



UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA

CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PRODUTO NATURAIS
E SINTÉTICOS BIOATIVOS**



**Estudo fitoquímico e antimicrobiano das raízes de *Maytenus distichophylla* Mart. ex
Reissek (Celastraceae) guiado por GNPS/espectrometria de massas**

PEDRO THIAGO RAMALHO DE FIGUEIREDO

JOÃO PESSOA - PB

Setembro de 2022

PEDRO THIAGO RAMALHO DE FIGUEIREDO

**Estudo fitoquímico e antimicrobiano das raízes de *Maytenus distichophylla* Mart. ex
Reissek (Celastraceae) guiado por GNPS/espectrometria de massas**

Tese 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 Doutor em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos. Área de concentração FARMACOQUÍMICA.

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Sobral da Silva

**JOÃO PESSOA - PB
Setembro de 2022**

PEDRO THIAGO RAMALHO DE FIGUEIREDO

Estudo fitoquímico e antimicrobiano das raízes de *Maytenus distichophylla* Mart. ex Reissek (Celastraceae) guiado por GNPS/espectrometria de massas

Aprovada em: 21/09/2022

Banca examinadora



Prof. Dr. Marcelo Sobral da Silva
(Orientador)

Documento assinado digitalmente
gov.br SOCRATES GOLZIO DOS SANTOS
Data: 27/09/2022 22:11:28-0300
Verifique em <https://verificador.itl.br>

Prof. Dr. Socrates Golzio Dos Santos
Universidade Federal da Paraíba – Campus I
(Examinador interno)

Harley da Silva Alves

Assinado digitalmente por Harley da Silva Alves
Data: 27/09/2022 10:24:33-0300
Verifique em <https://verificador.itl.br>

Prof. Dr. Harley da Silva Alves
Universidade Estadual da Paraíba – Campus I
(Examinador interno)

Prof. Dr. José Maria Barbosa Filho
Universidade Federal da Paraíba – Campus I
(Examinadora suplente interno)

Documento assinado digitalmente
gov.br XIRLEY PEREIRA NUNES
Data: 26/09/2022 13:57:53-0300
Verifique em <https://verificador.itl.br>

Profa. Dra. Xirley Pereira Nunes
Universidade Federal do Vale do São Francisco-UNIVASF
(Examinador Externo)

gov.br

BARBARA VIVIANA DE OLIVEIRA SANTOS
Data: 27/09/2022 10:24:33-0300
Verifique em <https://verificador.itl.br>

Profa. Dra. Bárbara Viviana de Oliveira Santos
Universidade Federal da Paraíba – Campus I
(Examinadora externa)

Prof. Dr. Gabriela Lemos de Azevedo Maia
Universidade Federal do Vale do São Francisco-UNIVASF
(Examinadora suplente externa)

Catálogo na publicação
Seção de Catalogação e Classificação

F475e Figueiredo, Pedro Thiago Ramalho de.

Estudo fitoquímico e antimicrobiano das raízes de
Maytenus distichophylla Mart. ex Reissek (Celastraceae)
guiado por GNPS/espectrometria de massas / Pedro Thiago
Ramalho de Figueiredo. - João Pessoa, 2022.
136 f. : il.

Orientação: Marcelo Sobral da Silva.
Tese (Doutorado) - UFPB/CCS.

1. Atividade antimicrobiana. 2. Alcaloide
sesquiterpênico piridínico. 3. Química computacional.
4. Rede molecular. 5. Maytenus distichophylla. I.
Silva, Marcelo Sobral da. II. Título.

UFPB/BC

CDU 615.33(043)

**Dedico este trabalho a minha avó, Alba (*In
memorian*), por todo empenho, esforço ao longo
da minha vida e sempre ter me motivado para
realizar os meus sonhos**

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** (*In memoriam*) por toda dedicação, carinho e força, estarem sempre ao meu lado, motivando e me proporcionando a vontade pela busca do conhecimento.

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.

A orientação do **Prof. Dr. Marcelo Sobral da Silva** nesses dois anos finais do doutorado por ser um exemplo de professor e repassar seus conhecimentos facilitando e contribuindo para a minha formação. Ao 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.

A **profa. Dr. Edeltrudes** pela disponibilidade do laboratório e a **profa. Laísa Vilar Cordeiro** por sua amizade, por toda ajuda durante o doutorado, por ter sido um grande suporte nos momentos mais difíceis e me incentivar durante minha trajetória bem como, a realização dos testes 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. A

aluna **Renata** 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 e Flavio por toda ajuda, pelas conversas e momentos de descontração.

À toda equipe Sobral, Fachine, Barbosa e Costa: **Thiago, Jociano, Emile, Diego, George, Kaio, Juliana, Anderson, Arthur, Cesar, Yuri, Lucas, Andreza, Rose, Ana Rita, Ranna, Lucas, Mariana** por todo apoio e ajuda na rotina laboratorial.

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 e Vinicius** pelos laços de amizades 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

Maytenus é considerado o gênero mais representativo da família Celastraceae, sendo representado, aproximadamente, por 123 espécies distribuídas nas regiões de clima tropical e subtropical do mundo. No Brasil, as espécies de *Maytenus* apresentam boa adaptação ao clima local, sendo o país considerado a região com a maior diversidade de espécies descritas do gênero. Foram relatadas 49 espécies das quais 36 são consideradas endêmicas das regiões brasileiras. Este gênero apresenta grande relevância para o tratamento dos distúrbios gastrointestinais, bem como para processos infecciosos e inflamatórios. *Maytenus distichophylla* Mart. ex Reissek é conhecida popularmente como “pau-colher”, “casca-amarela”, “pau-doce” é endêmica da região do Nordeste brasileiro, sendo utilizada, na medicina popular, para tratar doença renal crônica e úlceras estomacais. Nas raízes de *Maytenus* são encontrados os alcaloides sesquiterpênicos piridínicos (ASP) considerados marcadores quimiotaxonômico neste gênero. O objetivo deste trabalho foi realizar o estudo fitoquímico e quimioinformático de *M. distichophylla* e avaliar a atividade antimicrobiana de extratos e substâncias isoladas. As raízes de *M. distichophylla* foram coletadas no município de Matureia-PB. Posteriormente, as raízes foram secas e trituradas para obtenção do pó vegetal, o qual foi submetido a sucessivas extrações com etanol a 95% para obter-se o extrato etanólico bruto (EEB), sendo submetido a métodos cromatográficos para isolamento e purificação dos metabólitos secundários, além de ter sido obtida a rede molecular para avaliação do perfil de metabólitos secundários presente neste extrato. A identificação química das substâncias isoladas foi realizada pelo método espectroscópico de Ressonância Magnética Nuclear de ^1H , ^{13}C e bidimensionais. A rede molecular informou a presença de 233 nodos e 17 clusters, no qual foram estudados quatro clusters. Nestes foram anotados putativamente a presença de flavanois, flavonoides glicosilados, taninos condensados e alcaloides sesquiterpênicos piridínicos. Foram isolados seis alcaloides sesquiterpênicos piridínicos (ASP) das fases hexano:acetato (8:2) (Ebinifolina E2) e da fase diclorometano (Ebinifolina W1, Euojaponina K, F, A e Maiteína), sendo relatados pela primeira vez nesta espécie. Foram realizados estudos computacionais para avaliar a predição desses compostos em modelos contra os microorganismos *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *P. aeruginosa* e *S. epidermidis*. O modelo Random Forest de predição para os microorganismos citados obtiveram uma porcentagem de acerto acima de 70%, área sob a curva, Receiver Operating Characteristic, acima de 0,82. Deste estudo, os seis ASP foram preditas como ativas contra os microorganismos *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. parapsilopsis* com potencial atividade variando entre 54% a 79%. Em seguida, foi realizada a atividade antimicrobiana das fases e das substâncias isoladas utilizando as cepas bacterianas: *S. aureus* ATCC-25923, *S. epidermidis* ATCC-12228, *E. coli* ATCC-1873, *P. aeruginosa* ATCC-9027, *C. parapsilosis* ATCC-22019, *C. albicans* ATCC-90028, *C. albicans* LM-22, no qual os extratos e substâncias testadas apresentaram atividades para as bactérias Gram-positivas e fungos leveduriformes. Sendo assim, este trabalho contribuiu com o conhecimento químico e farmacológico de *M. distichophylla*, corroborando a presença de ASP nas raízes desta espécie, além de comprovar o potencial antifúngico dessas substâncias.

Palavras chave: *Maytenus distichophylla*, Alcaloide sesquiterpênicos piridínicos, Química computacional, Rede molecular, Atividade antimicrobiana.

ABSTRACT

Maytenus is considered the most representative genus of the Celastraceae family, being represented by approximately 123 species distributed in tropical and subtropical regions of the world. In Brazil, *Maytenus* species show good adaptation to the local climate, and the country is considered the region with the greatest diversity of described species of the genus. 49 species were reported, 36 of which are considered endemic to Brazilian regions. This genus has great relevance for the treatment of gastrointestinal disorders, as well as for infectious and inflammatory processes. *Maytenus distichophylla* Mart. ex Reissek is popularly known as “pau-colher”, “casca-amarela”, “pau-doce” is endemic to the Northeast region of Brazil, being used in folk medicine to treat chronic kidney disease and stomach ulcers. The pyridine sesquiterpene alkaloids considered chemotaxonomic markers in this genus are found in *Maytenus* roots. The objective of this work was to carry out a phytochemical and chemoinformatic study of *M. distichophylla* and to evaluate the antimicrobial activity of extracts and isolated substances. The roots of *M. distichophylla* were collected in the municipality of Matureia-PB. Subsequently, the roots were dried and crushed to obtain the vegetable powder, which was subjected to successive extractions with 95% ethanol to obtain the crude ethanolic extract (CEE), being subjected to chromatographic methods for isolation and purification of secondary metabolites. In addition to having obtained the molecular network to evaluate the profile of secondary metabolites present in this extract. The chemical identification of the isolated substances was performed by the ^1H , ^{13}C and two-dimensional Nuclear Magnetic Resonance spectroscopic method. The molecular network reported the presence of 233 nodes and 17 clusters, in which four clusters were studied. In these, the presence of flavanols, glycosylated flavonoids, condensed tannins and sesquiterpene pyridine alkaloids were putatively noted. Six sesquiterpene pyridine alkaloids (SPA) were isolated from the hexane:acetate (8:2) phases (Ebinifoline E2) and from the dichloromethane phase (Ebinifoline W1, Euojaponine K, F, A and Maiteine), being reported for the first time in this species. Computational studies were carried out to evaluate the prediction of these compounds in models against the microorganisms *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *P. aeruginosa* and *S. epidermidis*. The Random Forest prediction model for the mentioned microorganisms obtained a percentage of accuracy above 70%, area under the curve, Receiver Operating Characteristic, above 0.82. From this study, the six ASPs were predicted to be active against the microorganisms *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. parapsilopsi*s with potential activity ranging from 54% to 79%. Then, the antimicrobial activity of the phases and isolated substances was performed using the bacterial strains: *S. aureus* ATCC-25923, *S. epidermidis* ATCC-12228, *E. coli* ATCC-1873, *P. aeruginosa* ATCC-9027, *C. parapsilosis* ATCC-22019, *C. albicans* ATCC-90028, *C. albicans* LM-22, in which the extracts and substances tested showed activities for Gram-positive bacteria and yeast fungi. Therefore, this work contributed to the chemical and pharmacological knowledge of *M. distichophylla*, corroborating the presence of ASP in the roots of this species, in addition to proving the antifungal potential of ASP.

Keywords: *Maytenus distichophylla*, Sesquiterpene pyridine alkaloids, Computational chemistry, Molecular networking, Antimicrobial activity.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Mapa e distribuição geográfica da família Celastraceae no mundo, representadas pelas áreas em verde.....	29
Figura 2. Metabólitos secundários encontrados em Celastraceae	31
Figura 3. <i>Maytenus distichophylla</i> Mart. ex Reissek.....	33
Figura 4. Distribuição geográfica de <i>M. distichophylla</i> no Brasil.....	34
Figura 5. Estrutura química dos compostos isolados em <i>M. distichophylla</i>	36
Figura 6. Esqueleto básico dos ASP relatados na literatura.....	38
Figura 7. Cromatogramas obtidos no modo negativo (A) e positivo (B) por CLAE-ESI-MS/MS	45
Figura 8. Rede molecular do extrato etanólico bruto da raiz de <i>M. distichophylla</i>	57
Figura 9. Cromatogramas obtidos no modo negativo (A) e positivo (B) por CLAE-ESI-MS/MS	58
Figura 10. <i>Cluster A</i> com <i>m/z</i> dos flavonóis anotados	59
Figura 11. Espectros de IES-EM/EM dos compostos encontrados no <i>cluster A</i>	59
Figura 12. <i>Cluster B</i> com <i>m/z</i> dos flavonoides 3-O-glicosilados.....	61
Figura 13. Espectros de IES-EM/EM dos compostos anotados no <i>cluster B</i>	61
Figura 14. <i>Cluster C</i> com <i>m/z</i> dos taninos condensados anotados.....	63
Figura 15. Espectros de IES-EM/EM dos compostos anotados no <i>cluster C</i>	64
Figura 16. <i>Cluster D</i> com <i>m/z</i> dos alcaloides sesquiterpênicos piridínicos	65
Figura 17. Esqueleto da piridina 2,3 dissustituída do tipo wilfordato.....	67
Figura 18. Euojaponina F (MDR1) isolado de <i>Maytenus distichophylla</i>	69
Figura 19. Espectro de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) de ¹ H de MDR1 (MeOD, 500 MHz)	71
Figura 20. Expansão do espectro de RMN de ¹ H de MDR1 na região de 1,0-3,3 ppm (MeOD, 500 MHz)	71
Figura 21. Expansão do espectro de RMN de ¹ H de MDR1 na região de 3,9-5,9 ppm (MeOD, 500 MHz)	72
Figura 22. Expansão do espectro de RMN de ¹ H de MDR1 na região de 6,8-8,8 ppm (MeOD, 500 MHz).	72
Figura 23. Espectro de Ressonância Magnética Nuclear de ¹³ C BB de MDR1 (MeOD, 125 Mhz)	73

Figura 24. Expansão do espectro de RMN de ^{13}C de MDR1 na região de 16-40 ppm (MeOD, 125 Mhz)	73
Figura 25. Expansão do espectro de RMN de ^{13}C de MDR1 na região de 52-95 ppm (MeOD, 125 Mhz)	74
Figura 26. Expansão do espectro de RMN de ^{13}C de MDR1 na região de 123-180 ppm (MeOD, 125 Mhz)	74
Figura 27. Espectro das correlações entre sinais de $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ - J_{CH} -HMQC de MDR1	75
Figura 28. Espectro das correlações entre sinais de $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ - J_{CH} -HMBC de MDR1	75
Figura 29. Expansão espectro das correlações entre sinais de $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ - J_{CH} -HMBC de MDR1 registrados em MeOD (500 MHz).....	76
Figura 30. Expansão espectro das correlações entre sinais de $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ - J_{CH} -HMBC de MDR1 registrados em MeOD (500 MHz).....	76
Figura 31. Expansão espectro das correlações entre sinais de $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ - J_{CH} -HMBC de MDR1 registrados em MeOD (500 MHz).....	77
Figura 32. Euojaponine K (MDR2) isolado de <i>M. distichophylla</i>	79
Figura 33. Espectro de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) de ^1H de MDR2 (CDCl_3 , 500 MHz).	81
Figura 34. Expansão do espectro de RMN de ^1H de MDR2 na região de 1,0-3,1 ppm (CDCl_3 , 500 MHz).....	81
Figura 35. Expansão do espectro de RMN de ^1H de MDR2 na região de 3,6-5,1 ppm (CDCl_3 , 500 MHz).....	82
Figura 36. Expansão do espectro de RMN de ^1H de MDR2 na região de 6,9-9.0 ppm (CDCl_3 , 500 MHz).....	82
Figura 37. Espectro de Ressonância Magnética Nuclear de ^{13}C BB de MDR2 (CDCl_3 , 125 MHz)	83
Figura 38. Expansão do espectro de RMN ^{13}C de MDR2 na região de 15-60 ppm (CDCl_3 , 125 MHz)	83
Figura 39. Expansão do espectro de RMN ^{13}C de MDR2 na região de 67-95 ppm (CDCl_3 , 125 MHz)	84
Figura 40. Expansão do espectro de RMN ^{13}C de MDR2 na região de 125-176 ppm (CDCl_3 , 125 MHz)	84
Figura 41. Espectro das correlações entre sinais de $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ - J_{CH} -HMQC de MDR2 em CDCl_3 (500 MHz).....	85

Figura 42. Espectro das correlações entre sinais de ^1H x ^{13}C - J_{CH} -HMBC de MDR2 em CDCl_3 (500 MHz).....	85
/Figura 43. Expansão do espectro das correlações entre sinais de ^1H x ^{13}C - J_{CH} -HMQC de MDR2 em CDCl_3 (500 MHz)	86
Figura 44. Expansão do espectro das correlações entre sinais de ^1H x ^{13}C - J_{CH} -HMQC de MDR2 em CDCl_3 (500 MHz)	86
Figura 45. Expansão do espectro das correlações entre sinais de ^1H x ^{13}C - J_{CH} -HMQC de MDR2 em CDCl_3 (500 MHz)	87
Figura 46. Ebinifolina W-1 (MDR3) isolado de <i>Maytenus distichophylla</i>	89
Figura 47. Espectro de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) de ^1H de MDR3 (CDCl_3 , 500 MHz)	91
Figura 48. Expansão do espectro de RMN de ^1H de MDR3 na região de 1,2-3,0 ppm (CDCl_3 , 500 MHz).....	91
Figura 49. Expansão do espectro de RMN de ^1H de MDR3 na região de 3,6-6,2 ppm (CDCl_3 , 500 MHz).....	92
Figura 50. Expansão do espectro de RMN de ^1H de MDR3 na região de 6,9-8,8 ppm (CDCl_3 , 500 MHz).....	92
Figura 51. Espectro de Ressonância Magnética Nuclear de ^{13}C BB de MDR3 (CDCl_3 , 125 Mhz).	93
Figura 52. Expansão do espectro de RMN de ^{13}C de MDR3 na região de 14-62 ppm (CDCl_3 , 125 Mhz).....	93
Figura 53. Expansão do espectro de RMN de ^{13}C de MDR3 na região de 68-96 ppm (CDCl_3 , 125 Mhz).....	94
Figura 54. Expansão do espectro de RMN de ^{13}C de MDR3 na região de 121-138 ppm (CDCl_3 , 125 Mhz).....	94
Figura 55. Expansão do espectro de RMN de ^{13}C de MDR3 na região de 153-175 ppm (CDCl_3 , 125 Mhz).....	95
Figura 56. Esqueleto da piridina 2,3 dissustituída do tipo wilfordato.....	96
Figura 57. Maiteína (MDR4) isolado de <i>Maytenus distichophylla</i>	97
Figura 58. Espectro de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) de ^1H de MDR4 (CDCl_3 , 500 MHz)	99
Figura 59. Expansão do espectro de RMN de ^1H de MDR4 na região de 1,2-2,65 ppm (CDCl_3 , 500 MHz).....	99

Figura 60. Expansão do espectro de RMN de ^1H de MDR4 na região de 3,7-6,0 ppm (CDCl_3 , 500 MHz).....	100
Figura 61. Expansão do espectro de RMN de ^1H de MDR4 na região de 7,0-8,8 ppm (CDCl_3 , 500 MHz).....	100
Figura 62. Espectro de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) de ^{13}C de MDR4 (CDCl_3 , 125 MHz)	101
Figura 63. Expansão do espectro de RMN de ^{13}C de MDR4 na região de 9,5-24,5 ppm (CDCl_3 , 500 MHz).....	101
Figura 64. Expansão do espectro de RMN de ^{13}C de MDR4 na região de 36-98 ppm (CDCl_3 , 125 MHz).....	102
Figura 65. Expansão do espectro de RMN de ^{13}C de MDR4 na região de 116-178 ppm (CDCl_3 , 125 MHz).....	102
Figura 66. Euojaponina A (MDR5) isolado de <i>Maytenus distichophylla</i>	105
Figura 67. Espectro de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) de ^1H de MDR5 (CDCl_3 , 500 MHz)	107
Figura 68. Expansão do espectro de RMN de ^1H de MDR5 na região de 1,1-2,6 ppm (CDCl_3 , 500 MHz).....	107
Figura 69. Expansão do espectro de RMN de ^1H de MDR5 na região de 3,6-6,1 ppm (CDCl_3 , 500 MHz).....	108
Figura 70. Expansão do espectro de RMN de ^1H de MDR5 na região de 7-8,8 ppm (CDCl_3 , 500 MHz).	108
Figura 71. Espectro de Ressonância Magnética Nuclear de ^{13}C BB de MDR5 (CDCl_3 , 125 MHz).	109
Figura 72. Expansão do espectro de RMN de ^{13}C de MDR5 na região de 6-51 ppm (CDCl_3 , 125 MHz).....	109
Figura 73. Expansão do espectro de RMN de ^{13}C de MDR5 na região de 6-51 ppm (CDCl_3 , 125 MHz).....	110
Figura 74. Expansão do espectro de RMN de ^{13}C de MDR5 na região de 120-175 ppm (CDCl_3 , 125 MHz).....	110
Figura 75. Espectro das correlações entre sinais de ^1H x ^{13}C -JCH-HMQC de MDR5 em CDCl_3 (500 MHz).....	111
Figura 76. Espectro das correlações entre sinais de ^1H x ^{13}C -JCH-HMBC de MDR5 em CDCl_3 (500 MHz).	111

Figura 77. Espectro das correlações entre sinais de $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ - J_{CH} -HMBC de MDR5 em CDCl_3 (500 MHz).	112
Figura 78. Espectro das correlações entre sinais de $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ -JCH-HMBC de MDR5 em CDCl_3 (500 MHz).	112
Figura 79. Espectro das correlações entre sinais de $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ -JCH-HMBC de MDR5 em CDCl_3 (500 MHz).	113
Figura 80. Ebinifolina E2 (MDR6) isolado de <i>Maytenus distichophylla</i>	115
Figura 81. Espectro de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) de ^1H de MDR6 (CDCl_3 , 500 MHz)	117
Figura 82. Expansão do espectro de RMN de ^1H de MDR6 na região de 1,2-2,6 ppm (CDCl_3 , 500 MHz)	117
Figura 83. Expansão do espectro de RMN de ^1H de MDR6 na região de 3,4-6,1 ppm (CDCl_3 , 500 MHz)	118
Figura 84. Expansão do espectro de RMN de ^1H de MDR6 na região de 7,1-8,7 ppm (CDCl_3 , 500 MHz)	118
Figura 85. Espectro de Ressonância Magnética Nuclear de ^{13}C BB de MDR6 (CDCl_3 , 125 MHz).	119
Figura 86. Expansão do espectro de RMN de ^{13}C de MDR6 na região de 10-60 ppm (CDCl_3 , 125 MHz).	119
Figura 87. Expansão do espectro de RMN de ^{13}C de MDR6 na região de 67-97 ppm (CDCl_3 , 125 MHz).	120
Figura 88. Expansão do espectro de RMN de ^{13}C de MDR6 na região de 100-185 ppm (CDCl_3 , 125 MHz).	120
Figura 89. Espectro das correlações entre sinais de $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ - J_{CH} -HMQC de MDR6 em CDCl_3 (500 MHz).	121
Figura 90. Espectro das correlações entre sinais de $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ - J_{CH} -HMQC de MDR6 em CDCl_3 (500 MHz).	121
Figura 91. Espectro das correlações entre sinais de $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ - J_{CH} -HMQC de MDR6 em CDCl_3 (500 MHz).	122
Figura 92. Espectro das correlações entre sinais de $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ - J_{CH} -HMQC de MDR6 em CDCl_3 (500 MHz).	122
Figura 93. Espectro das correlações entre sinais de $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ -JCH-HMBC de MDR6 em CDCl_3 (500 MHz).	123

Figura 94. Espectro das correlações entre sinais de ^1H x ^{13}C -JCH-HMBC de MDR6 em CDCl_3 (500 MHz).	123
Figura 95. Espectro das correlações entre sinais de ^1H x ^{13}C - J_{CH} -HMBC de MDR6	124
Figura 96. Espectro das correlações entre sinais de ^1H x ^{13}C - J_{CH} -HMBC de MDR6	124

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Metabólitos secundários relatados em <i>M. distichophylla</i>	35
Tabela 2. Fracionamento cromatográfico da fase diclorometano de <i>M. distichophylla</i> ...	47
Tabela 3. Fracionamento cromatográfico da subfração 4 da fase diclorometano de <i>M. distichophylla</i>	48
Tabela 4. Bancos de dados do ChEMBL.	50
Tabela 5. Compostos anotados com auxílio da rede molecular.....	66
Tabela 6. Comparação dos dados espectrais de RMN ^1H e ^{13}C de MDR1 em CDCl_3 com os valores da literatura.....	70
Tabela 7. Comparação dos dados espectrais de RMN ^1H e ^{13}C de MDR2 em CDCl_3 com os valores da literatura.....	80
Tabela 8. Comparação dos dados espectrais de RMN ^1H e ^{13}C de MDR3 em CDCl_3 com os valores da literatura.....	90
Tabela 9. Comparação dos dados espectrais de RMN ^1H e ^{13}C de MDR4 em CDCl_3 com os valores da literatura.....	98
Tabela 10. Comparação dos dados espectrais de RMN ^1H e ^{13}C de MDR5 em CDCl_3 com os valores da literatura.....	106
Tabela 11. Comparação dos dados espectrais de RMN ^1H e ^{13}C de MDR6 em CDCl_3 com os valores da literatura.....	116
Tabela 12. Resumo dos resultados de performance dos modelos utilizando o algoritmo RF.....	125
Tabela 13. Predição dos compostos isolados de <i>M. distichophylla</i> nos modelos preditivos criados contra os microrganismos <i>C. albicans</i> , <i>C. tropicalis</i> , <i>C. parapsilopsis</i> , <i>P. aeruginosa</i> e <i>S. epidermides</i>	126
Tabela 14. Resultados da avaliação da Concentração Inibitória Mínima/CIM ($\mu\text{g/mL}$) das substâncias contra cepas bacterianas e fúngicas	127

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1. Biossíntese dos ácidos evonínico e wilfórdico	38
Esquema 2. Formação do sesquiterpeno dihidroagarofurano	39
Esquema 3. Formação do anel macrocíclico dos ASP.....	39
Esquema 4. Obtenção e partição líquido-líquido do extrato etanólico bruto das raízes de <i>M. distichophylla</i>	44
Esquema 5. Fracionamento cromatográfico da fase Hexano: Acetato de <i>M. distichophylla</i>	47
Esquema 6. Fracionamento da fase diclorometano de <i>M. distichophylla</i>	49

LISTA DE ABREVIATURAS, FÓRMULAS E SIGLAS

AcOEt	Acetato de Etila
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
CCS	Centro de Ciências da Saúde
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
<i>J</i>	Constante de acoplamento
LMCA	Laboratório Multiusuário de Caracterização e Análise
MHz	Megahertz

MCC	Matthews Correlation Coefficient
MeOH	Metanol
MVD	Molegro Virtual Docker
<i>m</i>	Multiplete
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>	Singleto
<i>sl</i>	Singleto Largo
<i>t</i>	Triplete
UFC	Unidade formadora de colônia
UFPB	Universidade Federal da Paraíba

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	24
2. OBJETIVOS	27
2.1 Objetivos gerais.....	27
2.2 Objetivos específicos.....	27
3. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	29
3.1 Considerações sobre a família Celastraceae	29
3.2 Considerações sobre o gênero <i>Maytenus</i>	31
3.3 Considerações sobre <i>Maytenus distichophylla</i> Mart. ex Reissek	33
3.4 Considerações sobre alcaloides sesquiterpênicos piridínicos (ASP)	37
3.5 Rede molecular	40
4. MATERIAIS E MÉTODOS	42
4.1 Coleta e identificação botânica.....	42
4.2 Procedimentos cromatográficos	42
4.3 Obtenção e particionamento do extrato etanólico das raízes de <i>M. distichophylla</i>	43
4.4 CLAE/EM do EEB da raiz de <i>M. distichophylla</i>	44
4.5 Rede molecular da raiz de <i>M. distichophylla</i>	46
4.6 Processamento cromatográfico da fase hexano:acetato (8:2).....	46
4.7 Processamento cromatográfico da fase diclorometano	47
Fonte: autoria própria.....	49
4.8 Procedimento espectroscópicos	49
4.8.1 Ressonância Magnética Nuclear (RMN)	49
4.9 Química Computacional	50
4.9.1 Banco de dados.....	50
4.9.2 Descritores Volsurf.....	51
4.9.3. Modelo de Predição	51

4.10 Estudo da atividade antimicrobiana do extrato, fases e substâncias isoladas das raízes de <i>Maytenus distichophylla</i>	52
4.10.1 Local de trabalho	52
4.10.2 Produtos testados.....	52
4.10.3 Meios de cultura.....	53
4.10.4 Micro-organismos.....	53
4.10.5 Inóculo	53
4.10.6. Concentração inibitória mínima (CIM)	54
5. RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	56
5.1 Caracterização dos compostos presentes na raiz de <i>M. distichophylla</i> com auxílio da rede molecular.....	56
5.2 Identificação dos compostos isolados por RMN	66
5.2.1 Identificação estrutural de MDR1	66
5.2.2 Identificação estrutural de MDR2	77
5.2.3 Identificação estrutural de MDR3	87
5.2.4 Identificação estrutural de MDR4	95
5.2.5 Identificação estrutural de MDR5	103
5.2.6 Identificação estrutural de MDR6	113
5.3 Análise dos modelos de QSAR.....	124
5.4 Atividade antimicrobiana das frações e fases de extratos de <i>M. distichophylla</i>	126
6. CONCLUSÕES.....	129
REFERÊNCIAS.....	130

Introdução

1. INTRODUÇÃO

Ao longo do tempo, a grande biodiversidade de produtos encontrados na natureza proporcionou as necessidades básicas para os seres humanos, nesse sentido, as plantas medicinais contribuem significativamente para alimentação, moradia e também são relatados o uso de extratos vegetais para o tratamento e cura de uma variedade de doenças (DZOBO, 2022; BUKHARI *et al.*, 2015). Foram relatados na Mesopotâmia em 2600 a.C o uso de várias espécies de plantas, como o ópio (*Papaver somniferum*), mirra (Espécies de *Commiphora*) e alcaçuz (*Glycyrrhiza glabra*), este conhecimento etnofarmacológico foi passado para as próximas gerações, sendo de grande importância para estudos científicos (SHEN *et al.*, 2019). Esta diversidade de uso está relacionada aos compostos químicos encontrados nos produtos de origem natural. Nesse sentido, as plantas medicinais são grandes produtores destes compostos químicos, chamados de metabólitos secundários.

Dessa maneira, as plantas medicinais fornecem uma importante fonte de inspiração para novos medicamentos, os metabólitos secundários produzidos pelas plantas medicinais podem ser candidatos a novos fármacos, bem como, sua estrutura química pode ser usada como protótipo para síntese orgânica e modificações estruturais. Atualmente, existem um grande número de medicamentos de origem de produtos naturais que são utilizados na clínica, cerca de 35% do mercado global de medicamentos são originários de produtos naturais, incluindo principalmente as plantas medicinais (25%) (CALIXTO, 2019). Os exemplos de medicamentos derivados de produtos naturais mais vendidos em todo o mundo incluem antibióticos e agentes antifúngicos como eritromicina, claritromicina, amoxicilina, anfotericina B; agentes anticancerígenos, paclitaxel, docetaxel e campotecina; medicamentos que diminuem o colesterol sanguíneo como atorvastatina, sinvastatina, lovastatina e agentes anti-hipertensivos, captopril e enalapril (SHEN *et al.*, 2019; LI; VEDERAS, 2009). Observando este contexto, o estudo químico das plantas medicinais apresenta grande importância no ramo da indústria farmacêutica, logo, para ter sucesso na criação de novos medicamentos a partir de produtos naturais devem ser elaboradas estratégias inovadoras e multidisciplinares para impulsionar completamente o desenvolvimento de novos medicamentos (XIE *et al.*, 2018).

O Brasil, apresenta uma grande área de vegetação mundial, compreendendo 22% do total da vegetação mundial, apresentando pouco mais de 46 mil espécies relatadas, sendo considerado o país que apresenta a maior biodiversidade de espécies do mundo distribuídas nos

seus seis biomas terrestre (Floresta amazônica, pantanal, cerrado, caatinga, pampas e a mata atlântica) e marinhos (BRASIL, 2022a). A caatinga bioma exclusivo da região do nordeste em que já foram descritas cerca de 930 espécies relatadas, sendo considerado a região de clima semiárido com maior biodiversidade do mundo (BRASIL, 2022b).

Cada vez mais o uso de técnicas computacionais está sendo utilizadas para o auxílio no desenvolvimento de novos candidatos a fármacos, pois, a utilização dos métodos quimioinformático ajudam a reduzir tempo e gastos durante o desenvolvimento de medicamentos (SUNIL *et al.*, 2022). Está área de pesquisa obteve uma grande relevância na busca de alternativas para combater o vírus do COVID-19 (FERREIRA; ANDRICOPULO, 2022). Ferramentas como o QSAR, docking e a dinâmica molecular auxiliam na descoberta de potenciais substâncias químicas, pois estes informam importantes propriedades químicas e possíveis interações que as moléculas podem apresentar nos sítios de ligação (DOYTCHINOVA, 2022).

Nesse contexto o gênero *Maytenus*, pertence à família Celastraceae, apresenta grande importância na medicina popular. Os extratos das espécies desse gênero são, principalmente, conhecidos por apresentarem um grande potencial contra distúrbios gastrointestinais, bem como, apresentam uma riqueza de metabólitos secundários com diversas propriedades, destacando-se os triterpenos friedelanos com atividade antimicrobiana e os alcaloides sesquiterpênicos piridínicos com atividade leishmanicida (FORMIGA *et al.*, 2017; VELOSO *et al.*, 2017).

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 das raízes e metabólitos secundários isolados da espécie *Maytenus distichophylla* irá contribuir para o conhecimento quimiotaxonômico e farmacológico deste gênero.

Objetivos

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivos gerais

Contribuir para a ampliação do conhecimento químico do gênero *Maytenus* através do estudo fitoquímico das raízes de *Maytenus distichophylla* Mart. ex. Reissek

2.2 Objetivos específicos

- Obter extratos e fases orgânicas das raízes de *M. distichophylla* para o estudo da sua composição química;
- Desenvolver metodologias analíticas em CLAE-DAD-EM para os extratos e fases da espécie *M. distichophylla*;
- Utilizar a ferramenta rede molecular para guiar o isolamento dos metabólitos secundários;
- Isolar e purificar metabólitos secundários dos extratos obtidos das raízes *Maytenus distichophylla* utilizando métodos cromatográficos;
- Identificar as substâncias químicas isoladas de *Maytenus distichophylla* através de Ressonância Magnética Nuclear e espectrometria de massas;
- Caracterizar e avaliar a atividade antimicrobiana dos extratos e dos metabólitos secundários isolados de *Maytenus distichophylla*;
- Realizar estudos de predição farmacológica das substâncias isoladas em bactérias e fungos.

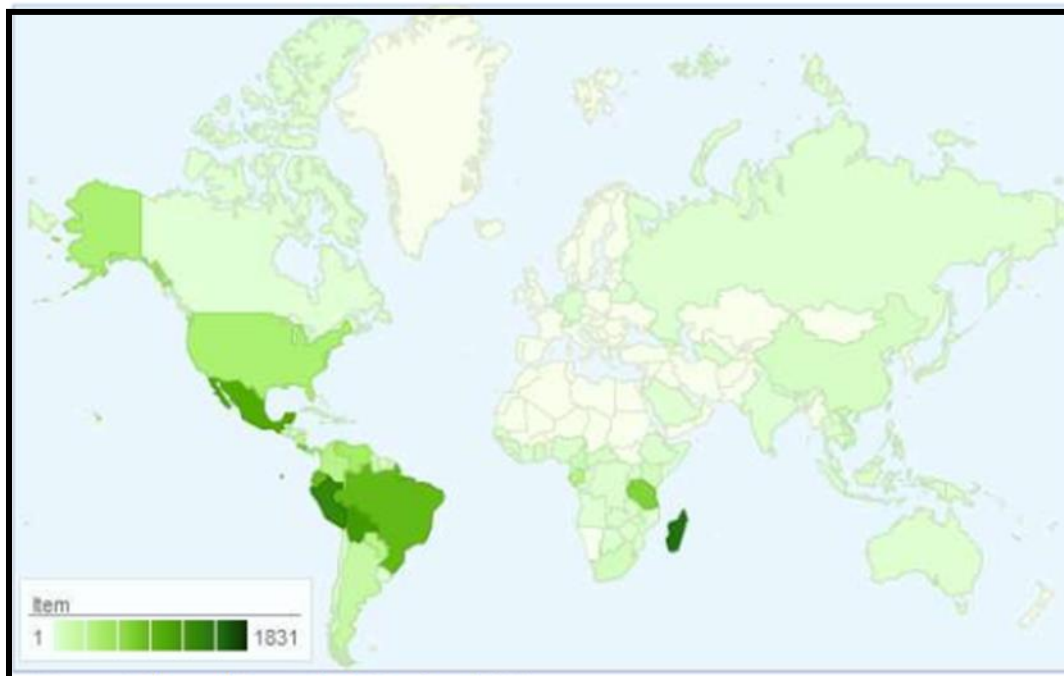
Fundamentação Teórica

3. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

3.1 Considerações sobre a família Celastraceae

A família Celastraceae é formada por arbustos e árvores de pequeno porte com características lenhosas e com caules e folhas resinosas (CAMARGO *et al.*, 2020; CHRISTENHUSZ; BYNG, 2016). Esta família é representada por 96 gêneros e 1350 espécies, apresentando distribuição pantropical, sendo encontradas, principalmente, nas regiões de clima tropical, subtropical e regiões de climas temperados do mundo, locais em que predominam o clima quente, como o Norte da África, América do Sul e Leste da Ásia, destacando-se os países Madagascar, Peru, Bolívia, México e Brasil como os locais que apresentam mais relatos de espécies encontradas e identificadas (Figura 1). (CAMARGO *et al.*, 2022; VELOSO *et al.*, 2017).

Figura 1. Mapa e distribuição geográfica da família Celastraceae no mundo, representadas pelas áreas em verde.



Fonte: tropicos.org/Name/42000007, acesso em 17 de maio de 2020

As espécies da família Celastraceae apresentam grande distribuição geográfica pelo mundo e uma rica diversidade e complexidade estrutural de metabólitos secundários (CALLIES *et al.*, 2017). *Euonymus*, *Maytenus*, *Celastrus* e *Cassine* são os gêneros que apresentam uma maior representatividade nesta família, porém, *Maytenus* e *Celastrus* destacam-se por apresentarem diversos relatos de uso na medicina popular e por serem utilizados pelas

populações indígenas e rurais para a agricultura (PERLEBERG *et al.*, 2021; VELOSO *et al.*, 2017; COPPEDE, 2014).

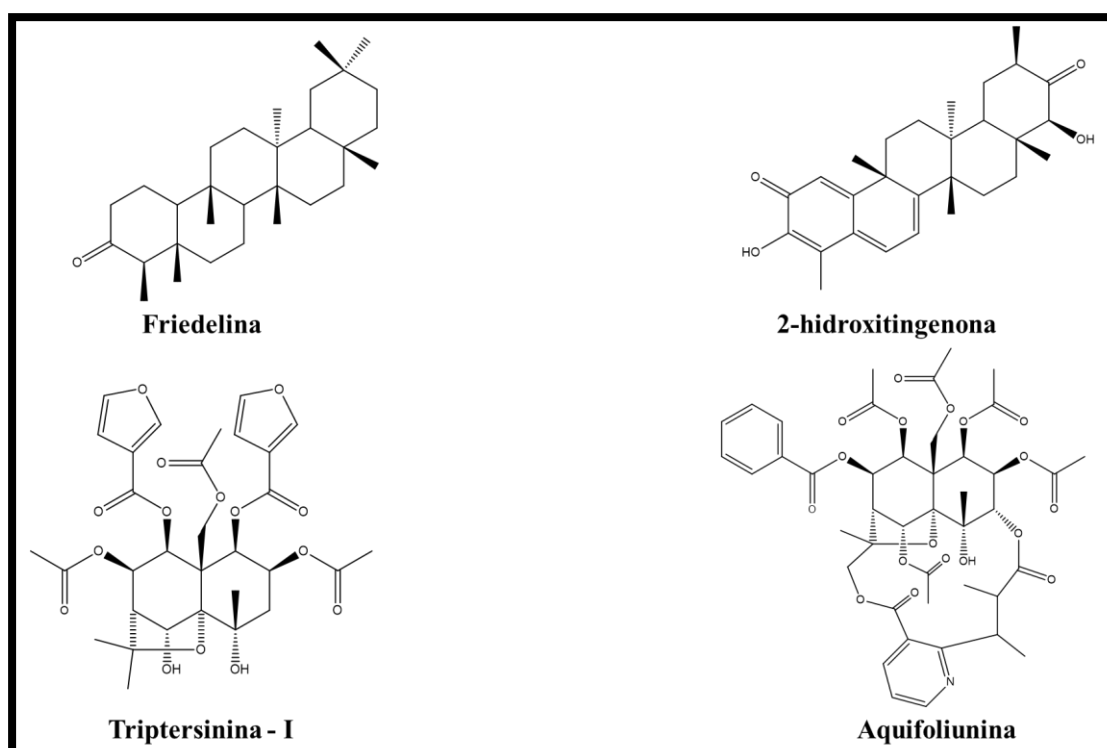
No Brasil, as espécies de Celastraceae estão distribuídas nas cinco regiões brasileiras e presente em seis biomas brasileiros (Amazônia, Caatinga, Cerrado, Mata Atlântica, Pampa e Pantanal), destacando-se o bioma da Amazônia como o local que apresenta um maior número de relatos de plantas de Celastraceae (BIRAL; LOMBARDI., 2020). Já foram registradas 19 gêneros e 141 espécies, dos quais os gêneros *Fraunhofer* e *Goniodiscus* são os únicos endêmicos e das 141 espécies, sendo 57 espécies endêmicas no Brasil. (SANTOS, 2016; BFG, 2015).

Os extratos de espécies de Celastraceae apresentam diversas propriedades medicinais. A literatura relata que estes extratos são utilizados para doenças estomacais, febre, artrite reumatoide, podem ser utilizados como inseticidas, repelentes de insetos, inibidores de apetites. Estudos mostraram que as substâncias produzidas por essas plantas apresentaram atividades antitumorais, anti-inflamatórias, antimicrobianas, antivirais, inibição da acetilcolinesterase, antiulcerogênicas, hepatoprotetora, hipoglicemiante, imunomoduladora (ARAÚJO-LEÓN *et al.*, 2019; BHUKARI; JANTAN; SEYED, 2016; VELLOSO *et al.*, 2017). No Brasil, além de serem usados para doenças estomacais, também são utilizados no combate à dengue (RODRIGUES *et al.*, 2019).

Este importante potencial farmacológico descrito acima é atribuído a presença de uma grande variedade de metabólitos secundários que estão presente nas espécies de Celastraceae. Dentre as inúmeras classes de metabólitos secundários existentes em Celastraceae destacam-se os triterpenos, sesquiterpenos do tipo dihidroagarofurano, alcaloides sesquiterpênicos piridínicos e as catequinas são os metabólitos secundários mais abundantes em Celastraceae (SHEN *et al.*, 2019; NIERO *et al.*, 2011). Os triterpenos apresentam relevante atividade antiviral, como exemplo temos friedelanol e friedelina que apresentaram atividades contra a cepas de coronavírus (DARSHANI *et al.*, 2022). Triptersinina I e triptersinina K, sesquiterpenos dihidroagarofurano isolados de *Tripterygium wilfordii*, apresentaram inibição dos efeitos do óxido nítrico em macrófagos, bem como, o alcaloide sesquiterpênico piridínico, aquifoliunina E-I apresentou uma potente atividade contra os protozoários *Leishmania Chagasi* e *Trypanosoma cruzi*, também foram relatadas atividade antitumoral da substância dimacrogelina C (YE *et al.*, 2022; LV *et al.*, 2019; KISHBAUGH, 2016). Rodrigues e colaboradores (2019) mostraram que os triterpenos do tipo quinonametídeos isolados de

Salacia impressifolia apresentaram atividade contra diversas linhagens de câncer, essa classe de triterpenos são considerados marcadores quimiotaxonomicos da família Celastraceae. Na figura 2 são listados alguns metabólitos secundários encontrados nesta família. (VALDEVITE *et al.*, 2021)

Figura 2. Metabólitos secundários encontrados em Celastraceae



Fonte: autoria própria

3.2 Considerações sobre o gênero *Maytenus*

Considerado o gênero com maior representatividade dentro da família Celastraceae, *Maytenus* apresenta uma grande importância química, farmacológica e botânica (SANTOS, 2016; HUANG *et al.*, 2021). Ao longo do tempo, *Maytenus* vem sofrendo diversas reclassificações taxonômicas, porém, estudos recentes utilizando critérios morfológicos juntamente com critérios genéticos resultou em uma divisão dentro deste gênero sendo criado o gênero *Monteverdia*, no qual grande parte das espécies de *Maytenus* foram agrupadas e reclassificadas para este novo gênero *Monteverdia* (BIRAL *et al.*, 2017; GROPPPO *et al.*, 2014).

Sendo assim, *Monteverdia* é representada por aproximadamente 123 espécies, distribuída geograficamente em regiões de clima tropicais e subtropicais do mundo (AMARAL *et al.*, 2022; CESSA, *et al.*, 2021). São representadas por espécies arbustivas ou arbóreas no

qual apresentam grande valor ornamental, sendo utilizadas como fonte de madeira e alimento para o gado. (SOTO-MALDONADO *et al.*, 2022; ESTEVAM *et al.*, 2009).

No Brasil, as espécies de *Monteverdia* apresentam boa adaptação ao clima brasileiro, sendo o Brasil considerado a região com a maior diversidade de espécies encontradas. Foram relatadas 49 espécies das quais 36 são consideradas endêmicas das regiões brasileiras, as espécies desse gênero são relatadas nos seis biomas brasileiros (Amazônia, Caatinga, Cerrado, Mata Atlântica, Pampa, Pantanal). No qual são encontradas desde do norte do país com o relato de *Monteverdia acanthophylla* (Tocantins) e *M. sprucei* (Acre e Amazonas) até a região Sul com a presença de *M. cassineformis* (Rio Grande do Sul e Santa Catarina) e *M. littoralis* (Santa Catarina e Paraná), bem como, espécies que se desenvolveram exclusivamente na região da caatinga como *M. erythoxylon* e *M. mucugensis* (FLORA DO BRASIL., 2020; BFG 2015; BIRAL *et al.*, 2015).

Por ter uma distribuição geográfica em todo o território brasileiro, os extratos das folhas, caules e raízes do gênero *Maytenus* apresentam grande importância para a medicina popular. Este gênero, destaca-se por sua atividade frente aos distúrbios do trato gastrointestinal, sendo inclusive, a espécie *M. ilicifolia* (Espinheira-santa) uma das doze espécies listada na RENAME (Relação Nacional de Medicamentos) (CAMASSOLA; BARBOSA, 2017). Outras espécies como *M. aquifolium* e *M. rígida* são utilizadas para o tratamento de úlceras peptídicas e diarreias, respectivamente (VELOSO *et al.*, 2017; FORMIGA *et al.*, 2016). Também são relatadas para o tratamento de febre e erupções cutâneas (folhas de *M. boaria*) e para processos inflamatórios e infecciosos (folhas e a casca do caule de *M. obtusifolia* e *M. rígida*) (SOTO-MALDONADO *et al.*, 2022; HUANG *et al.*, 2021; VELOSO *et al.*, 2017; AGRA *et al.*, 2007).

Maytenus (sin. *Monteverdia*) é conhecido pela grande diversidade de triterpenos do tipo friedelano e lupano presentes tanto nas folhas como nas raízes deste gênero. Os triterpenos friedelanos apresentam uma grande variedade de estruturas, seu esqueleto básico é derivado do ácido oleanólico no qual ocorre deslocamento das metilas para as posições C-4, C-5, C-9, C-14 e duas metilas geminadas em C-17 (HUANG *et al.*, 2021). A literatura relata que os triterpenos friedelanos friedelan-3-ona, 1 α ,29-dihidroxifriedelan-3-ona apresentam atividade antimicrobiana e o friedelano 3,15-dioxo-21 α -hidroxifriedelano isolado de *M. robusta* combateu úlceras induzidas em camundongos (SOUZA *et al.*, 2017; VELOSO *et al.*, 2017).

Os triterpenos do tipo quinonametídeos são encontrados nas raízes das espécies de *Maytenus* e são relatadas atividade anti-inflamatória, antioxidante e antitumoral (VALDEVITE

et al., 2021; INACIO *et al.*, 2019). Outra classe que merece destaque são os alcaloides sesquiterpênicos piridínicos são considerados marcadores químicos das raízes de *Maytenus* e apresentam atividades antitumoral, inseticida, imunossupressora, anti-HIV, anti-inflamatória (DIN; SIDDIQUI, 2022; CALLIES *et al.*, 2017).

3.3 Considerações sobre *Maytenus distichophylla* Mart. ex Reissek

Maytenus distichophylla (sinônimo *Monteverdia distichophylla*) é conhecida popularmente como “pau-colher”, “casca-amarela”, “pau-doce” é uma árvore de porte médio, arbustiva chegando até 12 metros de altura. São utilizadas de maneira ornamental e utilizadas para o reflorestamento de áreas de vegetação degradada (BIRAL; LOMBARDI, 2020; DUARTE, 2013) (Figura 3). Na medicina tradicional, a infusão das folhas de *M. distichophylla* são utilizadas para o tratamento de sintomas de doença renal crônica, bem como, utilizadas para tratamento de úlceras estomacais, inflamações e cicatrização de feridas (MORALES, *et al.*, 2020; VELOSO *et al.*, 2017; SOUZA *et al.*, 2014).

Figura 3. *Maytenus distichophylla* Mart. ex Reissek



Fonte: Tavares, J, F, 2019.

Considerada uma espécie endêmica do Brasil, *M. distichophylla* apresenta boa adaptação às regiões da caatinga, principalmente a região do semiárido nordestino, e da mata

atlântica. Esta espécie pode ser encontrada nos estados do litoral brasileiro, com destaque para o litoral do Nordeste (Alagoas, Bahia, Paraíba, Pernambuco, Rio Grande do Norte e Sergipe), do Sudeste (Espírito Santo) e algumas cidades do estado de Minas Gerais (LOMBARDI; BIRAL., 2020; CAMARGO *et al.*, 2020; DUARTE *et al.*, 2013) (Figura 4). Na Paraíba, *M. distichophylla* é encontrada no parque estadual do Pico do Jabre, situado entre as cidades de Maturéia e Mãe D'água (CUNHA; SILVA-JÚNIOR, 2018)

Figura 4. Estados brasileiros com relatos de *M. distichophylla*



Fonte: <https://floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/herbarioVirtual/ConsultaPublicoHVUC/ConsultaPublicoHVUC.do>

Existem poucos estudos fitoquímicos descrevendo o isolamento de metabólitos secundários de *M. distichophylla*. São descritos triterpenos do tipo friedelanos, lupanos, oleananos, quinonametídeos, como também, foram isolados epigalocatequina e alcaloides sesquiterpênicos piridínicos, porém a classe de metabólitos que apresenta maior incidência de isolamento são os triterpenos com esqueleto friedelano (Tabela 1) (Figura 5). Duarte e colaboradores (2013) relatam o isolamento de sete triterpenos do tipo friedelano das folhas da fase clorofórmica e acetato de etila, sendo a maitensifolona (3,16,21-trioxo-6 β ,12 α -dihydroxy-1-en-friedelano) um novo triterpeno, também foi descrito o isolamento de dois alcaloides sesquiterpênicos piridínico (DUARTE *et al.*, 2013; DUARTE, 2013).

Do caule de *M. Distichophylla* foi relatada a presença de Mistura 3-oxo-12 α -Hidroxifriedelano e 3-oxo-30-hidroxifriedelano, Mistura de 3-oxo-12 α - Hidroxifriedelano e 3-oxo-29-hidroxifriedelano, ainda nesse estudo foi descrito nas raízes o isolamento de β -Sitosterol, 11 α - Hidroxigloquidona e Rigidenol 4'-O-metilepigalocatequina (ESMERALDO., 2015). Das folhas Ferreira e colaboradores (2017) avaliaram o potencial dos triterpenos isolados

como inibidores da acetilcolinesterase e observaram que apenas o 3 β - hidroxifriedelano apresentou atividade. Também foi relatada nas raízes a presença dos quinonasmetídeos tingenona e pristimerina (MORALES *et al.*, 2020) (Figura 5). As demais substâncias estão na tabela 1.

