

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS  
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA**

**PROJETO DE PESQUISA**

**Estudo fitoquímico e atividade biológica de  
constituintes das folhas e galhos de *Maytenus  
quadrangulata* (celastraceae)**

**Grasiely Faria de Sousa**

**Belo Horizonte  
2017**

## SUMÁRIO

<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>01</b>
<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>04</b>
Objetivo Global.....	04
Objetivos Específicos e Metas.....	04
<b>METODOLOGIA PROPOSTA.....</b>	<b>05</b>
Coleta do Material Vegetal.....	05
Estudo Fitoquímico.....	05
Análise Estrutural.....	06
Avaliação da Atividade Biológica.....	06
<b>JUSTIFICATIVA DO PROJETO.....</b>	<b>07</b>
<b>MEIOS DE DIVULGAÇÃO.....</b>	<b>08</b>
<b>CRONOGRAMA DE ATIVIDADES PARA 3 ANOS.....</b>	<b>08</b>
<b>BIBLIOGRAFIA.....</b>	<b>08</b>

## INTRODUÇÃO

Produtos naturais desempenham um papel altamente significativo na busca de novos fármacos (NEWMAN e CRAGG, 2016). Isso se deve ao fato desses compostos possuírem estrutura química contendo grupos funcionais e estereoquímica adequada para interagir com enzimas e outros alvos biológicos que desempenham funções específicas nos organismos (LI e VEREDAS, 2009). Esta interação resulta em efeitos toxicológicos ou farmacológicos de interesse. Micro-organismos, plantas, organismos marinhos, vertebrados e invertebrados terrestres e outras fontes de produtos naturais, têm sido utilizados em pesquisas visando o isolamento de novos compostos com potencial farmacológico (NEWMAN et al., 2000).

Nas plantas os metabólitos secundários estão relacionados a funções ecológicas e são importantes para o processo de adaptação das espécies. Além de exercerem funções fisiológicas importantes, essas substâncias conferem proteção contra infecções microbianas e ação predatória de herbívoros (CROTEAU et al., 2000).

A maioria dos fármacos presentes nos medicamentos disponíveis apresenta alguma relação com produtos naturais. De acordo com Newman e Cragg (2016), entre 1981 e 2014 foram aprovados 1562 novos medicamentos pelo FDA e outras agências reguladoras. Destes, 25% apresentam fármacos baseados em produtos naturais e obtidos por síntese total, 26% contêm produtos naturais inalterados ou com pequenas modificações estruturais, 22% são vacinas e peptídeos, e 27% contêm fármacos totalmente sintéticos. Portanto, no período analisado, 73% dos medicamentos aprovados estão relacionados com produtos naturais. Newman e Cragg (2016) também avaliaram todos os medicamentos aprovados no mundo para o tratamento do câncer. Para essa categoria de doenças a influência de produtos naturais é ainda mais marcante. Entre 1940 e 2014 foram aprovados 246 novos medicamentos utilizados contra o câncer e 28% deles apresentam fármacos sintéticos baseados em produtos naturais, 37% contêm produtos naturais ou produtos naturais com pequenas modificações estruturais, 16% são vacinas e peptídeos e 19% apresentam fármacos totalmente sintéticos. Assim, 81% dos

medicamentos disponíveis para o tratamento do câncer apresentam alguma relação com produtos naturais.

A descoberta de novas classes de fármacos é extremamente importante e a diversidade estrutural encontrada nos metabólitos secundários é útil na pesquisa para se atingir diferentes alvos biológicos. Existem enfermidades para as quais os tratamentos ainda não são adequados ou eficazes, como, por exemplo, AIDS, mal de Alzheimer, doença de Chagas e diversos tipos de câncer. Assim, a exploração da diversidade química dos produtos naturais na busca de novos medicamentos certamente proporciona obtenção de resultados promissores (LI e VEDERAS, 2009).

