



UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA – UFPB

CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE – CCS

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO PRODUTOS NATURAIS E SINTÉTICOS
BIOATIVOS - PgPNSB**

PAULA FERREIRA DOS SANTOS ESMERALDO

**Contribuição ao conhecimento químico e biológico de espécies da
flora paraibana: *Xylopia langsdorffiana* e *Maytenus distichophylla*.**

Orientador: Prof. Dr. Josean Fachine Tavares

Co-orientadora: Dra. Luciana Scotti

JOÃO PESSOA – PB

2015

PAULA FERREIRA DOS SANTOS ESMERALDO

Contribuição ao conhecimento químico e biológico de espécies da flora paraibana: *Xylopia langsdorffiana* e *Maytenus distichophylla*.

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 as exigências para obtenção do título de Doutor em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos.

Área de concentração: Farmacoquímica

Orientador: Prof. Dr. Josean Fachine Tavares

Co-orientadora: Dra. Luciana Scotti

JOÃO PESSOA – PB

2015

E77c Esmeraldo, Paula Ferreira dos Santos.
Contribuição ao conhecimento químico e biológico de
espécies da flora paraibana: *Xylopia langsdorffiana* e *Maytenus*
distichophylla / Paula Ferreira dos Santos Esmeraldo.- João
Pessoa, 2015.
189f. : il.
Orientador: Josean Fachine Tavares
Coorientadora: Luciana Scotti
Tese (Doutorado) - UFPB/CCS
1. Produtos naturais. 2. *Maytenus distichophylla*. 3. *Xylopia*
langsdorffiana. 4. Celastraceae. 5. Annonaceae. 6. Óleo
essencial.

UFPB/BC

CDU: 547.9(043)

PAULA FERREIRA DOS SANTOS ESMERALDO

Contribuição ao conhecimento químico e biológico de espécies da flora paraibana:

***Xylopia langsdorffiana* e *Maytenus distichophylla*.**

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 as exigências para obtenção do título de Doutor em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos. Área de concentração: Farmacoquímica.

Tese aprovada em **23/02/2015**

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof. Dr. Josean Fachine Tavares
Universidade Federal da Paraíba – Orientador

Dra. Luciana Scotti
Universidade Federal da Paraíba – Co-orientadora

Profa. Dra. Silvana Maria Zucolotto Langassner
Universidade Federal do Rio Grande do Norte – Examinador Externo

Prof. Dr. Kristerson Reinaldo de Luna Freire
Universidade Federal da Paraíba - Examinador Externo

Prof. Dr. Damião Pergentino de Sousa
Universidade Federal da Paraíba – Examinador Interno

Prof. Dr. Marcus Tullius Scotti
Universidade Federal da Paraíba – Examinador Interno

Dedico este trabalho ao meu pai, Antônio Manoel Alves dos Santos (in memoriam), pelo que sempre representará em minha vida pessoal e acadêmica.

Agradecimentos

*Agradeço primeiramente a **Deus**, pois até aqui me ajudou o Senhor.*

Ao meu pai, Antônio Manoel Alves dos Santos, por nunca ter medido esforços para eu estar aqui, desde a época do mestrado, vendendo até seu carro (objeto de trabalho) para me manter em João Pessoa; e a minha mãe Maria Socorro Ferreira dos Santos pelo tempo de oração a mim concedido.

Ao meu esposo Germano Milfont Esmeraldo, por ter suportado a ausência da esposa em nosso lar, pelas orações, compreensão e principalmente amor.

Aos meus irmãos Samantha Ferreira dos Santos, Marylia Albuquerque, Amaralina Rocha, Bruno Ferreira dos Santos e Felipe Ferreira dos Santos, pelo apoio e por acharem que sou inteligente [risos].

A sobrinha linda Giovanna Liz Ferreira Silva, por cada ligação que ela perguntava: - Tia Paula vem quando? Por esperar ansiosamente a minha chegada, pelos bilhetes de “Te Amo tia Paula do fundo do meu coração”, pelo amor verdadeiro, e por me fazer rir com suas peripécias.

*A tios, tias, primos e primas da família Alves dos Santos, pelos momentos de muitas risadas e descontração em Fortaleza-CE, comandados principalmente pelas primas palhaças Carolina Sousa, Larissa Souza, e Sterfany Souza, a prima mais meiga e carinhosa. E pela recepção sempre carinhosa da Maria Eduarda (Duda), a espoleta e fofa da família. E principalmente aos meus avós Judite e “Zalzino”, e minha tia avó Jesuíta por ter me acolhido, me criado, ensinado as tarefas de casa, e educado (*in memoriam*).*

Ao meu orientador Prof. Dr. Josean Fechine Tavares, quero agradecer pela honra de ter sido a primeira aluna de mestrado e doutorado.

A minha querida, linda e estimada co-orientadora Dra. Luciana Scotti, a quem não tenho palavras para agradecer tamanha atenção a mim dedicada. Pela lição de vida, gargalhadas, descontração, momentos de conversas, paciência. E a Dona Lélia pelo carinho, cuidado, e por sempre me receber em sua casa.

A todos os amigos da Primeira Igreja Batista Crato-CE, que compartilharam os momentos de alegria, tristeza e orações.

A todos os amigos e pastores da Igreja Batista Sal & Luz de João Pessoa-PB, que tive a honra de dividir lágrimas, sorrisos e principalmente aprender mais de Deus.

A todos do sempre LTF, por transformar a tarefa árdua do doutorado em risos. Pelas amizades que ficarão para sempre e pela confiança.

A todos que contribuíram para a realização deste trabalho.

Muito obrigada!!!

RESUMO

Estudos fitoquímico com *Xylopia langsdorffiana* (Annonaceae), descrevem o isolamento de diterpenos do tipo traquilobano, atisano, caurano e labdano, das folhas, frutos, caule e raízes da espécie. *Maytenus distichophylla* (Celastraceae), conhecida popularmente como espinheira santa, é utilizada na medicina popular para o tratamento de úlceras estomacais, e dados da literatura relatam o isolamento de triterpenos do tipo friedelano e alcaloides sesquiterpênicos pirimidínicos. O planejamento de fármacos auxiliado por computador, vem otimizando técnicas que facilitam na descoberta de novos fármacos, oferecendo recursos que permitem o acoplamento de compostos à proteínas tridimensionalmente conhecidas e originando modelos capazes de prever valores experimentais confiáveis para moléculas biologicamente ativas, tornando a busca por compostos biologicamente ativos mais eficiente. Este trabalho associou ensaios experimentais e investigações computacionais baseadas nas plantas extraídas da flora Paraibana: *X. langsdorffiana*, *M. distichophylla*, e outras espécies do gênero *Maytenus*. Reportaremos os testes experimentais realizados com raízes e caule de *Maytenus distichophylla* que possibilitaram a extração e determinação estrutural de flavonoide, esteroide e, triterpenos do tipo friedelano e lupano. Paralelamente realizamos estudos computacionais de *docking*, PLS e hidrofobicidade, com 15 triterpenos isolados de espécies do gênero *Maytenus* (incluindo *M. distichophylla*) e, 17 diterpenos isolados de *X. langsdorffiana*. Além disso, determinamos a composição química (por CG-EM e RMN), e atividade moduladora frente a bactérias multirresistentes. Os óleos essenciais das 3 espécimes de *X. langsdorffiana* foram analisadas pela Análise de Componente Principal (PCA). Três compostos foram isolados do caule de *M. distichophylla* por técnicas cromatográficas: 3-oxo-12 α -hidroxifriedelano, 30-hidroxifriedelan-3ona e 29-hidroxifriedelan-3-ona. Outros quatro compostos foram isolados das raízes: β -sitosterol, 11 α -hidroxigloquidona, rigidinol e 4'-O-metilepigalocatequina, sendo os três últimos relatados pela primeira vez na espécie. No estudo de *docking*, os diterpenos *ent*-atisan-7 α -acetoxi-16 α -ol, ácido labdorfiânico C e ácido labdorfiânico B apresentaram os menores valores de energia de formação quando complexados com a cruzaina, CYP2C9 e COX, respectivamente. Os triterpenos que apresentaram os menores valores de energia de formação complexados com essas enzimas foram, 3 β -hidroxí-9,12-en-ursano (cruzaina), ácido 3,4-seco-friedelan-3-óico (CYP2C9) e 3-oxo-12 α -hidroxifriedelano (COX). Na predição da atividade antitumoral, calculada a partir do modelo PLS construído, o diterpeno ácido labdorfiânico C, e o triterpeno 3 β -hidroxifriedelano, apresentaram os melhores valores preditos. Os compostos majoritários identificados nos óleos essenciais foram: *ent*-atisan-16 α -ol, germacreno D, limoneno e β -pineno. Os monoterpênos, β -pineno e limoneno, foram identificados em todos os óleos essenciais analisados, com diferentes porcentagens. Através da análise do óleo essencial do caule (espécime A) de *X. Langsdorffiana*, por RMN (^1H e ^{13}C) foi possível identificar o *ent*-atisan-16 α -ol, relatado pela primeira vez na espécie. Alguns óleos essenciais do espécime A, quando modulados com oxacilina frente a *S. aureus*, diminuíram a concentração do antibiótico em 99%. A análise de componente principal (PCA) realizada com o óleo essencial de três espécimes de *X. langsdorffiana*, permitiu identificar uma similaridade química entre os espécimes A e B, e uma diferença em C, quando comparados com A e/ou B. Este resultado pode estar relacionado a idade ou porte dos espécimes, já que os mesmos se encontram na mesma coordenada geográfica. Os modelos obtidos nos estudos de CADD foram satisfatórios e geraram resultados preditivos.

Palavras-chave: *Maytenus distichophylla*, *Xylopia langsdorffiana*, Celastraceae, Annonaceae, triterpeno, diterpeno, óleo essencial, *docking*, PLS, PCA.

ABSTRACT

Phytochemical studies with *Xylopia langsdorffiana* (Annonaceae), have described isolation of trachylobane, atisane, kaurane, and labdane diterpenes, from the leaves, fruits, stems and roots of the species. *Maytenus distichophylla* (Celastraceae), popularly known as *espinheira santa* – (sacred thorn bush), is used in folk medicine to treat stomach ulcers, and data from the literature report the isolation of triterpenoids friedelane, and pyrimidine sesquiterpene alkaloids. Computer aided drug design brings optimizing techniques that facilitate the discovery of new drugs, offering features that allow the connection of compounds to known proteins in three dimensions, and the resulting models are able to predict reliable experimental values for biologically active molecules, making the search for biologically active compounds more efficient. Our work associated experimental tests and computational investigations based on plants selected from the Paraiban flora: *X. langsdorffiana*, *M. distichophylla*, and other *Maytenus* species. We report the experimental tests performed with roots and stems of *Maytenus distichophylla* that enabled extraction and structural determination of flavonoids, steroids, and friedelane and lupane triterpenoids. Parallel studies were developed using computational docking, PLS, and hydrophobicity, with 15 triterpenoids isolated from *Maytenus* species (including *M. distichophylla*), and 17 diterpenes isolated from *X. langsdorffiana*. Further, we determined chemical compositions (by GC-MS and NMR), and modulation activity against multi-resistant bacteria. Essential oils of three *X. langsdorffiana* specimens were analyzed by Principal Component Analysis (PCA). Three compounds were isolated from stems of *M. distichophylla* by chromatographic techniques: 3-oxo-12 α -hydroxyfriedelane, 30-hydroxyfriedelan-3-one and 29-hydroxyfriedelan-3-one. Another four compounds were isolated from the roots: β -sitosterol, 11 α -hydroxyglochidone, rigidinol and 4'-O-methylepigallocatechin, this being the first report in the species of the latter three. In the docking study, the diterpenes *ent*-atisan-7 α -acetoxyl-16 α -ol, labdorianic C acid and labdorianic B acid had the lowest formation energy values when respectively complexed with cruzaine, CYP2C9, and COX. The triterpenoids with the lowest formation energy values when complexed with these enzymes were, 3 β -hydroxy-9,12-en-ursane (cruzaine), 3,4-seco-friedelan-3-oic acid (CYP2C9) and 3-oxo-12 α -hydroxyfriedelane (COX). In predicting antitumor activity, as calculated from the constructed PLS model, the diterpene labdorianic C acid, and triterpene 3 β -hydroxyfriedelane, showed the best predicted values. The majority compounds identified in the essential oils were: *ent*-atisan-16 α -ol, germacrene D, limonene and β -pinene. The monoterpenes, β -pinene and limonene, were identified in all analyzed essential oils in different percentages. Through analysis of the essential oil of the *X. langsdorffiana* stem (specimen A), NMR (^1H and ^{13}C) were able to identify *ent*-atisan-16 α -ol, the first time reported for this species. Some essential oils from specimen A when modulated with oxacillin against *S. aureus*, decreased concentration of the antibiotic by 99%. Principal component analysis (PCA) performed with the essential oil of three *X. langsdorffiana* specimens allowed identifying a similarity between the chemical species A and B, and a difference in C compared to A and/or B. This result may be related to the age or size of the specimens, since they share the same geographic coordinates. The models obtained in the CADD studies of were satisfactory and generated predictive results.

Keywords: *Maytenus distichophylla*, *Xylopia langsdorffiana*, Celastraceae, Annonaceae, triterpene, diterpene, essential oil, docking, PLS, PCA.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Mapa de distribuição da família Annonaceae no mundo.....	16
Figura 2: Mapa de distribuição do gênero <i>Xylopia</i> L. no mundo.....	18
Figura 3: Flor (A), fruto verde (B) e fruto maduro (C) de <i>X. langsdorffiana</i>	19
Figura 4: Mapa de distribuição da família Celastraceae no mundo.....	24
Figura 5: Quinonametídeos, classe ocorrente somente em Celastraceae.....	25
Figura 6: Mapa de distribuição do gênero <i>Maytenus</i> Mol. no mundo.....	26
Figura 7: Novos compostos isolados de <i>Maytenus</i>	27
Figura 8: <i>Maytenus distichophylla</i> “in situ” (FONTE: Duarte, M.C).	28
Figura 9: Compostos isolados de <i>M. distichophylla</i>	29
Figura 10: Obtenção e fracionamento do EEB das raízes de <i>M. distichophylla</i>	35
Figura 11: Fluxograma do fracionamento da fração I.....	36
Figura 12: Fluxograma do fracionamento da fração III.....	36
Figura 13: Fluxograma mostrando a obtenção e CLMP do EEB do caule de <i>M. distichophylla</i>	37
Figura 14: Fluxograma da cromatografia em coluna da fração III.....	38
Figura 15: Fluxograma mostrando as partes utilizadas para extração de óleo essencial.....	39
Figura 16: Espectro de massas de MDR1	42
Figura 17: Espectro RMN de ¹ H de MDR1 (CDCl ₃ , 200 MHz).	43
Figura 18: β-sitosterol.....	44
Figura 19: Espectro RMN ¹ H de MDR2 (CDCl ₃ , 200 MHz).	45
Figura 20: 11α-hidroxigloquidona.....	46
Figura 21: Espectro IV de MDR3	47
Figura 22: Espectro RMN ¹ H de MDR3 (CDCl ₃ , 200 MHz).	48
Figura 23: Espectro RMN ¹³ C APT de MDR3 (CDCl ₃ , 50 MHz).	49
Figura 24: 11α-hidroxi-lup-20(29)-en-3-ona (rigidenol).....	50
Figura 25: Espectro RMN ¹ H de MDR4 (CD ₃ OD, 200 MHz).	51
Figura 26: Espectro RMN ¹³ C APT de MDR4 (CD ₃ OD, 50 MHz).	52
Figura 27: 4'-O-metilepigallocatequina.....	53
Figura 28: Espectro IV de MDC1-MDC2	54
Figura 29: Espectro RMN ¹ H de MDC1-MDC2 (CDCl ₃ , 500 MHz).	55
Figura 30: Espectro RMN ¹³ C APT (CDCl ₃ , 125 MHz).	56
Figura 31: Estrutura química de MDC1 e MDC2	57
Figura 32: Espectro RMN ¹ H de MDC2-MDC3 (CDCl ₃ , 500 MHz).	58
Figura 33: Expansão do espectro de RMN ¹ H de MDC3 (CDCl ₃ , 500 MHz).	59
Figura 34: Espectro RMN ¹³ C APT de MDC2-MDC3 (CDCl ₃ , 50 MHz).	60
Figura 35: Estrutura química dos compostos presente na mistura de MDC3	61
Figura 36: Esqueletos do tipo caurano e atisano.	63
Figura 37: Espectro de RMN de ¹ H do óleo essencial do miolo do caule (Espécime A) em CDCl ₃	63
Figura 38: Espectro de RMN de ¹³ C APT do óleo essencial do miolo do caule (Espécime A) em CDCl ₃	64
Figura 39: Expansão do espectro de RMN de ¹³ C APT do óleo essencial do miolo do caule (Espécime A) em CDCl ₃	65
Figura 40: Espectro de massas do composto majoritário do óleo essencial (miolo do caule-A), obtido por impacto eletrônico.	65
Figura 41: ent-atisan-16α-ol.....	66
Figura 42: Estrutura química dos compostos identificados nos óleos essenciais de <i>X</i> .	

<i>langsdorffiana</i>	73
Figura 43: Cromatograma do óleo essencial da casca do caule (espécime A) de <i>X. langsdorffiana</i>	75
Figura 44: Cromatograma do óleo essencial da casca da raiz (espécime A) de <i>X. langsdorffiana</i>	75
Figura 45: Cromatograma do óleo essencial da folha (espécime A) de <i>X. langsdorffiana</i>	76
Figura 46: Cromatograma do óleo essencial do miolo da raiz (espécime A) de <i>X. langsdorffiana</i>	76
Figura 47: Cromatograma do óleo essencial do miolo do caule (espécime A) de <i>X. langsdorffiana</i>	77
Figura 48: Cromatograma do óleo essencial da casca do caule (espécime B) de <i>X. langsdorffiana</i>	77
Figura 49: Cromatograma do óleo essencial da casca da raiz (espécime B) de <i>X. langsdorffiana</i>	78
Figura 50: Cromatograma do óleo essencial da folha (espécime B) de <i>X. langsdorffiana</i>	78
Figura 51: Cromatograma do óleo essencial do miolo do caule (espécime B) de <i>X. langsdorffiana</i>	79
Figura 52: Cromatograma do óleo essencial do miolo da raiz (espécime B) de <i>X. langsdorffiana</i>	79
Figura 53: Cromatograma do óleo essencial da casca do caule (espécime C) de <i>X. langsdorffiana</i>	80
Figura 54: Cromatograma do óleo essencial da casca da raiz (espécime C) de <i>X. langsdorffiana</i>	80
Figura 55: Cromatograma do óleo essencial da folha (espécime C) de <i>X. langsdorffiana</i>	81
Figura 56: Cromatograma do óleo essencial do miolo do caule (espécime C) de <i>X. langsdorffiana</i>	81
Figura 57: Cromatograma do óleo essencial do miolo da raiz (espécime C) de <i>X. langsdorffiana</i>	82
Figura 58: Modulação dos óleos essenciais da Espécime A.....	86
Figura 59: Modulação dos óleos essenciais da Espécime B.....	87
Figura 60: Modulação dos óleos essenciais da Espécime C.....	88
Figura 61: Diterpenos descritos para <i>X. langsdorffiana</i>	106
Figura 62: a) Cruzaina complexada com <i>Tetrafluorophenoxymethyl ketone</i> , b) CYP2C9, complexado com <i>flurbiprofen</i> e c) ciclooxygenase complexada com <i>taxane</i>	107
Figura 63: Triterpenos em estudo.....	109
Figura 64: Compostos selecionados para cálculo da lipofilicidade.....	119
Figura 65: Poses dos complexos formados com menor energia pelas interações dos compostos <i>Tetrafluorophenoxymethyl ketone</i> , LAB5 e LAB4. Sendo linhas tracejadas azuis - ligações de hidrogênio e vermelhas – estéricas.....	122
Figura 66: Interações dos compostos estudados com a cruzaina, sendo linhas tracejadas azuis - ligações de hidrogênio e vermelhas - estéricas.....	124
Figura 67: Poses dos complexos formados com menor energia pelas interações dos compostos <i>flurbiprofen</i> , LAB5 e LAB4. Sendo linhas tracejadas azuis - ligações de hidrogênio e vermelhas - estéricas.....	126
Figura 68: Interações dos compostos estudados com o CYP2C9, sendo linhas tracejadas azuis - ligações de hidrogênio e vermelhas - estéricas.....	128
Figura 69: Poses dos complexos formados com menor energia pelas interações dos compostos <i>taxane</i> , LAB5 e LAB4. Sendo linhas tracejadas azuis - ligações de hidrogênio e vermelhas - estéricas.....	130
Figura 70: Poses dos complexos formados pelas interações dos compostos estudados com a	

COX, sendo linhas tracejadas azuis - ligações de hidrogênio, e vermelhas - estéricas.	132
Figura 71: Pose de menor energia e interações dos compostos U1 e F6. Sendo linhas tracejadas azuis - ligações de hidrogênio e vermelhas - estéricas.	134
Figura 72: Ácido Ursólico	135
Figura 73: Pose de menor energia do ácido ursólico complexado com a cruzaína (a), e pontos de interação (ligação de hidrogênio, interações estérica) do composto com a enzima (b).	136
Figura 74: Poses dos complexos formados pelas interações dos compostos estudados com a cruzaína, sendo linhas tracejadas azuis - ligações de hidrogênio, e vermelhas - estéricas.	138
Figura 75: Pose de menor energia do <i>flurbiprofen</i> e compostos F1 e F8.	139
Figura 76: Pose de menor energia do ácido ursólico complexado com CYP2C9 (a), e pontos de interação (ligação de hidrogênio, interações estérica) do composto com a enzima (b).	140
Figura 77: Interações dos compostos estudados com o CYP2C9, sendo linhas tracejadas azuis - ligações de hidrogênio, e vermelhas - estéricas.	142
Figura 78: Pose de menor energia do <i>taxane</i> e compostos F3 e F8.	143
Figura 79: Pose de menor energia do ácido ursólico complexado com ciclooxigenase.	144
Figura 80: Interações dos compostos estudados com o ciclooxigenase, sendo linhas tracejadas azuis - ligações de hidrogênio, e vermelhas - estéricas.	146
Figura 81: Modulação dos óleos essenciais com amicacina frente a <i>P. aeruginosa</i> , gráfico de <i>scores</i> e <i>loading</i> .	150
Figura 82: Modulação dos óleos essenciais com gentamicina frente a <i>S. aureus</i> , gráfico de <i>scores</i> e <i>loading</i> .	151
Figura 83: Modulação dos óleos essenciais com gentamicina frente a <i>P. aeruginosa</i> , gráfico de <i>scores</i> e <i>loading</i> .	152
Figura 84: Modulação dos óleos essenciais com oxacilina frente a <i>P. aeruginosa</i> , gráfico de <i>scores</i> e <i>loading</i> .	153
Figura 85: Modulação dos óleos essenciais com oxacilina frente a <i>S. aureus</i> , gráfico de <i>scores</i> e <i>loading</i> .	154
Figura 86: Lipofilicidade de diterpenos e triterpenos, com regiões hidrofóbicas destacadas em verde.	157
Figura 87: Gráficos dos <i>scores</i> e <i>loadings</i> de PC1 e PC2 para folhas dos espécimes A, B e C de <i>X. langsdorffiana</i> .	159
Figura 88: Gráficos dos <i>scores</i> e <i>loadings</i> de PC1 e PC2 para casca do caule dos espécimes A, B e C de <i>X. langsdorffiana</i> .	160
Figura 89: Gráficos dos <i>scores</i> e <i>loadings</i> de PC1 e PC2 para casca da raiz dos espécimes A, B e C de <i>X. langsdorffiana</i> .	161
Figura 90: Gráficos dos <i>scores</i> e <i>loadings</i> de PC1 e PC2 para miolo do caule dos espécimes A, B e C de <i>X. langsdorffiana</i> .	162
Figura 91: Gráficos dos <i>scores</i> e <i>loadings</i> de PC1 e PC2 para miolo da raiz dos espécimes A, B e C de <i>X. langsdorffiana</i> .	163
Figura 92: Gráficos dos <i>scores</i> e <i>loadings</i> de PC1 e PC2 dos óleos essenciais dos espécimes A, B e C de <i>X. langsdorffiana</i> .	165

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Constituintes químicos isolados de <i>Xylopia langsdorffiana</i>	21
Tabela 2: Quantidade (g) de material vegetal utilizado para extração de OE.....	39
Tabela 3: Origem e perfil de resistência de bactérias multirresistentes.....	40
Tabela 4: Dados de RMN de ¹ H (CDCl ₃) de MDR1 , e dados do β -sitosterol descritos na literatura.....	44
Tabela 5: Dados de RMN de ¹ H (CDCl ₃) de MDR2 , e dados do 11 α -hidroxigloquidona descritos na literatura.	46
Tabela 6: Dados de RMN de ¹³ C de MDR3 (CDCl ₃ , 50 MHz) e dados do rigidinol descritos na literatura.	50
Tabela 7: Dados de RMN de ¹³ C e ¹ H de MDR4 (CD ₃ OD, 50 e 200 MHz).....	53
Tabela 8: Dados de RMN de ¹³ C de MDC1 e MDC2 (CDCl ₃ , 50 MHz), comparado com dados da literatura.	57
Tabela 9: Dados de RMN de ¹³ C de MDC3 (CDCl ₃ , 125 MHz), comparado com dados da literatura.....	61
Tabela 10: Rendimentos dos óleos essenciais de <i>X. langsdorffiana</i>	62
Tabela 11: Dados de RMN de ¹³ C (CDCl ₃) do composto majoritário do óleo essencial do miolo do caule de <i>X. langsdorffiana</i> , e dados do <i>ent</i> -atisan-16 α -ol descritos na literatura.	66
Tabela 12: Composição química dos óleos essenciais extraídos de diferentes partes e diferentes espécimes de <i>X. langsdorffiana</i>	68
Tabela 13: Concentração inibitória mínima dos óleos essenciais testados.....	83
Tabela 14: Diterpenos utilizados na construção do modelo PLS.	110
Tabela 15: Triterpenos utilizados na construção do modelo PLS.	115
Tabela 16: Valores binários atribuídos aos resultados obtidos na atividade microbiológica dos óleos essenciais de <i>X. langsdorffiana</i>	118
Tabela 17: Energias de formação dos complexos diterpeno-cruzaína.....	121
Tabela 18: Energias de formação dos complexos diterpeno-CYP2C9.....	125
Tabela 19: Energias de formação dos complexos diterpeno-ciclooxigenase.....	129
Tabela 20: Energias de formação dos complexos triterpeno-cruzaína.	133
Tabela 21: Energias de formação dos complexos triterpeno-CYP2C9.	138
Tabela 22: Energia de formação dos complexos triterpeno-ciclooxigenase.....	142
Tabela 23: Valores experimentais e preditos do conjunto teste.....	146
Tabela 24: Valores predito da atividade antitumoral de diterpenos isolados de <i>Xylopia langsdorffiana</i>	147
Tabela 25: Valores predito da atividade antitumoral de triterpenos isolados de espécies do gênero <i>Maytenus</i>	148
Tabela 26: Valores de <i>logP</i> para os diterpenos e triterpenos	155
Tabela 27: Variância explicada e cumulativa das componentes.....	157

SUMÁRIO

1	CAPÍTULO 1: ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DE COMPOSTOS.....	14
1.1	FAMÍLIA ANNONACEAE	16
1.1.1	Gênero <i>Xylopi</i> a.....	17
1.1.2	<i>Xylopi</i> a <i>langsdo</i> rffiana St-Hil & Tul.....	19
1.2	FAMÍLIA CELASTRACEAE	24
1.2.1	Gênero <i>Maytenus</i> Mol.....	26
1.2.2	<i>Maytenus distichophylla</i> Mart. ex Reissek	27
1.3	ÓLEOS ESSENCIAIS E ATIVIDADE MICROBIOLÓGICA.....	29
1.4	OBJETIVOS	32
1.4.1	Objetivo geral	32
1.4.2	Objetivos específicos	32
1.5	MATERIAIS E MÉTODOS	33
1.5.1	Métodos de análise	33
1.5.1.1	Métodos cromatográficos.....	33
1.5.1.2	Espectroscopia de ressonância magnética nuclear e infravermelho.....	33
1.5.1.3	Cromatografia gasosa	34
1.5.2	Estudo fitoquímico.....	34
1.5.2.1	Coleta e identificação do material botânico	34
1.5.2.2	Processamento do material vegetal.....	34
1.5.2.3	Fracionamento do extrato bruto das raízes de <i>Maytenus distichophylla</i>	35
1.5.2.4	Fracionamento do extrato bruto do caule de <i>Maytenus distichophylla</i>	36
1.5.3	Estudo fitoquímico e microbiológico dos óleos essenciais de <i>Xylopi</i> a <i>langsdo</i> rffiana.....	38
1.5.3.1	Extração de óleo essencial	38
1.5.3.2	Atividade microbiológica.....	39
1.6	RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	42
1.6.1	Estudo fitoquímico de <i>Maytenus distichophylla</i>	42
1.6.1.1.	Elucidação estrutural de MDR1	42
1.6.1.2.	Elucidação estrutural de MDR2	45

1.6.1.3.	Elucidação estrutural de MDR3	47
1.6.1.4.	Elucidação estrutural de MDR4	51
1.6.1.5.	Elucidação estrutural de MDC1 e MDC2	54
1.6.1.6.	Elucidação estrutural de MDC3	58
1.6.2	Estudo fitoquímico e microbiológico dos óleos essenciais de <i>X. langsdorffiana</i> 62	
1.6.2.1	Composição química dos óleos essenciais	62
1.6.2.2	Atividade microbiológica do óleo essencial de <i>X. langsdorffiana</i>	83
2	CAPÍTULO 2: PLANEJAMENTO DE FÁRMACO AUXILIADO POR COMPUTADOR	89
2.1	ESTUDOS DE CADD (<i>Computer-aided drug design</i>)	91
2.1.1	Modelagem molecular	91
2.1.2	Relação quantitativa entre estrutura química e atividade biológica (QSAR)	92
2.1.3	Análise de componentes principais (<i>Principal Component Analysis - PCA</i>)	93
2.1.4	Método dos mínimos quadrados parciais (<i>Partial Least Squares -PLS</i>)	94
2.1.4.1	Seleção de variáveis	97
2.1.5	<i>Molecular Interaction Fields</i> (MIFs)	98
2.1.6	Lipofilicidade	99
2.2	CÂNCER	99
2.3	DOENÇA DE CHAGAS	102
2.4	OBJETIVOS	104
2.4.1	Objetivo geral	104
2.4.2	Objetivos específicos	104
2.5	MATERIAIS E MÉTODOS	105
2.5.1	<i>Docking</i> com diterpenos	105
2.5.2	<i>Docking</i> com triterpenos	107
2.5.3	Método dos mínimos quadrados parciais (<i>Partial Least Squares -PLS</i>)	110
2.5.3.1	Diterpenos	110
2.5.3.2	Triterpenos	114
2.5.3.3	Atividade microbiológica X Composição química	117
2.5.4	Lipofilicidade	119

2.5.5	Análise de componentes principais (<i>Principal Component Analysis -PCA</i>) ...	119
2.6	RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	121
2.6.1	<i>Docking</i> com diterpenos	121
2.6.1.1	Complexos diterpeno-cruzaína.....	121
2.6.1.2	Complexos diterpeno-CYP2C9	124
2.6.1.3	Complexos diterpeno-ciclooxigenase.....	128
2.6.2	<i>Docking</i> com triterpenos	132
2.6.2.1	Complexos triterpeno-cruzaína	132
2.6.2.2	Complexos triterpeno-CYP2C9	138
2.6.2.3	Complexos triterpeno-ciclooxigenase	142
2.6.3	Partial Least Squares (PLS)	146
2.6.3.1	Diterpenos	146
2.6.3.2	Triterpenos	148
2.6.3.3	Atividade microbiológica X Composição química	149
2.6.4	Lipofilicidade de diterpenos e triterpenos.....	154
2.6.5	Análise de componentes principais (<i>Principal Component Analysis (PCA)</i>)..	157
3	CONCLUSÃO	166
4	REFERÊNCIAS	168

Capítulo 1

Isolamento e identificação de compostos

O uso de plantas com finalidades medicinais data de milhares de anos. As propriedades terapêuticas de tais plantas foram evidenciadas pela observação dos povos primitivos, e propagados de geração em geração (TYLER, 1996; TUROLLA & NASCIMENTO, 2006).

Os metabólitos secundários produzidos pelas plantas são essenciais para sua proteção contra herbívoros, microrganismos, proteção UV, atração de polinizadores ou dispersores de sementes (SIMÕES et al., 2007). Além dessas funções, esses compostos, isolados ou em misturas, apresentam diversas atividades biológicas, a saber: antitumoral (GALVE-ROPERH et al., 2000), antioxidante (SOUSA et al., 2007), inseticida (KNAAK et al., 2010), larvicida (FURTADO et al., 2005), antibacteriana (PESSINI et al., 2003), antifúngica (PASSOS et al., 2002), tripanocida (HERZOG-SOARES et al., 2002), dentre outras.

Os terpenoides formam uma classe de metabólitos secundários com estruturas bastante diversificadas, dentre elas os diterpenos e triterpenos. Os diterpenos vem apresentando importantes propriedades biológicas, das quais podemos citar: atividades anti-inflamatória (DÍAZ-VICIEDO et al., 2008), quimioterapêutica (CAVALCANTI et al., 2010), antitumoral e citotóxica (SANTOS et al., 2009; PITA, 2010), espasmolítica e hipotensiva (FURTADO, et al., 2006), propriedades cardioativas (BHAT et al., 1977), atividade anti-hipertensiva (KELECOM, 1983), dentre outras. Os triterpenos apresentam atividade antimicrobiana (MOKOKA et al., 2013), citotóxica (ORAMAS-ROYO et al., 2010; MAGALHAES et al., 2011; MOKOKA et al., 2013; MOMTAZ et al., 2013), antiprotozoária (SANTOS et al., 2013b), inibidor da replicação do vírus HIV (OSORIO et al., 2012), antioxidante, tratamento de diabetes mellitus tipo 2 (ARDILES et al., 2012).

Os diterpenos e triterpenos apresentam ampla distribuição no gênero *Xylopia*. (Annonaceae), e no gênero *Maytenus* (Celastraceae), respectivamente. Estudos relatam o isolamento e a identificação de compostos diterpênicos das folhas, frutos, caule e raízes de *Xylopia langsдорffiana* (TAVARES et al., 2004; TAVARES et al., 2006; TAVARES et al., 2007b, SILVA et al., 2009; DUARTE, 2009; SANTOS, 2011, SANTOS et al.,

2013), e o isolamento de triterpenos das folhas de *Maytenus distichophylla* (DUARTE et al., 2013).

Flores, folhas, cascas e frutos também são matérias-primas utilizadas na extração de óleos essenciais, na grande maioria das vezes, extraídos por arraste a vapor, e constituídos principalmente por uma mistura complexa de monoterpenos, sesquiterpenos e fenilpropanoides (BIZZO; HOVELL & REZENDE, 2009). Os óleos essenciais também apresentam atividades como antifúngica (CAVALCANTI, ALMEIDA & PADILHA, 2011), antibacteriana (GEROMINI et al., 2012), inseticida (KNAAK & FIUZA, 2010), antitumoral (AMARAL, 2014), antioxidante (PEREIRA & MAIA, 2007), larvicida frente a *Aedes aegypti* (FURTADO et al., 2005; DIAS & MORAES, 2014), dentre outras.

Os óleos essenciais têm sido aliados a fármacos antimicrobianos e têm apresentado sinergismo frente a cepas bacterianas, potencializando a atividade do antibiótico, e estimulando desta forma estudos que envolvam a terapia convencional e plantas medicinais (ZAGO et al., 2009). As atividades antibacteriana atribuídas aos óleos essenciais abrem perspectivas no desenvolvimento de fitoterápicos eficazes, podendo ser aplicado no tratamento de doenças causadas por microrganismos resistentes, modificando assim o fenótipo bacteriano de resistente para sensível (BERTINI et al., 2005).

O uso indiscriminado de antibióticos e o longo período de internação em Unidades de Terapias Intensivas - UTIs, tem levado ao surgimento de bactérias multirresistentes. A multirresistência é um termo designado para determinar a resistência dos organismos a um expressivo número de antimicrobianos (BOTA et al., 2003). A resistência aos antibióticos torna-se um problema de saúde pública, uma vez que os antibióticos empregados são em sua maioria o último recurso no tratamento das infecções (NEVES et al., 2011).

Com a finalidade de contribuir para o estudo fitoquímico da Flora Paraibana, este trabalho relata o isolamento e a elucidação estrutural de constituintes químicos presentes nas raízes e no caule de *Maytenus distichophylla*, além de determinar a composição química dos óleos essenciais extraídos das folhas, do caule e das raízes de *Xylopia langsdorffiana* e avaliar a atividade moduladora dos referidos óleos frente a diferentes linhagens bacterianas.

1.1 FAMÍLIA ANNONACEAE

Descrita por Linneau, a família Annonaceae foi relatada por Jussieu a partir do gênero *Annona*. Caracterizada como uma das principais angiospermas, Annonaceae é a maior família da ordem Magnoliales (APG III, 2009), com cerca de 2.500 espécies e 135 gêneros com distribuição pantropical (CHATROU et al., 2004), estando representada no Brasil por 26 gêneros, dos quais sete são endêmicos, e cerca de 260 espécies (ERKENS et al., 2006) (Figura 1). Pontes et al. (2005), registrou 6 gêneros e 15 espécies para o estado da Paraíba.



FONTE: Missouri Botanical Garden, 2014.

Figura 1: Mapa de distribuição da família Annonaceae no mundo.

Os gêneros mais importantes na família são: *Annona*, *Rollinia* e *Abernona*, nos quais se encontram espécies cultivadas. *Annona*, que em analogia aos saborosos frutos, significa em latim “farta colheita anual”. Sendo este o gênero mais importante economicamente, na qual destacam as frutíferas: cherimóia (*Annona cherimola* Mill.), condessa (*Annona reticulata* L.), graviola (*Annona muricata* L.), ata ou fruta-do-conde (*Annona squamosa*), atemóia (híbrido de *Annona cherimola* x *Annona squamosa*), araticum-do-campo (*Annona dioica*), araticum-do-brejo (*Annona paludosa*), cabeça-de-negro (*Annona coriacea*) e ilama (*Annona diversifolia*) (MANICA, 1997).

As espécies desta família se destacam pelo odor forte que apresentam quando seus troncos ou ramos são cortados, e pela presença de fibras longas e resistentes na casca do

caule, conhecida popularmente como envira (RIBEIRO et al., 1999).

No Brasil, as principais espécies nativas e gêneros encontrados são: *Annona coriacea* (cabeça-de-negro), *Annona dioica* (araticum-do-campo), *Annona paludosa* (araticum-do-brejo), *Rollinia silvatica* (araticum-do-mato), *Abernonia purpuraceae* (marolo), *Abernonia lanceolata* (pindaíba), e os seguintes gêneros: *Guateria*, *Uvaria*, *Anaxagorea*, *Xylopia* e *Bocagea* (SIMÃO, 1998). Comercialmente as mais importantes e cultivadas são: graviola, para indústria de suco e polpa, a fruta-do-conde, a cherimóia, a atemóia e fruta-da-condessa, para consumo *in natura* (MOSCA et al., 2006).

Na década de 80 surgiu um novo estímulo para o estudo fitoquímico da família, isto foi devido ao isolamento de uma nova classe de substâncias naturais bioativas conhecidas como “acetogeninas de anonáceas” (RUPRECHT et al., 1990), que apresentaram uma gama de importantes atividades biológicas tais como: citotóxica, antitumoral, pesticida, vermífida, abortiva, antimicrobiana, imunossupressora, antiemética, inibidora do apetite e antibacteriana (NASCIMENTO et al., 2003; PIMENTA et al., 2005; LIAW et al., 2003; LI et al., 2010). Além das acetogeninas, a família também é caracterizada pela presença de terpenoides, principalmente diterpenos (MIYASHITA et al., 2010), alcaloides (FEITOSA et al., 2009; SETTE et al., 2000; PINHEIRO et al., 2009), flavonoides (SANTOS & SALATINO, 2000), e óleos essenciais cuja a composição química é predominantemente monoterpenos e sesquiterpenos (COSTA et al., 2008; HUMEIRAH et al., 2010).

1.1.1 Gênero *Xylopia*

Xylopia L. foi descrita pela primeira vez na obra “Systema Naturae” por Linneau em 1759 por uma espécie nativa da Jamaica, *Xylopia muricata* (DIAS, 1988). Seu nome tem origem grega e significa “lenho amargo” (MARTIUS, 1967).

O gênero constitui um dos maiores entre a família Annonaceae, com cerca de 160 espécies, apresentando distribuição pantropical (CRONQUIST, 1981). No Brasil ocorrem 25 espécies distribuídas em todo o país, principalmente na região amazônica (DIAS, 1988) (Figura 2).



FONTE: Missouri Botanical Garden, 2014.

Figura 2: Mapa de distribuição do gênero *Xylopiya* L. no mundo.

As espécies de *Xylopiya* são encontradas principalmente na forma de arbustos e árvores com até 7 m, apresentando flores axilares em glomérulos, aos pares ou solitárias, botões florais trígonos, flores trímeras, actinomorfas, periantadas, cálice dialissépalo, corola dialipétala com prefloração valvar, seis pétalas dispostas em dois verticilos, androceu formado por numerosos estames e estaminoides, gineceu apocárpico com vários carpelos (PONTES & MELLO-SILVA, 2005).

As fibras de algumas espécies pertencentes ao gênero são utilizadas para a fabricação de cordas muito resistentes (FRIES, 1959), os frutos de algumas espécies também são utilizados popularmente como condimento por apresentar odor semelhante ao da pimenta-do-reino (*Piper nigrum*), substituindo a mesma (CHADWICK, 1990).

Vilegas et al. (1991) relata que as espécies do gênero *Xylopiya* apresentam substâncias comuns, os diterpenos, e acredita-se que esses compostos sejam potencialmente, marcadores quimiotaxonômicos do gênero. Além destes já foi relatada também a presença de acetogeninas biologicamente ativas como a xylopiena e a xylomatenina, que apresentam atividade citotóxica superior a adramicina para três linhagens de células tumorais (COLMAN-SAZARITORIA et al., 1994), sesquiterpenos (MARTINS et al., 1998), alcaloides (HARRIGAN et al., 1994), lignoides (WAHI et al., 1995) e flavonoides (SANTOS & SALATINO, 2000), óleos essenciais (SOUSA et al., 2004), esteroides, alcaloides, amidas, dentre outros (MOREIRA et al., 2013).

1.1.2 *Xylopi langsdorffiana* St-Hil & Tul

Xylopi langsdorffiana, conhecida popularmente como pimenteira-da-terra (FONTE: Paula F. Santos Esmeraldo

Figura 3), é considerada uma árvore que pode atingir de 5-7 metros de altura, com folhas alternas, lanceoladas, inteiras, seríceas, flor roxa e pedunculadas. Sua madeira é fornecida para obras internas, carpintaria e caixotaria (CORREA, 1984).



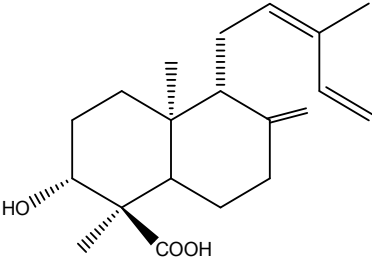
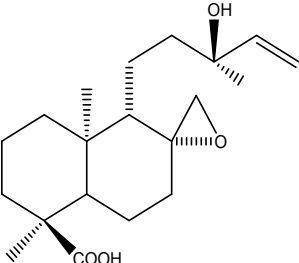
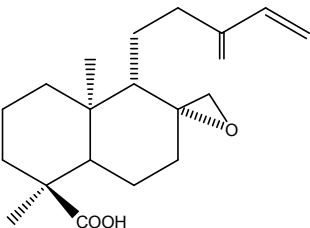
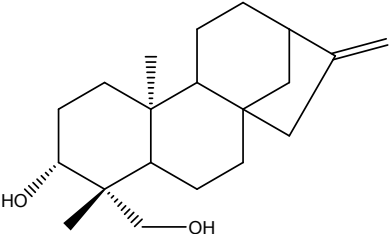
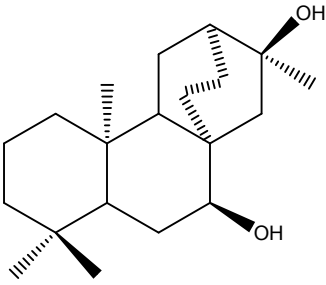
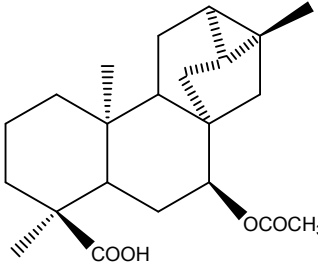
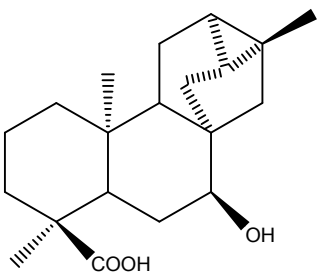
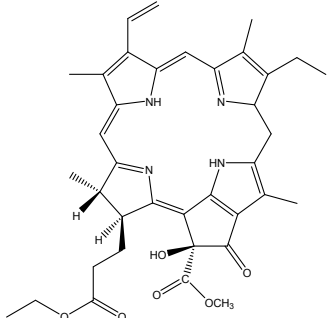
FONTE: Paula F. Santos Esmeraldo

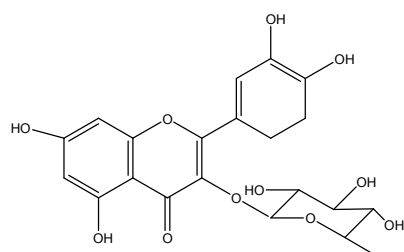
Figura 3: Flor (A), fruto verde (B) e fruto maduro (C) de *X. langsdorffiana*.

Por se mostrar uma fonte promissora de substâncias bioativas, a espécie vem sendo estudada desde 2002 pelo Programa de Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos da Universidade Federal da Paraíba - UFPB. Estudos anteriores relatam o isolamento de alcaloides (TAVARES et al., 2004), terpenoides (TAVARES et al., 2004; TAVARES et al., 2006; TAVARES et al., 2007b, SILVA et al., 2009; DUARTE, 2009; SANTOS, 2011, SANTOS et al., 2013), feoforbídeo e flavonoide glicosilado (SILVA et al., 2008). Estudos realizados pelo Programa de Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos, também descrevem avaliações farmacológicas realizadas com extratos, óleos essenciais ou substâncias isoladas de *X. langsdorffiana*, como a atividade moluscicida para o óleo essencial das folhas (TAVARES et al., 2007a), atividade espasmolítica em músculo liso de traqueia de cobaia para o ácido 8(17),12E,14-labdatrien-18-óico (RIBEIRO et al., 2007), atividade antitumoral, toxicidade (PITA, 2010; PITA et al., 2012), atividade citotóxica sobre células V79 e hepatócitos de rato (TAVARES et al., 2006) e estudo farmacocinético do ácido *ent*-7 α -acetoxitraquiloban-18-óico (PITA, 2014; PITA et al., 2014), efeito relaxante

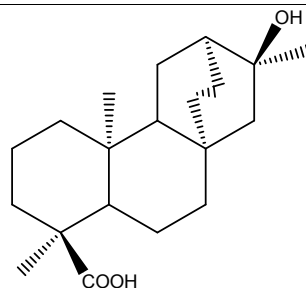
em traqueia isolada de cobaia do ácido *ent-7 α* -hidroxitraquiloban-18-óico (RIBEIRO et al., 2007), e efeito gastroprotetor do extrato de *X. langsdorffiana* (MONTENEGRO et al., 2014). Na Tabela 1 podem ser observadas as substâncias isoladas de *Xylopi* *langsdorffiana*.

Tabela 1: Constituintes químicos isolados de *Xylopia langsdorffiana*.

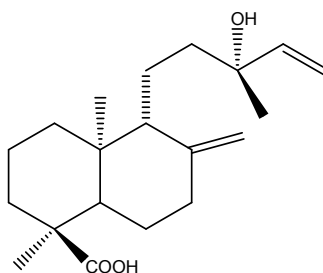
FRUTOS	
 Ácido labdorffianico A (DUARTE, 2009)	 Ácido labdorffianico B (DUARTE, 2009)
 Ácido labdorffianico C (DUARTE, 2009)	 ent-Cauran-3β-19β-diol (DUARTE, 2009)
FOLHAS	
 Xylodiol (TAVARES et al., 2007)	 Ácido ent-7α-acetoxitraquiloban-18-oico (TAVARES et al., 2006)
 Ácido ent-7α-hidroxitraquiloban-18-oico (TAVARES et al., 2006)	 13b (S)-Hidroxi-17c-toxifeoforbídeo (SILVA et al., 2009)



Quercetina-3- α -raminosídeo
(SILVA et al., 2009)

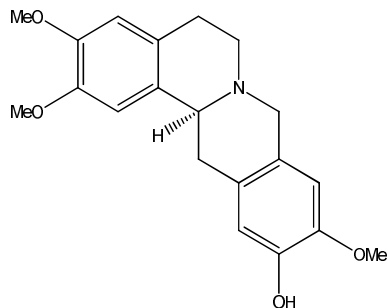


Ácido *ent*-16 α -hidroxi-atisan-18-oico
(SILVA et al., 2009)

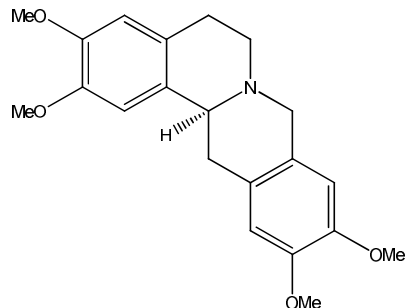


Ácido 13-epicuprésico
(TAVARES et al., 2007)

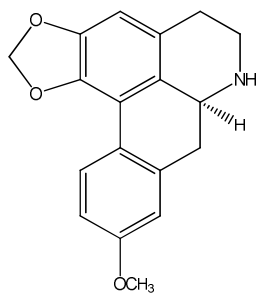
CAULE



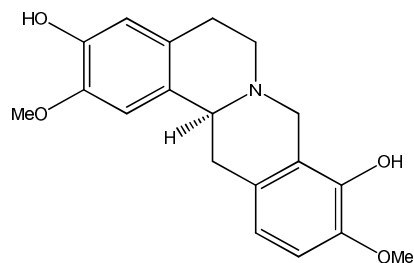
Coritenchina
(SILVA et al., 2009)



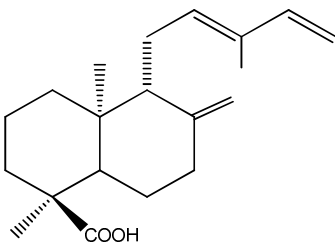
Xylopinina
(SILVA et al., 2009)



Xylopina
(SILVA et al., 2009)

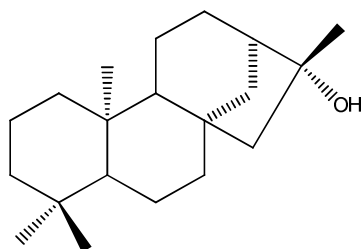


Discretamina
(SILVA et al., 2009)

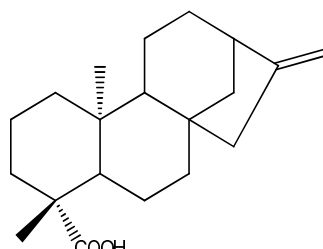


Ácido 8(17), 12E, 14-labdatrien-18-oico
(TAVARES et al., 2007)

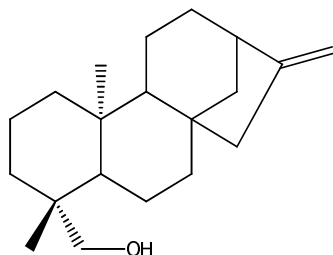
RAÍZES



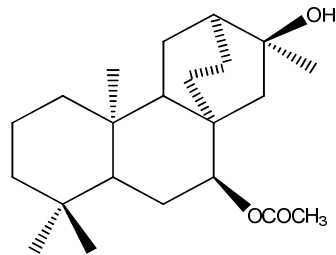
ent-cauran-16β-ol
(SANTOS, 2011)



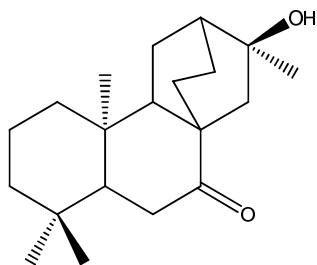
Ácido ent-caur-16-en-19-óico
(SANTOS, 2011)



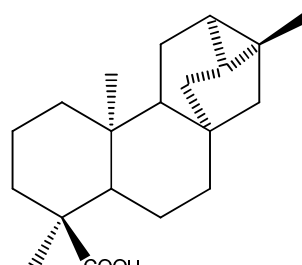
ent-caur-16-en-19-ol
(SANTOS, 2011)



Acetato de xylodiol
(SANTOS, 2011)



Xylopinona
(SANTOS, 2011)

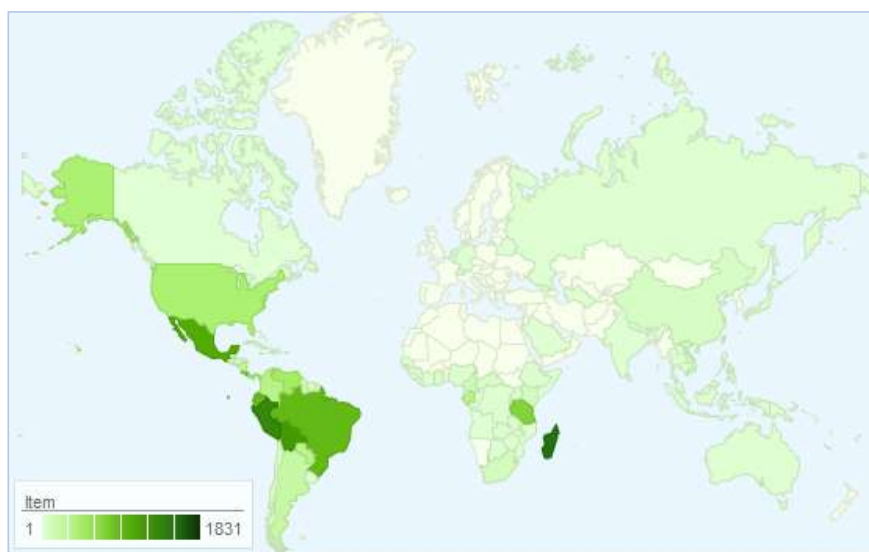


Ácido ent-traquiloban-18-óico
(SANTOS, 2011)

1.2 FAMÍLIA CELASTRACEAE

Celastraceae, conhecida também como família agridoce devido sabor dos seus frutos, está distribuída nos trópicos e subtropicais do mundo, com poucos representantes em regiões temperadas, predominando em zonas áridas (Figura 4).

A família apresenta cerca de 88 gêneros e 1300 espécies no mundo (CLEVINGER & CLEVINGER, 2010), sendo no Brasil representada por quatro gêneros: *Maytenus* Juss., *Austroplenckia* Lund., *Franhofera* Mart. e *Salacia* Mart. (OLIVEIRA 2006).



Fonte: Missouri Botanical Garden, 2014.

Figura 4: Mapa de distribuição da família Celastraceae no mundo.

Shan et al. (2013) retrataram Celastraceae como uma das duas maiores fontes de triterpenos friedelano, sendo os quinonametídeos e seus dímeros, restritos a esta família. Além de friedelanos, outros princípios ativos como oleanano e lupano, apresentam atividade antitumoral.

Silva, Duarte & Vieira Filho (2014), reportam outros tipos de compostos que apresentam propriedades biológicas interessantes na família Celastraceae, como: glicosídeos cardiotônicos com atividade antiproliferativa contra câncer de ovário humano, sesquiterpenos (esqueleto básico de di-hidro- β -agarofurano) com atividade de inibição fotossintética, alcaloides sesquiterpênico piridínico (esqueleto básico de sesquiterpeno do tipo di-hidro- β -agarofurano) com atividade citotóxica contra células tumorais de colo humano, flavonoides glicosilados, e triterpenos quinonametídeos com

atividade contra *Trypanosoma cruzi*.

Extratos de espécies da família Celastraceae tem sido utilizado durante séculos na América do Sul e China, como repelente e inseticida na agricultura tradicional, assim como para uma infinidade de doenças estomacais, febre, artrite reumática e câncer (SPIVEY, MATTHEW & WOODHEAD, 2002).

Os quinonametídeos são considerados os indicadores quimiotaxonômico da família Celastraceae, já que ocorrem somente em plantas desta família (Figura 5). Estes terpenos exibem diversas atividades biológicas, sendo recentemente concentrada toda a atenção para a tingenona, substância isolada das raízes de várias espécies de Celastraceae, com elevada toxicidade para inúmeras linhagens celulares de câncer (PAZ et al., 2013; PÉREZ et al., 2014; GOMES, 2008; SETZER et al., 2001).

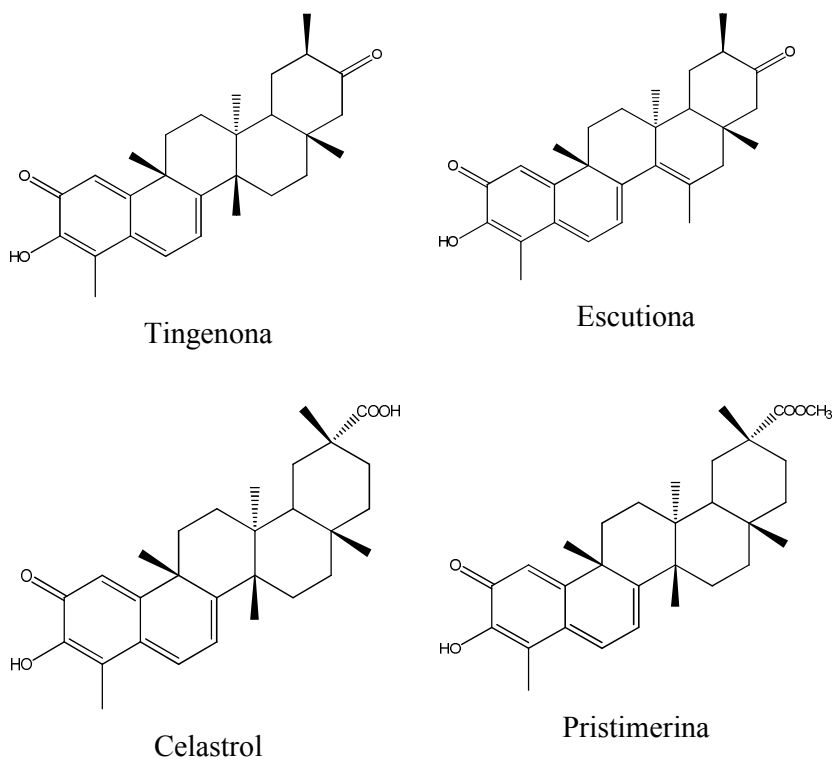
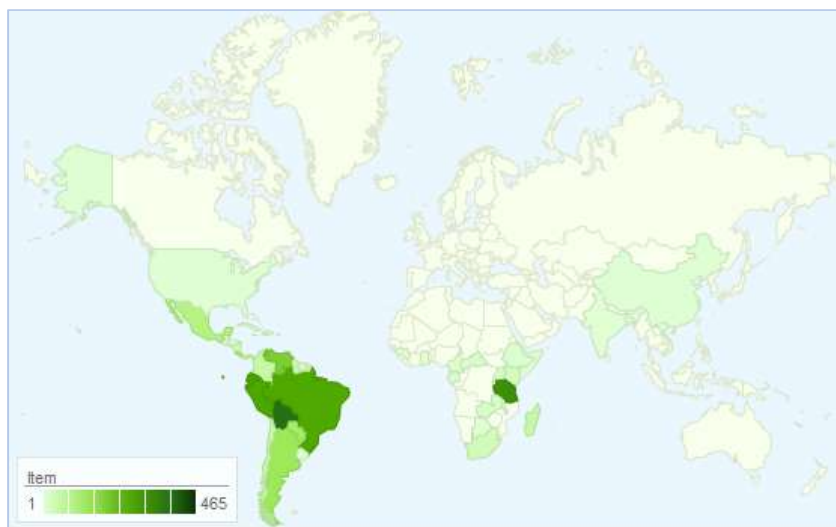


Figura 5: Quinonametídeos, classe ocorrente somente em Celastraceae.

1.2.1 Gênero *Maytenus* Mol.

O gênero *Maytenus* Mol., é um dos maiores gêneros da família Celastraceae, distribuída na América, Ásia e África, com 200 espécies difundida no mundo (CLEVINGER & CLEVINGER, 2010) (Figura 6).



Fonte: Missouri Botanical Garden, 2014.

Figura 6: Mapa de distribuição do gênero *Maytenus* Mol. no mundo.

Diversos compostos químicos tem sido isolados de espécies do gênero *Maytenus*, como: triterpenos com atividade antimicrobiana, citotóxica, antiprotzoária, inibidor da replicação do vírus HIV, antioxidante, tratamento de diabetes mellitus tipo 2, (RODRIGUES et al., 2014; MOKOKA et al., 2013; UDDIN et al., 2013; MOMTAZ et al., 2013; ARDILES et al., 2012; OSORIO et al., 2012; MAGALHAES et al., 2011; ORAMAS-ROYO et al., 2010); alcaloides sesquiterpênicos pirimidínicos com atividade inseticida, antiprotzoário, inseticida, antitumoral (SANTOS et al., 2012; NUNEZ et al., 2004; KUO et al., 1990); flavonoides (LEITE et al., 2001; VILEGAS et al., 1999; SANNOMIYA et al., 1998); catequina (CORSINO et al., 2003; MAGALHAES, 2011) e macrolídeos (KUO et al., 1994).

O gênero *Maytenus* é rico em triterpenos, e o surgimento de novas estruturas vem sendo relatado na literatura, a exemplo: maytensifolona (DUARTE et al., 2013), ácido ficusonico com moderada atividade citotóxica sobre células HeLa (DIN et al., 2013), 3,16-dioxo-12 α -hidroxifriedelano (SILVA et al., 2011a), 3,4-*seco*-friedelan-3,11 β -olide,

3 β -hidroxi-21 β -H-hop-22(29)-en (SOUSA et al., 2012a) e 1 β -hidroxi-3 β -cafeatolup-20(29)-en (DELGADO-MENDEZ et al., 2008) (Figura 7).