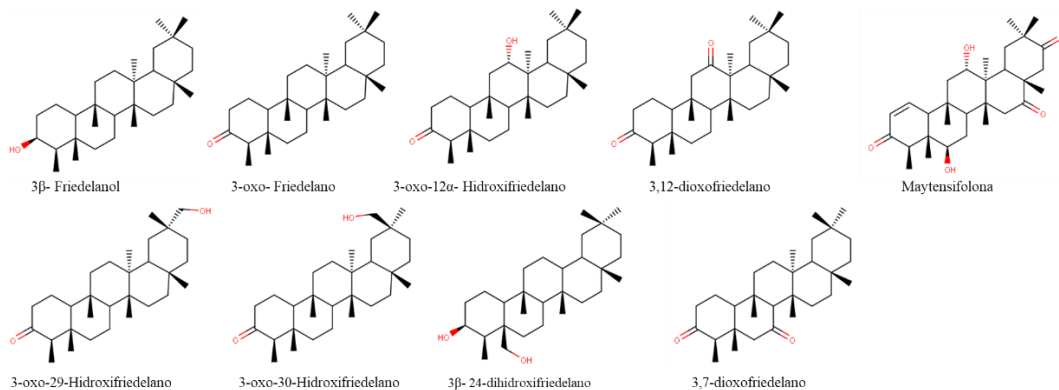
Tabela 1. Metabólitos secundários relatados em *M. distichophylla*

Parte da planta	Fase	Substâncias isoladas	Referências
Folhas	Hexânica	β -sitosterol Esqualeno Mistura de 3 β -esteariloxi-urs-12-eno e 3 β - esterealoiolean-12-eno 3 β - hidroxifriedelano 3 β ,24-dihidroxifriedelano 3-oxofriedelane 3-oxo-30-hidroxifriedelano α -amirina β -amirina 1,4- <i>trans</i> -poli-isopreno (guta-percha)	FERREIRA., 2014
Folhas	Clorofórmica	3 β - hidroxifriedelane 3 β ,24-dihidroxifriedelano 3-oxo-29-hidroxifriedelano 3-oxo-12 α -hidroxifriedelano 3-oxo-30-hidroxifriedelane 3-oxofriedelane β -sitosterol β -glucosil- β -sitosterol tritriacontanoic acid 1,4- <i>trans</i> -poli-isopreno (guta-percha) α -amirina β -amirina 3-steariloxi-urs-12-ene	FERREIRA <i>et al.</i> , 2017 DUARTE <i>et al.</i> , 2013
Folhas	Acetato de etila	3-oxofriedelano maytensifolona 3,12-dioxofriedelano	DUARTE <i>et al.</i> , 2013
Raiz	Hexânica	β - Sitosterol 3-oxofriedelano 3-oxo-olean-9(11),12-dieno Mistura de pristimerin e 11a-hidroxilup-20(29)-en-3- ona 30-hidroxilup-20(29)-en-3-ona friedelane-3,7-diona tingenona triacilglicerol	MORALES <i>et al.</i> , 2020
Raiz	Clorofórmica	Wilforina e Ebinifolina W-I	DUARTE, 2013
Raiz	Eter etílico	β - Sitosterol 11 α - Hidroxigloquidona	ESMERALDO., 2015
Raiz	Acetato de etila	Rigidenol 4'-O-metilepigalocatequina	ESMERALDO., 2015
Caule	Acetato de etila	Mistura 3-oxo-12 α -Hidroxifriedelano e 3-oxo-30- hidroxifriedelano Mistura de 3-oxo-12 α - Hidroxifriedelano e 3-oxo-29- hidroxifriedelano	ESMERALDO., 2015

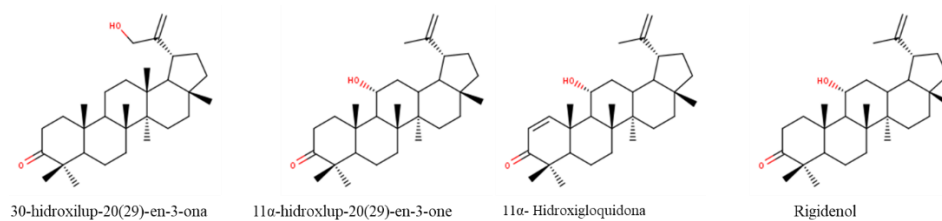
Fonte: autoria própria

Figura 5. Estrutura química dos compostos isolados em *M. distichophylla*

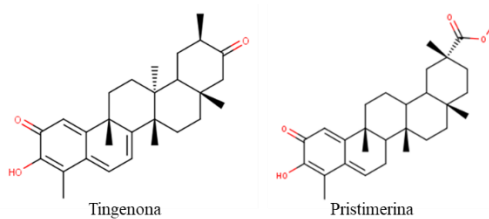
Triterpenos-friedelanos



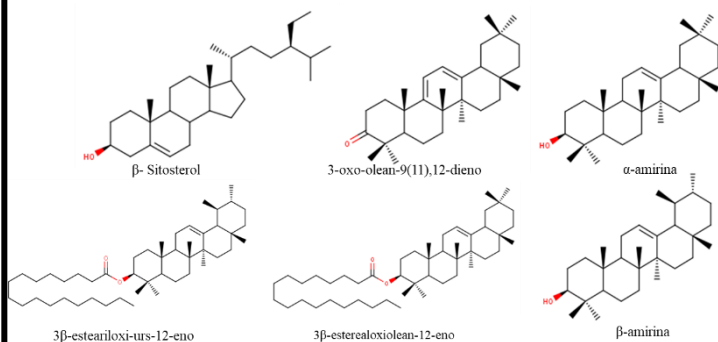
Triterpenos-lupanos



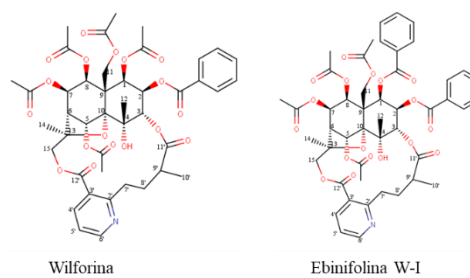
Triterpenos-quinonametídeos



Outros triterpenos e esteróides



Alcaloides sesquiterpênicos piridínicos



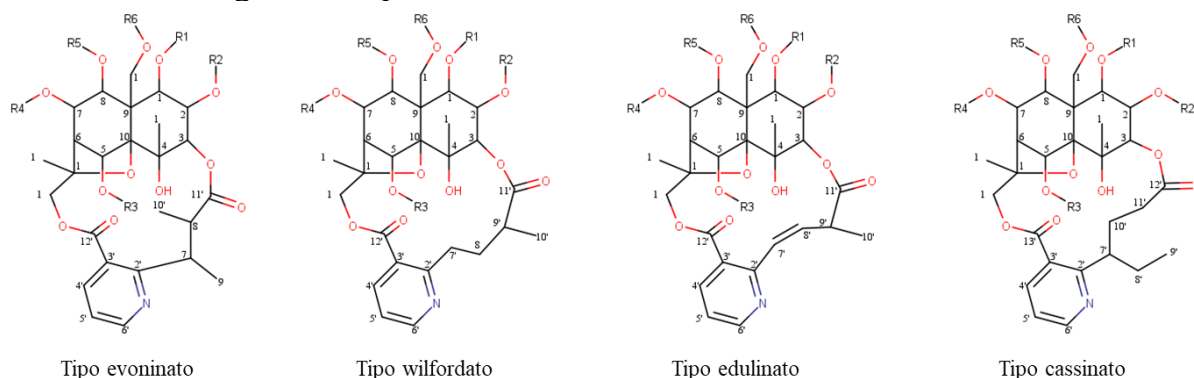
Fonte: autoria própria

3.4 Considerações sobre alcaloides sesquiterpênicos piridínicos (ASP)

As plantas medicinais são grandes produtoras de metabólitos secundários, estes são responsáveis por apresentarem importantes atividades farmacológicas e consequentemente trazer benefícios para a população, bem como, a diversidade de estruturas químicas encontradas apresenta importância para a indústria farmacêutica, pois são utilizadas como protótipos para o desenvolvimento de novos fármacos (ROY., 2017). Dentro dessa ampla diversidade de classes de metabólitos secundários destacam-se os alcaloides que são substâncias químicas que ocorrem na natureza que são caracterizados por possuir átomo de nitrogênio em sua estrutura. Os alcaloides são classificados de acordo com o aminoácido precursor da sua rota biosintética, no qual, merece destaque os alcaloides sesquiterpênicos piridínicos (DHYANI *et al.*, 2022; BRIBI., 2018).

Os ASP são considerados marcadores quimiotaxonômico da família Celastraceae, sendo encontrado principalmente nas raízes das espécies de Celastraceae (SANTOS *et al.*, 2021). Esta classe de metabólitos secundários é formada por uma estrutura macrocíclica entre um sesquiterpeno polioxigenado do tipo dihidro- β -agarofurano e por diferentes ácidos dicarboxílicos nicotínicos ligados por ligações ésteres nos carbonos 3 e 15. São classificados em quatro subgrupos de acordo com o tipo de ácido nicotínico (ácido evonínico, ácido wilfórdico, ácido edulínico e ácido cassínico) que está realizando a ligação éster com o sesquiterpeno. Entre os subgrupos apresentados os derivados do ácido evonínico e wilfórdico são os que apresentam mais relatos de isolamento na literatura (Figura 6) (LIAO *et al.*, 2003; CALLIES *et al.*, 2017; CORDELL., 2008). A presença do núcleo piridínico tem grande importância para as atividades farmacológicas desta classe de metabólitos secundários, este núcleo é capaz de realizar ligações de hidrogênio e ligações hidrofóbicas que são cruciais para atuar em receptores responsáveis na cura da doença de Alzheimer, câncer de mama, doença de Chagas e doença hepática gordurosa não alcoólica (LONG *et al.*, 2021)

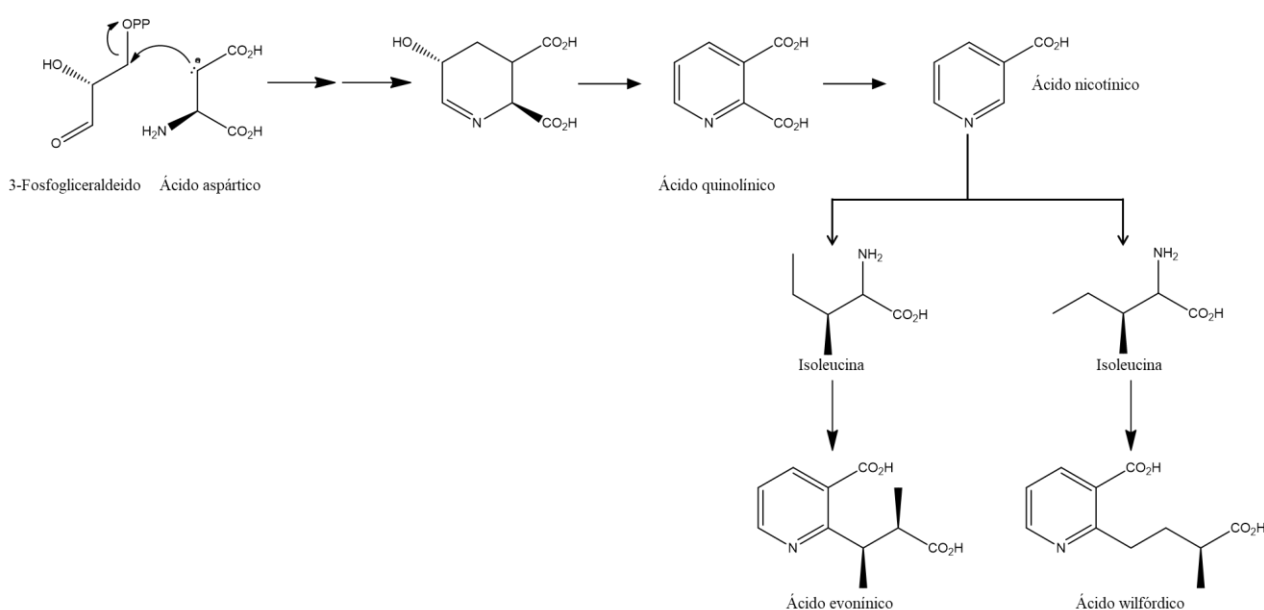
Figura 6. Esqueleto básico dos ASP relatados na literatura



Fonte: autoria própria

A biossíntese dos ASP é oriunda de rotas mistas. A porção sesquiterpênica tem origem pelo metabolismo do acetato através da via do ácido mevalônico, enquanto a porção do alcaloide é obtido a partir da via do ácido nicotínico que tem como aminoácido precursor o ácido aspártico (DEWICK., 2002). Inicialmente, para a formação do ácido nicotínico é necessário a presença da molécula de 3-fosfogliceraldeído o qual sofrerá um ataque nucleofílico do ácido aspártico formando um derivado do ácido quinolínico, este sofrerá sucessivas desidratações e desidrogenações para a formação do ácido nicotínico. Posteriormente, os derivados dos ácidos evonínico e wilfórdico são formados pelo acoplamento do ácido nicotínico com o aminoácido isoleucina (Esquema 1) (LIAO, 2003).

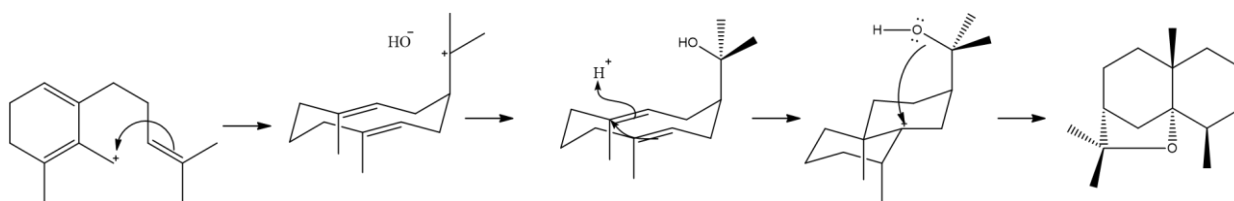
Esquema 1. Biossíntese dos ácidos evonínico e wilfórdico



Fonte: Liao, 2003 e Dewick, 2002 adaptado

O sesquiterpeno dihidroagarofurano é uma classe de compostos formados por 15 átomos de carbono no qual o precursor dessa classe é o cátion germacril. Para a formação deste cátion, ocorre uma adição eletrofílica de um inositol difosfato a um geranyl difosfato formando o cátion farnesil, em seguida ocorre uma ciclação entre o cátion e os elétrons da insaturação do isopreno, gerando o cátion germacril, este sofre uma hidroxilação no cátion formando o germacra-4,9-dien-11-ol. Um rearranjo de hidrogênio ocorre, alterando a posição do cátion para o carbono terciário vizinho que posteriormente sofre um ataque eletrofílico do oxigênio da hidroxila, promovendo uma nova ciclação, dando origem ao sesquiterpeno dihidroagarofurano (Esquema 2) (LIAO, 2003; DEWICK, 2002; BRÜNING, WAGNER, 1978).

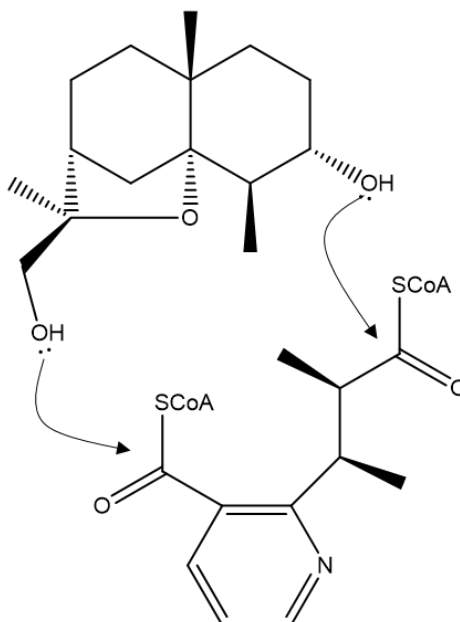
Esquema 2. Formação do sesquiterpeno dihidroagarofurano



Fonte: Liao, 2003 e Dewick, 2002 adaptado

Para finalizar a formação do ASP, ocorrerá a união da porção do sesquiterpeno com o alcaloide piridínico para a formação do anel macrocíclico. Essa união é realizada através da esterificação das carboxilas do alcaloide piridínico com hidroxilas que estão presentes na unidade sesquiterpênica (Esquemas 3) (LIAO, 2003)

Esquema 3. Formação do anel macrocíclico dos ASP.



3.5 Rede molecular

Com o surgimento de novas doenças, com o desenvolvimento de resistência de microrganismos frente aos antimicrobianos, bem como, a grande incidência de efeitos colaterais e adversos dos medicamentos, torna-se necessárias novas alternativas para suprir as dificuldades enfrentadas durante as terapias medicamentosas. Nos últimos anos, apenas duas novas classes de medicamentos foram desenvolvidas para microrganismos. Nesse contexto, existe uma necessidade crítica em buscar estratégias para a pesquisa e desenvolvimento de novos protótipos a fármacos que possam superar essas barreiras, principalmente para bactérias Gram-negativas, pois são os microrganismos que apresentam um maior grau de mortalidade e resistência aos antimicrobianos. Nesse sentido, as ferramentas computacionais, como a rede molecular, têm sido utilizadas para auxiliar pesquisadores na busca de potenciais substâncias químicas com atividades terapêuticas (SHAMSRIZI *et al.*, 2020; TOCONELLI *et al.*, 2020).

A rede molecular é uma ferramenta, cujo princípio, é realizar a organização de dados de espectrometria de massas em tandem (EM/EM), ou seja, mostrar de maneira geral os ions das substâncias químicas que foram detectados e fragmentados durante a análise de espectrometria de massas. A base desta ferramenta são algoritmos computacionais no qual agrupam as moléculas de acordo com a similaridade espectral observada entre os padrões de fragmentação de ions precursores diferentes, porém estruturalmente relacionados. A rede molecular levou ao desenvolvimento da plataforma GNPS (Global Natural Products Social), é uma plataforma online no qual armazena e analisa dados de espectrometria de massas de substâncias químicas isoladas para serem compartilhados entre os usuários. Para se obter uma rede molecular é utilizada esta plataforma para a realização deste agrupamento de dados espectrais e para visualizar e analisar a rede molecular o software mais usado é o *Cytoscape*®, no qual mostra os ions precursores na forma de nodos e as arestas que os ligam informam a similaridades entre esses nodos. (QUINN *et al.*, 2017; THOMFORD *et al.*, 2018).

Como os produtos naturais representam uma inesgotável fonte de substâncias químicas representando uma parcela de medicamentos criados. Esta ferramenta apresenta grande aplicação na área das genômicas, com destaque para a metabolômica em produtos naturais, sendo utilizada na dereplicação, detecção e isolamento de substâncias químicas de extratos e fases de origem de vegetal, sendo assim uma ferramenta de grande importância na busca de novos candidatos a protótipos a fármacos (OLIVON *et al.*, 2017; SOUZA *et al.*, 2020)

Material e métodos

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Coleta e identificação botânica

As raízes de *Maytenus distichophylla* foram obtidas no município de Maturéia – PB e identificadas pela Profa. Dra. Maria de Fátima Agra, do setor de botânica do Centro de Biotecnologia, uma exsicata encontra-se depositada no herbário Prof. Lauro Pires Xavier do Centro de Ciências Exatas e da Natureza (CCEN) da Universidade Federal da Paraíba (UFPB) sob código AGRA 7448. Esta espécie está registrada na plataforma do Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado (SisGen) sob código AF001C4.

4.2 Procedimentos cromatográficos

Os métodos cromatográficos utilizados para análise, fracionamento, purificação e isolamento dos constituintes químicos foram a cromatografia em cartucho C-18 (Strata C-18 E 55 μm , 50 g/150 mL gigatubes) com auxílio de um manifold (24port Vacuum SPE – Phenomenex). Além de utilizar um cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência (CLAE), na escala analítica da Shimadzu Prominence formado por controlador de sistema modelo CBM-20A, bomba LC-20AT, desgaseificador DGU-20A 5R, auto-injetor SIL-20A HT e detector de arranjo de diodo (DAD) SPD-M20A para o desenvolvimento de metodologias analíticas para posteriormente realizar a transposição para a escala preparativa. Como fase estacionária foram utilizadas colunas da Kromasil 100-10-C18 (250 mm x 4,6 mm e partículas de 10 μm) conectada a uma pré-coluna C18 (4 mm x 3,0 mm e partículas de 10 μm). O fluxo empregado para as análises foi de 0,6 mL/min, o volume de injeção foi de 20 μL e as amostras preparadas na concentração de 1 mg mL⁻¹. Também foi utilizado um CLAE da marca Shimadzu, utilizando uma coluna analítica C18 (Kromasil - 250 mm x 4,6 mm x 5 μm), acoplado ao Espectrômetro de Massas (EM) da marca Bruker (Ion-Trap AmazonX), com Ionização por *Eletrospray* (IES) e analisador do tipo *Ion Trap* (IT), situado no LMCA/IPeFarM/UFPB.

Os isolamentos em CLAE, na escala preparativa, ocorreram no equipamento Shimadzu com controlador de sistema modelo SLC-10A vp, duas bombas LC-6AD, injetor manual

Rheodyne e detector DAD SPD-M10A vp. A coluna preparativa utilizada no procedimento foi uma ACE 5 C18 (250 mm x 21,2 mm e partículas de 5 μm). O fluxo da fase móvel foi de 8,0 mL/min, com volume de injeção da amostra de 100 μL , as quais foram preparadas em concentrações de até 100 mg mL⁻¹, variando de acordo com suas características das frações. Para ambas CLAE, foram utilizados como fase móvel MeOH grau de pureza HPLC (Tedia®) e água ultrapura (purificada em sistema Milli-Q®), puros ou em misturas binárias.

O monitoramento das frações obtidas das cromatografias descritas acima 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 puros ou em misturas binárias) 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).

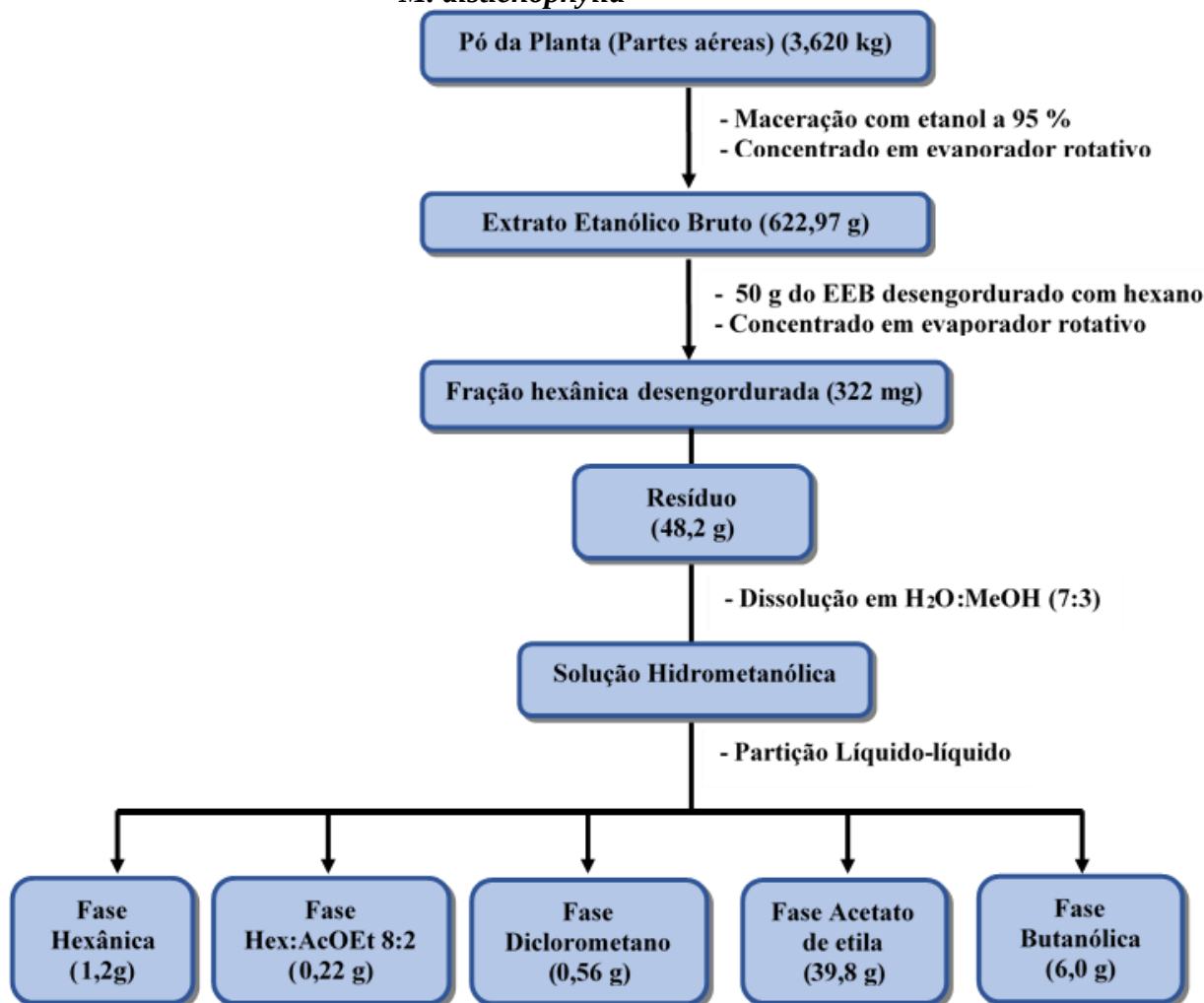
4.3 Obtenção e particionamento do extrato etanólico das raízes de *M. distichophylla*

O material botânico coletado foi seco em estufa com ar circulante utilizando temperatura média de 45 °C durante 72 horas. Após a secagem o material foi submetido a um processo de trituração em moimha mecânico obtendo 3,620 kg do pó das raízes de *M. distichophylla*. Em seguida, este pó foi submetido à maceração com etanol (EtOH) a 95 % em recipiente de aço inoxidável por 72 horas. A solução hidroetanólica foi concentrada em evaporador rotativo obtendo-se 622,97 g do extrato etanólico bruto das raízes.

50 g do EEB foi previamente solubilizado com hexano para o procedimento de retirada dos compostos mais apolares (desengorduramento) com agitação mecânica realizada pelo aparelho da ethiktechnology (Modelo M110-VER-4K3) durante 60 minutos. Após a evaporação do solvente foi obtido 322 mg da fração hexânica desengordurada. O resíduo não solúvel em hexano, foi solubilizado em H₂O:MeOH (7:3) e esta solução hidrometanólica foi submetida a um processo de partição líquido-líquido com os solventes hexano (100%), hexano:acetato de etila (8:2), diclorometano (100%), acetato de etila (100%) e n-butanol (100%). As soluções obtidas foram tratadas com sulfato de sódio anidro (NaSO₄) e submetidas à filtração sob pressão reduzida. Após este processo, as soluções foram concentradas em evaporador rotativo a 45 °C

e obtidas as seguintes fases: hexânica (1,2 g), hexano:acetato de etila (8:2) (0,22 g), diclorometano (0,56 g), acetato de etila (39,8 g) e n- butanol (6,0 g) das raízes (Esquema 4).

Esquema 4. Obtenção e partição líquido-líquido do extrato etanólico bruto das raízes de *M. distichophylla*



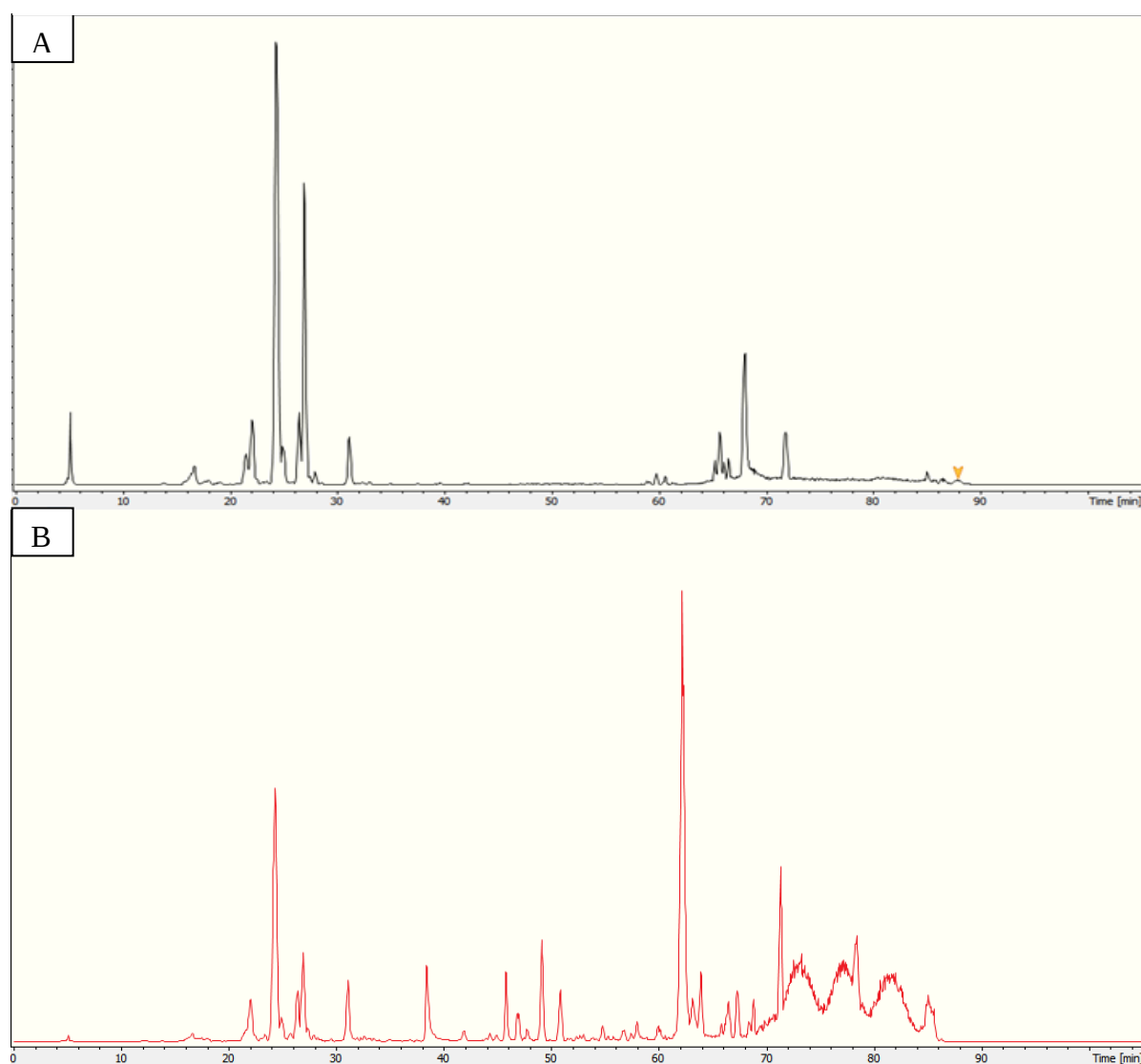
4.4 CLAE/EM do EEB da raiz de *M. distichophylla*

Para análise em escala analítica foi pesada 1 mg do EEB, solubilizado em 1 mL de metanol grau HPLC para obter a concentração de 1 mg. mL⁻¹. Em seguida para retirada de possíveis particulados não solúveis em metanol, a solução foi filtrada em filtro de PVDF (0.45 µm de diâmetro).

O método cromatográfico desenvolvido utilizou os solventes metanol (solvente B) de grau cromatográfico (J.T. Baker) e água ultrapura tipo I (Mili-Q) (solvente A), analisada em

gradiente de concentração (5 a 100% de B em 60 min), volume de injeção de 20 μ L e taxa de fluxo de 0,6 mL/min. No espectrômetro de massas as amostras foram submetidas a uma fragmentação sequencial em EM². Os parâmetros utilizados foram: capilar 4,5 kV, offset da placa final 500 V, gás nebulizador 10 bar, gás seco (N₂) com fluxo de 8 mL/min e temperatura de 300 °C. Através da análise do cromatograma e dos espectros de massas obtidos por CLAE/EM foi possível desenvolver metodologias para realização da partição líquido-líquido com enfoque para a obtenção de frações ricas de alcaloides sesquiterpênicos piridínicos (Figura 7).

Figura 7. Cromatogramas de picos base obtidos no modo negativo (A) e positivo (B) por CLAE-ESI-EM/EM



Fonte: autoria própria

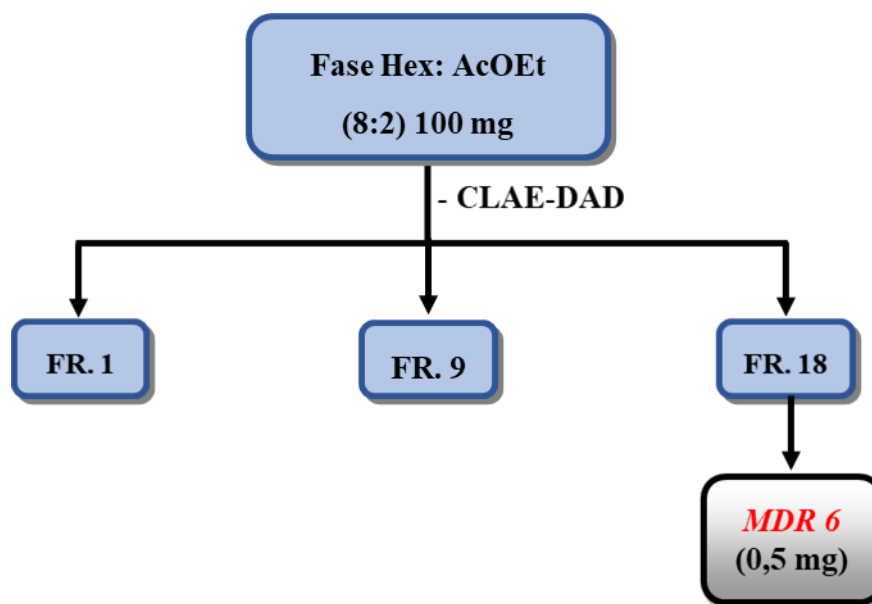
4.5 Rede molecular da raiz de *M. distichophylla*

Para a obtenção da rede molecular foram utilizados dados espectrais de CLAE/EM², utilizando os mesmos equipamentos, parâmetros e metodologia do tópico 4.4. Os dados espectrais do EEB da raiz de *M. distichophylla* obtidos por análise em CLAE/EM² no modo positivo e negativo, foram submetidos a plataforma online *Global Natural Product Social Molecular Networking* (GNPS <https://gnps.ucsd.edu>) para obtenção da rede molecular a fim de visualizar o perfil de metabólitos secundários contidos neste extrato e guiar para o isolamento dos alcaloides sesquiterpênicos piridínicos. Foram utilizados, para o alinhamento espectral, cosseno acima de 0,7, comparação com no mínimo seis íons fragmentos e até 10 ligações entre os nodos similares. Os espectros obtidos experimentalmente foram comparados com a biblioteca espectral disponível no GNPS e todas as correspondências entre estes (anotações), foram requeridas para possuírem um limite mínimo de similaridade de 0,7 pontos de cosseno e ao menos seis picos correspondentes entre si.

4.6 Processamento cromatográfico da fase hexano:acetato (8:2)

Esta fase foi submetida a uma análise exploratória em CLAE-DAD na escala analítica para a visualização do seu perfil cromatográfico. O método cromatográfico exploratório utilizou os solventes metanol (solvente B) de grau cromatográfico (J.T. Baker) e água ultrapura tipo I (Mili-Q) (solvente A), analisada em gradiente de concentração (5 a 100% de B em 95 min), volume de injeção de 20 µL e taxa de fluxo de 0,6 mL/min. A partir da análise do cromatograma exploratório, foram desenvolvidas metodologias cromatográficas para a obtenção de um melhor perfil de separação dos picos presentes neste cromatograma. O método escolhido para a transposição na escala preparativa foi um gradiente de concentração de 10 a 100% de B em 60 min ao qual foram coletadas 18 frações. Estas frações foram analisada por CCDA, das quais, a fração codificada como MDR6 (T_R 56 min, 86% (B) apresentou um melhor perfil de separação entre os picos, e em seguida foi analisada e teve sua estrutura química identificada por ressonância magnética nuclear ¹H e ¹³C (Esquema 5).

Esquema 5. Fracionamento cromatográfico da fase Hexano: Acetato de etila *M. distichophylla*



4.7 Processamento cromatográfico da fase diclorometano

220 mg desta fase foi submetida a um processo de separação utilizando como fase estacionária cartucho C-18 em um sistema a vácuo com auxílio de um manifold e fase móvel um gradiente de H₂O: MeOH obtendo 5 frações (Tabela 2). Estas frações foram analisadas por CLAE na escala analítica, como metodologia cromatográfica foi utilizado o método exploratório descrito na seção 4.4.

Tabela 2. Fracionamento cromatográfico da fase diclorometano de *M. distichophylla*

Subfrações	Sistemas de eluição
1 (51,6 mg)	H ₂ O:MeOH (65:35)
2 (44,9 mg)	H ₂ O:MeOH (1:1)
3 (31,7 mg)	H ₂ O:MeOH (35:65)
4 (55,1 mg)	H ₂ O:MeOH (2:8)
5 (31,6 mg)	H ₂ O:MeOH (5:95)

Fonte: autoria própria

Após análise dos cromatogramas exploratórios, a subfração 4 foi escolhida para o desenvolvimento de metodologias cromatográficas para melhorar o perfil de separação entre os picos. Desta maneira, a metodologia que melhor se adequou para uma separação eficiente entre os picos observados no cromatograma foi no gradiente de concentração de 60% a 100% em 60

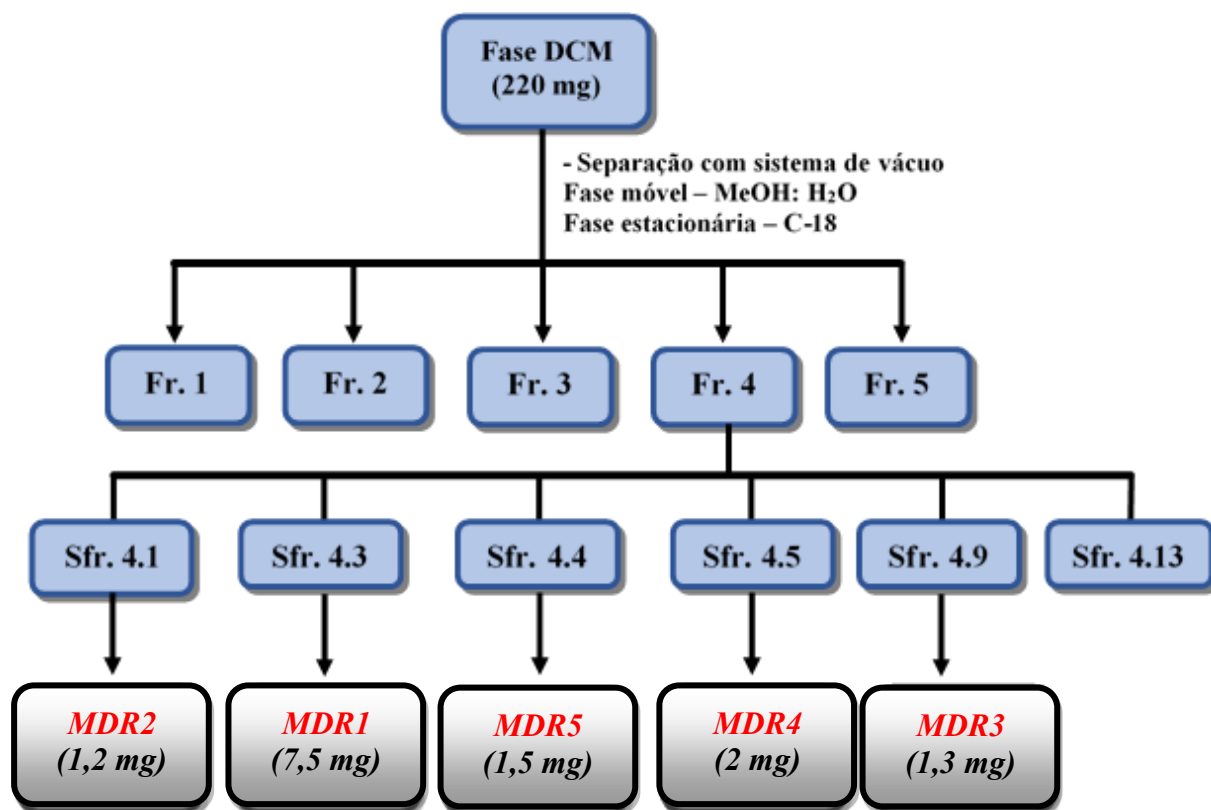
minutos de MeOH:H₂O e como fase estacionária uma coluna de C-18. Após transposição para o CLAE preparativo, foram obtidas 10 subfrações que foram coletadas de acordo com o tempo de retenção do pico, das quais as subfrações MDR4.1 (MDR2), MDR4.3 (MDR1), MDR4.4 (MDR5), MDR4.5 (MDR4) e MDR4.9 (MDR3) foram analisadas e tiveram suas estruturas químicas identificadas por ressonância magnética nuclear ¹H e ¹³C (Tabela 3) (Esquema 6).

Tabela 3. Fracionamento cromatográfico da subfração 4 da fase diclorometano de *M. distichophylla*

Sistemas de eluição H ₂ O(A):MeOH(B)	Tempo de retenção	Subfração
MeOH (72,3%)	29,3 min	4.1 (1,2 mg)
MeOH (74%)	35,5 min	4.2
MeOH (75%)	36,4 min	4.3 (7,5 mg)
MeOH (77%)	40,2 min	4.4 (1,5 mg)
MeOH (77,6%)	41,63 min	4.5 (2 mg)
MeOH (79%)	44,4 min	4.6
MeOH (84%)	48,1 min	4.7
MeOH (90%)	54,1 min	4.8
MeOH (92%)	55,5 min	4.9 (1,3 mg)
MeOH (100%)	73,48 min	4.10

Fonte: autoria própria

Esquema 6. Fracionamento da fase diclorometano de *M. distichophylla*



Fonte: autoria própria

4.8 Procedimento espectroscópicos

4.8.1 Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

Os espectros de RMN, uni e bidimensionais, foram registrados no espectrômetro da Varian system operando a 500 MHz (RMN ^1H) e 125 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) e metanol Deuterado, cujos pico característico do solvente em RMN ^1H (7,24 ppm) e ^{13}C (77,00 ppm), ^1H (3,33 ppm) e ^{13}C (49,00 ppm), respectivamente, servindo como padrão interno durante a obtenção dos espectros. Os espectros de RMN de ^{13}C foram obtidos pela técnica *Broad Band* (BB).

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), *dd* (duplo duplete), *ddd* (duplo duplo duplete), *dt* (duplo tripleto), *t* (tripleto), *q* (quarteto) e *m* (multiplete).

4.9 Química Computacional

4.9.1 Banco de dados

A partir do ChEMBL database (WILLIGHAGEN *et al.*, 2013; MENDEZ *et al.*, 2019), foram selecionados quatro conjuntos de estruturas químicas com atividade conhecida para os microrganismos *Candida albicans*, *Candida parapsilosis*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus epidermidis*, para a construção de modelos preditivos. Os detalhes de cada conjunto estão descritos na tabela 4. 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.

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.

Tabela 4. Bancos de dados do ChEMBL.

Microrganismos	Total de estruturas químicas	Moléculas ativas	Moléculas inativas	ChEMBL ID
<i>Candida albicans</i>	10440	5082 ($pMIC_{50} \geq 4.20$)	5358 ($pIC_{50} < 4.20$)	ChEMBL366
<i>Candida tropicalis</i>	2590	1268 ($pIC_{50} \geq 4.20$)	1322 ($pIC_{50} < 4.20$)	ChEMBL612870
<i>Candida parapsilosis</i>	2608	1183 ($pIC_{50} \geq 4.40$)	1425 ($pIC_{50} < 4.40$)	ChEMBL612868
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	11603	5012 ($pIC_{50} \geq 4.50$)	6591 ($pIC_{50} < 4.50$)	ChEMBL348
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	697	367 ($pIC_{50} \geq 4.50$)	330 ($pIC_{50} < 4.50$)	ChEMBL2366641

4.9.2 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; PASTOR; GUBA, 2000) tem a capacidade de calcular 128 descritores moleculares, utilizando campos de interação molecular (MIFs) através de sondas de N1 (amido nitrogênio-hidrogenio doador de ligação de hidrogênio), O (acceptor de ligação de hidrogênio), OH (água) e DRY (sonda hidrofóbica) e também cálculo de descritores não derivados de MIFs.

4.9.3. Modelo de Predição

O software Knime 3.5 (Knime 3.5.3 the Konstanz Information Miner Copyright, 2003-2017, www.knime.org) (BERTHOLD *et al.*, 2009) 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 substancias 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 arvores de decisão (SALZBER; QUINLAN, 1994), empregado no WEKA (BOUCKAERT *et al.*, 2010). Os parâmetros selecionados para RF para todos os modelos gerados foram de 100 o número total de arvores 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 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 (CHICCO; JURMAN, 2020; MATTHEWS, 1975)

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

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

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 distancias 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 (WEAVER; GLEESON, 2008).

4.10 Estudo da atividade antimicrobiana do extrato, fases e substâncias isoladas das raízes de *Maytenus distichophylla*

4.10.1 Local de trabalho

Os ensaios laboratoriais referentes a este estudo foram realizados no laboratório de pesquisa de atividade antibacteriana e antifúngica de Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos do Departamento de Ciências Farmacêuticas/Centro de Ciências da Saúde/Universidade Federal da Paraíba: setembro/2022.

4.10.2 Produtos testados

Os produtos utilizados para a avaliação da atividade antimicrobiana sobre cepas bacterianas e fúngicas foram as substâncias isoladas obtidas de *Maytenus distichophylla* identificadas como: **MDR1; MDR2; MDR3; MDR4, MDR5 e MDR6;** e as fases em Hexano, Hexano:AcOEt, Clorofórmio, Acetato de Etila e Butanol. 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).

4.10.3 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.

4.10.4 Micro-organismos

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

- **Bactérias:** *S. aureus* ATCC25923, *S. epidermidis* ATCC-12228, *E. coli* ATCC-18739, *P. aeruginosa* ATCC-9027
- **Fungos Leveduriformes:** *C. parapsilosis* ATCC-22019, *C. albicans* ATCC-9002, *C. albicans* LM-22

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 ± 2 °C e repiques de 7 - 14 dias em ASD para fungos filamentosos, incubados a 28 ± 2 °C.

4.10.5 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; HADACECK; GREEGER, 2000; CLEELAND; SQUIRES 1991; ANTUNES *et al.*, 2006; FREIRE *et al.*, 2014).

4.10.6. 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 µg/mL) para inibição das bactérias e Anfotericina B (32 µg/mL) para inibição dos fungos. As placas preparadas foram assepticamente fechadas e submetidas à incubação numa temperatura de 35 ± 2 °C por 24 - 48 horas para os ensaios com bactérias e leveduras, já os fungos filamentosos foram incubados a temperatura de 28 ± 2°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 ± 2°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 µg/mL= forte atividade; 600-1500 µg/mL= moderada atividade; > acima de 1500 µg/mL=fraca atividade ou produto inativo (HOLETZ *et al.*, 2002; SARTORATTO *et al.*, 2004; HOUGHTON *et al.*, 2007).

Resultados e Discussão

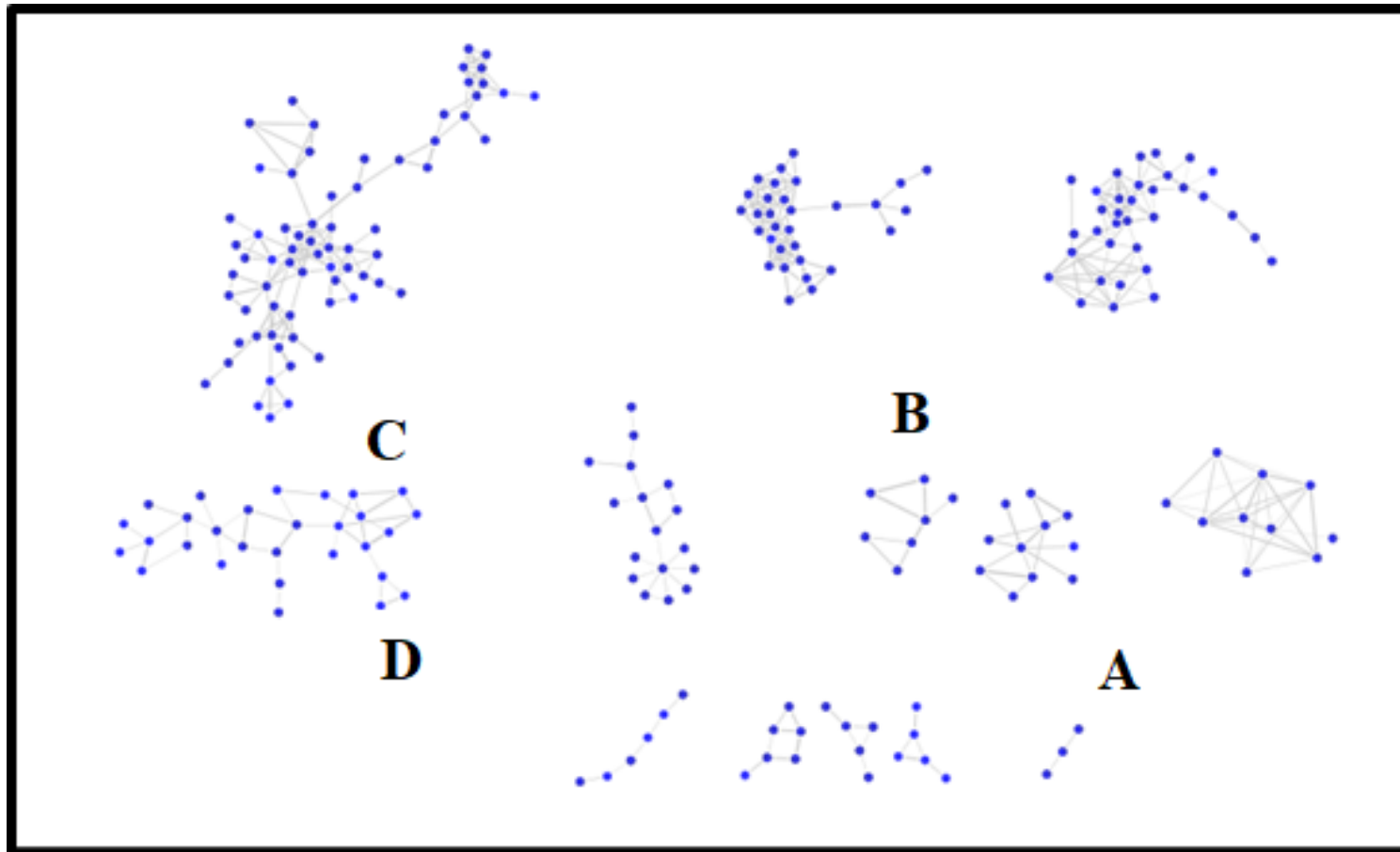
5. RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1 Caracterização dos compostos presentes na raiz de *M. distichophylla* com auxílio da rede molecular

Os espectros de massas, no modo negativo e positivo, do extrato etanólico bruto da raiz de *M. distichophylla* foram inseridos na plataforma GNPS para a produção da rede molecular, com o objetivo de realizar anotações de compostos presentes neste extrato e guiar para um posterior isolamento de metabólitos secundários de interesse. A rede molecular formada foi constituída por 233 nodos e 17 *clusters*, dentre estes, os nodos e *clusters* não relacionados a amostra foram excluídos, e os *clusters* formados com três ou mais nodos estão na figura 8. As intensidades das linhas entre os nodos foram relacionadas aos valores de cosseno, indicando quanto maior a espessura maior o grau de similaridade entre os nodos.

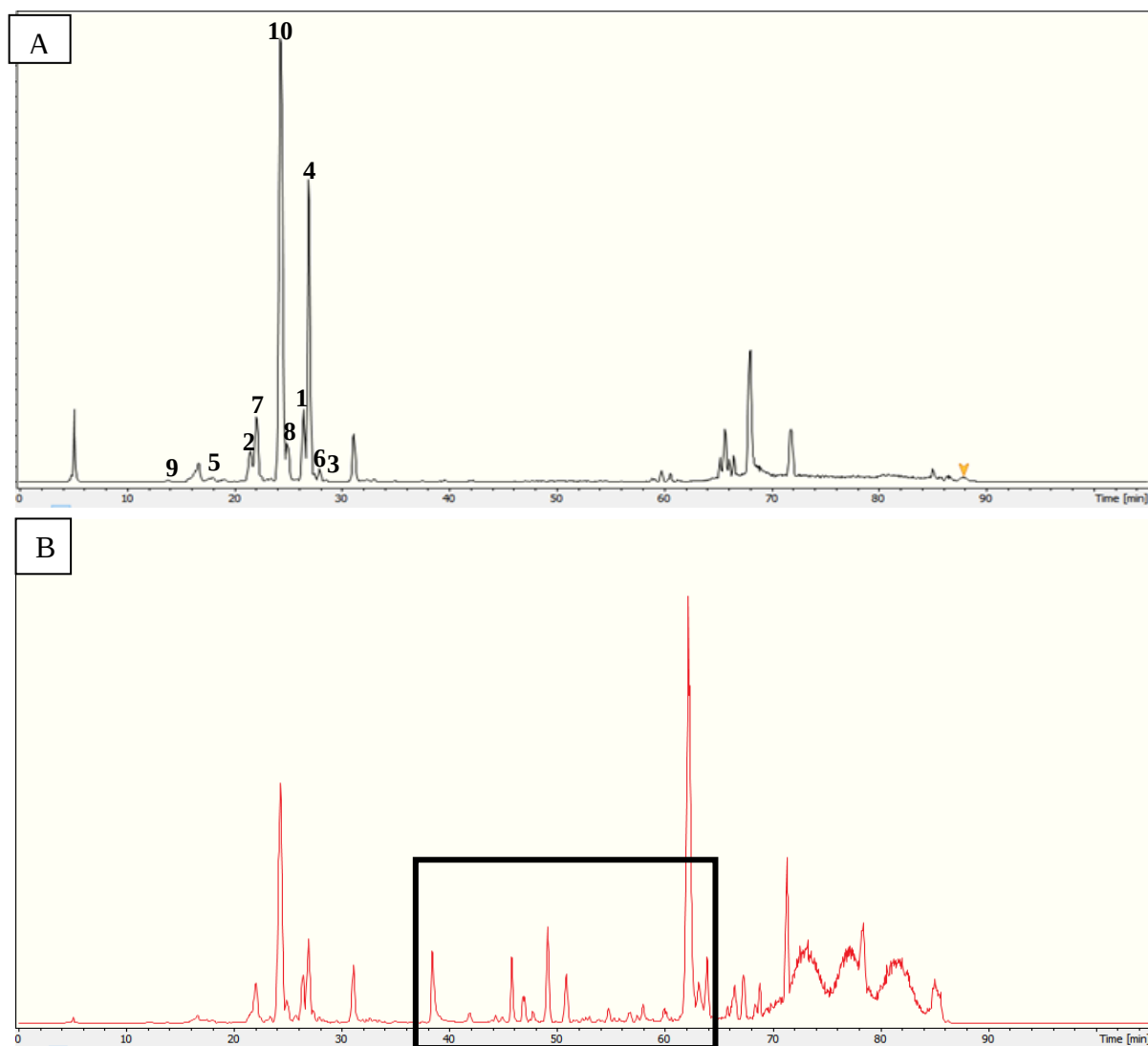
A plataforma GNPS, através da sua biblioteca espectral exibiu 90 anotações de substâncias para a rede molecular. O *cluster A*, apresentou nodos que foram anotados pelo GNPS como flavanóis. O *clusters B* apresentou anotações de flavonóis-3-O-glicosilados, o *cluster C* exibiu a presença de taninos condensados e os nodos que formam o *cluster D* são característicos de alcaloides sesquiterpênicos piridínicos. Ao confirmar a presença deste cluster D foram desenvolvidas metodologias cromatográficas com o objetivo de realizar o isolamento desses compostos. Todas as anotações inferidas na plataforma GNPS, foram conferidas individualmente com os dados espectrais da amostra e a literatura, com o objetivo de constatar a veemência dos dados com a substância proposta (Figura 9)

Figura 8. Rede molecular do extrato etanólico bruto da raiz de *M. distichophylla*. Em azul temos a representação dos nodos ligados entre si por arestas em cinza formando os clusters



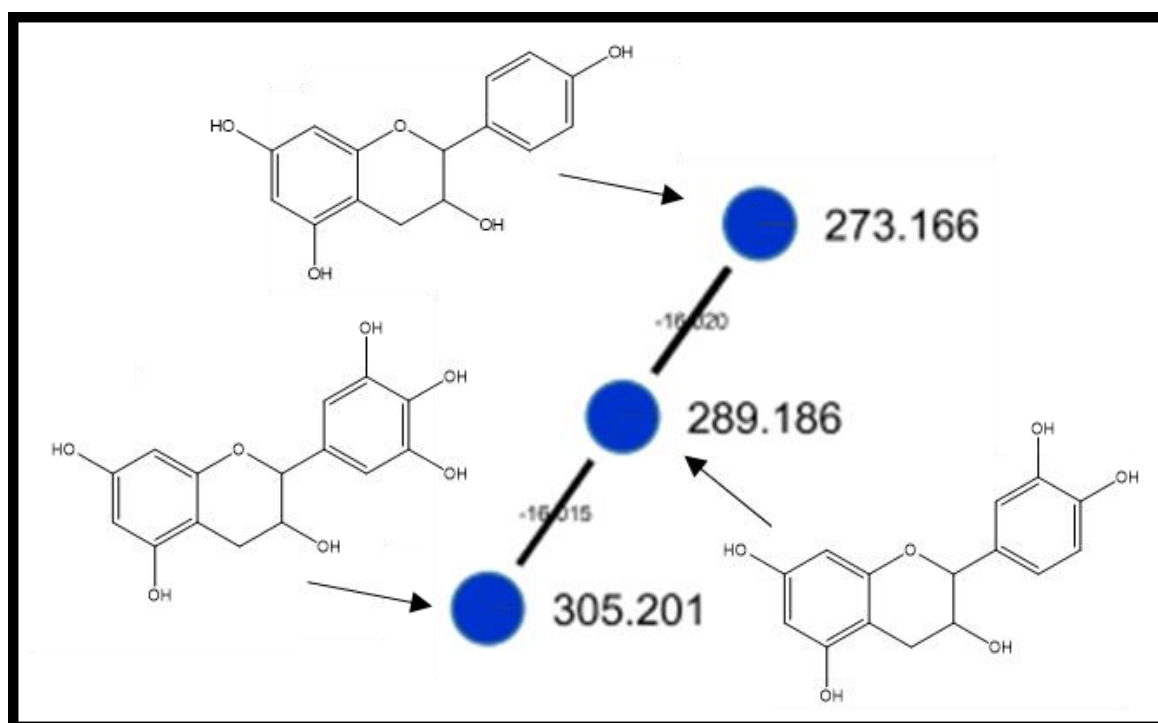
Fonte : autoria própria

Figura 9. Cromatogramas de picos bases obtidos no modo negativo (A) e positivo (B) por CLAE-ESI-EM/EM



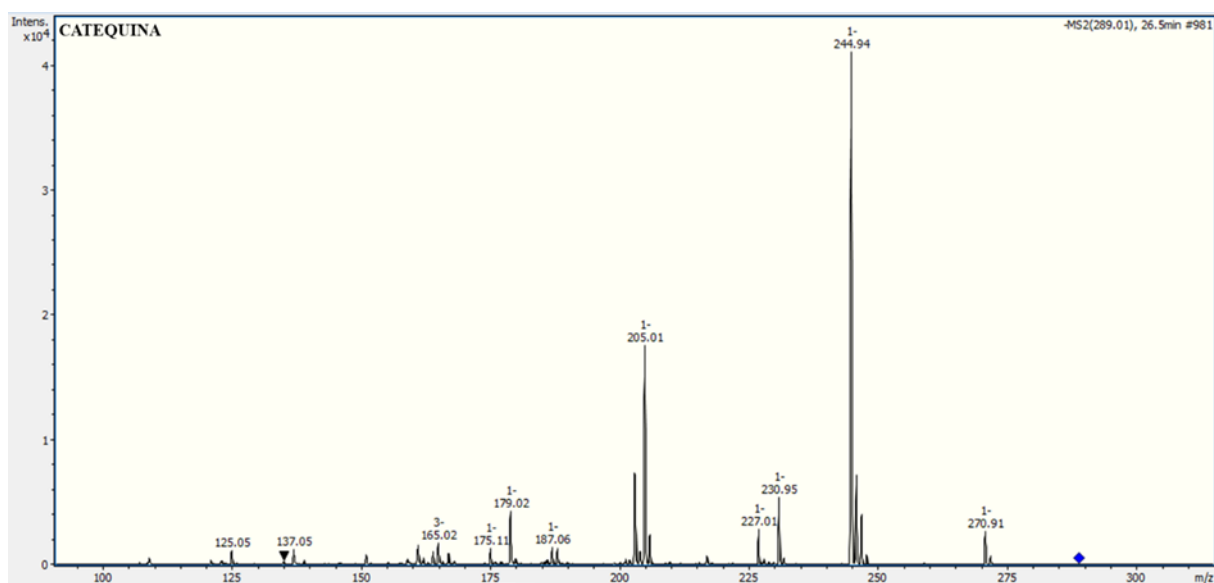
O cluster A (Figura 10), apresentou três nodos com m/z 273, 289 e 305 [M-H], com tempos de retenção em 29,1; 26,5 e 21,5 min correspondente aos picos 3, 1 e 2 do cromatograma. A diferença visualizada em entre os nodos foi de 16 Da, correspondente a unidades de OH. O GNPS mostrou valor de cosseno acima de 0,7 que determina a semelhança espectral entre o espectro do banco de dados do GNPS com o obtido experimentalmente. Estes íons foram anotados pelo GNPS sendo os compostos afzelequina, catequina e galocatequina, respectivamente. Ao analisar a fragmentação desses íons no espectro do extrato da raiz de *M. distichophylla*, a presença dos íons diagnósticos 165, 137, 125 para a catequina e galocatequina, bem como, 229, 189 e 123 para a afzelequina e em comparações com dados da literatura foi possível sugerir putativamente que esses compostos corroboram com as anotações realizadas pelo GNPS (Figura 10) (SOBEH *et al.*, 2018; CALLEMIEN; COLLIN., 2008) (Figura 11)

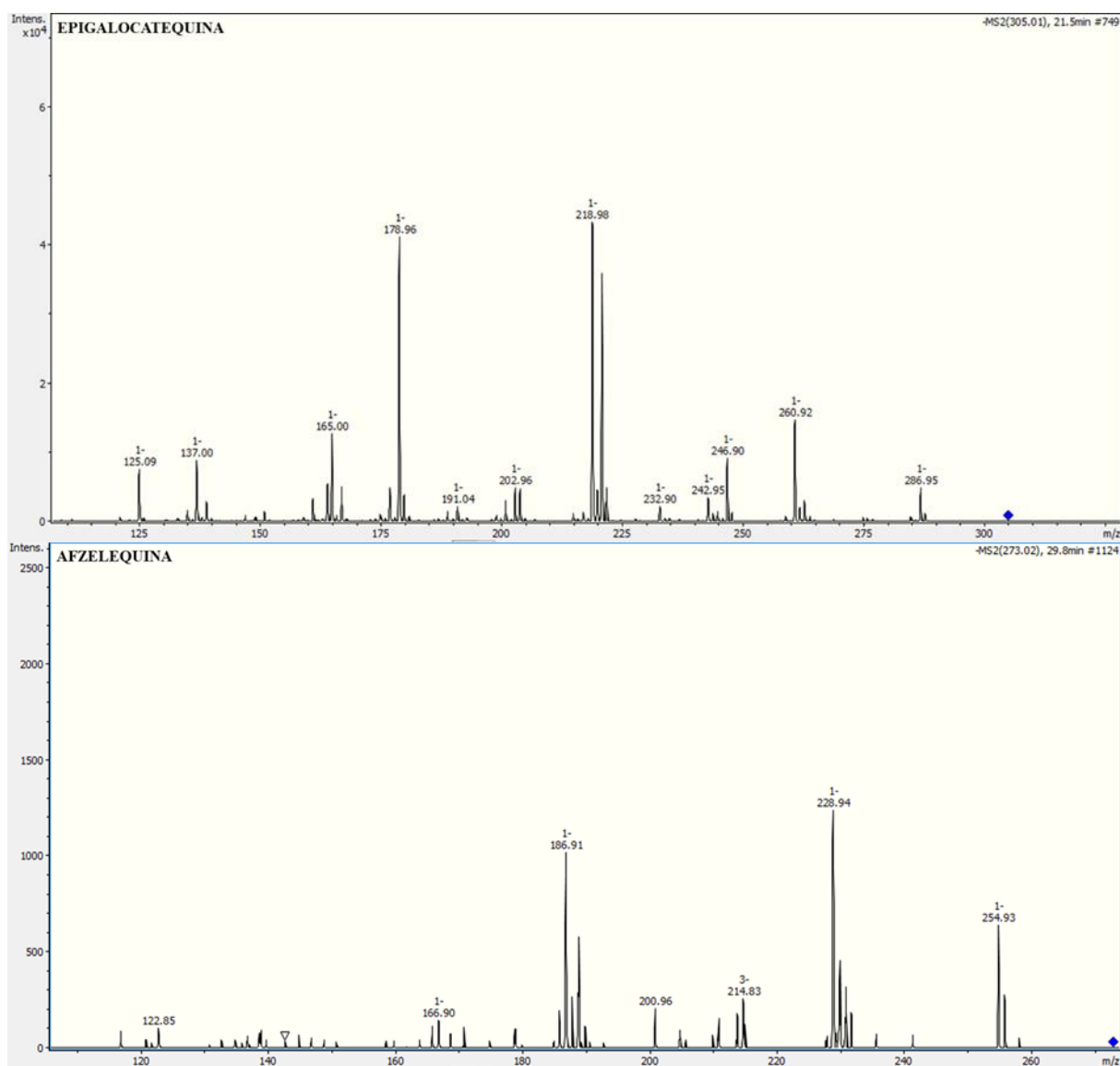
Figura 10. Cluster A com m/z dos flavonóis anotados



Fonte: autoria própria

Figura 11. Espectros de ESI-EM/EM dos compostos encontrados no cluster A





Fonte: autoria própria

O cluster B (Figura 12), apresentou um nodo com m/z 465 anotado pelo GNPS como uma quercetina-3-O-hexosídeo, com tempo de retenção 27,9 min correspondente ao pico 4. A presença do fragmento em m/z 303 no modo positivo, mostra a perda de uma unidade hexosídica e que este fragmento corresponde a quercetina na sua forma de aglicona. Neste mesmo cluster é visualizado um nodo com m/z 481 com uma diferença de 16 Da para o nodo m/z 465 a presença do fragmento m/z 319 com perda de 162 Da de uma unidade hexosídica mostra a presença de mais uma hidroxila no esqueleto da aglicona, mostrando que este fragmento m/z 319 corresponde a miricetina no modo positivo na sua forma de aglicona e foi possível identificar putativamente o pico 5 como sendo a miricetina-3-O-hexosídeo. Também foi visualizado o nodo m/z 495 com tempo de retenção 28,3, anotado como sendo a laritricina 3-O-Hex, a formação do fragmento m/z 333 indica a perda de uma unidade hexosídica sendo este fragmento

corresponde a laricitrina na sua forma de aglicona. Com esses dados e em comparação com a literatura foi possível inferir que este cluster apresenta flavonoides 3-O- glicosilados (Figura 13) (REHMAN *et al.*, 2022; WANG *et al.*, 2021; Fracasetti *et al.*, 2013).

