

ALCALOIDES SESQUITERPÊNICOS ISOLADOS DE *Maytenus distichophylla* (CELASTRACEAE)

Pedro Thiago Ramalho de Figueiredo^{a,1b}, Marcelo Cavalcante Duarte^b, Laís Vilar Cordeiro^{a,1b}, Renata Priscila Barros de Menezes^a, Edeltrudes de Oliveira Lima^a, Marcus Tullius Scotti^{a,1b}, Josean Fachine Tavares^{a,1b}, Vicente Carlos de Oliveira Costa^a e Marcelo Sobral da Silva^{a,*}

^aCentro de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Paraíba, 58051-900 João Pessoa – PB, Brasil

^bCentro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal de Sergipe, 49100-000 São Cristóvão – SE, Brasil

Recebido em 21/09/2022; aceito em 18/08/2023; publicado na web 06/11/2023

SESQUITERPENES ALKALOIDS FROM *Maytenus distichophylla* (CELASTRACEAE). The phytochemical study of the roots of *Maytenus distichophylla* Mart. ex Reissek (Celastraceae), resulted in the isolation of the seven sesquiterpenes pyridine alkaloids euojaponine F (1), euojaponine K (2), ebinifoline W-I (3), wilforine (4), maiteine (5), euojaponine A (6) and ebinifoline E-II (7). The structures of compounds were established using spectroscopic techniques such as 1D and 2D NMR. All compounds were subjected to an *in silico* study through of a predictive model and then submitted to *in vitro* testing against *S. epidermidis*, *P. aeruginosa*, *C. parapsilosis* and *C. albicans* for evaluation of their antimicrobial activity. The compounds tested showed bacterial and fungal growth inhibition with MIC values 1024 and 256 $\mu\text{g mL}^{-1}$, respectively.

Keywords: Celastraceae; *Maytenus distichophylla*; sesquiterpene pyridine alkaloids; antimicrobial activity.

INTRODUÇÃO

O gênero *Maytenus* (sinônimo *Monteverdia*) é considerado o maior em representatividade dentro da família Celastraceae, com aproximadamente 123 espécies distribuídas geograficamente em regiões de climas tropicais e subtropicais do mundo.^{1,2} No continente americano este gênero está presente desde do extremo sul da Argentina, precisamente na terra do fogo, até o sul dos Estados Unidos.³ No Brasil, espécies do gênero *Maytenus* podem ser encontradas nos seis biomas brasileiros (Amazônia, Caatinga, Cerrado, Mata Atlântica, Pampa, Pantanal), sendo relatadas 49 espécies, das quais 36 são consideradas endêmicas.^{4,5}

As raízes de espécies de *Maytenus* apresentam grande importância para a medicina popular, com destaque para o tratamento dos distúrbios do trato gastrointestinal, como diarreias e úlceras pépticas.^{6,7} *Maytenus* apresenta uma grande diversidade de metabólitos secundários. Dentre eles, incluem-se os alcaloides piridínicos sesquiterpênicos. Tais compostos são estruturas macrocíclicas, formadas pela esterificação de um sesquiterpeno polioxigenado do tipo dihidro- β -agarofurano com diferentes ácidos dicarboxílicos nicotínicos (ácido evonínico, ácido wilfordico, ácido edulínico e ácido cassínico). Destacam-se por possuírem atividades leishmanicida, antitumoral, inseticida, imunossupressora, anti-HIV e anti-inflamatória, além de serem considerados marcadores químicos das raízes das espécies de *Maytenus*.^{8,9}

Maytenus distichophylla (sinônimo *Monteverdia distichophylla*) é conhecida popularmente como “pau-colher”, “casca-amarela”, “pau-doce”. É uma árvore de porte médio, arbustiva, chegando a até 12 metros de altura. Considerada uma espécie endêmica do Brasil, *M. distichophylla* apresenta boa adaptação às regiões da caatinga, principalmente à região do semiárido nordestino e do bioma da mata atlântica. Essa espécie é encontrada com mais frequência em alguns estados do litoral brasileiro, como no Nordeste (Alagoas, Bahia, Paraíba, Pernambuco, Rio Grande do Norte e Sergipe) e Sudeste (Espírito Santo), embora também seja identificada em algumas cidades do estado de Minas Gerais.^{10,11} Das raízes de

M. distichophylla, já foi relatado o isolamento de triterpenos dos tipos friedelano, oleanano, além de quionanametideos.¹²

Observa-se, assim, que *Maytenus* representa um dos gêneros mais utilizados na medicina popular. Com importantes propriedades farmacológicas, apresentando uma riqueza de classes de metabólitos secundários, onde se destacam os alcaloides piridínicos sesquiterpênicos que são encontrados nas raízes de exemplares desse gênero. Entretanto, não são encontrados relatos de isolamento de alcaloides piridínicos sesquiterpênicos em *M. distichophylla*, tornando-se relevante a investigação da presença desses constituintes químicos na espécie, de forma a contribuir para o enriquecimento do conhecimento científico sobre o gênero.

Nesse sentido, este artigo relata os primeiros alcaloides piridínicos sesquiterpênicos isolados das raízes de *M. distichophylla*, bem como, o estudo *in silico* e *in vitro* de extratos, fases e substâncias isoladas.

