



UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA

CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PRODUTOS NATURAIS

E SINTÉTICOS BIOATIVOS



LUCAS SILVA ABREU

**Investigação fitoquímica e bioatividade de espécies de Euphorbiaceae da
Caatinga**

João Pessoa – PB

2020

LUCAS SILVA ABREU

**Investigação fitoquímica e bioatividade de espécies de Euphorbiaceae da
Caatinga**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em
Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos do Centro de
Ciências da Saúde da Universidade Federal da Paraíba,
em cumprimento às exigências para obtenção do título
de Doutor em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos,
área de concentração Farmacoquímica.

ORIENTADOR: Prof. Dr. Josean Fachine Tavares

CO-ORIENTADOR: Prof. Dr. Eudes da Silva Velozo

João Pessoa – PB

2020

Catálogo na publicação
Seção de Catalogação e Classificação

A162i Abreu, Lucas Silva.

Investigação fitoquímica e bioatividade de espécies de
Euphorbiaceae da Caatinga / Lucas Silva Abreu. - João
Pessoa, 2020.

282 f. : il.

Orientação: Josean Fechine Tavares.

Coorientação: Eudes da Silva Velozo.

Tese (Doutorado) - UFPB/CCS.

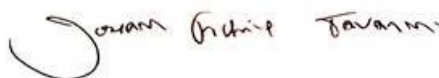
1. *Stillingia loranthacea*. 2. *Croton velutinus*. 3.
terpenoides. 4. fenilpropanoides. 5. anti-ZIKV. 6.
citotoxicidade. 7. anti-inflamatório. 8. tripanocida.
I. Tavares, Josean Fechine. II. Velozo, Eudes da Silva.
III. Título.

UFPB/BC

LUCAS SILVA ABREU

Investigação fitoquímica e bioatividade de espécies de Euphorbiaceae da Caatinga

COMISSÃO EXAMINADORA



Prof. Dr. Josean Fechine Tavares

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

Prof. Dr. Massuo Jorge Kato

Doutor em Química Orgânica
Universidade de São Paulo
(Examinador Externo)

Prof^a. Dra. Silvana Zucolotto Langassner

Doutora em Farmácia
Universidade Federal do Rio Grande do Norte
(Examinador Externo)

Prof^a. Dra. Maria de Fátima Vanderlei de Souza

Doutora em Química Orgânica
Universidade Federal da Paraíba
(Examinador Interno)



Prof^a. Dra. Marianna Vieira Sobral

Doutora em Farmacologia de Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos
Universidade Federal da Paraíba
(Examinador Interno)

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Josean Fachine Tavares, que aceitou me receber como seu orientando e me acolheu no laboratório dando todo o incentivo que eu poderia receber para o meu crescimento e evolução. Exemplo de pesquisador e apaixonado pela pesquisa com Produtos Naturais e Técnicas Espectroscópicas, levo comigo um pouco dessa determinação em pesquisar os Produtos Naturais. Levo também ensinamentos como humildade, gratidão e honestidade.

Ao Prof. Dr. Eudes da Silva Velozo pelo incentivo, dedicação e ensinamentos durante toda a minha experiência nesse mundo da pesquisa em produtos naturais.

Ao Prof. Dr. Marcelo Sobral da Silva por acreditar no meu potencial e me incentivar ao crescimento sempre. Fui iluminado pela oportunidade de diariamente poder estar discutindo e aprendendo Química de Produtos Naturais com um dos destaques nessa área em nível nacional.

Ao Prof. Dr. José Maria Barbosa Filho por todo incentivo, apoio ao desenvolvimento do trabalho e alegria ao me ver progredir nos estudos.

A Prof^a Dra. Cristiane Flora Villareal por toda a parceria nos estudos biológicos, além de todo apoio e incentivo para o meu sucesso. A todos do LAFTE-UFBA e LETI-Fiocruz pela realização dos experimentos.

Ao Prof. Dr. Lindomar José Pena e sua aluna Barbara Nayane pela parceria e realização dos experimentos da atividade antiviral.

Ao Prof. Dr. Marcus Tullius Scotti pela parceria e realização dos experimentos de químioinformática realizados nesse trabalho.

Ao Prof. Dr. Raimundo Braz Filho pela ajuda na elucidação estrutural das substâncias.

Aos professores Dr. Massuo Jorge Kato, Dra. Silvana Maria Zucolotto Langassner, Dra. Maria de Fátima Vanderlei de Souza e Dra. Marianna Viera Sobral, por aceitarem participar da banca examinadora e contribuírem para a melhoria do trabalho.

Ao Programa em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos (PGPNB) e aos professores que puderam contribuir com o meu conhecimento.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa de estudos.

A Yuri, primeiro colega do doutorado que tive contato, sempre solícito a me ajudar no que fosse preciso, parceiro de ideias, dias e noites de trabalho no laboratório, escrita de artigos, etc. Fora do laboratório, amigo para todas situações, de tomar uma cerveja pra relaxar a qualquer outra necessidade. Que nossa parceria e produtividade continue gerando bons frutos.

Aos colegas da turma de doutorado de 2016, Laiane, Kaio, Rose, Márcio, Andreza, Anderson e Diego pelos momentos vividos durante as disciplinas, dia-a-dia no laboratório, grupos de estudos, troca de experiências, etc.

Aos técnicos Vicente, Evandro, Sócrates, Nonato e Marcelo por toda disponibilidade na realização dos experimentos e ensinamentos para o desenvolvimento da pesquisa.

A todos integrantes do Laboratório Multiusuário de Caracterização e Análises – LCMA, nossa casa diária, onde pudemos ter, juntos, nossos momentos de tristezas e alegrias. Pesquisa é isso! Acredito nesse laboratório e sei que juntos só temos a crescer.

Aos colegas do meu eterno LAPEMM: Rafael e Iura pelo companheirismo e amizade mesmo que a distância. A Railda por toda ajuda para desenvolver o trabalho. Mayra, Kelly e Aline pela ajuda inicial nesse estudo.

A Antônio Marcos, por toda disponibilidade em nos ajudar com nossas batalhas diárias com os cromatógrafos além de todas as palavras de incentivo e amizade durante esse tempo.

A Laiane novamente, não mais como colega e sim como namorada. Sempre me apoiando e estando ao meu lado para me incentivar e ajudar a chegar aos meus objetivos. Por entender meus momentos difíceis e por sempre estar ao meu lado. Assim como para comemorar as vitórias. Sua presença foi fundamental para que eu chegasse até aqui. Muito Obrigado!

Gostaria de agradecer a minha família por todo o apoio que me dão na busca dos meus sonhos. Principalmente aos meus pais Samuel Abreu e Vilma Abreu que são meus guias nas batalhas de cada dia. Aos meus irmãos, Danilo e Verônica por toda força e incentivo.

A Deus por iluminar meus caminhos e me dar forças para que eu consiga cumprir com meus objetivos.

MUITO OBRIGADO!

RESUMO

Os produtos naturais são usados como opção de tratamento de doenças desde os tempos antigos. Nesse contexto o Brasil se destaca por possuir uma das principais biodiversidades mundial. Dentre os biomas brasileiros, a caatinga possui uma vegetação que suporta baixos índices pluviométricos e se torna uma região com mais espécies endêmicas. Nesse bioma são encontradas diversas espécies com fins medicinais, entre elas estão as da família Euphorbiaceae com relatos de diversas atividades biológicas. Assim, este trabalho teve como objetivo descrever o estudo fitoquímico das espécies *Stillingia loranthacea* e *Croton velutinus* da caatinga nordestina. As espécies foram coletadas na cidade de Morro do Chapéu – Bahia. Foram utilizadas técnicas de extração por maceração para obtenção dos extratos e cromatografia em coluna aberta para fracionamento inicial. Para o isolamento dos constituintes químicos foi utilizado Cromatografia Líquida de Alta Eficiência em escalas analíticas, semi e preparativa, e quando necessário, acoplado a espectrometria de massas para realização de um isolamento direcionado, utilizando como base informações obtidas por dados de redes moleculares. Os compostos isolados tiveram suas elucidações estruturais determinadas por dados espectroscópicos de RMN de ^1H e ^{13}C uni e bidimensionais, dados espectrométricos para confirmação estrutural e da fórmula molecular, infravermelho, rotação óptica e comparação com os dados disponíveis na literatura. Das cascas das raízes de *S. loranthacea*, foram isolados quatorze compostos sendo quatro novos derivados do esqueleto 28-nor-taraxareno (**SL1-SL4**), quatro novos diterpenos tiglicianos (**SL5-SL8**), três diterpenos tiglicianos conhecidos (**SL9-SL11**) e três diterpenos fexibilenos conhecidos (**SL12-SL14**). A citotoxicidade e atividade antiviral dos compostos **SL1**, **SL2**, **SL5-SL14** foram avaliadas contra células Vero e contra um vírus da Zika epidêmico (ZIKV) que circula no Brasil. Seis dos doze compostos (**SL2**, **SL5**, **SL9-SL11** e **SL14**) exibiram efeito antiviral significativo contra o ZIKV. Especificamente os compostos **SL2** e **SL5** demonstraram serem os compostos mais promissores. Das raízes de *C. velutinus*, foram isolados quatro novos derivados de fenilpropanoides (**CV1-CV4**) e três conhecidos (**CV5-CV7**). As atividades anti-inflamatória, citotóxica e tripanocida dos compostos foram avaliadas. Apenas os compostos **CV2** e **CV5** apresentaram atividade citotóxica para as linhas celulares de câncer (B16F10, HL-60, HCT116, MCF-7 e HepG2) assim como atividade tripanocida. Todos os compostos diminuíram a produção de nitrito em macrófagos J774 e apenas o composto **CV5** diminuiu a produção de IL-1 β .

Palavras-Chave: *Stillingia loranthacea*, *Croton velutinus*, 28-nor-taraxareno, diterpenos, fenilpropanoides, anti-ZIKV, citotoxicidade, anti-inflamatório e tripanocida.

ABSTRACT

Natural products have been used as a treatment option for diseases since ancient times. In this context, Brazil has one of the main biodiversities in the world. Among Brazilian biomes, the caatinga has vegetation that supports low rainfall and becomes a region with more endemic species. In this biome are several species of medicinal uses, including the Euphorbiaceae family with reports of various biological activities. In this context, the study describes the phytochemical study of the species *Stillingia loranthacea* and *Croton velutinus* from the northeastern caatinga. The species were collected in the city of Morro do Chapéu - Bahia. It was used maceration as extraction technique in order to obtain the extracts, and classical chromatography on open column for initial fractionation. For the isolation of chemical components, High Performance Liquid Chromatography on Analytical, Semi and Preparative Scales was used, when necessary mass spectrometry was also applied to perform a targeted treatment, which was the basic information to molecular network data. The compounds had their structures determined by ^1H and ^{13}C NMR spectroscopic data in one and two dimensions, spectrometric data for molecular and structural confirmation, infrared, optical rotation and comparison with data available in the literature. From the root barks of *S. loranthacea* fourteen compounds were isolated, four new derivate of the 28-taraxarene skeleton (**SL1-SL4**), four new tiglane diterpenes (**SL5-SL8**), three known tiglane diterpene (**SL9-SL11**) and three known flexibilines (**SL12-SL14**). The cytotoxicity and antiviral activity of compounds (**SL1, SL2, SL5-SL14**) were evaluated against Vero cells and against epidemic zika virus (ZIKV) circulating in Brazil. Six among the twelve compounds (**SL2, SL5, SL9-SL11 and SL14**) had significant antiviral effect against ZIKV. Specifically, compounds **SL2** and **SL5** were the most promising compounds. From the roots of *C. velutinus*, four new phenylpropanoid (**CV1-CV4**) and three knowns (**CV5-CV7**) were isolated. The anti-inflammatory, cytotoxic and trypanocidal activities of the compounds were evaluated. Only compounds **CV2** and **CV5** showed cytotoxic activity for cancer cell lines (B16F10, HL-60, HCT116, MCF-7 and HepG2), as well as trypanocidal activity. All compounds decreased the production of nitrite in macrophages J774, just the **CV5** compound decreased the production of IL-1 β .

Keywords: *Stillingia loranthacea*, *Croton velutinus*, 28-nor-taraxarene, diterpens, phenylpropanoids, anti-ZIKV, cytotoxic, anti-inflammatory and trypanocidal.

Lista de Figuras

Figura 1: Diterpenos isolados de <i>S. sylvatica</i>	24
Figura 2: Diterpenos isolados de <i>S. sanguinolenta</i>	25
Figura 3: Triterpenos identificados de <i>S. oppositifolia</i>	25
Figura 4: Diterpenos isolados de <i>S. lineata</i>	26
Figura 5: Espécie <i>Stillingia loranthacea</i> . Fonte: Lucas Abreu.	27
Figura 6: Espécie <i>Croton velutinus</i> . Fonte: Lucas Abreu.	28
Figura 7: Diterpenos macrocíclicos com esqueletos do tipo tigliano e ingenano.	30
Figura 8: Diterpenos macrocíclicos com esqueletos do tipo dafnano, jatrofano, latirano e flexibileno.	30
Figura 9: Proposta biossintética dos esqueletos cembrano e flexibileno.	31
Figura 10: Relação estrutura atividade anti-CHIKV dos tiglianos.	32
Figura 11: Esquema metodológico para obtenção do <i>Molecular Networking</i> seguido de desreplicação, obtenção de novos compostos e biomoléculas.	34
Figura 12: Cromatograma da fração 13-16 em 220 nm com identificação das substâncias isoladas de <i>S. loranthacea</i>	42
Figura 13: Cromatograma da fração SL2/7 em 220 nm com identificação das substâncias isoladas.	43
Figura 14: Cromatograma da fração 13 em 220 nm com identificação das substâncias isoladas.	48
Figura 15: Substâncias isoladas de <i>Stillingia loranthacea</i>	56
Figura 16: Rede molecular do extrato hexânico das cascas das raízes (nodos azul céu), cerne das raízes (nodos vermelhos), caule (nodos amarelos) e folhas (nodos verdes) de <i>Stillingia loranthacea</i> pelo CLAE-IESEM ²	58
Figura 17: Espectro de infravermelho do composto SL1	61
Figura 18: Correlações chaves nos HMBC ( , COSY () e NOESY () observadas para os compostos SL1 , SL5 e SL8	61
Figura 19: Proposta biossintética para a perda da Me-28 em SL1	62
Figura 20: Atividade antiviral dos terpenoides de <i>S. loranthacea</i> contra o ZIKV.....	67
Figura 21: Compostos isolados de <i>C. velutinus</i>	224
Figura 22: Projeções de Fisher e Newman para os compostos CV3 e CV4	227

Figura 23: Efeito de CV5 sobre a produção de IL-1 β na cultura de macrófagos J744 ativados por LPS e INF- γ	230
---	-----

Lista de Figuras Suplementares

Figura S1: Padrão de fragmentação dos compostos SL1-SL4.	81
Figura S3: Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) do composto SL1	82
Figura S4: Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) do composto SL1 (expansão).....	83
Figura S5: Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) do composto SL1 (expansão).....	84
Figura S6: Espectro de RMN de ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) do composto SL1	85
Figura S7: Espectro de RMN de ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) do composto SL1 (expansão).....	86
Figura S8: Espectro de RMN de ^{13}C -APT (100 MHz, CDCl_3) do composto SL1	87
Figura S9: Espectro de RMN de ^{13}C -APT (100 MHz, CDCl_3) do composto SL1 (expansão).	88
FiguraS 10: Espectro de RMN de COSY (500 MHz, CDCl_3) do composto SL1	89
Figura S11: Espectro de RMN de COSY (500 MHz, CDCl_3) do composto SL1 (expansão).90	
Figura S12: Espectro de RMN de HSQC (500 MHz, CDCl_3) do composto SL1	91
Figura S13: Espectro de RMN de HSQC (500 MHz, CDCl_3) do composto SL1 (expansão).92	
Figura S14: Espectro de RMN de HMBC (500 MHz, CDCl_3) do composto SL1	93
Figura S15: Espectro de RMN de HMBC (500 MHz, CDCl_3) do composto SL1 (expansão).	94
Figura S16: Espectro de RMN de HMBC (500 MHz, CDCl_3) do composto SL1 (expansão).	95
Figura S17: Espectro de RMN de HMBC (500 MHz, CDCl_3) do composto SL1 (expansão).	96
Figura S18: Espectro de RMN de NOESY (500 MHz, CDCl_3) do composto SL1	97
Figura S19: Espectro de RMN de NOESY (500 MHz, CDCl_3) do composto SL1 (expansão).	98
Figura S20: Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, C_6D_6) do composto SL1	99
Figura S21: Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, C_6D_6) do composto SL1 (expansão).	100
Figura S22: Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, C_6D_6) do composto SL1	101
Figura S23: Espectro de RMN de HSQC (400 MHz, C_6D_6) do composto SL1	102
Figura S24: Espectro de RMN de HMBC (400 MHz, C_6D_6) do composto SL1	103
Figura S25: Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, $\text{C}_3\text{D}_6\text{O}$) do composto SL1	104
Figura S26: Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, $\text{C}_3\text{D}_6\text{O}$) do composto SL1	105

Figura S27: Espectro de RMN de HSQC (400 MHz, C ₃ D ₆ O) do composto SL1 .	106
Figura S28: Espectro de RMN de HMBC (400 MHz, C ₃ D ₆ O) do composto SL1 .	107
Figura S29: Espectro de RMN de ¹ H (400 MHz, CD ₃ OD) do composto SL1 .	108
Figura S30: Espectro de RMN de ¹³ C (100 MHz, CD ₃ OD) do composto SL1 .	109
Figura S31: Espectro de RMN de HSQC (400 MHz, CD ₃ OD) do composto SL1 .	110
Figura S32: Espectro de RMN de HMBC (400 MHz, CD ₃ OD) do composto SL1 .	111
Figura S33: Espectro de IES-EMAR de SL1 ([M + H], modo de ionização positivo).	114
Figura S34: Espectro de CLAE-IESMS/MS de SL1 ([M + H], modo de ionização positivo).	114
Figura S35: Espectro de RMN de ¹ H (500 MHz, CDCl ₃) do composto SL2 .	115
Figura S36: Espectro de RMN de ¹ H (500 MHz, CDCl ₃) do composto SL2 (expansão).	116
Figura S37: Espectro de RMN de ¹ H (500 MHz, CDCl ₃) do composto SL2 (expansão).	117
Figura S38: Espectro de RMN de ¹³ C (125 MHz, CDCl ₃) do composto SL2 .	118
Figura S39: Espectro de RMN de COSY (500 MHz, CDCl ₃) do composto SL2 .	119
Figura S40: Espectro de RMN de COSY (500 MHz, CDCl ₃) do composto SL2 (expansão).	120
Figura S41: Espectro de RMN de HSQC (500 MHz, CDCl ₃) do composto SL2 .	121
Figura S42: Espectro de RMN de HSQC (500 MHz, CDCl ₃) do composto SL2 (expansão).	122
Figura S43: Espectro de RMN de HSQC (500 MHz, CDCl ₃) do composto SL2 (expansão).	123
Figura S44: Espectro de RMN de HMBC (500 MHz, CDCl ₃) do composto SL2 .	124
Figura S45: Espectro de RMN de HMBC (500 MHz, CDCl ₃) do composto SL2 (expansão).	125
Figura S46: Espectro de RMN de HMBC (500 MHz, CDCl ₃) do composto SL2 (expansão).	126
Figura S47: Espectro de RMN de HMBC (500 MHz, CDCl ₃) do composto SL2 (expansão).	127
Figura S48: Espectro de RMN de NOESY (500 MHz, CDCl ₃) do composto SL2 .	128
Figura S49: Espectro de RMN de NOESY (500 MHz, CDCl ₃) do composto SL2 (expansão).	129
Figura S50: Espectro de IES-EMAR de SL2 ([M + H], modo de ionização positivo).	130
Figura S51: Espectro de CLAE-IESEM/EM de SL2 ([M + H], modo de ionização positivo).	130

Figura S52: Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) do composto SL3 .	131
Figura S53: Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) do composto SL3 (expansão).	132
Figura S54: Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) do composto SL3 .	133
Figura S55: Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) do composto SL3 (expansão).	134
Figura S56: Espectro de RMN de COSY (400 MHz, CDCl_3) do composto SL3 .	135
Figura S57: Espectro de RMN de HSQC (400 MHz, CDCl_3) do composto SL3 .	136
Figura S58: Espectro de RMN de HSQC (400 MHz, CDCl_3) do composto SL3 (expansão).	137
Figura S59: Espectro de RMN de HMBC (400 MHz, CDCl_3) do composto SL3 .	138
Figura S60: Espectro de RMN de HMBC (400 MHz, CDCl_3) do composto SL3 (expansão).	139
Figura S61: Espectro de RMN de NOESY (400 MHz, CDCl_3) do composto SL3 .	140
Figura S62: Espectro de IES-EMAR de SL3 ($[\text{M} + \text{H}]$, modo de ionização positivo).	141
Figura S63: Espectro de CLAE-IESEM/EM de SL3 ($[\text{M} + \text{H}]$, modo de ionização positivo).	141
Figura S64: Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) do composto SL4 .	142
Figura S65: Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) do composto SL4 (expansão).	143
Figura S66: Espectro de RMN de COSY (400 MHz, CDCl_3) do composto SL4 .	144
Figura S67: Espectro de RMN de HSQC (400 MHz, CDCl_3) do composto SL4 .	145
Figura S68: Espectro de RMN de HMBC (400 MHz, CDCl_3) do composto SL4 .	146
Figura S69: Espectro de RMN de NOESY (400 MHz, CDCl_3) do composto SL4 .	147
Figura S70: Espectro de IES-EMAR de SL4 ($[\text{M} + \text{H}]$, modo de ionização positivo).	148
Figura S71: Espectro de CLAE-IESEM/EM de SL4 ($[\text{M} + \text{H}]$, modo de ionização positivo).	148
Figura S72: Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) do composto SL5 .	149
Figura S73: Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) do composto SL5 (expansão).	150
Figura S74: Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) do composto SL5 (expansão).	151
Figura S75: Espectro de RMN de ^{13}C -APT (100 MHz, CDCl_3) do composto SL5 .	152
Figura S76: Espectro de RMN de ^{13}C -APT (100 MHz, CDCl_3) do composto SL5 (expansão).	153
Figura S77: Espectro de RMN de COSY (400 MHz, CDCl_3) do composto SL5 .	154
Figura S78: Espectro de RMN de HSQC (400 MHz, CDCl_3) do composto SL5 .	155
Figura S79: Espectro de RMN de HSQC (400 MHz, CDCl_3) do composto SL5 (expansão).	156

Figura S80: Espectro de RMN de HMBC (400 MHz, CDCl ₃) do composto SL5	157
Figura S81: Espectro de RMN de HMBC (400 MHz, CDCl ₃) do composto SL5 (expansão).	158
Figura S82: Espectro de RMN de HSQC (400 MHz, CDCl ₃) do composto SL5 (expansão).	159
Figura S83: Espectro de RMN de NOESY (400 MHz, CDCl ₃) do composto SL5	160
Figura S84: Espectro de IES-EMAR de SL5 ([M + H], modo de ionização positivo).....	161
Figura S85: Espectro de CLAE-IESEM/EM de SL5 ([M + H], modo de ionização positivo).	161
Figura S86: Padrão de fragmentação do composto SL5	161
Figura S87: Espectro de RMN de ¹ H (400 MHz, CDCl ₃) do composto SL6	162
Figura S88: Espectro de RMN de ¹ H (400 MHz, CDCl ₃) do composto SL6 (expansão)....	163
Figura S89: Espectro de RMN de ¹ H (400 MHz, CDCl ₃) do composto SL6 (expansão)....	164
Figura S90: Espectro de RMN de ¹³ C (100 MHz, CDCl ₃) do composto SL6	165
Figura S91: Espectro de RMN de ¹³ C (100 MHz, CDCl ₃) do composto SL6 (expansão)....	166
Figura S92: Espectro de RMN de COSY (400 MHz, CDCl ₃) do composto SL6	167
Figura S93: Espectro de RMN de HSQC (400 MHz, CDCl ₃) do composto SL6	168
Figura S94: Espectro de RMN de HSQC (400 MHz, CDCl ₃) do composto SL6 (expansão).	169
Figura S95: Espectro de RMN de HMBC (400 MHz, CDCl ₃) do composto SL6	170
Figura S96: Espectro de RMN de HMBC (400 MHz, CDCl ₃) do composto SL6 (expansão).	171
Figura S97: Espectro de RMN de NOESY (400 MHz, CDCl ₃) do composto SL6	172
Figura S98: Espectro de IES-EMAR de SL6 ([M –H ₂ O+ H], modo de ionização positivo).	173
Figura S99: Espectro de CLAE-IESEM/EM de SL6 ([M –H ₂ O+ H], modo de ionização positivo).	173
Figura S100: Padrão de fragmentação do composto SL6	173
Figura S101: Espectro de RMN de ¹ H (400 MHz, CDCl ₃) do composto SL7	174
Figura S102: Espectro de RMN de ¹ H (400 MHz, CDCl ₃) do composto SL7 (expansão)...	175
Figura S103: Espectro de RMN de COSY (400 MHz, CDCl ₃) do composto SL7	176
Figura S104: Espectro de RMN de HSQC (400 MHz, CDCl ₃) do composto SL7	177
Figura S105: Espectro de RMN de HSQC (400 MHz, CDCl ₃) do composto SL7 (expansão).	178

Figura S106: Espectro de RMN de HSQC (400 MHz, CDCl ₃) do composto SL7 (expansão).	179
Figura S107: Espectro de RMN de HMBC (400 MHz, CDCl ₃) do composto SL7 .	180
Figura S108: Espectro de RMN de HMBC (400 MHz, CDCl ₃) do composto SL7 (expansão).	181
Figura S109: Espectro de RMN de HMBC (400 MHz, CDCl ₃) do composto SL7 (expansão).	182
Figura S110: Espectro de RMN de HMBC (400 MHz, CDCl ₃) do composto SL7 (expansão).	183
Figura S111: Espectro de RMN de NOESY (400 MHz, CDCl ₃) do composto SL7 .	184
Figura S112: Espectro de IES-EMAR de SL7 ([M – H ₂ O + H], modo de ionização positivo).	185
Figura S113: Espectro de CLAE-IESEM/EM de SL7 ([M – H ₂ O + H], modo de ionização positivo).	185
Figura S114: Padrão de fragmentação do composto SL7 .	185
Figura S115: Espectro de RMN de ¹ H (400 MHz, CDCl ₃) do composto SL8 .	186
Figura S116: Espectro de RMN de ¹ H (400 MHz, CDCl ₃) do composto SL8 (expansão).	187
Figura S117: Espectro de RMN de ¹³ C-APT (100 MHz, CDCl ₃) do composto SL8 .	188
Figura S118: Espectro de RMN de ¹³ C (100 MHz, CDCl ₃) do composto SL8 (expansão).	189
Figura S119: Espectro de RMN de COSY (400 MHz, CDCl ₃) do composto SL8 .	190
Figura S120: Espectro de RMN de HSQC (400 MHz, CDCl ₃) do composto SL8 .	191
Figura S121: Espectro de RMN de HSQC (400 MHz, CDCl ₃) do composto SL8 (expansão).	192
Figura S122: Espectro de RMN de HMBC (400 MHz, CDCl ₃) do composto SL8 .	193
Figura S123: Espectro de RMN de HMBC (400 MHz, CDCl ₃) do composto SL8 (expansão).	194
Figura S124: Espectro de RMN de NOESY (400 MHz, CDCl ₃) do composto SL8 .	195
Figura S125: Espectro de RMN de ¹ H (400 MHz, C ₅ D ₅ N) do composto SL8 .	196
Figura S126: Espectro de RMN de HMBC (400 MHz, C ₅ D ₅ N) do composto SL8 (expansão).	197
Figura S127: Espectro de IES-EMAR de SL8 ([M + H], modo de ionização positivo).	198
Figura S128: Espectro de CLAE-IESEM/EM de SL8 ([M + H], modo de ionização positivo).	198
Figura S129: Padrão de fragmentação do composto SL8 .	198

Figura S130: Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) do composto SL9 .	199
Figura S131: Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) do composto SL9 .	200
Figura S132: Espectro de IES-EMAR de SL9 ($[\text{M} + \text{H} - \text{H}_2\text{O}]$, modo de ionização positivo).	201
Figura S133: Espectro de CLAE-IESEM/EM de SL9 ($[\text{M} + \text{H} - \text{H}_2\text{O}]$, modo de ionização positivo).	201
Figura S134: Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) do composto SL10 .	202
Figura S135: Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) do composto SL10 .	203
Figura S136: Espectro de IES-EMAR de SL10 ($[\text{M} + \text{H} - \text{H}_2\text{O}]$, modo de ionização positivo).	204
Figura S137: Espectro de CLAE-IESEM/EM de SL10 ($[\text{M} + \text{H} - \text{H}_2\text{O}]$, modo de ionização positivo).	204
Figura S138: Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) do composto SL11 .	205
Figura S139: Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) do composto SL11 .	206
Figura S140: Espectro de IES-EMAR de SL11 ($[\text{M} + \text{H}]$, modo de ionização positivo).	207
Figura S141: Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) do composto SL12 .	208
Figura S142: Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) do composto SL12 .	209
Figura S143: Espectro de IES-EMAR de SL12 ($[\text{M} - \text{H}_2\text{O} + \text{H}]$, modo de ionização positivo).	210
Figura S144: Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) do composto SL13 .	211
Figura S145: Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) do composto SL13 .	212
Figura S146: Espectro de IES-EMAR de SL13 ($[\text{M} - \text{H}_2\text{O} + \text{H}]$, modo de ionização positivo).	213
Figura S147: Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) do composto SL14 .	214
Figura S148: Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) do composto SL14 .	215
Figura S149: Espectro de IES-EMAR de SL14 ($[\text{M} - \text{H}_2\text{O} + \text{H}]$, modo de ionização positivo).	216
Figura S150: Viabilidade de células Vero após tratamento com diferentes concentrações dos compostos de <i>S. loranthacea</i> .	217
Figura S151: Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) do composto CV1 .	235
Figura S152: Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) do composto CV1 (expansão).	236
Figura S153: Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) do composto CV1 .	237
Figura S154: Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) do composto CV1 (expansão).	238
Figura S155: Espectro de RMN de COSY (400 MHz, CDCl_3) do composto CV1 .	239

Figura S156: Espectro de RMN de HSQC (400 MHz, CDCl ₃) do composto CV1	240
Figura S157: Espectro de RMN de HMBC (400 MHz, CDCl ₃) do composto CV1	241
Figura S158: Espectro de RMN de HMBC (400 MHz, CDCl ₃) do composto CV1	242
Figura S159: Espectro de RMN de ¹ H (400 MHz, CDCl ₃) do composto CV2	243
Figura S160: Espectro de RMN de ¹ H (400 MHz, CDCl ₃) do composto CV2	244
Figura S161: Espectro de RMN de ¹ H (400 MHz, CDCl ₃) do composto CV2	245
Figura S162: Espectro de RMN de ¹³ C (100 MHz, CDCl ₃) do composto CV2	246
Figura S163: Espectro de RMN de ¹³ C (100 MHz, CDCl ₃) do composto CV2	247
Figura S164: Espectro de RMN de COSY (400 MHz, CDCl ₃) do composto CV2	248
Figura S165: Espectro de RMN de HSQC (400 MHz, CDCl ₃) do composto CV2	249
Figura S166: Espectro de RMN de HMBC (400 MHz, CDCl ₃) do composto CV2	250
Figura S167: Espectro de RMN de HMBC (400 MHz, CDCl ₃) do composto CV2	251
Figura S168: Espectro de RMN de ¹ H (400 MHz, CDCl ₃) do composto CV3	252
Figura S 169: Espectro de RMN de ¹ H (400 MHz, CDCl ₃) do composto CV3	253
Figura S170: Espectro de RMN de ¹ H (400 MHz, CDCl ₃) do composto CV3	254
Figura S171: Espectro de RMN de ¹³ C (100 MHz, CDCl ₃) do composto CV3	255
Figura S172: Espectro de RMN de ¹³ C (100 MHz, CDCl ₃) do composto CV3	256
Figura S173: Espectro de RMN de COSY (400 MHz, CDCl ₃) do composto CV3	257
Figura S174: Espectro de RMN de HSQC (400 MHz, CDCl ₃) do composto CV3	258
Figura S 175: Espectro de RMN de HMBC (400 MHz, CDCl ₃) do composto CV3	259
Figura S176: Espectro de RMN de ¹ H (400 MHz, CDCl ₃) do composto CV4	260
Figura S177: Espectro de RMN de ¹ H (400 MHz, CDCl ₃) do composto CV4	261
Figura S178: Espectro de RMN de ¹ H (400 MHz, CDCl ₃) do composto CV4	262
Figura S179: Espectro de RMN de COSY (400 MHz, CDCl ₃) do composto CV4	263
Figura S180: Espectro de RMN de HSQC (400 MHz, CDCl ₃) do composto CV4	264
Figura S181: Espectro de RMN de HMBC (400 MHz, CDCl ₃) do composto CV4	265
Figura S182: Espectro de RMN de ¹ H (400 MHz, CDCl ₃) do composto CV5	266
Figura S183: Espectro de RMN de ¹³ C (100 MHz, CDCl ₃) do composto CV5	267
Figura S184: Espectro de RMN de ¹ H (400 MHz, CDCl ₃) do composto CV6	268
Figura S185: Espectro de RMN de ¹³ C (100 MHz, CDCl ₃) do composto CV6	269
Figura S186: Espectro de RMN de ¹ H (400 MHz, CDCl ₃) do composto CV7	270
Figura S187: Espectro de RMN de ¹³ C (100 MHz, CDCl ₃) do composto CV7	271
Figura S188: Espectro de IES-EMAR de CV1 ([M + H], modo de ionização positivo).....	272
Figura S189: Espectro de IES-EMAR de CV2 ([M + H], modo de ionização positivo).....	272

Figura S190: Espectro de IES-EMAR de CV3 ([M + H], modo de ionização positivo).....	273
Figura S191: Espectro de IES-EMAR de CV4 ([M + H], modo de ionização positivo).....	273
Figura S192: Efeito de compostos na produção de IL-1 β na cultura de macrófagos J774 ativada por LPS e INF- γ	274

Lista de Tabelas

Tabela 1: Dados espectroscópicos de RMN de ^1H (500 e 400 MHz) e ^{13}C (125 e 100 MHz) dos compostos SL1–SL4 em CDCl_3	62
Tabela 2: Dados espectroscópicos de RMN de ^1H (500 e 400 MHz) e ^{13}C NMR (125 e 100 MHz) dos compostos SL5–SL8 em CDCl_3	66
Tabela 3: Dados de RMN de ^1H 400 MHz (CDCl_3) dos compostos CV1 a CV7 (<i>J</i> em Hz).	225
Tabela 4: Dados de RMN de ^{13}C 100MHz (CDCl_3) dos compostos CV1 a CV7	226
Tabela 5: Citotoxicidade e atividade anti- <i>T. cruzi</i> dos compostos CV1-CV7	228
Tabela 6: Citotoxicidade e inibição da produção de NO dos compostos isolados de <i>C. velutinus</i>	229

Lista de Tabelas Suplementares

Tabela S1: Dados de CLAE-IESEM2 e CLAE-IES-EMAR dos compostos presentes no cluster A.....	81
Tabela S2: Dados espectroscópicos de RMN de ^{13}C (100 e 125 MHz) do composto SL1 em diferentes solvents deuterados.	112
Tabela S3: Deslocamento químico experimental de RMN de ^{13}C do composto SL1 e respectivas previsões por DFT (PRED 01-05) de vários conformeros. Entre parênteses estão os valores de distribuição de Boltzmann.	113
Tabela S4: Atividade citotóxica dos compostos SL1, SL2, SL5–SL14 em células Vero....	216

Lista de Esquemas

Esquema 1: Obtenção dos extratos das cascas das raízes de <i>S. loranthea</i>	39
Esquema 2: Fracionamento cromatográfico do extrato hexânico de <i>S. loranthea</i>	41
Esquema 3: Obtenção dos extratos das raízes de <i>C. velutinus</i>	47
Esquema 4: Fracionamento cromatográfico do extrato hexânico de <i>C. velutinus</i>	48

Lista de Quadros

Quadro 1: Fracionamento cromatográfico por CC do extrato hexânico de *S. loranthacea*.

..... 39

Quadro 2: Fracionamento cromatográfico por CC do extrato hexânico de *C. velutinus*.47

Lista de Abreviaturas, Siglas e Fórmulas

AcOEt	Acetato de Etila
APT	<i>Attached Proton Test</i>
CC	Cromatografia em coluna
CCDA	Cromatografia em camada delgada analítica
CID	<i>Collision-induced dissociation</i>
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CH ₃ CN	Acetonitrila
COSY	<i>Correlation Spectroscopy</i>
C ₁₈	Octadecilsilano
<i>d</i>	Dubleto
DAD	Detector <i>Diode Array</i>
DFT	<i>Density Functional Theory</i>
<i>dd</i>	Duplo dubleto
<i>dl</i>	Dubleto largo
DMSO-d ₆	Dimetilsufóxido deuterado
CI ₅₀	Concentração Inibitória Média
EM	Espectrometria de massas
EMAR	Espectro de massas em alta resolução
EM/EM ou EM ² ou EM ⁿ	Espectrômetro de massas em <i>tandem</i>
ESI	Ionização por <i>electrospray</i>
GNPS	<i>Global Natural Product Social Molecular Networking</i>
Hex	Hexano
HMBC	<i>Heteronuclear Multiple Bond Correlation</i>
HSQC	<i>Heteronuclear Single Quantum Correlation</i>
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i>
IES	Ionização por eletronspray
IV	Infravermelho
<i>J</i>	Constante de acoplamento
MeOH	Metanol
<i>m</i>	Multiplete
Min	Minuto
<i>m/z</i>	Relação massa-carga
MHz	Mega-hertz
MOI	<i>Multiplicity of Infection</i>
[M + H] ⁺	Molécula protonada
[M – H] ⁻	Molécula desprotonada
NOESY	<i>Nuclear Overhauser Spectroscopy</i>
PPgPNSB	Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos
ppm	Partes por milhão
Rede molecular	<i>Molecular Networking</i>
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
<i>s</i>	Simpleto
<i>sl</i>	Simpleto largo
TOF	<i>Time-of-flight</i>
<i>t</i>	Triplete
<i>tl</i>	Triplete largo
<i>quin</i>	Quinteto

Sumário

1	INTRODUÇÃO.....	21
2	REFERENCIAL TEÓRICO.....	22
2.1	Família Euphorbiaceae	22
2.2	Gênero <i>Stillingia</i> e a espécie <i>S. loranthacea</i>	23
2.3	Gênero <i>Croton</i> e a espécie <i>C. velutinus</i>	27
2.4	Terpenoides de Euphorbiaceae e seu potencial biológico	29
2.5	Utilização de técnicas cromatográficas acopladas com espectroscopia e espectrometria.....	33
3	OBJETIVOS.....	35
3.1	OBJETIVO GERAL	35
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	35
4	MATERIAL E MÉTODOS.....	36
4.1	Métodos Cromatográficos.....	36
4.2	Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN)	37
4.3	Espectroscopia no Infravermelho (IV) e Rotação Ótica.	37
4.4	Espectrometria de Massas (EM)	37
4.5	Estudo Fitoquímico.....	38
4.5.1	Locais da Pesquisa.....	38
4.5.2	Material botânico.....	38
4.6	Obtenção dos extratos e fracionamento do extrato das cascas das raízes de <i>Stillingia loranthacea</i>	38
4.6.1	Isolamento e purificação por CLAE dos constituintes químicos de <i>S. loranthacea</i>	40
4.6.2	Análise dos extratos hexânicos da casca das raízes, cerne das raízes, folhas e caule por CLAE-IES-EM/EM.	43
4.7	Rede molecular	44
4.7.1	Isolamento guiado por RMN de ¹ H e CLAE-IES-EM/EM dos compostos SL3 e SL4	45

4.8	Cálculos do DFT e predição dos espectros de RMN de ^{13}C	46
4.9	Obtenção e fracionamento do extrato hexânico das raízes de <i>C. velutinus</i>	46
4.10	Atividades Biológicas.	49
4.10.1	Locais da pesquisa	49
4.10.2	Avaliação da citotoxicidade e atividade antiviral dos compostos isolados de <i>S. loranthacea</i>	49
4.10.3	Avaliação da citotoxicidade, tripanocida e anti-inflamatória <i>in vitro</i> realizado com os compostos isolados de <i>C. velutinus</i>	50
5	Resultados e discussão	53
5.1	Manuscrito 1: Tri- e Diterpenoides de <i>Stillingia loranthacea</i> como inibidores da replicação do Vírus da Zika (manuscrito foi aceito na revista Journal of Natural Products)	53
5.2	Manuscrito 2: Fenilpropanóides de <i>Croton velutinus</i> com Atividades Anti-inflamatória, Citotóxica e Tripanocida <i>in vitro</i> (manuscrito será submetido a revista Fitoterapia).....	218
6	Conclusões gerais	275
7	Referências	277

1 INTRODUÇÃO

Os produtos naturais são fontes promissoras de princípios ativos com potencial biológico e/ou terapêutico. Grande parte das substâncias naturais prospectadas nos séculos passados foram empregadas nos estudos para o desenvolvimento de novos fármacos, seja por utilização da substância isolada de fonte natural ou por meio do desenvolvimento de derivados semissintéticos ou sintéticos que utilizaram o produto natural como modelo (NEWMAN; CRAGG, 2016).

As propriedades terapêuticas das plantas são reconhecidas desde tempos antigos. Muitas doenças eram tratadas com preparações derivadas de plantas e foi a partir da observação dessa utilização por diferentes povos que muitos fármacos foram descobertos. Estas drogas são utilizadas como extratos únicos ou misturas de extratos vegetais concentrados sem o isolamento de compostos ativos. Porém a medicina moderna incentiva o isolamento e a purificação de pelo menos um ou dois compostos ativos afim de sanar muitos desafios de saúde como câncer, doenças degenerativas, HIV/AIDS e diabetes, dos quais a medicina moderna está lutando para fornecer curas (THOMFORD et al., 2018).

O estudo fitoquímico de matérias primas-vegetais busca a ampliação do conhecimento dos constituintes químicos presentes nas espécies, levando também a descoberta de novos candidatos ao desenvolvimento de medicamentos (ATANASOV et al., 2015). Em uma revisão, Butler et al. (2014) reforçam a ideia de pesquisar fármacos oriundos de fontes naturais pois esta havia enfraquecido durante um tempo e retornou após a descoberta de fármacos importantes como o taxol e artemisina. Nessa revisão, os autores descrevem um levantamento entre o período de 2008 a 2013, no qual 133 moléculas se encontravam em estudos de fase clínica, dentre elas 100 produtos naturais e derivados semissintéticos e 33 produtos naturais conjugados a anticorpos (BUTLER et al., 2014).

Nesse contexto, o Brasil é um dos países com maior biodiversidade mundial, o que torna a flora brasileira uma rica fonte para a busca de novos produtos farmacêuticos, cosméticos e nutracêuticos (BRANDÃO et al., 2010). Dentre os biomas brasileiros a caatinga possui sua biodiversidade pouco estudada. A região do semiárido é conhecida por possuir inúmeras plantas medicinais e tem a etnofarmacologia como referência do conhecimento popular dessa região (ALBUQUERQUE; ANDRADE, 2002).

Uma estratégia para acelerar a identificação de produtos naturais oriundos da caatinga é a utilização de técnicas espectroscópicas e espectrométricas acopladas a cromatografia. Essa

abordagem é possível a partir do desenvolvimento de métodos analíticos que contribuam na identificação do perfil químico de modo eficiente e com qualidade. Nos últimos anos, a desreplicação vem se tornando uma ferramenta importante que possibilita uma rápida identificação de substâncias conhecidas, diminuindo no tempo de pesquisa e estimula a pesquisa no descobrimento de novos compostos com potencial atividade farmacológica (WOLFENDER, 2009; WOLFENDER et al., 2013).

Recentemente, foi criada a plataforma *Global Natural Products Social Molecular Networking* (GNPS) que disponibiliza ferramentas como a rede molecular (*Molecular Networking*) e dados espectrométricos para acelerar a desreplicação de substâncias conhecidas e auxiliar na busca de novas entidades químicas naturais (WANG, M. et al., 2016).

Tendo como base a importância do estudo químico de espécies da caatinga brasileira por meio do uso de técnicas clássicas e modernas de análises, este trabalho traz contribuições ao estudo fitoquímico e farmacológico de espécies da família Euphorbiaceae (*S. loranthea* e *Croton velutinus*) da caatinga baiana.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Família Euphorbiaceae

A família Euphorbiaceae possui cerca de 8.000 espécies distribuídas nas regiões tropicais e temperadas de todo o planeta. Possui 317 gêneros que estão agrupados em 49 tribos e cinco subfamílias. No Brasil, há relatos da existência de aproximadamente 1.000 espécies nas diferentes vegetações do país distribuídas em 80 gêneros (SÁTIRO; ROQUE, 2008).

As espécies de Euphorbiaceae possuem destaque na atividade econômica, através da alimentação humana e na medicina a partir do conhecimento popular. Essas espécies são amplamente distribuídas no Brasil, sendo que algumas nunca foram estudadas quanto à sua utilização e sua composição química (DE SOUSA TRINDADE; ALVES LAMEIRA, 2014).

Dentre as espécies com importância econômica e alimentar, a seringueira (*Hevea brasiliensis* (Willd. Ex A. Juss.) se destaca, por ser uma fonte natural de borracha, enquanto a espécie *Manihot esculenta* Crantz, também conhecido no Brasil como "aipim", "macaxeira" ou "mandioca", se posiciona entre os 13 alimentos humanos mais consumidos (SECCO et al., 2012). No âmbito das propriedades medicinais, Trindade et al. 2014 destaca que vários gêneros

possuem descrição na medicina tradicional se destacando principalmente espécies de *Croton*, *Euphorbia* e *Jatropha* (DE SOUSA TRINDADE; ALVES LAMEIRA, 2014).

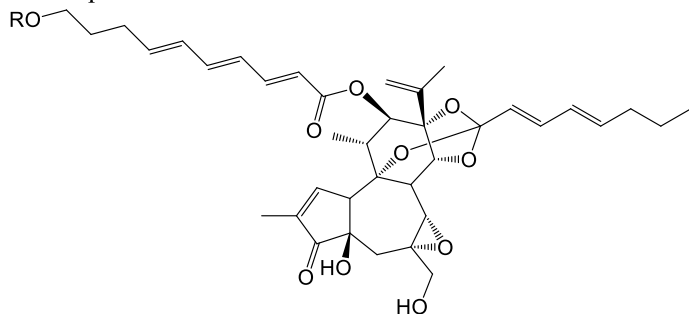
2.2 Gênero *Stillingia* e a espécie *S. loranthacea*

O gênero *Stillingia* (Euphorbiaceae) é representado por 30 espécies nas américas, além de várias ilhas do pacífico e Índia (OLIVON et al., 2015). No Brasil, sete espécies estão distribuídas entre Caatinga e Mata Atlântica, sendo quatro predominantemente na Caatinga (*S. saxatilis* Mull. Arg., *S. trapezoidea* Ule, *S. uleana* Pax & K. Hoffm e *S. loranthacea* Mull. Arg.) (ATHIÊ-SOUZA et al., 2014). Extratos das folhas e do látex de algumas espécies do gênero possuem atividades antifúngica, antiviral e citotóxica (CHAPUIS et al., 1988; DRÄGER et al., 2007; COTA et al., 2011; TECHER et al., 2015).

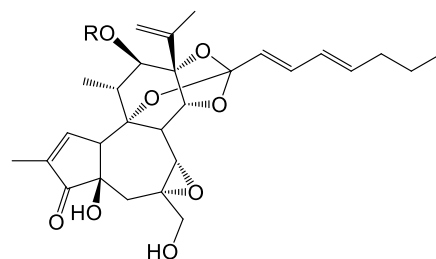
Apenas quatro espécies de *Stillingia* foram estudadas quimicamente (OLIVON et al., 2015). Das raízes de *S. sylvatica*, foi reportado o isolamento de ésteres de diterpenos dos tipos dafnano e tiglianos (Figura 1) (ADOLF; HECKER, 1980). Das raízes de *S. sanguinolenta* foram identificados diversos tipos de diterpenos, entre esses, as substâncias tonantzitlonas A e B considerados diterpenos não comuns por possuir em seu esqueleto um macrociclo flexibileno de 15 carbonos (Figura 2). Esses compostos demonstraram uma significativa atividade citotóxica frente as linhagens celulares de câncer de rim e pulmão humano (DRÄGER et al., 2007). Nos últimos anos, estudos foram publicados envolvendo a síntese desses diterpenos além de testes de atividades antiviral, citotóxica e ensaios de inibição da enzima cinesina-5 (OLIVON et al., 2015; SOURBIER et al., 2015; BUSCH et al., 2016; PFEFFER et al., 2016). Das folhas de *S. oppositifolia* foram identificados triterpenos do tipo oleanano e taraxareno (Figura 3) e nas folhas da espécie *S. lineata* foram identificados diterpenos do tipo tigliano e flexibileno com atividade antiviral (Figura 4) (COTA et al., 2011; OLIVON et al., 2015). A possibilidade do estudo desses terpenos, associado ao interesse na sua atividade biológica, vem impulsionando estudos químicos e farmacológicos desse gênero (BUSCH; KIRSCHNING, 2008).

Figura 1: Diterpenos isolados de *S. sylvatica*.

Esqueleto dafnano

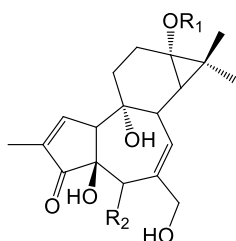


- 1-R = H
 2-R = CO-(CH₂)₁₂-CH₃
 3-R = CO-CH=CH-(CH₂)₁₁-CH₃

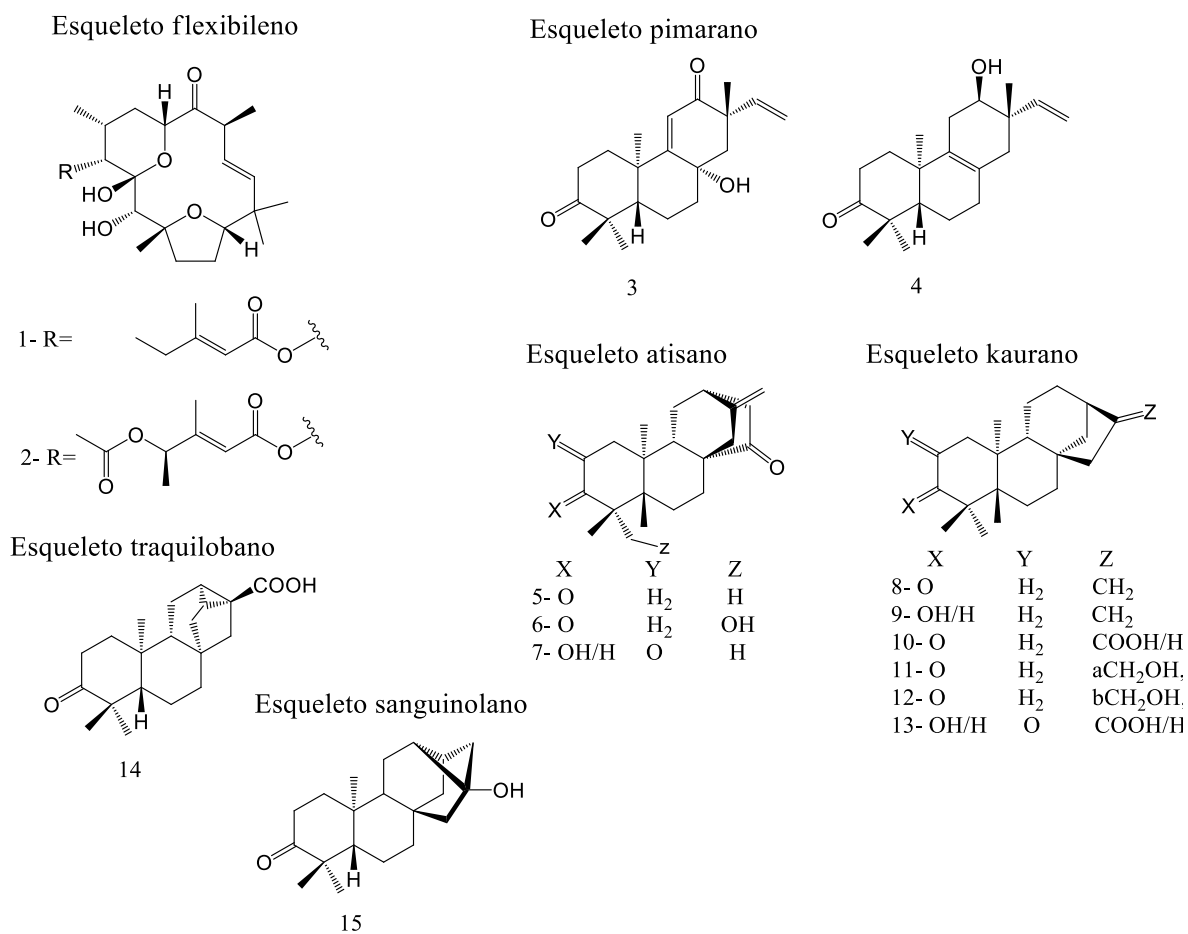


- 4-R = H
 5-R = CO-(CH=CH)₃-(CH₂)₃-OCOC₁₃H₂₇
 6-R = CO-(CH=CH)₃-(CH₂)₃-OCOC₁₄H₂₇
 7-R = COC₆H₅ (gnidilatidina)

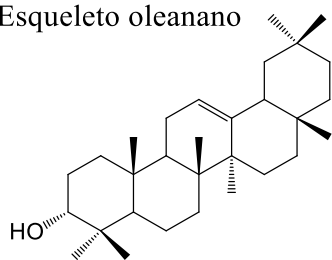
Esqueleto tigiano



- 8-R₁=2'-metilbutil; R₂=H
 9-R₁=COCH₃; R₂=H (prostratina)

Figura 2: Diterpenos aislados de *S. sanguinolenta*.**Figura 3:** Triterpenos identificados de *S. opositifolia*.

Esqueleto oleanano



Esqueleto taraxareno

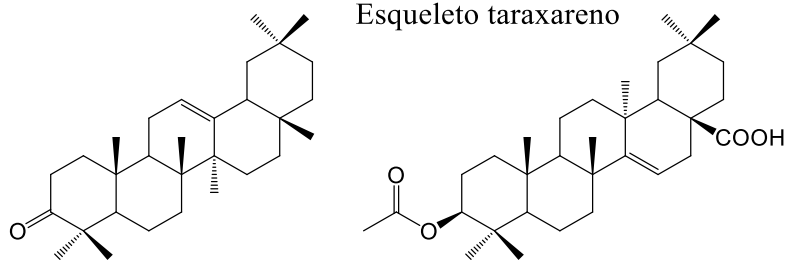
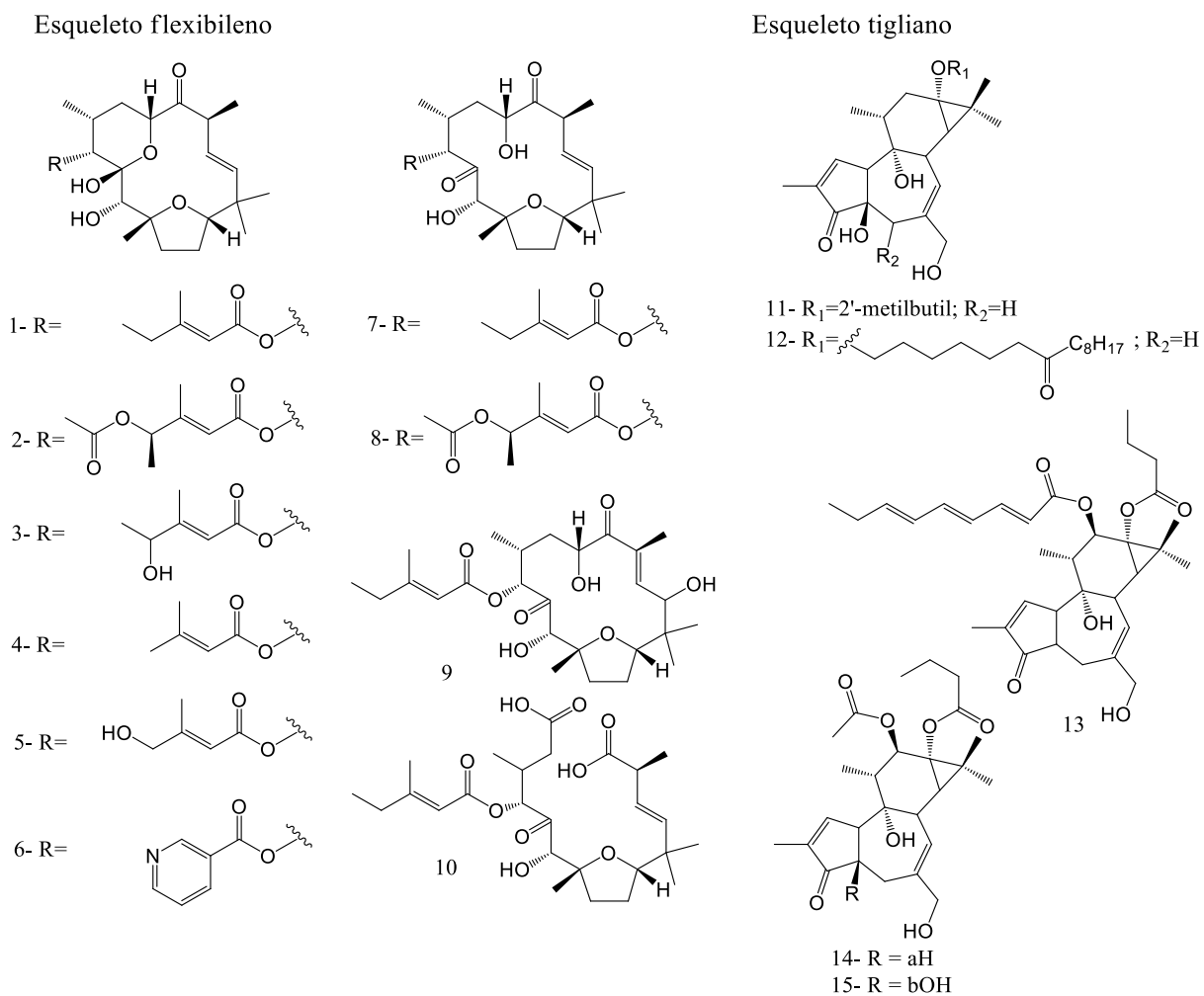


Figura 4: Diterpenos isolados de *S. lineata*.

A espécie *S. loranthacea* se apresenta-se como um arbusto com aproximadamente 1,6 m de altura com folhas concolores, caule vináceo na extremidade, estames amarelos e látex leitoso (Figura 5). Não há estudos fitoquímicos e farmacológicos dessa espécie.

Figura 5: Espécie *Stillingia loranthacea*.



Fonte: Lucas Abreu.

2.3 Gênero *Croton* e a espécie *C. velutinus*

Pertencente a subfamília Crotonoideae, o gênero *Croton* é o segundo maior gênero de Euphorbiaceae e conta com mais da metade das espécies dessa subfamília. O gênero apresenta aproximadamente 1300 espécies, com ampla distribuição. Encontra-se distribuído especialmente nos trópicos, nos mais variados tipos de vegetação e habitats (SECCO, et al. 2012). No Brasil esse gênero possui em torno de 250 a 300 espécies que incluem ervas, arbustos e árvores, sendo a maioria delas encontradas em regiões de vegetações abertas ou florestas secas (DE LIMA; PIRANI, 2003; LIMA, L. R. D.; PIRANI, 2008; SILVA et al., 2009). Foram reconhecidas 100 espécies de *Croton* para a Caatinga, sendo 54 delas endêmicas desse bioma (SILVA et al., 2009).

Espécies desse gênero possuem diversos estudos que relatam seu uso tradicional como plantas medicinais em diversos continentes como América do Sul, Ásia e África. Entre os usos observados estão para o tratamento de câncer, diabetes, feridas, febre, problemas digestivos, hipercolesterolemia, inflamação, hipertensão, malária, dor, úlceras e obesidade. Dentre as

classes de compostos mais presentes em espécies de *Croton* os diterpenos são os que mais aparecem como derivados dos ésteres de forbol, clerodanos, labdanos, kauranos, traquilobanos, pimaranos etc. Entretanto, ocorrem também outras classes como alcaloides, sesquiterpenos, triterpenos, e compostos derivados de fenilpropanóides como os flavonoides (SALATINO et al., 2007).

A espécie *C. velutinus* é facilmente reconhecida por apresentar ramos ferrugíneos, folhas cartáceas, ovais a deltóides, com face abaxial velutina e adaxial glabrescente e estiletes tetráfidos (Figura 6) (TORRES, 2009). A espécie conhecida popularmente como “pimentinha” teve sua caracterização química e farmacológica descrita na dissertação de Cezar, 2016. Nesse estudo, a partir dos talos dessa espécie foi possível realizar o isolamento e identificação de um diterpeno, sesquiterpenos e flavonoides, além de relatar as atividades anticolinesterase, larvicida, antioxidante e inibição da enzima conversora de angiotensina I para os extratos hexânico e metanólico dessa espécie (CEZAR, 2016). Estudos com as raízes dessa espécie não foram realizadas, tornando essas uma fonte promissora de novos metabólitos secundários com potenciais atividades biológicas. Normalmente, os fenilpropanóides de *Croton* estão presentes nos óleos essenciais das espécies e essa classe de metabólito possui vários relatos de atividade anti-inflamatória (DE CÁSSIA DA SILVEIRA E SÁ et al., 2014).

Figura 6: Espécie *Croton velutinus*.



Fonte: Lucas Abreu.

2.4 Terpenoides de Euphorbiaceae e seu potencial biológico

Dentre os vários diterpenos biossintetizados por espécies de Euphorbiaceae, os do tipo tigliano formam o maior grupo e dá origem aos derivados do forbol. Eles possuem um sistema de anéis tetracíclicos (5/7/6/3), no qual os anéis A-B e B-C possuem fusão do tipo trans, enquanto os anéis C-D possuem fusão cis. Uma carbonila está localizada em C3, uma dupla ligação em C1, e a maioria das tiglianos são hidroxilados nas posições 4, 9, 12, 13 e 20. Também chamados ésteres de forbol, a maioria dos derivados tiglianos existem na forma de 12,13 ou 13,20-diésteres, além de alguns também existirem como 12 ou 13-monoésteres e 12,13,20-triésteres. Os diterpenos de ingenanos possuem um esqueleto composto de um sistema de anéis tetracíclico (5/7/7/3) incluindo uma ponte entre C8 e C10 e são β -hidroxilados em C4. Os anéis A e B possuem fusão trans e ligações duplas podem ser encontradas entre os carbonos C1 e C2 no anel A, e entre C6 e C7 no anel B. Os carbonos C3, C5, C13, C17 e C20 podem ser oxigenados e/ou esterificados (Figura 7) (VASAS; HOHMANN, 2014; WANG, H. B. et al., 2015).

Os diterpenos do tipo dafnanos, que se acredita serem derivados de um precursor do tigliano, são baseados em um esqueleto tricíclico (5/7/6), com a fusão trans dos anéis A-B e dos anéis B-C. Uma ligação dupla ou um grupo epóxido podem estar presentes entre os carbonos C-6 e C-7. Um grande número de diterpenóides dafnanos possui uma porção ortoéster, que pode ser anexada ao anel C em várias posições, isto é, C9, C11, C12, C13 e C14 (HE et al., 2002). Os diterpenos do tipo jatrofano são baseados em um sistema de anéis bicíclicos (5/12) enquanto o latirano possui um sistema tricíclico (5/11/3). O número de posições substituíveis nos núcleos bicíclico/tricíclico fornecem aos jatrofanos/latiranos uma grande diversidade química (VASAS; HOHMANN, 2014). Os diterpenos do tipo flexibileno são raros e possuem um macrocíclico de 15 carbonos com um tetraidrofurano intramolecular, grupo hidroxila em C-10 e uma cadeia lateral em C-8. Pode ocorrer também a presença de um anel de piranol no macrocíclico. A estrutura dos flexibilenos é rígida devido às fortes ligações de hidrogênio internas entre o grupo hidroxila no C-10 e os oxigênios do grupo éster da cadeia lateral (Figura 8) (WITTENBERG et al., 2004; DRÄGER et al., 2007). Uma proposta biossintética dos diterpenos de euphorbiaceae a partir do geranilgeranil pirofosfato para a formação do macrocíclicos pode ocorrer de duas formas: fechamento entre os carbonos C1-C14, gerando um carbocation terciário (esqueleto cembrano), ou pelo C1-C15, gerando um carbocation secundário (esqueleto flexibileno), menos estável. Por isso a rota biossintética tende a um favorecimento da formação do esqueleto

cembrano, precursor da maioria dos diterpenos, em relação a formação do esqueleto flexibileno (Figura 9).

Figura 7: Diterpenos macrocíclicos com esqueletos do tipo tigliano e ingenano.

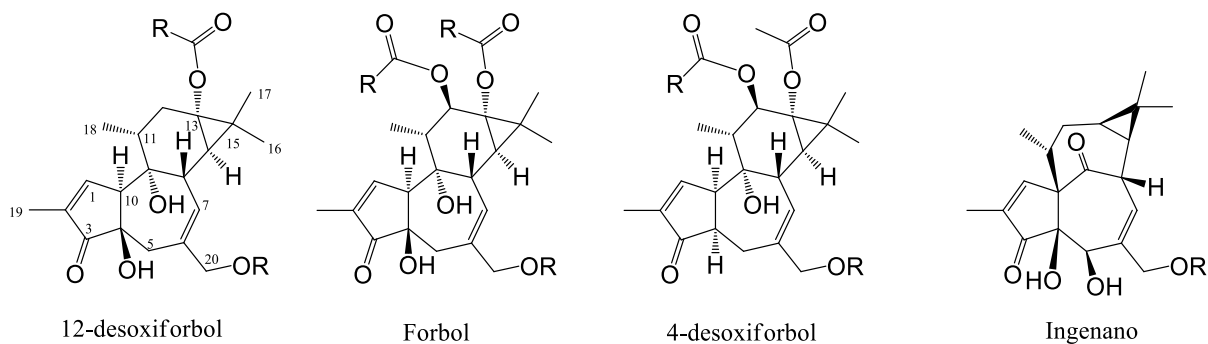


Figura 8: Diterpenos macrocíclicos com esqueletos do tipo dafnano, jatrofano, latirano e flexibileno.

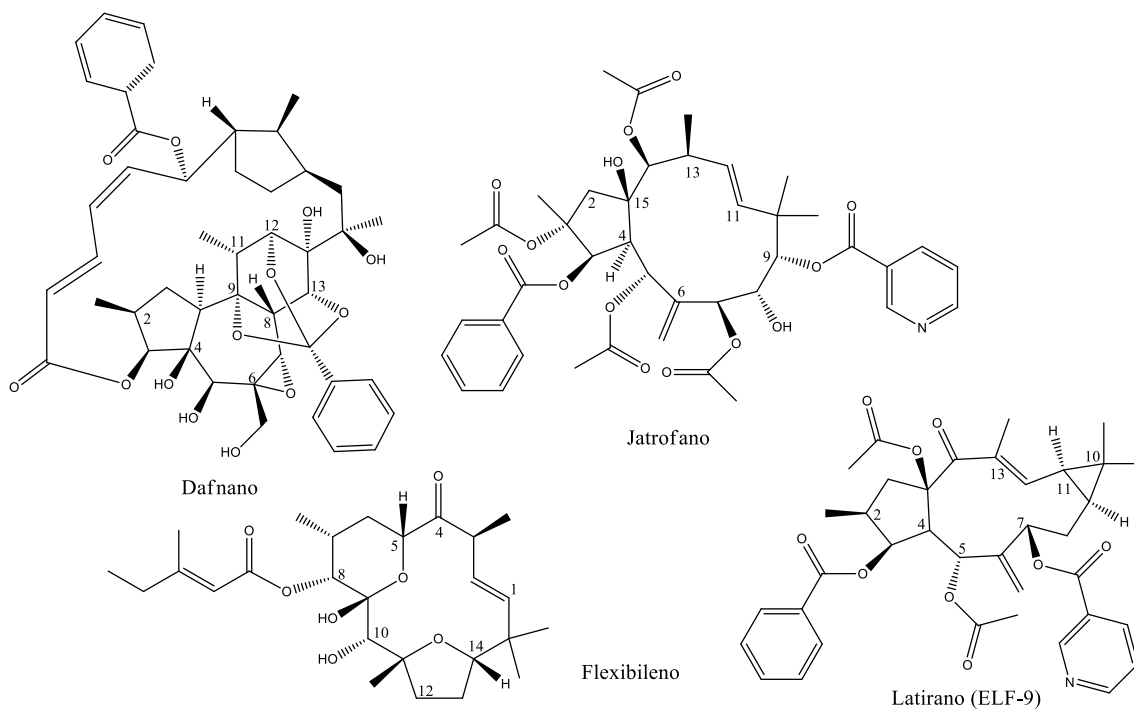
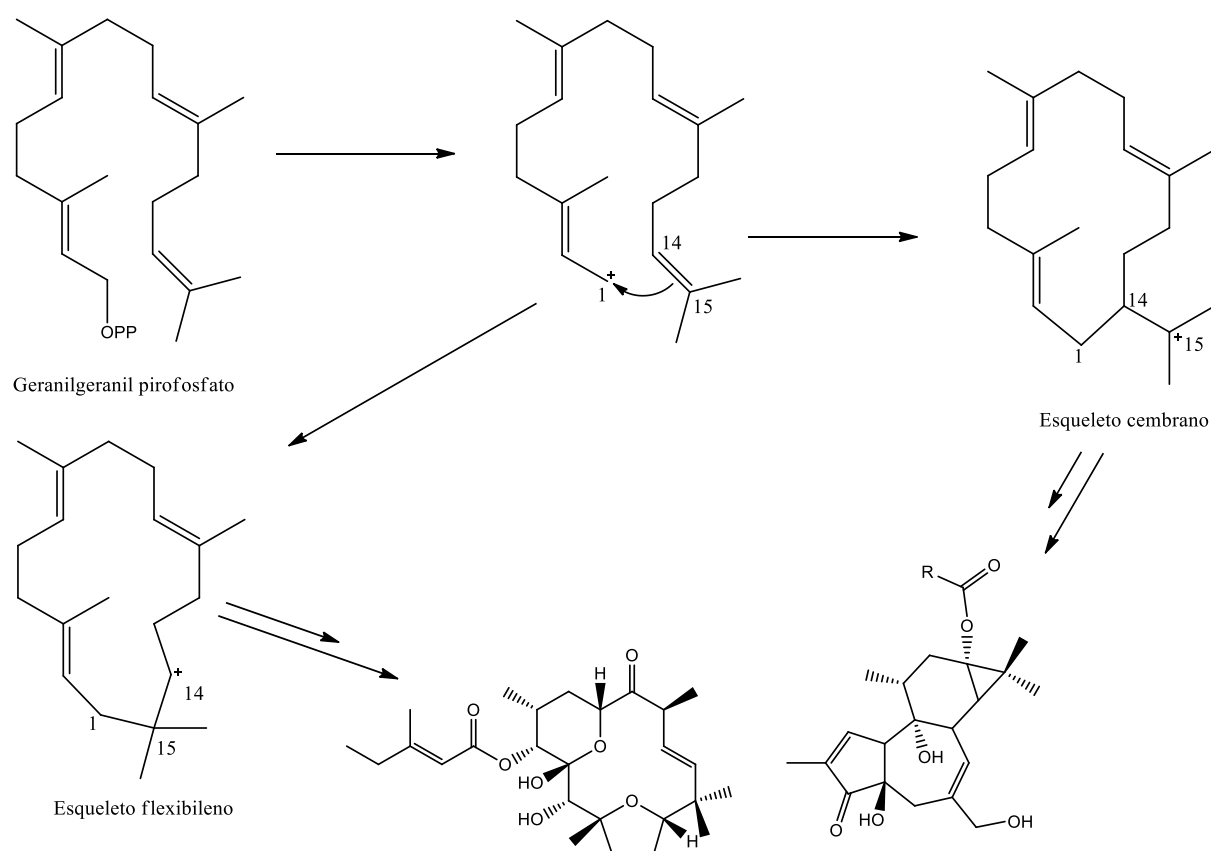


Figura 9: Proposta biossintética dos esqueletos cembrano e flexibileno.



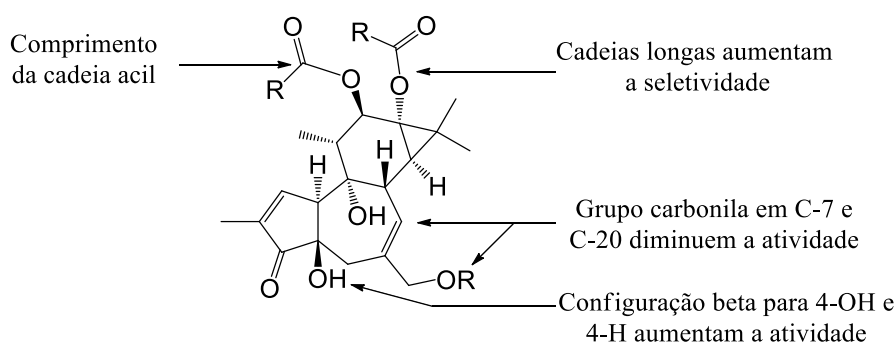
Os terpenos da família Euphorbiaceae são caracterizados por possuírem atividade antiviral *in vitro* em escala nanomolar (OLIVON et al., 2015). A família Euphorbiaceae possui espécies de plantas capazes de produzir uma diversidade de diterpenoides macrocíclicos que possuem vários tipos de esqueletos de carbono (por exemplo, jatrofano, latirano, mirsinano, ingenano, tigiliano, dafnano etc.), muitos dos quais são exclusivos dessa grande família de plantas (SHI et al., 2008; WANG, H. B. et al., 2015).

Desde a descoberta de suas propriedades anti-HIV no início dos anos 90, os diterpenoides macrocíclicos atraíram o interesse da comunidade científica e um número significativo de estudos concentrou-se em seu potencial anti-HIV através da ativação da proteína quinase C (PKC). A ativação da PKC é responsável por uma ampla variedade de atividades biológicas, como agregação plaquetária, promoção de tumores e atividade anti-HIV (VASAS; HOHMANN, 2014; WANG, H. B. et al., 2015). Alguns tiglianos não promotores de tumores, como a prostratina e o DDP (13-fenilacetato de 12-desoxiforbol), exibem potente atividade *in vitro* em relação à inibição da expressão do HIV em linhagens celulares e células

primárias infectadas de forma latente, sendo considerados agentes anti-HIV promissores (HEZAREH et al., 2004; SANCHEZ-DUFFHUES et al., 2011).

Por outro lado, a descoberta de propriedades antivirais de diterpenos macrocíclicos contra o vírus da chikungunya (CHIKV) é muito mais recente, uma vez que seguiu o surto africano da CHIKV nos anos 2000 e seu subsequente surgimento no Oceano Índico (HEZAREH et al., 2004; LEYSEN et al., 2014). Os principais vetores são mosquitos da família Culicidae e do gênero *Aedes* como *A. furcifer*, *A. africanus*, *A. luteocephalus*, *A. taylori* e *A. aegypti*. No Brasil, o vírus CHIKV foi detectado pela primeira vez em 2014 e ainda vem causando transtornos ao sistema público de saúde. Em 2018, o estado do Rio de Janeiro relatou mais de 37 mil casos da doença evidenciando o avanço em relação a 2017 com aproximadamente 4.500 ocorrências (ANTUNES, 2019; CRUZ, 2019). Nesse contexto, ocorreu um aumento da busca de substâncias com potencial inibição do CHIKV. Um recente estudo de revisão fez um levantamento da literatura entre 2011-2019 que revelou 80 diterpenos macrocíclicos com atividade anti-CHIKV, e propôs a relação estrutura atividade para alguns tipos desses metabólitos (REMY; LITAUDON, 2019). De acordo com Remy e Litaudon (2019), 54 compostos com o esqueleto tigiano tiveram atividade antiviral avaliada e a partir desses dados foi possível estabelecer uma relação estrutura atividade para esse tipo de metabólito (Figura 10) (REMY; LITAUDON, 2019).

Figura 10: Relação estrutura atividade anti-CHIKV dos tigianos.



Diversas atividades biológicas são relatadas para esses diterpenos além da antiviral. Esqueletos tigianos também apresentam atividade citotóxica contra a linhagem celular K562 com valores de IC_{50} entre 0,03, e 0,07 μM e foi possuí relatadas de atividade anti-inflamatória pela inibição das enzimas ciclooxygenases-1 (IC_{50} de 0,001 μM) e ciclooxygenases-2 (IC_{50} , 2,2 μM) (RIOS; AGUILAR-GUADARRAMA, 2006; ZHANG et al., 2016).

Das sementes de *Euphorbia lathyris* foram identificados diterpenos macrocíclicos com o esqueleto latirano, onde cinco compostos foram avaliados contra as linhagens celulares de câncer A549, MDA-MB-231, MCF-7, KB e KB-VIN. O composto EFL-9 (figura 8) foi o que apresentou maior citotoxicidade possuindo valores de IC₅₀ que variam de 5,7-8,4 μ M contra quatro das cinco linhas celulares testadas. É importante ressaltar que esse composto possui uma potente toxicidade contra as linhagens celulares cancerígenas multirresistentes KB-VIN e a linhagem celular precursora (IC₅₀ de 5,7 e 6,1 μ M, respectivamente), enquanto que o anticancerígeno taxol exibe uma toxicidade de com valores de IC₅₀ de 1,9 μ M e 6,7 nM, respectivamente, semelhantes ao apresentado pelo ELF-9. O grupo esterificado no carbono C-7 do EFL-9 possui um importante papel na citotoxicidade contra a linhagem celular KB-VIN e o mecanismo de ação desse composto é a capacidade de agregação filamentosa de actina, bem como na interrupção dos microtúbulos (LU et al., 2014; TENG et al., 2018; SALEHI et al., 2019).

Diante do exposto, os diterpenoides macrocíclicos podem ser considerados uma importante fonte de compostos alvo para o desenvolvimento de medicamentos. Assim, a realização de estudos investigativos da composição química de vegetais da família Euphorbiaceae, a fim de conhecer o perfil fitoquímico e a descoberta de novos princípios ativos, é de extrema relevância para o desenvolvimento de novos medicamentos (ATANASOV et al., 2015). Esses tipos de diterpenos não possuem estudos relacionados com o vírus da Zika, sendo essa uma área promissora a novos estudos. Nesse contexto uma investigação química e farmacológica da espécie *S. loranthea* pode levar a descoberta de compostos com potencial antiviral. Além disso, uma contínua investigação sobre o potencial anti-inflamatório, citotóxico e tripanocida de compostos oriundos da família Euphorbiaceae, como da espécie *C. velutinus*, é de potencial interesse biológico.

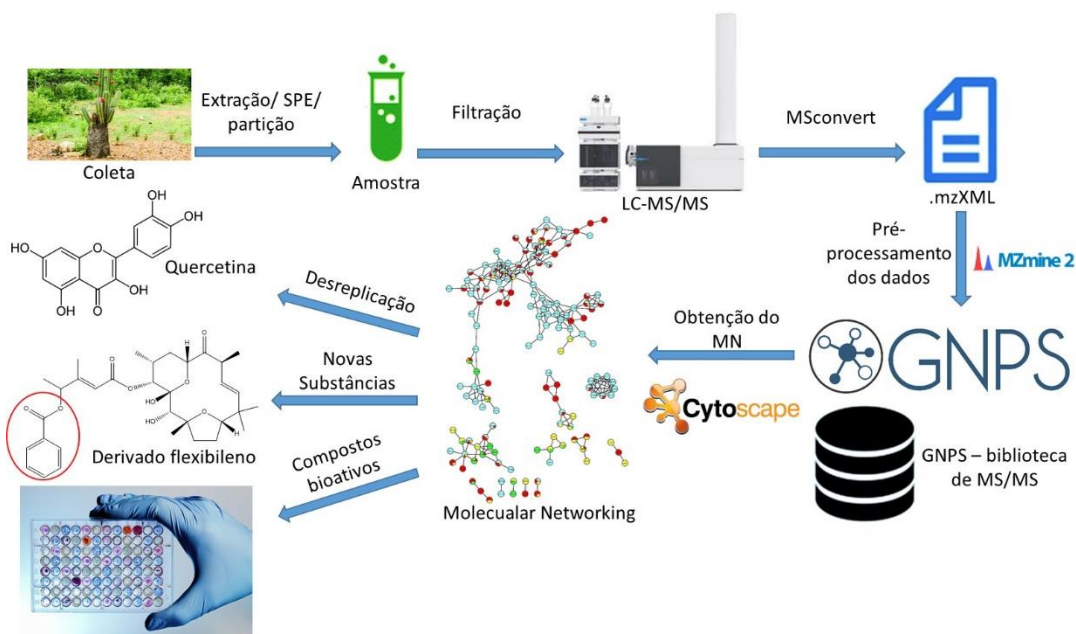
2.5 Utilização de técnicas cromatográficas acopladas com espectroscopia e espectrometria

Nos últimos anos vem aumentando o interesse nos programas de triagem (*screening*) pelos produtos naturais com potencial terapêutico. Com o desenvolvimento de técnicas acopladas como CLAE-DAD-EM, CLAE-DAD-RMN, entre outras e tornou-se possível o desenvolvimento de métodos analíticos capazes de identificar e quantificar substâncias com segurança, eficácia e qualidade, possibilitando a elucidação estrutural de moléculas complexas de fontes naturais, até há pouco tempo difíceis de serem identificadas em larga escala (WOLFENDER, 2009; WOLFENDER et al., 2013; VIEIRA, PAULO C et al., 2017).

A desreplicação de extratos brutos vem sendo uma ferramenta importante para o conhecimento da química do vegetal, a fim de evitar o isolamento de compostos sem interesse e podendo focar no isolamento do composto bioativo. Recentemente, com a criação da plataforma *Global Natural Products Social Molecular Networking* (GNPS), que visa o compartilhamento de dados de espectrometria de massas de diferentes fontes de produtos naturais, foi criada uma estrutura que permite a análise de dados brutos por comparação com uma biblioteca espectral de referência alimentada por toda a comunidade científica e livremente compartilhada, o que se tornou uma ferramenta estratégica na desreplicação de substâncias (YANG et al., 2013; WANG, M. et al., 2016).

Do ponto de vista de aplicação, o *Molecular Networking* ou rede molecular representa um mapa químico onde substâncias que possuem espectros de EM/EM semelhantes estão agrupados em *clusters*. Além disso, é possível enriquecer com anotações de dados espectrais de padrões internos, *in silico* e bibliotecas, dados de atividade biológica, entre outros, para assim ajudar na visualização da composição química de compostos conhecidos e evidenciar os desconhecidos, podendo assim, guiar para o isolamento de novas substâncias ou substâncias com potencial biológico (Figura 11) (FOX RAMOS et al., 2019).

Figura 11: Esquema metodológico para obtenção do *Molecular Networking* seguido de desreplicação, obtenção de novos compostos e biomoléculas.



Recentemente, Nothias (2018) introduziu um roteiro para se realizar uma rede molecular baseada na bioatividade a fim de auxiliar o fracionamento bioguiado e obtenção de compostos com atividade antiviral da espécie *Euphorbia dendroides* (Euphorbiaceae). Inicialmente deve ser

realizado a aquisição e processamento dos dados de CLAE-EM/EM. Em paralelo deve ser realizado o ensaio biológico do extrato e frações. Posteriormente, deve-se usar softwares como o OpenMS ou MZmine 2, para integrar os dados obtidos pela espectrometria de massas e dos ensaios biológicos. Num próximo passo deve-se gerar uma rede molecular usando a plataforma GNPS, a fim de obter anotações de moléculas usando a biblioteca espectral do GNPS e levar em conta os escores de bioatividade previstos. Essas etapas têm o objetivo de identificar *clusters* com candidatos bioativos e direcionar ao isolamento de substâncias que são fortes candidatos a possuírem atividade biológica. A partir dessa análise foi escolhido as frações que possuíam os candidatos a atividade biológica, levando ao isolamento de quatro derivados de éster de forbol. Por fim, dois compostos isolados foram bastante potentes e seletivos para inibição da replicação do vírus CHIK com valores de CE_{50} de 0,40 μ M e 0,60 μ M (NOTHIAS et al., 2018). Assim, com o uso de técnicas clássicas associado a técnicas instrumentais e ferramentas de quimioinformática, é possível aumentar a rapidez e direcionar o isolamento e identificação de compostos com potencial atividade biológica.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Realizar uma investigação fitoquímica e avaliação farmacológica das espécies *Stillingia loranthacea* e *Croton velutinus* (Euphorbiaceae) da caatinga baiana.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Extrair os metabólitos presentes nas espécies *S. loranthacea* e *C. velutinus* e avaliar as diferentes atividades biológicas.
- Desenvolver metodologia analítica em CLAE-DAD e promover uma transposição para escala preparativa para isolamento e purificação dos metabólitos presentes nas espécies.
- Identificar e elucidar as estruturas dos compostos isolados por espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear de ^1H e ^{13}C (uni e bidimensionais), infravermelho e espectrometria de massas de alta resolução.
- Desenvolver metodologia analítica em CLAE-EM/EM para determinação do perfil químico dos compostos presentes em extratos e frações obtidos das espécies e utilizar a ferramenta da rede molecular para guiar o isolamento de novos compostos.

- Avaliar a atividade citotóxica em células Vero, avaliar a atividade inibitória do vírus da ZIKA e propor uma relação estrutura atividade dos compostos isolados de *S. loranthacea*.
- Avaliar a atividade anti-inflamatória, citotóxica, tripanocida *in vitro* e discutir uma relação estrutura atividade dos compostos isolados de *C. velutinus*.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Métodos Cromatográficos

O isolamento, a purificação e a análise dos constituintes químicos foram realizadas utilizando métodos cromatográficos como: cromatografia em coluna (CC) cromatografia em camada delgada analítica (CCDA) e cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).

Para as CC utilizou-se sílica gel (Silicycle® de partículas com dimensões entre 0,063-0,2 mm ou 0,04-0,063 mm), tendo como suporte colunas de vidro cilíndricas cujos comprimentos e diâmetros variaram de acordo com a quantidade de amostra a ser cromatografada.

Na CLAE foi utilizado um cromatógrafo da marca Shimadzu constituído de duas bombas de alta pressão LC-10ADvp, detector de arranjo de diodos SPD-M10Avp, forno CTO-10Avp, controlador SCL-10Avp, degaseficador DGU-14a e injetor manual com alça de amostragem de 20 µL (analítico) e 100 µL (semi-preparativo). As colunas cromatográficas (analítica, semi-preparativa e preparativa) foram as da marca ACE C18, com 5 µm de tamanho de partícula e dimensões de 250 x 4,6 mm (analítica), 250 x 10,0 mm (semi-preparativa) e 250 x 21,2 mm (preparativa). Na preparação das soluções utilizou-se filtros para seringa em PVDF com 0,45 µm de diâmetro de poro e diâmetro 30 mm (Allcrom) além do aparelho de banho de ultrassom (Unique-USC-1600).

O monitoramento das frações obtidas por CC foi realizado por CCDA. Para isso, foram utilizadas placas comerciais de sílica gel (Whatman), em camadas de 0,25 mm de espessura sobre suporte de alumínio (20x20 cm).

As substâncias em análise foram evidenciadas pelo uso de radiação ultravioleta nos comprimentos de onda de 254 e 366 nm (aparelho de marca Boitton) como também impregnação das placas em cubas de vidro, saturadas por vapor de iodo. O monitoramento das

substâncias através do fator de retenção (R_f) na CCDA foi o método adotado para reunir as frações coletadas durante a cromatografia em coluna.

Os solventes orgânicos empregados para eluição foram: hexano, diclorometano, acetato de etila e metanol (Química Moderna e Vetec). Em CLAE, foram empregados solventes (acetonitrila e metanol) de grau cromatográfico (Tedia) e água ultrapura tipo I (Mili-Q).

4.2 Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

Os espectros de RMN de ^1H e ^{13}C foram obtidos em espectrômetros VARIAN-SYSTEM (500 MHz) e BRUKER AVANCE III HD (400 MHz), no Laboratório Multiusuário de Caracterização da UFPB (LMCA-UFPB). As amostras para análise foram preparadas dissolvendo-se pequena quantidade das mesmas em clorofórmio, benzeno, acetona, piridina ou metanol deuterados da marca Cambridge Isotope Laboratories. Os deslocamentos químicos (δ) foram expressos em partes por milhão (ppm) e as constantes de acoplamento (J) em Hz.

Os espectros de RMN também foram otimizados para as seguintes técnicas bidimensionais: HSQC (Heteronuclear Single Quantum Correlation), HMBC (Heteronuclear Multiple Bond Correlation), NOESY (Nuclear Overhauser Enhancement Spectroscopy) e COSY (Correlation Spectroscopy).

4.3 Espectroscopia no Infravermelho (IV) e Rotação Ótica.

O espectro na região do IV (4000 a 400 cm^{-1}) foi obtido em espectrômetro FTIR Vertex-70 da Bruker, do Laboratório de Pesquisa em Matéria Médica – LAPEMM - UFBA, utilizando 1 mg de amostra em janela de brometo de potássio (KBr), com frequência medida em cm^{-1} . A rotação ótica foi realizada a $25\text{ }^\circ\text{C}$ em CHCl_3 no polarímetro Jasco P-2000 no LMCA-UFPB.

4.4 Espectrometria de Massas (EM)

Para obtenção dos espectros de massas das substâncias foram utilizados espectrômetros de massas de alta e baixa resolução da marca Bruker, modelo microTOF II e Ion-Trap AmazonX, respectivamente, pela técnica de Ionização por Eletrospray nos modos positivo (IES+) e negativo (IES-), ambos situados no LMCA-UFPB.

4.5 Estudo Fitoquímico

4.5.1 Locais da Pesquisa

Os estudos fitoquímicos das espécies *S. loranthacea* e *C. velutinus* foram realizados no Laboratório Multiusuário de Caracterização e análise da UFPB e Laboratório de Pesquisa em Matéria Médica da UFBA. As predições de espectros de RMN de ^{13}C foram obtidos no Laboratório de Químioinformática da UFPB, coordenado pelo Prof^o Dr. Marcus Tullius Scotti.

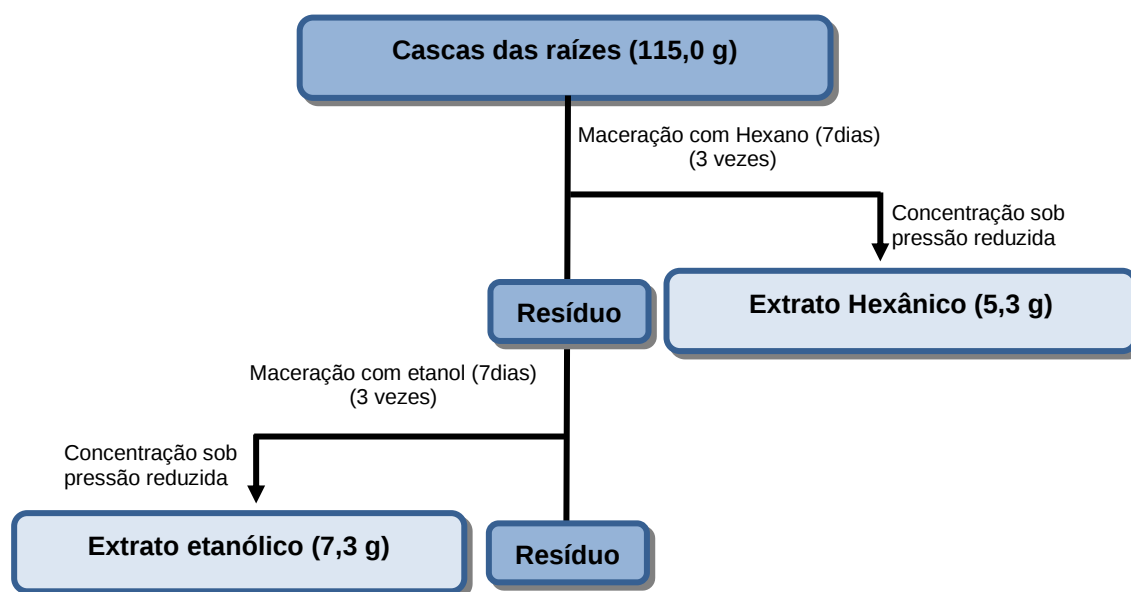
4.5.2 Material botânico

Os materiais botânicos das espécies foram coletados na cidade de Morro do Chapéu-BA, em março de 2016, e identificadas pela Prof^a. Maria Lenise Guedes, sendo as exsiccatas depositadas no Herbário Alexandre Leal da Costa do Instituto de Biologia, com números de exsiccatas 123491(*S. loranthacea*) e 124555 (*C. velutinus*). O registro de acesso no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado foi obtido sob número A22E9B0 (*S. loranthacea* e *C. velutinus*).

4.6 Obtenção dos extratos e fracionamento do extrato das cascas das raízes de *Stillingia loranthacea*

As cascas das raízes foram separadas do cerne de forma manual e posteriormente foram secas a temperatura ambiente por 72 horas, obtendo-se 115,0g e 560,0g, respectivamente. As cascas das raízes foram fracionadas utilizando tesoura botânica e submetido a extração com solvente orgânico. O processo escolhido para extração foi a maceração com hexano (4 L) por 7 dias, sendo este processo repetido três vezes. Após a primeira extração, as cascas das raízes foram extraídas novamente com etanol absoluto (4 L) da mesma forma anteriormente descrita. As soluções obtidas foram filtradas e concentradas sob pressão reduzida a 40 °C para obtenção dos extratos hexânico (5,3 g) e etanólico (7,3 g) (esquema 1). O processo de obtenção dos extratos hexânicos das outras partes da planta foram realizados da mesma forma que o realizado para as cascas das raízes. Assim obtiveram-se extratos hexânicos e etanólicos para as folhas, o caule e cerne das raízes.

Esquema 1: Obtenção dos extratos das cascas das raízes de *S. loranthacea*.



Após análise do extrato hexânico (2,6 g) por CCDA na busca de terpenoides, esta foi submetido a uma cromatografia em coluna aberta empacotada com sílica gel 60 (0,063 – 0,2 mm), e como fase móvel os solventes hexano, acetato de etila e metanol, puros ou em misturas binárias, com gradiente crescente de polaridade, obtendo-se 24 frações de 150 mL cada (quadro 1). As frações foram analisadas por CCDA e reunidas de acordo com seus perfis cromatográficos. As frações 1 e 2; 3 e 4; 11 e 12; 13 a 16 e 17 a 19 foram reagrupadas. Após o reagrupamento resultou em 12 frações (F1-F12).

As frações F4 (98,0 mg) e F8 (680,0 mg) apresentaram-se puras após análise por RMN, sendo então codificadas, respectivamente, de substâncias SL12 e SL13.

Quadro 1: Fracionamento cromatográfico por CC do extrato hexânico de *S. loranthacea*.

Frações	Solvente
1-4	Hexano
5-8	Hex: AcOEt (95:5)
9-12	Hex: AcOEt (9:1)
13-16	Hex: AcOEt (8:2)
17-20	Hex: AcOEt (7:3)
21-24	AcOEt (100%)

4.6.1 Isolamento e purificação por CLAE dos constituintes químicos de *S. loranthea*.

A fração F10 (314,0 mg), foi submetida à análise cromatográfica em CLAE em escala analítica e posteriormente foi submetido a fracionamento em escala preparativa utilizando uma coluna ACE-250 x 21,2 mm C-18 e o seguinte gradiente de eluição: solvente A = H₂O; Solvente B = CH₃CN; Perfil de eluição = 0,0 - 70,0 min (85 - 85% de B); 70,0 - 80,0 min (85 - 100% de B); 80,0 - 100,0 min (100 - 100% de B); 100,0 - 110,0 min (100 - 85% de B); 110,0 - 130,0 min (85 - 85% de B), volume de injeção de 100 µL e taxa de fluxo de 8,0 mL/min.; tempo de corrida: 130 min; fornecendo 24 frações (Figura 12). As análises dos espectros de RMN H¹ dos picos isolados permitiram a identificação de nove compostos (SL1, SL5, SL6, SL8–11, SL13 e SL14), além de uma mistura com duas substâncias (SL2 e SL7). Os compostos isolados tiveram os seguintes tempos de retenção: 18.73 (SL13 – 9.1 mg); 27.74 (SL14 – 15.9 mg); 50.74 (SL9 – 8.2 mg); 57.26 (SL5 – 10.5 mg); 59.97 (SL1 – 12.4 mg); 68.66 (SL2 and SL7 – 7.3 mg); 77.71 (SL6 – 4.3 mg); 84.38 (SL10 – 6.5 mg); 104.92 (SL8 – 1.8 mg); and 107.24 (SL11 – 5.3 mg) (esquema 2).

A fração SL2/7 (7,3 mg) também foi submetida a separação cromatográfica em CLAE (fase móvel: CH₃CN:H₂O (70:40); fluxo 3 mL/min; tempo de corrida: 200 min; coluna ACE-250 x 10 mm C-18; comprimento de onda 220 nm conduzindo ao isolamento dos compostos SL2 (Tr = 219.48 min; 1,0 mg), e SL7 (Tr = 211.34 min; 0,8 mg) (Figura 13).

Esquema 2: Fracionamento cromatográfico do extrato hexânico e *S. loranthacea*.

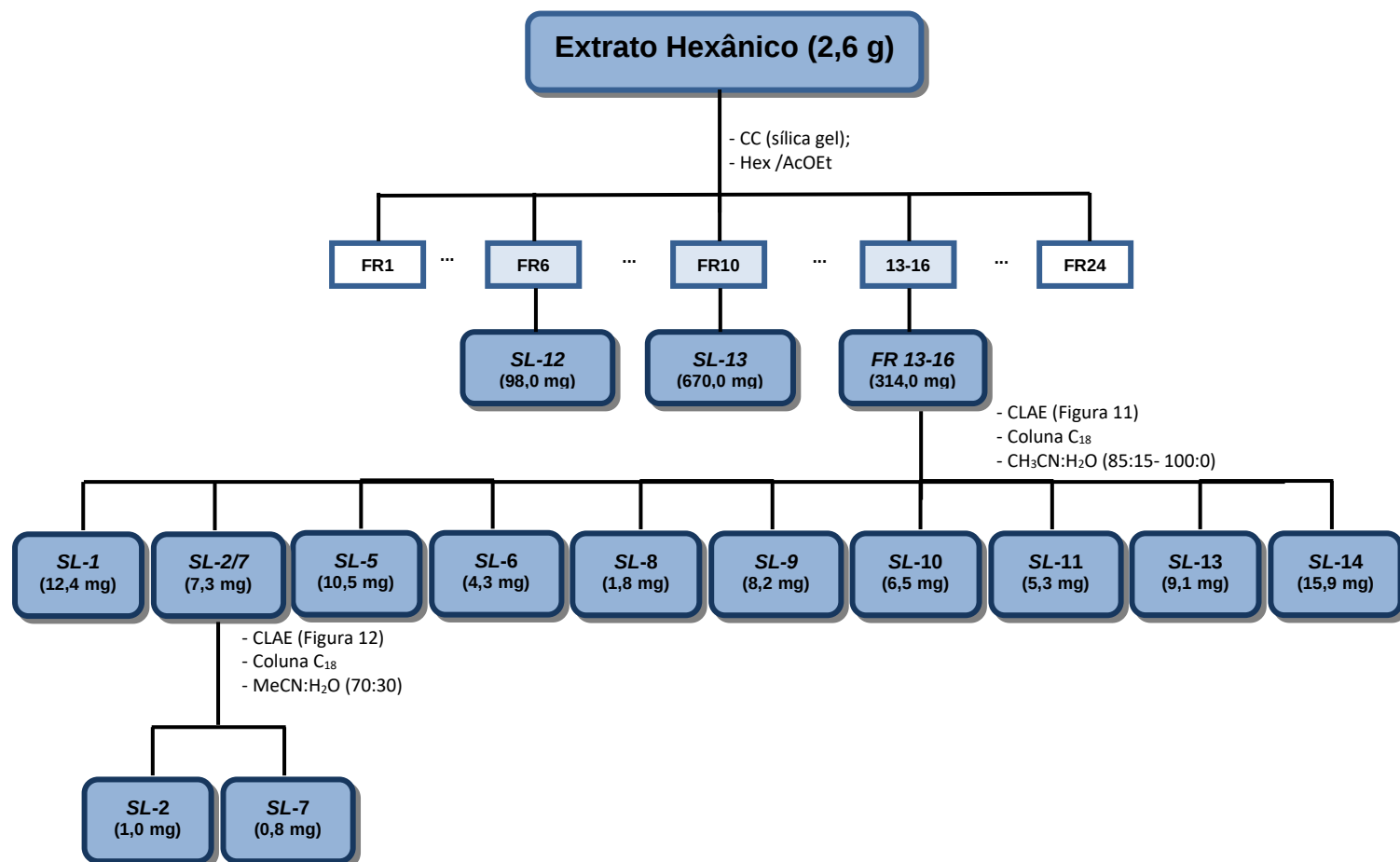


Figura 12: Cromatograma da fração 13-16 em 220 nm com identificação das substâncias isoladas de *S. loranthacea*.

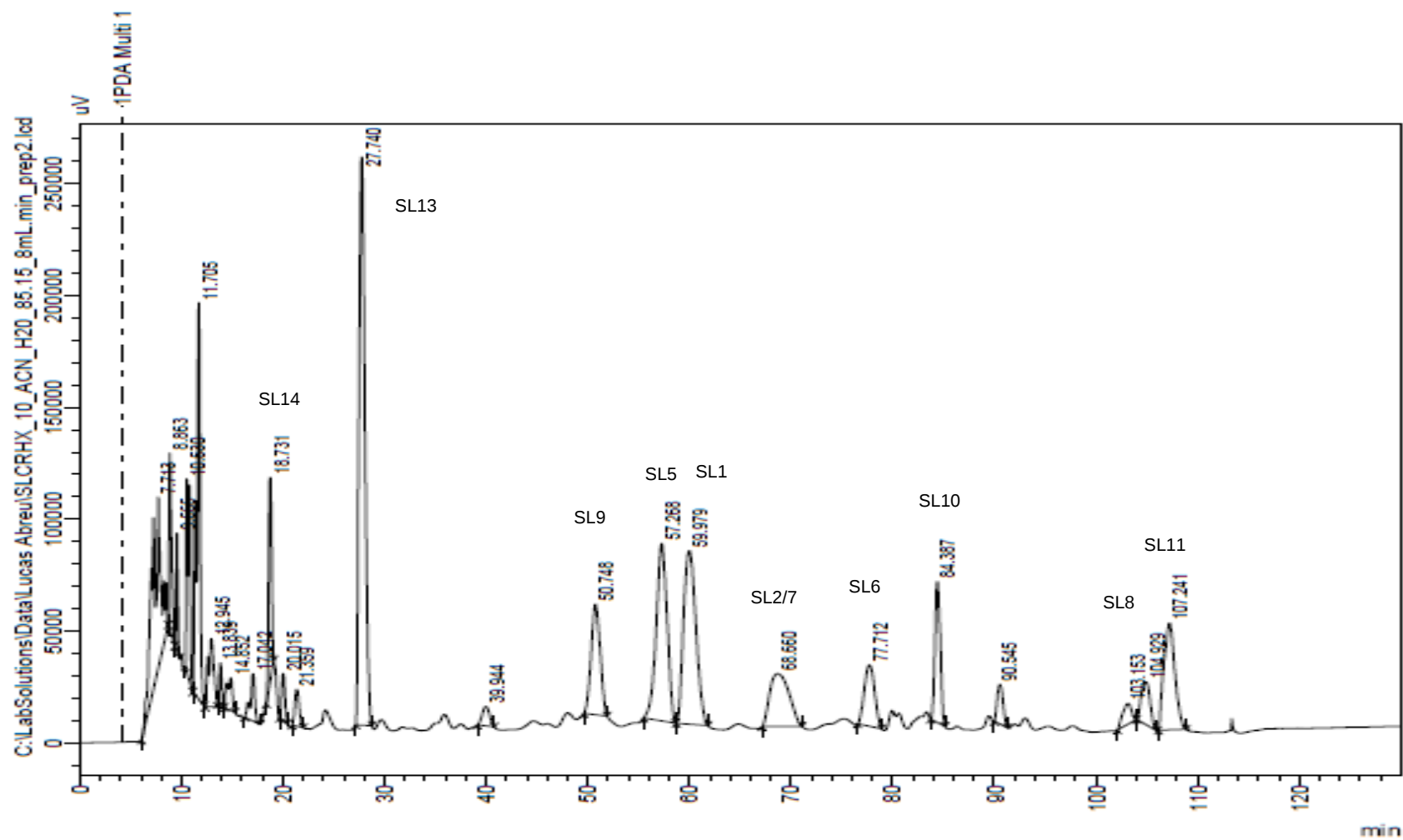
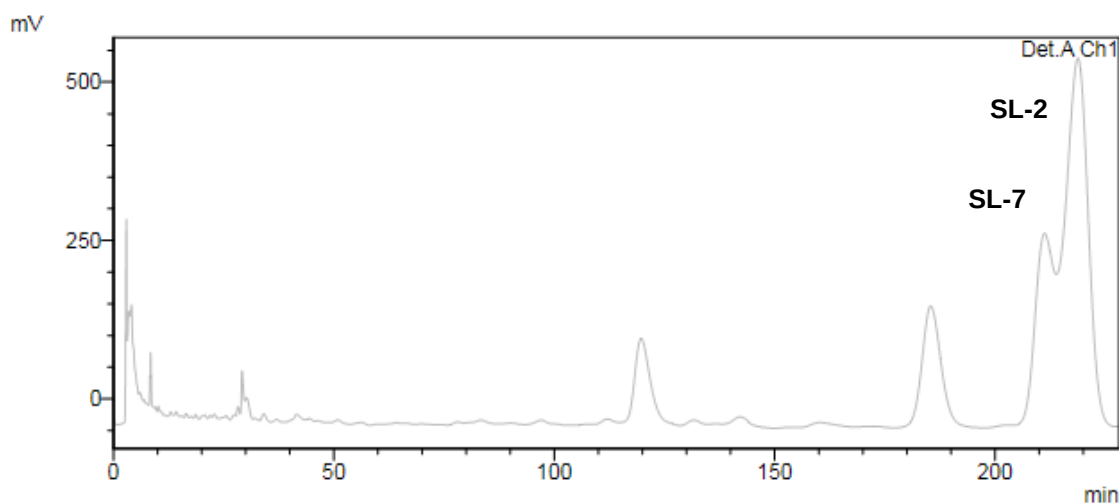


Figura 13: Cromatograma da fração SL2/7 em 220 nm com identificação das substâncias isoladas.

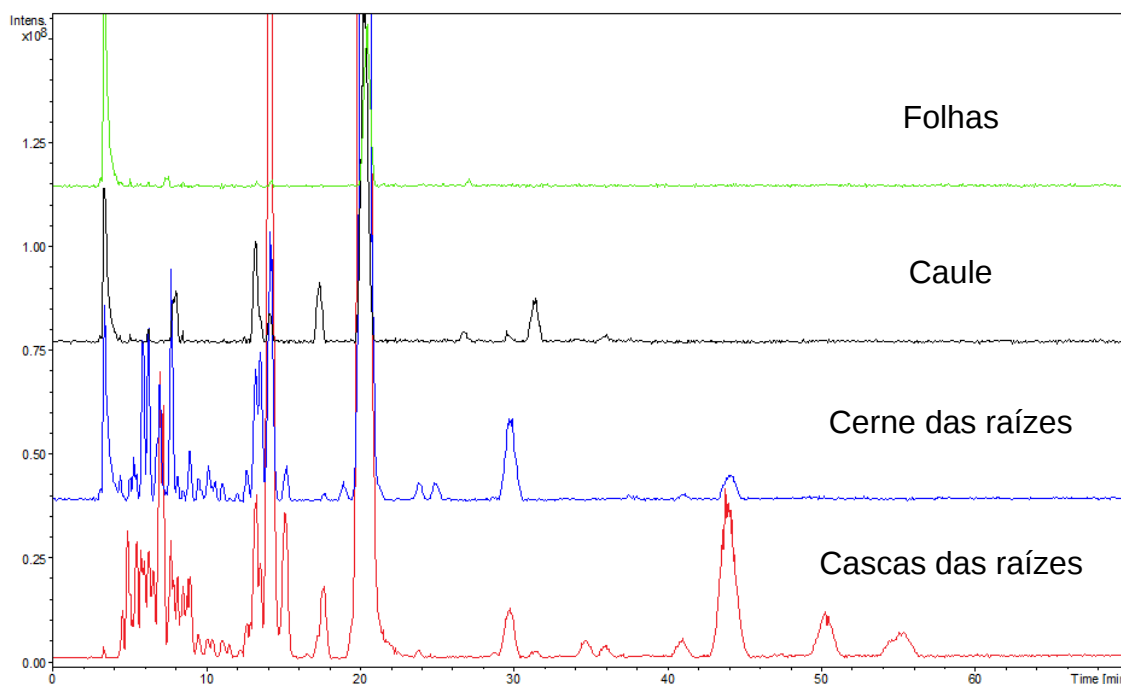


4.6.2 Análise dos extratos hexânicos da casca das raízes, cerne das raízes, folhas e caule por CLAE-IES-EM/EM.

Uma alíquota de cada extrato (1,5 mg) foi dissolvida em 1,0 mL de CH_3CN com ajuda do banho de ultrassom e filtradas através de um filtro PVDF de $0,45\ \mu\text{m}$ e injetadas no CLAE. As análises de CLAE-IES-EM/EM foram realizadas utilizando um UFLC (Shimadzu) contendo duas bombas de solvente LC20AD, um auto amostrador SIL20AHT e um controlador de sistema CBM20A, acoplado com um espectrômetro de massas Ion-Trap (AmaZon X).

Os experimentos de CLAE foram realizados utilizando uma coluna C_{18} (Kromasil - 250 mm x 4,6 mm x $5\ \mu\text{m}$) e o seguinte gradiente de eluição: solvente A = H_2O e ácido fórmico (0,1% v/v); Solvente B = CH_3CN ; Perfil de eluição = 0,0 - 70,0 min (85 - 85% de B); 70,0 - 80,0 min (85 - 100% de B); 80,0 - 100,0 min (100 - 100% de B); 100,0 - 110,0 min (100 - 85% de B); 110,0 - 130,0 min (85 - 85% de B), volume de injeção de $20\ \mu\text{L}$ e taxa de fluxo de 0,6 mL/min (Figura 14). Os parâmetros de análise do Ion-Trap foram os seguintes: capilar 4,5 kV, IES no modo positivo, offset da placa final 500 V, nebulizador 35 psi, gás seco (N_2) com fluxo de 8 mL/min e temperatura de $300\ ^\circ\text{C}$. A fragmentação na câmara de colisão (CID) foi conseguida no modo autoEM/EM utilizando o modo de resolução avançada para o modo EM e EM/EM. As possíveis estruturas putativas foram propostas com base no padrão de fragmentação EM/EM. Os espectros (m/z 50-1000) foram registrados a cada 2 s.

Figura 14: Cromatograma de íons dos extratos das cascas das raízes, cerne das raízes, caule e folhas.



4.7 Rede molecular

Os resultados obtidos no CLAE-IES-EM/EM foram submetidos a uma conversão para o formato mzXML utilizando-se o programa *Data Analysis*. Esse arquivo foi enviado para a plataforma do GNPS – *Global Natural Products Social Molecular Networking*, onde foi submetido a uma análise e gerado uma *Molecular Networking* (WANG, et al., 2016). Foi utilizado o programa Cytoscape 3.5 para visualização dos dados gerados (SHANNON et al., 2003).

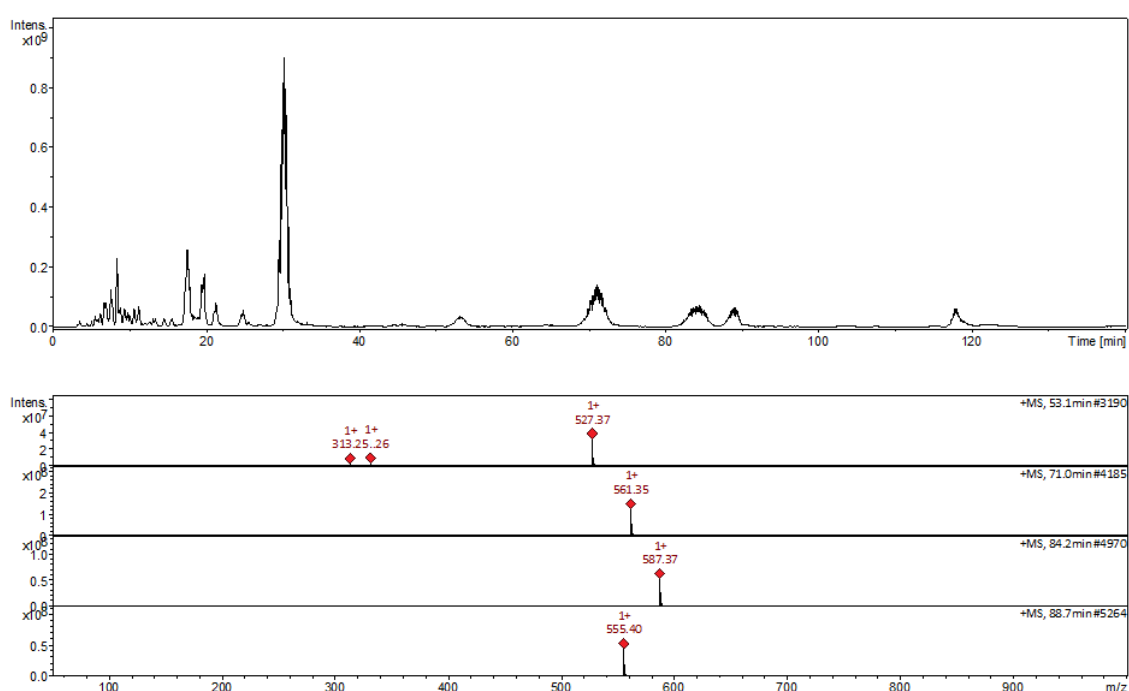
A rede molecular é gerada a partir do alinhamento dos espectros de EM/EM. Os agrupamentos entre os nodos são definidos por uma pontuação de cosseno modificado que determina a semelhança de dois espectros de EM/EM variando a pontuação de 0 (totalmente dissimilar) a 1 (completamente idêntico). A rede de espectros comparou todos os possíveis pares de vetores dos espectros de EM/EM, considerando tolerância de massa para picos de fragmentos (0,5 Da), tolerância de massa parental (1,0 Da), o número mínimo de picos correspondentes por alinhamento espectral (6) e um escore de cosseno mínimo de 0,6. Quanto maior o escore de cosseno entre dois espectros, mais semelhantes são os espectros de EM/EM e mais semelhantes são as moléculas (WANG, et al., 2016).

Após organizar os espectros com base na similaridade de fragmentações, os dados foram importados para o Cytoscape e exibidos como uma rede de nós e bordas. Para evitar interpretações errôneas de contaminantes ou ruído de CLAE, as injeções em branco (fase móvel) foram introduzidas na rede de espectros como um grupo de amostras distintas identificadas no Cytoscape e removidas da rede. O atributo de espessura da borda foi definido para refletir as pontuações de similaridade de cosseno, com linhas mais espessas indicando maior similaridade.

4.7.1 Isolamento guiado por RMN de ^1H e CLAE-IES-EM/EM dos compostos SL3 e SL4

Um novo fracionamento do extrato hexânico foi realizado após os estudos com CLAE-IES-EM/EM e rede molecular. Uma cromatografia em coluna foi realizada da mesma forma descrita anteriormente e obtiveram-se 24 frações. Essas não foram reagrupadas e todas foram analisadas por RMN de ^1H , onde foram selecionadas as frações 16 a 22 para análise por CLAE-IES-EM/EM. Na fração 19 foi observado os íons m/z 555 e m/z 527 que estavam presentes no cluster A da rede molecular e então foi submetido a um fracionamento direcionado para coleta dos picos que possuíam essas m/z (Figura 15). Esse isolamento foi realizado utilizando CLAE na escala preparativa nas mesmas condições já descritas anteriormente, obtendo-se os compostos SL3 e SL4.

Figura 15: Cromatograma da fração 19 e espectros de massas observando as m/z correspondentes dos compostos SL1-SL4.

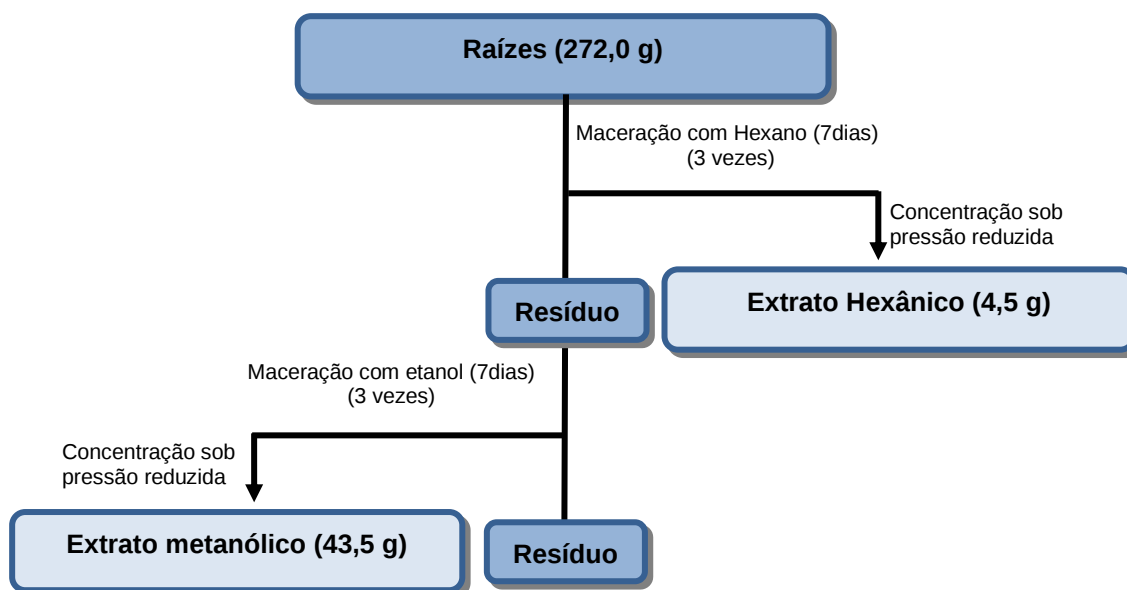


4.8 Cálculos do DFT e predição dos espectros de RMN de ^{13}C .

As estruturas dos compostos foram desenhadas usando o Marvin 16.1.11.0, 2016, ChemAxon (<http://www.chemaxon.com>). O software, Standardizer, JChem 16.1.11.0, 2016, ChemAxon, foi usado para canonizar as estruturas. Esse processo converte uma estrutura química escolhida arbitrariamente em uma notação única, adiciona hidrogênios e limpa a figura molecular em três dimensões. A estrutura é dividida em pequenos fragmentos organizados em uma árvore usando informações de conectividade. Os confôrmeros gerados para a estrutura inicial (representada pelo nó da raiz da árvore) são otimizados. O processo de construção da árvore usa uma versão estendida do campo de força Dreiding (IMRE et al., 2003). Todas as otimizações geométricas e pesquisas conformacionais foram realizadas usando o Spartan'16 para Windows (Wavefunction, Irvine, CA, EUA). A geometria da estrutura química do composto foi otimizada inicialmente com um campo de força do Merck Molecular Force Field (MMFF), (HALGREN, 1996) e uma nova otimização geométrica foi realizada com base no método semi-empírico, Austin Model 1 (AM1) (DEWAR et al., 1985). Posteriormente, foi utilizado um método de busca sistemática que analisou os confôrmeros e selecionou os tinham as energias mínimas usando AM1 e o algoritmo de Monte-Carlo (METROPOLIS; ULAM, 1949). Em seguida, as energias mínimas selecionadas foram otimizadas com base no cálculo do modo vibracional usando DFT (teoria funcional da densidade) (BECKE, 1988). Os cálculos da DFT foram realizados com o Spartan 16 para Windows (Wavefunction, Irvine, CA, EUA) (BECKE, 1988; LIN et al., 2004). Cada estrutura estudada foi examinada no nível EDF2/6-311G* e as estruturas de menor energia foram selecionadas para os cálculos. O mínimo global da energia potencial na superfície foi utilizado para a determinação de cada geometria, e os deslocamentos químicos de RMN de ^1H e ^{13}C foram geradas usando a média de Boltzmann.

4.9 Obtenção e fracionamento do extrato hexânico das raízes de *C. velutinus*.

As raízes (272 g) foram secas a temperatura ambiente por 72 horas e submetidas a extração com solvente orgânico. O processo escolhido para extração foi a maceração com hexano (4 L) por 7 dias, sendo este processo repetido três vezes. Após a primeira extração, foi extraída novamente com metanol da mesma forma anteriormente descrita para a espécie *S. loranthacea*. As soluções obtidas foram filtradas e concentradas sob pressão reduzida a 40 °C para obtenção dos extratos hexânico (4,5 g) e metanólico (43,5 g) (Esquema 3).

Esquema 3: Obtenção dos extratos das raízes de *C. velutinus*.