Figura 12. Cluster B com m/z dos flavonoides 3-O-glicosilados

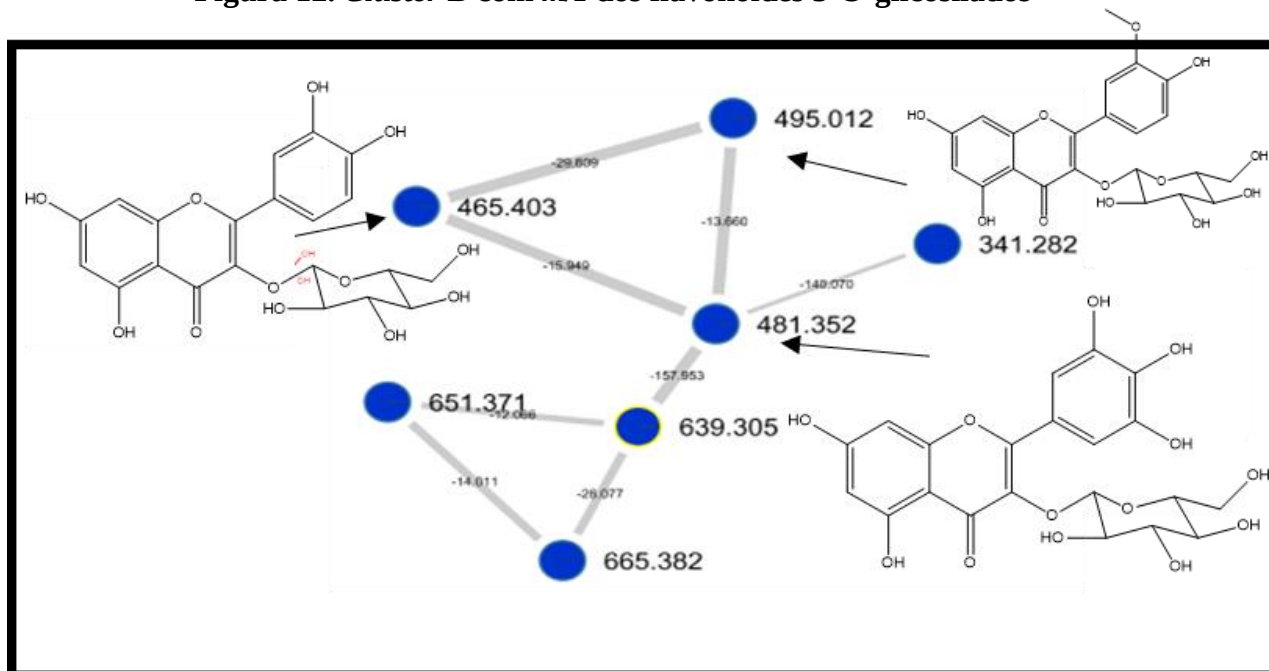
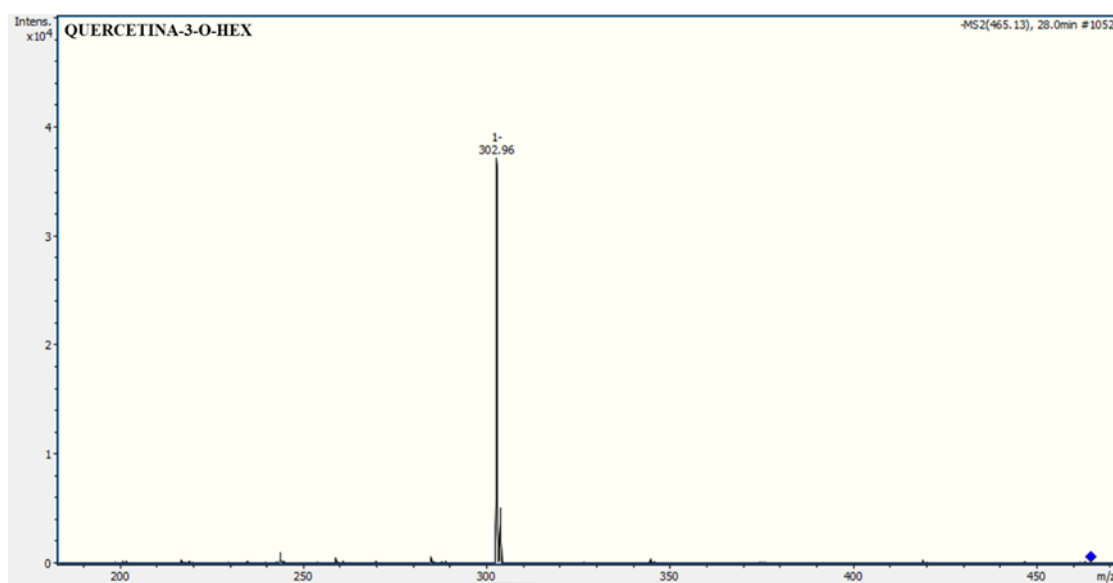
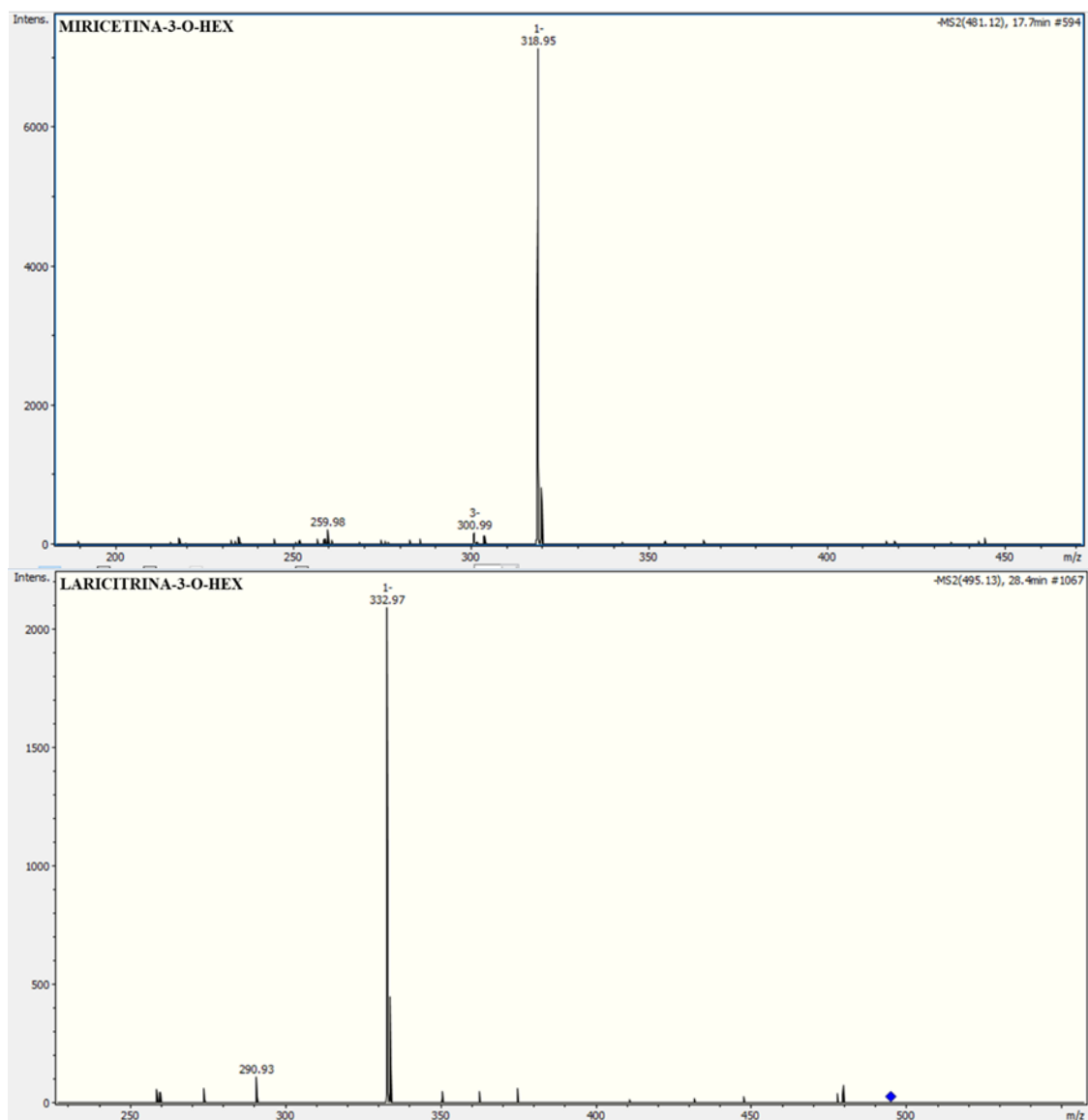


Figura 13. Espectros de ESI-EM/EM dos compostos anotados no *cluster B*

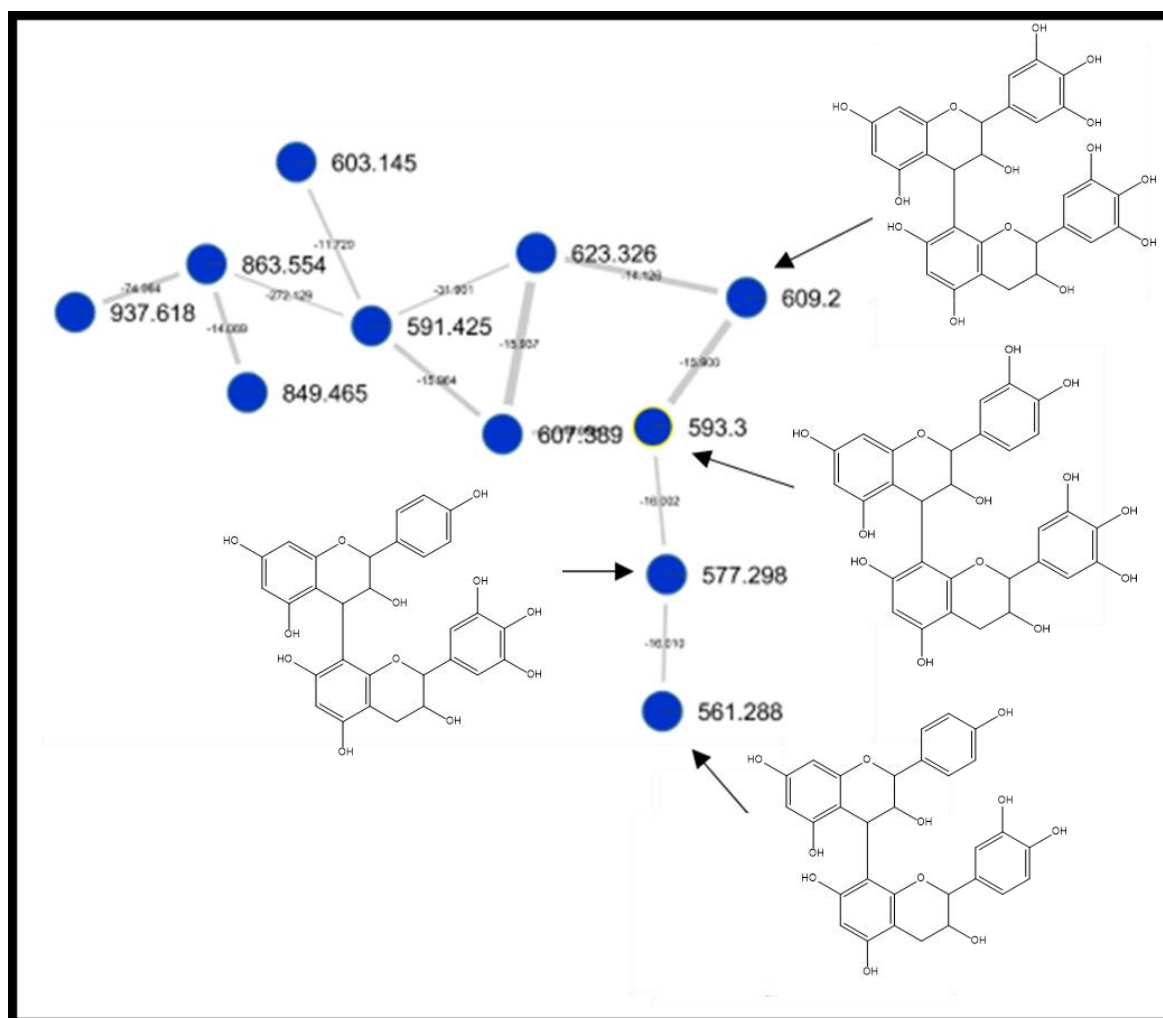




No *cluster C* (Figura 14) foram identificados putativamente, com o auxílio da literatura, 4 nodos dos quais em todos os nodos são observadas perdas de unidades monoméricas de taninos condensados 274, 290 e 306. O nodo m/z 577 com tempo de retenção 22.1 min corresponde ao pico 7, apresentou perdas de 273 Da e 305 Da característicos das catequinas afzelequina e galocatequina, identificando o pico 7 como sendo um dímero formado pela união da afzelequina com a galocatequina. Os nodos vizinhos com m/z 561 e 609 diferenciam-se pela perda e ganho de 16 Da, respectivamente. O nodo com relação m/z 561 com tempo de retenção 25 min correspondente ao pico 8, apresentou perdas de 273 e 290 Da que corrobora com a união da afzelequina e catequina. O nodo com m/z 609 correspondentes ao pico 9 apresenta perdas de unidades de galocatequinas. Este cluster revelou ainda o nodo m/z 593 que mostra fragmentos

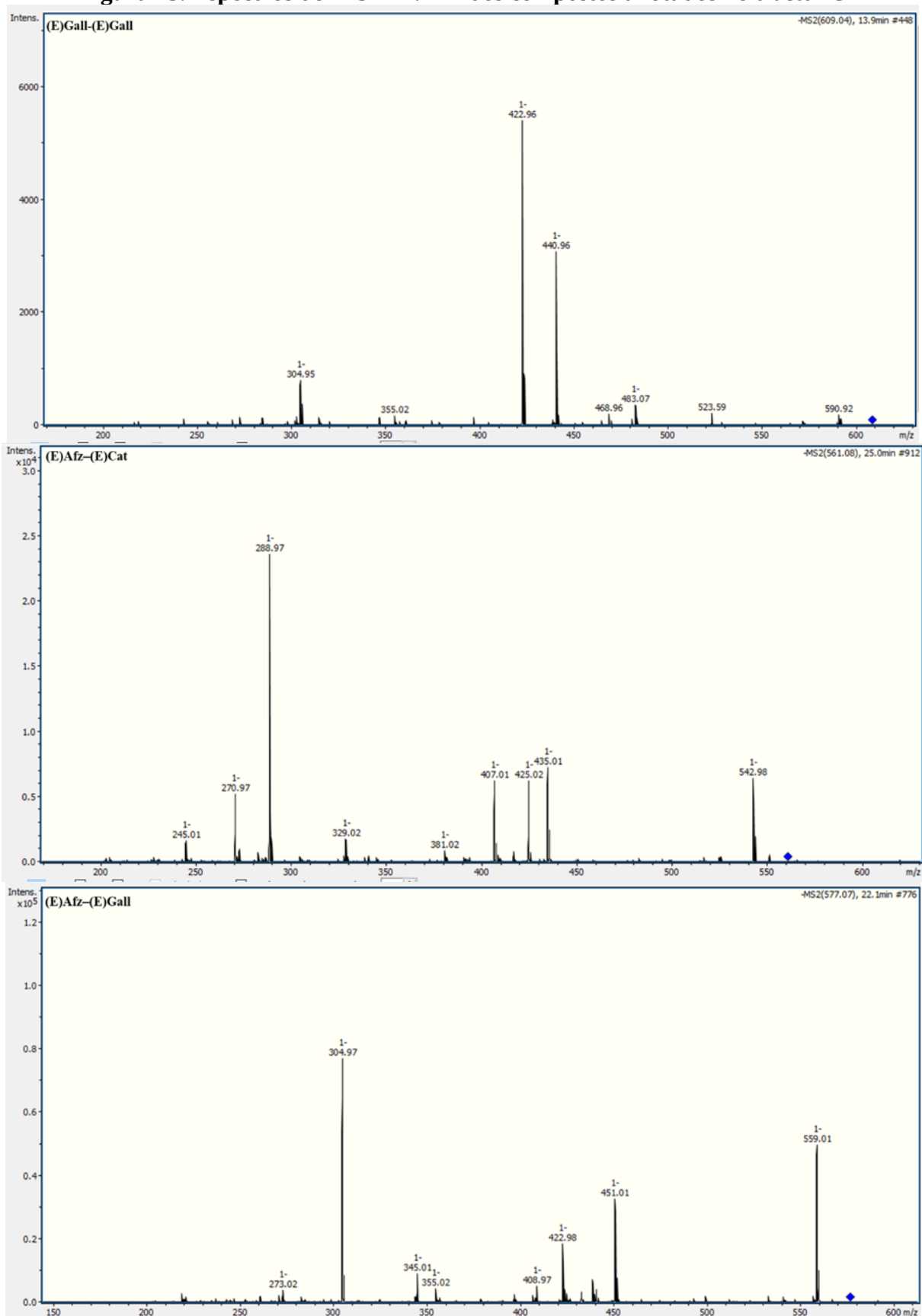
correspondentes ao dímero formado por Catequina-Galocatequina (Figura 15) (SOUZA *et al.*, 2008; SINGH *et al.*, 2018).

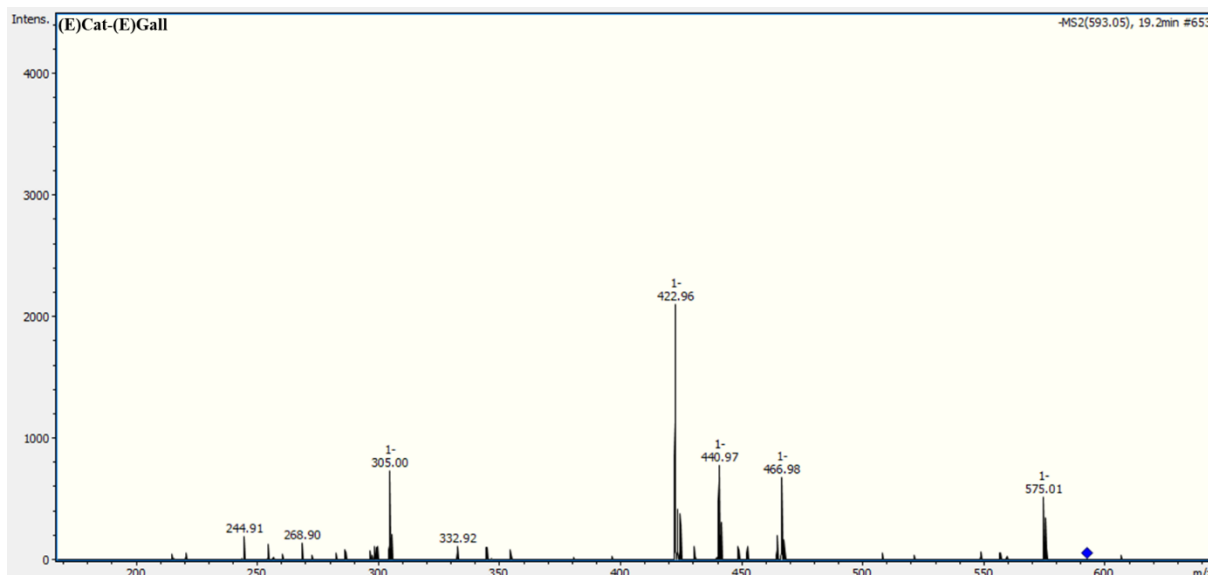
Figura 14. Cluster C com m/z dos taninos condensados anotados



Fonte: autoria própria

Figura 15. Espectros de IES-EM/EM dos compostos anotados no *cluster C*





O *cluster* D (Figura 16) apresentou m/z e fragmentações compatíveis com os alcaloides sesquiterpênicos piridínicos no modo positivo, dessa forma foram realizadas metodologias cromatográficas para o isolamento e purificação desses compostos. Os dados de espectrometria de massas dos compostos anotados com o auxílio da rede molecular podem ser visualizados na tabela 5.

Figura 16. Cluster D com m/z dos alcaloides sesquiterpênicos piridínicos

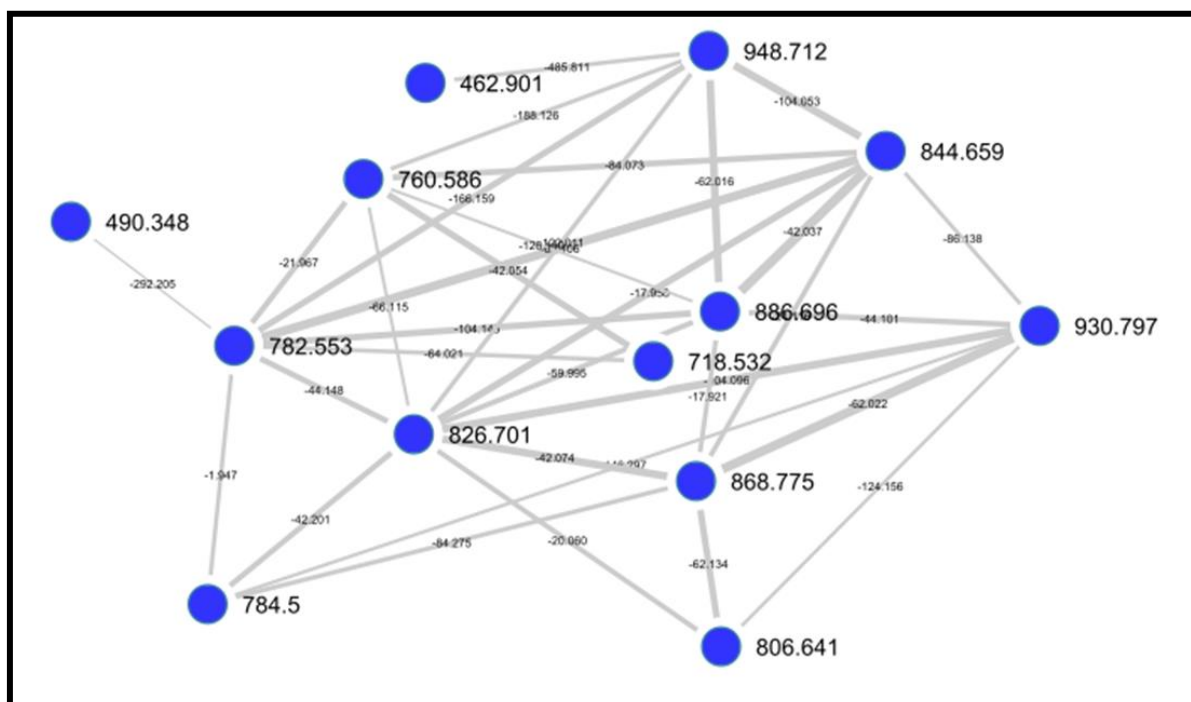


Tabela 5. Compostos anotados com auxílio da rede molecular

Composto	T _R (min)	Massa precursora	Fragmentos (m/z)	Anotação	Referência
1	26.5	289.186 [M – H] [–]	271, 245, 205, 179,165 137,125	Catequina	CALLEMIEN; COLLIN, 2008
2	21.5	305.201 [M – H] [–]	287, 261, 247, 219, 179, 165, 137, 125	Galocatequina	CALLEMIEN; COLLIN, 2008
3	29.7	273.166 [M – H] [–]	255, 229, 189, 123	Afzelequina	SOBEH <i>ET AL.</i> , 2018
4	27.9	465.403 [M – H] ⁺	447, 303, 285, 259, 245, 201	Quercetina-3-O-Hex	REHMAN <i>ET AL.</i> , 2022
5	17.9	481.352 [M – H] ⁺	319, 301, 259	Miricetina-3-O-Hex	FRACASSETI <i>ET AL.</i> , 2013
6	28.3	495.012 [M – H] ⁺	333, 291	Laricitrina-3-O-Hex	WANG <i>ET AL.</i> , 2021
7	22.1	577.298 [M – H] [–]	559,451,423,345 305,273	(E)Afz–(E)Gall	SOUZA <i>ET AL.</i> , 2008
8	24.9	561.288 [M – H] [–]	543, 435,425, 407, 289, 271,245	(E)Afz–(E)Cat	SOUZA <i>ET AL.</i> , 2008
9	14.0	609.04 [M – H] [–]	591, 483,4 41, 423, 305, 273	(E)Gall–(E)Gall	SINGH <i>ET AL.</i> , 2018
10	19,3	593,3 [M – H] [–]	575, 467, 441, 423, 305	(E)Cat–(E)Gall	SINGH <i>ET AL.</i> , 2018

5.2 Identificação dos compostos isolados por RMN

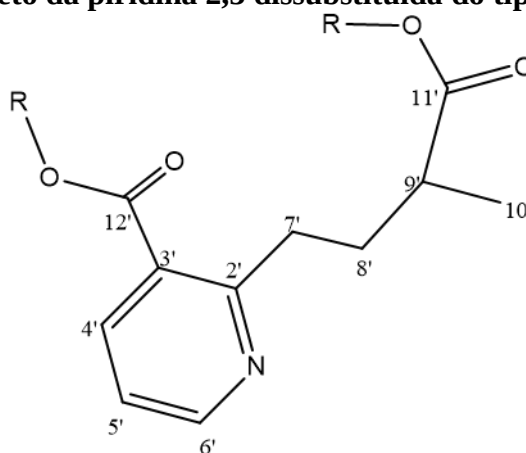
5.2.1 Identificação estrutural de MDR1

A substância codificada como MDR1 foi isolada na forma de um pó amorfo incolor, solúvel em metanol, apresentando uma massa de 1,2 mg representando 0,0013% do EEB.

Ao analisar o espectro de RMN de ¹H de MDR1 foi visualizado a presença de dois singletos δ_H 1,59 (s, 3H) e 1,66 (s, 3H) característicos de hidrogênios metílicos, deslocamentos químicos característicos de hidrogênios oximetínicos δ_H 5,93 (d, *J* = 3,9 Hz; 1H), 5,21 (dd, *J* = 3,9 e 2,6 Hz; 1H), 4,97 (d, *J* = 2,6 Hz; 1H), 6,99 (s; 1H), 5,54 (dd, *J* = 5,8 e 3,9 Hz; 1H) e 5,44 (d, *J* = 2,3 Hz; 1H), os deslocamentos químicos δ_H 5,43 (d, *J* = 13,4 Hz; 1H), 4,68 (d, *J* = 13,4 Hz; 1H), 3,94 (d, *J* = 12; 1H) 5,83 (d, *J* = 12 Hz; 1HB) de hidrogênios oximetilênicos, a presença de cinco singletos com deslocamentos químicos δ_H 1,42; 2,13; 2,15; 2,17 e 2,33 em que cada um apresenta integral para três hidrogênios, sinais estes característicos de hidrogênios de ésteres carbonílicos e ainda a presença dos deslocamentos químicos δ_H 7,47 (dd, *J* = 8,5; 1,6 Hz; 1H), 7,61 (t, *J* = 7,4 Hz, 1H) e 7,86 (dd, *J* = 8,4, 1,3 Hz, 2H) característicos de um grupo benzoato. Este padrão de hidrogenação sugere que em MDR1 apresenta um sesquiterpeno do tipo dihidroagarofurano. A presença dos sinais δ_H 8,47 (dd, *J* = 8 e 2; 1H), 7,45 (dd, *J* = 4,5; 8 Hz,

1H), 8,73 (dd, $J = 5$ e 2 ; 1H), 4,02 (ddd, $J = 13$, 10,3 e 5,7; 1H), 2,88 (dt, $J = 13$ e 5,7; 1H), 1,91 (m; 1HA), 2,28 (m; 1HB), 2,43 (m; 1H), 1,17 (d, $J = 7.1$; 3H) corrobora para a presença de um alcaloide piridínico 2,3 dissustituído, bem como, a presença de uma metila duplete δ_H 1,17 (d, $J = 7.1$; 3H) e de quatro sinais de hidrogênios metilênicos δ_H 4,02 (ddd, $J = 13$, 10,3 e 5,7; 1H), 2,88 (dt, $J = 13$ e 5,7; 1H), 1,91 (m; 1HA), 2,28 (m; 1HB), este conjunto de corroboram para a presença de um alcaloide piridínico 2',3' dissustituído do tipo wilfordato (Figura 17) (CORDELL., 2008).

Figura 17. Esqueleto da piridina 2,3 dissustituída do tipo wilfordato



No espectro de RMN de ^{13}C foram visualizados 30 sinais, dos quais sete são atribuídos a carbonos metílicos (δ_C 17,80; 20,29; 20,81; 21,07; 21,52; 21,63; 23,12), dois sinais são de carbonos oximetilênicos (δ_C 61,41 e 71,90), seis sinais de carbonos oximetínicos (δ_C 70,07; 70,71; 72,88; 74,96; 75,19; 77,16), um sinal de carbono metínico (δ_C 52,02), cinco sinais característicos de carbonos de ésteres carbonílicos (δ_C 170,36; 170,79; 171,35; 171,70; 172,05) e quatro sinais de carbonos não hidrogenados (δ_C 53,79; 71,35; 86,38; 95,01), como também, foi visualizado um conjunto de sinais δ_C 129,74; 130,51; 130,62; 134,80; 166,35 característicos de um grupo benzoato. Com a presença desses sinais é possível confirmar a presença de um sesquiterpeno dihidroagarofurano, possuindo cinco grupos acetatos e um benzoato. Além desses sinais, foram observados os deslocamentos químicos δ_C 18,98, 33,44; 34,55; 39,49; 123,11; 126,19; 140,54; 154,09; 164,92; 168,40; 176,41 que corroboram para a presença de um alcaloide piridínico. Com o conjunto desses sinais é possível inferir que MDR1 trata-se de um alcaloide sesquiterpênico piridínico, considerado um marcador quimiotaxonômico da família Celastraceae

No espectro de bidimensional HMBC, foi possível confirmar esterificação do núcleo dihidroagarofurano com o alcaloide piridínico através das correlações entre os mapas de

contornos de H-15 δ_H 3,94 (d, J = 12 Hz; 1HA) 5,83 (d, J = 12 Hz; 1HB) com C-12' (δ_C 168,40), juntamente com a correlação de H-3 δ_H 4,97 (d, J = 2,6 Hz; 1H) com C-11' (δ_C 176,41) e confirmar que MDR1 trata-se de um alcaloide sesquiterpênico piridínico.

A presença de um grupo acetato protegido em δ_H 1,42 é sugestivo para um possível padrão de substituição na porção do sesquiterpeno, no qual o grupo benzoato encontra-se na posição 1 e que as posições 11 e 8 apresentam grupos acetatos, esta forma de substituição pode ser explicada pelo efeito do cone de proteção do anel aromático do grupo benzoato sobre as metilas dos grupos acetatos. Essa ideia foi confirmada através das correlações de H-1 δ_H 5,93 (d, J = 3,9 Hz; 1H) com C-9 (δ_C 53,79), C-8 (δ_C 72,88), C-11 (δ_C 61,41), 1-OBz (δ_C 166,35), de H-11 δ_H 5,44 (d, J = 13,4; 1HB) 4,68 (d, J = 13,4 Hz; 1HA) com C-9 (δ_C 53,79), C-8 (δ_C 72,88), C-11OAc (δ_C 172,05) e H-8 δ_H 5,44 (d, J = 2,3 Hz; 1H) com C-9 (δ_C 53,79), C-1 (δ_C 74,96), C-11 (δ_C 61,41), C-8OAc (δ_C 170,79). As demais correlações são observadas na tabela 6.

Com base nas informações de 1H , ^{13}C e HMBC descritas acima e em comparação com dados da literatura foi possível identificar MDR1 como sendo a Euojaponina F, substância com relatos de isolamento em *Maytenus ebenifolia*, sendo isolada pela primeira vez em *M. distichophylla* (Figura 18).

Figura 18. Euojaponina F (MDR1) isolado de *Maytenus distichophylla*

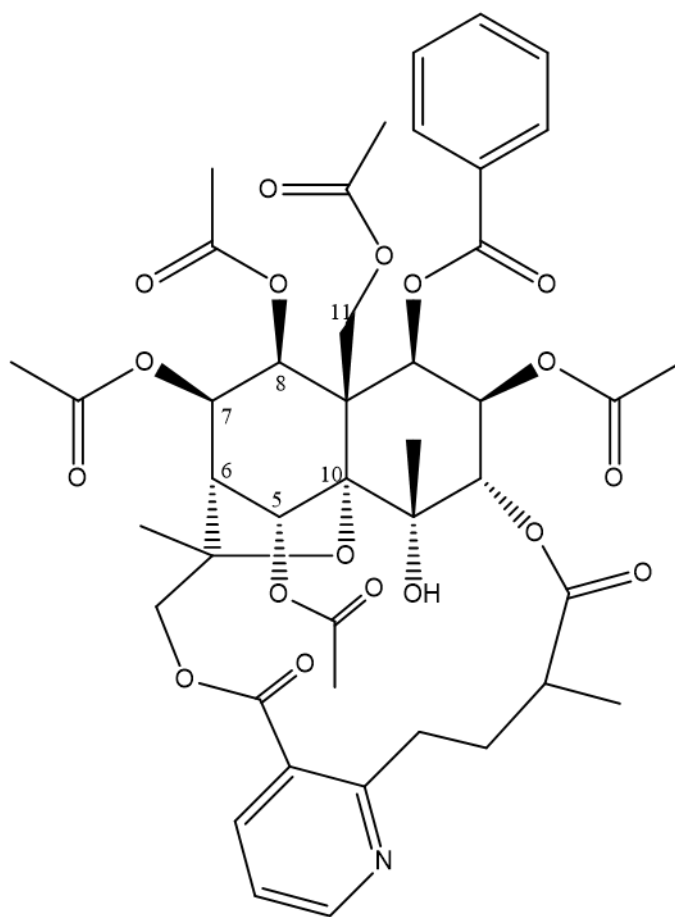


Tabela 6. Comparação dos dados espectrais de RMN ^1H e ^{13}C de MDR1 em MeOD com os valores da literatura

HMQC			HMBC		ITOKAWA, 1993	
C	^1H	^{13}C	2J	3J	^1H	^{13}C
1	5,93 (d, $J = 3,9$ Hz; 1H)	74,96	C-9	1-OBz, C-8, C-11	5.97 (d, $J=3.7$; 1H)	73.61
2	5,21 (dd, $J = 3,9$; 2,6 Hz; 1H)	70,71	C-3	2-OAc, C-4, C-9,	5.25(dd, $J = 2.7$ e 3.7; 1H)	69.94
3	4,97 (d, $J = 2,6$ Hz; 1H)	77,16	C-4, C-11'	C-1, C-10, C-12	5.01 (d, $J = 2.7$; 1H)	75.97
4	-	71,35	-	-	4.95 (d, 1H, 1. ,4-OH)	69.98
5	6,99 (s; 1H)	75,19	C-6, C-10	5-OAc, C-7, C-9, C-13	6.96 (s, 1H)	73.92
6	2,56 (d, $J = 4.0$ Hz; 1H)	52,02	C-5, C-7	C-8, C-10	2.37 (d, $J = 3.9$; 1H)	51.17
7	5,54 (dd, $J = 5,8$; 3,9 Hz; 1H)	70,07	C-6, C-8	C-7OAc, C-5, C-9	5.54 (dd, $J=3.9$ e 5.7; 1H)	69.08
8	5,43 (d, $J = 5,9$ Hz; 1H)	72,88	C-9	C-8OAc, C-1, C-11,	5.43 (d, $J=5.7$; 1H)	71.72
9	-	53,79	-	-	-	52.62
10	-	95,01	-	-	-	93.91
11	4,68(d, $J = 13,4$ Hz; 1HA) 5,45(d, $J = 13,4$ Hz; 1HB)	61,41	C-9	C-11OAc, C-8	4.66 (d, $J = 13.4$, 1HÁ) 5.41 (d, $J = 13.4$, 1HB)	60.36
12	1,59 (s, 3H)	23,12	C-3	C-4, C-10	1,59 (s, 3H)	22.77
13	-	86,38	-	-	-	84.69
14	1,66 (s, 3H)	17,80	C-13, C-15	C-6	1.70 (s, 3H)	17.94
15	3,94 (d, $J = 12$ Hz; 1HA) 5,83 (d, $J = 12$ Hz; 1HB)	71,90	C-13	C-15, C-12'	3.80 (d, $J=11.9$; 1H, HÁ) 5.75 (d, $J=11.9$; 1H, HB)	70.42
2'	-	164,92	-	-	-	164.12
3'	-	126,19	-	-	-	124.49
4'	8,47 (dd, $J = 8$; 2 Hz; 1H)	140,54		C-2', C-6', C-12'	8.33 (dd, $J = 1.8$ e 8.0; 1 H)	138.78
5'	7,45 (dd, $J = 4,5$; 8 Hz, 1H)	123,11	C-6'	C-3'	7.28 (dd, $J=4.7$ e 8.0; 1 H)	121.21
6'	8,73 (dd, $J = 5$; 2 Hz; 1H)	154,09	C-4', C-5',	C-2'	8.76 (dd, $J = 1.8$ e 4.7; 1H)	153.25
7'	2,88 (dt, $J = 13$; 5,7 Hz; 1HA) 4,02 (ddd, $J = 13$; 10,3; 5,7 Hz; 1HB)	33,44	C-2', C-8'	C-3', C-9'	2.97 (1 H, m, HÁ) 3.94 (ddd, $J=6.3$, 9.7, 13.51, HB)	33.52
8'	1,91 (m; 1HA) 2,28 (m; 1HB)	34,55	-	-	2.0 (1 H, m, HA) 2.32 (1 H, m, HB)	33.36
9'	2,43 (m; 1H)	39,49	C-8', C-11', C-10'	-	2.41 (m; 1H)	38.54
10'	1,17 (d, $J = 7,1$; 3H)	18,98	C-9'	C-8', C-11'	1.21 (d, $J = 7.0$; 3H)	18.83
11'	-	176,41	-	-	-	175.20
12'	-	168,40	-	-	-	166.95
2-OAc	2,15 (s; 3H)	170,36/20,81	-	-	2.15 (s, 3H)	168.46/ 20.94
5-OAc	2,17 (s; 3H)	171,35/21,63	-	-	2.19 (s, 3H)	169.93 /21.64
7-OAc	2,13 (s; 3H)	171,70/21,07	-	-	2.14 (s, 3H)	170.05 /21.01
8-OAc	1,42 (s; 3H)	170,79/20,29	-	-	1.42 (s, 3H)	168.99 /19.88
11-OAc	2,33 (s; 3H)	172,05/21,52	-	-	2.32 (s, 3H)	170.41 /21.44
1-OBz <i>ipso</i>	-	166,35	-	-	-	164.89
	-	130,51	-	-	-	129.37
<i>orto</i>	7,86 (dd, $J = 8,4$, 1.3 Hz, 2H)	130,62	-	-	7.84 (dd, $J = 1.3$ e 8.4 ; 2H)	129.58
<i>meta</i>	7,47 (dd, $J = 8,5$; 1,6 Hz; 2H)	129,74	-	-	7.40 (dt-like, $J = 1.5$ e 7.8; 2H)	128.55
<i>para</i>	7,61 (t; $J = 7,5$ Hz 1H)	134,80	-	-	7.54 (dt-like, $J = 1.3$ e 7.4; 1H,)	133.50

Figura 19. Espectro de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) de ^1H de MDR1 (MeOD, 500 MHz)

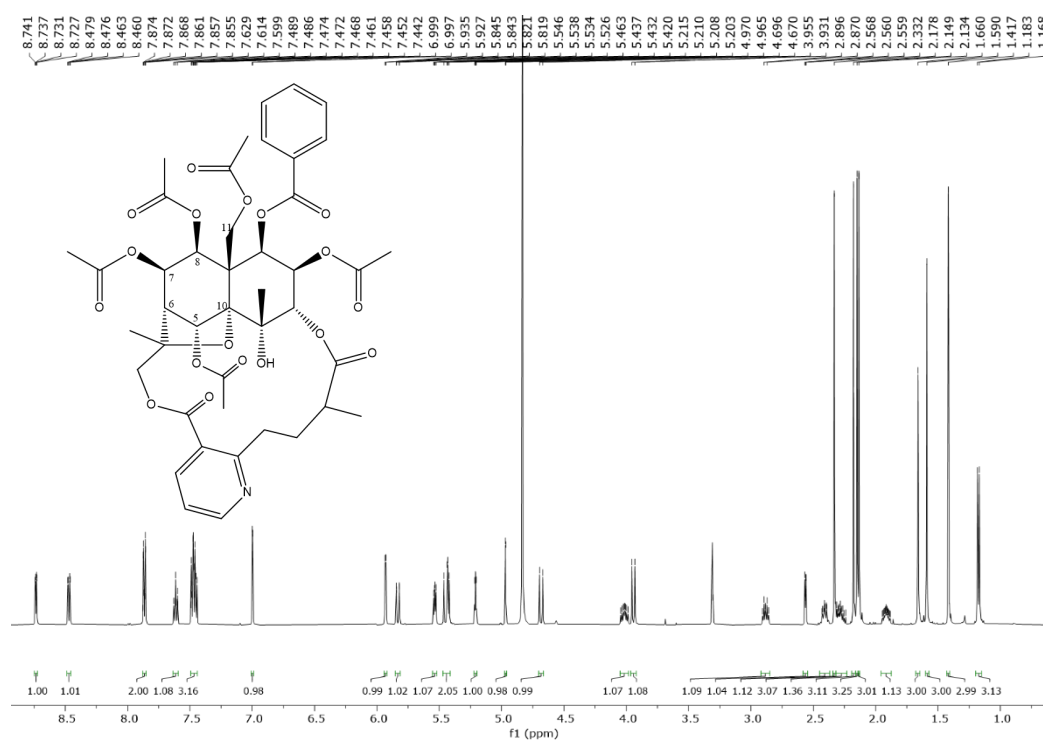


Figura 20. Expansão do espectro de RMN de ^1H de MDR1 na região de 1,0-3,3 ppm (MeOD, 500 MHz)

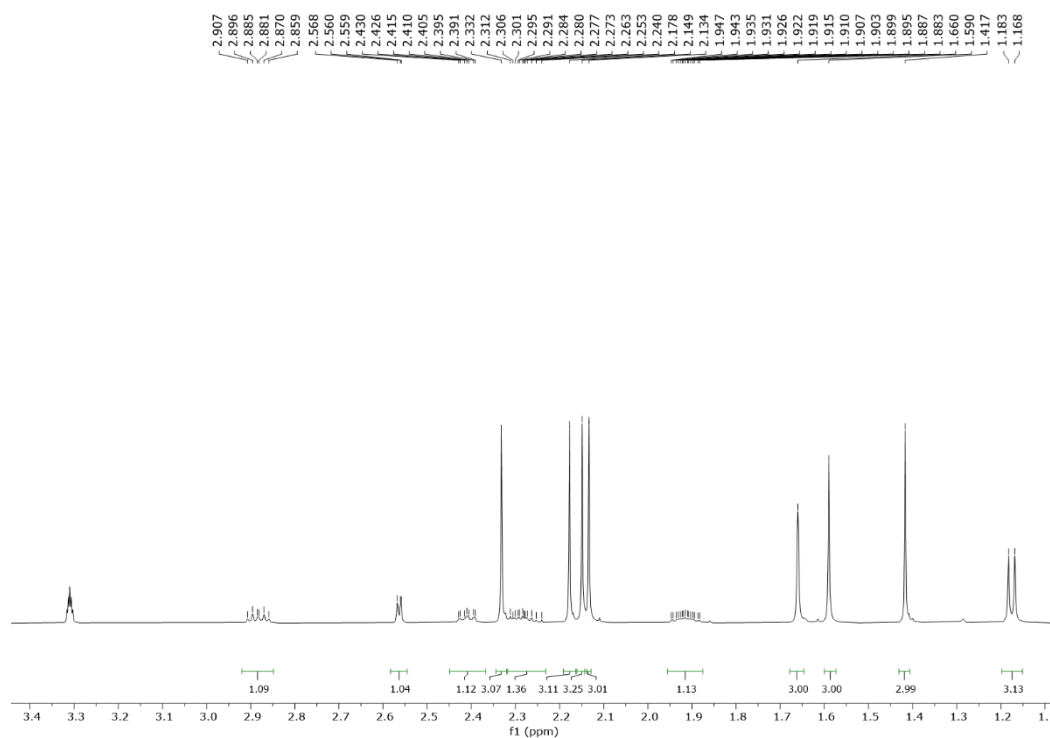


Figura 21. Expansão do espectro de RMN de ^1H de MDR1 na região de 3,9-5,9 ppm (MeOD, 500 MHz)

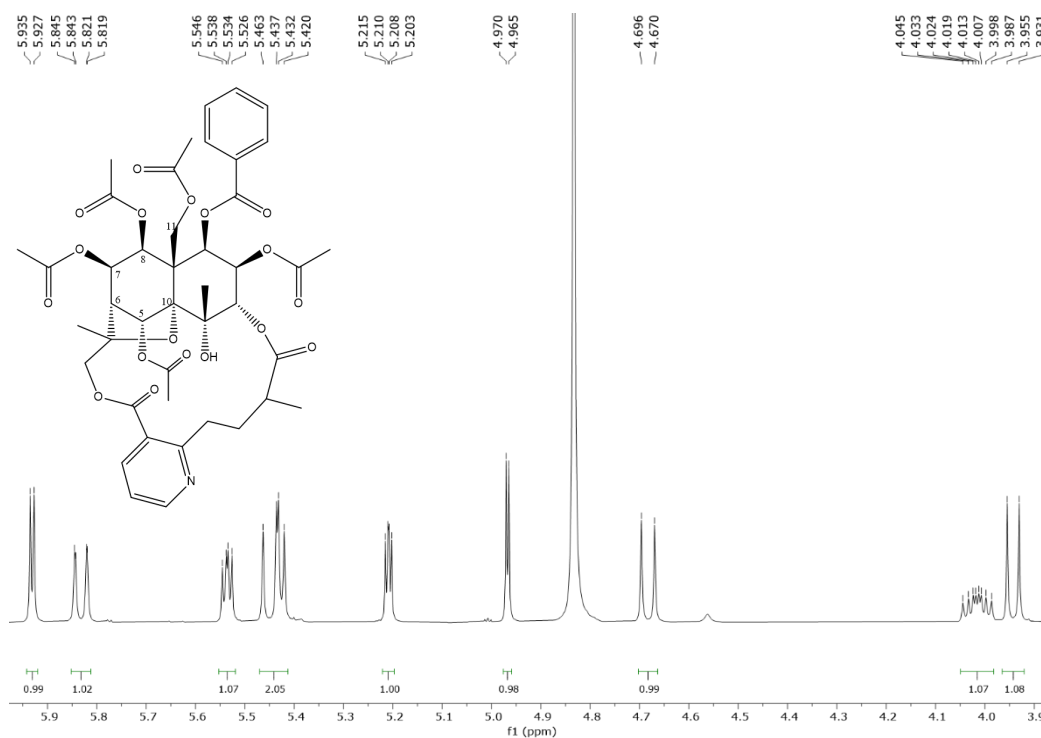


Figura 22. Expansão do espectro de RMN de ^1H de MDR1 na região de 6,8-8,8 ppm (MeOD, 500 MHz).