PARTE EXPERIMENTAL

Procedimentos experimentais gerais

Para análise e desenvolvimento de metodologias analíticas dos extratos e frações de *M. distichophylla* foi utilizada a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) analítica, com auxílio do equipamento Shimadzu Prominence, detector DAD SPD-M20A e colunas de fase reversa C18 (250 mm $\times$ 4,6 mm preenchida com partículas de 10 μm). O fluxo empregado para as análises em escala analítica foi de 0,6 mL min^{-1} , o volume de injeção foi de 20 μL e as amostras preparadas na concentração de 1 mg mL^{-1} . Os isolamentos em CLAE, na escala semi-preparativa, ocorreram no equipamento Shimadzu, detector DAD SPD-M10A VP. A coluna utilizada no procedimento foi uma ACE-5 C18 (250 mm $\times$ 21,2 mm e partículas de 5 μm). O fluxo da fase móvel foi de 8,0 mL min^{-1} , com volume de injeção da amostra de 100 μL , as quais foram preparadas em concentrações de até 100 mg mL^{-1} , variando de acordo com suas características das frações. Para ambos os procedimentos, foram utilizados como fase móvel MeOH grau de pureza HPLC (Tedia®) (solvente B) e água ultrapura (purificada em sistema Milli-Q®) (solvente A), puros ou em misturas binárias.

*e-mail: marcelosobral.ufpb@gmail.com

Os espectros de ressonância magnética nuclear (RMN), uni e bidimensionais, foram registrados nos espectrômetros da Varian System operando a 500 MHz (RMN ^1H) e 125 MHz (RMN ^{13}C) e no aparelho da Bruker Ascend operando a 400 MHz (RMN ^1H) e 100 MHz (RMN ^{13}C) do Laboratório Multiusuário de Caracterização e Análise (LMCA) da UFPB. O solvente empregado para a dissolução das amostras foi o clorofórmio deuterado (CDCl_3) e metanol deuterado (CD_3OD), cujos picos característicos do solvente em RMN ^1H (7,24 ppm), ^{13}C (77,00 ppm) e ^1H (3,33 ppm), ^{13}C (49,00 ppm), que respectivamente serviram como padrões internos durante a obtenção dos espectros.

Material vegetal

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

Extração e isolamento

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

Previamente, foram solubilizados 50 g do extrato etanólico bruto em hexano (Hex) para o procedimento de retirada dos compostos mais apolares com agitação mecânica realizada pelo aparelho da Ethik Technology (Modelo M110-VER-4K3) durante 60 min. Após a evaporação do solvente foram obtidas 322 mg do extrato Hex. O resíduo não solúvel em Hex, foi solubilizado em $\text{H}_2\text{O}:\text{MeOH}$ (7:3) e esta solução hidrometanólica foi submetida a um processo de partição líquido-líquido com os solventes Hex (100%), Hex:AcOEt (8:2), DCM (100%), AcOEt (100%) e *n*-BuOH (100%). As soluções obtidas foram tratadas com sulfato de sódio anidro (NaSO_4) e submetidas à filtração sob pressão reduzida. Após este processo, as soluções foram concentradas em evaporador rotativo a 45 °C e obtidas as seguintes fases: Hex (FH) (1,2 g), Hex:AcOEt (FHA) (8:2) (0,22 g), DCM (FDCM) (0,56 g), AcOEt (FA) (39,8 g) e *n*-BuOH (FB) (6,0 g). Sendo assim, prontas para a realização dos procedimentos cromatográficos.

FHA foi submetida a uma análise exploratória em CLAE-DAD na escala analítica para a visualização do seu perfil cromatográfico. Em seguida, FHA foi purificada por CLAE-DAD semi-preparativa utilizando um gradiente de concentração de 10 a 100% de B em 60 min a 220 nm, obtendo os compostos **3** (1,3 mg, t_r 53,8 min), **5** (2,0 mg, t_r 43,2 min) e **7** (0,8 mg, t_r 56,4 min). FDCM (220 g) foi submetida a um processo cromatográfico utilizando como fase estacionária um cartucho C-18 em sistema a vácuo com auxílio de um manifold e como fase móvel um gradiente de $\text{H}_2\text{O}:\text{MeOH}$ obtendo 5 frações. A fração 4 obtida em $\text{MeOH}:\text{H}_2\text{O}$ (8:2) foi analisada por cromatografia em camada delgada analítica (CCDA) e selecionada para também ser previamente analisada por CLAE-DAD na escala analítica e em seguida foi purificada por CLAE-DAD preparativa

utilizando um gradiente de concentração de 60 a 100% de B em 60 min a 220 nm para a obtenção de **1** (7,5 mg, t_r 36,4 min), **2** (1,2 mg, t_r 29,3 min), **4** (1,0 mg, t_r 35,5 min) e **6** (1,5 mg, t_r 40,2 min).

Banco de dados

A partir do ChEMBL database^{13,14} foram selecionados quatro conjuntos de estruturas químicas com atividade conhecida para os microrganismos *Candida albicans*, *Candida parapsilosis*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus epidermidis* para a construção de modelos preditivos. Os compostos foram classificados a partir da pMIC_{50} ($-\log \text{MIC}_{50}$) em mol L^{-1} , ressaltando que a MIC_{50} representa a concentração mínima necessária para uma inibição de 50% dos microrganismos estudados.