O extrato hexânico (4,5 g) foi submetido a CC, empacotada com sílica gel 60 e como fase móvel os solventes hexano e acetato de etila, puros ou em misturas binárias e metanol puro com gradiente crescente de polaridade, obtendo-se 26 frações de 150 mL cada (quadro 1). As frações foram analisadas por CCDA e reunidas em 15 (FR1-FR15) frações de acordo com seus perfis cromatográficos.

Quadro 2: Fracionamento cromatográfico por CC do extrato hexânico de *C. velutinus*.

Frações	Solvente
1-4	Hexano
5-8	Hex: AcOEt (95:5)
9-12	Hex: AcOEt (9:1)
13-16	Hex: AcOEt (8:2)
17-20	Hex: AcOEt (7:3)
21-24	AcOEt (100%)
25-26	MeOH (100%)

Após o reagrupamento as frações FR5 (95,3 mg), FR7 (10,1 mg) e FR10 (112,2 mg) apresentaram-se puras após análise por RMN, sendo então codificadas, respectivamente, de substâncias CV1, CV5 e CV2.

A fração F13 (15,2 mg), foi submetida à análise cromatográfica em CLAE em escala analítica e posteriormente foi submetido a fracionamento em escala semi-preparativa utilizando o seguinte gradiente de eluição: solvente A = H₂O e ácido fórmico (0,1% v/v); Solvente B =

MeOH; Eluição isocrática com 60% de A e 40% de B observado nos comprimentos de onda de 220 nm e 254 nm, volume de injeção de 100 μ L e taxa de fluxo de 3,0 mL/min.; tempo de corrida: 90 min; fornecendo 4 frações (Figura 16). A análise dos espectros de RMN ^1H dos picos isolados permitiu a identificação de 4 compostos. Os picos isolados tiveram os seguintes tempos de retenção: 57,17 min (CV6; 3,5 mg); 63,02 min (CV3; 3,8 mg); 81,03 min (CV7; 1,2 mg) e 89,96 min (CV4; 1,1 mg).

Esquema 4: Fracionamento cromatográfico do extrato hexânico de *C. velutinus*.

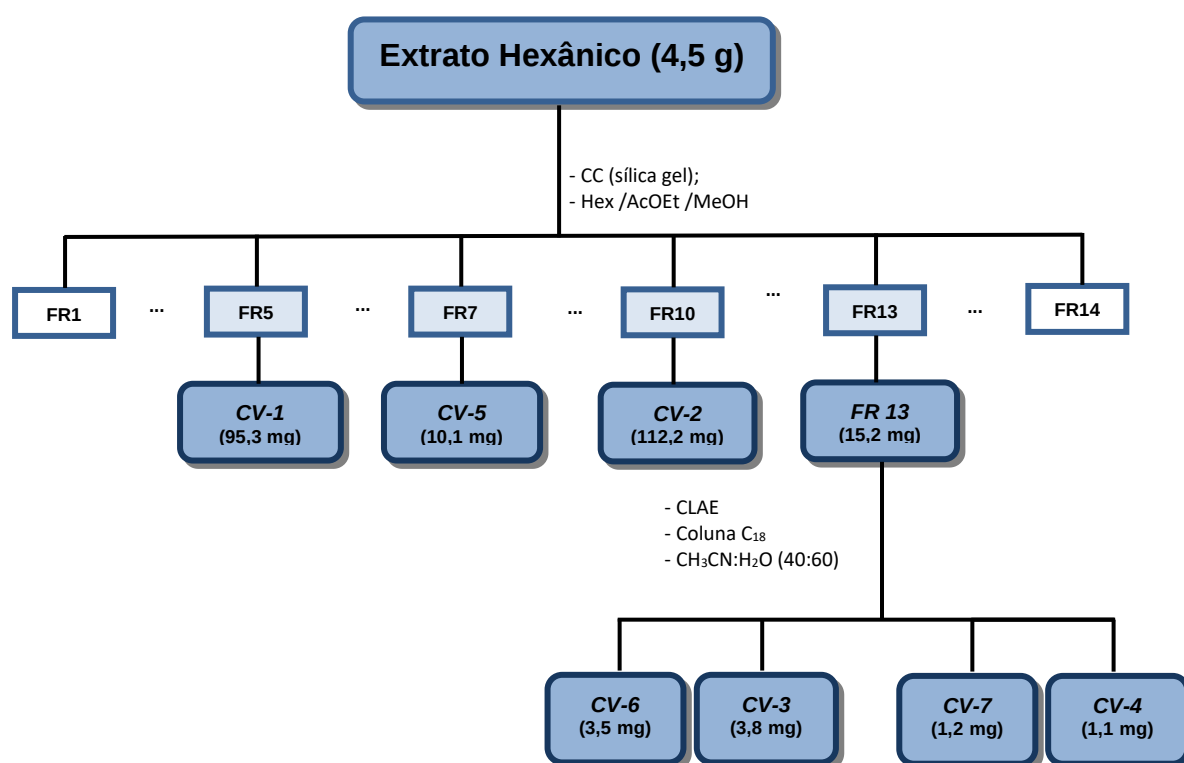
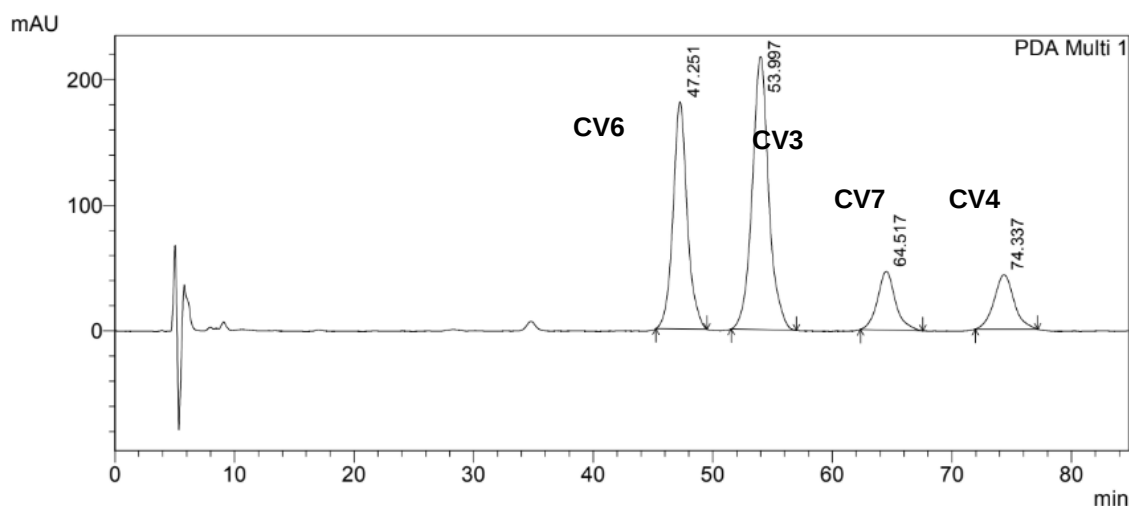


Figura 16: Cromatograma da fração 13 em 220 nm com identificação das substâncias isoladas.



4.10 Atividades Biológicas.

4.10.1 Locais da pesquisa

A avaliação da atividade antiviral foi realizada na Fiocruz – Recife, sob a coordenação do Prof. Dr. Lindomar José Pena. A avaliação da atividade anti-inflamatória, citotóxica e tripanocida foram realizadas na Fiocruz – Salvador, todas sob a coordenação da Prof^a Dra. Cristiane Flora Villareal.

4.10.2 Avaliação da citotoxicidade e atividade antiviral dos compostos isolados de *S. loranthacea*.

Células e Vírus – As células Vero (células epiteliais renais extraídas de um macaco verde africano) foram cultivadas em meio de Eagle modificado por Dulbelcco (DMEM) suplementado com soro fetal bovino (SFB) inativado a 10%, L-glutamina 2 mM e 100 U/mL de penicilina/estreptomicina 100 U/mL, a 37 ° C com 5% de CO₂. O vírus da Zika utilizado foi oriundo de uma cepa brasileira (ZIKV/*H.sapiens*/Brazil/PE243/2015; abreviado para ZIKV PE243; número de acesso GenBank KX197192.1) (DONALD et al., 2016). A cepa ZIKV PE243 foi propagada em células Vero e após a titulação pelo método padrão TCID₅₀ foi armazenado a -80 °C até ser utilizado (REED; MUENCH, 1938). O vírus foi tratado em um laboratório de nível 2 de biossegurança (BSL-2), aprovado pelo CQB: 98/99 e seguindo toda a legislação brasileira necessária.

Ensaio de citotoxicidade - Os compostos isolados foram dissolvidos em dimetilsulfóxido (DMSO) e depois diluídos em meio de cultura para uma concentração final de DMSO de 0,4% (v/v). A toxicidade celular foi determinada usando o ensaio de redução do MTT (brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2yl) -2,5-difenil tetrazolium]) (MOSMANN, 1983).

Detalhadamente, após plaqueamento das células Vero durante 24 horas em concentrações de 1×10^4 nas microplacas de 96 poços, foi realizado o tratamento com várias concentrações de cada composto isolado (SL1, SL2 e SL5-SL14) durante 1 hora. Em seguida, 50 µL de solução de MTT (1 mg/mL) foi adicionada a cada poço e a microplaca foi incubada a 37 °C, em 5% de CO₂, por 3-4 h. Em seguida, os cristais roxos de formazan do MTT foram solubilizados com DMSO e as densidades ópticas foram medidas usando um espectrofotômetro de microplacas (BioTek, ELX800, Winooski, VT, EUA) a 540 nm. Como controle para o teste de citotoxicidade, foi utilizado a ribose de 6-metilmercaptapurina (6MMPr), uma substância análoga ao nucleosídeo tiopurina, que possuiu atividade frente ao vírus da ZIKA em testes *in vitro* (DE CARVALHO et al., 2017). Uma solução inicial do controle positivo foi preparada

com H₂O Milli-Q, esterilizada por filtração em filtro de 0.22 μ M Millipore e armazenado sob refrigeração a -20°C. A viabilidade celular foi determinada pela subtração da densidade óptica da fração de células tratadas pelas células controles não tratados. O ponto limite para tratamento antiviral foi determinado pela concentração que inibe a viabilidade celular em 20% (CC₂₀).

Ensaio de atividade antiviral - As células Vero foram semeadas em placas de cultura de tecido de 48 poços a uma concentração inicial de 2×10^4 células/poço e incubada por 24 horas (37 °C, 5% CO₂). As culturas em monocamadas confluentes foram infectadas com a cepa ZIKV PE243 a um MOI de 0.1 diluído em 100 μ L de uma cultura de média contendo 2% (v/v) SFB por 2 horas a 37 °C e 5% CO₂. Após 2 horas, as células foram lavadas com PBS e tratadas com soluções dos compostos isolados (SL1, SL2 e SL5-SL14) em concentrações calculadas pela CC₂₀ no ensaio de citotoxicidade. As soluções foram inoculadas em triplicata e foram incubadas por cinco dias a 37 °C e 5% CO₂. Como controle positivo e de eficácia do teste, foi usado o 6MMPr. Após o período pós-infecção, o sobrenadante das células foi colhido e armazenado a -80 °C. A carga viral foi avaliada por titulação de vírus (TCID₅₀) em células Vero.

A análise estatística foi realizada para avaliar as diferenças no rendimento viral das células infectadas tratadas com os compostos isolados SL1, SL2, SL5–SL14 em comparação com o controle não tratado, em diferentes doses e intervalos de tempo. Os dados foram analisados por ANOVA *one-way* (análise de variância), utilizando o software GraphPad Prism Software 6.01. O teste de Dunnett foi usado para comparar os tratamentos com o controle. Os dados foram expressos como as médias $\pm$ os desvios padrão de três experimentos independentes. Um valor de $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo.

4.10.3 Avaliação da citotoxicidade, tripanocida e anti-inflamatória *in vitro* realizado com os compostos isolados de *C. velutinus*.

O glicocorticóide sintético, dexametasona (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO), foi utilizado como controle positivo para ensaios imunomodulatórios. A violeta genciana (Synth, São Paulo, SP, Brazil), foi utilizada como controle positivo para o ensaio de citotoxicidade. O benzonidazol (LAFEPE) foi utilizado como fármaco de referência anti-*T. cruzi*. A doxorubicina (Laboratório IMA S.A.I.C., Buenos Aires, Argentina) foi utilizado como droga anticâncer de referência. Todos os compostos foram solubilizados em dimetilsulfóxido (DMSO; PanReac, Barcelona, Spain) diluídos no meio de cultura celular. A concentração final de DMSO foi inferior a 1% em todos experimentos *in vitro*.

A linhagens celulares MCF7 (carcinoma de mama humano), HCT116 (carcinoma do cólon humano), HepG2 (carcinoma hepatocelular humano), HL-60 (leucemia promielocítica humana), B16F10 (melanoma murino), J774 (macrófagos murinos) e MRC-5 (fibroblasto pulmonar humano) foram obtidas da *American Type Culture Collection* (ATCC, Manassas, VA). As células foram cultivadas em meio completo com suplementos apropriados, conforme recomendado pela ATCC. Todas as linhagens celulares foram testadas quanto ao micoplasma usando o *Mycoplasma Stain Kit* (Sigma-Aldrich) para validar o uso de células livres de contaminação.

A cepa Y de *T. cruzi* (DTU II) foi utilizada neste estudo. Tripomastigotas da cultura de tecidos foram obtidos a partir de sobrenadantes de células LLC-MK2 infectadas com 5 a 6 dias, mantidas em meio Eagle modificado por Dulbecco's (DMEM; Life Technologies, GIBCO-BRL, Gaithersburg, MD) suplementado com soro fetal bovino a 10% (SFB; GIBCO) e 50 µg/mL de gentamicina (Life, Carlsbad, CA) a 37 °C em uma atmosfera de CO₂ umidificada a 5%.

As células foram cultivadas em placas de 96 poços para todas as experiências (concentração de 7×10^4 células/mL para as células B16F10, HCT116, HepG2, MCF-7 e MRC5; e concentração de 3×10^5 células/mL para as células HL-60). Após 24 horas, os compostos (CV1-CV7) foram adicionados a cada poço e incubados por 72 horas. Quatro horas antes do final da incubação, 20 µL de uma solução estoque (0,312 mg/mL) do alamar Blue (Resazurin, Sigma-Aldrich) foi adicionado a cada poço. A absorbância a 570 nm e 600 nm foi medida usando o Leitor de *Microplacas SpectraMax* 190 (Molecular Devices, Sunnyvale, CA). Para determinar a concentração inibitória de 50% (CI₅₀), foi usado regressão não linear. Além disso, foi realizado um ensaio de citotoxicidade com macrófagos J774 na presença de compostos mais LPS (500 ng/mL; Sigma-Aldrich) e INF-γ (5ng/mL; Sigma-Aldrich), utilizando o mesmo método descrito acima.

Quantificação de nitrito e IL-1β em sobrenadante de macrófagos J774- Para determinar a quantidade de nitrito e da citocina IL-1β, foram cultivados 1×10^5 macrófagos J774 por poço em DMEM suplementado com 10% de FBS e 50 µg/mL de gentamicina por 24 horas a 37°C e 5% CO₂. As células foram estimuladas com LPS (500ng/mL; Sigma) e INF-γ (5ng/mL; Sigma) e tratadas com os compostos teste em diferentes concentrações, veículo e dexametasona. Os sobrenadantes foram coletados 24 horas após os tratamentos e armazenados à -80°C para posterior quantificação. A determinação dos níveis de nitrito foi realizada de acordo com o método de Griess (GREEN et al., 1982) enquanto a quantificação de IL-1β utilizou a técnica de ELISA e seguiu o protocolo do kit DuoSet da R&D Systems (Minneapolis, MN, USA).

Citotoxicidade em tripomastigotas- As tripomastigotas (4×10^5 células/poço) foram semeadas em placas de 96 poços e os compostos foram adicionados em oito concentrações variando de 0,39 a 50 μM , em triplicata. As placas foram incubadas por 24 horas a 37°C e 5% de CO_2 . Alíquotas de cada poço foram coletadas e o número de parasitas viáveis, com base na integridade e motilidade do parasita, foi avaliado em uma câmara de Neubauer e comparado a culturas não tratadas. Três experimentos independentes foram realizados. Para determinar a concentração efetiva de 50% (CE_{50}), foi usado regressão não linear.

5 Resultados e discussão

5.1 Manuscrito 1: Tri- e Diterpenoides de *Stillingia loranthacea* como inibidores da replicação do Vírus da Zika (manuscrito foi aceito na revista Journal of Natural Products)

Tri- e Diterpenoides de *Stillingia loranthacea* como inibidores da replicação do Vírus da Zika

Lucas Silva Abreu,[†] Yuri Mangueira do Nascimento,[†] Rafael dos Santos Costa,[‡] Maria Lenise Silva Guedes,[§] Bárbara Nayane Rosário Fernandes Souza,[⊥] Lindomar José Pena,[⊥] Vicente Carlos de Oliveira Costa,[†] Marcus Tullius Scotti,[†] Raimundo Braz-Filho,^{||} José Maria Barbosa-Filho,[†] Marcelo Sobral da Silva,[†] Eudes da Silva Velozo,[‡] and Josean Fechine Tavares^{†*}

[†] Instituto de Pesquisa em Fármacos e Medicamentos, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, Brasil

[‡] Laboratório de pesquisa em Matéria Médica, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal da Bahia, Salvador, Brasil.

[§] Instituto de Biologia, Universidade Federal da Bahia, Salvador, Brasil.

[⊥] Departamento de Virologia, Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz), Recife, Brazil

^{||} Departamento de Química, Instituto de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Brazil

RESUMO: Este estudo representa a primeira análise fitoquímica da espécie *Stillingia loranthacea* e descreve novos terpenoides obtidos das cascas das raízes dessa planta. O fracionamento do extrato hexânico das cascas das raízes levou ao isolamento de dois novos derivados 28-nor-taraxarenos, loranthones A e B (**SL1** e **SL2**), quatro novos diterpenos tiglicianos (**SL5-SL8**), três diterpenos tiglicianos conhecidos (**SL9-SL11**) e três diterpenos flexibilenos conhecidos, tonantzitlolonas A-C (**SL12-SL14**). A investigação desses compostos e o uso de uma abordagem de priorização baseada em redes moleculares proporcionou o isolamento de outros dois novos 28-nor-taraxarenos, loranthones C e D (**SL3** e **SL4**). A citotoxicidade dos compostos **SL1**, **SL2**, **SL5-SL14** foram avaliadas contra células Vero e suas concentrações citotóxicas variaram entre 8.7 a 328 μM e a atividade antiviral foi testada contra um vírus da Zika epidêmico (ZIKV) que circula no Brasil. Seis dos doze compostos (**SL2**, **SL5**, **SL9-SL11** e **SL14**) exibiram em efeito antiviral significativo contra o ZIKV. Especificamente os compostos **SL2** e **SL5** demonstraram serem os compostos mais promissores por possuírem uma redução na replicação do ZIKV de 1.7 e 1.8 $\log_{10}$ TCID₅₀/mL, respectivamente. Assim, foram identificados terpenoides de *S. loranthacea* como potentes inibidores anti-ZIKV e abriram o caminho para o desenvolvimento de possíveis novos tratamentos contra esse patógeno devastador.

O vírus Zika (ZIKV) surgiu no hemisfério ocidental e pode ser transmitido pelo *Aedes aegypti*. No Brasil, em 2015, causou uma epidemia onde foram detectadas algumas complicações neurológicas, entre elas, síndrome de Guillain-Barré (GBS) e mielite, além de microcefalias em recém-nascidos de mães que tiveram a doença durante a gestação. O ônus das doenças associadas ao ZIKV levou cientistas de todo o mundo na busca de antivirais para bloquear a infecção.¹⁻⁴ Os produtos naturais representam uma grande diversidade biológica, e os metabólitos de Euphorbiaceae representam recursos para o desenvolvimento de novos agentes anti-ZIKAV.^{5,6} Nesse contexto, terpenos de plantas do gênero *Stillingia* possuem atividade antiviral em escala nanomolar.⁷

O gênero *Stillingia* (Euphorbiaceae) é representado por 30 espécies nas Américas do Norte e Sul e em várias ilhas do Pacífico e Oceanos Índicos.⁷ A maior diversidade é encontrada nos EUA e México com 15 espécies.⁸ No Brasil sete espécies estão distribuídas entre Caatinga e Mata Atlântica, sendo quatro predominantemente na região da Caatinga [*S. saxatilis* Müll. Arg., *S. trapezoidea* Ule, *S. uleana* Pax & K. Hoffm., and *S. loranthacea* (Müll. Arg.) Pax].⁹ Extratos das folhas e do látex de algumas espécies do gênero possuem atividades antifúngica, antiviral, citotóxica.¹⁰⁻¹³

Apenas quatro espécies de *Stillingia* foram estudadas quimicamente.⁶ Triterpenos dos tipos oleanano e taraxareno foram identificados das folhas e caules de *S. oppositifolia*.⁹ Das raízes de *S. sylvatica*, foi reportado o isolamento de ésteres de diterpenos dos tipos daphnano e tiglicanos.¹⁴ Tonantzitlolonas A e B foram isolados das raízes de *S. sanguinolenta* e das folhas de *S. lineata*. Esses diterpenos são considerados não comuns por possuir em seu esqueleto um macrociclo flexibilene de 15 carbonos. Exemplos desses compostos demonstraram uma interessante atividade citotóxica frente as linhagens celulares de câncer de rim e pulmão humano.^{7,13} Nos últimos anos, estudos foram publicados envolvendo a síntese desses diterpenos além de testes de atividades antiviral, citotóxica e ensaios de inibição da enzima cinesina-5.^{7,15-}

17

Estudos utilizando-se técnicas hifenadas, incluindo a cromatografia líquida- ionização por electrospray – espectrometria de massas em tandem (CLAE-IESEM²), permitem a análise do perfil químico de matrizes complexas sem a necessidade do isolamento das substâncias.¹⁸ Outra vantagem dessas técnicas é a elevada sensibilidade que permite a análise de substâncias com baixas concentrações em matrizes complexas como extratos de produtos naturais, podendo ser de grande utilidade nos processos de identificação dessas substâncias que, provavelmente, seriam de difícil isolamento e identificação estrutural.¹⁹ O desenvolvimento de novas técnicas de bioinformática, como as redes moleculares, melhora a organização e a visualização de dados

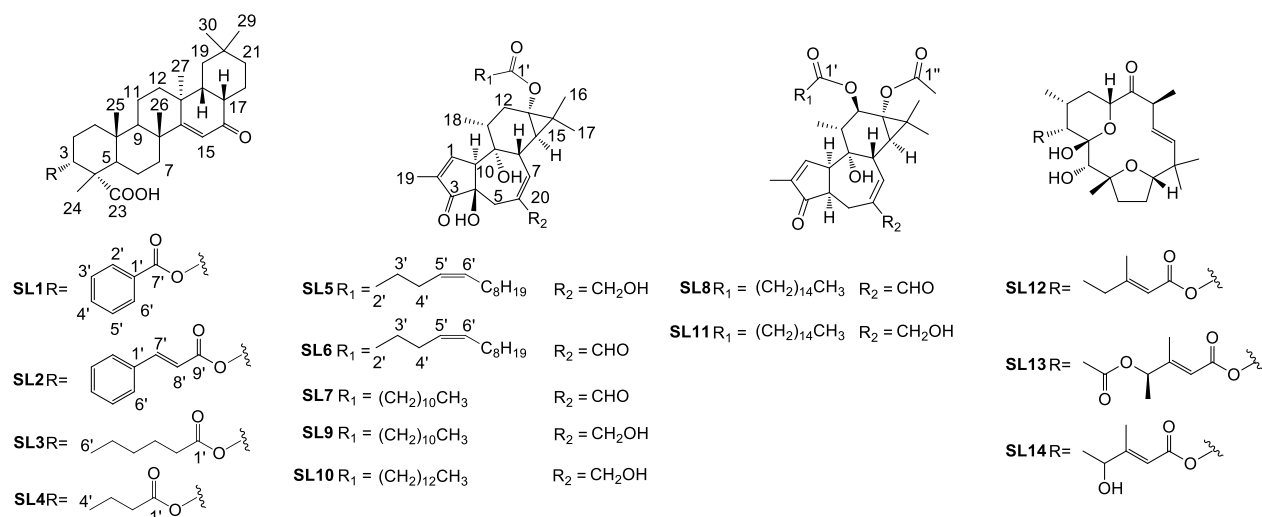
de EM em tandem por meio de um mapa de similaridade espectral, revelando a presença de padrões de fragmentação em EM² homólogos.²⁰ A utilização dessa ferramenta, que está disponível no site do GNPS (<http://gnps.ucsd.edu>), aumenta a velocidade de análise e facilidade de interpretação de dados gerados por CLAE-IESEM², incluindo de extratos de produtos naturais.²¹

Baseado na diversidade química obtida das raízes de espécies de *Stillingia*, esse trabalho buscou investigar o potencial antiviral de terpenos das cascas das raízes de *S. loranthacea*. Esse estudo descreve o isolamento de substâncias pela associação do CLAE-IESEM², redes moleculares e purificação por CLAE com a caracterização dos compostos por espectroscopia de RMN. Os compostos **SL1**, **SL2**, **SL5-SL14** foram avaliados contra a replicação do ZIKV em células Vero.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

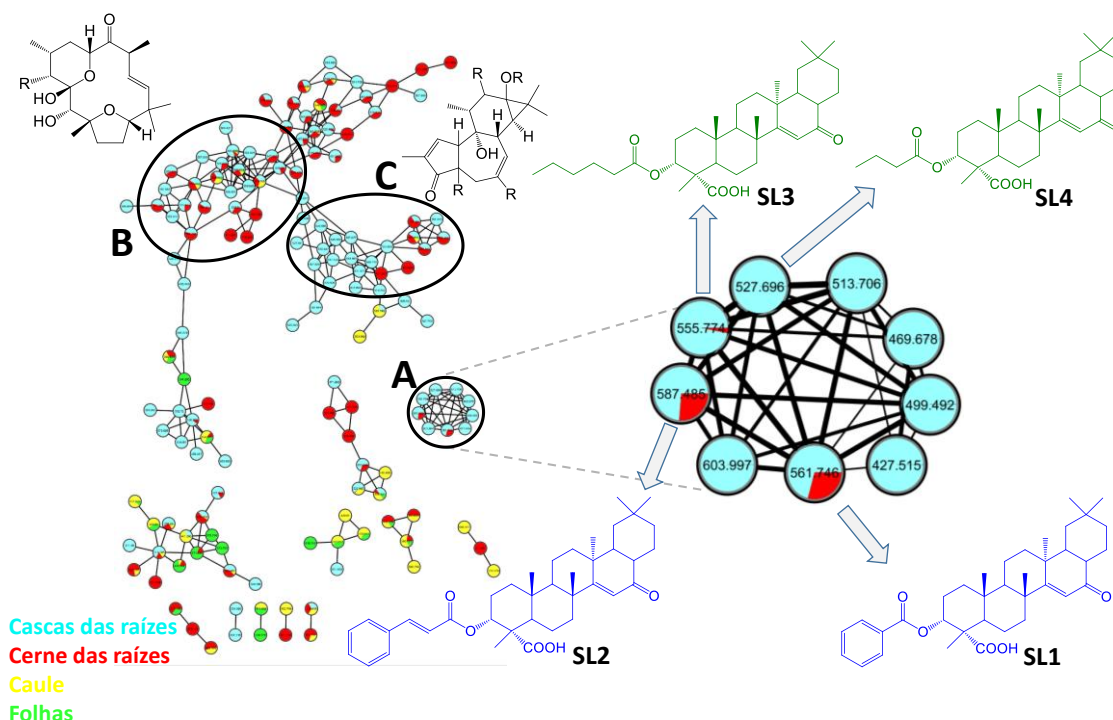
O fracionamento do extrato hexânico das cascas das raízes foi realizado através de dois procedimentos principais, utilizando-se cromatografia em coluna e CLAE preparativa, possibilitando o isolamento dos terpenoides não conhecidos (**SL1**, **SL2**, **SL5-SL8**) e conhecidos (**SL9-SL14**)²²⁻²⁴. Suas estruturas foram identificadas utilizando experimentos de RMN 1D e 2D além de IESEMAR. Os deslocamentos químicos de ¹H e ¹³C dos compostos (**SL1**, **SL2**, **SL5-SL8**) estão descritos nas tabelas 1 e 2 (Figura 17).

Figura 17: Substâncias isoladas de *Stillingia loranthacea*.



Após a identificação dos tipos de compostos presentes no extrato hexânico das cascas das raízes, o próximo passo foi analisar a presença de outros tipos raros de 28-nor-taraxarenos por CLAE-IESEM² nos extratos hexânicos das cascas das raízes, cerne das raízes, caules e folhas. O primeiro passo foi submeter os extratos e os compostos **SL1** e **SL2** (usados como padrões interno para identificação de substâncias similares e/ou *clusters* dessa classe de compostos) a análises cromatográficas usando coluna C₁₈ e CH₃CN–H₂O (0.1% ácido fórmico) como eluente. Os dados gerados de todos órgãos foram processados usando o site do GNPS para se obter a rede molecular.²¹ Baseado pela similaridade de cosseno, os espectros de EM² dos compostos foram agrupados em *clusters*. A rede molecular obtida mostrou 318 *nodos* (148 após remoção dos brancos) que foram discriminados pelas diferenças de cores, indicando o extrato hexânico correspondente (Figura 18). As intensidades das linhas entre os *nodos* foram relacionadas aos valores de cosseno, indicando quanto maior a espessura maior o grau de similaridade entre os *nodos*. A partir da utilização de **SL1** e **SL2** como sementes, foi possível identificar um *cluster* referentes aos esqueletos 28-nor-taraxarenos nos extratos hexânicos das partes subterrâneas (cascas das raízes e cerne das raízes). Nesse *cluster* (A), os *nodos* referentes aos 28-nor-taraxarenos **SL1** (*m/z* 561) e **SL2** (*m/z* 587), além de sete outros *nodos* (*m/z* 603, *m/z* 555, *m/z* 527, *m/z* 513, *m/z* 499, *m/z* 469 e *m/z* 427) foram analisados. Esses dados indicaram a presença de estruturas relacionadas a outros 28-nor-taraxarenos ainda não relatados na literatura (dados de CLAE-IESEMAR e EM² podem ser visualizados no material suplementar). Considerando essas informações, uma tentativa de isolamento dos compostos presentes nesse *cluster* A foi realizado levando a um novo fracionamento do extrato hexânico das cascas das raízes. As frações obtidas foram investigados por CLAE-IESEM²; esse procedimento guiou ao isolamento dos compostos **SL3** e **SL4**, que foram caracterizados por espectroscopia de RMN. Em adição, foi observado que os *clusters* B e C correspondiam a diterpenos do tipo flexibileno e tigliano, respectivamente. Essa observação foi possível após análise dos *nodos* e pela comparação dos espectros de EM² dos compostos isolados, seus padrões de fragmentação e dados da literatura.^{7,19}

Figura 18: Rede molecular do extrato hexânico das cascas das raízes (nodos azul céu), cerne das raízes (nodos vermelhos), caule (nodos amarelos) e folhas (nodos verdes) de *Stillingia loranthacea* pelo CLAE-IESEM².



OBS: O cluster A contendo os nortriterpenos está expandido. As substâncias com estruturas em azul escuro (SL1 e SL2) foram isoladas por CLAE preparativa e identificada por espectroscopia de RMN e usado como padrão interno; as estruturas em verde escuro (SL3 e SL4) foram submetidas a um isolamento guiado por CLAE-IESEM2. Os clusteres B e C correspondem aos diterpenos do tipo flexibileno e tigliano, respectivamente.

Composto **SL1** foi obtido como um óleo incolor. Sua fórmula molecular foi definida como $C_{36}H_{48}O_5$ por IES-EMAR com m/z 561.3557 $[M + H]^+$ (calculado para $C_{36}H_{49}O_5$, 561.3575, $\Delta = 1.8$ ppm) indicando a presença de treze graus de insaturações. O espectro de RMN ^{13}C -APT mostrou a presença de 34 sinais de carbono, sendo cinco sinais referentes a uma unidade benzoila (δ_C 165.5, C-7'; δ_C 133.1, C4'; δ_C 130.4 C-1'; δ_C 129.7, C-2'/6'; 128.5, C-3'/5'). Dos 29 sinais de carbonos remanescentes, seis foram atribuídos a carbonos metílicos (δ_C 17.0, CH₃-24; δ_C 15.8, CH₃-25; δ_C 26.4, CH₃-26; δ_C 20.2, CH₃-27; δ_C 33.5, CH₃-29; δ_C 24.8, CH₃-30) e cinco a carbonos metínicos (δ_C 76.3, C-3; δ_C 45.5, C-5; δ_C 47.4, C-9; δ_C 46.0, C-17; δ_C 47.9, C-18). Esses dados, associados aos do espectro de RMN 1H para os hidrogênios metílicos δ_H 0.85, 0.93, 1.03, 1.16, 1.17 e 1.30 (s, 3H para cada) e metínicos δ_H 5.13 (1H, t, $J = 2.6$ Hz, H-3), δ_H 2.15 (1H, dd, $J = 10.7$ e 2.5 Hz, H-5), δ_H 1.76 (1H, m, H-9), δ_H 2.07 (1H, m,

H-17) e δ_H 1.61 (1H, m, H-18), sugeriram um esqueleto nortriterpenico. Essas atribuições foram confirmadas pelo espectro de HSQC. Além desses, outros sinais de carbonos também foram observados em δ_C 202.5 (C-16), 185.2 (C-14) e 178.6 (C-23). A análise conjunta dos dados de HRESIMS, RMN 1H e ^{13}C , confirmou que o composto **SL1** é um nortriterpeno com uma unidade benzoila, com duas carbonilas e um sistema enona (IV 1720cm $^{-1}$ - carbonilas, 1653 e 1633cm $^{-1}$ - sistema enona, Figura 19). No espectro de HMBC, correlações cruzadas entre o sinal δ_H 5.13 (1H, t, J = 2.6 Hz, H-3) com os carbonos δ_C 165.5 (C-7'), 45.5 (C-5), 32.3 (C-1) e 17.0 (CH $_3$ -24) e do sinal em δ_H 2.15 (1H, dd, J = 10.7 e 2.5 Hz, H-5) com δ_C 178.6 (C-23), 47.4 (C-9), 40.5 (C-7) e 15.8 (CH $_3$ -25), permitiram inferir a localização dos grupos benzoila e ácido carboxílico nos carbonos C-3 e C-4, respectivamente. De maneira análoga, correlações entre o sinal δ_H 1.76 (1H, m, H-9) com os carbonos δ_C 15.8 (CH $_3$ -25) e 26.6 (CH $_3$ -26), confirmaram essas atribuições. Por outro lado, a correlação entre o sinal δ_H 1.61 (1H, m, H-18) com os carbonos δ_C 38.1 (C-13) e 28.7 (C-12) definiu os deslocamentos químicos destes carbonos. Adicionalmente, correlações observadas no espectro de COSY entre os sinais em δ_H 1.61 (1H, m, H-18) com δ_H 1.40 (1H, m, H-19a), δ_H 1.05 (1H, m, H-19b) e δ_H 2.07 (1H, m, H-17) e deste com δ_H 2.20 (1H, m, H-22a) e δ_H 1.22 (1H, m, H-22b), corroboraram com a demetilação no carbono C-17. Finalmente, correlações observadas no espectro de HMBC, entre os sinais em δ_H 1.16 (3H, s, CH $_3$ -26) com os carbonos δ_C 40.5 (C-7), 47.4 (C-9), assim como do δ_H 1.17 (3H, s, CH $_3$ -27) com δ_C 20.2 (C-12), 47.9 (C-18) e de ambos sinais metílicos com o carbono em δ_C 185.2 (C-14) confirmaram a posição da dupla ligação Δ^{14} (Figura 20). Além disso, foram obtidos espectros de RMN 1D e 2D em C $_6$ D $_6$, C $_3$ D $_6$ O, e CD $_3$ OD. No espectro de RMN 1H em C $_6$ D $_6$, as Me-26 e Me-27 exibiram deslocamentos químicos em δ_H 0.88 e δ_H 0.69, respectivamente, enquanto no espectro de HMBC, permaneceu as correlações dessas metilas com C-14, confirmando a dupla ligação em Δ^{14} . Os espectros de RMN nos quatro solventes deuterados estão presentes no material suplementar. No espectro de HMBC, em CDCl $_3$, a correlação em δ_H 2.07 (1H, m, H-17) com o carbono em δ_C 202.5 (C-16) demonstra a presença de um grupo carbonila de cetona em C-16, consistente com um estudo prévio para triterpenos do tipo D-friedooleano.²⁵ O efeito mesomérico do sistema enona justifica o descolamento químico de C-14 de maneira consistente com os dados da literatura^{26,27} e foi ratificado pelos cálculos de DFT (Tabela S3, material suplementar). A configuração relativa de C-3 foi definida pelo valor do J (2.6 Hz) do H-3 correspondendo a uma orientação β .²⁸ A partir dessa observação e as correlações observadas no espectro de NOESY, foi possível estabelecer a mesma orientação para Me-24/Me-25/Me-26/H-17/H-18. Além disso, correlações entre H-5/H-9/Me-

27 foram observadas, assumindo uma orientação oposta (Figura 20). A rotação óptica foi comparada com os dados da literatura do epitaraxareno com H-3 numa orientação β .²⁹

Similaridades entre os espectros de RMN de ^1H e ^{13}C dos compostos **SL1-SL4** indicaram que todos eles são do mesmo tipo de nortriterpeno, mas com a presença do grupo cinamoila (**SL2**), hexonoila (**SL3**) e butanoila (**SL4**), no lugar do grupo benzoila esterificado em C-3. Essa evidência, para o composto **SL2**, foi confirmada pela presença de dois sinais no espectro de RMN ^1H em δ_{H} 6.42 (1H, d, $J = 16.0$ Hz, H-7') e δ_{H} 7.64 (1H, d, $J = 16.0$ Hz, H-8'), corroborando a presença de uma dupla ligação com configuração *E*. Em adição, os sinais em δ_{H} 7.52 (2H, m) e 7.37 (3H, m), indicaram a presença de um anel aromático monosubstituído que foi confirmado pela sua fórmula molecular, $\text{C}_{38}\text{H}_{50}\text{O}_5$, pelo IES-EMAR com m/z 587.3720 $[\text{M} + \text{H}]^+$ (calculado para $\text{C}_{38}\text{H}_{51}\text{O}_5$, 587.3731, $\Delta = 1.9$ ppm). Os espectros de RMN de ^1H dos compostos **SL3** e **SL4** apresentou sinais correspondentes a metilas terminais em δ_{H} 0.87 (3H, t, $J = 6.6$ Hz, $\text{CH}_3\text{-6'}$) e δ_{H} 0.91 (3H, t, $J = 6.6$ Hz, $\text{CH}_3\text{-6'}$), respectivamente, confirmando a presença de unidades de ácido graxos. As fórmulas moleculares dos compostos **SL3** e **SL4** foram definidas pelo IES-EMAR como $\text{C}_{35}\text{H}_{54}\text{O}_5$ com m/z 555.4035 $[\text{M} + \text{H}]^+$ (calculado para $\text{C}_{35}\text{H}_{55}\text{O}_5$, 555.4044, $\Delta = 1.6$ ppm) e $\text{C}_{33}\text{H}_{50}\text{O}_5$ com m/z 527.3730 $[\text{M} + \text{H}]^+$ (calculado para $\text{C}_{33}\text{H}_{51}\text{O}_5$, 527.3731, $\Delta = 0.2$ ppm), respectivamente. Essas estruturas (**SL1-SL4**) foram confirmadas pelos espectros de IESEM² que possuíam íons fragmentos com m/z 439 e m/z 393, relacionado a perda do grupo em C-3 e do carboxila em C-23. O íon fragmento com m/z 205 (pico base) corroborou com o padrão de fragmentação do 16-oxo-taraxor-14-ene (Figura S1, material suplementar).³⁰⁻³² Baseado nesses dados, os compostos **SL1-SL4** foram identificados como ácido 3 α -benzoila-28-nor-D-friedoolean-14-en-16-one-23-oic, ácido 3 α -cinamoil-28-nor-D-friedoolean-14-en-16-one-23-oic, ácido 3 α -hexanoil-28-nor-D-friedoolean-14-en-16-one-23-oic e ácido 3 α -butanoil-28-nor-D-friedoolean-14-en-16-one-23-oic, respectivamente e receberam o nome trivial de loranthones A-D. Triterpenos do tipo 28-nor-friedooleano são raros na natureza e possuem apenas uma descrição em uma espécie da família Euphorbiaceae.²⁶ Uma proposta biossintética para a perda da Me-28 é apresentada na figura 21.

Figura 19: Espectro de infravermelho do composto **SL1**.

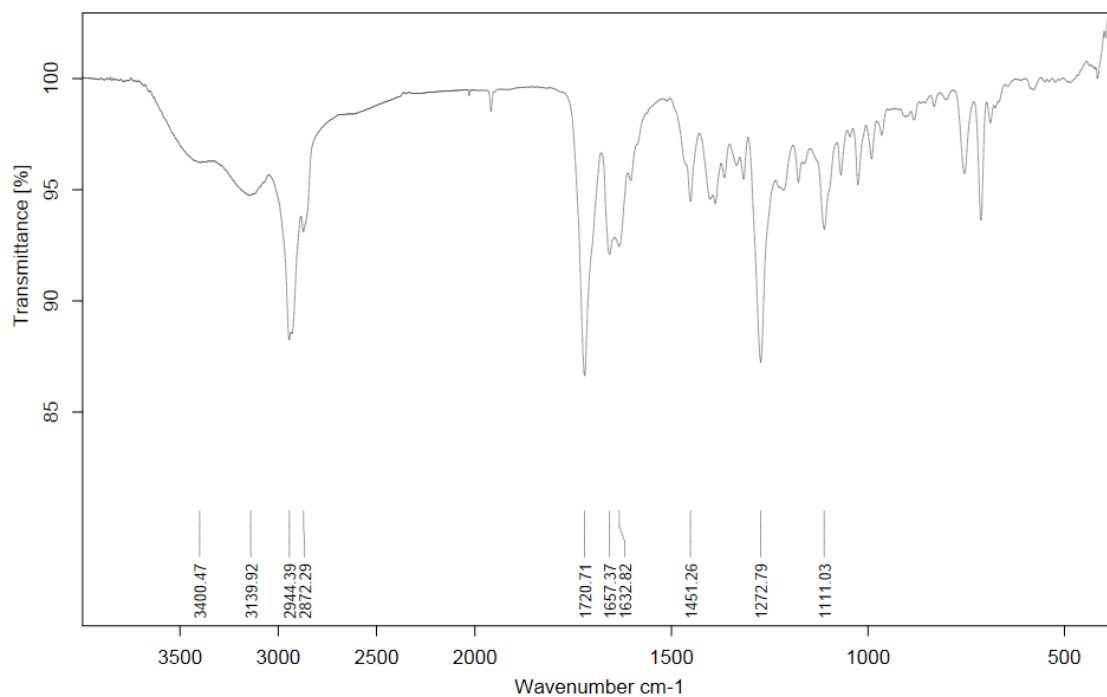


Figura 20: Correlações chaves nos HMBC (—), COSY (—) e NOESY (—) observadas para os compostos **SL1**, **SL5** e **SL8**.

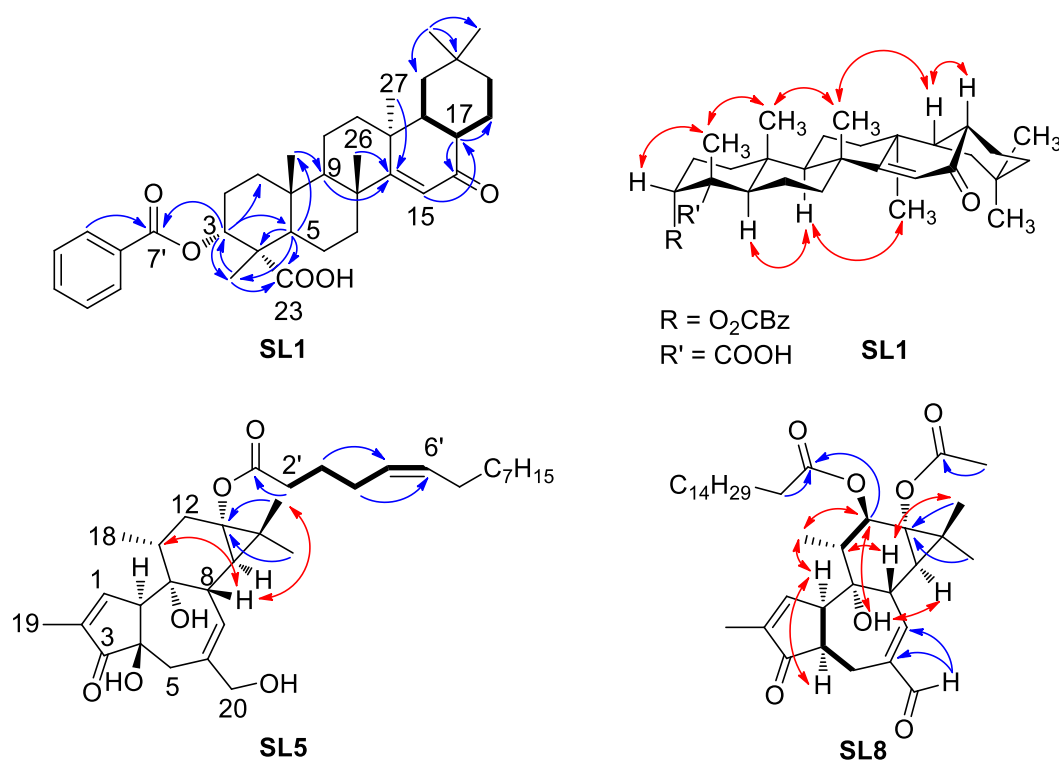
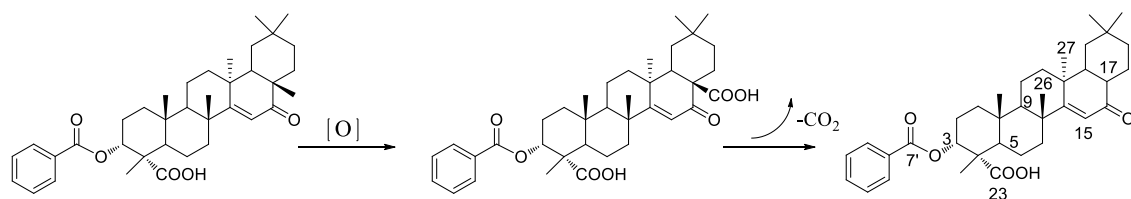


Figura 21: Proposta biossintética para a perda da Me-28 em SL1.**Tabela 1:** Dados espectroscópicos de RMN de ^1H (500 e 400 MHz) e ^{13}C (125 e 100 MHz) dos compostos SL1–SL4 em CDCl_3 .

posição	SL1 ^a		SL2 ^a		SL3 ^b		SL4 ^b	
	δ_{H}	δ_{C}	δ_{H}	δ_{C}	δ_{H}	δ_{C}	δ_{H}	δ_{C}
1	1.43 m; 1.25 m	32.3	1.41 m; 1.18 m	32.2	1.40 m; 1.21 m	32.3	1.40 m; 1.22 m	32.0
2	1.95 m	21.9	1.94 m	22.1	1.88 m; 1.77 m	22.0	1.88 m; 1.70 m	22.0
3	5.13 t (2,6)	76.3	5.10 t (3,0)	75.7	5.00 t (2,8)	75.1	4.98 brs	74.8
4		49.9		49.9		49.7		49.8
5	2.15 dd (10.7, 2.5)	45.5	2.04 m	45.3	1.99 m	45.1	2.09 m	45.5
6	1.55 m	21.6	1.60 m	21.6	1.60 m; 1.55 m	21.6	1.60 m; 1.55 m	21.4
7	2.05 m; 1.67 m	40.5	2.01 m; 1.58 m	40.3	2.02 m; 1.66 m	40.3	2.02 m; 1.58 m	40.2
8		41.0		41.1		41.1		41.3
9	1.76 m	47.4	1.80 m	47.2	1.77 m	47.2	1.79 m	47.0
10		37.6		37.7		37.7		37.8
11	1.78 m; 1.58 m	16.3	1.80 m; 1.55 m	16.4	1.77 m; 1.61 m	16.3	1.79 m; 1.60 m	16.2
12	1.83 m; 1.35 m	28.7	1.84 m; 1.32 m	28.7	1.82 m; 1.37 m	28.7	1.81 m; 1.37 m	28.5
13		38.1		38.1		38.1		38.3
14		185.2		185.6		185.6		185.6
15	5.90 s	121.6	5.89 s	121.6	5.91 s	121.7	5.87 s	121.5
16		202.5		202.9		202.9		n.o. ^c
17	2.07 m	46.0	2.08 m	46.0	2.04 m	46.0	2.08 m	46.0
18	1.61 m	47.9	1.60 m	47.9	1.61 m	47.9	1.60 m	47.8
19	1.40 m; 1.05 m	38.9	1.40 m; 1.05 m	38.9	1.40 m; 1.05 m	39.0	1.40 m; 1.05 m	38.8
20		30.3		30.3		30.4		30.4
21	1.45 m; 1.15 m	38.6	1.44 m; 1.17 m	38.6	1.46 m; 1.17 m	38.7	1.46 m; 1.17 m	38.5
22	2.20 m; 1.22 m	23.2	2.19 m; 1.18 m	23.2	2.20 m; 1.22 m	23.3	2.20 m; 1.22 m	23.1
23		178.6		177.2		178.3		178.1
24	1.30 s	17.0	1.31 s	17.2	1.28 s	17.1	1.24 s	17.1
25	1.03 s	15.8	1.02 s	15.9	1.00 s	15.9	0.99 s	15.7
26	1.16 s	26.4	1.15 s	26.5	1.16 s	26.4	1.13 s	26.0
27	1.17 s	20.2	1.20 s	20.3	1.18 s	20.2	1.18 s	20.0
29	0.93 s	33.5	0.94 s	33.6	0.94 s	33.6	0.94 s	33.5
30	0.85 s	24.8	0.86 s	24.9	0.85 s	24.9	0.86 s	24.8
1'		130.4		130.6		173.0		173.3
2'	7.95 dd (8.0 e 1.0)	129.7	7.52 m	128.4	2.26 dt (7.5 e 3.5)	34.7	2.26 tl (6.6)	36.7
3'	7.41 tl (8.0)	128.5	7.37 m	129.1	1.28 m	31.4	1.62 m	18.4
4'	7.55 m	133.1	7.37 m	134.5	1.59 m	24.9	0.91 t (6.6)	13.7
5'	7.41 tl (8.0)	128.5	7.37 m	129.1	1.29 m	22.5		
6'	7.95 dd (8.0 e 1.0)	129.7	7.52 m	128.4	0.87 t (6.7)	14.7		
7'		165.5	7.64 d (16.0)	145.3				
8'			6.42 d (16.0)	118.3				
9'				166.2				

^aRMN de ^1H , 500 MHz; RMN de ^{13}C , 125 MHz. ^bRMN de ^1H , 400 MHz; RMN de ^{13}C , 100 MHz. ^cn.o., sinais não observados.

Composto **SL5** foi obtido como um óleo incolor. Sua fórmula molecular foi definida como $C_{34}H_{52}O_6$ pelo IES-EMAR com m/z 539.3739 $[M - H_2O + H]^+$ (calculado para $C_{34}H_{51}O_5$, 539.3731, $\Delta = -1.5$ ppm) indicando a presença de nove graus de insaturações. O espectro de RMN de 1H apresentou uma sobreposição de sinais na região entre δ_H 1.29 e 1.21, assim como os sinais em δ_H 5.29 (1H, ddd, $J = 10.4, 7.6, 3.0$ Hz) e δ_H 5.39 (1H, ddd, $J = 10.4, 7.1, 3.2$ Hz), indicando a presença do éster do ácido (Z)-5-tetradecanoico. Os dados de IESEM² mostraram um íon protonado com m/z 539 $[M - H_2O + H]^+$ fragmentando em m/z 313, demonstrando a perda de uma unidade ácido 5(Z)-tetradecanóico, produzido a partir de um rearranjo do tipo McLafferty (Figura S86).^{19,33,34} Além disso, dados de RMN (1H , ^{13}C , e HSQC) para este composto indicaram que o substância possui um núcleo diterpênico do tipo 12-desoxiforbol similar aos já identificados em *S. lineata* e *S. silvatica*.^{7,14} O espectro de RMN de 1H apresentou 4 sinais de metilas do esqueleto diterpênico em δ_H 0.86 (3H, d, $J = 6.4$ Hz, CH₃-18), δ_H 1.04 (3H, s, CH₃-16), δ_H 1.16 (3H, s, CH₃-17) e δ_H 1.72 (3H, brs, CH₃-19), além de um sinal em δ_H 0.86 (3H, t, $J = 7.2$ Hz, CH₃-14') característico de uma metila terminal. Foi observada a presença de seis sinais de hidrogênios metínicos em δ_H 7.54 (1H, brs, H-1), δ_H 5.64 (1H, d, $J = 4.0$ Hz, H-7), δ_H 3.00 (1H, brs, H-8), δ_H 3.26 (1H, brs, H-10), δ_H 1.98 (1H, m, H-11) e δ_H 0.81 (1H, d, $J = 5.2$ Hz, H-14) e os oximetilênicos em δ_H 3.95 (1H, d, $J = 12.7$ Hz, H-20a) e δ_H 4.00 (1H, d, $J = 12.7$ Hz, H-20b). A diferença entre os 12-desoxiforbol, isolados anteriormente de *Stillingia*, foi a presença do grupo éster do ácido (Z)-5-tetradecanoico presente em C-13.^{7,14} A correlações observadas, no espectro de HMBC, dos sinais em δ_H 1.04 (CH₃-16) e δ_H 1.16 (CH₃-17) com o δ_C 63.5 (C-13) confirmaram um substituinte nessa posição. A confirmação da posição e estereoquímica relativa do grupo 5(Z)-tetradecanoil foi possível a partir das análises conjuntas dos espectros de 1H , COSY, HSQC e HMBC. Em relação ao espectro de COSY, o sinal em δ_H 2.28 (1H, t, $J = 7.5$ Hz, H-2') se correlacionou com δ_H 1.65 (1H, quint, $J = 7.3$ Hz, H-3'), enquanto que no espectro de HMBC, o mesmo sinal de próton se correlacionou com δ_C 175.9 (C-1') e δ_C 24.8 (C-3'). Esse sinal correspondente ao CH₂ (C-2') vizinho a carbonila de éster foi usada como referência inicial na busca da posição da dupla ligação. As correlações no entre H-2'/C-2' → H-3'/C-3' → H-4'/C-4' → H-5'/C-5' → H-6'/C-6' nos espectros de COSY e HSQC confirmaram a posição da insaturação em Δ^5 (Figura 20). Os sinais atribuídos a H/C5' e H/C6' foram δ_H 5.29/ δ_C 128.2 e δ_H 5.39/ δ_C 131.5, respectivamente. A estereoquímica *cis* pode ser atribuída a partir do valor de J e comparação com dados de RMN do ácido 5(Z)-tetradecanóico.³⁵ A configuração relativa do composto **SL5** foi deduzida a partir das correlações do espectro de NOESY, da rotação óptica e comparação com dados reportados na literatura.⁷ Correlações cruzadas de H-8/H-11 e H-8/H-16 indicaram uma β orientação para todos esses

prótons e grupo metila em C-16. Apesar de nenhuma outra correlação no NOESY ter sido encontrada para apoiar a junção *trans* dos anéis A/B com H-10 α e OH-4 β , assim como o grupo acil em C-13 com uma posição α , essas orientações foram baseadas em considerações biogenéticas de diterpenos tiglianos previamente descritos e também porque os deslocamentos químicos de carbonos de **SL5** estão semelhantes aos compostos estruturalmente relacionados.^{36,37} Os demais dados de RMN de ^1H e ^{13}C podem ser observados na Tabela 2. Baseado nesses dados, o composto **SL5** foi determinado como 13-(5Z) - tetradecanoato de 12-desoxiforbol.

O composto **SL6** foi obtido como um óleo incolor. Sua fórmula molecular foi definida como $\text{C}_{34}\text{H}_{50}\text{O}_6$ pelo IES-EMAR com m/z 537.3554 $[\text{M} - \text{H}_2\text{O} + \text{H}]^+$ (calculado para $\text{C}_{34}\text{H}_{49}\text{O}_5$, 537.3574, $\Delta = 2.1$ ppm) indicando a presença de dez graus de insaturações. Os dados de RMN de ^1H , ^{13}C e HSQC possuem uma grande semelhança com os dados da substância **SL5**. Nos espectros de RMN ^1H e ^{13}C , a diferença está na ausência dos sinais oximetilênicos do C-20 presentes na substância **SL5** e o aparecimento dos sinais em δ_{H} 9.42 (1H, s)/ δ_{C} 193.9 indicando a presença de um grupo aldeído nessa posição²⁶. A confirmação da posição foi possível ao observar a correlação no HMBC do δ_{H} 9.42 (H-20) com δ_{C} 142.9 (C-6) e ao deslocamento químico de H-7 em δ_{H} 6.71, agora numa posição β a carbonila, quando comparado ao H-7 do composto **SL5**. Os dados de ESIMS² mostrou um íon protonado com m/z 537 $[\text{M} - \text{H}_2\text{O} + \text{H}]^+$ que ao ser fragmentado apresentou um íon em m/z 311, demonstrando a perda de uma unidade do ácido 5(Z)- tetradecanóico (m/z 226) (Figura S100).³³ A posição da insaturação e sua configuração foi realizada de modo semelhante ao composto **SL5**. Demais dados de ^1H e ^{13}C podem ser observados na Tabela 2. A estereoquímica relativa do composto **SL6** foi deduzida pela similaridade nas correlações no espectro de NOESY e rotação óptica com o composto **SL5** e comparação com os dados reportados na literatura.⁷ Baseado nesses dados, o composto **SL6** foi determinada como 13-(Z)-5- tetradecanoato de 12-desoxiforbaldeído.

Composto **SL7** foi obtido como um óleo incolor. Sua fórmula molecular foi definida como $\text{C}_{32}\text{H}_{48}\text{O}_6$ pelo IES-EMAR com m/z 511.3410 $[\text{M} - \text{H}_2\text{O} + \text{H}]^+$ (calculado para $\text{C}_{32}\text{H}_{47}\text{O}_5$, 511.3418, $\Delta = 1.6$ ppm) indicando a presença de nove graus de insaturação. Os dados de RMN de ^1H e ^{13}C indicam que a substância possui um núcleo diterpênico do tipo 12-desoxiforbaldeído similar a substância **SL6** (Tabela 2). Os dados de ESIMS² mostrou um íon protonado com m/z 511 $[\text{M} - \text{H}_2\text{O} + \text{H}]^+$ que ao ser fragmentado apresentou um pico base com m/z 311, demonstrando a perda de uma unidade de ácido dodecanóico (Figura S114). Baseado nesses dados, o composto **SL7** foi determinado como 13-dodecanoato de 12-desoxiforbaldeído.

Composto **SL8** foi obtido como um óleo incolor. Sua fórmula molecular foi definida como $C_{38}H_{58}O_7$ pelo IES-EMAR com m/z 627.4268 $[M + H]^+$ (calculado para $C_{38}H_{59}O_7$, 627.4255, $\Delta = -2.0$ ppm) indicando a presença de dez graus de insaturações. Os dados de RMN de 1H , ^{13}C e HSQC para este composto indicam que o substância possui um núcleo diterpênico do tipo 4 α -desoxiforbaldeído.⁷ O espectro de RMN de 1H apresentou quatro sinais de metilas do esqueleto diterpênico em δ_H 1.10 (3H, d, $J = 6.3$ Hz, CH₃-18), δ_H 1.26 (3H, s, CH₃-16), δ_H 1.33 (3H, s, CH₃-17) e δ_H 1.75 (3H, brs, CH₃-19), assim como um sinal em δ_H 0.87 (3H, t, $J = 7.6$ Hz, CH₃-14') correspondente a uma metila terminal. Foi observada a presença de nove sinais de hidrogênios metínicos em δ_H 6.99 (1H, brs, H-1), δ_H 2.85 (1H, m, H-4), δ_H 6.04 (1H, brs, H-7), δ_H 2.25 (1H, m, H-8), δ_H 3.55 (1H, m, H-10), δ_H 1.76 (1H, m, H-11), δ_H 5.47 (1H, d, $J = 10.4$ Hz, H-12), δ_H 0.87 (1H, m, H-14) e δ_H 9.30 (1H, s, H-20). O sinal em δ_H 5.16 (1H, s, OH-9) foi assinalado como o grupo hidroxila em C-9. Os dados de IESEM² mostraram a presença de um íon protonado com m/z 627 $[M + H]^+$ que ao ser fragmentado apresentou um íon com m/z 371, demonstrando a perda de uma unidade de ácido hexadecanóico e um íon como pico base com m/z 311, demonstrando a perda de uma unidade de acetato (Figura S129). Correlações no HMBC de H-12 com C-1' (δ_C 173.5) confirma a posição da unidade de ácido graxo em C-12 via uma ligação éster (Figura 20). Além disso, experimentos de RMN 1D e 2D foram realizados em C_5D_5N corroborando esse assinalamento. A configuração relativa do composto **SL8** foi definida pelas correlações observadas no espectro de NOESY, rotação óptica e comparação com o composto **SL11** assim como os dados reportados na literatura.⁷ Correlações cruzadas de H-8/H-11, H-8/H-16 indicam que todos os hidrogênios estão para a mesma face e portanto foram atribuídos a orientação β , já as correlações cruzadas entre H-12/OH-9, H-12/H-18, H-18/H-10, H-10/H-4, H-4/H-5a e H-14/OH-9 foram atribuídos a orientação α , como representado na Figura 20. Assim, a estrutura **SL8** foi proposta como sendo o 12-O-hexadecanoato-4 α -desoxiforbol-13-acetato.

Baseado nos dados físicos e espectroscópicos e comparação com os valores publicados, os compostos conhecidos isolados nesse estudo foram identificados como diterpenos do tipo forbol, 12-desoxiforbol-13-dodecanoato (**SL9**),²² 12-desoxiforbol-13-tetradecanoato (**SL10**),²³ e 12-O-hexadecanoato-4 α -desoxiforbol-13-acetato (**SL11**),²⁴ e os diterpenos do tipo flexibilano, tonantzitlolonas A-C (**SL12–SL14**).¹¹

Tabela 2: Dados espectroscópicos de RMN de ^1H (500 e 400 MHz) e ^{13}C NMR (125 e 100 MHz) dos compostos **SL5–SL8** em CDCl_3 .

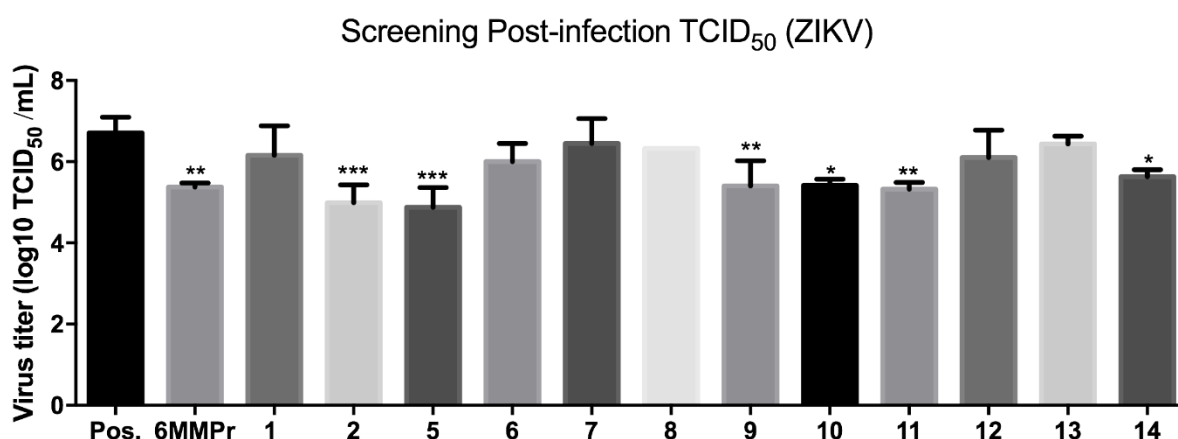
posição	SL5 ^b		SL6 ^a		SL7 ^a		SL8 ^b	
	δ_{H}	δ_{C}	δ_{H}	δ_{C}	δ_{H}	δ_{C}	δ_{H}	δ_{C}
1	7.54 sl	161.4	7.55 sl	160.8	7.55 sl	160.4	6.99 sl	154.7
2		132.9		133.6		133.2		143.8
3		209.6		208.2		n.o. ^c		206.7
4		73.8		72.9		n.o. ^c	2.85 m	48.7
5 α	2.46 d (19.0)	38.5	2.44 brd (19.5)	34.5	2.44 brd (19.5)	34.5	3.13 m	20.9
5 β	2.52 d (19.0)		2.88 d (19.5)		2.88 d (19.5)		3.26 dd (15.5 e 4.4)	
6		140.1		142.9		142.6		141.0
7	5.64 d (4.0)	130.4	6.71 dd (5.4 e 1.9)	158.3	6.71 dd (5.3 e 1.2)	158.1	6.04 sl	152.3
8	3.00 sl	39.1	3.30 t (5.4)	41.5	3.36 t (5.3)	41.3	2.25 m	41.7
9		76.3		77.3		76.6		77.9
10	3.26 sl	55.8	3.08 sl	55.8	3.08 sl	55.7	3.55 m	47.1
11	1.98 m	36.3	2.05 m	36.6	2.09 m	36.5	1.76 m	42.8
12 α	1.55 m	31.9	1.59 m	31.7	1.59 m	31.6	5.47 d (10.4)	74.8
12 β	2.07 m		2.10 m		2.09 m			
13		63.5		63.1		62.9		65.1
14	0.81 d (5.2)	32.6	1.00 d (5.4)	32.2	1.00 d (5.3)	32.0	0.87 m	36.2
15		22.7		22.8		22.8		25.3
16	1.04 s	15.4	1.08 s	15.4	1.08 s	15.1	1.26 s	16.5
17	1.16 s	23.3	1.23 s	23.3	1.23 s	23.0	1.33 s	24.2
18	0.86 d (6.4)	18.7	0.89 d (6.2)	18.6	0.88 d (6.2)	18.5	1.10 d (6.3)	12.0
19	1.72 sl	10.2	1.78 sl	10.2	1.78 sl	10.0	1.75 sl	10.6
20	a4.00 d (12.7)	68.3	9.42 s	193.9	9.42 s	n.o. ^c	9.30 s	194.3
	b3.95 d (12.7)							
1'		175.9		176.1		176.3		173.5
2'	2.29 t (7.4)	34.0	2.33 t (7.5)	34.0	2.31 t (7.0)	34.5	2.37 m	34.6
3'	1.65 quint (7.4)	24.8	1.70 quint (7.5)	24.8	1.62 m	24.6	1.24–1.30 m ^d	29.4–29.9 ^d
4'	2.05 m	26.6	2.05 m	26.6	1.21–1.29 m ^d	29.4–29.8 ^d	1.24–1.30 m ^d	29.4–29.9 ^d
5'	5.29 ddd (10.4. 7.6 e 3.2)	128.2	5.30 ddd (10.8. 7.2 e 3.5)	128.1	1.21–1.29 m ^d	29.4–29.8 ^d	1.24–1.30 m ^d	29.4–29.9 ^d
6'	5.39 ddd (10.4. 7.6 e 3.2)	131.5	5.39 ddd (10.8. 7.2 e 3.5)	131.6	1.21–1.29 m ^d	29.4–29.8 ^d	1.24–1.30 m ^d	29.4–29.9 ^d
7'	1.99 m	27.3	2.00 m	27.4	1.24–1.29 m ^d	29.4–29.8 ^d	1.24–1.30 m ^d	29.4–29.9 ^d
8'	1.21–1.29 m ^d	29.4–29.8 ^d	1.24–1.30 m ^d	29.2–29.8 ^d	1.24–1.29 m ^d	29.4–29.8 ^d	1.24–1.30 m ^d	29.4–29.9 ^d
9'	1.21–1.29 m ^d	29.4–29.8 ^d	1.24–1.30 m ^d	29.2–29.8 ^d	1.24–1.29 m ^d	29.4–29.8 ^d	1.24–1.30 m ^d	29.4–29.9 ^d
10'	1.21–1.29 m ^d	29.4–29.8 ^d	1.24–1.30 m ^d	29.2–29.8 ^d	1.24–1.29 m ^d	29.4–29.8 ^d	1.24–1.30 m ^d	29.4–29.9 ^d
11'	1.21–1.29 m ^d	29.4–29.8 ^d	1.24–1.30 m ^d	29.2–29.8 ^d	1.24–1.29 m ^d	29.4–29.8 ^d	1.24–1.30 m ^d	29.4–29.9 ^d
12'	1.21–1.29 m ^d	29.4–29.8 ^d	1.24–1.30 m ^d	29.2–29.8 ^d	0.88 t (7.2)	14.0	1.24–1.30 m ^d	29.4–29.9 ^d
13'	1.21–1.29 m ^d	29.4–29.8 ^d	1.24–1.30 m ^d	29.2–29.8 ^d			1.24–1.30 m ^d	29.4–29.9 ^d
14'	0.86 t (7.2)	14.2	0.88 t (7.1)	14.2			1.24–1.30 m ^d	29.4–29.9 ^d
15'							1.24–1.30 m ^d	29.4–29.9 ^d
16'							0.87 t (7.6)	14.2
1"								173.7
2"							2.1 s	21.1

^aRMN de ^1H , 500 MHz; RMN de ^{13}C , 125 MHz. ^bRMN de ^1H , 400 MHz; RMN de ^{13}C 100 MHz. ^c n.o., sinais não observados. ^d sobrepostos.

A citotoxicidade dos terpenoides foi avaliada usando o ensaio de redução do MTT em células Vero, como linhagem celular epitelial. A concentração citotóxica de 20% (CC₂₀), que é a concentração do composto que causa uma redução da viabilidade de 20%, variou de 8.7 a 328 μ M e a concentração citotóxica de 50% (CC₅₀) variou de 24.6 a 848 μ M (Tabela S4 e Figura S150). Os valores de CC₂₀ e CC₅₀ do controle positivo o ribosídeo 6-metilmercaptapurina (6 MMPr), um antiviral conhecido contra o ZIKV, foram de 60.5 e 291 μ M, respectivamente.³ Assim, os terpenoides selecionados demonstraram baixa citotoxicidade para células epiteliais, sugerindo seu potencial uso como candidatos antivirais contra o ZIKV.

A atividade antiviral dos terpenoides em células Vero foram avaliadas por titulação viral do sobrenadante das células infectadas com o ZIKV tratadas e não tratadas. Nesses experimentos, o ZIKV atingiu um título de 6.7 log₁₀ TCID₅₀/mL em células não tratadas e 5.4 log₁₀ TCID₅₀/mL em células tratadas com 6MMPr. Verificou-se que seis dos 12 compostos (compostos **SL2**, **SL5**, **SL9–SL11** e **SL14**) reduziram significativamente a replicação do ZIKV em relação ao controle não tratado. Os compostos **SL2** e **SL5** foram os mais ativos reduzindo a titulação em 1.7 e 1.8 log₁₀ TCID₅₀/mL, respectivamente (Figura 22). Essas reduções foram similares aos achados por outros inibidores de ZIKV sintéticos³, assim como de produtos de origem natural.³⁹ Assim, estes resultados indicam que os terpenoides de *S. loranthacea* representam candidatos antivirais promissores contra o ZIKV, o que justifica uma avaliação mais aprofundada em modelos animais.

Figura 22: Atividade antiviral dos terpenoides de *S. loranthacea* contra o ZIKV.



OBS: Células Vero foram infectadas com ZIKV MOI 0.1 e então tratadas com o CC20 dos compostos SL1, SL2, SL5–SL14. As células foram encubadas a 37 °C e 5% CO₂ por cinco dias, quando então o sobrenadante foi colhido e titulado pelo método TCID₅₀. Os valores são

a média $\pm$ desvio padrão de três experimentos independentes e foram calculados frente o controle negativo não tratado (neg.) Os dados foram analisados utilizando ANOVA one-way seguida pelo teste de Dunnett's. * $p < 0.05$; ** $p < 0.001$; *** $p < 0.0005$.

Estudos anteriores sobre a relação estrutura atividade dos diterpenos tiglianos foram estabelecidos para as atividades anti-CHIKV, anti-HIV-1 e anti-HIV-2.^{40,41} Resultados similares foram observados para os diterpenos testados nesse estudo contra a replicação do ZIKV. Para os resultados obtidos, apenas as substâncias que possuíam grupo hidoxila em C-20 (como nos compostos **SL5** e **SL9–SL11**) foram ativas. Além disso, foi observado que a presença de grupo formila (como nos compostos **SL6–SL8**) é prejudicial para a atividade antiviral.^{40,41}

SESSÃO EXPERIMENTAL

Procedimentos experimentais gerais. A rotação óptica foi mensurada num polarímetro Jasco P-2000 (Jasco, Easton MD) em CHCl_3 a 25 °C. Os espectros de IV foram obtidos num espectrômetro Bruker Vertex 70 (Bruker, Billerica, MA, USA). Os espectros de RMN unidimensionais (^1H and ^{13}C) e bidimensionais (HSQC, HMBC, COSY e NOESY) foram obtidos em espectrômetros VARIAN-SYSTEM (500 MHz e 125 MHz) e BRUKER AVANCE III HD (400 MHz e 100 MHz). C_6D_6 , CDCl_3 , $\text{C}_3\text{D}_6\text{O}$ e CD_3OD foram utilizados como solventes deuterados e usado os sinais dos solventes residuais não deuterado como referência. Para obtenção dos espectros de massas das substâncias foram utilizados espectrômetros de massas de alta e baixa resolução da marca Bruker, modelo microTOF II e Ion-Trap AmazonX (Bruker, Billerica, MA, USA), respectivamente, pela técnica de Ionização por Eletrospray modo positivo. O isolamento, purificação e análise dos constituintes químicos foram realizados utilizando métodos cromatográficos como: cromatografia em coluna (CC) cromatografia em camada delgada analítica (CCDA) e cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC).

Para as CC utilizou-se sílica gel (Silicycle® de partículas com dimensões entre 0,063-0,2 mm ou 0,04-0,063 mm). Para CCDA foram utilizadas placas comerciais de sílica gel (Whatman), em camadas de 0,25 mm de espessura sobre suporte de alumínio (20x20 cm). As substâncias em análise foram evidenciadas pelo uso de radiação ultravioleta nos comprimentos de onda de 254 e 366 nm (aparelho de marca Boitton) como também por impregnação das placas em cubas de vidro, saturadas por vapor de iodo.

Material vegetal. O material botânico foi coletado na cidade de Morro do Chapéu-BA, Brasil, (11°33'00"S, 41°09'22"W) em março de 2016. O registro de acesso no Sistema

Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado foi obtido sob número A22E9B0. A espécie foi identificada pela Prof^a. Maria Lenise Guedes, tendo uma exsicata depositada no Herbário Alexandre Leal da Costa (ALCB) do Instituto de Biologia, sob o número 123491. As raízes secas a 32 °C por 72 horas, produziram 560g do cerne da raiz e 115g das cascas das raízes.

Extração e Isolamento. As cascas das raízes foram fracionadas e submetidas a extração com solvente orgânico. O processo escolhido para extração foi a maceração com hexano por 7 dias, com repetição desse processo por três vezes. Após a primeira extração, a casca da raiz foi extraída novamente com etanol absoluto da mesma forma anteriormente descrita. As soluções obtidas foram filtradas e concentradas sob pressão reduzida a 40 °C para obtenção dos extratos hexânico (5,3 g) e etanólico (7,6 g). O mesmo procedimento foi feito para obtenção dos extratos do cerne da raiz, caule e folhas. O extrato hexânico (2,6 g) foi submetido a CC, empacotada com sílica gel 60 (0,063 – 0,2 mm), e como fase móvel os solventes hexano e acetato de etila (100:0; 95:5, 90:10, 80:20, 70:30 e 0:100; 600 mL de cada mistura). Frações de 150 mL foram coletadas e obtido 24 frações. As frações foram analisadas por CCDA e reunidas de acordo com seus perfis cromatográficos em 12 frações (F1-F12). As frações F4 (98,0 mg) e F8 (680,0 mg) apresentaram-se puras, sendo após análise por RMN codificadas, respectivamente, de substâncias **SL12** e **SL13**. A fração F10 (314,0 mg), foi submetida separação cromatográfica em CLAE-DAD com uma coluna ACE-250 x 21,2 mm x 5µm C₁₈ com o seguinte gradiente de eluição: solvente A = H₂O; Solvente B = CH₃CN; Perfil de eluição = 0,0 - 70,0 min (85% de B); 70,0 - 80,0 min (85 - 100% de B); 80,0 - 100,0 min (100 - 100% de B); 100,0 - 110,0 min (100 - 85% de B); 110,0 - 130,0 min (85 - 85% de B), volume de injeção de 100 µL e fluxo de 8,0 mL/min.; foram coletadas 24 frações. As análises dos espectros de RMN H¹ dos picos isolados permitiram a identificação de nove compostos (**SL1**, **SL5**, **SL6**, **SL8–11**, **SL13** e **SL14**), além de uma mistura com duas substâncias (**SL2** e **SL7**). Os picos isolados tiveram os seguintes tempos de retenção: 18.73 (**SL13** – 9.1 mg); 27.74 (**SL14** – 15.9 mg); 50.74 (**SL9** – 8.2 mg); 57.26 (**SL5** – 10.5 mg); 59.97 (**SL1** – 12.4 mg); 68.66 (**SL2** e **SL7** – 7.3 mg); 77.71 (**SL6** – 4.3 mg); 84.38 (**SL10** – 6.5 mg); 104.92 (**SL8** – 1.8 mg); e 107.24 (**SL11** – 5.3 mg) (Figura 12). A fração com a mistura de **SL2** e **SL5** (7,3 mg) foi submetida a separação cromatográfica em CLAE-DAD (fase móvel: CH₃CN:H₂O (70:40); fluxo isocrático 3 mL/min; tempo de corrida: 230 min; coluna ACE-250 x 10 mm x 5 µm C-18; comprimento de onda 220 nm conduzindo ao isolamento dos compostos **SL2** (Tr = 219.48 min; 1,0 mg), e **SL7** (Tr = 211.34 min; 0,8 mg). O isolamento dos compostos **SL3** (0.5 mg) e **SL4** (0.3 mg) foi possível

ao realizar um fracionamento similar ao procedimento descrito, guiado por CLAE-IESEM² na busca de picos com valores de m/z observados no *Cluster A*.

Ácido 3 α -Benzoila-28-nor-D-friedooleano-14-en-16-one-23-oico (SL1): óleo incolor; $[\alpha]^{25}_D -25$ (c 0.1, CHCl₃); IV $\nu_{\max}$ 3400, 3192, 2944, 2872, 1720, 1272 cm⁻¹; ¹H e ¹³C NMR, ver Tabela 1; IES-EMAR m/z 561.3557 [M + H]⁺ (calculado para C₃₆H₄₉O₅, 561.3575, $\Delta = 1.8$ ppm).

Ácido 3 α -Cinamoila-28-nor-D-friedooleano-14-en-16-one-23-oico (SL2): óleo incolor; $[\alpha]^{25}_D -19$ (c 0.1, CHCl₃); IV $\nu_{\max}$ 3402, 3189, 2941, 2870, 1721, 1275 cm⁻¹; ¹H e ¹³C NMR, ver Tabela 1; IES-EMAR m/z 587.3720 [M + H]⁺ (calculado para C₃₈H₅₁O₅, 587.3731, $\Delta = 1.9$ ppm).

Ácido 3 α -Hexanoila-28-nor-D-friedooleano-14-en-16-one-23-oico (SL3): óleo incolor; $[\alpha]^{25}_D -20$ (c 0.1, CHCl₃); IV $\nu_{\max}$ 3401, 3188, 2939, 2868, 1721, 1273 cm⁻¹; ¹H e ¹³C NMR, ver Tabela 1; IES-EMAR m/z 555.4035 [M + H]⁺ (calculado para C₃₅H₅₅O₅, 555.4044, $\Delta = 1.6$ ppm).

Ácido 3 α -Butanoila-28-nor-D-friedooleano-14-en-16-one-23-oico (SL4): óleo incolor; $[\alpha]^{25}_D -23$ (c 0.1, CHCl₃); IV $\nu_{\max}$ 3399, 3187, 2939, 2868, 1721, 1273 cm⁻¹; ¹H e ¹³C NMR, ver Tabela 1; IES-EMAR m/z 527.3730 [M + H]⁺ (calculado para C₃₃H₅₁O₅, 527.3731, $\Delta = 0.2$ ppm).

13-(Z)-5-Tetradecanoato de 12-desoxiforbol (SL5): óleo incolor; $[\alpha]^{25}_D +25$ (c 0.1, CHCl₃); IV $\nu_{\max}$ 3404, 2925, 2855, 1712 cm⁻¹; ¹H e ¹³C NMR, ver Tabela 2; IES-EMAR m/z 539.3739 [M – H₂O + H]⁺ (calculado para C₃₄H₅₁O₅, 539.3731, $\Delta = -1.5$ ppm).

13-(Z)-5-Tetradecanoato de 12-desoxiforbaldeído (SL6): óleo incolor; $[\alpha]^{25}_D +33$ (c 0.1, CHCl₃); IV $\nu_{\max}$ 3392, 2925, 2854, 1714 cm⁻¹; ¹H e ¹³C NMR, ver Tabela 2; IES-EMAR m/z 537.2959 [M – H₂O + H]⁺ (calculado para C₃₄H₄₉O₅, 537.3574, $\Delta = 2.1$ ppm).

13-Dodecanoato de 12-desoxiforbaldeído (SL7): óleo incolor; $[\alpha]^{25}_D +2$ (c 0.1, CHCl₃); IV $\nu_{\max}$ 3401, 2924, 2854, 1711 cm⁻¹; ¹H e ¹³C NMR, ver Tabela 2; IES-EMAR m/z 511.3410 [M – H₂O + H]⁺ (calculado para C₃₂H₄₇O₅, 511.3418, $\Delta = 1.6$ ppm).

12-O-Hexadecanoato de 13-acetato-4 α -desoxiforbaldeído (SL8): óleo incolor; $[\alpha]^{25}_D -4$ (c 0.1, CHCl₃); IV $\nu_{\max}$ 3408, 2926, 2853, 1715 cm⁻¹; ¹H e ¹³C NMR, ver Tabela 2; IES-EMAR m/z 627.4268 [M + H]⁺ (calculado para C₃₈H₅₉O₇, 627.4255, $\Delta = -2.0$ ppm).

Análises dos extratos hexânicos por CLAE-IESEM² and CLAE-IESEMAR. Aproximadamente 1,5 mg de cada extrato foi dissolvido em 1,0 mL de CH₃CN, filtradas em um filtro PVDF de 0,45 μ m e injetadas no CLAE. As análises de CLAE-IESEM² foram realizadas utilizando um UFLC (Shimadzu) contendo duas bombas de solvente LC20AD, um

auto amostrador SIL20AHT e um controlador de sistema CBM20A, acoplado com um espectrômetro de massas Ion-Trap (AmaZon X) ou um espectrômetro do tipo TOF (microTOFII). Os experimentos de LC foram realizados utilizando uma coluna C₁₈ (Kromasil - 250 mm x 4,6 mm x 5 µm) e o seguinte gradiente de eluição: solvente A = H₂O e ácido fórmico (0,1% v/v); Solvente B = CH₃CN; Perfil de eluição = 0,0 - 70,0 min (85 - 85% de B); 70,0 - 80,0 min (85 - 100% de B); 80,0 - 100,0 min (100 - 100% de B); 100,0 - 110,0 min (100 - 85% de B); 110,0 - 130,0 min (85 - 85% de B), volume de injeção de 20 µL e taxa de fluxo de 0,6 mL/min. Os parâmetros de análise do Ion-Trap foram os seguintes: capilar 4,5 kV, IES no modo positivo, offset da placa final 500 V, nebulizador 35 psi, gás seco (N₂) com fluxo de 8 mL/min e temperatura de 300 °C. A fragmentação de CID foi conseguida no modo autoEM/EM utilizando o modo de resolução avançada para o modo EM e EM/EM. As possíveis estruturas putativas foram propostas com base no padrão de fragmentação EM/EM. Os espectros (*m/z* 50-1000) foram registrados a cada 2 s.

Tratamento dos Dados de Espectrometria de Massas e Obtenção da Rede Molecular. Os resultados obtidos no CLAE-IESEM² foram submetidos a uma conversão para o formato mzXML utilizando o programa Data Analysis. Redes moleculares foram criadas usando um passo a passo online do site do GNPS (<http://gnps.ucsd.edu>).²¹ Esses dados foram agrupados em *clusters* com uma tolerância do íon precursor de 1.0 Da e os íons fragmentos (MS/MS) com uma tolerância de 0.5 Da para criar agrupamento com espectros semelhantes. Adicionalmente, espectros que possuíam menos de dois espectros semelhantes foram descartados. A rede foi então criada, onde as linhas foram filtradas para ter uma pontuação de cosseno acima de 0,6 e mais de seis picos correspondentes. Após os espectros serem organizados baseados na similaridade de fragmentação, os dados foram importados para o Cytoscape 3.5.1 e mostrado como uma rede contendo *nodos* e linhas.⁴² Para evitar a interpretação incorreta dos contaminantes ou ruído do CALE, injeções em branco (fase móvel) foram introduzidos na rede espectral para poder distinguir-se de amostras, sendo identificadas no Cytoscape com *nodos* de cor branca.

Cálculos do DFT e predição dos espectros de RMN de ¹³C. As estruturas dos compostos foram desenhadas usando o Marvin 16.1.11.0, 2016, ChemAxon (<http://www.chemaxon.com>). O software, Standardizer, JChem 16.1.11.0, 2016, ChemAxon, foi usando para canonizar as estruturas. Esse processo converte uma estrutura química escolhida arbitrariamente em uma notação única, adiciona hidrogênios e limpa a figura molecular em três dimensões. A estrutura é dividida em pequenos fragmentos organizados em uma árvore usando informações de conectividade. Os confômeros gerados para a estrutura inicial (representada

pelo nó da raiz da árvore) são otimizados. O processo de construção da árvore usa uma versão estendida do campo de força Dreiding.^{43,44} A geometria da estrutura química do composto foi otimizada inicialmente com um campo de força do Merck Molecular Force Field (MMFF),⁴⁵ e uma nova otimização geométrica foi realizada com base no método semi-empírico, Austin Model 1 (AM1).⁴⁶ Posteriormente, foi utilizado um método de busca sistemática que analisou os confôrmeros e selecionou os tinham as menores energias mínimas usando AM1 e o algoritmo de Monte-Carlo.⁴⁷ Em seguida, as energias mínimas selecionadas foram otimizadas com base no cálculo do modo vibracional usando DFT (teoria funcional da densidade).⁴⁸ Os cálculos da DFT foram realizados com o Spartan 16 para Windows (Wavefunction, Irvine, CA, EUA).^{48,49} Cada estrutura estudada foi examinada no nível EDF2/6-311G* e as estruturas de menor energia foram selecionadas para os cálculos. O mínimo global da energia potencial na superfície foi utilizado para a determinação de cada geometria, e os deslocamentos químicos de RMN de ¹H e ¹³C foram geradas usando a média de Boltzmann.

Células. As células Vero (células epiteliais renais extraídas de um macaco verde africano) foram cultivadas em meio de Eagle modificado por Dulbelcco (DMEM) suplementado com soro fetal bovino (SFB) inativado a 10%, L-glutamina 2 mM e 100 U/mL de penicilina/estreptomicina 100 U/mL, a 37 ° C com 5% de CO₂.

Vírus. O vírus da Zika utilizado foi a cepa brasileira (ZIKV/*H.sapiens*/Brazil/PE243/2015; abreviado para ZIKV PE243; número de acesso GenBank KX197192.1) (DONALD et al., 2016). A cepa ZIKV PE243 foi propagada em células Vero e após a titulação pelo método padrão TCID₅₀ foi armazenado a -80 °C até ser utilizado (REED; MUENCH, 1938). O vírus foi tratado em um laboratório de nível 2 de biossegurança (BSL-2), aprovado pelo CQB: 98/99 e seguindo toda a legislação brasileira necessária.

Ensaio de citotoxicidade. Os compostos isolados foram dissolvidos em dimetilsulfóxido (DMSO) e depois diluído em meio de cultura para uma concentração final de DMSO de 0,4% (v/v). A toxicidade celular foi determinada usando o ensaio de redução do MTT (brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2yl) -2,5-difenil tetrazolium]) (MOSMANN, 1983).

Detalhadamente, após plaqueamento das células Vero durante 24 horas em concentrações de 1x10⁴ nas microplacas de 96 poços, foi realizado o tratamento com várias concentrações de cada composto isolado durante 1 hora. Em seguida, 50 µL de solução de MTT (1 mg/mL) foi adicionada a cada poço e a microplaca foi incubada a 37 °C, em 5% de CO₂, por 3-4 h. Em seguida, os cristais roxos de formazan do MTT foram solubilizados com DMSO e as densidades ópticas foram medidas usando um espectrofotômetro de microplacas (BioTek, ELX800, Winooski, VT, EUA) a 540 nm. Como controle para o teste de citotoxicidade, foi

utilizado a ribose de 6-metilmercaptipurina (6MMPr), uma substância análoga ao nucleosídeo tiopurina, reproduzindo um estudo anterior, onde a 6MMPr possuiu atividade frente ao vírus da ZIKA em testes *in vitro* (DE CARVALHO et al., 2017). Uma solução inicial do controle positivo foi preparada com H₂O Milli-Q, esterilizada por filtração em filtro de 0.22 μ M Millipore e armazenado sob refrigeração a -20°C. A viabilidade celular foi determinada pela subtração da densidade óptica da fração de células tratadas pelas células controles não tratados. O ponto limite para tratamento antiviral foi determinado pela concentração que inibe a viabilidade celular em 20% (CC₂₀).

Ensaio de atividade antiviral. As células Vero foram semeadas em placas de cultura de tecido de 48 poços a uma concentração inicial de 2×10^4 células/poço e incubada por 24 horas (37 °C, 5% CO₂). As culturas em monocamadas confluentes foram infectadas com a cepa ZIKV PE243 a um MOI de 0.1 diluído em 100 μ L de uma cultura de média contendo 2% (v/v) SFB por 2 horas a 37 °C e 5% CO₂. Após 2 horas, as células foram lavadas com PBS e tratadas com soluções dos compostos isolados SL1, SL2, SL5-SL14 em concentrações calculadas pela CC₂₀ no ensaio de citotoxicidade. As soluções foram inoculadas em triplicata e foram incubadas por cinco dias a 37 °C e 5% CO₂. Como controle positivo e de eficácia do teste, foi usado o 6MMPr. Após o período pós-infecção, o sobrenadante das células foi colhido e armazenado a -80 °C. A carga viral foi avaliada por titulação de vírus (TCID₅₀) em células Vero.

Análise Estatística. A análise estatística foi realizada para avaliar as diferenças no rendimento viral das células infectadas tratadas com os compostos isolados SL1, SL2, SL5–SL14 em comparação com o controle não tratado, em diferentes doses e intervalos de tempo. Os dados foram analisados por ANOVA *one-way* (análise de variância), utilizando o software GraphPad Prism Software 6.01. O teste de Dunnett foi usado para comparar os tratamentos com o controle. Os dados foram expressos como as médias $\pm$ os desvios padrão de três experimentos independentes. Um valor de $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo.

CONTEÚDO ASSOCIADO

Material Suplementar. Dados de EM e RMN dos compostos SL1–SL14 estão disponíveis no material suplementar.

INFORMAÇÃO DO AUTOR

Autor Correspondente. *Tel: +55 83 32167427. E-mail: josean@ltf.ufpb.br.

Contribuição dos Autores. O manuscrito foi escrito com a contribuição de todos autores. Todos autores deram sua aprovação para a versão final desse manuscrito. Todos autores contribuíram de forma igual.

Notas. Os autores declaram que não possuem interesse financeiro.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem as agências brasileiras Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior-Brasil (CAPES) (Código de financiamento 001) e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelo suporte financeiro e bolsas. Também agradecemos por colaborar com a Rede Norte-Nordeste de Fitoterápicos (INCT-RENNOFITO).

Conflito de Interesse. Os autores declaram que não possuem conflito de interesse.

REFERÊNCIAS

- (1) Cordeiro, M. T.; Brito, C. A.; Pena, L. J.; Castanha, P. M.; Gil, L. H.; Lopes, K. G.; Dhalia, R.; Meneses, J. A.; Ishigami, A. C.; Mello, L. M.; Alencar, L. X.; Guarines, K. M.; Rodrigues, L. C.; Marques, E. T. *J. Infect. Dis.* **2016**, *15*, 1897-1904.
- (2) Brito, M. L. F.; Antunes, C. A. B.; Moreira, A. J. P.; Morais, M. I. M., Henrique-Souza, A. Cordeiro, M. T., Azevedo, E. T. M., Pena, L. J. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **2017**, *97*, 1405-1409.
- (3) Carvalho, O. V.; Félix, D. M.; Mendonça, L. R.; Araújo, C. M. C. S.; Oliveira Franca, R. F.; Cordeiro, M. T.; Silva-Júnior, A.; Pena, L. J. *Int. J. Antimicrob. Agents* **2017**, *50*, 718-725.
- (4) Meneses, J. D. A.; Ishigami, A. C.; Mello, L. M.; Albuquerque, L. L.; Brito, C. A. A.; Cordeiro, M. T.; Pena, L. J. *Clin. Infect. Dis.* **2017**, *64*, 1302-1308.
- (5) Lin, L. T.; Hsu, W. C.; Lin, C. C. *J. Tradit. Complement. Med.* **2014**, *4*, 24-35.
- (6) Olivon, F.; Remy, S.; Grelier, G.; Apel, C.; Eydoux, C.; Guillemot, J.C.; Neyts, J.; Delang, L.; Touboul, D.; Roussi, F.; Litaudon, M. *J. Nat. Prod.* **2019**, *82*, 330- 340.
- (7) Olivon, F.; Palenzuela, H.; Girard-Valenciennes, E.; Neyts, J.; Pannecouque, C.; Roussi, F.; Grondin, I.; Leyssen, P.; Litaudon, M. *J. Nat. Prod.* **2015**, *78*, 1119-1128.
- (8) Esser, H. J. *Rodriguésia* **2012**, *63*, 209-225.
- (9) Athiê-Souza, S. M.; Melo, A. L.; Silva, M. J.; Sales, M. F. *Syst. Bot.* **2014**, *39*, 510-516.
- (10) Cota, B. B.; Johann, S.; Oliveira, D. M.; Siqueira, E. P.; Souza-Fagundes, E. M.; Cisalpino, P. S.; Alves, T. M. A.; Zani, C. L. *Rev. Bras. Farmacogn.* **2011**, *21*, 70-77.
- (11) Techer, S.; Girard-Valenciennes, E.; Retailleau, P.; Neyts, J.; Guéritte, F.; Leyssen, P.; Litaudon, M.; Smadja, J.; Grondin, I. *Phytochem. Lett.* **2015**, *12*, 313-319.
- (12) Chapuis, J. C.; Sordat, B.; Hostettmann, K. *J. Ethnopharmacol.* **1988**, *23*, 273-284.
- (13) Dräger, G.; Jeske, F.; Kunst, E.; Lopez, E. G.; Sanchez, H. V.; Tschritzis, F.; Kirschning, A.; Jakupovic, J. *Eur. J. Org. Chem.* **2007**, 5020-5026.
- (14) Adolf, W.; Hecker, E. *Tetrahedron Lett.* **1980**, *21*, 2887-2890.
- (15) Sourbier, C.; Scroggins, B. T.; Mannes, P. Z.; Liao, P. J.; Siems, K.; Wolf, D.; Beutler, J. A.; Linehan, W. M.; Neckers, L. *Oncotarget* **2015**, *6*, 29963-29974.
- (16) Busch, T.; Drager, G.; Kunst, E.; Benson, H.; Sasse, F.; Siems, K.; Kirschning, A. *Org. Biomol. Chem.* **2016**, *14*, 9040-9045.
- (17) Pfeffer, T. J.; Sasse, F.; Schmidt, C. F.; Lakämper, S.; Kirschning, A.; Scholz, T. *Eur. J. Med. Chem.* **2016**, *112*, 164-170.

- (18) Allard, P. M.; Péresse, T.; Bisson, J.; Gindro, K.; Marcourt, L.; Pham, V. C.; Roussi, F.; Litaudon, M.; Wolfender, J. L. *Anal. Chem.* **2016**, *88*, 3317-3323.
- (19) Olivon, F.; Allard, P. M.; Koval, A.; Righi, D.; Genta-Jouve, G.; Neyts, J.; Apel, C.; Pannecouque, C.; Nothias, L.-F.; Cachet, X.; Marcourt, L.; Roussi, F.; Katanaev, V. L.; Touboul, D.; Wolfender, J. L.; Litaudon, M. *ACS Chem. Biol.* **2017**, *12*, 2644-2651.
- (20) Yang, J. Y.; Sanchez, L. M.; Rath, C. M.; Liu, X.; Boudreau, P. D.; Bruns, N.; Glukhov, E.; Wodtke, A.; de Felicio, R.; Fenner, A.; Wong, W. R.; Linington, R. G.; Zhang, L.; Debonsi, H. M.; Gerwick, W. H.; Dorrestein, P. C. *J. Nat. Prod.* **2013**, *76*, 1686-1699.
- (21) Wang, M.; Carver, J. J.; Phelan, V. V.; Sanchez, L. M.; Garg, N.; Peng, Y.; Nguyen, D. D.; Watrous, J.; Kapono, C. A.; Luzzatto-Knaan, T.; Porto, C.; Bouslimani, A.; Melnik, A. V.; Meehan, M. J.; Liu, W.-T.; Crüsemann, M.; Boudreau, P. D.; Esquenazi, E.; Sandoval-Calderón, M.; Kersten, R. D.; Pace, L. A.; Quinn, R. A.; Duncan, K. R.; Hsu, C.-C.; Floros, D. J.; Gavilan, R. G.; Kleigrew, K.; Northen, T.; Dutton, R. J.; Parrot, D.; Carlson, E. E.; Aigle, B.; Michelsen, C. F.; Jelsbak, L.; Sohlenkamp, C.; Pevzner, P.; Edlund, A.; McLean, J.; Piel, J.; Murphy, B. T.; Gerwick, L.; Liaw, C.-C.; Yang, Y.-L.; Humpf, H.-U.; Maansson, M.; Keyzers, R. A.; Sims, A. C.; Johnson, A. R.; Sidebottom, A. M.; Sedio, B. E.; Klitgaard, A.; Larson, C. B.; Boya P, C. A.; Torres-Mendoza, D.; Gonzalez, D. J.; Silva, D. B.; Marques, L. M.; Demarque, D. P.; Pociute, E.; O'Neill, E. C.; Briand, E.; Helfrich, E. J. N.; Granatosky, E. A.; Glukhov, E.; Ryffel, F.; Houson, H.; Mohimani, H.; Kharbush, J. J.; Zeng, Y.; Vorholt, J. A.; Kurita, K. L.; Charusanti, P.; McPhail, K. L.; Nielsen, K. F.; Vuong, L.; Elfeki, M.; Traxler, M. F.; Engene, N.; Koyama, N.; Vining, O. B.; Baric, R.; Silva, R. R.; Mascuch, S. J.; Tomasi, S.; Jenkins, S.; Macherla, V.; Hoffman, T.; Agarwal, V.; Williams, P. G.; Dai, J.; Neupane, R.; Gurr, J.; Rodríguez, A. M. C.; Lamsa, A.; Zhang, C.; Dorrestein, K.; Duggan, B. M.; Almaliti, J.; Allard, P.-M.; Phapale, P.; Nothias, L.-F.; Alexandrov, T.; Litaudon, M.; Wolfender, J.-L.; Kyle, J. E.; Metz, T. O.; Peryea, T.; Nguyen, D.-T.; VanLeer, D.; Shinn, P.; Jadhav, A.; Müller, R.; Waters, K. M.; Shi, W.; Liu, X.; Zhang, L.; Knight, R.; Jensen, P. R.; Palsson, B. Ø.; Pogliano, K.; Linington, R. G.; Gutiérrez, M.; Lopes, N. P.; Gerwick, W. H.; Moore, B. S.; Dorrestein, P. C.; Bandeira, N. *Nat. Biotechnol.* **2016**, *34*, 828– 837.
- (22) Evans, F. J. *Toxicon* **1978**, *16*, 51-57.
- (23) Kirira, P. G.; Rukunga, G. M.; Wanyonyi, A. W.; Muthaura, C. N.; Mungai, G. M.; Machoch, A. K.; Ndiege, I. O. *J. Nat. Prod.* **2007**, *70*, 842-845.
- (24) Hirota, M.; Ohigashi, H.; Koshimizu, K. *Agric. Biol. Chem.* **1979**, *43*, 2523- 2529.
- (25) Tan, Q. W.; Ouyang, M. A.; Chen, Q. J.; Wu, Z. J. *Molecules* **2014**, *19*, 17619-17631.
- (26) Mo, D. J.; Li, J.; Li, M. Y. *Nat. Prod. Commun.* **2018**, *13*, 21-22.

- (27) Chiang, Y. M.; Kuo, Y. H. *J. Nat. Prod.* **2001**, *64*, 436-439.
- (28) Badria, F. A.; Mikhaeil, B. R.; Maatooq, G. T.; Amer, M. M. A. *Z. Naturforsch. C* **2003**, *58*, 505-516.
- (29) Kiem, P. V.; Minh, C. V.; Huong, H. T.; Nam, N. H.; Lee, J. J.; Kim, Y. H. *Arch. Pharm. Res.* **2004**, *27*, 1109-1113.
- (30) Ageta, H.; Arai, Y. *Phytochemistry* **1983**, *22*, 1801-1808.
- (31) Shiojima, K.; Arai, Y.; Masuda, K.; Takase, Y.; Ageta, T.; Ageta, H. *Chem. Pharm. Bull.* **1992**, *40*, 1683-1690
- (32) Vilegas, J. H. Y.; Lanças, F. M.; Vilegas, W.; Pozetti, G. L. *J. Braz. Chem. Soc.* **1997**, *8*, 529-535
- (33) Apel, M. A.; Sobral, M.; Schapoval, E. E. S.; Henriques, A. T.; Menut, C.; Bessiere, J. *M. J. Essent. Oil Res.* **2004**, *16*, 437-439.
- (34) Tang, Q.; Su, Z.; Han, Z.; Ma, X.; Xu, D.; Liang, Y.; Cao, H.; Wang, X.; Qu, X.; Hoffman, A.; Liu, H.; Gu, D.; Qiu, D. *Phytochem. Lett.* **2012**, *5*, 214-218.
- (35) Wube, A. A.; Hüfner, A.; Thomaschitz, C.; Blunder, M.; Kollroser, M.; Bauer, R.; Bucar, F. *Bioorg. Med. Chem* **2011**, *19*, 567-579.
- (36) Forgo, P.; Redei, D. R.; Hajdu, Z.; Szabo, P.; Szabo, L. S.; Hohmann, J. *J. Nat. Prod.* **2011**, *74*, 639–643.
- (37) Bourjot, M.; Delang, L.; Nguyen, V. H.; Neyts, J.; Guéritte, F.; Leyssen, P.; Litaudon, M. *J. Nat. Prod.* **2012**, *75*, 2183– 2187.
- (38) Wang, Y. B.; Huang, R.; Wang, H. B.; Jin, H. Z.; Lou, L. G.; Qin, G. W. *J. Nat. Prod.* **2006**, *69*, 967-970.
- (39) Vazquez-Calvo, A.; Jimenez de Oya, N.; Martin-Acebes, M. A.; Garcia-Moruno, E.; Saiz, J. C. *Front. Microbiol.* **2017**, *8*, 1314.
- (40) Remy, S.; Litaudon, M. *Molecules* **2019**, *24*, 2336-2352.
- (41) Nothias-Scaglia, L. F.; Pannecouque, C.; Renucci, F.; Delang, L.; Neyts, J.; Roussi, F.; Costa, J.; Leyssen, P.; Litaudon, M.; Paolini, J. *J. Nat. Prod.* **2015**, *78*, 1277-1283.
- (42) Shannon, P.; Markiel, A.; Ozier, O.; Baliga, N. S.; Wang, J. T.; Ramage, D.; Amin, N.; Schwikowski, B.; Ideker, T. *Genome Res.* **2003**, *13*, 2498-2504.
- (43) Imre, G.; Veress, G.; Volfordd, A.; Farkas, Ö. *J. Mol. Struct.: Theochem* **2003**, *666*, 51–59.
- (44) http://www.wavefun.com/products/windows/SpartanModel/win_model.html (accessed April 15, 2018).
- (45) Halgren, T. A. *J. Comput. Chem.* **1996**, *17*, 490-519.

- (46) Dewar, M. J. S. E.; Zoebisch, G.; Healy, E. F.; Stewart J. J. P. *J. Am. Chem. Soc.* **1985**, *107*, 3902–3909.
- (47) Metropolis, N; Ulam, S. *J. Am. Stat. Assoc.* **1949**, *44*, 335-341.
- (48) Becke, A. D. *Phys. Rev. A* **1988**, *38*, 3098-3100.
- (49) Lin, C. Y; George, M. W; Gill, P. M. W. *Aust. J. Chem.* **2003**, *57*, 365-370.
- (50) Donald, C. L.; Brennan, B.; Cumberworth, S. L.; Rezelj, V. V.; Clark, J. J.; Cordeiro, M. T.; França, R. F. O., Pena, L. J.; Wilkie, G. S.; Filipe, A. S.; Davis, C.; Hughes, J.; Varjak, M.; Selinger, M.; Zuvanov, L.; Owsianka, A. M.; Patel, A. H.; McLauchlan, J.; Lindenbach, B. D.; Fall, G.; Sall, A. A.; Biek, R.; Rehwinkel, J.; Schnettler, E.; Kohl, A. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **2016**, *10*, 1-20.
- (51) Reed, L. J.; Muench, H. *Am. J. Epidemiol.* **1938**, *27*, 493-497.
- (52) Mosmann, T. *J. Immunol. Methods* **1983** *65*, 55-63.



Resumo gráfico

MATERIAL SUPLEMENTAR

Tri- e Diterpenoides de *Stillingia loranthacea* como inibidores da replicação do Zika Virus

Lucas Silva Abreu,[†] Yuri Mangueira do Nascimento,[†] Rafael dos Santos Costa,[‡] Maria Lenise Silva Guedes,[§] Bárbara Nayane Rosário Fernandes Souza,[⊥] Lindomar José Pena,[⊥] Vicente Carlos de Oliveira Costa,[†] Marcus Tullius Scotti,[†] Raimundo Braz-Filho,^{||} José Maria Barbosa-Filho,[†] Marcelo Sobral da Silva,[†] Eudes da Silva Velozo,[‡] and Josean Fachine Tavares^{†*}

[†] Instituto de Pesquisa em Fármacos e Medicamentos, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, Brasil

[‡] Laboratório de pesquisa em Matéria Médica, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal da Bahia, Salvador, Brasil.

[§] Instituto de Biologia, Universidade Federal da Bahia, Salvador, Brasil.

[⊥] Departamento de Virologia, Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz), Recife, Brazil

^{||} Departamento de Química, Instituto de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Brazil.

Tabela S1: Dados de CLAE-IESEM2 e CLAE-IES-EMAR dos compostos presentes no cluster A.

tr (min.)	Compostos	[M+H] ⁺ (m/z)	Formula Molecular	MS ²
23.5	-	499.3746	C ₃₂ H ₅₀ O ₄	MS ² [499]: 481.3 (8.2); 463.1 (7.0); 439.3 (16.3); 421.3 (14.3); 393.3 (42.8); 204.7 (100.0)
27.1	-	603.3680	C ₃₈ H ₅₀ O ₆	MS ² [603]: 557.3 (7.4); 439.3 (52.3); 393.3 (100.0); 204.7 (29.4)
28.8	-	513.3593	C ₃₂ H ₄₈ O ₅	MS ² [513]: 495.3 (5.0); 457.3 (3.0); 439.3 (25.3); 421.3 (16.0); 393.3 (42.4); 204.7 (100.0)
31.5	-	427.3584	C ₂₉ H ₄₆ O ₂	MS ² [427]: 409.3 (25.0); 391.3 (42.81); 204.7 (100.0)
34.7	4	527.3730	C ₃₃ H ₅₀ O ₅	MS ² [527]: 509.3 (2.8); 457.1 (4.3); 439.3 (25.8); 421.3 (16.7); 393.3 (45.5); 204.7 (100.0)
43.9	1	561.3557	C ₃₆ H ₄₈ O ₅	MS ² [561]: 543.3 (3.8); 515.3 (4.4); 439.3 (13.5); 421.3 (14.5); 393.3 (48.8); 204.7 (100.0)
50.3	2	587.3720	C ₃₈ H ₅₀ O ₅	MS ² [587]: 569.3 (3.8); 439.3 (24.3); 421.3 (14.9); 393.3 (45.2); 204.7 (100.0)
55.1	3	555.4035	C ₃₅ H ₅₄ O ₅	MS ² [555]: 457.3 (3.7); 439.3 (28.3); 421.3 (15.9); 393.3 (40.7); 204.7 (100.0)
75.2	-	469.3679	C ₃₁ H ₄₈ O ₃	MS ² [499]: 451.3 (4.3); 409.3 (18.4); 391.3 (12.6); 204.7 (100.0)

Figura S1: Padrão de fragmentação dos compostos SL1-SL4.

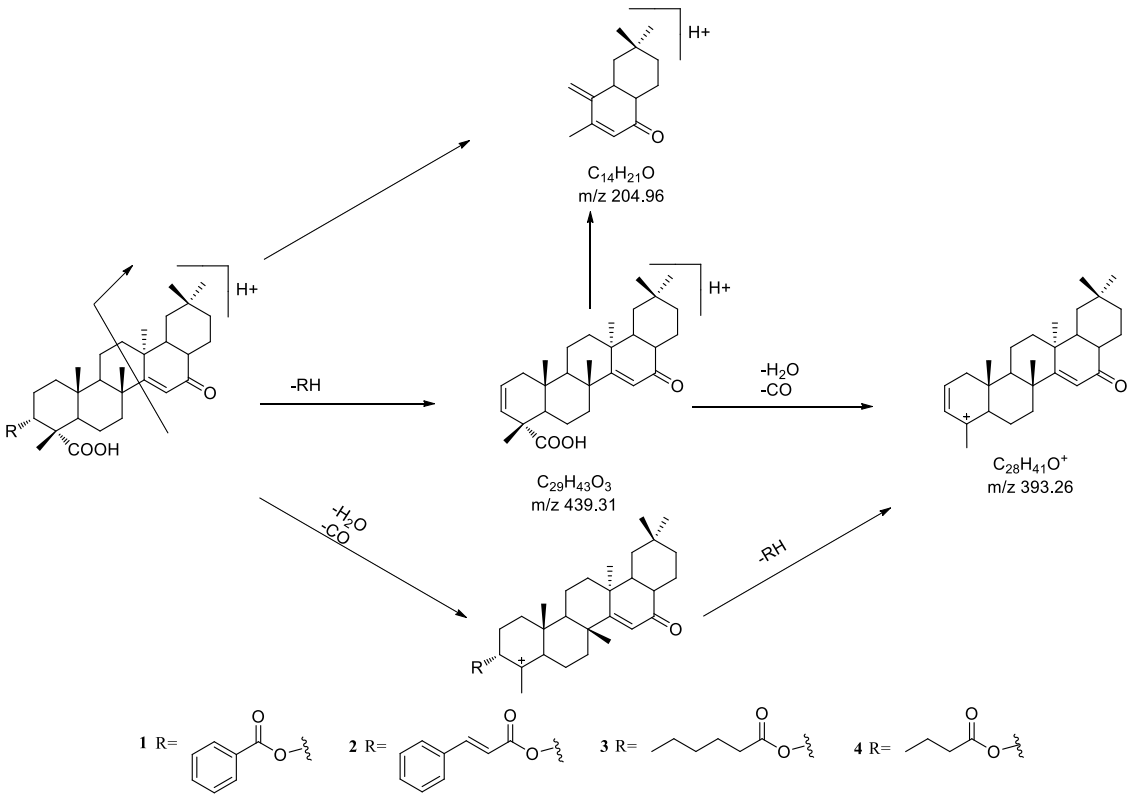


Figura S2: Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) do composto **SL1**.

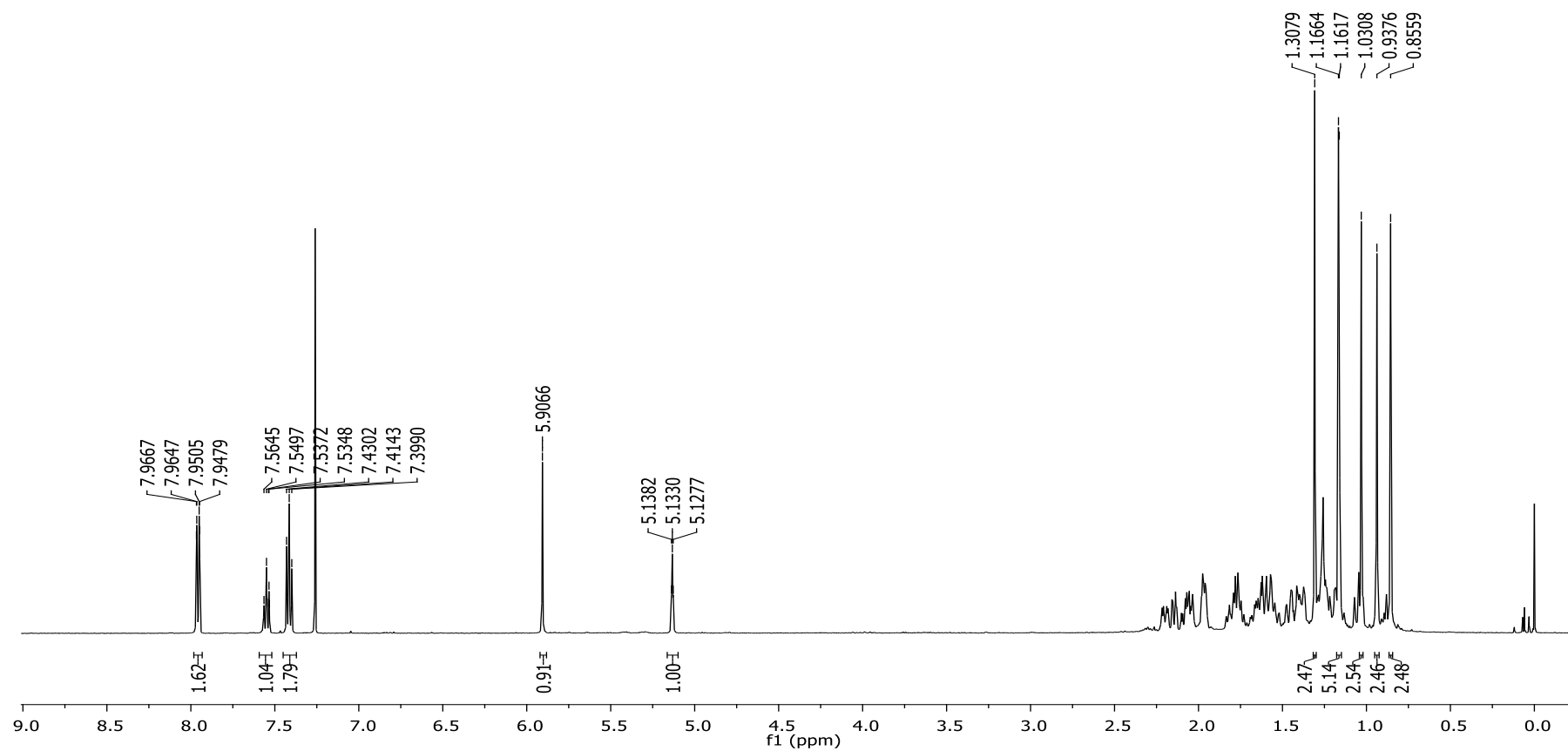


Figura S3: Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) do composto **SL1** (expansão).

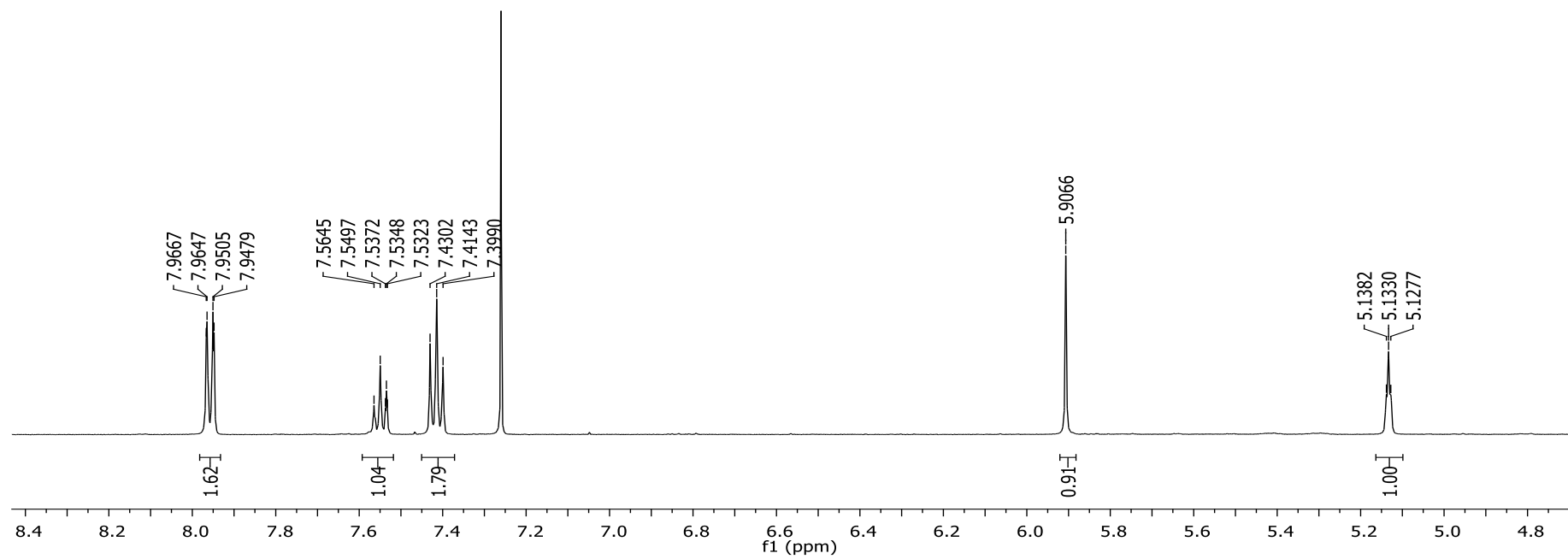


Figura S4: Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) do composto **SL1** (expansão).

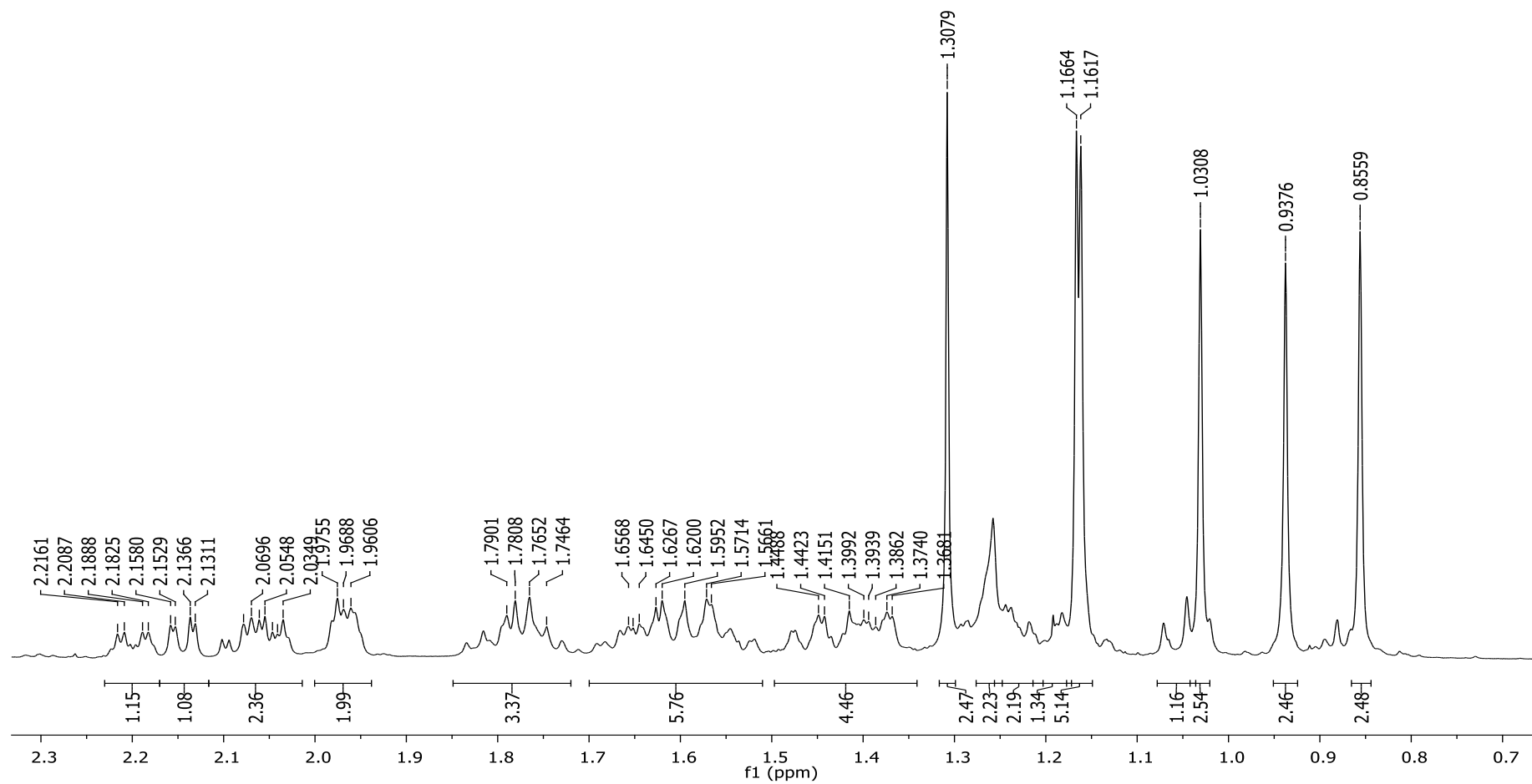


Figura S5: Espectro de RMN de ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) do composto **SL1**.

