LBCM pela realização dos testes biológicos.

SUMÁRIO

Índice de Figuras.....	i
Índice de Tabelas.....	iii
Lista de Abreviaturas, siglas e símbolos.....	iv
Lista de Constituintes isolados das raízes de <i>M. distichophylla</i>	vi
Resumo.....	viii
Abstract.....	ix
1. Introdução.....	1
1.1 Química de Produtos Naturais no Brasil.....	2
1.2 Família Celastraceae.....	3
1.3 Terpenoides.....	4
1.4 Triterpenos.....	4
1.5 Quinonametídeos.....	5
1.6 Gênero <i>Maytenus</i>	7
1.7 <i>Maytenus distichophylla</i>	8
2. Objetivos.....	12

Capítulo I: Estudo fitoquímico

3. Parte Experimental.....	13
3.1 Descrição geral.....	13
3.2 Coleta e identificação do material vegetal.....	14
3.3 Preparação dos extratos das raízes de <i>Maytenus distichophylla</i>	14
3.4 Elaboração do extrato hexânico (EH).....	15
3.5 Elaboração do extrato clorofórmico (EC).....	20
4. Determinação Estrutural.....	21
4.1 M1 : 3-Oxofriedelano.....	22
4.2 M2 : Triacilglicerol.....	23
4.3 M3 : β -Sitosterol.....	26
4.4 M4 : 3-Oxo-olean-9(11),12-dieno.....	30
4.5 M5 : 30-Hidroxilup-20(29)-en-3-ona.....	34
4.6 M6 : 11 α -Hidroxilup-20(29)-en-3-ona.....	38
4.7 M6 + M7 : 11 α -Hidroxilup-20(29)-en-3-ona e Pristimerina.....	42

4.8 M8: 3,7-Dioxofriedelano.....	46
4.9 M9: Tingenona.....	50

Capítulo II: Atividade biológica

5. Ensaio de Toxicidade.....	54
5.1 Descrição Geral.....	54
5.2 Metodologia.....	57
5.3 Resultados.....	59
6. Estimativa <i>in silico</i> de atividade biológica.....	64
6.1 Introdução.....	64
6.2 Quimioinformática.....	64
6.3 Resultados e Discussão.....	66
7. Conclusão	73
8. Referências.....	75

INDICE DE FIGURAS

Figura 1.1	Estrutura química da avermectina, utilizada no tratamento de doenças causadas por vermes nematódeos e artemisina, portadoras de expressiva ação antimalárica.....	2
Figura 1.2	Gêneros brasileiros pertencentes à família Celastraceae: <i>Maytenus</i> Juss., <i>Salacia</i> Mart., <i>Goupia</i> Reiss., <i>Austroplenckia</i> Lund. e <i>Franhoferia</i> Mart.....	3
Figura 1.3	Exemplos de esqueletos de diferentes séries de triterpenos.....	5
Figura 1.4	Alguns exemplos de quinonametídeos isolados de Celastraceae.....	5
Figura 1.5	Esquema simplificado da biossíntese de quinonametídeos a partir dos precursores oxidoesqualeno e β -friedelinol.....	6
Figura 1.6	Foto do tronco (a), flores e folhas (b) e folhas(c) de <i>Maytenus distichophylla</i>	9
Figura 1.7	Triterpenos pentacíclicos isolados de folhas de <i>M. distichophylla</i>	10
Figura 1.8	Estrutura química da wilforina e ebinifolina isoladas de raízes de <i>M. distichophylla</i>	11
Figura 3.1	Esquema utilizado para obtenção dos extratos de raízes de <i>Maytenus distichophylla</i>	15
Figura 3.2	Esquema do estudo fitoquímico com os extratos hexânico e clorofórmico.....	16
Figura 4.1.1	Espectro de massas 3-oxofriedelano M1	22
Figura 4.2.1	Espectro de RMN de ^1H de M2 (CDCl_3 , 400 MHz)	24
Figura 4.2.2	Espectro de RMN de ^{13}C de M2 (CDCl_3 , 100 MHz)	24
Figura 4.2.3	Subespectro DEPT 135 de M2 (CDCl_3 , 100 MHz)	25
Figura 4.3.1	Espectro na região do IV de M3 (ATR)	26
Figura 4.3.2	Espectro de RMN de ^1H de M3 (CDCl_3 , 400 MHz)	27
Figura 4.3.3	Espectro de RMN de ^{13}C de M3 (CDCl_3 , 100 MHz)	28
Figura 4.3.4	Subespectro DEPT 135 de M3 (CDCl_3 , 100 MHz)	28
Figura 4.4.1	Espectro na região do IV de M4 (ATR)	30
Figura 4.4.2	Espectro de RMN de ^1H para M4 (CDCl_3 , 400 MHz)	31
Figura 4.4.3	Espectro de RMN de ^{13}C para M4 (CDCl_3 , 100 MHz)	32
Figura 4.4.4	Subespectro DEPT 135 para M4 (CDCl_3 , 100 MHz)	32
Figura 4.5.1	Espectro de RMN de ^1H de M5 (CDCl_3 , 400 MHz)	35
Figura 4.5.2	Espectro de RMN de ^{13}C de M5 (CDCl_3 , 100 MHz)	35
Figura 4.5.3	Subespectro DEPT 135 de M5 (CDCl_3 , 100 MHz)	36

Figura 4.6.1	Espectro de absorção da região do IV de M6 (ATR)	38
Figura 4.6.2	Espectros de RMN de ^1H de M6 (CDCl_3 , 400 MHz)	39
Figura 4.6.3	Espectros de RMN de ^{13}C de M6 (CDCl_3 , 100 MHz)	40
Figura 4.6.4	Subespectro DEPT 135 de M6 (CDCl_3 , 100 MHz)	40
Figura 4.7.1	Espectro na região IV de M6 e M7 (ATR)	42
Figura 4.7.2	Espectro de RMN de ^1H de M6 + M7 (CDCl_3 , 400 MHz)	43
Figura 4.7.3	Espectro de RMN de ^{13}C de M6 + M7 (CDCl_3 , 100 MHz)	44
Figura 4.7.4	Subespectro DEPT 135 de M6 + M7 (CDCl_3 , 100 MHz)	44
Figura 4.8.1	Espectro na região de IV de M8 (ATR)	46
Figura 4.8.2	Espectro de RMN de ^1H de M8 (CDCl_3 , 400 MHz)	47
Figura 4.8.3	Espectro de RMN de ^{13}C de M8 (CDCl_3 , 100 MHz)	48
Figura 4.8.4	Subespectro DEPT 135 de M8 (CDCl_3 , 100 MHz)	48
Figura 4.9.1	Espectro da região de IV de M9 (ATR)	50
Figura 4.9.2	Espectro de RMN de ^1H de M9 (CDCl_3 , 400 MHz)	51
Figura 4.9.3	Espectro de RMN de ^{13}C de M9 (CDCl_3 , 100 MHz)	52
Figura 4.9.4	Subespectro DEPT 135 de M9 (CDCl_3 , 100 MHz)	52
Figura 5.1	Foto de <i>Caenorhabditis elegans</i> , adulto, hermafrodita.....	54
Figura 5.2	Ciclo de vida de <i>Caenorhabditis elegans</i> hermafrodita, a 22 °C	56
Figura 5.3A	Atividade biológica dos compostos, isolados de <i>Maytenus distichophylla</i> , sobre a viabilidade dos microrganismos patogênicos <i>S. aureus</i> MRSA (ATCC) e <i>C. albicans</i> (SC5314)	60
Figura 5.3B	Atividade biológica dos compostos, isolados de <i>Maytenus distichophylla</i> , sobre a viabilidade dos microrganismos patogênicos <i>S. aureus</i> MRSA (ATCC) e <i>C. albicans</i> (SC5314)	61
Figura 5.4.	Avaliação da potencial toxicidade para <i>C. elegans</i> , dos compostos isolados de <i>Maytenus distichophylla</i> (toxicidade água L1)	61
Figura 5.5	Curvas de sobrevivência de <i>C. elegans</i> na presença das substâncias	63

INDICE DE TABELAS

Tabela 1.1	Usos medicinais tradicionalmente atribuídos a espécies do gênero <i>Maytenus</i>	8
Tabela 3.1	Frações obtidas e eluentes utilizados para coluna EH.....	16
Tabela 4.1	Substâncias e misturas isoladas das raízes de <i>Maytenus distichophylla</i>	21
Tabela 4.3.1	Comparação dos dados de RMN de ¹³ C DE M3 com os dados da literatura para o β-sitosterol.	29
Tabela 4.4.1	Comparação dos dados de RMN de ¹³ C de M4 com os dados da literatura para o 3-oxo-olean-9(11),12-dieno.....	33
Tabela 4.5.1	Comparação dos dados de RMN de ¹³ C de M5 com os dados da literatura para 30-hidroxilup-20(29)-en-3-ona.....	37
Tabela 4.6.1	Comparação dos dados de RMN de ¹³ C de M6 com os dados da literatura para 11α-hidroxilup-20(29)-en-3-ona.....	41
Tabela 4.7.1	Comparação dos dados de RMN de ¹³ C de M6 + M7 com os dados da literatura para a mistura de 11α-hidroxilup-20(29)-en-3-ona e pristimerina.....	45
Tabela 4.8.1	Comparação dos dados de RMN de ¹³ C de M8 com os dados da literatura para o 3,7-dioxofriedelano.....	49
Tabela 4.9.1	Comparação dos dados de RMN de ¹³ C de M9 com os dados da literatura para a tingenona.....	53
Tabela 5.1	Concentração das amostras isoladas de <i>Maytenus distichophylla</i> utilizadas nos testes.....	57
Tabela 6.1	Alvos biológicos, doenças e efeitos relacionados ao alvo, selecionados <i>in silico</i> para 11α-hidroxilup-20(29)-en-3-ona (M6).....	67
Tabela 6.2	Alvos biológicos, doenças e efeitos relacionados ao alvo, selecionados <i>in silico</i> para 30-hidroxilup-20(29)-en-3-ona (M5).....	68
Tabela 6.3	Alvos biológicos, doenças e efeitos relacionados ao alvo, selecionados <i>in silico</i> para 3-oxo-olean-9(11),12-dieno (M4)	69

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SIMBOLOS

δ – Deslocamento químico

1D – Uma dimensão

2D – Duas dimensões

AcOEt – Acetato de etila

ATCC – *American Type Culture Collection*

ATR – *Attenuated Total Reflection*

CC – Cromatografia em Coluna

CCD – Cromatografia em Camada Delgada

CEFET-MG - Centro Federal de Educação Tecnológica de Minas Gerais

CCP - Cromatografia em camada preparativa

CLMP - Cromatografia líquida de média pressão

CG-EM – Cromatografia a gás acoplada à espectrometria de massas

d – duplete

DEPT – *Distortionless Enhancement by Polarization Transfer 135*

DMSO – Dimetil sulfóxido

GC-MS - Gas Chromatography Mass Spectrometry

ICB – Instituto de Ciências Biológicas

IV – Infravermelho

IR – Infrared Spectroscopy

J – Constante de acoplamento

LAREMAR – Laboratório de Ressonância Magnética de Alta Resolução

MeOH – Metanol

MRSA – Methicillin- Resistant *Staphylococcus aureus*

MTT - brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio]

NEPLAM – Núcleo de Estudo de Plantas Medicinais

NMR – Nuclear Magnetic Resonance

OMS – Organização Mundial da Saúde

RMN – Ressonância Magnética Nuclear

RMN de ^{13}C – Ressonância Magnética Nuclear de Carbono-13

RMN de ^1H – Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio

s – simpleto

SVM - Support Vector Machine

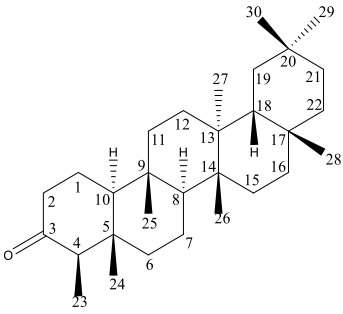
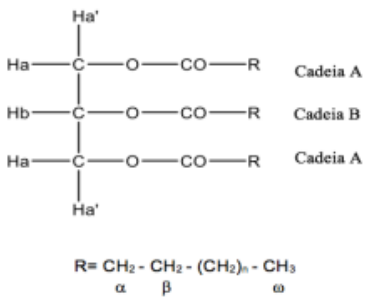
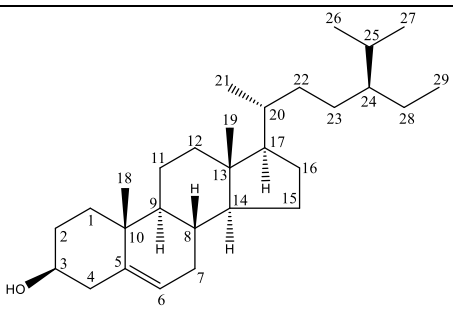
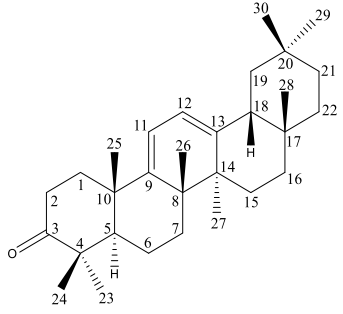
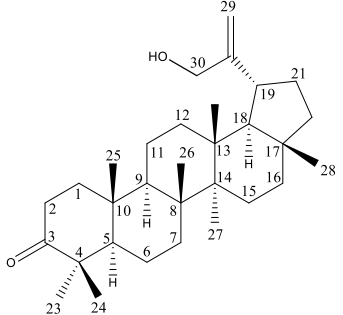
TMS – Tetrametilsilano

UESB - Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia

UFMG – Universidade Federal de Minas Gerais

UFOP – Universidade Federal de Ouro Preto

LISTA DE CONSTITUENTES ISOLADOS DE *Maytenus distichophylla*

Código	Nome	Estrutura	Página
M1	3-Oxofriedelano		22
M2	Triacilglicerol	 <p style="text-align: center;"> $R = \text{CH}_2 - \text{CH}_2 - (\text{CH}_2)_n - \text{CH}_3$ $\alpha \qquad \beta \qquad \omega$ </p>	23
M3	β -Sitosterol		26
M4	3-Oxo-olean-9(11),12-dieno		30
M5	30-Hidroxilup-20(29)-en-3-ona		34

Código	Nome	Estrutura	Pagina
M6	11 α -Hidroxilup-20(29)-en-3-ona		38
M7	Pristimerina*		42
M8	3,7-Dioxofriedelano		46
M9	Tingenona		50

*Mistura M6 + M7

RESUMO

Este trabalho envolve um estudo fitoquímico dos extratos hexânico e clorofórmico das raízes de *Maytenus distichophylla* e da avaliação da atividade biológica dos extratos e compostos isolados. Este estudo resultou no isolamento dos compostos: 3-oxofriedelano e 3,7-dioxofriedelano, com esqueleto friedelânico; 3-oxo-olean-9(11),12-dieno, do tipo oleano; 11 α -hidroxilup-20(29)-en-3-ona e 30-hidroxilup-20(29)-en-3-ona, do tipo lupano; pristimerina e tingenona, quinonametídeos; β -sitosterol, um esteroide e um triacilglicerol. As estruturas químicas das substâncias foram determinadas utilizando métodos espectroscópicos (IV, RMN de ^1H e de ^{13}C) e espectrométrico (CG-EM). O estudo da atividade biológica consistiu da avaliação da atividade antimicrobiana (antibacteriana e antifúngica), ensaio de toxicidade em *Caenorhabditis elegans* e cálculos de atividade biológica promissora, por meio de ferramentas *in silico*. Todas as substâncias testadas diminuíram significativamente a viabilidade de *Staphylococcus aureus* MRSA. Os compostos tingenona e a mistura de pristimerina e 11 α -hidroxilup-20(29)-en-3-ona e os extratos hexânico e clorofórmico, causaram uma redução da viabilidade de *S. aureus*, de aproximadamente 75%. Nas condições testadas não foi observado nenhum efeito sobre a viabilidade de *Candida albicans*. Os testes no estágio L4 de *C. elegans*, que é o estágio larval utilizando em ensaios de infecção, indicaram como bons candidatos a utilização do extrato hexânico e a mistura de pristimerina e 11 α -hidroxilup-20(29)-en-3-ona, para o tratamento da infecção bacteriana *in vivo*. Os demais compostos afetaram a viabilidade de *C. elegans* indicando que os mesmos apresentam potencial nematicida. Os cálculos *in silico* realizados utilizando os métodos SVM (Support Vector Machine) e Bayes (naive-Bayes Classifier) indicaram que os compostos lupânicos possuem potencial atividade no tratamento de doenças cardíacas e como inibidores da enzima β -lactamase. Os compostos 3-oxo-olean-9(11),12-dieno, 11 α -hidroxilup-20(29)-en-3-ona e 30-hidroxilup-20(29)-en-3-ona, apresentaram uma atividade promissora em vários tipos de câncer, principalmente câncer de mama e câncer de ovário.

Palavras-chave: Celastraceae, *Maytenus distichophylla*, triterpenos pentacíclicos, atividade antibacteriana, câncer de mama e ovário.

ABSTRACT

The phytochemical study of hexane and chloroform root extracts from *Maytenus distichophylla* was performed yielding natural products from a variety of classes such as friedelane, oleanane, lupane, quinonemethide and steroid compounds. The isolated compounds were identified as 3-oxofriedelane, 3,7-dioxofriedelane, 3-oxo-olean-9(11),12-diene, 11-hydroxylup-20(29)-en-3-one, 30-hydroxylup-20(29)-en-3-one, tingenone and β -sitosterol. Furthermore, one triacylglycerol and a mixture of 11 α -hydroxylup-20(29)-en-3-one/pristimerin were also isolated in this study. Their chemical structures were determined by spectroscopic (IR, H and C-NMR) and spectrometric (GC-MS) methods. The antimicrobial activity (antibacterial/antifungal) was evaluated for the extracts and isolated compounds. All substances reduced the viability of *Staphylococcus aureus* MRSA, however no effect was observed for *Candida albicans*. The most active samples were tingenone, the mixture of 11-hydroxylup-20(29)-en-3-one/pristimerin and the hexane and chloroform extracts, with a reduction of 75% approximately. The toxicity was also assayed using a *Caenorhabditis elegans* model in L1 and L4 phase. All tested compounds were non-toxic in L1 phase. However, only the hexane extract and the mixture 11 α -hydroxylup-20(29)-en-3-one/pristimerin allowed the nematodes survival in L4 phase (larval phase used on infection tests). Once these two samples also showed high antibacterial activity, they present themselves as potential candidates to *in vivo* treatment of bacterial infections. The toxic substances displayed a nematicide potential that could be explored in parasitological studies. Moreover, *in silico* calculations were performed for 3-oxo-olean-9(11),12-diene, 11 α -hydroxylup-20(29)-en-3-one and 30-hydroxylup-20(29)-en-3-one using the SVM (Support Vector Machine) and Bayes (naive-Bayes Classifier) methods. The lupane compounds showed a potential for treatment of heart diseases and inhibition of β -lactamase enzyme. Also, all three substances displayed promising activity for several types of cancer, mainly breast and ovary cancer.

Keywords: Celastraceae, *Maytenus distichophylla*, pentacyclic triterpenes, antibacterial, breast and ovarian cancer.

1. INTRODUÇÃO

Durante o processo de seleção e evolução natural, as plantas desenvolveram uma enorme diversidade estrutural de metabólitos (YUNES e FILHO, 2001). Muitos desses metabólitos apresentam atividades biológicas (NEWMAN, et al., 2012). Portanto, podemos dizer que o reino vegetal constitui uma importante fonte de substâncias naturais portadoras de propriedades biológicas distintas. Além disso, muitos compostos isolados de plantas servem de modelo para o desenvolvimento de fármacos (McCHESNEY et al., 2007). Newman e Cragg (2012) relatam que 74% das substâncias que são utilizadas em medicamentos nos últimos 30 anos, são relacionados a produtos naturais. Os produtos naturais também podem gerar análogos estruturais com maior atividade biológica e com menor efeito colateral (GORDALIZA, 2007), utilizando processos de semi-sínteses que levam à modificação estrutural de grupos já existentes.

A Organização Mundial da Saúde (OMS) estimou que em torno de 65% da população mundial utiliza fitoterápicos derivados da medicina tradicional como uma primeira opção no cuidado da saúde, com maior prevalência nos países em desenvolvimento (WHO, 2000).

O prêmio Nobel de Medicina e Fisiologia de 2015 foi concedido aos cientistas Dr. William C. Campbell, irlandês, e Dr. Satoshi Omura, japonês, por criarem novas terapias para combater doenças causadas por vermes nematódeos e para a Dra. Youyou Tu, chinesa, por desenvolver uma nova terapia contra a malária. Os trabalhos destes pesquisadores envolveram dois produtos naturais antimicrobianos, a avermectina e artemisina (Figura 1.1, p. 2), que combatem doenças parasíticas como a malária e oncocercosis. Um dos ganhadores, a Dra. Youyou Tu da Academia de Medicina Tradicional Chinesa, desenvolveu seu trabalho inspirado na medicina tradicional para o tratamento da malária, depois de ler um texto chinês escrito no ano 248 d.C., relatando o uso da erva *artemisia annua*, para aliviar sintomas da malária. Inspirada neste texto e a partir do remédio erval, ela obteve a substância ativa artemisinina. Esta substância se mostrou como um fármaco de expressiva ação antimalárica, e estima-se que, anualmente na África, ele salva a vida de aproximadamente 100.000 pessoas (GUNTHER, 2015).

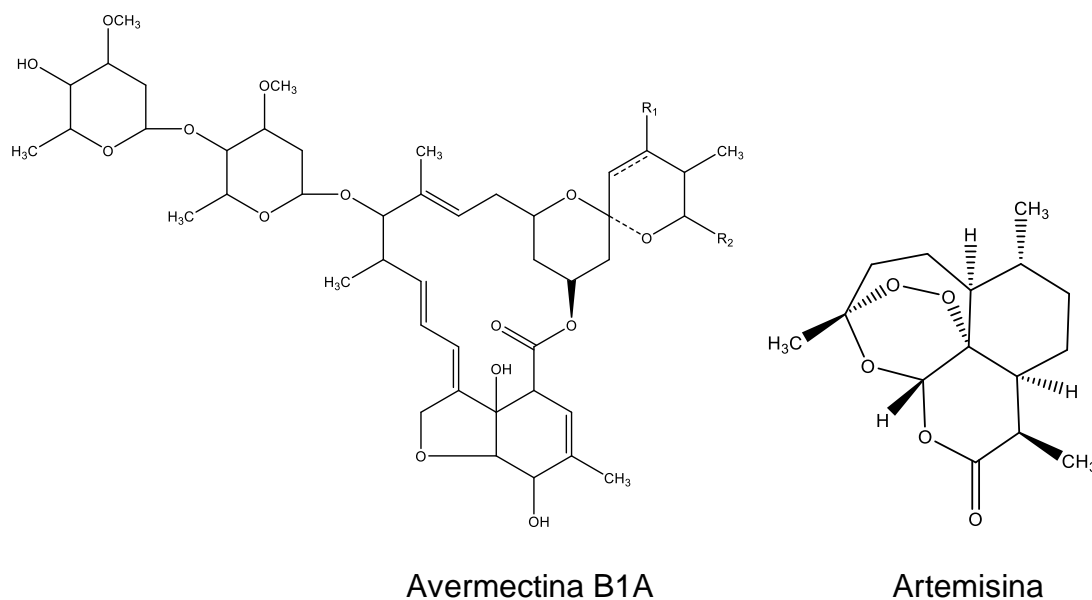


Figura 1.1 Estrutura química da avermectina, utilizada no tratamento de doenças causadas por vermes nematódeos e artemisina, portadoras de expressiva ação antimalárica.

1.1 Química de Produtos Naturais no Brasil

A química de produtos naturais no Brasil vem se tornando cada vez mais importante já que existe uma grande diversidade estrutural dos compostos orgânicos isolados de plantas da flora brasileira. Sua contribuição para esse campo e o potencial relacionado ao desenvolvimento social e econômico reafirma a contribuição da fitoquímica para o avanço científico e tecnológico do Brasil.

A biodiversidade genética vegetal brasileira é complexa, contando com mais de 55.000 espécies catalogadas de um total estimado entre 350 a 550.000 existentes, sendo que em torno de 50% delas são angiospermas, cujas principais características envolvem a presença de flores e frutos. Popularmente, a muitas delas são atribuídas atividades biológicas consideradas importantes (SIMÕES e SCHENKEL, 2001). Em função disso, a química de produtos naturais envolve várias linhas de investigação, sendo que a maioria delas é direcionada para o estudo de plantas utilizadas na medicina tradicional. Neste contexto, a família Celastraceae se destaca pela presença de constituintes com propriedades farmacológicas importantes.

1.2 Família Celastraceae

É reconhecido que, desde a antiguidade, espécies da família Celastraceae têm sido utilizadas devido as suas propriedades medicinais (SPIVEY et al., 2002). O extrato bruto de muitas delas é popularmente utilizado para fins terapêuticos, tais como estimulante, supressor de apetite, sedativo, emético, purgativo, restaurador da memória, contraceptivo masculino, antitumoral, antileucêmico, antibacterial, inseticida e repelente de insetos (SPIVEY et al., 2002; NIERO et al., 2011).

Dentre as espécies mais estudadas no Brasil, citam-se as dos gêneros (Figura 1.2) *Maytenus* Juss., *Salacia* Mart., *Goupia* Reiss., *Austroplenckia* Lund. e *Franhofera* Mart. (BARROSO et al., 1984; CARVALHO-OKANO, 1992). As principais classes de compostos isolados de espécies da família Celastraceae envolvem: triterpenos (RODRIGUES et al., 2015), sesquiterpenos (ALARCÓN et al., 2015), alcaloides (ZHOU et al., 2015), flavonoides (WANG et al., 2016) e esteroides glicosilados (RODRIGUES et al., 2015).



Figura 1.2 Gêneros brasileiros pertencentes à família Celastraceae: *Maytenus* Juss., *Salacia* Mart., *Goupia* Reiss., *Austroplenckia* Lund. e *Franhofera* Mart.

Fonte: <http://www.portalpower.com.br/trabalho-escola/mapa-capitais-brasil/>.

1.3 Terpenoides

Os principais constituintes bioativos, encontrados em maior quantidade nas espécies da família Celastraceae pertencem à classe dos terpenoides. Esta classe possui uma grande diversidade de metabólitos secundários com estruturas químicas distintas, formadas por unidades de isopreno C₅ (2-metilbuta-1,3-dieno). Como exemplo destes metabólitos cita-se os triterpenos (C₃₀), formados por seis unidades de isopreno, e que são encontrados com frequência em extratos menos polares de espécies da família Celastraceae (SPIVEY et al., 2002).

1.4 Triterpenos

As rotas biossintéticas de muitos triterpenos são conhecidas (DEWICK, 2009). A estes compostos é atribuída uma ampla faixa de atividades biológicas tais como bactericida, fungicida, larvicida, tripanocida, antimalárico, hipoglicêmico, antioxidante, cardioprotetor, antitumoral, anti-inflamatório, antireumático, antiartrítico e antimutagênico (RODRIGUES et al., 2015), tornando-os atrativos como novos potenciais fármacos.

Os principais triterpenos isolados de espécies da família Celastraceae pertencem à série dos friedelanos (a), oleanos (b), lupanos (c), taraxeranos (d), quinonametídeos (e) e damaranos (f) (Figura 1.3, p. 5). Os compostos triterpenoides quinonametídeos formam um pequeno grupo de derivados D:A-friedo-*nor*-oleano que invariavelmente contém grupos funcionais oxigenados, ligados no carbono 2 e 3. Até o momento, estes compostos somente foram encontrados em espécies da família Celastraceae e Hippocrateaceae, sendo, portanto, considerados como indicadores quimiotaxonômicos (ALVARENGA e FERRO, 2006).

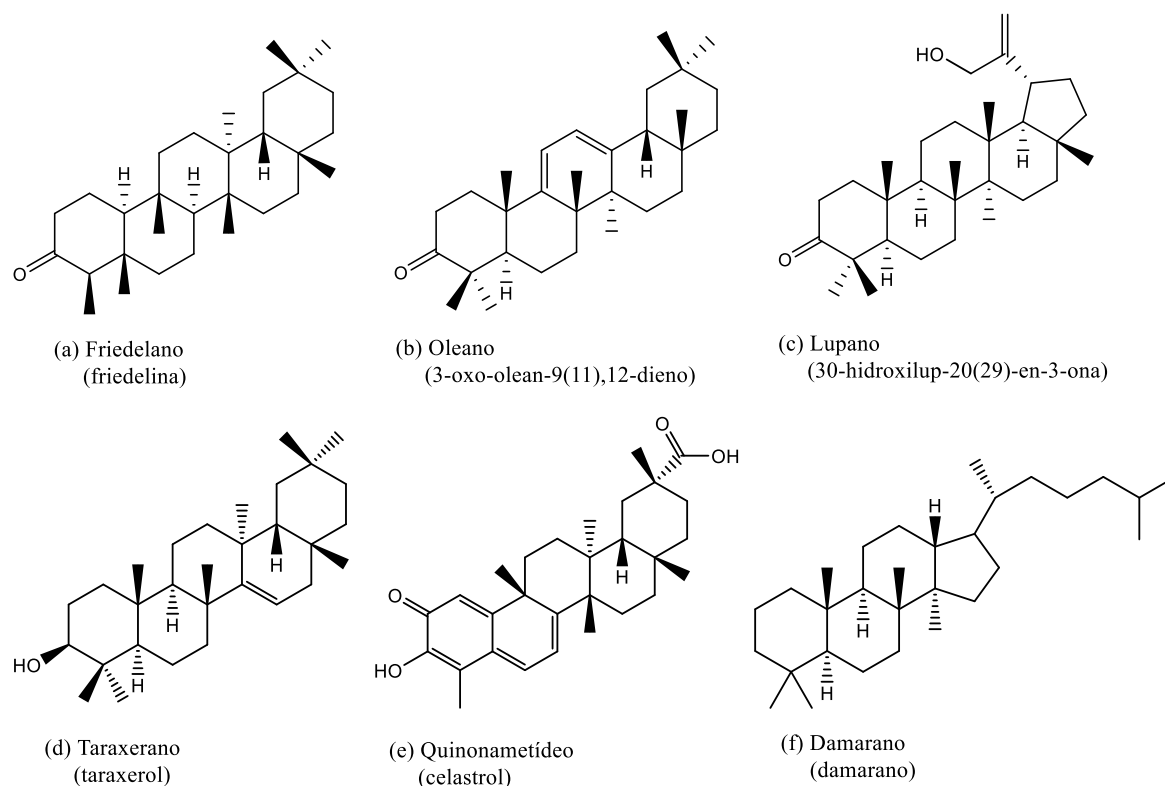


Figura 1.3 Exemplos de esqueletos de diferentes séries de triterpenos.

1.5 Quinonametídeos

Desde o isolamento do celastrol (Figura 1.3) em 1936, realizado por pesquisadores chineses, uma variedade de quinonametídeos (Figura 1.4) foi encontrada em espécies de Celastraceae e suas estruturas químicas, juntamente com uma variedade de atividades biológicas tem sido reportada (DA SILVA et al., 2016; NOSSACK et al., 2004; MENEZES et al., 2006). Estes compostos possuem importantes propriedades como antitumoral, antimicrobiano, antibiótico, antimalárico, além de atividade espermicida (ALVARENGA et al., 2006).