Para todas as estruturas foram utilizados códigos SMILES como dados de entrada para o Marvin 14.9.1.0, 2014, ChemAxon (<http://www.chemaxon.com>).¹⁵ Usou-se ainda o software Standardizer JChem 14.9.1.0, 2014, ChemAxon (<http://www.chemaxon.com>).¹⁶ o qual converte as diversas estruturas químicas em representações canônicas personalizadas. Esta padronização é de suma importância para criar bibliotecas de compostos consistentes, além de obter as estruturas em formas canônicas, adicionar hidrogênios, aromatizar, gerar o 3D e salvar os compostos em formato SDF.

Descritores Volsurf+ v.1.0.7

Foram utilizados descritores moleculares para prever propriedades biológicas e físico-químicas das moléculas dos dois bancos de dados. O cálculo dos descritores é gerado quando as moléculas são transformadas em uma representação molecular que permite o tratamento matemático. O software Volsurf+ v.1.0.7¹⁷ tem a capacidade de calcular 128 descritores moleculares, utilizando campos de interação molecular (MIFs) através de sondas de N1 (amido nitrogênio-hidrogênio doador de ligação de hidrogênio), O (aceptor de ligação de hidrogênio), OH (água) e DRY (sonda hidrofóbica) e também cálculo de descritores não derivados de MIFs.

Modelo de predição

O software Knime 3.5 (Knime 3.5.3 the Konstanz Information Miner Copyright, 2003-2017, www.knime.org)¹⁸ foi utilizado para realizar as análises e gerar o modelo *in silico*. Os bancos de moléculas com os descritores calculados foram importados do software Dragon, e para cada um, os dados foram divididos utilizando uma ferramenta Partitioning com a opção de "Amostra estratificada", separando em Treino e Teste, representando 80 e 20% de todos os compostos, respectivamente, onde foram selecionados aleatoriamente, mas mantendo a proporção de substâncias ativas e inativas, em ambos os bancos de dados.

Para a validação interna fez-se uso da validação cruzada, onde foram separados 10 grupos estratificados, selecionados aleatoriamente, mas distribuídos de acordo com a variável da atividade em todos os grupos de validação. Com os descritores selecionados, o modelo foi gerado usando o conjunto de treinamento utilizando o Random Forest (RF) que é um algoritmo para construção de árvores de decisão,¹⁹ empregado no WEKA.²⁰ Os parâmetros selecionados para RF para todos os modelos gerados foram de 100 o número total de árvores para construir e de 1 semente (*seed*) na geração de números aleatórios para o modelo.

As performances dos testes internos e externos dos modelos foram analisadas quanto a sensibilidade (taxa de verdadeiros positivos, ou seja, a taxa ativa), especificidade (verdadeira taxa de negativos, ou seja, a taxa de inativos) e precisão (previsibilidade geral). Além

disso, a sensibilidade e especificidade da curva *receiver operating characteristic* (ROC), foi utilizada para descrever o verdadeiro desempenho do modelo, com mais clareza do que precisão.

O modelo foi analisado também pelo coeficiente de Matthews, uma maneira de avaliar de modo global o modelo a partir dos resultados obtidos da matriz de confusão. O MCC é, em essência, um coeficiente de correlação entre as classificações binárias observadas e preditivas. Dele resulta um valor entre -1 e +1, onde um coeficiente de +1 representa uma previsão perfeita, o 0 nada mais que uma previsão aleatória e o -1 indica total desacordo entre previsão e observação.^{21,22}

O coeficiente de correlação de Matthews pode ser calculado a partir da Equação 1:

$$MCC = \frac{VP \times VN - FP \times FN}{\sqrt{(VP + FP)(VP + FN)(VN + FP)(VN + FN)}} \quad (1)$$

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

Foi utilizado ainda o domínio de aplicabilidade baseado nas distâncias euclidianas afim de sinalizar compostos no conjunto teste para os quais as previsões podem ser não confiáveis. São utilizadas medições de similaridade para definir o domínio de aplicabilidade do modelo com base nas distâncias euclidianas entre todos os compostos de treinamento, teste e da triagem virtual. A distância de um composto teste ao seu vizinho mais próximo no conjunto de treinamento é comparada com o limite de domínio de aplicabilidade predefinido, se a similaridade estiver além desse limite, a previsão é considerada não confiável.²³

Determinação da concentração inibitória mínima (CIM)

