



UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PRODUTO NATURAIS
E SINTÉTICOS BIOATIVOS



ISOLAMENTO, IDENTIFICAÇÃO E ANÁLISE QUIMIOINFORMÁTICA DE
TRITERPENOS DA ESPÉCIE *Maytenus erythroxylon* Reissek

PEDRO THIAGO RAMALHO DE FIGUEIREDO

JOÃO PESSOA - PB

Fevereiro de 2019

PEDRO THIAGO RAMALHO DE FIGUEIREDO

**ISOLAMENTO, IDENTIFICAÇÃO E ANÁLISE QUIMIOINFORMÁTICA DE
TRITERPENOS DA ESPÉCIE DE *Maytenus erythroxylon***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Paraíba em cumprimento às exigências para obtenção do título de Mestre em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos. Área de concentração FARMACOQUÍMICA.

ORIENTADOR: PROF. DR. VICENTE CARLOS DE OLIVEIRA COSTA

COORIENTADOR: PROF. DR. JOSEAN FECHINE TAVARES

JOÃO PESSOA - PB

Fevereiro de 2019

F475i Figueiredo, Pedro Thiago Ramalho de.

Isolamento, identificação e análise quimioinformática de triterpenos da espécie *Maytenus erythroxyloides* Reissek / Pedro Thiago Ramalho de Figueiredo. - João Pessoa, 2019.

123 f. : il.

Orientação: Vicente Carlos Oliveira Costa.

Coorientação: Josean Fachine Tavares.

Dissertação (Mestrado) - UFPB/CCS.

1. *Maytenus erythroxyloides*. 2. Triterpenos. 3. QSAR. 4. Docking molecular. 5. Atividade antimicrobiana. I. Costa, Vicente Carlos Oliveira. II. Tavares, Josean Fachine. III. Título.

UFPB/BC

PEDRO THIAGO RAMALHO DE FIGUEIREDO

**ISOLAMENTO, IDENTIFICAÇÃO E ANÁLISE QUIMIOINFORMÁTICA DE
TRITERPENOS DA ESPÉCIE DE *Maytenus erythroxylon***

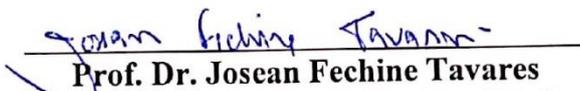
Aprovada em: 25/02/2019

Banca examinadora



Prof. Dr. Vicente Carlos de Oliveira Costa

Doutor em Farmacoquímica de Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos
Universidade Federal da Paraíba – Campus I
(Orientador)



Prof. Dr. Josecan Fechine Tavares

Doutor em Farmacoquímica de Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos
Universidade Federal da Paraíba – Campus I
(Coorientador)

Prof. Dr. Damião Pergentino de Sousa

Doutor em Química Orgânica - UFSCAR
Universidade Federal de Paraíba – Campus I
(Membro interno)



Profa. Dra. Bárbara Viviana de Oliveira Santos

Doutor em Farmacoquímica de Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos
Universidade Federal da Paraíba – Campus I
(Membro externo)

Dedico este trabalho aos meus avós, Alba e Germano, por todo empenho, esforço ao longo da minha vida e sempre me apoiarem nas minhas decisões.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradecer a **Deus**, pois até aqui o Senhor me ajudou, pelo seu amor infinito e por sempre ser minha esperança nos momentos mais difíceis durante essa caminhada.

Agradecer aos meus avós **Germano Ramalho** e **Maria Alba** por toda dedicação, carinho e força, estarem sempre ao meu lado, motivando e me proporcionando a vontade pela busca do conhecimento.

À minha namorada, **Laísa Vilar** por seu companheirismo, cumplicidade, paciência e atenção. Obrigado por sempre permanecer ao meu lado nas situações mais difíceis e por compartilhar momentos de felicidade ao meu lado e principalmente seu amor.

Aos meus pais **Luciano** e **Ligia** pelo apoio e cumplicidade durante esse período. Sou grato por toda dedicação durante minha vida. Aos meus tios **Lívia** e **Arthur** por toda atenção e carinho por mim.

Aos meus irmãos **Pierre e Pietro** e minhas primas **Maria Isadora** e **Maria Alice** por serem um incentivo para almejar em busca dos meus objetivos na vida e tornarem essa caminhada mais feliz.

Ao meu orientador e amigo **Prof. Dr. Vicente Carlos de Oliveira Costa**, por todo auxílio na bancada, por toda amizade, ensinamentos, incentivo e por essa oportunidade de realizar este trabalho.

Ao meu Coorientador **Prof. Dr. Josean Fechine Tavares** por sempre estar disponível e sempre se prontificando a ajudar nos espectros e em ideias nos experimentos, facilitando o aprendizado no dia-a-dia.

Ao **Prof. Dr. Marcelo Sobral da Silva** por ser um exemplo de professor e repassar seus conhecimentos facilitando e contribuindo para a minha formação.

A **profa. Dr. Edeltrudes** pela realização dos ensaios antimicrobianos

Ao **Prof. Dr. Marcus Scotti** por disponibilizar o seu laboratório para a realização dos estudos de *docking* e pelas conversas nos corredores sobre futebol.

As alunas **Renata** e **Jéssika** do laboratório de quimioinformática por toda ajuda, apoio e paciência nas análises computacionais.

Aos técnicos **Evandro** e **Marcelo** pelos espectros fornecidos.

Aos meus colegas de Pós-graduação Fernando, Luiz André, Flavio e Bruno, por toda ajuda, pelas conversas e momentos de descontração.

À toda equipe Sobral, Fachine, Barbosa e Costa: **Diego, George, Kaio, Juliana, Anderson, Arthur, Cesar, Yuri, Lucas, Andreza, Rose, Fiama, Hidna, Ana Rita, Ranna, Sabrina, Jordana, Joanda, Lianne** por todo apoio e ajuda na rotina laboratorial.

A aluna de iniciação **Emile** por ter me acompanhado durante esse tempo e ter ajudado nos experimentos.

Ao funcionário **Raimundo Nonato da Silva Filho**, pela ajuda sempre necessária no laboratório.

A todos os meus amigos do “Clube do Bolinha”, **John, Venâncio, Ricardo, Emmanuel, Kauê, Thyago, Bruno, Fernando, Felipe, Arthur, Vinicius e Heitor** pelos laços de amizade que permaneceram após a graduação e por tornarem essa caminhada mais alegre.

A todos aqueles que colaboraram de forma direta ou indireta para a realização desse trabalho.

A **Universidade Federal da Paraíba.**

Ao Instituto de Pesquisa em Fármacos e Medicamentos (IPeFARM).

A todos os funcionários que pertencem ao **Programa de Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos.**

Ao **Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico**
(CNPq) pelo apoio financeiro.

MUITO OBRIGADO!

***Conheço pessoas que triunfam e sempre triunfarão, sabe por que?
Eu lhe direi o porquê! Porque nunca desistem dos seus sonhos e
sempre terminam aquilo que começam.***

Napoleon Hill

RESUMO

FIGUEIREDO, P. T. R. Isolamento, identificação e análise quimioinformática de triterpenos da espécie de *Maytenus erythroxylo*n. 2019. 123 pág. Dissertação (Mestrado em Farmacoquímica de Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos) – Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2019.

Maytenus é um gênero que pertence à família Celastraceae, apresenta em torno de 300 espécies distribuídas nas regiões pantropicais do mundo. Este gênero, apresenta grande relevância para o tratamento dos distúrbios gastrointestinais. *Maytenus erythroxylo*n var. *Maytenus erythroxylo*n é endêmica da região do nordeste brasileiro e estudos recentes mostraram que o extrato etanólico desta espécie apresenta uma potente atividade antidiarreica. O objetivo deste trabalho é realizar o estudo fitoquímico e quimioinformático de *M. erythroxylo*n e avaliar a atividade antimicrobiana de extratos e substâncias isoladas. As partes aéreas de *M. erythroxylo*n foram coletadas no município de Mamanguape-PB, em seguida foram secas e trituradas para a obtenção do pó vegetal, este foi submetido a sucessivas extrações com etanol a 95%, para obtenção do extrato etanólico bruto, sendo submetido a métodos cromatográficos para isolamento e purificação dos metabólitos secundários. Para a identificação das estruturas químicas foram utilizados métodos espectroscópicos de Infravermelho e Ressonância Magnética Nuclear de ¹H, ¹³C e bidimensionais. Da fração hexânica desengordurada foram isolados cinco triterpenos pentacíclicos, três com esqueleto do tipo friedelano (3β-friedelanol, ácido-3,4-*seco*-friedelano-3-óico e 3-oxo-30-hidroxifriedelano) e dois com esqueleto lupano, (29-norlupan-3,20-diona e 30-hidroxi-20(29)-lupen-3-ona). Sendo todos os compostos relatados pela primeira nesta espécie, porém a 29-norlupan-3,20-diona foi isolado pela primeira vez no gênero. No estudo da Relação Estrutura-Atividade Quantitativa (QSAR) para avaliar a predição das atividades das substâncias isoladas contra os microorganismos *Salmonella enteritidis*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Candida albicans*. Os compostos foram classificados de acordo com valores de pMIC₅₀ para gerar e validar o modelo por “*Random Forest*” (RF). O modelo RF de predição para os microorganismos citados obtiveram uma porcentagem de acerto acima de 72%, área sob a curva, *Receiver Operating Characteristic*, acima de 0,8. Deste estudo, o triterpeno isolado ácido-3,4-*seco*-friedelano-3-óico foi considerado ativo para o modelo de *C. albicans*. Paralelamente, foi realizado o estudo de *docking* molecular das substâncias isoladas com as enzimas 14α-lanosterol-dimetilase, exo-beta-(1,3)-glucanase e N-Myristoyltransferase. Desse estudo, os triterpenos ácido-3,4-*seco*-friedelano, 30-hidroxi-(20)29-lupen-3-ona e 29-norlupan-3,20-diona apresentaram melhores energias de ligação na interação com 14α-lanosterol-dimetilase e os triterpenos ácido-3,4-*seco*-friedelano, 3-oxo-30-hidroxifriedelano e 3β-friedelanol apresentaram melhores energias de ligação na interação com a exo-beta-(1,3)-glucanase. Todos os triterpenos citados apresentaram interações semelhantes com os ligantes descritos na literatura. Foi realizado a atividade antimicrobiana das fases e substâncias isoladas utilizando as cepas bacterianas: *S. enteritidis* (ATCC-6017), *S. enteritidis* (LM-13), *E. coli* (ATCC-18739), *P. aeruginosa* (ATCC-9027) e cepas de fungos *C. albicans* (ATCC-60193), *C. tropicalis* (ATCC-13803). Este estudo revelou que os produtos testados apenas inibiram as cepas dos fungos leveduriformes.

Palavras-chave: *Maytenus erythroxylo*n, triterpenos, atividade antimicrobiana, QSAR, *Docking* molecular.

ABSTRACT

FIGUEIREDO, P. T. R. Isolation, identification and chemoinformatic analysis of triterpenes of *Maytenus erythroxylon* species. 2019. 123 pág. Dissertação (Mestrado em Farmacoquímica de Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos) – Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2019.

Maytenus, a genus which belongs to the Celastraceae family, presents around 300 species distributed in the pantropical regions of the world. This genus has great relevance for the treatment of gastrointestinal disorders. *Maytenus erythroxylon* var. *Maytenus erythroxyla* is endemic to the northeast region of Brazil, recent studies have shown that the ethanolic extract of this species present a potent antidiarrheal activity. The aims of this work are to perform the phytochemical study of *M. erythroxylon* and to evaluate the antimicrobial activity of extracts and isolated substances. The aerial parts of *M. erythroxylon* were collected in the city of Mamanguape-PB were dried and triturate to obtain the vegetal powder that were extracted with ethanol for obtaining the crude ethanolic extract, this was submitted to chromatographic methods for isolation and purification of secondary metabolites. For the identification of the chemical structures of the secondary metabolites were used spectroscopic methods of Infrared and Nuclear Magnetic Resonance of ^1H , ^{13}C and bidimensional. From the defatted hexane fraction, were isolated five pentacyclic triterpenes with friedelane skeleton (3 β -friedelanol, 3,4-seco-friedelan-3-oic acid and 3-oxo-30-hydroxyfriedelane) and two with lupan skeleton (norlupan-3,20-dione and 30-hydroxy-20 (29) -lupen-3-one). All compounds reported by the first in this species and 29-norlupan-3,20-dione were first isolated in the genus. In the *Quantitative structure–activity relationship* (QSAR) study, to evaluate the prediction of the activities of the isolated substances against the microorganisms *Salmonella enteritidis*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Candida albicans*. The compounds were classified according to pMIC₅₀ values to generate and validate the model by "Random Forest" (RF). The RF prediction model for the mentioned microorganisms obtained a percentage of accuracy above 72%, area under the curve, Receiver Operating Characteristic (ROC), above 0.8. From this study, isolated triterpene 3,4-seco-friedelan-3-oic acid was considered active for the *C. albicans* model. At the same time, the study of molecular docking of the isolated substances with the enzymes 14 α -lanosterol-demethylase, exo-beta- (1,3) -glucanase and N-Myristoyltransferase. From this study, the triterpenes 3,4-seco-friedelane, 30-hydroxy- (20) -29-lupen-3-one and 29-norlupan-3,20-dione showed better binding energies in the interaction with 14 α -lanosterol -dimethylase and triterpenes-3,4-seco-friedelane, 3-oxo-30-hydroxyfriedelane and 3 β -friedelanol showed better binding energies in the interaction with exo-beta- (1,3) -glucanase. All of the triterpenes cited had similar interactions with the binders described in the literature. The antimicrobial activity of the isolated phases and substances was studied using the bacterial strains *S. enteritidis* (ATCC-6017), *S. enteritidis* (LM-13), *E. coli* (ATCC-18739), *P. aeruginosa* and fungal strains *C. albicans* (ATCC-60193), *C. tropicalis* (ATCC-13803). This study revealed that the products tested inhibited yeast strains.

Key words: *Maytenus erythroxylon*, triterpenes, antimicrobial activity, QSAR, Molecular docking.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Mapa de distribuição da família Celastraceae pelo mundo.....	23
Figura 2 – Nova classificação das espécies de <i>Maytenus</i>	27
Figura 3 – Partes aéreas de <i>Maytenus erythroxylo</i> n Reissek.....	28
Figura 4 – Triterpenos com atividade contra o HIV.....	30
Figura 5 – Cromatograma da CLMP da fração hexânica de <i>Maytenus erythroxylo</i> n.....	44
Figura 6 – Estruturas dos ligantes complexadas com as enzimas do PDB.....	49
Figura 7 – Esqueleto triterpênico pentacíclico do tipo friedelano.....	56
Figura 8 – 3 β -Hidroxifriedelano ou 3 β -friedelanol isolado de <i>Maytenus erythroxylo</i> n.....	56
Figura 9 – Espectro no Infravermelho (KBr, cm ⁻¹) de Me-1.....	58
Figura 10 – Espectro de Ressonância Magnética Nuclear de ¹ H de Me-1 (CDCl ₃ , 500 MHz).....	58
Figura 11 – Expansão do espectro de RMN de ¹ H de Me-1 na região de 0,83-1,19 ppm (CDCl ₃ , 500 MHz).....	59
Figura 12 – Expansão do espectro de RMN de ¹ H na região de 1,20-3,7 ppm (CDCl ₃ , 500 MHz).....	59
Figura 13 – Espectro de Ressonância Magnética Nuclear de ¹³ C APT de Me-1 (CDCl ₃ , 125 MHz).....	60
Figura 14 – Expansão do espectro de RMN ¹³ C-APT de Me-1 na região de 10-74 ppm (CDCl ₃ , 125 MHz).....	60
Figura 15 – Espectros das correlações entre sinais de ¹ H x ¹³ C ²⁻³ J _{H-C} - HMBC de Me-1 registrados em CDCl ₃ (500 x 125 MHz).....	61
Figura 16 – Ácido 3,4-seco-friedelano-3-óico isolado de <i>Maytenus erythroxylo</i> n.....	64
Figura 17 – Espectro no Infravermelho (KBr, cm ⁻¹) de Me-2.....	64
Figura 18 – Espectro de RMN de ¹ H de Me-2 (CDCl ₃ , 500 MHz).....	65
Figura 19 – Espectro de RMN de ¹ H de Me-2 na região de 0,4-2,7 ppm (CDCl ₃ , 500 MHz).....	65
Figura 20 – Espectro de RMN de ¹³ C-APT de Me-2 (CDCl ₃ , 125 MHz).....	66
Figura 21 – Espectro de RMN de ¹³ C de Me-2 na região de 7-31 ppm (CDCl ₃ , 125 MHz).....	66

Figura 22 – Espectro de RMN de ^{13}C de Me-2 na região de 28-40 ppm (CDCl_3 , 125 MHz).....	67
Figura 23 – Espectro de RMN de ^{13}C de Me-2 na região de 42-63 ppm. (CDCl_3 , 125 MHz)....	67
Figura 24 – Espectro de RMN de ^{13}C de Me-2 na região de 70-200 ppm. (CDCl_3 , 125 MHz)..	68
Figura 25 – 29-norlupan-3,20-diona isolado de <i>Maytenus erythroxylo</i> n.....	71
Figura 26 – Espectro de Infravermelho (KBr , cm^{-1}) de Me-3.....	72
Figura 27 – Espectro de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) de ^1H de Me-3 (CDCl_3 , 500 MHz).....	73
Figura 28 – Expansão do espectro de RMN de ^1H de Me-3 na região de 0,7-2,7 ppm. (CDCl_3 , 500 MHz).....	73
Figura 29 – Expansão do espectro de RMN de ^1H de Me-3 na região de 2,24-2,74 ppm. (CDCl_3 , 500 MHz).....	74
Figura 30 – Espectro de RMN de ^{13}C -APT de Me-3 (CDCl_3 , 125 MHz).....	74
Figura 31 – Espectro de RMN de ^{13}C de Me-3 na região de 10-55 ppm (CDCl_3 , 125 MHz).....	75
Figura 32 – Espectro de RMN de ^{13}C de Me - 3 na região de 212 – 219 ppm (CDCl_3 , 125 MHz).....	75
Figura 33 – Expansão do espectro das correlações entre sinais de $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ - $J_{\text{H-C}}$ -HSQC de Me-3 registrados em CDCl_3 (500 x 125 MHz).....	76
Figura 34 – Expansão do espectro das correlações entre sinais de $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ $^{2-3}J_{\text{H-C}}$ -HMBC de Me-3 registrados em CDCl_3 (500 x 125 MHz).....	76
Figura 35 – Expansão do espectro das correlações entre sinais de $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ $^{2-3}J_{\text{H-C}}$ -HMBC de Me-3 registrados em CDCl_3 (500 x 125 MHz).....	77
Figura 36 – 3-oxo-30-hidroxyfriedelano (Me-4) isolado de <i>Maytenus erythroxylo</i> n.....	79
Figura 37 – Espectro de Ressonância Magnética Nuclear de ^1H de Me-4 (CDCl_3 , 500 MHz).....	80
Figura 38 – Espectro de RMN de ^1H Me-4 na região de 0,60-1,16 ppm (CDCl_3 , 500 MHz).....	80

Figura 39 – Espectro de RMN de ^1H de Me-4 na região de 2,20-3,40 ppm (CDCl_3 , 500 MHz).....	81
Figura 40 – Espectro de RMN de ^{13}C - Broad Band de Me-4 (CDCl_3 , 125 MHz).....	81
Figura 41 – Espectro de RMN de ^{13}C – Broad Band de Me-4 na região de 5,0–72,0 ppm (CDCl_3 , 500 MHz).....	82
Figura 42 – 30-hdroxi-20(29)-lupen-3-ona (Me-5) isolado de <i>Maytenus erythroxylon</i>	84
Figura 43 – Espectro de Infravermelho (KBr , cm^{-1}) de Me-5.....	86
Figura 44 – Espectro de Ressonância Magnética Nuclear de ^1H de Me-5 (CDCl_3 , 400 MHz)..	86
Figura 45 – Espectro de RMN de ^1H Me-5 na região de 0,74–1,08 ppm (CDCl_3 , 400 MHz)....	87
Figura 46 – Espectro de RMN de ^1H Me-5 na região de 1,80–2,55 ppm (CDCl_3 , 400 MHz)....	87
Figura 47 – Espectro de RMN de ^1H Me-5 na região de 3,65–5,05 ppm (CDCl_3 , 400 MHz)....	88
Figura 48 – Espectro de RMN de ^{13}C -APT Me-5 (CDCl_3 , 100 MHz).....	88
Figura 49 – Expansão do espectro de RMN de ^{13}C Me-5 na região de 14-65 ppm (CDCl_3 , 100 MHz).....	89
Figura 50 – Expansão do espectro de RMN de ^{13}C Me-5 na região de 106-218 ppm (CDCl_3 , 100 MHz).....	89
Figura 51 – Expansão do espectro das correlações entre sinais de ^1H x ^{13}C - $J_{\text{H-C}}$ -HSQC de Me-5 registrados em CDCl_3 (400 x 100 MHz).....	90
Figura 52 – Expansão do espectro das correlações entre sinais de ^1H x ^{13}C - $J_{\text{H-C}}$ -HSQC de Me-5 registrados em CDCl_3 (400 x 100 MHz).....	90
Figura 53 – Expansão do espectro das correlações entre sinais de ^1H x ^{13}C $^{2-3}J_{\text{H-C}}$ -HMBC de Me-5 registrados em CDCl_3 (400 x 100 MHz).....	91
Figura 54 – Expansão do espectro das correlações entre sinais de ^1H x ^{13}C $^{2-3}J_{\text{H-C}}$ -HMBC de Me-5 registrados em CDCl_3 (400 x 100 MHz).....	92
Figura 55 – Expansão do espectro das correlações entre sinais de ^1H x ^{13}C $^{2-3}J_{\text{H-C}}$ -HMBC de Me-5 registrados em CDCl_3 (400 x 100 MHz).....	91

Figura 56 – Gráfico de ROC, verdadeiros positivos versus falsos positivos, gerado para os modelos de RF selecionados para validação cruzada e conjuntos de testes: A) <i>Escherichia coli</i> B) <i>Pseudomonas aeruginosa</i> e C) <i>Salmonella enteritidis</i> . AUC = valor da área sob a curva; MCC = coeficiente de correlação de Matthews.....	95
Figura 57 – Sobreposições dos ligantes (amarelo), obtidos por docking, aos ligantes obtidos das estruturas do PDB (Verde).....	97
Figura 58 – Melhor conformação do ligante PDB após o docking e suas interações.....	99
Figura 59 – Melhores conformações e as interações com o sitio ativo da enzima.....	100
Figura 60 – Média das energias de ligação do ligante PDB e triterpenos complexados com a enzima exo-beta-(1,3)-glucanase.....	102
Figura 61 – Melhores conformações dos triterpenos e as interações com o sitio ativo da enzima.....	103
Figura 62 – Melhor conformação do ligante PDB após o docking e suas interações com a enzima N-miristoiltransferase.....	104
Figura 63 – Melhores conformações dos triterpenos e as interações com o sitio ativo da enzima N-miristoiltransferase.....	106

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Diferenças entre os gêneros <i>Maytenus</i> e <i>Monteverdia</i>	25
Tabela 2 - Fracionamento cromatográfico do extrato hexânico de <i>Maytenus erythroxylo</i>	44
Tabela 3 – Processamento cromatográfico da subfração 19 da fração hexânica desengordurada de <i>M. erythroxylo</i>	45
Tabela 4 – Processamento cromatográfico da subfração hexânica desengordurada de <i>M. erythroxylo</i>	45
Tabela 5 – Comparação dos dados de RMN de ^1H e ^{13}C de Me-1 em CDCl_3 com valores da literatura (ALMEIDA, 2011) (δ em ppm e J em Hz).....	57
Tabela 6 – Comparação dos dados de RMN de ^1H e ^{13}C de Me-2 em CDCl_3 com valores da literatura (Medeiros, 2007) (δ em ppm e J em Hz).....	63
Tabela 7 – Comparação dos dados de RMN de ^1H e ^{13}C de Me-3 em CDCl_3 em comparação com valores da literatura (COLE, 1991). (δ em ppm e J em Hz).....	71
Tabela 8 – Comparação dos dados de RMN de ^1H e ^{13}C de Me-4 em CDCl_3 em comparação com valores da literatura (Magalhães, 2011) (δ em ppm e J em Hz).....	78
Tabela 9 – Comparação dos dados de ^1H e ^{13}C de Me-5 em CDCl_3 em comparação com valores da literatura (TINTO et al., 1992). (δ em ppm e J em Hz).....	85
Tabela 10 – Bancos de dados do ChEMBL.....	93
Tabela 11 – Resultados da validação cruzada e testes dos modelos utilizando o algoritmo RF.....	94
Tabela 12 – Valores dos RMSD e <i>Moldockscore</i> do <i>redocking</i>	96
Tabela 13 – Média das energias de ligação do ligante PDB e as melhores energias das conformações dos triterpenos complexados com a enzima 14α -lanosterol-dimetilase.....	98
Tabela 14 – Média das energias de ligação do ligante PDB e triterpenos complexados com a enzima exo-beta-(1,3)-glucanase.....	101
Tabela 15 – Média das energias de ligação do ligante PDB e triterpenos complexados com a enzima N-miristoiltransferase.....	105
Tabela 16 – Resultados da avaliação da Concentração Inibitória Mínima/CIM ($\mu\text{g/mL}$) das substâncias contra cepas bacterianas e fúngicas.....	107

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1 – Precursores dos terpenoides via do mevalonato.....	31
Esquema 2 – Rota biosintética de formação do DMAPP e IPP.....	32
Esquema 3 – Rota biosintética de formação dos lupanos e friedelano.....	34
Esquema 4 – Obtenção e partição líquido-líquido do extrato etanólico bruto das partes aéreas de <i>M. erythroxylon</i>	42
Esquema 5 – Processamento da fração hexânica desengordurada do extrato etanólico bruto de <i>M. erythroxylon</i>	46

LISTA DE ABREVIATURAS, FÓRMULAS E SIGLAS

AcOEt	Acetato de Etila
APT	<i>Attached Proton Test</i>
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
ASD	Agar Sabouraud Dextrose
BB	<i>Broad Band</i>
BHI	Brain Heart Infusion
BuOH	Butanol
CC	Cromatografia em Coluna
CCDA	Cromatografia em Camada Delgada Analítica
CDCl ₃	Clorofórmio Deuterado
CLMP	Cromatografia Líquida de Média Pressão
CCS	Centro de Ciências da Saúde
CIF	Concentração inibitória fracionada
CIM	Concentração inibitória mínima
<i>d</i>	Dupleto
DCF	Departamento de Ciências Farmacêuticas
DMAPP	Dimetilalil Difosfato
DMSO	Dimetil-sulfóxido
EtOH	Etanol
EEB	Extrato Etanólico Bruto
Hex	Hexano
HMBC	Heteronuclear Multiple Bond Correlation
HSQC	Heteronuclear Single Quantum Correlation
IV	Infravermelho
IPP	Isopentil difosfato
<i>J</i>	Constante de acoplamento
KBr	Brometo de Potássio
LMCA	Laboratório Multiusuário de Caracterização e Análise
MHz	Megahertz
MCC	Matthews Correlation Coefficient
MeOH	Metanol
MVD	Molegro Virtual Docker

<i>m</i>	Multipleteo
NaSO ₄	Sulfato de Sódio
PDB	<i>Protein Data Bank</i>
ppm	Partes Por Milhão
QSAR	Quantitative structure–activity relationship
RF	<i>Random Forest</i>
ROC	<i>Reciver Operating Characteristic</i>
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
RMSD	Root Mean Square Deviation
<i>s</i>	Simpleto
<i>sl</i>	Simpleto Largo
<i>t</i>	Tripleteo
UFC	Unidade formadora de colônia
UFPB	Universidade Federal da Paraíba

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	19
2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	22
2.1 Considerações sobre a família Celastraceae.....	23
2.2 Considerações sobre o gênero <i>Maytenus</i>	24
2.3 Considerações sobre a espécie <i>Maytenus erythroxylon</i>	28
2.4 Considerações sobre os terpenoides.....	29
2.4.1 Biossíntese dos terpenóides.....	30
2.5 Ferramentas computacionais aplicada ao planejamento de fármacos.....	35
3 OBJETIVO	37
3.1 Objetivo geral.....	38
3.2 Objetivos específicos.....	38
4 MATERIAL E MÉTODOS	39
4.1 Material botânico.....	40
4.2 Métodos cromatográficos.....	40
4.3 Métodos espectroscópicos.....	40
4.3.1 Espectroscopia de infravermelho	40
4.3.2 Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN).....	41
4.4 Obtenção do extrato etanólico bruto e seu particionamento.....	41
4.5 Isolamento e purificação dos constituintes químicos.....	43
4.5.1 Processamento cromatográfico da fração hexânica desengordurada.....	43
4.6 Química Computacional.....	46
4.6.1 Banco de dados.....	46
4.6.2 Descritores Volsurf.....	47
4.6.3 Modelo de Predição.....	48
4.7 <i>Docking</i> molecular.....	49
4.7.1 Obtenção das enzimas bacterianas e fúngicas complexadas com seus ligantes.....	49
4.7.2 <i>Docking</i> das enzimas fúngicas complexadas com os triterpenos.....	50
4.7.3 Validação da metodologia do <i>docking</i> molecular.....	50
4.8 Estudo da atividade antibacteriana e antifúngica das frações e fases de extratos de <i>Maytenus erythroxylon</i>	51

4.8.1 Local de trabalho.....	51
4.8.2 Produtos testados.....	51
4.8.3 Meios de cultura.....	51
4.8.4 Micro-organismos.....	51
4.8.5 Inóculo.....	52
4.8.6. Concentração inibitória mínima (CIM).....	52
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	54
5.1 Identificação estrutural dos constituintes químicos isolados de <i>M. erythroxylo</i>	55
5.1.1 Identificação estrutural de Me-1.....	55
5.1.2 Identificação estrutural de Me-2.....	55
5.1.3 Identificação estrutural de Me-3.....	69
5.1.4 Identificação estrutural de Me-4.....	77
5.1.5 Identificação estrutural de Me-5.....	82
5.2 Análise dos modelos de QSAR para <i>Candida albicans</i> , <i>Salmonella enterica</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Escherichia coli</i>	93
5.3 <i>Docking</i> Molecular.....	96
5.3.1 <i>Redocking</i>	96
5.3.2 <i>Docking</i> molecular triterpenos.....	97
5.3.2.1 Triterpenos complexados com a enzima 14 α -lanosterol-dimetilase (5TZ1).....	97
5.3.2.2 Triterpenos complexados com a enzima exo-beta-(1,3)-glucanase (1EQC).....	101
5.3.2.3 Triterpenos complexados com a enzima N- miristoiltransferase-NMT (1IYL).....	104
5.4 Atividade antibacteriana e antifúngica das frações e fases de extratos de <i>Maytenus erythroxylo</i>	107
6 CONCLUSÕES.....	108
REFERÊNCIAS.....	109

Introdução

1. INTRODUÇÃO

A grande biodiversidade de produtos de origem natural se tornou uma fonte inesgotável de utilidades para o homem, sendo os produtos de origem vegetal as primeiras formas de utilização dos produtos naturais como também as que mais contribuem significativamente para o homem (DUTRA, et al., 2016). As plantas medicinais são utilizadas para a alimentação, para o tratamento e cura de doenças, tendo então uma grande importância para a medicina, compreendendo 25% dos medicamentos prescritos atualmente. (MADEIRO, 2012; VELOSO et al., 2017). Além dessas vantagens, os produtos vegetais podem ser usados como inseticidas e também como utensílios domésticos (PÉRICO et al., 2018).

O reino vegetal apresenta uma grande importância etnomedicinal, pois as substâncias químicas produzidas pelos vegetais, a partir do seu metabolismo secundário, são as responsáveis por causar os efeitos benéficos, porém da mesma forma que essas substâncias químicas causam benefícios podem ter efeitos tóxicos graves (BOUFRIDI; QUINN, 2017). Sabendo desta importância e observando a grande diversidade de substâncias químicas produzidas pelas espécies vegetais, estes metabólitos secundários podem servir como modelos de novas moléculas alvo para aplicações farmacológicas, assim podendo vir a se tornar novos medicamentos (XIE et al., 2018).

Para auxiliar no desenvolvimento de novos candidatos a fármacos, existem os estudos *in silico*, como exemplo o de *docking* molecular, pois estas ferramentas podem informar importantes propriedades químicas que possam existir durante as interações existentes em um complexo ligante-receptor (MAGALHÃES, 2010).

O Brasil por ser constituído por uma vasta flora, compreendendo 22% do total da vegetação mundial em que mais de 50.000 espécies de vegetais foram catalogadas e estão distribuídas nos principais ecossistemas brasileiro, estes vegetais são utilizados pela população no combate e prevenção de doenças na forma de infusões, decoctos, garrafadas entre outros. (CARVALHO et al., 2014). No Brasil, por mais que existam muitos estudos com essas plantas medicinais poucas apresentam registro de medicamento fitoterápico em comparação com Japão, EUA e países da Europa (CARVALHO et al., 2018; KLEIN et al., 2009; VELOSO et al., 2017).

Diante deste potencial das espécies vegetais, destaca-se o gênero *Maytenus*, o qual pertence à família Celastraceae possuindo diversos usos na medicina popular, sendo um gênero utilizado especialmente contra doenças do trato gastrointestinal (FORMIGA et al., 2017). As atividades biológicas relatada para esse gênero são causadas pela presença de diversas classes

de metabólitos secundários como os flavonoides glicosilados, terpenoides, esteroides, alcaloides, taninos (NIERO; ANDRADE; CECHINEL-FILHO, 2011; SOUSA, 2008).

Por se tratar de um gênero importante para o uso popular apresentando um grande potencial farmacológico para o tratamento das doenças gastrointestinais, como também por apresentar uma grande riqueza de metabólitos secundários torna-se interessante a realização de estudos com espécies do gênero *Maytenus*. Diante do pressuposto, a realização dos estudos fitoquímicos, farmacológicos e computacionais de extratos e metabólitos secundários isolados da espécie *Maytenus erythroxylo* que irão contribuir para o conhecimento quimiotaxonômico e farmacológico deste gênero.

Fundamentação Teórica

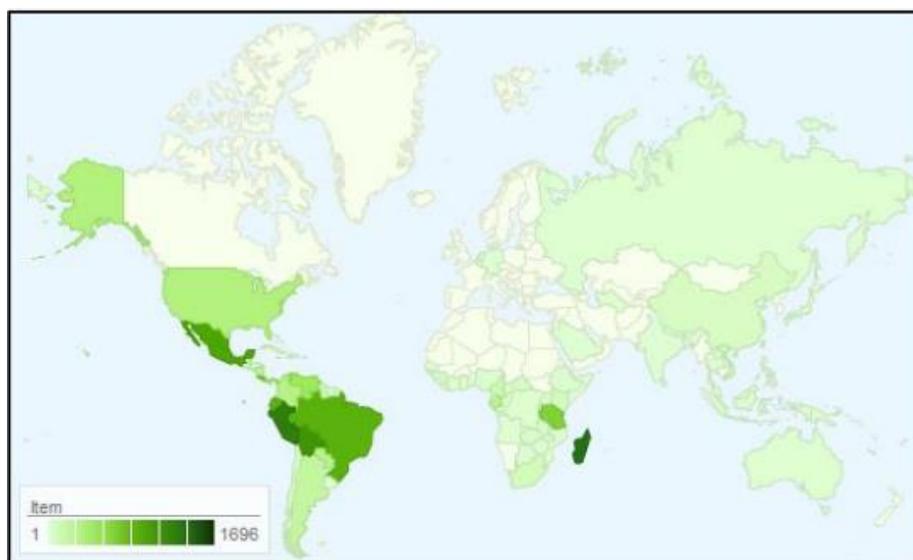
2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 Considerações sobre a família Celastraceae

A família Celastraceae pertence ao grupo das angiospermas (JOFFILY; VIEIRA, 2010), são representadas por 106 gêneros e 1300 espécies aproximadamente, possuem distribuição pantropical, sendo encontradas nas regiões de clima tropical, subtropical e regiões de climas temperados do mundo, como o Norte da África, América do Sul e Leste da Ásia, destacando-se Madagascar, Peru, Bolívia, México e Brasil como os países que apresentam mais relatos de espécies encontradas e identificadas, não sendo relatadas nas regiões árticas (Figura 1) (VELOSO et al., 2017; NUÑEZ et al., 2016; BFG, 2015).

As espécies desta família são caracterizadas por serem árvores de pequeno porte e arbustivas, seus frutos são conhecidos por apresentarem um sabor agridoce (BIRAL, et al., 2015). Dentro desta família, os gêneros que apresentam mais espécies relatadas na literatura são *Euonymus*, *Maytenus*, *Celastrus* e *Cassine*, destacando os gêneros *Maytenus* e *Celastrus*, por serem amplamente usados na medicina popular (CALLIES et al., 2017; PERESTELO, 2010). Além de serem usados na medicina popular, as espécies da família Celastraceae apresentam grande distribuição geográfica e uma grande diversidade e complexidade estrutural de metabólitos secundários (COPPEDE et al., 2014).

Figura 1. Mapa de distribuição da família Celastraceae pelo mundo, representadas pelas áreas em verde.



Fonte: (<http://www.tropicos.org/Name/maps>, acessado em 10/10/2018)

No Brasil, foram catalogados 19 gêneros e 141 espécies sendo 57 endêmicas. Dos 19 gêneros encontrados *Fraunhofer* e *Goniodiscus* são endêmicas nas regiões brasileiras (LOMBARDI; BIRAL, 2016; BFG, 2015). São encontradas nos diversos biomas brasileiros, das quais a floresta amazônica é o centro de ocorrência de espécies dessa família, porém, não ficam restrito a este tipo de vegetação, como exemplo o gênero *Fraunhofer* ocorre na caatinga, outros biomas como mata atlântica, cerrado e restinga também apresentam relatos de espécies de Celastraceae (JOFFILY; VIEIRA, 2010).

A grande importância das plantas da família Celastraceae é devido ao seu uso na medicina popular, é relatado que os extratos obtidos são utilizados para o tratamento de doenças estomacais, febre, sedativo, purgativo, artrite reumatoide, inibidores de apetite e antitumoral (SPIVEY; WESTON; WOODHEAD, 2002). Como é relatado por Kuo e Kuo, 1997 em que foi observado que o extrato de *Celastrus hindsii* apresentou uma potente ação frente a linhagens celulares de hepatoma, carcinoma do cólon do útero e carcinoma cervical, também são utilizados na agricultura com propriedades inseticidas (VELOSO et al., 2017).

Desta maneira, são encontrados diversos tipos de metabólitos secundários em plantas de Celastraceae, destacando-se os triterpenos pentacíclicos sendo os mais abundantes (NIERO; ANDRADE; CECHINEL-FILHO, 2011). Como exemplo, temos os triterpenos do tipo friedelano de *Maytenus robusta* que apresentam atividade antiulcerogênica (ANDRADE et al., 2008; ANDRADE et al., 2007). Os alcaloides sesquiterpênicos piridínicos, encontrados nas raízes das espécies do gênero *Maytenus*, são considerados marcadores químicos em espécies de Celastraceae que apresentam atividade imunossupressora e antiinflamatória (CALLIES et al., 2017; OLIVEIRA et al., 2006). Porém são encontrados vários outros tipos de metabólitos secundários, como os quinonametídeos relatados em espécies de *Salacia* e *Maytenus* com atividade antitumoral (ESPINDOLA et al., 2018), diterpenos do tipo abietano com atividade antitumoral (JIANG et al., 2018, BUFFA et al., 2004), sesquiterpenos com atividade contra leishmanias de *Maytenus apurimacensis* (DELGADO-MÉNDEZ et al., 2008) como também alguns tipos de flavonoides com atividade antiinflamatória encontrados em espécies de *Maytenus* (DUTRA et al., 2016).

2.2 Considerações sobre o gênero *Maytenus*

O gênero *Maytenus* é amplamente estudado em caráter químico, farmacológico e botânico, este gênero vem sofrendo diversas modificações em sua organização taxonômica ao longo do tempo (SIMMONS et al. 2008). O seu nome é derivado da palavra “Maytén” dado

por uma tribo originária do Chile denominada de Mapuche (NIERO; ANDRADE; CECHINEL-FILHO, 2011). Estudos realizado por McKenna et al. (2011) classificavam este gênero com 300 espécies distribuído nas regiões tropicais e subtropicais do mundo, das quais 140 espécies estão distribuídas nas américas desde das regiões tropicais do caribe até as regiões subtropicais da Argentina e Chile (BIRAL et al., 2015).

No Brasil, o gênero é representado por 76 espécies, das quais 36 são endêmicas no país. A maior incidência de espécie deste gênero fica localizado entre os estados da Bahia e Ceará. (ROCHA, et al., 2004). Estão distribuídos nos vários biomas brasileiros, seja em regiões de extremo calor como a caatinga (*Maytenus truncata* e *Maytenus ilicifolia*) ou como em florestas de altitudes (*Maytenus erythroxyton*) (VELOSO et al., 2017; BIRAL et al., 2015).

Ao longo do tempo, o gênero *Maytenus* foi reclassificada várias vezes por sempre serem descobertas novas espécies e essas possuem algumas particularidades. As espécies classificadas para este gênero devem possuir as seguintes características morfológicas: presença de indumento e lenticelas, espinhos nos galhos, folhas com margens espinhosas e proeminência da venação foliar. Como a maioria das espécies de *Maytenus* apresentam estruturas reprodutivas bastante uniformes, as características vegetais são frequentemente mais importantes do que as características reprodutivas para identificação de espécies. (BIRAL et al., 2017; McKENNA, et al., 2011).