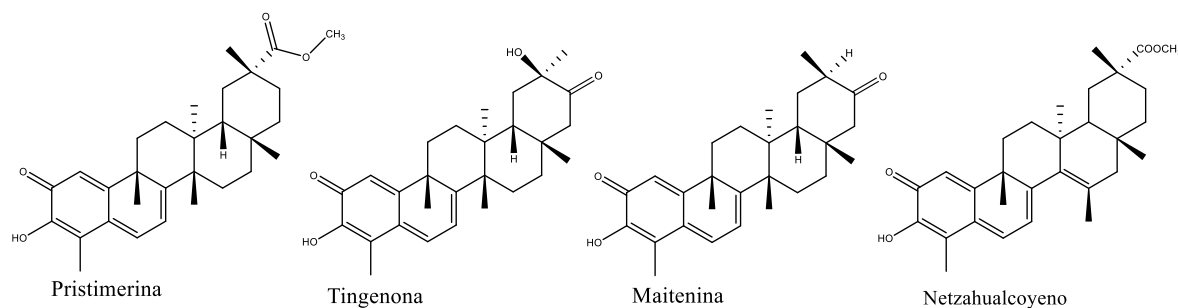


Figura 1.4 Alguns exemplos de quinonametídeos isolados de Celastraceae.

Aspectos biogénéticos

Compostos do tipo friedelano e quinonametídeos, presentes em algumas plantas da família Celastraceae e Hippocrateaceae, estudos envolvendo cultivos de células levam a estabelecer um tipo de relacionamento biogénético entre essas duas classes de triterpenoides (Figura 1.5).

O ponto inicial para a biossíntese de quinonametídeos requer oxidoesqualeno como um intermediário central, que pela ação da enzima ciclase é transformado em 3β -friedelanol, considerado como o primeiro intermediário cíclico. Posteriormente, pela ação de uma oxidoreductase, ocorre a conversão de 3β -friedelanol a friedelina, que provavelmente deve ocorrer entre as folhas e as raízes. E, a transformação de friedelina à quinonametídeo deve ser realizada nas raízes (CORSINO et al., 2000).

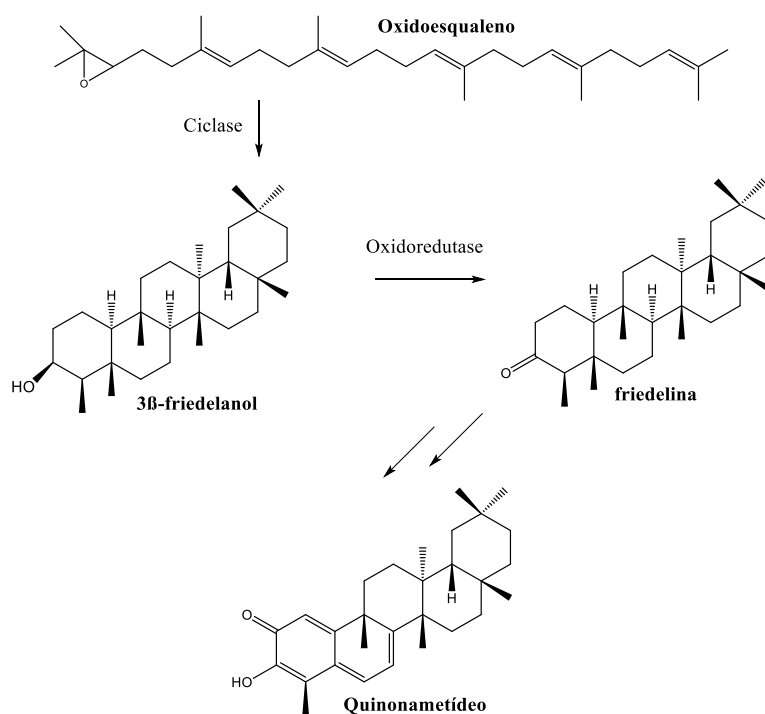


Figura 1.5 Esquema simplificado da biossíntese de quinonametídeos a partir dos precursores oxidoesqualeno e β -friedelanol.

1.6 Gênero *Maytenus*

O nome *Maytenus* é derivado da palavra “Maytén” um nome utilizado por Chilenos da etnia Mapuche. De acordo com o folclore sulamericano, um grande número de aplicações medicinais tem sido atribuído a diferentes espécies do gênero *Maytenus* (NIERO et al., 2011). Em função disso, nos últimos anos ocorreu um aumento significativo do interesse por plantas deste gênero.

No Brasil, existem 76 espécies reconhecidas de *Maytenus*, que estão plenamente adaptadas a uma variedade de *habitats*, principalmente da floresta amazônica e da mata atlântica. Espécies de *Maytenus* podem alcançar até 15 m de altura, sendo sua madeira utilizada para diferentes finalidades. Assim, neste gênero há algumas espécies que se encontram em perigo de extinção devido ao rápido desmatamento do bioma (GROPPO et al., 2014).

Fito preparações e substâncias puras obtidos de diferentes espécies de *Maytenus* têm sido pesquisadas em função de suas propriedades terapêuticas. A maioria das propriedades biológicas tem sido correlacionada à presença de compostos fenólicos, particularmente flavonoides, glicosídeos, terpenos, esteroides e alcaloides (NIERO et al., 2011).

O principal uso popular de espécies do gênero *Maytenus* está associado principalmente ao tratamento de distúrbios gastrintestinais (Tabela 1.1). Vários estudos corroboram a eficácia de várias espécies, no tratamento de asma, como antitumoral, antiviral, anti-inflamatório e como antisséptico (DUARTE et al., 2002).

Tabela 1.1 Usos medicinais tradicionalmente atribuídos a espécies do gênero *Maytenus*

Especies	Usos Medicinais tradicionais
<i>M. ilicifolia</i>	Antiúlcera, diurético, laxativo, antitumoral, digestivo, abortivo, anticoncepcivo, antisséptico, antiasmático, analgésico, anti-inflamatório, emenagogo
<i>M. truncata</i>	Antiúlcera, anti-inflamatório.
<i>M. robusta</i>	Antiúlcera
<i>M. rigida</i>	Analgésico, antisséptico, anti-inflamatório
<i>M. aquifolium</i>	Antiúlcera, analgésico
<i>M. salicifolia</i>	Antialérgico e para aliviar coceira
<i>M. obtusifolia</i>	Antiúlcera, anti-inflamatório, antitumoral

Fonte: NIERO et al., 2011.

Como exemplos de triterpenos isolados de raízes de *Maytenus* no NEPLAM, citam-se 6-oxo-tingenol, 3,7-dioxofriedelano, 3-oxo-29-hidroxifriedelano e tingenona de *Maytenus imbricata* (RODRIGUES, 2012); 3,11-dioxofriedelano, 3,16-dioxofriedelano e 3-oxo-12 α -hidroxifriedelano de *Maytenus gonoclada* (SILVA, 2014).

1.7 *Maytenus distichophylla*

A espécie *M. distichophylla*, assim como outras do gênero *Maytenus*, é popularmente conhecida como “espinheira santa”. É uma árvore de médio porte, medindo de 6 a 12 m de altura e é uma espécie bem adaptada às condições ambientais da região sudeste e sul do Brasil (Figura 1.6). Devido ao seu bonito porte, ela tem sido utilizada em projetos ornamentais e, em função do interesse pela fauna nativa, é também recomendada para a composição de reflorestamentos heterogêneos destinados ao repovoamento de áreas degradadas (DUARTE, 2013).



Figura 1.6 Foto do tronco (a), flores e folhas (b) e folhas(c) de *Maytenus distichophylla*

Fonte: Tarciso Leão e Alex Popovkin:

<https://www.flickr.com/search/?q=maytenus+distichophylla>.

A partir de estudos fitoquímicos de folhas de *M. distichophylla* foram isolados e elucidados os triterpenos pentacíclicos: 3,16,21-trioxo-6 β ,12 α -dihidroxi-1-en-friedelano, 3-oxofriedelano, 3 β -hidroxifriedelano, 3,12-dioxofriedelano, 3-oxo-29-hidroxifriedelano, 3-oxo-12 α -hidroxifriedelano, 3 β ,24-dihidroxifriedelano, 3-oxo-30-hidroxifriedelano, as misturas de 3 β -esteariloxi-urs-12-eno e 3 β -esteariloxi-olean-12-eno; 3 β -hidroxi-urs-12-eno e 3 β -hidroxi-olean-12-eno. As estruturas químicas de alguns destes triterpenos estão representadas na Figura 1.7, p. 10 (FERREIRA, 2014; DUARTE, 2013; DUARTE et al., 2013).

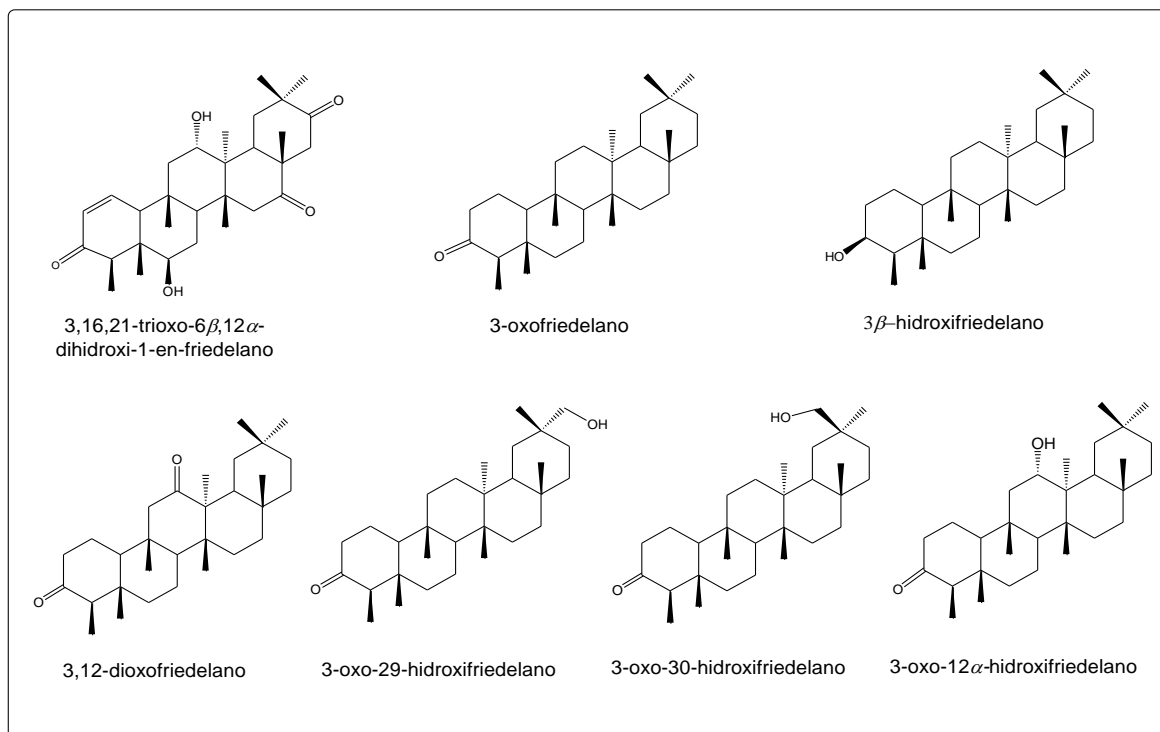


Figura 1.7 Triterpenos pentacíclicos isolados de folhas de *M. distichophylla*.

O extrato hexânico das folhas de *M. distichophylla* foi submetido a testes de atividade antibacteriana *in vitro*, por meio dos quais foi observada uma significativa atividade contra *Bacillus cereus*. O extrato clorofórmico, a mistura de 3 β -esteariloxi-urs-12-eno e 3 β -esteariloxi-olean-12-eno, a mistura de 3 β -hidroxi-urs-12-eno e 3 β -hidroxi-olean-12-eno, 3 β -hidroxifriedelano e 3 β ,24-dihidroxifriedelano apresentaram atividade inibitória do crescimento de *Staphylococcus aureus* (FERREIRA, 2014).

Em relação a estudos anteriormente realizados com raízes de *M. distichophylla*, somente foi encontrado um relato abordando o isolamento de dois alcaloides sesquiterpênicos piridínicos, conhecidos como wilforina e ebinifolina (Figura 1.8, p. 11), isolados da fração clorofórmica do extrato metanólico (DUARTE, 2013). Portanto, neste trabalho foi realizado um estudo mais detalhado das raízes de *Maytenus distichophylla*, uma planta originária da Bahia, que é utilizada na medicina popular para o tratamento de úlcera estomacal.

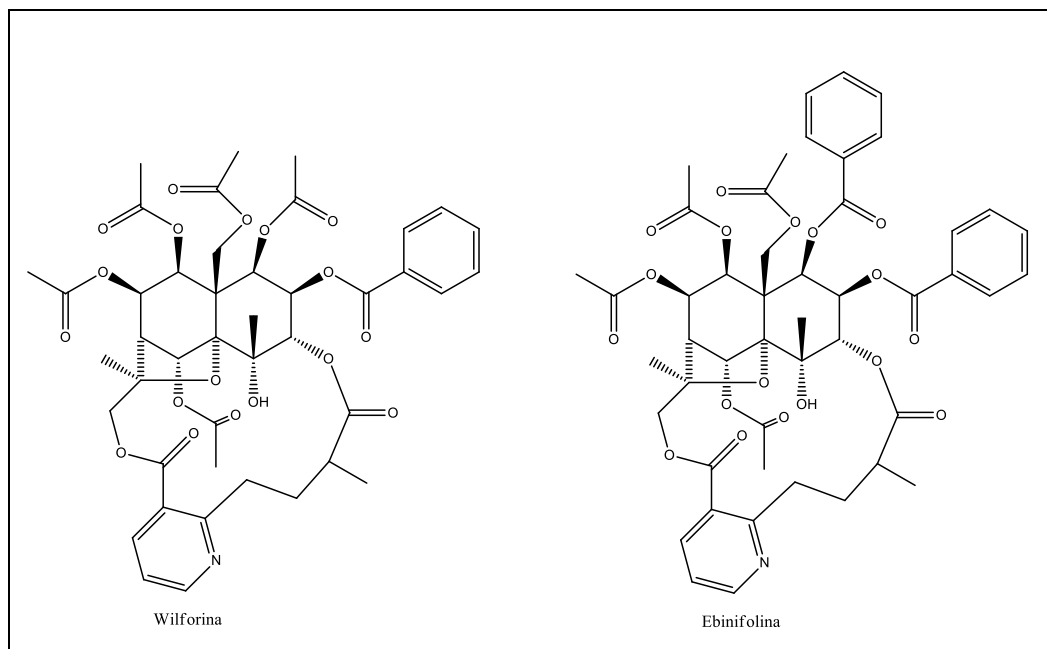


Figura 1.8 Estrutura química da wilforina e ebinifolina isoladas de raízes de *M. distichophylla*.

2. OBJETIVOS

Objetivo geral

Desenvolvimento de um estudo fitoquímico das raízes da espécie *Maytenus distichophylla* para a identificação dos metabólitos que contribuam para o estudo quimiotaxonômico e para incrementar o conhecimento químico e biológico da espécie.

Objetivos específicos

- Realização do estudo fitoquímico das raízes de *Maytenus distichophylla*, visando o isolamento, a elucidação estrutural e a identificação dos metabólitos secundários presentes nas raízes.
- Confirmação das estruturas dos metabólitos secundários isolados, utilizando métodos espectroscópicos.
- Estabelecimento das relações fitoquímicas entre espécies da família Celastraceae e contribuição para o estudo quimiotaxonômico.
- Avaliação do potencial biológico da espécie por meio da realização de estudos de atividade biológica de extratos e das substâncias isoladas.
- Realização de cálculos de predição de atividade biológica por meio de ferramentas *in silico*.

CAPITULO I - Estudo Fitoquímico

3. PARTE EXPERIMENTAL

3.1 Descrição geral

Para o isolamento dos constituintes químicos dos extratos hexânico e clorofórmico das raízes de *Maytenus distichophylla*, foram utilizadas as seguintes técnicas de separação: cromatografia em coluna de sílica de 70-230 mesh (CC), cromatografia em camada preparativa (CCP) e cromatografia líquida de média pressão (CLMP).

Os solventes utilizados foram hexano, clorofórmio, acetato de etila e metanol puros e em mistura com gradiente de polaridade. A proporção de fase estacionária utilizada nas colunas de sílica foi determinado pela quantidade e complexidade da mistura da amostra.

As placas preparativas (CCP) foram preparadas com uma espessura de 0,50 mm e a amostra aplicada continha uma carga de aproximadamente 10 mg por placa, em placas de 10 por 20 cm.

As CLMP foram realizadas no equipamento BIOTAGE® Isolera™ Spektra One, foram usadas colunas de sílica de 10 e 25 g (SNAP ULTRA HP Sphere 25 μ m) e 100 g (Snap KP-Sil), estas foram escolhidas seguindo as sugestões do fabricante e de acordo com a quantidade de amostra.

Depois de obtidas as frações da cromatografia em coluna, estas foram avaliadas por cromatografia de camada delgada (CCD), o aparecimento de uma única mancha é usado como critério para considerar que o composto tem uma pureza aceitável para sua análise estrutural. As placas foram preparadas com espessura de 0,25 mm e utilizadas depois de serem ativadas em estufa a 100 °C por 1 h; após a eluição as placas foram reveladas com uma solução 1:1 v/v de vanilina (1% m/v em etanol) e ácido perclórico (3% v/v em água) seguido de aquecimento (100 °C) em estufa.

As faixas de fusão dos compostos isolados foram determinadas em aparelho Microquímica MQAFP-302.

Algumas frações foram selecionadas para serem analisadas por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (GC-EM), no Laboratório de Cromatografia do Centro Federal de Educação Tecnológica de Minas Gerais (CEFET-MG) em cromatógrafo a gás Agilent 7890A GC 5975 séries MSD, equipado com detector de massas e coluna HP 5MS (30 m × 0,25 mm × 0,25 µm).

Os espectros de absorção no infravermelho foram obtidos no equipamento Perkin Elmer *Frontier Single Range-MIR* com acessório ATR no Laboratório de Química Analítica do Departamento de Química da UFMG.

As análises de ressonância magnética nuclear (RMN) para a determinação estrutural dos compostos isolados, foram realizadas nos espectrômetros Bruker *Avance DPX-200* e Bruker *Avance DRX-400* do Laboratório de Ressonância Magnética de Alta Resolução (LAREMAR) do Departamento de Química da UFMG.

3.2 Coleta e identificação do material vegetal

As raízes de *Maytenus distichophylla* foram coletadas em Brejo Novo, no Município de Jequié, Bahia, no ano de 2011. A planta foi identificada pela Professora Dra. Guadalupe Licon de Macedo do Departamento de Botânica da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia (UESB). Uma exsicata do material encontra-se depositada no herbário do Departamento de Botânica da UESB, sob o número HUESB 2093.

3.3 Preparação dos extratos das raízes de *Maytenus distichophylla*

O material vegetal foi submetido a secagem à temperatura ambiente, depois foi pulverizado em moinho de martelos e 1722,3 g do material moído foram obtidos. Extrações exaustivas foram realizadas pela maceração das raízes com solvente em ordem crescente de polaridade. O processo consistiu em deixar o material submerso em solvente durante uma semana, filtrar e recuperar o solvente destilando a pressão reduzida e separar o material remanente da destilação (extrato), repetindo esse processo três vezes para cada solvente, observando uma diminuição da coloração a medida que os componentes foram extraídos.

Os extratos obtidos foram: extrato hexânico (EH), clorofórmico (EC), acetato-etílico (EAc) e metanólico (EM), Figura 3.1, p. 15.

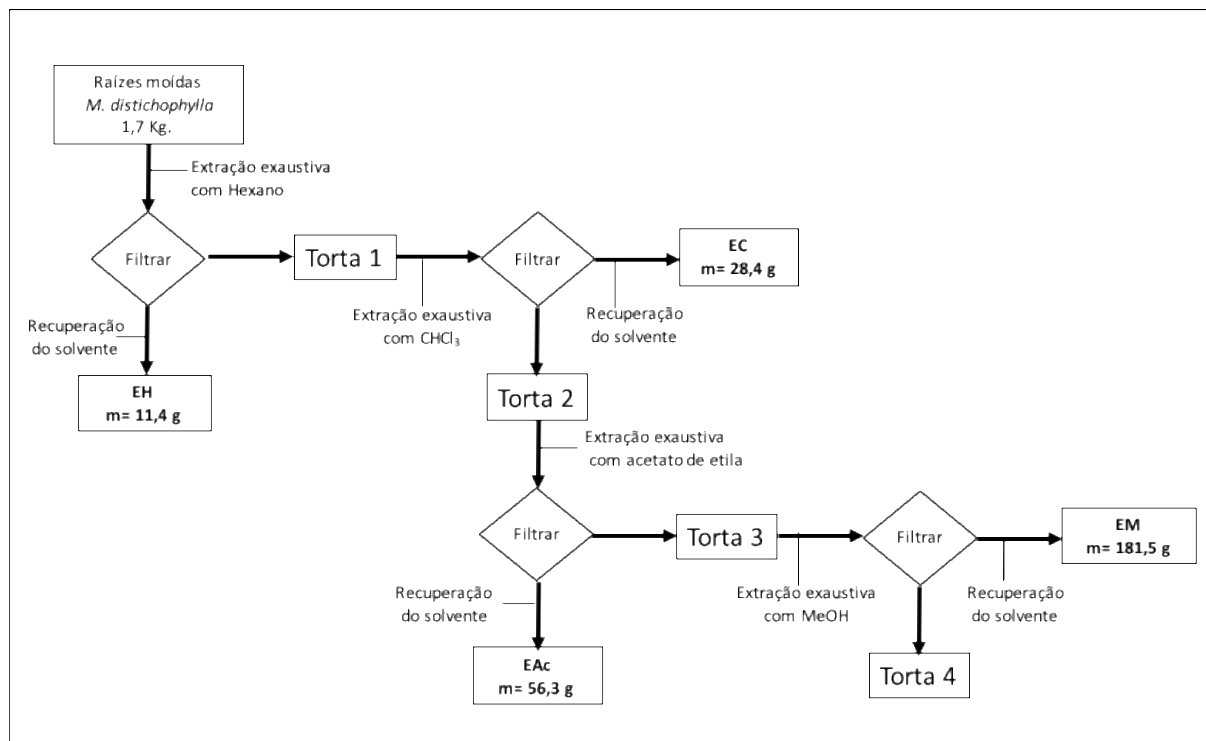


Figura 3.1 Esquema utilizado para obtenção dos extratos de raízes de *Maytenus distichophylla*.

3.4 Elaboração do extrato hexânico (EH)

Foram obtidos 11,4 g de extrato hexânico com uma cor laranja de aparência pastosa. Foram separados 2,0 g para testes biológicos e o restante (9,4 g) foi submetido à cromatografia em coluna, com 500 g de sílica gel 60 (70-230 mesh) que foi cromatografado com hexano, clorofórmio, acetato de etila e metanol, puros e em misturas com ordem crescente de polaridade.

Da coluna realizada com o extrato de EH foram coletadas 211 frações, de 200 mL cada uma, que foram reunidas em 15 grupos (EH1-EH25) de acordo com os perfis apresentados nas placas de CCD. O Esquema 3.2, p. 16, apresenta o fracionamento dos extratos EH e EC.

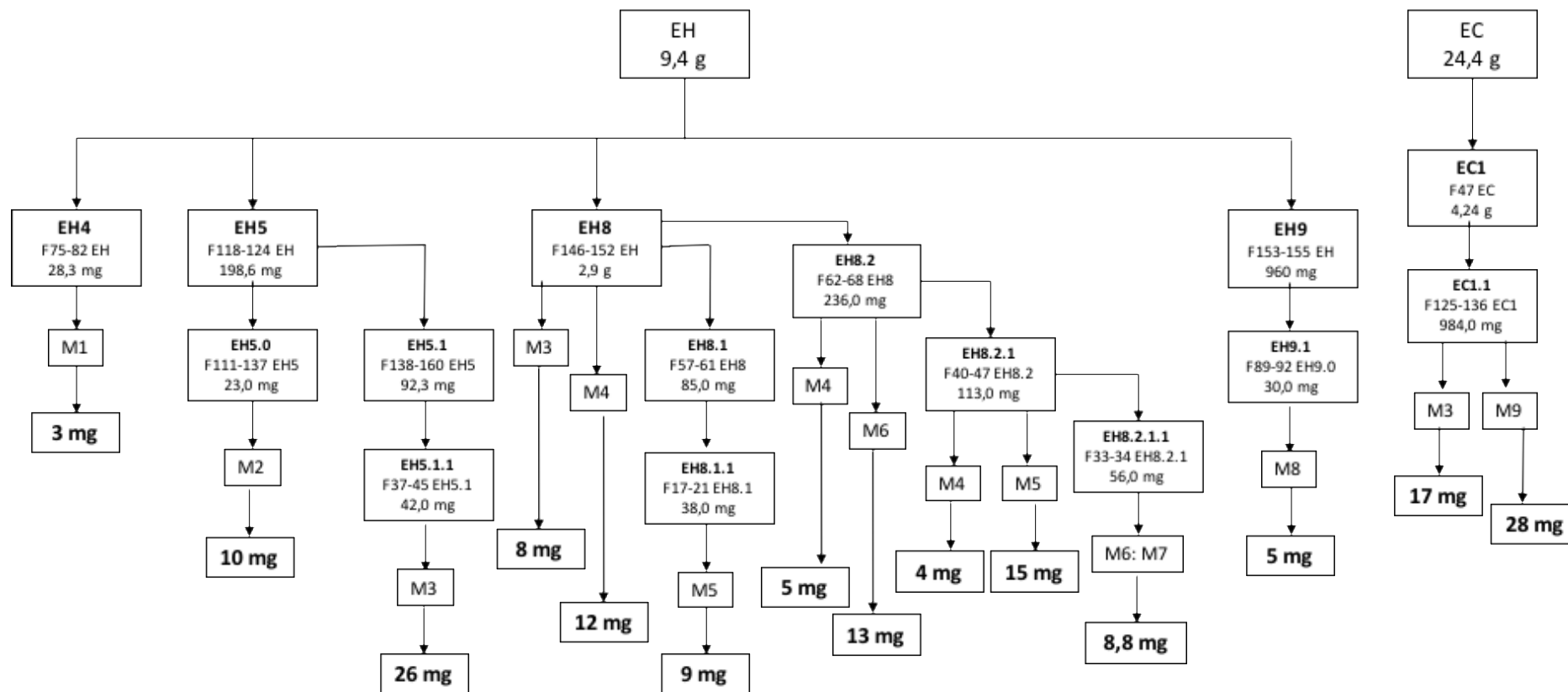


Figura 3.2 Esquema do estudo fitoquímico com os extratos hexânico e clorofórmico.

Tabela 3.1 Frações obtidas e eluentes utilizados para coluna EH

Solvente	Proporção	Frações
Hexano	100	1-8
Hexano: CHCl ₃	90:10	9-48
Hexano: CHCl ₃	50:50	49-117
CHCl ₃	100	118-142
CHCl ₃ : AcOEt	50:50	143-171
AcOEt	100	189-207
Metanol	100	208-211

Grupo EH4

Este grupo corresponde às frações 75-82, com uma massa de 28,3 mg de um sólido de cor amarela. Foi analisado seu perfil em CCD e foram visualizadas três manchas com boa separação. Foi realizada uma nova coluna de sílica gel 60 (230-400 mesh) e obteve-se um sólido, com uma única mancha em CCD, massa de 3 mg e cor amarelada. Foi analisada por CG-EM, usando o equipamento descrito na seção 3.1, p. 14, com as seguintes condições: rampa de temperatura de 22 °C até 90 °C em 1 min, depois 5 °C/min até 220 °C, 10 °C/min até 290 °C e em 290 °C por 6 min, sendo uma corrida de 40 minutos. E por comparação com a biblioteca NIST foi identificada como 3-oxo-friedelano (**M1**) com 93% de probabilidade.

Grupo EH5

As frações 118-124 apresentaram-se como um sólido amarelo de massa 198,6 mg. A CCD realizada mostrou 6 manchas não bem resolvidas de diferentes cores. Foi realizada uma cromatografia em coluna utilizando-se 10 g de sílica gel 60 (230-400 mesh), e como fase móvel hexano, clorofórmio, acetato de etila e metanol, puros e em mistura, e foram obtidas 165 frações de 10 mL. Dessas frações foram agrupadas (EH5.0) as frações 111 a 137 (23 mg), eluída com CHCl₃, que apresentavam duas manchas próximas em CCD. Foram realizadas várias análises por CCP, para isolar os compostos. Foram obtidos 10 mg de um sólido branco que apresentava uma única mancha em CCD de cor rosa ao ser revelada. Esse sólido foi caracterizado por RMN como um triacilglicerol (**M2**).

Grupo EH5.1 e EH5.1.1

O grupo EH5.1 (92,3 mg) resultou do agrupamento das frações 138-160 de EH5, com massa de 92,3 mg de um sólido amarelo. Foi realizada uma CLMP com uma coluna de 10 g SNAP Ultra HP (25 μ m) e foram coletadas 65 frações usando uma fase móvel em ordem crescente de polaridade com os solventes hexano, clorofórmio, acetato de etila e metanol.

Dessa coluna as frações 37-45 foram agrupadas levando a obtenção de EH5.1.1 (42,0 mg) este foi fracionado usando cromatografia em coluna com sílica gel, e hexano, CHCl₃, acetato de etila e metanol como eluentes. As frações 37 à 46 levaram a obtenção de 26,0 mg de um sólido branco identificado após análise por RMN como sendo o β -sitosterol puro (**M3**) e com uma faixa de fusão de 133,4 – 134,3 °C.

Grupo EH8

As frações 146 a 152 de coluna EH foram agrupadas obtendo-se uma massa de 2,9 g. Foi feita uma coluna de sílica gel utilizando como fase móvel em ordem crescente de polaridade, hexano, clorofórmio, acetato de etila e metanol, obtendo-se 145 frações. A fração 25, com uma massa de 8,0 mg, apresentou uma única mancha, que após análise por RMN foi identificada como **M3**. As frações 30-32 foram agrupadas apresentando uma única mancha de cor amarela que após análise por RMN foi identificada como 3-oxo-olean-9(11),12-dieno (**M4**) com uma massa de 12,0 mg, apresentou-se como um sólido branco.

Grupo EH8.1 e EH8.1.1

As frações 57 a 61, da coluna do grupo EH8, foram agrupadas para formar o grupo EH8.1 (85 mg) esse foi submetido a cromatografia por coluna de sílica gel 60 (230-400 mesh) e foram obtidas 122 frações de 10 mL que foram agrupadas de acordo com perfil em CCD. As frações 17 a 21 de EH8.1 foram agrupadas e nomeada como grupo EH8.1.1 (38 mg). Este grupo foi fracionado em coluna usando os solventes hexano, clorofórmio, acetato de etila e metanol em ordem crescente de polaridade. As frações 18 e 19 foram agrupadas já que apresentavam uma única mancha, e o sólido branco obtido foi analisado por RMN de ¹H e ¹³C e identificado como o 30-hidroxilup-20(29)-en-3-ona (**M5**) com uma massa de 9,0 mg.