Para a determinação da CIM, foram utilizadas como drogas controle gentamicina e anfotericina B obtidas da Merck/Sigma-Aldrich. As substâncias isoladas e as drogas controle foram solubilizadas com dimetilsulfoxido (DMSO) a 5% e em Tween-80 a 2% até obter a concentração inicial de 1024 µg mL⁻¹. Nesse estudo foram utilizadas as cepas de espécies bacterianas *Staphylococcus epidermidis* ATCC-12228, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC-9027 e cepas fúngicas de *Candida parapsilosis* ATCC-22019, *Candida albicans* ATCC-9002, *Candida albicans* LM-22. Todos os microrganismos utilizados pertencem à Micoteca do Laboratório de Micologia da Universidade Federal da Paraíba, Brasil. Para a preparação do inóculo, colônias obtidas de culturas de cepas bacterianas em meio BHI e fungos em meio ASD, foram suspensas em solução salina 0,9% estéril e ajustadas de acordo com a escala padrão de McFarland para obter 10⁶ UFC mL⁻¹ para fungos e 10⁸ UFC mL⁻¹ para bactérias. Para a determinação da CIM de cada composto, foram realizadas microdiluições em série em placas de 96 poços.²⁴ Paralelamente, foram realizados os controles: viabilidade das cepas, esterilidade do meio de cultura e controle positivo da atividade, utilizando-se gentamicina para inibir bactérias e anfotericina B para inibir leveduras. As placas preparadas foram incubadas a 35 ± 2 °C por 24-48 h para os ensaios. A CIM para cada produto foi definida como a menor concentração capaz de inibir visualmente o crescimento microbiano.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O estudo químico das fases Hex:AcOEt (8:2) e diclorometano das raízes de *M. distichophylla* levou ao isolamento de sete alcaloides piridínicos sesquiterpênicos. Suas estruturas químicas foram determinadas com base na análise de dados espectroscópicos de RMN uni e bidimensionais e em comparação com dados da literatura.

O composto **1** foi isolado na forma de pó amorfo branco, em que no espectro de RMN de ¹H revelou a presença de sinais para 5 grupos acila (δ_H 2,15, 2,17, 2,13, 1,42, 2,33) e de um grupo benzoila (*orto*) 7,86 (dd, *J* 8,4, 1,3 Hz, 1H), (*meta*) 7,47 (dd, *J* 8,4, 1,3 Hz, 1H) e (*para*) 7,61 (t, *J* 7,5 Hz, 1H). Também foram visualizados a presença de dois grupos metilas δ_H 1,59 (s, 3H) e 1,66 (s, 3H), cinco hidrogênios oximetínicos δ_H 5,93 (d, *J* 3,9 Hz, 1H), 5,21 (dd, *J* 3,9, 2,6 Hz, 1H), 4,97 (d, *J* 2,6 Hz, 1H), 6,99 (s, 1H), 5,54 (dd, *J* 5,8, 3,9 Hz, 1H) e 5,44 (d, *J* 2,3 Hz, 1H), quatro hidrogênios oximetilênicos δ_H 5,43 (d, *J* 13,4 Hz, 1H), 4,68 (d, *J* 13,4 Hz, 1H), 3,94 (d, *J* 12,0 Hz, 1H) 5,83 (d, *J* 12,0 Hz, 1H) e a presença de sinais característicos de um grupo piridínico 2,3 dissubstituído do tipo wilfordato δ_H 8,47 (dd, *J* 8, 2 Hz, 1H), 7,45 (dd, *J* 5, 8 Hz, 1H), 8,73 (dd, *J* 5, 2 Hz, 1H), 4,02 (ddd, *J* 13,0, 10,3, 5,7 Hz, 1H), 2,88 (dt, *J* 13,0, 5,7 Hz, 1H), 1,91 (m, 1H), 2,28 (m, 1H), 2,43 (m, 1H), 1,17 (d, *J* 7,1 Hz, 1H) (Tabela 1S, material suplementar). No espectro de ¹³C foram observados duas carbonilas de ésteres (δ_C 176,4, 168,4) e dois sinais δ_C 164,9, 126,1 de carbonos quaternários da unidade piridínica, bem como, a presença de três carbonos quaternários oxigenados (δ_C 71,3, 53,7 e 95,0) e um carbono quaternário alifático δ_C 53,7 de uma unidade sesquiterpênica (Tabela 2). Através das correlações de HMBC de H-1 com C-9, C-8, C-11 e 1-OBz, de H-11 com C-9, C-8 e C-11OAc e de H-8 com C-9, C-1, C-11 e C-8OAc foi possível definir as posições dos grupos benzoila e acila.

A ligação da porção piridínica com a sesquiterpênica foi confirmada através das correlações de HMBC de H-15 com C-12', juntamente com a correlação de H-3 com C-11'. Com essas informações foi possível confirmar que o composto **1** trata-se do alcaloide piridínico sesquiterpênico euojaponina F.²⁵

O composto **2** foi isolado na forma de um pó amorfo branco, apresentou sinais semelhantes ao composto **1**. Em **2** foram observados apenas a presença de quatro hidrogênios metílicos de grupos acetil δ_H 2,16 (s, 1H), 2,11 (s, 1H), 1,40 (s, 1H), 2,29 (s, 1H). Diferentemente do composto **1**, no espectro de RMN de ¹H de **2** foi observado a presença do deslocamento químico 4,02 (dd, *J* 3,7, 2,4 Hz, 1H) característico hidrogênio oximetínico próximo a uma hidroxila podendo inferir que na posição C2 temos a ausência de um grupo acila, porém com a presença do grupo hidroxila. Esta informação foi confirmada através das correlações do HMBC de H-3 com C-2, C-1, C-10, C-12 e C-11'. Dessa forma, com os dados de RMN de ¹H e ¹³C e com os dados da literatura foi possível identificar **2** como sendo a euojaponina K.²⁶