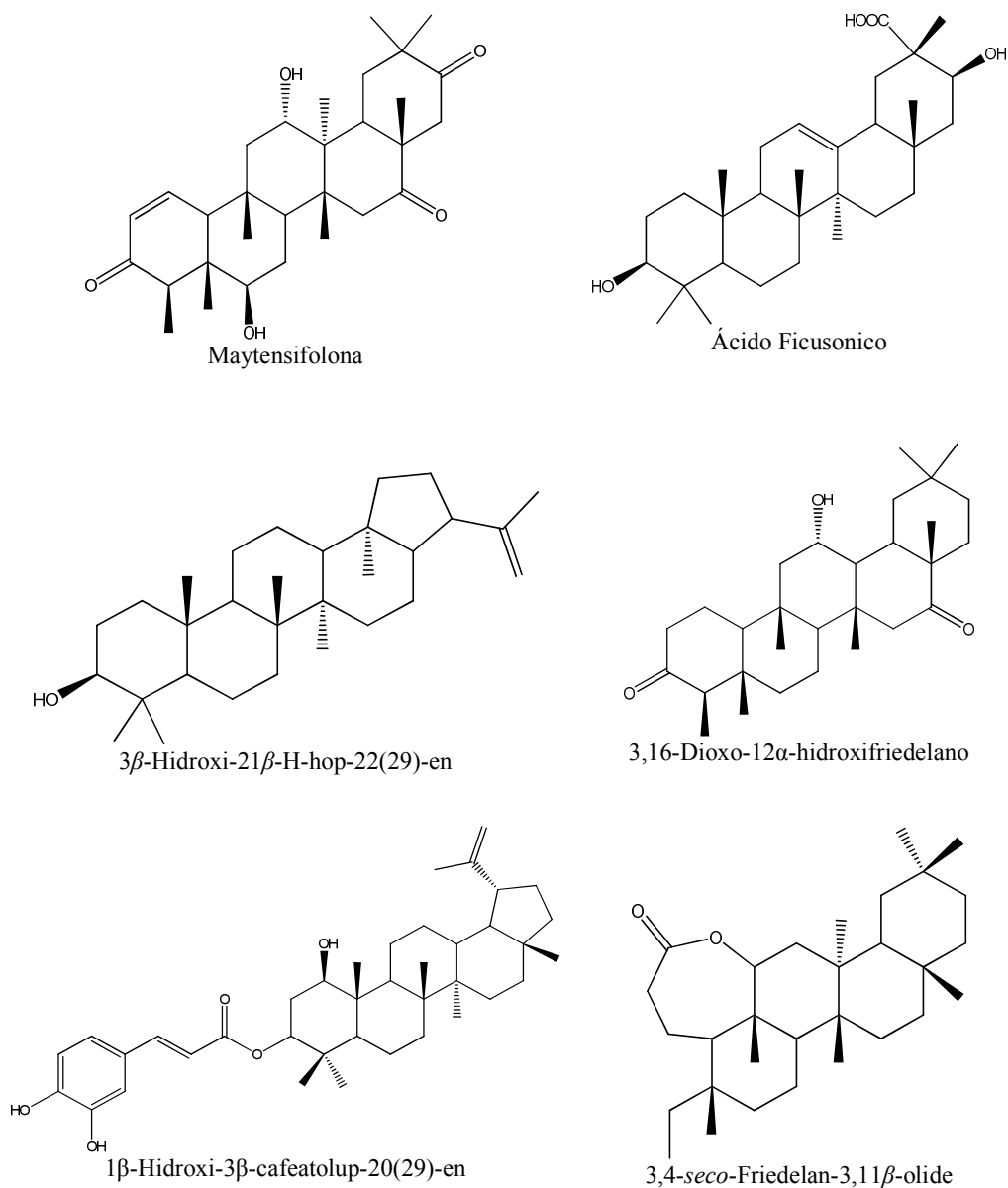


Figura 7: Novos compostos isolados de *Maytenus*.

1.2.2 *Maytenus distichophylla* Mart. ex Reissek

Maytenus distichophylla Mart. ex Reissek (Figura 8), pertencente ao gênero *Maytenus*, apresenta-se na forma de árvore e arbusto. É uma espécie litorânea, endêmica

do Brasil, evoluiu historicamente na Mata Atlântica e encontra-se distribuída geograficamente no nordeste e sudeste (LOMBARDI, GROPPPO & BIRAL et al., 2014).



Figura 8: *Maytenus distichophylla* “in situ” (FONTE: Duarte, M.C).

Estudos realizados com *M. distichophylla* relatam o isolamento de triterpenos do tipo friedelano das folhas: 3,16,21-trioxo-6 β ,12 α -dihidroxi-1-en-friedelano (maytensifolona), 3-oxofriedelano, 3,12-dioxofriedelano, 3 β -hidroxifriedelano, 3-oxo-29-hidroxifriedelano, 3-oxo-12 α -hidroxifriedelano, 3-oxo-30-hidroxifriedelano, e alcaloides sesquiterpeno pirimidínicos das raízes: wilforina e ebinifolina (DUARTE et al., 2013) (Figura 9).

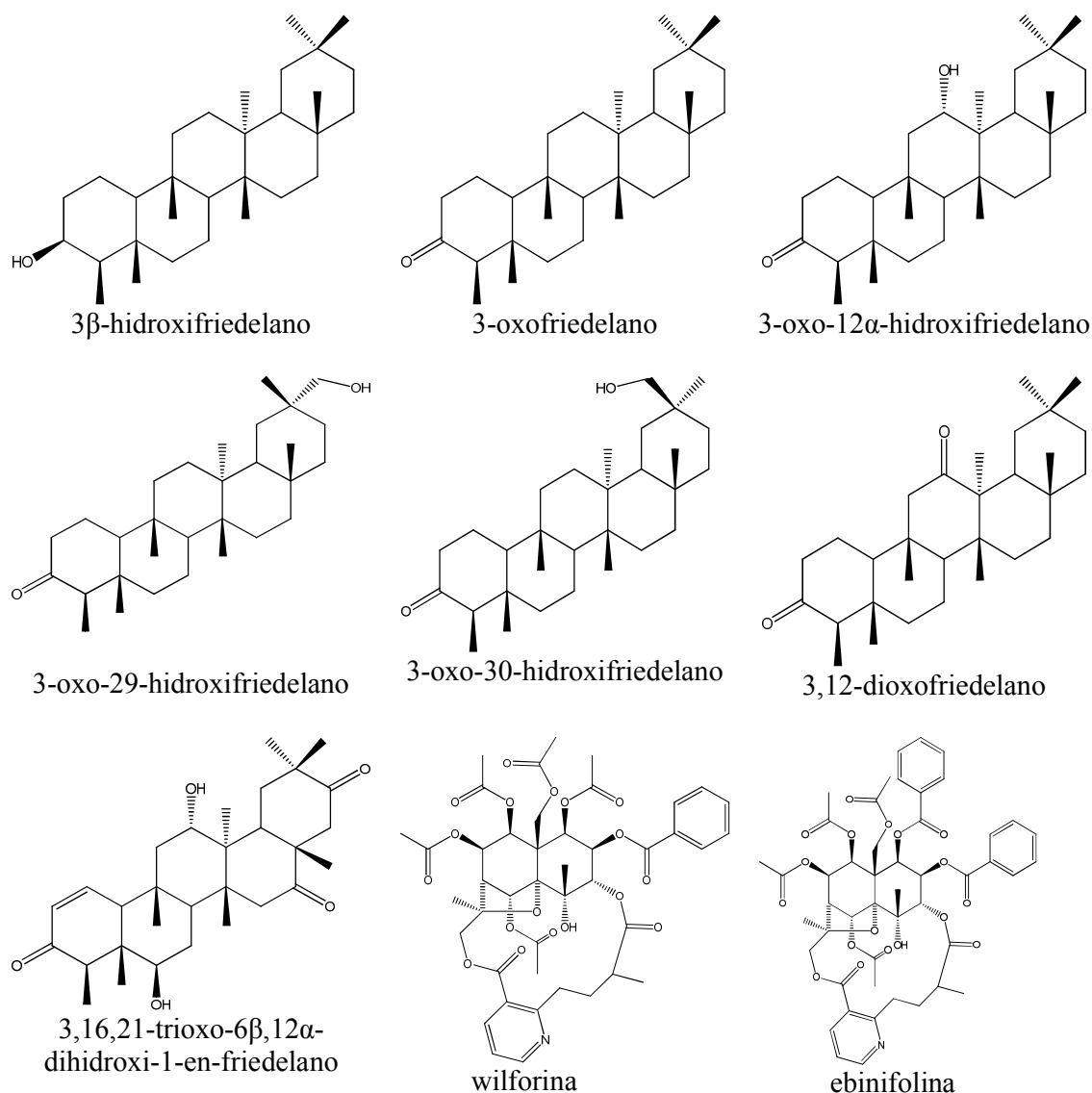


Figura 9: Compostos isolados de *M. distichophylla*.

1.3 ÓLEOS ESSENCIAIS E ATIVIDADE MICROBIOLÓGICA

A *International Standart Organization* (ISO) define óleos essenciais como produto obtido de partes de plantas mediante destilação por arraste com vapor d'água, bem como produtos obtidos por expressão dos pericarpos de frutos cítricos, composto por uma mistura complexa, contendo dezenas de substâncias (ISO, 2013).

Constituídos por elementos voláteis e assim denominados devido à composição lipofílica que apresentam, os óleos essenciais possuem funções ecológicas como, inibidores da germinação, proteção contra predadores, atração de polinizadores devido ao

seu aroma, proteção contra perda de água, entre outras. Os terpenos compõem cerca de 90% dos óleos voláteis, tendo monoterpenos e sesquiterpenos como as classes de terpenos mais frequentes (SIMOES et al., 2007).

Estudos relatam diversas atividades biológicas atribuídas a óleos essenciais como: antifúngica (CAVALCANTI, ALMEIDA & PADILHA, 2011), antibacteriana (GEROMINI et al., 2012), alelopática (SOUZA FILHO et al., 2009), inseticida (KNAAK & FIUZA, 2010), antitumoral (AMARAL, 2014), antioxidante (PEREIRA & MAIA, 2007), larvicida frente a *Aedes aegypti* (FURTADO et al., 2005; DIAS & MORAES, 2014), dentre outras.

O uso indiscriminado de antibióticos vem causando uma seletividade dos microrganismos, resultando no desenvolvimento de espécies multirresistentes. Estudos realizados em Unidades de Terapia Intensiva-UTI, onde pacientes internados são mais susceptíveis a infecções hospitalares, relatam 12,98% de casos com pacientes portadores de infecção por bactérias multirresistente, onde *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus* sp. ocorre com maior frequência (ANDRADE, LEOPOLDO & HAAS, 2006; ANVISA, 2007).

Os carbapenêmicos (ex. imipenem) são antibióticos de amplo espectro, com atividade bactericida sobre isolados multirresistentes de *Pseudomonas aeruginosa*, principal agente de infecção hospitalar no Brasil (NEVES et al., 2011). A resistência bacteriana leva ao uso de betalactâmicos mais potentes, exercendo desta forma pressão seletiva sobre a microbiota, e consequentemente ocasionando um aumento da resistência a esses agentes (MENDES et al., 2006). Kokis et al. (2005), analisou um total de 85 isolados de *P. aeruginosa* obtidas em um hospital brasileiro, e verificou 61% apresentavam resistência ao imipenem, e ressalta à importância de conhecer a forma de transmissão do organismo entre os pacientes. Neves et al. (2011) ressaltaram que essas características são preocupantes, tendo em vista a falta de terapias eficazes no tratamento de infecções por esse patógeno.

Escherichia coli também é a causa mais frequente de infecções do trato urinário em pacientes hospitalizados, e o uso indiscriminado de antibióticos também está ocasionando a resistência desse microrganismo à antimicrobianos (BLATT & MIRANDA, 2005).

Amostras de *Escherichia coli* isoladas de açudes também vêm apresentando perfil de resistência a alguns antimicrobianos. A resistência desses isolados pode estar relacionado ao lançamento de antibióticos nas águas, através dos esgotos,

comprometendo a saúde da população em caso de uso inadequado dessas águas (VASCONCELOS et al., 2010).

Outro microrganismo que vem despertando preocupação é *Staphylococcus aureus*, que se tornou uma das espécies de maior importância devido a sua resistência e enorme capacidade de adaptação (GELATTI et al., 2009).

Ensaio antimicrobianos associando extratos, compostos isolados ou óleos essenciais à antibiótico, vem sendo realizados na busca de novas alternativas para o tratamento de bactérias multirresistentes. O efeito sinérgico dessas combinações tem se mostrado promissor, revertendo a condição dos microrganismos, de multirresistente a sensível, potencializando o efeito da combinação antibiótico/produto natural em até 16x (COSTA et al., 2008; ZAGO et al., 2009; FREITAS et al., 2013; TINTINO et al., 2013; SILVA, 2013).

Dentro deste contexto, uma das propostas desse trabalho é avaliar a atividade antimicrobiana e moduladora de óleos essenciais extraídos de diferentes partes de *X. langsdorffiana*.

1.4 OBJETIVOS

1.4.1 Objetivo geral

Isolar e identificar os constituintes químicos de *Maytenus distichophylla*, e analisar a composição química e atividade microbiológica dos óleos essenciais de *Xylopia langsdorffiana*.

1.4.2 Objetivos específicos

- Isolar constituintes químicos das raízes e do caule de *Maytenus distichophylla*;
- Identificar e elucidar a estrutura química dos compostos isolados, por técnicas espectroscópicas e espectrométricas;
- Extrair óleo essencial das folhas, miolo do caule, casca do caule, miolo da raiz e miolo da raiz de *Xylopia langsdorffiana*;
- Identificar os constituintes químicos dos óleos essenciais extraídos das diferentes partes de *Xylopia langsdorffiana*;
- Analisar a concentração inibitória mínima dos óleos essenciais de *Xylopia langsdorffiana* frente a três linhagens bacterianas;
- Avaliar a atividade moduladora dos óleos essenciais de *Xylopia langsdorffiana*.

1.5 MATERIAIS E MÉTODOS

1.5.1 Métodos de análise

1.5.1.1 *Métodos cromatográficos*

Para isolamento e purificação dos compostos foram empregadas cromatografias de adsorção: cromatografia em coluna (CC), cromatografia líquida a vácuo (CLV), e cromatografia líquida de média pressão (CLMP); utilizando como fase estacionária sílica gel 60 (70-230 mesh-ASTM, Merck®) ou sílica gel 60 (230 – 400 mesh-ASTM, Merck®), e para cromatografia de camada delgada (CCD), sílica gel 60 (PF₂₅₄, ART 7749, Merck®).

Para extrações e sistemas cromatográficos foram utilizados os solventes: hexano, diclorometano, acetato de etila, metanol, etanol e água; sendo estes de grau analítico (Merck® e Vetec®), exceto a água, destilada no próprio laboratório.

Como revelador para cromatoplasas empregou-se lâmpada de irradiação ultravioleta (TE-540, Tecnal®) com dois comprimentos de onda (254 e 365 nm), e câmara saturada com vapores de iodo.

1.5.1.2 *Espectroscopia de ressonância magnética nuclear e infravermelho*

Os espectros de Ressonância Magnética Nuclear de ¹H e ¹³C, uni e bidimensionais, foram obtidos em espectrômetro VARIAN modelo System operando a 500 MHz (¹H) e 125 MHz (¹³C), e espectrômetro VARIAN modelo Mercury operando a 200 MHz (¹H) e 50 MHz (¹³C).

Para solubilizar as amostras analisadas, utilizou-se clorofórmio deuterado (CDCl₃), referenciados pelos picos característicos pertencentes as frações não deuteradas com sinais em δ_H 7,24 e δ_C 77,0. Os deslocamentos químicos (δ) foram expressos em partes por milhão (ppm) e as constantes de acoplamento (J) em Hz. As multiplicidades dos sinais em RMN ¹H foram indicadas segundo a convenção: *s* (simpleto), *sl* (simpleto largo), *d* (duplete), *dd* (duplo duplete) e *m* (multiplete).

Os espectros na região do infravermelho (IV) foram obtidos em espectrômetro Shimadzu, na faixa de 4000 a 400 cm⁻¹, utilizando pastilhas de KBr na proporção 0,5 mg de amostra:100 mg de KBr.

1.5.1.3 Cromatografia gasosa

A composição química do óleo essencial foi evidenciada por um cromatógrafo de fase gasosa acoplado a um espectrômetro de massas (CG-EM) Shimadzu, modelo QP2010 Ultra equipado com coluna capilar de sílica fundida (30m x 0,25mmID) com fase estacionária Rtx-5MS (0,25 µm de espessura do filme); gás de arraste hélio, ajustado para fornecer uma velocidade linear de 36,4 cm/s; temperatura do injetor 250°C; temperatura da fonte e outras partes 200°C; tipo de injeção: sem divisão de fluxo, 0,1 µL de uma solução 2:1000 de *n*-hexano; temperatura programada para 60°-240°C, com gradiente de 3°C/min. O filtro do quadrupolo varreu a faixa de 40 a 500 daltons a cada segundo. A ionização foi obtida pela técnica de impacto eletrônico, com energia de 70 eV.

Cada constituinte químico foi identificado através da comparação de seu espectro de massas (massa molecular e o padrão de fragmentação) com espectros existentes na literatura (ADAMS, 2007), com espectros avaliados pelo banco de dados (Willey, NIST) do equipamento, pela comparação do índice de retenção com aqueles da literatura, e por RMN de ¹H e RMN de ¹³C. Os índices de retenção foram determinados através de uma equação que relaciona o tempo de retenção dos compostos ao tempo de retenção de uma série de hidrocarbonetos homólogos, foi utilizada uma curva de calibração de uma série de *n*-alcanos (C₈-C₂₄) injetados nas mesmas condições cromatográficas das amostras.

1.5.2 Estudo fitoquímico

1.5.2.1 Coleta e identificação do material botânico

Maytenus distichophylla foi coletada no município de Maturéia-PB, e identificada pela Prof. Dra. Maria de Fátima Agra. Sua exsicata encontra-se depositada no Herbário Prof. Lauro Pires Xavier, localizado na Universidade Federal da Paraíba (UFPB), sob o número de registro AGRA7448.

1.5.2.2 Processamento do material vegetal

Raízes e caule de *M. distichophylla*, foram secos em estufa com ar circulante à temperatura de 40°C durante 72 horas, e em seguida triturados em moinho mecânico,

obtendo-se um pó seco utilizado para preparação dos extratos etanólico.

1.5.2.3 *Fracionamento do extrato bruto das raízes de Maytenus distichophylla*

As raízes secas e pulverizadas de *Maytenus distichophylla* (5 Kg) foram submetidas a maceração exaustiva com etanol (95%). A solução extrativa foi concentrada em evaporador rotativo sob pressão reduzida a uma temperatura de 40°C, obtendo-se o extrato etanólico bruto (EEB - 200 g).

O EEB (100 g) foi solubilizado em metanol:água (7:3), e submetido a partições líquido-líquido com éter etílico, diclorometano e acetato de etila, resultando em três frações: **I**, **II** e **III**, respectivamente (Figura 10).

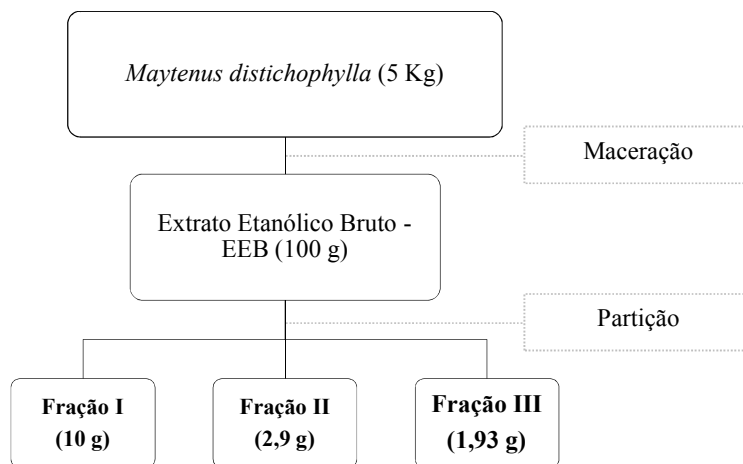


Figura 10: Obtenção e fracionamento do EEB das raízes de *M. distichophylla*.

A fração **I** (10 g), obtida com éter etílico, foi submetida a cromatografia líquida sob média pressão (CLMP), utilizando sílica gel 60 (230-400 mesh-ASTM, Merck) como fase fixa, e como fase móvel, hexano, acetato de etila e metanol, resultando em 41 frações. A fração 4 foi identificada como uma mistura, posteriormente separada por cromatografia em coluna (CC) e identificada como **MDR1** e **MDR2** (Figura 11).

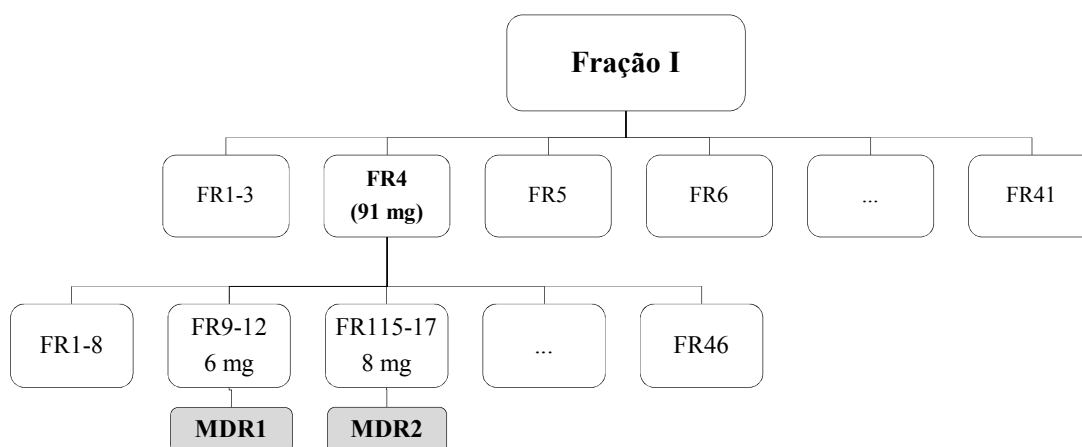


Figura 11: Fluxograma do fracionamento da fração I.

A fração **III** (1,93 g), foi submetida a uma cromatografia sob média pressão (CLMP), utilizando sílica gel 60 (230-400 mesh-ASTM, Merck), e hexano, acetato de etila, metanol, obtendo 35 frações. A fração 11-14 foi codificada como **MDR-4**. A fração 3-4 foi submetida a CC, totalizando 18 frações. A fração 4 foi cromatografada em coluna, e a fração 6-9 resultante foi codificada como **MDR-3** (Figura 12).

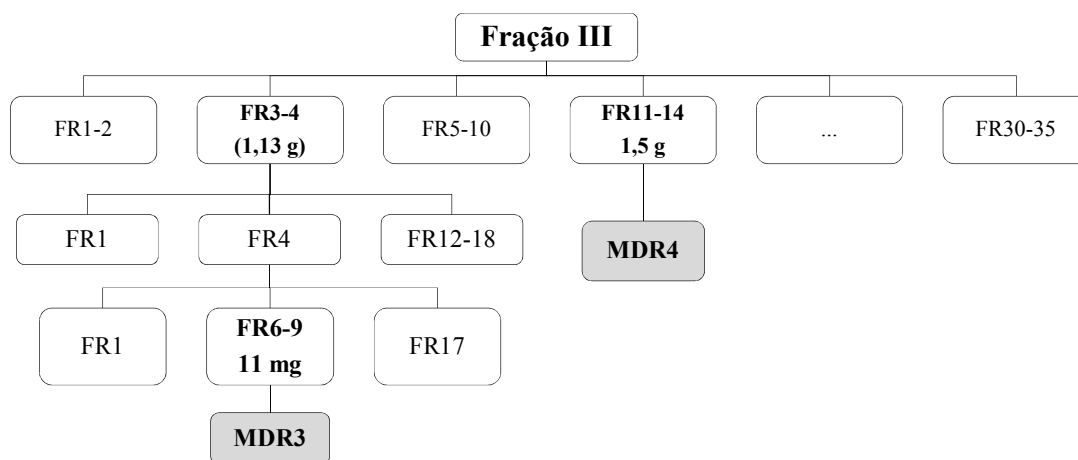


Figura 12: Fluxograma do fracionamento da fração III.

1.5.2.4 Fracionamento do extrato bruto do caule de *Maytenus distichophylla*

O caule seco e pulverizado de *Maytenus distichophylla* foi submetido a maceração exaustiva com etanol (95%). A solução extrativa foi concentrada em evaporador rotativo

sob pressão reduzida a uma temperatura de 40°C, obtendo-se 50 g do extrato etanólico bruto (EEB).

O EEB (50 g) foi submetido cromatografia sob média pressão (CLMP), utilizando sílica gel 60 (230-400 mesh-ASTM, Merck) como fase fixa, e como fase móvel, hexano, diclorometano, acetato de etila, acetato de etila:metanol (7:3), resultando nas frações **I**, **II**, **III** e **IV**, respectivamente (Figura 13).

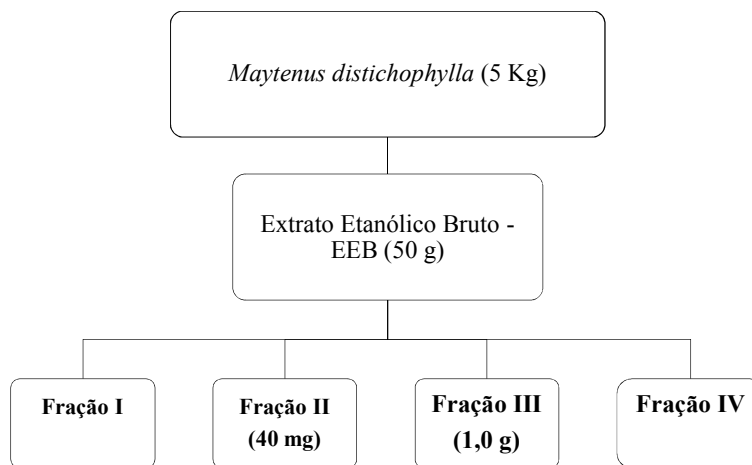


Figura 13: Fluxograma mostrando a obtenção e CLMP do EEB do caule de *M. distichophylla*.

A fração **III** (1,0 g), foi submetida a cromatografia em coluna com sílica gel 60 (230-400 mesh-ASTM, Merck), hexano, acetato de etila e metanol, resultando em 51 frações. A fração 6-9 foi submetida a cromatografia em coluna, e as frações resultantes FR15-17, FR19, foram identificadas como uma mistura de **MDC1-MDC2**, e **MDC1-MDC3**, respectivamente (Figura 14).

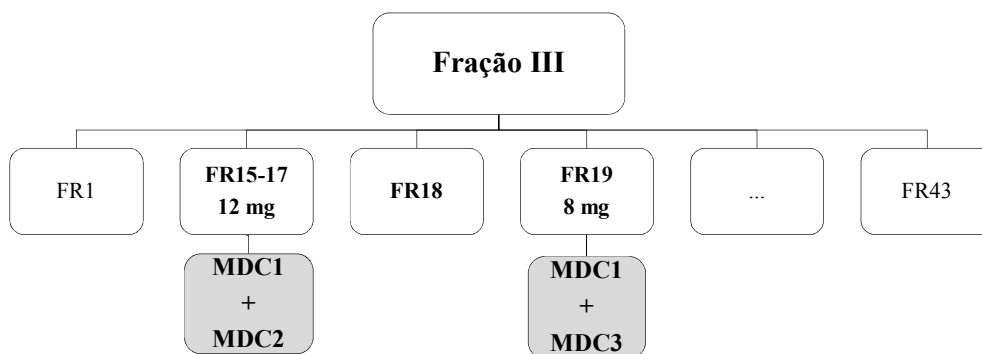


Figura 14: Fluxograma da cromatografia em coluna da fração III.

1.5.3 Estudo fitoquímico e microbiológico dos óleos essenciais de *Xylopia langsdorffiana*

Três espécimes de *X. langsdorffiana* (A, B e C) foram coletadas em maio de 2013, as 7:30AM, na cidade de Cruz do Espírito Santo-PB, a uma altitude de 95m acima do nível do mar, com as seguintes coordenadas de coleta: Lat. 35.09° e Long. 7.19°. Coletaram-se folhas, caules e raízes, sendo estas utilizadas para extração de óleo essencial.

O material vegetal foi identificado pela Prof. Dra. Maria de Fátima Agra, e sua exsicata encontra-se depositada no Herbário Prof. Lauro Pires Xavier, localizado na Universidade Federal da Paraíba (UFPB), sob o número de registro AGRA5541.

1.5.3.1 Extração de óleo essencial

Folhas, raízes e caule dos espécimes A, B e C, de *X. langsdorffiana*, passaram por um processo de triagem. Os caules e as raízes foram descascados e separados: casca do caule, miolo do caule, casca da raiz e miolo da raiz (Figura 15). Em seguida foram congelados em freezer até a extração do óleo essencial.

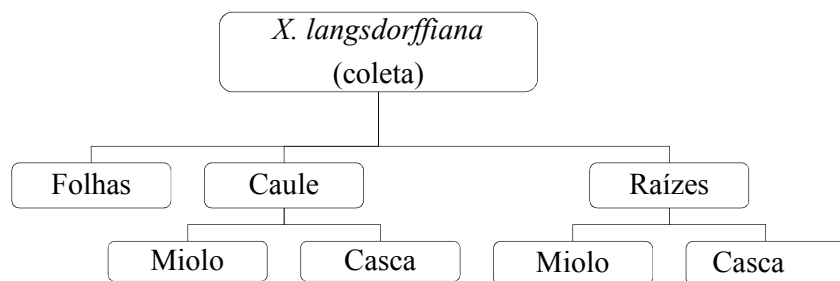


Figura 15: Fluxograma mostrando as partes utilizadas para extração de óleo essencial.

Para extração do óleo essencial (OE), os espécimes de *X. langsdorffiana* (Tabela 2) foram submetidos à técnica tradicional de hidrodestilação (Aparelho tipo Clevenger), durante 3 horas, utilizando uma proporção de 2 L de água para cada 100 g de material vegetal. Após o processo de extração a mistura óleo/água foi coletada, seca com sulfato de sódio anidro (Na_2SO_4), filtrada e armazenada sob refrigeração até realização de bioensaios e análise em cromatógrafo de fase gasosa acoplado a espectrômetro de massas (CG/EM).

Tabela 2: Quantidade (g) de material vegetal utilizado para extração de OE.

	Casca raiz	Miolo raiz	Casca caule	Miolo caule	Folhas
Espécime A	100 g	300 g	90 g	300 g	100 g
Espécime B	90 g	180 g	100 g	300 g	100 g
Espécime C	60 g	150 g	100 g	300 g	100 g

*Não foi possível padronizar a quantidade (g) de material vegetal devido a amostragem coletada e rendimento.

1.5.3.2 Atividade microbiológica

O teste foi realizado no Laboratório de Microbiologia e Biologia Molecular-LMBM da Universidade Regional do Cariri-URCA, sob a orientação do Prof. Dr. Henrique Douglas Melo Coutinho.

Micro-organismos:

Para a avaliação da concentração inibitória mínima (CIM) dos óleos essenciais de *X. langsdorffiana* – OEXL utilizou-se três espécies de bactérias padrão: *Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027. Na atividade moduladora da ação antibiótica foram utilizadas cepas multirresistente: *Escherichia coli* EC27, *Staphylococcus aureus* SA358 e *Pseudomonas aeruginosa* PA03, com perfil de resistência descritos na Tabela 3.

Tabela 3: Origem e perfil de resistência de bactérias multirresistentes.

Bactéria	Origem	Perfil de Resistência
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PA03	Cultura de aspirado traqueal	Cpm, Ctz, Lev, Cip, Ptz, Imi, Mer
<i>Escherichia coli</i> EC27	Urocultura	Cf, Cfx, Ca, Cft, Cfp, Amp
<i>Staphylococcus aureus</i> SA358	Cultura de swab retal	Ca, Cfx, Cf, Oxa, Pen, Amp, Amx, Mox, Cip, Lev, Amox, Eri, Cla, Azi, Clin

Amp-Ampicilina; Ca-Cefadroxil; Cf-Cefalotina; Cip-Ciprofloxacino; Imi-Imipenem; Ctz-Ceftazidima; Ptz-Piperacilina-tazobactam; Lev-Levofloxacina; Mer-Meropenem; Cf-Cefalexina; Cft-Ceftriaxona; Oxa-Oxacilina; Pen-Penicilina; Amx-Amoxicilina; Mox-Moxifloxacina; Amox-Amoxicilina; Eri-Eritromicina; Cla-Clarithromicina; Azi-Azithromicina; Clin-Clindamicina; Mer-Meropenem.

Antibióticos e reagentes:

Na avaliação da atividade moduladora da ação antibiótica dos OEXL foram utilizados antibióticos: amicacina, gentamicina, imipenem e oxacilina, adquiridos comercialmente, diluídos em água destilada e estéril em uma concentração de 5.000 µg/mL.

Para realização da leitura dos testes de CIM e Modulação, foi utilizado o reagente resazurina sódica (Sigma–Aldrich), diluída em água destilada estéril. O reagente é um indicador de crescimento bacteriano de coloração azul, no qual a mudança de coloração para rosa, indica a redução da resazurina e consequentemente crescimento bacteriano.

Produto natural testado:

Os testes foram realizados com os óleos essenciais das folhas, casca do caule,

miolo do caule, casca da raiz e miolo da raiz, de três espécimes de *X. langsdorffiana*, extraídos e tratados conforme descrito anteriormente. Devido à pouca quantidade, não foi possível realizar os testes com o óleo essencial do miolo da raiz do espécime C.

Para preparar a solução inicial dos OEXL, foram pesados 10 mg de cada óleo e diluídos em 1 mL de dimetilsulfóxido (DMSO - Merck), obtendo uma concentração inicial de 10 mg/mL. A partir dessa concentração foi feito uma diluição em água estéril para atingir uma concentração inicial de 1024 µg/mL, solução utilizada para teste.

Concentração Inibitória Mínima (CIM):

Para determinar a CIM foi utilizado o método de microdiluição em caldo em uma placa estéril de 96 poços, meio Brain Heart Infusion (BHI 10%), uma suspensão de 10^5 UFC/mL, e concentração dos OEXL 1024 µg/mL, sendo a última diluída sequencialmente pelo título 1:2, com concentrações finais de 512 a 8 µg/mL. Em seguida as placas foram incubadas durante 24 h a 37°C (JAVADPOUR et al., 1996). Após esse período os resultados dos testes foram analisados utilizando resazurina.

A CIM é definida como a menor concentração onde não é observado o crescimento microbiano (NCCLS, 2008).

Para a avaliação atividade moduladora da ação antibiótica das substâncias sobre cepas multirresistentes, a concentração subinibitória foi determinada pelo CIM/8.

Modulação:

Para avaliar a atividade moduladora, cada poço da placa de microdiluição continha a concentração subinibitória dos OEXL de forma constante, e concentrações decrescente dos antibióticos, partindo de 2500 µg/mL, diluídas sequencialmente 1:2 até 2,4 µg/mL, e misturadas em caldo BHI 10%.

Em cada poço foi adicionado caldo BHI 10% (100 µL), a concentração subinibitória dos OEXL e o inóculo bacteriano (105 UFC/mL). 100 µL da solução do antibiótico (5000 µg/mL) foi adicionado no primeiro poço, procedendo em seguida a diluição sequencial com título 1:2 nos poços seguintes.

O teste foi realizado em triplicata, e as placas incubadas por 24 h a 37 °C. Após esse período foi realizado a leitura dos testes utilizando resazurina.

1.6 RESULTADOS E DISCUSSÕES

1.6.1 Estudo fitoquímico de *Maytenus distichophylla*

1.6.1.1. Elucidação estrutural de *MDR1*

MDR1 apresentou-se como um sólido branco, solúvel em clorofórmio.

O espectro de massas do composto, obtido por CG-EM, sugerem uma massa molecular de 414 ($C_{29}H_{50}O$), com íon molecular observado em m/z 414 (Figura 16).

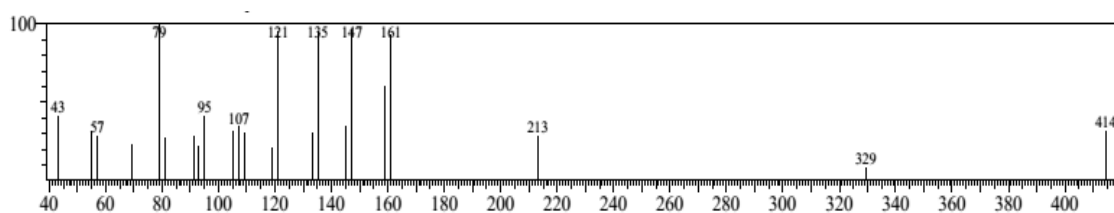


Figura 16: Espectro de massas de **MDR1**.

O espectro RMN de ^1H , mostrou simpletos e dupletos, entre δ_H 0,98 e δ_H 0,65, referentes a 6 grupos metila. Também exibiu um duplete em δ_H 5,34 ($J = 5,2$ Hz, H-6), característico de hidrogênio olefínico, e um multiplete em δ_H 3,50 atribuído a hidrogênio oximetínico (H-3). Outros prótons referentes a **MDR1** foram observados na região entre δ_H 1,0 e δ_H 2,3. Esses dados são compatíveis com estruturas triterpênicas e esteroidais (Figura 17).

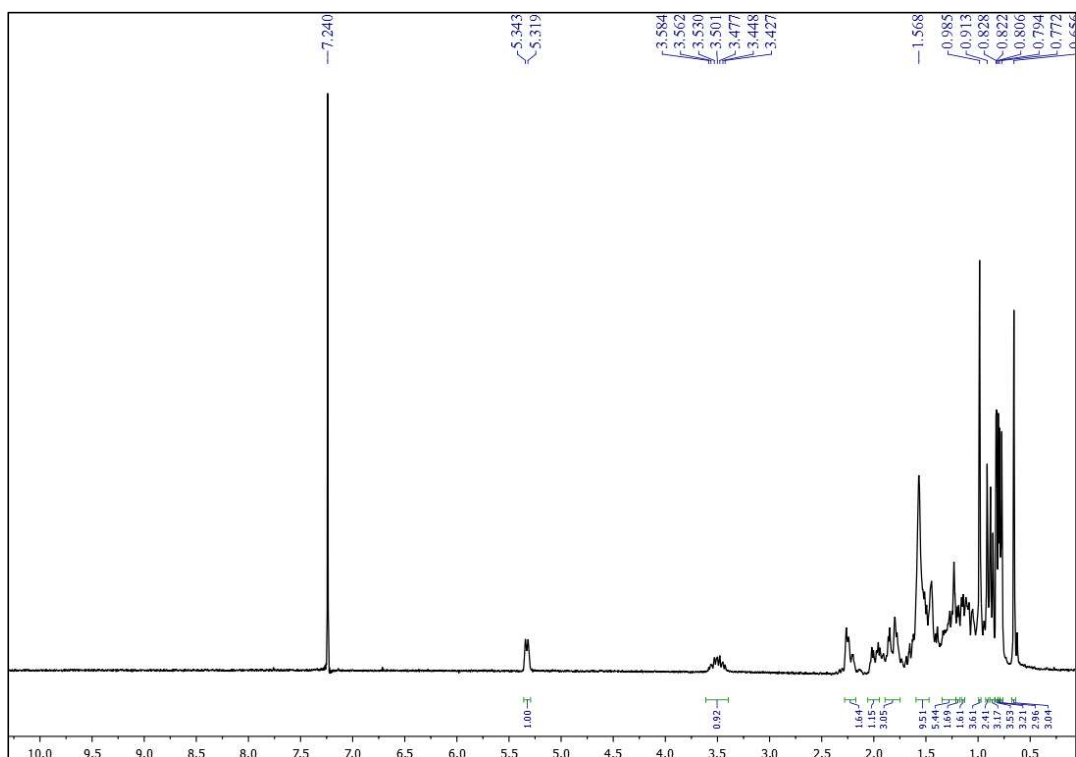


Figura 17: Espectro RMN de ^1H de **MDR1** (CDCl_3 , 200 MHz).

Os dados espectrométricos de massas e RMN de ^1H (Tabela 4) obtidos de **MDR1**, comparado com dados da literatura (PATRA et al., 2010; MAGALHAES, 2012), permitiu identificar a substância como β -sitosterol (Figura 18).

Tabela 4: Dados de RMN de ^1H (CDCl_3) de **MDR1**, e dados do β -sitosterol descritos na literatura.

Hidrogênio	MDR1	β-sitosterol (MAGALHAES, 2012) (CDCl_3)
3	3,50 (<i>m</i>)	3,52 (<i>dd</i> , $J = 4,8; 9,6$ Hz)
6	5,34 (<i>d</i> , $J = 5,2$ Hz)	5,35 (<i>d</i> , $J = 5,2$ Hz)
18	0,65 (<i>s</i>)	0,68 (<i>s</i>)
19	0,98 (<i>s</i>)	1,01 (<i>s</i>)
21	0,91 (<i>d</i> , $J = 6,4$ Hz)	0,92 (<i>d</i> , $J = 6,5$ Hz)
26	0,82 (<i>d</i> , $J = 4,4$ Hz)	0,82 (<i>s</i>)
28	0,79 (<i>d</i> , $J = 4,4$ Hz)	0,80 (<i>s</i>)
29	0,85 (<i>s</i>)	0,84 (<i>s</i>)

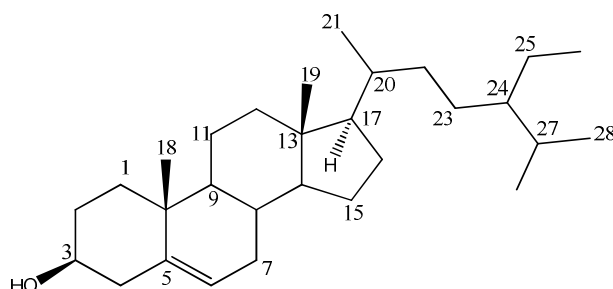


Figura 18: β -sitosterol

1.6.1.2. Elucidação estrutural de MDR2

O composto foi obtido na forma de óleo incolor. No espectro de RMN de ^1H de **MDR2**, os sinais em δ_{H} 4,70 e em δ_{H} 4,58, foram atribuídos a hidrogênios metilênicos de dupla ligação terminal de lupanos. Também foram observados dois dupletos em δ_{H} 8,31 (1H, $J = 10,4$ Hz, H-1) e δ_{H} 5,72 (1H, $J = 10,6$ Hz, H-2) associados a hidrogênio olefínico de cetona α , β -insaturada, e o sinal em δ_{H} 4,07 relativo a hidrogênio metínico de carbono carbinólico (Figura 19). Dados de **MDR2**, juntamente com dados da literatura, permitiram identifica a substância como 11 α -hidroxigloquidona (REYES et al., 2006; MAGALHAES, 2012) (Tabela 5; Figura 20).

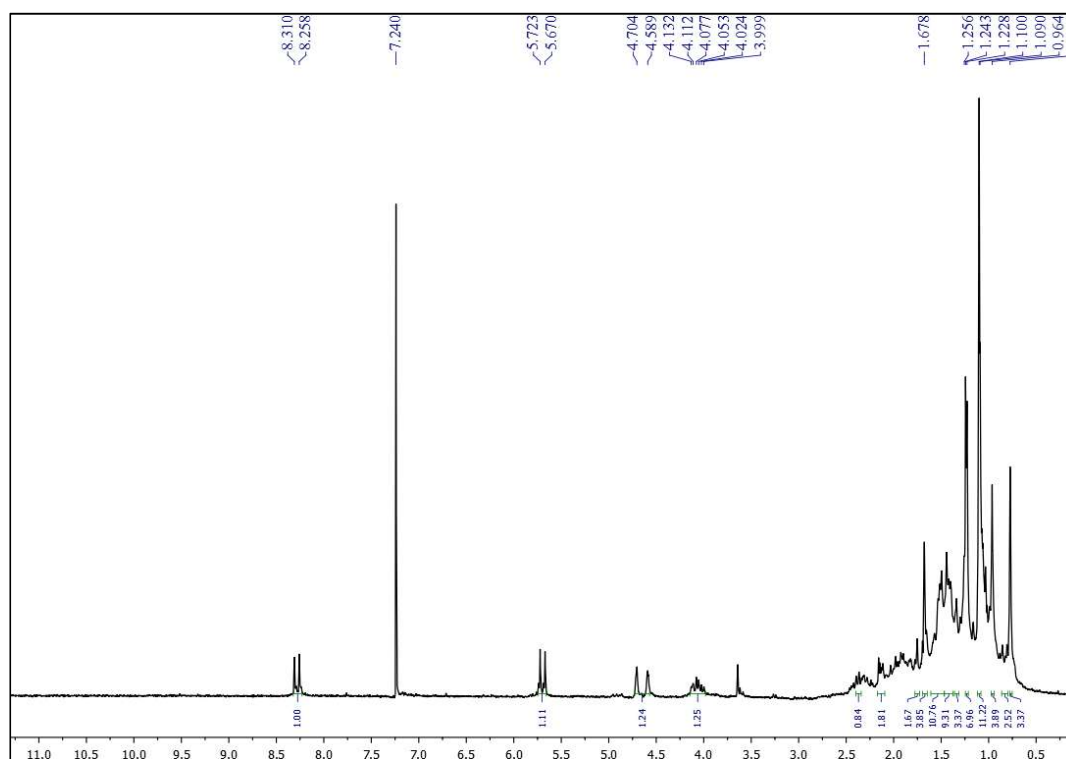


Figura 19: Espectro RMN ^1H de **MDR2** (CDCl_3 , 200 MHz).

Tabela 5: Dados de RMN de ^1H (CDCl_3) de **MDR2**, e dados do 11α -hidroxigloquidona descritos na literatura.

Hidrogênio	MDR2	11α-hidroxigloquidona
		(MAGALHAES, 2012; CDCl_3)
1	8,31 (<i>d</i> , $J = 10,4$ Hz)	8,30 (<i>d</i> , $J = 8,4$ Hz)
2	5,72 (<i>d</i> , $J = 10,6$ Hz)	5,71 (<i>d</i> , $J = 8,4$ Hz)
11	4,08 (<i>m</i>)	4,09 (<i>d</i> , $J = 4,0$ Hz)
23	1,10 (<i>s</i>)	1,15 (<i>s</i>)
24	1,10 (<i>s</i>)	1,15 (<i>s</i>)
25	1,24 (<i>s</i>)	1,26 (<i>s</i>)
26	1,10 (<i>s</i>)	1,14 (<i>s</i>)
27	0,96 (<i>s</i>)	1,01 (<i>s</i>)
28	0,77 (<i>s</i>)	0,82 (<i>s</i>)
29	4,58 (<i>sl</i>)	4,61 (<i>sl</i>)
30	1,67 (<i>s</i>)	1,70 (<i>s</i>)

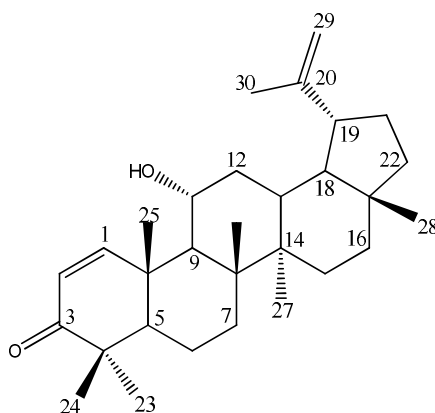


Figura 20: 11α -hidroxigloquidona

Há relatos do isolamento de 11α -hidroxigloquidona (**MDR2**) em *Maytenus salicifolia* (MAGALHAES et al., 2013), *Maytenus cuzcoina* e *Maytenus chiapensis* (REYES et al., 2006), sendo este o primeiro relato do composto em *Maytenus distichophylla*.

1.6.1.3. Elucidação estrutural de MDR3

MDR3 foi obtida como um sólido branco amorfo.

O espectro infravermelho (IV) mostrou bandas de absorção em 3419 cm^{-1} (OH), 2945 cm^{-1} (CH_2), 2856 cm^{-1} (CH), 1639 cm^{-1} ($\text{C}=\text{C}$), e em 1689 cm^{-1} ($\text{C}=\text{O}$) (Figura 21).

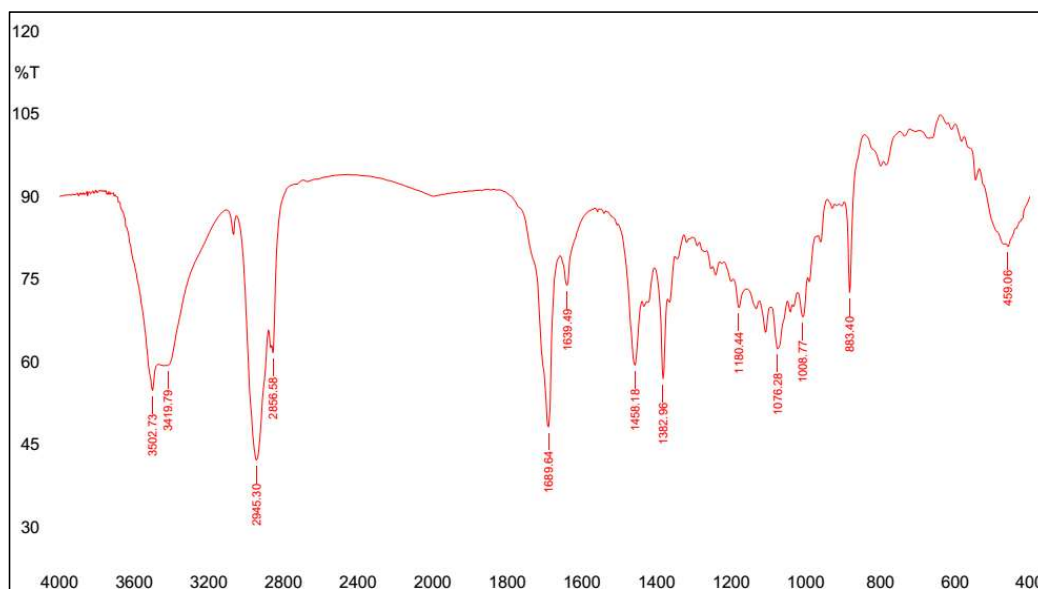


Figura 21: Espectro IV de **MDR3**.

O espectro de RMN de ^1H de **MDR3** apresentou deslocamento químico em δ_{H} 4,69 (*sl*) e 4,57 (*sl*) característicos de átomos de hidrogênio metilênico de dupla ligação terminal, de triterpenos lupano, assim como observado para o composto MDR2 (ALBUQUERQUE et al., 2007) (Figura 22). Também foi observado um sinal em δ_{H} 3,89 (1H , *dt*, $J=4,8$; $10,8$; $11,0$ Hz) característico de hidrogênio oximetínico.

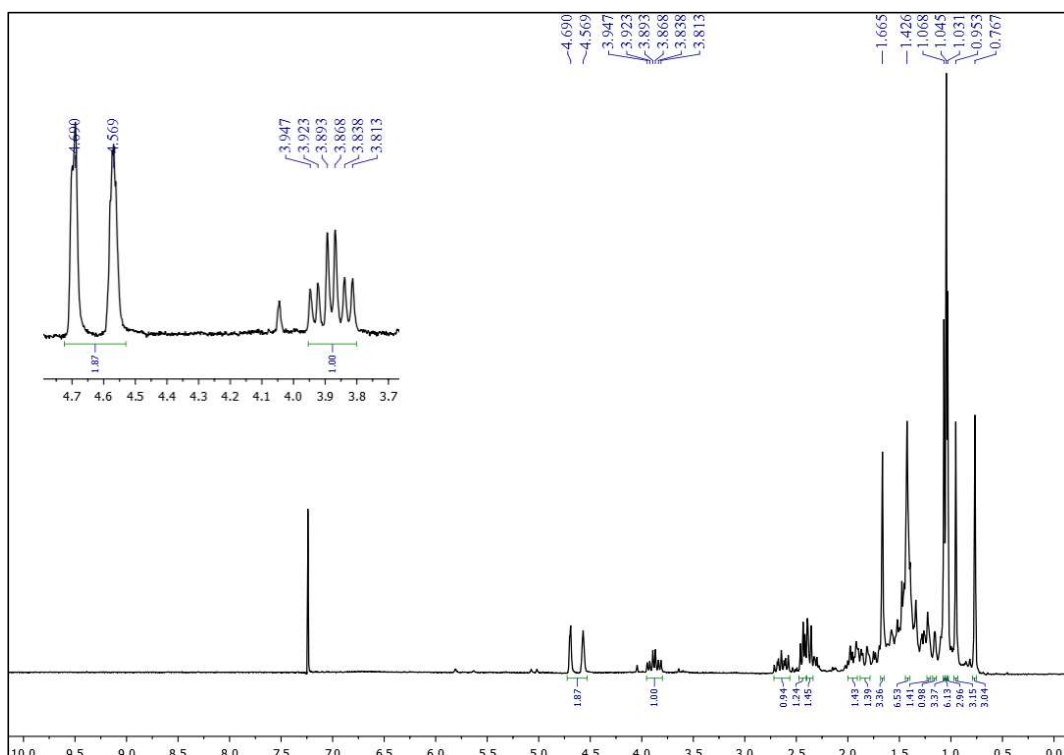


Figura 22: Espectro RMN ^1H de **MDR3** (CDCl_3 , 200 MHz).

O espectro de RMN ^{13}C apresentou 30 sinais, atribuídos a sete carbonos metílicos, dez metilênicos, seis metínicos e sete átomos de carbono não hidrogenados (Figura 23). O deslocamento químico em δ_{C} 218,8 e em δ_{C} 70,4, sugerem a presença de carbonila de cetona e grupamento OH, respectivamente (Figura 23).

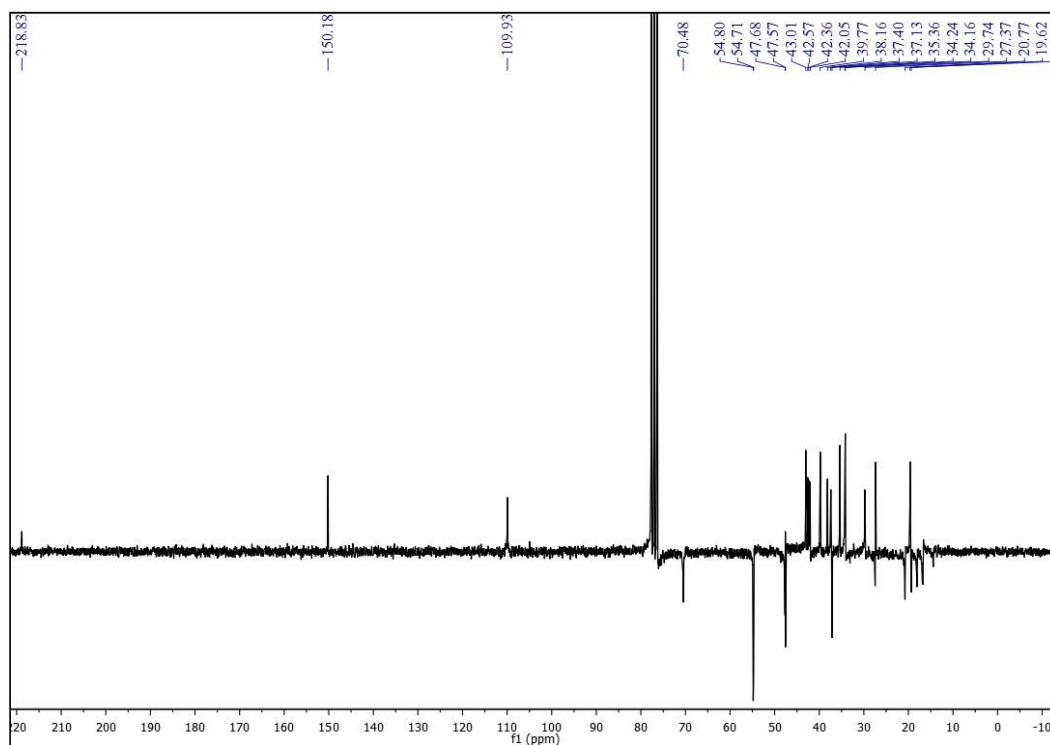


Figura 23: Espectro RMN ^{13}C APT de **MDR3** (CDCl_3 , 50 MHz).

Os dados apresentados pelos espectros de **MDR3** (Tabela 6), juntamente com o completo assinalamento proposto por Alves et al. (2000), e relatos da presença de triterpenos lupano no gênero *Maytenus*, foi possível identificar **MDR3** como 11 α -hidroxilup-20(29)-en-3-ona (rigidenol) (Figura 24).

É o primeiro relato de 11 α -hidroxilup-20(29)-en-3-ona em *Maytenus distichophylla*. O composto foi isolado pela primeira vez de *Maytenus rigida* (MARTA et al., 1979). Há relatos do isolamento deste composto em outras espécies do gênero *Maytenus*: *M. cuzcoina* (REYES et al., 2006; NUNEZ et al., 2005), *M. acanthophylla* (OLIVEIRA et al., 2006b), *M. obtusifolia* (ALVES et al., 2000; SILVA et al., 2005), *M. imbricata* (RODRIGUES et al., 2012; CORREA et al., 2012), *M. salicifolia* (MAGALHAES et al., 2013; MAGALHAES, 2012). Estudos farmacológicos relatam a atividade inibitória sobre a produção de NO e PGE2 (REYES et al., 2006), atividade antimicrobiana e potencial tóxico sobre *A. salina* (RODRIGUES et al., 2012).

Tabela 6: Dados de RMN de ^{13}C de **MDR3** (CDCl_3 , 50 MHz) e dados do rigidinol descritos na literatura.

Carbono	MDR3 δ_{C}	Rigidinol (ALVES et al., 2000; CDCl_3)
1	42,0	42,0
2	34,2	34,2
3	218,8	218,8
4	47,5	47,6
5	54,7	54,7
6	19,6	19,6
7	34,1	34,2
8	42,3	42,4
9	54,8	54,8
10	38,1	38,2
11	70,4	70,4
12	37,4	37,4
13	37,1	37,1
14	42,5	42,6
15	27,3	27,4
16	35,3	35,4
17	43,0	43,0
18	47,5	47,6
19	47,6	47,7
20	150,1	150,0
21	29,7	29,7
22	39,7	39,8
23	27,3	27,4
24	20,7	20,7
25	16,7	16,7
26	16,8	16,8
27	14,4	14,4
28	18,0	18,0
29	109,9	109,9
30	19,6	19,3

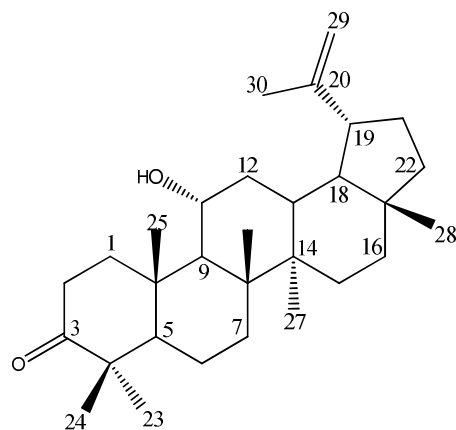


Figura 24: 11 α -hidroxi-lup-20(29)-en-3-ona (rigidinol).

1.6.1.4. Elucidação estrutural de MDR4

MDR4 apresentou-se na forma de cristais em forma de agulha. No espectro de RMN ^1H de **MDR4** (Figura 25) foram observados sinais referentes a hidrogênio de anel aromático em δ_{H} 6,54 (2H, *s*, H-2'; H-6'), δ_{H} 5,97 (1H, *d*, $J=2,2$ Hz, H-8), e em δ_{H} 5,94 (1H, *d*, $J=2,4$ Hz, H-6). Estes sinais, referentes a hidrogênio de anel aromático, juntamente com os sinais observados em δ_{H} 2,80 (1H, *dd*, $J=4,4$; 17 Hz, H-4a) e δ_{H} 2,74 (1H, *dd*, $J=2,8$; 16,8 Hz, H-4b), atribuídos a hidrogênios metilênicos, sugerem uma estrutura de flavona do tipo epigallocatequina para **MDR4** (MAGALHAES et al., 2013).

O sinal em δ_{H} 3,77 (3H, *s*), foi atribuído a hidrogênio de grupo metoxila, e os sinais em δ_{H} 4,83 (1H, *s*, H-2) e δ_{H} 4,19 (1H, *sl*, H-3) atribuídos a hidrogênios carbinólicos.

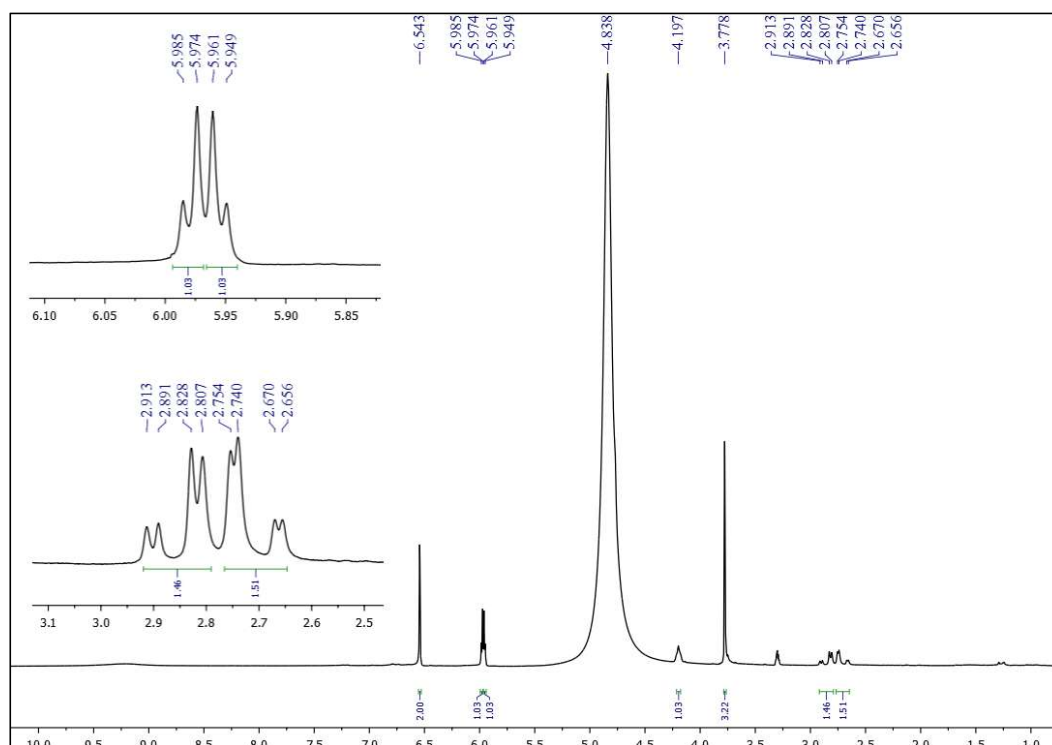


Figura 25: Espectro RMN ^1H de **MDR4** (CD_3OD , 200 MHz).

No espectro de RMN ^{13}C APT, foram observados 14 sinais, referentes a 16 carbonos, sendo um carbono metilênico, seis metínicos, oito átomos de carbono não hidrogenado, e um carbono metílico de grupo metoxila (Figura 26).

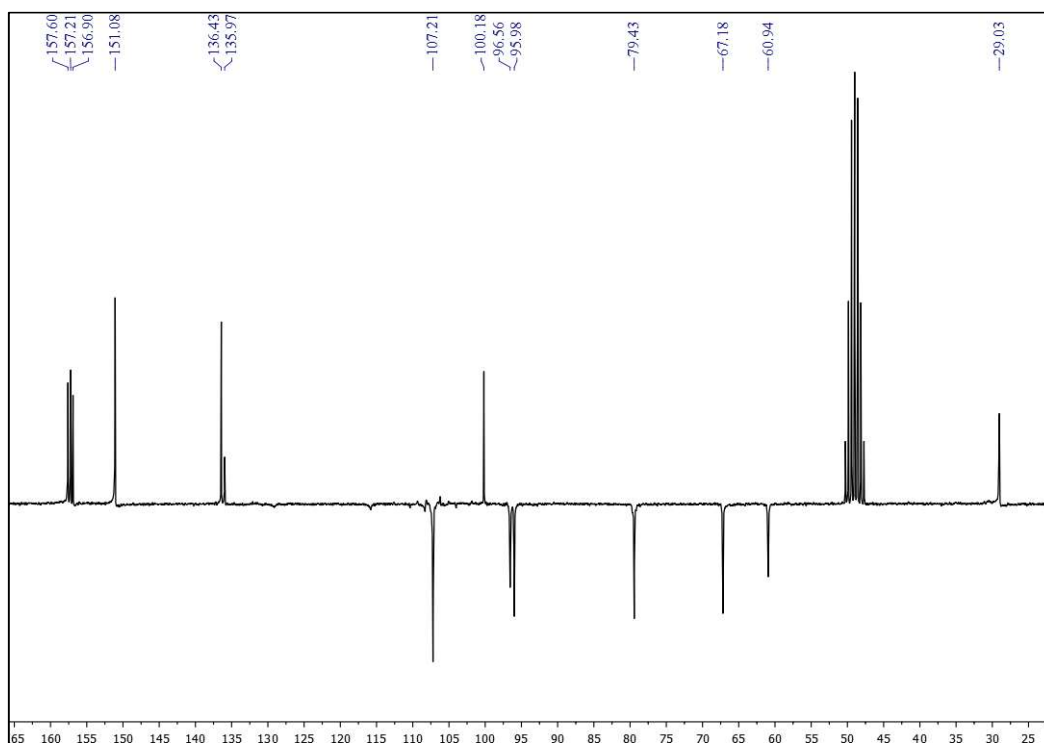


Figura 26: Espectro RMN ^{13}C APT de **MDR4** (CD_3OD , 50 MHz).