Diante disto, alguns gêneros como *Tricerma*, *Fraunhoferia*, *Plenckia* apresentam semelhanças com *Maytenus*, dessa forma, Biral et al. (2017) realizaram um estudo para delimitar esses quatro gêneros, utilizando métodos genéticos em conjunto com as características morfológicas das espécies que representam esses gêneros. Nesse estudo algumas espécies de *Tricerma* que estavam dentro de *Maytenus* foram separadas, *Fraunhoferia* e *Plenckia* continuaram como gêneros diferentes e *Maytenus* foi dividido em dois gêneros *Maytenus* e *Monteverdia* (Tabela 1).

Tabela 1. Diferenças entre os gêneros *Maytenus* e *Monteverdia*

	<i>Maytenus</i> 15-24	<i>Monteverdia</i> 123
Número de espécies		
Distribuição geográfica	Região subtropical da América do Sul, região dos Andes da Argentina até Venezuela, Costa Rica e Panamá.	Regiões Neotropicais do Mundo
Diferenças morfológicas	Folhas cartaceosas ou coriáceas, flores com dois ou três carpelos, um ou dois óvulos por carpelo, frutos com pericarpo membranáceo, arilos vermelhos ou amarelados	Folhas membranosas, cartaceosas ou coriáceas, flores com dois carpelos, dois óvulos por carpelo, frutos com pericarpo coriácea, arilos brancos.

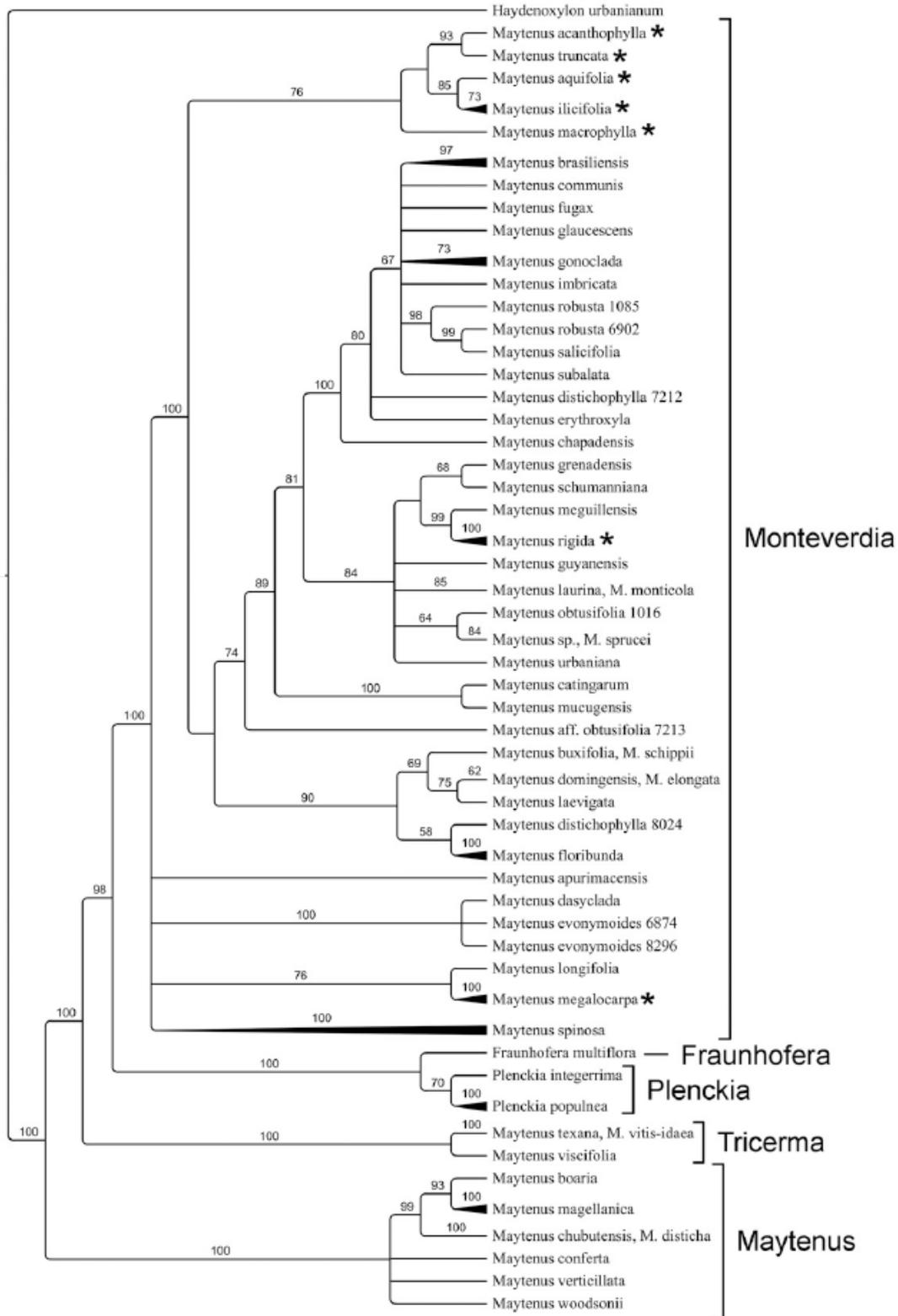
Fonte: Adaptado de BIRAL et al., 2017

Como visualizado na tabela, o gênero *Maytenus* foi dividido, principalmente, pela presença de uma membrana que reveste o pericarpo, em que aquelas espécies vegetais que apresentassem está membrana permaneceram no grupo de *Maytenus* e aquelas espécies que não apresentassem essas membranas foram classificadas no gênero *Monteverdia* como observado na figura 2. Sendo assim, com esta nova classificação, o gênero *Monteverdia* é constituído por 123 espécies com distribuição pantropical e *Maytenus* foi reduzida para 15-24 espécies sendo predominante na América Latina (Figura 2).

As espécies de *Maytenus* são conhecidas pelo seu grande potencial contra as doenças gastrointestinais, como exemplo, a infusão das folhas de *Maytenus ilicifolia* (espinheira-santa) são utilizadas na medicina popular para o tratamento de hiperacidez, úlceras gástricas, úlceras duodenais e gastrite crônica (NIERO; ANDRADE; CECHINEL-FILHO, 2011). Estudos realizado com outras espécies como *M. robusta*, *M. truncata* e *M. rigida* mostraram que essas espécies apresentam atividade gastroprotetora, antiulcerogênica e antidiarreica, respectivamente. Porém, outras atividades são relatadas para essas espécies como para o tratamento da diabetes, problemas renais e como antiinflamatório e analgésico (VELOSO et al., 2017; CALDAS-FILHO 2013; LEME et al., 2013; GONZALES, 2001).

Maytenus é representada por diversas classes de metabólitos secundários dentre elas destacam-se os triterpenos pentacíclicos, diterpenos, alcaloides sesquiterpenos piridínicos e os flavonoides (CALLIES et al., 2017; TEBOU et al., 2017). Os triterpenos são as substâncias químicas majoritárias nas folhas das espécies de *Maytenus*, das quais os triterpenos que apresentam esqueleto do tipo lupano e friedelano são os mais abundantes. Para esta classe de metabólitos estão associadas as atividades de analgesia, anticâncer, antidiarreica, antiviral, inibição da acetilcolinesterase antiparasitária, antifúngica e antibacteriana (FERREIRA et al., 2017; MAGALHÃES et al., 2011; SILVA et al., 2017; VELOSO et al., 2017). Nas raízes são encontrados os alcaloides sesquiterpênicos piridínicos que são considerados marcadores químicos para estas plantas, pois são restritas as espécies da família Celastraceae e apresentam atividades antiinflamatória, inseticida e imunossupressora (CALLIES et al., 2017). Outros metabólitos como os flavonoides apresentam atividade na inibição da acetilcolinesterase, contra a bactéria da cólera e anti-inflamatório (NIERO; ANDRADE; CECHINEL-FILHO, 2011; TEBOU et al., 2017; SOUSA et al., 2017)

Figura 2. Nova classificação das espécies de *Maytenus*



Fonte: BIRAL, et al., 2017

2.3 Considerações sobre *Maytenus erythroxylon*

Maytenus erythroxylon var. *Maytenus erythroxyla* foi atualmente classificada como *Monteverdia erythroxylon* (BIRAL et al., 2017; TROPICOS, 2018). É uma espécie endêmica do Brasil, conhecida popularmente como “Bom-nome” (CESTARO; SOARES, 2004) e “Casca-grossa” (CASTRO et al., 2012). Ficam localizadas, principalmente, no litoral brasileiro nos estados da Bahia, Ceará, Maranhão, Paraíba, Piauí, Rio Grande do Norte e Sergipe, predominante da vegetação da caatinga e mata atlântica, porém, também são encontradas espécies no estado de Minas Gerais na vegetação do cerrado (BFG, 2015; BANDEIRA, 2016).

Maytenus erythroxylon são consideradas árvores arbustivas, que chegam a ter em média 4,0 metros de altura, suas folhas são verdes nas duas faces, coriáceas, lanceoladas, glabra com uma forma obtusa e a margem levemente serreada. Essas duas últimas características são importantes na determinação de espécies do gênero *Maytenus*, apresentam inflorescências fasciculadas, com até quatro flores e frutos (Figura 3) (BANDEIRA, 2016).

Figura 3. Partes aéreas de *Maytenus erythroxylon* Reissek



Fonte: Laboratório de Farmacologia do Trato Gastrointestinal

Existem muitos estudos desta espécie de caráter botânico, com o objetivo de delimitar sua morfologia e anatomia das outras espécies do gênero *Maytenus*, como exemplo as folhas de *M. erythroxylon* são bem semelhantes com *M. obtusifolia* (PINTO et al., 2012; CESTARO;

SOARES, 2004; BANDEIRA, 2016). Este gênero possui grande importância contra as doenças que acometem o trato gastrointestinal. Formiga et al. 2017, realizaram um estudo do extrato etanólico desta espécie que apresentou uma baixa toxicidade e uma potente ação antidiarreica.

Desta maneira, por este gênero ter uma grande importância farmacológica, apresentar uma riqueza de metabólitos secundários e como, a espécie *Maytenus erythroxylo* apresenta poucos estudos farmacológicos e nenhum estudo fitoquímico dos extratos das suas folhas, é de suma importância realizar a investigação dos constituintes químicos presentes nesta espécie.

2.4 Considerações sobre os terpenóides

Os terpenóides são consideradas uma das classes de metabólitos secundários mais abundantes na natureza, sendo relatados mais de 40.000 terpenoides na literatura. Estão presentes em maior quantidade no reino vegetal, podendo também ser encontrados no reino marinho, fauna e em organismos unicelulares como as bactérias, sendo considerados constituintes essenciais para a manutenção desses microrganismos. Apresentam importantes funções biológicas apresentando grande importância para a área farmacêutica (TETALI, 2018; NIERO; ANDRADE; CECHINEL-FILHO, 2011).

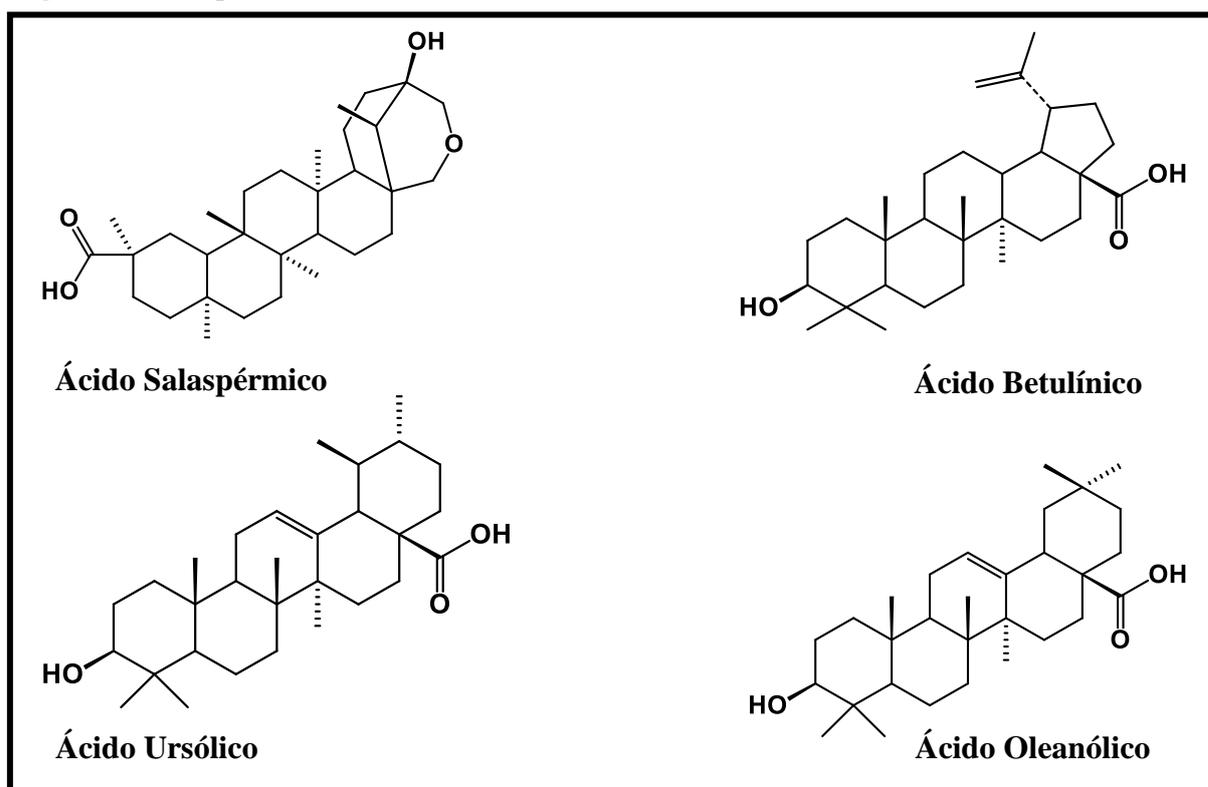
Esta classe de metabólitos secundários, estão presentes nos extratos orgânicos de características apolares dos vegetais (NIERO; ANDRADE; CECHINEL-FILHO, 2011). Podem ser considerados adjuvantes farmacológicos por apresentarem características que auxiliam na absorção de fármacos no organismo, como também estão sendo usados para a produção de polímeros biorenováveis para a produção de plásticos biodegradáveis (WILBON; CHU; TANG, 2013; AQIL et al., 2007).

São classificados de acordo com a quantidade de unidades isoprênicas, moléculas que apresentam cinco átomos de carbonos em sua estrutura (C_5) (2-metilbutadieno), podem existir na forma acíclica e cíclica. Os terpenos mais simples são os hemiterpenos (C_5) são raros e de pouca importância biológica. Com duas e três unidades isoprênicas existem os monoterpenos (C_{10}) e os sesquiterpenos (C_{15}), respectivamente, que são as substâncias majoritárias nos óleos essenciais dos vegetais, com quatro e cinco unidades isoprênicas formam respectivamente, os diterpenos (C_{20}) e os sesterterpenos (C_{25}). Porém, o grupo com maior quantidade de representantes desta classe são os triterpenos (C_{30}), sendo relatados mais de 4.000 tipos de triterpenos distribuídos em 40 diferentes esqueletos (ZHANG et al., 2002).

Devido à grande diversidade deste grupo de metabólitos e por possuírem uma grande variedade de esqueletos, apresentam diversas atividades farmacológicas. Os monoterpenos e

sesquiterpenos presentes nos óleos essenciais das plantas medicinais, apresentam atividades antibacteriana (HEYDARI et al., 2018), antifúngica (WANG et al., 2018), utilizados como flavorizantes e no ramo da perfumaria (AQIL et al., 2007). Vários estudos relatam atividade antileishmania como características dos sesquiterpênicos, por exemplo, o guaiol (GARCIA et al., 2018). Para os diterpenos do tipo pimaranos são relatados na literatura atividades antiviral, antifúngica, antiespasmódica e antibacteriana (REVEGLIA et al., 2018). Os triterpenos são os terpenóides mais estudados na literatura, por apresentarem uma variedade grande de esqueletos, conseqüentemente, apresentam diversas atividades farmacológicas (HILL; CONNOLY, 2018; ABREU et al, 2011; NIERO; ANDRADE; CECHINEL-FILHO, 2011). Estudos recentes realizados por Xiao et al. (2018), mostrou que os triterpenos de diferentes tipos como, ácido salaspérmico, ácido oleanólico, ácido ursólico e o ácido betulínico bloqueiam a replicação do Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV) em linfócitos, através da inibição de proteases presentes no vírus (Figura 4).

Figura 4. Triterpenos com atividade contra o HIV

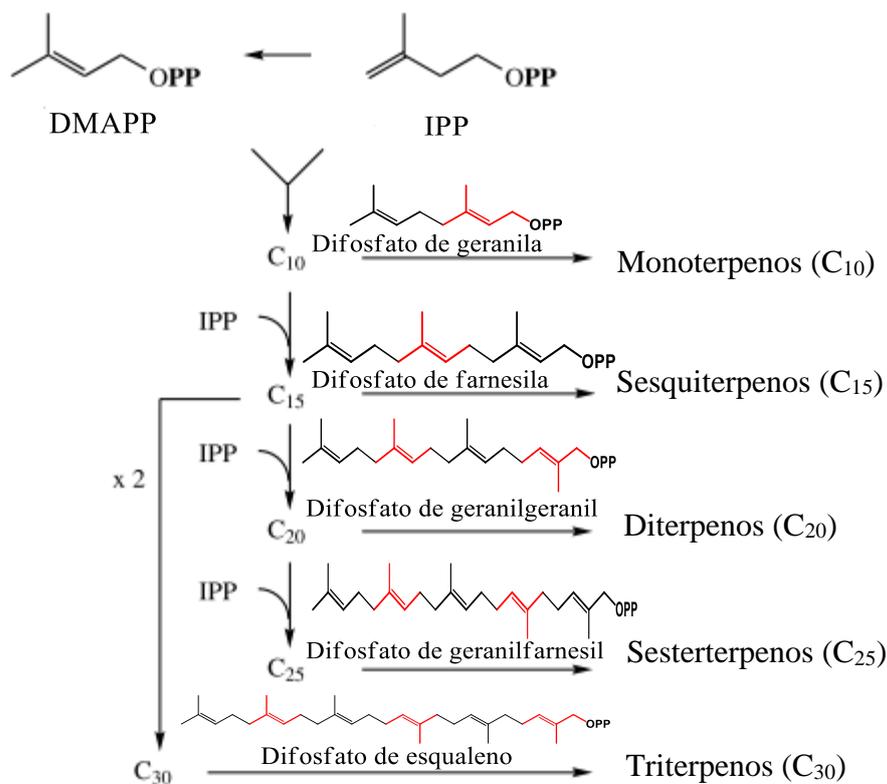


2.4.1 Biossíntese dos triterpenos

Os terpenóides são oriundos do ácido mevalônico que é um produto da via do metabolismo do acetato, são formados através da união cabeça-cauda das unidades isoprênicas, que são estruturas químicas constituídas por cinco átomos de carbonos, considerados a base de formação dos terpenóides (REMLINGER, 2017).

Para a unidade isoprênica participar das reações de formação das substâncias desta classe de metabólitos, é necessário que estejam na sua forma bioquimicamente ativa que são as unidades difosfato dimetilalila (DMAPP) e o difosfato isopentila (IPP), desta maneira, essas duas substâncias darão origem as estruturas químicas precursoras de cada classe de triterpenos o geranil, farnesil, geranilgeranil, geranilfarnesil e esqualeno que irão sofrer sucessivas reações de ciclização dando origem aos esqueletos básicos dos monoterpênos, sesquiterpênos, diterpênos, sesterterpênos e triterpênos, respectivamente (Esquema 1) (DEWICK, 2010).

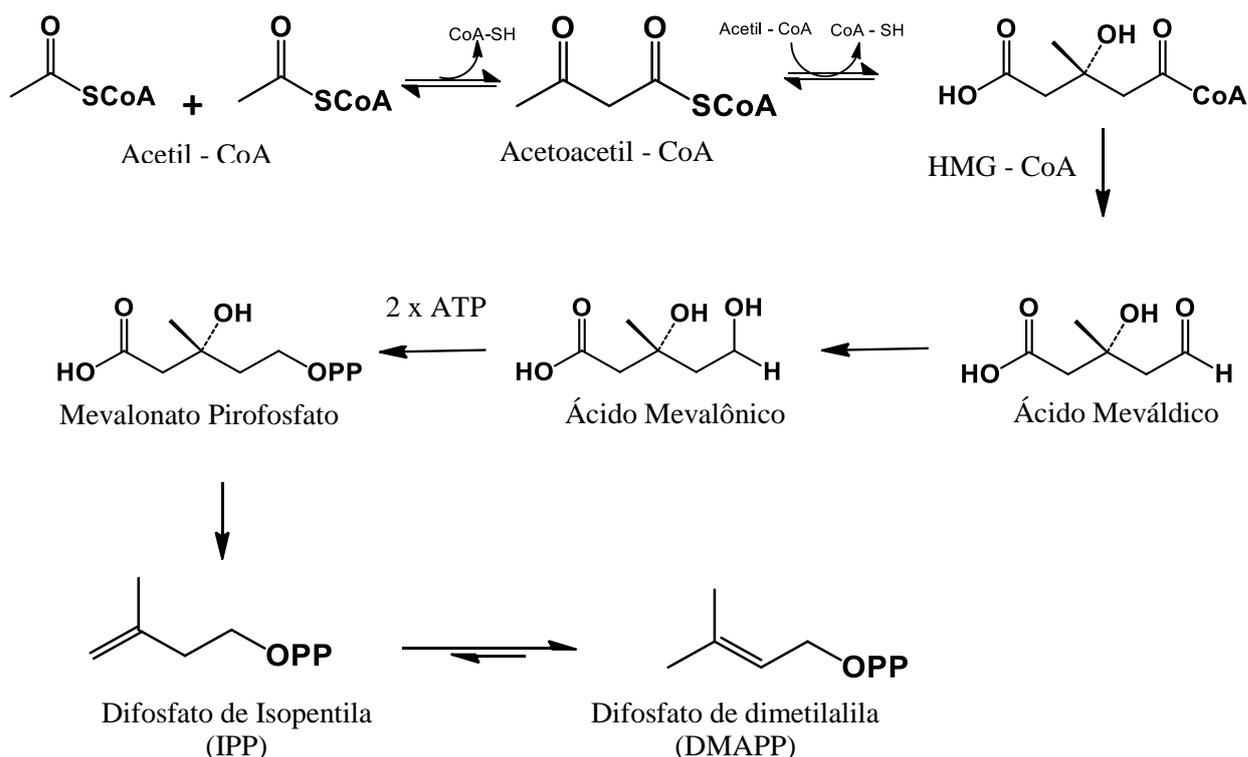
Esquema 1. Precursores dos terpenoides via do mevalonato



Fonte: Adaptado, DEWICK, et al., 2010

Inicialmente, ocorre a condensação de duas moléculas de acetil-CoA formando o acetoacetil-CoA, em seguida ocorre a inserção de mais uma molécula de acetil-CoA para a formação do β -hidroxi- β -metilglutaril-CoA (HMG-CoA). O próximo passo é a formação do ácido mevalônico, para isso ocorre a redução do grupo tioéster para gerar um álcool primário, na primeira etapa da reação é formado o intermediário ácido meváldico que apresenta um grupo aldeído e em seguida ocorre uma redução do aldeído em um álcool primário formando assim o ácido mevalônico, este por sua vez sofre uma fosforilação dando origem ao mevalonato pirofosfato. As unidades isoprênicas bioquimicamente viáveis para a formação dos terpenoides são obtidas por descarboxilação e eliminação de uma molécula de água. A reação requer a presença de ATP, formando assim o isopentenil pirofosfato este por sua vez sofre a ação de uma isomerase e é convertida no dimetilalil difosfato (DMAPP). Esquema 2 (DEWICK et al., 2010; MEDEIROS, 2007).

Esquema 2. Rota biosintética de formação do DMAPP e IPP



Os triterpenos são formados a partir de duas moléculas de farnesil difosfato que se acoplam cauda-cauda, pelo ataque nos carbonos 2,3 da dupla ligação de uma das moléculas do farnesil difosfato para formar uma molécula com 30 átomos de carbono o esqualeno, para essa reação é necessário a doação de um hidrogênio pelo NADPH.

Em seguida, o esqualeno sofre uma reação catalisada por uma flavoproteína, com auxílio de O₂ e NADPH, produzindo o 2,3-óxido de esqualeno, sendo este o precursor da maioria dos triterpenos pentacíclicos hidroxilados no carbono 3. (THIMMAPPA et al., 2014; DEWICK et al., 2010). A formação dos diversos esqueletos triterpênicos dependerá das enzimas conhecidas como óxido de esqualeno ciclases que irão promover a ciclização do 2,3-óxido de esqualeno (THIMMAPPA et al., 2014).

Para a formação dos triterpenos pentacíclicos com um grupo hidroxila em C-3, deve ocorrer uma protonação que permitirá a abertura do anel do grupamento epóxido do óxido de esqualeno formando um carbocátion terciário que facilitará o ataque eletrofílico das duplas adjacentes possibilitando a ciclização do esqualeno para a formação dos anéis de 6 membros. (XU; FAZIO; MATSUDA, 2004). Os esqueletos triterpênicos mais conhecidos no gênero *Maytenus* são os lupanos e friedelanos, que apresentam como estrutura base o cátion damaril (NIERO, 2010, XU; FAZIO; MATSUDA, 2004).

Para a formação do esqueleto lupano, este cátion damaril sofre ação da sintase LUP1, o qual realiza a expansão do anel D e forma um carbocátion C-18 que promoverá a ciclização e formação do anel E, gerando o cátion lupil precursor dos diversos tipos de substâncias com esqueleto lupano, como exemplo a formação do lupeol que é devido ao cátion lupil sofrer uma desprotonação nos carbonos 20 e 29 formando o radical isopropenila, processo final da formação do lupeol (THIMMAPPA et al., 2014; XU; FAZIO; MATSUDA, 2004). Esse mesmo cátion lupil sofre uma expansão do seu anel E pela migração do carbocátion para C-21 formando uma substância com seis anéis, o cátion germanicil, que apresenta um carbocátion em C-18, o qual pode migrar para os C-9, C-10, C-5 e C-3 para formar o cátion friedelil, precursor da série dos friedelano (Esquema 3) (THIMMAPPA et al., 2014; XU; FAZIO; MATSUDA, 2004).

2.5 Ferramentas computacionais aplicada ao planejamento de fármacos

O desenvolvimento e produção de fármacos é um processo lento, que requer grandes investimentos e pode demorar décadas para que o medicamento produzido seja levado para as prateleiras. Em média, o medicamento pode demorar de 10-15 anos para estar disponível no mercado e para chegar neste medicamento, a indústria farmacêutica realiza a pesquisa entre mais de 10.000 compostos para se obter uma substância que seja eficaz (HOQUE, 2017). Pinto e Barreiro (2013) relatam que nos últimos anos houve uma diminuição na descoberta de medicamentos inovadores, como exemplo, em 2012 apenas 31 novos medicamentos foram lançados no mercado.

Para auxiliar no desenvolvimento de novos fármacos surgiu a química computacional que está cada vez mais sendo usada pela indústria farmacêutica para diminuir gastos, tempo e otimizar a escolha da substância para ser usadas nos testes *in vitro* e *in vivo* (SURABHI; SINGH, 2018). Os métodos computacionais são baseados nas propriedades físico-químicas que caracterizam uma interação entre uma substância farmacologicamente ativa com uma macromolécula, propriedades como: superfície da molécula, interações eletrostáticas, hidrofóbicas, formação de ligações de hidrogênio, sendo essas propriedades consideradas durante a análise e predição quando ocorre interação entre as moléculas analisadas (HOQUE,2017).

Os métodos computacionais usados para desenvolvimento de fármacos são classificados de acordo com a estrutura do ligante ou baseados na estrutura do receptor. Os estudos computacionais baseados na estrutura do receptor fundamentam-se nas características que aquela estrutura tem para ser um possível alvo farmacológico, em que irá prevê como uma substância química interage no alvo estudado, gerando uma energia de ligação e mostra quais tipos de interações estão ocorrendo entre o ligante e a proteína alvo (docking molecular). Aqueles baseados na estrutura do ligante, é fundamentada na predição da atividade farmacológica de compostos com valores de atividade conhecidos para a construção de modelos de relação quantitativa entre a estrutura química e a atividade biológica (QSAR, do inglês Quantitative Structure-Activity Relationship) (ACEVEDO et al., 2017).

Estudo realizado por Esmeraldo (2015), investigou as possíveis interações entre os triterpenos de esqueleto oleanano, ursano, lupano e friedelano isolados de espécies de *Maytenus* com enzimas envolvidas na ação antitumoral e com a ciclooxigenase. Para esse estudo foi utilizado o método por *docking* molecular, que mostrou boas interações dessas classes de

metabólitos com as enzimas citadas, mostrando semelhança com as interações dos fármacos usados na clínica e essas enzimas

Cada vez mais as bactérias e fungos estão adquirindo resistência para as diversas classes de antibióticos e antifúngicos. No ano de 2017 a Organização Mundial da Saúde realizou uma lista com as bactérias resistentes a antibióticos de grande relevância mundial e que necessitam da descoberta e desenvolvimento de novos antibióticos, nesta lista as Enterobacteriaceas, como *Escherichia coli* e *Salmonella* spp estão classificadas como de ordem crítica e de alta prioridade para que sejam produzidos novos antibióticos para combater essas bactérias (WHO, 2017). Os fungos leveduriformes do gênero *Candida* spp apresentam mecanismos de resistências aos antifúngicos e sabendo que esses microorganismos são os maiores causadores de infecções no trato gastrointestinal, existe uma grande necessidade em descobrir novos fármacos para combater bactérias e fungos (FORMIGA et al., 2017; SURABHI; SINGH, 2018). Para superar essas dificuldades, as ferramentas computacionais, como o *docking*, estão auxiliando os pesquisadores para a descoberta e desenvolvimentos de novas substâncias químicas com potencial farmacológico, como também auxiliam no entendimento das interações entre ligante-receptor afim de realizar modificações nas moléculas já existentes com o objetivo de melhorar os efeitos farmacológicos dessas moléculas (MALATHI; RAMAIAH, 2018).

Objetivos

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Contribuir para a ampliação do conhecimento químico do gênero *Maytenus* através do estudo fitoquímico de *Maytenus erythroxyton* Reissek

3.2 Objetivos específicos

- Obter extratos orgânicos das partes aéreas de *Maytenus erythroxyton* para o estudo da sua composição química;
- Isolar e purificar metabólitos secundários dos extratos obtidos das partes aéreas de *Maytenus erythroxyton* utilizando métodos cromatográficos;
- Identificar as substâncias químicas isoladas de *Maytenus erythroxyton* através de técnicas de infravermelho e Ressonância Magnética Nuclear;
- Caracterizar e avaliar a atividade antimicrobiana dos extratos e dos metabólitos secundários isolados de *Maytenus erythroxyton*;
- Realizar estudos de predição farmacológica das substâncias isoladas em bactérias e fungos
- Avaliar, através do estudo por *docking* molecular, como as substâncias isoladas de *Maytenus erythroxyton* se ancoram nos sítios ativos de enzimas fúngicas.

Material e métodos

4 MATERIAL E MÉTODO

4.1. Material Botânico

As partes aéreas de *Maytenus erythroxylon* foram coletadas no município de Mamanguape - PB. Sua identificação botânica foi realizada pela Dra. Zelma Glebya Maciel Quirino do setor de botânica do departamento CCAE/UFPB e uma exsicata encontra-se depositada no Herbário Professor Lauro Pires Xavier do Centro de Ciências Exatas e da Natureza da UFPB sob código 6051, registrada no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado (SisGen) sob código AB0F7BA.

4.2. Métodos Cromatográficos

Os métodos cromatográficos utilizados para o isolamento e purificação dos constituintes químicos foram Cromatografia em Coluna (CC) e Cromatografia Líquida de Média Pressão (CLMP), utilizando como fase estacionária sílica gel F60 da SILICYCLE com partículas de dimensões entre 0,063-0,200 mm e 0,04-0,063 mm. O comprimento e as dimensões das colunas de vidro variaram de acordo com a quantidade de amostra que foi submetido a cromatografia.

O monitoramento das frações obtidas das CC e das CLMP foi realizado por Cromatografia em Camada Delgada Analítica (CCDA), utilizando cromatoplasmas da SILICYCLE de dimensões 20x20 cm, espessura 0,2 mm e indicador F-254. Foram utilizados solventes orgânicos (hexano, diclorometano, acetato de etila e metanol) para eluição das cromatoplasmas em cubas de variadas dimensões. A visualização das substâncias aplicadas nas cromatoplasmas foi feita por exposição da mesma à lâmpada de irradiação ultravioleta, sob comprimento de onda 254 e 366 nm aparelho BOITTON (modelo BOIT-LUB01).

4.3. Métodos espectroscópicos

4.3.1. Espectroscopia no Infravermelho (IV)

Os dados espectrais na região do infravermelho (4000 a 400 cm^{-1}) foram obtidos em aparelho de espectrômetro de infravermelho Rayleigh WQF-510A FT-IR do Instituto de Pesquisa em Fármacos e Medicamentos (IPeFARM) da Universidade Federal da Paraíba -

UFPB, utilizando-se de 1 a 3 mg de amostra em pastilhas de brometo de potássio (KBr), com número de onda medido em cm^{-1} .

4.3.2. Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

Os espectros de RMN, uni e bidimensionais, foram registrados nos espectrômetros da Varian system operando a 500 MHz (RMN ^1H) e 125 MHz (RMN ^{13}C) e no aparelho da Bruker Ascend operando a 400 MHz (RMN ^1H) e 100 MHz (RMN ^{13}C) do Laboratório Multiusuário de Caracterização e Análise (LMCA) da UFPB. O solvente empregado para a dissolução das amostras foi o clorofórmio deuterado (CDCl_3), cujos pico característico do solvente em RMN ^1H (7,24 ppm) e ^{13}C (77,00 ppm) serviu como padrão interno durante a obtenção dos espectros.

Os deslocamentos químicos (δ) foram expressos em partes por milhão (ppm) e as constantes de acoplamento (J) em Hz. As multiplicidades dos deslocamentos químicos de RMN de ^1H foram indicadas segundo as convenções: *s* (simpleto), *sl* (simpleto largo), *d* (duplete), *t* (triplete) e *m* (multiplete).

Os espectros de RMN de ^{13}C obtidos pela técnica *Broad Band (BB)* e *Attached Proton Test (APT)* que teve como base a seguinte convenção: os sinais de carbonos não hidrogenados (C) e metilênicos (CH_2) acima da linha base e sinais de carbonos metínicos (CH) e metílicos (CH_3) abaixo da linha base.

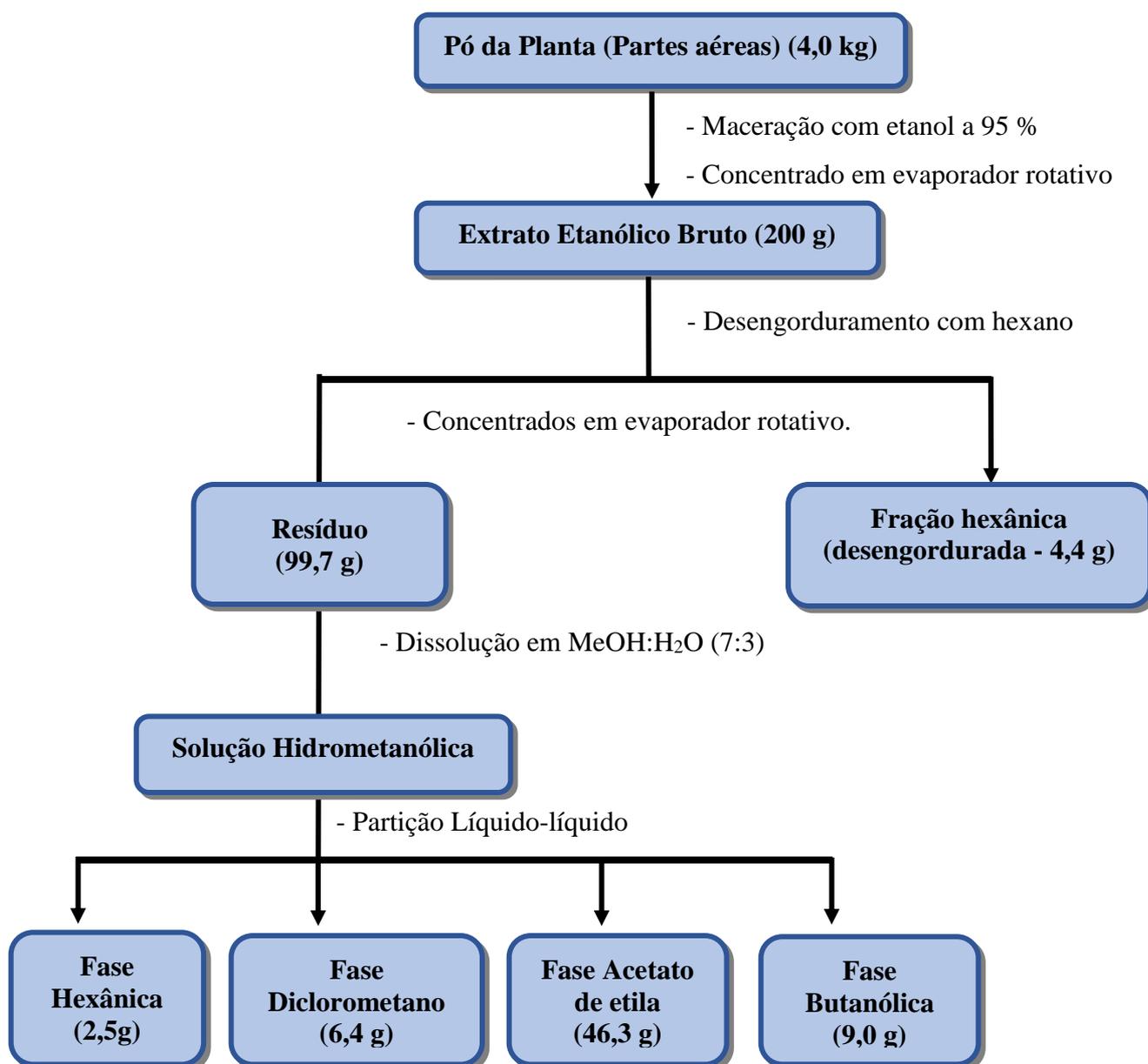
4.4. Obtenção do extrato etanólico bruto e seu particionamento

O material botânico foi seco em estufa com ar circulante, utilizando temperatura média de 45 °C durante 72 horas. Quando seco, o material foi submetido a um processo de trituração em moinho mecânico, obtendo-se 4,0 Kg do pó da planta. Em seguida, este pó foi submetido à maceração com etanol (EtOH) a 95 % em recipiente de aço inoxidável, por 72 horas. A solução hidroalcoólica obtida foi concentrada em evaporador rotativo sob pressão reduzida a uma temperatura de 40 °C sendo obtido 404,0 g de extrato etanólico bruto (EEB) (Esquema 4).

Uma alíquota deste extrato (200,0 g) foi previamente solubilizada com hexano, para retirar os constituintes apolares, mantida sob agitação mecânica no aparelho da ethiktechnology (Modelo M110-VER-4K3) durante 60 minutos para a obtenção de uma fração hexânica desengordurada (4,4 g). A parte que não foi solubilizada com o hexano foi dissolvido em uma solução MeOH:H₂O (7:3) obtendo-se uma solução hidrometanólica, que por sua vez foi submetida a um processo de partição líquido-líquido em ampola de separação com os solventes hexano, clorofórmio, acetato de etila e n - butanol. As soluções obtidas foram tratadas com

sulfato de sódio anidro (NaSO_4) e submetidas à filtração sob pressão reduzida. Após esse processo, as soluções resultantes desse foram concentradas em evaporador rotativo a $45\text{ }^\circ\text{C}$, obtendo-se 8,4 g da fase hexânica, 6,9 g da fase clorofórmica, 46,3 g da fase acetato de etila e 9,0 g da fase n- butanólica (Esquema 4).

Esquema 4. Obtenção e partição líquido-líquido do extrato etanólico bruto das partes aéreas de *M. erythroxylon*.



4.5. Isolamento e purificação dos constituintes químicos

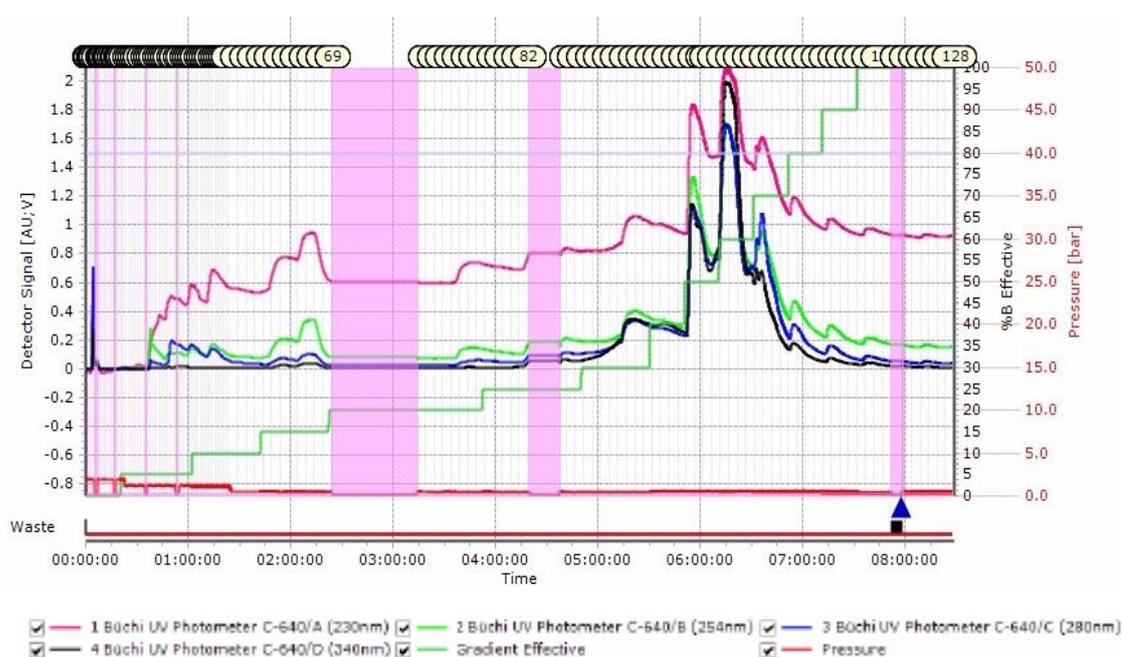
4.5.1. Processamento cromatográfico da fração hexânica desengordurada

A fração hexânica (4,4 g) foi submetida a cromatografia líquida a média pressão utilizando o aparelho de sistema binário de separação flash da Büchi, equipado com dois módulos de bombas (C-605) programadas com a pressão máxima de 40 Bar com um fluxo de 10 mL/min, módulo controlador (C-620), coletor de fração (C-660) e um detector de espectrofotômetro na região de ultravioleta utilizando os comprimentos de onda fixos 230, 240, 254 e 340 nm. Para o empacotamento da coluna foi utilizado como fase estacionária sílica gel com tamanho de partícula 0,04-0,063 mm e como fases móveis hexano (Hex), acetato de etila (AcOEt) e de metanol (MeOH) puros ou em misturas binárias em ordem crescente de polaridade (Tabela 2). Desta coluna cromatográfica foram coletadas 128 frações de 50 mL cada, que foram reunidas em 40 frações de acordo com os seus perfis de separação no cromatograma (Figura 5). Na tabela 2 apresenta o processamento cromatográfico, em que é observado o tempo decorrido em cada gradiente de concentração, os sistemas de eluição, a quantidade de frações obtidas em cada sistema e suas reuniões.