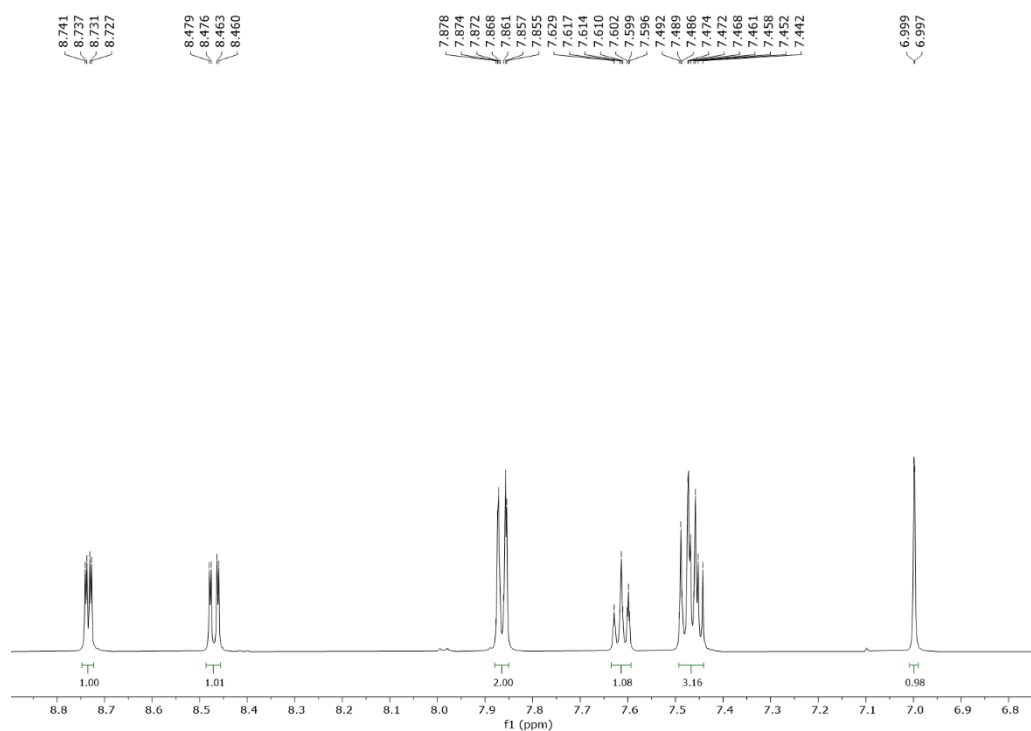


Figura 23. Espectro de Ressonância Magnética Nuclear de ^{13}C BB de MDR1 (MeOD, 125 Mhz)

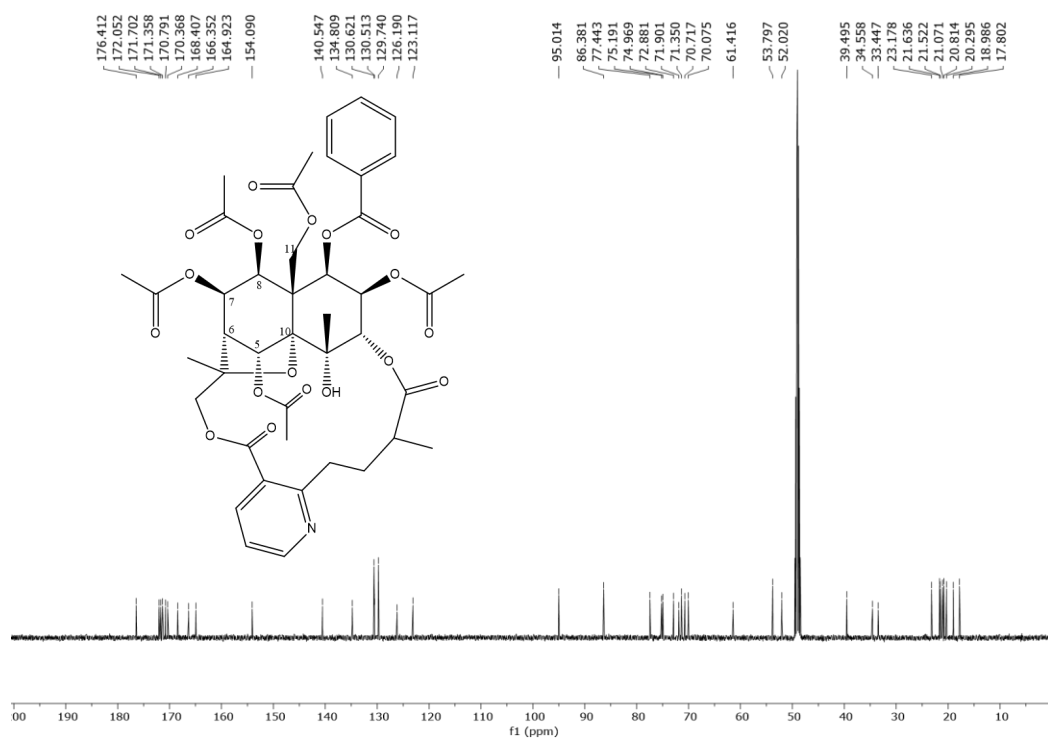


Figura 24. Expansão do espectro de RMN de ^{13}C de MDR1 na região de 16-40 ppm (MeOD, 125 Mhz)

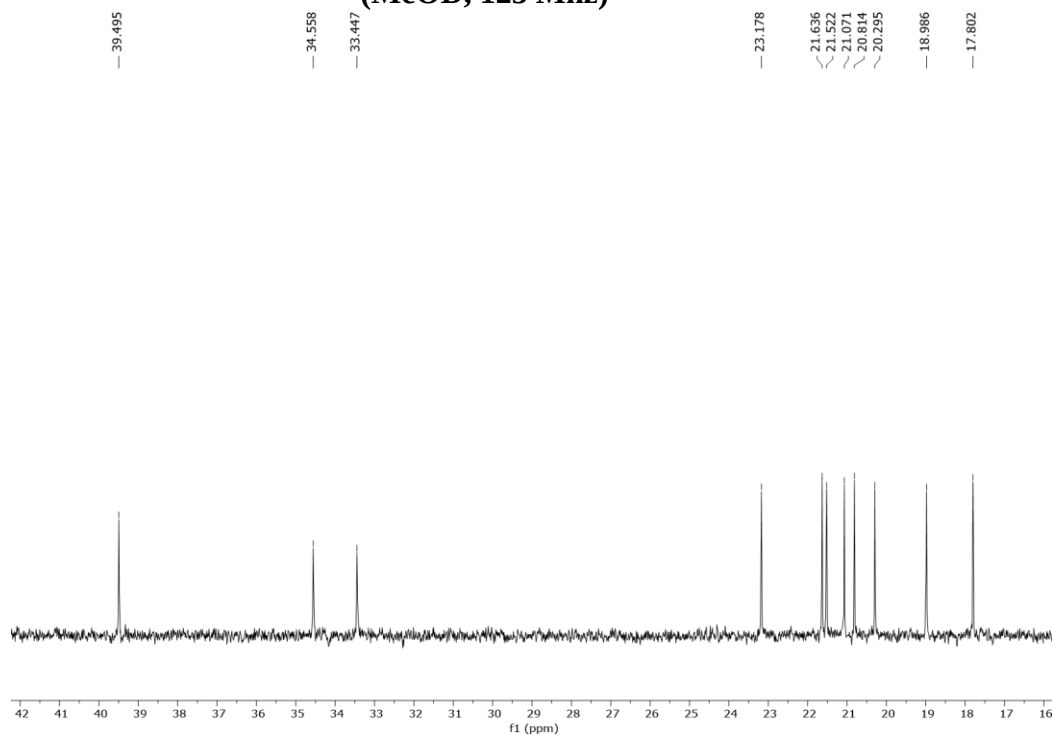


Figura 25. Expansão do espectro de RMN de ^{13}C de MDR1 na região de 52-95 ppm (MeOD, 125 Mhz)

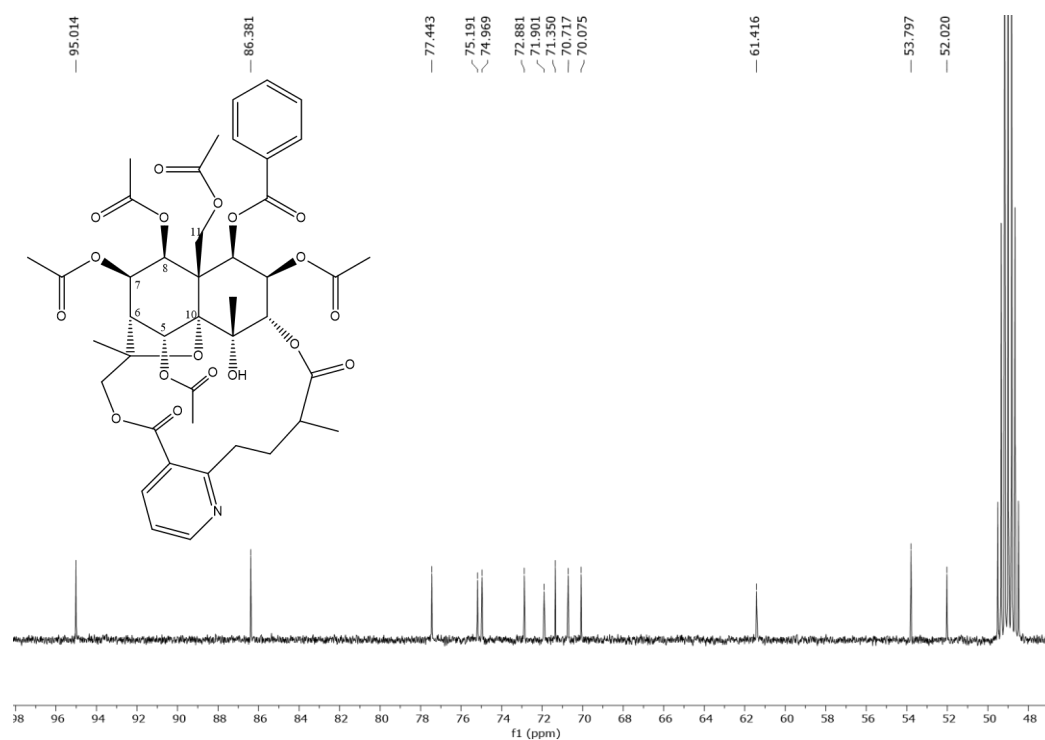


Figura 26. Expansão do espectro de RMN de ^{13}C de MDR1 na região de 123-180 ppm (MeOD, 125 Mhz)

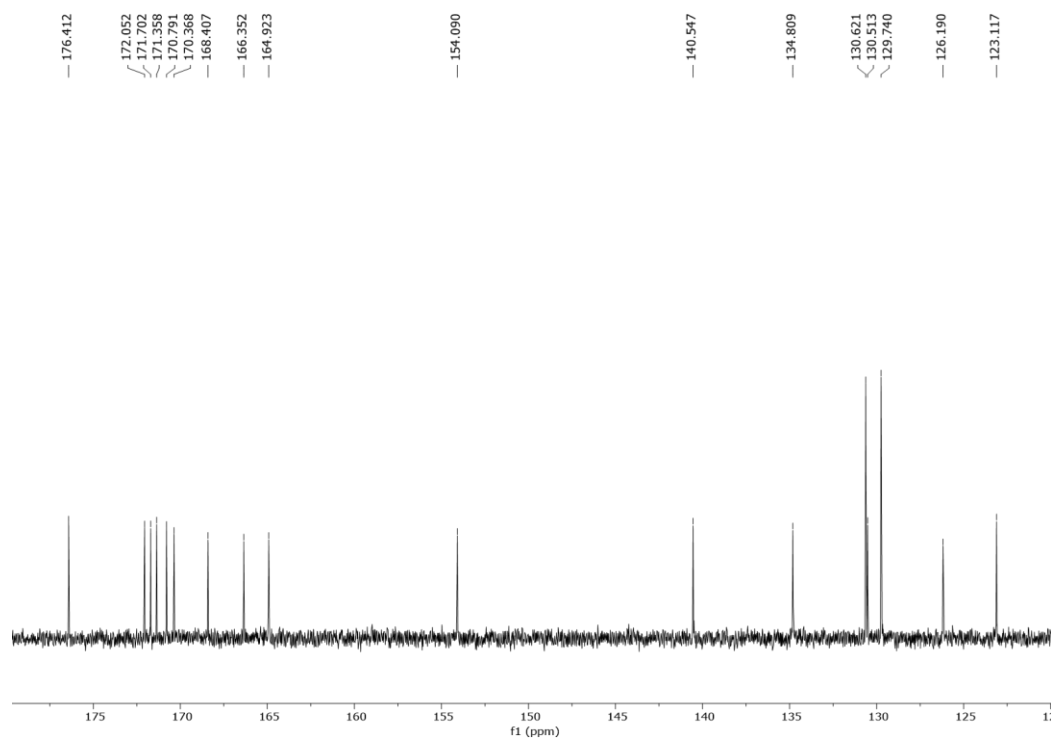


Figura 27. Espectro das correlações entre sinais de ^1H x ^{13}C - J_{CH} -HMQC de MDR1

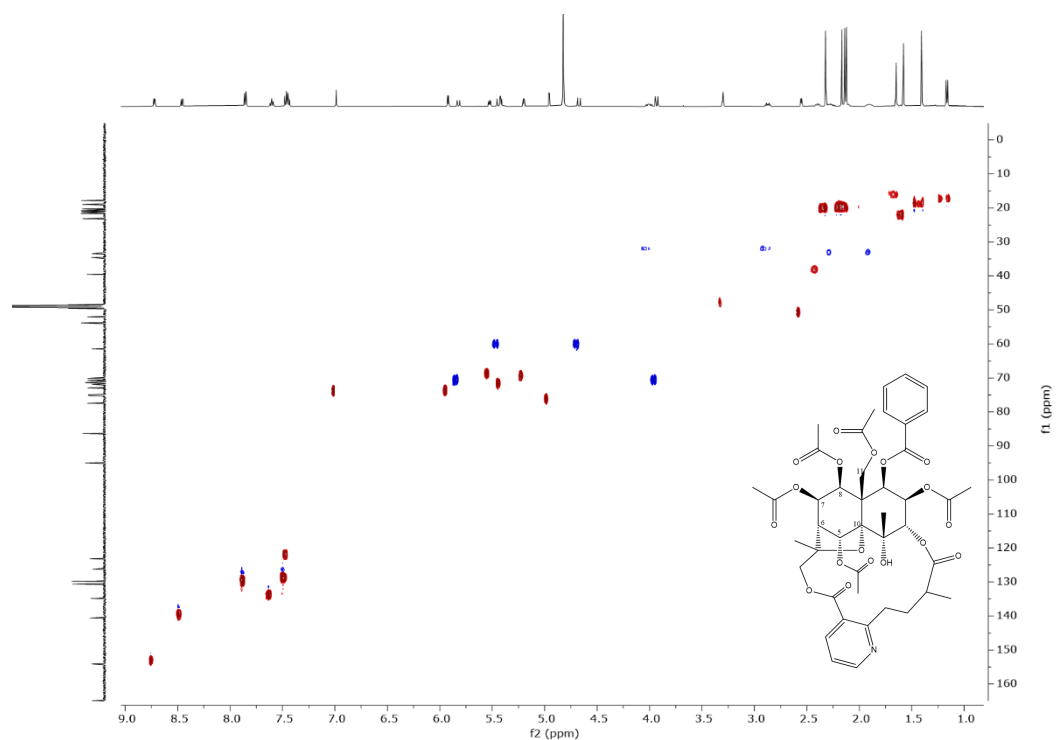


Figura 28. Espectro das correlações entre sinais de ^1H x ^{13}C - J_{CH} -HMBC de MDR1

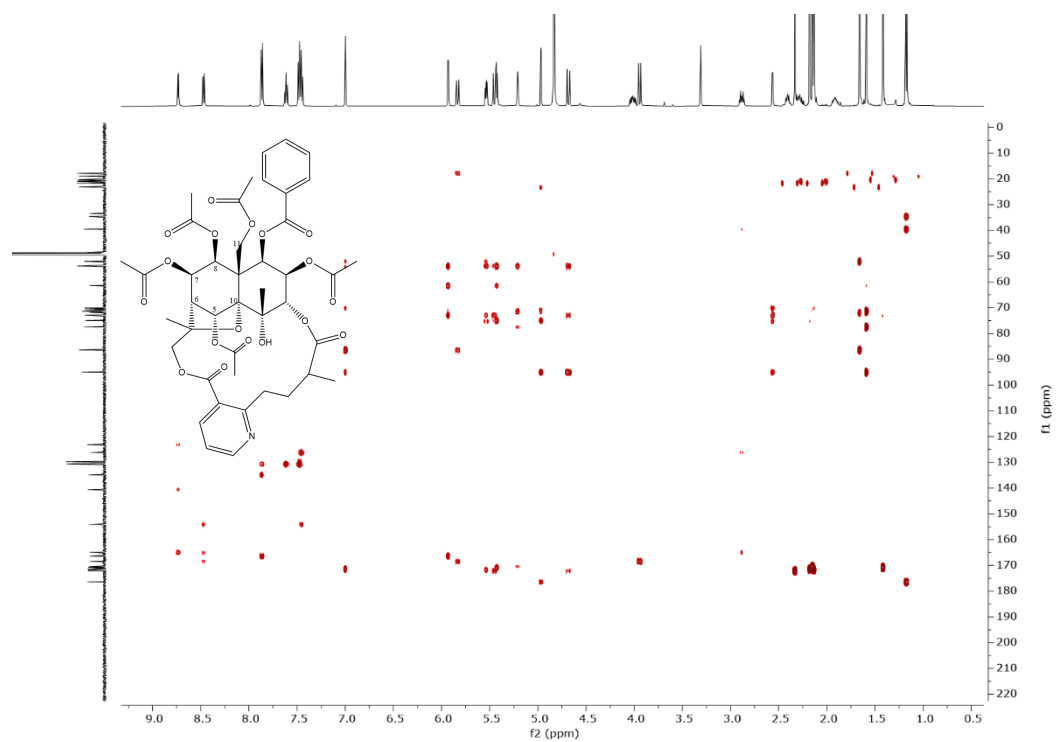


Figura 29. Expansão espectro das correlações entre sinais de ^1H x ^{13}C - J_{CH} -HMBC de MDR1 registrados em MeOD (500 MHz).

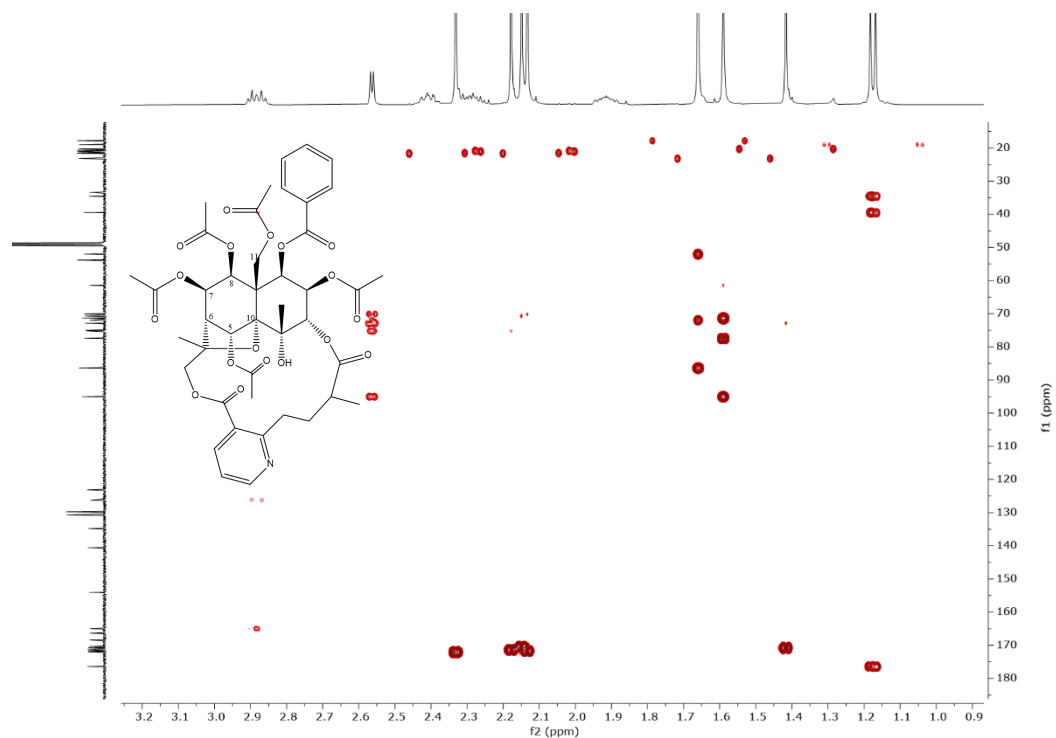


Figura 30. Expansão espectro das correlações entre sinais de ^1H x ^{13}C - J_{CH} -HMBC de MDR1 registrados em MeOD (500 MHz).

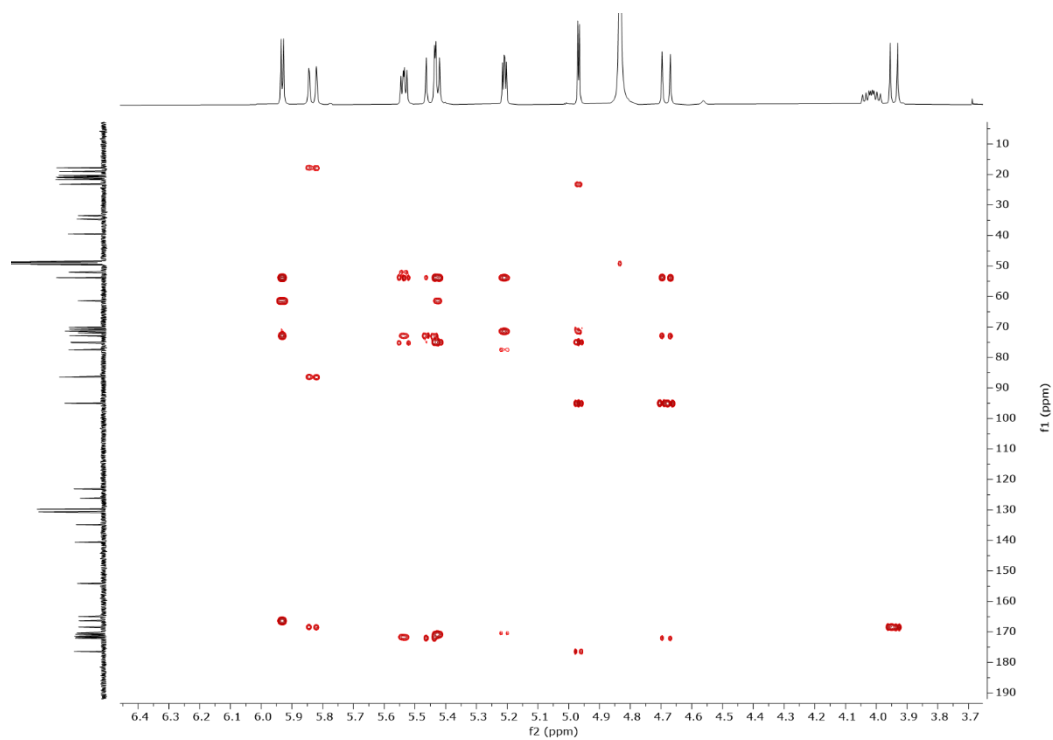
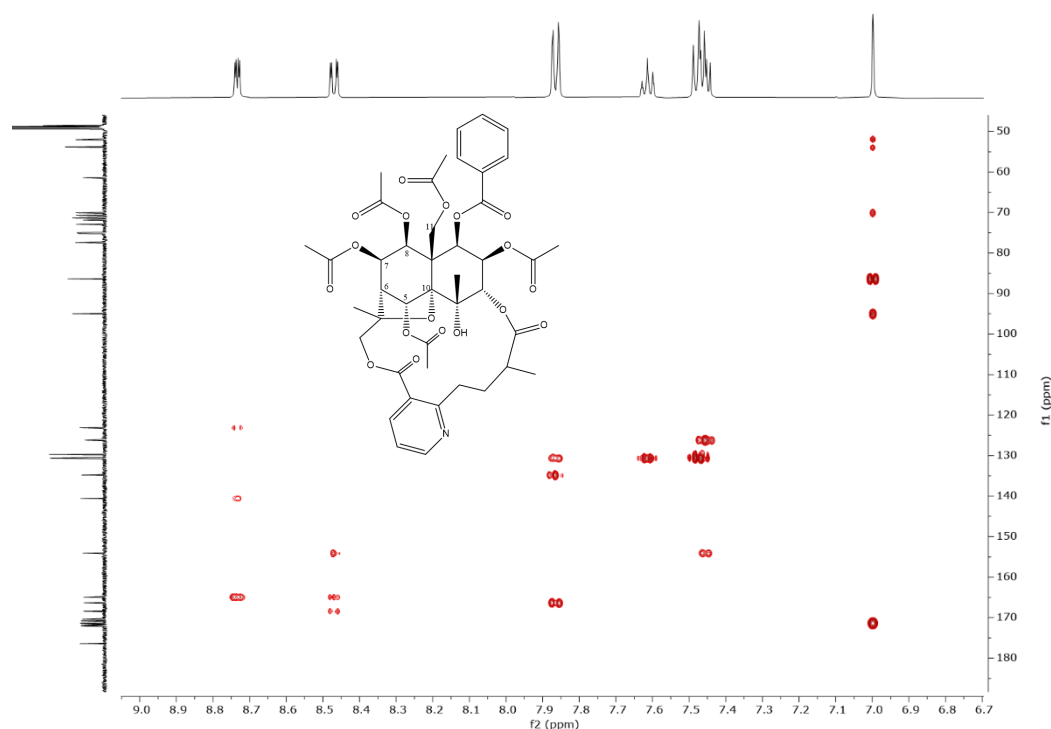


Figura 31. Expansão espectro das correlações entre sinais de ^1H x ^{13}C -JCH-HMBC de MDR1 registrados em MeOD (500 MHz).



5.2.2 Identificação estrutural de MDR2

A substância codificada como MDR2 foi isolada na forma de um pó amorfo incolor, solúvel em clorofórmio, apresentando uma massa de 1,2 mg representando 0,00019% do EEB.

MDR2 apresentou sinais no espectro de RMN ^1H e ^{13}C semelhantes a MDR1. Ao analisar o espectro de RMN de ^1H de MDR2 foi visualizado a presença de dois singletos δ_{H} 1,61 (s, 3H) e 1,67 (s, 3H) característicos de hidrogênios metílicos, os deslocamentos químicos δ_{H} 4,02 (dd, $J = 3,7; 2,4$ Hz, 1H), 5,07 (d, $J = 2,7$ Hz; 1H), 5,84 (d, $J = 3,6$ Hz; 1H), 6,94 (s, 1H), 5,52 (dd, $J = 5,8; 4,2$ Hz, 1H) e 5,40 (d, $J = 5,8$ Hz, 1H) característicos de hidrogênios oximetínicos, também foram observados os deslocamentos químicos δ_{H} 5,51 (d, $J = 13,5$ Hz, 1H), 4,77 (d, $J = 13,5$ Hz, 1H) e 5,70 (d, $J = 11,9$ Hz, 1H) 3,79 (d, $J = 11,8$ Hz, 1H) de hidrogênios oximetilênicos, a presença de quatro singletos com deslocamentos químicos δ_{H} 1,40; 2,11; 2,16; 2,29 cada um com integral para três hidrogênios, mostrando a presença de hidrogênios metílicos de ésteres carbonílicos e ainda a presença dos deslocamentos químicos δ_{H} 7,41 (t, $J = 7,7$ Hz, 2H), 7,55 (t, $J = 7,4$ Hz, 1H) e 7,95 (dd, $J = 8,3; 1,7$ Hz, 2H) característicos de um grupo benzoato. Com esse conjunto de deslocamentos químicos, assim como MDR1, MDR2 revelou a presença de um sesquiterpeno dihidroagarofurano. Neste espectro também

foram observados sinais característicos de um núcleo piridínico com a presença dos deslocamentos δ_H 8,29 (dd, $J = 7.9, 1.8$ Hz; 1H), 7,25 (dd, $J = 7.9, 4.7$ Hz; 1H), 8,73 (dd, $J = 4.7, 1.8$ Hz; 1H), o conjunto de deslocamento químico 3,88 (ddd, $J = 10, 6.5, 4.5$), 2,96 (dt, $J = 13.1, 6.1$; 1H), 1,98 (m), 2,21 (m), 2,36 (m), 1,15 (d, $J = 7.0$) revela que este núcleo piridínico é derivado do ácido wilfórdico (CORDELL, 2008; HAN *et al*, 1990). Dessa forma, pode-se sugerir que MDR2 é um alcaloide sesquiterpênico piridínico.

Inicialmente, ao analisar o espectro de RMN de ^{13}C foram visualizados 28 sinais dos quais seis são carbono metílicos (δ_C 17,91; 20,00; 20,96; 21,48; 21,59; 22,74), dois carbonos oximetilênicos (δ_C 60,58; 70,34), seis carbonos oximetínicos (δ_C 68,97; 70,88; 71,91; 73,93; 75,43; 77,92), um carbono metínico (δ_C 50,99), quatro ésteres carbonílicos (δ_C 169,10; 169,91; 170,08; 170,18) e quatro carbonos não hidrogenados (δ_C 52,76; 69,81; 84,32; 94,14), bem como a presença de um conjunto de sinais característicos de um grupo benzoato (δ_C 128,57; 129,23; 129,67; 133,65 e 164,99). Também foram observados os sinais δ_C 18,63; 33,25; 33,45; 38,57; 121,12; 124,60; 138,73; 153,03; 163,76; 166,89 e 175,69 os quais são característicos de um alcaloide piridínico. Com essas informações de 1H e ^{13}C é possível inferir que MDR2 apresenta um núcleo de um sesquiterpeno dihidroagarofurano com quatro grupos acetatos, um benzoato e um núcleo piridínico 2', 3' dissustituído do tipo wilfordato.

No espectro de bidimensional HMBC, foi possível confirmar esterificação do núcleo dihidroagarofurano com o alcaloide piridínico através das correlações de H-15 δ_H 5,70 (d, $J = 11,9$ Hz, 1H) 3,79 (d, $J = 11,8$ Hz, 1H) com C-12' (δ_C 166,89), juntamente com a correlação de H-3 δ_H 5,07 (d, $J = 2,7$ Hz; 1H) com C-11' (δ_C 175,69) e confirmar que MDR2 trata-se de um alcaloide sesquiterpênico piridínico. Diferentemente de MDR1, temos a ausência de um hidrogênio metílico de um éster carbonílico e juntamente com a presença do sinal δ_H 4,02 (dd, $J = 3,7, 2,4$ Hz, 1H) pode-se inferir que existe uma hidroxila a mais em MDR2, na posição C2.

Assim como em MDR1, é observado o mesmo padrão de substituição nas posições 1, 11 e 8, o qual foram confirmadas através das correlações de H-1 δ_H 5,84 (d, $J = 3.6$ Hz; 1H) com C-9 (δ_C 52,76), C-8 (δ_C 71,91), C-11 (δ_C 60,58), 1-OBz (δ_C 164,99), de H-11 δ_H 5,51 (d, $J = 13,5$ Hz, 1H) 4,77 (d, $J = 13.5$ Hz, 1H) com C-9 (δ_C 52,76), C-8 (δ_C 71,91), C-10 (δ_C 94,14), C-11OBz (δ_C 170,18) e H-8 δ_H 5,40 (d, $J = 5,8$ Hz, 1H) com C-9 (δ_C 52,76), C-1 (δ_C 75,43), C-11 (δ_C 60,58), C-8OAc (δ_C 169,10). O deslocamento químico δ_H 4,02 (dd, $J = 3,7, 2,4$ Hz, 1H) sugere a presença de uma hidroxila a mais e um grupo acetato a menos, sua posição foi determinada pelas correlações de H-3 δ_H 5,07 (d, $J = 2,7$ Hz; 1H) com C-2 (δ_C 70,88), C-1 (δ_C

75,43), C-10 (δ_C 94,14), C-12 (δ_C 22,74), C-11' (δ_C 175,69). Com base nas informações de 1H , ^{13}C , HMBC e HMQC descritas acima e em comparação com dados da literatura foi possível identificar MDR2 como sendo a Euojaponina K, substância relatada pela primeira vez na espécie *Euonymus japonica* (Celastraceae), sendo isolada pela primeira vez em *M. distichophylla* (Tabela 7) (Figura 32).

Figura 32. Euojaponine K (MDR2) isolado de *M. distichophylla*

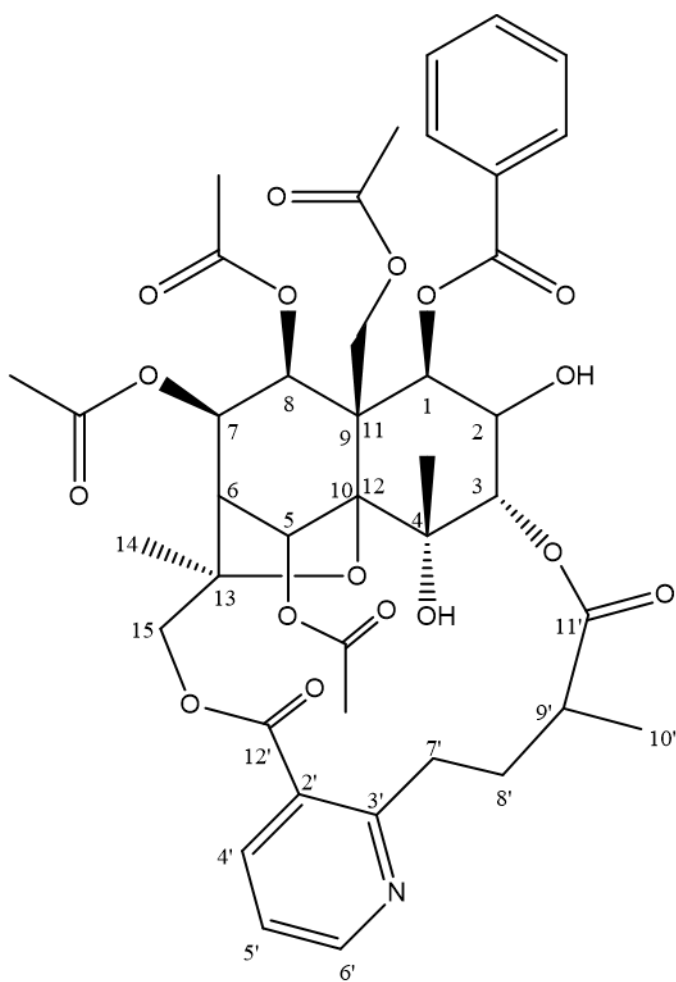


Tabela 7. Comparação dos dados espectrais de RMN ^1H e ^{13}C de MDR2 em CDCl_3 com os valores da literatura.

HMQC			HMBC		HAN <i>et al</i> ,1990	
C	^1H	^{13}C	2J	3J	^1H	^{13}C
1	5,84 (d, $J = 3.6$ Hz; 1H)	75,43	C-9	C-8; C-11; 1-OBz	5,82 (d, $J = 3,7$ Hz, 1H)	75,46
2	4,02 (dd, $J = 3,7; 2,4$ Hz, 1H)	70,88			4.03 (dd, $J = 3.7, 2.7$ Hz, 1H)	70,64
3	5,07 (d, $J = 2,7$ Hz; 1H)	77,92	C-2	C-1; C-10; C-12; C-11'	5.07(d, $J = 2.7$ Hz, 1H)	78,16
4	-	69,81			-	69,81
5	6,94 (s, 1H)	73,93	C-10	C-7,C-13, -C-OBz	6.97 (brs, 1H)	73,95
6	2,33 (d, $J = 4.2$ Hz; 1H)	50,99	C-5	C-10	2,33 (d, $J = 4.0$ Hz, 1H)	50,98
7	5,52 (dd, $J = 5,8; 4,2$ Hz, 1H)	68,97	C-8	C-7OBz	5,53 (dd, $J = 6,0, 4,0$ Hz, 1H)	68,97
8	5,40 (d, $J = 5,8$ Hz, 1H)	71,91	C-9	C-1; C-11; C-8OBz	5,51 (d, $J = 6,0$ Hz, 1H)	71,86
9	-	52,76			-	52,80
10	-	94,14			-	94,14
11	5,51 (d, $J=13,5$ Hz, 1H) 4,77 (d, $J = 13.5$ Hz, 1H)	60,58	C-9	C-8, C-10, C-11OBz	4.79 (ABq, $J = 13.5$ Hz, 1H) 5.54(ABq, $J = 13.5$ Hz, 1H)	60,55
12	1, 60 (s, 1H)	22,74	C-4	C-3, C10	1.34 (d, $J = 1.2$ Hz, 1H)	22,67
13	-	84,32			-	84,24
14	1,66 (s, 1H) 5,70 (d, $J = 11.9$ Hz, 1H)	17,91	C-13	C-6, C-15	1.67 (s, 1H)	17,87
15	3,79 (d, $J = 11.8$ Hz, 1H)	70,34	C-13	C-14; C12'	3.79, (ABq, $J = 11.9$ Hz, 1H) 5.70(ABq, $J = 11.9$ Hz, 1H)	70,33
2'	-	163,76			-	163,72
3'	-	124,60			-	124,58
4'	8,29 (dd, $J = 7,9; 1,8$ Hz, 1H)	138,73		C-2',C-6',C-12'	8.29 (dd, $J = 7,8, 1,8$ Hz, 1H)	138,71
5'	7,25 (dd, $J = 7,9; 4,7$ Hz, 1H)	121,12			7.26 (dd, $J = 7,8, 4,8$ Hz, 1H)	121,09
6'	8,73 (dd, $J = 4,7, 1,8$ Hz, 1H)	153,03		C-2',C-6'	8.72 (dd, $J = 4,8, 1,8$ Hz, 1H)	152,96
7'	3,88 (ddd, $J = 10, 6,5, 4,5$) 3,00 (dt, $J = 13,1; 6,1$ Hz; 1H)	33,25	C-2'	C-9'	3.79 (ddd, $J = 13,7, 6,3, 5,5$ Hz, 1H) 3.86 (ddd, $J = 13.7, 6.3, 5.5$)	33,22
8'	1,98 (m, 1HA) 2,21 (m, 1HB)	33,45			1.97 (m, 1H) 2.18 (m,1H)	33,40
9'	2,36 (m, 1H)	38,57			2.36 (m)	38,54
10'	1,15 (d, $J = 7.0$ Hz, 3H)	18,63	C-9'	C-8',C-11'	1.12 (d, $J = 7.0, 3\text{H}$)	18,57
11'	-	175,69			-	175,88
12'	-	166,89			-	169,06
5-OAc	2,16 (s, 1H)	21,48/169,91	C=O 5OAc		2,17 (s, 1H)	21,46/169,87
7-OAc	2,11 (s, 1H)	20,96/170,08	C=O 7OAc		2,12 (s, 1H)	20,94/170,05
8-OAc	1,40 (s, 1H)	20,00/169,10	C=O 8OAc		1,41(s, 1H)	19,98/169,06
11-OAc	2,29 (s, 1H)	21,59/170,18	C=O 11OAc		2,29 (s, 1H)	21,57/170,18
1-OBz	-	164,99			-	165,00
<i>ipso</i>	-	129,23			-	129,31
<i>orto</i>	7,95 (dd, $J = 8,3; 1,7$ Hz, 1H)	129,67			7.95 (dd, $J = 8,5, 1,4$)	129,64
<i>meta</i>	7,41 (t, $J = 7.7$ Hz, 2H)	128,57			7,40 (dd, $J = 8,5, 7,5$)	128,50
<i>para</i>	7,55 (t, $J = 7.4$ Hz, 1H)	133,65			7,54 (dd, 7,5, 1,4)	133,53

Figura 33. Espectro de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) de ^1H de MDR2 (CDCl_3 , 500 MHz).

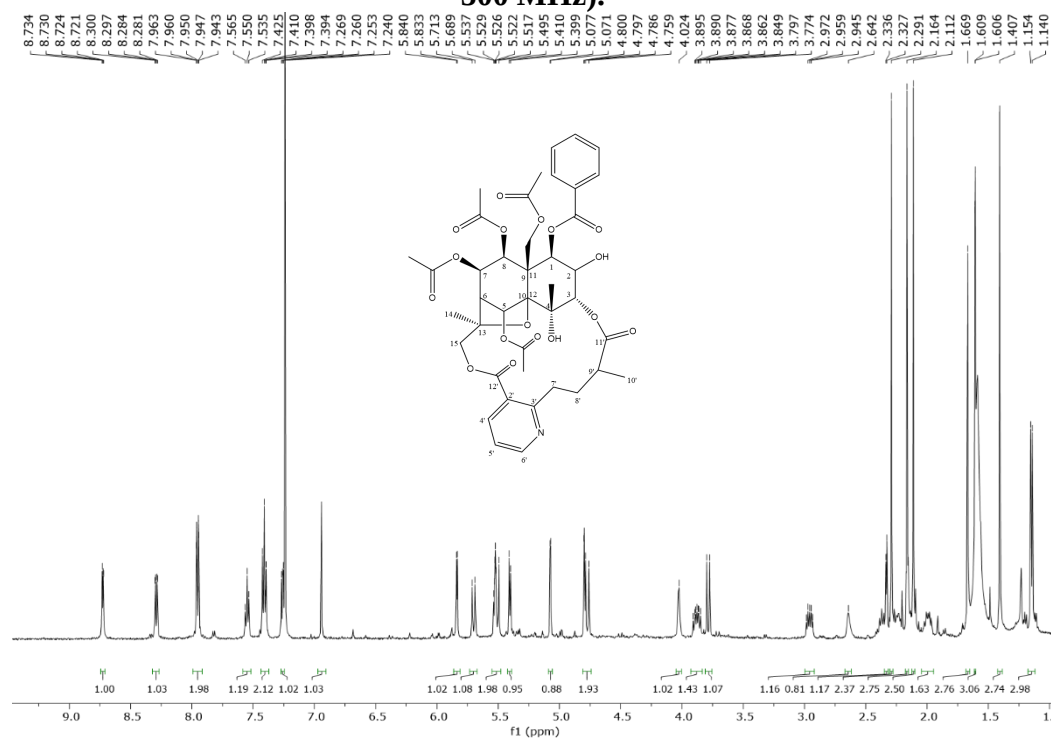


Figura 34. Expansão do espectro de RMN de ^1H de MDR2 na região de 1,0-3,1 ppm (CDCl_3 , 500 MHz).

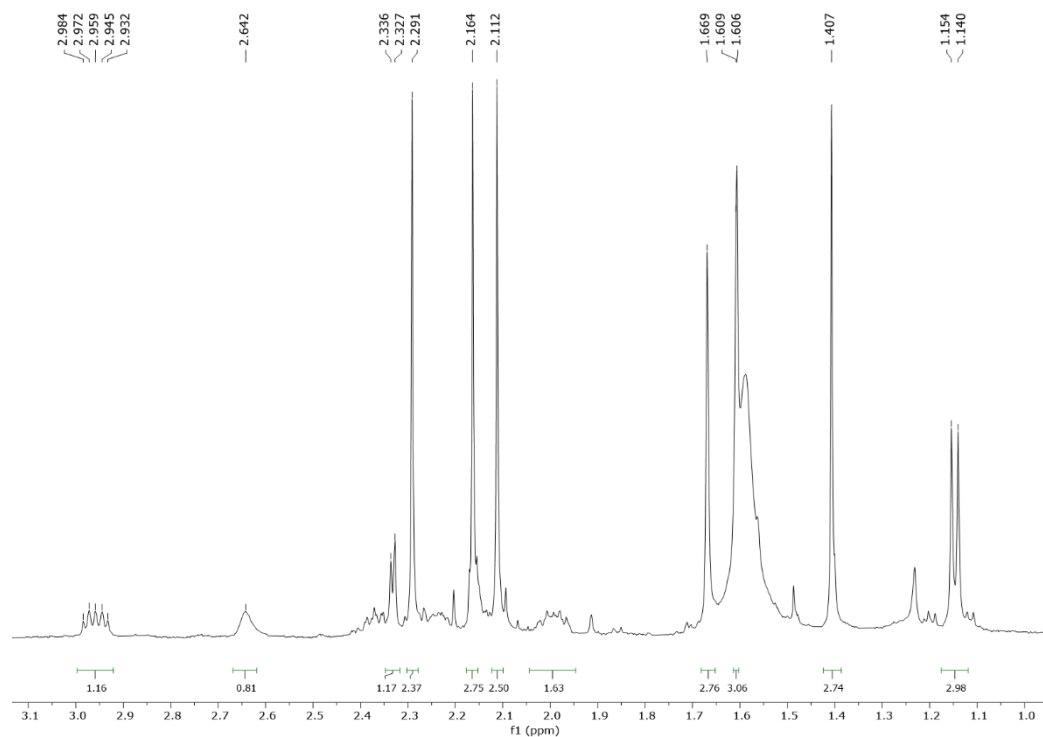


Figura 35. Expansão do espectro de RMN de ^1H de MDR2 na região de 3,6-5,1 ppm (CDCl_3 , 500 MHz).

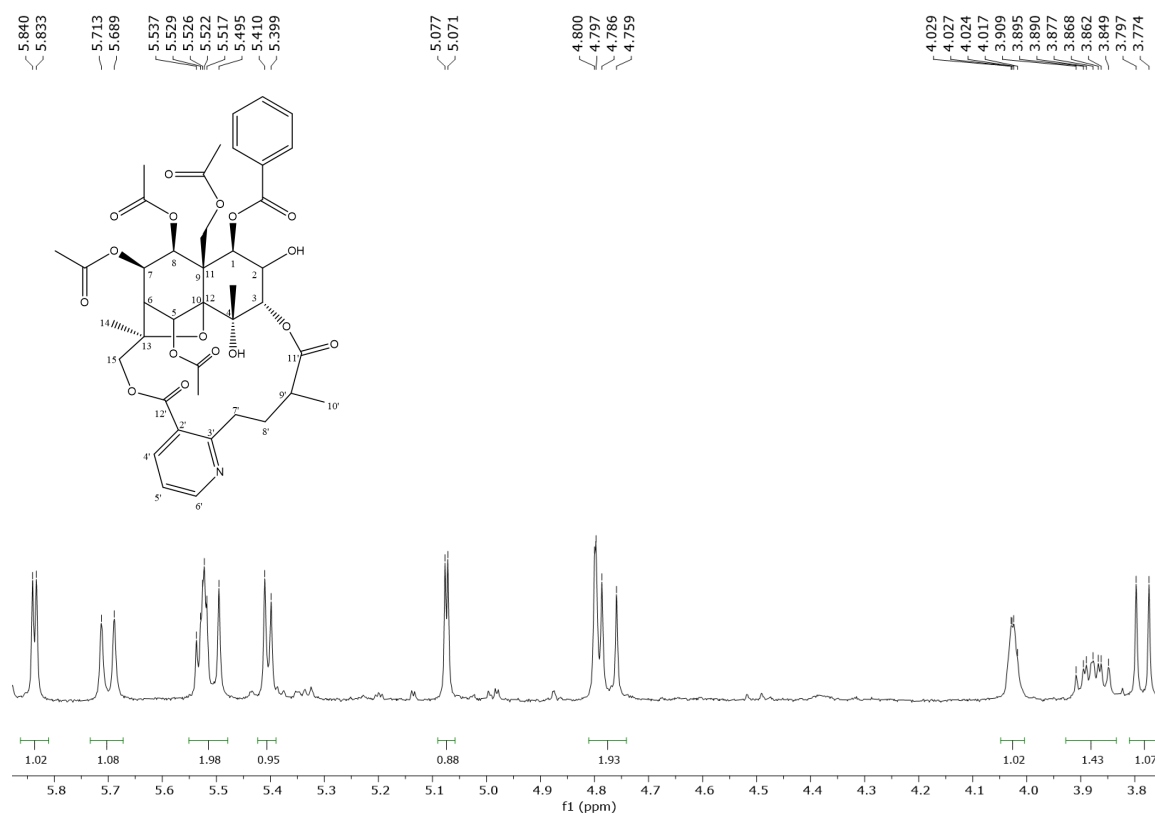


Figura 36. Expansão do espectro de RMN de ^1H de MDR2 na região de 6,9-9.0 ppm (CDCl_3 , 500 MHz).

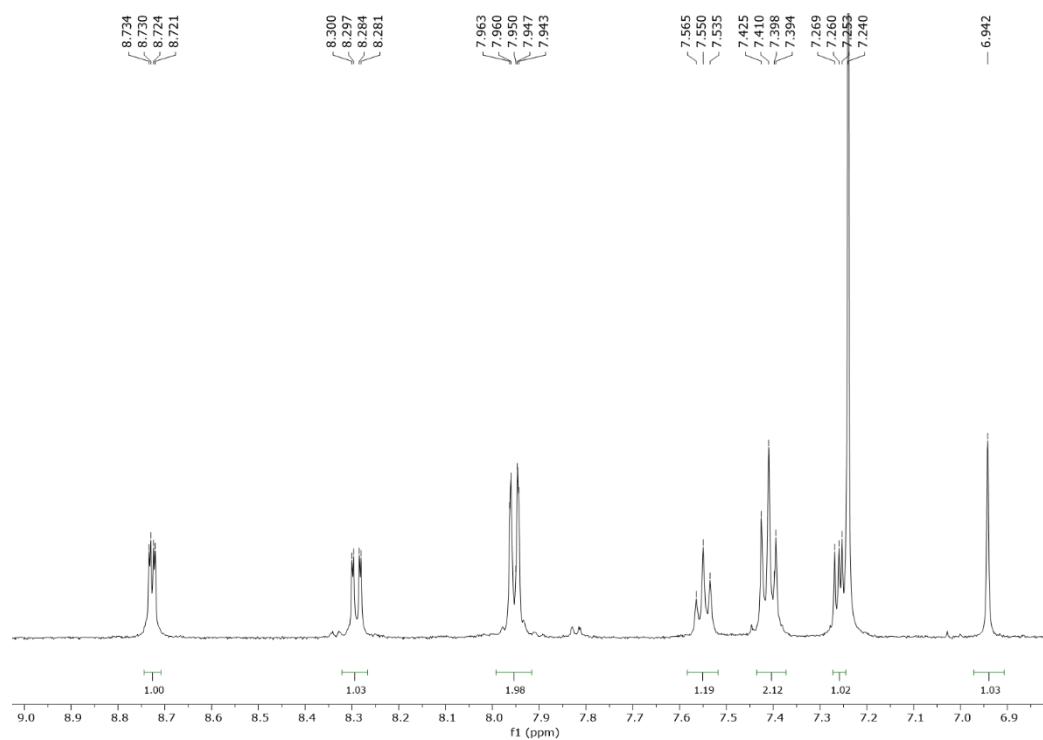


Figura 37. Espectro de Ressonância Magnética Nuclear de ^{13}C BB de MDR2 (CDCl_3 , 125 MHz)

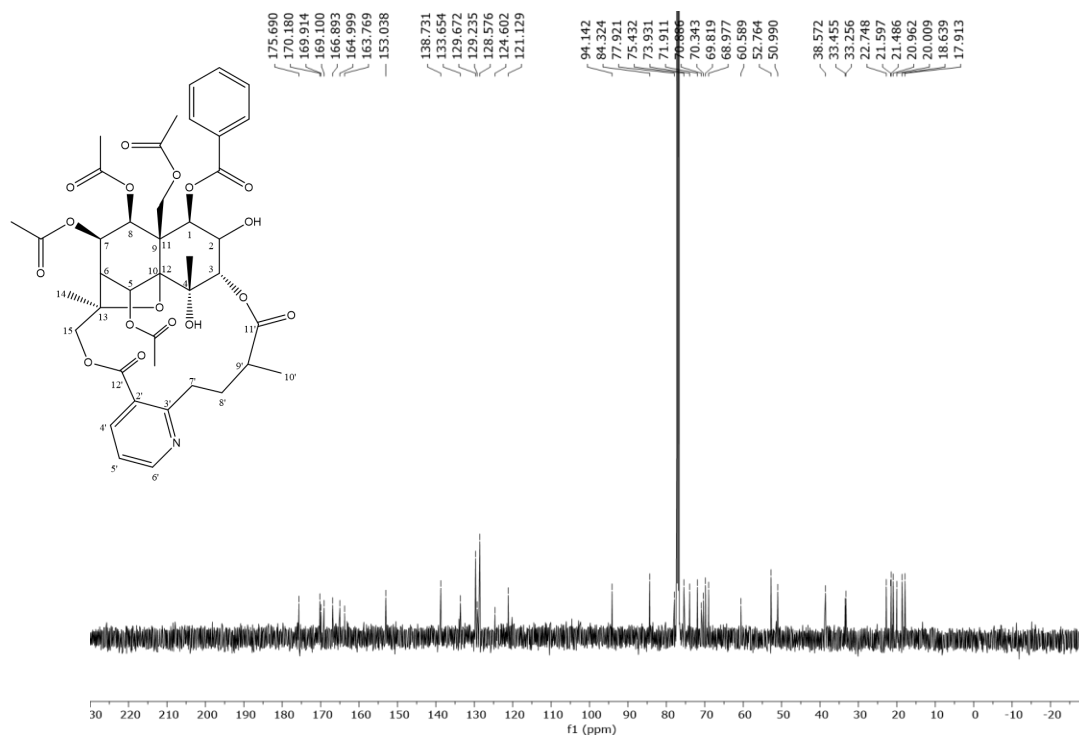


Figura 38. Expansão do espectro de RMN ^{13}C de MDR2 na região de 15-60 ppm (CDCl_3 , 125 MHz)

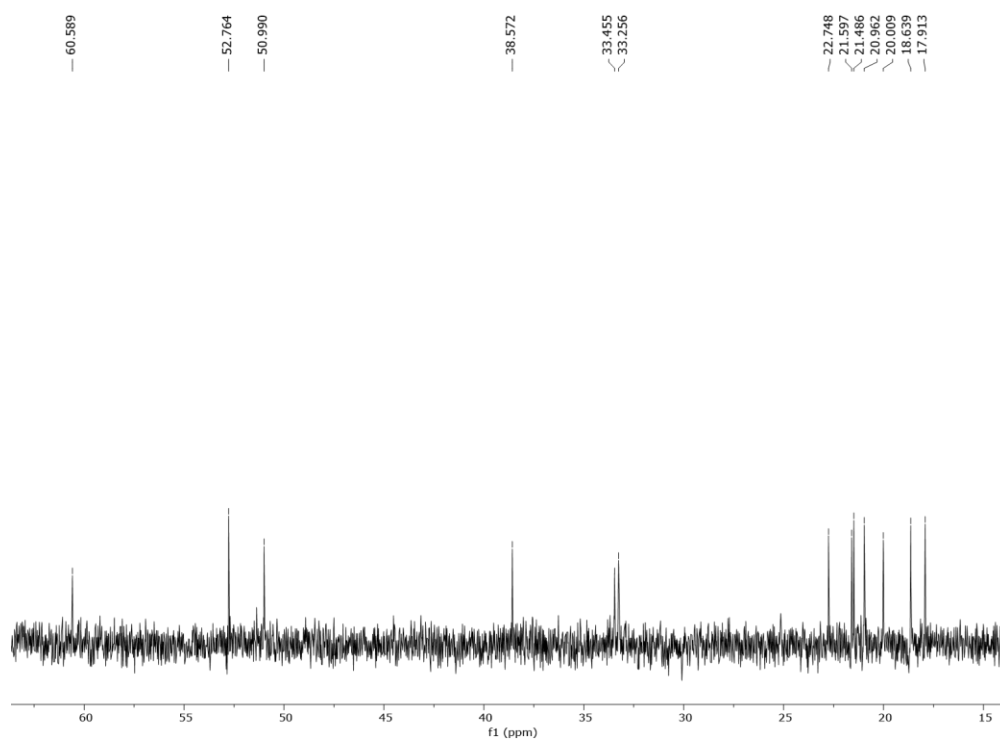


Figura 39. Expansão do espectro de RMN ^{13}C de MDR2 na região de 67-95 ppm (CDCl_3 , 125 MHz)

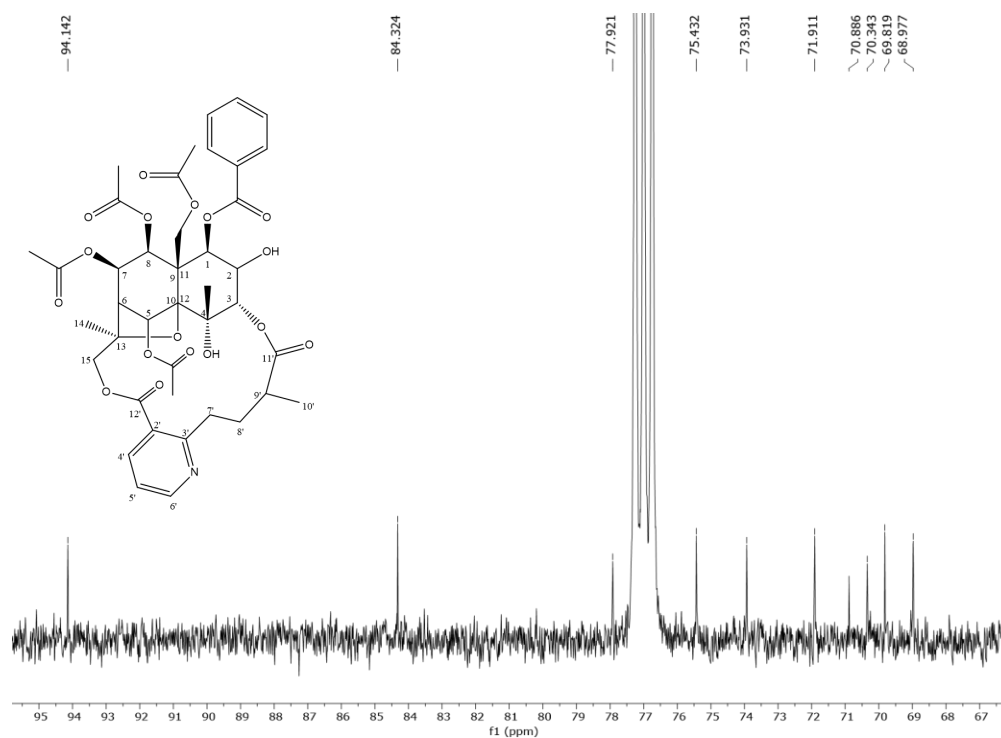


Figura 40. Expansão do espectro de RMN ^{13}C de MDR2 na região de 125-176 ppm (CDCl_3 , 125 MHz)