Os dados de **MDR4**, juntamente com os dados da literatura (MAGAHAES, 2012; Tabela 7), permitiram identificar **MDR4** como 4'-*O*-metilepigallocatequina (Figura 27).

Este é o primeiro relato do isolamento da 4'-*O*-metilepigallocatequina em *M. distichophylla*. Outras espécies, como *Maytenus acanthophylla* (OLIVEIRA et al., 2006b), *Maytenus aquifolium* (CORSINO et al., 2003) e *Maytenus floribunda* (SALAZAR et al., 1999), também apresentaram a substância em sua composição. Dados da literatura relatam o efeito antiespasmódico (ROCHA et al., 2012), inibição de COX-1 e COX-2 (NOREEN et al., 1998), citotoxicidade (TSHIKALANGE & HUSSEIN, 2010), e os efeitos: proteção UV, anti-inflamatório (RHODES et al., 2013), inibição do tumor de próstata (HENNING et al., 2012), e farmacocinética (LEE et al., 2002), dos chás verdes ricos em catequinas.

Tabela 7: Dados de RMN de ^{13}C e ^1H de **MDR4** (CD_3OD , 50 e 200 MHz).

MDR4			4'-<i>O</i>-metilepigalocatequina (MAGALHAES, 2012; CD_3OD)
Carbono	δ_{C}	δ_{H}	δ_{C}
2	79,4	4,83 (<i>s</i>)	79,8
3	67,1	4,19 (<i>sl</i>)	67,5
4	29,0	2,80 (<i>dd</i> , $J=4,4$; 17 Hz) 2,74 (<i>dd</i> , $J=2,8$; 16,8 Hz)	29,3
5	100,1	-	100,2
6	96,5	5,94 (<i>d</i> , $J=2,4$ Hz)	96,6
7	156,9	-	157,3
8	95,9	5,97 (<i>d</i> , $J=2,2$ Hz)	96,0
9	157,6	-	158,1
10	157,2	-	157,8
1'	136,4	-	136,7
2'	107,2	6,54 (<i>s</i>)	107,3
3'	151,0	-	151,5
4'	135,9	-	136,3
5'	151,0	-	151,5
6'	107,2	6,54 (<i>s</i>)	107,3
OMe	60,9	3,77 (<i>s</i>)	60,9

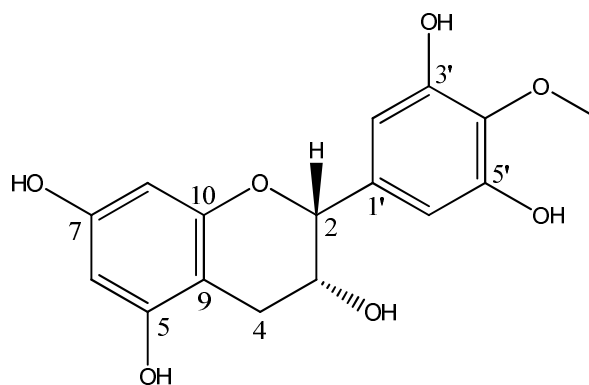


Figura 27: 4'-*O*-metilepigalocatequina

1.6.1.5. Elucidação estrutural de MDC1 e MDC2

A mistura de **MDC1-MDC2** foi obtida como um sólido branco amorfo, solúvel em clorofórmio.

O espectro infravermelho (IV) mostrou bandas de absorção em 3531 cm^{-1} (OH), 2935 cm^{-1} (CH_2), 2868 cm^{-1} (CH), e em 1716 cm^{-1} ($\text{C}=\text{O}$) (Figura 28).

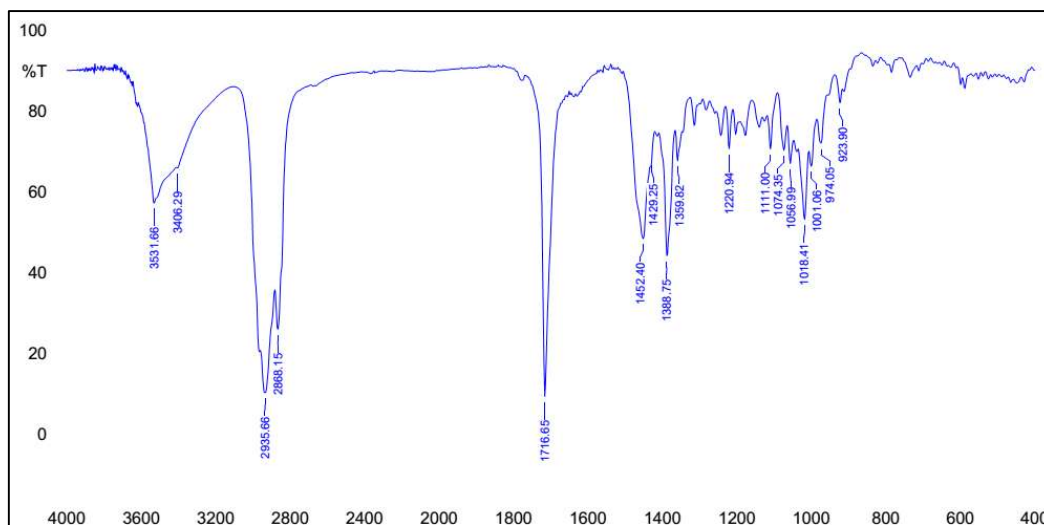


Figura 28: Espectro IV de **MDC1-MDC2**.

O espectro de RMN ^1H apresentou vários multipletos na região de δ_{H} 0,69 a δ_{H} 2,39, sugerindo tratar de triterpenos pentacíclicos, e um duplete em δ_{H} 0,86 associado a metila C-23 de triterpeno friedelano.

O espectro de RMN de ^1H , mostrou um duplete em δ_{H} 0,86, característico de triterpenos de esqueleto friedelano, e um duplo duplete em δ_{H} 3,91 (*dd*; $J=4,2$; $11,0$) sugerindo a presença de grupo hidroxila, e o aparente quarteto em δ_{H} 3,41, que se trata de dois dupletos: δ_{H} 3,41 (1H, *d*, $J=10,5$ Hz) e δ_{H} 3,34 (1H, *d*, $J=10,5$ Hz), atribuído a hidrogênios de carbono metilênico ligado a hidroxila (Figura 29).

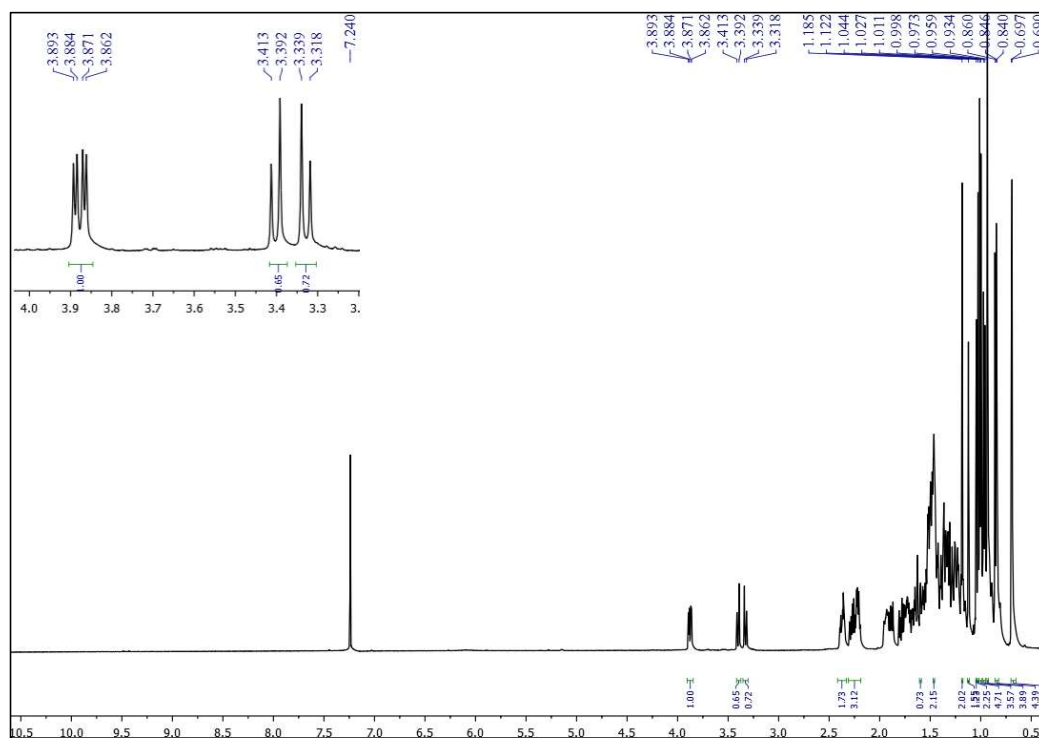


Figura 29: Espectro RMN ^1H de **MDC1-MDC2** (CDCl_3 , 500 MHz).

A presença de 58 sinais no espectro de RMN ^{13}C , confirmou a mistura de triterpenos (Figura 30).

Os sinais em δ_{C} 212,8 e δ_{C} 213,2 foram atribuídos a presença de carbonila de cetona, e os sinais em δ_{C} 73,1 e δ_{C} 71,9 atribuídos a carbono hidroxilado, sendo o primeiro de CH, e o segundo CH_2 .

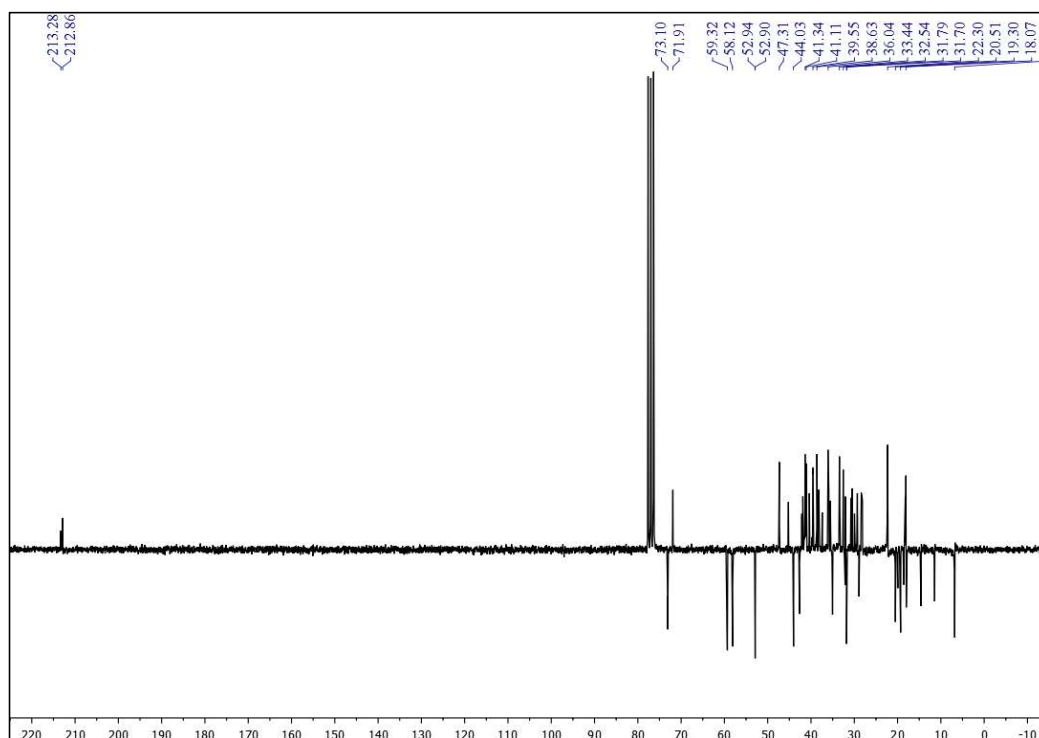


Figura 30: Espectro RMN ¹³C APT (CDCl₃, 125 MHz).

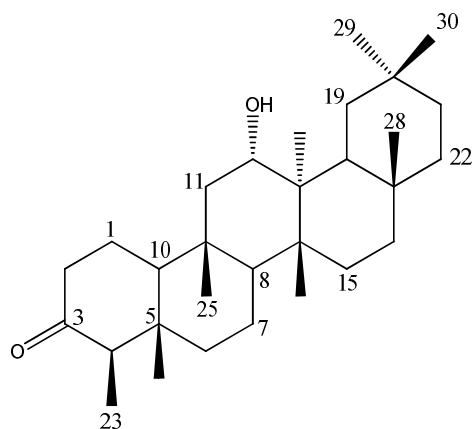
Comparando esses dados com a literatura (OLIVEIRA et al., 2007; MAGALHAES et al., 2013), **MDC1** foi identificado como 3-oxo-12 α -hidroxifriedelano, e **MDC2** como 3-oxo-30-hidroxifriedelano (Figura 31). A mistura de compostos já foi isolada das folhas de *M. distichophylla* (DUARTE et al., 2013).

O composto 3-oxo-30-hidroxifriedelano (**MDC2**) já foi isolado das folhas de *M. distichophylla* (DUARTE et al., 2013), e de *M. salicifolia* (MAGALHAES et al., 2013). De acordo com dados da literatura, 3-oxo-12 α -hidroxifriedelano (**MDC1**) foi isolado de *Maytenus gonoclada* (SILVA et al., 2011a; OLIVEIRA et al., 2007), *M. distichophylla* (DUARTE et al., 2013), de outras espécies pertencentes a família Celastraceae (CHEN et al., 2013; ZHANG et al., 2008; LIU & WU, 1993; DELLE MONACHE et al., 1979), e apresenta atividade antifúngica frente a *C. albicans* (SILVA et al., 2011b).

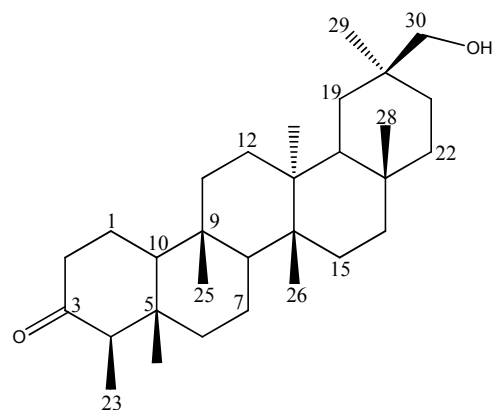
Os dados de ressonância magnética nuclear de **MDC1** e **MDC2**, estão compilados na Tabela 8.

Tabela 8: Dados de RMN de ^{13}C de **MDC1** e **MDC2** (CDCl_3 , 50 MHz), comparado com dados da literatura.

Carbono	MDC1 δ_c	3-oxo-12 α -hidroxifriedelano (OLIVEIRA et al, 2007)	MDC2 δ_c	30-hidroxifriedelano-3-ona (MAGALHAES, 2012)
1	22,3	22,3	22,3	22,3
2	41,3	41,4	41,4	41,6
3	212,8	212,7	213,2	212,9
4	58,1	58,1	58,1	58,3
5	41,8	41,9	42,1	42,5
6	41,1	41,2	41,2	41,4
7	18,0	18,1	18,2	18,3
8	52,8	52,9	52,9	53,1
9	38,1	38,2	37,3	37,5
10	59,3	59,4	59,4	59,1
11	47,3	47,4	35,8	35,7
12	73,0	72,7	29,2	29,4
13	45,2	45,3	39,5	39,4
14	40,3	40,4	38,3	38,2
15	33,4	33,4	32,0	32,2
16	36,0	36,1	29,9	29,7
17	30,7	30,8	30,4	30,1
18	44,0	44,2	42,6	42,9
19	38,6	38,4	30,7	30,6
20	28,3	28,4	33,3	33,5
21	32,5	32,7	28,1	28,3
22	39,5	39,6	39,7	39,9
23	6,8	6,8	6,8	6,8
24	14,5	14,6	14,6	14,7
25	19,2	19,3	18,0	18,0
26	20,5	20,5	18,5	18,6
27	11,4	11,6	19,9	20,0
28	31,6	31,8	32,1	32,2
29	35,0	34,9	28,9	29,0
30	31,7	31,9	71,9	72,1



3-oxo-12 α -hidroxifriedelano (**MDC1**)



3-oxo-30-hidroxifriedelano (**MDC2**)

Figura 31: Estrutura química de **MDC1** e **MDC2**.

1.6.1.6. Elucidação estrutural de MDC3

MDC3 foi obtida como um sólido branco amorfo, solúvel em clorofórmio. O espectro de RMN ^1H apresentou vários multipletos na região de δ_{H} 0,69 a δ_{H} 2,39, sugerindo tratar de triterpenos pentacíclicos, e um duplete em δ_{H} 0,86 associado a metila C-23 de triterpeno friedelano (MAGALHAES, 2012; Figura 32).

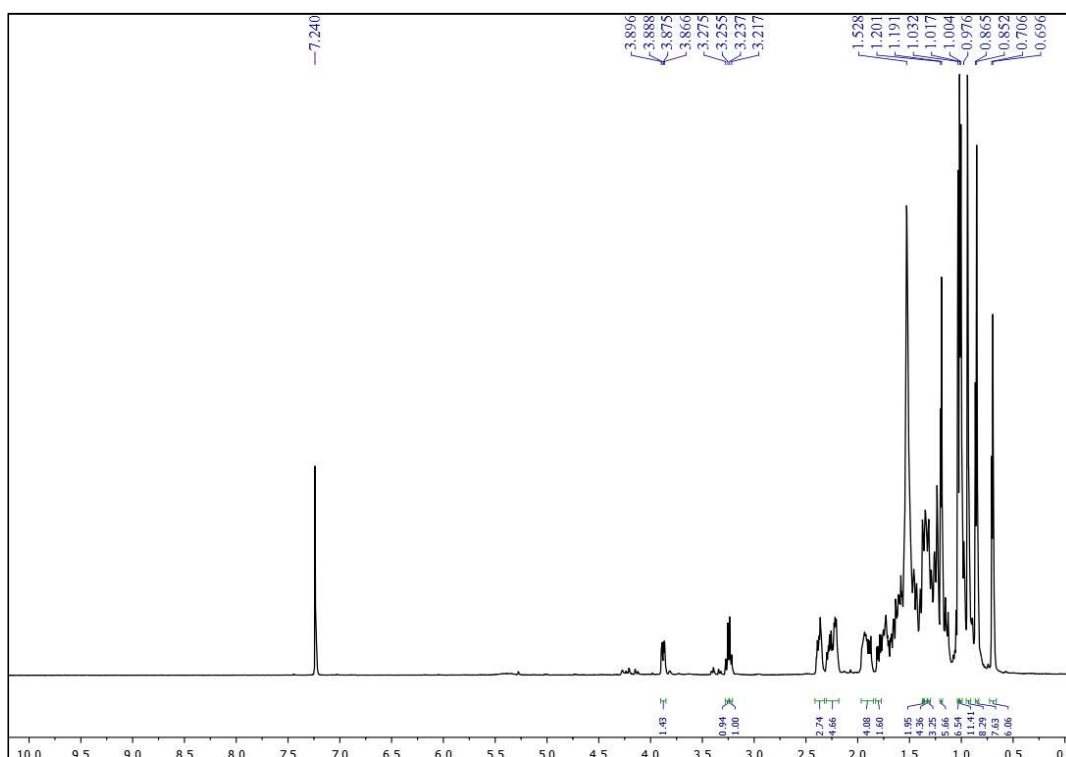


Figura 32: Espectro RMN ^1H de **MDC2-MDC3** (CDCl_3 , 500 MHz).

O espectro de RMN ^1H , mostrou um duplete em δ_{H} 0,86 (d , $J=6,5$), característico de triterpenos de esqueleto friedelano, e um duplo duplete em δ_{H} 3,89 (dd ; $J=4,0$; $10,5$) sugerindo a presença de grupo hidroxila, e o aparente quarteto em δ_{H} 3,27, que se trata de dois dupletos: δ_{H} 3,27 (1H, d , $J=10,0$ Hz) e δ_{H} 3,23 (1H, d , $J=10,0$ Hz), atribuído a hidrogênios de carbono metilênico ligado a hidroxila (Figura 33).

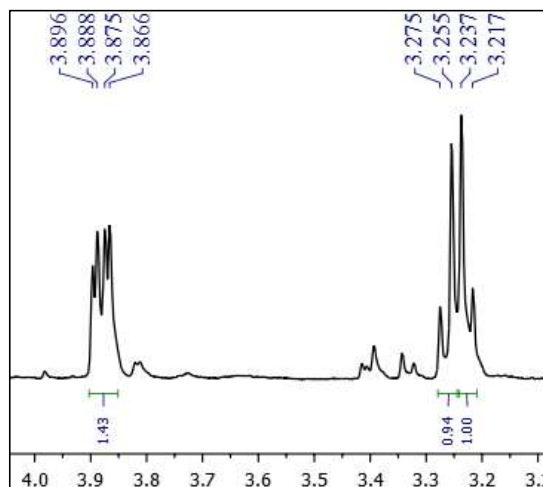


Figura 33: Expansão do espectro de RMN ^1H de **MDC3** (CDCl_3 , 500 MHz).

Comparando os dados de **MDC1-MDC2** com os dados de **MDC3**, foi possível identificar um dos compostos da mistura como sendo o composto 3-oxo-12 α -hidroxifriedelano (**MDC1**).

O sinal δ_{C} 25,7 (Figura 34), os dupletos em δ_{H} 3,27 e δ_{H} 3,23, juntamente com os dados da literatura (MAGALHAES, 2012), permitiu identificar o segundo composto da mistura como o 3-oxo-29-hidroxifriedelano (**MDC3**).

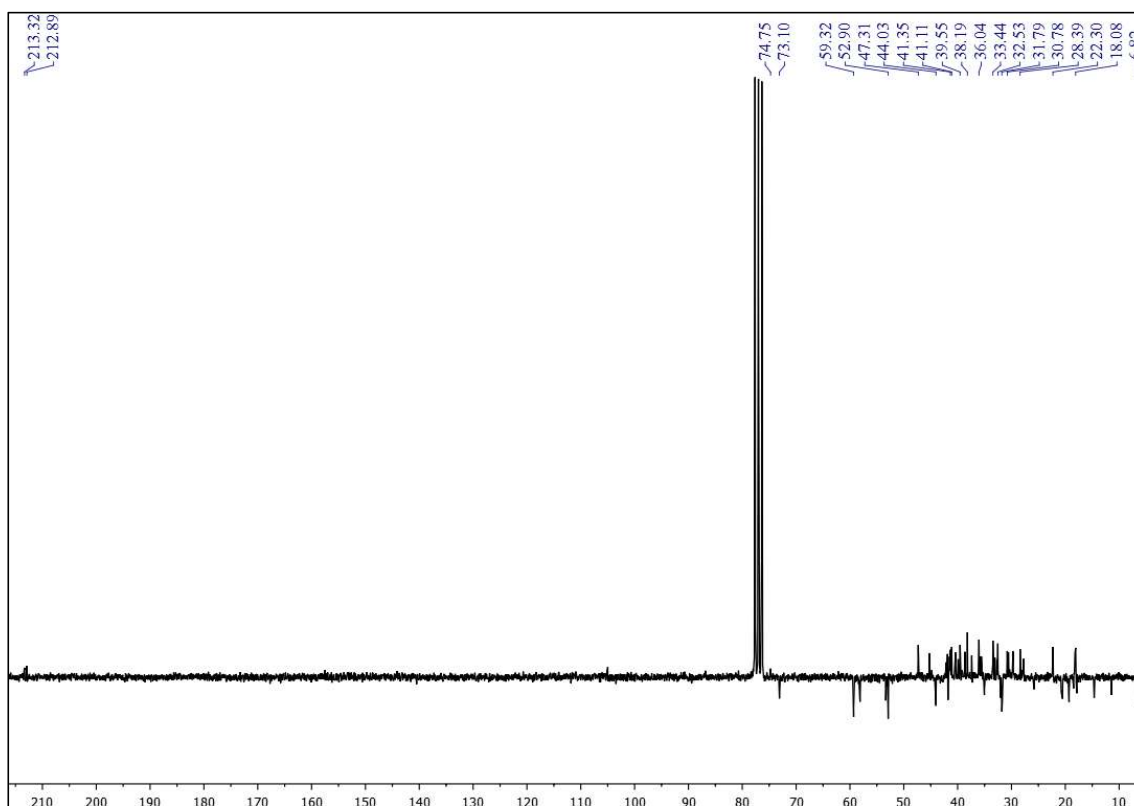


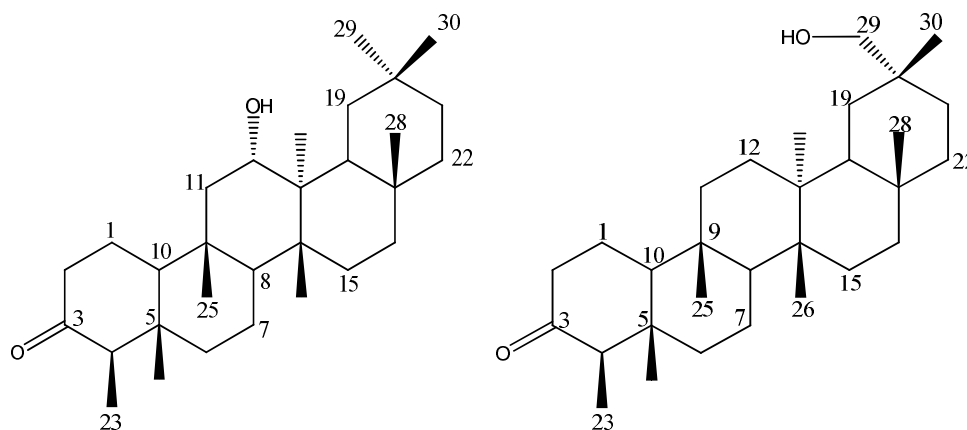
Figura 34: Espectro RMN ^{13}C APT de **MDC2-MDC3** (CDCl_3 , 50 MHz).

O composto foi isolado de *M. salicifolia* (MAGALHAES, 2012), e a mistura destes compostos já foi isolada das folhas de *M. distichophylla* (DUARTE, 2013), e das folhas de *M. gonoclada*, (OLIVEIRA, 2007; SILVA, 2010) (Figura 35).

Os dados de ressonância magnética nuclear de **MDC3**, estão compilados na Tabela 9.

Tabela 9: Dados de RMN de ^{13}C de **MDC3** (CDCl_3 , 125 MHz), comparado com dados da literatura.

Carbono	MDC3 δ_c	3-oxo-29-hidroxifriedelano (MAGALHAES, 2012) CDCl_3
1	22,3	22,3
2	41,3	41,5
3	213,3	213,2
4	58,1	58,2
5	42,1	42,5
6	41,2	41,3
7	18,2	18,3
8	53,3	53,4
9	37,3	37,4
10	59,4	59,5
11	35,5	35,6
12	29,7	29,8
13	40,3	40,0
14	38,1	38,3
15	32,6	32,7
16	35,8	35,9
17	29,7	29,8
18	41,7	41,9
19	30,5	30,6
20	33,0	33,1
21	27,7	27,8
22	39,5	39,5
23	6,8	6,8
24	14,6	14,7
25	17,8	17,9
26	18,4	18,4
27	20,7	20,8
28	32,0	32,1
29	74,7	74,8
30	25,7	25,8



3-oxo-12 α -hidroxifriedelano (**MDC1**) 3-oxo-29-hidroxifriedelano (**MDC3**)
Figura 35: Estrutura química dos compostos presente na mistura de **MDC3**.

1.6.2 Estudo fitoquímico e microbiológico dos óleos essenciais de *X. langsdorffiana*

Os óleos essenciais apresentaram diferentes rendimentos, quando comparado entre partes do mesmo espécime, e quando comparado entre partes semelhantes de espécimes distintas, com variação entre 0,05% a 1,11% (Tabela 10).

Tabela 10: Rendimentos dos óleos essenciais de *X. langsdorffiana*.

	Casca raiz	Miolo raiz	Casca caule	Miolo caule	Folhas
Espécime A	0,3 mL (0,3%)	0,5 mL (0,16%)	0,6 mL (0,66%)	0,6 mL (0,2%)	0,3 mL (0,3%)
Espécime B	1,0 mL (1,11%)	0,1 mL (0,05%)	0,5 mL (0,5%)	0,3 mL (0,1%)	0,5 mL (0,5%)
Espécime C	0,2 mL (0,33%)	0,5 mL (0,33%)	0,4 mL (0,4%)	0,7 mL (0,23%)	0,72 mL (0,72%)

1.6.2.1 Composição química dos óleos essenciais

Considerando os 15 óleos essenciais extraídos das diferentes partes dos três espécimes de *X. langsdorffiana*, foi possível identificar 50 compostos químicos, divididos entre monoterpenos, sesquiterpenos e diterpenos.

Além dos dados fornecidos pela biblioteca do CG-EM, e do índice de Kovats, também foram utilizados dados de RMN de ^1H e RMN de ^{13}C para determinação da composição química dos óleos.

A maioria dos óleos analisados, mostrou a presença de um pico com tempo de retenção 54,51 min, índice de Kovats 2738, pico base m/z 257, não sendo possível determinar sua estrutura química somente com esses dados. Verificando que o referido pico corresponde a 90,69% da composição química do óleo essencial do miolo do caule do espécime A, este óleo foi submetido a análise de RMN de ^1H e RMN de ^{13}C .

Os dados obtidos por RMN de ^1H e ^{13}C , comparados com dados da literatura, indicaram tratar-se de diterpeno com esqueleto do tipo caurano ou atisano, com grupo hidroxila em C-16 (SANTOS, 2011; SILVA et al., 2009) (Figura 36).

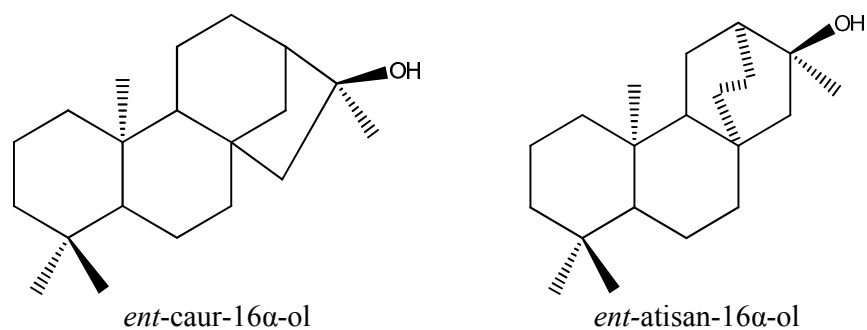


Figura 36: Esqueletos do tipo caurano e atisano.

Os dados de RMN de ^1H apresentou simpletos em δ_{H} 0,75, δ_{H} 0,78, δ_{H} 0,87 e δ_{H} 1,21, referentes a quatro metilas (Figura 37).

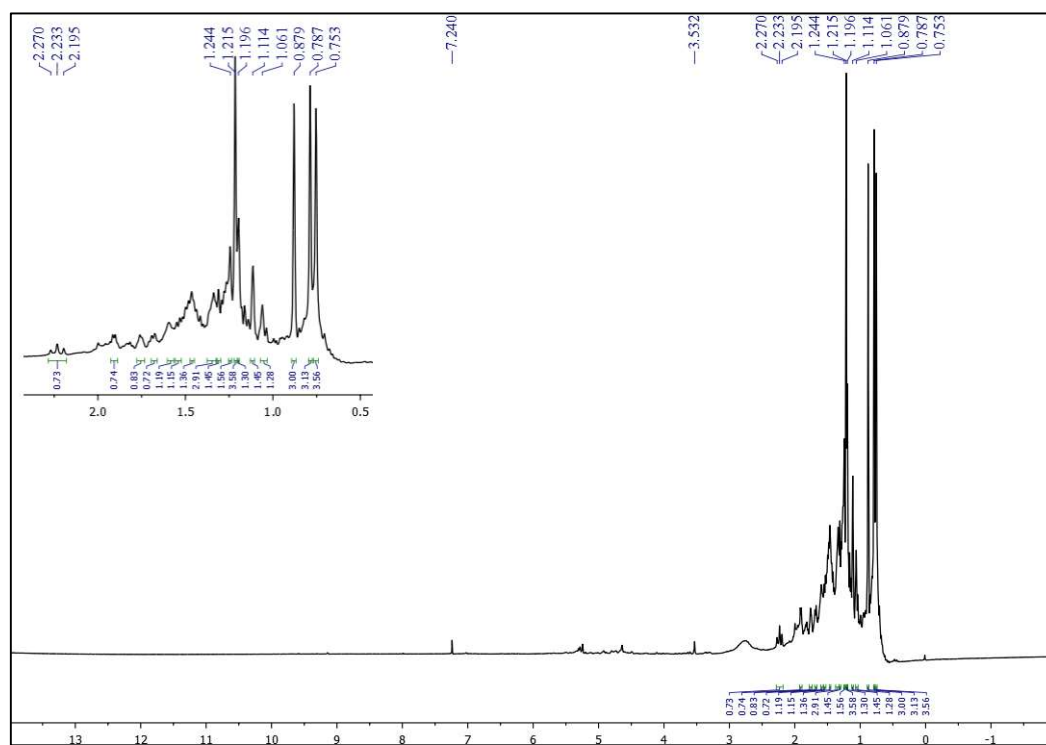


Figura 37: Espectro de RMN de ^1H do óleo essencial do miolo do caule (Espécime A) em CDCl_3 .

O espectro de RMN de ^{13}C , exibiu 20 sinais, com deslocamentos químicos em δ_{C} 23,1 (C-11), δ_{C} 37,7 (C-12) e δ_{C} 23,9 (C-13), característicos de esqueleto diterpeno do tipo atisano. Em diterpenos caurano os deslocamentos químicos dos referidos carbonos

são observados em δ_C 18,9 (C-11), δ_C 26,7 (C-12) e δ_C 46,9 (C-13). Diferenças entre diterpenos do tipo atisano e caurano, também podem ser notadas no deslocamento químico de C-16, com valores característicos em δ_C 77,6 para caurano, e δ_C 72,1 para atisano, quando este está ligado a um grupo hidroxila (MORRIS et al., 2005) (Figura 38; Figura 39).

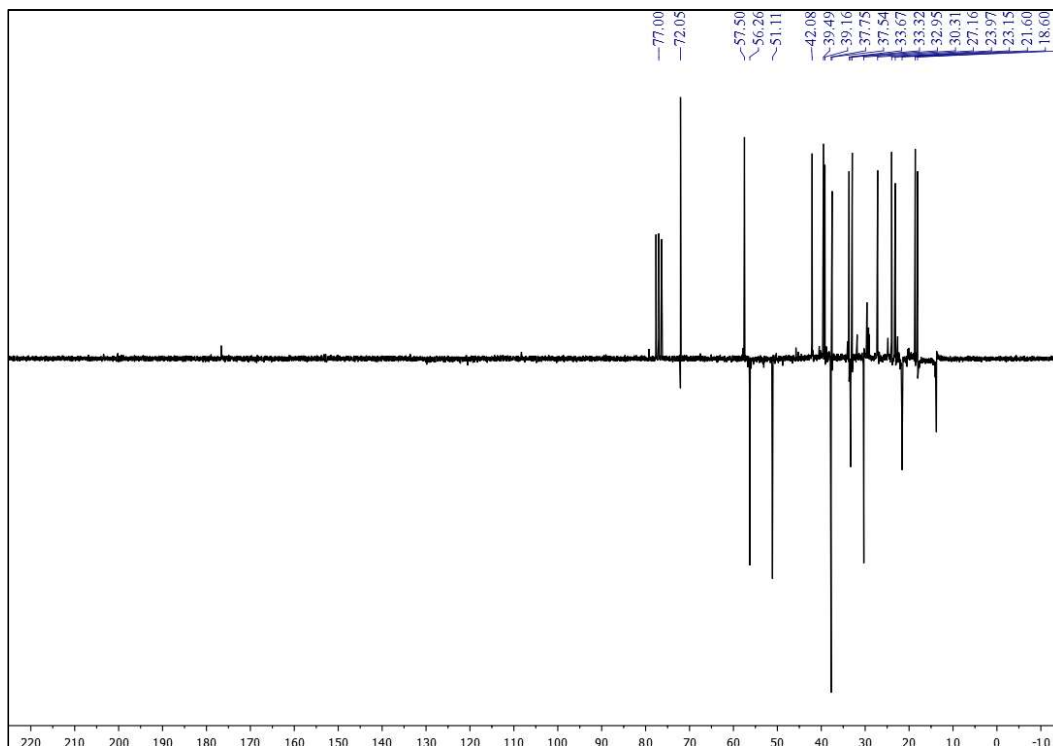


Figura 38: Espectro de RMN de ^{13}C APT do óleo essencial do miolo do caule (Espécime A) em CDCl_3 .

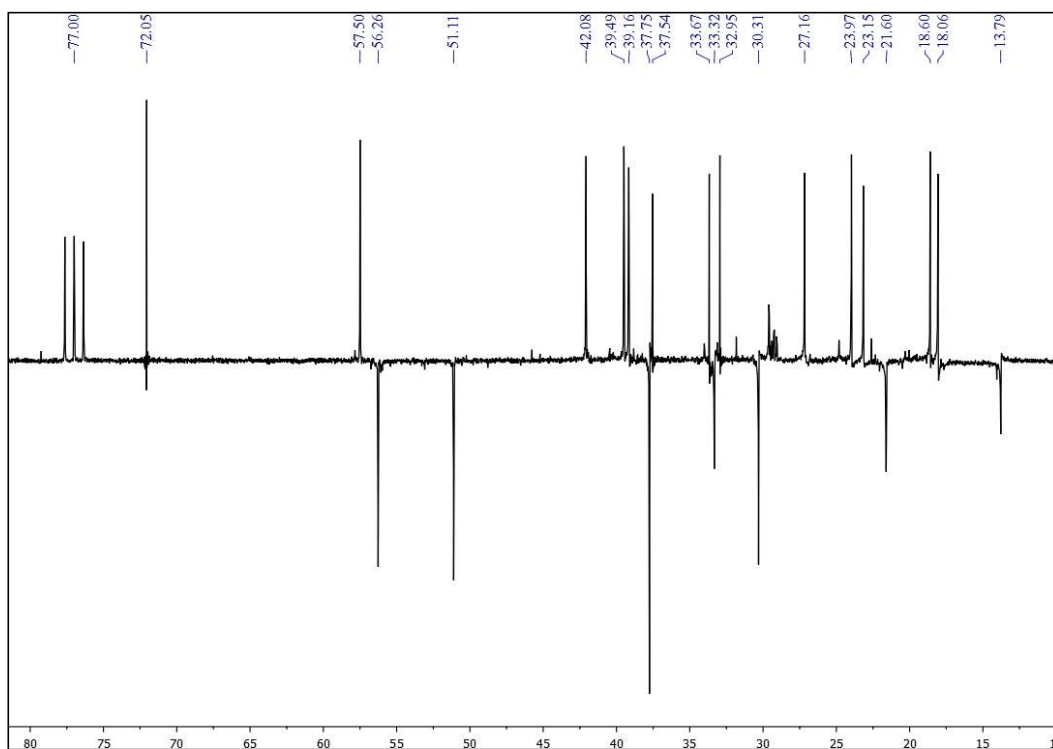


Figura 39: Expansão do espectro de RMN de ^{13}C APT do óleo essencial do miolo do caule (Espécime A) em CDCl_3 .

De acordo com dados da literatura, espectros de massas obtido no CG-EM (IE), são distintos para as classes em discussão, com pico base em m/z 257 (atisano) e m/z 272 (caurano), corroborando com o esqueleto do tipo atisano para o composto majoritário do óleo em análise, já que o mesmo apresentou pico base em m/z 257 (MORRIS et al., 2005) (Figura 40).

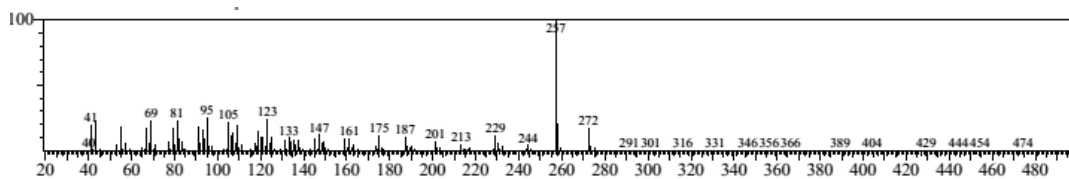


Figura 40: Espectro de massas do composto majoritário do óleo essencial (miolo do caule-A), obtido por impacto eletrônico.

Comparando dados da literatura, com os dados de espectro de massas, RMN de ^1H e RMN de ^{13}C , do composto majoritário do óleo essencial do miolo do caule (espécime A) de *X. langsdorffiana*, identificamos o composto foi identificado como *ent*-atisan-16 α -

ol (Figura 41) (SANTOS, 2011; SILVA et al., 2009; MORRIS et al., 2005; KONISHI et al., 2003). Os dados de carbono estão compilados na Tabela 11.

Tabela 11: Dados de RMN de ^{13}C (CDCl_3) do composto majoritário do óleo essencial do miolo do caule de *X. langsdorffiana*, e dados do *ent*-atisan-16 α -ol descritos na literatura.

Carbono	δ_c 50 MHz - CDCl_3	<i>ent</i> -atisan-16 α -ol 100 MHz - CDCl_3 (KONISHI et al., 2003)
1	39,1	39,3
2	18,0	18,7
3	42,0	42,2
4	32,9	33,1
5	56,2	56,4
6	18,6	18,2
7	39,4	39,7
8	33,6	33,8
9	51,1	51,3
10	37,5	37,1
11	23,1	24,1
12	37,7	37,9
13	23,9	23,2
14	27,1	27,3
15	57,5	57,7
16	72,0	72,2
17	30,3	30,4
18	33,3	33,4
19	21,6	21,7
20	13,7	13,9

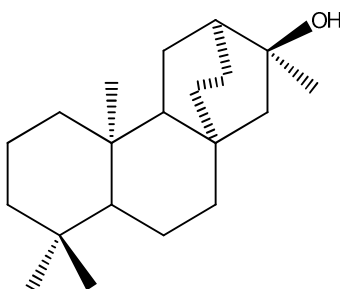


Figura 41: *ent*-atisan-16 α -ol

Dados da literatura relatam o isolamento do *ent*-atisan-16 α -ol em *Xylopi* *aromatica* (MORAES & ROQUE, 1988).

Com a definição da estrutura química do composto majoritário do óleo essencial do miolo do caule (espécime A) de *X. langsdorffiana*, foi possível identificar uma maior porcentagem da composição química dos óleos essenciais em estudo. Na Tabela 12 estão compilados os compostos identificados nos óleos essenciais de 3 espécimes de *X. langsdorffiana*, e na Figura 42, suas respectivas estruturas químicas.

Tabela 12: Composição química dos óleos essenciais extraídos de diferentes partes e diferentes espécimes de *X. langsdorffiana*.

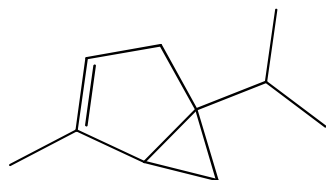
Compostos	KI ^b	Espécime A (%)					Espécime B (%)					Espécime C (%)				
		Fo	CR	MR	CC	MC	Fo	MR	CR	MC	CC	Fo	CC	MC	CR	MR
1	α -turjeno	927	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,29	0,10	0,07	-
2	α -pineno	935	9,12	2,35	1,49	4,96	-	8,03	2,84	0,94	2,22	5,11	10,19	22,93	11,59	5,59
3	Canfeno	950	2,08	0,53	0,19	0,56	-	1,48	-	0,71	-	0,26	1,90	2,48	1,09	0,58
4	Sabineno	974	-	-	-	0,10	-	-	-	-	-	0,13	-	0,19	-	-
5	β -pineno	979	0,85	1,26	1,23	3,50	0,39	3,21	2,57	0,62	3,41	4,73	6,40	43,02	22,09	12,39
6	β -mirceno	991	0,29	1,27	0,17	0,81	-	-	-	1,09	-	0,89	0,41	1,30	0,51	1,81
7	2-careno	994	0,07	-	1,17	-	-	-	-	8,61	-	-	-	-	-	-
8	Pseudocumeno	997	0,24	20,05	3,29	-	-	0,55	1,93	20,97	-	0,42	0,52	-	0,12	26,13
9	Pseudolimoneno	1006	-	0,08	-	0,27	-	-	-	-	-	0,42	-	-	-	-
10	p-cimeno	1025	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,25	-	0,25	-
11	Limoneno	1030	2,74	11,57	2,65	34,92	1,74	5,99	2,92	2,91	7,66	45,52	0,83	2,40	1,11	1,79
12	(Z)- β -ocimeno	1043	0,50	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
13	(E)- β -ocimeno	1047	0,29	-	-	-	-	-	-	0,12	-	-	0,49	-	-	-
14	Trans-pinocarveol	1141	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,25	-	-	-
15	Terpinen-4-ol	1179	-	-	-	0,18	-	-	-	-	-	-	0,38	-	-	-
16	α -terpineol	1192	-	-	-	0,29	-	-	-	-	-	0,26	-	2,20	0,37	0,97
17	Mirtenal	1199	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,39	-	-	-
18	Timol metil éter	1236	-	0,25	-	-	-	-	-	0,35	-	-	-	-	-	-
19	Δ -elemeno	1340	1,27	-	-	0,90	-	1,58	-	-	-	0,61	1,17	0,37	1,01	-
20	α -cubebeno	1352	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,50	1,04	-	-
21	α -copaeno	1378	1,64	1,29	0,77	1,56	-	1,42	-	1,36	-	1,54	2,41	2,44	4,19	2,11
22	β -elemeno	1394	0,88	0,71	0,37	0,15	-	0,96	-	0,59	-	-	0,87	-	-	0,16
23	Cipereno	1403	-	4,70	2,66	-	-	-	1,46	4,63	-	-	-	0,25	8,99	2,63
24	Cariofileno	1423	4,35	0,72	0,58	1,97	1,30	12,16	-	0,69	3,08	4,34	9,14	2,56	5,51	0,75
25	ω -elemeno	1436	0,37	-	-	0,25	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
26	α -guaiano	1452	-	-	-	-	-	-	-	0,20	-	-	-	-	-	-
27	α -humuleno	1457	0,63	-	-	0,34	-	1,26	-	-	-	0,47	1,02	0,17	0,31	-
28	ω -muuroleno	1480	-	-	-	12,44	-	-	-	-	-	-	0,63	2,67	5,51	0,56
29	Germacreno D	1485	22,68	2,67	-	-	-	-	-	0,78	-	4,31	34,68	5,27	-	0,81
30	β -selineno	1490	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,60	-
31	α -selineno	1499	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,83	-

32	ε -amorfenos	1498	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1,40	-	-
33	epi- β -cariofileno	1465	0,12	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
34	Biciclogermacreno	1501	12,97	-	-	0,86	-	12,57	-	-	-	-	9,26	-	-	-	-
35	α -muuroleno	1504	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,59	0,99	-	-
36	ω -cadineno	1518	0,24	-	-	0,34	-	-	-	-	-	-	0,89	1,29	2,86	-	-
37	Δ -cadineno	1527	1,08	0,55	0,63	0,66	-	0,88	-	-	-	-	1,60	2,22	7,43	-	2,17
38	Cis-sesquisabineno hidratado	1542	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,22	-
39	Germacreno B	1561	1,15	-	-	0,77	-	2,39	-	-	-	1,29	1,21	0,52	1,27	-	-
40	Óxido de Cariofileno	1587	-	-	-	-	-	3,88	-	-	1,95	1,34	2,41	0,34	-	-	-
41	Espatuleno	1575	4,39	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1,15	-	-	-	-
42	Viridiflorol	1588	2,38	-	-	0,16	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
43	Cedrol	1606	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1,58
44	Copaborneol	1609	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,41	-
45	α -muurolol	1650	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,65	-	-
46	Intermedeol	1659	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,47	-
47	Cadin-4-en-10-ol	1658	1,56	-	-	0,46	-	-	-	-	-	0,40	1,01	0,98	2,17	-	-
48	<i>ent</i> -atisan-16 α -ol ^a	2738	19,13	19,66	59,07	24,24	90,69	16,05	9,92	1,00	71,38	18,35	1,13	-	2,90	0,57	7,50
TOTAL			89,09	67,66	74,27	90,69	94,12	72,41	21,64	45,57	89,70	90,39	89,32	96,00	74,47	66,06	20,91

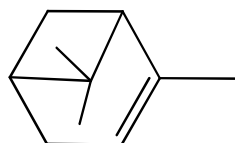
a: identificado com o auxílio de RMN de ¹³C e RMN de ¹H.

b: índice de Kovats calculado.

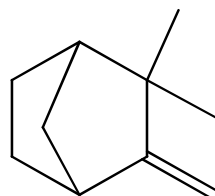
Fo-Folha; CR-casca da raiz; MR-miolo da raiz; CC-casca do caule; MC-miolo do caule.



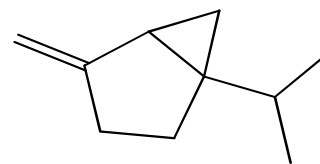
α -turjeno



α -pineno



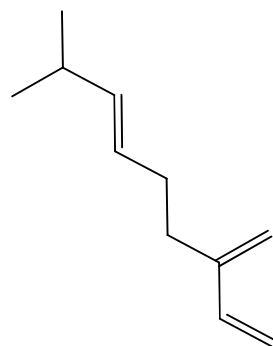
Canfeno



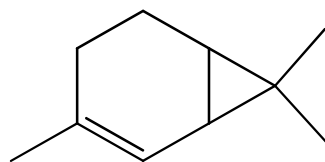
Sabineno



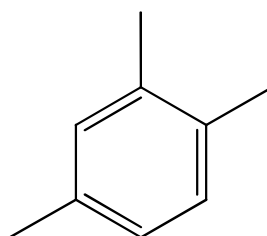
β -pineno



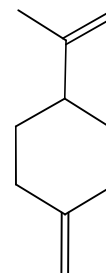
β -mirceno



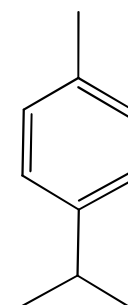
2-careno



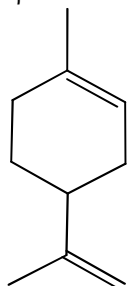
Pseudocumeno



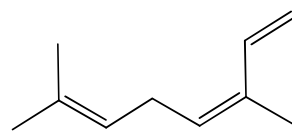
Pseudolimoneno



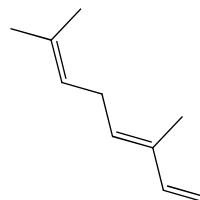
p-cimeno



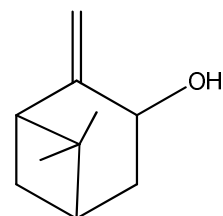
Limoneno



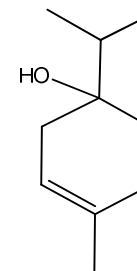
(Z)- β -ocimeno



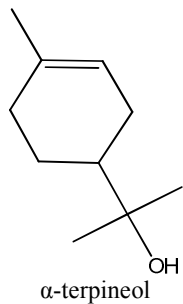
(E)- β -ocimeno



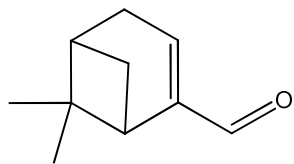
Trans-pinocarveol



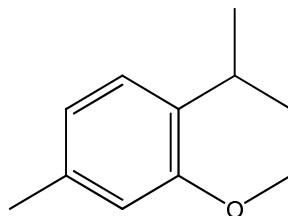
Terpinen-4-ol



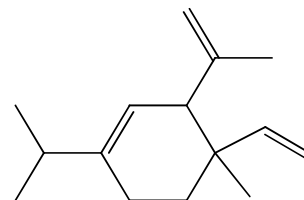
α -terpineol



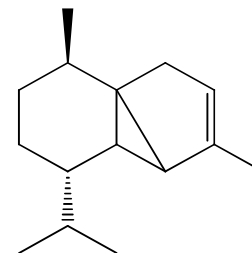
Mirtenal



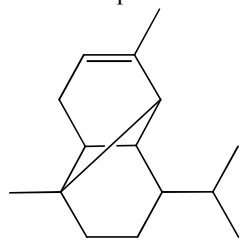
Metil timol éter



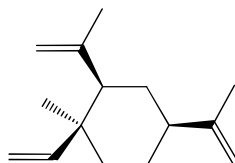
Δ -elemeno



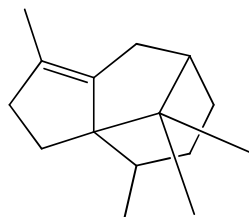
α -cubebeno



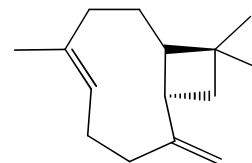
α -copaeno



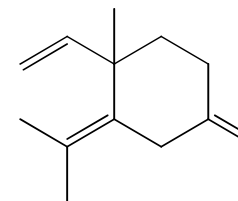
β -elemeno



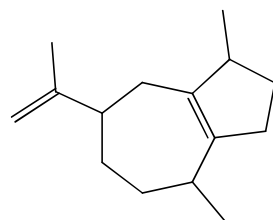
Cipereno



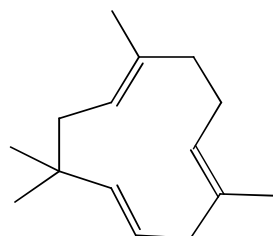
Cariofileno



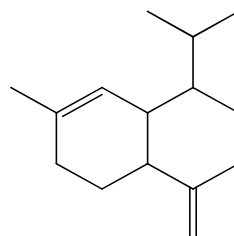
ω -elemeno



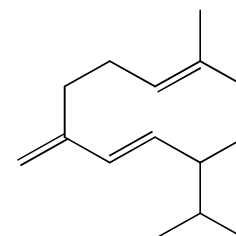
α -guaieno



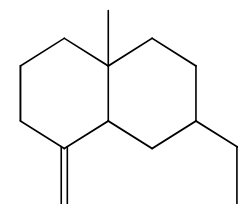
α -humuleno



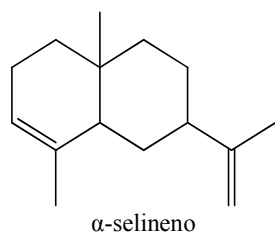
ω -muuroleno



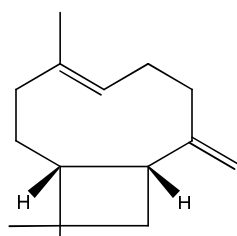
Germacreno D



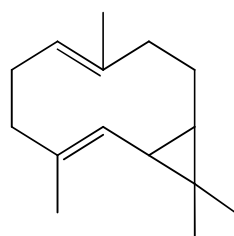
β -selineno



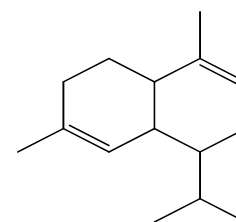
α -selineno



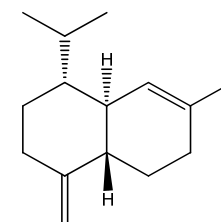
epi- β -cariofileno



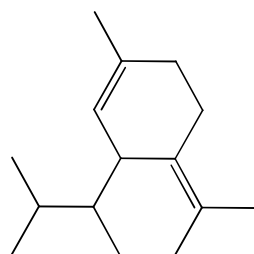
Biciclogermacreno



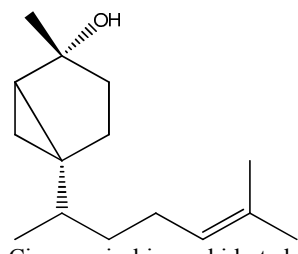
α -muuroleno



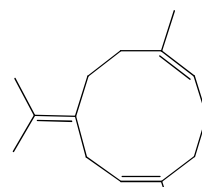
ω -cadineno



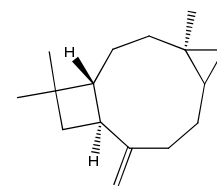
Δ -cadineno



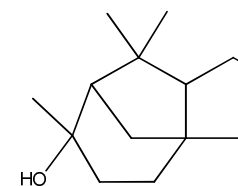
Cis-sesquisabineno hidratado



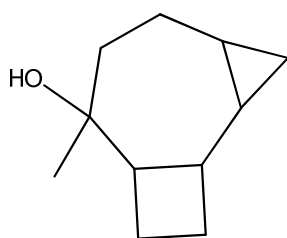
Germacreno B



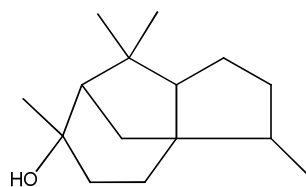
Óxido de Cariofileno



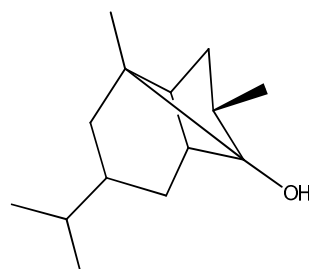
Espatuleno



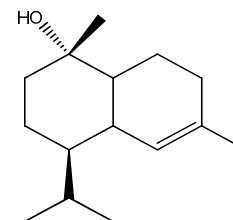
Viridiflorol



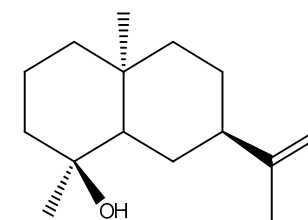
Cedrol



Copaborneol



α -muurolol



Intermedeol

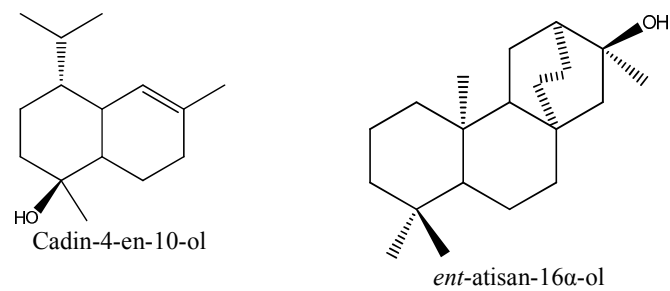


Figura 42: Estrutura química dos compostos identificados nos óleos essenciais de *X. langsdorffiana*.

Os três espécimes apresentaram diferentes composições químicas. Porém, algumas semelhanças foram observadas. Os monoterpenos, β -pineno e limoneno, foram identificados em todos os óleos essenciais analisados, com diferentes porcentagens.

As folhas dos três espécimes apresentaram o biciclogermacreno entre os 3 compostos majoritários, e os espécimes A e B, apresentaram o *ent*-atisan-16 α -ol e biciclogermacreno entre os três compostos majoritários.

Os compostos majoritários identificados foram, espécime A: germacreno D (folha – 22,68%), *ent*-atisan-16 α -ol (miolo raiz – 59,07%, miolo caule - 90,69%), pseudocumeno (casca raiz - 20,05%), Limoneno (casca caule – 34,92%); espécime B: *ent*-atisan-16 α -ol (folha – 16,05%, miolo caule – 71,38%), Limoneno (miolo raiz 2,92%, casca caule – 45,52%), pseudocumeno (casca raiz - 20,97%); espécime C: Germacreno D (folha – 34,68%), β -pineno (casca caule - 43,02%, miolo caule 22,09%), pseudocumeno (casca raiz - 26,13%) e *ent*-atisan-16 α -ol (miolo raiz – 7,50%).

Não foi possível identificar os compostos presentes a partir do tempo de retenção 33,0 min, como exceção do *ent*-atisan-16 α -ol. Isso resultou numa baixa porcentagem de compostos identificados no miolo da raiz (espécime B e C), e casca raiz (espécime B), que apresenta a maior porcentagem de seus compostos no referido tempo de retenção.

Nas figuras seguintes podemos visualizar os cromatogramas dos óleos essenciais dos três espécimes analisados (Figura 43 à Figura 57).

No capítulo 3, está descrito os resultados referentes a análise de componente principal (PCA) dos óleos essenciais em estudo.

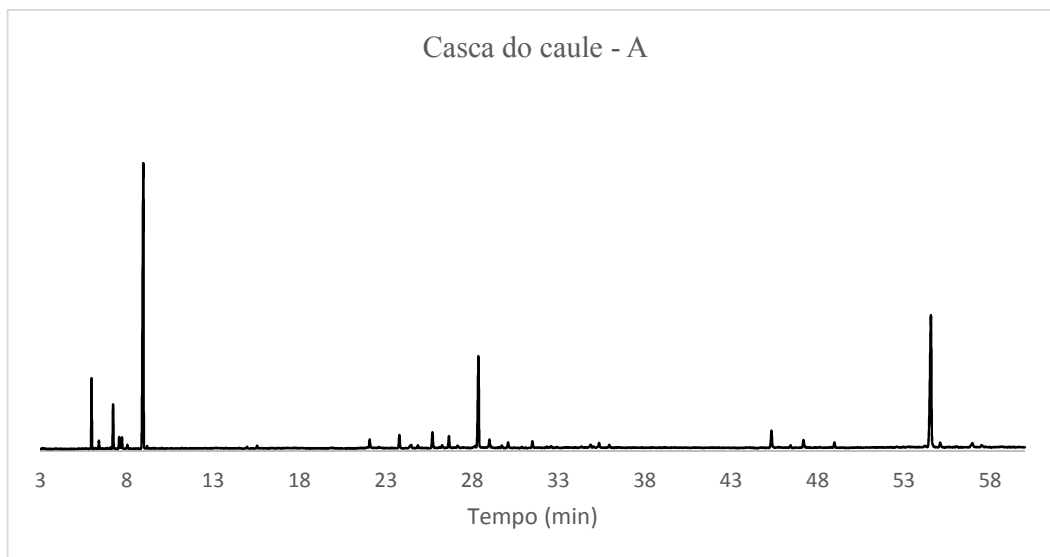


Figura 43: Cromatograma do óleo essencial da casca do caule (espécime A) de *X. langsdorffiana*.

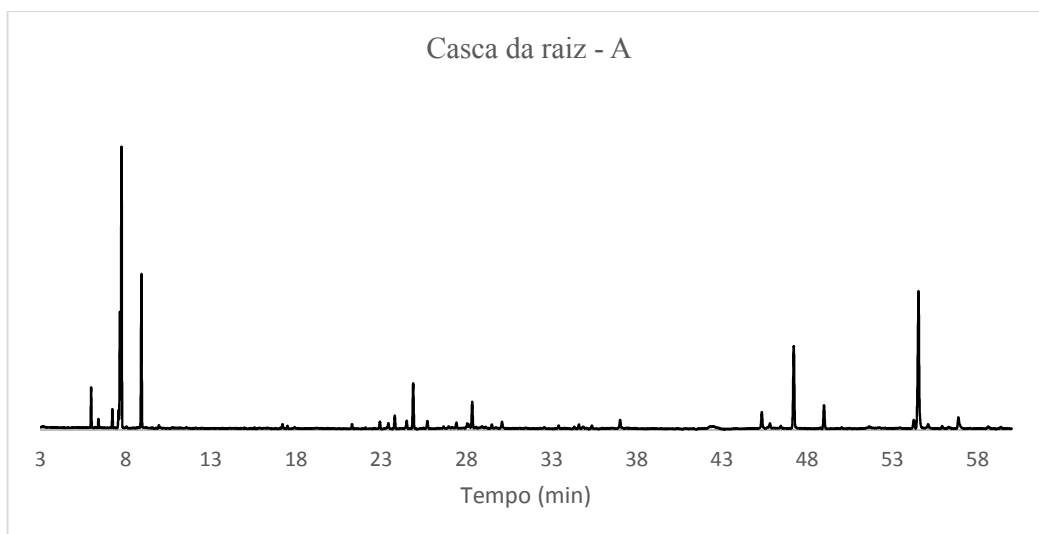


Figura 44: Cromatograma do óleo essencial da casca da raiz (espécime A) de *X. langsdorffiana*.