A reunião das frações de 27-29 resultando na subfração nove, apresentou um precipitado na forma de cristais incolores e quando analisadas em CCDA foi observado uma única mancha, sendo então codificada como **Me-1** (22,0 mg). A fração 36 e a reunião da 37 - 38 resultaram no grupo de subfrações 12 e 13 respectivamente, que após a análise em CCDA apresentaram uma única mancha com os mesmos fatores de retenção, ambas frações foram isoladas como precipitado na forma de cristais em formato de agulha, sendo codificada como **Me-2** (30,0 mg). A subfração 14 apresentou um precipitado com o aspecto de um sólido amorfo amarelado sendo visualizada nas cromatoplasmas de CCDA como uma mancha única que foi codificada como **Me-3** (40,0 mg) (Esquema 5). Todas as substâncias acima codificadas tiveram suas estruturas químicas identificadas através dos espectros de RMN ^1H e ^{13}C .

Tabela 2. Fracionamento cromatográfico do extrato hexânico de *Maytenus erythroxylon*.

Tempo (Minutos)	Polaridade (Porcentagem)	Frações	Reuniões
1 – 20	100% Hexano	1-3	1
20 – 40	95: 5 Hexano: Acetato de etila	4-5	2
40 – 80	90: 10 Hexano: Acetato de etila	6-26	6-13(3); 14-19(4); 20-23(5); 24(6); 25(7); 26(8)
80 – 120	85: 15 Hexano: Acetato de etila	27-38	27-29(9); 30-31(10); 32-35(11); 36-37(12); 38(13)
120 – 180	80: 20 Hexano: Acetato de etila	39-43	39(14); 40(15); 41(16); 42- 43(17)
180 – 220	75: 25 Hexano: Acetato de etila	44-51	44-47(18); 48-49(19); 50-51(20) 52(21); 53(22); 54(23); 55- 58(24); 59-63(25)
220 – 260	70: 30 Hexano: Acetato de etila	52-63	
260 – 280	60: 40 Hexano: Acetato de etila	64	26
280 – 300	50: 50 Hexano: Acetato de etila	65-67	27
300 – 320	40: 60 Hexano: Acetato de etila	68-72	28
320 – 340	30: 70 Hexano: Acetato de etila	73-76	29
340 – 360	20: 80 Hexano: Acetato de etila	77-80	30
360 – 380	10: 90 Hexano: Acetato de etila	81-88	81-84(31) e 85-88(32)
380 – 400	100 Acetato de etila	89-92	33
400 – 430	90: 10 Acetato de etila: Metanol	93-99	34
430 – 460	80: 20 Acetato de etila: Metanol	100-113	100-103(35); 104-106(36); 107- 113(37)
460- 490	70: 30 Acetato de etila: Metanol	114-119	38
490 – 520	50: 50 Acetato de etila: Metanol	120-128	120-121(39); 122-128(40)

Figura 5. Cromatograma da CLMP da fração hexânica de *Maytenus erythroxylon*

A reunião das frações 48 e 49 resultaram no grupo de subfrações 19 (10 mg) que foi submetida a uma cromatografia em coluna resultando em 24 frações de 20 mL cada (Tabela 3). A fração 19.5 foi isolada na forma de um óleo amarelado que após análise em CCDA mostrou-se como uma mancha única, sendo posteriormente submetida a RMN de ^1H e ^{13}C e codificada como **Me-4** (Esquema 5). Para esta cromatográfica foram utilizados como fase móvel hexano e acetato de etila puro ou em misturas binárias em ordem crescente de polaridade e como fase estacionária sílica gel flash.

As subfrações 21, 22 e 23 passaram por uma análise em CCDA apresentando uma única mancha e foram reunidas por apresentarem o mesmo fator de retenção. Em seguida as frações reunidas, 21-23, foram submetidas a uma CC utilizando como fase estacionária sílica gel flash e como fase móvel hexano e acetato de etila puro ou em misturas binárias, resultando em 19 subfrações de 20 mL (Tabela 4). Na fração 21-23.12 (24,2 mg) foi observada a presença de um óleo amarelado que após análise por CCDA foi evidenciado uma única mancha sendo assim encaminhada para a realização das análises espectroscópicas de RMN ^1H e ^{13}C para a sua determinação estrutural, sendo codificada como **Me-5** (Esquema 5).

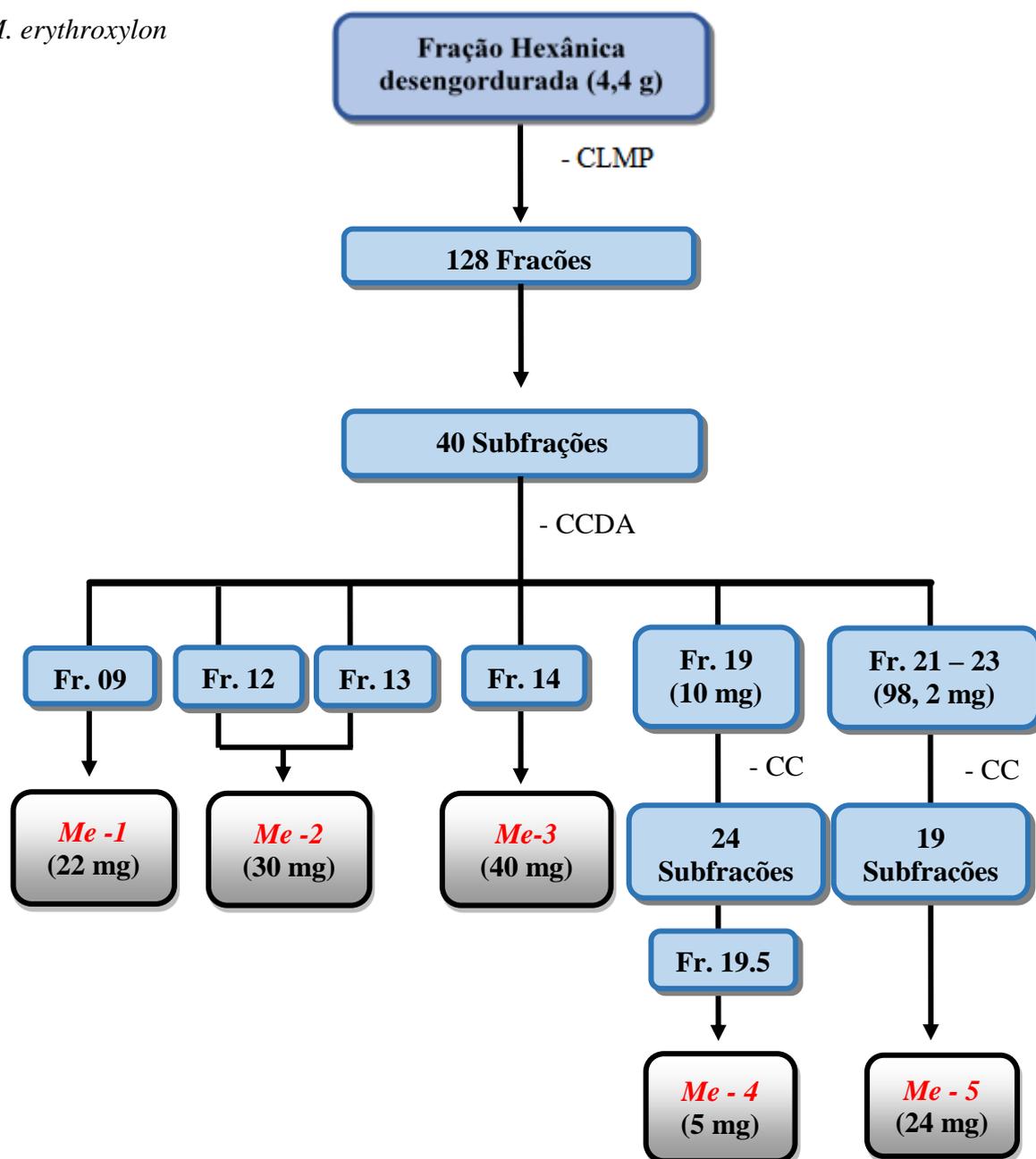
Tabela 3. Processamento cromatográfico da subfração 19 da fração hexânica desengordurada de *M. erythroxylo*n.

Sistema de eluição	Frações coletadas	Frações reunidas
Hexano	1-4	1-2; 3-4
Hex:AcOEt (95:5)	5-10	5 ; 6-8; 9-10
Hex:AcOEt (93:7)	11-17	11-14; 15-17
Hex:AcOEt (90:10)	18	18
Hex:AcOEt (87:13)	19-20	19-20
Hex:AcOEt (85:15)	21-22	21-22
Hex:AcOEt (80:20)	23	23
Hex:AcOEt (70:30)	24	24

Tabela 4. Processamento cromatográfico da subfração 21-23 da fração hexânica desengordurada de *M. erythroxylo*n.

Sistema de eluição	Frações coletadas	Frações reunidas
Hexano	1	1
Hex:AcOEt (95:5)	2-3	2-3
Hex:AcOEt (93:7)	4-8	4-6; 7-8
Hex:AcOEt (90:10)	9-13	9-11; 12
Hex:AcOEt (85:15)	14-15	13-15
Hex:AcOEt (80:20)	16	16
Hex:AcOEt (70:30)	17	17
Hex:AcOEt (50:50)	18	18
Acetato de etila	19	19

Esquema 5 – Processamento da fração hexânica desengordurada do extrato etanólico bruto de *M. erythroxylon*



4.6 Química computacional

4.6.1 Banco de dados

A partir do ChEMBL database, foi selecionado quatro conjuntos de estruturas químicas com atividade conhecida para os microrganismos *Candida albicans*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Salmonella* sp., para a construção de modelos preditivos. Os detalhes de cada conjunto estão descritos da tabela 1. Os compostos foram classificados a partir

da $pMIC_{50}$ ($-\log MIC_{50}$ (mol/l)), ressaltando que a MIC_{50} representa a concentração mínima necessária para uma inibição de 50% dos microrganismos estudados.

Um outro banco de dados de moléculas isoladas da espécie *Maytenus erythroxylon* foi construído a partir do estudo fitoquímico dessa espécie, com um total de cinco triterpenos.

Para todas as estruturas foram utilizados códigos SMILES como dados de entrada para o Marvin 14.9.1.0, 2014, ChemAxon (<http://www.chemaxon.com>). Usou-se ainda o software Standardizer [JChem 14.9.1.0, 2014; ChemAxon (<http://www.chemaxon.com>)] o qual converte as diversas estruturas químicas em representações canônicas personalizadas. Esta padronização é de suma importância para criar bibliotecas de compostos consistentes, além de obter as estruturas em formas canônicas, adicionar hidrogênios, aromatizar, gerar o 3D e salvar os compostos em formato SDF.

4.6.2 Descritores Volsurf

Foi utilizado descritores moleculares para prever propriedades biológicas e físico-químicas das moléculas dos dois bancos de dados. O cálculo dos descritores é gerado quando as moléculas são transformadas em uma representação molecular que permite o tratamento matemático.

O software Volsurf+ v.1.0.7 (CRUCIANI et al., 2000) tem a capacidade de calcular 128 descritores moleculares, utilizando campos de interação molecular (MIFs) através de sondas de N1 (amido nitrogênio-hidrogênio doador de ligação de hidrogênio), O (aceptor de ligação de hidrogênio), OH (água) e DRY (sonda hidrofóbica) e também cálculo de descritores não derivados de MIFs.

4.6.3 Modelo de Predição

O software Knime 3.5 (Knime 3.5.3 the Konstanz Information Miner Copyright, 2003-2017, www.knime.org) foi utilizado para realizar as análises e gerar o modelo *in silico*. Os bancos de moléculas com os descritores calculados foram importados do software Dragon, e para cada um, os dados foram divididos utilizando uma ferramenta “*Partitioning*” com a opção de “Amostra estratificada”, separando em Treino e Teste, representando 80% e 20% de todos os compostos, respectivamente, onde foram selecionados aleatoriamente, mas mantendo a mesma proporção de substâncias ativas e inativas, em ambos os bancos de dados.

Para a validação interna fez-se uso da validação cruzada, onde foram separados 10 grupos estratificados, selecionados aleatoriamente, mas distribuídos de acordo com a variável da atividade em todos os grupos de validação. Com os descritores selecionados, o modelo foi gerado usando o conjunto de treinamento utilizando o “*Random Forest*” (RF) que é um algoritmo para construção de árvores de decisão (SALZBERG, 1994), empregado no WEKA (HALL et al., 2009). Os parâmetros selecionados para RF para todos os modelos gerados foram de 100 o número total de árvores para construir e de 1 semente (seed) na geração de números aleatórios para o modelo.

As performances dos testes internos e externos dos modelos foram analisadas quanto a sensibilidade (taxa de verdadeiros positivos, ou seja, a taxa ativa), especificidade (verdadeira taxa de negativos, ou seja, a taxa de inativos) e precisão (previsibilidade geral). Além disso, a sensibilidade e especificidade da curva “*Receiver Operating Characteristic*” (ROC), foi utilizada para descrever o verdadeiro desempenho do modelo, com mais clareza do que precisão.

O modelo foi analisado também pelo coeficiente de Matthews, uma maneira de avaliar de modo global o modelo a partir dos resultados obtidos da matriz de confusão. O MCC (Matthews correlation coefficient) é, em essência, um coeficiente de correlação entre as classificações binárias observadas e preditivas. Dele resulta um valor entre -1 e +1, onde um coeficiente de +1 representa uma previsão perfeita, o 0 nada mais que uma previsão aleatória e o -1 indica total desacordo entre previsão e observação (MATHEWS, 1975).

O coeficiente de correlação de Matthews pode ser calculado a partir da seguinte fórmula:

$$MCC = \frac{VP \times VN - FP \times FN}{\sqrt{(VP + FP)(VP + FN)(VN + FP)(VN + FN)}}$$

Onde VP é o valor de verdadeiros positivos, VN o valor de verdadeiros negativos, FP o valor de falsos positivos e FN de falsos negativos.

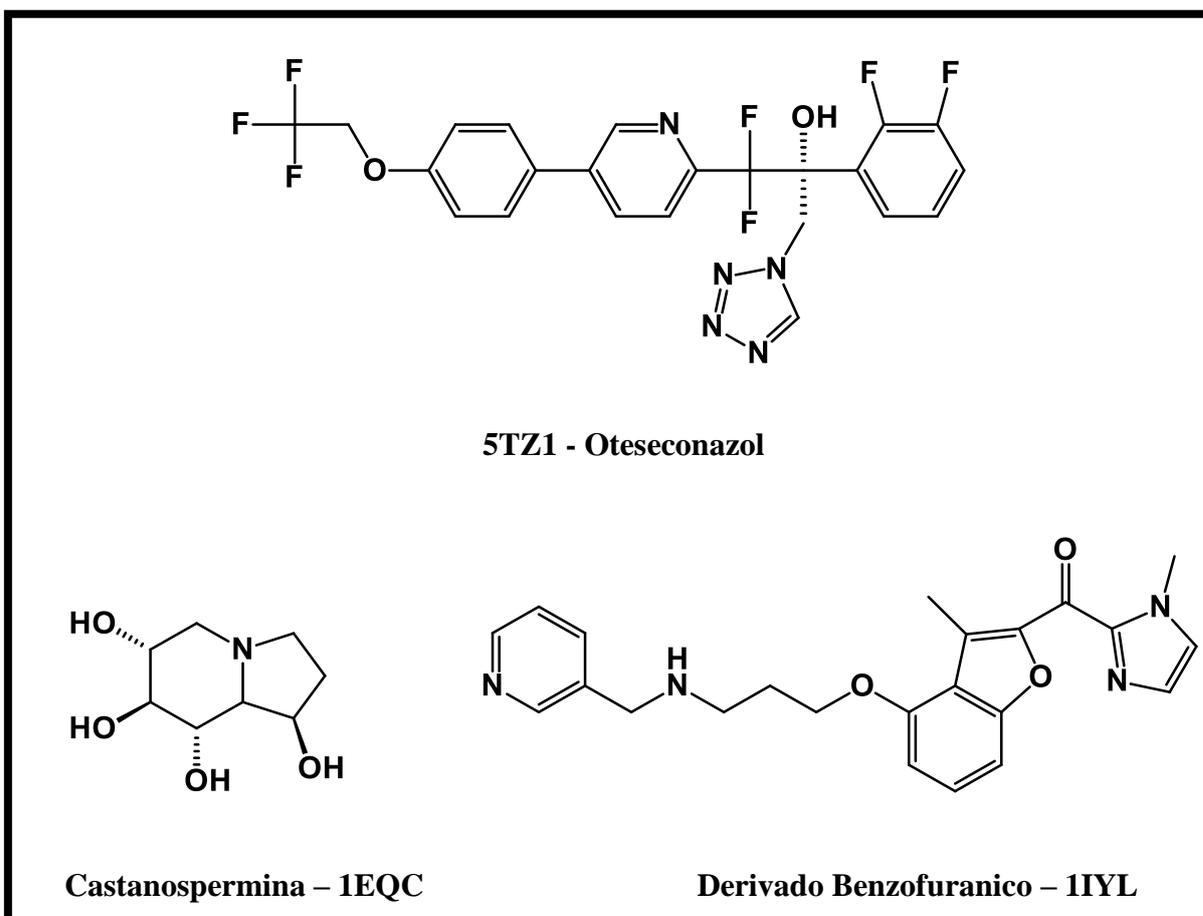
Foi utilizado ainda o domínio de aplicabilidade baseado nas distâncias euclidianas afim de sinalizar compostos no conjunto teste para os quais as previsões podem ser não confiáveis. São utilizadas medições de similaridade para definir o domínio de aplicabilidade do modelo com base nas distancias euclidianas entre todos os compostos de treinamento, teste e da triagem virtual. A distância de um composto de um composto teste ao seu vizinho mais próximo no conjunto de treinamento é comparada com o limite de domínio de aplicabilidade predefinido, se a similaridade estiver além desse limite, a previsão é considerada não confiável (ZHANG et al., 2006).

4.7 Docking molecular

4.7.1 Obtenção das enzimas bacterianas e fúngicas complexadas com seus ligantes

Para a realização do *docking* molecular foram selecionadas três enzimas fúngicas que estão localizadas na parede celular (exo-beta-(1,3)-glucanase), membrana celular (14 α -lanosterol-dimetilase) do fungo leveduriforme *Candida albicans*, a outra enzima foi a N-Myristoyltransferase que atua na viabilidade celular do fungo, sendo um alvo potencial para novos fármacos. Todas as enzimas foram obtidas do *Protein Data Bank* (PDB, disponível em www.pdb.org) com códigos de acessos e suas respectivas resoluções, 5TZ1 (14 α -lanosterol-dimetilase, R= 2 Å, Ligante: Oteseconazol, 1EQC (exo- β -(1,3)-glucanase, R= 1,85 Å, Ligante: Castanospermina) e 1IYL (N-Myristoyltransferase, R= 3,2 Å, Ligante: 1-metil-1h-imidazol-2-il)-(3-metil-4-{3-[(piridin-3-il-metil)-amino]-propoxi} benzofuran-2-il)-metanona (Figura 6).

Figura 6. Estruturas dos ligantes complexadas com as enzimas



4.7.2 Docking das enzimas fúngicas complexadas com os triterpenos

As análises de *docking* foram realizadas no laboratório de quimioinformática da Universidade Federal da Paraíba – UFPB, os programas computacionais foram disponibilizados pelo professor Marcus Tullius Scotti. Os triterpenos usados para a realização do *docking* foram os triterpenos obtidos do isolamento de *Maytenus erythroxylon*. As estruturas dos triterpenos foram desenhadas no *software* MarvinSketch64, para a minimização das suas energias das moléculas foi utilizado o *Hyperchem* 8.0 utilizando método Mecânica Molecular (MM+) e pelo método semi-empírico AM1 (DEWAR et al, 1985).

Para a realização do *docking*, os dados obtidos do PDB e das substâncias com suas energias minimizadas foram inseridos no *software* Molegro virtual Docker (MVD) versão 2013.6.0.1 (MOTOHASHI et al., 2013). MVD é um programa que realiza cálculos das interações entre ligantes e macromoléculas, que de acordo com Thomsen e Christensen (2006) seu algoritmo o MolDock score é baseado nas combinações dos algoritmos de evolução diferencial com um algoritmo de previsão de cavidades, sendo a energia de pontuação E_{score} resultado das somas da interação energética entre ligante-proteína (E_{inter}) e da energia interna do ligante (E_{intra}). Esses autores também mostraram que o MVD por possuir esses algoritmos apresenta uma precisão maior na predição dos resultados do que outros softwares que realizam *docking* molecular.

Os estudos de *docking* dos ligantes cristalográficos e dos triterpenos isolados com as enzimas selecionadas foram realizados sob os mesmos parâmetros: função de pontuação: MolDock Score; avaliação do ligante: internal ES, H-bond internal, Sp2-Sp2 torsions, número de execuções: 10; algoritmo: MolDock SE; interações máximas: 1500; tamanho máximo da população: 50; máximos de passos: 300; fator de vizinhança: 1.00; número máximo de conformações: 5. Para as enzimas identificadas como 5TZ1, 1EQC e 1IYL foram criados um *template* com o ligante do PDB.

4.7.3 Validação da metodologia do *docking* molecular

Para garantir um ancoramento preciso e uma MolDock *score* válido, foi realizado o *redocking* para a validação das análises realizadas no *docking*, para isso é usado como base os valores obtidos da Raiz do Desvio Quadrático Médio (RMSD) que todos os seus valores devem ser menores que 2,0 Å para se obter uma metodologia comprovadamente validada (THOMSEN; CHRISTENSEN, 2006; KAUSHIK, 2014).

4.8 Estudo da atividade antibacteriana e antifúngica das frações e fases de *Maytenus erythroxylo*

4.8.1 Local de trabalho

Os ensaios laboratoriais referentes a este estudo foram realizados no Laboratório de Pesquisa: Atividade Antibacteriana e Antifúngica de Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos do Departamento de Ciências Farmacêuticas/Centro de Ciências da Saúde/Universidade Federal da Paraíba: Maio/2018.

4.8.2 Produtos testados

Os produtos utilizados para a avaliação da atividade antimicrobiana sobre cepas bacterianas e fúngicas foram as substâncias isoladas obtidas de *Maytenus erythroxylo* identificadas como: **Me-1; Me-2; Me-3; Me-4 e Me-5**; e as fases em Hexano (A), Clorofórmio (B), Acetato de Etila (C) e Butanol (D). Os produtos foram pesados e devidamente solubilizados em 250 µL (5%) de dimetil-sulfóxido (DMSO) e adicionados 100 µL (2%) de tween 80, completando-se o volume final com água destilada esterilizada q.s.p. 5 mL. Dessa forma, foi obtida a concentração inicial dos produtos de 1024 µg/mL e diluído em série até 128 µg/mL (CLEELAND; SQUIRES, 1991; NASCIMENTO et al., 2007; PEREIRA et al., 2014).

4.8.3 Meios de cultura

Os meios de cultura utilizados nos ensaios para avaliação da atividade biológica foram Brain Heart Infusion (BHI), Agar Sabouraud Dextrose (ASD)- adquiridos da Difco Laboratories Ltd, USA, France, para manutenção, respectivamente, das cepas de bactérias e fungos. E para os ensaios de atividade biológica, foram usados caldo Brain Heart Infusion (BHI) para as bactérias e meio RPMI 1640 com L-glutamina e sem bicarbonato para os fungos (Difco Laboratories Ltd, USA, France e INLAB, São Paulo, Brasil). Todos os meios foram preparados conforme as descrições dos fabricantes.

4.8.4 Micro-organismos

Para os ensaios de atividade biológica dos produtos testes, foram utilizadas as seguintes cepas:

- **Bactérias:** *Salmonella enteritidis* ATCC-6017, *Salmonella enteritidis* LM-13, *Escherichia coli* ATCC-18739, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC-9027;

- **Fungos Leveduriformes:** *Candida albicans* ATCC-60193, *Candida tropicalis* ATCC-13803;

Os micro-organismos pertencem a MICOTECA do Laboratório de Micologia, Departamento de Ciências Farmacêuticas (DCF), Centro de Ciências da Saúde (CCS) da Universidade Federal da Paraíba (UFPB). As cepas foram mantidas em BHI/bactérias e em ASD/fungos à temperatura de 4°C. Foram utilizados para os ensaios, repiques de 24 - 48 horas em BHI/ASD, respectivamente, para bactérias e leveduras, incubados a $35 \pm 2^\circ\text{C}$ e repiques de 7 - 14 dias em ASD para fungos filamentosos, incubados a $28 \pm 2^\circ\text{C}$.

4.8.5 Inóculo

Para preparação do inóculo, as colônias obtidas de culturas das cepas de bactérias em meio BHI e fungos em meio ASD, foram suspensas em solução fisiológica a 0,9% estéril e ajustadas de acordo com o tubo 0,5 da escala padrão de Mc Farland para obtenção de 10^6 UFC/mL (CLSI, 2008; NCCLS, 2000; HADACECK; GREEGER, 2000; CLEELAND; SQUIRES 1991; ANTUNES et al., 2006; FREIRE et al., 2014).

4.8.6. Concentração inibitória mínima (CIM)

Os ensaios de atividade antimicrobiana foram realizados conforme os protocolos de Cleeland; Squires (1991), Eloff (1998) e CLSI (2008). A determinação da CIM das substâncias sobre cepas bacterianas e fúngicas foram realizadas através da técnica de microdiluição em caldo em placa para cultura de células (TPP/ SWITZERLAND/EUROPA) contendo 96 poços com fundo em "U". Inicialmente, foram distribuídos 100 µL de caldo RPMI duplamente concentrado nos poços das placas de microdiluição. Em seguida, 100 µL das amostras foram dispensados nas cavidades da primeira linha da placa. E por meio de uma diluição seriada a uma razão de dois, foram obtidas concentrações de 1024 µg/mL até 128 µg/mL. Por fim, foi

adicionado 10 μL das suspensões das cepas bacterianas e fúngicas nas cavidades, onde cada coluna da placa refere-se, especificamente, a uma espécie. Paralelamente, foram realizados os controles: micro-organismos (CBHI + bactérias e RPMI + leveduras ou fungo filamentosos), para comprovação da viabilidade das cepas, meio de cultura (RPMI/CBHI), para comprovação da esterilidade do meio e controle negativo com antibióticos: Gentamicina (64 $\mu\text{g}/\text{mL}$) para inibição das bactérias e Anfotericina B (32 $\mu\text{g}/\text{mL}$) para inibição dos fungos. As placas preparadas foram assepticamente fechadas e submetidas à incubação numa temperatura de $35 \pm 2^\circ\text{C}$ por 24 - 48 horas para os ensaios com bactérias e leveduras, já os fungos filamentosos foram incubados a temperatura de $28 \pm 2^\circ\text{C}$ por 7 dias.

No caso do ensaio biológico com as bactérias, após 24 h de incubação, foi adicionado 20 μL de solução do corante resazurina a 0,01 % (INLAB), reconhecido como um indicador colorimétrico de óxido-redução (MANN; MARKAN, 1998). O ensaio foi incubado a $35 \pm 2^\circ\text{C}$ por 24 - 48 h. Após a mudança de coloração do corante (azul para vermelho), considerou-se como indicador de crescimento microbiano; e se a cor permanece azul, significa a ausência de crescimento microbiano. A CIM para cada produto foi definida como a menor concentração capaz de inibir visualmente o crescimento microbiano e/ou verificado pela permanência da coloração do corante indicador.

A atividade antimicrobiana dos produtos foi interpretada e considerada como ativa ou inativa, conforme os seguintes critérios: até 600 $\mu\text{g}/\text{mL}$ = forte atividade; 600-1500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ = moderada atividade; > acima de 1500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ =fraca atividade ou produto inativo (HOLETZ et al., 2002; SARTORATTO et al., 2004; HOUGHTON et al., 2007).

Resultados e Discussão

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Identificação estrutural dos constituintes químicos isolados de *M. erythroxylon*

5.1.1 Identificação estrutural de Me-1

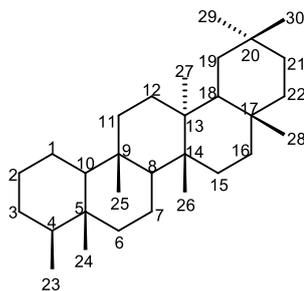
A substância codificada como Me-1 foi isolada na forma de cristais em forma de agulha, solúveis em clorofórmio, pesando 22,2 mg, representando 0,005 % do extrato etanólico bruto.

No espectro de infravermelho obtidos em pastilhas de KBr, foi observado uma banda larga com absorção em 3490 cm^{-1} característico de estiramento de um grupo hidroxila (- OH), outra absorção observada em 1070 cm^{-1} característico de dobramento C-O que confirma a presença de uma hidroxila secundária. Foi também visualizado uma banda larga em 2933 cm^{-1} de estiramento C-H sp^3 e duas absorções em 1451 e 1380 cm^{-1} característicos de grupos metilênicos e metílicos de carbonos sp^3 , respectivamente (Figura 9) (SILVERSTEIN et al., 2007; PAVIA et al., 2010).

Na análise realizada do espectro de RMN de ^1H foi possível observar um envelope de sinais entre δ_{H} 0,84-1,15 ppm característicos de hidrocarbonetos saturados (Figura 10), nesta região foram observados sete sinpletos com integração para três hidrogênios cada e um duplete com integração para seis hidrogênios sendo sinais característicos de metilas, com a presença desses oito sinais com esse padrão de deslocamentos químicos δ_{H} 0,91; 0,97; 0,84; 0,92; 0,99; 1,15; 0,94; 0,98 (Figura 11). É possível sugerir que M-1 apresenta um esqueleto característicos de triterpeno pentacíclico do tipo friedelano (Figura 7) (ESTEVAM et al., 2005). Este espectro, também revelou um multiplete com deslocamento químico δ_{H} 3,71 ppm característico de hidrogênio metínico situado na posição alfa a uma hidroxila tornando este hidrogênio carbinólico desprotegido (Figura 12).

No espectro de RMN de ^{13}C foram observados 30 sinais sendo oito sinais atribuídos a carbonos metílicos, onze sinais atribuídos a carbonos metilênicos, cinco sinais atribuídos a carbonos metínicos e seis sinais atribuídos a carbonos não hidrogenados (Figura 13 e 14). A presença dos deslocamentos químicos δ_{C} 49,18; 53,20; 61,36; 42,84 foram atribuídos aos carbonos metínicos C-4, C-8, C-10 e C-18, respectivamente e confirmando através de dados da literatura que Me-1, trata-se de um triterpeno do tipo friedelano, corroborando assim com a proposta observada no espectro de RMN ^1H (Figura 7) (ALMEIDA, 2011; SALAZAR, 2000).

Figura 7. Esqueleto triterpênico pentacíclico do tipo friedelano



No espectro bidimensional de HMBC, foi observado os mapas de contorno da correlação entre H-25 com C-9, confirmando a inserção da metila CH₃-25 em C-9 e não em C-10 que acontece na maioria dos triterpenos pentacíclicos. Diante disto e juntamente com os dados de RMN ¹H e ¹³C pode confirmar que Me-1 possui um esqueleto triterpenico do tipo friedelano (SEEBACHER et al., 2003). Outra correlação observada neste espectro foram os mapas de contorno entre δ_H 3,72 (H-3) com C-1, C-5, C-23 em δ_C 15,80; 38,38; 11,61, respectivamente (Figura 15). Com esses dados e em comparação com dados da literatura foi possível sugerir que a OH está inserida em C-3 (SALAZAR, 2000). Os demais sinais de ¹H e ¹³C são apresentados na tabela 5.

Com os dados apresentados de ¹H, ¹³C e HMBC e em comparação com a literatura foi possível identificar Me-1 como sendo o 3β-hidroxi-friedelano ou 3β-Friedelanol, substância encontrada em outras espécies do gênero *Maytenus*, sendo utilizado para o controle de qualidade de espécies do gênero *Maytenus* (Figura 8) (VALLADÃO et al.,2009) podendo então, sugerir que este metabólito secundário é um possível marcador deste gênero (NIERO; ANDRADE; CECHINEL-FILHO, 2011). Estudos mostram que o 3β-friedelanol, apresenta atividade antimicrobiana e antiviral (SHAMIM; AHMED; FATIMA, 2018; TOMOKOU et al., 2009). Sendo este relatado pela primeira vez na espécie *Maytenus erythroxylo*.

Figura 8. 3β-Hidroxifriedelano ou 3β-friedelanol isolado de *Maytenus erythroxylo*.

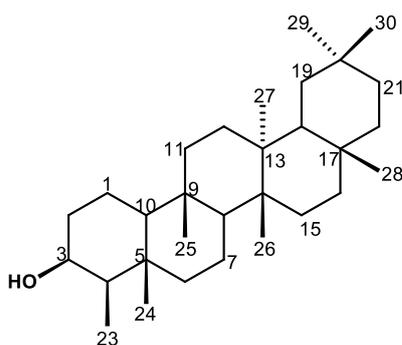


Tabela 5. Comparação dos dados de RMN de ^1H e ^{13}C da substância **Me-1** em CDCl_3 com valores da literatura (Almeida, 2011) (δ em ppm e J em Hz).

Me – 1 (CDCl_3)			Almeida, 2011			
C	δC	δH	$^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ HMBC		δC	δH
			2J	3J		
5	38,38			H-3	38,1	
9	37,11			H-25	37,4	
13	37,84				38,6	
14	39,68				39,9	
17	30,03			H-28	30,0	
20	28,17				28,2	
CH						
3	72,76	3,71 (<i>m</i>)		H-23	72,9	3,73 (<i>m</i>)
4	49,18		H-23	H-24	49,4	
8	53,20			H-25	53,4	
10	61,36			H-24	61,6	
				H-25		
18	42,84	1,55 (<i>m</i>)		H-28	43,1	1,57(<i>m</i>)
CH₂						
1	15,80	1,46 (<i>m</i>)		H-3	15,8	1,43 (<i>m</i>)
2	36,09	1,87 (<i>m</i> , H-2a)			36,3	1,9(<i>dt</i> , H-2a)
		1,53 (<i>m</i> , H-2b)				1,5(<i>m</i> , H-2b)
6	41,74	1,71(<i>m</i> , H-6a)		H-24	41,9	1,74 (<i>dt</i> , H-6a)
		1,51(<i>m</i> , H-6b)				1,45 (<i>m</i> , H-6b)
7	17,55				17,6	
11	35,57				35,6	
12	30,64				30,6	
15	32,34				32,3	
16	35,34				35,8	
19	35,19				35,4	
21	32,83				32,8	
22	39,28	0,89 (<i>m</i>)		H-25	39,5	0,91 (<i>m</i>)
CH₃						
23	11,61	0,91(<i>s</i>)		H-3	11,6	0,93 (<i>d</i> ; $J = 7.3$)
24	16,39	0,97(<i>s</i>)			16,4	0,97 (<i>s</i>)
25	18,24	0,84 (<i>s</i>)			18,2	0,86 (<i>s</i>)
26	20,11	0,92(<i>s</i>)			20,1	0,99 (<i>s</i>)
27	18,64	0,99(<i>s</i>)			18,6	1,01 (<i>s</i>)
28	32,09	1,15 (<i>s</i>)			32,1	1,17 (<i>s</i>)
29	35,02	0,94(<i>s</i>)			35,2	0,95 (<i>s</i>)
30	31,79	0,98(<i>s</i>)			31,8	1,00 (<i>s</i>)

Figura 9. Espectro no Infravermelho (KBr, cm^{-1}) de **Me-1**.

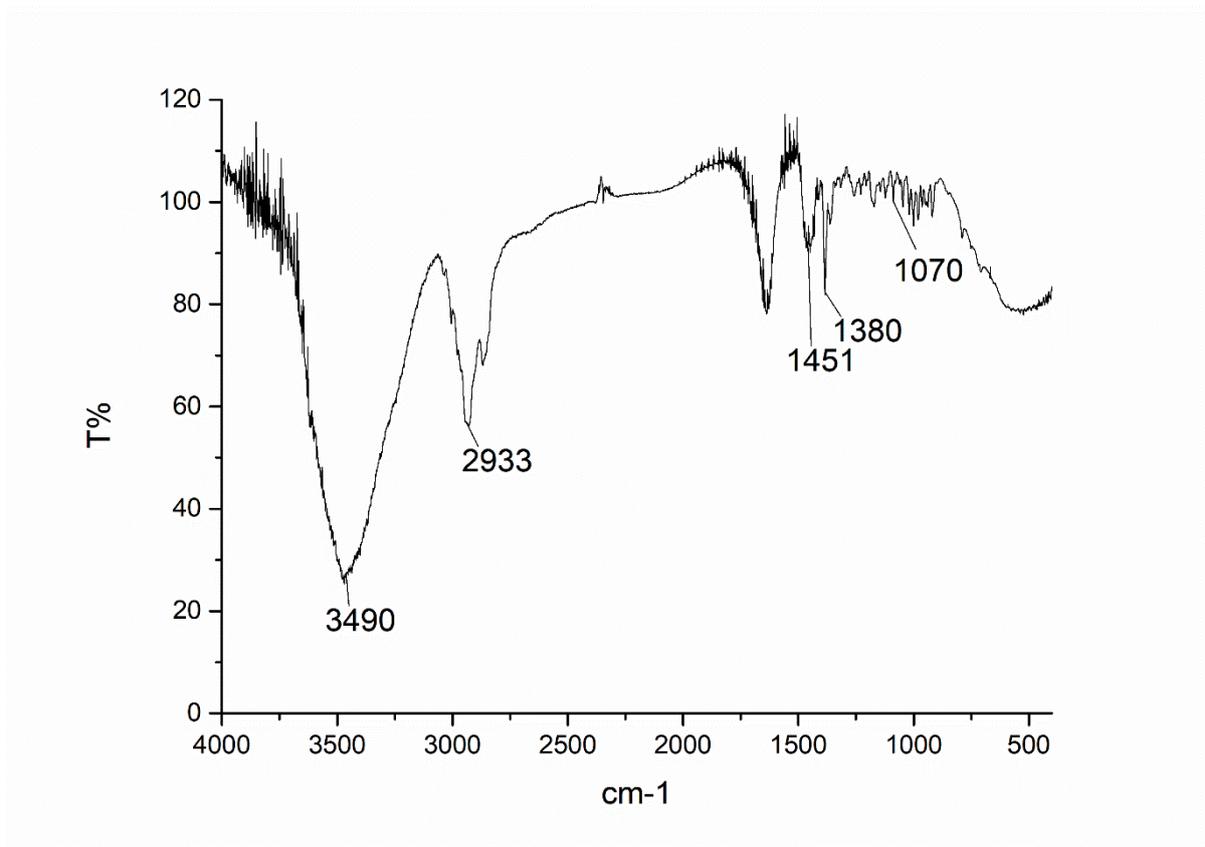


Figura 10. Espectro de Ressonância Magnética Nuclear de ^1H de **Me-1** (CDCl_3 , 500 MHz).

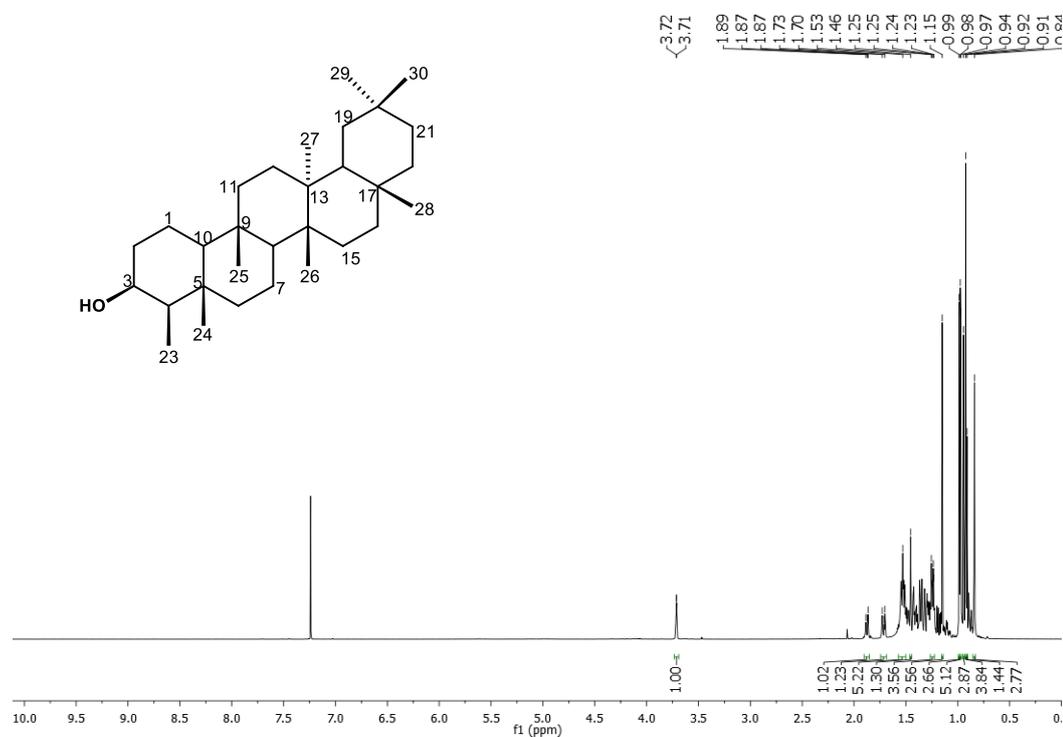


Figura 11. Expansão do espectro de RMN de ^1H de Me-1 na região de 0,83-1,19 ppm (CDCl_3 , 500 MHz).