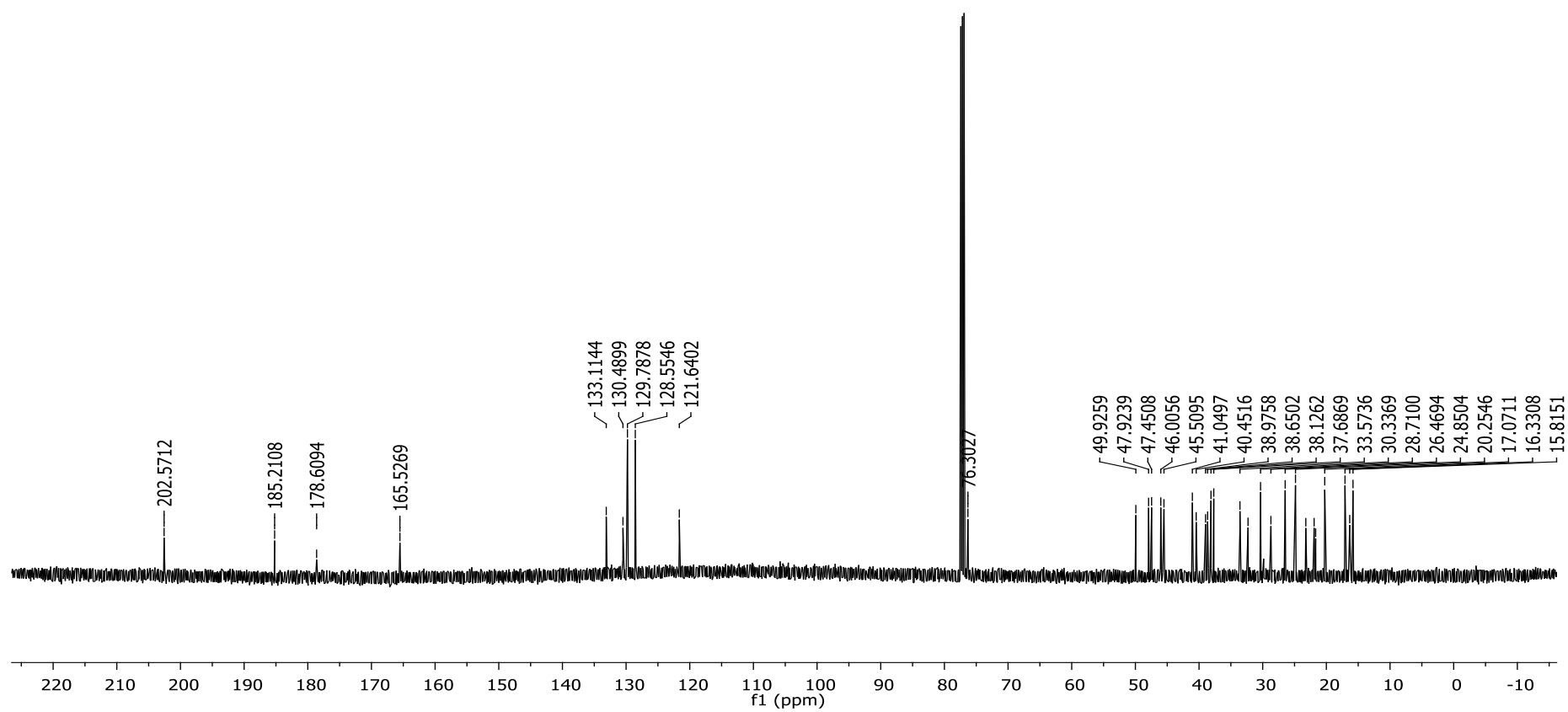


Figura S6: Espectro de RMN de ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) do composto **SL1** (expansão).

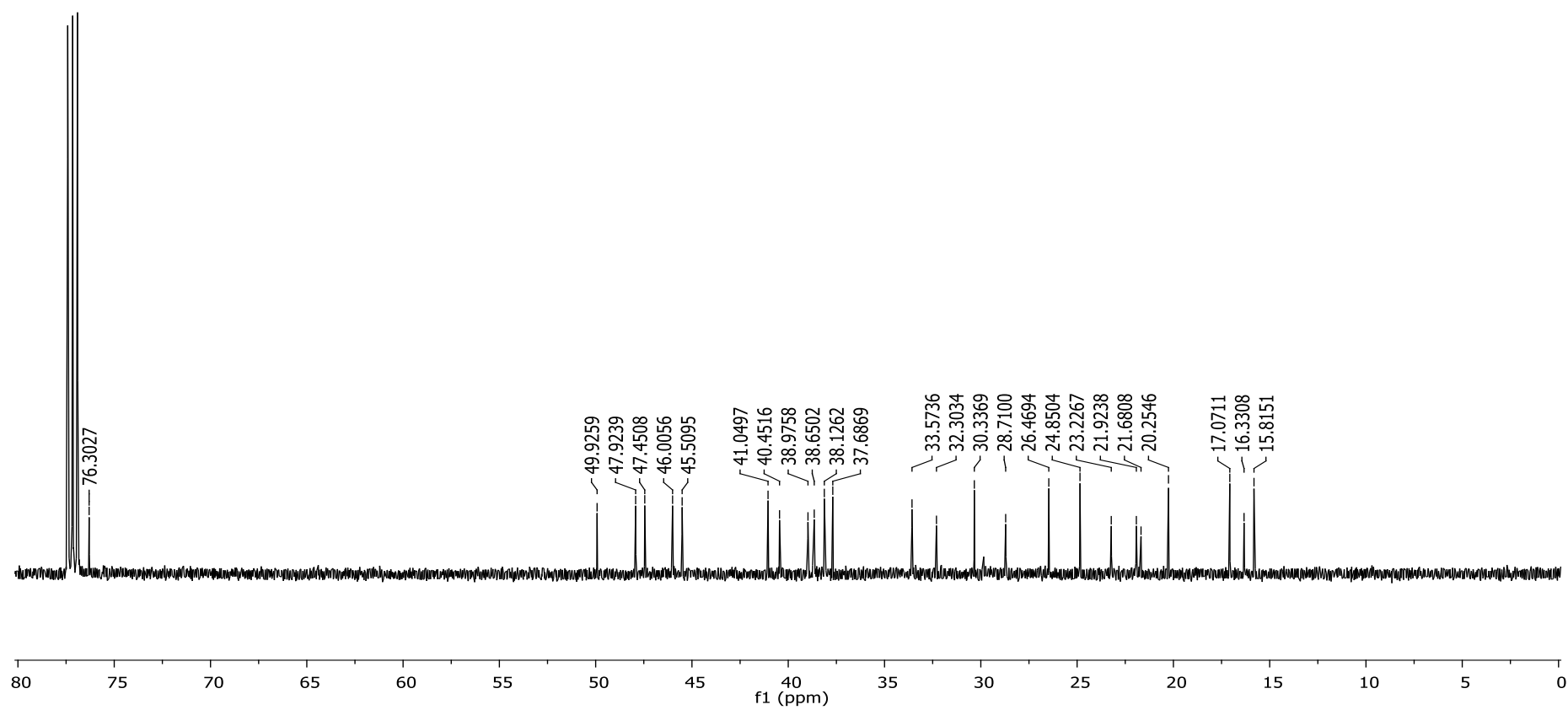


Figura S7: Espectro de RMN de ^{13}C -APT (100 MHz, CDCl_3) do composto **SL1**.

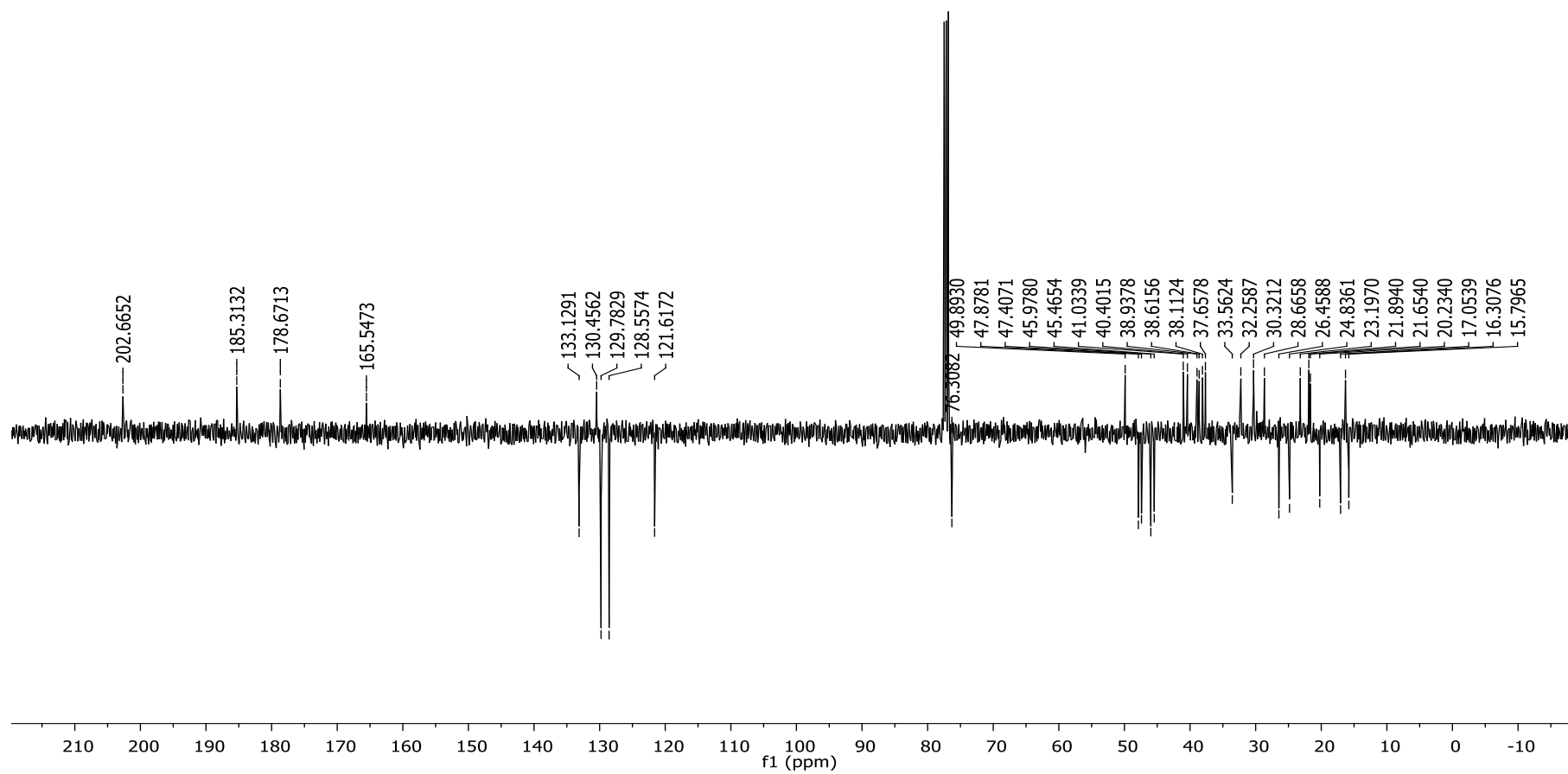
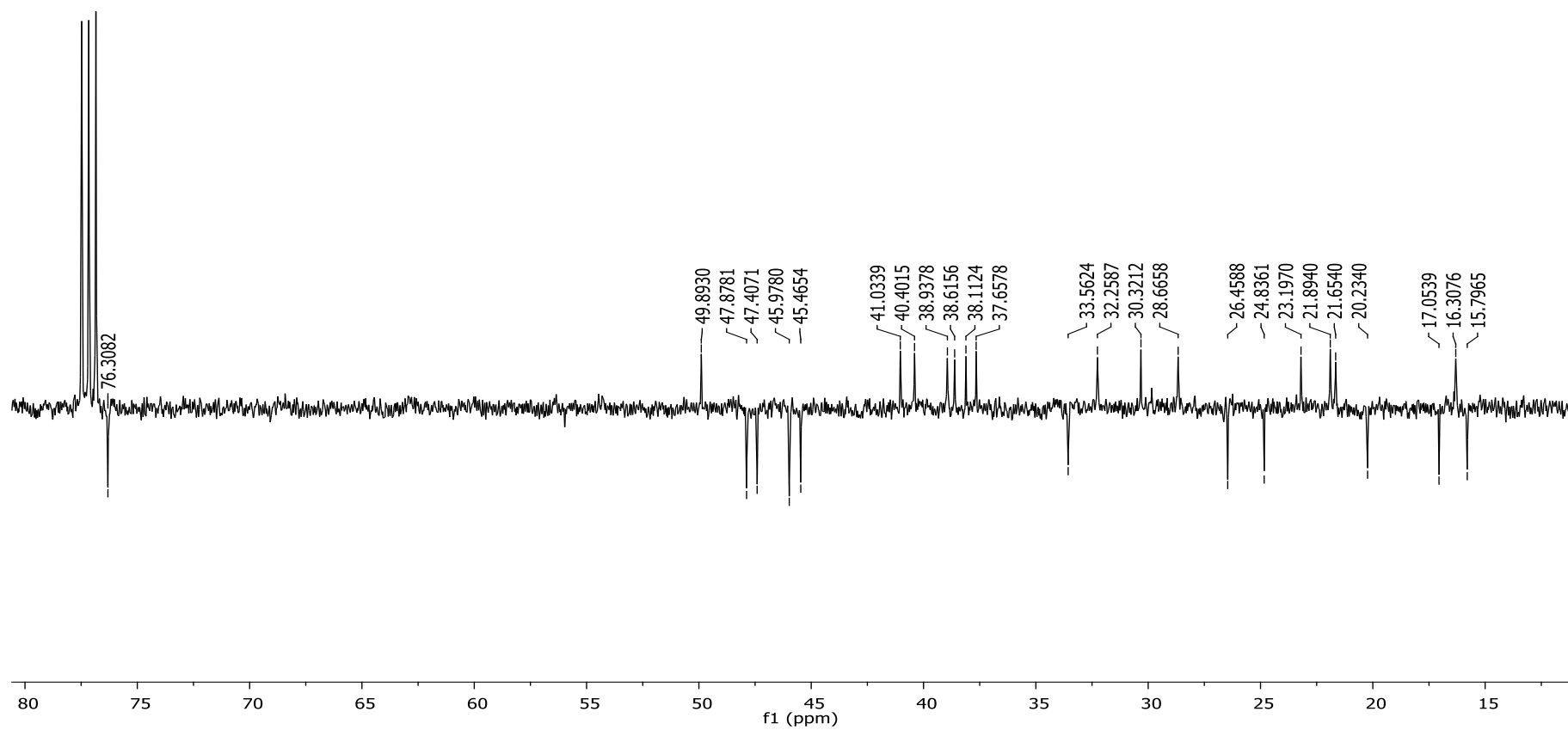


Figura S8: Espectro de RMN de ^{13}C -APT (100 MHz, CDCl_3) do composto **SL1** (expansão).



FiguraS 9: Espectro de RMN de COSY (500 MHz, CDCl₃) do composto **SL1**.

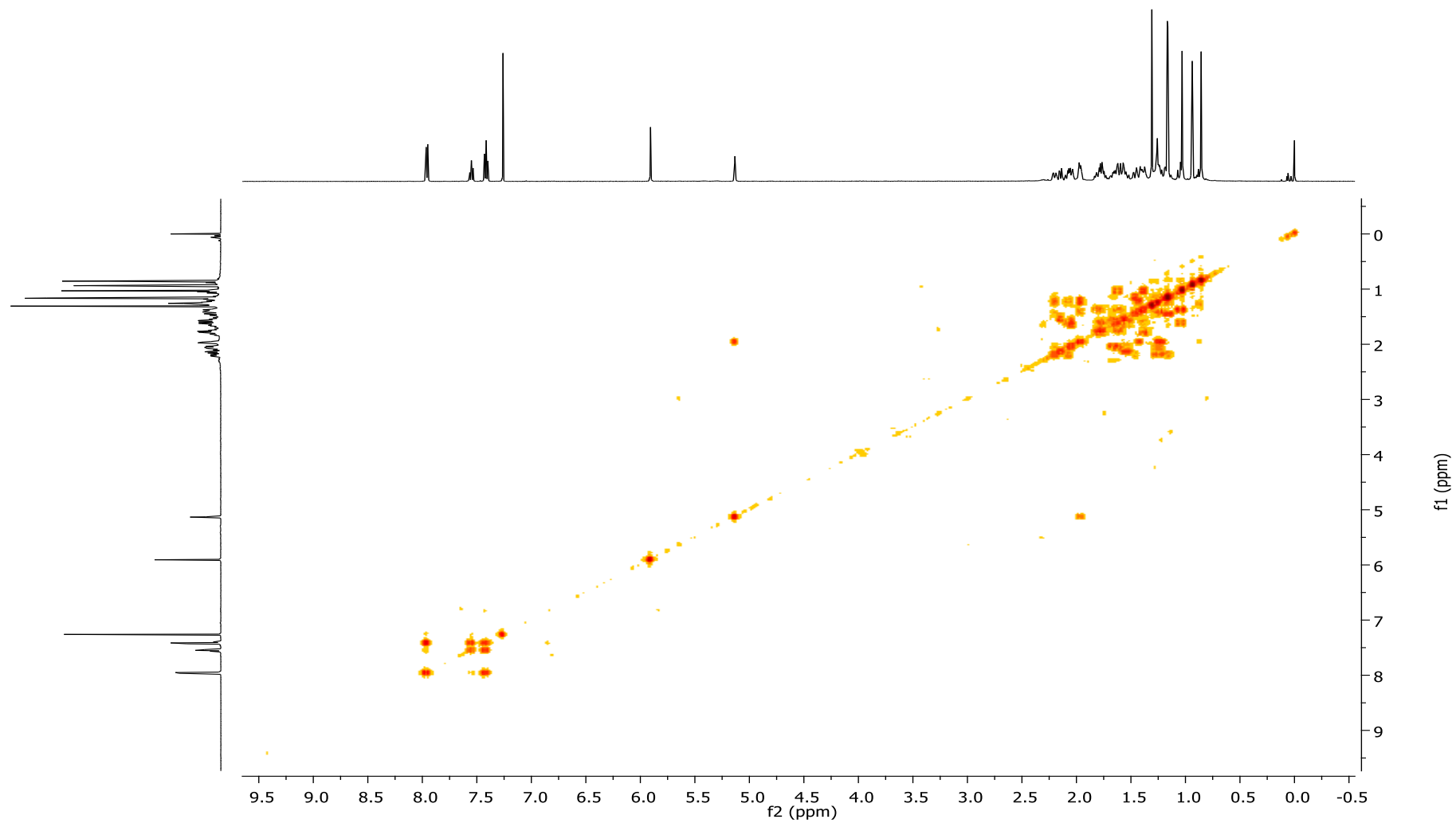


Figura S10: Espectro de RMN de COSY (500 MHz, CDCl_3) do composto **SL1** (expansão).

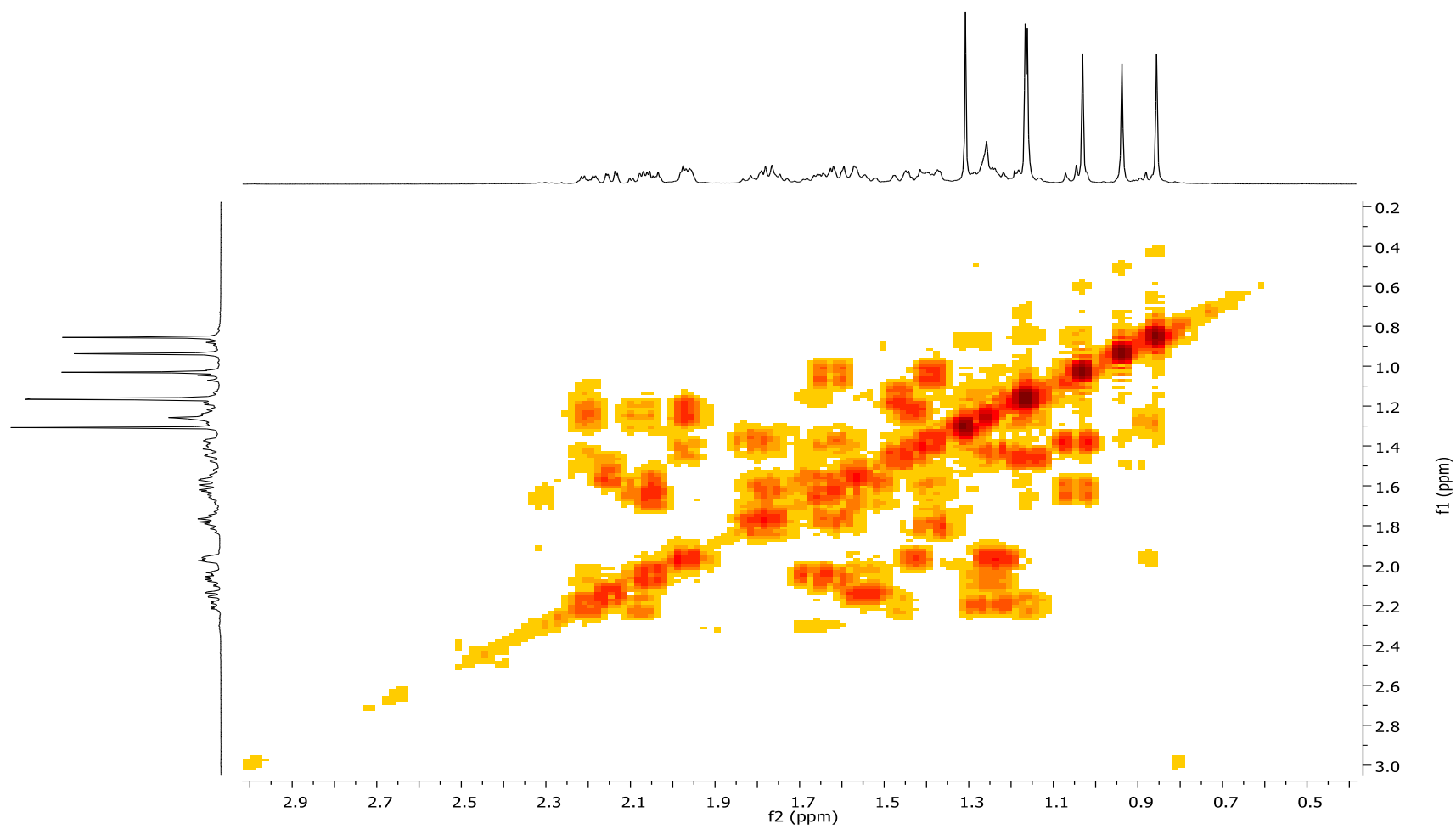


Figura S11: Espectro de RMN de HSQC (500 MHz, CDCl_3) do composto **SL1**.

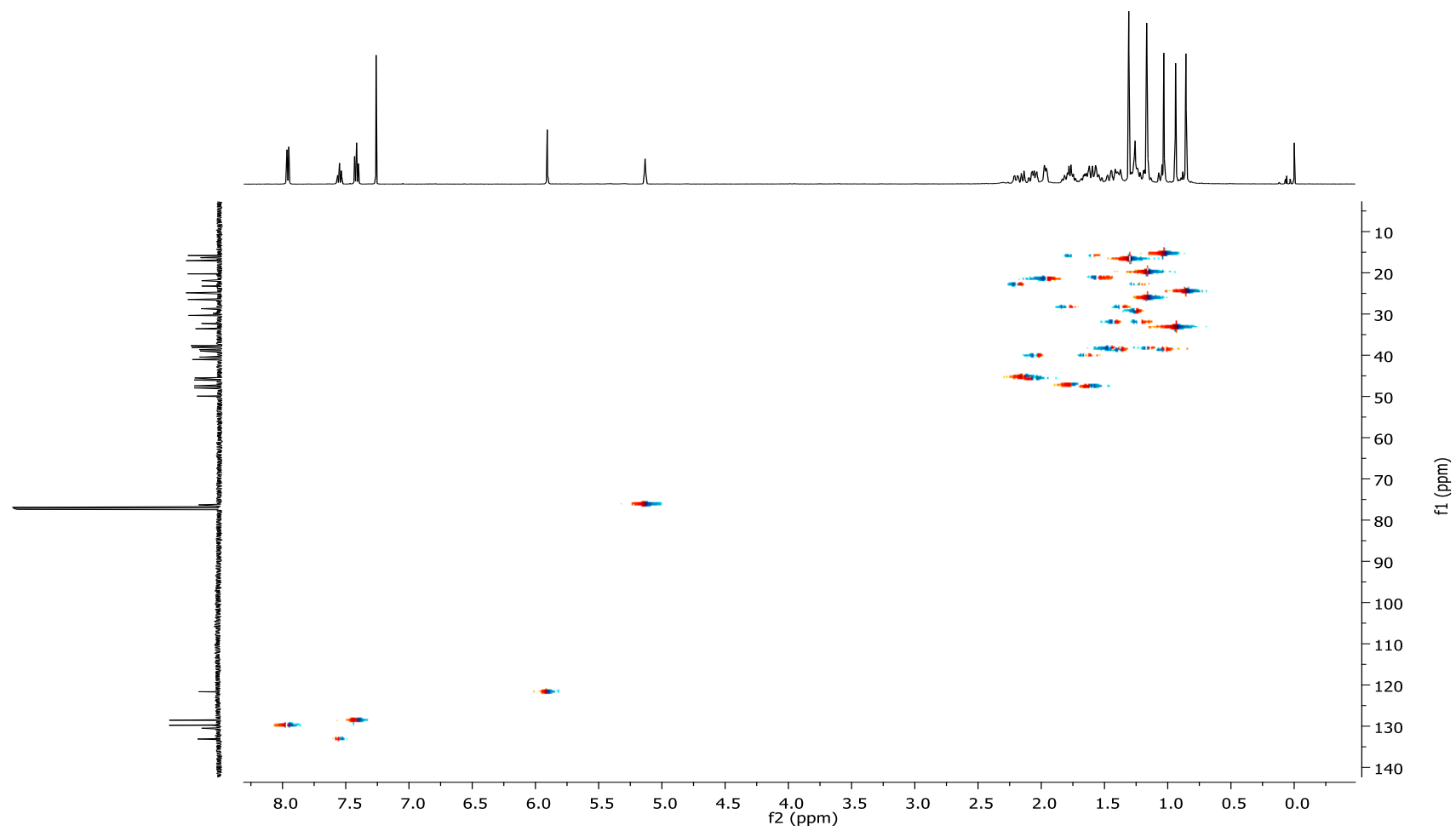


Figura S12: Espectro de RMN de HSQC (500 MHz, CDCl_3) do composto **SL1** (expansão).

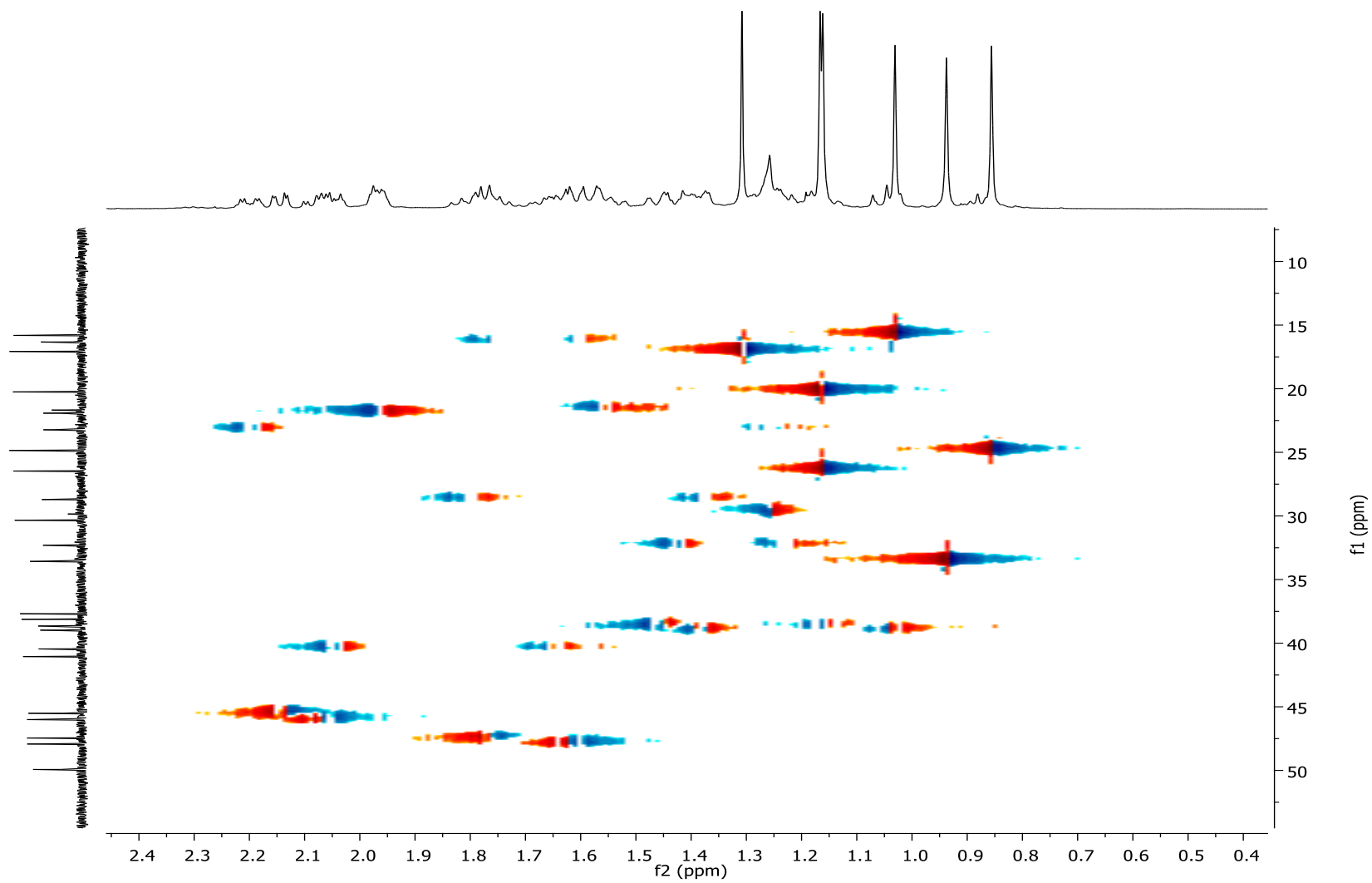


Figura S13: Espectro de RMN de HMBC (500 MHz, CDCl_3) do composto **SL1**.

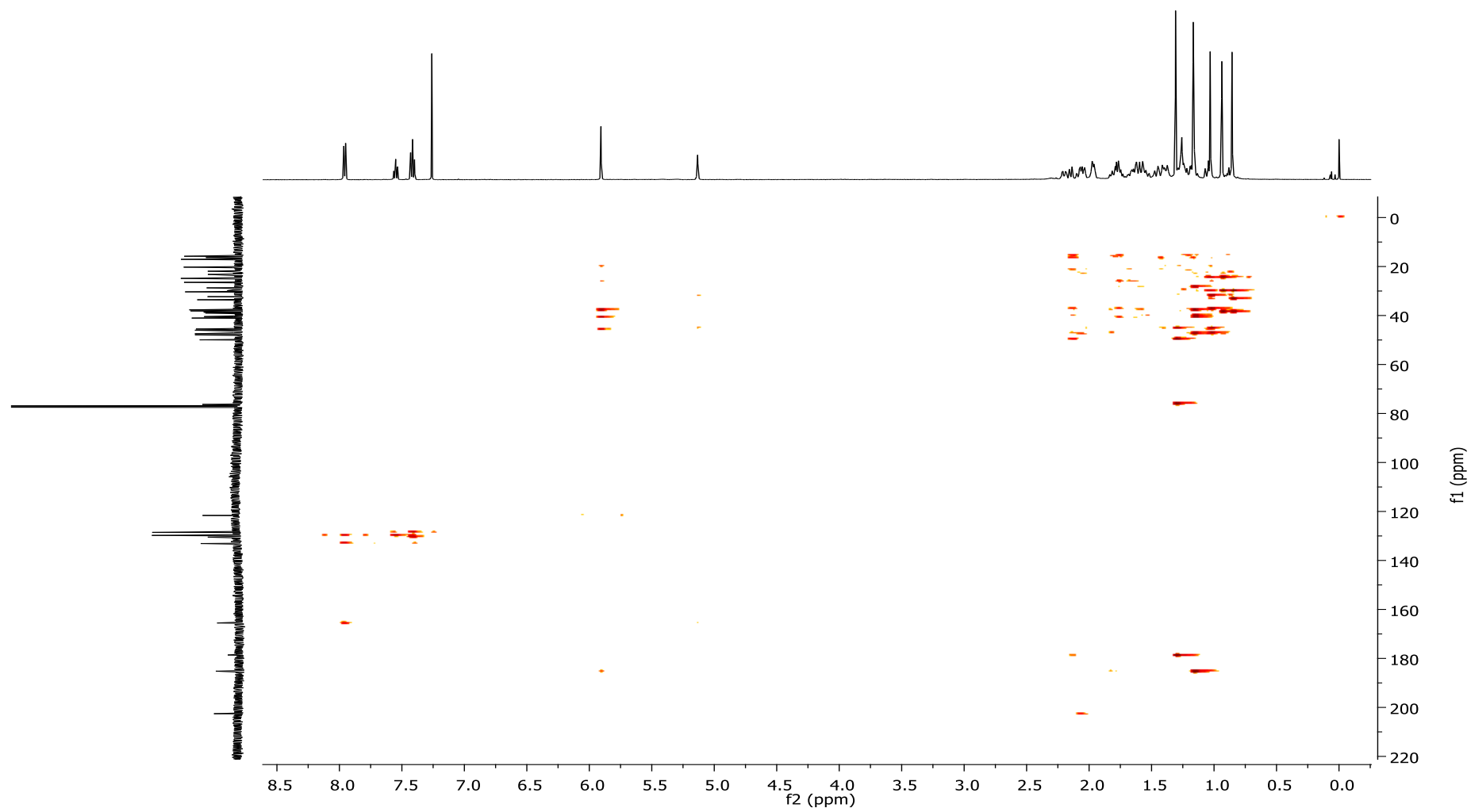


Figura S14: Espectro de RMN de HMBC (500 MHz, CDCl_3) do composto **SL1** (expansão).

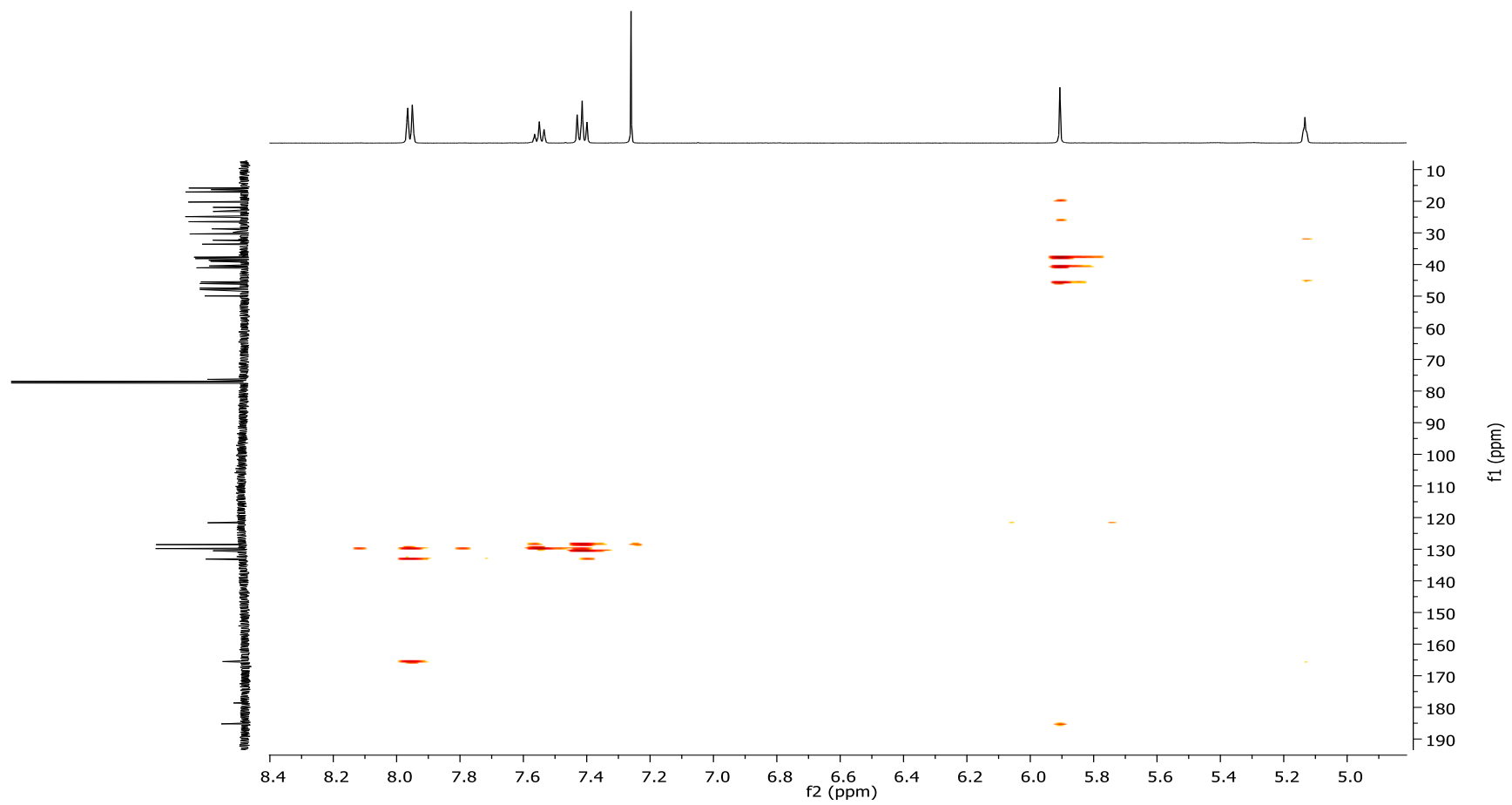


Figura S15: Espectro de RMN de HMBC (500 MHz, CDCl_3) do composto **SL1** (expansão).

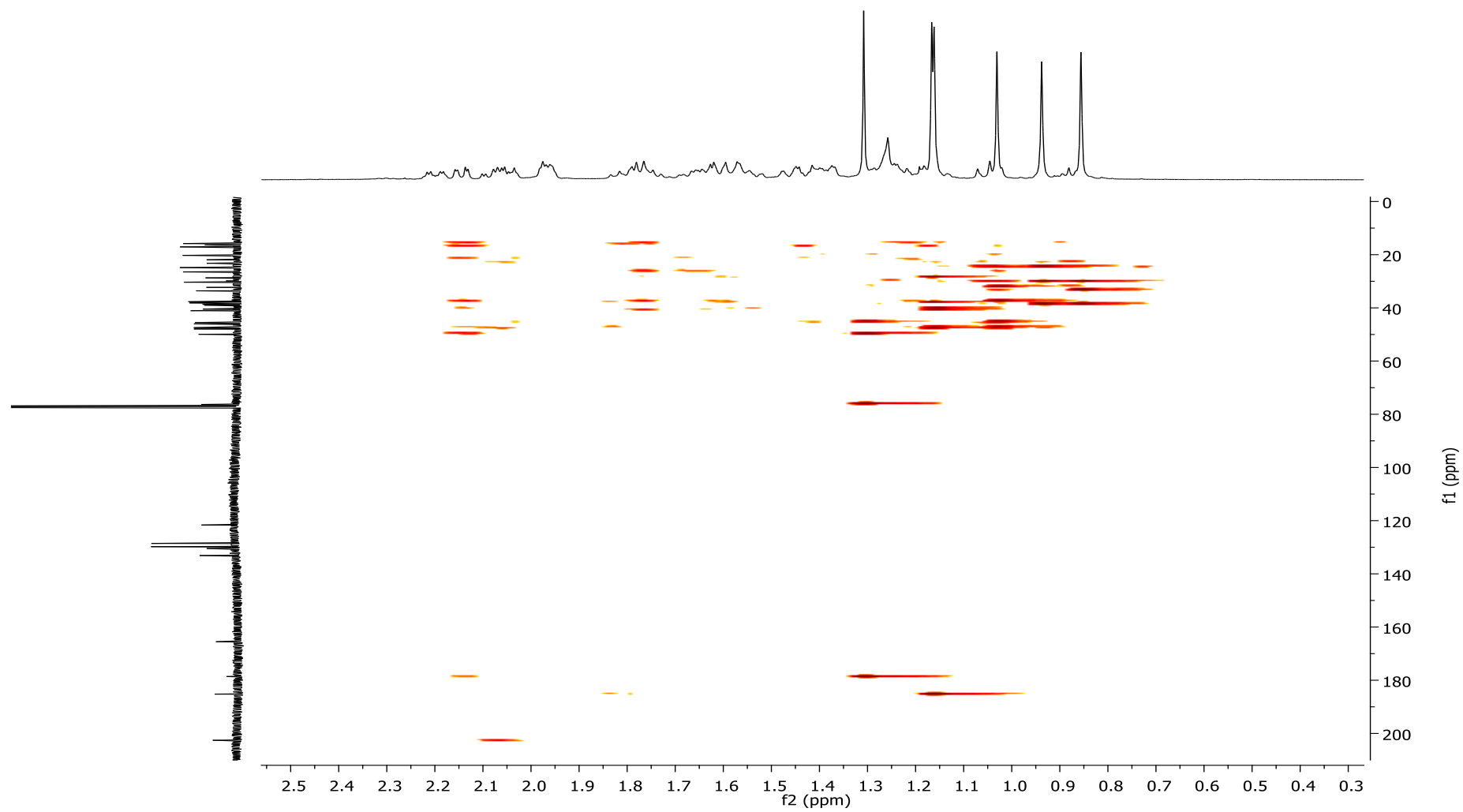


Figura S16: Espectro de RMN de HMBC (500 MHz, CDCl_3) do composto **SL1** (expansão).

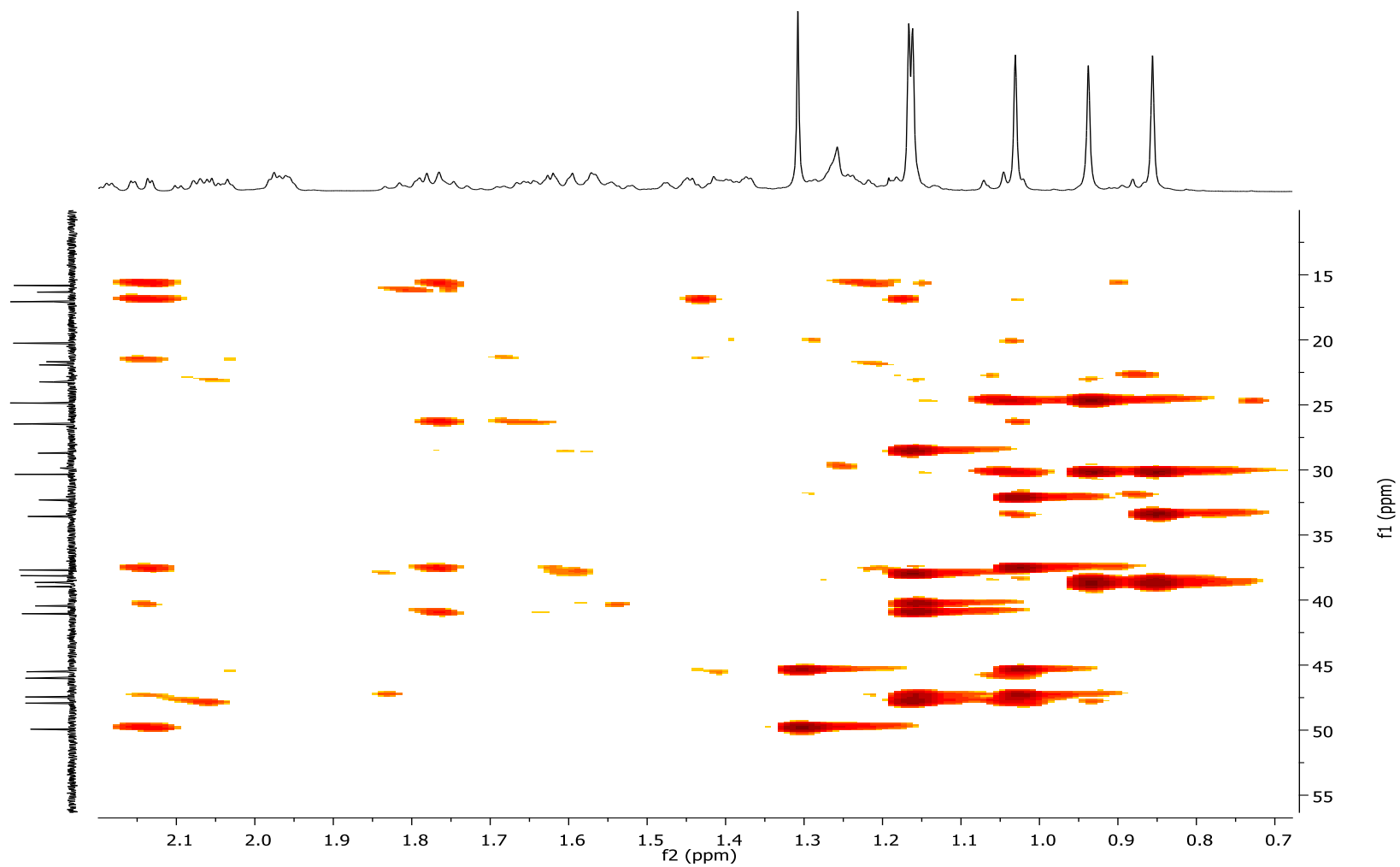


Figura S17: Espectro de RMN de NOESY (500 MHz, CDCl_3) do composto **SL1**.

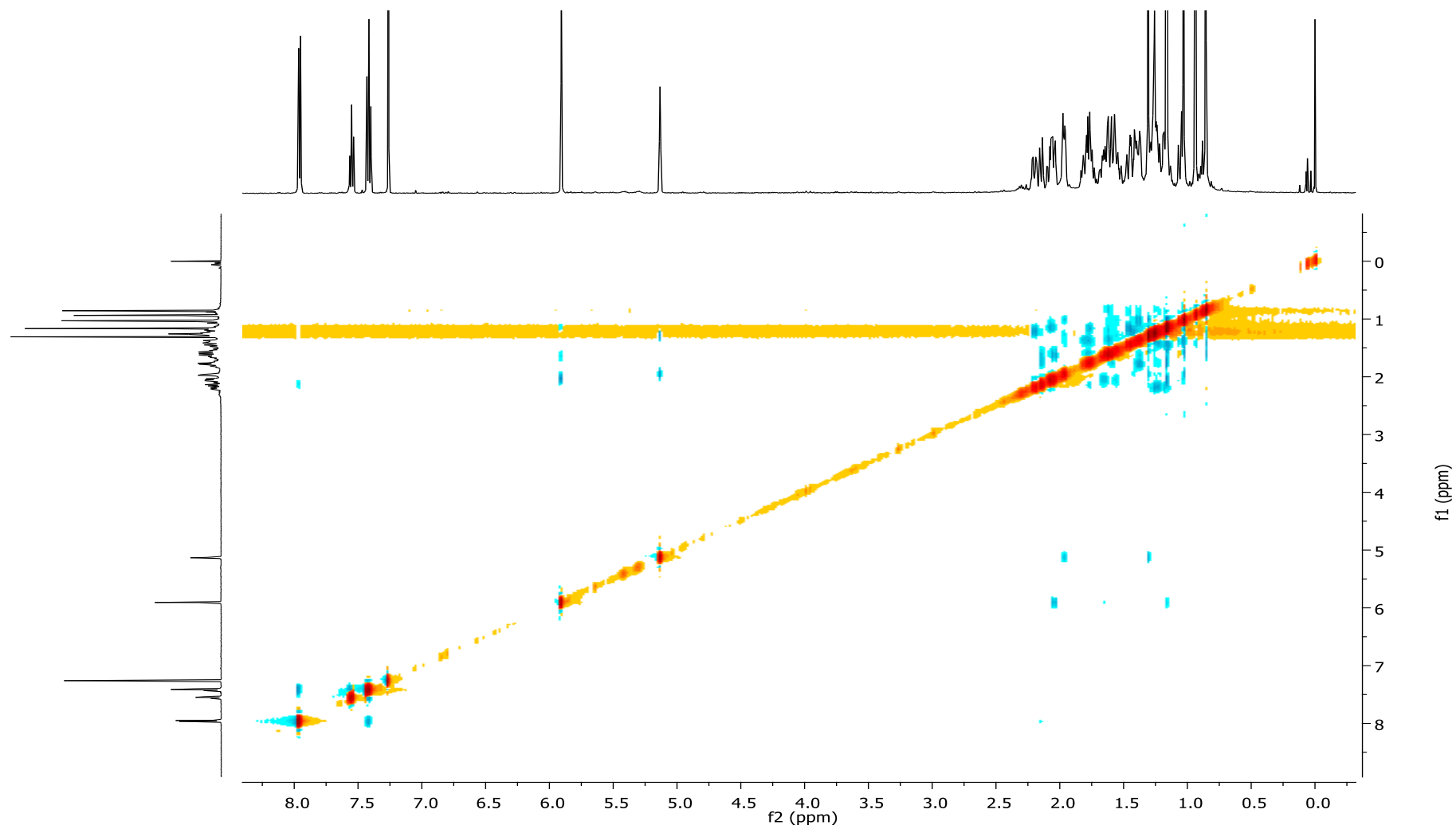


Figura S18: Espectro de RMN de NOESY (500 MHz, CDCl_3) do composto **SL1** (expansão).

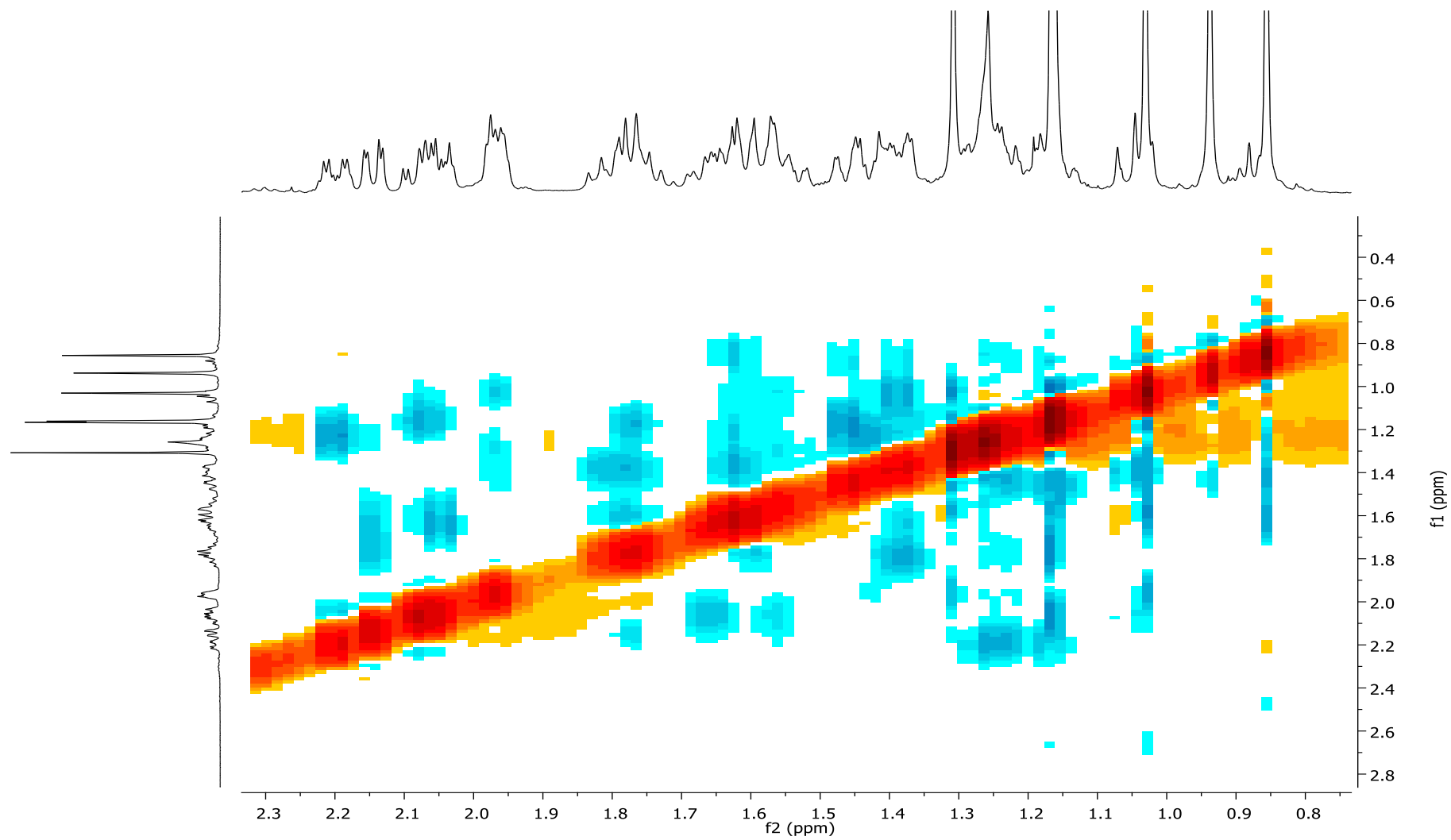


Figura S19: Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, C_6D_6) do composto **SL1**.

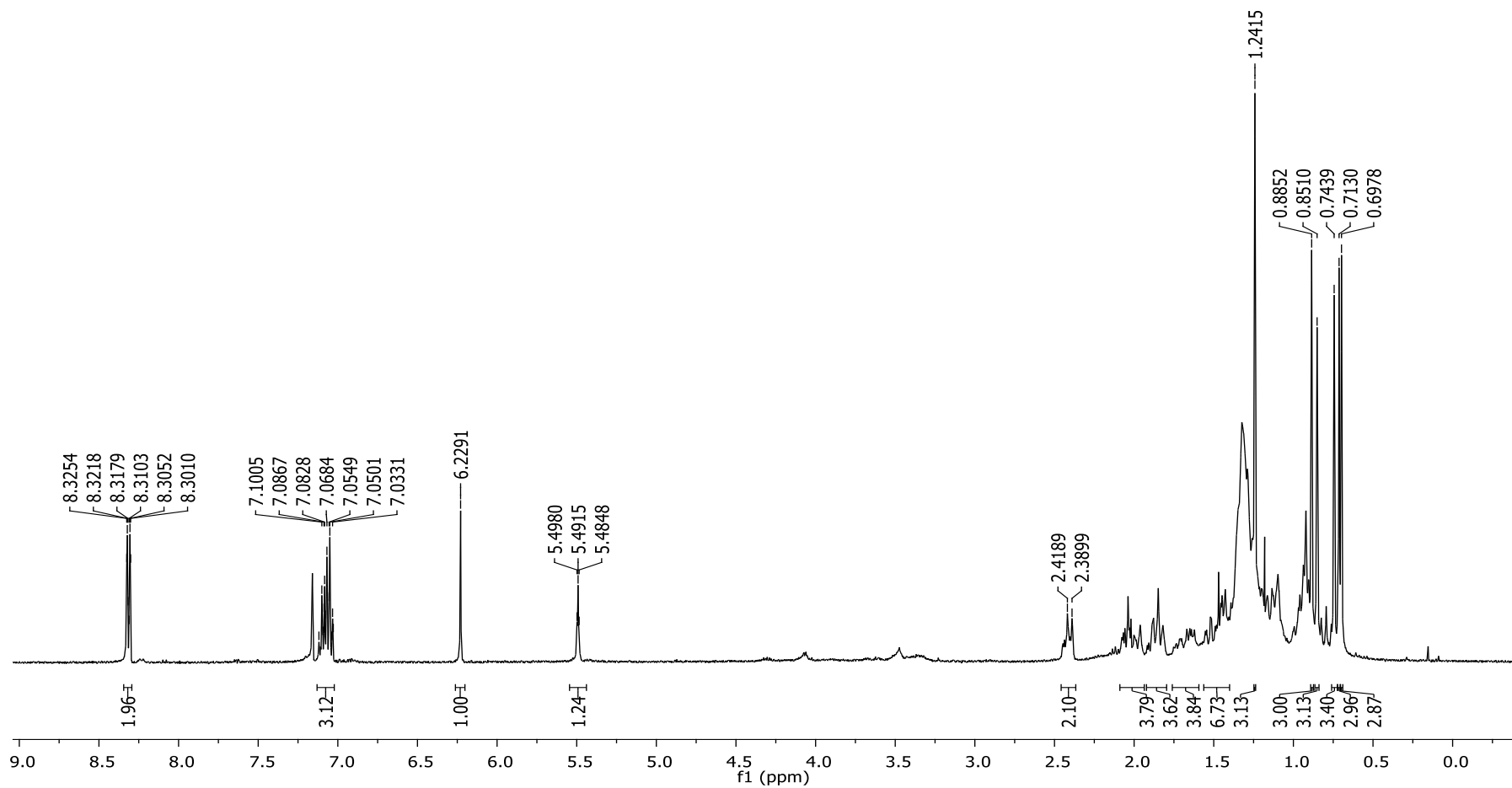


Figura S20: Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, C_6D_6) do composto **SL1** (expansão).

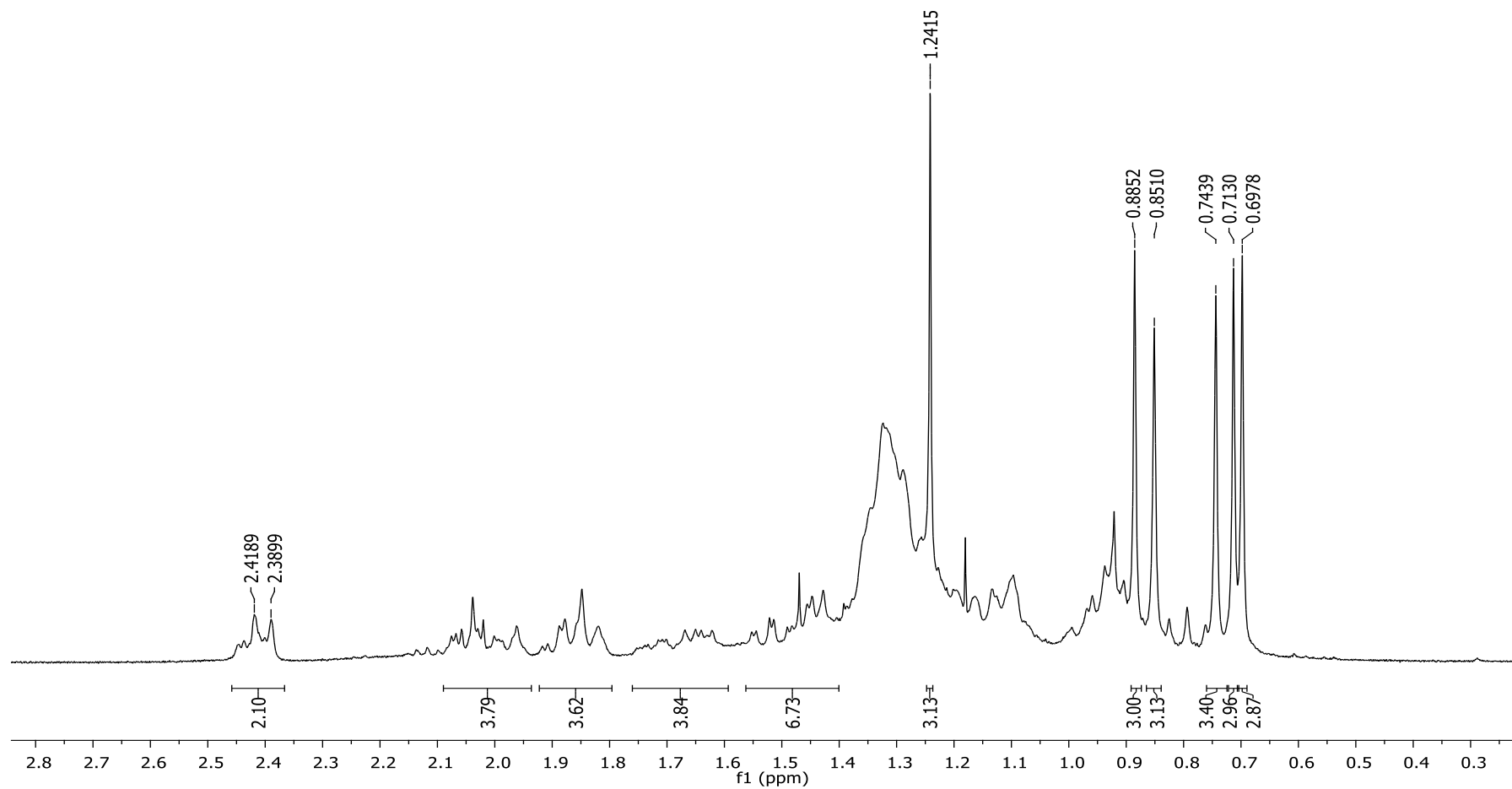


Figura S21: Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, C_6D_6) do composto **SL1**.

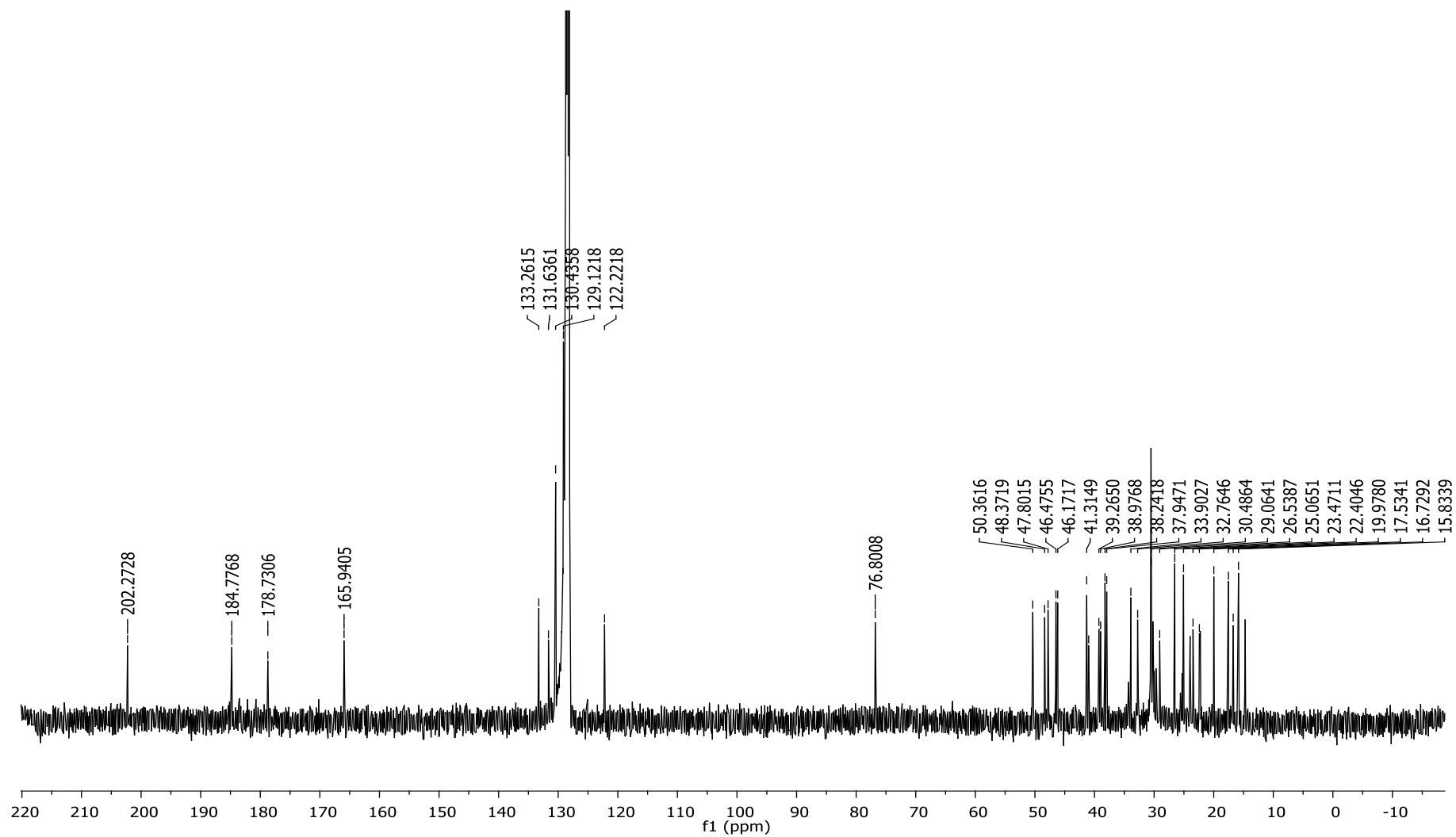


Figura S22: Espectro de RMN de HSQC (400 MHz, C₆D₆) do composto **SL1**.

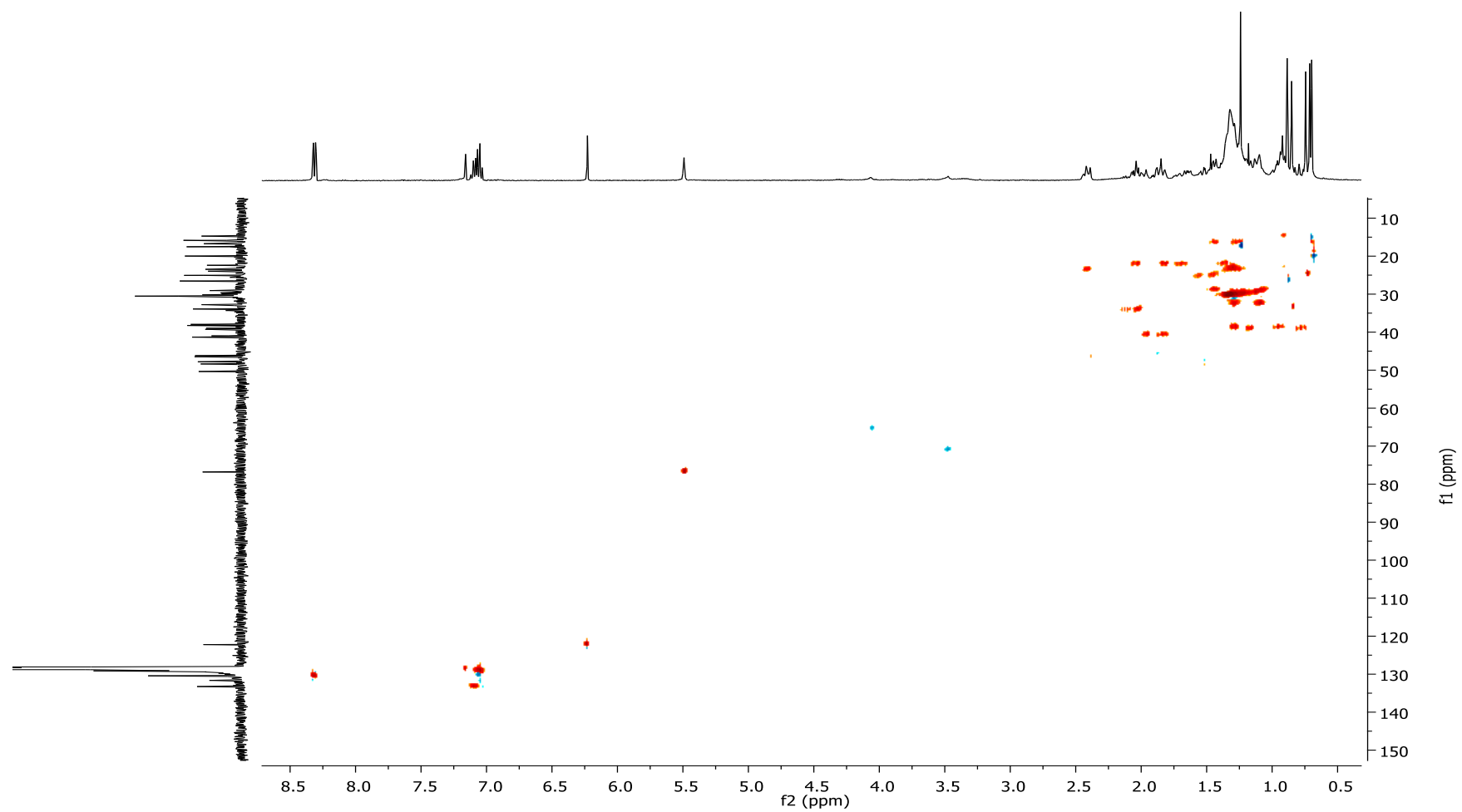


Figura S23: Espectro de RMN de HMBC (400 MHz, C₆D₆) do composto **SL1**.

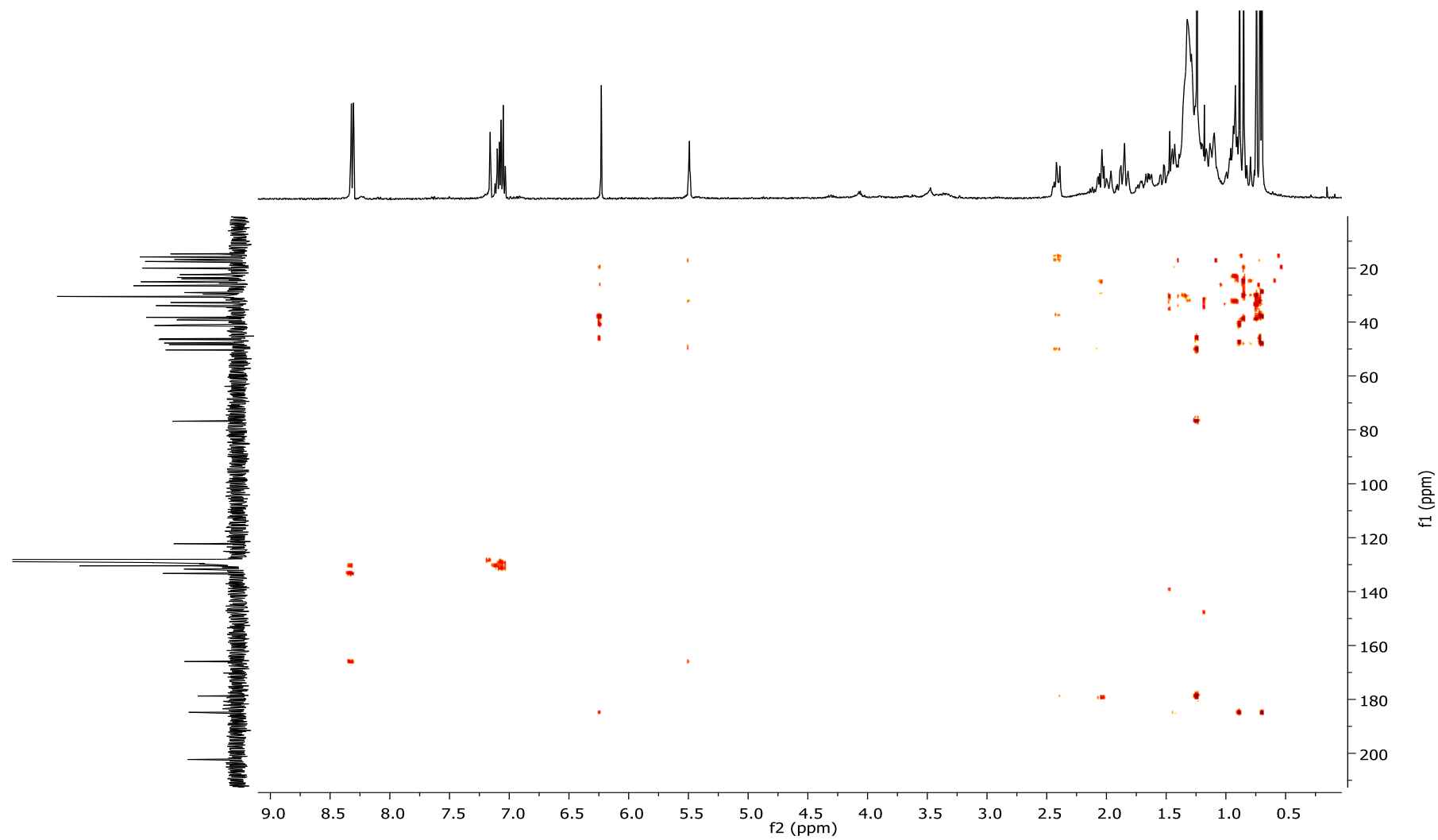


Figura S24: Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, $\text{C}_3\text{D}_6\text{O}$) do composto **SL1**.

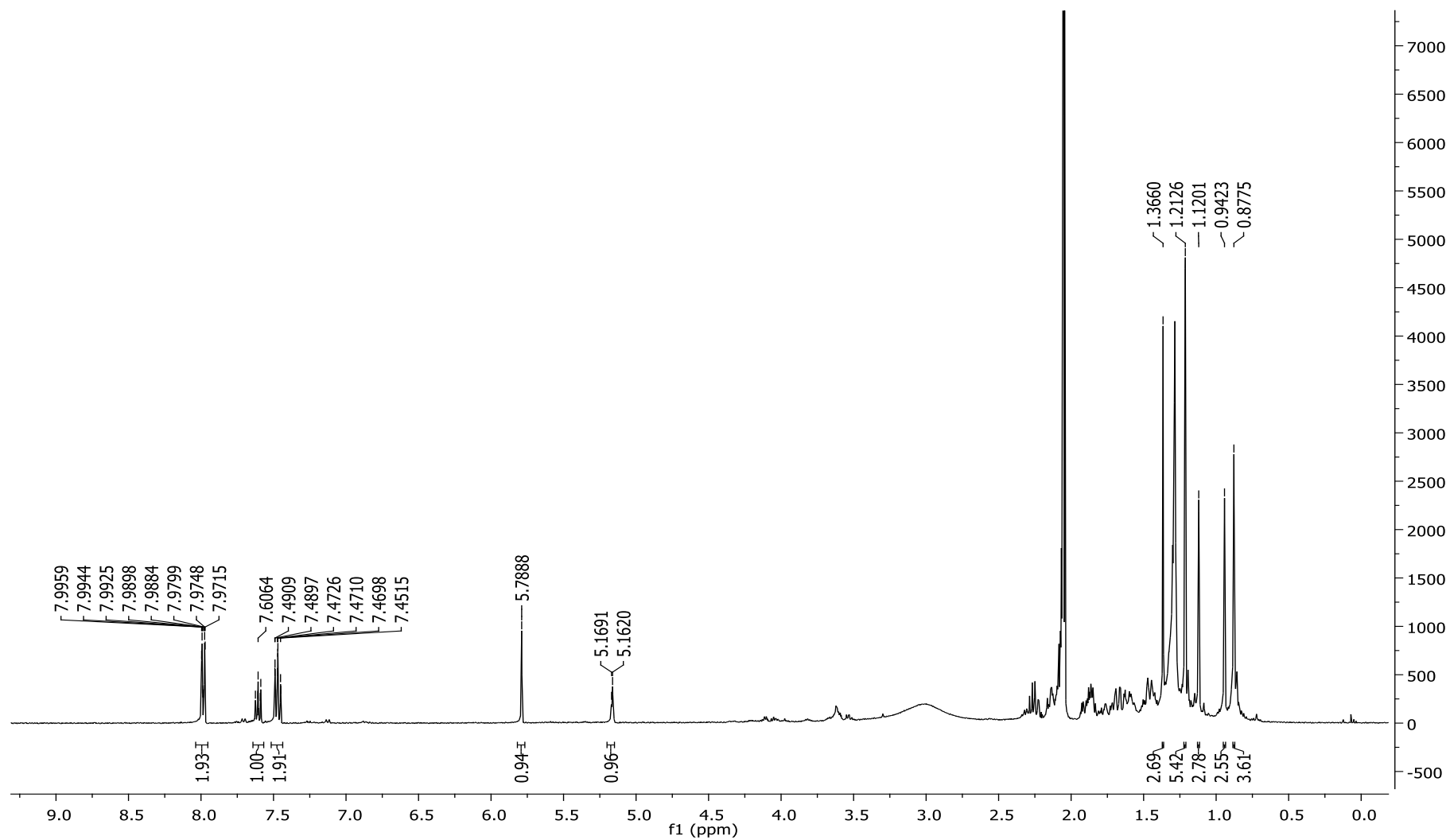


Figura S25: Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, $\text{C}_3\text{D}_6\text{O}$) do composto **SL1**.

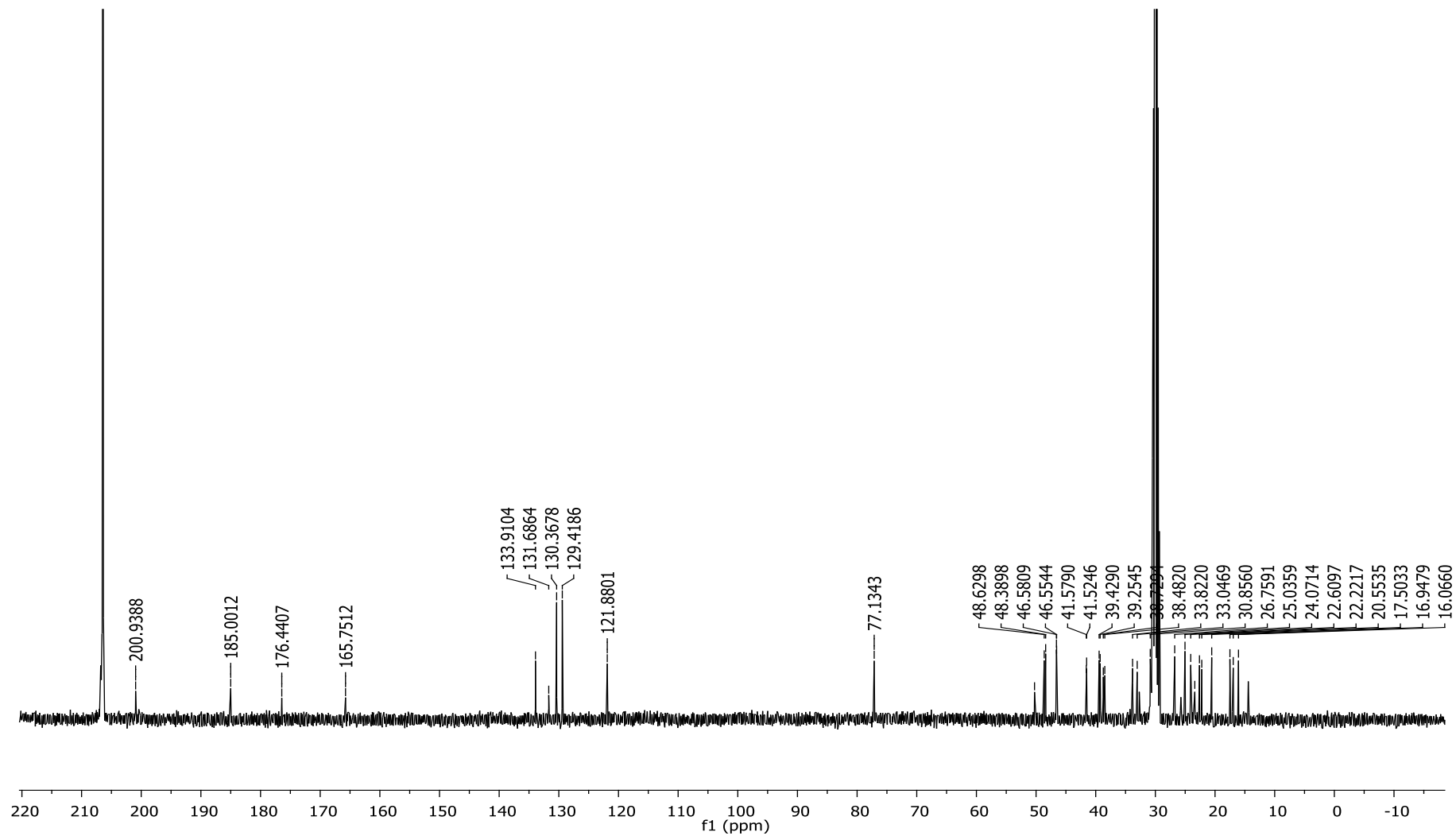


Figura S26: Espectro de RMN de HSQC (400 MHz, C₃D₆O) do composto **SL1**.

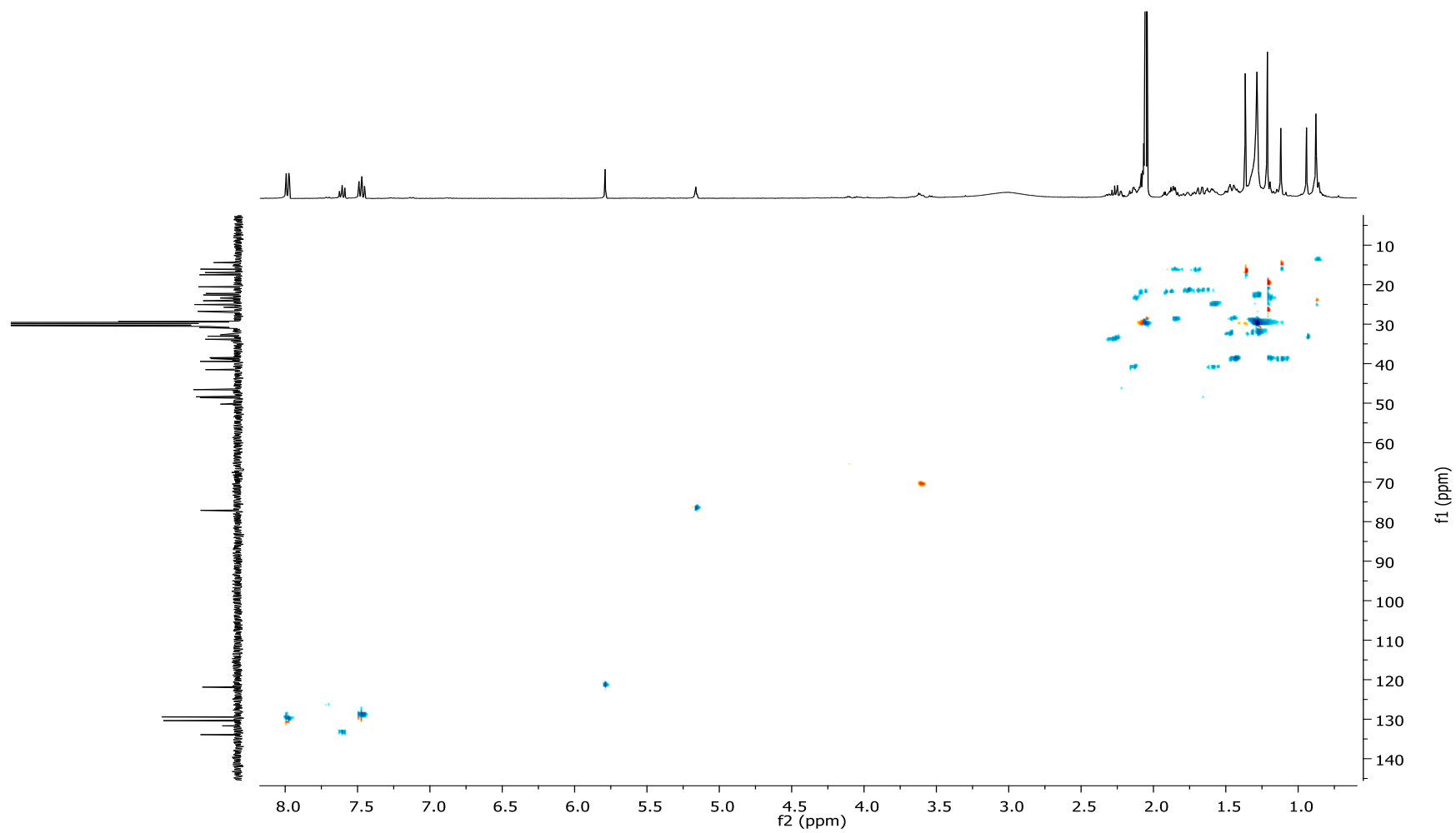


Figura S27: Espectro de RMN de HMBC (400 MHz, C₃D₆O) do composto **SL1**.

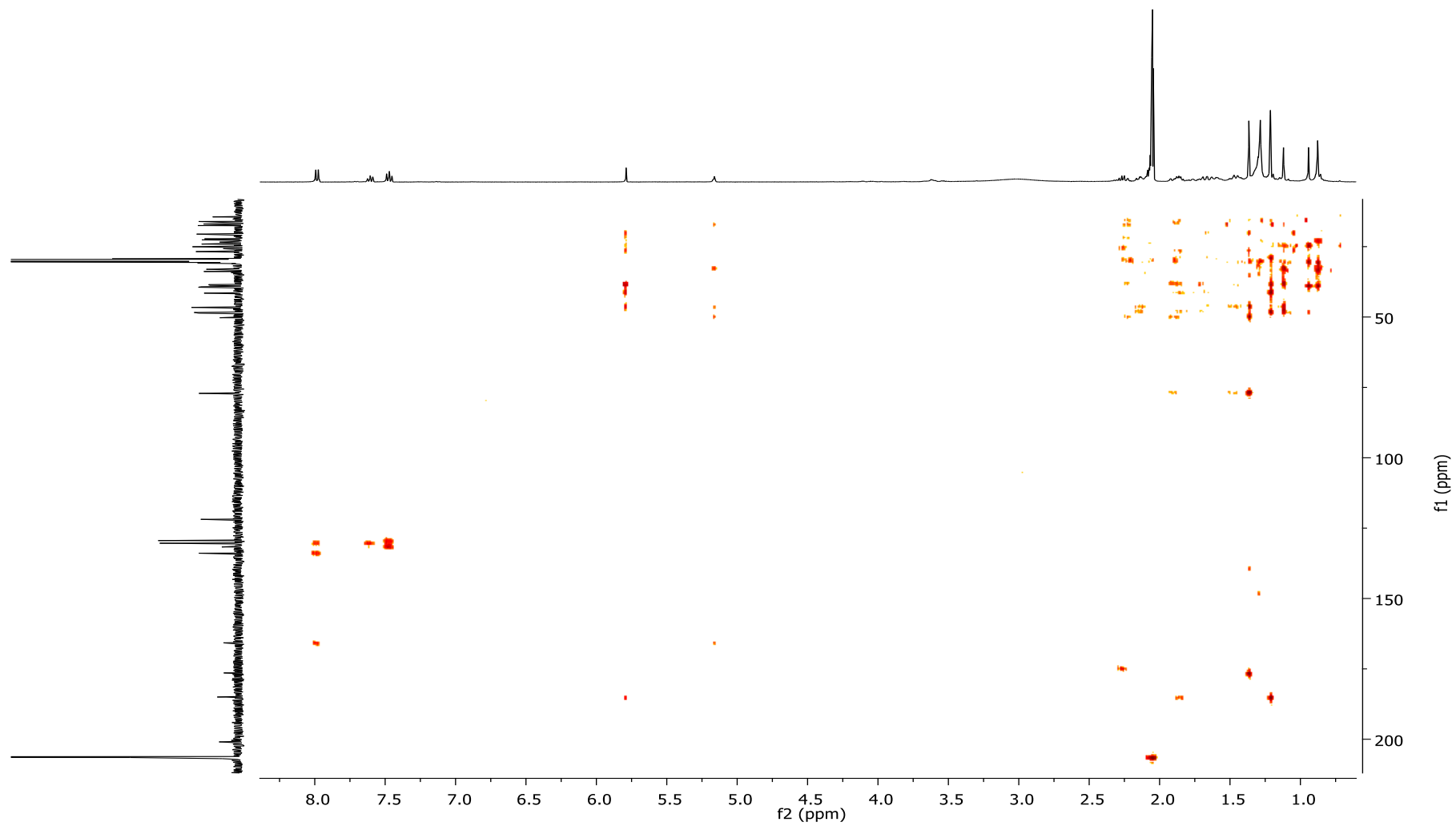


Figura S28: Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CD_3OD) do composto **SL1**.

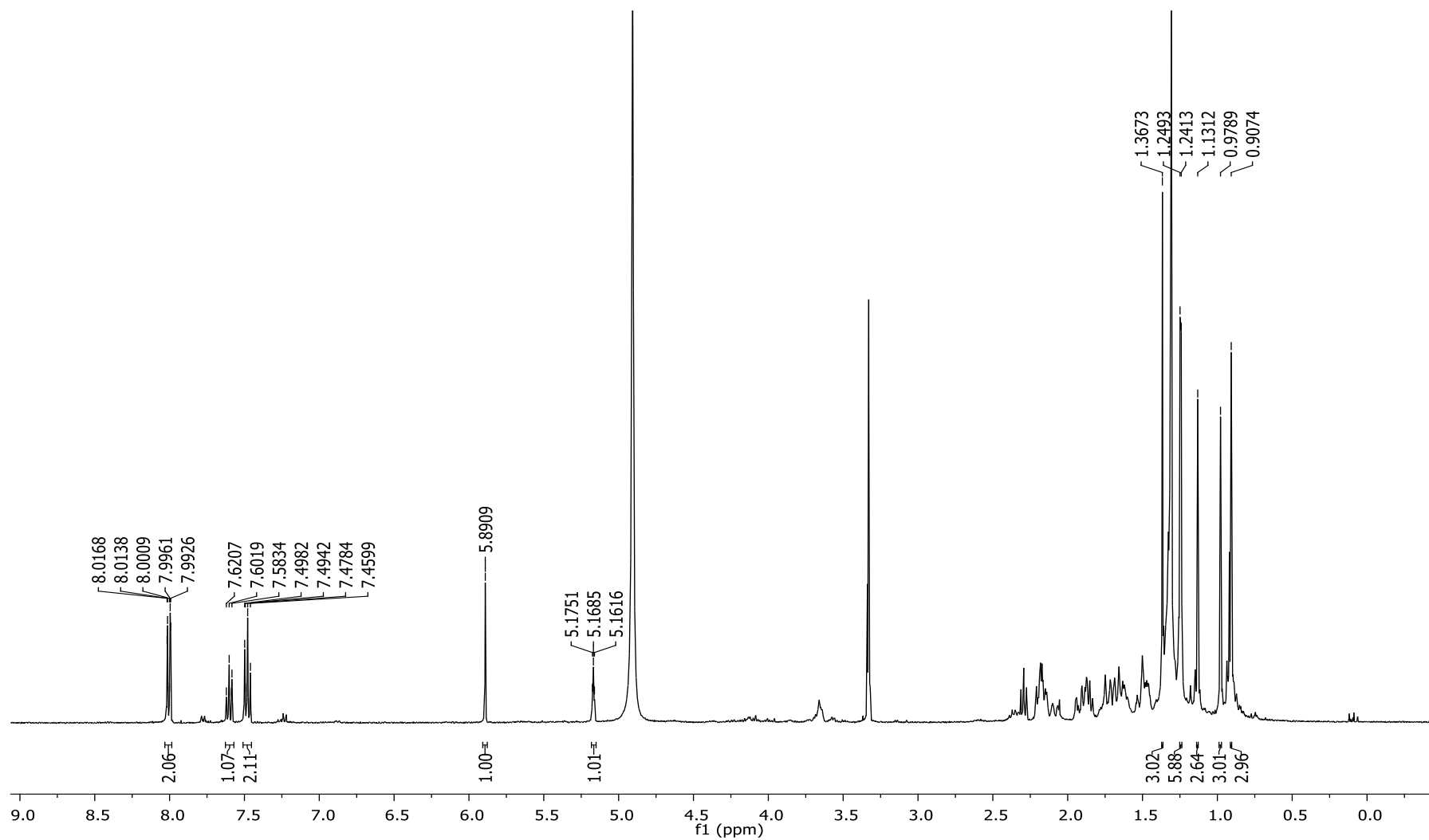


Figura S29: Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, CD_3OD) do composto **SL1**.

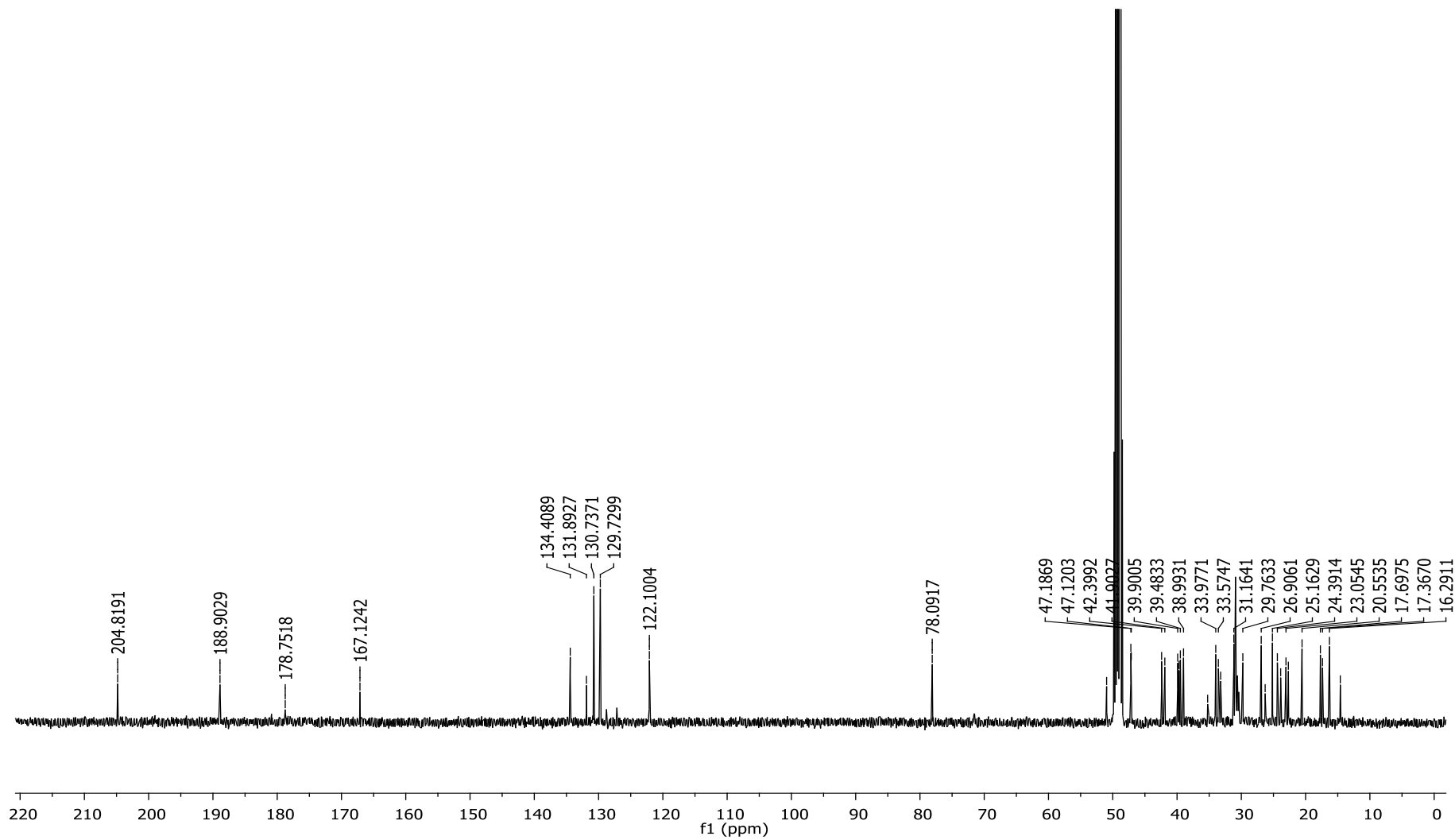


Figura S30: Espectro de RMN de HSQC (400 MHz, CD₃OD) do composto **SL1**.

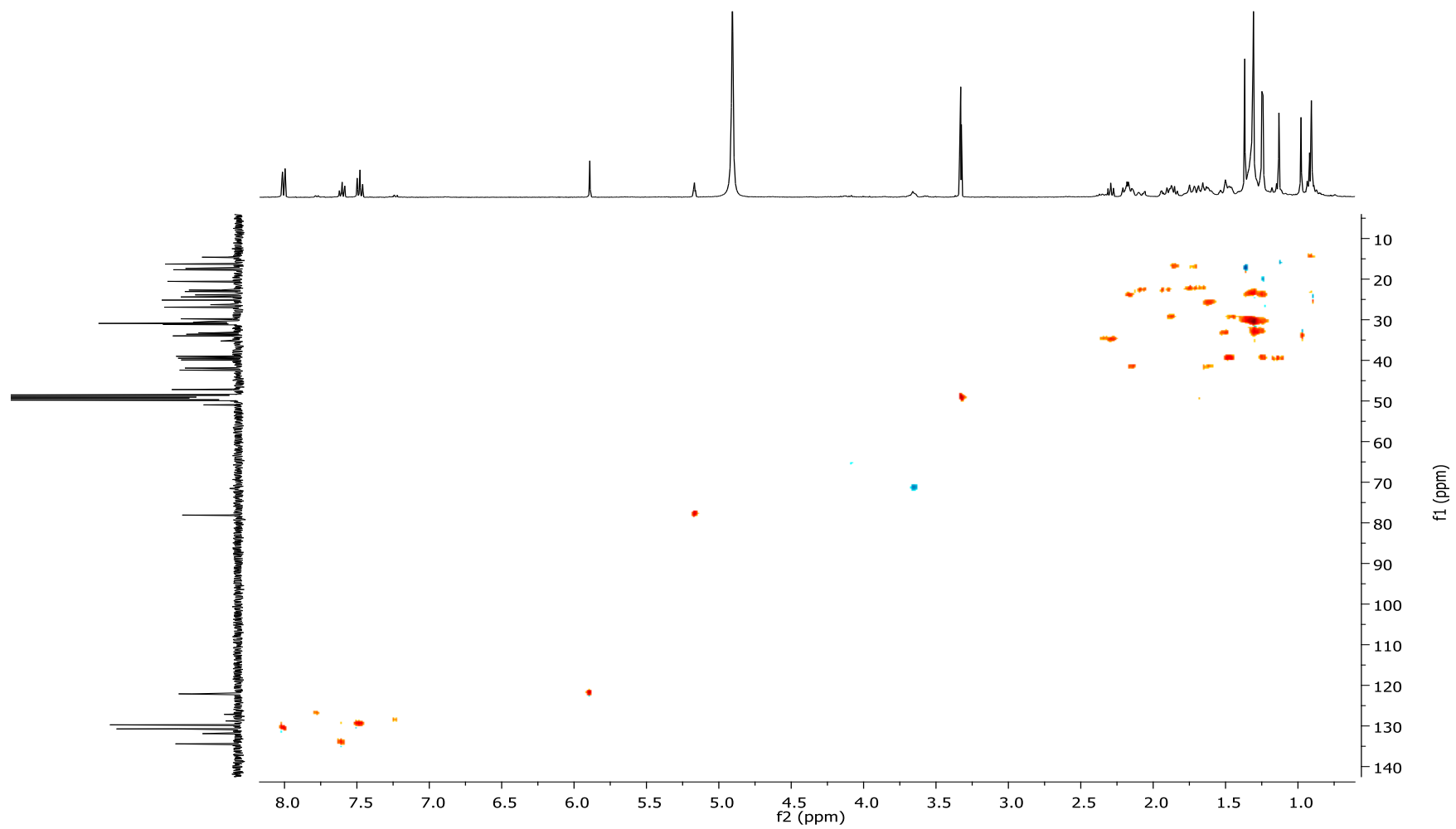


Figura S31: Espectro de RMN de HMBC (400 MHz, CD₃OD) do composto **SL1**.

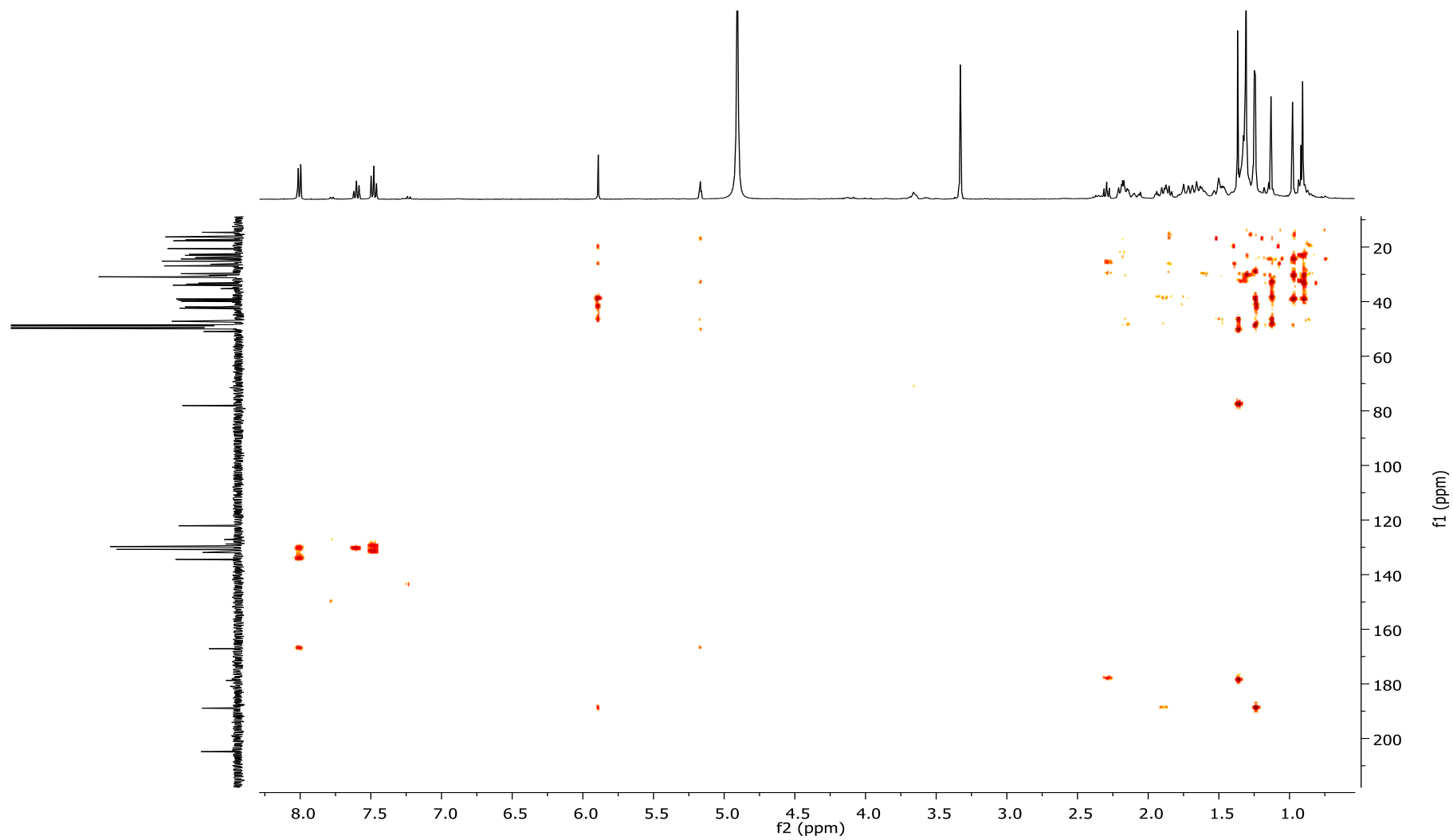


Tabela S2: Dados espectroscópicos de RMN de ^{13}C (100 e 125 MHz) do composto **SL1** em diferentes solvents deuterados.

posição	SL1^{b,c}	SL1^{a,d}	SL1^{a,e}	SL1^{a,f}
	δ_{C}	δ_{C}	δ_{C}	δ_{C}
1	32.3	32.7	33.0	33.6
2	21.9	22.4	21.6	23.0
3	76.3	76.8	77.1	78.0
4	49.9	50.3	50.2	50.9
5	45.5	46.2	46.5	47.1
6	21.6	22.2	22.2	22.7
7	40.5	40.9	41.5	41.9
8	41.0	41.3	41.6	42.4
9	47.4	47.8	48.4	48.8
10	37.6	37.9	38.5	39.0
11	16.3	16.7	16.9	17.4
12	28.7	29.0	29.3	29.7
13	38.1	38.2	38.7	39.5
14	185.2	184.7	185.0	188.9
15	121.6	122.2	121.9	121.6
16	202.5	202.3	200.9	204.8
17	46.0	46.5	46.5	47.2
18	47.9	48.3	48.6	49.3
19	38.9	39.2	39.4	39.9
20	30.3	30.7	30.8	31.2
21	38.6	38.9	39.2	39.7
22	23.2	23.5	24.0	24.3
23	178.6	178.7	176.4	178.7
24	17.0	17.5	17.5	17.7
25	15.8	15.8	16.0	16.3
26	26.4	26.5	26.7	26.9
27	20.2	20.0	20.5	20.5
29	33.5	33.9	33.8	34.0
30	24.8	25.0	25.0	25.1
1'	130.4	131.6	131.7	131.9
2'	129.7	130.4	130.3	130.7
3'	128.5	129.1	129.4	129.7
4'	133.1	133.2	133.9	134.4
5'	128.5	129.1	129.4	129.7
6'	129.7	130.4	130.3	130.7
7'	165.5	165.9	165.7	167.1

^aRMN de ^{13}C , 100 MHz. ^bRMN de ^{13}C NMR 125 MHz. ^c CDCl_3 . ^d C_6D_6 . ^e $\text{C}_3\text{D}_6\text{O}$. ^f CD_3OD

Tabela S3: Deslocamento químico experimental de RMN de ^{13}C do composto **SL1** e respectivas predições por DFT (**PRED 01-05**) de vários conformeros. Entre parênteses estão os valores de distribuição de Boltzmann.

	SL1	PRED01 (0.852)	PRED02 (0.144)	PRED03 (0.002)	PRED04 (0.001)	PRED05 (0.001)	Deslocamento químico médio (Boltzmann)
position	δ_c	δ_c	δ_c	δ_c	δ_c	δ_c	δ_c
1	32.3	32.3	32.6	36.4	36.3	36.5	32.4
2	21.9	21.8	21.9	23.1	22.5	23.1	21.8
3	76.3	76.6	77.7	76.2	77.4	76.2	76.8
4	49.9	48.6	49.5	48.8	48.5	48.8	48.7
5	45.5	45.5	44.9	46.5	47.5	46.5	45.4
6	21.6	21.4	23.0	22.2	22.7	22.2	21.6
7	40.5	39.4	39.6	38.5	38.4	38.8	39.4
8	41.0	40.6	40.8	40.5	40.5	40.7	40.6
9	47.4	47.5	47.7	47.2	46.9	47.1	47.5
10	37.6	37.3	37.5	36.6	36.5	36.5	37.3
11	16.3	18.2	18.2	17.2	17.1	17.1	18.2
12	28.7	29.5	29.4	29.2	29.3	29.3	29.5
13	38.1	38.0	38.1	38.2	38.2	38.2	38.0
14	185.2	182.7	182.8	182.5	182.7	181.9	182.7
15	121.6	122.9	122.9	123.0	123.0	123.0	122.9
16	202.5	199.4	199.5	199.5	199.5	199.4	199.4
17	46.0	44.9	45.0	44.8	44.7	44.7	44.9
18	47.9	47.3	47.2	47.2	47.2	47.2	47.3
19	38.9	38.1	38.1	38.1	38.1	38.0	38.1
20	30.3	29.1	29.1	29.1	29.1	29.1	29.1
21	38.6	37.6	37.6	37.7	37.6	37.7	37.6
22	23.2	24.0	24.0	23.8	23.8	23.7	24.0
23	178.6	175.2	176.3	175.4	176.5	175.4	175.4
24	17.0	17.5	18.4	20.0	18.8	20.0	17.6
25	15.8	16.7	16.7	21.7	21.3	21.8	16.7
26	26.4	27.2	27.1	25.7	25.9	25.6	27.2
27	20.2	21.3	21.4	21.3	21.1	21.3	21.3
29	33.5	33.3	33.6	33.4	33.4	33.3	33.3
30	24.8	24.6	24.6	24.4	24.6	24.4	24.6
1'	130.4	129.5	129.5	129.0	129.0	129.0	129.5
2'	129.7	130.5	130.5	130.5	130.4	130.5	130.5
3'	128.5	128.6	128.6	128.6	128.4	128.5	128.6
4'	133.1	132.7	132.7	132.7	132.7	132.7	132.7
5'	128.5	128.6	128.6	128.6	128.4	128.5	128.6
6'	129.7	130.5	130.5	130.5	130.4	130.5	130.5
7'	165.5	165.3	165.3	166.3	166.2	166.3	165.3

Figura S32: Espectro de IES-EMAR de **SL1** ($[M + H]$, modo de ionização positivo).

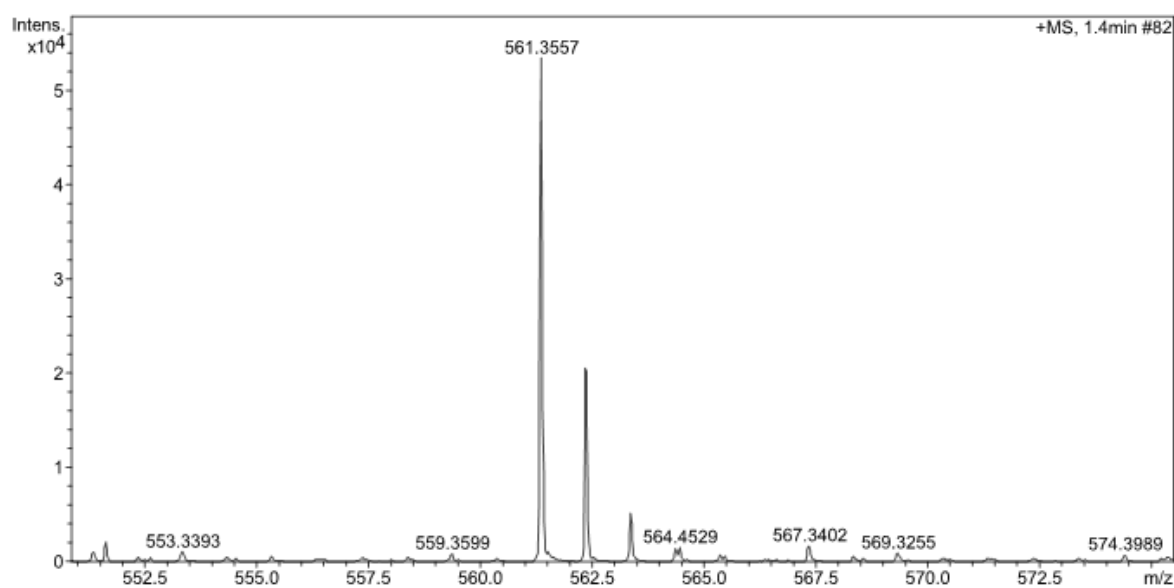


Figura S33: Espectro de CLAE-IESMS/MS de **SL1** ($[M + H]$, modo de ionização positivo).

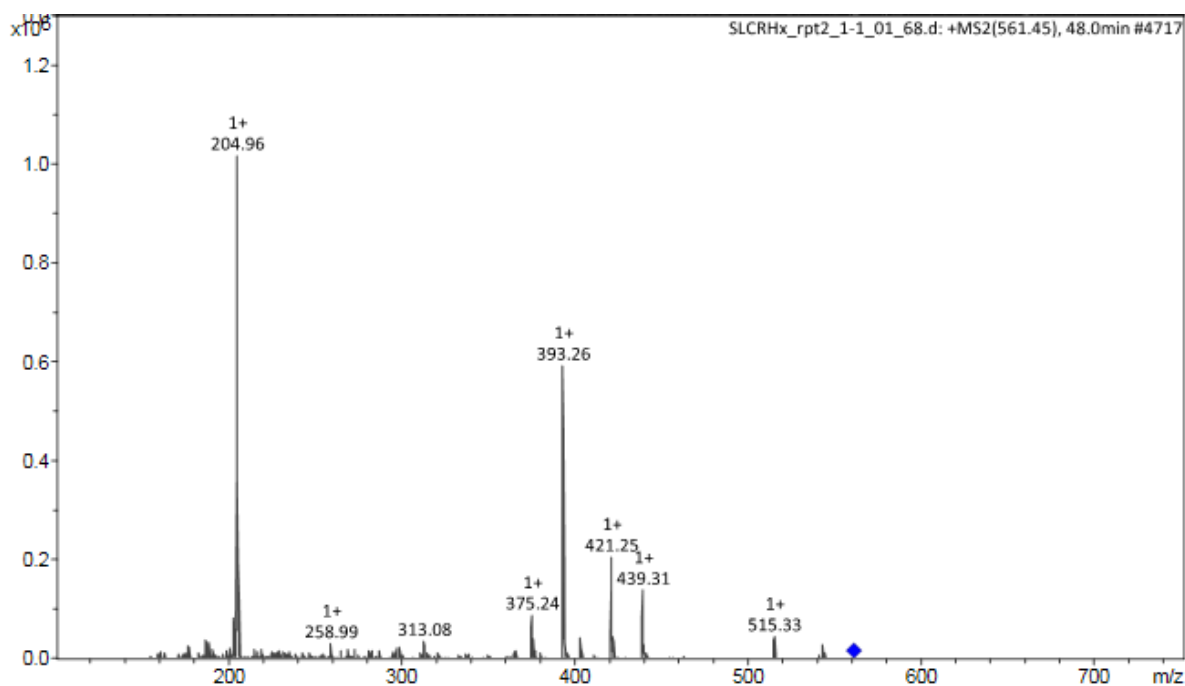


Figura S34: Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) do composto **SL2**.

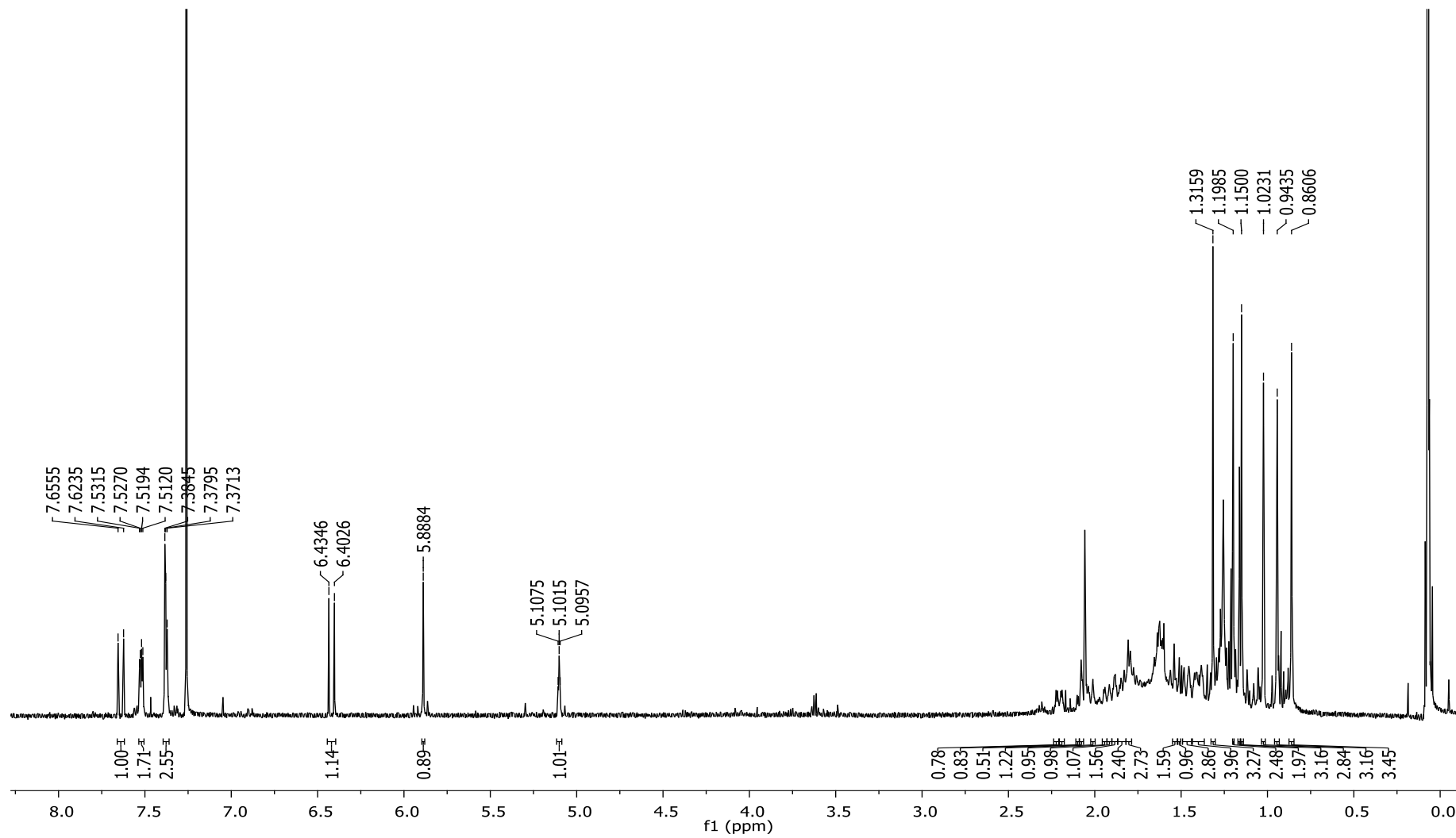


Figura S35: Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) do composto **SL2** (expansão).

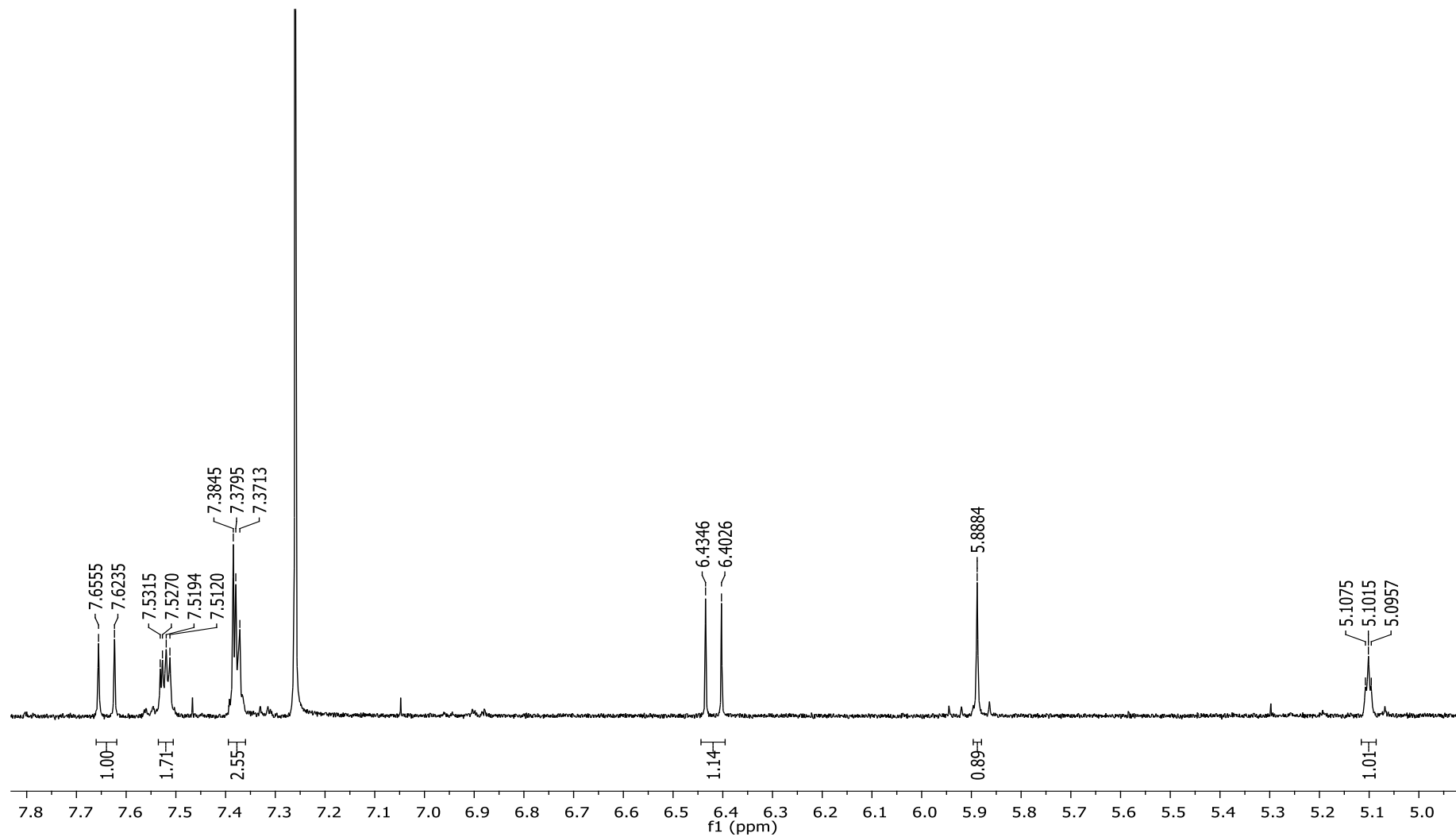


Figura S36: Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) do composto **SL2** (expansão).