Grupo EH8.2, EH8.2.1 e EH8.2.1.1

As frações 62 a 68, de EH8, foram agrupadas (EH8.2, 236 mg) com base no perfil de CCD e submetidas a cromatografia em coluna, as frações da 5 a 10, eluídos com hexano, apresentaram uma única mancha, foram agrupadas e analisadas por RMN identificadas como **M4**. A fração 36, eluída com hexano-clorofórmio 50%, também mostrou uma única mancha em CCD, com uma massa de 13,0 mg, depois da análise por RMN foi identificada como 11 α -hidroxilup-20(29)-en-3-ona (**M6**).

As frações 40 a 47, de EH8.2, foram agrupadas formando o grupo EH8.2.1 (113 mg), esse foi submetido a cromatografia em coluna sendo recolhidas 63 frações de 5 mL. A fração 10 foi identificada como **M4** (4,0 mg), eluente hexano-clorofórmio 50%, e a fração 32, eluída com clorofórmio, como **M5** (15,0 mg). As frações 33 e 34, eluídas com clorofórmio, foram agrupadas, para formar o grupo EH8.2.1.1 com uma massa 56 mg. Foi feita uma cromatografia em coluna de sílica gel 60 (230-400 mesh) e foram obtidas 55 frações de 10 mL, as frações 27 a 31, eluídas com clorofórmio, apresentavam uma única mancha azul ao ser reveladas com vanilina/ácido perclórico com uma massa de 8,8 mg, o sólido amarelo obtido ao ser analisado por RMN foi identificado como uma mistura de 11 α -hidroxilup-20(29)-en-3-ona (**M6**) e pristimerina (**M7**).

Grupo EH9

As frações 153 a 155 de EH foram agrupadas, com uma massa de 960 mg, submetida a cromatografia em coluna de sílica gel 60 (230-400 mesh) e foram obtidas 140 frações de 10 mL. As frações 89-92, clorofórmio-acetato 20%, foram agrupadas para formar o grupo EH9.1 com uma massa de 30 mg. Este foi fracionado em coluna onde foram obtidas 36 frações de 10 mL. A fração 7 (hexano-clorofórmio 50%), depois de ser analisado seu perfil CCD, apresentou uma única mancha e uma massa de 5 mg, e foi identificada como 3,7-dioxo-friedelano (**M8**) após análise de RMN de ^1H e ^{13}C com uma faixa de fusão de 154,4 – 157,9 °C.

As demais frações de EH, bem como das outras colunas, também foram trabalhadas, mas não levaram ao isolamento de nenhum composto.

3.5 Elaboração do extrato clorofórmico (EC)

Foram obtidos 28,4 g de extrato clorofórmico com uma cor avermelhada de aparência pastosa. Foram separados 4,0 g para testes biológicos e o restante (24,4 g) foi submetido a cromatografia em coluna, com 500 g de sílica gel 60 (70-230 mesh) que foi cromatografado em ordem crescente de polaridade utilizando hexano, clorofórmio, acetato de etila e metanol, puros e em misturas com ordem crescente de polaridade.

Da coluna realizada com o extrato de EC foram coletadas 85 frações, de 200 mL cada. De acordo com os perfis apresentados nas placas de CCD e devido ao tempo para finalizar o trabalho, foi selecionada a fração 47 (4,2 g) eluída com uma mistura de clorofórmio e 30% de acetato de etila, para o fracionamento. Todas as frações coletadas apresentaram uma forte coloração alaranjada e avermelhada, o que é indício da presença de quinonametídeos.

EC1 e EC1.1

Em uma coluna com 250 g de sílica gel, foram cromatografados os 4,24 g da fração 47 de EC, e foram obtidas 215 frações de 20 mL cada. As frações 125-136 foram agrupadas para a formação de EC1.1 (984 mg) e foram fracionadas. Dessa coluna foram obtidas 118 frações de 10 mL cada. Ao avaliar os perfis de CCD de EC1.1, foram agrupadas as frações 21-23 (em clorofórmio) que foi identificada por RMN como **M3** (17 mg).

Também foram agrupadas as frações 42-47 (clorofórmio-acetato 20%) que apresentaram uma única mancha vermelha na cromatoplaça. Depois da análise por RMN, foi determinado que o composto obtido correspondia à estrutura da tingenona **M9** (28 mg), com uma faixa de fusão de 147,9 – 151,8 °C.

Não foram determinados os pontos de fusão de todos os compostos, já que alguns foram isolados em quantidades pequenas, e por isso foram priorizados os ensaios de atividade biológica.

4. DETERMINAÇÃO ESTRUTURAL

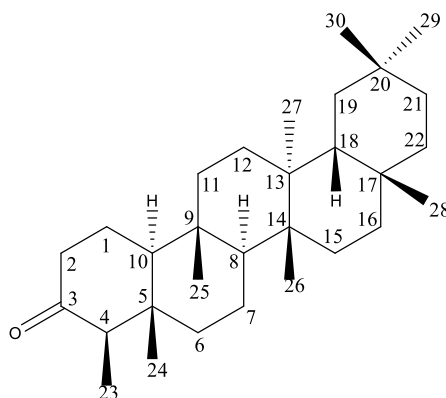
Na Tabela 4.1 estão listados os compostos isolados a partir das raízes de *Maytenus distichophylla*, do extrato hexânico (EH) e clorofórmico (EC). A maioria dos compostos isolados são triterpenos pentacíclicos, característicos do gênero *Maytenus*.

Tabela 4.1: Substâncias e misturas isoladas das raízes de *Maytenus distichophylla*

Código da amostra	Substâncias	Extrato
M1	3-Oxofriedelano (ou friedelina)	EH
M2	Triacilglicerol	EH
M3	β -Sitosterol	EH + EC
M4	3-Oxo-olean-9(11),12-dieno	EH
M5	30-Hidroxilup-20(29)-en-3-ona	EH
M6	11 α -Hidroxilup-20(29)-en-3-ona	EH
M6 + M7	11 α -hidroxilup-20(29)-en-3-ona e Pristimerina	EH
M8	3,7-Dioxofriedelano	EH
M9	Tingenona	EC

O composto **M1** foi identificado por meio do espectro de massas pela comparação com a biblioteca de referência NIST. Os demais foram identificados a partir dos espectros de absorção no infravermelho e os dados obtidos pelos espectros de RMN de ^1H , ^{13}C e subespectro DEPT 135, analisados e comparando com dados publicados na literatura.

4.1 M1: 3-Oxofriedelano



A Figura 4.1.1 corresponde ao espectro de massas obtido para **M1**. A comparação deste espectro com os espectros do banco de dados da biblioteca NIST, permitiu identificar **M1** como sendo 3-oxofriedelano, com 92% de certeza. O íon molecular (M^+) aparece em m/z 426 e ao comparar com o perfil de fragmentação na literatura, os dez picos de maior intensidade coincidiram e estão em m/z : 69 (pico base), 109, 95, 55, 125, 123, 82, 96, 41 e 67. (NIST, 2009)

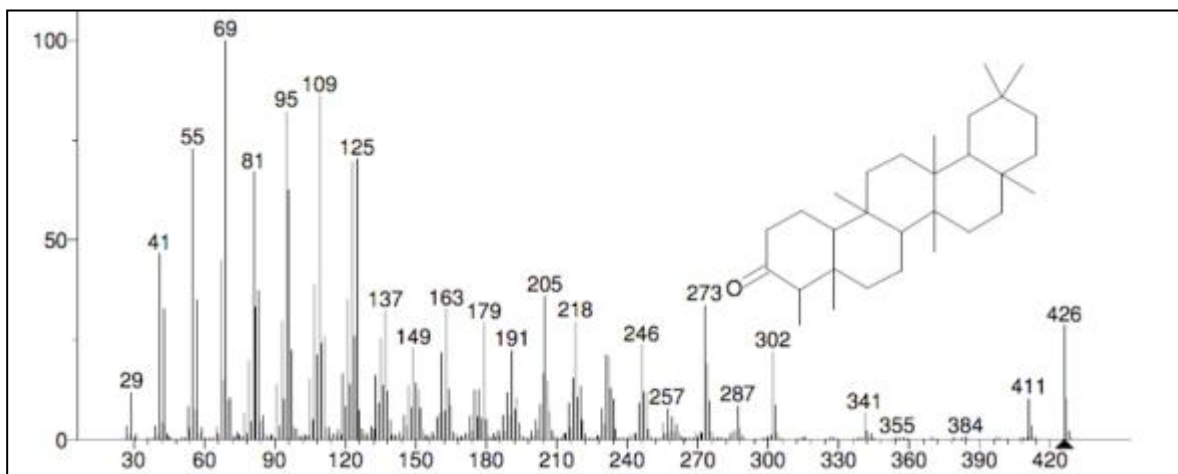
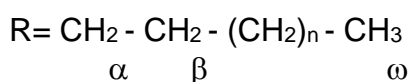
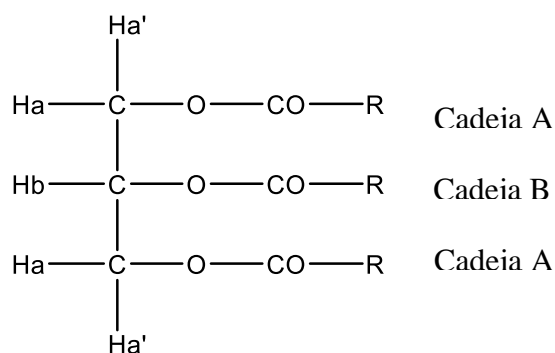


Figura 4.1.1 Espectro de massas da ionização por impacto de elétrons de **M1**.

A quantidade de amostra obtida ($m = 3$ mg) de **M1** não foi suficiente para a análise por RMN. Conforme relatado por Corsino e colaboradores (2000), os triterpenos friedelânicos como o 3-oxofriedelano, são biossintetizados nas folhas e levados para as raízes onde são transformados em quinonametídeos (como pristimerina), isto pode justificar a pequena quantidade isolada de **M1**.

4.2 M2: Triacilglicerol



O triacilglicerol foi isolado como um sólido translúcido, a partir de EH. A Figura 4.2.1 corresponde ao espectro de RMN de ^1H do triacilglicerol. Neste espectro é observado um multipletto entre δ_{H} 5,24-5,34, referente ao átomo de hidrogênio b, dois duplos dupletos em δ_{H} 4,10-4,19 ($J_1 = 11,9$ Hz e $J_2 = 5,9$ Hz) e δ_{H} 4,26-4,34 ($J_1 = 11,9$ Hz e $J_2 = 4,3$ Hz) referente aos hidrogênios H_a , H_a' (4H); δ_{H} 2,27-2,35 corresponde aos hidrogênios metilênicos α a carbonila (6H), o sinal em δ_{H} 1,26 corresponde aos demais hidrogênios metilênicos da cadeia alifática, e o tripleto δ_{H} 0,85-0,91 ($J = 4,45$ Hz, 9H) corresponde aos hidrogênios das metilas terminais ω (GUNSTONE et al., 2007).

No espectro de RMN de ^{13}C (Figura 4.2.2) os sinais em δ_{C} 173,30 e 172,89 foram atribuídos às carbonilas das cadeias A e B, respectivamente. No subespectro DEPT 135 (Figura 4.2.3) foi possível observar sinais em δ_{C} 62,13 e δ_{C} 68,91 referentes aos átomos de carbono metilênicos a e metínico b respectivamente, e em δ_{C} 14,12 referentes aos átomos de carbono metílicos ω (GUNSTONE et al., 2007).

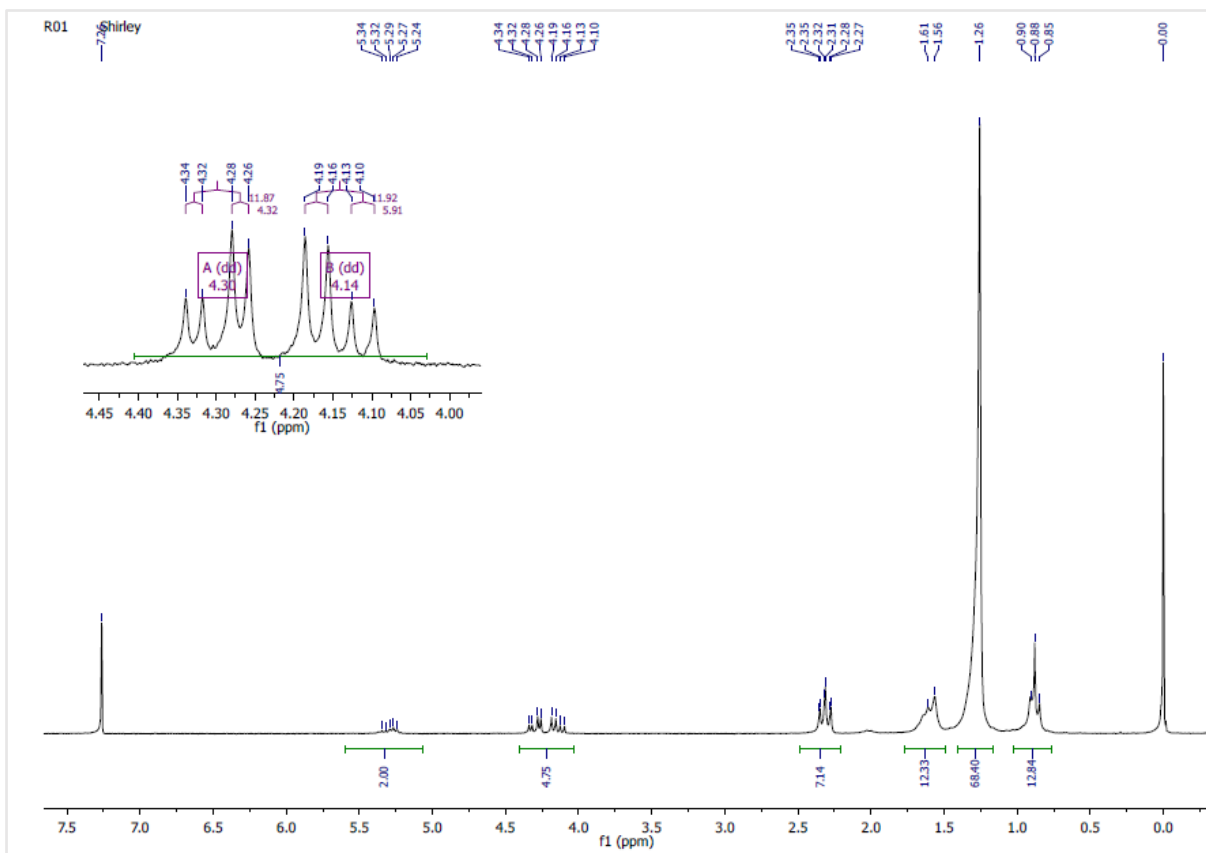


Figura 4.2.1 Espectro de RMN de ^1H de **M2** (CDCl_3 , 400 MHz).

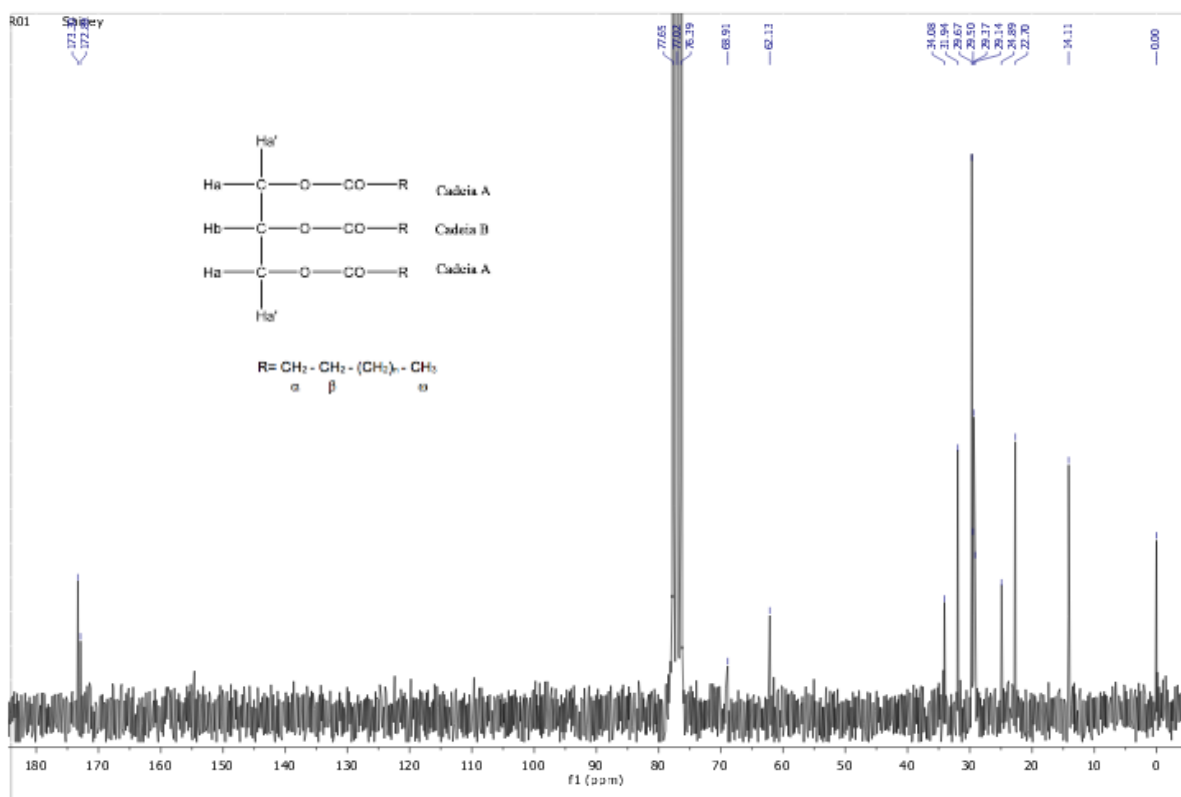


Figura 4.2.2 Espectro de RMN de ^{13}C de **M2** (CDCl_3 , 100 MHz).

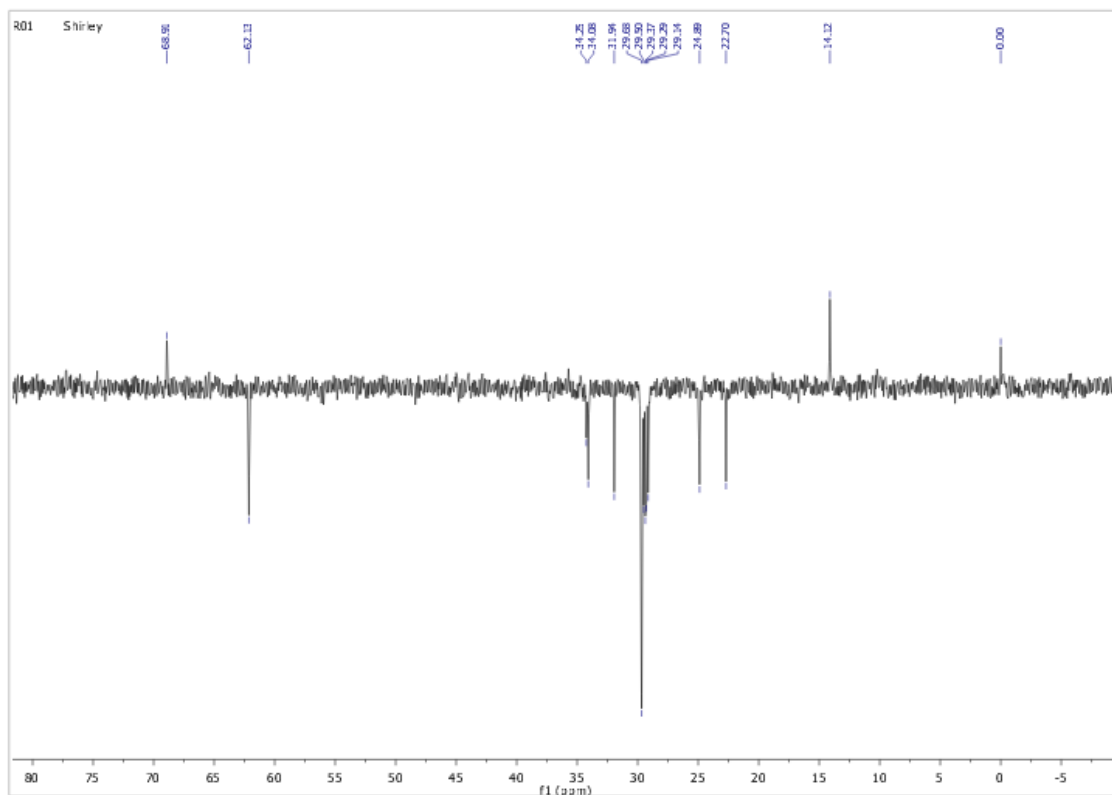
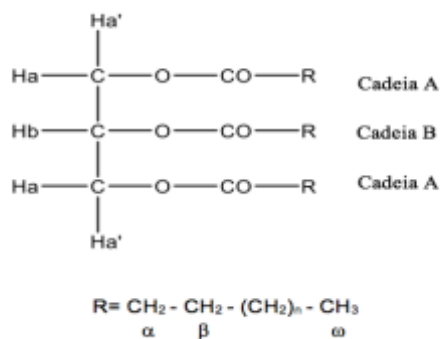
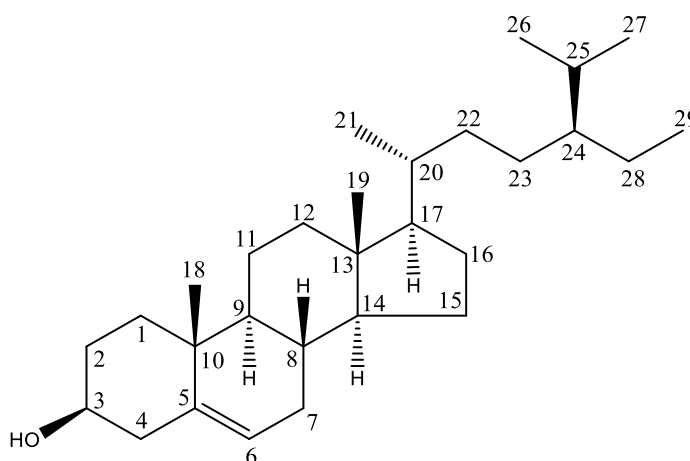


Figura 4.2.3 Subespectro DEPT 135 de **M2** (CDCl₃, 100 MHz).



4.3 M3: β -Sitosterol



M3 é um sólido branco e cristalino, que foi obtido dos extratos hexânico e clorofórmico. Na Figura 4.3.1 é apresentado o espectro na região do IV que mostra bandas de absorção em 3371 cm^{-1} referente ao estiramento da ligação OH, $2926\text{--}2867\text{ cm}^{-1}$ características de estiramento simétrico e assimétrico da ligação CH de grupos alifáticos, 1467 e 1369 cm^{-1} referentes à deformação angular no plano de ligação simples CH de grupos alifáticos. As bandas que apareceram na faixa de 840 a 742 cm^{-1} correspondem a ligação C-H fora de plano da insaturação dos carbonos C5-C6.

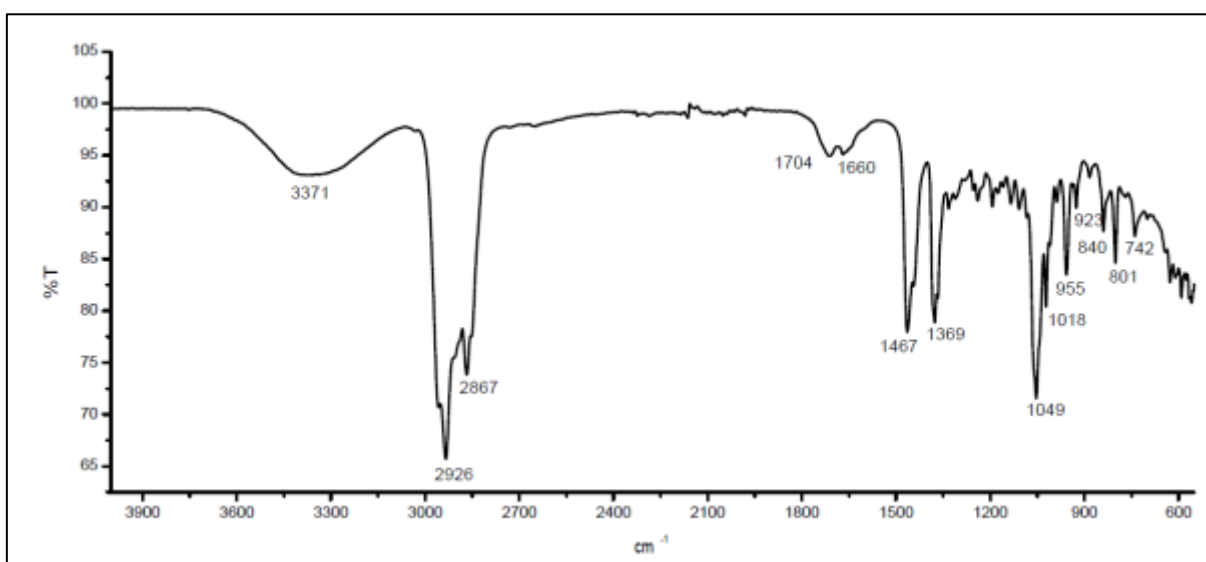
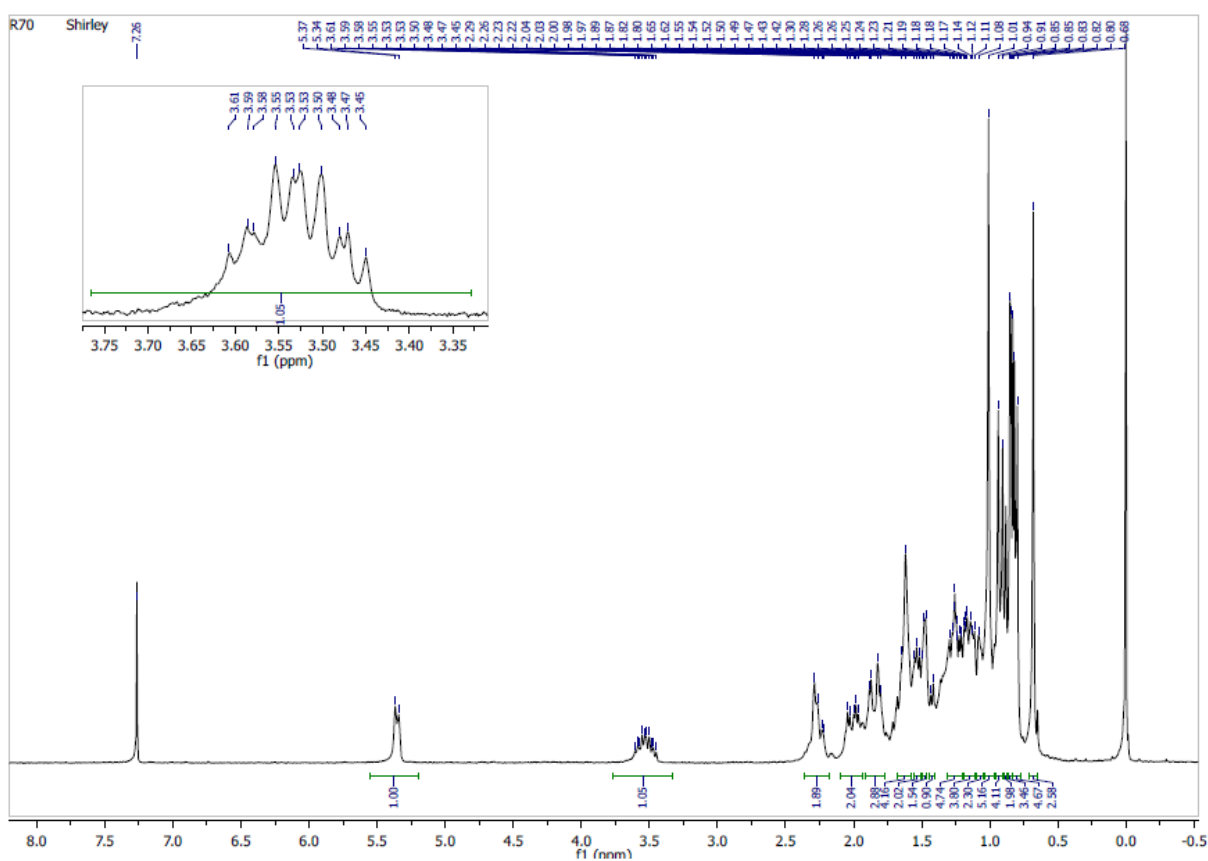


Figura 4.3.1 Espectro na região do IV (ATR) de **M3**.

O espectro de RMN de ^1H (Figura 4.3.2) de **M3** apresenta um multipletto de δ_{H} 3,45-3,48 que é atribuído ao hidrogênio do carbono carbinólico C3, um dupletto em δ_{H} 5,34-5,37 que é atribuído a H-6 que é um hidrogênio olefínico.

No espectro de RMN de ^{13}C (Figura 4.3.3) aparecem 27 sinais, sendo que dois possivelmente se encontram sobrepostos, o que daria um total de 29 sinais, sugerindo a estrutura de um esteroide. O sinal em δ_{C} 71,83 foi atribuído ao carbono C3 contendo o grupo hidroxila e os sinais em δ_{C} 140,79 e δ_{C} 121,73 atribuídos aos carbonos olefínicos das posições C5 e C6, respectivamente.



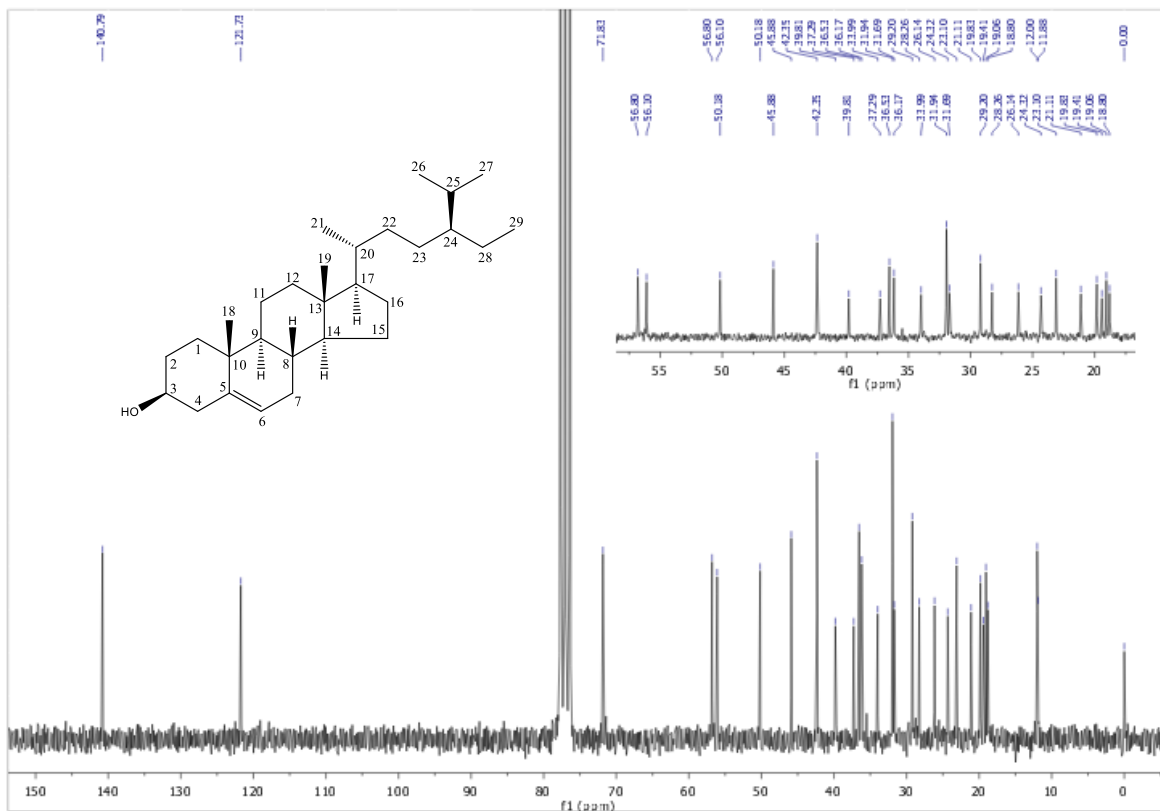


Figura 4.3.3 Espectro de RMN de ^{13}C de **M3** (CDCl₃, 100 MHz).