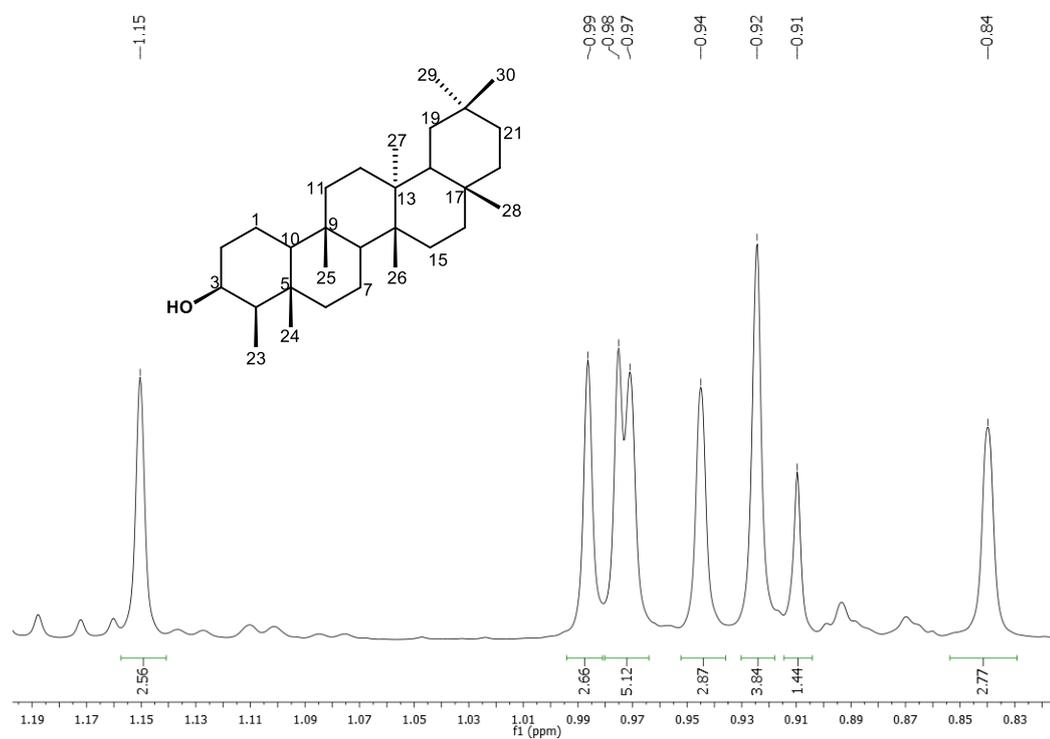


Figura 12. Expansão do espectro de RMN de ^1H na região de 1,20-3,7 ppm (CDCl_3 , 500 MHz).

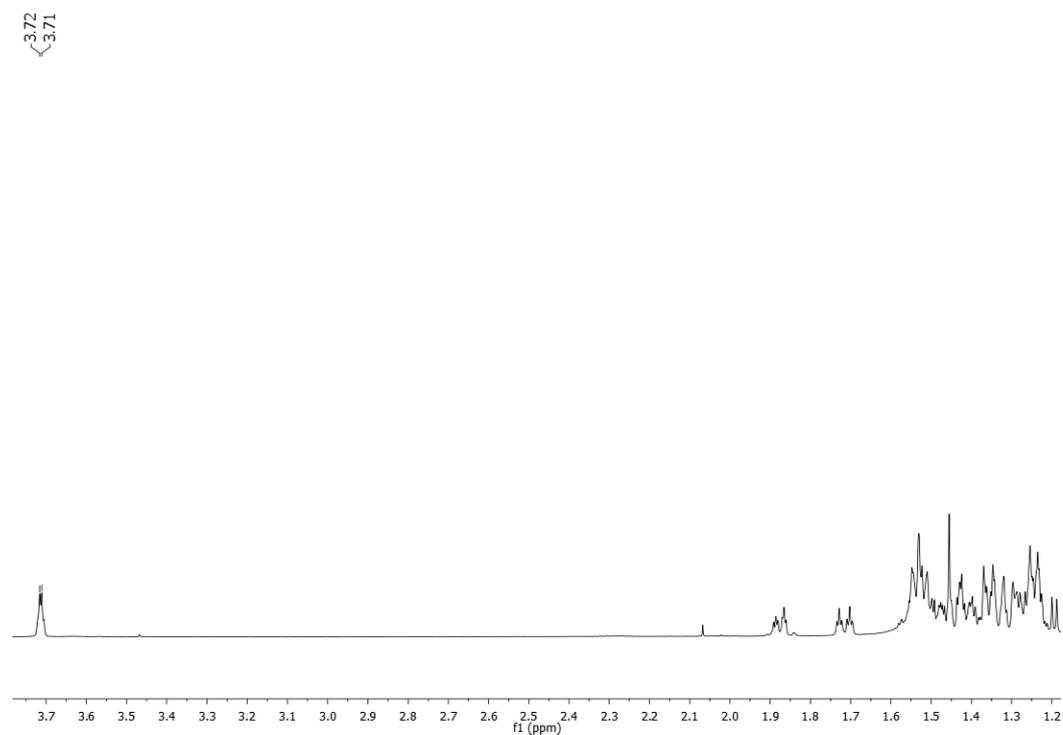


Figura 13. Espectro de Ressonância Magnética Nuclear de ^{13}C APT de Me-1 (CDCl_3 , 125 Mhz)

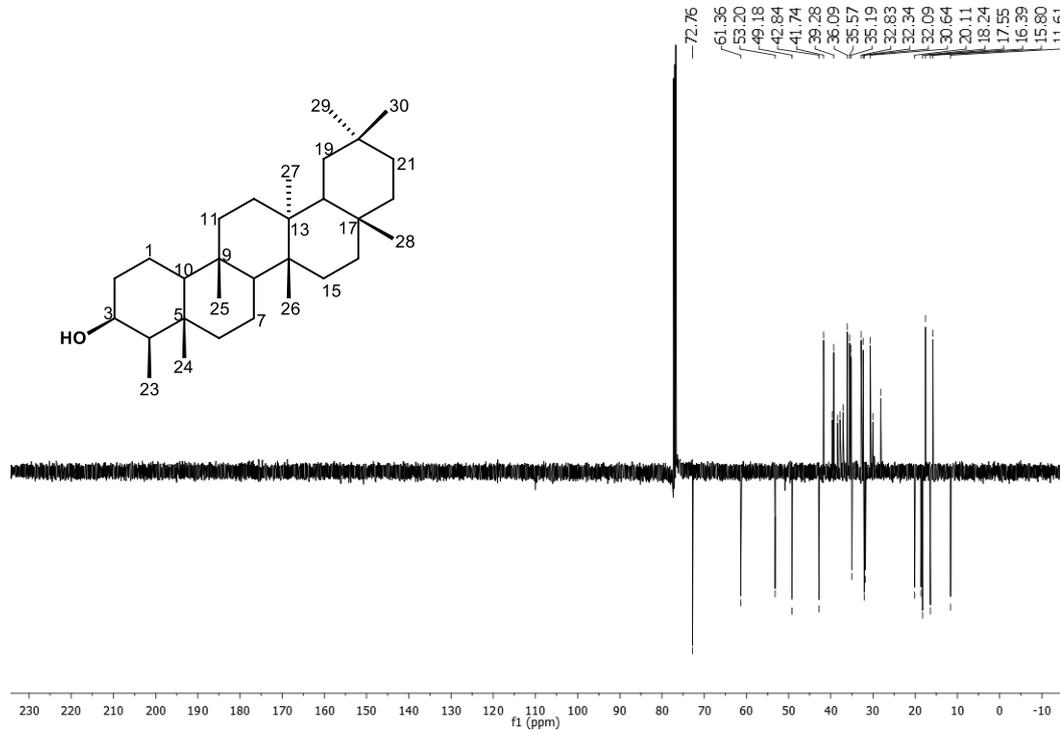


Figura 14. Expansão do espectro de RMN ^{13}C de Me-1 na região de 10-74 ppm (CDCl_3 , 125 MHz).

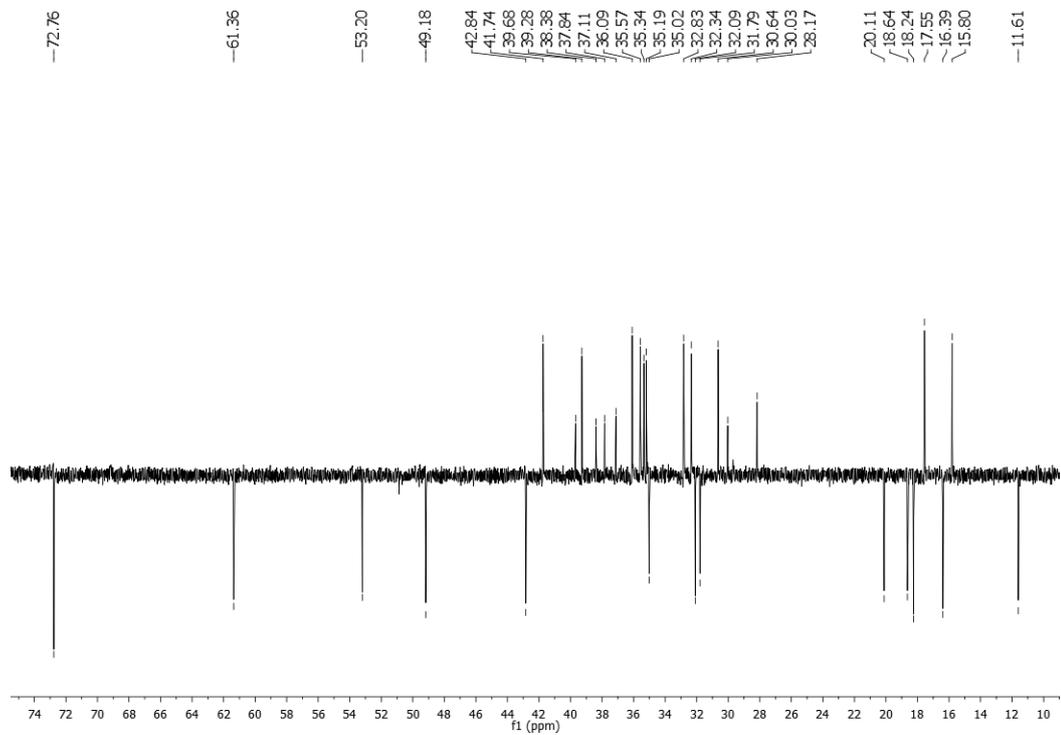
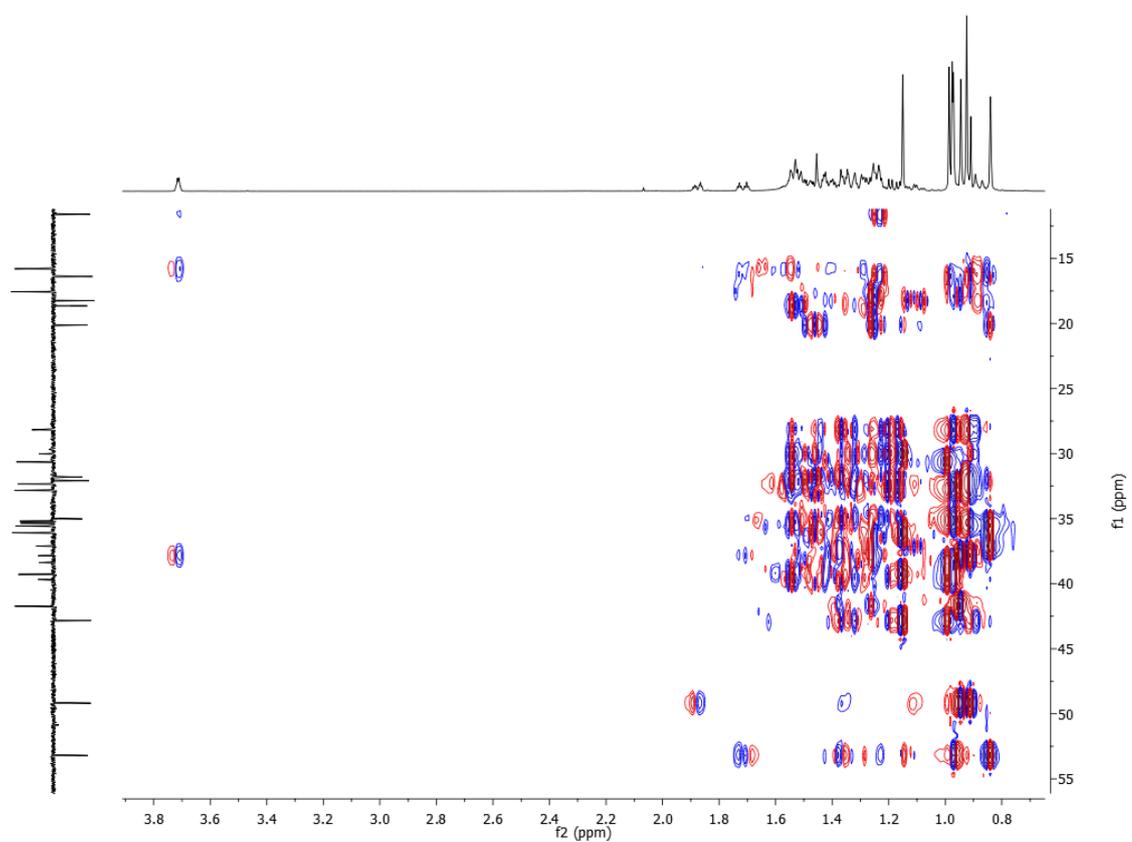


Figura 15. Espectros das correlações entre sinais de ^1H x ^{13}C $^{2-3}J_{\text{H-C-HMBC}}$ de Me-1 registrados em CDCl_3 (500 x 125 MHz).



5.1.2 Identificação estrutural de Me-2

A substância codificada como Me-2 foi isolada na forma de cristais incolores em forma de agulha, solúvel em clorofórmio, apresentando um peso de 30,0 mg representando 0,007% do extrato etanólico bruto.

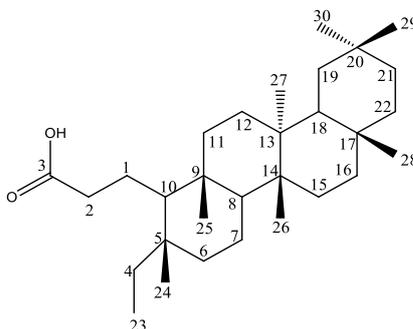
Na análise do espectro de infravermelho obtido em pastilha de KBr foram observadas absorções de banda larga em 3349-2855 cm^{-1} (-OH) e 1709 cm^{-1} (C=O) característicos de estiramentos pertencente a um grupo hidroxila e ácido carboxílico, respectivamente. Neste mesmo espectro, foi visualizado uma banda de intensidade media em 1283 cm^{-1} característico de estiramento C-O. O espectro apresentou uma banda larga em 2927 e 2862 característico de estiramento de C-H de hidrocarbonetos sp^3 como também absorções de dobramento em 1463 e 1386 cm^{-1} de C-H de grupos metilênicos e metílicos, respectivamente (Figura 17) (SILVERSTEIN et al., 2007; PAVIA et al., 2010).

No espectro de RMN de ^1H de Me-2 foi observado um envelope de sinais na região de δ_{H} 0,76-1,23 ppm característicos de hidrocarbonetos saturados, sendo sete sinpletos com integração para três hidrogênios que são característicos de metilas e um tripleto com deslocamento químico em δ_{H} 0,76 ppm com integração para 3 hidrogênios também característico de metila (Figura 18). Foi observado uma multiplicidade em δ_{H} 2,35 ppm referente a hidrogênios metilênicos desprotegidos (Figura 19), com este perfil de informações do espectro de RMN de ^1H pode-se sugerir que Me-2 apresenta um esqueleto de triterpeno pentacíclico.

No espectro de RMN de ^{13}C foram visualizados 30 sinais sendo oito atribuídos a carbonos metílicos, doze a carbonos metilênicos, três a carbonos metínicos e sete sinais atribuídos a carbonos não hidrogenados. (Figuras 20, 21, 22, 23). Me-2 apresentou sinais semelhantes a Me-1, apresentando oito metilas, corroborando com a sugestão observada no espectro de RMN de ^1H , sugerindo que a substância Me-2 apresenta característica de um triterpeno do tipo friedelano (ESTEVAM et al., 2005). Neste espectro, foi visualizado um sinal em δ_{C} 179,60 sugerindo que a molécula possui um grupo funcional do tipo ácido carboxílico (Figura 24). Os demais sinais de ^1H e ^{13}C estão descritos na tabela 6.

Em comparação com Me-1, a substância codificada como Me-2 apresentou um sinal a mais para um carbono não hidrogenado e para um carbono metilênico como também foi observado o desaparecimento de dois sinais de carbonos metínicos. O deslocamento químico

δ_c 7,57 sugere uma metila na região de proteção devido a um efeito gama da metila C-24 (SANTOS et al., 2009). A presença desse sinal desprotegido e a ausência desses dois sinais de carbonos metínicos como também a comparação com dados da literatura pode sugerir que o anel A do esqueleto triterpeno friedelano está aberto. De acordo com Medeiros, 2007 é possível sugerir que possa ter ocorrido a oxidação da cetona nos carbonos três e quatro da friedelina para a formação de um ácido carboxílico, corroborando então com as propostas apresentadas ao realizar a análise dos espectros de RMN de ^1H e ^{13}C . Sendo assim, com os dados de RMN ^1H e ^{13}C em comparação com a literatura foi possível identificar Me-2 como sendo o ácido-3,4 *seco*-friedelano-3-óico, apresentando atividade antiangiogênica (PEREIRA et al., 2018) sendo relatado pela primeira vez na espécie (Figura 16).

Figura 16. Ácido 3, 4 – seco – friedelano – 3- óico isolado de *Maytenus erythroxylo*n.**Tabela 6.** Comparação dos dados de RMN de ^1H e ^{13}C da substância **Me-2** em CDCl_3 com valores da literatura (Medeiros, 2007) (δ em ppm e J em Hz).

		Me – 2 (CDCl_3)		Medeiros, 2007	
C	δC	δH	δC	δH	
3	179,60		179,85		
4	38,89		38,86		
9	37,79		37,78		
13	39,58		39,57		
14	38,27		38,25		
17	29,69		29,69		
20	28,13		28,13		
CH					
8	52,94		52,93		
10	59,76		59,74		
18	42,78		42,75		
CH₂					
1	21,02		21,00		
2	35,12	2,35 (<i>m</i>)	35,11	2,36 (<i>dd</i>)	
5	32,80		32,78		
6	39,00		38,99		
7	17,91		18,05		
11	36,01		36,01		
12	29,96		29,96		
15	30,17		30,16		
16	37,51		37,49		
19	35,27		35,26		
21	32,24		32,22		
22	39,26		39,25		
CH₃					
23	7,57	0,76 (<i>t</i>)	7,58	0,76	
24	19,32	0,96 (<i>s</i>)	19,29	0,95 (<i>s</i>)	
25	17,91	0,85 (<i>s</i>)	17,91	0,84 (<i>s</i>)	
26	20,12	0,98 (<i>s</i>)	20,13	0,98 (<i>s</i>)	
27	18,73	1,23 (<i>s</i>)	18,74	1,23 (<i>s</i>)	
28	32,09	1,14 (<i>s</i>)	32,08	1,14 (<i>s</i>)	
29	34,96	0,92 (<i>s</i>)	34,96	0,92 (<i>s</i>)	
30	31,82	0,97 (<i>s</i>)	31,81	0,97 (<i>s</i>)	

Figura 17. Espectro no Infravermelho (KBr, cm^{-1}) de **Me-2**.

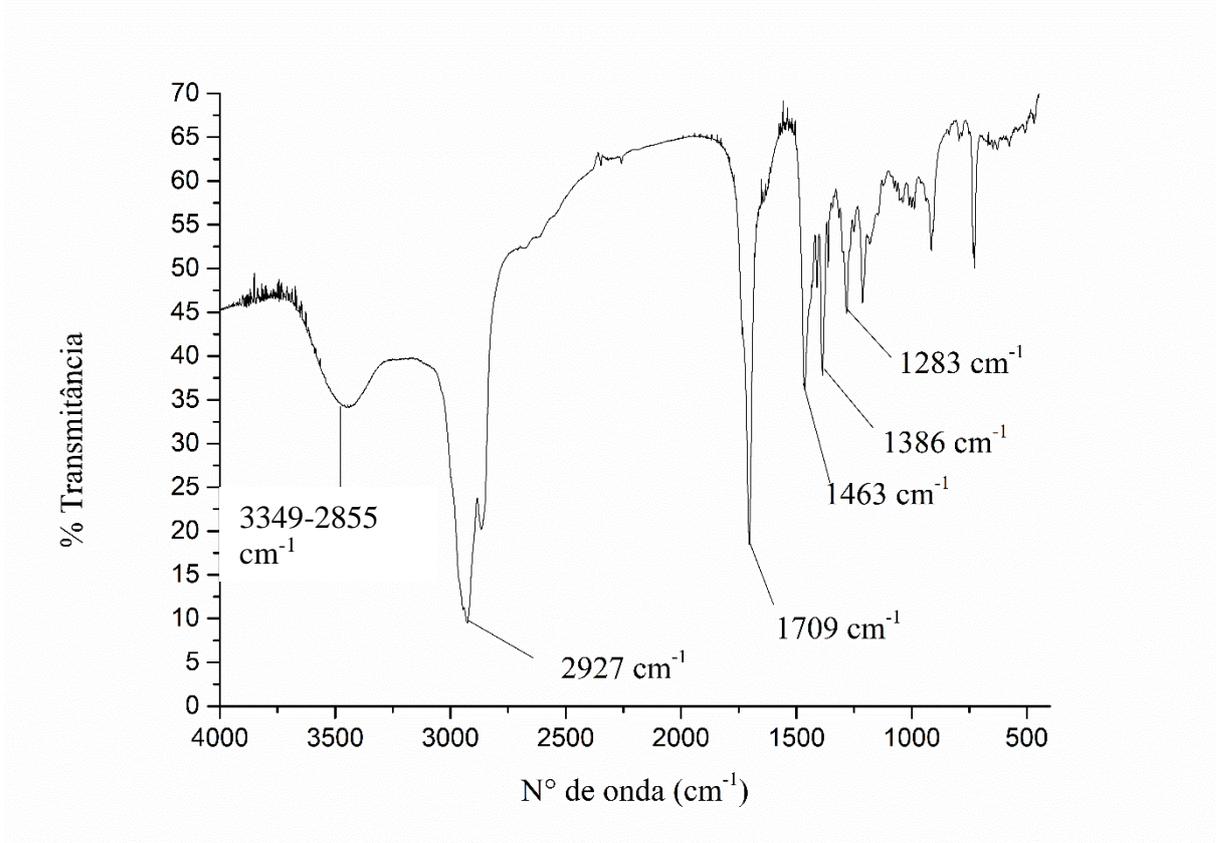


Figura 18. Espectro de RMN de ^1H de **Me-2** (CDCl_3 , 500 MHz).

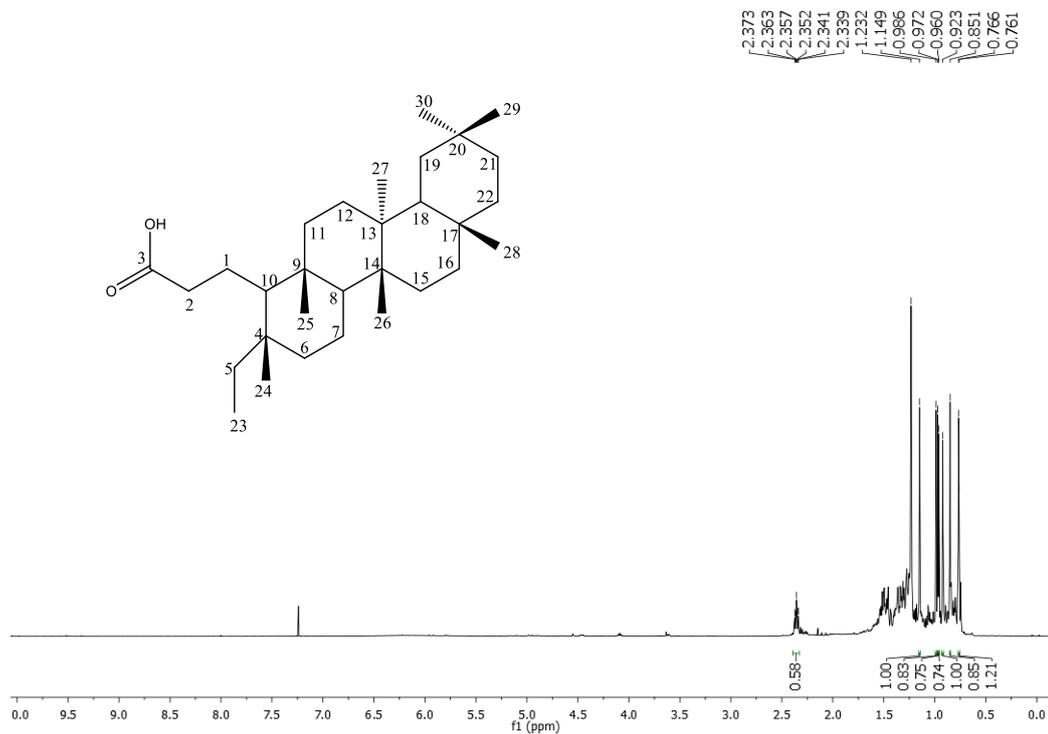


Figura 19. Espectro de RMN de ^1H de **Me-2** na região de 0,4-2,7 ppm (CDCl_3 , 500 MHz).

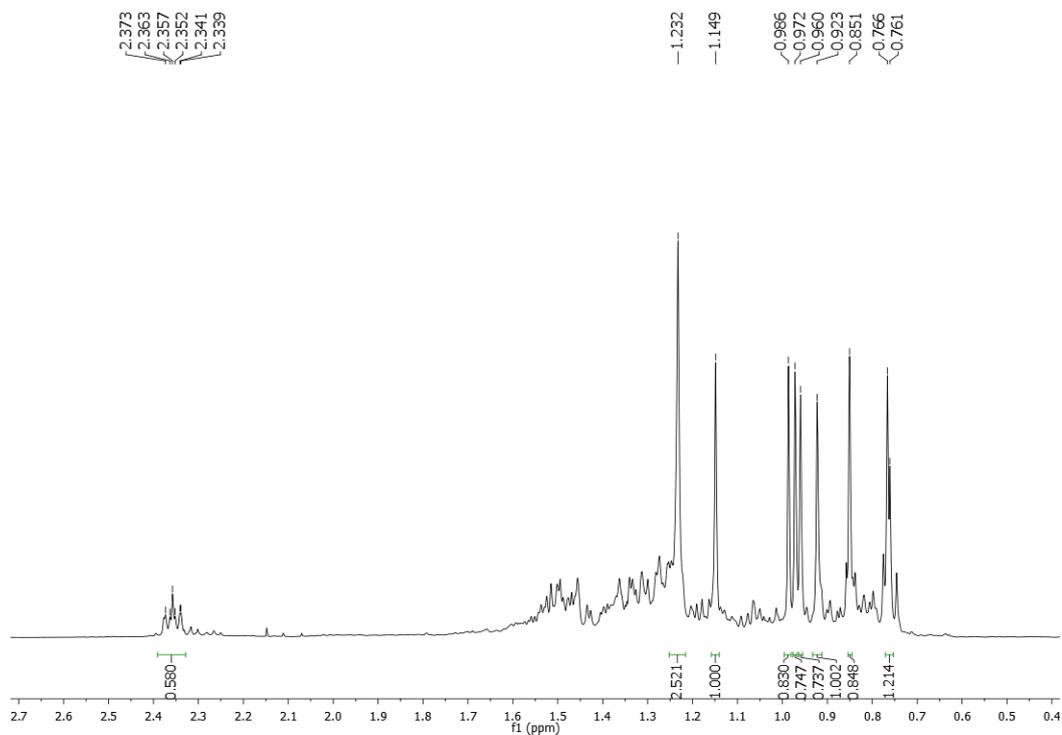


Figura 20. Espectro de RMN de ^{13}C -APT de Me-2 (CDCl_3 , 125 MHz).

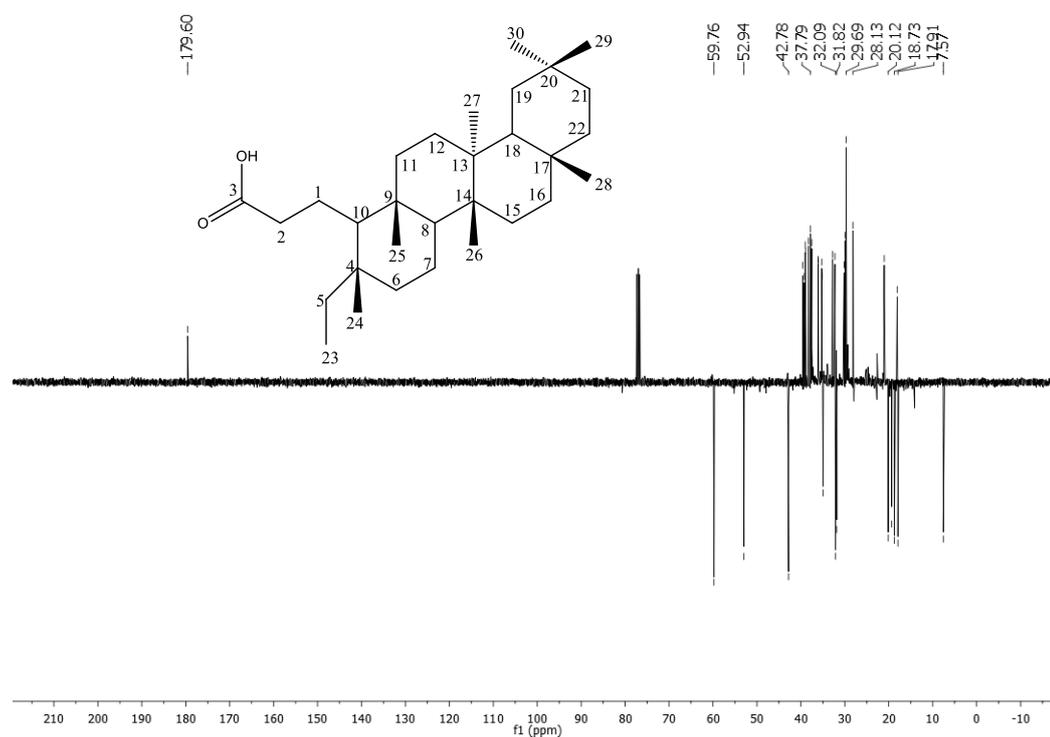


Figura 21. Espectro de RMN de ^{13}C de Me-2 na região de 7-31 ppm (CDCl_3 , 125 MHz).

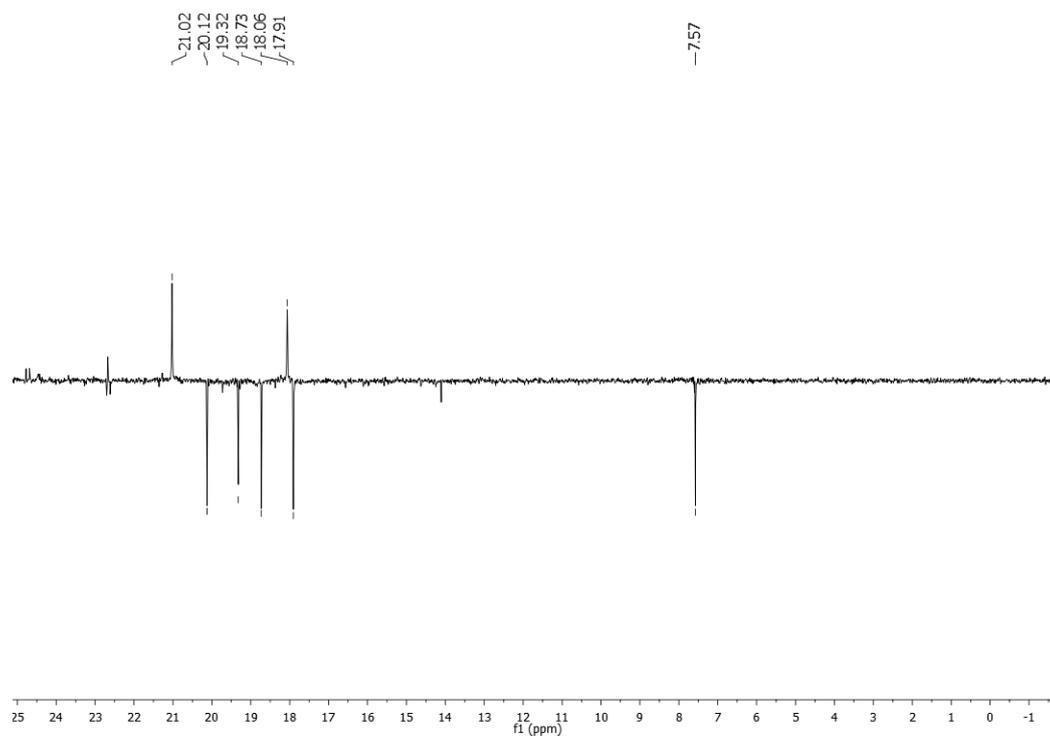


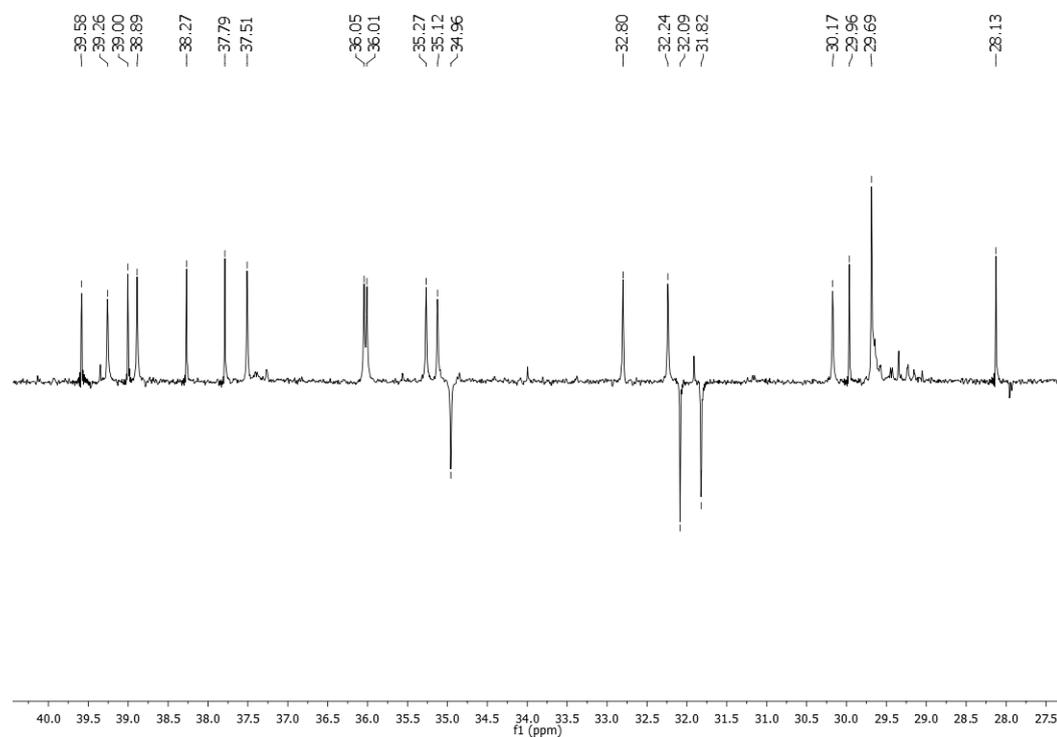
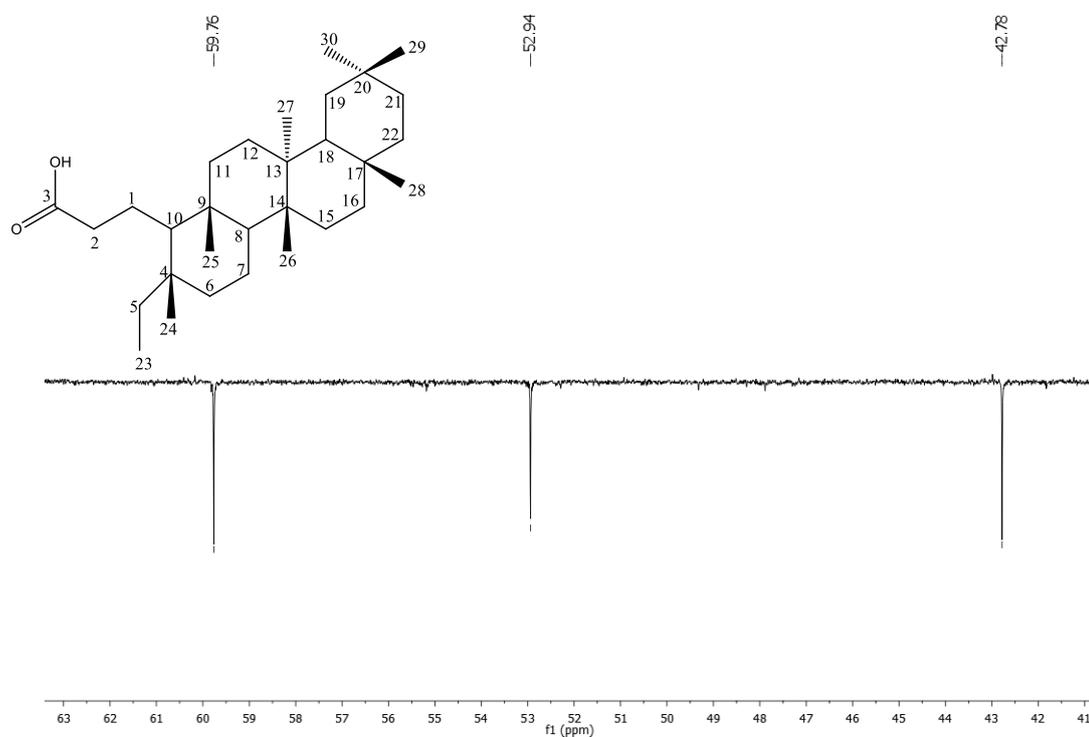
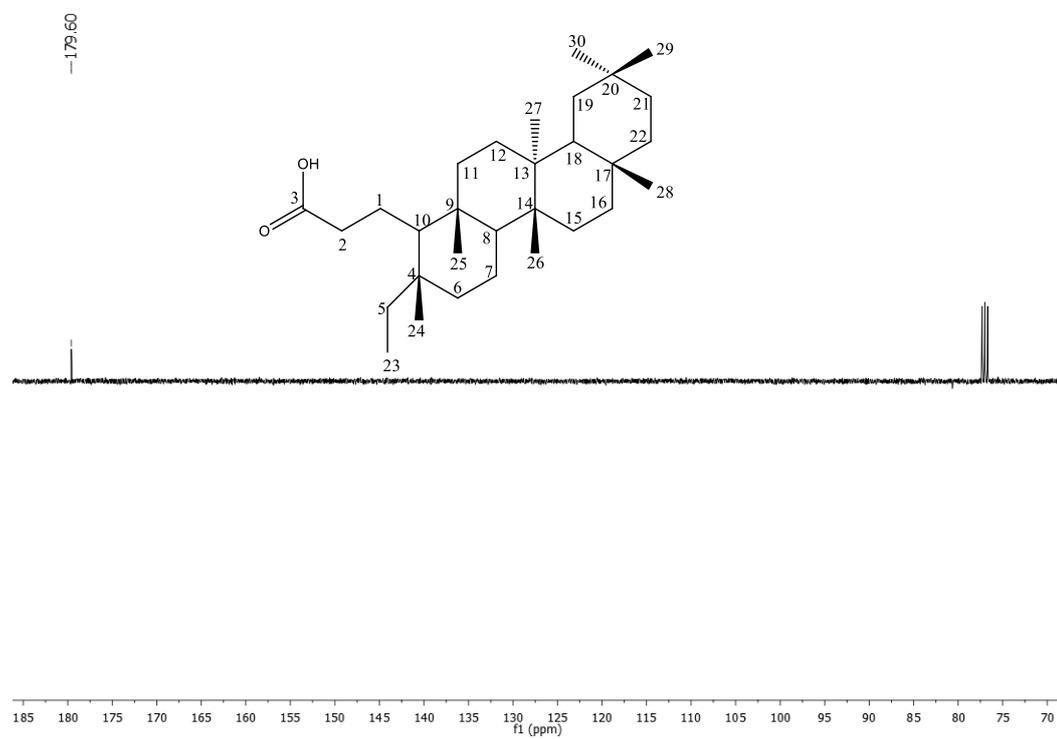
Figura 22. Espectro de RMN de ^{13}C de Me-2 na região de 28-40 ppm (CDCl_3 , 125 MHz).**Figura 23.** Espectro de RMN de ^{13}C de Me-2 na região de 42-63 ppm (CDCl_3 , 125 MHz).