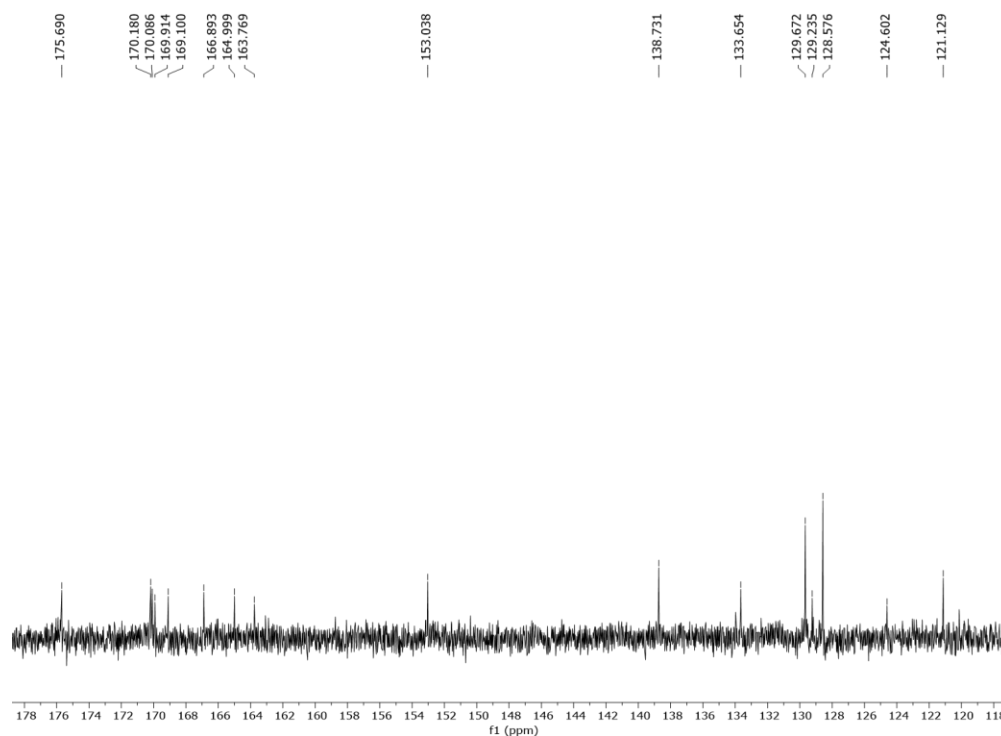


Figura 41. Espectro das correlações entre sinais de ^1H x ^{13}C - J_{CH} -HMQC de MDR2 em CDCl_3 (500 MHz)

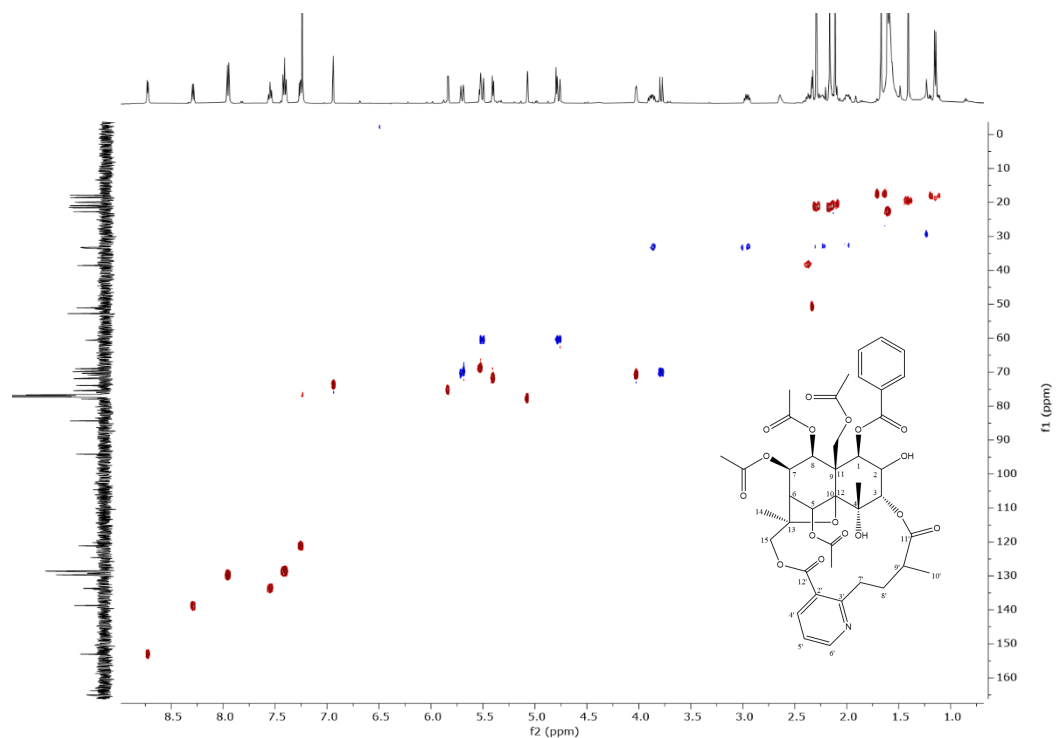
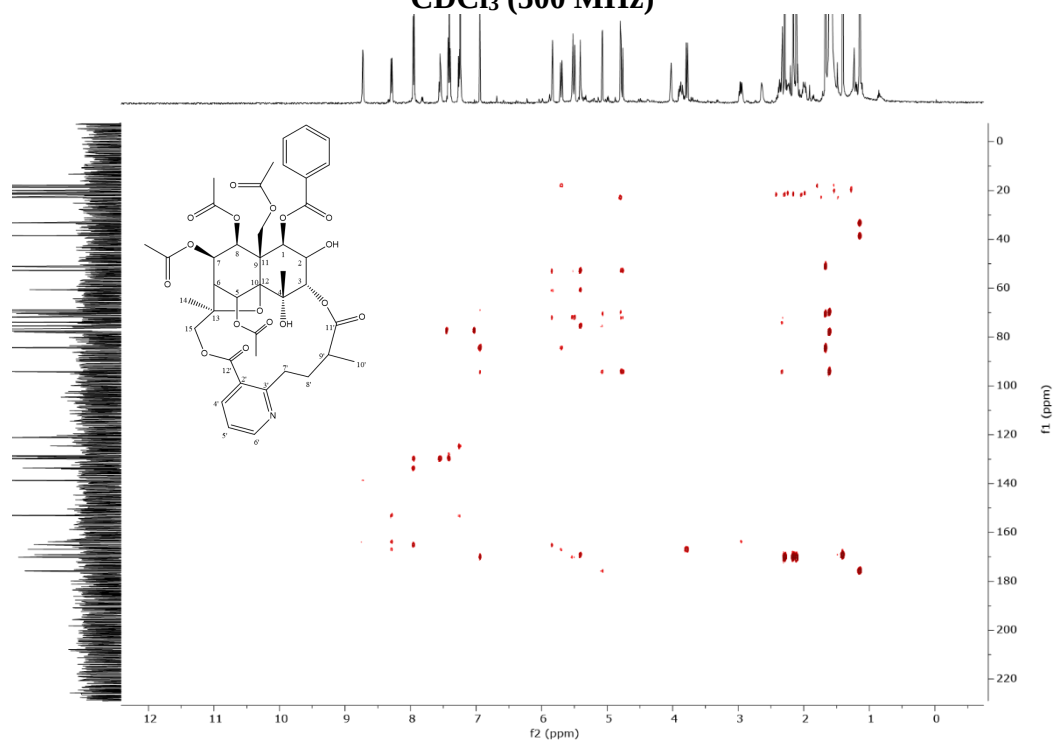


Figura 42. Espectro das correlações entre sinais de ^1H x ^{13}C - J_{CH} -HMBC de MDR2 em CDCl_3 (500 MHz)



/Figura 43. Expansão do espectro das correlações entre sinais de ^1H x ^{13}C - J_{CH} -HMQC de MDR2 em CDCl_3 (500 MHz)

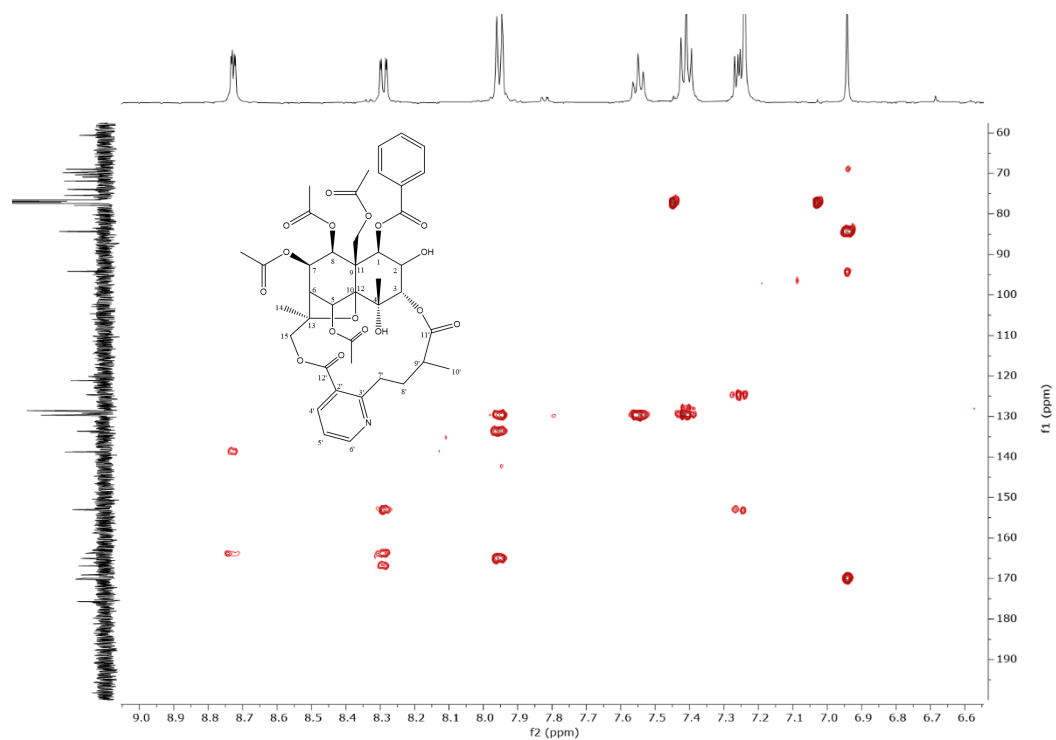


Figura 44. Expansão do espectro das correlações entre sinais de ^1H x ^{13}C - J_{CH} -HMQC de MDR2 em CDCl_3 (500 MHz)

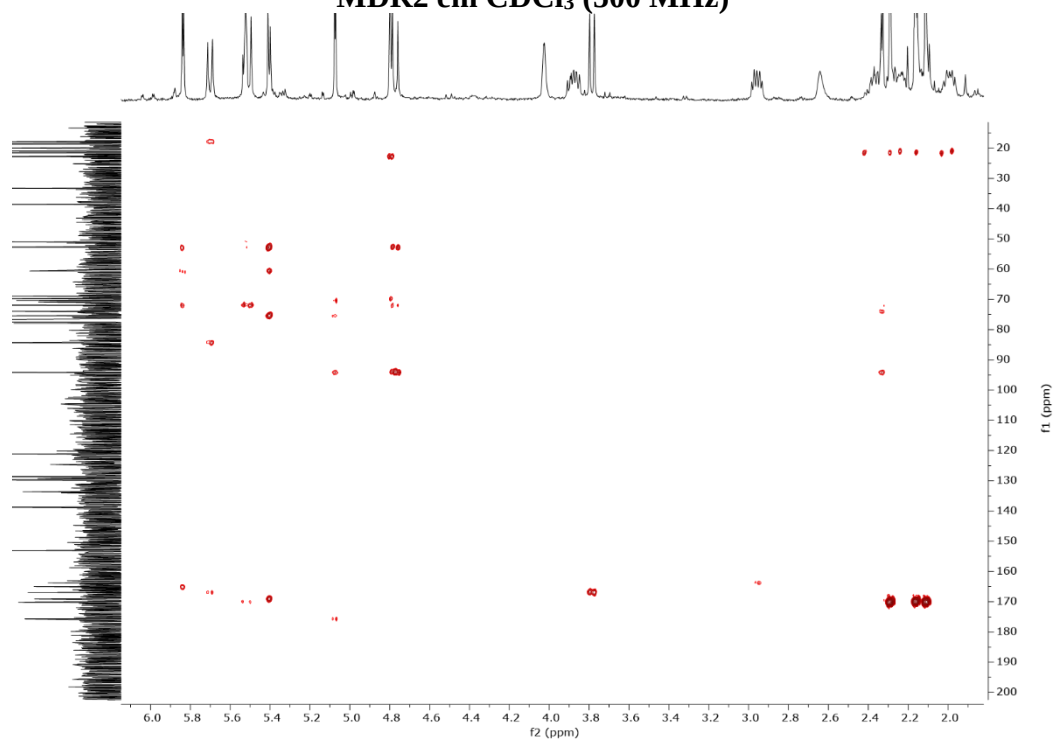
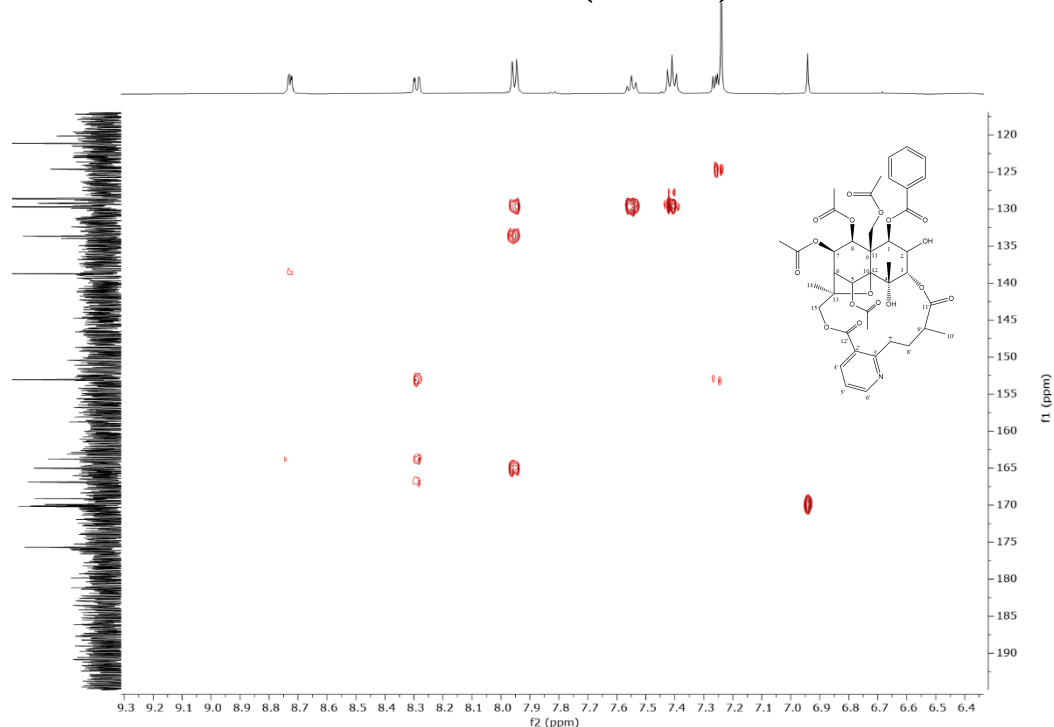


Figura 45. Expansão do espectro das correlações entre sinais de ^1H x ^{13}C - J_{CH} -HMQC de MDR2 em CDCl_3 (500 MHz)



5.2.3 Identificação estrutural de MDR3

A substância codificada como MDR3 foi isolada na forma de um pó amorfo incolor, solúvel em clorofórmio e metanol, apresentando uma massa de 1,3 mg representando 0,00020% do EEB.

Ao analisar o espectro de ^1H de RMN de MDR3 apresentou padrão de hidrogenação semelhante a MDR2. Este espectro revelou a presença de hidrogênios oximetínicos δ_{H} 6,10 (d, $J = 3,9$ Hz, 1H), 5,52 (dd, $J = 3,9, 2,6$ Hz, 1H), 5,13 (d, $J = 2,6$ Hz, 1H), 6,93 (s, 1H), 5,54 (dd, $J = 5,8, 3,9$ Hz, 1H), 5,45 (d, $J = 5,9$ Hz, 1H), deslocamentos químicos de hidrogênios oximetilênicos δ_{H} 4,58 (d, $J = 13,2$ Hz, 1H), 5,66 (d, $J = 13,2$ Hz, 1H), 2,95 (dt, $J = 13,0, 5,9$ Hz, 1H), 3,95 (ddd, $J = 13,4, 9,8, 6,2$ Hz, 1H), bem como, quatro singletos característicos de hidrogênios metílicos de ésteres carbonílicos δ_{H} 2,18 (s, 3H), 2,12 (s, 3H), 1,34 (s, 3H), 2,20 (s, 3H) e um conjunto de sinais característicos de dois grupos benzoato δ_{H} 7,76 (d, $J = 7,6$ Hz, 2H), 7,30 (t, $J = 8, 2\text{H}$), 7,48 (t, $J = 7,6$ Hz, 1H), 8,06 (d, $J = 7,6$ Hz, 1H), 7,49 (t, $J = 7,6$ Hz, 2H), 7,61 (t, $J = 7,5$ Hz, 1H). Foi observado um padrão de sinais característicos de um núcleo piridínico 2',3' dissustituído δ_{H} 8,33 (dd, $J = 7,9, 1,9$ Hz, 1H), 7,30 (dd, $J = 5,0; 8,0$ Hz, 1H), 8,75 (dd, $J = 4,8, 1,8$ Hz, 1H), além dos deslocamentos químicos δ_{H} 2,95 (dt, $J = 13,0, 5,9$ Hz, 1H), 3,95 (ddd, $J = 13,4, 9,8, 6,2$ Hz, 1H), 1,99 (q, $J = 9,5$ Hz, 1H), 2,35 (m), 2,43 (m), 1,23 (d, $J = 7,0$

Hz, 3H). Com essas informações podemos inferir que MDR3 trata-se de um alcaloide sesquiterpênico piridínico, apresentando uma porção de um sesquiterpeno do tipo dihidroagarofurano e outra porção formada por um alcaloide piridínico do tipo wilfordato.

Na análise do espectro de RMN ^{13}C foram observados 44 sinais dos quais sete foram atribuídos a carbonos metílicos (δ_{C} 17,94; 18,85; 19,84; 20,97; 21,20; 21,59; 23,07), seis a carbonos oximetínicos (δ_{C} 68,94; 70,40; 71,52; 73,40; 73,72; 75,82), cinco sinais de carbono metínico (δ_{C} 38,42; 51,09; 138,72; 121,15; 153,21), dois sinais atribuídos a carbonos oximetilênicos (δ_{C} 60,74 e 70,33), dois sinais de carbonos metilênicos (δ_{C} 33,38 e 33,27), seis sinais atribuídos a carbonos não hidrogenados (δ_{C} 69,80; 52,42; 84,66; 93,82; 124,33; 164,16), a presença de quatro sinais de ésteres carbonílicos (δ_{C} 168,94; 169,93; 170,01; 170,46), deslocamento químicos característicos de grupos benzoatos (δ_{C} 164,96; 129,20; 129,56; 128,37; 133,34; 164,78; 128,77; 129,90; 128,76; 133,74). Esses dados revelam que em MDR3 apresenta um grupo benzoato a mais do que em MDR1, dessa forma, MDR3 apresenta dois grupos benzoatos e quatro acetatos. Com base nas informações de ^1H , ^{13}C descritas acima e em comparação com dados da literatura foi possível identificar MDR3 como sendo a ebinifolina W-I (Tabela 8) (Figura 46).

Figura 46. Ebinifolina W-1 (MDR3) isolado de *Maytenus distichophylla*

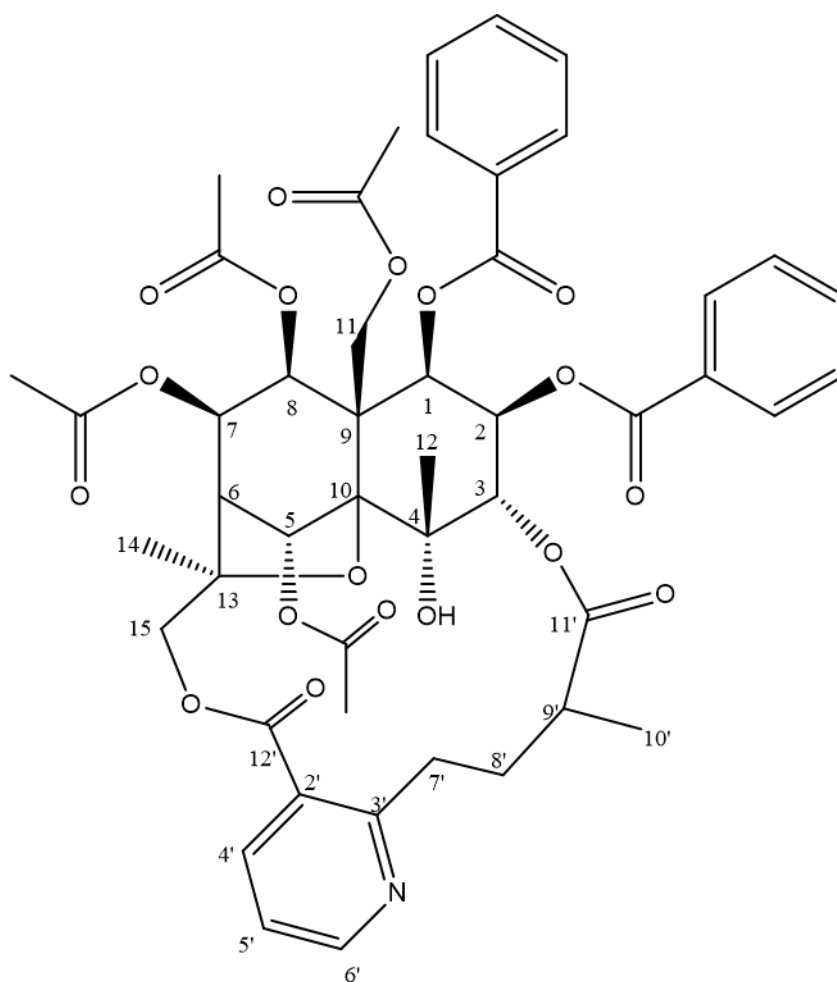


Tabela 8. Comparação dos dados espectrais de RMN ^1H e ^{13}C de MDR3 em CDCl_3 com os valores da literatura

MDR3			ITOKAWA, 1993	
C	^1H	^{13}C	^1H	^{13}C
1	6,10 (d, $J = 3.9$ Hz, 1H)	73,40	6.13 (d, 3, 3.9)	73.47
2	5.52 (dd, $J = 3.9, 2.6$ Hz, 1H)	70,40	5.52 (dd, 2.4, 3.9)	70.51
3	5.13 (d, $J = 2.6$ Hz, 1H)	75,82	5.16 (d, 2.4)	75.94
4	-	69,80	4.99 (s)	69.88
5	6,93 (s)	73,72	6.96 (s)	73.85
6	2.37 (d, $J = 4.0$ Hz, 1H)	51,09	2.40 (d, 3.8)	51.18
7	5.54 (dd, $J = 5.8, 3.9$ Hz, 1H)	68,94	5.54 (dd, 3.8, 5.8)	69.03
8	5.45 (d, $J = 5.9$ Hz, 1H)	71,52	5.48 (d, 5.8)	71.65
9	-	52,42	-	52.54
10	-	93,82	-	93.89
11	4.58 (d, $J = 13.2$ Hz, 1H)	60,74	4.61 (d, 13.3)	60.83
	5.66 (d, $J = 13.2$ Hz, 1H)		5.69 (d, 13.3)	
12	1.67 (s)	23,07	1.70 (s)	23.15
13	-	84,66	-	84.71
14	1,71 (s)	17,94	1.74 (s)	17.97
15	3.79 (d, $J = 11.9$ Hz, 1H)	70,33	3.83 (d, 1 1.9)	70.39
	5.75 (d, $J = 11.9$ Hz, 1H)		5.77 (d, 1 1.9)	
2'	-	164,16	-	164.09
3'	-	124,33	-	124.09
4'	8.33 (dd, $J = 7.9, 1.9$ Hz, 1H)	138,72	8.34 (dd, 1.6, 8.0)	138.78
5'	7, 30 (dd, $J = 5,0; 8,0$)	121,15	7.30 (dd, 4.7, 8.0)	121.20
6'	8.75 (dd, $J = 4.8, 1.8$ Hz, 1H)	153,21	8.77 (dd, 1.6, 4.7)	153.21
7'	2.95 (dt, $J = 13.0, 5.9$ Hz, 1H)	33,38	2.99 (ddd, 4.4, 6.0, 13.2)	33.49
	3.95 (ddd, $J = 13.4, 9.8, 6.2$ Hz, 1H)		3.97 (ddd, 5.9, 9.2, 13.2)	
8'	1.99 (q, $J = 9.5$ Hz, 1H)	33,27	2.04(ddd, 1.7, 6.0, 9.2, 12.1)	33.35
	2,35 (m)		2.32 (dddd, 4.4, 5.9, 10.0, 12.1)	
9'	2,43 (m)	38,42	2.47(dqd, 1.7, 6.9, 10.0)	38.55
10'	1.23 (d, $J = 7.0$ Hz, 3H)	18,85	1.26 (d, 6.9)	18.82
11'	-	175,08	-	175.12
12'	-	166,85	-	166.94
5-OAc	2,18 (s, 3H)	169,93/21,59	2.19 (s)	169.93/21.61
7-OAc	2,12 (s, 3H)	170,01/20,97	2.14 (s)	170.02/20.99
8-OAc	1,34 (s, 3H)	168,94/19,84	1.36 (s)	168.96/19.88
11-OAc	2,20 (s, 3H)	170,46/21,20	2.21 (s)	170.47/21.23
1-OBz	-	164,96	-	165.02
<i>ipso</i>	-	129,20	-	129.33
<i>orto</i>	7.76 (d, $J = 7.6$ Hz, 2H)	129,56	7.78 (d, 7.7)	129.62
<i>meta</i>	7,29 (t, $J = 8$ Hz, 2H)	128,37	7.32 (t-like, 7.8)	128.42
<i>para</i>	7,48(t, $J = 7,8$ Hz, 1H)	133,34	7.49 (t-like, 7.9)	133.38
2-OBz	-	164,78	-	164.85
<i>ipso</i>	-	128,77	-	128.85
<i>orto</i>	8.06 (d, $J = 7.6$ Hz, 2H)	129,90	8.09 (d, 7.7)	129.96
<i>meta</i>	7,49 (t, $J = 7,8$ Hz, 2H)	128,76	7.51 (t-like, 7.8)	128.83
<i>para</i>	7.61 (t, $J = 7.5$ Hz, 1H)	133,74	7.63 (t-like, 7.4)	133.79

Figura 47. Espectro de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) de ^1H de MDR3 (CDCl_3 , 500 MHz)

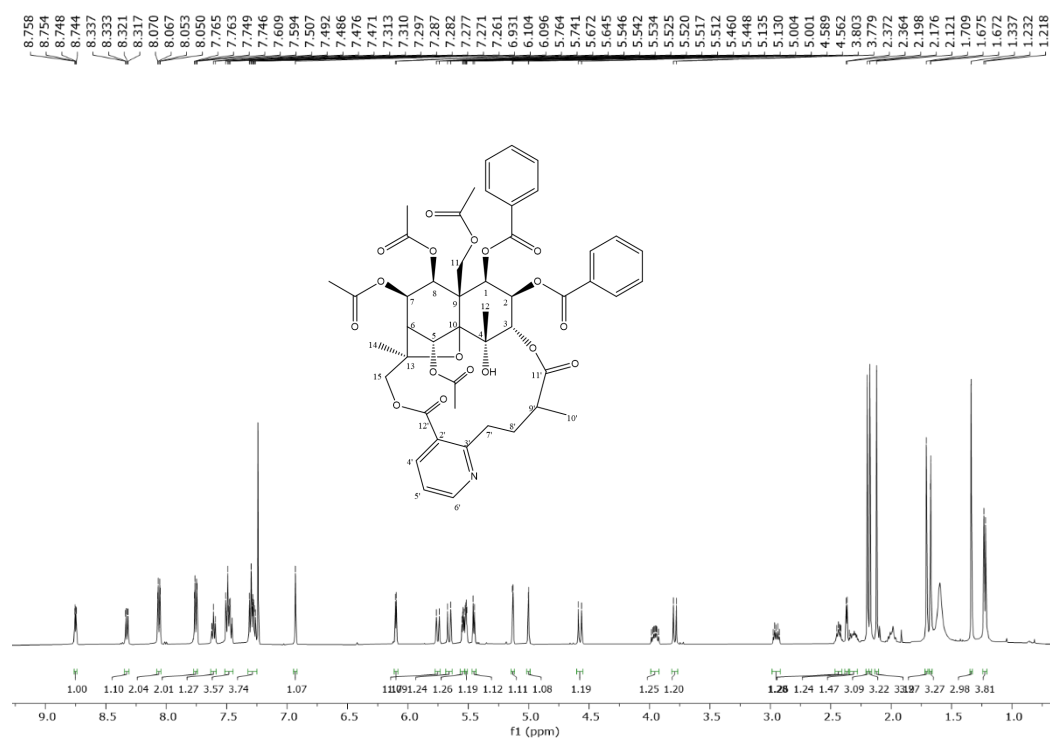


Figura 48. Expansão do espectro de RMN de ^1H de MDR3 na região de 1,2-3,0 ppm (CDCl_3 , 500 MHz)

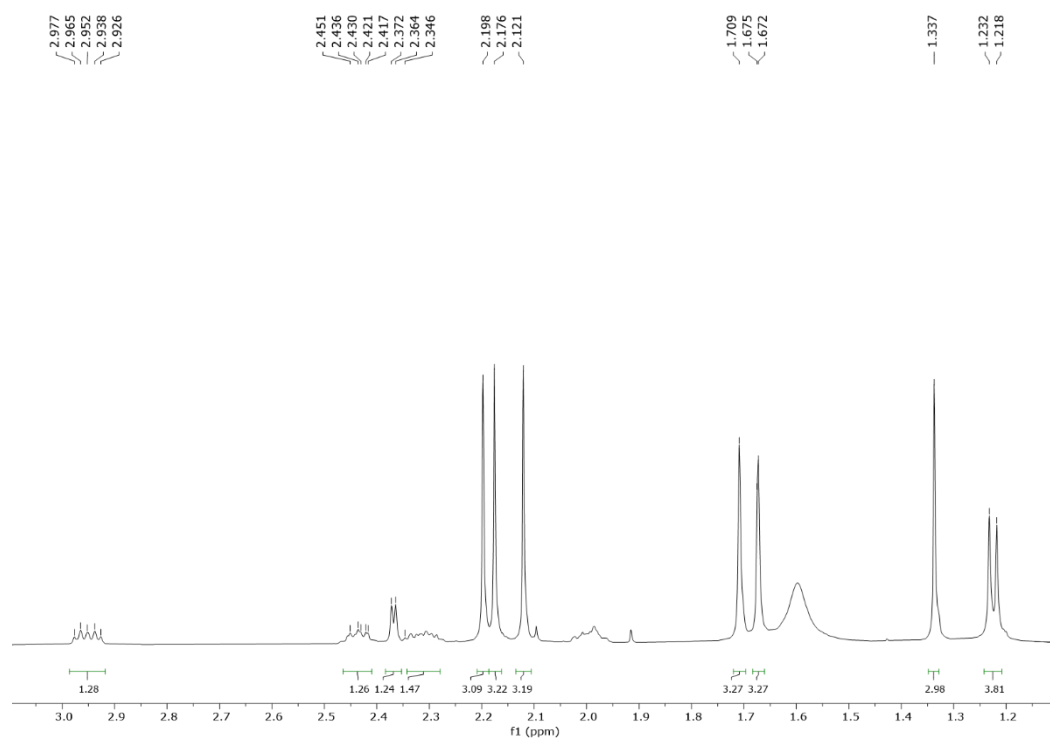


Figura 49. Expansão do espectro de RMN de ^1H de MDR3 na região de 3,6-6,2 ppm (CDCl₃, 500 MHz)

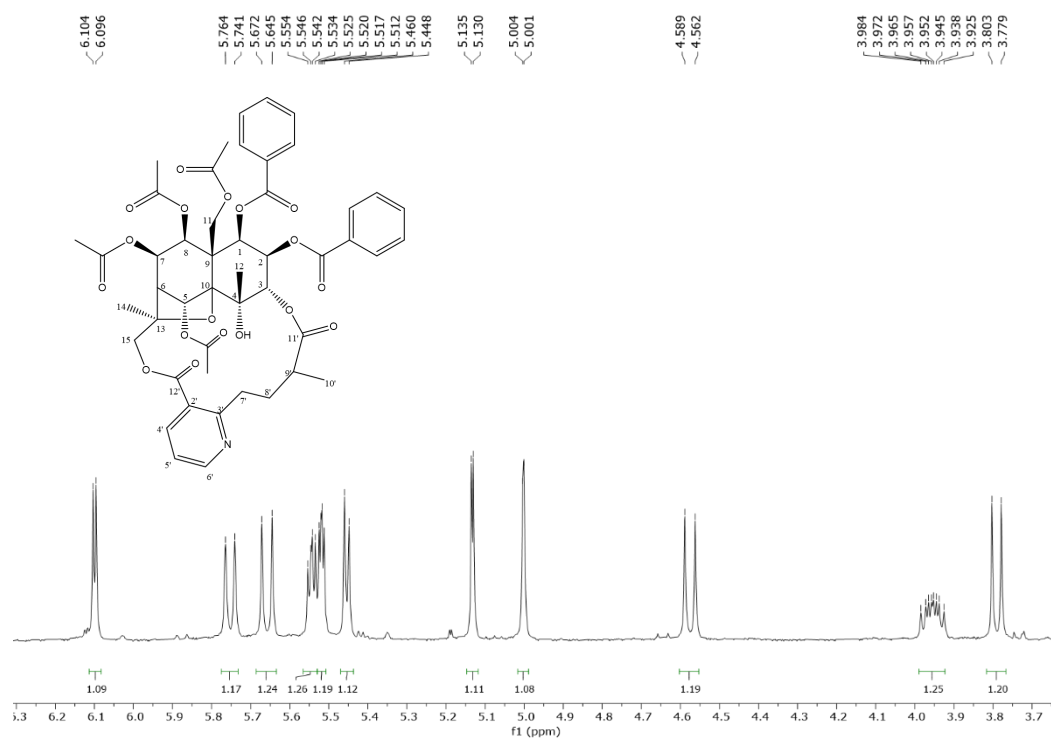


Figura 50. Expansão do espectro de RMN de ^1H de MDR3 na região de 6,9-8,8 ppm (CDCl₃, 500 MHz)

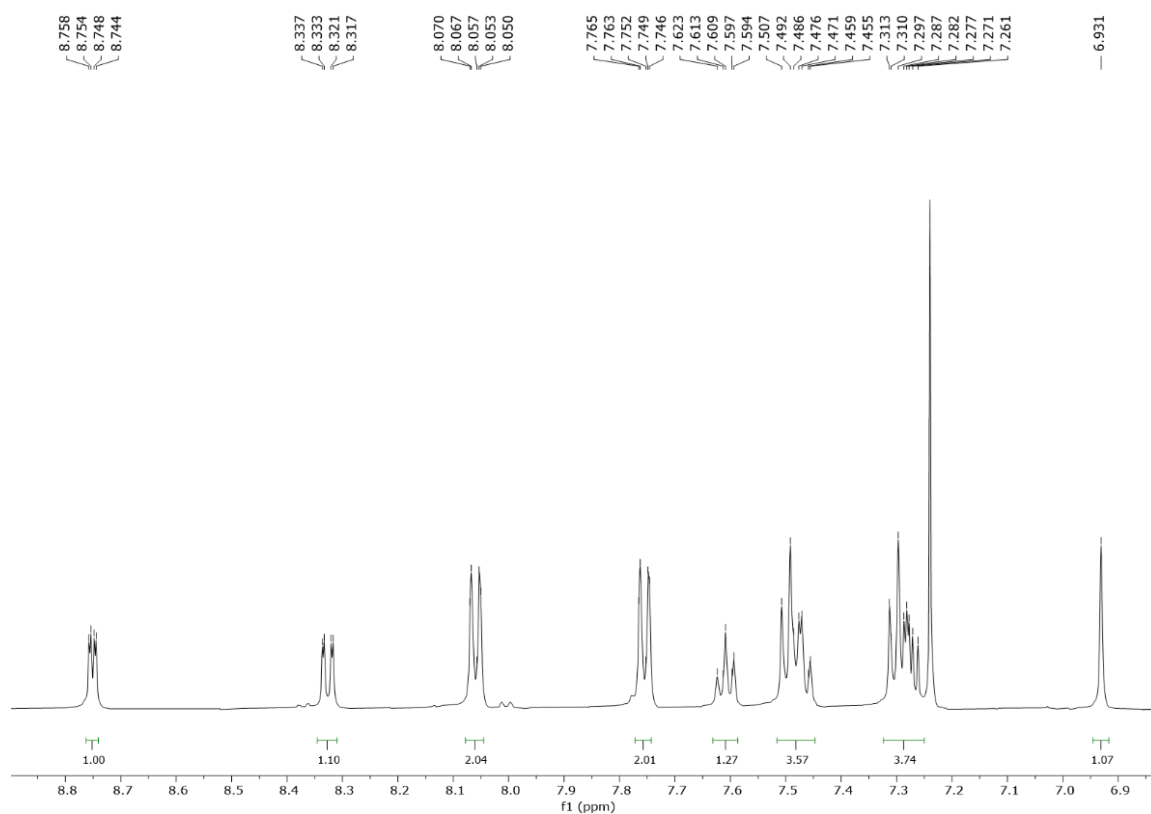


Figura 51. Espectro de Ressonância Magnética Nuclear de ^{13}C BB de MDR3 (CDCl_3 , 125 Mhz).

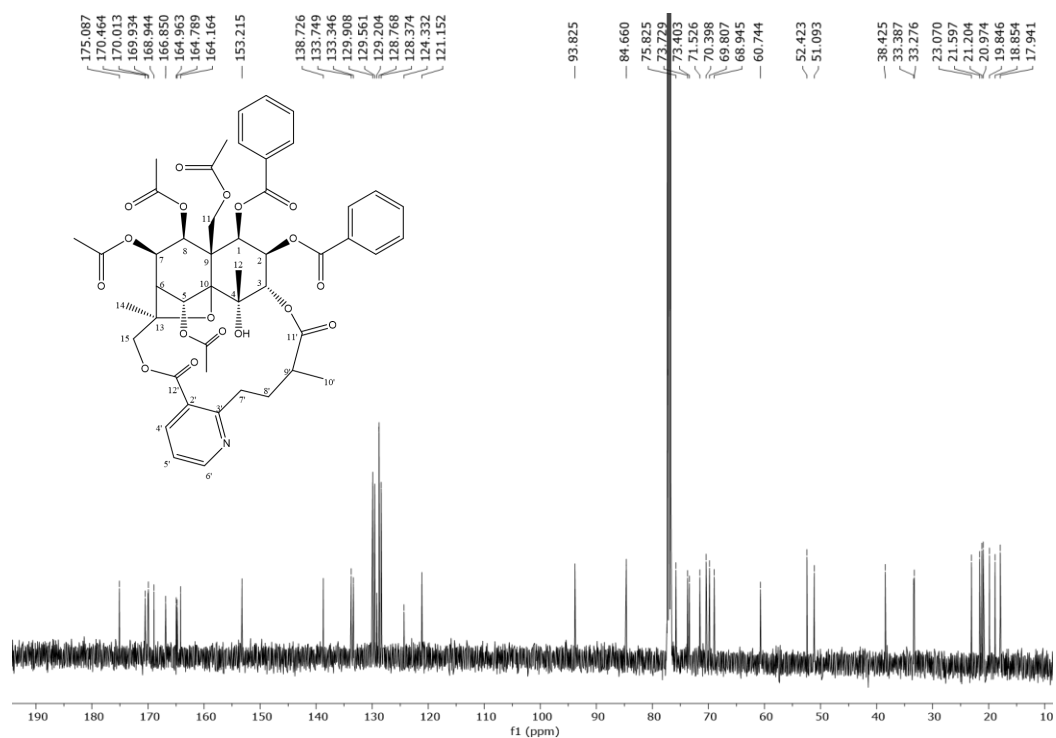


Figura 52. Expansão do espectro de RMN de ^{13}C de MDR3 na região de 14-62 ppm (CDCl_3 , 125 Mhz).

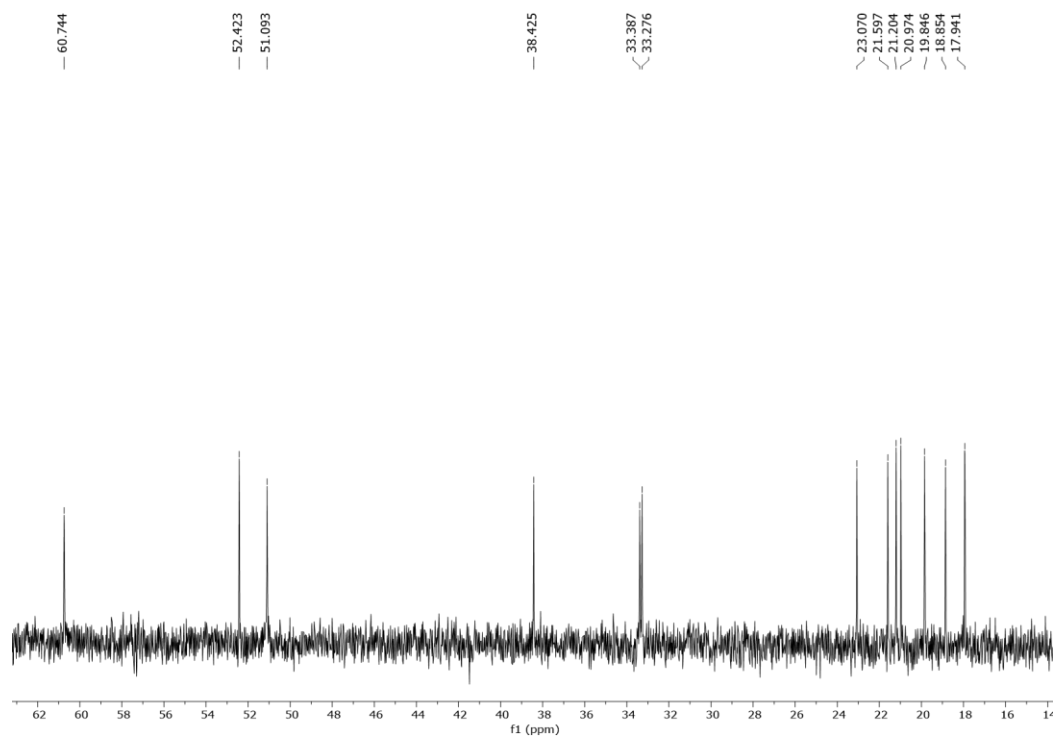


Figura 53. Expansão do espectro de RMN de ^{13}C de MDR3 na região de 68-96 ppm (CDCl_3 , 125 Mhz).

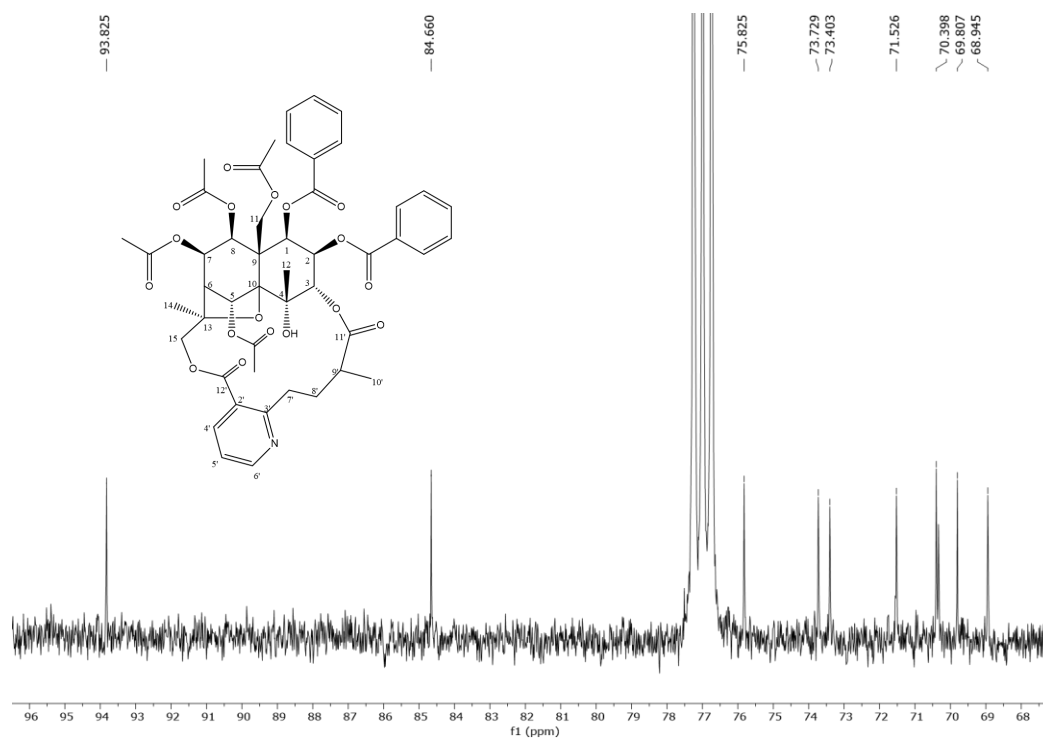


Figura 54. Expansão do espectro de RMN de ^{13}C de MDR3 na região de 121-138 ppm (CDCl_3 , 125 Mhz).

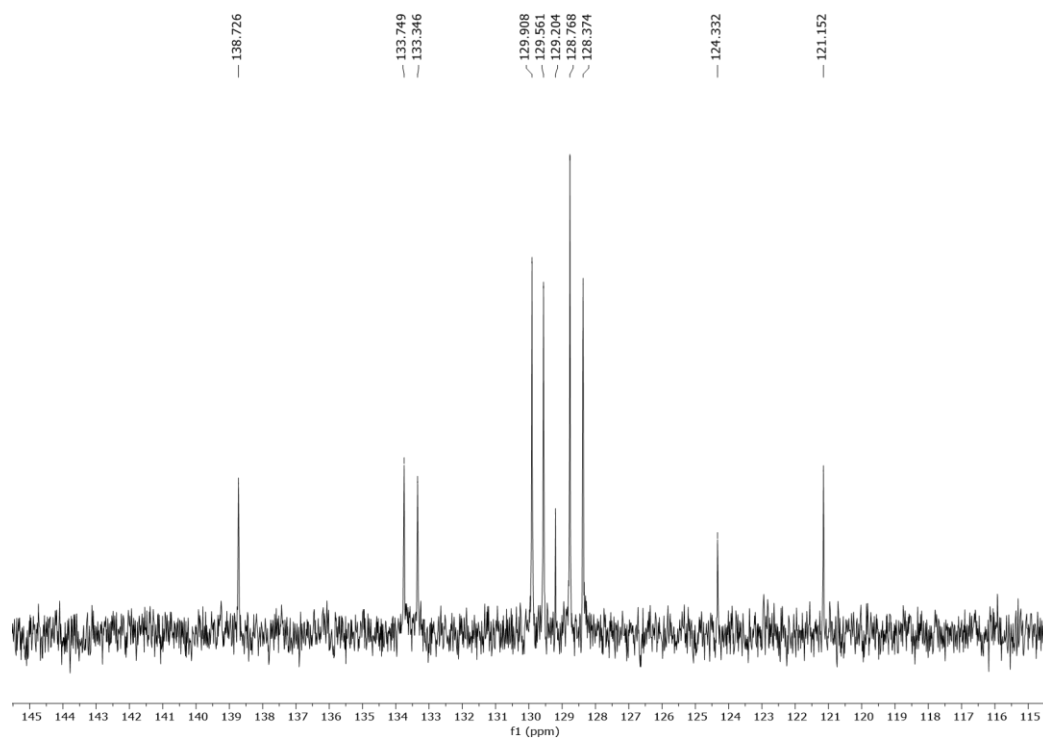
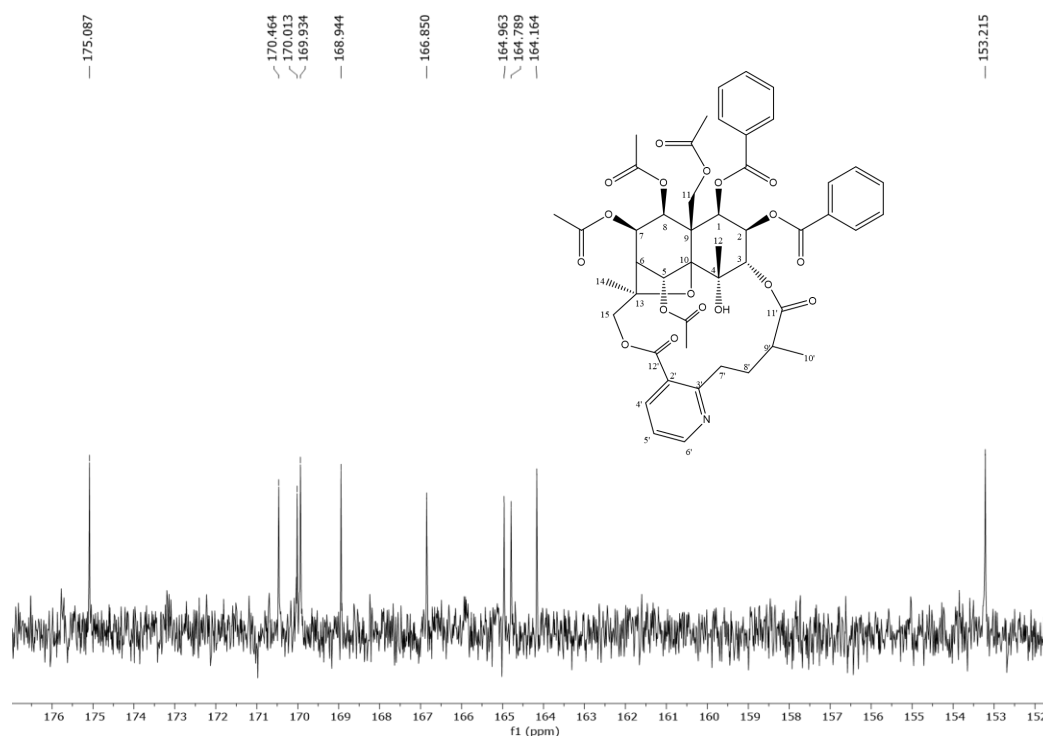


Figura 55. Expansão do espectro de RMN de ^{13}C de MDR3 na região de 153-175 ppm (CDCl_3 , 125 Mhz).



5.2.4 Identificação estrutural de MDR4

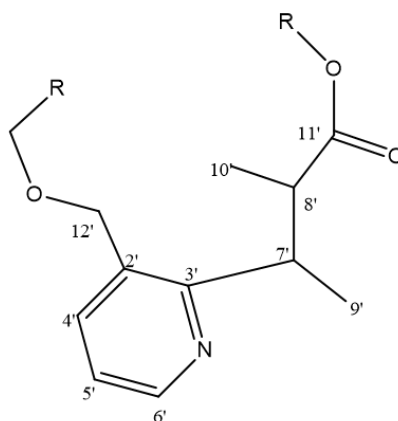
A substância codificada como MDR4 foi isolada na forma de um pó amorfo incolor, solúvel em clorofórmio, apresentando uma massa de 2 mg representando 0,00032% do EEB.

No espectro de RMN ^1H foram observados os deslocamentos químicos δ_{H} 1,56 (d, $J = 1.3$ Hz, 3H) e 1,70 (s, 3H) atribuídos a hidrogênios metílicos, os deslocamentos químicos δ_{H} 5,85 (d, $J = 4.1$ Hz; 1H), 5,32 (dd, $J = 4.2, 2.4$ Hz; 1H), 4,77 (d, $J = 2.4$ Hz; 1H), 7,03 (s, 1 H), 5,49 (dd, $J = 5.9, 4.2$; 1H), 5,39 (d, $J = 6.0$; 1H), característicos de hidrogênios oximetínicos, presença de um hidrogênio metínico δ_{H} 2,34 (d, $J = 4.5$ Hz, 1H), bem como, sinais característicos de hidrogênios metílicos de ésteres carbonílicos δ_{H} 2,13 (s; 3H), 2,19 (s; 3H), 2,10 (s; 3H), 1,37 (s; 3H), 2,32 (s; 3H) e um conjunto de sinais característicos para a presença de um grupo benzoato δ_{H} 7,78 (dd, $J = 8.4, 1.3$; 2H), 7,37 (t, $J = 7.4$ Hz, 2H), 7,51 (d, $J = 7.4$; 1H). Esses sinais revelam a presença de um sesquiterpeno do tipo dihidroagarofurano. Neste espectro também foram visualizados sinais característicos de um grupo piridínico 2,3 dissustituído δ_{H} 8,06 (dd, $J = 7.8, 1.8$ Hz; 1H), 7,25 (dd, $J = 7.8, 4.9$ Hz; 1H), 8,68 (dd, $J = 4.9; 1.8$ Hz; 1H), 4,63 (m; 1H), 2,58 (dd, $J = 7.1, 1.1$ Hz, 1H), 1,38 (d, $J = 7.1$ Hz, 3H), 1,19 (d,

$J = 7.1$ Hz; 3H). A presença das metilas dupletos, juntamente com o conjunto de hidrogênios aromático sugere que em MDR4 a piridina 2,3 dissubstituída é do tipo evoninato (Figura 56)

Esqueleto da piridina 2,3 dissustituída do tipo wilfordato

Figura 56. Esqueleto da piridina 2,3 dissustituída do tipo wilfordato



Na análise do espectro de RMN ^{13}C foram observados 30 sinais, dos quais dois foram atribuídos a carbonos metílicos (δ_{C} 18,44 e 22,84), dois carbonos oximetilênicos (δ_{C} 59,98; 69,92), seis sinais atribuídos a carbonos oximetínicos (δ_{C} 68,85; 69,10; 71,29; 73,45; 73,76; 75,60;), um carbono metínico (δ_{C} 50,39), quatro sinais atribuídos a carbonos não hidrogenados (δ_{C} 52,47; 70,54; 84,35; 94,05), à presença de cinco ésteres carbonílicos (δ_{C} 168,23; 168,87; 169,87; 169,93; 170,35), suas metilas correspondentes δ_{C} 20,97, 19,96, 21,65, 20,90, 21,38 e 21,65 e um conjunto de sinais característico de um grupo benzoato (δ_{C} 128,49; 129,05; 129,45; 133,45; 165,31). Além desses sinais, foram observados a presença de sinais que confirmam a presença do grupo piridínico, juntamente com o RMN de ^1H , confirma a presença do grupo piridínico, sendo este do tipo evoninato (CORDELL, 2008) (δ_{C} 9,80, 11,89, 36,42; 44,92; 121,09; 124,99; 137,75; 151,48; 164,50; 168,60 e 173,96) (Tabela 9). A presença desses sinais descritos acima, juntamente com os dados de ^1H , corroboram para a presença de uma porção sesquiterpênica do tipo dihidroagarofurano com a presença de 5 grupos acetatos e um benzoato. Assim como descrito em MDR1, MDR4 apresenta o mesmo padrão de substituição nas posições 1, 2, 11 e 8. Com base nas informações de ^1H , ^{13}C descritas acima e em comparação com dados da literatura foi possível identificar MDR4 como sendo a maiteína, sendo isolada pela primeira vez na espécie *M. distichophylla* (Tabela 9) (Figura 55).