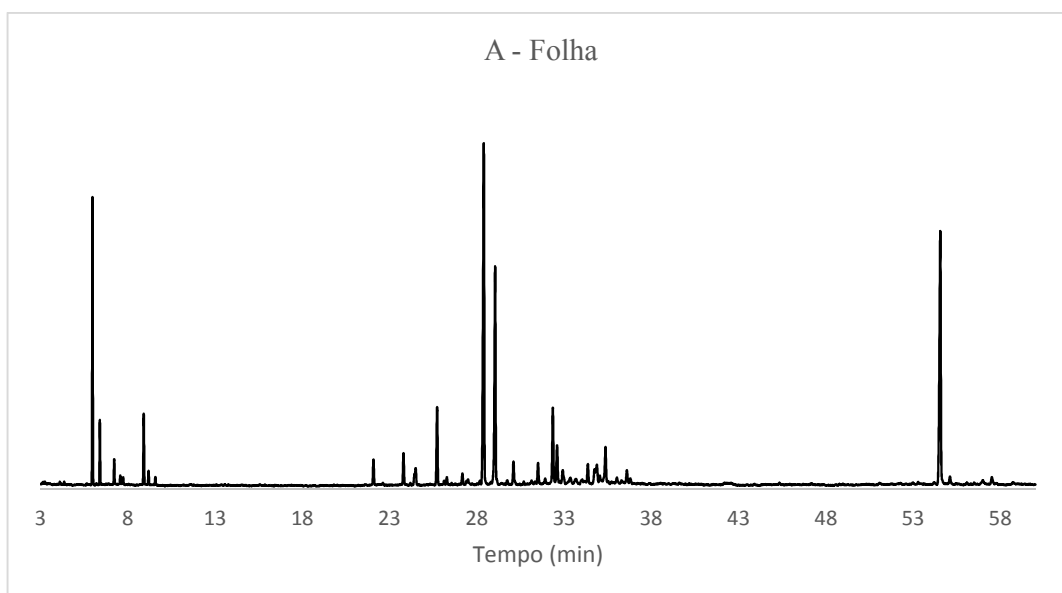


Figura 45: Cromatograma do óleo essencial da folha (espécime A) de *X. langsdorffiana*.

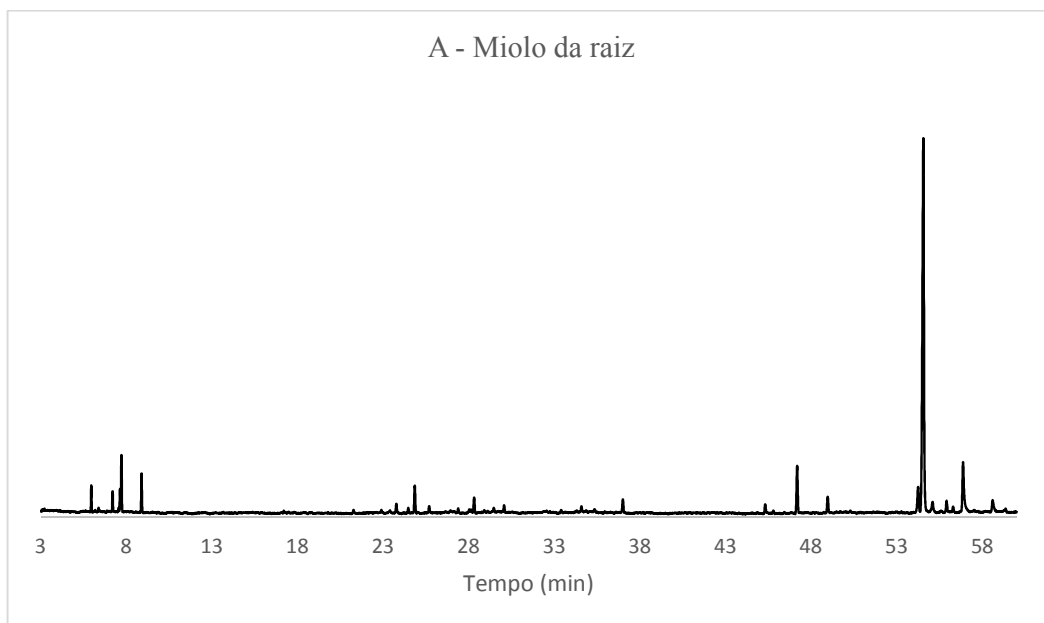


Figura 46: Cromatograma do óleo essencial do miolo da raiz (espécime A) de *X. langsdorffiana*.

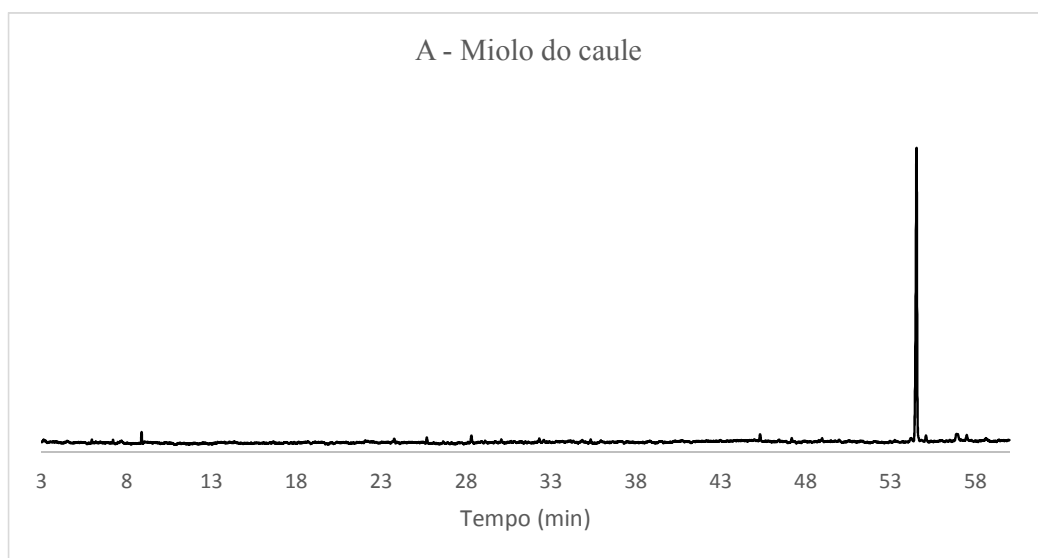


Figura 47: Cromatograma do óleo essencial do miolo do caule (espécime A) de *X. langsdorffiana*.

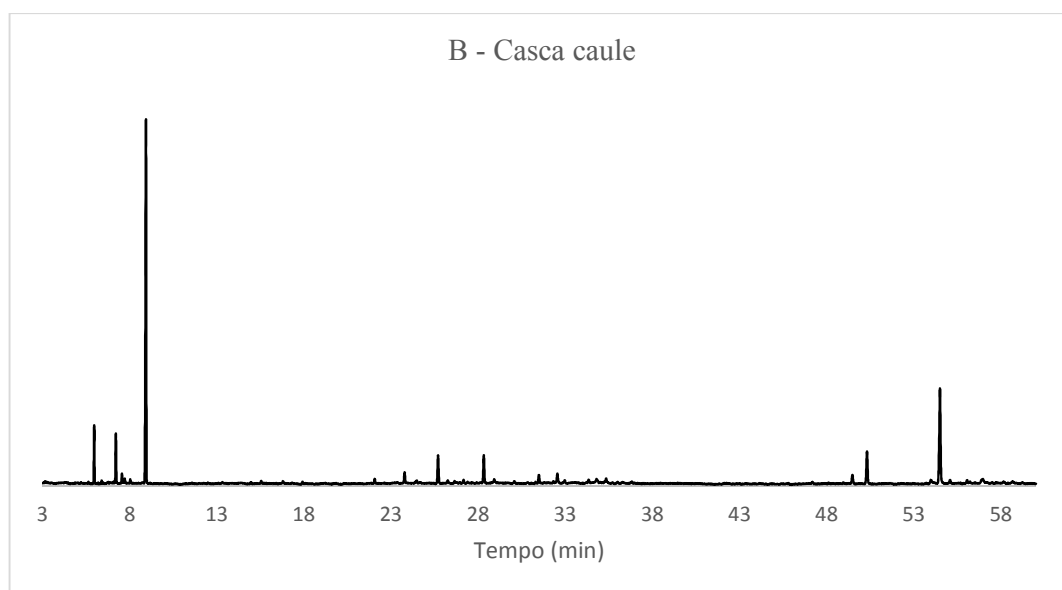


Figura 48: Cromatograma do óleo essencial da casca do caule (espécime B) de *X. langsdorffiana*.

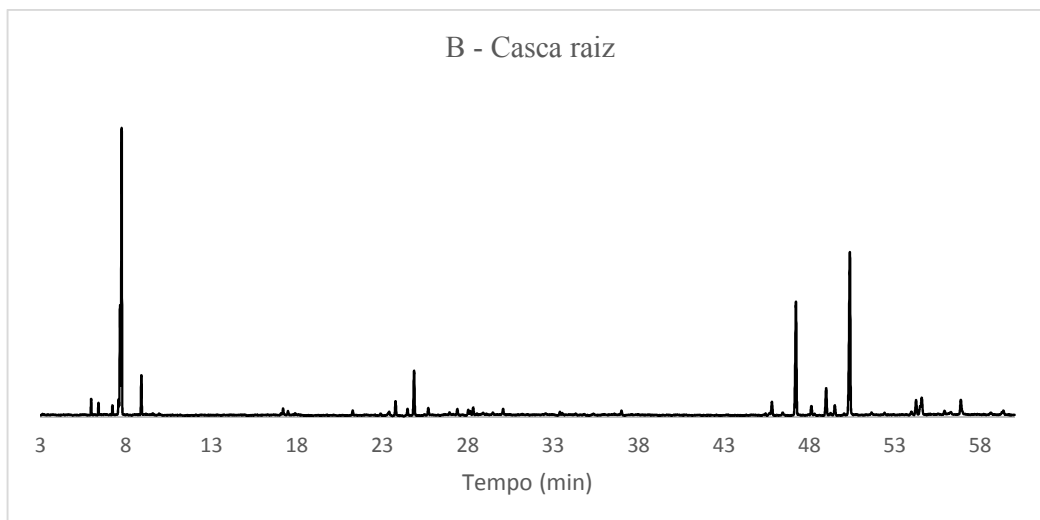


Figura 49: Cromatograma do óleo essencial da casca da raiz (espécime B) de *X. langsdorffiana*.

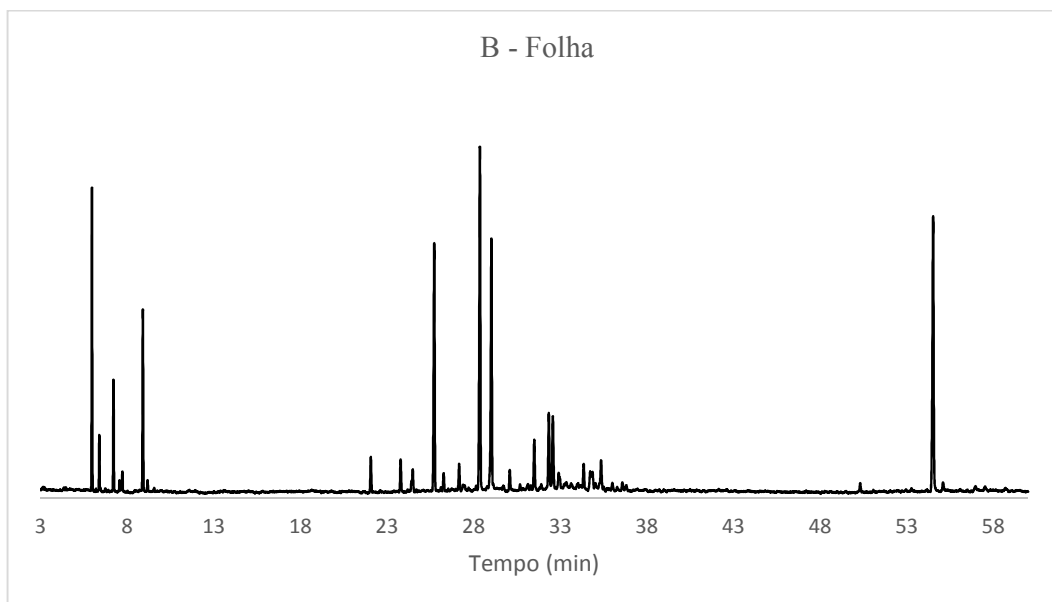


Figura 50: Cromatograma do óleo essencial da folha (espécime B) de *X. langsdorffiana*.

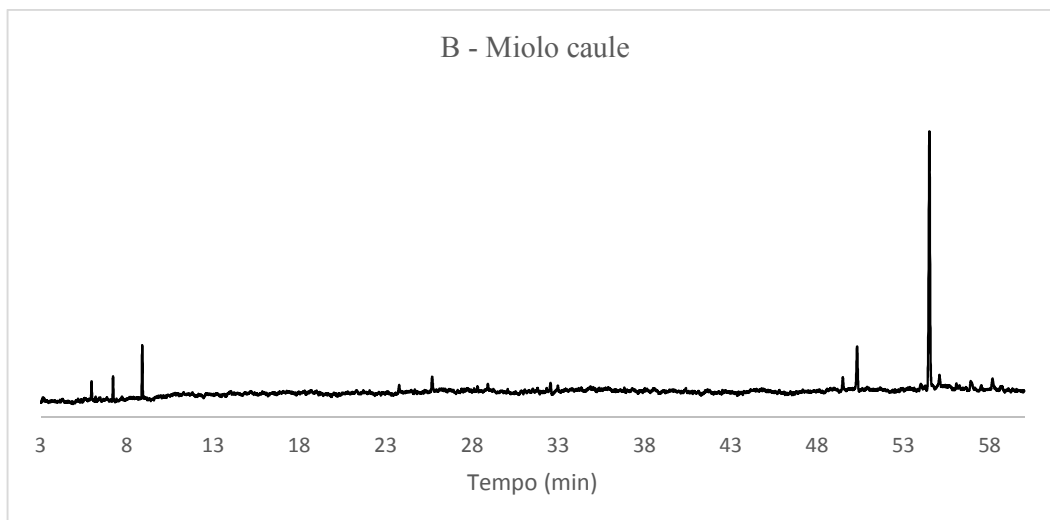


Figura 51: Cromatograma do óleo essencial do miolo do caule (espécime B) de *X. langsdorffiana*.

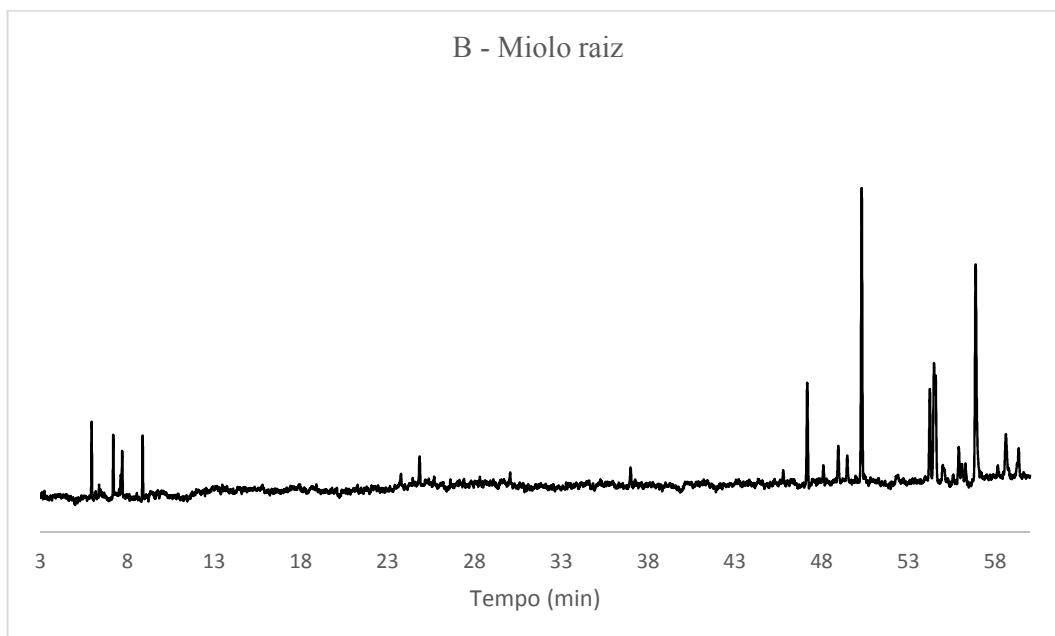


Figura 52: Cromatograma do óleo essencial do miolo da raiz (espécime B) de *X. langsdorffiana*.

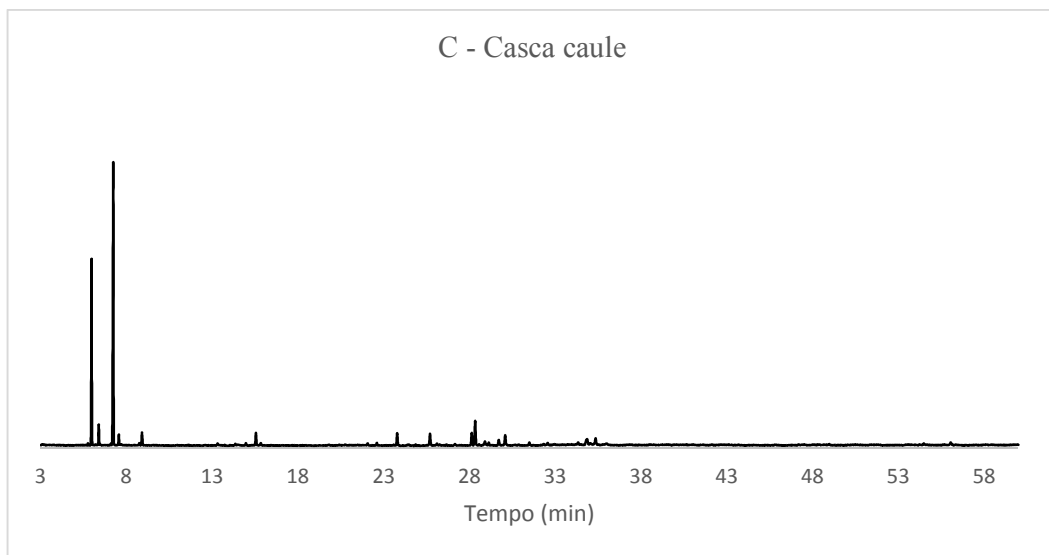


Figura 53: Cromatograma do óleo essencial da casca do caule (espécime C) de *X. langsdorffiana*.

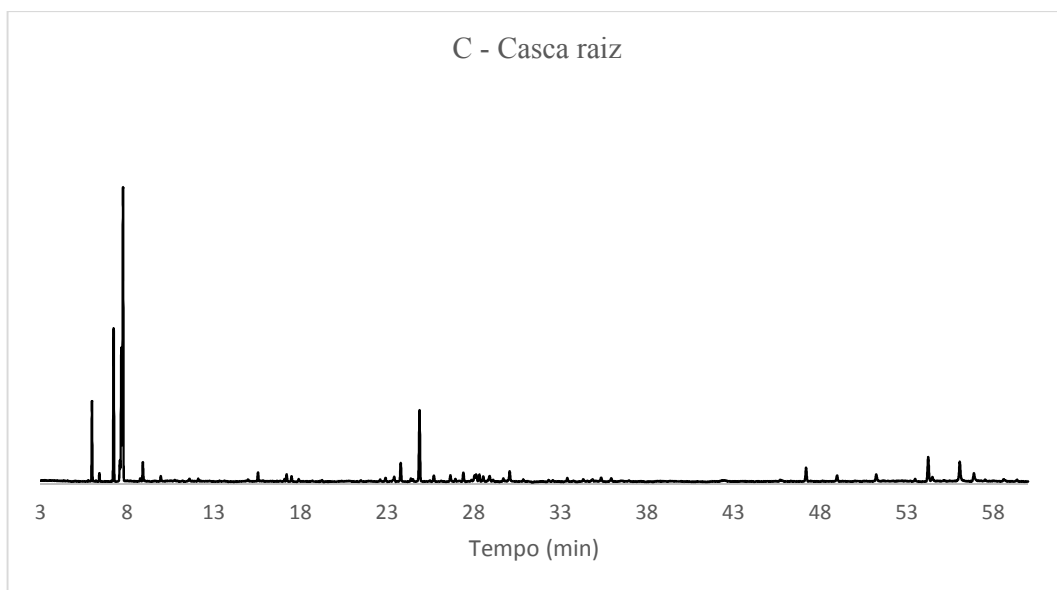


Figura 54: Cromatograma do óleo essencial da casca da raiz (espécime C) de *X. langsdorffiana*.

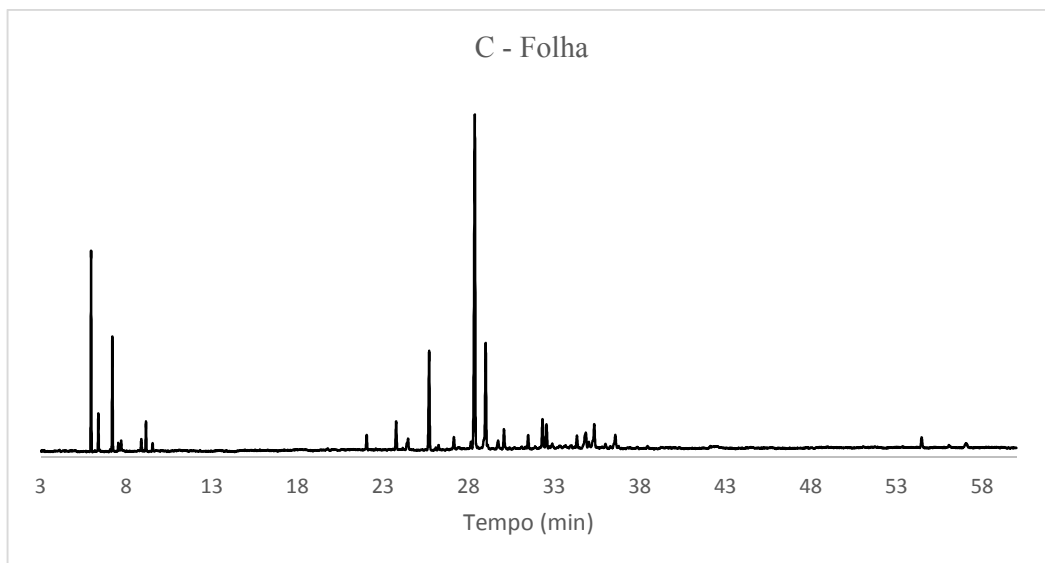


Figura 55: Cromatograma do óleo essencial da folha (espécime C) de *X. langsdorffiana*.

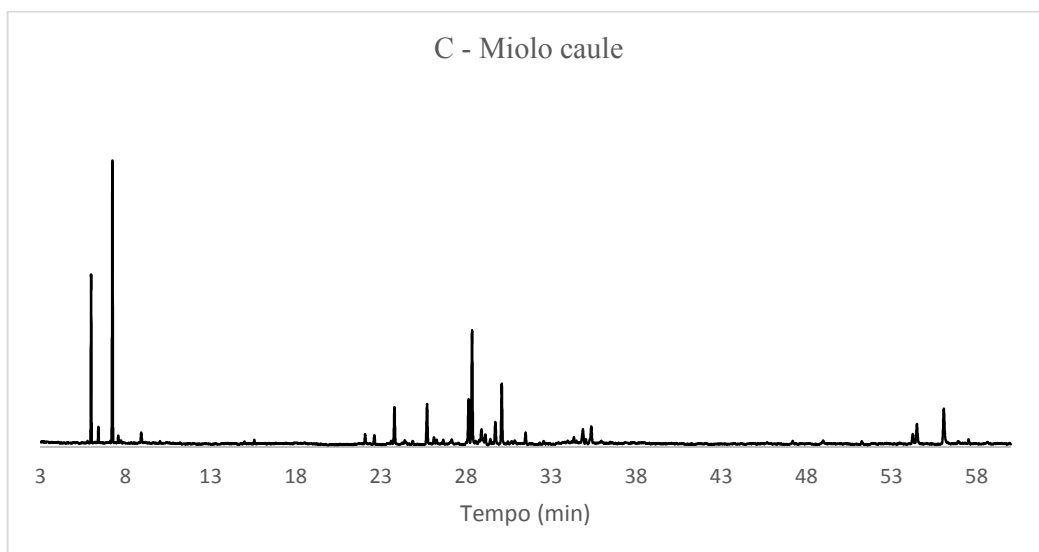


Figura 56: Cromatograma do óleo essencial do miolo do caule (espécime C) de *X. langsdorffiana*.

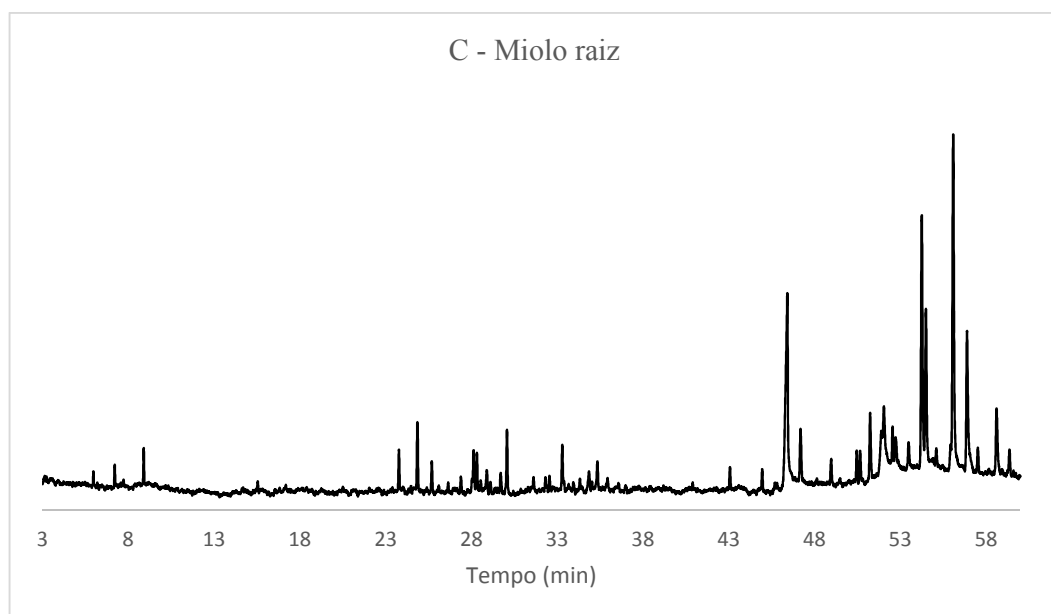


Figura 57: Cromatograma do óleo essencial do miolo da raiz (espécime C) de *X. langsdorffiana*.

1.6.2.2 Atividade microbiológica do óleo essencial de *X. langsdorffiana*

Os óleos essenciais apresentaram valores de CIM $\geq 1024 \mu\text{g/mL}$ e $512 \mu\text{g/mL}$, conforme mostra a Tabela 13.

Tabela 13: Concentração inibitória mínima dos óleos essenciais testados.

Produto Natural		Concentração Inibitória Mínima (CIM) - $\mu\text{g/mL}$		
		<i>E. coli</i> (ATCC 25922)	<i>P. aeruginosa</i> (ATCC 9027)	<i>S. aureus</i> (ATCC 25923)
Espécime A	Folha	≥ 1024	≥ 1024	≥ 1024
	Miolo Caule	≥ 1024	≥ 1024	≥ 1024
	Casca Caule	≥ 1024	≥ 1024	≥ 1024
	Miolo Raiz	≥ 1024	512	≥ 1024
	Casca Raiz	≥ 1024	512	≥ 1024
Espécime B	Folha	≥ 1024	≥ 1024	512
	Miolo Caule	≥ 1024	512	≥ 1024
	Casca Caule	≥ 1024	512	512
	Miolo Raiz	≥ 1024	≥ 1024	≥ 1024
	Casca Raiz	≥ 1024	≥ 1024	≥ 1024
Espécime C	Folha	≥ 1024	≥ 1024	≥ 1024
	Miolo Caule	≥ 1024	≥ 1024	≥ 1024
	Casca Caule	≥ 1024	512	512
	Casca Raiz	≥ 1024	512	512

Todos os óleos essenciais dos três espécimes apresentaram CIM $\geq 1024 \mu\text{g/mL}$ frente a *E. coli* (ATCC 25922).

O OE das folhas e o miolo do caule dos três espécimes, apresentaram CIM $\geq 1024 \mu\text{g/mL}$ para as três cepas testadas, com exceção do miolo do caule do espécime B frente a *P. aeruginosa* que mostrou valor igual a $512 \mu\text{g/mL}$.

A casca do caule dos espécimes B e C, apresentaram CIM $512 \mu\text{g/mL}$, frente a *P. aeruginosa* e *S. aureus*.

Como podemos observar na tabela acima, dos 42 testes realizados, somente 10 apresentaram CIM $512 \mu\text{g/mL}$, e os demais CIM $\geq 1024 \mu\text{g/mL}$.

As divergências apresentadas pelos óleos essenciais da casca do caule, e miolo e casca da raiz, podem estar relacionadas a diferente composição ou proporção de constituintes químicos apresentado pelos óleos de cada espécime.

Modulação:

A modulação tem por objetivo analisar a influência da concentração subinibitória (CIM/8) dos óleos essenciais de *X. langsdorffiana* sobre a ação de diversas concentrações de antibióticos (2500 µg/mL a 0,61 µg/mL) frente as cepas bacterianas multirresistentes.

Antibióticos associados a produtos naturais têm se mostrado como uma importante opção no combate a resistência bacteriana. Isso ocorre quando o produto natural gera sinergismo com os antibióticos inibindo o desenvolvimento de resistência (COUTINHO et al., 2008).

A avaliação do sinergismo de óleos essenciais associados a antibióticos, frente às cepas multirresistentes, vem sendo objeto de diversos estudos (ZAGO et al., 2009; RIBEIRO, VELOSO & GUIMARÃES, 2013; PROBST, 2012). Esta combinação pode aumentar a atividade dos antibióticos, revertendo a resistência desenvolvida pela bactéria ou aumentando os alvos atingidos nela. Os possíveis mecanismos de ação envolvidos são: aumento da permeabilidade da membrana celular, o que aumenta a absorção do antibiótico na célula alvo, inibição do efluxo ativo de antibióticos através da membrana plasmática, eliminação de plasmídeos e alteração no sistema enzimático da bactéria (HELANDER et al., 1998; COUTINHO et al., 2009).

O estudo de modulação como os óleos essenciais de *X. langsdorffiana*, mostraram resultados como: não significativo, sinergismo e antagonismo.

Frente a *P. aeruginosa*, os óleos essenciais da casca raiz e do miolo raiz (espécime A), e casca caule e folha (espécime B), diminuíram a concentração de ação do antibiótico gentamicina em 50%, igualmente ocorreu para os óleos essenciais da casca raiz e miolo raiz (espécime A), modulado com amicacina. No espécime A, foi verificado alguns casos de antagonismo, a exemplo: casca do caule, quando modulados com amicacina; e casca do caule e miolo do caule, quando modulados com gentamicina.

Os compostos majoritários da casca raiz (espécime A) e casca caule (espécime B), foram pseudocumeno e limoneno, respectivamente. O OE do miolo raiz (espécime A) e das folhas (espécime B) apresentou o *ent*-atisan-16 α -ol como composto majoritário.

Quando avaliado o potencial modulador frente a *E. coli*, somente o óleo essencial da casca do caule do espécime B, mostrou sinergismo significativo quando modulado com gentamicina, diminuindo de 115 µg/mL para 19 µg/mL, reduzindo sua concentração de ação em 83%.

Os óleos essenciais mostraram valores expressivos quando modulado com o antibiótico oxacilina, diminuindo a concentração de ação do fármaco em 99%. Este foi o

caso dos óleos essenciais da casca e do miolo da raiz do espécime A, quando modulados com oxacilina, frente a *S. aureus*, reduziu sua concentração de ação de $\geq 2500 \mu\text{g/mL}$ para $3 \mu\text{g/mL}$, modificando assim o fenótipo bacteriano de resistente para sensível.

Todos os óleos essenciais dos espécimes A, B e C, apresentaram sinergismo significativo frente a *S. aureus*, quando modulados com imipenem, diminuindo a concentração de ação dos antibióticos de 63% a 98%.

Não há relatos sobre atividades biológicas do *ent-atisan-16 α -ol*, dados da literatura reportam somente o isolamento e identificação da substância (MORAES & ROQUE, 1988). O limoneno apresenta atividade antimicrobiana (SCHUCK et al., 2001), atividade inseticida (PETRAKIS et al., 2005; VIEGAS JUNIOR, 2003), e atividade antitripanossoma (GOMES, 2014).

Não foi possível estabelecer uma relação entre a composição química dos óleos essenciais, e as atividades moduladoras apresentadas.

Podemos observar os resultados da modulação dos óleos essenciais dos espécimes A, B e C nos seguintes gráficos (Figura 58, Figura 59, Figura 60).

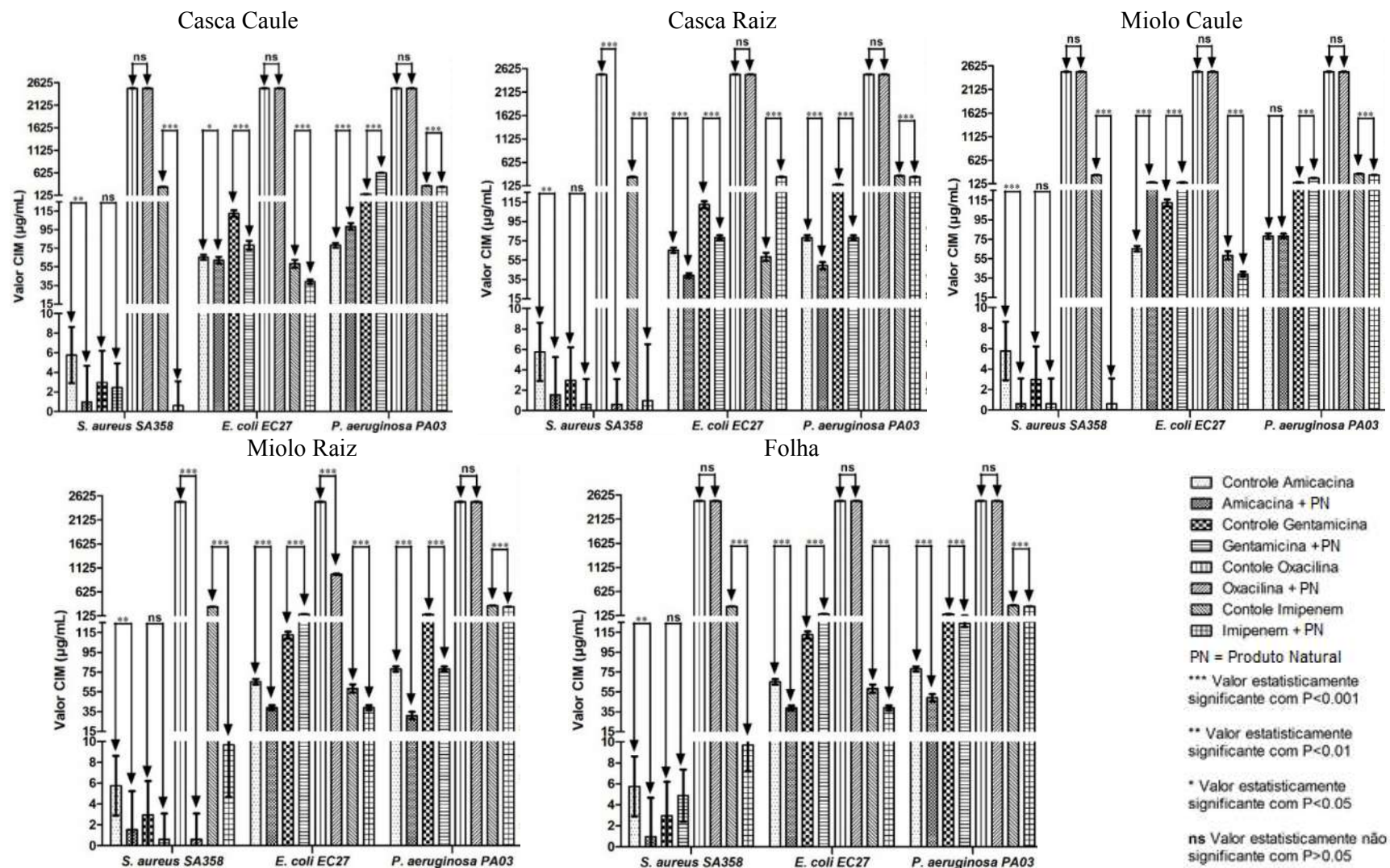


Figura 58: Modulação dos óleos essenciais da Espécime A.

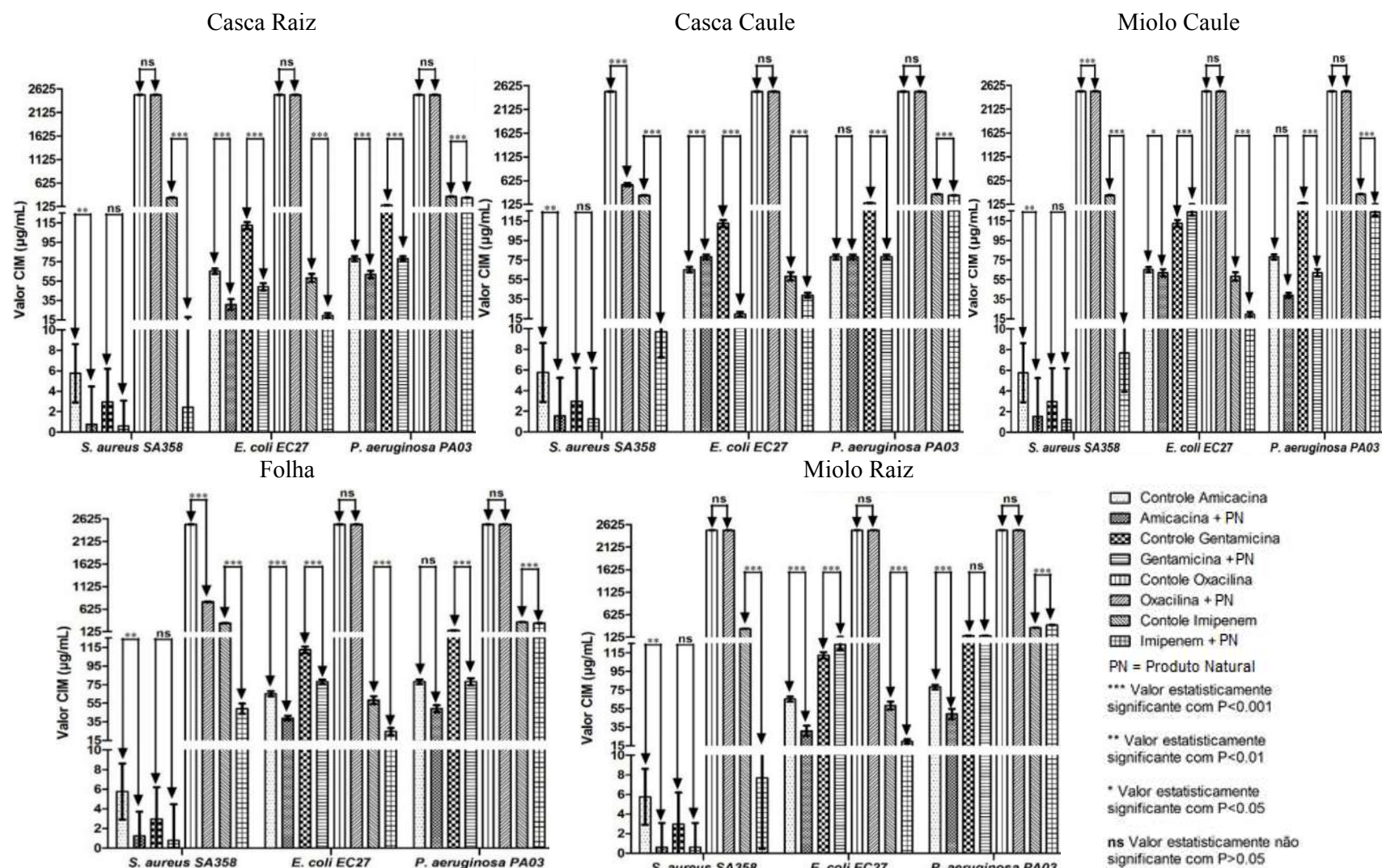


Figura 59: Modulação dos óleos essenciais da Espécie B.

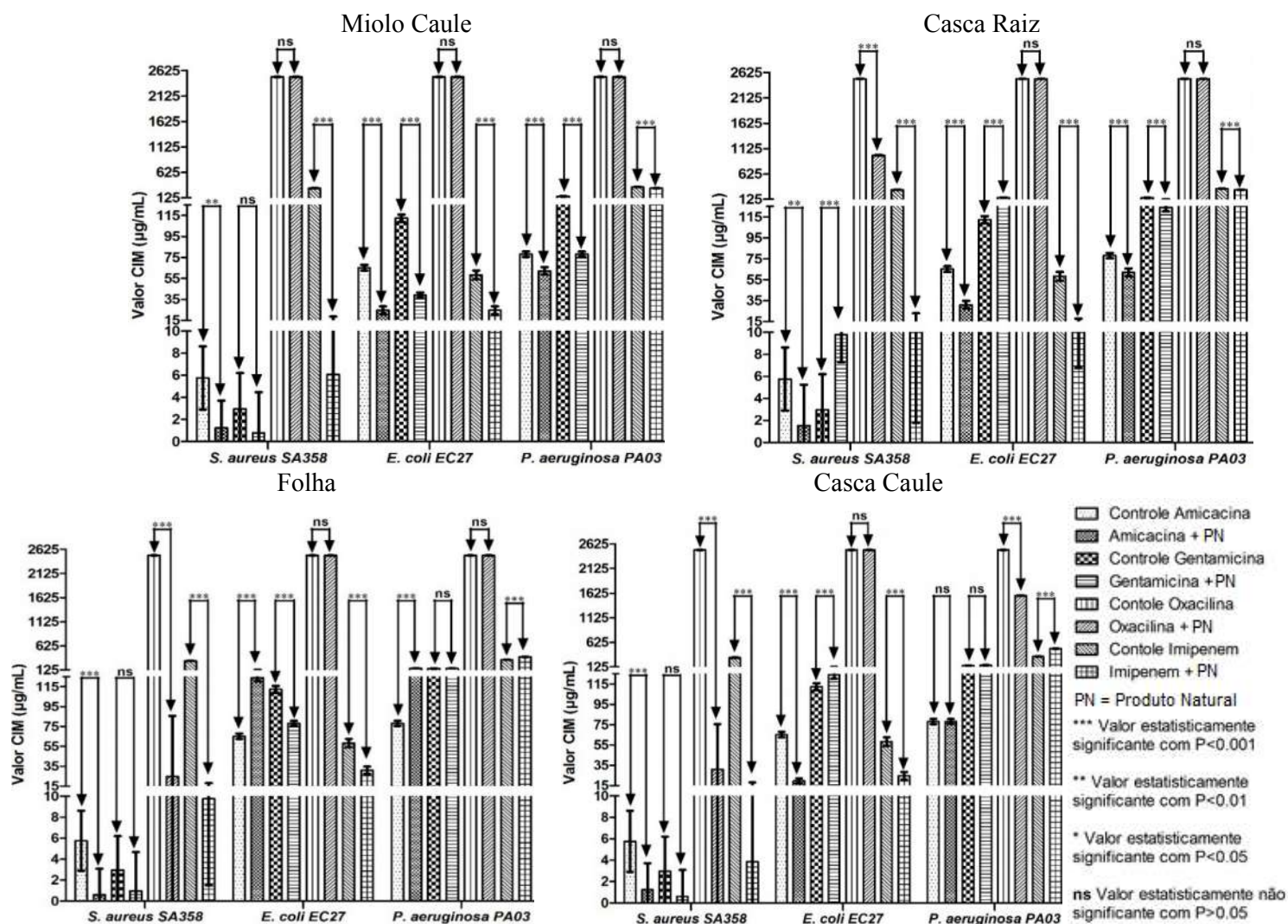


Figura 60: Modulação dos óleos essenciais da Espécime C.

Capítulo 2

Planejamento de fármaco auxiliado por computador

A competição no desenvolvimento de novos fármacos estimula constantes pesquisas visando aprimorar o conhecimento do ligante e sítio ativo, triagem em bancos de dados disponíveis e ensaios experimentais. Efeitos tóxicos e características farmacocinéticas inadequadas são os principais problemas em um novo fármaco. A fim de se atingir um perfil farmacocinético ideal (absorção, distribuição, metabolismo e excreção (ADME)) há necessidade de novas estratégias racionais. As probabilidades de sucesso nesta pesquisa, associando afinidade e seletividade pelo sítio ativo, foram aumentadas com a inclusão das metodologias de planejamento de fármacos auxiliado por computador (*Computer Aided Drug Design - CADD*) e química combinatória. A síntese de compostos da série planejada, medidas experimentais de parâmetros, como lipofilicidade, e avaliações biológicas, seguidos por análise quantitativa da relação estrutura-atividade (QSAR); fornecem informações úteis sobre características físico-químicas e melhor perfil farmacocinético. Entretanto, embora estes estudos sejam de fundamental importância, requerem tempo/gastos significativos. A química computacional correlaciona estruturas moleculares com propriedades físico-químicas, economizando tempo e dinheiro (GHOSE, VISWANADHAN & WENDOLOSKI, 1999; CRUCIANI, PASTOR & MANNHOLD, 2002; OPREA, ZAMORA & UNGELL, 2002; GARRIDO et al., 2005).

O planejamento de fármaco auxiliado por computador oferece recursos computacionais que armazenam, gerenciam, analisam e fazem a modelagem de compostos, facilitando a construção e a descoberta de novos fármacos; otimizando as pesquisas, que vem sendo caracterizada pela necessidade de analisar grande número de substâncias (SANT'ANNA, 2002; BARREIRO, 2002).

A busca por compostos ativos, envolvendo a utilização de técnicas de planejamento de fármacos auxiliado por computador, *docking* e QSAR (Relações Quantitativas Estrutura-Atividade), tem sido relatado na literatura. O *docking*, ou acoplamento molecular, é uma das

principais ferramentas para o desenvolvimento de fármacos auxiliado por computador. No estudo de *docking*, um conjunto de compostos são submetidos a um *screening* virtual, acoplando os compostos à proteínas que têm sua estrutura tridimensional conhecida; classificando os candidatos e propondo hipóteses estruturais de como o ligante inibe o alvo, o que é primordial na otimização da ligação (MORRIS & LIM-WILBY, 2008). As relações quantitativas estrutura-atividade, utilizam modelos matemáticos que relacionam a estrutura química e a atividade farmacológica de forma quantitativa para uma série de compostos, incluindo várias técnicas de regressão e reconhecimento de padrões (SANT'ANNA, 2002). Os estudos envolvendo essas ferramentas computacionais avaliam atividades imunomoduladores, anti-inflamatória (MAURYA et al., 2012), inibição da enzima HIV-1 protease (SOUSA et al., 2014), antitumoral (ANDRADE et al., 2013), dentre outras.

O conhecimento sobre a estrutura tridimensional de enzimas e a utilização de técnicas teóricas também vem auxiliando na busca de compostos ativos para o tratamento do câncer e de doenças negligenciadas, como por exemplo, a doença de Chagas.

A doença de Chagas ainda não apresenta nenhum fármaco eficaz para tratamento da sua fase crônica (DIAS & DESSOY, 2009), e segundo a Fundação Oswaldo Cruz, um estudo recente revelou que menos de 5% do financiamento mundial de inovação para doença negligenciada, foi investido em doenças extremamente negligenciadas, dentre estas a doença de Chagas (VALVERDE, 2014).

Na busca de compostos ativos, os produtos naturais são considerados fontes promissoras para novos vários fármacos, inclusive anticâncer (COSTA-LOTUFO et al., 2010), e tripanocida (GUIMARÃES & FARIA, 2007). Setzer & Setzer (2003), descrevem os terpenoides como potenciais agentes antineoplásicos, podendo destacar os diterpenos e triterpenos, que apresentam atividade antitumoral frente a células leucêmicas, câncer de pâncreas, câncer de próstata, câncer de colón, câncer de mama, dentre outras (MOREIRA, 2013; DEEB et al., 2014; PITA et al., 2012; SUNG et al., 2014).

Os diterpenos são tidos como marcadores quimiotaxonômicos do gênero *Xylopia* (Annonaceae), e a família Celastraceae uma fonte de triterpenos pentacíclicos. Diante desses dados podemos considerar as espécies, *Xylopia langsdorffiana* (Annonaceae) e *Maytenus distichophylla* (Celastraceae), importantes na investigação de compostos com potente atividade antitumoral e tripanomicida (VILEGAS et al., 1991; SILVA, 2014).

Dentro deste contexto, este trabalho tem por objetivo analisar a energia de formação de diterpenos e triterpenos, acoplados as enzimas ciclooxigenase, citocromo P450 e cruzaína, através de estudos de *docking*; além de avaliar a potencial atividade anticancerígena de

diterpenos e triterpenos utilizando modelos construídos a partir de dados da literatura, pelo método dos mínimos quadrados parciais.

2.1 ESTUDOS DE CADD (*COMPUTER-AIDED DRUG DESIGN*)

2.1.1 Modelagem molecular

Modelo é uma simplificada descrição de um sistema ou processo, que frequentemente é representado em termos matemáticos, facilitando cálculos e predições (LEACH, 2001).

A modelagem molecular é uma ferramenta do planejamento racional para a descoberta de novos fármacos, que envolve a compreensão da interação molecular dos pontos de vista qualitativo e quantitativo. Permite que se analisem, não só a estrutura molecular compreendida em determinado sistema, como também fornece meios para se prever a potencialidade de moléculas candidatas a serem compostos bioativos. De forma simples, pode ser considerada como conjunto de técnicas computadorizadas baseadas nos métodos de química teórica e dados experimentais, compreendendo a construção e manipulação de modelos químicos ou biológicos, que, submetidos a cálculos envolvendo parâmetros físico-químicos, fornecem informações úteis para o estudo da natureza estérica, eletrônica e lipofílica da provável interação do fármaco ou de substâncias propostas como ligante com o receptor (abordagem direta). Também pode estabelecer as relações entre estrutura química e atividade biológica de série de novos compostos (abordagem indireta). Ambos os modos de abordagem podem auxiliar na compreensão do mecanismo de ação responsável pelo efeito biológico (COHEN, 1996).

Por meio desta técnica, pode-se selecionar um bom ligante, ou seja, o mais favorável ao sítio de ação e a conformação mais apropriada; descobrir qual molécula se adapta melhor ao objetivo estabelecido e, também, analisar sínteses orgânicas e caminhos de reações e produtos teóricos (COHEN, 1996; LEACH, 2001).

Técnicas computacionais ampliaram os modelos moleculares, possibilitando cálculos com o uso de computadores e dando maior conhecimento do sistema molecular em questão. A modelagem molecular é a representação e manipulação de estruturas moleculares em três dimensões (3D) e as propriedades moleculares dependentes destas estruturas (COHEN, 1996; LEACH, 2001).

O estudo de modelagem molecular pode ser realizado por meio de cálculos de parâmetros selecionados para determinada molécula, fornecendo informações sobre suas propriedades. As propriedades da molécula podem ser macroscópicas, como o ponto de fusão de um material, e microscópicas, como a massa molecular. Também são classificadas como:

físicas (termodinâmicas, estado físico e outras), químicas (reatividade, solubilidade, dentre outras) ou biológicas (como inibição enzimática, antagonismo, metabolismo). Essas propriedades moleculares, sejam elas macroscópicas ou microscópicas, podem ser computadas a partir de estruturas moleculares, de conformações individuais de moléculas, ou, ainda, ser estimadas (COHEN, 1996).

Algumas propriedades como: entalpia, energia de ativação, momento de dipolo, características de orbitais moleculares, eletrônicas, atômicas, de ligações, polarizabilidade, caráter hidrofóbico, coeficiente de partição (logP), refratividade molar (MR), dentre outras, podem ser originadas por meio de cálculos computacionais que incluem mecânica molecular, métodos semi-empíricos, cálculos *ab initio* e outros métodos empíricos (HARIHARAN & POPLE, 1973; COHEN, 1996).

Existem diversas conformações possíveis de cada molécula (ligante) se ligar ao seu receptor (macromolécula). Através de estudos de *docking* a energia de interação do complexo formado pela proteína-ligante para cada conformação investigada é calculada, também é possível observar os tipos de interações formadas (eletrostáticas, estéricas, ligações de hidrogênio, dentre outras) e os átomos envolvidos (THOMSEN & CHRISTENSEN, 2006).

Com esta técnica é possível sugerir qual o melhor ligante, melhor sítio de ligação, conformação mais favorável ao ligante, e diferenciar entre uma família de ligantes ou inibidores, qual o mais promissor para atuar como um fármaco (THOMSEN & CHRISTENSEN, 2006).

2.1.2 Relação quantitativa entre estrutura química e atividade biológica (QSAR)

A relação quantitativa estrutura-atividade (QSAR) procura correlacionar estrutura química e propriedades/descriptores moleculares com atividade biológica. Parâmetros físico-químicos incluem medidas relativas à hidrofobicidade, topologia, propriedades eletrônicas, efeitos estéricos e são determinados por métodos computacionais.

Os avanços dos estudos de QSAR ocorreram após o trabalho de Louis Hammett (1924-1987) (HAMMETT, 1970), que correlacionou propriedades eletrônicas de ácidos e bases orgânicas com constantes de equilíbrio químico e reatividade. Hammett observou que adicionando grupos substituintes em diferentes posições no anel aromático do ácido e/ou da base orgânica, alterava-se sua constante de dissociação. O ácido carboxílico considerado foi o ácido benzoico substituído nas posições meta e para.

A técnica dos estudos de QSAR foi desenvolvida de modo que englobasse os parâmetros

eletrônicos de Hammett, concentrações molares relativas à atividade do composto (IC50, DL50, entre outros) e medidas relacionadas ao volume e área molecular (polarizabilidade, efeitos estéricos, refratividade molar, hidrofobicidade).

2.1.3 Análise de componentes principais (*Principal Component Analysis - PCA*)

A Análise dos Componentes Principais (PCA) é largamente usada no entendimento da distribuição de objetos, de como e quantos são significativos para construção do modelo. A melhor maneira de extrair informações de um PCA é organizar graficamente os resultados das matrizes obtidas em 2D e 3D. Os resultados representam a posição relativa no espaço bi- ou tridimensional das Componentes Principais (PC) e assim *outliers* são facilmente identificados (CRUCIANI et al., 2000a; CRUCIANI et al., 2000b).

A primeira PC fornece grande quantidade de informações sobre a variância, e neste contexto, ela pode ser entendida como a síntese dos distintos fragmentos dos objetos agrupados. São obtidas por meio da combinação linear das variáveis originais. A interpretação do peso de uma simples variável indica quantas variáveis participam na definição da PC, sendo que o quadrado indica a respectiva porcentagem. Variáveis que contribuem pouco são de pequenos valores e se localizam mais centralmente na representação gráfica e as de maior contribuição são periféricas.

A PCA reduz a informação da matriz principal, decompondo em duas matrizes menores chamadas *loading* e *score*. A matriz *loading* (P) contém informações sobre as variáveis e é composta de vetores (Componentes Principais, PCs) as quais são obtidos das variáveis originais, e a matriz *score* (T) contém informações sobre os objetos. Cada objeto é descrito em termos das projeções a partir das PC em lugar das variáveis originais (CRUCIANI et al., 2000a; CRUCIANI et al., 2000b).

A informação contida nestas matrizes não explica a variância contida na matriz residual (E), a qual possui a mesma dimensão da matriz original (X) (Equação 1).

$$\textbf{Equação 1: } X = TP' + E$$

As PC possuem duas propriedades interessantes: extraem a informação em ordem decrescente de importância e são ortogonais entre si, não havendo correlação entre as informações contidas em diferentes PC.

Na PCA, dependendo do número de PC extraídos limita a dimensionalidade do modelo. Cada nova PC traz maior quantidade de informações extraídas, explicando melhor a variância traduzida pelo modelo. Geralmente as PC explicam mais de 90% da variância total. Não há um

critério único para se decidir quantas PC devam ser extraídos. Teoricamente é possível usar validação cruzada. Do ponto de vista prático, um número amplo de PC extraídas não ajuda na melhor interpretação dos resultados (CRUCIANI et al., 2000a; CRUCIANI et al., 2000b).

A análise de componente principal (PCA), é utilizada para dados com muitas variáveis, resumindo as informações contidas em grandes quantidades, e com aplicação em diversos campos da ciência (WOLD, 1987). O método é aplicado em diferentes estudos, incluindo metabolômica (NASCIMENTO et al., 2011), taxonomia (SOARES, 2006), estudo de solo (GUEDES et al., 2006), estudo morfológico de plantas (ROCHA, RODELLA & MARTINS, 2007), e análise química de óleos essenciais (SILVA et al., 2007; TININIS et al., 2006).

2.1.4 Método dos mínimos quadrados parciais (*Partial Least Squares* -PLS)

É uma análise de regressão com o objetivo de explicar uma ou mais variáveis dependentes (Y's) em relação aos de números preditos (X) (Equação 2).

$$\textbf{Equação 2: } Y = f(X) + E$$

É possível construir diferentes modelos representados por equações. Vários métodos procuram refinar os resultados originando modelos contendo mais ou menos variáveis Y. O melhor seria um método capaz de calcular valores confiáveis de Y experimentais, inclusive para moléculas não incluídas no estudo, gerando modelos preditivos.

As variáveis Y contêm erros, mas os modelos são gerados na tentativa de evitar 'ruídos' e *overfitting* (presença no modelo de variáveis que estão explicando a mesma parte da variação). Este último origina modelos aparentemente muito bons, mas pouco preditivos.

A capacidade preditiva de um modelo é atribuída à existência de uma relação verdadeira medida entre valores de X (propriedades resultantes de energias de interações) e propriedades Y medidas (geralmente a atividade biológica da molécula).

Os modelos gerados por 3D-QSAR identificam a parte estrutural responsável pela atividade, mas vale dizer que 'nenhum modelo de regressão é melhor do que a série que o originou', no sentido de que não fornece a quantidade de informações contida na série em estudo. O novo e sofisticado método PLS 3D-QSAR apresenta os mesmos limites.

Frequentemente, em estudos de 3D-QSAR a matriz X contém menos objetos (moléculas) do que variáveis e nestas situações o método estatístico clássico da Múltipla Regressão Linear (MLR) não é usado. A MLR foi desenvolvida para situações em que o número de objetos (N) é três vezes maior que o número de variáveis (K), e há uma alta probabilidade

de se obter relações corretas (CRUCIANI et al., 2000a; CRUCIANI et al., 2000b).

No programa Pentacle as variáveis são altamente correlacionadas, porque as propriedades medidas são obtidas por meio do mesmo campo de força (GAUDIO et al., 2001).

O único método de análise de regressão que usa um similar da matriz X do 3D-QSAR é o *Partial Least Squares* (PLS), decompondo a matriz X em matrizes menores, muito parecido com PCA.

Nesses métodos, matriz *loading* (P) contém informações sobre as variáveis, poucos vetores (*Latent Variables, LV*) os quais são combinações lineares das variáveis-X originais. A matriz *score* contém informações sobre os objetos e cada uma é descrita em termos dos LVs.

A principal diferença do PCA é que as PCs são obtidas representando a melhor estrutura da matriz X e o PLS é obtido a partir dos LV:

- ✓ Representando a estrutura das matrizes X e Y.
- ✓ Maximizando o ajuste entre X's e Y's.

Os LVs apresentam propriedades importantes das PC, são também extraídos em ordem decrescente de importância, o primeiro LV sempre contém maiores informações que o segundo e assim sucessivamente, com cada LV ortogonal em relação ao outro. Não havendo correlação entre as informações contidas nos LV.

Como no PCA, o pesquisador seleciona o número de LV contidos no modelo, mas no PLS, a dimensionalidade é muito importante. Se houver vários LV no modelo, pode-se obter um resultado com pouca ou nenhuma validade. Para verificar quantos LV deve-se incluir é necessário testar a capacidade preditiva do modelo e assim avaliar sua qualidade.

O teste de avaliação da capacidade preditiva do modelo geralmente é a validação cruzada (*cross-validation* (CV)), que forma modelos com objetos reduzidos e os utiliza para prever as variáveis Y. Assim o Y predito é comparado ao observado e a dimensionalidade dos seguintes índices são computados:

- ✓ Desvio padrão do erro de predição (*Standard Deviation of Errors of Prediction -SDEP*) (Equação 3) (CRUCIANI et al., 2000a; CRUCIANI et al., 2000b).

$$\text{Equação 3: } SDEP = \sqrt{\frac{\sum (Y - Y')^2}{N}}$$

- ✓ Coeficiente de correlação preditivo (Equação 4) (CRUCIANI et al., 2000a; CRUCIANI et al., 2000b).

$$\text{Equação 4: } Q^2 = 1 - \frac{\sum (Y - Y')^2}{\sum (Y - \bar{Y})^2}$$

Onde:

Y = valor experimental;

Y' = valor predito;

$\bar{Y}$ = valor médio;

N = número de objetos.

A validação cruzada é uma técnica de predição interna, que permite a estimativa da capacidade preditiva do modelo sem a participação de valores externos. Isto é particularmente importante em estudos de QSAR, em que o número de objetos é usualmente pequeno e nem sempre é possível remove-los do estudo. Uma das desvantagens desse método é que não existem técnicas concordantes para se decidir quantos objetos participam do modelo. É claro que cada objeto poderá ser removido uma, e somente uma vez, na construção do modelo e para isto ser feito, tem-se (CRUCIANI *et al.*, 2000a; CRUCIANI *et al.*, 2000b):

- ✓ *Leave one out* (LOO) - modelos são construídos com a exclusão de um objeto de cada vez.
- ✓ *Leave two out* (LTO) - modelos são construídos removendo-se dois objetos de cada vez.
- ✓ *Fixed groups* - subdivide-se os objetos em N grupos, cada um contendo aproximadamente o mesmo número de objetos e os modelos são calculados a partir destes grupos.
- ✓ *Random groups* - os objetos são determinados por um caminho randômico em N grupos, cada um contendo aproximadamente o mesmo número de objetos e os modelos são calculados a partir destes grupos. A formação dos grupos é repetida várias vezes.

A escolha do método de validação cruzada apropriado depende do estudo de QSAR envolvido, assim LOO e/ou LTO não possuem capacidade de remover algumas informações sobre estruturas do modelo, sendo que informações dos objetos removidos continuam incluídas no modelo. A análise feita por meio de *Random Groups* fornece modelos mais preditivos, mas depende do número de grupos envolvidos. Quanto menor o número de objetos, mais difícil a escolha do critério de validação. Com o intuito de estimar a dispersão dos valores entre os diferentes métodos o SDEP é calculado (CRUCIANI *et al.*, 2000a; CRUCIANI *et al.*, 2000b).

Outro tipo de análise da capacidade de predição do modelo é por meio da predição externa. Neste método, os componentes em estudo são divididos em dois grupos no início do estudo: o primeiro denominado grupo de trabalho ou treinamento é utilizado para construção do modelo PLS; o outro, denominado grupo de teste, é usado para comparar os respectivos

valores experimentais de Y com aqueles obtidos por predição do modelo gerado anteriormente pelo PLS.