Figura 24. Espectro de RMN de ^{13}C de Me-2 na região de 70-200 ppm (CDCl_3 , 125 MHz).



5.1.3 Identificação estrutural de Me-3

A substância codificada como Me-3 foi isolada na forma de sólido amorfo amarelado, solúvel em clorofórmio, apresentando um peso de 40 mg, representando 0,009% do extrato etanólico bruto.

Na análise do espectro de infravermelho realizado em pastilhas de KBr foi visualizado uma banda larga intensa em 1710 cm^{-1} característico de estiramento C=O de cetona, como também foi observado o dobramento em 1264 cm^{-1} de C=O. Neste espectro, também apresentou absorções característicos de C-H de alcanos em 2920 e 2836 cm^{-1} como também dobramentos de C-H de carbonos metilênicos e metílicos em 1463 e 1380 cm^{-1} , respectivamente (Figura 26) (SILVERSTEIN et al., 2007; PAVIA et al., 2010).

No espectro de ^1H foi observado um envelope de sinais na região entre $\delta_{\text{H}} 0,75$ - $2,12$ ppm (Figura 27) informando a presença de hidrogênios saturados. Nesta região, estão sendo visualizados sete singletos com integral para três hidrogênios cada em $\delta_{\text{H}} 0,75$; $0,89$; $0,95$; $0,99$; $1,02$; $1,04$ e $2,12$ ppm, sendo atribuídos as metilas de Me-3 (Figura 28). Destes sete sinais, destaca-se o simpleto com deslocamento químico de $\delta_{\text{H}} 2,12$ ppm característico de uma metila alfa carbonila desprotegida, como no espectro de infravermelho mostrou uma banda característica de C=O de cetona, sugere-se que esta desproteção pode ser causada pelo efeito de anisotropia da carbonila de cetona (Figura 28) (PAVIA et al., 2010). Neste mesmo espectro, foi observado um tripleto de duplete com integral para um hidrogênio com deslocamento químico $\delta_{\text{H}} 2,56$ ppm, também característico de hidrogênio alfa carbonila com essas informações e analisando o padrão dos deslocamentos químicos das metilas, pode-se sugerir que Me-3 apresenta um esqueleto triterpênico (Figura 29).

Após análise do espectro de ^{13}C - APT foram visualizados 29 sinais de carbonos sendo sete atribuídos a carbonos não hidrogenados, cinco atribuídos a carbonos metínicos, dez atribuídos a carbonos metilênicos e sete atribuídos a carbonos metílicos (Figura 30). Os deslocamentos químicos em $\delta_{\text{C}} 212,89$ (C-20) e $218,26$ (C-3) ppm sugere que Me-3 apresenta carbonilas de cetonas, corroborando com a ideia proposta ao analisar o espectro de infravermelho e de RMN ^1H (Figura 32). Observando os sinais $\delta_{\text{C}} 54,75$ (C-5); $49,48$ (C-9); $37,09$ (C-13); $46,56$ (C-18) ppm característicos de carbonos metínicos, este padrão de deslocamentos são característicos de triterpenos da classe dos lupanos (Figura 31) (COLE, et al., 1991). A presença do sinal $\delta_{\text{C}} 212,89$ (C-20) ppm de carbonila de cetona juntamente com o deslocamento químico $\delta_{\text{C}} 52,52$ (C-19) ppm de um carbono metínico desprotegido, revela a

ausência da ligação sp^2 nos C-20 e C-29 que geralmente acontece nos lupanos que apresentam o grupo isopropenila não substituído. Diante disto, com a ausência desta ligação sp^2 , pode sugerir que Me-3 apresenta em sua estrutura química um carbono a menos, logo possuindo um esqueleto do tipo norlupano (NÚÑEZ et al., 2005; PARK et al., 2010).

Os assinalamentos dos hidrogênios metílicos foram confirmados ao analisar os mapas de contorno, das correlações diretas observadas no espectro heteronuclear HSQC. Neste espectro, foram observadas as correlações dos simples em δ_H 0,75; 0,89; 0,95; 0,99; 1,02; 1,04 e 2,12 ppm com os respectivos sinais em δ_C 17,96; 15,69; 14,32; 22,01; 16,92; 26,70 ppm, corroborando assim com a estrutura de um triterpeno do tipo lupano (Figura 33).

No espectro de correlação heteronuclear a duas ou três ligações de HMBC, foi possível confirmar as posições das carbonilas através das correlações do singlete com deslocamento químico de δ_H 1,04 (H-23) com o sinal de δ_C 218,26 a três ligações informando que esta carbonila está inserida em C-3. Outra correlação observada foi o sinal do simpleto de δ_H 2,12 (H-29) ppm com o deslocamento químico de δ_C 212,89 ppm a duas ligações, confirmando a presença da carbonila em C-20, revelando a ausência da dupla ligação em C-20 e C-29 dos lupanos (Figura 34). Outra correlação que confirmou a presença da carbonila em C-20 foi entre δ_H 2,50 (H-19) com δ_C 37,09; 49,56; 212,89; 27,67 (C-13, C-18, C-20 e C-21) (Figura 35).

Na Tabela 7 estão compilados os deslocamentos químicos e as correlações observadas nos espectros de RMN 1H e ^{13}C e bidimensionais para Me-3. Diante dos dados descritos acima e em comparação com os dados da literatura foi possível identificar **Me-3** como sendo 29 – norlupan – 3,20-diona isolado pela primeira vez no gênero *Maytenus* e relatada pela primeira vez nesta espécie (Figura 25).

Figura 25. 29-norlupan-3,20-diona (Me-3) isolado de *Maytenus erythroxylon*.

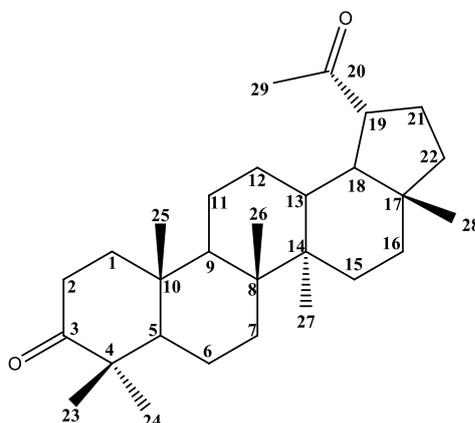


Tabela 7. Comparação dos dados de ^1H e ^{13}C de **Me-3** em CDCl_3 com valores da literatura (COLE, 1991). (δ em ppm e J em Hz).

Me – 3 (CDCl_3)				Cole, 1991		
C	$^{13}\text{C} \times ^1\text{H}$ HMQC		$^{13}\text{C} \times ^1\text{H}$ HMBC		δC	δH
	δC	δH	^2J	^3J		
3	218,26				217,8	
4	47,26		H-23; H-24		47,2	
8	40,63		H-26	H-27	40,6	
10	36,83		H-25		36,8	
14	42,70			H-26	42,7	
17	43,00		H-28		43,0	
20	212,89		H-19		212,0	
CH						
5	54,75			H-23; H-24; H-25	54,7	
9	49,48			H-25; H-26	49,4	
13	37,09			H-27; H-19	37,1	
18	49,56		H-19	H-28	49,5	
19	52,52	2,56 (td)		H-29	52,5	
CH₂						
1	39,78			H-25	39,8	
2	34,06				34,0	
6	19,63				19,7	
7	33,39			H-26	33,4	
11	21,41				21,4	
12	27,21				27,2	
15	27,15			H-27	27,1	
16	34,87			H-28	34,9	
21	27,67		H-19		27,6	
22	39,49			H-28	39,5	
CH₃						
23	26,70	1,04 (s)		H-24	26,7	-
24	20,99	0,99 (s)		H-23	21,0	-
25	15,94	0,89 (s)			16,0	-
26	15,66	1,02 (s)			15,7	-
27	14,37	0,95 (s)	H-27		14,4	-
28	17,96	0,75 (s)			18,0	-
29	29,19	2,12 (s)			29,0	-

Figura 26. Espectro de Infravermelho (KBr, cm^{-1}) de **Me-3**.

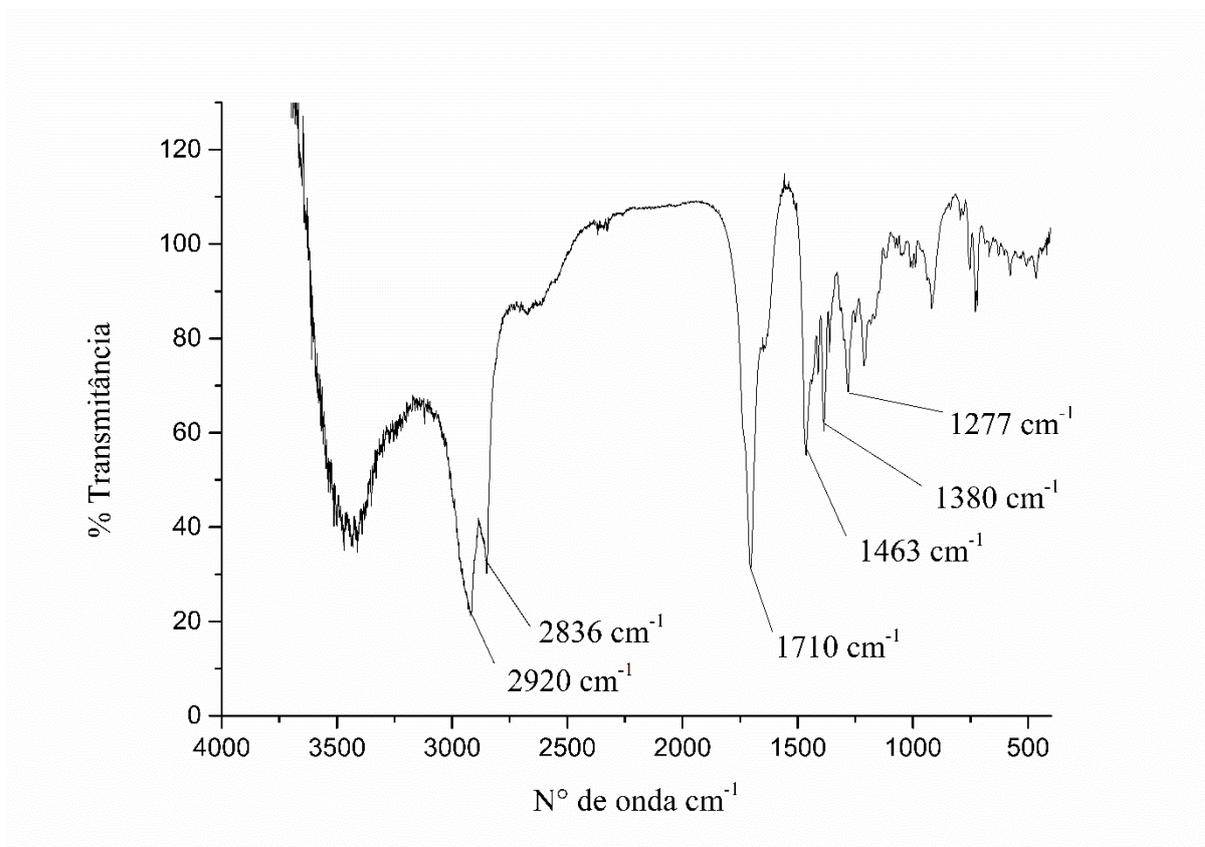


Figura 27. Espectro de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) de ^1H de **Me-3**. (CDCl_3 , 500 MHz).

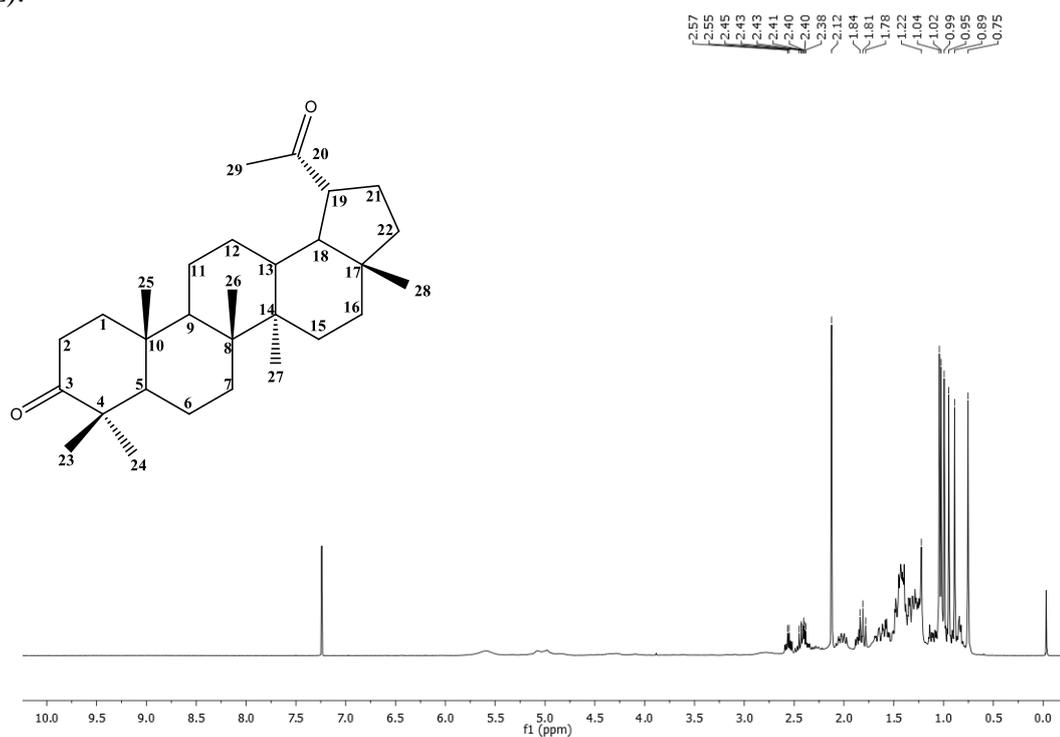


Figura 28. Expansão do espectro de RMN de ^1H de Me-3 na região de 0,7-2,7 ppm (CDCl_3 , 500 MHz).

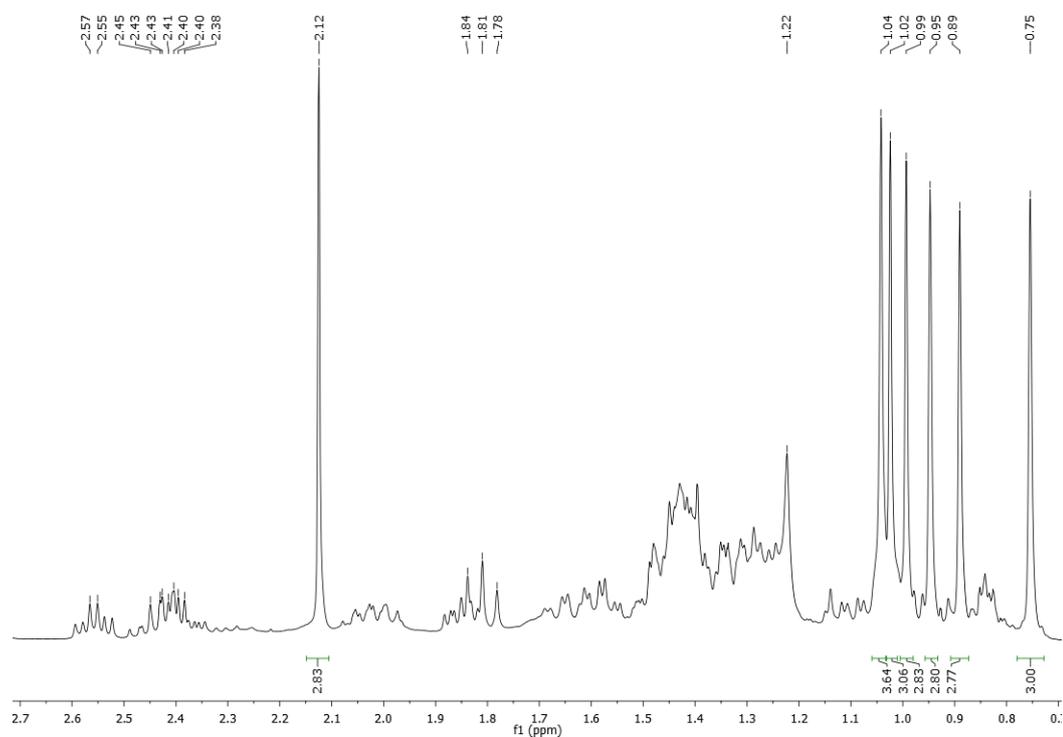


Figura 29. Expansão do espectro de RMN de ^1H de Me -3 na região de 2,24-2,74 ppm (CDCl_3 , 500 MHz).

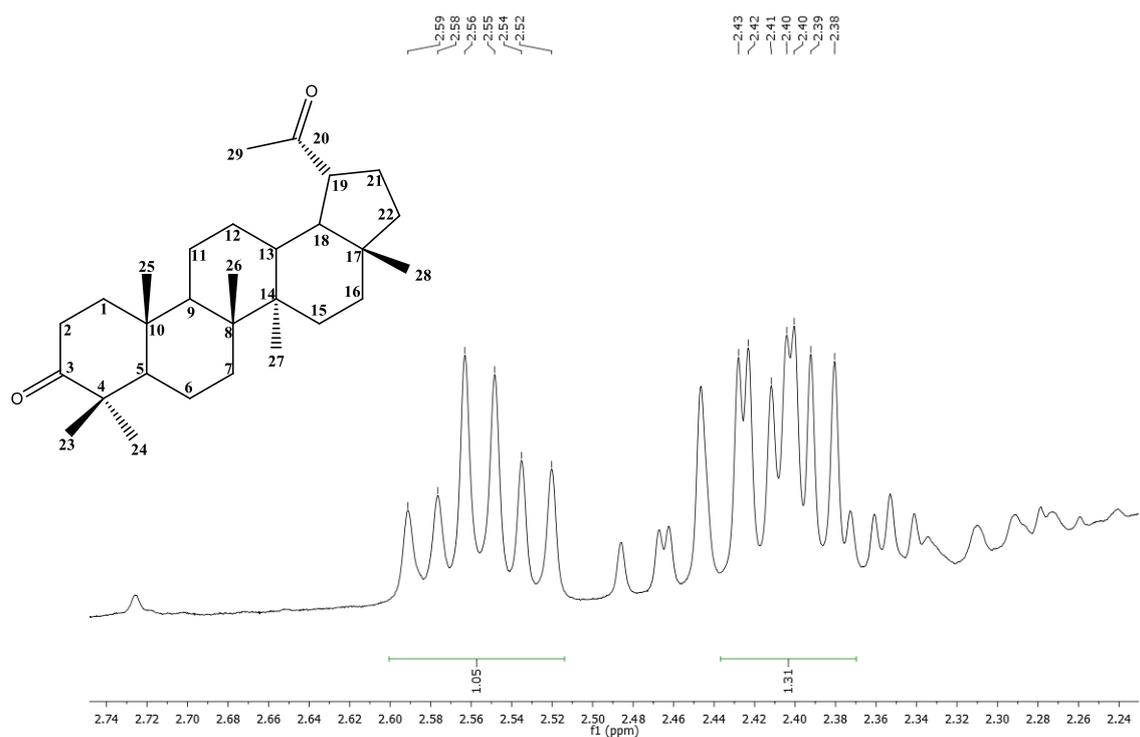


Figura 30. Espectro de RMN de ^{13}C -APT de Me-3 (CDCl_3 , 125 MHz).

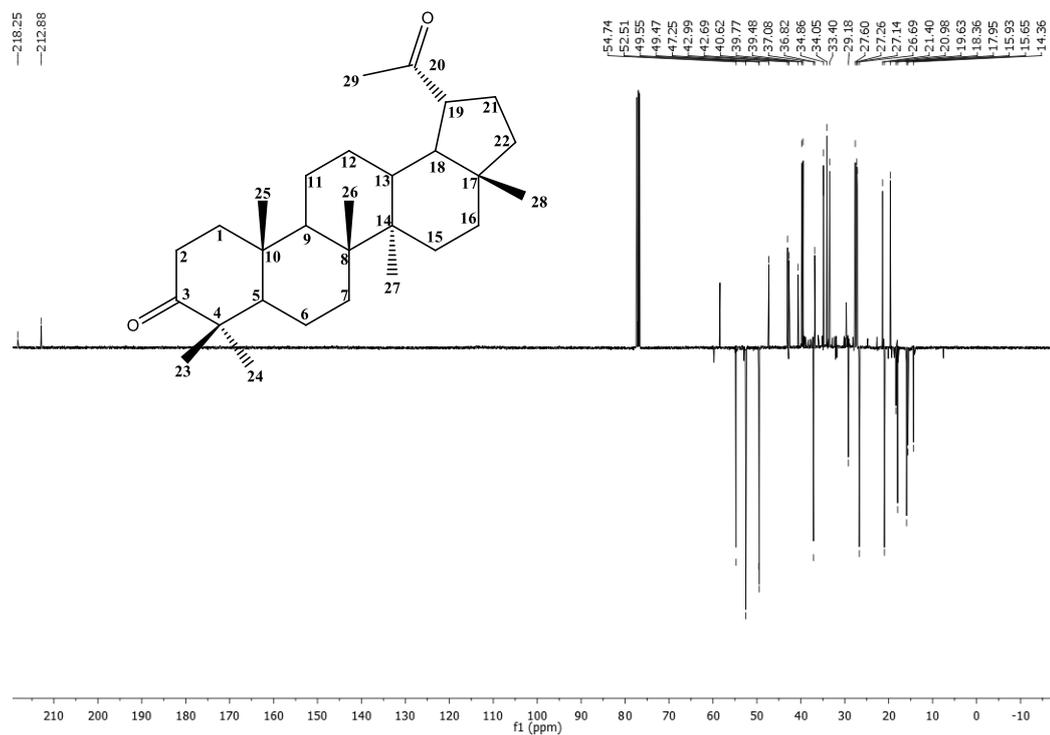


Figura 31. Espectro de RMN de ^{13}C -APT de Me-3 na região de 10-55 ppm (CDCl_3 , 125 MHz).

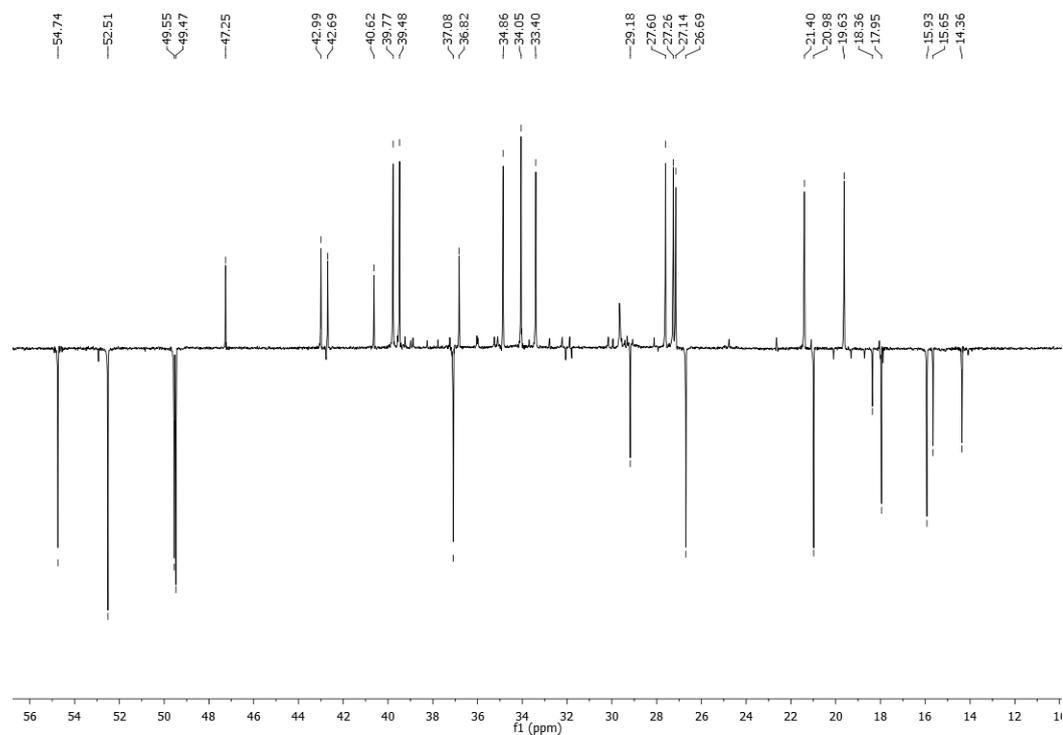


Figura 32. Espectro de RMN de ^{13}C -APT de Me-3 na região de 212-219 ppm (CDCl_3 , 125 MHz).

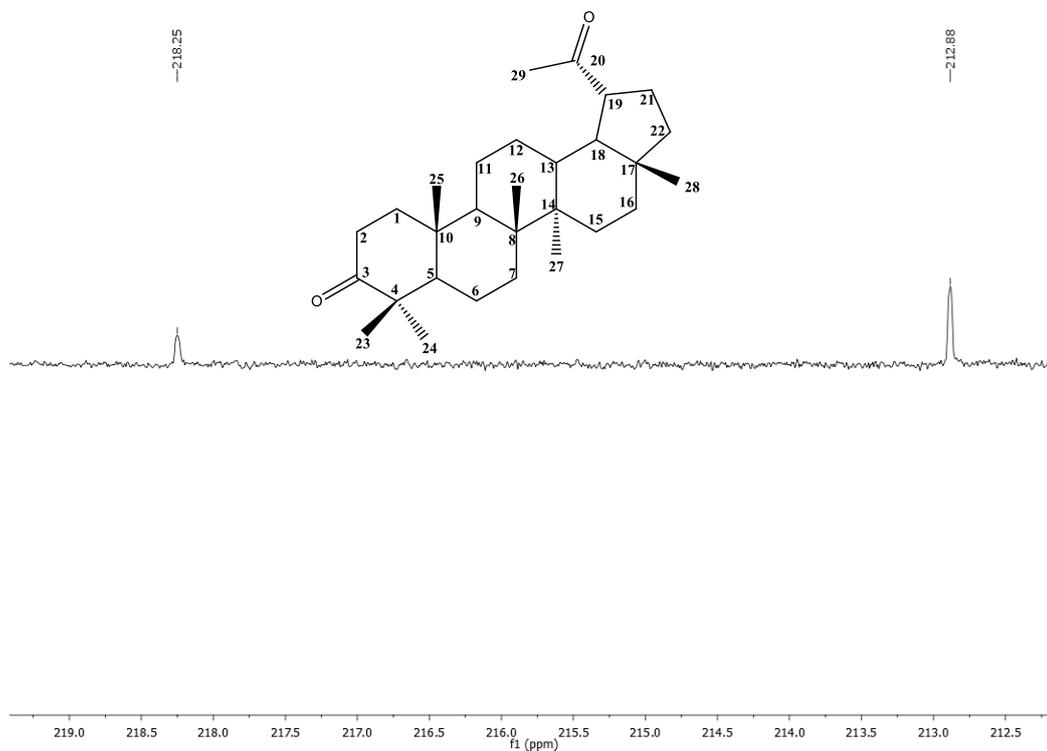


Figura 33. Expansão do espectro das correlações entre sinais de ^1H x ^{13}C - $J_{\text{H-C}}$ -HSQC de Me-3 registrados em CDCl_3 (500 x 125 MHz).

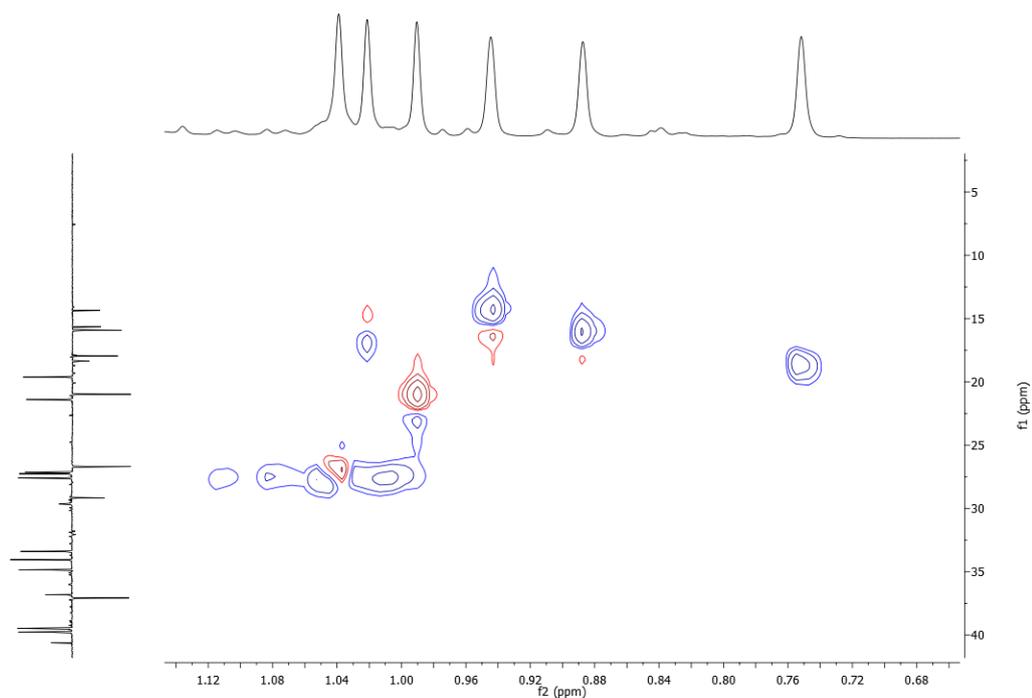


Figura 34. Expansão do espectro das correlações entre sinais de $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}^{2-3}J_{\text{H-C}}\text{-HMBC}$ de Me-3 registrados em CDCl_3 (500 x 125 MHz).

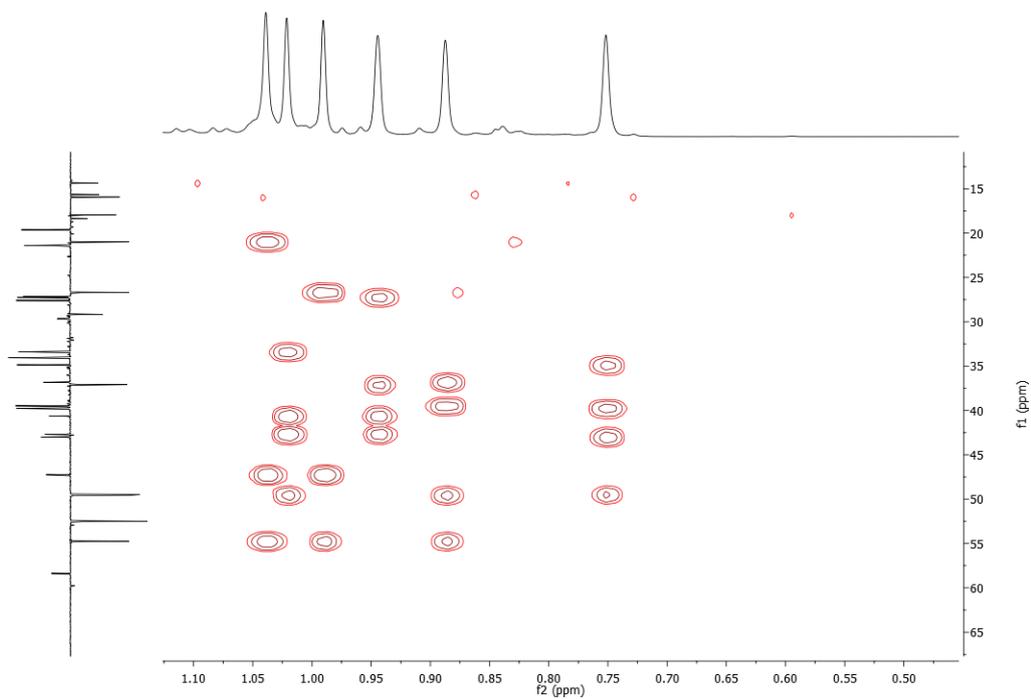
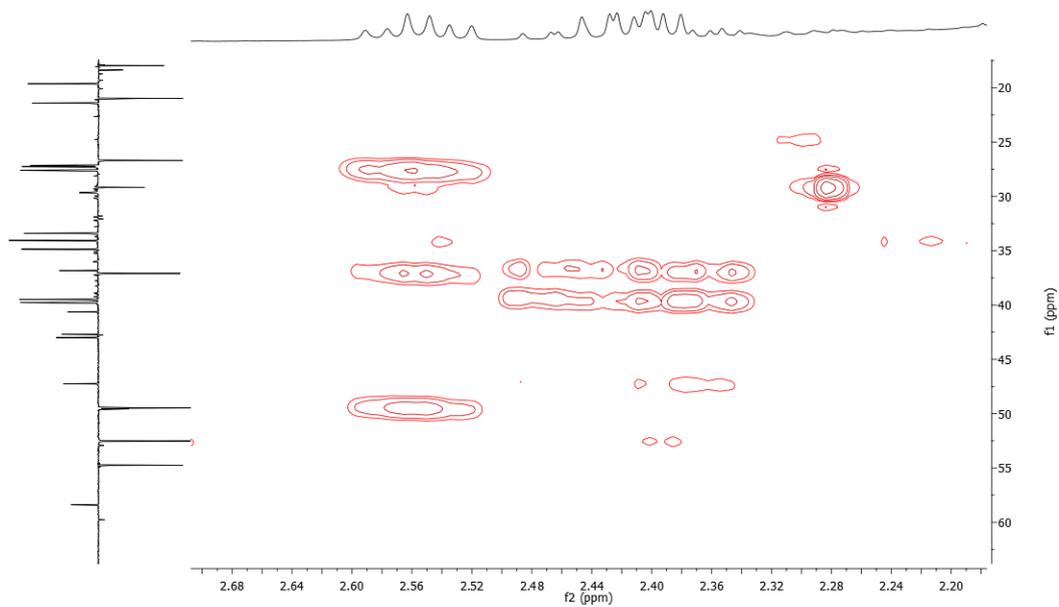


Figura 35. Expansão do espectro das correlações entre sinais de $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}^{2-3}J_{\text{H-C}}\text{-HMBC}$ de Me-3 registrados em CDCl_3 (500 x 125 MHz).



5.1.4 Identificação estrutural de Me-4

A substância codificada como Me-4 foi isolada na forma de um sólido amorfo amarelado, solúvel em clorofórmio, apresentando um peso de 5 mg, representando 0,001 % do extrato etanólico bruto.

Na análise do espectro de ^1H foi observado um envelope de sinais na região de δ_{H} 0,6 – 1,16 ppm (Figura 37) característicos de hidrogênios saturados. Nesta região foram visualizados sete simpletos com integral para três hidrogênios cada em δ_{H} 0,70; 0,85; 0,86; 0,97; 0,98; 1,05 e 1,13 ppm, que foram atribuídos as metilas de Me-4, com estes dados e em comparação com a literatura pode-se sugerir que Me-4 pertence à classe dos triterpenos (Figura 36) (DUARTE, 2010). Este espectro mostrou-se semelhante a Me-1, desta forma, pode-se sugerir que Me-4 é um triterpenoide com esqueleto básico do tipo friedelano. Foram visualizados dois dupletos com deslocamento químico δ_{H} 3,33 e 3,41 ppm ($J=10,5$) característicos de hidrogênios ligados a carbono carbinólico sofrendo desproteção pelo efeito de indução do oxigênio (Figura 39) (PAVIA *et al.*, 2010) sugerindo a presença do grupo metilênico ligado a uma hidroxila (CH_2OH), em comparação com a literatura, é possível sugerir que este grupo está inserido no carbono C-30 (DUARTE, 2010). Foi observado um quarteto com deslocamento químico δ_{H} 2,22 ppm ($J=7,0$) (Figura 39), em comparação com Me-1, é observado a ausência do sinal em δ_{H} 3,71 ppm de H-3, sugerindo então, a presença de uma carbonila em C-3, esta informação pode ser explicada pela presença deste sinal desprotegido em δ_{H} 2,22 ppm que é característico de hidrogênios α carbonílicos (SILVERSTEIN *et al.*, 2007).

No espectro de ^{13}C foram observados 30 sinais em que sete foram atribuídos a carbonos não hidrogenados, quatro atribuídos a carbonos metínicos, doze atribuídos a carbonos metilênicos e sete atribuídos a carbonos metílicos. Os deslocamentos químicos em δ_{C} 58,24; 53,00; 59,51 e 42,75 ppm que são característicos de carbonos metínicos de triterpenos friedelano (Figura 40) (MAGALHÃES, 2011). O deslocamento químico em δ_{C} 213,12 ppm confirma a presença da carbonila de cetona. Outro deslocamento químico observado é δ_{C} 71,98 ppm característico de carbono metilênico ligado a uma hidroxila, estes dados juntamente com o de ^1H e em comparação com a literatura confirma a presença de uma hidroxila inserida em C-30 (Figura 41).

Na Tabela 8 estão compilados os deslocamentos químicos e as correlações observadas nos espectros de RMN ^1H e ^{13}C para Me-4. Diante dos dados descritos acima e em comparação com os dados da literatura foi possível identificar Me-4 como sendo 3-oxo-30-hidroxfriedelano relatada pela primeira vez nesta espécie (Figura 36).

Tabela 8. Comparação dos dados de RMN de ^1H e ^{13}C de **Me-4** em CDCl_3 em comparação com valores da literatura (Magalhães, 2011) (δ em ppm e J em Hz).

Me – 4 (CDCl_3)		Magalhães, 2011		
C	δC	δH	δC	δH
3	213,12		213,3	
5	42,14		42,15	
9	37,45		37,42	
13	38,38		39,77	
14	38,10		38,38	
17	29,99		29,96	
20	33,38		33,36	
CH				
4	58,24	2,22 (q, $J=7,0$)	58,19	2,23 (q, $J=6,8$)
8	53,00		53,00	
10	59,51		59,44	
18	42,75		42,69	
CH₂				
1	22,28		22,27	
2	41,51		41,50	
6	41,30		41,24	
7	18,25		18,23	
11	35,58		35,55	
12	29,35		29,71	
15	32,13		32,12	
16	29,70		29,71	
19	30,52		30,50	
21	28,17		28,15	
22	39,81		39,77	
30	71,98	3,33(d, H _a); 3,41 (d, H _b) $J_{\text{a}}=J_{\text{b}}=10,5$	71,90	3,35 (d, H _a); 3,43 (d, H _b) $J_{\text{a}}=J_{\text{b}}=10,4$
CH₃				
23	6,81	0,85 (<i>m</i>)	6,83	0,87 (<i>d</i> ; $j=6,8$)
24	14,66	0,70 (<i>s</i>)	14,65	0,73 (<i>s</i>)
25	18,01	0,86 (<i>s</i>)	18,01	0,90 (<i>s</i>)
26	18,57	1,05 (<i>s</i>)	18,59	1,07 (<i>s</i>)
27	19,95	0,97 (<i>s</i>)	19,95	0,99 (<i>s</i>)
28	32,13	1,13 (<i>s</i>)	32,12	1,15 (<i>s</i>)
29	28,92	0,98 (<i>s</i>)	28,93	1,01 (<i>s</i>)

Figura 36. 3-oxo-30-hidroxifriedelano (Me-4) isolado de *Maytenus erythroxylon*.

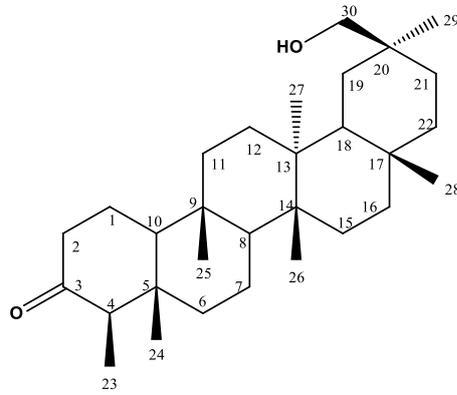


Figura 37. Espectro de Ressonância Magnética Nuclear de ^1H de Me-4 (CDCl_3 , 500 MHz).