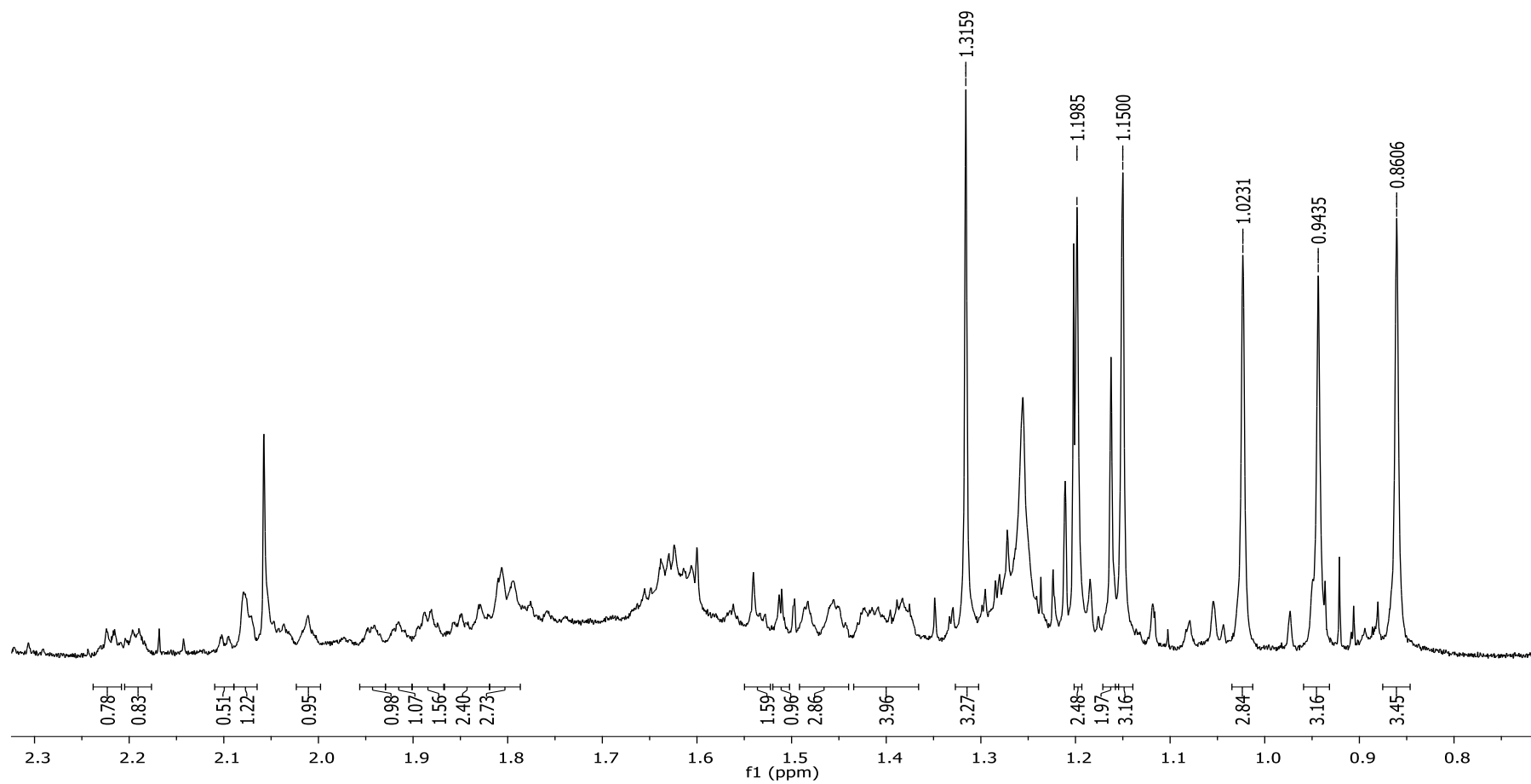


Figura S37: Espectro de RMN de ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) do composto **SL2**.

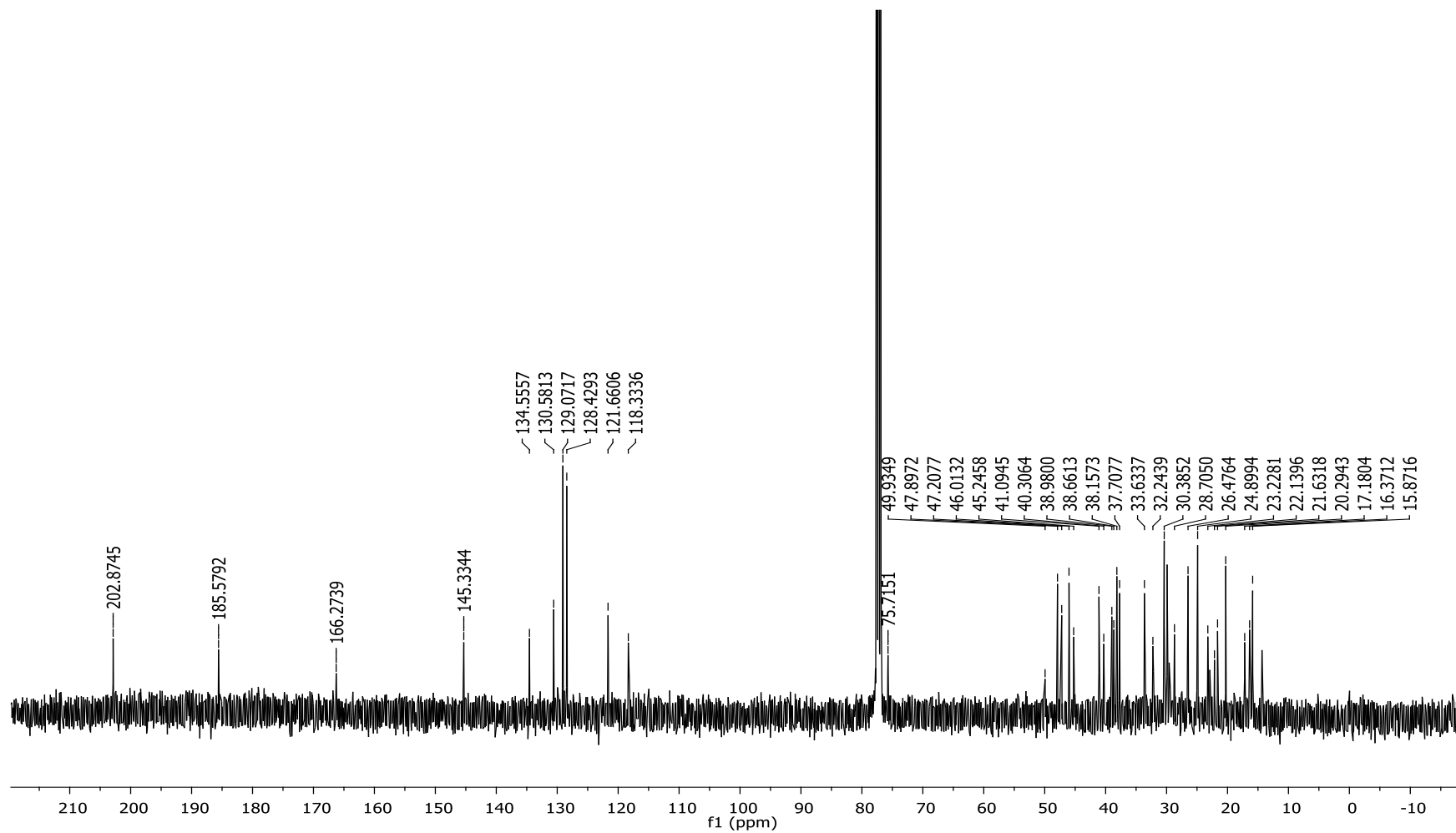


Figura S38: Espectro de RMN de COSY (500 MHz, CDCl_3) do composto **SL2**.

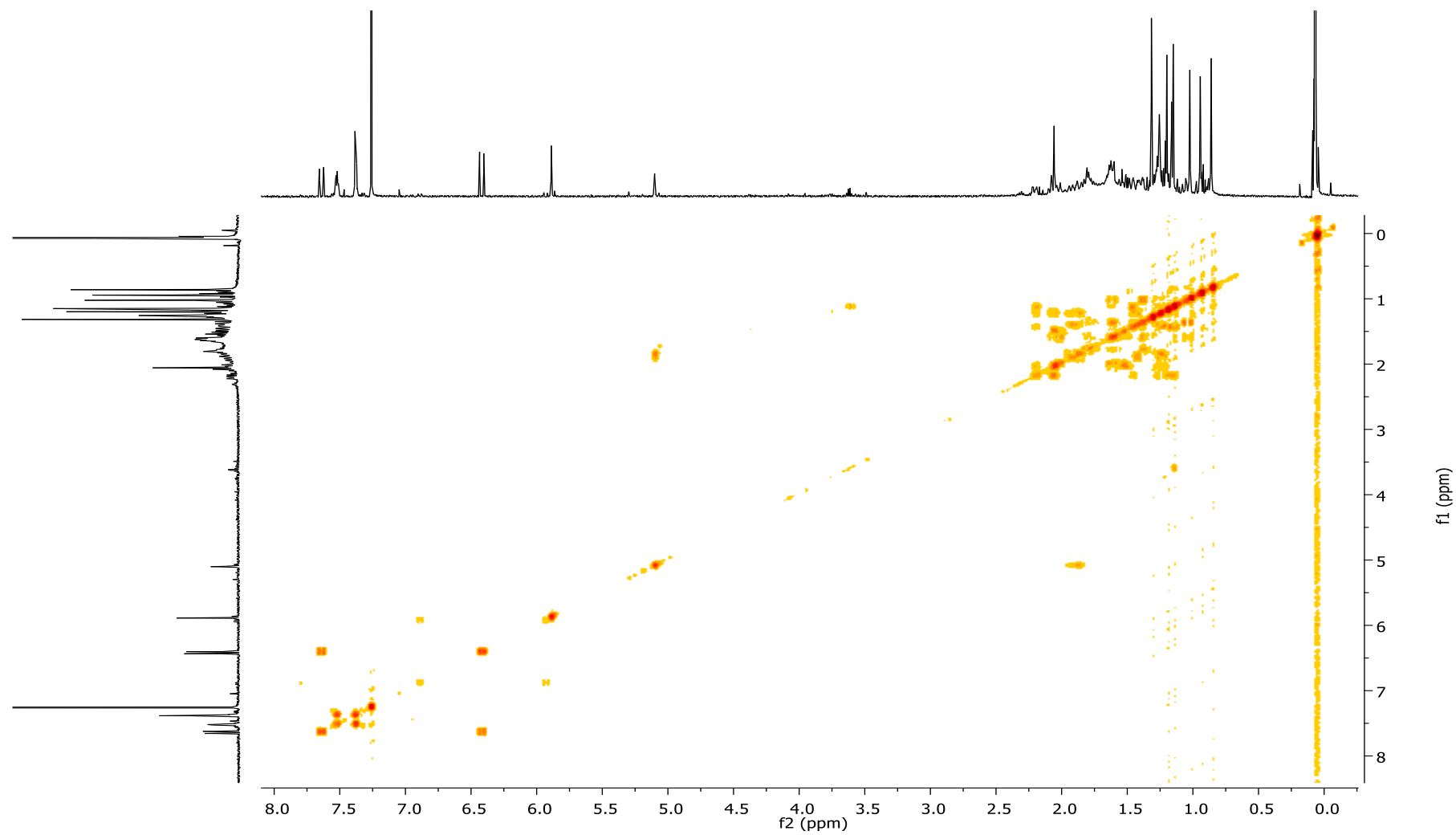


Figura S39: Espectro de RMN de COSY (500 MHz, CDCl_3) do composto **SL2** (expansão).

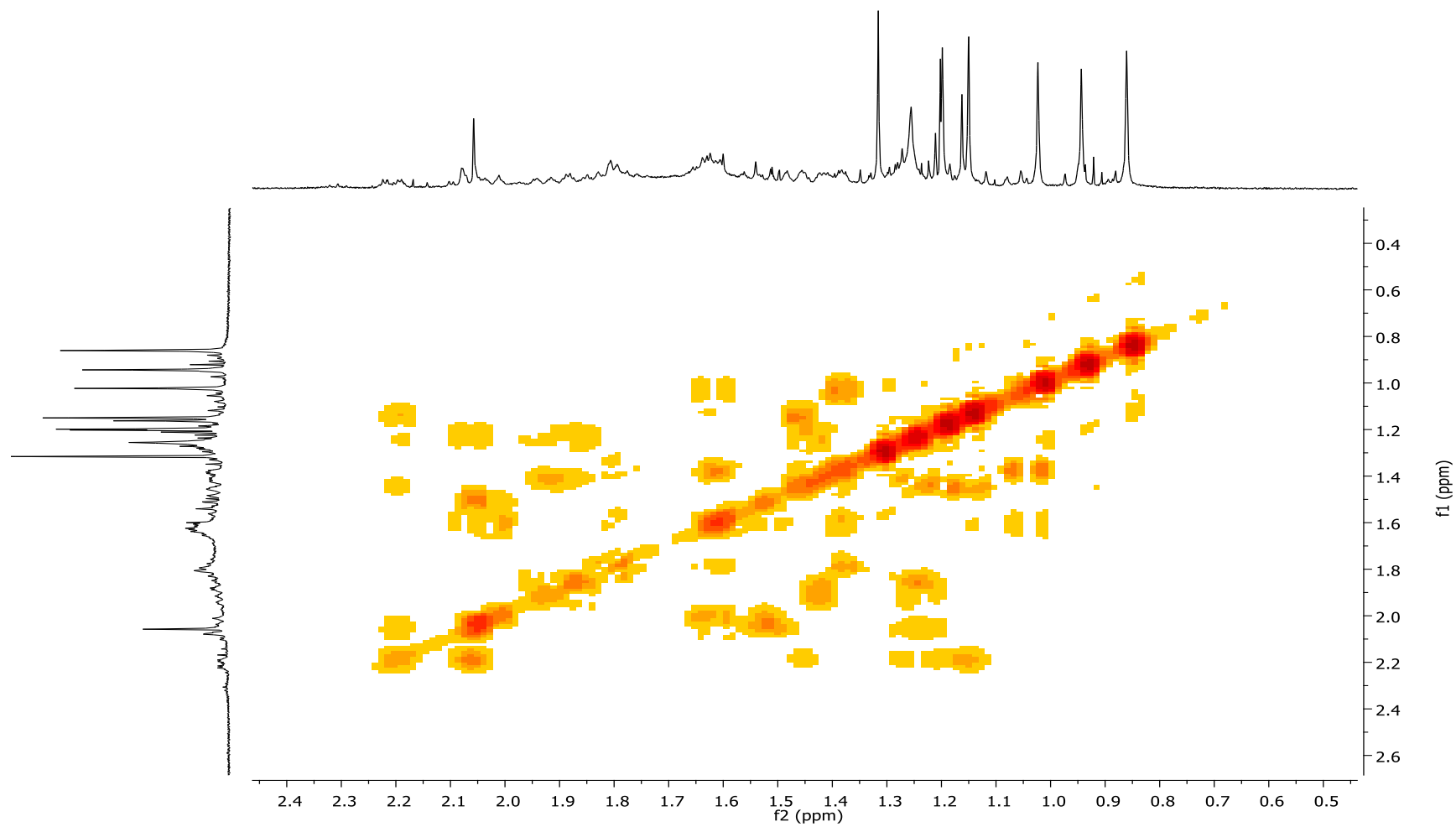


Figura S40: Espectro de RMN de HSQC (500 MHz, CDCl_3) do composto **SL2**.

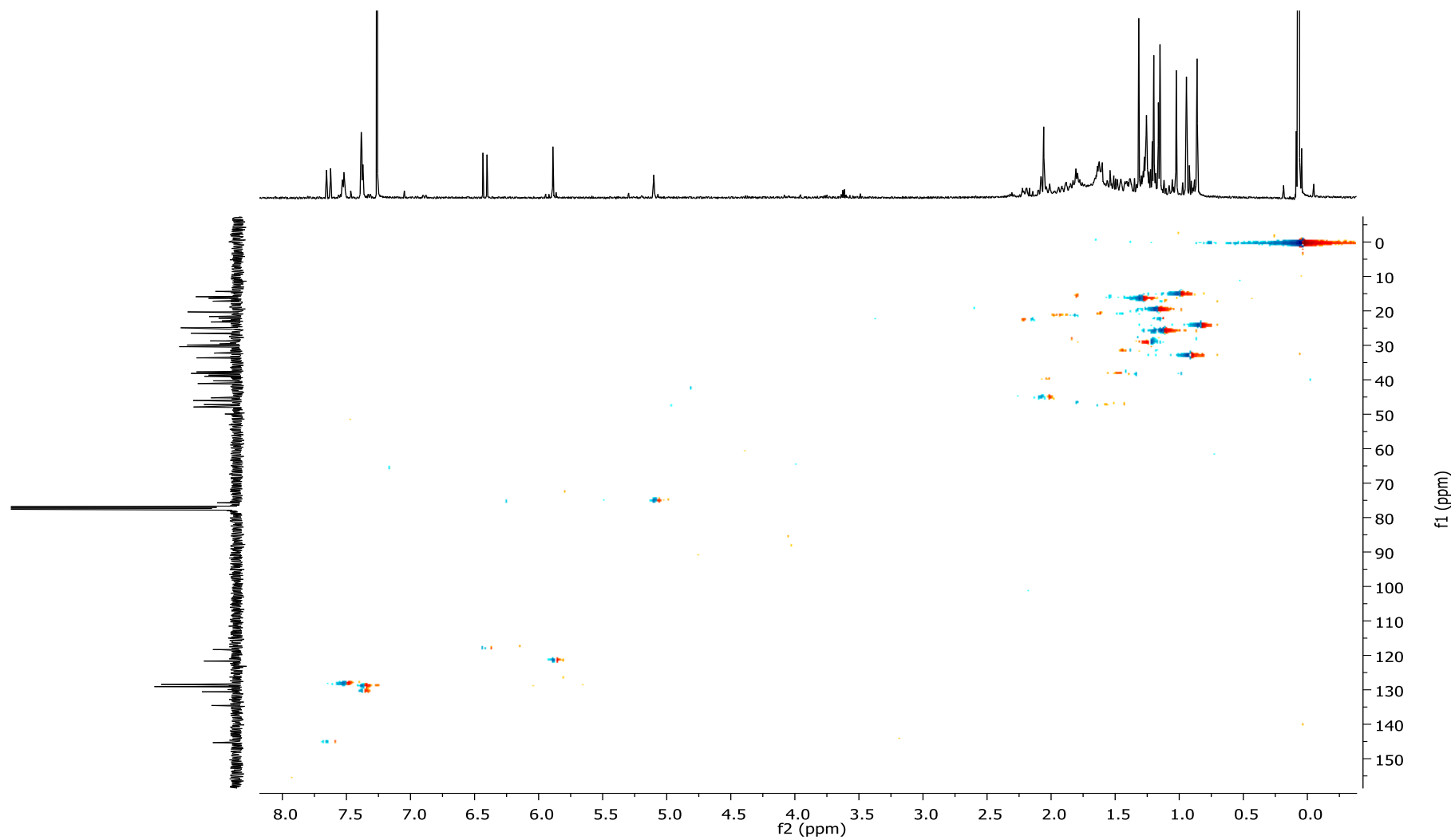


Figura S41: Espectro de RMN de HSQC (500 MHz, CDCl_3) do composto **SL2** (expansão).

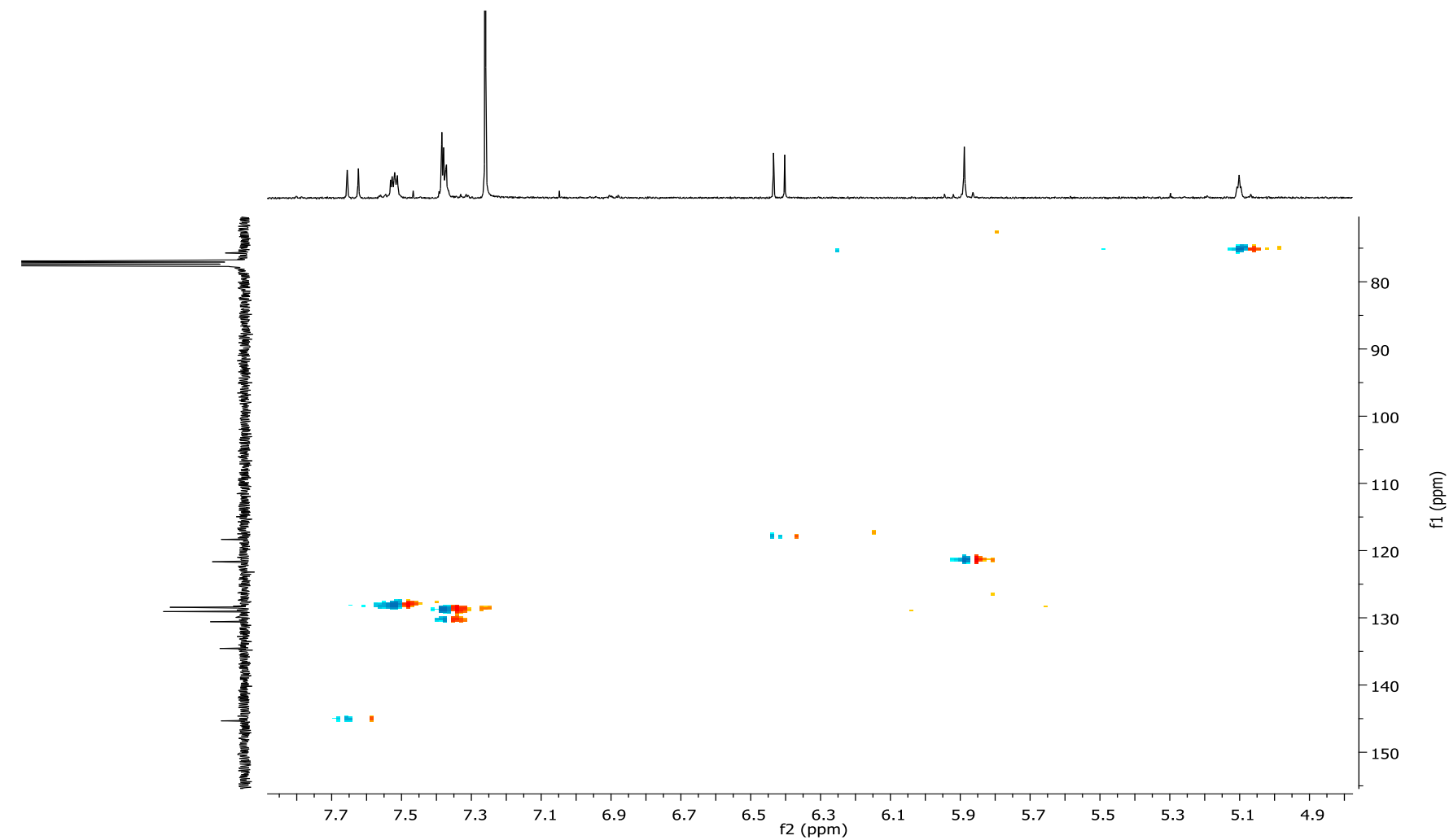


Figura S42: Espectro de RMN de HSQC (500 MHz, CDCl_3) do composto **SL2** (expansão).

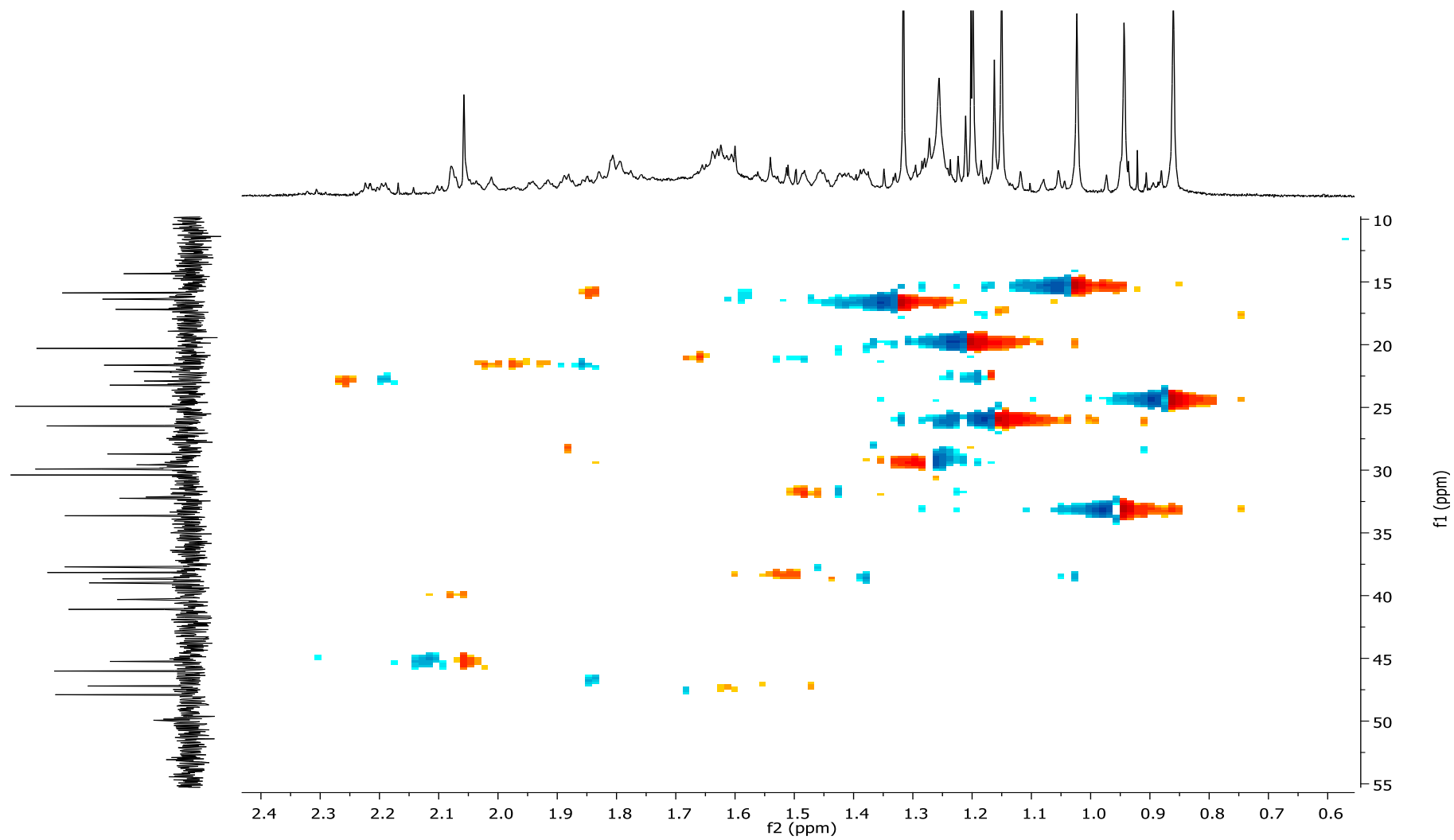


Figura S43: Espectro de RMN de HMBC (500 MHz, CDCl_3) do composto **SL2**.

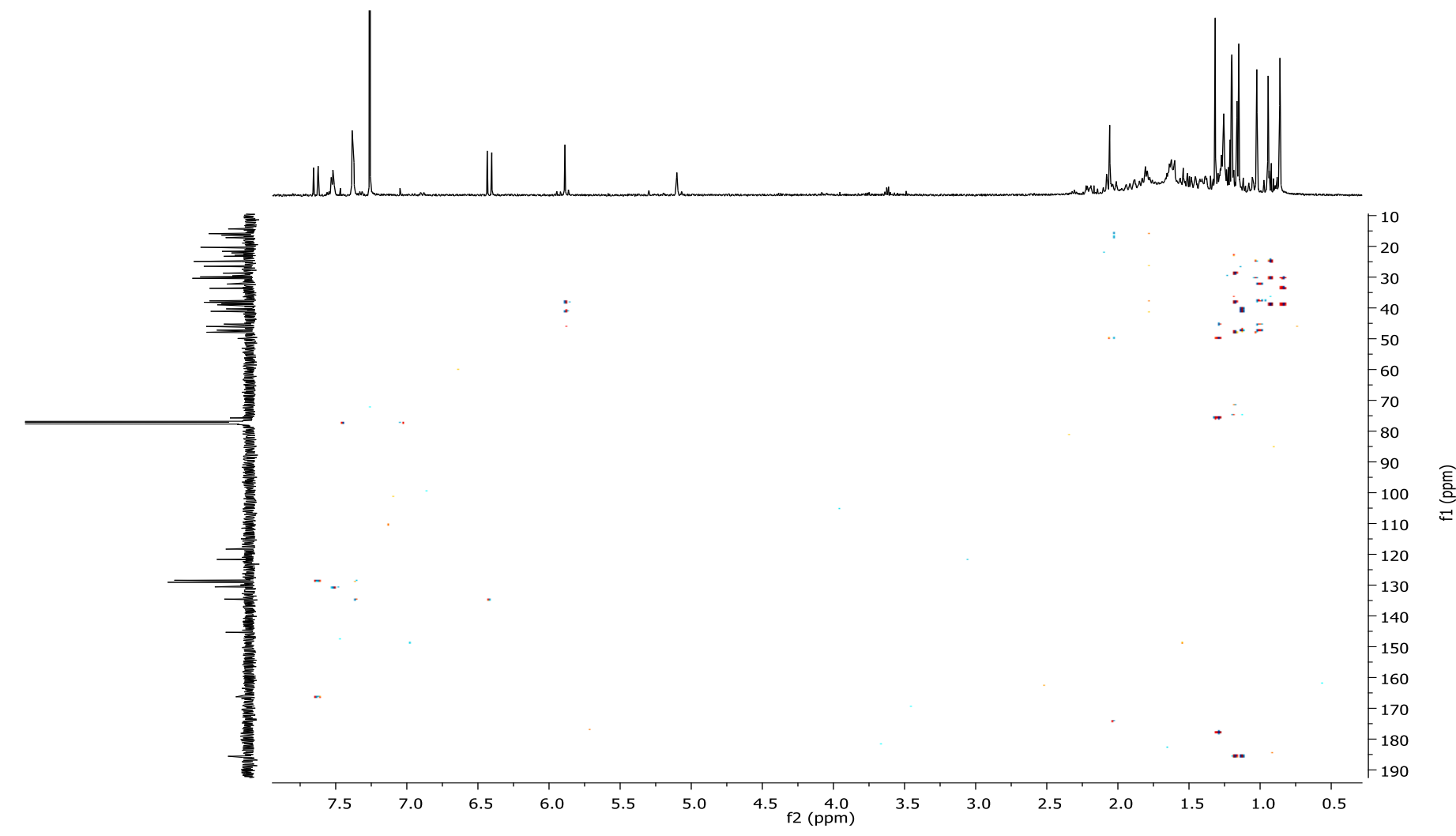


Figura S44: Espectro de RMN de HMBC (500 MHz, CDCl_3) do composto **SL2** (expansão).

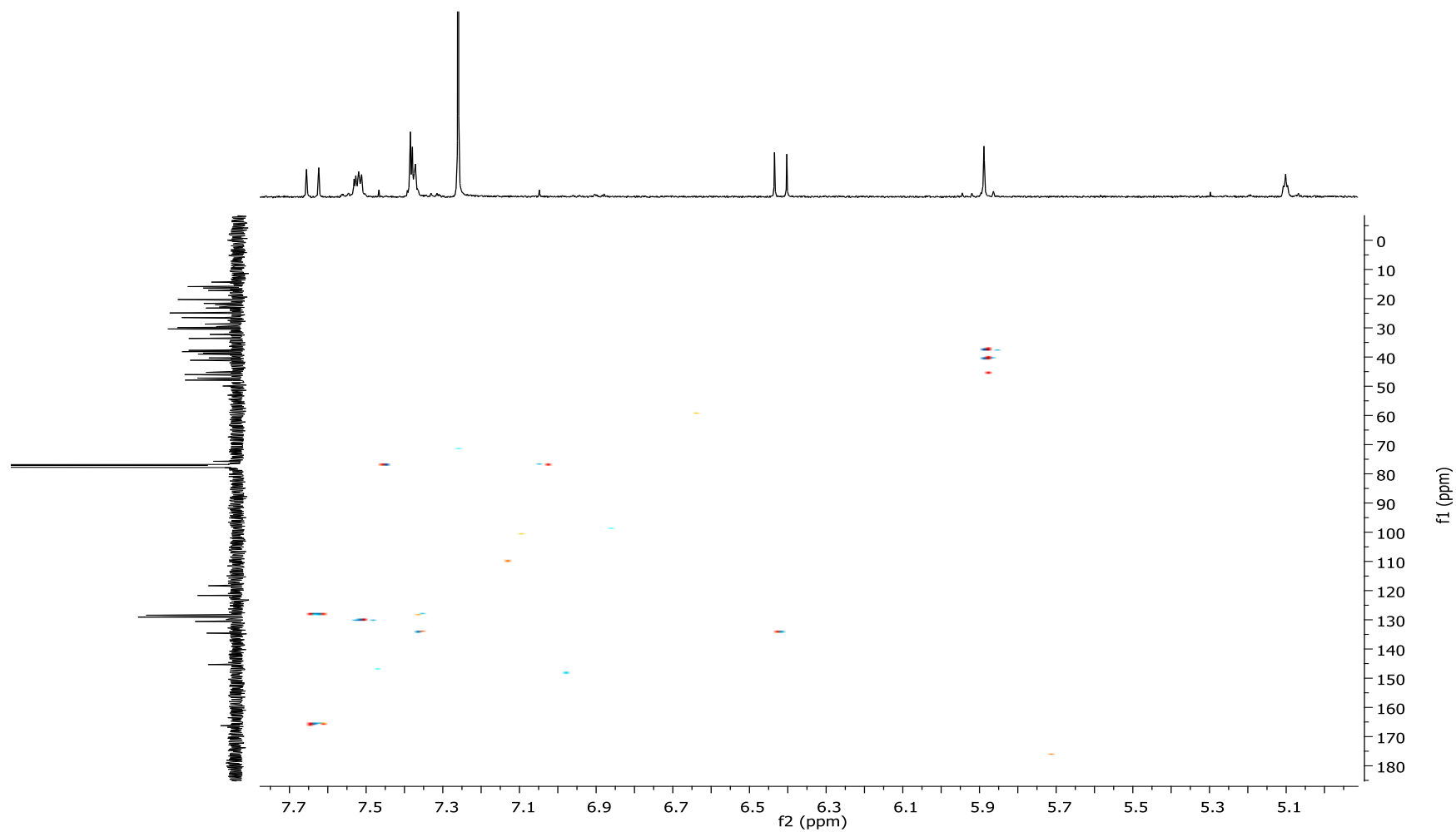


Figura S45: Espectro de RMN de HMBC (500 MHz, CDCl_3) do composto **SL2** (expansão).

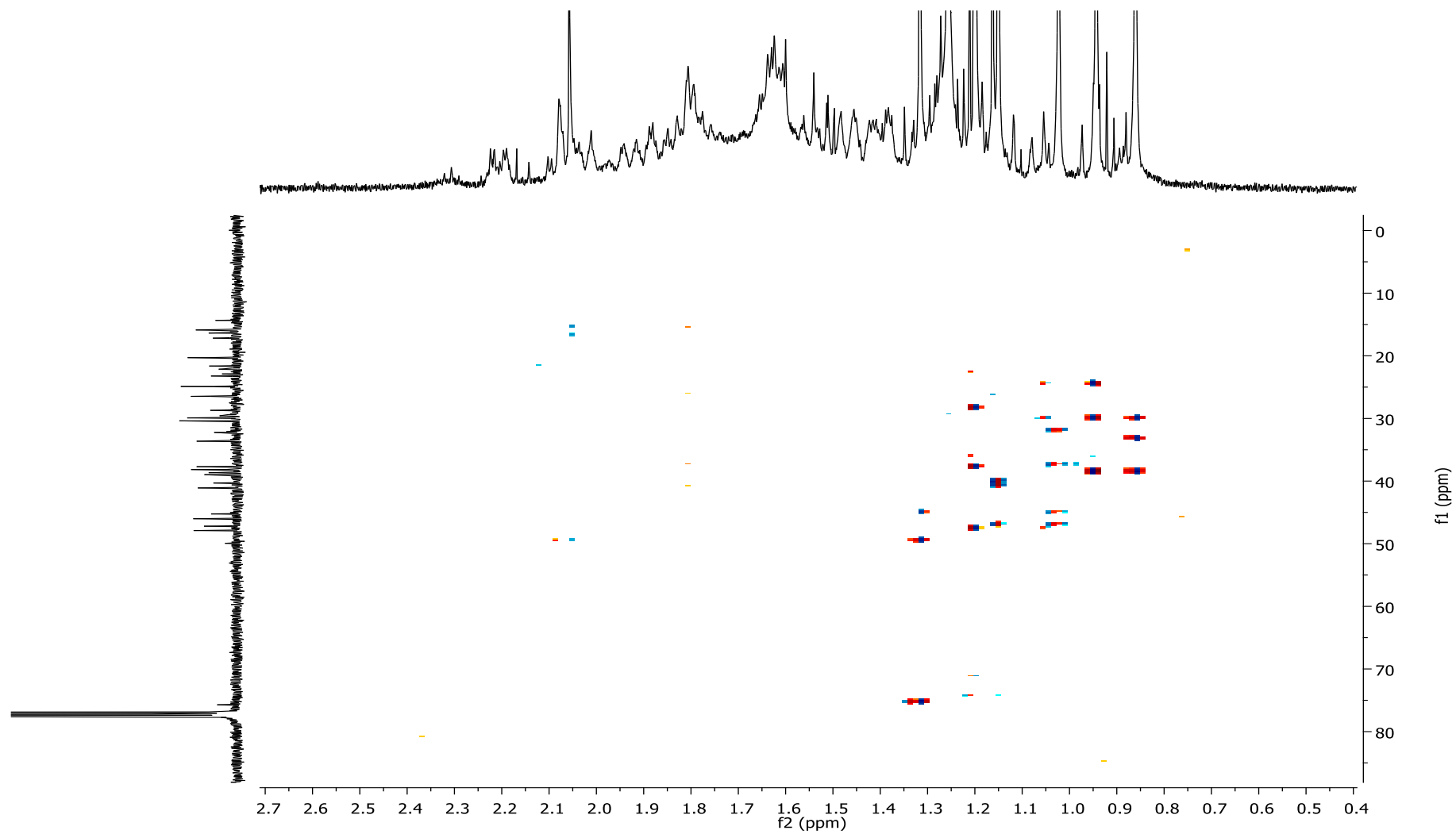


Figura S46: Espectro de RMN de HMBC (500 MHz, CDCl_3) do composto **SL2** (expansão).

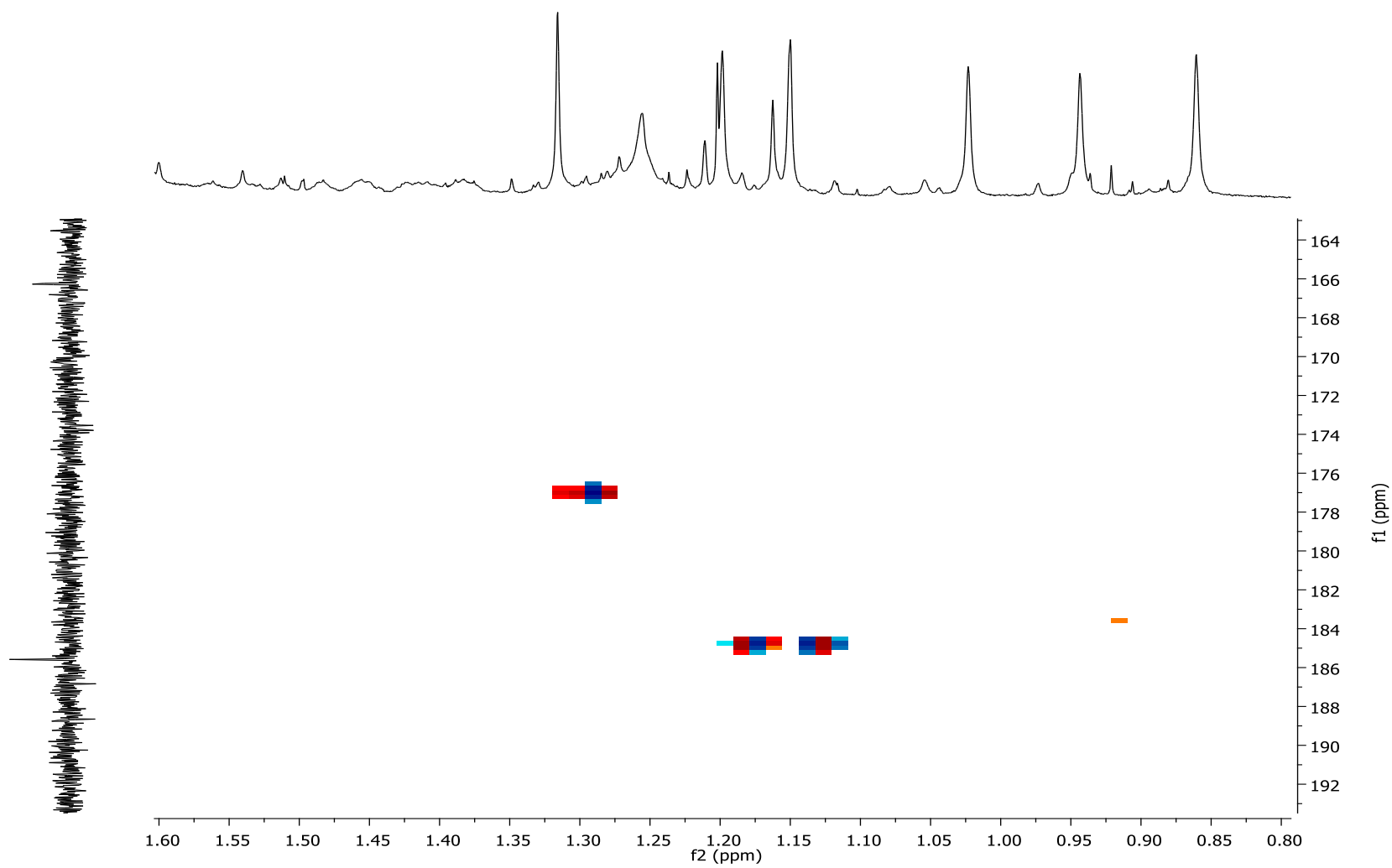


Figura S47: Espectro de RMN de NOESY (500 MHz, CDCl_3) do composto **SL2**.

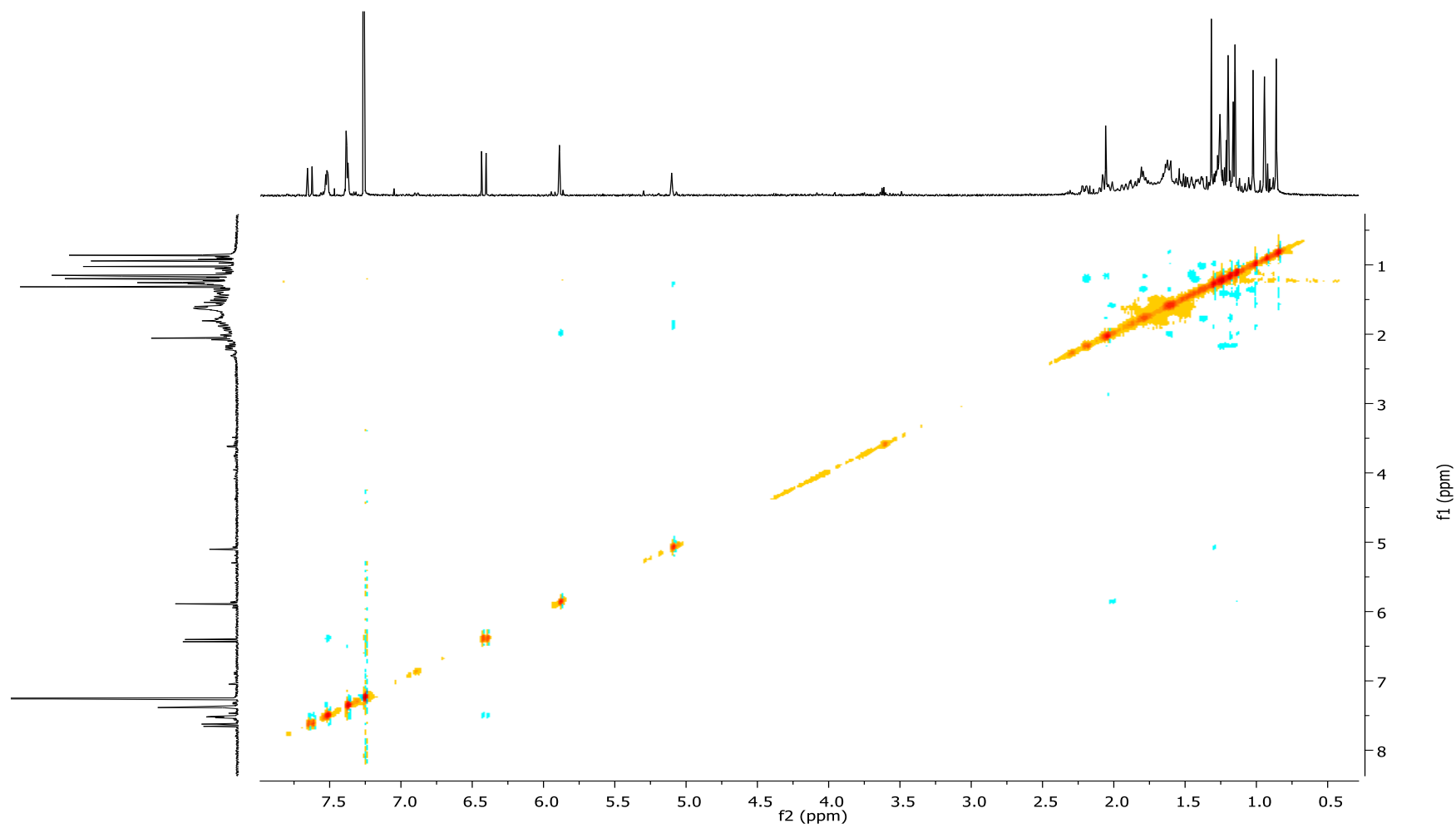


Figura S48: Espectro de RMN de NOESY (500 MHz, CDCl_3) do composto **SL2** (expansão).

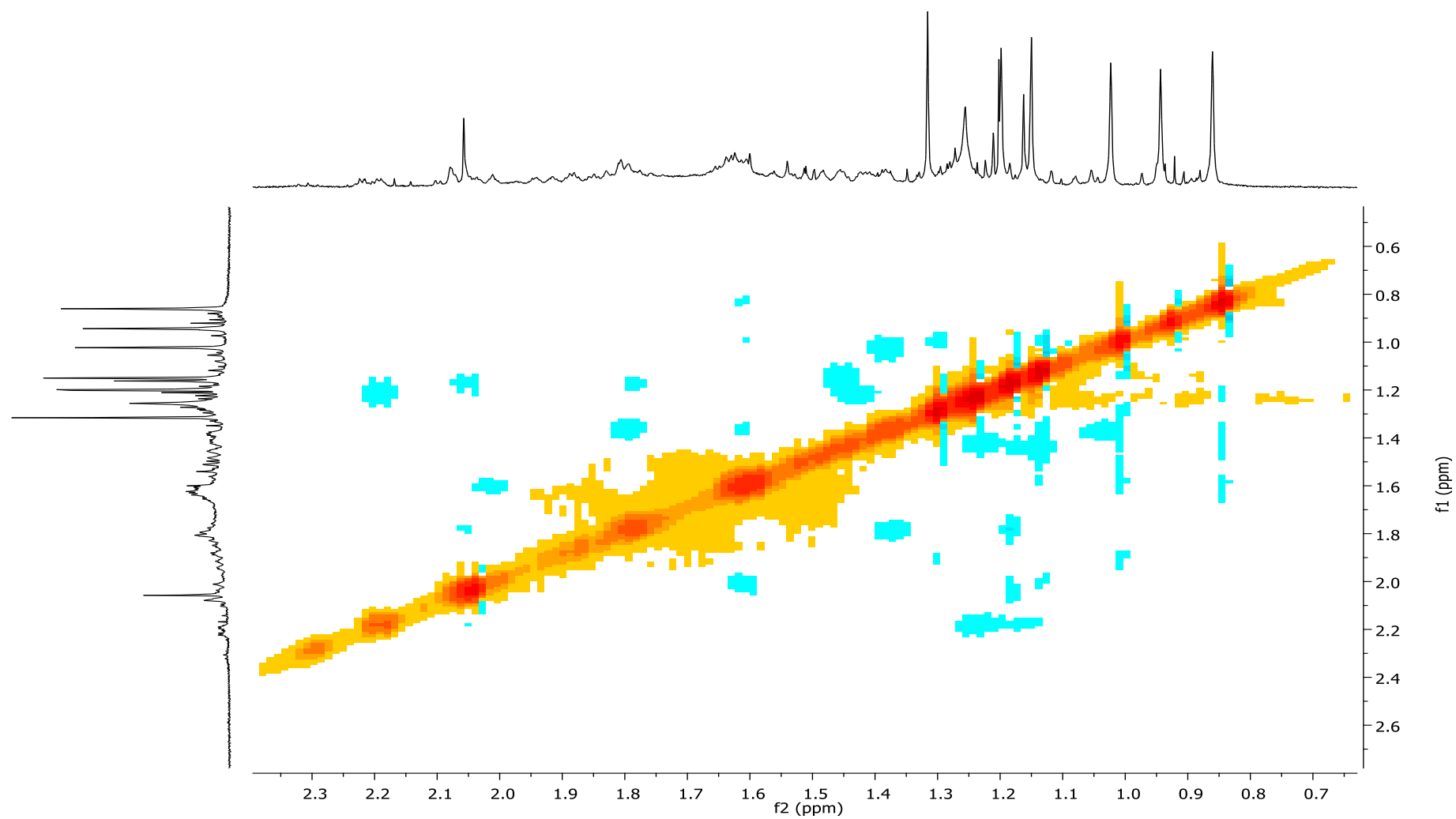


Figura S49: Espectro de IES-EMAR de SL2 ([M + H], modo de ionização positivo).

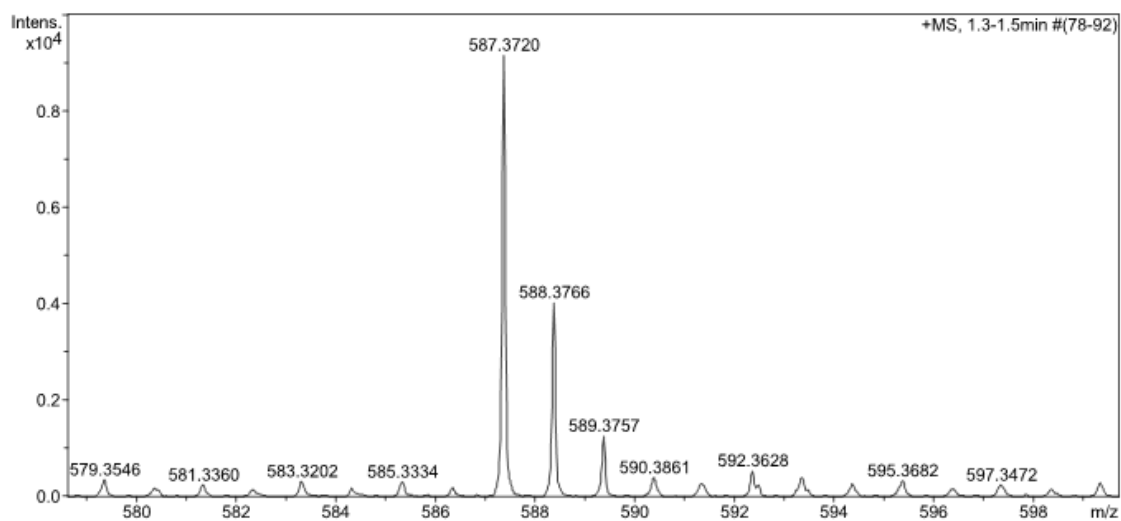


Figura S50: Espectro de CLAE-IESEM/EM de SL2 ([M + H], modo de ionização positivo).

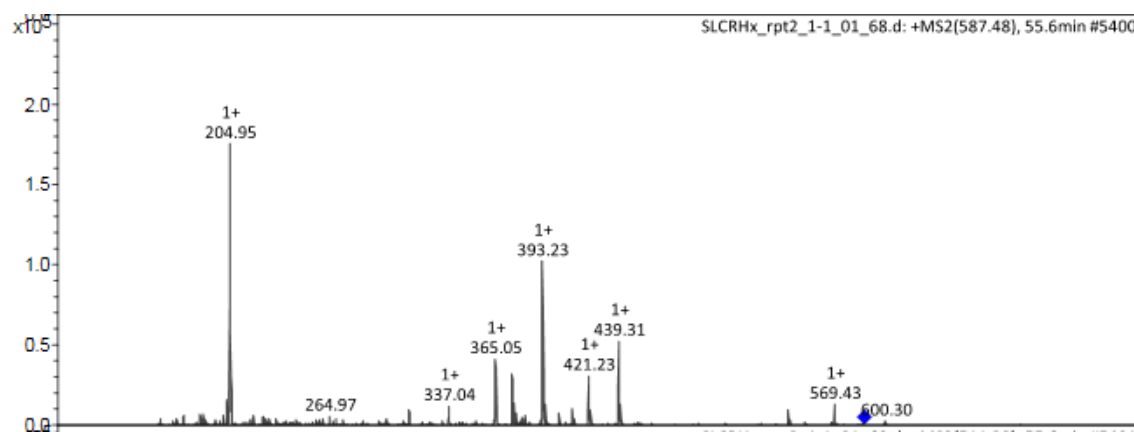


Figura S51: Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) do composto **SL3**.

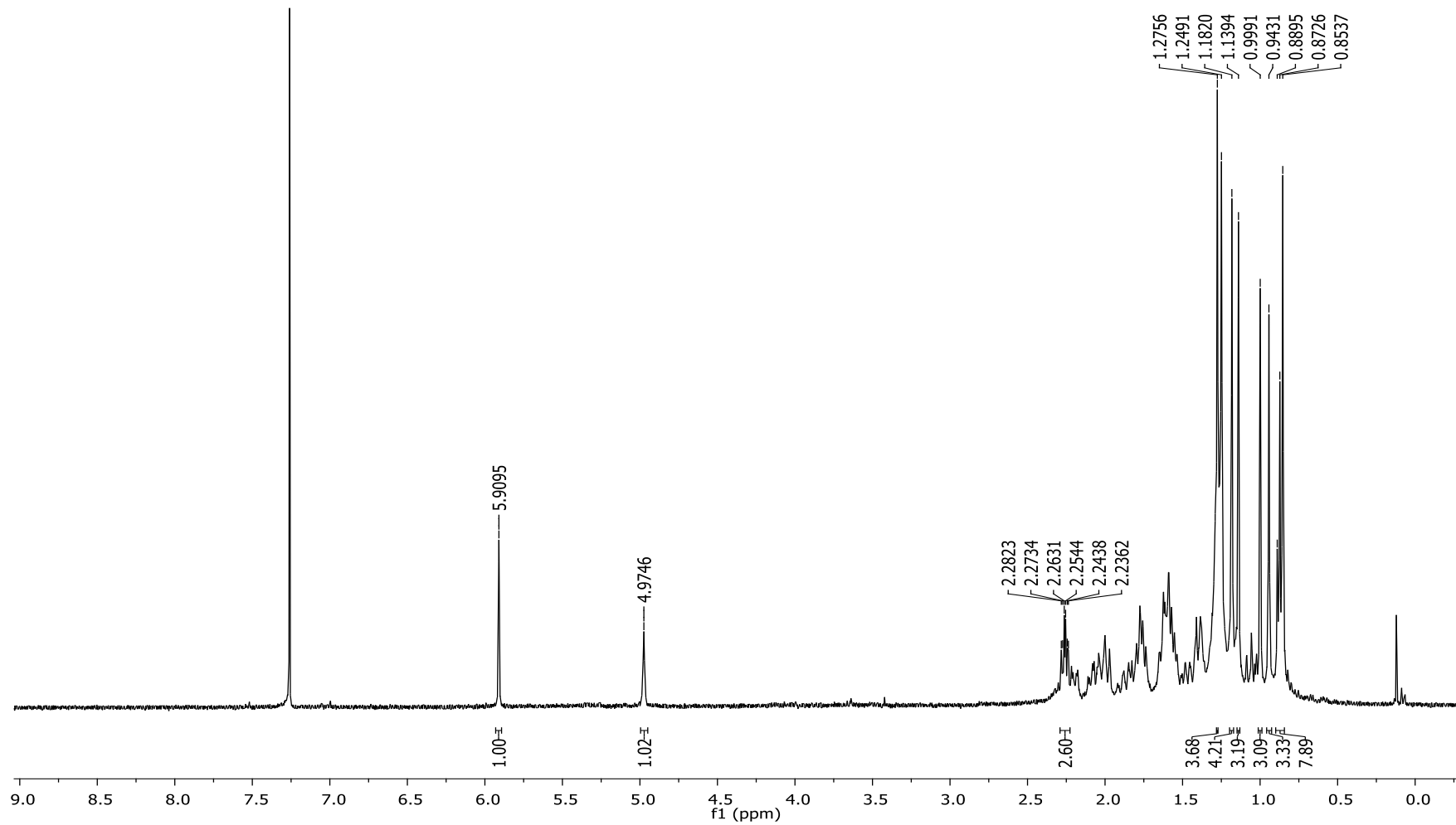


Figura S52: Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) do composto **SL3** (expansão).

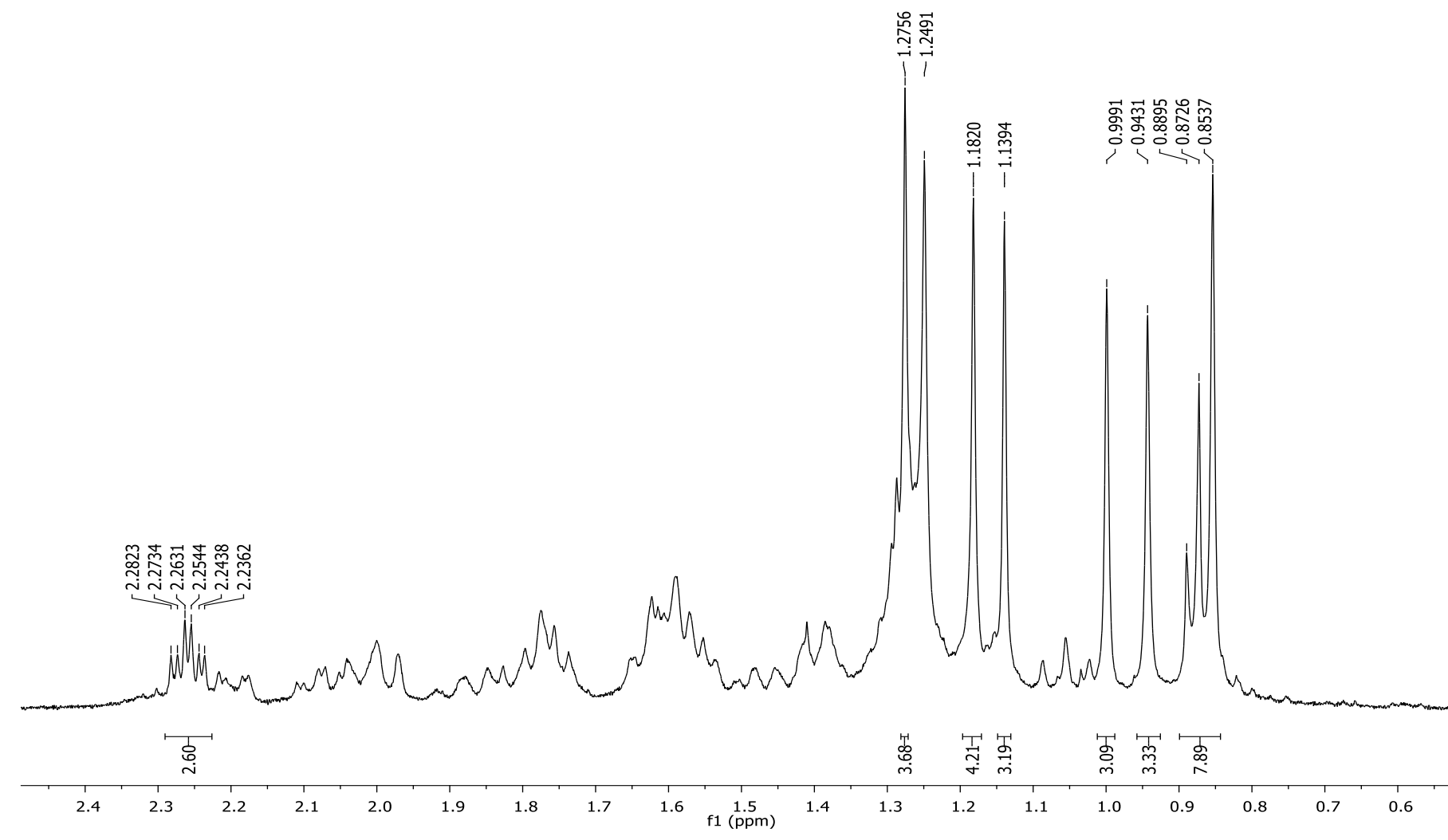


Figura S53: Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) do composto **SL3**.

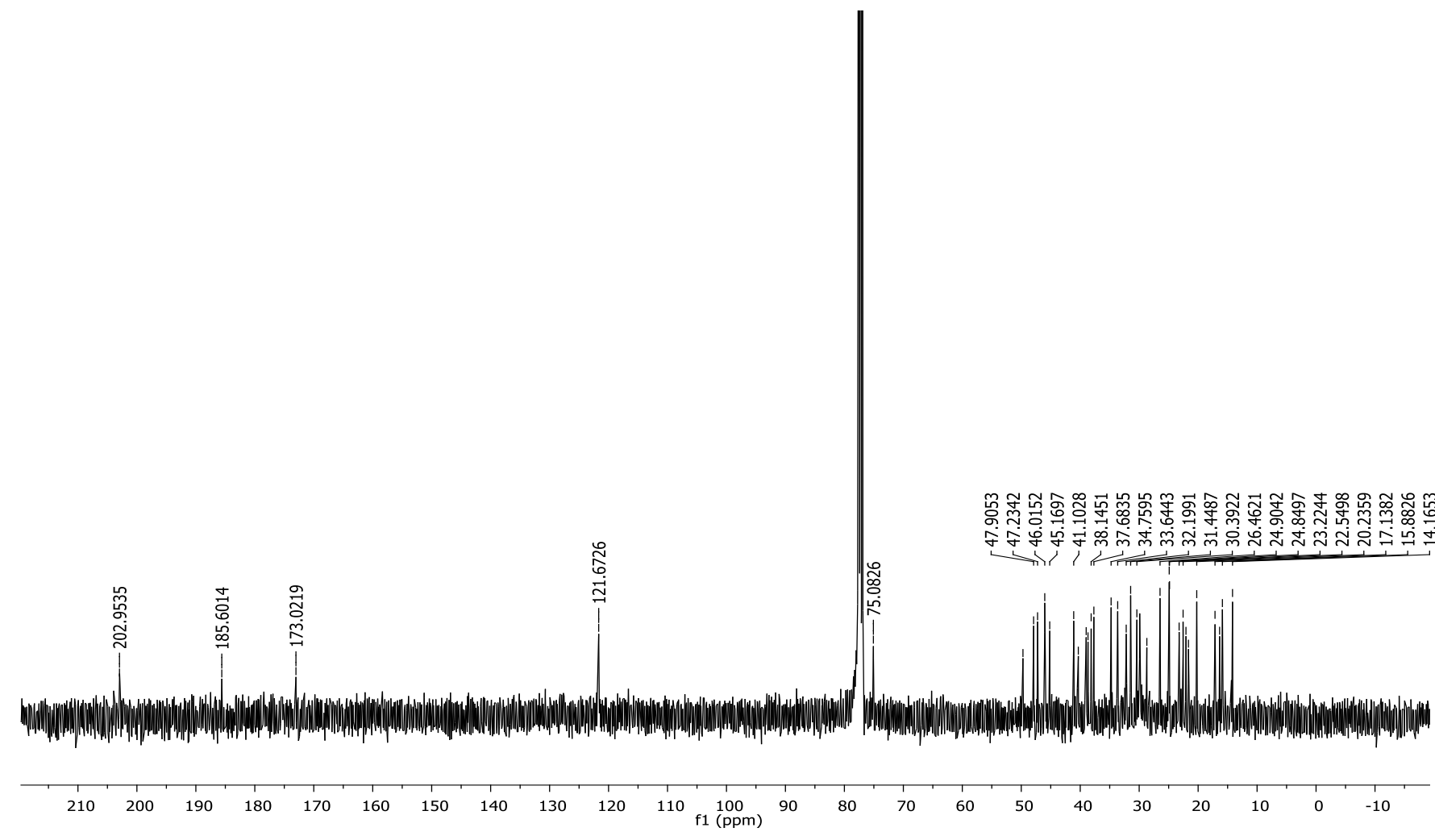


Figura S54: Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) do composto **SL3** (expansão).

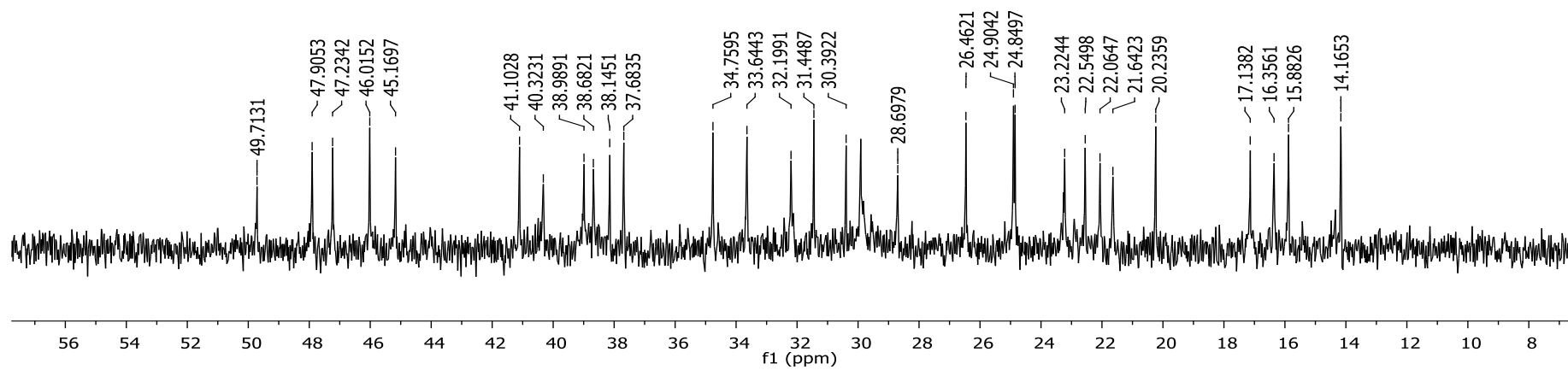


Figura S55: Espectro de RMN de COSY (400 MHz, CDCl_3) do composto **SL3**.

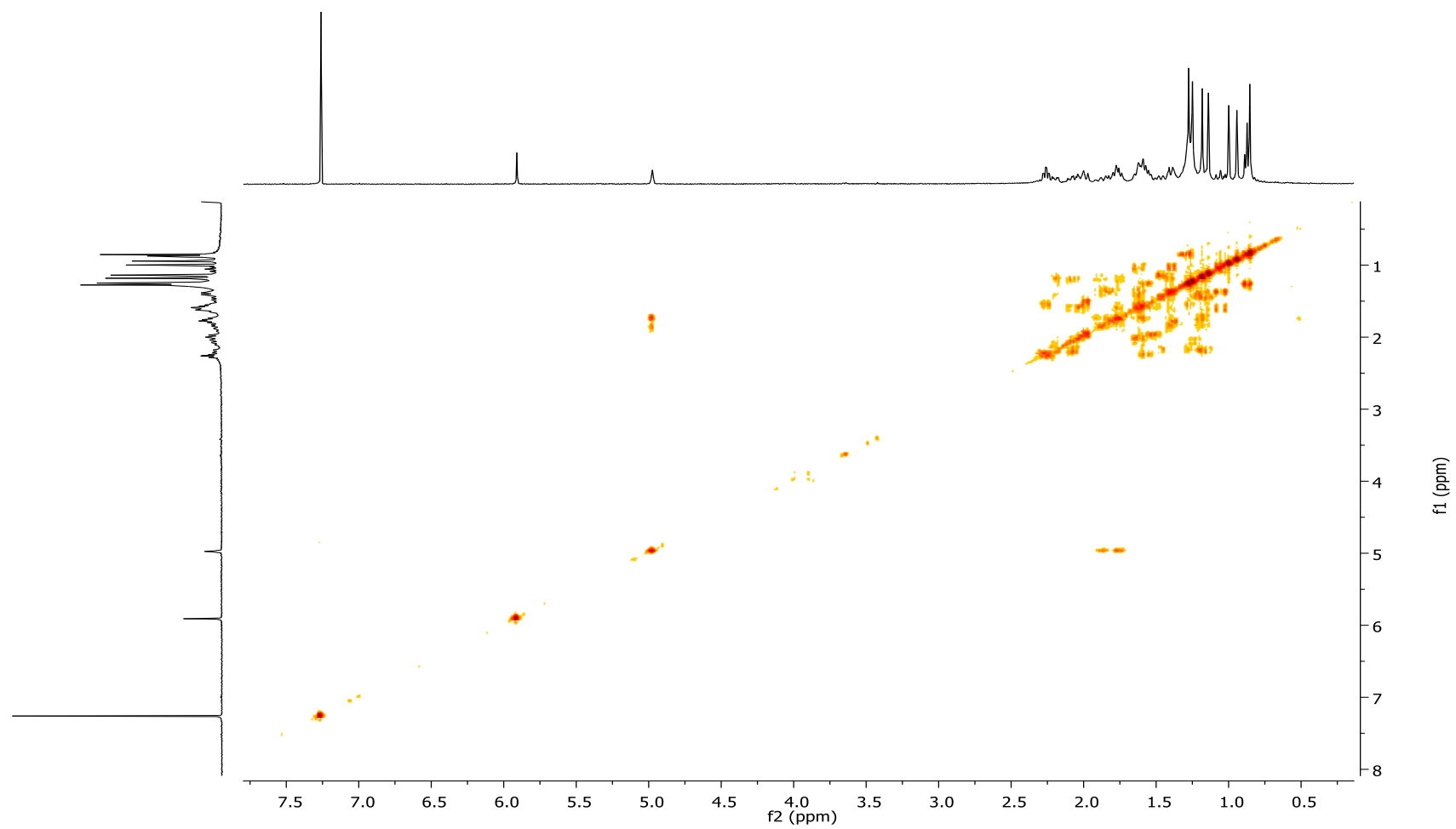


Figura S56: Espectro de RMN de HSQC (400 MHz, CDCl_3) do composto **SL3**.

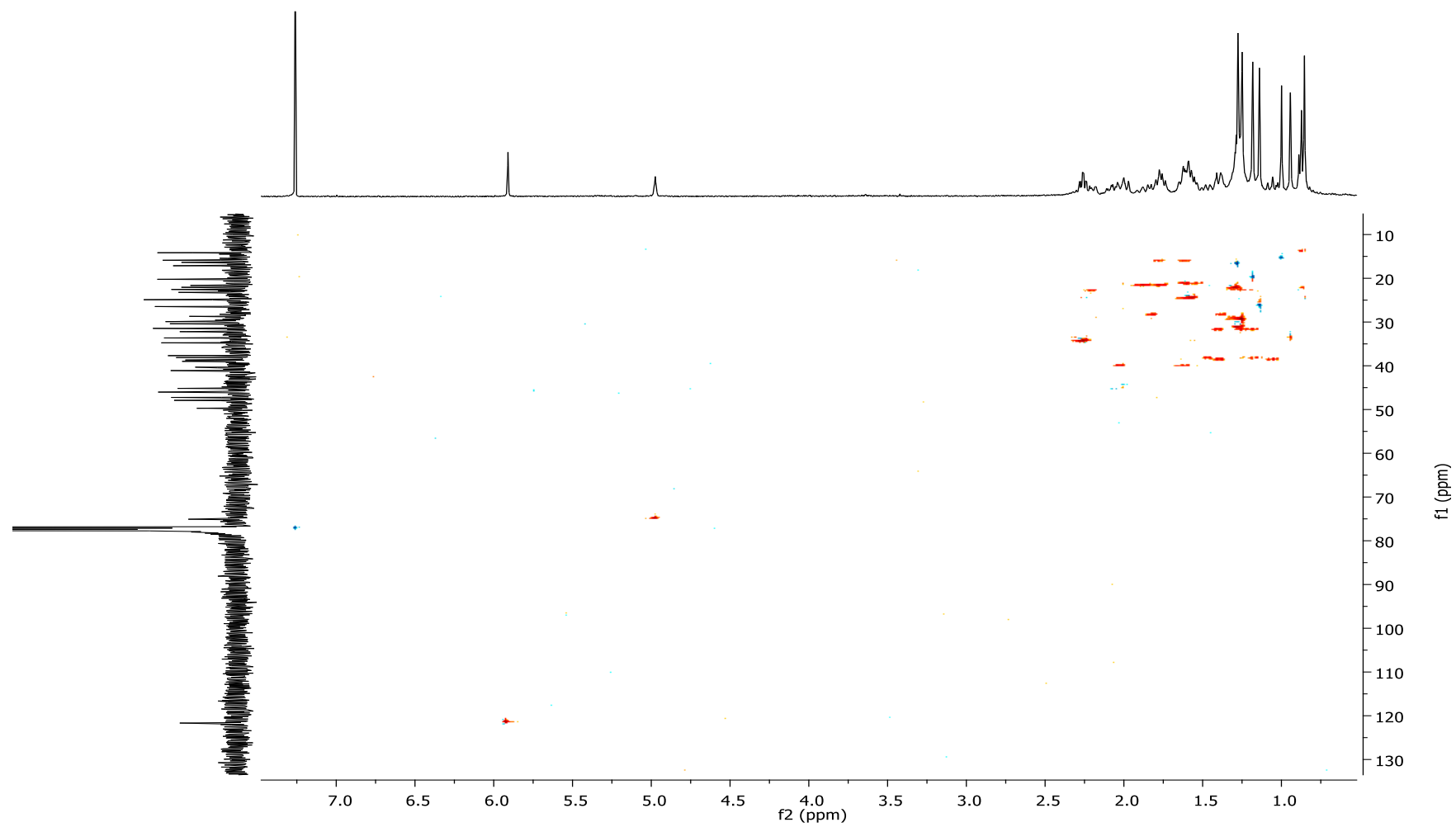


Figura S57: Espectro de RMN de HSQC (400 MHz, CDCl_3) do composto **SL3** (expansão).

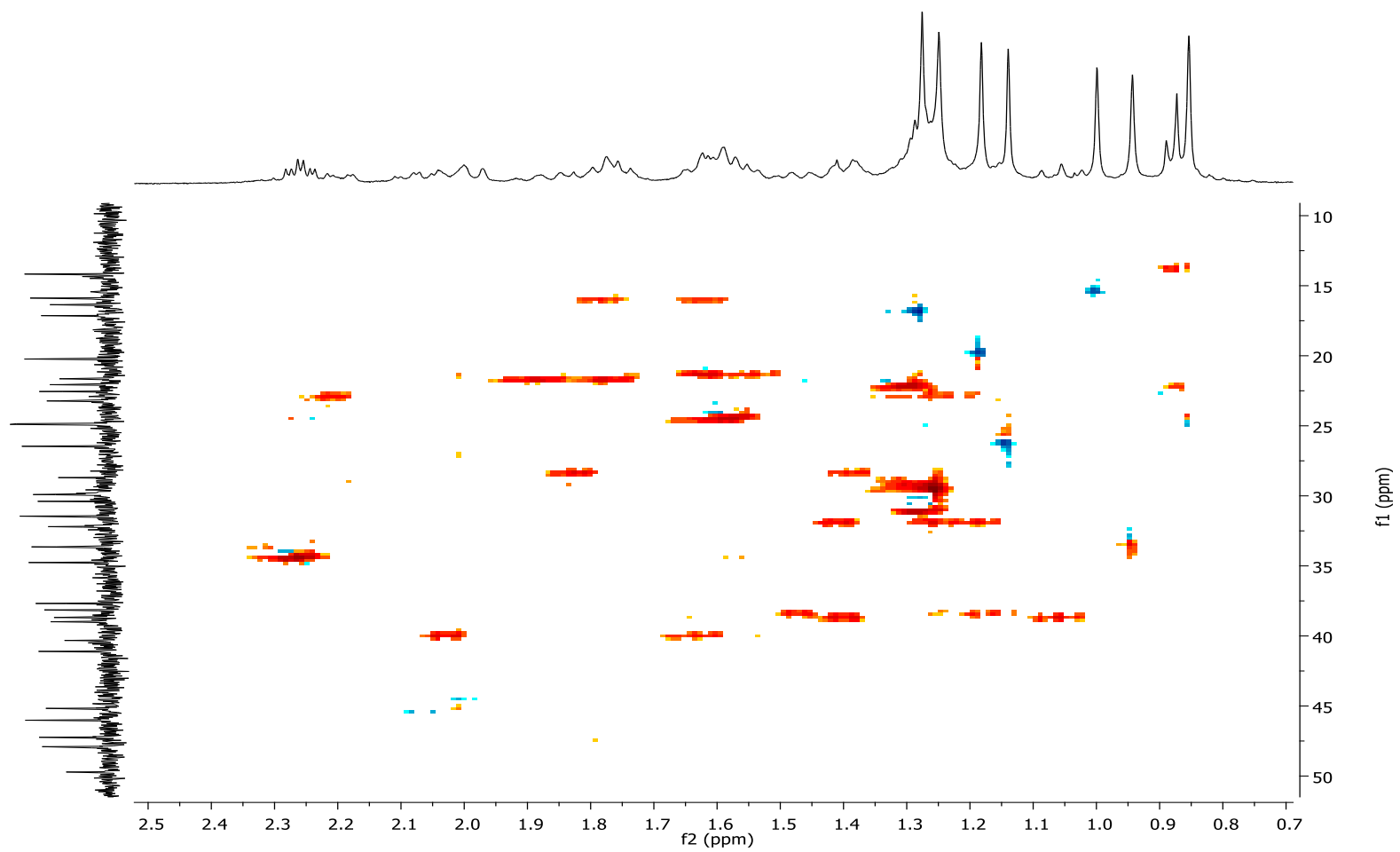


Figura S58: Espectro de RMN de HMBC (400 MHz, CDCl_3) do composto **SL3**.

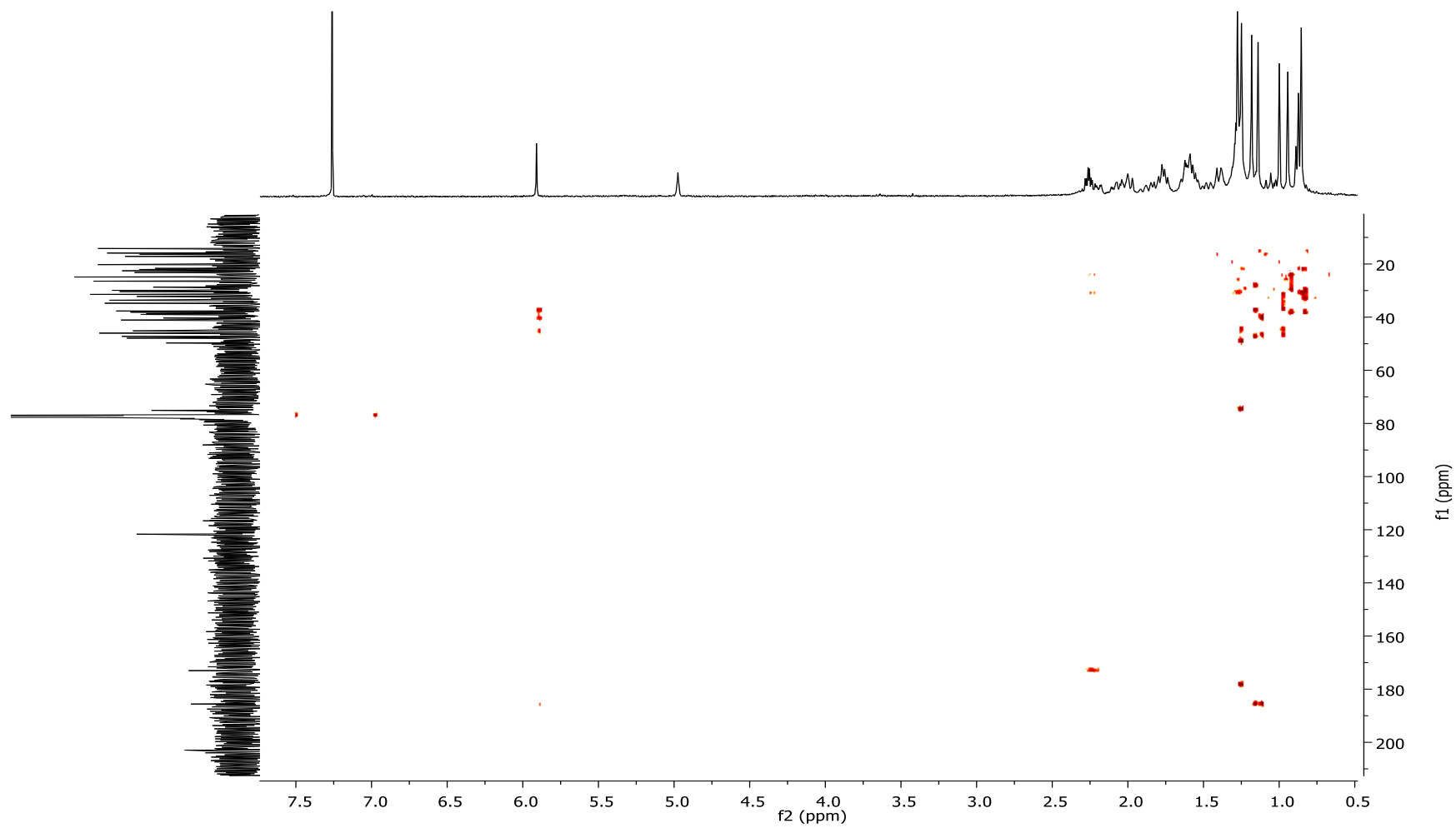


Figura S59: Espectro de RMN de HMBC (400 MHz, CDCl_3) do composto **SL3** (expansão).

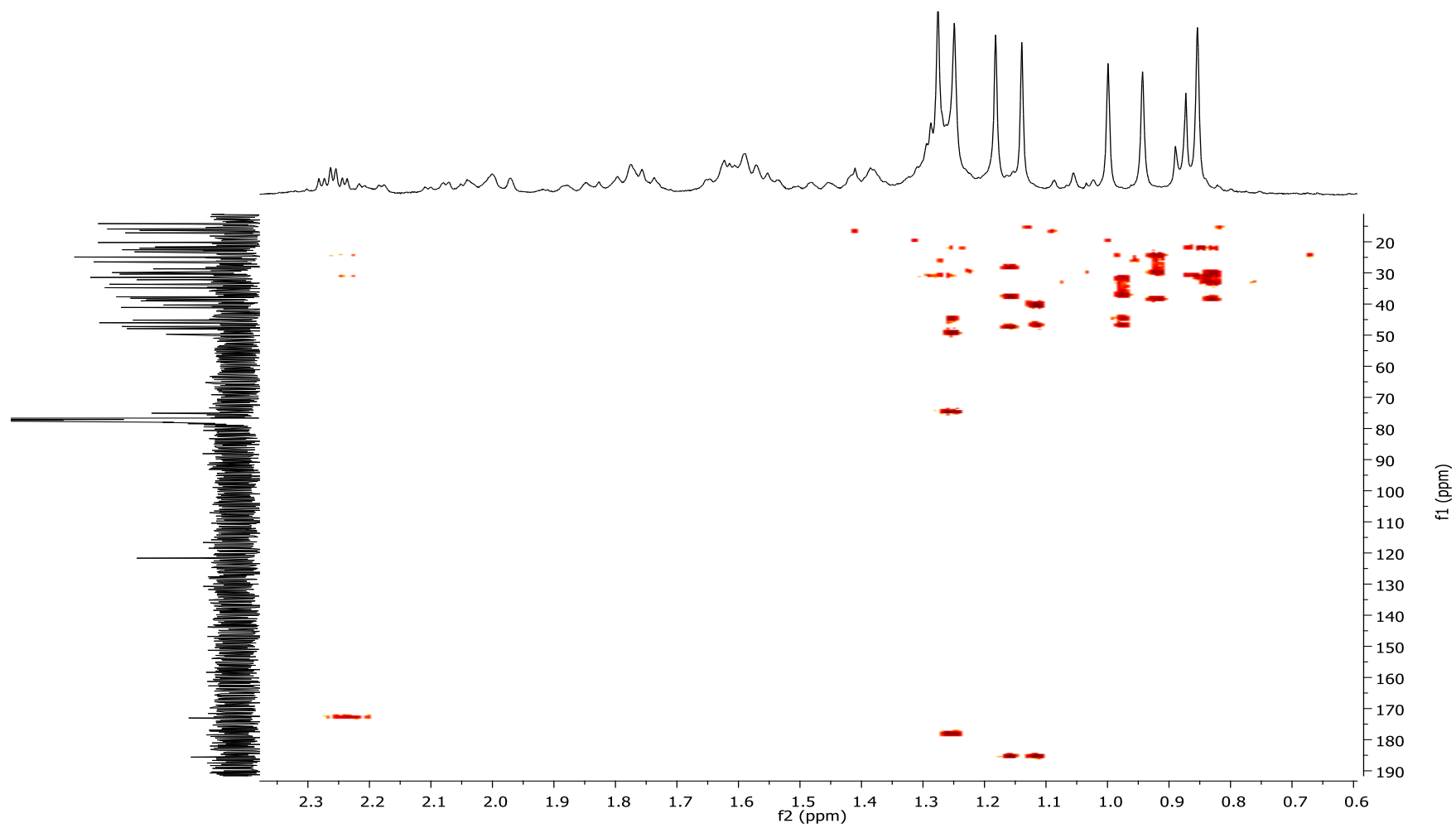


Figura S60: Espectro de RMN de NOESY (400 MHz, CDCl_3) do composto **SL3**.

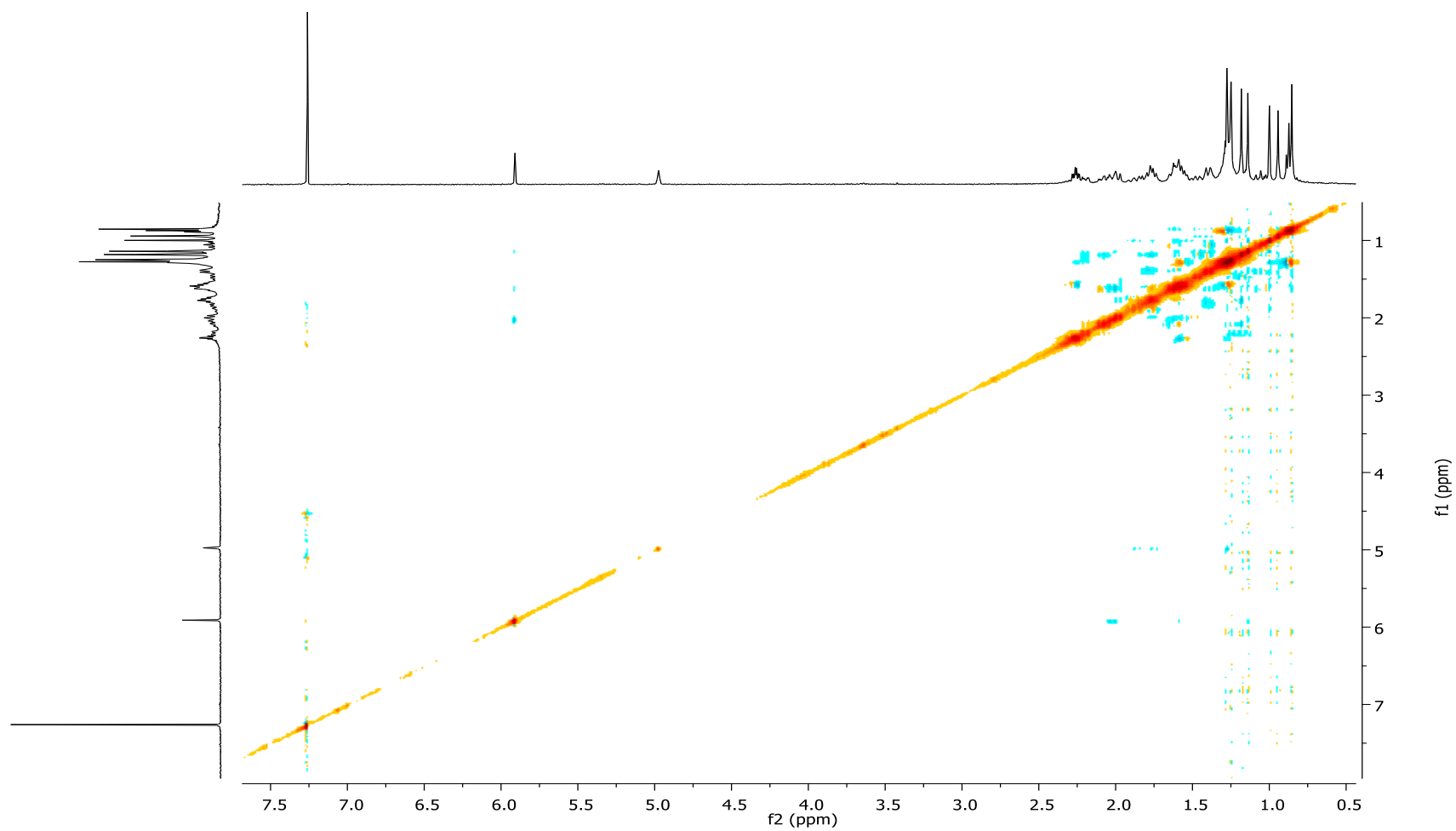


Figura S61: Espectro de IES-EMAR de **SL3** ($[M + H]$, modo de ionização positivo).

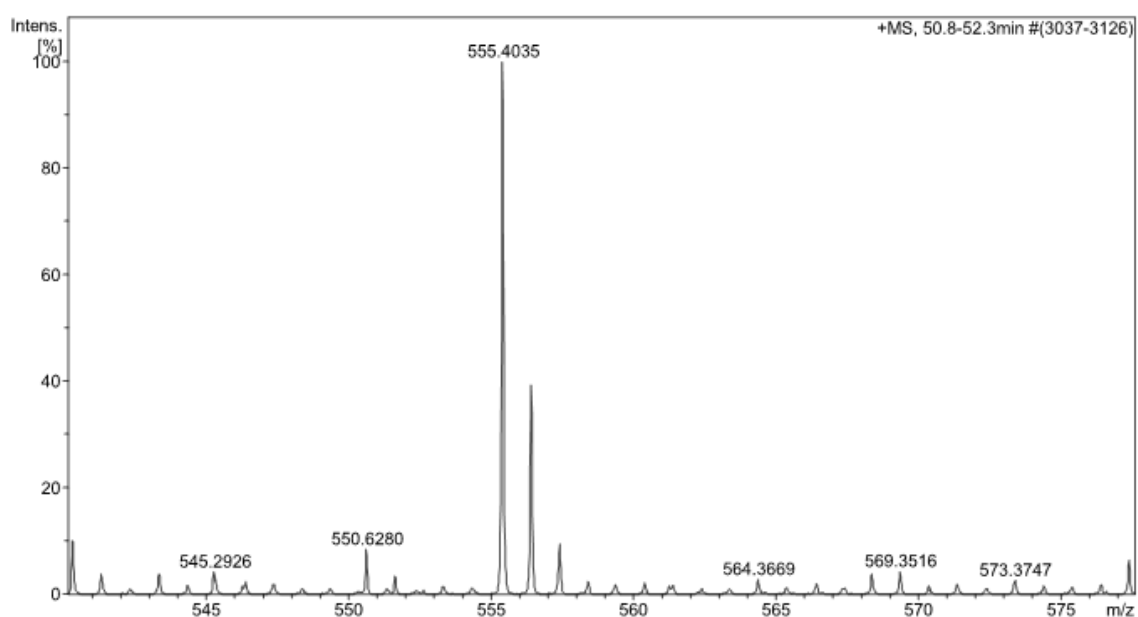


Figura S62: Espectro de CLAE-IESEM/EM de **SL3** ($[M + H]$, modo de ionização positivo).

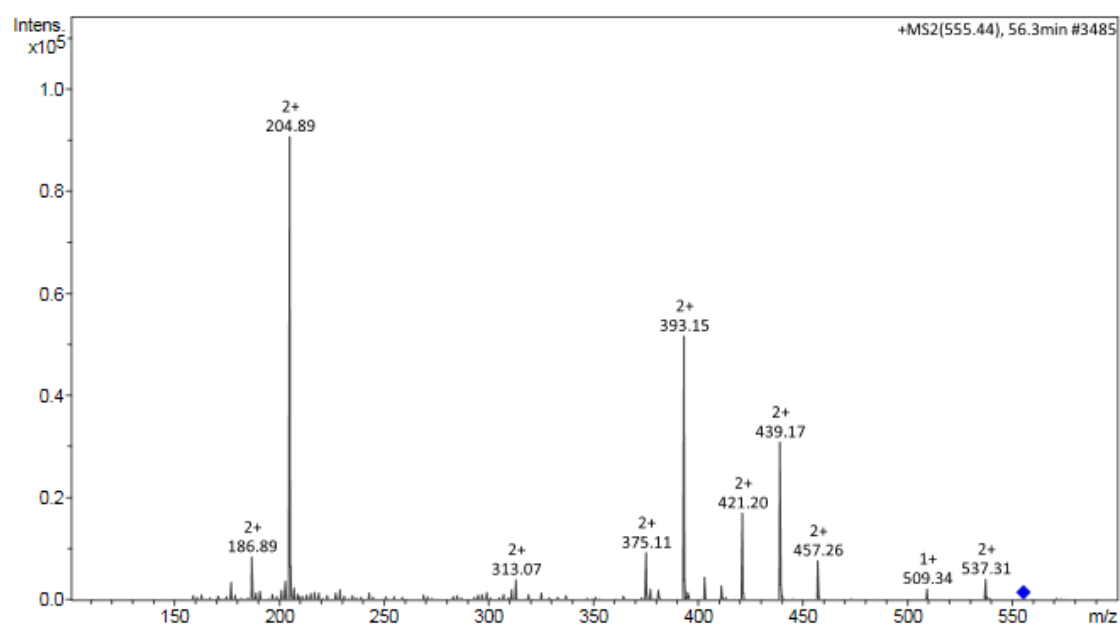


Figura S63: Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) do composto **SL4**.

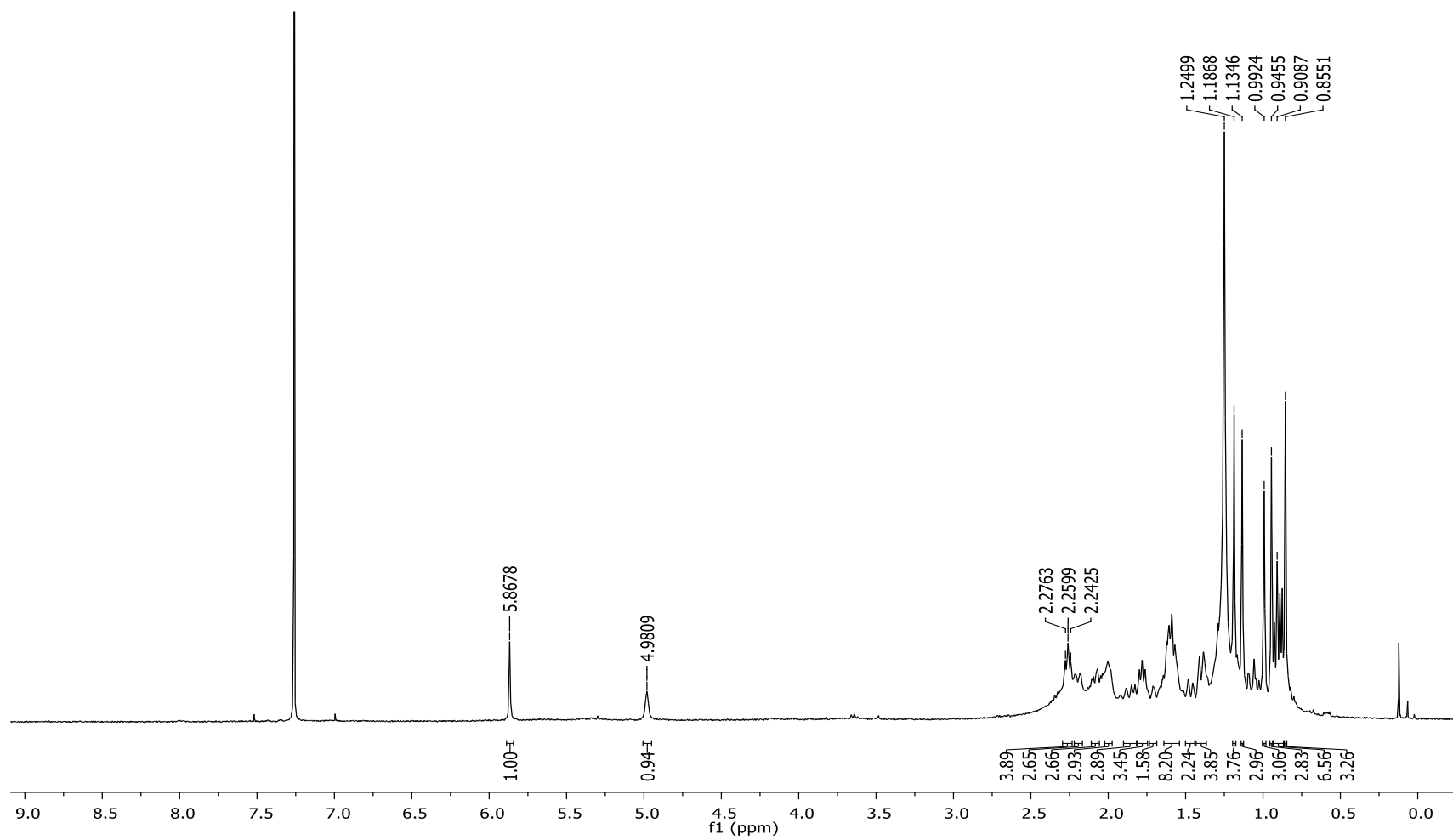


Figura S64: Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) do composto **SL4** (expansão).

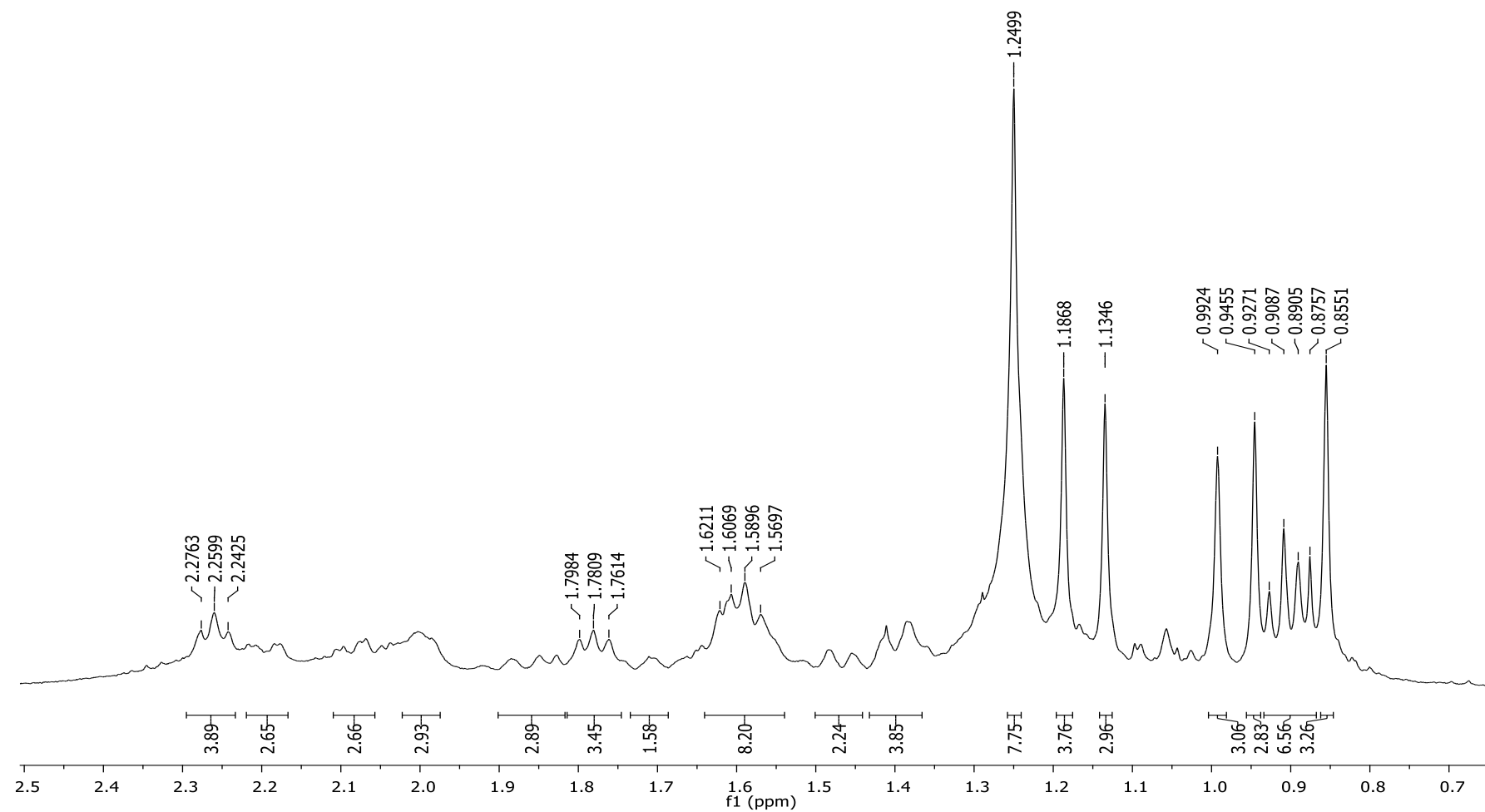


Figura S65: Espectro de RMN de COSY (400 MHz, CDCl_3) do composto **SL4**.

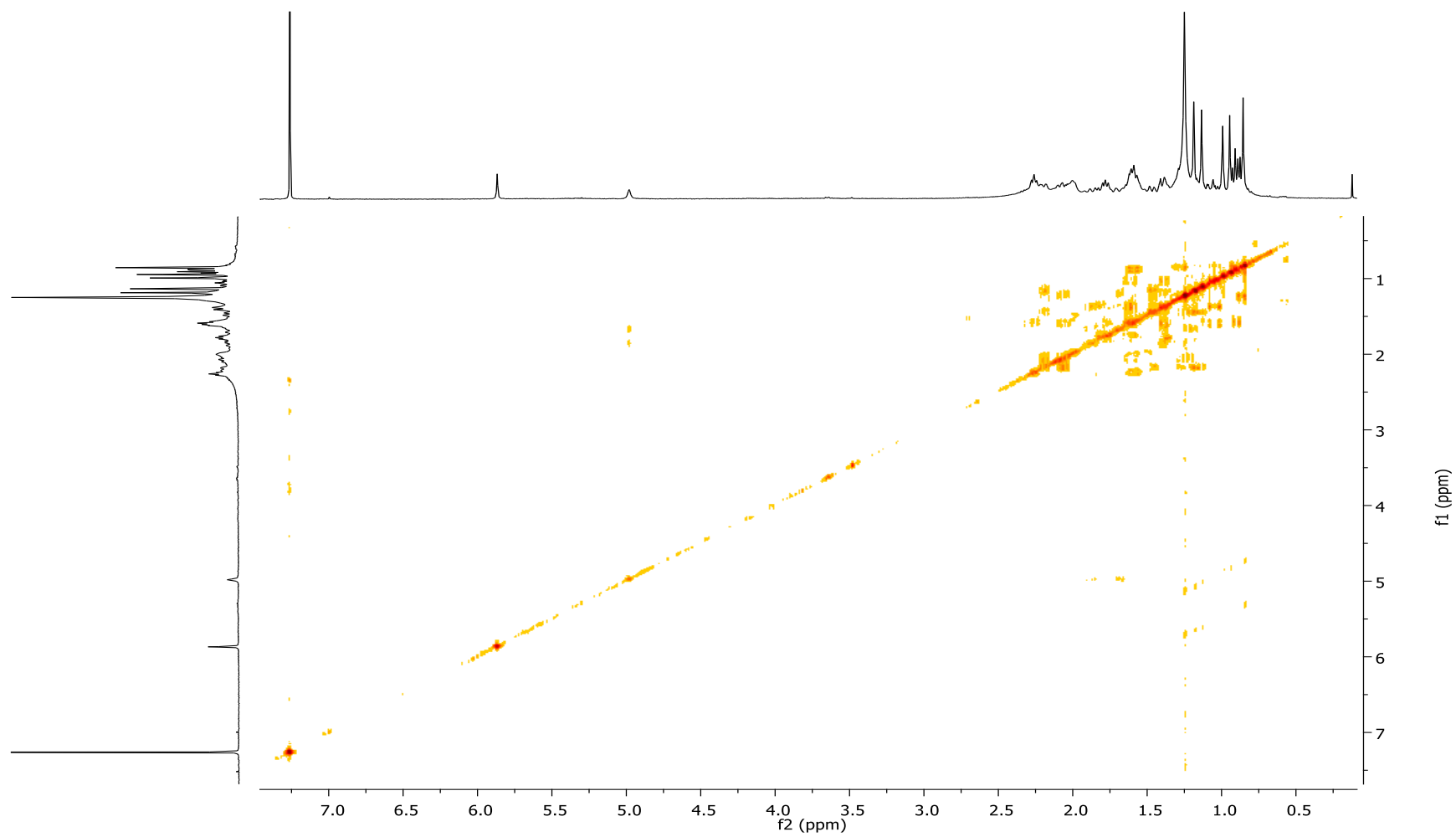


Figura S66: Espectro de RMN de HSQC (400 MHz, CDCl_3) do composto **SL4**.

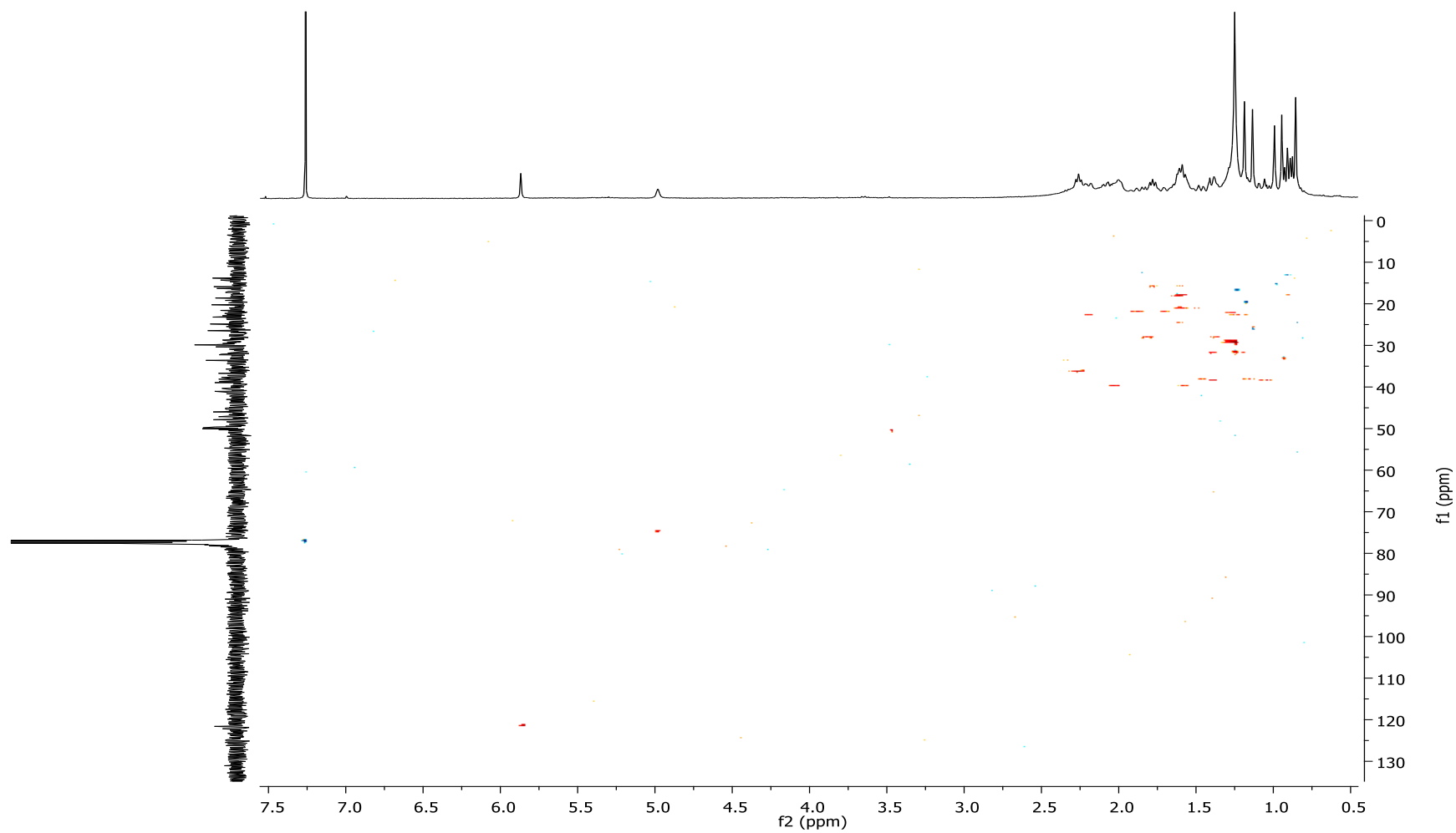


Figura S67: Espectro de RMN de HMBC (400 MHz, CDCl_3) do composto **SL4**.

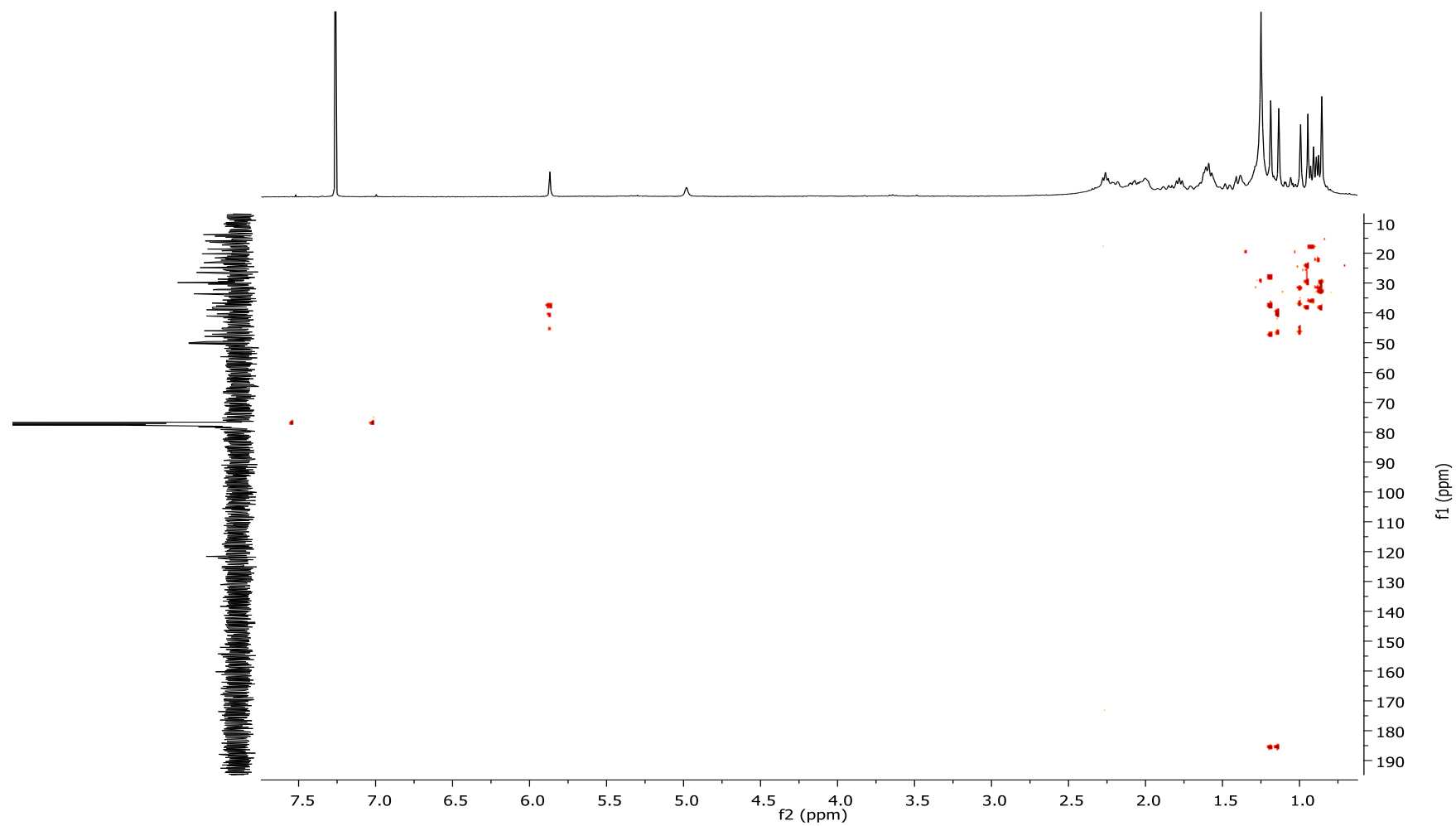


Figura S68: Espectro de RMN de NOESY (400 MHz, CDCl_3) do composto **SL4**.

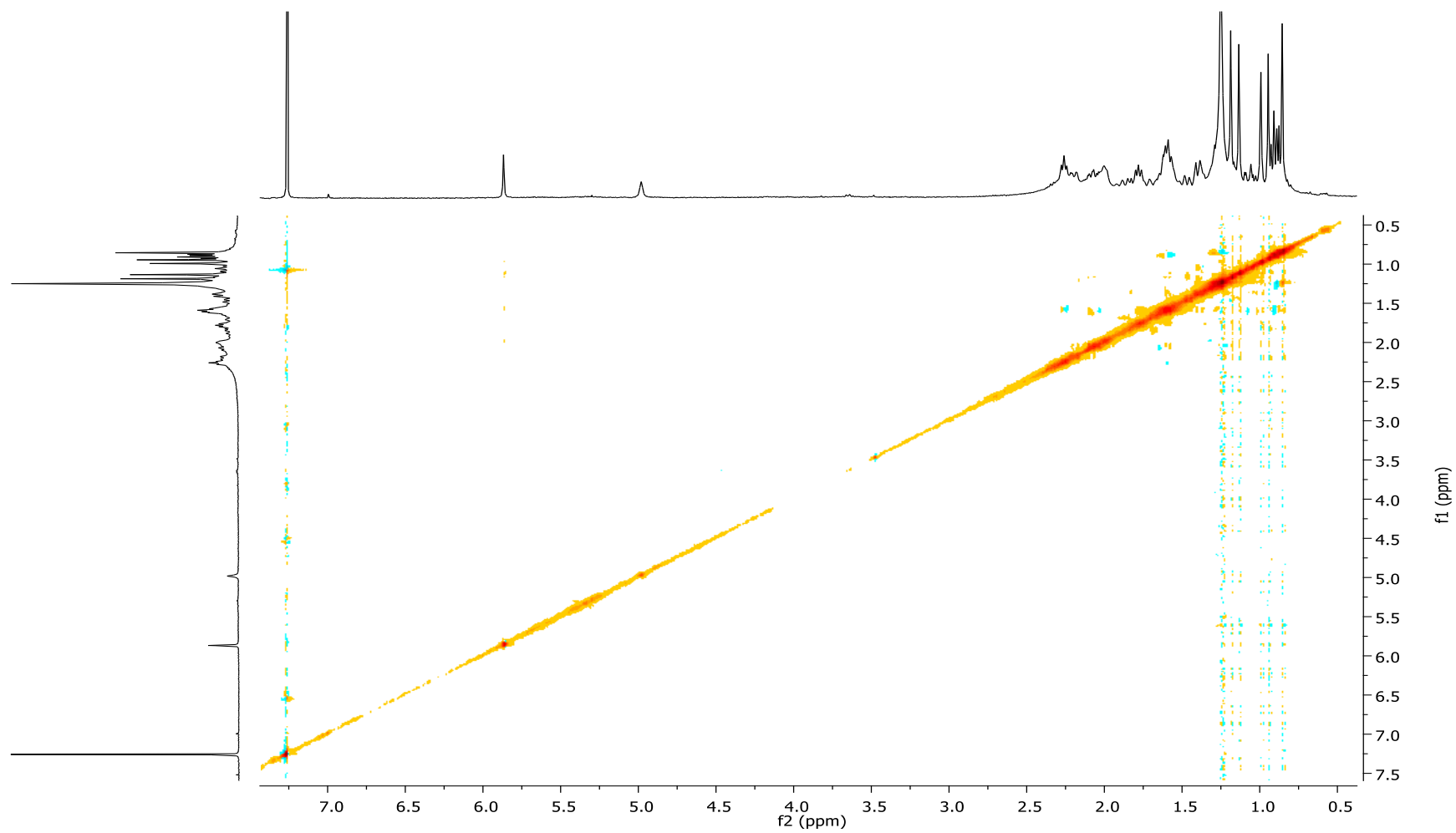


Figura S69: Espectro de IES-EMAR de **SL4** ($[M + H]$, modo de ionização positivo).

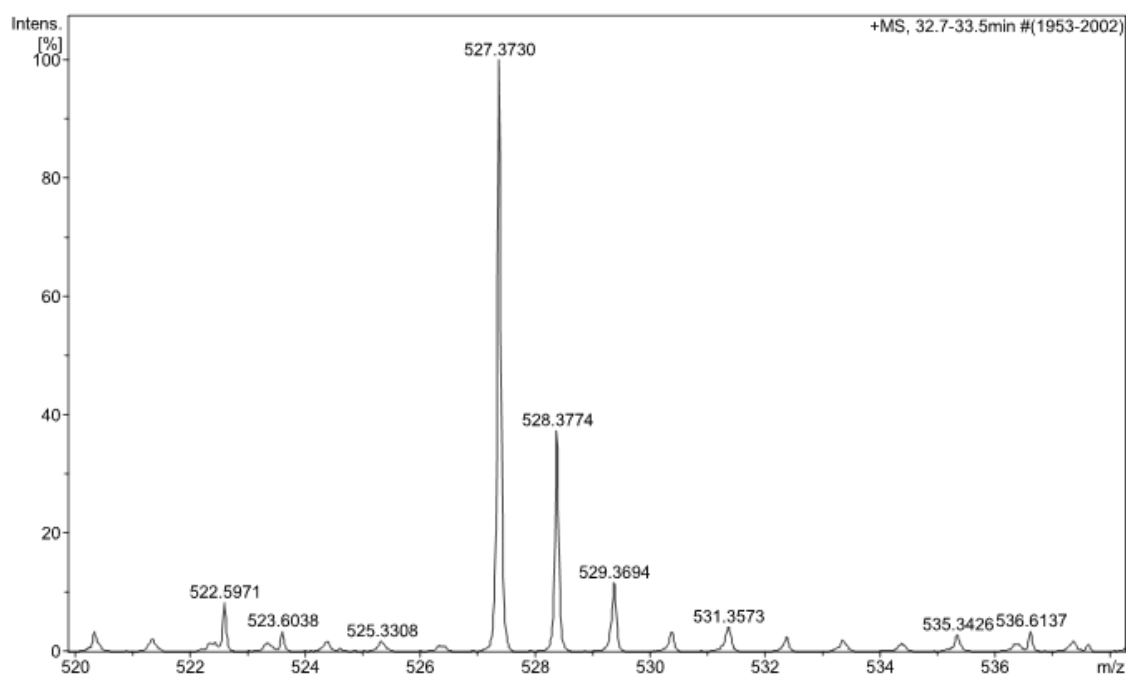


Figura S70: Espectro de CLAE-IESEM/EM de **SL4** ($[M + H]$, modo de ionização positivo).