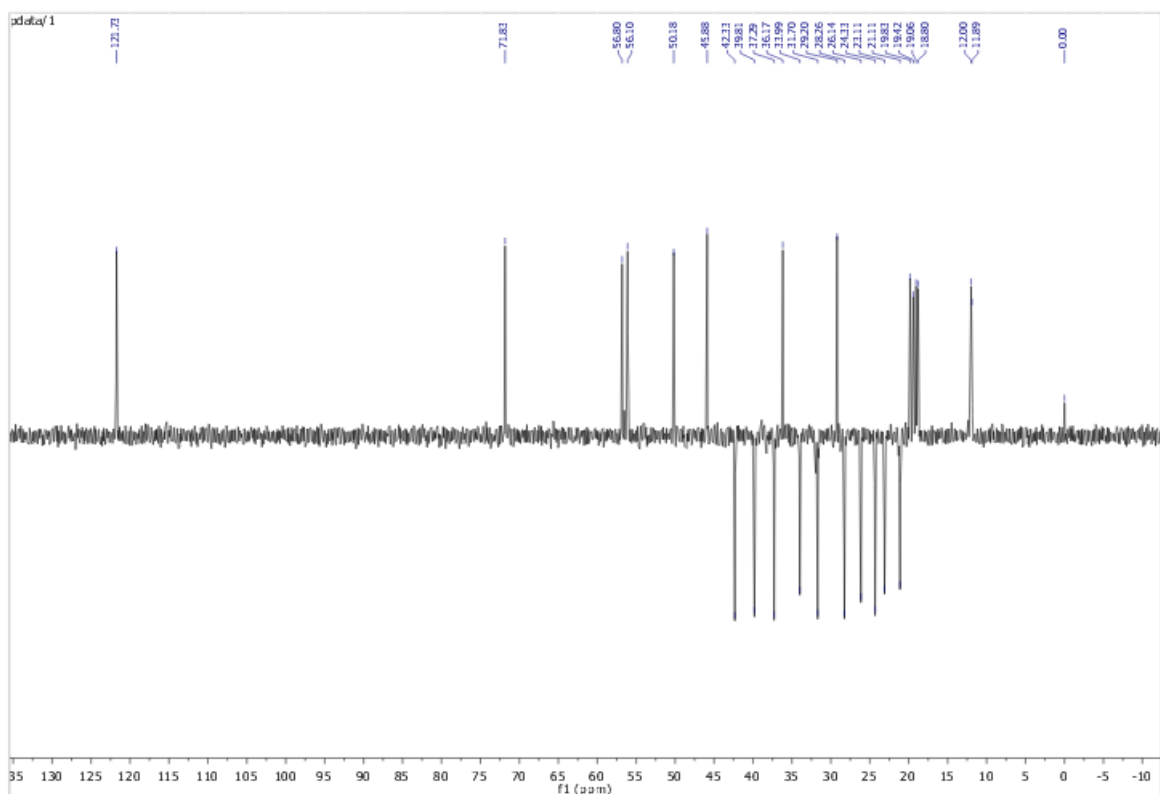


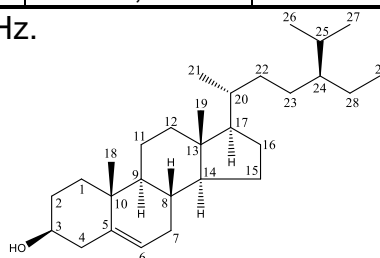
Figura 4.3.4 Subespectro DEPT 135 de **M3** (CDCl₃, 100 MHz).

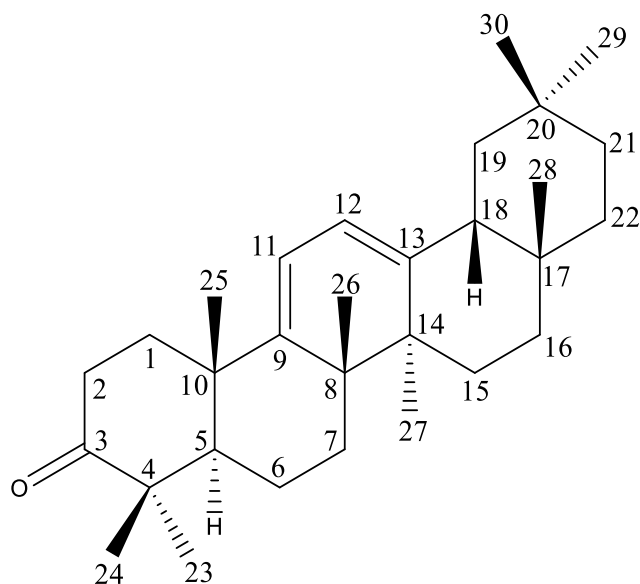
Os dados obtidos a partir do espectro de RMN de ^{13}C e subespectro DEPT 135 foram comparados com os da literatura (DE-EKNAMKUL e POTDUANG, 2003) e são apresentados na Tabela 4.3.1 e permitiram confirmar que **M3** trata-se do **β -sitosterol**.

Tabela 4.3.1 Comparação dos dados de RMN de ^{13}C de **M3** com os dados da literatura para o β -sitosterol

No. do C	Tipo de C	δ_{C}^* M3	Referência (DE-EKNAMKUL e POTDUANG, 2003)
1	CH ₂	37,28	37,22
2	CH ₂	31,69	31,63
3	CH	71,83	71,80
4	CH ₂	42,35	42,19
5	C	140,79	140,72
6	CH	121,73	121,71
7	CH ₂	31,94	31,87
8	CH	31,94	31,87
9	CH	50,18	50,10
10	C	36,53	36,48
11	CH ₂	21,11	21,07
12	CH ₂	39,81	39,74
13	C	42,35	42,26
14	CH	56,80	56,73
15	CH ₂	24,32	24,29
16	CH ₂	28,26	28,22
17	CH	56,09	56,02
18	CH ₃	11,80	11,84
19	CH ₃	19,42	19,39
20	CH	36,16	36,12
21	CH ₃	18,80	18,76
22	CH ₂	33,99	33,91
23	CH ₂	26,14	26,02
24	CH	45,88	45,81
25	CH	29,20	29,11
26	CH ₃	19,83	19,80
27	CH ₃	19,06	19,01
28	CH ₂	23,10	23,04
29	CH ₃	12,00	11,97

Solvente: *CDCl₃, 100 MHz.



4.4 M4: 3-Oxo-olean-9(11),12-dieno

O espectro na região do IV (Figura 4.4.1) de **M4** apresentou bandas de forte intensidade em 2945, 2922 e 2867 cm^{-1} , correspondendo às deformações axiais de ligação CH de grupos CH_3 e CH_2 . A banda em 892 cm^{-1} corresponde à deformação fora do plano da ligação dupla (MAIA et al., 2000). A banda de absorção em 1712 cm^{-1} sugere a presença de carbonila no composto. A presença de uma banda em 3407 cm^{-1} , sugere a presença de água durante a análise da amostra, característica do grupo hidroxila.

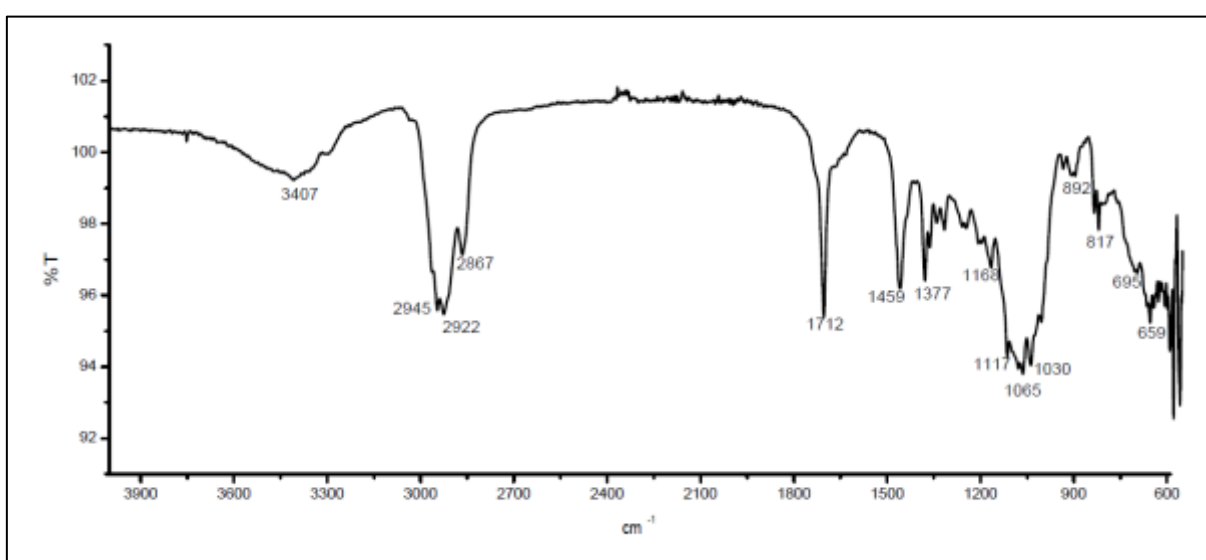


Figura 4.4.1 Espectro na região do IV (ATR) de **M4**.

O espectro de RMN de ^1H (Figura 4.4.2) apresentou dois dupletos em δ_{H} 5.63 ($J = 5,6$ Hz) e δ_{H} 5,53 ($J = 5,6$ Hz), correspondente a hidrogênios olefínicos. Este espectro apresenta também oito simpletos em δ_{H} 0,88; 0,90; 1,01; 1,08; 1,11, 1,17; 1,21; 1,26; correspondendo a oito grupos metilas características de esqueleto triterpênico.

O espectro de RMN de ^{13}C (Figura 4.4.3), que apresentou 30 sinais de carbono, confirmando a natureza triterpênica de **M4**, e o subespectro DEPT 135 (Figura 4.4.4) apresentaram sinais em δ_{C} 117,54 e 120,63 correspondentes aos CH dos carbonos 11 e 12 e δ_{C} 147,71 e 152,35 atribuídos a C13 e C9. Em δ_{C} 217,67 aparece um sinal que foi atribuído ao carbono carbonílico.

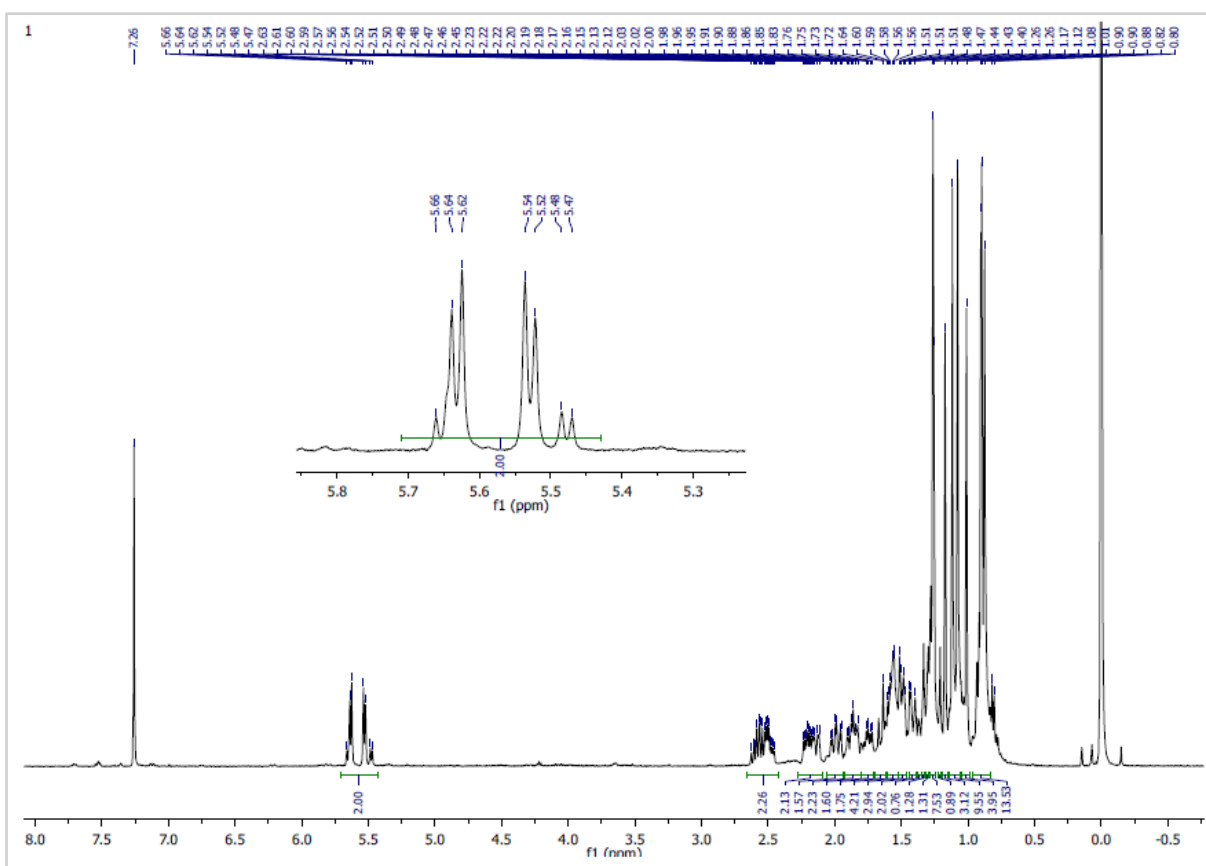
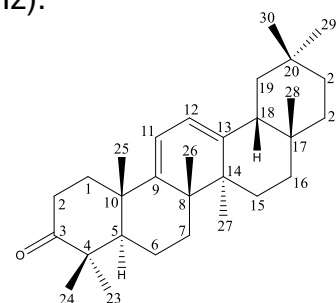


Figura 4.4.2 Espectro de RMN de ^1H para **M4** (CDCl_3 , 400 MHz).



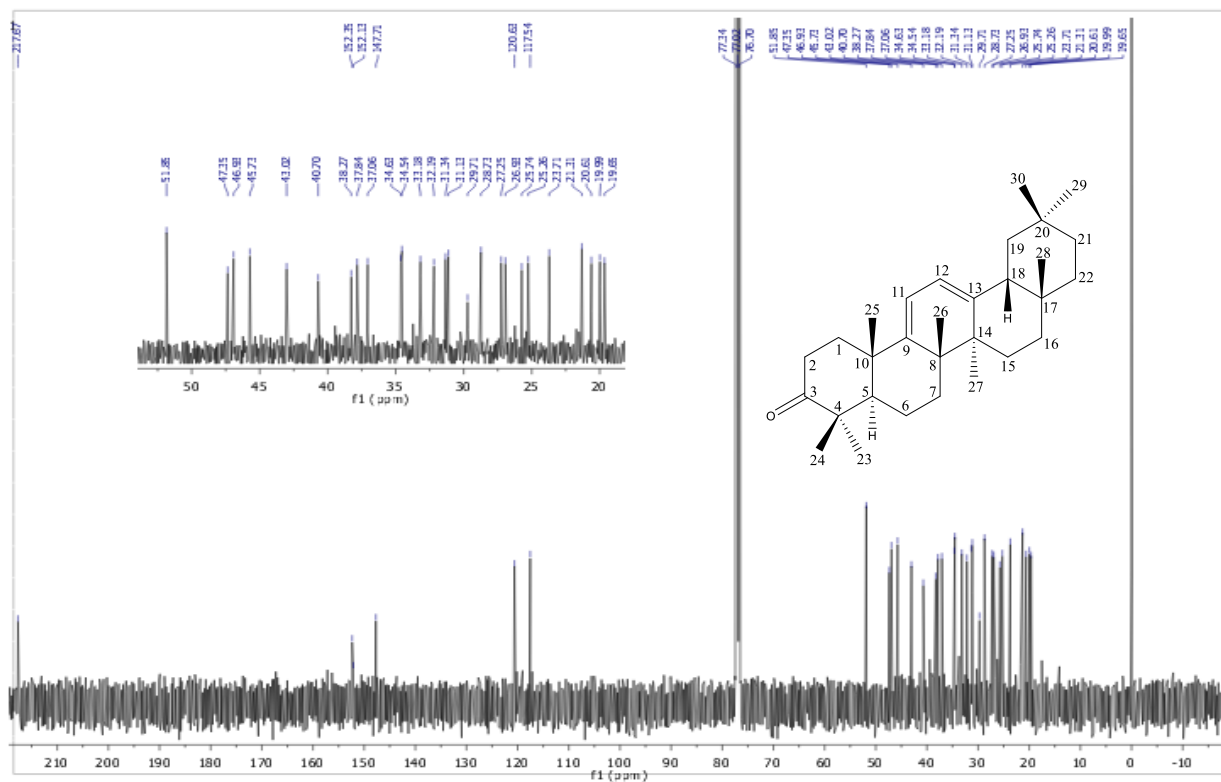


Figura 4.4.3 Espectro de RMN de ^{13}C para **M4** (CDCl_3 , 100 MHz).

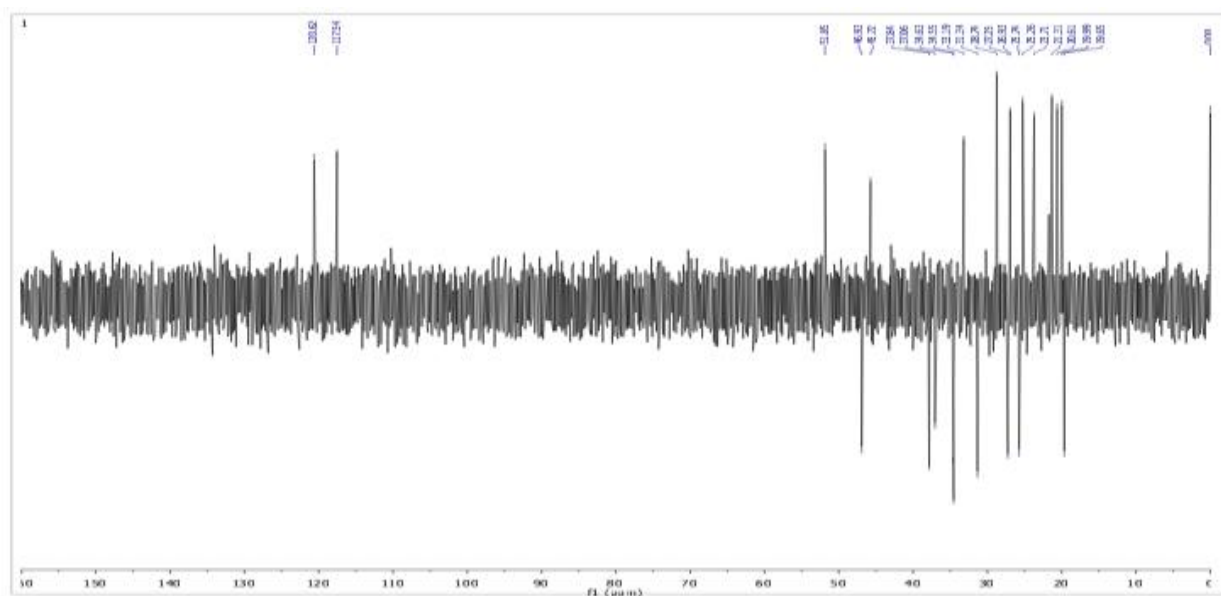


Figura 4.4.4 Subespectro DEPT 135 para **M4** (CDCl_3 , 100 MHz).

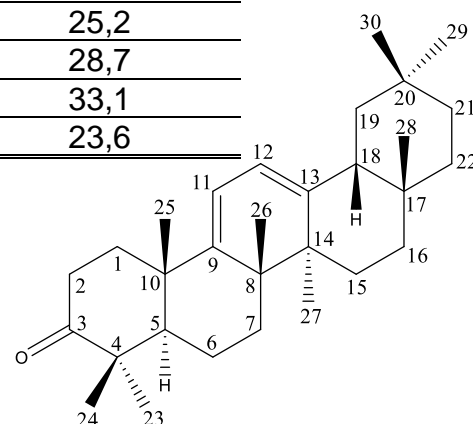
Os dados obtidos a partir dos espectros de RMN de ^{13}C e subespectro DEPT 135 foram comparados com os da literatura (BARNES et al., 1984) e são apresentados na Tabela 4.4.1 e permitiram identificar **M4** como sendo o **3-oxo-olean-9(11),12-dieno**. Para o átomo de carbono C14 pode se observar uma diferença

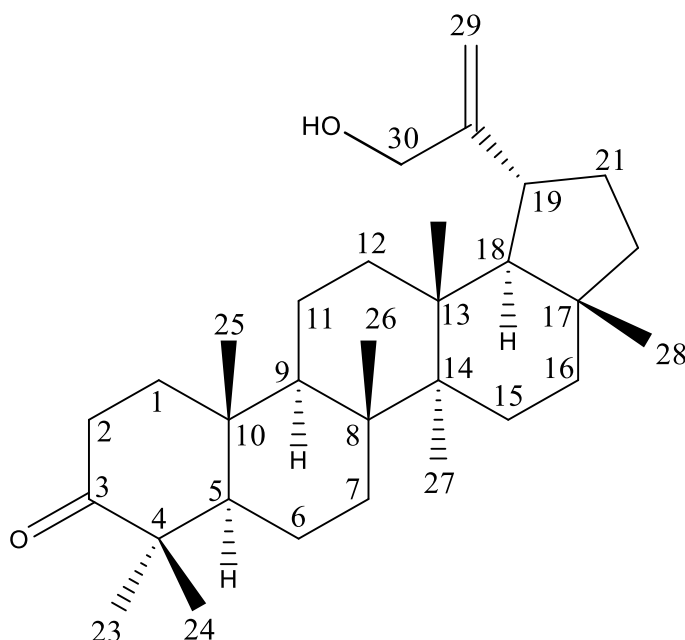
considerável no deslocamento químico entre **M4** e o relatado na literatura. No entanto, para o 3 β -olean-9(11),12-diol foi relatado para C14 o valor de δ_C 43,14 (MENEZES, 2004) e para o ácido 3-oxo-olean-9(11),12-dien-30-oico o valor de δ_C 44,4 (MUHAMMAD et al., 2000), compostos com mesmo esqueleto que **M4**, estes dados sugerem que o valor reportado por Barnes (1984) deve estar incorreto.

Tabela 4.4.1 Comparação dos dados de RMN de ^{13}C de **M4** com os dados da literatura para o 3-oxo-olean-9(11),12-dieno

No. do C	Tipo de C	δ_C^* M4	Referência (BARNES, 1984)
1	CH ₂	37,06	37,0
2	CH ₂	34,63	34,5
3	C	217,67	217,5
4	C	47,36	47,2
5	CH	51,85	51,7
6	CH ₂	19,65	19,1
7	CH ₂	31,34	31,2
8	C	40,70	40,6
9	C	152,35	152,1
10	C	38,27	38,1
11	CH	117,54	117,3
12	CH	120,63	120,4
13	C	147,71	147,2
14	C	43,02	49,9
15	CH ₂	27,25	27,2
16	CH ₂	25,74	25,6
17	C	32,19	32,1
18	CH	45,73	45,6
19	CH ₂	46,93	46,8
20	C	31,13	31,6
21	CH ₂	34,54	34,5
22	CH ₂	37,84	37,7
23	CH ₃	26,93	26,8
24	CH ₃	21,31	21,2
25	CH ₃	20,61	20,5
26	CH ₃	19,99	19,9
27	CH ₃	25,26	25,2
28	CH ₃	28,74	28,7
29	CH ₃	33,18	33,1
30	CH ₃	23,71	23,6

Solvente: *CDCl₃, 100 MHz



4.5 M5: 30-Hidroxilup-20(29)-en-3-ona

O espectro de RMN de ^1H (Figura 4.5.1) de **M5** apresentou sinais de hidrogênios olefínicos sendo dois simpletos em δ_{H} 4,90 e δ_{H} 4,94, característicos do esqueleto lupânico (SILVA, 2014). Apresentou, também um sinal em δ_{H} 4,12 integrado para dois hidrogênios indicando grupo oximetilênico ($-\text{CH}_2\text{OH}$).

No espectro de RMN de ^{13}C (Figura 4.5.2) foram identificados 30 sinais de carbono, que correspondem à estrutura de um triterpeno. Foram observados os sinais de 6 metilas, δ_{C} 14,38, δ_{C} 15,71, δ_{C} 15,90, δ_{C} 17,63, δ_{C} 20,94 e δ_{C} 26,60, sugerindo que uma das sete metilas do esqueleto lupânico encontrava-se hidroxilada. O sinal em δ_{C} 218,00 foi atribuída ao carbono da carbonila em C3, e o sinal em δ_{C} 64,97 atribuído ao carbono metilênico C30. Também foram observados os sinais em δ_{C} 106,85 e δ_{C} 154,64 que correspondem aos carbonos olefínicos C29 e C20, respectivamente.

Os dados de RMN de ^{13}C foram comparados com os dados da literatura (TINTO et al., 1992) o que permitiu identificar **M5** como a **30-hidroxilup-20(29)-en-3-ona**.

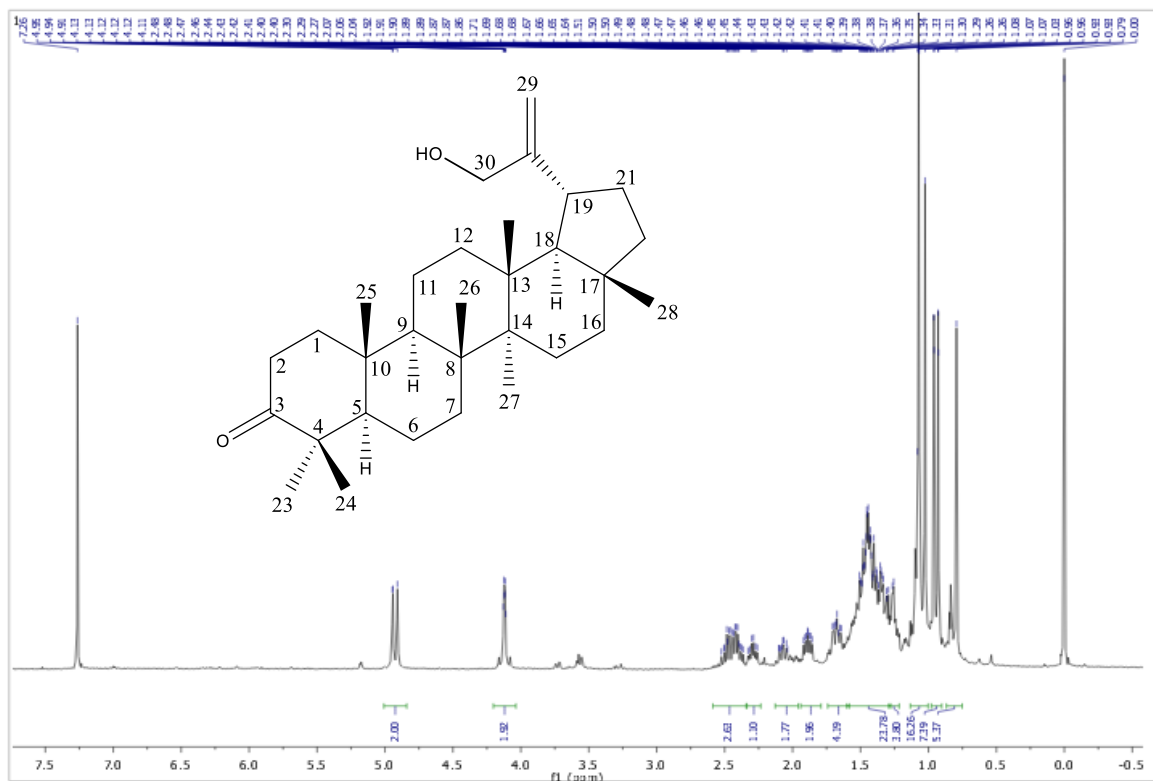


Figura 4.5.1 Espectro de RMN de ¹H de **M5** (CDCl₃, 400 MHz).

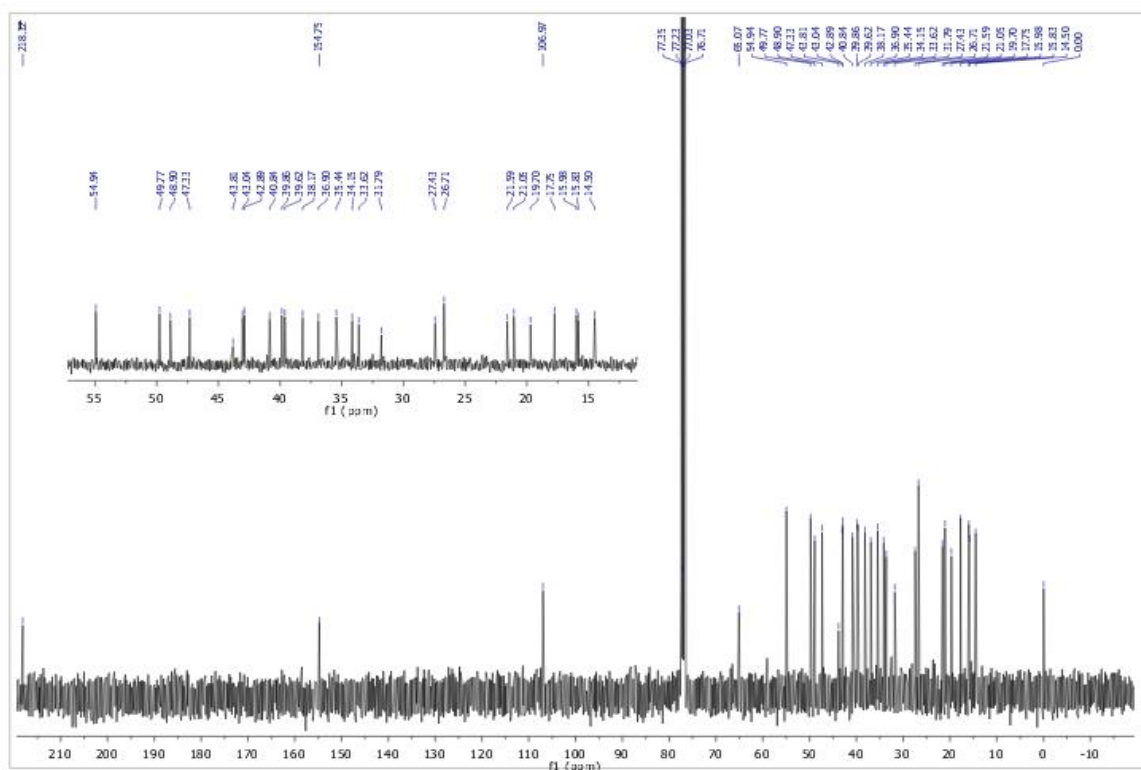


Figura 4.5.2 Espectro de RMN de ¹³C de **M5** (CDCl₃, 100 MHz).