Um novo composto bioativo isolado serve de modelo para a obtenção de análogos com melhores propriedades farmacológicas e farmacocinéticas do que a substância natural original e pode resultar na produção de mais de um novo fármaco. Nesse contexto, produtos naturais estimulam o desenvolvimento da química orgânica, ocasionando avanços em metodologias de síntese na busca de fármacos que resultem em melhores resultados terapêuticos e sejam, ainda, economicamente viáveis (HARVEY, 2008).

O Brasil é privilegiado em relação ao número de fontes de produtos naturais disponíveis em seu território. O país possui uma riqueza biológica quase imensurável e abriga grande biodiversidade, contendo de 10 a 20% dos seres vivos conhecidos, distribuídos em seis grandes biomas: amazônia, caatinga, mata atlântica, cerrado, pantanal e pampa (VALLI et al., 2012). A biodiversidade brasileira representa um grande potencial econômico a ser explorado para a identificação de novos compostos bioativos. Recentemente o país alterou a legislação referente à exploração da biodiversidade, com o objetivo de desburocratizar o processo e estimular o desenvolvimento sustentável e a pesquisa científica no país. Em 20 de maio de 2015 foi aprovada a Lei Federal nº 13.123 que entrou em vigor em 17 de novembro de 2015 e revogou a Medida provisória nº 2.186-16, de 23 de agosto de 2001. A nova lei foi regulamentada pelo Decreto nº 8.772/2016 e visa facilitar o acesso ao patrimônio genético e ao conhecimento tradicional, com a substituição da autorização prévia do Conselho de Gestão do Patrimônio Genético (CGen) por um cadastro de pesquisa. Essa lei, também, legaliza e incentiva a pesquisa, estimula a inovação e obtenção de novos produtos, facilita o depósito de patentes no Instituto Nacional de Propriedade Industrial (INPI) e aumenta a participação das populações

indígenas, comunidades e agricultores tradicionais nas decisões (Brasil. Lei nº 13.123 de 20 de maio de 2015).

Entre os diversos tipos de organismos que podem ser explorados na busca de agentes terapêuticos existe um grande interesse por espécies vegetais. Isso se deve ao elevado número de fármacos derivados de plantas que deram origem a medicamentos (KINGHORN et al., 2011). Uma família de plantas que vem se destacando é a Celastraceae.

As plantas da família Celastraceae são agrupadas em 98 gêneros, compreendendo cerca de 1300 espécies encontradas principalmente nas regiões tropicais e subtropicais (SIMMONS et al., 2001; SPIVEY et al., 2002). Vários compostos bioativos foram obtidos de espécies dessa família. Entre eles, sesquiterpenos, triterpenos e quinonametídeos (ALVARENGA e FERRO, 2006; NIERO et al., 2011). No Brasil, os gêneros da família Celastraceae mais conhecidos são *Maytenus* Juss., *Goupia* Reiss., *Austroplenckia* Lund. e *Franhoferia* Mart. (BARROSO et al., 1984; CARVALHO OKANO, 1992).

O gênero *Maytenus* é um dos maiores da família Celastraceae com aproximadamente 300 espécies, distribuídas ao redor do mundo em regiões tropicais e subtropicais (McKENNA et al., 2011). No Brasil, são reconhecidas 76 espécies de *Maytenus* (NIERO et al., 2011). Em estudos fitoquímicos envolvendo espécies desse gênero foram identificados compostos de várias classes, tais como flavonoides, triterpenos pentacíclicos, taninos condensados, alcaloides e outras (DE ANDRADE et al., 2008). Algumas espécies de *Maytenus* são utilizadas na medicina popular para o tratamento de úlceras estomacais (NIERO et al., 2001). No Brasil existem medicamentos fitoterápicos produzidos a partir do extrato seco de *M. ilicifolia* e empregados no tratamento de distúrbios gastrointestinais.