Vale ressaltar que a predição depende do número de objetos envolvidos na análise e frequentemente os estudos de QSAR contêm tão poucos objetos que ao serem removidos ocorre perda de informação. Desta forma, o melhor modo de se examinar os dados obtidos pelo PLS é graficamente, permitindo o perfeito entendimento dos resultados obtidos organizados no espaço (CRUCIANI *et al.*, 2000a; CRUCIANI *et al.*, 2000b).

2D T - U scores plot

Esta organização dos resultados no espaço expressa os resultados X obtidos *versus* Y, permitindo que o pesquisador tenha uma ideia da correlação entre os valores X e Y obtida para cada LV e de eventuais *outliers* (CRUCIANI *et al.*, 2000a; CRUCIANI *et al.*, 2000b).

2D E 3D loading plots

Os *plots* representam as variáveis no espaço bi- e tridimensional das *Latent Variables* (P). O *loading* de uma variável indica quanto esta está incluída no cálculo da LV. Assim variáveis que participam pouco, aparecem na região central do *plot* e as que influenciam muito estão na borda (CRUCIANI *et al.*, 2000a; CRUCIANI *et al.*, 2000b).

Aos *loading plots* segue o teste de ‘homogeneidade’ das contribuições das variáveis X no modelo. Quando mais de um campo de força pode agir sobre a variável, destaca-se cada uma em cada campo de força e, assim, é possível entender como cada um deles atua sobre a variável (CRUCIANI *et al.*, 2000a; CRUCIANI *et al.*, 2000b).

2D e 3D weight plots

Os pesos (*weight (W)*) representam a multiplicidade do coeficiente de X quando ocorre o melhor ajuste com Y'. Pode-se entender o *loading* como o primeiro melhor obstáculo criado, na matriz X, para construção do modelo PLS enquanto que *weight* representa o segundo melhor obstáculo originado no ajuste com Y' (CRUCIANI *et al.*, 2000a; CRUCIANI *et al.*, 2000b).

2.1.4.1 Seleção de variáveis

Muitos modelos obtidos em estudos de 3D-QSAR contêm um grande número de variáveis que participam da análise, porém várias delas não apresentam boa relação com a atividade e apenas introduzem ‘ruído’ ao modelo. Pode ocorrer da matriz X conter uma variável

que explica bem os valores Y, porém esta se encontra imersa entre muitas outras que provocam ‘ruído’ (GAUDIO *et al.*, 2001).

O método FFD foi desenvolvido com o objetivo de distinguir a informação significativa para construção do modelo e eliminar eventuais ‘ruídos’. Em outras palavras, a metodologia FFD para selecionar variáveis é empregada com o intuito de se obter modelos PLS mais preditivos (BOX, HUNTER & HUNTER, 2005).

O método FFD envolve os seguintes passos:

- ✓ Obtenção de um modelo PLS inicial;
- ✓ Construção da matriz e avaliação da importância de cada variável na capacidade preditiva do modelo, utilizando validação cruzada (CV);
- ✓ Remoção das variáveis não significativas que estejam na matriz X, obtendo um novo modelo PLS. Deve haver o cuidado de não remover muitas variáveis, podendo ocorrer *overfitting*, quebra da estrutura da matriz e do formalismo do método PLS.

2.1.5 *Molecular Interaction Fields (MIFs)*

O programa de CADD denominado VolSurf interpreta a estrutura molecular 3D e gera mapas de interação (*Molecular Interaction Fields* - MIFs) com determinado *probe* que serão posteriormente interpretados, em procedimento computacional automatizado e rápido. Assim, parâmetros são investigados e ressaltados, otimizando a pesquisa (CRUCIANI *et al.*, 2000a; CRUCIANI *et al.*, 2000b).

O VolSurf é capaz de gerar MIFs, representando parâmetros físico-químicos, calculados rapidamente e relacionados com a geometria estrutural molecular (CIANCHETTA *et al.*, 2004). A interação de uma molécula com a membrana biológica envolve diversas propriedades de superfícies como ligações de hidrogênio, forças de van der Waals, eletrostáticas e hidrofóbicas. O campo de força GRID, calcula, em tempo rápido, sítio de interações energeticamente favoráveis. O GRID calcula energias de interação de grupos químicos (‘probe’) e uma molécula em estudo, podendo ser desde macromoléculas, como proteínas, até moléculas pequenas, como a histamina. Neste cálculo são consideradas forças eletrostáticas, ligações de hidrogênio e outras interações (CRUCIANI *et al.*, 2000a; CRUCIANI *et al.*, 2000b).

2.1.6 Lipofilicidade

A lipofilicidade é um dos parâmetros físico-químicos investigados e extremamente importante na pesquisa por novos candidatos a fármaco. O logP é o coeficiente de partição obtido experimentalmente; sendo que o sistema de solventes mais utilizado para sua obtenção é octanol-água. O emprego de octanol deve-se ao fato de sua semelhança com os fosfolipídios de membrana. O coeficiente de partição ou Log P expressam a lipofilicidade relativa, sendo seus valores normalmente correlacionados com atividade biológica.

O ClogP é o coeficiente de partição calculado por softwares que utilizam os fragmentos de banco de dados (annlogP, atomic6) ou por fragmentos de Rekker. Em vários estudos de CADD o CLogP é calculado baseado no método teórico desenvolvido por Ghose-Pritchett-Crippen e é considerado no planejamento racional de fármacos (GHOSE et al., 1988; CRUCIANI et al., 2002; OPREA et al., 2002; GARRIDO et al., 2005).

O ClogP é frequentemente associado as regras de Lipinski (*Lipinski's rule of five*) que estabeleceram limites de parâmetros necessários a um potencial fármaco: o composto não deve ter mais de 5 substituintes doadores de ligação de hidrogênio, também não mais que mais de 10 aceptores de ligação de hidrogênio, massa molecular menor que 500 ua e Log P maior que 5 (CONGREVE et al, 2003). O limite para o log P nos lembra que é necessário um perfil hidrofílico e lipofílico até um composto atingir o seu receptor e provocar um efeito biológico.

2.2 CÂNCER

O câncer é umas das doenças mais temidas pela sociedade, frequentemente associada a dor e morte. O termo de origem latina (*cancer*) tem como significado “caranguejo”, atualmente referindo-se especificamente aos tumores malignos é definido cientificamente pelo termo neoplasia (ALMEIDA et al., 2005).

Behzad et al. (2014) relata que, segundo a organização mundial de saúde (*World Health Organization* - WHO), cerca de 84 milhões de pessoas morrerão de câncer entre 2005 e 2015. Superada apenas por doenças cardiovasculares, o câncer é a segunda maior causa de morte por doença no Brasil (GARÓFOLO et al., 2004).

A ocorrência de neoplasias malignas na população reflete cada vez mais a necessidade de descoberta de fármacos anticâncer eficazes. Os produtos naturais vêm se mostrando como promissora fonte anticancerígena. Nativa de Madagascar, *Catharanthus roseus* é um dos exemplos mais importantes da utilização de espécies vegetais na descoberta de substâncias

bioativas contra tumores malignos. Os alcaloides isolados desta espécie, vimblastina e vincristina, atualmente são de grande utilidade no tratamento de linfoma de Hodgkin, sarcoma de Kaposi, câncer de ovário e testículos e leucemia linfoblástica aguda infantil (BRANDÃO et al., 2010).

Setzer & Setzer (2003), analisaram publicações de 1988 a 2003, e verificaram um aumento exponencial do interesse por triterpenos com efeito antineoplásicos. Em sua revisão sobre triterpenos (origem vegetal) citotóxicos ou antineoplásicos, eles examinaram as características estruturais e mecanismo proposto da ação das seguintes classes: cicloartano, lupano, ursano, eleanano, friedelano, damarano, cucurbitacina e limonoides. De acordo com os dados apresentados por Setzer & Setzer (2003), 73% dos triterpenos levantados em seu trabalho apresentam citotoxicidade (IC_{50}) que variam entre 0,004 a 10 μ M.

A Família Celastraceae vem mostrando-se como uma fonte promissora de triterpenos pentacíclicos com potencial atividade biológica anticancerígena (SILVA et al., 2014). Estudos relatam compostos triterpênicos isolados de espécies da família Celastraceae com alto efeito citotóxico sobre algumas linhagens celulares; MOLT-3 (leucemia linfoblástica aguda T), SW620 (carcinoma de cólon humano), HepG2 (hepatocarcinoma), KATO-III (carcinoma gástrico), MDA-MB-231 (câncer de mama), HT-29 (adenocarcinoma de cólon humano), HCT-116 (câncer colorretal), SW-480 (adenocarcinoma de cólon humano), P-388 (leucemia linfócita), A-549 (carcinoma de pulmão humano), HT-29 (carcinoma de cólon humano), MEL-28 (melanoma humano), e Hela (carcinoma cervical humano) (CHOI et al., 2014; KAWETRIPOB et al., 2012; SOMWONG et al., 2011; YEH et al., 2009; ALVARENGA & FERRO, 2006; RUPHIN et al., 2013; MOMTAZ et al., 2013; NOZAKI et al., 1990).

Além de triterpenos pentacíclicos, o gênero *Maytenus* (Celastraceae) também apresenta outras classes de compostos com atividade antitumoral ou quimiopreventivo, como; sesquiterpenos (PERESTELO et al., 2010), flavonoides (OKOYE et al., 2014), ciclopeptídeo (ZHANG, 2014), triterpeno quinonamatídico (MAGALHAES et al., 2013; MU et al., 2012; ALMEIDA et al., 2010), diterpenos (NUNEZ et al., 2011), alcaloide sesquiterpênico (LHINHATRAKOOL et al., 2011) além das classes citadas, extratos de espécies do gênero também apresentam tal atividade (ARAUJO et al., 2013).

Outra classe de terpenos que apresenta potencial atividade antitumoral frente a diversas linhagens celulares são os diterpenos. Dados da literatura descrevem compostos diterpênicos que se destacam neste tipo de atividade (XU et al., 2014; LIU et al., 2014; AL-LIHAIBI et al., 2014; GUO et al., 2014; YIN et al., 2013).

Moreira (2013) retrata 862 estudos *in vitro* com diterpenos frente a 27 diferentes

linhagens de células leucêmicas, dos quais 84,7% mostraram alguma atividade frente às células estudadas.

Segundo Vilegas et al. (1991), o gênero *Xylopi* (Annonaceae) tem como característica substâncias com esqueleto diterpênico. Estudos relatam diterpenos isolados deste gênero com atividade antitumoral frente a diferentes linhagens como; HL60 (leucemia promielocítica humana), U937 (linfoma histiocítico), K562 (leucemia eritromieloblastoide), HepG2 (hepatocarcinoma) e Hep3B (hepatocarcinoma) (CASTELO-BRANCO et al., 2009; TAVARES et al., 2006; CHANG, et al., 2006).

Um estudo realizado por Ashok et al. (2011) mediu a associação entre os inibidores seletivos de COX-2 com o risco de câncer de mama. Os resultados mostraram que a utilização de potentes inibidores de COX-2, reduziu o risco de câncer de mama em 46%.

Outros trabalhos também relacionam a inibição de COX com a redução dos riscos de câncer colorretal e pólipos adenomatosos colorretais (MAZHAR, GILLMORE & WAXMAN, 2005).

Ojeda et al. (2013), após o tratamento de um carcinoma nasal associando cisplatina e piroxicam (inibidor seletivo de COX-2), verificou que houve uma redução significativa da massa tumoral, e concluiu que a diminuição da expressão de COX-2 após a quimioterapia pode ser considerada como uma indicação para uma boa resposta ao tratamento e evolução favorável.

Dados da literatura relatam a atividade inibitória de alguns triterpenos sobre COX-2, como: celastrol (DING et al., 2013), ácido tormêntico (AN et al., 2011), um derivado do ácido oleanólico (SUTHAR, LEE & SHARMA, 2014), ácido ursólico e ácido oleanólico (HUSS et al., 2002; RINGBOM et al., 1998), lanostano (YOSHIKAWA et al., 2005), triterpenos dammarano (HOMHUAL et al., 2006), kalopanaxsaponina A (JEONG et al., 2013). Também há relatos de diterpenos que inibem COX-2: diterpeno do tipo briarano (BAHL et al., 2014; JOYNER et al., 2011), ácido caurenólico, ácido traquilobânico (DÍAZ-VICIEDO et al., 2008; CHOI et al., 2011), 11,12-dihidroxi-6-oxo-8,11,13-abietatrieno (HERAS et al., 2001), derivados de estemodina (RUSSELL et al., 2011), diterpeno do tipo cebranoide (YAN, FENG & GUO, 2008), caveol (KIM, KIM & JEONG, 2006), e diterpenos do tipo lábdano (HEGAZY et al., 2008b).

Proteínas do citocromo P450, são assim nomeadas devido a banda de absorção no UV em 450 nm. Também chamadas de CYP, constituem umas das maiores superfamílias de proteínas enzimáticas. As CYPs têm um papel importante na ativação e inativação de fármacos pré-carcinogênicos e carcinogênicos (ANTONA & SUNDBERG, 2006; VERMES, GUCHELAAR & KOOPMANST, 1997).

McFadyen et al. (1999) verificou que 77% dos cânceres de mama continham CYP1B1 localizada em células tumorais, corroborando com estudos anteriores que retratam o CYP1B1, como a principal forma de citocromo P450 presentes com frequência elevada em diferentes tipos de cânceres, incluindo câncer de mama, não sendo detectado em células normais (MURRAY et al., 1997).

A família CYP2C é composta por quatro membros, dentre eles o CYP2C9. As enzimas CYP2C9 são expressas principalmente no fígado e estão relacionadas ao metabolismo de 20% dos medicamentos utilizados e que apresentam grande importância no uso clínico (SCHAIK, 2005).

Alguns produtos naturais têm mostrado ser potentes inibidores de CYP2C9, como flavonoides (SI et al., 2009). Kim et al. (2004), evidenciam o efeito inibitório dos triterpenos, ácido ursólico e oleanólico, sobre CYPs, e relacionam parte do efeito inibitório com as atividades anti-inflamatória e anticâncer apresentadas pelos compostos.

2.3 DOENÇA DE CHAGAS

Segundo dados da Organização Mundial de Saúde – OMS, a doença de Chagas, nomeada pelo médico brasileiro Carlos Ribeiro Justiniano Chagas, é transmitida pelo *Trypanosoma cruzi* e encontrada em áreas endêmicas de 21 países na América Latina, dentre eles o Brasil, afetando milhões de pessoas.

A doença de Chagas é dividida em fase aguda e fase crônica. Para combater a doença são utilizados dois fármacos, Nifurtimox (Lampit[®], Bayer) e Benzonidazol (Rochagan[®], Roche), que apresentam pouco ou nenhuma atividade na fase crônica da doença, com efeito benéfico somente na fase aguda (WHO, 2014). Caçado (2002) investigou a taxa de cura de pacientes, na fase aguda e crônica da doença, tratados com Benzonidazol, e verificou que a cura foi constatada em 76% dos pacientes na fase aguda, e apenas em 8% dos pacientes na fase crônica.

A transmissão ocorre principalmente pelo vetor (80-90%), transfusão de sangue (5-20%) e vias congênitas (0,5-8%). A incidência de transmissão da mãe para o filho é estimada em pelo menos 15 mil casos na América Latina. Estudos têm sido realizados no intuito de desenvolver estratégias para o controle da infecção congênita pelo *T. cruzi*, com validação pela OMS e aplicação em vários países latino-americanos (CARLIER, 2007).

A Cruzaína ou cruzipaina é um cisteíno protease essencial para a replicação intracelular do *T. cruzi* dentro da célula hospedeira, tornando-a alvo exploratório para o desenvolvimento

de fármacos com potencial antichagásico. Experimentos *in vitro* relatam que a adição de inibidores da cisteíno-protease impede a replicação dos parasitas, o que prevê a importância da enzima para o parasita (McKERROW, 1999; McGRATH et al., 1995)

Guimarães & Faria (2007) em seu trabalho intitulado: “Substâncias da natureza com atividade anti-*Trypanosoma cruzi*”, retratam mais de 20 terpenos com atividade tripanocida, dentre estes o ácido caurenóico, ácido xilópico, ácido traquilobânico, 17-hidroxicauranol e *ent*-12*R*-hidroxilabda-7,13-dien-15,16-olídeo. Outros estudos também relatam diterpenos, alguns isolados do gênero *Xylopi*a, com expressiva atividade sob *T. cruzi* (ARAYA et al., 2003; IZUMI et al., 2012; NASCIMENTO et al., 2004; SILVA et al., 2013), e triterpenos que apresentam atividade tripanocida sob a forma epimastigota do parasita (SANTOS et al., 2013b; LIAO et al., 2008).

Após 100 anos da descoberta da doença de Chagas nenhum fármaco seguro e eficaz foi encontrado, permanecendo a fase crônica da doença sem nenhuma alternativa de tratamento, tornando-se em um grave problema, aumentando o sofrimento dos infectados na América Latina (DIAS & DESSOY, 2009).

Diante do exposto, a proposta deste trabalho é empregar ferramentas computacionais na busca de compostos que apresentem atividade cancerígena e antichagásica, a partir de uma série de compostos terpênicos isolados de plantas da Flora Paraibana. Além de utilizar tais ferramentas para analisar os óleos essenciais extraídos de *Xylopi*a *langsdo*rrffiana, tratado no capítulo anterior.

2.4 OBJETIVOS

2.4.1 Objetivo geral

Avaliar, através de ferramentas computacionais, potenciais atividades biológicas de diterpenos isolados de *Xylopia langsdorffiana* e triterpenos isolados de espécies do gênero *Maytenus*; e realizar a Análise da Componente Principal dos óleos essenciais de *Xylopia langsdorffiana*, e a atividade microbiológica dos referidos óleos pelo método discriminante dos mínimos quadrados parciais.

2.4.2 Objetivos específicos

- Realizar estudo de *docking* com diterpenos isolados de *Xylopia langsdorffiana* e triterpenos isolados de espécies do gênero *Maytenus* da Flora Paraibana;
- Avaliar a atividade antitumoral de diterpenos e triterpenos através do método dos mínimos quadrados parciais;
- Analisar a atividade antichagásica de diterpenos e triterpenos por meio do método dos mínimos quadrados parciais;
- Determinar a lipofilicidade dos diterpenos e triterpenos com melhores valores preditos na atividade antitumoral e antichagásica;
- Realizar Análise da Componente Principal dos óleos essenciais das folhas, do miolo do caule, da casca do caule, do miolo da raiz e da casca da raiz de *Xylopia langsdorffiana*;
- Analisar a concentração inibitória mínima e a composição química dos óleos essenciais de *Xylopia langsdorffiana* através do método dos mínimos quadrados discriminante.

2.5 MATERIAIS E MÉTODOS

2.5.1 **Docking** com diterpenos

Considerando trabalhos disponíveis na literatura científica que reportam estudos de diterpenos ativos frente a avaliações com a doença de Chagas (GUIMARÃES & FARIA, 2007; ARAYA et al., 2003; ALVES et al., 1995) e com atividade antitumoral (PARK, 2013; VILLENA et al., 2013) investigamos, através de *docking*, as possíveis interações formadas entre os diterpenos isolados de *X. langsdorffiana* (Figura 61), e a cruzaina (id PDB: 3IUT), e enzimas envolvidas na ação anticancerígena: CYP2C9 (id PDB:1R9O) e ciclooxigenase (id PDB: 2WD2) (LEESE, 2010; BRAK, 2010; WESTER, 2004). Os diterpenos avaliados no estudo, foram isolados dos extratos de folhas, frutos, caule e raízes de *X. langsdorffiana* (SANTOS, 2011; SANTOS et al., 2013a; TAVARES, 2004; TAVARES, 2007a; TAVARES et al., 2007b, TAVARES et al., 2006; SILVA et al., 2008; DUARTE, 2009), pelo grupo de pesquisa do Programa de Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos, coordenado pelo Prof. Dr. Marcelo Sobral e Prof. Dr. Josean Fachine.

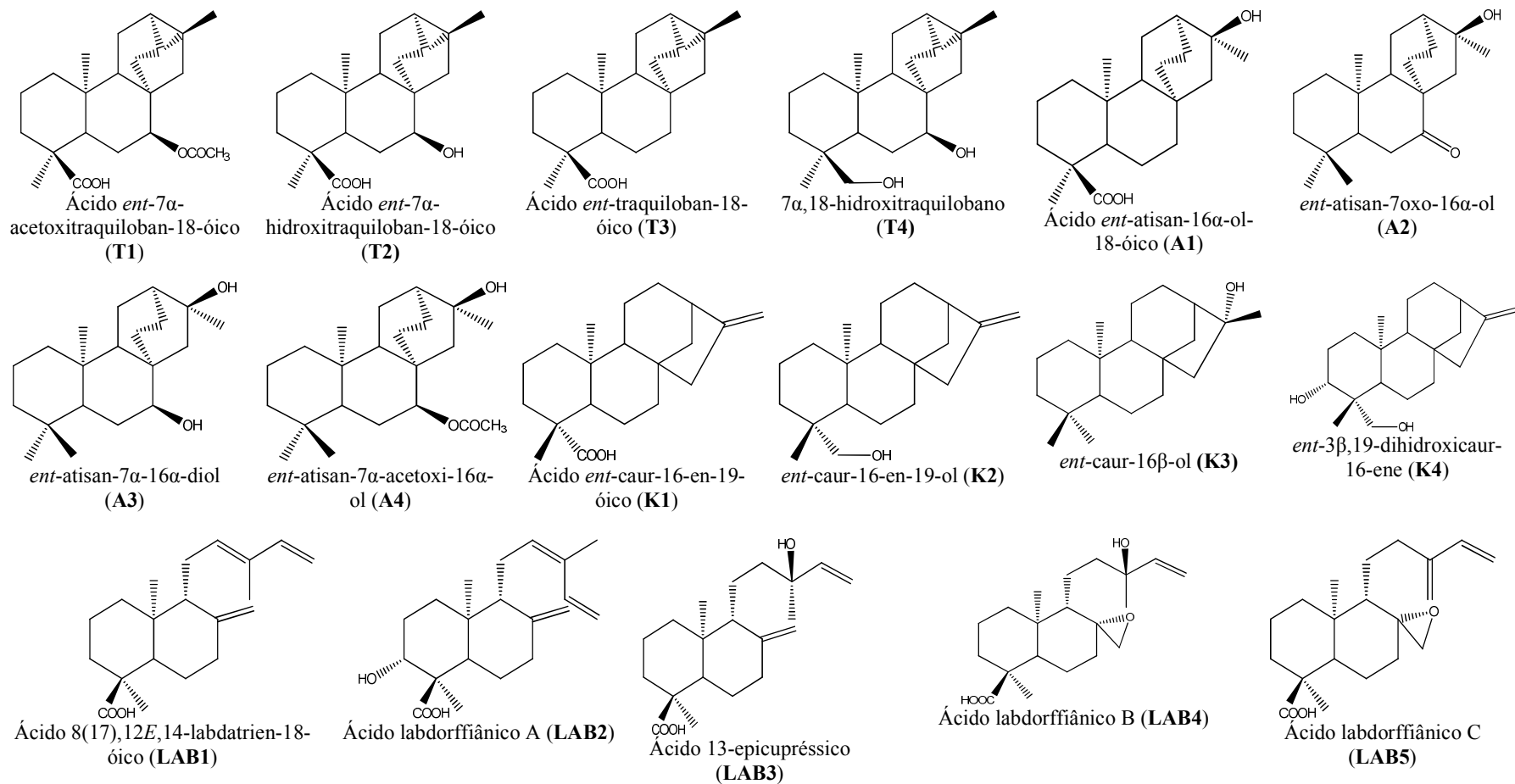


Figura 61: Diterpenos descritos para *X. langsdorffiana*.

As enzimas investigadas, complexadas com seus respectivos ligantes e extraídas do PDB, são mostradas na Figura 62.

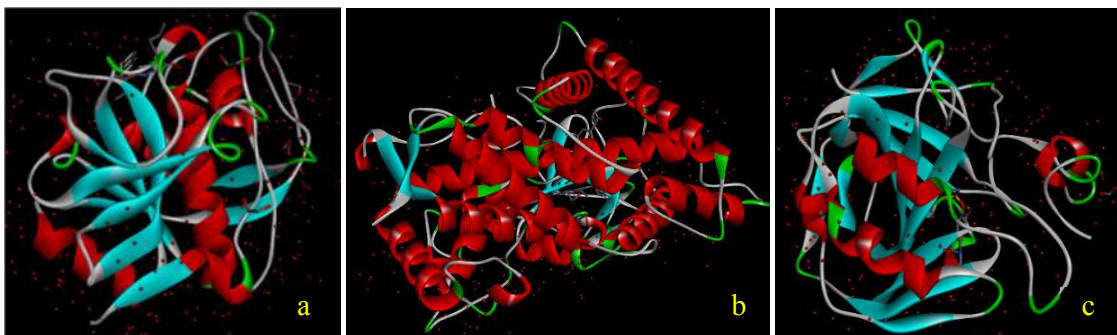


Figura 62: a) Cruzaína complexada com *Tetrafluorophenoxymethyl ketone*, b) CYP2C9, complexado com *flurbiprofen* e c) ciclooxigenase complexada com *taxane*.

Inicialmente as estruturas foram desenhadas em 2D no ChemDraw® e salvas em .mol. Posteriormente usou-se o programa de Modelagem Molecular Spartan 8.0 (SPARTAN'08, 2008) para gerar as estruturas em 3D. Os compostos foram minimizados por Mecânica Molecular (MM+) e pelo método semi-empírico AM1 (DEWAR et al, 1985). Posteriormente foram salvas no formato sdf.

As macromoléculas foram analisadas no programa Molegro Virtual Docker 6.0- (MOTOHASHI et al., 2013). Para iniciar o *docking*, foi criado um *template* com o ligante proveniente do *Protein Data Bank* (PDB).

O diretório dos ligantes foi então selecionado. Estabeleceu-se a caixa virtual GRID em X: 4.6 Å; Y:28,60 Å e Z:-4.66Å; algoritmo Lamarquiano (GREBLICKI et al, 2009); 5 poses para cada ligante.

2.5.2 *Docking* com triterpenos

Considerando trabalhos disponíveis na literatura científica que reportam estudos de triterpenos frente a avaliações com doença de Chagas (LEITE et al., 2008; FERREIRA et al., 2013b) e com atividade antitumoral (DEEB et al., 2014; PARK et al., 2013; SUNG et al., 2014; LU et al., 2014), foi investigado, através de *docking*, as possíveis interações formadas entre triterpenos isolados do gênero *Maytenus* e a cruzaína (id PDB: 3IUT), e enzimas envolvidas na ação anticancerígena de triterpenos: CYP2C9 (id PDB:1R9O) e ciclooxigenase (id PDB:

2WD2). A Figura 63 mostra os compostos triterpenos estudados.

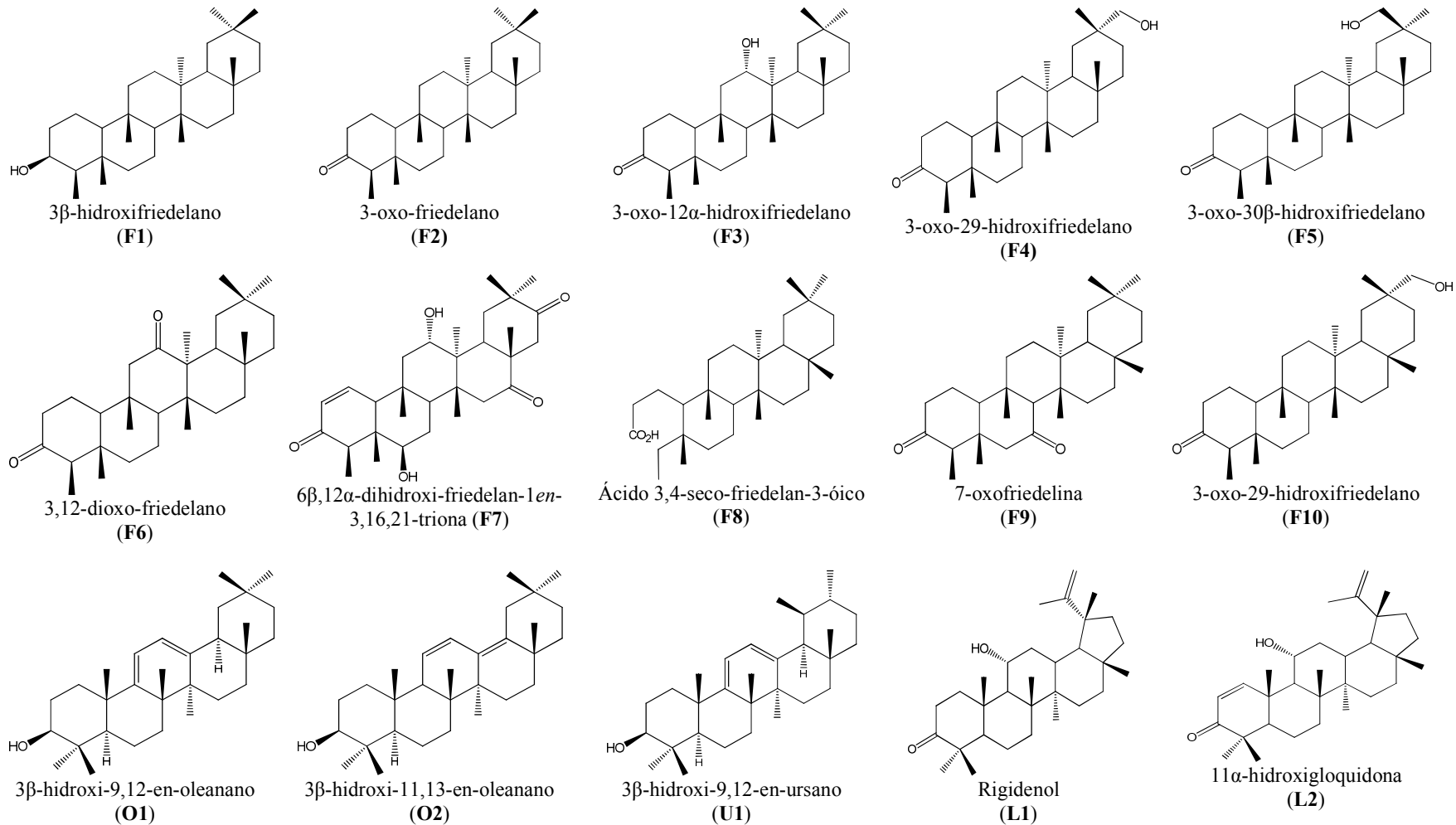


Figura 63: Triterpenos em estudo.

Os triterpenos de espécies do Gênero *Maytenus* da Flora Paraibana, foram isolados no Laboratório de Fitoquímica, da Universidade Federal da Paraíba, coordenado pelo Prof. Dr. Marcelo Sobral e pelo Prof. Dr. Josean Fechine.

As enzimas investigadas, complexadas com seus respectivos ligantes e extraídas do PDB, são mostradas na Figura 62.

Os programas utilizados, a preparação dos ligantes e da macromolécula, bem como as opções selecionadas estão descritas na seção anterior.

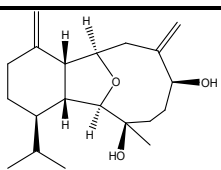
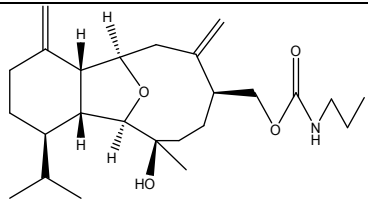
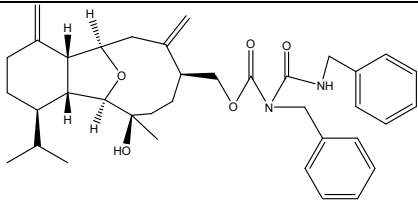
2.5.3 Método dos mínimos quadrados parciais (*Partial Least Squares* -PLS)

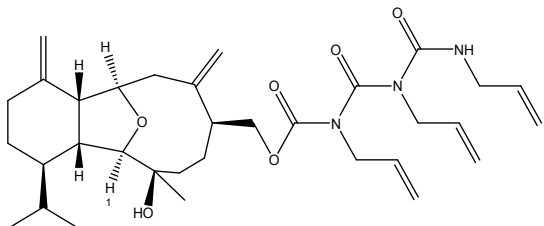
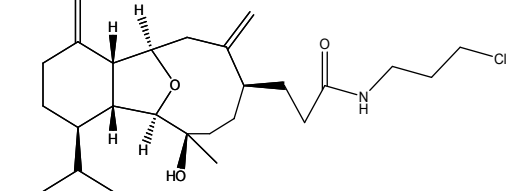
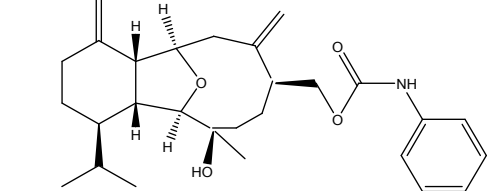
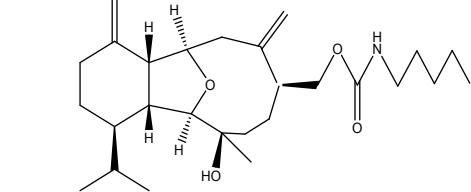
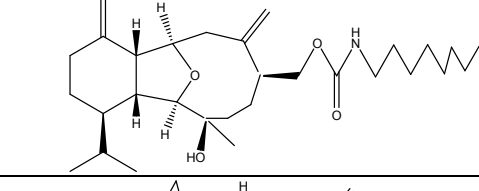
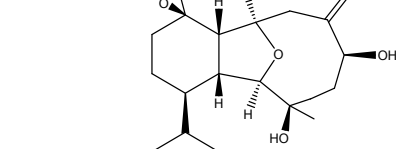
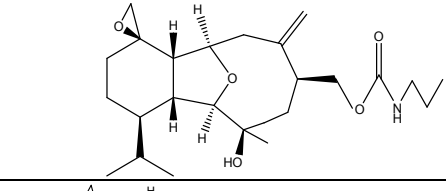
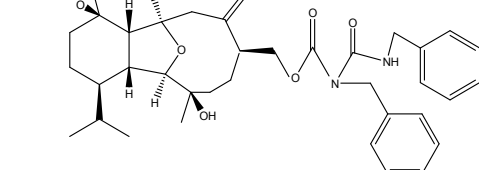
2.5.3.1 Diterpenos

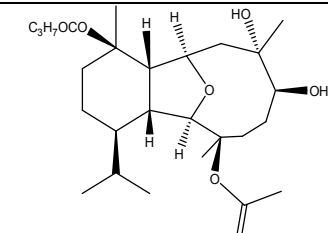
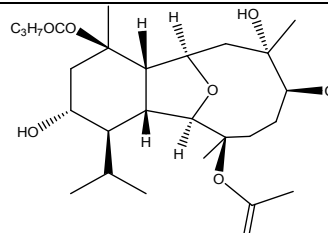
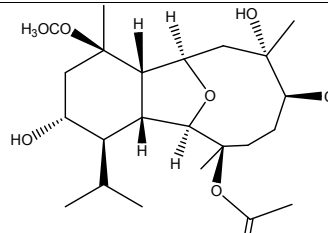
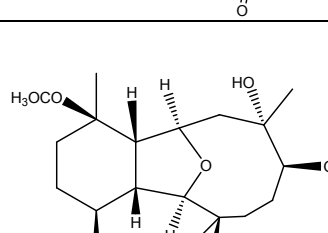
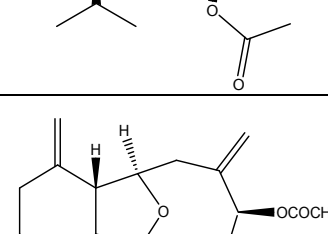
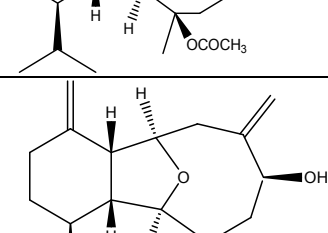
Este estudo teve o objetivo de construir um modelo teórico que permitisse avaliar a potencial atividade anticancerígena dos diterpenos isolados de *Xylopia langsdorffiana* (Ver Figura 61).

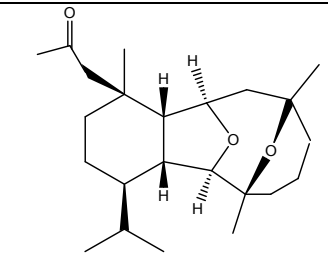
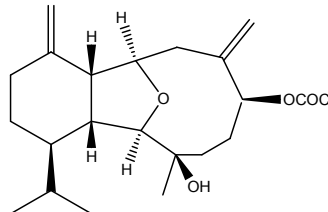
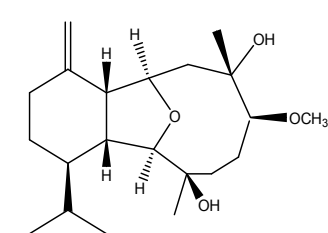
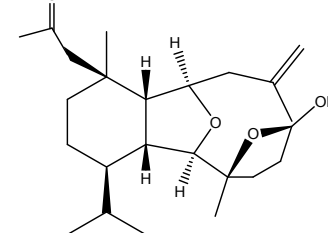
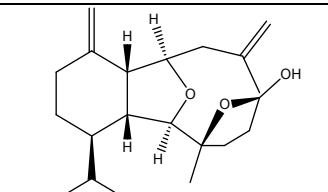
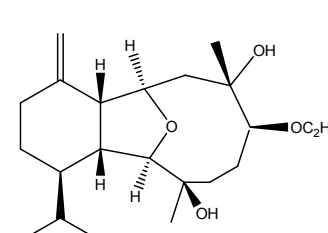
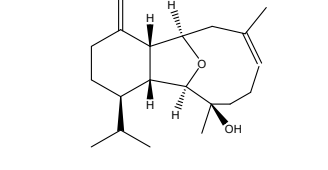
A série utilizada para construção do modelo foi selecionada da literatura científica existente (HASSAN et al., 2011), formada por 26 compostos semissintéticos diterpenoides, que apresentaram atividade contra células cancerígenas PC-3 (câncer de próstata) (Tabela 14).

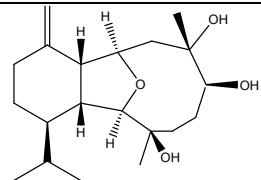
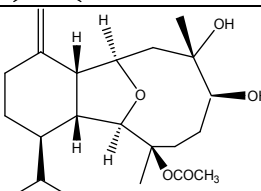
Tabela 14: Diterpenos utilizados na construção do modelo PLS.

<i>Composto</i>	<i>Estrutura química</i>	<i>IC₅₀ (μM)</i> (GOLBRAIKH et al, 2003)
1		88
2		37
3		30

4		97
5		67
6		57
7		43
8		122
9		160
10		90
11		70

12		5
13		88
14		125
15		16
16		36
17		44

18		52
19		56
20		59
21		64
22		75
23		76
24		84

25		84
26		160

As estruturas químicas dos diterpenos utilizados na construção do modelo PLS, foram desenhadas e as geometrias otimizadas utilizando-se campo de força de mecânica molecular MM+ (ALLINGER, 1977), utilizando o programa HyperChem 8.0 (HYPERCHEM, 2009). Em seguida, uma nova otimização da geometria foi feita, adotando-se o método semi-empírico AM1 (Austin Model 1) (DEWAR et al., 1985). Os compostos foram importados no programa Pentacle. Para importação os compostos foram convertidos para o formato .sdf, através do software Spartan 8.0 (Spartan'08, 2008).

Para a construção do modelo PLS (*Partial Least Squares*), a atividade expressa em IC_{50} foi utilizada em escala logarítmica ($pIC_{50} = -\log IC_{50}$ ou $1/IC_{50}$), padronizando e minimizando o erro experimental. O conjunto de treino foi formado por 19 compostos e 7 foram racionalmente selecionados (GOLBRAIKH et al, 2003) para a validação externa (2, 8, 11, 15, 22, 24, 26; Tabela 23). A validação interna foi realizada por *leave-one-out* (LOO) e a seleção de variáveis foi realizada por Fractional Factorial Design (BOX et al, 2005).

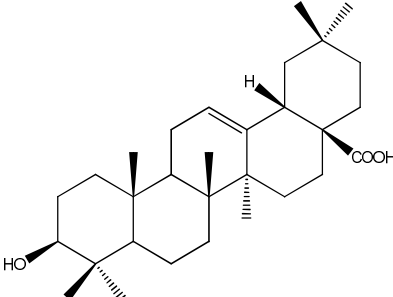
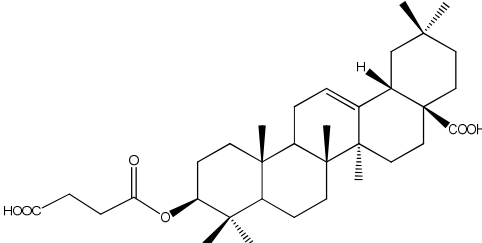
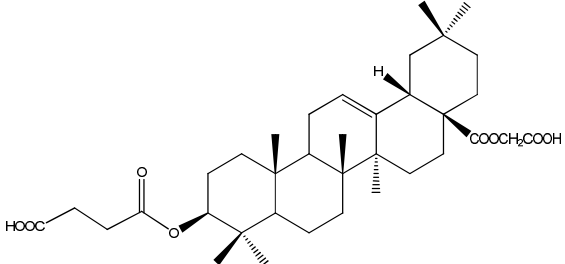
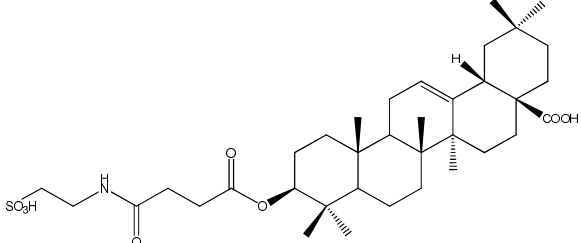
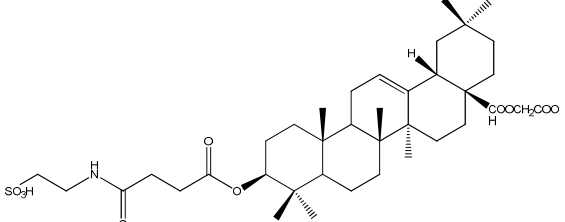
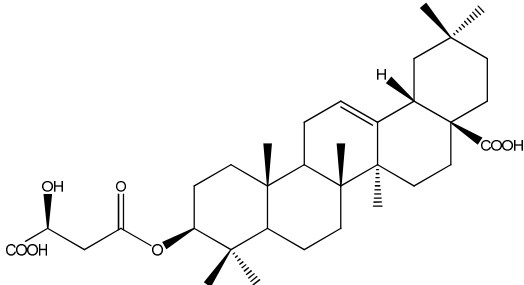
Depois de obtido um modelo robusto e preditivo, os 17 diterpenos do estudo, isolados de *X. langsdorffiana* (Figura 61), foram avaliados.

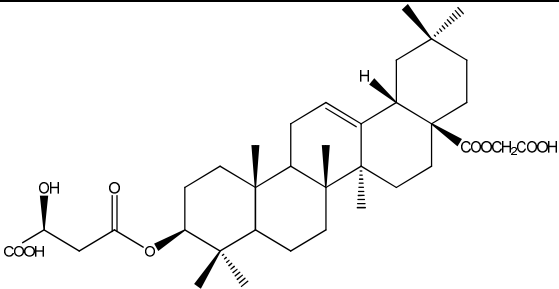
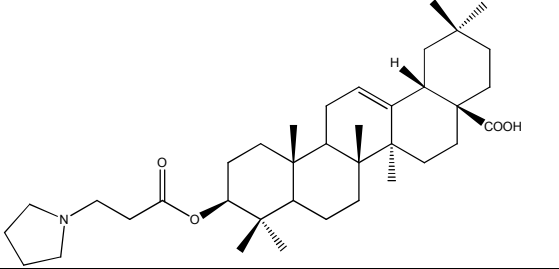
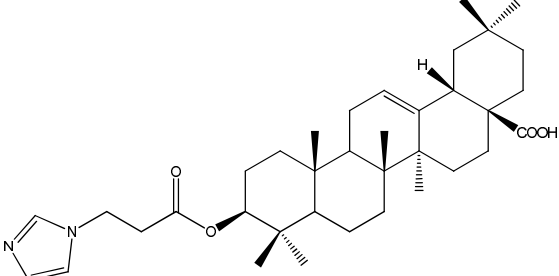
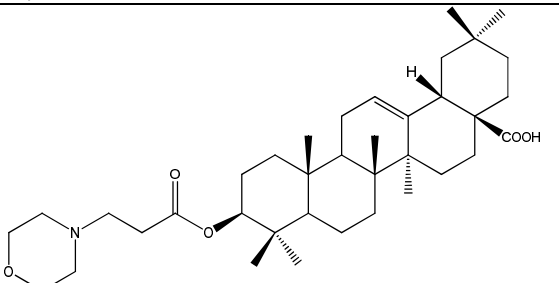
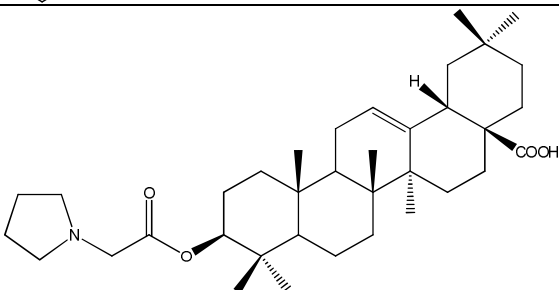
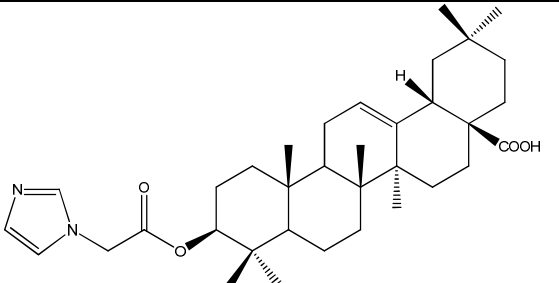
2.5.3.2 Triterpenos

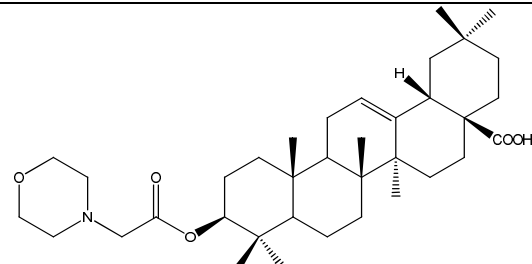
Este estudo teve o objetivo de construir um modelo teórico que permitisse avaliar a potencial atividade anticancerígena dos triterpenos isolados de espécies do Gênero *Maytenus* da Flora Paraibana (Ver **Erro! Fonte de referência não encontrada.**).

Após várias tentativas de se construir um modelo PLS com uma série grande de treinamento, foi possível obter dados satisfatórios com apenas 13 triterpenos (Tabela 15), selecionados a partir da literatura (HAO et al., 2013). Devido ao número reduzido de moléculas, não houve série teste.

Tabela 15: Triterpenos utilizados na construção do modelo PLS.

Composto	Estrutura Química	IC_{50} (μM) (HAO et al., 2013)
1		0,39
2		6,57
3		11,9
4		1,31
5		268,1
6		0,71

7		19,3
8		6,12
9		0,22
10		727,5
11		8,53
12		16,9

13		8,27
----	--	------

O desenho, minimização e importação das estruturas seguiu o protocolo descrito acima, na metodologia sobre a construção do modelo PLS com diterpenos.

2.5.3.3 Atividade microbiológica X Composição química

Obtendo-se a análise química dos óleos essenciais das diferentes partes dos três espécimes dos óleos essenciais de *X. langsdorffiana*, juntamente com a avaliação microbiológica de modulação com antibióticos dos referidos óleos essenciais (descritos no capítulo anterior), esses dados foram analisados pelo método discriminante ou binário dos mínimos quadrados parciais (*Partial Least Squares discriminat* – PLS-DA).

O objetivo da análise foi obter uma melhor visualização da relação da composição química dos óleos essenciais, com suas respectivas atividades microbiológica de modulação, tendo em vista o grande número de variáveis: 14 óleos essenciais e seus respectivos cromatogramas, 4 antibióticos e 3 cepas bacterianas.

A análise foi realizada considerando os resultados dos óleos essenciais modulados com o antibiótico frente à determinada cepa. Para avaliação dos dados, atribuiu-se aos resultados microbiológicos estatisticamente significativo (a partir de $p < 0,05$), o valor **1**, e aos resultados não significativos (ou $p > 0,05$) atribuiu-se valor **-1** (**Tabela 16**).

Para os resultados estatisticamente significativo, foram considerados os que apresentaram sinergismo e antagonismo, tendo a vista a importância de conhecer os compostos que contribuem de forma positiva ou negativa na modulação.

Tabela 16: Valores binários atribuídos aos resultados obtidos na atividade microbiológica dos óleos essenciais de *X. langsdorffiana*.

		<i>P. aeruginosa</i>			<i>S. aureus</i>			<i>E. coli</i>		
		A	B	C	A	B	C	A	B	C
Amicacina	Folha	1	-1	1	1	1	1	1	1	1
	Miolo caule	-1	-1	1	1	1	1	1	1	1
	Miolo raiz	1	1	*	1	1	*	1	1	*
	Casca caule	1	-1	-1	1	1	1	1	1	1
	Casca raiz	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Gentamicina	Folha	1	1	-1	-1	-1	-1	1	1	1
	Miolo caule	1	1	1	-1	-1	-1	1	1	1
	Miolo raiz	1	-1	*	-1	-1	*	1	1	*
	Casca caule	1	1	-1	-1	-1	-1	1	1	1
	Casca raiz	1	1	1	-1	-1	1	1	1	1
Oxacilina	Folha	-1	-1	-1	-1	1	1	-1	-1	-1
	Miolo caule	-1	-1	-1	-1	1	-1	-1	-1	-1
	Miolo raiz	-1	-1	*	-1	-1	*	1	-1	*
	Casca caule	-1	-1	1	-1	1	1	-1	-1	-1
	Casca raiz	-1	-1	-1	1	-1	1	-1	1	-1
Imipenem	Folha	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	Miolo caule	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	Miolo raiz	1	1	*	1	1	*	1	1	*
	Casca caule	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	Casca raiz	1	1	1	1	1	1	1	1	1

vermelho: estatisticamente significativo (a partir de $p < 0,05$)/azul: resultados não significativos (ou $p > 0,05$) *: óleo essencial com atividade microbiológica não avaliada

Para as atividades microbiológicas que não apresentaram variações nos valores atribuídos (1 e -1), exibindo exclusivamente um dos valores, não foi possível realizar a análise PLS, devido à falta de variância. Sendo verificado para os antibióticos imipenem frente a *P. aeruginosa*, *S. aureus* e *E. coli*, amicacina frente a *S. aureus*, e os demais antibióticos avaliados frente a *E. coli* (amicacina, gentamicina e oxacilina).

Estes dados foram submetidos à análise com o software Unscrambler versão 9.7 (CAMO Process AS, Noruega).

2.5.4 Lipofilicidade

Neste estudo, o MIF (*Molecular Interaction Fields*) que ressalta a lipofilicidade foi obtido no programa VolSurf+, onde observa-se graficamente a interação do composto com o *probe* DRY. O programa utiliza o campo de força do GRID para caracterizar potencial polar e regiões de interação hidrofóbica ao redor de moléculas-alvo. Os probes do programa são: nitrogênio amida (N1), a água (H2O), hidrofóbico (DRY) e o oxigênio da carbonila (O).

Os compostos que se destacaram no *docking*, foram selecionados para calcular o coeficiente de partição, além do ácido ursólico (AU), utilizado para comparação nas discussões dos triterpenos nos estudos de *docking* descritos anteriormente (Figura 64).

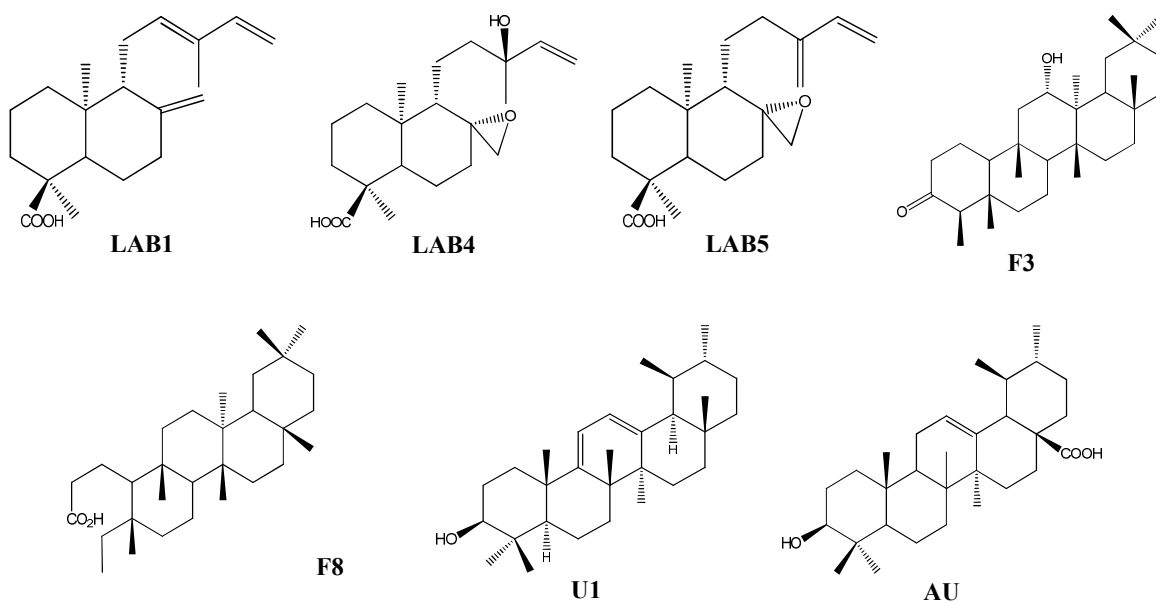


Figura 64: Compostos selecionados para cálculo da lipofilicidade.

2.5.5 Análise de componentes principais (*Principal Component Analysis -PCA*)

Os cromatogramas obtidos a partir da análise dos óleos essenciais obtidos de diferentes partes de três espécimes de *X. langsdorffiana* (descrito no capítulo anterior), foram submetidos a análise da componente principal.

Os arquivos dos espectros CG_MS no formato netCDF foram utilizados como dados de

entrada no programa XCMS para realizar o alinhamento dos espectros e converter as variáveis m/z e tempo em uma única variável. Os dados dos espectros de massas, mais precisamente os valores de integrais das áreas dos diferentes fragmentos (m/z) em função do tempo de retenção das extrações feitas a partir de folhas, casca raiz, casca caule, miolo raiz e miolo caule de *X. langsdorffiana*, foram utilizados e exportados em arquivo texto no formato csv. Estes dados foram submetidos à análise de componentes principais (PCA) com o software Unscrambler versão 9.7 (CAMO Process AS, Noruega), sendo previamente utilizado a normalização de área para cada amostra. Esta transformação normaliza o espectro X_i , calculando a área sob a curva $\sum x_{ij}$. Após a normalização, a área sob a curva é a mesma para todos os espectros.

Equação 5:

$$newX_i = X_i / \sum_j x_{i,j}$$

2.6 RESULTADOS E DISCUSSÕES

2.6.1 *Docking* com diterpenos

Os valores das energias de formação dos complexos diterpeno-cruzaína, diterpeno-CYP2C9 e diterpeno-COX, estão plotados nas Tabela 17, Tabela 18 e Tabela 19 respectivamente.

2.6.1.1 *Complexos diterpeno-cruzaína*

Tetrafluorophenoxymethyl ketone complexado com a cruzaína apresentou energia de formação igual a 132,55 kcal/mol.

Os diterpenos **A4** e **LAB1**, mostraram os menores valores de energia de formação quando complexados com a enzima (Tabela 17).

Tabela 17: Energias de formação dos complexos diterpeno-cruzaína.

Diterpeno	Moldock Score kcal/mol (Motohashi et al., 2013)	Diterpeno	Moldock Score kcal/mol (Motohashi et al., 2013)
A4	-68,84	K2	-44,11
LAB1	-66,06	T1	-42,41
LAB4	-61,27	A3	-42,22
LAB2	-61,19	K1	-42,05
LAB3	-59,72	A1	-37,94
LAB5	-57,55	T4	-37,83
T3	-48,08	T2	-37,65
A2	-46,26	K4	-33,12
K3	-44,23		

Ent-atisan-7 α -acetoxi-16 α -ol (**A4**), apresentou interações com os resíduos de CYS25 e GLY66, e o ácido 8(17),12*E*,14-labdatrien-18-óico (**LAB1**) com resíduos de GLN19, GLY23, CYS25 e GLY66, semelhante ao ligante PDB *Tetrafluorophenoxymethyl ketone* (Figura 65).

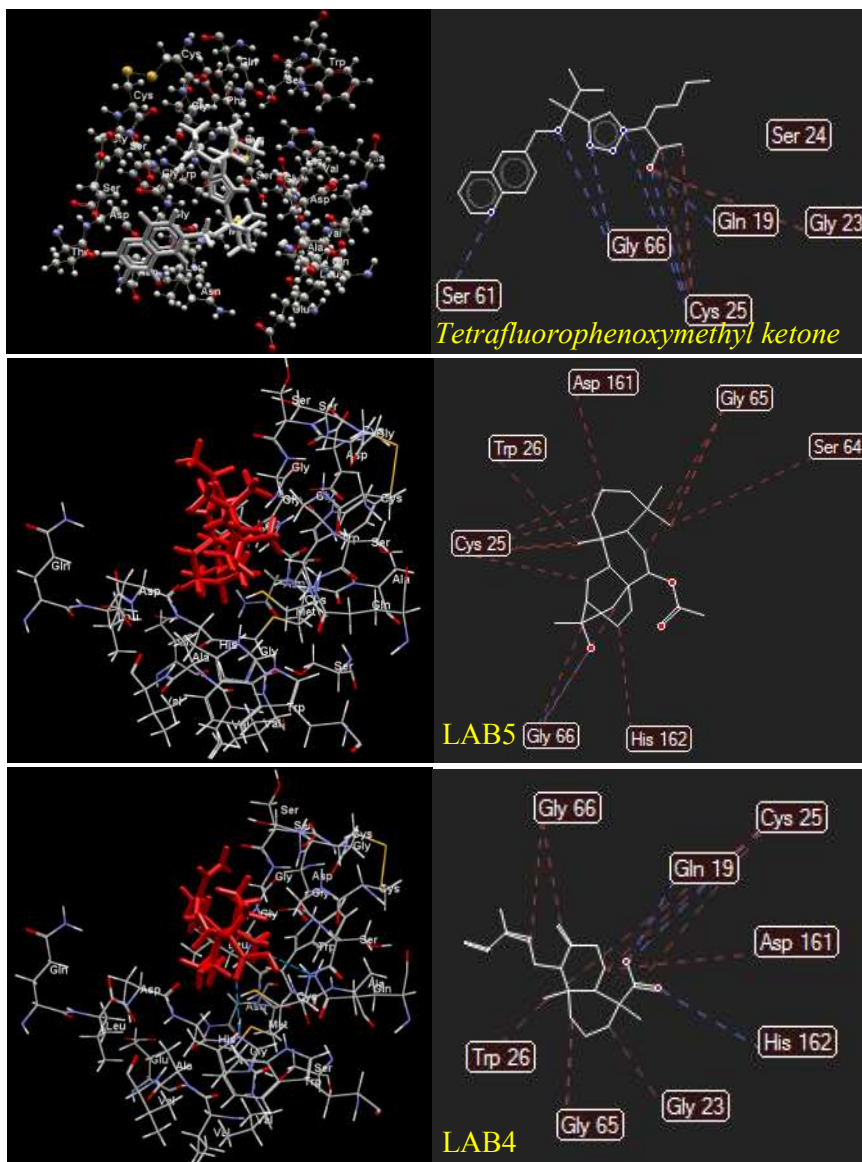


Figura 65: Poses dos complexos formados com menor energia pelas interações dos compostos *Tetrafluorophenoxymethyl ketone*, LAB5 e LAB4. Sendo linhas tracejadas azuis - ligações de hidrogênio e vermelhas – estéricas

De acordo com levantamento bibliográfico realizado (SciFinder[®]), não há relatos de estudos da atividade tripanossomicida com diterpenos do tipo atisano.

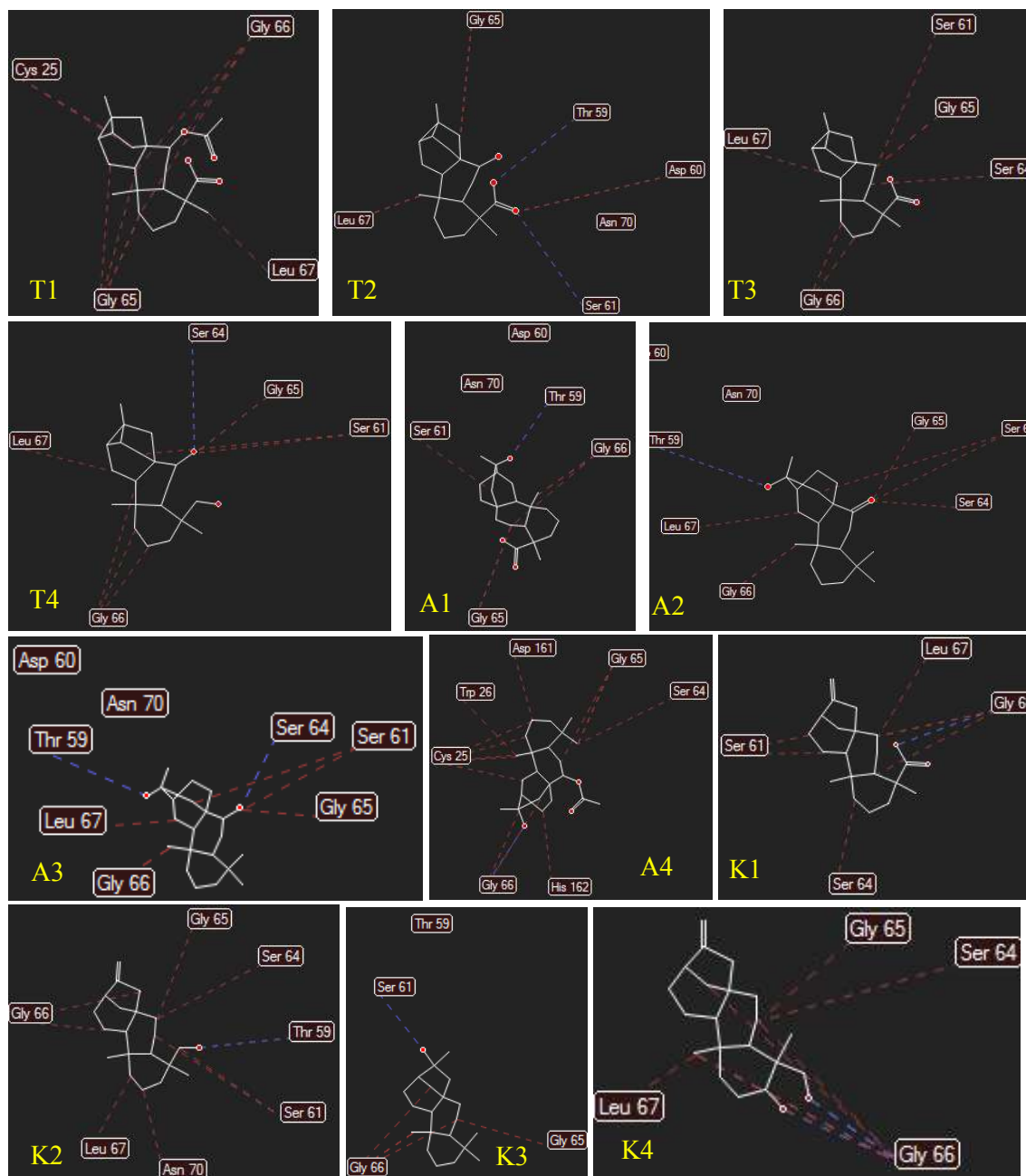
Para diterpenos do tipo labdano, Varela et al. (2012) descreveram as atividades de: (+) -15-hydroxy-labd-7-en-17-al e (+) -13,14,15,16-tetranor-labd-7-en-17,12-olide, apresentando, o primeiro, atividade antitripanossoma equipotente ao composto de referência Nifurtimox[®], um antiprotozoário utilizado no tratamento da Doença de Chagas.