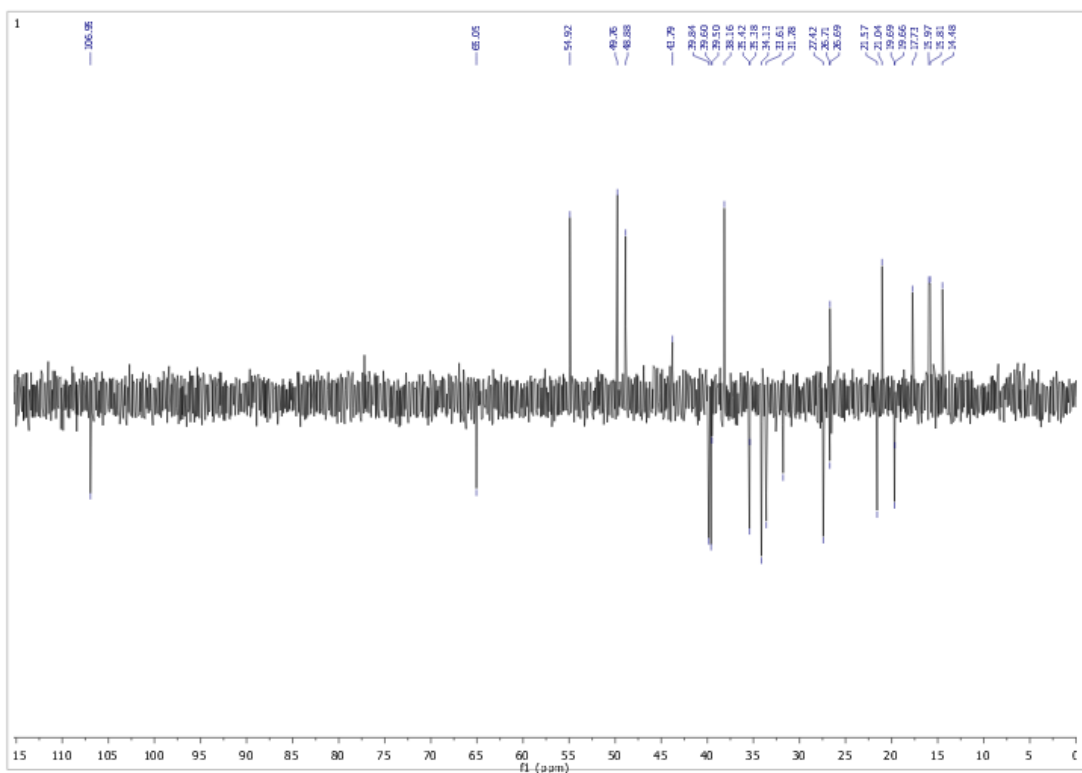


Figura 4.5.3 Subespectro DEPT 135 de **M5** (CDCl₃, 100 MHz).

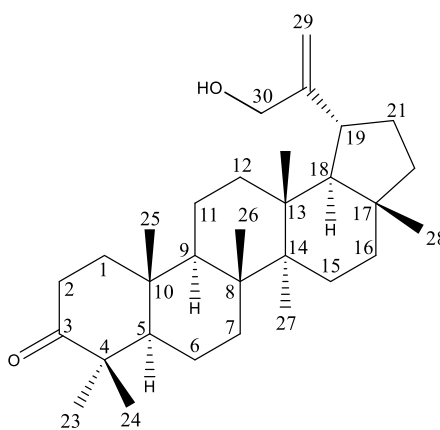
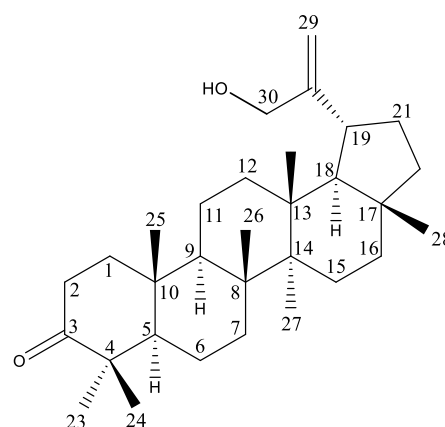
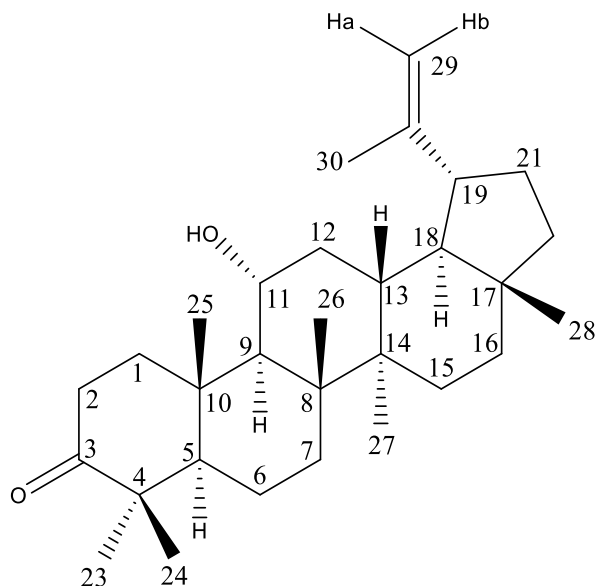


Tabela 4.5.1 Comparação dos dados de RMN de ^{13}C de **M5** com os dados da literatura para 30-hidroxiup-20(29)-en-3-ona

No. do C	Tipo de C	δ_c^* M5	Referência (TINTO, 1992)
1	CH ₂	39,50	39,6
2	CH ₂	34,04	34,1
3	C	218,00	218,3
4	C	47,22	47,3
5	CH	54,82	54,9
6	CH ₂	19,59	19,7
7	CH ₂	33,51	33,6
8	C	40,73	40,8
9	CH	49,66	49,7
10	C	36,79	36,9
11	CH ₂	21,48	21,6
12	CH ₂	26,71	26,7
13	CH	38,06	38,1
14	C	42,78	42,9
15	CH ₂	27,32	27,4
16	CH ₂	35,33	35,4
17	C	42,93	43,0
18	CH	48,78	48,8
19	CH	43,70	43,8
20	C	154,64	154,7
21	CH ₂	31,68	31,8
22	CH ₂	39,75	39,8
23	CH ₃	26,60	26,7
24	CH ₃	20,94	21,0
25	CH ₃	15,90	16,0
26	CH ₃	15,71	15,8
27	CH ₃	14,38	14,5
28	CH ₃	17,63	17,7
29	CH ₂	106,85	106,8
30	CH ₂	64,97	65,0

Solvente: $^*\text{CDCl}_3$, 100 MHz



4.6 M6: 11 α -Hidroxilup-20(29)-en-3-ona

O composto **M6** foi isolado como um sólido branco e cristalino, dos extratos hexânico e clorofórmico. O espectro na região de IV apresentou sinais em 3505 e 3395 cm^{-1} , característica de deformação axial de hidroxila; em 2938 e 2863 cm^{-1} atribuídos à deformação axial das ligações CH de CH_3 e CH_2 , em 1764 cm^{-1} referente à deformação axial do grupo carbonila (MENEZES, 2004). Apresentou também, banda intensa em 880 cm^{-1} atribuída a presença de insaturação.

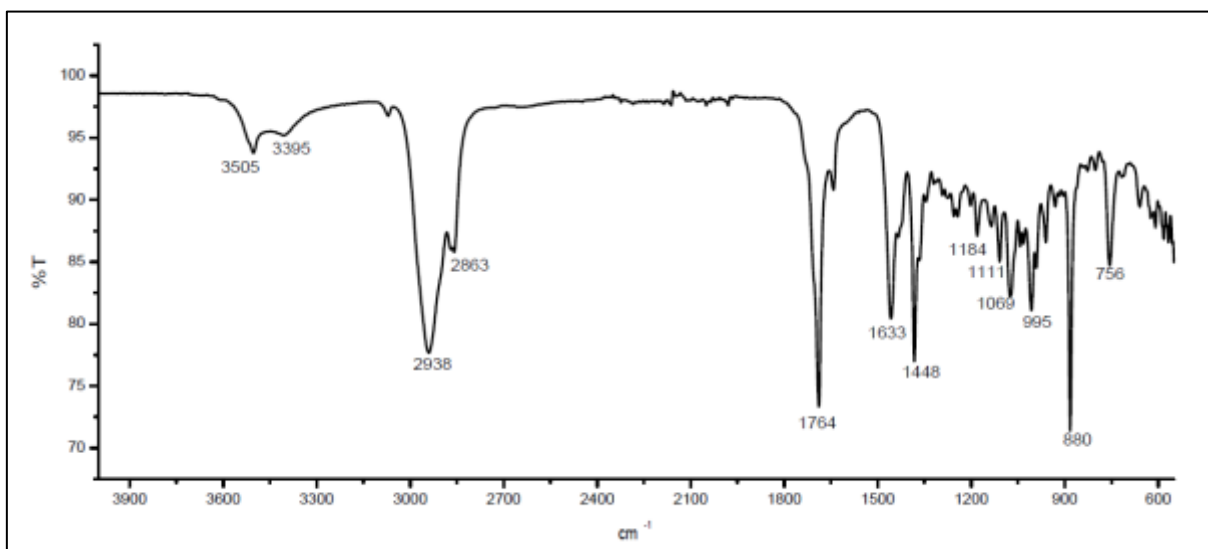


Figura 4.6.1 Espectro de absorção da região do IV de **M6** (ATR).

O espectro de RMN de ^1H de **M6** (Figura 4.6.2) apresenta sinais de um duplete triplo em δ_{H} 3,87-3,94 ($J_1 = 4,8$ Hz, $J_2 = 10,8$ Hz) correspondente a um hidrogênio carbinólico (H-11), também apresenta sinais em δ_{H} 4,60 e δ_{H} 4,72 que correspondem a hidrogênios olefínicos de uma dupla ligação terminal.

No espectro de RMN de ^{13}C (Figura 4.6.3), são registrados os sinais de δ_{C} 109,96 e δ_{C} 150,22 que correspondem aos carbonos de uma olefina característica de C29 e C20 em esqueleto lupânico.

Os sinais do espectro de RMN de ^{13}C e do subspectro DEPT 135 (Figura 4.6.4), indicam um lupano duplamente funcionalizado com uma carbonila em C3, com deslocamento químico em δ_{C} 218,64, e uma hidroxila na posição 11, com δ_{C} 70,50. A estrutura do composto foi determinada através da comparação dos dados obtidos para **M6** com a literatura (SILVA, 2007), esses dados são apresentados na Tabela 4.6.1 e correspondem ao composto **11 α -hidroxilup-20(29)-en-3-ona**.

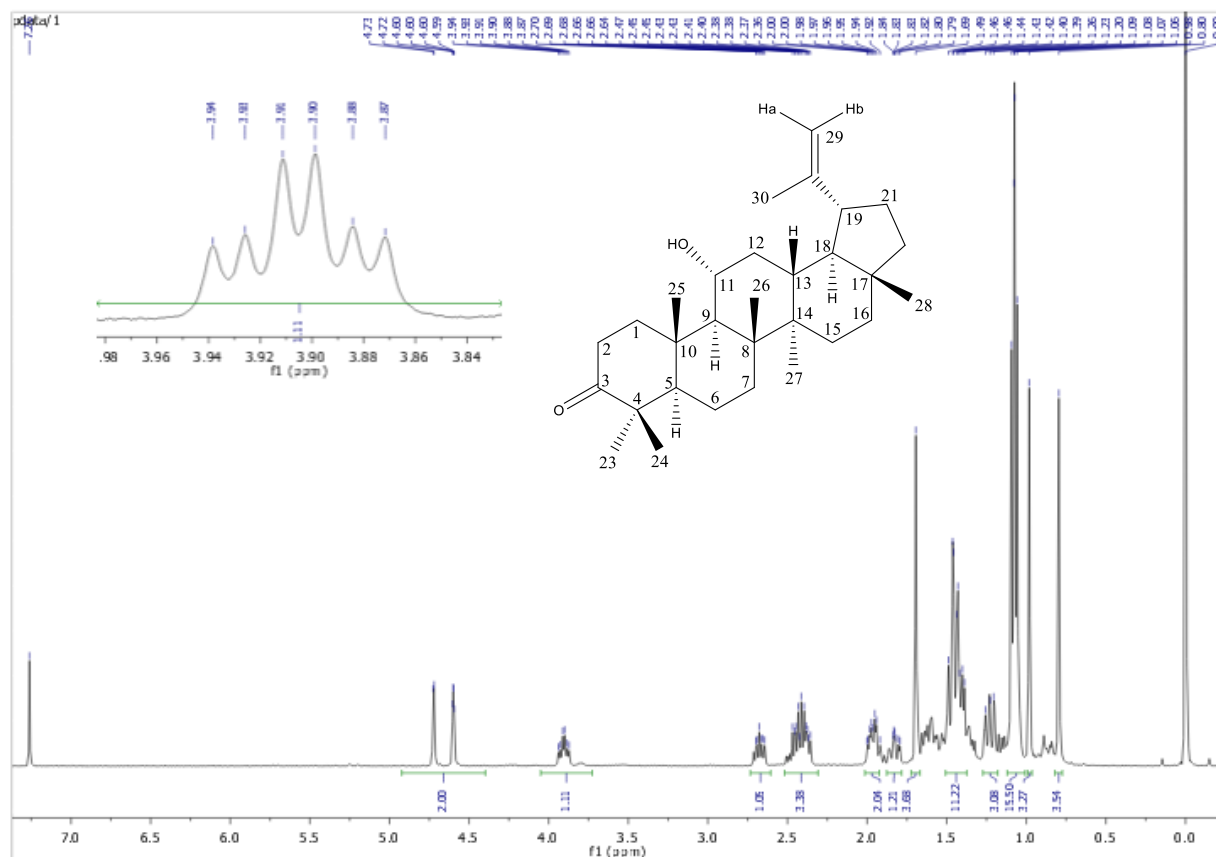


Figura 4.6.2 Espectros de RMN de ^1H de **M6** (CDCl_3 , 400 MHz).

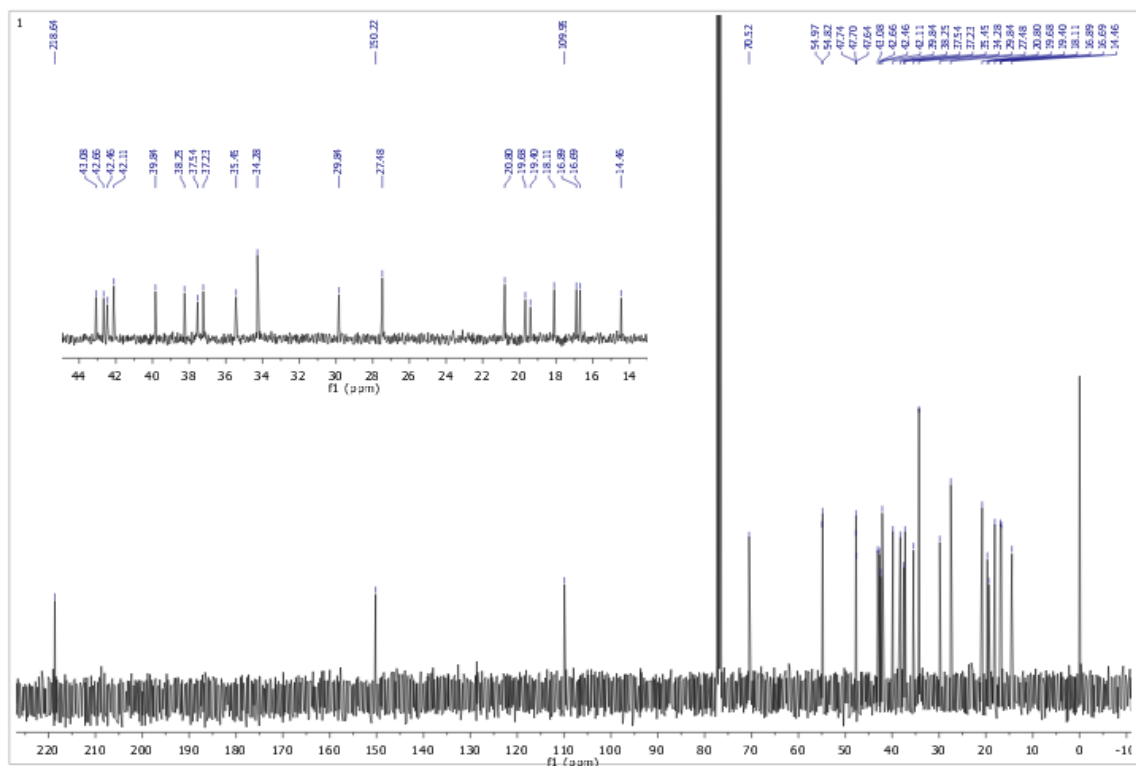


Figura 4.6.3 Espectros de RMN de ^{13}C de M6 (CDCl_3 , 100 MHz).

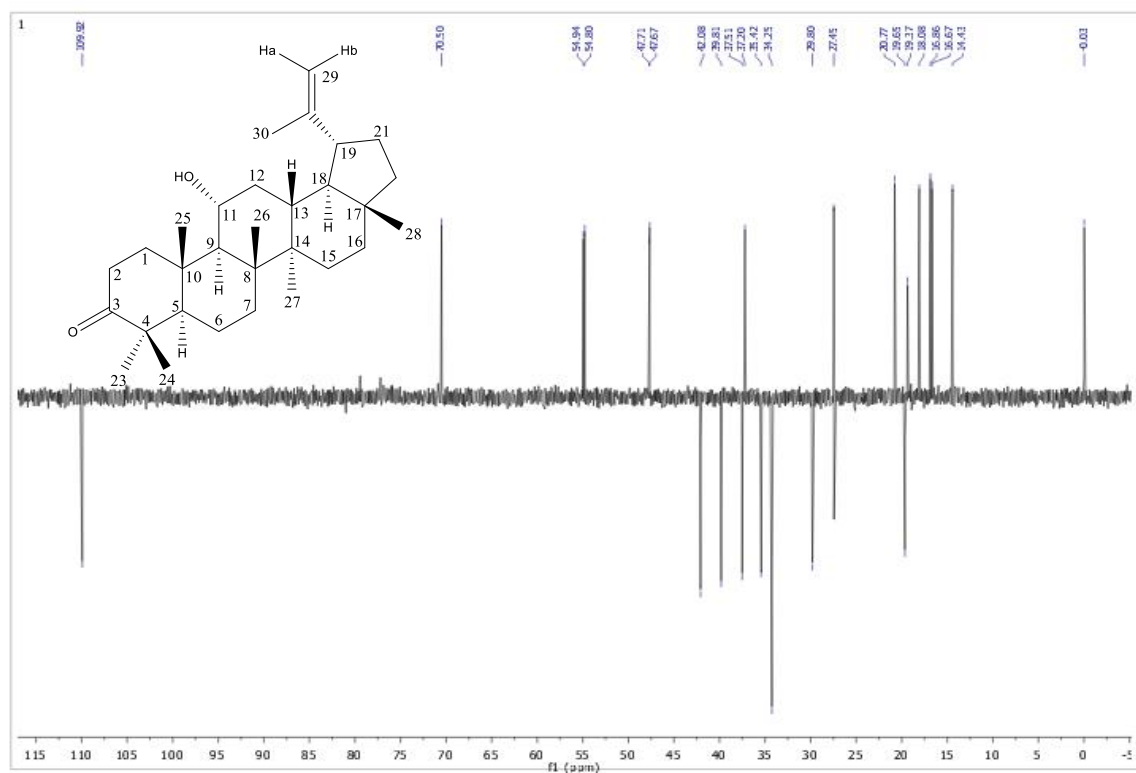
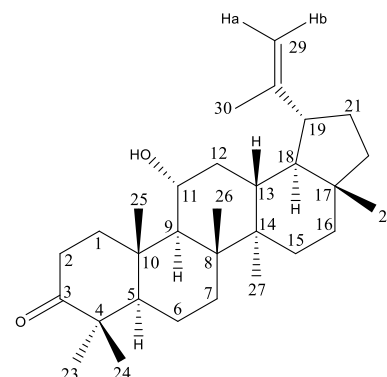


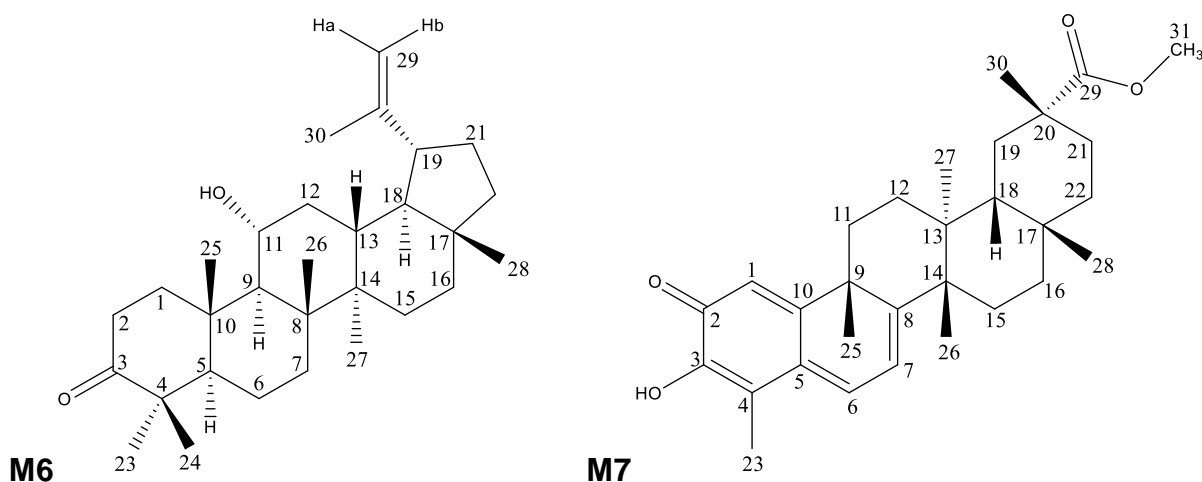
Figura 4.6.4 Subespectro DEPT 135 de M6 (CDCl_3 , 100 MHz).

Tabela 4.6.1 Comparação dos dados de RMN de ^{13}C de **M6** com os dados da literatura para 11 α -hidroxilup-20(29)-en-3-ona

No. do C	Tipo de C	δ_c^* M6	Referência (SILVA, 2007)
1	CH ₂	42,11	42,07
2	CH ₂	34,28	34,21
3	C	218,64	218,84
4	C	47,74	47,63
5	CH	54,84	54,76
6	CH ₂	19,68	19,64
7	CH ₂	34,28	34,27
8	C	42,47	42,41
9	CH	54,98	54,87
10	C	38,25	38,20
11	CH	70,50	70,49
12	CH ₂	37,55	37,44
13	CH	37,24	37,17
14	C	42,67	42,16
15	CH ₂	27,44	27,41
16	CH ₂	39,84	39,80
17	C	43,08	43,05
18	CH	47,65	47,63
19	CH	47,70	47,70
20	C	150,22	150,20
21	CH ₂	29,84	29,78
22	CH ₂	35,45	35,40
23	CH ₃	27,45	27,46
24	CH ₃	20,80	20,77
25	CH ₃	16,67	16,71
26	CH ₃	16,89	16,86
27	CH ₃	14,46	14,42
28	CH ₃	18,10	18,08
29	CH ₂	109,96	109,95
30	CH ₃	19,40	19,37

Solvente: $^*\text{CDCl}_3$, 100 MHz



4.7 M6 + M7: 11 α -Hidroxilup-20(29)-en-3-ona e pristimerina

A mistura de **M6** e **M7** foi obtida como um sólido cristalino de cor avermelhada, a partir do extrato hexânico. O espectro no IV apresentou bandas em 3350 e 1597 cm^{-1} atribuídas à presença de grupos hidroxila e alqueno respectivamente. A mistura apresenta três tipos de carbonila: cetona, éster e cetona conjugada, no entanto, no espectro podem ser observadas apenas duas bandas, em 1732 e 1704 cm^{-1} , características do grupo carbonila. Apresentou, também, bandas em 2942 e 2867 cm^{-1} que correspondem à deformação axial da ligação CH de grupos CH_3 e CH_2 . A banda que corresponde ao grupo $-\text{OH}$ esta com baixa intensidade devido à técnica que foi utilizada para a obtenção dos espectros.

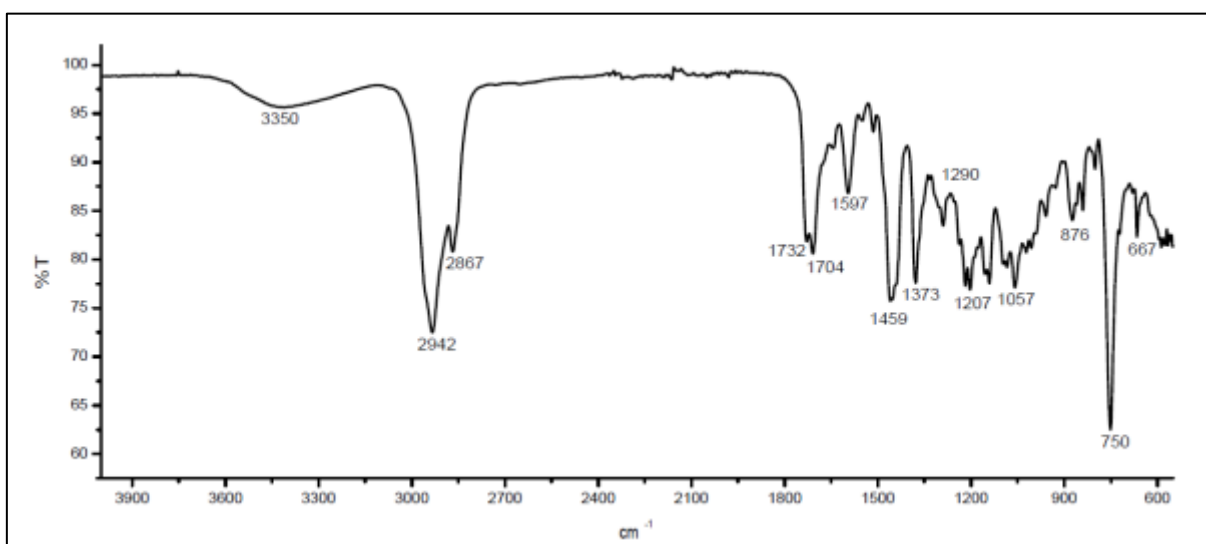


Figura 4.7.1 Espectro na região IV de **M6** e **M7** (ATR).

O espectro de RMN de ^1H (Figura 4.7.2) apresenta sinais de hidrogênio em δ_{H} 7,02 (1H, d, $J = 8,0$ Hz, H-6), δ_{H} 6,54 (1H, s, H-1), δ_{H} 6,36 (1H, d, $J = 8,0$ Hz, H-7) que são característicos de triterpenos da classe dos quinonametídeos. Também aparecem sinais em δ_{H} 4,60 e δ_{H} 4,72 que são característicos de hidrogênios olefínicos de uma dupla ligação terminal de triterpenos da classe dos lupanos (MENEZES, 2004).

No espectro de RMN de ^{13}C (Figura 4.7.3) são registrados os sinais de δ_{C} 109,96 e δ_{C} 150,22 que são característicos dos carbonos olefínicos do composto **M6**.

Os sinais dos carbonos olefínicos δ_{C} 146,00; δ_{C} 134,16; δ_{C} 127,39; δ_{C} 119,55; δ_{C} 118,14 e do carbono metoxílico δ_{C} 51,57 foram atribuídos aos carbonos de **M7** (MENEZES, 2004).

A identificação da mistura foi obtida pela comparação dos dados obtidos com a literatura conforme apresentado na Tabela 4.7.1. A partir destes dados foi possível identificar **M6** como sendo a **11 α -hidroxilup-20(29)-en-3-ona** e **M7** como **pristimerina**. Pela intensidade dos sinais de ^{13}C e a integração dos hidrogênios, pode-se sugerir que os compostos estão presentes numa proporção de aproximadamente 1:1 na mistura.