O composto **3** foi isolado na forma de um pó amorfo branco, apresentando sinais semelhantes ao composto **1**. O composto **3** apresentou deslocamentos químicos de apenas quatro grupos acila δ_H 2,18 (s, 3H), 2,12 (s, 3H), 1,34 (s, 3H), 2,20 (s, 3H) e a presença de sinais para dois grupos benzoíla δ_H 7,76 (d, *J* 7,6 Hz, 2H), 7,29 (t, *J* 8 Hz, 2H), 7,48 (t, *J* 7,6 Hz, 1H), 8,06 (d, *J* 7,6 Hz, 2H), 7,49 (t, *J* 7,8 Hz, 2H), 7,61 (t, *J* 7,5 Hz, 1H), bem como, sinais característicos de uma piridina 2,3 dissubstituída do tipo wilfordato (Tabelas 1S e 2S, material suplementar). Em comparação com dados da literatura, esse padrão de deslocamentos químicos confirma que uma das unidades benzoíla está presente em C2. Com base nos dados de RMN ¹H e ¹³C e em comparação com os dados da literatura foi possível concluir que **3** trata-se da ebiniolina W-I.²⁵

O composto **4** foi isolado na forma de um pó amorfo branco, apresentando sinais semelhantes com o composto **1**. Através dos dados de RMN de ¹H e ¹³C foi observado a presença de cinco grupos acila e um benzoíla. O composto **4** diferencia-se de **1** pela posição do seu grupo benzoíla. A presença do sinal em δ_H 1,92 (s, 3H) indica a ausência de um grupo benzoíla na posição 1. Com base nessas informações e com os dados da literatura foi possível concluir que **4** trata-se da wilforina.²⁷

O composto **5** foi isolado na forma de um pó amorfo branco, apresentando sinais semelhantes com o composto **1**. Em que no espectro de RMN de ^1H revelou a presença de 5 sinais para grupos acila δ_{H} 2,13 (s, 3H), 2,19 (s, 3H), 2,10 (s, 3H), 1,37 (s, 3H), 2,32 (s, 3H) e a presença de um grupo benzoíla δ_{H} 7,78 (dd, J 8,4, 1,3 Hz, 2H), 7,37 (t, J 7,4 Hz, 2H), 7,51 (t, J 7,4 Hz, 1H) (Tabelas 1S e 2S). Também foram visualizadas a presença de uma piridina 2,3 dissustituída δ_{H} 8,06 (dd, J 7,8, 1,8 Hz, 1H), 7,25 (dd, J 7,8, 4,9 Hz, 1H), 8,68 (dd, J 4,9, 1,8 Hz, 1H), 4,63 (m, 1H), 2,58 (dd, J 7,1, 1,1 Hz, 1H), 1,38 (d, J 7,1 Hz, 1H), 1,19 (d, J 7,1 Hz, 1H), porém, neste espectro foi observado um padrão de substituição diferente do composto **1** no qual a presença dos sinais de metilas dupletos δ_{H} 1,38 (d, J 7,1 Hz, 1H), 1,19 (d, J 7,1 Hz, 1H) indica que esta piridina é do tipo evoninato. Com essas informações de RMN de ^1H e ^{13}C e em comparação com dados da literatura foi possível identificar **5** como sendo a maiteína.²⁸

O composto **6** foi isolado na forma de um pó amorfo branco, com sinais de RMN de ^1H e ^{13}C semelhantes com **5**, apresentando 4 grupos acila δ_{H} 2,14 (s, 3H), 2,08 (s, 3H), 1,37 (s, 3H), 2,21 (s, 3H) e 1 grupo benzoíla δ_{H} 7,79 (dd, J 8,3, 1,2 Hz, 2H), 7,36 (t, J 7,7 Hz, 2H), 7,51 (t, J 7,4 Hz, 1H). Este diferencia-se de **5** pela ausência de um sinal de um grupo acila. A presença δ_{H} 5,46 (d, J 2,8 Hz, 1H) sugere que na posição 5 encontra-se uma hidroxila. Essas informações foram confirmadas ao analisar os espectros de RMN de HMBC por meio das correlações entre H-1 com C-9, C-8, C-11 e 1-OBz, de H-11 com C-9, C-8 e de H-8 com C-9, C-1, C-11 e C-8OAc. Com esses dados e em comparação com a literatura foi possível identificar **6** como sendo euojaponina A.²⁸

O composto **7** foi isolado na forma de um pó amorfo branco, com sinais semelhantes com composto **5**. O composto **7** diferencia-se de **5** por apresentar de quatro grupos acila e dois benzoíla. A posição do OBz em C5 foi confirmada através das correlações de HMBC de H-5 com C-10, 5OBz(C=O) e C-13. Com base nesses dados e em comparação com a literatura foi possível identificar **7** como sendo a ebinifolina E-II²⁵ (Tabelas 1S e 2S).

Análise dos modelos preditivos antimicrobianos

Na análise de performance dos modelos gerados, foi observado que os modelos preditivos contra os microrganismos *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *P. aeruginosa* e *S. epidermidis* obtiveram bons resultados de desempenho, com precisão superior a 70%. As boas performances também foram observadas na análise de curva ROC, com valores superiores a 0,82. Desta forma é possível afirmar que os modelos possuem boas taxas de precisão, performance e robustez, além de uma boa capacidade de predição (Tabela 1 e Figura 2).