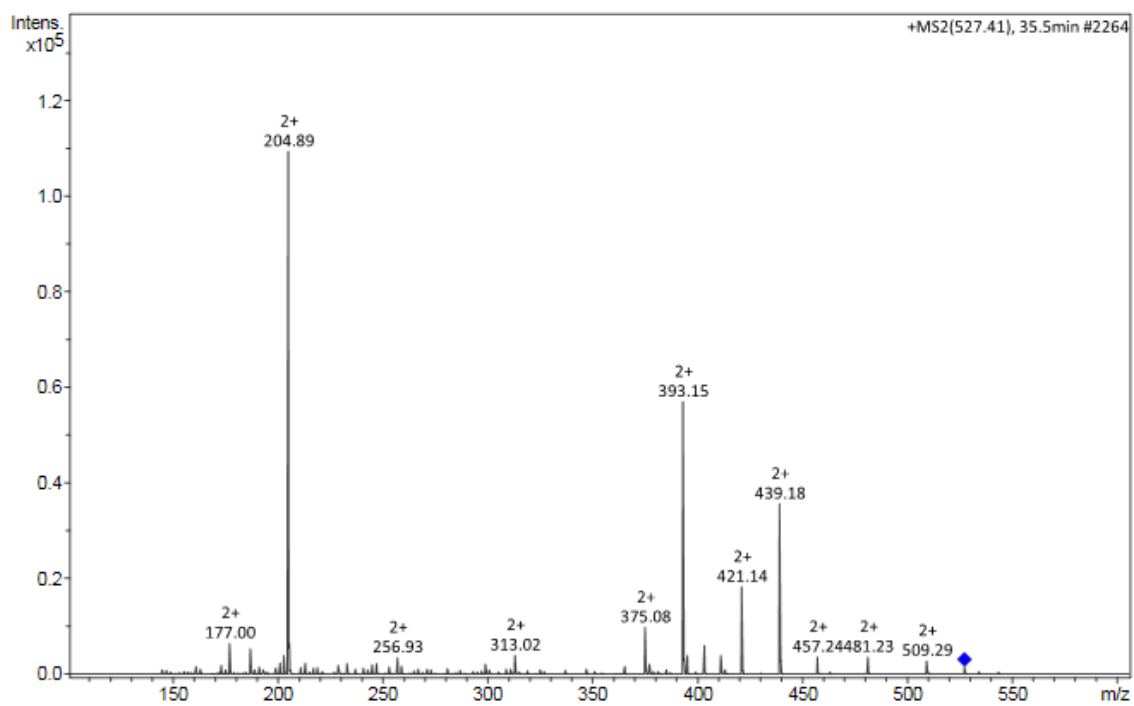


Figura S71: Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) do composto **SL5**.

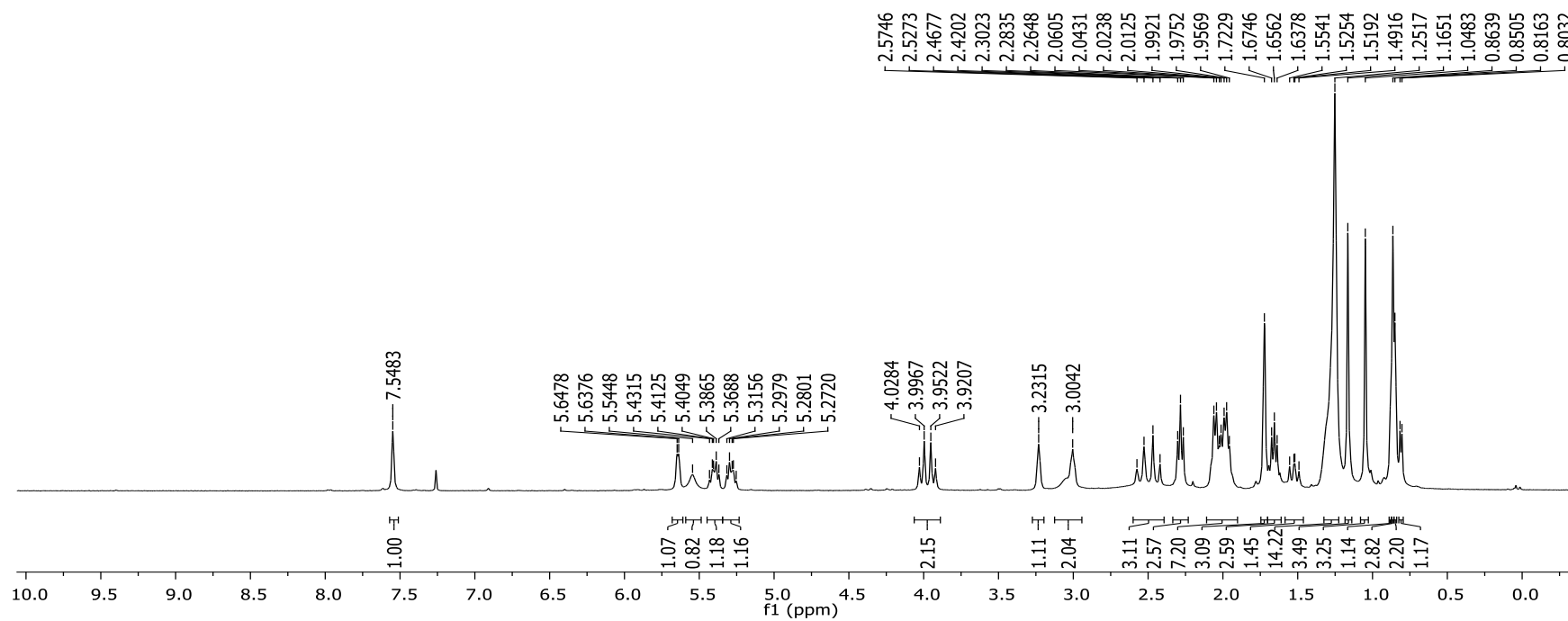


Figura S72: Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) do composto **SL5** (expansão).

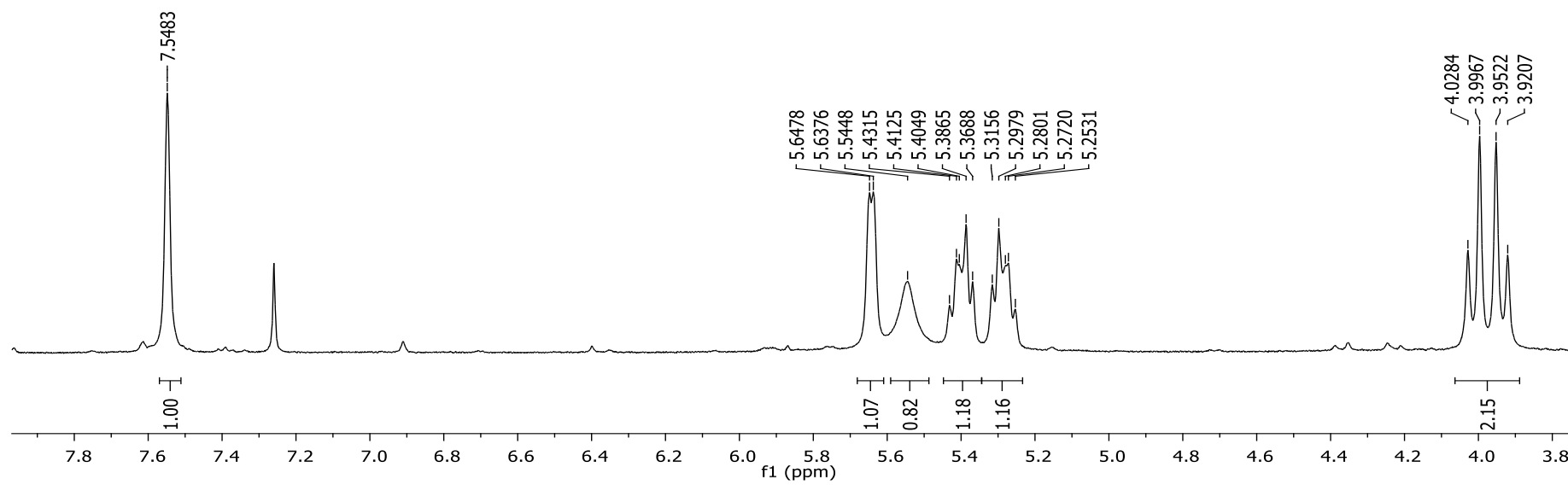


Figura S73: Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) do composto **SL5** (expansão).

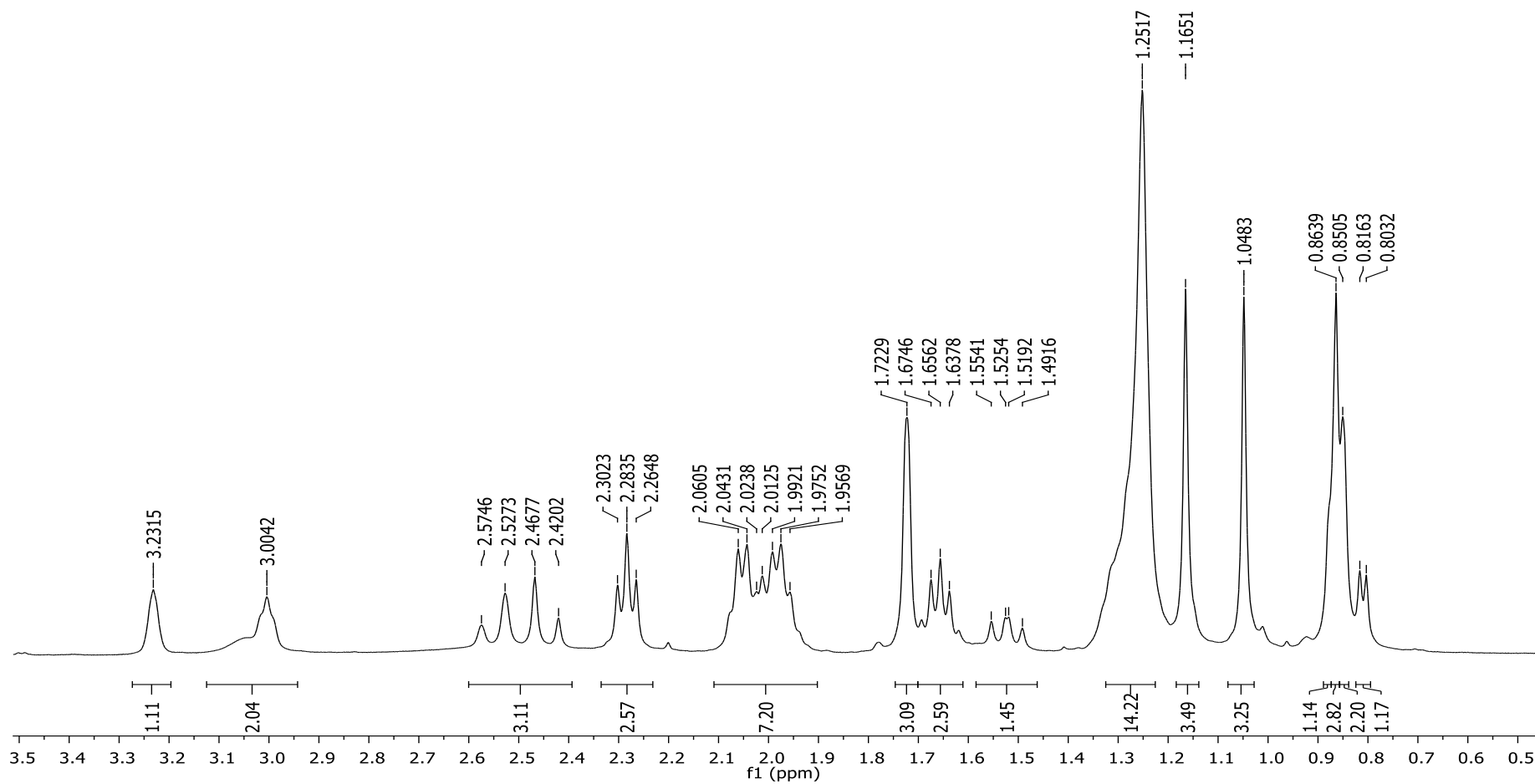


Figura S74: Espectro de RMN de ^{13}C -APT (100 MHz, CDCl_3) do composto **SL5**.

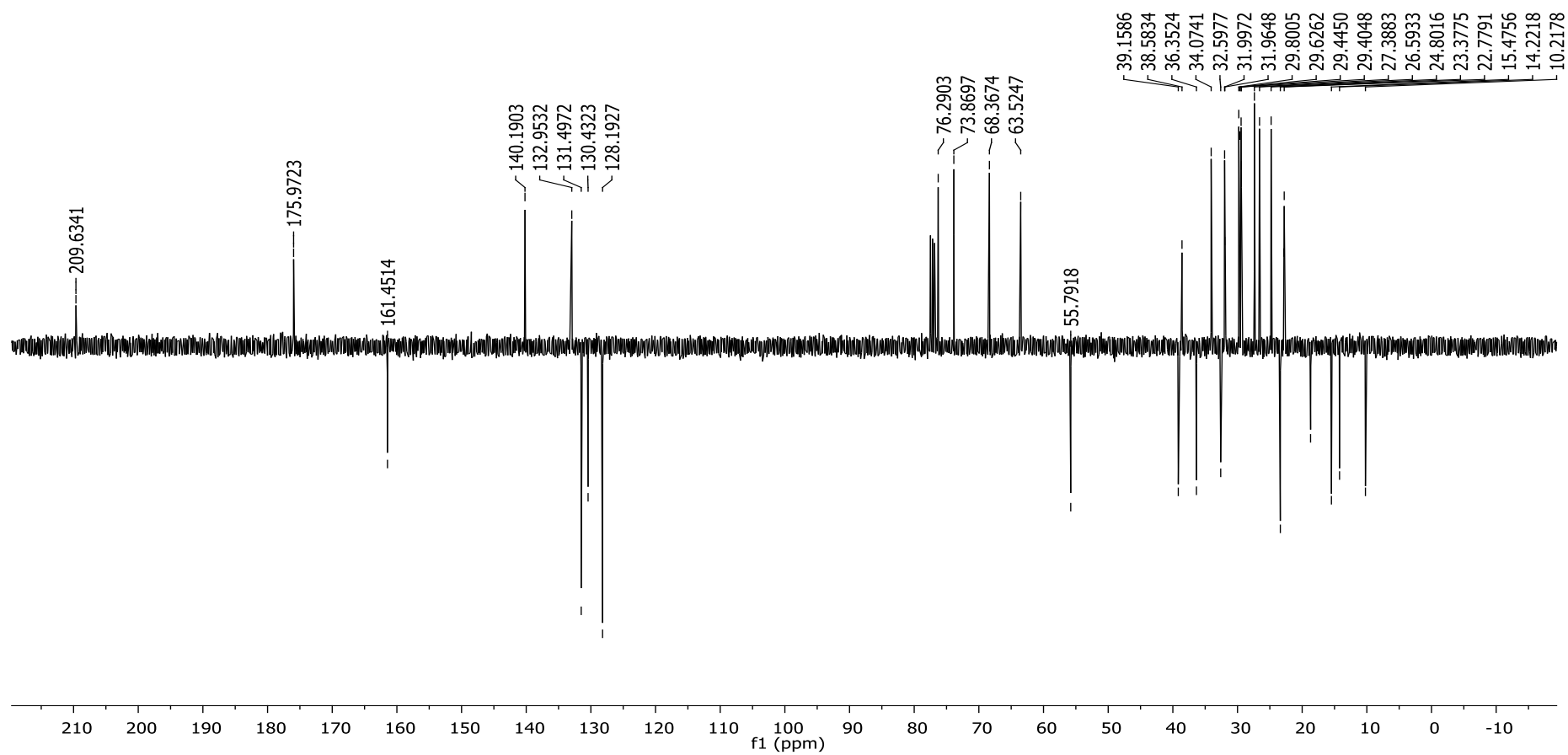


Figura S75: Espectro de RMN de ^{13}C -APT (100 MHz, CDCl_3) do composto SL5 (expansão).

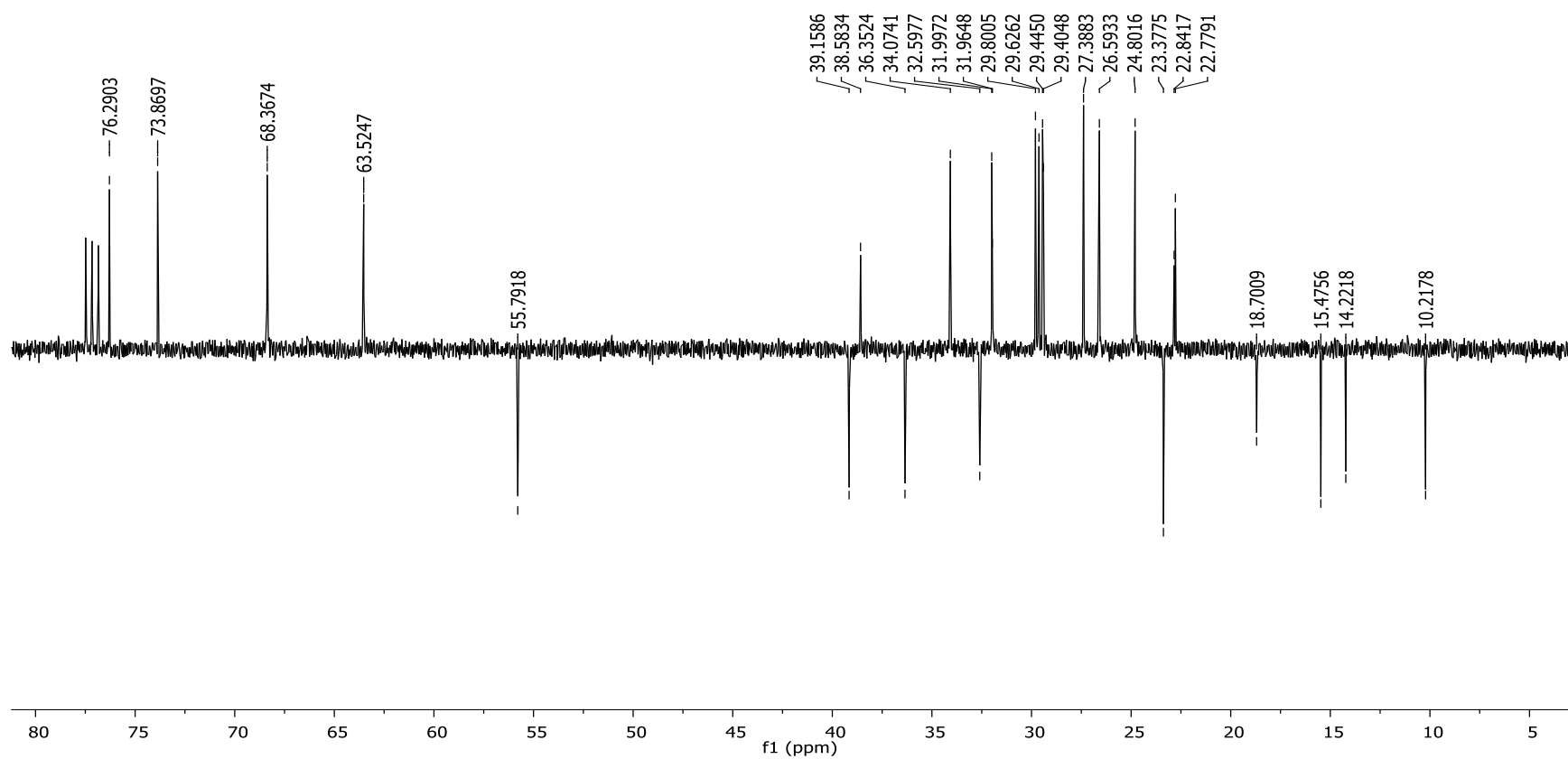


Figura S76: Espectro de RMN de COSY (400 MHz, CDCl_3) do composto **SL5**.

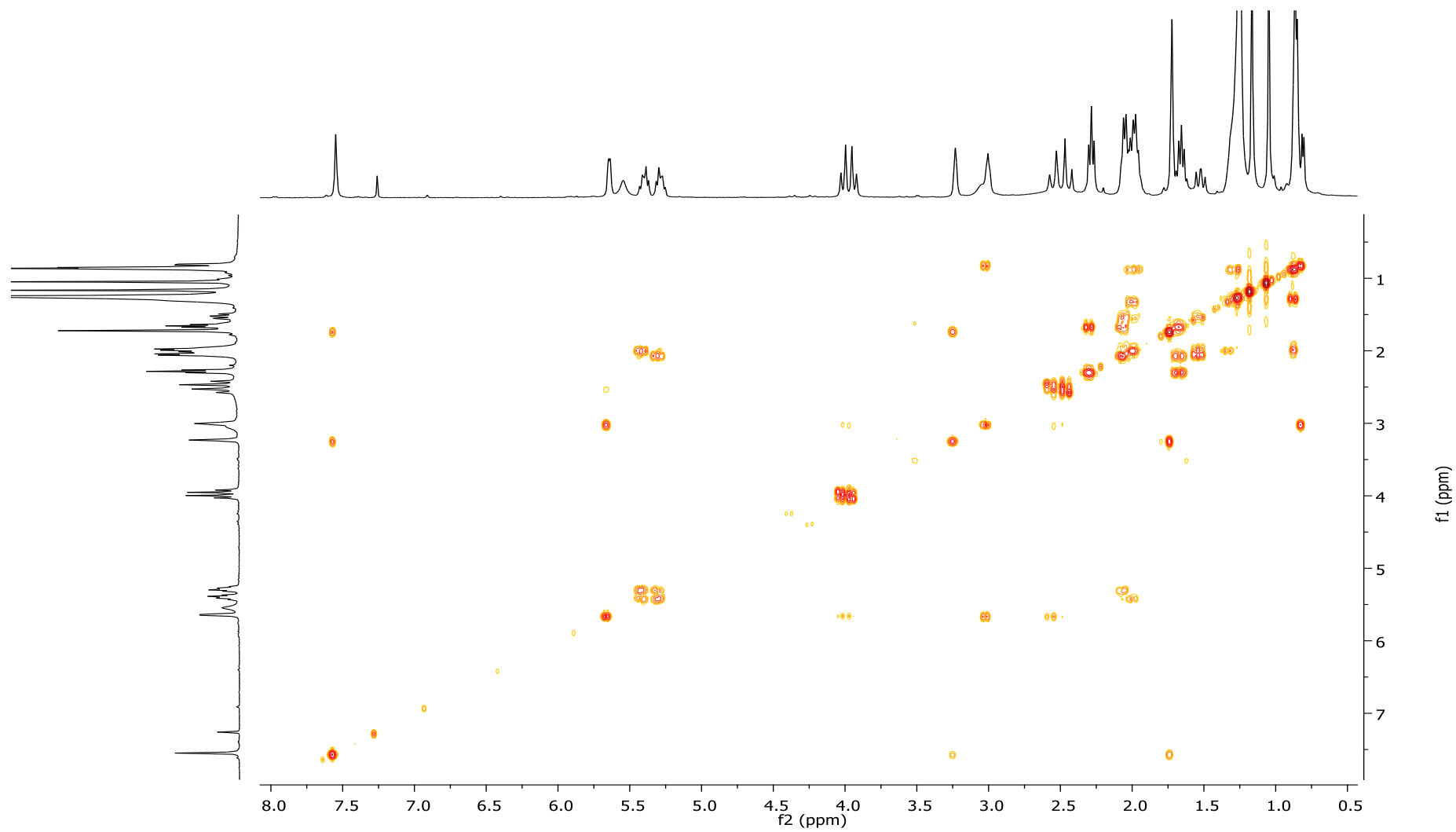


Figura S77: Espectro de RMN de HSQC (400 MHz, CDCl_3) do composto **SL5**.

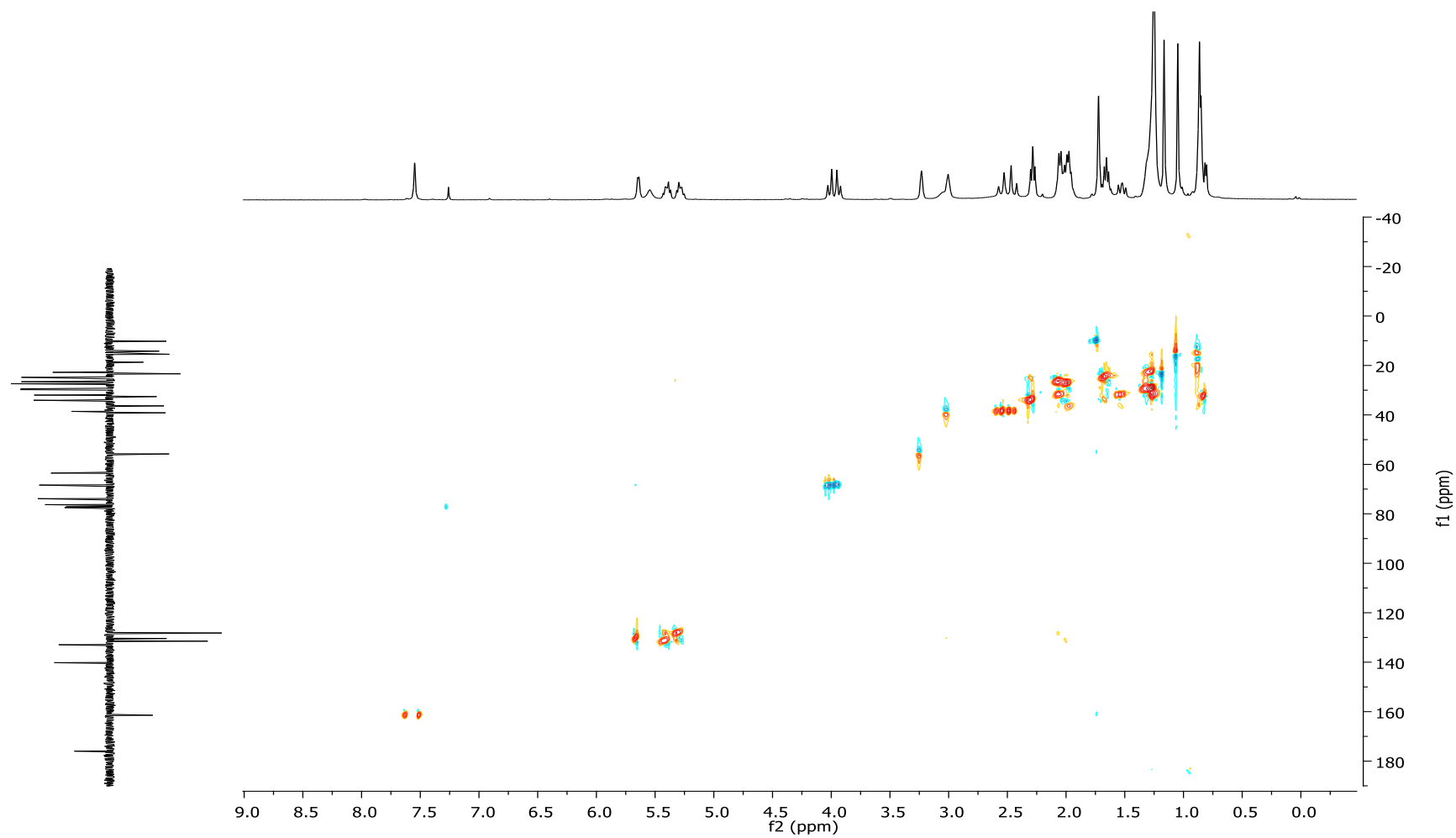


Figura S78: Espectro de RMN de HSQC (400 MHz, CDCl_3) do composto **SL5** (expansão).

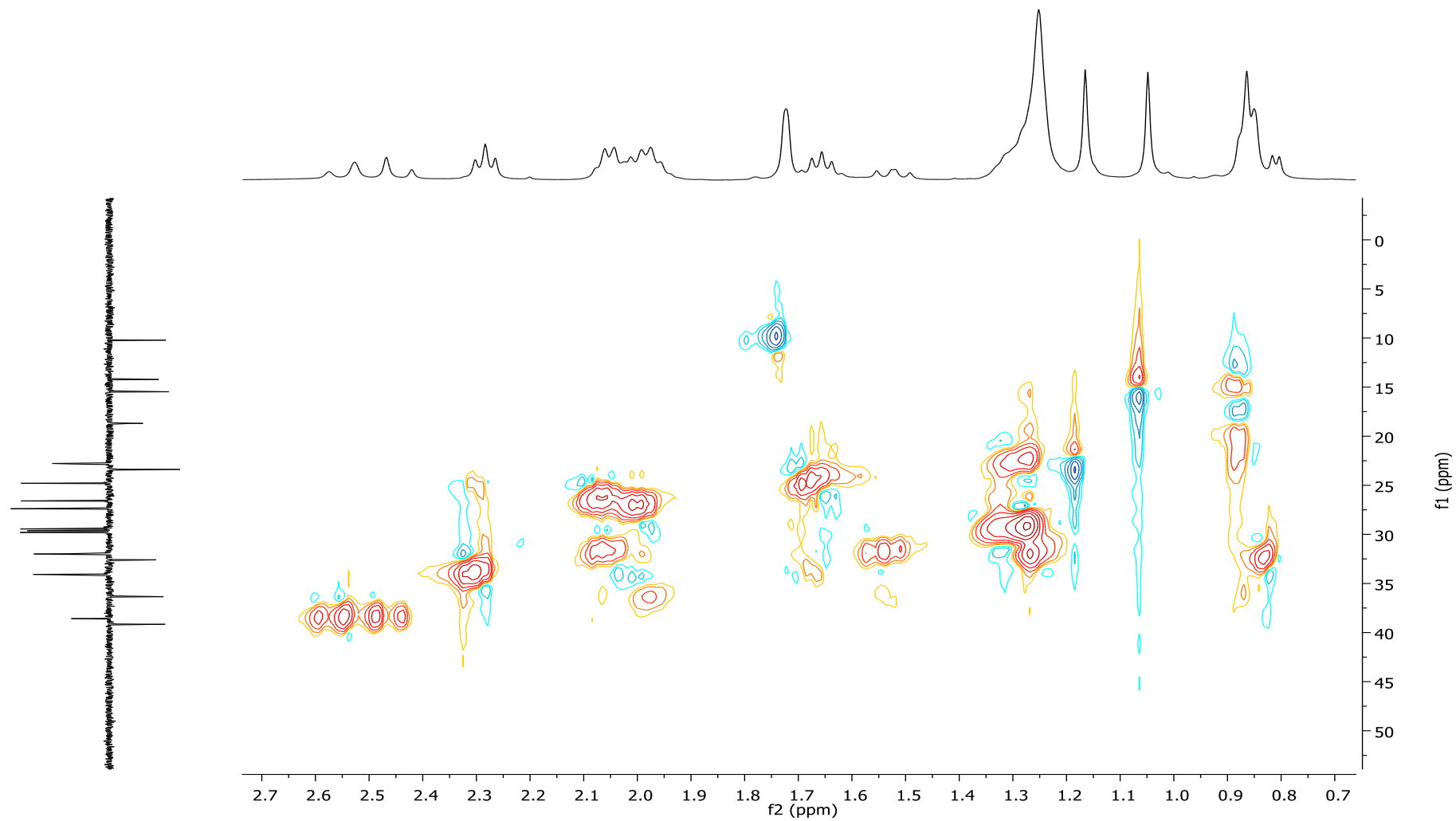


Figura S79: Espectro de RMN de HMBC (400 MHz, CDCl_3) do composto **SL5**.

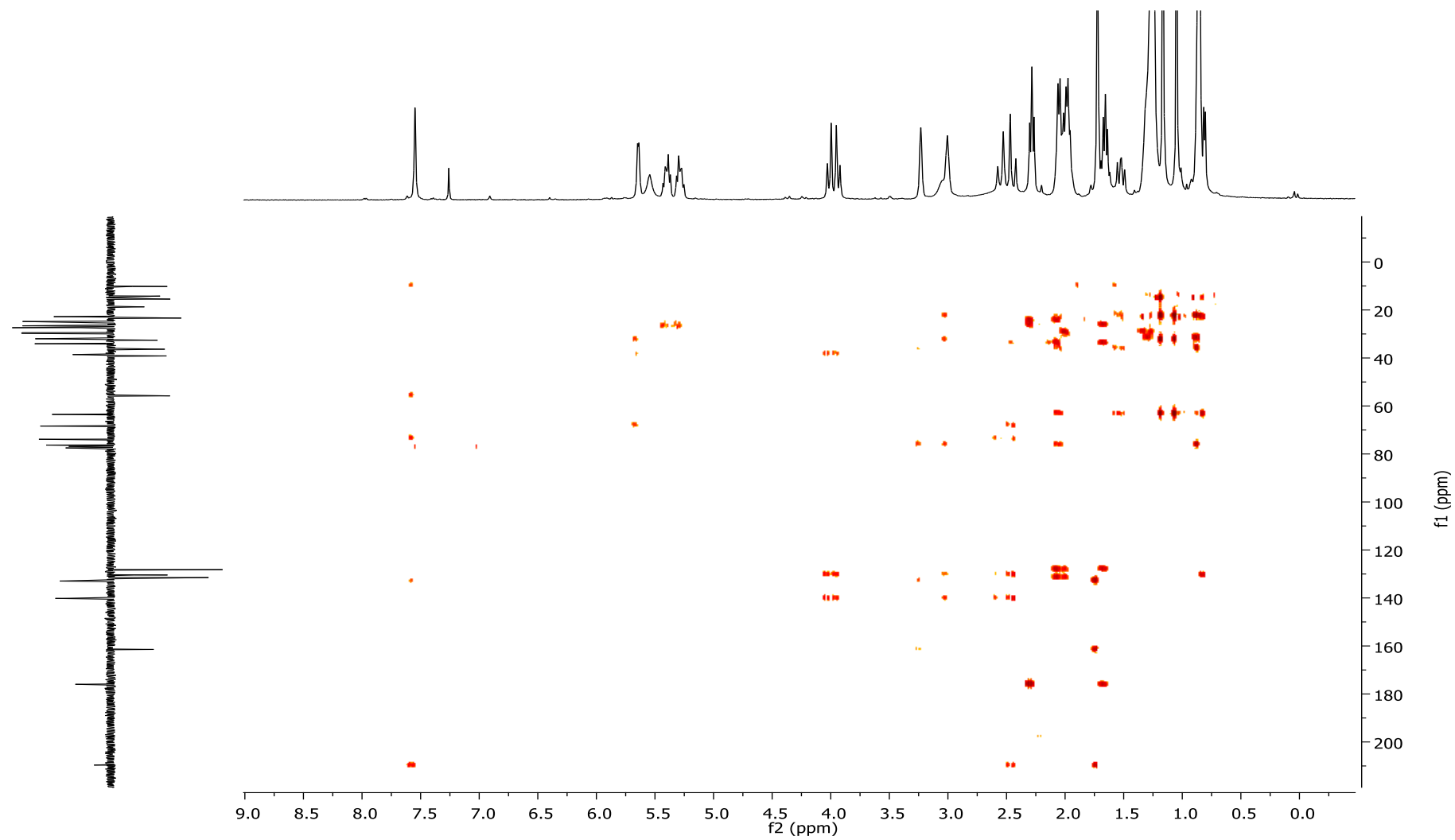


Figura S80: Espectro de RMN de HMBC (400 MHz, CDCl_3) do composto **SL5** (expansão).

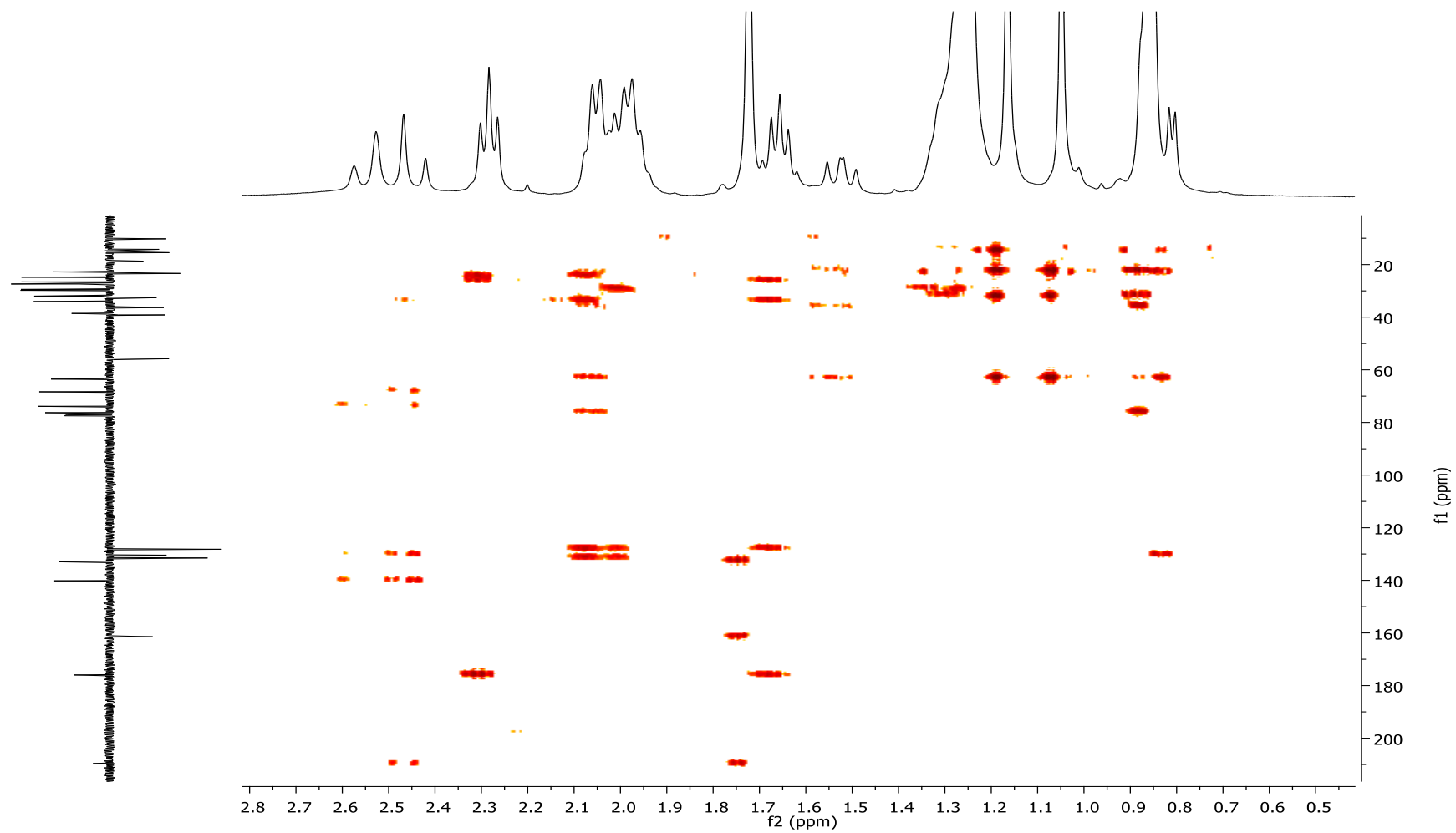


Figura S81: Espectro de RMN de HSQC (400 MHz, CDCl_3) do composto **SL5** (expansão).

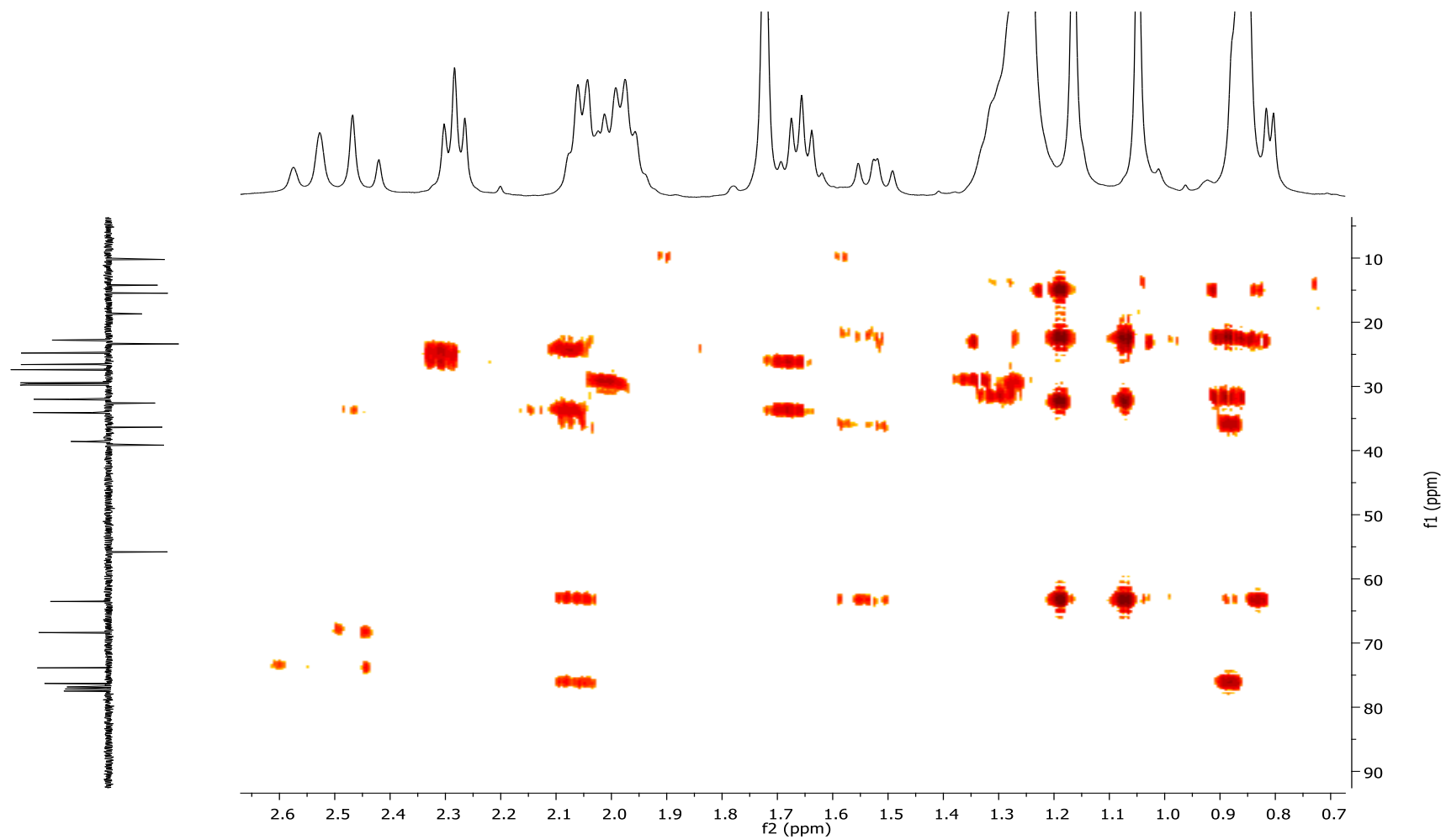


Figura S82: Espectro de RMN de NOESY (400 MHz, CDCl_3) do composto **SL5**.

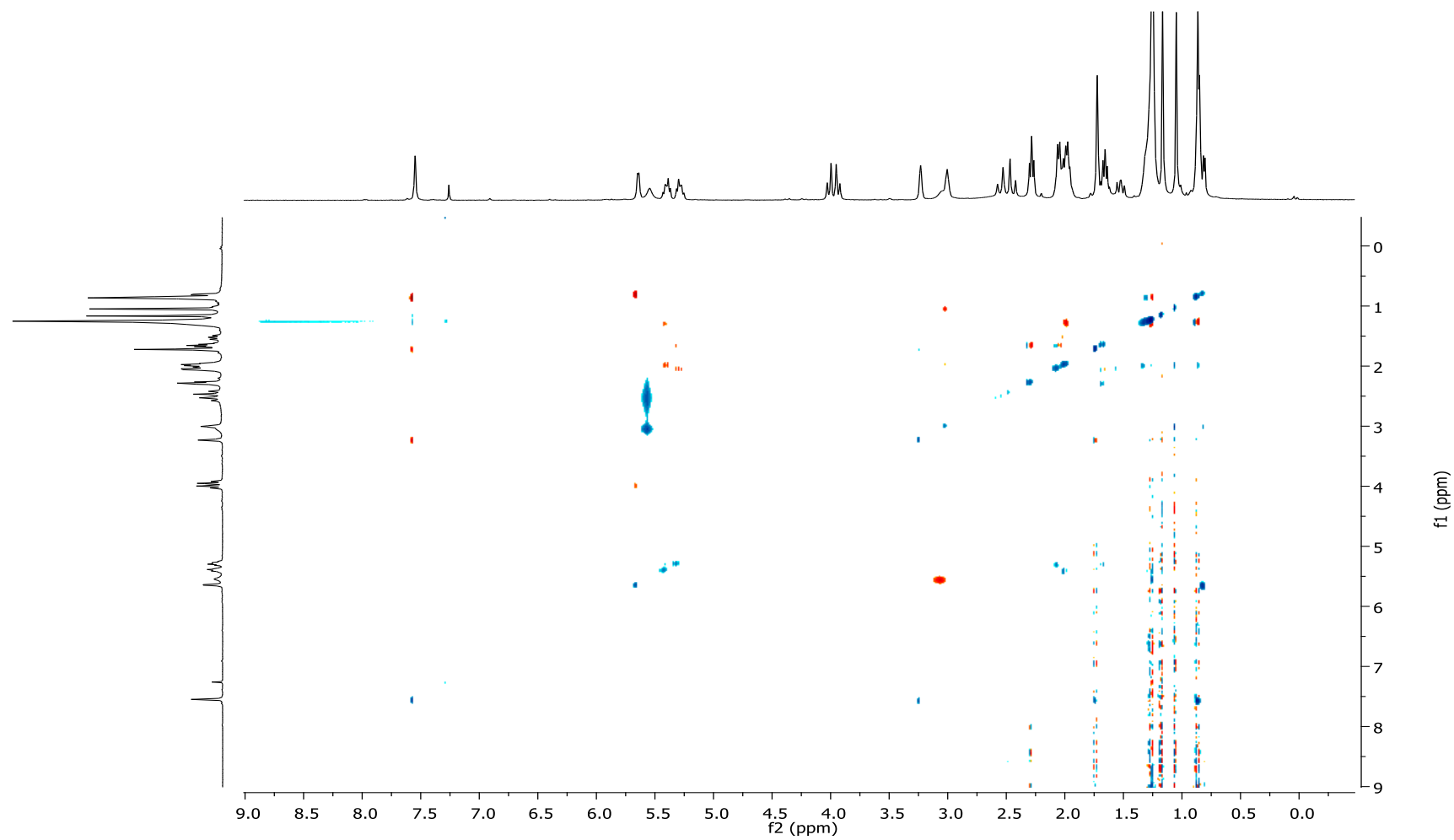


Figura S83: Espectro de IES-EMAR de SL5 ([M + H], modo de ionização positivo).

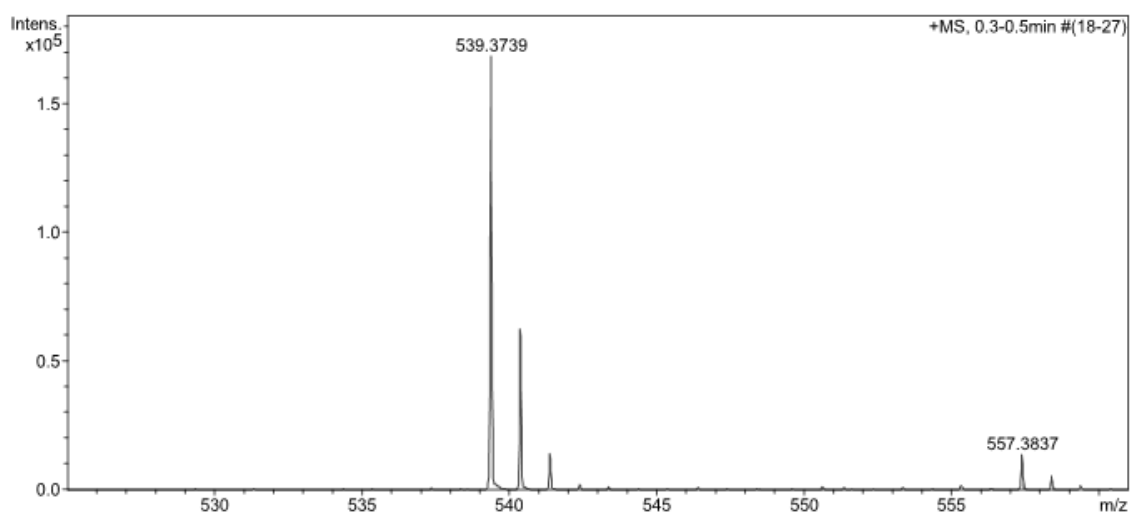


Figura S84: Espectro de CLAE-IESEM/EM de SL5 ([M + H], modo de ionização positivo).

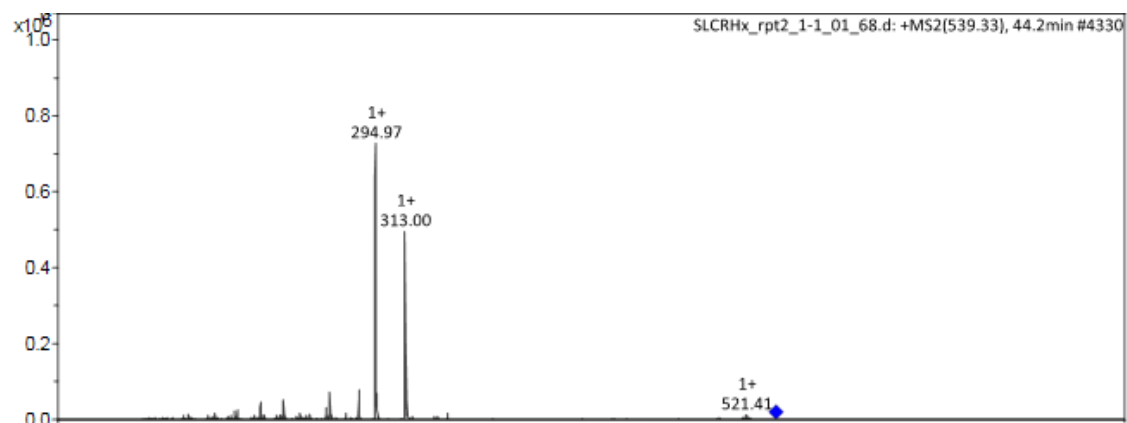


Figura S85: Padrão de fragmentação do composto SL5.

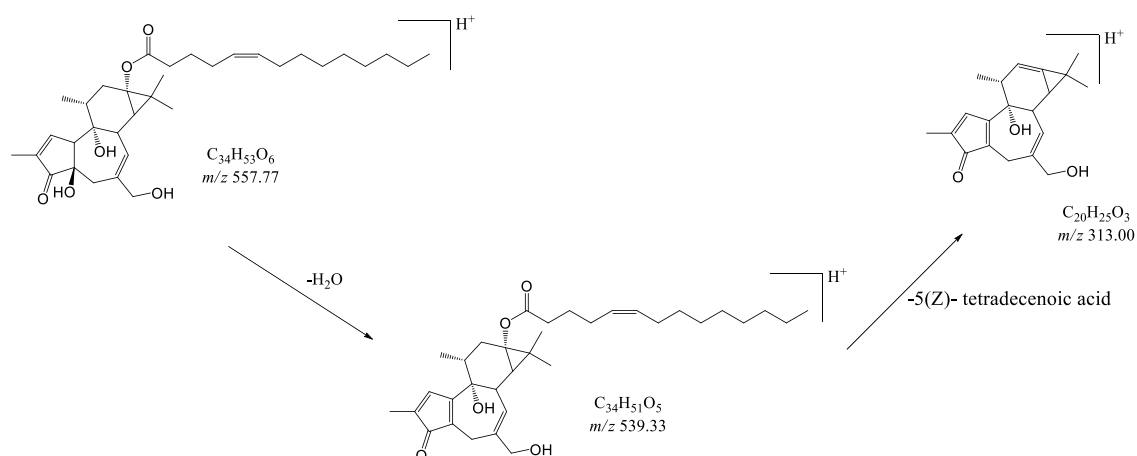


Figura S86: Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) do composto **SL6**.

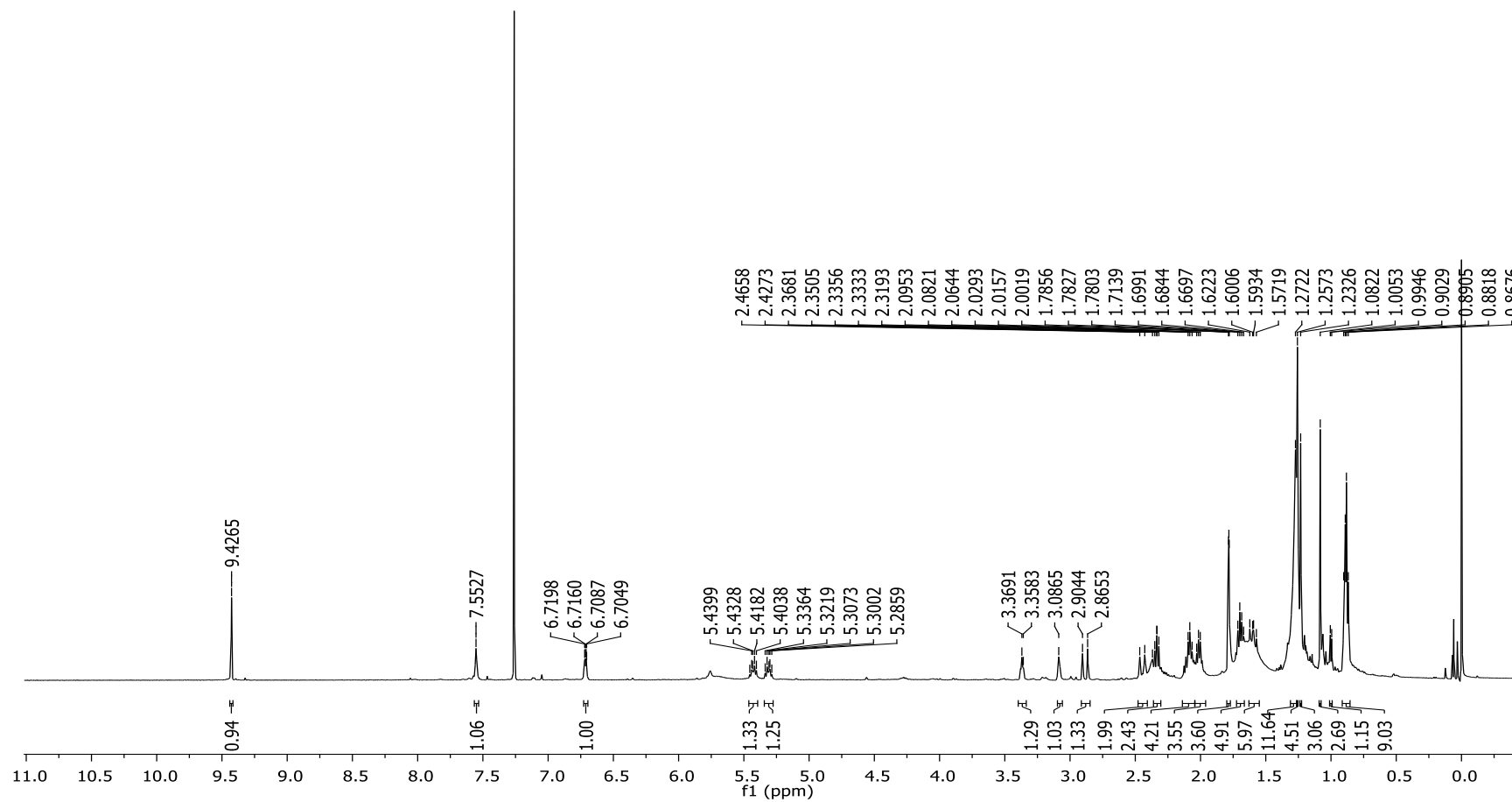


Figura S87: Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) do composto **SL6** (expansão).

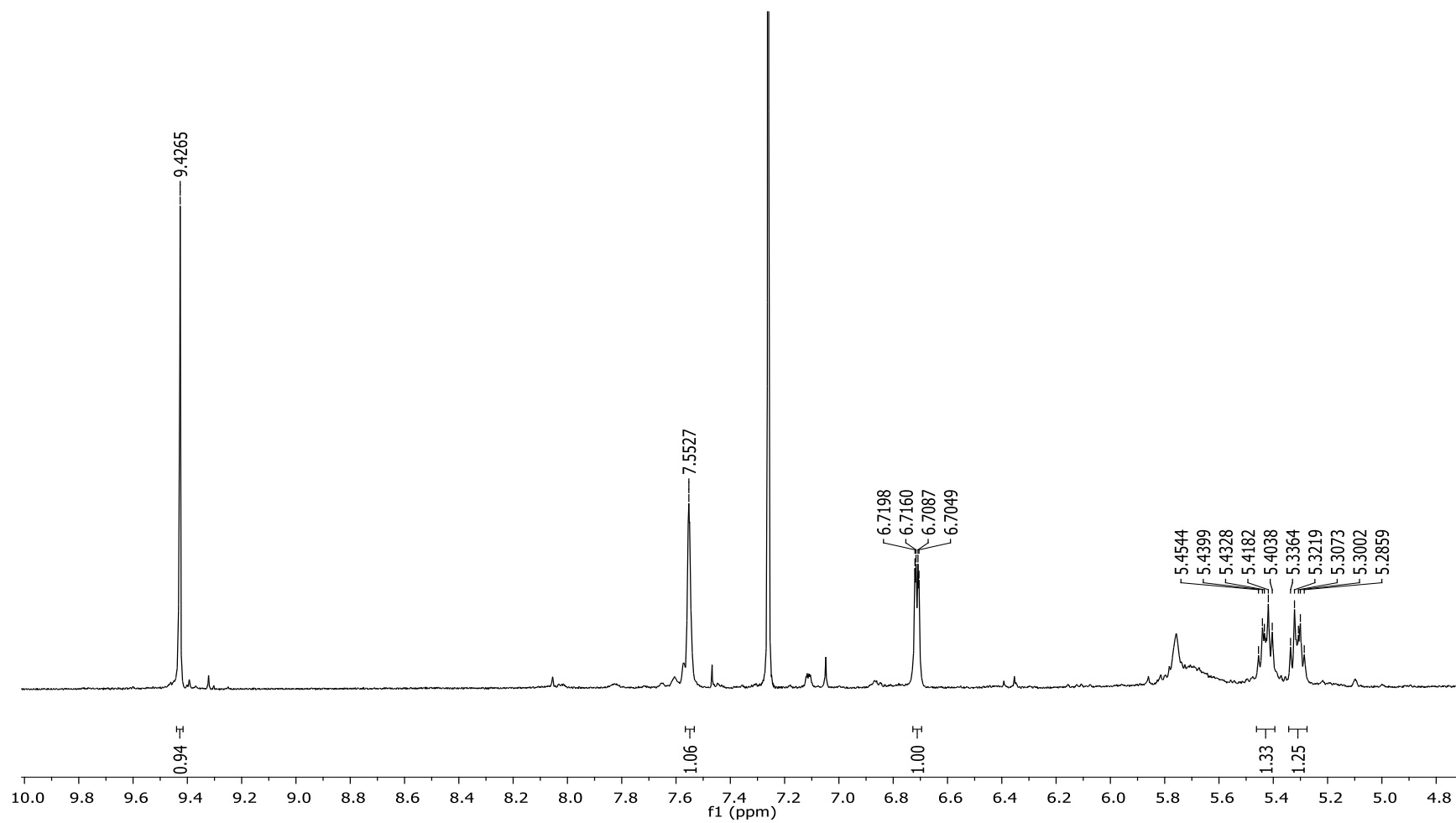
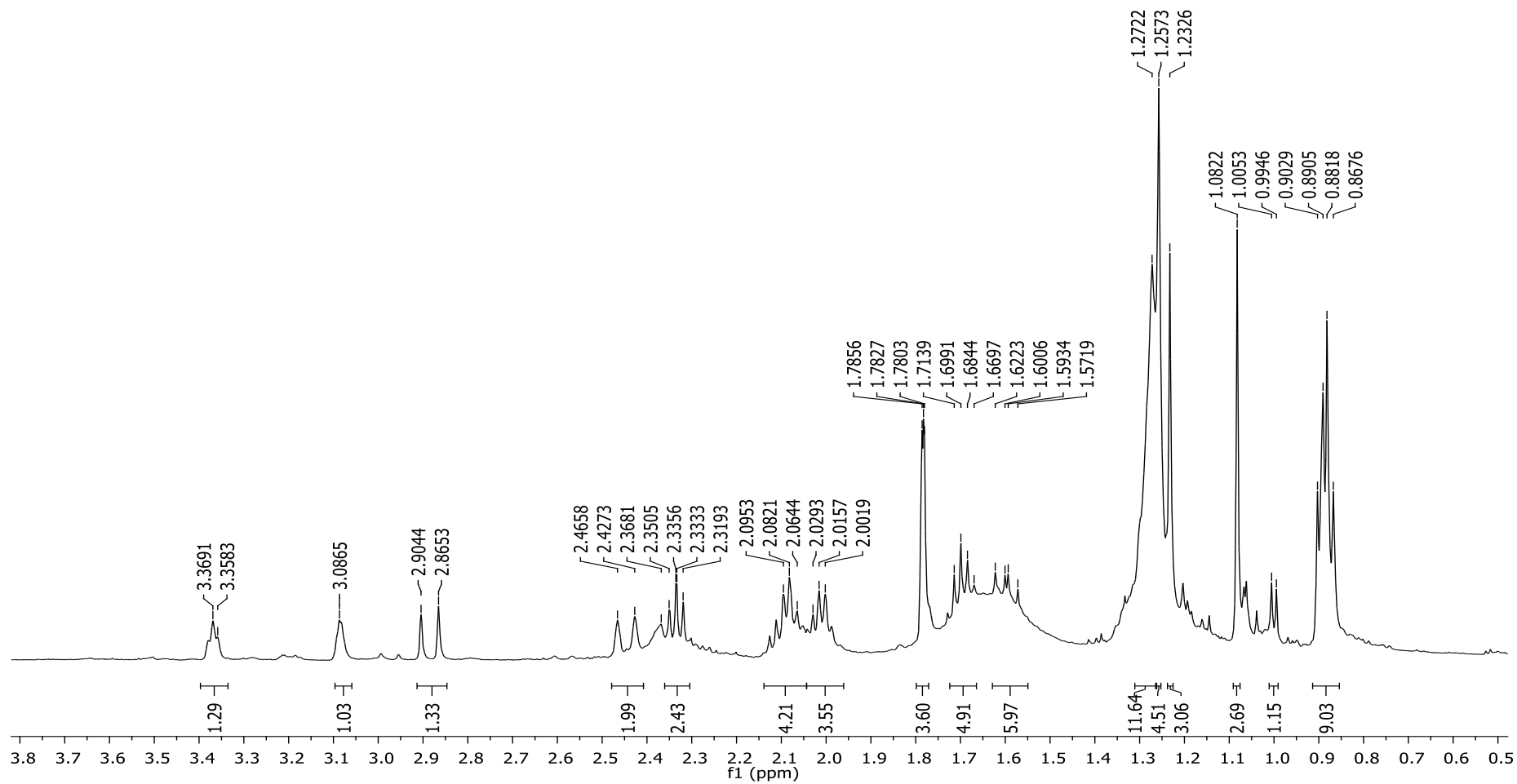


Figura S88: Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) do composto **SL6** (expansão).



.

Figura S89: Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) do composto **SL6**.

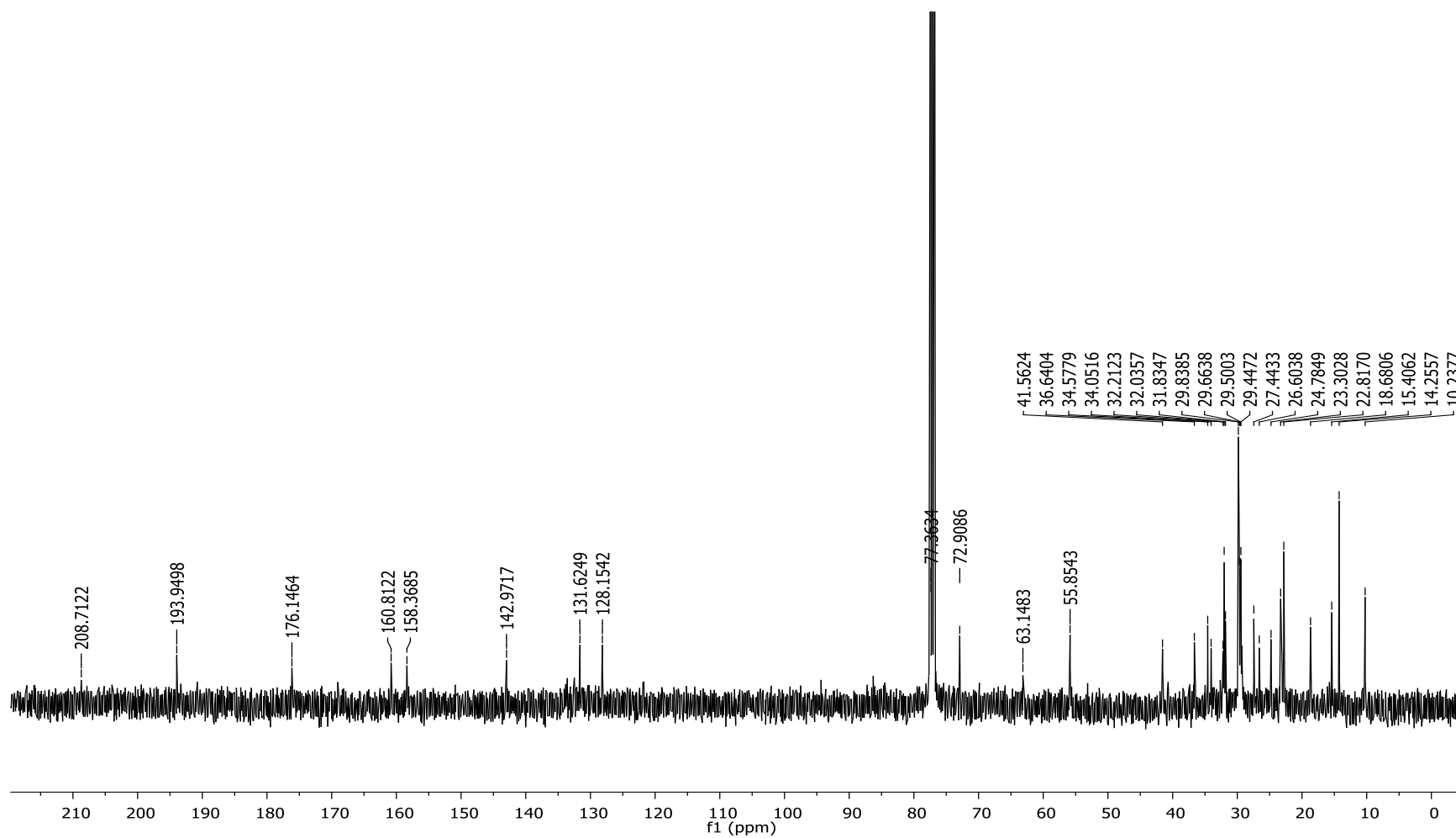


Figura S90: Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) do composto **SL6** (expansão).

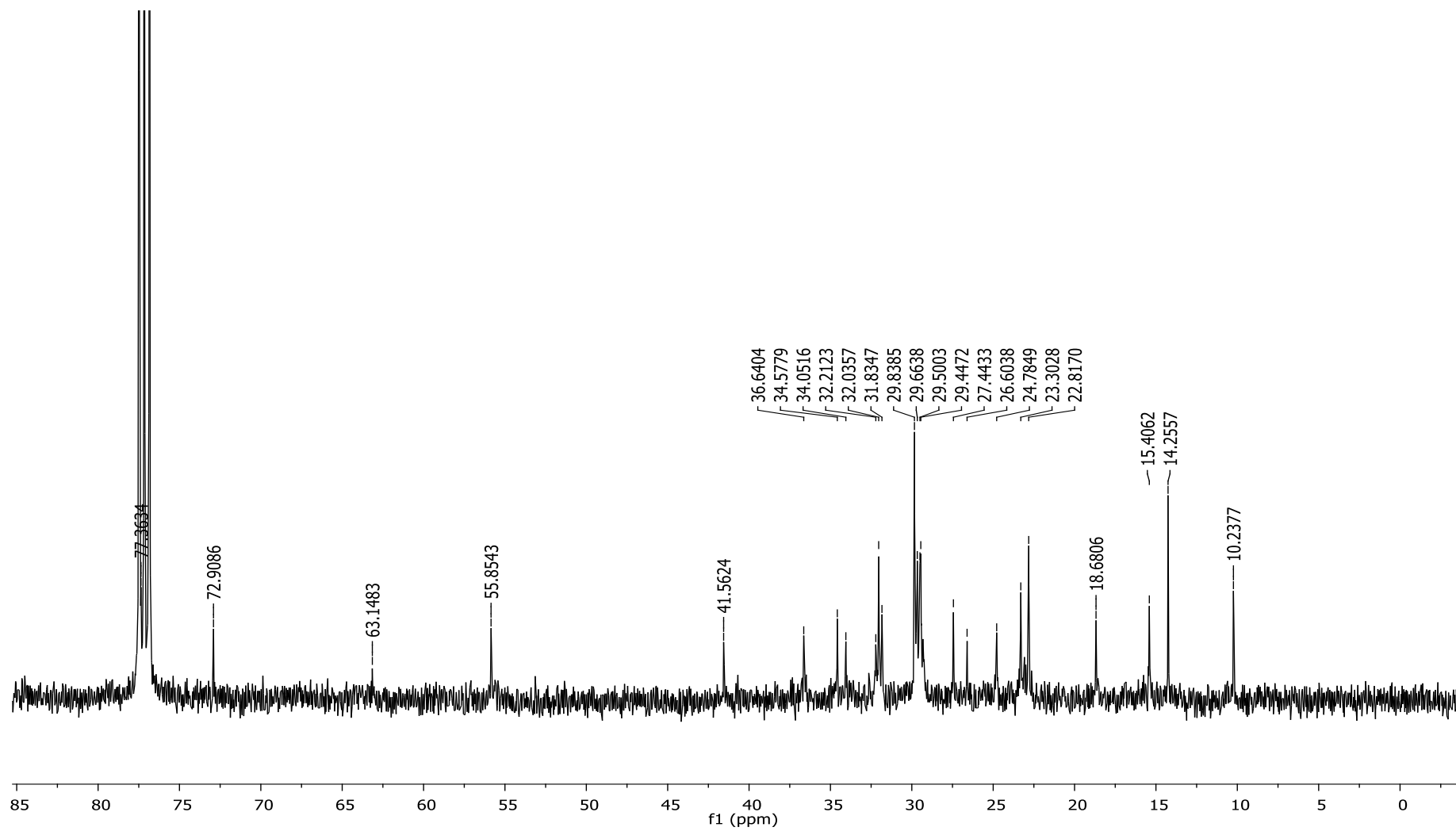


Figura S91: Espectro de RMN de COSY (400 MHz, CDCl_3) do composto **SL6**.

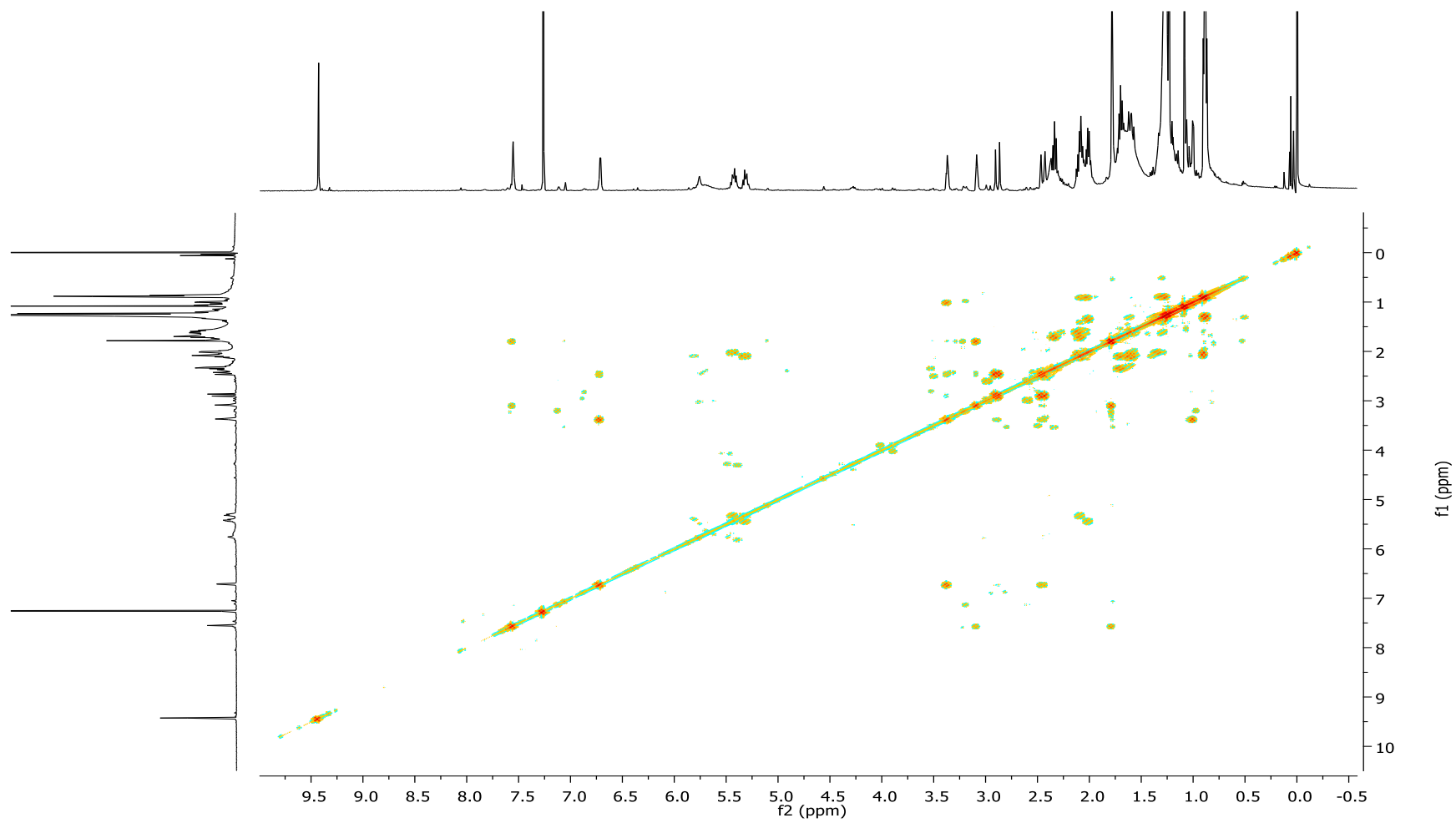


Figura S92: Espectro de RMN de HSQC (400 MHz, CDCl_3) do composto **SL6**.

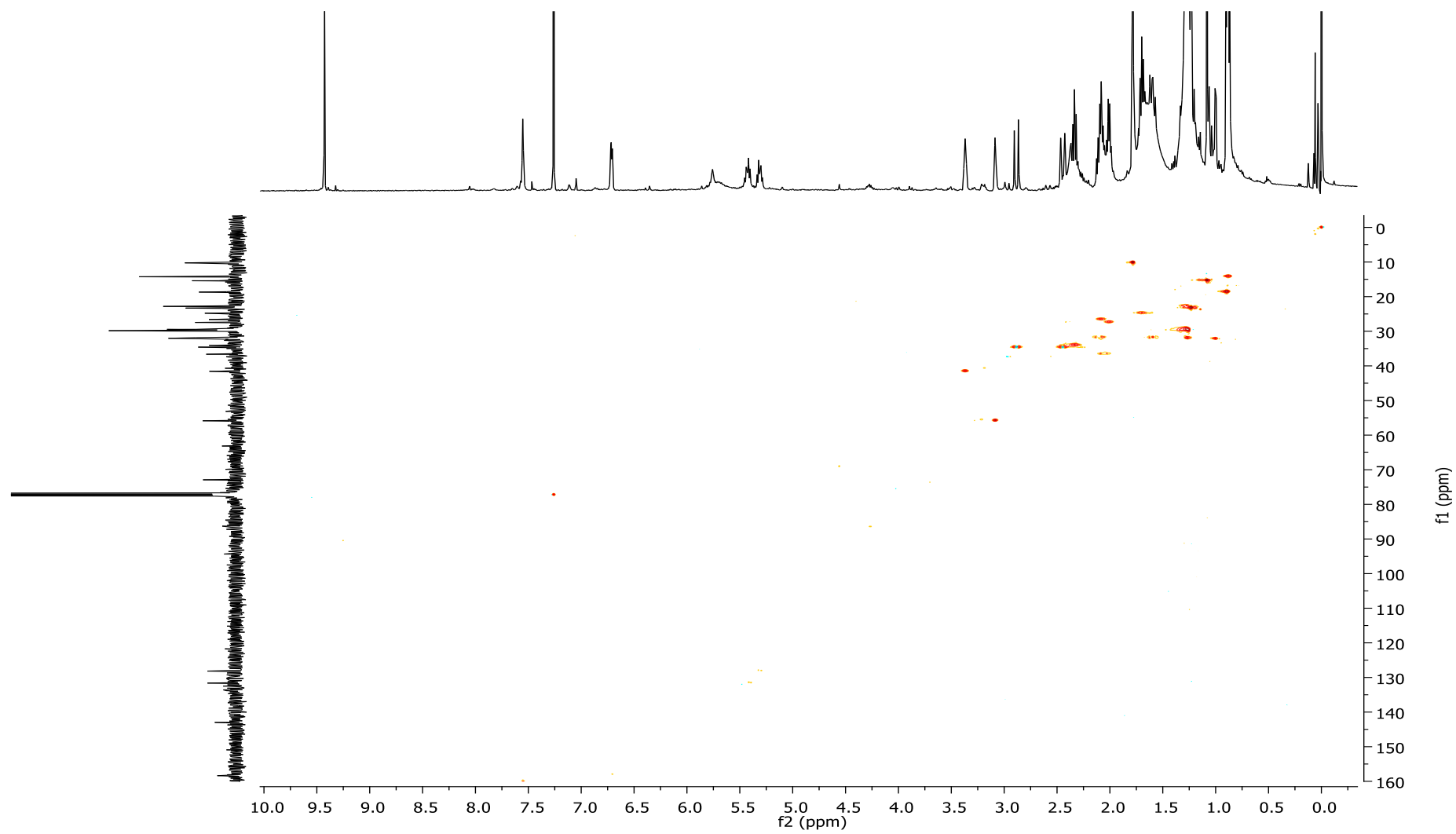


Figura S93: Espectro de RMN de HSQC (400 MHz, CDCl_3) do composto **SL6** (expansão).

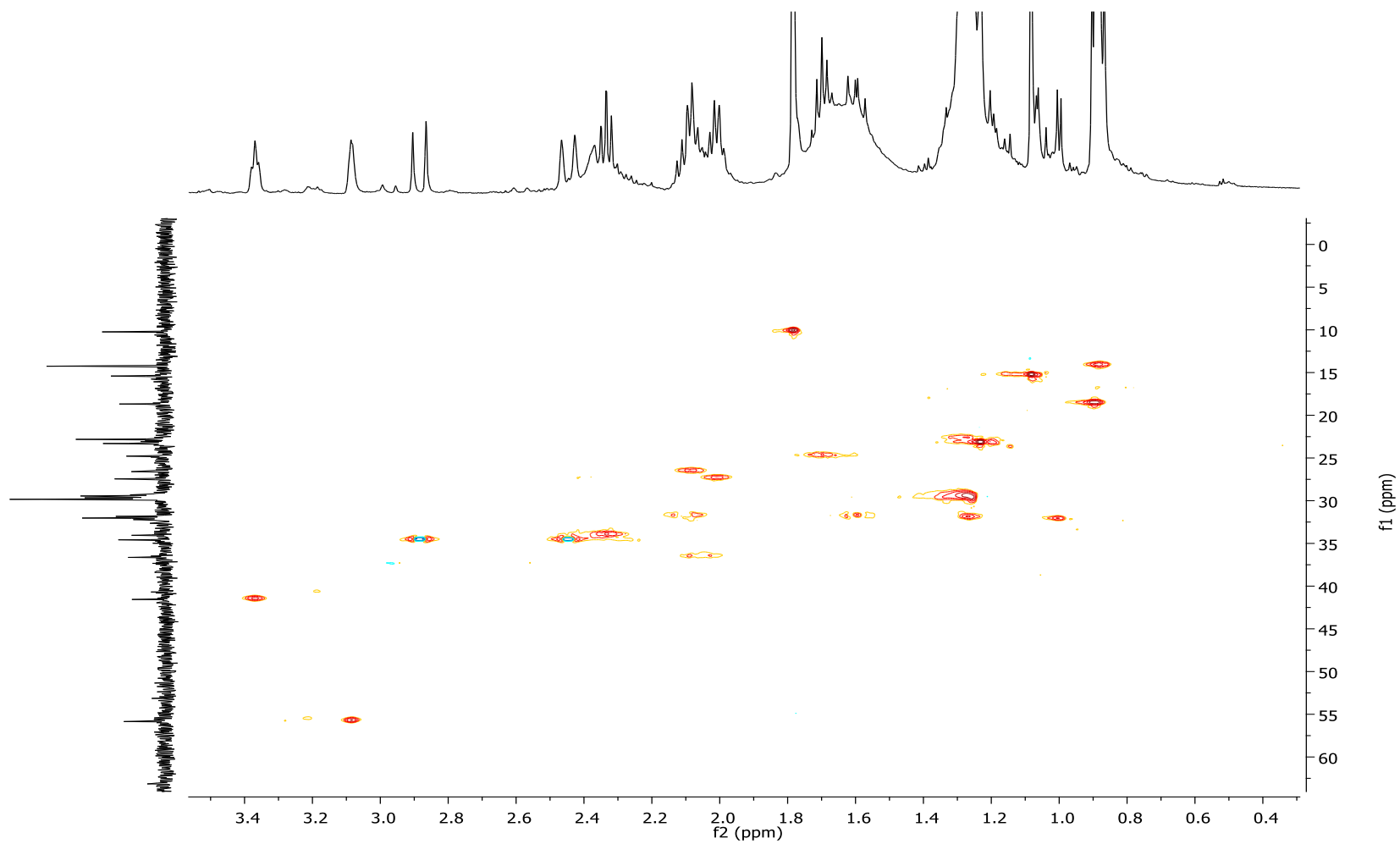


Figura S94: Espectro de RMN de HMBC (400 MHz, CDCl_3) do composto **SL6**.

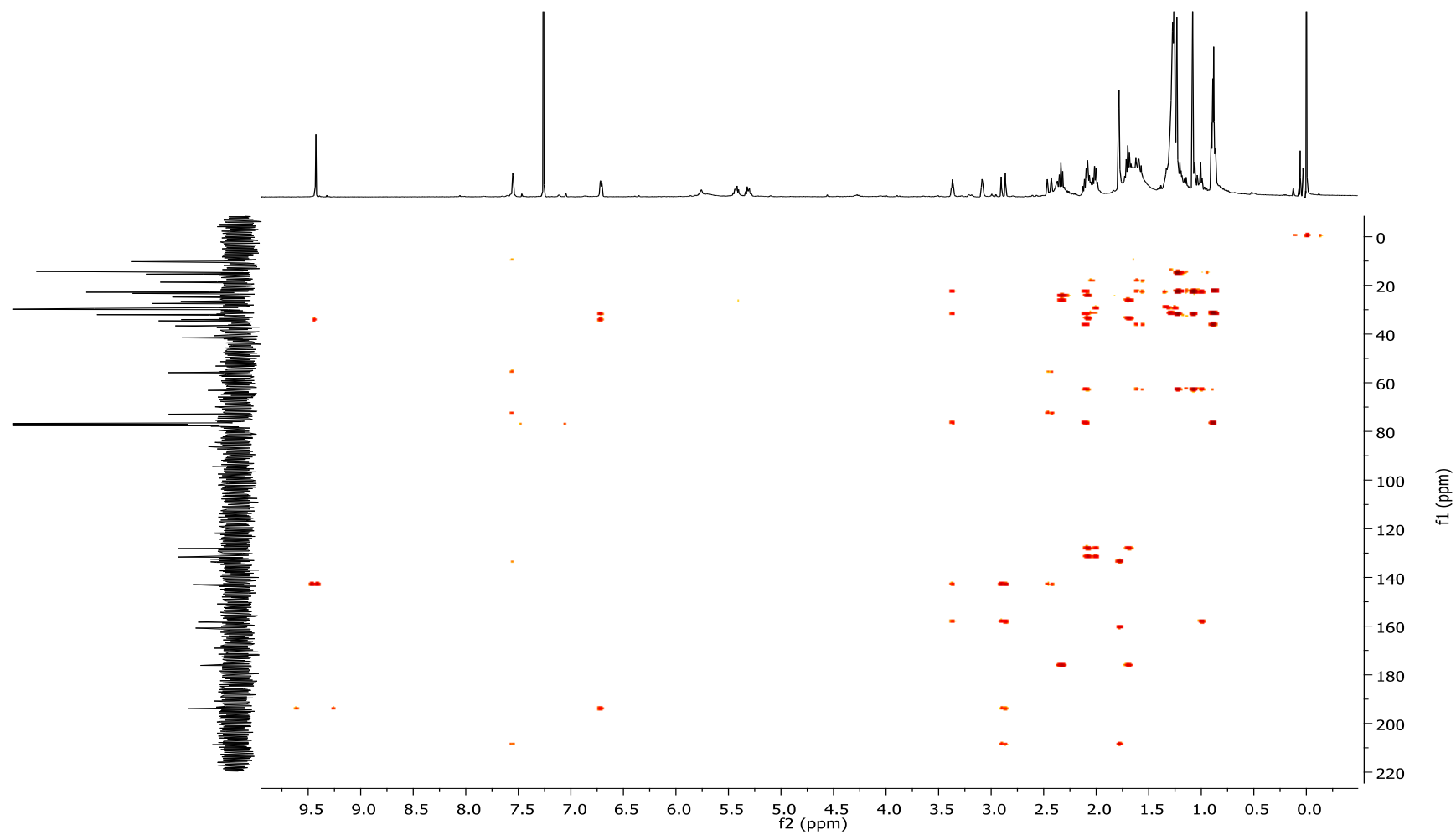


Figura S95: Espectro de RMN de HMBC (400 MHz, CDCl_3) do composto **SL6** (expansão).

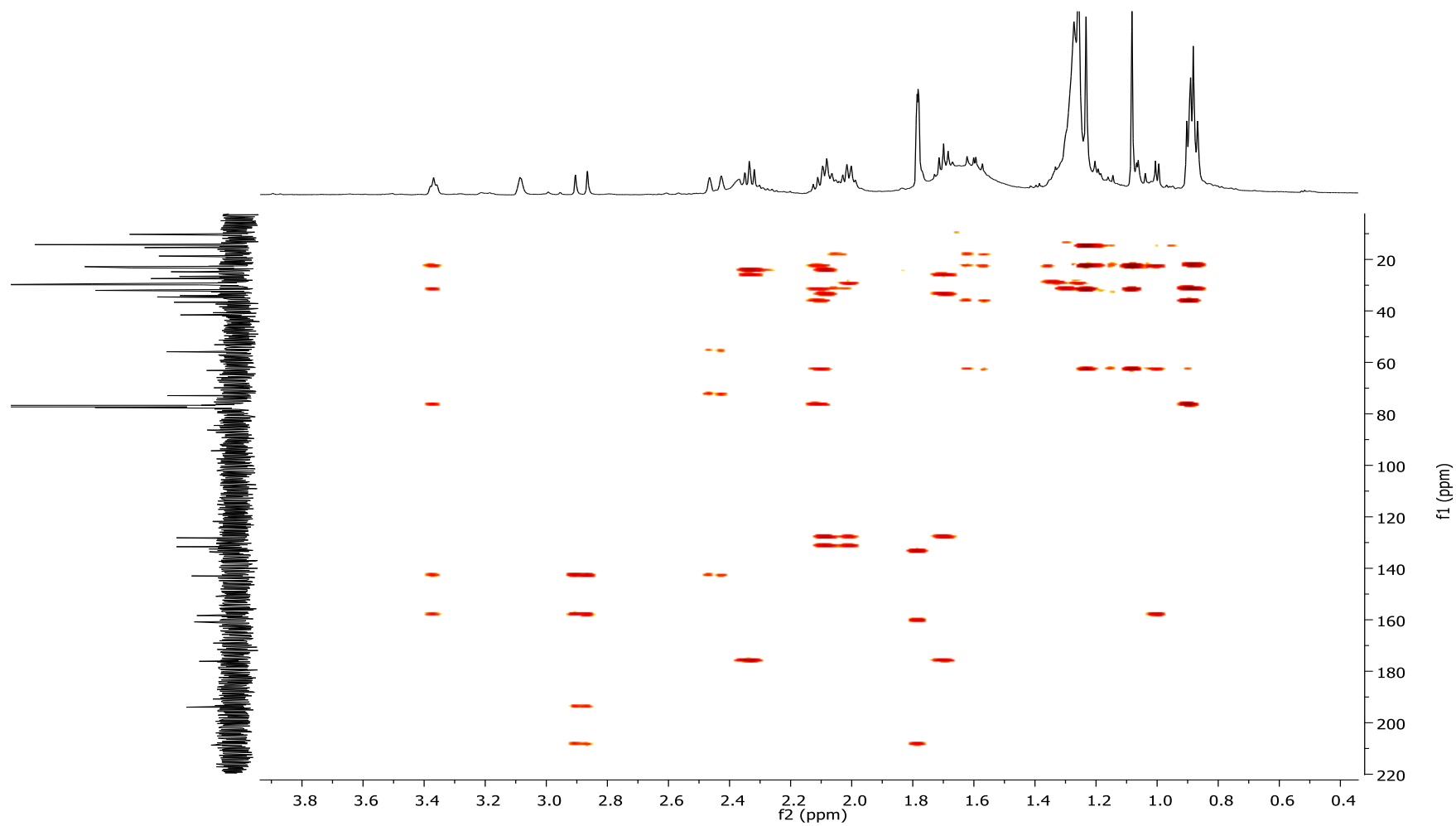


Figura S96: Espectro de RMN de NOESY (400 MHz, CDCl₃) do composto **SL6**.

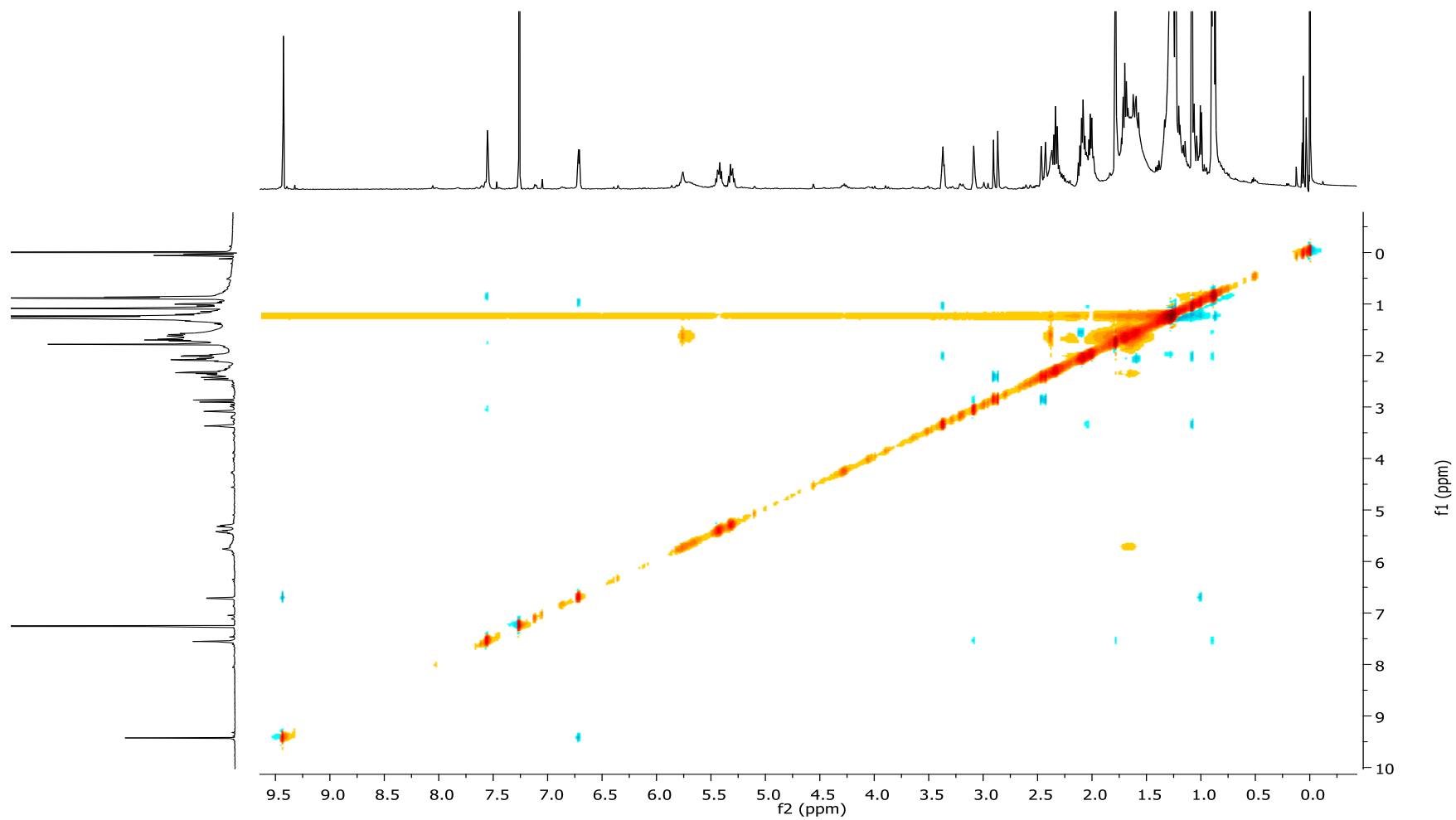


Figura S97: Espectro de IES-EMAR de SL6 ($[M - H_2O + H]$, modo de ionização positivo).

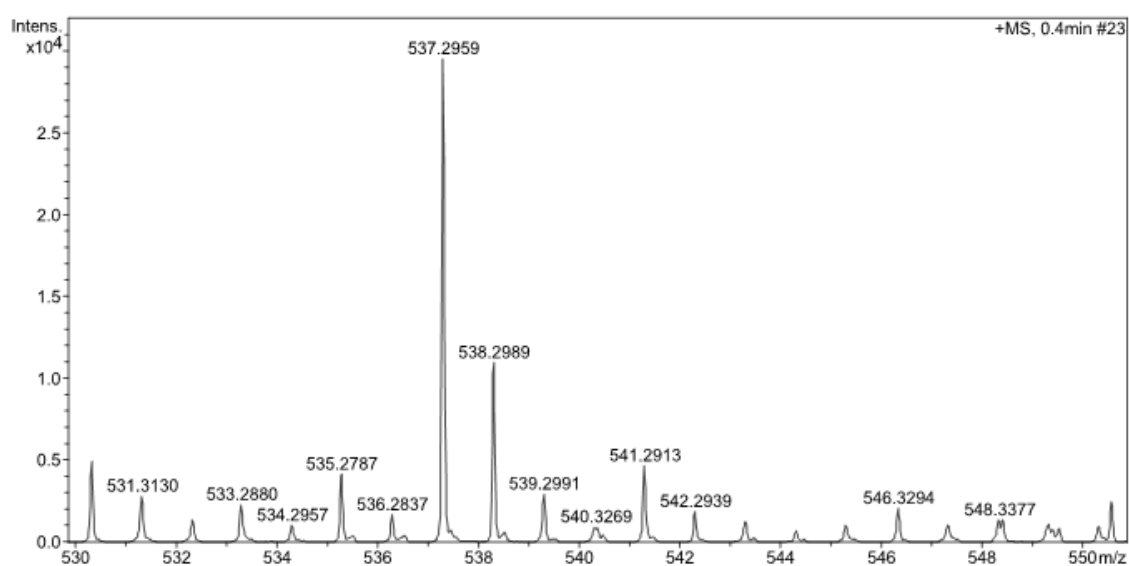


Figura S98: Espectro de CLAE-IESEM/EM de SL6 ($[M - H_2O + H]$, modo de ionização positivo).

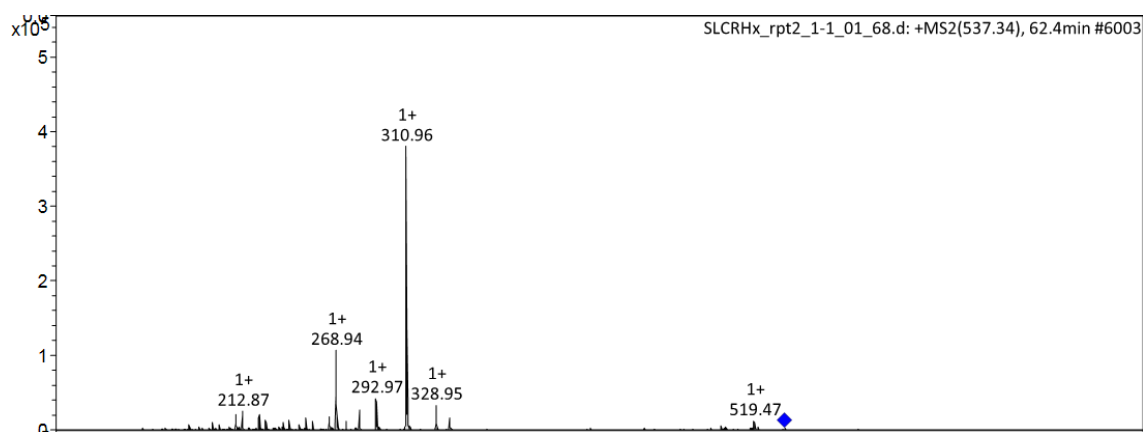


Figura S99: Padrão de fragmentação do composto SL6.

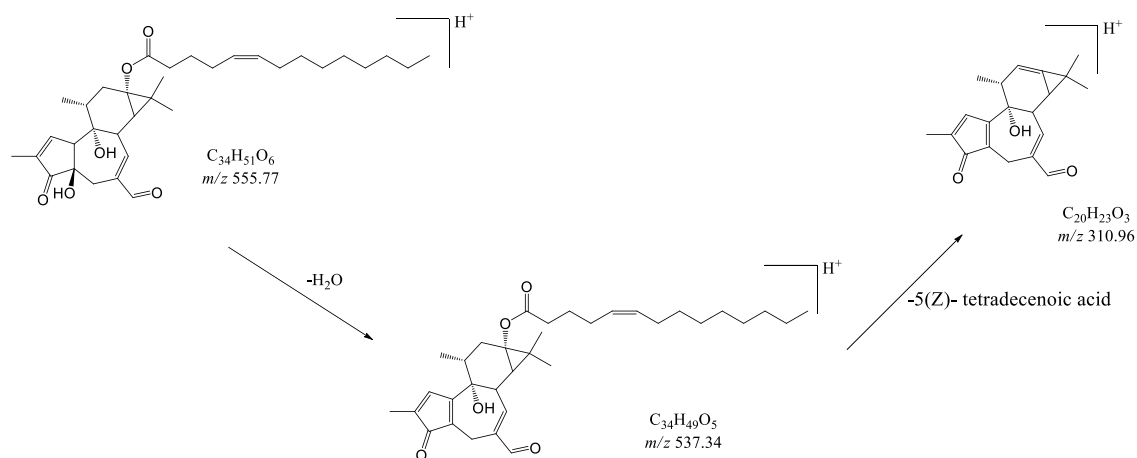


Figura S100: Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) do composto **SL7**.

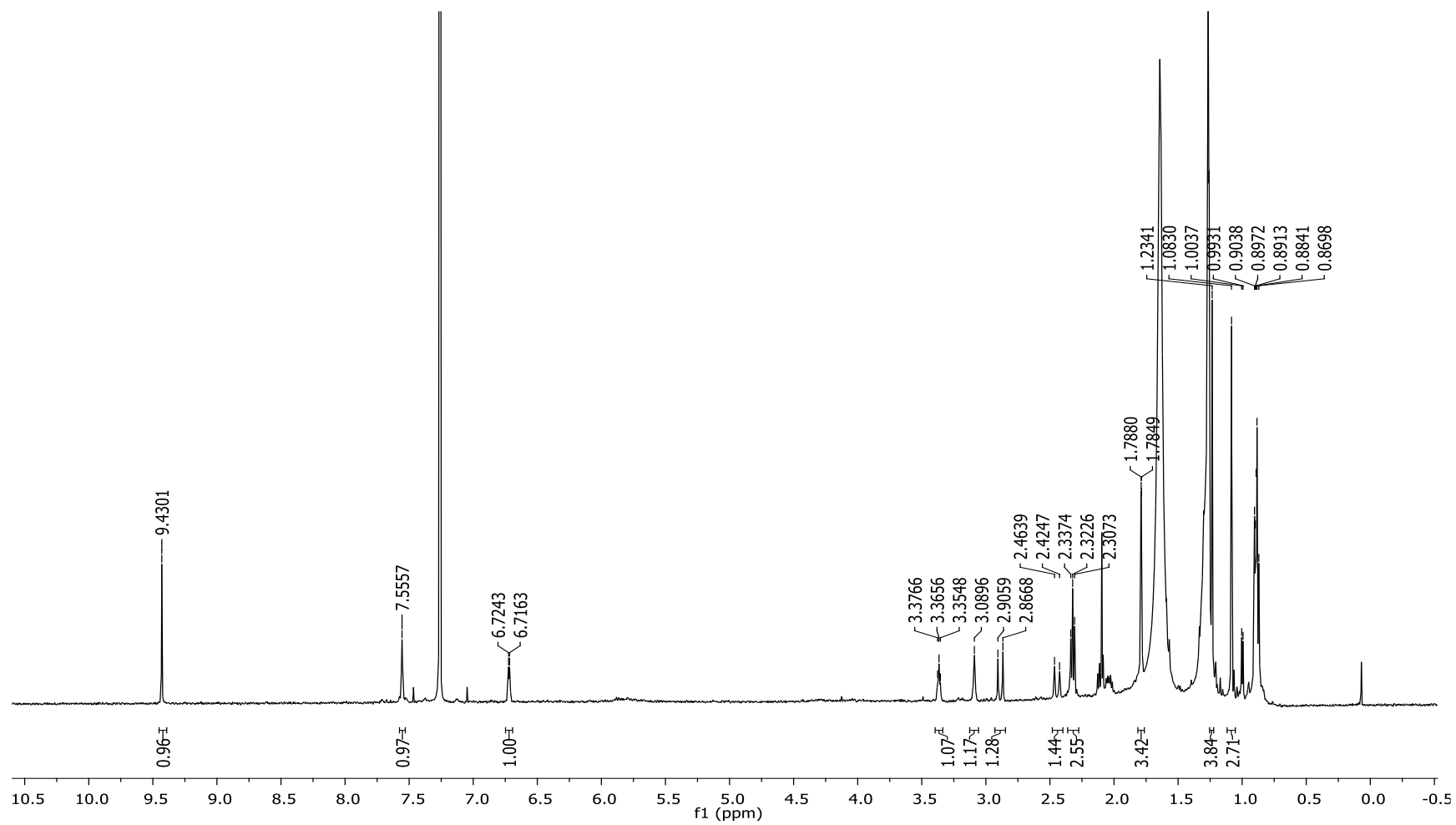


Figura S101: Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) do composto **SL7** (expansão).

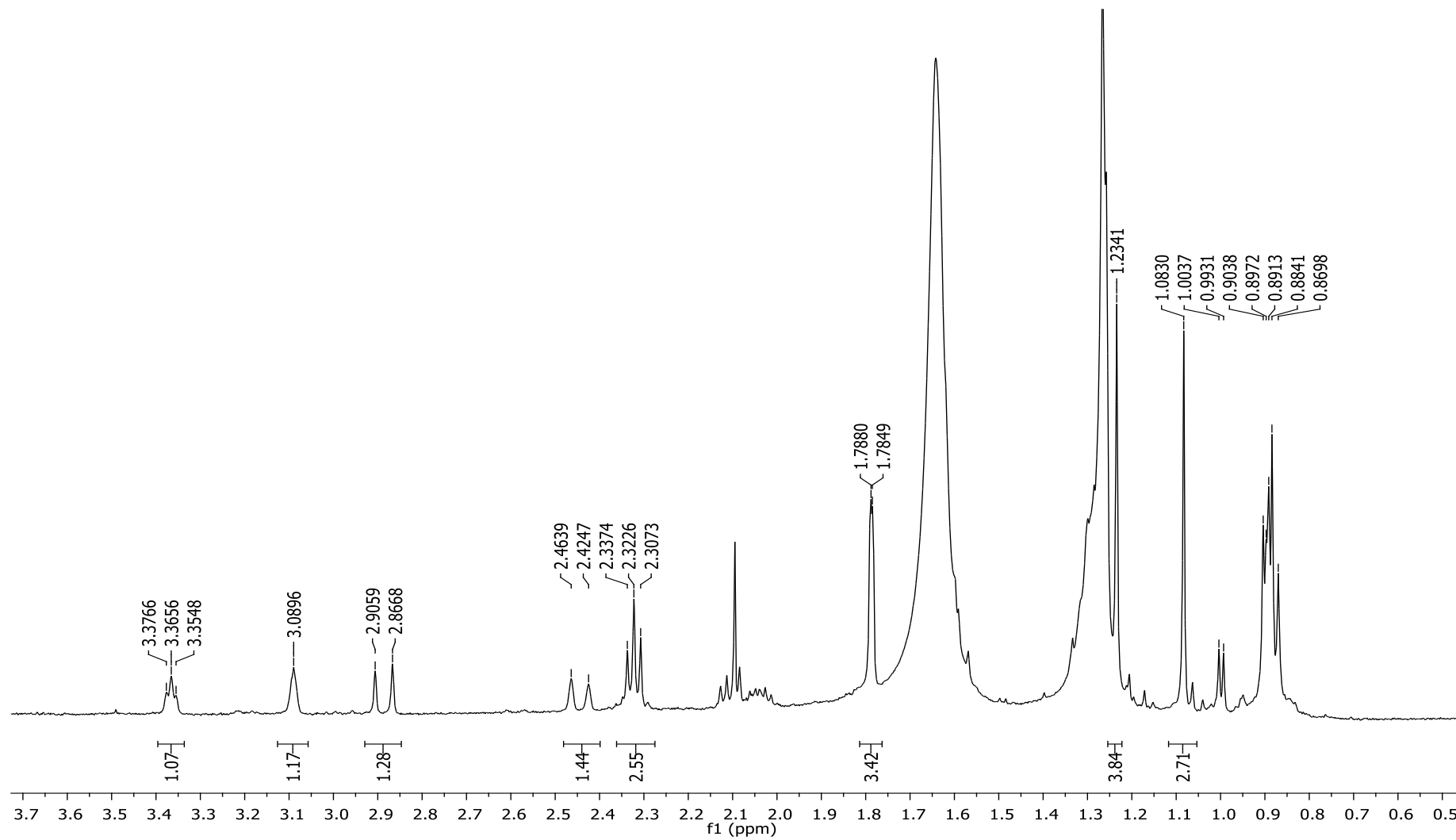


Figura S102: Espectro de RMN de COSY (400 MHz, CDCl_3) do composto **SL7**.

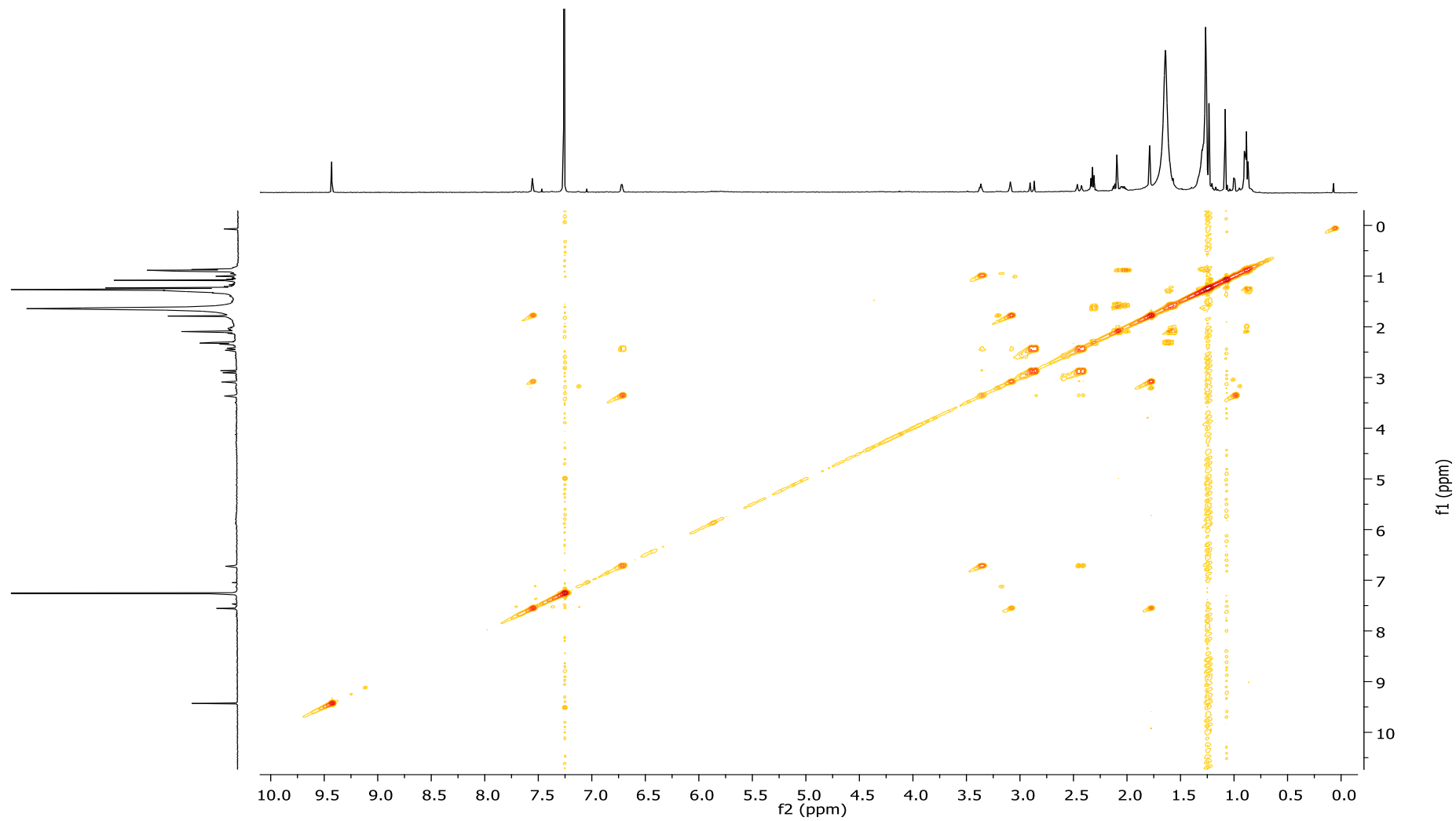


Figura S103: Espectro de RMN de HSQC (400 MHz, CDCl_3) do composto **SL7**.

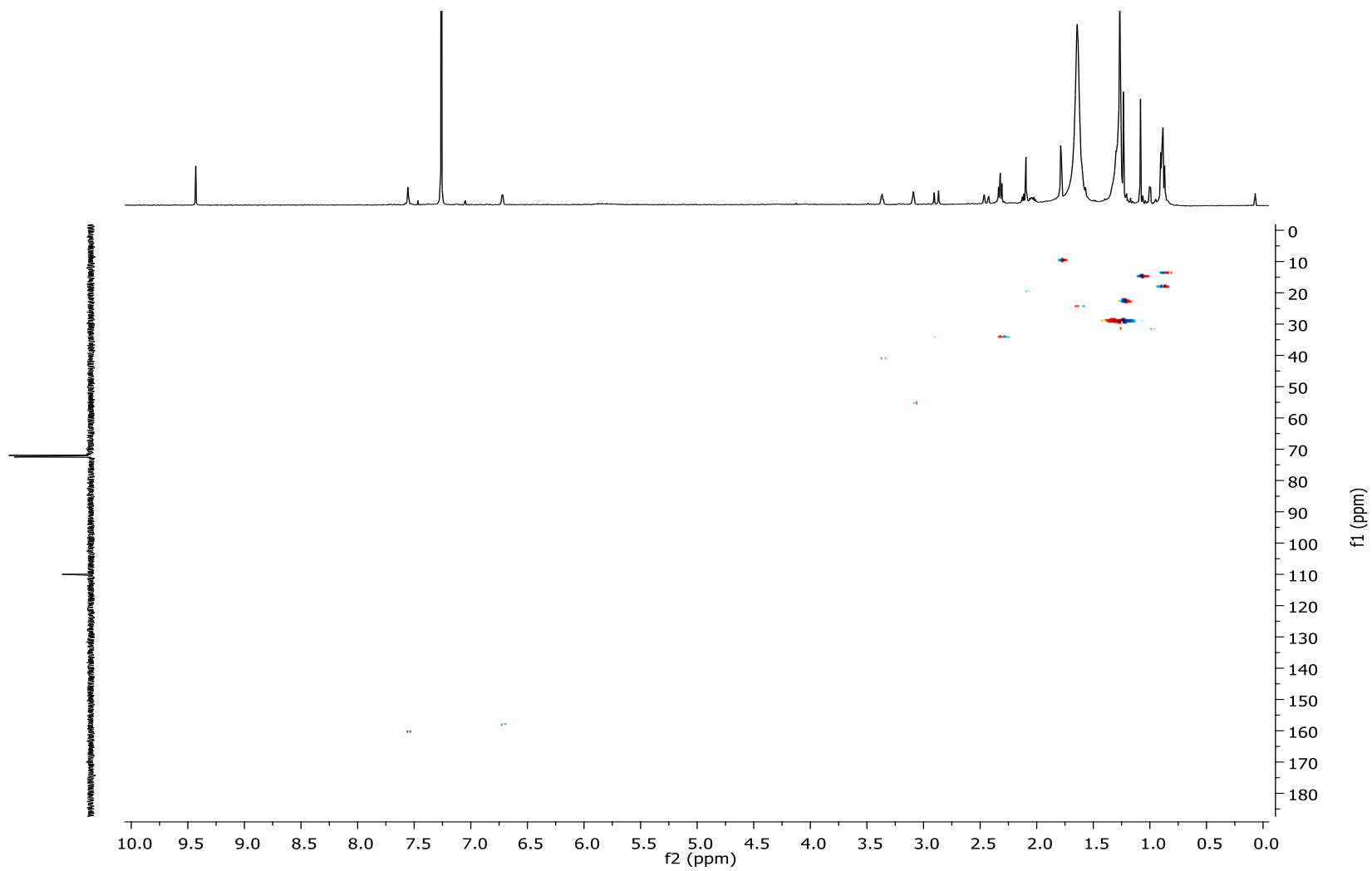


Figura S104: Espectro de RMN de HSQC (400 MHz, CDCl₃) do composto **SL7** (expansão).

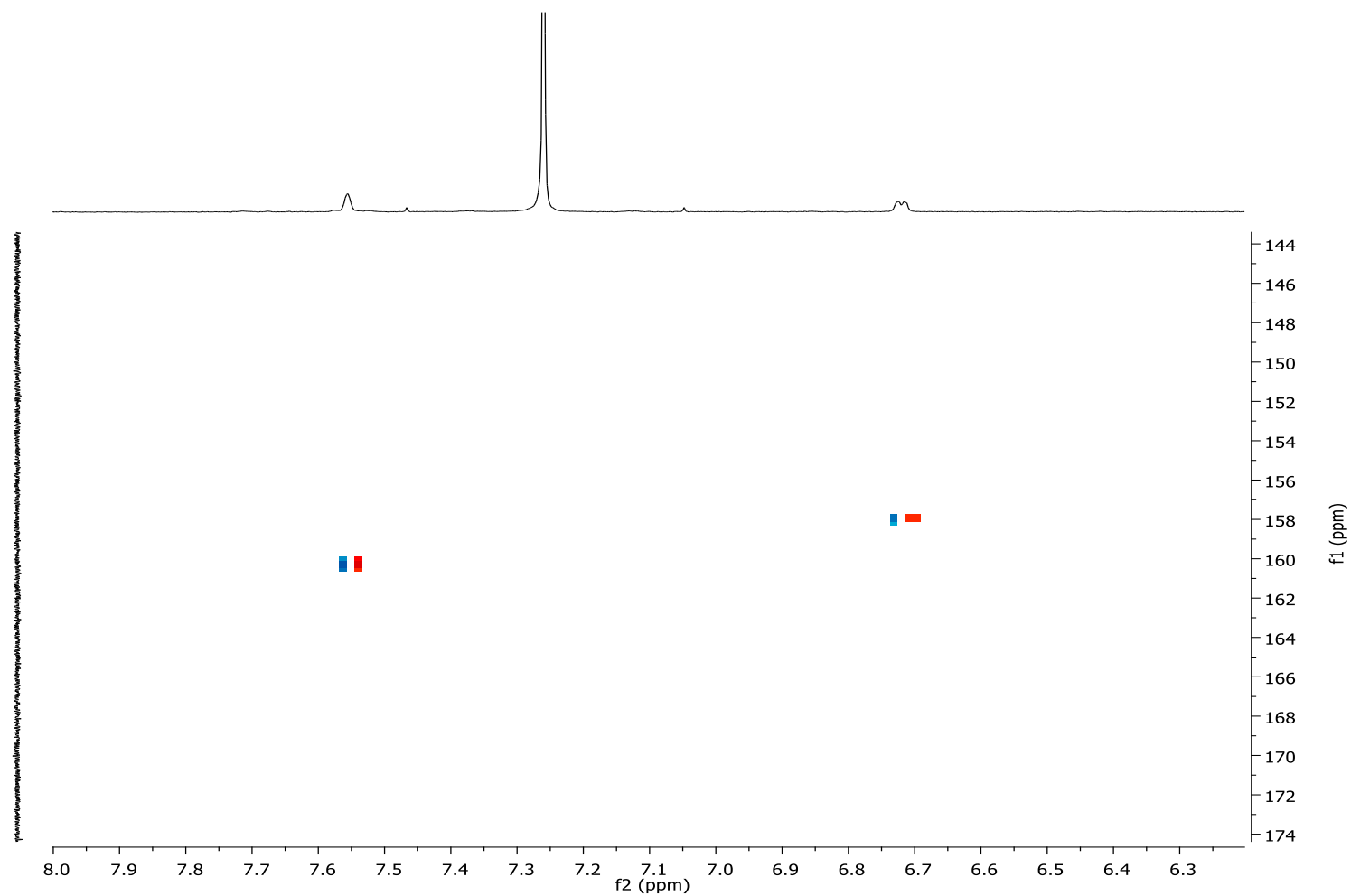


Figura S105: Espectro de RMN de HSQC (400 MHz, CDCl₃) do composto **SL7** (expansão).