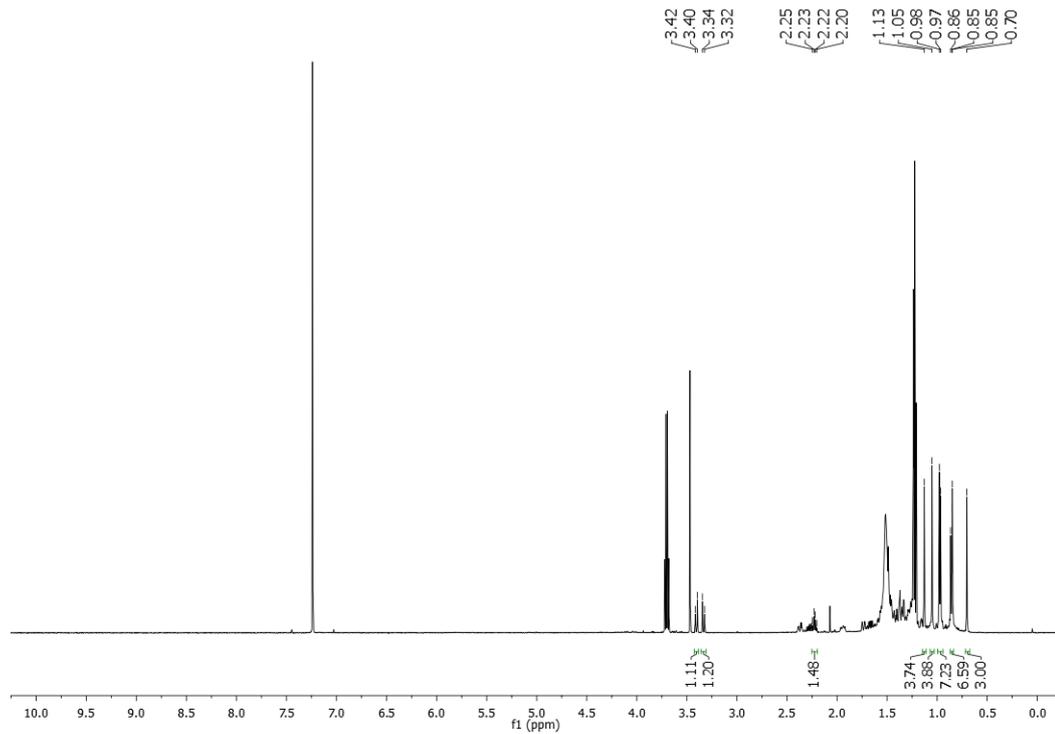


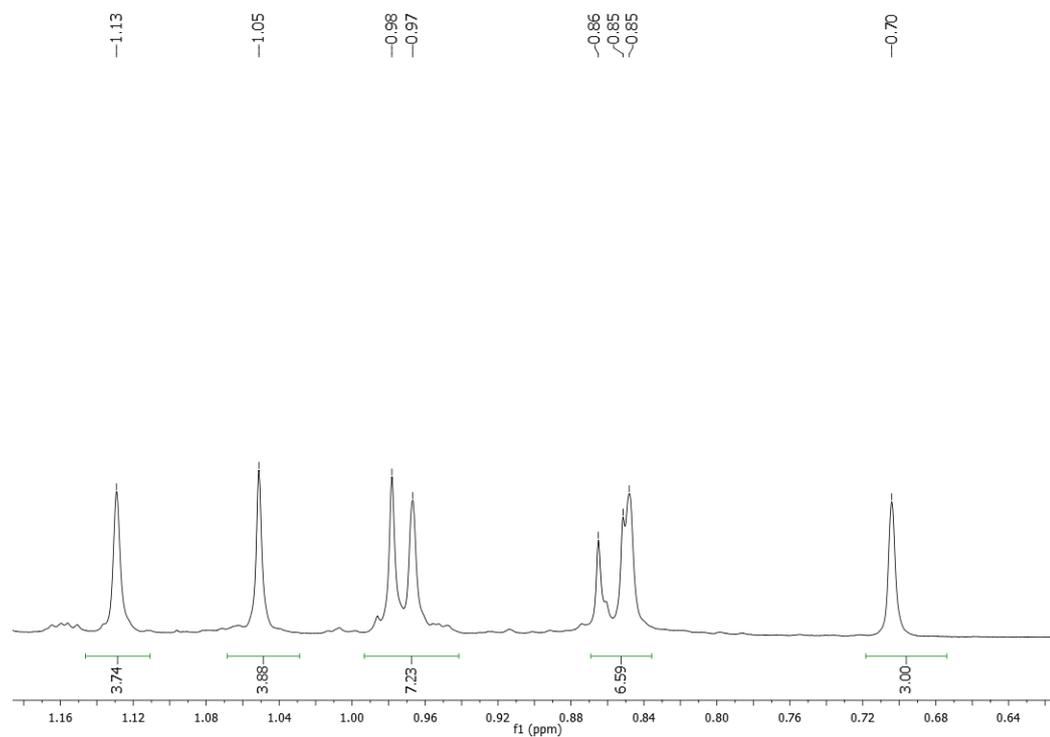
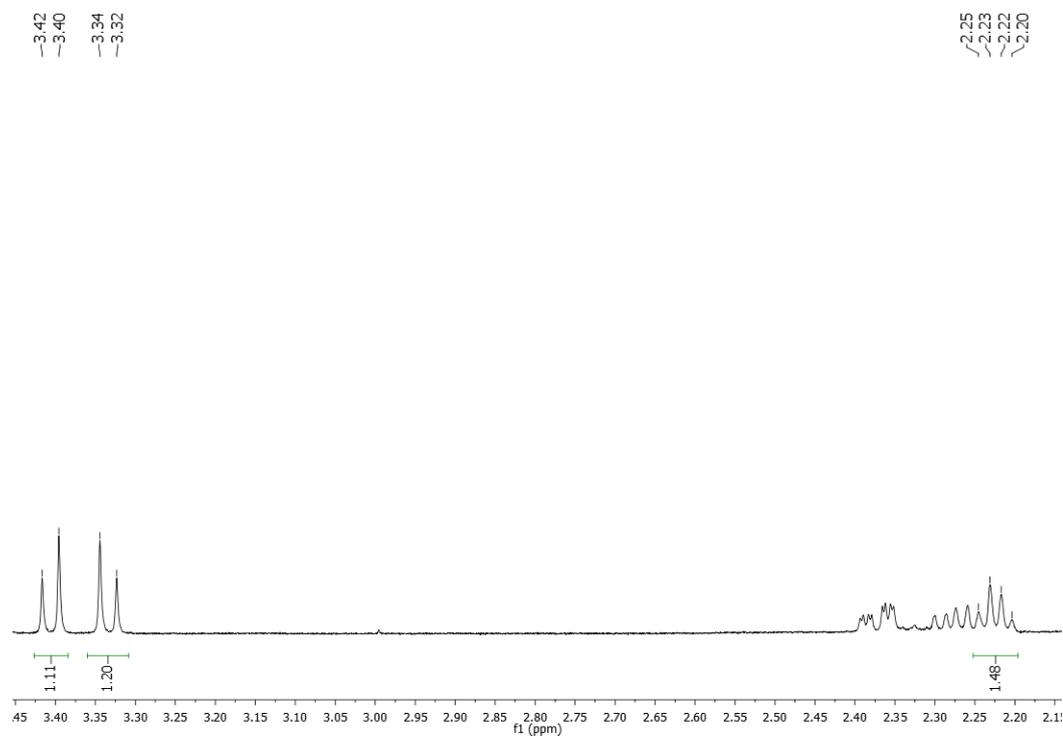
Figura 38. Espectro de RMN de ^1H Me-4 na região de 0,60-1,16 ppm (CDCl_3 , 500 MHz).**Figura 39.** Espectro de RMN de ^1H de Me-4 na região de 2,20-3,40 ppm (CDCl_3 , 500 MHz).

Figura 40. Espectro de RMN de ^{13}C - broad band de Me-4 (CDCl_3 , 125 MHz).

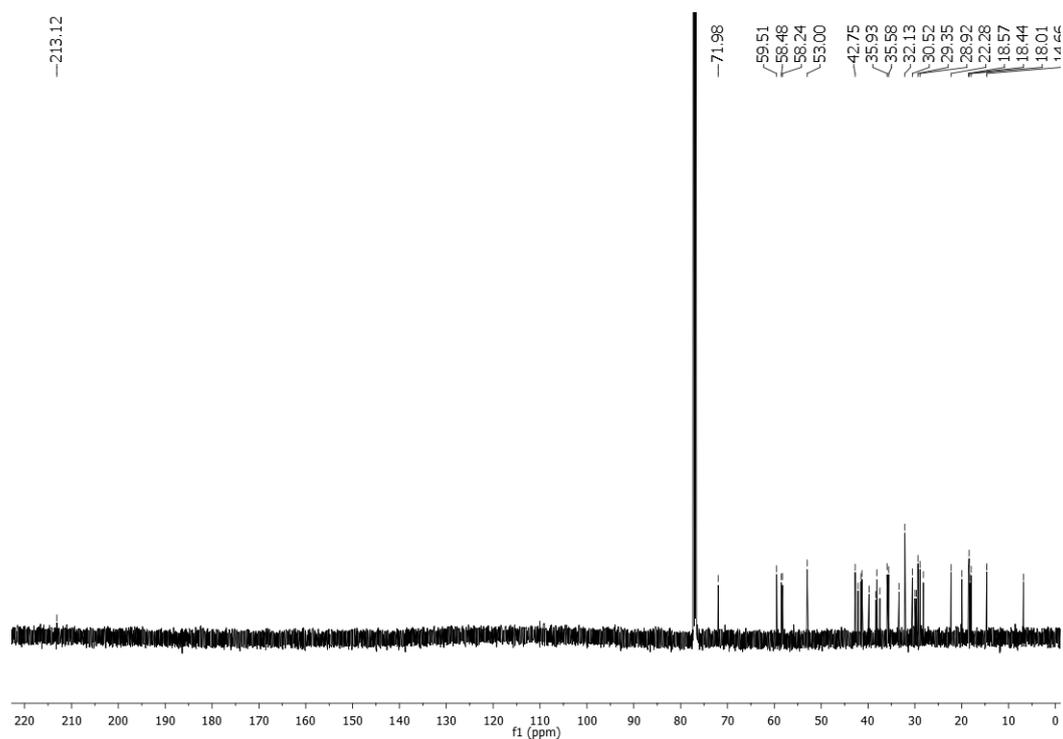
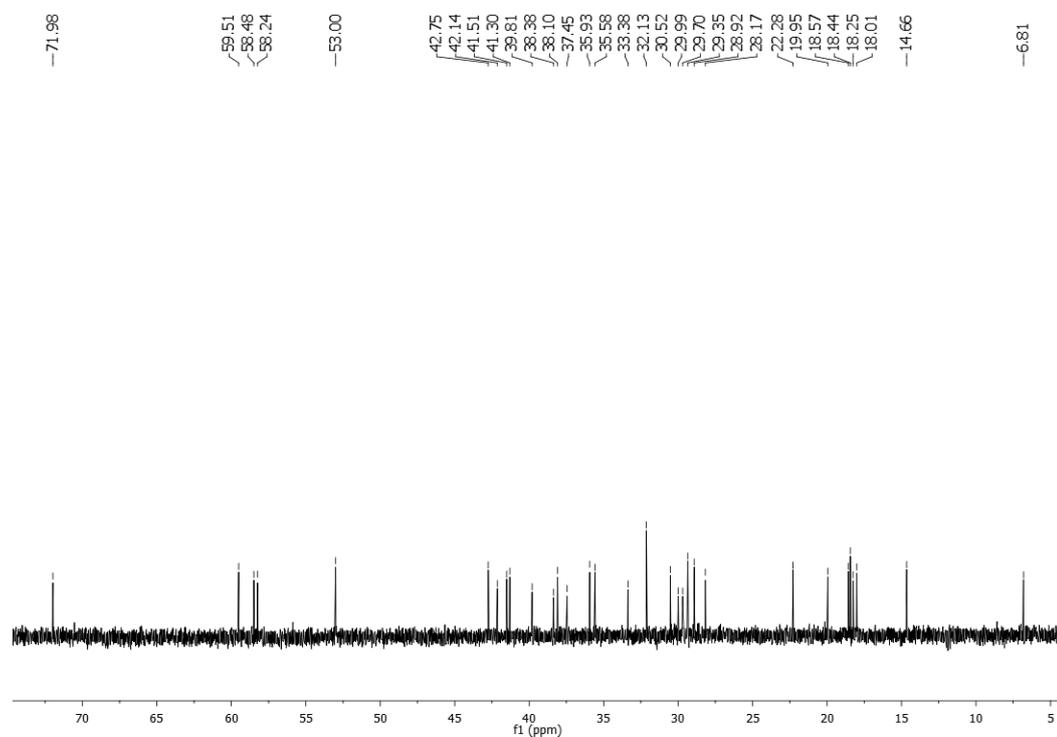


Figura 41. Espectro de RMN de ^{13}C - Broad band de Me-4 na região de 5,0-72,0 ppm (CDCl_3 , 500 MHz).



5.1.5 Identificação estrutural de Me-5

A substância codificada como Me-5, foi isolado na forma de óleo amarelado, solúvel em clorofórmio, pesando 24 mg representando 0,006 % do extrato etanólico bruto.

Na análise do espectro de infravermelho obtido em pastilhas de KBr foi observado uma banda larga com absorção em 3462 cm^{-1} característicos do grupo funcional hidroxila (OH), foi observado uma absorção em 1709 cm^{-1} característico de carbonila de cetona (C=O). Outras absorções visualizadas foram os estiramentos de C – H sp^3 em 2945 cm^{-1} e os dobramentos com absorção em 1451 cm^{-1} e 1380 cm^{-1} característicos de C – H sp^3 de CH_2 e CH_3 , respectivamente (Figura 43).

O espectro de ^1H apresentou um envelope de sinais na região de δ_{H} 0,7 – 1,90 característicos de hidrogênios de hidrocarbonetos saturados (Figura 44), nesta mesma região foram observados um duplete δ_{H} 1,04 integrando para seis hidrogênios e quatro singletos δ_{H} 0,76; 0,90; 0,93 e 1,00 integrando para 3 hidrogênios cada (Figura 45), sugerindo a presença de grupos metilas em Me-5, Com essas informações é possível sugerir que esta substância apresenta um esqueleto triterpênico (ZHOU et al., 2014). Foi observado um duplete e um simpleto com deslocamento químico δ_{H} 4,92 e 4,88 integrados para um hidrogênio cada, característicos de hidrogênios vinílicos, sugerindo que Me-5 apresenta dupla ligação (Figura 47). Outra multiplicidade visualizada foi um duplete com deslocamento químico em δ_{H} 4,10 (Figura 47) com integral para dois hidrogênios sugerindo a presença de hidrogênios α hidroxilas (OH), sofrendo desproteção pelo efeito indutivo do oxigênio da hidroxila, diante dessas informações e em comparação com a literatura é possível sugerir que Me-5 apresenta um esqueleto básico de triterpeno do tipo lupano (TINTO et al., 1992). Foram observados multipletos característicos de hidrogênios metilênicos na região de 1,80 – 2,55 ppm (Figura 46).

Analisando o espectro de RMN de ^{13}C foram observados 30 sinais em que sete foram atribuídos a carbonos não hidrogenados, cinco sinais atribuídos a carbonos metínicos, doze sinais atribuídos a carbonos metilênicos e seis sinais atribuídos a carbonos metílicos, confirmando que Me-5 possui um esqueleto triterpenico (Figura 48). Na figura 50 é visualizado um sinal com deslocamento químico δ_{C} 218,26 indicando a presença de carbonila de cetona e na figura 49 um sinal de δ_{C} 65,00 de carbono α hidroxila sugerindo a presença de um carbono metilênico oxigenado, observando os deslocamentos químicos do carbono metilênico δ_{C} 106,87 e do carbono não hidrogenado δ_{C} 154,67 é possível confirmar a presença de dupla ligação do tipo isoprenil (Figura 50) e juntamente com os carbonos metínicos δ_{C} 54,85; 49,71; 38,09;

48,87 e 43,74, confirma a presença do esqueleto triterpenico lupano (Figura 49) (TINTO et al., 1992; CURSINO et al., 2009).

Para a confirmação do assinalamento dos carbonos metílicos foi realizado a técnica de HSQC em que no espectro observa-se correlações diretas heteronuclear. Neste espectro foram registradas as correlações dos singletos δ_H 0,76; 0,90; 0,93 e 1,00 com os deslocamentos químicos de δ_C 17,70; 15,96; 14,45 e 21,02, respectivamente (Figura 51). Neste espectro foi possível confirmar a dupla ligação do radical isopropenil, através da correlação do dubleto em δ_H 4,92 com δ_C 106,87 (Figura 52).

Através da análise do espectro de correlação de HMBC foi possível confirmar a posição da carbonila através das correlações entre δ_C 218,26, δ_H 2,50 – 2,38 (J^2) e δ_H 1,89 – 1,83 (J^3) confirmando que a carbonila está inserida em C-3 (Figura 55). Outra correlação visualizada foi entre δ_H 4,92 e 4,88 com δ_C 65,00 confirmando que o carbono metilênico α hidroxila está inserido no radical isopropenil em C-30 (Figura 54). Na figura 53 podemos observar as correlações que confirmam a posição das metilas δ_H 0,76 com δ_C 35,38; 39,80; 42,99; 48,8 (C-16; C-17 C-18; C-22), δ_H 0,90 com δ_C 36,85; 39,56; 49,71; 54,85 (C-10; C-1; C-9 e C-5), δ_H 0,99 com δ_C 27,37; 38,09; 40,77 e 42,83 (C-13; C-15; C-8; C-14), δ_H 1,00 com δ_C 26,65; 47,31; 54,92 e 218,26 (C-23; C-4; C-5 e C-3) δ_H 1,04 com δ_C 33,55; 40,77; 42,83; 49,71 (C-7; C-8; C-14 e C-9), 1,05 com 47,31; 54,81; 21,02 (C-4; C-5 e C-23).

Na Tabela 9 estão compilados os deslocamentos químicos e as correlações observadas nos espectros de RMN 1H e ^{13}C e bidimensionais para Me-5. Diante dos dados descritos acima e em comparação com os dados da literatura foi possível identificar Me-5 como sendo 30 hidroxil-20(29)-lupen-3-ona ou 30-hidroxilupenona relatada pela primeira vez nesta espécie (Figura 42).

Figura 42. 30 hidroxil-20(29)-lupen-3-ona (Me-5) isolado de *Maytenus erythroxylon*.

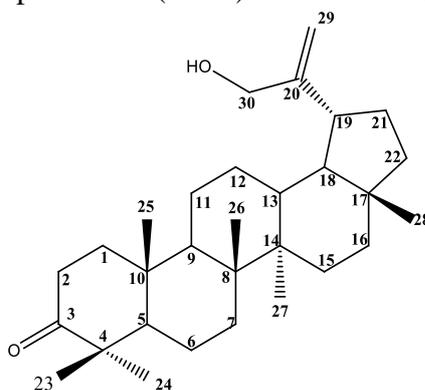


Tabela 9. Comparação dos dados de ^1H e ^{13}C de Me-5 em CDCl_3 em comparação com valores da literatura (TINTO et al., 1992). (δ em ppm e J em Hz).

C	Me – 5 (CDCl_3)			Tinto et al., 1992		
	$^{13}\text{C} \times ^1\text{H}$ HSQC		$^{13}\text{C} \times ^1\text{H}$ HMBC		δC	δH
	δC	δH	^2J	^3J		
3	218,26		C-2	C-3	218,27	
4	47,31				47,32	
8	40,77				40,79	
10	36,85				36,87	
14	42,83				42,85	
17	42,99				43,01	
20	154,67				154,67	
CH						
5	54,85				54,87	
9	49,71				49,73	
13	38,09				38,12	
18	48,81				48,81	
19	43,74				43,75	
CH₂						
1	39,56	1,89-1,83 (m)			39,59	1,91
2	34,12	2,50 – 2,38 (m)			34,13	2,47
6	19,65				19,8	
7	33,55				33,58	
11	21,53				21,57	
12	26,67				26,68	
15	27,37				27,40	
16	35,38				35,40	
21	31,73				31,75	
22	39,80				39,83	
29	106,87	4,92 (d, $J = 1,4$ MHz) 4,88 (s)	C-30; C-19		106,83	4,99, 4,93
30	65,00	4,10 (d, $J = 4,2$ MHz)	C-29; C-20		64,95	4,16
CH₃						
23	26,65	1,04 (d)	C-4	C-5; C-3; C-23	26,68	1,09
24	21,02	1,00 (s)	C-4	C-3; C-5; C- 23	21,04	1,05
25	15,96	0,90 (s)	C-10	C-1; C-5; C-9	15,99	0,95
26	15,78	1,04 (d)	C-8	C-7; C-9; C- 14	15,80	1,09
27	14,45	0,93 (s)	C-14	C-8; C-13; C-15	14,47	0,98
28	17,10	0,76 (s)	C-17	C-16; C-18; C-22	17,72	0,81

Figura 45. Espectro de RMN de ^1H Me-5 na região de 0,74-1,08 ppm (CDCl_3 , 400 MHz).

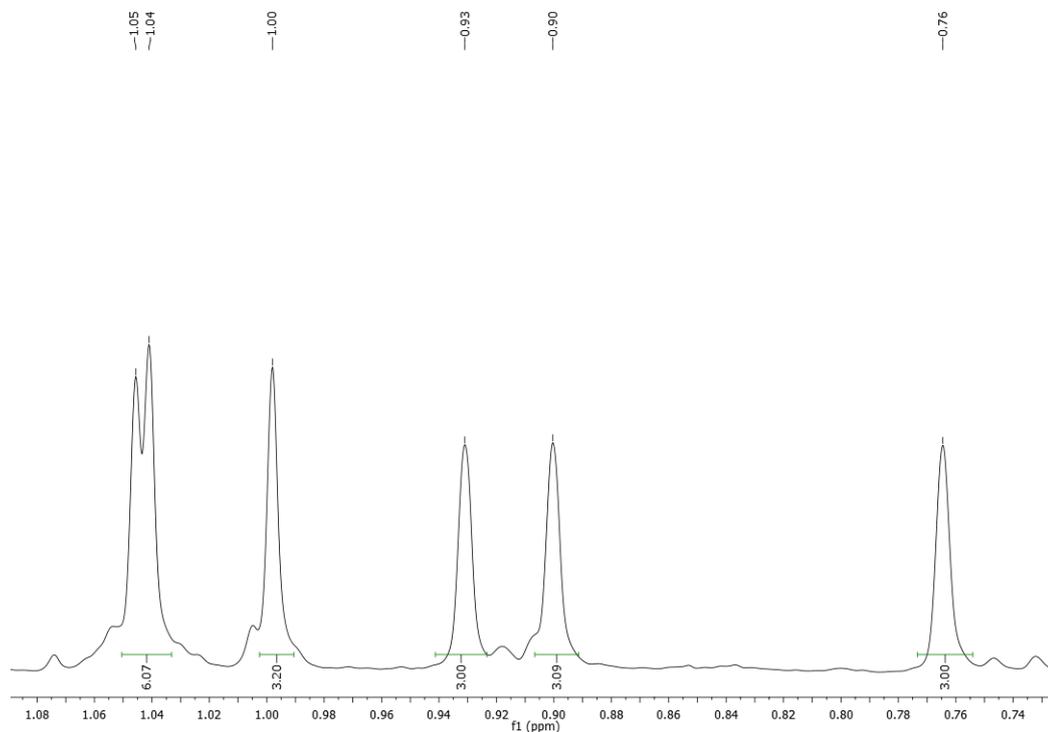


Figura 46. Espectro de RMN de ^1H Me-5 na região de 1,80-2,55 ppm (CDCl_3 , 400 MHz).

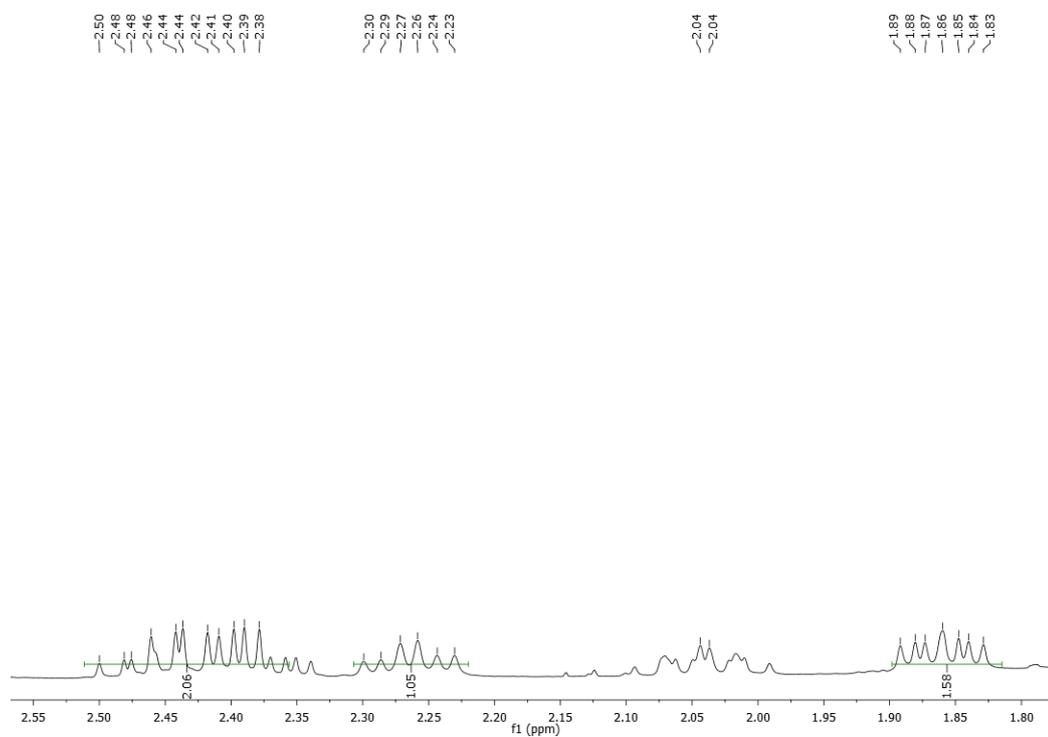


Figura 47. Espectro de RMN de ^1H Me-5 na região de 3,65-5,05 ppm (CDCl_3 , 400 MHz).

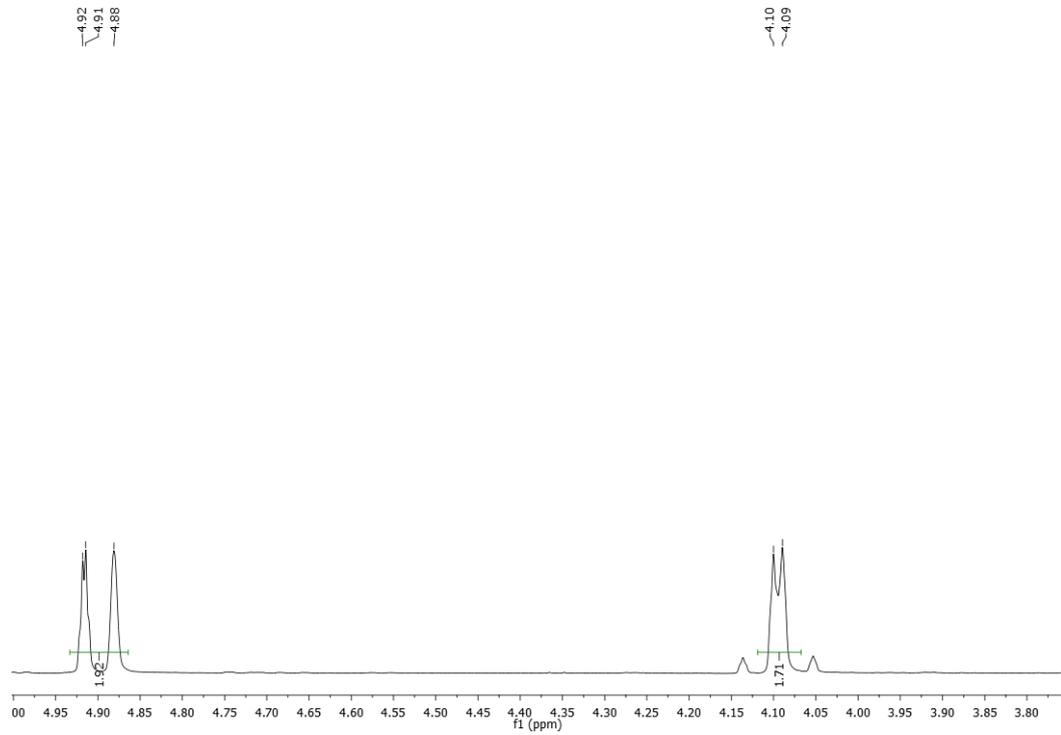


Figura 48. Espectro de RMN de ^{13}C -APT Me-5 (CDCl_3 , 100 MHz).

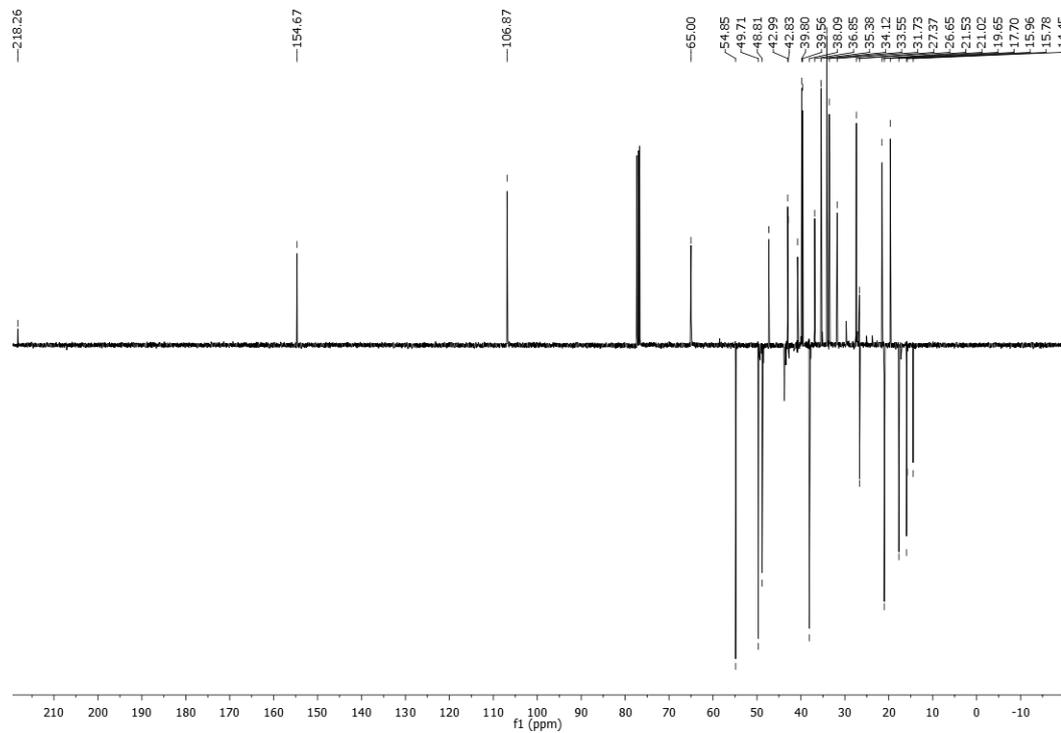


Figura 49. Expansão do espectro de RMN de ^{13}C Me-5 na região de 14-65 ppm (CDCl_3 , 100 MHz).

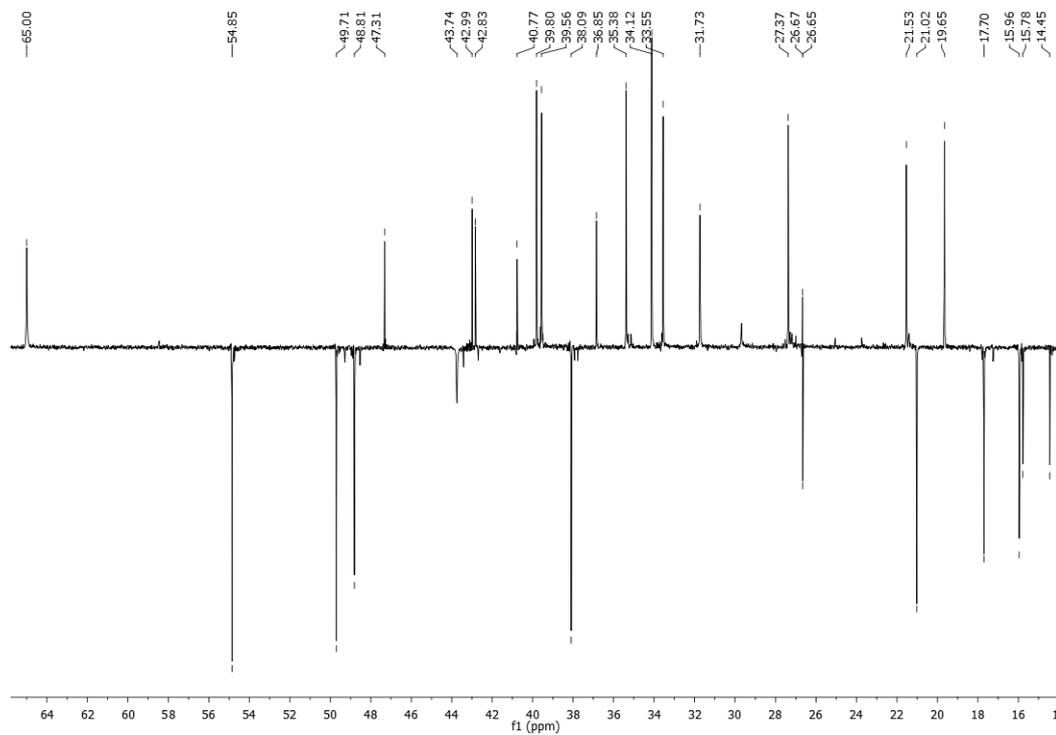


Figura 50. Expansão do espectro de RMN de ^{13}C Me-5 na região de 106-218 ppm (CDCl_3 , 100 MHz).

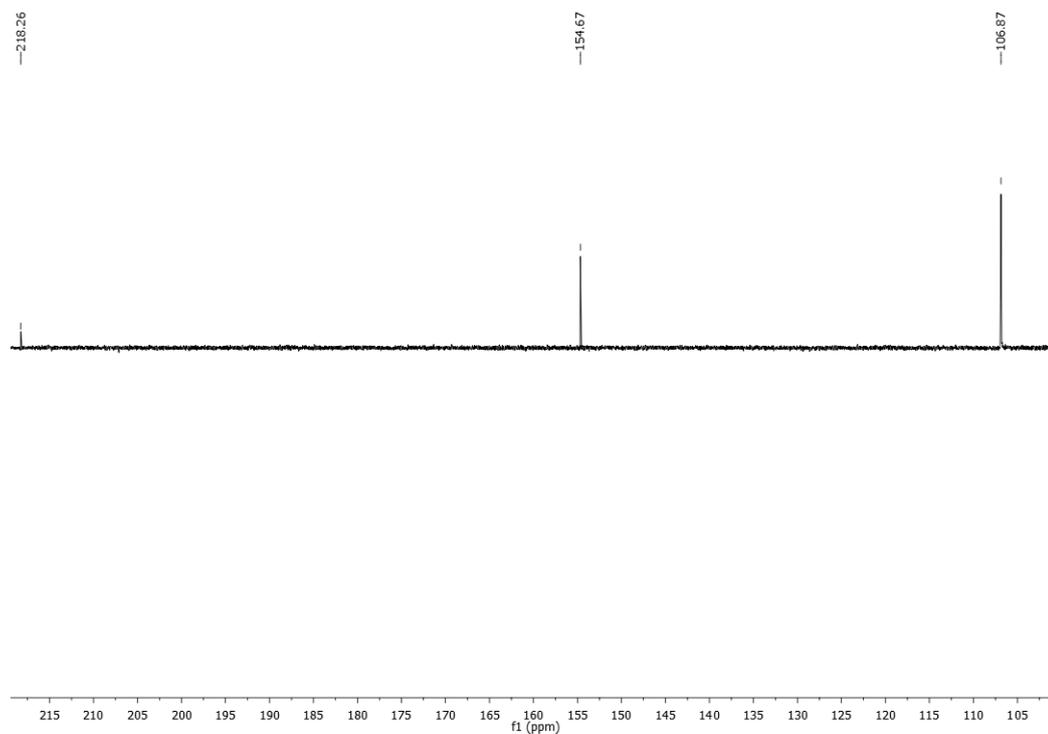


Figura 51. Expansão do espectro das correlações entre sinais de $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ - $J_{\text{H-C}}$ -HSQC de Me-5 registrados em CDCl_3 (400 x 100 MHz).

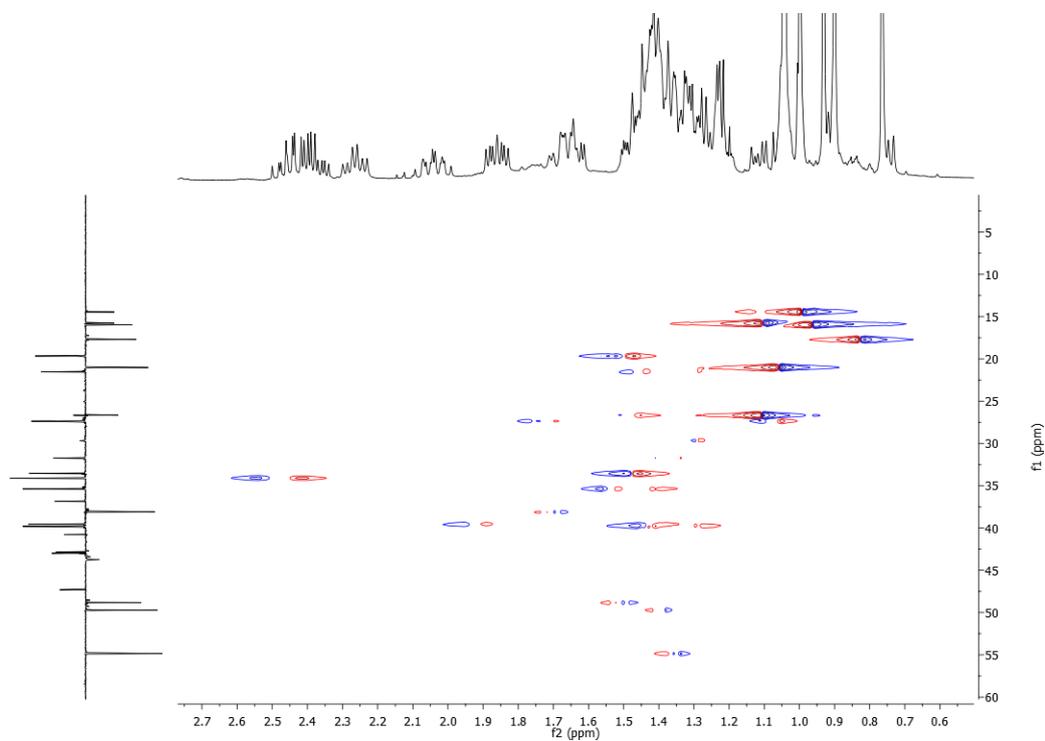


Figura 52. Expansão do espectro das correlações entre sinais de $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ - $J_{\text{H-C}}$ -HSQC de Me-5 registrados em CDCl_3 (400 x 100 MHz).

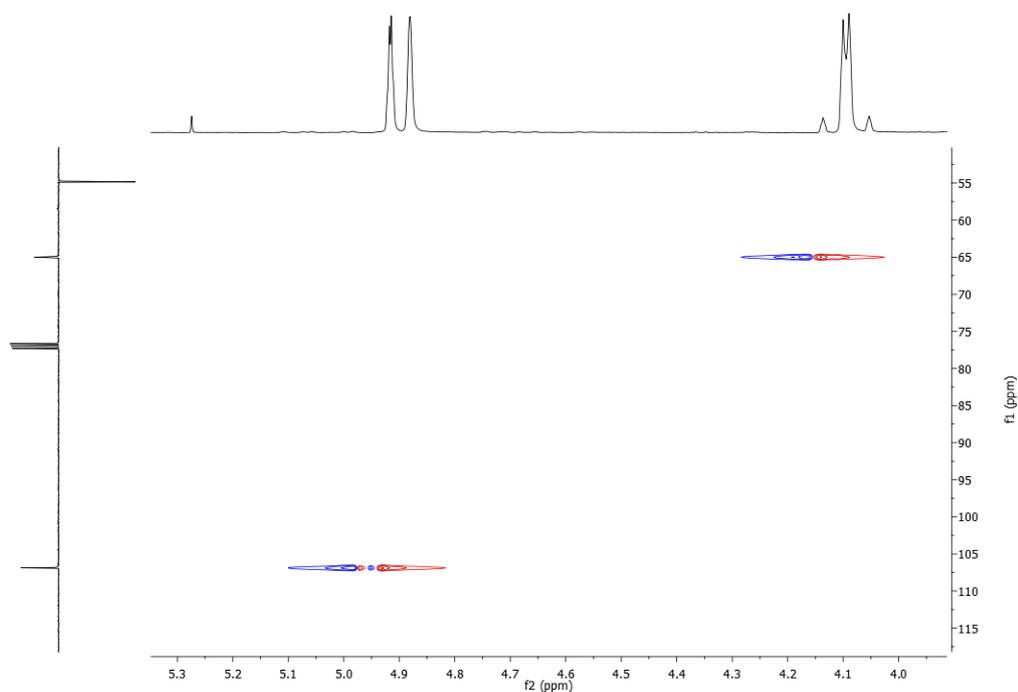


Figura 53. Expansão do espectro das correlações entre sinais de ^1H x ^{13}C $2^{-3}J_{\text{H-C-HMBC}}$ de Me-5 registrados em CDCl_3 (400 x 100 MHz).

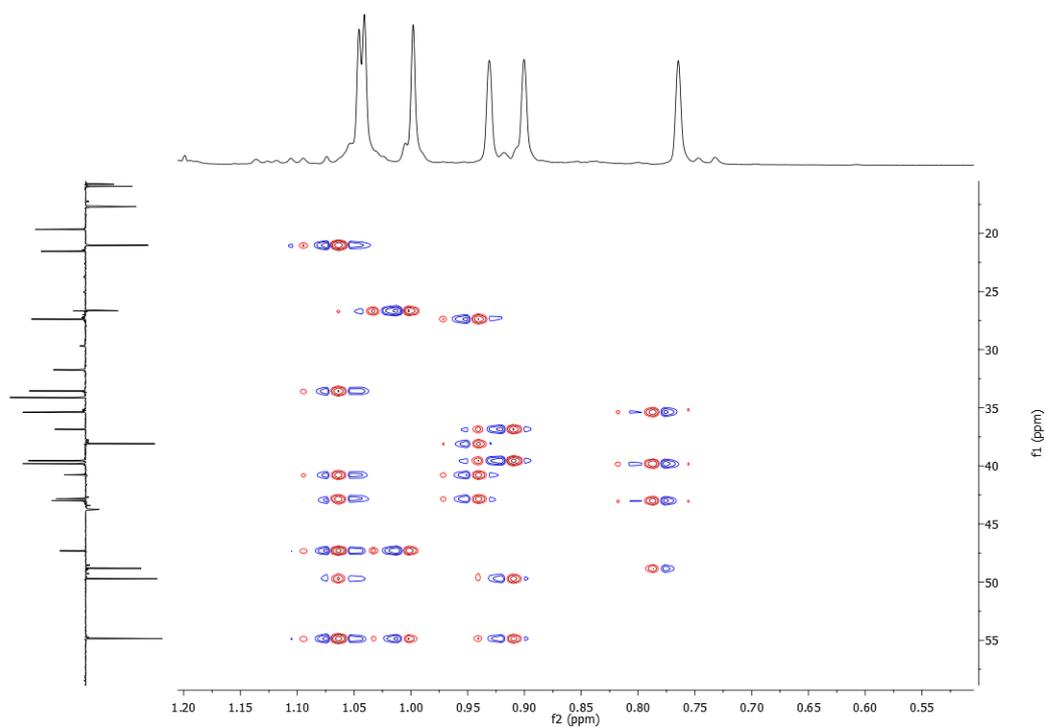


Figura 55. Expansão do espectro das correlações entre sinais de ^1H x ^{13}C $2^{-3}J_{\text{H-C-HMBC}}$ de Me-5 registrados em CDCl_3 (400 x 100 MHz).