*Maytenus quadrangulata* (Schrad.) Loes. é um arbusto endêmico do Brasil e ocorre nos biomas caatinga e mata atlântica. Foram encontrados exemplares nos estados de Minas Gerais, Espírito Santo e Bahia (CARDOSO e QUEIROZ, 2008; Flora do Brasil 2020 em construção; MENINO et al., 2015). *M. quadrangulata* é popularmente conhecida como espinho-de-Deus na Bahia, a espécie atinge cerca de 10 metros de altura, apresenta caule ramificado desde a base, ramos achatados-retangulares com ângulos carenados e folhas em formato elíptico, sem pêlos, com margem contendo muitos espinhos (Carvalho-Okano, 1992). Em buscas realizadas na literatura não foi encontrado nenhum relato de estudos de identificação de

constituintes químicos e avaliação da atividade biológica da espécie. Diante do exposto acima, pretende-se realizar o estudo fitoquímico de *M. quadrangulata* a fim de identificar, isolar, realizar a determinação estrutural e avaliar a atividade de possíveis compostos bioativos presentes na espécie.

## **OBJETIVOS**

### **Objetivo Global**

Fortalecer o grupo Núcleo de Estudos de Plantas Medicinais (NEPLAM), coordenado até o momento pela professora Dra. Lucienir Pains Duarte, contribuindo com utilização da técnica hifenada de cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas de alta resolução para a desreplicação de extratos polares.

Dar continuidade aos estudos quimiotaxonômicos da família Celastraceae, por meio do isolamento de constituintes, identificação estrutural e avaliação da potencial atividade biológica de extratos e compostos isolados da espécie *Maytenus quadrangulata*.

### **Objetivos Específicos e Metas**

- Realizar o estudo fitoquímico de folhas e galhos de *Maytenus quadrangulata*.
- Realizar um estudo detalhado de confirmação estrutural dos metabólitos secundários isolados, utilizando métodos espectroscópicos e espectrométricos.
- Realizar estudos de atividade biológica de extratos e de compostos isolados.
- Realizar modificações estruturais em compostos isolados que apresentarem atividade biológica e que tenham sido isolados em quantidades satisfatórias.
- Analisar extratos polares e frações utilizando cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas de alta resolução, a fim de obter informações para direcionar o isolamento de novos compostos ou para a desreplicação de constituintes conhecidos.
- Estabelecer relações quimiotaxonômicas entre espécies da família Celastraceae.

- Contribuir com a formação e capacitação de pessoal em nível de graduação e pós-graduação, através de orientações de estagiários e bolsistas.

## **METODOLOGIA PROPOSTA**

### **Coleta do Material Vegetal**

Após a localização e a identificação botânica da espécie *Maytenus quadrangulata* será realizada a coleta do material vegetal. Uma exsicata desse material será preparada e depositada em herbário. Será realizado o cadastro da atividade de pesquisa do material vegetal no SisGen (Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado) conforme determina a legislação vigente. Para a coleta e identificação contamos com a colaboração da Profa. Maria Olívia Mercadante Simões da Universidade Estadual de Montes Claros - (UNIMONTE).

### **Estudo Fitoquímico**

Após secagem ao ar livre e em temperatura ambiente, o material vegetal será pulverizado e em seguida submetido à extração exaustiva, em temperatura ambiente ou em aparelho Soxhlet, com hexano, diclorometano ou clorofórmio, acetato de etila, metanol e/ou outros solventes que permitam a obtenção de gradiente de polaridade.

Para o isolamento de compostos químicos serão utilizados métodos fitoquímicos convencionais de fracionamento compreendendo técnicas de cromatografia em coluna aberta, cromatografia em camada delgada e marcha química. Também será empregada cromatografia líquida de média pressão utilizando o equipamento Isolera One Biotage® equipado com detector UV/VIS e coluna de fase normal ou fase reversa. A purificação dos compostos isolados será feita por meio de recristalização, cromatografia em coluna, cromatografia em camada delgada preparativa e cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).