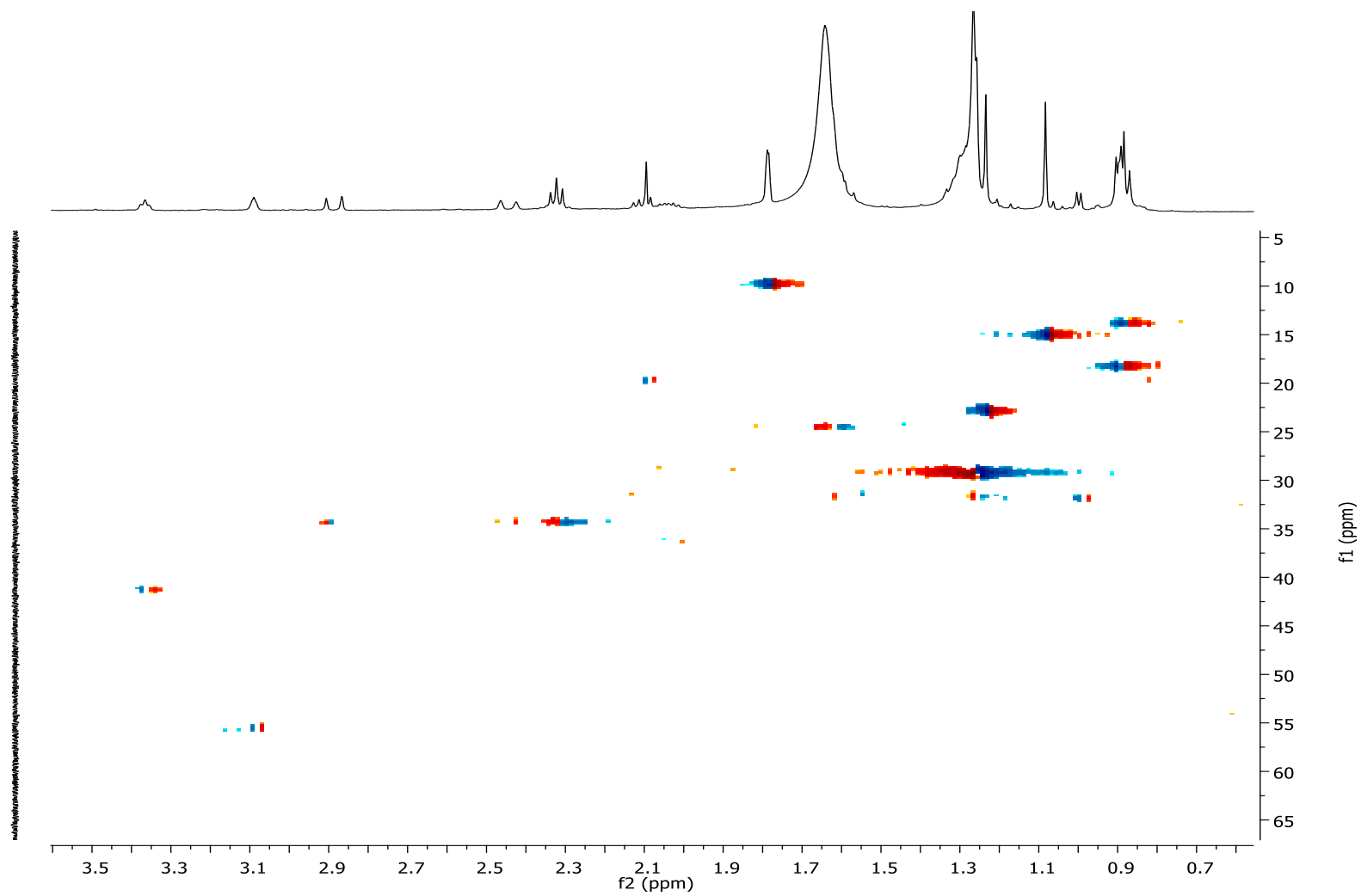


Figura S106: Espectro de RMN de HMBC (400 MHz, CDCl_3) do composto **SL7**.

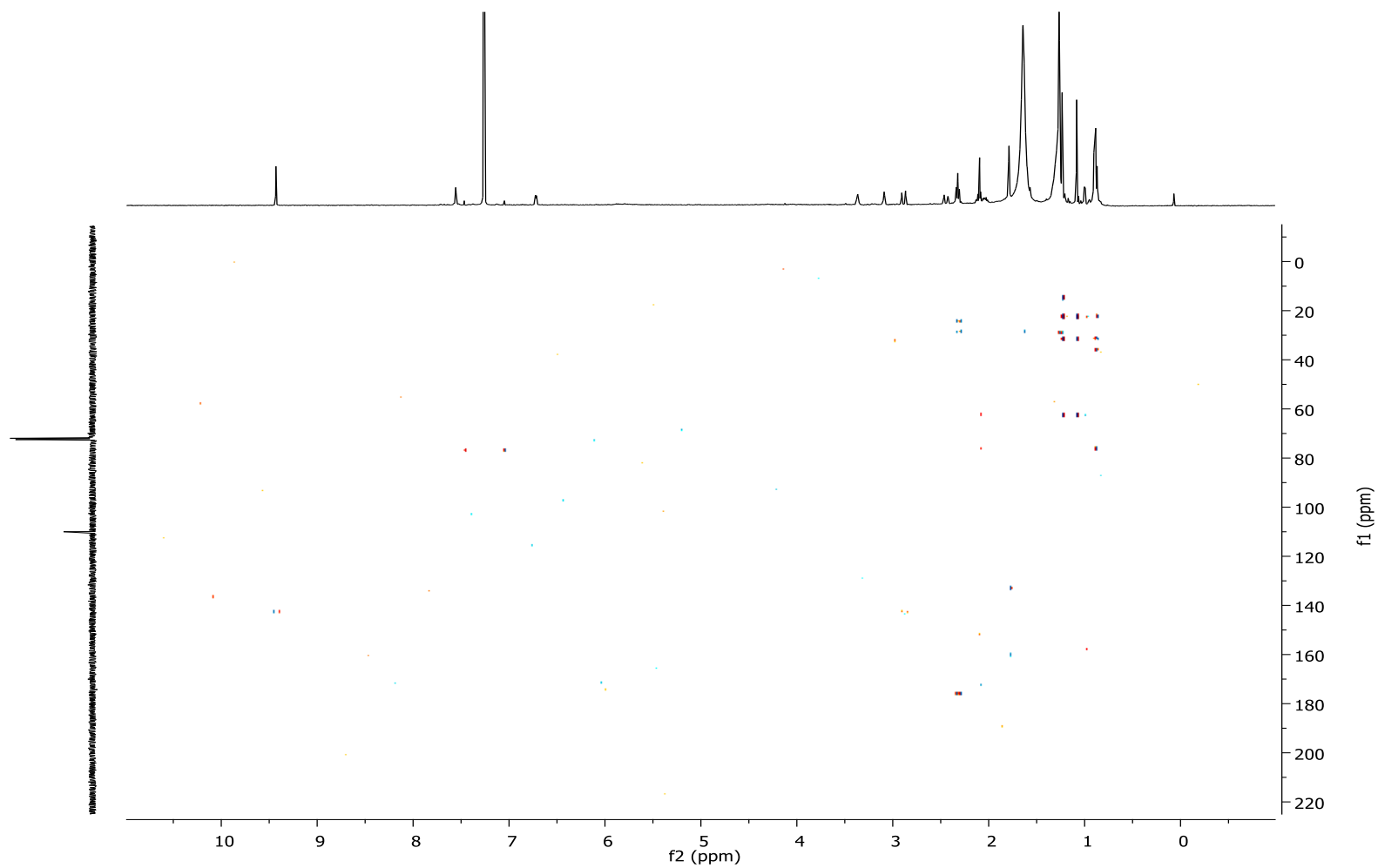


Figura S107: Espectro de RMN de HMBC (400 MHz, CDCl_3) do composto **SL7** (expansão).

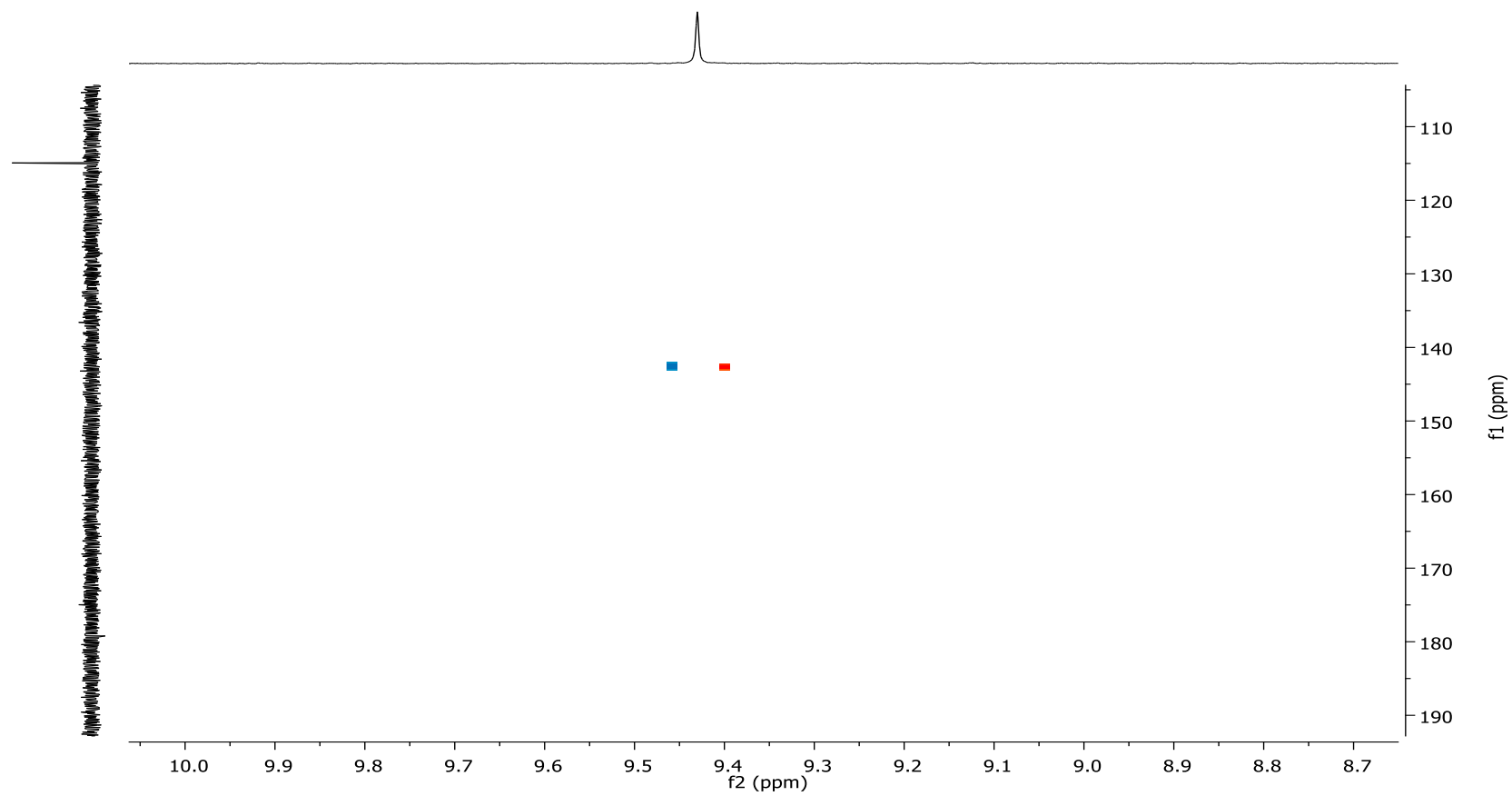


Figura S108: Espectro de RMN de HMBC (400 MHz, CDCl_3) do composto **SL7** (expansão).

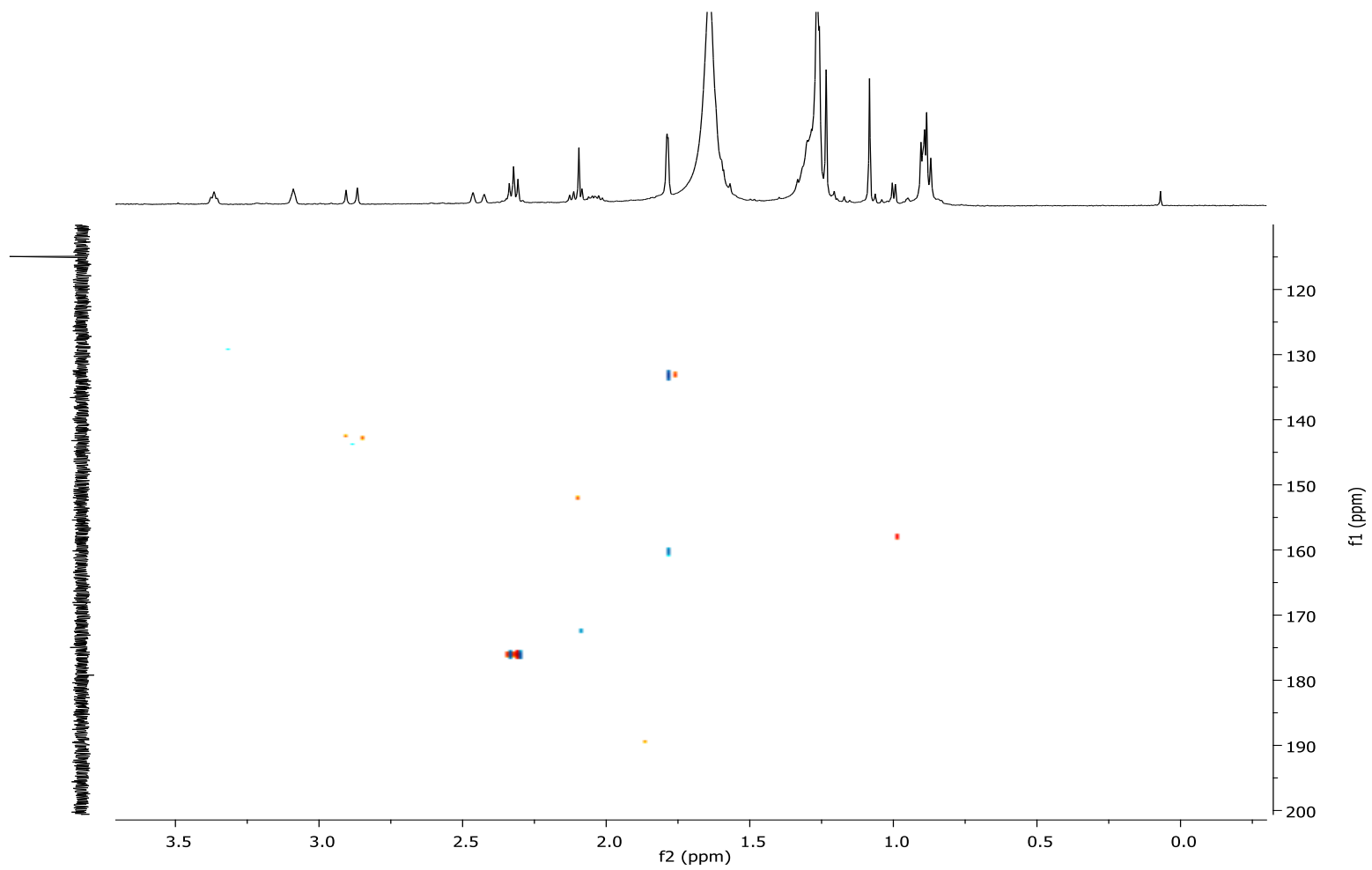


Figura S109: Espectro de RMN de HMBC (400 MHz, CDCl_3) do composto **SL7** (expansão).

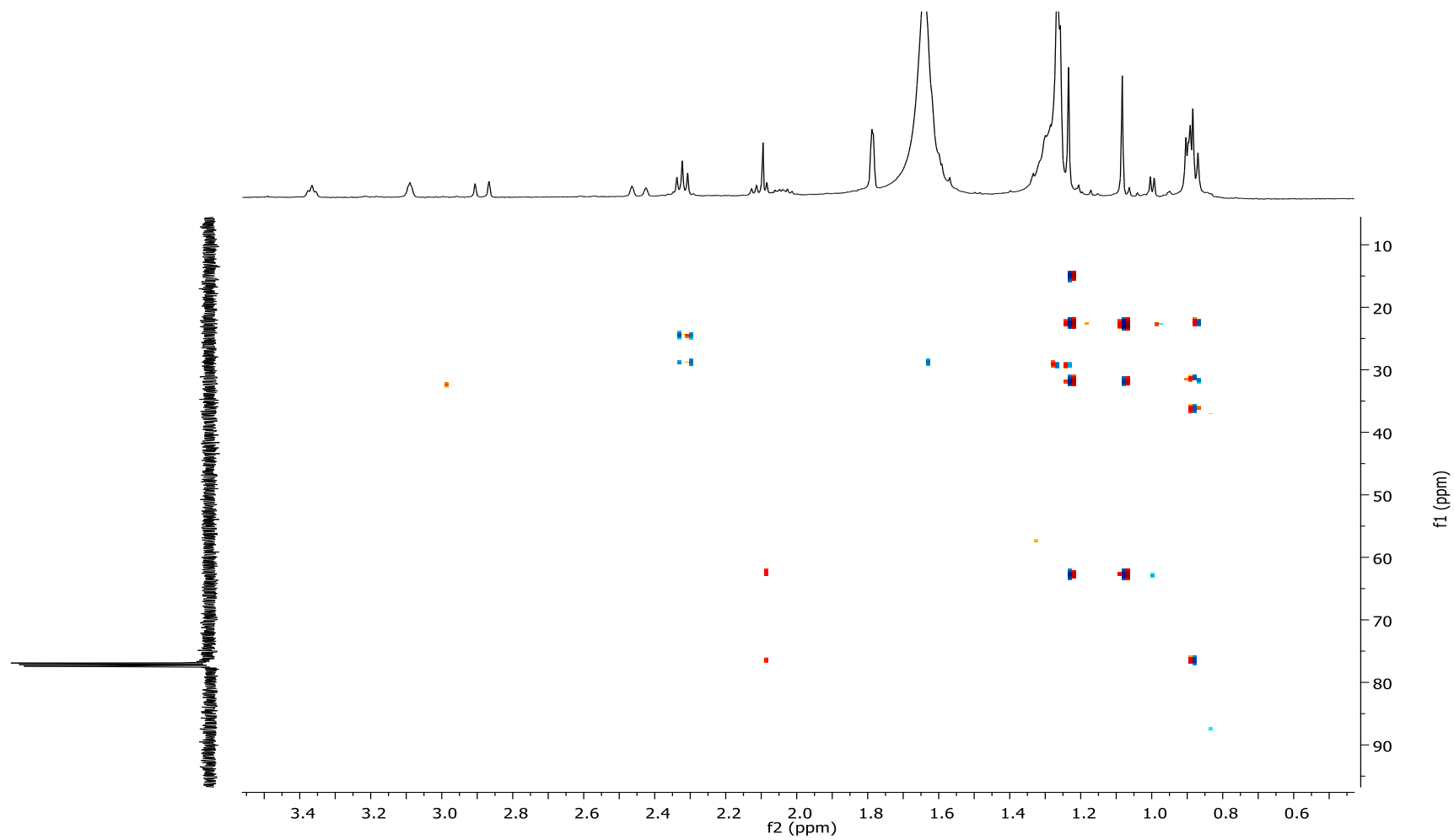


Figura S110: Espectro de RMN de NOESY (400 MHz, CDCl_3) do composto **SL7**.

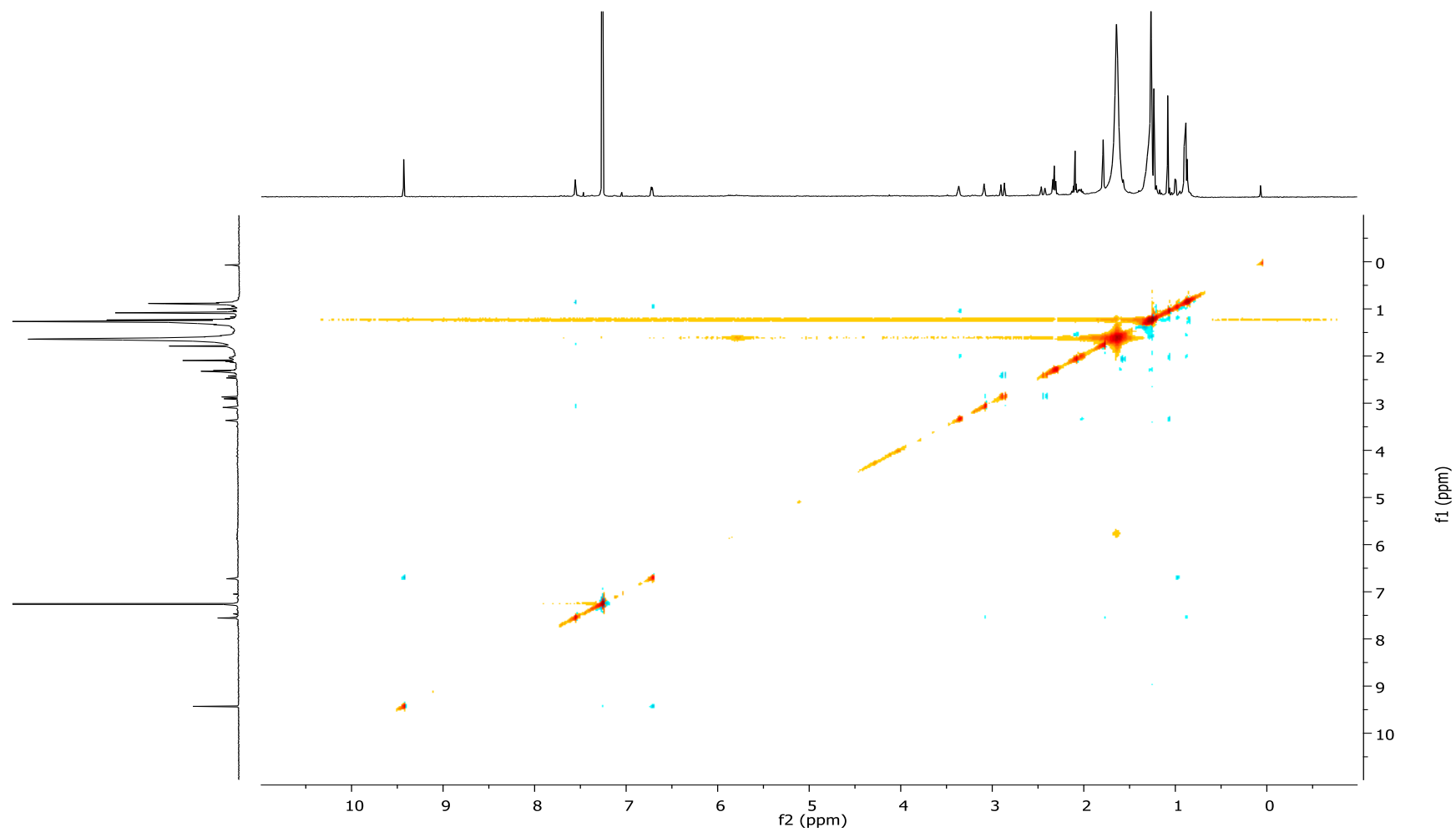


Figura S111: Espectro de IES-EMAR de SL7 ($[M - H_2O + H]^+$, modo de ionização positivo).

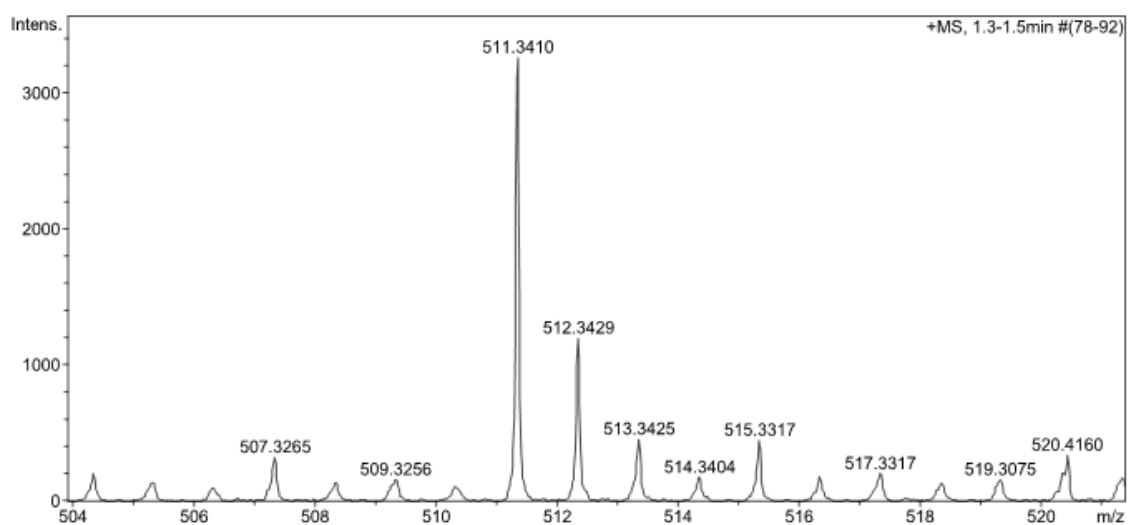


Figura S112: Espectro de CLAE-IESEM/EM de SL7 ($[M - H_2O + H]^+$, modo de ionização positivo).

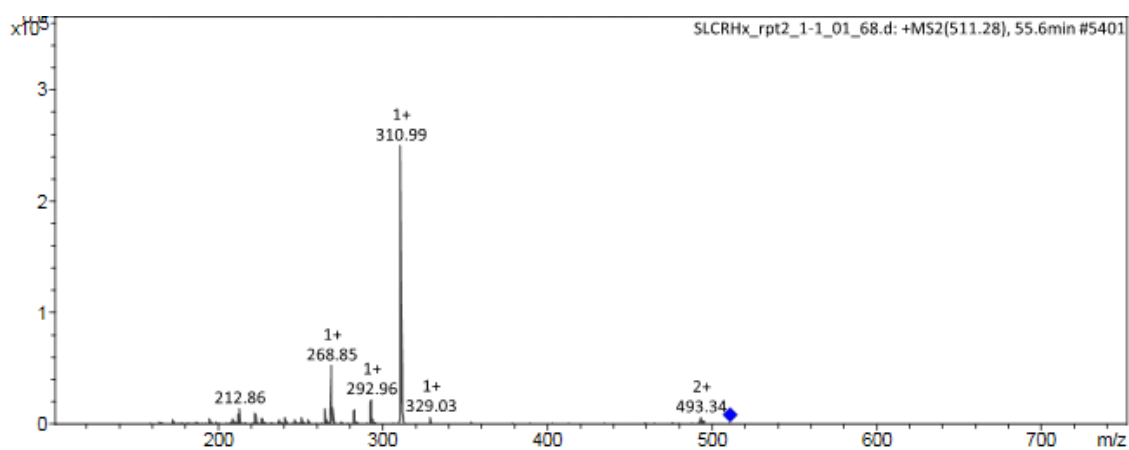


Figura S113: Padrão de fragmentação do composto SL7.

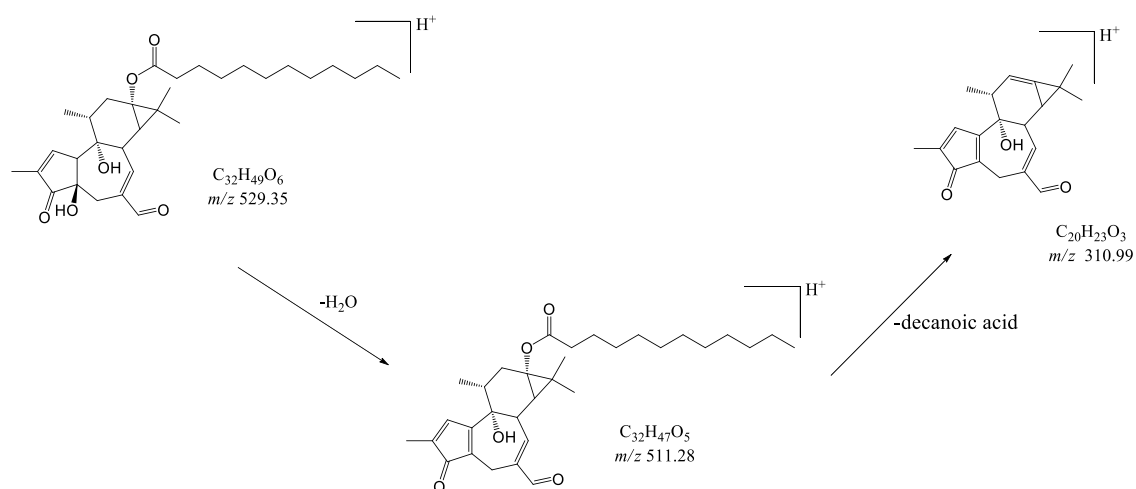


Figura S114: Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) do composto **SL8**.

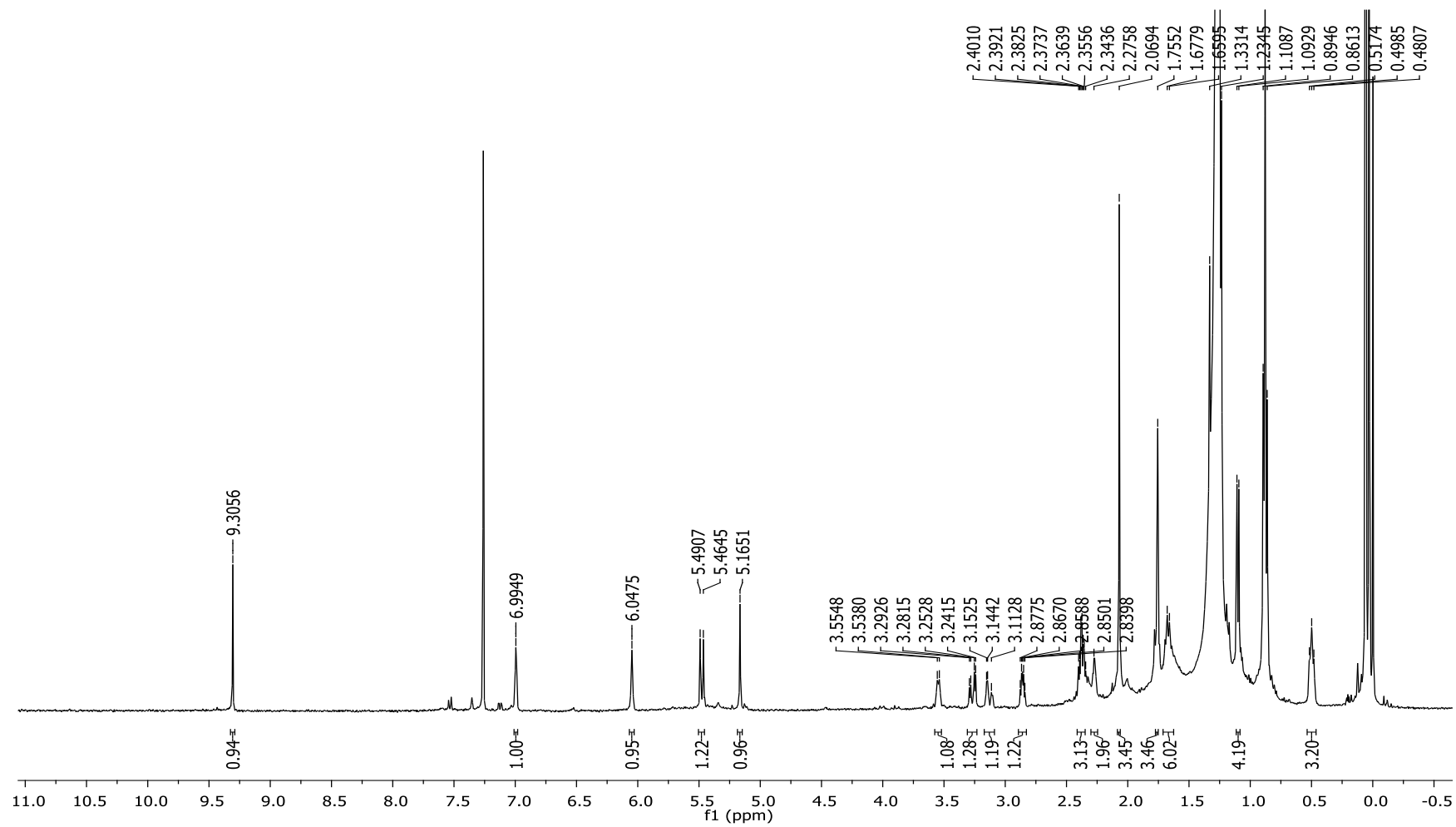


Figura S115: Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) do composto **SL8** (expansão).

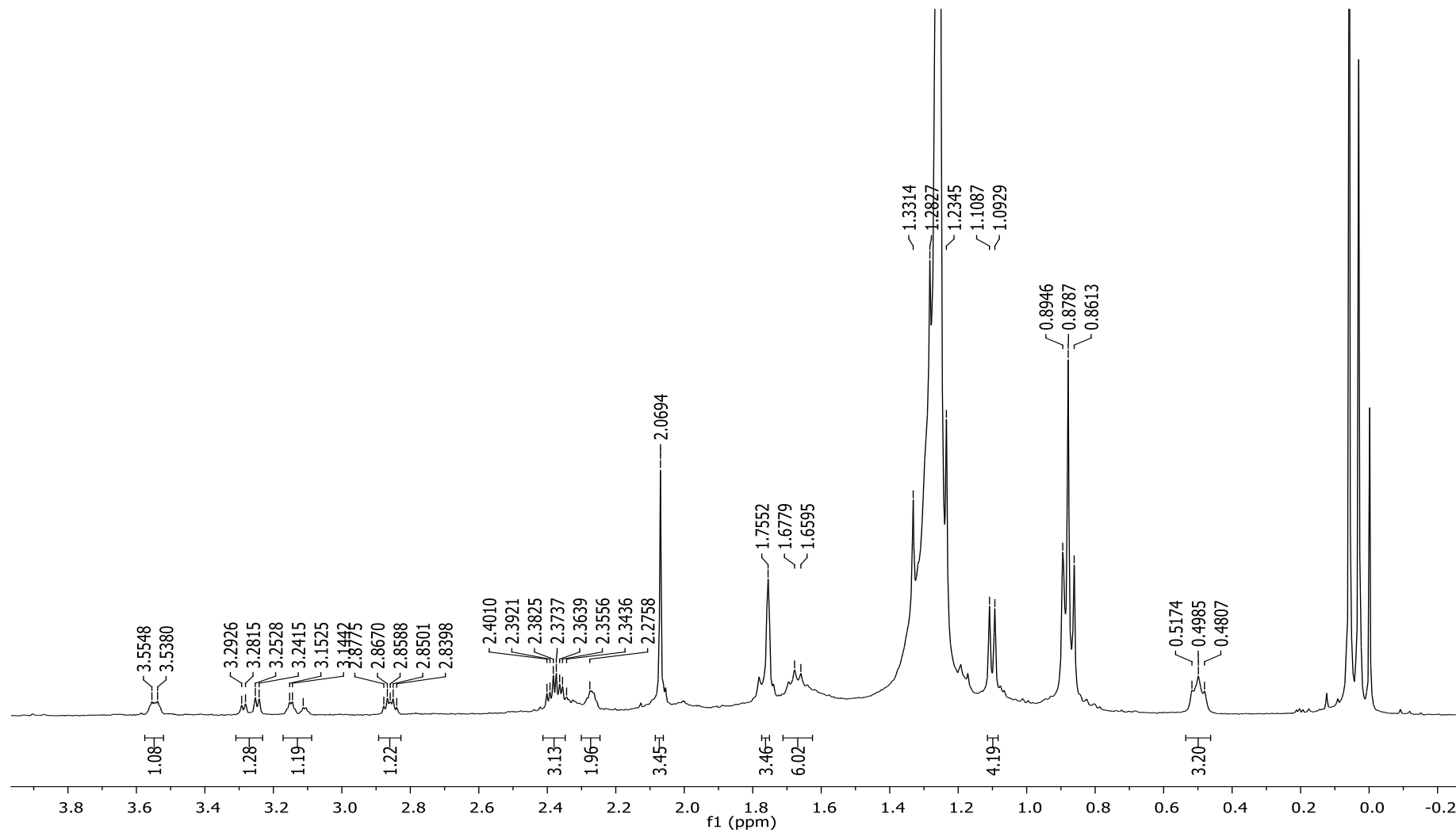


Figura S116: Espectro de RMN de ^{13}C -APT (100 MHz, CDCl_3) do composto **SL8**.

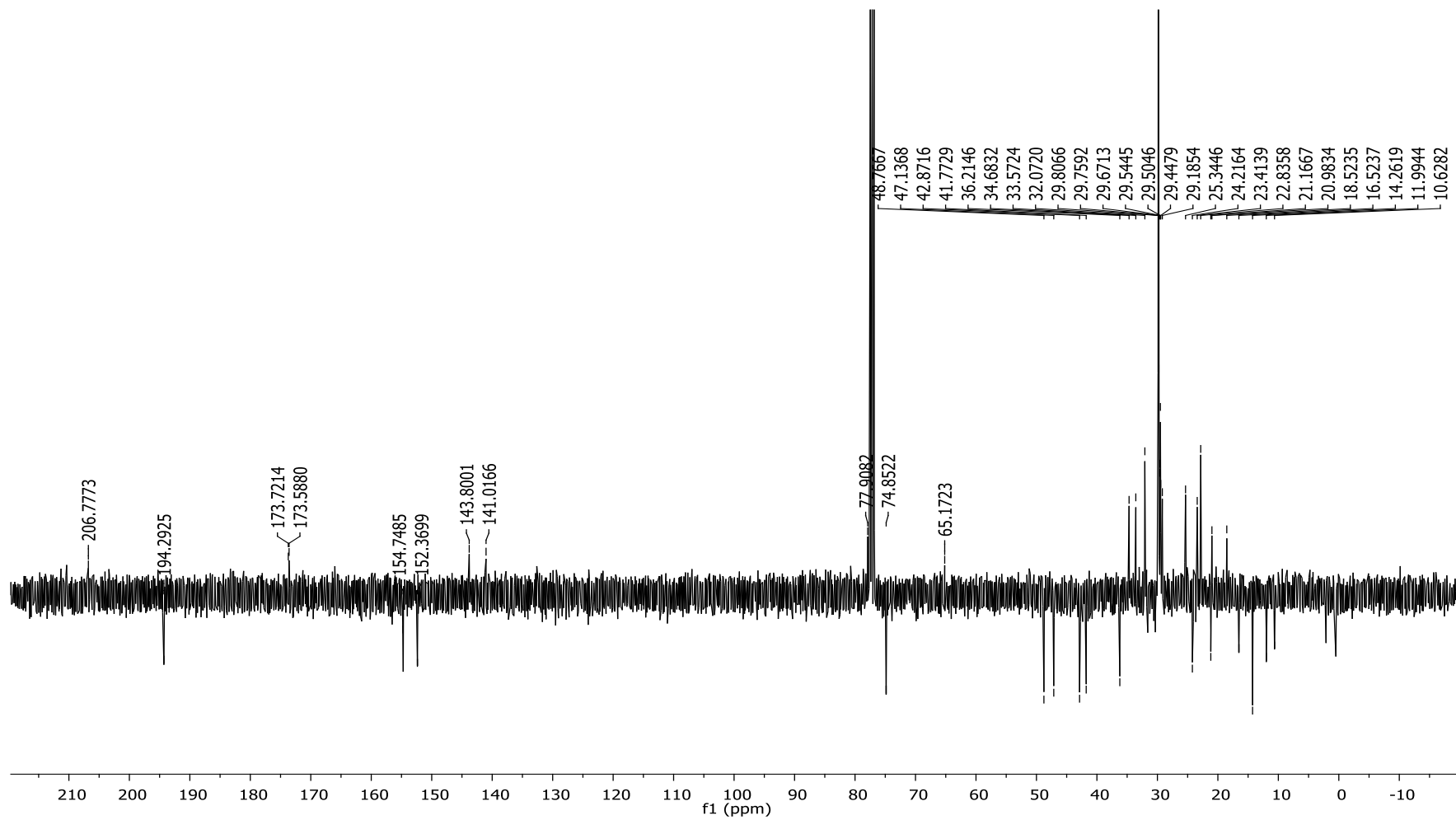


Figura S117: Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) do composto **SL8** (expansão).

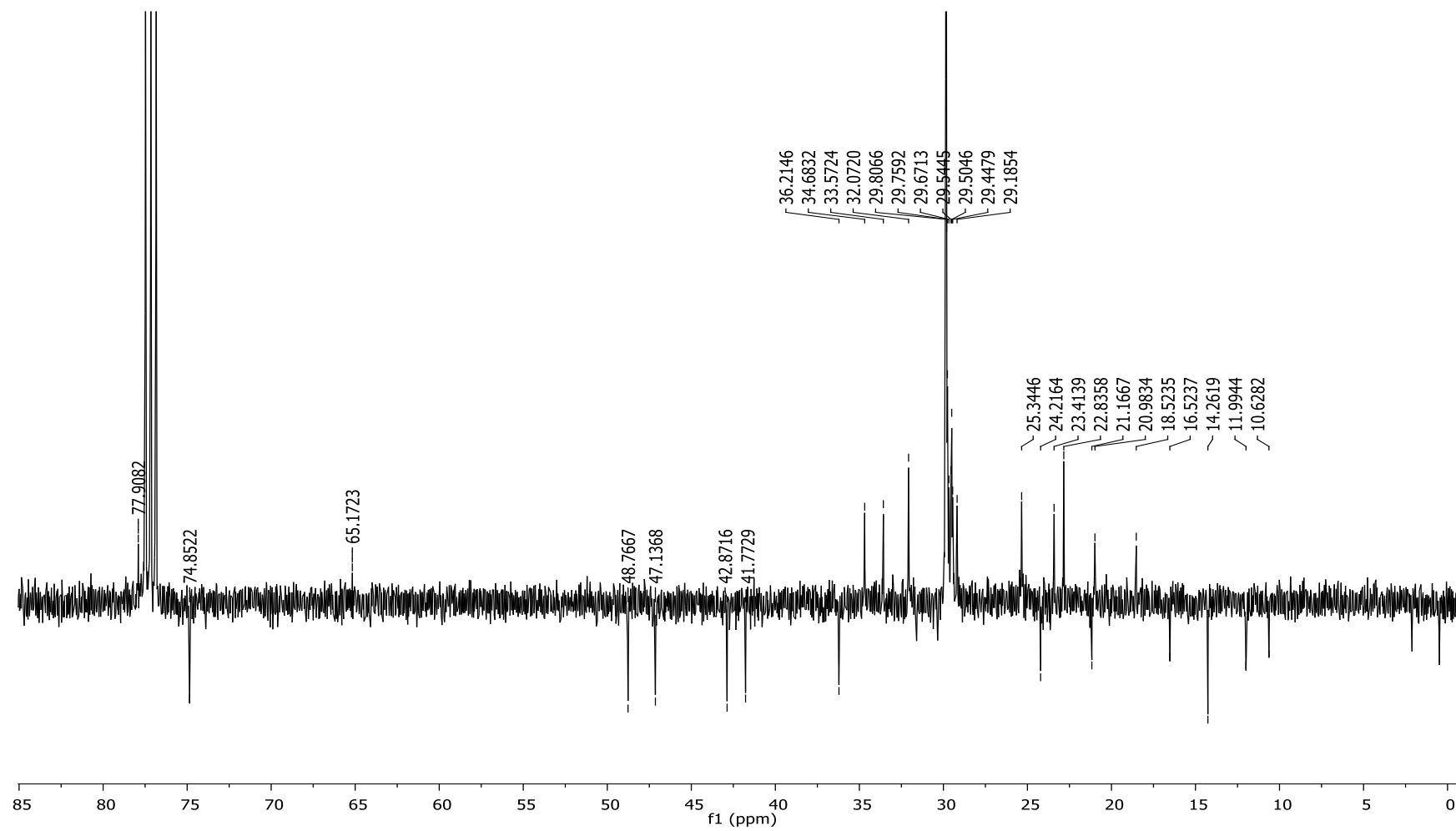


Figura S118: Espectro de RMN de COSY (400 MHz, CDCl₃) do composto **SL8**.

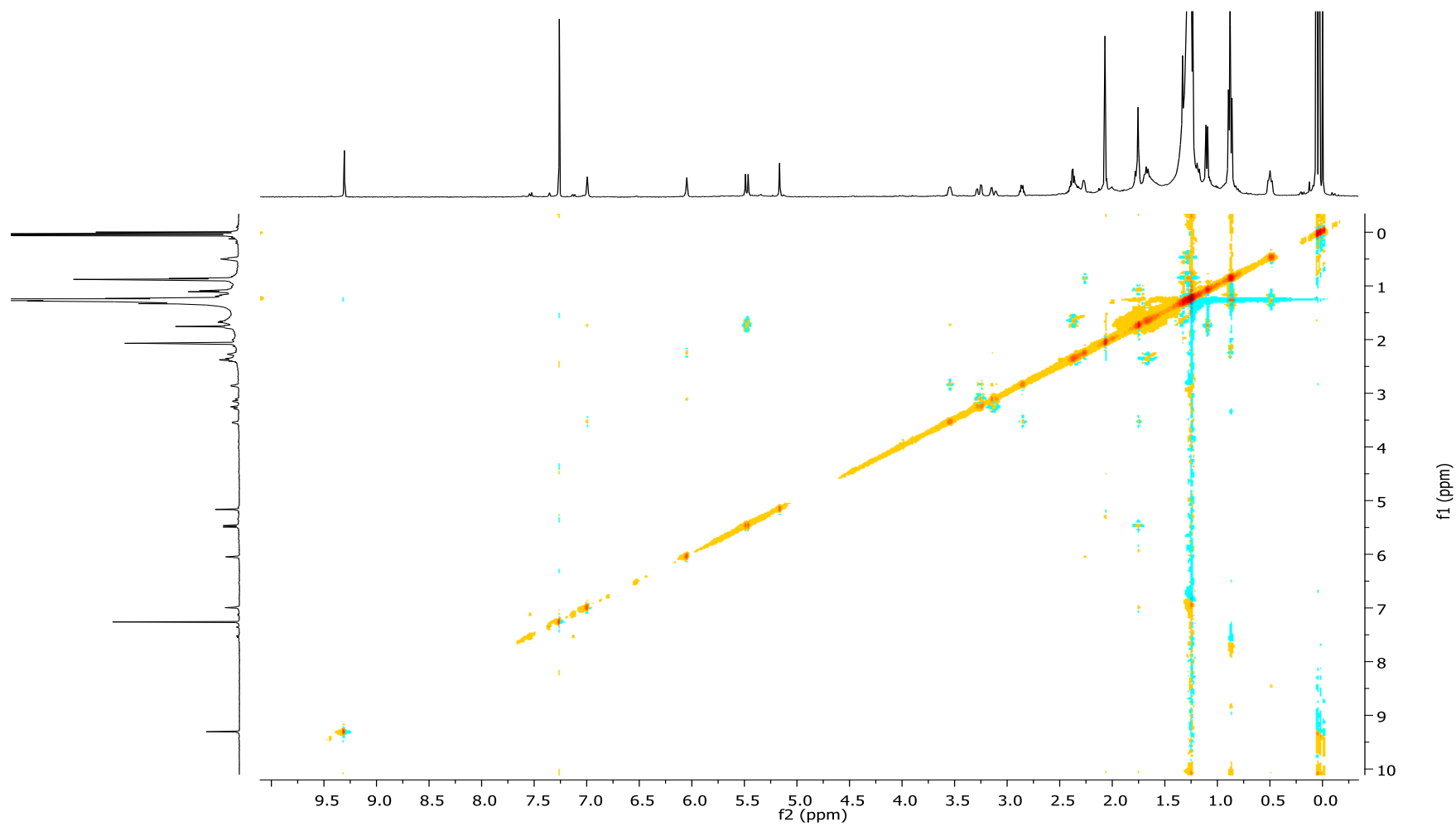


Figura S119: Espectro de RMN de HSQC (400 MHz, CDCl_3) do composto **SL8**.

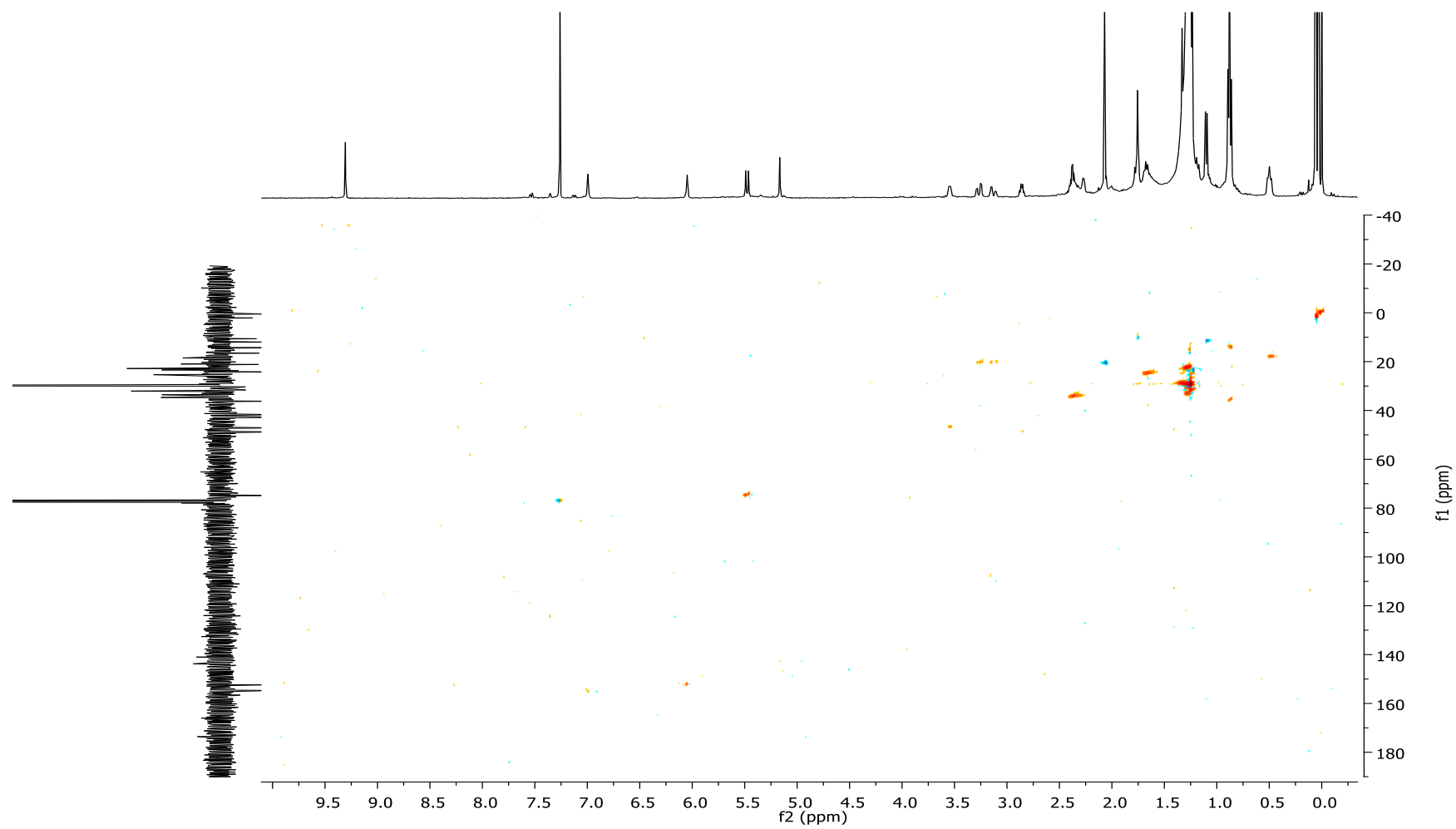


Figura S120: Espectro de RMN de HSQC (400 MHz, CDCl_3) do composto **SL8** (expansão).

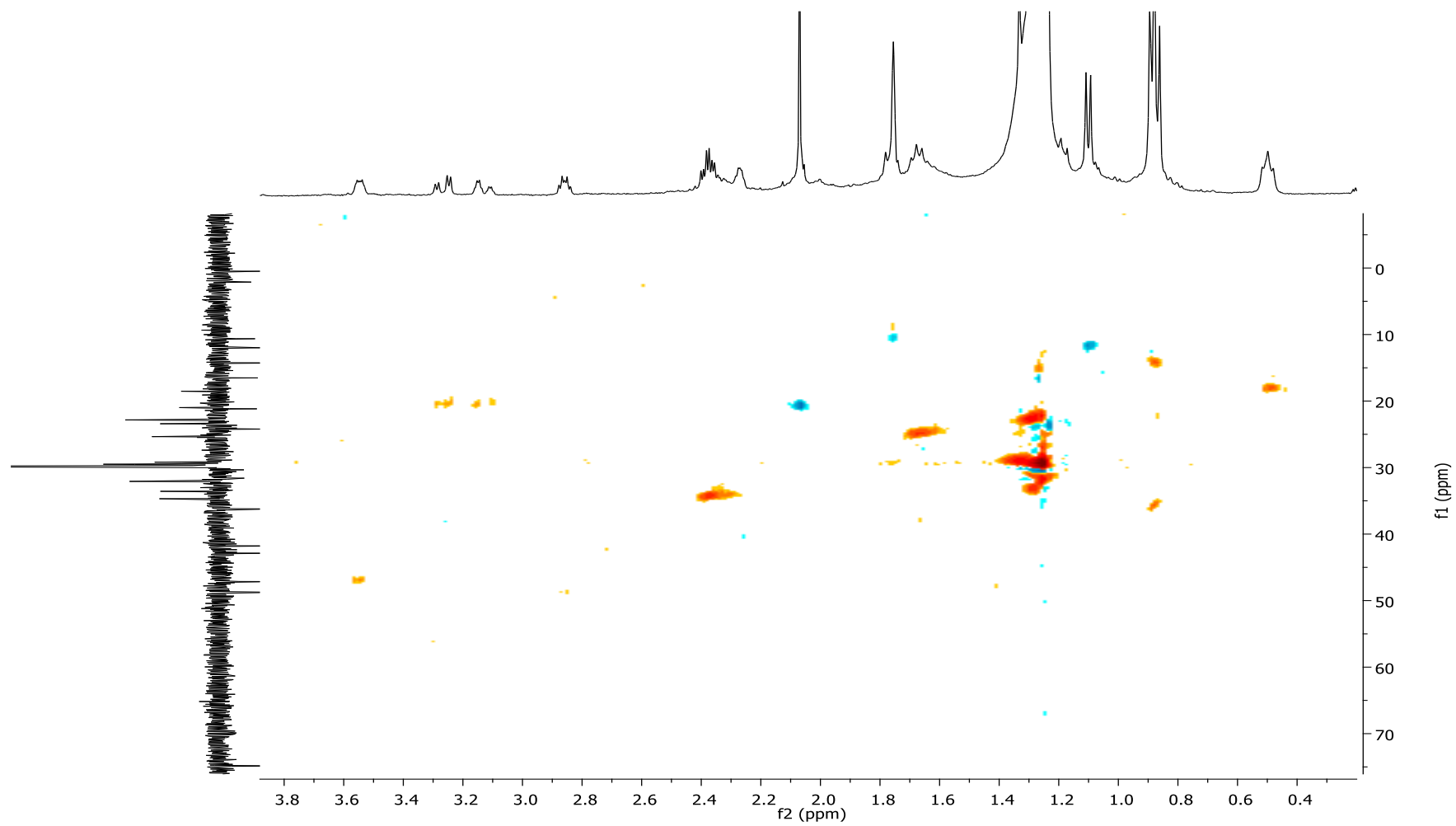


Figura S121: Espectro de RMN de HMBC (400 MHz, CDCl_3) do composto **SL8**.

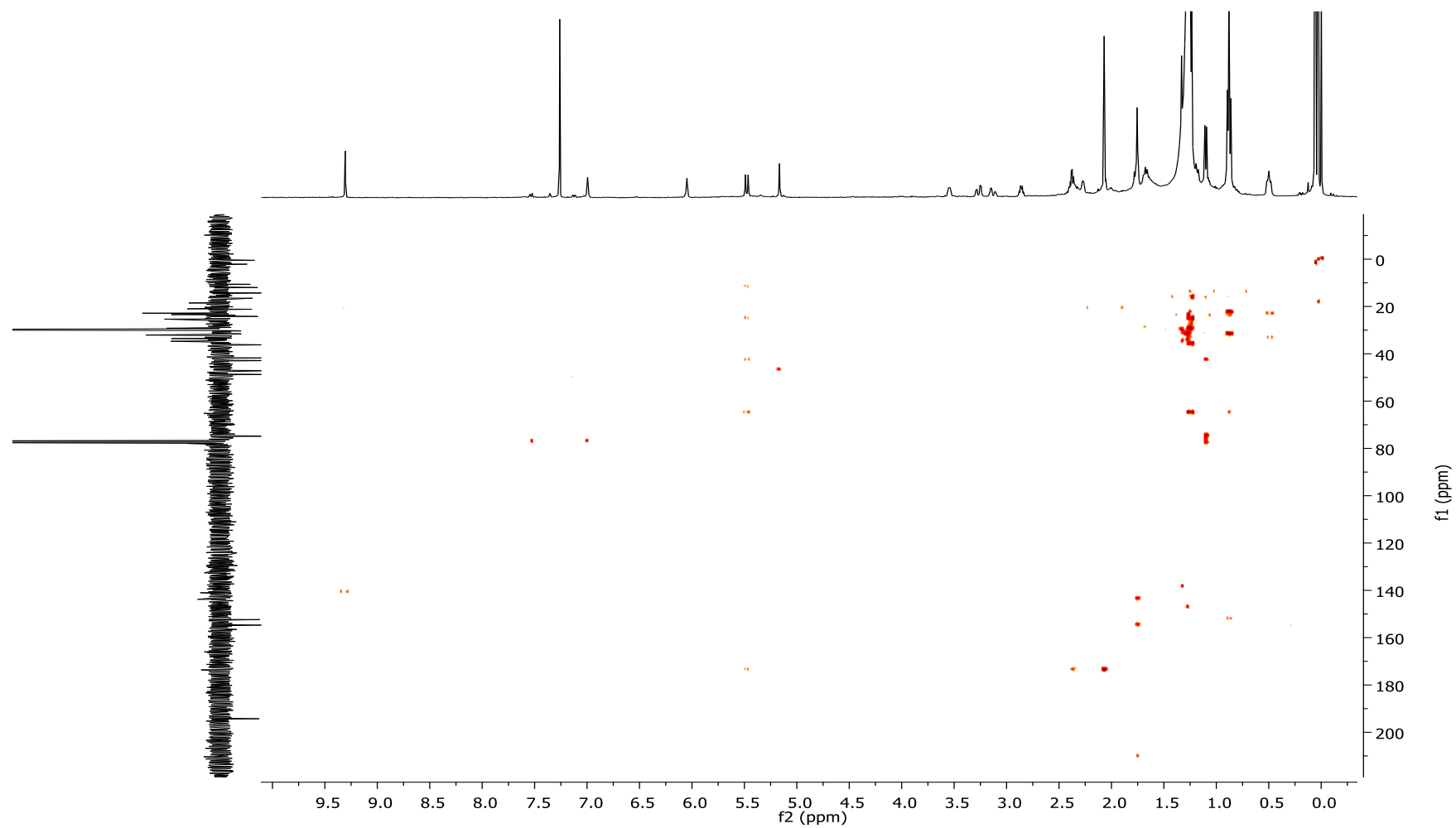


Figura S122: Espectro de RMN de HMBC (400 MHz, CDCl_3) do composto **SL8** (expansão).

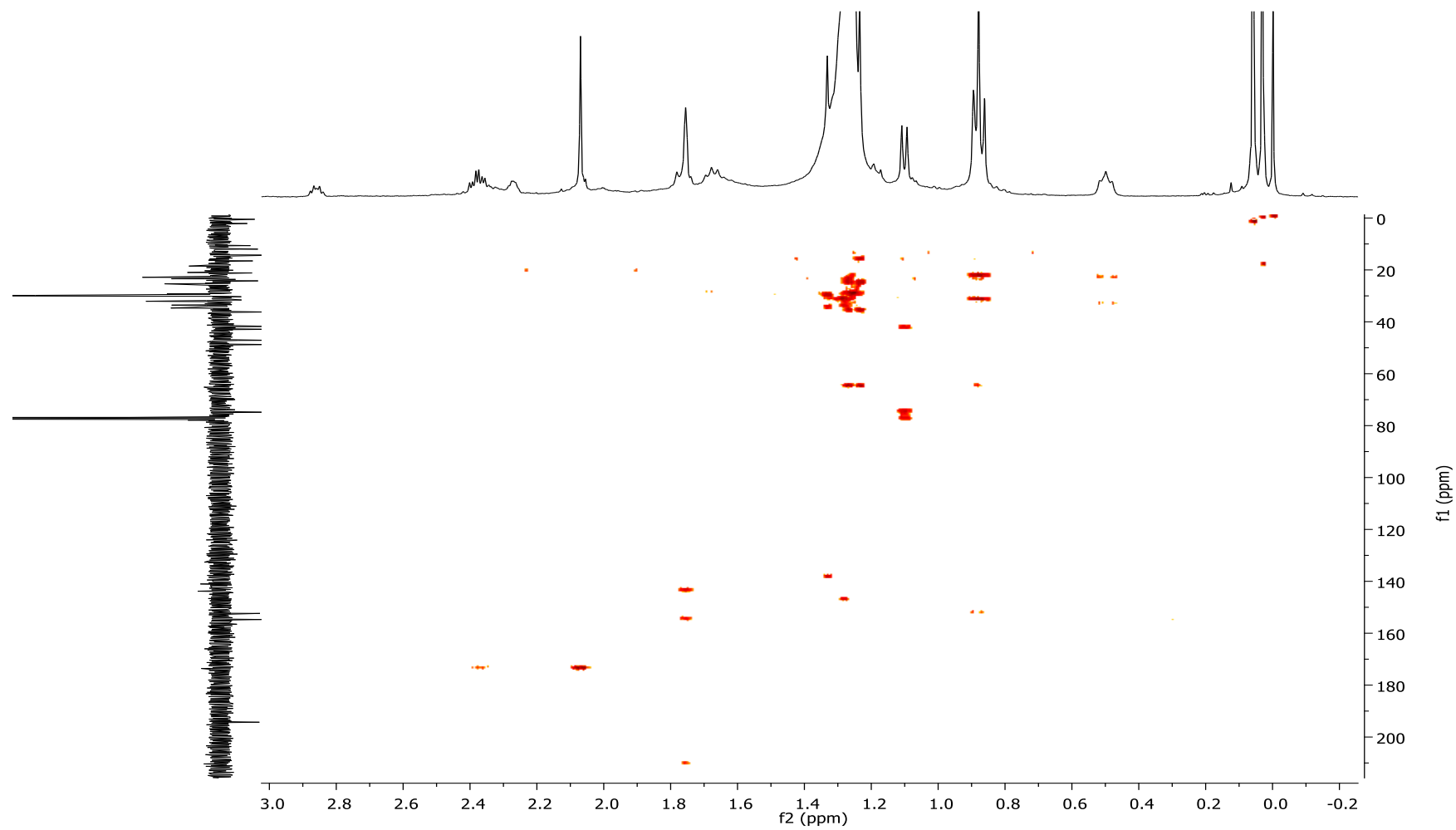


Figura S123: Espectro de RMN de NOESY (400 MHz, CDCl_3) do composto **SL8**.

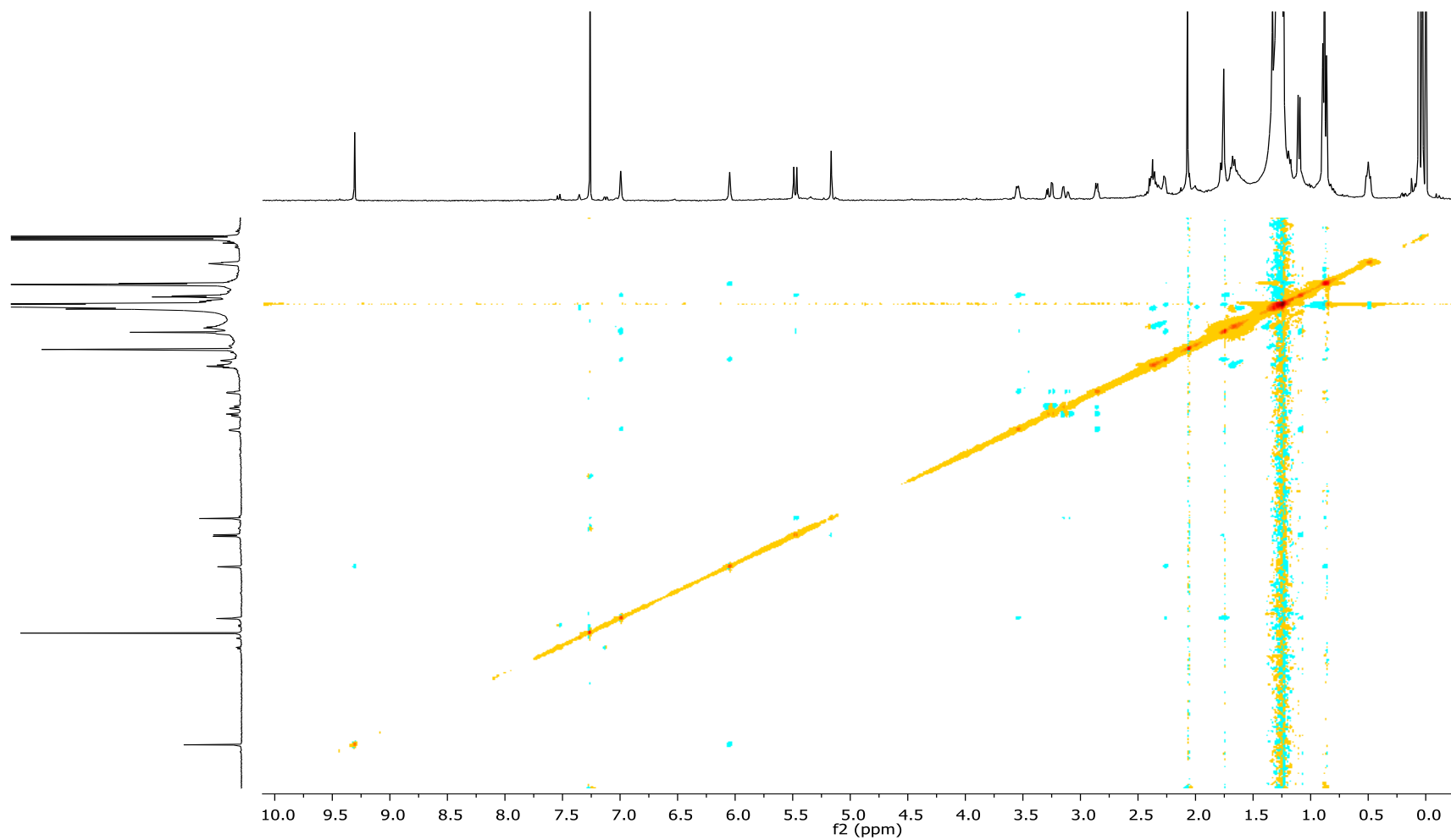


Figura S124: Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$) do composto **SL8**.

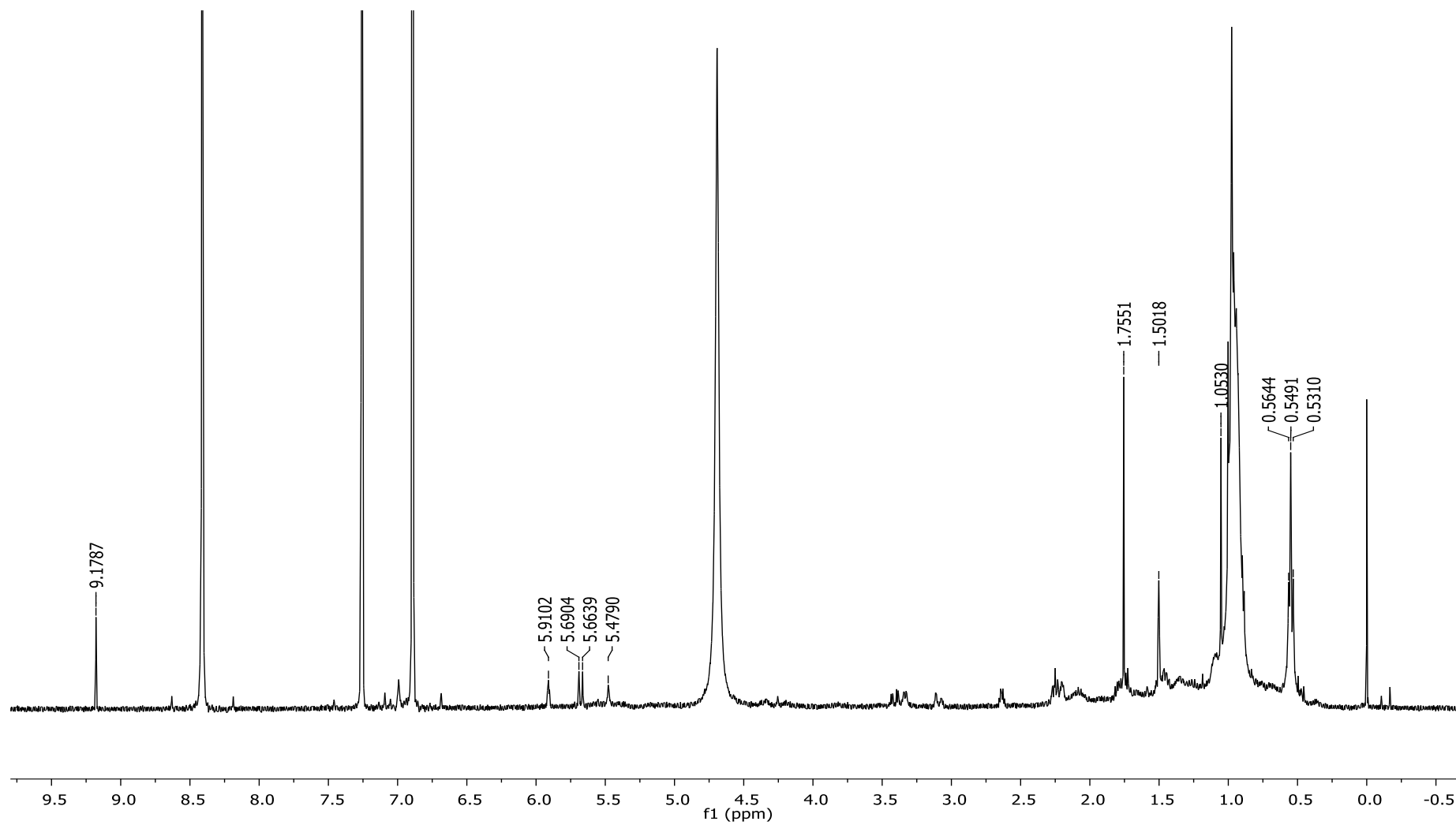


Figura S125: Espectro de RMN de HMBC (400 MHz, C₅D₅N) do composto **SL8** (expansão).

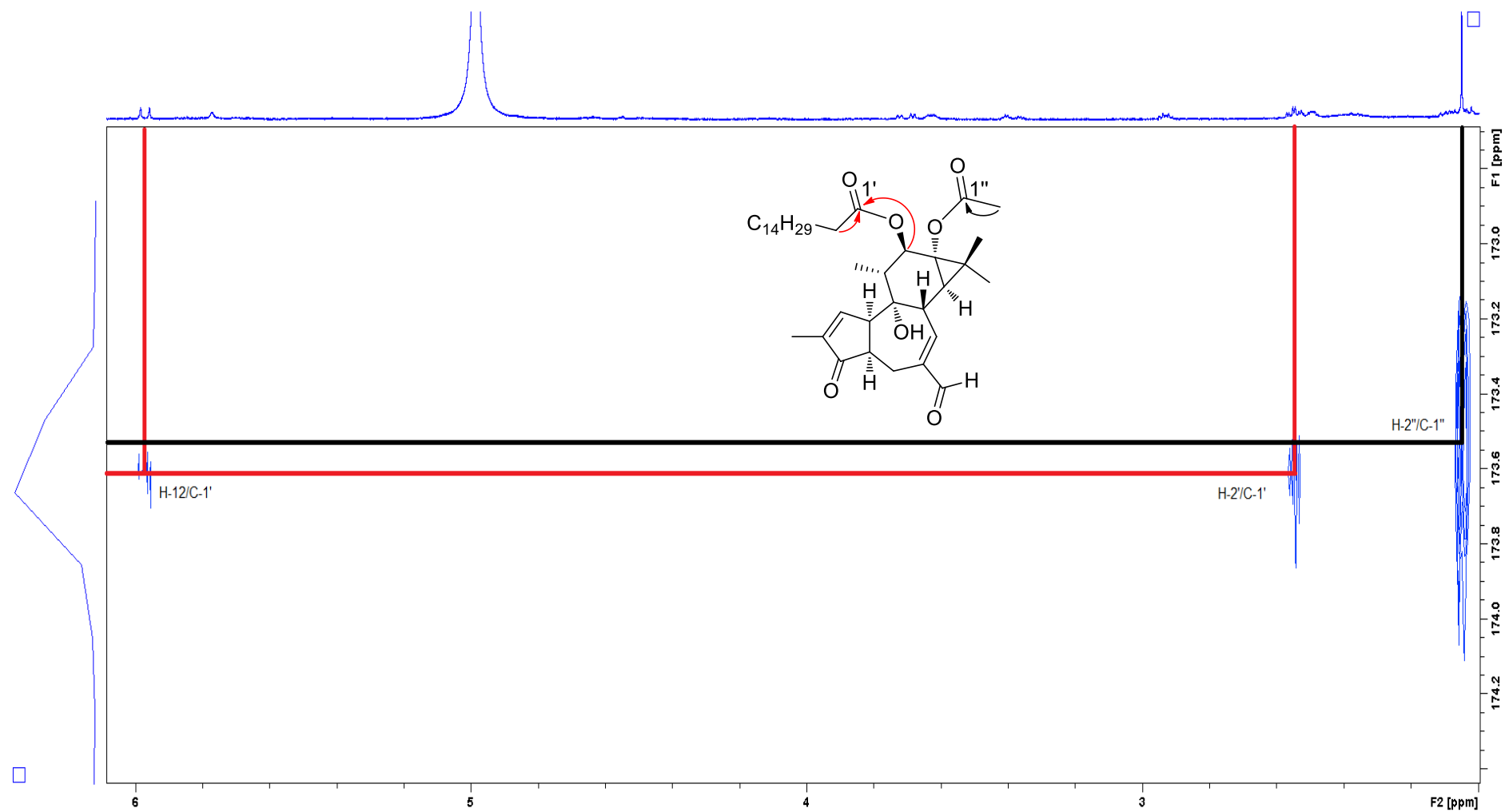


Figura S126: Espectro de IES-EMAR de **SL8** ($[M + H]$, modo de ionização positivo).

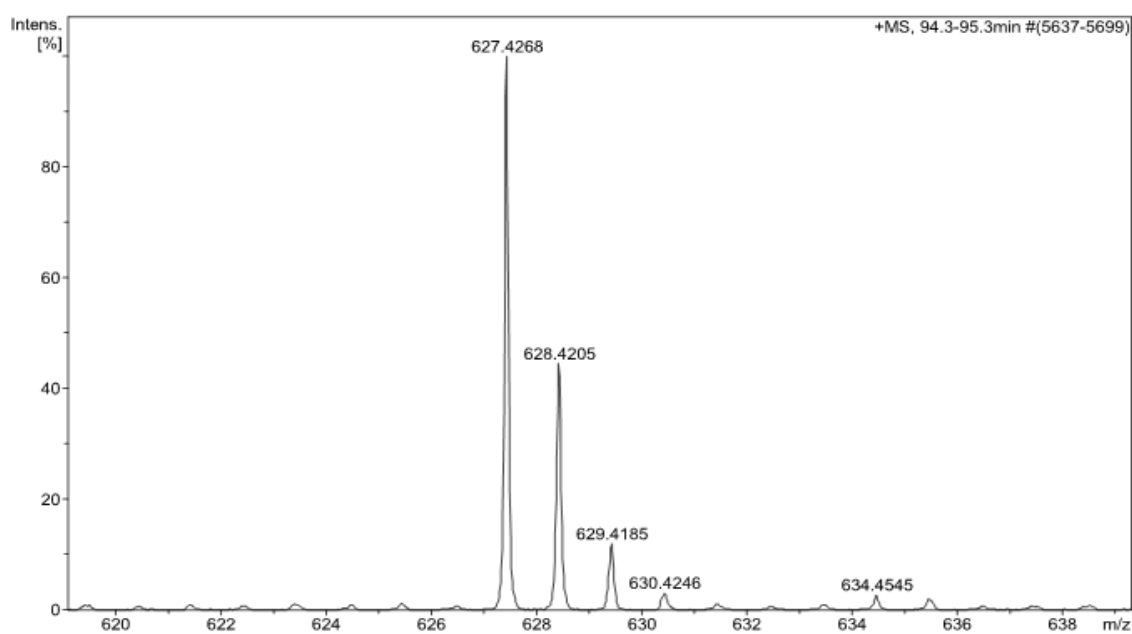


Figura S127: Espectro de CLAE-IESEM/EM de **SL8** ($[M + H]$, modo de ionização positivo).

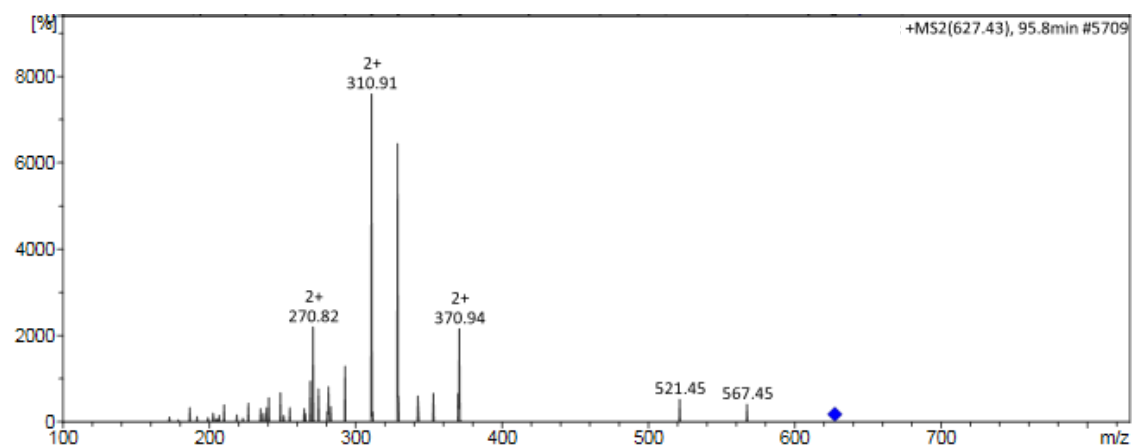


Figura S128: Padrão de fragmentação do composto SL8.

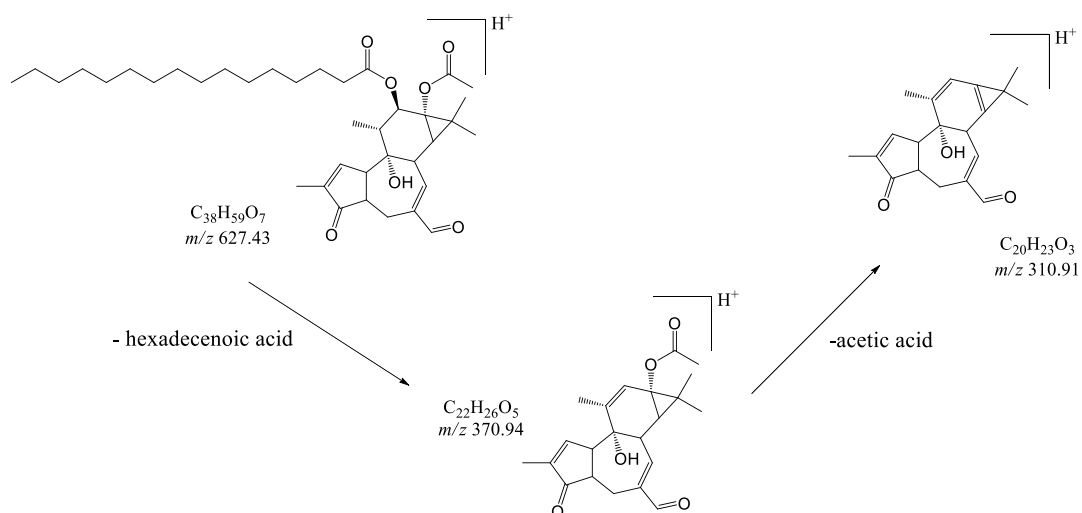


Figura S129: Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) do composto **SL9**.

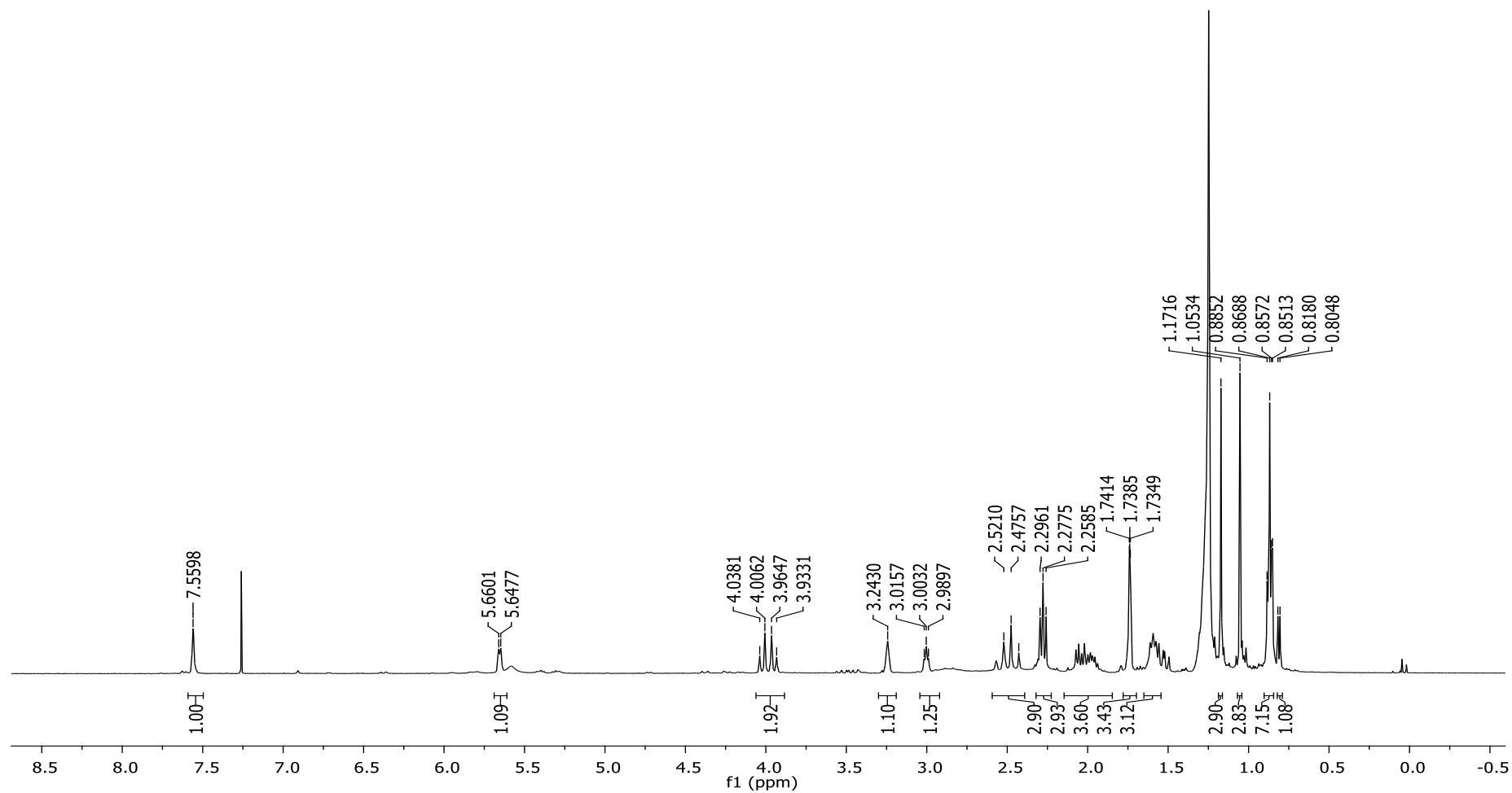


Figura S130: Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) do composto **SL9**.

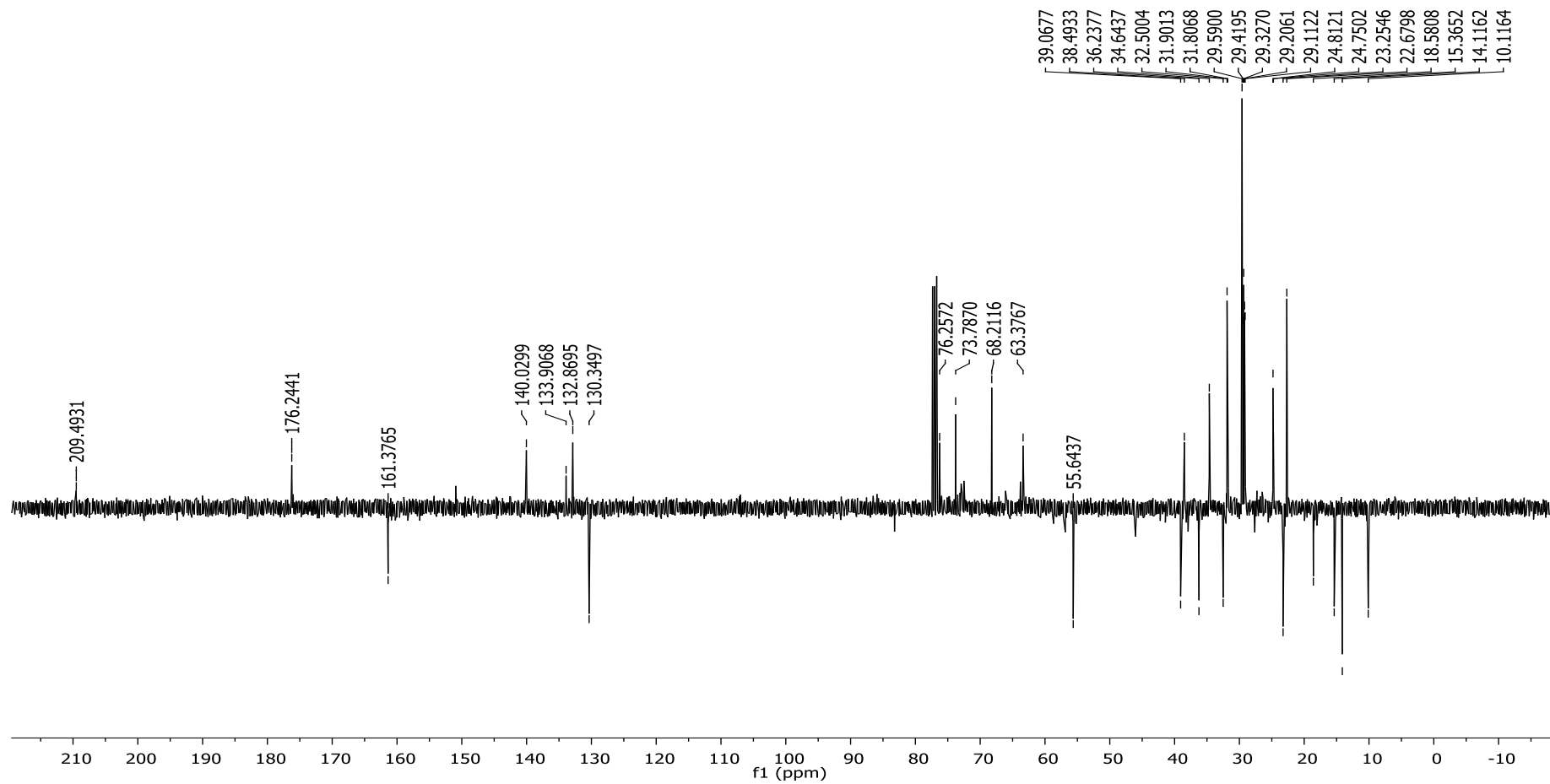


Figura S131: Espectro de IES-EMAR de **SL9** ($[M + H - H_2O]$, modo de ionização positivo).

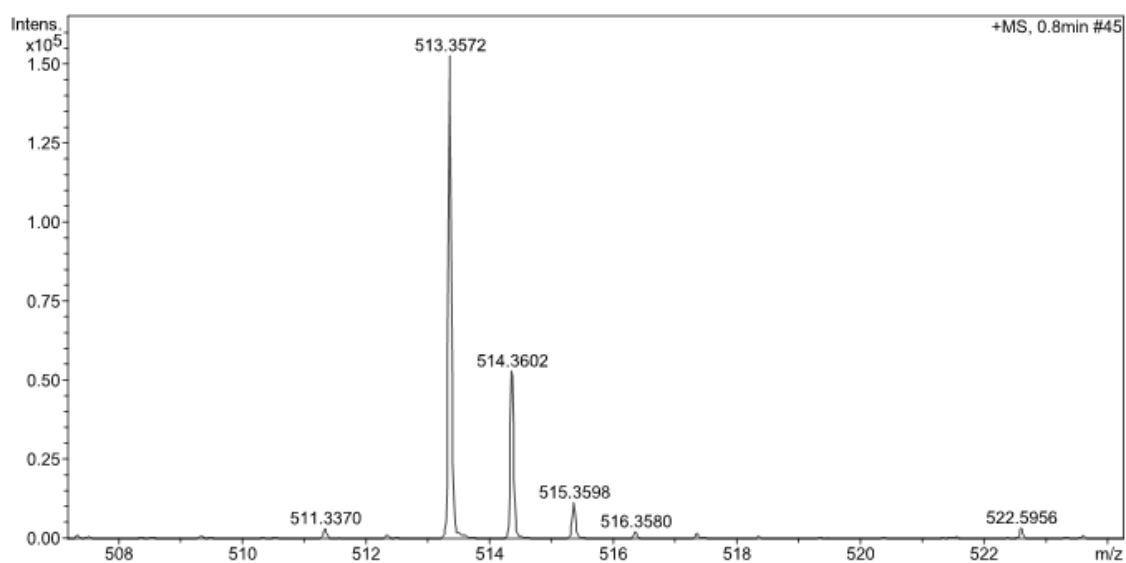


Figura S132: Espectro de CLAE-IESEM/EM de **SL9** ($[M + H - H_2O]$, modo de ionização positivo).

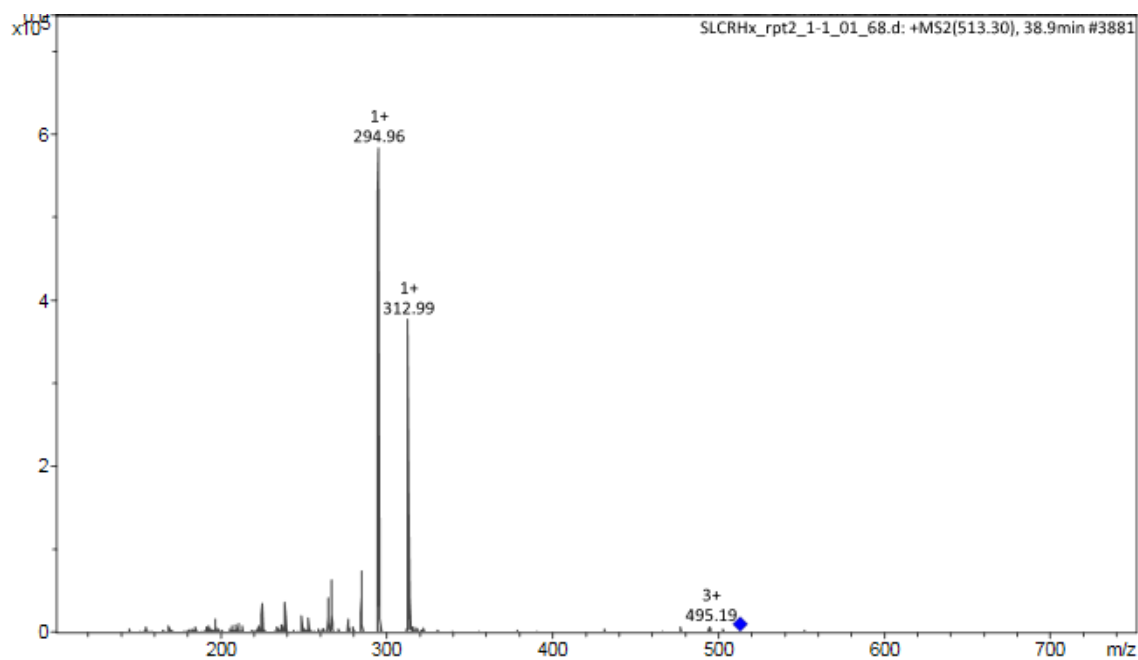


Figura S133: Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) do composto **SL10**.

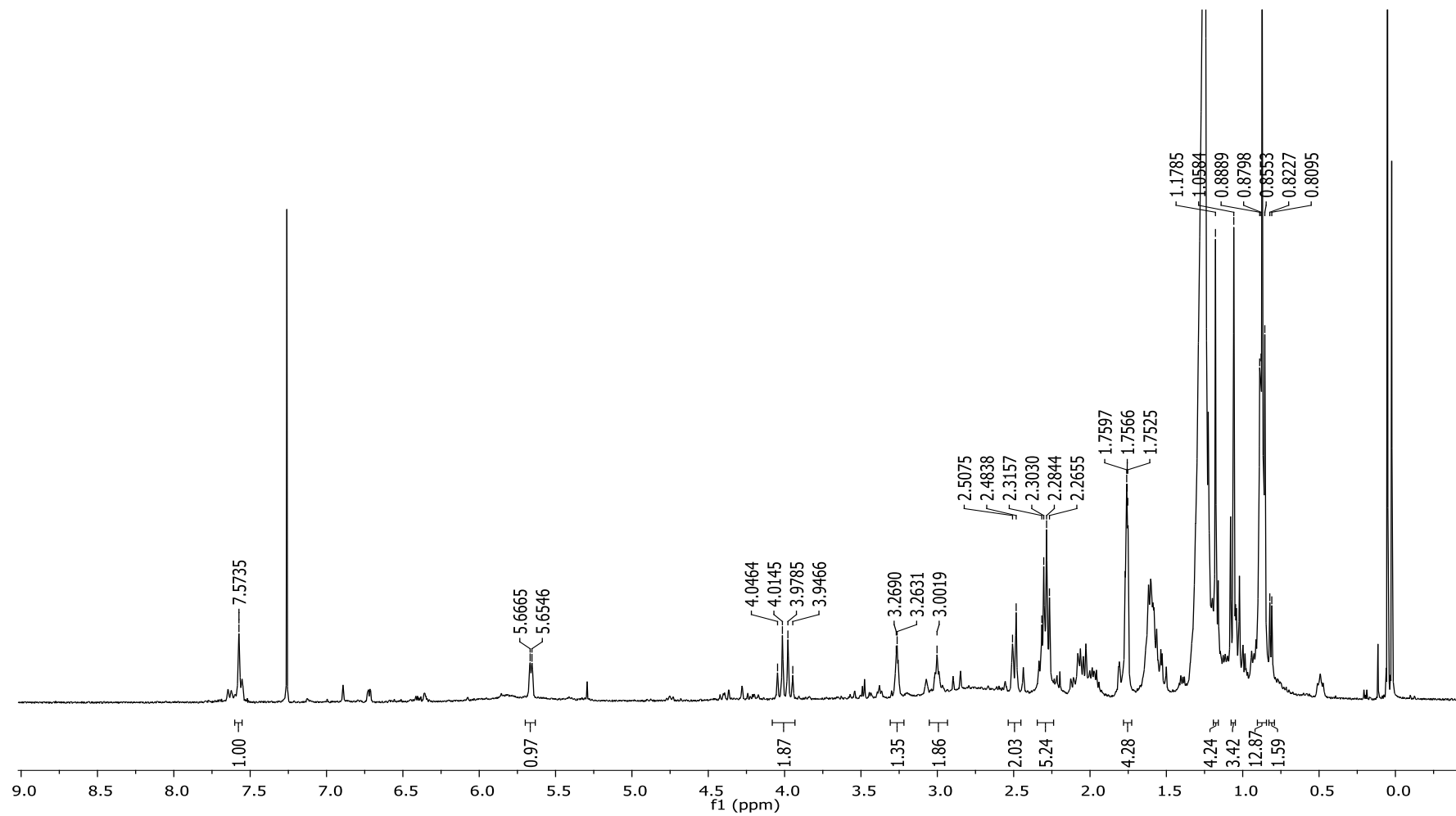


Figura S134: Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) do composto **SL10**.

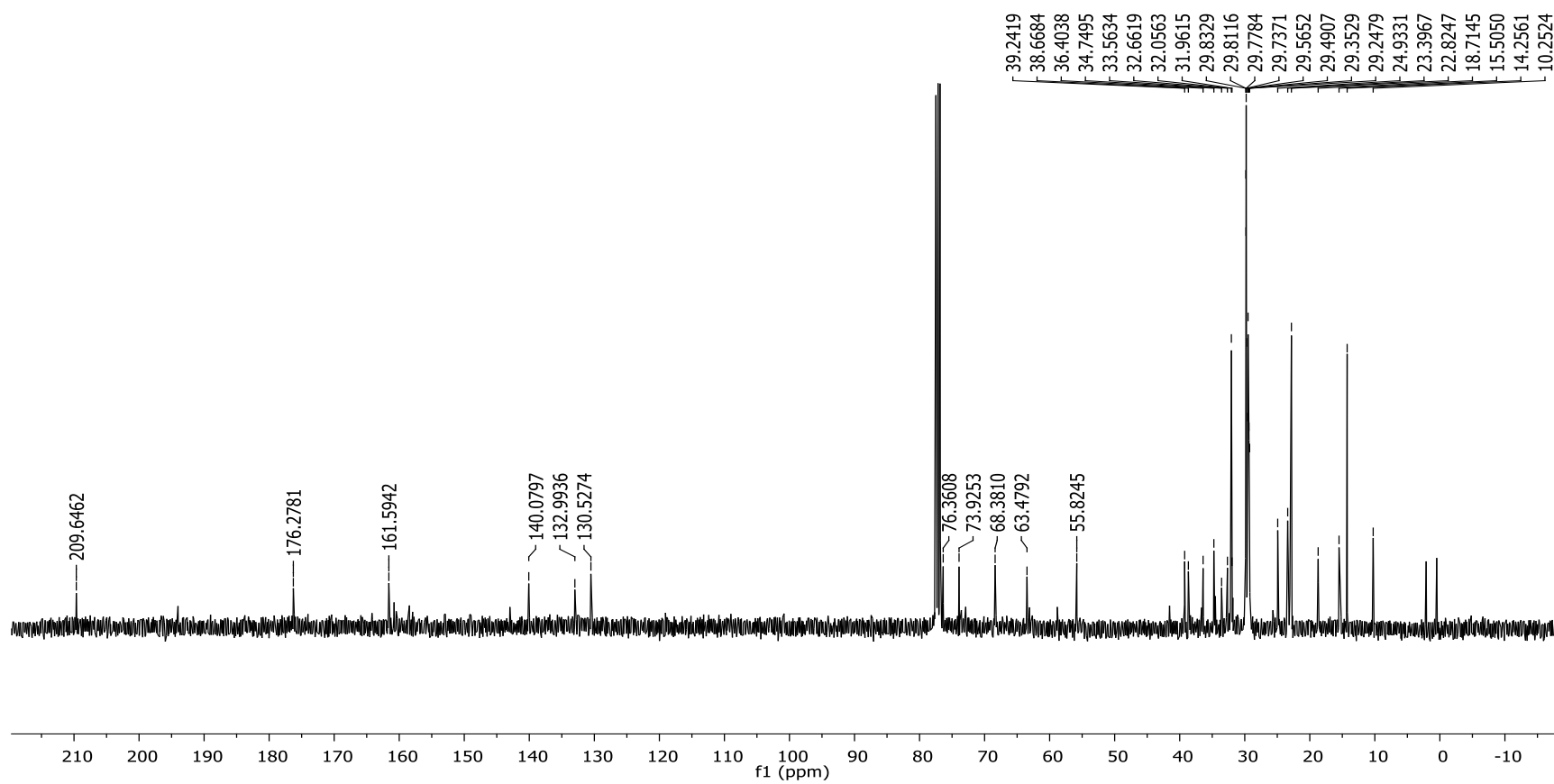


Figura S135: Espectro de IES-EMAR_de **SL10** ($[M + H - H_2O]$, modo de ionização positivo).

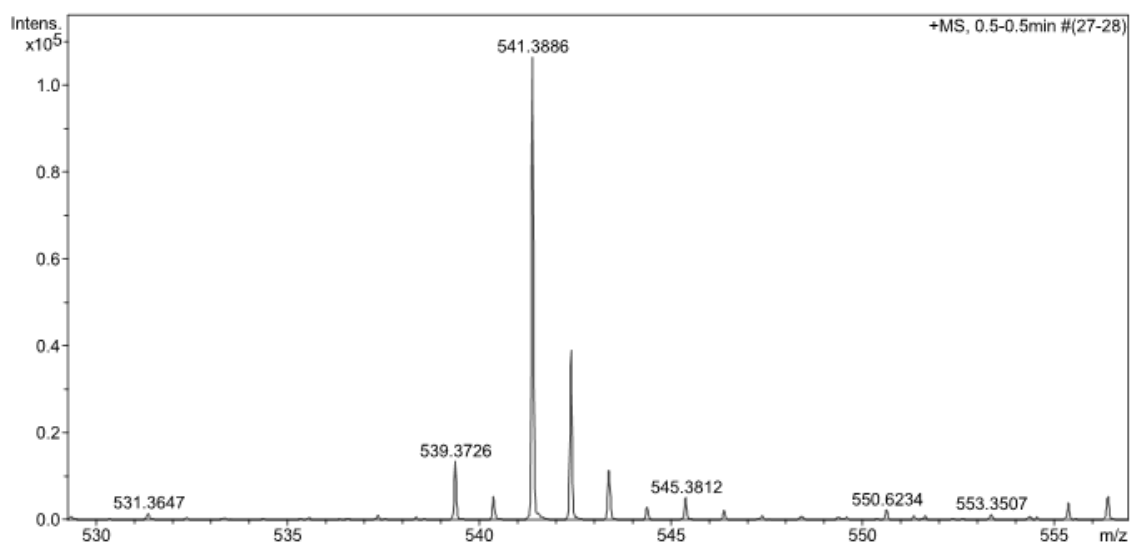


Figura S136: Espectro de CLAE-IESEM/EM_de **SL10** ($[M + H - H_2O]$, modo de ionização positivo).

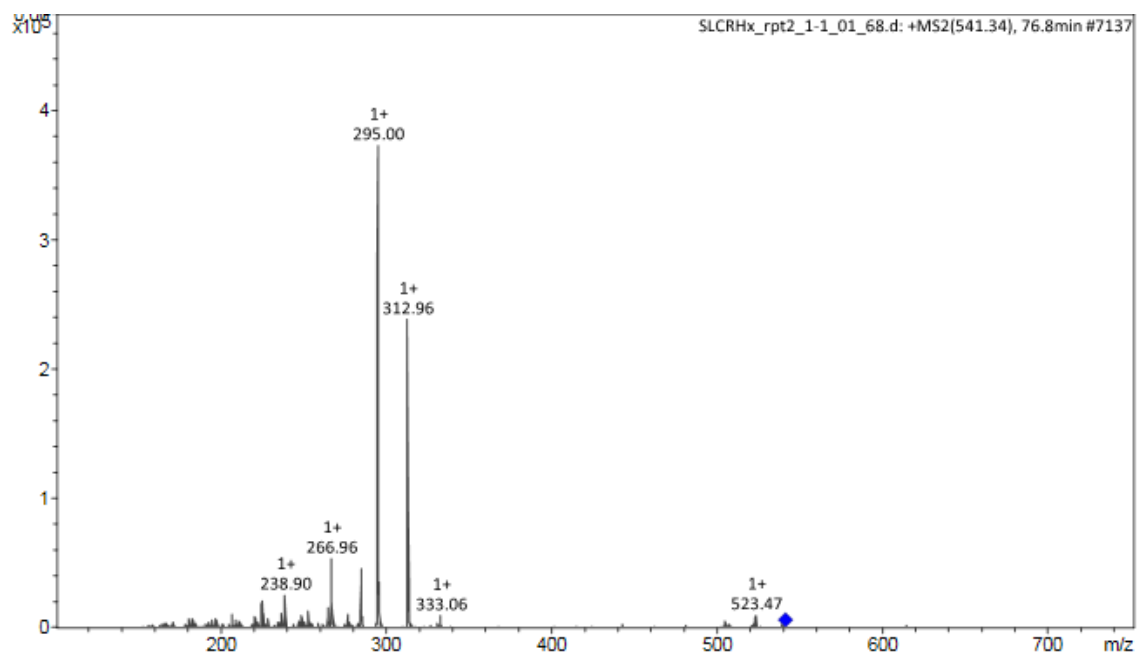


Figura S137: Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) do composto **SL11**.

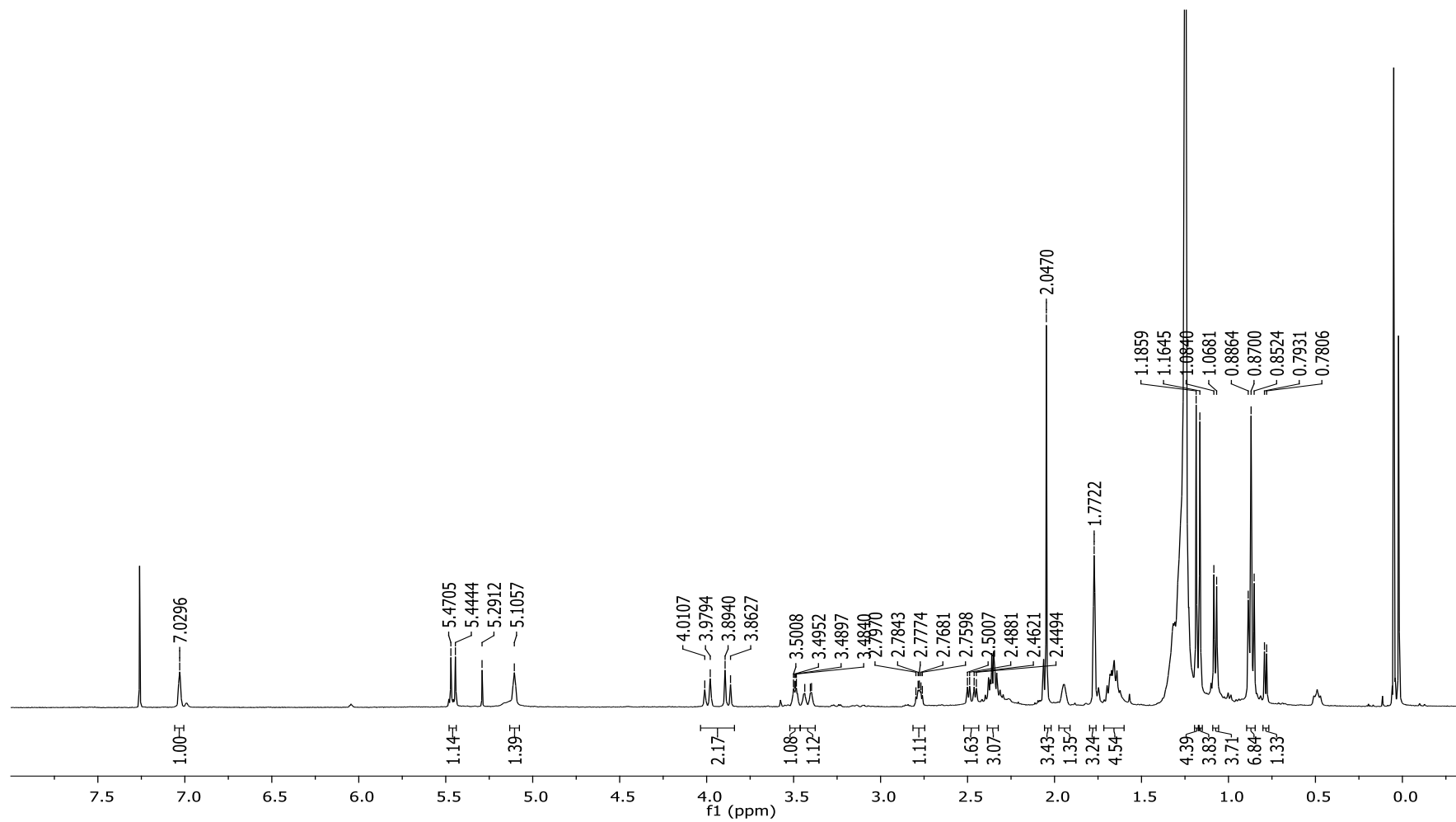


Figura S138: Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) do composto **SL11**.

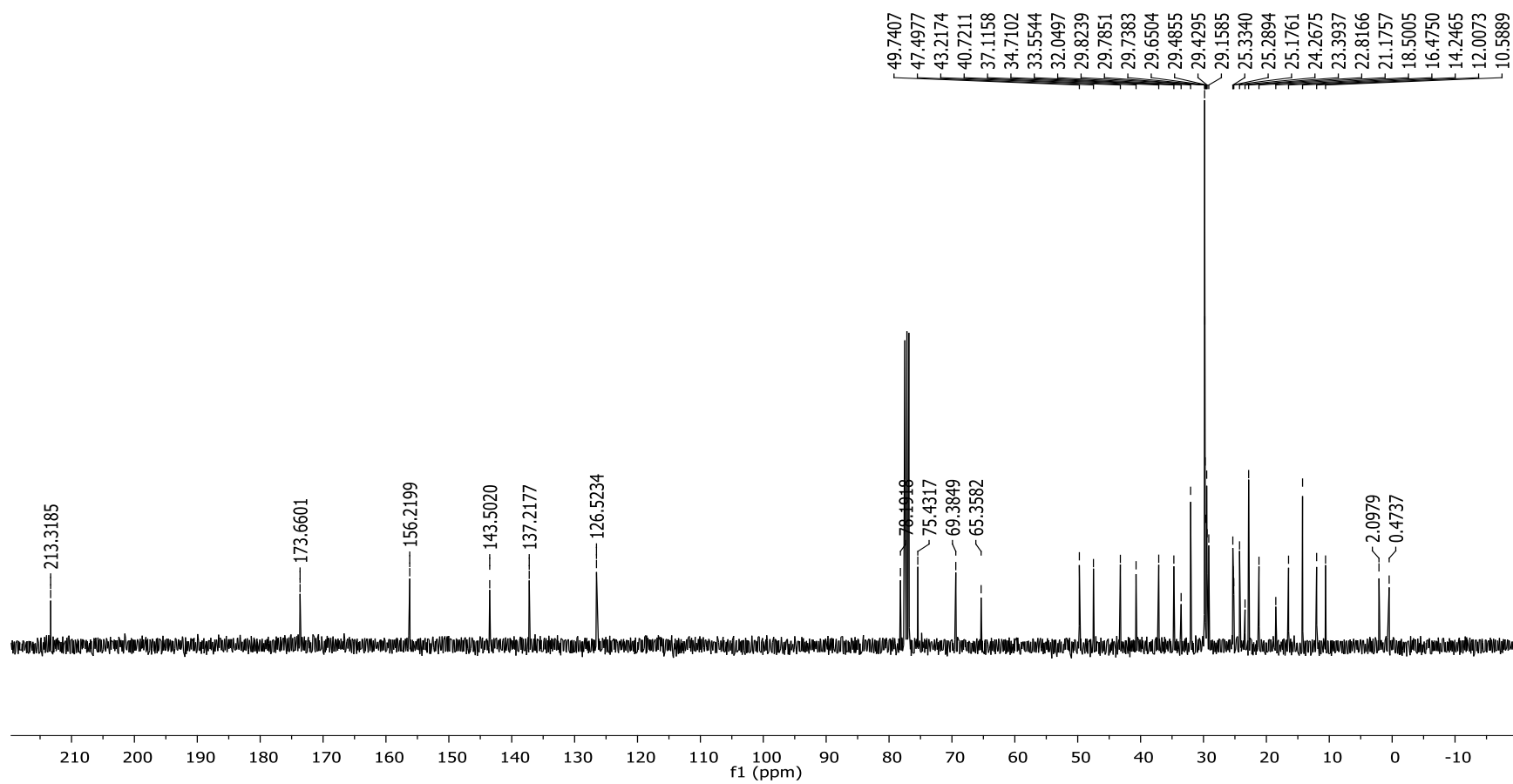


Figura S139: Espectro de IES-EMAR_de **SL11** ($[M + H]$, modo de ionização positivo).

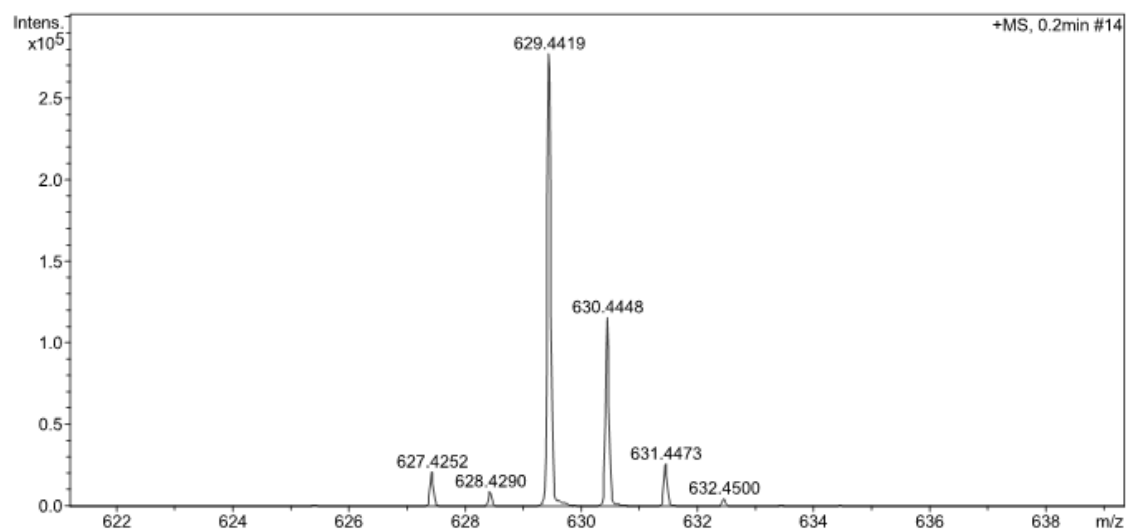


Figura S140: Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) do composto **SL12**.

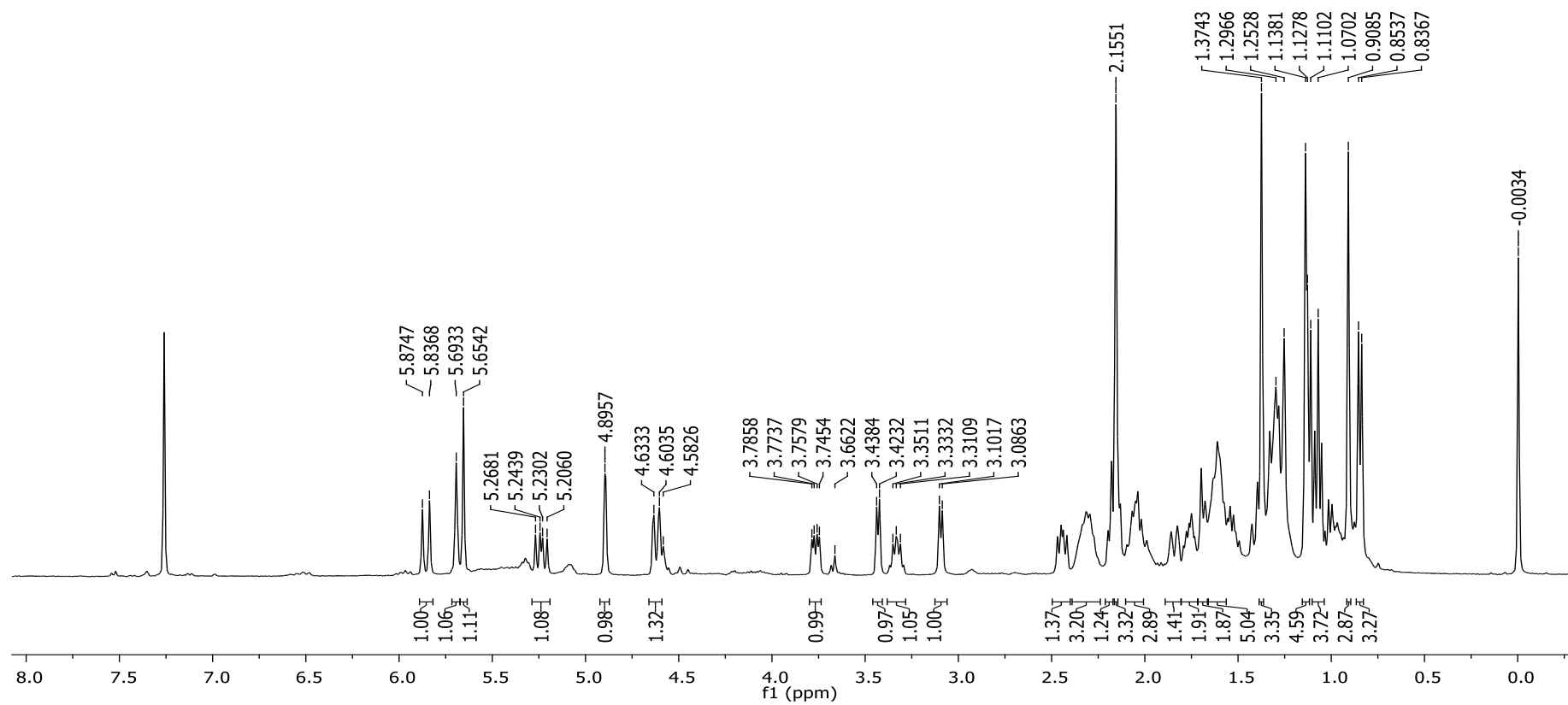


Figura S141: Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) do composto **SL12**.

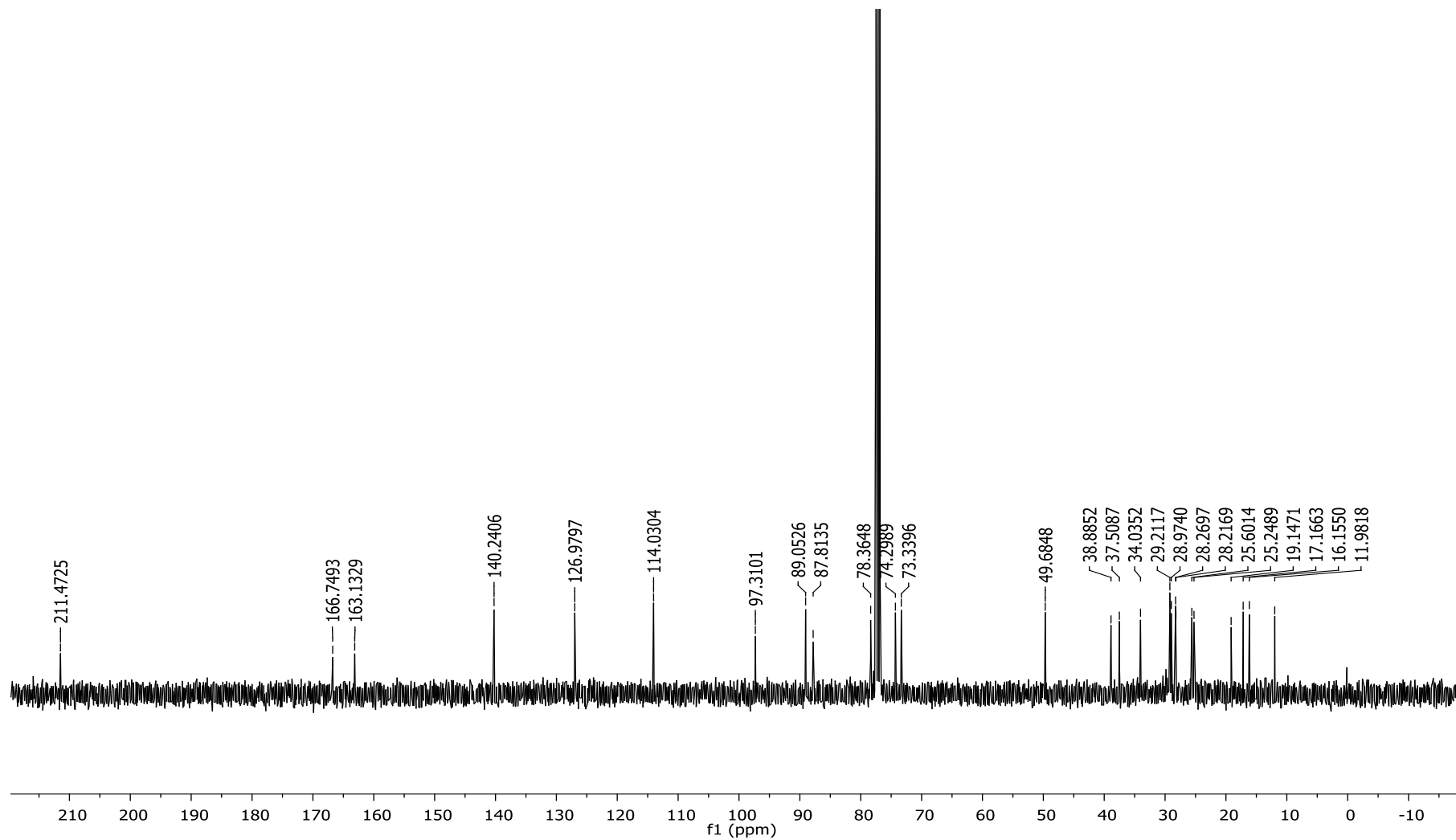


Figura S142: Espectro de IES-EMAR_de **SL12** ($[M - H_2O + H]$, modo de ionização positivo).