Figura 57. Maiteína (MDR4) isolado de *Maytenus distichophylla*

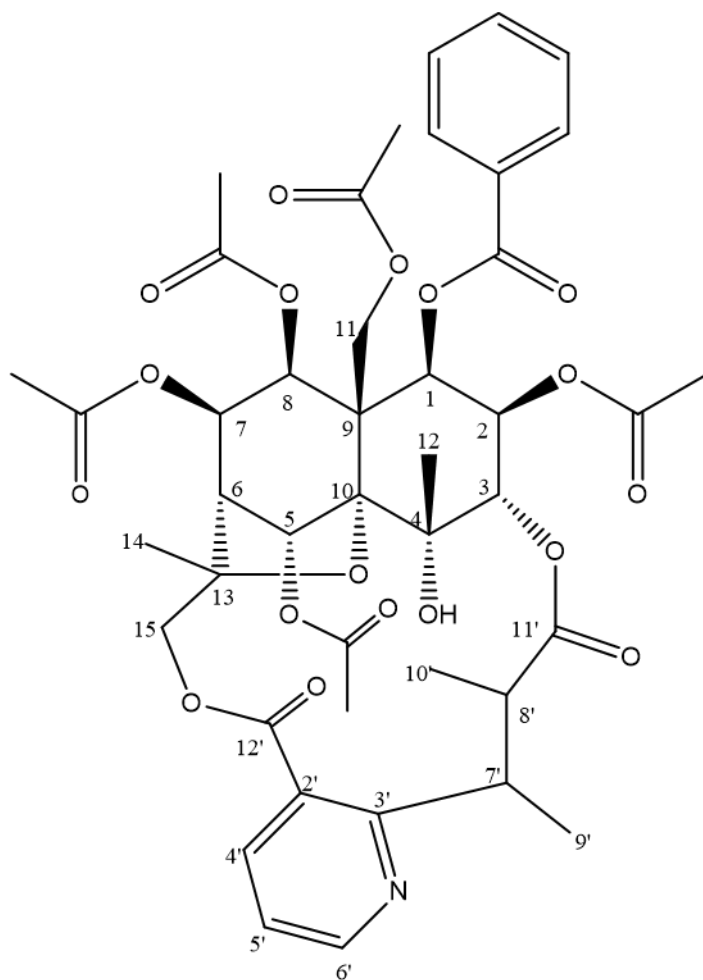


Tabela 9. Comparação dos dados espectrais de RMN ^1H e ^{13}C de MDR4 em CDCl_3 com os valores da literatura

MDR4			ITOKAWA, 1993	
C	^1H	^{13}C	^1H	^{13}C
1	5.85 (d, $J = 4.1$ Hz; 1H)	73.45	5.89 (d, $J = 4.1$; 1H)	73.60
2	5.32 (dd, $J = 4.2, 2.4$; 1H)	69.10	5.35 (dd, $J = 2.4, 4.1$; 1 H)	69.32
3	4.77 (d, $J = 2.4$; 1H)	75.60	4.80 (d, $J = 2.4$; 1 H)	75.78
4	-	70.54	4.51 (d, $J = 1.1$; 1H)	70.70
5	7.03 (s, 1 H)	73.76	7.05 (s, 1 H)	73.97
6	2.34 (d, $J = 4.5$ Hz, 1H)	50.39	2.36 (d, $J = 4.1$; 1H)	50.58
7	5.49 (dd, $J = 5.9, 4.2$; 1H)	68.85	5.53 (dd, $J = 5.8, 4.1$; 1H)	69.05
8	5.39 (d, $J = 6.0$; 1H)	71.29	5.42 (d, $J = 5.8$; 1 H)	71.50
9	-	52.47	-	52.69
10	-	94.05	-	94.21
11	4.63 (d, $J = 13.6$ Hz, 1HA)	59.98	4.66 (d, $J = 13.5$; 1HA)	60.16
12	5.32 (d, $J = 13.5$ Hz, 1HB)	22.84	5.35 (d, $J = 13.5$, 1-HB)	23.00
13	1.56 (d, $J = 1.3$ Hz, 3H)	84.35	1.59 (d, $J = 1.1$; 3H)	84.47
14	-	18.44	-	18.53
15	1.70 (s, 3H)	69.92	1.72 (s; 3H)	70.07
	3.69 (d, $J = 11.6$, 1HA)		3.72 (d, $J = 11.3$; 1HA)	
	5.94 (d, $J = 11.5$ Hz, 1HB)		5.96 (d, $J = 11.3$; 1HA)	
2'	-	164.50	-	164.64
3'	-	124.99	-	125.19
4'	8.06 (dd, $J = 7.8, 1.8$; 1H)	137.75	8.08 (dd, 1.8, 7.8; 1H)	137.84
5'	7.25 (dd, $J = 7.8, 4.9$; 1H)	121.09	7.27 (dd, $J = 7.8, 4.8$; 1H)	121.19
6'	8.68 (dd, $J = 4.9$; 1,8 Hz; 1H)	151.48	8.71 (dd, 1.8, 4.8; 1H)	151.62
7'	4.63 (m; 1H)	36.42	4.66 (q, $J = 7.0$; 1H)	36.66
8'	2.58 (dd, $J = 7.1, 1.1$ Hz, 1H)	44.92	2.62 (q, $J = 7.1$; 1H)	45.04
9'	1.38 (d, $J = 7.1$ Hz, 3H)	11.89	1.41 (d, $J = 7.0$; 3H)	12.06
10'	1.19 (d, $J = 7.1$ Hz; 3H)	9.80	1.23 (d, $J = 7.1$; 3H)	9.90
11'	-	173.96	-	174.09
12'	-	168.60	-	168.60
2-OAc	2.13 (s; 3H)	20.97/168.23	2.16 (s; 3H)	21.04/168.31
5-OAc	2.19 (s; 3H)	21.65/169.87	2.22 (s; 3H)	21.72/169.96
7-OAc	2.10 (s; 3H)	20.90/169.93	2.12 (s; 3H)	20.95/170.02
8-OAc	1.37 (s; 3H)	19.96/168.87	1.40 (s; 3H)	19.96/168.96
11-OAc	2.32 (s; 3H)	21.38/170.35	2.34 (s; 3H)	21.46/170.4
1-OBz	-	165.31	-	165.46
<i>ipso</i>	-	129.05	-	129.29
<i>orto</i>	7.78 (dd, $J = 8.4, 1.3$; 2H)	129.45	7.81 (dd, 1.4, 8.4, 2H)	129.61
<i>meta</i>	7.37 (t, $J = 7.4$ Hz, 2H)	128.49	7.39 (t-like, 7.8; 2H)	128.60
<i>para</i>	7.51 (t, $J = 7.4$ Hz, 1H)	133.45	7.54 (tt-like, 1.2, 7.5; 1H)	133.55

Figura 58. Espectro de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) de ^1H de MDR4 (CDCl_3 , 500 MHz)

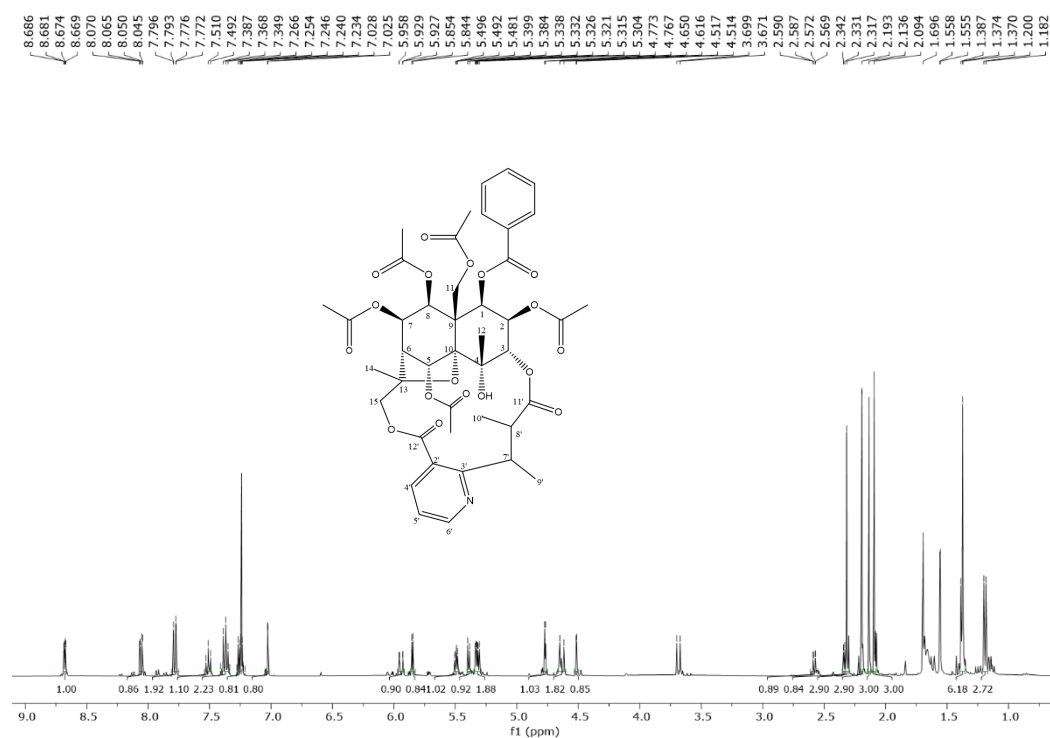


Figura 59. Expansão do espectro de RMN de ^1H de MDR4 na região de 1,2-2,65 ppm (CDCl_3 , 500 MHz)

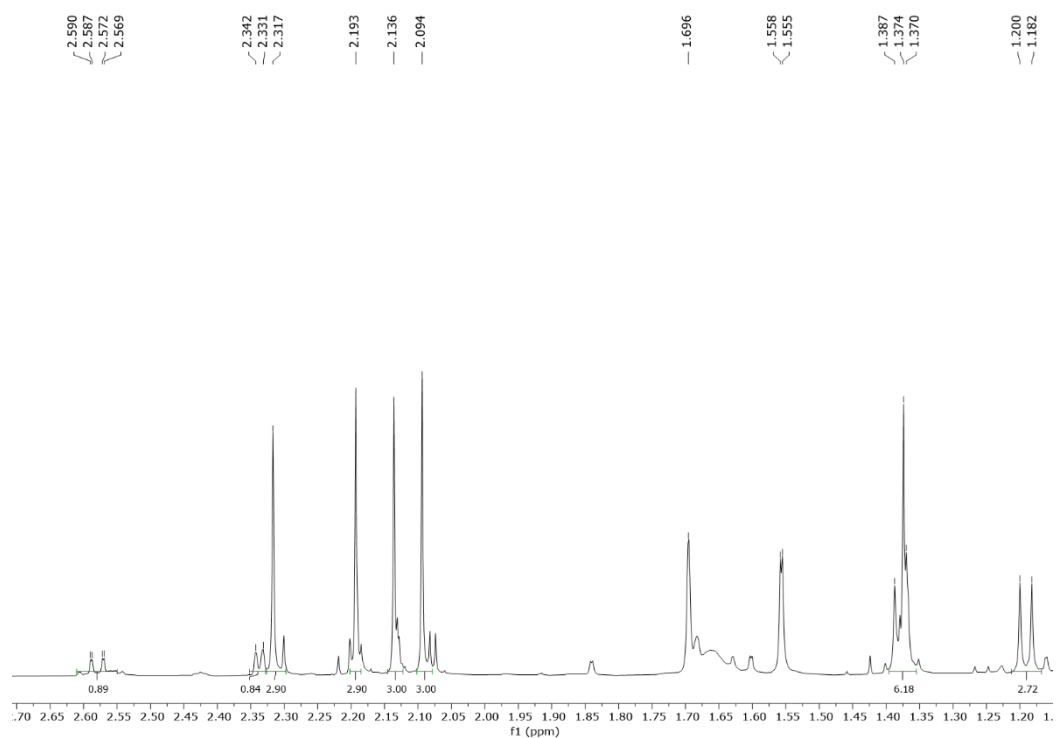


Figura 60. Expansão do espectro de RMN de ^1H de MDR4 na região de 3,7-6,0 ppm (CDCl_3 , 500 MHz).

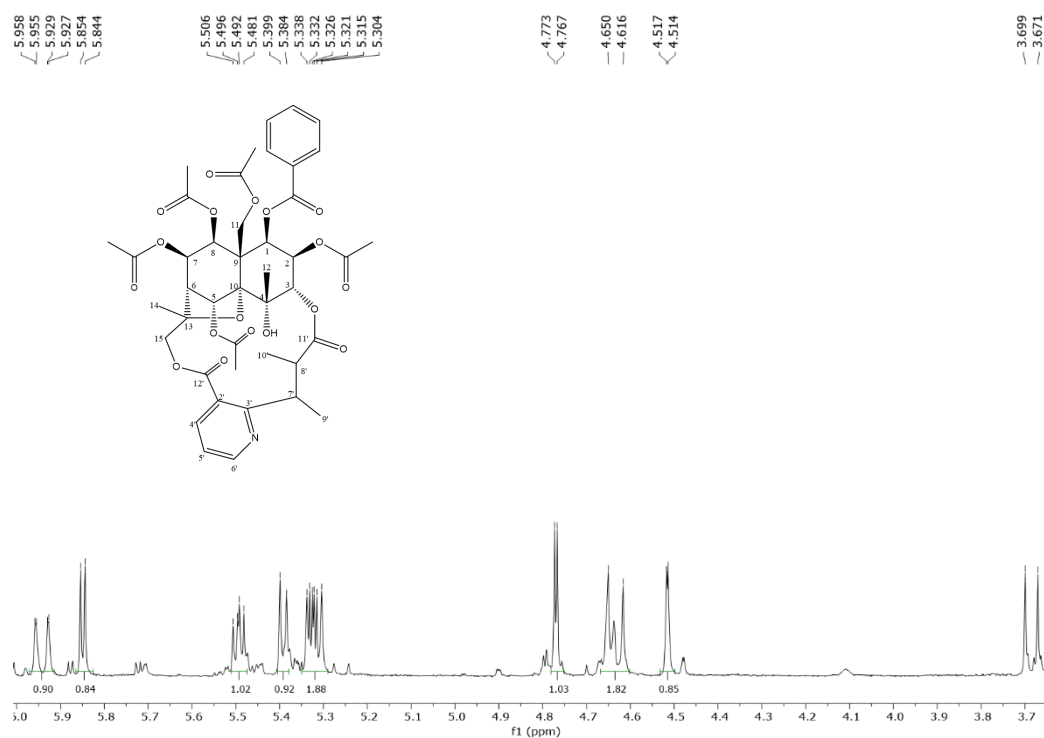


Figura 61. Expansão do espectro de RMN de ^1H de MDR4 na região de 7,0-8,8 ppm (CDCl_3 , 500 MHz).

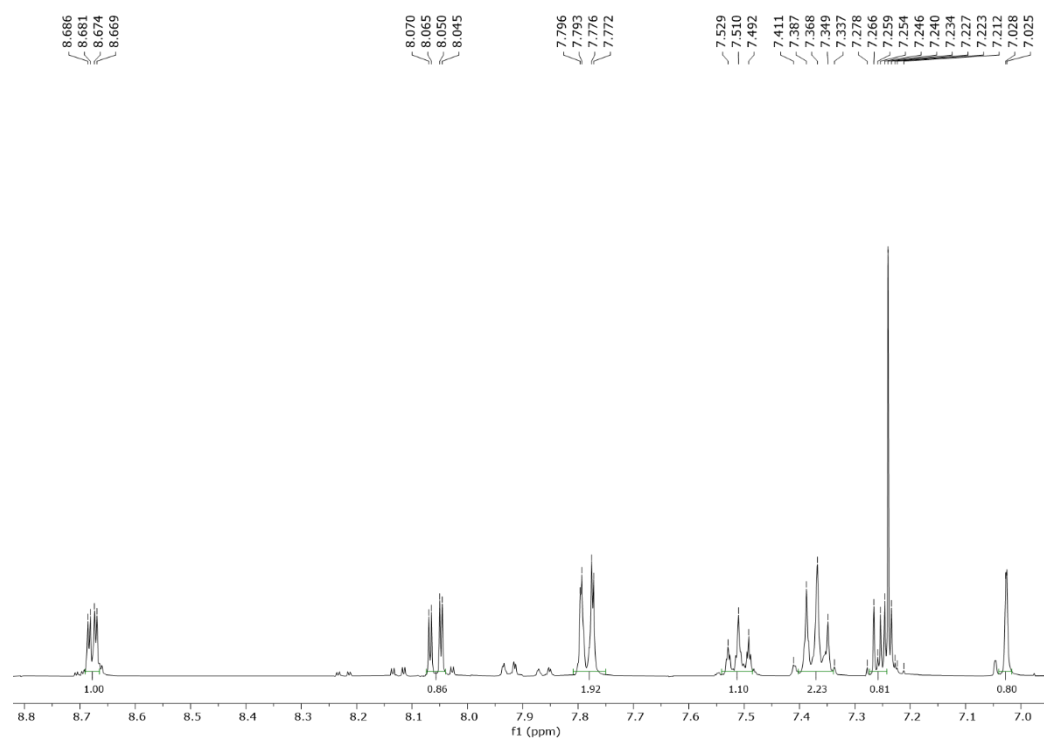


Figura 62. Espectro de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) de ^{13}C de MDR4 (CDCl_3 , 125 MHz)

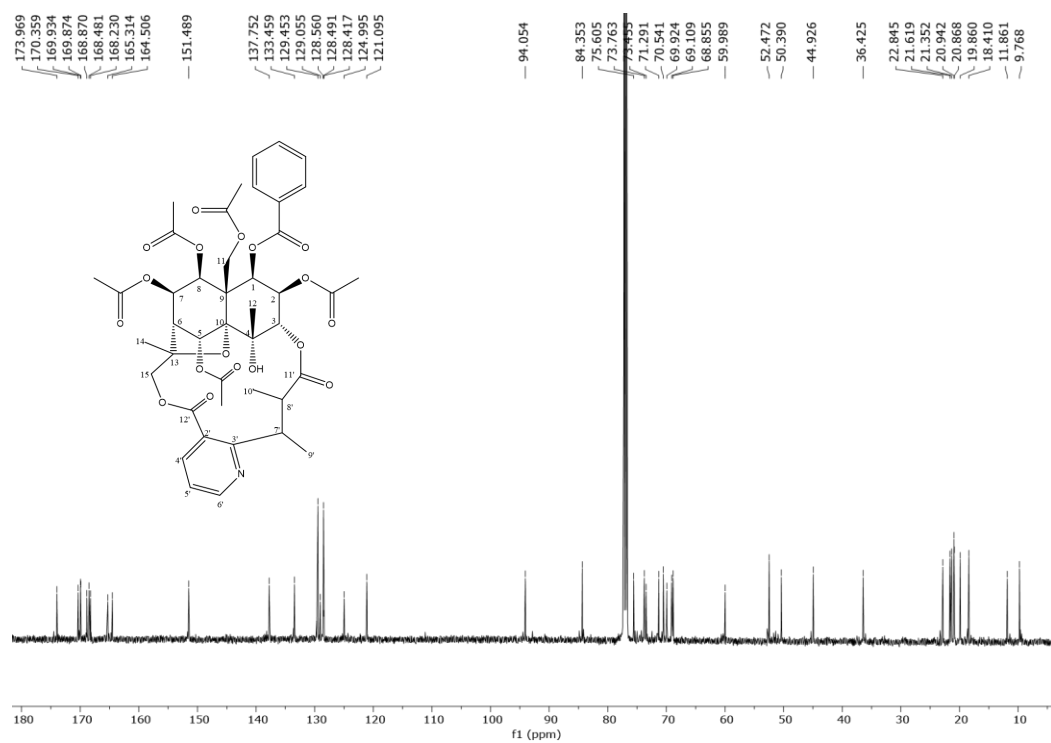


Figura 63. Expansão do espectro de RMN de ^{13}C de MDR4 na região de 9,5-24,5 ppm (CDCl_3 , 500 MHz)

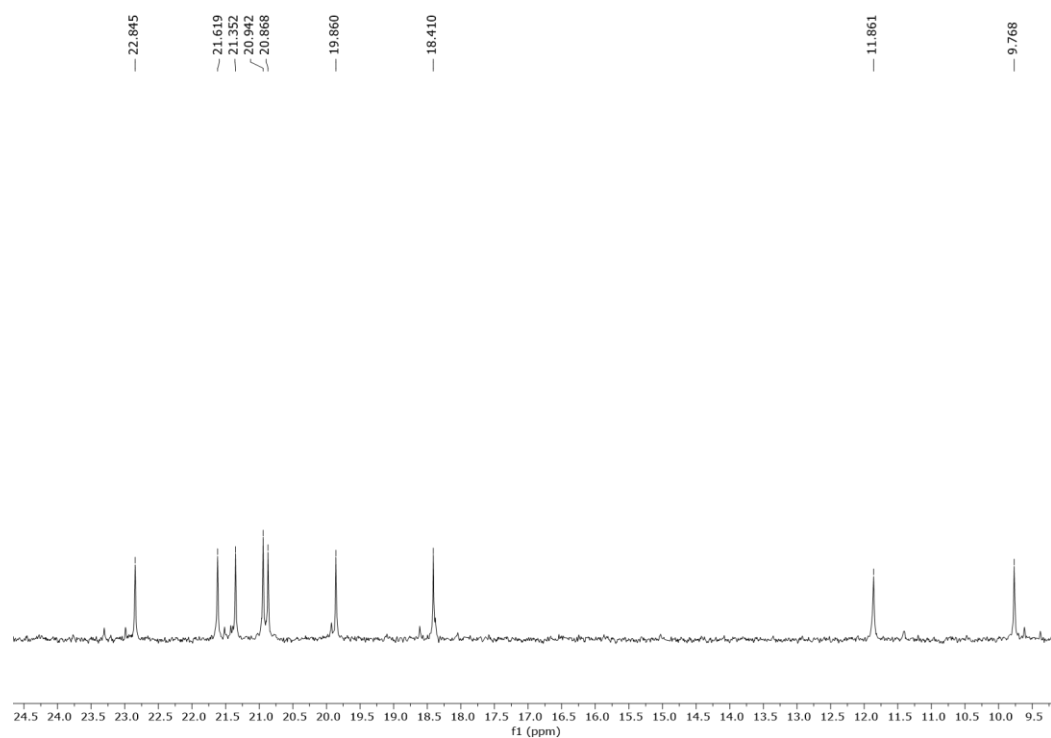


Figura 64. Expansão do espectro de RMN de ^{13}C de MDR4 na região de 36-98 ppm (CDCl_3 , 125 MHz).

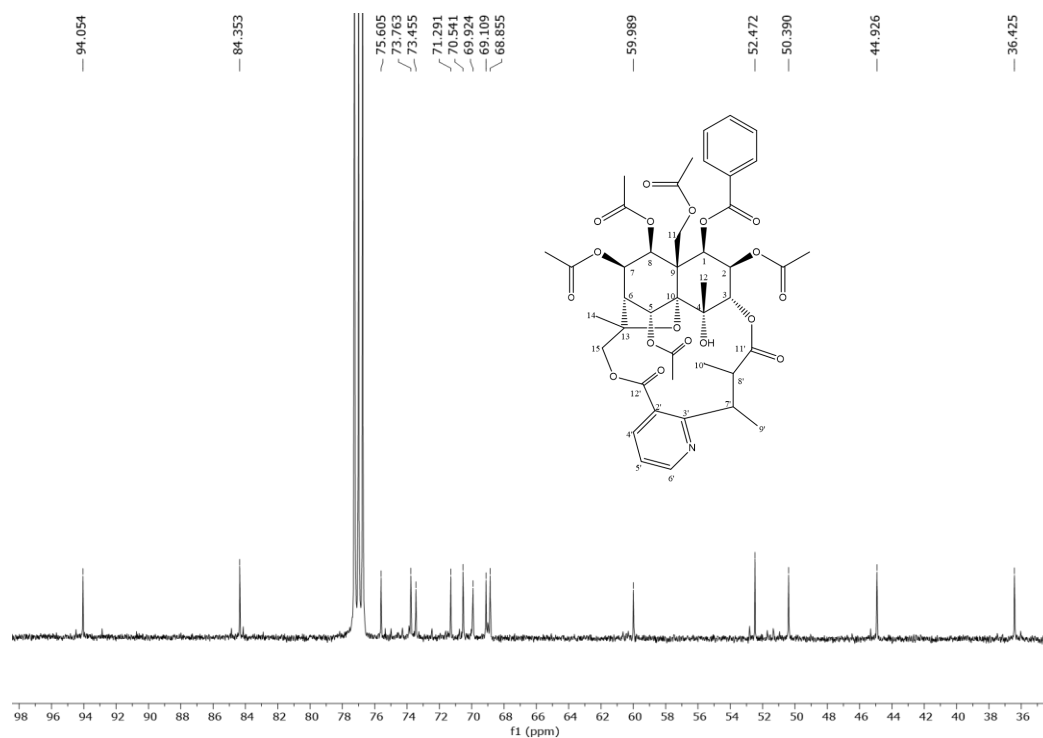
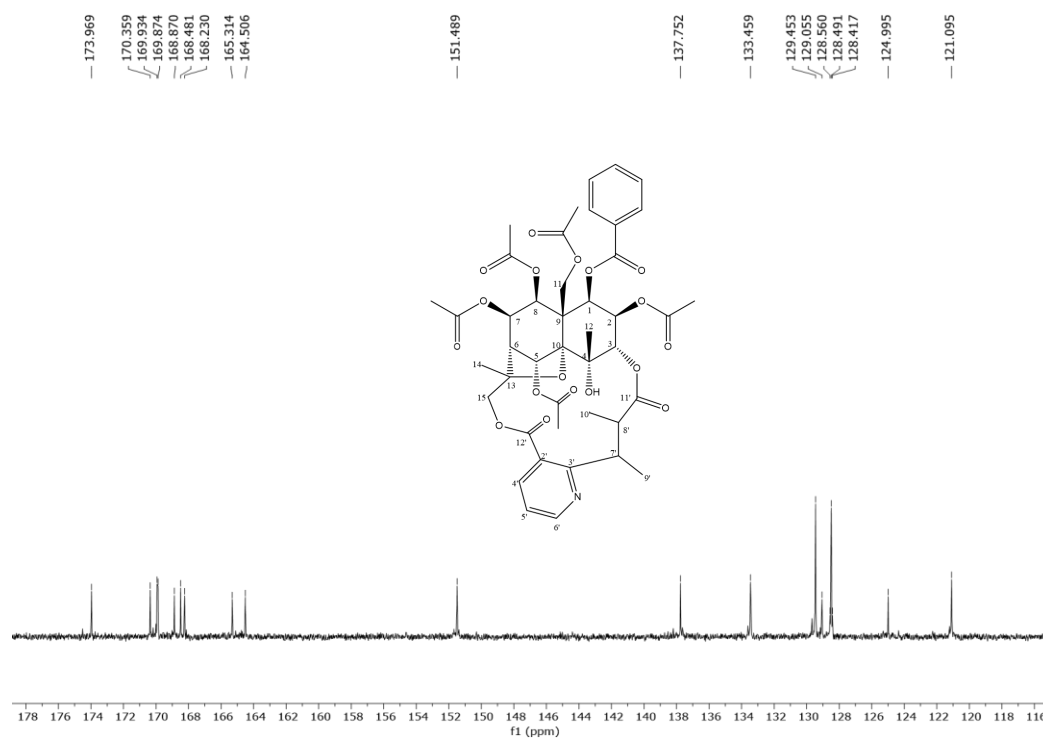


Figura 65. Expansão do espectro de RMN de ^{13}C de MDR4 na região de 116-178 ppm (CDCl_3 , 125 MHz).



5.2.5 Identificação estrutural de MDR5

A substância codificada como MDR5 foi isolada na forma de um pó amorfo incolor, solúvel em clorofórmio, apresentando uma massa de 1,5 mg representando 0,00024% do EEB.

Ao analisar o espectro de RMN de ^1H e ^{13}C de MDR5 foi possível verificar deslocamentos químicos semelhantes com MDR4. No espectro de RMN de ^1H foram visualizados os deslocamentos químicos δ_{H} 1,85 (s; 3H), 1,69 (s, 3H) característicos de hidrogênios metílicos, os deslocamentos químicos δ_{H} 5,89 (d, $J = 3,9$ Hz; 1H), 5,37 (m, 1H), 4,78 (d, $J = 2,6$ Hz; 1H), 5,46 (d, $J = 2,8$ Hz; 1H), 5,48 (dd, $J = 6,0, 4,0$ Hz; 1H), 5,37 (d, $J = 6,5$, 1H) característicos de hidrogênios oximetínicos, os deslocamentos químicos δ_{H} 4,69 (d, $J = 13,3$ Hz; 1HA), 5,27 (d, $J = 13,3$ Hz; 1HB); 3,68 (d, $J = 11,9$ Hz; 1HA), 6,05 (d, $J = 11,9$ Hz; 1HA) característicos de hidrogênios oximetilênicos, bem como a presença dos deslocamentos químicos δ_{H} 2,14 (s; 3H), 2,08 (s; 3H), 1,37 (s; 3H), 2,21 (s; 3H) característicos de hidrogênios de ésteres carbonílicos e sinais característicos de um grupo benzoato 7,79 (dd, $J = 8,3, 1,2$ Hz, 1H), 7,36 (t, $J = 7,7$ Hz, 2H), 7,51 (t, $J = 7,4$ Hz; 1H). Esses dados mostram a presença de um sesquiterpeno dihidroagarofurano. Este espectro ainda revelou deslocamentos químicos característicos de um grupo piridínico do tipo evoninato δ_{H} 8,13 (dd, $J = 7,8, 1,8$ Hz; 1H), 7,27 (dd, $J = 7,8, 4,8$ Hz; 1H), 8,69 (dd, $J = 4,9, 1,8$ Hz; 1H), 4,80 (d, $J = 7,0$ Hz; 1H), 2,56 (d, $J = 7,2$ Hz; 1H), 1,40 (d, $J = 7,0$ Hz; 1H), 1,16 (d, $J = 7,1$ Hz; 1H).

Analisando o espectro de RMN de ^{13}C revelou a presença dos deslocamentos químicos de δ_{C} 18,63; 20,89; 20,96; 23,32; 21,54 que foram atribuídos a carbonos metílicos, os deslocamentos químicos δ_{C} 69,02; 73,29; 74,31; 74,99 atribuídos aos carbonos oximetínicos e δ_{C} 51,73 atribuído a um carbono metínico. Também foram visualizados os sinais δ_{C} 60,66 e 70,79 característicos de hidrogênios oximetilênicos, bem como, a presença de quatro sinais de carbonos não hidrogenados δ_{C} 51,36; 72,47; 84,90; 92,89. A presença dos deslocamentos químicos δ_{C} 168,15; 168,84; 169,90; 169,91 sugere a presença de quatro ésteres carbonílicos e também foram visualizados o conjunto de sinais δ_{C} 164,76; 129,46; 129,46; 128,43; 133,40. Dessa forma, com esses dados e juntamente com os sinais de ^1H confirmam a presença de um núcleo sesquiterpeno dihidroagarofurano com quatro acetatos e um benzoato. A presença do grupo piridínico foi confirmada através dos onze sinais no RMN de ^{13}C , dois sinais foram atribuídos a carbonos metílicos (δ_{C} 11,39; 9,62), cinco sinais foram atribuídos a carbonos metínicos (δ_{C} 138,21; 121,22; 151,70; 36,06; 45,34) e quatro sinais de carbonos não hidrogenados (δ_{C} 165,80; 124,37; 173,26; 168,8).

A posição dos grupos benzoato e acetato, MDR5 apresentou o mesmo padrão de substituição que MDR1, os padrões de sinais que confirmam a presença do grupo benzoato em 1 causando a proteção do acetato na posição 8. A ausência do sinal em aproximadamente δ_H 7 ppm indica ausência de um grupo acetil na posição 5, em contrapartida, a presença δ_H 5,46 (d, $J = 2,8$ Hz; 1H) sugere que na posição 5 encontra-se uma hidroxila. Essas informações foram confirmadas ao analisar os espectros de RMN de HMBC por meio das correlações entre H-1 δ_H 5,89 (d, $J = 3,9$ Hz; 1H) com C-9 (δ_C 51,36), C-8 (δ_C 71,48), C-11 (δ_C 60,66), 1-OBz (δ_C 164,76, entre H-11 δ_H 4,69 (d, $J = 13,3$ Hz; 1HA), δ_H 5,27 (d, $J = 13,3$ Hz; 1HB) com C-9 (δ_C 51,36), C-8 (δ_C 71,48) e H-8 (δ_H 5,37 (m, 1H) com C-9 (δ_C 51,36), C-1 (δ_C 73,29), C-11 (δ_C 60,66), C-8OAc (δ_C 168,84). As demais correlações são observadas na tabela 10.

A união do sesquiterpeno e do alcaloide piridínico foi confirmado pelas correlações no espectro de bidimensional HMBC através das correlações entre os mapas de contornos de H-15 δ_H 3,68 (d, $J = 11,9$ Hz; 1HA), 6,05 (d, $J = 11,9$ Hz; 1HA) com C-12' (δ_C 168,82), juntamente com a correlação de H-3 δ_H 4,78 (d, $J = 2,6$ Hz; 1H) com C-11' (δ_C 173,26) e confirmar que MDR5 trata-se de um alcaloide sesquiterpênico piridínico. Com base nas informações de 1H , ^{13}C , bidimensionais descritas acima e em comparação com dados da literatura foi possível identificar MDR5 como sendo a euojaponina A, isolado pela primeira vez em *M. distichophylla* (Figura 66).

Figura 66. Euojaponina A (MDR5) isolado de *Maytenus distichophylla*

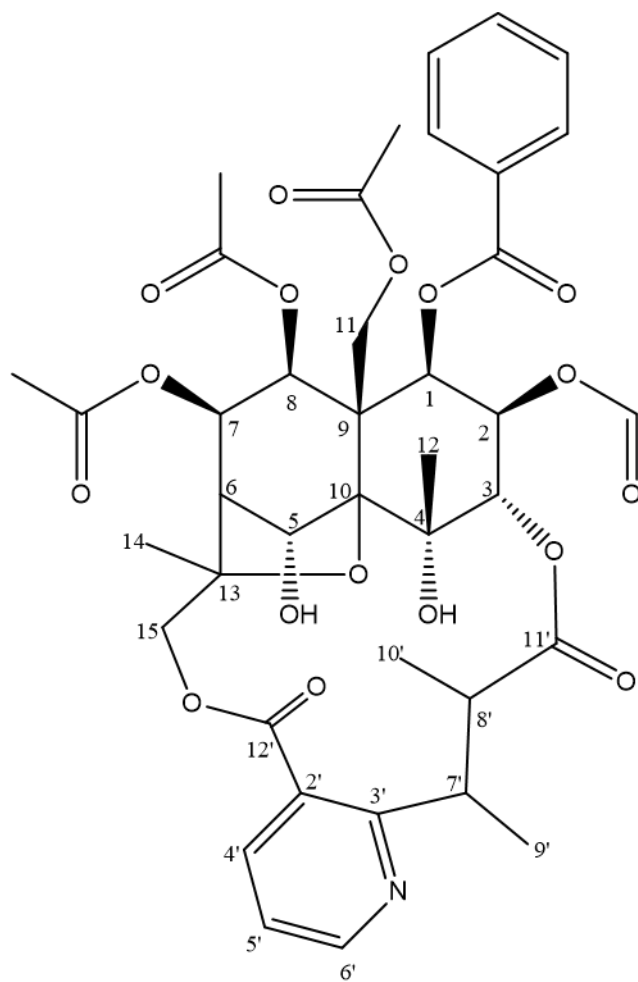


Tabela 10. Comparação dos dados espectrais de RMN ^1H e ^{13}C de MDR5 em CDCl_3 com os valores da literatura

HMQC			HMBC		HAN,1990	
C	^1H	^{13}C	2J	3J	^1H	^{13}C
1	5,89 (d, $J = 3,9$ Hz; 1H)	73,29	C-9	C-1OBz, C-8, C-11	5,90 (d, $J = 3,9$; 1H)	73,25
2	5,37 (m, 1H)	69,02			5,38 (dd, $J = 3,9, 5,5$; 1H)	68,98
3	4,78 (d, $J = 2,6$ Hz; 1H)	74,99		C-1, C-10, C-11'	4,80 (d, $J = 2,6$; 1H)	75,04
4	5,71 (s; 1H)	72,47	C-12		-	72,46
5	5,46 (d, $J = 2,8$ Hz; 1H)	74,31		C-9, C-13	5,47 (d, $J = 3,1$; 1H)	74,28
6	2,43 (d, $J = 4,0$ Hz; 1H)	51,73		C-8	2,45 (d, $J = 4,0$; 1H)	51,72
7	5,48 (dd, $J = 6,0, 4,0$ Hz; 1H)	69,02		C-7OAc	5,50 (dd, $J = 5,6, 4,0$; 1H)	68,98
8	5,38 (d, $J = 6,5$ Hz; 1H)	71,48	C-9	C-1, C-8, C-11, C-8OAc	5,39 (dd, $J = 5,6$; 1H)	71,48
9	-	51,36			-	51,36
10	-	92,89			-	92,93
					4,70 (ABq, $J = 13,4$; 1HA)	
11	4,69 (d, $J = 13,3$ Hz; 1HA) 5,27 (d, $J = 13,3$ Hz; 1HB)	60,66	C-9	C-8, C-10	5,28 (ABq, $J = 13,4$; 1HB)	60,63
12	1,85 (s; 3H)	23,32		C-3, C-4, C-10	1,86 (s; 1H)	23,31
13	-	84,90			-	84,84
14	1,69 (s, 3H)	18,63	C-13	C-6, C-15	1,71 (s; 1H)	18,60
15	3,68 (d, $J = 11,9$ Hz; 1HA) 6,05 (d, $J = 11,9$ Hz; 1HA)	70,79		c-12'	3,68 (d, $J = 11,9$; 1HA) 3,68 (d, $J = 11,9$; 1HA)	70,93
2'	-	165,80			-	165,49
3'	-	124,37			-	124,65
4'	8,13 (dd, $J = 7,8, 1,8$; 1H)	138,21		C-2', C-6'	8,19 (dd, $J = 7,8, 1,8$; 1H)	138,75
5'	7,27 (dd, $J = 7,8, 4,8$; 1H)	121,22	C-6'	C-3'	7,33 (dd, $J = 7,8, 4,8$; 1H)	121,45
6'	8,69 (dd, $J = 4,9, 1,8$; 1H)	151,70		C-2'	8,74 (dd, $J = 4,8, 1,8$; 1H)	151,23
7'	4,80 (d, $J = 7,0$; 1H)	36,06	C-2'	C-11'	4,82 (q, $J = 7,0$; 1H)	36,03
8'	2,56 (d, $J = 7,2$; 1H)	45,34	C-10'		2,56 (q, $J = 7,1$; 1H)	45,32
9'	1,40 (d, $J = 7,0$; 1H)	11,39	C-7'	C-2', C-8'	1,42 (d, $J = 7,0$; 1H)	11,41
10'	1,16 (d, $J = 7,1$; 1H)	9,62	C-8'	C-11'	1,18 (d, $J = 7,1$; 1H)	9,74
11'	-	173,26			-	173,58
12'	-	168,82	C-2OAc		-	168,55
2-OAc	2,14 (s; 3H)	20,96/168,15	C-7OAc		2,15 (s; 3H)	20,92/168,10
7-OAc	2,08 (s; 3H)	20,89/169,91	C-8OAc		2,10 (s; 3H)	20,85/169,84
8-OAc	1,37 (s; 3H)	21,54/168,84	C-11OAc		1,40 (s; 3H)	21,50/168,78
11-OAc	2,21 (s; 3H)	21,54/169,90	C-2OAc		2,23 (s; 3H)	21,50/169,80
1-OBz	-	164,76			-	164,73
<i>ipso</i>	-	129,46			-	129,17
<i>orto</i>	7,79 (dd, $J = 8,3, 1,2$ Hz; 1H)	129,46			7,84 (t, $J = 8,5$; 2H)	129,44
<i>meta</i>	7,36 (t, $J = 7,7$ Hz; 2H)	128,43			7,42 (dd, $J = 7,5$ Hz; 2H)	128,40
<i>para</i>	7,51 (t, $J = 7,4$; 1H)	133,40			7,56 (dd, $J = 7,5$; 1H)	133,38

Figura 67. Espectro de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) de ^1H de MDR5 (CDCl_3 , 500 MHz)

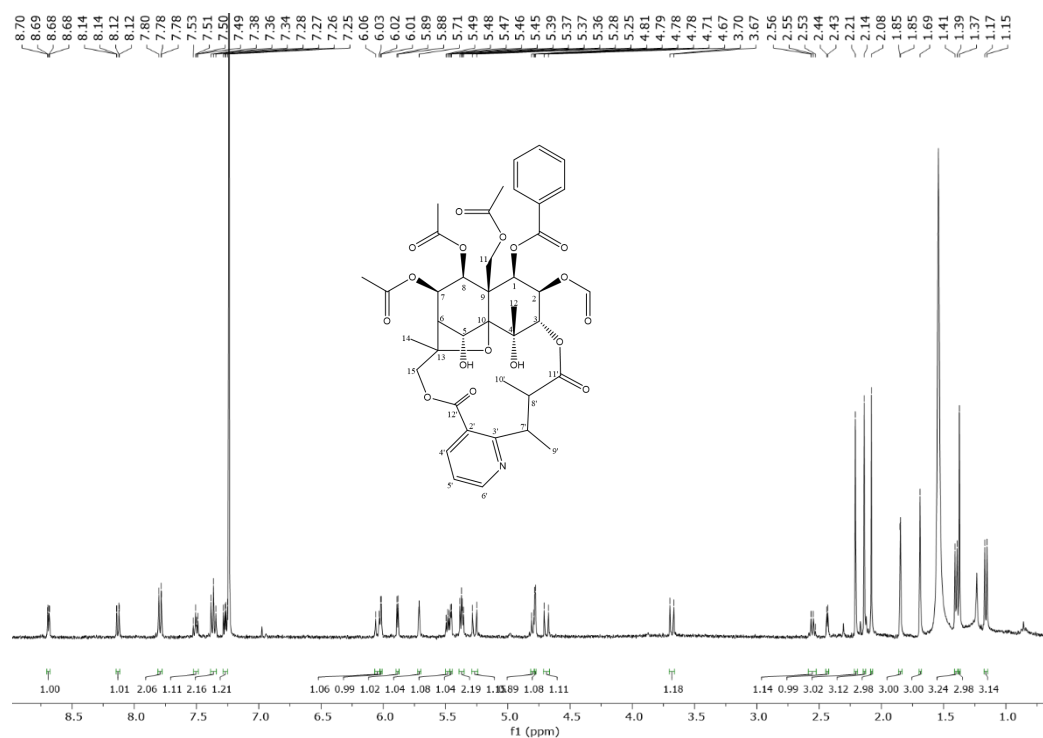


Figura 68. Expansão do espectro de RMN de ^1H de MDR5 na região de 1,1-2,6 ppm (CDCl_3 , 500 MHz).

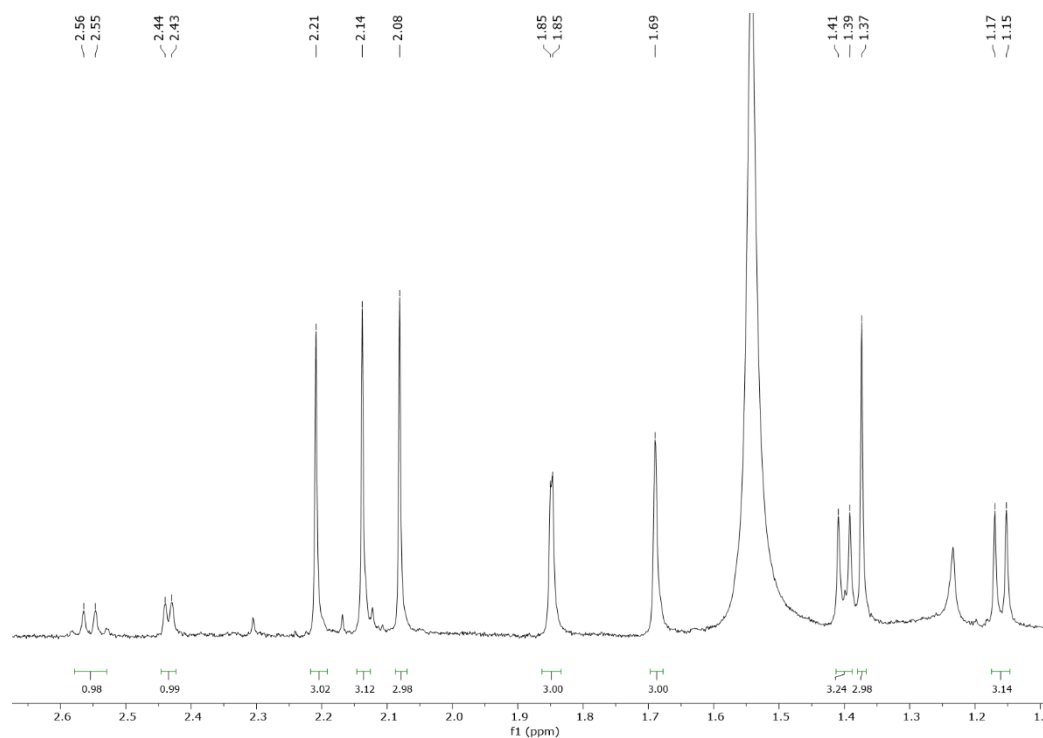


Figura 69. Expansão do espectro de RMN de ^1H de MDR5 na região de 3,6-6,1 ppm (CDCl_3 , 500 MHz).

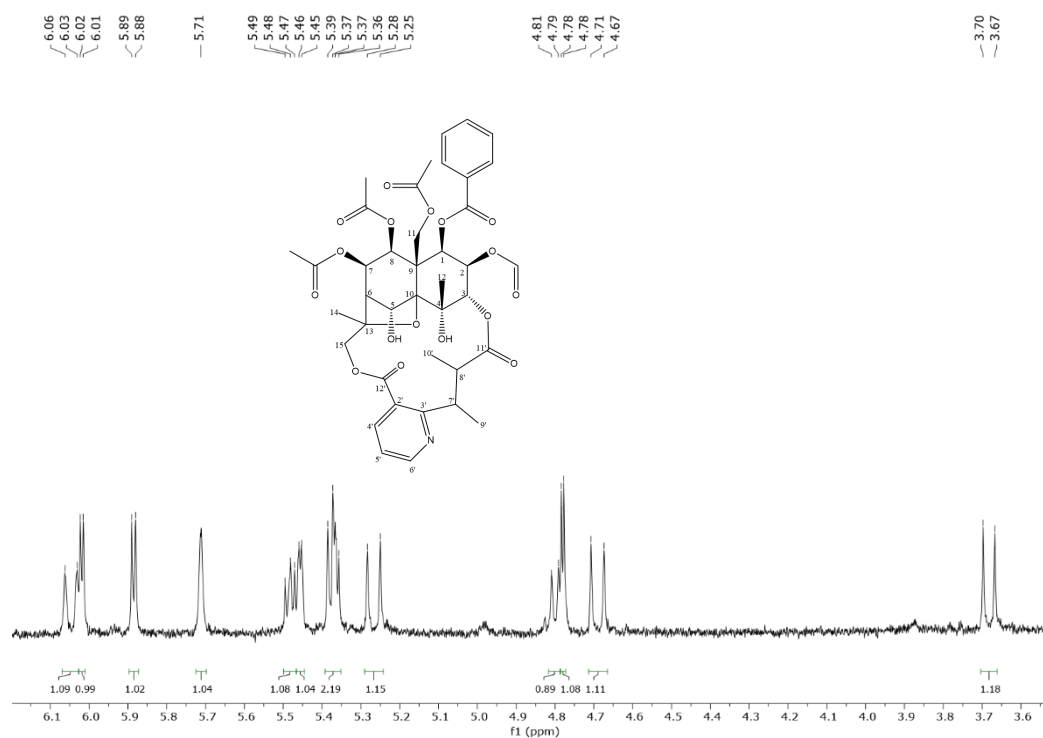


Figura 70. Expansão do espectro de RMN de ^1H de MDR5 na região de 7-8,8 ppm (CDCl_3 , 500 MHz).

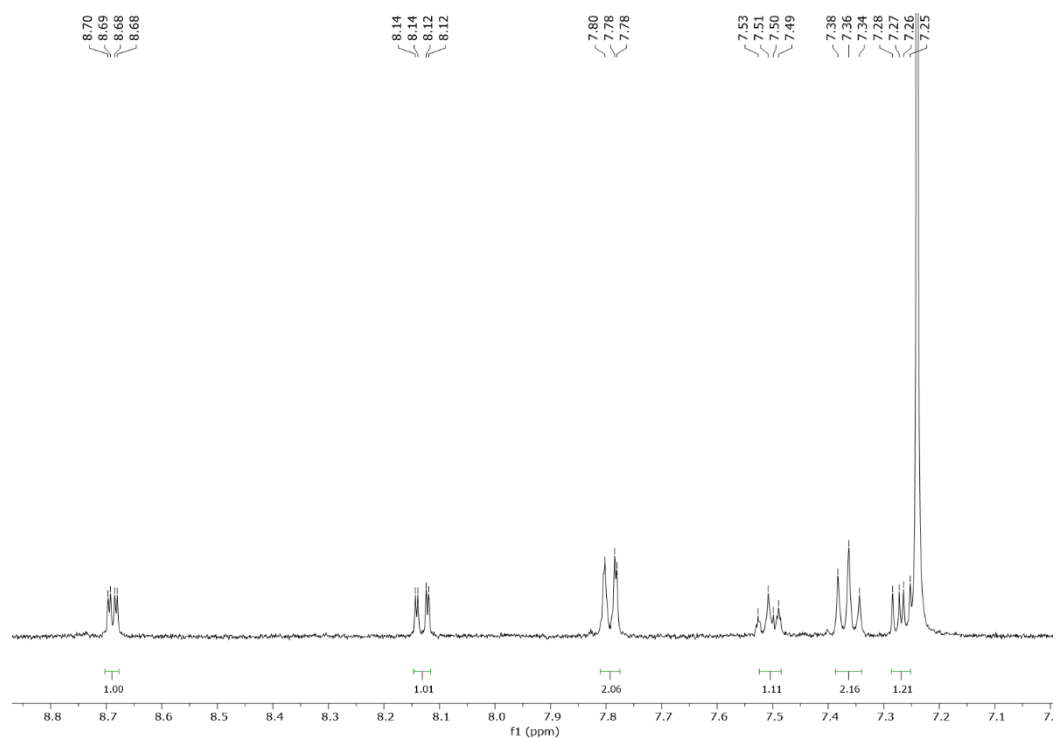


Figura 71. Espectro de Ressonância Magnética Nuclear de ^{13}C BB de MDR5 (CDCl_3 , 125 MHz).

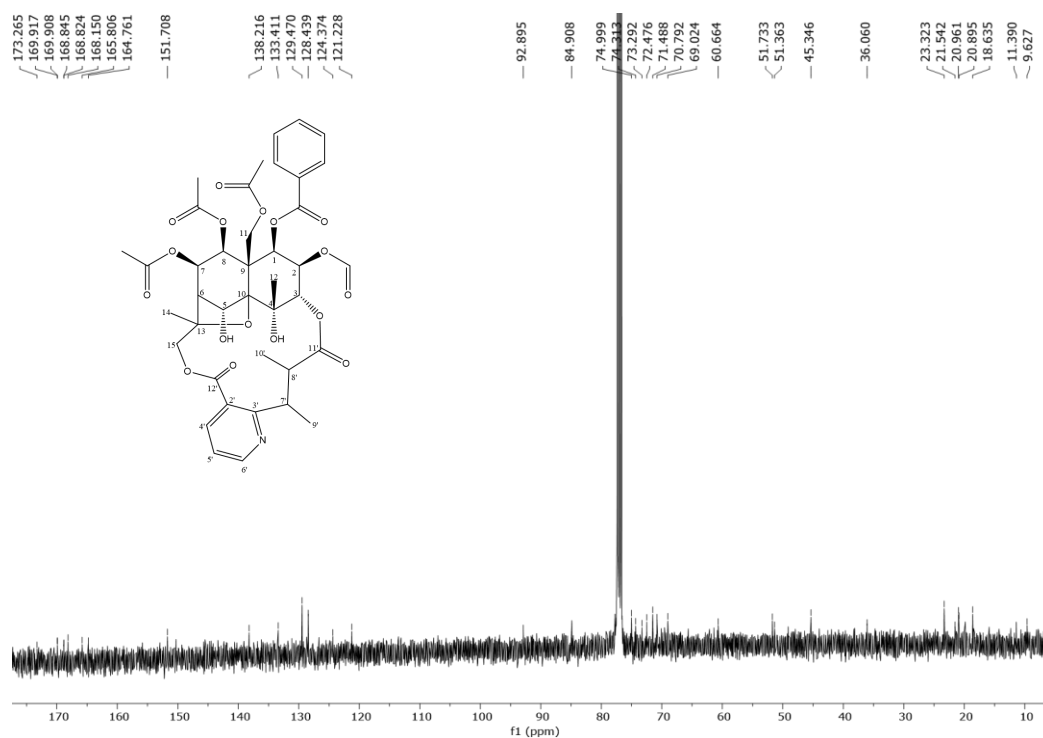


Figura 72. Expansão do espectro de RMN de ^{13}C de MDR5 na região de 6-51 ppm (CDCl_3 , 125 MHz).

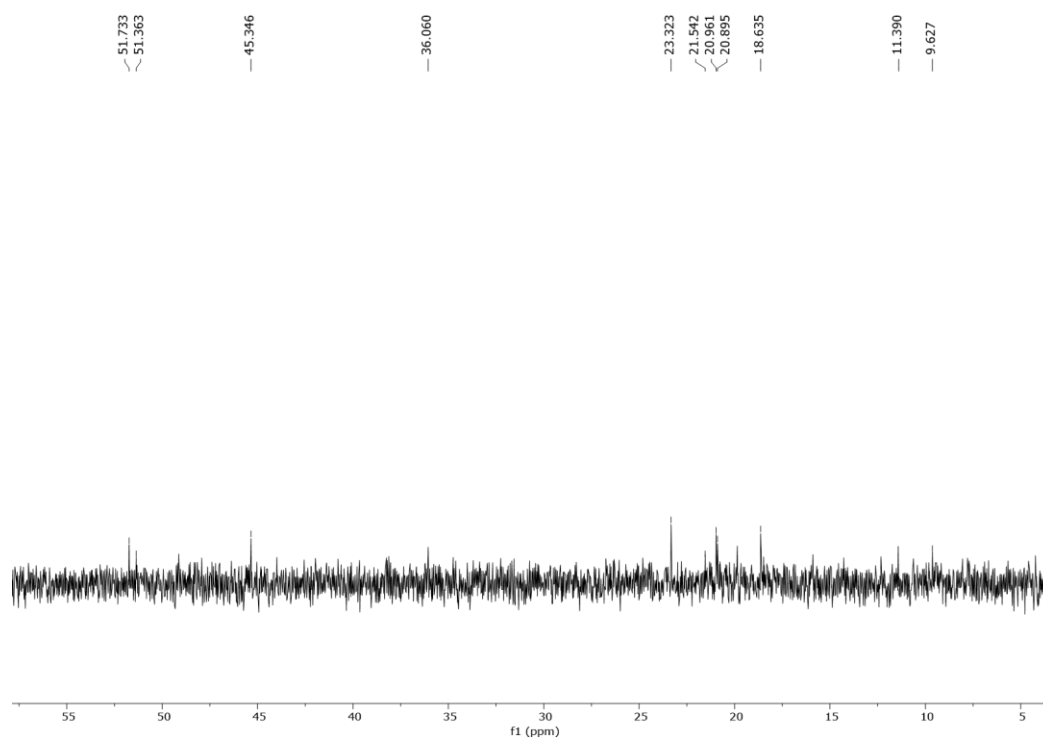


Figura 73. Expansão do espectro de RMN de ^{13}C de MDR5 na região de 6-51 ppm (CDCl_3 , 125 MHz).