Os cinco diterpenos labdano utilizados do estudo de *docking*, apresentaram os melhores

valores de energia de formação quando complexados com a cruzaina (não considerando o diterpeno atisano **A4**), mostrando-se como fortes candidatos para a avaliação da atividade antitripanossoma.

Com exceção da consideração feita aos labdanos, não foi verificada nenhuma relação dos esqueletos diterpênicos com os valores de energia.

Na Figura 66, pode-se verificar as interações da enzima com os compostos analisados.



Continua...

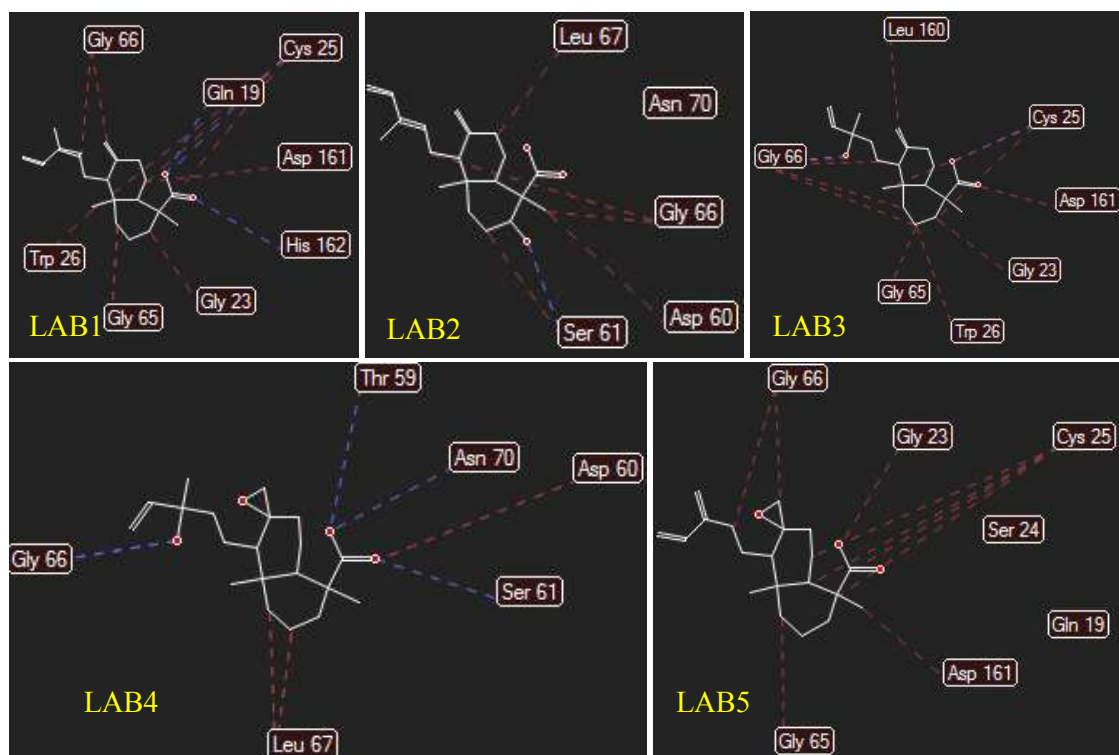


Figura 66: Interações dos compostos estudados com a cruzaina, sendo linhas tracejadas azuis - ligações de hidrogênio e vermelhas - estéricas.

2.6.1.2 Complexos diterpeno-CYP2C9

Flurbiprofen complexado com a CYP2C9 apresentou energia de formação igual a 88,60 kcal/mol.

Os valores da energia de formação dos complexos diterpeno-CYP2C9 obtidos no estudo de *docking* são mostrados na Tabela 18.

Tabela 18: Energias de formação dos complexos diterpeno-CYP2C9.

Diterpeno	Moldock Score kcal/mol (Motohashi et al., 2013)	Diterpeno	Moldock Score kcal/mol (Motohashi et al., 2013)
LAB5	-78,27	T1	-66,06
LAB4	-71,69	T2	-63,90
K1	-71,19	T3	-61,35
LAB2	-70,41	A4	-52,22
LAB1	-69,77	T4	-51,16
K3	-68,61	A3	-50,39
K4	-68,22	A1	-47,44
LAB3	-67,48	A2	-46,59
K2	-66,52		

Ácido labdorffiânico C (**LAB5**) e ácido labdorffiânico B (**LAB4**) são compostos novos na literatura, isolados recentemente dos frutos de *Xylopi langsdorffiana* (DARTE, 2013). Pode-se observar na Tabela 18 que os menores valores energias são mostrados para os compostos **LAB5** e **LAB4**, ambos diterpenos com esqueleto do tipo labdano.

Na Figura 67 pode-se visualizar, a esquerda, a conformação do ligante na pose do complexo de menor energia entre composto e enzima, e a direita, as interações formadas entre o composto e os resíduos do receptor. As interações estéricas (linha tracejada vermelha) representam ligações entre átomos apolares; ligações de H (linha tracejada azul) ocorrem devido a interação eletrônica entre eletronegativamente diferentes, sendo um deles o hidrogênio; na interação eletrostática (linha tracejada verde) ocorre interação eletrônica entre átomos, sendo um desprovido de elétrons e outro muito eletronegativo.

Os compostos **LAB5** e **LAB4** apresentaram interações com os resíduos ARG108, ASN204, semelhantemente ao *flurbiprofen*, ligante complexado com a enzima no PDB (Figura 67). Observa-se que a interação com o resíduo ARG108, exibida pelo *flubirprofen*, parece ser importante e é presente nas formações de menores energias.

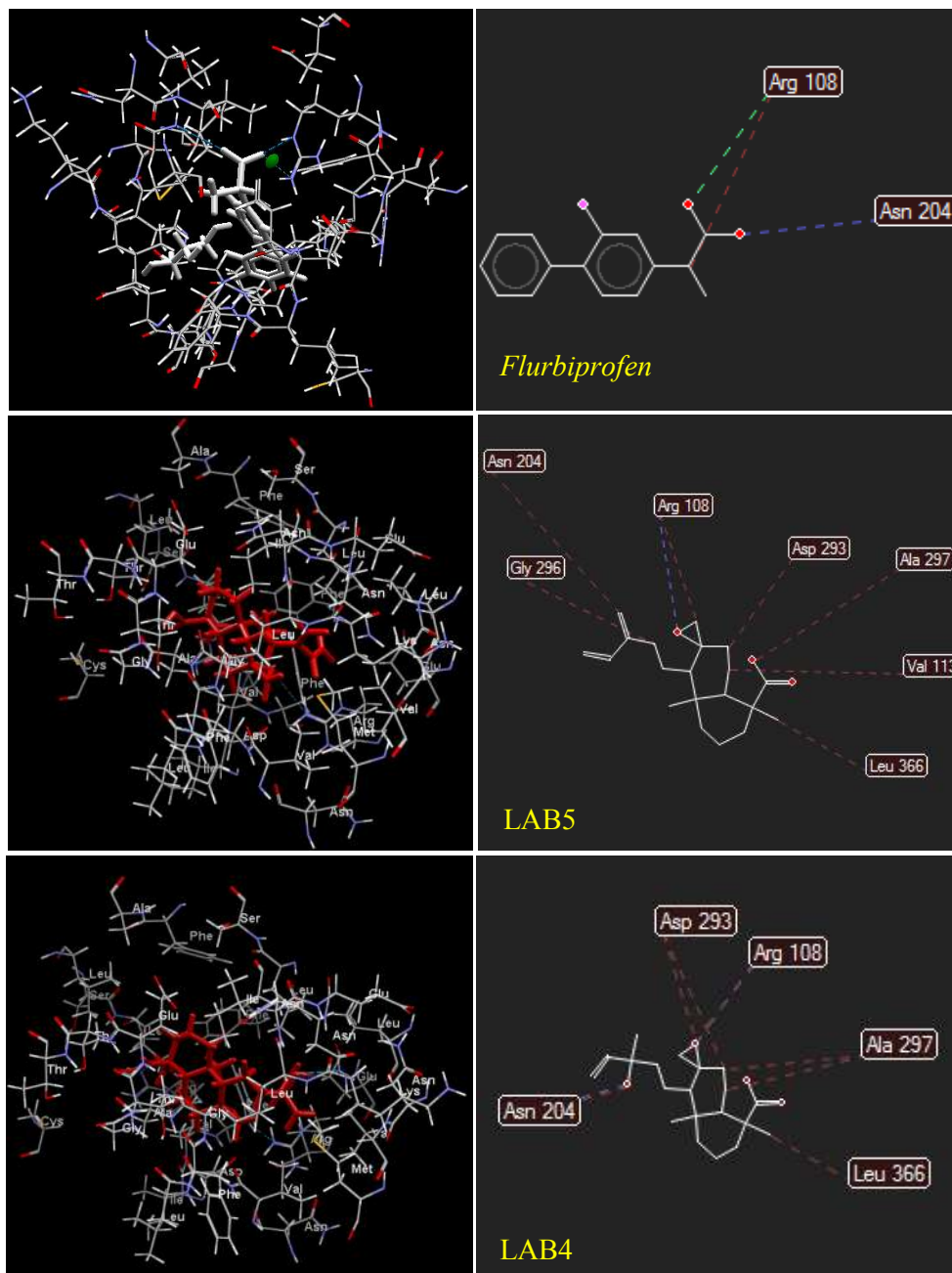
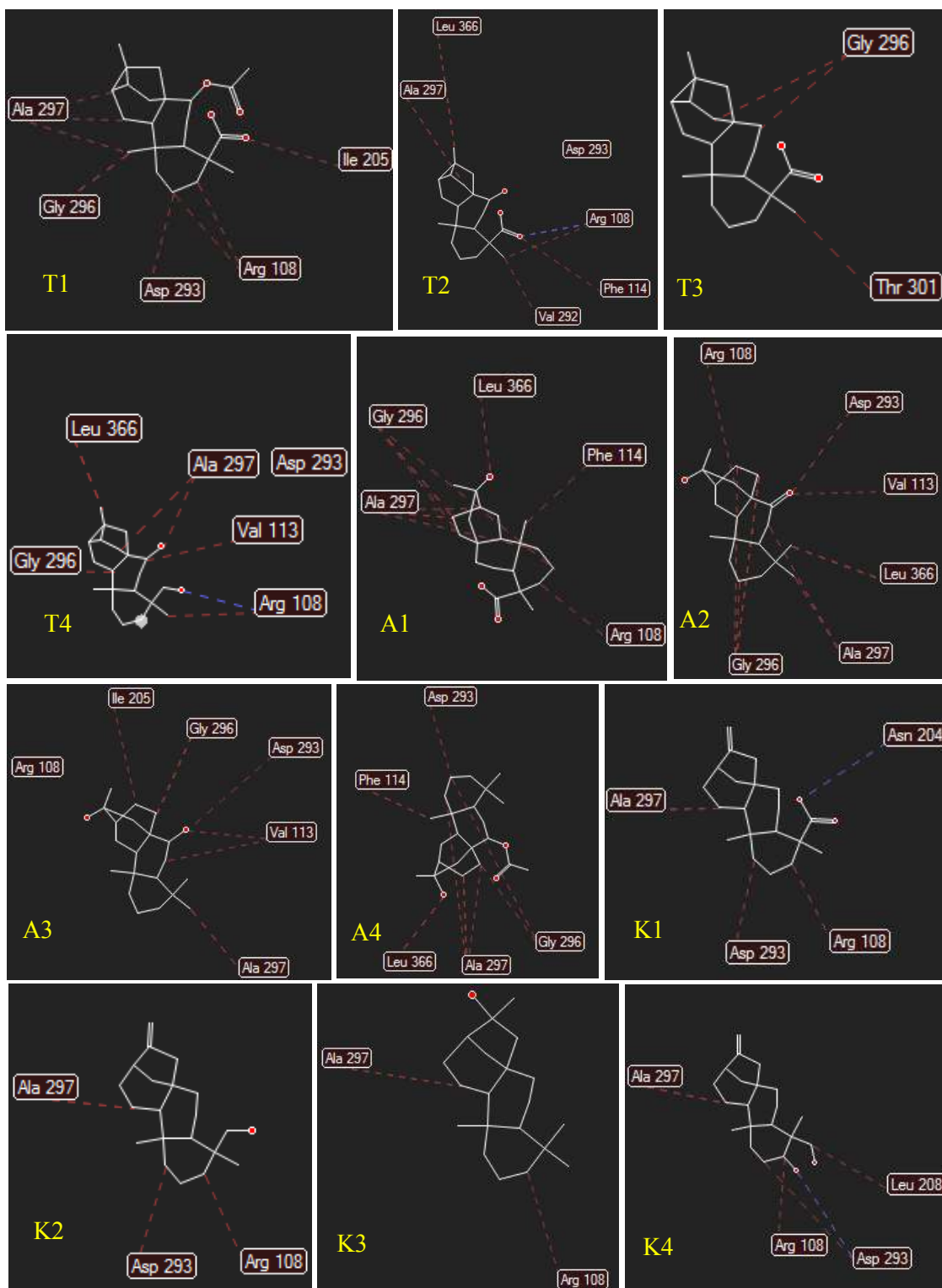


Figura 67: Poses dos complexos formados com menor energia pelas interações dos compostos *flurbiprofen*, LAB5 e LAB4. Sendo linhas tracejadas azuis - ligações de hidrogênio e vermelhas - estéricas

Na Figura 68 estão reportadas todas as poses obtidas entre os ligantes investigados e a macromolécula. Pode-se notar maior número de interações, ligações de hidrogênio e estéricas, em lábdanos do que nos demais diterpenos. Tal fato é melhor evidenciado, comparando LAB4 e LAB5 aos outros ligantes.



Continua...

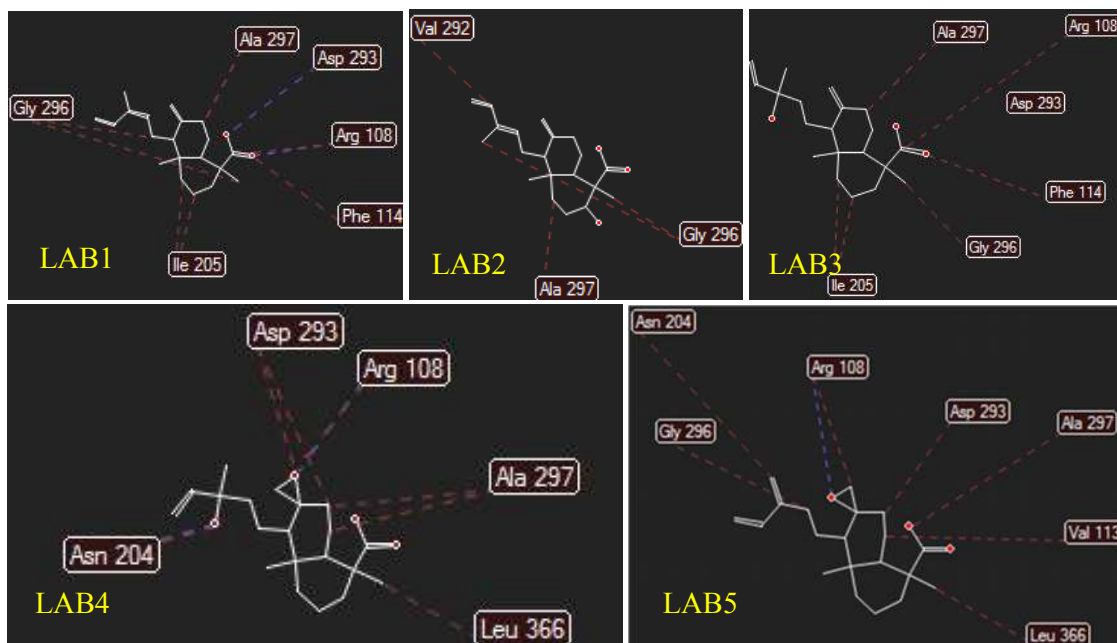


Figura 68: Interações dos compostos estudados com o CYP2C9, sendo linhas tracejadas azuis - ligações de hidrogênio e vermelhas - estéricas.

2.6.1.3 Complexos diterpeno-ciclooxigenase

Taxane complexado com a ciclooxigenase apresentou energia de formação igual a 102,18 kcal/mol.

Os valores da energia de formação dos complexos diterpeno-ciclooxigenase obtidos no estudo de *docking* estão reportados na Tabela 19.

Tabela 19: Energias de formação dos complexos diterpeno-ciclooxigenase.

Diterpeno	Moldock Score kcal/mol (Motohashi et al., 2013)	Diterpeno	Moldock Score kcal/mol (Motohashi et al., 2013)
LAB4	-83,66	T4	-56,45
LAB5	-79,52	LAB2	-55,56
T1	-78,60	K3	-55,13
A4	-77,86	T3	-53,71
K1	-70,89	A1	-51,70
LAB3	-70,66	A2	-51,47
LAB1	-69,88	A3	-49,64
K2	-58,78	K4	-48,36
T2	-56,69		

Os menores valores de energias são mostrados para os compostos **LAB4** e **LAB5**, ambos diterpenos lábdano, corroborando com os dados obtidos no *docking* com a enzima do citocromo P450.

Na Figura 69 pode-se visualizar os complexos formados entre a proteína e os ligantes: LAB4, LAB5 e *taxane*-originário do PDB. A esquerda tem-se a conformação do ligante na pose do complexo de menor energia entre composto e enzima, e a direita, as interações formadas entre o composto e os resíduos do receptor. As interações estéricas representam ligações entre átomos apolares e ligações de H ocorrem devido a interação eletrônica entre átomos eletronegativamente diferentes, sendo um deles o hidrogênio.

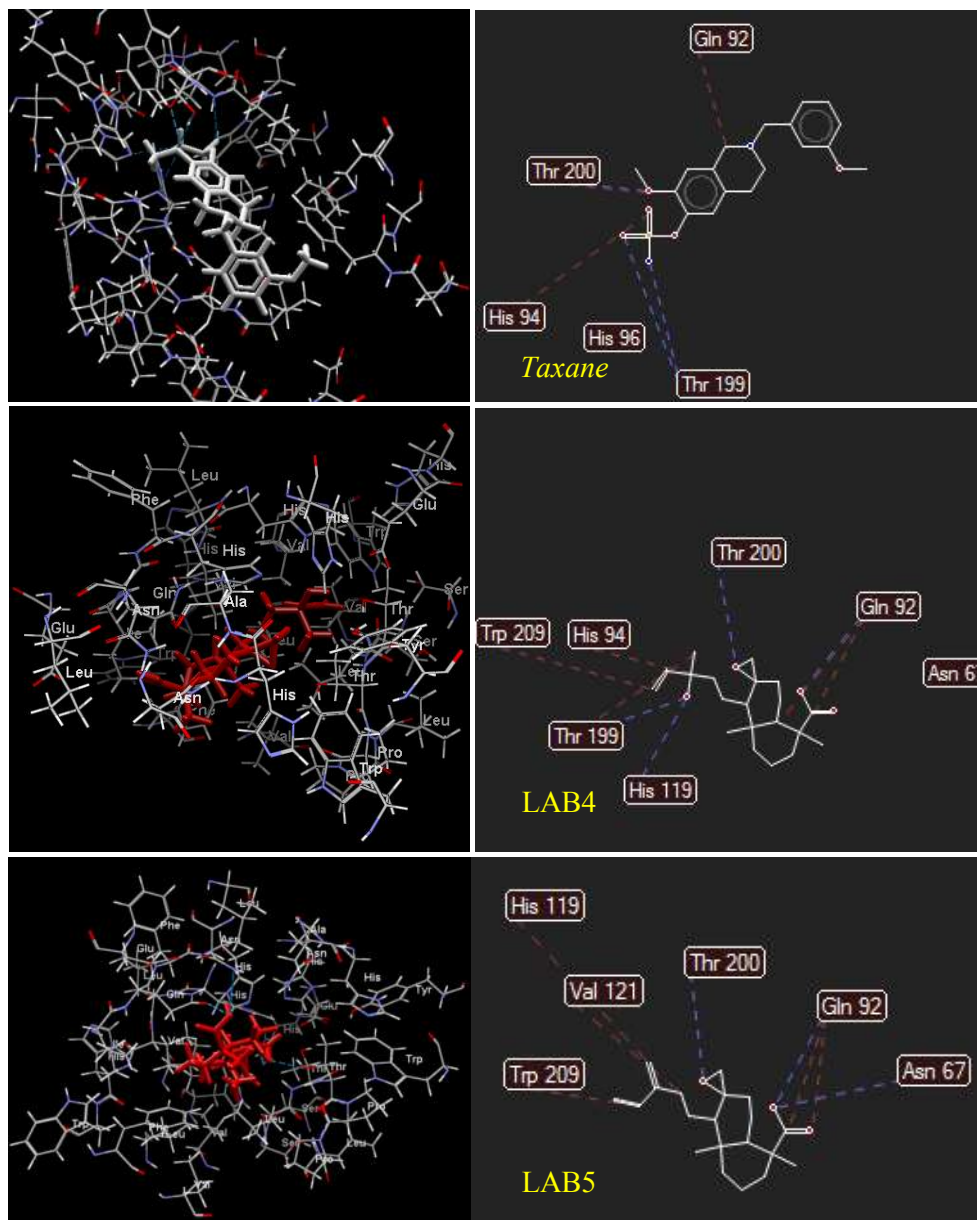
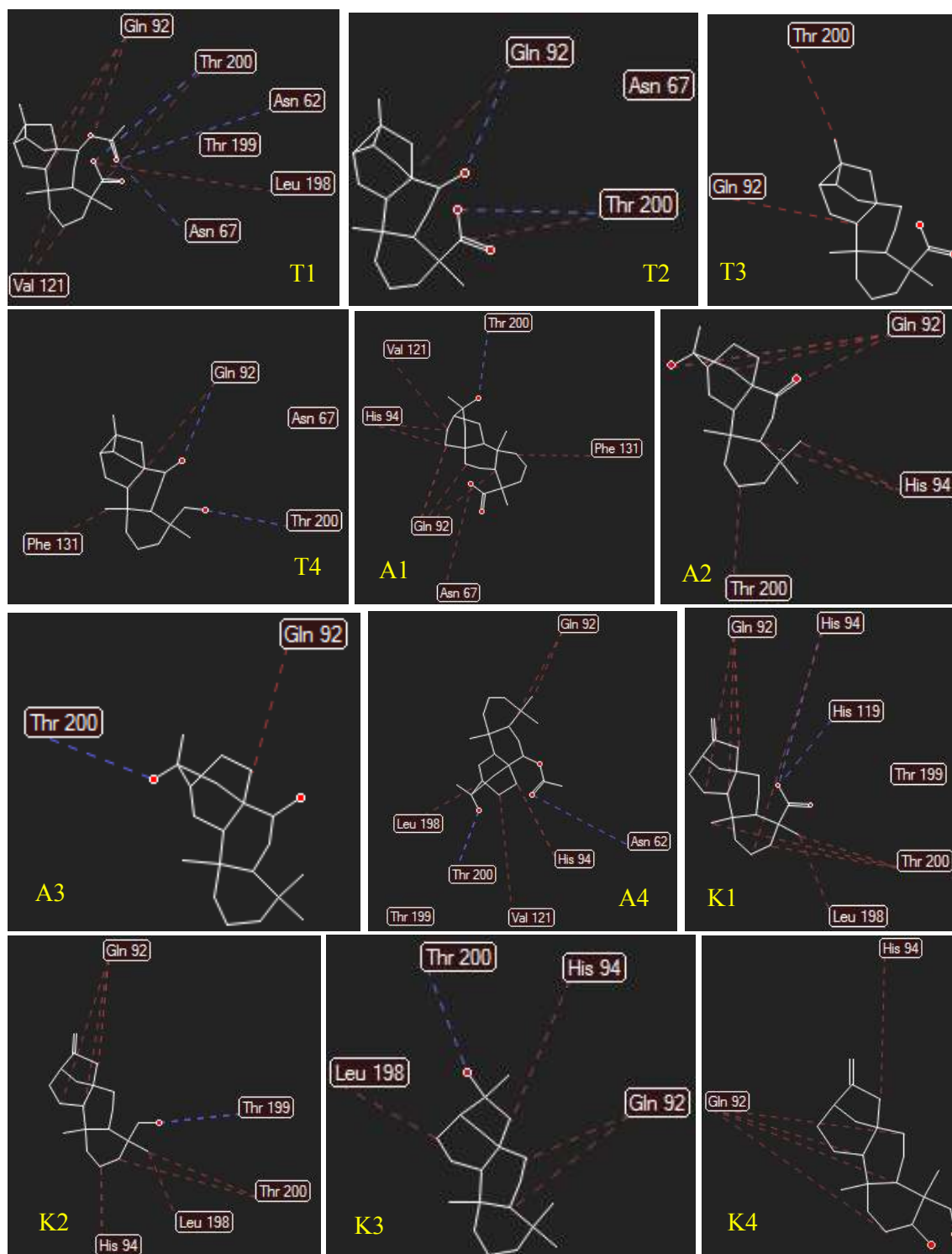


Figura 69: Poses dos complexos formados com menor energia pelas interações dos compostos *taxane*, LAB5 e LAB4. Sendo linhas tracejadas azuis - ligações de hidrogênio e vermelhas - estéricas.

Semelhante ao *taxane*, LAB4 e LAB5 mostraram interações estéricas com o resíduo de GLN92 e ligação de hidrogênio com THR200.

Na Figura 70 pode ser visualizada a interação, dos 17 diterpenos em estudo com a ciclooxygenase. Aqui também se evidencia o maior número de interações em LAB4 e LAB5, ligantes que formam complexos com menor energia.



Continua...

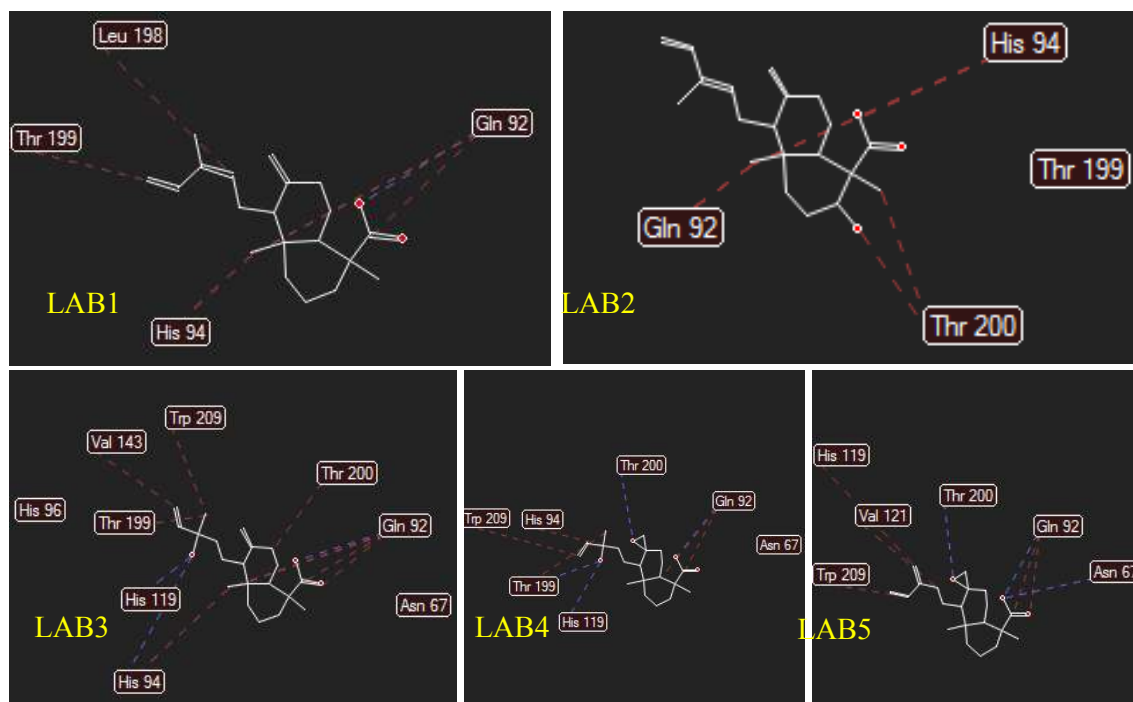


Figura 70: Poses dos complexos formados pelas interações dos compostos estudados com a COX, sendo linhas tracejadas azuis - ligações de hidrogênio, e vermelhas - estéricas.

Estudos com diterpenos labdanos, naturais ou sinteticamente modificados, relatam a supressão da expressão (KIM et al., 2013), inibição moderada (WENZIG et al., 2008), baixa inibição ou inatividade (HEGAZY et al., 2008a) da COX, reforçando nossa investigação nesse alvo.

Não foi possível observar qualquer relação energética entre as classes apresentadas.

2.6.2 *Docking* com triterpenos

As interações dos 15 triterpenos (ligantes) com a cruzaína também foram investigados em nosso estudo de *docking*, para avaliar quais triterpenos podem apresentar potencial efeito antichagásico e/ou antitumoral.

2.6.2.1 *Complexos triterpeno-cruzaína*

Tetrafluorophenoxymethyl ketone complexado com a cruzaína apresentou energia de formação igual a 132,55 kcal/mol.

Os valores da energia de formação dos complexos triterpeno-cruzaína obtidos estão

reportados na Tabela 20.

Tabela 20: Energias de formação dos complexos triterpeno-cruzaína.

Triterpeno	Moldock Score kcal/mol (Motohashi et al., 2013)	Triterpeno	Moldock Score kcal/mol (Motohashi et al., 2013)
U1	-52.87	F2	-38.45
F6	-49.40	O2	-33.92
F4	-48.76	F5	-32.46
F9	-47.73	F10	-25.28
F7	-44.68	F3	-14.88
O1	-44.67	L2	49.96
F1	-42.14	L1	50.53
F8	-39.60		

Na Figura 71 pode ser visualizada, a esquerda, a conformação do ligante na pose do complexo de menor energia entre composto e enzima, e a direita, as interações formadas entre o composto e os resíduos do receptor. As interações estéricas representam ligações entre átomos apolares e ligações de H ocorrem devido a interação eletrônica entre eletronegativamente diferentes, sendo um deles o hidrogênio.

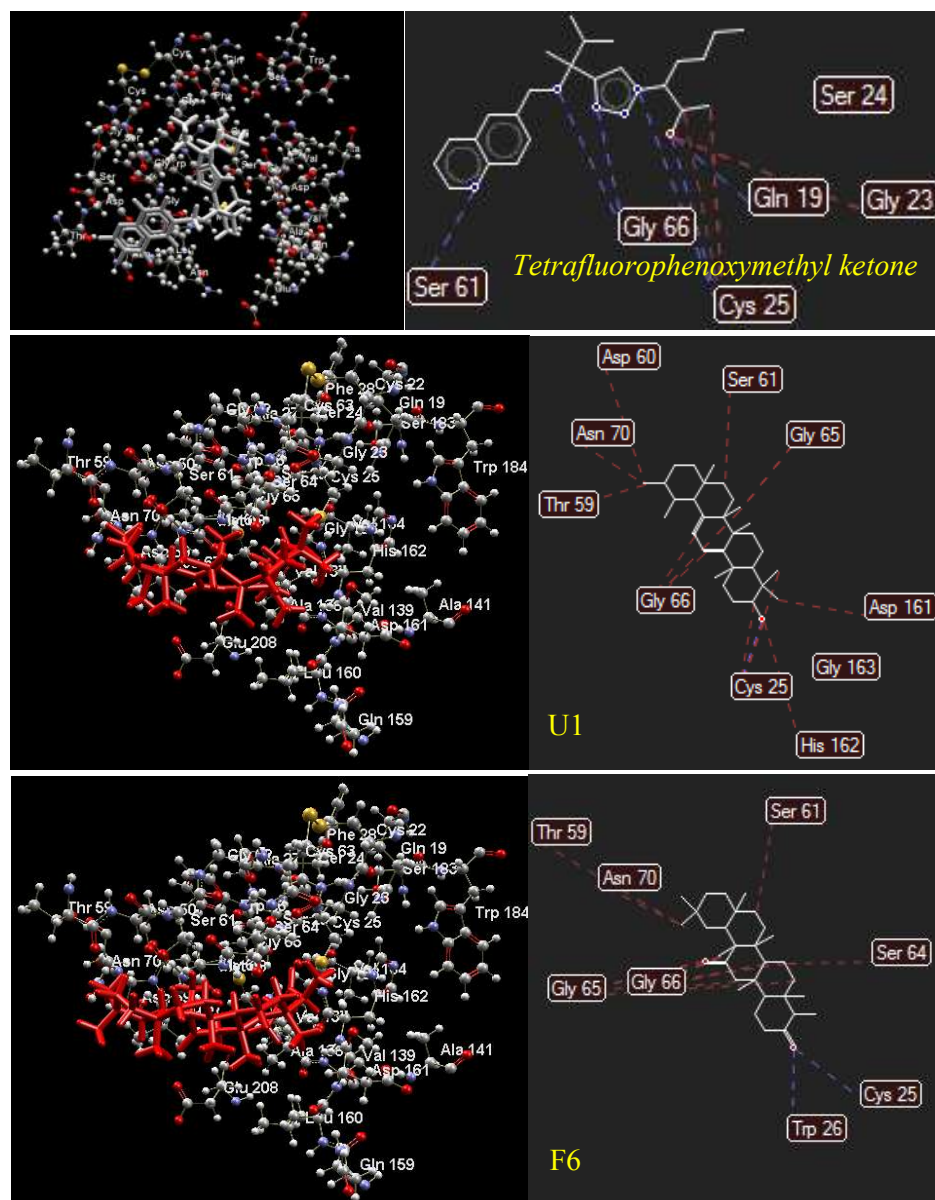


Figura 71: Pose de menor energia e interações dos compostos U1 e F6. Sendo linhas tracejadas azuis - ligações de hidrogênio e vermelhas - estéricas.

O triterpeno Ursano **U1**, que forma o complexo de menor energia, tem maior número de interações com a enzima. Semelhantemente ao *Tetrafluorophenoxymethyl ketone*, um potente inibidor da cruzaina (BRAK et al., 2010), o composto **U1** apresentou interação com os resíduos de CYS25, SER61 e GLY66. A literatura científica reforça nossa observação, pois diversos estudos ressaltam a atividade antichagásica de triterpenos do tipo ursano (CUNHA et al., 2003; FERREIRA et al., 2013a; MUSAYEIB et al., 2013; CUNHA et al., 2006; ROSAS et al., 2007).

O ácido ursólico (Figura 72) é um dos compostos triterpênicos mais ativos contra a doença de Chagas, objeto de diversos estudos científicos (FERREIRA et al., 2010; LEITE et al., 2006; FERREIRA et al., 2013b). Assim, este composto foi submetido a *docking* e os resultados obtidos foram comparados aos resultados obtidos com os demais triterpenos.

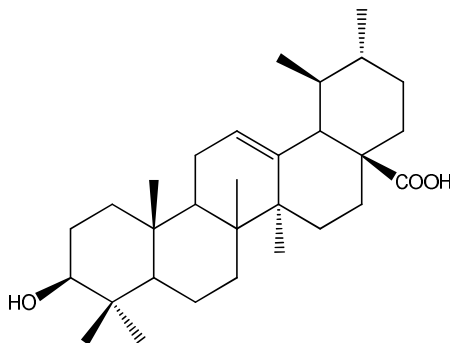


Figura 72: Ácido Ursólico

O complexo cruzaína/ácido ursólico (Figura 73) mostrou interações com os resíduos de SER61 e GLY66, semelhante ao *Tetrafluorophenoxymethyl ketone* (Ver Figura 71), e energia de formação com valor de MolDock Score de **-50,22 kcal/mol**. Diante dos resultados obtidos nos estudos de *docking*, o composto 3β-hidroxi-9,12-en-ursano (**U1**) (MolDock Score de **-52,87 kcal/mol**) forma complexo de menor energia com a enzima do parasita, sendo mais estável e potencialmente mais ativo. Aqui vale ressaltar que as predições aventadas pelos estudos teóricos não substitui os tradicionais testes experimentais. A atividade predita é um provável resultado de futuros testes de bancada, direcionando e otimizando a pesquisa.

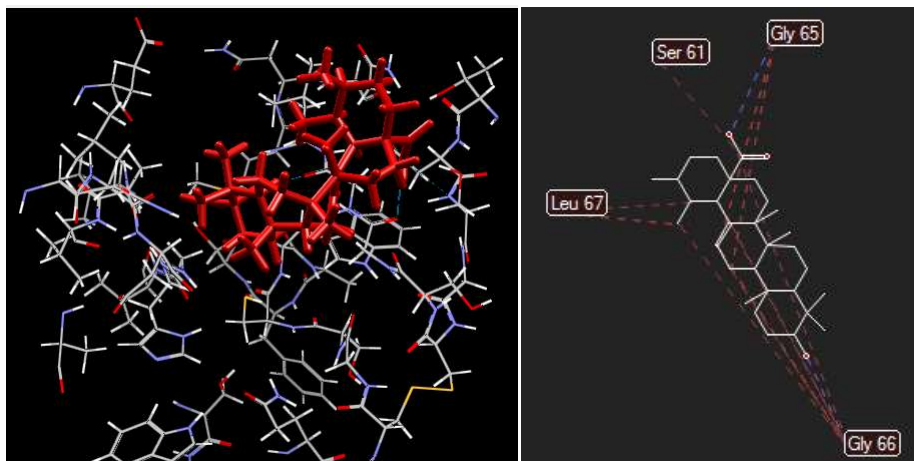
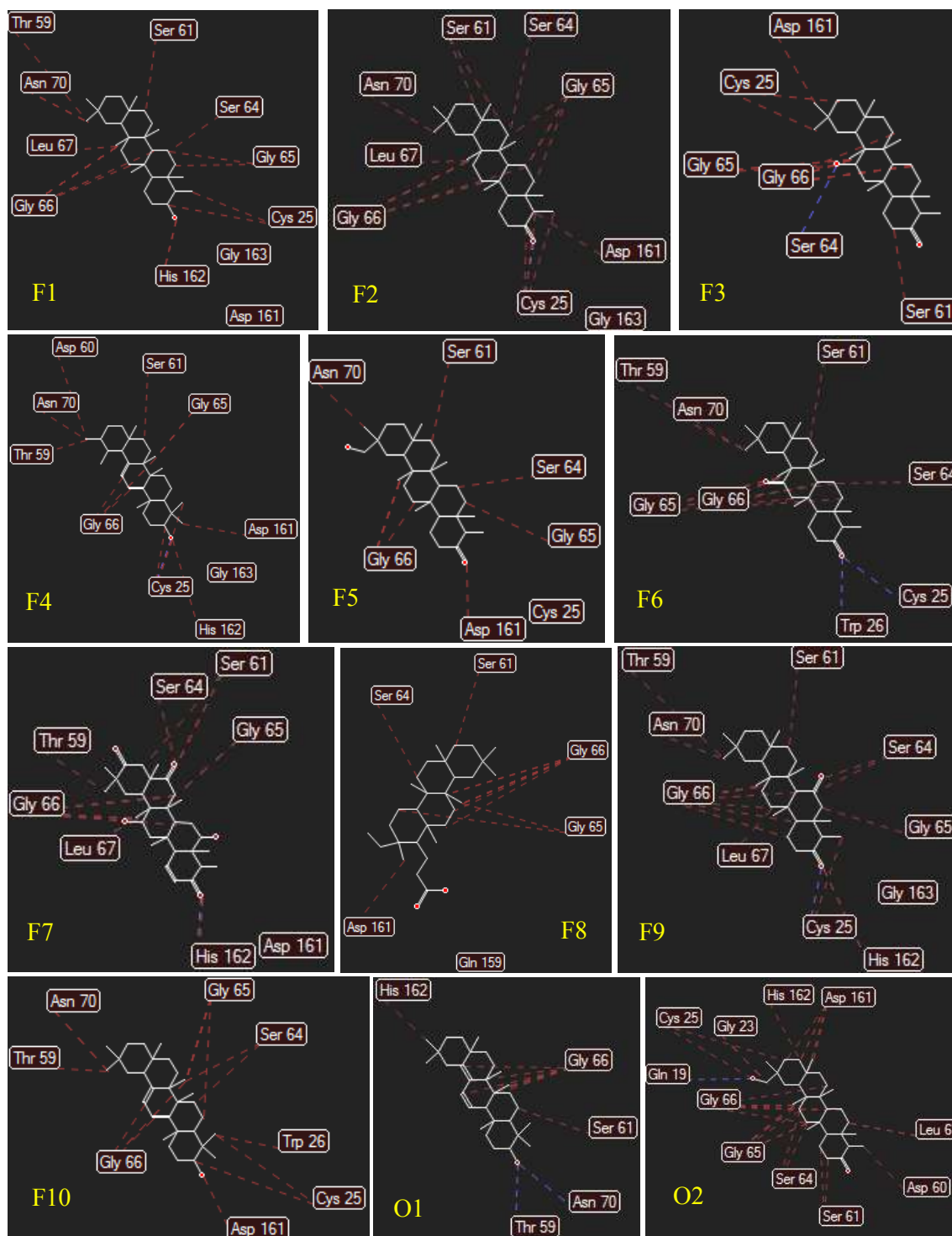


Figura 73: Pose de menor energia do ácido ursólico complexado com a cruzaina (a), e pontos de interação (ligação de hidrogênio, interações estérica) do composto com a enzima (b).

De acordo com levantamento bibliográfico realizado (Web of Science e SciFinder®), não há relatos de estudos da atividade tripanossomicida do composto 3 β -hidroxi-9,12-en-ursano (**U1**). Diversos trabalhos reportam o isolamento (OLIVEIRA et al., 2006b; SILVA et al., 2008), estudos frente a linhagens celulares de câncer (KAWEETRIPOB et al., 2012) e avaliação preliminar do potencial antitumoral (AKAZAWA et al., 2012).

Não foi possível observar qualquer relação energética entre as classes apresentadas ou grupamentos químicos (Figura 74), porém os triterpenos da classe lupano (**L1** e **L2**) mostraram os maiores valores de energia. O composto 6 β ,12 α -dihidroxi-friedelan-1-en-3,16,21-triona (**F7**), composto inédito de *Maytenus distichophylla*, mostrou-se com o quinto menor valor de energia, considerando os quinze compostos avaliados.



Continua...

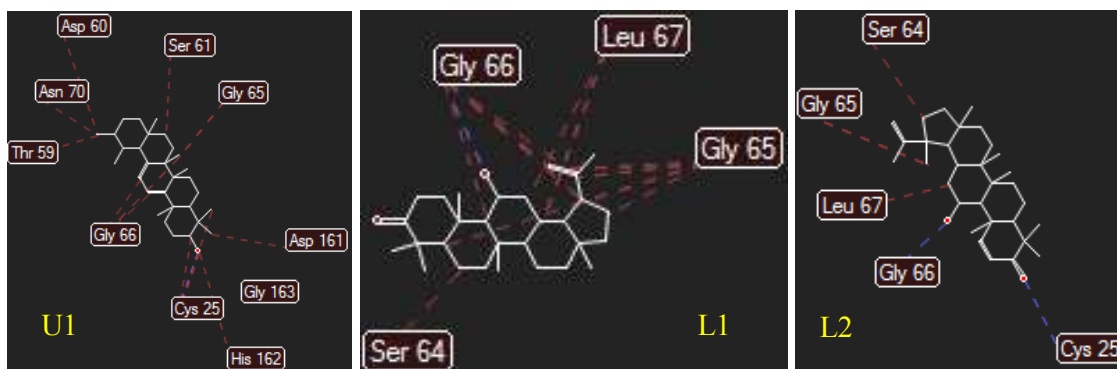


Figura 74: Poses dos complexos formados pelas interações dos compostos estudados com a cruzaina, sendo linhas tracejadas azuis - ligações de hidrogênio, e vermelhas - estéricas.

2.6.2.2 Complexos triterpeno-CYP2C9

Flurbiprofen complexado com a CYP2C9 apresentou energia de formação igual a 88,60 kcal/mol.

A Tabela 21 exibe os valores de energia de formação dos complexos triterpeno-CYP2C9.

Tabela 21: Energias de formação dos complexos triterpeno-CYP2C9.

Triterpeno	Moldock Score kcal/mol (Motohashi et al., 2013)	Triterpeno	Moldock Score kcal/mol (Motohashi et al., 2013)
F8	-95.39	F4	-70.32
F1	-79.95	F9	-68.72
F7	-76.42	F6	-67.97
F5	-76.29	F2	-62.73
U1	-75.26	O2	-61.73
F3	-73.45	L1	-17.03
O1	-70.51	L2	34.15
F10	-70.42		

Pode-se verificar na Tabela 21, que os compostos **F8** e **F1** apresentaram os menores valores de energia de formação. O triterpeno friedelano **F7**, composto inédito de *M. distichophylla*, foi a terceira estrutura química com melhor valor de energia (o terceiro

complexo mais estável).

Na Figura 75 pode ser visualizada a conformação do ligante na pose de menor energia, os compostos **F1** e **F8** complexados com a enzima, e as interações formadas entre os compostos e os resíduos do receptor (linha azul: ligação de hidrogênio; linha vermelha: interação estérica e linha verde: eletrostática - interação eletrônica entre átomos: um desprovido de elétrons e o outro muito eletronegativo).

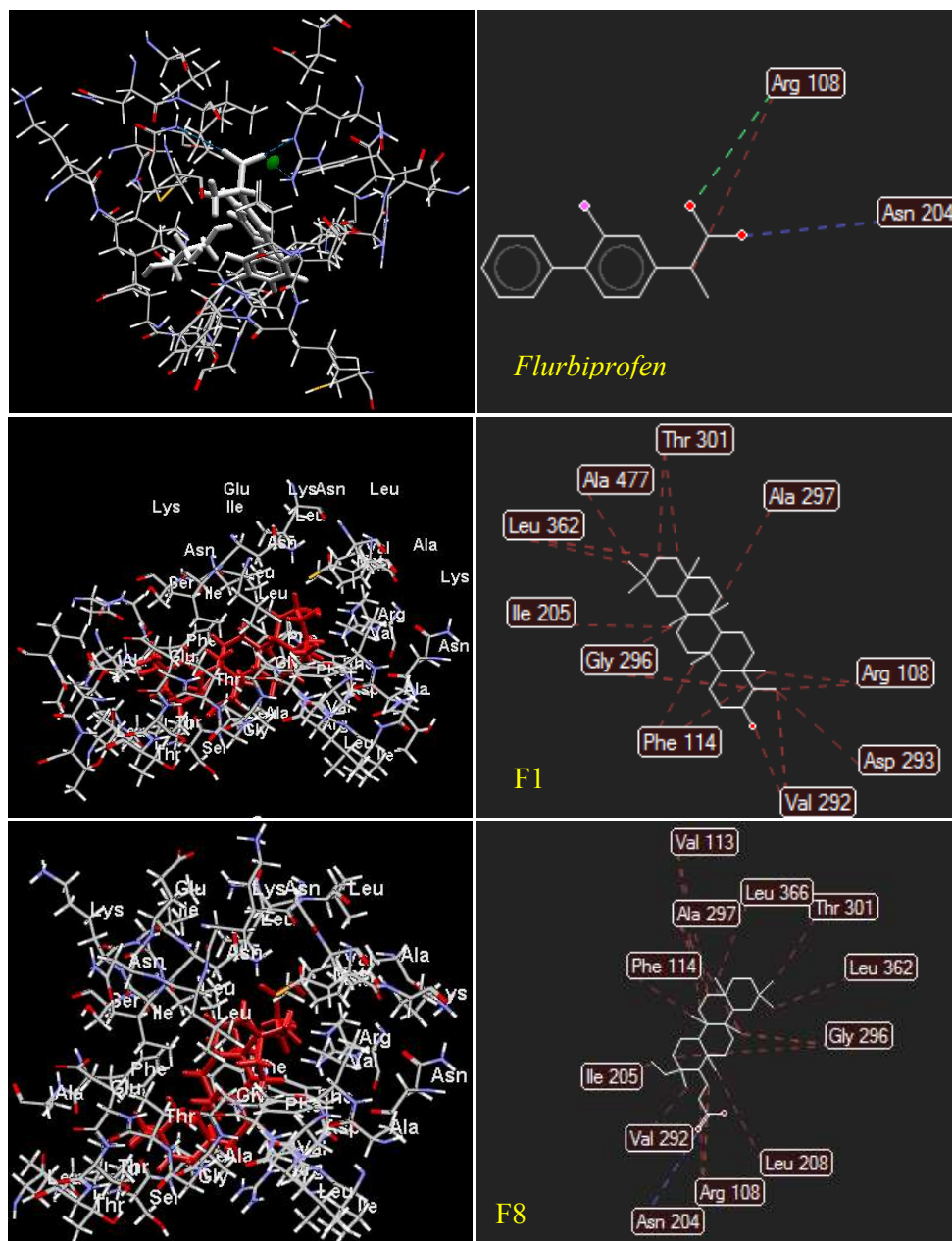


Figura 75: Pose de menor energia do *flurbiprofen* e compostos **F1** e **F8**.

O complexo formado entre o ácido 3,4-seco-friedelan-3-óico (**F8**) e a enzima P450 CYP2C9, de menor energia de formação, apresentou ligação de hidrogênio com o resíduo ASN204 e interação estérica com o resíduo ARG108 (Figura 75) como o *flurbiprofen* (WESTER et al., 2004). Wester e colaboradores (2004) relatam que ARG108 desempenha um papel importante na ligação do *flurbiprofen* com a enzima, e no complexo *flurbiprofen*-CYP2C9, a conformação de ARG108 é estabilizada por interações deste com os resíduos ASP293 e ASN 289.

Dados da literatura reportam o efeito citotóxico do ácido 3,4-seco-friedelan-3-óico (**F8**) sobre células hepatocarcinogênica HepG2, carcinoma epidermoidal A-431, inibidor da topoisomerase II (SETZER et al., 2000) e propriedade inibidora da acetilcolinesterase (SOUSA et al., 2012b).

Considerando estudos envolvendo o ácido ursólico e as CYPs (Kim et al., 2004), submetemos o ácido ursólico a *docking* nas mesmas condições dos compostos triterpenos investigados, observando a energia de formação quando complexado com a CYP2C9.

O ácido ursólico apresentou valor de energia igual a **-71,87 kcal/mol** (Figura 76). Diante dos 15 triterpenos em estudo, 9 compostos apresentaram valores energéticos mais favoráveis.

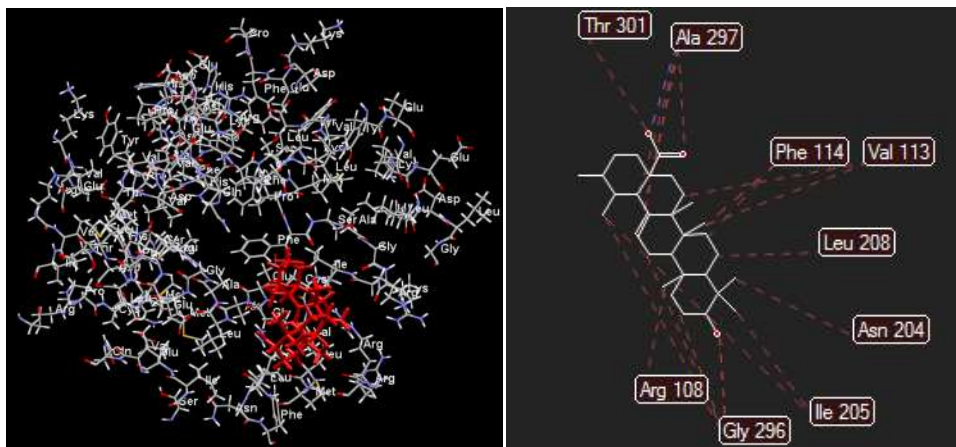
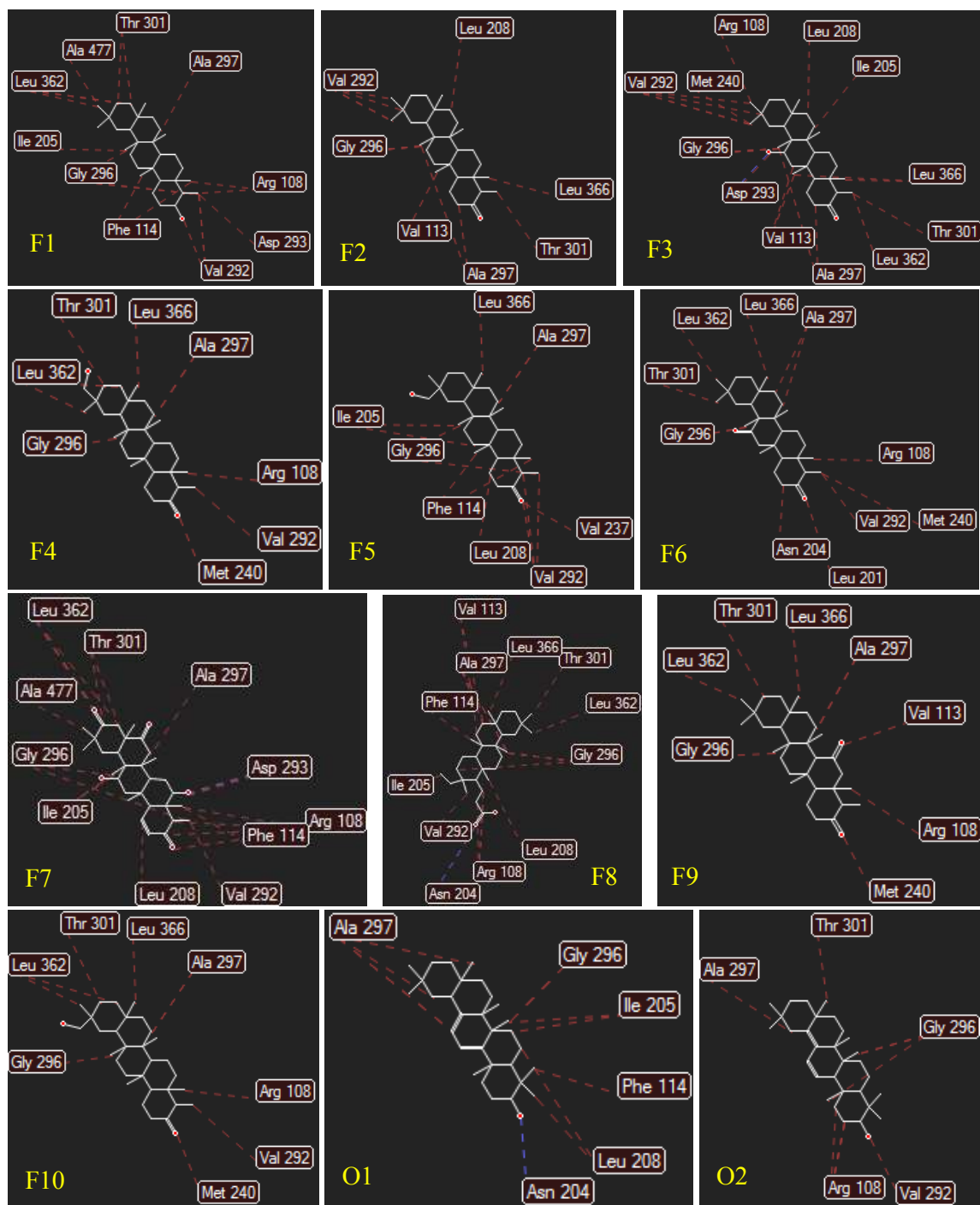


Figura 76: Pose de menor energia do ácido ursólico complexado com CYP2C9 (a), e pontos de interação (ligação de hidrogênio, interações estérica) do composto com a enzima (b).

Não foi possível observar qualquer relação entre as classes apresentadas ou grupamentos químicos, e seus valores de energia, exceto para os triterpenos da classe lupano, **L1** e **L2**, que novamente mostraram os maiores valores de energia (Figura 77).



Continua...

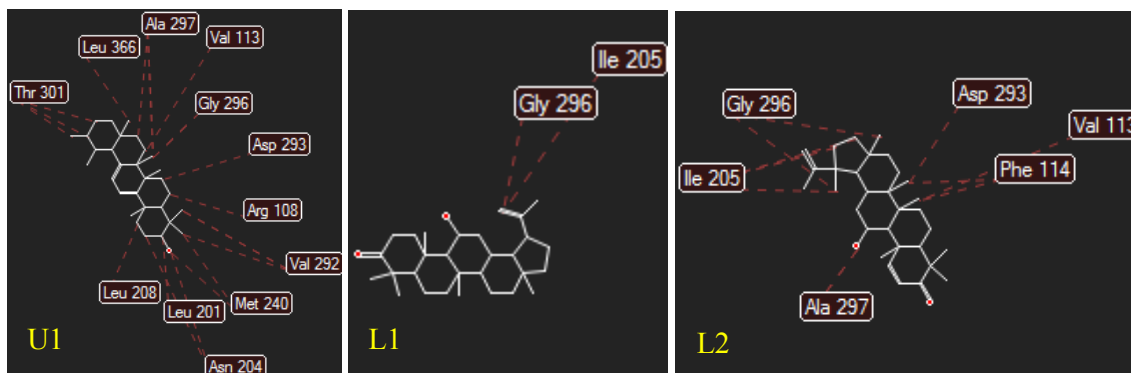


Figura 77: Interações dos compostos estudados com o CYP2C9, sendo linhas tracejadas azuis - ligações de hidrogênio, e vermelhas - estéricas.

2.6.2.3 Complexos triterpeno-ciclooxigenase

Taxane complexado com a ciclooxigenase apresentou energia de formação igual a 102,18 kcal/mol.

A Tabela 22 exibe os valores de energia de formação dos complexos triterpeno-ciclooxigenase, obtidos no estudo de *docking*.

Tabela 22: Energia de formação dos complexos triterpeno-ciclooxigenase.

Triterpeno	Moldock Score kcal/mol (Motohashi et al., 2013)	Triterpeno	Moldock Score kcal/mol (Motohashi et al., 2013)
F3	-92,26	F5	-69,14
F8	-84,56	F7	-67,90
F2	-80,54	O2	-67,77
F1	-75,39	F9	-66,07
F6	-73,16	O1	-64,66
U1	-72,45	L1	18,79
F10	-71,94	L2	53,81
F4	-71,82		

Pode-se verificar na Tabela 22 que os compostos **F3** e **F8** exibiram os menores valores de formação do complexo.

Na Figura 78 podemos visualizar a conformação do ligante na pose de menor energia,

os compostos **F3** e **F8** complexados com a enzima, e as interações formadas entre os compostos e os resíduos do receptor (linha azul: ligação de hidrogênio; linha vermelha: interação).

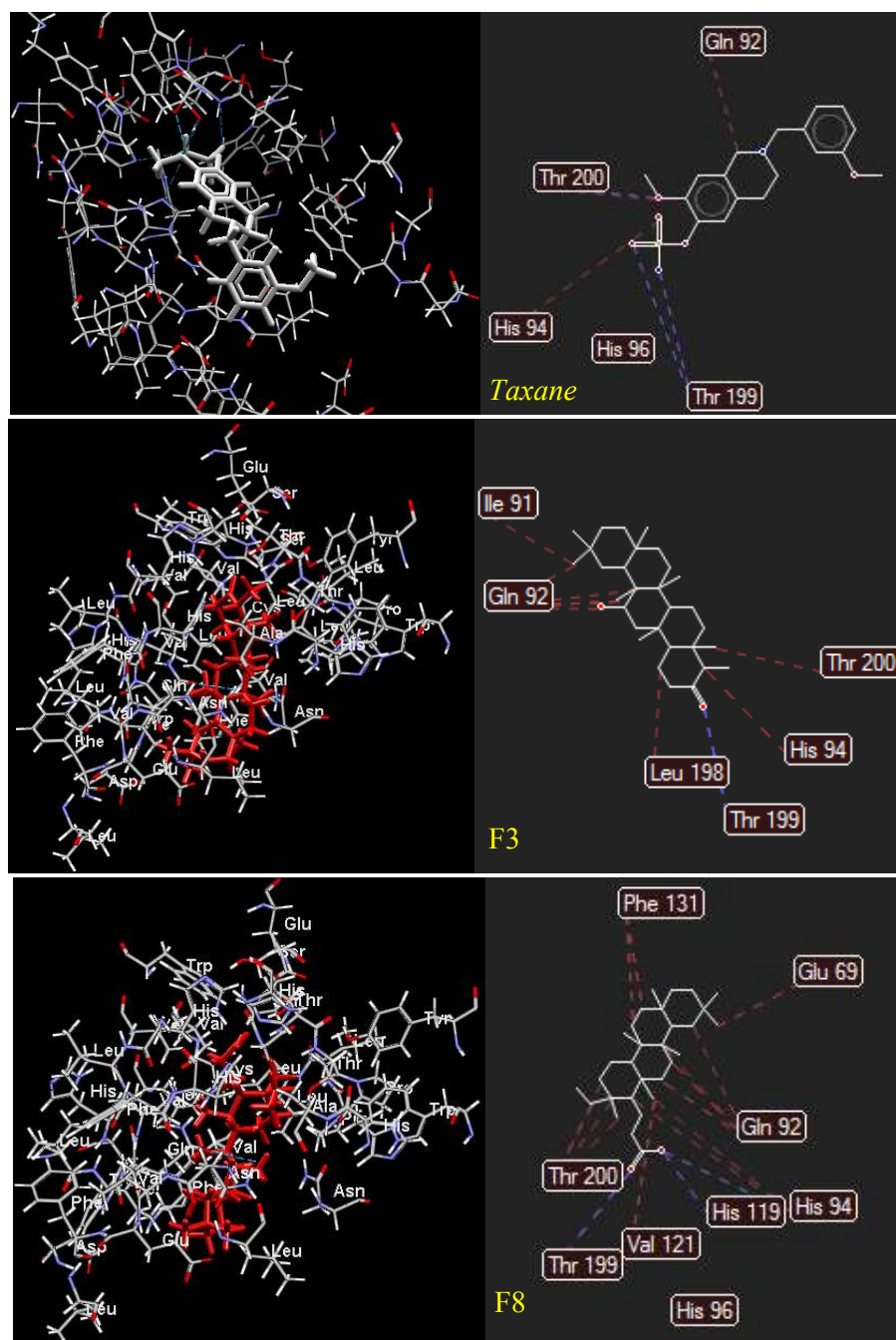


Figura 78: Pose de menor energia do *taxane* e compostos F3 e F8.

O complexo formado, entre o 3-oxo-12 α -hidroxifriedelano (**F3**) e a enzima ciclooxigenase, apresentou ligação de hidrogênio com o resíduo THR199 e interação estérica

com os resíduos THR200, HIS94 e GLN92 (Figura 78), como o *taxane* (LEESE et al., 2010).

A literatura reporta o envolvimento de triterpenos na inibição de COX-1 e COX-2 (RAMÍREZ-CISNEROS et al., 2012; FU et al., 2010; AN et al., 2011; SHIN et al., 2010; VITOR et al., 2009; MEDEIROS et al., 2007; ZHANG et al., 2005). Dados sobre 3-oxo-12 α -hidroxifriedelano reportam sobre avaliação da atividade antibacteriana e atividade antifúngica (XIE et al., 2013; SILVA et al., 2011a).

Tendo observado estudo de *docking* e experimentos *in vivo* relataram uma forte afinidade do ácido ursólico sobre COX-2 (MAURYA et al., 2012), e a supressão de COX-2 pelo ácido ursólico (LEE et al., 2008), submetemos esta estrutura química (ácido ursólico) a *docking*, nas mesmas condições de estudo dos compostos triterpênicos aqui analisados, afim de comparar os resultados obtidos (Figura 79).