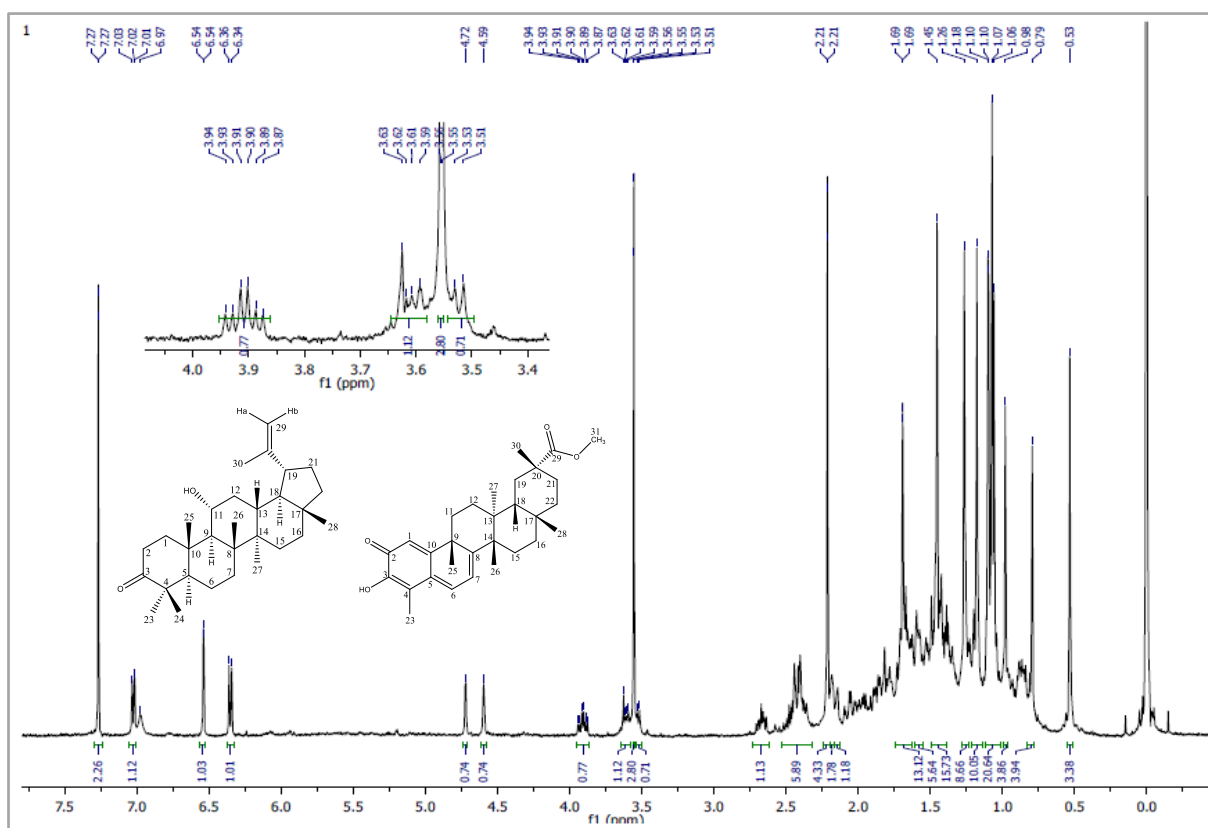
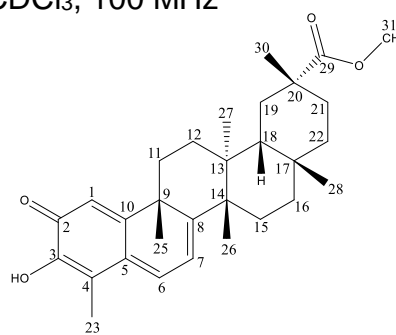


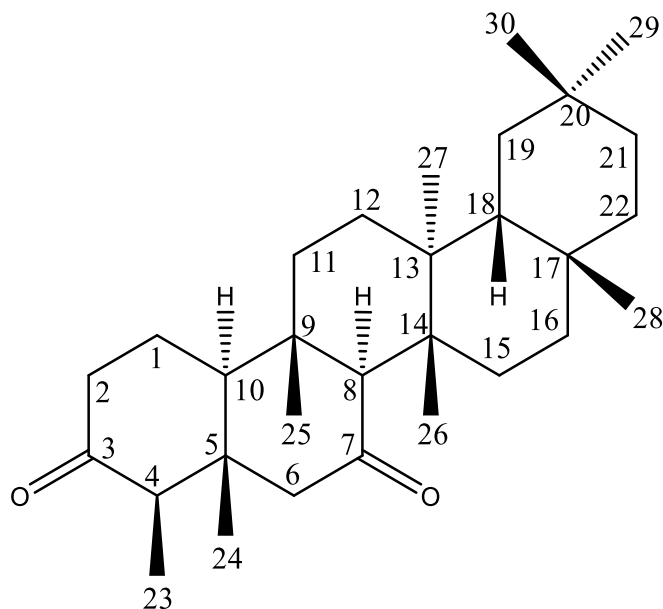
Figura 4.7.2 Espectro de RMN de ^1H de **M6** + **M7** (CDCl_3 , 400 MHz).

Tabela 4.7.1 Comparação dos dados de RMN de ^{13}C de **M6** + **M7** com os dados da literatura para a mistura de 11 α -hidroxilup-20(29)-en-3-ona e pristimerina

No. do C	Tipo de C	δ_{C}^* M6	Referência M6 (SILVA, 2007)	No. do C	Tipo de C M7	δ_{C}^* M7	Referência M7 (FERNANDO et al.,1989)
1	CH ₂	42,11	42,07	1	CH	119,55	119,6
2	CH ₂	34,28	34,21	2	C	178,33	178,4
3	C	218,64	218,84	3	C	146,00	146,1
4	C	47,74	47,63	4	C	117,16	117,0
5	CH	54,84	54,76	5	C	127,39	127,5
6	CH ₂	19,68	19,64	6	CH	134,16	133,9
7	CH ₂	34,28	34,27	7	CH	118,14	118,1
8	C	42,47	42,41	8	C	170,16	169,9
9	CH	54,98	54,87	9	C	42,07	42,9
10	C	38,25	38,20	10	C	164,80	164,7
11	CH	70,50	70,49	11	CH ₂	33,55	33,6
12	CH ₂	37,55	37,44	12	CH ₂	29,75	29,7
13	CH	37,24	37,17	13	C	39,41	39,4
14	C	42,67	42,16	14	C	45,05	45,0
15	CH ₂	27,44	27,41	15	CH ₂	28,63	28,7
16	CH ₂	39,84	39,80	16	CH ₂	36,37	36,4
17	C	43,08	43,05	17	C	30,54	30,6
18	CH	47,65	47,63	18	CH	44,29	44,4
19	CH	47,70	47,70	19	CH ₂	30,90	30,9
20	C	150,22	150,20	20	C	39,79	40,4
21	CH ₂	29,84	29,78	21	CH ₂	29,65	29,9
22	CH ₂	35,45	35,40	22	CH ₂	34,79	34,8
23	CH ₃	27,45	27,46	23	CH ₃	10,27	10,2
24	CH ₃	20,80	20,77	25	CH ₃	38,28	38,3
25	CH ₃	16,67	16,71	26	CH ₃	21,61	21,6
26	CH ₃	16,89	16,86	27	CH ₃	18,07	18,3
27	CH ₃	14,46	14,42	28	CH ₃	31,60	31,6
28	CH ₃	18,10	18,08	29	C	178,76	178,7
29	CH ₂	109,96	109,95	30	CH ₃	32,69	32,7
30	CH ₃	19,40	19,37	31	CH ₃	51,57	51,50

Solvente: $^*\text{CDCl}_3$, 100 MHz



4.8 M8: 3,7-Dioxofriedelano

O composto **M8** foi isolado como um sólido branco, cristalino, em forma de agulhas. O espectro na região do IV (Figura 4.8.1) de **M8** apresentou bandas de absorção em 2981-2859 cm^{-1} característica de estiramento simétrico e assimétrico da ligação CH de compostos alifáticos. Além disso, também apresentou bandas em 1451 e 1392 cm^{-1} características da deformação angular de ligações simples CH de compostos alifáticos. Em 1708 cm^{-1} aparece uma banda de carbonila, de forte intensidade, correspondente aos dois grupos carbonila no triterpeno.

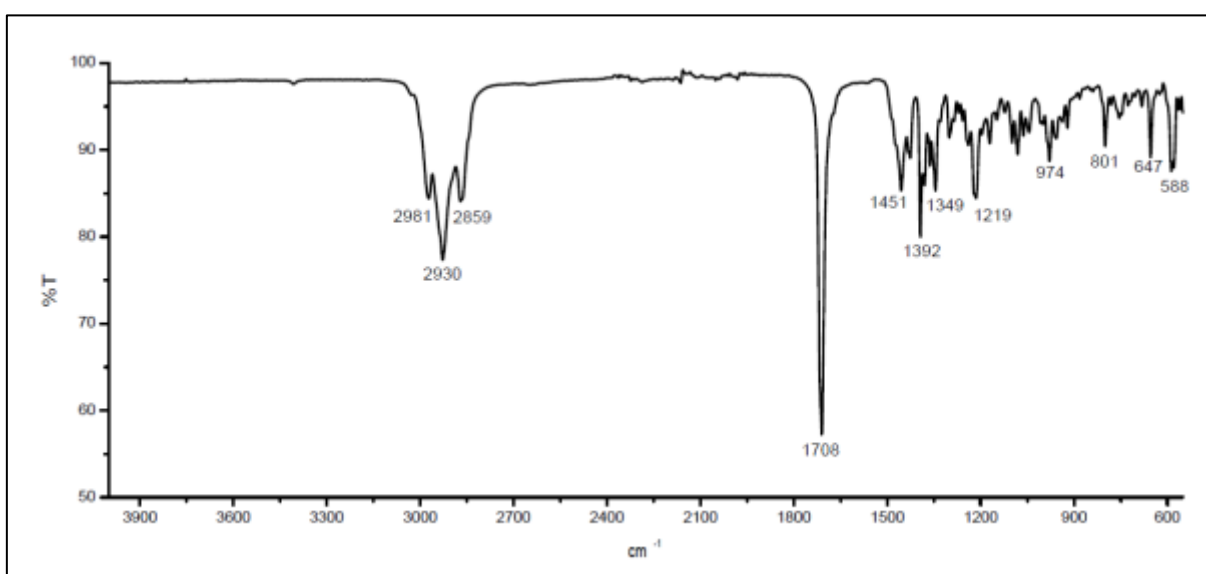


Figura 4.8.1 Espectro na região de IV (ATR) de **M8**.

O espectro de RMN de ^1H (Figura 4.8.2) apresentou sete simpletos em δ_{H} 0,77, 0,88, 0,91, 0,96, 1,00, 1,07, e 1,18 relativos a sete metilas e um duplete em δ_{H} 0,88 associado à metila C23, características de esqueleto friedelano (RODRIGUES, 2011).

Nos espectros de RMN de ^{13}C e subespectro DEPT 135 (Figuras 4.8.3 e 4.8.4) observam-se um total de 30 sinais de carbono. Os sinais em δ_{C} 210,93 e 210,48 indicaram que no esqueleto friedelano existiam duas carbonilas.

Os dados de RMN de ^{13}C foram comparadas com dados da literatura (SILVA, 2014) e permitiram identificar **M8** como sendo do **3,7-dioxofriedelano**.

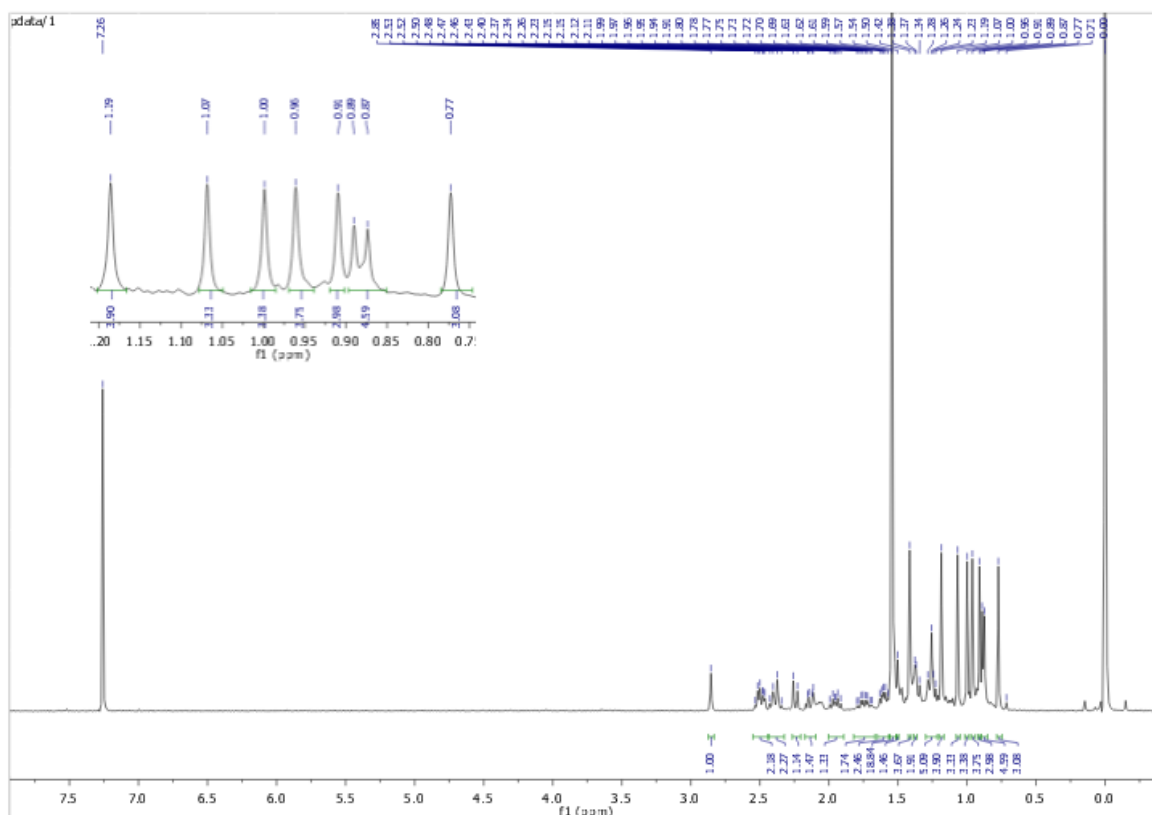
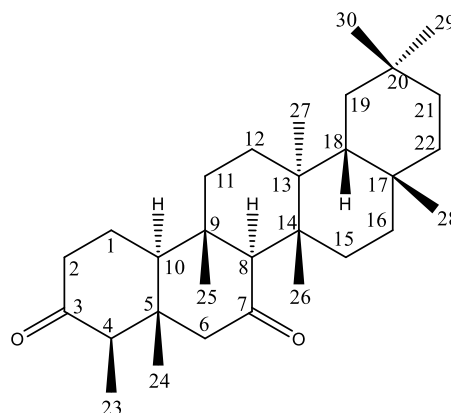


Figura 4.8.2 Espectro de RMN de ^1H de **M8** (CDCl_3 , 400 MHz).



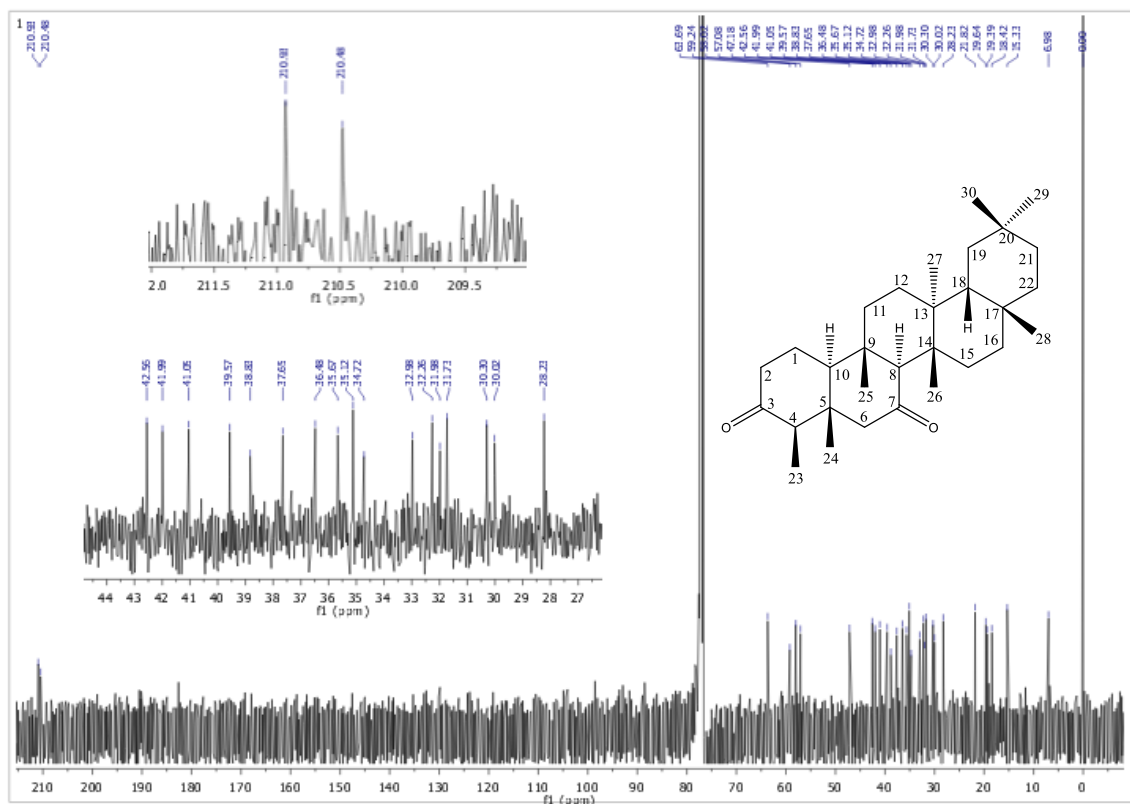


Figura 4.8.3 Espectro de RMN de ^{13}C de **M8** (CDCl_3 , 100 MHz).

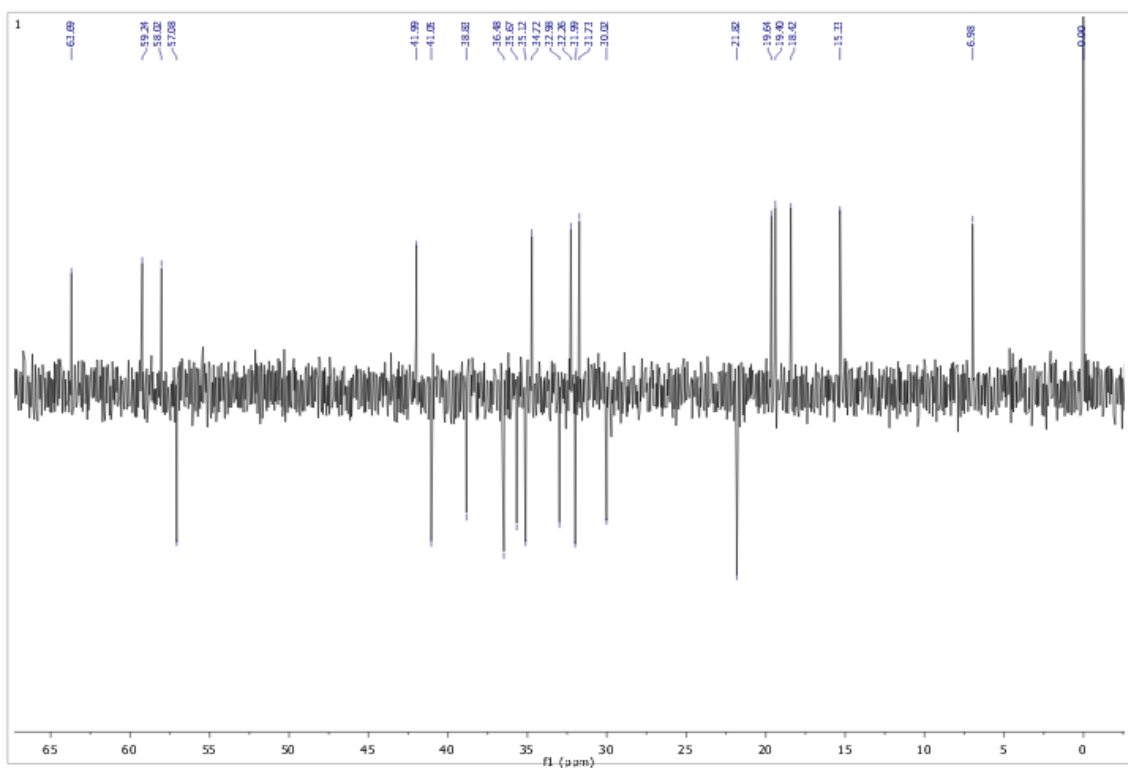
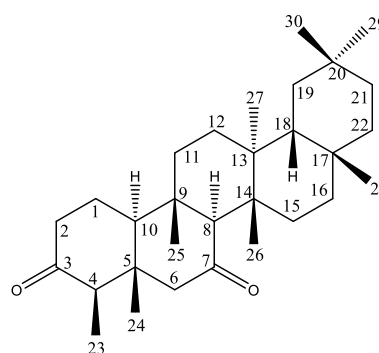


Figura 4.8.4 Subespectro DEPT 135 de **M8** (CDCl_3 , 100 MHz).

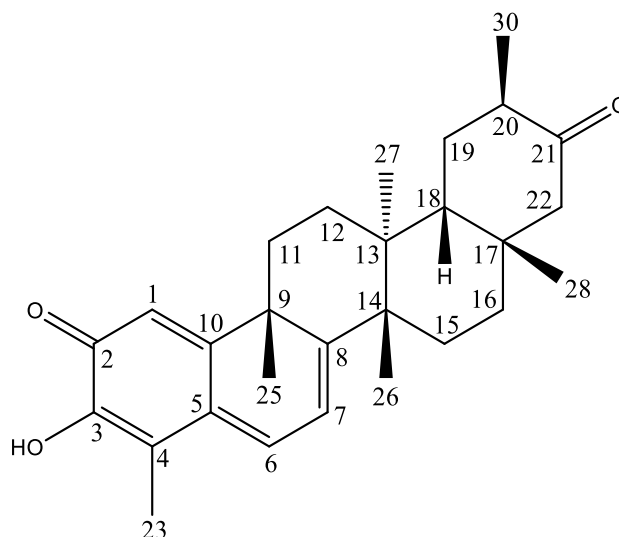
Tabela 4.8.1 Comparação dos dados de RMN de ^{13}C de **M8** com os dados da literatura para o 3,7-dioxofriedelano

No. do C	Tipo de C	δ_{C}^* M8	Referencia (SILVA, 2014)
1	CH ₂	21,82	21,66
2	CH ₂	41,05	40,89
3	C	210,93	210,82
4	CH	58,02	57,84
5	CH	47,18	47,02
6	CH ₂	57,08	56,90
7	C	210,48	210,35
8	C	63,69	63,51
9	C	42,55	42,38
10	CH	59,23	59,05
11	CH ₂	35,67	35,50
12	CH ₂	30,02	29,86
13	C	39,57	39,39
14	C	37,65	37,48
15	CH ₂	31,99	31,81
16	CH ₂	36,48	36,31
17	C	30,30	30,14
18	CH	41,98	41,81
19	CH ₂	35,12	34,94
20	C	28,23	28,07
21	CH ₂	32,97	32,81
22	CH ₂	38,83	38,66
23	CH ₃	6,98	6,84
24	CH ₃	15,33	15,18
25	CH ₃	18,42	18,28
26	CH ₃	19,39	19,24
27	CH ₃	19,64	19,48
28	CH ₃	32,26	32,11
29	CH ₃	31,73	31,57
30	CH ₃	34,72	34,57

Solvente: *CDCl₃, 100 MHz



4.9 M9: Tingenona



O composto **M9** foi isolado como um sólido alaranjado, isolado dos extratos EH e EC. O espectro no IV (Figura 4.9.1) de **M9** apresentou bandas de absorção em 2926-2867 cm^{-1} , característica de estiramento simétrico e assimétrico da ligação CH de compostos alifáticos. O sinal em 1727 cm^{-1} é característica da presença de carbonila de cetona e uma banda em 1668 cm^{-1} indica a presença de uma segunda carbonila conjugada. A banda observada em 3434 cm^{-1} que é característica da hidroxila, não está intensa devido à técnica que foi utilizada para a obtenção do espectro.

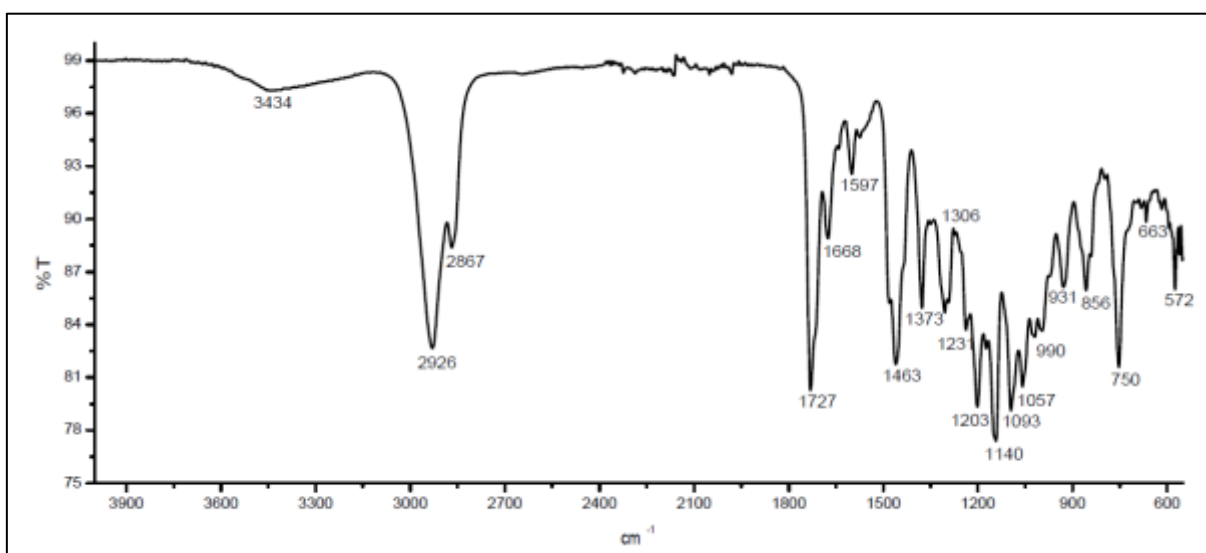


Figura 4.9.1 Espectro da região de IV de **M9** (ATR).

O espectro de RMN de ^1H (Figura 4.9.2) apresentou sinais em δ_{H} 7,07 (1H, d, $J = 7,1$ Hz, H-6); δ_{H} 6,55 (1H, s, H-1); δ_{H} 6,40 (1H, d, $J = 7,1$ Hz, H-7) que são características de triterpeno quinonametídeo.

O espectro de RMN de ^{13}C (Figura 4.9.3) apresenta 28 sinais de carbono, sendo os sinais na região de δ_{C} 117-180, correspondentes a carbonos olefínicos e carbonílico, característicos de triterpeno com esqueleto quinonametídeo.

Os valores de deslocamento químico dos espectros de RMN de ^{13}C e subespectro DEPT 135 (Figura 4.9.4), foram comparados com a literatura (RODRIGUES, 2011) e permitiram identificar este composto como **tingenona**.

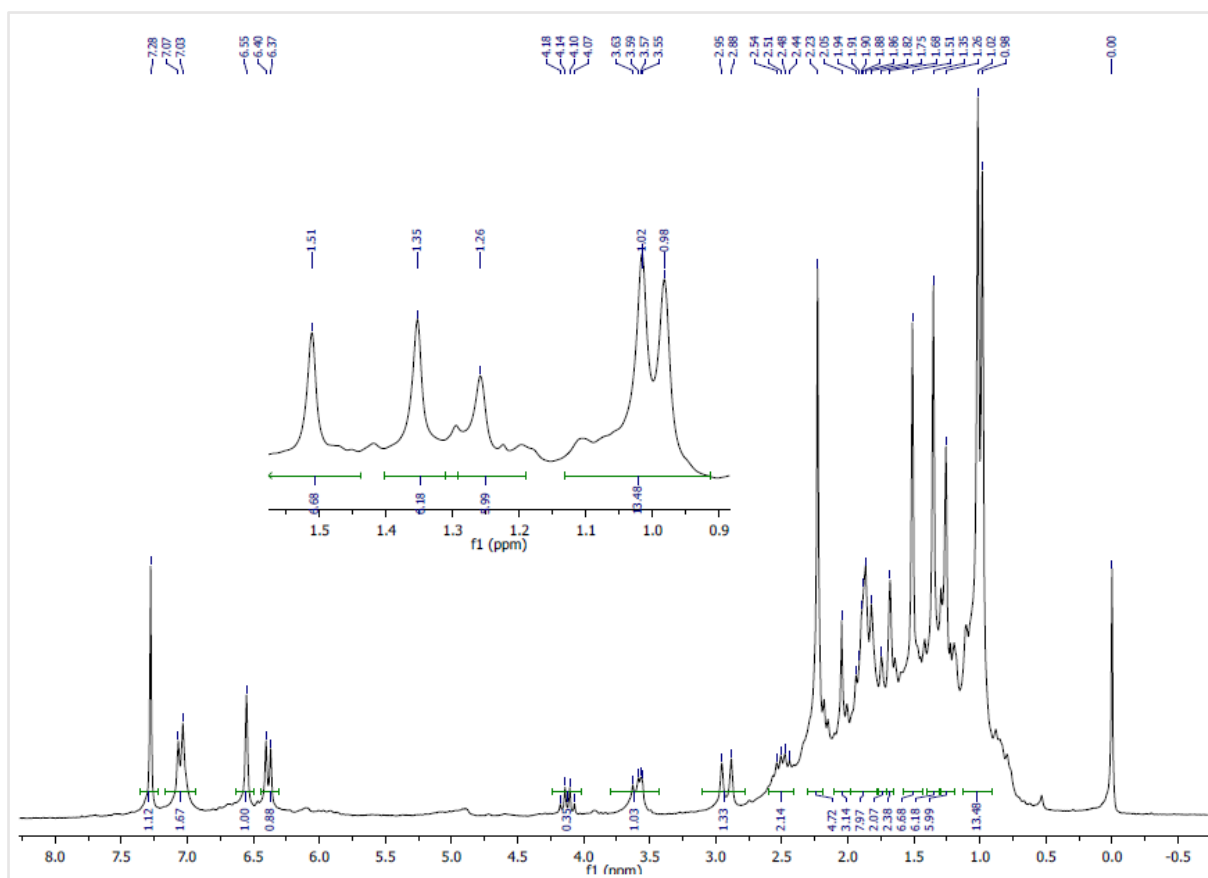


Figura 4.9.2 Espectro de RMN de ^1H de **M9** (CDCl_3 , 400 MHz).

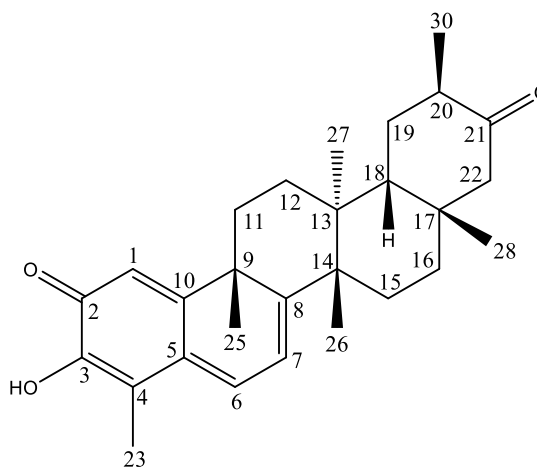
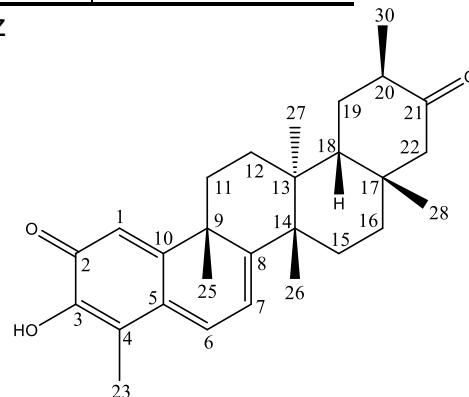


Tabela 4.9.1 Comparação dos dados de RMN de ^{13}C de **M9** com os dados da literatura para a tingenona

No. do C	Tipo de C	δ_c^* M9	Referencia (RODRIGUES, 2011)
1	CH	118,79	119,8
2	C	178,42	178,4
3	C	146,14	146,0
4	C	117,25	117,1
5	C	127,77	127,7
6	CH	133,64	133,6
7	CH	118,16	118,1
8	C	168,71	168,7
9	C	42,75	42,7
10	C	164,73	164,7
11	CH ₂	33,83	33,8
12	CH ₂	29,97	29,9
13	C	40,67	40,6
14	C	44,68	44,6
15	CH ₂	28,55	28,5
16	CH ₂	35,55	35,5
17	C	38,19	38,2
18	CH	43,58	43,5
19	CH ₂	32,10	32,0
20	CH	41,91	41,8
21	C	213,49	213,6
22	CH ₂	52,55	52,5
23	CH ₃	10,27	10,2
25	CH ₃	39,05	39,0
26	CH ₃	21,57	21,5
27	CH ₃	19,73	19,7
28	CH ₃	32,58	32,5
30	CH ₃	15,10	15,1

Solvente: $^*\text{CDCl}_3$, 100 MHz



CAPITULO II - Atividade Biológica

5. Ensaio de toxicidade

5.1 Descrição Geral

O nematódeo *Caenorhabditis elegans* tem sido usado como um modelo animal importante em diferentes áreas como a neurobiologia e a genética. As características que fazem dele uma boa opção são: a facilidade para sua manipulação genética, o programa de desenvolvimento completamente descrito, o genoma bem caracterizado, a facilidade de manutenção, ciclo de vida curto e prolífico e o seu tamanho pequeno (LEUNG et al., 2008).