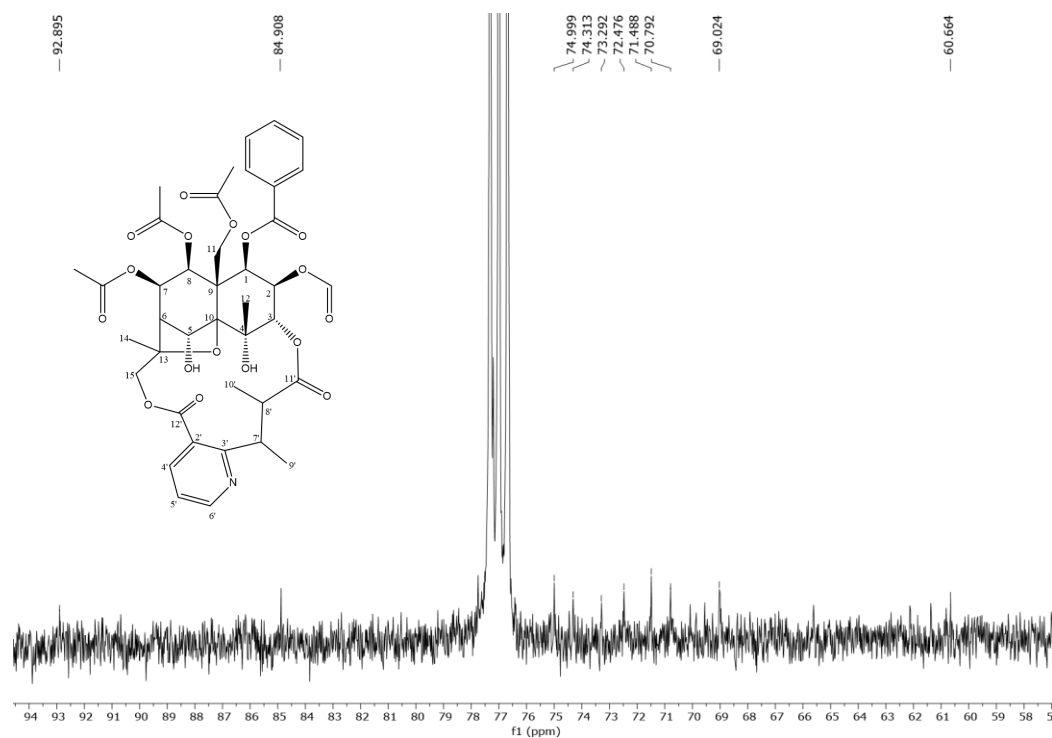


Figura 74. Expansão do espectro de RMN de ^{13}C de MDR5 na região de 120-175 ppm (CDCl_3 , 125 MHz).

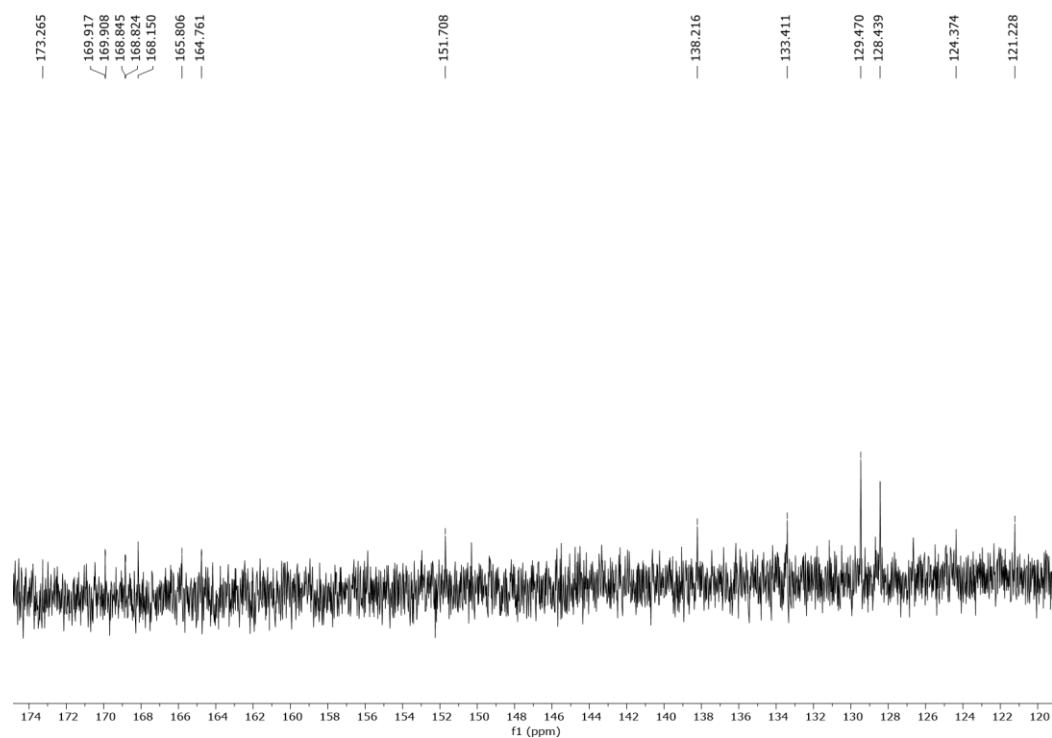


Figura 75. Espectro das correlações entre sinais de ^1H x ^{13}C -JCH-HMQC de MDR5 em CDCl_3 (500 MHz).

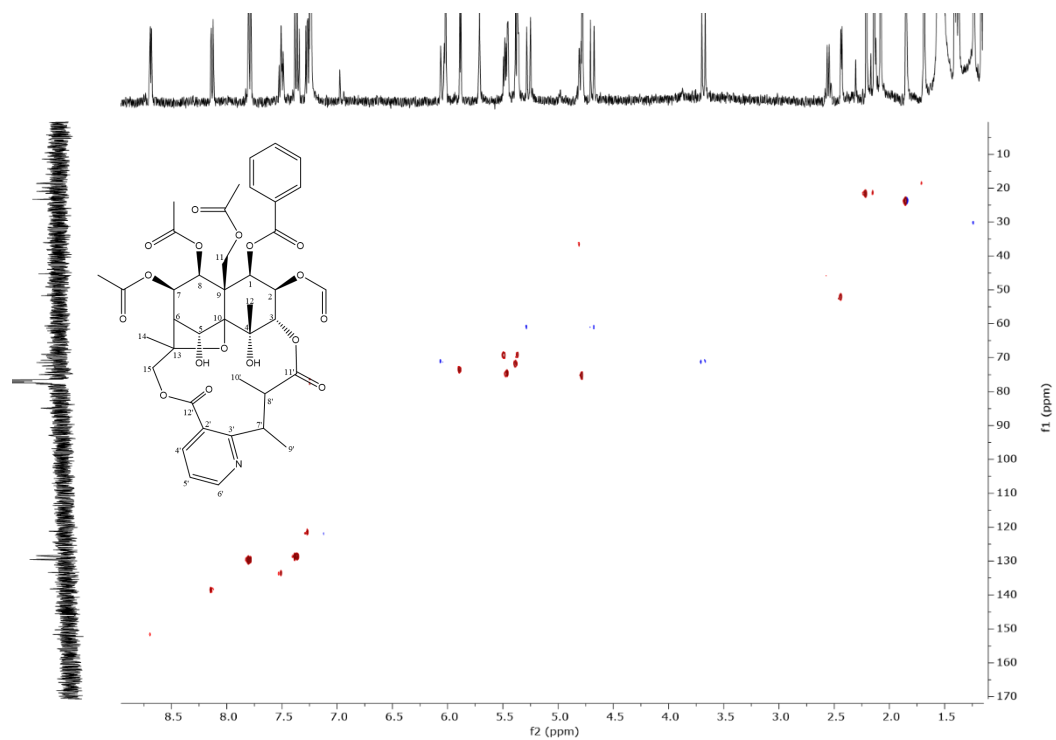


Figura 76. Espectro das correlações entre sinais de ^1H x ^{13}C -JCH-HMBC de MDR5 em CDCl_3 (500 MHz).

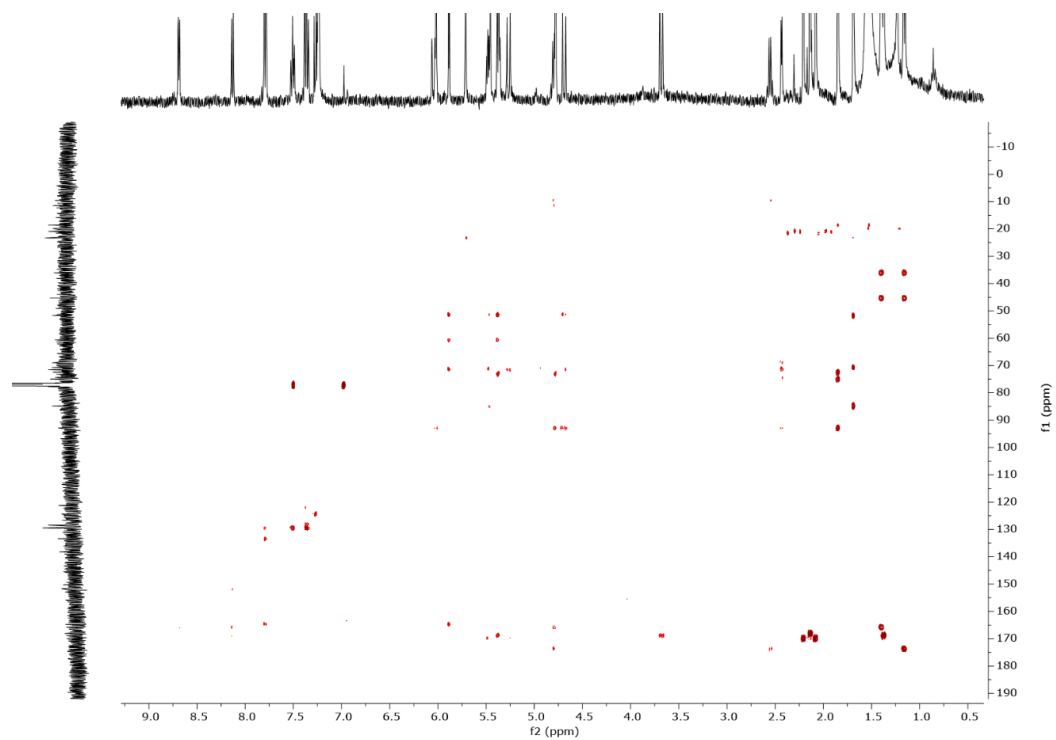


Figura 77. Espectro das correlações entre sinais de ^1H x ^{13}C - J_{CH} -HMBC de MDR5 em CDCl_3 (500 MHz).

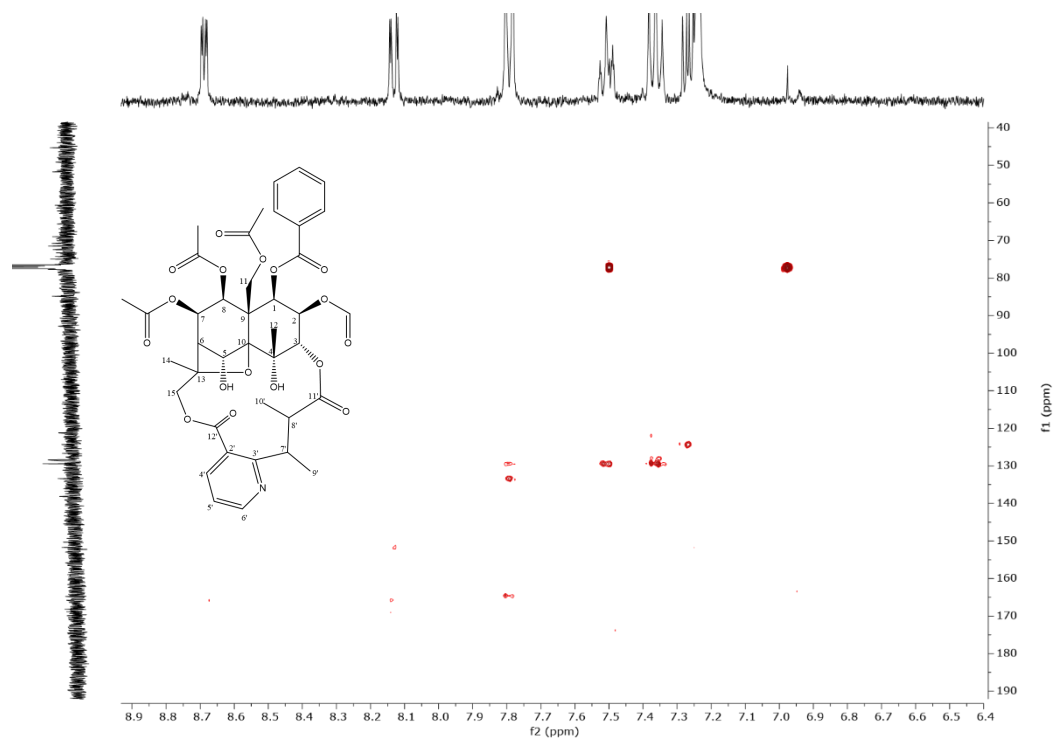


Figura 78. Espectro das correlações entre sinais de ^1H x ^{13}C - J_{CH} -HMBC de MDR5 em CDCl_3 (500 MHz).

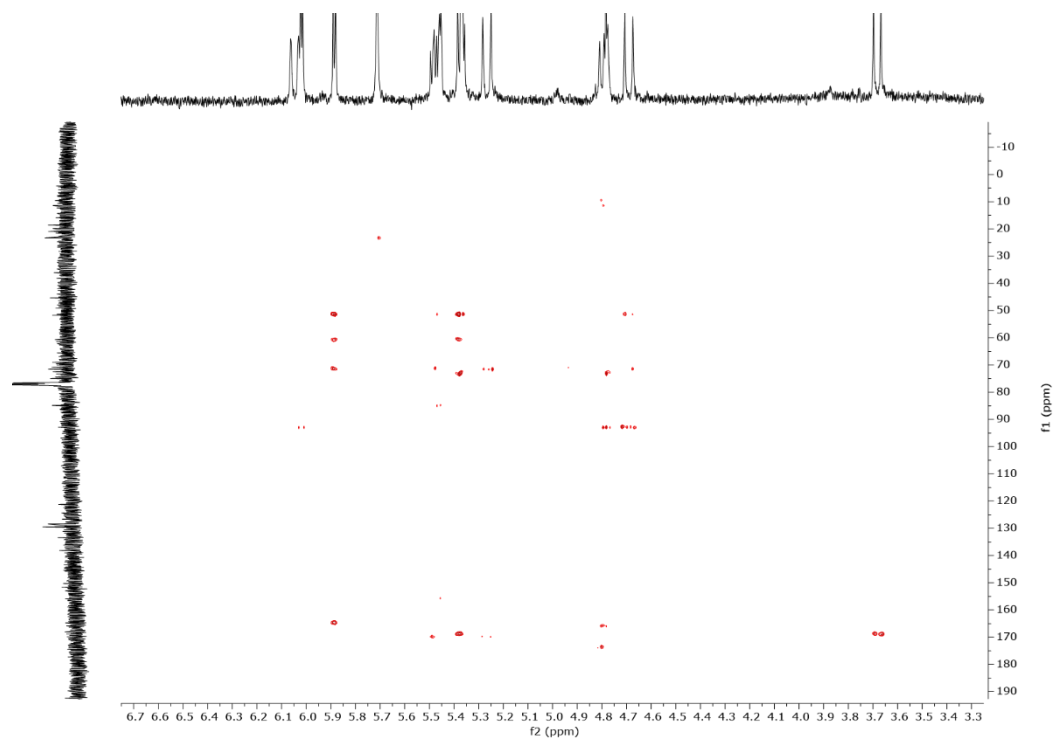
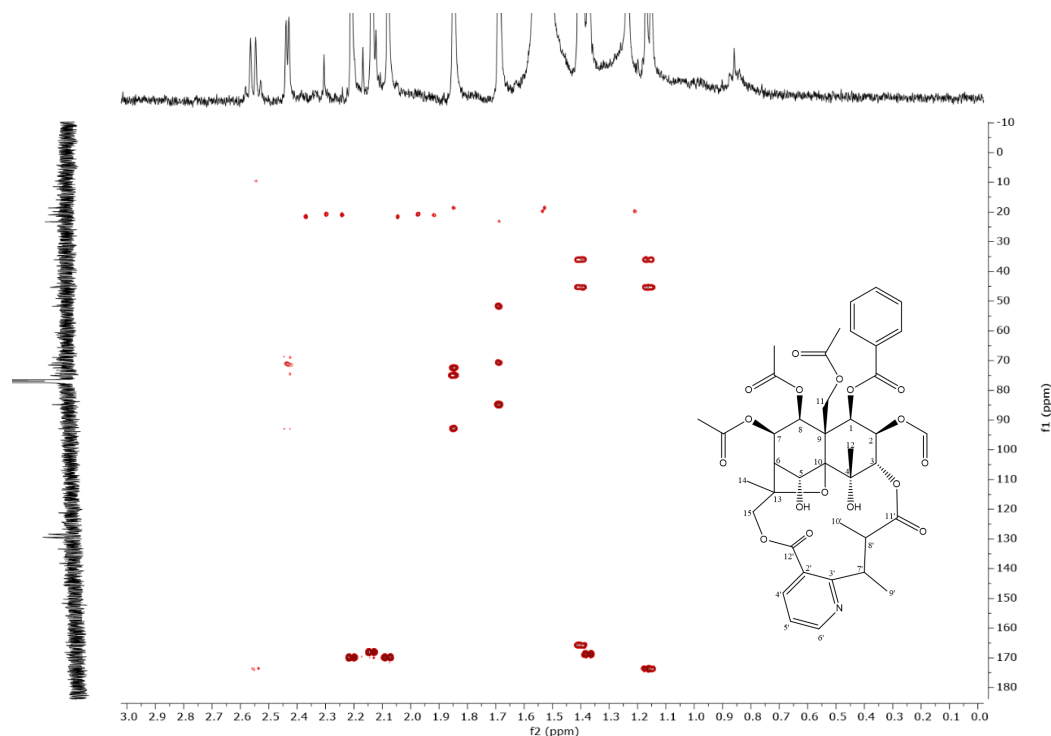


Figura 79. Espectro das correlações entre sinais de ^1H x ^{13}C -JCH-HMBC de MDR5 em CDCl_3 (500 MHz).



5.2.6 Identificação estrutural de MDR6

A substância codificada como MDR6 foi isolada na forma de um pó amorfo incolor, solúvel em clorofórmio, apresentando massa de 0,5 mg representando 0,00008% do EEB.

Ao analisar os espectros de RMN de ^1H , MDR6 apresentou sinais semelhantes a MDR4, no qual foram observados a presença de quatro singletos (δ_{H} 1,41, 3H; 2,15, 3H; 2,19, 3H; 2,35, 3H) característicos de grupos acetatos, a presença de um conjunto de sinais característicos de dois grupos benzoatos δ_{H} 7,81 (dd, $J = 8,4$; 1,4 Hz, 2H), δ_{H} 7,38 (t, $J = 7,8$ Hz, 2H); δ_{H} 7,53 (t, $J = 7,5$ Hz, 1H) e δ_{H} 8,31 (dd, $J = 8,4$; 1,3 Hz, 2H), δ_{H} 7,49 (t, $J = 7,7$ Hz, 1H), δ_{H} 7,58 (t, $J = 7,5$ Hz, 1H), dois singletos característicos de hidrogênios metílicos (δ_{H} 1,57, 3H e 1,72, 3H), seis sinais de hidrogênios oximetínicos δ_{H} 5,91 (d, $J = 4,1$ Hz, 1H); 5,37 (dd, $J = 4,2$; 2,7 1H); 4,80 (d, $J = 2,5$ Hz, 1H); 7,18 (s, 1H); 5,55 (dd, $J = 5,5$; 4,3 1H); 5,45 (d, $J = 5,9$ Hz, 1H), bem como a presença de um conjunto de sinais de hidrogênios oximetilênicos δ_{H} 4,73 (d, $J = 13,5$ Hz, 1H); 5,37 (d, $J = 13,5$ Hz, 1H) e δ_{H} 6,02 (d, $J = 11,2$ Hz, 1H); 3,61 (d, $J = 11,4$ Hz, 1H). Com essas informações é possível sugerir que MDR6 apresenta um núcleo de um sesquiterpeno dihidroagarofurano. Também foi visualizado a presença de três duplo dupletos δ_{H} 8,05 (dd, $J = 7,8$; 1,8 Hz, 1H); 7,26 (dd, $J = 7,8$, 4,8 Hz, 1H); 8,69 (dd, $J = 4,8$; 1,8 Hz, 1H) característicos de um grupo de uma piridina 2,3 dissustituído, dois dupletos δ_{H} 1,44 ($J = 7,0$ Hz, 3H); 1,21 (J

= 7.2 Hz, 3H) característicos de hidrogênios metílicos, bem como, os sinais δ_H 4,72 (m, 1H) e 2.61 (d, J = 7.1 Hz, 1H) de hidrogênios metínicos. Com isto, pode-se sugerir que o grupo piridínico de MDR6 trata-se do ácido evonínico.

No espectro de RMN ^{13}C utilizando a técnica de BB, foram visualizados a presença de 44 sinais, dos quais, seis sinais foram atribuídos a carbonos metílicos (δ_C 18,38; 19,92; 20,92; 21,09; 21,49 22,93), seis sinais foram atribuídos a carbonos oximetínicos (δ_C 69,07; 69,14; 71,48; 73,47; 74,84; 75,78), um sinal de carbono metínicos (δ_C 50,34), dois sinais atribuídos a carbonos oximetilênicos (δ_C 60,12; 70,02), três a carbonos não hydrogenados (δ_C 52,63; 70,69; 93,78), quatro sinais atribuídos a ésteres carbonílicos (δ_C 168,60; 168,91; 170,10; 170,29) e sinais característicos de dois grupos benzoatos (δ_C 128,51; 128,83; 128,89; 129,12; 129,51; 130,32; 133,47; 133,57; 164,59; 165,30), bem como, a presença de sinais característicos do grupo piridínico do tipo evoninato (δ_C 9,72; 11,84; 36,39; 45,05; 121,11; 125,11; 137,67; 151,50; 165,70; 168,24; 173,92). Confirmando a presença do núcleo piridínico e do sesquiterpeno dihidroagarofurano. A partir das correlações de HMBC de H-15 δ_H 6,02 (d, J = 11,2 Hz, 1H), 3,61 (d, J = 11,4 Hz, 1H) com C-12' (δ_C 168,60), juntamente com a correlação de H-3 δ_H 4,80 (d, J = 2,5 Hz, 1H) com C-11' (δ_C 173,92) foi possível confirmar que MDR6 trata-se de um alcaloide sesquiterpênico piridínico.

MDR6 diferencia-se de MDR4 pela presença de um grupo benzoato a mais. Em MDR6, o deslocamento químico de H-5 encontra-se desprotegido em relação ao mesmo hidrogênio em MDR4, sugerindo a presença de um grupo benzoato em H-5. Através das correlações de HMBC de H-5 δ_H 7,18 (s, 1H) com C-10 (δ_C 93,78), 5OBz(C=O) (δ_C 165,70) e C-13 (δ_C 84,42) a posição deste grupo benzoato de MDR6 em H-5 Com base nas informações de 1H , ^{13}C , bidimensionais descritas acima e em comparação com dados da literatura foi possível identificar MDR6 como sendo a ebinofolina E2, isolada pela primeira vez na espécie *M. distichophylla* (Tabela 11) (Figura 80).

Figura 80. Ebinifolina E2 (MDR6) isolado de *Maytenus distichophylla*

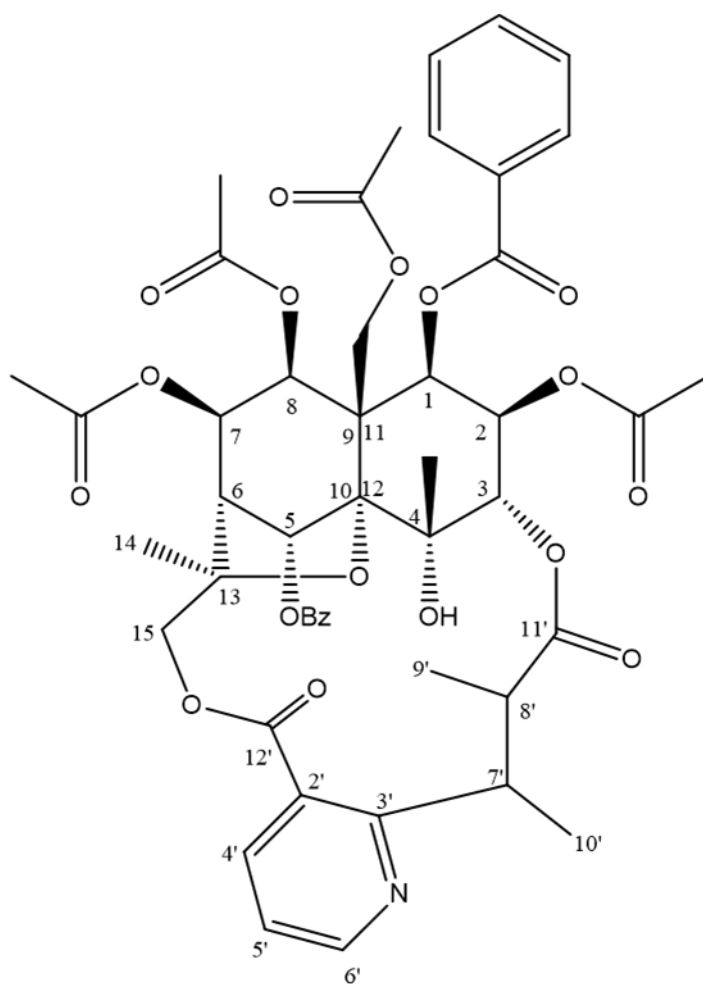


Tabela 11. Comparação dos dados espectrais de RMN ^1H e ^{13}C de MDR6 em CDCl_3 com os valores da literatura

MDR6			HMBC		ITOKAWA, 1993	
C	^1H	^{13}C	J^2	J^3	^1H	^{13}C
1	5.91 (d, $J = 4.1$ Hz, 1H)	73,47	C9	C11, C1OBz	5.94 (d, 3.9)	73.51 (d)
2	5,37 (dd, $J = 4,2$; 2,7 Hz 1H)	69,14		C4, C9	5.41 (dd, 2.5, 3.9)	69.21 (d)
3	4.80 (d, $J = 2.5$ Hz, 1H)	75,78		C1, C11'	4.83 (d, 2.5)	75.86 (d)
4	4.77 (d, $J = 1.5$ Hz, 1H)	70,69			4.78 (br s)	70.72 (s)
5	7,18 (s, 1H)	74,84	C10	C5OBz, C13	7.22 (s)	74.89 (d)
6	2.52 (d, $J = 4.0$ Hz, 1H)	50,34		C10	2.55 (d, 4.0)	50.40 (d)
7	5,55 (dd, $J=5,5$; 4.3 1H)	69,07		C9	5.58 (dd, 4.0, 5.7)	69.11 (d)
8	5.45 (d, $J = 5.9$ Hz, 1H)	71,48	C9	C1, C8OAc	5.48 (d, 5.7)	71.55 (d)
9	-	52,63			-	52.72 (s)
10	-	93,78			-	93.83 (s)
11	4,73 (d, $J=13,5$ Hz, 1H)	60,12	C9	C8, C10	4.76 (d, 13.4)	60.15 (t)
	5,37 (d, $J=13,5$ Hz, 1H)				5.41 (d, 13.4)	
12	1.57 (s, 3H)	22,93	C4	C-3, C10	1.61 (s)	22.91 (4)
13	-	84,42			-	84.44 (s)
14	1.72 (s, 3H)	18,38	C13	C6, C15	1.75(s)	18.35(4)
15	6.02 (d, $J = 11.2$ Hz, 1H)	70,02		C12'	3.64 (d, 11.5)	70.04 (t)
	3.61 (d, $J = 11.4$ Hz, 1H)				6.05 (d, 1 1.5)	
2'	-	165,30			-	165.23(s)
3'	-	125,11			-	125.20(s)
4'	8.05 (dd, $J = 7.8, 1.8$ Hz, 1H)	137,67			8.07 (dd, 1.7, 7.8)	137.66(d)
5'	7,26 (dd, $J = 7.8, 4.8$ Hz, 1H)	121,11			7.27 (dd, 4.8, 7.8)	121.14(d)
6'	8.69 (dd, $J = 4.8, 1.8$ Hz, 1H)	151,50			8.71 (dd, 1.7,4.8)	151.51 (d)
7'	4,72 (m, 1H)	36,39			4.74 (q, 6.9)	36.48 (d)
8'	2.61 (d, $J = 7.1$ Hz, 1H)	45,05			2.64 (4, 7.1)	45.05 (d)
9'	1.44 (d, $J = 7.0$ Hz, 1H)	11,84	C7'	C2', C8'	1.46(d, 6.9)	11.90(d)
10'	1.21 (d, $J = 7.2$ Hz, 1H)	9,72	C-8'	C7', C11'	1.24 (d, 7.1)	9.72 (4)
11'	-	173,92			-	173.93(s)
12'	-	168,60			-	168.61(s)
2-OAc	2.15 (s, 3H)	168,24/21,49	2C=O		2,17 (s)	169.93/21.61
7-OAc	2.19 (s, 3H)	170,10/20,92	7C=O		2,21 (s)	170.02/20.99
8-OAc	1.41 (s, 3H)	168,91/19,92	8C=O		1,43 (s)	168.96/19.88
11-OAc	2.35 (s, 3H)	170,29/21,09	11C=O		2,37 (s)	170.47/21.23
1-OBz	-	164,59			-	164.62(s)
<i>ipso</i>	-	129,12			-	129.21 (s)
<i>orto</i>	7.81 (dd, $J = 8.4, 1.4$ Hz, 2H)	129,51		1OBz(C=O), C1OBz (p)	7.84 (d, 7.3)	129.58(d)
<i>meta</i>	7.38 (t, $J = 7.8$ Hz, 2H)	128,51		C1OBz (o)	7.40 (t-like, 7.7)	128.52 (d)
<i>para</i>	7,53 (t, $J = 7.5$ Hz, 1H)	133,47		C1OBz (o)	7.54 (t-like, 7.4)	133.38
5-OBz	-	165,70			-	164.85
<i>ipso</i>	-	128,89			-	128.85
<i>orto</i>	8,31 (dd, $J = 8.4, 1.3$ Hz, 2H)	130,32		C5OBz(p), C5OBz(C=O)	8.34 (d, 7.3)	129.96
<i>meta</i>	7,49 (t, $J = 7.7$ Hz, 2H)	128,83		C5OBz (o)	7.50 (t-like, 7.7)	128.83
<i>para</i>	7.58 (t, $J = 7.5$ Hz, 1H)	133,57		C5OBz (o)	7.60 (t-like, 7.4)	133.79

Figura 81. Espectro de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) de ^1H de MDR6 (CDCl₃, 500 MHz)

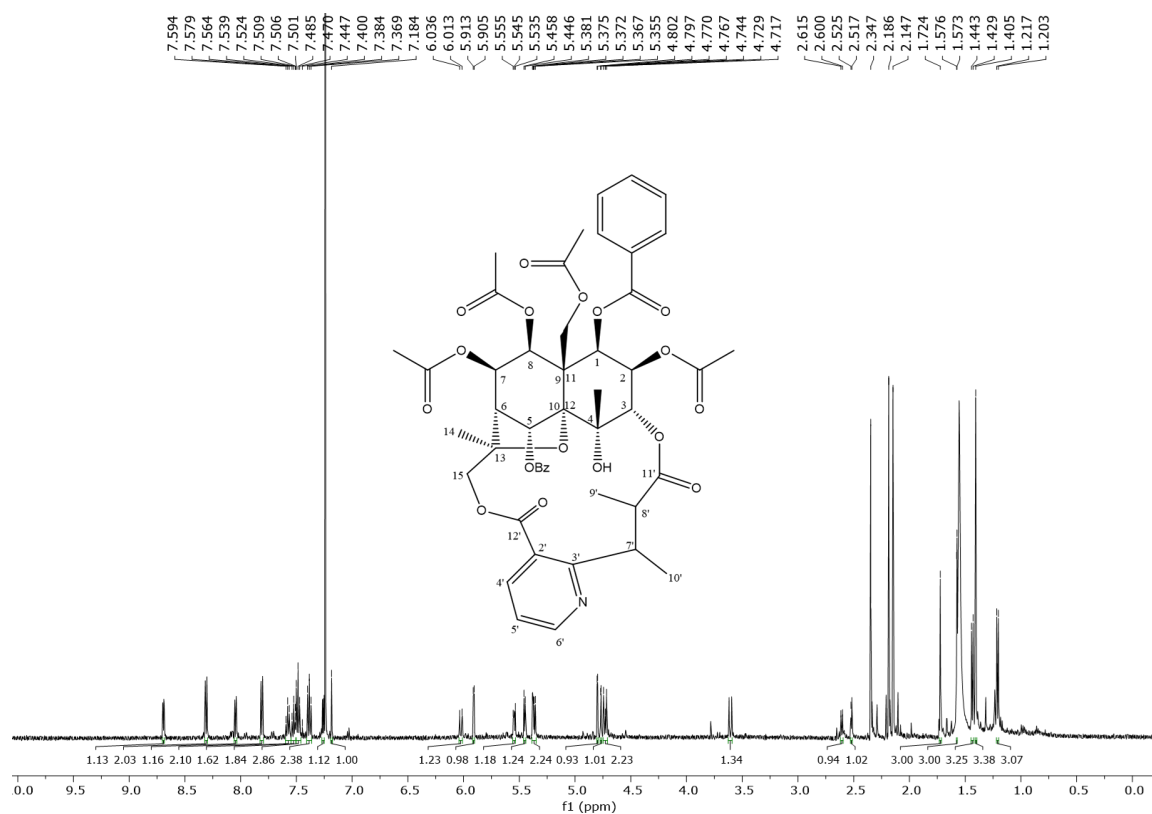


Figura 82. Expansão do espectro de RMN de ^1H de MDR6 na região de 1,2-2,6 ppm (CDCl₃, 500 MHz)

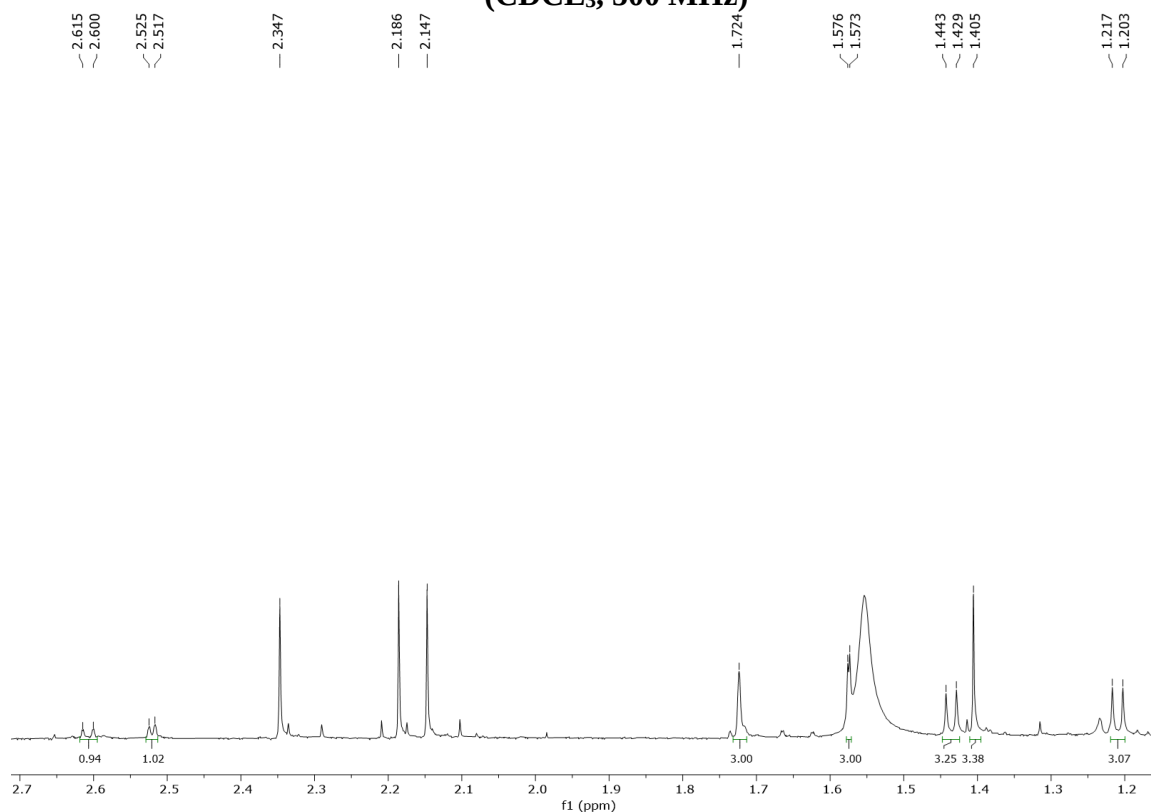


Figura 83. Expansão do espectro de RMN de ^1H de MDR6 na região de 3,4-6,1 ppm (CDCL₃, 500 MHz)

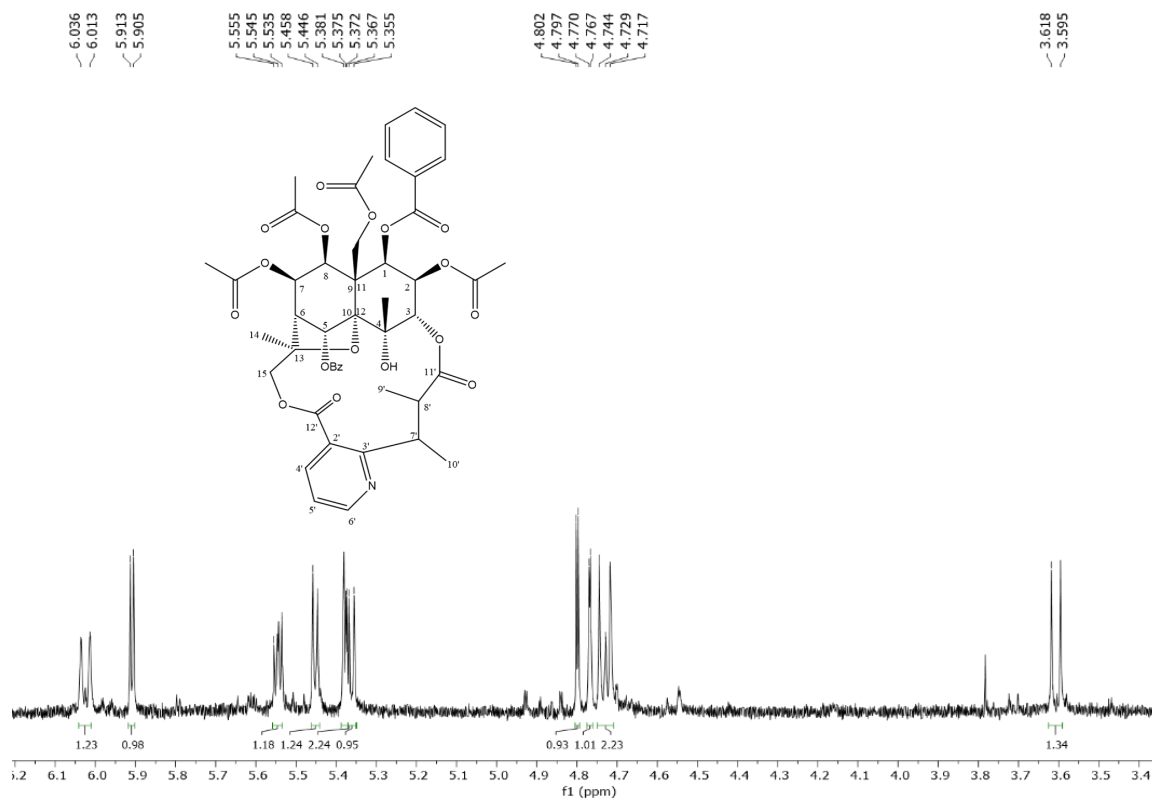


Figura 84. Expansão do espectro de RMN de ^1H de MDR6 na região de 7,1-8,7 ppm (CDCL₃, 500 MHz)

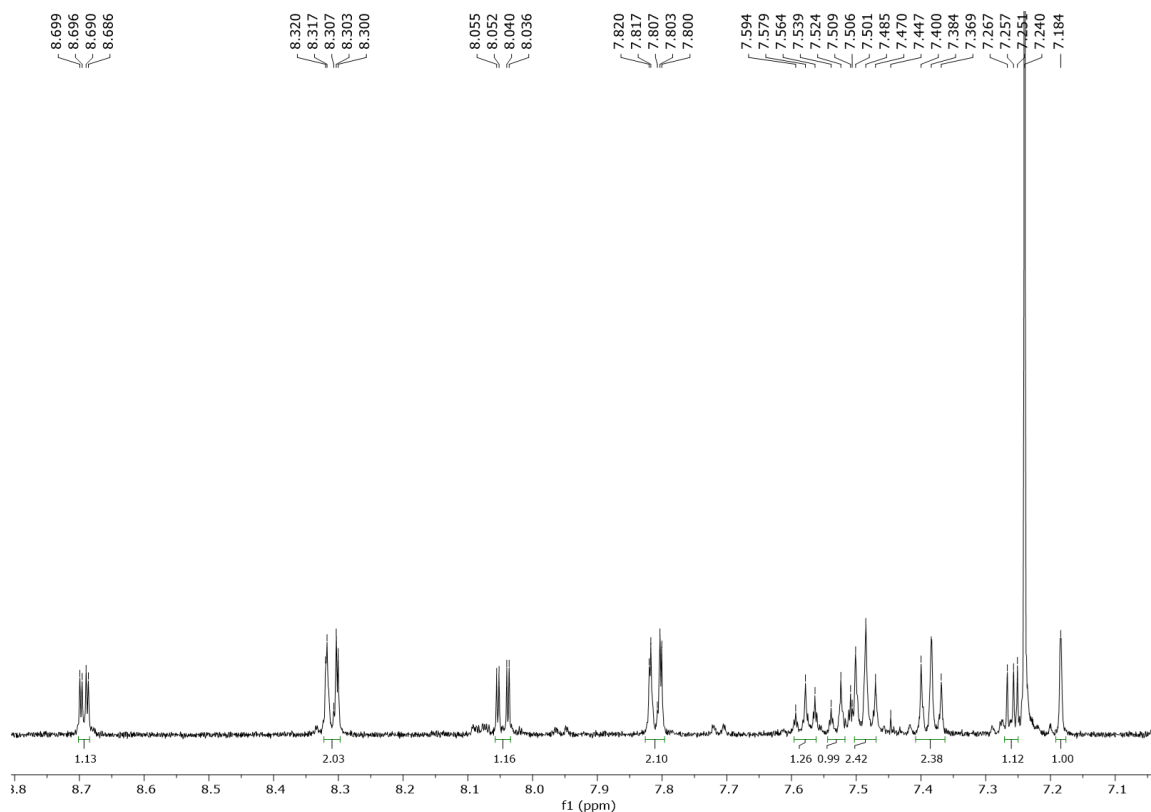


Figura 85. Espectro de Ressonância Magnética Nuclear de ^{13}C BB de MDR6 (CDCl_3 , 125 MHz).

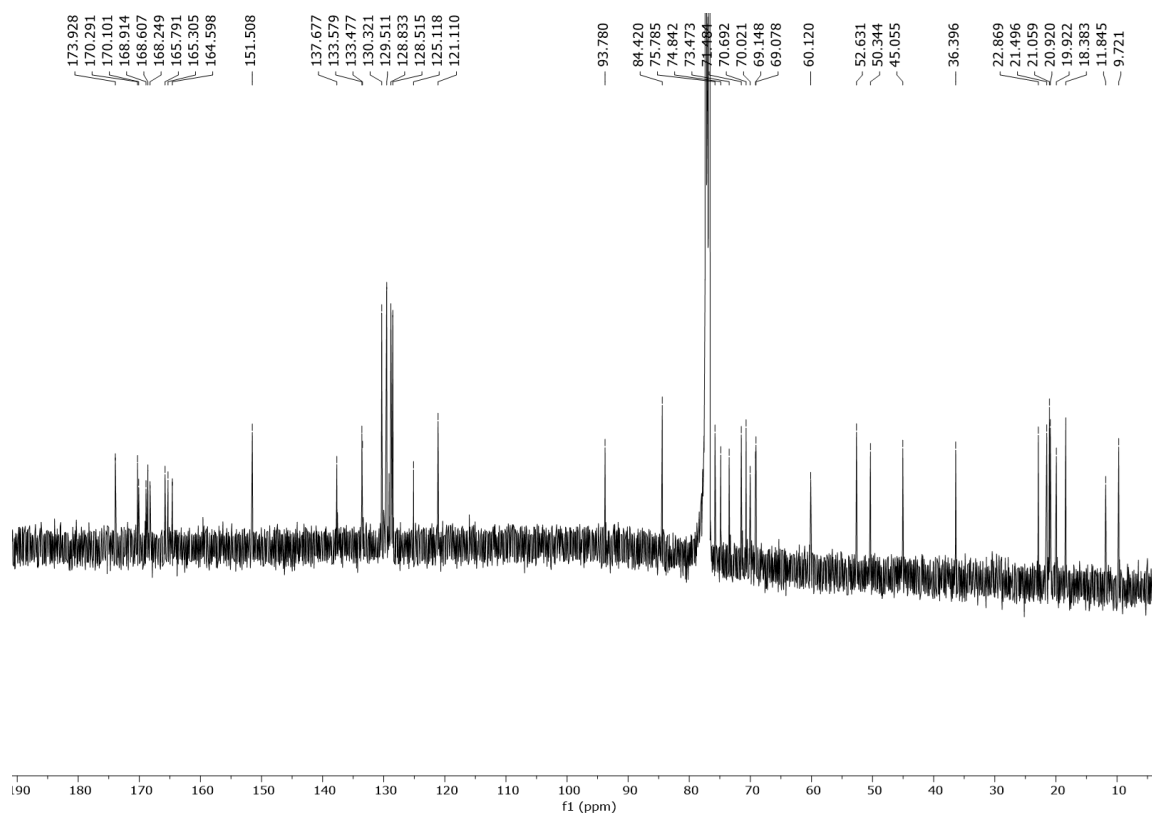


Figura 86. Expansão do espectro de RMN de ^{13}C de MDR6 na região de 10-60 ppm (CDCl_3 , 125 MHz).

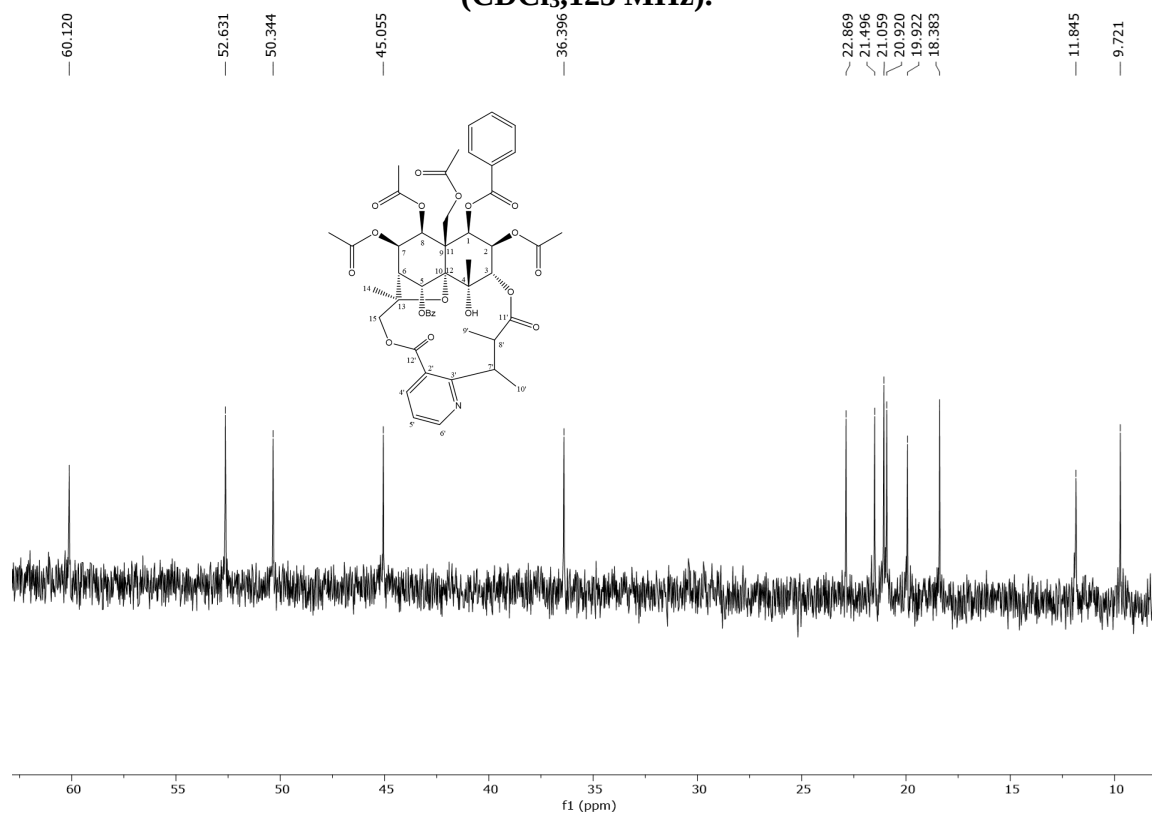


Figura 87. Expansão do espectro de RMN de ^{13}C de MDR6 na região de 67-97 ppm (CDCl_3 , 125 MHz).

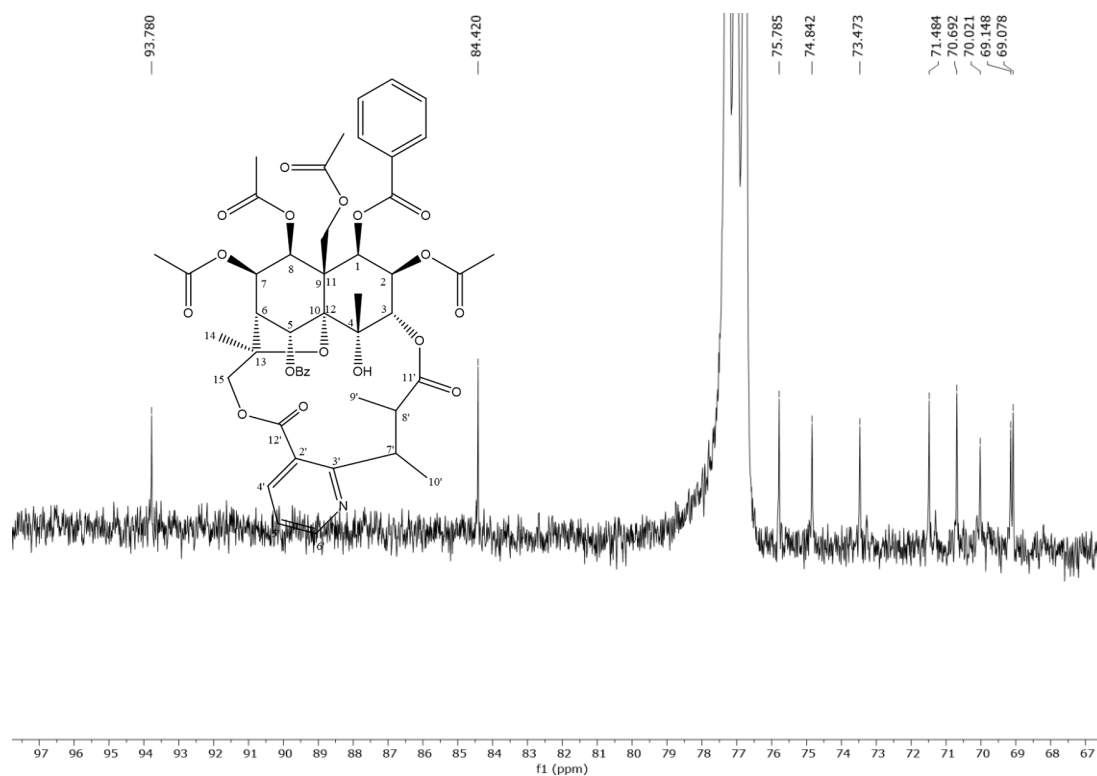


Figura 88. Expansão do espectro de RMN de ^{13}C de MDR6 na região de 100-185 ppm (CDCl_3 , 125 MHz).

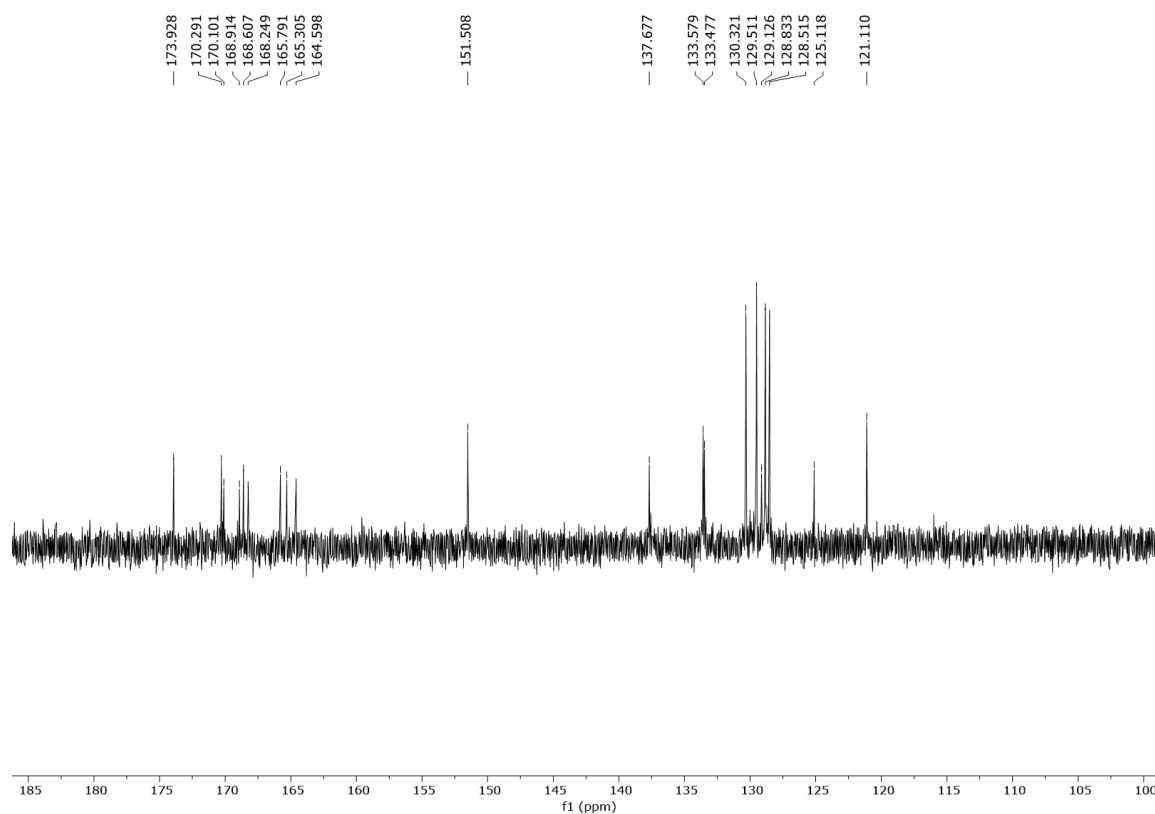


Figura 89. Espectro das correlações entre sinais de ^1H x ^{13}C - J_{CH} -HMQC de MDR6 em CDCl_3 (500 MHz).

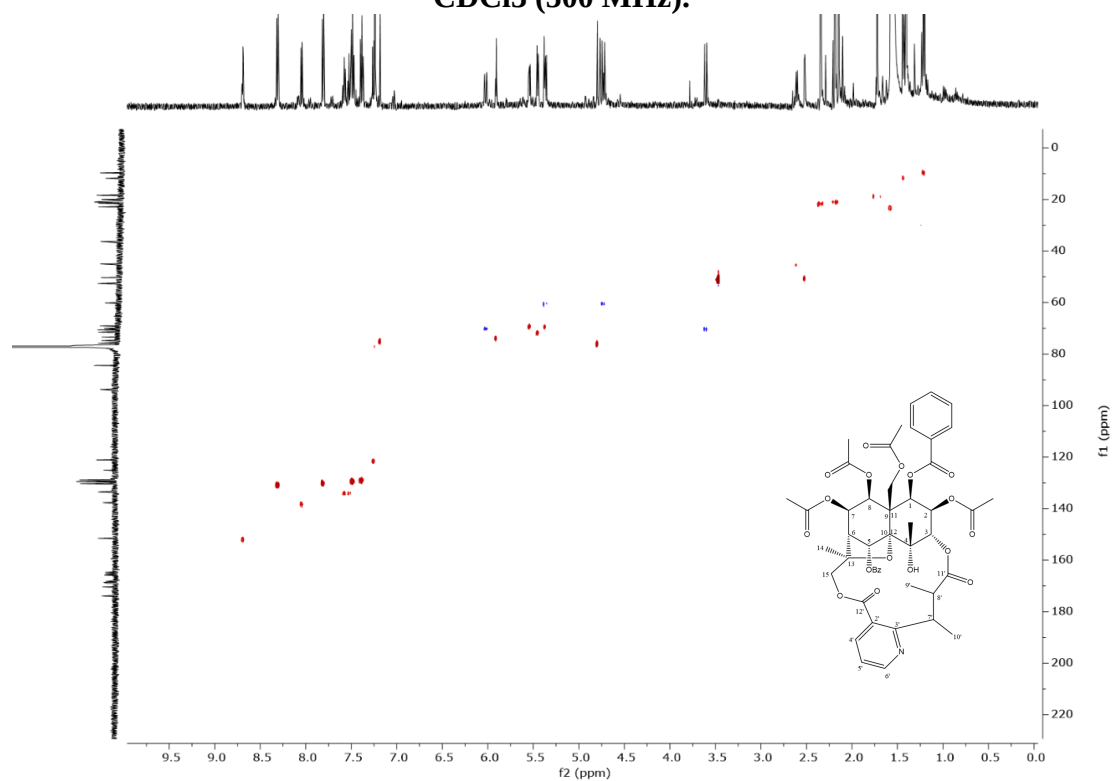


Figura 90. Espectro das correlações entre sinais de ^1H x ^{13}C - J_{CH} -HMQC de MDR6 em CDCl_3 (500 MHz).