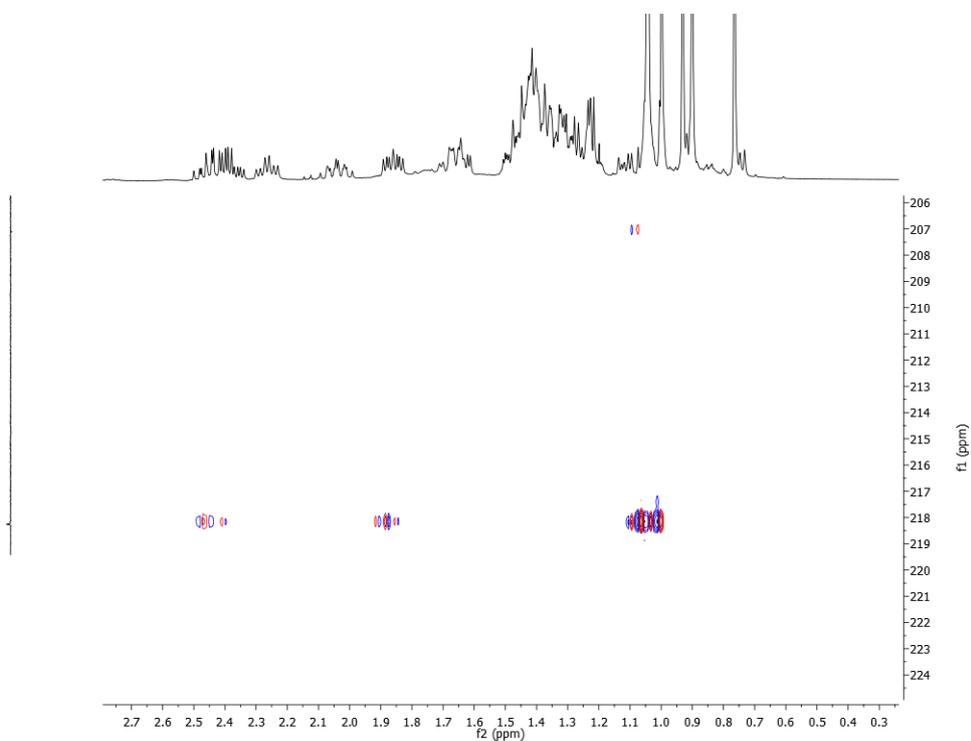
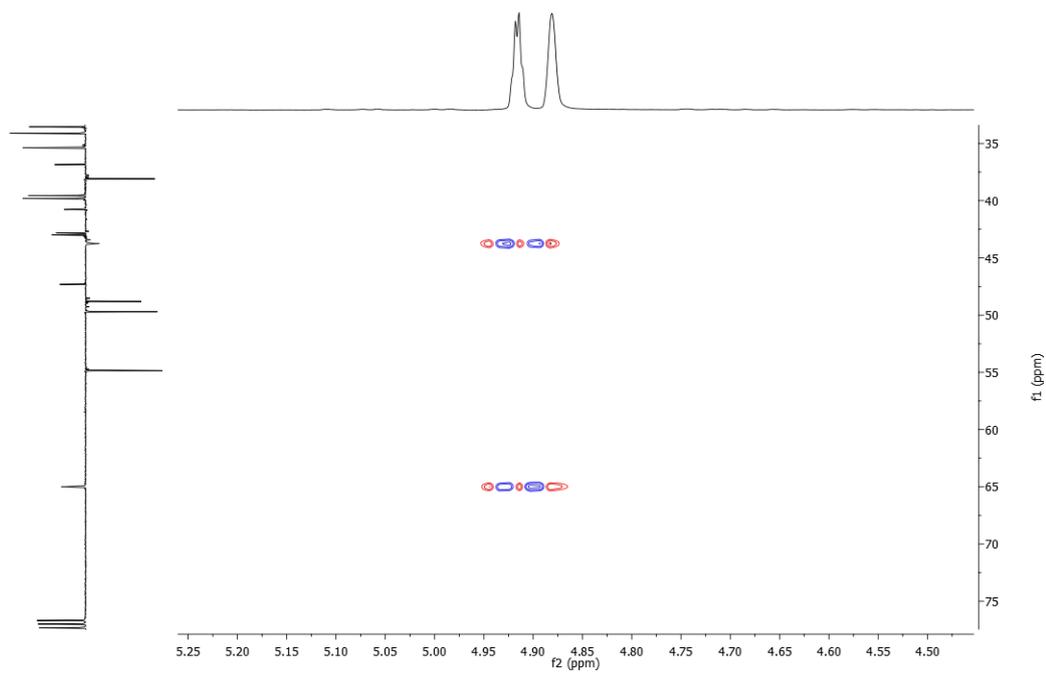


Figura 54. Expansão do espectro das correlações entre sinais de ^1H x ^{13}C $^{2-3}J_{\text{H-C}}$ -HMBC de Me-5 registrados em CDCl_3 (400 x 100 MHz).



5.2 Análise dos modelos de QSAR para *Candida albicans*, *Salmonella enterica*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*.

Foram selecionadas estruturas químicas com atividade biológica relatadas na literatura contra as bactérias *Salmonella enterica*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*. As estruturas das moléculas no formato *smiles* foram utilizadas como dados de entrada no software Volsurf+ que é um programa computacional que estuda as propriedades físico-químicas espaciais de molécula ou de um conjunto delas, a partir de mapas tridimensionais de energia de interações. Este *software* gerou 128 descritores para 10434 moléculas com atividade frente *Candida albicans*, 316 moléculas para *Salmonella entérica*, 10664 para *Pseudomonas aeruginosa* e 982 moléculas com atividade conhecida para *Escherichia coli*.

Os descritores moleculares juntamente com os dados da atividade antimicrobiana qualitativos foram utilizados para a geração do modelo com o aprendizado de máquina “Random Forest” (RF), onde para o modelo de *Salmonella enterica*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Escherichia coli* as moléculas com $pMIC_{50} \geq 5$ foram consideradas como Ativas, com um total de 486 moléculas para *E. coli*, 2622 moléculas para *P. aeruginosa* e 129 moléculas para *S. entérica*. Para as moléculas com $pMIC_{50} < 5$ foram tidas como Inativas, totalizando 496 moléculas para *E. coli*, 8042 moléculas para *P. aeruginosa*, 187 moléculas para *S. entérica* (Tabela 10). O modelo gerado para *C. albicans* foi utilizado um $pMIC_{50} \geq 4,46$ para moléculas ativas, que será utilizado nos testes gerando um total de 3934 moléculas ativas e para as moléculas inativas foi considerado um $pIC_{50} < 4,46$ com um total de 6500.

Tabela 10. Bancos de dados do ChEMBL

Banco de dados contra microrganismos	Total de estruturas químicas	Moléculas ativas (pMIC ₅₀)	Moléculas inativas (pMIC ₅₀)	ChEMBL ID
<i>C. albicans</i>	10436	(pMIC ₅₀ ≥ 4,46) 2622	(pMIC ₅₀ < 4,46) 8042	ChEMBL366
<i>E. coli</i>	982	(pMIC ₅₀ ≥ 5,00) 486	(pMIC ₅₀ ≥ 5,00) 496	ChEMBL354
<i>P. aeruginosa</i>	10693	(pMIC ₅₀ ≥ 5,00) 10550	(pMIC ₅₀ ≥ 5,00) 143	ChEMBL348
<i>S. enterica</i>	316	(pIC ₅₀ ≥ 5,00) 129	(pIC ₅₀ ≥ 5,00) 187	ChEMBL613762

Em análise dos modelos de *C. albicans*, *E. coli*, *P. aeruginosa* e *S. enterica* vemos que a validação cruzada e o teste demonstraram desempenho estatístico próximos, com taxas de

acertos superiores a 72%, como pode ser visualizado na tabela 9. O treinamento obteve desempenho perfeito, possuindo taxa de acerto de 100%. Pode-se observar também que os conjuntos de validação cruzada e teste permaneceram bem próximos, demonstrando modelos constantes.

Tabela 11. Resultados de validação cruzada e testes dos modelos utilizando o algoritmo RF

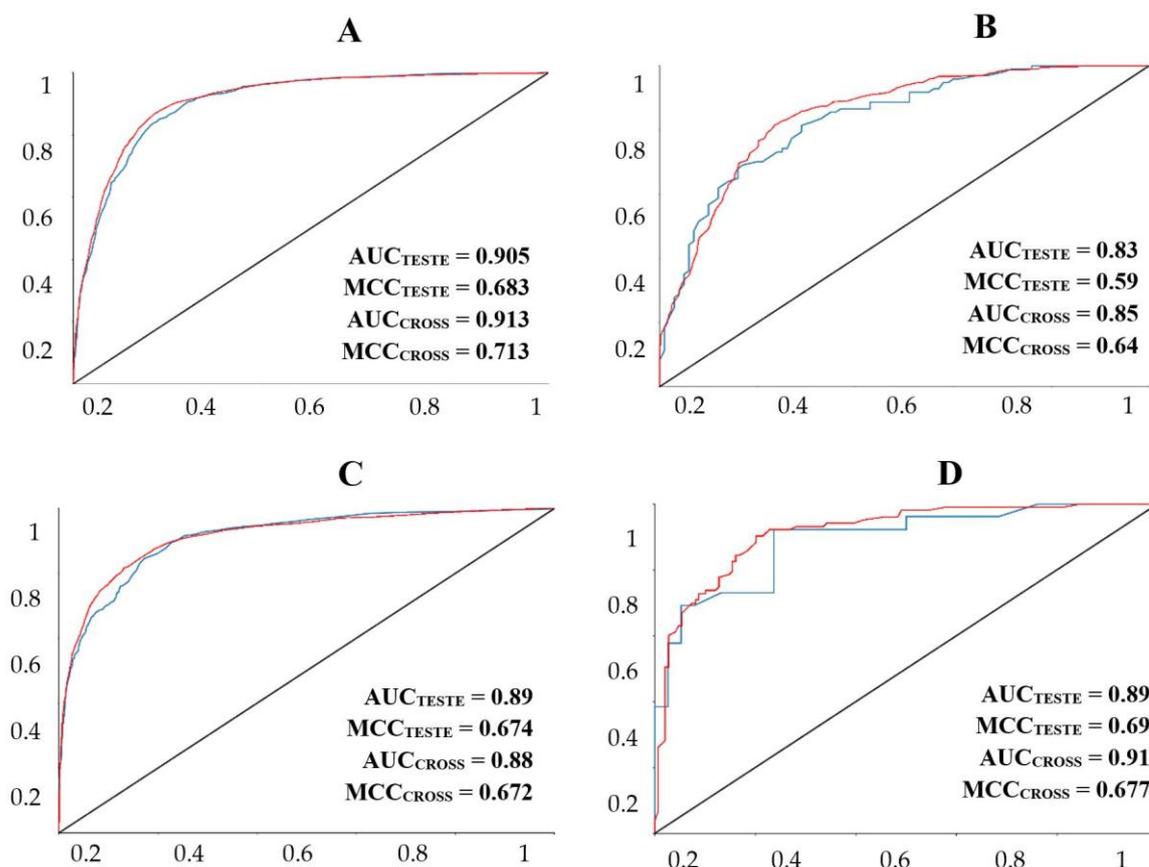
Modelo		Validação Cruzada			Teste		
		Amostra	Predito	%Acerto	Amostra	Predito	%Acerto
<i>Candida albicans</i>	Ativo	3147	2355	74	787	564	71
	Inativo	5200	4660	89	1300	1153	86
	Total	8347	7015	84	2087	1717	82
<i>Escherichia coli</i>	Ativo	151	138	91	97	71	72
	Inativo	133	111	83	100	76	76
	Total	284	249	87	197	147	74
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Ativo	3777	2733	72	944	686	72
	Inativo	4754	4136	87	1189	1030	86
	Total	8531	6869	80	2133	1716	80
<i>Salmonella enterica</i>	Ativo	103	77	74	26	19	73
	Inativo	149	130	87	38	33	86
	Total	252	207	82	64	52	81

Através destes dados foi possível calcular também o Coeficiente de Correlação de Matthews (MCC – “Matthews correlation coefficient”) para avaliação geral dos modelos gerados para as bactérias, que correlaciona as classificações binárias observadas e preditivas, resultando um valor entre -1 e $+1$, onde $+1$ é uma predição perfeita e -1 indica um total desacordo entre a predição e observação (BARROS et al., 2018). O valor obtido de MCC foram superiores a 0,6, como pode ser visualizado na figura 56, esses resultados demonstram que os modelos possuem uma boa taxa de predição.

Na análise da performance do modelo é gerado um gráfico de característica de operação do receptor (ROC), que para serem considerados modelos seguros os valores da área sob a curva devem ser próximos de um. Para os modelos criados foram obtidos valores do conjunto de teste para a área sob a curva de 0,83; 0,89 e 0,89 *E. coli*, *P. aeruginosa* e *S. enterica*, respectivamente.

Com essas informações é possível afirmar que o modelo é capaz de realizar uma alta taxa de classificação para este método de RF (Figura 56).

Figura 56: Gráfico de ROC, verdadeiros positivos versus falsos positivos, gerado para os modelos de RF selecionados para validação cruzada e conjuntos de testes: Linha vermelha: Validação cruzada; Linha azul: Teste A) *Candida albicans*, B) *Escherichia coli*, C) *Pseudomonas aeruginosa* e D) *Salmonella enteris*. AUC = valor da área sob a curva; MCC = coeficiente de correlação de Matthews.



Estes modelos foram utilizados para triar o banco dos cinco triterpenos isolados de *Maytenus erythroxylo*, para a investigação de possíveis moléculas bioativas contra os microorganismos escolhidos. Para que os triterpenos fossem ativos nos modelos gerados para as bactérias, devem apresentar $pIC_{50} \geq 5$ e para o fungo leveduriforme *Candida albicans* deve apresentar $pIC_{50} \geq 4,46$. Desta maneira, todos os triterpenos foram preditos como inativos nos modelos de *E. coli*, *S. enterica*, *P. aeruginosa*. No modelo de *Candida albicans* apenas o triterpeno ácido-3,4 *seco*-friedelano-3-óico foi predito como ativo.

5.3 Docking molecular

5.3.1 Redocking

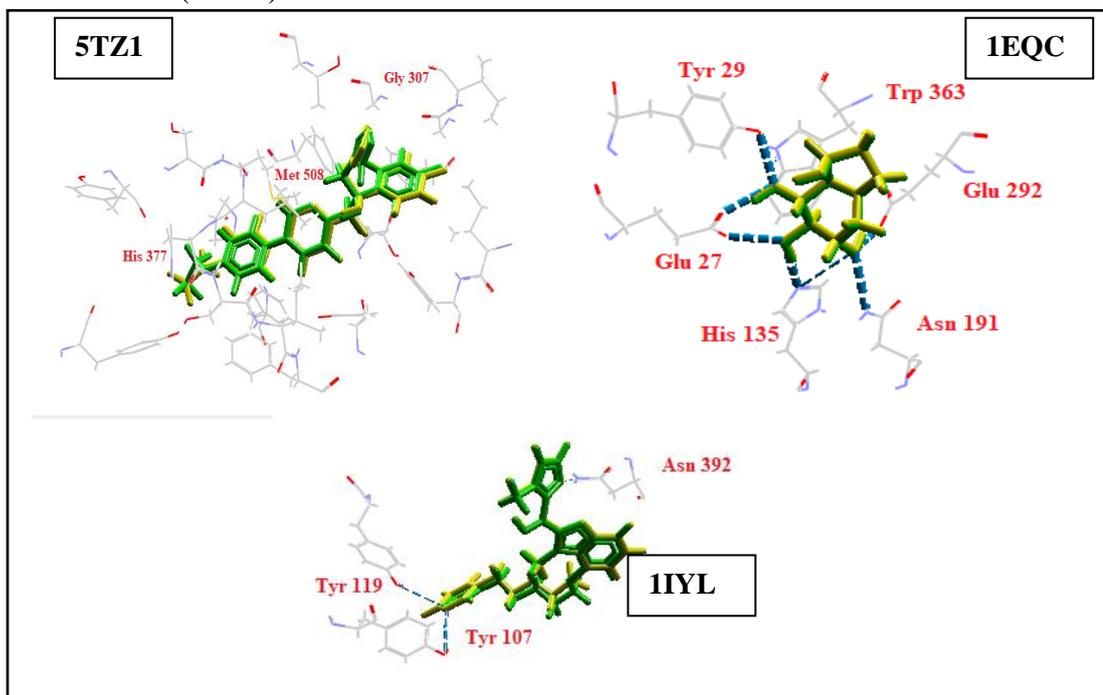
O *redocking* é a forma de analisar e validar os protocolos realizados durante o *docking* e garantir resultados confiáveis. Para isso o critério fundamental para descrever a qualidade de uma simulação do *docking* é a Raiz do Desvio Quadrático Médio (RMSD, do inglês Quantitative structure–activity relationship (XAVIER et al., 2016). Para considerar que as simulações do *docking* sejam válidas, o RMSD deve ter um valor na faixa de 0-2 Å (THOMSEN; CHRISTENSEN, 2006; KAUSHIK, 2014).

Foram realizados o *redocking* com as três enzimas utilizadas neste estudo [14 α -lanosterol-dimetilase (5TZ1), exo- β -(1,3)-glucanase, (1EQC), N-myristoyltransferase (1IYL) em que seus valores ficaram na faixa 0,1-0,7 Å (Tabela 12), confirmando que os protocolos realizados para o *docking* são considerados válidos. Com o valor de RMSD abaixo de dois podemos observar que existe uma sobreposição do ligante cristalizado com o ligante minimizado, demonstrando sua proximidade de acoplamento, confirmado pelo RMSD (Figura 57).

Tabela 12. Valores dos RMSD e Moldockscore do *redocking*.

Enzima	Código PDB	Moldockscore (kcal/mol)	RMSD
14 α -lanosterol-dimetilase	5TZ1	-131,9	0,71
exo-beta-(1,3)-glucanase	1EQC	-99,3	0,14
N-Myristoyltransferase	1IYL	-168,6	0,28

Figura 57. Sobreposições dos ligantes (amarelo), obtidos por docking, aos ligantes obtidos das estruturas do PDB (Verde).



5.3.2 Docking molecular dos triterpenos

Na análise do *docking* molecular dos triterpenos isolados de *Maytenus erythroxylon* complexados com as enzimas fúngicas, podemos selecionar os compostos que apresentam o melhor perfil de ancoragem do complexo ligante-receptor, que pode ser compreendida pela conformação do composto de menor energia de ligação, ou seja, pelo menor valor de *Moldock score*. Na análise do *docking* molecular é visualizado as possíveis interações que possam existir entre eles. Essas informações são úteis para predizer em qual local os triterpenos possivelmente podem atuar contra os microorganismos. Nas simulações de docking pelo programa MVD, as conformações das substâncias analisadas foram medidas pelo valor de pontuação *MolDock Score*.

5.3.2.1 Triterpenos complexados com a enzima 14 α -lanosterol-dimetilase (5TZ1)

A enzima 14 α -lanosterol-dimetilase (CYP51) pertence à família do citocromo P450, necessária para a biossíntese do ergosterol, esteroide essencial para manutenção da membrana celular, uma vez que está localizada na membrana do retículo endoplasmático. O grupo de antifúngico azóis, são considerados a maior classe de antifúngicos de uso clínico, sendo relatados sua atividade inibidora na enzima 14 α -lanosterol-dimetilase impedindo a formação do ergosterol. Este processo torna a membrana celular sensível, como também prevenindo a

formação de esteróis intracelulares, que são necessários para a regulação do ciclo celular (HARGROVE, et al., 2017).

A primeira análise observada é a quantidade de conformações geradas pelo MVD para o ligante PDB e qual conformação gerou uma melhor energia de ligação. Foram geradas cinco conformações, onde a média dos valores de energia foi de -121,4 kcal/mol. A melhor conformação encontrada para o ligante PDB (Oteseconazol), apresentou energia de interação de -131,9 kcal/mol ([00]VT1_602). Com relação aos triterpenos foram geradas: três conformações para o friedelanol (Me-1), quatro para o ácido-3,4-seco-friedelano (Me-2), quatro para o 29-norlupan-3,20-diona (Me-3), três para o 3-oxo-30-hidroxi-friedelano (Me-4) e três conformações para o 30-hidroxi-20(29)-lupen-3-ona (Me-5).

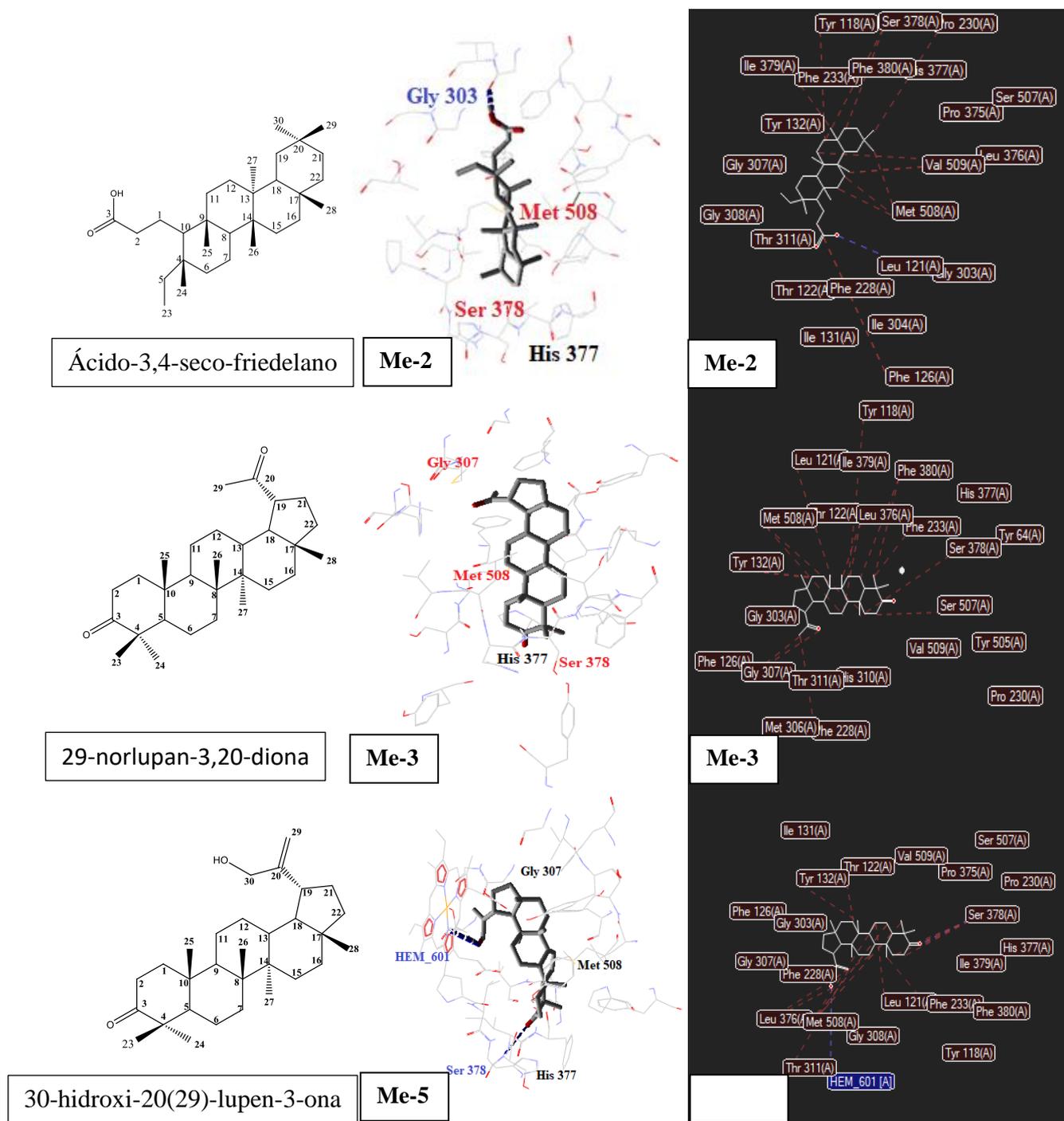
Na tabela 13 podemos visualizar todas as energias de ligação das médias das conformações geradas para cada substâncias. Com base neste resultado é possível visualizar que as conformações geradas para o ácido-3,4-seco-friedelano, 30-hidroxi-(20)29-lupen-3-ona e 29-norlupan-3,20-diona apresentaram energias de ligação melhores do que o ligante do PDB (Oteseconazol), demonstrando que as melhores energias de ligação das conformações dessas três substâncias apresentaram energia de ligação superior o antifúngico de uso clínico (Tabela 13).

Tabela 13. Média das energias de ligação do ligante PDB e as melhores energias das conformações dos triterpenos complexados com a enzima 14 α -lanosterol-dimetilase.

Substâncias	Média das Energias (kcal/mol)	Melhores conformações	Energias (kcal/mol)
VT1_602	-121,4	[0] VT1_602	-131,9
Ácido-3,4-seco-friedelano	-142,7	[0] Ácido-3,4-seco-friedelano	-150,0
30-hidroxi-(20)29-lupen-3-ona	-137,9	[1] 30-hidroxi-(20)29-lupen-3-ona	-143,2
29-norlupan-3,20-diona	-128,3	[1] 29-norlupan-3,20-diona	-138,0
3-oxo-30-hidroxi-friedelano	-120,7	[0] 3-oxo-30-hidroxi-friedelano	-129,4
Friedelanol	-118,6	[0]Friedelanol	-120,4

Como observado na figura 58, o antifúngico oteseconazol interage com os resíduos de aminoácido da glicina 307 (Gly 307), metionina 508 (Met 508), serina 378 (Ser 378) e histidina (His 377) através de interações estéricas (linhas vermelhas), que facilitam a inserção da molécula no sitio ativo. As demais interações observadas são consideradas de *van der Waals*,

Figura 59. Melhores conformações e as interações com o sítio ativo da enzima.



5.3.2.2 Triterpenos complexados com a enzima exo-beta-(1,3)-glucanase (1EQC)

A enzima exo- β -(1,3)-glucanase (Exg), pertence à família das hidrolases, nos fungos estão presentes na parede celular. Esta enzima realiza a síntese do glucano, polímeros formados por monômeros de D-glicose que são essenciais para constituição e manutenção da parede celular fúngica. A castanopermina, ligante que está complexado à enzima, é um alcaloide isolado nas sementes de *Castanopermium australe*, sendo considerado um inibidor competitivo da Exg atuando nos resíduos de aminoácidos tirosina 29, triptofano 363, glutamato 27 e 292, asparagina 146 e 191, histidina 135 (CUTFIELD et al., 1999).

No estudo, o programa MVD gerou apenas uma conformação para a castanopermina apresentando energia de ligação de -99,3 kcal/mol. Com relação aos triterpenos foram gerados cinco conformações para o friedelanol (Me-1), quatro para o ácido-3,4-seco-friedelano (Me-2), quatro para o 29-norlupan-3,20-diona (Me-3), quatro para o 3-oxo-30-hidroxifriedelano (Me-4) e duas conformações para o 30-hidroxi-20(29)-lupen-3-ona (Me-5). Após realizar a média das conformações obtidas pelo MVD nenhum dos triterpenos apresentou energias de ligação melhor que a do ligante, porém quando comparadas separadamente as conformações [00] friedelanol, [01] ácido-3,4-seco-friedelano e [00] 3-oxo-30-hidroxifriedelano mostraram energias de ligação melhores que o ligante PDB (tabela 14).

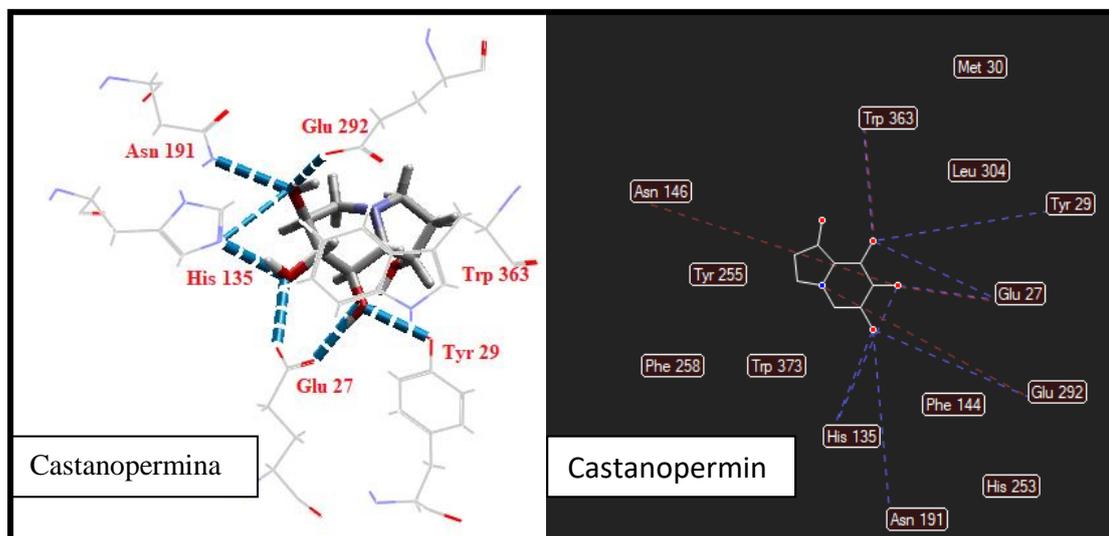
Tabela 14. Média das energias de ligação do ligante PDB e triterpenos complexados com a enzima exo-beta-(1,3)-glucanase.

Substâncias	Média das Energias (kcal/mol)	Melhores conformações	Energias (kcal/mol)
Castanopermina	-99,3	[0] Castanopermina	-99,3
Ácido-3,4-seco-friedelano	-75,6	[1] Ácido-3,4-seco-friedelano	-120,2
30-hidroxi-(20)29-lupen-3-ona	-67,5	[1] 30-hidroxi-(20)29-lupen-3-ona	-86,1
29-norlupan-3,20-diona	-55,1	[1] 29-norlupan-3,20-diona	-90,8
3-oxo-30-hidroxifriedelano	-74,2	[0] 3-oxo-30-hidroxifriedelano	-109,9
Friedelanol	-72,3	[0] Friedelanol	-99,8

Como observado na figura 60 estão ocorrendo interações de ligação de hidrogênio (linhas azuis), interações estéricas (linhas vermelhas) e interações de *van der Waals* no complexo ligante-proteína. Destaca-se as ligações de hidrogênios do ligante com os resíduos de aminoácidos tirosina 29, triptofano 363, glutamato 27 e 292, asparagina 191 e histidina 135

como essências para o acoplamento. Corroborando com os dados na literatura, mostrando assim a confiabilidades dos resultados obtidos pelo docking.

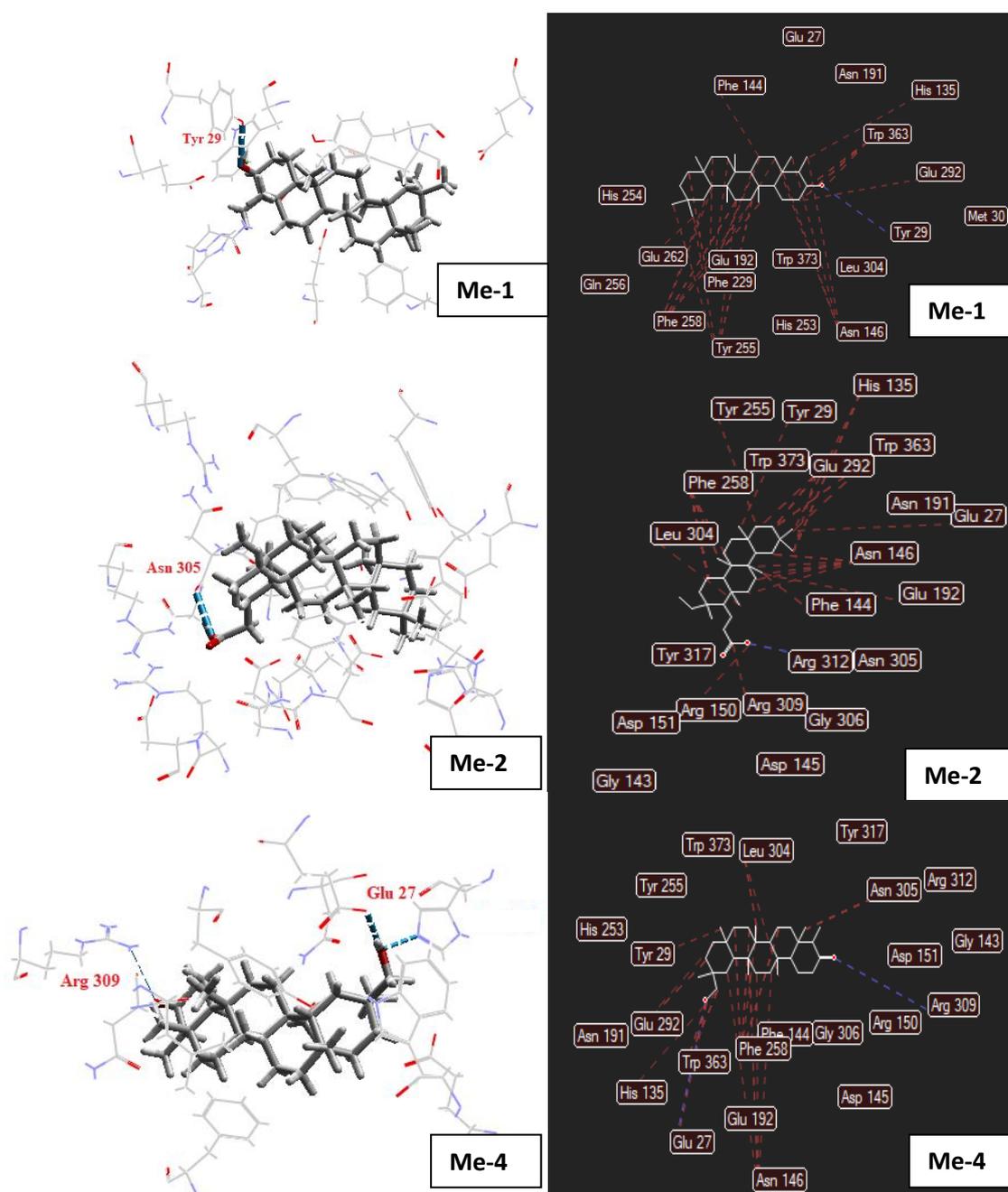
Figura 60. Melhor conformação do ligante PDB após o docking e suas interações.



Para os triterpenos foram visualizadas as mesmas interações, porem predominam as interações estéricas devido aos triterpenos possuírem uma longa cadeia hidrofóbica. Observando a figura 61 a conformação [0] do fridelanol realizou ligação de hidrogênio com o resíduo de aminoácido tirosina 29, a conformação [1] do ácido-3,4-seco-friedelano realizou uma interação com a asparagina 305 e a conformação [0] do 3-oxo-30-hidroxifriedelano realizou interação com o arginina 309 e glutamato 27 os resíduos de glutamato, principalmente o aminoácido Glu 27 que são considerados os mais importantes na manutenção da ligação dos inibidores das glicosidades (CUTIFIELD et al., 1999).

Com base nesses dados e associando com os resultados *in vitro*, é possível sugerir que os triterpenos isolados de *Maytenus erithroxylon* possivelmente atuam a nível de parede celular presentes em fungos e também terem seus estudos ampliados afim de melhorar a molécula com mudanças em sua estruturais afim de aumentar sua afinidade por este sitio ativo e melhorar seu potencial farmacológico.

Figura 61. Melhores conformações dos triterpenos e as interações com o sítio ativo da enzima.



5.3.2.3 Triterpenos complexados com a enzima N- miristoiltransferase-NMT (1IYL)

A enzima N-miristoiltransferase catalisa a transferência do miristato (ácido graxo saturado de 14 carbonos) de miristoil-CoA para substrato peptídico ou proteico adequado. A inibição dessa reação causa danos irreversíveis na montagem do complexo de membrana celular interna, vários estudos comprovaram que a miristoilação é necessária para a ligação de proteínas à membrana (SOGABE et al., 2002).

Para que ocorra a inibição deve existir interações por ligação de hidrogênio com os seguintes resíduos de aminoácidos Tyr 119, Leu 451, Asn 392 e His 227 e também com os resíduos Tyr 107, Phe 115, Phe 117, , Phe 176, Tyr 225, Phe 240, Tyr 256, Tyr 335, Phe 339 e Tyr 354 (SOGABE et al., 2002).

No *docking* realizado com o complexo enzima-ligante PDB cinco conformações foram geradas, das quais apresentaram uma média das energias de ligação de -147,3 kcal/mol, com a melhor conformação com energia de ligação de -168,6 kcal/mol. Destas interações foi possível observar interações do tipo ligação de hidrogênio (linhas azuis) com os resíduos tirosina 119 e 107 (Tyr 229 e Tyr 107) e asparagina 392 (Asn 392). As interações estéricas se apresentam (linhas vermelhas) com os resíduos fenilalanina 176 e 117 (Phe 176 e Phe 117), leucina 451 e 350 (Leu 451 e Leu350), tirosina 107 (Tyr 107) e cisteína 393 (Cys 393). Corroborando com a maioria das interações relatadas na literatura (Figura 62) (SOGABE et al., 2002).

Figura 62. Melhor conformação do ligante PDB após o docking e suas interações com a enzima N-miristoiltransferase.

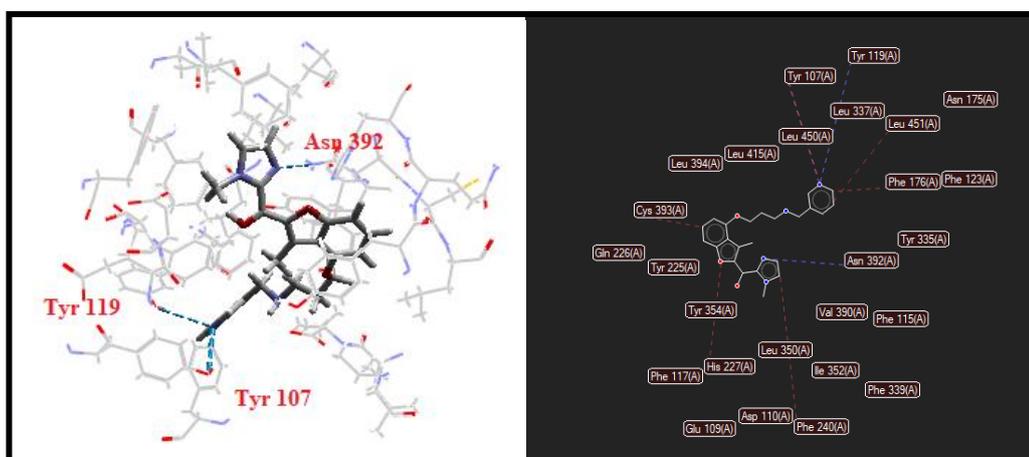
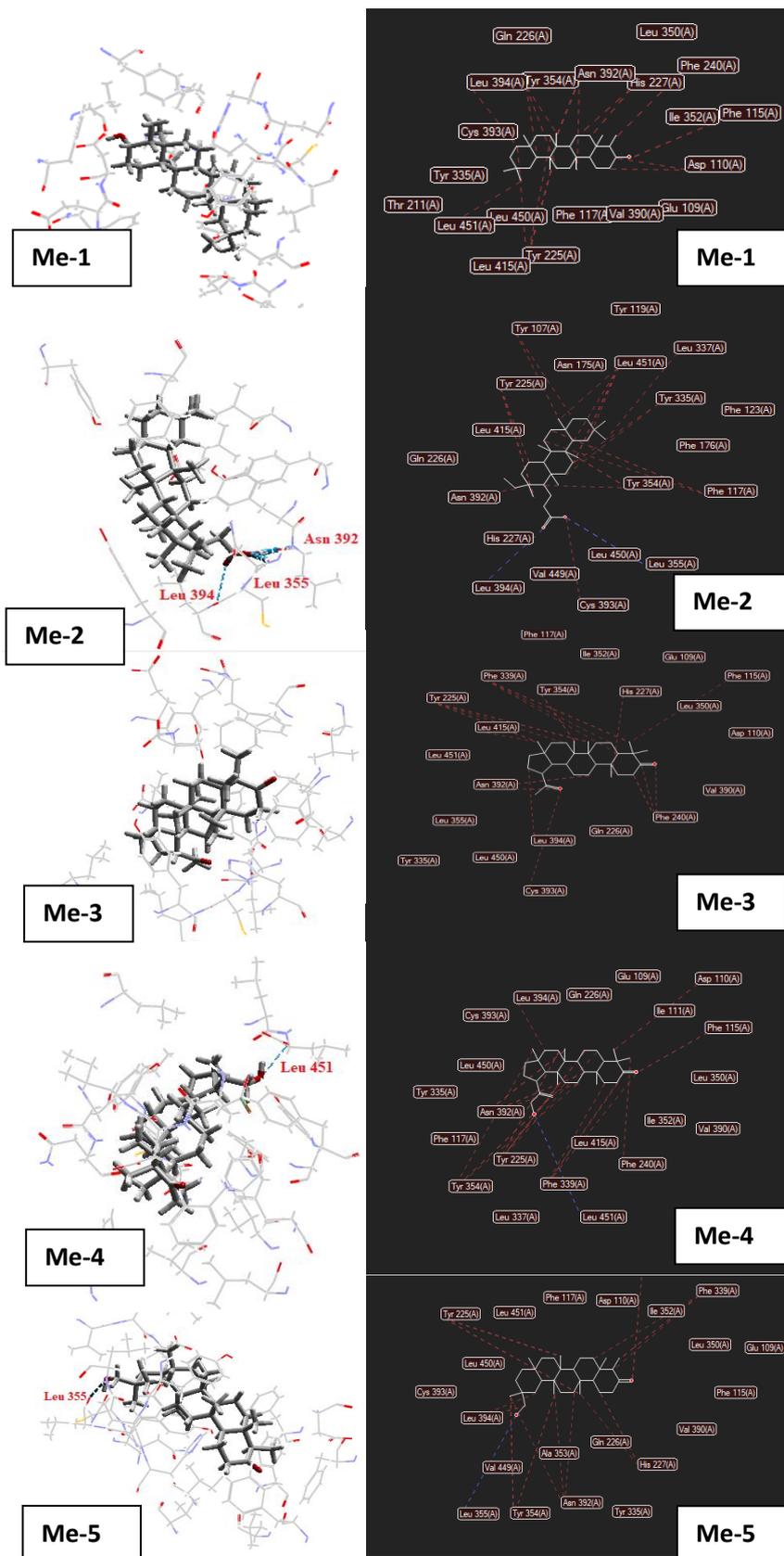


Tabela 15. Média das energias de ligação do ligante PDB e triterpenos complexados com a enzima N-miristoiltransferase.