O modelo de teste de toxicidade utilizando *C. elegans* é válido visto que os resultados das análises realizadas assemelham-se àqueles observados em experimentos utilizando modelos clássicos de organismos eucariotas. Muitos dos processos básicos fisiológicos e respostas ao estresse que são observados em outros eucariotas e murinos (subfamília de roedores miomorfos Murinae que inclui ratos) são similares aos observados em *C. elegans*. Por meio de dados de bioinformática constatou-se que 60-80% dos humanos possuem genes homólogos ortólogos em *C. elegans* (KALETTA e HENGARTNER, 2006). Sendo genes ortólogos aqueles que foram separados por um processo de especiação, onde cada cópia divergiu para espécies distintas, eles partilham de um ancestral comum e possuem funções similares.



Figura 5.1 Foto de *Caenorhabditis elegans*, adulto, hermafrodita. Fonte: BOYD et al., 2012.

Existem relatos na literatura de vários testes utilizando *C. elegans*, para determinar a toxicidade e eficácia de um número elevado de compostos. A principal vantagem desse modelo é a de se avaliar a toxicidade e a eficácia dos compostos *in*

vivo e em maior escala utilizando microplacas, isto é, simultaneamente são avaliados vários compostos em um curto espaço de tempo.

A inclusão do modelo de *C. elegans* nas primeiras etapas do desenvolvimento de fármacos antifúngicos ou de antimicrobianos permite, *in vivo*, a determinação de doses não tóxicas, a seleção dos compostos mais promissores e o acompanhamento da concentração efetiva em um único ensaio, conseqüentemente reduzindo consideravelmente os experimentos em animais (THEVISSSEN et al., 2011).

Para testar a eficácia dos compostos no modelo de infecção de *C. elegans*, a sobrevivência dos nematódeos infectados é monitorada na ausência e na presença das substâncias em análise. Quando um composto químico não tem atividade no modelo de infecção *in vivo*, só uma média de 10-20% dos nematódeos permanecerá viva (THEVISSSEN et al., 2011).

A aplicação do modelo *C. elegans* permite estabelecer uma classificação dos potenciais de toxicidade entre os compostos, favorecendo a escolha mais racional dos posteriores testes *in vivo*, com redução dos estudos em animais (DENGG e VAN MEEL, 2004). Este fato contribui para o estudo da toxicidade potencial de novos compostos farmacêuticos. Vários estudos de tolerabilidade/letalidade apresentam boas correlações entre os resultados obtidos de testes realizados com *C. elegans* e com roedores (DENGG et al., 2004). Assim, o modelo *C. elegans* proporciona uma resposta rápida e de baixo custo, da toxicidade de compostos farmacêuticos.

O ciclo de vida do *C. elegans* é apresentado na Figura 5.2. A maior parte da população de *C. elegans* é hermafrodita, sendo que os machos, responsáveis pela variabilidade genética representam 0,1% dos indivíduos. O ciclo de vida dura de 21-23 dias em temperatura ambiente, podendo se alterar em velocidade em duas outras temperaturas permissivas. Durante o desenvolvimento o animal passa por quatro estágios larvais L1, L2, L3 e L4 (adulto jovem) que antecede o indivíduo considerado adulto, apto para a postura de ovos. Portanto, os ovos constituem um desenvolvimento embrionário externo e eclodem no estágio L1 (CORSI, 2006).

Os testes de toxicidade normalmente são realizados nos estágios L1 e L4. No estágio L1 pode se controlar as concentrações iniciais e as condições de crescimento e no L4 é o estágio larval utilizado em ensaios de infecção.

Os testes de toxicidade são importantes na avaliação da potencial atividade nematocida e, assim, na aplicação em Parasitologia para o desenvolvimento de novos fármacos.

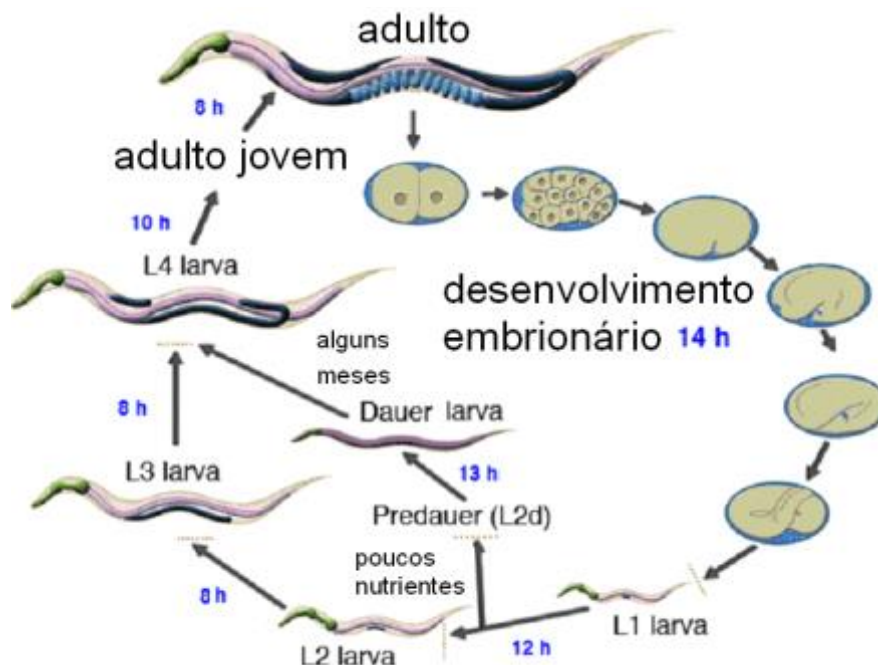


Figura 5.2 Ciclo de vida de *Caenorhabditis elegans* hermafrodita, a 22 °C. Quando a embriogênese é completada, as larvas L1 saem da casca do ovo e começam o desenvolvimento pós-embriônico, que é dependente da disponibilidade de fontes nutricionais adequadas. O animal continua seu desenvolvimento através das etapas L2-L4, até atingir a adulta. Observa-se gônadas escuras expandindo-se durante esse período de tempo. O tempo de permanência em cada etapa do desenvolvimento é indicado nas setas.

Fonte: http://francisco-scientiaestpotentia.blogspot.com.br/2014_05_01_archive.html (adaptado).

Os compostos isolados de *Maytenus distichophylla* (M1, M3 à M9), bem como os extratos hexânico, clorofórmico, acetato-etílico e metanólico, foram submetidos aos ensaios de toxicidade em *C. elegans*. E, também, aos testes de avaliação do potencial bacteriostático/bactericida, utilizando *Staphylococcus aureus* MRSA e fungistático/fungicida, por meio de testes com *Candida albicans* 5314. Estes ensaios são essenciais e preliminares para posterior avaliação da potencialidade de utilização dos compostos para tratamento de infecções bacterianas e fúngicas, utilizando *C. elegans* como modelo de infecção.

5.2 Metodologia

Os testes foram realizados pela professora Dra. Viviane Alves Gouveia e seu grupo de pesquisa, do Laboratório de Biologia Celular de Microrganismos (LBCM) do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG.

a) Preparo de amostras

Soluções estoque das amostras foram preparadas utilizando DMSO 100% como solvente. Devido às diferentes solubilidades das amostras em DMSO, diferentes concentrações foram utilizadas para realização do teste. Na Tabela 5.1 estão compiladas as concentrações finais de cada extrato e constituinte de *M. distichophylla* utilizado nos ensaios realizados.

Tabela 5.1 Concentração das amostras isoladas de *Maytenus distichophylla* utilizadas nos testes

Código*	Nome	Código Anterior	Conc. Final (µg/mL)
C0	Extrato hexânico	EH	27,4
DS	Extrato clorofórmico	EC	27,8
ES	Extrato acetatoetílico	EAE	40,8
FS	Extrato metanólico	EM	40,8
C1	3-Oxofriedelano	M1	11,0
C2	β -Sitosterol	M3	16,1
C3	3-Oxo-olean-9(11),12-dieno	M4	20,0
C4	11 α -Hidroxilup-20(29)-en-3-ona e Pristimerina	M6:M7	54,8
C5	11 α -Hidroxilup-20(29)-en-3-ona	M6	29,6
C6	30-Hidroxilup-20(29)-en-3-ona	M5	32,0
C7	3,7-Dioxofriedelano	M8	45,6
C8	Tingenona	M9	56,0

*Códigos atribuídos pela equipe que realizou o teste

b) Cultivo de microrganismos

Candida albicans (SC5314) foi mantida em meio de cultivo YPD sólido. Para os ensaios, uma colônia de *C. albicans* isolada do meio sólido, foi crescida em meio YPD líquido a 28 °C, sob agitação e mantida durante 18 h. *Staphylococcus aureus* MRSA (ATCC) foi mantida em LB sólido e para os ensaios foi crescida, a partir de uma colônia isolada, durante 18 h em meio LB líquido. Os estoques foram preservados a -80 °C.

c) Cultivo e manutenção de *Caenorhabditis elegans*

A linhagem tipo selvagem N2 Bristol obtida do Caenorhabditis Genetics Center (CGC) foi mantida em meio específico “Nematode Growth Media” (NGM) semeado com *Escherichia coli* OP50, a 20 °C (BRENNER, 1974). Para os ensaios de toxicidade os nematódeos foram mantidos em meio tampão M9 (KH₂PO₄ 3.0 g, Na₂PO₄ 6,0 g, NaCl 5,0 g em 1L de água e 1 mL de MgSO₄ 1 mol L⁻¹), usando um protocolo padrão modificado (LIONAKI e TAVERNARAKIS, 2013).

d) Ensaio de viabilidade antimicrobiana

Para avaliação da viabilidade celular, microbiana ou de *C. elegans*, foi realizado o teste colorimétrico de metabolização de MTT (brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio]) Sigma. Este teste se fundamenta na absorção do MTT pelas células metabolicamente ativas, sendo o mesmo reduzido pela succinato desidrogenase no interior da mitocôndria, a um produto insolúvel e de cor púrpura, chamado formazan (HJERTSTEDT et al., 1998). Para este ensaio, realizado em placas de 96 poços, a suspensão dos microrganismos *C. albicans* ou *S. aureus* (~ 2x10⁶ células/mL), em 200 µL de tampão M9, foram adicionadas de 2% (v/v) dos compostos e incubados durante 24 h a 28 °C. Em seguida, 20 µL de MTT (5 mg/mL) foram adicionados à suspensão e a mistura incubada durante 4 h a 18 h a 28 °C. O meio de cultivo foi removido e 100 µL de DMSO foram adicionados para solubilização do azul de formazan. A absorbância foi medida em espectrofotômetro (550 nm) e utilizada para determinar a viabilidade celular em comparação com as mesmas suspensões celulares não expostas aos compostos.

e) Análises de toxicidade dos compostos em *C. elegans*

A exposição a diferentes compostos potencialmente bioativos foi realizada utilizando dois sistemas distintos, em placas de 96 poços: (1) larvas L1 em tampão M9 durante 24 h (exposição aguda de L1) e (2) larvas L4 com alimentação normal de *E. coli* OP50 por 12 dias.

Todas as exposições foram realizadas a 25 °C, na ausência de alimentação normal (*E. coli* OP50), utilizando DMSO como controle negativo.

Após a exposição aguda e crônica de L1, a viabilidade de *C. elegans* foi medida por ensaio de MTT (JAMES e DAVEY, 2007).

f) Análise da toxicidade crônica dos compostos em *C. elegans* (viabilidade e sobrevivência)

Os ensaios de toxicidade crônica (exposição crônica) e sobrevivência de *C. elegans* com determinação de LT50 (SOLIS e PETRASCHECK, 2011), que representa 50% de letalidade em uma concentração de um dado composto, foi realizada utilizando *C. elegans* adultos jovens (L4) em tampão M9 (em placas de 96 poços) na presença de FUDR, um inibidor de timidilato síntese, adicionada ao tampão M9 para impedir a produção de descendência de *C. elegans* (MITCHELL, et al. 1979), e utilizando a concentração máxima dos compostos. Após exposição de larvas L4, a porcentagem de sobrevivência foi usada para avaliar a sobrevivência, assim os nematódeos observados em estereomicroscópio foram considerados como mortos se não responderem ao estímulo mecânico com a alça utilizada para manipulação (“worm picker”).

5.3 Resultados

A potencial interferência dos compostos sobre a viabilidade celular de *S. aureus* MRSA e *C. albicans* foi avaliada por meio do teste de MTT. As taxas de sobrevivência (%) de *S. aureus* MRSA e *C. albicans* frente às amostras testadas, quando comparadas aos mesmos microrganismos expostos ao DMSO (solvente), estão apresentadas na Figura 5.3, p. 60.

Todos os compostos causaram uma diminuição significativa da viabilidade de *S. aureus* MRSA. Não foram detectados efeitos sobre a viabilidade de *C. albicans* na concentração máxima testada. As amostras C0, C4 (EH, **M5: M6**) (Figura 5.3A, p. 60), C8 e DS (**M9** e EC), Figura 5.3B, apresentaram a maior redução de viabilidade de *S. aureus*, sendo a redução de aproximadamente 75% ou mais.

Os compostos foram isolados dos extratos hexânico e clorofórmico. Ao comparar a atividade desses dois extratos (C0 e DS) pode se observar que eles apresentam uma atividade maior que os extratos acetato-etílico e metanólico (ES e FS). Isso pode ser atribuído à presença dos compostos triterpenos pentacíclicos na mistura, os quais têm comprovada atividade antibacteriana (RODRIGUES et al., 2012). Além disso, a tingenona (C8), isolada do extrato clorofórmico, teve a mesma

atividade que o extrato (DS), o que pode indicar que a atividade deste, esta associada à presença da tingenona.

No momento, está sendo avaliado se os compostos que apresentaram atividade têm caráter bacteriostático ou bactericida, sendo o segundo caso o mais interessante no que se refere às infecções humanas. Bem como a determinação da concentração inibitória mínima, para que os compostos sejam utilizados em ensaio de infecção/ tratamento no modelo de *C. elegans*.

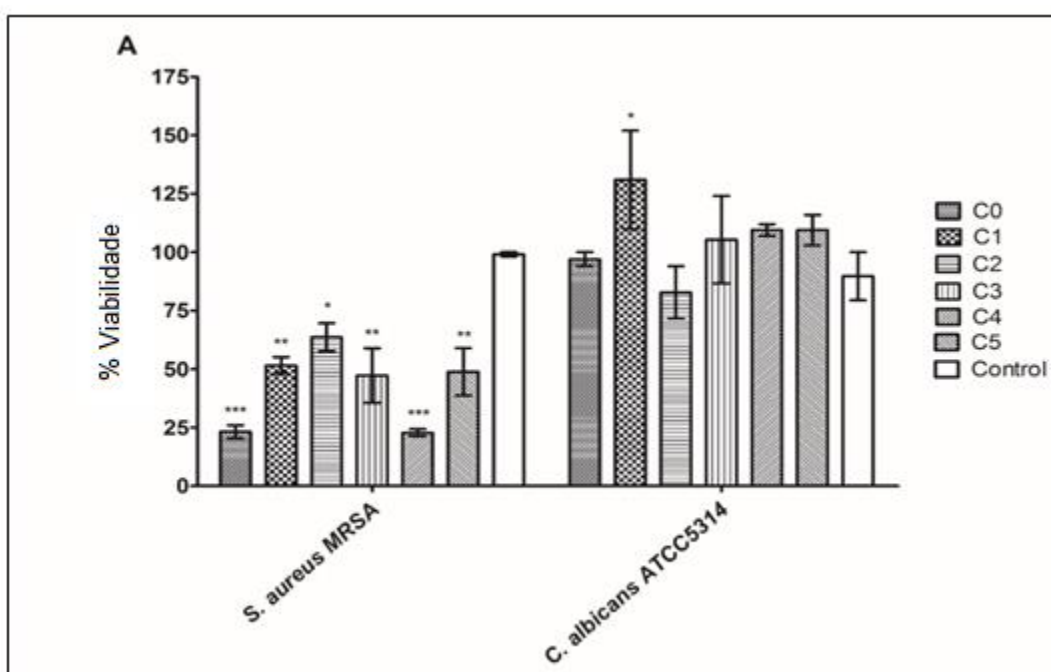


Figura 5.3A Atividade biológica dos compostos, isolados de *Maytenus distichophylla*, sobre a viabilidade dos microrganismos patogênicos *S. aureus* MRSA (ATCC) e *C. albicans* (SC5314).

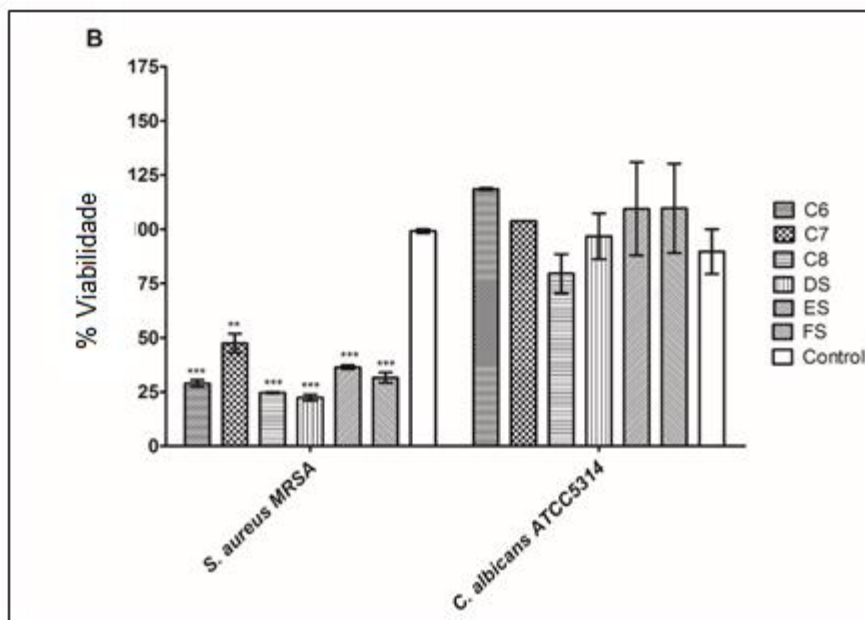


Figura 5.3B Atividade biológica dos compostos, isolados de *Maytenus distichophylla*, sobre a viabilidade dos microrganismos patogênicos *S. aureus* MRSA (ATCC) e *C. albicans* (SC5314).

A potencial toxicidade aguda (24 h) das amostras sobre larvas L1 de *C. elegans* foi avaliada por teste de MTT (Figura 5.4). Nenhum dos compostos apresentou toxicidade sobre os nematódeos no tempo e concentração testados.

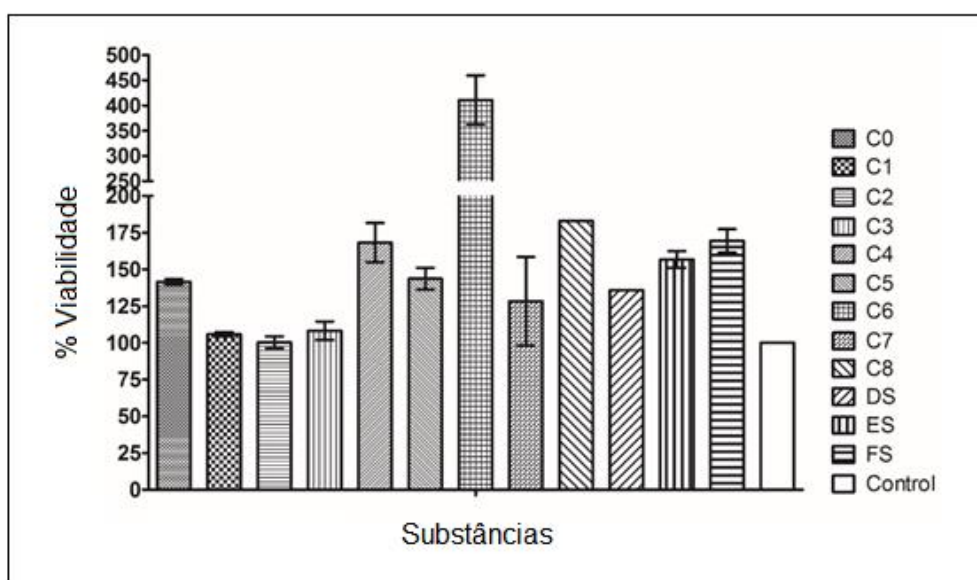


Figura 5.4. Avaliação da potencial toxicidade para *C. elegans*, dos compostos isolados de *Maytenus distichophylla* (toxicidade aguda L1).

Para alguns compostos observou-se um aumento na formação de azul de formazan, que sugere uma indução de proliferação de *C. elegans*. Entretanto larvas L1 não se multiplicam, então valores superiores a 100% indicam número maior de nematódeos nestes poços, superestimando a leitura espectrofotométrica da avaliação da toxicidade aguda dos compostos sobre *C. elegans*.

Para verificar se não é observada toxicidade dos compostos sobre os indivíduos no estágio L4, visto que este é o estágio larval utilizado em ensaios de infecção, foram realizadas curvas de sobrevivência na presença de alimentação normal de *E. coli* OP50 e na presença dos compostos de interesse (toxicidade/exposição crônica) na concentração máxima testada. Os resultados observados nas curvas de sobrevivência (Figura 5.5, p. 63) demonstram que na concentração testada os nematódeos apresentaram redução significativa da LT50 para quase todos os compostos, exceto C0 e C4, quando comparados ao controle, indicando que a exposição crônica a eles afeta a viabilidade dos *C. elegans*, sendo assim estes poderiam ser considerados nematicidas, propriedade que pode ser aproveitada no campo da Parasitologia. Estes dados, preliminares e que estão sob nova análise, não excluem a utilização dos outros compostos como antimicrobianos, em concentrações mais baixas (testes em andamento), considerando seus efeitos sobre a viabilidade de *S. aureus* demonstrada anteriormente.

O resultado da análise sobre os efeitos dos compostos sobre a viabilidade de *S. aureus* juntamente com a não toxicidade dos compostos para larvas L1 e L4 de *C. elegans*, sinaliza positivamente para a utilização do extrato hexânico e a mistura de pristimerina e 11 α -hidroxilup-20(29)-en-3-ona (C0 e C4) que apresentaram atividade, para tratamento da infecção bacteriana *in vivo*, abrindo portas para potenciais novos fármacos.

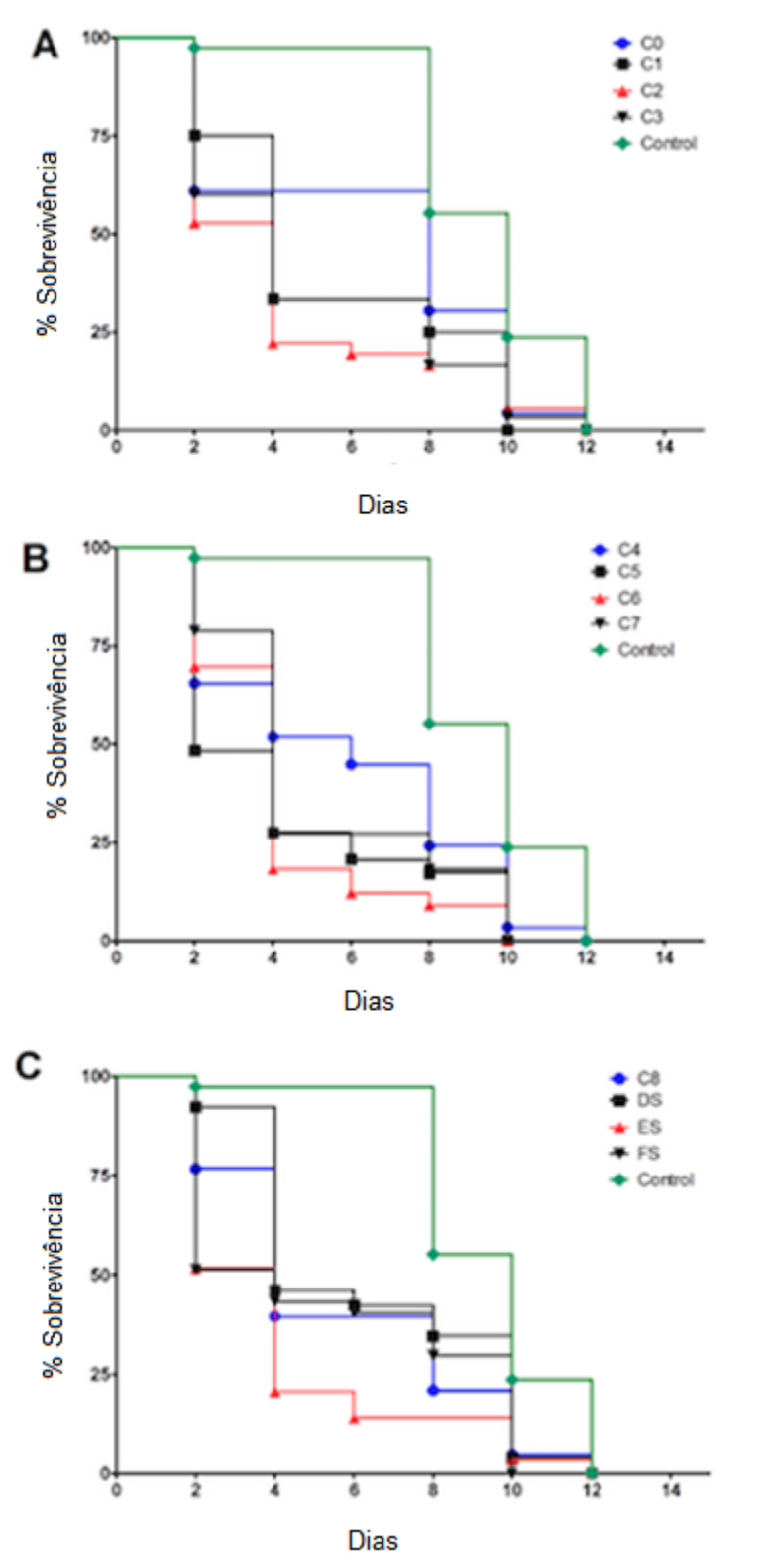


Figura 5.5 Curvas de sobrevivência de *C. elegans* L4 na presença das substâncias isoladas de *Maytenus distichophylla*. Os compostos que apresentaram um LT50 maior a 5 dias são considerados com potencial terapêutico, isso foi observado para as amostras C0 (8 dias) e C4 (6 dias).

6. Estimativa *in silico* de atividade biológica

6.1 Introdução

A pesquisa com produtos naturais, em geral, é de custo elevado e demanda um tempo bastante prolongado para a avaliação das propriedades farmacológicas e toxicológicas dos compostos isolados. Para minimizar estes custos bem como diminuir o tempo de realização de testes biológicos, ultimamente têm-se realizado a triagem virtual para fornecer uma direção efetiva para os ensaios biológicos dos compostos isolados. Essa triagem realizada em um computador (*in silico*) representa uma ferramenta que contribui para o descobrimento e desenvolvimento de novos compostos bioativos (OLIVEIRA et al., 2014).

Métodos *in silico* constituem um avanço na Farmacologia propiciando uma avaliação e predição de efeitos ou de alvos moleculares que um determinado composto pode apresentar. Estes métodos tratam-se de um conjunto de abordagens metodológicas, utilizando modelos computacionais e processos estatísticos relacionados a dados já publicados sobre farmacologia e toxicologia de vários compostos já conhecidos.

A maioria dos compostos naturais, isolados por processos fitoquímicos, é obtida em quantidades da ordem de miligramas. Assim sendo, uma seleção ou “screening” prévio *in silico* dos compostos naturais de interesse, a partir de resultados positivos previamente estabelecidos, facilita a interação com grupos de pesquisas em áreas específicas da biologia, para realizar os testes de interesse, que garantem o uso dos recursos científicos e laboratoriais de forma mais eficiente.

6.2 Quimioinformática

O Professor Dr. Júlio Lopes, Departamento de Química, ICEX, UFMG, desenvolveu um “software” por meio do qual são realizados cálculos dos compostos com diferentes alvos biológicos, utilizando os métodos SVM (Support Vector Machine) e Bayes (naive-Bayes Classifier), utilizando os “*data sets*” do ChEMBL. As principais características destas bases de dados são apresentadas a seguir.

ChEMBL data set

ChEMBL é uma base de dados “Open Access” que contém informações sobre a função e farmacocinética (absorção, distribuição, metabolismo e excreção) de um grande número de compostos bioativos com potencial farmacêutico. Esses dados são abstraídos de publicações científicas, analisados e padronizados para maximizar sua qualidade e utilidade para aplicação no desenvolvimento de fármacos (GAULTON et al., 2017). Neste início de 2017, esta base de dados já contém mais de 65.000 publicações, 50 “*data sets*” depositados, com mais de 1,6 milhões compostos diferentes representados na base de dados e 14 milhões de valores de atividades biológicas, associadas a mais de 1,2 milhões de ensaios. Esses ensaios estão mapeados para 11.000 alvos biológicos, incluindo 9052 proteínas das quais 4255 são de humanos (GAULTON et al., 2017).

Métodos SVM e naive-Bayes

Um algoritmo típico de aprendizado de máquina “aprende” ou gera uma função que mapeia uma coleção de dados relacionados a um conjunto de resultados. Em quimioinformática esses dados de entrada são tipicamente uma descrição das moléculas. O resultado é um prognóstico se uma molécula é ativa ou inativa frente a uma determinada proteína ou uma família de proteínas. Algoritmos do tipo de aprendizagem de máquina que têm sido utilizados em quimioinformática, incluem máquina de suporte de vector, métodos de montagem, árvores de decisão, redes neurais e classificadores tipo naive-Bayes (WATSON, 2008).

Uma máquina de suporte de vector (SVM) é um algoritmo de computador que “aprende”, por exemplo, a classificar objetos. SVMs têm sido utilizados com sucesso em uma grande variedade de aplicações biológicas. O SVM é uma entidade de processamento estabelecida para maximizar uma função matemática particular para uma coleção de dados (NOBLE, 2006). Um classificador naive-Bayes é gerado utilizando um conjunto (“set”) de treinamento de casos onde cada um deles é conhecido e pertence a uma determinada classe (ativo ou inativo). Ao contar o número de vezes que um caso aparece para cada classe, o classificador “aprende” a distinguir as principais características das diferentes classes. Os classificadores naive-Bayes

são atrativos pela sua simplicidade e podem ser gerados em tempo linear (WATSON et al., 2008).