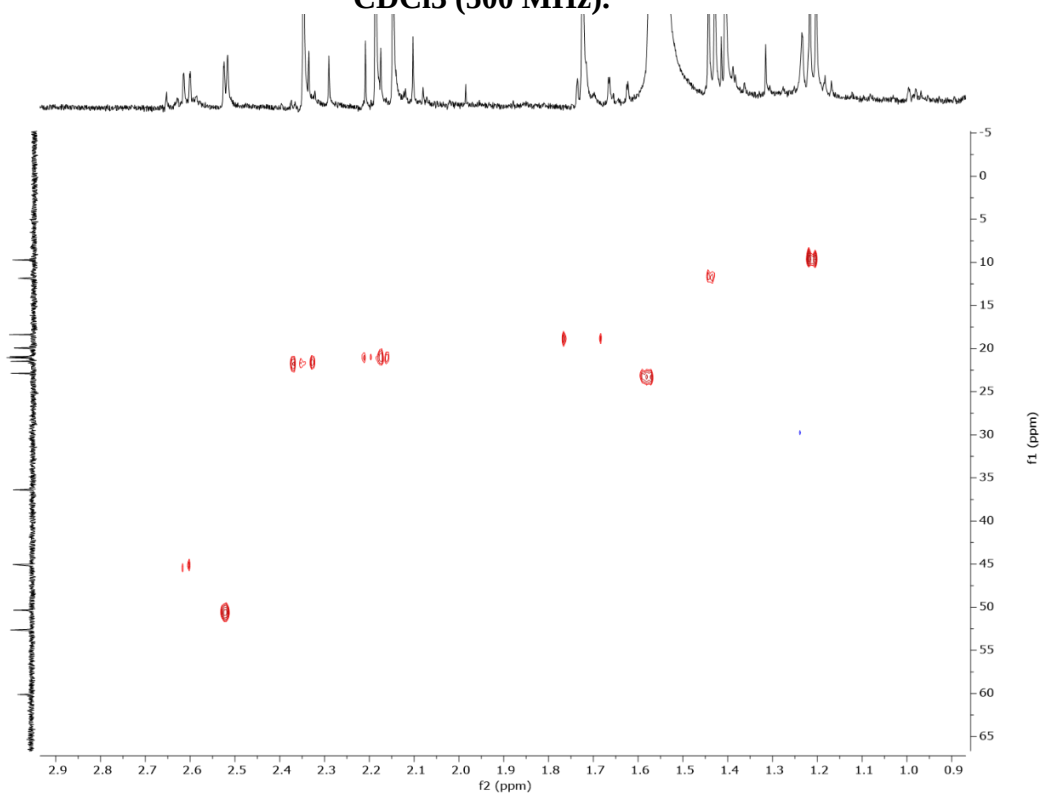


Figura 91. Espectro das correlações entre sinais de ^1H x ^{13}C - J_{CH} -HMQC de MDR6 em CDCl_3 (500 MHz).

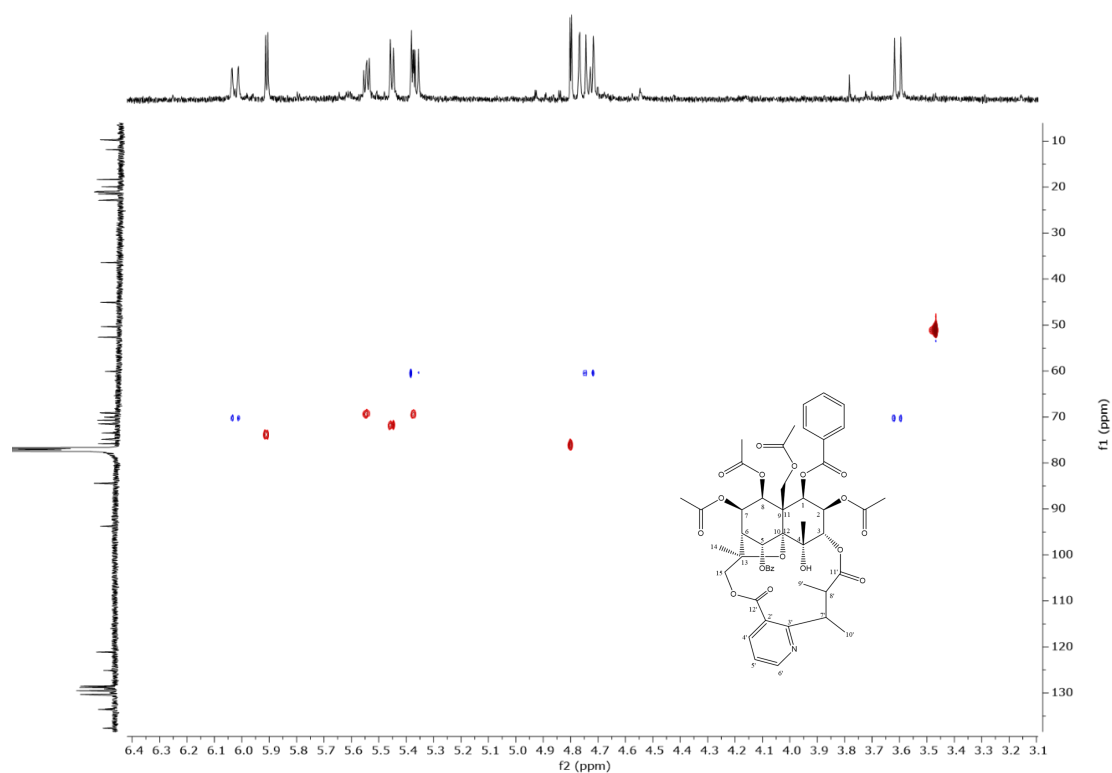


Figura 92. Espectro das correlações entre sinais de ^1H x ^{13}C - J_{CH} -HMQC de MDR6 em CDCl_3 (500 MHz).

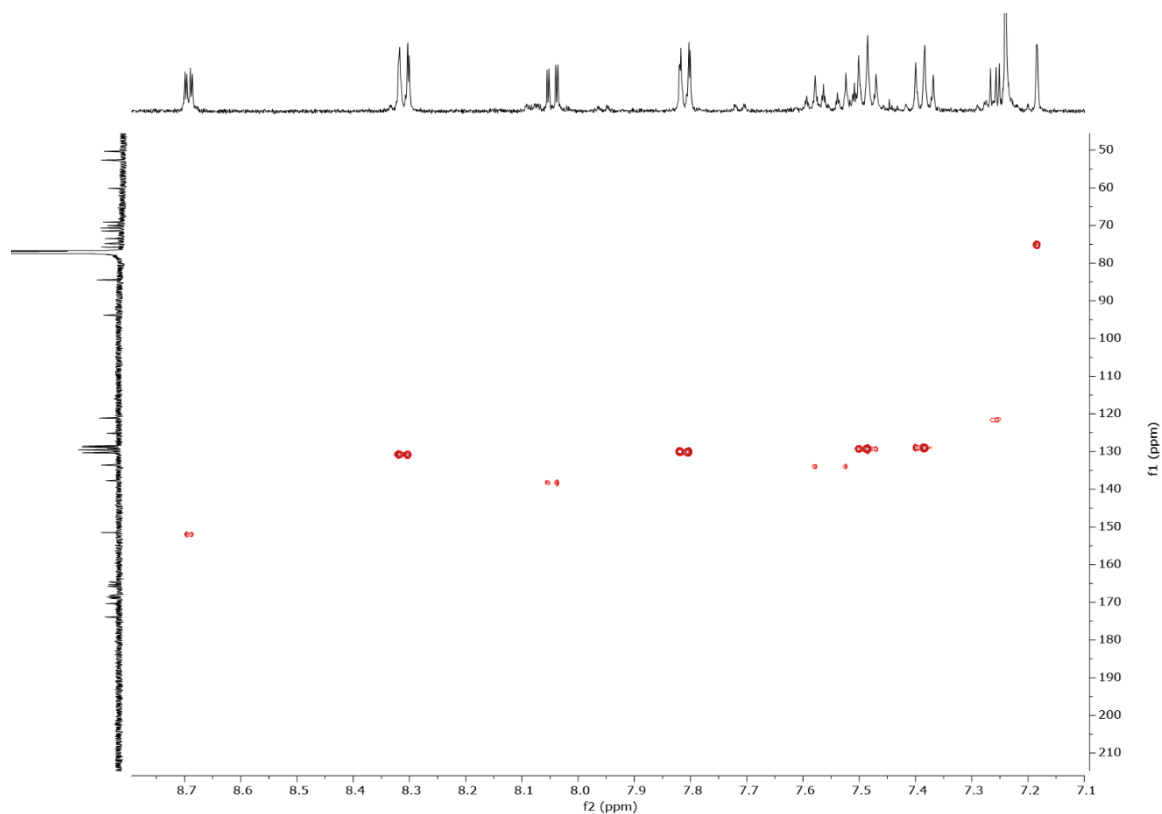


Figura 93. Espectro das correlações entre sinais de ^1H x ^{13}C -JCH-HMBC de MDR6 em CDCl_3 (500 MHz).

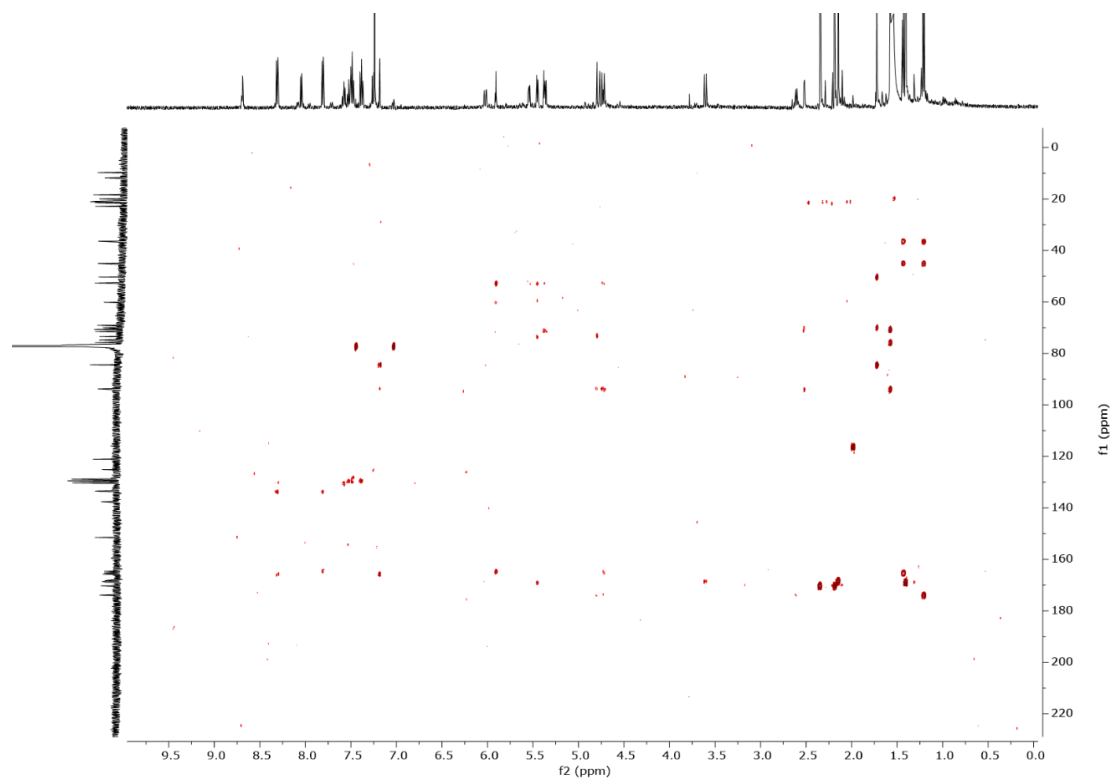


Figura 94. Espectro das correlações entre sinais de ^1H x ^{13}C -JCH-HMBC de MDR6 em CDCl_3 (500 MHz).

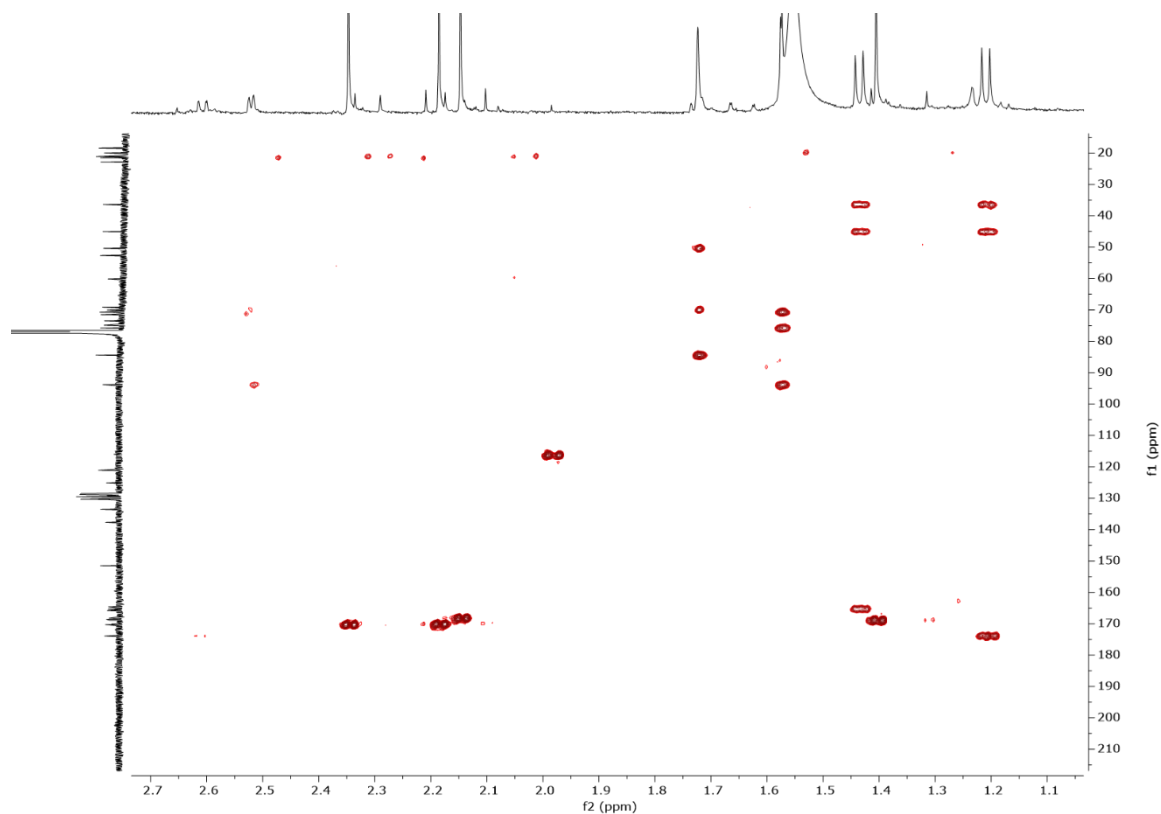


Figura 95. Espectro das correlações entre sinais de ^1H x ^{13}C - J_{CH} -HMBC de MDR6

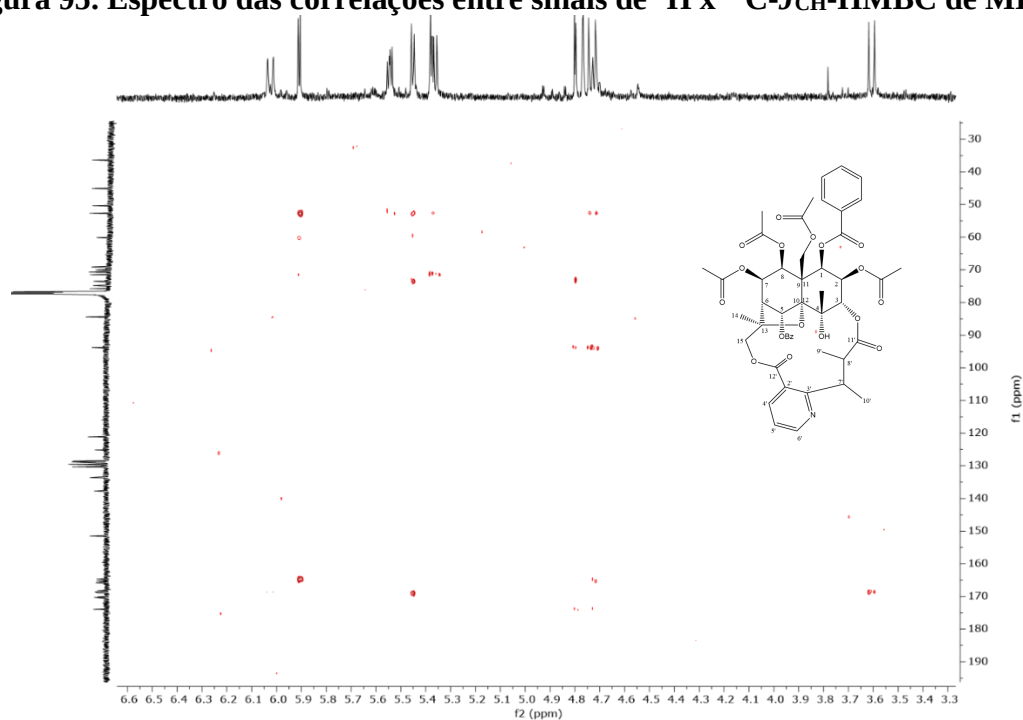
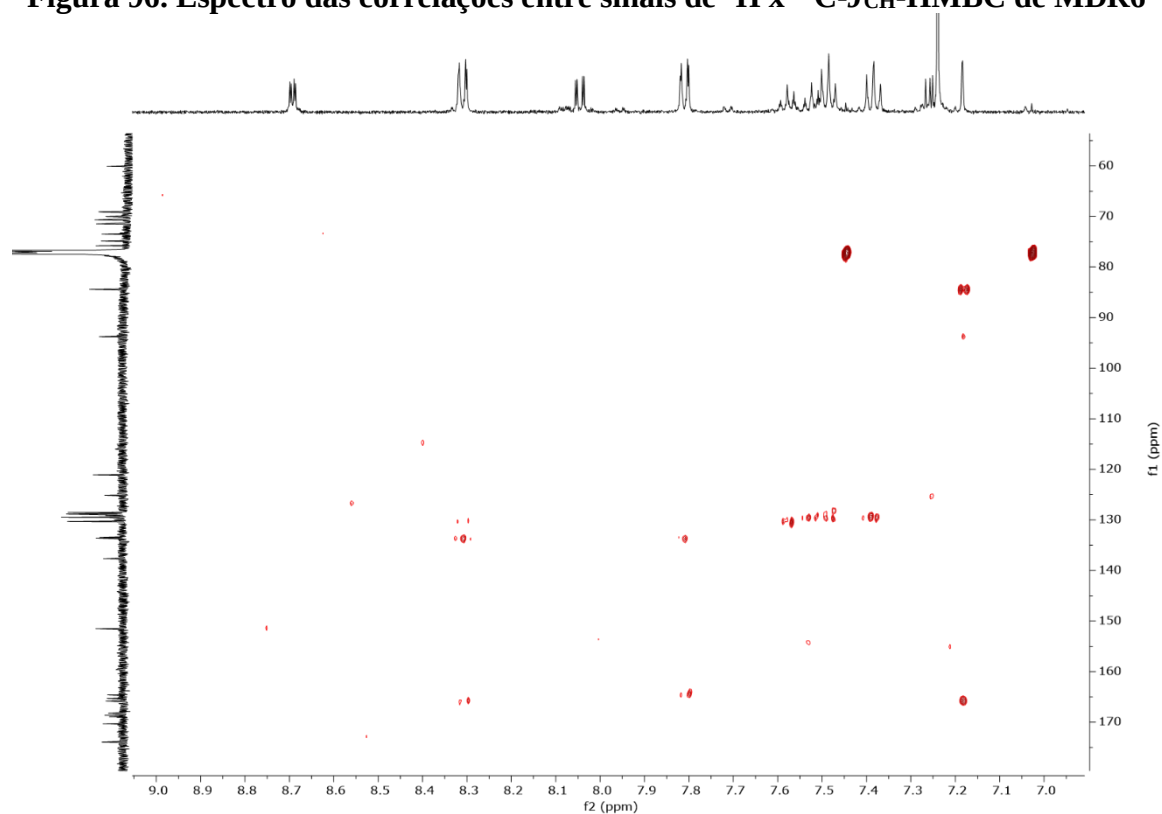


Figura 96. Espectro das correlações entre sinais de ^1H x ^{13}C - J_{CH} -HMBC de MDR6



5.3 Análise dos modelos de QSAR

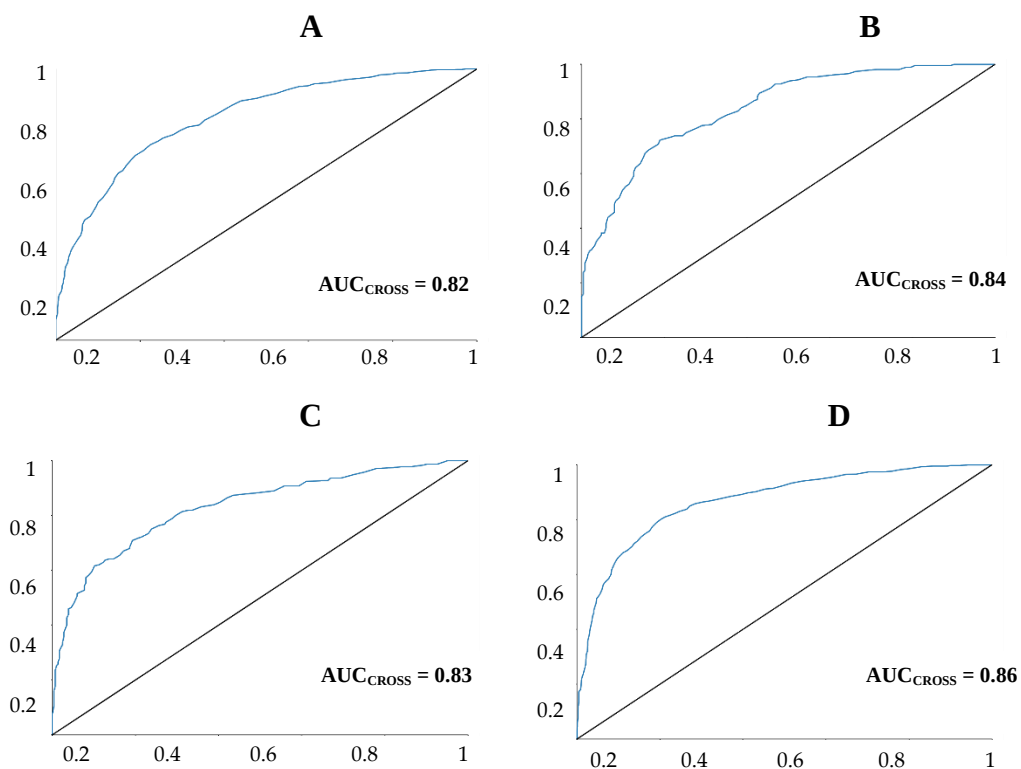
Na análise de performance dos modelos gerados, foi observado que os modelos preditivos contra os microrganismos *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *P. aeruginosa*

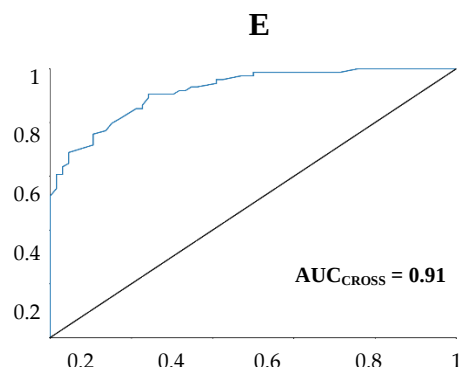
e *S. epidermides* obtiveram bons resultados de desempenho, com precisão superior a 70%. As boas performances também foram observadas na análise de curva ROC, com valores superiores a 0.82. Desta forma é possível afirmar que os modelos possuem boas taxas de precisão, performance e robustez, além de uma boa capacidade de predição. Os dados de performances dos modelos podem ser observados na tabela 12 e figura 95.

Tabela 12. Resumo dos resultados de performance dos modelos utilizando o algoritmo RF.

Modelo	Especificidade	Sensibilidade	Precisão	VPP	VPN	MCC
<i>C. albicans</i>	0.79	0.70	0.75	0.76	0.74	0.5
<i>C. tropicalis</i>	0.77	0.74	0.75	0.77	0.74	0.51
<i>C. parapsilosis</i>	0.83	0.7	0.74	0.77	0.74	0.5
<i>P. aeruginosa</i>	0.86	0.71	0.78	0.80	0.79	0.58
<i>S. epidermides</i>	0.79	0.85	0.82	0.81	0.82	0.64

Figura 95: Gráfico de ROC, verdadeiros positivos versus falsos positivos, gerado para os modelos de RF selecionados para validação cruzada. A) *C. albicans*, B) *C. tropicalis* C) *C. parapsilosis* D) *P. aeruginosa* e E) *S. epidermides*. AUC = valor da área sob a curva.





As seis moléculas estavam dentro do espaço químico dos modelos de predição gerados, tendo, portanto, suas predições confiáveis. As moléculas foram preditas como ativas contra os microorganismos *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. parapsilopsis* com potencial atividade variando entre 54% a 79%. Já para a bactéria *P. aeruginosa*, as moléculas foram preditas como inativas. Para o modelo de *S. epidermides* algumas moléculas foram inativas e outras ativas. Os resultados das predições podem ser observados na tabela 13. Com as boas performances dos modelos gerados, foi realizada, então, a triagem das seis moléculas isoladas neste estudo, a fim de avaliar o perfil antimicrobiano dessas substâncias.

Tabela 13. Predição dos compostos isolados de *M. distichophylla* nos modelos preditivos criados contra os microrganismos *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. parapsilopsis*, *P. aeruginosa* e *S. epidermides*.

Moléculas	Modelos				
	<i>C. albicans</i>	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. parapsilopsis</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>S. epidermides</i>
Ebinifolina E2	0.70	0.56	0.66	0.39	0.47
Ebinifolina W	0.71	0.56	0.67	0.41	0.47
Euojaponine A	0.72	0.63	0.70	0.32	0.44
Euojaponine F	0.66	0.62	0.76	0.35	0.56
Euojaponine K	0.74	0.68	0.78	0.38	0.60
Maiteina	0.7	0.61	0.67	0.35	0.51

5.4 Atividade antimicrobiana das frações e fases de extratos de *M. distichophylla*

Na Tabela 14, estão registrados os resultados da avaliação da atividade antimicrobiana das substâncias isoladas e fases orgânicas de *Maytenus distichophylla* que foram testadas nas

concentrações de 1024 a 128 µg/mL. Todos os produtos foram capazes de inibir o crescimento microbiano das cepas *S. aureus* ATCC-25923, *S. epidermidis* ATCC-12228, *C. parapsilosis* ATCC-22019 *C. albicans* ATCC-90028 e *C. albicans* LM-22 nas concentrações entre 1024 - 256 µg/mL. Notavelmente, as substâncias Maiteína (MDR4), Ebinifolina W1 (MDR3) e as fases MDR Hex, MDR Hex: AcOEt, MDR DCM apresentaram as maiores atividades contra as cepas *C. albicans* ATCC-90028, LM-22 e *C. parapsilosis* ATCC-22019, inibindo o crescimento das leveduras na concentração de 256 µg/mL. Para as cepas das espécies bacterianas a inibição ficou entre 1024 – 512 µg/mL, entretanto, nenhuma das substâncias e fases foi capaz de inibir o crescimento microbiano de quaisquer cepas de espécies bacterianas gram negativas. O resultado deste estudo corrobora com o estudo computacional validando o modelo preditivo realizado e confirmando a atividade das substâncias para os fungos leveduriformes. Mostrando um potencial de bom a moderado para os alcaloides sesquiterpênicos piridínicos e das fases de *M. distichophylla* contra leveduras do gênero *Cândida* (PEIXOTO *et al.*, 2016)

Tabela 14. Resultados da avaliação da Concentração Inibitória Mínima/CIM (µg/mL) das substâncias contra cepas bacterianas e fúngicas

Substâncias	<i>S. aureus</i> ATCC-25923	<i>S. epidermidis</i> ATCC-12228	<i>E. coli</i> ATCC-18739	<i>P. aeruginosa</i> ATCC-9027	<i>C. parapsilosis</i> ATCC-22019	<i>C. albicans</i> ATCC-90028	<i>C. albicans</i> LM-22
Euojaponina F (MDR1)	1024	1024	+	+	512	512	512
Maiteína (MDR4)	512	1024	+	+	256	256	256
Ebinifolina W1 (MDR3)	512	1024	+	+	256	256	256
MDR Hex	512	512	+	+	256	256	256
MDR Hex: AcOEt	512	512	+	+	256	256	256
MDR DCM	512	512	+	+	256	256	256
MDR AcOEt	512	512	+	+	1024	1024	512

MDR n-BuOH	1024	1024	+	+	1024	1024	1024
EEB MDR	512	512	+	+	512	512	512
Meio de cultura	-	-	-	-	-	-	-
Micro-organismo	+	+	+	+	+	+	+
Gentamicina	-	-	-	-	x	x	x
Anfotericina B	x	x	x	x	-	-	-

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

(x): Controle não usado nos ensaios

6. CONCLUSÕES

O estudo da rede molecular resultou na presença de 233 nodos e 17 clusters no qual foi possível anotar putativamente através dos espectros de massas e das diferenças visualizadas entre os nodos a presença de flavanois, flavonoides glicosilados, taninos condensados e alcaloides sesquiterpênicos piridínicos. A presença dos compostos fenólicos e dos ASP corrobora para a importância quimiotaxonômica dessas substâncias para o gênero *Maytenus*.

O estudo fitoquímico das raízes de *Maytenus distichophylla* resultou no isolamento de seis alcaloides sesquiterpênicos piridínicos (ASP) relatados pela primeira vez nesta espécie, sendo três derivados do ácido wilfordico (Ebinifolina W1, Euojaponina K e F) e três derivados do ácido evonínico (Ebinifolina E2, Euojaponina A e Maiteína). Este estudo reforçou importância quimiotaxonômica dos ASP nos extratos das raízes do gênero *Maytenus*.

As substâncias isoladas apresentaram boa predição para os modelos computacionais para os microrganismos *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *P. aeruginosae* e *S. epidermidis* sendo as moléculas consideradas ativas para os fungos leveduriformes. Desta maneira essas substâncias se mostraram promissoras com este estudo, sendo importante o aprofundamento de estudos quimioinformáticos afim de ampliar o entendimento da sua ação nesses alvos e assim, melhorar seus potenciais farmacológicos.

O estudo da atividade antimicrobiana dos extratos e substâncias isoladas de *Maytenus distichophylla* revela que os produtos testados apresentam atividade antifúngica, inibindo o crescimento microbiano das leveduras testadas apresentando valores de CIM entre 1024 – 256 µg/mL. Vale destacar que todas as substâncias isoladas apresentaram uma CIM de 256 µg/mL, sendo promissoras para realização de estudos computacionais e para modificações estruturais com o objetivo de melhorar seu potencial antimicrobiano.

REFERÊNCIAS

- AGRA, M. D. F.; FREITAS, P. F. D.; BARBOSA-FILHO, J. M. Synopsis of the plants known as medicinal and poisonous in Northeast of Brazil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 17, p. 114-140, 2007.
- AMARAL, F. M.; BRAGA, J. M. A.; GUIMARÃES, L. D.; VALVERDE, A. L.; ANHOLETI, M. C.; PAIVA, S. R.; JOFFILY, A. Chemical Constituents and Antioxidant Activity of Leaves and Stems Extracts of *Monteverdia communis* (Celastraceae), **Biointerface Research in Applied Chemistry**, v. 12, n. 2, p. 2340-2352, 2021.
- 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
- ARAUJO-LEÓN, J. A.; CANTILLO-CIAU, Z.; RUIZ-CIAU, D. V.; CORAL-MARTÍNEZ, T. I. HPLC profile and simultaneous quantitative analysis of tingenone and pristimerin in four Celastraceae species using HPLC-UV-DAD-MS. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 29, p. 171-176, 2019.
- BERTHOLD, M. R.; CEBRON, N.; DILL, F.; GABRIEL, T. R.; KÖTTER, T.; MEINL, T.; OHL, P.; THIEL, K.; WISWEDEL, B. KNIME - the Konstanz Information Miner. **ACM SIGKDD Explor. Newsl**, v.11, n. 1, p. 26–31, 2009.
- BFG. Growing knowledge: an overview of Seed Plant diversity in Brazil. **Rodriguésia**, v. 66, n. 4, p.1085-1113, 2015.
- BIRAL, L.; LOMBARDI, J. A. 2020. *Celastraceae in Flora do Brasil 2020*. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em <https://floradobrasil2020.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB82>. Acesso em: 16 ago. 2022.
- BIRAL, L.; SIMMONS, M. P.; SMIDT, E. C.; TEMBROCK, L. R.; BOLSON, M.; ARCHER, 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**, 231, n.1, p. 53-62, 2015.
- BOUCKAERT, R. R.; HOLMES, G.; PFAHRINGER, B.; REUTEMANN, P.; WITTEN, I. H. WEKA-Experiences with a Java Open-Source Project Eibe Frank Mark A. Hall. **Journal**
- BRASIL, 2022a. Biodiversidade Brasileira. Ministério do Meio Ambiente. Disponível em: <https://www.gov.br/mma/pt-br/assuntos/biodiversidade/fauna-e-flora>. Acesso em: 28/08/2022.
- BRASIL, 2022b. Biodiversidade Brasileira. Ministério do Meio Ambiente. Disponível em: <https://www.gov.br/mma/pt-br/assuntos/ecossistemas-1/biomas/caatinga>. Acesso em: 28/08/2022.

- BRIBI, N. Pharmacological activity of alkaloids: a review. **Asian Journal of Botany**, v. 1, n. 1), p. 1-6, 2018.
- BRÜNING, R., & WAGNER, H. Übersicht über die celastraceen-inhaltsstoffe: Chemie, chemotaxonomie, biosynthese, pharmakologie. **Phytochemistry**, v. 17, n.11, p. 1821-1858, 1978.
- BUKHARI, N. A.; JANTAN, S. I.; MOHAMED, A. S. Effects of plants and isolates of Celastraceae family on cancer pathways. **Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry (Formerly Current Medicinal Chemistry-Anti-Cancer Agents)**, v. 15, n. 6, p. 681-693, 2015.
- CALIXTO, J. B. The role of natural products in modern drug discovery. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 91, p. e20190105, 2019.
- CALLEMIEN, D.; COLLIN, S. Use of RP-HPLC-ESI (–)-MS/MS to differentiate various proanthocyanidin isomers in lager beer extracts. **Journal of the American Society of Brewing Chemists**, v. 66, n. 2, p. 109-115, 2008.
- 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.
- CAMARGO, K. C.; AGUILAR, M. G.; MORAES, A. R. A.; CASTRO, R. G.; SZCZERBOWSKI, D.; MIGUEL, E. L. M.; OLIVEIRA, L. R.; SOUSA, G. F.; VIDAL, D. M.; DUARTE, L. P. Pentacyclic Triterpenoids Isolated from Celastraceae: A Focus in the ¹³C-NMR Data. **Molecules**, v. 27, n. 3, p. 959, 2022.
- CAMARGO, K. C.; DUARTE, L. P.; VIDAL, D. M.; PEREIRA, H. V.; PEREIRA, R. C.; AGUILAR, M. G.; SOUSA, G. F.; VIERA-FILHO, S. A.; MERCADANTE-SIMÕES, M. O.; MESSIA, M. C. T. B.; OLIVEIRA, D. M. Chemodiversity of Essential Oils from Nine Species of Celastraceae. **Chemistry & Biodiversity**, v. 17, n. 5, p. e2000107, 2020.
- CAMASSOLA, T. M.; BARBOSA, F. G. Distribuição geográfica potencial de *Maytenus Illiciflora* (celastraceae) no Brasil frente às mudanças climáticas. **Os Desafios da Geografia Física na Fronteira do Conhecimento**, v. 1, p. 1307-1312, 2017.
- CESSA, R. M. A.; ROSA, P. S.; BARBOSA, T.; OLIVEIRA, M. L. Zoneamento agroclimático para *Monteverdia ilicifolia* (Mart. ex Reissek) Biral (Celastraceae) no Distrito Federal, Brasil. **Brazilian Journal of Development**, v. 7, n. 11, p. 103001-103013, 2021.
- CHICCO, D.; JURMAN, G. The Advantages of the Matthews Correlation Coefficient (MCC) over F1 Score and Accuracy in Binary Classification Evaluation. **BMC Genomics**, v. 21, n. 1, p. 1–13, 2020.
- CHRISTENHUSZ, M. J.; BYNG, J. W. The number of known plants species in the world and its annual increase. **Phytotaxa**, p. 261, n. 3, p. 201-217, 2016.
- CLEELAND, R.; SQUIRES, E. Evalution of new antimicrobials “*in vitro*” and in experimental animal infections. In: LORIAN, V. M. D. **Antibiotics in Laboratory Medicine**. Willians & 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.

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.L

CORDELL, G. A. **The alkaloids: chemistry and biology**. Academic Press, 2008.

CRUCIANI, G.; PASTOR, M.; GUBA, W. VolSurf: A New Tool for the Pharmacokinetic Optimization of Lead Compounds. **European Journal of Pharmacology. Science**, v. 11 n. SUPPL. 2, 2000.

CUNHA, M. D. C. L.; SILVA JÚNIOR, M. C. D. Comunidades de Árvores Na Floresta Estacional Semidecidual Montana do Pico do Jabre, Paraíba. **Ciência Florestal**, v. 28, p. 1365-1380, 2018.

DARSHANI, P.; SEN SARMA, S.; SRIVASTAVA, A. K.; BAISHYA, R.; KUMAR, D. Anti-viral triterpenes: a review. **Phytochemistry Reviews**, p. 1-82, 2022.

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

DHYANI, P.; QUISPE, C.; SHARMA, E.; BAHUKHANDI, A.; SATI, P.; ATTRI, D. C.; SZOPA, A.; SHARIFI-RAD, J.; DOCEA, A. O.; MARDARE, I.; CALINA, D.; CHO, W. C. Anticancer potential of alkaloids: a key emphasis to colchicine, vinblastine, vincristine, vindesine, vinorelbine and vincamine. **Cancer Cell International**, v. 22n. 1, p. 1-20, 2022.

DIN, A. U.; SIDDIQUI, B. S. Royleanine A, an Antitumor Dihydro- β -agarofuran Sesquiterpene Pyridine Alkaloid from *Maytenus royleanus*. **Journal of the brazilian chemical society**, v. 0, n. 0, p. 1-6, 2022.

DOYTCHINOVA, I. Drug Design—Past, Present, Future. **Molecules**, v. 27, n. 5, p. 1496-1505, 2022.

DUARTE, M. C.; TAVARES, J. F.; MADEIRO, S. A. L.; COSTA, V. C. O.; BARBOSA FILHO, J. M.; AGRA, M. D. F.; BRAZ-FILHO, R.; SILVA, M. S. D. Maytensifolone, a new triterpene from *Maytenus distichophylla* Mart. ex Reissek. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 24, p. 1697-1700, 2013.

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

DZOBO, K. The role of natural products as sources of therapeutic agents for innovative drug discovery. **Comprehensive Pharmacology**, p. 408-422, 2022.

ESMERALDO, P. F. S. Contribuição ao conhecimento químico e biológico de espécies da flora paraibana: *Xylopia langsdorffiana* e *Maytenus distichophylla*. Tese de Doutorado. Programa de

Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos do Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Paraíba, **2015**

ESTEVAM, C. S.; CAVALCANTI, A. M.; CAMBUI, É. V. F.; ARAÚJO NETO, V.; LEOPOLDO, P. T.; FERNANDES, R. P.; ARAUJO, B. S.; PORFÍRIO, Z.; SANT'ANA, A. E. G. Perfil fitoquímico e ensaio microbiológico dos extratos da entrecasca de *Maytenus rigida* Mart. (Celastraceae). **Revista Brasileira de farmacognosia**, v. 19, p. 299-303, 2009.

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.; VIEIRA-FILHO, S. A. V. *Maytenus distichophylla* and *Salacia crassifolia*: source of products with potential acetylcholinesterase inhibition. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 27, p. 471-474, 2017.

FERREIRA, L. L. G.; ANDRICOPULO, A. D. Chemoinformatics Approaches to Structure- and Ligand-Based Drug Design, Volume II. **Frontiers in Pharmacology**, v. 13, p. 1416-1417 2022.

FERREIRA, F. L. ESTUDO FITOQUÍMICO E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE BIOLÓGICA DE EXTRATOS E CONSTITUINTES DAS FOLHAS DE *Maytenus distichophylla* (CELASTRACEAE). Dissertação de mestrado. Programa de Pós-Graduação em Química, Departamento de Química do Instituto de Ciências Exatas, Universidade Federal de Minas Gerais, **2014**.

FLORA do Brasil 2020 em construção. **Celastraceae**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <http://reflora.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB604473> Acesso em: 01 jun. 2021

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

FRACASSETTI, D.; COSTA, C.; MOULAY, L.; TOMÁS-BARBERÁN, F. A. Ellagic acid derivatives, ellagitannins, proanthocyanidins and other phenolics, vitamin C and antioxidant capacity of two powder products from camu-camu fruit (*Myrciaria dubia*). **Food Chemistry**, v. 139, n. 1-4, p. 578-588, 2013.

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.

GROPPO, M.; SIMMONS, M. P.; CAPPA, J. J.; BIRAL, L.; LOMBARDI, J. A. A new species of *Maytenus* (Celastraceae) with fleshy fruits from eastern Brazil, with notes on the delimitation of *Maytenus*. **Systematic Botany**, v. 39,n.2, p. 478-484, 2014.

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

- HAN, B. H.; RYU, J. H.; HAN, Y. N.; PARK, M. K.; PARK, J. H.; NAOKI, H. New sesquiterpene alkaloids from *Euonymus japonica*: structures of euojaponines D, F, J, and K. **Journal of Natural Products**, v. 53, n. 4, p. 909-914, 1990a.
- HAN, B. H.; PARK, M. K.; RYU, J. H.; PARK, J. H.; NAOKI, H.. Sesquiterpene alkaloids from *Euonymus japonica*. **Phytochemistry**, v. 29,n. 7, p. 2303-2307, 1990b.
- 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.
- 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 Etnopharmacology**, v.110, p.391-400, 2007.
- HUANG, Y. Y.; CHEN, L.; MA, G. X.; XU, X. D.; JIA, X. G.; DENG, F. S.; LI, X. J.; YUAN, J. Q. A review on phytochemicals of the genus *Maytenus* and their bioactive studies. **Molecules**, v. 26, n.15, p. 4563, 2021.
- INÁCIO, M. C.; PAZ, T. A.; PEREIRA, A. M. S.; FURLAN, M. Maytenin plays a special role in the regulation of the endophytic *Bacillus megaterium* in *Peritassa campestris* adventitious roots. **Journal of Chemical Ecology**, v. 45, n. 9, p. 789-797, 2019.
- ITOKAWA, H.; SHIROTA, O.; MORITA, H.; TAKEYAA, K.; IITAKAB, Y. Isolation, structural elucidation and conformational analysis of sesquiterpene pyridine alkaloids from *Maytenus ebenifolia* Reiss. X-Ray molecular structure of ebenifoline WI. **Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 1**, v. 11, p. 1247-1254, 1993.
- LI, J. W. H.; VEDERAS, J. C. Drug discovery and natural products: end of an era or an endless frontier?. **Science**, v. 325, n. 5937, p. 161-165, 2009.
- LIAO, L. M. Sesquiterpene pyridine alkaloids. **Alkaloids-new york-academic press**, v. 60, p. 287-344, 2003.
- KISHBAUGH, T.L.S. Pyridines and Imidazopyridines with medicinal significance. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, v. 16, n. 28, p. 3274-3302, 2016.
- LOMBARDI, J. A.; BIRAL, L. Flora das cangas da Serra dos Carajás, Pará, Brasil: Celastraceae. **Rodriguésia**, v. 67, p.1285-1290, 2016.
- LONG, C.; YANG, Y.; YANG, Y.; HUANG, S.; ZHANG, X.; DU, W.; YANG, D.; GU, Y.; ZHANG, L. The Exploration of Novel Pharmacophore Characteristics and Multidirectional Elucidation of Structure-Activity Relationship and Mechanism of Sesquiterpene Pyridine Alkaloids from *Tripterygium* Based on Computational Approaches. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2021 p. 1-14, 2021.
- LV, H.; JIANG, L.; ZHU, M.; LI, Y.; LUO, M.; JIANG, P.; JIANG, P.; TONG, S.; ZHANG, H.; YAN, J. The genus *Tripterygium*: A phytochemistry and pharmacological review. **Fitoterapia**, v. 137, p. 104190, 2019.

MATTHEWS, B. W. Comparison of the Predicted and Observed Secondary Structure of T4 Phage Lysozyme. **Biochim. Biophys. Acta - Protein Struct**, v. 405, n. 2, p. 442–451, 1975.

MENDEZ, D.; GAULTON, A.; BENTO, A. P.; CHAMBERS, J.; DE VEIJ, M.; FÉLIX, E.; MAGARIÑOS, M. P.; MOSQUERA, J. F.; MUTOWO, P.; NOWOTKA, M.; MARAÑÓN-GORDILLO, M.; HUNTER, F.; JUNCO, L.; MUGUMBATE, G.; RODRIGUEZ-LOPEZ, M.; ATKINSON, F.; BOSC, N.; RADOUX, C. J.; SEGURA-CABRERA, A.; HERSEY, A.; LEACH, A. R. ChEMBL: Towards Direct Deposition of Bioassay Data. **Nucleic Acids Research**, v. 47, n. D1, p. D930–D940, 2019.

MORALES, S. A. T.; AGUILAR, M. G.; PEREIRA, R. C. G.; DUARTE, L. P.; SOUSA, G. F.; OLIVEIRA, D. M. D.; EVANGELISTA, F. C. G.; SABINO, A. P.; VIANA, R. O.; ALVES, V. S.; VIEIRA-FILHO, S. A. Constituents from roots of *Maytenus distichophylla*, antimicrobial activity and toxicity for cells and *Caenorhabditis elegans*. **Química Nova**, v. 43, p. 1066-1073, 2020.

MORALES, S. A. T. *Maytenus distichophylla*: Fitoquímica dos extratos hexânico e clorofórmico das raízes, atividade biológica e cálculos *in silico*. Dissertação de mestrado, . Programa de Pós-Graduação em Química, Departamento de Química do Instituto de Ciências Exatas, Universidade Federal de Minas Gerais, 2017

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.

OLIVON, F.; ALLARD, P. M.; KOVAL, A.; RIGHI, D.; GENTA-JOUE, G.; NEYTS, J.; APEL, C.; PANNECOUQUE, C.; NOTHIAS, L.; CACHET, X.; MARCOURT, L.; ROUSSI, F.; KANAEV, V.; TOUBOUL, D.; WOLFENDER, J.; LITAUDON, M. Bioactive natural products prioritization using massive multi-informational molecular networks. **ACS chemical biology**, v. 12, n.10, p. 2644-2651, 2017.

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-Thiazolium-5-thiolate. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 27, n. 10, p. 1807-1813, 2016.

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.

PERLEBERG, T. D.; BARBIERI, R. L.; MARIOT, M. P.; PETER, P.; GOMES, G. C., SILVA, T. E.; VITÓRIA, J. M.; SILVA, P. S.; MAGALHÃES, R. Pollinators and seed dispersers of espinheira-santa (*Monteverdia ilicifolia*-Celastraceae), a Brazilian medicinal plant. **CIÊNCIA E NATUREZA**, v. 43, p. e52, 2021.

QUINN, R. A.; NOTHIAS, L. F.; VINING, O.; MEEHAN, M.; ESQUENAZI, E.; DORRESTEIN, P. C. Molecular networking as a drug discovery, drug metabolism, and precision medicine strategy. **Trends in pharmacological sciences**, 38, n. 2, p. 143-154, 2017.

- REHMAN, Z. U.; GURGUL, A.; YOUN, I.; MALDONADO, A.; WAHID, F.; CHE, C. T.; KHAN, T. UHPLC-MS/MS-GNPS based phytochemical investigation of *Equisetum arvense* L. And evaluation of cytotoxicity against human melanoma and ovarian cancer cells. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 29, n. 6, p. 103271, 2022
- RODRIGUES, A. C. B. C.; OLIVEIRA, F. P.; DIAS, R. B.; SALES, C. B. S.; ROCHA, C. A. G.; SOARES, M. B. P.; COSTA, E. V.; SILVA, F. M. A.; ROCHA, W. C. KOOLEN, H. H. F.; BEZERRA, D. P. In vitro and in vivo anti-leukemia activity of the stem bark of *Salacia impressifolia* (Miers) AC Smith (Celastraceae). **Journal of ethnopharmacology**, v. 231, p. 516-524, 2019.
- ROY, A. A review on the alkaloids an important therapeutic compound from plants. **IJPB**, v. 3, n. 2, p. 1-9, 2017.
- SALZBERG, S.; Quinlan, R. Book Review: C4. 5: Programs for Machine Learning by J. Ross Quinlan 1994, 1–6.
- SANTOS, V. A.; DIAS, N. B.; TEIXEIRA, S. P.; PALMA, M. S.; FURLAN, M. Mapping biochemical pathways in *Maytenus ilicifolia* (Celastraceae) through integrated proteomics and histochemistry. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 32, p. 237-248, 2021.
- SANTOS, L. B. Sistemática e filogenia de *Maytenus* Molina (Celastraceae) na região neotropical, tese de doutorado, Rio Claro, São Paulo: Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho), 2016.
- 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.
- SHAMSRIZI, P.; GLADSTONE, B. P.; CARRARA, E.; LUISE, D.; CONA, A.; BOVO, C.; TACCONELLI, E. Variation of effect estimates in the analysis of mortality and length of hospital stay in patients with infections caused by bacteria-producing extended-spectrum beta-lactamases: a systematic review and meta-analysis. **BMJ open** V. 10, n. 1, 2020.
- SHEN, Y.; CHEN, B. L.; ZHANG, Q. X.; ZHENG, Y. Z.; FU, Q. Traditional uses, secondary metabolites, and pharmacology of *Celastrus* species: a review. **Journal of ethnopharmacology**, v. 241, p. 111934, 2019.
- SINGH, A.; KUMAR, S.; KUMAR, B. LC-MS Identification of proanthocyanidins in bark and fruit of six *Terminalia* species. **Natural Product Communications**, v. 1, n. 5, p. 1934578X1801300511, 2018.
- SOBEH, M.; MAHMOUD, M. F.; ABDELFAHATTAH, M. A.; CHENG, H.; EL-SHAZLY, A. M.; WINK, M. A proanthocyanidin-rich extract from *Cassia abbreviata* exhibits antioxidant and hepatoprotective activities in vivo. **Journal of ethnopharmacology**, v. 213, p. 38-47, 2018.
- SOTO-MALDONADO, C.; FERNÁNDEZ-ARAYA, B.; SAAVEDRA-SÁNCHEZ, V.; SANTIS-BERNAL, J.; ALCAÍNO-FUENTES, L.; ARANCIBIA-DÍAZ, A.; ZÚÑIGA-HANSEN, M. E. Antioxidant and antimicrobial capacity of *Maytenus boaria* leaves, recovery

by infusion and solvent extraction. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 56, p. 47-53, 2022.

SOUSA, G. F.; AGUILAR, M. G.; DIAS, D. F.; TAKAHASHI, J. A.; MOREIRA, M. E. C.; VIEIRA-FILHO, S. A.; SILVA, D. G. F.; RODRIGUES, S. B. V.; MESSIAS, M. C. T. B.; DUARTE, L. P. Anti-inflammatory, antimicrobial and acetylcholinesterase inhibitory activities of friedelanes from *Maytenus robusta* branches and isolation of further triterpenoids. **Phytochemistry Letters**, v. 21, p. 61-65, 2017.

SOUZA, L. P. ALSEEKH, S., BROTMAN, Y., FERNIE, A. R.. Network-based strategies in metabolomics data analysis and interpretation: From molecular networking to biological interpretation. **Expert Review of Proteomics**, v. 17, n.4, p. 243-255, 2020.

SOUZA, R. K. D.; SILVA, M. A. P.; MENEZES, I. R. A.; RIBEIRO, D. A.; BEZERRA, L. R.; ALMEIDA SOUZA, M. M. Ethnopharmacology of medicinal plants of carrasco, northeastern Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 157, p. 99-104, 2014.

SOUZA, L. M.; CIPRIANI, T. R.; IACOMINI, M.; GORIN, P. A.; SASSAKI, G. L. HPLC/ESI-MS and NMR analysis of flavonoids and tannins in bioactive extract from leaves of *Maytenus ilicifolia*. **Journal of pharmaceutical and biomedical analysis**, v. 47, n. 1, p. 59-67, 2008.

SUNIL, A.; MUTHUSAMY, S.; RAMANATHAN, S. A Review on Different Computational Approaches of In Silico Drug Design. **Int. J. of Multidisciplinary and Current research**, v. 10, 2022.

TACCONELLI, E.; GORSKA, A.; DE ANGELIS, G.; LAMMENS, C.; RESTUCCIA, G.; SCHRENZEL, J.; HUDSON, D. H.; CAREVIĆ, B.; PREOTESCU, L.; CARMELI, Y.; KAZMA, M.; SPANU, T.; CARRARA, E.; MALHOTRA-KUMAR, S.; GLADSTONE, B. P. Estimating the association between antibiotic exposure and colonization with extended-spectrum β -lactamase-producing Gram-negative bacteria using machine learning methods: a multicentre, prospective cohort study. **Clin. Microbiol. Infec**, v. 26, n. 1, p. 87-94, 2020.

THOMFORD, N. E.; SENTHEBANE, D. A.; ROWE, A.; MUNRO, D.; SEELE, P.; MAROYI, A.; DZOBO, K. Natural products for drug discovery in the 21st century: innovations for novel drug discovery. **International journal of molecular sciences**, v.19, n.6, p.1578-1607, 2018.

VALDEVITE, M.; BERTONI, B. W.; BIRAL, L.; CREVELIN, E. J.; FRANÇA, S. C.; PINA, E. S.; LOPES, A. A.; PEREIRA, A. M. S. Root cultures of *Monteverdia floribunda* (Reissek) Biral grown in air sparging systems are sources of quinonemethide triterpenes. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)**, v. 147, n. 3, p. 647-651, 2021.

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, C., ZHANG, M., WU, L., WANG, F., LI, L., ZHANG, S., & SUN, B. Qualitative and quantitative analysis of phenolic compounds in blueberries and protective effects on hydrogen peroxide-induced cell injury. **Journal of Separation Science**, v. 44, n. 14, p. 2837-2855, 2021.

WEAVER, S.; GLEESON, M. P. The Importance of the Domain of Applicability in QSAR Modeling. **Journal of Molecular Graphics Model**, v. 26, n. 8, p. 1315–1326, 2008.

WILLIGHAGEN, E. L.; WAAGMEESTER, A.; SPJUTH, O.; ANSELL, P.; WILLIAMS, A. J.; TKACHENKO, V.; HASTINGS, J.; CHEN, B.; WILD, D. J. The ChEMBL Database as Linked Open Data. **Journal of Cheminformatics**, v. 5, n. 5. 2013.

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.

YE, H. L.; LIU, Y.; PAN, J.; GUAN, W.; LIU, Y.; LI, X. M.; WANG, S. Y.; ALGRADI, A. M.; KUANG, H. X. Three new sesquiterpenoid alkaloids from the roots of *Tripterygium wilfordii* and its cytotoxicity. *Natural Product Research*, v. 36, n. 15, p. 3979-3987, 2022.