As análises por CLAE acoplada a espectrometria de massas de alta resolução serão, a princípio, realizadas em parceria com a Profa. Dra. Tânia Maria de Almeida Alves do Laboratório de Química de Produtos Naturais do Centro de Pesquisas

René Rachou - FIOCRUZ. Os dados de massas obtidos (MS e MS/MS) serão processados empregando um *software* para a obtenção de uma lista de possíveis fórmulas moleculares dos íons adquiridos. As informações obtidas serão comparadas com perfis de substâncias descritas em bancos de dados de massas (MassBank, MetFrag, METLIN). Estas análises poderão ser futuramente desenvolvidas no Departamento de Química da UFMG, já que o departamento possui com um espectrômetro Shimadzu LCMS-IT-TOF.

### **Análise Estrutural**

Os metabólitos secundários isolados serão caracterizados por meio de análise comparativa e métodos espectroscópicos e espectrométricos. A elucidação estrutural será realizada utilizando espectroscopia na região do infravermelho e de ressonância magnética nuclear (RMN) e espectrometria de massas. As análises serão realizadas empregando os equipamentos disponíveis na infraestrutura do Departamento de Química da UFMG.

### **Avaliação da Atividade Biológica**

O estudo da atividade biológica dos extratos e de compostos isolados será realizado em parceria com outros grupos de pesquisa.

#### *Atividade antimicrobiana*

Extratos, frações e compostos puros obtidos serão submetidos a testes contra bactérias e fungos utilizando a técnica de concentração inibitória mínima (TAKAHASHI et al., 2008), realizados no Laboratório de Biotecnologia e Bioensaios, sob supervisão da Profa. Dra Jacqueline Aparecida Takahashi.

A avaliação da atividade tripanocida utilizando teste de inibição da enzima tripanotiona redutase (OLIVEIRA et al., 2006). E, a avaliação da atividade leishmanicida empregando o ensaio de citotoxicidade *in vitro* contra células amastigotas de *Leishmania amazonensis* (SIQUEIRA et al., 2010) serão realizados no Centro de Pesquisas René Rachou – FIOCRUZ, com a colaboração da Profa. Dra Tânia Maria de Almeida Alves.



### *Atividade citotóxica*

Extratos e compostos puros serão submetidos a testes de atividade citotóxica utilizando linhagens de células tumorais. Será utilizado o método colorimétrico desenvolvido no Instituto Nacional do Câncer dos EUA (MONKS et al., 1991). Os ensaios serão realizados em colaboração com o Prof. Dr. Adriano de Paula Sabino da Faculdade de Farmácia da UFMG.

### *Atividade de inibição da enzima acetilcolinesterase*

Testes da capacidade de inibição da enzima acetilcolinesterase serão realizados no Laboratório de Biotecnologia e Bioensaios do Departamento de Química da UFMG, utilizando o método de inibição da AChE em microplaca (RHEE et al., 2001).

### *Atividade anti-inflamatória*

Ensaio de avaliação da atividade anti-inflamatória empregando o modelo do edema de pata induzido por carragenina (WINTER et al., 1962) serão realizados no Laboratório de Fitoquímica e Química Medicinal da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Alfenas, em colaboração com a Professora Dra. Danielle Ferreira Dias.

## **JUSTIFICATIVA DO PROJETO**

O estudo de *Maytenus quadrangulada* levará ao isolamento, determinação estrutural e avaliação da atividade biológica de constituintes da espécie. Novos compostos bioativos poderão ser identificados e será possível estabelecer relações fitoquímicas entre espécies da família Celastraceae. Não há registros na literatura de estudos dos constituintes químicos e/ou da atividade biológica de *M. quadrangulada*. A espécie é uma planta endêmica do Brasil e o seu estudo contribuirá para a exploração da biodiversidade brasileira na busca de compostos químicos que possam contribuir para o desenvolvimento de novos fármacos. A princípio serão utilizadas as folhas e galhos da planta uma vez que se trata de recurso renovável e de fácil coleta.

## MEIOS DE DIVULGAÇÃO

Os resultados da pesquisa serão publicados em periódicos indexados no Qualis da Química, definido pela Capes, e/ou com fator de impacto, definido pelo *Institute for Scientific Information* (ISI). Os resultados obtidos, também, serão divulgados em congressos científicos ou similares.