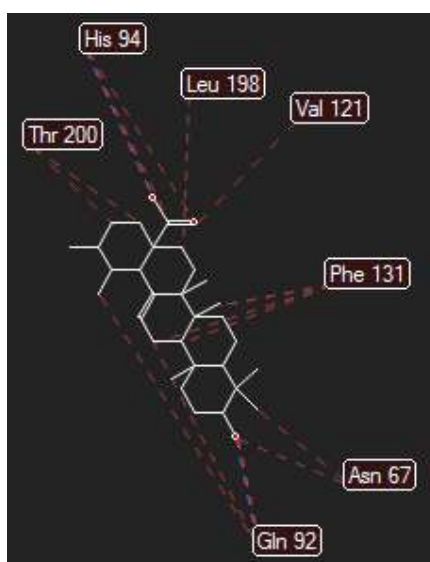


Figura 79: Pose de menor energia do ácido ursólico complexado com ciclooxygenase

Apesar do ácido ursólico ter apresentado interações com os resíduos HIS94 e THR200, similar ao *taxane* (Figura 78), o ácido ainda sim apresentou energia de formação igual a **-87,74 kcal/mol**, valor este, superior ao 3-oxo-12 α -hidroxifriedelano (**-92.26 kcal/mol**). Diante dos resultados, podemos verificar que o 3-oxo-12 α -hidroxifriedelano, ainda se destaca, com menor valor de energia de formação, mostrando-se o ácido ursólico como o segundo melhor composto avaliado, dentre todos os triterpenos em estudo.

Não foi possível observar qualquer relação entre as classes apresentadas ou grupamentos

Figure 1 displays 12 panels (F1-O2) illustrating different hydrogen bonding networks between a steroid molecule and various amino acid residues. The residues involved in the interactions are labeled in boxes: Ile 91, Gln 92, Thr 200, His 94, Thr 199, His 119, Phe 131, Leu 198, His 119, His 94, Thr 199, Thr 200, His 94, His 119, His 96, Phe 131, Thr 200, His 94, Thr 199, His 94, Leu 198, Thr 199, His 94, Thr 200, Phe 131, Glu 69, Gln 92, Thr 200, His 119, His 94, Val 121, His 96, Thr 199, Thr 200, His 94, Thr 199, His 94, Thr 200, Leu 198, Val 121, Thr 199, Thr 200, Leu 198, Val 121, Thr 199.

145

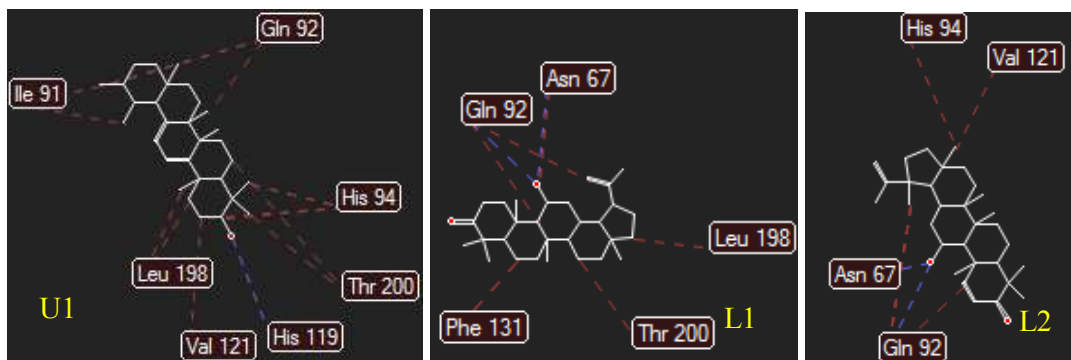


Figura 80: Interações dos compostos estudados com o ciclooxigenase, sendo linhas tracejadas azuis - ligações de hidrogênio, e vermelhas - estéricas.

2.6.3 Partial Least Squares (PLS)

2.6.3.1 Diterpenos

Após validação interna por LOO e seleção de variáveis por *Fractional Factorial Design* (Box et al, 2005), o melhor modelo foi formado por 89 variáveis, três variáveis latentes e apresentou $q^2=0,81$ e $r^2=0,99$.

A predição para a atividade farmacológica, foi realizada utilizando um modelo PLS construído.

Os valores experimentais e preditos do conjunto teste estão plotados na Tabela 23.

Tabela 23: Valores experimentais e preditos do conjunto teste.

Composto	pIC ₅₀ Experimental	pIC ₅₀ Predito
2	4,43	4,55
8	3,91	3,98
11	4,15	4,92
15	4,80	5,10
22	4,12	4,20
24	4,08	4,33
26	3,80	3,53

Após submeter os diterpenos do estudo ao modelo PLS construído, foram obtidos os valores preditos da atividade antitumoral mostrados na Tabela 24.

Tabela 24: Valores predito da atividade antitumoral de diterpenos isolados de *Xylopia langsdorffiana*

Compostos	Predição da Atividade (pIC ₅₀)
Ácido <i>ent</i> -7 α -acetoxitraquiloban-18-óico (T1)	4,49
Ácido <i>ent</i> -7 α -hidroxitraquiloban-18-óico (T2)	4,29
Ácido <i>ent</i> -traquiloban-18-óico (T3)	4,41
7 α ,18-dihidroxitraquilobano (T4)	4,34
Ácido <i>ent</i> -atisan-16 α -ol-18-óico (A1)	4,13
<i>Ent</i> -atisan-7oxo-16 α -ol (A2)	4,04
<i>Ent</i> -atisan-7 α -16 α -diol (A3)	3,88
<i>Ent</i> -atisan-7 α -acetoxi-16 α -ol (A4)	4,13
Ácido <i>ent</i> -caur-16-en-19-óico (K1)	4,45
<i>Ent</i> -caur-16-en-19-ol (K2)	4,13
<i>Ent</i> -caur-16 β -ol (K3)	3,97
<i>Ent</i> -3 β ,19-dihidroxicaur-16-ene (K4)	4,11
Ácido 8(17),12<i>E</i>,14-labdatrien-18-óico (LAB1)	4,69
Ácido labdorffiânico A (LAB2)	4,40
Ácido 13-epicuprêssico (LAB3)	4,40
Ácido labdorffiânico B (LAB4)	4,38
Ácido labdorffiânico C (LAB5)	4,73

As moléculas que se destacaram na predição da atividade antitumoral foram **LAB1** e **LAB5**, ambas diterpeno do tipo labdano.

Ácido labdorffiânico C (**LAB5**) é um composto novo na literatura, isolado pela primeira vez dos frutos de *Xylopia langsdorffiana* (DARTE, 2013). Não há relatos de avaliação de atividades com **LAB5**, no entanto, há relatos de atividade antitumoral com diterpenos do tipo lábdano, naturais ou modificados, frente a HL-60 (WU et al., 2013), HEP-2, HT-29, MKN-45, MCF-7, HeLa (FRANCO et al., 2011), HL-60, SMMC-7721 (CHEN et al., 2011), A-549, MCF-7, HeLa (SURESH et al., 2010).

Ácido 8(17),12*E*,14-labdatrien-18-óico (**LAB1**), um dos destaques na predição da atividade antitumoral, apresenta de acordo com a literatura, atividade vasorrelaxante (OLIVEIRA et al., 2006a), citotoxicidade moderada frente as linhagens celulares tumorais humanas HEP-2, HT-29, MKN-45, MCF-7 e HeLa (FRANCO et al., 2011), indução da diferenciação de células leucêmicas humanas HL60 e K562 (CASTELO-BRANCO et al., 2009) e baixa toxicidade sobre células V79 e hepatócitos (TAVARES et al., 2007b).

Os compostos que apresentaram os menores valores na predição da atividade foram *ent-caur-16 β -ol* (**K3**) e *ent-atisan-7 α -16 α -diol* (**A3**).

Não foi possível relacionar os tipos de esqueletos dos diterpenos com os valores obtidos da atividade, exceto para os dois compostos que se destacaram **LAB1** e **LAB5**, ambos diterpenos do tipo labdano.

2.6.3.2 Triterpenos

Na análise PLS, empregando o programa Pentacle v.1.052, o melhor modelo foi obtido com três variáveis latentes e 121 variáveis, obtidas após emprego do método de seleção FFD. O modelo exibiu boa qualidade estatística e coeficiente preditivo ($q_{cv}^2=0,78$; $r^2=0,99$). A predição para a atividade anticâncer, expressa contra células A-549 (adenocarcinoma de pulmão humano), foi realizada utilizando um modelo PLS construído.

Após a análise dos triterpenos ao modelo PLS construído, foram obtidos os valores preditos da atividade antitumoral conforme Tabela 25.

Tabela 25: Valores predito da atividade antitumoral de triterpenos isolados de espécies do gênero *Maytenus*.

Compostos	Predição da Atividade (pIC ₅₀)
3β-hidroxifriedelano (F1)	8,55
3-oxo-friedelano (F2)	7,13
3-oxo-12 α -hidroxifriedelano (F3)	5,29
3-oxo-29-hidroxifriedelano (F4)	5,54
3-oxo-30 β -hidroxifriedelano (F5)	7,29
3,12-dioxo-friedelano (F6)	6,37
6 β ,12 α -dihidroxi-friedelan-1 en -3,16,21-triona (F7)	4,57
Ácido 3,4-seco-friedelan-3-óico (F8)	6,52
7-oxofriedelina (F9)	6,41
3-oxo-29-hidroxifriedelano (F10)	7,31
3β-hidroxi-9,12-en-oleanano (O1)	7,90
3 β -hidroxi-11, 13-en-oleanano (O2)	7,72
3 β -hidroxi-9, 12-en-ursano (U1)	7,28
Rigidenol (L1)	5,35
11 α -hidroxigloquidona (L2)	6,56

As moléculas que se destacaram na predição da atividade antitumoral foram **F1** e **O1**, triterpenos do tipo friedelano e oleanano, respectivamente.

De acordo com a literatura, 3 β -hidroxifriedelano (**F1**), demonstra atividade citotóxica promissora frente a linhagens de células cancerígenas, HeLa, CEM-SS, A431, atividade moderada frente a MCF-7, células leucêmicas e carcinoma de esôfago, inatividade, ou fraca atividade, frente a MRC-5, HCT-8, SF-295, MDA-MB-435, TK-10, UACC-62, NCI-H460, SF-268 (UTAMI et al., 2013; LÖFFLER et al., 2011; KANDU et al., 2000; CHEN et al. 2014; OLIVEIRA et al., 2012; MOITEIRO et al., 2001), além de não inibir a enzima α -Glicosidase (KIEM et al., 2013), e inibir de forma moderada a COX-1 (KIM et al., 2012).

Apesar dos dois compostos em destaque (**F1** e **O1**), apresentarem grupamento do tipo OH no carbono 3, não foi possível observar relação da predição da atividade com a presença de grupamentos químicos, já que outras estruturas apresentam a mesma substituição química. Também não foi possível relacionar o tipo de esqueleto triterpênico, exceto para os compostos que apresentaram menores valores de predição da atividade antitumoral, **F7** (6 β ,12 α -dihidroxifriedelan-1 α ,3,16,21-triona) e **F3** (3-oxo-12 α -hidroxifriedelano), ambos do tipo friedelano.

2.6.3.3 Atividade microbiológica X Composição química

Após análise discriminante dos mínimos quadrados parciais (PLS-DA), foi possível visualizar quais fragmentos, ou os referidos compostos, contribuem positivamente para a atividade moduladora dos óleos essenciais associado aos antibióticos estudados.

As Figura 81 e a Figura 85 mostra os gráficos de *scores* e *loading* dos óleos essenciais das folhas (F_A, F_B, F_C), miolo raiz (M_R_A, M_R_B), miolo caule (M_C_A, M_C_B, M_C_C), casca raiz (C_R_A, C_R_B, C_R_C) e casca caule (C_C_A, C_C_B, C_C_C) dos três espécimes de *X. langsdorffiana*. No gráfico de *scores* pontos azuis representam os óleos essenciais com atividade moduladora não significativa, e os pontos vermelhos os óleos essenciais com atividade moduladora significativa frente as cepas, com $p < 0,05$, $p < 0,01$ e $p < 0,001$.

Na Figura 81 temos os gráficos PLS dos óleos essenciais modulados com amicacina frente a cepas de *P. aeruginosa*, e na Figura 82 os gráficos PLS dos óleos essenciais modulados com gentamicina frente a cepas de *S. aureus*. De acordo com o gráfico de *loading* (Figura 81, Figura 82), os fragmentos que contribuem positivamente para as referidas atividades microbiológica, apresenta tempo de retenção 7,7 min, identificado como pseudocumeno. O composto representa de 0 a 26,1% da composição química dos óleos essenciais, com destaque

para os óleos essenciais da casca raiz de A, B e C, com porcentagens de 20,5, 20,9 e 26,1%, respectivamente.

Para os óleos essenciais modulados com gentamicina frente a *S. aureus* (Figura 82), o único que apresentou atividade significativa foi casca raiz do espécime C. A modulação do óleo com o antibiótico resultou em um sinergismo, potencializando em 2x a atividade. A atividade pode estar relacionada aos compostos majoritários, pseudocumeno, ou a ação combinada de todos as substâncias que compõe o óleo essencial da casca raiz do espécime C.

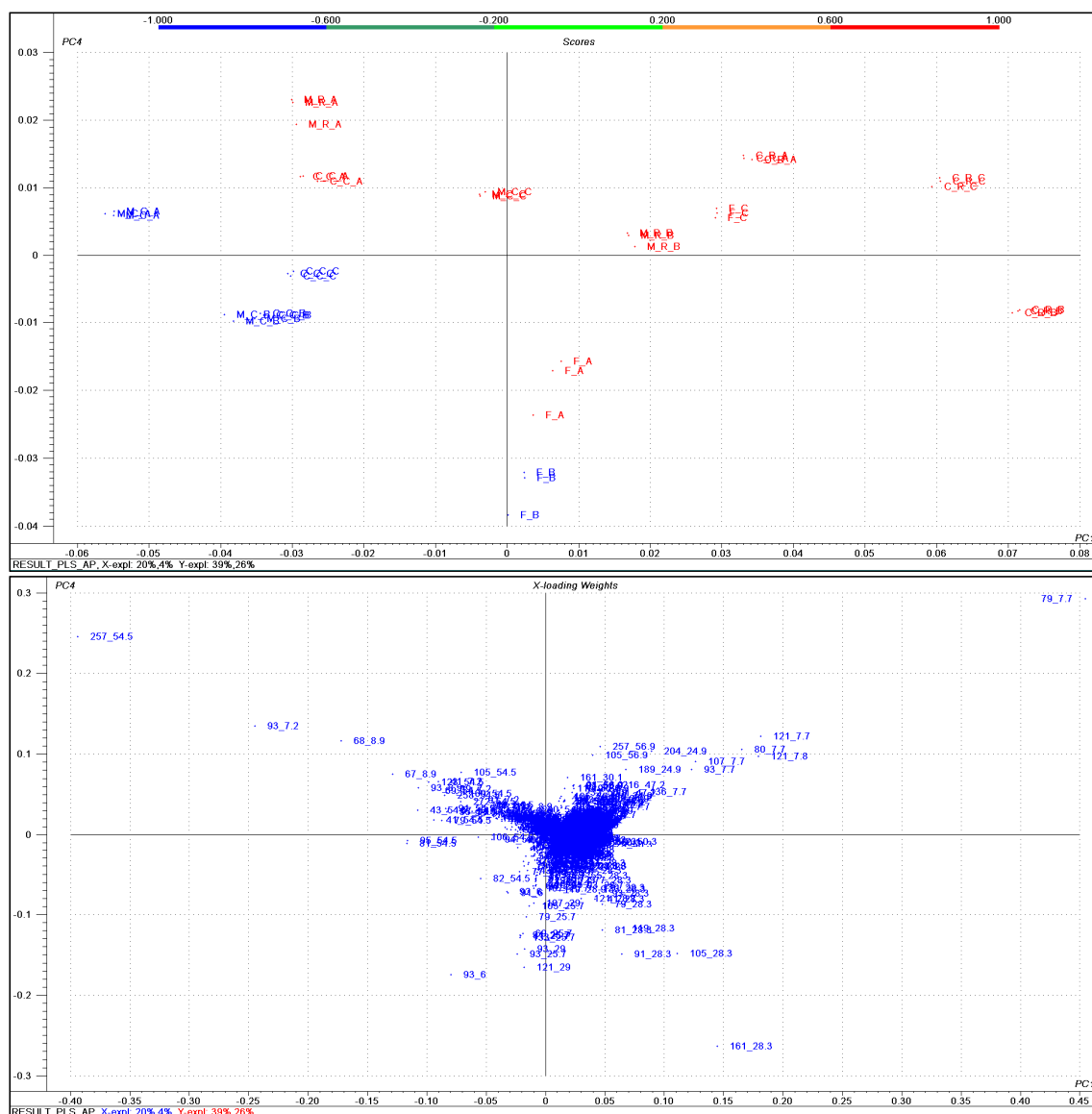


Figura 81: Modulação dos óleos essenciais com amicacina frente a *P. aeruginosa*, gráfico de scores e loading.

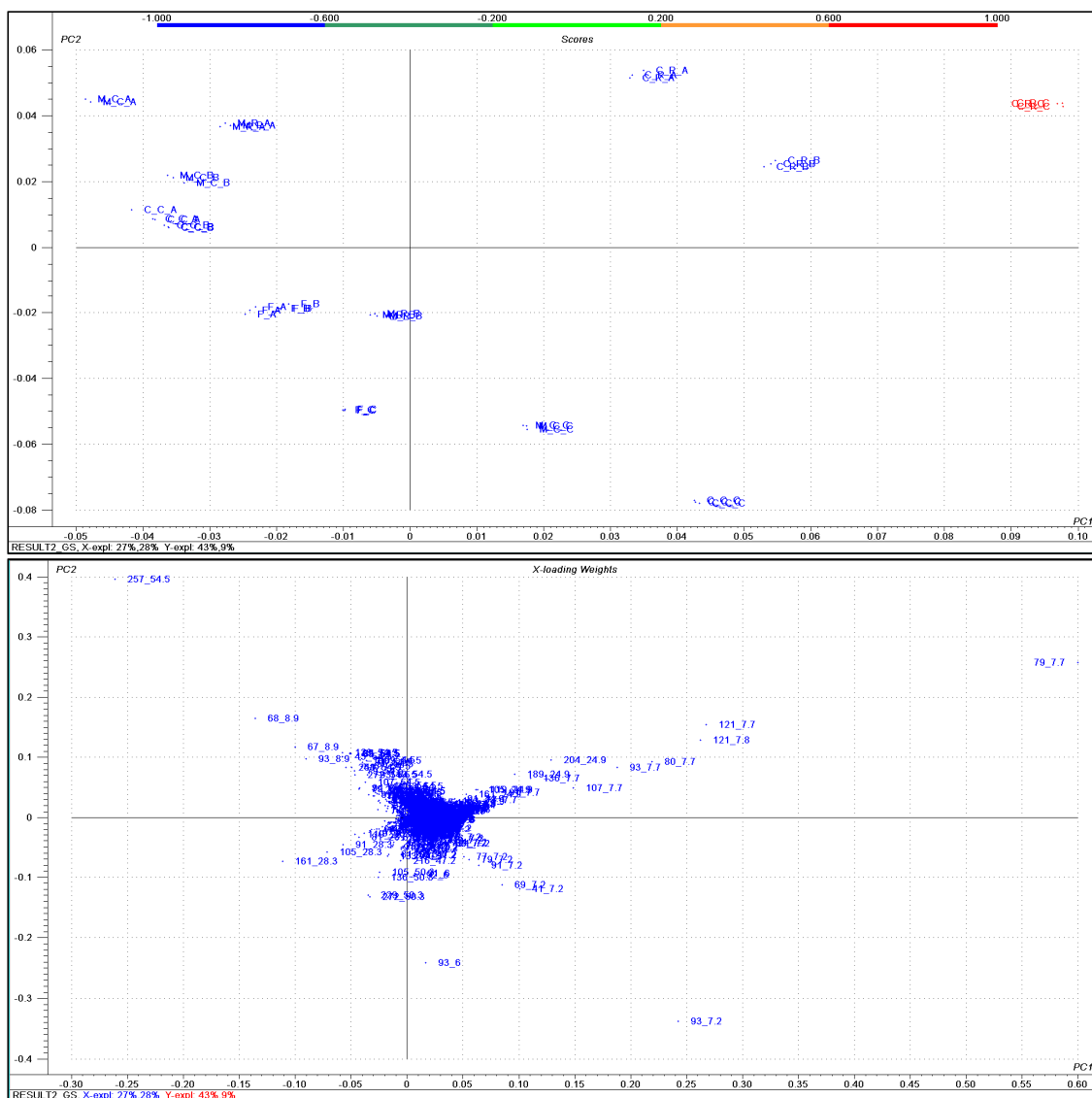


Figura 82: Modulação dos óleos essenciais com gentamicina frente a *S. aureus*, gráfico de scores e loading.

Na Figura 83 temos os gráficos PLS dos óleos essenciais modulados com gentamicina frente a cepas de *P. aeruginosa*. De acordo com o gráfico de *loading* (Figura 83), os fragmentos que contribuem positivamente para a atividade microbiológica correspondem ao composto presente nos tempos de retenção 7,7 min e 8,9 min, correspondendo respectivamente ao pseudocumeno e limoneno.

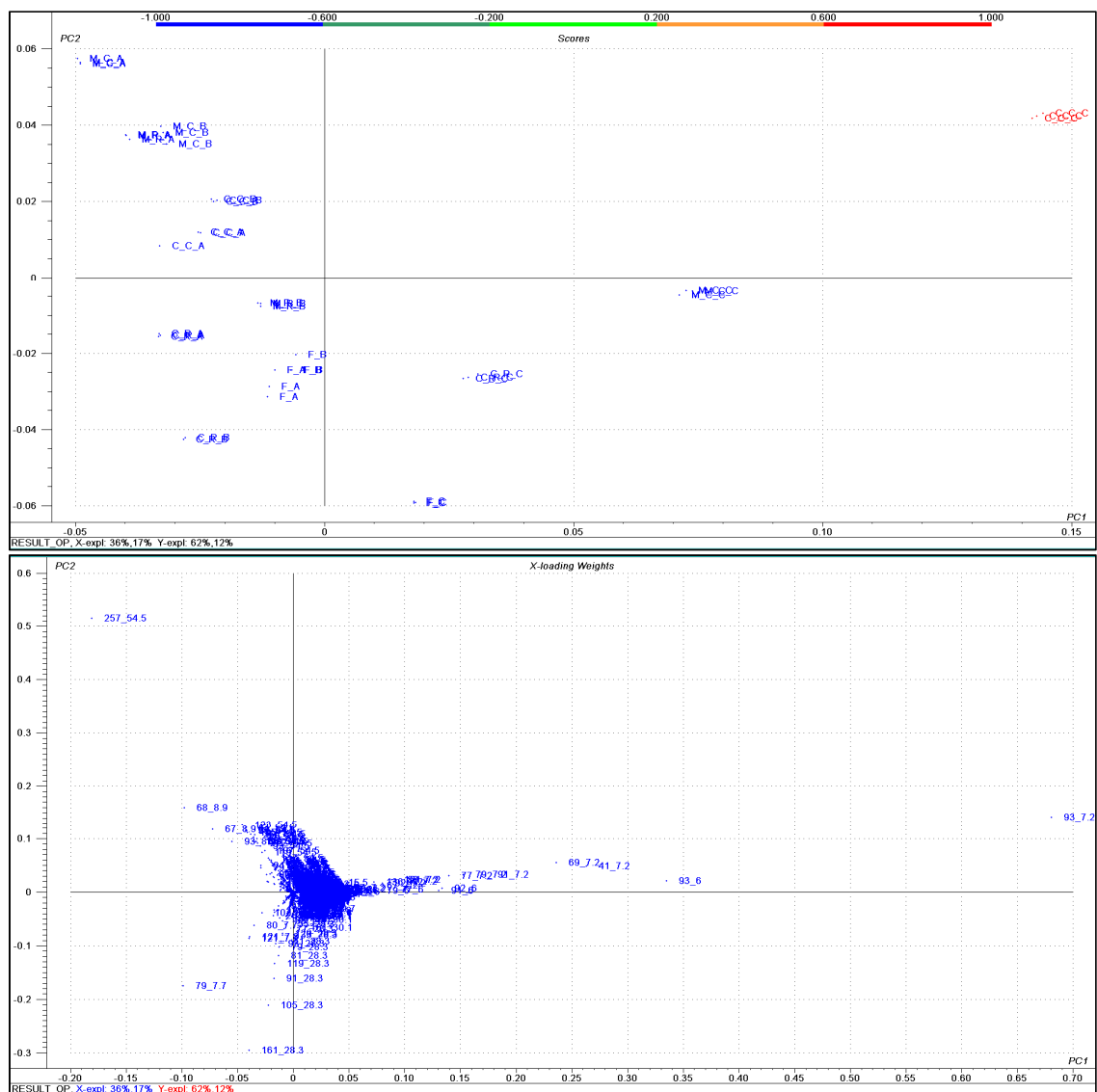
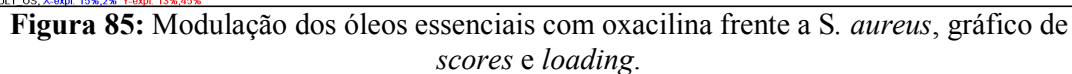


Figura 84: Modulação dos óleos essenciais com oxacilina frente a *P. aeruginosa*, gráfico de scores e loading.

A presença do *ent*-atisan-16 α -ol, com tempo de retenção em 54,5 min, contribuiu para a atividade moduladora dos óleos essenciais associado a oxacilina, frente a *S. aureus*. Os fragmentos pertencentes ao *ent*-atisan-16 α -ol podem ser visualizados nos gráficos de *loading* na Figura 85.



Os coeficientes de partição ($\log P$) dos terpenos que se destacaram nos estudos de *docking* estão plotados na Tabela 26.

Tabela 26: Valores de *logP* para os diterpenos e triterpenos

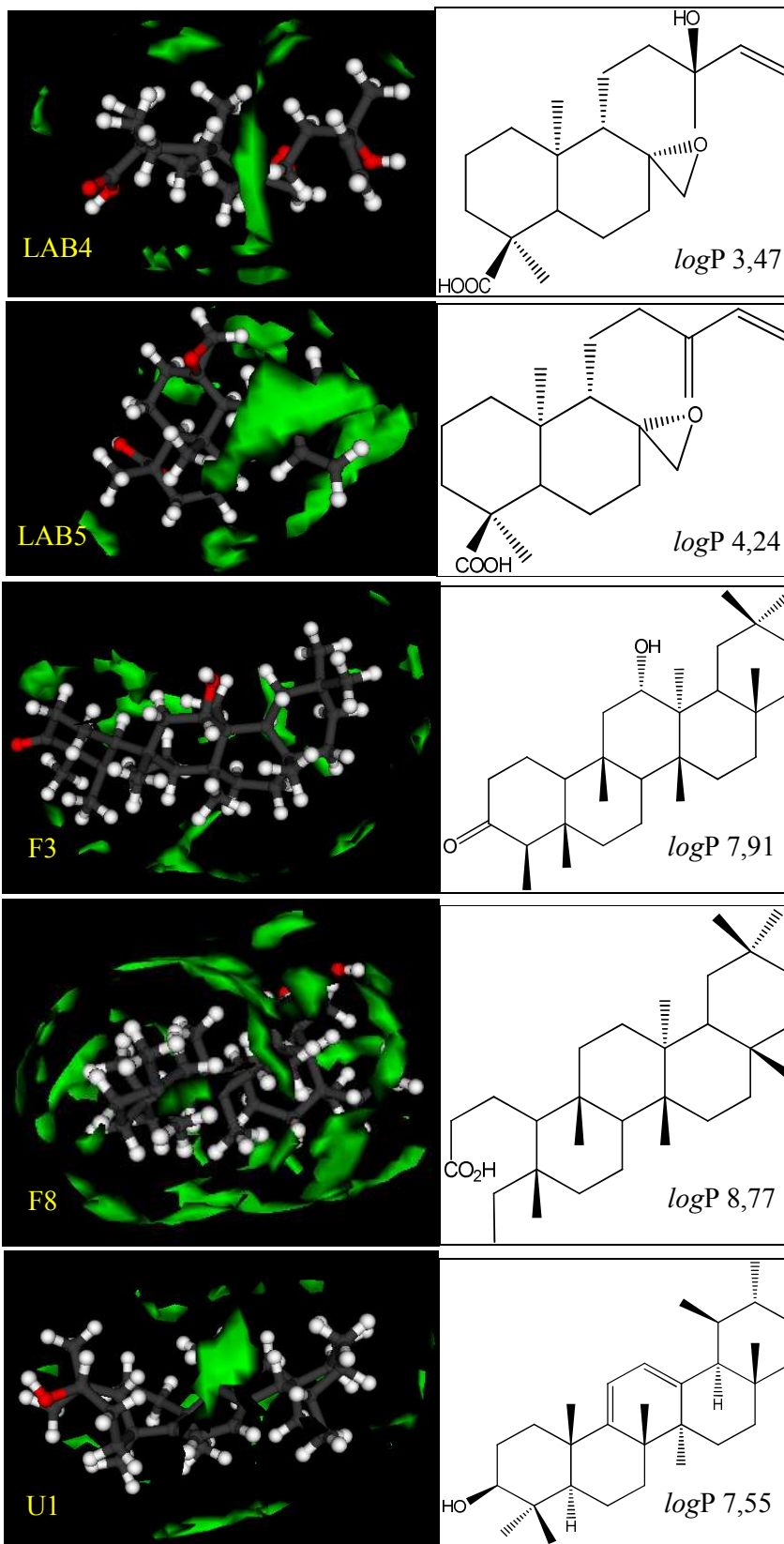
Composto		Lipofilicidade (<i>logP</i>)
DITERPENOS	<i>Ent</i> -atisan-7 α -acetoxi-16 α -ol (A4)	7,55
	Ácido labdorffiânico B (LAB4)	3,47
	Ácido labdorffiânico C (LAB5)	4,24
TRITERPENOS	Ácido ursólico (AU)	7,21
	3 β -hydroxy-9, 12-en-ursane (U1)	7,55
	3-oxo-12 α -hidroxifriedelano (F3)	7,91
	Ácido 3,4-seco-friedelan-3-óico (F8)	8,77

Lipinski et al (1997), descrevem parâmetros, conhecidos como ‘regra dos 5’, que devem ser associados a solubilidade e permeabilidade. Dentre estes tem-se o Log P, afirmando a regra que a má absorção ou penetração de fármacos é mais provável quando o Log P não é maior que 5.

Considerando o parâmetro Log P descrito pela ‘regra dos 5’, e os resultados apresentados na Tabela 26, pode-se observar que os compostos diterpênicos, com valores de lipofilicidade menores que cinco, 3,47 (**LAB4**) e 4,24 (**LAB5**), serão melhor absorvidos e desencadearão atividades biológicas.

Lipinski (2004) relata que as citações a ‘regra dos 5’ no CAS SciFinder será superior a 1000 até o final de 2004. Isto retrata a importância desses parâmetros para desenvolvimento de novos fármacos que apresentem boa absorção e consequentemente atividade biológica.

Na Figura 86 podemos visualizar as regiões hidrofóbicas dos compostos.



Continua...

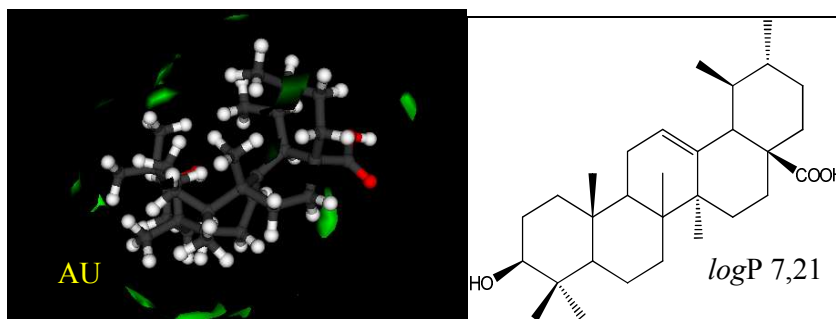


Figura 86: Lipofilicidade de diterpenos e triterpenos, com regiões hidrofóbicas destacadas em verde.

2.6.5 Análise de componentes principais (*Principal Component Analysis (PCA)*)

O PCA é muito empregado nas análises de “fingerprints” de metabólitos (BAILEY et al., 2003; DEFERNEZ & COLQUHOUN, 2002; LINDON, HOLMES & NICHOLSON, 2001). É possível sumarizar a informação contida em grandes quantidades de dados espectrais, transformando como mencionado anteriormente as variáveis originais em uma série muito menor de variáveis (componentes). Estas novas variáveis são as combinações das variáveis originais, explicando a maior variância possível e removendo as redundâncias existentes.

Análises cromatográficas das partes dos três espécimes de *X. langsdorffiana* foram submetidas à técnica de Análise de Componente Principal (PCA), separadamente, considerando os valores de integrais de área de cada fragmento e respectivo tempo de retenção. As figuras seguintes mostram a análise multivariada dos resultados da análise de cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas dos três espécimes.

As variâncias explicadas e cumulativas para cada uma das componentes (PC1 e PC2), são mostrados na Tabela 27.

Tabela 27: Variância explicada e cumulativa das componentes.

Espécime A, B, C ¹	Variância explicada (%)		Variância cumulativa (%)
	PC1	PC2	PC1 + PC2
Folha	83%	16%	99%
Casca do caule	97%	2%	99%
Casca da raiz	71%	29%	100%
Miolo do caule	84%	13%	97%
Miolo da raiz	68%	29%	97%

¹: Variância explicada e cumulativa de uma mesma análise que inclui partes iguais dos três espécimes diferentes.

Verificando o gráfico de *loadings* das **folhas** dos três espécimes, percebe-se que os fragmentos m/z 161 e m/z 105, referentes ao composto Germacreno D, tem contribuição positiva para PC1 nas amostras do indivíduo C. O *ent*-atisan-16 α (m/z 257) contribuiu negativamente para PC1 nas amostras do espécime A e B (Figura 87).

No gráfico de *loadings* e *scores*, **casca do caule** (espécime A, B e C), podemos perceber a contribuição do β -pineno (m/z 93) para o indivíduo C, do limoneno (m/z 68, m/z 67 e m/z 93) para o indivíduo B, e do *ent*-atisan-16 α (m/z 257) para o indivíduo A (Figura 88).

Em relação a **casca da raiz** (Figura 89) observa-se que o *ent*-atisan-16 α (m/z 257) e o Limoneno (m/z 79) contribuem positivamente para PC2 no espécime A. Os fragmentos com tempo de retenção 50,4 (substância não identificada) contribuem negativamente na PC1 para o indivíduo B, e o β -pineno (m/z 93), juntamente com o pseudocumeno (m/z 79) contribuem positivamente na PC1 para o indivíduo C.

Nas análises realizadas com o **miolo do caule**, *ent*-atisan-16 α (m/z 257) contribui de forma positiva na PC1 para o indivíduo A, o limoneno (m/z 68, m/z 67 e m/z 93) contribui de forma negativa na PC2 para o indivíduo B, e o α -pineno e β -pineno, contribuíram de forma negativa na PC1 para o indivíduo C (Figura 90).

No gráfico de *scores* e *loadings*, do **miolo da raiz**, o *ent*-atisan-16 α (m/z 257) contribui de forma positiva na PC1 para o indivíduo A, o fragmento m/z 272 no tempo de retenção 50,4, contribui de forma positiva na PC2 para o indivíduo B, e os fragmentos com tempo de retenção em 46,4 e 56,4 contribuem de forma negativa na PC2 para o indivíduo C (Figura 91).

De acordo com a observações citadas acima as amostras das folhas, casca do caule, casca raiz, miolo do caule e miolo da raiz, dos três espécimes aparecem diferenciadas em 3 grupos distintos, mostrando que os indivíduos apresentam composição química distinta.

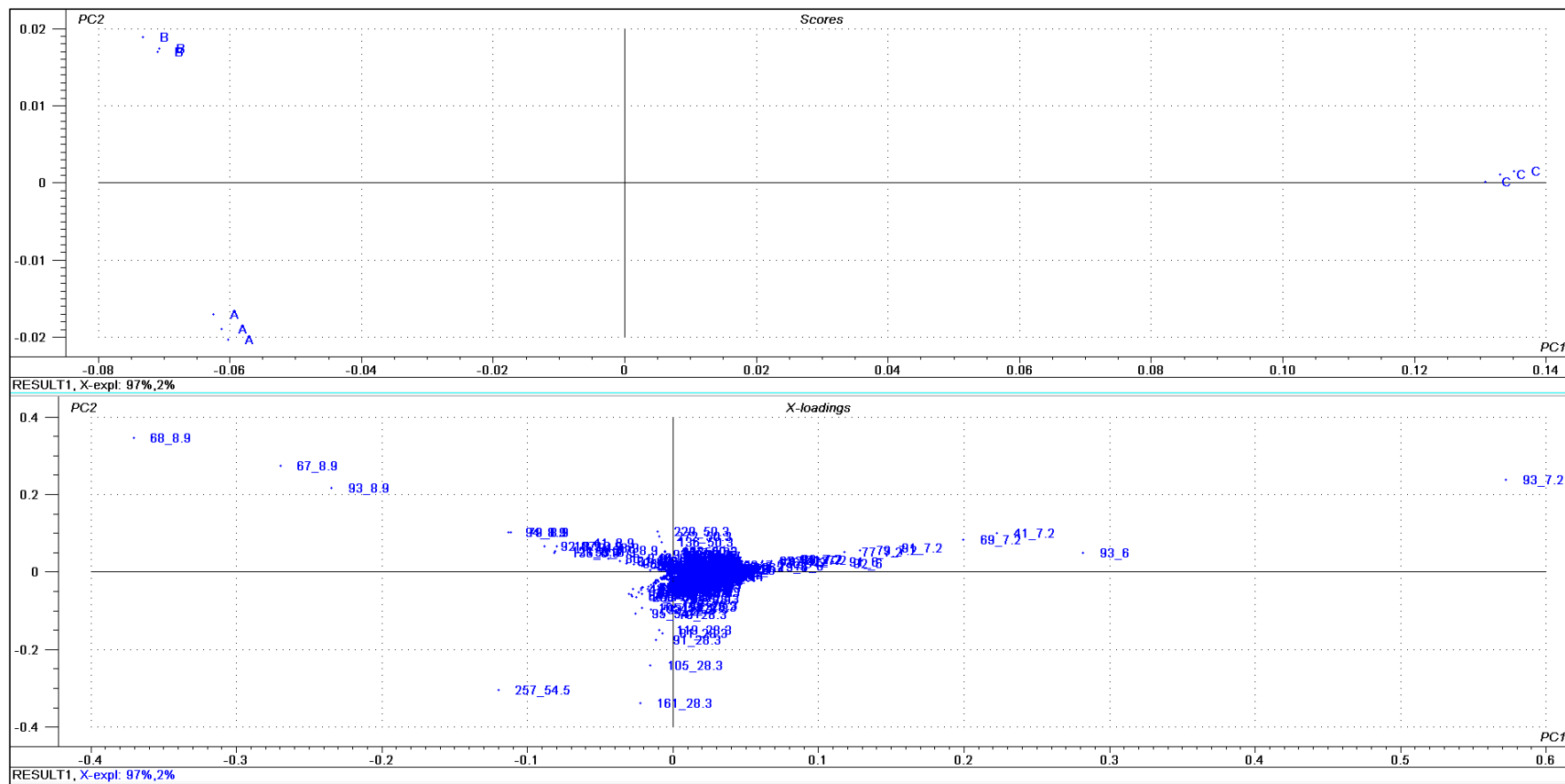


Figura 88: Gráficos dos *scores* e *loadings* de PC1 e PC2 para casca do caule dos espécimes A, B e C de *X. langsdorffiana*.

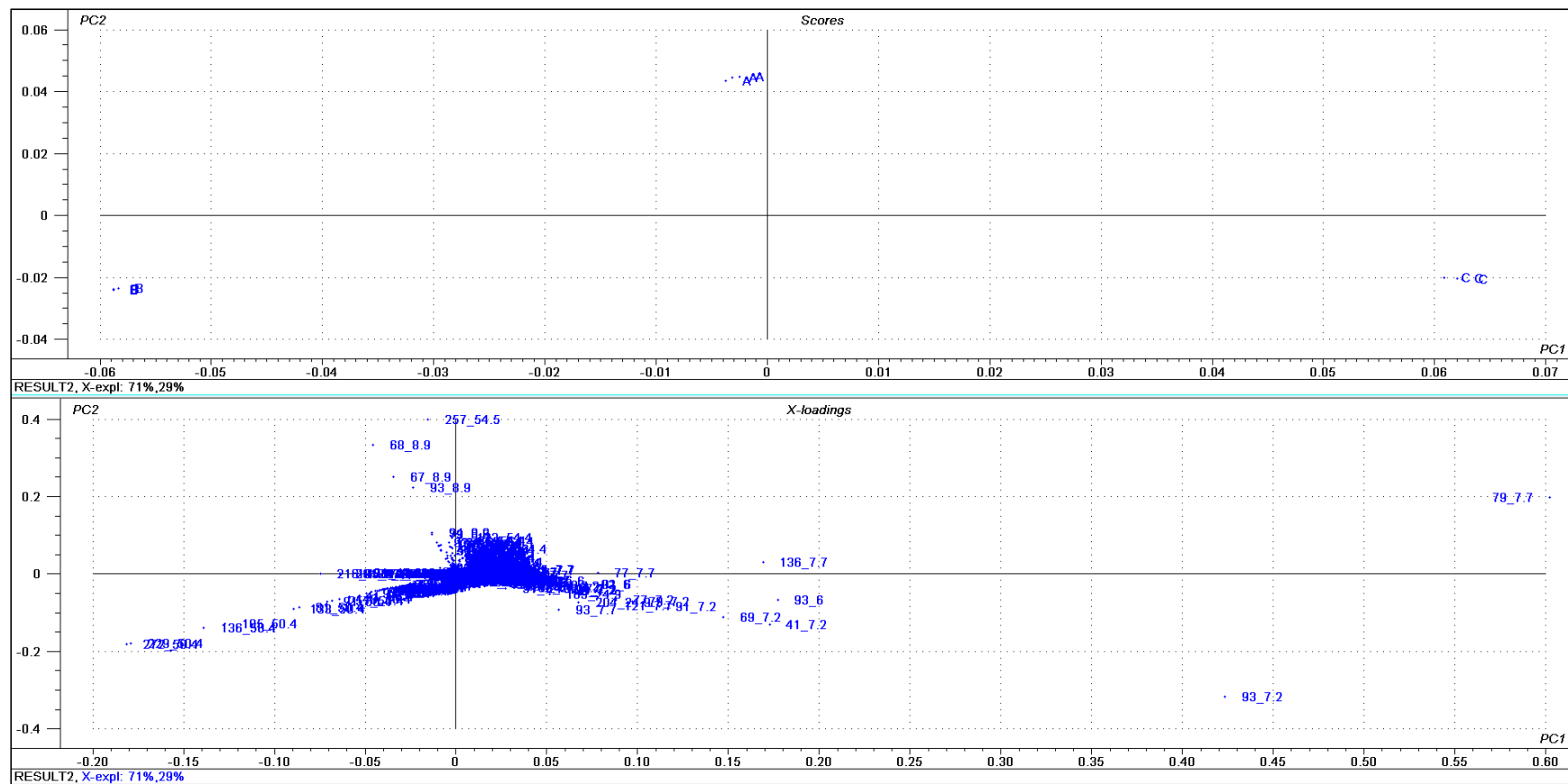


Figura 89: Gráficos dos scores e loadings de PC1 e PC2 para casca da raiz dos espécimes A, B e C de *X. langsdorffiana*.

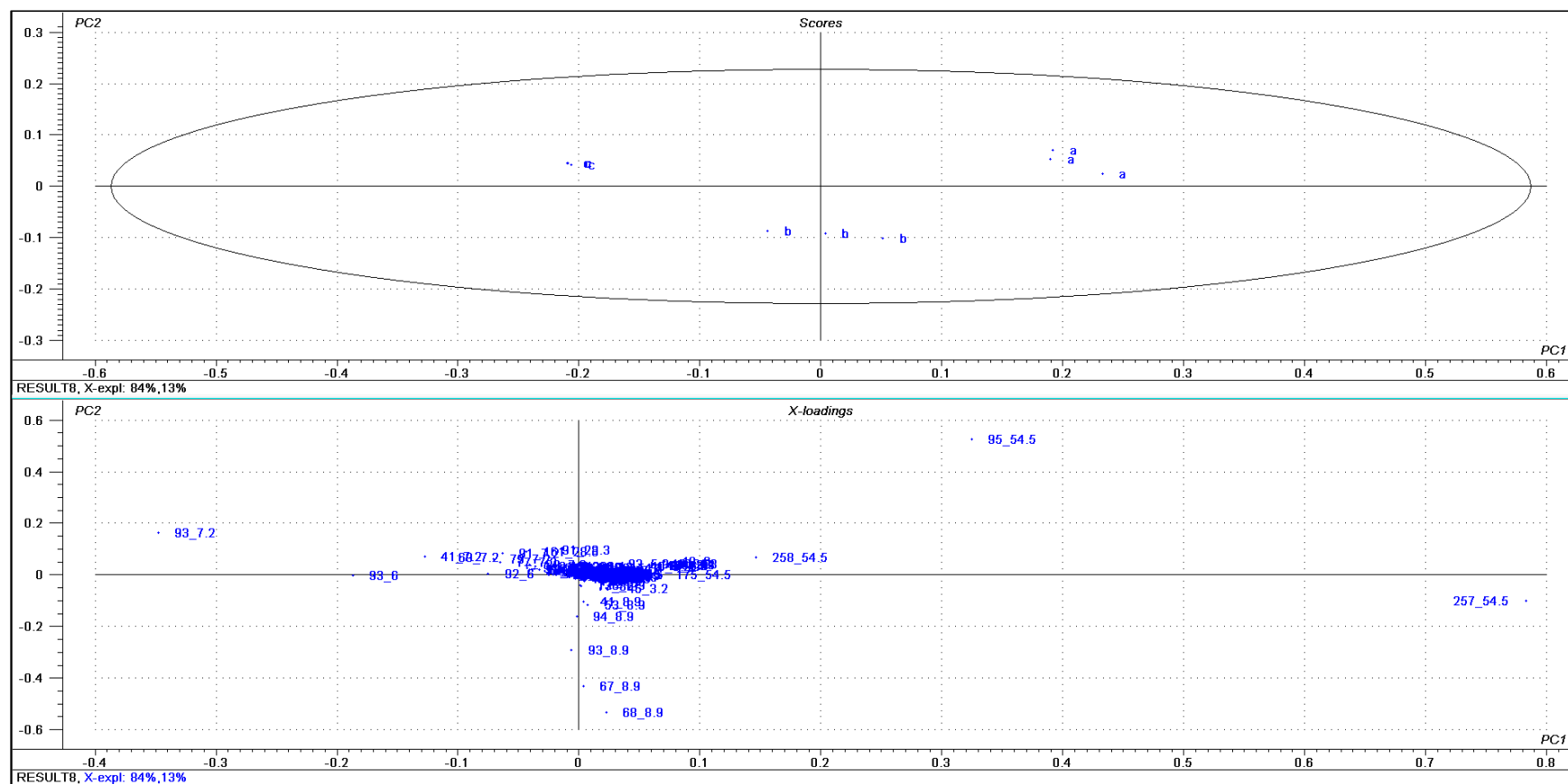


Figura 90: Gráficos dos *scores* e *loadings* de PC1 e PC2 para miolo do caule dos espécimes A, B e C de *X. langsdorffiana*.

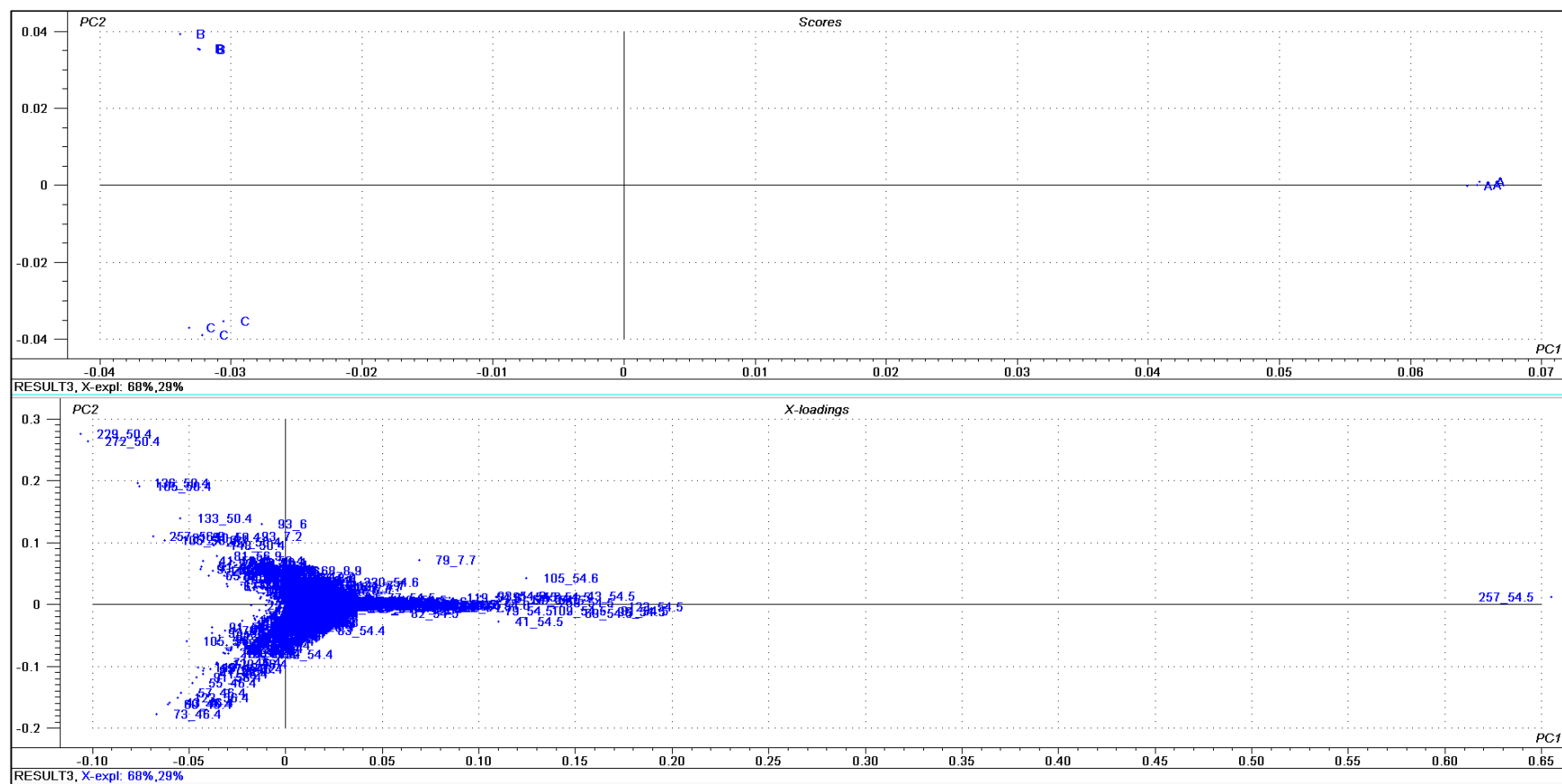


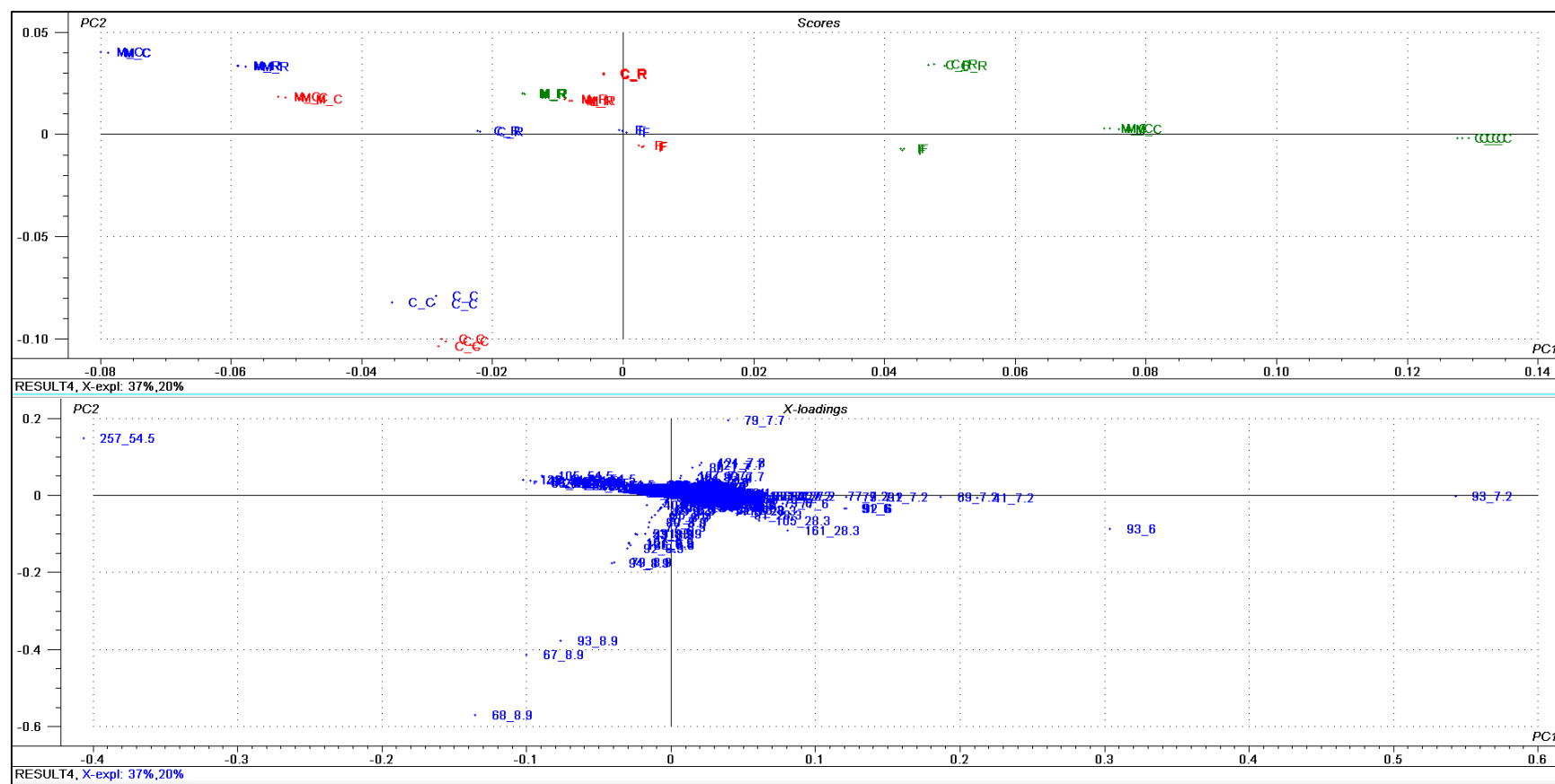
Figura 91: Gráficos dos *scores* e *loadings* de PC1 e PC2 para miolo da raiz dos espécimes A, B e C de *X. langsdorffiana*.

Análises cromatográficas de todas as partes dos três espécimes de *X. langsdorffiana* foram submetidas à mesma Análise de Componente Principal (PCA), considerando os valores de integrais de área de cada fragmento e respectivo tempo de retenção. A primeira componente principal explica 37% da variância, e a segunda componente explica 20% da variância, resultando em uma variância cumulativa de 57%.

No gráfico de *scores* (Figura 92) percebe-se o agrupamento da casca do caule dos espécimes A e B, com o limoneno contribuindo negativamente na PC2. Outros grupos são observados com miolo do caule (espécime B) e miolo da raiz (espécime A), as folhas dos espécimes A e B, casca da raiz e miolo da raiz do espécime B, mostrando uma similaridade na composição química entre os espécimes A e B.

O espécime C ficou deslocado positivamente na PC1, enquanto os espécimes A e B se deslocaram negativamente para PC1 ou PC2, percebendo-se uma diferença do espécime C, para os demais.

A diferente composição do espécime C, para os espécimes A e B, pode estar relacionada a idade ou porte das plantas.



Legenda: Espécime A; Espécime B; Espécime C

Figura 92: Gráficos dos scores e loadings de PC1 e PC2 dos óleos essenciais dos espécimes A, B e C de *X. langsdorffiana*.

3 CONCLUSÃO

M. distichophylla apresentou em sua constituição química três triterpenos do tipo friedelano (3-oxo-12 α -hidroxifriedelano, 3-oxo-30-hidrofriedelano e 3-oxo-29-hidroxifriedelano), já isolados das folhas da espécie, dois triterpenos lupano (11 α -hidroxigloquidona e rigidinol), um flavonoide (4'-*O*-metilepigallocatequina), e um esteroide (β -sitosterol). O flavonoide e os triterpenos lupoanos estão sendo relatados pela primeira vez na espécie.

A partir da análise de RMN de ^1H e RMN de ^{13}C , do óleo essencial do miolo do caule do espécime A de *Xylopia langsdorffiana*, foi possível identificar o *ent*-atisan-16 α -ol, composto majoritário do óleo, relatado pela primeira vez em *X. langsdorffiana*.

Os óleos dos três espécimes de *Xylopia langsdorffiana* apresentaram diferentes composições químicas, porém os monoterpênos β -pineno e limoneno, foram identificados em todos os óleos essenciais analisados, em porcentagens que variaram entre 0,39% e 45,52%.

Os óleos essenciais de *X. Langsdorffiana*, quando submetidos a modulação com antibióticos, diminuíram a concentração de ação de alguns antibióticos em até 99%, modificando assim o fenótipo bacteriano de resistente para sensível.

A análise da componente principal (PCA), quando analisadas partes iguais de indivíduos diferentes, mostrou os três indivíduos em três grupos diferentes, concluindo que estes são diferentes entre si. Porém quando analisada todas as partes, dos três indivíduos, verificamos que há uma semelhança química entre o indivíduo A e B, e que C se mostra diferente de A e B, exceto o miolo da raiz de C, que está agrupado com o miolo da raiz de B.

Os diterpenos *ent*-atisan-7 α -acetoxi-16 α -ol, ácido labdorffiano C e ácido labdorffiano B, apresentaram os menores valores de energia de formação quando complexados com a cruzaina, CYP2C9 e COX, respectivamente, e os triterpenos que apresentaram os menores valores de energia de formação quando complexados com essas enzimas foram, 3 β -hidroxí-9,12-en-ursano (cruzaina), ácido 3,4-seco-friedelan-3-óico (CYP2C9) e 3-oxo-12 α -hidroxifriedelano (COX).

Através do modelo PLS construído, foi calculada a predição da atividade antitumoral para células cancerígenas PC-3 (câncer de próstata humano). O diterpeno, ácido labdorffiano C, e o triterpeno, 3 β -hidroxifriedelano, apresentaram os melhores valores preditos para a atividade farmacológica.

Os compostos terpênicos que se destacaram nos estudos *in silico* apresentando os

menores valores de energia de formação no estudo de *docking* e os melhores valores de predição da atividade antitumoral no modelo PLS construído, mostraram-se como promissoras fontes para tais atividades farmacológicas a serem avaliados em estudos *in vitro* e/ou *in vivo*.

REFERÊNCIAS

- ADAMS, Robert P. **Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectrometry** 4th Edition. 2007.
- AKAZAWA, Hiroyuki *et al.* Anti-Inflammatory and anti-tumor-promoting effects of 5-deprenyllupulonol C and other compounds from Hop (*Humulus lupulus*L.). **Chem Biodivers**, v. 9, p. 1045-1054, 2012.
- ALBUQUERQUE, Irineu L. Ácido canário (3,4-secoderivado do lupano) em própolis do ceará. **Quim Nova** v. 30, n. 4, p. 828-831, 2007.
- AL-LIHAIBI, Sultan S. *et al.* Three new cembranoid-type diterpenes from Red Sea soft coral *Sarcophyton glaucum*: Isolation and antiproliferative activity against HepG2 cells. **Eur J Med Chem**, v. 81, p. 314-322, 2014.
- ALLINGER, N. L. A hydrocarbon force-field utilizing V1 and V2 torsional terms. **Journal of the American Chemical Society**, v.99, n.25, p.8127-8134, 1977.
- ALMEIDA, Maria Tereza Rojo *et al.* Antiproliferative terpenoids and alkaloids from the roots of *Maytenus vitis-idaea* and *Maytenus spinosa*. **Phytochemistry**, v. 71, n. 14-15, p. 1741-1748, 2010.
- ALMEIDA, Vera Lúcia *et al.* Câncer e agentes antineoplásicos ciclo-celular específicos e ciclo-celular não específicos que interagem com o DNA: uma introdução. **Quim Nova**, v. 28, n. 1, p. 118-129, 2005.
- ALVARENGA, Nelson & FERRO, A. Esteban. Bioactive triterpenes and related compounds from celastraceae. **Stud Nat Prod Chem**, v. 33, p. 239-307, 2006.
- ALVES, Josinete S. *et al.* Complete assignment of the ¹H and ¹³C NMR spectra of four triterpenes of the ursane, artane, lupane and friedelane groups. **Magn Reson Chem**, v. 38, p. 201-206, 2000.
- ALVES, Tânia M. A. *et al.* A diterpene from *Mikania obtusata* active on *Trypanosoma cruzi*. **Planta Med**, v. 61, n 1, p. 85-87, 1995.
- AMARAL, Ricardo Guimarães. **Avaliação da atividade antitumoral do óleo essencial da *Mentha x villosa* (Lamiaceae)**. Dissertação (mestrado em Ciência Fisiológica). Universidade Federal de Sergipe, 2014.
- AN, Hyo-Jin *et al.* Tormentic acid, a triterpenoid saponin, isolated from *Rosa rugosa*, inhibited LPS-induced iNOS, COX-2, and TNF- α expression through inactivation of the nuclear factor- κ b pathway in RAW 264.7 macrophages. **Int Immunopharmacol**, v. 11, p. 504-510, 2011.
- ANDRADE, Bruno Silva *et al.* Avaliação do potencial antitumoral de substâncias isoladas de plantas do semiárido utilizando-se testes de ancoragem molecular. **Revista Saúde.com**, v. 9, Suple., n. 3, 2013.

- ANDRADE, Denise de; LEOPOLDO, V.C. & HAAS, V.J. Ocorrência de bactérias multiresistentes em um centro de terapia intensiva de hospital brasileiro de emergências. **Revista Brasileira Terapia Intensiva**, v. 18, n. 1, 2006.
- ANTONA, C. Rodriguez & SUNDBERG, M. Ingelman. Cytochrome P450 pharmacogenetics and cancer. **Oncogene**, v. 25, p. 1679-1691, 2006.
- ANVISA – **Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Investigação e controle de bactérias multirresistentes** 2007.
- APG III. An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG III. **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 161, p. 105–121, 2009.
- ARAUJO, Raimundo Fernandes *et al.* Maytenus ilicifolia dry extract protects normal cells, induces apoptosis and regulates Bcl-2 in human cancer cells. **Exp Biol Med**, v. 238, n. 11, p. 1251-1258, 2013.
- ARAYA, Jorge E. *et al.* Diterpenoids from Azorella compacta(Umbelliferae) Active on Trypanosoma cruzi. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 98, n. 3, p. 413-418, 2003.
- ARDILES, Alejandro E. *et al.* Studies of naturally occurring friedelane triterpenoids as insulin sensitizers in the treatment type 2 diabetes mellitu. **Phytochemistry**, v. 84, p. 116-124, 2012.
- ASHOK, Varun *et al.* Selective cyclooxygenase-2 (COX-2) inhibitors and breast cancer risk. **The Breast**, v. 20, p. 66-70, 2011.
- BAHL, Anu *et al.* 2-acetoxyverecynarmin C, a new briarane COX inhibitory diterpenoid from Pennatula aculeata. **Nat Prod Commun**, v. 9, n. 8, p. 1139-1141, 2014.
- BAILEY, N.J.C. *et al.* Metabolomic analysis of the consequences of cadmium exposure in Silene cucubalus cell cultures via 1H NMR spectroscopy and chemometrics. **Phytochemistry**, v. 62, n. 6, p. 851-858, 2003.
- BARREIRO, Eliezer J. Estratégia de simplificação molecular no planejamento racional de fármacos: a descoberta de novo agente cardioativo. **Quim Nova**, v. 25, n. 6B, p. 1172-1180, 2002.
- BEHZAD, Sahar; PIRANI, A.& MOSADDEGH, M. Cytotoxic Activity of Some Medicinal Plants from Hamedan District of Iran. **Iranian Journal of Pharmaceutical Research**, v. 13 (supplement), p. 199-205, 2014.
- BERTINI, Luciana Medeiros *et al.* Perfil de sensibilidade de bactérias frente a óleos essenciais de algumas plantas do nordeste do Brasil. **Infarma**, v.17, n. 3/4, 2005.
- BHAT, S.V. Structures and stereochemistry of new labdane diterpeneoids from Coleus forskohlii Brinq. **Tetrahedron Letters**, v. 19, p. 1669-1672, 1977.
- BIZZO, Humberto R.; HOVELL; A. M. C. & REZENDE, Claudia M. Óleos essenciais no Brasil: aspectos gerais, desenvolvimento e perspectivas. **Quim Nova**, v. 32, n. 3, p. 588-594, 2009.