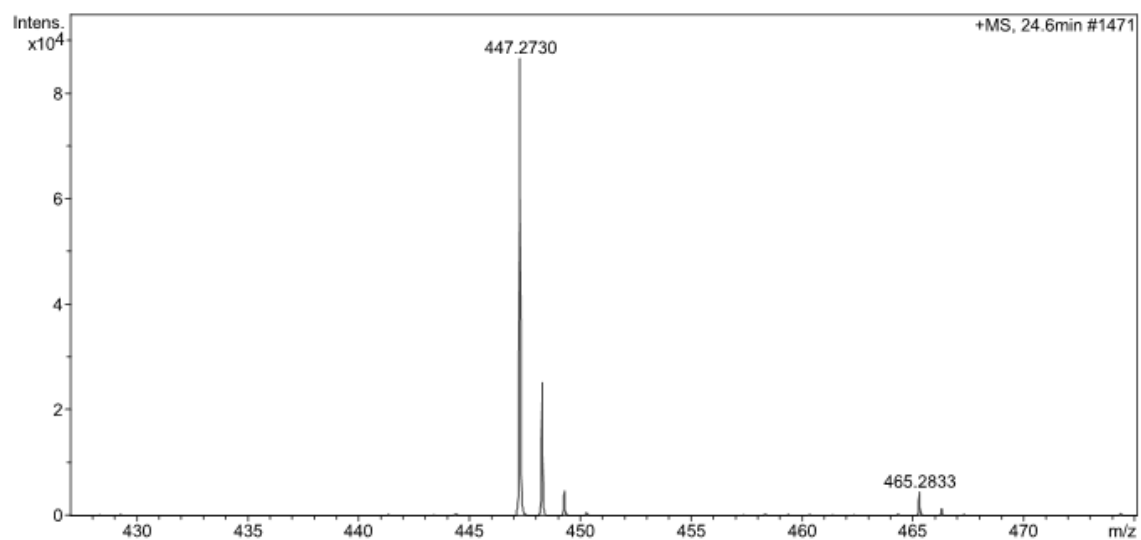


Figura S143: Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) do composto **SL13**.

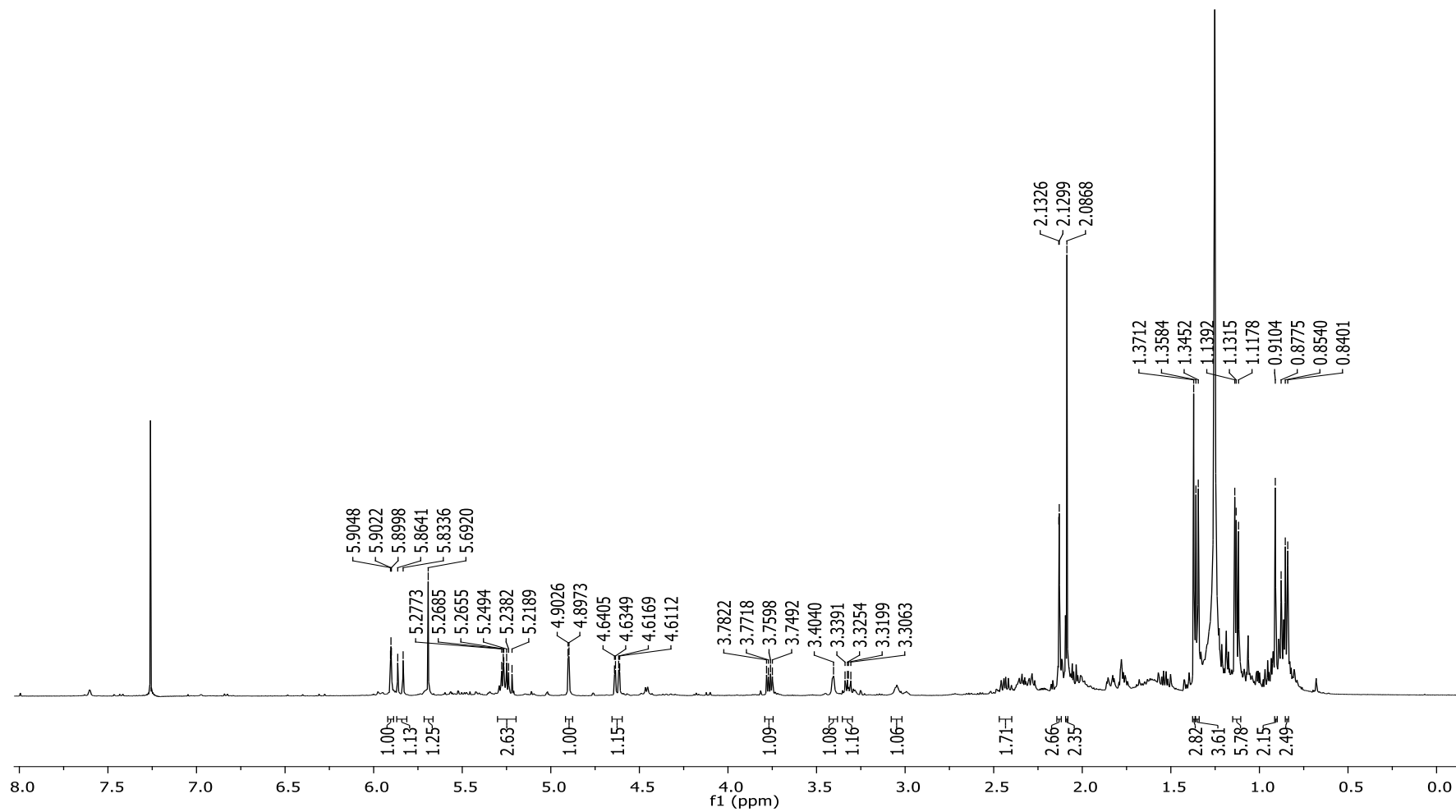


Figura S144: Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) do composto **SL13**.

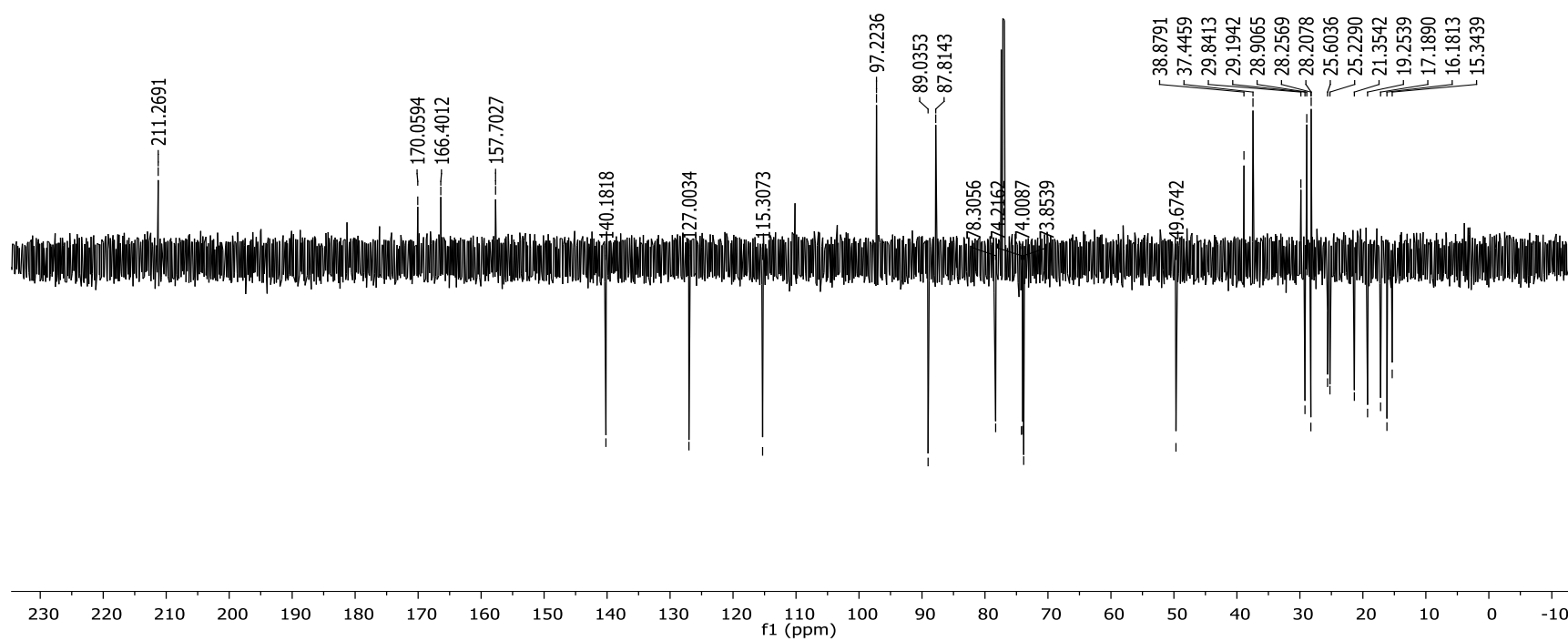


Figura S145: Espectro de IES-EMAR de **SL13** ($[M - H_2O + H]$, modo de ionização positivo).

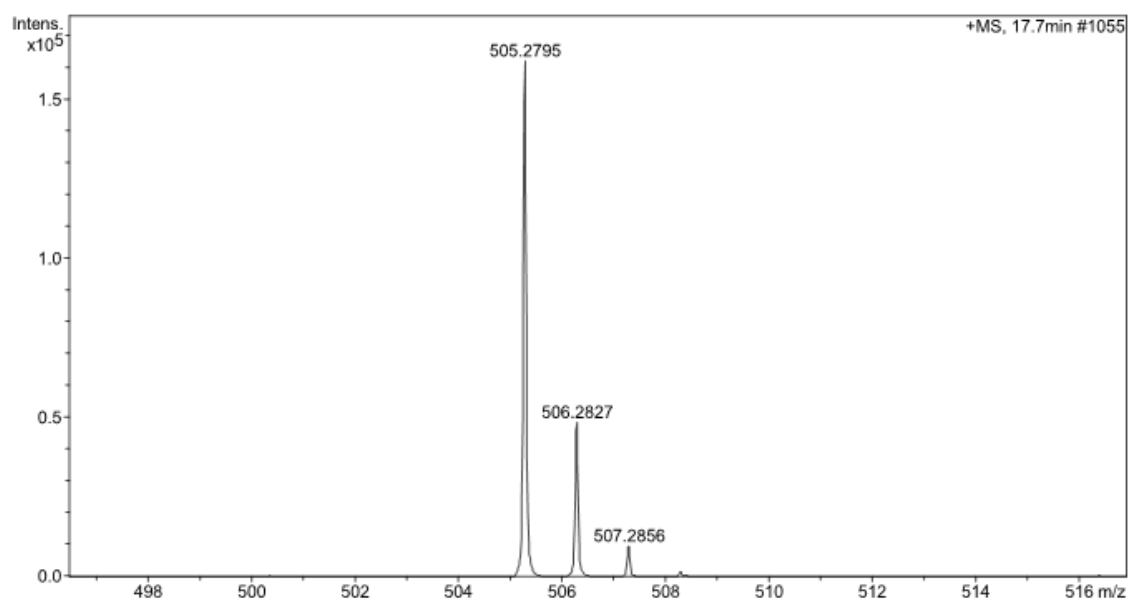


Figura S146: Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) do composto **SL14**.

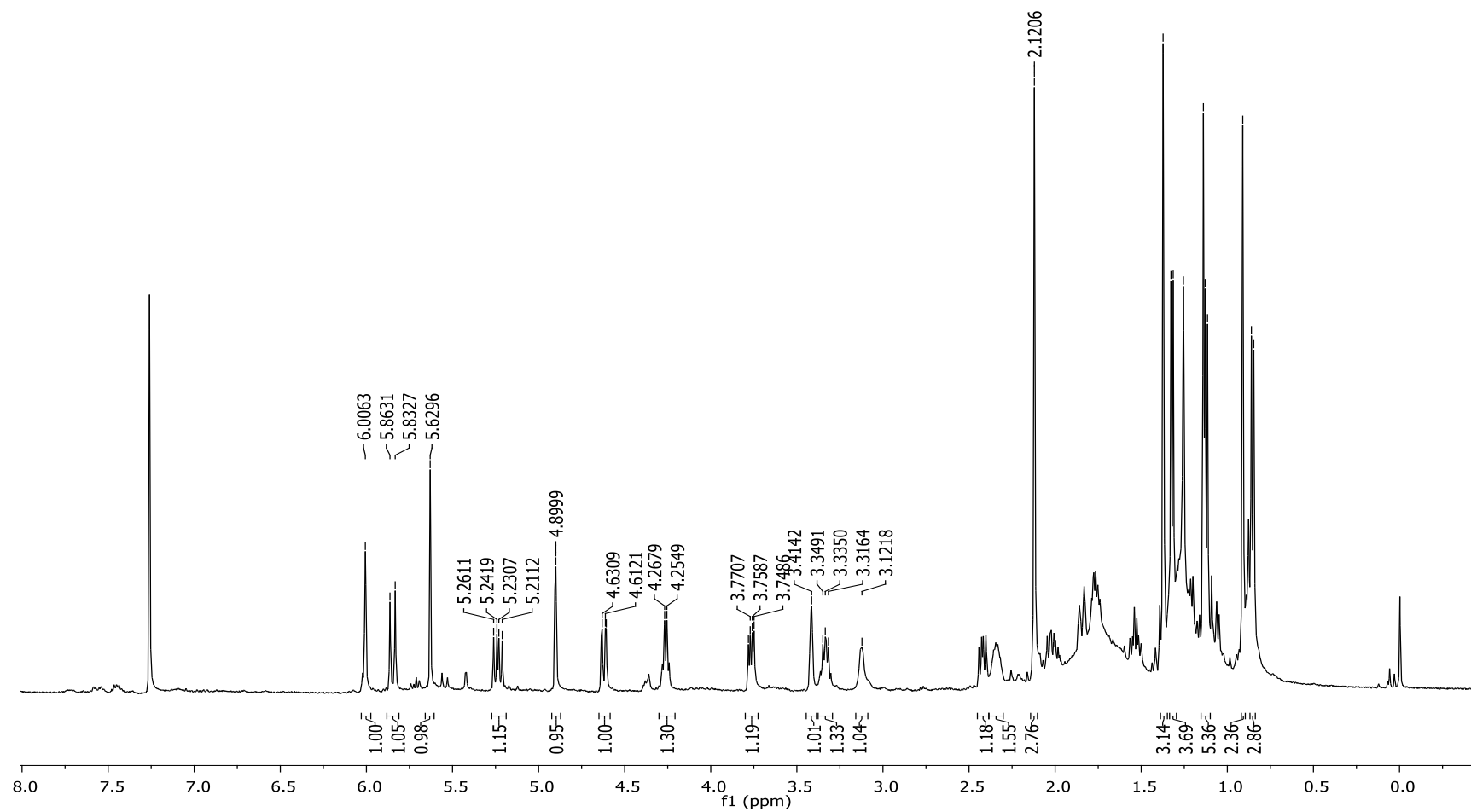


Figura S147: Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) do composto **SL14**.

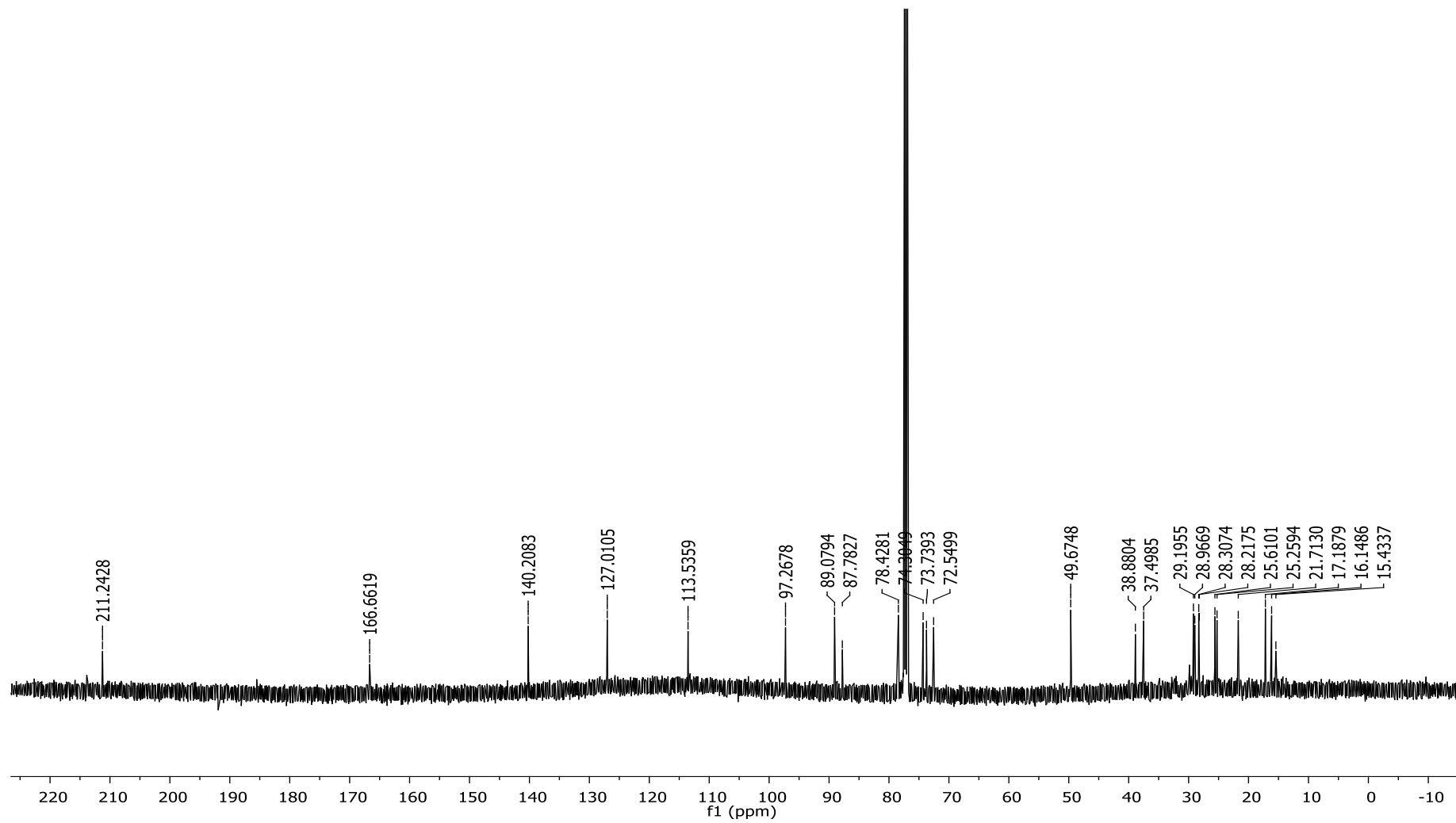


Figura S148: Espectro de IES-EMAR de **SL14** ($[M - H_2O + H]$, modo de ionização positivo).

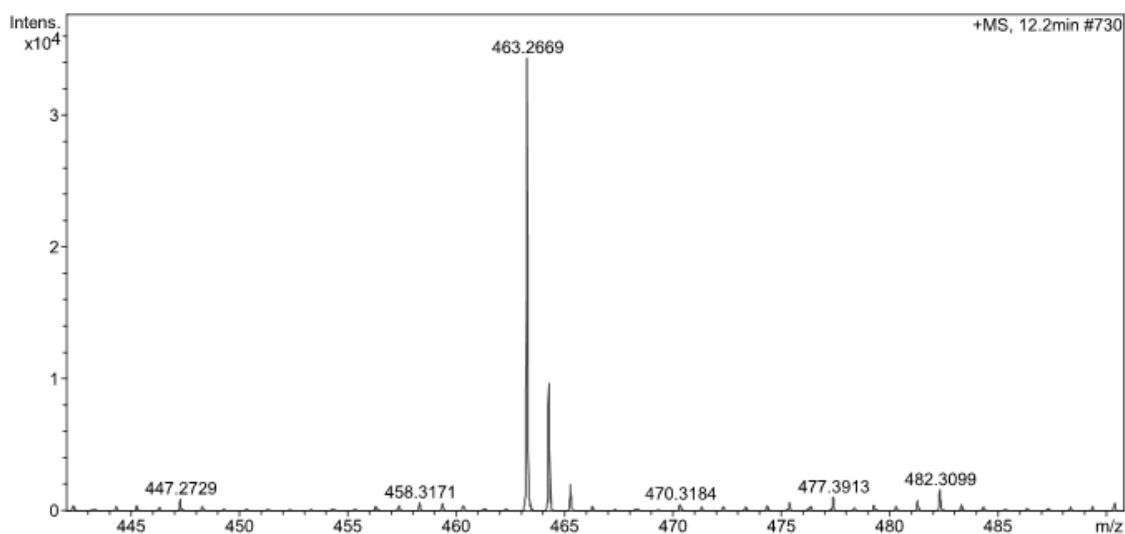
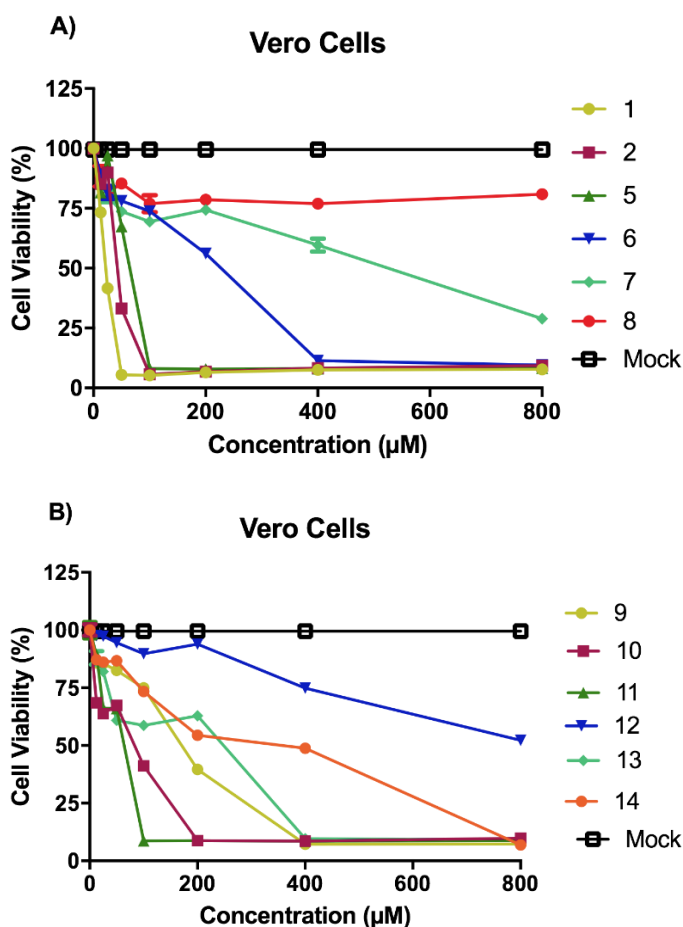


Tabela S4: Atividade citotóxica dos compostos **SL1**, **SL2**, **SL5–SL14** em células Vero.

Compounds	Cytotoxicity CC_{20} (μM) ^a	Cytotoxicity CC_{50} (μM) ^b	Compounds	Cytotoxicity CC_{20} (μM) ^a	Cytotoxicity CC_{50} (μM) ^b
1	8.7 $\pm$ 0.7	24.6 $\pm$ 1.2	9	66.2 $\pm$ 1.6	216 $\pm$ 2.1
2	20.4 $\pm$ 0.5	50.2 $\pm$ 1.9	10	11.5 $\pm$ 0.3	77.4 $\pm$ 3.5
5	27.4 $\pm$ 1.2	60.5 $\pm$ 2.7	11	21.5 $\pm$ 1.4	55.9 $\pm$ 4.4
6	63.4 $\pm$ 0.9	225 $\pm$ 1.5	12	328 $\pm$ 0.2	848 $\pm$ 1.6
7	44.3 $\pm$ 0.8	160 $\pm$ 2.4	13	32.5 $\pm$ 1.2	106 $\pm$ 3.6
8	73.9 $\pm$ 0.4	244 $\pm$ 1.4	14	84.5 $\pm$ 0.6	368 $\pm$ 1.4

^a CC_{20} (20% cytotoxic concentration) refers to compound concentration that caused a 20% reduction in viability and it is the maximum nontoxic concentration employed in the antiviral assays. ^b CC_{50} (50% cytotoxic concentration) refers to compound concentration that caused a 50% reduction in viability. ^{a,b} Values are the mean $\pm$ standard deviation calculated from at least three independent assays.

Figura S149: Viabilidade de células Vero após tratamento com diferentes concentrações dos compostos de *S. loranthacea*.



Os efeitos dos compostos SL1, SL2, SL5-SL8 (Painel A) e SL9-SL14 (Painel B) na viabilidade das células Vero foram determinados pelo método MTT. Resumidamente, 1×10^4 células Vero/poço foram semeadas em placas de cultura de tecidos de 96 poços e depois tratadas com várias concentrações de cada composto. Após 120 h de incubação a 37° C, o meio de cultura foi removido e reabastecido com 50 μL de solução de trabalho MTT (1 mg/mL) e posteriormente incubado por 3-4 h. O controle incluiu células infectadas por simulação (DMSO a 0,4% v/v em meio de cultura). Optical density was measured at 540 nm. Data are means $\pm$ SD from three independent experiments.

5.2 Manuscrito 2: Fenilpropanóides de *Croton velutinus* com Atividades Anti-inflamatória, Citotóxica e Tripanocida *in vitro* (manuscrito aceito na revista Fitoterapia)

Fenilpropanoides de *Croton velutinus* com Atividades Anti-inflamatória, Citotóxica e Tripanocida *in vitro*

Lucas Silva Abreu¹, Yuri Manguiera do Nascimento¹, Renan Fernandes do Espirito-Santo², Cássio Santana Meira², Ivanilson Pimenta Santos², Railda Batista Brandão³, Augusto Lopes Souto¹, Maria Lenise Guedes⁴, Milena Botelho Pereira Soares², Cristiane Flora Villarreal^{2,3}, Marcelo Sobral da Silva¹, Eudes da Silva Velozo³, Josean Fechine Tavares^{1*}

¹ Instituto de Pesquisa em Fármacos e Medicamentos, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, PA, Brazil

² Instituto Gonçalo Muniz, Fundação Oswaldo Cruz, Salvador, BA, Brazil

³ Faculdade de Farmácia, Universidade Federal da Bahia, Salvador, BA, Brazil

⁴ Instituto de Biologia, Universidade Federal da Bahia, Salvador, BA, Brazil

* Universidade Federal da Paraíba, Departamento de Ciências Farmacêuticas, Caixa Postal 5009, 58051-970, João Pessoa – PB, Brasil, (phone: +55-83-32167427) E-mail: josean@ltf.ufpb.br

* Universidade Federal da Paraíba, Departamento de Ciências Farmacêuticas, Caixa Postal 5009, 58051-970, João Pessoa – PB, Brasil, (phone: +55-83-32167427) E-mail: josean@ltf.ufpb.br

RESUMO

Esse estudo apresenta a primeira análise fitoquímica das raízes de *C. velutinus*, e descreve fenilpropanoides obtidos das raízes dessa espécie. O fracionamento do extrato hexânico das raízes levaram ao isolamento de quatro novos fenilpropanoides, velutinas A-D (**CV1-CV4**) e de três conhecidos (**CV5-CV7**). Essas estruturas foram determinadas com base em análises espectroscópicas (RMN 1D-2D; EMAR e IV). As atividades anti-inflamatória, citotóxica e tripanocida dos compostos foram avaliadas. Apenas os compostos **CV2** e **CV5** apresentaram atividade citotóxica para as linhagens celulares de câncer (B16F10, HL-60, HCT116, MCF-7 e HepG2) com CI_{50} variando de 6,8 a 18,3 μ M e 11,1 a 18,3 μ M, respectivamente. Esses compostos também apresentaram atividade tripanocida com um valor de CE_{50} de 9,0 e 9,58 μ M, respectivamente. Estes compostos tiveram uma melhor atividade que o medicamento de referência, benzonidazol, que apresentou um valor de CE_{50} de 12,5 μ M. Além disso, foi testado a atividade anti-inflamatória pela capacidade de modulação de macrófagos após um estímulo inflamatório de LPS e INF- γ , avaliando a inibição de NO e IL-1 β , respectivamente. Todos os compostos inibiram a produção de nitrito com valor de CE_{50} entre 1,7 e 42,9 μ M, sendo os compostos **CV2** e **CV5** os de melhor resultado. Apenas o composto **CV5** diminuiu a produção de IL-1 β de maneira concentração dependente.

Palavras-chave: *Croton velutinus*, fenilpropanoides, anti-inflamatório, citotoxicidade e atividade tripanocida.

1. Introdução

O gênero *Croton* é o segundo maior da família Euphorbiaceae possuindo aproximadamente 1300 espécies. No Brasil foram descritas cerca de 300 espécies sendo que destas 68 foram relatadas na Caatinga sendo 21 endêmicas desse bioma [1, 2]. A química do gênero *Croton* é bastante descrita, tendo como principais classes de metabólitos secundários os diterpenos e alcaloides. Sesquiterpenos e monoterpenos são bastante relatados na composição química dos óleos essenciais [3].

Atividade anti-inflamatória já foi descrita em plantas do gênero *Croton* em ensaios bioguiados [4], demonstrando inibição de ciclooxigenases, produção de nitrito e citocinas em macrófagos [5, 6]. Espécies de *Croton* possuem uso popular com atividade anticâncer e possui diversos relatos de atividade citotóxica frente a células tumorais [7, 8]. Além disso há relatos de atividade tripanocida inibindo a via da tripanotiona redutase nas formas epimastigotas e tripomastigotas [9]. Em adição, essas mesmas atividades já foram descritas para a classe dos fenilpropanoides [10-12].

Croton velutinus Baill. é encontrada em diversas regiões do nordeste brasileiro, principalmente em campos rupestres e cerrados de altitude. Cezar (2016) relata a identificação de flavonoides, sesquiterpenos e um diterpeno no caule dessa espécie. Além disso, atividades anticolinesterase, antioxidante, larvicida e inibição da enzima conversora de angiotensina I foram relatadas para os extratos hexânico e metanólico [13].

Em continuidade de nossos estudos com espécies do semiárido em busca de compostos bioativos, nesse trabalho descrevemos a ocorrência de novos derivados de fenilpropanoides incomuns no gênero *Croton* com atividades anti-inflamatória, citotóxica e tripanocida.

2. Experimental

2.1 Procedimentos experimentais gerais

A rotação óptica foi mensurada num polarímetro Jasco P-2000 (Jasco, Easton MD) em CHCl₃ a 25 °C. Os espectros de IV foram obtidos num espectrômetro Bruker Vertex 70 (Bruker, Billerica, MA, USA). Os espectros de RMN unidimensionais (¹H and ¹³C) e bidimensionais (HSQC, HMBC, COSY e NOESY) foram obtidos em espectrômetros VARIAN-SYSTEM (500 MHz e 125 MHz) e BRUKER AVANCE III HD (400 MHz e 100 MHz). CDCl₃ foi utilizado como solvente deuterado e usado o sinal de solvente residual não deuterado como referência. Para obtenção dos espectros de massas das substâncias foi utilizado o espectrômetro de massas de alta resolução da marca Bruker, modelo microTOF II (Bruker, Billerica, MA, USA), pela técnica de Ionização por Eletrospray modo positivo. Para as CC

utilizou-se sílica gel (Silicycle® de partículas com dimensões entre 0,063-0,2 mm ou 0,04-0,063 mm). Para CCDA foram utilizadas placas comerciais de sílica gel (Whatman), em camadas de 0,25 mm de espessura sobre suporte de alumínio (20x20 cm). As substâncias em análise foram evidenciadas pelo uso de radiação ultravioleta nos comprimentos de onda de 254 e 366 nm (aparelho de marca Boitton) como também impregnação das placas em cubas de vidro, saturadas por vapor de iodo.

2.2. Material vegetal

O material botânico foi coletado na cidade de Morro do Chapéu-BA, Brasil, (11°33'00"S, 41°09'22"W) em março de 2016. O registro de acesso no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado foi obtido sob número A22E9B0. A espécie foi identificada pela Prof^a. Maria Lenise Guedes, tendo uma exsicata depositada no Herbário Alexandre Leal da Costa (ALCB) do Instituto de Biologia, sob o número 106742. As raízes foram secas a 32 °C por 72 horas.

2.3 Extração e isolamento

As raízes secas de *C. velutinus* (272,0 g) foram maceradas por três vezes com hexano (4 L/7dias) e por três vezes com MeOH (4 L) pelo mesmo período. As soluções foram concentradas sob pressão reduzida obtendo os extratos brutos hexânicos (4,5 g) e metanólicos (43,5 g). O extrato hexânico (4,5 g) foi submetido a uma cromatografia em coluna utilizando sílica gel e como eluente hexano e acetato de etila em misturas puras ou binárias e metanol puro com aumento crescente de polaridade. A partir desse procedimento foram obtidas 26 frações que foram reagrupadas em 15 grupos (F1-F15) de acordo com o perfil cromatográfico observado por CCDA. A fração F5 (95,3 mg), F7 (10.1 mg) e F10 (112,2 mg) foram submetidas para análises de RMN e foram identificados os compostos **CV1**, **CV5** e **CV2**, respectivamente.

A fração F13 (15,2 mg) foi submetida a cromatografia utilizando CLAE-DAD e como fase móvel: MeOH:HCOOH 0,1% (60:40); fluxo isocrático de 3 mL/min; tempo de corrida: 90 min; coluna C₁₈ ACE-250 x 10 mm x 5 µm; comprimentos de onda 220 e 254 nm, levando ao isolamento dos compostos **CV3** (Tr = 63.02 min, 3,8 mg), **CV4** (Tr = 89.96 min, 1,1 mg), **CV6** (Tr = 57.17 min, 3,5 mg) e **CV7** (Tr = 81.03 min, 1,2 mg).

Benzoato de (E)-4-(1-propenil) fenila (CV1). Sólido amorfo; $[\alpha]_D^{25} +5$ (c. 0,1, CHCl₃). IES-EMAR [M + H]⁺, 239.1073 (calculado para C₁₆H₁₅O₂, *m/z* 239.1067). IV $\nu_{\max}$: 2955, 2924, 2851, 1730, 1269 cm⁻¹. RMN de ¹H e ¹³C (CDCl₃) ver tabela 3 e 4.

Benzoato de (E)-4-(1-epoxi-7,8-propen) fenila (CV2). Sólido amorfo; $[\alpha]^{25}_D +7$ (c. 0,1, CHCl₃). IES-EMAR $[M + H]^+$, 255.1023 (calculado para C₁₆H₁₅O₃, m/z 255.1016). IV ν_{max} : 2958, 2925, 1736, 1601, 1265 cm⁻¹. RMN de ¹H e ¹³C (CDCl₃) ver tabela 3 e 4.

Benzoato de Eritro-4-(propan-7,8-diol) fenila (CV3). Óleo sem cor; $[\alpha]^{25}_D +15$ (c. 0,1, CHCl₃). IES-EMAR $[M + H]^+$, 273.1115 (calculado para C₁₆H₁₇O₄, m/z 273.1121). IV ν_{max} : 3391, 2923, 1734, 1268, 1204 cm⁻¹. RMN de ¹H e ¹³C (CDCl₃) ver tabela 3 e 4.

Benzoato de Treo-4-(propan-7,8-diol) fenila (CV4). Óleo sem cor; $[\alpha]^{25}_D -18$ (c. 0,1, CHCl₃). IES-EMAR $[M + H]^+$, 273.1120 (calculado para C₁₆H₁₇O₄, m/z 273.1121). IV ν_{max} : 3392, 2919, 1735, 1266, 1205 cm⁻¹. RMN de ¹H e ¹³C (CDCl₃) ver tabela 3 e 4.

2.4 Drogas

O glicocorticóide sintético, dexametasona (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO), foi utilizado como controle positivo para ensaios imunomodulatórios. A violeta genciana (Synth, São Paulo, SP, Brazil), foi utilizada como controle positivo para o ensaio de citotoxicidade. O benzonidazol (LAFEPE) foi utilizado como droga de referência anti-*T. cruzi*. A doxorrubicina (Laboratório IMA S.A.I.C., Buenos Aires, Argentina) foi utilizada como droga anticâncer de referência. Todos os compostos foram solúveis em dimetilsulfóxido (DMSO; PanReac, Barcelona, Spain) e diluídos em cultura de células médias para uso nos ensaios. A concentração final de DMSO foi inferior a 1% em todos experimentos *in vitro*.

2.5 Células e Parasitas

A linhagens celulares MCF7 (carcinoma de mama humano), HCT116 (carcinoma do cólon humano), HepG2 (carcinoma hepatocelular humano), HL-60 (leucemia promielocítica humana), B16F10 (melanoma murino), J774 (macrófagos murinos) e MRC-5 (fibroblasto pulmonar humano) foram obtidas da *American Type Culture Collection* (ATCC, Manassas, VA). As células foram cultivadas em meio completo com suplementos apropriados, conforme recomendado pela ATCC. Todas as linhagens celulares foram testadas quanto ao micoplasma usando o *Mycoplasma Stain Kit* (Sigma-Aldrich) para validar o uso de células livres de contaminação.

A cepa Y de *T. cruzi* (DTU II) foi utilizada neste estudo. Tripomastigotas da cultura de tecidos foram obtidos a partir de sobrenadantes de células LLC-MK2 infectadas com 5 a 6 dias, mantidas em meio Eagle modificado por Dulbecco's (DMEM; Life Technologies, GIBCO-BRL, Gaithersburg, MD) suplementado com soro fetal bovino a 10% (SFB; GIBCO) e 50

µg/mL de gentamicina (Life, Carlsbad, CA) a 37 °C em uma atmosfera de CO₂ umidificada a 5%.

2.6 Ensaio da Atividade Citotóxica

As células foram cultivadas em placas de 96 poços para todas as experiências (concentração de 7×10^4 células/mL para as células B16F10, HCT116, HepG2, MCF-7 e MRC5; concentração de 3×10^5 células/mL para as células HL-60). Após 24 horas, os compostos foram adicionados a cada poço e incubados por 72 horas. Quatro horas antes do final da incubação, 20 µL de uma solução estoque (0,312 mg/mL) do alamar Blue (Resazurin, Sigma-Aldrich) foi adicionado a cada poço. A absorbância a 570 nm e 600 nm foi medida usando o Leitor de *Microplacas SpectraMax* 190 (Molecular Devices, Sunnyvale, CA). Para determinar a concentração inibitória de 50% (CI₅₀), foi usado regressão não linear. Além disso, foi realizado um ensaio de citotoxicidade com macrófagos J774 na presença de compostos mais LPS (500 ng/mL; Sigma-Aldrich) e INF-γ (5ng/mL; Sigma-Aldrich), utilizando o mesmo método descrito acima.

2.7 Quantificação de nitrito e IL-1β em macrófagos J774 ativados por LPS e INF-γ

Para determinar a quantidade de nitrito e da citocina IL-1β, foram cultivados 1×10^5 macrófagos J774 por poço em DMEM suplementado com 10% de SFB e 50 µg/mL de gentamicina por 24 horas a 37°C e 5% CO₂. As células foram estimuladas com LPS (500 ng/mL; Sigma) e INF-γ (5 ng/mL; Sigma) e tratadas com os compostos teste em diferentes concentrações, veículo e dexametasona. Os sobrenadantes foram coletados 24 horas após os tratamentos e armazenados à -80°C para posterior quantificação. A determinação dos níveis de nitrito foi realizada de acordo com o método de Griess [14] enquanto a quantificação de IL-1β utilizou a técnica de ELISA e seguiu o protocolo do kit DuoSet da R&D Systems (Minneapolis, MN, USA).

2.8 Citotoxicidade em tripomastigotas

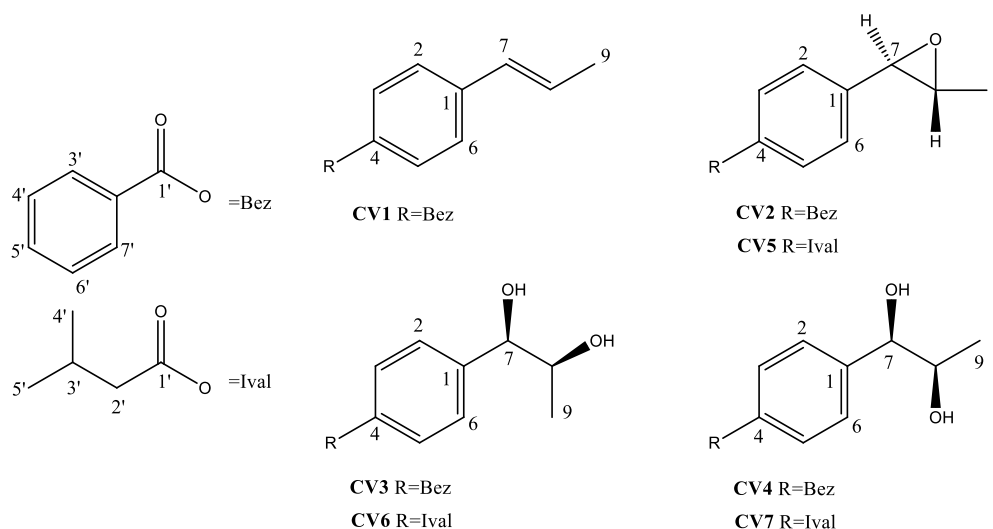
As tripomastigotas (4×10^5 células/poço) foram semeadas em placas de 96 poços e os compostos foram adicionados em oito concentrações variando de 0,39 a 50 µM, em triplicata. As placas foram incubadas por 24 horas a 37°C e 5% de CO₂. Alíquotas de cada poço foram coletadas e o número de parasitas viáveis, com base na integridade e motilidade do parasita, foi avaliado em uma câmara de Neubauer e comparado a culturas não tratadas. Três experimentos

independentes foram realizados. Para determinar a concentração efetiva de 50% (CE₅₀), foi usado regressão não linear.

3. Resultados e discussão

O fracionamento do extrato hexânico das raízes de *C. velutinus* por técnicas de cromatográfica em coluna e CLAE preparativo resultou no isolamento de quatro novos derivados de fenilpropanoides e de três descritos na literatura (Figura 23).

Figura 23: Compostos isolados de *C. velutinus*.



Composto **CV1** foi isolado como óleo incolor. Sua fórmula molecular foi definida como C₁₆H₁₄O₂ por IES-EMAR com m/z 239.1073 [M + H]⁺ (calculado para C₁₆H₁₅O₂, 239.1067) indicando a presença de dez graus de insaturações. O espectro de RMN de ¹H apresentou os conjuntos de sinais em δ_H 8.21 (2H, dd, J = 8.5, 1.0 Hz, H-3' e H-7'), δ_H 7.65 (1H, tl, J = 7.5 Hz, H-5'), δ_H 7.52 (2H, tl, J = 8.5 Hz, H-4' e H-6') e δ_H 7.33 (2H, d, J = 8.5 Hz, H-2 e H-6), δ_H 7.15 (2H, d, J = 8.5 Hz, H-3 e H-5) evidenciando a presença de anéis aromáticos mono e dissubstituídos, respectivamente. Os sinais em δ_H 6.44 (1H, dd, J = 15.8, 1.6 Hz, H-7), δ_H 6.24 (1H, dq, J = 15.8 e 6.5 Hz, H-8) e δ_H 1.91 (3H, dd, J = 6.5, 1.6 Hz, CH₃-9) correspondem a presença de um propeno com configuração *trans*. O espectro de RMN ¹³C possui um sinal de carbono em δ_C 165.1 (C-1') que associado a fórmula molecular indica a presença de uma carbonila de éster. A correlação no espectro de HMBC entre o δ_H 8.21 com δ_C 165.1 (C-1') confirma a inserção do grupo no éster no anel aromático monosubstituído. Já a correlação entre o sinal em δ_H 7.33 com δ_C 133.5 (C-7) indica a presença do grupo propeno no anel aromático dissubstituído. As demais atribuições de ¹H e ¹³C podem ser observadas nas tabelas 3 e 4. Assim,

o composto **CV1** foi atribuído como benzoato de (*E*)-4-(1-propenil) fenila. Esse composto já foi sintetizado por Díaz-Álvarez, et al. 2012, mas esse é primeiro relato como produto natural [15].

Composto **CV2** foi isolado como óleo incolor. Sua fórmula molecular foi definida como $C_{16}H_{14}O_3$ por IES-EMAR com m/z 255.1023 $[M + H]^+$ (calculado para $C_{16}H_{15}O_3$, m/z 255.1016) indicando a presença de dez graus de insaturações. O espectro de RMN de 1H apresentou sinais semelhantes ao composto **CV1** correspondente a presença dos anéis mono e dissustituídos. Além desses apresentou um conjunto de sinais em δ_H 3.61 (1H, sl, H-7), δ_H 3.04 (1H, dq, $J = 5.1$ e 1.9 Hz, H-8) e δ_H 1.46 (3H, d, $J = 5.1$ Hz, CH₃-9) correspondem a presença de um sistema epoxi-propano com configuração relativa *trans* [16]. As demais atribuições dos dados de RMN de 1H e ^{13}C podem ser observadas nas tabelas 3 e 4. Assim, o composto **CV2** foi atribuído como *benzoato de (E)-4-(1-epoxi-7,8-propen) fenila*.

Tabela 3: Dados de RMN de 1H 400 MHz (CDCl₃) dos compostos **CV1** a **CV7** (J em Hz).

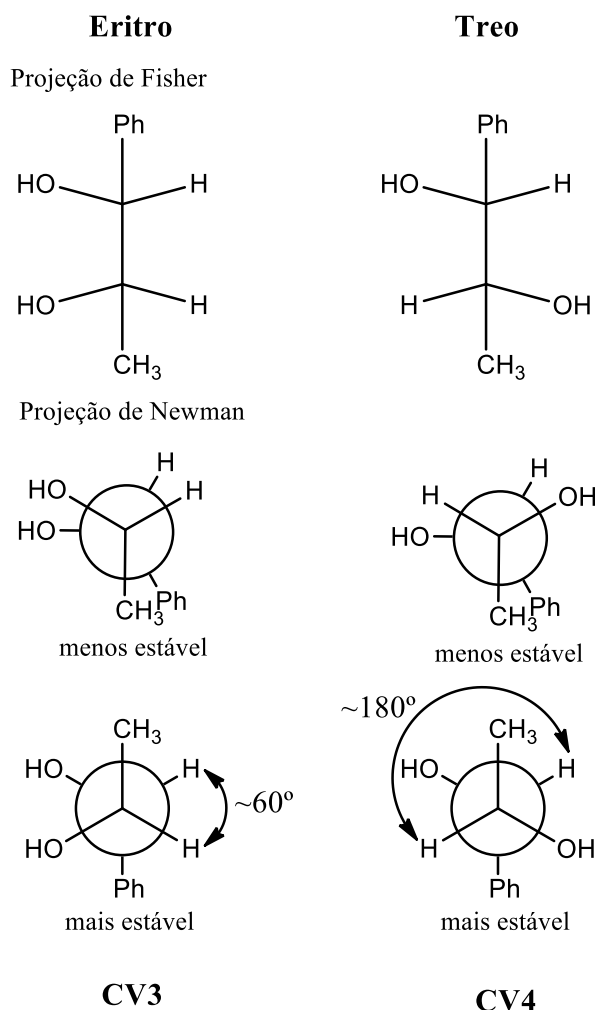
CV1		CV2	CV3	CV4	CV5		CV6	CV7
No	δ_H	δ_H	δ_H	δ_H	No	δ_H	δ_H	δ_H
1	-	-	-	-	1	-	-	-
2/6	7.38 d (8.6)	7.32 d (8.6)	7.43 d (8.5)	7.42 d (8.5)	2/6	7.27 d (8.5)	7.36 d (8.5)	7.35 d (8.5)
3/5	7.15 d (8.6)	7.19 d (8.6)	7.21 d (8.5)	7.22 d (8.5)	3/5	7.05 d (8.5)	7.06 d (8.5)	7.06 d (8.5)
4	-	-	-	-	4	-	-	-
7	6.44 dd (15.8; 1.6)	3.61 d (1.9)	4.70 d (4.3)	4.43 d (7.2)	7	3.57 d (1.8)	4.66 d (4.2)	4.36 d (7.0)
8	6.24 dq (15.8; 6.5)	3.04 dq (5.1; 1.9)	4.02 dq (6.4; 4.3)	3.88 quint (6.4)	8	3.01 dq (5.1; 1.9)	3.98 m	3.82 m
9	1.91 d (6.5; 1.6)	1.46 d (5.1)	1.11 d (6.4)	1.11 d (6.4)	9	1.45 d (5.1)	1.08 d (6.3)	1.06 d (6.3)
1'	-	-	-	-	1'	-	-	-
2'	-	-	-	-	2'	2.43 d (7.2)	2.43 d (7.2)	2.43 d (7.1)
3'/7'	8.21 dd (8.5; 1.0)	8.19 d (7.9)	8.20 dd (8.4; 1.1)	8.20 d (7.4)	3'	2.26 n (6.8)	2.23 n (6.7)	2.23 n (6.7)
4'/6'	7.52 tl (8.5)	7.51 tl (8.0)	7.51 tl (7.5)	7.51 tl (7.4)	4'/5'	1.06 d (6.7)	1.05 d (6.7)	1.05 d (6.7)
5'	7.65 tl (7.5)	7.64 tl (7.5)	7.64 tl (7.5)	7.64 tl (7.8)				

Tabela 4: Dados de RMN de ^{13}C 100MHz (CDCl_3) dos compostos **CV1** a **CV7**.

CV1						CV2					
No	mult	δ_c	δ_c	δ_c	δ_c	No	mult	δ_c	δ_c	δ_c	δ_c
1	C	135.9	135.6	138.2	138.7	1	C	135.2	138.0	138.7	
2/6	CH	126.8	126.8	127.9	127.9	2/6	CH	126.5	127.8	128.0	
3/5	CH	121.7	121.9	121.8	121.7	3/5	CH	121.6	121.6	121.8	
4	C	149.8	150.8	150.7	150.6	4	C	150.4	150.4	150.6	
7	CH	130.2	59.3	77.2	78.8	7	CH	59.0	77.2	79.0	
8	CH	126.1	59.2	71.4	72.1	8	CH	58.9	71.3	72.3	
9	CH ₃	18.6	18.0	17.4	18.7	9	CH ₃	17.8	17.4	18.9	
1'	C	165.3	165.2	165.3	165.2	1'	C	171.4	171.8	171.7	
2'	C	129.7	129.6	129.5	129.3	2'	CH ₂	43.2	43.4	43.5	
3'/7'	CH	130.3	130.3	130.3	130.1	3'	CH	25.8	26.0	26.0	
4'/6'	CH	128.6	128.7	128.7	128.5	4'/5'	CH ₃	22.3	22.5	22.5	
5'	CH	133.6	133.7	133.8	133.6						

Os compostos **CV3** e **CV4** foram, isolados como óleos incolores. As fórmulas moleculares de **CV3** e **CV4** foram definidas por IES-EMAR como $\text{C}_{16}\text{H}_{16}\text{O}_4$ com m/z 273.1115 $[\text{M} + \text{H}]^+$ (calculado para $\text{C}_{16}\text{H}_{17}\text{O}_4$, 273.1021) e $\text{C}_{16}\text{H}_{16}\text{O}_4$ at m/z 273.1120 $[\text{M} + \text{H}]^+$ (calculado para $\text{C}_{16}\text{H}_{17}\text{O}_4$, 273.1021) respectivamente, indicando se tratarem de isômeros com a presença de nove graus de instaurações. O espectro de RMN de ^1H dos compostos **CV3** e **CV4** são bastante semelhantes. Apresentaram sinais compatíveis com a presença dos anéis aromáticos mono e dissustituídos presentes também em **CV1** e **CV2**. Além desses sistemas de anéis, apresentaram sinais compatíveis com um sistema propan-diol onde a diferença das estruturas está nas configurações relativas do tipo *eritro* e *treo*. O composto **CV3** apresentou os sinais em δ_{H} 4.70 (1H, d, $J = 4.3$ Hz, H-7), δ_{H} 4.02 (1H, dq, $J = 6.4$ e 4.3 Hz, H-8) e δ_{H} 1.11 (3H, d, $J = 6.4$ Hz, CH₃-9) estabelecendo uma configuração do tipo *eritro*. O composto **CV4** apresentou os sinais em δ_{H} 4.43 (1H, d, $J = 7.2$ Hz, H-7), δ_{H} 3.88 (1H, quint, $J = 6.4$ Hz, H-8) e δ_{H} 1.11 (3H, d, $J = 6.4$ Hz, CH₃-9) estabelecendo uma configuração relativa do tipo *treo*. Balboul B., et al. 1996, fez a identificação de derivados de fenilpropanoides em *Narvalina domingensis* possuindo sistemas propan-diol, relatando valores de J em torno de 5 Hz para a configuração relativa *eritro* e de 7 Hz para *treo*. Esses valores de J são compatíveis com os ângulos diedro entre os hidrogênios como pode ser observado na figura 24. Os dados de RMN de ^{13}C estão presentes na tabela 3. A rotação óptica dos diastereoisômeros **CV3** e **CV4** foi comparada com dados da literatura [17]. Assim foi atribuído ao composto **CV3** como Benzoato de *eritro*-1- hidroxifenilpropan-7,8-diol e ao composto **CV4** como Benzoato de *treo*-1- hidroxifenilpropan-7,8-diol.

Figura 24: Projeções de Fisher e Newman para os compostos **CV3** e **CV4**.



Baseado nos dados físicos e espectroscópicos e comparação com os valores publicados, os compostos isolados conhecidos nesse estudo foram identificados como sellovicine B (**CV5**), 4-isovalerato de *eritro*-4-hidroxifenilpropan-7,8-diol (**CV6**) e 4-isovalerato de *treo*-4-hidroxifenilpropan-7,8-diol (**CV7**) [16, 17].

Uma vez que os compostos foram caracterizados quimicamente, o próximo passo foi avaliar seus potenciais efeitos biológicos. Todos os compostos foram avaliados primeiro contra células tumorais. A citotoxicidade dos compostos foi avaliada em cinco linhagens diferentes de células cancerígenas (B16F10, HL-60, HCT116, MCF-7 e HepG2) e em uma linhagem celular não-cancerígena (MRC5) usando um método colorimétrico, o teste AlamarBlue. Conforme demonstrado na tabela 5, o composto **CV2** apresentou valores de CI_{50} variando de 6,8 a 16,7 μM para as linhagens celulares de câncer MCF-7 e HepG2, respectivamente. **CV5**

apresentou valores de CI_{50} variando de 11,1 a 18,3 μM para as linhas celulares de câncer MCF-7 e HepG2, respectivamente. Doxorrubicina apresentou valores de CI_{50} variando de 0,1 a 1,39 μM para as linhagens celulares de câncer HepG2 e MCF-7, respectivamente. Os demais compostos não apresentaram citotoxicidade ($CI_{50} > 50 \mu M$). Em relação à citotoxicidade em células não tumorais, **CV2**, **CV5** e doxorrubicina apresentaram valores de CI_{50} de 16,3, 19,4 e 0,96 μM , respectivamente, mostrando um perfil seletivo contra a maioria das linhagens de células cancerígenas (Tabela 5).

A atividade anti-*T. cruzi* dos compostos também foi investigada contra a forma infecciosa do parasita (formas tripomastigotas). Como mostrado na tabela 5, apenas os compostos **CV2** e **CV5** possuem atividade tripanocida. **CV2** e **CV5** apresentaram um valor de CE_{50} de 9,0 e 9,58 μM , respectivamente. Nas mesmas condições, o medicamento de referência, benzonidazol, apresentou um valor de CE_{50} de 12,5 μM . Esses resultados reforçam o potencial antiparasitário do gênero *Croton* descrito anteriormente [18-20].

Tabela 5: Citotoxicidade e atividade anti-*T. cruzi* dos compostos **CV1-CV7**.

Compostos	CI_{50} (μM)						CE_{50} (μM)
	B16F10 ^a	HL-60 ^a	HCT116 ^a	MCF-7 ^a	HepG2 ^a	MRC5 ^a	<i>T. cruzi</i> ^b
CV1	> 50	> 50	> 50	> 50	> 50	> 50	> 50
CV2	14.4 ($\pm$ 0.5)	9.8 ($\pm$ 2.6)	12.9 ($\pm$ 1.8)	6.8 ($\pm$ 1.59)	16.7 ($\pm$ 0.7)	16.3 ($\pm$ 1.1)	9.0 ($\pm$ 0.59)
CV3	> 50	> 50	> 50	> 50	> 50	> 50	> 50
CV4	> 50	> 50	> 50	> 50	> 50	> 50	> 50
CV5	13.8 ($\pm$ 01)	11.4 ($\pm$ 3.6)	13.2 ($\pm$ 1.0)	11.1 ($\pm$ 1.4)	18.3 ($\pm$ 1.8)	19.4 ($\pm$ 1.7)	9.58 ($\pm$ 0.1)
CV6	> 50	> 50	> 50	> 50	> 50	> 50	> 50
CV7	> 50	> 50	> 50	> 50	> 50	> 50	> 50
Doxorrubicina	0.6 ($\pm$ 0.1)	0.47 ($\pm$ 0.1)	0.2 ($\pm$ 0.04)	1.39 ($\pm$ 0.05)	0.1 ($\pm$ 0.01)	0.96 ($\pm$ 0.02)	-
Benzonidazol	-	-	-	-	-	-	12.5 ($\pm$ 0.6)
VG	-	-	-	-	-	-	-

^aDeterminado 72 horas após a incubação com compostos. ^b Determinado 24 horas após a incubação com compostos. Valores representativos da média $\pm$ S.D. e foram calculados a partir de três experimentos independentes. CE_{50} = concentração efetiva para 50%. CI_{50} = concentração inibitória para 50%. VG = violeta genciana. S.D. = Desvio padrão.

No que se refere aos possíveis efeitos farmacológicos dos compostos **CV1-CV7** em relação aos macrófagos estimulados com LPS e INF- γ , foi realizado um novo ensaio de citotoxicidade utilizando macrófagos J774 na presença dos compostos mais o LPS e INF- γ . Os compostos **CV1**, **CV3**, **CV4**, **CV6** e **CV7** não apresentaram efeito citotóxico na concentração

mais alta avaliada (100 μM). Os compostos **CV2** e **CV5** apresentaram efeitos citotóxicos, com valores de CC_{50} de 10,1 e 26,3 μM , respectivamente (Tabela 6). Nas mesmas condições, a violeta de genciana, o medicamento de referência citotóxico, apresentou um valor de CC_{50} de 0,8 μM . Por conseguinte, foram utilizadas concentrações não citotóxicas dos compostos como concentrações iniciais.

A capacidade de modulação de macrófagos após um estímulo inflamatório nos ensaios de LPS e $\text{INF-}\gamma$ foi avaliada pela quantificação de nitrito (Tabela 6) e da citocina IL-1 β (Figura S191) na linhagem de células J774. Todos os compostos diminuíram a produção de nitrito com valor de CE_{50} entre 1,7 e 42,9 μM , sendo os compostos **CV2** e **CV5**, aqueles com os melhores perfis (Tabela 6). Nas mesmas condições, a dexametasona mostrou um valor de CE_{50} de 0.7 μM . Compostos que reduzem a produção de óxido nítrico (NO) por células que participam do processo inflamatório, como os macrófagos, tem um potencial de atividade anti-inflamatório [21]. Esta correlação é possível devido ao NO ser considerado um importante mediador pró inflamatório e estar envolvido na patogênese da inflamação [22].

Tabela 6: Citotoxicidade e inibição da produção de NO dos compostos isolados de *C. velutinus*.

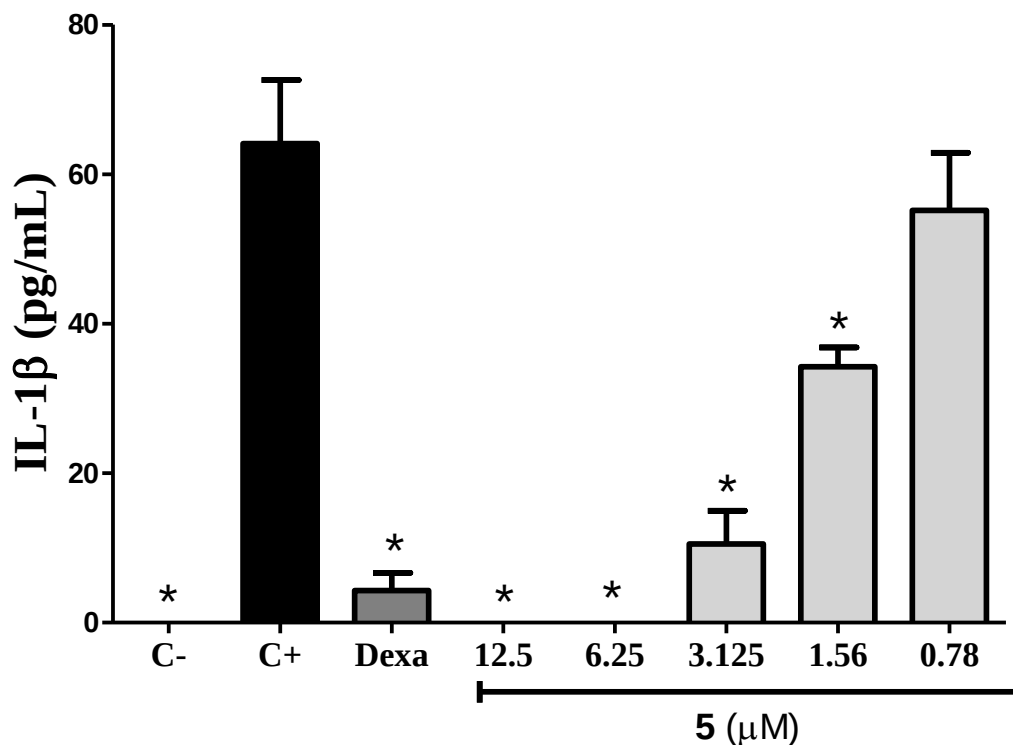
Compostos	CC_{50} (μM)	CE_{50} (μM)
CV1	>100	10.6 ($\pm$ 1.28)
CV2	10.1 ($\pm$ 1.42)	4.3 ($\pm$ 0.61)
CV3	>100	14.5 ($\pm$ 0.7)
CV4	>100	42.9 ($\pm$ 2.6)
CV5	26.3 ($\pm$ 0.7)	1.7 ($\pm$ 0.35)
CV6	>100	32.2 ($\pm$ 3.4)
CV7	>100	30.4 ($\pm$ 1.9)
Dexa	-	2.9 ($\pm$ 0.7)
VG	0.8 ($\pm$ 0.1)	-

Valores representativos da média $\pm$ S.D. e foram calculados a partir de três experimentos independentes. CC_{50} = concentração citotóxica para 50% em macrófagos J774. CE_{50} = concentração efetiva para 50 %. Dexa = Dexametasona. VG = violeta genciana. S.D. = desvio padrão.

Em relação à produção de IL-1 β pelos macrófagos J774 estimulados, o composto **CV5** diminuiu a produção de IL-1 β de maneira concentração dependente, assim como a dexametasona (Figura 25). Os outros compostos também diminuíram significativamente a

produção de IL-1 β , porém em menor potência (Figura S191). Outro mediador fundamental na cascata pró inflamatória é a IL-1 β , e a sua diminuição em condições inflamatórias tem sido utilizada como estratégia terapêutica em doenças inflamatórias crônicas importantes como a artrite reumatoide [23].

Figura 25: Efeito de CV5 sobre a produção de IL-1 β na cultura de macrófagos J744 ativados por LPS e INF- γ .



OBS: Células J774 foram incubadas com veículo (DMSO, C- grupo controle não estimulado), apenas com LPS (500ng/mL) e INF- γ (5ng/mL) (C+, grupo controle positivo) ou com diferentes concentrações não citotóxicas do composto testes durante 24 horas e o sobrenadante coletado para quantificação da IL-1 β através de ELISA sanduíche. O controle padrão ouro utilizado foi dexametasona (10 μ M, Dexa). Os dados foram expressos como média $\pm$ EPM; n=5 por grupo. *p < 0.05 em comparação às culturas estimuladas com LPS e INF- γ tratadas apenas com o veículo. ANOVA seguida do teste de Tukey.

Relacionando as estruturas dos compostos **CV1-CV7** e suas atividades biológicas avaliadas nesse estudo, é possível observar que os compostos que apresentaram melhores resultados (**CV2** e **CV5**) possuem o epoxy-propane system. Dados da literatura demonstram

que substâncias com o grupo epóxido como farmacóforo apresentam diversas atividades biológicas, entre elas citotóxica e anti-inflamatória [24, 25].

4. Conclusão

Este trabalho avaliou a citotoxicidade, atividade anti-inflamatória e tripanocida de sete fenilpropanóides, dos quais quatro são novos produtos naturais (**CV1-CV4**). Os derivados fenilpropanóides **CV2** e **CV5** apresentaram os melhores perfis biológicos, sendo capazes de inibir a proliferação de um número de linhagens celulares de câncer, lisar a forma infecciosa do *T. cruzi* e diminuir a produção de mediadores pró-inflamatórios. Assim, este trabalho reforça a importância de investigações químicas e farmacológicas do gênero *Croton*, em particular *C. velutinus*, na busca de novos agentes anticancerígenos, anti-inflamatórios e tripanocidas.

Notas

Os autores declaram que não possuem interesse financeiro.

Material suplementar

Dados de EM e RMN dos compostos **CV1- CV7**, além dos de inibição da IL-1 β , estão disponíveis no material suplementar.

Agradecimentos

Os autores agradecem as agências brasileiras Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior-Brasil (CAPES) (Código de finança 001) e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelo suporte financeiro e bolsas. Também agradecemos por colaborar com a Rede Norte-Nordeste de Fitoterápicos (INCT-RENNOFITO).

Conflito de interesse

Os autores declaram que não possuem conflito de interesse.

Referências

- [1] A. Salatino, M.L.F. Salatino, G. Negri, Traditional uses, chemistry and pharmacology of *Croton* species (Euphorbiaceae), Journal of the Brazilian Chemical Society 18 (2007) 11-33.
- [2] J.S. Silva, M.F.d. Sales, A.P.d.S. Gomes, D.S. Carneiro-Torres, Sinopse das espécies de *Croton* L. (Euphorbiaceae) no estado de Pernambuco, Brasil, Acta Botanica Brasilica 24 (2010) 441-453.
- [3] V.M.T. Medeiros, J. F.; Almeida, J. R. G. S.; Araujo Junior, V. T.; Athayde-Filho, P. F.; Cunha, E. V. L.; Barbosa filho, J. M ; Silva, M. S., Phytochemistry of the Genus *Croton*. In: V. K. Gupta. (Org.). Natural Products: Research Reviews. 1ed.New Delhi:, Daya Publishing House2012.

- [4] M.Y. Rios, A.B. Aguilar-Guadarrama, Nitrogen-Containing Phorbol Esters from *Croton ciliatoglandulifer* and Their Effects on Cyclooxygenases-1 and -2, *Journal of Natural Products* 69(6) (2006) 887-890.
- [5] J.-F. Wang, S.-H. Yang, Y.-Q. Liu, D.-X. Li, W.-J. He, X.-X. Zhang, Y.-H. Liu, X.-J. Zhou, Five new phorbol esters with cytotoxic and selective anti-inflammatory activities from *Croton tiglium*, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 25(9) (2015) 1986-1989.
- [6] P.-C. Kuo, Y.-C. Shen, M.-L. Yang, S.-H. Wang, T.D. Thang, N.X. Dung, P.-C. Chiang, K.-H. Lee, E.J. Lee, T.-S. Wu, Crotonkinins A and B and Related Diterpenoids from *Croton tonkinensis* as Anti-inflammatory and Antitumor Agents, *Journal of Natural Products* 70(12) (2007) 1906-1909.
- [7] R. Nath, S. Roy, B. De, M. D. Choudhury, Anticancer and Antioxidant activity of *Croton*: A Review, *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences* 5(2) (2013) 63-70.
- [8] G. T. Vieira, T.T. Oliveira, L.P. Monteiro, M.M. Kanashiro, M.R. Costa, W.L. Pereira, Avaliação citotóxica do extrato de *Croton urucurana* Baill contra linhagens de células leucêmicas humanas U937 e THP1, *Ciência e Natura* 39(3) (2017) 512-519.
- [9] M.C. Campos, K. Salomão, D.B. Castro-Pinto, L.L. Leon, H.S. Barbosa, M.A. Maciel, S.L. de Castro, *Croton cajucara* crude extract and isolated terpenes: activity on *Trypanosoma cruzi*, *Parasitology Research* 107(5) (2010) 1193-1204.
- [10] J. Cheng, X. Yi, H. Chen, Y. Wang, X. He, Anti-inflammatory phenylpropanoids and phenolics from *Ficus hirta* Vahl, *Fitoterapia* 121 (2017) 229-234.
- [11] A.A. Carvalho, L.N. Andrade, É.B. Sousa, D.P. Sousa, Antitumor Phenylpropanoids Found in Essential Oils. *BioMed research international*, BioMed Research International, (2015) 1-21.
- [12] Neelam, A. Khatkar, K.K. Sharma, Phenylpropanoids and its derivatives: biological activities and its role in food, pharmaceutical and cosmetic industries, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* (2019) 1-21.
- [13] H.M. Cezar, Phytochemistry study of stalks of *Croton velutinus* baill and analysis of essential oil compounds of *Ocimum basilicum* var. purpurascens BENTH and its derivatives by diffusion ordered spectroscopy (DOSY). *Dissertação (Mestrado em Química)*, Universidade Federal do Ceará (2016).
- [14] L.C. Green, D.A. Wagner, J. Glogowski, P.L. Skipper, J.S. Wishnok, S.R. Tannenbaum, Analysis of nitrate, nitrite, and [15N]nitrate in biological fluids, *Analytical Biochemistry* 126(1) (1982) 131-138.
- [15] A.E. Díaz-Álvarez, P. Crochet, V. Cadierno, A general route for the stereoselective synthesis of (E)-(1-propenyl)phenyl esters by catalytic CC bond isomerization, *Tetrahedron* 68(12) (2012) 2611-2620.
- [16] I. Leôncio d'Albuquerque, F. Delle Monache, F. Ferrari, G. Marini-Bettolo, p-trans-1, 2-Epoxy-1-propyl phenyl isovalerate (sellovicine B), an antibacterial substance from *Croton sellowii*, *Gazz Chim Ital* 98 (1968) 1189-1196.
- [17] B.A.A.A. Balboul, A.A. Ahmed, H. Otsuka, A. de Adams, 4-hydroxyphenylpropan-7,8-diols and derivatives from *Narvalina domingensis*, *Phytochemistry* 42(4) (1996) 1191-1193.
- [18] M.C. Campos, K. Salomao, D.B. Castro-Pinto, L.L. Leon, H.S. Barbosa, M.A. Maciel, S.L. de Castro, *Croton cajucara* crude extract and isolated terpenes: activity on *Trypanosoma cruzi*, *Parasitology research* 107(5) (2010) 1193-204.

- [19] J. García Díaz, E. Tuentler, J.C. Escalona Arranz, G. Llauradó Maury, P. Cos, L. Pieters, Antimicrobial activity of leaf extracts and isolated constituents of *Croton linearis*, *Journal of Ethnopharmacology* 236 (2019) 250-257.
- [20] T.B. de Souza, I.S. Caldas, F.R. Paula, C.C. Rodrigues, D.T. Carvalho, D.F. Dias, Synthesis, activity, and molecular modeling studies of 1,2,3-triazole derivatives from natural phenylpropanoids as new trypanocidal agents, *Chemical Biology & Drug Design* 95(1) (2020) 124-129.
- [21] R.F. Espírito-Santo, C.S. Meira, R.d.S. Costa, O.P. Souza Filho, A.F. Evangelista, G.H.G. Trossini, G.M. Ferreira, E.d.S. Velozo, C.F. Villarreal, M.B. Pereira Soares, The anti-inflammatory and immunomodulatory potential of braylin: Pharmacological properties and mechanisms by in silico, in vitro and in vivo approaches, *PLOS ONE* 12(6) (2017) e0179174.
- [22] J.N. Sharma, A. Al-Omran, S.S. Parvathy, Role of nitric oxide in inflammatory diseases, *Inflammopharmacology* 15(6) (2007) 252-9.
- [23] C.A. Dinarello, A clinical perspective of IL-1 β as the gatekeeper of inflammation, *European Journal of Immunology* 41(5) (2011) 1203-1217.
- [24] J. Marco-Contelles, M.T. Molina, S. Anjum, Naturally Occurring Cyclohexane Epoxides: Sources, Biological Activities, and Synthesis, *Chemical Reviews* 104(6) (2004) 2857-2900.
- [25] Q. Lu, D.S. Harmalkar, Y. Choi, K. Lee, An Overview of Saturated Cyclic Ethers: Biological Profiles and Synthetic Strategies, *Molecules (Basel, Switzerland)* 24(20) (2019) 3778.

MATERIAL SUPLEMENTAR

Fenilpropanoides de *Croton velutinus* com Atividades Anti-inflamatória, Citotóxica e Tripanocida

Lucas Silva Abreu¹, Yuri Manguiera do Nascimento¹, Renan Fernandes do Espirito-Santo², Cássio Santana Meira², Ivanilson Pimenta Santos², Railda Batista Brandão³, Augusto Lopes Souto¹, Maria Lenise Guedes⁴, Milena Botelho Pereira Soares², Cristiane Flora Villarreal^{2,3}, Marcelo Sobral da Silva¹, Eudes da Silva Velozo³, Josean Fechine Tavares^{1*}

¹ Instituto de Pesquisa em Fármacos e Medicamentos, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, PA, Brazil

² Instituto Gonçalo Muniz, Fundação Oswaldo Cruz, Salvador, BA, Brazil

³ Faculdade de Farmácia, Universidade Federal da Bahia, Salvador, BA, Brazil

⁴ Instituto de Biologia, Universidade Federal da Bahia, Salvador, BA, Brazil

* Universidade Federal da Paraíba, Departamento de Ciências Farmacêuticas, Caixa Postal 5009, 58051-970, João Pessoa – PB, Brasil, (phone: +55-83-32167427) E-mail: josean@ltf.ufpb.br

* Universidade Federal da Paraíba, Departamento de Ciências Farmacêuticas, Caixa Postal 5009, 58051-970, João Pessoa – PB, Brasil, (phone: +55-83-32167427) E-mail: josean@ltf.ufpb.br

Figura S150: Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) do composto **CV1**.

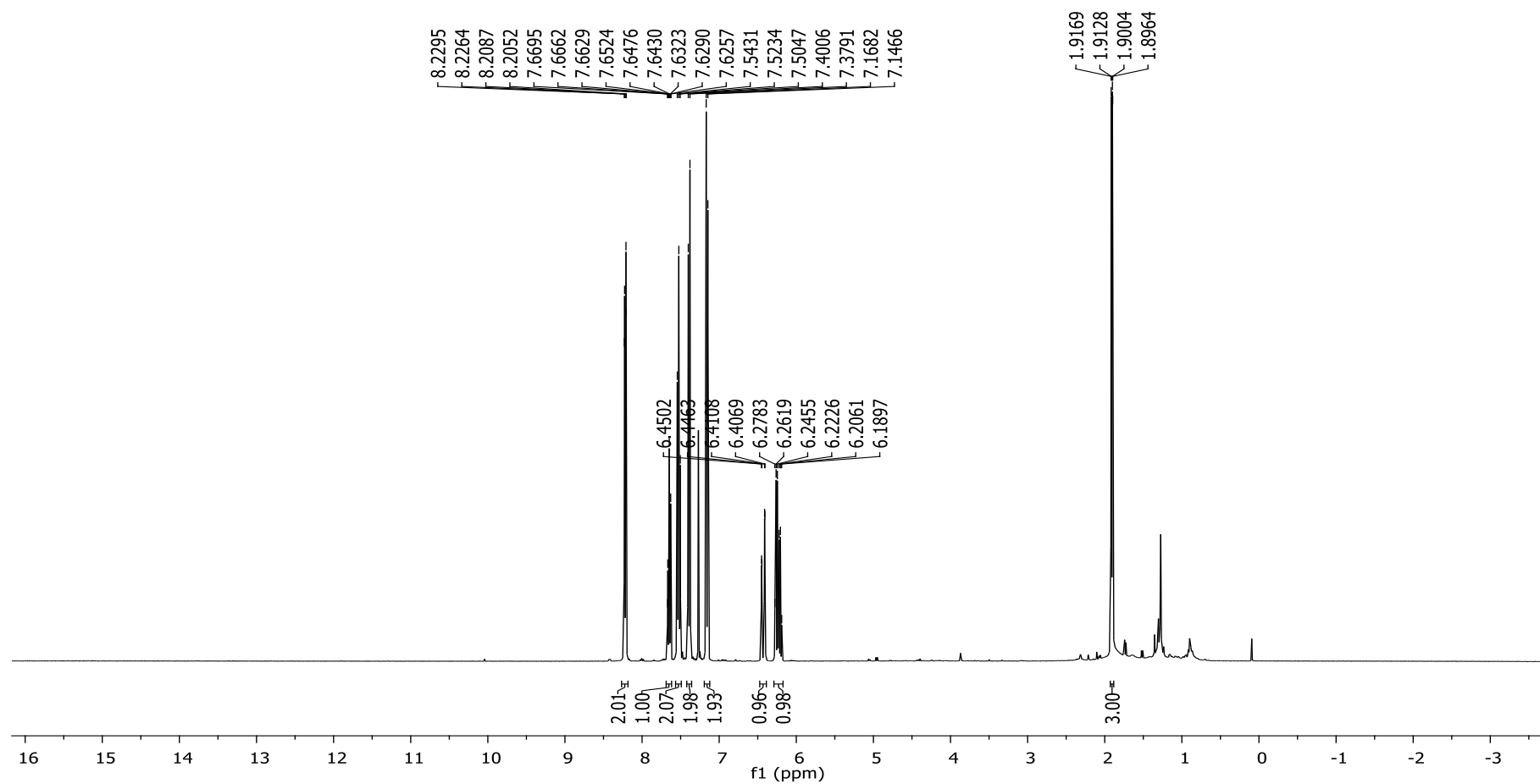


Figura S151: Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) do composto **CV1** (expansão).

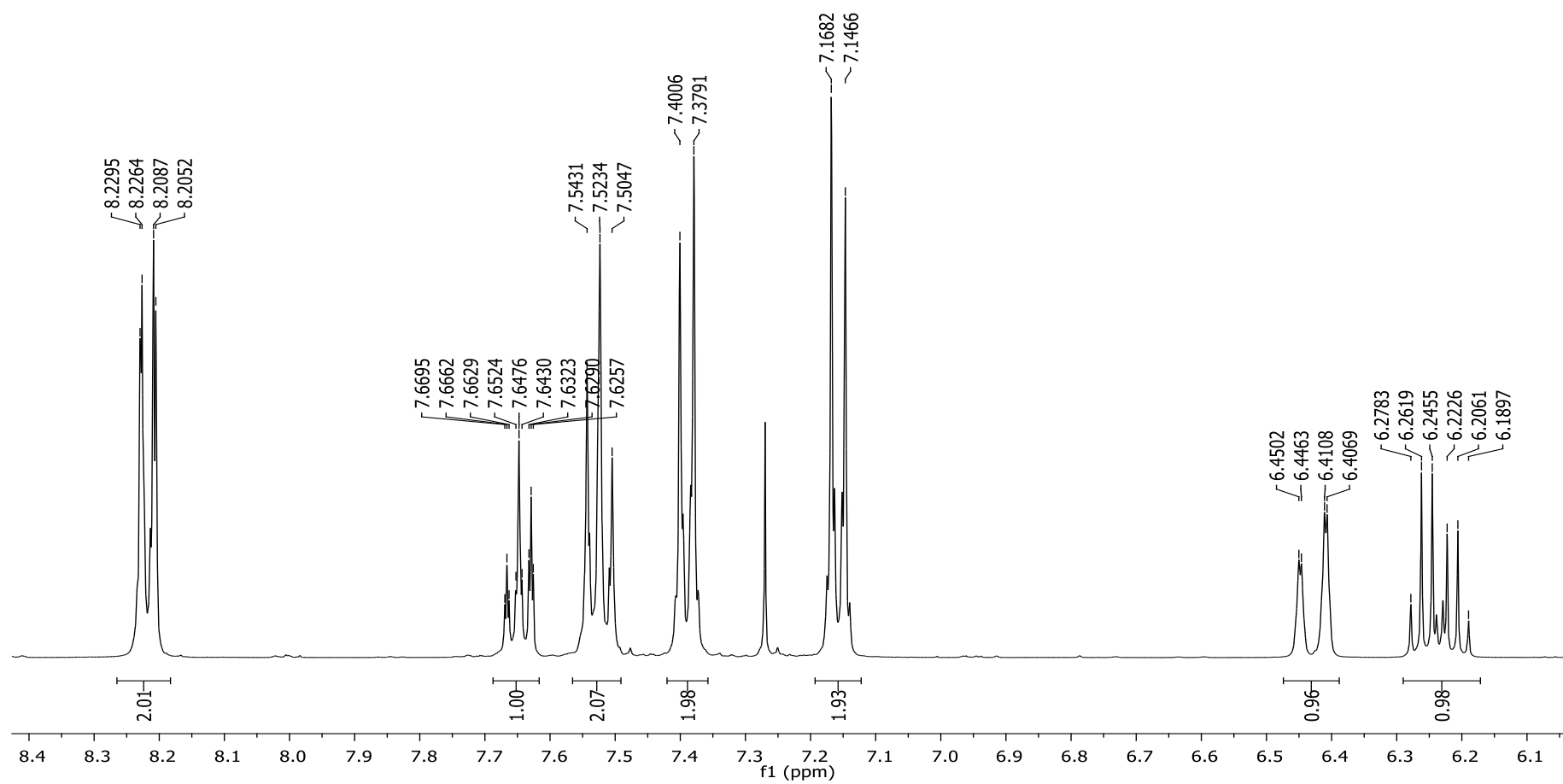


Figura S152: Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) do composto **CV1**.

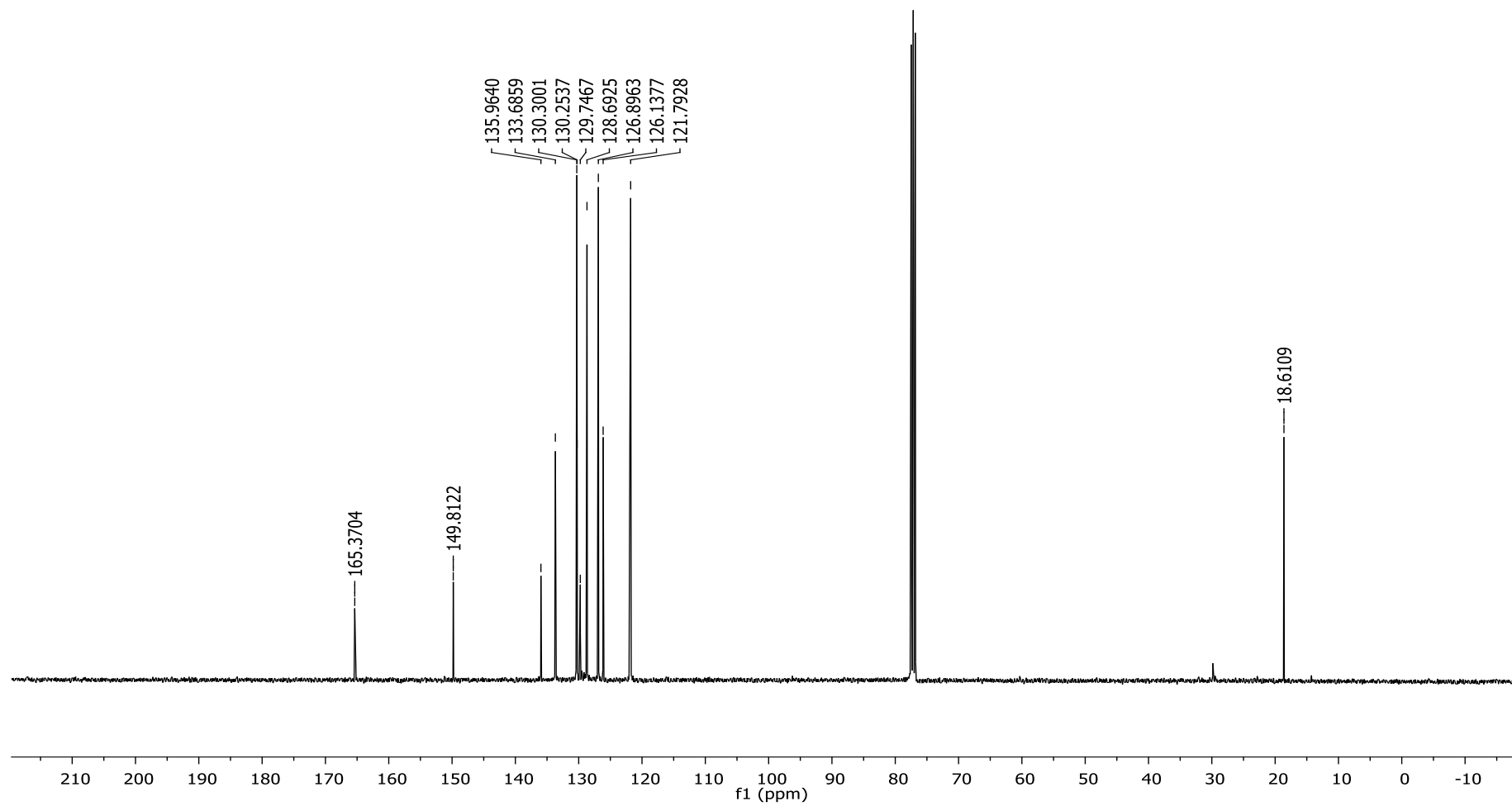


Figura S153: Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) do composto **CV1** (expansão).

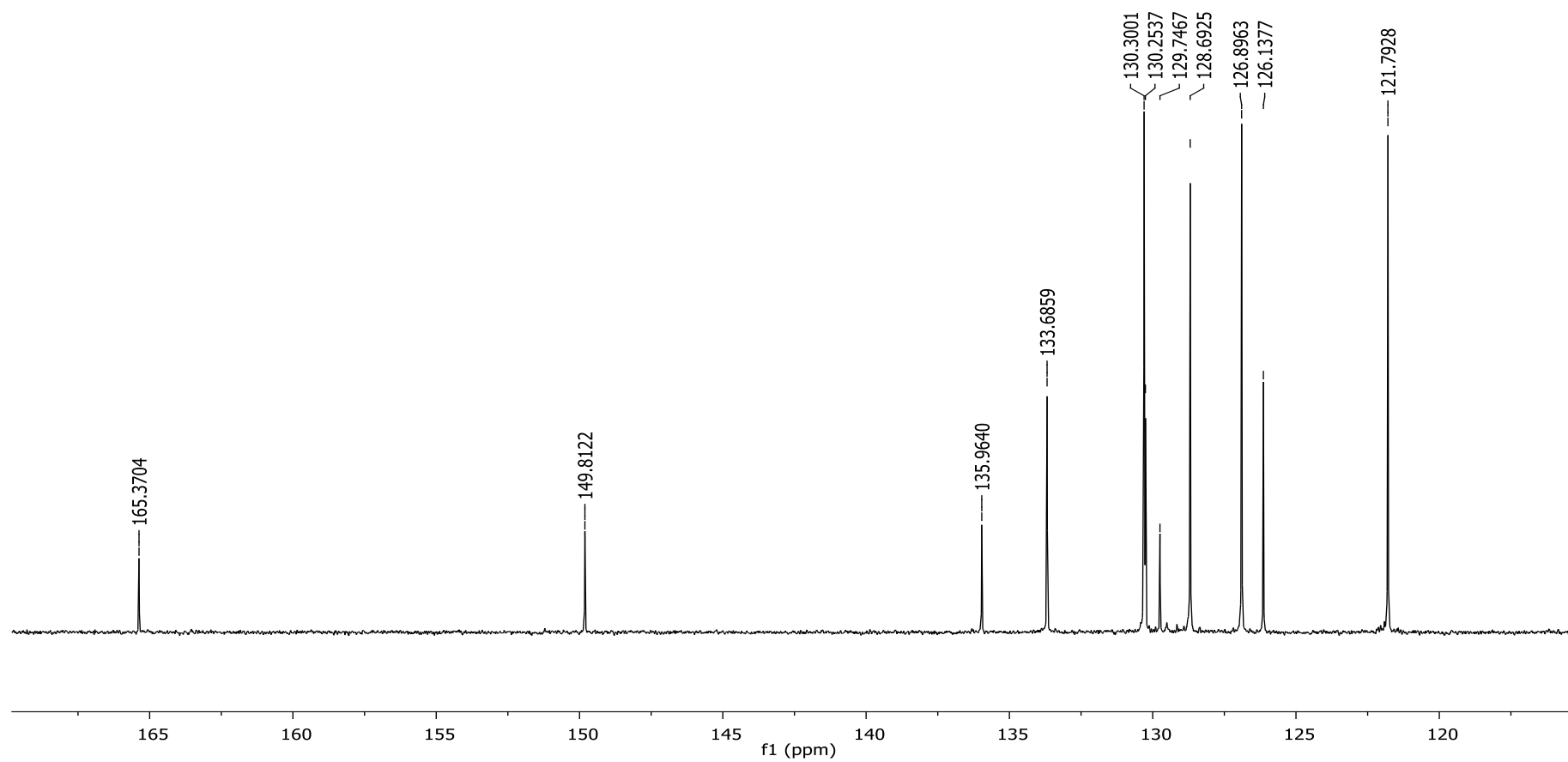


Figura S154: Espectro de RMN de COSY (400 MHz, CDCl_3) do composto **CV1**.

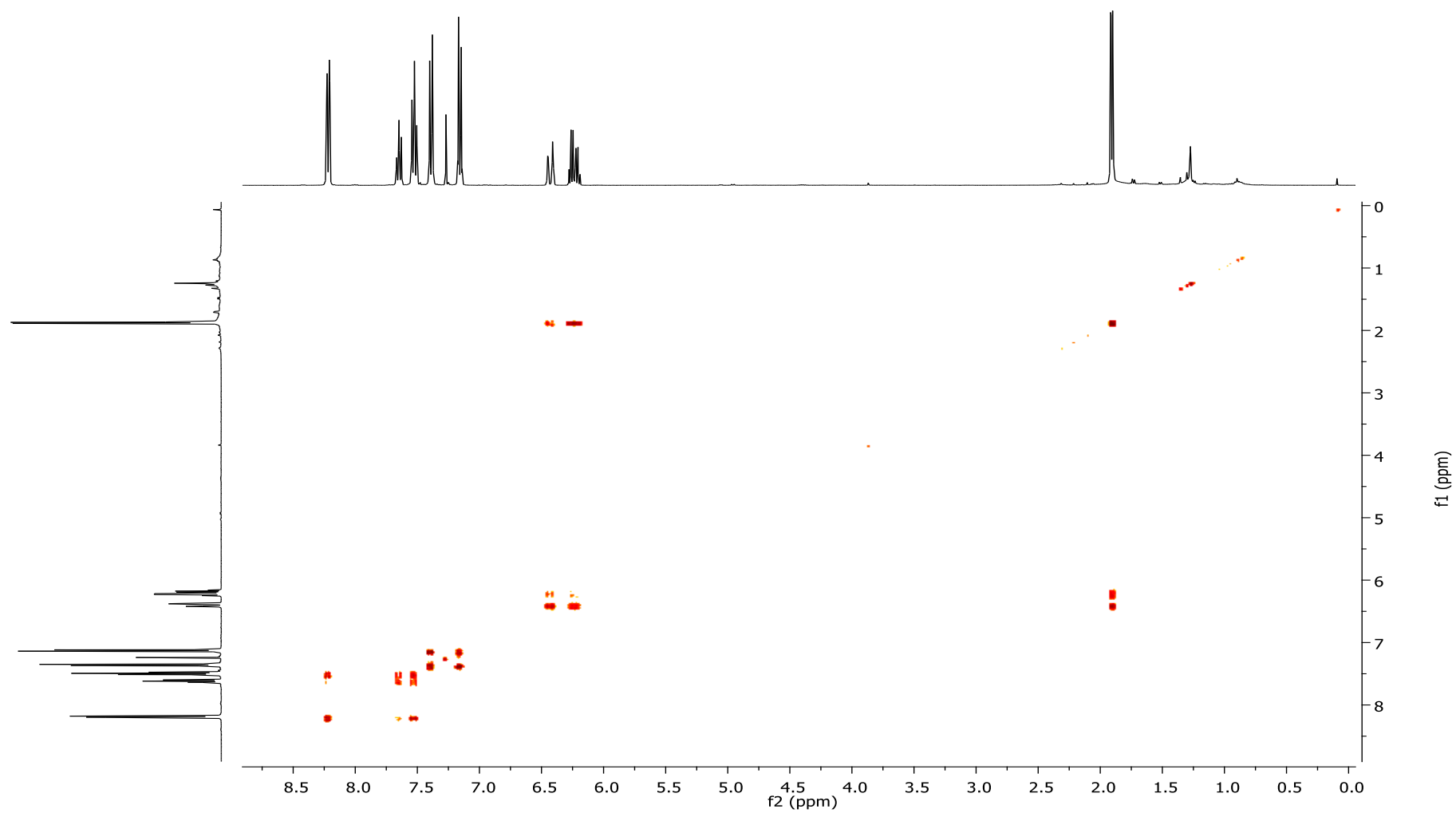


Figura S155: Espectro de RMN de HSQC (400 MHz, CDCl_3) do composto **CV1**.

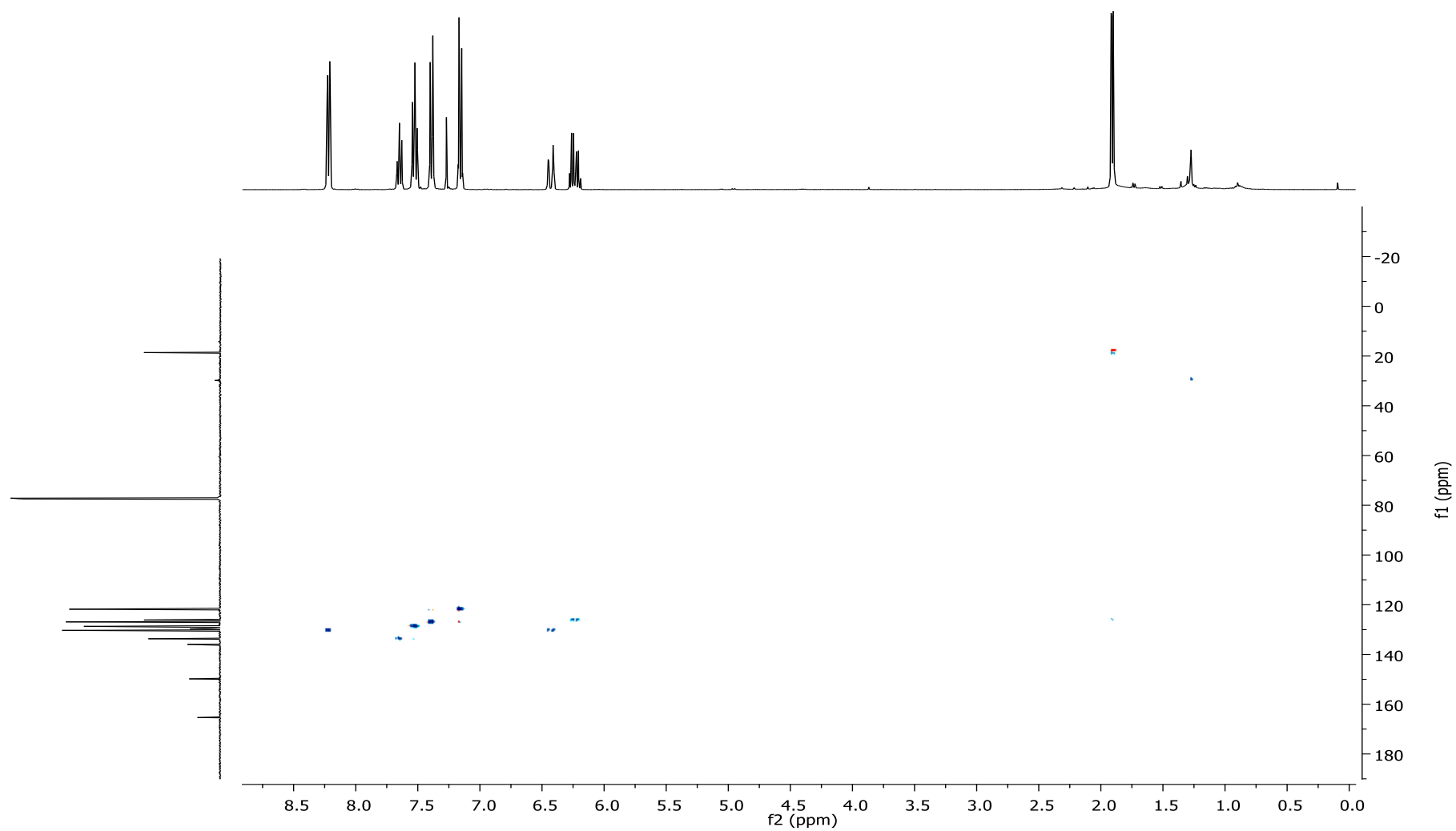


Figura S156: Espectro de RMN de HMBC (400 MHz, CDCl_3) do composto **CV1**.

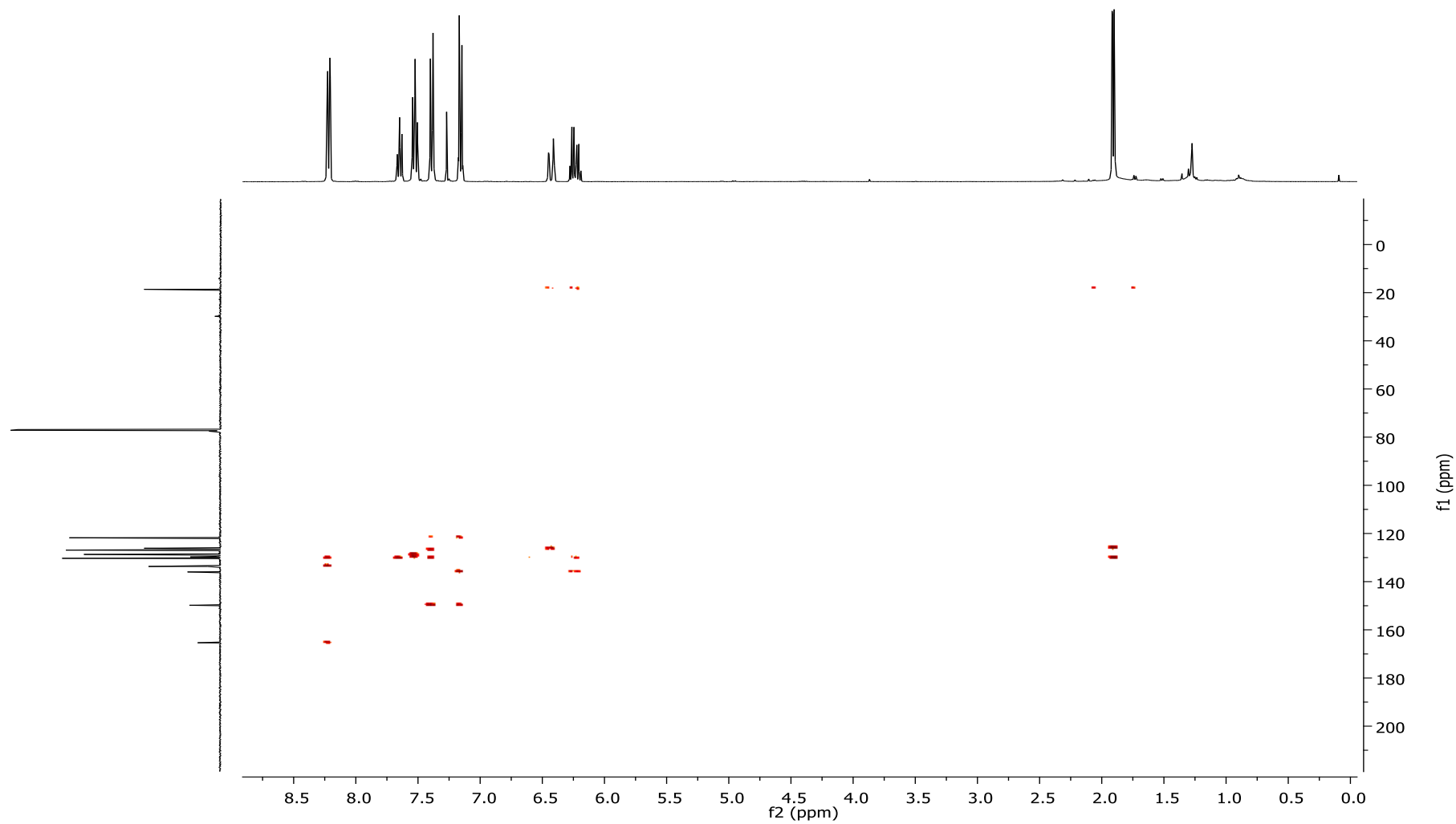


Figura S157: Espectro de RMN de HMBC (400 MHz, CDCl_3) do composto **CV1**.

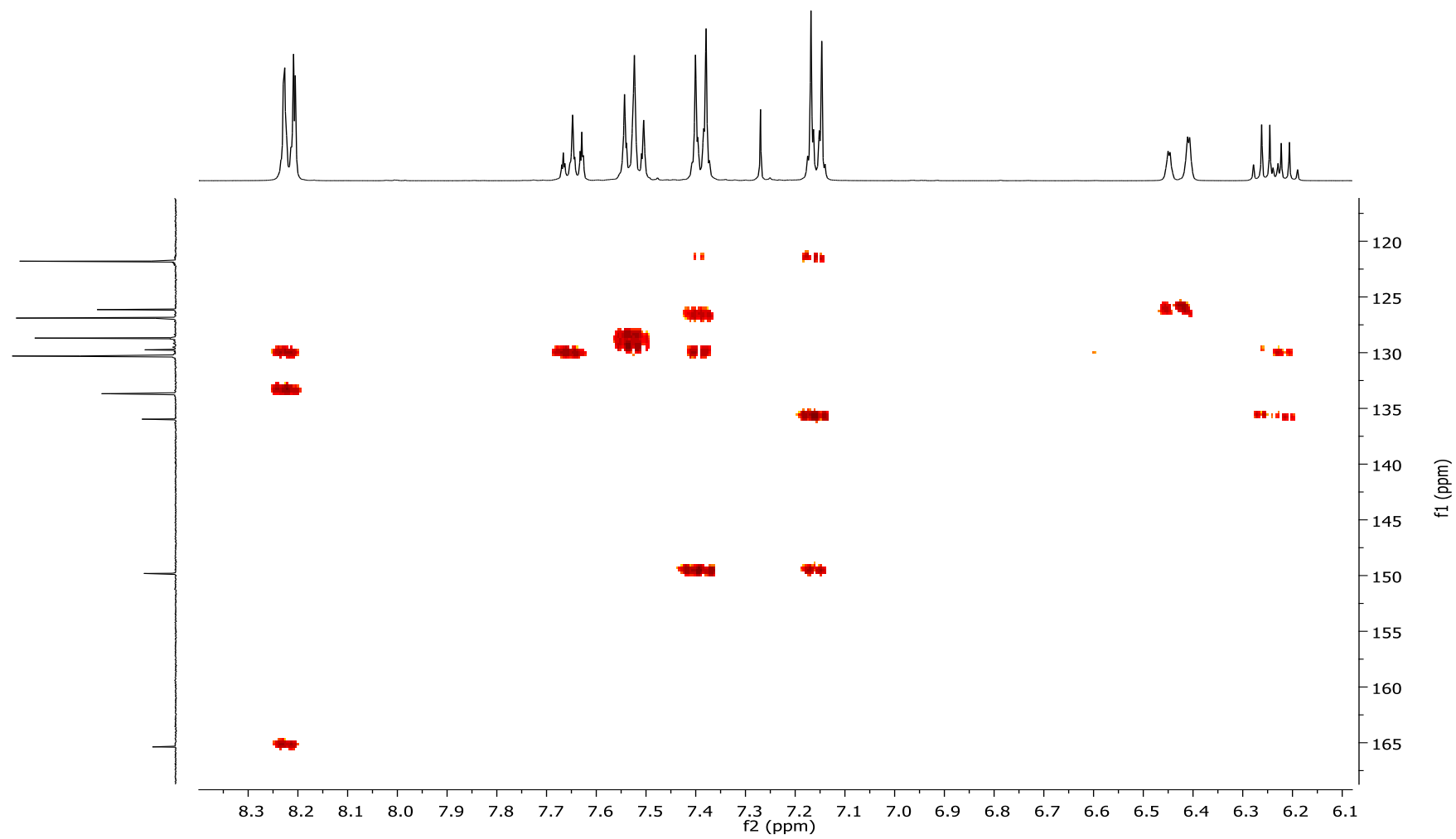


Figura S158: Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) do composto **CV2**.

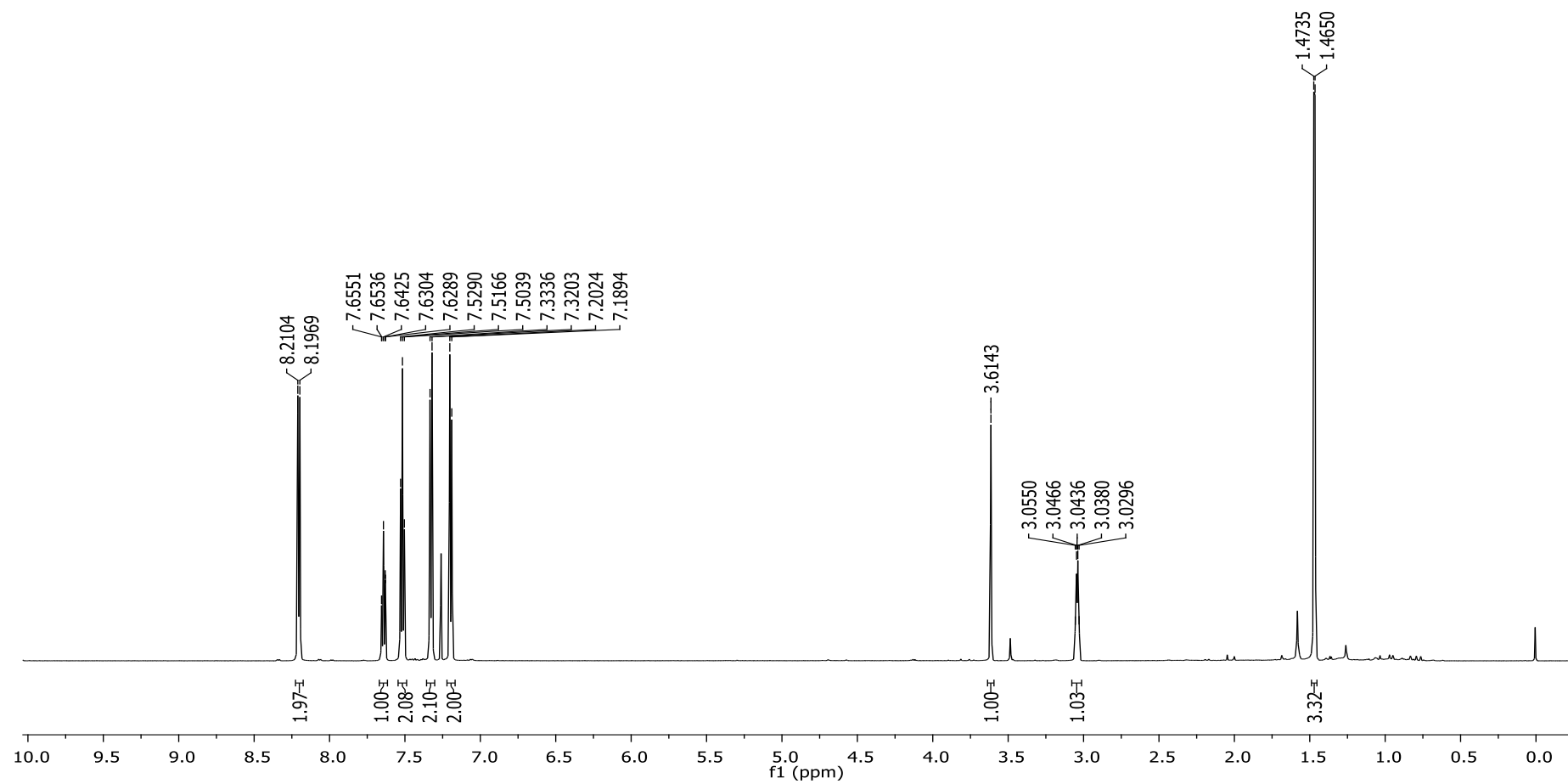


Figura S159: Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) do composto **CV2**.

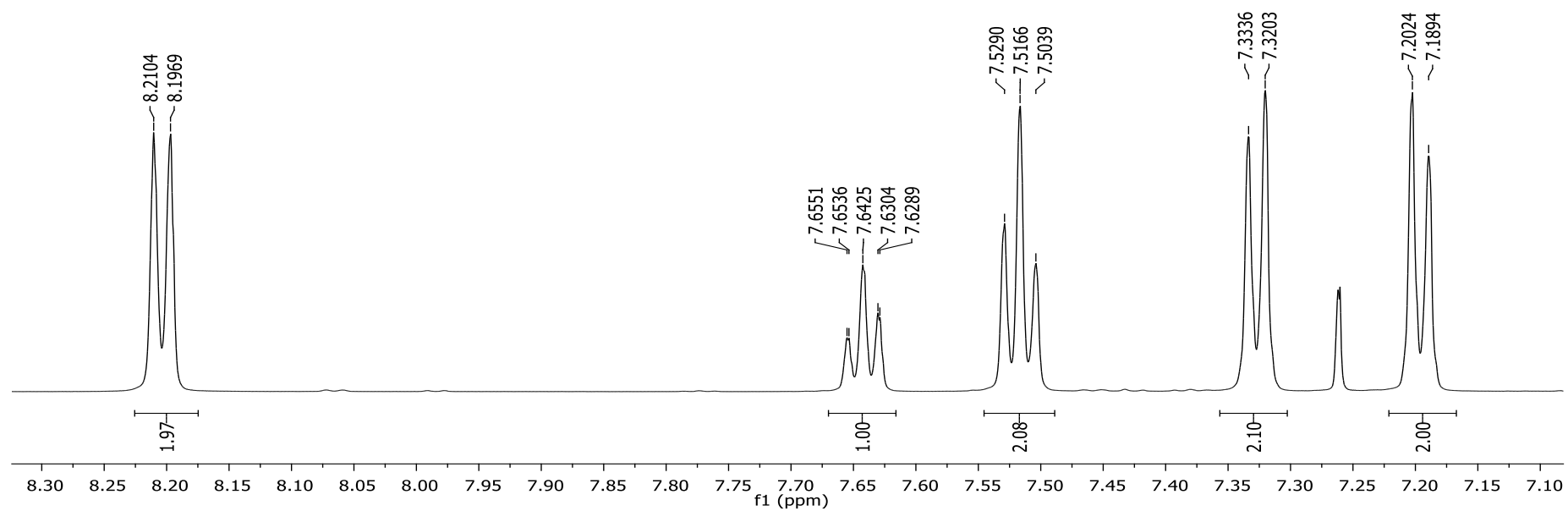


Figura S160: Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) do composto **CV2**.

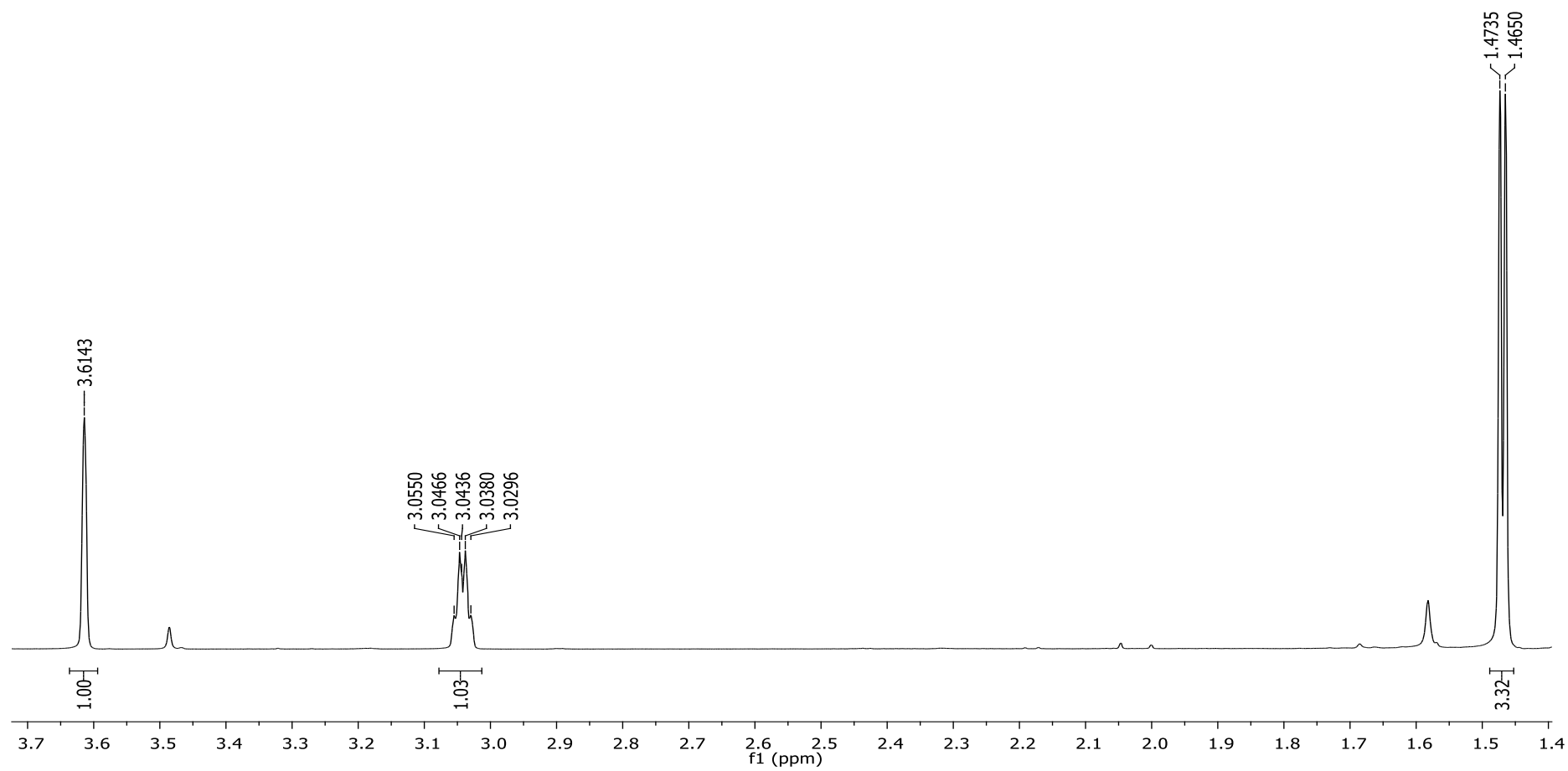


Figura S161: Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) do composto **CV2**.

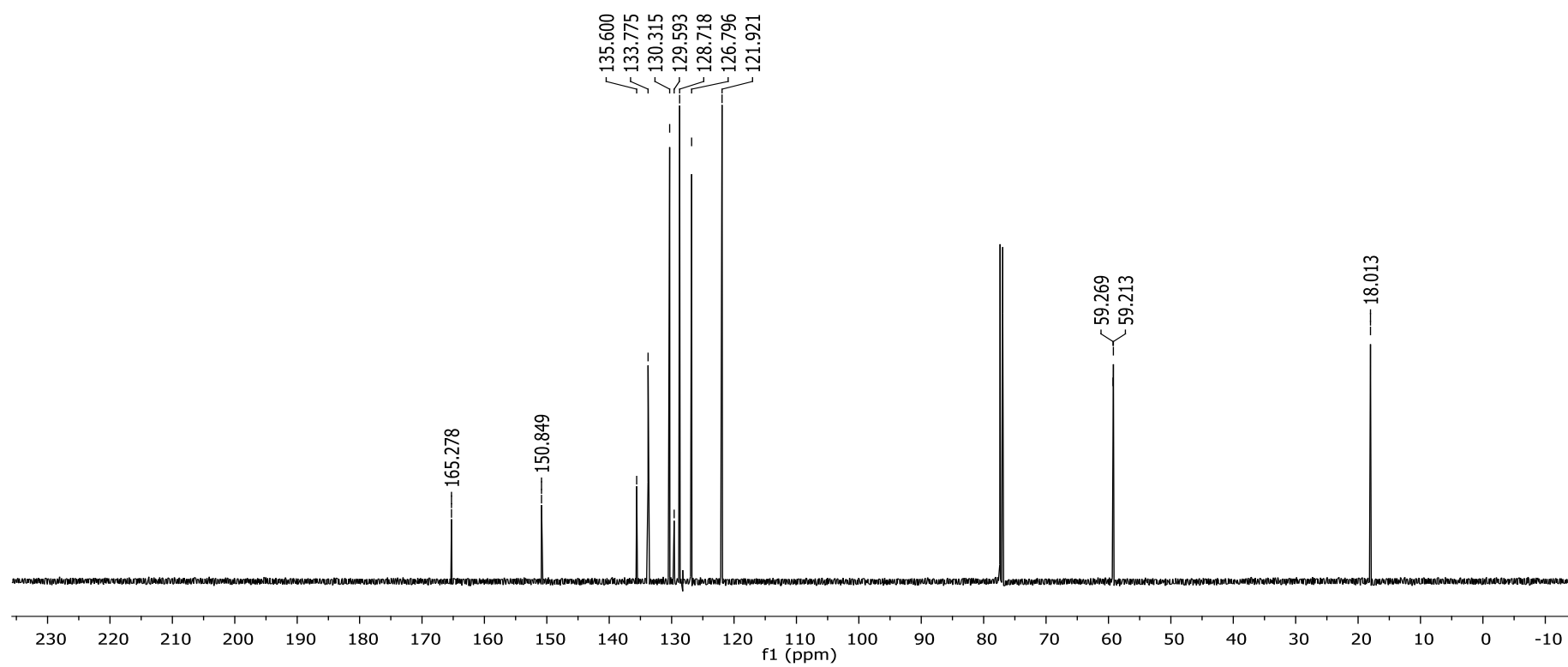


Figura S162: Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) do composto **CV2**.

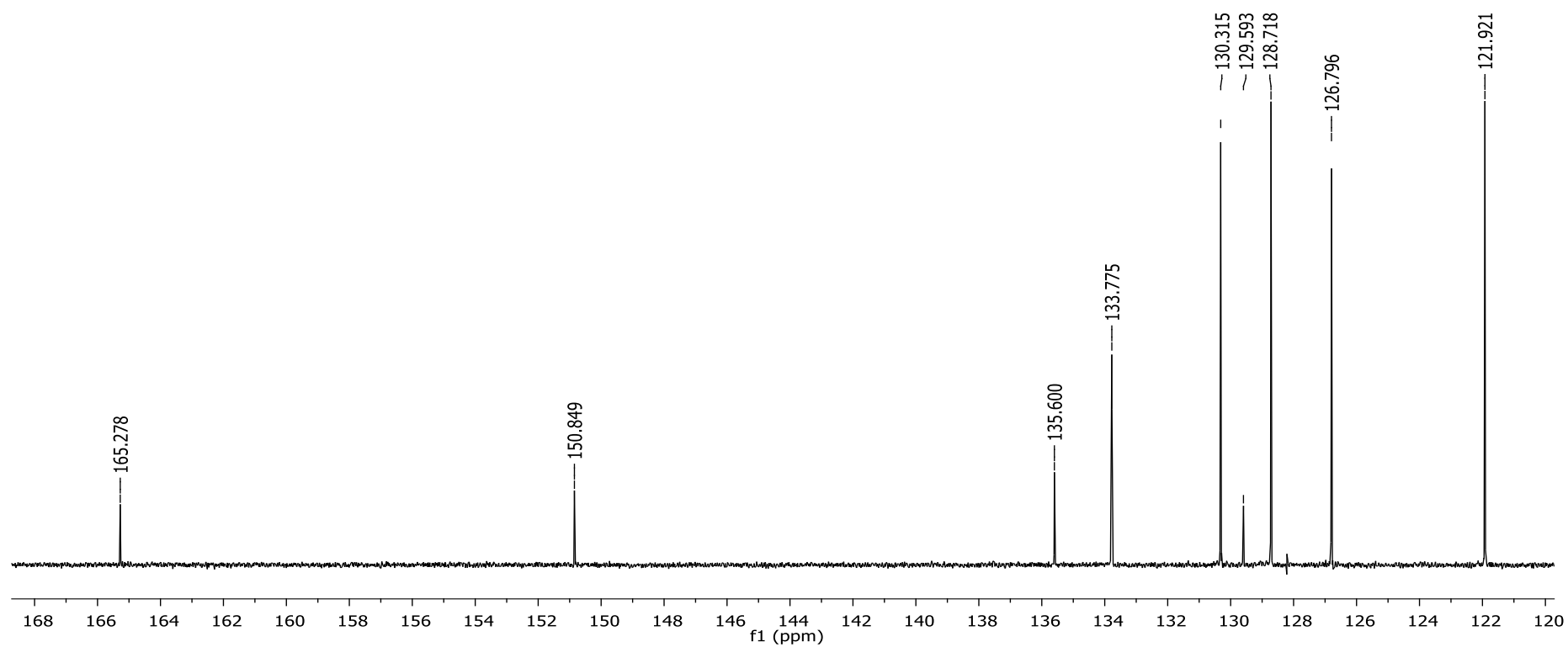


Figura S163: Espectro de RMN de COSY (400 MHz, CDCl_3) do composto **CV2**.