## CRONOGRAMA DE ATIVIDADES

Atividades	2017		2018		2019	
	1	2	1	2	1	2
Pesquisa bibliográfica	■	■	■	■	■	■
Obtenção dos extratos das folhas e galhos	■	■	■			
Fracionamento dos extratos das folhas e galhos	■	■	■	■	■	
Caracterização estrutural		■	■	■	■	■
Estudo da atividade biológica		■	■	■	■	■
Redação e submissão de artigos			■			■
Divulgação dos resultados em congressos científicos		■		■	■	■

## BIBLIOGRAFIA

Alvarenga, N.; Ferro, E. A. Bioactive triterpenes and related compounds from Celastraceae. *Stud. Nat. Prod. Chem.*, 33, 239-307, 2006.

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

Brasil. Lei nº 13.123 de 20 de maio de 2015. Dispõe sobre o acesso ao patrimônio genético, sobre a proteção e o acesso ao conhecimento tradicional associado e sobre a repartição de benefícios para conservação e uso sustentável da biodiversidade. Disponível em: <[http://www.planalto.gov.br/ccivil\\_03/\\_Ato2015-2018/2015/Lei/L13123.htm](http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_Ato2015-2018/2015/Lei/L13123.htm)>. Acesso em: 27 janeiro 2017.

Brasil. Decreto nº 8.772 de 11 de maio de 2016. Regulamenta a Lei nº 13.123, de 20 de maio de 2015, que dispõe sobre o acesso ao patrimônio genético, sobre a proteção e o acesso ao conhecimento tradicional associado e sobre a repartição de benefícios para conservação e uso sustentável da biodiversidade. Disponível em: [http://www.planalto.gov.br/ccivil\\_03/\\_Ato2015-2018/2016/Decreto/D8772.htm](http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_Ato2015-2018/2016/Decreto/D8772.htm).

Acesso em: 27 janeiro 2017.

Cardoso, D. B. O. S.; Queiroz, L. P. Floristic composition of seasonally dry tropical forest fragments in central Bahia, Northeastern Brazil. *J. Bot. Res. Inst. Tex.*, 2, 551-573, 2008.

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

Croteau, R.; Kutchan, T. M.; Lewis, N. G. Natural Products (Secondary Metabolites). In: Buchanan, B.B.; Gruissem, W.; Jones, R.L. Biochemistry and molecular biology of plants. Rockville: American Society of Plant Physiologists, 2000. 1367p.

De Andrade, S. F.; Lemos, M.; Comunello, E.; Noldin, V. F.; Delle Monache, F.; Cechinel Filho, V.; Niero, R. Antiulcerogenic activity of fractions and 3,15-dioxo-21 $\alpha$ -hydroxyfriedelane isolated from *Maytenus robusta* (Celastraceae). *Arch. Pharm. Res.*, 31, 41-46, 2008.

Flora do Brasil 2020 em construção. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: < <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/> >. Acesso em: 28 Jan. 2017

Harvey, A. L. Natural products in drug discovery. *Drug Disc. Today*, 13, 894-901, 2008.

Kinghorn, A. D.; Pan, L.; Fletcher, J. N.; Chai, H. The Relevance of Higher Plants in Lead Compound Discovery Programs. *J. Nat. Prod.*, 74, 1539-1555, 2011.

Li, J. W.H.; Vederas, J. C. Drug Discovery and Natural Products: End of an Era or an Endless Frontier? *Science*, 325, 161-165, 2009.

McKenna, M. J.; Simmons, M. P.; Bacon, C. D.; Lombardi, J. A. Delimitation of the Segregate Genera of *Maytenus* s. l. (Celastraceae) Based on Morphological and Molecular Characters. *Syst. Bot.*, 36, 922-932, 2011.

Menino, G. C. O.; Santos, R. M.; Apgaua, D. M. G.; Pires, G. G.; Pereira, D. G. S.; Fontes, M. A. L.; Almeida, H. S. Florística e estrutura de florestas tropicais sazonalmente secas. *Cerne*, 21, 277-291, 2015.