- BLATT, Jucelene Marchi & MIRANDA, M.C. Perfil dos microrganismos causadores de infecções do trato urinário em pacientes internados. **Rev Panam Infectol**, v. 7, n. 4, p. 10-14, 2005.
- BOTA, Daliana Peres *et al.* Are infections due to resistant pathogens associated with a worse outcome in critically ill patients? **Journal of Infection**, v. 47, p. 307–316, 2003.
- BOX, G.E.; Hunter, J.S., Hunter, W.G. **Statistics for Experimenters: Design, Innovation, and Discovery**, 2nd Edition. Wiley, 2005.
- BRAK, Katrien *et al.* Nonpeptidic tetrafluorophenoxymethyl ketone cruzain inhibitors as promising new leads for Chagas disease chemotherapy. **J Med Chem**, v. 53, n. 4, p. 1763-1773, 2010.
- BRANDÃO, Hugo N *et al.* Química e farmacologia de quimioterápicos antineoplásicos derivados de plantas. **Quim Nova**, v. 33, n. 6, p. 1359-1369, 2010.
- CAÇADO, J. ROMEU. Long term evaluation of etiological treatment of Chagas disease with benznidazole. **Rev Inst Med trop S Paulo**, v. 44, n. 1, p. 29-37, 2002.
- CARLIER, Y. Congenital Chagas disease: from the laboratory to public health. **Bull Mem Acad R Med Belg**, v. 162, n. 7-9, p. 409-416, 2007.
- CASTELO-BRANCO, Marianna V.S. *et al.* Diterpenes from *Xylopia langsdorffiana* inhibit cell growth and induce differentiation in human leukemia cells. **Z Naturforsch C**, v. 64, n. 9-10, p. 650-656, 2009.
- CAVAL, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento** 6ª Ed. Porto Alegre: Editora, Porto UFRGC. Florianópolis: Editora UFSC, 2007.
- CAVALCANTI, B.C. *et al.* Structure–mutagenicity relationship of kaurenoic acid from *Xylopia sericeae* (Annonaceae). **Mutation Research**, v. 701, p. 153-163, 2010.
- CAVALCANTI, Yuri Wanderley; ALMEIDA, L.F.D. & W.W.N. PADILHA. Atividade antifúngica de três óleos essenciais sobre cepas de *Candida*. **Rev Odontol Bras Central**, v. 20, n. 52, 2011.
- CHADWICK, D. J. **Bioactive Compounds from Plants**. John Wiley, New York, 1990.
- CHANG, Frang-Rong *et al.* Anti-inflammatory and cytotoxic diterpenes from formosan *Polyalthia longifolia* var. *pendula*. **Planta Med**, v. 72, n. 14, 1344-1347, 2006.
- CHATROU, L. W.; RAINER, H. & MAAS, P. J. M. **Annonaceae (Soursop Family)**. IN: SMITH, N.; MORI, S. A.; HENDERSON, A.; STEVENSON, D. W. & HEALD, S. V. (eds.). *Flowering Plants of the Neotropics*. The New York Botanical Garden, New York. Pp. 18-20, 2004.
- CHEN, Jia *et al.* Labdane diterpenoids and shikimic acid derivatives from *Araucaria cunninghamii*. **Planta Med**, v. 77, n. 5, p. 485-488, 2011.
- CHEN, Yu-Jen *et al.* Use of compounds isolated from *Euphorbia neriifolia* for treating cancer

- and/or thrombocytopenia. **Patent application publication**, 2014.
- CHOI, Ran Joo *et al.* Inhibitory effects of kaurenoic acid from *Aralia continentalis* on LPS-induced inflammatory response in RAW264.7 macrophages. **Phytomedicine**, v. 18, p. 677–682, 2011.
- CHOI, Sung Hee *et al.* Synthetic triterpenoid induces 15-PGDH expression and suppresses inflammation-driven colon carcinogenesis. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 124, n. 6, p. 2472-2482, 2014.
- CIANCHETTA G. *et al.* Chemometric studies on the bactericidal activity of quinolones via an extended VolSurf approach, **Journal of Medicinal Chemistry**, v.47, n.12, p.3193-3201, 2004.
- CLEVINGER, Curtis & Clevinger, JENNIFER. Flora del valle de Tehuacán-Cuicatlán. Facs **Celastraceae R.Br.** México, Distrito Federal, 2010.
- COHEN, N. C., **Guidebook on molecular modeling in drug design**. San Diego: Academic Press, p.361, 1996.
- COLMAN-SAZARITORIA, T.; ZAMBRANO, J. & FERRIGNI, N. R. Bioactive Annonaceous acetogenins From the bark of *Xylopia aromatica*. **Journal of Natural Products**, v. 57, n. 4, p. 486-493, 1994.
- CONGREVE, M. *et al.* A 'rule of three' for fragment-based lead discovery **Drug Discov Today**, v. 8, n. 19, p. 876-7, 2003.
- CORREA, M. P. **Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas**. Rio de Janeiro: IBDF, Vol. 6, 1984.
- CORREA, Rodrigo S. *et al.* Influence of hydrogen bonds on the Molecular structure and conformations Of two (C₃₀H₄₈O₂) pentacyclic triterpene isomers. **J Struct Chem**, v. 53, n. 1, p. 156-163, 2012.
- CORSINO, Joaquim *et al.* Antioxidant flavan-3-ols and flavonol glycosides from *Maytenus aquifolium*. **Phytother Res**, v. 17, n. 8, p. 913-916, 2003.
- COSTA, V.C.O. *et al.* Composição química e modulação da resistência bacteriana a drogas do óleo essencial das folhas de *Rollinia leptopetala* R.E. Fries. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, n. 2, p. 245-248, 2008.
- COSTA-LOTUFO, L. V. A Contribuição dos produtos naturais como fonte de novos fármacos anticâncer: estudos no laboratório nacional de oncologia experimental da Universidade Federal do Ceará. **Rev Virtual Quim**, v. 2, n. 1, p. 47-58, 2010.
- COUTINHO, H. D. M. *et al.* Enhancement of the antibiotic activity against a multiresistant *Escherichia coli* by *Mentha arvensis* L. and chlorpromazine. **Chemotherapy, Geneva**, v. 54, n. 4, p. 328-330, 2008.
- COUTINHO, Henrique Douglas Melo. Herbal therapy associated with antibiotic therapy: Potentiation of the antibiotic activity against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by *Turnera ulmifolia* L. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 9,

p. 13-17, 2009.

CRONQUIST, A. **Na integrated system of classification of flowering plants**. New York: Columbia Univ. Pr. p. 53-55, 1981.

CRUCIANI G., CRIVORI P., CARRUPT P-A., TESTA B., Molecular fields in quantitative structure-permeation relationships: the VolSurf approach, **Journal of Molecular Structure (Theochem)**, v.503, n.1, p.17-30, 2000b.

CRUCIANI G., PASTOR M. & MANNHOLD R. Suitability of molecular descriptors for database mining. A comparative analysis. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 45, n. 13, p. 2685-2694, 2002.

CRUCIANI G., PASTOR M., GUBA, W. VolSurf: a new tool for the pharmacokinetic optimization of lead compounds, **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.11, supl.2, p.S29-S39, 2000a.

CUNHA, Wilson Roberto *et al.* A study of the trypanocidal activity of triterpene acids isolated from Miconia species. **Phytother Res**, v. 20, p. 474-478, 2006.

CUNHA, Wilson Roberto *et al.* In vitro trypanocidal activity of triterpenes from Miconia species. **Planta Med**, v. 69, p. 470-472, 2003.

DEEB, Dorrah *et al.* Pristimerin, a quinonemethide triterpenoid, induces apoptosis in pancreatic cancer cells through the inhibition of pro-survival Akt/NF- κ B/mTOR signaling proteins and anti-apoptotic Bcl-2. **Int J Oncol**, v. 44, n. 5, p. 1707-1715, 2014.

DEFERNEZ, M. & COLQUHOUN, I. J. Factors affecting the robustness of metabolite fingerprinting using ¹H NMR spectra. **Phytochemistry**, v. 62, n. 6, p. 1009-1017, 2003.

DELGADO-MENDEZ, Paulino *et al.* New terpenoids from Maytenus apurimacensis as MDR reversal agents in the parasite Leishmania. **Bioorg Med Chem**, v. 16, n. 3, 1425-1430, 2008.

DELLE MONACHE, Franco *et al.* Molecular and crystal structure of prionostemmadione, a new dioxofriedelane from Prionostemma aspera. **J Chem Soc, Perkin Trans 1**, p. 2649-51, 1979.

DEWAR, Michael J.S. *et al.* A new general purpose quantum mechanical molecular model. **J Am Chem Soc**, v. 107, n. 13, p. 3902-3909, 1985.

DIAS, M. C. **Estudos taxonômicos do gênero Xylopia L., (Annonaceae) no Brasil extraamazônico**. Dissertação de Mestrado. São Paulo - Universidade Estadual de Campinas. 1988.

DIAS, C.N.; MORAES, D.F.C. Essential oils and their compounds as Aedes aegypti L. (Diptera: Culicidae) larvicides: review. **Parasitol Res**, v. 113, p. 565-592, 2014.

DIAS, LUIZ C. & DESSOY, MARCO A.. Quimioterapia da doença de chagas: estado da arte e perspectivas no desenvolvimento. **Quim Nova**, v. 32, n. 9, p. 2444-2457, 2009.

DÍAZ-VICIEDO, Rodrigo *et al.* Modulation of inflammatory responses by diterpene acids from

- Helianthus annuus L. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 369, p. 761–766, 2008.
- DIN, Ala Ud *et al.* Ficusonic acid: a new cytotoxic triterpene isolated from *Maytenus royleanus* (Wall. ex M. A. Lawson) Cufodontis. **J Brazil Chem Soc**, v. 24, n. 4, 663-668, 2013.
- DING, Qian-hai *et al.* Celastrol, an inhibitor of heat shock protein 90 β potently suppresses the expression of matrix metalloproteinases, inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 in primary human osteoarthritic chondrocytes. **European Journal of Pharmacology**, v. 708, p. 1–7, 2013.
- DUARTE, Marcelo Cavalcante. **Novos diterpenos dos frutos de *Xylopia langsdorffiana*. João Pessoa - Universidade Federal da Paraíba**. Dissertação. Mestrado em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos. Universidade Federal da Paraíba. 2009.
- DUARTE, Marcelo Cavalcante *et al.* Maytensifolone, a new triterpene from *Maytenus distichophylla* Mart. ex Reissek. **J Braz Chem Soc**, v. 24, n. 10, p. 1697-1700, 2013.
- ERKENS, R.H.J. *et al.* Seven taxonomic discoveries in Annonaceae from southeastern Central America. **Blumea**, v. 51: p. 199-220, 2006.
- FEITOSA, E.M.A. *et al.* Chemical Composition and Larvicidal Activity of *Rollinia leptopetala* (Annonaceae). **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 20, n. 2, p. 375-378, 2009.
- FERREIRA, Daniele da Silva *et al.* In vivo activity of ursolic and oleanolic acids during the acute phase of *Trypanosoma cruzi* infection. **Exp Parasitol**, v. 134, p. 455-459, 2013a.
- FERREIRA, Daniele da Silva *et al.* Natural products and Chagas disease: the action of triterpenes acids isolated from *Miconia* species. **Univ Sci**, v. 18, n. 3, p. 243-256, 2013b.
- FERREIRA, Daniele da Silva *et al.* Trypanocidal activity and acute toxicity assessment of triterpene acids. **Parasitol Res**, v. 106, p. 985-989, 2010.
- FRANCO, Martha S. *et al.* cytotoxic labdane diterpenoids isolated from the hexane fraction of the *Croton stipuliformis* stem bark. **Vitae**, 18, n. 2, p. 173-182, 2011.
- FREITAS, Maria Audilene *et al.* Avaliação in vitro da atividade antimicrobiana do carvacrol através dos métodos de contato direto e gasoso. **Biosci J**, v. 29, n. 3, p. 781-786, 2013.
- FRIES, R. E. Annonaceae. In: ENGLER, A. & PRANTL, K (eds.) **Die Natürlichen Pflanzenfamilien**. 2 ed. Berlin, Dunker & Humblot. v. 17a: 1-171. 1959.
- FU, Qiang *et al.* Triterpene saponins from *Clematis chinensis* and their potential anti-inflammatory activity. **J Nat Prod**, v. 73, p. 1234-1239, 2010.
- FURTADO, ROSELAYNE F. *et al.* Atividade larvica de óleos essenciais contra *Aedes aegypti* L. (Diptera: Culicidae). **Neotropical Entomology**, v. 34, n. 5, p. 843-847, 2005.
- GALVE-ROPERH, ISMAEL *et al.* Anti-tumoral action of cannabinoids: Involvement of sustained ceramide accumulation and extracellular signal-regulated kinase activation. **Nature Medicine**, v. 6, n. 3, p. 313-319, 2000.

- GARÓFOLO, Adriana *et al.* Dieta e câncer: um enfoque epidemiológico. **Rev Nutr, Campinas**, v. 17, n. 4, p. 491-505, 2004.
- GARRIDO F.M.S. *et al.* Química Combinatória de Materiais com Análise por Microdifração de Raios X. Primeira Parte: Fundamentos. **Quim Nova**, v. 28, n. 4, p. 670-677, 2005.
- GAUDIO A.C. & ZANDONADE E. Proposição, Validação e Análise dos modelos que correlacionam estrutura química e atividade biológica, **Quim Nova**, v. 24, n. 5, p. 658-671, 2001.
- GELATTI, Luciane Cristina *et al.* Sepsis por *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina adquirida na comunidade no sul do Brasil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 42, n. 4, p. 458-460, 2009.
- GEROMINI, K. V. N. *et al.* Atividade antimicrobiana de óleos essenciais de plantas medicinais. **Arq Ciênc Vet Zool**, v. 15, n. 2, p. 127-131, 2012.
- GHOSE, A.K., VISWANADHAN V.N. & WENDOLOSKI J. J., A knowledge-based approach in designing combinatorial or medicinal chemistry libraries for drug discovery. 1. A qualitative and quantitative characterization of known drug databases, **Journal of Combinatorial Chemistry**, v.1, n.1, p.55-68, 1999.
- GHOSE, A.K.; PRITCHETT, A.; CRIPPEN, G. M. Atomic physicochemical parameters of three dimensional structure directed quantitative structure-activity relationships III: Modeling hydrophobic interactions. **Journal of Computational Chemistry**, v.9, n.1, p.80-90, 1988.
- GOLBRAIKH, A. *et al.* Rational selection of training and test sets for the development of validated QSAR models. **Journal of Computer-Aided Molecular Design**, v.17, n.2, p.241-253, 2003.
- GOMES, Juliana Pizarro Martins. **Pesquisa de atividade antitumoral e mutagênica in vitro de produtos naturais**. Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, 2008.
- GOMES, Marcos de Souza. **Atividade biológica dos óleos essenciais de três espécies do gênero *Citrus* e de seus componentes majoritários**. Universidade Federal de Lavras. Lavras-MG. Tese. Doutorado no Programa de Pós-Graduação em Agroquímica. 2014.
- GREBLICKI, Jerzy & KOTOWSKI, Jerzy. **Analysis of the Properties of the Harmony Search Algorithm Carried Out on the One Dimensional Binary Knapsack Problem**. Computer Aided Systems Theory – Eurocast. Springer Berlin / Heidelberg, v. 5717, p. 697-704, 2009.
- GUEDES, Marcelino Carneiro. Propriedades químicas do solo e nutrição do eucalipto em função da aplicação de lodo de esgoto. **R Bras Ci Solo**, v. 30, p. 267-280, 2006.
- GUIMARÃES, Dênia A. Saúde & FARIA, Angélica R. Substâncias da natureza com atividade anti-*Trypanosoma cruzi*. **Rev Bras Farmacogn**, v. 17, n. 3, 2007.
- GUO, Lan-qing *et al.* Chemical constituents of *Isodon serra* and their cytotoxicity. **Xinxiang Yixueyun Xuebao**, v. 31, n. 2, p. 96-99, 2014.

- HAMMETT, Louis P. **Physical organic chemistry**: reaction rates, equilibria, and mechanisms. 2.ed. New York: McGraw-Hill, 420p. (McGraw-Hill series in advanced chemistry), 1970.
- HAO, Jia *et al.* Synthesis and cytotoxicity evaluation of oleanolic acid derivatives. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 23, p. 2074–2077, 2013.
- HARIHARAN, P. C.; POPLER J. A. The influence of polarization functions on molecular orbital hydrogenation energies. **Theoretica Chimica Acta**, v.28, n.3, p.213-222, 1973.
- HARRIGAN, G. G. *et al.* Isolation of bioactive and other oxoaporphine alkaloids from two Annonaceous plants, *Xylopia aethiopica* and *X. milusa* Cf. Banacea. **Journal of Natural Products**, v. 57, n. 1, p. 68-73, 1994.
- HASSAN H.M. *et al.* Design of semisynthetic analogues and 3D-QSAR study of eunicellin-based diterpenoids as prostate cancer migration and invasion inhibitors. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 46, p. 1122-1130, 2011.
- HEGAZY, Mohamed-Elamir *et al.* A new 14,15-dinor-labdanone glucoside from *Crassocephalum mannii*. **Nat Prod Commun**, v.3, n. 6, p. 869-872, 2008a.
- HEGAZY, Mohamed-Elamir *et al.* Cyclooxygenase (COX)-1 and -2 Inhibitory Labdanone Diterpenes from *Crassocephalum mannii*. **J Nat Prod**, v. 71, p. 1070-1073, 2008b.
- HELANDER, I.M. *et al.* Characterization of the Action of Selected Essential Oil Components on Gram-Negative Bacteria. **Journal Agricultural Food Chemistry**, v. 46, p. 3590-3595, 1998.
- HENNING, Susanne M. *et al.* Polyphenols in brewed green tea inhibit prostate tumor xenograft growth by localizing to the tumor and decreasing oxidative stress and angiogenesis. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 23, n. 11, p. 1537-1542, 2012.
- HERAS, B. de las *et al.* Effects of six diterpenes on macrophage eicosanoid biosynthesis. **Life Sci**, v. 70, p. 269–278, 2001.
- HERZOG-SOARES, J.D. *et al.* Atividade tripanocida in vivo de *Stryphnodendron adstringens* (barbatimão verdadeiro) e *Caryocar brasiliensis* (pequi). **Rev Bras Farmacogn**, v. 12, Supl. 1, p. 1-2, 2002.
- HOMHUAL, Sudarat *et al.* Bioactive dammarane triterpenes from the mangrove plant *Bruguiera gymnorrhiza*. **J. Nat. Prod**, v. 69, p. 421-424, 2006.
- HUMEIRAH, A.G.S. *et al.* Chemical constituents and antimicrobial activity of *Goniothalamus macrophyllus* (Annonaceae) from Pasoh Forest Reserve, Malaysia. **African Journal of Biotechnology**, v. 9, n. 34, p. 5511-5515, 2010.
- HUSS, H *et al.* Screening of Ubiquitous Plant Constituents for COX-2 Inhibition with a Scintillation Proximity Based Assay. **J Nat Prod**, v. 65, n. 11, 2002.
- ISO - INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. **Aromatic natural raw materials** – Vocabulary: ISO 9235. Geneva, 2013.

- IZUMI Erika. *et al.* Terpenes from *Copaifera* Demonstrated in Vitro Antiparasitic and Synergic Activity. **J Med Chem**, v. 55, p. 2994-3001, 2012.
- JAVADPOUR, M.M *et al.* De novo antimicrobial peptides with low mammalian cell toxicity. **Journal of Medicinal Chemistry**, v.39, p.3107-3113, 1996.
- JEONG, Yeon-Hui *et al.* Kalopanaxsaponin A exerts anti-inflammatory effects in lipopolysaccharide-stimulated microglia via inhibition of JNK and NF- κ B/AP-1 pathways. **Biomol Ther**, v. 21, n. 5, p. 332-337, 2013.
- JOYNER, P. Matthew *et al.* Briarane diterpenes diminish COX-2 expression in human colon adenocarcinoma cells. **J Nat Prod**, v. 74, p. 857-861, 2011.
- KANDU, J.K. *et al.* Antitumor activity of epifriedelanol from *Vitis trifolia*. **Fitoterapia**, v. 71, p. 574-576, 2000.
- KAWEETRIPOB, Wirongrong *et al.* 5-Formylfurfuryl esters from *Duabanga grandiflora*. **Phytochemistry**, v. 76, p. 78-82, 2012.
- KELECOM, Alphonse. Isolation, structure determination, and absolute configuration of barbatusol, a new bioactive diterpene with a rearranged abietane skeleton from the labiate *Coleus barbatus* **Tetrahedron**, v. 39, p. 3603- 3608, 1983.
- KIEM, Phan Van *et al.* Chemical constituents of *Ficus drupacea* leaves and their α -Glucosidase inhibitory activities. **Bull Korean Chem Soc**, v. 34, n. 1, p. 263-266, 2013.
- KIM, Jeong Ah *et al.* Cyclooxygenase inhibitory components from *Portulaca oleracea*. **Nat Prod Sci**, v. 18, n. 1, p. 23-25, 2012.
- KIM, Ji Young; KIM, Dong Hee & JEONG, Hye Gwang. Inhibitory effect of the coffee diterpene kahweol on carrageenan-induced inflammation in rats. **BioFactors**, v. 26, p 17-28, 2006.
- KIM, Kyoung-Ah *et al.* Inhibition of cytochrome P450 activities by oleanolic acid and ursolic acid in human liver microsomes. **Life Sciences**, v. 74, p. 2769-2779, 2004.
- KIM, Tae-Hee *et al.* A new labdane diterpenoid with anti-inflammatory activity from *Thuja orientalis*. **J Ethnopharmacol**, v. 146, p. 760-767, 2013.
- KNAAK, Neiva & FIUZA, L.M. Potencial dos óleos essenciais de plantas no controle de insetos e microrganismos. **Neotropical Biology and Conservation**, v. 5, n. 2, p. 120-132, 2010.
- KOKIS, V. M. *et al.* Identification of an imipenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* clone among patients in a hospital in Rio de Janeiro. **Journal of Hospital Infection**, v. 60, p. 19-26, 2005.
- KONISHI, Tenji *et al.* Three diterpenoids (excoecarins v1—v3) and a flavanone glycoside from the fresh stem of *Excoecaria agallocha*. **Chem Pharm Bull**, v. 51, n. 10, p. 1142-1146, 2003.
- KUO, Yao Haur *et al.* Two new macrolide sesquiterpene pyridine alkaloids from *Maytenus*

- emarginata: marginatine G and the cytotoxic emarginatine F. **J Nat Prod**, v. 57, n. 2, p. 263-269, 1994.
- KUO, Yao Haur; Antitumor agents, 112. Emarginatine B, a novel potent cytotoxic sesquiterpene pyridine alkaloid from *Maytenus emarginata*. **J Nat Prod**, v. 53, n. 2, 422-8, 1990.
- LEACH, A. R. **Molecular Modeling: Principles and Applications**. 2 ed. England: Prentice Hall, p.774, 2001.
- LEE, Chang-Hsien *et al.* Eriobotrya japonica leaf and its triterpenes inhibited lipopolysaccharide-induced cytokines and inducible enzyme production via the nuclear factor- κ B signaling pathway in lung epithelial cells. **Am J Chin Med**, v. 36, n. 6, p. 1185-1198, 2008.
- LEE, Mao-Jung *et al.* Pharmacokinetics of tea catechins after ingestion of green tea and (-)-epigallocatechin-3-gallate by humans: formation of different metabolites and individual variability. **Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention**, v. 11, n. 10, p. 1025-1032, 2002.
- LEESE, Mathew P. *et al.* Chimeric microtubule disruptors. **Chem Commun**, v. 46, p. 2907-2909, 2010.
- LEITE, Ana Cristina *et al.* Trypanocidal activity of limonoids and triterpenes from *Cedrela fissilis*. **Planta Med**, v. 74, p. 1795-1799, 2008.
- LEITE, Joao Paulo V. *et al.* Isolation and HPLC quantitative analysis of flavonoid glycosides from Brazilian beverages (*Maytenus ilicifolia* and *M. aquifolium*). **J Agric Food Chem**, v. 49, n. 8, p. 3796-3801, 2001.
- LEITE, João Paulo V. *et al.* Trypanocidal Activity of Triterpenes from *Arrabidaea triplinervia* and Derivatives. **Biol Pharm Bull**, v. 29, n. 11, p. 2307-2309, 2006.
- LHINHATRAKOOL, Thitima *et al.* Antiplasmodial Sesquiterpene Alkaloids from the Roots of *Maytenus mekongensis*. **J Nat Prod**, v. 74, n. 6, p. 1386-1391, 2011.
- LI, X. *et al.* Annonaceous acetogenins from the seeds of *Annona squamosa*. **Chemistry of Natural Compound**, v. 46, n. 1, 2010.
- LIAO, Luciano M. *et al.* Trypanocidal activity of quinonemethide triterpenoids from *Cheiloclinium cognatum* (Hippocrateaceae). **Zeitschrift fuer Naturforschung, C: Journal of Biosciences**, v. 63, n. 3/4, p. 207-210, 2008.
- LIAW, C.C. *et al.* A Novel Constituent from *Rollinia mucosa*, Rollicosin, and a New Approach to Develop Annonaceous Acetogenins as Potential Antitumor Agents. **Journal of Natural Products**, v. 66, p. 279-281, 2003.
- LINDON, J.C., HOLMES, E., NICHOLSON, J.K., Pattern recognition methods and applications in biomedical magnetic resonance. **Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy**, v. 39, n. 1, p. 1-49, 2001.
- LIPINSKI, Christopher A. *et al.* Experimental and computational approaches to estimate

- solubility and permeability in drug discovery and development settings. **Adv Drug Deliv Rev**, v. 23, p. 3–25, 1997.
- LIPINSKI, Christopher A. Lead- and drug-like compounds: the rule-of-five revolution. **Drug Discovery Today: Technologies**, v. 1, n. 4, 2004.
- LIU, Hua *et al.* Anti-tumor activity of oridonin on SNU-5 subcutaneous xenograft model via regulation of c-Met pathway. **Tumor Biol**, 2014.
- LIU, Xikui & WU, Dagang. Chemical constituents of friedelane triterpenoids from oneseed monocelastrus (*Monocelastrus monospermus*). **Zhongcaoyao**, v. 24, n. 8, p. 395-7, 410, 1993.
- LÖFFLER, Boglárka Csupor *et al.* Antiproliferative constituents of the Roots of *Conyza Canadensis*. **Planta Med**, v. 77, p. 1183-1188, 2011.
- LOMBARDI, J.A.; Groppo, M. & Biral, L. **Celastraceae** in Lista de Espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB6756>>. Acesso em: 09 Set. 2014.
- LU, Yan *et al.* Application of cycloartane triterpenes in antineoplastic preparation. **Faming Zhuanli Shenqing**, 2014.
- MAGALHAES, Cassia G. **Estudo fitoquímico do tronco e raiz de *Maytenus salicifolia* Reissek (celastraceae) e avaliação da atividade biológica de seus constituintes e de ésteres derivados do lupeol**. Tese (doutorado). Universidade Federal de Minas Gerais, 2012.
- MAGALHAES, Cassia G. *et al.* Maytenus salicifolia: triterpenes isolated from stems and antioxidant property of extracts from aerial parts. **Rev Bras Farmacogn Braz J Pharmacogn**, v. 21, n. 3, 415-419, 2011.
- MAGALHAES, Cassia G. *et al.* Salicassin, an Unprecedented chalcone-diterpene adduct and a quinone methide triterpenoid from *Maytenus salicifolia*. **Helv Chim Acta**, v. 96, n. 6, p. 1046-1054, 2013.
- MANICA, I. **Taxonomia, morfologia e anatomia**. In: São José, A.R. *et al.* **Anonáceas, produção e mercado (pinha, graviola, atemóia e cherimólia)**. Vitória da Conquista: UESB. P. 20-33, 1997.
- MARTA, Maurizio *et al.* Rigidenol, a new triterpene with a lupane skeleton from *Maytenus rigida*. **Gazzetta Chimica Italiana**, v. 109, n. 1-2, p. 61-63, 1979.
- MARTINS, D. *et al.* A sesquiterpene dimer from *Xylopia aromatica*. **Phytochemistry**, v. 48, n. 4, p. 677-680, 1998.
- MARTIUS, C.F.P. **Flora Brasiliensis**. Vol. XIII, part. I, Ed. Wheldon & Wesley, New York, p. 1-46, 1967.
- MAURYA, Anand Kumar *et al.* QSAR, docking and in vivo studies for immunomodulatory activity of isolated triterpenoids from *Eucalyptus tereticornis* and *Gentiana kurroo*. **Eur J Pharm Sci**, v. 47, p. 152-161, 2012.

- MAZHAR, D.; GILLMORE, R & WAXMAN, J.. COX and cancer. **Q J Med**, v. 98, p. 711–718, 2005.
- McFADYEN, Morag C.E. *et al.* Immunohistochemical Localization of Cytochrome P450 CYP1B1 in Breast Cancer with Monoclonal Antibodies Specific for CYP1B1. **The Journal of Histochemistry & Cytochemistry** v. 47, n. 11, p. 1457–1464, 1999.
- McGRATH, Mary E. *et al.* The crystal structure of Cruzain: A therapeutic target for Chagas' Disease. **J Mol Biol**, v. 247, p. 251-259, 1995.
- McKERROW, J.H. Development of cysteine protease inhibitors as chemotherapy for parasitic diseases: insights on safety, target validation, and mechanism of action. **Int J Parasitol**, v. 29, n. 6, p. 833-837, 1999.
- MEDEIROS, Rodrigo *et al.* Mechanisms underlying the inhibitory actions of the pentacyclic triterpene α -amyrin in the mouse skin inflammation induced by phorbol ester 12-*O*-tetradecanoylphorbol-13-acetate. **Eur J Pharmacol**, v. 559, p. 227-235, 2007.
- MENDES, Rodrigo Elisandro *et al.* Metallo- β -lactamases. **J Bras Patol Med Lab**, v. 42, n. 2, p. 103-113, 2006.
- MISSOURI BOTANICAL GARDEN. Disponível em: <
<http://www.missouribotanicalgarden.org/>> Acesso em: maio de 2014.
- MIYASHITA, H. *et al.* Four New ent-Kaurane Diterpenoids from the Fruits of *Annona cherimola*. **Chemical & Pharmaceutical Bulletin**, v. 58, n. 5, p. 765-768, 2010.
- MOITEIRO, Cristina *et al.* Synthetic secofriedelane and friedelane derivatives as inhibitors of human lymphocyte proliferation and growth of human cancer cell lines in vitro. **J Nat Prod**, v. 64, p. 1273-1277, 2001.
- MOKOKA, Tsholofelo Abednego *et al.* Antimicrobial activity and cytotoxicity of triterpenes isolated from leaves of *Maytenus undata* (Celastraceae). **BMC Complement Altern Med**, v. 13, p. 111, 2013.
- MOMTAZ, S. *et al.* Growth inhibition and induction of apoptosis in human cancerous HeLa cells by *Maytenus procumbens*. **Food Chem Toxicol**, v. 51, p. 38-45, 2013.
- MONTENEGRO, Camila de Albuquerque *et al.* Gastroprotective Effect of *Xylopia langsdorffiana* A. St.-Hil. & Tul. (Annonaceae): Involvement of Endogenous Sulphydryls Compounds and Nitric Oxide. **Rec Nat Prod**, v. 8, n. 2, p. 165-183, 2014.
- MORAES, Miguel P. L. & ROQUE, N.F. Diterpenes from the fruits of *Xylopla aromatic*. **Phytochemistry**, v. 27, n. 10, p. 3205-3208, 1988.
- MOREIRA, Madson Matheus Barbosa. **Diterpenos com atividade antitumoral frente células leucêmicas: uma revisão**. [Monografia de conclusão do curso de Farmácia]. João Pessoa: Universidade Federal da Paraíba, 2013.
- MORRIS, Bruce D. *et al.* Isolation of the diterpenoids, ent-kauran-16 α -ol and ent-atisan-16 α -ol, from sunflowers, as oviposition stimulants for the banded sunflower moth, *Cochylis hospes*. **Journal of Chemical Ecology**, v. 31, n. 1, p. 89-102, 2005.

- MORRIS, Garrett M. & LIM-WILBY, Marguerita. Molecular docking. **Methods Mol Biol**, v. 443, p. 365-382, 2008.
- MOSCA, J.L.; CAVALCANTE, C.E.B. & DANTAS, T.M.D. **Características botânicas das principais anonáceas e aspectos fisiológicos de maturação**. Fortaleza: Embrapa agroindústria tropical, p. 28, 2006.
- MOTOHASHI, Yurie *et al.* Antiviral activity of stachyflin on influenza A viruses of different hemagglutinin subtypes. **Virol J**, v. 16, p. 10:118, 2013.
- MU, Xianmin *et al.* Pristimerin, a triterpenoid, inhibits tumor angiogenesis by targeting VEGFR2 activation. **Molecules**, v. 17, p. 6854-6868, 2012.
- MURRAY, Graeme I. *et al.* Tumor-specific Expression of Cytochrome P450 CYP1B1¹. **Cancer Research**, v. 57, p. 3026-3031, 1997.
- MUSAYEIB, Nawal M. Al *et al.* In Vitro Antiprotozoal Activity of Triterpenoid Constituents of *Kleinia odora* Growing in Saudi Arabia. **Molecules**, v. 18, p. 9207-9218, 2013.
- NASCIMENTO, F.C. *et al.* Acetogeninas de anonáceas isoladas de folhas de *Rollinia laurifolia*. **Química Nova**, v. 26, n. 3, p. 319-322, 2003.
- NASCIMENTO, A.M. *et al.* Trypanocidal properties of *Mikania stipulacea* and *Mikania hoehnei* isolated terpenoids. **Fitoterapia**, v. 75, n. 381-384, 2004.
- NASCIMENTO, Eduardo Sanches Pereira do *et al.* Effect of rootstock on the scion of *Hevea brasiliensis* through metabolic analysis of latex samples by ¹H NMR. **Crop Breed Appl Biotechnol [online]**, v.11, p. 82-88, 2011.
- NCCLS - National Comitee for Clinical Laboratory Standards. **Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically: Approved standard**, 6th ed. NCCLS document M7-A6. Wayne: National Committee for Clinical Laboratory Standards, 2008.
- NEVES, Patrícia R. *et al.* *Pseudomonas aeruginosa* multirresistente: um problema endêmico no Brasil. **J Bras Patol Med Lab**, v. 47, n. 4, p. 409-420, 2011.
- NOREEN, Ylva *et al.* Flavan-3-ols isolated from some medicinal plants inhibiting COX-1 and COX-2 catalyzed prostaglandin biosynthesis. **Planta Medica**, v. 64, n. 6, p. 520-524, 1998.
- NOZAKI, Hiroshi *et al.* Antitumor agents, 116. Cytotoxic triterpenes from *Maytenus diversifolia*. **J Nat Prod**, v. 53, n. 4, p. 1039-1041, 1990.
- NUNEZ, Marvin J *et al.* ent-Rosane and abietane diterpenoids as cancer chemopreventive agentes. **Phytochemistry**, v. 72, n. 4-5, p. 385-390, 2011.
- NUNEZ, Marvin J. *et al.* Lupane triterpenoids from *Maytenus* species. **J Nat Prod**, v. 68, p. 1018-1021, 2005.
- NUNEZ, Marvin J.; Insecticidal Sesquiterpene Pyridine Alkaloids from *Maytenus chiapensis*. **J Nat Prod**, v. 67, n. 1, p. 14-18, 2004.

- OJEDA, J.E. *et al.* Cox-2 expression after chemotherapy in a canine nasal transitional cell carcinoma: a case report. **Veterinarni Medicina**, v. 58, n. 11, p. 599–604, 2013.
- OKOYE, Festus Basden Chiedu *et al.* A phenyldilactone, bisnorsesquiterpene, and cytotoxic phenolics from *Maytenus senegalensis* leaves. **Tetrahedron Letters**, v. 55, p. 3756-3760, 2014.
- OLIVEIRA, Aldeídia Pereira *et al.* Calcium channel blockad as a target for the cardiovascular effects induced by the 8(17), 12E, 14-labdatrien-18-oic acid (labdane- 302). **Vascular Pharmacology**, v. 44, n 5, p. 338-344, 2006a.
- OLIVEIRA, Djalma Menezes *et al.* Chemical constituents isolated from roots of *Maytenus acanthophylla* Reissek (Celastraceae). **Biochem Syst Ecol**, 34(8), 661-665, 2006b.
- OLIVEIRA, Jocélia P.C. *et al.* Chemical constituents of *Lecythis pisonis* and cytotoxic activity. **Rev Bras Farmacogn Braz J Pharmacogn**, v. 22, n. 5, p. 1140-1144, 2012.
- OLIVEIRA, Mauro Lúcio G. *et al.* 3-oxo-12 α -hydroxyfriedelane from *Maytenus gonoclada*: structure elucidation by ^1H and ^{13}C chemical shift assignments and 2D-NMR spectroscopy. **Magn Reson Chem**, v. 45, n. 10, p. 895-898, 2007.
- OPREA T.I., ZAMORA I., UNGELL A-L. Pharmacokinetically based mapping device for chemical space navigation. **Journal of Combinatorial Chemistry**, v. 4, n. 4, p. 258-266, 2002.
- ORAMAS-ROYO, Sandra M. *et al.* Cytotoxic Triterpenoids from *Maytenus*. **J Nat Prod**, v. 73, n. 12, p. 2029-2034, 2010.
- OSORIO, Alex A. *et al.* Olean-18-ene triterpenoids from Celastraceae species inhibit HIV replication targeting NF- κ B and Sp1 dependent transcription. **J Med Chem**, v. 52, p. 295-303, 2012.
- PARK, Ji-Hyuk *et al.* Inhibition of Wnt/ β -catenin signaling mediates ursolic acid-induced apoptosis in PC-3 prostate cancer cells. **Pharmacol Rep**, v. 65, n. 5, p. 1366-1374, 2013.
- PASSOS X.S. *et al.* Atividade antifúngica de *Caryocar brasiliensis* (Caryocaraceae) sobre *Cryptococcus neoformans*. **Rev Soc Br Med Trop**, v. 35, p. 623-627, 2002.
- PATRA, Arjun. Isolation and characterization of stigmast-5-en-3 β -ol (β -sitosterol) from the leaves of *Hygrophila spinosa* T. Anders. **International Journal of Pharma Sciences and Research**, v. 1, n. 2, p.95-100, 2010.
- PAZ, Tiago Antunes *et al.* Production of the quinone-methide triterpene maytenin byin vitro adventitious roots of *Peritassa campestris*(Cambess.) A.C.Sm. (Celastraceae) and rapid detection and identification by APCI-IT-MS/MS. **Biomed Res Int**, 2013.
- PEREIRA, C.A.M. & MAIA, J.F. Estudo da atividade antioxidante do extrato e do óleo essencial obtidos das folhas de alfavaca (*Ocimum gratissimum* L.). **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 27, n. 3, p. 624-632, 2007.
- PERESTELO, Nayra R. *et al.* Sesquiterpenes from *Maytenus jelskii* as potential cancer chemopreventive agentes. **J Nat Prod**, v. 73, n. 2, p. 127-132, 2010.

- PÉREZ, Miriam *et al.* Antifouling activity of celastroids isolated from Maytenus species, natural and sustainable alternatives for marine coatings. **Ind Eng Chem Res**, v. 53, p. 7655–7659, 2014.
- PESSINI, G.L. Avaliação da atividade antibacteriana e antifúngica de extratos de plantas utilizados na medicina popular. **Rev Bras Farmacogn**, v. 13, supl., p. 21-24, 2003.
- PETRAKIS, V.P. The effect of terpenoid extracts from 15 pine species on the feeding behavioural sequence of the late instars of the pine processionary caterpillar *Thaumetopoea pityocampa*. **Behav Process**, v. 69, p. 303-322, 2005.
- PIMENTA, L.P.S.; NASCIMENTO, F.C. & BOAVENTURA, M.A.D. Acetogenins from the Leaves of *Rollinia laurifolia*. **Helvetica Chimica Acta**, v. 88, 2005.
- PINHEIRO, M.L.B. *et al.* Acanthoic Acid and other Constituents from the Stem of *Annona amazonica* (Annonaceae). **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 20, n. 6, p. 1095-1102, 2009.
- PITA, João Carlos Lima Rodrigues *et al.* In vitro and in vivo antitumor effect of trachylobane-360, a diterpene from *Xylopia langsdorffiana*. **Molecules**, v. 17, n. 8, p. 9573-89, 2012.
- PITA, João Carlos Lima Rodrigues. 2010. **Avaliação da atividade antitumoral e toxicidade do trachylobano-360 de *Xylopia langsdorffiana* St. Hil. & Tul. (Annonaceae)**. Dissertação. Mestrado em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos. Universidade Federal da Paraíba. 2010.
- PITA, João Carlos Lima Rodrigues. 2014. **Avaliação da toxicidade e farmacocinética do trachylobano-360, um diterpeno isolado de *Xylopia langsdorffiana* St. Hil. & Tul. (ANNONACEAE)**. Tese. Doutorado em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos. Universidade Federal da Paraíba. 2014.
- PITA, João Carlos Lima Rodrigues. *et al.* Matrix effect and optimization of LC-MSn determination of trachylobane-360 in mice blood. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis (Print)**, v. 100, p. 262-270, 2014.
- PONTES, A. F. & MELLO-SILVA, R. DE. Annonaceae do Parque Nacional da Serra da Canastra, Minas Gerais, Brasil. **Bol Bot Univ São Paulo**, v. 23, n. 1, p. 71-84, 2005.
- PROBST, Isabella da Silva. **Atividade antibacteriana de óleos essenciais e avaliação de potencial sinérgico**. Dissertação. Universidade Estadual Paulista. 2012.
- RAMÍREZ-CISNEROS, M. Angeles *et al.* Cycloartanes from *Krameria pauciflora* and their in vitro PLA₂, COX-1, and COX-2 enzyme inhibitory activities. **Planta Med**, v. 78, p. 1942–1948, 2012.
- REYES, Carolina P. *et al.* Activity of lupane triterpenoids from *Maytenus* species as inhibitors of nitric oxide and prostaglandin E₂. **Bioorg Med Chem**, v. 14, n. 5, p. 1573-1579, 2006.
- RHODES, Lesley E. *et al.* Oral green tea catechin metabolites are incorporated into human skin and protect against UV radiation-induced cutaneous inflammation in association with reduced production of pro-inflammatory eicosanoid 12-hydroxyeicosatetraenoic acid.

- British Journal of Nutrition**, v. 110, n. 5, p. 891-900, 2013.
- RIBEIRO, Daniele Silva; VELOZO, Eudes da Silva & GUIMARÃES, Alaíse Gil. Interaction between the rosemary essential oil (*Rosmarinus officinalis* L.) and antimicrobial drugs in the control of bacteria isolated from foods. **J Biotec Biodivers**, v. 4, n.1, p. 10-19, 2013.
- RIBEIRO, J.E.L.S. *et al.* **Flora da Reserva Ducke. Guia de identificação das plantas vasculares de uma floresta de terra firme na Amazônia Central**. p. 648-651. INPA, Manaus. 1999.
- RIBEIRO, L. A. A. *et al.* The (8)17,12E,14-labdatrien-18-oic acid (labdane 302), a labdane-type diterpene isolated from *Xylopia langsdorffiana* St. Hil. & Tul. (Annonaceae), relaxes the guinea pig trachea. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 17, n. 2, p. 197-203, 2007.
- RINGBOM, Therese *et al.* Ursolic acid from *plantago major*, a selective inhibitor of cyclooxygenase-2 catalyzed prostaglandin biosynthesis. **J Nat Prod**, v. 61, p. 1212-1215, 1998.
- ROCHA, Barbosa *et al.* Antispasmodic effect of 4'-methylepigallocatechin on guinea pig ileum. **Fitoterapia**, v. 83, n. 7, p. 1286-1290, 2012.
- ROCHA, D.C.; RODELLA, R.A. & MARTINS D. Caracterização morfológica de espécies de trapoeraba (*Commelina* spp.) utilizando a análise multivariada. **Planta Daninha**, v. 25, n. 4, p. 671-678, 2007.
- RODRIGUES, Vanessa G. *et al.* Evaluation of antimicrobial activity and toxic potential of extracts and triterpenes isolated from *Maytenus imbricata*. **Quim Nova**, v. 35, n. 7, p. 1375-1380, 2012.
- RODRIGUES, Vanessa G. *et al.* Pentacyclic triterpenes from *maytenus* genus as acetylcholinesterase inhibitors. **Int J Pharm Pharm Sci**, v. 6, n. 2, p. 918-920, 2014.
- ROSAS, L.V *et al.* In vitro evaluation of the cytotoxic and trypanocidal activities of *Ampelozizyphus amazonicus* (Rhamnaceae). **Braz J Med Biol Res**, v. 40, p. 663-670, 2007.
- RUPHIN, Fatiany Pierre *et al.* Antiplasmodial, cytotoxic activities and characterization of a new naturally occurring quinone methide pentacyclic triterpenoid derivative isolated from *Salacia leptoclada* Tul. (Celastraceae) originated from Madagascar. **Asian Pac J Trop Biomed**, v. 3, n. 10, p. 780-784, 2013.
- RUPRECHT, J. K.; HUI, Y. -H.; MCLAUGHLIN, J. L. Annonaceous Acetogenins: A Review. **Journal of Natural Products**, v. 53, n. 2, p. 237-278. 1990.
- RUSSELL, Floyd A. *et al.* Stemodin-derived analogues with lipid peroxidation, cyclooxygenase enzymes and human tumour cell proliferation inhibitory activities. **Phytochemistry**, v. 72, p. 2361-2368, 2011.
- SALAZAR, G. D. C. Melendez; Chemical constituents from bark wood and leaves of *Maytenus floribunda* (Reiss). **Acta Horti**, p. 205-208, 1999.

- SANNOMIYA, Miriam *et al.* A flavonoid glycoside from *Maytenus aquifolium*. **Phytochemistry**, v. 49, n 1, p. 237-239, 1998.
- SANT'ANNA, Carlos Mauricio R. Glossário de termos usados no planejamento de fármacos (recomendações da IUPAC para 1997). **Quim Nova**, v. 25, n. 3, p. 505-512, 2002.
- SANTOS, D. Y. A. C. & SALATINO, M. L. F. Foliar flavonoids of Annonaceae from Brazil: taxonomic significance. **Phytochemistry**, v. 55, n. 6, p. 567-573, 2000.
- SANTOS, Paula Ferreira *et al.* Diterpenes from *Xylopia Langsdorffiana*. **Helvetica Chimica Acta**, v. 96, p. 1085-1092, 2013a.
- SANTOS, Paula Ferreira. **Novos diterpenos isolados das raízes de *Xylopia langsdorffiana* St-Hil & Tul. (Anonaceae)**. Dissertação. Mestrado em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos. Universidade Federal da Paraíba. 2011.
- SANTOS, Vania A. F. F. M. *et al.* Antiprotozoal Sesquiterpene Pyridine Alkaloids from *Maytenus ilicifolia*. **J Nat Prod**, v. 75, n. 5, p. 991-995, 2012.
- SANTOS, Vania A. F. F. M.; Antiprotozoal activity of quinonemethide triterpenes from *Maytenus ilicifolia* (Celastraceae). By Leite, K.M. *et al* **Molecules**, v. 18, p. 1053-1062, 2013b.
- SCHAIK, Ron H.N. Cancer treatment and pharmacogenetics of cytochrome P450 enzymes. **Invest New Drugs**, v. 23, p. 513-522, 2005.
- SCHUCK, Virna J. A. *et al.* Avaliação da atividade antimicrobiana de *Cymbopogon citratus*. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 37, n. 1, 2001.
- SETTE, I.M. *et al.* The First tetrahydroprotoberberine alkaloid from the genus *Rollinia*. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 28, p. 393-394, 2000.
- SETZER, W. N. *et al.* Isolation and Frontier Molecular Orbital Investigation of Bioactive Quinone-Methide Triterpenoids from the Bark of *Salacia petenensis*. **Planta Med**, v. 67, p. 65-69, 2001.
- SETZER, Willian N. *et al.* A Phytochemical investigation of *Alchornea latifolia*. **Fitoterapia**, v. 71, p. 195-198, 2000.
- SETZER, Willian.N. & SETZER, M.C. Plant-derived triterpenoids as potential antineoplastic agents. **Mini Rev Med Chem**, v. 3, p. 540-556, 2003.
- SHAN, Wei-Guang. Natural Friedelanes. **Chem Biodivers**, v. 10, 2013.
- SHIN, Eun Myoung *et al.* Anti-inflammatory activity of hispidol A 25-methyl ether, a triterpenoid isolated from *Ponciri Immaturus Fructus*. **Eur J Pharmacol**, v. 627, p. 318-324, 2010.
- SI, Dayong *et al.* Mechanism of CYP2C9 Inhibition by Flavones and Flavonols. **Drug Metabolism and Disposition**, v. 37, n. 3, p. 629-634, 2009.
- SILVA, M.S. *et al.* Alcaloides e outros constituintes de *Xylopia langsdorffiana*

- (ANNONACEAE). **Quim Nova**, v. 32, n. 6, p. 1566-1570, 2009.
- SILVA, Fabiano G. *et al.* Seasonal variability in the essential oils of wild and cultivated *Baccharis trimera*. **J Braz Chem Soc**, v. 18, n. 5, 990-997, 2007.
- SILVA, Fernando C *et al.* A new friedelane triterpenoid from the branches of *Maytenus gonoclada* (Celastraceae). **J Chem Res**, v. 35, n. 10, p. 555-557, 2011a.
- SILVA, Fernando C. *et al.* Chemical constituents from branches of *Maytenus gonoclada* (Celastraceae) and evaluation of antimicrobial activity. **J Braz Chem Soc**, v. 22, n. 5, p. 943-949, 2011b.
- SILVA, Fernando Cesar. **Estudo fitoquímico e da atividade biológica do extrato hexânico de galhos de Maytenus gonoclada (Celastraceae)**. Dissertação. Universidade Federal de Minas Gerais. 2010.
- SILVA, Fernando Cesar. *et al.* Celastráceas: fontes de triterpenos pentacíclicos com potencial atividade biológica. **Rev Virtual Quím**, v. 6, p. 4, 2014.
- SILVA, FERNANDO CÉSAR; DUARTE, L.P. & VIEIRA FILHO, S.A. Celastráceas: fontes de triterpenos pentacíclicos com potencial atividade biológica. **Revista Virtual de Química**, v. 6, n. 5, 2014.
- SILVA, Marcelo Sobral *et al.* Alkaloid, flavonoids, and pentacyclic triterpenoids of *Maytenus obtusifolia* Mart. **Biochem Sys Ecol**, v. 36, p. 500-503, 2008.
- SILVA, Silvia Ribeiro de Souza *et al.* Lupane pentacyclic triterpenes isolated from stems and branches of *Maytenus imbricate* (Celastraceae). **Helv Chim Acta**, v. 88, p. 1102-1109, 2005.
- SILVA, Suellen Maria Pinto de Menezes. **Potencial antibacteriano e mdulador de resitência a drogas de extratos e constituintes de alga marinha em Staphylococcus aureus**. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Molecular). Universidade Federal da Paraíba. 2013.
- SILVA, T.B. *et al.* Chemical composition and anti-Trypanosoma cruzi activity of essential oils obtained from leaves of *Xylopia frutescens* and *X. laevigata* (Annonaceae). **Nat Prod Commun**, v. 8, n. 3, p. 403-406, 2013.
- SIMÃO, S. **Tratado de fruticultura**. Piracicaba: FEALQ, p.313-326, 1998.
- SOARES, PATRÍCIA KAORI. **Taxonomia por abordagem metabolômica e métodos quimiométricos para análise e rastreo de plantas do gênero Bauhinia**. Dissertação (Mestrado em Química dos Recursos Naturais). Universidade Estadual de Londrina. 2006.
- SOMWONG, Pathom; SUTTISRI, R. BUAKEAW, A. A new 1,3-diketofriedelane triterpene from *Salacia verrucosa*. **Fitoterapia**, v. 82, p. 1047-1051, 2011.
- SOUSA, O.V. *et al.* Atividades antiinflamatória e antinociceptiva do óleo essencial das cascas de *Duguetia lanceolata* St. Hil., Annonaceae. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 14, p. 14-16, 2004.

- SOUSA, CLEYTON MARCOS DE M. *et al.* Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. **Quim Nova**, v. 30, n. 2, p. 351-355, 2007.
- SOUSA, Grasiely F. *et al.* New Triterpenes from *Maytenus robusta*: Structural Elucidation Based on NMR Experimental data and theoretical calculations. **Molecules**, v. 17, p. 13439-13456, 2012a.
- SOUSA, Grasiely F. *et al.* Structural determination of 3 β ,11 β -dihydroxyfriedelane from *Maytenus robusta* (Celastraceae) by 1D and 2D NMR. **J Chem Res**, v. 36, n. 4, p. 203-205, 2012b.
- SOUSA, Grasiely Faria *et al.* Pentacyclic Triterpenes from Branches of *Maytenus robusta* and in vitro Cytotoxic Property Against 4T1 Cancer Cells. **J Braz Chem Soc**, p. 1-8, 2014.
- SOUZA FILHO, A.P.S *et al.* Atividade potencialmente alelopática do óleo essencial de *Ocimum americanum*. **Planta Daninha**, v. 27, n. 3, p. 499-505, 2009.
- SPIVEY, Alan C.; WESTON, Matthew & WOODHEAD, Steven. Celastraceae sesquiterpenoids: biological activity and synthesis. **Chem Soc Rev**, v. 31, p. 43-59, 2002.
- SUNG, Bokyoung *et al.* Corosolic acid induces apoptotic cell death in HCT116 human colon cancer cells through a caspase-dependent. **Int J Mol Med**, v. 33, n. 4, p. 943-949, 2014.
- SURESH, G. *et al.* Two new cytotoxic labdane diterpenes from the rhizomes of *Hedychium coronarium*. **Bioorg Med Chem Lett**, v. 20, n. 24, p. 7544-7548, 2010.
- SUTHAR, Sharad Kumar; LEE, Hong Boon & SHARMA, Manu. The synthesis of non-steroidal anti-inflammatory drug (NSAID)-lantadene prodrugs as novel lung adenocarcinoma inhibitors via the inhibition of cyclooxygenase-2 (COX-2), cyclin D1 and TNF- α -induced NF- κ B activation. **RSC Adv**, v. 4, p. 19283-19293, 2014.
- TAVARES, J. F. 2004. **Alcalóides de *Xylopia langsdorffiana* A. St. Hil & Tul (Annonaceae)**. João Pessoa – Universidade Federal da Paraíba. Dissertação de mestrado. 2004.
- TAVARES, J. F. **Estudo fitoquímico de *Xylopia langsdorffiana* St.-Hil. & Tul e *Fusaea longifolia* (Aubl.) Saff.: Isolamento, Caracterização Estrutural e Atividade Biológica**. João Pessoa - Universidade Federal da Paraíba. Tese de Doutorado, 2007a.
- TAVARES, J. F. *et al.* Xylodiol, a new atisane diterpenoid from *Xylopia Langsdorffiana* St.-Hil. & Tul. (Annonaceae). **Z Naturforsch**, v. 62, n. 5, p. 742-744, 2007b.
- TAVARES, Josean Fechine *et al.* ent-trachylobane diterpenoids from *Xylopia langsdorffiana*. **J Nat Prod**, v. 69, p. 960-962, 2006.
- THOMSEN, R. & CHRISTENSEN, M. H. MolDock: A New Technique for high-Accuracy Molecular Docking. **J Med Chem**, v. 49, n. 11, p. 3315-3321, 2006.
- TININIS, A.G. *et al.* Composição e variabilidade química de óleo essencial de *Casearia sylvestris* SW. **Rev Bras Pl Med**, v. 8, n. 4, p. 132-136, 2006.

- TINTINO, Saulo Relison *et al.* Atividade moduladora de extratos etanólico e hexânico de raiz de *Costus cf. arabicus* sobre drogas antimicrobianas. **R bras Bioci**, v. 11, n. 2, p. 157-162, 2013.
- TSHIKALANGE, T. E. & HUSSEIN, A. Cytotoxicity activity of isolated compounds from *Elaeodendron transvaalense* ethanol extract. **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 4, n. 16, p. 1695-1697, 2010.
- TUROLLA, M.S.R.; Nascimento, E. Informações toxicológicas de alguns fitoterápicos utilizados no Brasil. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 42, n. 2, 2006.
- TYLER, V.E. **Natural products and medicine: an overview**. In: Balick, M.J.; Elisabetsky, E.; Laird, S.A., eds. Medicinal resources of the tropical forest, biodiversity and its importance to human health. New York: Columbia University Press, p.3-10, 1996.
- UDDIN, Ala *et al.* Isolation of triterpenes and bioassay of fractions from roots of the *Maytenus royleanus* (Wall. ex M.A. Lawson) Cufodontis. **World Applied Sciences Journal**, v. 21, n. 2, 196-202, 2013.
- UTAMI, Rahayu *et al.* Phenolic contents, antioxidant and cytotoxic activities of *Elaeocarpus floribundus* Blume. **Pak J Pharm Sci**, v. 26, n. 2, p. 245-250, 2013.
- VALVERDE, Ricardo. Doenças negligenciadas. Disponível em: <<http://www.agencia.fiocruz.br/doen%C3%A7as-negligenciadas>>. Acesso em 16 de novembro de 2014.
- VARELA, Javier *et al.* Bioactive-guided identification of labdane diterpenoids from aerial parts of *Aristeguietia glutinosa* as anti-*Trypanosoma cruzi* agents. **Nat Prod Commun**, v. 7, n. 9, p. 1139-1142, 2012.
- VASCONCELOS, F. R. *et al.* Perfil de resistência antimicrobiana de *Escherichia coli* isoladas do açude santo anastácio, ceará, Brasil. **Arq Inst Biol**, v.77, n. 3, p. 405-410, 2010.
- VERMES, A.; GUCHELAAR, H.J. & KOOPMANS, R.P. Individualization of cancer therapy based on cytochrome P450 polymorphism: a pharmacogenetic approach. **Cancer Treatment Reviews**, v. 23, p. 321-339, 1997.
- VIEGAS JÚNIOR, Cláudio. Terpenos com atividade inseticida: uma alternativa para o controle químico de insetos. *Quim. Nova*, v. 26, n. 3, p. 390-400, 2003.
- VILEGAS, W. *et al.* Diterpenic adducts from *Xylopia* species. **Phytochemistry**, v. 30, p. 1869-1872, 1991.
- VILEGAS, Wagner *et al.* Isolation and Structure Elucidation of Two New Flavonoid Glycosides from the Infusion of *Maytenus aquifolium* Leaves. Evaluation of the Antiulcer Activity of the Infusion. **J Agr Food Chem**, 47(2), 403-406, 1999.
- VILLENA, Joan *et al.* Diterpenylhydroquinones from Natural ent-Labdanes Induce Apoptosis through Decreased Mitochondrial Membrane Potential. **Molecules**, v. 18, p. 5348-5359, 2013.
- VITOR, C.E. *et al.* Therapeutic action and underlying mechanisms of a combination of two

- pentacyclic triterpenes, α and β -amyrin, in a mouse model of colitis. **Br J Pharmacol**, v. 157, n. 6, p. 1034–1044, 2009.
- WAHI, A.; ROBLLOT, F.; CAVE, A. Isolation and Structure Elucidation of Xylobuxin: A new neolignan from *Xylopia buxifolia*. **Jurnal of Natural Products**, v. 54, n. 5, p. 786- 789, 1995.
- WENZIG, Eva M. Pferschy *et al.* In Vitro Anti-inflammatory Activity of Larch (*Larix decidua* L.) Sawdust. **J Agric Food Chem**, v. 56, p. 11688-11693, 2008.
- WESTER, Michael R. *et al.* The structure of human cytochrome P450 2C9 complexed with flurbiprofen at 2.0-Å resolution. **J Biol Chem**, v. 279, n. 34, p. 35630-7, 2004.
- WHO – World Health Organization. Chagas disease (American trypanosomiasis). Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs340/en/> Acesso em: 06 de Nov. de 2014.
- WOLD, Svante. Principal Component Analysis. **Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems**, v.2, p. 37-52, 1987.
- WU, Xing-De *et al.* Labdane diterpenoids and lignans from *Calocedrus macrolepis*. *Fitoterapia*, v. 85, p. 154-160, 2013.
- XIE, Haiping *et al.* Three novel friedelane triterpenes with antimicrobial activity from the stems of *Celastrus monospermus*. **J Chem Res**, v. 37, n. 1, p. 14-18, 2013.
- XU, Xudong *et al.* Eight kinds of cassane diterpene compounds with significant antitumor activity. **Faming Zhuanli Shenqing**, 2014.
- YAN, Xiao-Hong; FENG, Lin-Yin & GUO, Yue-We. Further new cembrane diterpenes from the hainan soft coral *Sarcophyton latum*. **Chin J Chem**, v. 26, p. 150-152, 2008.
- YEH, Chi-Tai *et al.* Cytotoxic triterpenes from *Antrodia camphorata* and their mode of action in HT-29 human colon cancer cells. **Cancer Lett**, v. 285, n. 1, p. 73-9, 2009.
- YIN, Tianpeng *et al.* Two new diterpenoid alkaloids from the roots of *Aconitum duclouxii* Levi. **Youji Huaxue**, v. 33, n. 12, p. 2528-2532, 2013.
- YOSHIKAWA, Kazuko *et al.* Lanostane Triterpenoids and Triterpene Glycosides from the Fruit Body of *Fomitopsis pinicola* and Their Inhibitory Activity against COX-1 and COX-2. **J Nat Prod**, v. 68, p. 69-73, 2005.
- ZAGO, Juliana A. A. *et al.* Sinergismo entre óleos essenciais e drogas antimicrobianas sobre linhagens de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* isoladas de casos clínicos humanos. **Rev Bras Farmacogn**, v. 19, n. 4, p. 828-833 2009.
- ZHANG, Hongjie. Anticancer and anti-obesity cyclic peptide agents derived from plant *Maytenus variabilis*. **PCT Int Appl**, 2014.
- ZHANG, Yanjun *et al.* Cyclooxygenase-2 enzyme inhibitory triterpenoids from *Picrorhiza kurroa* seeds. **Life Sciences**, v. 77, p. 3222-3230, 2005.

ZHANG, Yi *et al.* The absolute stereostructures of three rare D:B-friedobaccharane skeleton triterpenes from the leaves of *Salacia chinensis*. **Tetrahedron**, v. 64, n. 30-31, p. 7347-7352, 2008.