As moléculas foram preditas como ativas contra os microrganismos *C. albicans*, *C. tropicalis* e *C. parapsilopsi* com potencial atividade variando entre 54 a 79%. Já para a bactéria *P. aeruginosa*, as moléculas foram preditas como inativas. Para o modelo de *S. epidermidis* algumas moléculas foram inativas e outras ativas. Os resultados das predições podem ser observados na Tabela 2. Dada

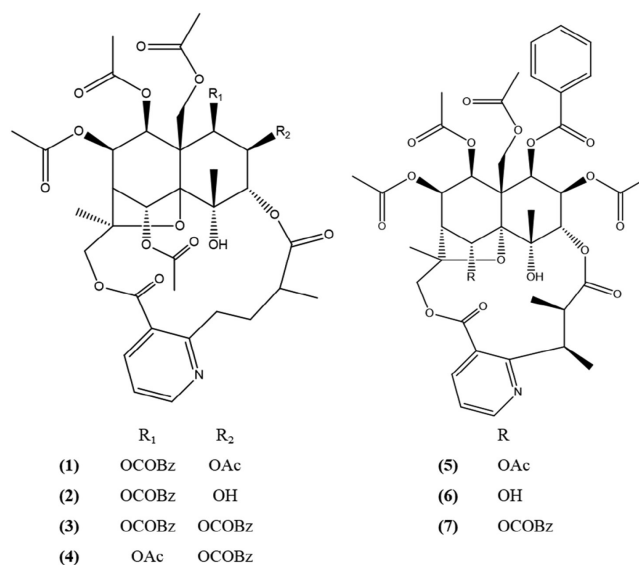


Figura 1. Alcaloides piridínicos sesquiterpênicos isolados de *M. distichophylla*

as boas performances dos modelos gerados, foi realizada, então, a triagem das sete moléculas isoladas neste estudo, a fim de avaliar o perfil antimicrobiano dessas substâncias.

Avaliação da atividade antimicrobiana

Na Tabela 3 estão registrados os resultados da avaliação da atividade antimicrobiana das substâncias isoladas e fases orgânicas de *M. distichophylla*. Todas as amostras foram capazes de inibir o crescimento microbiano das cepas *S. epidermidis* ATCC-12228, *C. parapsilosis* ATCC-22019, *C. albicans* ATCC-90028 e *C. albicans* LM-22 nas concentrações entre 1024-256 $\mu\text{g mL}^{-1}$. As substâncias maiteína (**5**), ebinifolina W1 (**3**) e as fases MDR (*Maytenus distichophylla* raiz) Hex, MDR Hex:AcOEt e MDR DCM apresentaram as maiores atividades contra as cepas *C. albicans* ATCC-90028, LM-22 e *C. parapsilosis* ATCC-22019, inibindo o crescimento das leveduras na concentração de 256 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Para as cepas bacterianas a inibição ficou entre 1024-512 $\mu\text{g mL}^{-1}$, entretanto, nenhuma das substâncias e fases foram capazes de inibir o crescimento microbiano da cepa de *P. aeruginosa*.²⁹

CONCLUSÕES

A investigação fitoquímica das fases Hex:AcOEt (8:2) e DCM das raízes de *M. distichophylla* levou ao isolamento de sete alcaloides piridínicos sesquiterpênicos: euojaponine F (**1**), euojaponine K (**2**), ebinifolina W-I (**3**), wilforina (**4**), maiteína (**5**), euojaponina A (**6**) e ebinifolina E-II (**7**), todos relatados pela primeira vez em *M. distichophylla*. Todas as amostras foram capazes de inibir o crescimento microbiano corroborando com os resultados do estudo computacional, porém as MICs de 256/512 $\mu\text{g mL}^{-1}$ foram consideradas como uma fraca atividade frente as cepas avaliadas.

Tabela 1. Resumo dos resultados de performance dos modelos utilizando o algoritmo RF

Modelo	Especificidade	Sensibilidade	Precisão	VPP	VPN	MCC
<i>C. albicans</i>	0,79	0,70	0,75	0,76	0,74	0,50
<i>C. parapsilosis</i>	0,83	0,70	0,74	0,77	0,74	0,50
<i>P. aeruginosa</i>	0,86	0,71	0,78	0,80	0,79	0,58
<i>S. epidermidis</i>	0,79	0,85	0,82	0,81	0,82	0,64

VPP: verdadeiro preditivo positivo; VPN: verdadeiro preditivo negativo; MCC: Matthews correlation coefficient.