Monks, A.; Scudiero, D.; Skehan, P.; Shoemaker, R.; Paull, K.; Vistica, D.; Hose, C.; Langley, J.; Cronise, P.; Vaigro-Wolff, A.; Gray-Goodrich, M.; Campbell, H.; Mayo, J.; Boyd, M. Feasibility of a high-flux anticancer drug screen using a diverse panel of cultured human tumor-cell lines. *J. Natl. Cancer Inst.* 83, 757-766, 1991.

Newman, D. J.; Cragg, G. M.; Snader, K. M. The influence of natural products upon drug discovery. *Nat Prod Rep.*, 17, 215-234, 2000.

Newman, D. J.; Cragg, G. M.; Snader, K. M. Natural Products as Sources of New Drugs from 1981 to 2014. *J. Nat. Prod.*, 79, 629-661, 2016.

Niero, R.; Moser, R.; Busato, A. C. B.; Yunes, R. A.; Reis, A.; Cechinel Filho, V. A comparative chemical study of *Maytenus ilicifolia* Mart. Reiss and *Maytenus robusta* Reiss (Celastraceae). *J. Biosci.*, 56, 158-161, 2001.

Niero, R.; Andrade, S. F.; Cechinel Filho, V. A Review of the ethnopharmacology, phytochemistry and pharmacology of plants of the *Maytenus* Genus. *Curr. Pharm. Des.*, 17, 1851-1871, 2011.

Oliveira, R. B.; Vaz, A. B. M.; Alves, R. O.; Liarte, D. B.; Donnici, C. L.; Romanha, A. J.; Zani, C. L. Arylfurans as potential *Trypanosoma cruzi* trypanothione reductase inhibitors. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 101, 169-173, 2006.

Rhee, I.; Meent, M.; Ingkaninan, K.; Verpoorte, R. Screening for acetylcholinesterase inhibitors from Amaryllidaceae using silica gel thin-layer chromatography in combination with bioactivity staining. *J. Chromatography A*, 915, 217-223, 2001.

Simmons, M. P.; Savolainen, V.; Clevinger, C. C.; Archer, R. H.; Davis, J. I., Phylogeny of the Celastraceae Inferred from 26S Nuclear Ribosomal DNA, Phytochrome B, *rbcl*, *atpB*, and Morphology. *Mol. Phylogenet. Evol.*, 19, 353-366, 2001.

Siqueira, E. P.; Souza-Fagundes, E. M.; Sobral, M. E. G.; Alves, T. M. A.; Rabello, A.; Zani, C. L. Leishmanicidal activities of the extract from *Blepharocalyx salicifolius* (Kunth) O. Berg, Myrtaceae. *Rev. Bras. Farmacog.* 20, 416-421, 2010.

Spivey, A. C.; Weston, M.; Woodhead, S., Celastraceae sesquiterpenoids: biological activity and synthesis. *Chem. Soc. Rev.*, 31, 43-59, 2002.

Takahashi, J. A.; Castro, M. C. M.; Souza, G. G.; Lucas, E. M. F.; Bracarense, A. A. P.; Abreu, L. M.; Marriel, I. E.; Oliveira, M. S.; Floreano, M.; Oliveira, T. S. Isolation and screening of fungal species isolated from Brazilian cerrado soil for antibacterial activity against *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhimurium*, *Streptococcus pyogenes* and *Listeria monocytogenes*. *J Mycol Med.*, 18, 198-204, 2008.

Valli, M.; Pivatto, M.; Danuello, A.; Castro-Gamboa, I.; Siqueira Silva, D. H.; Cavalheiro, A. J.; Araújo, A. R.; Furlan, M.; Lopes, M. N.; Bolzani, V. S. Tropical biodiversity: has it been a potential source of secondary metabolites useful for medicinal chemistry? *Quim. Nova*, 35, 2278-2287, 2012. 13.

Winter, C. A; Riskey, E. A.; Nuss, G. W. Carrageenin-induced edema in hind paw of the rat as an assay for antiinflammatory drugs. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 111, 544-547, 1962.