Os resultados obtidos após o uso dos cálculos *in silico*, indicam os alvos biológicos para os quais os compostos testados apresentaram alguma interação. Os alvos indicados foram filtrados com base nos valores de Pa-Pi (probabilidade de ser ativo, menos a probabilidade de ser inativo) obtidos pelo software empregado. Valores maiores a 0,1 para o método SVM e de 0,8 para o método Bayes, foram considerados como os de maior probabilidade de atividade para ser analisados. Esses valores foram ordenados e apresentados como um ranking em ordem decrescente de prioridade. Porém, com esse primeiro filtro os resultados ainda foram numerosos, sendo para 11 α -hidroxilup-20(29)-en-3-ona (**M6**), com o método SVM, 54 alvos prováveis e com o método Bayes, 114; para 30-hidroxilup-20(29)-en-3-ona (**M5**) pelo método SVM, 66 e o Bayes, 282. Para 3-oxo-olean-9(11),12-dieno (**M4**) pelo método SVM foram 8 alvos prováveis e método Bayes 16.

6.3 Resultados e discussão

Com a colaboração do Professor Dr. Júlio Lopes do Departamento de Química da UFMG, cálculos *in silico* foram realizados para encontrar potenciais atividades biológicas que poderiam ser atribuídas para alguns compostos. Para estes cálculos foram selecionados os compostos da série oleano e lupano isolados de *Maytenus distichophylla*. Nas análises foram utilizados os métodos SVM e naive-Bayes.

Para discussão, foram selecionados aqueles alvos que correspondiam aos “rankings” de maior probabilidade de ser ativo, sendo comparados os primeiros 20 resultados de cada método, dando prioridade às coincidências de alvos obtidas em cada método.

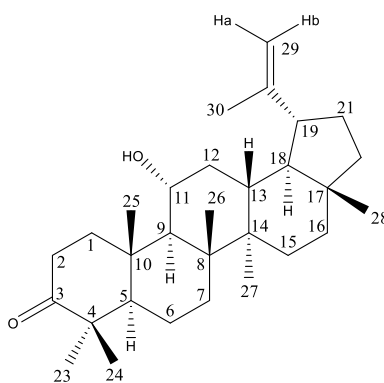
Com base em dados da literatura, o alvo obtido foi correlacionado com a doença ou com efeitos associados a ele. Para cada composto, alguns alvos podem estar correlacionados com as mesmas doenças, o que é interessante visto que aumenta a probabilidade do composto ser ativo no tratamento.

Os resultados de atividade em alvos biológicos, doenças ou efeitos associados ao alvo, considerados como de maior relevância foram tabelados para os compostos

11 α -hidroxi-lup-20(30)-en-3-ona (Tabela 6.1), 30-hidroxi-lup-20(29)-en-3-ona (Tabela 6.2, p. 68) e 3-oxo-olean-9(11),12-dieno (Tabela 6.3, p. 69).

Tabela 6.1 Alvos biológicos, doenças e efeitos relacionados ao alvo, selecionados *in silico* para 11 α -hidroxilup-20(29)-en-3-ona (**M6**)

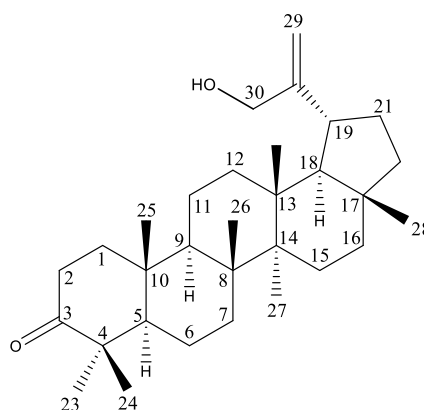
Alvo	Doença ou efeitos relacionados ao alvo	Método Bayes*	Método SVM*
Troponina do músculo cardíaco	Ataque cardíaco	1	5
β -lactamase	Resistência a antibióticos penicilínicos	2	8
SR	Câncer de mama	3	12
ZPR1	Câncer	8	7
NCI ADR RES	Carcinoma de mama / ovário	9	10
Cisteína protease ATG4B	Câncer	18	14



* Ranking das atividades dos *data sets* do ChEMBL de cada composto com base nos valores de Pa-Pi (probabilidade de ser ativo menos a probabilidade de ser inativo). Para o método SVM o corte mínimo foi de 0,1 e para o método Bayes o corte mínimo foi de 0,8.

Tabela 6.2 Alvos biológicos, doenças e efeitos relacionados ao alvo, selecionados *in silico* para 30-hidroxiup-20(29)-en-3-ona (**M5**)

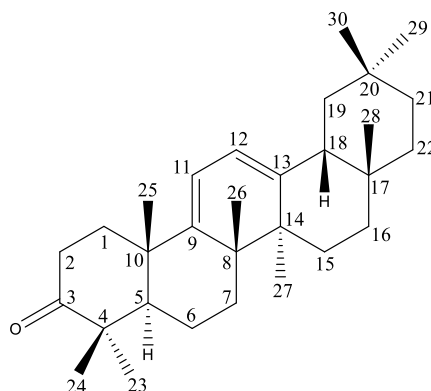
Alvo	Doença ou efeitos relacionados ao alvo	Método Bayes*	Método SVM*
Troponina do músculo cardíaco	Ataque cardíaco	-	1
β -lactamase	Resistência a antibióticos penicilínicos	-	2
OVCAR 4	Câncer de ovário	2	6
Acetilcolinesterase	Doença de Alzheimer	3	4
WM 115	Câncer de pele	4	8
NCI H226	Câncer de pulmão	5	12
HS 578T	Câncer de mama	8	20
SHP77	Câncer de pulmão	12	7
CaMKinase delta	Leucemia mielóide aguda	17	18



* Ranking das atividades dos *data sets* do ChEMBL de cada composto com base nos valores de Pa-Pi (probabilidade de ser ativo menos a probabilidade de ser inativo). Para o método SVM o corte mínimo foi de 0,1 e para o método Bayes o corte mínimo foi de 0,8.

Tabela 6.3 Alvos biológicos, doenças e efeitos relacionados ao alvo, selecionados *in silico* para 3-oxo-olean-9(11),12-dieno (**M4**)

Alvo	Doença ou efeitos relacionados ao alvo	Método Bayes*	Método SVM*
Anidrase carbônica III	Artrite reumatoide, lúpus e diabetes tipo 1	1	4
Acetilcolinesterase	Doença de Alzheimer	-	1
HCC1806	Câncer de mama	2	-
SF268	Glioblastoma	-	2
NCI ADR RES	Carcinoma de mama / ovário	-	3



* Ranking das atividades dos *data sets* do ChEMBL de cada composto com base nos valores de Pa-Pi (probabilidade de ser ativo menos a probabilidade de ser inativo). Para o método SVM o corte mínimo foi de 0,1 e para o método Bayes o corte mínimo foi de 0,8.

Lupanos

Para 11 α -hidroxilup-20(29)-en-3-ona (Tabela 6.1) e 30-hidroxilup-20(29)-en-3-ona (Tabela 6.2, p. 68) foram determinados possíveis efeitos em alvos biológicos de interesse, tais como, efeitos sobre a troponina do músculo cardíaco e em inibidores de β -lactamases.

A atividade sobre a troponina do músculo cardíaco foi a mais importante determinada para a 11 α -hidroxilup-20(29)-en-3-ona (Tabela 6.1, p. 67). A troponina é

um complexo de três proteínas regulatórias (troponina C, troponina I e troponina T), envolvido na contração do músculo cardíaco, mas não do músculo liso (FERNANDES et al., 1998). Pode ser relacionado com as lesões no músculo cardíaco provocados por um ataque cardíaco.

Aos dois compostos lupânicos, acima citados, também foram atribuídos efeitos sobre os inibidores das β -lactamases que pertencem a uma família de enzimas envolvidas na resistência bacteriana aos antibióticos β -lactâmicos. A ação destes inibidores envolve o rompimento do anel β -lactâmico permitindo que antibióticos do tipo penicilínico atuem. Estratégias para combater esta forma de resistência incluem o desenvolvimento de novos antibióticos β -lactâmicos que são mais resistentes ao rompimento e ao desenvolvimento de novos inibidores enzimáticos β -lactâmicos. Embora eles exerçam uma atividade antibiótica baixa, ajudam na prevenção da degradação bacteriana dos antibióticos β -lactâmicos e por isso incrementam a faixa de bactérias onde os fármacos são efetivos (ESSACK, 2001).

Aos dois compostos lupânicos acima, também foi atribuída atividade em alvos envolvidos em câncer de mama e câncer de ovário (Tabela 6.1 e 6.2).

Além disso, o estudo *in silico* atribuiu a 11 α -hidroxi-lup-20(30)-en-3-ona possível atividade sobre os alvos SR (Signal Recognition Particle Receptor), ZPR1 (Proteína citoplásmica zinc-finger), NCI ADR RES e a cisteína protease ATG4B (Tabela 6.1).

O alvo SR situado em células mamárias é utilizado para alterar a função de proteínas secretórias da membrana do retículo endoplásmico (OGG et al., 1992). O alvo ZPR1 (Proteína citoplásmica *zinc-finger*) é uma proteína que transloca do citoplasma até o núcleo, depois do tratamento das células com mitógenos. As células sem ZPR1 não são viáveis, portanto, essa proteína é essencial para a função nucleolar normal na proliferação das células, e está relacionada com o tratamento do câncer (GALCHEVA-GARGOVA et al., 1998). O alvo NCI-ADR-RES é uma linhagem celular relacionada com o carcinoma em tecidos de ovários e mama (Base de dados: CANCER RESEARCH UK).

O alvo cisteína protease ATG4B, situado no citoplasma, está envolvido no transporte vacuolar e na autofagia (Base de dados: UNIVERSAL PROTEIN RESOURCE). A autofagia ajuda na eliminação de agregados intracelulares e organelas danificadas, promove a senescência celular, a produção de antígenos

superficiais, que protegem contra a instabilidade do genoma e prevê a necrose, sendo, portanto, importante na prevenção de doenças como o câncer, a neuro degeneração, cardiomiopatia, diabetes, doenças do fígado, doenças autoimunes e infecções (GLICK e BARTH, 2010).

Por meio do estudo *in silico* foi atribuído a 30-hidroxilup-20(29)-en-3-ona, (Tabela 6.2), atividade sobre o alvo: OVCAR-4, que é uma linhagem celular cancerígena relacionada ao adenocarcinoma seroso de ovário de alto grau (Base de dados: SWISS INSTITUTE OF BIOINFORMATICS); sobre a enzima acetilcolinesterase, cuja inibição é uma estratégia promissora para o tratamento de distúrbios neurológicos como a doença de Alzheimer, demência senil, ataxia e miastenia grave (MUKHERJEE et al., 2007). Outros alvos foram o WM 115, que corresponde a uma linhagem celular relacionada com câncer de pele, é derivado de um tumor primário epitelioide que expressa o antígeno proteoglicano característico de melanomas (Base de dados: SIGMA-ALDRICH); o NCI H226, uma linha celular do tecido pulmonar relacionada ao mesotelioma e ao carcinoma de célula escamosa que são formas de câncer típicas do pulmão (ATCC); o HS 578T, que é uma linha celular epitelial de glândula mamária relacionada com o câncer de mama (ATCC); SHP 77 que é também uma linhagem celular epitelial de pulmão, relacionada com carcinoma e câncer de pulmão (ATCC); e sobre a CaMKinase delta que é uma enzima que opera a cascata de sinais entre CaMKK-CaMK1 iniciadas pelo cálcio, que parece exercer um papel importante no processo de apoptose de células de eritroleucemia (Base de dados: SWISS INSTITUTE OF BIOINFORMATICS).

Oleanos

Ao triterpeno 3-oxo-olean-9(11),12-dieno o estudo *in silico* atribuiu possível atividade sobre a anidrase carbônica III (CA3), uma metaloenzima que catalisa a hidratação reversível de dióxido de carbono. A expressão do gene da CA3 é específico do tecido e apresenta altos níveis no músculo esquelético e menores no tecido cardíaco e tecido liso. Ela é insuficiente nos músculos de pacientes portadores de miastenia grave. Autoanticorpos de CA3 têm sido encontrados em maiores quantidades em pacientes com artrite reumatoide, lúpus eritematoso sistêmico e diabetes tipo 1 (CHENGENG, et al., 2012).

Nos dois métodos *in silico* utilizados, os lupanos apresentaram maior atividade para alvos relacionados com doenças cardíacas e inibidores de β -lactamase associados à resistência bacteriana a antibióticos penicilínicos. Os três compostos avaliados *in silico* apresentaram atividade promissora em vários tipos de câncer, principalmente para câncer de mama e de ovário (Tabela 6.1, 6.2 e 6.3). Essa atividade pode ser atribuída à similaridade da estrutura destes triterpenos pentacíclicos, com a de vários hormônios.

7. CONCLUSÃO

Neste trabalho foi realizado o estudo fitoquímico dos extratos hexânico e clorofórmico das raízes de *Maytenus distichophylla* (Celastraceae), coletadas na Bahia, Brasil. Os extratos e substâncias isoladas foram testados para atividade antibacteriana contra *Staphylococcus aureus* e antifúngica contra *Candida albicans*. Ensaio de toxicidade aguda em *Caenorhabditis elegans* e cálculos para a determinação da atividade biológica promissora, mediante métodos de quimioinformática também foram realizados.

O estudo fitoquímico consistiu na preparação de extratos hexânico, cloroformico, acetato-etílico e metanólico. Dos extratos hexânico e clorofórmico foram isoladas as seguintes substâncias de diferentes classes: Os friedelanos, 3-oxofriedelano e 3,7-dioxofriedelano; o oleano, 3-oxo-olean-9(11),12-dieno; os lupanos, 11 α -hidroxilup-20(29)-en-3-ona e 30-hidroxilup-20(29)-en-3-ona; os quinonametídeos, pristimerina e tingenona; o esteroide, β -sitosterol e um triacilglicerol. As estruturas químicas das substâncias foram determinadas utilizando métodos espectroscópicos (IV, RMN de ^1H e de ^{13}C) e espectrométrico (CG-EM).

Os triterpenos pentacíclicos 3,7-dioxofriedelano, 3-oxo-olean-9(11),12-dieno, 11 α -hidroxilup-20(29)-en-3-ona, 30-hidroxilup-20(29)-en-3-ona, pristimerina, tingenona e triacilglicerol, foram descritos pela primeira vez como constituintes de *Maytenus distichophylla*.

Todas as substâncias mostraram atividade antibacteriana, diminuindo significativamente a viabilidade de *S. aureus* MRSA, principalmente a tingenona, a mistura de pristimerina e 11 α -hidroxilup-20(29)-en-3-ona e os extratos hexânico e clorofórmico, enquanto nenhum dos compostos testados apresentou atividade antifúngica.

Os testes no estágio L4 de *C. elegans*, que é o estágio larval utilizando em ensaios de infecção, indicaram como bons candidatos a utilização do extrato hexânico e a mistura de pristimerina e 11 α -hidroxilup-20(29)-en-3-ona, para o tratamento da infecção bacteriana *in vivo*. Os outros compostos não apresentaram toxicidade no estágio L1, mas apresentaram no estágio L4, indicando a sua potencial atividade nematicida.

Os cálculos *in silico* realizados utilizando os métodos SVM e Bayes indicaram que os compostos avaliados, 3-oxo-olean-9(11),12-dieno, 11 α -hidroxilup-20(29)-en-3-ona e 30-hidroxilup-20(29)-en-3-ona, apresentaram uma atividade promissora em vários tipos de câncer, principalmente câncer de mama e câncer de ovário. Além disso, os compostos tipo lupano, mostram uma possível atividade no tratamento de doenças cardíacas e como inibidores de β -lactamase.

Esse trabalho colabora para o estudo quimiotaxonômico do gênero *Maytenus* e da família Celastraceae e contribui para o conhecimento de possíveis atividades biológicas de compostos isolados de plantas, importante para o desenvolvimento de fármacos e fitoterápicos que ajudem à população em geral.

8. REFERENCIAS

Alarcón, J.; Céspedes, C.L.; Muñoz, E.; Balbontin, C.; Valdes, F.; Gutierrez, M.; Astudillo, L.; Selgler, D.S. Dihydroagarofuranoid Sesquiterpenes as Acetylcholinesterase Inhibitors from Celastraceae Plants: *Maytenus disticha* and *Euonymus japonicus*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 63(47), p. 10250-10256, **2015**.

Alvarenga, N; Ferro, E.A. Bioactive Triterpenes and Related Compounds from Celastraceae. *Studies in Natural Products Chemistry*, 33, Part M, p. 239-307, **2006**.

Barnes R.A., Perlera A.L., Scofield T.C.V., Fieho R.B., Pinto A.C. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin* 32, p. 3674, **1984**.

Barroso, G. M.; Peixoto, A.L; Ichaso, C. L.; Costa, C. G.; Guimarães, E. F.; Lima, H. C. "Sistemática das Angiospermas do Brasil", V.2. Imprensa Universitária. Universidade Federal de Viçosa, **1984**.

Brenner, S. The genetics of *Caenorhabditis elegans*. *Genetics*, 77, p. 71-94, **1974**.

Boyd, M.A.; Smith, M.V.; Freedman, J.H. *Caenorhabditis elegans* as a model in developmental toxicology. *Methods in Molecular Biology*, 889, p. 15-24, **2012**.

Carvalho-Okano, R. M. Estudos Taxonômicos do Gênero *Maytenus* Mol. Emend. Mol (*Celastraceae*) do Brasil Extra Amazônico. Tese de Doutorado. Instituto de Biologia. Universidade de Campinas. Campinas SP, **1992**.

Chengeng, L. Yue, W.; Jianmin, W.; Langan, P.; Jianjun H.; Peichang, W.; Carbonic Anhidrasas III and IV Autoantibodies in Rheumatoid Arthristis, Systemic Lupus Erythematosus, Diabetes, Hypertensive Renal Disease, and Heart Failure. *Clinical and Developmental Immunology*, doi: 10.1155/2012/354594, **2012**.

Corsi, A.K. A Biochemist's Guide to *C. elegans*. *Analytical Biochemistry*, 359(1), p. 1-17, **2006**.

Corsino, J., Carvalho, P. R. F., Kato, M. J., Latorre, L. R., Oliveira, O. M., Araújo, A. R., Bolzani, V. S., França, S. C., Pereira, A. M. S., Furlan, M., Biosynthesis of friedelane and quinonemethide triterpenoids is compartmentalized in *Maytenus aquifolium* and *Salacia campestris*, *Phytochemistry*, 55, p. 741-748, **2000**.

Da Silva, F.M.A.; Paz, W.; Vasconcelos, F.; Da Silva, A.; Da Silva-Filho, F.A.; De Almeida, R.A.; De Souza, A.; Pinheiro, M.L.B.; Koolen, H.H.F. Chemical constituents from *Salacia impressifolia* (Miers) A. C. Smith collected at the Amazon rainforest. *Biochemical Systematics and Ecology*, 68, p. 77-80, **2016**.

De-Eknamkul, W.; Potduang, B. Biosynthesis of β -sitosterol and stigmasterol in *Croton sublyratus* proceeds via a mixed origin of isoprene units. *Phytochemistry*, 62(3), p. 389-398, **2003**.

Dengg, M.; Van Meel, J.C. *Caenorhabditis elegans* as model system for rapid toxicity assesment of pharmaceutical compounds. *Journal of pharmacological and toxicological methods*, 50(3), p. 209-214, **2004**.

Dewick, P. M. Medicinal Natural Products: A Biosynthetic Approach. 2ª Edição, John Wiley and Sons, New York, pp. 507, **2009**.

Duarte, L.P.; Vieira Filho, S. A.; Silva, G. D. F.; Sousa, J. R.; Pinto, A. S. Anti-trypanosomal activity of pentacyclic triterpenes isolated from *Austroplenckia populnea* (Celastraceae). *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, 44(2), p. 109-102, **2002**.

Duarte, M.C. Constituintes Químicos de *Maytenus distichophylla* Mart. ex Reissek. Tese de Doutorado. Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos do Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Paraíba, **2013**.

Duarte, M. C.; Tavares, J. F.; Madeiro, S. A. L.; Costa, V. C. O.; Filho, J. M. B.; Agra, M. F.; Filho, R. B.; Silva, M. S. Maytensifolone, a New Triterpene from *Maytenus distichophylla* Mart. ex Reissek. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 24, p. 1697-1700, **2013**.

Essack, S.Y. The Development of β -Lactam Antibiotics in Response to the Evolution of β -Lactamases. *Pharmaceutical Research*, 18(10), p. 1391-1399, **2001**.

Fernandes, M.; Marcolino, D.; Purini, J.; A troponina como marcador de injúria celular miocárdica. *Arquivos Brasileiros de Cardiologia*, 71, n. 4, **1998**.

Fernando H.C., Gunatilaka A.A.L., Tezuka Y., Kikuchi T. Studies on terpenoids and steroids – 18 balaenonol, balaenol and isobalaendiol: Three new 14(15)-ene-quinone-methide triterpenoids from *Cassine balaë*. *Tetrahedron*, 45(18), p. 5867-5876, **1989**.

Ferreira, F. L. Estudo fitoquímico e avaliação da atividade biológica de extratos e constituintes das folhas de *Maytenus distichophylla* (Celastraceae). Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil, **2014**.

Galcheva-Gargova Z.; Gangwani, L.; Konstantinov, K.N.; Mikrut, M., Theroux, S.J.; Enoch, T.; Davis, R.J. The Cytoplasmic Zinc Finger Protein ZPR1 Accumulates in the Nucleolus of Proliferating Cells. *Molecular Biology of the Cell*, 9(10), p. 2963-2971, **1998**.

Gaulton, A.; Hersey, A.; Nowotka, M.; Bento, A.P., Chambers, J. et al. The ChEMBL database in 2017. *Nucleic Acids Research*, doi: 10.1093/nar/gkw1074, **2017**.

Glick, D.; Barth, S.; Macleod, K.F. Autophagy: cellular and molecular mechanisms. *The Journal of Pathology*, 221(1), p. 3-12, **2010**.

Gordaliza, M. Natural products as leads to anticancer drugs. *Educational series – Clinical and Translation Oncology*, 9, p. 767-776, **2007**.

Groppo, M.; Simmons, M.; Cappa, J.; Biral, L.; Lombardi, J. "A new species of *Maytenus* (Celastraceae) with Fleshy Fruits from Eastern Brazil, with Notes on the Delimitation of *Maytenus*". *Systematic Botany*, 39(2), p. 478-484, **2014**.

Gunstone, F.D. Harwood, J.L.; Dijkstra, A.J. *The Lipid Handbook*. Taylor & Francis Group. **2007**

Gunther, M.; Antiparasitic drugs derived from natural products take 2015 medicine Nobel. *Chemistry world. Royal Society of Chemistry*, **2015**.

Hjertstedt J, Hahn B.L., Kos W.L., Sohnle P.G. Comparison of fungal viability assays using *Candida albicans* yeast cells undergoing prolonged incubation in the absence of nutrients. *Mycoses*, 41, p. 487-492, **1998**.

James C.E., Davey M.W. A rapid colorimetric assay for the quantitation of the viability of free-living larvae of nematodes in vitro. *Parasitology Research*, 101, p. 975-980, **2007**.

Kaletta, T.; Hengartner, M.O. Finding function in novel targets: *C. elegans* as a model organism. *Nature Reviews Drug Discovery*, 5(5), p. 387-98, **2006**.

Leung, M.C.; Williams, P.L.; Benedetto, A.; Au, C.; Helmcke, K.J.; Aschner, M.; Meyer, J.N. *Caenorhabditis elegans*: An emerging model in Biomedical and Environmental Toxicology. *Toxicological Sciences*, 106(1), p. 5-28, **2008**.

Lionaki E, Tavernarakis N. High-throughput and longitudinal analysis of aging and senescent decline in *Caenorhabditis elegans*. *Methods in Molecular Biology*, 965, p. 485-500, **2013**.

Maia, R.M.; Barbosa, P.R.; Cruz, F.G.; Roque, B.F. e Fascio, M. Triterpenos da Resina de *Protium heptaphyllum* March (Bourseraceae): Caracterização em Misturas Binárias. *Química Nova*, 23(5), **2000**.

McChesney, J. D.; Venkataraman, S. K.; Henry, J. T. Plant natural products: Back to the future or into extinction? *Phytochemistry*, 68, p. 2015–2022, **2007**.

Menezes, D. Estudo fitoquímico de raízes de *Maytenus acanthophylla* Reissek (Celastraceae) e avaliação da atividade antimicrobiana do extrato clorofórmico. Dissertação de Mestrado, Departamento de Química. Universidade Federal de Minas Gerais, **2004**.

Menezes, D.; Silva, G.; Duarte, L.P.; Vieira, S.A. Chemical constituents isolated from roots of *Maytenus acanthophylla* Reissek (Celastraceae). *Biochemical Systematics and Ecology*, 34, p. 661-666, **2006**.

Mitchell DH, Stiles JW, Santelli J, Sanadi DR. Synchronous growth and aging of *Caenorhabditis elegans* in the presence of fluorodeoxyuridine. *Journal of gerontology*, 34, p. 28-36, **1979**.

Muhammad, I.; El Sayed, K.; Mossa, J. S.; Al-Said, M.; El-Feraly, F.; Clark, A.; Hufford, C.; Oh, S.; Mayer, A. Bioactive 12-Oleanene Triterpene and Secotriterpene Acids from *Maytenus undata*. *Journal of Natural Products*, 63, p. 605-610, **2000**.

Mukherjee, P.K.; Kumar, V.; Mall, M. Houghton, P.J. Acetylcholinesterase inhibitors from plants. *Phytomedicine*, 14(4), p. 289-300, **2007**.

Newman, D. J.; Cragg, G. M. Natural products as sources of new drugs over the 30 years from 1981 to 2010. *Journal of Natural Products*, 75, p. 311–335, **2012**.

Niero, R.; Andrade, S. F.; Filho, V. C. A review of the ethnopharmacology, phytochemistry and pharmacology of plants of the *Maytenus Genus*. *Current Pharmaceutical Design*, 17, p. 1851-1871, **2011**.

NIST. The NIST Mass Spectral Search Program. Version 2.0, Oct. 22, **2009**.

Noble, W.S. What is a support vector machine? *Nature biotechnology*, 24(12), p. 1565-1567, **2006**.

- Nossack, A.C.; Celeghini, R.M; Lanças, F.M.; Yariwake, J.H. HPLC-UV and LC-MS Analysis of Quinonemethides Triterpenes in Hydroalcoholic Extracts of “espinheira santa” (*Maytenus aquifolium* Martius, Celastraceae) Leaves. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 15(4), p. 582-586, **2004**.
- Ogg, S.C.; Poritz, M.A.; Walter, P. Signal recognition particle receptor is important for cell growth and protein secretion in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular Biology of the Cell*, 3(8), p. 895-911, **1992**.
- Oliveira, M.; Assenco, R.A.; Silva, G.D; Lopes, J.C.; Silva, F.C.; Lanna, M.C.; Magalhães, J.C.; Duarte, L.P.; Vieira, S.A. Citotoxicity, anti-poliovirus, activity and in silico biological evaluation of constituents from *Maytenus Gonoclada* (Celastraceae). *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 6(10), **2014**.
- Rodrigues, V.G. Estudo fitoquímico e atividade biológica de raízes de *Maytenus imbricata* Mart. Ex. Reissek. Dissertação de Mestrado, Departamento de Química. Universidade Federal de Minas Gerais, **2011**.
- Rodrigues, V.G.; Duarte, L.P.; Silva, G.D.; Silva, F.; Góes, J.V.; Takahashi, J.A.; Pimenta, L.P.; Vieira Filho, S.A. Evaluation of antimicrobial activity and toxic potential of extracts and triterpenes isolated from *Maytenus imbricata*. *Química Nova*, 35, p. 1375-1380, **2012**.
- Rodrigues, V.G.; Duarte, L.P.; Silva, R.; Silva,G.; Mercadante-Simões, M.; Takahashi, J. Matildes, B.; Fonseca, T.; Gomes, M.; Vieira, S. *Salacia crassifolia* (Celastraceae): Chemical constituents and antimicrobial activity. *Química Nova*, 38(2), p. 237-242, **2015**.
- Silva, S.R. Estudo químico e avaliação do potencial farmacológico de *Maytenus imbricata* Mart. ex. Reissek. Tese de doutorado. Departamento de Química, Universidade Federal de Minas Gerais, **2007**.

Silva, F.C. Estudo fitoquímico de galhos e raízes de *Maytenus gonoclada* (Celastraceae), obtenção de derivados do lupeol e avaliação de atividades biológicas. Tese de doutorado. Departamento de Química, Universidade Federal de Minas Gerais, **2014**.

Simões, C. M. O.; Schenkel, E. P. “A pesquisa e a produção brasileira de medicamentos a partir de plantas medicinais: a necessária interação da indústria com a academia”. *NEXUS Ciência e Tecnologia*, 1(1), p. 24-27, **2001**.

Spivey, A. C.; Weston, M.; Woodhead, S.. Celastraceae sesquiterpenoids: biological activity and synthesis. *Chemical Society Reviews*, 31, p. 43-59, **2002**.

Solis GM, Petrascheck M. Measuring *Caenorhabditis elegans* life span in 96 well microtiter plates. *Journal of Visualized Experiments*, doi:10.3791/2496, **2011**.

Tinto W. F., Blair L. C., Ali A., Reynolds W.F., McLean S. Lupane triterpenoids of *Salacia cordata*, *Journal of Natural Products*, 55, p. 395-398, **1992**.

Thevissen, K.; Pellens, K.; Brucker, K.; François, I.E.; Chow, K.K. Novel fungicidal benzylfulfanyl-phenylguanidines. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. 21, p. 3686-3692, **2011**

Wang, L.; Zhu, Y.; Chen, X.; Rongtao Li, C. Chemical constituents from the stems of *Tripterygium regelii*. *Biochemical systematics and ecology*, 68, p. 88-91, **2016**.

Watson, P. Naive Bayes Classification using 2D Pharmacophore Feature Triplet Vectors. *Journal of Chemical Information and Modeling*, 48, p. 166-178, **2008**.

WHO. General Guidelines for Methodologies on Research and Evaluation of Traditional Medicine. Geneva: *World Health Organisation*; **2000**.

Yunes, R. A.; Filho, V. C. “Breve Análise Histórica da Química de Plantas Medicinais: Sua Importância na Atual Concepção de Fármaco Segundo os Paradigmas Ocidental

e Oriental". *Plantas Mediciniais sob a Ótica da Química Medicinal Moderna*. Chapecó: Argos - Editora Universitária. p.17-44, **2001**.

Zhou, L.; Li, J.; Liu, X.; Ma, Z.; Feng, J.; Zhang, X. Effects of total alkaloids from *Tripterygium wilfordii* (Celastraceae) on the activities of neural enzymes and content of neurotransmitters in larval *Mythimna separata* (Lepidoptera: Noctuidae). *Acta Entomologica Sinica*, 58(8), p. 856-863, **2015**.

Bases de Dados consultadas:

Cancer Research UK

<https://cansar.icr.ac.uk/cansar/cell-lines/NCI-ADR-RES/>

Swiss Institute of Bioinformatics

http://web.expasy.org/cellosaurus/CVCL_1627

Universal Protein Resource

<http://www.uniprot.org/uniprot/Q9Y4P1>

Sigma-Aldrich

<http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/91061232?lang=pt®ion=BR&gclid=CKuQsseqtNECFQaAkQod7dYKEw>

American Type Culture Collection

<https://www.atcc.org/Products/All/CRL-5826.aspx>

<https://www.atcc.org/Products/All/HTB-126.aspx>

<https://www.atcc.org/Products/All/CRL-2195.aspx>