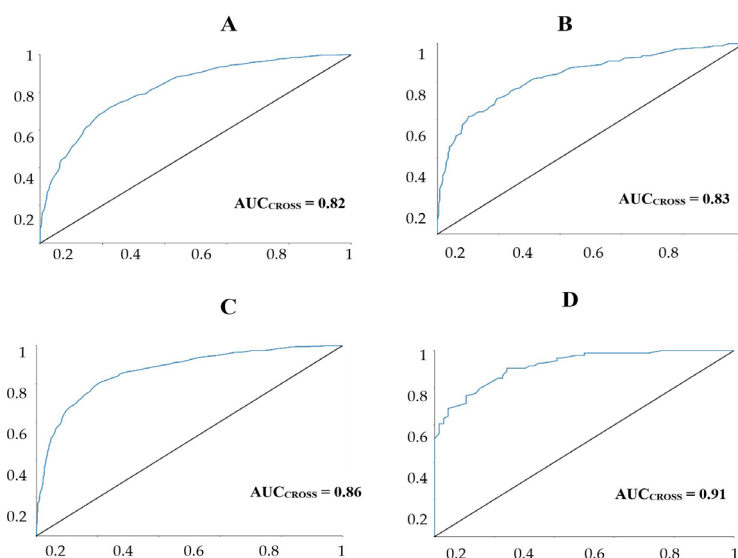


Figura 2. Curva ROC, verdadeiros positivos versus falsos positivos, gerado para os modelos de RF selecionados para validação cruzada; (A) *C. albicans*, (B) *C. parapsilosis* (C) *P. aeruginosa* e (D) *S. Epidermides*. AUC = valor da área sob a curva

Tabela 2. Predição dos compostos isolados das raízes de *M. distichophylla* nos modelos preditivos criados contra os microrganismos *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *P. aeruginosa* e *S. epidermides*

Compostos	Modelos				
	<i>C. albicans</i>	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. parapsilosis</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>S. epidermides</i>
Ebinifolina E-II	0,70	0,56	0,66	0,39	0,47
Ebinifolina W-I	0,71	0,56	0,67	0,41	0,47
Euojaponine A	0,72	0,63	0,70	0,32	0,44
Euojaponine F	0,60	0,62	0,76	0,35	0,56
Euojaponine K	0,74	0,68	0,78	0,38	0,60
Maiteína	0,70	0,61	0,67	0,35	0,51
Wilforina	0,73	0,60	0,74	0,35	0,50

Tabela 3. Concentração inibitória mínima (CIM, $\mu\text{g mL}^{-1}$) dos extratos e compostos isolados contra cepas bacterianas e fúngicas

	CIM / $\mu\text{g mL}^{-1}$						
	<i>S. aureus</i> ATCC-25923	<i>S. epidermidis</i> ATCC-12228	<i>E. coli</i> ATCC-18739	<i>P. aeruginosa</i> ATCC-9027	<i>C. parapsilosis</i> ATCC-22019	<i>C. albicans</i> ATCC-90028	<i>C. albicans</i> LM-22
Euojaponina F	1024	1024	+	+	512	512	512
Maiteína	512	1024	+	+	256	256	256
Ebinifolina W1	512	1024	+	+	256	256	256
MDR Hex	512	512	+	+	256	256	256
MDR Hex:AcOEt	512	512	+	+	256	256	256
MDR DCM	512	512	+	+	256	256	256
MDR AcOEt	512	512	+	+	1024	1024	512
MDR <i>n</i> -BuOH	1024	1024	+	+	1024	1024	1024
EEB MDR	512	512	+	+	512	512	512
Meio de cultura	—	—	—	—	—	—	—
Micro-organismo	+	+	+	+	+	+	+
Gentamicina	—	—	—	—	x	x	x
Anfotericina B	x	x	x	x	—	—	—

Gentamicina e anfotericina B: grupos controle; +: crescimento de microrganismos; —: ausência de crescimento; x: antimicrobiano não utilizado para estas espécies.

MATERIAL SUPLEMENTAR

O material suplementar desse trabalho está disponível em <http://quimicanova.sbq.org.br/>, na forma de arquivo PDF, com acesso livre.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) (código de financiamento 001) e

ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo suporte financeiro e bolsas de pesquisa, ao Laboratório Multiusuário de Caracterização e Análise (LMCA-UFPB), ao Laboratório de Micologia da UFPB e ao Laboratório de Químioinformática da UFPB.