Substâncias	Média das Energias (kcal/mol)	Melhores conformações	Energias (kcal/mol)
Der. Benzofurano	-147,3	[0] Der. Benzofurano	-168,6
Ácido-3,4-seco-friedelano	-102,7	[2] Ácido-3,4-seco-friedelano	-146,6
30-hidroxi-(20)29-lupen-3-ona	-92,1	[0] 30-hidroxi-(20)29-lupen-3-ona	-101,7
29-norlupan-3,20-diona	-85,5	[0] 29-norlupan-3,20-diona	-107,2
3-oxo-30-hidroxifriedelano	-85,1	[0] 3-oxo-30-hidroxifriedelano	-92,9
Fridelanol	-76,3	[1]Fridelanol	-82,5

Em comparação com o *docking* realizado com a enzima complexada com os triterpenos, foram predominantes as interações estéricas e algumas conformações apresentaram interações por ligação de hidrogênio. Para cada triterpeno foram geradas cinco conformações em que todas as conformações apresentaram energias de ligação piores que o ligante PDB (Tabela 15). Isso se explica, pelo fato de que as interações realizadas entre os triterpenos e o sitio ativo não foram nenhuma daquelas descritas acima para ser considerado um inibidor deste receptor (figura 63). Desta maneira, por não apresentar os grupos farmacofóricos que se liguem aos resíduos que inibam esta enzima pode considerar que esta enzima não é um alvo viável para os triterpenos.

Figura 63. Melhores conformações dos triterpenos e as interações com o sítio ativo da enzima N-miristoiltransferase.



5.4 Atividade antibacteriana e antifúngica das frações e fases de extratos de *Maytenus erythroxylo*

Na Tabela 16, estão registrados os resultados da avaliação da atividade antimicrobiana das substâncias isoladas e fases orgânicas de *Maytenus erythroxylo* que foram testadas nas concentrações de 1024 a 128 µg/mL. Todos os produtos foram capazes de inibir o crescimento microbiano das cepas *C. albicans* ATCC-60193 e *C. tropicalis* ATCC-13803 na concentração de 1024 µg/mL. Notavelmente, fase hexânica (A) do extrato apresentou maior atividade contra estas cepas (*C. albicans* ATCC-60193 e *C. tropicalis* ATCC-13803), inibindo o crescimento das leveduras na concentração de 512 µg/mL. Entretanto, nenhuma das substâncias foi capaz de inibir o crescimento microbiano de quaisquer cepas das espécies bacterianas. Juntamente com o estudo de predição dos triterpenos *in silico*, confirma a não atividade dos triterpenos fridelanos e lupanos frente a essas bactérias. Corroborando assim para um potencial de fraco para os triterpenos e moderado para as fases de *M. sidifolium* contra leveduras do gênero *Cândida* (PEIXOTO et al., 2016)

Tabela 16. Resultados da avaliação da Concentração Inibitória Mínima/CIM (µg/mL) das substâncias contra cepas bacterianas e fúngicas.

Produtos (µg/mL)	Bactérias				Leveduras	
	<i>S. enteritidis</i> ATCC-6017	<i>S. enteritidis</i> LM-13	<i>E. coli</i> ATCC-18739	<i>P. aeruginosa</i> ATCC-9027	<i>C. albicans</i> ATCC-60193	<i>C. tropicalis</i> ATCC-13803
Me-1	+	+	+	+	1024	1024
Me-2	+	+	+	+	1024	1024
Me-3	+	+	+	+	1024	1024
Me-4	+	+	+	+	1024	1024
Me-5	+	+	+	+	1024	1024
Fase Hexânica (A)	+	+	+	+	512	512
Fase Clorofórmica (B)	+	+	+	+	1024	1024
Fase em Acetato de Etila (C)	+	+	+	+	1024	1024
Fase Butanólica (D)	+	+	+	+	1024	1024
Controle: meio de cultura	-	-	-	-	-	-
Controle: micro-organismo	+	+	+	+	+	+
Controle: anfotericina B	X	X	X	X	-	-
Controle: gentamicina	-	-	-	-	X	X

(+): Crescimento do microrganismo, (-): Não houve crescimento do microrganismo,

(x): Controle não usado nos ensaios

Conclusões

6 CONCLUSÕES

O estudo fitoquímico da fração hexânica desengordurada de *Maytenus erythroxylon* resultou no isolamento de cinco triterpenos pentacíclicos relatados pela primeira vez nesta espécie, sendo três com esqueleto do tipo friedelano (3β -friedelanol; ácido-3,4-*seco*-friedelano-3-óico e 3-oxo-30-hidroxyfriedelano) e dois com esqueleto lupano (29-norlupan-3,20-diona e 30-hidroxi-20(29)-lupen-3-ona). Destes a substância 29-norlupan-3,20-diona é relatado pela primeira vez no gênero *Maytenus*. Este estudo reforçou a importância quimiotaxonômica dos triterpenos pentacíclicos neste gênero.

Os estudos de docking molecular para as três enzimas fúngicas, revelaram que os triterpenos Ácido-3,4-*seco*-friedelano, 30-hidroxi-(20)29-lupen-3-ona e 29-norlupan-3,20-diona apresentaram melhores energias de ligação do que o ligante PDB para a enzima 14α -lanosterol-dimetilase, Como também os triterpenos Ácido-3,4-*seco*-friedelano, oxo-30-hidroxyfriedelano e 3β -Friedelanol apresentaram melhores energias de ligação em comparação com o ligante PDB da enzima exo-beta-(1,3)-glucanase. Desta maneira essas substâncias se mostraram promissoras com este estudo, sendo importante o aprofundamento de estudos quimioinformáticos com esses metabólitos secundários, afim de ampliar o entendimento da sua ação nesses alvos e assim, melhorar seus potenciais farmacológicos.

O estudo da atividade antimicrobiana e antifúngica dos extratos e substâncias isoladas de *Maytenus erythroxylon* revela que os produtos testados apresentam atividade antifúngica, inibindo o crescimento microbiano das leveduras testadas com uma CIM estabelecida em 1024 $\mu\text{g/mL}$. Vale notar que a fase hexânica apresentou maior eficácia com uma CIM de 512 $\mu\text{g/mL}$. Contudo, nenhuma das cepas bacterianas foram sensíveis a nenhuma das substâncias. Desta forma, os produtos podem ser considerados como sendo de fraca a moderada atividade antifúngica conforme os critérios.

REFERÊNCIAS

ABREU, V. G. C.; TAKAHASHI, J. A.; DUARTE, L. P.; PILÓ-VELOSO, D.; SALES JUNIOR, P. A.; ALVES, R. O.; ROMANHA, A. J.; ALCÂNTARA, A. F. C. Evaluation of the bactericidal and trypanocidal activities of triterpenes isolated from the leaves, stems, and flowers of *Lychnophora pinaster*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 21, p. 615-621, 2011.

ACEVEDO, C. H.; SCOTTI, L.; ALVES, M. F.; DINIZ, M. F. F. M.; SCOTTI, M. T. Computer-Aided Drug Design Using Sesquiterpene Lactones as Sources of New Structures with Potential Activity against Infectious Neglected Diseases. **Molecules**, v. 22, p. 1-19, 2017.

ALMEIDA, M. F. O.; MELO, A. C. R.; PINHEIRO, L. B.; SILVA, J. F. A.; BARISON, A.; CAMPOS, F. R.; BARISON, A.; AMARAL, A. C. F.; MACHADO, G. M. C.; LEON, L. L. P.; SOUZA, A. D. L. Constituintes químicos e atividade leishmanicida de *Gustavia elliptica* (LECYTHIDACEAE). **Química Nova**, v. 34, p. 1182-1187, 2011.

ANDRADE, S. F.; COMUNELLO, E.; NOLDIN, V. F.; MONACHE, F. D.; CECHINEL-FILHO, V.; NIERO, R. Antiulcerogenic activity of fractions and 3,15-Dioxo-21 α -hydroxyfriedelane isolated from *Maytenus robusta* (Celastraceae). **Archives of Pharmacal Research**, v. 31, p. 41-46, 2008.

ANDRADE S.F.; LEMOS M, COMUNELLO E, NOLDIN VF, CECHINEL-FILHO V, NIERO R. Evaluation of the antiulcerogenic activity of *Maytenus robusta* (Celastraceae) in different experimental ulcer models. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 113, p. 252-257, 2007.

AQIL, M.; AHAD, A.; SULTANA, Y.; ALI, A. Status of terpenes as skin penetration enhancers. **Drug Discovery Today**, v. 12, n. 23/24, p. 1061-1067, 2007.

ANTUNES, R. M. P.; LIMA, E. O.; PEREIRA, M. S. V.; CAMARA, C. A.; ARRUDA, T. A.; CATÃO, R. M. R.; BARBOSA, T. P.; NUNES, X. P.; DIAS, C. S.; SILVA, T. M. S. Atividade antimicrobiana “*in vitro*” e determinação da concentração inibitória mínima (CIM) de fitoconstituintes e produtos sintéticos sobre bactérias e fungos leveduriformes. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.16, n. 4, p. 517-524, 2006

BANDEIRA, K. L. A. **Morfoanatomia foliar de *Maytenus erythroxyla* reissek (celastraceae) proveniente de área de restinga**, 2016, Monografia (Trabalho de Conclusão de Curso em ecologia), Universidade Federal da Paraíba, Rio Tinto – PB.

BAZZOCCHI, I. L.; TORRES-ROMERO, D.; KING-DÍAZ, B.; JIMÉNEZ, I. A.; LOTINA-HENNSEN, B. Sesquiterpenes from *Celastrus vulcanicola* Photosynthetic Inhibitors. **Journal of Natural Products**, v. 71, p. 1331-1335, 2008.

BARROS, R. P. C.; CUNHA, E. V. L.; CATÃO, R. M. R.; SCOTTI, L.; SOUZA, M. S. R.; BRÁS, A. A. Q.; SCOTTI, M. T. Virtual screening of secondary metabolites of the genus *Solanum* with potential antimicrobial activity. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 28, p. 686-691, 2018.

BFG. Growing knowledge: an overview of Seed Plant diversity in Brazil. **Rodriguésia**, v. 66, n. 4, p.1085-1113, 2015.

BIRAL, L.; SIMMONS, M. P.; SMIDT, L. R.; TEMBROCK, L. R.; BOLSON, M.; ACHER, R. H.; LOMBARDI, J. A. Systematics of New World *Maytenus* (Celastraceae) and a New Delimitation of the Genus. **Systematic Botany**, v. 42, n. 4, p. 680-693, 2017.

BIRAL, L.; SMIDT, E. C.; BOLSON, M.; LOMBARDI, J. A. A new species of *Maytenus* (Celastraceae) from the Brazilian Atlantic Forest, with evidence of molecular phylogeny, and two new synonyms for *Maytenus floribunda*. **Phytotaxa**, v. 231, n. 1, p. 53-62, 2015.

BOUFRIDI, A.; QUINN, R. J. Harnessing the Properties of Natural Products, **Annual Review Pharmacology Toxicology**, v. 58, p. 17.1-17.20, 2017.

BUFFA, W.; BOLZANI, V. D.; FURLAN, M.; PEREIRA, S. I. V.; PEREIRA, M. A. S.; FRANCA, S. C. *In vitro* propagation of *Maytenus ilicifolia* (Celastraceae) as potential source for antitumoral and antioxidant quinomethide triterpenes production. A rapid quantitative method for their analysis by reverse-phase high-performance liquid chromatography. **Arkivoc**, v. 6, p. 137-146, 2004.

CALDAS-FILHO M. R. D. **Avaliação da atividade gastroprotetora de *Maytenus distichophylla* Mart. ex Reissek (Celastraceae)**. Dissertação da Universidade Federal da Paraíba (UFPB), João Pessoa, 2013.

CALLIES, O.; NÚÑEZ, M. J.; PERESTELO, N. R.; REYES, C. P.; TORRES-ROMERO, D.; JIMÉNEZ, I. A.; BAZZOCHI, I. L. Distinct sesquiterpene pyridine alkaloids from in *Salvadoran* and *Peruvian* Celastraceae species. **Phytochemistry**, v. 142, p. 21-29, 2017.

CARVALHO, A. C. B.; LANA, T. N.; PERFEITO, J. P. S.; SILVEIRA, D. The Brazilian market of herbal medicinal products and the impacts of the new legislation on traditional medicines, **Journal of Ethnopharmacology**, v. 212, p 29-35, 2018.

CARVALHO, A. C. B.; RAMALHO, L. S.; MARQUES, R. F. O.; PERFEITO, J. P. S. Regulation of herbal medicines in Brazil, **Journal of Ethnopharmacology**, in press 2014.

CASTRO A. S. F., MORO M. F, MENEZES M. O. T. O Complexo Vegetacional da Zona Litorânea no Ceará: Pecém, São Gonçalo do Amarante. **Acta Botanica Brasilica**. v. 26, p. 108-124, 2012.

CESTARO L. A, SOARES J. J. Variações florística e estrutural e relações fitogeográficas de um fragmento de floresta decídua no Rio Grande do Norte, Brasil. **Acta Botanica Brasilica** v. 18, p. 203-218, 2004.

CLEELAND, R.; SQUIRES, E. Evaluation of new antimicrobials “*in vitro*” and in experimental animal infections. In: LORIAN, V. M. D. **Antibiotics in Laboratory Medicine**. Williams & Wilkins, p. 739-788, 1991.

CLINICAL LABORATORY STANDARDS INSTITUTE^a. **Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts**. Approved standard M27-A3. Pennsylvania, United States of America: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2008.

CLINICAL LABORATORY STANDARDS INSTITUTE^b. **Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of filamentous fungi**. Approved standard M38-A2. Pennsylvania, United States of America: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2008.

COLE, B. J. W.; BENTLEY, M. D.; HUA, Y.; BU, L. Triterpenoid Constituents in the Outer Bark of *Betula alleghaniensis* (Yellow Birch). **Journal Wood Chemistry and technology**, v.11, n. 2, p. 209-223, 1991.

COPPEDE, J. S.; PINA, E. S.; PAZ, T. A.; FACHIN, A. L.; MARINS, M. A.; BERTONI, B. W.; FRANÇA, S. C.; PEREIRA, A. M. S. Cell cultures of *Maytenus ilicifolia* Mart. are richer sources of quinone-methide triterpenoids than plant roots *in natura*. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, v. 118, p. 33-43, 2014.

CRUCIANI, G.; CRIVORI, P.; CARRUPT, P.A.; TESTA, B. Predicting Blood–Brain Barrier Permeation from Three-Dimensional Molecular Structure. **Journal of Molecular Structure**, v. 503, p. 17-30, 2000.

CURSINO, L. M. C.; MESQUITA A. S. S.; MESQUITA, D. W. O.; FERNANDES, C. C.; PEREIRA-JUNIOR, O. L.; AMARAL, I. L.; NUNEZ, C. V. Triterpenos das folhas de *Minquartia guianensis* Aubl. (Olacaceae). **Acta Amazonica**, v. 39, n. 1, p. 181-186, 2009.

CUTFIELD, S. M.; DAVIES, G. J.; MURSHUDOV, G.; ANDERSON, B. F.; MOODY, P. C. E.; SULLIVAN, P. A.; CUTFIELD, J. F. The Structure of the Exo-b-(1,3)-Glucanase from *Candida albicans* in Native and Bound Forms: Relationship between a Pocket and Groove in Family 5 Glycosyl Hydrolases. **Journal of Molecular Biology**, v. 294, n. 3, p. 771-783, 1999.

DELGADO-MÉNDEZ, P.; HERRERA, N.; CHÁVEZ, H.; ESTÉVEZ-BRAUN, A.; ERAVELO, A. G.; CORTES, F.; CASTANYS, S.; GAMARRO, F. New terpenoids from *Maytenus apurimacensis* as MDR reversal agents in the parasite *Leishmania*. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v.16, p. 1425–1430, 2008.

DEWAR, M. J. S.; ZOEBISCH, E. G.; HEALY, E. F.; STEWART, J. P. A new general purpose quantum mechanical molecular model. **Journal of American Chemical Society**, v. 107, n. 13, p. 3902-3909, 1985.

DEWICK, P.M.; **Medicinal natural products: a biosynthetic approach**. 2^a ed. Chichester: John Wiley & Sons Ltda, 2002.

DUARTE, L. P.; FIGUEIREDO, R. C.; DE SOUZA, G. F.; SOARES, D. B. S.; RODRIGUES, S. B. V.; SILVA, F. C.; SILVA, G. D. F. Chemical constituents of *Salacia elliptica* (Celastraceae). **Química Nova**. v. 22, n. 4, p. 900-903, 2010.

DUTRA, R. C.; CAMPOS, M. M.; SANTOS, A. R. S.; CALIXTO, J. B. Medicinal plants in Brazil: Pharmacological studies, drug discovery, challenges and perspectives. **Pharmacological Research**, 2016.

ESPINDOLA, L. S.; DUSI, R. G.; DEMARQUE, D. P.; BRAZ-FILHO, R.; YAN, P.; BOKESH, H. R.; GUSTAFSON, K. R.; BEUTLER, J. A. Cytotoxic Triterpenes from *Salacia crassifolia* and Metabolite Profiling of Celastraceae Species. **Molecules**, v. 23, n. 1494, p. 1-11 2018.

ESTEVAM, C.S.; OLIVEIRA, F. M.; CONSERVA, L. M.; LIMA, L. F. C. O.; BARROS, E. C. P.; BARROS, A. C. P.; ROCHA, E. M. M.; ANDRADE, E. H. A. Constituintes químicos e avaliação preliminar *in vivo* da atividade antimalárica de *Ouratea nitida* Aubl (Ochanaceae), **Revista Brasileira de Farmacognosia** v. 15, n. 3, p. 195-98, 2005.

FERREIRA, F. L.; RODRIGUES, V. G.; SILVA, F. C.; MATILDES, B. L. G.; TAKAHASHI, J. A.; SILVA, G. D. F.; DUARTE, L. P.; OLIVEIRA, D. M.; FILHO, S. A. V. *Maytenus distichophylla* and *Salacia crassifolia*: source of products with potential acetylcholinesterase inhibition. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 27, p 471-474, 2017.

FORMIGA, R. O.; QUIRINO, Z. G. M.; DINIZ, M. F. F. M.; MARINHO, A. F.; TAVARES, J. F.; BATISTA, L. M. *Maytenus erythroxylon* Reissek (Celastraceae) etanol extract presents antidiarrheal activity via antimotility and antisecretory mechanisms, **World Journal of Gastroenterology**, v. 23, n. 24, p. 4381-4389, 2017.

FREIRE, I. C. M.; PÉREZ, A. L. A. L.; CARDOSO, A. M. R.; MARIZ, B. A. L. A.; ALMEIDA, L. F. D.; CAVALCANTI, Y. W.; PADILHA, W. W. N. Atividade antibacteriana de Óleos Essenciais sobre *Streptococcus mutans* e *Staphylococcus aureus*. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.16 n.2, 2014.

GARCIA, M. C. F.; SOARES, D. C.; SANTANA, R. C.; SARAIVA, E. M.; SIANI, A. C.; RAMOS, M. F. S.; DANELLI, M. G. M.; SOUTO-PADRON, T. C.; PINTO-DA-SILVA, L. H. The *in vitro* antileishmanial activity of essential oil from *Aloysia gratissima* and guaiol, its major sesquiterpene against *Leishmania amazonensis*. **Parasitology**, 2017.

GONZALES F. G. Antiulcerogenic and analgesic effects of *Maytenus aquifolium*, *Sorocea bomplandii* and *Zolernia ilicifolia*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 77 p. 41-7, 2001.

HADACECK, F.; GREGER, H. Testing of antifungal natural products: methodologies, comparability of results and assay choice. **Phytochemical Analyses**, v. 11, p. 137-147, 2000.

HALL, M.; FRANK, E.; HOLMES, G.; PFAHRINGER, B.; REUTEMANN, P. The WEKA data mining software: an update. **SIGKDD Exploration**, v. 11, n. 1, p.10-18. 2009.

HARGROVE, T. Y.; FRIGGERI, L.; WAWRZAK, Z.; QI, A.; HOEKSTRA, W. J.; SCHOTZINGER, R. J.; YORK, J. D.; GUENGERICH, F. P.; LEPESHEVA, G. L. Structural analyses of *Candida albicans* sterol 14-demethylase complexed with azole drugs address the molecular basis of azole-mediated inhibition of fungal sterol biosynthesis. **Journal of Biological Chemistry**, v. 292, n. 16, p. 6728-6743, 2017.

HEYDARI, M.; ZANFARDINO, A.; TALEEI, A.; BUSHEHRI, A. A. S.; HADIAN, J.; MARESCA, V.; SORBO, S.; NAPOLI, M. D.; VARCAMONTI, M.; BASILE, A.; RIGANO, D. Effect of Heat Stress on Yield, Monoterpene Content and Antibacterial Activity of Essential Oils of *Mentha x piperita* var. *Mitcham* and *Mentha arvensis* var. *piperascens*. **Molecules**, v. 23, n. 8, p. 1061-1067, 2018.

HILL, R. A.; CONNOLLY, J. D. Triterpenoids. **Natural Product Reports**, v. 34, p. 90-122, 2018.

HOLETZ, F.B.; HOMES, M. J.; LEE, C. C.; STEVENTON, G. Screening of some plants used in the Brazilian folk medicine for the treatment of infectious diseases. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 97, n. 7, p. 1027-1031, 2002.

HOQUE, I.; CHATTERJEE, A.; BHATTACHARYA S.; BISWAS, R. An Approach of Computer-Aided Drug Design (CADD) Tools for In Silico Pharmaceutical Drug Design and Development. **International Journal of Advanced Research in Biological Sciences**, v.4, p. 60-71, 2017.

HOUGHTON, P. J.; HOWES, M. J.; LEE, C. C.; STEVENTON, G. Uses and abuses of *in vitro* tests in ethnopharmacology: visualizing an elephant. **Journal of Ethnopharmacology**, v.110, p.391-400, 2007.

JIANG, Z.; LIU, Y.; HE, M.; ZHAO, J.; WANG, T.; FENG, Y.; YUE, H.; AN, R.; FU, Y. A new abietane diterpenoid from the roots of *Tripterygium regelii*. **Natural Product research**, v. 32, n. 20, p. 2418-2423, 2018.

JOFFILY, A.; VIEIRA, R. C. Cork-warts on the leaf epidermis of four genera of *Celastroidea* Celastraceae. **Flora**, v. 205, p. 313–318, 2010.

KAUSHIK, P.; KHORA, S. L.; RANA, A. C.; KAUSHIK, D. Pharmacophore Modeling and Molecular Docking Studies on *Pinus roxburghii* as a Target for Diabetes Mellitus. **Advances in Bioinformatics**, p. 1-8, 2014

KLEIN, T.; LONGHINI, R.; BRUSCHI, M. L.; MELLO, J. C. P. Fitoterápicos: um mercado promissor, **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 30, n. 3, p. 241-48, 2009.

KUO, Y.; KUO, L. Y. Antitumour and anti-aids triterpenes from *Celastrus hindsii*. **Phytochemistry**, v. 44, n. 7, p. 1275-1281, 1997.

LEME, T. S. V.; PRANDO, T. B. L.; GASPAROTTO, F. M.; SOUZA, P.; CRESTANI, S.; SOUZA, L. M.; CIPRIANI, T. R.; LOURENÇO, E. L. B.; GASPAROTTO-JUNIOR, A. Role of prostaglandin/cAMP pathway in the diuretic and hypotensive effects of purified fraction of *Maytenus ilicifolia* Mart ex Reissek (Celastraceae). **Journal of ethnopharmacology**, v. 150, n. 1, p. 154-161, 2013

LOMBARDI, J. A.; BIRAL, L. Flora das cangas da Serra dos Carajás, Pará, Brasil: Celastraceae. **Rodriguésia**, v. 67, n. 5, p. 1285-1290. 2016.

MADEIRO, S. A. L. **Novas neolignanas de *Krameria tomentosa* A. St.-Hill (Krameriaceae)**, 2012, Dissertação (Mestrado em Ciências farmacêuticas), Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa.

McKENNA, M. J.; SIMMONS, M. P.; BACON, C. D.; LOMBARDI, J. A. Delimitation of the Segregate Genera of *Maytenus* s. l. (Celastraceae) Based on Morphological and Molecular Characters. **Systematic Botany**, v. 36, n. 4, p. 922-932, 2011.

MAGALHÃES, C. G.; FERRARI, F. C.; GUIMARÃES, D. A. S.; SILVA, G. D. F.; DUARTE, L. P.; FIGUEIREDO, R. C.; FILHO, S. A. V. *Maytenus salicifolia*: triterpenes isolated from and antioxidante property of extracts from aerial parts. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 21, n. 3, p. 415-419, 2011

MAGALHÃES, W. S. **Modo de interação dos ácidos oleanólico e ursólico com as isoformas da ciclooxigenase através de docking e dinâmica molecular**, 2010, Dissertação (Mestrado em Ciências farmacêuticas), Universidade Federal de Ouro Preto, Escola de farmácia, Ouro Preto.

MALATHI, K.; RAMAIAH, S. Bioinformatics approaches for new drug discovery: a review. **Biotechnology and Genetic Engineering Reviews**, v. 34, n. 2, p. 243-260, 2018.

MANN, C. M.; MARKHAM, J. L. A new method for determining the minimum inhibitory concentration of essential oils. **Journal of Applied Microbiology**, v.84, p.538-544, 1998.

MATTHEWS, B.W. Comparison of the predicted and observed secondary structure of T4 phage lysozyme. **Biochimica Et Biophysica Acta (bba) - Protein Structure**, v. 405, n. 2, p.442-451, 1975.

MEDEIROS, V. M. **Isolamento e Caracterização Estrutural dos Constituintes Químicos de *Maytenus obtusifolia* Mart. (Celastraceae)**, 2007, Dissertação (Mestrado em Ciências farmacêuticas), Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa.

MOTOHASHI, Y.; IGARASHI, M.; OKAMATSU, M.; NOSHI, T. SAKODA, Y.; YAMAMOTO, N.; ITO, K; YOSHIDA, R; KIDA, H. Antiviral activity of stachyflin on influenza A viruses of different hemagglutinin subtypes. **Journal of Virology**, v. 16, p. 10:118, 2013.

NIERO, R.; ANDRADE, S. F.; CECHINEL-FILHO, V. A review os the ethnopharmacology, phytochemistry and pharmacology of plants of the *Maytenus Genus*, **Current Pharmaceutical Design**, v. 17, p 1851-71, 2011.

NUÑEZ, M. J.; JIMÉNEZ, I. A.; MENDOZA, C. R.; CHAVEZ-SIFONTES, M.; MARTINEZ, M. L.; ICHIISHI, E.; TOKUDA, R.; TOKUDA, H.; BAZZOCCHI, I. L. Dihydro- β -agarofuran sesquiterpenes from Celastraceae species as anti-tumour-promoting agents: Structure-activity relationship. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 111, p. 95-102, 2016.

NÚÑEZ, M. J.; REYES, C. P.; JIMÉNES, I. A.; MOUJIR, L.; BAZZOCHI, I. L. Lupane Triterpenoids from *Maytenus* Species. **Journal of Natural Products**, v.68, p. 1018-1021, 2005.

OLIVEIRA, D. M.; SILVA G. D. F.; DUARTE, L. P.; FILHO, S. A. V. Chemical constituents isolated from roots of *Maytenus acantophylla* Reissek (Celastraceae). **Biochemical Systematics and Ecology**. v. 34, p. 661-665, 2006.

PARK, S. H.; NHIEM, N. X.; KIEM, P. V.; CHOI, E. M.; KIM, J, A.; KIM, Y, H. A New Norlupane Triterpene from the Leaves of *Acanthopanax koreanum* Increases the Differentiation of Osteoblastic MC3T3-E1 Cells. **Archives of Pharmacal Research**, v. 33, n. 1, p. 75-80, 2010.

PAVIA, D. L.; LAMPMAN, G. M.; KRIZ, G. S.; VYVYAN, J. R. **Introdução à espectroscopia**. 4^o ed., São Paulo: Cengage Learning, 2010.

PEIXOTO, I. N.; SOUZA, H. D. S.; LIRA, B. F.; SILVA, D. F.; LIMA, E. O.; BARBOSA-FILHO, J. M.; ATHAYDE-FILHO, P. F. Synthesis and Antifungal Activity Against *Candida* Strains of Mesoionic System Derived From 1, 3-Thyazolium-5-thiolate. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 27, n. 10, p. 1807-1813, 2016.

PEREIRA, R. C. G.; SOARES, D. C. F.; OLIVEIRA, D. C. P.; SOUSA, G. F.; VIEIRA-FILHO S. A.; MERCADANTE-SIMÕES, M. O.; LULA, I.; SILVA, C. A.; Triterpenes from

leaves of *Cheiloclinium cognatum* and their in vivo antiangiogenic activity. **Magnetic Resonance in Chemistry**, v. 56, n. 5, p. 360-366, 2018.

PEREIRA, F. O.; MENDES, J. M.; LIMA, I. O.; MOTA, K. S. L.; OLIVEIRA, W. A.; LIMA, E. O. Antifungal activity of geraniol and citronellol, two monoterpenes alcohols, against *Trichophyton rubrum* involves inhibition of ergosterol biosynthesis. **Pharmaceutical Biology**, v. 53, n. 2, p. 1–7, 2014.

PERESTELO, N. I. R. **Metabolitos secundarios aislados de *Maytenus jelskii* (Celastraceae). Estudio de relación estructura-actividad.** 2010. Tese de doutorado, Universidad de La Laguna, La Laguna.

PÉRICO, L. L.; RODRIGUES, V. P.; ALMEIDA, L. F. R.; FORTUNA-PEREZ, A. P.; VILEGAS, W.; HIRUMA-LUMA, C. A. *Maytenus ilicifolia* Mart. ex Reissek. **Medicinal and Aromatic Plants of South America**, v. 5, p. 323-335, 2018.

PINTO, A. C.; BARREIRO, E. J. Desafios da indústria farmacêutica brasileira. **Química Nova**, v. 36, n. 10, p. 1557-1560, 2013.

PINTO M. S. C., SAMPAIO E. V. S. B., NASCIMENTO L. M. Florística e estrutura da vegetação de um brejo de altitude em Pesqueira, PE, Brasil. **Revista Nordestina. de Biologia.** v. 21, p. 47-79, 2012.

REMLINGER, M. **Estudo dos resíduos de aminoácidos da enzima friedelina sintase de *Maytenus ilicifolia* envolvidos com sua especificidade biossintética,** 2017, Dissertação (Mestrado em Biotecnologia), Universidade Estadual Paulista, Araraquara – SP.

REVEGLIA, P.; CIMMINO, A.; MAIS, M.; NOCERA, P.; BEROVA, N.; ELLESTAD, G.; EVIDENTE, A. Pimarane diterpenes: Natural source, stereochemical configuration, and biological activity. **Chirality**, v.30, p. 1115–1134, 2018.

ROCHA, C. S.; PIMENTEL, R. M. M.; RANDAU, K. P.; XAVIER, H. S. Morfoanatomia de folhas de *Maytenus rigida* Mart.(Celastraceae); uma espécie utilizada como medicinal no nordeste do Brasil. **Acta Farmaceutica Bonaerense**, v. 23, p. 472-476, 2004.

SALAZAR, G. C. M.; SILVA, G. D. F.; DUARTE, L. P.; VIEIRA FILHO, S. A.; LULA, I. S. Two epimeric friedelane triterpenes isolated from *Maytenus truncata* Reiss: ¹H and ¹³C chemical shift assignments, **Magnetic Resonance in Chemistry**, v. 38, p. 977-80, 2000.

SALZBERG, S. L. (1994). Book Review: C4.5: Programs for Machine Learning Morgan Kaufmann Publishers by J. Ross Quinlan. Inc., 1993. **Machine Learning**, © 1994 Kluwer Academic Publishers, Boston. Manufactured In The Netherlands, v. 16, p.235-240.

SANTOS, A. K. L.; MAGALHÃES, T. S.; MONTE, F. J. Q.; MATTOS, M. C.; OLIVEIRA, M. C. F.; ALMEIDA, M. M. B.; LEMOS, T. L. G.; BRAZ-FILO, R. Alcaloides iboga de *peschiera affinis* (apocynaceae) – atribuição inequívoca dos deslocamentos químicos dos átomos de hidrogênio e carbono. atividade antioxidante, **Química Nova**, v. 32, p. 1834-1838, 2009.

SARTORATTO, A.; MACHADO, A. L. M.; DELARMELINA, C.; FIGUEIRA, G. M.; DUARTE, M. C. T.; REHDER, V. L. G. Composition and antimicrobial activity of essential oils from aromatic plants used in Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 35, p. 275-280, 2004.

SEEBACHER, W.; SIMIC, N.; WEIS, R.; SAF, R.; KUNERT, O. Complete assignments of ^1H and ^{13}C NMR resonances of oleanolic acid, 18α -oleanolic acid, ursolic acid and their 11-oxo derivatives. **Magnetic Resonance in Chemistry**, v. 41, p. 636-638, 2003.

SHAMIM; AHMED, S.; FATIMA, L. Pharmacological actions and therapeutic benefits of thuhar (*Euphorbia neriifolia*): A review. **The Pharma Innovation Journal**, v.7,n.9, p. 221-226, 2018.

SILVA, F. C.; RODRIGUES, V. G.; DUARTE, L. P.; LULA, I. S.; SINISTERRA, R. D.; VIEIRA-FILHO, S. A.; RODRIGUES, R. A. L.; KROON, E. G.; OLIVEIRA, P. L.; FARIAS, L. M.; MAGALHÃES, P. P.; SILVA, G. D. F. Antidiarrheal activity of extracts from *Maytenus gonoclada* and inhibition of Dengue virus by lupeol. **Annals of the Brazilian Academy of Sciences**, v. 89, n. 3, p. 1555-1564, 2017.

SILVERSTEIN, R. M.; WEBSTER, F. X.; KIEMLE, D. J. **Identificação espectrométrica de compostos orgânicos**. 7. ed. Rio de Janeiro: LTC, 2007.

SIMMONS, M. P.; CAPPA, J. J.; ARCHER, R. H.; FORD, A. J.; EICHSTEDT, D.; CLEVINGER, C. C. Phylogeny of the *Celastrae* (Celastraceae) and the relationships of *Catha edulis* (qat) inferred from morphological characters and nuclear and plastid genes. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 48, n. 2, p. 745-757, 2008.

SOGABE, S.; MASUBUCHI, M.; SAKATA, K.; FUKAMI, T. A.; MORIKAMI, K.; SHIRATORI, Y.; EBIIKE, H.; KAWASAKI, K.; AOKI, Y.; SHIMMA, N.; DÁRCY, A.; WINKLER, F. K.; BANNER, D. W.; OHTSUKA, T. Crystal Structures of Candida albicans N-Myristoyltransferase with Two Distinct Inhibitors. **Chemistry and Biology**, v. 9, n. 10, p. 1119-1128, 2002

SOUSA, G. F.; AGUILAR, M. G.; TAKAHASHI, J. A.; ALVES, T. M. A.; KOHLHOFF, M.; VIEIRA-FILHO, S. A.; SILVA, G. D. F.; DUARTE, L. P. Flavonol triglycosides of leaves from *Maytenus robusta* with acetylcholinesterase inhibition. **Phytochemistry Letters**, v. 19, p. 34-38, 2017.

SOUSA, D. P.; SILVA, M. S.; MEDEIROS, V. M.; FOLLY, M. A. B.; TAVARES, J. F.; BARBOSA-FILHO, J. M. "Alkaloid, flavonoids, and pentacyclic triterpenoids of *Maytenus obtusifolia* Mart.". **Biochemical Systematic and Ecology**, v. 36, p. 500-503, 2008.

SPIVEY, A. C.; WESTON, M.; WOODHEAD, S. Celastraceae sesquiterpenoids: biological activity and synthesis. **The Royal Society of Chemistry**, v. 31, p. 43–59, 2002.

SURABHI. SINGH, B. K.; Computer aided drug design: an overview. **Journal of Drug Delivery and Therapeutics Open**, v. 8, p. 504-509, 2018.

TEBOU, P. L. F.; TAMOKOU, J.; NGNOKAM, D.; VOUTEQUENNE-NAZABADIOKO, L.; KUIATE, J.; BAG, P. K. Flavonoids from *Maytenus buchananii* as potential cholera chemotherapeutic agents. **South African Journal of Botany**, v. 109, p. 58-65, 2017.

TETALI, S. D. Terpenes and isoprenoids: a wealth of compounds for global use. **Planta**, p. 1-8, 2018.

THIMMAPPA, R.; GEISLER, K.; LOUVEAU, T.; O'MAILLE, P.; OSBOURN, A. Triterpene Biosynthesis in Plants. **Annual Review of Plant Biology**, v. 65, p. 225-257, 2014.

THOMSEN, R.; CHRISTENSEN, M. H. MolDock: A New Technique for High-Accuracy Molecular Docking. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 49, n. 11, p. 3315-3321, 2006.

TINTO, W. F.; BLAIR, L. C.; ALLI, A.; REYNOLDS, W. F.; MCLEAN, S. Lupane triterpenoids of *salacia cordata*. **Journal of Natural Products**, v. 55(3), p. 395-398, 1992.

TOMOKOU, J. D; TALA, M. F.; WABO, H. K.; KUIATE, J. R.; TANE, P. Antimicrobial activities of methanol extract and compounds from stem bark of *Vismia rubescens*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 124, p. 571–575, 2009.

Tropicos.org. Missouri Botanical Garden. 24, Dec, 2018
<<http://www.tropicos.org/Name/42000222>>

VALLADÃO, F. N.; MIRANDA, R. R. S.; VALE, F. H.; VALLADÃO, S. A.; SILVA, G. D. F.; DUARTE, L. P.; CARVALHO-OKANO, R. M.; MESSIAS, M. C. T. B.; VIERA-FILHO, S. A. Four Brazilian *Maytenus salicifolia* Reissek (Celastraceae) groups studied by TLC and UV/Vis spectrophotometry. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**. v. 19, n. 3, p. 733-739, 2009.

VELOSO, C.C.; SOARES, G. L.; PEREZ, A. C.; RODRIGUES, V. G.; SILVA, F. C. Pharmacological potential of *Maytenus* species and isolated constituents, especially tingenone, for treatment of painful inflammatory diseases, **Brazilian Journal of Pharmacognosy** v. 27, p. 533-40, 2017.

WANG, K.; JIANG, S.; PU, T.; FAN, L.; SU, F.; YE, M. Antifungal activity of phenolic monoterpenes and structure-related compounds against plant pathogenic fungi. **Natural Product research**, p. 1-8, 2018.

WILBON, P. A.; CHU, F.; TANG, C. Progress in Renewable Polymers from Natural Terpenes, Terpenoids, and Rosin. **Macromolecular Rapid Communications**, v. 34, p. 8-37, 2013.

XIAO, S.; TIAN, Z.; WANG, T.; SI, L.; ZHANG, L.; ZHOU, D. Recent progress in the antiviral activity and mechanism study of pentacyclic triterpenoids and their derivatives. **Medicinal Research Reviews**, P. 1-26, 2018.

XIE, J.; ZHANG, A.; SUN, H.; YAN, G.; WANG, X. Recent advances and effective strategies in the discovery and applications of natural products. **Royal Society of Chemistry**, v. 8, p. 812-824, 2018.

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

ZHANG, S.; GOLBRAIKH, A.; OLOFF, S.; KOHN, H.; TROPSHA A. A Novel Automated Lazy Learning QSAR (ALL-QSAR) Approach: Method Development, Applications, and Virtual Screening of Chemical Databases Using Validated ALL-QSAR Models. **Journal of Chemical Information and Modeling**, v. 46, n. 5, p. 1984–1995, 2006.

ZHANG, H.; QIU, M.; CHEN, Y.; CHEN, J.; SUN, Y.; WANG, C.; FONG, H. H. Plant terpenes. **Phytochemistry and Pharmacognosy Encyclopedia of Lyfe Support Systems**. 2002.

ZHOU, J.; LI, C. J.; YANG, J. Z.; MA, J.; LI, Y.; BAO, X. Q.; CHEN, X. G.; ZHANG, D.; ZHANG, D. M. Lupane Triterpenoids from the Stems of *Euonymus carnosus*. **Jornal of Natural Products**, v. 77(2), p. 276-284, 2014.