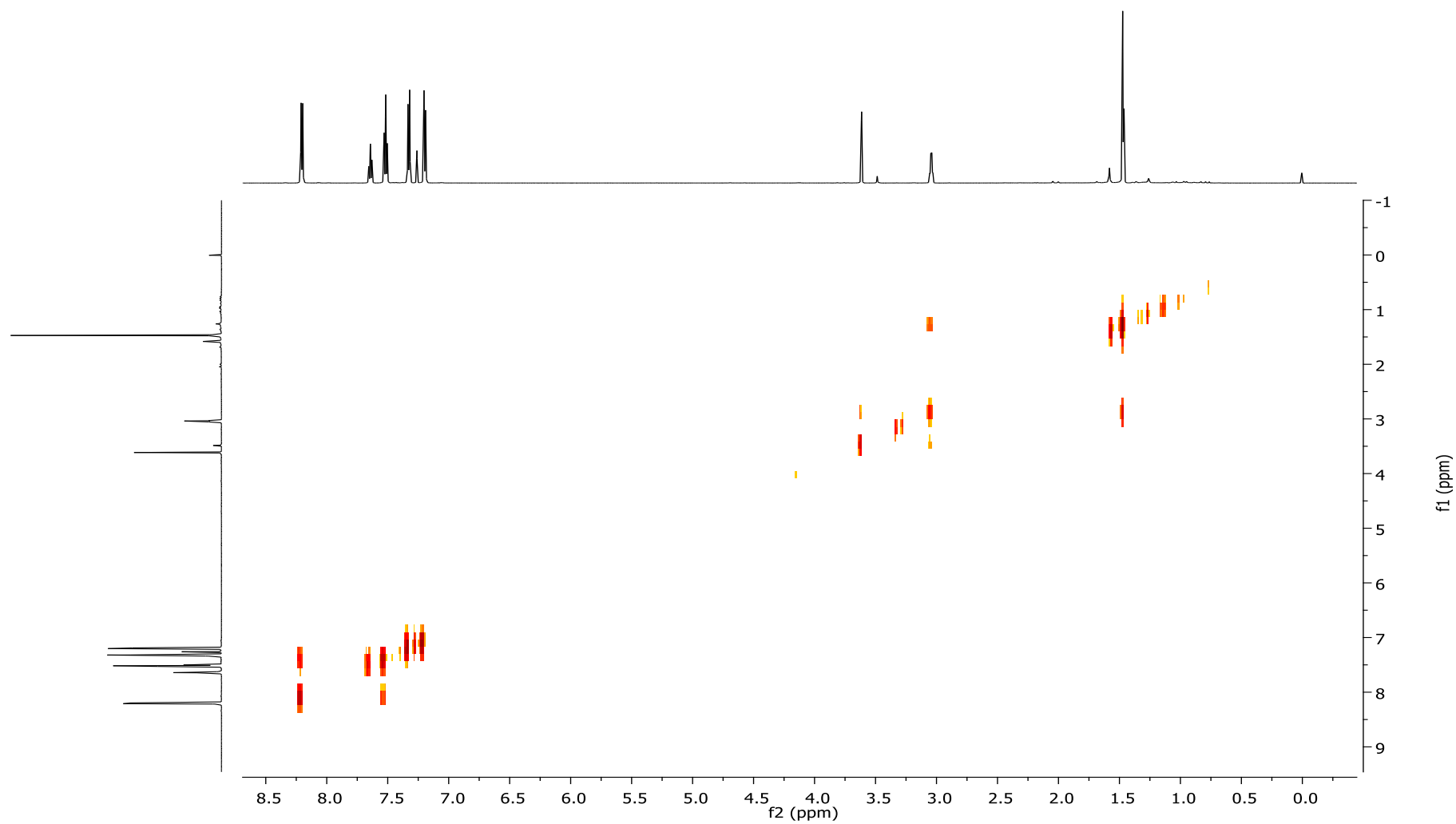


Figura S164: Espectro de RMN de HSQC (400 MHz, CDCl_3) do composto **CV2**.

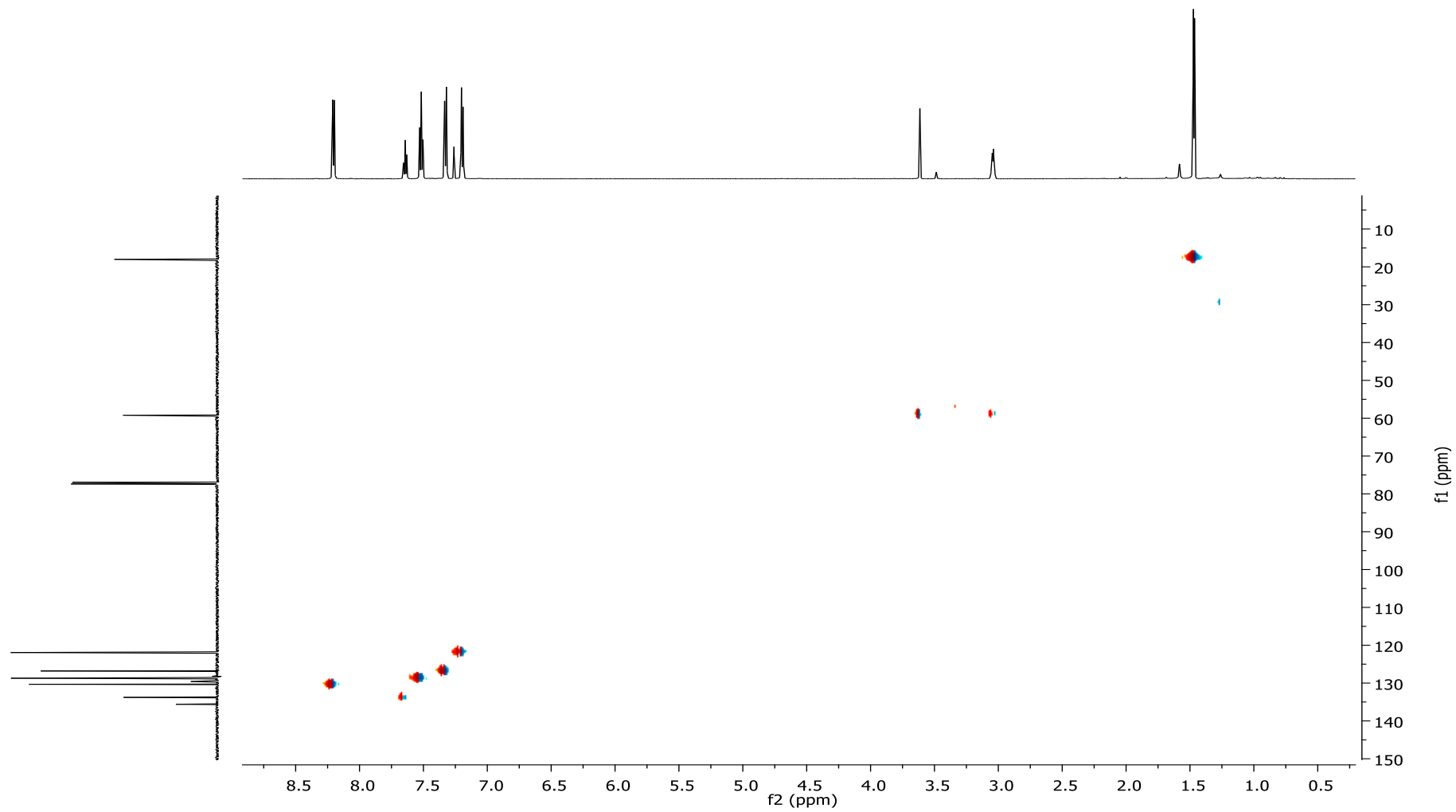


Figura S165: Espectro de RMN de HMBC (400 MHz, CDCl₃) do composto **CV2**.

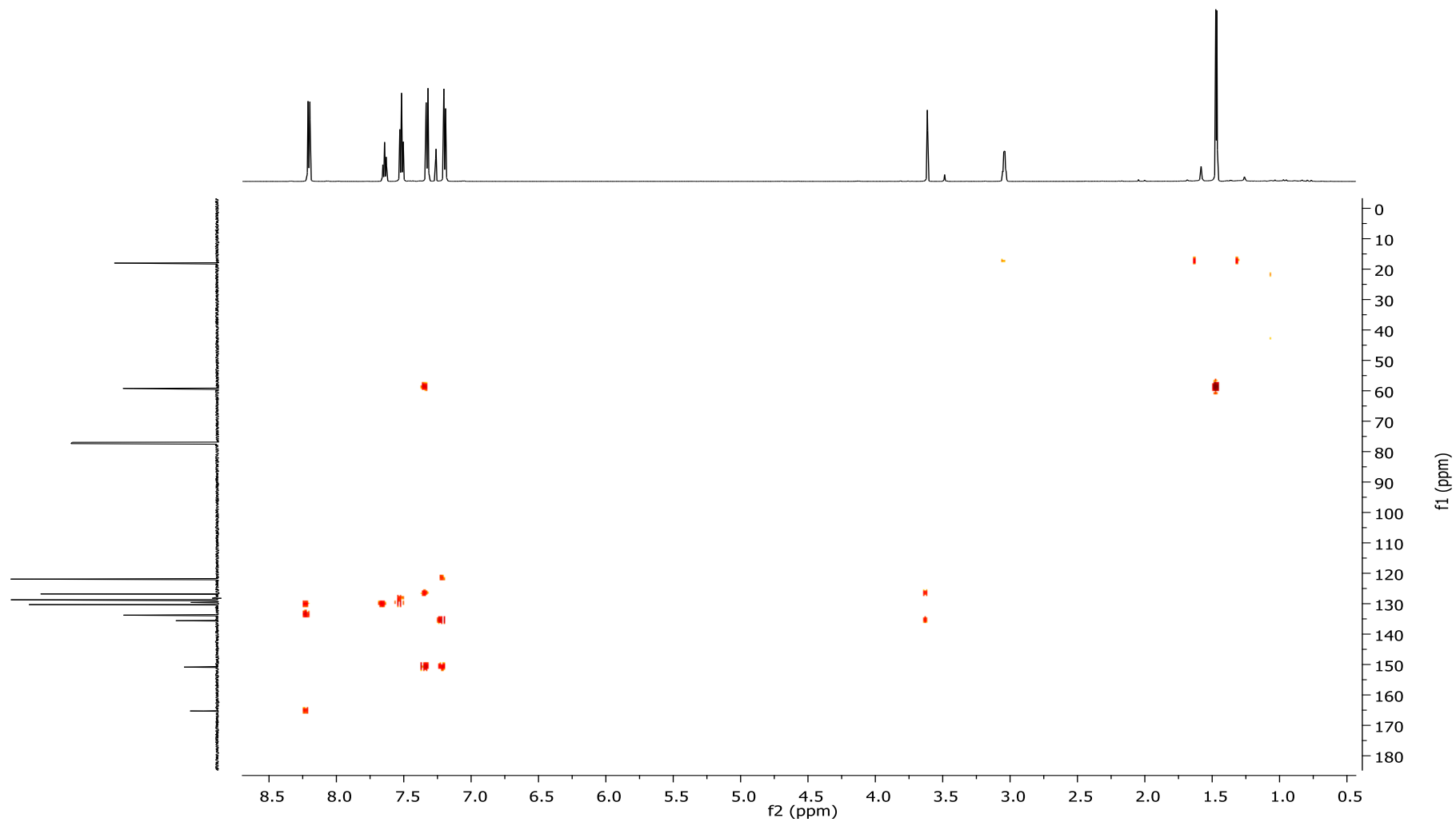


Figura S166: Espectro de RMN de HMBC (400 MHz, CDCl_3) do composto **CV2**.

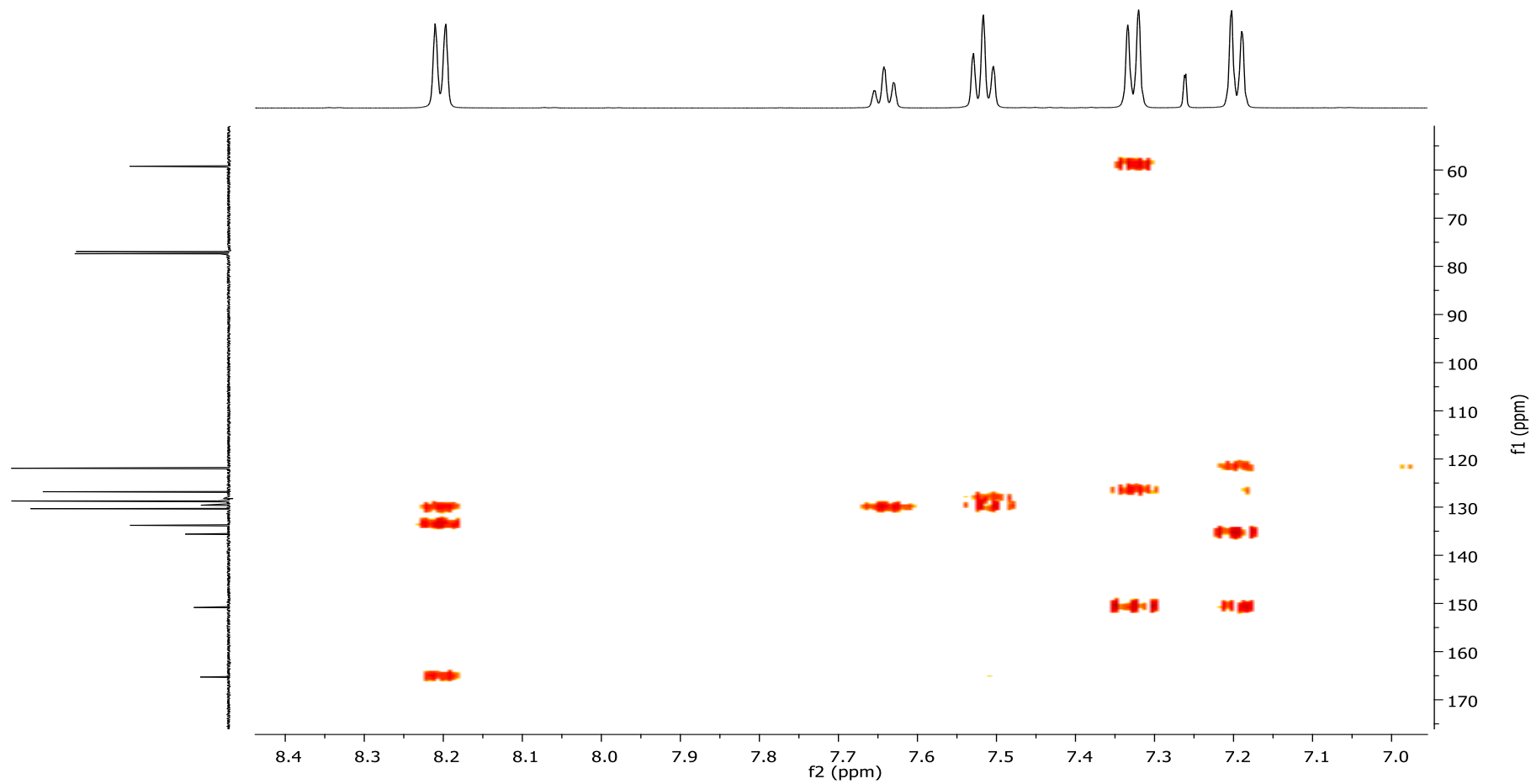


Figura S167: Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) do composto **CV3**.

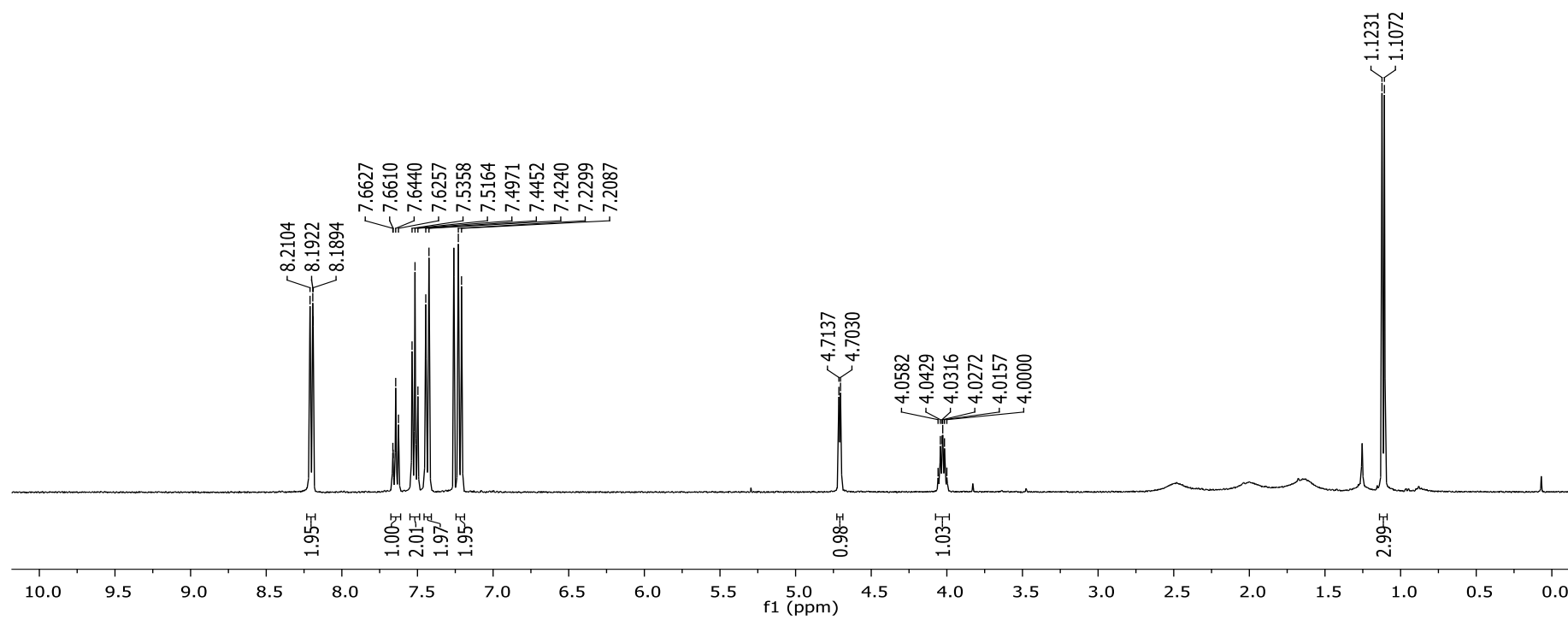


Figura S 168: Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) do composto **CV3**.

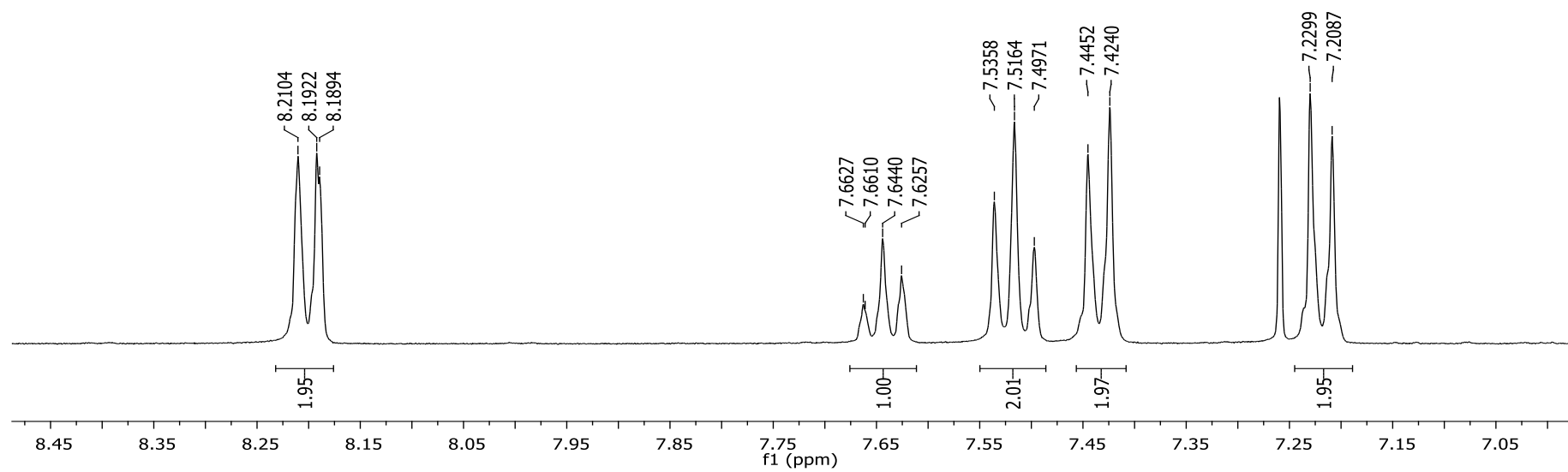


Figura S169: Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) do composto **CV3**.

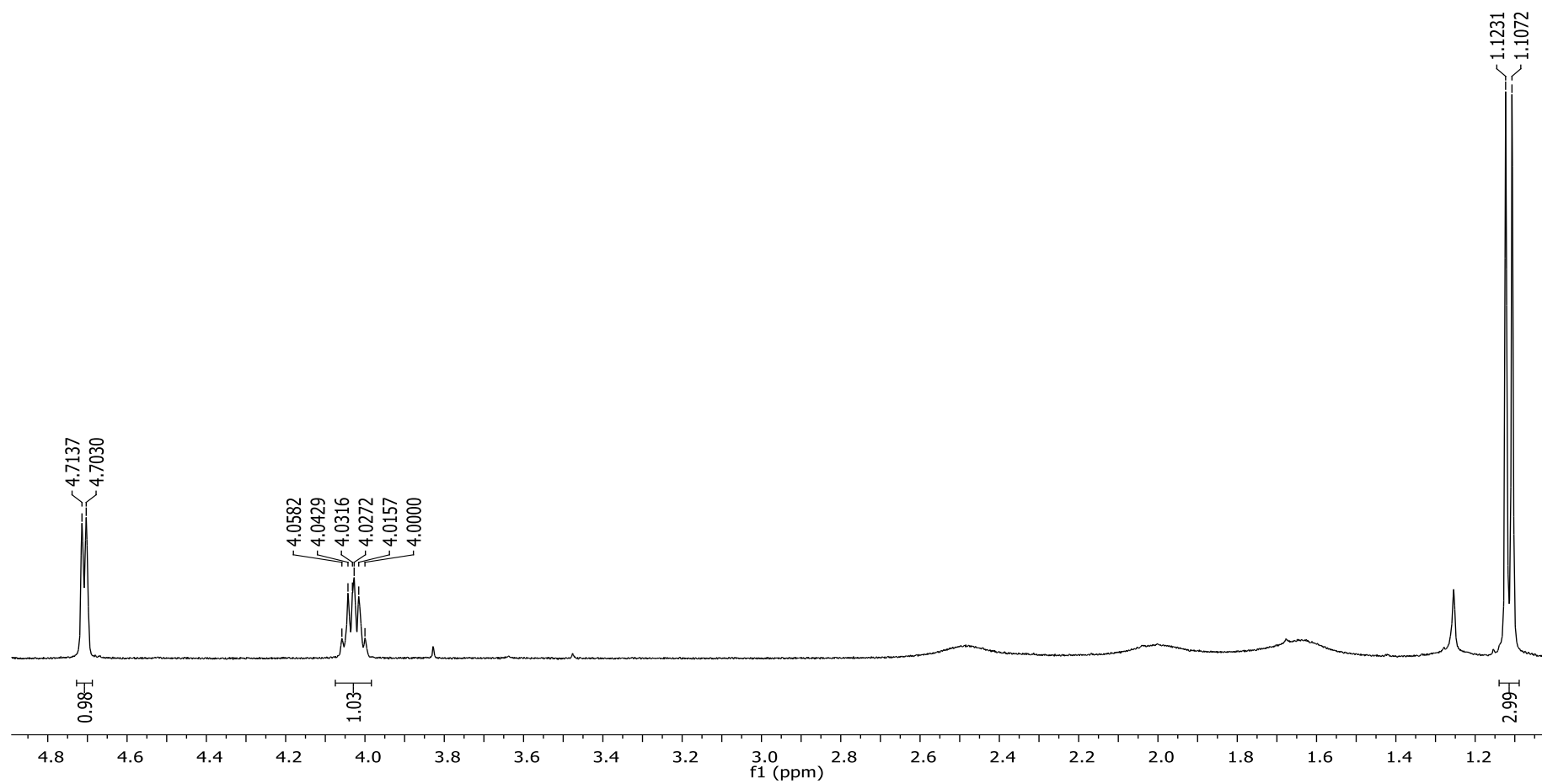


Figura S170: Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) do composto **CV3**.

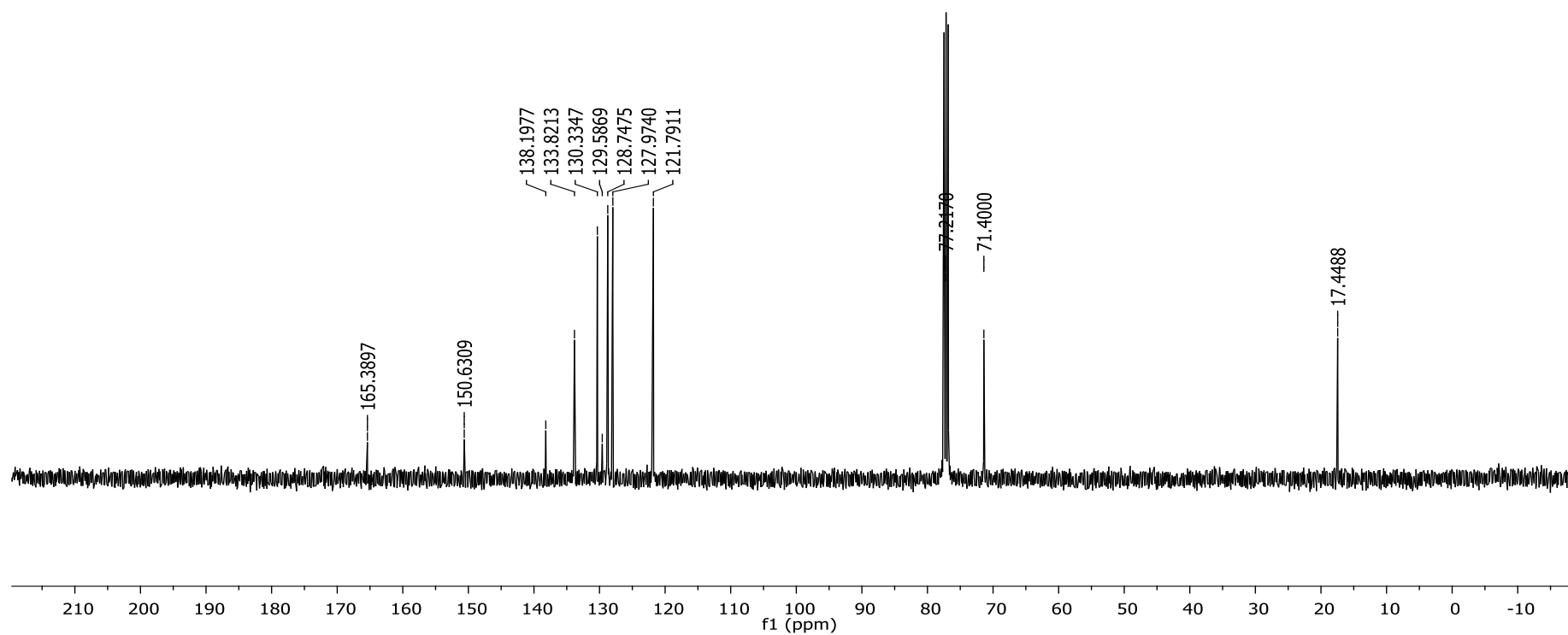


Figura S171: Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) do composto **CV3**.

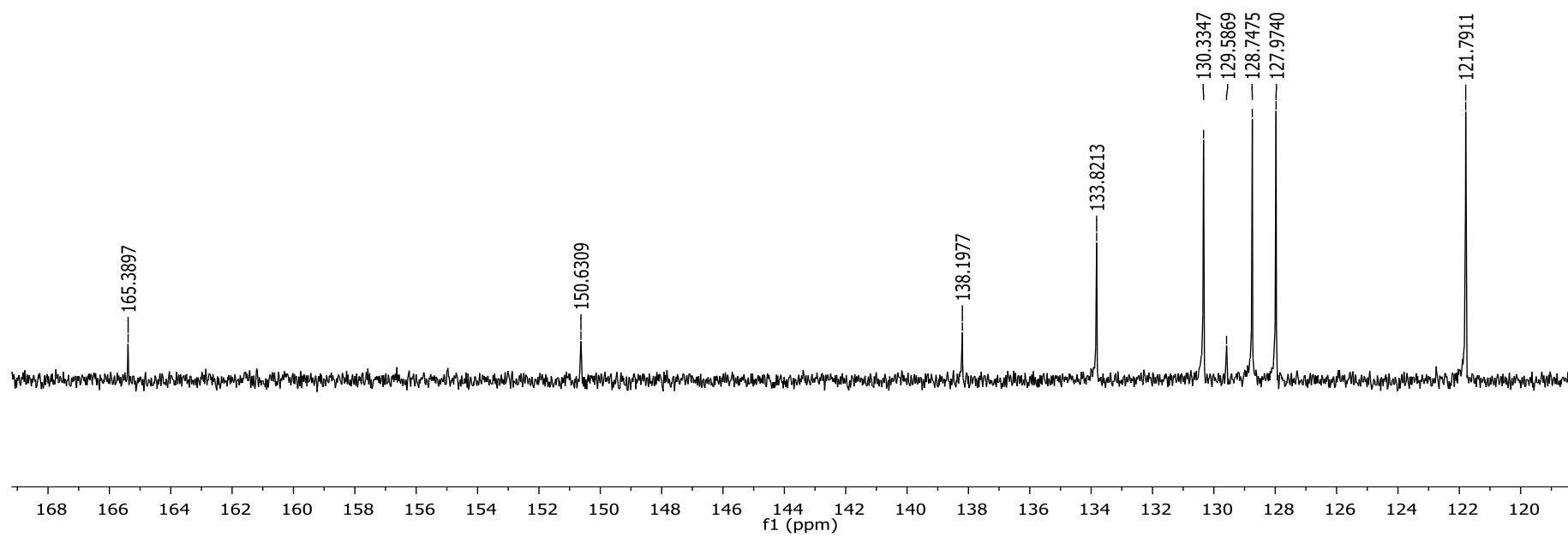


Figura S172: Espectro de RMN de COSY (400 MHz, CDCl_3) do composto **CV3**.

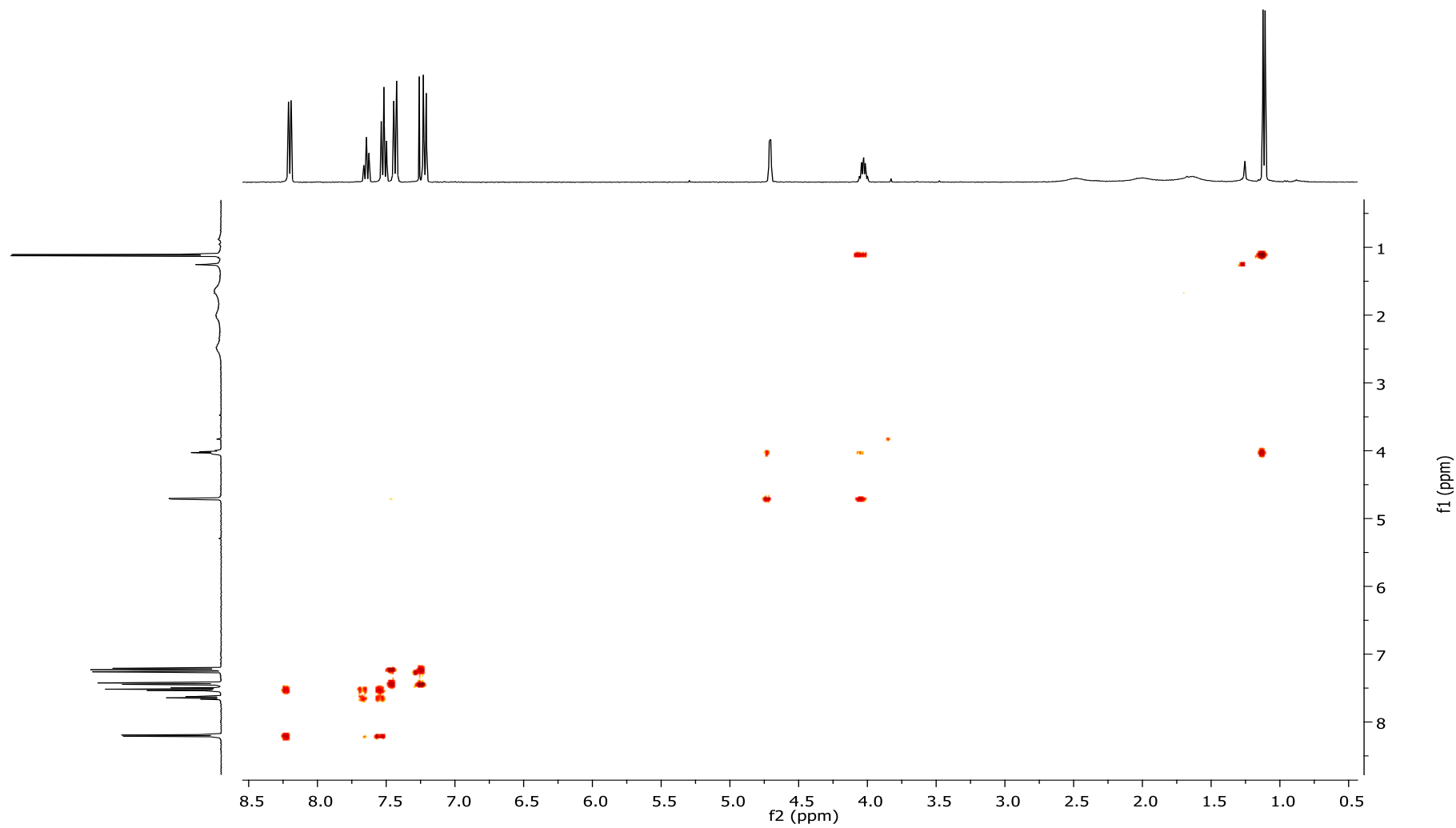


Figura S173: Espectro de RMN de HSQC (400 MHz, CDCl_3) do composto **CV3**.

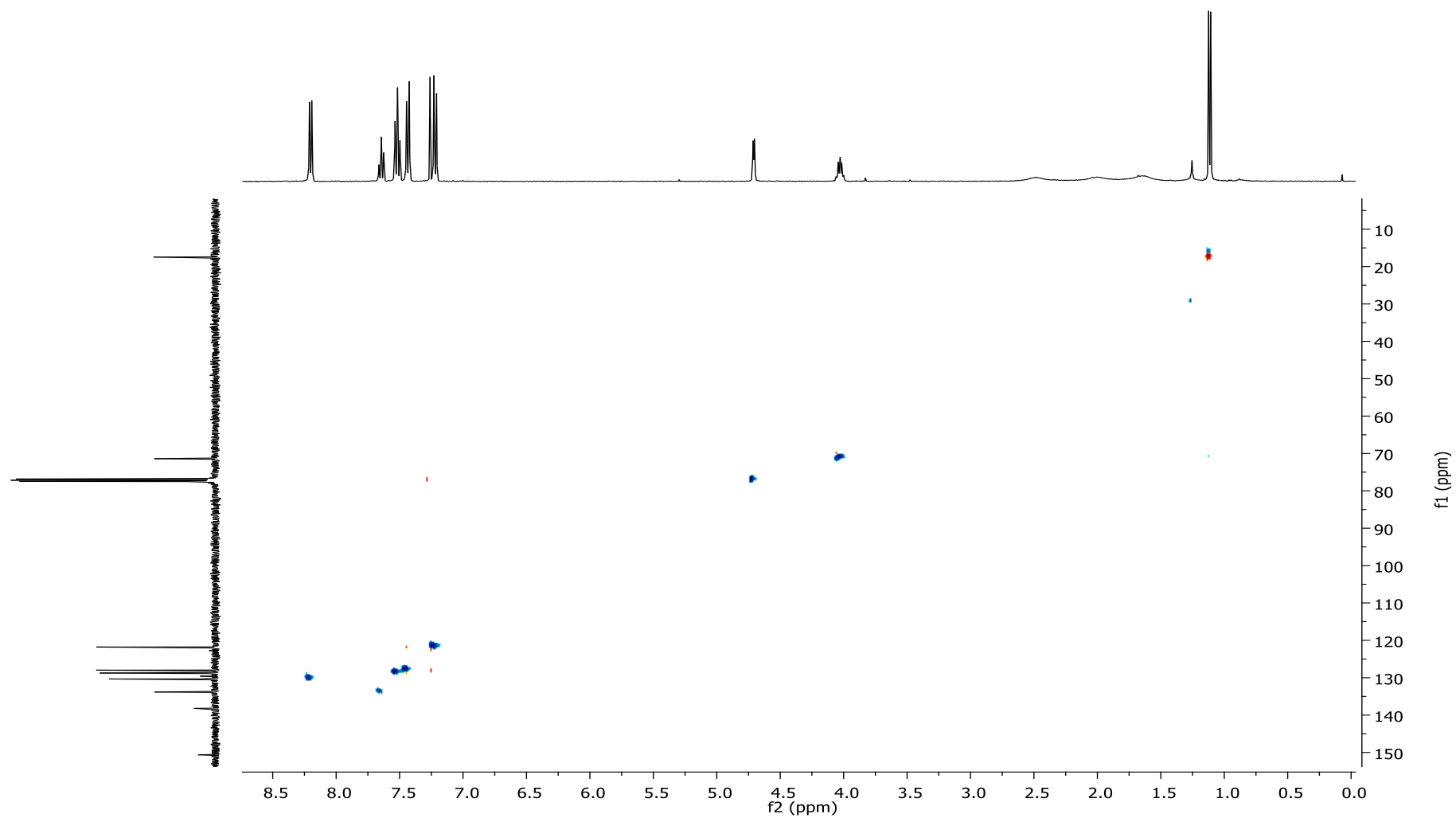


Figura S 174: Espectro de RMN de HMBC (400 MHz, CDCl_3) do composto **CV3**.

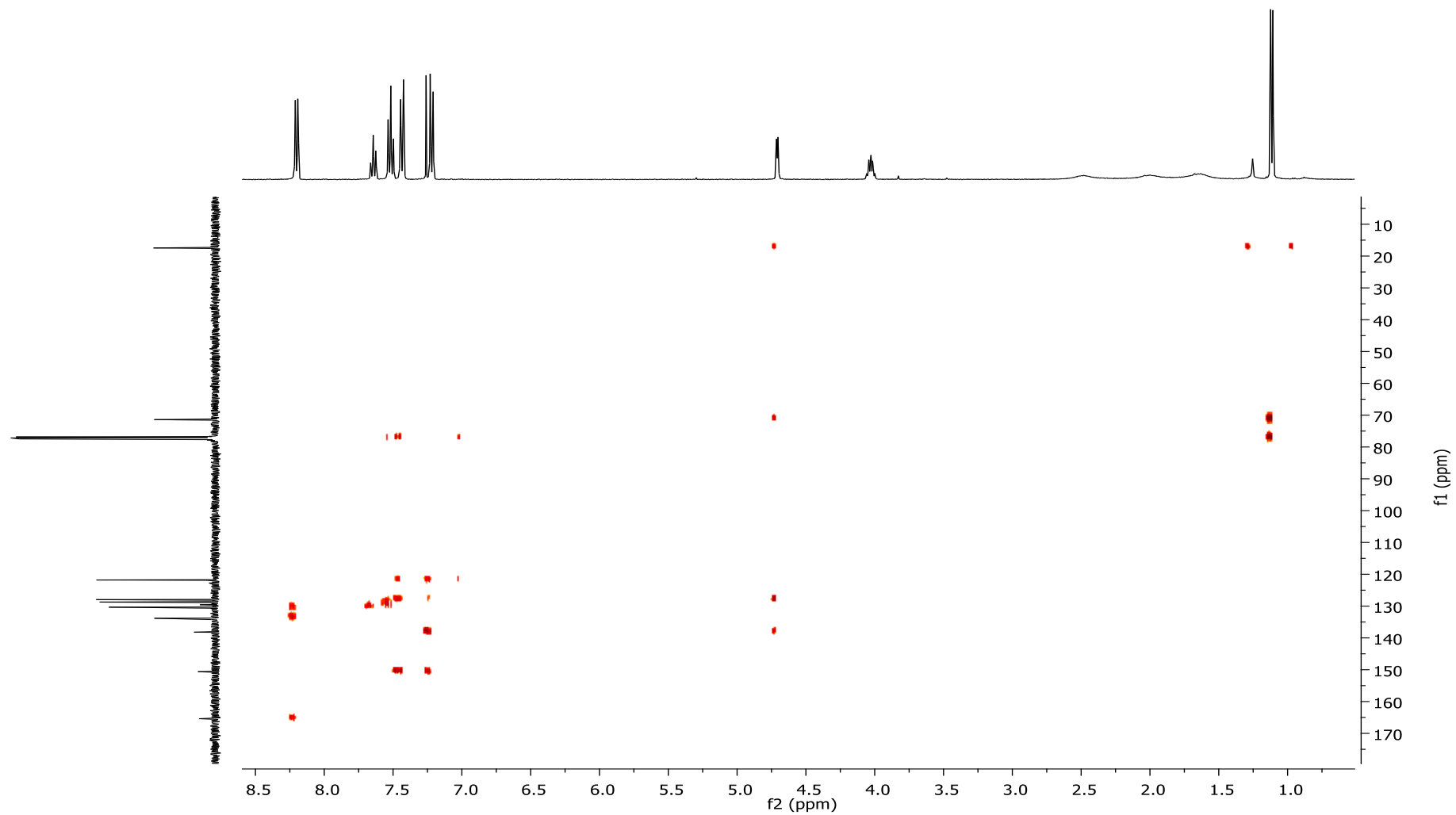


Figura S175: Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) do composto **CV4**.

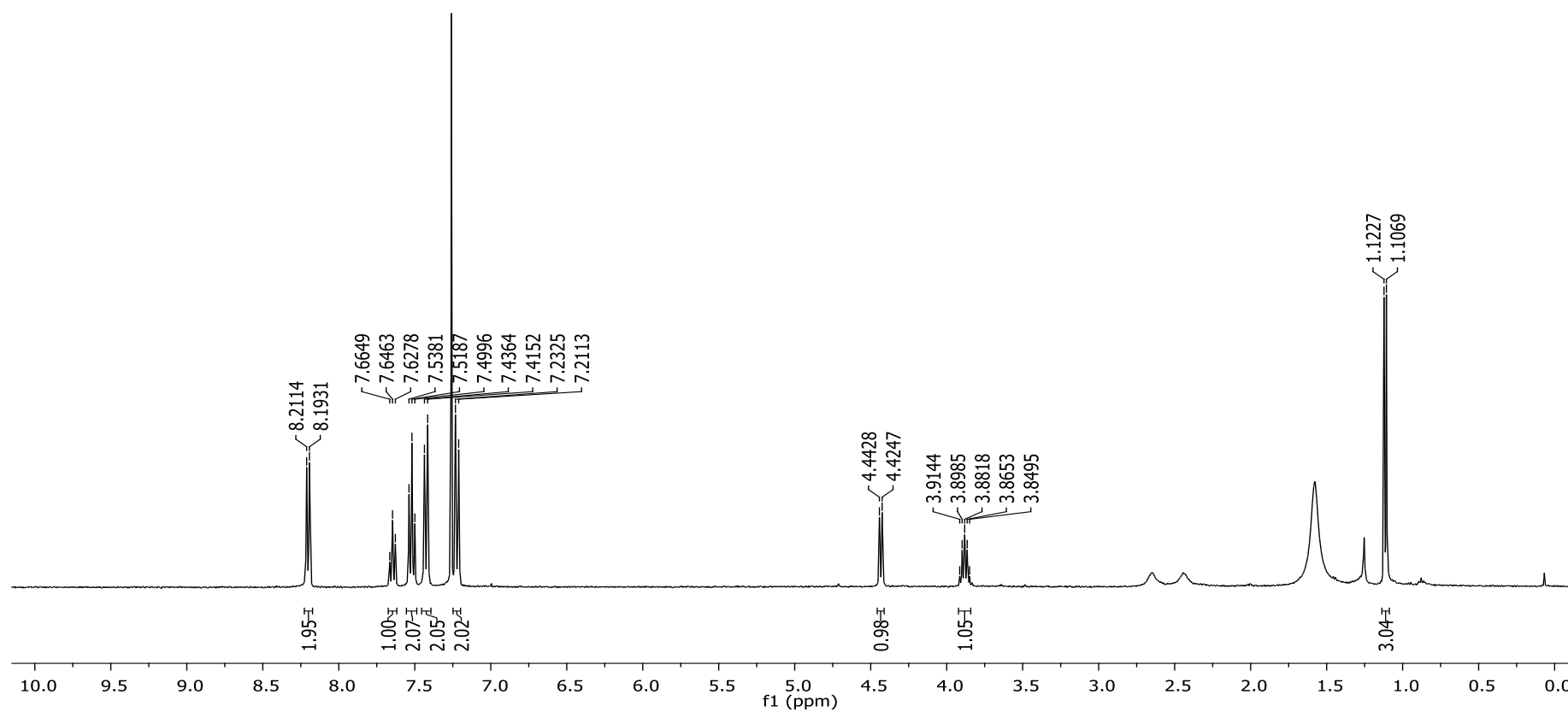


Figura S176: Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) do composto **CV4**.

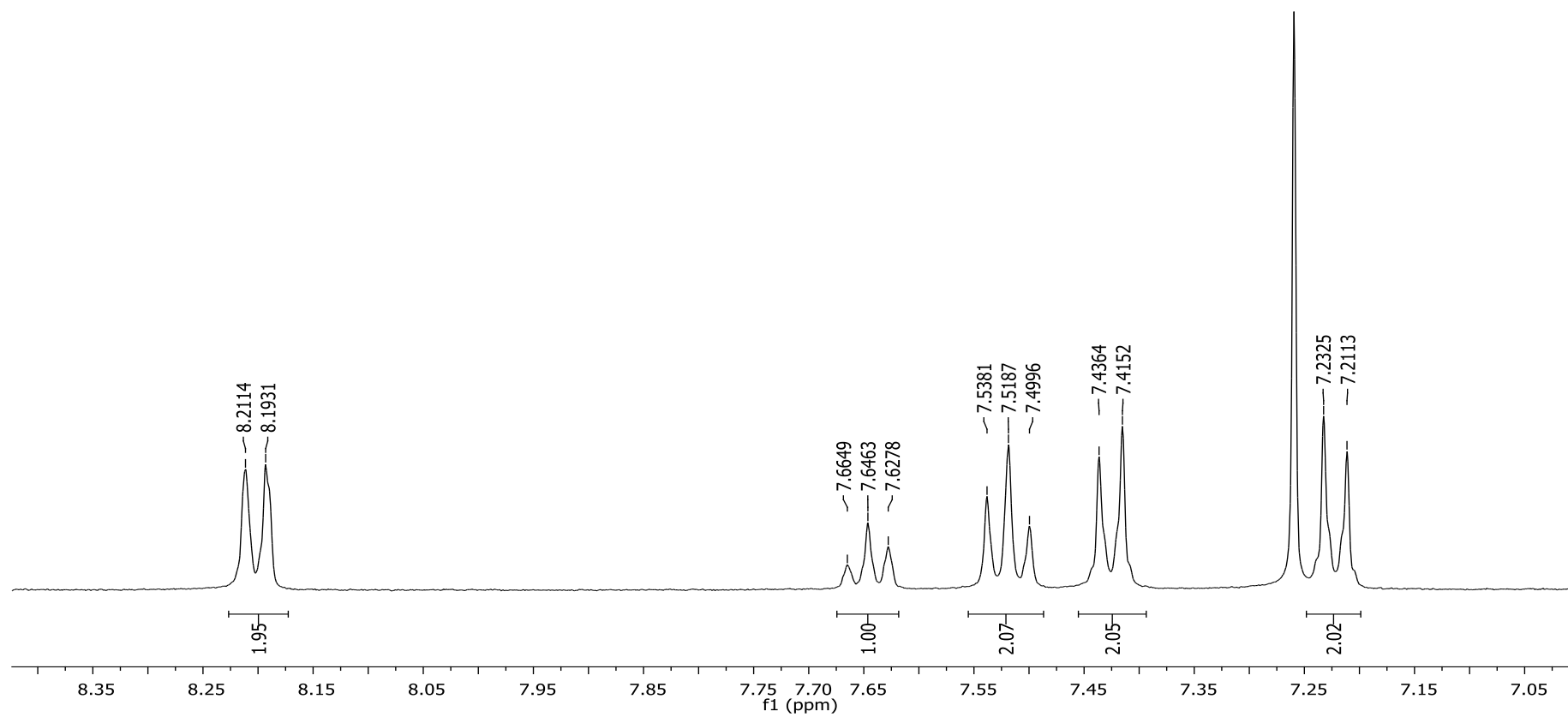


Figura S177: Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) do composto **CV4**.

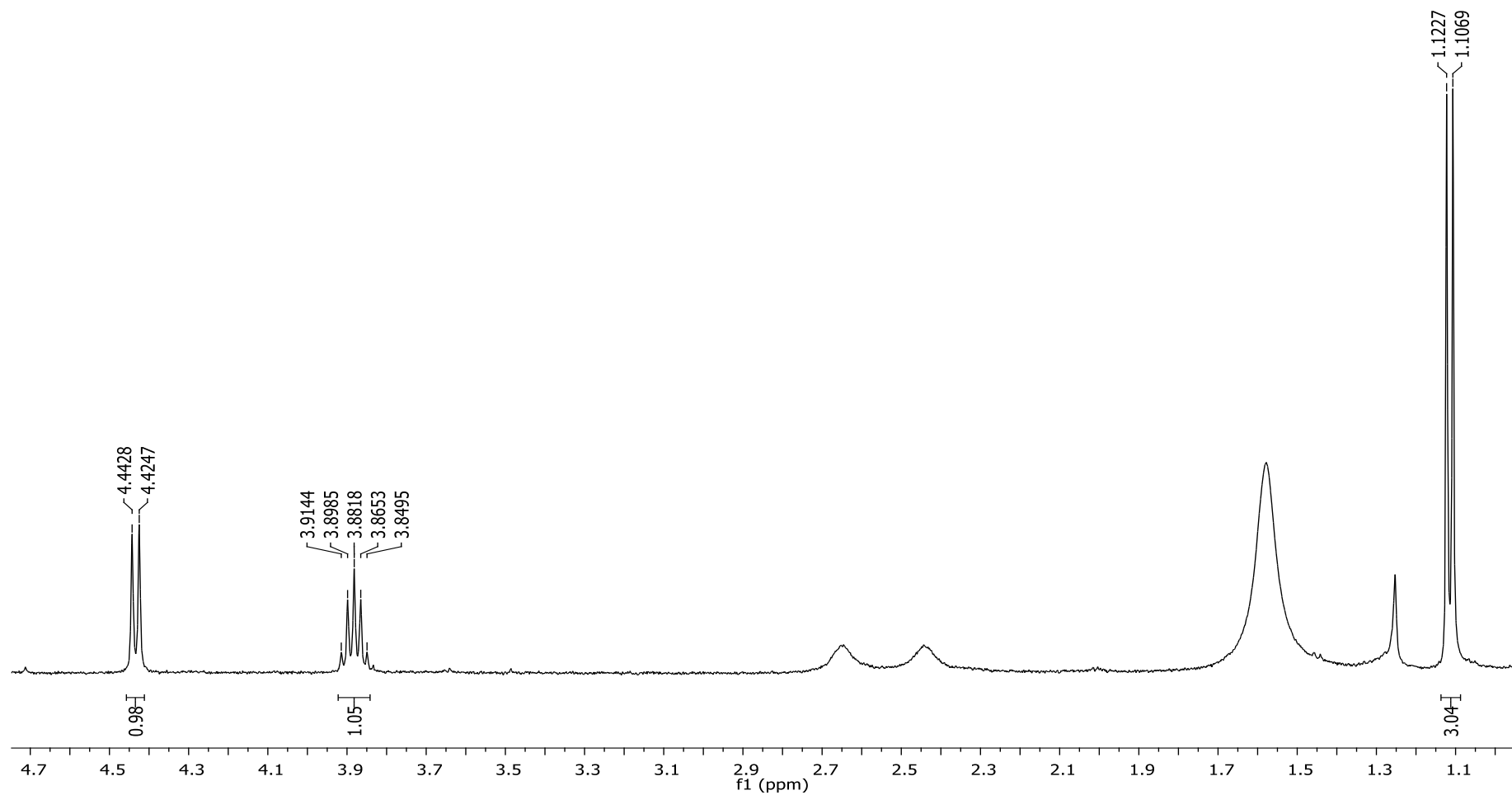


Figura S178: Espectro de RMN de COSY (400 MHz, CDCl_3) do composto **CV4**.

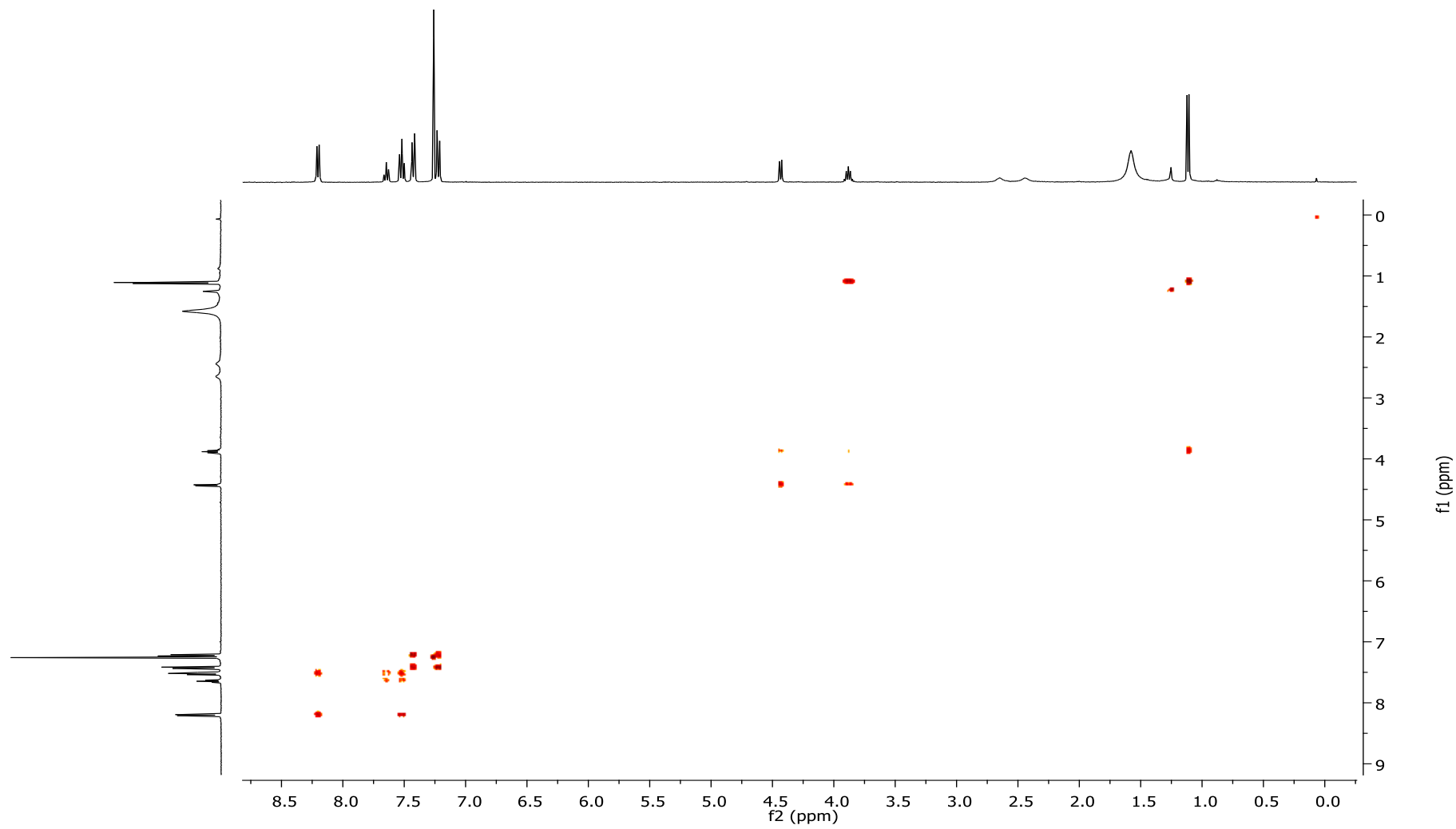


Figura S179: Espectro de RMN de HSQC (400 MHz, CDCl_3) do composto **CV4**.

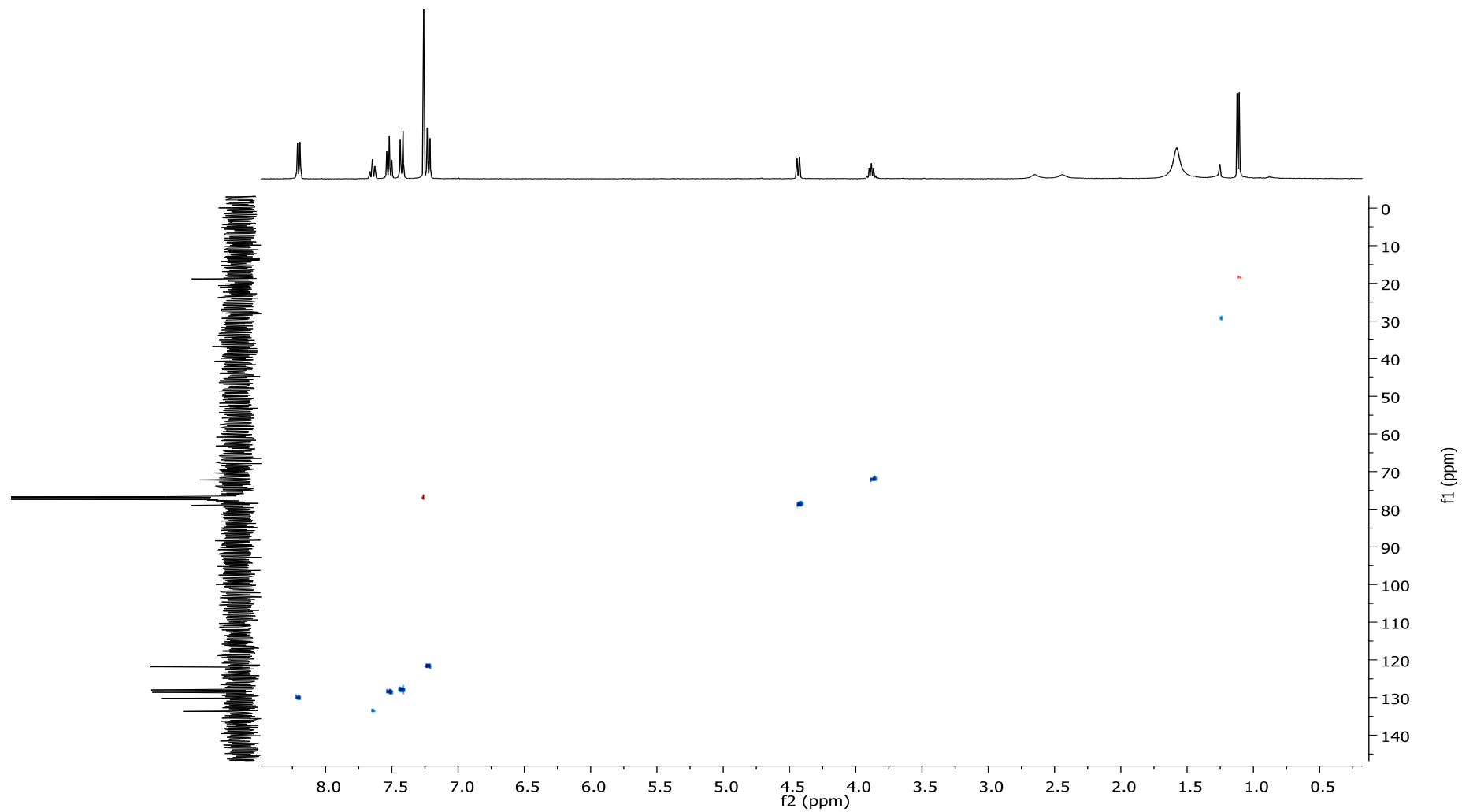


Figura S180: Espectro de RMN de HMBC (400 MHz, CDCl_3) do composto **CV4**.

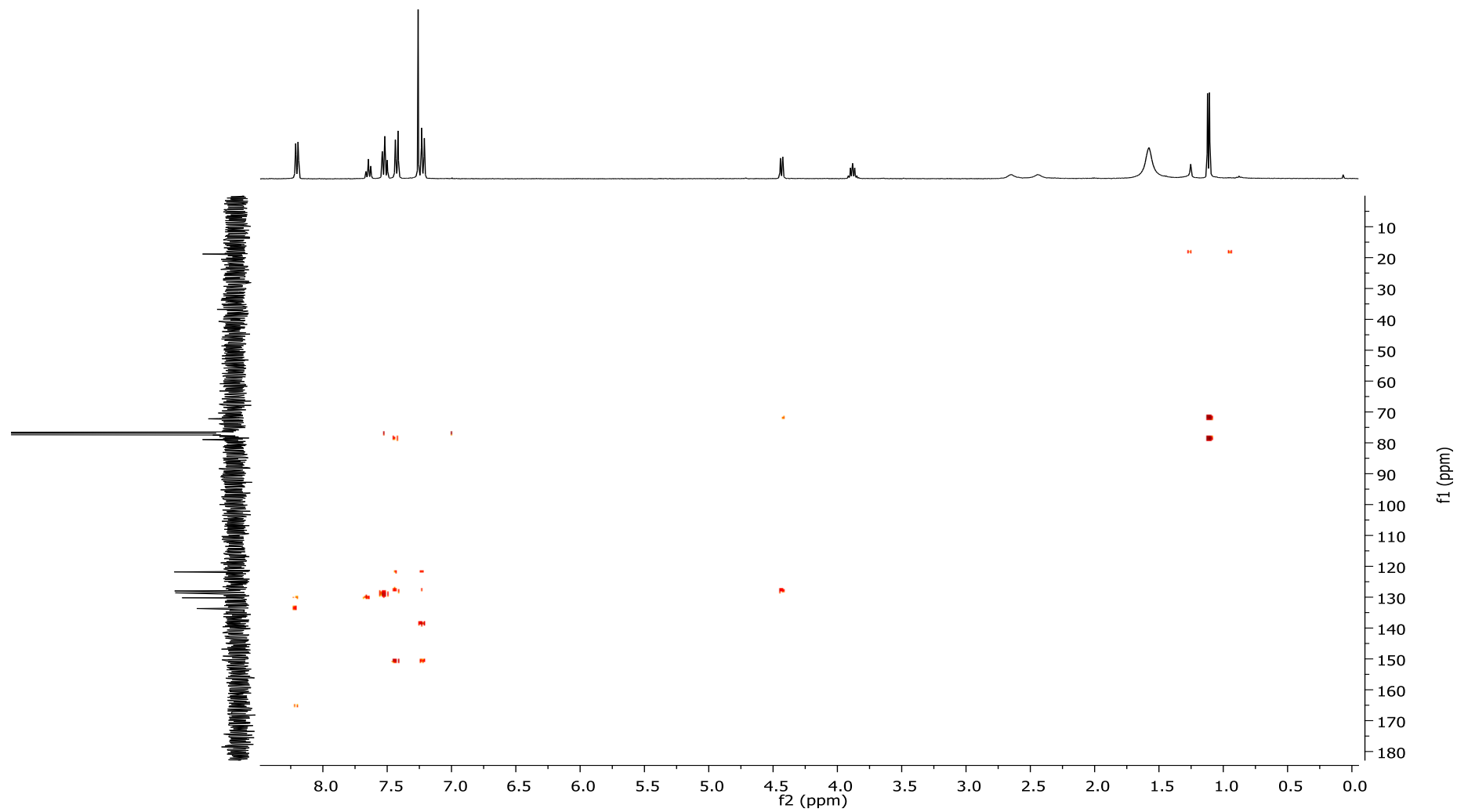


Figura S181: Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) do composto **CV5**.

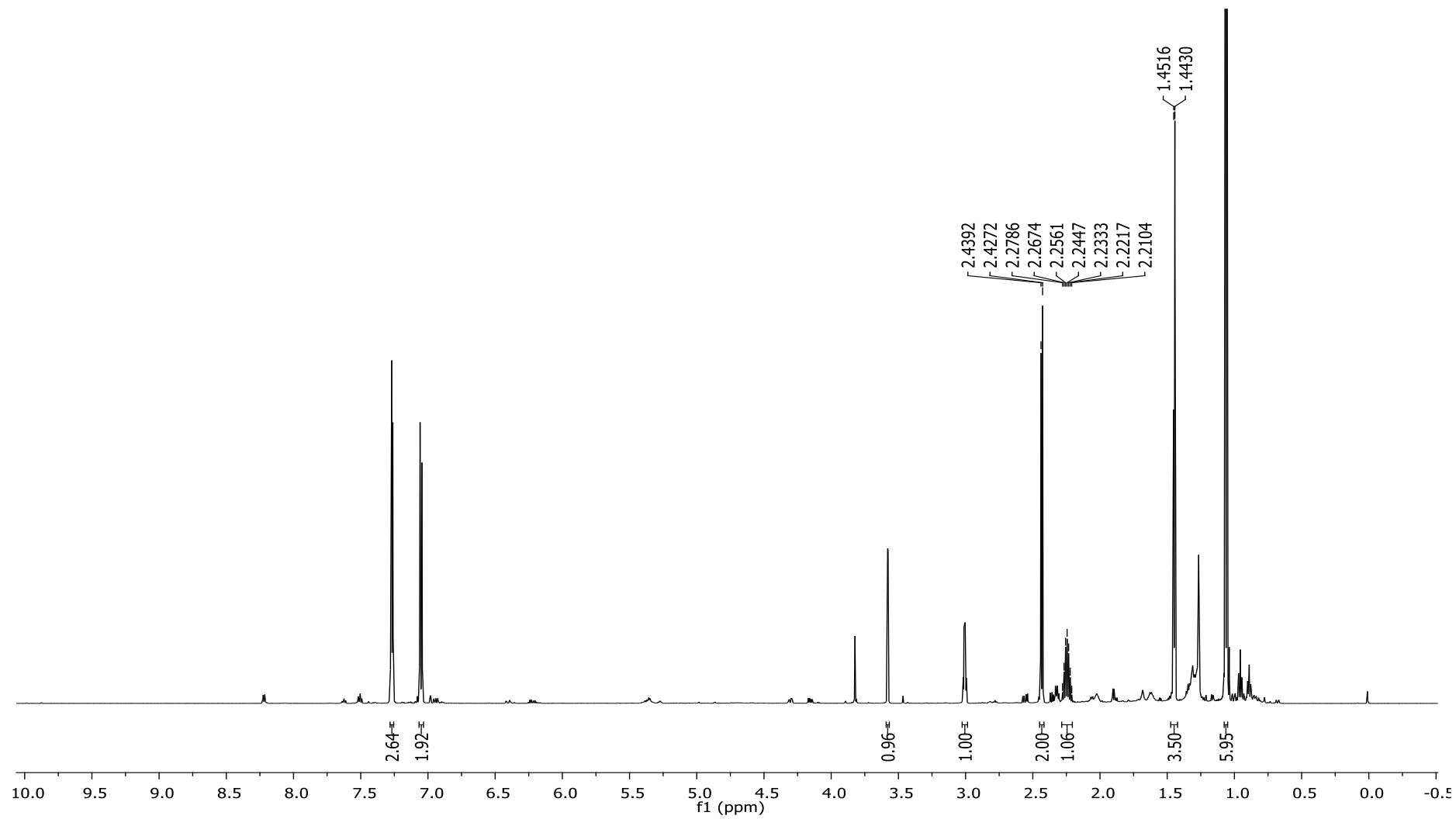


Figura S182: Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) do composto **CV5**.

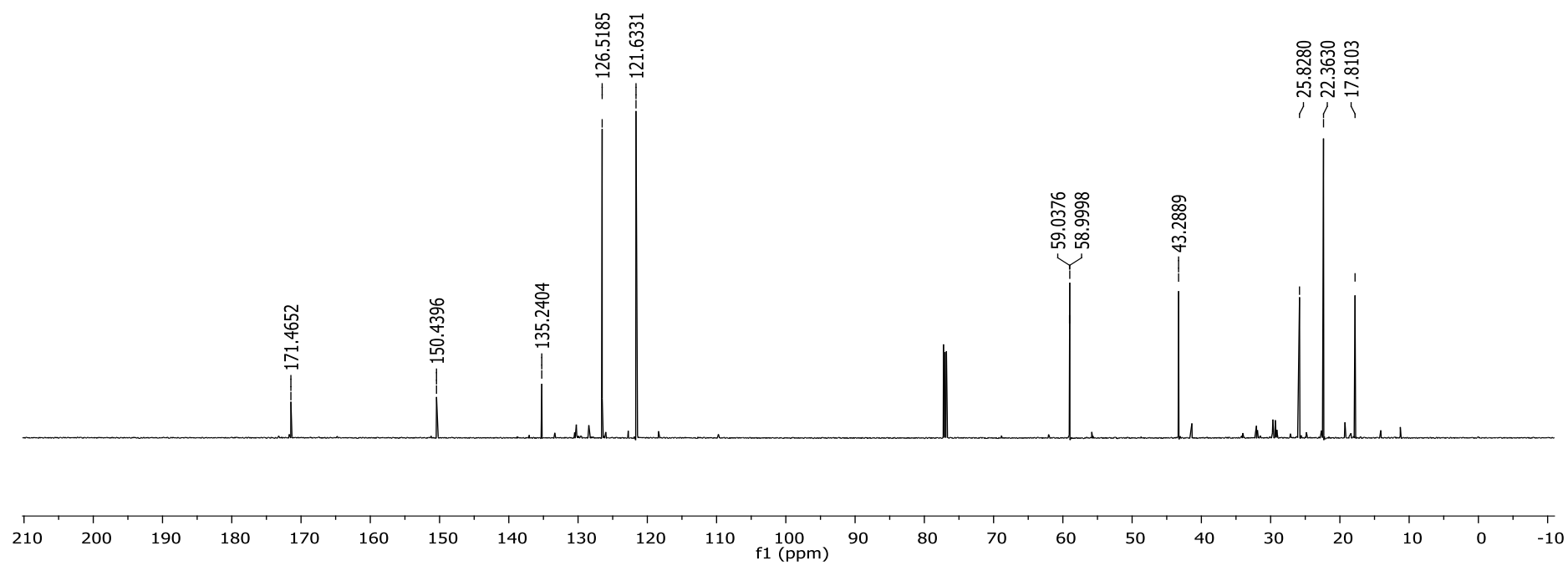


Figura S183: Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) do composto **CV6**.

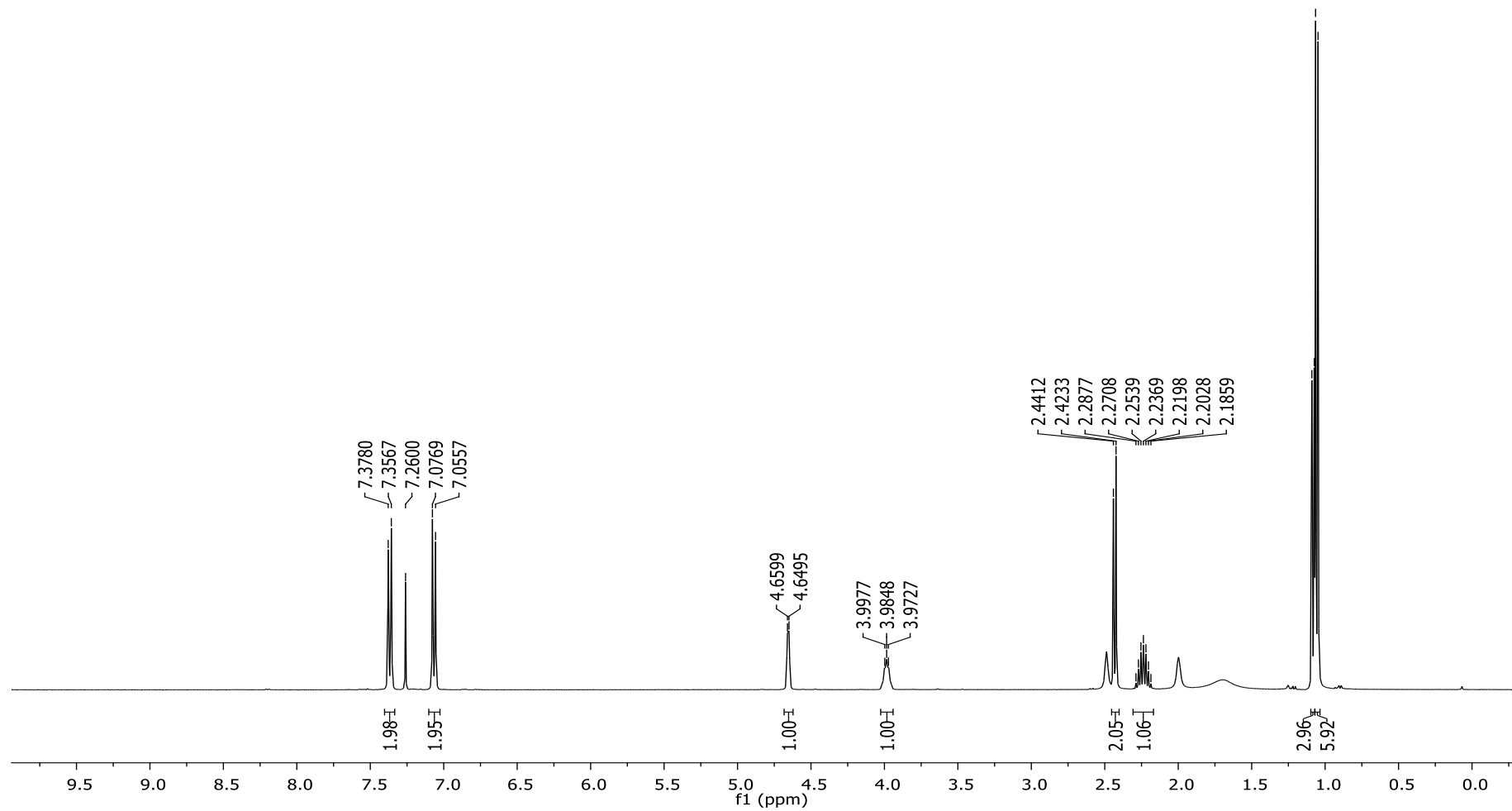


Figura S184: Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) do composto **CV6**.

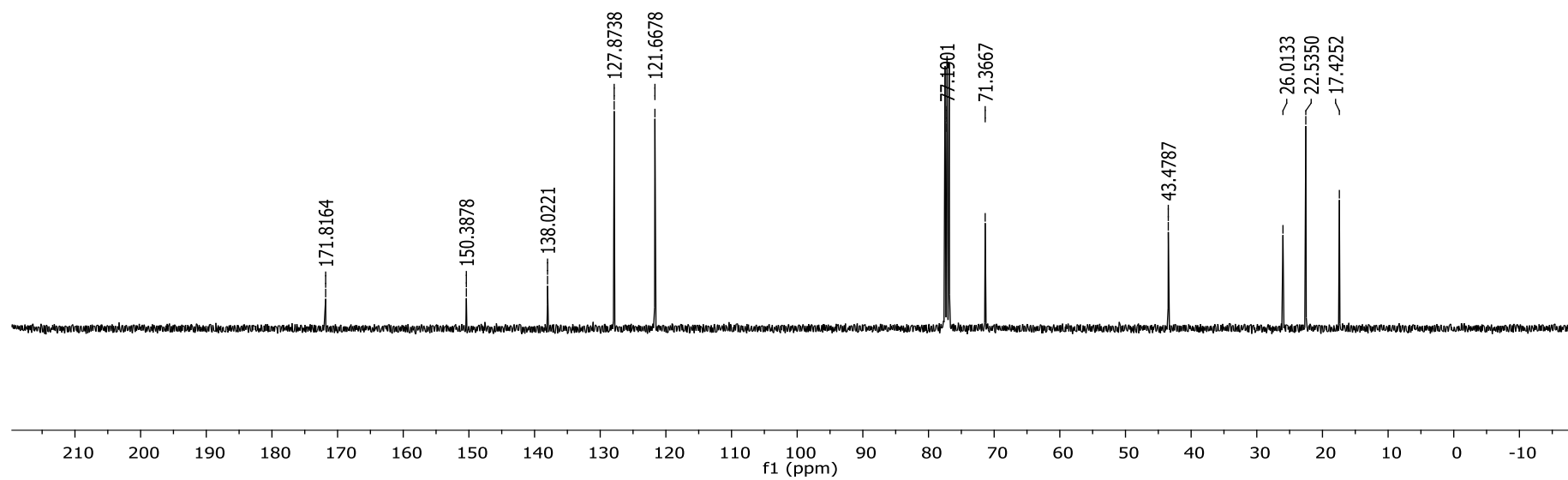


Figura S185: Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) do composto **CV7**.

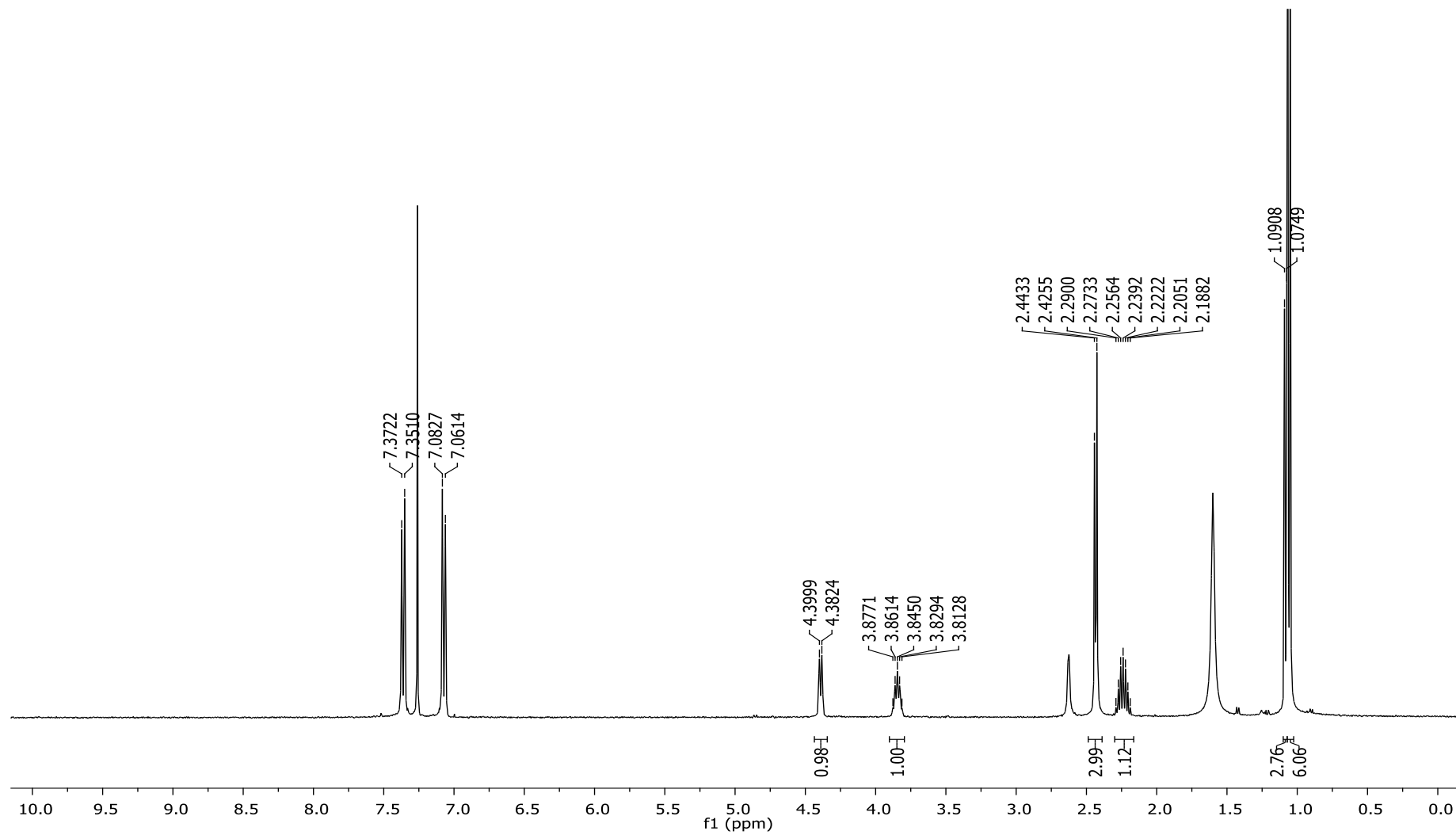


Figura S186: Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) do composto **CV7**.

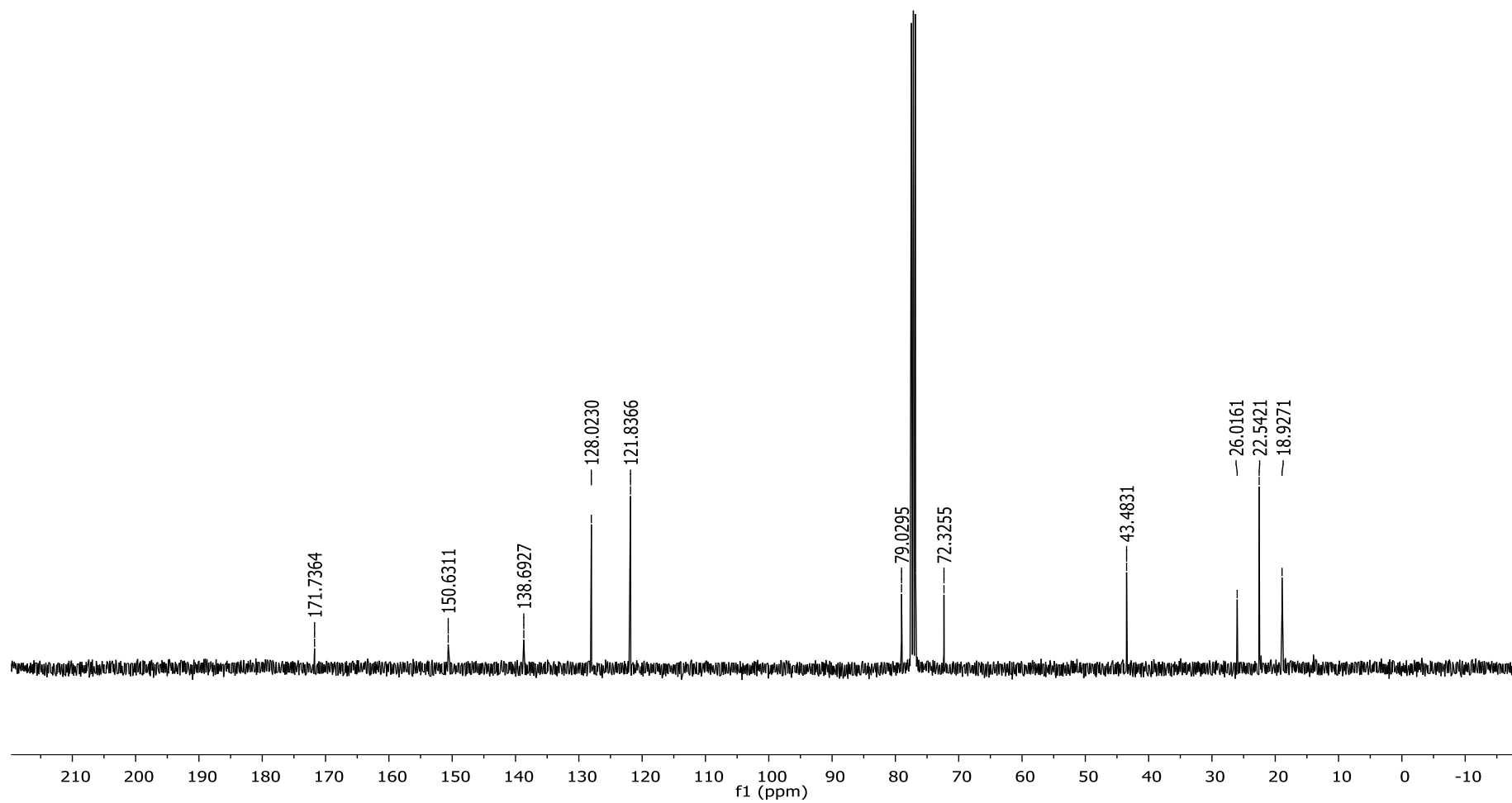


Figura S187: Espectro de IES-EMAR de CV1 ([M + H], modo de ionização positivo).

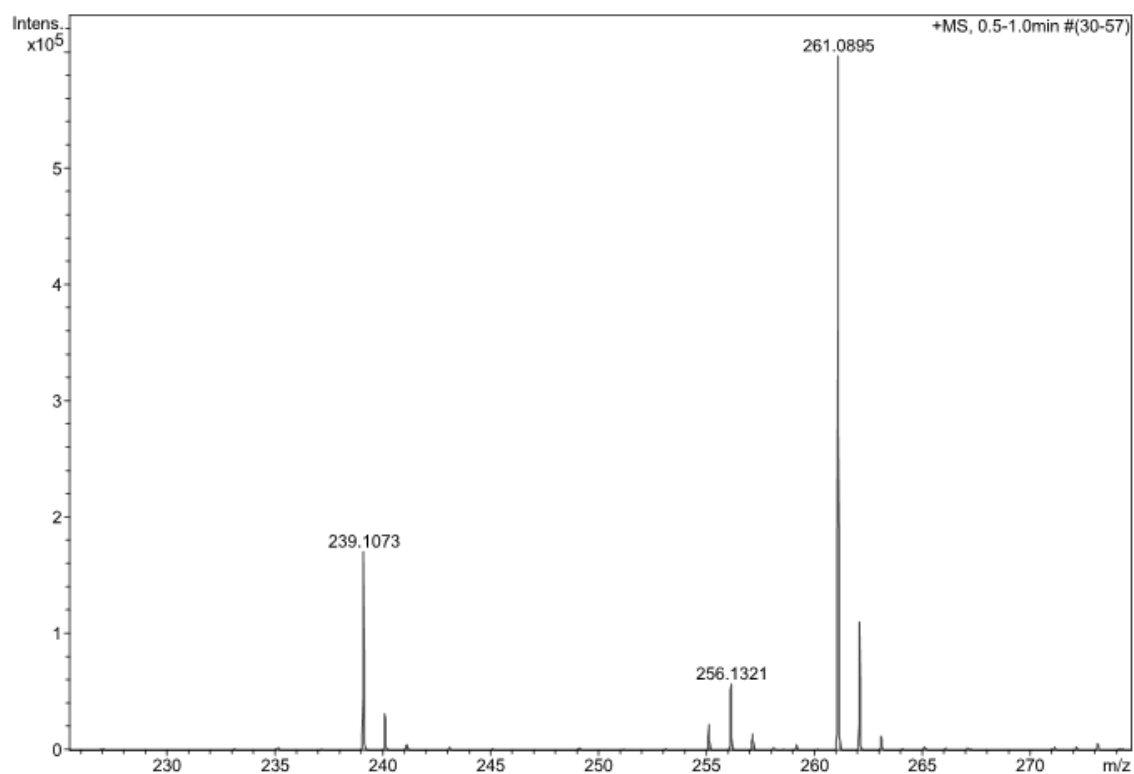


Figura S188: Espectro de IES-EMAR de CV2 ([M + H], modo de ionização positivo).

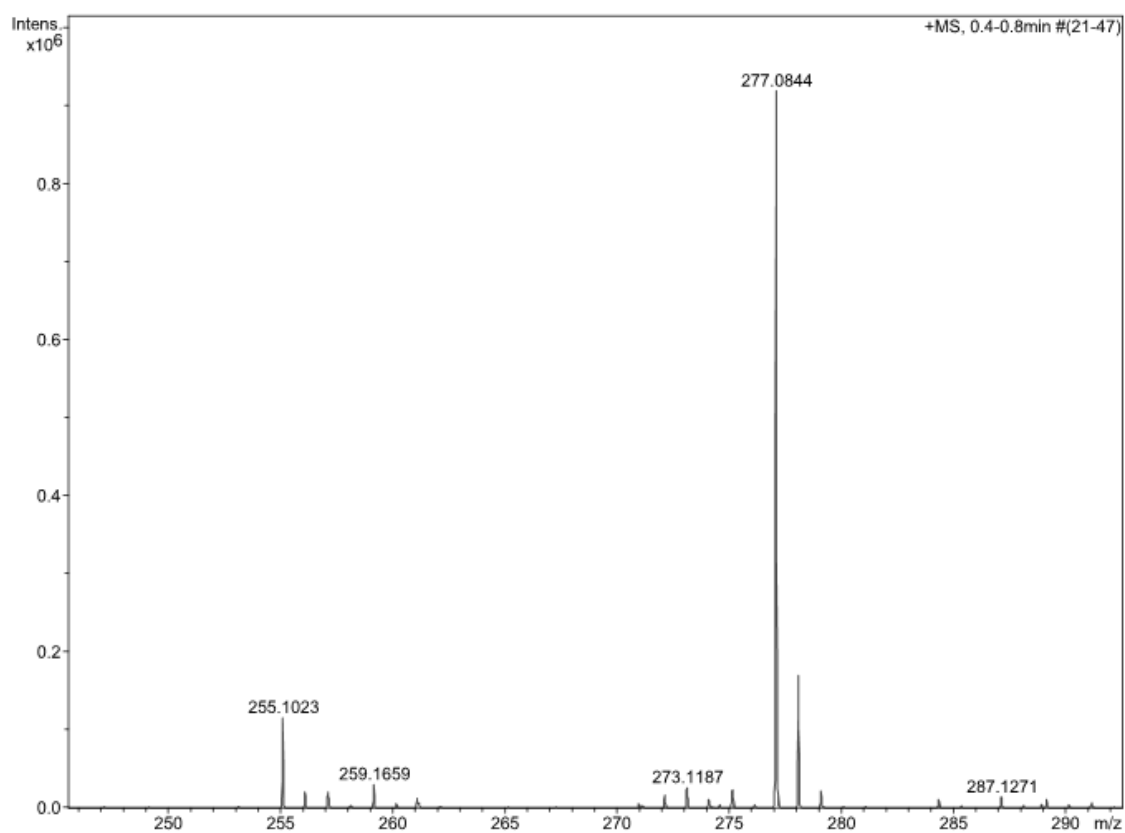


Figura S189: Espectro de IES-EMAR de CV3 ([M + H], modo de ionização positivo).

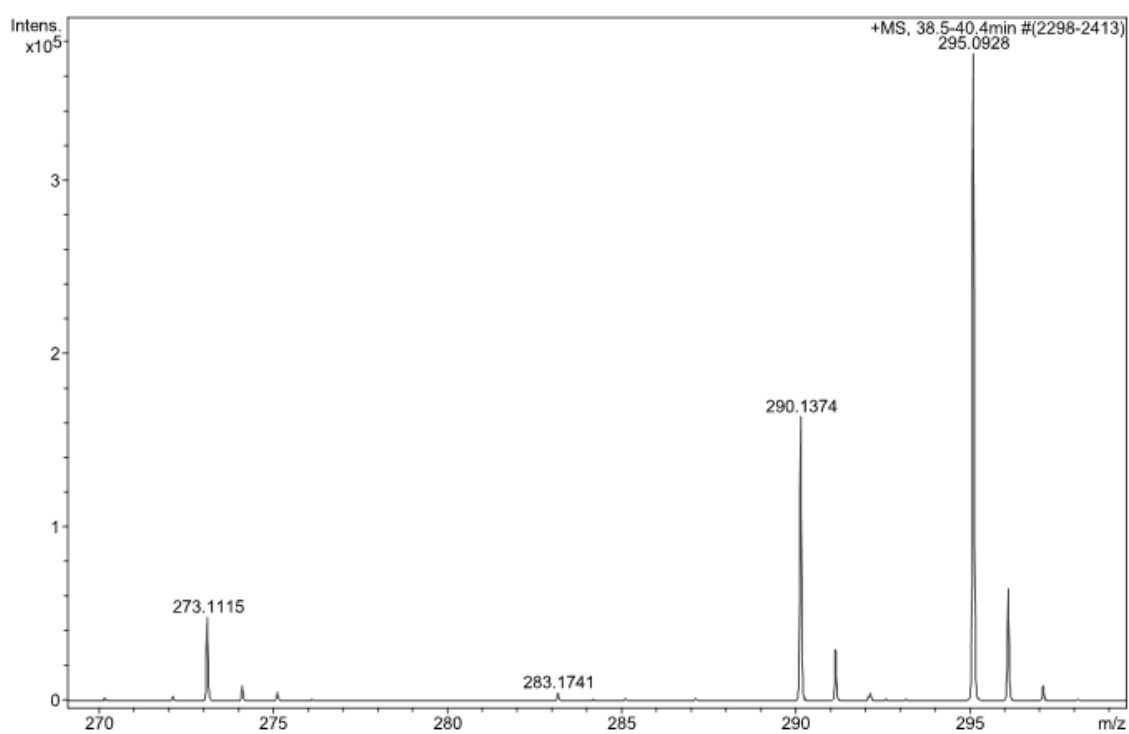


Figura S190: Espectro de IES-EMAR de CV4 ([M + H], modo de ionização positivo).

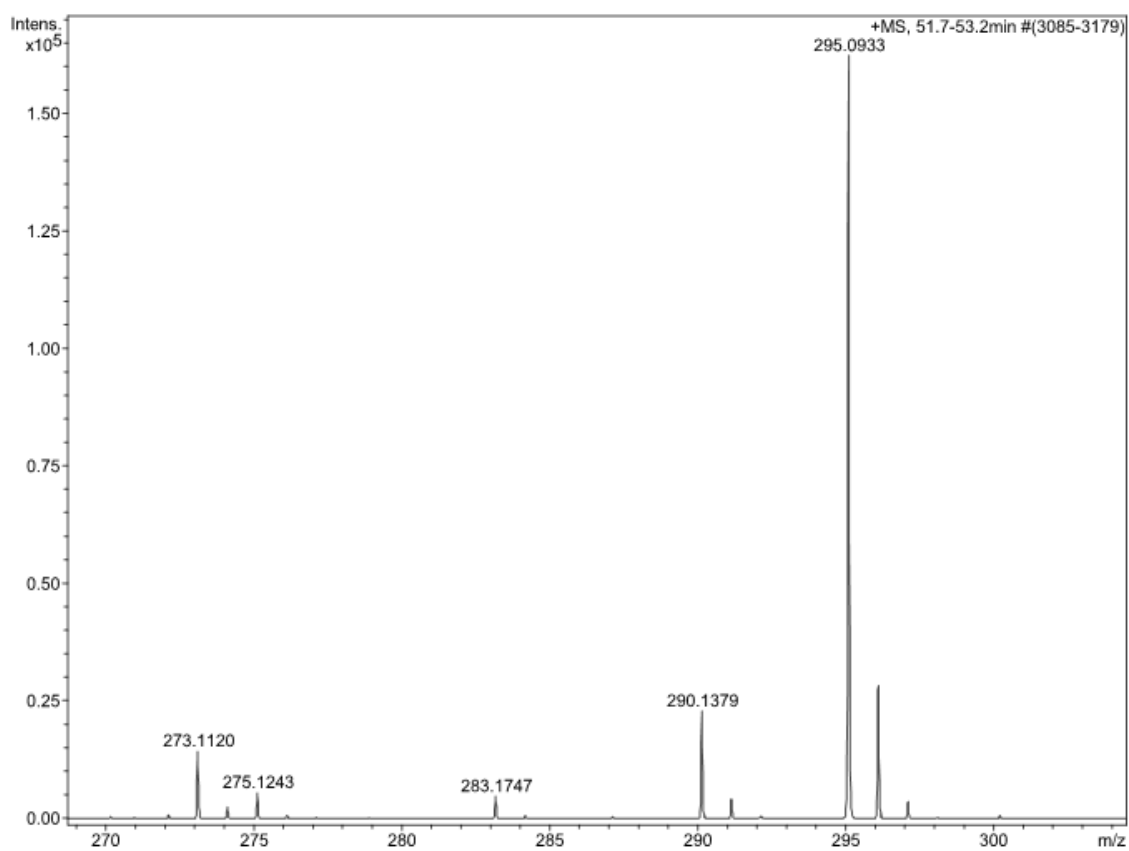
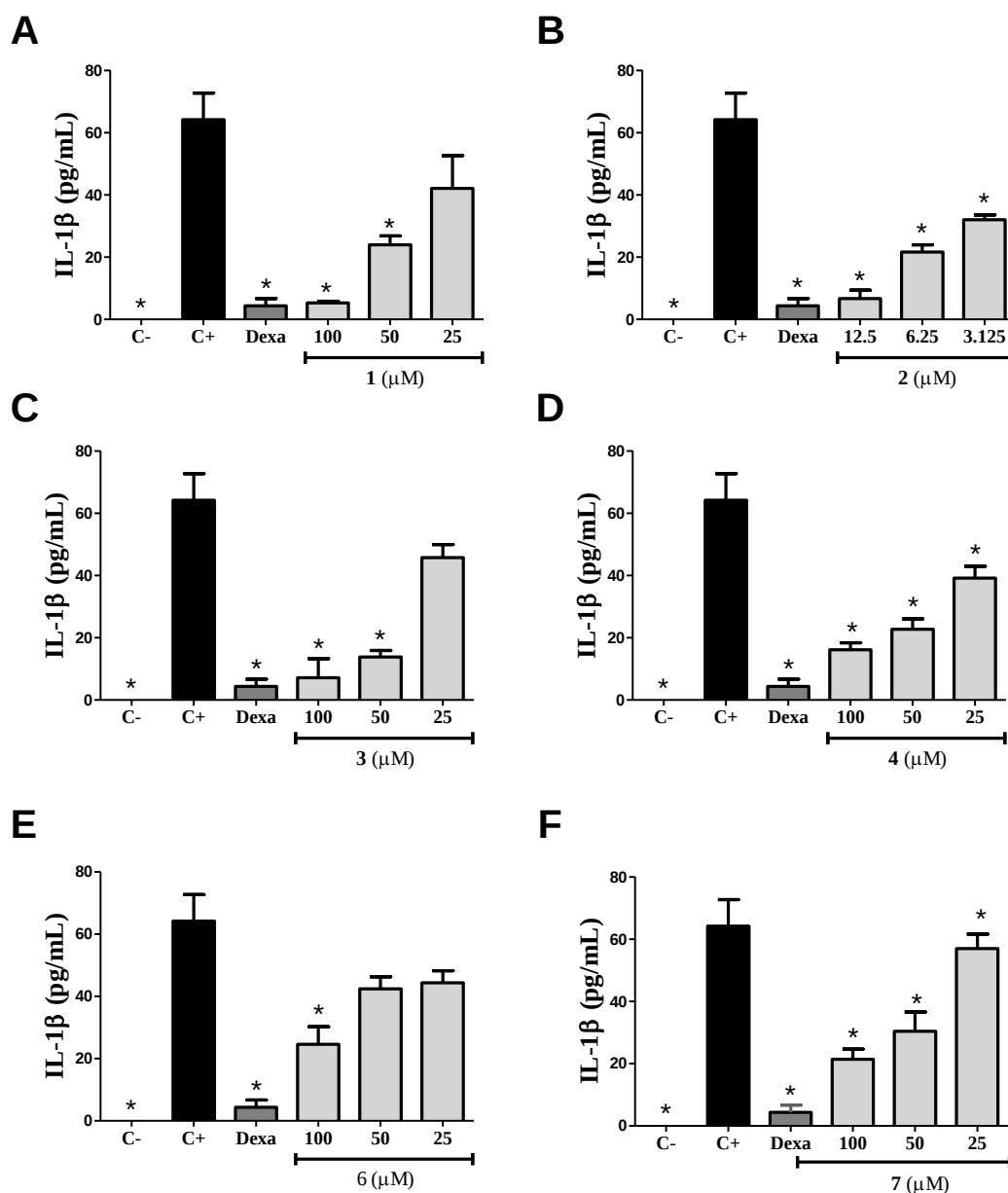


Figura S191: Efeito de compostos na produção de IL-1 β na cultura de macrófagos J774 ativada por LPS e INF- γ .



OBS: Células J774 foram incubadas com veículo (DMSO, C- grupo controle não estimulado), apenas com LPS (500ng/mL) e INF- γ (5ng/mL) (C+, grupo controle positivo) ou com diferentes concentrações não citotóxicas dos compostos testes durante 24 horas e o sobrenadante coletado para quantificação da IL-1 β através de ELISA sanduíche. O controle padrão ouro utilizado foi dexametasona (10 μ M, Dexa). Os dados foram expressos como média $\pm$ EPM; n=5 por grupo. *p < 0.05 em comparação às culturas estimuladas com LPS e INF- γ tratadas apenas com o veículo. ANOVA seguida do teste de Tukey

6 Conclusões gerais

O presente estudo descreveu o estudo fitoquímico e farmacológico de duas espécies de Euphorbiaceae, *S. loranthacea* e *C. velutinus*, coletadas na cidade de Morro do Chapéu na Bahia. Para obtenção dos resultados, de ambas as espécies, foram realizados métodos de extração clássicos como a maceração estática utilizando inicialmente um solvente de baixa polaridade, como o hexano, e posteriormente um de alta polaridade como metanol e etanol. Esse procedimento teve como objetivo concentrar compostos menos polares, como os terpenoides, nos extratos hexânicos e por esse motivo esses extratos foram os primeiros a serem investigados. Foram realizados inicialmente uma investigação utilizando cromatografia em camada delgada analítica e relevadores para identificação dos compostos presentes nos extratos hexânicos. Posteriormente foram submetidos a cromatografia em coluna aberta utilizando sílica Gel como fase estacionária e misturas de Hex: AcOEt como fase móvel. A partir desse procedimento de fracionamento já foi possível realizar o isolamento de substâncias que foram analisadas por RMN de ^1H e ^{13}C uni e bidimensionais, tendo suas estruturas identificadas. Posteriormente outras frações foram analisadas por CLAE-DAD em escalas analíticas e preparativas o qual forneceu o isolamento das demais substâncias.

Para a espécie *S. loranthacea*, no intuito de responder se existiam outros 28-nortriterpenos das partes da planta, os extratos hexânicos das cascas das raízes, cerne das raízes, caule e folhas foram submetidos a análise por CLAE-DAD-EM/EM e os dados foram submetidos ao GNPS para análise espacial da composição química desses extratos. A partir desses dados foi possível realizar um isolamento guiado por espectrometria de massas e obter outros 28-nortriterpenos.

Todos os compostos isolados tiveram suas elucidações estruturais determinadas por dados espectroscópicos de RMN de ^1H e ^{13}C uni e bidimensionais, dados espectrométricos para confirmação estrutural e da fórmula molecular, infravermelho, rotação óptica e comparação com os dados disponíveis na literatura. Das cascas das raízes de *S. loranthacea*, foram isolados quatorze compostos sendo quatro novos derivados do esqueleto 28-nor-taraxareno (**SL1-SL4**), quatro novos diterpenos tiglianos (**SL5-SL8**), três diterpenos tiglianos conhecidos (**SL9-SL11**) e três diterpenos flexibilenos conhecidos (**SL12-SL14**). Das raízes de *C. velutinus*, foram isolados quatro novos derivados de fenilpropanoides (**CV1-CV4**) e três conhecidos (**CV5-CV7**).

Estudos com o extrato etanólico das cascas das raízes de *S. loranthacea* não foi realizado e há uma necessidade de investigação dos constituintes desse extrato. Dos demais extratos

hexânicos e etanólicos das demais partes dessa espécie apenas o extrato hexânico das folhas foi fracionado e realizado o isolamento do triterpeno lupeol, de um diterpeno clerodano e de um flexibileno. Esses dados foram realizados por alunos e iniciação científica e publicados como trabalho de PIBIC.

Estudos do extrato metanólico das raízes de *C. velutinus* foram realizados e isolados derivados de fenilpropanóides metoxilados. Após investigação da origem da metoxilação percebeu-se que se tratava de artefatos oriundos da extração com metanol e por isso esses dados não foram colocados nesse trabalho. Os demais extratos hexânicos e metanólicos das folhas e caule não foram investigados.

A atividade farmacológica dos compostos isolados foi realizada de acordo com seu esqueleto químico. Levantamento da literatura foram estabelecidos após a identificação dos compostos e escolhido a atividade a ser realizada. Para a espécie *S. lorantheae*, a citotoxicidade e atividade antiviral dos compostos **SL1**, **SL2**, **SL5-SL14** foram avaliadas contra células Vero e contra um vírus da Zika epidêmico (ZIKV) que circula no Brasil. Seis dos doze compostos (**SL2**, **SL5**, **SL9-SL11** e **SL14**) exibiram efeito antiviral significativo contra o ZIKV. Especificamente os compostos **SL2** e **SL5** demonstraram serem os compostos mais promissores. Para a espécie *C. velutinus*, as atividades anti-inflamatória, citotóxica e tripanocida dos compostos foram avaliadas. Apenas os compostos **CV2** e **CV5** apresentaram atividade citotóxica para as linhas celulares de câncer (B16F10, HL-60, HCT116, MCF-7 e HepG2) assim como atividade tripanocida. Todos os compostos diminuíram a produção de nitrito em macrófagos J774 e apenas o composto **CV5** diminuiu a produção de IL-1 β .

Por fim, esse estudo descreveu pela primeira vez a composição química das cascas das raízes de *S. lorantheae* e das raízes de *C. velutinus*. Foi realizado o isolamento de vinte e um compostos que tiveram suas estruturas elucidadas ou indentificadas a partir de técnicas espectroscópicas e espectrométricas. A maioria dos compostos tiveram suas atividades biológicas descrita. O estudo da espécie *S. lorantheae* foi publicado na revista Journal of Natural Products e o da espécie *C. velutinus* será submetido a revista Fitoterapia.

7 Referências

- ABREU, L. S. **Estudo fitoquímico e avaliação da atividade antifalcizante de *Dictyoloma vandellianum* Adr. Juss.** 2016. Mestrado na Faculdade de Farmácia, Universidade Federal da Bahia.
- ADOLF, W.; HECKER, E. New irritant diterpene-esters from roots of *Stillingia sylvatica* L. (Euphorbiaceae). **Tetrahedron Letters**, v. 21, n. 30, p. 2887-2890, 1980.
- ALBUQUERQUE, U. P. D.; ANDRADE, L. D. H. C. Conhecimento botânico tradicional e conservação em uma área de caatinga no estado de Pernambuco, Nordeste do Brasil. **Acta Botanica Brasilica**, v. 16, p. 273-285, 2002.
- ALVES, I. M. et al. Pyranochromones from *Dictyoloma vandellianum* A. Juss and Their Cytotoxic Evaluation. **Chemistry & Biodiversity**, v. 14, n. 3, p. e1600276-n/a, 2017.
- ANTUNES, J. **Fiocruz alerta sobre possível epidemia de chikungunya em 2019, no Rio.** Rio de Janeiro, 12/12/2018. Disponível em: <http://agenciabrasil.ebc.com.br/saude/noticia/2018-12/fiocruz-alerta-sobre-possivel-epidemia-de-chikungunya-em-2019-no-rio>. . 2019.
- ATANASOV, A. G. et al. Discovery and resupply of pharmacologically active plant-derived natural products: A review. **Biotechnology advances**, v. 33, n. 8, p. 1582-1614, 2015.
- ATHIÊ-SOUZA, S. M. et al. Reinstatement and Lectotypification of *Stillingia loranthea* (Euphorbiaceae), a Vulnerable Species from Chapada Diamantina, Bahia (Brazil), and a New Circumscription of *Stillingia saxatilis*. **Systematic Botany**, v. 39, n. 2, p. 510-516, 2014.
- BECKE, A. D. Density-functional exchange-energy approximation with correct asymptotic behavior. **Physical Review A**, v. 38, n. 6, p. 3098-3100, 1988.
- BRANDÃO, M. D. G. L. et al. **BIODIVERSIDADE, USO TRADICIONAL DE PLANTAS MEDICINAIS E PRODUÇÃO DE FITOTERÁPICOS EM MINAS GERAIS.** Anais do XIV Seminário sobre a Economia Mineira [Proceedings of the 14th Seminar on the Economy of Minas Gerais] 2010.
- BUSCH, T. et al. Synthesis and antiproliferative activity of new tonantzitlolone-derived diterpene derivatives. **Organic & Biomolecular Chemistry**, v. 14, n. 38, p. 9040-9045, 2016.
- BUSCH, T.; KIRSCHNING, A. Recent advances in the total synthesis of pharmaceutically relevant diterpenes. **Natural Product Reports**, v. 25, n. 2, p. 318-341, 2008.
- BUTLER, M. S.; ROBERTSON, A. A. B.; COOPER, M. A. Natural product and natural product derived drugs in clinical trials. **Natural Product Reports**, v. 31, n. 11, p. 1612-1661, 2014.
- CEZAR, H. M. **Phytochemistry study of stalks of *croton velutinus* baill and analysis of essential oil compounds of *Ocimum basilicum* var. *purpurascens* BENTH and its derivatives by diffusion ordered spectroscopy (DOSY).** 2016. Dissertação (Mestrado em Química), Universidade Federal do Ceará.

CHAPUIS, J.-C.; SORDAT, B.; HOSTETTMANN, K. Screening for cytotoxic activity of plants used in traditional medicine. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 23, n. 2, p. 273-284, 1988.

COTA, B. B. et al. Biological potential of *Stillingia oppositifolia*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 21, p. 70-77, 2011.

CRUZ, M. V. G. **Chikungunya entrou no Brasil um ano antes do previsto**. Brasil, 27/02/2019, disponível em: <https://portal.fiocruz.br/noticia/chikungunya-entrou-no-brasil-um-ano-antes-do-previsto>., 2019.

DE CÁSSIA DA SILVEIRA E SÁ, R. et al. A review on anti-inflammatory activity of phenylpropanoids found in essential oils. **Molecules**, v. 19, n. 2, p. 1459-1480, 2014.

DE CARVALHO, O. V. et al. The thiopurine nucleoside analogue 6-methylmercaptopurine riboside (6MMPr) effectively blocks Zika virus replication. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 50, n. 6, p. 718-725, 2017.

DE LIMA, L. R.; PIRANI, J. R. O GÊNERO CROTON L. (EUPHORBIACEAE) NA CADEIA DO ESPINHAÇO, MINAS GERAIS, BRASIL. **Boletim de Botânica da Universidade de São Paulo**, v. 21, n. 2, p. 299-344, 2003.

DE SOUSA TRINDADE, M. J.; ALVES LAMEIRA, O. Espécies úteis da família Euphorbiaceae no Brasil. **Revista Cubana de Plantas Medicinales**, v. 19, p. 292-309, 2014.

DEWAR, M. J. S. et al. Development and use of quantum mechanical molecular models. 76. AM1: a new general purpose quantum mechanical molecular model. **Journal of the American Chemical Society**, v. 107, n. 13, p. 3902-3909, 1985.

DONALD, C. L. et al. Full Genome Sequence and sfRNA Interferon Antagonist Activity of Zika Virus from Recife, Brazil. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 10, n. 10, p. e0005048, 2016.

DRÄGER, G. et al. Tonantzitlolone and other Diterpenes from *Stillingia sanguinolenta*. **European Journal of Organic Chemistry**, v. 2007, n. 30, p. 5020-5026, 2007.

FOX RAMOS, A. E. et al. Natural products targeting strategies involving molecular networking: different manners, one goal. **Natural Product Reports**, v. 36, n. 7, p. 960-980, 2019.

GAMA, K. B. et al. Evidence for the Involvement of Descending Pain-Inhibitory Mechanisms in the Antinociceptive Effect of Hecogenin Acetate. **Journal of Natural Products**, v. 76, n. 4, p. 559-563, 2013.

GÖZLER, B. et al. Minor lignans from *haplophyllum cappadocicum*. **Phytochemistry**, v. 42, n. 3, p. 689-693, 1996.

GREEN, L. C. et al. Analysis of nitrate, nitrite, and [¹⁵N]nitrate in biological fluids. **Analytical Biochemistry**, v. 126, n. 1, p. 131-138, 1982.

- HALGREN, T. A. Merck molecular force field. I. Basis, form, scope, parameterization, and performance of MMFF94. **Journal of Computational Chemistry**, v. 17, n. 5-6, p. 490-519, 1996.
- HEZAREH, M. et al. Mechanisms of HIV receptor and co-receptor down-regulation by prostratin: role of conventional and novel PKC isoforms. **Antiviral Chem Chemother**, v. 15, n. 4, p. 207-222, 2004.
- IMRE, G. et al. Molecules from the Minkowski space: an approach to building 3D molecular structures. **Journal of Molecular Structure: THEOCHEM**, v. 666-667, p. 51-59, 2003.
- LAVAUD, C. et al. 4-Quinolinone alkaloids from *Dictyoloma peruviana*. **Phytochemistry**, v. 40, n. 1, p. 317-320, 1995.
- LEYSEN, P. et al. Biodiversity as a source of potent and selective inhibitors of Chikungunya virus replication. In: GURIB-FAKIM, A. (Ed.). **Novel Plant Bioresources, Applications in Food, Medicine and Cosmetics**: John Wiley & Sons, Ltd, Chichester UK., p.151-160, 2014.
- LIMA, L. R. D.; PIRANI, J. R. Revisão taxonômica de *Croton* sect. *Lamprocroton* (Müll. Arg.) Pax (Euphorbiaceae s.s.). **Biota Neotropica**, v. 8, p. 0-0, 2008.
- LIMA, M. D. P. et al. Alkaloids from *Spathelia excelsa*: Their chemosystematic significance. **Phytochemistry (Elsevier)**, v. 66, n. 13, p. 1560-1566, 2005.
- LIN, C. Y.; GEORGE, M. W.; GILL, P. M. W. EDF2: A Density Functional for Predicting Molecular Vibrational Frequencies. **Australian Journal of Chemistry**, v. 57, n. 4, p. 365-370, 2004.
- LU, J. et al. Lathyrane-type diterpenoids from the seeds of *Euphorbia lathyris*. **Phytochemistry**, v. 104, p. 79-88, 2014.
- METROPOLIS, N.; ULAM, S. The Monte Carlo Method. **Journal of the American Statistical Association**, v. 44, n. 247, p. 335-341, 1949.
- METZKER DE OLIVEIRA, C. et al. Antinociceptive Properties of Bergenin. **Journal of Natural Products**, v. 74, n. 10, p. 2062-2068, 2011.
- MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, v. 65, n. 1, p. 55-63, 1983.
- NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural Products as Sources of New Drugs from 1981 to 2014. **Journal of Natural Products**, v. 79, n. 3, p. 629-661, 2016.
- NOTHIAS, L. F. et al. Bioactivity-Based Molecular Networking for the Discovery of Drug Leads in Natural Product Bioassay-Guided Fractionation. **Journal of Natural Products**, v. 81, n. 4, p. 758-767, 2018.

OLIVON, F. et al. Antiviral Activity of Flexibilane and Tiglane Diterpenoids from *Stillingia lineata*. **Journal of Natural Products**, v. 78, n. 5, p. 1119-1128, 2015.

PFEFFER, T. J. et al. The natural diterpene tonantzitlolone A and its synthetic enantiomer inhibit cell proliferation and kinesin-5 function. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 112, n. Supplement C, p. 164-170, 2016.

REED, L. J.; MUENCH, H. A SIMPLE METHOD OF ESTIMATING FIFTY PER CENT ENDPOINTS¹². **American Journal of Epidemiology**, v. 27, n. 3, p. 493-497, 1938.

REMY, S.; LITAUDON, M. Macrocyclic Diterpenoids from Euphorbiaceae as A Source of Potent and Selective Inhibitors of Chikungunya Virus Replication. **Molecules**, v. 24, n. 12, 2019.

RIOS, M. Y.; AGUILAR-GUADARRAMA, A. B. Nitrogen-Containing Phorbol Esters from *Croton ciliatoglandulifer* and Their Effects on Cyclooxygenases-1 and -2. **Journal of Natural Products**, v. 69, n. 6, p. 887-890, 2006.

SALATINO, A.; SALATINO, M. L. F.; NEGRI, G. Traditional uses, chemistry and pharmacology of *Croton* species (Euphorbiaceae). **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 18, p. 11-33, 2007.

SALEHI, B. et al. Euphorbia-Derived Natural Products with Potential for Use in Health Maintenance. **Biomolecules**, v. 9, n. 8, p. 337, 2019.

SANCHEZ-DUFFHUES, G. et al. Activation of latent HIV-1 expression by protein kinase C agonists. A novel therapeutic approach to eradicate HIV-1 reservoirs. **Curr Drug Targets**, v. 12, n. 3, p. 348-356, 2011.

SARTOR, C. F. P. et al. New Limonoids from *Dictyoloma vandellianum* and *Sohnreyia excelsa*: Chemosystematic Considerations. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 30, p. 2464-2476, 2019.

SÁTIRO, L. N.; ROQUE, N. A família Euphorbiaceae nas caatingas arenosas do médio rio São Francisco, BA, Brasil. **Acta Botanica Brasilica**, v. 22, p. 99-118, 2008.

SECCO, R. D. S. et al. An overview of recent taxonomic studies on Euphorbiaceae s.l. in Brazil. **Rodriguésia**, v. 63, p. 227-242, 2012.

SHANNON, P. et al. Cytoscape: A Software Environment for Integrated Models of Biomolecular Interaction Networks. **Genome Research**, v. 13, n. 11, p. 2498-2504, 2003.

SHI, Q. W.; SU, X. H.; KIYOTA, H. Chemical and pharmacological research of the plants in genus Euphorbia. **Chemical Reviews**, v. 108, n. 10, p. 4295-4327, 2008.

SILVA, J. S.; SALES, M. F. D.; CARNEIRO-TORRES, D. S. O gênero *Croton* (Euphorbiaceae) na microrregião do Vale do Ipanema, Pernambuco, Brasil. **Rodriguésia**, v. 60, p. 879-901, 2009.

- SOURBIER, C. et al. Tonantzitlolone cytotoxicity toward renal cancer cells is PKC θ - and HSF1-dependent. **Oncotarget**, v. 6, n. 30, p. 29963-29974, 2015.
- TECHER, S. et al. Tonantzitlolones from *Stillingia lineata* ssp. *lineata* as potential inhibitors of chikungunya virus. **Phytochemistry Letters**, v. 12, p. 313-319, 2015.
- TENG, Y.-N. et al. Mechanism of action of cytotoxic compounds from the seeds of *Euphorbia lathyris*. **Phytomedicine**, v. 41, p. 62-66, 2018.
- THOMFORD, N. E. et al. Natural Products for Drug Discovery in the 21st Century: Innovations for Novel Drug Discovery. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 19, n. 6, p. 1578, 2018.
- TORRES, D. S. C. **Diversidade de Croton L. (EUPHORBIACEAE) no Bioma da Caatinga**. 2009. Tese de Doutorado., Universidade Estadual de Feira de Santana.
- VASAS, A.; HOHMANN, J. Euphorbia diterpenes: isolation, structure, biological activity, and synthesis (2008-2012). **Chemical Review**, v. 114, n. 17, p. 8579-8612, 2014.
- VIEIRA, P. C. et al. The chemosystematics of *Dictyoloma*. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 16, n. 6, p. 541-544, 1988.
- VIEIRA, P. C. et al. Limonoids, alkaloids, and chromones from *Dictyoloma vandellianum*, and their chemosystematic significance. **Química Nova**, v. 13, n. 4, p. 287-288, 1990.
- VIEIRA, P. C.; SANTOS, A. C. A.; SILVA, T. L. Mass Spectrometry for Discovering Natural Products. In: (Ed.). **Mass Spectrometry in Chemical Biology**, p.144-158, 2017.
- WANG, H. B. et al. Tiglane diterpenoids from the Euphorbiaceae and Thymelaeaceae families. **Chemical Reviews**, v. 115, n. 9, p. 2975-3011, 2015.
- WANG, M. et al. Sharing and community curation of mass spectrometry data with Global Natural Products Social Molecular Networking. **Nature Biotechnology**, v. 34, p. 828, 2016.
- WATERMAN, P. G.; GRUNDON, M. F. **Chemistry and chemical taxonomy of the Rutales**. Nova Iorque: Academic Press, 1983.
- WITTENBERG, R. et al. Towards the total synthesis of tonantzitlolone—Preparation of key fragments and the complete carbon backbone. **Tetrahedron Letters**, v. 45, n. 23, p. 4457-4460, 2004.
- WOLFENDER, J. L. HPLC in natural product analysis: the detection issue. **Planta Medica**, v. 75, n. 7, p. 719-734, 2009.
- WOLFENDER, J. L. et al. Plant metabolomics: from holistic data to relevant biomarkers. **Curr Med Chem**, v. 20, n. 8, p. 1056-1090, 2013.
- YANG, J. Y. et al. Molecular networking as a dereplication strategy. **Journal of Natural Products**, v. 76, n. 9, p. 1686-1699, 2013.

ZHANG, X.-L. et al. Four new phorbol diesters from *Croton tiglium* and their cytotoxic activities. **Phytochemistry Letters**, v. 16, p. 82-86, 2016.