REFERÊNCIAS

- Huang, Y. Y.; Chen, L.; Ma, G. X.; Xu, X. D.; Jia, X. G.; Deng, F. S.; Li, X. J.; Yuan, J. Q.; *Molecules* **2021**, *26*, 4563. [Crossref]
- Cessa, R. M. A.; Silva, P. S. R.; Barbosa, T.; Oliveira, M. L.; *Brazilian Journal of Development* **2021**, *7*, 103001. [Crossref]
- Biral, L.; Simmons, M. P.; Smidt, E. C.; Tembrock, L. R.; Bolson, M.; Archer, R. H.; Lombardi, J. A.; *Syst. Bot.* **2017**, *42*, 680. [Crossref]
- Zappi, D. C.; Filardi, F. L. R.; Leitman, P.; Souza, V. C.; Walter, B. M. T.; Pirani, J. R.; Morim, M. P.; Queiroz, L. P.; Cavalcanti, T. B.; Mansano, V. F.; Forzza, R. C.; *Rodriguesia* **2015**, *66*, 1085. [Crossref]
- Biral, L.; Smidt, E. C.; Bolson, M.; Lombardi, J. A.; *Phytotaxa* **2015**, *231*, 53. [Crossref]
- Maldonado, C. S.; Araya, B. F.; Sánchez, V. S.; Bernal, J. S.; Fuentes, L. A.; Díaz, A. A.; Hansen, M. E. Z.; *Electron. J. Biotechnol.* **2022**, *56*, 47. [Crossref]
- Veloso, C. C.; Soares, G. L.; Perez, A. C.; Rodrigues, V. G.; Silva, F. C.; *Rev. Bras. Farmacogn.* **2017**, *27*, 533. [Crossref]
- Din, A. U.; Siddiqui, B. S.; *J. Braz. Chem. Soc.* **2022**, *33*, 1386. [Crossref]
- Callies, O.; Núñez, M. J.; Perestelo, N. R.; Reyes, C. P.; Romero, D. T.; Jiménez, I. A.; Bazzocchi, I. L.; *Phytochemistry* **2017**, *142*, 21. [Crossref]
- Camargo, K. C.; Aguilar, M. G.; Moraes, A. R. A.; Castro, R. G.; Szczerbowski, D.; Miguel, E. L. M.; Oliveira, L. R.; Sousa, G. F.; Vidal, D. M.; Duarte, L. P.; *Molecules* **2022**, *27*, 959. [Crossref]
- Duarte, M. C.; Tavares, J. F.; Madeiro, S. A. L.; Costa, V. C. O.; Barbosa, J. M. B.; Agra, M. F.; Braz, R.; Silva, M. S.; *J. Braz. Chem. Soc.* **2013**, *24*, 1697. [Crossref]
- Morales, S. A.; Aguilar, M. G. D.; Pereira, R. C.; Duarte, L. P.; Sousa, G. F.; Oliveira, D. M. D.; Evangelista, F. C. B.; Sabino, A. P.; Viana, R. O.; Alves, V. S.; Vieira-Filho, S. A.; *Quim. Nova* **2020**, *43*, 1066. [Crossref]
- Willighagen, E. L.; Waagmeester, A.; Spjuth, O.; Ansell, P.; Williams, A. J.; Tkachenko, V.; Hastings, J.; Chen, B.; Wild, D. J.; *J. Cheminf.* **2013**, *5*, 23. [Crossref]
- Mendez, D.; Gaulton, A.; Bento, A. P.; Chambers, J.; De Veij, M.; Félix, E.; Magariños, M. P.; Mosquera, J. F.; Mutowo, P.; Nowotka, M.; Gordillon-Maranon, M.; Hunter, F.; Junco, F.; Mugumbate, G.; Rodriguez-Lopez, M.; Atkinson, F.; Bosc, N.; Radoux, C. J.; Segura-Cabrera, A.; Hersey, A.; Leach, A. R.; *Nucleic Acids Res.* **2019**, *47*, D930. [Crossref]
- ChemAxon; Marvin; <https://www.chemaxon.com>, acessado em Outubro 2023.
- ChemAxon; Standardizer; <https://www.chemaxon.com>, acessado em Outubro 2023.
- Cruciani, G.; Pastor, M.; Guba, W.; *Eur. J. Pharm. Sci.* **2000**, *11*, S29. [Crossref]
- Berthold, M. R.; Cebren, N.; Dill, F.; Gabriel, T. R.; Kötter, T.; Meinl, T.; Ohl, P.; Thiel, K.; Wiswedel, B.; *ACM SIGKDD Explorations Newsletter* **2009**, *11*, 26. [Crossref]
- Salzberg, S.; Quinlan, R.; *Machine Learning* **1994**, *16*, 235. [Crossref]
- Bouckaert, R. R.; Frank, E.; Hall, M. A.; Holmes, G.; Pfahringer, B.; Reutemann, P.; Witten, I. H.; *Journal of Machine Learning Research* **2010**, *11*, 2533. [Link] acessado em Setembro 2023
- Chicco, D.; Jurman, G.; *BMC Genomics* **2020**, *21*, 6. [Crossref]
- Matthews, B. W.; *Biochim. Biophys. Acta, Protein Struct.* **1975**, *405*, 442. [Crossref]
- Weaver, S.; Gleeson, M. P.; *J. Mol. Graphics Modell.* **2008**, *26*, 1315. [Crossref]
- CLSI; *M07 Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria that Grow Aerobically*, 11th ed.; Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, 2018. [Link] acessado em Setembro 2023
- Itokawa, H.; Shiota, O.; Morita, H.; Takeyaa, K.; Iitakab, Y.; *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **1993**, *11*, 1247. [Crossref]
- Han, B. H.; Ryu, J. H.; Han, Y. N.; Park, M. K.; Park, J. H.; Naoki, H.; *J. Nat. Prod.* **1990**, *53*, 909. [Crossref]
- Monache, F. D.; Bettolo, G. M.; Bernays, E. A.; *J. Appl. Entomol.* **1984**, *97*, 406. [Crossref]
- Han, B. H.; Park, M. K.; Ryu, J. H.; Park, J. H.; Naoki, H.; *Phytochemistry* **1990**, *29*, 2303. [Crossref]
- Peixoto, I. N.; Souza, H. D. S.; Lira, B. F.; Silva, D. F.; Lima, D. O.; Barbosa-Filho, J. M.; Athayde-Filho, P. F.; *J. Braz. Chem. Soc.* **2016**, *27*, 1807. [Crossref]